

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07141

研究課題名(和文) ショウジョウバエにおける性成熟に伴う生殖行動発現の神経機構

研究課題名(英文) Neural mechanism of regulation in reproductive behavior during sexual maturation in *Drosophila* females

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエにおける生殖行動は、羽化後の性成熟に伴って発現する。本研究では、性成熟に伴う行動変化として、dsx発現ニューロンの強制活性化により誘導される産卵行動に注目して解析を進めた。その結果、ドーパミン作動性(pale発現)ニューロンが産卵行動を制御するdsx発現ニューロン群をmodulateしており、一群のdsx発現ニューロン群が別々のドーパミンレセプターDopRあるいはDopR2を発現し、それらが異なる産卵行動要素をコントロールしていることが示された。これはドーパミンにより調節されている行動要素を、発現しているレセプターを変えることで、別々にコントロールしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila*, a female exhibits a typical repertoire of reproductive behavior. After copulation, the mated female lays eggs, at which she bends her abdomen downward and inserts the ovipositor into the substrate. A sex determination factor, doublesex (dsx), establishes the neural circuitry underlying the female reproductive behavior. Here, we will address whether dopaminergic neurons modulate the reproductive behavior. A pale gene encodes tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme for dopamine synthesis. Activation of all pale-expressing neurons induced reproductive behavior in females. Also, activation of neurons co-expressing dsx and Dopamine receptors such as DopR or DopR2 induced parts of the reproductive behavior. Dopaminergic (pale-expressing) neurons possibly modulate the distinct sets of abdominal dsx-expressing neurons through the specific expression of the dopamine receptor, DopR or DopR2, that regulates the different elements of female reproductive behavior.

研究分野：生物学

キーワード：昆虫 行動学 脳・神経 遺伝子 ショウジョウバエ 成熟 生殖行動 ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエにおける生殖行動は、羽化後の性成熟に伴って発現するようになることは、古くから知られている。例えば、雄の交尾行動は羽化直後の未成熟な個体では現れず、羽化1日後以降、徐々に性成熟とともに盛んになる。また、雌も羽化直後では交尾受容能はなく、性成熟に伴って交尾受け入れ可能となる。通常、交尾後、雌は卵成熟とともに産卵行動があらわれ、産卵が行われる。この雌の性成熟に伴う生殖行動の発現に、ホルモン(幼若ホルモンやエクジステロイド)や生体アミンであるドーパミンが関わっていることは薬理学的実験により示唆されているが、性成熟に伴う生殖行動の発現が神経回路レベルでどのように制御されているか不明である。

一方、ショウジョウバエにおける生殖行動を制御する神経回路の解明自身は、この10年の間に急速に進展してきた。ショウジョウバエの性決定因子 Fruitless(Fru)タンパク及び Doublesex(Dsx)タンパクは、脳の性差形成においても重要な働きを担っている。申請者は雌特異的な *dsx* 発現ニューロンを同定し、それが雌の産卵行動を制御していることを見いだした。しかし、これら生殖行動を制御する神経回路が、性成熟に伴ってどのようにして動作可能となるか、その調節機構は不明である。本研究は、雌の生殖行動に注目し、その性成熟に伴って発現する行動の神経機構を明らかにしようとするものである。

2. 研究の目的

多くの動物において個体の成長・発達に伴って行動パターンに変化が生じる。特に生殖行動に関わる行動は、個体の性成熟に伴って発現するようになり、どのようにして特定の行動パターンが性成熟とともに発現可能となるか、その解明には中枢神経系における神経回路網の発達機構、すなわち神経回路の形態変化あるいは機能変化を明らかにすることが必要である。近年、ショウジョウバエにおいて、雌雄の生殖行動に関わる神経回路網の研究は大きく進展したが、性成熟に伴う変化に注目した研究はなされていない。本研究では、ショウジョウバエ雌の産卵行動を制御する神経

回路網がどのようにして性成熟するか、そのしくみをニューロモデレーターによる神経回路網の修飾という側面から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、性成熟に伴う行動変化として、雌生殖行動のうち *dsx* 発現ニューロンの強制活性化により引き起こされる産卵行動に注目して解析を進めた。産卵行動には、産卵管伸展、腹部曲、腹部細、産卵などのいくつかの行動要素よりなっている。

(1) *dsx* 発現ニューロン活性化により誘導される産卵行動のドーパミンの作用

*dsx*発現ニューロン群に dTRPA1 を強制発現させ (*dsx>dTRPA1* 個体)、温度を上げると、産卵行動が誘起される。この強制活性化により引き起こされる産卵行動がドーパミンの作用により変化するかどうかを、ドーパミン合成阻害剤投与による影響を調査した。

(2) 雌産卵行動を誘導するドーパミン作動性 *pale* 発現ニューロン群の同定

ドーパミン作動性ニューロンにおける様々な遺伝子の発現誘導には、ドーパミン合成過程に関わる酵素 Tyrosine hydroxylase をコードする *pale* 遺伝子を利用し、*pale-Gal4* 系統を用いた。*pale* 発現ニューロン群に dTRPA1 を強制発現させ (*pale>dTRPA1* 個体)、温度上昇により活性化させると、産卵行動が誘起される。この産卵行動が羽化後に変化するか調査した。また、この産卵行動の誘起に対するドーパミン合成阻害剤投与による影響を調査した。さらに、産卵行動を調節する *pale* 発現ニューロン群の同定を行った。*pale-Gal4* 系統に MARCM 法を適用し、特定の *pale* 発現ニューロン群を GFP ラベルするとともに、dTRPA1 を強制発現させたモザイク個体を作成し、温度を上昇により一部の *pale* 発現ニューロン群を強制的に活性化した時、雌の産卵行動が引き起こされるか調査した。産卵行動が誘導された個体について、どのニューロン群が活性化されているか、脳の抗体染色を行い、その標識パターンから産卵行動を制御する *pale* 発現

ニューロンの同定を試みた。

(3)産卵行動制御に関わるドーパミンレセプターの同定とドーパミン受容ニューロンの調査

ドーパミンの作用機序を明らかにするために、ドーパミンを受容するレセプターを同定した。ショウジョウバエでは4種類のレセプター(DopR, DopR2, D2R, DopEcR)が知られている。そこで、まずこれらのドーパミン受容体遺伝子の発現をモニターするGal4系統を選別し、それらをドライバーとしてドーパミン受容体発現ニューロン群を同定するとともに、dTRPAによる強制活性化による産卵行動の誘導を調査した。

4. 研究成果

*dsx*発現ニューロン群および*pale*発現ニューロン群のdTRPA1による強制活性化は、どちらも産卵行動を誘導し(図1)、その誘導は性成熟に伴って生ずることが確認された。そこで*dsx*と*pale*を共発現するニューロンが存在するかどうか、免疫組織化学染色法により調査した結果、共発現するニューロンはほとんど存在しなかった(図2)。また、共発現するニューロンを強制活性化しても、産卵行動を誘導することができなかった。*dsx*発現ニューロンおよびドーパミン作動性ニューロン(*pale*発現ニューロン)の強制活性化による産卵行動の誘導がドーパミンの作用により変化するかどうか、ドーパミン合成阻害剤3-iodo-tyrosine(3IY)の投与実験を行った。その結果、*dsx*発現ニューロン群の強制活性化による産卵行動の誘導はドーパミン合成阻害剤の影響をほとんど受けなかったが、*pale*発現ニューロン群の強制活性化による産卵行動の誘導はドーパミン合成阻害剤により抑制された。これらのことは、*dsx*発現ニューロン群と*pale*発現ニューロン群の

