

種特異的性行動を規定する *fru* 遺伝子と *fru* 神経回路の 解明

Exploring the genomic basis for the species difference
in the neural circuitry for male courtship in *Drosophila*

山元 大輔 (YAMAMOTO DAISUKE)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授



研究の概要

動物は、種ごとに特有の行動様式を示す。この行動の多様性を生み出す脳と遺伝子の機構を明らかにするため、ショウジョウバエの2種、*melanogaster* と *subobscura* を用いて、雄の求愛行動のマスターレギュレーター、*fruitless* 遺伝子を発現するニューロンを比較した。その結果、2種で異なる細胞に *fruitless* が発現し、それが行動の種差の一因である可能性が示唆された。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：求愛行動、多様性、ショウジョウバエ、ニューロン、転写

1. 研究開始当初の背景

遺伝学の技術を縦横に駆使できるキイロショウジョウバエ、*Drosophila melanogaster* の研究から、*fruitless* 遺伝子が雄の求愛行動を惹き起こす神経回路を組み立てる司令塔であることがわかってきた。そこで、求愛行動の種による違いが *fruitless* 遺伝子の種間の違いに起因するとの仮説が生まれた。この仮説を検証すべく、特異な求愛行動を示す *D. subobscura* に注目し、脳と遺伝子の比較研究を開始した。

2. 研究の目的

行動の種差がどのような神経回路の違いから生み出されるのか、その神経回路の違いを惹き起こしているのはどの遺伝子のどのような変化なのかを具体的に解明し、そうした遺伝的变化を選択し維持に導いた要因の理解へと繋ぐことが本研究の最終目的である。その実現のため、*Drosophila* 属の二つの種、*malanogaster* と *subobscura* で *fruitless* 発現ニューロンを構造・機能的に比較し、行動の種差を規定する機構解明を目指す。

3. 研究の方法

subobscura の *fruitless* 遺伝子発現制御領域を *melanogaster* に導入し、*melanogaster* の *fruitless* 発現ニューロンと異なるニューロンに発現が起こるか否かを検討する。発現が起こる場合、そのニューロンの強制活性化により、*melanogaster* に *subobscura* 型の行動が惹起されるか否かを調べ、行動の種差へのその寄与を評価する。

4. これまでの成果

・ *subobscura* 由来 *fruitless* 遺伝子の上流配列を *melanogaster* 個体内で働かせる実験
subobscura の *fruitless* 遺伝子第1プロモーター上流約 31kb をクローニングして、酵母の転写因子 GAL4 をコードする配列につなぎ、これを *melanogaster* のゲノムに挿入した。この操作を受けた *melanogaster* 系統を以下、*5'fru-Gal4(sub)* と呼ぶ。GAL4 の標的配列 *UAS* に蛍光タンパク質 GFP のコード配列をつないだ人工遺伝子を持つ系統、*UAS-GFP* と *5'fru-Gal4(sub)* とを交配して生まれた子世代では、*subobscura* の *fruitless* 制御配列によって規定される細胞に GAL4 が産生され、その GAL4 の結合を受けて *UAS-GFP* が発現する結果、こうした細胞だけが GFP 蛍光で標識されて可視化される。すなわち、*subobscura* という種において *fruitless* 遺伝子を発現している細胞と相同の細胞が *melanogaster* で可視化されたと考えられる。一方、*melanogaster* という種で *fruitless* を発現する細胞は、既存の *fru-Gal4* または抗 *Fruitless* 抗体染色によって可視化される。これらの染色像の比較から、両種で共通して *fruitless* を発現する細胞と一方の種でのみ *fruitless* を発現すると思われる細胞とが存在することが判明した。つまり、求愛行動のマスターレギュレーターとされる *fruitless* 遺伝子の発現する細胞は、種によって一部異なっている。その差は果たして行動の種差の原因なのであろうか？

・ *fruitless* 発現ニューロンの強制活性化によって惹起される行動の種特異性の検討
melanogaster の雄の求愛行動は、雌の腹部を叩く tapping、雌の後方からの追尾、片翅振動による求愛歌発生、雌の交尾器への licking、及び交尾試行からなる。



melanogaster 雄の片翅による求愛歌発生

一方、*subobscura* の雄は、雌の正面に出て両翅を真一文字に開き、雌とキスをして、その際に消化物のギフトを与える。またこれ以外にも、中脚をしきりに前後に振り動かす、両翅を同時に振るわせるといった特異な動作を求愛中に行う。

こうした *subobscura* に特徴的な行動は、どのようなニューロンからなる回路によって生み出されるのであろうか。

温度感受性のチャンネル、dTrpA1 をニューロンに強制発現させておき、実験室の温度を通常の 25°C から 30°C 程度にまで上昇させると、このチャンネルが開口してニューロンを興奮させる。たとえば *5'fru-Gal4(sub)* と *UAS-dTrpA1* とを交配して得た子世代の個体は、*subobscura* で *fruitless* を発現しているニューロンに相同な *melanogaster* の細胞において dTrpA1 が生成される。これらのニューロンは従って、温度を上げると興奮することになる。

実験の結果、*5'fru-Gal4(sub)* 発現ニューロンを *dTrpA1* の働きによって興奮させると、その個体は *melanogaster* でありながら、幾つかの *subobscura* に特徴的な行動が出現することがわかった。*5'fru-Gal4(sub)* を発現するニューロンは数千個存在するため、種特異的行動に関わるニューロンがそのうちのどれなのかを特定するためには、*Gal4* の発現をさらに限定する必要がある。そこで、MARCM と呼ばれる細胞クローン作製法によってこれを実現し、行動と細胞との相関を調べた結果、一部の *subobscura* 固有の行動が、*subobscura* においてのみ *fruitless* を発現し *melanogaster* では *fruitless* を発現しない細胞の活性化によって引き起こされる可能性が示唆された。*fruitless* 遺伝子の発現細胞が種によって切り替わり、行動の種差をもたらす可能性を暗示する結果と言える。

5. 今後の計画

subobscura に可視劣性変異を CRISPR-Cas9 により作り出す。続いて *fruitless* ノックアウト、さらに可視劣性変異体に遺伝子導入し、ニューロンの標識・操作を実現して、*subobscura* 型行動の神経基盤を解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Hamada-Kawaguchi, N., Nore, B. F., Kuwada, Y., Smith C. I. E., and Yamamoto, D. (2014) Btk29A promotes Wnt4 signaling in the niche to terminate germ cell proliferation in *Drosophila*. *Science* 343, 294-297.

Sakurai, A., Koganezawa, M., Yasunaga, K., Emoto, K. and Yamamoto, D. (2013) Select interneuron clusters determine female sexual receptivity in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 4, 1825-1833.

Nawaz, HM., Kysten, P., Hamada, N., Yamamoto, D., Smith, C.I.E. and Lindvall JM. (2012) Differential Evolutionary Wiring of the Tyrosine Kinase Btk. *PLoS ONE* 7, e35640.

Ito H., Sato K., Koganezawa M., Ote M., Matsumoto K., Hama C. and Yamamoto D. (2012) Fruitless cooperates with two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron sexual dimorphism. *Cell* 149, 1327-1338.

Takayanagi, S., Toba, G., Koganezawa, M., Lukacsovich, T. and Yamamoto, D. (2012) An untranslated RNA sequence encoded in the putative regulatory region of *fruitless*, a major courtship regulator gene of *Drosophila*. *Intern. J. Biol.* 4, 20-26.

Bousquet, F., Nojima, T., Houot, B., Chauvel, I., Chaudy, S., Dupas, S., Yamamoto, D. and Ferveur, J-F. (2012) Expression of a desaturase gene, *desat1*, in neural and nonneural tissues separately affects perception and emission of sex pheromones in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 249-254.

Watanabe, K., Toba, G., Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2011) Gr39a, a highly diversified gustatory receptor in *Drosophila*, has a role in sexual behavior. *Behav. Genet.* 41, 746-753.

Goto, J., Mikawa, Y., Koganezawa, M., Ito, H. and Yamamoto, D. (2011) Sexually dimorphic shaping of interneuron dendrites involves the Hunchback transcription factor. *J. Neurosci.* 31, 5454-5459.

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto_lab/