

令和元年6月14日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18369

研究課題名(和文)メダカを用いた配偶者防衛行動の神経基盤解析

研究課題名(英文)Analysis of neural basis of mate-guarding behavior using medaka fish.

研究代表者

横井 佐織 (Yokoi, Saori)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10772048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：配偶者防衛行動はオス、オス、メスの三者関係により誘起されると考えられており、様々な動物種で観察される。メダカの配偶者防衛行動にバソプレシンなどのホルモンが関与することは明らかになっていたが、脳のどの部分で働くことで行動の発露が起きているかは明らかになっていなかった。そこで、脳の特定の領域における神経活動を低分子化合物の有無により時期特異的に制御する手法を開発した。また、メダカのメスは見知ったオスを配偶相手として選択しやすいという点に着目し、配偶者防衛には、メスがライバルオスを見て記憶することを妨害する効果があることを示唆した (Frontiers in zoology, 2016)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子化合物の有無により時期特異的に遺伝子発現を制御する方法はマウスなどの哺乳類ではすでに確立されているが、同様の手法がメダカで使用できない、あるいは着目する行動によっては投与物質の性質的に問題がある、という問題があった。本研究で確立した方法はこうした問題をクリアしており、毒性も低いことが明らかになった。また、これまでメダカのメスが見知ったオスを配偶相手として選択する適応的意義は不明であったが、本結果により、配偶者防衛行動において優位となる、健康なオスの子孫を残すことができるというメリットがあると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mate-guarding behavior is induced by triadic relationships (two males and one female) and is observed in various animals. I previously found that vasopressin, which is one of neuropeptides, regulated mate-guarding behavior in medaka fish. Which neuron in the brain was necessary for inducing the behavior, however, is unknown. Therefore, I established the new methods in which I suppressed neural activity in some specific regions of the brain in a low molecular weight compound specific manner. In addition, we focused on female mating preference in medaka and revealed that long lasting mate-guarding increased the reproductive success of dominant males via disturbing visual interaction between the female and rival males.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：配偶者防衛行動 不安定化ドメイン バソプレシン 配偶者選択

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「配偶者防衛行動」は「オスがメスに追従し、他のオスとの交配を阻止する行動」と定義され、昆虫から霊長類まで様々な動物で観察報告が存在する。しかしながら、これまでその研究は行動生態学的なものにとどまっており、分子神経基盤についての報告が存在しなかった。近年、モデル動物であるメダカのオスが配偶者防衛を示すことが明らかになり、神経ペプチドであるバソトシンが行動制御に関与することが示された(PLoS Genetics, 2015)。バソトシン関連遺伝子の変異体を用いることで、配偶者防衛行動の適応的意義を遺伝学的に考察することが初めて可能になった。また、行動制御機構のさらなる解析には神経回路の同定が必須であると考えられるが、バソトシンやその受容体遺伝子が発生段階でも発現していることを考慮すると、成魚においてこれらの遺伝子が発現する神経細胞の興奮を制御する必要があった。

### 2. 研究の目的

- (1) 配偶者防衛行動の適応的意義を遺伝学的に考察すること(Front. Zool., 2016)
- (2) 不安定化ドメイン(Destabilizing Domain, 以下 DD)を用いた、低分子化合物依存の遺伝子発現制御法の確立
- (3) (1)の手法を利用した、時期特異的に特定の神経細胞においてその興奮を操作する手法の確立
- (4) 配偶者防衛行動を制御する神経ペプチド受容体の脳における発現パターンの可視化

### 3. 研究の方法

(1) メスの排卵期以外のオスの配偶者防衛行動とメスの配偶者選択との関係を検証  
配偶者防衛行動は多くのエネルギーを必要とするため、殆どの動物において、繁殖期以外に示されることがない。一方、メダカのオスはメスの排卵期以外にも配偶者防衛行動を示すことから、排卵期以外の配偶者防衛にはなんらかの適応的意義が存在する可能性が考えられた。メダカのメスは見知ったオスを配偶相手として選択しやすいという点に着目し、メダカのオスがメスとライバルのオスとの間に割り込む(メダカにおける配偶者防衛行動の様式)ことで、メスがライバルオスを見て記憶することを妨害している、という仮説をたて、検証した。

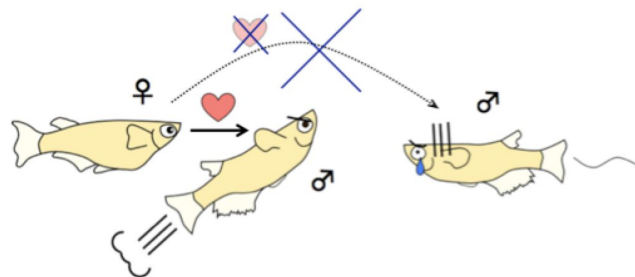
(2) TMP 依存の遺伝子発現制御系の確立  
DD を標的タンパク質と融合させることで、通常はプロテアソームによるタンパク質分解が起き、標的タンパク質が発現しない。この分解は、低分子化合物である TMP(トリメトプリム)を投与することで阻害されることから、TMP 依存にタンパク質の発現誘導が可能とされている。そこで、幼若神経特異的に発現することが知られている HuC 遺伝子のプロモーター下流に、組み換えタンパク質である Cre と DD とを融合させた DDCre が発現する遺伝子組み換えメダカ(「HuC pro-DDCre」)を作製し、Cre 依存的に DsRed の発現が GFP へと切り替わる個体と掛け合わせた。当該メダカの受精卵を「TMP あり」または「TMP なし」で飼育した際に、GFP への発現の切り替えが起きるかを、様々な濃度の TMP を用いて検証した。

(3) TMP 依存の神経興奮抑制誘導系の確立  
DD に TeTX(テタヌス毒素、神経興奮を抑制する)を融合した DDTeTX が HuC プロモーター下流で発現する個体を作成し、TMP 投与群と TMP 非投与群とでその後の発生状況を比較した。また、DDTeTX が配偶者防衛制御遺伝子のプロモーター制御下で発現する個体を作成した。

(4) ノックインによる標的遺伝子発現領域の可視化  
CRISPR/Cas9 法を用いて標的遺伝子領域に蛍光タンパク質を導入することで、標的遺伝子発現領域をタンパク質レベルで標識した。

### 4. 研究成果

(1) メスの排卵期以外のオスの配偶者防衛行動とメスの配偶者選択との関係を検証  
水槽を透明な仕切りで3つの区画に分け、端から順に、メス、オス(近位オス)、オス(遠位オス)を一匹ずつ入れ一晩置き、メスにオスを記憶させた。そして翌朝各オスの求愛に対するメスの受け入れの早さを評価した。近位オスとして正常なオスを用いた際は、メスは「遠位オス」を記憶できず、その求愛を拒絶する傾向を示した。一方、近位オスとして、配偶者防衛を示さないオスを用いたところ、メスは「遠位オス」を記憶し、その求愛をすぐに受け入れた。この結果は、上記の仮説(「研究の方法」を参照)の正しさを実験的に示すものである。また、これまでメダカのメスにおける配偶者選択(「研究の方法」を参照)の適応的意義は不明であったが、本結果により、配偶者防衛行動において優位となる、健康なオスの子孫を残すことができるというメリットがあると考えられた(図参照)。



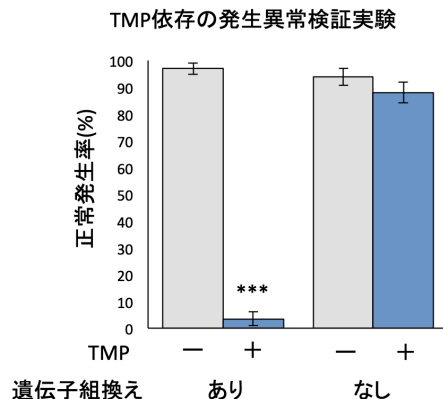
メダカの配偶者防衛行動には、  
1.ライバルオスとメスとの接触を防ぐ 2.メスにライバルオスを見させない  
という2つの意義がある

## (2) TMP 依存の遺伝子発現制御系の確立

作出した遺伝子組み換えメダカにおいて、TMP の投与依存的に DsRed の発現が GFP への発現へと切り替えることができた。よって、メダカ脳において TMP 依存に遺伝子発現を誘導できる系が確立されたと考えられる。また、メダカ稚魚で遺伝子発現を誘導可能な TMP の濃度はこれまでのゼブラフィッシュにおける報告とは異なることも明らかにした。

## (3) TMP 依存の神経興奮抑制誘導系の確立

作出した遺伝子組み換えメダカにおいて、TMP 投与群と TMP 非投与群とでその後の発生状況を比較したところ、孵化率においては大きな影響は検出されなかった。一方で、孵化直後の運動性における異常を示す個体(その場で回り続ける、沈んだまま浮かぶことが出来ない)の割合は TMP 投与群において非投与群よりも有意に多いという結果が得られた(右図参照)。この結果は、DD システムを用いた時期特異的な神経興奮抑制系がワークしたことを示唆している。



