

交尾における生殖器の連結および解除に異常を示すキイロシヨウジョウバエの変異体、*lingerer*の解析

遺伝子構造解析グループ 国吉久人

キイロシヨウジョウバエの配偶行動は、雄成虫の雌成虫に対する追跡行動に始まり、ラブソング、リッキング（雄が雌の交尾器をなめる行動）を経て交尾に至り、雌雄の分離によって終結する。*lingerer*変異体は、P因子挿入によって得られた突然変異体であり、この変異体のホモ接合体の雄成虫は、交尾に至る過程や交尾中には異常を示さないが、交尾終了後、連結した交尾器を速やかに解除することができない。そのため、雌雄がつながったままの状態が数秒から長いものでは10分ほど続く。また、*lingerer*のヘミ接合体（*lingerer/Deficiency*）の雄成虫は、さらに重い症状を示し、交尾試行を繰り返すものの、交尾に至ることは稀である。このように、*lingerer*変異体は交尾の開始と終了の際に異常を示すが、交尾器には形態異常が観察されなかったことから、交尾器の運動制御に問題があると考えられた。つまり、交尾器を動かすための筋肉か、それを支配する神経系に障害を持っていることが考えられた。この突然変異の原因遺伝子を同定するために、P因子挿入部近傍、約30kbにわたってゲノムウォーキングを行い、約10kbの転写単位が、P因子挿入点を第1イントロンに含む形で存在することを見出した。この転写単位からは4.6 kbのmRNAが転写され、変異体ではその転写量は減少していた。また、この転写単位を含むゲノム領域を変異体に導入すると、雄成虫の交尾異常が消失したことから、この転写単位が*lingerer*の原因遺伝子であることが示された。*lingerer*遺伝子は、推定分子量150kDの新規タンパク質をコードしており、ホモロジー検索の結果、ヒト、マウス由来の機能不明のタンパク質と部分的に高いホモロジーを示した。熱ショックプロモーターを用いたレスキュー実験から、雄成虫が正常に交尾を開始するためには、3令幼虫後期から蛹期初期での*lingerer*遺伝子の発現が必要であることが明らかとなった。この時期には、*lingerer*遺伝子は中枢神経系、生殖腺、成虫原基で発現していることが、*in situ* hybridizationによって示された。さらに、抗Lingerer抗体を作成して、中枢神経系について抗体染色を行ったところ、*lingerer*遺伝子は一部のニューロン、グリア細胞で発現しており、それらの細胞内でLingererタンパク質は細胞質に局在していた。成虫の運動性の基礎となる運動神経-筋肉のネットワークの大部分は、変態期に構築されることが知られている。*lingerer*遺伝子は変態初期の中枢神経系で発現しており、その減少によって成虫の交尾器の運動障害が引き起こされることから、交尾器運動の神経ネットワークの構築の際に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

1. はじめに

地球上には数多くの種類の動物が生活している。それぞれの種は、自分の子孫、あるいは自分の遺伝子を残すために、配偶者を探しだし、交尾を行い、卵または子供を産む。これら一連の配偶行動は「儀式」的とも思えるような、その動物種に独特な様式で行われる。このような行動様式は、その動物種の親から子へと、遺伝的に伝わる性質であり、「本能」の一部と考えられている。しかし、「本能」を構成する遺伝子の化学的実体は、現在でもほとんど判っていない。

古くから遺伝学の材料として研究されているキイロショウジョウバエは、「本能」的行動を解析する上で有力なモデル生物になりうる。その理由として、まず、注目する生物現象（ここでは配偶行動様式）が異常になった突然変異体を人為的に作り出すことができる（突然変異誘発）。そして、その原因遺伝子がコードする物質（タンパク質）を容易に突き止めることができる（遺伝子のクローニング）。さらに、様々な遺伝学的トリックを駆使することにより、目的の遺伝子がハエの体内でどのような働きを担っているのかを調べることができる。私たちは、配偶行動様式が異常になった突然変異体を、これまでに8系統分離し、それぞれについて解析を進めている。その中の1つ、*lingerer*変異体 (*lig*と略す) の解析について、その成果を発表する。

