

論文内容の要旨

Analysis of the neural basis that underlies female sexual preference depending on visual information in medaka fish

メダカを用いた視覚情報依存的な配偶者選択行動の神経基盤解析

奥山 輝大

Introduction

多くの動物種において、メスは適応度を上げるため、より良い形質を持つオスを選択する。これは「配偶者選択行動」と呼ばれ、形態進化の強い駆動力となると考えられている。例えば、グッピーのメスは尾鰭に橙色の斑点を多く持つオスを選び好むため、グッピーでは近縁種と比較し尾鰭の形態が大きく進化したと考えられている[1]。このような視覚に依存した配偶者選択行動は行動学的知見が多い一方で、モデル動物を用いた実証的研究は極めて少なく、神経・分子基盤はほとんど明らかになっていない。そこで私は、モデル動物のメダカに着目した。メダカは遺伝学的手法が利用可能なだけでなく、性周期がわずか1日なため、毎日配偶行動の解析が可能である。本研究ではメダカのメスの配偶相手の好みを検定する新規な行動アッセイ系を確立し、当該行動に必要な遺伝子と神経細胞を検索、同定した。

Results

メスは良く見知ったオスの求愛を受け入れる

メダカの配偶行動は、一連のステレオタイプな流れで行われる。オスがメスに対して特徴的な求愛円舞を複数回行い、その求愛をメスは当初拒絶するが、数分後に受け入れることで放卵・放精に至る。まず、配偶相手の視覚情報が配偶行動に与える影響を考えるため新規行動アッセイ系を確立した。行動実験の前夜からオスとメスを様々な視覚条件の元で隔離し、翌朝に隔離解除した後の配偶行動を定量化した。その結果、オスとメスを透明なビーカーを用いて隔離し、互いの姿が見えるように隔離したペア(Group1)では、不透明壁を用いて見えないように隔離したペア(Group2)と比較して、メスの「求愛を受け入れるまでの時間」が有意に短くなることを見出した(Fig.1)。またグループ間でオスの求愛円舞数に差はなかった。このことから、オスを視覚的に認識することで「メスの求愛の受け入れ允進」が起きる可能性が考えられた。メスの眼球や嗅上皮を外科的に切除した個体を用いてアッセイした結果、求愛の受け入れ允進は、嗅覚ではなく視覚情報依存的であることが示された。また、配偶相手と異なるオスを見せた場合にはメスの配偶相手に対する求愛受け入れ允進は起きないため、メスは視覚的に個体識別を行い、「良く見知った(視認した)オスを特異的に配偶相手として受け入れる」可能性が示唆された。

メスによる視認はオスの適応度を上昇させる

メスの求愛受け入れ行動において、視認されたオスが実際にメスの配偶相手になる(配偶者選択を引き起こす)かを調べる目的で1匹のメスと2匹のオスを用いてアッセイを行った。その際、一方のオスには GFP 遺伝子をホモに持つトランスジェニック系統を用い、GFP 蛍光を指標に子の父親検定を行った。2匹のオスの内、一方のみを前夜から視認させたところ、視認したオスの精子を受精する割合が有意に上昇した。以上から、メスによる視認は配偶者選択を引き起こし、オスの適応度を上昇させることが示唆された。メダカの配偶者選択ではメスが見知っている(視認した)ことが、オスの選択における一つの基準となっていると考えられた。

CXCR7, CXCR4 変異体ではメスの求愛受け入れが亢進する

上記アッセイ系を用いて、ENU 処理変異体を対象に求愛受け入れに異常を示すメダカ変異体のスクリーニングを行った。その結果、前夜から視認していなかったオスに対しても、メスが求愛受け入れの亢進を示す変異体として、CXCR7 変異体と CXCR4 変異体を同定した(Fig.1)。また各々の変異体のオスでは求愛円舞数の減少が観察された。CXCR7・CXCR4 は共通リガンド CXCL12/SDF-1(ケモカイン)に対する受容体であり、細胞移動などの形態形成に協調的に関与する[2]。CXCR7/4 の両遺伝子をそれぞれ特異的にノックダウンするモルフォリノオリゴ(MO)を野生型メダカの受精卵に注入したところ、成体で変異体と同様の行動異常が観察された。以上から、胚発生期における CXCR7/4 遺伝子の発現が、オス、メスの両方で正常な配偶行動を行うために必要であることが示された。なお、当該変異体を用いて視運動反応テストを行い、視覚運動能力には異常がないことを確認している。

始原生殖細胞の増減は、メスの求愛受け入れ亢進には影響しない

メダカやマウスにおいて CXCR シグナルは、胚発生期に起きる始原生殖細胞(PGC)の生殖巣への細胞移動に関わる[2]。そこで CXCR7/4 変異体における、メスの求愛受け入れの異常な亢進が、生殖巣中の PGC 数の減少によるか検討した。まず、CXCR7 変異体の PGC 数を人為的に増加させる目的で、GFP 蛍光を目安に野生型 PGC を CXCR7 変異体へ細胞移植したが、行動異常は回復しなかった。一方、野生型個体の PGC 数を減少させる目的で PGC の生存に必須な Dead-End 遺伝子をノックダウンする MO を顕微注入した野生型メス個体を作製したが、野生型と同様の求愛受け入れを示した。以上から、CXCR7/4 変異体の行動異常は、生殖巣における PGC 数減少に起因するものではないことが示唆された。

CXCR シグナルは終神経 GnRH ニューロンの形態形成に関わる

近年、マウスとゼブラフィッシュにおいて、CXCR シグナルが GnRH(ゴナドトロピン放出ホルモン)ニューロンの発生に関与することが報告され、当該変異体の行動異常が GnRH ニューロンの発生異常に起因する可能性が考えられた[3]。脊椎動物には3種類の GnRH ニューロンが存在するが、その中でいずれの発生に CXCR シグナルが働かかは不明であった。CXCR7-MO と CXCR4-MO の注入の結果、視索前野 GnRH ニューロンの発生は正常であった一方、終神経 GnRH ニューロンは細胞移動に異常が生じて、異所的な軸索投射が生じた。また、CXCR7-/- gnrh3-gfp 系統では同様に、終神経 GnRH ニューロンの形態形成異常が観察された(Fig.2)。以上から、メダカでは終神経 GnRH ニューロンの細胞移動に、CXCR シグナルが必要であることが示された。

終神経 GnRH ニューロン破壊個体は、求愛受け入れが異常に亢進する

3種類の GnRH ニューロンのうち、視索前野 GnRH ニューロンは、脳下垂体へ投射してゴナドトロピン(LH・FSH)の放出制御を介して性成熟・排卵を制御している。一方、終神経 GnRH ニューロンは網膜・嗅球から小脳に至るまで広範囲に軸索を投射するという特徴的な形態

を示し、オスの性的動機付けに関わると示唆されていたが[4]、メスでの役割や配偶者選択行動における役割は不明であった。そこで終神経 GnRH ニューロンがメスの求愛受け入れに関与するか調べる目的で、GFP ガイドレーザーアブレーション法により、終神経 GnRH ニューロン特異的な破壊実験を行った。その結果、終神経 GnRH ニューロン破壊個体メスでは「見知らぬオスも受け入れる」という求愛受け入れの異常な亢進、オスでは求愛円舞数の減少が見られ、これは CXCR7/4 変異体の行動異常と同様であった。

オスの視認は、規則的自発発火の頻度を上昇させる

オスの視覚情報がメスの終神経 GnRH ニューロンへ伝達される可能性を検討するため、電気生理学的手法により、メスの終神経 GnRH ニューロンの規則的自発発火パターンを記録した。その結果、

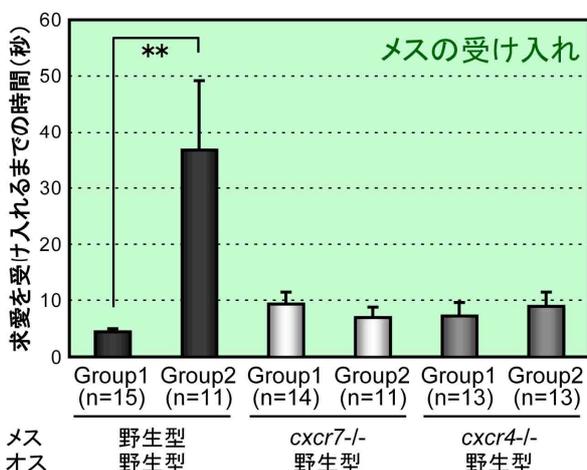


Fig.1 CXCR7/4変異体は、異常な求愛の受け入れを示した

配偶行動を頻繁に行う若い成体メスでは、配偶相手のオスを視認した後に自発発火頻度が上昇した(Fig.3)。一方、性成熟前のメスや性成熟していない老齢メスでは自発発火頻度上昇は観察されず、発火頻度は非常に低かった。以上から、オスの視認とメスの終神経 GnRH ニューロンの自発発火の頻度との間に相関関係があることが示された。

CXCR7 変異体メスは配偶者選択に異常を示す

終神経 GnRH ニューロンが求愛受入れだけでなく、適応的意味をもつ配偶者選択行動に関与するか検証するため、上記の1匹のメスと2匹のオスによる配偶者選択アッセイ系を用いて、CXCR7 変異体メスが「視認したこと」を価値基準としてオスを選択するか検討した。その結果、CXCR7 変異体メスは前夜から視認していたオスとも、そうでないオスとも同程度、放卵・放精に至ったことから、配偶者選択行動に異常を示すことが示唆された。

Discussion

本研究ではこれまでブラックボックスであった配偶者選択行動の神経基盤の一端を初めて解明した。メスはオスを視認すると、終神経 GnRH ニューロンの自発発火頻度の増加を介して求愛拒絶を解除する可能性がある。また終神経 GnRH ニューロンはオスの求愛円舞、メスの配偶者選択の動機付けを制御していることが示唆された。性的動機が上昇すると、オスは求愛、メスは好みの配偶相手を選別する傾向が強くなり、生じられる行動様式に性的二型が生じると考えられる。終神経 GnRH ニューロンの機能がグッピーなどの他種において保存されているか検定することが、今後の興味深い課題である。

Reference

- 1, Andersson et al., *Trends Ecol. Evol.* 21: 296 (2006)
- 2, Sasado et al., *Dev. Biol.* 320: 328 (2008)
- 3, Palevitch et al., *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 262 (2010)
- 4, Oka et al., *J. Neuroendocrinol.* 21:334 (2009)

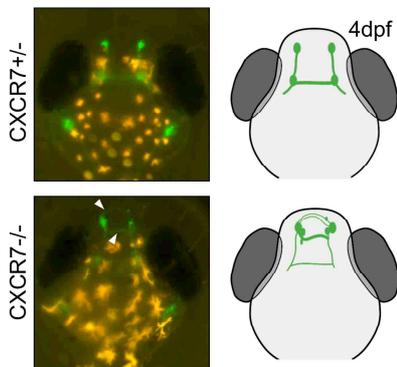


Fig.2 CXCR7変異体では終神経 GnRH ニューロンの回路形成に異常が生じる

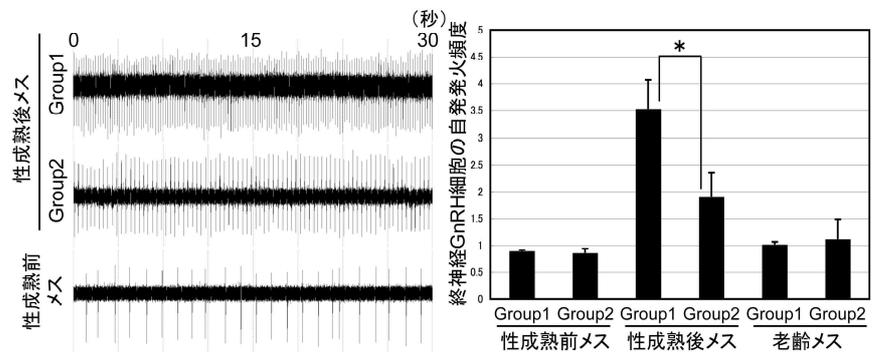


Fig.3 終神経 GnRH ニューロンの規則的自発発火頻度

性成熟メスにおいて、交尾相手のオスを視覚的に認識することにより、規則的自発発火の頻度が増加する。生殖能力のない老齢メスや性成熟前メスでは、自発的発火の頻度は低い。