

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07040

研究課題名（和文）転写因子の性特異的な切断によるショウジョウバエ脳神経系の性分化機構の解明

研究課題名（英文）The role of partial proteasomal degradation of Lola in regulating sexually dimorphic neurite formation and behavior in *Drosophila*

研究代表者

佐藤 耕世 (Sato, Kosei)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・研究員

研究者番号：40451611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエの脳神経系に雄特異的に産生される転写因子Fruitless (Fru)は、その存在によってFruを発現するニューロンの一群を雄性化し、それによって雄の性行動様式を作り出す。Fruの転写コファクターとして特定したLolaは、Fruを持たない雌の脳神経系においては部分的なタンパク質分解を受け、サイズの小さい推定転写因子Lola29Fを雌だけに産生する。Lola29Fは雌の性的受容性を制御するSex peptide受容ニューロンに発現しており、性的受容性を正に制御する役割を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世代交代において雄に比べて多くの投資を行う雌では、配偶者を選ぶ際に雄よりもはるかに複雑な情報処理がなされるものと推察されるが、その仕組みはほとんど解明されていない。チャールズ・ダーウィンは、雄がもつ派手な模様や特殊な求愛の様式が雌による選り好みによって進化するという説（性淘汰説）を提唱した。雌による選り好みの神経機構が解明されれば、性淘汰の具体的な仕組みを神経科学の言葉で説明可能になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The *Drosophila* Fruitless (Fru), a major masculinizer protein of the central nervous system, forms a transcriptional repressor complex with Lola to generate sexually dimorphic courtship circuit. In the female CNS, which lacks Fru, Lola undergoes partial proteasomal degradation to form Lola29F, a female-enriched N-terminal truncation product with unknown functions. This study suggests that Lola29F is expressed in subsets of sex peptide sensory neurons (SPSNs: fru-expressing mechanosensory neurons originating from the uterus) and regulates female sexual receptivity.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ 性行動 脳 性差 fruitless タンパク質分解 ユビキチン プロテアソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエの同性愛行動突然変異体 *satori* (Yamamoto et al., 1991) の責任遺伝子である *fruitless* (Ito et al., 1996, 以後、*fru* と略す) は、その転写産物すなわち mRNA を雌雄の脳神経系に神経細胞特異的に発現するが、翻訳によって Fru タンパク質を生じるのは雄に限られ、雌はこれを持たない (Usui-Aoki et al., 2000)。Fru タンパク質の有無は個々の細胞の生死を制御し、また神経突起や樹状突起叢のパターンを制御してニューロンに性差を作り出す (Kimura et al., 2005)。性差をもつニューロンによって構成される神経回路はおのずと雌雄で異なるものとなり、行動様式の性差が生み出される。

fru 遺伝子の Null 変異体である *satori* の雄は雌に対してまったく求愛しないが、Partial loss-of-function 変異体 (*fru²/fru^{sat}*) の雄では、雌への求愛活性がマイルドに低下する。この行動表現型を、1コピーの機能欠失型変異によって相乗的に増強する(雌への求愛活性をさらに低下させる)のが *lola* である。*lola* は選択的スプライシングによって 109 種類もの mRNA 派生体と、20 種類のタンパク質派生体(少数の例外を除き、いずれも Fru と同じく BTB-Zinc フィンガー型の推定転写因子)を細胞特異的かつ発生段階依存的に産生する (Horiuchi et al., 2003; Giniger et al., 2003)、興味深くも、研究する側からすればやっかいな遺伝子である。脳神経系では、全ての *lola* バリエントが産生されない Common 変異によって、軸索ガイダンスの異常 (Crownier et al., 2002) や、分化したニューロンの幹細胞 (Neuroblast) への再プログラム化 (Southall et al., 2014) という発生の異常だけでなく、神経伝達物質受容体の発現低下 (Fukui et al., 2012) という生理機能の異常などが起こることが知られていた。*lola* の多面的な機能が結果の解釈を困難にすると考え、スプライシング派生体を個別に機能阻害する実験を進めた。*lola* の莫大なアイソフォーム産生能の源となる、相互排他的な 24 個のエクソン (Ohsako et al., 2003) を個別にターゲットとする RNAi を *fru* 発現ニューロンに発現させ、それによって前述の *lola* 変異による雌への求愛活性の低下がどの *lola* 派生体によるものかを調べた。その過程で、少なくとも一つの派生体が、この表現型に寄与することが示唆された。29番目のエクソンから産生される Lola Q である。Lola Q に着目した解析によって、この派生体が Fru と転写因子複合体を形成することや、それによって性差形成の実働部隊となる Fru と Lola の転写標的遺伝子の一つ、*robo1* を抑制すること、その制御機構が *fru* 発現ニューロンの一つ、mAL の投射様式を雄性化すること (図1) を解明していた。本研究を提案するきっかけは、Lola Q タンパク質の発現パターンを雌雄で比較するために、このタンパク質に対する特異的な抗体(抗 Lola isoform Q 抗体)を作製した実験から得られた。Western blot法によって、前蛹期の脳神経系における Lola Q タンパク質の発現を調べたところ、雄では予想通り Lola Q タンパク質が検出された。一方、雌ではサイズの小さいタンパク質 (Lola29F と呼ぶ) が予想外に検出された (図2)。

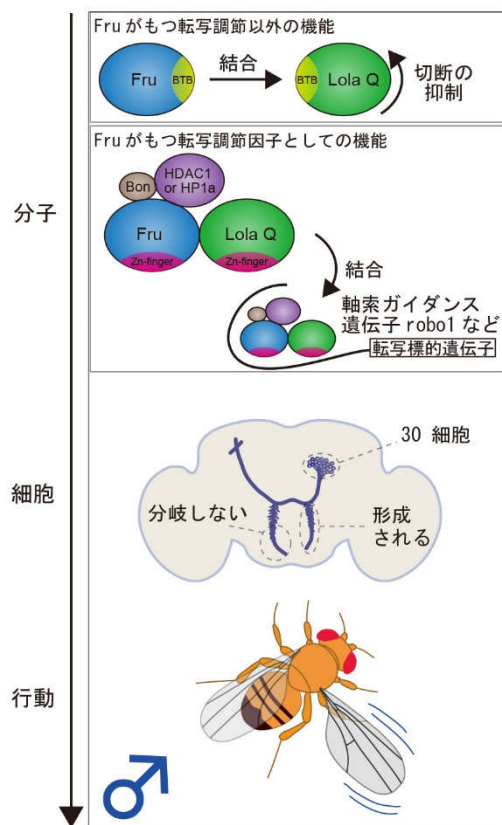


図1. Fru および Lola タンパク質による脳神経系と行動の雄性化機構。

雌の脳神経系に産生された Lola29F が、どのような脳細胞で作られており、どのような役割を持つのかを明らかにし、それによってキイロショウジョウバエの脳神経系が雌に性分化する機構や雌の性行動を制御する神経機構がどのようなものかを解明する。

2. 研究の目的

雌の脳神経系に産生された Lola29F が、どのような脳細胞で作られており、どのような役割を持つのかを明らかにし、それによってキイロショウジョウバエの脳神経系が雌に性分化する機構や雌の性行動を制御する神経機構がどのようなものかを解明する。

3. 研究の方法

- (1) Lola29F タンパク質の産生機構および産生箇所の解析。
- (2) Lola29F タンパク質の構造解析。
- (3) 雌の性行動に対する Lola29F タンパク質の役割の解析。

4. 研究成果

(1) Lola29F タンパク質が Lola Q タンパク質の部分分解(以後、切断と呼ぶ)によって産生されること (図3)、産生箇所が雌の *fru* 発現ニューロンであることを明らかにした (図4)。Lola Q タンパク質の N 末端部および C 末端部をそれぞれ HA および V5 タグで標識し、前蛹期の雄あるいは雌の *fru* 発現ニューロンに細胞特異的に発現させた (図4)。Western blot 法によって、強制発現させた Lola Q タン

