

平成21年 4月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18570065
 研究課題名（和文）ショウジョウバエ微小脳における性的二型神経回路網とその機能の解明
 研究課題名（英文）Function of sexually dimorphic neural circuitry
 in the *Drosophila* microbrain
 研究代表者
 木村 賢一（Kimura Ken-ichi）
 北海道教育大学・教育学部・教授
 研究者番号：80214873

研究成果の概要：

ショウジョウバエ成虫の脳には、雌雄で構造的な違いがあることが示され、雄にしかない P1 ニューロン群が雄の性行動の開始に重要なはたらきを持っていることがわかった。さらに、この P1 ニューロン群は、性を決定する二つの因子フルートレスとダブルセックスというタンパク質が協調して働くことで形成され、その結果、雄と雌で異なる脳の神経回路を作り出され、雄と雌の行動の違いが保証されていることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：昆虫、行動学、脳・神経、遺伝子、ショウジョウバエ、性行動、性決定

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む多くの動物において、行動パターンに雌雄差が見られることが知られている。行動パターンにおける性差を生み出す基盤は、脳の神経回路網にあると考えられる。果たして中枢神経回路網には機能的な性差に加え、構造的な性差が存在するのだろうか。また、もし存在するとすれば、それらが行動パターンにおける性差をどのように作りだしているのだろうか。さらに、構造上の性差は発生過程においてどのように形成されてくるのだろうか。これらの点に関しては、多くが謎のまま残されている。

ショウジョウバエでは、転写調節因子 Fruitless が、神経系の性決定に関与していると考えられている。確かに、Fruitless タンパクは、雄の脳の特定の神経細胞群で発現するが、雌では発現しない。また、fruitless (*fru*) 突然変異は雄の性行動に異常を引き起こすことから、Fruitless を発現する神経細胞群は、雄の交尾行動を制御する神経回路網に関わっていると考えられている。しかし、Fruitless タンパク発現神経細胞がどのような神経回路網を形成し、果たしてそれらが性行動に関与しているのかについては、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ微小脳の高次中枢神経回路網に注目し、構造上の性差の存在を明らかにし、性行動における機能を解明することを目的とする。そこで本研究では、Fru タンパク発現神経細胞の形態および中枢内投射領域を網羅的に調査し、その入出力関係について解析することで、Fru タンパク発現神経細胞が構成する神経回路網を明らかにする。さらに、それらの神経回路網が性行動パターンにどのように関わっているか、その機能を明らかにする。

3. 研究の方法

Fruitless (Fru) 発現神経細胞群で Gal4 を発現する系統として、すでに申請者より同定された *fru*^{NP21} 系統を用いる。マーカー遺伝子 (GFP) や性決定遺伝子などの遺伝子強制発現には、Gal4/UAS システムを利用する。

(1) Fru発現神経細胞群の形態調査と中枢投射領域の特定

fru^{NP21} (Fru) 発現神経細胞の特定のsubsetをGFPラベルするため、ショウジョウバエ MA RCM法を利用する。ニューロblastの分裂の早い時期に体細胞組換えを誘導し、クローンがクラスターでラベルされるようにする。抗 GFP 抗体とneuropile特異抗体を用いた二重蛍光染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元構築し、特定のクラスターの神経細胞群が脳のどの領域に投射しているか調査する。さらに、約400対あるFruitless発現神経細胞が、細胞系譜からいくつのクラスターに分かれるか明らかにする。これにより網羅的にFru発現神経細胞群の形態と投射パターンを調査し、雌雄で比較することで性的二型を示す神経群を同定する。

上記により同定された性的二型神経細胞について、中枢投射領域のどこに入力部位があり、どこが出力部位となっているか明らかにする。そのため、前シナプス領域に蓄積されるシナプトタグミンをヘマグルチニン (HA) で標識したタンパクを、性的二型神経細胞群に強制発現させ、HAの蓄積部位を抗体染色により調査する。投射領域のうちHA標識シナプトタグミンの蓄積がある部域が出力部位であり、蓄積がない部域が入力部位であると特定できる。これらの形態学的な解析から、Fru発現神経細胞からなる神経回路網の脳地図を作製し、性的二型回路網をまとめる。

