

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570082

研究課題名(和文) ショウジョウバエ求愛歌生成を制御する神経回路の同定とその動的特性の生理学的解析

研究課題名(英文) Identification of neural circuitry controlling the courtship song of *Drosophila*

研究代表者

小金澤 雅之 (Koganezawa, Masayuki)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：10302085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの体細胞の性分化はfruitless (*fru*)とdoublesex (*dsx*)と呼ばれる二つの性決定因子により制御されている。近年の研究により求愛行動の実現には性決定因子であるこれらの遺伝子を発現する神経回路が重要である事が分かってきた。雄が雌に対して示す求愛では、羽展開・振動による求愛歌生成が最も特徴的な行動要素である。本研究では*fru/dsx*発現ニューロンの活動の人為的操作技術とモザイク法を組み合わせることにより、特徴的な音響パターンをもつ求愛歌がどのニューロンによって生み出されているのかを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The sexual differentiation of somatic cells in *Drosophila* is controlled by the terminal genes in the sex determination hierarchy; fruitless (*fru*) and doublesex (*dsx*). Recent studies revealed that neurons expressing these genes play central role in the courtship behavior. The courtship song produced by a male fly is one of the hallmarks of courtship of *Drosophila*. To reveal the neural basis for courtship song production, I performed behavioral experiments by using the technique to manipulate neural activity of *fru/dsx*-expressing neurons. In this study, I identified 4 types of *dsx*-expressing neurons controlling proper courtship song production.

研究分野：神経行動学

キーワード：ショウジョウバエ 求愛行動 fruitless doublesex

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの求愛行動では転写制御因子をコードする *fruitless (fru)* 遺伝子の機能が決定的な役割を果たしている。*Fru* 蛋白質は雄のニューロンにのみ発現し、下流の遺伝子群を制御することにより細胞数や神経突起パターンなどにおける性差を生み出している (Kimura *et al.*, 2005)。*fru* は約 2% のニューロンにしか発現しないにも関わらず、全ての *fru* 発現ニューロンのシナプス伝達を阻害すると求愛行動は完全に抑制されることから、*fru* 発現神経回路が求愛行動の実行時に必須な機能を担っていることはわかっていた。しかし、約 50 種に分類される各々の *fru* 発現ニューロン群が求愛行動時にどのような機能分担を行っているのかは未解明であった。

我々は *fru* 発現ニューロンに注目した求愛行動の神経機構に関する研究を行ってきた (Kimura *et al.*, 2008; Koganezawa *et al.*, 2010, Kohatsu and Koganezawa *et al.*, 2011)。特に、温度感受性チャンネルである *dTrpA1* を雄の *fru* 発現ニューロンに異所的に発現し、高温条件下で当該ニューロンを人為的に興奮させたところ、ターゲットとなる雌が存在しない条件でも雄型の求愛行動が解発できることを示した研究は極めて重要である (Kohatsu and Koganezawa *et al.*, 2011)。同研究では、モザイク法を用いて *dTrpA1* の異所発現を局限する実験により、P1 および P2b と名付けた 2 種類の *fru* 発現ニューロン群の強制的活性化より求愛行動が解発出来ることを明らかとした。さらに Ca^{2+} イメージング法を用いることによりこれらの神経細胞が実際の求愛行動時に興奮することも示した。この研究は求愛行動を解発する「司令ニューロン」を同定した画期的なものであった。しかしながら、脳内に約 2,000 個存在する *fru* 発現ニューロン群がどのような機能的回路を構成することにより、複雑な運動パターンを持つ求愛行動を実現しているのかについては依然明らかでは無かった。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの求愛行動は定型的な運動パターンから構成されている。中でも雄が羽を振動させることによって生ずる求愛歌は、その音響パターンが雌が同種雄を識別する際に決定的な役割を果たしている点で最も重要な行動要素であるといえる。キイロショウジョウバエの求愛歌は *sine song* と *pulse song* と呼ばれる 2 種の歌から構成されている (図 1)。一方、*fru* 発現神経回路を強制的に興奮させることにより解発される求愛歌は、本来の歌の時間パターンを再現できる (Clyne and Miesenböck, 2008; von Philipsborn *et al.*, 2011)。このことは *fru* 発

