

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870264

研究課題名(和文)同種か異種かを識別する種間認識システムの進化を司る神経分子基盤

研究課題名(英文)Neural mechanisms underlying the evolution of mating preference

研究代表者

石川 由希 (Ishikawa, Yuki)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：70722940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：配偶者選好性の種特異性は、生物多様性の維持や促進に大きな役割を果たしている。しかしどのような神経回路の変化が、このような配偶者選択性の進化や分化を実現するのは全くわかっていなかった。申請者はこの謎を解明するために、ショウジョウバエのフェロモン選好性と求愛選好性に着目し、その種間差をもたらす神経回路の違いを探索した。本研究の結果、フェロモン選好性や求愛選好性に関与すると考えられる神経回路の違いを見出すことが出来た。この結果は、動物行動学において大きな謎であった同種に対する配偶者選好性がいかにして獲得されるのかという問いに対して、単一ニューロンレベルで応える大きな成果であった。

研究成果の概要(英文)：Species-specific mating preference plays important role for the generation and maintenance of biodiversity. However, what kind of change in neural circuits causes the evolution of the preference is largely unknown. To solve this question, I searched the difference of neural circuit causing the species difference of pheromone and song preference in *Drosophila*. As a result, I found several differences in the neural circuits, which might be involved in the species difference of these preferences. These findings may provide clues to understand how the mating preference to conspecific individuals has been acquired during evolutionary process.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：配偶者選好性 行動進化 フェロモン 求愛歌 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

生物多様性が生まれ、維持される過程には行動の進化的変化が常に重要な役割を果たしている。しかし、行動を支配する神経回路の複雑さ故に、「どのような神経回路の変化が行動進化をもたらすのか」はほとんどわかっていなかった。同種と異種を識別し、同種と選択的に交配する配偶者選好性は、生殖隔離や性選択を介して、生物多様性の維持・促進に特に大きな役割を果たしている。この配偶者選好性の性質は、末梢から中枢までの神経回路から成る種間認識システムにコードされている。当然ながらこのシステムは種ごとに異なる。特に種分化直後には、劇的な配偶者選好性の分化をもたらすような神経回路の改変が起こり、同種を好み、異種を嫌う種特異的な配偶者選好性が獲得されることで、生殖隔離や形質分化が促進される。しかし、具体的にどのような神経回路の変化が、配偶者選好性の進化や分化を実現するのは、申請者が研究を始めるまで全くわかっていなかった。

申請者はこの課題に取り組むモデルとして、キイロショウジョウバエ（以下キイロ）とその姉妹種オナジショウジョウバエ（以下オナジ）に着目した。キイロショウジョウバエはいち早く全ゲノム解読が完了したモデル生物で、脳内のさまざまなニューロン群を標識・操作する膨大な遺伝学的ツールが開発されている。これらのツールは、種間認識システムの進化をもたらす神経回路の変化を特定のニューロン群の機能や性質に落とし込むのに必要不可欠である。また、オナジは約540万年前にキイロと分岐した姉妹種である。分子遺伝学的ツールの開発はほとんど進んでいないものの、キイロと同様に全ゲノム解読が完了しており、飼育や遺伝子導入が比較的容易である。そこで申請者は、これら二種の配偶者選好に關与する神経回路を網羅的に比較することで、種間認識システムの進化の実体を解き明かす計画を立てた。

配偶者選好にはさまざまなモダリティの情報処理が關与する。本研究では、キイロとオナジにおける配偶者選好性の種間差をもたらす神経基盤を解き明かすために、両種の生殖隔離に寄与するとされる(1)体表フェロモンに対する選好性と(2)求愛歌に対する選好性を司る神経回路を対象に解析を行った。

(1) フェロモン選好性に関しては、特にキイロ雌に特異的な体表フェロモン7,11-heptacosadiene (7,11-HD)に対する選好性に着目した。キイロ雄の求愛は7,11-HDによって促進されるが、オナジ雄の求愛は7,11-HDによって強く抑制される(Billeter et al. 2009)。オナジ雌は、7,11-HD合成酵素遺伝子の制御領域の変異によって、7,11-HD合成能力を失っていることが既にわかっている(Shirangi et al. 2009)。つまり、オナジ

は二次的に性フェロモン7,11-HDを失い、同時に7,11-HDに対する負の選好性を獲得したと考えられる。このことから、オナジにおいて、祖先種が持っていた7,11-HDを情報処理する神経回路が変化し、7,11-HD選好性が正から負に逆転したと考えられる。しかしどのような神経回路の変化がこのような選好性の劇的な逆転をもたらすのかは全く未知であった。これまでの研究で、キイロでは脚に存在する味覚受容ニューロン(ppk25ニューロン)が7,11-HDを受容し、求愛活性を上昇させることが知られていた(Lu et al. 2012, Thistle et al. 2012, Lu et al. 2014)。このことから申請者は、7,11-HD選好性の種間差はこれら7,11-HD受容ニューロン群とその下流の神経回路の種間差に起因するのではないかと考え、この神経回路を構成するニューロン群の形態や機能を種間比較しようと考えた。しかし、先述の通り、オナジではキイロで開発されているようなさまざまなニューロン群を標識する系統は存在しない。そこで、本研究ではまずオナジと同様に7,11-HDに対して負の選好性を示す雑種をオナジのモデルとして用いて、7,11-HD選好性の逆転をもたらす神経回路の種間差を特定しようとした。

(2) 求愛歌選好性に関しては、パルス歌のパルス間隔に着目した。キイロとオナジの求愛歌はよく似ており、ともにパルス歌とサイン歌から成る。キイロの近縁種では古くからパルス歌のパルス間隔が種間で多様であることが知られており(Bennet-Clark & Ewing 1969) またそれぞれ同種の求愛歌に最もよく応答することがわかっていた(Ritchie et al. 1999)。しかし、この同種の求愛歌に対する選好性が、パルス間隔に対する選好性によるものなのか、あるいは他のパラメータによるものなのかを明確に示した例はなかった。このため、本研究ではまずキイロとその近縁種において、パルス間隔選好性が種ごとに異なることを、行動実験を用いて確かめた。また、パルス間隔選好性を効率よく定量解析するための、単一個体を用いた行動解析法の確立も目指した。続いて、パルス間隔選好性の種間差をもたらす神経回路の違いを特定するために、音情報の入口である聴覚一次ニューロンを含むジョンストン器官(JO)ニューロンの形態や細胞数をキイロとその近縁3種間で比較した。

## 2. 研究の目的

本研究では、キイロとオナジにおける(1)体表フェロモン選好性と(2)求愛歌選好性の種間差をもたらす神経回路の変化を解き明かすことを大きな目的とし、以下の個別の目的を設定した。

(1) 2種の雑種をオナジのモデルとして用い、キイロ雌フェロモン7,11-HDの情報処理を行う神経回路の“種間”差を同定する。

(2) パルス歌のパルス間隔に対する選好性が種間で異なることを確かめ、また聴覚一次ニューロンの形態や数の種間差を見出す。

### 3. 研究の方法

#### (1) フェロモン選好性

ほぼすべての実験において、実験対象のニューロン群にエフェクター(蛍光色素/神経毒/ $Ca^{2+}$ インディケータなど)を発現させるキイロ系統を、野生型キイロあるいは野生型オナジと掛け合わせ、得られた雄をそれぞれキイロ、雑種として比較した。

キイロで 7,11-HD を受容し求愛活性を上昇させることが知られている ppk25 ニューロンが、2種の 7,11-HD 選好性の違いに寄与している可能性を検証するため、ppk25 ニューロンに神経毒素(テトロドトキシン)を発現させたキイロや雑種のキイロ雌に対する求愛活性を定量した。また、キイロにおいて 7,11-HD を情報処理する神経回路を構成するニューロン群の形態や細胞数を比較するために、これらのニューロン群を蛍光タンパク質 GFP で標識し、脳、胸腹部神経節、脚を抗体染色し、共焦点顕微鏡で観察した。ppk25 ニューロンの活動性を比較するために、細胞内のカルシウム濃度依存的に蛍光タンパク質を発現させる CaLexA システムを用いた(Masuyama et al. 2012)。さらに、7,11-HD を構成するニューロン群の機能を比較するために、光遺伝学の手法を用いた(Inagaki et al. 2014)。各ニューロンに光受容性イオンチャネルを発現させ、光を当てて各ニューロンの神経活動を促進させ、求愛行動に対する影響を観察した。また、GRASP 法(Feinberg et al. 2008)を用いてこれらのニューロン群の神経接続を比較した。

本研究で存在が示唆されたオナジや雑種に存在する未知の 7,11-HD 受容性求愛抑制ニューロン(後述)を同定するために、脚に発現するさまざまな味覚受容ニューロン群に神経毒を発現させ、キイロ雌に対する求愛活性を観察した。また、これらのニューロン群に蛍光タンパク質を発現させ、細胞数や投射パターンを比較した。

#### (2) 求愛歌選好性

キイロと近縁3種におけるパルス歌のパルス間隔選好性を定量的に比較するために、チェーン行動(パルス歌によりオス同士が求愛し追いかけ合う行動)を観察した(Eberl et al. 1997, Yoon et al. 2013)。パルス間隔 35ms, 55ms, 95ms の人工パルス歌を雄6匹に与え、ChaIN ソフトウェア(Yoon et al. 2013)によってチェーン行動頻度を、Ctrax ソフトウェア(Branson et al. 2009)によって運動活性を定量した。また、解析の効率性を上げるために、単一個体を用いた解析も行った。雄1匹にパルス歌を与え、ChaIN ソフトウェアを用いて運動活性を定量した。

JO ニューロンの細胞数を4種で比較する

ために、抗 ELAV 抗体を用いて触角第2節内のニューロンの核を標識し、EVEA ソフトウェアを用いて数を計測した。聴覚一次ニューロンの蛍光トレーサーを用い、JO ニューロンの投射部位を標識し、共焦点顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) フェロモン選好性

オナジや雑種の求愛活性は 7,11-HD によって抑制される。この抑制効果は前脚を切除することによって失われることが、先行研究によりわかっていた(Fan et al. 2013)。これは、オナジや雑種の前脚に、7,11-HD を受容し、求愛を抑制する味覚ニューロン(以下 7,11-HD 受容性求愛抑制ニューロンと呼ぶ)が存在することを示唆している。キイロでは既に 7,11-HD を受容し、求愛を促進する味覚ニューロンとして ppk25 ニューロンが知られていた(当初は ppk23 ニューロン; Lu et al. 2012, Thistle et al. 2012, Lu et al. 2014)。そこで申請者はまず、この ppk25 ニューロンが 7,11-HD 受容性求愛抑制ニューロンの実体であるという作業仮説を立て、ppk25 ニューロンに神経毒を発現させた雑種を用いてこれを検証した。これらの雑種のキイロ雌(7,11-HD をもつ)に対する求愛活性を観察したところ、予想に反し、ppk25 ニューロンの抑制した場合でも、キイロ雌に対する求愛は上昇しなかった。この結果により、雑種に存在する 7,11-HD 受容性求愛抑制ニューロンは ppk25 ニューロンとは別に存在する未知の味覚ニューロンであることがわかった。

この未知の 7,11-HD 受容性求愛抑制ニューロンを同定するため、脚に存在する味覚ニューロン群に神経毒を発現させた系統を用いて、スクリーニングを行った。その結果、ある特定の味覚ニューロン群(以下 GrX ニューロンと呼ぶ)に神経毒を発現させたときに、キイロ雌に対する雑種の求愛活性が劇的に上昇した。この GrX ニューロンは雑種やオナジにおいてキイロ雌の 7,11-HD を受容し求愛を抑制するニューロンである可能性が極めて高い。今後 GrX ニューロンの性質や機能が、キイロとオナジでどのように異なるのかを明らかにすることで、7,11-HD 選好性の進化的逆転がどのような神経機構で起こったのかを明らかにすることができる。

本研究開始後、Clowney らや Kallman らによって、キイロにおいて ppk25 ニューロンから求愛コマンド様 P1 ニューロンまでの神経回路(ppk25-P1 経路)が報告された(Clowney et al. 2015, Kallman et al. 2015)。これらの神経回路はキイロにおいて 7,11-HD が求愛を促進するのに機能している。キイロとオナジの共通祖先においてもこのような神経回路はおそらく存在していたと考えられるが、7,11-HD に対する負の選好

性を獲得したオナジにおいて、この“祖先的”な神経回路にどのような変化が起こったのだろうか？これを明らかにするために、キイロと雑種において、この ppk25-P1 経路を構成するニューロン群の形態や性質、機能を比較した。各ニューロン群に GFP を発現させて細胞数や投射パターンを比較したが、それぞれキイロと雑種において明確な違いを見出すことはできなかった。次に、ppk25 ニューロンの感受性をキイロと雑種で比較するため、神経活動依存的に GFP が蓄積する CaLexA システムを用いて、キイロ雌存在下における ppk25 ニューロンの活動量を定量した。その結果、キイロにおいては高い GFP 蓄積量が観察された一方で、雑種の蓄積量は低かった。このことは、ppk25 ニューロンの 7,11-HD 感受性が雑種において低下している可能性を示唆している。さらに ppk25-P1 経路の各ニューロン群の機能を比較するため、光遺伝学を用いて各ニューロン活動を活性化させ、求愛行動に対する影響を観察した。その結果、求愛コマンド様 P1 ニューロンを始めとするニューロン群の機能は、キイロと雑種で違いが検出されなかった一方で、ppk25 ニューロンを含む味覚ニューロン群の機能は逆転していることが分かった。GRASP 法を用いて、これらのニューロン群と下流ニューロンの神経接続を観察すると、雑種においてその接続が喪失していた。これらの結果は、雑種やオナジにおける 7,11-HD に対する負の選好性の背景には、で明らかになった 7,11-HD 受容性求愛抑制ニューロンだけではなく、祖先的な ppk25-P1 経路における ppk25 ニューロンの 7,11-HD 感受性の低下や下流ニューロンへの接続の喪失が存在していることが示唆される。

