様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３１ 年　 ４ 月 ３０ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０４９７９

研究課題名（和文）魚類の脳の性的二型：その形成機構と生理学的意義

研究課題名（英文）Sexual dimorphisms of the teleost brain: mechanisms of establishment and physiological significances

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）・准教授

研究者番号：１０３７０１３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,100,000円

研究成果の概要（和文）：魚類においては、攻撃性や性行動、成長や成熟、ストレス耐性など、水産増養殖の可否や商品価値の高さを左右する形質に顕著な性的二型が認められる。それらの雌雄差の多くは、脳内に存在する何らかの性的二型に起因すると考えられるが、魚類の脳にどのような性的二型が存在し、それがどのように形成され、どのような形質に結び付いているのかは明らかとなっていない。本研究では、我々が最近メダカの脳に見出した三つの性的二型に着目し、その形成機構と生理学的意義を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の成果によって、魚類の脳に存在する性的二型がどのような形質と結び付いているかの一端が明らかとなった。それにより、魚類における水産上の重要形質を生み出す生理機構が見えてきた。脊椎動物全体を見渡してみても、脳内の性的二型がどのような形質と結び付いているかを明らかにした研究は驚くほど少ない。本研究の成果は、魚類だけでなく、哺乳類を含めた脊椎動物全般での研究に大きなインパクトを与え得るものになり、学術的にも高い価値をもつと期待される。

研究成果の概要（英文）：Teleost fish exhibit sexual dimorphisms in a range of traits that influence their productivity and economic value, including aggression, mating behavior, growth, sexual maturation, and stress response. Many of these sexual dimorphisms in traits presumably stem from those within their brains; however, it is still unclear what sexual dimorphisms exist within their brains, how these dimorphisms are established, and what traits these dimorphisms are relevant to. In this study, we focused on three sexual dimorphisms we have recently found in the medaka brain, and investigated the mechanisms of establishment and physiological significance of these dimorphisms.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：水産学　生理学　脳・神経

１．研究開始当初の背景

魚類においては、攻撃性や性行動、成長や成熟、ストレス耐性など、水産増養殖の可否や商品価値の高さを左右する形質に顕著な性的二型が認められる。例えば、魚類全般を通して、メスよりもオスの方が圧倒的に攻撃性が高く、複数のオス個体を一緒に飼育することが困難な魚種さえ存在する。また、ストレス条件下ではオスよりもメスの方が自発的な成熟や性行動が抑制されやすいという現象も魚類一般で認められる。成長や成熟のスピードが雌雄で異なる魚種も少なくない。こうした形質の性的二型の多くは、脳内に存在する何らかの性的二型に起因すると考えられる。しかし、魚類の脳にどのような性的二型が存在し、それがどのように形成され、どのような形質に結び付いているのかは明らかとなっていなかった。そのような状況の中、我々は最近、それらを明らかにするための突破口となり得る以下の三つの性的二型をメダカ（*Oryzias latipes*）の脳内に見出した。

(1) 性行動の中枢領域とされる脳部位にメス特異的に存在する巨大ニューロン

魚類の性行動の中枢領域とされる脳部位に、メスだけに巨大ニューロンが存在することが見出された。このニューロンで発現している種々の遺伝子をノックアウトすると、メスの性行動が異常になったことから、このニューロンはメスの性行動を制御するニューロンだと推察される。

(2) 視索前野内の特定の領域に集中してみられる顕著な遺伝子発現の性的二型

内分泌機構や種々の本能行動を支配するとされる脳部位に、顕著な遺伝子発現の性的二型が集中して存在する領域が見出された。この領域で発現に性的二型を示す遺伝子の中には、攻撃性や性行動、成長や成熟、ストレス応答などに関わるとされる種々の神経ペプチドが含まれていたため、これらの遺伝子が内分泌機構や種々の本能行動に性的二型をもたらしている可能性が考えられる。

(3) グリア細胞にみられる顕著な遺伝子発現の性的二型

長年、脳の性的二型は、イコール、ニューロンの性的二型と考えられてきたが、ニューロン以外の脳細胞（グリア細胞）にも顕著な遺伝子発現の性的二型があることが見出された。グリア細胞で女性ホルモン合成酵素遺伝子 *cyp19a1b* が、メスで高発現していたのである。

