

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06429

研究課題名(和文) 魚類の脳における性スペクトラム

研究課題名(英文) Sexual spectrum of fish brain

研究代表者

大久保 範聡 (Okubo, Kataaki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：10370131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 92,212,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の脳の性は、体内のホルモン環境に応じて、成熟後も容易に逆転する。この現象は、「魚類の脳は生涯にわたって性スペクトラム上を移動できる」ことの表れであると捉えられる。我々は最近、メダカの脳内の性行動中枢に、体内の性ホルモンバランスに応じて可逆的に出現・消失する特殊なニューロン群を見出した。本研究では、このニューロン群こそが、「魚類の脳(性行動パターン)が、性スペクトラム上を移動する」ことを可能とするメカニズムの本体であることを強く示唆するデータを得たとともに、そのメカニズムの分子基盤の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、体内のホルモン環境に応じて性スペクトラム上の位置が変わる魚類の脳に焦点を当て、魚類の脳(性行動パターン)が性スペクトラム上を大きく移動できるメカニズムの一端を明らかにした。研究をさらに進めることで、脳の性の確かさや変わりやすさの分子基盤がみえてくると期待される。魚類は生涯にわたって性転換する能力を有していることが知られており、性転換に伴って、脳の性も雌雄逆転する。本研究の成果は、未だ謎に包まれている魚類の性転換メカニズムを明らかにする糸口としても注目に値する。

研究成果の概要(英文)：Teleost fish are unique among vertebrates in that their sex-specific phenotypes, including behaviors, are quite labile and can even be reversed as adults. This indicates that the fish brain can transition from one end of the sexual spectrum to the other throughout their lifetime. In medaka (*Oryzias latipes*), we recently identified a group of neurons in the brain region implicated in mating behavior that appear and disappear in a reversible manner in response to changes in the adult sex steroid milieu. The results of this study strongly suggest that these neurons underpin the mechanisms that allow the fish brain (mating behavior pattern) to transition on the sexual spectrum and also revealed part of the molecular and cellular basis of these mechanisms.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：性スペクトラム 魚類 脳 行動

1. 研究開始当初の背景

生殖腺に精巣と卵巣の性的二型があるように、脳にもオス型とメス型があり、その違いによって種々の行動や神経内分泌のパターンに雌雄差がもたらされている。魚類では、性ステロイドで処理することによって、性成熟後でも逆の性に特徴的な行動パターンが簡単に誘導される (Godwin, 2010)。この現象は、「魚類の脳の性は固定されておらず、内分泌要因によって、生涯にわたって性スペクトラム上を大きく移動できる」ことを意味する。それゆえ魚類は、脳の性が性スペクトラム上を移動するメカニズムを理解するための格好の研究材料であると考えられる。

我々はこれまで、メダカ (*Oryzias latipes*) をモデル魚として用いて、魚類の脳内にどのような性差が存在し、その性差がどのようなメカニズムによって生じるのかについて研究を進めてきた。その過程で、魚類の性行動の中核領域とされる脳部位 (終脳腹側部 Vs/Vp) および視索前野大細胞部 PMm/PMg) に、メスだけに存在する「性ステロイドに応答して種々の神経ホルモンを分泌する特殊なニューロン (female-specific, sex steroid-responsive peptidergic neurons (FeSP ニューロン) と命名)」を見出した (Hiraki *et al.*, 2012; 2014)。

