

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22453

研究課題名（和文）シナプス接続の獲得/喪失による生殖隔離の進化とその分子基盤

研究課題名（英文）Possible gain/loss of synaptic connection underlying reproductive isolation

研究代表者

石川 由希（Ishikawa, Yuki）

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：70722940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：配偶者選好性の分化は、生殖隔離や性選択を介してさらなる形質進化を駆動する。配偶者選好性の分化には脳内の情報プロセスの変化が重要であると考えられるが、神経回路の複雑性のためその機構は殆どわかっていなかった。本研究では、フェロモン選好性の進化によって生殖隔離を実現したショウジョウバエをモデルにこの解明に挑戦した。フェロモン選好性に関連するppk23-P1神経回路を構成する7種のニューロン群の形態、機能、シナプス結合をキイロショウジョウバエと雑種で比較し、雑種において失われたシナプス接続を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種を配偶相手として好み、異種を避ける性質（同種に対する配偶者選好性）は、さまざまな動物に広く保存されている。一方で、配偶者選好性は種分化に伴い、速やかに分化する。どのような神経回路の変化が、この分化を実現しているのだろうか？本研究では、神経科学や遺伝学のモデル生物であり、遺伝学的ツールや神経回路情報の豊富なショウジョウバエを使い、この問いに挑んだ。その結果、神経回路内の特定の神経接続の喪失が配偶者選好性の進化に重要であった可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Differentiation of mating preference drives further phenotypic evolution through reproductive isolation and sexual selection. Changes in information processing in neural network are thought to be important for the preference differentiation, but the mechanism has been largely unknown due to the complexity of the neural circuitry. In this study, we aimed to elucidate this mechanism using two related *Drosophila* species as a model, in which reproductively isolated by the difference of pheromone preference. We compared the morphology, function and synaptic connections of seven different neural populations that constitute the neural circuitry associated with pheromone preference between *Drosophila melanogaster* and hybrids, and identified the possible lost of synaptic connections lost in hybrids.

研究分野：進化生物学、神経科学

キーワード：配偶者選好性

## 1. 研究開始当初の背景

配偶者選好性の分化は、生殖隔離や性選択を介してさらなる形質進化を駆動する。配偶者選好性の分化には脳内の情報プロセスの変化が重要であると考えられるが、神経回路の複雑性のためその神経機構はほとんど解明されていなかった。本研究では、神経科学や遺伝学のモデル生物であるキロショウジョウバエと近縁種をモデルにこの解明に挑戦した。

キロショウジョウバエとオナジショウジョウバエは 250-340 万年前に分化した姉妹種（最近縁種）である。これら 2 種は野外において同所的に分布するものの、それぞれ同種を交配相手として選好する配偶者選好性にもとづく生殖隔離機構により、交雑しない。この配偶者選好性においては、体表フェロモンが重要な役割を持っている。特にキロショウジョウバエにおいては、メス特異的なフェロモンである 7,11-heptacosadiene (7,11-HD) がオスの求愛活性を強く上昇させる。一方、姉妹種おなじショウジョウバエは、7,11-HD を合成する能力を進化的に失っており、さらにオナジショウジョウバエのオスは、相手メスの体表にある 7,11-HD により求愛を低下させる。このことは、種分化の過程で、オナジショウジョウバエの 7,11-HD 選好性が正から負に逆転したことを示唆している。ではこの 7,11-HD 選好性の進化的逆転はどのような神経機構により生じたのだろうか？

キロショウジョウバエにおいては、7,11-HD を受容し、オスの求愛活性を上昇させる神経回路が知られている。この神経回路は、7 種のニューロン群により構成され、前脚に存在するフェロモン受容細胞 ppk23 ニューロンを最上流として、いくつかの介在ニューロンを経て、求愛コマンドニューロンである P1 ニューロンに情報を入力する（以降、この神経回路を ppk23-P1 神経回路と呼ぶ）。ppk23-P1 神経回路の基本的な構造は、姉妹種オナジショウジョウバエでも保存されていると考えられる。そこで、本研究では、7,11-HD 選好性の進化的逆転がこの ppk23-P1 神経回路の何らかの変化によって生じたという仮説を立て、ppk23-P1 神経回路を種間比較することで、この逆転をもたらす神経機構を解き明かすことを目指した。

オナジショウジョウバエにおいては当時、キロショウジョウバエとは異なり、遺伝学的ツールがほとんど存在しなかった。そのため、ppk23-P1 神経回路を構成する 7 種のニューロン群を標識するツールや、各ニューロンの形態や機能を検証するツールを全て自前で開発することには大きな労力がかかることが想定された。そこで本研究では、キロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの雑種オスを用いることで、この労力を軽減し、7,11-HD 選好性の逆転をもたらす神経機構を絞り込む戦略を取ることにした。本研究で用いる 2 種は野外では交雑しないが、人工環境下においては一定の確率で交配し、雑種を生む。キロショウジョウバエのメスとオナジショウジョウバエのオスを交配させて生じる雑種オスは、生殖腺が発達しないために不妊であるが、メスの追跡から交尾に至る求愛行動は正常である。これまでの研究代表者の先行研究により、この雑種オスはオナジショウジョウバエと類似した 7,11-HD に対する負の選好性を示すことが示されていた。さらに、遺伝学的ツールを用いたキロショウジョウバエを交配に用いることで、雑種オスにはさまざまなツールを簡単に導入できることも示された。そこで本研究では、この雑種オスとキロショウジョウバエを用いることにより ppk23-P1 神経回路の網羅的な擬似的“種間”比較を実現し、種間差の候補を絞り込み、絞り込んだニューロン群を標識する遺伝学的ツールをオナジショウジョウバエに導入し、神経回路の種間差を特定することを目指した。

## 2. 研究の目的

配偶者選好性の分化をもたらす神経機構を解明するため、キロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの 7,11-HD 選好性の種間差がどのような神経回路の違いによりもたらされているのかを解明する。

## 3. 研究の方法

まず、ppk23-P1 神経回路を構成する 7 種のニューロン群を標識する遺伝学的ツールを交配を用いて雑種に導入し、それぞれのニューロンの形態をキロショウジョウバエと雑種で比較した。次に、ppk23-P1 神経回路の機能を比較するために、光遺伝学的ツール CsChrimson を用いて ppk23 ニューロン、mAL ニューロン、P1 ニューロンを活性化し、求愛活性への影響を調べた。さらに、GFP 再構成法を用いて各ニューロン群のシナプス結合を比較した。

オナジショウジョウバエにおいて、特定のニューロン群を標識するために、CRISPR/Cas9 法を用いて目的ゲノム領域にランディングサイト attP、可視マーカー-3xP3-RFP を挿入した。可視マーカーの発現を観察することで、attP がノックインされた系統を選抜した。

## 4. 研究成果

まず、ppk23-P1 神経回路の基本的な構造がキロショウジョウバエと雑種で保存されていることを検証するために、ppk23-P1 神経回路を構成する 7 種のニューロン群を標識する遺伝学的ツールをそれぞれ雑種に導入し、各ニューロンの形態と細胞数をキロショウジョウバエと雑

種で比較した。その結果、全てのニューロンの形態と細胞数に明確な違いはなく、ppk23-P1 神経回路の基本的な構造は保存されていることがわかった。

ppk23-P1 神経回路の求愛活性に対する機能がキイロショウジョウバエと雑種において異なるのかを検証するために、回路の最上流に位置する ppk23 ニューロンを光遺伝学的ツールを用いて強制活性化し、オナジショウジョウバエのメスに対する求愛活性を観察した。その結果、キイロショウジョウバエにおける活性化は求愛活性を上昇させたのに対し、雑種における活性化は求愛活性を低下させた。このことは、ppk23-P1 神経回路の機能がキイロショウジョウバエと雑種において逆転していることを示している。

次に、ppk23-P1 神経回路の最下流に位置する求愛コマンドニューロンである P1 ニューロンの機能について同様の比較を行った。その結果、キイロショウジョウバエでも雑種でも、P1 ニューロンの活性化はオスの求愛活性を上昇させた。さらに P1 ニューロンに接続し、P1 ニューロンの神経活動を抑制することが知られる mAL ニューロンについても同様の比較を行った。その結果、どちらにおいても mAL ニューロンの活性化は求愛活性を抑制した。これらのことは、P1 ニューロンの求愛コマンド機能や mAL の抑制機能はキイロショウジョウバエと雑種で保存されていることを示している。

上記2つの実験結果により、雑種においては、P1 や mAL の機能はキイロショウジョウバエと類似しているにも関わらず、ppk23-P1 神経回路の求愛活性に対する機能は逆転しているということを示している。このことから、研究代表者は、ppk23 ニューロンから P1 ニューロンの間の回路のどこかに存在する違いが、7,11-HD 選好性の選好性の逆転をもたらしたのではないかと考えた。さまざまなあり得る可能性の中で、研究代表者はシナプス接続について着目して比較することにした。GFP 再構成法を用いて、7種のニューロン群の全ての組み合わせに関してシナプス接続を可視化し、キイロショウジョウバエと雑種を比較した。その結果、特定のニューロン間の GFP シグナルが雑種においてのみ観察できないことがわかった。このことは、雑種において特定のニューロン間のシナプス接続が失われていることを示唆している。

この雑種にみられたシナプス接続の喪失がオナジショウジョウバエにおいても存在するかを検証するために、当該ニューロン群を標識するオナジショウジョウバエシステムを作成することにした。キイロショウジョウバエにおいて当該ニューロンを標識するシステムの性質を検討した結果、相同なゲノム領域に LexA 配列をノックインすることが最も有力な方法であろうと結論した。そこで、配列の長い LexA 配列を直接ノックインできる可能性が低いことを考慮し、まず LexA 配列を導入するためのランディングサイトである attP 配列と可視マーカー 3xP3-RFP 配列を CRISPR/Cas9 法を用いて標的領域に導入することにした。可視マーカーを用いたスクリーニングの結果、複数の attP ノックインシステムが確立できた。現在、このシステムに LexA 配列のノックインを行っているところである。LexA システムが確立でき次第、オナジショウジョウバエにおいて GFP 再構成法を用いて、当該ニューロン群のシナプス接続濃度の有無を検証する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Kim Hyunsoo, Horigome Mihoko, Ishikawa Yuki, Li Feng, Lauritzen J. Scott, Card Gwyneth, Bock Davi D., Kamikouchi Azusa	4. 巻 528
2. 論文標題 Wiring patterns from auditory sensory neurons to the escape and song relay pathways in fruit flies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2068 ~ 2098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24877	査読の有無 無
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 Yuki Ishikawa, Mao Fujiwara, Junlin Wong, Akari Ura, Azusa Kamikouchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Stereotyped Combination of Hearing and Wind/Gravity-Sensing Neurons in the Johnston's Organ of <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2019.01552	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 <i>Drosophila</i> : Unraveling the Circuit Basis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 157 ~ 157
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 無
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 Ishikawa Yuki, Okamoto Natsuki, Yoneyama Yusuke, Maeda Naoki, Kamikouchi Azusa	4. 巻 33
2. 論文標題 A single male auditory response test to quantify auditory behavioral responses in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurogenetics	6. 最初と最後の頁 64 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01677063.2019.1611805	査読の有無 無
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 Yamazaki S.J., Ohara K, Ito K, Kokubun N, Kitanishi T, Takaichi D, Yamada Y, Ikejiri Y, Hiramatsu F, Fujita K, Tanimoto Y, Yamazoe-Umemoto A, Hashimoto K, Sato K, Yoda K, Takahashi A, Ishikawa Y, Kamikouchi A, Hiryu S, Maekawa T, Kimura K D.	4. 巻 13
2. 論文標題 STEFTR: A Hybrid Versatile Method for State Estimation and Feature Extraction From the Trajectory of Animal Behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 626-626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.00626	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石川由希, 林優人, 藤井航平, 武方宏樹, 田中良弥, 上川内あづさ
2. 発表標題 花に棲むカザリショウジョウバエの訪花選好性
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuro Ohashi, Yuki Ishikawa, Takeshi Awasaki, Su Matthew, Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Identifying auditory neurons that shape song selectivity in two Drosophila species
3. 学会等名 JSCPB 2020 Yamagata
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi, Yuki Ishikawa, Takuya Maekawa, Daisuke Takaichi
2. 発表標題 Song exposure modifies the male courtship strategy to chase females in Drosophila melanogaster
3. 学会等名 JSCPB 2020 Yamagata
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Ishikawa, Yuto Hayashi, Kohei Fujii, Hiroki Takekata, Ryoya Tanaka, Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Flower-visiting behavior of <i>Drosophila elegans</i> in Okinawa
3. 学会等名 JSCPB 2020 Yamagata
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 由希, 林 優人, 藤井 航平, 武方 宏樹, 田中 良弥, 上川内 あづさ
2. 発表標題 花に棲むカザリショウジョウバエの訪花選好性
3. 学会等名 日本生態学会第68回全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Ishikawa, Naoki Maeda, Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Evolution of neural circuit for chemical communication in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 由希
2. 発表標題 性フェロモン選好性の進化的逆転をもたらす神経基盤
3. 学会等名 第21回日本進化学会年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 由希
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける化学コミュニケーションに寄与する神経回路の進化
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会
4. 発表年 2019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
---------	---------