２．研究の目的

以上三つの性的二型を見出したことで、魚類の脳の性的二型の形成機構と生理学的意義を明らかにする突破口が得られたと考えられた。そこで本研究では、これら三つの性的二型に焦点を当て、それぞれの性的二型の詳細を把握した上で、それらが性的二型がどのようなしくみで形成され、どのような形質と結び付いているのかを明らかにすることを目指すこととした。

３．研究の方法

(1) 性行動の中枢領域とされる脳部位にメス特異的に存在する巨大ニューロン

このメス特異的な巨大ニューロンは、周囲のニューロンと比べて非常に大型の核と細胞体を有するが、その理由を明らかにするために、電子顕微鏡、および共焦点イメージングによって細胞内構造を調べた。また、各種の化学修飾に対する抗体を用いた免疫組織化学によって、このニューロンの転写活性を調べた。さらに、この巨大ニューロンでトランスクリプトーム解析を行い、このニューロンの機能を考える上で重要な役割を担っていると推察される遺伝子を 5 種類ピックアップした後、それらの遺伝子のノックアウトメダカを作出し、メスの表現型を解析した。

(2) 視索前野内の特定の領域に集中してみられる顕著な遺伝子発現の性的二型

まずは、この領域でほぼオス特異的に発現する神経ペプチドの一種に着目した。その神経ペプチドがなぜオス特異的な発現を示すのかを、生殖腺除去実験や性ホルモン投与実験、性ホルモン受容体との共発現解析によって調べるとともに、その神経ペプチドの作用部位を明らかにするために、特異抗体を用いた免疫組織化学を行った。さらに、その神経ペプチドをコードする遺伝子のノックアウトメダカを作出して表現型を解析することで、その神経ペプチドがどのような形質と結び付いているのかを検証した。

また、この領域で逆にメス優位に発現する神経ペプチドの一種、イソトシンにも着目し、研究を進めた。生殖腺除去実験や性ホルモン投与実験、性ホルモン受容体との共発現解析を行うことによって、イソトシンがどのようなメカニズムでメス優位に発現するようになるのかを調べた。また、特異抗体を用いた免疫組織化学を行うことによって、この領域で産生されたイソトシンがどこに運ばれ、どのような形質と結び付いているのかを推定した。

(3) グリア細胞にみられる顕著な遺伝子発現の性的二型

グリア細胞で発現に性的二型を示す遺伝子 *cyp19a1b* がどのような形質と結び付いているのかを明らかにする目的で、*cyp19a1b* ノックアウトメダカの表現型を多角的に解析した。

４．研究成果

(1) 性行動の中枢領域とされる脳部位にメス特異的に存在する巨大ニューロン

このメス特異的な巨大ニューロンは、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装置、および神経ペプチドを多量に含む分泌顆粒を有することが明らかとなった（図1）。また、このニューロンでは、RNAポリメラーゼIIのリン酸化、および、高い転写活性のエピジェネティックマークであるH3K36 のメチル化が周囲の他のニューロンよりも有意に亢進していることも明らかとなった（図2）。以上の結果から、このメス特異的なニューロンは、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、神経ペプチド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。この成果は、原著論文としてEndocrinology 誌で発表した。

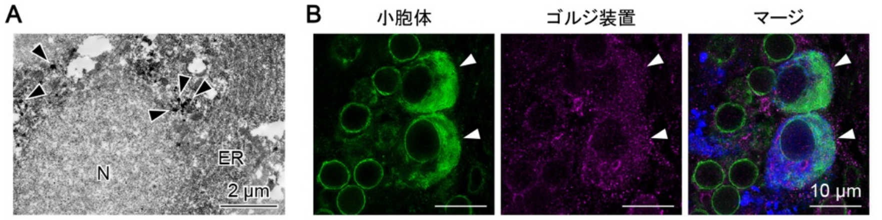

図1 メス特異的巨大ニューロンの細胞内構造。（A）電子顕微鏡像。Nは巨大ニューロンの核、ERは小胞体、矢尻は神経ペプチドを含む分泌顆粒を示す。（B）共焦点イメージングによる小胞体とゴルジ装置の染色像、およびそのマージ像。矢尻で示した細胞が巨大ニューロン。