2. 本研究の内容

(1) *lingerer*変異体の雄成虫は交尾開始時および終了時に異常を示す

*lig*変異体は配偶行動の異常を指標として分離されたショウジョウバエの変異体である。まず、野生型ショウジョウバエ (CS) と *lig*変異体のホモ接合体 (*lig/lig*) のハエの配偶行動を比較するために、雄成虫1匹と雌成虫1匹を一つの小さな容器内に閉じこめて、配偶行動を観察した。図1に示すとおり、野生型雄は野生型雌に対して、約80%の成功率で交尾を行った。一方、変異体の雄成虫は、正常に交尾を開始するものの、交尾終了後に自分の交尾器をメスの交尾器から外すことができず、その結果、しばらく雌雄がつながったまま、反対方向に引っ張り合う状態が続く。この「引っ張り合い」は、変異体の雄成虫の場合、交尾したペアーのうちの約80%で観察されたが、野生型雄ではごく稀にしか観察されなかった。その後、「引っ張り合い」は数秒から数分間続くが、最終的には力づくでなんとか分離することができる。なお、その場合でも、変異体の雄成虫と交尾した野生型雌成虫は正常に子孫を残すことができたことから、変異体雄からの精子の受け渡しには異常はないといえる。

次に、X線照射により、*lig*遺伝子座近傍のゲノム領域を欠失した染色体を持つ系統（Deficiency; *Df*）を作成し、これと*lig*変異体とを交配して、ヘミ接合体（*lig/Df*）のハエを作った。ヘミ接合体では、*lig*遺伝子がホモ接合体（*lig/lig*）の半分しかいないため、さらに重い症状を示すことが予想される。そこで、ヘミ接合体の雄成虫の交尾行動を観察したところ、交尾試行を繰り返すものの、交尾に成功することは稀であり、その結果、交尾成功率は著しく低くなった（図2）。

このように*lig*変異体は、症状の強さに応じて、交尾器の連結あるいは解除の際に異常を示した。しかし、交尾器に形態異常は観察されなかったことから、交尾器の運動制御、すなわち、交尾器を動かすための筋肉か、それを支配する神経系に問題があるものと考えられた。

（2）*lingerer*遺伝子は新規タンパク質をコードする

*lig*変異体は第2染色体上の一か所に、トランスポゾン（動く遺伝子）の一種であるP因子が挿入されている。P因子は遺伝学的操作によって取り除くことができる。この操作により、*lig*変異体からP因子を取り除いた系統（リバータント；*lig^R*）の雄成虫は、交尾後の分離を正常に行うことができた（図1）。このことから、*lig*変異体では、挿入されたP因子が近くに存在する原因遺伝子の発現パターンに何らかの影響を及ぼし、その結果、交尾後の分離が異常になったと考えられる。そこで、P因子挿入位置の近傍のゲノム領域内に存在する転写単位（mRNAに転写されるゲノム領域）を探索した。その結果、P因子挿入位置をまたぐ形で、1つの転写単位が存在することが明らかとなった。この転写単位からは、14個のエキソンからなる4.6kbのmRNAが転写され、P因子は第1エキソンと第2エキソンの間（第1イントロン）に挿入されていた（図3）。ノーザン分析の結果、*lig*変異体のハエではその転写量が野生型のハエに比べて減少していた（図4）。これは、P因子の挿入によって、この転写単位からのmRNAの転写が妨害されたためと考えられる。同様に、その翻訳産物であるタンパク質も、変異体で減少していることが、抗体を用いたウェスタン分析から明らかになった（図5）。さらに、この転写単位を含むゲノム領域（図3、*Glig*）をホモ及びヘミ接合変異体のゲノム中に導入すると、いずれの場合においても、交尾行動における異常は消失し、症状はレスキューされた（図1、図2）。これは、導入した*Glig*から転写されたmRNAが、不足分を補ったためと説明できる。以上の結果から、この転写単位が*lig*変異体の原因遺伝子、すなわち*lig*遺伝子であると結論した。

*lig*遺伝子の塩基配列を調べたところ、1333残基のアミノ酸からなる推定分子量約150kDaのタンパク質がコードされていた。このタンパク質（Ligタンパク質と略す）は今までに機能が判っているいずれのタンパク質とも似ていない、全く新規のタンパク質であった。アミノ酸配列中に疎水領域を持たず、分泌性タンパク質とか膜タンパク質と

