

# 魚類の脳の性成熟機構に関する研究

大久保 範聡 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

okubo@marine.fs.a.u-tokyo.ac.jp

魚類の性成熟に関する研究はこれまで、人為催熟や安定的な種苗生産を可能にするなど、水産増養殖に大きく貢献してきた。しかし、研究の多くは生殖腺や下垂体の性成熟に焦点を当てたものであったため、それらの器官をより上位から支配している脳の性成熟プロセスについての知見は乏しかった。そこで私は、魚類の脳がどのようなプロセスを経て性成熟し、最終的に配偶子形成や性行動を支配できるようになるのかについて、これまで研究を進めてきた。特に、配偶子形成と性行動の両者を支配する脳内因子として知られる gonadotropin-releasing hormone (GnRH) を産生するニューロンが発生・発達するプロセス、そして、配偶子形成や性行動のパターンに雌雄差をもたらす脳の性分化プロセスに焦点を当て、以下に記すような知見を得てきた。

## GnRH 産生ニューロンが発生・発達するプロセス

魚類を含む脊椎動物では、性成熟期になると脳内の特定のニューロンが GnRH と呼ばれる神経ペプチドを盛んに産生するようになる。それによって、配偶子形成が進行するとともに性行動が誘起される。しかし、GnRH を産生するニューロンがどのように発生・発達し、配偶子形成と性行動をコントロールできる状態になるかについては、ごく限られた知見しかなかった。そこで私は、生殖生物学や発生学、神経科学の分野での材料として優れた特徴をもつメダカ (*Oryzias latipes*) をモデルに用いて、GnRH 産生ニューロンの発生・発達のプロセスを解析することとした。

まずは、メダカの GnRH 分子を単離・同定した。従来、メダカは2種類の GnRH 分子をもつとされていたが、解析の結果、新規の GnRH 分子を含む計3種類の GnRH (GnRH1、GnRH2、GnRH3) をもつことが明らかとなった (1, 2)。また、メダカの GnRH 受容体の単離・同定も行った結果、やはり計3種類の GnRH 受容体 (GnRH-R1、GnRH-R2、GnRH-R3) が存在することが分かり、魚類は複数種の GnRH 受容体をもつことが明らかとなった (3, 4)。ヒトやマウス、ラットを含む多くの哺乳類が1種類の GnRH 受容体しかもたないことと対照的である。

その後の発現・局在解析から、GnRH1 が下垂体からゴナドトロピンを分泌させることで配偶子形成を促進する役割を担っているのに対し、GnRH2 と GnRH3 は脳内で神経修飾物質として機能することが示唆された (5-7)。GnRH2 と GnRH3 の両者、あるいはどちらかが性行動を促進する役割を担っているものと考えられる。また、GnRH 受容体のリガンド選択性や局在を調べた結果から、GnRH1 による下垂体からのゴナドトロピン分泌を仲介するのは GnRH-R3 である一方、GnRH2 と GnRH3 の神経修飾物質としての作用には、3種類全ての GnRH 受容体が関わることを示唆された (3, 4)。

以上のような基礎データを収集した後、GnRH 産生ニューロンを蛍光タンパク質で可視化したトランスジェニックメダカを作出し、GnRH 産生ニューロンの発生・発達をリアルタイムにトレースした (8, 9)。その結果、下垂体からのゴナドトロピン分泌を介して配偶子形成を進行させる GnRH1 の産生ニューロンは、鼻部と終脳前端部で誕生した後、脳内を後方へと移動していくこと、そして、視索前野までたどり着くと、そこから下垂体に連絡することが明らかとなった。一方、性行動に関わることを推定される GnRH2 と GnRH3 の産生ニューロンはそれぞれ、中脳と鼻部で誕

生ずること、GnRH3 産生ニューロンは鼻部で誕生した後、嗅球から視索前野にかけての領域まで移動することが明らかとなった。

また、*p73* 遺伝子が、移動後の GnRH3 産生ニューロンの定着に必須であることを明らかにするとともに、ヒトの生殖疾患である X リンクカールマン症候群の原因遺伝子である *KAL1* 遺伝子が、GnRH1 と GnRH3 の産生ニューロンの鼻部から脳内への移動を制御していることを明らかにした (8)。また、GnRH2 と GnRH3 は母性由来の発現も含め、初期発生過程で非常に強い発現を示し、前脳・眼・嗅覚器の形態形成に関与することを見出した。同様の形態形成作用は、性成熟期以降に GnRH の分泌を促進する役割をもつとされるキスペプチンにも見られた (10)。GnRH やその関連分子が、初期発生過程において性成熟とは関係のない役割を担っているのは意外であった。