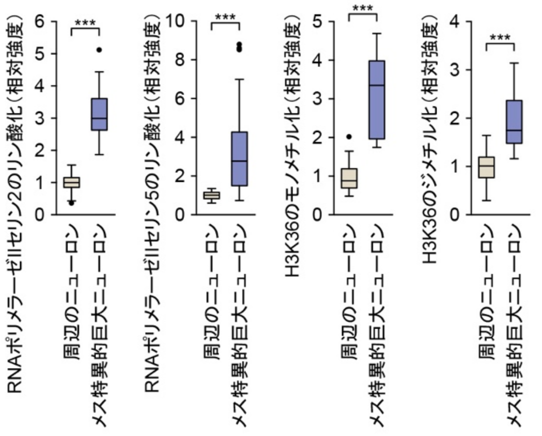

図2 メス特異的巨大ニューロンにおけるRNAポリメラーゼIIのリン酸化度合い（左二つのグラフ）とH3K36メチル化度合い（二つのグラフ）。

また、このニューロンでエストロゲン依存的に発現する遺伝子としてトランスクリプトーム解析で同定された5種類の遺伝子について解析を進めたところ、うち1種類の遺伝子が、ノックアウトするとメスの性行動が異常になった。さらに解析を進めたところ、このノックアウトメスは正常な卵巣を有し、成熟卵の個数や受精率に異常がなく、性行動のみが異常になることも確認された。このことから、この遺伝子は、エストロゲン存在下でメスの性行動を直接制御している遺伝子であることが示唆された。

(2) 視索前野内の特定の領域に集中してみられる顕著な遺伝子発現の性的二型

視索前野内でほぼオス特異的に発現する神経ペプチドの一種は、精巣から放出されるアンドロゲンによる発現促進効果によって、ほぼオス特異的に発現していることが明らかとなった。その際、アンドロゲンはその神経ペプチドを発現するニューロンに直接作用することが示唆された。また、そこでほぼオス特異的に産生されたその神経ペプチドは、終脳、視蓋、小脳、延髄/脊髄へと運ばれること、ノックアウトすると、オス特異的に攻撃性が低下することが明らかとなった。以上の結果から、この神経ペプチド遺伝子が、精巣由来のアンドロゲンに応じて、オス特異的に攻撃性を高める遺伝子であることが示唆された。

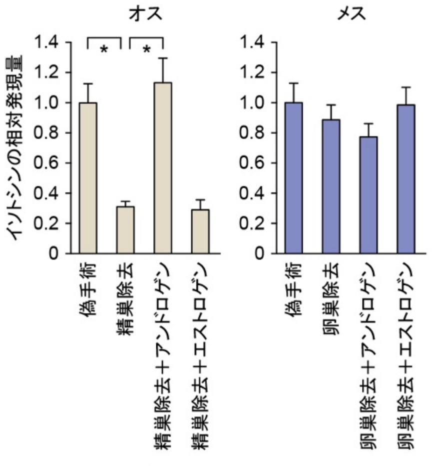

図3 雌雄のメダカの脳におけるイソトシンの発現レベルに対する生殖腺除去と性ホルモン投与の影響。

一方、イソトシンの発現は、オス特異的に精巣由来のアンドロゲンによって促進されることが明らかとなった（図3）。メスで高い発現を示すイソトシンが、実はオスのみでアンドロゲンによって発現が促進されていることは意外であった。また、アンドロゲンは、イソトシンを発現するニューロンには直接作用せず、キスペプチンという別の神経ペプチドを介して、イソトシンの発

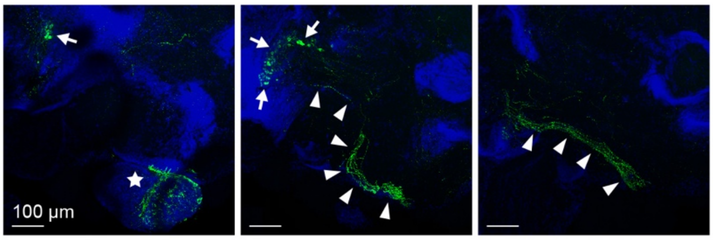

図4 メダカの脳におけるイソトシンペプチドの分布。3枚のサジタル切片を順番に示した。矢印はイソトシン発現ニューロンの細胞体を、矢尻はイソトシン発現ニューロンの軸索を、星印は下垂体を示す。

現を促進している可能性が高いことも見出された。さらに、そうして産生されたイソトシンは下垂体を介して末梢に運ばれ（図 4）、おそらくは、浸透圧調節など雌雄に関係なく重要なはたらきを担っていることが示唆された。何らかの機構でメスに偏ってしまうイソトシン発現の性差を打ち消すために、オス特異的にアンドロゲンがイソトシンの発現を促進していると考えられた。この成果は、原著論文として J Neuroendocrinol 誌で発表した。

