

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700338

研究課題名（和文）

ショウジョウバエの求愛行動制御における Lola タンパク質の分子的多様性の役割

研究課題名（英文）

Molecular diversity and function of Longitudinals lacking transcription factors in regulating courtship behavior in *Drosophila*

研究代表者

佐藤 耕世 (SATO KOSEI)

東北大学・国際高等研究教育機構・助教

研究者番号：40451611

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエの *longitudinals lacking (lola)* 遺伝子は、遺伝子産物（BTB-Zn-finger 型の転写因子）を雌雄で異なる様式で脳神経系に産生し、この仕組みによって、ニューロンの構造的な性差が形成される。雄では、Lola は雄特異的な性決定因子 Fruitless (Fru) の転写共役因子として働き、ニューロンの投射様式を雄化する。Fru が産生されない雌では、Fru 非依存的にニューロンの投射様式を雌化する。このように、*lola* 遺伝子から産生される多様な転写因子の働きによって、脳神経系の性差が形成される。

研究成果の概要（英文）：

Our results suggest the *longitudinal lacking (lola)* gene, encoding putative transcription factors of the BTB-Zn-finger family, plays an essential role to generate the sexual differences in neuronal structures and behavior by producing sexually dimorphic transcription factors. In males, Lola acts as a transcriptional cofactor of Fru, the male-specific sex determination factor that masculinizes subsets of neurons that govern courtship behavior. In females, Lola controls female-specific neurite formation in a *fru*-independent manner. Collectively, *lola* might acquire its ability to orchestrate sexual development of the entire brain by producing hundreds of Lola isoforms each with potentially different target specificity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経科学一般

キーワード：行動神経科学、神経発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 一つの遺伝子から複数種類の遺伝子産物（RNA あるいはタンパク質）が産生される

現象はヒトを含む高等生物において普遍的に見られ、この仕組みによって、限られた数の遺伝子からそれを上回る多様な産物が産

生される。しかしながら、このような多様性の創出が生命活動にとってどのような役割を担うのか（あるいは遺伝情報の読み出しエラーでしかないのか）はほとんど解明されていない。

(2) ショウジョウバエの *longitudinals lacking (lola)* 遺伝子は、80 種類以上の mRNA から少なくとも 20 種類のタンパク質（転写因子）を産生する (Horiuchi *et al.*, 2003)。このうち 17 種類は構造の異なる DNA 結合ドメイン (Zn-finger ドメイン) をもつ (Goeke *et al.*, 2003) ことから、それぞれが異なる遺伝子の転写を制御しうる。また、Lola はタンパク質どうしの結合を仲介する BTB/POZ ドメイン (Bardwell *et al.*, 1994) を介して、Lola と共に、あるいはこのドメインをもつ Lola 以外のタンパク質と共に複合体を形成しうる。その組み合わせは莫大である。個々のアイソフォームの発現は組織特異的あるいは発生段階依存的に制御される (Goeke *et al.*, 2003) ことから、産生された場所でそれぞれに固有の機能を担う可能性がうかがえる。しかしながら、個々のアイソフォームがどのような機能を担うのかは具体的には解明されていない。

2. 研究の目的

(1) ショウジョウバエの *lola* 遺伝子が産生する多様なアイソフォーム（転写因子）が、生命活動にとってそれぞれどのような機能を担うのかを解明する。これによって、生物が限られた数の遺伝子を駆使して多様な遺伝子産物を産生する意義の解明を目指す。

(2) 研究を開始する前に行った予備実験によると、*lola* は蛹期においてニューロンの一群に産生されており、脳神経系の性決定遺伝子（雄化遺伝子）*fruitless (fru)*（図 2, 3; Kimura *et al.*, 2005）と表現型レベルで相互作用する（図 4; Sato, unpublished）。そこで本研究では、*lola* 遺伝子から産生される多様なアイソフォームが脳神経系の性決定という局面において何らかの機能をもつ可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗 Lola 抗体の作製（2 種）。

全てのアイソフォームに共通の定常領域（エクソン 7 にコードされたペプチド配列）を抗原とする抗体（ウサギ免疫、抗 Lola-COM 抗体）を作製した。この抗体はこれまでに既知のアイソフォーム全てを抗原として認識しうる。また、可変領域にある 25 個のエクソン（エクソン 8 から 32）のうち、エクソン 29 にコードされるペプチド配列を抗原とするアイソフォーム特異的な抗体（ウサギ免疫、

抗 Lola-exon-29 抗体）を作製した。これらが抗原（Lola タンパク質）を特異的に認識することをウエスタンブロッティングおよび免疫組織化学染色によって確認した。現在、可変領域にあるエクソンのうち、エクソン 29 以外にコードされたペプチド配列（それぞれに固有の 11 配列）に対しても特異的な抗体を作製中である。