(2) 性行動におけるFru発現神経細胞群の機能の解析

ショウジョウバエ雄の性行動は、定型的な

一連の行動パターンよりなる。雄は、雌に対して1) 定位し、2) タッピングにより雌を認識し、3) 追跡および翅によるラブソングを歌い、4) リッキングにより雌の交尾器をなめ、その後5) 交尾試行、6) 交尾成立となる。同定されたFru発現神経細胞群が、ショウジョウバエ雄の性行動にどのような役割を持っているか、脳の雌雄モザイク個体を作成し解析する。ショウジョウバエにおいて、MARCM法を利用することで、Gal4を発現する細胞の一部だけに突然変異を誘導する方法が開発されている。この方法を適用し、雌の脳の一部のニューロン群に*transformer (tra)*突然変異を誘導し雄化させる。そうして作成されたモザイク個体の性行動を調査し、どのFru発現ニューロン群が雄化すると雄型の性行動が誘導されるかを解析する。

(3) 性行動開始Fru発現神経細胞群の形成に関わる性決定因子の役割の解析

性行動を司令するニューロン群を同定することができたら、それらが性決定因子によりどのように形成されるか調査する。*fruitless*突然変異体や*doublesex (dsx)*突然変異体において、性行動開始Fru発現神経細胞群の形成がどのように変化するか解析する。

4. 研究成果

(1) *fru*^{NP21} 系統を用いた Fru 発現神経細胞群の同定

fru^{NP21} 系統は、*fru* 遺伝子の第2イントロンに *gal4* が挿入された系統である。*fru*^{NP21} 系統における Gal4 タンパクの発現と、その細胞の核での Fru タンパクの発現がどの程度一致しているかを調査するため、Gal4 タンパクの発現を GFP でモニターし、Fru タンパクの発現との重なりを調べた。その結果、GFPを発現している細胞の約8割でFruタンパクを発現していることがわかった。このように、*fru*^{NP21} 系統は *fru* 遺伝子の発現パターンを非常によく反映していると考えられる。

fru 発現神経細胞群を網羅的に同定するために、*y hs-flp ; UAS-mCD8-GFP ; fru*^{NP21}/*TM6b* 系統を用い、Lee (2000) からの Fru タンパク発現細胞の分類をもとに、さらに詳しく分類した。細胞体から伸びる神経束走行から、同じ走行を示す細胞群を一つのクラスターと

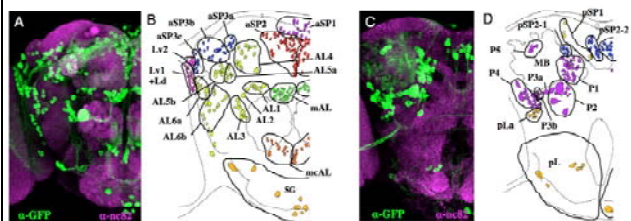


図1 *fru* 発現ニューロン群の同定

して扱い、それぞれを Lee らによる分類からさらにサブタイプとして分類し、命名した (図 1)。また、MARCM 法を用いて *fru*^{NP21} 発現神経細胞群の一部のニューロンだけをラベルし、各クラスターの投射パターンを明らかにした。

fru 発現神経細胞群を網羅的に同定し、雌雄で比較したところ、雌雄差には 2 つのタイプが存在することが示された。1 つは雌雄に存在するが、細胞体の数が異なる神経細胞群である (図 2)。このタイプのものには aSP2、mAL と mcAL がある。そのうち、aSP2 と mAL については投射パターンが雌雄で異なっていることがわかった。もう 1 つのタイプは、雄にのみ存在する神経細胞群である (図 3)。M と P1 がこのタイプに属する。

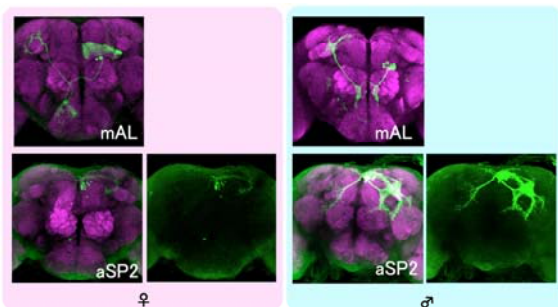


図 2 性的二型ニューロン群

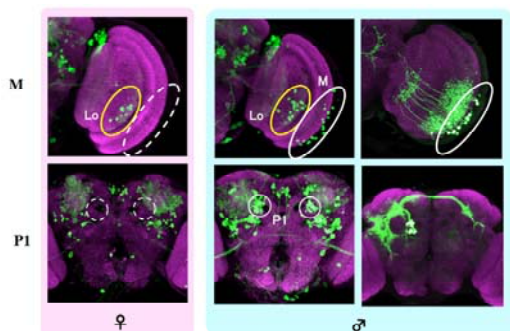


図 3 雄特異的ニューロン群

(2) 雄交尾行動を引き起こすニューロン群の同定

Fru 発現ニューロン群における雌雄モザイクの作成のために *tra* 突然変異を利用した。*tra* 突然変異により Tra タンパクが形成されないと、細胞は雄化する。

ショウジョウバエにおいて、MARCM 法を利用することで、細胞系譜の一部の細胞群に突然変異を誘導し、細胞の一部に Gal4 を発現するモザイク個体を作成する方法が開発されている。この方法を用い、特定の *Fru* 発現ニューロン群だけが *tra* 突然変異になったモザイク個体を作成し、雌の脳の一部を雄化することができた。

もし脳の一部のクラスターが交尾行動の開始を司令しているとすれば、脳の一部が雄化した *tra* モザイク個体の雌も雄型の交尾行動を開始するかも知れない。そこで、この *tra* モザイク個体の処女雌 1 匹と、野生型雌 1 匹を一緒のチェンバーにいれ、毎日 30 分間 3 日間にわたり交尾行動を観察した。その結果、205 匹の *tra* モザイク雌を観察したところ、16 匹が確かに雄の交尾行動を開始した (図 2)。しかし、その交尾活動は追尾と翅の伸展にとどまり、決してそれ以降の交尾行動は発現しなかった。これら雄の交尾行動を始めた個体と交尾行動をしなかった個体の脳を取り出し、どこのニューロンが GFP でラベルされているか、免疫組織化学染色により確認し、雄化していたニューロン群を同定した。その結果、雄の交尾行動を開始した個体の 8 割の脳で、共通して P1 ニューロン群が雄化していた (図 4 左)。P1 ニューロン群は、雄特異的に存在し、*Fru* を発現する約 20 個の神経細胞からなるニューロン群だった (図 4 右)。



図 4 *tra* モザイク雌における交尾行動 (左) と交尾を開始した *tra* モザイク雌の脳 (右)

この P1 ニューロン群について、中枢投射領域のどこに入力部位があり、どこが出力部位となっているか明らかにするため、前シナプス領域に蓄積されるシナプトタグミンをヘマグルチニン (HA) で標識したタンパクを性的二型神経細胞群に強制発現させ、HA の蓄積部位を抗体染色することにより調査した。その結果、P1 ニューロン群は、細胞体から脳前方に向かって primary neurite を伸ばし、両側性に投射する介在ニューロンであった (図 5)。キノコ体 pedunculus の上方から側方にかけて、両側とも同じように投射し、そ

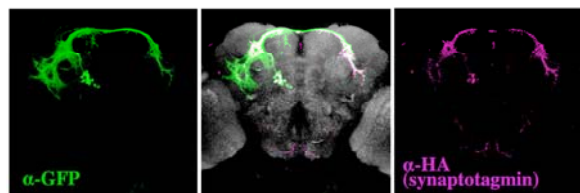


図 5 P1 ニューロン群の投射領域

の領域に出力部位がある。一方、入力部位は同側のキノコ体 pedunculus の下方から前方の ventral lobe まで広がる。両側を結ぶ神経繊維は、superior medial protocerebrum の上部を通り、そこでも出力が見られた。

(3) 雄特異的な P1 ニューロン群の形成と細胞死

P1 ニューロン群の雄特異的な形成に、細胞死が関与するか調査した。第3染色体に3つの細胞死誘導遺伝子(*hid grim rpr*)が並んで存在する。*Df(3L)H99* 欠失突然変異は、この3つの遺伝子を全て欠く。そこで、*Df(3L)H99* をホモでもつようなモザイククローンを MARCM 法で作成した。その結果、雌の脳において細胞死を抑制すると、本来存在しない P1 ニューロン群がラベルされるようになった(図6)。このことは、雌の脳においては細胞死により P1 ニューロン群が発生過程で除去されていることを示している。

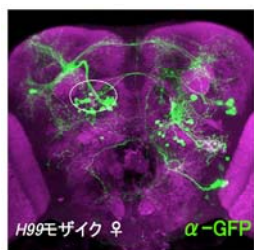


図6 細胞死抑制突然変異による P1 ニューロン群の形成

(4) 雄特異的な P1 ニューロン群の形成と性決定遺伝子

P1 ニューロン群の形成に雌特異的な細胞死が関与していることが明らかになった。そこで、この性特異的な細胞死が性決定遺伝子によりどのように制御されているのか解析した(図7)。

① *tra* 遺伝子と P1 ニューロン群形成

tra 遺伝子が P1 ニューロン群に与える影響を明らかにするために、*tra* 突然変異体において P1 ニューロン群が形成されるか調査した。*tra* 突然変異体では雄だけでなく雌にも細胞体が存在した。このように *tra* 遺伝子の作用のもと、P1 ニューロン群が形成されることが確認された。

② *fru* 遺伝子と P1 ニューロン群形成

tra 遺伝子の下流で働く *fru* 遺伝子に注目し、*fru* 突然変異が P1 ニューロン群に与える影響を調査した。*fru^{NP21}/fru^{sat}* 個体の雄は、Fru タンパクを消失する。この雄においても P1 ニューロン群は存在し、雌では存在しなかった。

また、*fru^{NP21}/fru^M* 個体では雌において Fru タンパクが強制発現しているにもかかわらず、P1 ニューロンは存在しなかった。雄においては野生型と同様に P1 ニューロン群は存在していた。このように Fru タンパクの存在は、P1 ニューロン群の形成自身には影響しなかった。

③ *dsx* 遺伝子と P1 ニューロン群形成

上述のように確かに *tra* 突然変異体においては、雌でも P1 は形成される。そこで、*tra* 遺伝子の下流で働くもう一つの遺伝子 *dsx* の関与を調査した。Dsx タンパクは、雌雄で異なるアイソフォーム(雄型: DsxM および雌型: DsxF) が形成されることが知られている。DsxM および DsxF をどちらも欠く突然変異体(*dsx⁻*)では、雌において P1 の形成が見られた。また雌において、DsxM が作用しても DsxF の作用がなければ(*dsx⁻/dsx^P*) P1 は形成され、DsxF が作用すれば(*dsx⁺/dsx^P*) P1 は形成されない。このように DsxF タンパクが存在する場合、P1 ニューロンが形成されなくなることが明らかになった。これらのことから、雌においては DsxF が発現することによって P1 神経細胞群が細胞死を起こしているものと考えられる。

確かに、P1 ニューロンが Dsx を発現しているかどうか、anti-DsxM 抗体で染色し、観察した。その結果、脳の後部領域では2つのニューロン群で DsxM を発現しており、そのうちひとつのクラスターの一部が P1 ニューロン群であった。

④ *fru* 遺伝子が P1 ニューロン群の投射パターン

	XY				XX			
	Fru	Dsx M	Dsx F	P1 neurons	Fru	Dsx M	Dsx F	P1 neurons
<i>Wild-type</i>	+	+	-		-	-	+	
<i>tra⁻</i>	+	+	-		+	+	-	
<i>fru⁻</i>	-	+	-		-	-	+	
<i>fru^M</i>	+	+	-		+	-	+	
<i>dsx⁻</i>	+	-	-		-	-	-	
<i>dsx⁻/dsx^P</i>	+	+	-		-	+	-	
<i>dsx⁺/dsx^P</i>	+	+	-		-	+	+	

