

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04790

研究課題名(和文) 経験依存的な性指向性決定機構のショウジョウバエモデルでの解析

研究課題名(英文) The experience-dependent mechanism for sexual orientation in *Drosophila*

研究代表者

山元 大輔 (YAMAMOTO, Daisuke)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所神戸フロンティア研究センター・室長

研究者番号：50318812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの突然変異体、satoriはfruitless遺伝子の変異であり、雄が雄に対して求愛し、雌と交尾をしないため不妊となる。この雄同士の求愛は、satori雄を隔離して単独飼育すると抑制される経験依存的要素を持つ。この経験依存的な性指向性の神経基盤を追求した。その結果、satori変異体雄を集団飼育した際には、一過性K⁺電流の顕著な増大が認められた。さらに、翻訳されつつあるmRNAのプロファイル解析では、Sh K⁺チャンネルとその調節因子タンパク質をコードする遺伝子が、経験依存的な発現変化を示した。求愛開始ニューロンのチャンネル自体が、経験依存的な行動変容に関わることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性指向性を決定する要因の理解では「遺伝」か「環境」か、という単純な二分律ではなく、遺伝と環境の相互作用こそ重要である、との認識に生物学的根拠を与える研究成果と考えている。遺伝と環境の相互作用、という概念の実体として、行動を生み出す個々のニューロンに刻印される分子的变化を提示することは、不毛の論争に終止符を打ち、行動変容の一般的機構の解明に、確固とした道筋をつけることでもある。その意味では、モデル生物を用いた本研究成果は、大きな説得力を持ちうるものと確信する。

研究成果の概要(英文)：satori mutants of *Drosophila melanogaster* are known to show enhanced male-male courtship when group housed. Indeed, deprivation of social interactions suppressed this same sex courtship behavior. Electrophysiological recordings from the courtship triggering P1 neurons in the fly brain revealed that transient K⁺ currents were markedly enhanced by group housing. Comparative transcriptome of P1 enriched preparations with a sensitive TRAP technique identified some social interaction-sensitive genes, which included those encoding the Sh K⁺ channel subunit and its associated binding protein. These findings collectively suggest that the ion channel activities in P1 neurons are modulated by social experience, and the modulated state may sustain for stable expression of the behavioral characteristic.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ショウジョウバエ突然変異体 *satori* の分離とその原因遺伝子、*fruitless (fru)* のクローニングを契機に、単一ニューロンの性差を発見、続いて性行動を制御する神経回路の主要部を明らかにしてきた。当初、変異体雄が同性間求愛を行うのは、当該遺伝子の機能喪失のいわば自動的な帰結と考えていたが、さまざまな飼育条件で行動が変化することを目の当たりにし、表現型の顕在化に経験的要素が大きく寄与することに気づくに至った。本研究は、この経験依存性の生物学的基盤を解明するために行ったものである。性指向性の理解は、我々人類の社会生活に直結する課題であり、従来にも増してその重要性が指摘されており、また、付随する課題も山積している。一方、ヒトそのものを扱って研究を行うことには数多くの制約があり、技術的に困難な問題がある。モデル生物であるショウジョウバエを研究対象にすることにより、より具体的、より客観的な成果へと繋げられるとの期待を持って研究を開始した。

2. 研究の目的

性指向性を決めるのは「遺伝か環境か」という単純な図式ではなく、その相互作用こそが重要である、というコンセプトを、生物学の土俵で実体化することを目指した。研究代表者はこれまでの自身の研究により、ショウジョウバエの脳内において求愛行動を生成する主要なニューロ

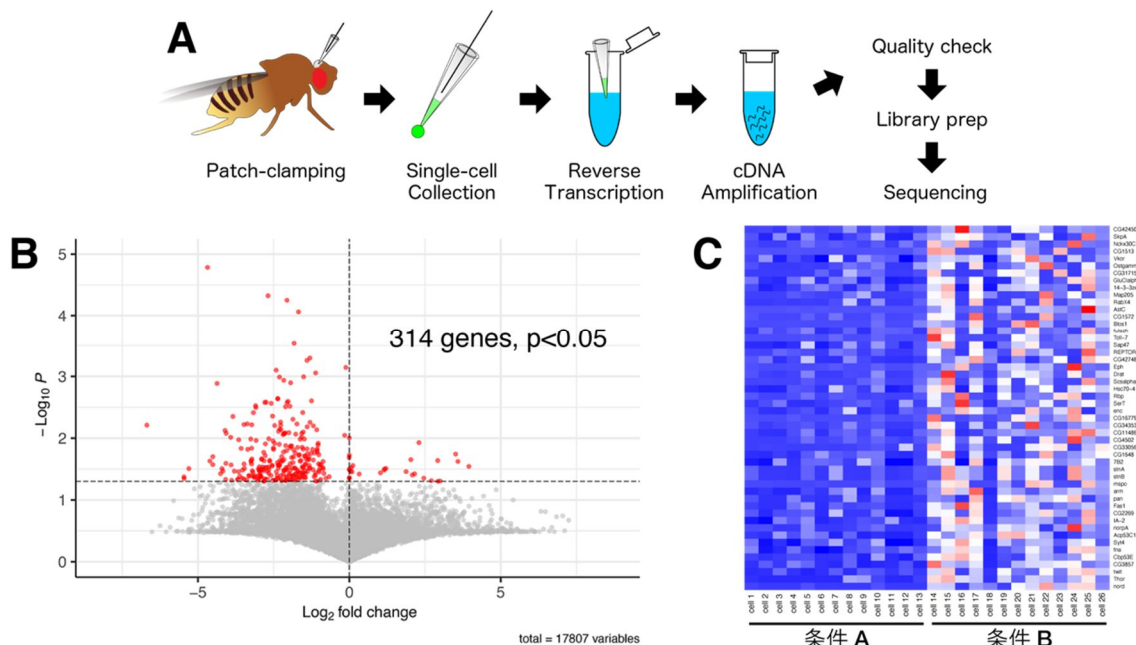


図 1. patch-seq 法の概略と分析例。

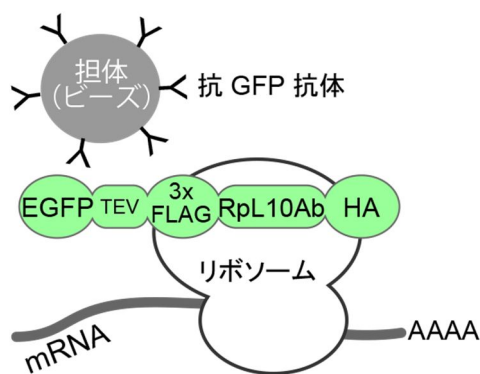


図 2. 多重タグ付きリボソームタンパク質をベイトとして翻訳中の mRNA を enrich する STRAP 法。

ンを同定し、その相互関係、即ち回路構築の大枠を決定してきた。このように特定の行動を生み出す神経回路が、単一ニューロンの同定とその接続関係のレベルで明らかになっている例はわずかしがなく、ショウジョウバエの性行動回路はその稀な一例である。この系を用いることによって、漠然たる遺伝環境相互作用、でなく、個々のニューロンでの分子動態という視点から、遺伝と環境が行動を作り上げる実相を明らかにしていく。

3. 研究の方法

研究手法選択にあたって重視したのは、「単一ニューロンレベル」の解像度を確保して、「環境条件」に起因するヴァリエーションが細胞ごとのばらつきによって隠されてしまう危険を取り去ることである。そこで、単一ニューロンを対象とする手法である whole cell patch-clamp technique によって、ニューロンの膜特性を電気生理学的に記録することとした。Whole cell patch clamp 法はもともと電気的活動記録のために開発された手法ではあるが、電気的記録を取った細胞の細胞質がパッチ電極に流入するため、その電極内液をソースとして、外部からの夾雑物なしの細胞質を得ることができる。この細胞質を用いて RNA-seq を行えば、確実に同定したニューロン一個についての transcriptome 解析 (patch-seq) が可能となる (図 1)。本研

究では、求愛開始ニューロンとして確定している P1 ニューロンに狙いを定め、このニューロンから電気活動の記録を行うとともに、transcriptome 解析を実行した。一方、patch-seq では P1 ニューロン群全体としての転写プロファイルが十分把握できず、またテクニカルなデマンドが非常に大きい。そこで、P1 ニューロン群を含む 150 個のニューロンを特異的に選別する GAL4 系システムを用いて、これらの細胞集団から翻訳過程にある mRNA を濃縮し transcriptome 解析を行うことも並行して行った。その際用いたのは従来の Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) を改良して感度を約 1000 倍向上させた Super-sensitive TRAP (STRAP) 法である (図 2)。STRAP 法は本研究の過程で我々が確立したものであり、特許出願中である。

