

# 雄の性指向性と雄特異的筋肉の形成を支配する *satori(fruitless)* 遺伝子の解析

高橋邦明、青木-薄井一恵、中田裕美

キイロショウジョウバエの *satori(fruitless)* 突然変異体は、1) 雄が雌に全く興味を示さず、雄に対して求愛する、2) 雄のみに存在すべきローレンス筋を欠く、という表現型を持つ。我々は、この *satori* 遺伝子が既知の性決定カスケードとは別の新規なカスケードにおいて働き、雄特異的な神経発生を誘導していることを見いだした。

## 1.はじめに

キイロショウジョウバエの雄は図1に示す定型的な配偶行動を雌に対して行なう。

*satori(fruitless)* 突然変異体はこのうち、雄が雌に対して全く興味を示さない（つまり、悟っていない）変異体として約2000系統の行動スクリーニングから単離されたものである。後に詳細な表現型の解析により *satori* 雄が実は雌に対しての興味を失ったのではなく、興味の対象を雄に変化させていることがわかった。さらに、雄のみに存在するローレンス筋が欠失していることがわかった。性指向性と筋肉という一見関連のなさそうな表現型に共通するキーワードは、神経である。

古典的な雌雄モザイク解析により配偶行動は脳に支配されていることが知られている (Hotta and Benzer, 1972)。また雌雄モザイク解析に加え核移植実験によりローレンス筋の発生は筋肉母細胞の性に拘わらず、当該筋肉を支配する神経の雌雄に依存することが明らかになっている

(Lawrence and Johnston, 1986)。つまり *satori* 遺伝子は成虫の神経発生において性特異的な分化を誘導すると考えられる。

キイロショウジョウバエの性決定のしくみは哺乳動物である我々人間のそれとは大きく異なる。図2に既知の性決定カスケードについて示す。突然変異体を用いた解析により、雄の配偶行動やローレンス筋形成は *transformer(tra)* には依存する反面、そのターゲットの一つである *doublesex(dsx)* には依存しないことが既に報告されている (Taylor et al, 1995)。また当プロジェクトの伊藤らが *satori* 遺伝子の雌型 mRNA には Tra タンパク質結合部位があることから、*fru* は Tra のターゲットとして働き、*dsx* とは別の新規カスケードにおいて機能することを報告している (Ito et al, 1996; Ryner et al, 1996)。キイロショウジョウバエではこれらの遺伝子群が細胞の一つ一つで ON/OFF されることにより細胞毎に雌雄が決まる。つまり、一つの個体の中に雌雄両方の細胞が入り交じった、いわゆる雌雄モザイク個体を作成することができる。このことを利用して脳のごく一部だけに *satori* 遺伝子を発現させると、性指向性を支配する部位を細胞のレベルで同定することが可能となり、神経系の性特異性を解析する上で大きな利点となる。

今回我々は、モデル動物としてのショウジョウバエの利点を生かしながら、神経系の性分化のしくみを知ることを目的として、*satori* 遺伝子の構造と機能について解析を行なった。以下にこれまでに得られた実験結果について報告する。

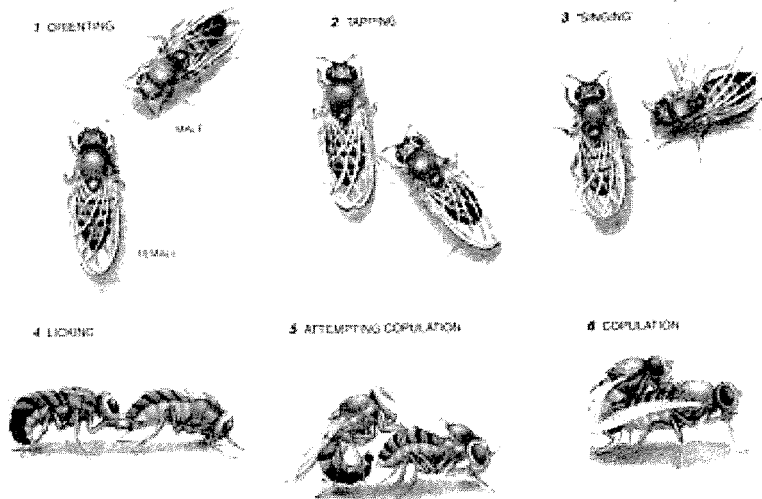


図1 キイロショウジョウバエの配偶行動

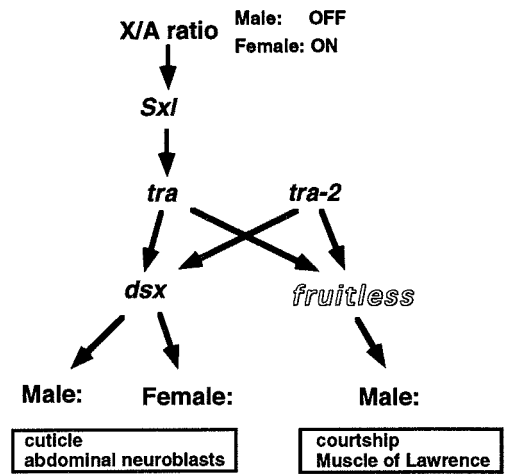


図2 キイロショウジョウバエの性決定カスケード

## 2.研究の内容

### satori突然変異体の表現型

野生型雄と *satori* 突然変異体雄のそれぞれが、野生型の雄と雌に対してどの程度求愛するか測定した結果を図3に示す。野生型雄は雌に対し10分間の観察時間中平均4分間求愛歌を歌うが雄-雄間での求愛歌は観察されなかった。一方 *satori* 突然変異体雄は雌に対して求愛歌を全く歌わないが雄に対しては平均30秒間求愛歌を歌った。また、*satori* 突然変異体雄は雌と全く交尾を行なわない。さらに *satori* 突然変異体雄を複数匹同時に観察すると、雄が鎖状に連なった求愛隊列が観察された (図4)。

図5に野生型と *satori* 突然変異体の腹部背側筋肉を示す。野生型雄第5節に左右一対存在するのがローレンス筋である。図に示すようにこの筋肉は雄のみに存在する。ところが、*satori* 突然変異体の雄では完全に欠落していた。

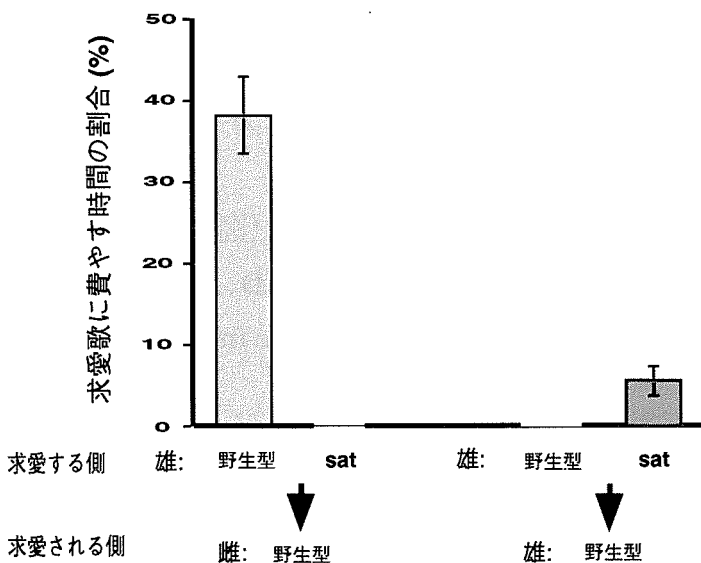


図3 野生型と *satori* 変異体雄が雄と雌に対してどの程度求愛したかを比較した



図4 *satori* 変異体雄の求愛隊列

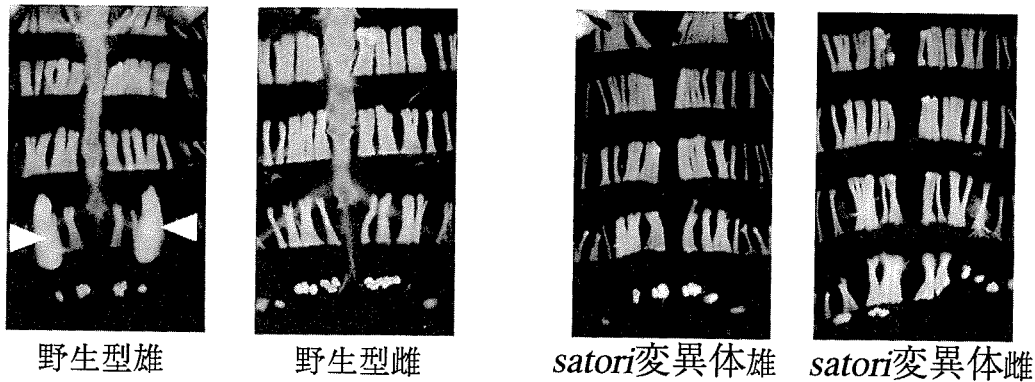


図5 野生型と *satori* 突然変異体の腹部背側筋肉  
(ローレンス筋を白矢印で示した)

### *satori* 遺伝子の構造

*satori* 突然変異体は、トランスポゾン的一种であるP因子を染色体に挿入し、突然変異を誘発する手法により作出された。つまりP因子が本来正常に機能している遺伝子のそばに挿入したことによりその遺伝子の発現に影響を与え、その結果突然変異が生じたと考えられる。そこで *satori* 変異体において、唾腺染色体上のどの位置にP因子の挿入があるのかを調べた。この結果、第3染色体9II P因子が挿入していることがわかった。この位置には既知の遺伝子として *fruitless* が存在しており、*fruitless* の雄は雌雄両方に対して求愛するが、雌と交尾はしないこと、ローレンス筋が欠失、あるいは短くなっていることが報告されていた (Gill, K.S., 1963)。 *satori* 変異と *fruitless* 変異が同一の遺伝子の異常によるものか否かを *satori/fruitless* ヘテロ接合体を作成しその表現型から調べた結果、両者が同一の遺伝子の変異であることがわかった。

先に述べたように *satori* 遺伝子は、P因子挿入部位近傍のゲノム上にあると考えられる。そこで、伊藤らはP因子挿入部位周辺のゲノムを90kb以上にわたりクローニングし、そのゲノム内に位置する転写単位 (mRNAに転写されるゲノム領域) を探した。その結果、約9.5kbから3.8kbまでの複数のmRNAを産する1つの転写単位が、ちょうど *fru*<sup>3</sup>、*satori*、*fru*<sup>4</sup> 変異のP因子挿入部位を大きなイントロンによってまたぐ形で存在していた (図6)。

この転写単位のcDNAをライブラリーのスクリーニング、及び5'-RACE、3'-RACE法によって単離し、*satori* 遺伝子の構造を明らかにした。以下にその特徴を述べる。

- 1) *satori* 遺伝子はN末付近にBTB domain、C末付近にZinc finger motifを持つ転写因子様タンパク質をコードしている。
- 2) *satori* mRNAの3'領域ではalternative splicingによって5種類の異なるエクソン (図6のVIII) が使用される。その結果、C末の配列の異なる5種類のタンパク質 (タイプA、B、C、D、E) が作られる。タイプA、B、EはC末に2つのZinc finger motifsを持つが、タイプC、Dはzinc finger motifを持たない。
- 3) *satori* 遺伝子は、体細胞の性決定因子の1つであるTransformer、Transformer-2タンパク質の結合配列と推定される部分を有する (下述) ので、直接のターゲットである可能性がある。

先に示したように、ショウジョウバエの体細胞 (体表のクチクラの構造、外部生殖器) の雄特異的な分化、雌特異的な分化は、X/A ratioによる性決定スイッチのON/OFF → *Sex-lethal* → *transformer* (*tra*), *transformer-2* (*tra-2*) → *doublesex* (*dsx*) 遺伝子の順に制御されている。今回クローニングした

*satori* cDNAのうち、性特異的なsplicingを受けるエクソン IIの3'端にはRNA splicing調節タンパク質であるTra及びTra-2タンパク質の結合部位が3つ存在している。この事からエクソン IIの性特異的なsplicingはTraタンパク質の結合の有無によって調節されていると考えられる。つまり *tra*、*tra-2*の下流で性決定カスケードは二分し、一方は*dsx*、他方が *satori* 遺伝子であると考えられる。なお、最近この考えはRynerら（1996）による *tra*、*tra-2* 変異体を用いた研究と、Heinrichsら（1998）によるショウジョウバエ培養細胞を用いた研究から支持された。

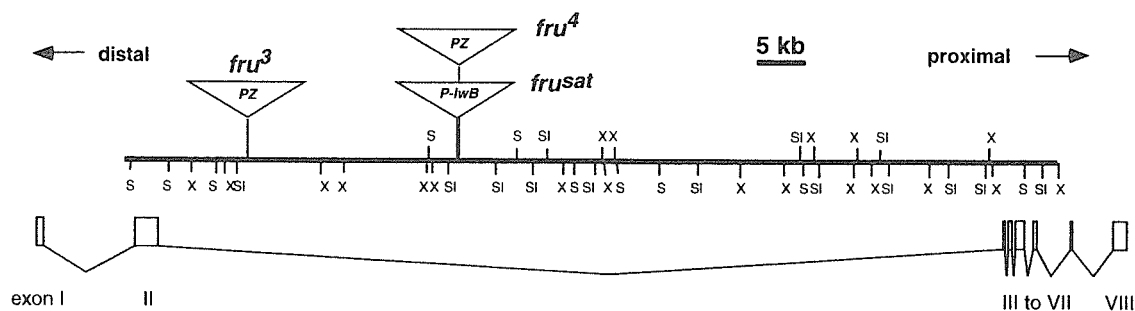


図6 *fruitless* locusのゲノム構造

physical mapの上の三角は *fru*<sup>3</sup>、*fru*<sup>sat</sup>、*fru*<sup>4</sup> 変異体でのP因子挿入の位置を示している。physical mapの下の白いboxは *fru* 遺伝子のエクソンを示している。

### *satori* 遺伝子の発現

*satori* 突然変異体では雄の性指向性に異常が現れることから、本来、*satori* 遺伝子は中枢神経系中の雌雄認識を制御する部位の構造形成あるいは機能発現に関わるものと考えられる。そこで、*satori* cDNAをプローブに *in-situ* ハイブリダイゼーションを行い、野生型ハエの中枢神経系での *satori* mRNA発現を調べた。この結果から、(1) *satori* mRNAは3齢幼虫、蛹、成虫のいずれのステージでも中枢神経系の脳、胸腹部神経節、の一部で発現していること、(2) 成虫の脳の再構築がダイナミックに起きている蛹期の脳で *satori* mRNA発現が最も強いこと、(3) 成虫では脳の前方表面上部、特に触角から入力のある触角葉付近などで *satori* mRNA発現が見られる事がわかった。

次に *satori* 突然変異体の成虫の脳に *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、全くシグナルが得られなかった。従って、*satori* 突然変異体の脳では Satori タンパク質はほとんど発現していないと予想される。