図7 P1 ニューロン群の形成と *fru*, *dsx* 遺伝子

ンへ及ぼす影響の調査

Fru タンパクは、P1 ニューロン群において確かに発現しているが、その形成の初期の細胞死により除去されるかどうかに関しては関与していない。それでは、Fru はどのような役割を持っているのだろうか。fru 突然変異体において P1 ニューロンがどのような投射パターンを示すかを調査した。P1 ニューロンの反対側末端部の投射パターンを比較したところ、野生型雄個体では、一部の神経束が lateral 側へと伸び、その他の多くの神経束は ventral 側へと伸張し、二股に分かれている。fru^{NP21}/fru^{sat} モザイク突然変異体雄の P1 ニューロンの反対側末端部では、野生型よりも多くの神経束が lateral 側に伸張してしまっていた。さらに、そこから ventral 側へと伸張し、野生型には見られない異常な投射がみられた。また、lateral 側へと伸張しなかったわずかな神経束は ventral 側へと投射し、異常なパターンとなることが示された。このように、Fru タンパクは P1 ニューロンの投射パターンの形成に重要な役割を持っていることが明らかになった。

本研究により、脳の性差形成には細胞死が関与し、二つの性決定因子が協調してはたらくことで制御されていることを明らかにした。これらの因子は、いずれも転写調節因子である。今後は、これら因子により制御される下位の遺伝子群がどのようなネットワークを形成し、脳の性差を生み出しているのが課題となる。また、本研究により雄の交尾行動を開始するために働くニューロン群を同定することができた。そのニューロン群はどのニューロン群からどのような情報を受け、さらにどのニューロン群は出力しているのか、神経回路網を特定していく必要がある。また、本研究で明らかになった様々な fru 遺伝子発現ニューロン群がどのような回路網を形成し、それぞれが性差を示す行動のどの要素を制御しているか、今後の課題として残されている。

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 6 件)

1. Koganezawa, M., Matsuo, T., Kimura, K.-I. and Yamamoto, D. (印刷中) The shaping of *Drosophila* male courtship posture by a gustatory pheromone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 査読有り
2. Kimura, K.-I., Hachiya, T., Koganezawa, M., Tazawa, T. and Yamamoto, D. (2008) Fruitless and Doublesex coordinate to generate male-specific neurons that can

initiate courtship. *Neuron* 59, 759-768, 査読有り

3. Hari, P., Deshpande, M., Sharma, N., Rajadhyaksha, N., Ramkumar, N., Kimura, K.-I., Rodrigues, V., Tole, S. (2008) Chip is required for post eclosion behavior in *Drosophila*. *J. Neuroscience* 28, 9145-9150, 査読有り
4. Endo, K., Aoki, T., Yoda, Y., Kimura K.-I. and Hama C. (2007) Notch signal organizes the *Drosophila* olfactory circuitry by diversifying the sensory neuronal lineages. *Nature Neuroscience* 10, 153-160, 査読有り
5. 木村賢一 (2007) 細胞死制御による脳の性差形成 *バイオニクス* 28 号 40-43, 査読なし
6. 木村賢一 (2006) ショウジョウバエの脳の性差は1つの遺伝子で支配されている *化学と生物* 44 巻 6 号 357-359, 査読なし

[学会発表] (計 23 件)

1. 木村賢一、ショウジョウバエ脳の性差形成と性行動制御、日本遺伝学会第 80 回大会 2008 年 9 月 3-5 日 (名古屋大学)
2. 木村賢一、細胞死抑制により生き残ったショウジョウバエ雄特異神経群は雌に交尾を誘導できるか、日本動物学会第 79 回大会 2008 年 9 月 5-7 日 (福岡大学)
3. 木村賢一、ショウジョウバエ脳の性差形成と細胞死、第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会 2008 年 8 月 1-2 日 (メルパルク京都)
4. 木村賢一、ショウジョウバエ成虫脳の雄特異的ニューロン群の形成機構、日本比較生理生化学会大 30 回大会 2008 年 7 月 19-21 日 (北海道大学)
5. 木村賢一、ショウジョウバエ性決定因子 Fruitless と Doublesex による脳の性差形成、日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008 年 5 月 26-27 日 (京王プラザホテル札幌)
6. Azusa Fujimoto, Before and after: remodeling of neuronal dendritic arbors in the *Drosophila* peripheral nervous system, 日本発生物学会第 41 回大会 2008 年 5 月 28-30 日 (徳島県郷土文化会館)
7. 木村賢一、キイロショウジョウバエ中枢神経系における性的二型神経回路網、第 30 回日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 11-15 日 (パシフィコ横浜)
8. 蜂谷友祥、キイロショウジョウバエ成虫脳における雄交尾行動制御ニューロン群の同定とその形成機構、第 30 回日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 11-15 日 (パシフィコ横浜)
9. Ken-ichi Kimura, Formation of sexually

dimorphic neural circuitry and its function in courtship behavior of *Drosophila melanogaster*, NIBS Seminar 2007年10月12日 (National Institute of Biological Sciences, Beijing)