4. 研究成果

キイロショウジョウバエの野生型と *satori* 変異体の雄を羽化後二つの条件、即ち単独飼育 (single) と 10 頭の集団飼育 (group) で 6-8 日間維持し、その後、雄同士での求愛行動を観察、定量した (図 3)。対照として、羽化直後の雄についても同様に求愛行動を定量した。求愛行動

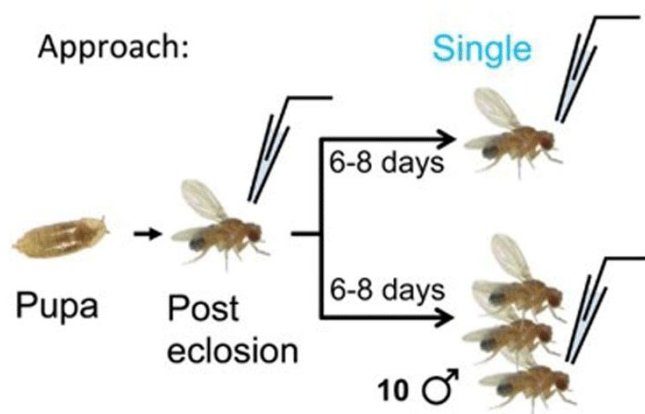


図 3. 社会経験のある雄とない雄で P1 ニューロンの電気特性と転写様態を比較する実験の設定。

の定量には courtship index (CI) を用いた。CI は観察時間中、雌雄ペアにした際に、雄がどれだけの時間を求愛に費やしたかを示す指標である。また、雄 5 頭をチャンバーに入れて雄同士が求愛して縦列を作っている時間を計測する chaining index (Chain I) によって、雄 雄求愛の生起する割合を定量化した。

その結果、対照区 (野生型または変異ヘテロ接合体、即ち正常型) では集団飼育によって雄による雌への求愛の活性 (CI) が低下、単独飼育で上昇し (図 4)、*satori* 変異体では雄同士での求愛 (Chain I) が集団生活によって増強され、単独飼育で抑制された。

STRAP 法を適用して、P1 ニューロンを含む頭部の *dsx-GAL4* 陽性細胞で翻訳されつつある mRNA の profiling を行ったところ、正常型個体、*satori* 変異体個体それぞれについて、単独飼育であるか集団飼育であるかに依存して有意な発現の増減を示す遺伝子群 (differentially expressed genes: DEGs) が見出された。変異体については、*satori* に加えて *fru* 遺伝子座の異なる変異体 allele (*fru^{FLP}*) についても解析を行い、allele 特異的でなく *fru* 機能喪失時に共通した発現プロファイルを

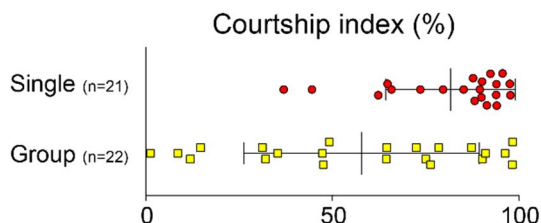


図 4. 正常型雄の求愛に見られる経験依存性。

把握することとした。その結果、それぞれの条件を特徴づける DEG プロファイルが得られた。これらの中には、細胞間、細胞内情報伝達に関わるタンパク質をコードする一連の遺伝子が含まれていた。例えば主要な電位依存性 K^+ チャンネルの構成要素である *Shaker (Sh)* や、それに結合する調節因子タンパク質は、正常型個体では単独飼育によって顕著に発現減少を示した。

一方、単一 P1 ニューロンが社会経験依存的に変容するとの想定のもと、whole cell patch clamp 法によってその膜電流特性の解析を進めた。電流固定下での測定から、脳片半球あたり 20 個存在する P1 ニューロンの多くが、外向き通電刺激に対して漸次的膜電位応答を示す non-spiking ニューロンであることがわかった。実際、膜電位固定下での脱分極電圧ステップ時に内向き電流は検出できない (K^+ 電流抑制条件下でのみ観測可能と考えられる)。これに対して外向き電流は電位依存的に活性化を受ける複数の異なる成分が検出された。一つは一過性外向き K^+ 電流であり、もう一つは定常的外向き K^+ 電流である。定常的外向き K^+ 電流には、緩やかに不活性化するものと、電流測定中は全く減衰しない成分とが含まれていた。注目すべきことに、正常型個体を単独飼育すると一過性 K^+ 電流が増加、集団飼育すると同電流が減少し、*satori* を含む *fru* 変異体個体では逆に単独飼育で一過性 K^+ 電流が減少、集団飼育で増加した。この電気生理学的結果と上述の STRAP による DEG プロファイルの両者から、*Sh* K^+ チャンネルが経験依存的に修飾を受ける可能性が示唆される。P1 ニューロンに於ける K^+ 電流の増加は接続ターゲットとなるニューロンの神経活動の抑制を通じて求愛行動の抑制につながり、 K^+ 電流の現象は神経活動促進を齎して求愛行動の増強を惹き起こすと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kohatsu S, Tanabe N, Yamamoto D, Isono K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Which Sugar to Take and How Much to Take? Two Distinct Decisions Mediated by Separate Sensory Channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 895395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2022.895395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liang HQ, Katoh T, Sato K, Yamamoto D, Wen SY.	4. 巻 11
2. 論文標題 Evolution of a neuromuscular sexual dimorphism in the Drosophila montium species group	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 15272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94722-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Y, Yamamoto D.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of Food and Temperature on Drosophila melanogaster Reproductive Dormancy as Revealed by Quantification of a GFP-Tagged Yolk Protein in the Ovary	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Physiol.	6. 最初と最後の頁 803144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.803144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Yamamoto D.	4. 巻 43
2. 論文標題 Mutually exclusive expression of sex-specific and non-sex-specific fruitless gene products in the Drosophila central nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene Expr Patterns	6. 最初と最後の頁 119232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2022.119232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山元 大輔
2. 発表標題 The neural basis of nuptial gift giving
3. 学会等名 The 3rd Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山元 大輔
2. 発表標題 Neural basis of nuptial gift giving: the mechanism and evolutionary implications
3. 学会等名 Sexually Dimorphic Circuits and Behaviors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 原 佑介 佐藤 耕世 郷 康広 山元 大輔
2. 発表標題 脂質依存的な脳内インスリン産生細胞の機能変化とその環境ストレス応答への寄与
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村 賢一 山元大輔
2. 発表標題 キイロショウジョウバエのアクチピンはオス特異筋の誘導因として作用する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamamoto D.
2. 発表標題 The circuit basis for nuptial gift giving in <i>Drosophila subobscura</i> and its evolutionary implications.
3. 学会等名 The 15th Japan <i>Drosophila</i> Research Conference (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村賢一、山元大輔
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ腹部雄特異筋の誘導因子の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤耕世、原佑介、Daniel. J. Rinner、伊藤弘樹、山元大輔
2. 発表標題 超高感度な遺伝子発現解析システムSTRAPによる経験依存的な行動発現を制御する遺伝子の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会、ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimura K-I, Yamamoto D.
2. 発表標題 Identification of genes involved in the induction of male-specific muscle formation in <i>Drosophila melanogaster</i> .
3. 学会等名 The 15th Japan <i>Drosophila</i> Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara, Y., Sato, K., Go, Y., Yamamoto, D.
2. 発表標題 Diet-dependent electrical and transcriptional changes in brain insulin-producing cells adaptation to environmental stresses
3. 学会等名 The 15th Japan Drosophila Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohatsu S, Yamamoto D.
2. 発表標題 A visual interneuron subclass that mediates vision-dependent courtship pursuit in male
3. 学会等名 The 15th Japan Drosophila Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimura K-I, Yamamoto D.
2. 発表標題 Identification of candidate factors to induce the formation of male specific muscles in Drosophila
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Zoological Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原佑介、田中良弥、古波津創、佐藤耕世、山元大輔
2. 発表標題 Drosophila subobscuraの脳内インスリン産生ニューロンは物運動を制御して種特異的な求愛行動を生み出す
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamoto, D.
2. 発表標題 Exploring the neural basis for nuptial gift giving, an essential courtship repertoire in <i>Drosophila subobscura</i> .
3. 学会等名 The 2nd Asia Evo Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山元大輔、古波津創、佐藤耕世、原佑介
2. 発表標題 小さな脳の効率的な仕組みを情報技術に活かす.
3. 学会等名 国際フロンティア産業メッセ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原佑介、佐藤耕世、郷康広、山元大輔.
2. 発表標題 食物依存的な脳内インスリン産生細胞の電氣的及び遺伝子発現変化とその環境ストレス応答への寄与.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamamoto D., Editor	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Humana Press in Springer Nature	5. 総ページ数 296
3. 書名 Behavioral Neurogenetics	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 遺伝子解析方法	発明者 佐藤耕世、山元大輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-189772	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------