

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23220007

研究課題名(和文)種特異的性行動を規定する fru 遺伝子と fru 神経回路の解明

研究課題名(英文) Roles of the fru gene and fru-neural circuitry for the species-specificity in *Drosophila* courtship behavior

研究代表者

山元 大輔 (YAMAMOTO, DAISUKE)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50318812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,200,000 円

研究成果の概要(和文)：動物は種によって独特の行動を示す。本研究では、求愛行動様式に歴然たる相違のあるショウジョウバエ2種、*Drosophila melanogaster*と*D. subobscura*に着目して、なぜ行動の違いが生まれるのかを解明した。あらゆる行動は、特定のニューロンが決まった順序で活動することによって生み出される。研究の結果、fruitless という遺伝子のスイッチがどのニューロンでオンになるかが変わることによって、種ごとの行動の違いが生まれる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Why does every animal species exhibit a behavioral pattern that is distinctly different from that of other species? In this study, we address this question by a comparative approach in two fruit fly species, *Drosophila melanogaster* and *D. subobscura*. We focus on a courtship behavior element unique to *D. subobscura*, the extrusion of proboscis by a male directed to the female face (licking-like action). We hypothesized that a new behavioral element will be added to the courtship ritual when a new cellular member is recruited to the circuit by mutations. We revealed that genetic transfer of a regulatory region of the courtship master regulator gene fruitless from *subobscura* to *melanogaster* partly conferred the ability to execute the licking-like action on the *melanogaster* host, when the transferred sequence was used to activate the neurons. It remains unknown which neurons are critically involved in producing the *subobscura*-type licking-like action in the *melanogaster* host.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：種特異的行動 神経回路 fruitless ショウジョウバエ 転写 同定ニューロン 求愛行動 性差

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝学の優れたモデル生物であるキショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では、脳の性差を決定する二つの遺伝子、*fruitless (fru)*、*doublesex* を発現する一連のニューロンの網羅的同定を突破口として、雄の求愛行動を作り出す上で鍵となる幾つかのニューロン群が特定された。さらに、求愛行動を正に負に制御する感覚刺激の入力経路や、求愛の運動出力の生成に関与する可能性のあるニューロン群についても一部が特定された。しかし、*Drosophila* 属であっても *melanogaster* 以外の非モデル種では、求愛行動を生み出すニューロン群の特定はおろか、変異誘発や形質転換といった遺伝的操作は実質上一切不可能であり、行動の種差を生み出す遺伝子・細胞機構の解明は不可能といっても過言ではない状況にあった。

### 2. 研究の目的

異なる種の動物は、なぜ違った行動を示すのか、その秘密を、脳と遺伝子のレベルから解き明かすのが、本研究の目的である。検証すべき仮説は以下の通りである。新種の形成に呼応して雄の求愛行動回路形成のマスターレギュレーター、*fru* 遺伝子の発現制御領域に変異が生じ、その結果、新種では元の種とは一部異なるニューロンに *fru* が発現することとなって、求愛行動回路に新たな要素が付加されたため、行動に新奇の成分が生じた。この仮説に沿って以下の点を解明する。*fru* 遺伝子の発現調節領域に行動の種特異性を担う配列が存在するか。それが存在するのならば、その配列によって求愛行動回路に組み込まれる *fru* 発現ニューロンはどのように変化するのか。さらに、種によって差のあるそれらの *fru* 発現ニューロンは、実際に種特異的な行動要素の生成に寄与しているのか。

### 3. 研究の方法

(1) *fru* 遺伝子の発現調節領域に行動の種差を規定する配列が存在すると仮定すると、その配列に *GAL4* を接続したミニジーンを構築して一た一発現解析やニューロン強制活性化を行うことにより、*fru* 発現ニューロンの種差、行動に果たすその役割を解明できる。そこで、求愛行動が顕著に異なるキショウジョウバエの2種から *fru* 発現調節領域を得て、*GAL4* に繋いだ。使用した2種は、*D. melanogaster* (上述) と *D. subobscura* である。このミニジーンをそれぞれ、*mel fru-GAL4*、*sub fru-GAL4* と呼ぶ。両者を *D. melanogaster* のゲノムの同一部位 (*AttP2*) に *phiC31* インテグラーゼにより挿入し、形質転換体を作成した。これらの *GAL4* 系統を *UAS-mCD8::GFP* と掛け合わせてどのニューロンに発現が誘導されるのかを比較した。また、*UAS-dTrpA1* とも掛け合わせ、高温条件にハエを置くことでそれを発現しているニューロンを強制的に興奮させ、惹起される行動を比較した。さ

らに、*MARCM* (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) と呼ばれるクローン解析法を用いて *GAL4* を発現する細胞を少数に限定し、ニューロンの全形を標識して同定を試みるとともに、それらの行動惹起能の評価を試みた。

(2) 上記の一連の研究は、*subobscura* の遺伝子配列を *melanogaster* に持ち込んでニューロンの操作を行うという異所の実験である。*subobscura* そのものの中で当該配列がどのニューロンに *fru* 発現を引き起こすのか、それらのニューロンが *subobscura* 個体で活性化されるとどのような行動が起こるのかについては、*subobscura* そのものを使った実験でのみ調べることが出来る。そのためには *subobscura* での変異誘発、遺伝子導入が必要であるが、従来、いずれも不可能視されていた。我々は *CRISPR/Cas9* 法を適用して、この課題の解決をも目指した。

### 4. 研究成果

(1) *subobscura* の求愛行動は独特であり、中でも雄が雌に口移して食べたものを与える *Nuptial gift* は *Drosophila* の他種には見られない行動である。*Nuptial gift* を与える以外の求愛場面でも *subobscura* の雄は高頻度に口吻を突き出す行動をとる。*melanogaster* の求愛行動では、雄が雌の交尾器を舂める *licking* が口吻の伸展という点でこれに似るが、発生頻度ははるかに低い。この他、中脚



#### *subobscura*

に特徴的な求愛行動要素の一つ、*nuptial gift* (田中良弥)

をゆっくりと前後に動かす手招き行動や求愛のクライマックスで両翅を左右真一文字に開く行動など、いずれもこの種に特徴的な行動である。こうした *subobscura* に特徴的な行動を *melanogaster* に移植する実験を試みた。

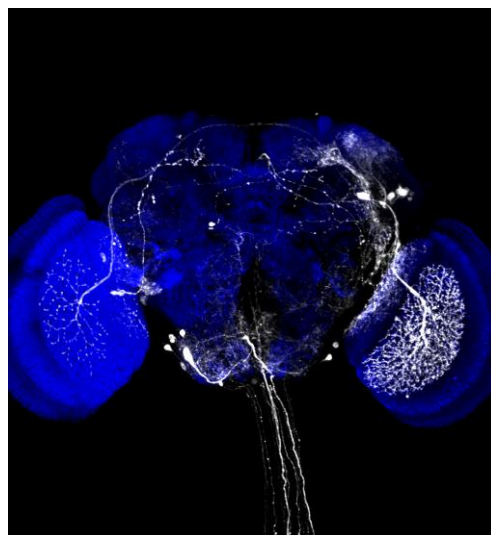
*subobscura* の *fru* 遺伝子発現調節領域の最大 31kb の断片に *GAL4* を接続し、*melanogaster* に導入後、*UAS-dTrpA1* 発現をその *GAL4* で駆動、温度を 30°C 程度に上げることによって *sub fru-GAL4* 発現ニューロンを強制的に活性化した。すると、*subobscura* の求愛要素に類似した行動が引き起こされ、特に口吻の伸展は非常に高頻度に生じた。しかし、*melanogaster* が元々持っている類似

の行動要素と、*subobscura* から移植された行動要素を区別することは、非常に難しい。我々は *sub fru-GALA* に使用した *fru* 発現制御領域と相同と考えられる *melanogaster* の *fru* 発現制御領域を用いて同様の実験を行った。すると、この時には口吻の伸展はほとんど全く生じなかった。この結果は、*sub fru-GALA* によって誘導される licking が *melanogaster* の本来有する motor act に属する licking ではなく、*subobscura* 固有の神経経路の出力として生じる licking であることを強く示唆している。



*sub fru-GALA* を用いてニューロン強制活性化を行い *melanogaster* に生じた口吻伸展 (小金澤雅之)

Cande et al (2014) は *melanogaster* の *fru* 変異体に他種の *fru* 座の全長を Bac clone で導入し、雄の求愛行動を救済した上で、その行動様式 (求愛歌) が *fru* 座を提供した種のパターンであるのか、*melanogaster* のパターンであるのかを、詳細な定量的解析によって検討した。その結果、全ての種の組み合わせに於いて、救済された求愛歌は *melanogaster* 本来のパターンであり、*fru* 座のドナーの種のパターンとなった事例はないと報告した。この Cande et al. (2014) の結果から、我々の実験で種を越えた行動様式の移植ができる可能性は低いと推察していたが、意外にも当初の期待に沿った結果が得られた。我々の実験と Cande らの実験の間には大きな操作上の差がある。Cande らは *fru* 変異救済後の雄に雌を対面させ、その結果生ずる行動を解析した。これに対して我々は、遺伝子導入後の単独雄を用いて dTrpA1 によるニューロン強制活性化を行い、生起する行動を解析した。他種から導入されたニューロンとその回路が、通常感覚入力路を介しては活性化され得ないならば、たとえそのニューロンや回路が *melanogaster* に移植されていたとしても、起動することはないであろう。たとえば、ホストの感覚入力路と他種から導入された中枢ニューロンとの接続に不具合がある場合である。あるいは GAL4 タンパク質でなく Fruitless タンパク質が生成される Cande ら



*sub fru-GALA* によって誘導した MARCM clone (木村賢一)

の設定では *malanogaster* の回路が修復されるに過ぎない (たとえば transvection により)、といったことが想定される。我々はこの成功に基づき、MARCM 法を用いて種間移入した細胞の一部のみを活性化して、*subobscura* 型 licking を引き起こすニューロンの同定を開始している。

(2) *subobscura* から *melanogaster* に *fru* 調節配列を導入してニューロンの強制活性化を行うアプローチに加え、*subobscura* そのものを用いてニューロンを操作し行動中枢を同定するため、この種で遺伝的ツールキットを作成する試みを開始し、CRISPR/Cas9 法により可視変異体の *w* と *y* の作出に成功した。更に *piggyBac* ベクターによる *y* の救済、また phiC31 インテグラーゼによるゲノムへの遺伝子導入サイト、AttP の埋設にも成功した。引用文献

Cande, J. et al. (2014) Cell Rep. 8, 363-370.

#### 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 25 件) 全件査読有

1. Koganezawa, M., Kimura, K.i. and Yamamoto, D. (2016) The neural circuitry that functions as a switch for courtship *versus* aggression in *Drosophila* males. Curr. Biol. (in press)
2. Tanaka, R., Murakami, H., Ote, M. and Yamamoto, D. (2016) Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated mutagenesis and phenotype rescue by

- piggyBac* transgenesis in a nonmodel *Drosophila* species. Insect Mol. Biol. (in press)
3. Goto, T., Sato, K., Sone, H., Koganezawa, M., Ito, H. and Yamamoto, D. (2015) Zeste tunes the timing of ecdysone actions in triggering programmed tissue degeneration in *Drosophila*. J. Neurogenet. 29, 169-173.
  4. Hara, Y., Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2015) The *Dmca1D* channel mediates Ca<sup>2+</sup> inward currents in *Drosophila* embryonic muscles. J. Neurogenet. 29, 117-123.
  5. Kimura, K-i., Sato, C., Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2015) *Drosophila* ovipositor extension in mating behavior and egg deposition involves distinct sets of brain interneurons. PLoS ONE 10, e0126445.doi:10.1371/journal.pone.0126445.eCollection 2015.PMID: 25955600
  6. Hamada-Kawaguchi, N., Nishida, Y. and Yamamoto, D. (2015) Btk29A-mediated tyrosine phosphorylation of Armadillo/ $\beta$ -catenin promotes ring canal growth in *Drosophila* oogenesis. PLoS ONE10,e012148doi:10.1371/journal.pone.0121484. eCollection 2015.PMID: 25803041
  7. Kohatsu, S. and Yamamoto, D. (2015) Visually induced initiation of *Drosophila* innate courtship-like following pursuit is mediated by central excitatory state. Nat. Commun. 6, 6457. doi: 10.1038/ncomms7457.PMID:25743851
  8. Takayanagi, S., Toba, G., Lukacsovich, T., Ote, M., Sato, K. and Yamamoto, D. (2015) A *fruitless* upstream region that defines the species specificity in the male-specific muscle patterning in *Drosophila*. J. Neurogenet. 29, 23-29.
  9. Kimura, K-i., Sato, C., Yamamoto, K. and Yamamoto, D. (2015) From the back or front: the courtship position is a matter of smell and sight in *Drosophila melanogaster* males. J. Neurogenet. 29, 18-22.
  10. Kimura, S., Sakakibara, Y., Sato, K., Ote, M., Ito, H., Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2015) The *Drosophila* Lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. J. Neurogenet. 29, 8-17.
  11. Hamada-Kawaguchi, N., Nore, B. F., Kuwada, Y., Smith C. I. E., and Yamamoto, D. (2014) Btk29A promotes Wnt4 signaling in the niche to terminate germ cell proliferation in *Drosophila*. Science 343, 294-297.
  12. Sato, K. and Yamamoto, D. (2014) An epigenetic switch of the brain sex as a basis of gendered behavior in *Drosophila*. Adv. Genet. 86, 46-63.
  13. Yamamoto, D., Sato, K. and Koganezawa, M. (2014) Neuroethology of male courtship in *Drosophila*: from the gene to behavior. J. Comp. Physiol. A 200, 251-264.
  14. Yamamoto, D. and Koganezawa, M. (2013) Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males. Nat. Rev. Neurosci. 14, 681-692.
  15. Yamamoto, D. and Ishikawa, Y. (2013) Genetic and neural bases for species-specific behavior in *Drosophila* species. J. Neurogenet. 27, 130-142.
  16. Ito, H., Sato, K. and Yamamoto, D. (2013) Sex-switching of the *Drosophila*