- 1 0. 木村賢一、キイロショウジョウバエ fru 発現/性的二型ニューロン群の中樞投射パターン解析、日本動物学会第78回大会 2007年9月20-22日 (弘前大学)
- 1 1. Yamamoto, D., THE FRUITLESS GENE FUNCTIONS AS A NEURAL MASCULINIZATION FACTOR THAT PRODUCES CELLULAR AND BEHAVIORAL SEXUAL DIMORPHISM IN *DROSOPHILA*., Twentieth European *Drosophila* Research Conference 2007年9月12-13日 (Vienna, Austria)
- 1 2. 木村賢一、ショウジョウバエ生殖器形成過程における雄特異的プログラム細胞死、第16回日本アポトーシス研究会学術集会 2007年8月3-4日 (東邦大学)
- 1 3. 木村賢一、ショウジョウバエ Fru 発現神経細胞群の中樞投射パターンと機能解析、日本比較生理生化学会第29回大会 2007年7月6-8日 (岡山大学)
- 1 4. Ken-ichi Kimura, Projection Pattern of Fruitless- expressing Neurons and their Function in Courtship Behavior of *Drosophila*, ショウジョウバエ研究会 第8回研究集会 2007年7月2-4日 (淡路夢舞台国際会議場)
- 1 5. 木村賢一、ショウジョウバエ *fruitless* 遺伝子による脳の性差形成と性行動制御、第21回ショウジョウバエ遺伝資源センター公開セミナー 2007年3月6日 (京都工芸繊維大学)
- 1 6. 木村賢一、神経回路の発生を介した性行動の制御、日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006年12月6-8日 (名古屋国際会議場)
- 1 7. 蜂谷友祥、キイロショウジョウバエ成虫脳における性的二型神経回路網、日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006年12月6-8日 (名古屋国際会議場)
- 1 8. 田澤辰典、ショウジョウバエ成虫脳における雄交尾行動制御ニューロン群の同定、日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006年12月6-8日 (名古屋国際会議場)
- 1 9. 木村賢一、ショウジョウバエ Fruitless は細胞死を通して成虫脳に性差をつくる、日本動物学会第77回大会 2006年9月21-24日 (島根大学)
- 2 0. 木村賢一、ショウジョウバエでは Fruitless 発現の有無が神経回路網に性差をつくる、日本比較生理生化学会第28回大会 2006年7月27-29日 (クリエート浜松)
- 2 1. 木村賢一、ショウジョウバエ成虫脳で

は Fruitless 発現の有無が神経回路網に性差をつくる、日本動物学会北海道支部第52回大会 2006年7月30日 (北海道大学)

- 2 2. 田澤辰典、ショウジョウバエにおける性指向性を決める神経回路の同定、日本動物学会北海道支部第52回大会 2006年7月30日 (北海道大学)
- 2 3. 蜂谷友祥、キイロショウジョウバエ成虫脳における Fruitless 発現ニューロン群の投射パターン解析、日本動物学会北海道支部第52回大会 2006年7月30日 (北海道大学)

[図書] (計 1件)

1. 木村賢一 (2008) 神経系の雌雄差形成 昆虫ミメティクスー昆虫の設計に学ぶー 第2編 1章 デザイン 第7節 (下澤楯夫、針山孝彦 監修) (株) NTS (東京), pp135-142

[その他]

研究成果の一部は、以下の新聞メディアを通じて報道された。

- 産経新聞 (2008年9月15日)
- 毎日新聞 (2008年10月15日)
- 朝日新聞 (2008年9月15日)
- 河北新報 (2008年9月11日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- 木村 賢一 (Kimura Ken-ichi)
- 北海道教育大学・教育学部・教授
- 研究者番号: 80214873

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者