

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06326

研究課題名(和文) ショウジョウバエ性成熟に伴う生殖行動発現のホルモン制御機構

研究課題名(英文) Hormonal control of the activity in neural circuit underlining the female reproductive behavior in *Drosophila*

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの雌の産卵行動は、性的に成熟した個体で出現するようになる。この産卵行動は、dsx発現ニューロンにより制御され、ドーパミン作動性ニューロンの活動により調節されている。幼若ホルモン受容体のノックダウンの影響を調査した結果、この性成熟に伴う産卵行動の誘導は、ドーパミン作動性ニューロンやドーパミン受容体を発現するdsx発現ニューロンやに幼若ホルモンが作用することで調節されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性成熟に伴って、動物の個体の行動パターンに変化が生じることは古くから知られている。本研究において、キイロショウジョウバエの雌ではドーパミンにより修飾される性決定遺伝子羽化を発現するニューロン回路網が、羽化後幼若ホルモンJHの作用により変化し、成熟に伴う産卵行動の発現が調節されていることが示唆された。動物の個体の成長・発達に伴って行動パターンが変化する仕組みの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila* female, 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. Dopaminergic neurons modulate the reproductive behavior. Activation of neurons co-expressing dsx and Dopamine receptors such as DopR or DopR2 induced the oviposition posture in females. This induction of the female reproductive behavior appeared frequently after eclosion. The increases of the induction of female reproductive behavior were inhibited by the knockdown of Juvenile hormone (JH) receptors, Met and gce. These results imply that the activation of neural circuit underlining the female reproductive behavior is regulated by JH hormone with sexual maturation after eclosion.

研究分野：動物生理学

キーワード：昆虫 キイロショウジョウバエ 生殖行動 ホルモン 性成熟

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエにおいて、羽化後の性成熟に伴って生殖行動が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は、この 10 数年の間に急速に進展してきた。申請者らは、ショウジョウバエ脳の高次の中枢神経系における性差をはじめて発見し、その性差形成に性決定因子 Fru や Dsx が重要な役割を持っていることを明らかにした。雌の生殖行動についても、中枢における交尾受容に関わるニューロン群の同定や雌の交尾後の行動変化を引き起こす感覚情報処理機構の解析が進められてきた。また、申請者らは雌特異的な 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ている。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、性成熟に伴って発現する行動のホルモン制御機構を神経回路網のレベルで明らかにしようとするものである。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエの雌は、交尾後に産卵する。この産卵行動は、腹部の屈曲・産卵管の伸展という産卵姿勢行動と引き続き起こる産卵の一連の行動要素によりなりたっている。産卵行動は、羽化直後の性的に未成熟な個体では生じず、性的に成熟した個体ではじめて出現する。我々は、この産卵行動が dsx 発現ニューロン群の強制活性化により引き起こされることをすでに見いだしている。また、この dsx 発現ニューロン群による産卵行動の誘導も羽化直後の個体では見られず、羽化 1 日後以降に徐々にあらわれるようになることを明らかにしている。さらに、この dsx 発現ニューロンによる産卵行動の制御が、ドーパミン作動性ニューロンの活動により調節されており、Dop1R1 および Dop1R2 タイプのドーパミンレセプターを発現する特定の dsx 発現ニューロンがその産卵行動の制御に関わっていることが示されている。そこで本研究では、産卵行動を制御する dsx 発現ニューロン回路網とドーパミン作動性ニューロンによる修飾機構（あわせて dsx-pale 産卵行動制御回路網と呼ぶ）が性成熟とともにどのように変化し、その変化は体内の JH ホルモンによりどのように調節されているか、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエにおける特定の遺伝子の強制発現には、Gal4/UAS システムや LexA/LexAop システムを適用する。これにより、レポーター遺伝子(GFP など)や特定の遺伝子の発現を特定のニューロンに誘導することが可能となる。ドーパミン作動性ニューロンのドライバーとして pale 遺伝子（ドーパミン合成過程に関わる酵素 Tyrosine hydroxylase をコード）-gal4 システムを利用する。また、ニューロンの活性化を実験的に制御するために、温度受容に関わるレセプターチャンネル dTRPA1（高温シフトで活動電位が生ずる）を利用し、上記の方法と組み合わせ、特定のニューロン群を活性化させた。

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、特に、産卵管伸展および腹部曲の行動要素に焦点を絞って解析を進めた。

(1) dsx-pale 産卵行動制御回路網におけるニューロンの活性化により誘導される産卵行動の性成熟

pale 発現ニューロンあるいはドーパミンレセプター (DopR, DopR2) 発現ニューロン群に dTRPA1 を強制発現させ (pale>dTRPA1 個体、DopR>dTRPA1 個体、DopR2>dTRPA1 個体)、温度を上げると産卵行動 (腹部曲および産卵管伸展) が誘起される。この dsx-pale 産卵行動制御回路網の強制活性化により引き起こされる産卵行動が羽化後の成熟に伴って変化するかどうか、未交尾雌および既交尾雌において、羽化後 1 日以内 (0day) 3 日後、7 日後における産卵行動の誘導率を調査する。

(2) JH ホルモンレセプターのノックダウンが生殖行動の誘導に及ぼす影響の調査

dsx-pale 産卵行動制御回路網の強制活性化により引き起こされる産卵行動の成熟に伴う変化に JH が関与するかどうか、ドーパミンレセプター (DopR, DopR2) 発現ニューロンおよび pale 発現ニューロン特異的に JH レセプター (Met or gce) をノックダウンさせ、日齢に伴って変化する産卵行動発現への影響を調査する。また、ドーパミンレセプター (DopR, DopR2) と dsx を共発現するニューロン群の強制活性化による産卵行動誘発への影響もあわせて調査する。

(3) dsx 発現ニューロンにおける JH レセプターの発現と性成熟に伴う変化の調査

JH レセプター (Met or gce) ドライバー Gal4 を用いてレポーター遺伝子を発現させ、dsx 発現ニューロンと共発現しているかどうか調査し、性成熟に関する候補ニューロンの同定を行う。もし、同定することができたら、そのニューロンの性成熟に伴う形態的な変化を調査する。

#### 4. 研究成果

ショウジョウバエの雌の産卵行動は、羽化直後の性的に未熟な個体では生じず、性的に成熟した個体で出現するようになる。この産卵行動が dsx 発現ニューロン群の強制活性化により引き起こされ、その誘導も性成熟とともに生ずることが知られている。また、この dsx 発現ニューロンによる産卵行動の制御がドーパミン作動性 pale ニューロンの活動により調節されており、ドーパミン受容体 DopR あるいは DopR2 を発現するニューロン群 (dsx DopR ニューロン、dsx DopR2 ニューロン) がその調節に関与することが明らかになっている。そこで、DopR あるいは DopR2 を発現するニューロン群の強制活性化による産卵行動の誘導も性成熟とともに変化するかどうか、未交尾の雌および既交尾について雌調査した。産卵行動として、産卵管伸展および腹部屈曲の行動要素に焦点を絞って解析した。その結果、いずれも羽化後、性成熟とともに誘導能が上昇することがわかった (図 1)。DopR 発現ニューロンの強制活性化は、産卵管伸展よりも腹部屈曲の誘導率が高かった。一方、DopR2 発現ニューロンの強制活性化は、腹部屈曲よりも産卵管伸展の方が若干より多く誘導した。このように、DopR あるいは DopR2 発現ニューロン群は、異なる回路網で作用していることが示唆された。また、羽化直後でも産卵行動は誘導されることから、産卵のための dsx 回路網は、羽化時にすでに形成されており、羽化後行動発現の関

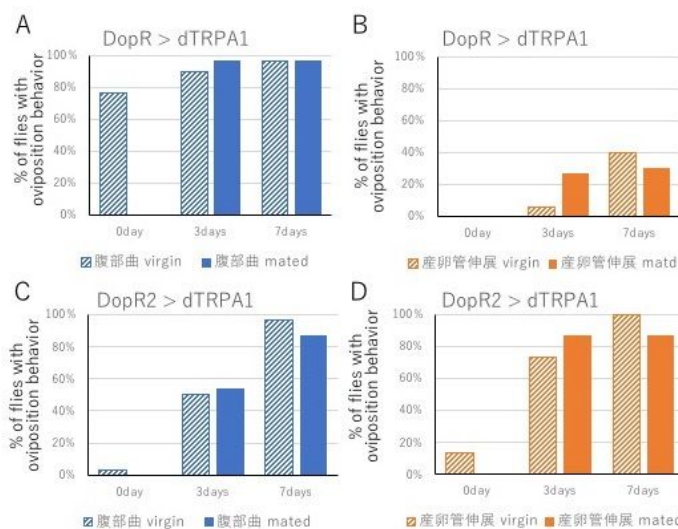


図1 ドーパミン受容体発現ニューロン群の強制活性化による産卵行動の羽化後の誘導

値が変化している可能性が示唆された。

次に、性成熟にともなう DopR あるいは DopR2 を発現するニューロン群の強制活性化による産卵行動の誘導率の上昇に、幼若ホルモン JH が関与するかどうか検証するため、JH リセプターの発現をノックダウンし、その影響を調査した。JH レセプターとしては、Met (Methoprene-tolerant) と Gce (germ cell-expressed) が知られている。そこで、JH レセプターである Met や Gce の発現を DopR あるいは DopR2 発現ニューロン群においてノックダウンさせ、強制活性化による産卵管伸展および腹部屈曲反応の誘導への影響を調査した (図 2、3)。未交尾雌において、どちらのレセプターのノックダウンも、羽化後 7 日目における誘導率の減少を引き起こした。さらに強制活性化させるニューロン群をより限定するために、dsx とドーパミン受容体 DopR あるいは DopR2 を共発現するニューロン群 (dsx DopR ニューロン、dsx DopR2 ニューロン) への Met レセプターのノックダウンの影響も調査した。未交尾雌においては、同様に産卵管伸展および腹部屈曲の誘導率の減少を引き起こした。このように、産卵行動のための回路網の成熟過程は Met および Gce レセプターを介して JH により制御されていることが示唆された。

既交尾雌について調査したところ、Met あるいは gce のノックダウンにより腹部屈曲の誘導率は減少し、未交尾の同様の結果であったが、産卵管伸展の誘導率は Met あるいは gce のノックダウンにより増強し、未交尾と逆の反応を示した。この奇妙な現象は、DopR、DopR2 発現ニューロンの modifier として働くドーパミン (pale 発現) ニューロン自身が JH の影響を受けていることによる可能性も考えられ、pale 発現ニューロンの強制活性化による産卵行動の成熟への影響を調査することにした。

まず、pale 発現ニューロンの強制活性化による産卵管伸展および腹部屈曲の誘導率が成熟過程に伴って変化するかどうか調査した (図 4)。pale 発現ニューロンの強制活性化による腹部屈曲の誘導率は未交尾雌、既交尾雌とも羽化後上昇した。しかし、産卵管伸展の誘導率は、既交尾雌では羽化後 3 日目と比較して 7 日目に

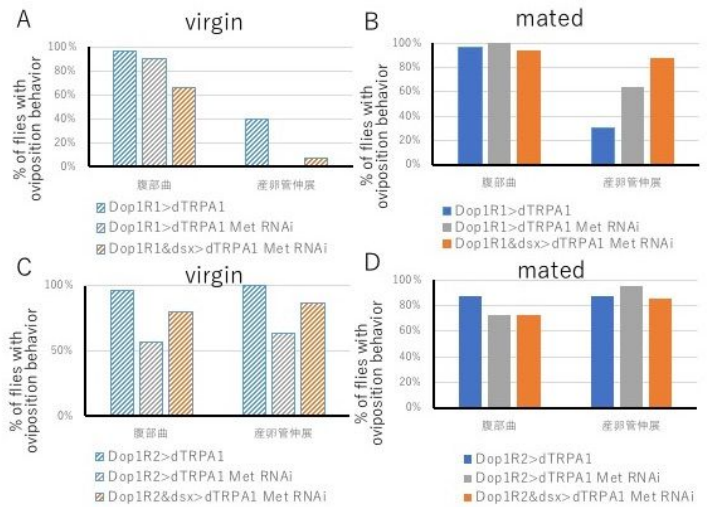


図 2 JH 受容体 Met のノックダウンがドーパミン受容体発現ニューロン群の強制活性化による産卵行動の誘導に及ぼす影響

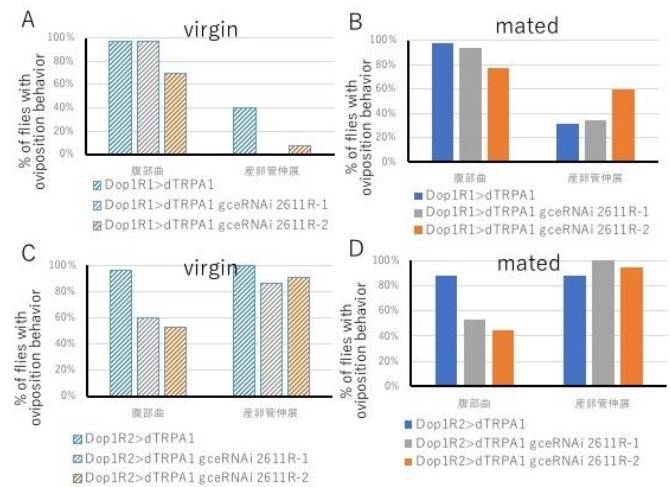


図 3 JH 受容体 gce のノックダウンがドーパミン受容体発現ニューロン群の強制活性化による産卵行動の誘導に及ぼす影響

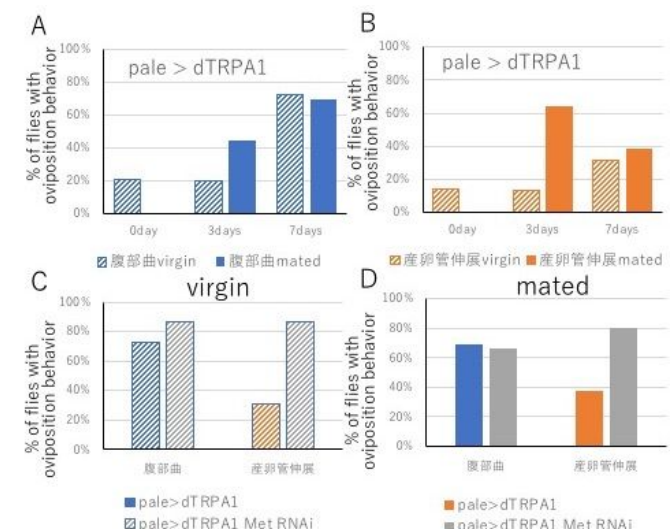


図 4 pale 発現ニューロン群の強制活性化による産卵行動の羽化後の誘導と JH 受容体のノックダウンの影響



は減少した。これは、pale 発現ニューロン群は羽化後の産卵管伸展の抑制にも関わっていることを示唆している。pale 発現ニューロン自身が JH ホルモンにより制御を受けている可能性を検討するため、pale 発現ニューロン群において JH レセプター (Met) をノックダウンさせたとき、pale 発現ニューロンの強制活性化の羽化後の誘導率の変化に影響を及ぼすかどうか調査した (図 4)。その結果、産卵管伸展の誘導率は、未交尾および既交尾の雌で上昇した。pale ニューロンは、交尾誘導の産卵管伸展の成熟後の抑制系に参与しているのかも知れない。

これら JH レセプターの関与を明らかにするためには、これらの産卵行動制御ニューロンにおいて JH レセプターの発現が確かに存在するかどうか検証する必要がある。そのため、JH レセプター (Met or gce) ドライバー-Gal4 を用いてレポーター遺伝子を発現させ、これらニューロンと共発現しているかどうか調査した (図 5)。腹部の dsx 発現ニューロンにおける JH レセプター遺伝子の発現を調べた結果、多くの腹部ニューロンで共発現が認められた。それらのニューロンは、この産卵制御ニューロンに相当するものが含まれていると思われたが、ラベルされたニューロンの数が多く、特定することはできなかった。そのため、上記ニューロンが羽化後成熟とともに形態的に変化するかどうかの検証は、今後の課題として残された。

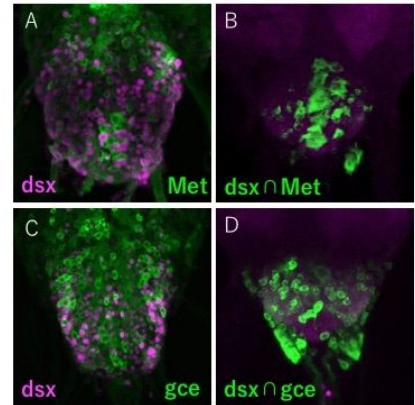


図 5 dsx と JH 受容体 (Met, gce) の共発現ニューロン群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura Ken-ichi, Urushizaki Akira, Sato Chiaki, Yamamoto Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel sex difference in Drosophila contact chemosensory neurons unveiled using single cell labeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurogenetics	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01677063.2018.1531858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小森袈乃子、山元大輔、木村賢一
2. 発表標題 キイロシヨウジウバエの雄特異筋形成機構1 - 運動神経におけるFruitlessの発現と細胞死の関与 -
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊野梨美、山元大輔、木村賢一
2. 発表標題 キイロシヨウジウバエの雄特異筋形成機構2- 支配運動神経の活動抑制の影響 -
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村賢一、山元大輔
2. 発表標題 キイロシヨウジウバエドーパミン作動性ニューロンによる性成熟に伴う雌の生殖行動の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊野梨美、山元大輔、木村賢一
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ雄特異筋形成における支配神経の活動抑制の影響
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rimi Kumano, Daisuke Yamamoto, and Ken-ichi Kimura
2. 発表標題 Inhibition of neural activity in a motoneuron innervating the male specific muscles causes the loss of the muscle in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 Japan <i>Drosophila</i> Research Conference 13
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊野梨美、山元大輔、木村賢一
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ運動神経の活動抑制は、雄特異筋の形成を阻害する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------