

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570081

研究課題名(和文) ショウジョウバエ雌の生殖行動を制御する性的二型神経回路網

研究課題名(英文) Sexually dimorphic neurons controlling female reproductive behavior in *Drosophila*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：キイロショウジョウバエの雌は、交尾拒否行動中や産卵の際に産卵管の突き出し行動を示す。本研究は、それぞれの状況下における産卵管突き出し行動が、脳内の別個のdoublesex発現ニューロン群によって制御されていることを明らかにした。また、交尾拒否行動中の産卵管突き出し行動を引き起こす雌ニューロンは雄にも相同なものが存在し、この性的二形ニューロンが雄の交尾行動を誘発することも示した。このように、性的二型ニューロンが雌雄の配偶行動制御の一端を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila*, sex-specific behavior should derive from sexually dimorphic neural circuitry in the CNS. Two sex determination factors, doublesex (*dsx*) and fruitless, establish in most sexual dimorphism in the CNS. Although *dsx*-expressing neurons have been shown to be involved in female reproductive behavior, the neural circuitry underlying the female behavior is poorly defined. We identified the sexually dimorphic and the female-specific neurons, two distinct classes of *dsx*-expressing neurons that can initiate ovipositor extension associated with rejection and oviposition behavior, respectively. The sexually dimorphic interneurons, which induce ovipositor extrusion for rejection in females, have homologues that control courtship behavior in males. This finding points to the intriguing possibility that the sexes share a mating command system, which drives distinct sets of lower-rung neurons to execute sexually dimorphic mating behavior.

研究分野：生物学

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 生殖行動 性決定

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの性決定のしくみは解析が進んでおり、重要な性決定因子の多くはすでに同定されている。性決定因子 Fruitless(Fru)タンパクは、雄の脳の特定の神経細胞群で発現するが、雌では発現せず、主に脳の性決定を行っている。もう一つの性決定因子 Doublesex(Dsx)タンパクは、雌雄で異なるアイソフォーム（雄型(DsxM)と雌型(DsxF)）が形成され、主に外部形態の雌雄差を制御していると考えられてきた。近年、*doublesex (dsx)*遺伝子は脳のニューロンでも発現があり、脳の性差形成においても重要な働きを担っていることが示された。そのため、脳の性差を理解するためには *fru* 発現ニューロンだけでなく、*dsx* 発現ニューロンも解析を行う必要が生じてきている。

ショウジョウバエにおいては、海外を含めいくつかの研究室により、脳の構造における性差の解析の試みがなされてきたが、最近までその存在はほとんど明らかにされていなかった。そのため、行動の性差は主に脳の機能的な性差によるものとの解釈がなされていた。しかし私たちは、まず嗅覚系の糸球体の特定領域に性的二型が存在することを示し、さらに脳の高次の中枢神経系における性差を発見し、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。その後、*fru* 発現ニューロンの網羅的同定を推し進め、雄の交尾行動開始に重要な雄特異的 *fru* 発現ニューロン P1 を見いだした。これらを契機に、ショウジョウバエの脳の性差に注目が集まり、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、性的二型 *fru* 発現ニューロン群が数多く明らかにされた。また、*fru* 発現ニューロン群の機能解析も進み、我々が指摘した P1 ニューロンが交尾開始の司令ニューロンとして作用していることが確認された。さらに、雄のラブソングのための回路網や、雄が既交尾の雌をフェロモンにより認識し交尾を避ける行動に必要な回路網の一部も同定されてきている。

このように、性的二型ニューロン群については、雄の生殖行動に果たす役割に関して解析が進んでいる一方、雌の生殖行動についてはほとんど解析されていない。*dsx* 発現ニューロンの活動をすべて抑制すると、雌の交尾

後の拒否行動や産卵行動に影響がでることが示されており、*dsx* 発現ニューロン群が直接雌の生殖行動に関わっていることが示唆されている。しかし、それぞれの個々のニューロン群がどのような働きを持っているのかは全く解析されておらず、どのような回路網によりこれらの雌の生殖行動が制御されているかは不明である。

2. 研究の目的

ショウジョウバエは、定型的な交尾行動パターンを示す。雄は雌に出会うと、後を追いかけて、時々前肢を上げて雌をさわる。さらに、片方の翅をあげ求愛歌を歌い、その後雌の後ろに回り込み交尾器をなめ、背後から交尾を試みる。雌が受け入れ可能ならばそのまま交尾が成立し、雄は雌に精子を送り込む。このあいだ雌は一見積極的な行動を示さないが、最終的な交尾受入は雌が決める。雌が受け入れ状態にない場合には、産卵管をつきだしたり、翅で追い払ったり、足蹴にしたりして、交尾を拒否する。とくに、既交尾の雌はこの交尾拒否行動を示す。交尾後、雌は産卵行動を行う。

本研究では、まず *dsx* 発現ニューロン群の網羅的同定を行う。個々の *dsx* 発現ニューロンの形態および投射領域を調査し、その入出力関係を解析することで、*dsx* 発現ニューロンが構成する性的二型神経回路網を明らかにする。その上で、特定の *dsx* 発現ニューロン群を活性化あるいは抑制化した時の雌の生殖行動への影響を調査し、雌の生殖行動を制御する *dsx* 発現ニューロン群を特定し、それらからなる雌特異的行動を制御する神経回路網を明らかにする。さらに、雌生殖行動制御回路網の動作作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ成虫脳において、*dsx* 発現ニューロンを遺伝学的に操作するために、*dsx* 遺伝子に Gal4 遺伝子が挿入した系統 *dsx-Gal4* を用いた。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 システムを適用した。さらに、マーカー遺伝子や目的とする遺伝子を特定の細胞系譜にのみ強制発現させるために、ショウジョウバエで開発された MARCM 法を用

いた。これらにより特定の細胞群に限定し、任意の遺伝子を発現させることができる。

(1) *dsx* 発現ニューロン群の網羅的同定と投射パターンの調査

MARCM 法により選択的に *dsx* 発現ニューロン群を GFP 標識し、抗 GFP 抗体と neuropile 特異抗体を用いた二重蛍光染色をした後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその投射パターンを 3 次元構築し、個々のニューロン群を同定した。

(2) 雌生殖行動に対する *dsx* 発現ニューロン群の機能解析

dsx 発現ニューロンの強制活性化による雌生殖行動への影響調査を行った。ニューロンの活性化を実験的に制御するために、温度受容に関わるレセプターチャネル dTRPA1 (高温シフトで活動電位が生ずる) タンパクを利用した。dsx-Gal4 系統を用い、すべての *dsx* 発現ニューロン群に dTRPA1 を強制発現させ、温度を上げたときに誘導される雌生殖行動を観察した。また、誘発された行動が脳にあるニューロンによるものか、胸腹部の神経節にあるニューロンによるものかを明らかにするために、Otd-flp を用いた flip-out 法にて脳あるいは腹部のニューロンを活性化させ、その影響を解析した。また、*dsx* 発現ニューロン群のうち、どのニューロン群が雌生殖行動を制御しているか明らかにするため、dsx-Gal4 系統に MARCM 法を適用した。特定の *dsx* 発現ニューロン群を GFP ラベルするとともに、dTRPA1 を強制発現させたモザイク個体を作成し、温度を上昇により一部の *dsx* 発現ニューロン群を強制的に活性化した時、雌の生殖行動が誘発されるかどうか調査した。それぞれの個体について、どのニューロン群がラベルされているか、脳の抗体染色を行い、その標識パターンから、行動を誘発するニューロン群を解析した。

(3) 雌生殖行動制御ニューロンの動作作用機構の調査

ドーパミン作動性ニューロン群が雌の生殖行動へ与える影響を調査した。ドーパミン作動性ニューロン群で発現する pale-Gal4 系統を用い、dTRPA1 を強制発現させ、生殖行動が誘発されるか調査した。また、MARCM

法にて pale 発現ニューロン群の同定を行った。

4. 研究成果

ショウジョウバエの雌の生殖行動として次の 2 つの行動に注目した。一つは、既交尾の雌が雄の求愛に対して交尾拒否をする際に示す産卵管伸展反応である。もう一つは、交尾後雌が産卵する際の産卵管伸展反応である。前者の産卵管伸展は、後方へまっすぐ強く伸ばすのに対して、後者は腹部を屈曲し、産卵管を下方へ伸展させる行動であり、それぞれの産卵管伸展パターンを mating (M)-type、oviposition (O)-type とした。

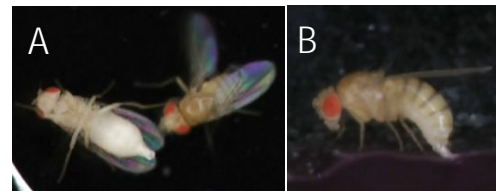


図1 ショウジョウバエ雌の生殖行動

A. 交尾拒否に伴う産卵管伸展(M-type)、B. 産卵に伴う産卵管伸展(O-type)

すべての *dsx* 発現ニューロン群を強制的に活性化させると、雌は産卵姿勢行動をとり、O-type の産卵管伸展を示し、それに引き続き産卵した。この雌の生殖行動誘導が、頭部のニューロンによって引き起こされるのか、腹部のニューロンによって誘導されるのか調査した。脳の *dsx* 発現ニューロンだけを活性化させると、M-type の産卵管伸展が誘導され、脳以外の領域で *dsx* 発現ニューロンだけを活性化させると、O-type の産卵管伸展が誘導された。このように *dsx* 発現ニューロン群の活性化により引き起こされる雌の生殖行動には 2 つのタイプが存在することが明らかになった。