## (4) ノックインによる標的遺伝子発現領域の可視化

遺伝子発現領域の可視化には mRNA レベルの発現を可視化する *in situ* hybridization 法や、タンパク質レベルでの発現を可視化する免疫染色法が一般的に用いられている。しかし、遺伝子産物のなかには mRNA レベルでの発現調節がほとんど行われないものが存在し、*in situ* hybridization 法を用いた可視化が難しいことがある。実際、本研究でも標的遺伝子の *in situ* hybridization 法を用いた可視化は実現できなかった。また、抗体染色においては標的遺伝子と似た構造を持つ遺伝子も同時に染色してしまう可能性が高く、配偶者防衛行動を制御する神経ペプチド受容体はホモログを持つため適していないと考えられた。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いたノックインにより(「研究の方法」を参照)、標的遺伝子の発現領域のみを可視化するメダカを作製した。水晶体プロモーター調節下で蛍光タンパク質を発現するコンストラクトを用いることで、F0 世代においてノックインに成功した個体のみを抽出可能にしたため、効率よくノックイン個体を得ることに成功した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. Watakabe I, Hashimoto H, Kimura Y, Yokoi S, Naruse K, Higashijima SI. *Zoological letters* 4 3 (2018)、査読あり、DOI:10.1186/s40851-017-0086-3

(2) メスの目移りを防ぐオスメダカ 横井佐織 化学と生物 55(6) 406-411 (2017)、査読あり

(3) Molecular basis of social competence in medaka fish. \*Okuyama T, Yokoi S, Takeuchi H (\*: equal contribution). *Development, growth & differentiation* (2017)、査読あり、DOI: 10.1111/dgd.12359

(4) Mate-guarding behavior enhances male reproductive success via familiarization with mating partners in medaka fish. Yokoi S, Ansai S, Kinoshita M, Naruse K, Kamei Y, Young LJ, Okuyama T, Takeuchi H. *Frontiers in Zoology* 13 21 (2016)、査読あり、DOI:10.1186/s12983-016-0152-2.

(5) Ontogeny and Sexual Differences in Swimming Proximity to Conspecifics in Response to Visual Cues in Medaka Fish. Isoe Y, Konagaya Y, Yokoi S, Kubo T, Takeuchi H. *Zoological Science* 33(3) 246-254 (2016)、査読あり、DOI: 10.2108/zs150213.

[学会発表](計 9 件)

(1) 横井佐織(招待講演)

親密度によって変化するメダカオスの社会行動発現

第13回バイオイメージングフォーラム重点共同利用合同シンポジウム 2019年2月12日

(2) Saori Yokoi(招待講演)

Analysis of molecular basis underlying decision making according to social familiarity  
4th Strategic Meeting for Medaka Research 2018年4月16日

(3) 横井佐織(招待講演)

メダカを用いた、配偶者防衛行動の分子神経基盤解析

分子生物学会 2017年12月8日

(4) Saori Yokoi(招待講演)

Analysis of molecular basis underlying decision making according to social familiarity  
in small fish, medaka IBNS 2017 2017年6月29日

(5) 横井佐織(招待講演)

メダカメスの配偶者選択を左右する、オスの配偶者防衛におけるバソトシンの役割

第 26 回 日本行動神経内分泌研究会 2017 年 4 月 29 日

(6) 横井佐織 (招待講演)

メダカのパソトシンイソトシンシステム

第 87 回日本動物学会 2016 年 11 月 17 日

(7) 横井佐織

メダカオスの配偶者防衛がメスの配偶者選択にもたらす影響

第 35 回 日本動物行動学会 2016 年 11 月 12 日

(8) 横井佐織 (招待講演)

Vasotocin system regulates mate-guarding behavior in medaka fish

第 38 回日本比較生理生化学会 2016 年 9 月 2 日

(9) Saori Yokoi

Persistent mate - guarding enhances male reproductive success via familiarization with the female in medaka fish

第 22 回小型魚類研究会 2016 年 8 月 21 日

〔図書〕(計 2 件)

(1) 「メダカの行動学 研究の最先端」 王 牧芸, 横井佐織, 奥山 輝大, 竹内 秀明

生物の科学 遺伝 72 (2018), エヌ・ティ・エス, 630-636

(2) 「メダカ学最前線 -日本が育てたモデル動物メダカ-」 横井佐織、竹花祐介、竹内秀明、成瀬清 株式会社あるむ (2016), 91-110

〔産業財産権〕

特になし

〔その他〕

(1) [出演] 第 98 回 サイエンスカフェ札幌 (2017)

<http://costep.open-ed.hokudai.ac.jp/costep/contents/article/1718/>

(2) [TV 番組] ガリレオ X オスの戦略・メスの戦略 性と進化の不思議 (2016)

[http://web-wac.co.jp/program/galileo\\_x/gx160724](http://web-wac.co.jp/program/galileo_x/gx160724)

(3) [プレスリリース] メスの目移りを防ぐオスメダカ ～恋敵に奪われないための二重の戦略～ (2016) <http://www.nibb.ac.jp/press/2016/06/02.html>

6 . 研究組織

特になし

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。