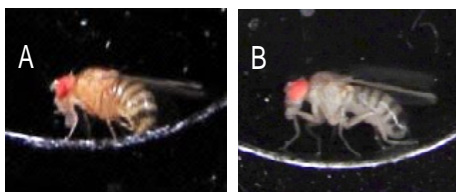


図1 *dsx* 発現ニューロンを強制発現させた時の反応(A)と *pale* 発現ニューロンを強制発現させた時の反応(B)。

強制活性化は似たような行動を誘発するものの、それらを誘導するニューロンは同一の

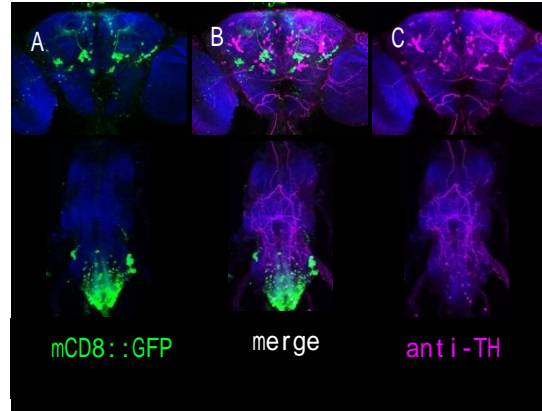


図2 *dsx* 発現ニューロン(A:緑)とドーパミンニューロン(C:マゼンダ)。共発現するニューロンは見られない(B:merge)。

ものではないことを示している。このことから、*pale*発現ニューロンが産卵行動を制御する*dsx*発現ニューロン群をmodulateしている上位のニューロンである可能性が示唆された。

*pale*発現ニューロン群の強制活性化により、産卵行動が誘導されることは、少なくとも産卵行動を調節しているニューロンが*pale*発現ニューロン群の中にあることを示している。そこで、産卵行動を調節する*pale*発現ニューロン群の同定を試みた。産卵行動を誘導する*pale*発現ニューロンは、頭部のニューロンが関与しているのか、あるいは腹部のニューロンが関与しているか調査したところ、胸腹部神経節(VNC)の*pale*発現ニューロンの強制活性化(32)は、産卵行動を誘導したが、脳の*pale*発現ニューロンの強制活性化は誘導しなかった。このように、産卵行動の誘導には腹部のニューロン群が関与していることが明らかになった。続いて、*pale*-Gal4系統にMARCM法を適用し、特定の*pale*発現ニューロン群をGFPラベルするとともに、dTRPA1を強制発現させたモザイク個体を作成し、一部の*pale*発現ニューロン群を強制的に活性化した時、雌の産卵行動が引き起こされるか調査した。1000匹以上のモザイク雌について調査したが、産卵行動を誘導するニューロン群の同定することはできなかった。本研究で用いたMARCM法は細胞系譜にしたがって特定のニューロンをラベルする方法であり、ニューロンの形成される時期によっては、まれにしかラベルされないニューロ

ン群がある。さらに複数のニューロン群が関与する場合、同時にラベルされないという行動誘発ができない。そのため行動を誘起するニューロン群を同定できていない可能性が考えられた。そこで新たな同定方法として、intersectional flip-out法による特定ニューロンをラベルする方法を適用した。118のエンハサートラップFLP系統を確立し、それらの系統と *pale-Gla4* 系統と交配し、*pale-Gla4* とエンハサートラップFlp系統の発現が共通する (intersectional) ニューロン群で dTRPA1 の発現を誘導し、温度上昇により産卵行動が誘発されるかスクリーニングした。しかしながら、安定して産卵行動を誘発する系統は得られなかった。intersectional flip-out法が機能しているか intersectional なニューロン群を免疫組織染色で確認したところ、たしかに flip-out が機能していることは確認できたが、系統内での flip-out の安定性が必ずしも高くない系統が多く存在し、それがスクリーニングで引っかかってこなかった原因の一つと考えられた。

産卵行動を調節する神経回路網を明らかにする戦略として、*pale* 発現ニューロン群から情報を受け取るドーパミンレセプター発現ニューロンの同定から進めることに変更した。ドーパミンレセプターである DopR と DopR2 について、これらレセプター発現ニューロン群に dTRPA1 の発現を誘導し、温度上昇により産卵行動が誘発されるかどうか調査したところ、DopR 発現ニューロン群の活性化は腹部の屈曲姿勢を誘導し、DopR2 ニューロン群の活性化は主に腹部を細くし、産卵を誘導することが明らかになった。

dsx 発現ニューロンのうち DopR あるいは DopR2 を共発現するニューロン群を intersectional 法のより強制活性化させたところ、それぞれ上記と同様な産卵行動の一部の行動要素を誘発することがわかった。また、それら共発現するニューロン群を免疫組織化学染色により調査したところ、それぞれ異なる少数の *dsx* 発現ニューロン群によりそれらの行動要素は制御されていることが示され (図 3)、これらの *dsx* 発現ニューロン群はドーパミン作動性ニューロンからの情報を受け、異なる産卵行動のレパートリーをコントロールしていることが示唆された。こ

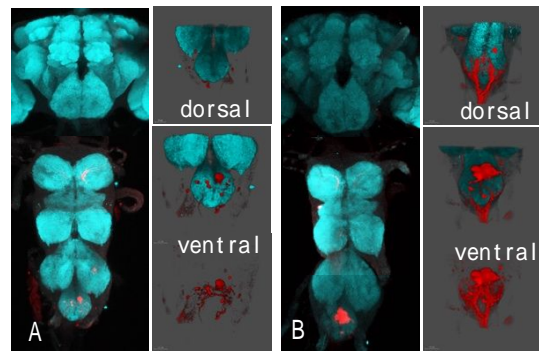


図 3 *dsx* とドーパミンレセプターの共発現ニューロン (赤)。A は DopR、B は DopR2。

れはドーパミンにより調節されている行動のレパートリーを、発現しているレセプターの種類を変えることで、別々にコントロールしていることを示唆しており、大変興味深い結果がえられた。

本研究により、ドーパミン作動性ニューロンが雌の産卵行動を制御する *dsx* 発現ニューロン群を modulate しており、発現するドーパミンレセプターのタイプによって、異なる行動要素を修飾していることが示唆された。このように産卵行動を制御する *dsx* 発現ニューロンによる回路網がドーパミンにより調節されていることが明らかになり、回路網の成熟過程との関連も考えられるようになった。しかし、性成熟に伴ってドーパミン作動性ニューロンおよび *dsx* 発現ニューロンのどこがどのように変化していくかについては、今後の課題として残された。

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 2 件)

Koganezawa M, Kimura, K-I, Yamamoto D. (2016) The Neural Circuitry that Functions as a Switch for Courtship versus Aggression in *Drosophila* Males. *Curr. Biol.* 26(11): 1395-1403 Doi: 10.1016/j.cub.2016.04.017 【査読有】

Kimura, K-I, Sato C, Koganezawa M, Yamamoto D. (2015) *Drosophila* ovipositor extension in mating behavior and egg deposition involves distinct sets of brain interneurons. *PLOS ONE* 10(5) Doi: 10.1371/journal.pone.0126445 【査読有】

〔学会発表〕(計 5件)

Ken-ichi Kimura (2018) Formation of the male specific muscles: still unsolved problems. Neuro Global Focused symposium: Sex on the Brain, 2018 2/20 Tohoku University (Sendai)

木村賢一、佐藤千晶、山元大輔. キイロショウジョウバエ腹部のドーパミン作動性ニューロンによる雌の生殖行動の制御. 第40回日本分子生物学会年会 2017 12/6 神戸国際展示場(神戸)

木村賢一、佐藤千晶、山元大輔. キイロショウジョウバエにおけるドーパミン作動性ニューロンによる雌の生殖行動の制御. 第88回日本動物学会 富山大会 2017 9/23 富山県民会館(富山市)

Ken-ichi Kimura, Chiaki Sato and Daisuke Yamamoto. Dopaminergic neurons in the VNC regulate reproductive posture of *Drosophila*. Japanese *Drosophila* Research Conference 12. 2016 9/10 Rikkyo University (Tokyo)

佐藤千晶、山元大輔、木村賢一. ショウジョウバエ生殖行動に関する腹部神経節の pale 発現ニューロン. 日本動物学会第86回大会 2015 9/17 新潟コンベンションセンター(新潟)

〔図書〕(計 1件)

木村賢一(2015) “筋肉を支配する神経を光らせて見てみよう”「研究者が教える動物実験 第2巻 神経・筋」尾崎まみこ、村田芳博、藍浩之、定本久世、吉村和也、神崎亮平、日本比較生理生化学会 編集、共立出版 pp. 24-27【著書】

6. 研究組織

(1)研究代表者

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