この FeSP ニューロンで発現しているエストロゲン受容体の一種 *esr2b* をノックアウトしたメスは、正常に卵形成を行い、オスから求愛されるにも関わらず、オスの求愛を全く受け入れず、逆にオスに対して求愛を行うようになることが分かった。つまり、メスの性行動パターンがオス型に逆転したことになる。また、FeSP ニューロンで発現している神経ホルモン遺伝子 *npba* をノックアウトしたメスでは、オスの求愛を受け入れて交尾 (哺乳類でいう交尾) に至るまでの時間が長くなるとともに、オスの求愛なしに産卵に至る個体の割合が増加することが明らかとなった。さらに、FeSP ニューロンの有無は、体内のエストロゲンとアンドロゲンの量的バランスによって決まることが明らかとなった。そのバランスが変われば、FeSP ニューロンは性成熟したメスでも消失し、性成熟したオスにも新たに出現することも明らかとなった。これらの知見から、この FeSP ニューロンこそが、魚類の性行動パターンのオス化、メス化の程度を決める機構の本体であると推察され、これにより、魚類の脳 (性行動パターン) の性が生涯にわたって固定されることなく、性スペクトラム上を自由に移動できるメカニズムを紐解く糸口をつかむことができたと考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、FeSP ニューロンに焦点を当てた解析を行うことで、魚類の性行動パターンの性スペクトラム上の位置が、体内の性ステロイド環境 (エストロゲンとアンドロゲンの量的バランス) に応じて大きく変化するメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 性行動における FeSP ニューロンの役割の解析

性行動における FeSP ニューロンの役割を明らかにするため、*esr2b* ノックアウトメスの性行動を詳細に解析した。その過程で、*esr2b* ノックアウトメスがオス型の性行動を示すのは、卵巣からわずかに放出されるアンドロゲンによることが分かったので、メダカの卵巣でどのような種類のアンドロゲンが合成されているのかを LC-MS/MS で調べた。

(2) 性ステロイド依存的な FeSP ニューロンの出現・消失メカニズムの解析

オスのメダカでもエストロゲンを投与すると FeSP ニューロンが出現する。神経幹細胞から細胞増殖を経て新たに誕生するのか、あるいは、すでに存在するニューロンが分化して出現するのかを明らかにするために、オスに出現させた FeSP ニューロンの細胞増殖の履歴を解析した。

本研究の開始時まで、PMm/PMg に存在する FeSP ニューロンは、周囲のニューロンと比べて極めて大型の核と細胞体をもつことが見出されていたが、どのような細胞内構造ゆえに大型化しているのかは分かっていなかった。そこで、電子顕微鏡、および共焦点超解像イメージングによって細胞内構造を調べた。また、FeSP ニューロンの核では、遺伝子の転写活性のエピジェネティックマークである H3K36 のメチル化、および RNA ポリメラーゼ II のリン酸化が周囲の他のニューロンよりも有意に亢進しているが、それらの特徴が、卵巣から分泌されるエストロゲン依存的に亢進しているか否かを、エストロゲンの投与実験によって調べた。

我々はさらに、通常メスの FeSP ニューロンと卵巣除去メスの FeSP ニューロンのトランスクリプトームを比較することで、卵巣依存的に FeSP ニューロンの活性化に関わる遺伝子の候補を数種類選定し、それらの発現を解析した。

(3) FeSP ニューロンで発現し、性行動パターンの性スペクトラム上の移動に関わる遺伝子の探索

上記の FeSP ニューロンのトランスクリプトーム解析の結果から、「FeSP ニューロンで発現し、性行動パターンの性スペクトラム上の移動に関わる遺伝子」の候補を数種類選定し、それらのノックアウトメダカを作成し、メスの性行動パターンを定量解析した。

4. 研究成果

(1) 性行動における FeSP ニューロンの役割の解析

本研究の開始時には、「FeSP ニューロンで発現しているエストロゲン受容体の一種 *esr2b* をノックアウトしたメスマダカは、オスの求愛を全く受け入れず、逆にオスに対して求愛を行うようになる」と認識していたが、*esr2b* ノックアウトメスの行動を詳細に解析したところ、オスに対してよりもメスに対して、より積極的に求愛することが分かった。この結果から、FeSP ニューロンは性行動パターンだけでなく、性指向の性スペクトラム上の位置を規定する役割も担っていることが明らかとなった。

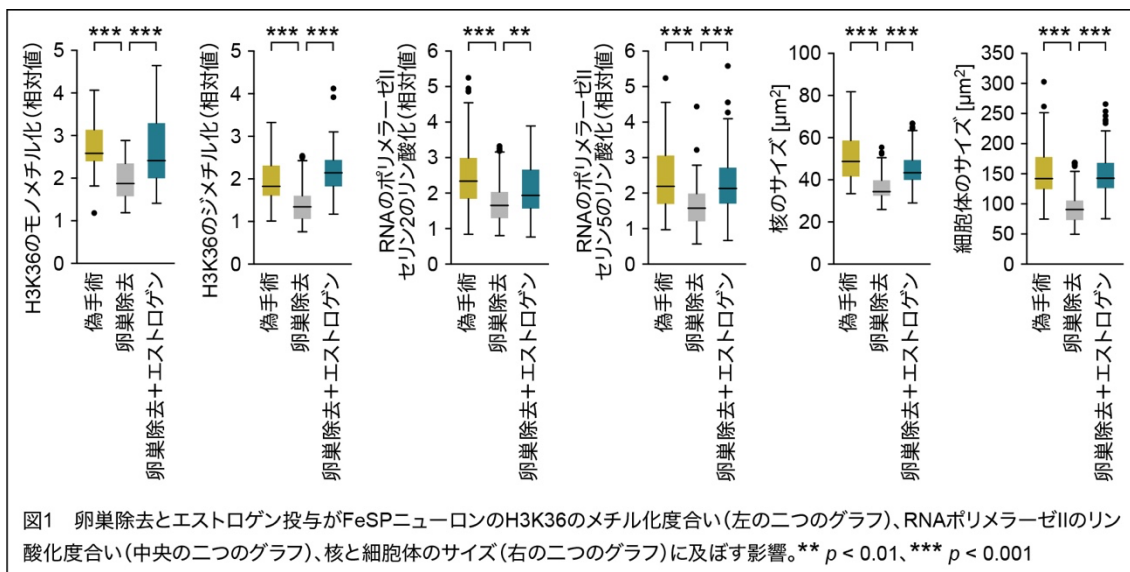
また、*esr2b* ノックアウトメスにみられるオス型の性行動は、卵巣の除去、あるいはアンドロゲン受容体アンタゴニストの投与によって消失し、逆に、アンドロゲンの投与によって増強されたことから、*esr2b* ノックアウトメスがオス型の性行動を示すのは、卵巣からわずかに放出されるアンドロゲンによることが明らかとなった。メスのメダカの卵巣では、11 ケトテストステロンとジヒドロテストステロンが合成されていることも分かり、これらのアンドロゲンがオス型の性行動を引き起こしていると考えられた。FeSP ニューロンによる性行動と性指向のメス化作用は、このアンドロゲンによるオス化作用と拮抗的にはたらくと考えられた。

(2) 性ステロイド依存的な FeSP ニューロンの出現・消失メカニズムの解析

オスに出現させた FeSP ニューロンの細胞増殖の履歴を解析したところ、FeSP ニューロンは細胞増殖を経ずに出現することが分かった。この結果から、オスの脳内にも FeSP ニューロンに相当するニューロンが小型で不活性化状態で存在すること、そしてそのニューロンがエストロゲンに応じて大型化、活性化し、FeSP ニューロンとなることが示唆された。このようなメカニズムが、魚類の性行動パターンの性スペクトラム上の迅速な移動を可能としていると考えられた。

PMm/PMg に存在する FeSP ニューロンの細胞内構造を調べたところ、FeSP ニューロンは、ゲノムワイドにユークロマチン化した核を有すること、細胞質中には、非常によく発達した粗面小胞体とゴルジ体、および神経ホルモンを多量に含む分泌顆粒を有することが明らかとなった。このことから、PMm/PMg に存在する FeSP ニューロンは、メス型の性行動を引き起こすために必要な遺伝子群を活発に発現しているとともに、神経ホルモンを盛んに分泌するための各種オルガネラも発達させており、それゆえに大型化していると考えられた。

また、FeSP ニューロンで亢進している H3K36 のメチル化、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化は、卵巣から分泌されるエストロゲンに依存することが分かった。さらに、FeSP ニューロン特有の大型の核と細胞体、そして発火頻度のいずれも、卵巣由来のエストロゲン依存的であることが明らかとなった。卵巣を除去すると、H3K36 のメチル化度合い、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化度合いの減少、核と細胞体の小型化、発火頻度の低下がみられた一方、エストロゲンを投与すると、H3K36 のメチル化度合い、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化度合いの亢進、核と細胞体の大型化、発火頻度の上昇がみられたのである (図 1、図 2)。この結果は、FeSP ニューロン特有の細胞形態、転写活性、電気生理学的な特徴のいずれもが、卵巣由来のエストロゲンによって活性化されていることを意味する。このような FeSP ニューロンの特徴が、魚類の性行動の性スペクトラム上のダイナミックな移動を可能としていると考えられた。



また、メスにアンドロゲンを投与すると FeSP ニューロンが消失するが、メスへのアンドロゲン投与は、脳内のエストロゲン量を劇的に減少させることが明らかとなった。したがって、メスにアンドロゲン投与によって FeSP ニューロンが消失するのは、エストロゲンの減少による二次

的な効果だと考えられた。本研究開始時には、エストロゲンとアンドロゲンの量的バランス（エストロゲンとアンドロゲンの拮抗作用）によって、FeSPニューロンが出現・消失すると考えていたが、直接的には、エストロゲン量という単一のパラメーターによって FeSPニューロンの有無が決まると考えられた。

我々はさらに、FeSPニューロンの卵巣依存的な活性化に関わる遺伝子の候補として、RNAポリメラーゼIIの修飾に関わる遺伝子、分泌顆粒への輸送に関わる遺伝子、ペプチダーゼ遺伝子に着目して解析を進め、それらの転写産物と翻訳産物が確かに卵巣依存的に FeSPニューロンで発現していることを見出した。しかし、いずれの遺伝子についても、性ステロイドによって転写が直接制御されている証拠を得ることはできなかった。

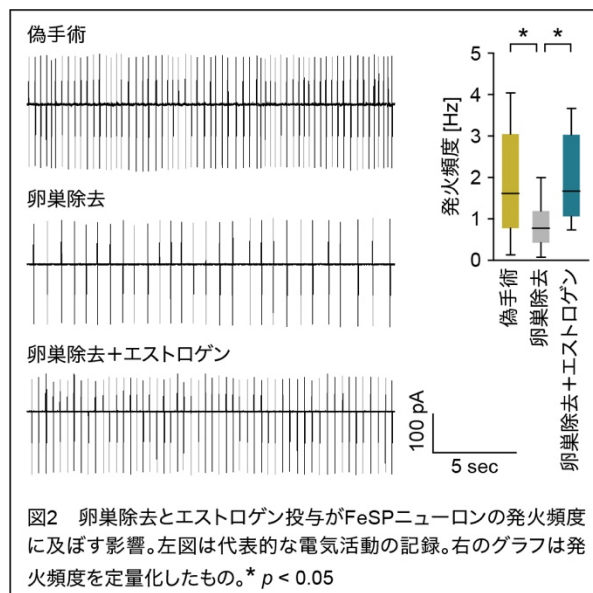


図2 卵巣除去とエストロゲン投与がFeSPニューロンの発火頻度に及ぼす影響。左図は代表的な電気活動の記録。右のグラフは発火頻度を定量化したもの。* $p < 0.05$

(3) FeSPニューロンで発現し、性行動パターンの性スペクトラム上の移動に関わる遺伝子の探索

FeSPニューロンで発現し、性行動パターンの性スペクトラム上の移動に関わる遺伝子候補の一つとして、プロスタグランジンE2受容体の一種 *ptger4b* 解析を進めたところ、*ptger4b* のノックアウトメスは、野生型メスと変わらない卵巣形態、成熟卵数、受精率を示すが、オスの求愛を受け入れるまでにかかる時間が短くなることを見出された。このことから、FeSPニューロンで発現する *ptger4b* は、オスの求愛の受け入れを制御する分子として機能している可能性が示唆された。

さらに、*ptger4b* ノックアウトメスの FeSPニューロンの電気活動、および、細胞内の *Npba* ペプチド存在量を調べたところ、野生型メスの FeSPニューロンよりも発火頻度が低下しており、細胞内により多くの *Npba* が蓄積していることが分かった (図3)。このことから、*ptger4b* ノックアウトメスの FeSPニューロンでは、発火頻度の低下によって神経ホルモンの放出が抑制されていることが示唆された。

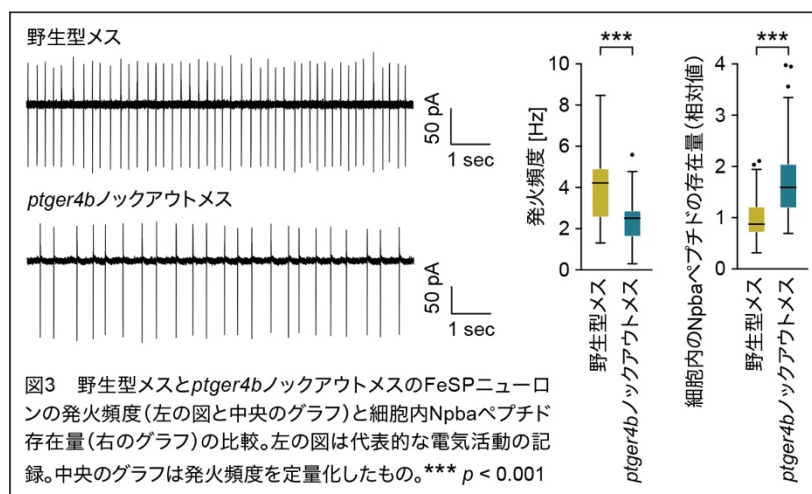


図3 野生型メスと *ptger4b* ノックアウトメスの FeSPニューロンの発火頻度 (左の図と中央のグラフ) と細胞内 *Npba* ペプチド存在量 (右のグラフ) の比較。左の図は代表的な電気活動の記録。中央のグラフは発火頻度を定量化したもの。*** $p < 0.001$

プロスタグランジンE2/Ptger4bシグナルは FeSPニューロンの発火頻度を高めることで、*Npba* を含む神経ホルモンの放出を促進し、性行動パターンのメス化に寄与していると考えられた。

<引用文献>

- ① Godwin J (2010) Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol* 31:203–216
- ② Hiraki T, Nakasone K, Hosono K, Kawabata Y, Nagahama Y, Okubo K (2014) Neuropeptide B is female-specifically expressed in the telencephalic and preoptic nuclei of the medaka brain. *Endocrinology* 155:1021–1032
- ③ Hiraki T, Takeuchi A, Tsumaki T, Zempo B, Kanda S, Oka Y, Nagahama Y, Okubo K (2012) Female-specific target sites for both oestrogen and androgen in the teleost brain. *Proc Royal Soc B* 279:5014–5023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita J, Nishiike Y, Fleming T, Kayo D, Okubo K	4. 巻 4
2. 論文標題 Estrogen mediates sex differences in preoptic neuropeptide and pituitary hormone production in medaka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02476-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishiike Y, Miyazoe D, Togawa R, Yokoyama K, Nakasone K, Miyata M, Kikuchi Y, Kamei Y, Todo T, Ishikawa-Fujiwara T, Ohno K, Usami T, Nagahama Y, Okubo K	4. 巻 31
2. 論文標題 Estrogen receptor 2b is the major determinant of sex-typical mating behavior and sexual preference in medaka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1699-1710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.01.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita J, Takeuchi A, Hosono K, Fleming T, Nagahama Y, Okubo K	4. 巻 9
2. 論文標題 Male-predominant galanin mediates androgen-dependent aggressive chases in medaka	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e59470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawabata-Sakata Y, Nishiike Y, Fleming T, Kikuchi Y, Okubo K	4. 巻 287
2. 論文標題 Androgen-dependent sexual dimorphism in pituitary tryptophan hydroxylase expression: relevance to sex differences in pituitary hormones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20200713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rspb.2020.0713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraki-Kajiyama T, Yamashita J, Yokoyama K, Kikuchi Y, Nakajo M, Miyazoe D, Nishiike Y, Ishikawa K, Hosono K, Kawabata-Sakata Y, Ansai S, Kinoshita M, Nagahama Y, Okubo K	4. 巻 8
2. 論文標題 Neuropeptide B mediates female sexual receptivity in medaka fish, acting in a female-specific but reversible manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e39495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.39495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okubo K, Miyazoe D, Nishiike Y	4. 巻 284
2. 論文標題 A conceptual framework for understanding sexual differentiation of the teleost brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol	6. 最初と最後の頁 113129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.02.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Y, Hiraki-Kajiyama T, Nakajo M, Umatani C, Kanda S, Oka Y, Matsumoto K, Ozawa H, Okubo K	4. 巻 160
2. 論文標題 Sexually Dimorphic Neuropeptide B Neurons in Medaka Exhibit Activated Cellular Phenotypes Dependent on Estrogen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 827-839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita J, Kawabata Y, Okubo K	4. 巻 29
2. 論文標題 Expression of isotocin is male-specifically upregulated by gonadal androgen in the medaka brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neuroendocrinol	6. 最初と最後の頁 e12545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12545.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 大久保範聡
2. 発表標題 魚類の性行動パターンの性差形成と性的可逆性
3. 学会等名 日本内分泌学会 第37回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中城 光琴、平木（梶山）十和子、大久保 範聡
2. 発表標題 メス特異的なNpb発現を示すペプチドニューロンの性行動制御における役割
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajo M, Hiraki-Kajiyama T, Okubo K
2. 発表標題 Sexually dimorphic neuropeptide B neurons in the ventral telencephalon, a leading candidate for the regulator of female reproductive behavior, show estrogen dependence and diurnal changes in their neuronal activities
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中城光琴、平木（梶山）十和子、大久保範聡
2. 発表標題 終脳腹側野においてメス特異的なNpb発現を示すペプチドニューロンの神経生理学的解析
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池結貴子、大久保範聡
2. 発表標題 メダカのメス特異的Npbニューロンの遺伝子発現プロファイルと機能の解析
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮副大地、西池雄志、大久保範聡
2. 発表標題 メダカの脳と行動の性分化における性ステロイドの役割
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西池雄志、宮副大地、大久保範聡
2. 発表標題 メダカにおける攻撃行動に寄与する神経核の探索
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立澤雅也、大久保範聡
2. 発表標題 メダカの視索前野に存在するメス特異的な性ステロイド応答性ニューロンの活性化に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保範聡
2. 発表標題 真骨魚類の脳の性分化・性的可逆性に関する研究
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会（日本比較内分泌学会奨励賞受賞者講演）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大久保範聡
2. 発表標題 魚類の性の不思議な世界
3. 学会等名 第11回日本性差医学・医療学会学術集会（公開シンポジウム「性差生物学の最近の進歩：進化の過程での性差」）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池結貴子・大久保範聡
2. 発表標題 メダカにおけるメス特異的なペプチド産生ニューロンの性ステロイド応答性と性的可逆性
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮副大地・大久保範聡
2. 発表標題 エストロゲン受容体ノックアウトメダカを用いた魚類の行動の性差形成メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮副大地・大久保範聡
2. 発表標題 エストロゲン受容体Esr2bノックアウトメダカの性行動と生殖腺における表現型解析
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okubo K
2. 発表標題 How do evolutionarily conserved neural substrates give rise to variation in social behaviors across species?
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishiike Y, Okubo K
2. 発表標題 Estrogen receptor 2b plays an essential role in establishing female mating behavior in medaka
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fleming T, Okubo K
2. 発表標題 Prostaglandin receptor 4b (ptger4b) regulates female receptivity in medaka
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西池雄志、大久保範聡
2. 発表標題 性ステロイド環境に応じてメダカの性行動パターンをメス型化する脳内メカニズム
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中城 光琴 (Nakajo Mikoto) (60824795)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------