

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430001

研究課題名(和文) ニューロンの性差を生み出すFru蛋白質の標的遺伝子の解析

研究課題名(英文) Searching for fru-target genes that regulate the development of sexual dimorphisms in *Drosophila* central neurons.

研究代表者

伊藤 弘樹 (Ito, Hiroki)

東北大学・生命科学研究科・研究支援者

研究者番号：00425612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではショウジョウバエの脳のオス化に中心的役割を果たす転写因子Fruに関し以下の事実を明らかにした。(1)Fruは軸索投射因子robo1遺伝子プロモーターに直接結合しrobo1発現を抑制する。(2)Robo1は脳の性的二型を示すmALニューロンのオス特異的な神経突起の形成を抑制する。(3)Fru結合配列を欠くrobo1変異体オスではmALニューロンを構成する単一ニューロンの多くでオス特異的な神経突起が消失し、さらに変異体オスはメスに求愛する際左右の翅を交互に振り続ける異常行動を示した。本研究によりFruが標的遺伝子の発現を調節しオスの性行動を制御するメカニズムの一端が初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The *Drosophila* fruitless (*fru*) gene is regarded as a master regulator of the formation of male courtship circuitry, yet little is known about its molecular basis of action. Fru proteins are expressed in a small population (~2%) of neurons of the brains in males, but not females. In this study, we showed the following: (1) Fru binds to the promoter of *robo1*, an axon guidance-regulating gene, and represses the expression of *robo1*, (2) *Robo1* suppresses formation of the male-specific neurite in sexually-dimorphic mAL interneurons in females, and (3) small deletions in the Fru-binding site of *robo1* promoter induce a loss of the male-specific neurite and disrupt male courtship patterns. This study paves the way for a thorough understanding of the mechanism whereby Fru proteins orchestrate transcription for the formation of courtship circuitry.

研究分野：神経行動遺伝学

キーワード：脳 ニューロン 性的二型 求愛 神経回路 軸索投射 性決定 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

動物の本能行動は脳に予め遺伝的にプログラミングされた行動であり、本能行動を制御する神経回路がいかに作られるかを明らかにするのが動物神経行動学の重要なテーマの一つである。申請者らは遺伝学的解析ツールとして優れたショウジョウバエを用い求愛行動に関してこの問題に取り組んでおり、これまでにオスが同性愛行動を行う突然変異体 *fru^{sat}* の原因遺伝子 *fru* が転写因子をコードしていること、さらに脳の全ニューロン 10 万個のうちわずか 2% の細胞に *fru* mRNA が発現しており、性特異的スプライシングによりオスの脳に作られたオス型 mRNA のみが Fru 蛋白質を産生できることを明らかにした (Ito *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9687 (1996); Usui-Aoki, Ito *et al.*, Nat. Cell. Biol., 2, 500 (2000))。その後、Dickson らはメスであってもオス型 *fru* mRNA を作る変異体を作成し、この変異体メスが完全なオスの性行動を示しながらメスに求愛することを示した (Demir & Dickson, Cell, 121, 785 (2005))。つまり個体の性に関わらず脳に Fru 蛋白質を発現させればオスの性行動を誘起できる。この事実は *fru* がオスの性行動の誘起に必要な神経回路の主要部の組み立てを制御する遺伝子、すなわち『ニューロンのオス化因子』であることを明確に示している。さらに脳の *fru* 発現ニューロンは 60 種類のニューロン群からなり、そのうち約 20 種類のニューロン群に性的二型が見られることを申請者のグループを含む国内外の複数の研究グループが報告した (Kimura *et al.*, Nature, 438, 229 (2005); Kimura *et al.*, Neuron, 59, 759 (2008); Cachero *et al.*, Curr. Biol., 20, 1589 (2010); Yu *et al.*, Curr. Biol., 20, 1602 (2010))。さらに申請者らは *fru* が DNA 結合型の転写因子をコードしていることから、成虫の脳が作られる過程において Fru 蛋白質がどのように標的遺伝子の発現を ON/OFF しニューロンをオス化する