現神経回路が求愛歌生成を制御していることを強く示唆している。

本研究は、分子遺伝学的な手法が駆使できるキイロショウジョウバエを用いて、求愛時に特徴的な運動パターンである求愛歌生成に焦点を絞り、その秩序だった運動を生み出すニューロンの同定とその機能的特性を明らかとすることを目的とした。

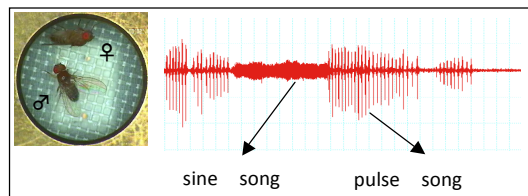


図 1 求愛歌の音響パターン

キイロショウジョウバエの雄は片方の羽を開いて振動させることにより求愛歌を奏でる。マイクロホンで記録された求愛歌のオシログラムを右に示す。求愛歌は *sine song* と *pulse song* と呼ばれる 2 種類の音響パターンから構成されている。

3. 研究の方法

実験にはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた。ニューロンの興奮性を一過的に操作するために温度感受性陽イオンチャンネル *dTrpA1* の異所的発現を利用した。成虫になるまでの発育時期における *dTrpA1* による不必要なニューロンの活性化を抑えるために、実験個体は 19°C で飼育した。実験個体は羽化後に 1 匹ずつ隔離し 19°C で 4~14 日間継続飼育した上で行動実験に用いた。求愛歌の記録には、床面にマイクロホンを設置した温度制御可能な金属製チェンバーを用いた。ニューロンの強制活性化実験では、まず *dTrpA1* が開口しない 20°C での行動を記録した上で、27~35°C にチェンバーの温度を上昇させ *dTrpA1* によるニューロン的人為的活性化によって誘起される行動を記録した。

ニューロン活動を人為的に操作する神経回路として、「*fru* 発現ニューロン群」および *fru* と並ぶショウジョウバエの性決定因子である *doublesex (dsx)* 遺伝子を発現する「*dsx* 発現ニューロン群」を対象とした。*dTrpA1* の異所発現には Gal4/UAS システムを利用した。少数のニューロンだけに *dTrpA1* を発現させその機能を探る実験では、MARCM 法 (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker)、Gal80 による Gal4 機能阻害を利用した発現領域制限、さらに FLP/FRT システムを用いた intersection 法などを用いた。ニューロン的人為的活性化により誘起された求愛歌のパターンを解析することにより、どの神経細胞が求愛歌のどの要素の制御に関わるのかを解析した。

4. 研究成果

(1) 全ての *fru* 発現ニューロンを強制的に興奮させることによって求愛行動が解発できることから、まず *fru* 発現神経回路についての機能的モザイク実験を行った。さらに以前の研究 (Kimura et al., 2008; Kohatsu and Koganezawa et al., 2011) から、求愛行動を解発する *fru* 発現神経細胞の一部は *fru* と並ぶショウジョウバエの性決定因子である *dsx* 遺伝子を共発現することが明らかとされていることから、*dsx* 発現神経回路にも注目して実験を行った。温度感受性チャンネル *dTrpA1* を *fru* もしくは *dsx* 発現ニューロンに異所発現し、高温条件下でこれらのニューロン群を強制活性化することによって、*pulse* と *sine* から構成される正常な音響パターンを持つ求愛歌が生成されることが明らかとなった (図 2)。*fru* 発現ニューロンの強制活性化で用いた個体の遺伝子型は *w; UAS-dTrpA1/+; fru^{NP21-Gal4}/+* であり、*dsx* 発現ニューロンの強制活性化で用いた個体の遺伝子型は *w; UAS-dTrpA1/+; dsx^{Gal4}/+* である。この結果により、正常な求愛歌の生成には *fru* や *dsx* を発現する神経回路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。*dsx* 発現ニューロンの数は *fru* 発現ニューロンの約 1/10 であり、その多くは *fru* を共発現している。さらに誘導された求愛歌は *dsx* 発現ニューロンを強制活性化した時の方がより正常な音響パターンであったことから、求愛歌の生成には *dsx* 発現ニューロンが中核的であることが示唆された。

