

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14981

研究課題名(和文) 魚類の行動を支配するニューロンの活性を人為的に操作する

研究課題名(英文) Artificial manipulation of the activity of fish neurons that regulate behavior

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ニューロンの活性を上昇あるいは低下させる人工受容体を、繁殖行動を制御する特定のニューロンで強制発現させることで、個体の生理状態や周囲の環境条件によらず、繁殖行動のスイッチを任意にオン・オフできるメダカ系統を作出することを試みた。本研究の期間内にその目標を達成することはできなかったが、人工受容体を目的のニューロンで発現させるために必要なプロモーター・エンハンサーを有する遺伝子の同定や、DNAコンストラクトのメダカへの導入方法の検討などを通じて、目標に近づくことはできた。今後も研究を進めていくことで、近い将来、目的のメダカ系統が作出できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目標として掲げた「繁殖行動を任意のタイミングで人為的に操作できるメダカ系統の作出」を、本研究の期間内に達成することはできなかったが、近い将来、それが可能となれば、魚類の神経行動学に飛躍的な発展が見込まれる。また将来的には、水産増養殖や水産資源管理に大きく貢献する技術にもなり得ると考えられる。例えば、遺伝子改変を伴わない非侵襲的な方法(非ウイルスベクターを用いたドラッグデリバリーシステムなど)で人工受容体を標的のニューロンに一過性に導入することで、養殖魚の繁殖行動を任意のタイミングで操作することも可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at generating a medaka strain whose mating behavior can be promoted or suppressed as we like at any time, by expressing designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) in the specific neurons that regulate mating behavior. Although we could not achieve this goal within the period of this study, we have identified a gene whose promoter/enhancer can be used to drive the expression of DREADD in the target neurons and we are establishing the technology to introduce the DREADD-containing DNA constructs into medaka. Further studies will allow us to generate the medaka strain which this study aimed to generate.

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

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の各種行動がどのような脳内機構によって引き起こされているのかを明らかにすることは、今日の生物学における重要課題の一つであり、神経行動学とよばれる学問分野が形成されるまでになっている。特に魚類の場合、繁殖行動や攻撃行動、不安行動などの各種行動は、水産増養殖や水産資源管理の可否に直結する形質でもあり、その制御機構の解明は水産業への応用という観点からも極めて重要な課題である。しかしながら、魚類における神経行動学は、ショウジョウバエやマウスなどでの研究に大きな後れを取っており、残念ながら、そこで得られた知見を水産業に応用するところまでは達していない。もしも魚類において、各種の行動を任意のタイミングで人為的に操作することができるようになれば、魚類の神経行動学は飛躍的に発展するとともに、将来的に、水産増養殖や水産資源管理に大きく貢献する技術にもなり得ると考えられる。

最近、これを可能とするような新しい技術が登場した。生体内には存在しない人工リガンドに応答して、ニューロンの活性を上昇あるいは低下させる人工受容体 designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) である (Sternson and Roth, 2014, *Annu Rev Neurosci*, 37:387-407; Vardy *et al.*, 2015, *Neuron*, 86:936-946)。実際にマウスでは、この DREADD を用いて記憶や学習などを改変することに成功した例が複数報告されている。そこで我々は、各種の行動を制御する特定のニューロンにこのような人工受容体を強制発現させ、そこに人工リガンドを投与すれば、魚類でも各種の行動を任意のタイミングで人為的に操作することが可能になるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

以上の考えのもと、本研究課題では、そのためのパイロット研究として、個体の生理状態や周囲の環境条件によらず、繁殖行動を任意にオン・オフできるメスメダカを作出することを計画した。

上記のように、人工受容体はマウスへの適用例は複数報告されているが、魚類への適用例はまだない。一つの mRNA から二つのタンパク質を別々に翻訳させるためのツールである internal ribosomal entry site (IRES) など、哺乳類での研究では広く普及しているものの、魚類への適用が困難である技術も中には存在するため、本研究が成功するという保証はない。しかし、以下で述べるような得られるリターンの大きさを考えると、挑戦する価値は十分にあると考え、挑戦的萌芽研究として本研究に取り組むこととした。

### 3. 研究の方法

本研究では、メスメダカの繁殖行動を支配することが強く示唆される視索前野内のメス特異的な巨大ニューロン (Hiraki *et al.*, 2014, *Endocrinology*, 155(3):1021-1032; Kikuchi *et al.*, 2019, *Endocrinology*, 160:827-839) に焦点を当て、同ニューロンで人工受容体を発現する (それにより、同ニューロンの活性を人為的にオン・オフすることができる) メダカ系統を作出することを目指すこととした。そのために、以下の二つの研究項目に取り組んだ。

#### (1) 視索前野内のメス特異的な巨大ニューロン特異的なプロモーター・エンハンサー配列の探索

視索前野内のメス特異的な巨大ニューロン特異的に人工受容体を発現させるためには、同ニューロンで特異的、あるいはほぼ特異的に発現する遺伝子のプロモーター・エンハンサー配列を使って人工受容体をドライブする必要がある。そこで、同ニューロンでのトランスクリプトーム解析の結果、およびメダカ全脳でのトランスクリプトーム解析の結果を照合し、そのような遺伝子を探索することとした。具体的には、同ニューロンで高発現が確認される一方、全脳ではほとんど発現が検出できない遺伝子を探索することとした。

また、Cre-loxP システムを用いて、同ニューロン特異的に人工受容体を発現させるとなると、Cre をドライブするプロモーター・エンハンサー配列が、成魚の段階で視索前野内のメス特異的な巨大ニューロン特異的にはたらくだけでなく、胚発生過程でははたらかないことを確認する必要がある。そこで、プロモーター・エンハンサー配列を利用する候補遺伝子の初期発生過程の発現をリアルタイム PCR によって解析した。解析漏れを防ぐために、受精直後の 1 細胞期 (stage 2-3) から孵化直後の仔魚期 (stage 40) まで経時的に解析を行い、得られた結果は、ハウスキーピング遺伝子の 1 種である *actb* の発現量で補正した。

#### (2) 人工受容体遺伝子の導入

人工受容体の導入は魚類では前例がないので、様々な人工受容体を含む DNA コンストラクトをメダカの受精卵に導入するための実験系を確立させることを目指した。具体的な戦略としては、bacterial artificial chromosome (BAC) クローンをを用いた大腸菌中での homologous recombination によるトランスジェニック、ゲノム編集 CRISPR/Cas9 での homology-directed repair をベースとしたノックイン、ゲノム編集 CRISPR/Cas9 での non-homologous end joining をベースとしたノックインの 3 通りを考えた。

### 4. 研究成果

#### (1) 視索前野内のメス特異的な巨大ニューロン特異的なプロモーター・エンハンサー配列の探索

視索前野内のメス特異的な巨大ニューロンのトランスクリプトームデータとメスの全脳のトランスクリプトームデータを比較することで、同ニューロン特異的に発現している可能性が高い遺伝子が複数見出された(図1)。それらの遺伝子の一部について、発現を *in situ* hybridization によって確認した結果、見出された遺伝子の一つが期待されるパターンに近い発現を示すことが明らかになった。この遺伝子(便宜的に FeSP1 と呼ぶことにする)は、メス特異的な巨大ニューロンが局在する視索前野内の神経核



図1 メス特異的な巨大ニューロン特異的に発現している可能性が高い遺伝子 FeSP1。上段3レーンがメスの全脳でのトランスクリプトーム解析(RNA-seq)のリードデータ(n = 3)のマッピング結果を、下段3レーンはメス特異的な巨大ニューロンでのトランスクリプトーム解析(RNA-seq)のリードデータ(n = 3)のマッピング結果を示す。メス特異的な巨大ニューロンでは高発現が確認されたのに対し、全脳ではほぼ発現が認められなかった。このことから、FeSP1はほぼメス特異的な巨大ニューロン特異的な発現を示すと予想された。

magnocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus (PMm) (隣接する神経核 anterior parvocellular preoptic nucleus (PPa) を含む)、および gigantocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus (PMg) においてメス特異的な発現を示し、さらに他の部位での発現は検出されなかった(図2)。この結果は、FeSP1 が PMm/PMg のメス特異的な巨大ニューロン特異的に発現する可能性を示唆しており、この遺伝子のプロモーター・エンハンサー配列を使えば、メス特異的な巨大ニューロンのみで人工受容体を発現させることができると期待された。ただ、FeSP1 の発現細胞は PMm に隣接する神経核 PPa (そこにはメス特異的な巨大ニューロンは存在しない)でも認められたので、FeSP1 はメス特異的な巨大ニューロン以外のニューロンでも発現していると考えられるべきであろう。そのことを確認するためにも、FeSP1 の発現細胞がどの程度メス特異的な巨大ニューロンと重なるかを早急に解析する必要がある。

また、視索前野内のメス特異的な巨大ニューロンで強く発現する別の遺伝子(便宜的に FeSP2 と呼ぶことにする)について、胚発生過程における発現を解析した。その結果、1細胞期から発現が確認されたため、FeSP2 は母体由来に受精卵に発現していることが分かった(図3)。このことから、この遺伝子のプロモーター・エンハンサー配列を用いて、Cre をドライブすることは難しいと考えられた。

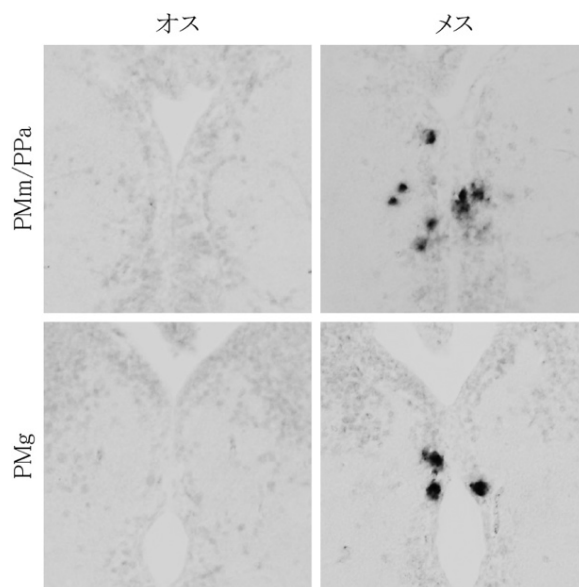


図2 PMm/PPaおよびPMgにおけるFeSP1の発現。これらの脳領域において、メス特異的に発現していることが見てとれる。

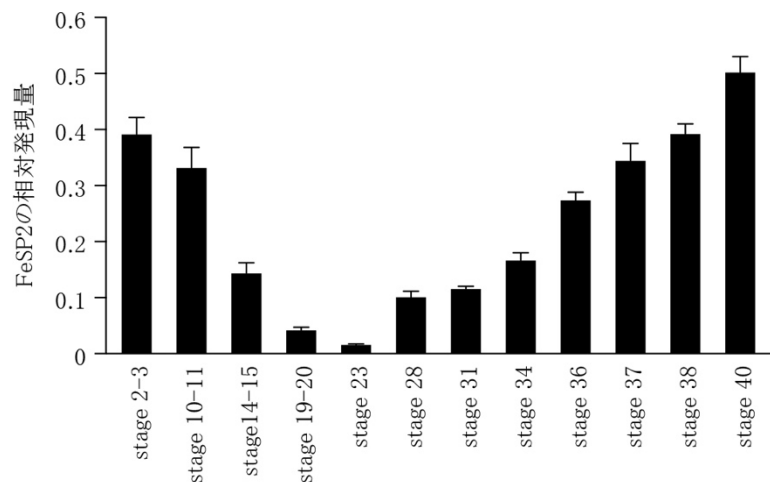


図3 胚発生過程におけるFeSP2の発現。stage 2-3(1細胞期)の時点ですでに発現がみられたことから、FeSP2は母体由来に発現していることが分かった。

## (2) 人工受容体遺伝子の導入

論文や学会等で得られた最新の情報 (Ansai and Kinoshita, 2017, *Methods Mol Biol*, 1630:175-188; Watakabe et al., 2018, *Zoological Lett*, 4:3 など) をもとに、導入する人工受容体の種類や DNA コンストラクトの構造、および、メダカへの導入方法を検討した。その結果、従来想定していた DREADD だけでなく、カプサイシン受容体や内向き整流性 K<sup>+</sup>チャンネルも試してみることにし、それらの受容体を含む DNA コンストラクトも何種類か作製した。

その後、想定していた BAC クローンを用いた homologous recombination によるトランスジェニック、homology-directed repair ベースのノックイン、non-homologous end joining ベースのノックインのうち、後者の二つを用いてメダカ胚への導入を試みた。試行錯誤を重ねたが、いずれの方法を用いても導入効率が極めて悪く、目的のメダカ系統を作出するには至らなかった。ただ、最後にはポジティブコントロールの DNA コンストラクトは導入されるようになったので、近い将来、目的のメダカ系統を作出できるようになると期待している。

以上、目標として掲げた「繁殖行動を任意のタイミングで人為的に操作できるメダカ系統の作出」を、本研究の期間内に達成することはできなかったが、近い将来、それが可能となれば、魚類の神経行動学に飛躍的な発展が見込まれる。また将来的には、水産増養殖や水産資源管理に大きく貢献する技術にもなり得ると考えられる。例えば、遺伝子改変を伴わない非侵襲的な方法 (非ウイルスベクターを用いたドラッグデリバリーシステムなど) で人工受容体を標的のニューロンに一過性に導入することで、養殖魚の繁殖行動を任意のタイミングで操作することも可能になると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

研究分担者、および研究協力者は設けていないが、研究項目 (2) 人工受容体遺伝子の導入では、基礎生物学研究所の安齋賢博士に様々なアドバイスをいただいた。この場を借りて、お礼を申し上げます。

※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。