### Satori タンパク質の発現

Satori タンパク質に対する抗体を作成し、Satori タンパク質の発現を調べた。この結果、1) Satori タンパク質は蛹、成虫期の中枢神経系において限られた領域の神経細胞で発現している。この発現パターンは *satori* cDNAをプローブに行なった *in-situ* ハイブリダイゼーションの結果と似ている。2) Satori タンパク質は蛹、成虫期においては雄のみで発現している。3) Satori タンパク質は *satori* 突然変異体では全く発現していない。4) Satori タンパク質の発現は蛹期が最も強く成虫になると弱くなる。Satori 発現細胞は蛹期を通して同一である。

mRNAのレベルでは雌雄共に発現が見られたがタンパク質のレベルでは雄のみで発現がみられることから、mRNAからタンパク質への翻訳の過程で雌雄特異的な制御メカニズムが働いている

ものと推定される。このメカニズムは雌雄間での遺伝子量補正に関わる遺伝子の一つである *msl-2*(*male specific lethal-2*)が*Sxl*によって翻訳制御を受けている現象に似ている(Bashaw et al,1997)。

### 正常遺伝子強制発現による *satori*突然変異体表現型の機能救済 (レスキュー) 実験

分離した遺伝子(cDNA)が*satori*変異の原因遺伝子であることを確定する為に、cDNAを人為的に*satori*突然変異体へ導入し、変異体の表現型が回復するか否かについて調べた。

1) 性指向性の回復：ヒートショックプロモーターを用い、蛹前期に断続的にヒートショックを与えたところ、不完全ながら性指向性の回復が見られた。野生型では1時間の観察時間中約94%の雄が雌に対して求愛歌を歌った。ヒートショックプロモーターの下流に*satori*正常型遺伝子をつないだ人工遺伝子を導入した個体において、ヒートショックを与えない個体(正常型遺伝子をもってはいるがそれが発現していない個体)では全く求愛歌は観察されなかったがヒートショックを与えたもの(正常型遺伝子の発現をおこした個体)では、約29%の個体で求愛歌が観察された。いずれの個体においても交尾は成立しなかった。

2) ローレンス筋の回復：1) 同様にヒートショックプロモーターを用いた場合では、約1/3の個体でローレンス筋が完全に回復した。中には本来存在しない第4節に筋肉が生じたり、片側体節に2本の筋肉が生じるなどの形成異常も見られた。

さらに、ローレンス筋の形成が当該筋肉へ投射する運動神経の雌雄によって決まるとされていることから、酵母の転写因子GAL4を利用したGAL4/UASシステムを用いて、運動神経特異的に*satori*正常型遺伝子を発現させた。

この結果、雄で正常なローレンス筋が発生したばかりか、雌においてもローレンス筋が形成された。

つまり、*Satori*タンパク質は神経系を雄型に分化させるスイッチとして働いていると考えられる。

### 3. 今後の展望

今後は抗*Satori*抗体を用いてより詳細な組織学的・解剖学的解析を行ない、*Satori*発現細胞が脳のどの領域へ投射しているかを同定したい。さらにその領域へ*satori*正常型遺伝子を強制発現させることにより雄の性指向性を支配する神経細胞の同定を進めたい。また、*satorimRNA*から*Satori*タンパク質への翻訳過程における性特異的な制御機構の解明の為に、培養細胞を用いて*in-vitro*系での解析が必要である。

さらに*Satori*は転写因子であると考えられるので、その下流には転写のスイッチのON(OFF)を受けている遺伝子群が存在するはずである。神経系の性分化の機構をより解明する為にはこれらの遺伝子(群)の探索も急務であろう。

### 4. 参考文献

- 1) Ito, H., Fujitani, K., Usui, K., Shimizu-Nishikawa, K., Tanaka, S. and Yamamoto, D. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9687-9692.
- 2) Yamamoto, D., Ito, H., Fujitani, K. (1996) Neurosci. Res. 26, 95-107.
- 3) Yamamoto, D., Fujitani, K., Usui, K., Ito, H., Nakano, Y. (1998) Mech. Dev. 73, 135-146