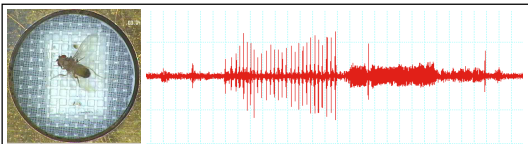


図 2 全 *dsx* 発現ニューロンを強制活性化した際に誘起される行動

dsx 発現ニューロンの活性化によりターゲットとなる雌がいなくても片翅展開が誘起され (左図)、*sine song* と *pulse song* から構成される正常な求愛歌が生成された (右図)。

(2) 胸部分節化に関わる *teashirt* (*tsh*) 遺伝子を利用して、脳もしくは胸部神経節のみの *fru* 発現神経細胞を *dTrpA1* により強制活性化する実験を行った。まず胸部のみに *Gal80* を発現する *tsh-Gal80* を利用することにより脳の *fru* 発現ニューロンのみの強制活性化を行った。実験に用いた個体の遺伝子型は *w; UAS-dTrpA1/tsh-Gal80; fru^{NP21-Gal4}/+* である。脳の *fru* 発現ニューロンのみの強制活性化により、片翅展開が観察され *pulse song* が誘導されることが明らかとなった。しかしながらこの条件では明確な *sine song* は生成されなかった。次に胸部の *fru* 発現ニューロンのみの

強制活性化のために最近開発された *intersection* 法を用いて実験を行った。胸部にのみ *Gal4* を発現する *tsh-Gal4*、*fru* 遺伝子座に *FLP* 遺伝子がノックインされた *fru^{FLP}* および *UAS* 配列と *dTrpA1* 遺伝子配列の間に *FLP* の標的である *FRT* 配列で転写 *stop* 配列を挟んだトランスジーン (*UAS>stop>dTrpA1*)、以上三つの要素を持つ個体 (遺伝子型は *w; UAS>stop>dTrpA1/tsh-Gal4; fru^{FLP}/+*) では胸部の *fru* 発現ニューロンでのみ *dTrpA1* が異所発現する。この個体を用いて高温条件下で胸部の *fru* 発現ニューロンのみを強制活性化したところ、生成される音響パターンは求愛歌とは全く異なり、翅展開についても両翅展開となることが明らかとなった。以上の結果より、*pulse* と *sine* から構成される片翅展開に伴う正常な求愛歌生成は、胸部の運動パターン生成回路の強制活性化のみで生成できるのではなく、脳に由来するコマンド信号との相互作用により生み出されている可能性が示唆された。

(3) 求愛歌生成において中核的な役割を果たしていることが示唆された *dsx* 発現ニューロンのうち、どのニューロン群が求愛歌の音響パターン形成に重要であるのかを解析するために、*MARCM* 法を用いた機能的モザイク解析を行った。使用した個体の遺伝子型は *y hs-Flp; FRTG13 UAS-mCD8::GFP/FRTG13 tubP-Gal80; dsx^{Gal4}/UAS-dTrpA1* である。この遺伝子型の個体の発生初期に熱ショックを 1 時間与える事により *FRT* 配列を認識する *FLP* タンパク質を発現し、*FLP* による染色体組換えを誘導することで、一部の *dsx* 発現ニューロンのみに *dTrpA1* を異所発現したモザイク個体を作成できる。*GFP* をレポーターとして発現したモザイク個体の解剖学的解析より、*dsx* 発現ニューロンは脳内で 8 グループ、胸部神経節内で少なくとも 3 グループに分類できることが明らかとなった。

dTrpA1 を少数の *dsx* 発現ニューロンに異所発現させたモザイク個体の行動解析から、脳内の *pC1*、*pC21*、胸腹部神経節内の *TN1*、*prA* と名付けられた *dsx* 発現ニューロン群をそれぞれ単独で強制活性化することにより、羽振動による音響生成がなされることが明らかとなった。興味深いことに、上記ニューロン群を強制活性化した際に生成される音響パターンはそれぞれのニューロン群で異なっていた。例えば脳内 *pC1* ニューロン群の強制活性化は *pulse song* を誘起するが、*sine song* は生成できない。*pC21* ニューロンの強制活性化は *sine* と *pulse* の両方の歌要素を生成できる。胸部神経節に存在する *TN1* ニューロンの強制活性化では、連続した *sine song* のみが生成され、明確な *pulse song* は誘導されなかった。例として *pC1* もしくは *TN1* ニューロンを強制活性化した際に記録された音響パターンを図 3 に示す。正常な求愛歌は *pulse song*