は考えにくいことから、細胞同士の情報交換に寄与している可能性は低い。また、ウェスタン分析で用いたのと同じ抗体で組織を染色したところ、Ligタンパク質は細胞質に存在しているが、核には存在していなかった（図8）。このことから、ゲノム構造や転写を直接制御するような核タンパク質としての機能は考えられない。逆に、細胞質に存在していることから、細胞外からのシグナルを核に伝達する経路の一員を担っている可能性は考えられる。

一方、データベースを検索した結果、ヒトやネズミなどの哺乳類にも、Ligタンパク質に似たタンパク質をコードする遺伝子が最低2種類（相同遺伝子1と2）存在することが明らかとなった（ただし、機能は不明である）。さらに、そのうちの一つ、相同遺伝子2はalternative splicingによって、C末端側のアミノ酸配列が異なる2つのサブタイプを生成する（相同遺伝子2 aと2 b）。ショウジョウバエのLigタンパク質と哺乳類の*lig*相同遺伝子産物との間でアミノ酸配列を比較すると、局所的に非常に良く似た領域（保存領域）が5カ所存在する（図6）。このような保存領域は、タンパク質の機能にとって重要な部分である可能性が高い。興味深いことに、相同遺伝子2 bでは5番目の保存領域が欠けており、何らかの機能の使い分けがあることも考えられる。このように、*lig*遺伝子は、ショウジョウバエからヒトまで進化的に離れた動物種の間でも保存されていることから、動物全般で重要な機能を担う遺伝子であると考えられる。

（3）*lingerer*遺伝子は変態初期の神経系、成虫原基、生殖腺で機能する

*lig*変異体の交尾後の分離異常は、ハエ体内のいつの時期の、どの組織の異常によって引き起こされるのであろうか？この問いの答えは、すなわち、雄成虫の交尾行動様式の形成において、*lig*遺伝子がいつどこで機能しているのかを知る手がかりとなる。

初めに、発生過程において、*lig*遺伝子が必要とされる時期を特定するために、次のような実験を行った。まず、熱ショックプロモーターの後ろに*lig*遺伝子をつないだ人工遺伝子（*hs-lig*）を合成し、これをゲノム中に導入したトランスジェニックバエを作成した。熱ショックプロモーターは、生体が常温下（ハエの場合は25℃）にあるときには作動しないが、高温下（37℃）にさらされた時に初めて、その後ろにある遺伝子の発現を誘導する働きを持っている。従って、*hs-lig*を持ったハエを37℃に置くこと（熱ショック）によって、任意の発生段階で*lig*遺伝子を強制発現させることができる。交配によって*hs-lig*を持ったヘミ接合体のハエ（*lig/Df; hs-lig*）を作り、卵から幼虫、蛹を経て成虫に至るまでの様々な発生段階で37℃、1時間の熱ショックを1回だけ与えて、羽化したハエの交尾行動を観察した（図7）。熱ショックを全く与えない場合、*hs-lig*を持たないヘミ接合体と同様、交尾成功率は低かった。ところが、3令幼虫の後期または蛹1日目に熱ショックを与えて、*lig*遺伝子を強制的に発現させた場合には、交尾成功率は50%以上にまで回復した。このレスキュー効果は、他の発生段階で熱ショックを与え

たときにはほとんど見られなかったことから、*lig*遺伝子が必要とされるのは3令幼虫後期から蛹1日目にかけての2日間、すなわち変態初期であることがわかる。

では、この時期のどの組織で*lig*遺伝子は必要とされるのだろうか？この問いに対するヒントを得る一つの方法は、どの組織で*lig*遺伝子が発現しているかを調べることである。つまり、*lig*遺伝子はそれが発現している組織内で何らかの働きをしているはずであり、変異体では*lig*遺伝子産物が十分に供給されていないためにその組織が異常をきたし、その結果、交尾異常を示したと考えられるからだ。そこで、*in situ*ハイブリダイゼーションという方法を用いて、3令幼虫後期での*lig*遺伝子の発現場所を調べたところ、脳・腹部神経節（中枢神経系）と生殖腺（精巣と卵巣）の他、ほとんど全ての成虫原基で発現していた。成虫原基は、幼虫体内で細胞分裂を繰り返し、蛹の間に分化して、最終的にハネや複眼などの成虫の外部器官になる組織である。*lig*遺伝子は将来交尾器になる成虫原基にも発現していたことから、変異体の交尾異常は、交尾器の形態異常に起因する可能性が考えられる。一方、*lig*遺伝子は中枢神経系にも発現しているので、交尾器の運動を制御している神経系が変異体では異常になっている可能性も考えられる。これまでのところ、交尾器の形態異常は見つかっていないことから、後者の可能性の方がより強いと考え、中枢神経系での*lig*発現細胞について、抗*Lig*抗体を用いて、さらに詳細に調べた（図8）。*lig*遺伝子は、ニューロン、グリア細胞の両方で発現しているが、全てのニューロン、グリアで発現している訳ではなかった。例えば、脳ではある特定の領域に固まっているニューロンの集団で発現しているが、その他のニューロンでは発現が見られない。また、グリアについては、脳の表面に分布するグリアにのみ発現し、脳内部に存在するグリアでは発現していない。また、腹部神経節では、背側のニューロンの大部分で発現しているが、腹側ではほんの一部のニューロンでしか発現していない。これらのニューロン、グリアが、何らかの特定の役割を担っていることが想像されるが、その機能については不明である。

以上の結果から、雄成虫の交尾の行動様式の形成のために、*lig*遺伝子が変態初期の中枢神経系、成虫原基、生殖腺のいずれかで機能する必要があることが示された。特に、*lig*変異体の雄成虫は交尾器に運動障害を持つことが推定されていることから、中枢神経系での*lig*遺伝子の発現が注目に値する。すなわち、成虫の運動制御の基礎となる運動神経-筋肉のネットワークは変態期に構築されることが知られており、*lig*遺伝子は交尾器運動の神経ネットワークの構築に寄与していることが考えられる。

3. 今後の展望

これまでの研究成果から、*lig*遺伝子は雄成虫の交尾器運動を制御する神経ネットワークの構築に寄与している可能性が示唆された。しかし、どのように寄与しているかはまだ明らかではなく、神経系における*lig*遺伝子の具体的な機能を調べるのが今後の課題である。一つの手段は、*lig*変異体でどのような異常が生じているのかを、解剖学的、電気生理学的に調べることである。例えば、神経の回路網がおかしいのか、神経と神経、神経と筋肉をつなぐシナプスがおかしいのか、あるいは神経を通る電気信号がおかしいのか、といったことを一つ一つ調べることである。もう一つの手段は、*lig*遺伝子が発現している神経細胞の性質を調べることである。例えば、筋肉の収縮を直接制御する運動神経なのか、あるいは筋肉の運動指令をプログラミングする高次の神経なのかを調べることである。このような解析を進めていくことによって、*lig*遺伝子の生物学的な機能を解明していきたい。一方、Ligタンパク質は、これまでに知られているどのタンパク質とも似ていない、全く新規のタンパク質であるために、分子レベルの機能を予測することは極めて困難である。今後は、このタンパク質と相互作用する分子を探索していくことによって、この問題を打開できるものと考えている。

*lig*遺伝子は、ショウジョウバエと哺乳類という、進化的にかけ離れた動物種間で保存されていることから、重要な機能を担う遺伝子であることが示唆される。近い将来、ショウジョウバエの*lig*遺伝子についての成果が、我々哺乳類の持つ*lig*相同遺伝子の機能を知る手がかりを提供してくれることを期待している。

4. 参考文献

Yamamoto, D., Jallon, J.M. and Komatsu, A. (1997) *Annu. Rev. Entomol.*, **42**, 551-85.

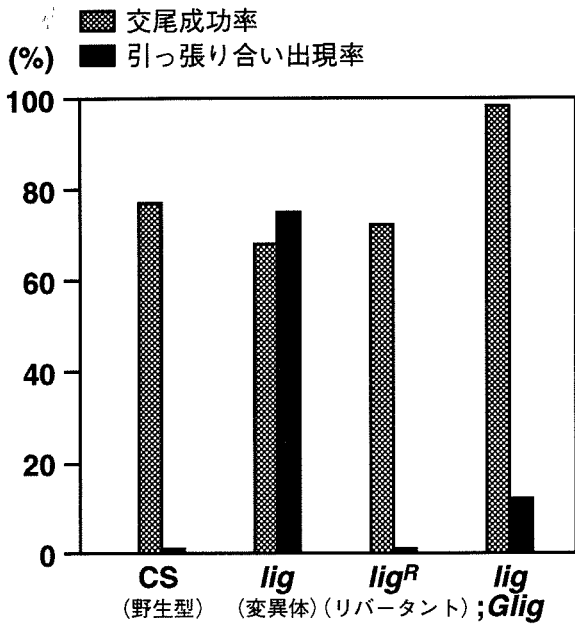


図1 ホモ接合体の表現型

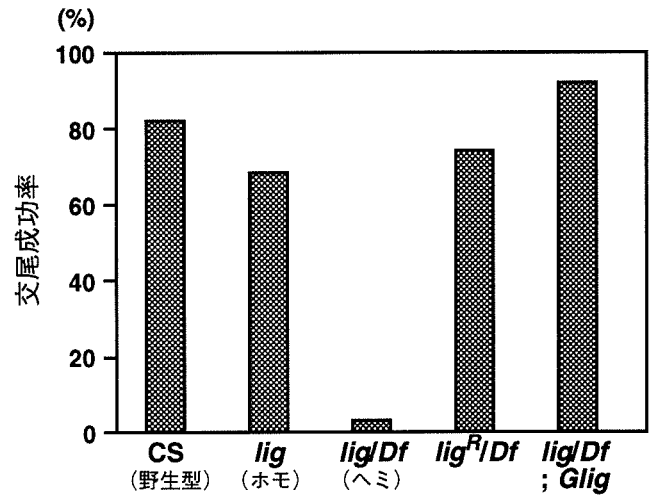


図2 ヘミ接合体の表現型

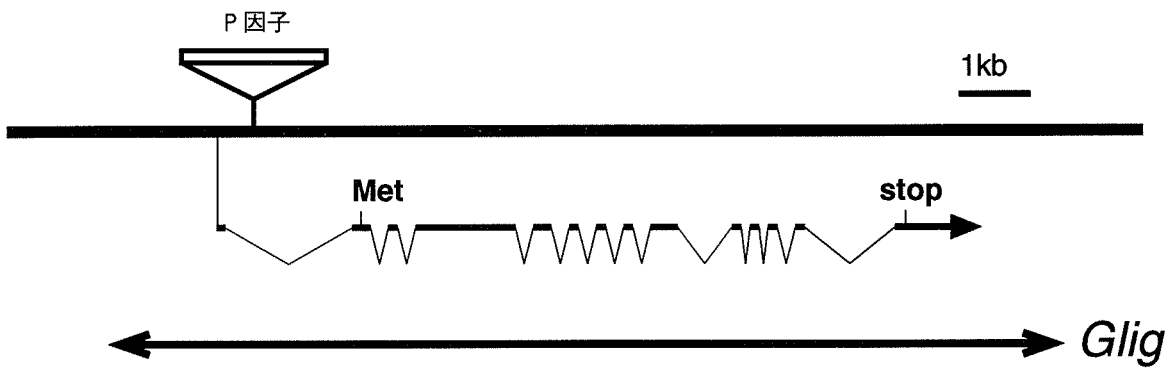


図3 *liggerer* 遺伝子の構造

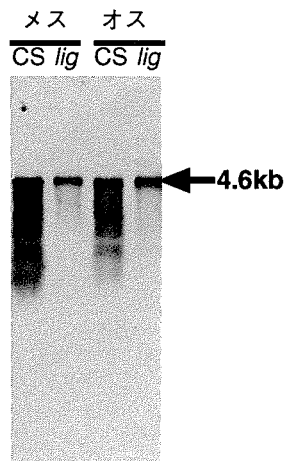


図4 ノーザン分析

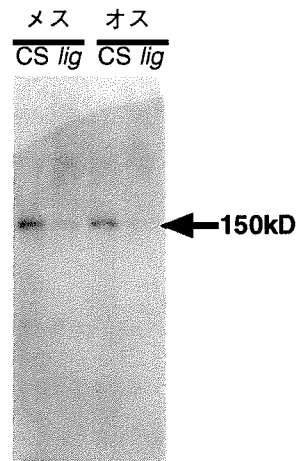


図5 ウェスタン分析

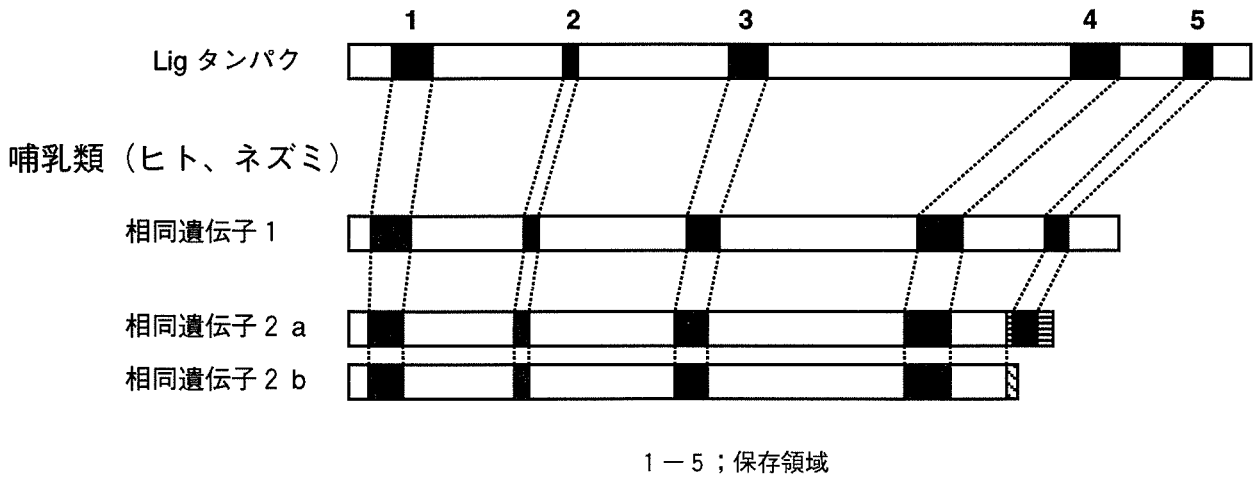


図 6 Lingerer タンパク質の構造

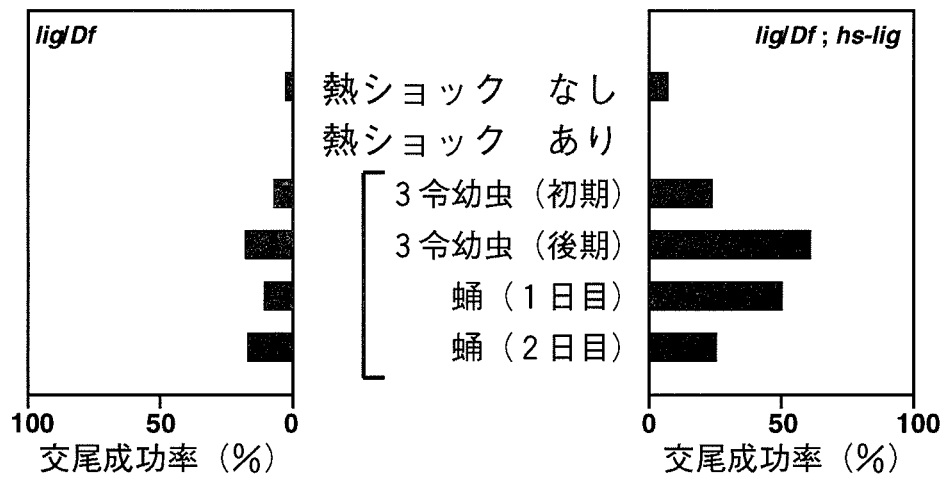


図 7 レスキュー実験



図 8 抗 Lingerer 抗体染色