るか明らかにすることにした。その結果、(1) Fru は転写共役因子 Bon を介して Fru-Bon-HDAC1 複合体 (HDAC1: 脱アセチル化酵素) または Fru-Bon-HP1a 複合体 (HP1a: ヘテロクロマチン化因子) を形成し染色体上の標的遺伝子に結合すること、(2) 前者が標的遺伝子に結合した場合、性的二型を示すニューロンのオス化、オスの性行動の活性化が起き、後者が結合した場合、性的二型ニューロンのオス化の阻害、オスの性行動の抑制化が起きることを明らかにした (Ito *et al.*, Cell, 149, 1327 (2012))。しかし、Fru がニューロンの性差を形成するメカニズムをより詳細に明らかにするには標的遺伝子の同定が必須であるが一切不明であった。そこで、本研究では遺伝学的手法を用いて Fru 標的遺伝子群の同定を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は Fru 標的遺伝子群の同定である。Fru は DNA 結合ドメイン (DBD) として Zinc finger モチーフを持つ転写因子である。最近、国外の複数グループにより Fru 標的遺伝子を同定するため以下のような研究が実施されたが信用に足る結果を得られていない。Arbeitman らはグルタチオン-S-転移酵素 (GST) と FruDBD を融合させた GST-FruDBD 蛋白質を合成し *in vitro* で結合する DNA 配列を決定した (Dalton *et al.*, BMC Genomics, 14, 659 (2013))。また Goodwin らは DNA アデニンメチル基転移酵素 (Dam) と Fru を融合させた Dam-Fru をハエの脳に発現させメチル化された DNA 結合配列を決定した (Neville *et al.*, Curr. Biol., 24, 229 (2014))。しかし、両者の報告した結合配列は全く一致せず、さらに両者とも報告した結合配列を持つ標的遺伝子がニューロンの性差形成に実際に関与していることを全く示していない。申請者が先の論文で報告したように Fru は複数のクロマチン調節因子と結合し、その結合相手により染色

体上の標的遺伝子が変わるので (Ito *et al.*, Cell, 149, 1327 (2012)), 大腸菌を使って合成した GST-FruDBD はもとより、脳に Dam-Fru を強制発現した場合でも個々のニューロンの状況を検出するのは極めて難しい。さらに Fru は脳の 2% のニューロンでしか発現していないので脳全体に Dam-Fru を発現させた Goodwin らの解析では正確な結合配列を決定するのは困難であったと考えられる。そこでこの問題を回避するため、申請者は「個々のニューロンの性的二型を指標とした遺伝学的スクリーニング」によって Fru 標的遺伝子を同定することにした。

3. 研究の方法

性的二型を示すニューロンでは神経突起の投射、細胞数に関して性差が見られる。従って、Fru の遺伝学的に下流に位置する遺伝子には軸索誘導、細胞死等を調節する遺伝子が含まれることが予想される。そこで申請者は MARCM 法と呼ばれる成虫脳のニューロン群をモザイク状に GFP ラベルする方法 (Lee & Luo, Neuron 22, 451 (1999)) と遺伝子ノックダウンを組み合わせた方法を用いて性的二型を示すニューロンに関して軸索誘導や細胞死に関連した遺伝子のノックダウンを行い、本来の性とは逆の表現型に変化させる候補遺伝子をスクリーニングした。その後、その候補遺伝子のプロモーターを含むレポーター遺伝子を使ったレポーターアッセイによって Fru がその候補遺伝子の発現を調節するのに重要なシス配列をマッピングし、さらにゲルシフト解析によって Fru がそのシス配列に直接結合するか否かを調べた。さらに CRISPR/Cas9 法を使ってゲノムの Fru 結合配列を削った変異体を作成し、その変異体の性的二型ニューロンの形態および求愛行動への影響を調べた。

4. 研究成果

マウスの脊髄やショウジョウバエの腹部神

経節の交連ニューロンでは軸索が正中線を越えて投射するか否かを軸索投射因子 Robo1 が制御している (Kid *et al.*, Cell 92, 205 (1998); Long *et al.*, Neuron 42, 213 (2004))。本研究期間中に申請者は Fru の標的遺伝子の一つとして *robo1* を同定し、さらに以下の事実を明らかにした。(1) オス特異的に発現する Fru が *robo1* のプロモーターに直接結合し *robo1* 発現を抑制していた。さらに Robo1 は性的二型を示すニューロンの一つ、mAL ニューロンのオス特異的な神経突起の分岐を抑制していた。(2) オスの mAL ニューロンは約 30 個の単一ニューロンから構成されているが、*robo1* プロモーターの Fru 結合配列を欠く変異体のオスではその単一ニューロンの多くでオス特異的な神経突起が消失していた。さらに、(3) Fru 結合配列を欠く変異体のオスはメスに求愛する際、左右の翅を交互に振り続ける異常行動を示した。この変異体のオスでは *robo1* プロモーターに Fru が結合できないため *robo1* mRNA が発現し、mAL ニューロンの神経突起がメス化したため求愛行動異常が起きたものと考えられる。(4) 変異体オスの mAL ニューロンの *robo1* mRNA 発現を *robo1* ノックダウンによって抑制すると求愛行動の異常が完全に野生型の行動に回復した。野生型のオスがメスに求愛する際、オス前肢の受容細胞がメスのフェロモンを検出後 mAL ニューロンにその情報を伝達し、mAL ニューロンは左右どちらの肢からの情報が強いかを判別し、メス側の翅を振るよう出力することが報告されている (Koganezawa *et al.*, Curr. Biol., 20, 1 (2010))。従って mAL ニューロンの *robo1* で制御されているオス特異的な神経突起は、左右どちらの肢からフェロモン情報が強いかを判別するのに重要な役割を果たしているものと考えられた。本研究の結果は Fru が特定標的遺伝子の発現を調節することによってニューロンの神経突起の性的二型形成を制御しさらにオスの性行動を制

御するその具体的なメカニズムを初めて明らかにするものである(Ito et al., Curr. Biol., in press)

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 5 件)

H. Ito, K. Sato, S. Kondo, R. Ueda, and D. Yamamoto, Fruitless represses *robo1* transcription to shape male-specific neural morphology and behavior in *Drosophila*. Curr. Biol., 査読有, 2016, in press

T. Goto, K. Sato, H. Sone, M. Koganezawa, H. Ito, and D. Yamamoto, Zeste tunes the timing of ecdysone actions in triggering programmed tissue degeneration in *Drosophila*. J. Neurogenet., 査読有, 29, 2015, pp. 169-173
Doi: 10.3109/01677063.2015.1098638.

S. Kimura, Y. Sakakibara, K. Sato, M. Ote, H. Ito, M. Koganezawa, and D. Yamamoto, The *Drosophila* Lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. J. Neurogenet., 査読有, 29, 2015, pp. 8-17.
Doi: 10.3109/01677063.2014.917644.

H. Ito, K. Sato, and D. Yamamoto, Sex-switching of the *Drosophila* brain by two antagonistic chromatin factors. Fly (Austin), 査読有, 7, 2013, pp. 87-91.
Doi: 10.4161/fly.24018.

伊藤弘樹、山元大輔、性行動の違いを生み出す分子機構、化学と生物、 査読有、51, 2013, pp. 686-692.
<https://www.jstage.jst.go.jp/article/>

kagakutoseibutsu/51/10/51_686/_article/-char/ja/

[学会発表] (計 15 件)

H. Ito, K. Sato, S. Kondo, R. Ueda, and D. Yamamoto, Searching for *fru*-target genes that regulate the development of sexual dimorphisms in *Drosophila* central neurons. (口頭発表), 2015 年 12 月 1 日 - 4 日, 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神経科学 II, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

H. Ito, K. Sato, S. Kondo, R. Ueda, and D. Yamamoto, Searching for *fru*-target genes that regulate the development of sexual dimorphisms in *Drosophila* central neurons. (ポスター発表), 2015 年 12 月 1 日 - 4 日, 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

H. Ito, K. Sato, S. Kondo, R. Ueda, and D. Yamamoto, Searching for *fru*-target genes that regulate the development of sexual dimorphisms in *Drosophila* central neurons., 2015 年 11 月 25 日 - 27 日, NTNU-Tohoku University Brain Science Meeting, Life Science Project Building, Tohoku University, Sendai

K. Sato, H. Ito, M. Koganezawa, G. Toba, and D. Yamamoto, Sex-specific cleavage of *lola* specifies sex-specific neurite structures in *Drosophila*., 2015 年 11 月 25 日 - 27 日, NTNU-Tohoku University Brain Science Meeting, Life Science Project Building, Tohoku University, Sendai

K. Sato, H. Ito, M. Koganezawa, and D.

Yamamoto, 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 年 9 月 29 日- 10 月 3 日, 2015 CSHL Meeting on Neurobiology of *Drosophila*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

伊藤弘樹「ショウジョウバエの脳の性を決める分子機構」: ワークショップ「生命」への多面的アプローチ - ショウジョウバエをモデルとして、2015 年 9 月 24 日- 9 月 26 日, 日本遺伝学会第 87 回大会, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)

H. Ito, K. Sato, S. Kondo, and D. Yamamoto, A genetic screen for Fru-target genes required for sexually-dimorphic projection patterning in *Drosophila* neurons., 2014 年 12 月 7 日- 10 日, 第 2 回日台神経科学若手ワークショップ, 宮城蔵王ロイヤルホテル (宮城県蔵王町)

K. Sato, G. Toba, H. Ito, M. Koganezawa, and D. Yamamoto, Sex-specific functions of *longitudinals lacking*., 2014 年 12 月 7 日- 10 日, 第 2 回日台神経科学若手ワークショップ, 宮城蔵王ロイヤルホテル (宮城県蔵王町)

伊藤弘樹, 佐藤耕世, 小金澤雅之, 大手学, 松本健, 浜千尋, 山元大輔, 拮抗的に働く 2 種類のクロマチン制御因子によってキイロショウジョウバエ脳の性差が形成される, 2013 年 12 月 3 日- 6 日, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

木村真吾, 須之内和也, 佐藤耕世, 伊藤弘樹, 野本聡, 小金澤雅之, 山元大輔, キイロショウジョウバエの長期記憶形成に必要とされる CREB タンパク質と相互作用する因子とその役割の解明, 2013 年 12 月 3 日- 6 日, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

K. Sato, G. Toba, H. Ito, M. Koganezawa, and D. Yamamoto, Sex-specific functions of *longitudinals lacking*., 2013 年 10 月 1 日- 5 日, 2013 CSHL Meeting on Neurobiology of *Drosophila*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

佐藤耕世, 加藤貴大, 鳥羽岳太, 伊藤弘樹, 小金澤雅之, 山元大輔, 行動様式の性差を生み出す遺伝的プログラムと細胞間相互作用, 2013 年 9 月 5 日- 7 日, 新学術領域「性差構築の分子基盤」第 5 回領域会議, 虹の松原ホテル (佐賀県唐津市)

K. Sato, T. Kato, G. Toba, H. Ito, M. Koganezawa and D. Yamamoto, Molecular and cellular mechanisms generating sexual differences in neuronal structures and behavior of *Drosophila*., 2013 年 8 月 2 日- 3 日, IDE (Intercalation, development and evolution) 研究会, 東京大学 (東京)

伊藤弘樹, 「ショウジョウバエ脳の性を調節するクロマチン因子の作用機構」, 2013 年 6 月 4 日, 京都産業大学 総合生命科学部 生命システム学科セミナー, 京都産業大学 総合生命科学部 生命システム学科 (京都府京都市)

伊藤弘樹, 山元大輔, ショウジョウバエ脳の性を調節するエピジェネティック因子の作用機構, 2013 年 6 月 2 日- 4 日, 平成 23 年

度 文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究」ゲノム・遺伝子相関 班会議、
ANAクラウンプラザホテル神戸(兵庫県神戸市)

[図書](計 2 件)

伊藤弘樹、新曜社、「脳の性差をつくるしくみを探る - 遺伝子が司る性行動 - 」『生命誌 年刊号 vol.77-80 ひらく』、2015、207 (88-95)

伊藤弘樹、新曜社、『季刊 生命誌 77 BRH cards 2013 夏』(JT 生命誌研究館)中村桂子 編、「脳の性差をつくるしくみを探る」BRH カード. 2013、12 (3-4)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤弘樹 (ITO, Hiroki)

東北大学・生命科学研究科・研究支援者

研究者番号 : 00425612