

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658168

研究課題名(和文) 魚類の攻撃性を支配する脳内因子の同定

研究課題名(英文) Identification of a neural factor that governs aggression in teleosts

研究代表者

大久保 範聡 (Okubo, Kataaki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10370131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類を含む脊椎動物の攻撃性を高める主因子は男性ホルモンであることが知られている。本研究ではメダカをモデル魚として用いて、男性ホルモンによる攻撃行動の誘導に関わる脳内メカニズムを明らかにすることを試みた。解析の結果、精巣由来の男性ホルモンが視床下部でオス特異的にバソトシン遺伝子の発現を誘導すること、その際、男性ホルモンは直接的にバソトシン遺伝子の転写を活性化し得ること、また、バソトシンは攻撃行動を促進する作用を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Androgen serves as the primary stimulator of aggression in vertebrates, including teleosts. In this study, we examined the neural mechanisms underlying the induction of aggressive behavior by androgen, using medaka as a model teleost species. Our result demonstrated that androgen secreted by the testis male-specifically induces the expression of vasotocin in the hypothalamus, that androgen is capable of activating the transcription of vasotocin directly, and that vasotocin has the ability to promote aggressive behavior.

研究分野：魚類生理学

キーワード：水産学 行動学 生理学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類の中には、同種他個体に対して強い攻撃性を示すものが少なくない。例えば、水産業にとっての最重要魚種の1つであるトラフグは極めて高い攻撃性をもち、鋭い歯を使って相手のヒレがぼろぼろになるまで攻撃する習性をもつ。相手を死に追いやるまで攻撃することもしばしばあり、このことが水産増養殖の現場では大きな問題となっている。そこで、トラフグの養殖現場においては、幼魚のうちに1匹1匹作業でトラフグの歯をニッパーなどで切り落とす「歯切り」という極めて手間のかかる作業を行っている。同様に、ブリやクロマグロなどの養殖現場においても、つつき合いや共食いなどの攻撃行動によって生存率が低くなってしまうことが問題となっている。この問題を解決するためには、魚類の攻撃行動がどのような生理機構によって引き起こされているのかを理解した上で、その機構を人為的にコントロールし、攻撃行動を抑制する技術やシステムを開発することが大変有効であると考えられる。

(2) これまでの研究によって、魚類の攻撃性を高める主因子は男性ホルモンであることが知られている。男性ホルモンが攻撃行動を引き起こす仕組みとしては、生殖腺から放出された男性ホルモンが脳に作用し、脳内で何らかのイベントが起こった結果、攻撃行動が引き起こされるものと考えられる。具体的に脳内でどのようなイベントが起こっているのかについては明らかとなっていないが、そこを人為的に制御できれば、攻撃行動を低下させることができるはずである。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、男性ホルモンが攻撃行動を引き起こす過程で、脳内で何が起きているのかを明らかにし、攻撃性を抑制する技術やシステムの開発に繋げることを最終目標として掲げることとした。

(2) 男性ホルモンは、その受容体と結合することで転写因子としてはたらく。つまり、男性ホルモンによって、脳内で何らかの遺伝子の発現が活性化あるいは抑制され、その結果、攻撃性が高まることになる。この点を考慮し、本研究では、男性ホルモンの標的となり、攻撃行動を引き起こす脳内遺伝子を明らかにするとともに、男性ホルモンがその遺伝子の発現を制御する機構、その遺伝子が攻撃行動を引き起こす機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 過去の知見(文献 ~)から、男性ホルモンの標的となり、攻撃行動を引き起こす脳内遺伝子の有力候補としてバソトシン遺伝子(*vt*: vasotocin)に着目した。まずは、メダカ脳の完全長cDNAライブラリーを用い

て、*vt*のcDNAをクローニングするとともに、メダカのゲノムデータベースを用いて、その遺伝子を*in silico*クローニングした。

(2) *in situ* hybridizationによって、メダカの脳における*vt*の発現を解析し、その結果を雌雄で比較した。

(3) 上記の解析によって見出されたオス特異的な*vt*発現は精巣由来の男性ホルモンのたらしきに起因するとの作業仮説のもと、精巣を除去したオスメダカ、精巣を除去して男性ホルモンあるいは女性ホルモンを投与したオスメダカの脳における*vt*の発現を*in situ* hybridizationによって解析した。

(4) 男性ホルモンが*vt*の転写を直接的に活性化する可能性を検証するために、まず、オス特異的な*vt*発現ニューロンにおける男性ホルモン受容体の発現を解析した。その後、*vt*の推定制御領域にルシフェラーゼを結合させたコンストラクトを用いた*in vitro*でのプロモーターアッセイにより、男性ホルモンがルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を解析した。その結果、男性ホルモンは*vt*の転写を直接的に活性化し得ることが明らかとなったので、同コンストラクトに種々の変異を導入し、その際に機能するシスエレメントを特定した。

(5) *vt*が攻撃行動を促進することを証明するために、*vt*のアゴニストをメダカの脳室内に投与することで、*vt*の機能発現を模倣し、その際の攻撃行動の変化を定量解析した。また、*vt*の機能をさらに検証することを目的として、*vt*変異体メダカの継代飼育を行った。

4. 研究成果

(1) メダカから*vt*のcDNAとゲノムDNAをクローニングした。

(2) メダカの脳における*vt*の発現解析の結果、視床下部内の神経核 nucleus posterior tuberis (NPT)において、*vt*はオス特異的に発現していることが明らかとなった(図1参照)。