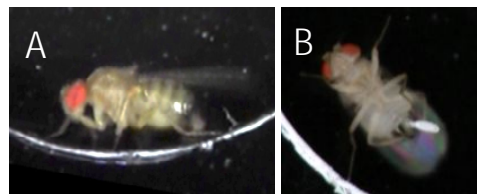


図2 *dsx* 発現ニューロンの活性化により引き起こされた産卵姿勢行動(A)および産卵(B)

この 2 つの行動を誘導する *dsx* 発現ニューロンを同定するために、*dsx* 発現ニューロンの一部だけを活性化させ、行動を誘導するニューロン群を探索することとした。そのため

に、まず初めに *dsx* 発現ニューロン群の網羅的同定を行った。*dsx*-Gal4 を用いて *dsx* 発現ニューロン群を GFP 標識し、抗 GFP 抗体と neuropile 特異抗体を用いた二重蛍光染色をした後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。*dsx* 発現ニューロン群の細胞体の位置から、雄の脳では 10 個のニューロン群を、雌の脳では 8 個のニューロン群を同定した。さらに、MARCM 法により選択的に *dsx* 発現ニューロン群を GFP 標識し、個々のニューロン群の投射パターンを明らかにした。これらの結果、3 つの雄特異的ニューロン群および 1 つの雌特異的ニューロン群に加え、投射パターンが雌雄で異なる 4 つの性的二型ニューロン群を見いだすことができた。

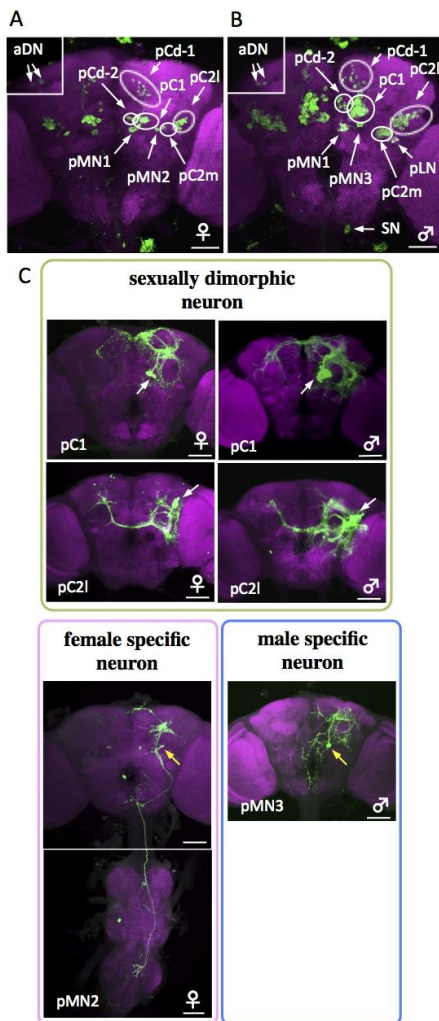


図3 *dsx* 発現ニューロン群
A. 雌の脳、B. 雄の脳、C. 性的二型ニューロン群、雌特異的ニューロン、雄特異的ニューロン

dsx 発現ニューロンの一部だけを活性化させるために、*dsx*-Gal4 系統に MARCM 法を適

用し、特定の *dsx* 発現ニューロン群を GFP ラベルするとともに、dTRPA1 (温度上昇によりニューロンを活性化) を強制発現させたモザイク個体を作成した。温度を上昇させ、一部の *dsx* 発現ニューロン群を強制的に活性化した時、M-type あるいは O-type の産卵管伸展行動が誘発されるか調査した。それぞれのモザイク個体について、どのニューロン群が活性化されているか、脳の抗体染色を行い、その標識パターンから関与するニューロン群を同定した。その結果、性的二型を示す pC2l ニューロンが雌の M-type 産卵管伸展を制御しており、雌特異的に存在する pMN2 ニューロンが O-type 産卵管伸展および産卵を制御していることが明らかになった。このように一つの産卵管伸展行動も、上位の脳では異なる司令回路で制御され、状況に応じて異なる文脈で引き起こされることが明らかになった。

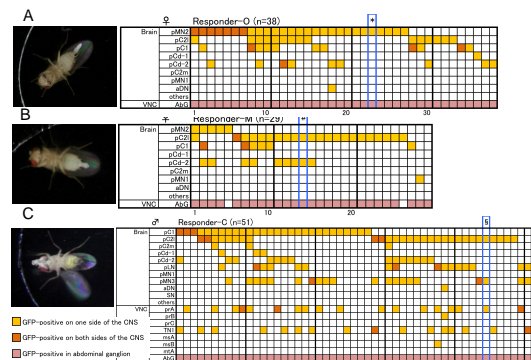


図4 一部の *dsx* 発現ニューロン群を活性化したときに誘導された雌 O-type 産卵管伸展 (A)、M-type 産卵管伸展 (B)、雄交尾行動 (C)

また、雌の交尾拒否に伴って起こる産卵管伸展 (M-type) を制御している pC2l ニューロンは、雄にも相同なニューロン群が存在する。そこで雄における pC2l 相同ニューロンの役割を明らかにするために、MARCM 法により一部の *dsx* 発現ニューロンを活性化させ、雄において誘導される行動を調査した。その結果、雄の pC2l ニューロンの活性化により交尾行動が誘起されることが示され、雌雄の性的二型ニューロンがそれぞれの交尾行動制御の一端を担っていることが明らかになった。

雌生殖行動を制御する神経回路網の動作機構を明らかにするために、ドーパミン作動性ニューロン群が雌の生殖行動へ与える影響に注目した。ドーパミン作動性ニューロン

群で発現する pale-Gal4 系統を用い、dTRPA1 を強制発現させ、ドーパミン作動性ニューロン群を活性化させると、雌の産卵姿勢行動が誘発されることを見いだした。ドーパミン作動性ニューロンを MARCM 法により選択的に GFP 標識し、投射パターンから同定し、*dsx* 発現ニューロン群と比較した。その結果、*dsx* 発現ニューロン自身はドーパミンを発現していないことが確認された。ドーパミン作動性ニューロンのどのニューロンが雌の生殖行動を誘発しているのかについては、今後の課題として残された。また、それらの pale 発現ニューロン群と *dsx* 発現ニューロン群がどのような神経回路網のもと、雌生殖行動の制御を行っているか、今後の進展が期待される。

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3件)

1. Kimura K-I, Sato C, Koganezawa M, Yamamoto D. (2015) *Drosophila* ovipositor extension in mating behavior and egg deposition involves distinct sets of brain interneurons. PLoS ONE, **10** (5): e0126445, 査読あり
2. Kimura K-I, Sato C, Yamamoto K, Yamamoto D. (2015) From the back or front: the courtship position is a matter of smell and sight in *Drosophila melanogaster* males. Journal of Neurogenetics **29** 18-22, 査読あり
3. Satoh D, Suyama R, Kimura K-I, Uemura T. (2012) High-resolution in vivo imaging of regenerating dendrites of *Drosophila* sensory neurons during metamorphosis: local filopodial degeneration and heterotypic dendrite-dendrite contacts. Genes to Cells **17**, 939-951, 査読あり

[学会発表](計6件)

1. 佐藤千晶, 山元大輔, 木村賢一. 生殖行動の誘発に関連する pale 発現ニューロンの同定. 日本動物学会第 85 回大会, 2014. 9/11, 東北大学(仙台)
2. Kimura K-I, Sato C, Koganezawa M, Yamamoto D. doublesex-expressing neurons controlling female reproductive behavior in *Drosophila*. 2014ICN / JSCP 2014. 7/29, Sapporo Convention Center (Sapporo)

3. 佐藤千晶, 小金澤雅之, 山元大輔, 木村賢一. 雌キイロショウジョウバエの産卵管突き出し行動に関する *dsx* 発現ニューロン. 日本動物学会第 84 回大会, 2013. 9/28, 岡山大学(岡山市)

4. Sato C, Koganezawa M, Yamamoto D, Kimura K-I. Identification of neurons controlling female reproductive behavior in *Drosophila*. Japanese Drosophila Research Conference 10, 2012. 10/13, The Jikei University School of Medicine (Tokyo)

5. 木村賢一, 佐藤千晶, 小金澤雅之, 山元大輔. ショウジョウバエ doublesex 発現ニューロン群における性差 - 1. 性差形成機構. 日本動物学会第 83 回大会, 2012. 9/13, 大阪大学(豊中)

6. 佐藤千晶, 小金澤雅之, 山元大輔, 木村賢一. ショウジョウバエ doublesex 発現ニューロン群における性差 - 2. 雌生殖行動の制御. 日本動物学会第 83 回大会, 2012. 9/13, 大阪大学(豊中)

[図書](計1件)

1. 木村賢一 (2012) ショウジョウバエ「研究者が教える動物飼育 第2巻 - 昆虫とクモの仲間」(針山孝彦・小柳光正・嬉正勝・妹尾圭司・小泉修・日本比較生理生化学会編集) 共立出版(東京) pp. 200-206

[その他]

ホームページ等

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