

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700309

研究課題名(和文)ニューロンの性差形成を制御する遺伝的プログラムと細胞間相互作用

研究課題名(英文) Genetic and cellular mechanisms generating sexually dimorphic neuronal structures and behavior in *Drosophila*

研究代表者

佐藤 耕世 (Sato, Kosei)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40451611

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)：キイロショウジョウバエの神経特異的な雄決定タンパク質 Fruitless (Fru)が、その存在によって性行動を制御するニューロンの一群に性差を作り出す過程で、Fruの転写コファクターLolaの切断を抑制することを解明した。Lolaは、Fruタンパク質との複合体形成によって、プロテアソームによる切断を免れるが、Fruタンパク質が存在しない雌では切断され、N末端側のBTB/POZドメインを欠く短いフォームを産生する。このフォームは、切断前のフォームのドミナントネガティブ型として働いており、それによってニューロンの雄化が雌では阻止される。

研究成果の概要(英文)：The *Drosophila* gene fruitless produces male-specific Fruitless, which orchestrates the expression of ~100 target genes, although their transcription is not always sex-specific. This study shows that Fruitless produces sex differences in a target gene product Lola by blocking its proteolysis; males with Fruitless acquire full-length Lola whereas females acquire a Lola proteolytic product, and both Lola products induce distinct sex-specific neural characteristics. Fruitless transcribes lola, protects Lola from proteolysis and forms a complex with Lola for transcriptional regulation. This triad of interactions control neuronal sexual differentiation underlying gendered behavior in *Drosophila*.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ 性行動 脳 性差 fruitless RNAスプライシング ユビキチン BTB/POZ

1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエの同性愛突然変異体 *satori* の原因遺伝子として同定された *fruitless (fru)* は、その遺伝子産物である Fru タンパク質を、成虫の脳神経系の約 2,000 個のニューロンに雄特異的に産生する (Ito *et al.*, 1996; Usui-Aoki *et al.*, 2000)。Fru タンパク質は、その存在によって、細胞死や神経突起形態を制御し、それによって雄の性行動を制御するニューロンの一群に性差を作り出す (Kimura *et al.*, 2005)。Fru は、N 末端側に BTB/POZ ドメイン (このドメインをもつタンパク質どうしの複合体形成に関与するとされるドメイン) を、C 末端側に Zn-finger モチーフ (DNA 結合モチーフ) をもつ (Ito *et al.*, 1996) ことから、転写因子として働くものと考えられるが、Fru がどのような仕組みでニューロンを雄化するのかはほとんど分かっていない。

Fru タンパク質の転写コファクターおよび転写標的遺伝子を探索するため、*fru* 遺伝子の Gain-of-function 表現型を増強あるいは抑制する遺伝子スクリーニングを過去に行い、*fru* と表現型レベルで相互作用する遺伝子として *longitudinals lacking (lola)* を特定していた。その遺伝子産物である Lola タンパク質もまた、Fru タンパク質と同じく BTB-Zn-finger 型の転写因子ファミリーに属する。Lola タンパク質と Fru タンパク質が複合体を形成することを示唆する共免疫沈降実験の結果を得ており、Lola は Fru の転写コファクターとして機能するものと考えられた。

lola 遺伝子は選択的スプライシングによって、多数のアイソフォームを産生する。これらのアイソフォームは、N 末端側の BTB/POZ ドメインを共通にもつが、C 末端側の Zn-finger モチーフにはバリエーションがある。*lola* 遺伝子が産生するアイソフォームのうち、29 番目のエクソンにコードされるアミノ酸配列をもつ遺伝子産物、すなわち Lola29M が、*fru* 発現ニューロンの雄化に関与することを示唆する結果を得ていた；雄の *fru* 発現ニューロンにおいて、Lola29M を細胞特異的にノックダウンしたところ、ニューロンの突起パターンが脱雄化(雌化)した。

Lola29M に対する特異的な抗体を作成し、雄あるいは雌の脳神経系における発現を Western blot 法によって調べたところ、発現パターンに性差が認められた。すなわち、Lola29M は雄に豊富に発現しており、雌では発現量が少なかった。一方、雌の脳神経系には、分子量の小さい産物 (Lola29F と命名) が豊富に発現しており、雄には検出されなかった。Lola29M および Lola29F の発現パターンを *fru* 変異体の雄で調べたところ、野生型の雄には検出されない Lola29F の発現が認められたことから、発現パターンの性差は Fru タンパク質の有無によって作り出されるものと推察された。

2. 研究の目的

前述の実験結果に基づき、本研究では、(1) Fru タンパク質の存在が Lola29F タンパク質の産生を阻害する仕組みがどのようなものか、(2) Lola29F がどのような役割をもつか、という二つの問題について解明することにした。

3. 研究の方法

(1) Lola29F が雌の *fru* 発現ニューロンにおいて作られるプロセスを明らかにし、次に、このプロセスのどの部分を Fru タンパク質が抑えるのかを解明した。そのため、以下に示す実験を行った。Lola29F タンパク質をコードする mRNA が存在するかどうかを検討するため、雌の脳から調製した polyA+ mRNA を用いて、5' RACE および 3' RACE を行った。また、AY060256 (GenBank) という、過去に Berkeley Drosophila Genome project (2001) によってクローニングされた *lola* mRNA が、Lola29F をコードする可能性についても検討した。AY060256 の予想されるタンパク質コード部分をショウジョウバエの形質転換用プラスミドベクター *pUAST-attB* にクローニングし、ショウジョウバエの *fru* 発現ニューロンに発現させ、Western blot 法によって、Lola29F タンパク質とサイズが同じであるかどうかを見当した。

上記のいずれの実験でもネガティブな結果となったため、次に Lola29F タンパク質が、タンパク質翻訳後の制御によって作られる可能性を見当した。Lola29M をコードする mRNA をクローニングし、雌の *fru* 発現ニューロンに発現させ、Lola29F が産生されるかどうかを検討した。

(2) 上記の実験によって、Lola29F タンパク質を人為的に強制発現させることが可能となったため、これを用いて、雄の *fru* 発現ニューロンに Lola29F タンパク質を異所発現させ、ニューロンの解剖学的な性差、および性行動に対する影響を評価した。対照実験として、雄の *fru* 発現ニューロンに産生される Lola29M を Lola29F の代わりに発現させた場合についてもその影響を評価した。それによって、Lola29F が Lola29M とは異なる役割をもつ可能性を比較検討した。

4. 研究成果

(1) Lola29F タンパク質が、Lola29M タンパク質の N 末端アミノ酸配列の除去によって作られることを明らかにした。Lola29M の N 末端部を HA タグで、C 末端部を V5 タグで標識した、改変型 Lola29M を雌の *fru* 発現ニューロンに発現させ、このタンパク質の発現を Western blot 法によって検出した。Lola29M タンパク質の C 末端部を認識する Anti-V5 抗体を用いて検出した場合、Lola29M に加えて、Lola29F に相当するサイズの産物も発現が認められた。一方、N 末端部を認識する Anti-HA

抗体を用いた場合では、検出されるのは Lola29M のみであり、Lola29F は検出されなかった。これらの結果は、Lola29F が Lola29M タンパク質に由来して産生されること、Lola29F は C 末端側の配列は保持するが、N 末端側の配列を持たないことを示唆している。

N 末端部の除去（以後、タンパク質切断と呼ぶ）がプロテアソームによってなされることを、プロテアソームの阻害剤 MG-132 および Lactacystin 処理実験によって示した。また、Lola29M タンパク質の BTB/POZ ドメイン内に、ユビキチン化のターゲットとなり、デグロンとして機能するリジン残基を見出した。このアミノ酸残基をアルギニンに置換した改変型 Lola29M を雌の *fru* 発現ニューロンに発現させた場合、Lola29F の産生が阻害されたことから、タンパク質切断に耐性を獲得したものと考えられた。

Lola29F が N 末端側の BTB/POZ ドメインをもたないことを、アミノ酸配列の段階的除去実験によって明らかにした。現在、Lola29F タンパク質の N 末端アミノ酸をエドマン分解によって決定するため、Lola29F タンパク質の精製を行っているところである。まだ Lola29F タンパク質の構造決定には至っていないものの、Lola29M の N 末端側 300 アミノ酸を欠く産物が Western blot 上で Lola29F と同じサイズに検出されることから、この産物を暫定的に Lola29F-like と見なし、以下の実験を行った。

(2) 上記において作成した、Lola29F-like および切断耐性型 Lola29M をキイロショウジョウバエの *fru* 発現ニューロンに発現させ、ニューロンの解剖学的性差および性行動を解析した。その結果、雌がもつ Lola29F が Lola29M のドミナントネガティブ型として働いており、それによってニューロンの雄化を阻止することを示唆する結果を得た。

前述のように、Lola29M の BTB/POZ ドメイン内に、デグロンとして機能するリジン残基があることを示唆する結果を得た。Lola29M と Fru はこのドメインを介して結合することから、Fru-Lola29M の結合がデグロンを隠すという仕組みが、Lola29M を切断から守るものと推察された。この結果は、転写因子と推察される Fru が転写制御以外の機能を持ち、それによってニューロンの性差を作ること示唆する結果であり、脳神経系の性差形成メカニズムについて、新しい概念を提唱できる可能性があるのではないかと考えている。

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 7 件)

(1) Ito H., Sato K., Kondo S., Ueda R. and Yamamoto D. The Fruitless transcriptional

target *robo1* is a switch of neurite sex types. *Current Biology*, in press. 査読有

(2) Goto T., Sato K., Sone H., Koganezawa M., Ito H. and Yamamoto D. Zeste tunes the timing of ecdysone actions in triggering programmed tissue degeneration in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics* 29; 169-173, 2015. 査読有

(3) Takayanagi S., Toba G., Lukacsovich T., Ote M., Sato K., and Yamamoto D. A *fruitless* upstream region that defines the species-specificity in the male-specific muscle patterning in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics* 29; 23-29, 2015. 査読有

(4) Kimura S., Sakakibara Y., Sato K., Ote M., Ito H., Koganezawa M. and Yamamoto D. The *Drosophila* Lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. *Journal of Neurogenetics* 29; 8-17, 2015. 査読有

(5) Sato K., Yamamoto D. An epigenetic switch of the brain sex as a basis of gendered behavior in *Drosophila*. *Advances in Genetics*, 86; 46-63, 2014. 査読有

(6) Yamamoto D., Sato K., Koganezawa M. Neuroethology of male courtship in *Drosophila*: from the gene to behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, 200(4):251-64, 2014. 査読有

(7) Ito H., Sato K., Yamamoto D. Sex-switching of the *Drosophila* brain by two antagonistic chromatin factors. *Fly* 7; 87-91, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) Ito H., Sato K., Kondo S., Ueda R. and Yamamoto D. Searching for *fru*-target genes that regulate the development of sexual dimorphism in *Drosophila* central neurons., 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) (ポスター発表)

(2) Ito H., Sato K., Kondo S., Ueda R. and Yamamoto D. Searching for *fru*-target genes that regulate the development of sexual dimorphism in *Drosophila* central neurons., 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) (口頭発表)

(3) Ito H., Sato K., Kondo S., Ueda R. and Yamamoto D. Searching for *fru*-target genes that regulate the development of sexual dimorphism in *Drosophila* central neurons., NTNU-Tohoku Univ. Brain Science Meeting, November 25-27th, 2015, 東北大学 (宮城県・仙台市)

(4) Sato K., Ito H., Koganezawa M., Toba G. and Yamamoto D. Sex-specific cleavage of Lola specifies sex-specific neurite structures in *Drosophila*., NTNU-Tohoku Univ. Brain Science Meeting, Sendai, November 25-27th, 2015, 東北大学 (宮城県・仙台市)

(5) Sato K., Ito H., Koganezawa M. and Yamamoto D. Male-specific transcription factor Fruitless non-transcriptionally suppresses proteolytic cleavage of a Lola isoform to generate sexual differences in neuronal structures and behavior of *Drosophila*. 2015 CSHL Meeting on Neurobiology of *Drosophila*., September 29th-October 3rd, 2015, Cold Spring Harbor (U.S.A.)

(6) Chowdury ZS., Sato K. and Yamamoto D., Trf2 may act as a co-factor of Fruitless, a neural masculinizing factor, The 2nd Taiwan-Tohoku University Neuroscience Workshop for Young Scientists, December 7-11th, 2014, 蔵王ロイヤルホテル (宮城県・蔵王町)

(7) Kato T., Sato K. and Yamamoto D., A possible involvement of non-cell-autonomous mechanism in shaping sexually dimorphic neuronal structures, The 2nd Taiwan-Tohoku University Neuroscience Workshop for Young Scientists, December 7-11th, 2014, 蔵王ロイヤルホテル (宮城県・蔵王町)

(8) Ito H., Sato K., Kondo S. and Yamamoto D., A genetic screen for Fru-target genes required for sexually-dimorphic projection patterning in *Drosophila* neurons, The 2nd Taiwan-Tohoku University Neuroscience Workshop for Young Scientists, December 7-11th, 2014, 蔵王ロイヤルホテル (宮城県・蔵王町)

(9) Sato K., Toba G., Ito H., Koganezawa M., Yamamoto D., Sex-specific functions of *longitudinals lacking*, The 2nd Taiwan-Tohoku University Neuroscience Workshop for Young Scientists, December 7-11th, 2014, 蔵王ロイヤルホテル (宮

城県・蔵王町)

(10) 佐藤耕世, 鳥羽岳太, 伊藤弘樹, 小金澤雅之, 山元大輔, ショウジョウバエ脳神経系の雄化因子 Fruitless がもつ転写調節以外の機能, 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第6回領域会議, 2014年10月9-11日, 館山寺サゴロイヤルホテル (静岡県・浜松市)

(11) Sato K., Toba G., Ito H., Koganezawa M., Yamamoto D., A potential non-transcriptional role of Fruitless that specifies neuronal sex-types and fly sexual orientation, 日本動物学会第85回大会, 2014年9月11-14日, 東北大学 (宮城県・仙台市)

(12) Kimura S., Sunouchi K., Sato K., Ito H., Nomoto S., Sakakibara Y. and Yamamoto D. A possible role for the CPEB-interacting protein in the long-term memory formation explored in *Drosophila melanogaster*. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

(13) Sato K., Toba G., Ito H., Koganezawa M., Yamamoto D., Sex-specific functions of *longitudinals lacking*., 2013 CSHL Meeting on Neurobiology of *Drosophila*, 1-5th October, 2013, Cold Spring Harbor (U.S.A)

(14) Kato T., Sato K., Yamamoto D., Non-cell-autonomous mechanism generates sexually dimorphic neuronal structures in the *Drosophila* brain. Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference 2013, Seoul, 13-16th May, 2013, Seoul (Korea)

(15) Kato T., Sato K., Yamamoto D., Non-cell-autonomous mechanism generates sexually dimorphic neuronal structures in the *Drosophila* brain. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, 9-10th May, 2013, 東北大学 (宮城県・仙台市)

(16) Kato T., Sato K., Yamamoto D., Non-cell-autonomous mechanism generates sexually dimorphic neuronal structures in the *Drosophila* brain. The 4th UCL-Tohoku University Symposium, 21th February, 2013, London (UK)

(17) 後藤貴章, 佐藤耕世, 伊藤弘樹, 山元大輔, ショウジョウバエのクロマチン制御因子 Zeste は変態時に起こる細胞死を組織に応じて正または負に制御する, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡

県・福岡市)

〔図書〕(計2件)

(1) 山元大輔, 佐藤耕世, 「越境する性」の生物学 (Biological bases for typical and atypical gendered behaviors), 岩波科学 84 (7); 736-744, 2014.

(2) Yamamoto D., Sato K., The female brain and the male brain. Brain and Nerve 65 (10); 1147-1158, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 耕世 (SATO, Kosei)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 40451611

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: