

# Identification of the gene and neurons that control copulation in *Drosophila*

著者	YILMAZER YASEMIN
号	14
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第324号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00097248">http://hdl.handle.net/10097/00097248</a>

氏名（本籍地）	イルマゼル ヤーセミン YILMAZER YASEMIN
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第324号
学位授与年月日	平成28年11月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	Identification of the gene and neurons that control copulation in <i>Drosophila</i> （ショウジョウバエの交尾を制御する遺伝子とニューロンの同定）
博士論文審査委員	（主査） 教授 山元 大輔 教授 谷本 拓 助教 大原 慎也

## 論文内容の要旨

**Introduction** The *platonic* (*plt*) mutant males of *Drosophila melanogaster* vigorously court females as the wild-type males do, but are unsuccessful in copulation. The mutants also show a morphological phenotype of short posterior-most longitudinal wing veins (L5). In this study, I aimed to identify the gene responsible for the *plt* mutation and the neural mechanism whereby copulation is impaired in *plt*.

**Results** It was found that the males heterozygous for *plt* and chromosomal deficiencies that delete a part of 55C region of the second chromosome show low copulation success and short L5 vein phenotypes. Within the region to which *plt* is mapped, there is a gene called *scribbler* (*sbb*), which encodes a transcription factor functioning downstream of *dpp*. When *sbb* mutant alleles were made heterozygous with *plt*, the flies also exhibited the short L5 vein and low copulation success. The *plt* mutation was induced by an insertion of the transposon *P* element, which tagged the gene in question. The inverse PCR technique located the *P*-element insertion site in the *sbb* locus: 31 bp downstream of transcription start site of *sbb*. RNA interference (RNAi) experiments were carried out to see if *sbb* knockdown recapitulates the *plt* phenotypes, by expressing genetically encoded RNAi constructs (*UAS-sbb RNAi*) in male flies using several different GAL4 drivers. When a heat-inducible GAL4 driver (*hs-GAL4*) was used, and the heat shock was applied at the larval stage, about 70% of emerged flies showed the short wing vein phenotype. When the heat shock was applied at the pupal stage, about 10% of emerged flies showed the short wing vein phenotype. The copulation success rate was also decreased when the expression of *UAS-sbb RNAi* was induced at the larval stage, but not in the pupal stage. To examine if the *sbb* function is required in neurons for normal copulation behavior, we expressed *UAS-sbb RNAi* using a pan-neural GAL4 driver (*elav<sup>C155</sup>*). *UAS-sbb RNAi* was expressed by two GAL4 drivers that drive expression in specific neurons in which *fruitless* (*fru*; *fru<sup>NP21</sup>*) or *doublesex* (*dsx*; *dsx<sup>GAL4</sup>*) are expressed. *fru* and *dsx* have an important part of the neural circuit that controls sexual behavior in *Drosophila*. We observed a low rate of copulation success when *UAS-sbb RNAi* was expressed by *elav<sup>C155</sup>*, and also by *fru<sup>NP21</sup>*. In contrast, copulation was completely inhibited when *UAS-sbb RNAi* was expressed by *dsx<sup>GAL4</sup>*. The result demonstrated that *plt* functions in a subset of *dsx* expressing neurons. To determine

which subset of *dsx*-expressing neurons are critical for the regulation of copulation, I performed the intersectional experiment by using *tsh-GAL80* (*tsh* is expressed in the thoracic region) and brain-specific *Otd-FLP* to restrict neurons in which *sbb* is knocked down. I also used different GAL4 drivers that are specified by neurotransmitters in the other set of intersection experiments. The results indicated that *sbb* expression in the neurons called *dsx*-SN and *dsx*-TN2 and *dsx*-expressing neurons in the abdominal ganglia are pivotal for copulation to occur. These neurons are likely to be GABAergic and serotonergic.

**Conclusion** We concluded that *plt* is an allele of *sbb*, and the impairment of *sbb* function in the *plt* mutant is responsible for its non-copulating phenotype. The *sbb* is involved in the *decapentaplegic* (*dpp*) pathway, and has been shown to play roles in multiple aspects in the development including axon guidance during the visual system development. The results of our study are consistent with the hypothesis that *sbb* function is required in the GABAergic and serotonergic *dsx*-expressing neurons in the abdominal ganglion during development for establishing the neural circuit that regulates copulation behavior in male flies.

## 論文審査結果の要旨

本研究では、交尾を支える遺伝子機構とニューロン機構を、雄が盛んに求愛しつつも交尾をしないキイロショウジョウバエの突然変異体、*platonie* (*plt*) を用いて解明した。*plt* は *P* 因子挿入変異であるため、*P* 因子挿入点のゲノム DNA クローニングを行うとともに、欠失染色体を用いた遺伝的相補性試験を実施し、原因遺伝子として *scribbler* (*sbb*) を同定した。*Sbb* は BMP モルフォゲン、*Dpp* の下流で働く転写のリプレッサーとして知られる。発生段階特異的 *sbb* ノックダウン実験から、幼虫期に *sbb* が失われると、成虫になった後、交尾が出来なくなることが判明した。続いて、組織特異的 *sbb* ノックダウンを行った結果、性決定遺伝子、*dsx* を発現するニューロンに於いて *sbb* をノックダウンした時に、全く交尾をしなくなった。また、神経系の部位を限定して *sbb* をノックダウンした実験から、腹部神経節の重要性が明らかになった。さらに、特定の神経伝達物質を合成するニューロン群ごとに検討したところ、GABA 及びセロトニン作動性ニューロンでの *sbb* 欠損が最も大きな交尾阻害を引き起こした。*Dsx* 陽性セロトニン作動性ニューロンは腹部神経節にわずか8個しか存在しないにも拘らず、*sbb* ノックダウンが強い阻害効果を示したことから、これらにしばってさらに解析した。*Dsx* 陽性ニューロン特異的にセロトニン合成酵素遺伝子 (*Trh*) をノックダウンしたところ、成虫の雄は全く交尾できなくなった。また、*sbb* をノックダウンすると腹部神経節の *Dsx* 陽性セロトニン作動性ニューロンは半数以下に数を減じた。これらの結果から、*sbb* は、腹部神経節の *Dsx* 陽性セロトニン作動性ニューロンが正常な発生を遂げ、成虫まで存続するために幼虫期に必要であり、*sbb* 欠損によってこれらの細胞の多くを失った雄の成虫では、交尾にかかわるセロトニン神経回路が破綻し、交尾が出来なくなると結論される。本研究は、発生過程での *Dpp* シグナル伝達と *Dsx* 依存的性決定シグナル系との連携により、性特異的なセロトニン作動性交尾制御回路が形成されることを明らかにした点が新奇性に富み、Yilmazer が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、Yasemin Yilmazer 提出の論文は、博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。