

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20770007

研究課題名（和文）ショウジョウバエにおける *ebony* 遺伝子多型と交配相手選好性の関係について研究課題名（英文）Association between *ebony* gene polymorphism and mate preference in *Drosophila*

研究代表者

高橋 文 (TAKAHASHI AYA)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教

研究者番号：90370121

研究成果の概要（和文）：本研究は、*ebony* 遺伝子というメラニン生成系酵素をコードする遺伝子の 5' 領域の変異がその遺伝子の発現量を変化させることによってショウジョウバエの交配相手選好性に直接関与しているかどうかを明らかにするという内容である。*ebony* 遺伝子は、神経系でも発現しており、自然集団内の *ebony* 遺伝子 5' 領域の変異は、表皮細胞での発現量及び脳での発現量を変化させていることが明らかとなった。脳での発現量の変異は交尾行動に影響することも明らかとなり、*ebony* 遺伝子 5' 領域の変異が行動の違いと結びついていることを示唆する成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The goal of this project is to study the association between mate preference and polymorphism in the 5' *cis*-regulatory region of the *ebony* gene in *Drosophila*. The gene codes for an enzyme in the melanin synthesis pathway and is also known to function in the nervous system. Natural variation in the 5' *cis*-regulatory region was shown to be responsible for the expression level variation in epidermis as well as that in brain. The expression level variation in brain was shown to influence the mating behavior. Therefore, the results indicated that the variation in 5' *cis*-regulatory region affects mate preference in this species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・ゲノム動態

キーワード：種分化、*ebony*、昆虫、多型、上流解析、多面発現、交尾行動、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

多くの生物のゲノムが解読されているが、それは、種という単位をもとにその生物の特徴を規定するゲノム塩基配列の情

報を蓄積しようとしているプロセスである。その単位となる種がどのような遺伝的变化によって他の種と異なる特徴を有するにいたったかという種分化の問題は、モデル生物の近縁種ゲノムの解読が進む中、

進化遺伝学的観点から見て優先されるべき課題である。

近年、キイロショウジョウバエの近縁種間で生殖的隔離を起こす遺伝子が複数明らかとなってきた (Ting et al. 1998; Barbash et al. 2003; Presgraves et al. 2003; Masly et al. 2006)。しかし種間の比較では、種分化の初期に起こった変化と種が確立したその後起こった変化とを分離することができないという難点がある。

そこで、本申請者は現在種内に存在する交配相手選好性の違いに関与するという示唆が得られている *ebony* 遺伝子に着目し、この遺伝子と行動の関係を詳細に分析することによって種分化初期の段階で起こりうる集団間の生殖的隔離機構の解明につながると考え、本申請課題中のシステムを用いて解析を推し進めるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究に先立ち、申請者は *ebony* 遺伝子の発現量の違いがキイロショウジョウバエにおける胸部三叉色素沈着パターンの種内多型の原因となっていることを明らかにした (Takahashi et al. 2007)。また、このような集団内多型が観察される西表の集団についてこの遺伝子領域の塩基配列を比較した結果、遺伝子上流領域の一部と表現型変異の間に強い相関が見られること、またこの集団における塩基配列多型のパターンより、この多型が非ランダムな同類交配に関与していることを示唆するデータを得ている。

よって本研究課題においては、この結果を受けて、*ebony* 遺伝子の 5' 領域の変異が交配相手選好性に直接関与しているかどうか、またそれはどのような組織の発現を通して起こっているのかを実験的に明らかにすることを目的として研究を推進した。

3. 研究の方法

ebony 遺伝子の 5' 領域の変異が交配様式に直接関与しているかどうか、またそれはどのような組織の発現を通して起こっているのかを明らかにするため下記の実験的方法を用いた。

(1) *ebony* 発現組織の同定

どの組織での *ebony* の発現が非ランダム交配に関わっているのか絞り込むため、抗体染色などの情報のもとに遺伝子の発現組織及び発現パターンを明らかにする。また、定量 PCR やパイロシーケンス法などを利用して、自然集団内で発現量の変異があるかどうかについても調べる。

(2) RNAi knockdown 実験

本研究では、キイロショウジョウバエ特有の GAL4-UAS システムを用いて下記の実験を進める計画である。まず、複数の組織特異的に GAL4 の発現を誘導するドライバを用いた、RNAi knockdown 実験で *ebony* 遺伝子の交配様式への影響を直接的に調べる実験を行う。

(3) *ebony* 遺伝子の上流解析

どのコントロール領域の変異が交尾行動に影響を与えるのかを明らかにするため、*ebony* 遺伝子 5' 発現制御領域を明らかにするためのコンストラクトを作成し、トランスジェニックによる上流解析を進める。

4. 研究成果

(1) *ebony* 発現組織の同定

ebony 遺伝子の発現組織について、特に下記二つの組織での発現を確認し、それらにおける発現量の集団内変異について調べた。

① 表皮組織

色素の沈着が見られる胸部や腹部の表皮細胞で *ebony* が発現していることは知られている。これらの組織での発現量の集団内変異は、体色の濃淡と関連していることが明らかとなっており (Takahashi et al. 2007; Rebeiz et al. 2009)、日本国内で採集した西表及び勝沼集団についても発現量変異と体色の間で相関関係が観察されることも明らかとなった。下記、西表集団からのサンプル個体について行った定量 PCR の結果を示す (図 1)。

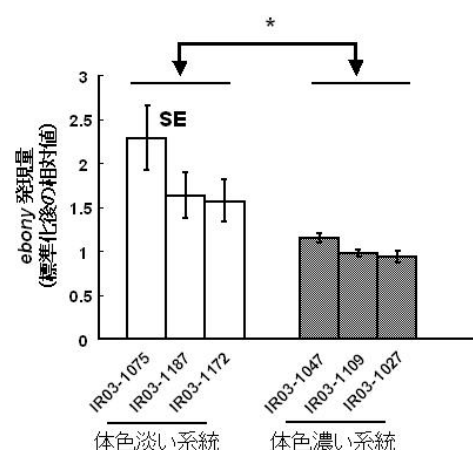


図1 西表集団における体色の濃淡と胸部における *ebony* 発現量の関係 (*Nested ANOVA, $p < 0.05$)

② 脳

Wisconsin大学のS. Carroll教授から分譲してもらったEbonyの抗体を用いて研究代表者の所属研究機関に所属する来栖光彦助教及び鈴木えみ子准教授の協力を得て、脳の抗体染色を行った。その結果、グリア細胞と考えられる組織での発現が確認された(図2)。これは、Suh and Jackson (2007)の報告とも一致する。

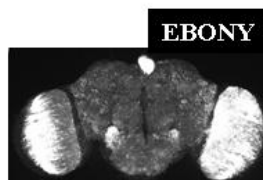


図2 Ebony抗体染色による脳での発現パターン

また、勝沼集団からの複数系統からのサンプルを解析したところ、胸部での発現量と同様、集団内で脳での発現量の変異も見られることが確認できた。

更に、パイロシーケンシング法により、ヘテロの状態に対立遺伝子特異的な定量を行うことができる。この方法を利用して、トランスの環境が同じであると仮定できるF1の状態、対立遺伝子の定量化を行った。この結果、勝沼自然集団でサンプルした対立遺伝子間で、発現量に変異があることが明らかとなった。これは、シス発現制御領域の違いによる発現量の変異のみを抽出する方法であることから、5'発現制御領域の集団内変異が、脳での*ebony*の発現量の変異を生み出していることが明らかとなった。

(2) RNAi knockdown 実験

下記二つの組織で特異的に*ebony*をノックダウンするため、組織特異的なGal4ドライバを選定した。そのようなドライバシステムを同所属研究機関の上田龍教授から分譲してもらったRNAiシステム(*UAS-ebony-IR*)とかけあわせ、そこで生じるGal4-UASシステムによるノックダウン個体について、交尾相手の選好性の違いや非ランダム交配が見られるかを野生型との比較により調べた。

① 表皮組織

表皮細胞での発現を制御するドライバとしては、下記(3)で詳細に示すとおり、本研究により明らかとなった*e_ECR0.9*という*ebony*上流に存在する900bpのエンハンサー領域をGal4につないだものを用いた。

これらと野生型の交配パターンを雌雄3個体ずつ入れた交配バイアルから最初に交

配したペアを取り出すという実験をn=50行ったところ、雌雄の交配相手選好性に非ランダムなパターンは認められなかった。

② 脳

上記(1)②により、脳内グリアでの発現が見られたため、グリア細胞特異的なドライバである*repo-Gal4*システムを用いて実験を行った。

*ebony*のグリア細胞での発現には日周期があることが知られている(Suh and Jackson 2007)ため、朝(ZT0)及び夜(ZT14)2回の時間帯で、交配実験を行った。その結果、まだ完全なデータではないが、朝の時間帯に比べ、夜の時間帯の方が、ノックダウン雄の交尾成功率が高い傾向が見られた。よって、グリア細胞での発現量の変異は、時間帯別の交配パターンに違いをもたらし、交尾のタイミングなどの違いから非ランダムな交配パターンを生むという可能性が示唆された。

(3) *ebony* 遺伝子の上流解析

これまでの*ebony*遺伝子5'発現制御領域のDNA塩基配列の解析により、900bpの有力なエンハンサー候補領域*e_ECR0.9*が同定されていたため、これについて下図のようなコンストラクトを作成し、遺伝子組み換え体を作成した(図3)。

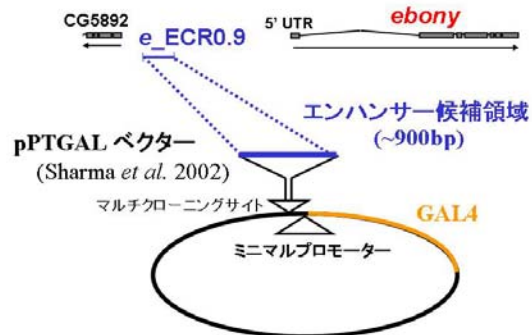


図3 エンハンサー候補領域アッセイ用ベクター

このような*e_ECR0.9*-GAL4システムをUAS-GFPシステムにかけ合わせることで、遺伝子発現パターンのレポーターアッセイを行った。その結果、胸部表皮組織の中で色素が沈着する三叉パターンでの強い発現が見られた(図4A)。また、腹部の表皮組織でも発現が確認された(図4B)。この腹部での発現については、Rebeiz et al. (2009)が、全く同じ領域内のコアエンサー約500bpについて、表皮細胞でのエンハンサー活性があることを研究代表者らより先に報告してしまったが、本研究による実験が他のラボでも再現性があつたことが示された。

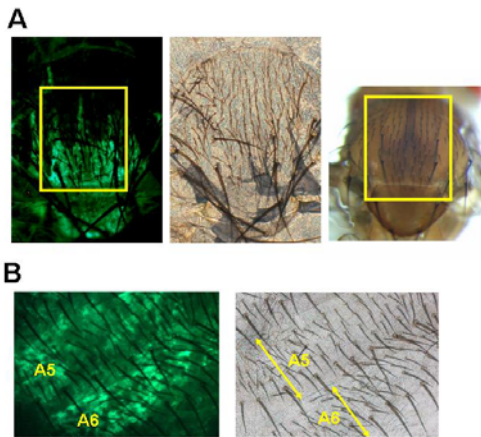


図4 GFPレポーターアッセイによる表皮エンハンサー *e_ECR0.9* の発現誘導パターン

- (A) 胸部背側
(胸部三又の色素沈着部位を四角で表示)
(B) 腹部側面
(腹部A5節及びA6節を表示)

また、この領域が、脳での発現をも誘発するのではないかと当初期待していたが、同所属研究機関の来栖光彦助教及び鈴木えみ子准教授の協力によって脳では全くシグナルが見えないことが明らかとなった。

このドライバは、幼虫期のトラキアの一部で発言が誘導される他、成虫での他の組織では強い発現の誘導が確認されなかったため、成虫の表皮組織特異的ドライバとして、上記(2)①のノックダウン実験に用いた。

(4) 研究成果のまとめと今後の展開

本研究課題による成果をまとめると、*ebony* が発現している組織である表皮細胞での発現は、5´発現制御領域内の *e_ECR0.9* により誘導されているが、この組織での発現量の変異は非ランダムな交配パターンを生み出す交尾相手選好性には顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