（3）グリア細胞にみられる顕著な遺伝子発現の性的二型

まだ予備的なデータの段階ではあるが、*cyp19a1b* のノックアウトメダカの解析から、*cyp19a1b* は体成長の性的二型を形成する役割を担っていることが示唆された。現在、さらに解析を進めているところである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① Okubo K, Miyazoe D, Nishiike Y (2019) A conceptual framework for understanding sexual differentiation of the teleost brain. *Gen Comp Endocrinol* (in press) (査読有り)
doi: 10.1016/j.ygcen.2019.02.020.

② Kikuchi Y, Hiraki-Kajiyama T, Nakajo M, Umatani C, Kanda S, Oka Y, Matsumoto K, Ozawa H, Okubo K (2019) Sexually dimorphic neuropeptide B neurons in medaka exhibit activated cellular phenotypes dependent on estrogen. *Endocrinology* 160:827–839 (査読有り)
doi: 10.1210/en.2019-00030.

③ Yamashita J, Kawabata Y, Okubo K (2017) Expression of isotocin is male-specifically up-regulated by gonadal androgen in the medaka brain. *J Neuroendocrinol* 29:e12545 (査読有り)
doi: 10.1111/jne.12545.

〔学会発表〕（計 14 件）

① 菊池結貴子, 大久保範聡 (2018 年 11 月) 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. 第 43 回日本比較内分泌学会, 宮城県仙台市

② 宮副大地, 西池雄志, 大久保範聡 (2018 年 11 月) 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. 第 43 回日本比較内分泌学会, 宮城県仙台市

③ 西池雄志, 宮副大地, 大久保範聡 (2018 年 11 月) メダカにおける攻撃行動に寄与する神経核の探索. 第 43 回日本比較内分泌学会, 宮城県仙台市

④ 立澤雅也, 大久保範聡 (2018 年 11 月) 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. 第 43 回日本比較内分泌学会, 宮城県仙台市

⑤ 宮副大地, 大久保範聡 (2018 年 3 月) 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. 平成 30 年日本水産学会春季大会, 東京都港区

⑥ 大久保範聡 (2018 年 1 月) 魚類の性の不思議な世界. 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」), 福岡県福岡市 (招待講演)

⑦ 大久保範聡 (2017 年 11 月) 真骨魚類の脳の性分化・性的可逆性に関する研究. 第 42 回日本比較内分泌学会 (日本比較内分泌学会奨励賞受賞者講演), 奈良県奈良市 (招待講演)

⑧ 菊池結貴子, 大久保範聡 (2017 年 11 月) 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. 第 42 回日本比較内分泌学会, 奈良県奈良市

⑨ 宮副大地, 大久保範聡 (2017 年 11 月) 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. 第 42 回日本比較内分泌学会, 奈良県奈良市

⑩ Okubo K (June, 2017) Molecular basis of sexual differentiation and plasticity of the teleost brain. *18th International Congress of Comparative Endocrinology* (Grace Pickford Medal Lecture), Lake Louise, Alberta, Canada (招待講演)

⑪ Okubo K (November, 2016) Sexual differentiation and plasticity of the teleost brain. *The 22nd International Congress of Zoology*, Okinawa, Japan (招待講演)

⑫ Okubo K (June, 2016) Stress-related hormones in the medaka brain: identification of a new player and sex differences. *The 8th International Symposium on Fish Endocrinology*, Gothenburg, Sweden (招待講演)

⑬ 山下純平, 大久保範聡 (2017 年 3 月) メダカの脳においてオスで高発現する神経ペプチド: オスでの高発現を生み出す二つのメカニズム. 平成 29 年日本水産学会春季大会, 東京都港区

⑭ 槇しずく, 大久保範聡 (2016 年 12 月) メダカにおける脳型アロマターゼの生理的役割. 第 41 回日本比較内分泌学会, 神奈川県相模原市

〔図書〕（計 1 件）

① 大久保範聡, 田中実, 宮副大地 (2019) 魚の性. "遺伝子から解き明かす性の不思議な世界" (田中実編) pp.65–115

６．研究組織

(1)研究分担者
　該当なし

(2)研究協力者
　該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。