(2) *UAS-RNAi* 系統の作製（15 種）。

全てのアイソフォームを機能阻害するため、定常領域にあるエクソン 7 をノックダウンの標的とするヘアピン型二本鎖 RNA（dsRNA）配列をデザインした。また、アイソフォームを個別に機能阻害するため、可変領域にある 25 個のエクソン（エクソン 8 から 32）に対して、ノックダウン効果をもつヘアピン型二本鎖 RNA（dsRNA）配列をデザインした。酵母由来の転写因子 GAL4 の結合配列である *UAS* 配列を含む形質転換ベクター（*VARIUM10* ベクター）に、デザインしたヘアピン型二本鎖 RNA 合成用 cDNA 配列をクローニングし、これまでに 15 種類の *UAS-lola-dsRNA* 形質転換ベクターを作製した。本ベクターを、*attP2* 部位特異的組み換えサイトをもつショウジョウバエ系統（Bloomington Stock Number: #8622）に形質転換し、*UAS-lola-dsRNA* 系統を作製した。この系統を用いて特定の脳細胞だけで dsRNA を発現させることが可能である。

4. 研究成果

(1) ***lola* 遺伝子は雌雄で異なるアイソフォームを脳神経系に産生する。** 蛹期の脳神経系から抽出した Lola タンパク質の一群を SDS-PAGE によってサイズごとに分離し、共通ドメインを認識する抗体（anti-Lola-COM 抗体）を用いて免疫染色した（図 6）。成虫期では発現様式の性差は見られなかったが、三齢幼虫期の末期（wandering third instar larval stage）および蛹期では、雌と雄で異なる様式でアイソフォームが産生される結果を得た。エクソン 29 にコードされるアイソフォームのみを抗原として認識する抗体（抗 Lola-exon29 抗体）を用いて免疫染色した（図 7）。85kD サイズの産物が雌の脳神経系でのみ産生されており、一方 120kD サイズの産物は雄の脳神経系で多く産生されていた。

(2) **産生されたアイソフォームの違いによって脳神経系の性的二型が形成される。** 投射パターンに顕著な性差を示す介在ニューロン（mAL クラスタ）においてエクソン 29 にコードされるアイソフォームのみをノックダウンした（図 8）。このエクソンから産生されるアイソフォームは発現様式に性差

がある。雌では投射様式が脱雌化（雌型から雄型へ性転換）し、雄に特徴的な同側樹状突起が形成された。一方、雄の mAL クラスターでは脱雌化が起こり、雌に特徴的な構造（二股に分岐した反対側樹状突起）が形成された。神経突起の形態が性転換したものと考えられる。

(3)雄では *Lola* は *Fru* の転写共役因子として働き、ニューロンの投射様式を雄化する。*Fru* は *Lola* と同じく、タンパク質どうしの結合を仲介する BTB ドメインをもつ。これらが複合体を形成して機能する可能性を共免疫沈降実験によって検討した (図 5)。HA で標識された *Fru* と共に *Lola* を複眼原基に発現させた。抗 HA 抗体による免疫沈降物の中に *Lola* が含まれることを anti-*Lola*-COM 抗体を用いて確認した。

(4)以上のように、*lola* 遺伝子から産生される多様な転写因子の働きによって脳神経系の性差が形成されることが解明された (図 9)。

(5)この発見をもとに、脳神経系の性を規定する新しい遺伝的なフレームワークが解明されることが期待される。

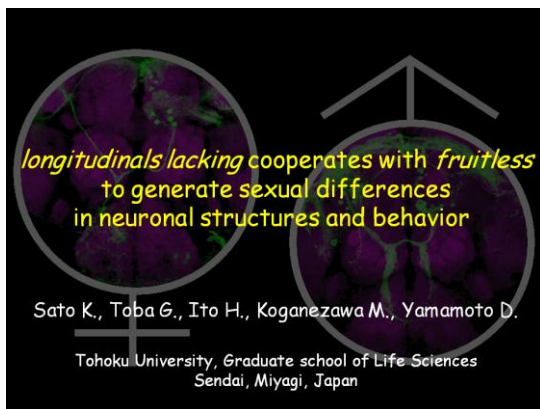


図 1

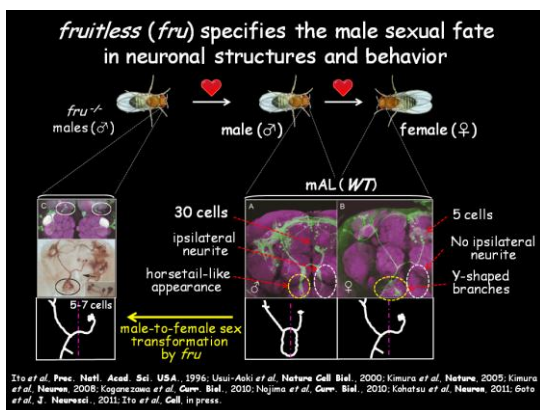


図 2

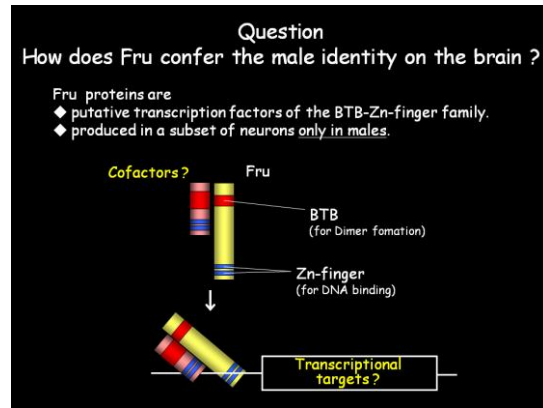


図 3

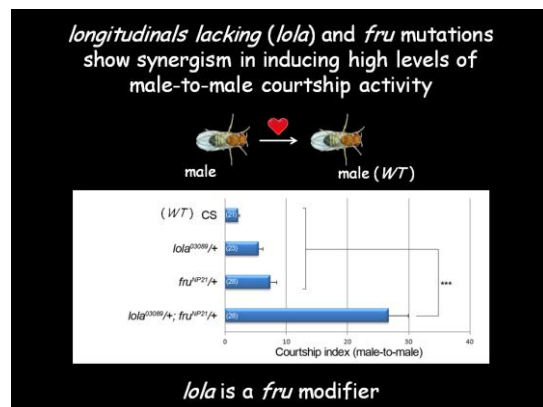


図 4

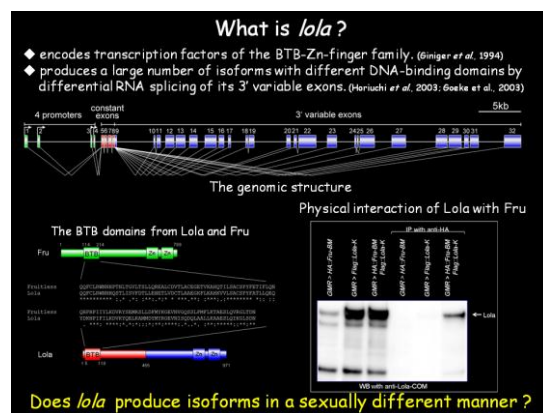


図 5

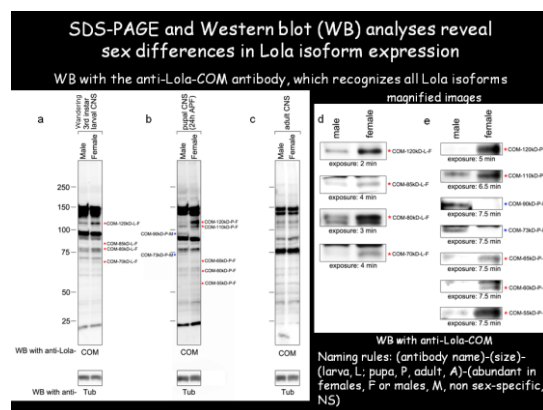
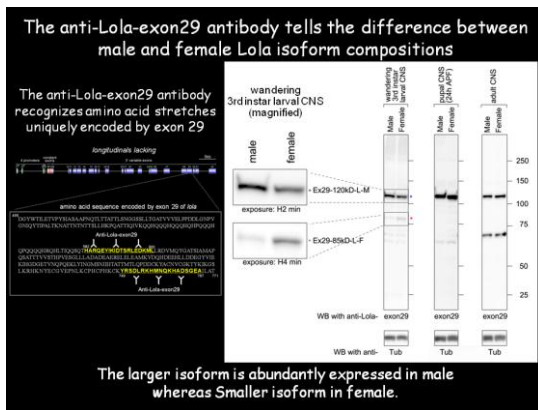
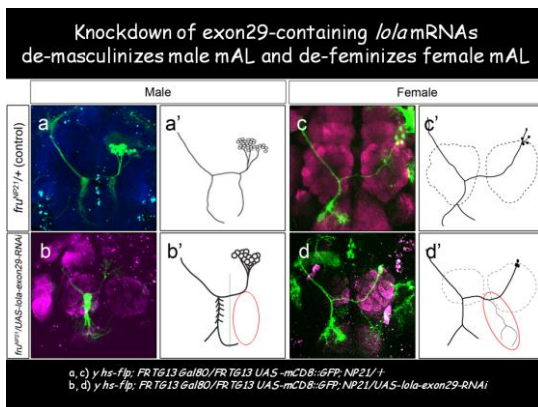


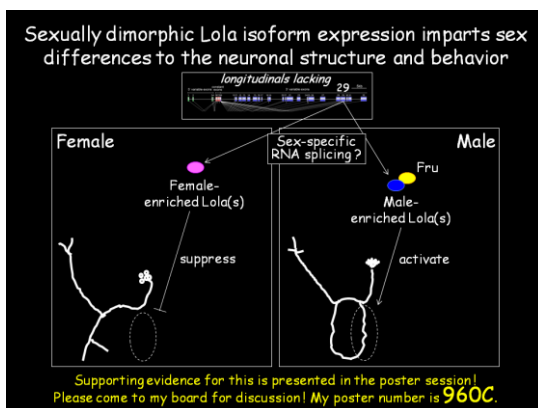
図 6



☒ 7



☒ 8



☒ 9

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2件)

- ① Ito H., Sato K., Koganezawa M., Ote M., Matsumoto K., Hama C., and Yamamoto D. Fruitless cooperates with two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron dimorphism. *Cell*, 2012, in press. 査読有

- ② Sato K., Seki R., Noro M., Yokoyama H., and Tamura K., Morphogenetic change of the limb bud in the hand plate formation., *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314B; 539-551, 2010. 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① Sato, K., Toba, G., Ito, H., Koganezawa, M. and Yamamoto, D., *longitudinals lacking* cooperates with *fruitless* to generate sexual differences in neuronal structures and behavior, "Everything you ever wanted to know about sex" workshop, Chicago, U.S.A., 10th March 2012
- ② Sato, K., Toba, G., Ito, H., Koganezawa, M. and Yamamoto, D., *longitudinals lacking* cooperates with *fruitless* to generate sexual differences in neuronal structures and behavior, 53rd Drosophila Annual Conference, Chicago, U.S.A., 8-9th March 2012
- ③ Sato, K., Toba, G., Ito, H., Koganezawa, M. and Yamamoto, D., *longitudinals lacking* cooperates with *fruitless* in generating sexual differences in neuronal structures and behavior., 東北脳科学ウィンタースクール, 2012年2月18日, 宮城県蔵王町
- ④ Sato, K., Toba, G., Koganezawa, M. and Yamamoto, D., *fruitless* and *longitudinals lacking* cooperate to generate the brain sexual differences that govern male courtship behavior in *Drosophila*., 第34回日本神経科学大会, 2011年9月16日, 横浜
- ⑤ Sato K., Koganezawa M., Toba G., Yamamoto D., *fruitless* and *longitudinal lacking* cooperate to generate the sexual difference of the brain and courtship behavior of *Drosophila*, 東北大学脳科学GCOE第31回若手フォーラム, 2010年12月22日, 東北大学
- ⑥ Sato K., Koganezawa M., Toba G., Yamamoto D., *fruitless* and *longitudinal lacking* cooperate to generate the sexual difference of the brain and courtship behavior of *Drosophila*, 第33回日本分子生物学会年会, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド
- ⑦ 佐藤耕世, Morphogenetic change of the limb bud in the hand plate formation, 東北大学脳科学GCOE第29回若手フォーラム, 2010年10月29日, 東北大学
- ⑧ 佐藤耕世, Sexually dimorphic

development of *fruitless*-expressing neurons requires *longitudinals lacking* function, RNA フロンティアミーティング 2010, 富士教育研修所, 2010年9月28日

- ⑨ Sato K., Yamamoto D. Genes, Neurons, Circuits underlying the reproductive behavior in *Drosophila*, The 8th International Symposium of Integrated Field Science, 18th September 2010, Sendai, Japan
- ⑩ 佐藤耕世, ショウジョウバエの求愛行動制御における Lola タンパク質の分子的多様性の役割, 第1回国際高等融合領域研究所セミナー, 2009年10月23日, 東北大学

[図書] (計2件)

- ① 佐藤耕世, 生得的な行動を生み出す脳と遺伝子のしくみ, 21世紀型学術の発信 - 国際舞台で活躍する若手研究者たちの実践活動 -, pp15-16, 2010
- ② 佐藤耕世, 融合研究してみませんか, 東北大学クロスオーバー (学術広報誌), pp4, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

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

○取得状況 (計0件)

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

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 耕世 (SATO KOSEI)
東北大学・国際高等研究教育機構・助教
研究者番号 : 40451611

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :