

令和 6 年 4 月 2 日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06260

研究課題名(和文)性決定遺伝子発現ニューロンによるターゲット細胞の非細胞自律的な性差形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of non-cell-autonomous formation of sex-specific muscle innervated by neurons expressing sex-determining gene

研究代表者

木村 賢一 (Ken-ichi, KIMURA)

北海道教育大学・教育学部・教授

研究者番号：80214873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのオス腹部第5体節には、オス特異的な筋肉MOL (Muscle of Lawrence) が存在する。このオス特異筋の形成は、それを支配する性決定因子Fru発現運動ニューロンにより誘導されることが知られている。本研究ではMOL誘導に関わる因子の探索を行った。スクリーニングの結果、アクチビンがMOL誘導因子として作用することが明らかになった。アクチビンは、変態中のMOL形成過程においてMOLを支配する運動ニューロンから分泌され、そのシグナルはbaboおよびputレセプターにより受容され、dSmad2を介してMOL形成に関与する下流遺伝子に作用することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの動物において行動パターンに雌雄差が見られるが、その基盤は脳の神経回路網にある。どのようにして中枢神経系における性的二型神経回路網が形成されるかは、未だ多くが謎である。本研究では、ショウジョウバエにおいて性決定因子発現運動ニューロンが、どのようにオス特異筋の形成を非細胞自律的に誘導するのか調査した。その結果、アクチビンタンパク質がMOL誘導因子として見出され、そのシグナルはActivinシグナル伝達系を通じてMOLの誘導を引き起こすことが明らかになった。この成果は、性決定因子を発現しない細胞が非自律的に性差を生ずる新たなメカニズムの解明に繋がった。

研究成果の概要(英文)：Drosophila melanogaster has a pair of male-specific muscles called the muscle of Lawrence (MOL) in abdominal 5th segment of adult flies. The MOL is produced only when its innervating motoneuron expresses Fruitless neural masculinizing proteins. Block of presynaptic activity by deprivation of synaptic vesicles to be released from the presynaptic terminals prevents the MOL induction in males. This implies that the motoneuron innervating MOL releases a specific myotrophic factor that induces MOL formation. Here we screened possible factors to induce the MOL. Our screening revealed that Activin would be a myotrophic factor for MOL induction. Activin would be secreted from the motoneuron innervating the future MOL to the myotube during metamorphosis, and the signal is received by babo, the type I receptor, or put, the type II receptor for activin signaling and then transmitted to dSmad2, which functions as a transcription factor to regulate downstream genes involved in MOL formation.

研究分野：neurogenetics

キーワード：キイロショウジョウバエ 性決定遺伝子 雄特異筋 誘導 アクチビン fruitless

1. 研究開始当初の背景

性差を示す行動の典型的なものとして、動物の生殖行動がある。キイロショウジョウバエ(以下ショウジョウバエ)における生殖行動を制御する神経回路の解明自身は、この15年の間に急速に進んできた。ショウジョウバエの性決定因子 *Fruitless(Fru)* 及び *Doublesex(Dsx)* タンパクは、脳の性差形成においても重要な働きを担っている。申請者らは、ショウジョウバエ脳の高次の中枢神経系における性差をはじめて発見し、その性差形成に性決定因子 *Fru* が重要な役割を持っていることを明らかにした。これを契機に、ショウジョウバエの脳の性差に注目が集まり、我々や海外の研究室により *fru* 発現ニューロン群の詳細な解析が行われ、また *fru* 発現ニューロン群の機能解析も進んだ。*Fru* や *Dsx* タンパクは転写調節因子であり、これらを発現するニューロンの形態や機能を細胞自律的に変化させ、性的二型ニューロンを形成する。それらは、性的二型神経回路網構築の重要な要素となっている。一方、性決定因子を発現するニューロンは全ニューロンのうちの数%であり、その他の大多数のニューロンは性決定因子非発現ニューロンである。性的二型神経回路網の構築においては、これらの非発現ニューロンも要素となるはずであり、これらが性決定因子発現ニューロンとシナプス接続することにより作用することを考えれば、性決定因子非発現ニューロンにも性差が形成される必要がある。性決定因子を発現しないターゲットニューロンにおいてどのように性差が形成されるかは、依然謎のままである。この謎を明らかにするためには、性決定因子発現ニューロンと性差を示すターゲットを同定し、その形成過程を解析する必要がある。しかし、中枢神経系ではその組み合わせを常に解析するよい系が見つかっていない。そこで、本研究では性決定因子 *fru* 発現運動ニューロンとそのターゲットであるオ斯特異筋 (MOL: Muscle of Lawrence) をモデル系として、*fru* 発現運動ニューロンがどのようにしてオ斯特異筋を非細胞自律的に形成するか調査することとした。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの腹部第5体節(A5)には、オス特異的に存在する筋肉 MOL がある(図1)。このオ斯特異筋の形成は、それを支配する運動ニューロンにより決定されることが知られている。その運動ニューロンは *Fru* を発現し、*Fru* の発現がオ斯特異筋の形成にとって必要十分であることが明らかにされている。しかしながら、*Fru* 発現運動ニューロンがどのようにして MOL の形成を誘導するかは全く解析されていない。我々の研究により、*shibire* 遺伝子のノックダウンが MOL 形成誘導を抑制することが示されている。*shibire* はエンドサイトーシスに関わるダイナミンをコードし、そのノックダウンは、シナプス領域でのトランスマッターやリガンドの放出の抑制を引き起こすことが知られている。このことは、*Fru* 発現運動ニューロンのシナプス領域から何らかの MOL 誘導因子が放出あるいは提示され、そのシグナルが発生中の筋肉細胞に非細胞自律的に作用し、MOL への誘導が生ずる可能性を示唆している。本研究では、*fru* 発現運動ニューロンがどのようにして性決定因子を発現しないオ斯特異筋 MOL の形成を誘導するのか、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

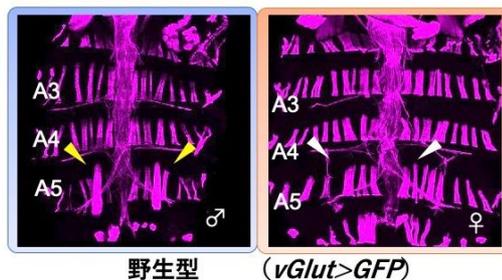


図1 ショウジョウバエ腹部筋肉系
黄矢印はオ斯特異筋MOL

3. 研究の方法

ショウジョウバエ成虫脳において、*fru* 発現ニューロンやそのターゲットなる MOL 形成細胞を遺伝学的に操作するために、運動ニューロンや myoblast で発現するドライバー系統等を用い、Gal4/UAS システムや LexA/LexAop システムを適用した。これらによりマーカー遺伝子(GFP や RFP など)や特定の遺伝子の発現を運動ニューロンや myoblast に誘導することが可能となる。蛹期における MOL 形成過程を観察するために、運動神経と myoblast をそれぞれ蛍光タンパクで標識し、共焦点顕微鏡を用いてライブイメージングを行った。

(1) MOL 誘導に関わる因子の探索

fru 発現運動ニューロンによる MOL 誘導のプロセスとしては、次の様なプロセスが想定される(図3) ① *fru* 発現運動ニューロンから誘導因子(リガンド)が放出あるいは提示され、② そのシグナルを myoblast がレセプターにより受容、③ シグナル伝達系-転写因子を介して、④ MOL の分化に関わる遺伝子の活性化により誘導が生ずる。これらのプロセスに関わる因子を探索した。ショウジョウバエにおいては、様々な遺伝子の RNAi 系統や強制発現系統がストックセンターに維持されており、それらを利用して①については運動ニューロンで発現を誘導する vGlut-Gal4 を用いて、また②~④に関しては myoblast で発現する 1151-Gal4 を用いて、強制発現やノックダウンにより MOL 形成に変化が生ずる系統をスクリーニングした。

(2) Notch シグナル系の関与の調査

Notch RNAi 系統と 1151-Gal4 系統を交配し、myoblast における Notch の発現をノックダウンさせ、MOL 形成への影響を調査した。また、Notch レセプターのリガンドとして、ショウジョウバエでは Serrate あるいは Delta が知られている。これらの RNAi 系統を vGlut-Gal4 を用いて運動ニューロンで発現させ、MOL 形成に異常が生ずるか調査し、リガンドを同定した。また、同定されたリガンド遺伝子の強制発現系を用いて、他の体節の運動ニューロンに発現させたときの影響を調査し、そのリガンドの発現が MOL 形成に十分であるかどうか明らかにした。

(3) Activin シグナル系の関与の調査

Activinβ の RNAi 系統と vGlut-Gal4 系統を交配し、運動ニューロンにおいて Activinβ の発現をノックダウンさせた時の、MOL 形成への影響を調査した。さらに、Activin のレセプター候補遺伝子の RNAi 系統を myoblast で発現させ、MOL 形成に異常が生ずるか調査し、レセプターを同定した。また、同定されたリガンドやレセプター遺伝子を強制発現させたときの影響を調査し、そのリガンドおよびレセプターの発現が MOL 形成に十分であるかどうか明らかにした。また、レセプターの下流で作用する Activin シグナル伝達系に関わる因子のノックダウンや強制発現により、MOL 形成に同様の变化を与えるか確認した。Activinβ の発現パターンは、新たに抗 Activinβ-Gal4 抗体を作成し、免疫化学染色のより調査した。また Activinβ-Gal4 をドライバーとして、GFP を発現させ、その発現パターンを調査した。

4 . 研究成果

ショウジョウバエのオス腹部第 5 体節には、オス特異的に存在する筋肉 MOL (Muscle of Lawrence : MOL) がある。このオス特異筋の形成は、それを支配する性決定因子 Fru 発現運動ニューロンにより誘導されることが知られている。MOL 誘導因子を探索するために、既知のシグナル伝達系について、そのリガンドおよびレセプターのノックダウンを施し、MOL 形成への影響を調査した (表 1)。Notch シグナル系、FGFR シグナル系、Hedgehog シグナル系、Activin シグナル系、Wnt シグナル系、BMP シグナル系、EGFR シグナル系、Toll シグナル系についてスクリーニングを行った結果、Notch シグナル系および Activin シグナル系のノックダウンが MOL 形成を抑制することを見いだした。

表 1 スクリーニングしたシグナル伝達系

signaling pathway	ligand	receptor
Activin	Act β	bab
	daw	put
	myo	wit
FGFR	bnl	btl
	pyr	htl
	ths	
Hedgehog	hh	ptc
		smo
BMP	dpp	tkv
Notch	DI	N
	Ser	
Wnt-TCF	wg	
EGFR	spi	
	vn	Egfr
Toll		Tl

myoblast に Notch RNAi を発現させると MOL 形成が異常になったことから、MOL 誘導因子のレセプターとして Notch が関与する可能性が示唆された。Notch レセプターのリガンドとして、ショウジョウバエでは Serrate あるいは Delta が知られている。そこで、これらの RNAi 系統を運動ニューロンで発現させ、MOL 形成に異常が生ずるか調査したところ、Serrate のノックダウンは影響を示さなかったが、Delta のノックダウンは MOL 形成を抑制することを見いだした。しかし、運動神経における Delta の強制発現では、メスや他の体節に新たな MOL 形成は見られず、オスの MOL は予想とは逆に小さくなってしまいうものが出現した。また myoblast における Notch の強制発現も、新たな MOL 形成は引き起こさず、MOL を含めた腹部体壁筋の形成が一部抑制されてしまった。Delta ノックダウンの作用時期を調査したところ、蛹期前に作用していることが示され、これらから Notch/Delta システムは MOL 誘導に関与すると言うよりも、MOL 誘導よりも早い時期に作用し、成虫筋の形成など別の役割をもっていることが示唆された。

続いて、MOL 誘導メカニズムにおける Activin シグナル系の関与を検証した。まず、運動神経において Activinβ をノックダウンした結果、オスの MOL 形成は抑制された (図 2)。次に、運動神経において Activinβ を強制的に発現誘導してやると、オスでは第 5 体節以外の体節も、メスでも腹部の各体節で MOL 様筋肉が形成された (図 2)。このことから Activinβ が運動神経から分泌されることにより、筋肉の伸長がおき MOL が形成されると考えられる。

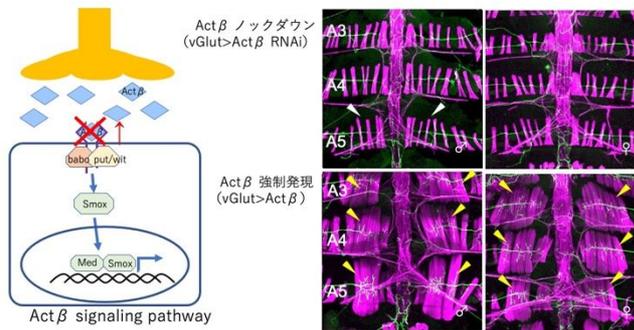


図2 Activin β のノックダウンと強制発現

Activinβ リガンドは、babo と punt というレセプターに受容されることが知られている。そこで、これらレセプター遺伝子のノックダウンを myoblast に誘導したところ、オスにもかかわら

ず MOL の形成が抑制された (図 3) 。また、*babo* の活性型を筋肉系に強制発現すると、オスにおいて第 5 体節以外の体節にも大きな MOL 様筋肉が誘導された (図 3) 。以上から、運動神経からの Activin β リガンドは、筋肉細胞の *babo/punt* レセプターに受容されているものと考えられた。Activin グナル伝達系では、*babo/punt* レセプターに受容されたシグナルは、細胞内で Smox (あるいは dSmad2) と呼ばれる転写因子を介して、ターゲットの遺伝子発現を調節していることが知られている。そこで、Smox のノックダウンを筋肉系で引き起こしてやると、MOL 形成は抑制され、また活性型の Smox を強制発現させると、オスの他の体節に MOL 様筋肉が誘導されることがわった (図 4) 。以上の結果から、本年度の研究において MOL 誘導因子として Activin β が同定され、このシグナルは Activin シグナル伝達系を通じて MOL の誘導を引き起こすと考えられた。

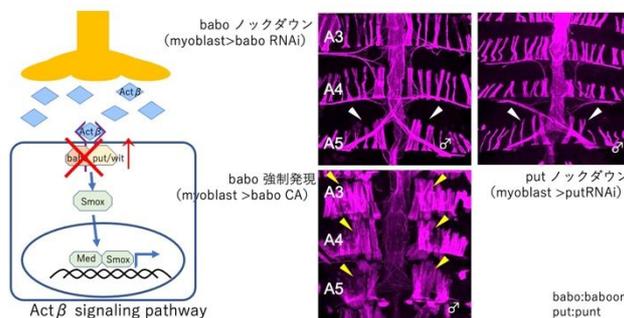


図3 *babo* / *put* のノックダウンと強制発現

運動神経において Fru タンパクが発現すると MOL の誘導が起こることから、Fru が Activin β の発現を誘導している可能性が考えられる。そこで Activin β の発現パターンの解析を行った。

抗 Activin β 抗体を新たに作成し、その発現を免疫組織化学染色により調査したが、十分な染色像を得られず、作成した抗体が適するものでなかったものと考えられた。次に、Activin β -Gal4 でその発現をモニターしたところ、確かに MOL を支配する運動ニューロンで発現が見られたが、雌雄の他の体壁筋を支配する運動ニューロンでも発現があり、オス特異的な発現パターンは見られなかった。このことから、単純に MOL を支配する運動神経で Activin β の発現が誘導されて、その結果 MOL の形成が起こることではなく、他の因子も関与している可能性も示唆された。

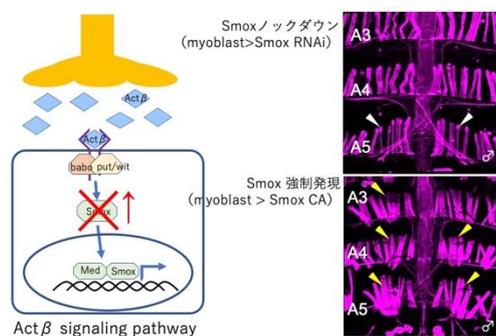


図4 Smox (dSmad2) のノックダウンと強制発現

アクチビンシグナル伝達系の下流で作用する MOL 分化制御因子の同定のため、腱の形成に関わる遺伝子について *myoblast* において発現をノックダウンさせたところ、*perd* および *mys* 遺伝子では確かに筋肉の付着が異常となった。しかし、その異常は MOL だけではなく、他の体壁筋にも同様に現れ、アクチビンシグナルの下流で作用しているかどうかは不明である。今後、Activin シグナルの下流で作用する遺伝子について、その候補を探索する必要がある。

Activin β やそのレセプターのノックダウンにより MOL 形成に異常を引き起こした際、形成過程でどのような変化が運動ニューロンや myotube に起こっているか、その変化をライブイメージング法にて明らかにすることは、今後の課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Ken-ichi, Kumano Rimi, Yamamoto Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Activin is a neural inducer of a male-specific muscle in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-54295-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村賢一、山元大輔
2. 発表標題 キイロショウジョウバエのアクチピンはオス特異筋の誘導因子として作用する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken-ichi Kimura, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Activin signaling promotes the male muscle phenotype in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村賢一、山元大輔
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ腹部雄特異筋の誘導因子の探索
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken-ichi Kimura, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Identification of genes involved in the induction of male-specific muscle formation in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 15th Japan <i>Drosophila</i> Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村賢一、山元大輔
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ成虫腹部の雄特異筋を誘導する因子の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関