この遺伝子の脳内グリア細胞については、で発現制御領域は絞られていないが、シス発現制御領域の変異によって、自然集団内に発現量の異なる個体が存在することが明らかとなった。また、グリア細胞特異的な遺伝子ノックダウンにより、この組織での *ebony* の発現量の変異は、時間帯別の交配パターンに違いをもたらし、交尾のタイミングなどの違いから非ランダムな交配パターンを生むという可能性が示唆された。

よって、*ebony* 遺伝子の5´発現制御領域の変異が、実際に交配パターンに影響を与えることが示されたことは大きな成果であったといえる。

今後は、脳での発現制御領域を特定すること、及び、ノックダウンのレベルと自然集団内の変異のレベルを比較するなど、自然集団内では実際のどの程度交配パターンに影響が

出ていると考えられるかなど考察していく必要がある。

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6件)

- ① Sawamura, K., Maehara, K., Mashino, S., Kagesawa, T., Kajiwara, M., Matsuno, K., Takahashi, A., and Takano-Shimizu, T. (2010) Introgression of *Drosophila simulans Nup160* (nuclear pore protein 160) in *Drosophila melanogaster* alone does not cause inviability but does cause female sterility. **Genetics** 186: 669-76. 査読有
- ② *Takahashi, A. (2009) Effect of splicing regulation on the synonymous codon usage in alternatively spliced exons of *Drosophila Dscam*. **BMC Evol. Biol.** 9: 214. 査読有
- ③ Fujikawa, K., *Takahashi, A., Nishimura, A., Itoh, M., Toshiyuki Takano-Shimizu, T., and Ozaki, M. (2009) Characteristics of genes up-regulated and down-regulated after 24 h starvation in the head of *Drosophila*. **Gene** 446: 11-7. 査読有
- ④ Watanabe, Y., Takahashi, A., Itoh, M., and *Takano-Shimizu, T. (2009) Molecular spectrum of spontaneous *de novo* mutations in male and female germ line cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 181: 1035-43. 査読有
- ⑤ 高橋文 (2009) 中立説と実験集団遺伝学、総研大ジャーナル No.15:11-13. 査読無
- ⑥ Liu, Y.-H., Takahashi, A., Kitano, T., Koide, T., Shiroishi, T., Moriwaki, K., and *Saitou, N. (2008) Mosaic genealogy of the *Mus musculus* genome revealed by 21 nuclear genes from its three subspecies. **Genes Genet. Syst.** 83: 77-88. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 高橋文「ショウジョウバエにおける体色と行動の関連性について」北海道大学低温科学研究所研究集会、2010年9月22日、北海道大学(札幌市)
- ② 高橋文「ショウジョウバエにおける体色種内変異の分子基盤と行動への影響について」第82回遺伝学会WS、2010年9月20日、北海道大学(札幌市)
- ③ 高橋文「ショウジョウバエにおける体色

の種内変異と非ランダム交配」特定領域研究『植物ゲノム障壁』若手ワークショップ、2010年7月12日、名古屋大学（名古屋市）

- ④ 高橋文ら「キイロショウジョウバエ集団内における胸部三叉の色素沈着パターンの多型と非ランダム交配」日本遺伝学会第81回大会、2009年9月18日、信州大学（松本市）
- ⑤ Takahashi *et al.* Natural variant of a pigmentation gene and its role in mating incompatibility, The 9th Japanese Drosophila Research Conference, 2009年7月7日、ヤマハリゾート（掛川市）
- ⑥ 高橋文ら「*Dscam*遺伝子のalternatively spliced exonにおけるスプライシングの制御が同義コドン使用頻度に与える影響の解析」日本遺伝学会第80回大会、2008年9月4日、名古屋大学（名古屋市）
- ⑦ 高橋文「ショウジョウバエ模様の種内多型について」第10回日本進化学会大会、2008年8月23日、東京大学（東京都）

〔図書〕（計1件）

- ① 高橋文「生殖隔離と種分化遺伝子」、共立出版、『シリーズ 現代の生態学』7巻4部4章、2011年(in press)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/takano/takano-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 文 (TAKAHASHI AYA)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教
研究者番号：90370121