

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06754

研究課題名(和文) 形態的可塑性とリンクした行動戦略の多型はどのような神経基盤により生じるのか？

研究課題名(英文) Research for the neural basis of behavioral phenotypic variation

研究代表者

渡邊 崇之 (Watanabe, Takayuki)

総合研究大学院大学・統合進化科学研究センター・助教

研究者番号：70547851

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)：本研究では、密度効果に応じて生じる表現型可塑性に伴いオスの攻撃性が変容することが知られるコオロギを材料に、その背景にある神経メカニズムを探るべく研究を展開した。表現型可塑性に伴い発現変動する遺伝子の候補として神経ペプチドなどの内分泌因子を念頭に RNA-seq 解析を進めたが、密度効果により発現変動する遺伝子数が想定よりも少なく仮説検証に至らなかった。一方、オスの攻撃行動がオス固有の行動要素を含むことから、脳の性差を作る doublesex 遺伝子についてのかいせきを進めた結果、コオロギ doublesex 遺伝子の分子進化速度の著しい亢進を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の神経回路の性決定を担う doublesex 遺伝子の進化について、コオロギ類で極めてイレギュラーな進化が起きていることが明らかとなった。性決定因子の進化に関する知見としては、他に類を見ない発見であり、今後さらなる研究の推進が必要と考えられる。(現在、成果報告のための追加実験を進めており、詳細についてはここで記載することを控えたい)

研究成果の概要(英文)：In this study, we used crickets to clarify the neural mechanism of behavioral phenotypic variation in response to density effects. We conducted neural RNA-seq analysis to identify endocrine factors whose expression changes in response to phenotypic plasticity, but the number of genes whose expression changes due to density effects was smaller than expected, and the hypothesis could not be tested. On the other hand, since male aggressive behavior includes male-specific behavioral elements, we analyzed the cricket doublesex gene, the neural sex-determination factor in the cricket, and found a marked increase in the rate of molecular evolution of the doublesex gene in crickets.

研究分野：神経行動学

キーワード：性的二型 doublesex 遺伝子 表現型可塑性

1. 研究開始当初の背景

生物は栄養状態や社会環境などの環境条件に応じて表現型を柔軟に変化させる。特に動物においては、この表現型可塑性は形態レベルの可塑性のみならず、行動戦略の多型・可塑性を生じさせることが知られている。例えばサケ・マスでは、大型のオス個体が繁殖時に自分のテリトリーを争いメスを獲得するのに対し、小型オス個体はスニーキング行動という交尾行動への割り込みを見せる。様々な動物種において、このような形態的可塑性とリンクした行動戦略の多型性が観察されているが、この行動可塑性を担う神経基盤の理解は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、形態的可塑性とリンクした行動戦略の多型性を担う神経基盤を明らかにするため、成虫雄コオロギの示す闘争行動をモデルに研究を進めた。成虫雄コオロギは、テリトリーや配偶相手を巡って儀式的な闘争行動を示すことが知られる。この闘争行動には体サイズの多型に応じた多型性があることが知られていた。すなわち、小型個体は触覚を叩きつける程度の軽微な攻撃行動しか示さないが、大型個体の闘争は大顎を広げ相手個体に組みつく激しい攻撃行動まで激化する。またコオロギの体サイズの多型は、飼育集団の密度を変化させることで容易に生じることや、遺伝的背景が均質な個体群をもちいて実験室内で容易に再現可能であることから、本研究の目的である行動戦略多型のモデル実験系として優れている。

さらに本研究では成虫オスコオロギの儀式的な闘争行動を扱うが、コオロギに限らず動物の闘争行動のパターンには性差があることが広く知られていた。昆虫の行動の性差が性的二型神経回路によって規定されていることから、本研究では「体サイズに応じて性的二型神経回路の形態・機能が可塑的に変化し、闘争行動のパターンが変容するのではないか？」という作業仮説を立て、この仮説を検証することで形態的可塑性とリンクした行動戦略の多型性を担う神経基盤の実態に迫ることとした。

3. 研究の方法

本研究では、神経遺伝学的研究アプローチが可能なフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を材料に、性的二型神経回路の形態的多型や闘争行動における役割を解明するとともに、密度効果に依存した種々の生理変化をトリガーするであろう内分泌因子に着目して、密度効果に依存した性的二型神経回路の形態的・機能的可塑性の成因を探ることを計画した。

これまでに、コオロギ脳の性的二型を規定する遺伝子として *doublesex* 遺伝子が候補に上がっていた。本研究ではコオロギ脳で発現する *doublesex* 遺伝子に着目して、体サイズに依存した発現変動等を調査するとともに、*doublesex* 遺伝子座に蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだ遺伝子導入システムを作成することで *doublesex* 発現細胞を可視化し、密度効果に依存した性的二型神経回路の形態的多型を調査することとした。

また、密度効果に依存した種々の生理変化をトリガーするであろう内分泌因子を探索する目的で、単独飼育個体と高密度飼育個体の脳を対象としたトランスクリプトーム解析を実施することにした。興味深い因子が得られた段階で、RNAi 法による遺伝子機能抑制実験をおこない、密度効果に依存した性的二型神経回路の形態的多型への影響を調査することとした。

4. 研究成果

密度効果による多型を生じさせる飼育条件の検討

コオロギを単独飼育・低密度・高密度条件下それぞれで飼育し、成長速度と成虫個体の体サイズを調査した。これら3条件で成虫が生じるまでの時間に有意な差はみられなかったが、密度効果による体サイズの減少が確認された。一方、成虫雄コオロギの闘争行動については、先行研究の結果を再現することはできず、低密度群・高密度群ともに激しい闘争行動が観察された。

本研究では、闘争行動の行動実験に先立ち3日間の隔離飼育をおこない、直前の社会的相互作用の効果をリセットしたが、おそらく先行研究ではこの隔離処理を行なっていなかったと考えられる。先行研究で報告された小型個体における攻撃性の減衰は、体サイズの効果と社会経験の履歴の2つの要因に起因することが考えられたことから、コオロギにおける密度効果による行動戦略の多型性を検出する方法論について再検討が必要となった。

密度効果によって発現量変動する脳内内分泌関連因子の探索

本研究では、密度効果に依存して脳内で幼若ホルモンやインスリン様ペプチドなどの内分泌関連因子の遺伝子発現が変動するだろうという仮説を立てていた。この仮説を検証すべく、単独飼育・高密度飼育によって大型個体・小型個体を準備し、成虫7日齢の個体から脳神経節・食道下神経節を単離し、short read RNA-seq 解析をおこなって発現変動する遺伝子群を探索した。

しかし、RNA-seq 解析の結果、密度効果は成虫コオロギ脳の遺伝子発現パターンにそれほど大きな影響を与えないことが明らかとなり、発現変動を示す遺伝子群の中に主要な内分泌因子は含まれていなかった。

コオロギ脳の性的二型を規定する *doublesex* 遺伝子に関する研究

まず、密度効果に依存して脳内で発現する *doublesex* 遺伝子の発現量が変化するかを調査した。本研究で、コオロギ *doublesex* 遺伝子には3つのアイソフォームがあることが明らかになっており、その内訳はアイソフォーム1が雌雄の脳で共通して発現し、アイソフォーム2はメスでのみ検出され、アイソフォーム3がオスで有為に発現量が高いというものであった。これら全てについて、単独飼育・高密度飼育によって得られた大型個体・小型個体の脳で発現量を調査した。RT-qPCR による mRNA 発現量の調査の結果、大型個体・小型個体の脳では *doublesex* 遺伝子の mRNA 総量、各アイソフォームの発現量全てについて有為差は検出されなかった。

次に、*doublesex* 遺伝子のイントロン領域を CRISPR/Cas9 システムで切断し、そこに eYFP 遺伝子を挿入することで *doublesex* 発現細胞を可視化することを試みた。この前段階の実験として、*doublesex* 遺伝子の第一エクソンに CRISPR/Cas9 システムを用いてフレームシフト変異を導入し、*doublesex* 遺伝子の遺伝子破壊をする実験系を立ち上げ、*doublesex* 遺伝子の性的二型における機能を検証した。

<ここからは重要な未発表データを含むため、再提出版で記載したい>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 渡邊崇之	4. 巻 37
2. 論文標題 昆虫脳性分化機構の進化を探る：不完全変態昆虫を材料とした研究から見えてきたこと	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 比較生理生化学	6. 最初と最後の頁 130-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3330/hikakuseiriseika.37.130	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 -

1. 著者名 Takayuki Watanabe	4. 巻 28
2. 論文標題 Evolution of the neural sex-determination system in insects: does fruitless homolog regulate neural sexual dimorphism in basal insects?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insect Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 807-827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imb.12590.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 3. 渡邊崇之
2. 発表標題 神経遺伝学”的方法論を取り入れたコオロギ行動学の確立に向けて～これまでの取り組み、課題と展望～
3. 学会等名 第92回日本動物学会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 崇之，水波 誠
2. 発表標題 fruitless 遺伝子は原始的な昆虫で脳の性分化に関わるか？
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水波 誠, 佐藤 貴光, 呂 恵, 渡邊 崇之
2. 発表標題 フタホシコオロギ味覚嫌悪学習系の確立
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 崇之
2. 発表標題 昆虫脳性分化機構の進化を探索-doublesex 遺伝子の分子進化を中心に
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022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