- brain by two antagonistic chromatin factors. *Fly 7*, 87-91.
17. Sakurai, A., Koganezawa, M., Yasunaga, K., Emoto, K. and Yamamoto, D. (2013) Select interneuron clusters determine female sexual receptivity in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 4, 1825. doi: 10.1038/ncomms2837.PMID:23652013
  18. Nawaz, H. M., Kylsten, P., Hamada, N., Yamamoto, D., Smith, C. I. E. and Lindvall J. M. (2012) Differential evolutionary wiring of the tyrosine kinase Btk. *PLoS ONE* 7, e35640. doi: 10.1371/journal.pone.0035640. Epub 2012 May 4. PMID: 22574122
  19. Ito, H., Sato, K., Koganezawa, M., Ote, M., Matsumoto, K., Hama, C. and Yamamoto, D. (2012) Fruitless cooperates with two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron sexual dimorphism. *Cell* 149, 1327-1338.
  20. Bousquet, F., Nojima, T., Houot, B., Chauvel, I., Chaudy, S., Dupas, S., Yamamoto, D. and Ferveur, J.-F. (2012) Expression of a desaturase gene, *desat1*, in neural and nonneural tissues separately affects perception and emission of sex pheromones in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 249-254.
  21. Watanabe, K., Toba, G., Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2011) Gr39a, a highly diversified gustatory receptor in *Drosophila*, has a role in sexual behavior. *Behav. Genet.* 41, 746-753.
  22. Goto, J., Mikawa, Y., Koganezawa, M., Ito, H. and Yamamoto, D. (2011) Sexually dimorphic shaping of interneuron dendrites involves the Hunchback transcription factor. *J. Neurosci.* 31, 5454-5459.
- [学会発表] (計 130 件)
1. Yamamoto, D. Brain insulin-producing cells integrate light and temperature information for diapause control in *Drosophila*. Invertebrate Neuropeptide Conference, Solar do Rosario Hotel, Auro Preto, Brazil, 2016 年 2 月 14-18 日.
  2. Yamamoto, D. Genes and circuits for male courtship behavior in *Drosophila*. EMBO Conference “Neural Development”. Taipei, Taiwan, 2015 年 12 月 4-8 日.
  3. Yamamoto, D. Nature vs. nurture in *Drosophila* courtship. EMBO-Kavli Workshop on Neural Circuits and Behaviour of *Drosophila*. Kolymbari, Crete, Greece, 2015 年 7 月 5-10 日.
- [その他]  
ホームページ等  
[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto_lab/)
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者  
山元 大輔 (YAMAMOTO, Daisuke)  
東北大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号：50318812
    - (2) 研究分担者  
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
    - (3) 連携研究者  
小金澤 雅之 (KOGANEZAWA, Masayuki)  
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：10302085
- 鳥羽 岳太 (TOBA, Gakuta)  
筑波大学・URA 研究戦略推進室・リサーチ  
アドミニストレーター  
研究者番号：40599669