と sine song から構成されており、上述した脳内および胸部神経節内の *dsx* 発現ニューロン群が協調して働くことにより正常な求愛歌が生成されることが示唆された。

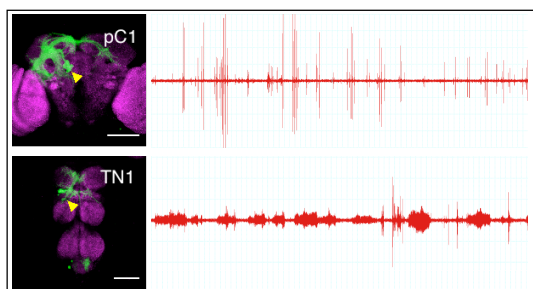


図3 特定の *dsx* 発現ニューロンを強制活性化した際に誘起される音響パターン

上段：脳内の pC1 ニューロン（左図）の強制活性化は pulse song のみを誘起する。

下段：胸部神経節内の TN1 ニューロン（左図）の強制活性化では、連続した sine song のみが生成される。

(4) 強制活性化により sine song と pulse song から構成される正常に近い求愛歌を生成できたのは、*dsx* 発現 pC21 ニューロンであった。このことから pC21 ニューロンが求愛歌生成に最も重要であると考えられた。そこで、pC21 の機能についてさらに解析を行った。通常の求愛歌生成時には片翅のみが使用される。しかしながら TN1 ニューロンのような胸部神経節内に存在する求愛歌制御用ニューロンの強制活性化では、多くの場合両翅が展開される。このことは脳からの下行性シグナルが片翅展開の実現に重要である事を示唆している。興味深いことに pC21 の強制活性化では求愛歌生成時に細胞体とは反対側の羽が優先的に使用されることが分かった。一方、羽展開を伴う音響生成の可能な脳内 *dsx* 発現ニューロンである pC1 の強制活性化ではこのような羽使用の偏りは観察されない。このことは pC21 が通常の求愛行動での片翅展開の制御に寄与する事を示唆している。羽展開の側方性には脳内の側抑制的な神経回路が機能している可能性がある。さらに GABA 合成酵素である *Gad1* のノックダウン実験を通して、片翅展開には GABA 作動性 *fru* 発現ニューロンの一つである mAL が関与している可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Kimura, S., Sakakibara, Y., Sato, K., Ote, M., Ito, H., Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2014) The *Drosophila* lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. *J*

Neurogenet. (29) pp. 8-17. 査読有
doi: 10.3109/01677063.2014.917644.

2. Yamamoto, D., Sato, K. and Koganezawa, M. (2014) Neuroethology of male courtship in *Drosophila*: from the gene to behavior. *Journal of Comparative Physiology A* (200) pp. 251-264. 査読有
doi: 10.1007/s00359-014-0891-5.
3. Yamamoto, D. and Koganezawa, M. (2013) Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males. *Nature Reviews Neuroscience* (14) pp. 681-692. 査読有 doi: 10.1038/nrn3567.
4. Sakurai, A., Koganezawa, M., Yasunaga, K., Emoto, K., and Yamamoto, D. (2013) Select interneuron clusters determine female sexual receptivity in *Drosophila*. *Nature Communications*, (4) Article number:1825. 査読有
doi: 10.1038/ncomms2837.
5. Ito, H., Sato, K., Koganezawa, M., Ote, M., Matsumoto, K., Hama, C. and Yamamoto, D. (2012) Fruitless recruits two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron sexual dimorphism. *Cell* (149) pp. 1327-1338. 査読有
doi: 10.1016/j.cell.2012.04.025.

〔学会発表〕(計25件)

1. Koganezawa, M. and Yamamoto, D. Pheromone sensitive interneurons switching courtship and aggression in *Drosophila*. *The 2nd Taiwan-Tohoku University Neuroscience Workshop for Young Scientists: The Brain in Function and Malfunction: a Neurogenetic Approach.* 2014.12.7 ~ 12.11 @ The Miyagi-Zao Royal Hotel and Tohoku University (Miyagi, Japan)
2. 小金澤雅之・山元大輔 ショウジョウバエの求愛/攻撃の切り替えに関わる *fruitless* 発現神経回路 平成26年度日本動物学会東北支部大会 2014年7月12日~13日 @岩手大学復興祈念銀河ホール(岩手)
3. Koganezawa, M. and Yamamoto, D. Neural circuitry switching between courtship and aggression in *Drosophila*. *11th International Congress of Neuroethology (ICN)* 2014.7.28 ~ 8.1 @ Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)

4. 小金澤雅之・山元大輔 ショウジョウバエの求愛/攻撃を制御する脳内 *fruitless* 発現ニューロン 日本動物学会第84回年会 2013年9月26日~28日 @岡山大学津島キャンパス (岡山)
 5. 小金澤雅之・山元大輔 ショウジョウバエの求愛と攻撃を制御するフェロモン感受性介在ニューロンの同定 日本味と匂学会第47回大会 2013年9月5日~7日 @仙台市民会館 (仙台)
 6. 小金澤雅之・山元大輔 強制活性化法を用いた求愛と攻撃を制御する中枢ニューロンの同定 平成25年度日本動物学会東北支部大会 2013年7月20日 @秋田大学手形キャンパス・大会会館クレール (秋田)
 7. 小金澤雅之 ショウジョウバエにおける“種特異的”求愛行動パターンを生み出す神経基盤 第6回 *Evo-devo* 青年の会「新奇性の生まれるとき *The Emergence of Evolutionary Novelities*」 2013年7月13日~14日 @東京大学三崎臨海実験所 (三崎) 招待講演
 8. 小金澤雅之 ショウジョウバエの求愛行動を司る *fruitless* 発現神経回路 日本遺伝学会第84回大会・ワークショップ「モデル動物の特徴を生かした行動遺伝学の新たな展開」 2012年9月24日~26日 @九州大学医学部 (福岡) 招待講演
 9. Koganezawa, M. and Yamamoto, D. Functional dissection of neural circuitry generating *Drosophila* courtship song by intersectional approach. *The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, 2012.9.18~9.21. Nagoya Congress Center, (Nagoya)
 10. 小金澤雅之・山元大輔 ショウジョウバエ求愛歌生成を制御する *fruitless/doublesex* 発現神経回路 日本動物学会第83回大会 2012年9月13日~15日 @大阪大学豊中キャンパス (大阪)
 11. 小金澤雅之・山元大輔 ショウジョウバエ種特異的求愛行動パターンを生み出す *fru* 発現神経回路 平成24年度日本動物学会東北支部大会 2012年7月21日 @山形大学理学部 (山形)
 12. Koganezawa, M. and Yamamoto, D. Functional dissection of *fru/dsx*-expressing neural circuitry generating *Drosophila* courtship behavior. *JCCPB2012(第34回日本比較生理生化学会年会)* 2012年7月6日~8日 @湘南国際村センター(葉山)
- [図書] (計2件)
1. Yamamoto, D., Kohatsu, S., Koganezawa, M. (2013) *Insect Pheromone Behavior: Fruit Fly In: Pheromone Signaling: Methods in Molecular Biology*, vol.1068, Tohara K Ed., Springer: New York, p.261-272.
 2. Kohatsu, S., Koganezawa, M., Yamamoto, D. (2012) *in vivo* optical recording of brain interneuron activities from a *Drosophila* male on a treadmill. In: *Genetically Encoded Functional Indicators*, J.-R. Martin Ed., Humana Press Springer: New York, p.103-112.
- [産業財産権]
○出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)
- [その他]
ホームページ等
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者
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
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
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