

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570072

研究課題名（和文）ショウジョウバエ微小脳の化学感覚系における性差形成とその機能の解明

研究課題名（英文）Formation of sexually dimorphic neural circuitry and its function in the *Drosophila* chemosensory system

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

研究成果の概要（和文）：

キイロショウジョウバエ附節の味覚感覚ニューロンの中樞投射パターンには性差がある。個々の味覚ニューロンの投射パターンを調査した結果、特定の化学感覚毛の味覚ニューロンが雄特異的な投射パターンを示すことがわかった。この雄特異的な投射パターンの形成には、性決定因子 *Fruitless* および *Doublesex* が必須である。これらの働きを抑制した雄では、雌型の投射パターンに変化してしまう。このような雄の交尾行動を観察したところ、交尾活性には変化が見られなかった。雄特異的投射は交尾行動の他の要素の制御に関わっている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

In *Drosophila melanogaster*, sexually dimorphic projection pattern is seen in the taste neurons on tarsus of the forelegs. We identified the projection pattern of each taste neuron. Results showed that the neurons with some specific bristles in males have male-typical projection. Two sex determination factors, *Fruitless* and *Doublesex*, regulate the formation of male-specific projection pattern. Loss of function of *Fruitless* or *Doublesex* caused males having female-type of the projection pattern. They showed the normal activity of courtship still.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：昆虫、行動学、脳・神経、遺伝子、ショウジョウバエ、性行動、性決定

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの性決定のしくみは解析が進んでおり、重要な性決定因子の多くは

すでに同定されている。従来外部形態の性的特徴は *doublesex* (*dsx*) 遺伝子により、また脳の性決定は *fruitless* (*fru*) 遺伝子により

制御されているとされてきた。性決定因子 Fruitless (Fru) タンパクは、雄の脳の特定の神経細胞群で発現するが、雌では発現しない。また、*fru* 突然変異は雄の性行動に異常（ホモセクシャル行動やバイセクシャル行動）を引き起こすことから、Fru を発現する神経細胞群は、雄の交尾行動を制御する神経回路網に関わっていると考えられている。

ショウジョウバエにおいては、いままで海外を含めいくつかの研究室により、脳の構造における性差の解析の試みがなされてきたが、最近までほとんど明らかにされていなかった。例えば、Dickson らのグループや Baker らのグループは、*fru* 遺伝子の転写調節領域を利用することで *fru* 発現細胞を標識することを行い解析したが、どちらも脳の *fru* 発現神経細胞には性差がないと結論した。そのため、行動の性差は主に脳の機能的な性差によるものとの解釈がなされていた。しかし、私たちはまず嗅覚系の糸球体の特定領域に性的二型が存在することを明らかにした。また、脳の高次の中枢神経系における性差を発見し、その性差形成に性決定因子 Fru が重要な役割を持っていることを明らかにした。さらに、性差を示すニューロン群の役割を解析することで、雄の性行動を開始するニューロン群を同定することに成功し、その形成過程には Fru に加え、もう一つの性決定因子 Doublesex (Dsx) も関与していることを示唆した。これらを契機に、行動の性差の基盤が脳の性差にあることが、広く認められるようになってきている。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエの交尾行動はフェロモンにより解発される。ショウジョウバエのフェロモンは、体表の不揮発性物質であり、肢の味覚器で受容される。近年、味覚器内のいくつかのニューロンで *fru* 遺伝子が発現していることが明らかにされた。味覚器はもともと表皮から発生過程で形成されることから、Fru に加え、もう一つの性決定因子 Dsx も関与していることが予想される。本研究では、この二つの性決定因子がどのように作用し、味覚感覚神経系の性差を作り出すのかを明らかにする。その成果を利用し、雌型の味覚感覚系をもつモザイク雄や逆に雄型の味覚感覚系を持つモザイク雌個体を作成し、それ

らの性行動を調査する。あわせて *fru* 発現味覚ニューロン群の機能阻害実験や機能亢進実験を行い、性差を示す *fru* 発現味覚ニューロン群の性行動に果たす役割を明らかにする。このように本研究では、脳の性差形成とその機能解析をフェロモン受容に関わる化学感覚系に発展させ、行動の性差を生み出す脳のしくみの解明を行う。

## 3. 研究の方法

*fru* 発現ニューロン群で Gal4 を発現する系統として *fru*-Gal4 系統を、*dsx* 発現ニューロン群で Gal4 を発現する系統として *dsx*-Gal4 系統、また化学感覚毛で特異的に Gal4 が発現する系統として *poxn*-Gal4 系統を利用した。マーカー遺伝子 (GFP) や性決定遺伝子などの遺伝子強制発現には、Gal4/UAS システムを適用した。さらに、マーカー遺伝子や目的とする遺伝子を特定の細胞系譜にのみ強制発現させるために、ショウジョウバエで開発された MARCM 法 (mosaic analysis with a repressive cell marker) を用いた。これらにより特定の細胞群に限定し、任意の遺伝子を発現させることができる。さらに、特定の細胞群が突然変異となったモザイクを形成することができる。

(1) *fru* 発現味覚ニューロン群および *dsx* 発現味覚ニューロン群の同定と性差の解析

① *fru* 発現味覚ニューロンの数における性差

味覚器 (味覚感覚毛) の数には雌雄差が存在することが知られている。前肢の味覚器をすべて同定し、*fru* 発現味覚ニューロンがどの味覚器に存在するか、またその存在様式が雌雄で異なるかどうか調査した。

② *fru* 発現味覚ニューロンの中枢投射パターンにおける性差

MARCM 法により選択的に *fru* 発現味覚ニューロンを標識し、抗 GFP 抗体と neuropile 特異抗体を用いた二重蛍光染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその投射パターンを 3 次元構築し、投射領域を雌雄で比較した。これにより投射パターンにおいて性差を示す *fru* 発現味覚ニューロンを同定した。

③ *dsx* 発現味覚ニューロンの中枢投射パターンにおける性差

*dsx*-Gal4 系統を利用し、味覚ニューロンを

GFP により標識した。 *dsx* 発現ニューロンが附節のどの味覚器に存在するか調査し、それらの中枢投射パターンが性差を示すかどうか調べた。また、 *dsx* 発現ニューロンの中枢投射パターンを雌雄で比較した。さらに、 *dsx* 発現味覚ニューロン群が *fru* 発現味覚ニューロン群と同じニューロンであるか共発現系統を作成し調査した。

#### ④ 味覚ニューロンの出力部域の特定

味覚ニューロンについて、中枢投射領域のどこが出力部位となっているか明らかにするため、前シナプス領域のマーカースとしてヘマグルチニン (HA) で標識したシナプトタグミンを利用した。 *poxn-Gal4* を用い、このマーカースを強制発現させ、標識タンパクの発現領域を調査することで出力部域を特定した。

#### ⑤ 味覚レセプターにおける性差

ショウジョウバエでは、味覚レセプター遺伝子はすべて同定されており、それらの発現を観察できるレポーター系統がつくられている。それらを *fru* 発現系統で共発現させることにより、味覚レセプター同定することが可能である。そこで、 *fru* 発現ニューロンでのレセプターが発現しているのか調査し、雌雄で比較する。これを通してフェロモン受容レセプターを同定することができる可能性がある。

#### (2) 味覚ニューロンの性差形成における *fru* 遺伝子および *dsx* 遺伝子の役割

味覚ニューロンに見られた性差の形成が、 *fru* 遺伝子および *dsx* 遺伝子の支配のもと制御されているか検証した。そのため、 *fru* 突然変異体や *dsx* 突然変異体などを利用し、 *Fru* や *Dsx* を発現しなくなった個体や、逆に *Fru* や *Dsx* を強制的に発現するようになった個体

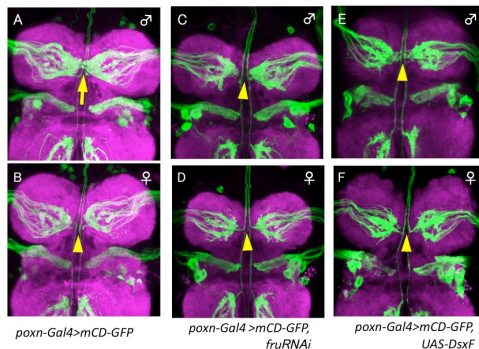


図1 肢の味覚ニューロンの中枢神経投射パターン

で、味覚ニューロンに見られる性的特徴に性転換が引き起こされるか調査した。

#### (3) 性行動における性的二型味覚ニューロン群の機能の解析

雄の肢の味覚ニューロンの中枢投射パターンを雌化させるため、 *poxn-Gal4* により味覚ニューロン群に *fruRNAi* 遺伝子を強制発現し *fru* 遺伝子の発現作用を抑制した雄と、雌型 *Dsx* (*DsxF*) タンパク質を味覚ニューロンに強制発現させた雄を利用した。このような雄特異的な投射パターンが雌様に変化した個体がどのような交尾行動を示すか観察し、味覚ニューロン群の性特異的な投射パターンの機能を調査した。交尾の指標としては、交尾開始までの時間 (Courtship Latency:CL) および一定時間中に交尾行動を示した時間の割合 (Courtship Index:CI) を計測し、野生型雄の場合と比較した。

#### 4. 研究成果

ショウジョウバエ附節の味覚感覚系における性差を解剖学的・形態学的に調査した。まず、味覚感覚ニューロンで発現する *poxn* 遺伝子を利用し GFP を発現させ、その中枢神経系での投射を雌雄で比較した (図 1 A, B)。すると、雌では正中線を越えないのに、雄では正中線を越える投射があることがわかった。そこで、この雄特異的な投射パターンを示すニューロンの同定を試みた。味覚感覚ニューロンは化学感覚毛の根元に4つあり、そのうち2つのニューロンで *fru* 遺伝子が発現していることを確認した (図 2)。前肢附節第3節に注目し、 *fru* 発現味覚ニューロンを GFP でラベルし、体細胞モザイク法により、個々のニューロンの中枢投射パターンを調査した。その結果、特定の化学感覚毛に存在する

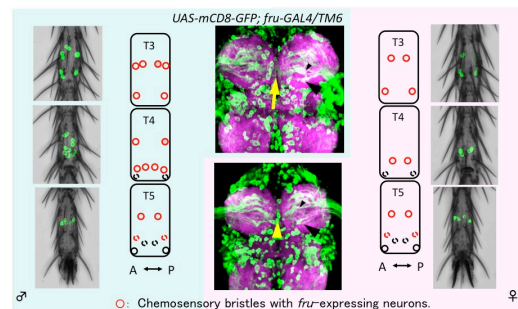


図2 附節の *fru* 発現味覚ニューロンとその中枢神経投射パターン

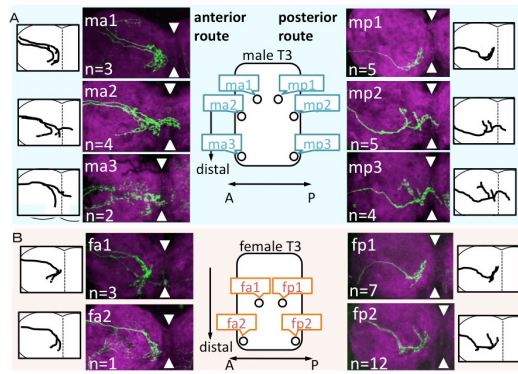


図3 附節(第3節) *fru* 発現味覚ニューロンの中枢神経投射パターン  
味覚感覚ニューロンが、雄特異的な中枢投射パターンを示すことが明らかになった(図3)。

もう一つの性決定因子 *Dsx* に注目し、*dsx* 発現味覚ニューロンにおける性差を調査した。*dsx-Gal4* 系統を利用し、味覚ニューロンを GFP により標識し、*dsx* 発現ニューロンが附節のどの味覚器に存在するか観察したところ、特定の感覚毛で発現することがわかった(図4)。またそれらの中枢投射パターンは、*fru* 発現ニューロンと同様に性差を示した。*dsx* 発現と *fru* 発現は、一部のニューロンでは共発現するが、それぞれ単独に発現するニューロンも存在した。

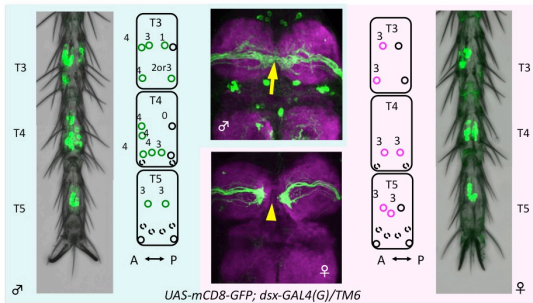


図4 附節の *dsx* 発現味覚ニューロンとその中枢神経投射パターン

次に、性決定因子 *Fru* の性的二型投射パターン形成に果たす役割を調査した。もし、*Fru* タンパクの発現の ON/OFF で、性差が決定されているとすれば、実験的に *Fru* タンパクの発現の ON/OFF を誘導すれば、雄型から雌型へ、あるいは逆の転換が引き起こされると考えられる。*fru* 突然変異体では、雄得的な投射パターンが形成されなかった。また、同様に味覚ニューロン群に *fruRNAi* 遺伝子を強制発現させ、*fru* 遺伝子の発現作用を抑制すると、雄の投射パターンは雌化した(図1C, D)。一方、*Fru* の強制発現では雌のパターンを雄化することはできなかった。このことから、

味覚ニューロンの投射パターンの性差形成に *Fru* 以外の因子の関与が示唆された。

さらに、味覚ニューロンの性差形成における *Dsx* の役割を解析した。*dsx* 遺伝子からは、雄では雄型 *Dsx* (*DsxM*)、雌では雌型 *Dsx* (*DsxF*) タンパクがつくられる。性特異的な *Dsx* タンパクの発現の ON/OFF で、性差が誘導されているかどうか調査した(図1E, F)。雌型 *Dsx* (*DsxF*) タンパク質を味覚ニューロンに強制発現させると、雄の投射パターンは雌型に変更された。逆に、雄型 *Dsx* (*DsxM*) タンパク質を味覚ニューロンに強制発現させると、雌の投射パターンは雄型に変更された。このように、*Dsx* の発現により投射パターンの性差形成がなされていることも明らかになった。

味覚ニューロン群に *fruRNAi* 遺伝子を強制発現し *fru* 遺伝子の発現作用を抑制すると、雄の投射パターンは雌化した。また、雌型 *Dsx* (*DsxF*) タンパク質を味覚ニューロンに強制発現させると、同様に雄の投射パターンは雌型に変更された。この結果を利用することで、雄の性特異的な投射パターンを雌型の変更することが可能となった。そこで、これらの雄特異的な投射パターンを示す味覚ニューロンを持たない雄を野生型雌と一緒にし、雄の交尾行動を観察した。交尾開始までの時間(Courtship Latency:CL)および一定時間中に交尾行動を示した時間の割合(Courtship Index:CI)を計測し、野生型雄の場合と比較したところ、野生型との違いは示されなかった(図5)。一方、HA標識された synaptotagmin を味覚ニューロンで発現させると、確かに正中線領域もラベルされた。synaptotagmin は前シナプス領域に蓄積することから、雄特異的な投射領域でシナプス出力があることが推察される。このことから、

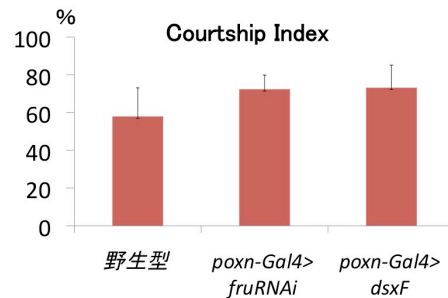


図5 味覚ニューロンの投射パターンを雌型に変更した雄の交尾活性

雄特異的な投射領域は雌とは異なる何らかの情報を伝えていると考えられ、CL や CI に反映されない交尾行動のパターンの制御にその機能を持っているのかも知れない。

本研究において、同定されている味覚レセプター遺伝子(Gr)の発現を観察できるレポーター系統を用い、性差を示す味覚ニューロンで発現する味覚レセプター同定を試みた。甘みに関する味覚レセプター (Gr5a, Gr64f) や苦みに関する味覚レセプター (Gr66a)、雄が忌避するフェロモンに関与するとされている味覚レセプター (Gr32a, Gr66a) は、いずれも性差を示す味覚ニューロンでは発現しておらず、その投射領域も異なることが示された。性差を示す味覚ニューロンで特異的に発現する Gr は、不明のままである。ごく最近、DEG/ENaC sodium channel subunit の仲間である ppk23 や ppk25, ppk19 などが *fru* 発現味覚ニューロンにおいて発現していることが明らかになり、これらを発現するニューロンは性フェロモンを受容し、雄や雌の性行動に関わっていることが示された。投射領域が異なることが、雌雄の行動パターンにどのような役割をもっているかは、依然として謎である。これは、今後の課題として残されている。

#### 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 6 件)

1. Kuranaga E, Matsunuma T, Kanuka H, Takemoto K, Koto A, Kimura K-I, Miura M. (2011) Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development* **138**, 1493-1499, 査読あり
2. Kimura K-I. (2011) Role of cell death in the formation of sexual dimorphism in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Growth & Different.* **53** 236-244, 査読あり
3. Nojima T, Kimura K-I, Koganezawa M, Yamamoto D. (2010) Role of cell death in the formation of sexual dimorphism in the *Drosophila* central nervous system. *Curr. Biol.* **20** 836-840, 査読あり
4. Koganezawa, M, Matsuo Y, Kimura K-I, Yamamoto D. (2009) The shaping of

*Drosophila* male courtship posture by a gustatory pheromone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1170** 497-501, 査読あり

5. Sakurai M, Aoki T, Yoshikawa S, Santschi LA, Saito H, Endo K, Ishikawa K, Kimura K, Ito K, Thomas JB, Hama C. (2009) Differentially expressed Drl and Drl-2 play opposing roles in Wnt5 signaling during *Drosophila* olfactory system development. *J. Neurosci.* **19** 4972-4980, 査読あり

6. Shimono K, Fujimoto A, Tsuyama T, Yamamoto-Kochi M, Sato M, Hattori Y, Sugimura K, Usui T, Kimura K-I, Uemura T. (2009) Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. *Neural Develop.* **4** 37, 査読あり

[学会発表] (計 18 件)

1. 木村賢一, 小金澤雅之, 佐藤千晶, 山元大輔. ショウジョウバエ成虫脳における性決定因子 doublesex 発現ニューロン群に見られる性差 日本動物学会第 82 回大会. 2011.9/21, 旭川市大雪クリスタルホール
2. Kimura K-I, Urushizaki A, Sato C, Matsuda R, Yamamoto D. Sexually dimorphic projection patterns of gustatory neurons in *Drosophila* forelegs, 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011.6/3-4, Nagoya Congress Center
3. Kimura K-I, Urushizaki A, Sato C, Matsuda R, Yamamoto D. Sexually dimorphic taste neurons on the forelegs in *Drosophila melanogaster*. 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2011.6/3-4, チェンタン青年活動センター (台湾)
4. 木村賢一. 「細胞の死」と「いきものの生」-ハエのハネ、おしり、そして脳-, 日本分析化学会北海道支部 第 46 回氷雪セミナー 2011.1/8, 小樽
5. Nojima T, Kimura K-I, Koganezawa M, Yamamoto D. Neuronal synaptic outputs determine the sexual fate of postsynaptic

targets. 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010.12/7-10, 神戸ポートアイランド

6. Kimura K-I, Urushizaki A, Sato C, Yamamoto D. Fruitless and Doublesex cooperate to specify the sexual dimorphism in *Drosophila* taste neurons. 第33回日本分子生物学会年会, 2010.12/7-10, 神戸ポートアイランド(神戸)

7. 漆崎彬、松田理恵、山元大輔、木村賢一. Sexually dimorphic taste neurons on the forelegs in *Drosophila melanogaster*. 第33回日本分子生物学会年会, 2010.12/7-10, 神戸ポートアイランド

8. Nojima, T., Kimura, K., Koganezawa, M., and Yamamoto, D. Neuronal synaptic outputs determine the sexual fate of postsynaptic targets. 13th European *Drosophila* Neurobiology Conference "Neurofly" 2010" 2010.9/1-5, Manchester (UK)

9. 漆崎彬、松田理恵、山元大輔、木村賢一. ショウジョウバエ前肢附節味覚ニューロンの中枢投射パターンにおける雌雄差. 日本動物学会第81回大会, 2010. 9/23-25, 東京大学

10. 木村賢一, 山本佳奈, 佐藤千晶, 山元大輔. ショウジョウバエの雄は求愛中どの感覚情報で雌の前後を見分けるか, 日本比較生理生化学会大32回大会, 2010. 7/17-19, 九州産業大学

11. 木村賢一、漆崎彬、松田理恵、山元大輔. ショウジョウバエ性決定因子 Fruitless による味覚感覚ニューロンの性特異的投射パターンの形成. 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12/9-12, パシフィコ横浜

12. 漆崎彬、松田理恵、山元大輔、木村賢一. ショウジョウバエ前肢味覚感覚ニューロンの中枢投射パターンにおける性差. 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12/9-12, パシフィコ横浜

13. 下野耕平、木村賢一、藤本梓、津山泰一、碓井理夫、上村匡. Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic remodeling, and life-long maintenance of dendritic arbors. 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12/9-12, パシフィコ横浜

14. 木村賢一、山元大輔. ショウジョウバ

エ運動神経系の性差形成-雄特異筋を支配する運動神経. 第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会, 2009.10/22-24, 千里ライフサイエンスセンター

15. 漆崎彬、松田理恵、山元大輔、木村賢一. ショウジョウバエ前肢味覚感覚ニューロンにおける性差-中枢投射パターン. 日本動物学会第80回大会, 2009.9/17-20. 静岡大学

16. 木村賢一、漆崎彬、松田理恵、山元大輔. ショウジョウバエ前肢味覚感覚ニューロンにおける性差-性決定因子による性差形成. 日本動物学会第80回大会, 2009.9/17-20, 静岡大学

17. Shimono K, Kimura K-I, Fujimoto A, Tsuyama T, Usui T, Uemura T. Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic remodeling, and life-long maintenance of dendritic arbors, The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2009. 7/6-8, つま恋

18. Kimura K-I, Yamamoto D. Identification of a motoneuron innervating the male specific muscle (Muscle of Lawrence), The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2009.7/6-8, つま恋

[図書] (計2件)

1. 木村賢一 (2011) 昆虫クチクラ形成の発生遺伝学的検討 「次世代バイオミメティクス研究の最前線—生物多様性に学ぶ」(下村政嗣 編) シーエムシー出版(東京) pp.114-119

2. 木村賢一 (2010) 脳の性差形成と細胞死 「細胞死研究 総集編」(三浦正幸 編) 第4章 発生における細胞死, 羊土社(東京) pp.116-121

[その他]

ホームページ等

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者