## (2) 求愛歌選好性

キイロと近縁 3 種のパルス間隔選好性を定量的に比較するため、パルス間隔 35, 55, 95ms の人工パルス歌に対する応答行動を、チェーン行動を指標に定量した。その結果、キイロはパルス間隔 35ms のパルス歌に対して有意に高い応答性を示した一方で、他の 3 種はチェーン行動を示さなかった。いくつかの種においてパルス歌の開始と同時に運動活性が上昇していたことから、パルス音開始前後 10 秒間の運動活性を定量した。すると、セーシェルショウジョウバエとモーリシャスショウジョウバエにおいて、同種の求愛歌に近いパルス間隔のパルス歌において有意に高い応答を観察することができた。また、オナジにおいては、音開始前後では行動応答が検出できなかったが、音開始 6 分後において同種の求愛歌に近いパルス間隔に有意に高い行動応答が観察できた。これらのことから、キイロとその近縁 3 種のパルス間隔選好性が種間で異なることを初めて定量的に示した。また、パルス間隔選好性をより効率的に定量解析するために、単一個体にパルス歌

を与え、運動活性の上昇を定量する新たな行動解析法 (Single Male Auditory Response Test; SMART) を確立した。

パルス間隔選好性の種間差をもたらす神経基盤を明らかにするために、音情報の入口となる聴覚一次ニューロンを含む JO ニューロンに着目し、キイロと近縁 3 種においてその形態と細胞数を比較した。神経トレーサーを用いて、JO ニューロンの投射パターンを比較すると、キイロにおいて知られている領域 A~E (Kamikouchi et al. 2006) が近縁 3 種においても保存されていることがわかった。一方 JO ニューロン数を比較すると、キイロでは  $482 \pm 6$  個なのに対し、オナジで  $435 \pm 8$  個、セーシェルで  $457 \pm 7$  個、モーリシャスで  $454 \pm 6$  個と、オナジ種群において 10%ほどニューロン数が少ないことが明らかになった。このことは、オナジ種群においては、JO ニューロンによって情報処理される音や重力に対する情報の解像度がキイロよりも低下していることを示唆している。

以上の研究により、キイロとその近縁種のフェロモン選好性や求愛歌選好性の種間差の基盤となる神経回路の違いが世界で初めて明らかとなった。これは、動物行動学において大きな謎であった同種に対する配偶者選好性がいかにして獲得されるのかという問に関して、単一ニューロンレベルで応えるインパクトのある結果であった。

## 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 1 件)

Ishikawa Y, Kamikouchi A (2015) Auditory system of fruit flies. Hearing research. doi:10.1016/j.heares.2015.10.017 (査読有)

[学会発表](計 25 件)

1. 石川由希, 岡本夏紀, 上川内あづさ ハエ一匹の聴覚応答行動を検出する行動解析法 SMART (Single Male Auditory Response Test)の確立、第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016/07/22
2. 米山祐輔, 松尾恵倫子, 石川由希, 上川内あづさ ショウジョウバエの聴覚応答行動と聴覚システムの種間比較、第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016/07/22
3. 石川由希, 前田直希, 上川内あづさ, 山元大輔 ショウジョウバエのフェロモン選好性の急速な進化をもたらす神経基盤、第 18 回日本進化学会、東京工業大学、大岡山キャンパス 2016/08/26
4. 大橋拓朗, 米山祐輔, 石川由希, 森本

- 菜央, 上川内あづさ ショウジョウバエの種特異的な求愛歌選択性の進化の神経基盤、第 18 回日本進化学会東京工業大学、大岡山キャンパス、2016/08/26
5. 石川由希, 前田直希, 上川内あづさ, 山元大輔 Neural mechanisms underlying differential responses to pheromones in two closely related fruit fly species. 第 38 回日本比較生理生化学会、玉川大学、2016/09/02
  6. 石川由希, 上川内あづさ, 山元大輔 種特異的なフェロモン嗜好性の進化の神経基盤、第 88 回日本遺伝学会、日本大学、2016/09/07
  7. 石川由希, 前田直希, 上川内あづさ, 山元大輔 Neural basis for species-specific pheromone preference in *Drosophila*. 第 12 回 ショウジョウバエ研究会、立教大学、池袋キャンパス、2016/09/11
  8. 米山祐輔, 松尾恵倫子, 石川由希, 上川内あづさ Species-specific auditory behavior of four *Drosophila* species. 第 12 回 ショウジョウバエ研究会、立教大学、池袋キャンパス 2016/09/09
  9. 前田直希, 上川内あづさ, 石川由希 Neural basis of species-specific pheromone response in *Drosophila*. 第 12 回 ショウジョウバエ研究会、立教大学池袋キャンパス、2016/09/10
  10. 石川由希 Neural mechanisms underlying the species-specific mating preference in *Drosophila*. 第 4 回 神経回路合同研究会、名古屋大学 南館、2016/10/11
  11. 石川由希, 岡本夏紀, 米山祐輔, 上川内あづさ Quantification of sound discrimination ability in fruit fly. 第 22 回国際動物学会、沖縄コンベンションセンター、2016/11/17
  12. 石川由希, 岡本夏紀, 米山祐輔, 上川内あづさ Quantification of sound discrimination ability in fruit fly. 第 87 回日本動物学会、沖縄コンベンションセンター、2016/11/18
  13. 石川由希, 前田直希, 上川内あづさ, 山元大輔 ショウジョウバエのフェロモン嗜好性の進化をもたらすふたつの異なる神経基盤、第 10 回 Evo-Devo 青年の会、岡崎コンファレンスセンター、2016/06/25
  14. 石川由希, 前田直希, 野村岳民, 上川内あづさ ショウジョウバエのフェロモン嗜好性の進化をもたらす神経基盤、研究集会「ショウジョウバエの生殖システムと生殖戦略」 国立遺伝学研究所、2017/02/07 (招待)
  15. 石川由希, 上川内あづさ, 山元大輔 ショウジョウバエの種特異的なフェロモン嗜好性を決める神経回路の進化、日本生態学会第 63 回仙台大会、仙台国際センター、2016/03/20-24
  16. 石川由希 ショウジョウバエはどのような神経回路で同種の求愛歌を識別するのか? - 新しい聴覚応答行動解析法 SMART を用いた解析 -、第 3 回 生態進化発生コロキウム、東京大学、2015/12/28
  17. 石川由希 行動進化の神経分子基盤を探る、昆虫学土曜セミナー、岡山大学、2015/08/29 (招待)
  18. 石川由希, 上川内あづさ, 山元大輔 異性への『好み』の進化の神経基盤、第 28 回 高遠分子細胞生物学シンポジウム、延暦寺会館、2015/08/26-27
  19. 石川由希, 上川内あづさ, 山元大輔 異性への『好み』の急速な進化をもたらす神経基盤、日本進化学会第 17 回大会、中央大学後楽園キャンパス、2015/08/20-23
  20. 石川由希, 岡本夏紀, 上川内あづさ ショウジョウバエの聴覚応答に関する神経行動解析法 SMART の確立、第 38 回 日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015/07/28-31
  21. 上川内あづさ, 岡本夏紀, 中村水紀, 松尾恵倫子, 石川由希 多様な形態を持つ ショウジョウバエ高周波振動応答性細胞の特性解析、第 38 回 日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015/07/28-31
  22. 石川由希 ショウジョウバエのフェロモン嗜好性の進化の神経基盤、第 8 回 Evo-Devo 青年の会、名古屋大学、2015/06/28-29
  23. Yuki ISHIKAWA, Yusuke YONEYAMA, Azusa KAMIKOUCHI, Species Specificity of Male Auditory Response in *Drosophila*, 2014 European Fly Neurobiology, Hersonissos, 2014/10/05-09
  24. 石川由希, 上川内あづさ, 山元大輔 異性に対する『好み』の進化をもたらす神経基盤の解明、日本進化学会第 16 回大阪大会、高槻現代劇場、2014/08/21-24
  25. Yuki Ishikawa, Azusa Kamikouchi, Daisuke Yamamoto, Neuronal Mechanisms Underlying Species Specificity of Mating Preference, 11th Japanese *Drosophila* Research Conference, Kanazawa, 2014/06/04-06
- 〔図書〕(計 1 件)  
Azusa Kamikouchi, Yuki Ishikawa (2016) Hearing in *Drosophila*. In: Insect Hearing, pp. 239-262, Springer Japan
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
石川 由希 (ISHIKAWA Yuki)  
名古屋大学・理学研究科・特任助教  
研究者番号: 70722940

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
上川内あづさ (KAMIKOUCHI Azusa)  
名古屋大学・理学研究科・教授