
東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻

平成 29 年度

修士論文 要旨

ショウジョウバエ中枢神経系における
dunce の性特異的発現制御機構の解析

【キーワード】

ショウジョウバエ, 性分化, *doublesex*, *dunce*

2018 年 1 月提出

指導教員 鈴木 雅京 准教授

資源生物制御学分野

47-166331 高瀬 鍛

【序論】

神経系の性差やそれによって生み出される性行動の分子基盤は未だ不明な点が多い。ショウジョウバエの *doublesex* (*dsx*) 遺伝子は、体細胞の性分化を誘導する。*dsx* は雌雄で異なるスプライシングを受け、それぞれ雌型 Dsx タンパク質 (Dsx^F)、雄型 Dsx タンパク質 (Dsx^M) が作られる。それらは転写因子として機能し、標的遺伝子の転写を制御することにより個体の性分化を誘導するが、それは形態や生理面のみならず、行動にも及ぶ。近年、性行動に関与する *dsx* 発現ニューロンが相次いで同定されており、Dsx は神経系で発現する様々な遺伝子の制御を担っていると考えられる。しかし行動に関わる *dsx* 標的遺伝子は未だ 1 例しか報告されていない。このため、*dsx* が神経系の性差を形作る分子基盤の大部分は未解明のままである。そこで本研究では神経系で機能する *dsx* 新規標的遺伝子の同定を通じて、性行動を形作る分子メカニズムの理解を目指した。

【結果と考察】

dsx と *dunce* の関係

本研究ではまず *dsx* 標的候補遺伝子の選定を行った。はじめに Clough ら (2014) による ChIP-seq により Dsx が結合していると予測された遺伝子を 6230 個見出した。このうち、性により深く関連している遺伝子を抽出するため、Dsx マウスオルソログ *Dmrt1* の結合が示唆されているマウス遺伝子とオルソローガスな関係にある 585 遺伝子を選抜した。さらにこの中で配偶行動に関係のある遺伝子を 10 遺伝子選び出した。このうち中枢神経系の腹部神経節において雌で雄よりも強い発現を示すと報告されている *dunce* (*dnc*) に焦点を当てることにした (Nighorn et al., 1991)。まず Dnc-GFP-Dnc

融合タンパク質を発現する *dnc* プロテイントラップ系統 (Venken et al., 2011) を用いた免疫染色法により、中枢神経系における Dnc の発現パターンを調べた。その結果、先行研究の報告通り、腹部神経節において雌で雄より高い発現が確認された (図 1A)。*dsx* がこの雌雄差に関与するか検証するために *dsx* null mutant における Dnc の発現を観察したところ、腹部神経節における雌特異的発現が消失し、発現レベルに雌雄差が見られなくなった (図 1B)。この結果は、*dnc* の腹部神経節における雌特異的発現には *dsx* が必要であることを示している。そこで Caussinus ら (2011) によって開発された deGradFP を利用して *dsx* 発現細胞における Dnc の発現をノックダウンした。その結果、*dsx* null mutant の場合と同様、腹部神経節における雌特異的発現が消失し、発現レベルに雌雄差が見られなくなった (図 1C)。以上の結果から、腹部神経節で見られる Dnc シグナルの雌雄差は、*dsx* 発現細胞における Dnc の発現に起因することがわかった。一方、中枢神経系の腹部神経節における *dsx* 発現細胞は、雌の交尾後の性行動を制御することが知られている (Rezával

et al., 2012; Feng et al., 2014)。*dnc* 遺伝子も雌の交尾後の性行動に関与するとの報告がある (Bellen and Kiger, 1987)。この点に着目し、上述の Dnc ノックダウンが雌の性行動に及ぼす影響を調べたところ、交尾後の雌にみられる交尾拒否行動のうち、産卵管突き出し行動が有意に減少することがわかった (図 3)。以上の結果から、*dnc* が腹部神経節において雌特異的に発現し、産卵管突き出しによる交尾拒否行動を制御するという機能を発揮する上で *dsx* の働きが必要であることが明らかとなった。以上より、

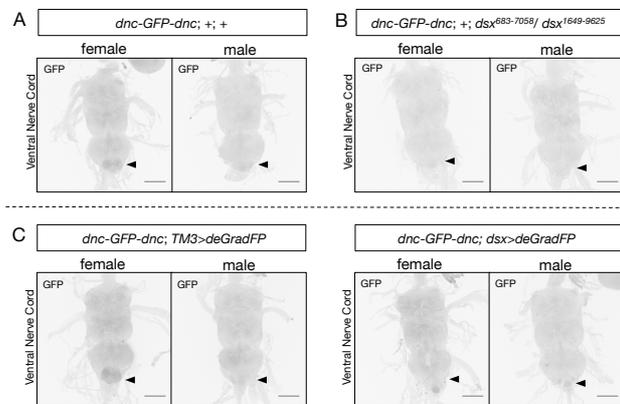


図 1 中枢神経系における Dnc-GFP-Dnc 発現解析
(A) 中枢神経系における内在性 Dnc の発現。(B) *dsx* null mutant における内在性 Dnc 発現。
(C) Dnc-GFP-Dnc ノックダウン個体における内在性 Dnc 発現。左図はネガティブコントロール個体、右図が Dnc ノックダウン個体。矢じりは腹部神経節を示す。scale bar : 100 μm.

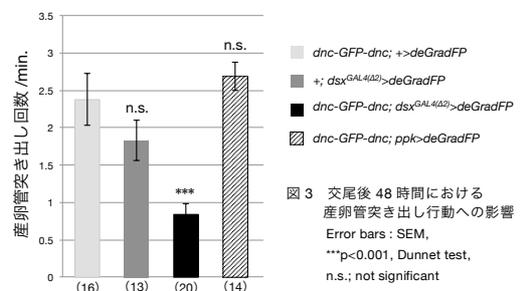


図 3 交尾後 48 時間における産卵管突き出し行動への影響
Error bars : SEM, ***p<0.001, Dunnett test, n.s.: not significant

中枢神経系で働く *dsx* の下流遺伝子として *dnc* を新規に同定できたといえる。

dnc の腹部神経節の雌特異的発現を制御するエンハンサーの探索

ではこの雌特異的な *dnc* の発現は、*dsx* によって直接制御されているのだろうか。この点を検証するため、*Dsx* が結合することで腹部神経節において雌特異的に *dnc* の転写を促進

するようなエンハンサー領域を探索することにした。まず *dnc* 遺伝子座において、Clough ら (2014) の ChIP-seq のデータにより *Dsx* の結合が示唆されており、なおかつ *Dsx* 結合コアコンセンサス配列 (ACAATGT) が存在するような領域を抽出した。さらにこれらの中から、Jenett ら (2012) によって中枢神経系におけるエンハンサー活性を示すことが確認されている領域を 5 つ見出した (図 3A)。これら 5 つのエンハンサーを用いたエンハンサートラップ系統の発現解析を行ったところ、*13D02sh* をエンハンサーとして用いた場合に腹部神経節における雌特異的なレポーターの発現が観察された (図 4A)。*13D02sh* が *dnc* の発現に責任をもつエンハンサーなのか調べるために *13D02sh-GAL4* でドライブされるレポーター遺伝子の発現と内在性 *Dnc* の発現を共免疫染色にて観察した。その結果、腹部神経節において両方の発現部位が一致することが確認された (図 5)。以上の結果から、*13D02sh* は腹部神経節において *dnc* の発現を促すエンハンサーであることが判明した。

13D02sh における *Dbs1* の機能解析

次に *13D02sh* 内に存在する推定上の *Dsx* 結合部位 (*Dsx* binding site 1: *Dbs1*) の機能解析を行った。まず、*Dbs1* に *Dsx* が結合することを確認するため、リコンビナント *Dsx*-DBD タンパク質を用いたゲルシフトアッセイを行ったところ、*Dsx* が特異的に結合することが明らかとなった。続いて *Dbs1* のエンハンサー活性に対する機能を検証するため、*13D02sh* 内の *Dbs1* のみを欠失した *13D02sh.d* を作製し、そのレポーターの発現を観察した。その結果、雌の腹部神経節におけるレポーターの発現が消失することがわかった (図 4B)。この結果は、*13D02sh* が腹部神経節において雌特異的エンハンサー活性を発揮する上で *Dbs1* が必要であることを示している。以上の結果より、雌の腹部神経節における *13D02sh* のエンハンサー活性は *Dbs1* を介した *Dsx* の結合により制御されると結論した。

13D02sh-GAL4 発現細胞における *Dnc* の機能解析

13D02sh 発現細胞における *Dnc* の機能を調べるため、*13D02sh-GAL4* を用いて *Dnc* のノックダウンを試みたが、腹部神経節における *Dnc* のノックダウンが観察されなかった。これはノックダウンに用いた deGradFP 法がもつ、*GAL4* の発現量によってノックダウン効率が大きく変化するという性質によるものであると考えられる。念のため産卵管突き出し行動に及ぼす影響を調べたが特に異常はみられなかった。今後ノックダウン効率の改善のためにドライバーをホモにする等の方策が必要である。

【総括】

以上本研究により、雌の腹部神経節において *dsx* が *dnc* の発現を促進し、その結果産生された *Dnc* が雌の性行動、特に交尾拒否行動の制御に関わることが明らかとなった。さらに、*dnc* の腹部神経節における雌特異的発現に責任をもつエンハンサー領域を特定し、そのエンハンサー活性が *Dsx* の直接的な制御を受けることを明らかにすることができた。本研究により、中枢神経系で機能する *dsx* の直接的な標的遺伝子を新たに一つ同定できたといえる。

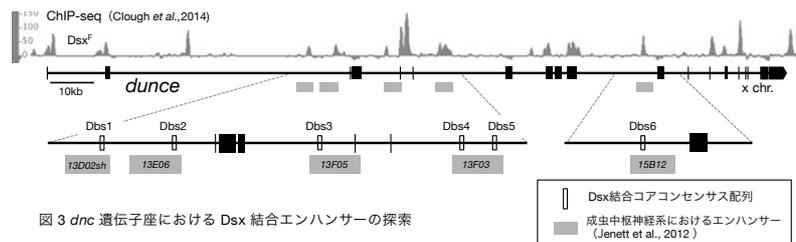


図 3 *dnc* 遺伝子座における *Dsx* 結合エンハンサーの探索

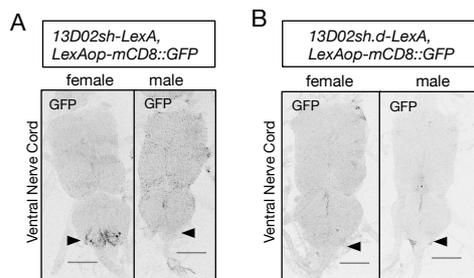


図 4 *13D02sh-LexA* によるレポーターの発現パターン (A) と *13D02sh.d-LexA* によるレポーターの発現パターン (B) 矢じりは腹部神経節を示す。scale bar: 100 μm

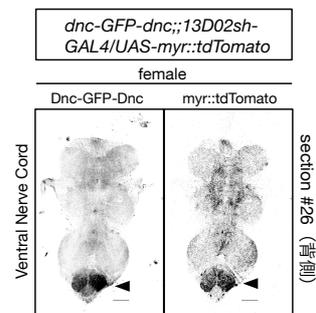


図 5 内在性 *Dnc* の発現部位と *13D02sh-GAL4* によるレポーターの発現部位の比較 矢じりは腹部神経節を示す。scale bar: 50 μm