### 脳の性差と性分化のプロセス

マウスやラットでは出生前後の時期までに、遺伝的要因（性染色体や性決定遺伝子）と内分泌的要因の両者によって、脳がどちらか一方の性に機能的な分化を遂げる。それにより、分化した方の性に応じた行動パターンや配偶子形成に関わる内分泌パターンが発現するようになる。そして通常、オス型あるいはメス型のいずれかに分化した脳の性が、その生活史において逆転することはない。ところが魚類では、性成熟後でも性ホルモン処理によって、異性の行動パターンや生殖腺構造が誘導され得る。また、自然条件下で自発的に性転換を起こす魚種も少なくない。これらのことは、魚類の脳はいったん性分化が起きたとしても、一生涯にわたって性的な可逆性を保持しており、外的・内的要因によって容易に性が逆転し得ることを意味している。したがって、魚類の脳の性分化は、明らかにマウスやラットとは異なるメカニズムによって支配されていることになる。しかし、その分子の実体については未だに全くのブラックボックスであり、そもそも魚類の脳にはどのような性差が存在するのかさえもはっきりしていないのが現状であった。そこで私は、やはりメダカをモデルに用いて、魚類の脳の性差と性分化プロセスを解析することとした。

まず、メダカの脳内で発現に性差を示す遺伝子の網羅的スクリーニングを行い、新規遺伝子や機能が未知の遺伝子を含め、脳で性依存的に発現する遺伝子群を単離・同定した。その後、それらの遺伝子の脳内での発現を詳細にマッピングし、メダカの脳における遺伝子レベルでの性差を把握した。

その過程で、終脳腹側部と視索前野の一部の領域において性ホルモン受容体（男性ホルモン受容体と女性ホルモン受容体の両方）が、個体の成長にともなってメス特異的に発現することが明らかとなった (11)。これらの脳領域は、魚類における性行動の中枢領域であることが報告されているので、魚類においては、性行動の中枢領域はメスのみが性ホルモン（男性ホルモンと女性ホルモンの両方）を受容できることになる。また、これらの領域を詳細に調べたところ、メス特異的な巨大ニューロンが存在するとともに、メスでより多くのニューロンが活性化されていることが明らかとなった。このような性ホルモンの受容性、およびニューロンの形態と活性化度合いに見られる性差が性行動の性差をもたらしている可能性が考えられる。

さらに、それらの脳領域における男性ホルモン受容体と女性ホルモン受容体のメス特異的発現は、女性ホルモンによる促進、男性ホルモンによる抑制という二重の制御によって成り立っており、両ホルモンのバランスを人為的に改変すると、性成熟後でも、その性特異性が逆転することも明らかとなった。この脳領域で発現している女性ホルモン受容体サブタイプの遺伝子 *esr2b* をノックアウトしたところ、メスが全く性行動を行わなくなったので、そこでのメス特異的な *esr2b* 発現は、

メスの性行動に重要であることが示唆された。一方、女性ホルモンのみならず、男性ホルモンを受容できるのもメスだけ、というのは全くの予想外であったが、男性ホルモン受容体がメスで恒常的に発現することで、何らかの理由で体内の男性ホルモンが増加した場合に備えて、いつでも脳が脱メス化できる状態を作っているのかもしれない。このようなシステムが、魚類の性行動パターンの性的可逆性の分子基盤となっている可能性が高いと考えられる。

また、スクリーニングによって得られた他の遺伝子についても解析を進め、これまでに、中脳視蓋の一部に存在する未熟なラディアルグリア細胞において、男性ホルモンを女性ホルモンに転換する酵素であるアロマトラーゼの遺伝子 *cyp19a1b* がメスのみで発現し、女性ホルモンが中脳視蓋の細胞ライフサイクルに影響を及ぼすこと (12, 13)、脳の実組織を包む脳髄膜において、*heme-binding protein 3* と命名した新規のヘム結合タンパク質をコードする遺伝子 *hebp3* がメスに偏った発現を示すこと (14)、視床下部において、性行動や攻撃行動への関与が示唆されているバソトシンの遺伝子 *vt* がオス特異的に発現すること (15) などを報告してきた。また、上記の性行動に関わる脳領域において、性ホルモン受容体と同様にメスのみで発現する機能未知の神経ペプチド遺伝子が存在することも明らかとなった。

同定された遺伝子群の発現を多方面から解析したところ、それらの大部分は、初期発生時には発現に性差を示さず、性成熟の開始期（第二次性徴の出現期）になって初めて性差を示すこと、遺伝的な性ではなく、表現型の性に一致した発現パターンを示すこと、性成熟後でも生殖腺除去や性ホルモン処理によって、性依存的な発現パターンが雌雄間で逆転することなどが明らかとなった (11, 12, 14)。また、同定された遺伝子の多くは、性ホルモン受容体と同じ細胞で共発現し、性ホルモンによって直接的に転写活性の制御を受けていることも明らかとなった。

これらの成果から、メダカにおいては、マウスやラットでの知見とは異なり、生殖腺の性成熟が開始されるまで脳の性は確立しないこと、脳の性分化と、形成された性差の維持は、遺伝的要因（性染色体や性決定遺伝子）によって直接支配されているのではなく、性成熟した生殖腺由来の男性ホルモン・女性ホルモンのバランスの性差によって副次的、かつ可逆的に引き起こされることが示唆された。このようなシステムが存在するからこそ、魚類の脳は性的な可逆性を有しており、生殖腺の状態（精巣をもつか卵巣をもつか）によって、脳の性別も自由自在に変えることができるものと考えられる。

## おわりに

GnRH 産生ニューロンが発生・発達するプロセス、および、魚類の脳の性差と性分化プロセスに関する研究はこれまでも行われてきたが、それらの多くは現象の提示にとどまっており、分子メカニズムの解明はほとんど為されていなかった。本研究によって、それらのプロセスを理解する上で鍵となる知見をいくつか得ることができたが、分子の実体については、まだその一端が見えてきたに過ぎない。今後、研究をより深く掘り下げ、分子メカニズムの全容を明らかにしていく必要がある。

特に、脳の性差と性分化プロセスに関しては、これまでの研究によって単離・同定された性差を示す脳内遺伝子のそれぞれが、最終的にどのような表現型の性差に結びついているのかを、早急に明らかにしなければならない。それらの遺伝子の中には、配偶子形成や性行動だけでなく、攻撃性や成長、ストレス耐性など、魚類の増養殖の可否や商品価値の高さに直結する形質の性差に結びつくものも含まれていると考えられる。それらの遺伝子の生理機能と作用機序を明らかにし、そこ

で得られる知見を水産増養殖に応用する道筋を立てることで、農学の発展に貢献していければ幸いである。

## 謝辞

本賞の受賞にあたっては、公益社団法人日本水産学会からの推薦をいただきました。渡部終五会長をはじめ学会関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究を進める上で多大なご指導・ご支援をいただいた會田勝美名誉教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）、長濱嘉孝教授（愛媛大学社会連携推進機構）、岡良隆教授（東京大学大学院理学系研究科）、ならびに金子豊二教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）に深く感謝いたします。また、末武弘章准教授（福井県立大学海洋生物資源学部）、吉浦康寿主任研究員（水産総合研究センター増養殖研究所）、天野勝文教授（北里大学海洋生命科学部）、赤染康久助教と神田真司助教（東京大学大学院理学系研究科）、阿部秀樹准教授（名古屋大学大学院生命農学研究科）など、多くの共同研究者の方々にも多大なご協力をいただきました。心よりお礼を申し上げます。本研究の遂行に携わった竹内研生君、平木十和子さん、仲宗根潔君、川幡由希香さん、外川理絵さん、細野耕平君、山下純平君、横山圭子さん、菊池結貴子さん、前廣清香さんをはじめとする学生の皆さんにも心より感謝いたします。

本研究は、文部科学省と日本学術振興会の科学研究費助成事業、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業、ならびに、サントリー生命科学財団の研究奨励助成事業による支援のもとで行われました。この場を借りて、各機関にお礼を申し上げます。

## 文献

1. Okubo K *et al.* (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 276:298–303
2. Okubo K *et al.* (2002) *Gene* 293:181–189
3. Okubo K *et al.* (2001) *Endocrinology* 142:4729–4739
4. Okubo K *et al.* (2003) *Gene* 314:121–131
5. Okubo K *et al.* (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 312:531–536
6. Karigo T *et al.* (2012) *Endocrinology* 153:3394–3404
7. Wayne NL *et al.* (2005) *Biol Reprod* 73:1228–1234
8. Okubo K *et al.* (2006) *Endocrinology* 147:1076–1084
9. Kanda S *et al.* (2010) *Endocrinology* 151:695–701
10. Hodne K *et al.* (2013) *Endocrinology* 154:3437–3446
11. Hiraki T *et al.* (2012) *Proc Biol Sci* 279:5014–5023
12. Okubo K *et al.* (2011) *J Neuroendocrinol* 23:412–423
13. Takeuchi A *et al.* (2013) *PLoS One* 8:e73663
14. Nakasone K *et al.* (2013) *Endocrinology* 154:920–930
15. Kawabata Y *et al.* (2012) *Neuroscience* 218: 65–77

### Looking at the mechanisms underlying sexual maturation of fish brain

Kataaki Okubo (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

okubo@marine.fs.a.u-tokyo.ac.jp