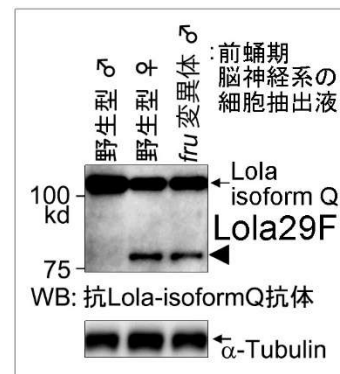


図2. 脳神経系における Lola29F タンパク質の雌特異的な産生。fru 変異体の雄でも Lola29F が産生される。

パク質を検出したところ、雄では抗 HA および抗 V5 どちらの抗体を使った場合でも Lola Q タンパク質のみが検出された。一方、雌では C 末端部タグ(抗 V5 抗体)を用いた場合に、Lola29F タンパク質が検出される約 75 kD の位置にタンパク質の存在を示すバンド(Lola29F 様タンパク質と呼ぶ)が検出された。N 末端部タグ(抗 HA 抗体)を用いた場合には Lola29F 様タンパク質は検出されないことから、N 末端部のアミノ酸配列が分解を受けることによって、Lola29F タンパク質が産生されるものと推察した。

(2) 上記において、C 末端部を V5 タグで標識した Lola Q タンパク質を雌の *fru* 発現ニューロンに発現させると Lola29F 様タンパク質が産生されることに着目して、このタンパク質を抗 V5 タグ抗体を用いて精製し、Lola29F 様タンパク質が持つ N 末端部のアミノ酸配列をエドマン分解法によってシーケンスした。その結果、Lola29F 様タンパク質は、Lola Q タンパク質の 264 番目以降のアミノ酸配列を持っており、その N 末端側にある 263 アミノ酸はプロテアソームによって部分分解されること(以後、切断と呼ぶ、図 3)が示唆された。Lola29F は、この分解によって BTB/POZ ドメインを失うが、C 末端部にもつ Zinc フィンガードメインは保持すると推察され、このことから転写因子として機能するものと推察した。

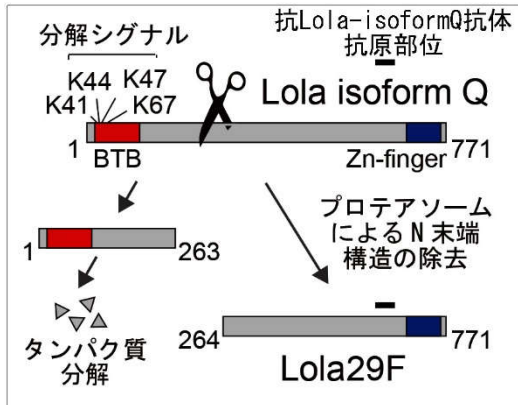


図3. Lola isoform Q の切断による Lola29F の産生。Lola29F は Zn-finger をもつ新規の推定転写因子と推察される。

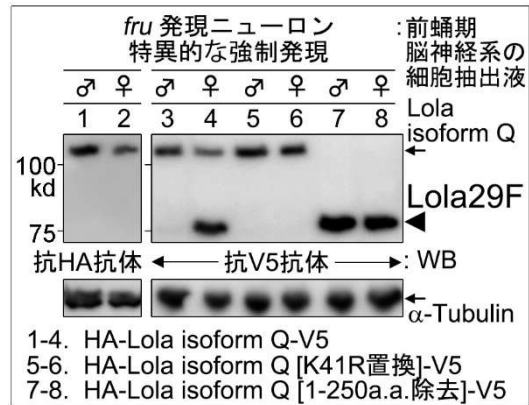


図4. 雌の *fru* 発現ニューロンで産生される Lola29F タンパク質。切断前タンパク質(Lola isoform Q)を HA (N末端部) および V5 (C末端部) タグで標識し、*fru* 発現ニューロンに発現させた。Lola29F は、抗 V5 抗体によって雌特異的に検出された(レーン4)。

(3) *fru* 遺伝子の遺伝子産物(mRNA)を発現するニューロンは、雌では性的受容性(雌が雄と交尾するかどうかという性質)を制御することが分かっている(Kvitsiani and Dickson, 2006)。Lola29F がこの行動に関与する可能性を検討した。アイソフォーム特異的なRNAi によって *lola* を *fru* 発現ニューロンの一つ、Sex peptide 受容ニューロン(図5)に限定して発現させ、*lola* をノックダウンすると、雌の性的受容性が顕著に低下した(図6)。この効果は、Lola Q の共発現によっては救済されなかったが、Lola29F によっては救済された。Lola29F は何らかの仕組みによって雌の性的受容性を制御することが示唆された。この実験とは別に、Lola29F が切断前タンパク質(Lola Q)のドミナント・ネガティブ型として働くことを示唆する結果を得ており、このことから雄化タンパク質(Lola Q)の機能を阻害することによって、Lola29Fは雌化を実現するものと推察された。

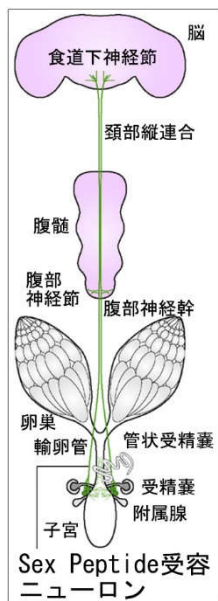


図5. 雌の交尾後の性的受容性低下を引き起こす感覚ニューロン (Hasemeyer et al., 2009を改変)

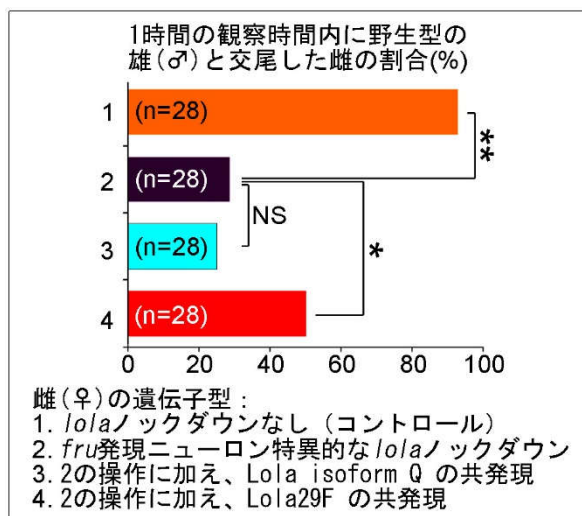


図6. 雌の *fru* 発現ニューロン特異的な *lola* ノックダウンによる性的受容性の低下と、Lola29F による救済。Lola isoform Q によっては救済されない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Sato Kosei, Ito Hiroki, Yamamoto Daisuke	4. 巻 3
2. 論文標題 teiresias, a Fruitless target gene encoding an immunoglobulin-superfamily transmembrane protein, is required for neuronal feminization in Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01327-z	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 -
1. 著者名 Sato Kosei, Yamamoto Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Contact-Chemosensory Evolution Underlying Reproductive Isolation in Drosophila Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnbeh.2020.597428	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 -
1. 著者名 Sato Kosei, Tanaka Ryoya, Ishikawa Yuki, Yamamoto Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Behavioral Evolution of Drosophila: Unraveling the Circuit Basis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11020157	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 -
1. 著者名 Sato Kosei, Goto Junpei, Yamamoto Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Sex Mysteries of the Fly Courtship Master Regulator Fruitless	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnbeh.2019.00245	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 -

1. 著者名 Sato Kosei, Ahsan Md. Tanveer, Ote Manabu, Koganezawa Masayuki, Yamamoto Daisuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Calmodulin-binding transcription factor shapes the male courtship song in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008309	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 -

1. 著者名 Sato Kosei, Yamamoto Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 The mode of action of Fruitless: Is it an easy matter to switch the sex?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes, Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gbb.12606	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 -

1. 著者名 Sato Kosei, Ito Hiroki, Yokoyama Atsushi, Toba Gakuta, Yamamoto Daisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Partial proteasomal degradation of Lola triggers the male-to-female switch of a dimorphic courtship circuit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-08146-1	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 -

1. 著者名 Zhang Binglong, Sato Kosei, Yamamoto Daisuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Ecdysone signaling regulates specification of neurons with a male-specific neurite in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.029744	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 -

1. 著者名 Tanaka Ryoya, Higuchi Tomohiro, Kohatsu Soh, Sato Kosei, Yamamoto Daisuke	4. 巻 37
2. 論文標題 Optogenetic Activation of the fruitless-Labeled Circuitry in Drosophila subobscura Males Induces Mating Motor Acts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 11662 ~ 11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1943-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chowdhury Zahid Sadek, Sato Kosei, Yamamoto Daisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 The core-promoter factor TRF2 mediates a Fruitless action to masculinize neurobehavioral traits in Drosophila	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01623-z	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15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 佐藤耕世, 山元大輔.
2. 発表標題 ショウジョウバエ中枢ニューロンからのPatch-seq解析手法の技術習得.
3. 学会等名 新学術領域研究「多様な「個性」を創発する脳システムの統合的理解」第5回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤耕世, 伊藤弘樹, 山元大輔.
2. 発表標題 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する新規の推定膜タンパク質 Teiresias によるショウジョウバエ脳神経系の性差形成.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤耕世, 山元大輔.
2. 発表標題 免疫グロブリン様ドメインを持つ推定膜タンパク質Teiresiasによるショウジョウバエ脳神経系の性差形成.
3. 学会等名 新学術領域研究「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」第5回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良弥, 樋口智大, 古波津創, 佐藤耕世, 栗崎健, 山元大輔.
2. 発表標題 ショウジョウバエの性決定遺伝子から迫る配偶行動の種特異性を生みだす神経機構.
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤耕世, Ahsan MT, 大手学, 小金澤雅之, 山元大輔.
2. 発表標題 求愛歌のテンポを規定するカルモジュリン結合型転写因子Camtaの解析.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中良弥, 樋口智大, 古波津創, 佐藤耕世, 栗崎健, 山元大輔.
2. 発表標題 The neural mechanism underlying species-specific courtship behavior in <i>Drosophila subobscura</i> .
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato K., Ahsan MT., Ote M., Koganezawa M. and Yamamoto D.
2. 発表標題 Canta, the Calmodulin-binding transcription factor, shapes the male courtship song in Drosophila.
3. 学会等名 CSHL Meeting on Neurobiology of Drosophila (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤耕世, 山元大輔.
2. 発表標題 A molecular and neuronal basis of social experience that affects male courtship propensity in Drosophila.
3. 学会等名 新学術領域研究「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」第4回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato K. and Yamamoto D.
2. 発表標題 Calmodulin-binding transcription factor shapes the male courtship song.
3. 学会等名 新学術領域研究「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」第4回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中良弥, 樋口智大, 古波津創, 佐藤耕世, 栗崎健, 山元大輔
2. 発表標題 ショウジョウバエ非モデル種を用いた求愛行動の進化をもたらす分子・神経メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤耕世, 山元大輔.
2. 発表標題 生得的な行動が遺伝する仕組み - 発生学から電気生理学へ-
3. 学会等名 第3回 IDE研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤耕世, 山元大輔.
2. 発表標題 ショウジョウバエ脳神経系の雄化因子Fruitlessがもつ転写調節以外の機能
3. 学会等名 日本動物学会岡山県例会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka R., Higuchi T., Kohatsu S., Sato K. and Yamamoto D.
2. 発表標題 Anatomical dissection and optogenetic activation of the fruitless-labeled circuitry in genome edited <i>Drosophila subobscura</i> .
3. 学会等名 CSHL Meeting on Neurobiology of <i>Drosophila</i> (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中良弥, 樋口智大, 古波津創, 佐藤耕世, 山元大輔.
2. 発表標題 新規な求愛行動形質の獲得を実現する神経メカニズムの探求 - ショウジョウバエを用いた試み -
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka R., Higuchi T., Kohatsu S., Sato K. and Yamamoto D.
2. 発表標題 Visualization and optogenetic activation of the fruitless-labeled circuitry in genome-edited <i>Drosophila subobscura</i> .
3. 学会等名 EMBO/EMBL Symposia: Neural Circuits in the Past, Present and Future (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山元研究室 情報通信研究機構 未来ICT研究所 行動神経生物学プロジェクト https://www2.nict.go.jp/neuro/evoneuro/index.html Kosei Sato Web Page https://sites.google.com/site/koseisato777
--

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
---------	---------