

令和元年5月20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：16K20875

研究課題名(和文) 昆虫脳性分化機構の「進化」を探る

研究課題名(英文) Evolution of the neural sex-determination system in insects

研究代表者

渡邊 崇之 (Watanabe, Takayuki)

北海道大学・理学研究院・学術研究員

研究者番号：70547851

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)：本研究の目的は、原始的な昆虫の脳の性決定機構を明らかにし、昆虫脳性分化機構の進化を解き明かすことである。ショウジョウバエ脳で性特異的遺伝子として発現し神経細胞の性決定を担う fruitless・doublesex遺伝子に着目し、原始的な不完全変態昆虫の神経系でこれらが性決定に関与するかを調査した。その結果、原始的な不完全変態昆虫の fruitless遺伝子には性特異的遺伝子産物を生み出す機構が備わっておらず、doublesex遺伝子の性特異的遺伝子産物のみが生じることを明らかにした。このことから原始的な昆虫はdoublesex遺伝子のみ依存した脳の性分化機構を保有していたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトを含む多くの動物は、脳の形態や脳を構成する神経回路に雌雄差(性的二型)が存在する。本研究では昆虫を材料に、性的二型が作られる遺伝的メカニズムと脳の発達メカニズム、そしてその進化を理解するための研究を展開した。本研究の結果、モデル生物であるショウジョウバエ脳で主要な神経回路の雌雄差を決定する遺伝子である fruitless遺伝子が、コオロギやゴキブリなどの原始的な不完全変態昆虫脳においては性決定に関与しないことなど、昆虫脳における性決定メカニズムの多様性を示す結果を得た。脳の性的二型は性行動の発現に重要だと考えられることから、本研究から昆虫における性行動の神経基盤の多様性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sexually dimorphism in the brain of the fruit fly is regulated by two transcription factor genes, fruitless and doublesex. In the fly brain, these genes are expressed as sex-specific isoforms to shape sexually dimorphic circuits. To reveal the evolutionary origin of neural sex determination system in insects, identification and characterization of these two genes was conducted in basal direct-developing insects including the two-spotted cricket. The result indicated that the fruitless gene of basal direct-developing insects does not possess molecular mechanisms for generating sex-specific gene product. On the other hand, the cricket brain expresses sex-dependent gene products of doublesex. These results support the idea that the doublesex gene is a prototypic neural sex-determination gene in basal direct-developing insects, and advanced holometabolous insects acquired an additional sex-determination mechanism regulated by the fruitless gene.

研究分野：神経生物学、進化生物学

キーワード：性決定 性的二型神経回路 doublesex fruitless

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

## 1. 研究開始当初の背景

動物は成熟し成体へと至る過程で、生殖や配偶行動などの成体に特異的かつ性特異的な行動を担う神経回路を備えた脳を発達させる。特に昆虫や両生類など「変態」を経て成体へと至る動物では、変態に伴い幼生期の神経系をドラスティックに再編しながら、成体特異的・性特異的な行動を担う神経回路基盤を確立していく。モデル昆虫であるキロショウジョウバエを含む完全変態昆虫では、変態に特化した発生ステージである蛹期において神経系の大規模な構造的再編成が起きる。一方で、蛹期を持たない原始的な不完全変態昆虫の神経系において、既に存在する幼虫期神経系の機能を乱すことなく、いつ、どのようにして成虫特異的な神経回路が構築されるのかは、全く明らかにされていない発生生物学的問題であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、変態を介した成体特異的・性特異的な行動を担う神経回路基盤について、原始的な不完全変態昆虫であるコオロギを実験モデルとした進化発生学研究をおこない、成体特異的・性特異的な行動を担う神経回路基盤がいつどのようにして獲得されるかを明らかにすることを第一の目的とした。成体特異的・性特異的な行動を担う神経回路として、昆虫脳で性特異的な行動を司ると考えられる性的二型神経回路に着目した。研究開始当初、原始的な不完全変態昆虫において性的二型神経回路を規定する分子メカニズムが明らかになっていなかったため、昆虫神経系の性決定を司る分子基盤を明らかにし、その進化過程を解明することを第2の目的とした。さらに、コオロギ神経系において性的二型神経回路が成体特異的・性特異的な行動を担うか否かを調査する目的で、コオロギ脳全脳活動マッピング法の確立に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 昆虫の脳・神経回路の性決定を担う分子基盤の進化の解明

モデル昆虫であるキロショウジョウバエでは、分子遺伝学研究により脳の性的二型神経回路の形成が *fruitless* と *doublesex* という2つの転写因子をコードする遺伝子により制御されていることが明らかになっている。これらの遺伝子の遺伝子産物(タンパク質)には性的二型アイソフォームが存在し、性特異的な転写制御を担うことが知られている。本研究では、コオロギ脳で発現する *fruitless*・*doublesex* 遺伝子のホモログを同定し、その発現解析や遺伝子構造の解析をおこない、*fruitless*・*doublesex* 遺伝子のコオロギホモログに、ショウジョウバエのものと類似した性的二型アイソフォームが存在するか否か?また、それらが神経系の性的二型に寄与し得るかを検討した。

### (2) コオロギ脳における性的二型神経回路の可視化とその発生学的解析

(1)で解明したコオロギ脳の性的二型を司る遺伝子について、その遺伝子産物に対する特異的抗体を作成し脳内分布を調査した。さらに、CRISPR/Cas9法によるDNA二本鎖切断と非相末末端結合による遺伝子挿入法を利用したGene Trap法を開発し、性決定遺伝子の発現する神経回路で蛍光タンパク質を発現する遺伝子導入系統の作出を行なった。

### (3) 最初期遺伝子プロモーターを利用したコオロギ脳全脳活動マッピング法の確立

コオロギ脳で神経活動依存的に発現誘導のかかる最初期遺伝子(IEG)を同定し、その発現制御領域の下流で核移行型蛍光タンパク質遺伝子を発現する遺伝子導入コオロギを、*piggyBac* トランスポゾンを利用して作出した。作成した遺伝子導入コオロギをもちいて、核移行型蛍光タンパク質遺伝子が神経活動依存的に発現誘導を受けるか否かを検討した。さらに、この遺伝子導入コオロギ系統が全脳活動マッピングに利用できるか否かを検討する目的で、特定の行動(摂食行動)を遂行したのちに行動依存的な蛍光タンパク質の発現が味覚情報処理を担う脳領域で検出できるかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 昆虫の脳・神経回路の性決定を担う分子基盤の進化の解明

#### *fruitless* 遺伝子に関する解析

キロショウジョウバエでは、*fruitless* 遺伝子は複数のプロモーターから発現することが知られている。この中で最も上流に存在するP1プロモーターから転写される転写産物は、性特異的スプライシングの結果、オスではN-末端伸長配列をもつ機能的なFruitlessタンパク質(Fru<sup>M</sup>)をコードし、メスではN-末端伸長配列以外の主要な機能ドメインを欠くタンパク質をコードする。ショウジョウバエFruitlessタンパク質と類似した性特異的遺伝子産物はハチでも確認されており、P1プロモーターから転写される転写産物がメスで機能的なFruitlessタンパク質をコードし、オスでは機能しないタンパク質を生じることが知られている。これらの結果から、P1プロモーターが存在するか否かが、*fruitless* 遺伝子の性特異的遺伝子産物の有無を決める重要な要因であることがわかる。

本研究で、コオロギ脳で発現する*fruitless* 遺伝子は1種類のプロモーターから発現することがわかり、ゲノム上の位置関係から、このプロモーターがショウジョウバエ・ハチで見られるP1プロモーターと相同でないことが支持された。また、5'非翻訳領域の配列解析により、いかなるスプライシングを受けたとしても、N-末端伸長配列と機能ドメインを備えた機能的なFruitlessタンパク質をコードし得ないことが明らかとなった。さらに、コオロギ脳で発現する*fruitless* 遺伝子には、異なるDNA結合ドメイン(zinc finger domain)をもつ7つのアイソフォ

ームが確認できたが、いずれのアイソフォームの mRNA 発現量にも顕著に性にバイアスの掛かった差異が観察されなかった。これらの結果は、コオロギ脳で発現する *fruitless* 遺伝子に性特異性がないことを示している。コオロギ *Fruitless* タンパク質に対する特異的抗体をもちいた脳内 *fruitless* 発現細胞の分布の調査からも同様の結論が得られたことから、少なくともコオロギでは *fruitless* 遺伝子は脳・神経回路の性決定に関与しないという結論を得た。

では、この結論はコオロギ以外の原始的な昆虫にも当てはまるものなのだろうか？それともコオロギにおいて *fruitless* 遺伝子の機能が変化したのだろうか？様々な昆虫を対象とした *fruitless* 遺伝子の構造解析により、バッタやゴキブリ、トンボなどの原始的な不完全変態昆虫は P1 プロモーターを持たないことが明らかとなった。その一方、ショウジョウバエやハチを含む完全変態昆虫と、その姉妹群である準新翅上目（セミ、カメムシなどの不完全変態昆虫）では P1 様プロモーターが存在することが明らかとなった。準新翅上目において P1 様プロモーターが *fruitless* 遺伝子の性特異的遺伝子産物の発現に寄与するかはまだ明らかにできていないが、昆虫が進化の過程で *fruitless* 遺伝子を中心とした新奇な性決定機構を獲得した進化的シナリオが明らかとなった。

### *doublesex* 遺伝子に関する解析 (図 1)

キロショウジョウバエでは、*doublesex* 遺伝子は性特異的スプライシングカスケードの下流で、異なる C-末端配列を持つ性特異的 Doublesex タンパク質 ( $Dsx^M$  および  $Dsx^F$ ) が生じることが明らかになっている。コオロギ脳内で発現する *doublesex* 遺伝子についても、オスで優先的に発現する  $dsx^M$  アイソフォーム、メスで特異的に発現する  $dsx^F$  アイソフォームが確認できたほか、両方の性で発現する  $dsx^{com}$  アイソフォームが存在することが明らかになった (図 1 A, B)。コオロギの  $dsx^M$  アイソフォームはショウジョウバエの  $Dsx^M$  タンパク質に類似した C-末端配列を持つタンパク質をコードしていたが、コオロギの  $dsx^F$  アイソフォームはショウジョウバエや他の完全変態昆虫の  $Dsx^F$  タンパク質の C-末端配列とは配列保存性のないアイソフォーム特異的領域を有するタンパク質をコードしていた。完全変態昆虫の  $Dsx^F$  タンパク質の C-末端配列は、転写因子コファクターである Intersex タンパク質との相互作用の場として機能する。コオロギの Intersex タンパク質は完全変態昆虫のものと同様に配列保存性が極めて高いことから、コオロギの  $Dsx^F$  アイソフォームは、Intersex タンパク質とは相互作用しないことが予想された。

さらに、上記のメス型 *doublesex* アイソフォームの構造的差異は、*doublesex* 遺伝子構造の差異により生じることが明らかになった。すなわち、ショウジョウバエを含む完全変態昆虫の *doublesex* 遺伝子は、共通領域の下流にメス特異的エクソンが配置し、その下流にオス特異的エクソンが続く。一方、コオロギの *doublesex* 遺伝子では、図 1 A に示す通り、共通領域の下流にオス特異的エクソンが配置し、その下流にメス特異的エクソンが続く。このことはメス特異的アイソフォームが生じるスプライシング機構自体に、完全変態昆虫とコオロギとで差異があることを示している。

そもそもコオロギにおいて性特異的アイソフォームが生じない *fruitless* 遺伝子とは異なり、コオロギの *doublesex* 遺伝子には性特異的アイソフォームが存在し、それゆえにショウジョウバエと同様にコオロギにおいても脳・神経回路の性決定に寄与すると考えられるが、性特異的アイソフォームの生じ方には大きな違いがあることが明らかとなった。*doublesex* 遺伝子の属する DMRT ファミリー遺伝子は、動物の性決定においてオス化因子として機能することが知られている。ショウジョウバエにおいては、*doublesex* 遺伝子の性特異的遺伝子産物がオス化・メス化因子として機能することがわかっているが、コオロギにおいてメス特異的アイソフォームの生じ方が異なり、メス特異的アイソフォームの C-末端配列が転写調節機能を持たない可能性が示唆されたことから、コオロギにおいて *doublesex* 遺伝子は主にオス化因子として機能する可能性が考えられた。

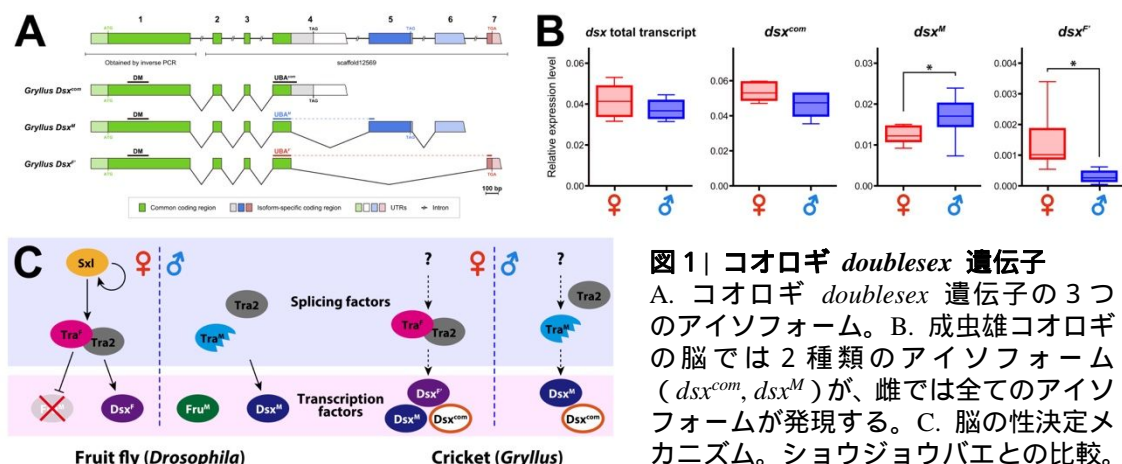


図 1 | コオロギ *doublesex* 遺伝子

A. コオロギ *doublesex* 遺伝子の 3 つのアイソフォーム。B. 成虫雄コオロギの脳では 2 種類のアイソフォーム ( $dsx^{com}$ ,  $dsx^M$ ) が、雌では全てのアイソフォームが発現する。C. 脳の性決定メカニズム。ショウジョウバエとの比較。

## (2)コオロギ脳における性的二型神経回路の可視化とその発生学的解析

上記の研究により、コオロギ脳では *doublesex* 遺伝子を発現する神経細胞に形態学的性的二型が存在することが示唆されたことから、*Doublesex* 発現細胞の標識と脳内分布の調査のため、抗コオロギ *Doublesex* 抗体を用いた免疫組織化学法による *doublesex* 発現細胞の検出と、*doublesex* 発現細胞で蛍光タンパク質遺伝子を発現する遺伝子導入コオロギの作成を進めた。

抗コオロギ *Doublesex* 抗体については、すべての *Doublesex* アイソフォームを認識する抗体と、3つのアイソフォームを特異的に認識する抗体を作成した。抗原には N-末端に GST tag を結合したりコンビナントタンパク質をもちいた (*Dsx<sup>com</sup>* アイソフォームについては抗ペプチド抗体を作成した)。しかし残念なことに、免疫組織化学法や Western blot 法による解析の結果、いずれの抗体も脳内で発現する *Doublesex* タンパク質を検出することができなかった。その理由としては、*Doublesex* タンパク質の脳内発現量が想定以上に低いことなどが考えられる。抗コオロギ *Doublesex* 抗体の作成と *Doublesex* タンパク質の検出については、引き続き条件検討を続ける必要がある。

*doublesex* 発現細胞で蛍光タンパク質遺伝子を発現する遺伝子導入コオロギの作成のため、CRISPR/Cas9 system を利用した Gene Trap 系統の作成を進めた。まず、コオロギにおける CRISPR/Cas9 system の効率の評価を行なった。コオロギ受精卵に Cas9 タンパク質と *doublesex* 遺伝子のイントロン領域を標的とした gRNA を顕微量注入したところ、胚発生を進めた胚のおよそ 8割で insertion/deletion が生じた。次に、Cas9 タンパク質、gRNA とともに Gene Trap vector をコオロギ受精卵に顕微量注入し、Gene Trap 系統を樹立することを試みた。しかし、この実験を行なっている間に、本研究室で維持しているコオロギ個体群に致死性のウイルスが蔓延し実験の継続が困難な状況となってしまった。飼育設備や受精卵の消毒などの処置により、現在はウイルス感染が沈静化しており、Gene Trap 系統の樹立について再度検討を進めている。

## (3)最初期遺伝子プロモーターを利用したコオロギ脳全脳活動マッピング法の確立 (図 2)

コオロギ脳に存在する性的二型神経回路が制御すると予想される闘争行動や配偶行動などの性特異的行動は、複数個体間の相互作用、すなわち社会行動であり、特定の性的二型神経回路が特定の性特異的行動に関与するか否かを検討するには、従来の細胞内記録法やカルシウムイメージング法などの神経生理学的手法を適用することは困難である。そこで、本研究では特定の行動を遂行した後にその行動遂行時に賦活化した神経細胞を検出可能な、新奇な全脳活動マッピング法の確立を進めた。

神経細胞が賦活化すると、細胞内シグナル伝達系の下流で CREB などの刺激活性化型転写因子群が活性化し、最初期遺伝子 (IEG) と呼ばれる遺伝子群の発現を誘導する。IEG の発現を検出することで、特定の行動と関連する脳領域を探索する方法は、主に脊椎動物神経系を対象とした研究で広く用いられている。本研究では、コオロギ脳で発現する IEG を特定し、その転写調節領域の下流でレポーター遺伝子を発現する遺伝子導入コオロギを作成することで、簡便に活動マッピングが可能なレポーター系を構築した。

まず、GABA<sub>A</sub> 受容体の阻害剤である Picrotoxin を投与することでコオロギ脳の活動を強制的に賦活化し、最初期遺伝子を探索したところ、コオロギ脳内で *egr-B* 遺伝子が刺激後 60 分までに発現量を増大させることが明らかとなった。*egr-B* 遺伝子の転写調節領域は、昆虫種間で高い配列保存性を示し、*egr-B* 遺伝子の転写調節領域の下流に核移行型不安定化黄色蛍光タンパク質遺伝子をつないだレポーターコンストラクトを遺伝子導入したコオロギでは、Picrotoxin 投与により脳を構成するほぼすべての神経細胞でレポータータンパク質の発現誘導が確認された。さらに、砂糖水の摂食により、味覚中枢の食道下神経節において砂糖水に応答すると考えられるオクトパミン作動性 DUM ニューロン群におけるレポータータンパク質の発現誘導が確認された。これらの結果から、コオロギにおいて 1細胞レベルの解像度を持つ全脳活動マッピングが可能なレポーター系統が樹立できたと判断した。作成したレポーター系統を用いて、現在、闘争行動や配偶行動などの性特異的行動に関与する神経回路の同定を進めている。

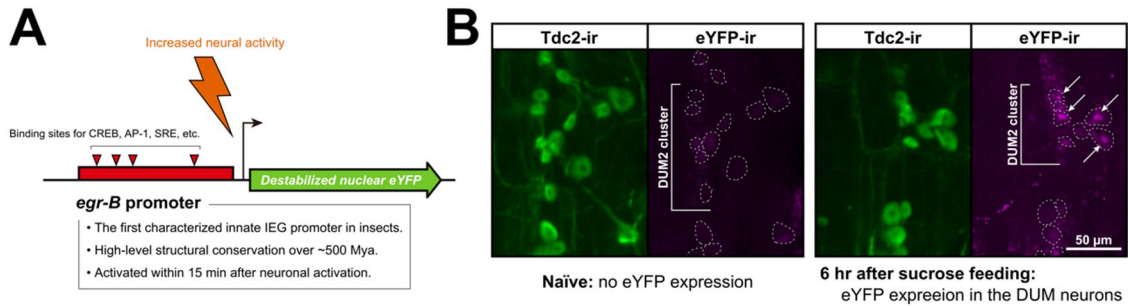


図2 | 1細胞レベルの解像度をもつ脳機能マッピング法の開発

A. *egr-B* 遺伝子のプロモーターを利用したレポーター遺伝子の概略。この人工遺伝子をゲノムに組み込んだ。発現した eYFP タンパク質は細胞核に局在する。B. ショ糖溶液の摂食に依存してレポータータンパク質が発現する神経細胞を白矢印で示す。1細胞レベルの解像度で脳機能マッピングが可能なが実証できた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) **T. Watanabe**, (2019). Evolution of the neural sex-determination system in insects: does *fruitless* homolog regulate neural sexual dimorphism in basal insects? *Insect Mol Biol.* in press. DOI: <https://doi.org/10.1111/imb.12590> 【査読あり】
- (2) **T. Watanabe**, A. Ugajin, H. Aonuma. (2018). Immediate-early promoter-driven transgenic reporter system for neuroethological researches in a hemimetabolous insect. *eNeuro*. 5:e0061-18.2018. DOI: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0061-18.2018> 【査読あり】

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) **渡邊崇之**  
昆虫性分化機構の進化を探る: *fruitless* 遺伝子は原始的な昆虫で脳の性分化に関わるか?  
日本動物学会北海道支部第 63 回大会、2019 年 3 月 23 日
- (2) **渡邊崇之**、水波誠  
昆虫脳性決定機構の進化を探る~*doublesex* 遺伝子はコオロギ脳の性を決めるのか?  
日本動物学会第 89 回大会、2018 年 9 月 14 日
- (3) **Takayuki Watanabe**, Atsushi Ugajin, Hitoshi Aonuma  
Whole-brain activity mapping using the immediate-early promoter-driven reporter system in the cricket  
Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting、2017 年 11 月 15 日
- (4) **渡邊 崇之**、宇賀神 篤、青沼 仁志  
初期応答遺伝子プロモーターを利用したコオロギ脳機能マッピング  
日本動物学会第 88 回大会、2017 年 9 月 21 日
- (5) **渡邊 崇之**、宇賀神 篤、青沼 仁志  
最初期遺伝子プロモーターを利用したコオロギ脳機能マッピング法の確立  
日本動物学会北海道支部第 62 回大会、2017 年 8 月 26 日
- (6) **Takayuki Watanabe**, Atsushi Ugajin, Hitoshi Aonuma  
Whole-brain activity mapping for neuroethological study in the cricket  
The 8th International Symposium on Adaptive Motion of Animals and Machines (AMAM2017) 、  
2017 年 6 月 29 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。