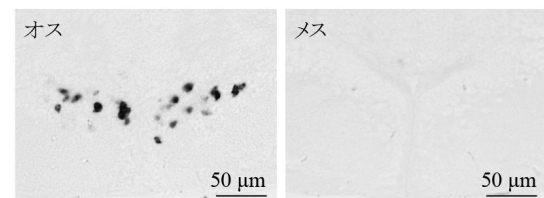


図1. メダカ脳内のNPTにおける*vt*のオス特異的発現

(3) NPTにおけるオス特異的な*vt*発現は、精巣除去によって顕著に低下するが、男性ホルモン投与によって回復することが分かった。また、女性ホルモンにはそのような回復

効果はみられなかった(図2参照)。

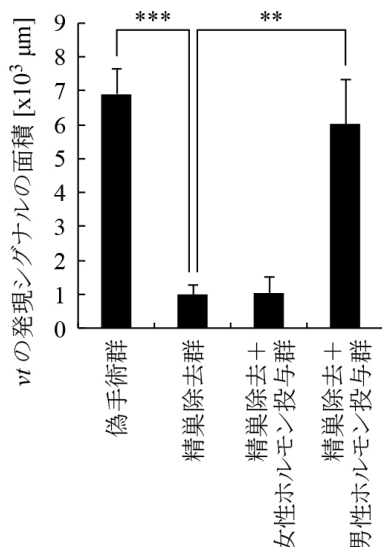


図2. 精巣除去と性ホルモン(女性ホルモンおよび男性ホルモン)がオスメダカのNPTにおけるvt発現に与える影響

(4) NPTにおけるオス特異的なvt発現ニューロンは男性ホルモン受容体を発現していることが明らかとなった。また、男性ホルモンは濃度依存的にvtの転写を活性化し得ることも明らかとなった。これらの結果から、男性ホルモンはNPTでのvt発現をオス特異的に直接誘起していると考えられた。ゲノム上のvtの近傍領域の配列を解析したところ、6個の男性ホルモン応答配列(ARE: androgen-responsive element)様の配列が見つかった。プロモーターアッセイの結果、これらのARE様配列のうちのいくつかは協調して機能することで、男性ホルモンはvtの転写を直接活性化していることが推察された。

(5) 本来は攻撃行動を示さないメスのメダカにvtのアゴニストを投与したところ、顕著な攻撃行動が誘導された。これにより、vtが攻撃性を誘導する脳内因子であることが証明された。また、vtの機能をさらに検証することを目的として、vt変異体メダカの継代飼育を行った結果、変異がホモに導入されたvtノックアウト個体を得ることができた。

(6) 以上の結果を考え合わせると、精巣から放出された男性ホルモンが視床下部NPTでオス特異的にvtの発現を直接誘導し、それによってオス特異的に攻撃行動が引き起こされるという流れが見えてきた。将来的には、CRISPR/Cas9などのゲノム編集技術を用いて、今回見出されたvt近傍のARE様配列に変異を導入することで、攻撃性を抑えた魚類の系統が得られるものと期待される。

<引用文献>

J. Bastian, S. Schneiderjan, J. Nguyenkim. Arginine vasotocin modulates a sexually

dimorphic communication behavior in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Exp. Biol.*, 204 (2001), 1909–1923

K. Semsar, F.L. Kandel, J. Godwin. Manipulations of the AVT system shift social status and related courtship and aggressive behavior in the bluehead wrasse. *Horm. Behav.*, 40 (2001), 21–31

K. Semsar, J. Godwin. Multiple mechanisms of phenotype development in the bluehead wrasse. *Horm. Behav.*, 45 (2004), 345–353

S.C. Lema, G.A. Nevitt. Exogenous vasotocin alters aggression during agonistic exchanges in male Amargosa River pupfish (*Cyprinodon nevadensis amargosae*). *Horm. Behav.*, 46 (2004), 628–637

N. Santangelo, A.H. Bass. New insights into neuropeptide modulation of aggression: field studies of arginine vasotocin in a territorial tropical damselfish. *Proc. Biol. Sci.*, 273 (2006), 3085–3092

T. Backstrom, S. Winberg. Arginine-vasotocin influence on aggressive behavior and dominance in rainbow trout. *Physiol. Behav.*, 96 (2009), 470–475

A.L. Filby, G.C. Paull, T.F. Hickmore, C.R. Tyler. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics*, 11 (2010), 498

N. Santangelo, A.H. Bass. Individual behavioral and neuronal phenotypes for arginine vasotocin mediated courtship and aggression in a territorial teleost. *Brain Behav. Evol.*, 75 (2010), 282–291

R.G. Oldfield, H.A. Hofmann. Neuropeptide regulation of social behavior in a monogamous cichlid fish. *Physiol. Behav.*, 102 (2011), 296–303

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

Kawabata Y, Okubo K (May 26, 2014) possible involvement of male-specific androgen-induced hypothalamic vasotocin expression in aggressive behavior of medaka. 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Olhao (Portugal)

大久保範聡 (2013年11月25日) 魚類の脳の性成熟機構に関する研究. 平成25年度(第12回)日本農学進歩賞受賞者講演会. 東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)

大久保範聡 (2013年3月28日) 魚類の脳の性成熟機構に関する研究. 平成25年度

日本水産学会春季大会 (平成 24 年度水産学奨励賞受賞講演). 東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区)

〔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

(1) 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・
准教授
研究者番号: 10370131

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし