
博士論文

カイコの雌決定遺伝子 *Fem* の 同定とその機能解析

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

酒井弘貴

目次

緒言	2
第一章	10
序論.....	11
材料・方法	12
結果.....	13
考察.....	15
図表.....	17
第二章	25
序論.....	26
材料・方法	27
結果.....	31
考察.....	38
図表.....	40
第三章	58
序論.....	59
材料・方法	60
結果.....	62
考察.....	64
図表.....	66
第四章	76
序論.....	77
材料・方法	79
結果.....	81
考察.....	87
図表.....	93
総合考察	111
謝辞	119
引用	120

緒言

多くの動物で、大きな配偶子を形成する「雌」と、運動性の高い小さな配偶子を形成する「雄」の2つの性をもつが、個体の性を決定するメカニズム（性決定様式）は動物種によって大きく異なり、遺伝的に決まる場合や個体の環境要因によって決まる場合が知られている（Bachtrog et al., 2014, 図 0-1）。個体の環境要因で性が決まる動物には、胚子期の保護温度によって性決定が行われる複数種の爬虫類（Crain and Guillette, 1998）や餌不足、短日などの外部環境の良し悪しで雌雄を産み分けるオオミジンコ（Kato et al., 2011）などが報告されている。遺伝的要因によって性が決まる動物においても、その性決定様式は多岐にわたる。例えば、我々が属する哺乳類の大部分では性染色体構成が XX だと雌に分化し、XY だと雄に分化する（図 0-1）。哺乳類では Y 染色体上に座する *Sry* (*Sex-determining region Y*) 遺伝子が、性決定に関わる遺伝子のカスケード（性決定カスケード）の最上流遺伝子（性決定マスター遺伝子）として働き、雄分化を誘導する（Kashimada and Koopman, 2010）。同様に、性染色体構成が XX の場合は雌に分化し、XY の場合は雄に分化するキイロショウジョウバエでは、X 染色体と常染色体のセットの数の比によって性決定が行われる（Bridges, 1921）。正確には X 染色体上の遺伝子由来の翻訳産物である *SisA*、*Scute*、*Unpaired*、*Runt* といったタンパク質（XSE タンパク質: X-linked Signal Element proteins）の総量が適切な量に達することで、性決定マスター遺伝子である *Sex-lethal* (*Sxl*) の初期プロモーター (*Sxl-pe*: *Sxl* establishment promoter) が活性化されることで雌決定がなされる（Erickson and Cline 1993 ; Erickson and Quintero, 2007）。一方、性染色体構成が ZW の個体は雌に分化し、ZZ の個体は雄に分化する種では、アフリカツメガエルにおいて W 染色体に座する *DM-W* が雌分化を誘導することが報告されている（Yoshimoto et al., 2008）。ZW/ZZ 型の性決定を行う代表的な生物として鳥類や鱗翅目昆虫の大部分が含まれるが（図 0-1）、これらの生物種では性決定マスター遺伝子が同定されていない。

性決定様式は多岐にわたる一方、DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインをもつ Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor (DMRT) ファミリーに属する転写因子が、無脊椎動物から脊椎動物に至る多くの多細胞生物の性決定に関与することが知られている（Raymond et al., 1999）。DMRT の頭文字「D」は、キイロショウジョウバエにおいて最初に同定された性分化遺伝子 *doublesex* (*dsx*) の名称に由来する。*dsx* はこれまで調べられてきたほとんどの昆虫において、雌雄で異なる選択的スプライシ

ングを受けることで雄型と雌型の DSX タンパク質を生じるという点で一致している (Bopp et al., 2014)。DSX の働きはキイロショウジョウバエにおいてもっとも研究されており、雄型 DSX の働きは雌分化に関わる遺伝子の発現を抑制し、雄分化に必要な遺伝子の発現を誘導するのに対して、雌型 DSX はこの逆の作用を示す (Bownes et al., 1988 ; Inoue et al., 1992 ; Jursnich and Burtis, 1993)。dsx は双翅目、鱗翅目、膜翅目、甲虫目などの様々な昆虫で同定されており、実際に性分化に関与することが知られている (Suzuki et al., 2003, 2005; Hediger et al., 2004; Shukla and Nagaraju, 2010; Shukla and Palli, 2012)。

昆虫の性決定カスケードについては、キイロショウジョウバエを用いた研究により詳細が報告されている (図 0-2)。キイロショウジョウバエの雌では、X 染色体に座位する XSE タンパク質 (X-linked Signal Element proteins) の総量が適切な量に達することで、*Sxl-pe* が活性化され、その結果転写された mRNA から機能のある SXL タンパク質が作られる (Cline, 1993; Erickson and Cline, 1993; Barbash and Cline, 1995; Wrishnik, 2003)。SXL タンパク質は下流の遺伝子である *transformer (tra)* の pre-mRNA に結合し、雌特異的なスプライシングを引き起こすことによって、雌でのみ機能のある TRA タンパク質が産生されるように制御する (Inoue et al., 1990)。この TRA は、雌雄両方で発現する TRA-2 (*Transformer-2*) とよばれるスプライシング因子と複合体を形成し、*dsx* の第 4 番エクソンに存在するスプライシングのエンハンサーエレメント (*dsx repeat element: dsxRE*) に結合することで *dsx* の雌型スプライシングを誘導し、その結果生じる mRNA から雌型 DSX タンパク質が翻訳される (McKeown et al., 1988; Nagoshi et al., 1988, 1990)。これに対して雄では、機能をもつ SXL タンパク質が生産されないため、機能をもつ TRA タンパク質もつくられない。TRA 非存在下では、*dsx* の雄特異的なスプライシングが引き起こされるため、雄型 DSX が産生される (Hoshijima et al., 1991)。同様に、*tra* による *dsx* の制御機構は複数の双翅目、膜翅目、甲虫目において報告されており、イエバエ (Hediger et al., 2010)、チチュウカイミバエ (Pane et al., 2002)、ヒツジキンバエ (Concha and Scott, 2009)、キョウソヤドリコバチ (Verhulst et al., 2010)、ミカンコミバエ (Liu et al., 2015)、そしてコクヌストモドキ (Shukla and Palli, 2012) において、RNAi 法によって *tra* をノックダウンすると、雌における *dsx* の雌型スプライシングが消失し、雄型スプライシングが起こることによって雄型 *dsx* が発現し、雄化が進行する。それゆえ *tra* による *dsx* のスプライシング制御は、昆虫において広く保存されていると考えられていた。しかし、近年様々な昆虫の全ゲノム解読が進むにつれて、*tra* をもたない昆虫も多数存在することが明らかとなっている。カイコ (Mita et al., 2004)、オオカバマダラ、メルポメネドクチョウ (Geuverink and

Beukeboom, 2014) といった鱗翅目昆虫では、解析されたすべての種において *tra* が存在しないことがわかっている。さらに、膜翅目のカブラハバチ (峰ら 2016)、双翅目のハマダラカ、ガンビエハマダラカ、ネッタイシマカ、ネッタイイエカといったカ下目や、甲虫目のアメリカマツノキクイムシ (Geuverink and Beukeboom, 2014) も *tra* をもたないことがわかっている。

tra をもたない昆虫において、最も性決定機構の研究が進んでいる種としてカイコがあげられる。カイコの性決定カスケードの最下流で働く遺伝子は *Bmdsx* である。*Bmdsx* には TRA-TRA2 の結合に必要な dsxRE が存在しない (Suzuki et al., 2001)。さらに、カイコにおける *tra-2* のオーソログをノックダウンしたとしても、*Bmdsx* の性特異的なスプライシングに何も影響しないことが報告されている (Suzuki et al., 2012)。*Bmdsx* は基底状態で雌型のスプライシングを受け (Suzuki et al., 2001)、雄型のスプライシングには *BmPSI* (*Bombyx* homolog of *P-element* somatic inhibitor) と、あらゆる組織で雄特異的に発現する *Imp^M* (*male-specific isoform of the Bombyx* homolog of *insulin-like growth factor II mRNA-binding protein*) が関与する (Suzuki et al., 2010)。これらのタンパク質は複合体を形成し、*Bmdsx* の雌特異的エクソンに存在する CE1 と呼ばれるシスエレメントに結合し、雄において雌型スプライシングが起こるのを抑制する。これらのことから、カイコの性決定カスケードはこれまで昆虫で報告されている *tra* を用いた性決定機構とは全く異なるものだと考えられる。

カイコの性は、性染色体構成が ZW であると雌に ZZ であると雄になること (Tanaka, 1916) から、W 染色体には優性の雌決定遺伝子 *Fem* (*Feminizer*) が存在すると考えられている (橋本, 1933; Doira, 1978)。しかしこの *Fem* は、半世紀以上前からその存在が想定されているものの、本研究開始時点で同定には至っておらず、どのように性決定に関与するのかまったく不明であった。カイコの常染色体並びに Z 染色体の塩基配列は、雄ゲノムを対象としたホールゲノムショットガン解析によって明らかにされている (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004)。しかし、カイコの W 染色体は、非常に多くの転移因子と繰り返し配列からなる (Abe et al., 2005, 2010) ため、アセンブル作業が困難であり、未だにその全塩基配列は明らかとなっていない。仮に W 染色体の全塩基配列が明らかとなったとしても、W 染色体と Z 染色体では組換えが起こらないことから、*Fem* が座位する場所を絞り込むことができず、したがってポジショナルクローニングなどの手法によって *Fem* を単離することができない。これらのことから、*Fem* を同定することは困難を極めると予想される。

それではこの *Fem* を同定するためにはどうすればよいだろうか。私は雌雄のトランスクリプトームを比較することによって *Fem* を同定することができないかと考え

た。それではどのステージの雌雄を比較するのが最も適切だろうか。性決定カスケードの最上流に位置する遺伝子は、性決定がなされる発生段階において一過的に発現する例が報告されている（図 0-3）。例えば、哺乳類の性決定マスター遺伝子である *Sry* の発現は時期特異的に制御されており、マウスにおいてその発現期間は胎生 10.5 日から 12.5 日の間に限られる（Kashimada and Koopman, 2010）。キイロショウジョウバエの性決定マスター遺伝子 *Sxl* についてみると、発生開始後 3~4 時間の雌の胚子で *Sxl-pe* が特異的に発現し、発生開始後 4~5 時間にはその発現が減少する（Salz et al., 1989）。アフリカツメガエルの性決定マスター遺伝子 *DM-W* の場合、生殖巣に形態的な雌雄差が生まれる前のステージである st. 48 ~ st. 50（幼生の時期に相当する）に一過的に発現することが知られている（Yoshimoto et al., 2008, 2011）。同様に、カイコの性決定のマスター遺伝子も性決定が起こる時期に一過的に発現する可能性がある。

そこで本研究では、*Fem* を同定することを目的として、カイコの性決定が起こる時期における雌雄のトランスクリプトームを比較し、雌特異的に発現する遺伝子を探索することにした。ところが、カイコでは性決定がいつ起こるのかがわかっておらず、本研究はまずこの点について明らかにすることから始めることにした。このために注目した遺伝子が、カイコの性分化に関連する *Bmdsx* と、*Bmdsx* の雄型スプライシングを誘導し、あらゆる組織で雄特異的に発現することが知られる *Imp^M* である（図 0-4）。これらの遺伝子の胚発生初期における発現パターンを追跡し、カイコの性分化が起こる時期を特定することにした。

本論文では、第一章でカイコの性決定時期の特定について記載し、第二章で性決定時期における雌雄のトランスクリプトーム解析の結果同定された *Fem* について述べ、第三章では、*Fem* とその標的遺伝子である *Masculinizer* (*Masc*) 遺伝子（Kiuchi et al., 2014）及び *Bmdsx* の雄型スプライシングに関わる *Imp^M* との遺伝的相互関係を調べることでカイコの性決定カスケードを明らかにした。最後の章では、*Masc* を過剰発現する遺伝子組換えカイコを解析することで明らかとなった *Masc* の機能について紹介する。

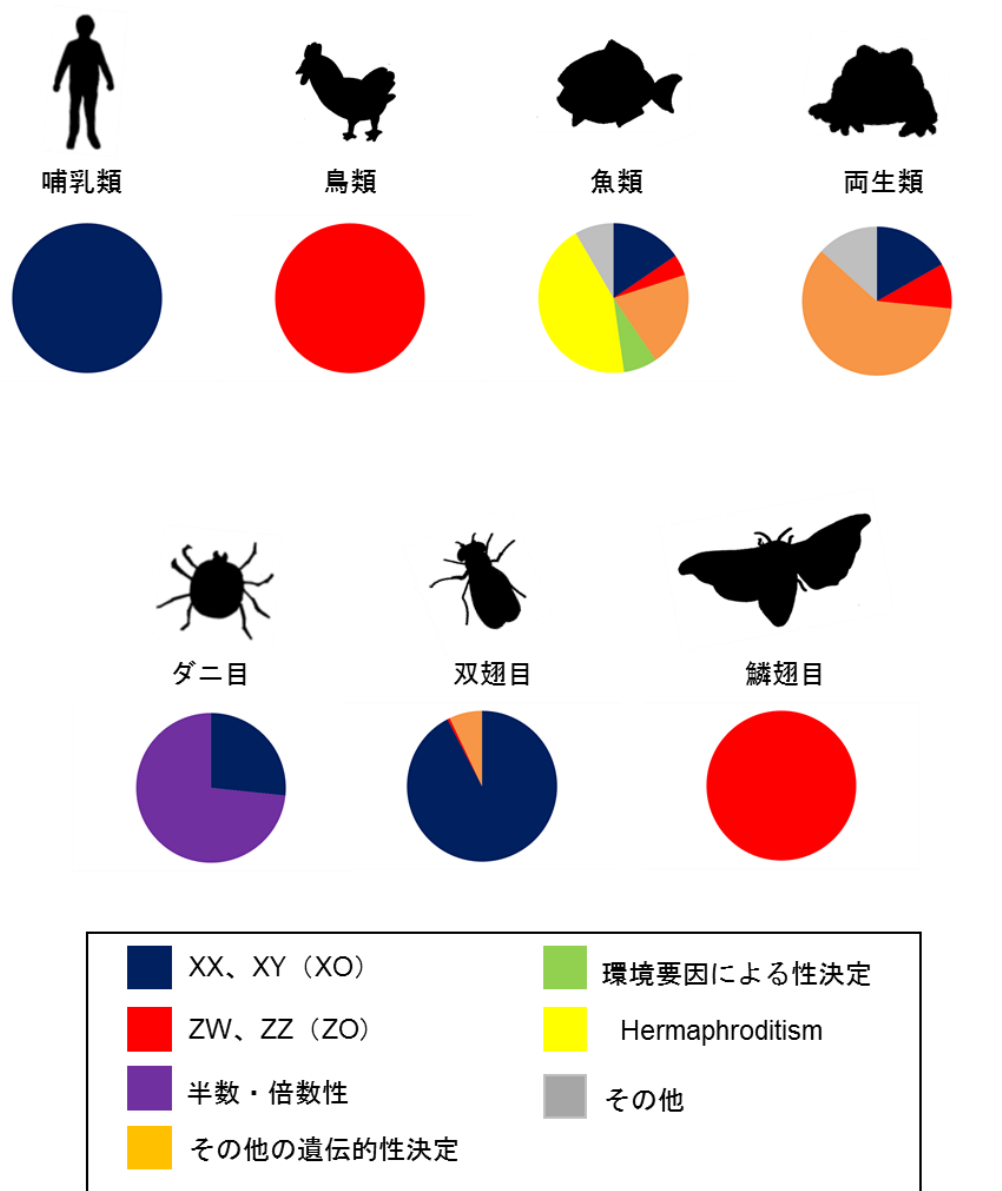


図 0-1. 多様な動物の性決定機構

脊椎動物のうち哺乳類、鳥類、魚類、両生類において、また無脊椎動物のうちダニ目、双翅目、鱗翅目において採用されている性決定様式の内訳を円グラフで示した。グラフに挙げた性決定様式については、図中のボックス内に示した。Hermaphroditism は、雌雄同体の他、成育のステージに伴い性が変わるような性決定様式を示す。性的二型をもたず単為発生のみで次世代を残す種も存在するが、そのような種は除外して円グラフを作成した。円グラフは、Tree of sex: a database of sexual systems (<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.v1908>) に公開されているデータベースを用いて作成した。

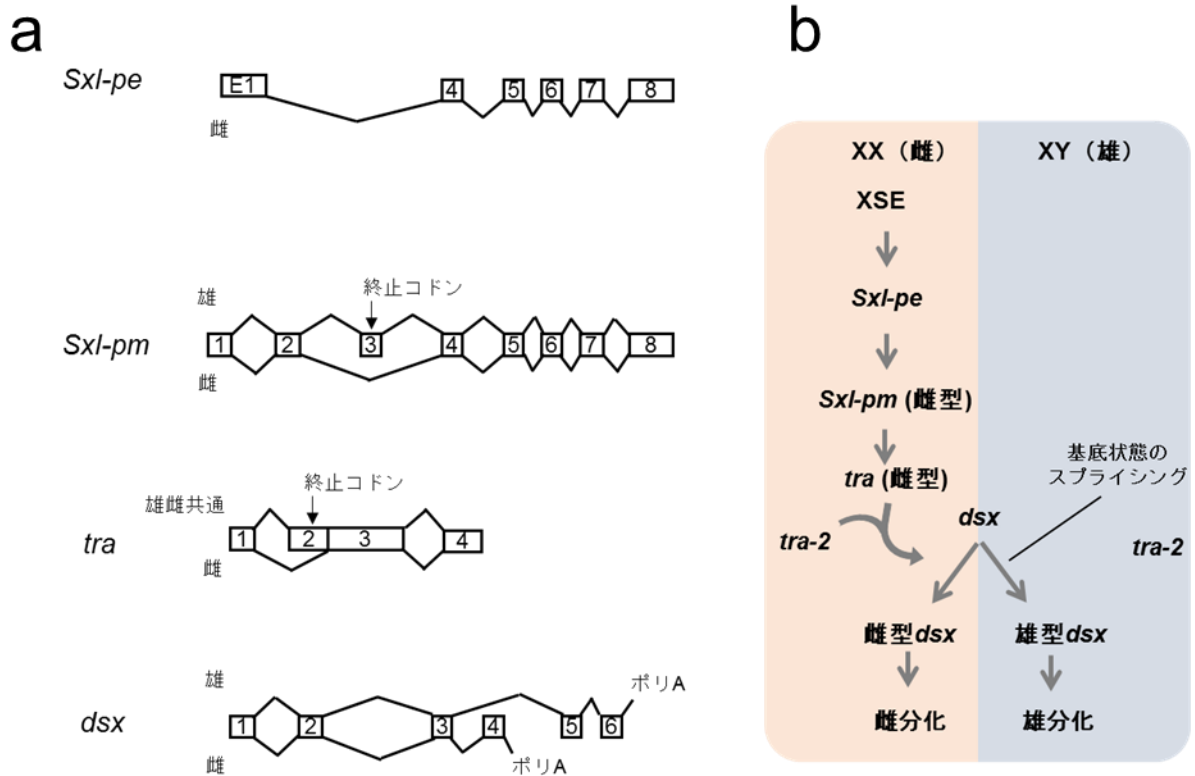


図 0-2. キイロショウジョウバエの性決定カスケード

(a) キイロショウジョウバエの性決定にかかわる遺伝子のスプライシングパターン。ボックスはエキソンを示す。上側に雄型もしくは雌雄共通型のスプライシングパターンを、下側に雌型のスプライシングパターンを示す。矢印で終止コドンの位置を示した。*Sxl-pe* は胚発生初期の雌でのみ発現する。(b) キイロショウジョウバエの性決定カスケード。キイロショウジョウバエでは、XX が雌に XY が雄に分化する。XSE の発現量は、X 染色体を 2 本もつ雌において、X 染色体を 1 本しかもたない雄に比べ 2 倍高く発現する。これが引き金となって、*Sxl-pe* の発現が誘導され成熟型の SXL タンパク質が生産される。*Sxl-pm* は雌雄両方で発現するが、成熟型の SXL タンパク質が生産されている雌でのみ終止コドンを含むエクソン 3 がスキップされるため、再び成熟型の SXL タンパク質が生産される。SXL は *tra* の pre-mRNA に結合し、終止コドンを含むエクソン 2 をスキップさせることで機能をもつ TRA タンパク質が雌でのみ作られる。TRA タンパク質はスプライシング因子として働き、雌雄両方で発現する TRA-2 と複合体を形成することで、*dsx* の雌型スプライシングを誘導し、その結果産生された雌型 DSX が雌分化を誘導する。雄では機能をもつ TRA が生産されないため、*dsx* は基底状態のスプライシングである雄型のスプライシングを受け、その結果産生された雄型 DSX が雄分化を誘導する。

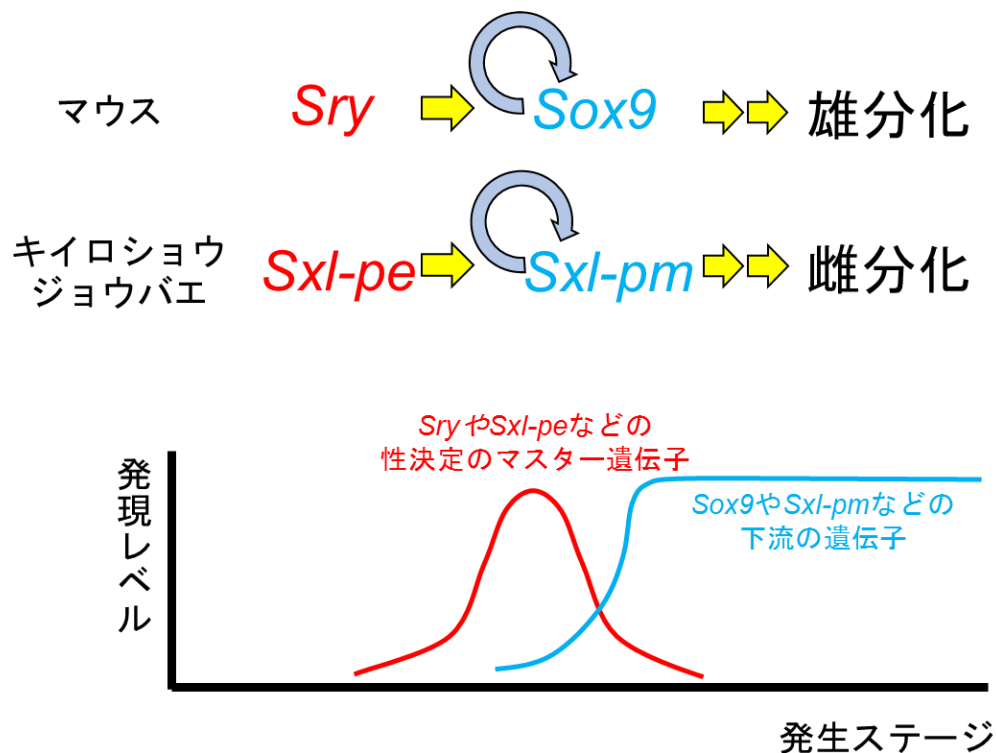


図 0-3. 性決定のマスター遺伝子の発生ステージと発現レベルのイメージ図

性決定カスケードの最上流に位置する遺伝子（性決定のマスター遺伝子）は、性決定がなされる発生段階において一過的に発現する例が知られている。具体例として、マウスとキイロショウジョウバエの性決定遺伝子について模式的に示した。マウスでは性決定のマスター遺伝子である *Sry* が E10.5 から E12.5 日の間に一過的に発現し、この発現が下流の遺伝子である *Sox9* の発現を誘導する（Kashimada and Koopman, 2010）。SOX9 タンパク質は転写因子として働き、自身のプロモーター領域に結合することで自身の発現レベルを安定化させる。キイロショウジョウバエでは、性決定のマスター遺伝子 *Sxl* の early promoter から転写されたアイソフォーム（*Sxl-pe*）が 12 から 14 回目の核分裂時に発現する（Barbash and Cline, 1995）。*Sxl-pe* から翻訳された SXL タンパク質は機能をもつ成熟型のタンパク質となる。その後、*Sxl-pe* の発現が低下し、*Sxl* の maintenance promoter から転写されたアイソフォーム（*Sxl-pm*）が発現する。*Sxl-pm* がコードする ORF には、途中に stop コドンが含まれるため、機能をもつ SXL タンパク質が作られない。しかし、*Sxl-pe* 由来の SXL タンパク質が存在する場合、雌型スプライシングが誘導され、stop コドンを含むエキソンが除去されるため、機能をもつ成熟型の SXL が作られる。こうして産生された SXL は引き続き自身の pre-mRNA のスプライシングに作用し、SXL の産生を維持する（Bell et al., 1991; Nagengast et al., 2003）。

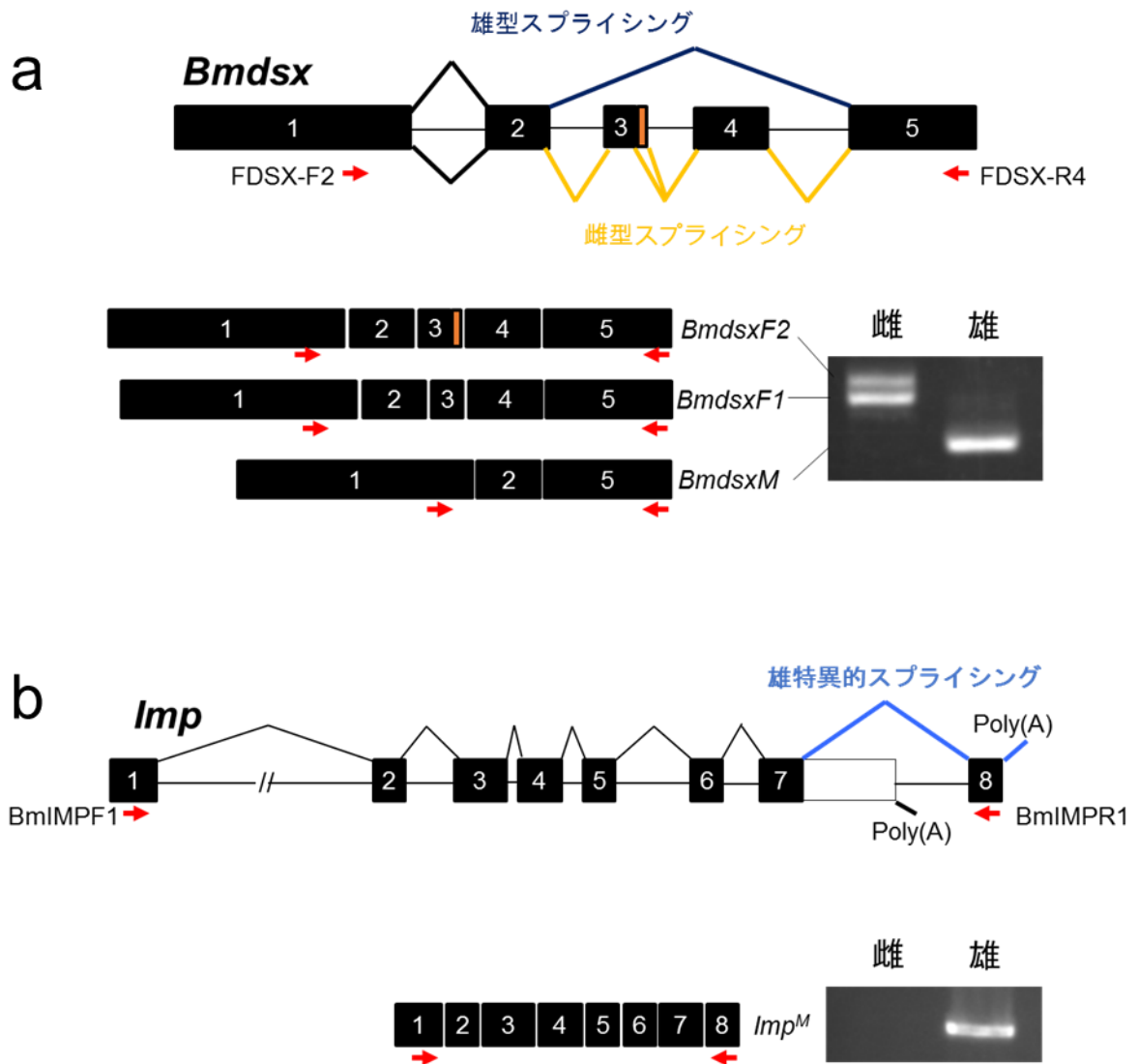


図 0-4. *Bmdsx* 並びに *Imp* の構造

(a) *Bmdsx* の構造。雄型 *Bmdsx* (*Bmdsx*M) はエクソン 1, 2, 5 からなり、雌型 *Bmdsx* のうち *Bmdsx*F1 はエクソン 1, 2, 3, 4, 5 から構成される。一方 *Bmdsx*F2 は、エクソン 3 の 15pb 下流に存在するスプライスドナー部位においてスプライシングが起こるといふ点が *Bmdsx*F1 とは異なる (Shukla et al., 2011)。赤色の矢印は、プライマーの位置を示す。これらのプライマーを用いることで雄型 *Bmdsx*、雌型 *Bmdsx* の両方を同時に検出できる (FDSX-F2/FDSX-R4)。(b) *Imp* の遺伝子構造。*Imp*^M は、エクソン 8 が選択されることによって生じ、エクソン 8 内に存在する AAUAAA シグナルの下流に polyA が付加される。一方 *Imp*^c はエクソン 7 と 8 の間に存在する AAGAAA シグナルの下流に polyA が付加される。赤色の矢印は、*Imp*^M を特異的に検出できるプライマーの位置を示す (BmIMPF1/BmIMPR1)。

第一章

序論

性決定のマスター遺伝子は、性が決まる発生段階において一過的に発現する場合が報告されている。例えば、ほ乳類の性決定マスター遺伝子である *Sry* の発現時期は、マウスの場合胎生 10.5 日から 12.5 日の間に限られる (Kashimada and Koopman, 2010)。キイロショウジョウバエでは、発生開始後 3~4 時間の雌の胚子で *Sxl* が特異的に発現し、発生開始後 4~5 時間にはその発現が減少する (Salz et al., 1989)。アフリカツメガエルの性決定マスター遺伝子 *DM-W* は、生殖巣に形態的な雌雄差が生まれる前のステージである st. 48~st. 50 (幼生の時期に相当する) に一過的に発現する (Yoshimoto et al., 2008, 2011)。同様に、カイコの性決定のマスター遺伝子も性決定が起こる時期に一過的に発現する可能性がある。そこで本研究では、まずカイコにおいて性決定が起こる時期を特定することにした。このために注目した遺伝子が、カイコの性分化に関連する *Bmdsx* と、*Bmdsx* の雄型スプライシングを誘導し、あらゆる組織で雄特異的に発現することが知られている *Imp^M* である。*Bmdsx* は産下後 4 日目の発生初期卵においてすでに雌型、雄型の発現パターンに分かれている (Suzuki et al., 2012) ことから、カイコの性決定は少なくとも産下後 4 日目以前の胚発生初期に行われると予想される。そこで本研究では、胚発生初期における *Bmdsx*、*Imp^M* の発現パターンを指標にカイコの性分化が起こる時期を追跡することによって、性決定がなされる時期を特定することにした。

カイコの性決定時期を特定する上で、胚発生初期における雌雄鑑別が不可欠となってくる。この点について、カイコでは W 染色体特異的 DNA マーカーを用いたゲノム PCR 法による雌雄鑑別法が確立されており (Abe et al., 2005)、この手法を産下卵の雌雄鑑別に用いた報告例もある (Fujii et al., 2006)。しかし、我々の先行研究によって 30% 以上のカイコの発生初期卵には、胚子を構成する細胞の他、W 染色体をもつ極体核を由来とする漿液膜細胞や卵黄細胞が含まれていることが示されており、産下後 4 日目以前の卵では上述の PCR による診断法では正確な雌雄鑑別が困難であることがわかっている (Sakai et al., 2013, 図 1-1 及び図 1-2)。そこで本研究では、W 染色体と連鎖する形質マーカーによる雌雄鑑別法を新たに確立し、この手法に基づいて雌雄鑑別を行ったカイコ発生初期卵を解析に用いることにした。

材料・方法

供試蚕

カイコの飼育は $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明期－8 時間暗期の条件下の部屋で行った。発生中の卵は湿度が十分に足りたプラスチックの容器に保存し、幼虫の飼育には人工飼料（日本農産工製シルクメイト）を使用した。

実験には非休眠系統である pnd-w1 系統（独立行政法人理化学研究所、本賢一専任研究員より分与）、及びこの pnd-w1 系統と限性黒色蚕黒卵系統である 2pB 系統（国立大学法人東京農工大蚕学研究室、横山岳准教授より分与）を用いて交配を繰り返すことによって、当研究室で系統樹立した S-1 系統を用いた（図 1-3）。この S-1 系統は色素合成に関わる遺伝子が座乗する第五染色体が W 染色体に転座した系統（Tanaka et al., 2000）に由来し、ZW（雌）卵では漿液膜細胞において色素合成が行われるため卵の着色が起こり黒卵（黒色）に、ZZ（雄）卵では色素合成が行われないため卵は未着色（白卵）となる。

RNA の抽出

カイコ卵からの total RNA 抽出は ISOGEN（ニッポン・ジーン）を使用し、鈴木ら（2012）の方法にしたがって行った（Suzuki et al., 2012）。

RT-PCR

逆転写反応による cDNA 合成は、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ）を用い、添付マニュアルの手順にしたがって行った。逆転写反応の鋳型には、1 μg の total RNA もしくは、卵 1 粒から抽出した全量の total RNA を使用し、逆転写反応の際には上述の cDNA Synthesis Kit に添付されている random hexamer をプライマーとして使用した。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ）を使用し、添付マニュアルの指示にしたがって行った。使用したプライマーの塩基配列と PCR の条件は表 1 に示した。得られた反応産物はエチジウムブロマイド (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む 1% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、電気泳動像は E-Shot（ATTO）を用いて撮影した。

結果

カイコにおける性決定時期の特定

カイコの性決定が起こる時期を特定するため、発生初期卵における *Bmdsx* 並びに *Imp^M* の発現パターンを経時的に追跡することにした。まず、卵巣卵、及び産下後 12、24、48、120 時間の卵 1 粒ずつから total RNA を抽出し、RT-PCR によってこれらの遺伝子の発現解析を行った。我々の先行研究により、30%以上の卵において、極体を由来とする多数の細胞が形成されているため、産下後 96 時間以前の発生初期卵ではゲノム PCR 法を用いた正確な雌雄鑑別が困難であることが明らかとなっている。そこで、本研究では雌雄鑑別を行わずに、各時間において採取した 9 粒の卵を RT-PCR 解析に供試し、*Bmdsx* と *Imp^M* の発現パターンの経時的变化を追跡することにした。

その結果を図 1-4 に示す。卵巣卵、並びに産下後 12 時間の卵ではすべての個体において、雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1*、*BmdsxF2*) のみが発現していた (図 1-4b, c)。産下後 24 時間の卵ではすべての個体で雌型 *Bmdsx*、雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) 両方の発現と *Imp^M* の発現がみられた (図 1-4d)。その後、産下 48 時間以降の卵では雌型 *Bmdsx* が発現した個体と雄型 *Bmdsx*、*Imp^M* が発現した個体とに分かれた (図 1-4e, f)。

以上の結果から、産下後 24 時間までは個体間の *Bmdsx* 並びに *Imp^M* の発現に関して雌雄差は見られないことが予想された。一方、産下後 48 時間では雌型 *Bmdsx* のみが発現する個体と雄型 *Bmdsx* 及び *Imp^M* が発現する個体とに分かれた。これは前者のグループが雌であり、後者のグループが雄であると考えるのが最も妥当である。したがって、カイコの性決定は産下後 24 時間から 48 時間の間に起こると考えられる。産下後 24 時間の胚子の発生ステージはだるま形期にあたり、さじ形期を経て 48 時間にへら形期となる (図 1-4g)。よってカイコの性決定はだるま形期から、へら形期の間に行われると推察することができる。

限性黒卵系統を用いた性決定時期の特定

上述までの実験により、カイコの性決定は卵の産下後 24 時間から 48 時間の間に起こると推察することができた。しかし、性決定が起こる時期をより正確に特定するためには、この時期における卵の性を確実に識別することが不可欠である。産下後 24 時間から 48 時間の間はゲノム PCR による雌雄鑑別が困難なステージである (図 1-2c)。そこで簡便かつ正確に雌雄の判別が可能なカイコ系統である限性黒卵着色非休眠卵系統「S-1」を作出し (図 1-3)、この系統を用いた雌雄鑑別法の開発を試みた。保護温度 25°C の条件下

において、産下後 27 時間の時点で着色を開始する卵をわずかながら認めることができた（図 1-5a）。これらの卵がその後の発生に伴って正常に着色することを確認するため、同程度の着色を示した卵を産下後 29 時間の時点で 30 粒選択し、産下後 96 時間における卵色を観察した結果、全ての卵が正常に着色することがわかった。以上の結果は、早ければ産下後 27～29 時間の時点で、卵色を指標にして雌個体の選抜が可能であることを示している。しかし、この時期の卵の中には着色が未だ始まっていない ZW 卵も含まれていたため、この時期の未着色卵のすべてを ZZ 卵とみなすことはできない。一方、産下後 32 時間の卵の着色具合を観察したところ、全く着色をしていない卵と、着色開始間もない卵とが 1:1 に分離した蛾区（1 組の雌雄の交配により産下された卵塊）が得られた（図 1-5c）。この比率はカイコの性比と一致することから、これらの蛾区のうち未着色の卵は ZZ 個体であるとみなすことができる。以上の結果より、S-1 系統の産下卵を用いれば、卵色を指標とすることによって ZW（雌）卵を産下後 27 時間の時点で、一方 ZZ（雄）卵を産下後 32 時間の時点で取得することが可能であることが明らかとなった。

この S-1 系統を用いて、各時間の雌の卵 10 粒、雄の卵 10 粒から total RNA を抽出し、図 1-4 と同様の RT-PCR 解析を行った。その結果を図 1-6 に示す。雌では調査したすべてのステージにおいて雌型 *Bmdsx* が発現しており、産下後 27 時間、29 時間では雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の発現も見られた（図 1-6, lane 1, 2）。これらの雌における雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の発現レベルは、産下後 32 時間で劇的に減少することがわかった（図 1-6, lane 3）。これに対して、雄では調査したすべてのステージにおいて雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* が発現していた（図 1-6, lane 6, 7, 8）。以上の実験結果と図 1-4 に示された実験結果を総合すると、産下後 24 時間の時点では *Bmdsx* と *Imp^M* の発現パターンに雌雄差は見られず、卵の性に無関係な発現パターンが見られるが、産下後 29 時間以後になると、雌では雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の発現レベルが急激に減少し始め、産下後 32 時間の時点では *Bmdsx* と *Imp^M* は卵固有の性に一致した発現パターンを示すようになるといえる。このことから、カイコの性決定は産下後 29 時間から 32 時間の間に行われることが強く示唆された。産下後 29 時間の胚子の発生ステージはだるま形期にあたり、32 時間の胚子はさじ形期にあたる（図 1-4g）。よって、カイコにおいて性決定はさじ形期の初期に起こると推察される。

考察

本章では、カイコの性決定時期を明らかにする目的で、*Bmdsx* 並びに様々な組織で雄特異的に発現する *Imp^M* の発現パターンの変化を継時的に調べた。カイコの卵巣卵では雌型 *Bmdsx* のみが発現していた (図 1-4b) ことから、産下卵の中には母親由来の雌型 *Bmdsx* が含まれていると考えられる。母親由来の *dsx* の存在については、双翅目のガンビエハマダラカ (Krzywinska et al., 2016) や、甲殻類のオオミジンコ (Nong et al., 2016) で報告されている。オオミジンコでは、この母親由来の *dsx* が存在しないとは胚致死することから、*dsx* が初期発生に重要な役割をもつと考えられている (Nong et al., 2016)。性分化に関わる *dsx* が、カイコにおいても卵巣卵に含まれることから、この母親由来の *dsx* はカイコにおいても初期発生に重要なものかもしれない。産下後 12 時間の卵でも同様に雌型 *Bmdsx* が検出された (図 1-4c)。産下後 24 時間の卵では、すべての個体で雌型 *Bmdsx*、雄型 *Bmdsx* 並びに *Imp^M* が発現していた (図 1-4d)。このことは、胚発生初期の雌個体においても雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* が発現することを示唆している。したがって、この時期の卵は性が未分化な状態にあり、このために遺伝的に雌であったとしても雄型の遺伝子発現が起こると考えることができる。これら雄型の遺伝子発現は、産下後 32 時間以降、雌で発現が見られなくなった (図 1-6, lane 3)。このことから、雌では雌決定遺伝子 *Fem* が発現することによって雄型 *Bmdsx*、*Imp^M* を含む雄型の遺伝子発現が抑制を受け、その結果雌への分化が決定付けられると予想できる (図 1-7)。性決定最上流遺伝子が下流の遺伝子の働きを抑制、もしくは阻害するという性決定機構のモデルは、ネッタイシマカやチチュウカイミバエ、昆虫以外では両生類のアフリカツメガエルや植物のマメガキなどでも報告されている。ネッタイシマカでは、スプライシング因子である *tra-2* と起源を同じくする *Nix* が性決定マスター遺伝子として働き、この *Nix* が雌で *tra-2* の働きを阻害することで、雄分化を誘導すると考えられている (Adelman and Tu, 2016)。チチュウカイミバエでは Y 染色体上の性決定のマスター遺伝子 *M* が母性由来の *tra* の働きを阻害することにより、雄分化が誘導され则认为られている (Pane et al., 2002; Shukla and Palli, 2012)。アフリカツメガエルの性決定のマスター遺伝子である *DM-W* は雄分化を誘導する転写因子 *DMRT-1* ドミナントネガティブとして働き、*DMRT-1* のターゲット配列に競合的に結合することで雄分化を抑制し、結果として雌分化を促進する (Yoshimoto and Ito, 2011)。また、マメガキでは Y 染色体特異的な small RNA が、常染色体上から転写される雌化因子を分解することで性決定が行われる (Akagi et al., 2014)。カイコにおいてもこれらの生物と同じように性決定マスター遺伝子である *Fem* が、下流の遺伝子の働きを阻害すること

で性決定が行われているのかもしれない。

雌型 *Bmdsx* は産下直後の卵においては雌雄に関わらず発現がみられるものの、性決定後は雌ではそのまま発現が維持され、雄では発現が消失するという発現パターンを示した (図 1-4b, c, d)。産下直後卵から性決定時期までの雌型 *Bmdsx* mRNA は母親由来であり、それは発生初期において重要な役割をもつために安定的に保護されているのかもしれない。おそらく雄でも雌でも雄型 *Bmdsx* の発現が始まる時期が zygotic な *Bmdsx* の発現開始時期に相当し、この頃には母親由来の雌型 *Bmdsx* mRNA の分解が始まり、性決定時期を過ぎる頃には母親由来の雌型 *Bmdsx* mRNA は完全に分解されるのだろう (図 1-7)。雌では母親由来の雌型 *Bmdsx* mRNA が zygotic な雌型 *Bmdsx* mRNA と置き換わり、雄では母親由来の雌型 *Bmdsx* mRNA が分解され、zygotic な雄型 *Bmdsx* に置き換わると考察した。

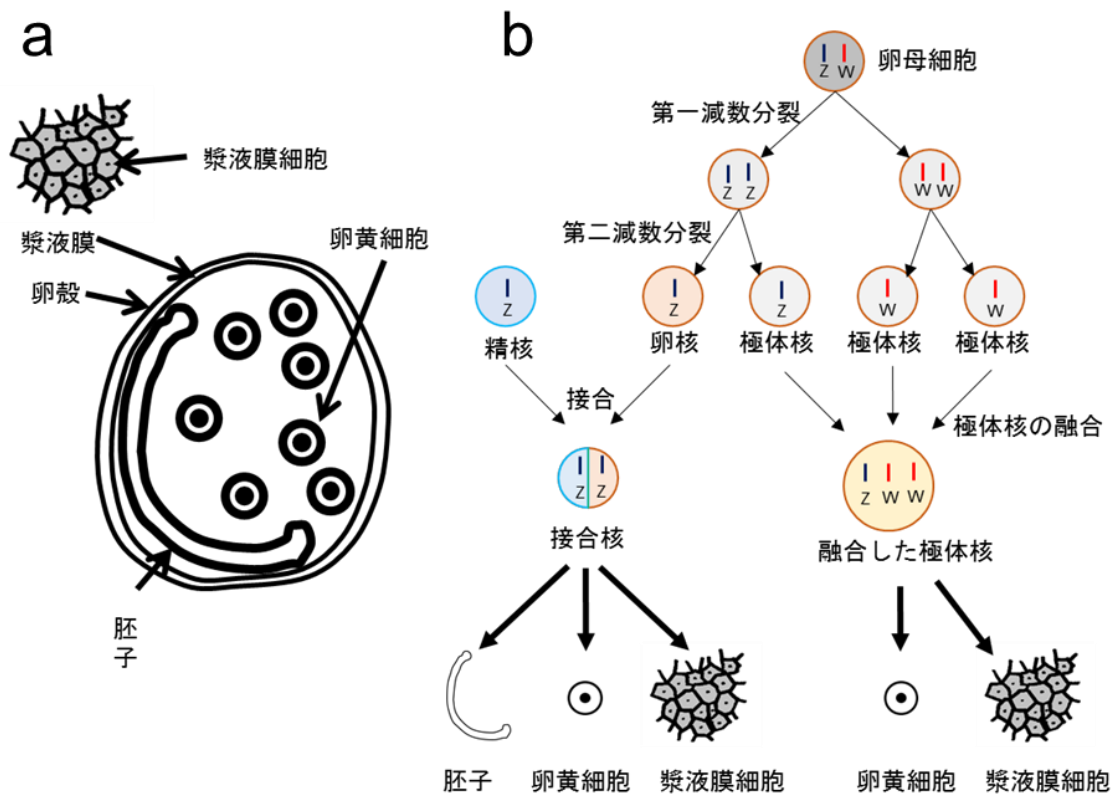
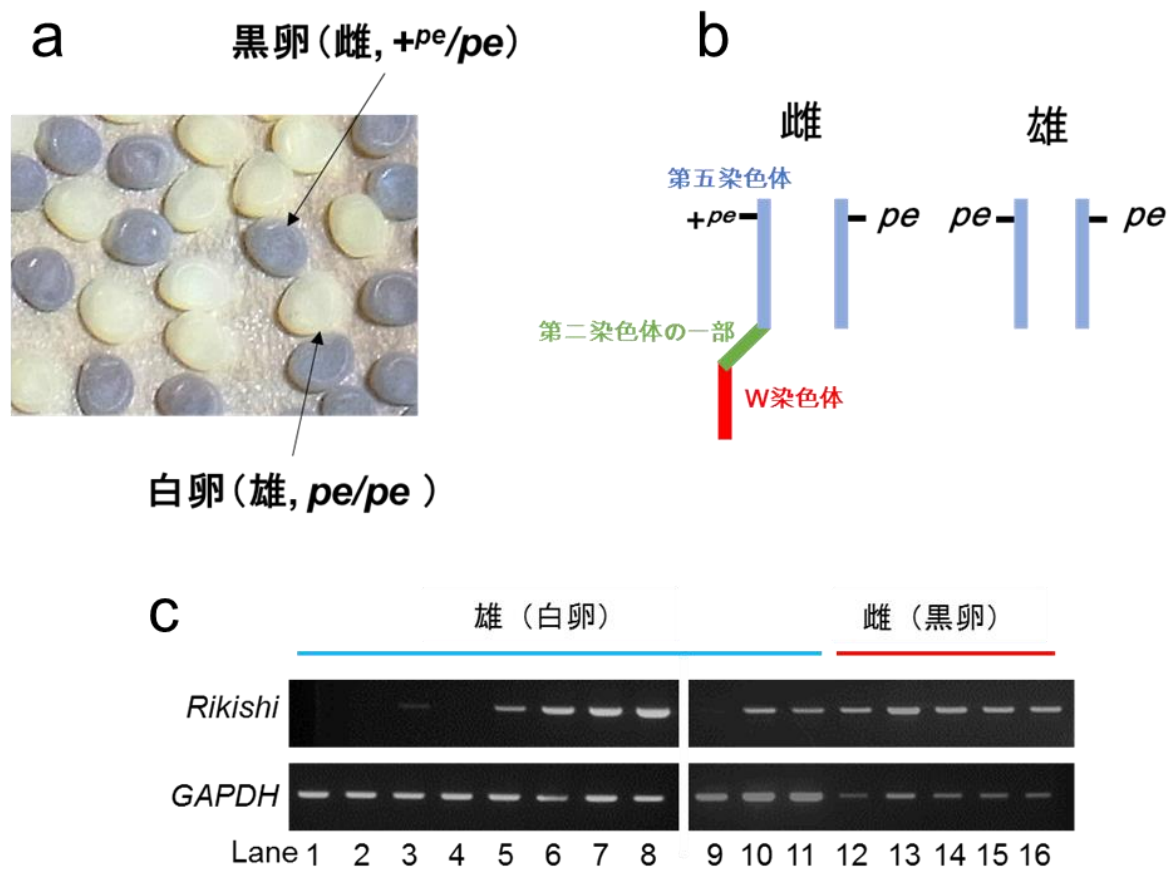


図 1-1. カイコの発生初期卵には極体核由来の細胞が含まれることがある

(a) カイコ発生初期卵の模式図。カイコ発生初期卵には、胚子を構成する細胞以外に、卵黄細胞や漿液膜細胞が含まれる。(b) 極体核由来の細胞が卵黄細胞や漿液膜細胞へと分化する場合がある。卵母細胞から減数分裂によって、卵核と3つの極体核が形成される。卵核は精核と融合して接合核を形成し、胚子、卵黄細胞、漿液膜細胞へと分化する。これに対して、極体核は融合し（佐藤 1926）、胚子以外の細胞へと分化する場合が報告されている（Sakai et al., 2013）。3つの極体核のうち少なくとも2つの極体核の中に、W 染色体が含まれている。このため胚子の遺伝子型がZZであったとしても、カイコ卵中にW 染色体をもつ細胞が含まれることとなる。減数分裂のモデルは前還元型で図示した。



(Sakai et al., 2013 を改変)

図 1-2. カイコの発生初期卵では W 染色体マーカーを用いたゲノム PCR による正確な雌雄鑑別を行うことができない

(a) カイコ 2pB 系統の産下卵。限性黒卵系統である 2pB 系統は正常着色卵（黒卵）が雌に、未着色卵（白卵）が雄となる（Sakai et al., 2013）。(b) 2pB 系統の融合染色体と第五染色体。2pB 系統の W 染色体（赤線）には、第二染色体の一部（緑線）と第五染色体（青線）が融合している。雌では劣勢白卵遺伝子（ pe ）がヘテロ（ $+pe/pe$ ）となるため黒卵となり、雄ではホモ（ pe/pe ）となるため白卵となる。(c) 2pB 系統を用いて卵色によって雌雄鑑別をした卵についてカイコ W 染色体特異的マーカーである Rikishi (Abe et al., 2005) を用いたゲノム PCR を行った。その結果、雄のいくつかの個体において W 染色体特異的マーカーの増幅が確認された（Lane 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11）。実験に供試した卵は、休眠している休眠卵を用いた。この時期の胚子は、非休眠卵の胚子の産下後 3~4 日目のステージに相当する。PCR の増幅コントロールとして *GAPDH* を用いた。

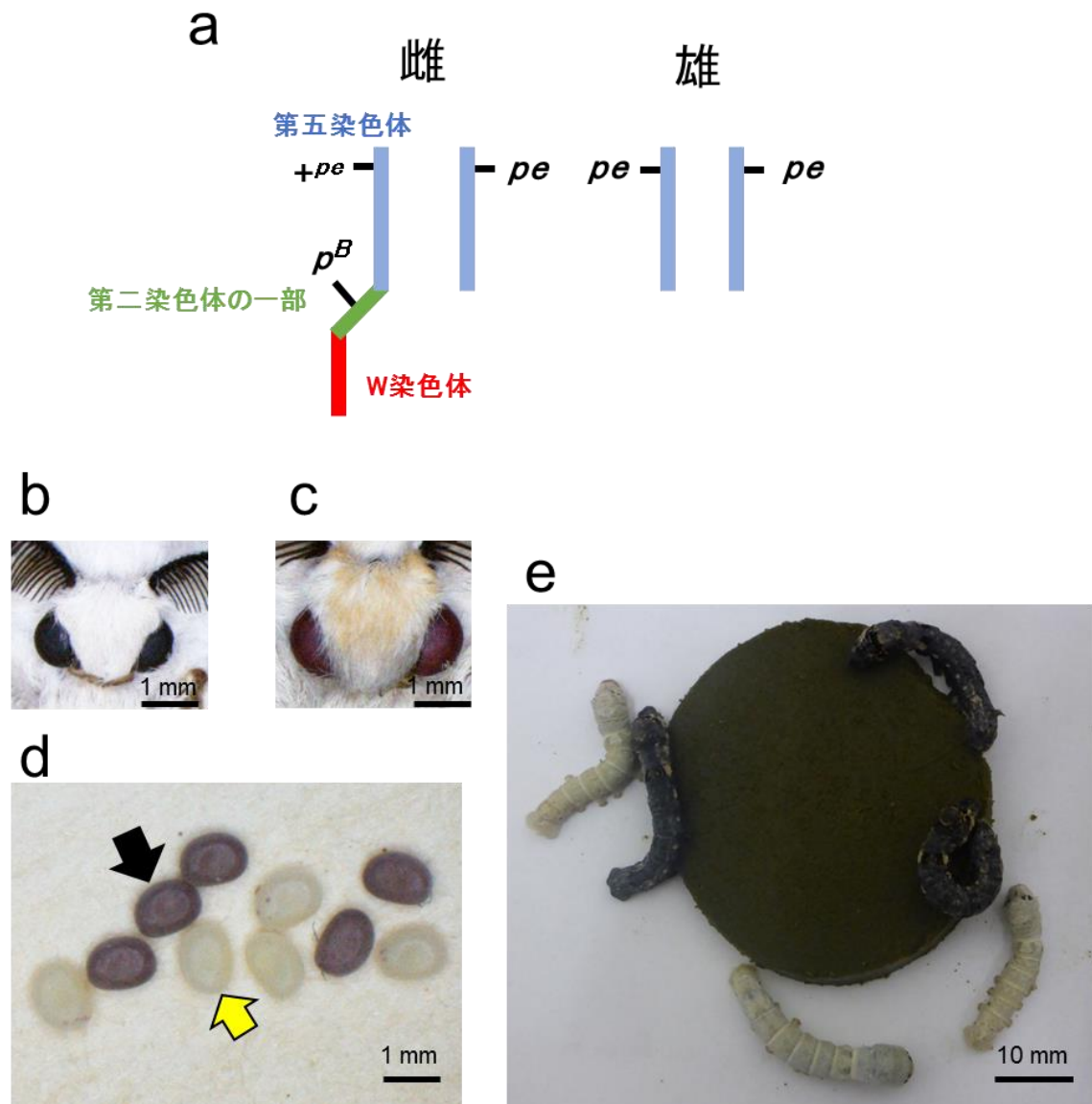


図 1-3. S-1 系統の特徴

(a) S-1 系統の融合染色体と第五染色体。S-1 系統の W 染色体（赤線）には、第二染色体の一部（緑線）と第五染色体（青線）が融合している。雌では劣勢淡赤眼白卵遺伝子 (pe) がヘテロ ($+^{pe}/pe$) となり、雄ではホモ (pe/pe) となる。(b) S-1 系統の雌の成虫眼色。S-1 系統の雌では、遺伝子型が $pe/+$ となるため、雌の眼色は正常型（黒色）となる。(c) S-1 系統の雄では、遺伝子型が pe/pe となるため雄の眼色は淡赤眼となる。(d) S-1 系統の卵。黒い卵は雌（黒矢印）、白い卵は雄（黄色矢印）である。S-1 系統は、 pnd （着色非休眠卵）遺伝子をホモで持つため、通常は着色が起こらない非休眠卵であっても正常な着色が起こるが、雄個体は pe 遺伝子をホモでもつため着色がほとんど起こらない。(e) S-1 系統の幼虫。S-1 系統の W 染色体と融合した第二染色体の一部には p^B （黒色蚕）遺伝子が転座しているため、雌は黒色に、雄は正常体色となる。

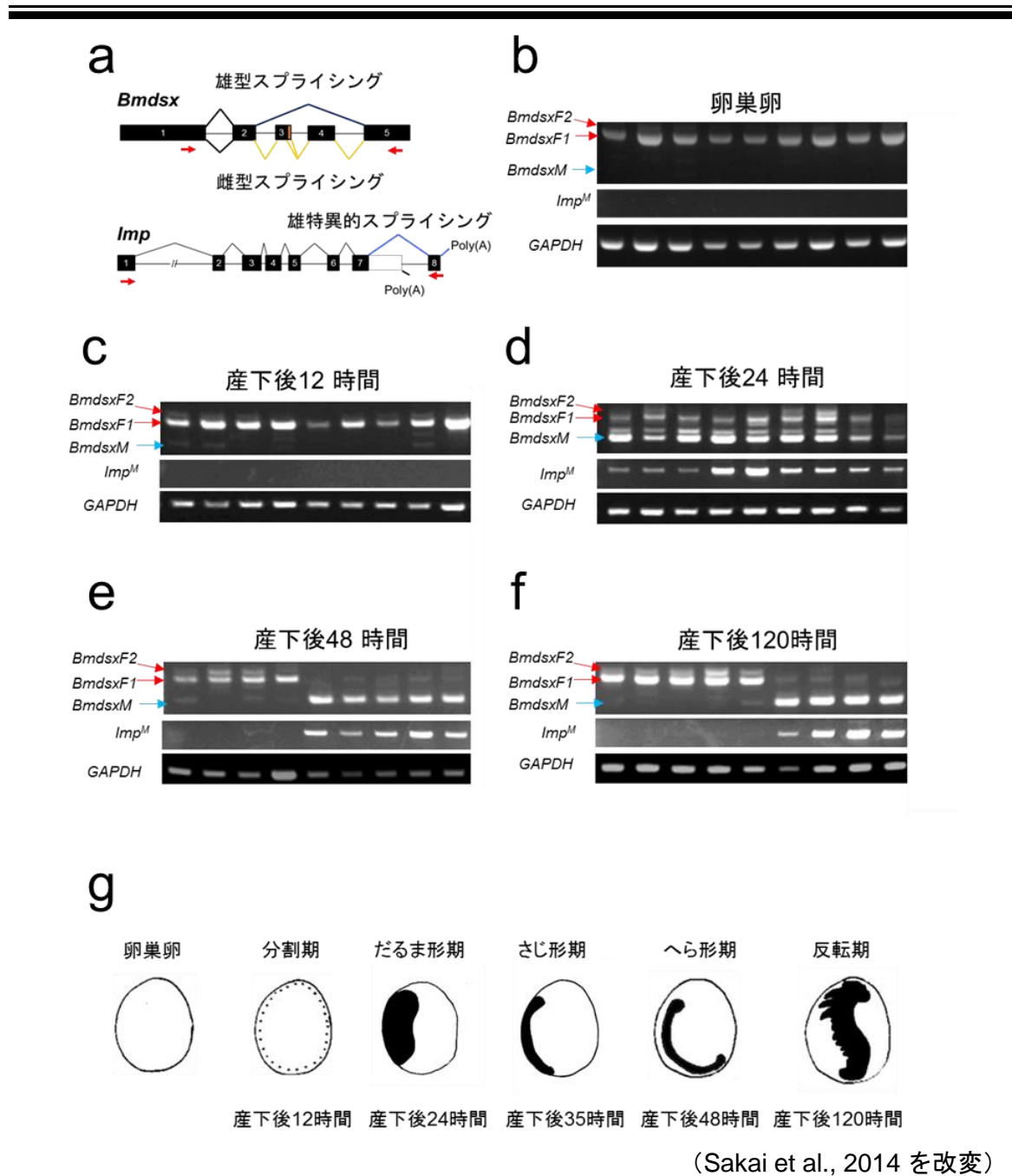
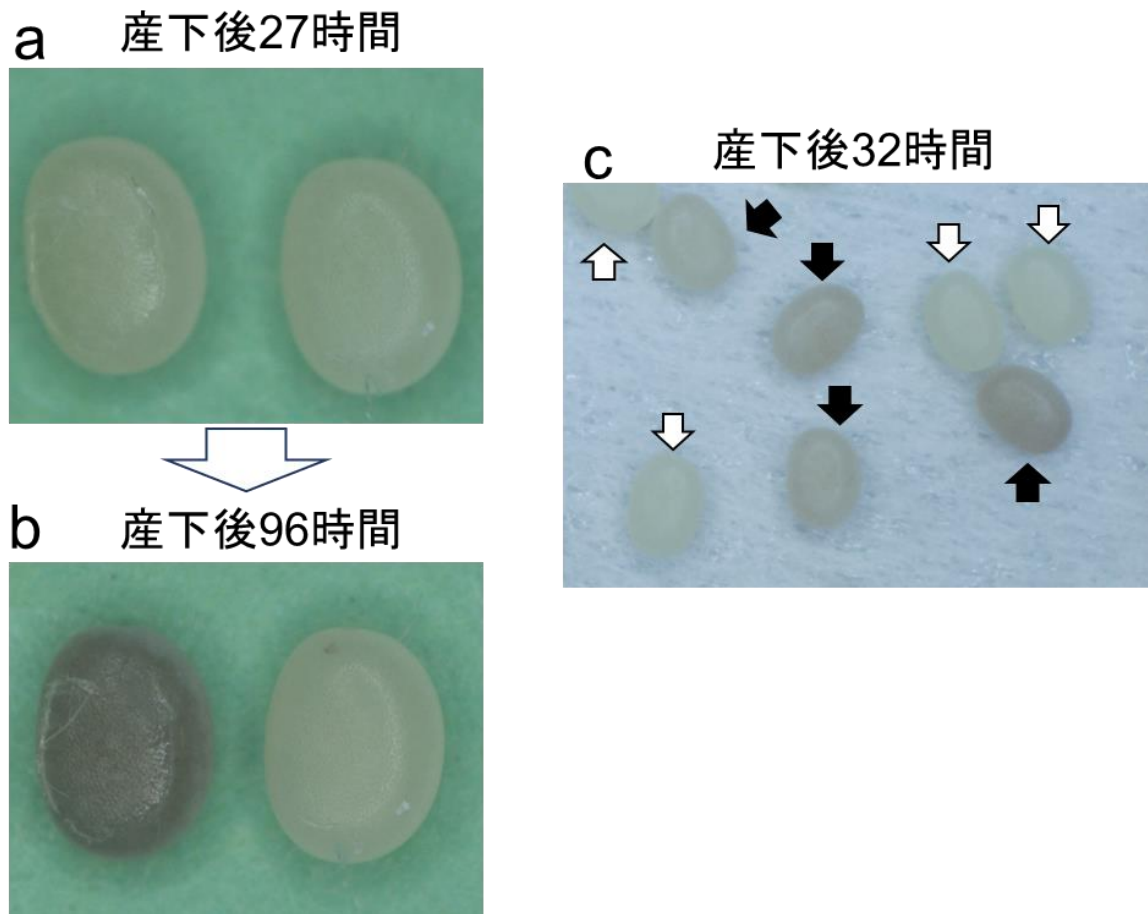


図 1-4. 胚発生に伴う *Bmdsx* 及び *Imp^M* の発現パターンの変化

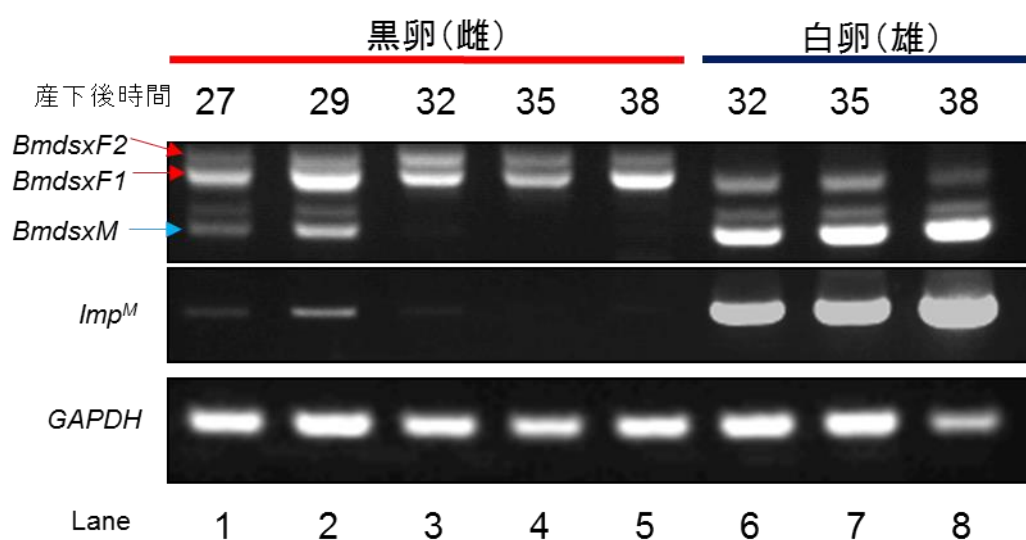
(a) *Bmdsx* 及び *Imp^M* のスプライシングパターンの模式図。(b) ~ (f) の RT-PCR で用いたプライマーを赤矢印で示した。卵巣卵 (b)、産下後 12 時間 (c)、産下後 24 時間 (d)、産下後 48 時間 (e)、産下後 120 時間 (f) の卵 9 粒における *Bmdsx* 及び *Imp^M* の発現パターンを RT-PCR により調べた。内部標準として *GAPDH* を RT-PCR により増幅した。電気泳動写真の左に示した矢印は *BmdsxF1*、*BmdsxF2* 並びに *BmdsxM* のサイズを表している。(g) 高見, 北沢 (1960)、高見 (1969)、Sakaguchi (1978a) の文献を参考に、カイコの発生段階と各段階における胚子を模式的に示した。カイコの胚子の部分を黒く塗りつぶした。



(Sakai et al., 2014 を改変)

図 1-5. 限性黒卵系統 S-1 における卵の着色

限性黒卵系統 S-1 の受精卵は、その性染色体構成が ZW である場合黒く着色した卵（黒卵）となり、ZZ の場合は着色が起こらず未着色卵（白卵）となる。したがって卵色によって雌雄鑑別が可能である。(a) 産下後 27 時間の S-1 系統の卵。左の卵はこの時点で着色の開始が認められた卵、右の卵はこの時点で着色の開始が認められなかった卵である。(b) (a) で示した卵を産下 96 時間後に観察した。その結果、左の卵の完全な着色が確認された。(c) 産下後 32 時間の S-1 系統の卵。着色が始まった卵（黒矢印）、未着色の卵（白矢印）が 1:1 の割合で出現した。



(Sakai et al., 2014 を改変)

図 1-6. 限性黒卵系統を用いた雌雄鑑別により得られた雌雄の卵における *Bmdsx* 及び *Imp^M* の発現パターンの変化

限性黒卵系統を用いて雌雄鑑別を行い、雌雄それぞれの卵における *Bmdsx*、*Imp^M* の発現パターンを図 1-4 に示した方法と同様の RT-PCR により調べた。図に示した左矢印は、*BmdsxF1*、*BmdsxF2* 並びに *BmdsxM* のサイズを示している。内部標準として *GAPDH* を同様の RT-PCR により増幅した。

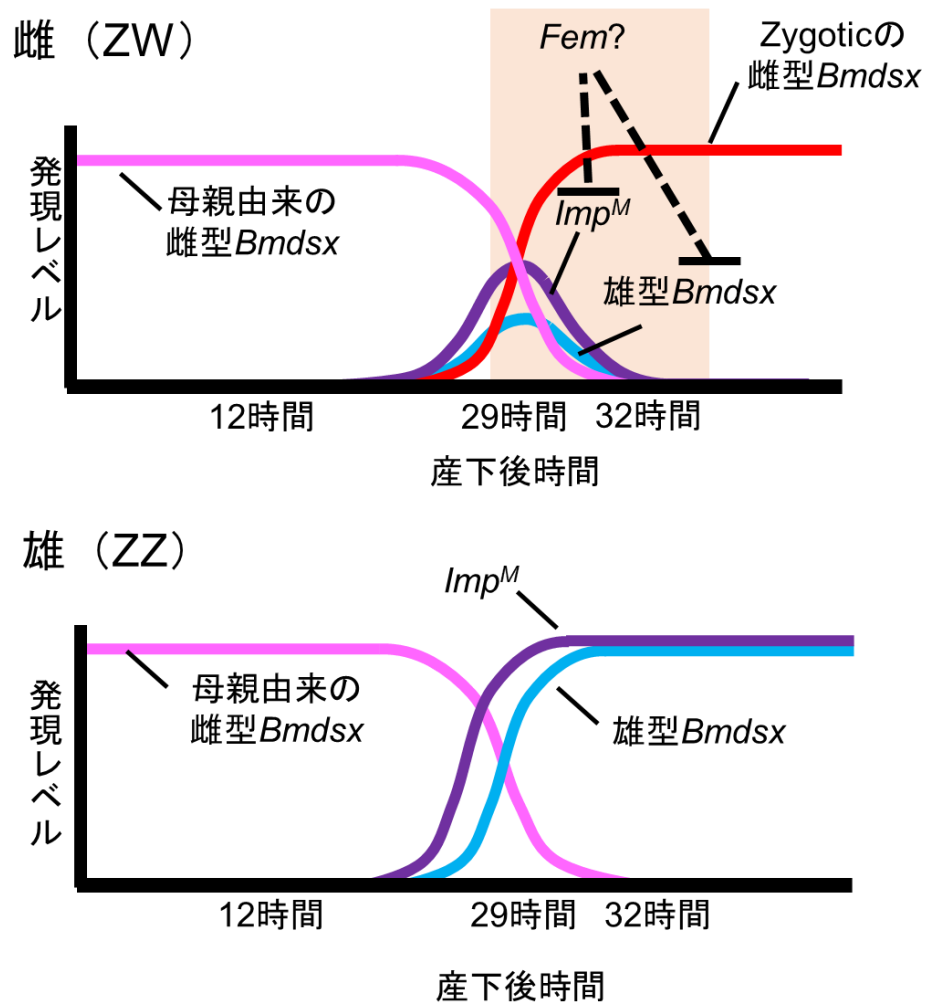


図 1-7. 雌雄の卵の産下後経過時間に伴う *Bmdsx* と *Imp^M* の発現レベルの変動について示した模式図

胚発生初期の雌では雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* が一旦発現し、やがてそれらの発現が消失する。このことから、*Fem* の働きによって間接的もしくは直接的に雄型 *Bmdsx*、*Imp^M* を含む雄型の遺伝子発現が抑制を受け、その結果雌への分化が決定付けられると予想される。これに対して、雄では *Fem* が発現しないため雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の抑制が起こらず、その結果雄へと分化する。雌型 *Bmdsx* は、産下直後の卵においては雌雄に関わらず発現がみられるものの、性決定後は雌ではそのまま発現が維持され、雄では発現が消失するという発現パターンを示す。雌では母親由来の雌型 *Bmdsx* mRNA が zygotic な雌型 *Bmdsx* mRNA と置き換わり、雄では母親由来の雌型 *Bmdsx* mRNA が分解され zygotic な雄型 *Bmdsx* に置き換わる。

表1. PCRに用いたプライマーの配列（第一章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')	Denaturation	Annealing	Elongation
<i>Bmdsx</i>	FDSX-F2	CGCCTTACCGCAGACAGGCAG	98°C 10sec	57°C 30sec	72°C 60sec
	FDSX-R4	GCGCAGTGTCTGTCTACAAGG			
<i>Imp^M</i>	BmiMP-F	ATGGACGGTGACATGTCTCAAG	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec
	BmiMP-R	TCATCCCGCCTCAGACGATTG			
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F	CATGAACAGTAGTCATCAAGC	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec
	GAPDH-R	GCCGCATTGGCCGTTTGGTGC			

第二章

緒言

カイコの性は、性染色体構成が ZW であると雌に、ZZ であると雄になること (Tanaka, 1916) から、W 染色体には優性の雌決定遺伝子 *Fem* (*Feminizer*) が存在すると考えられている (橋本, 1933; Doira, 1978)。しかしこの *Fem* は、半世紀以上前からその存在が想定されているものの、本研究開始時点で同定には至っておらず、どのように性決定に関与するのかまったく不明である。*Fem* が座するカイコの W 染色体は、非常に多くの転移因子と繰り返し配列からなる (Abe et al., 2005, 2010) ため、アセンブル作業が困難であり、未だにその全塩基配列は明らかとなっていない。仮に W 染色体の全塩基配列が明らかとなったとしても、W 染色体と Z 染色体では組換えが起こらないことから、*Fem* が座する場所を絞り込むことができず、したがってポジショナルクローニングなどの手法によって *Fem* を単離することができない。これらのことから、*Fem* を同定することは困難を極めると予想される。

そこで、本研究では、レファレンス配列が不要な *de novo* トランスクリプトーム解析を行った。通常の RNA シークエンスでは既知のゲノム配列 (レファレンス配列) に、次世代シーケンサーによって解読された断片配列であるリードをマッピングしていくことで遺伝子の発現量を測定する。これに対して *de novo* トランスクリプトーム解析は、次世代シーケンサーで得られたリードを、解析プログラムでアセンブルすることで推定遺伝子 (unigene) を作成し、この unigene に対してリードをマッピングすることで遺伝子の発現を測定する方法である。この *de novo* トランスクリプトーム解析を行えばレファレンス配列が存在しない W 染色体上の遺伝子であっても検出することが可能である。

一方、カイコの常染色体並びに Z 染色体の塩基配列は、雄ゲノムを対象としたホールゲノムショットガンシーケンシス解析によって明らかとなっている (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004)。このことから、*de novo* トランスクリプトーム解析の結果雌特異的な発現が確認された unigene から、常染色体、Z 染色体の遺伝子を除くことで W 染色体に座する遺伝子を見つけ出すことができると考えた。また、カイコでは性決定が行われる胚発生初期において高効率かつ再現性の高いノックダウンを達成できる (Yamaguchi et al., 2011; Suzuki et al., 2012) ことから、同定された W 染色体特異的遺伝子に対して機能解析を行うことで、*Fem* の有力候補遺伝子の絞り込みを行うことができる。本章では、以上のアプローチをとることで同定された W 染色体特異的遺伝子の性質や機能について調べ、最終的に *Fem* の同定に至った経緯について説明する。

材料・方法

供試蚕

カイコの飼育は $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明期－8 時間暗期の条件下の部屋で行った。発生中の卵は湿度が十分に足りたプラスチックの容器内に保存し、幼虫の飼育には人工飼料（日本農産工製シルクメイト）を使用した。実験には、前章で使用した S-1 系統（図 1-3）と S-2 系統（図 2-1）を用いた。S-2 系統は S-1 系統と同様、色素合成に関わる遺伝子が座乗する第五染色体と W 染色体が融合した系統（Tanaka et al., 2000）に由来し、ZW（雌）卵では漿液膜細胞において正常な色素合成が行われるために卵の着色が起こり黒色（黒卵）に、ZZ（雄）卵では色素合成が途中で止まるため卵は赤色（赤卵）となる（図 2-1d 赤矢印、黒矢印）。一方、未受精卵や発生初期で死亡した卵では着色が起こらないため（図 2-1d 黄色矢印）、発生初期において容易かつ正確な雌雄鑑別ができるだけでなく、卵色によって正常な発生が起こらなかった個体を解析の対象から除外することができる。

ゲノム PCR

W 染色体に座上する遺伝子の候補として選び出された unigene に対して、カイコ日本種の小石丸と日本一、中国種の緋紅と支 108 号、欧州種の伊黄繭とセグザード、日本産のクワコ（国立大学法人東京農工大蚕学研究室、横山岳准教授より分与）に対してゲノム PCR を行った。カイコの複数の系統並びにクワコのゲノム DNA は、BD tract Genomic DNA Isolation Kit（Maxim Biotech）を用いて 5 齢 3 日目の幼虫から摘出した絹糸腺より精製した。実験の手順は添付マニュアルの指示にしたがった。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ）を使用し、添付マニュアルの指示にしたがって行った。使用したプライマーの塩基配列と PCR の条件は表 2-1 に示した。

RNA の抽出

カイコ卵からの total RNA 抽出は、ISOGEN（ニッポン・ジーン）を使用し、鈴木ら（2012）の方法にしたがって行った（Suzuki et al., 2012）。

RT-PCR

逆転写反応による cDNA 合成は、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ）を用い、添付マニュアルの手順にしたがって行った。逆転写反応の鋳型に

は、1 μ g の total RNA もしくは、卵 1 粒から抽出した全量の total RNA を使用し、逆転写反応の際には上述の cDNA Synthesis Kit に添付されている random hexamer をプライマーとして使用した。Unigene20348 並びに Unigene20468 の転写産物の向きを調べる際には、表 2-1 に記した 20348F1、20348R1、20468F1、20468R1 プライマーを、それぞれ逆転写反応に用いた。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用し、添付マニュアルの指示にしたがって行った。使用したプライマーの塩基配列と PCR の条件は表 2-1 に示した。得られた反応産物はエチジウムブロマイド (0.5 μ g/mL) を含む 1% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、電気泳動像は E-Shot (ATTO) を用いて撮影した。

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量は、Suzuki ら (2012) の方法にしたがった (Suzuki et al., 2012)。PCR 反応に用いたプライマーの塩基配列は表 2-2 に示した。内部標準として用いた EF2 (*Elongation factor 2*) 遺伝子の増幅には、Koike ら (2003) の用いたプライマーを使用した (Koike et al., 2003)。

de novo トランスクリプトーム解析

S-1 系統を用いて卵色によって雌雄鑑別された産下後 32 時間の雌の卵 40 粒、雄の卵 40 粒それぞれから上述に示した方法により total RNA を抽出し、混在するゲノム DNA を除去するために TURBO DNase (Life technology) を用い、添付マニュアルの指示にしたがって DNase I 処理を行った。その後、Beijing Genomics Institute の提供する「*de novo* トランスクリプトーム解析」受託サービスに供試した。Oligo (dT) を有する磁気ビーズを使用して mRNA を単離したのち、mRNA を鋳型として cDNA を合成した。その後、アダプターを付加し PCR による増幅を行ったのち、次世代シーケンサー (HiSeq2000, Illumina) を用いてシーケンスを行った。本研究で使用された次世代シーケンサーは、1 サンプル当たり約 300bp \times 5000 万リードのデータを得ることができる。雌雄の遺伝子発現差異解析についても、同社の提供するバイオインフォマティクス解析サービスを利用した。同社が提供するプログラムによって、アダプターの配列を除去し、クオリティーが低いと判断された約 8.5% のリードを解析対象から除外した後、解析プログラム Trinity による *de novo* アセンブリを行った。

シーケンス

PCR によって得られた増幅産物は電気泳動により分離した後、Wizard SV Gel and

PCR Clean-Up System (Promega) を用いて添付マニュアルの指示にしたがってゲル抽出を行い、pGEM-T Easy vector (Promega) の TA クローニングサイトに挿入した。得られたプラスミド DNA を *E. coli* DH5 α Competent Cells (タカラバイオ) にトランスフォーメーション後、陽性コロニーを振とう培養により少量培養し、AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer) を用い、添付マニュアルの指示にしたがってプラスミド DNA を精製した。その後、オペロンバイオテクノロジー株式会社の提供する受託 DNA シーケンスサービスを利用してシーケンスを行った。

LNA-DNA ギャップマーの合成

FET-W に対して 2 種類の LNA (Locked nucleic acid) -DNA ギャップマーを設計した (表 2-3)。ギャップマーの合成は、株式会社ジーンデザインの提供する受託合成サービスを利用した。negative control は、Probst ら (Probst et al., 2010) と同じ配列からなるコントロール LNA-DNA ギャップマーを用いた。

カイコ卵へのインジェクション

カイコ卵へのインジェクションの方法とその後の卵の回収は、鈴木ら (2012) の方法にしたがった (Suzuki et al., 2012)。50 μ M の LNA-DNA ギャップマーをインジェクションした。

組織切片の観察

切片の作製、染色は株式会社新組織科学研究所に委託した。卵から切り出した胚子並びに幼虫を 10%ホルマリン (Wako) で固定しパラフィンで包埋処理をした後、切片を作製した。ホルマリン液によって固定されたカイコ胚子を自動包埋装置 (Tissue-Tek Vip5Jr, サクラファインテックジャパン株式会社) を使用して、脱水・透徹・パラフィン浸透の操作の後、包埋センター (サクラファインテックジャパン株式会社) 上で手作業により包埋した。作製したパラフィンプロックから滑走式ミクロトームを用いて、厚さ 3~4 μ m の切片を作製し、スライドガラスに貼付しヘマトキシリン・エオシン染色標本作製し光学顕微鏡観察 (BX51, Olympus) を用い観察した。撮影には写真撮影装置 (DP73, Olympus) を用いた。

組織切片の免疫染色

組織切片の免疫染色は株式会社新組織科学研究所に委託した。作製した切片を脱パラフィン化し、蒸留水で洗浄した後、10 mM クエン酸緩衝液 [pH6.0] で 95°C、20

分間加熱することで抗原賦活化を行った。室温で 20 分間放冷した後、PBS [pH 7.4] で洗浄し、3% 過酸化水素水中で室温 5 分間静置した。PBS [pH 7.4] で 5 分間×3 回洗浄した後、一次抗体を室温で 50 分間処理した。一次抗体には、1/100 希釈した抗カイコ VASA 抗体（Thomas Jefferson 大学 桐野陽平氏より分与）を使用した。PBS [pH 7.4] で 5 分間×3 回洗浄した後、二次抗体を室温で 30 分間処理した。二次抗体にはヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO (MULTI)（ニチレイバイオサイエンス）を使用した。PBS [pH 7.4] で 5 分間×3 回洗浄した後、ジアミノベンジジン（3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride ; DAB）で 10 分間発色させた。蒸留水で 10 分間洗浄した後、マイヤーのヘマトキシリン液で 1 分間核染色を行った。蒸留水で洗浄し色出しを行った後、脱水、透徹、封入を行った。観察には、光学顕微鏡観察 (BX51, Olympus) を用い、撮影には写真撮影装置 (DP73, Olympus) を用いた。

1 齢幼虫の生殖巣の観察

1 齢幼虫の生殖巣は 2 μ M Calcein-AM (Promo Kine) によって蛍光染色した後、観察を行った。Calcein -AM は細胞浸透性色素であり、非蛍光の Calcein -AM は、細胞内エステラーゼによって緑色蛍光を放つ Calcein へと分解されるため、細胞が蛍光染色される。腹側を切開したカイコを、2 μ M Calcein-AM に 10 分間浸漬したのち、PBS で組織表面を洗浄後、実体顕微鏡 (SZX7, Olympus) 並びに、蛍光照明 (U-HGLGPS, Olympus) または、位相差顕微鏡 (IX70, Olympus) を用い観察した。撮影には写真撮影装置 (DP73, Olympus) を用いた。生殖巣の断面積の測定は、画像解析ソフト cellSens (Olympus) を用いた。

結果

W 染色体特異的遺伝子のスクリーニング

第一章の研究により、胚発生初期には雌個体においても雄型 *Bmdsx* 並びに *Imp^M* が発現し、この発現はやがて減少することが明らかとなった。この雌個体における雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の発現の減少は産下後 29 時間から 32 時間までの間に起こった。このことからカイコにおける性決定は産下後 29 時間から 32 時間の間に起こると考察できる。そこでこのステージにあたる雌雄のトランスクリプトームの比較を行った。カイコでは W 染色体の塩基配列が未知であるため、レファレンスシーケンスが不要な *de novo* トランスクリプトーム解析を行った。

産下後 32 時間に相当する S-1 系統の卵について卵色による雌雄鑑別を行ったのち、total RNA を精製し *de novo* トランスクリプトーム解析に供試した。次世代シーケンサーから得られた RNA-seq データに対して、解析プログラム Trinity による *de novo* アセンブリを行ったところ、54,438 個の unigene が得られた。次に、雌で雄より 8 倍以上高い FPKM 値 (Fragments Per Kilobase per Million reads) を示した unigene を“雌特異的”と定義し、スクリーニングを行なったところ、149 個が雌特異的な unigene として同定された。これらのすべてについてカイコの雄ゲノムシーケンスが登録されているゲノムブラウザ KAIKOBASE (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) を対象とする blastn サーチを行い、最長の Hit Length (Hit Rate) が 100 base 以下となる unigene を“常染色体もしくは Z 染色体上にコードされていない”として定義し、そのような unigene を W 染色体上に存在する遺伝子の候補として選び出した。その結果選定された 10 種類の unigene それぞれについて、カイコの複数の系統及びカイコの野生種であるクワコ (日本産) のゲノム DNA を鋳型に用いたゲノム PCR を行い、W 染色体に特異的に座乗する unigene か否かを確認した (図 2-2)。その結果、以下に述べるように 2 つの unigene (Unigene20348 と Unigene20468) がカイコ並びにクワコの W 染色体上の遺伝子であることを示唆する結果が得られた (図 2-2i, 2-2j)。すなわち Unigene20348 については、調査したすべてのカイコの系統とクワコの雌でのみ明瞭な増幅産物が確認された (図 2-2i)。Unigene20468 については、すべてのカイコの系統で雌特異的な増幅産物が得られ、クワコにおいてもわずかではあるが雌で特異的な増幅が見られた (図 2-2j)。以上の結果から Unigene20348 と Unigene20468 は、カイコの複数の系統並びにクワコで保存されている W 染色体特異的遺伝子に由来する転写産物であることがわかった。

Unigene 20348 と Unigene20468 の構造

de novo アセンブリの結果得られた W 染色体特異的転写産物である Unigene 20348 と Unigene20468 の実際の遺伝子構造について解析を行った。まず Unigene20348 と Unigene20468 の転写方向を特定するため、産下後 32 時間の雌雄の卵から total RNA を抽出し、DNase I 処理によりゲノム DNA を除去後、互いに向きの異なるプライマー(図 2-3a, 20348F と 20348R; 図 2-4a, 20468F と 20468R)を用いて逆転写反応を行い、その結果得られた cDNA を鋳型に PCR を行った。その結果、Unigene20348 についてはプライマー20348R を、Unigene20468 についてはプライマー20468R を用いて逆転写反応を行った場合において明瞭な増幅産物が得られたことから(図 2-3b, 2-4b)、Unigene20348 と Unigene20468 の転写産物の向きは図 2-3a, 2-4a に示した通りであることが確認できた。次に Unigene 20348 と Unigene20468 それぞれの機能を類推する目的で、*de novo* トランスクリプトーム解析でアセンブルされた塩基配列を query 配列として、相同性検索プログラム blastn、blastx 及び tblastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用いて NCBI に登録されているデータベースを対象とした相同性検索を行った。その結果、Unigene20348 は卵巣で発現が確認されている 7 種類の piRNA (PIWI-interacting RNA) と完全に一致する塩基配列をコードすることがわかった(図 2-3a)。一方、Unigene20468 と有意な相同性を示すものは見当たらなかった(図 2-4a)。続いて open reading frame (ORF) を予測したところ、Unigene20348 は最長で 87base、Unigene20468 は最長で 159base の ORF をコードすると予測された。

Unigene20348 と Unigene20468 の発現パターンを RT-PCR により調べた(図 2-5)。産下直後、産下後 48 時間、産下後 96 時間の卵、孵化直後の 1 齢幼虫、5 齢 3 日目の幼虫から total RNA を抽出し、DNase I 処理によりゲノム DNA を除去後、逆転写反応を行った。5 齢 3 日目の幼虫の解析には、カイコの代表的な幼虫組織である脂肪体を供試した。脂肪体は哺乳動物の肝臓に相当する器官であり、雌雄に共通して存在する器官であるが、雌の脂肪体では卵黄の原料となるタンパク質の生合成が活発にみられるなど、生理機能に雌雄差がある(Sakurai et al., 1988; Yano et al., 1994)。Unigene20348 と Unigene20468 の発現を調べた結果、産下後 48 時間、96 時間で最も強く発現しており、これら 2 つの unigene の発現パターンは酷似していた(図 2-5, lane 2 と 3)。発現パターンが酷似していたことから、Unigene20348 と Unigene20468 が同一の遺伝子から転写されている可能性を考え、産下後 48 時間の雌卵から total RNA を抽出し、DNase I 処理によりゲノム DNA を除去後逆転写反応を行い、プライマー20348F と 20468R の組み合わせで PCR を行ったところ、約 1.2kbp のサイズの増幅産物が得られた(図 2-6a)。この増幅産物が、コンタミネーションしたゲノム DNA 由来である可能性を排除するため、逆転写反応を行っていない total RNA を鋳型に PCR を行ったところ、増幅産物は得られなかった(図 2-6b)。したがって、

プライマー20348Fと20468Rの組み合わせで得られた増幅産物は mRNA 由来であると判断できる。また Unigene20348 を増幅した場合、複数の DNA バンドが得られた (図 2-6a, lane 2) ことから図 2-6c の緑色のボックスで図示したように、Unigene20348 は繰り返し配列である可能性が考えられる。図 2-6a のレーン 4 で示した増幅産物が非特異的な増幅産物ではないことを調べるため、増幅産物をクローニングし、その塩基配列を確認したところ、実際に Unigene20348 の配列と Unigene20468 の塩基配列を含むことがわかった (図 2-7)。以上の結果から Unigene20348 と Unigene20468 が実際は同一の遺伝子から転写された転写産物であることが明らかとなった。そこで、これら 2 つの unigene をコードする遺伝子を *FET-W* (*Female Expressed Transcript-W-chromosome*) と名付けた。

ノックダウンによる *FET-W* の機能解析

FET-W が、*Fem* として機能するか否かを検討するため、*FET-W* のノックダウンが性分化に及ぼす影響を調べることにした。上述したように *FET-W* がコードする予測 ORF の長さは比較的短いこと、また多数の piRNA 配列と完全一致する塩基配列を含むことから non-coding-RNA として機能している可能性を考慮する必要があった。そこで、mRNA ばかりでなく non-coding-RNA についても効果的にノックダウンすることが知られる Locked nucleic acid (LNA) - DNA ギャップマーをノックダウン (Probst et al., 2010; Mayer et al., 2006; 図 2-8) 実験に供試した。

性決定は胚発生初期に起こること、並びにカイコでは胚発生初期において高効率かつ再現性の高いノックダウンを達成できる (Yamaguchi et al., 2011; Suzuki et al., 2012) ことから、胚子を解析の対象として実験を行った。カイコ S-2 系統の産下 8 時間以内の卵に、*FET-W* の塩基配列の一部に相補的な 2 種類の LNA-DNA ギャップマー (*FET-W gap1* と *FET-W gap2*, 図 2-9a) を顕微注入した。S-2 系統は S-1 系統と同様、色素合成に関わる遺伝子が座乗する第 5 染色体と W 染色体が融合した系統 (Tanaka et al., 2000) に由来し、ZW (雌) 卵では漿液膜細胞において正常な色素合成が行われるために卵の着色が起こり黒色 (黒卵) に、ZZ (雄) 卵では色素合成が途中の段階で止まるため卵は赤色 (赤卵) となる (図 2-1d)。一方、未受精卵や発生初期で死亡した卵では着色が起こらないため、発生初期において容易かつ正確な雌雄鑑別ができるだけでなく、卵色によって正常な発生が起こらなかった個体を解析の対象から除外することができる。

性決定が行われ、*Bmdsx* の発現に完全な性的二型が認められるステージである産下後 4 日目の卵を、卵色を指標として雌と雄に選別した。quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) により *FET-W* mRNA 量を定量した結果、*FET-W gap1*、*FET-W gap2* いずれを顕微注入した場合においても有意に *FET-W* mRNA の発現レベルが減少していた

(図 2-9b)。特に、*FET-W gap1* を顕微注入した実験群において、コントロールに比べて *FET-W* mRNA の発現レベルが 15%以下まで低下した。

次に *FET-W* のノックダウンの影響が、性決定に関わる *Bmdsx* と *Imp^M* の発現に影響を及ぼすか調査した。コントロール用の LNA-DNA ギャップマーを注射した場合、雌では雌型、雄では雄型の *Bmdsx* の発現がみられた (図 2-10, lane 1 と 4)。ところが *FET-W gap1* もしくは *FET-W gap2* を顕微注入した場合、雄個体では雄型 *Bmdsx* の発現が認められたのに対して (図 2-10a, lane 5 と 6)、雌では雌型に加え、さらに雄型 *Bmdsx* の発現が検出された (図 2-10a, lane 2 と 3)。これらの結果を定量的に評価するため、雌型、雄型 *Bmdsx* の DNA バンドのシグナル強度を画像解析ソフト Image J により測定したところ、コントロール雌では雄型 *Bmdsx* のシグナルが見られなかったのに対して、*FET-W* をノックダウンした雌個体では雄型 *Bmdsx* のシグナルの割合が雌型、雄型両方の *Bmdsx* のシグナルの合計に対して 60%以上となっていた (図 2-10b)。以上の結果を裏付けるかのように、*FET-W gap1* を顕微注入した雌では、*Bmdsx* の雄型スプライシングに関わるとされる *Imp^M* の明瞭な発現が認められた (図 2-10a, lane 2)。qRT-PCR によって *Imp^M* の発現レベルを定量したところ、コントロール雌個体と比較して *FET-W gap1* では 75 倍、*FET-W gap2* では 30 倍高い発現がみられた (図 2-10c)。 *FET-W* のノックダウンを行ったところ、雌において *Bmdsx^M*、*Imp^M* の発現が誘導されたことから、*FET-W* は *Bmdsx^M*、*Imp^M* の発現を抑制する機能をもつことが示唆された。この *FET-W* の機能は、第一章で予想された *Fem* の機能と一致することから、*FET-W* は *Fem* の有力な候補であるといえる。

胚子期及び 1 齢幼虫の卵巢と精巢の雌雄差

次に *FET-W* の発現レベルを 15%以下まで抑え、*Bmdsx*、*Imp^M* の発現に大きく影響を与えた *FET-W gap1* を用いて、*FET-W* のノックダウンが確認された胚子のステージにおける性分化への影響を調査することを試みた。しかし、胚子におけるカイコの性的二型形質に関する知見は非常に少なく、それらが記載された時期も古い (Miya, 1958; Takeuchi, 1969) ことから、まず本研究においてカイコの胚子の生殖巣で性的二型の形質を認めることができるのか調査を行った。

生殖巣の位置を確認するため、限性黒卵系統 S-2 系統を用いて卵色による雌雄鑑別を行い、孵化後 2 日目幼虫の組織切片を作成し観察を行った。カイコでは第 5 腹節の背側に生殖巣が形成されることが知られている (Omura, 1936; Takeuchi, 1969)。雌雄それぞれの組織切片において、生殖巣だと考えられる組織が、第 5 腹節の背側に観察された (図 2-11a, b)。この観察された組織が生殖巣であることを明確にするため、anti-Bombyx mori vasa-like protein (BmVLG) 抗体を用いた免疫染色を行った。*Vasa* は

哺乳類からショウジョウバエにいたる多くの生物種において生殖細胞で特異的に働くことが知られている (Raz, 2000)。カイコにおいても *Vasa* は、*Bombyx mori vasa-like gene* (*Bmvlg*) として同定されており *Bmvlg* は生殖細胞特異的に発現することが報告されている (Nakao, 1999; Nakao et al., 2006)。抗 BmVLG 抗体による免疫染色を行ったところ、第 5 腹節の背側に観察された組織に BmVLG の局在が観察された (図 2-11c, d)。したがって、これら第 5 腹節の背側に観察された組織が生殖巣であることが明確となった。生殖巣内に形成される生殖細胞は、組織切片で円形の細胞として観察されることがわかった (図 2-11e, f)。これらの生殖細胞は卵巢小胞 (図 2-11e) または精巢小胞 (図 2-11f) 内に囲まれていた。

生殖巣が確認されたので、限性黒卵系統 S-2 系統を用いて卵色による雌雄鑑別を行い、孵化後 2 日目、催青 II 期 (孵化 1 日前に相当するステージ)、点青 II 期 (孵化 3 日前に相当するステージ) における切片標本作製し、卵巢および精巢を観察した (図 2-12)。孵化後 2 日目の卵巢 (図 2-12a) では明瞭な 4 つの卵巢小胞が観察されたのに対して、催青 II 期 (図 2-12b)、点青 II 期 (図 2-12c) の卵巢では、卵巢小胞が明瞭に区別できなかった。同様の観察を雄で行ったところ、孵化後 2 日目の精巢 (図 2-12d) では明瞭な 4 つの精巢小胞が観察された。また、催青 II 期 (図 2-12e)、点青 II 期 (図 2-11f) の精巢では精巢小胞間の被膜の発達が不十分であるものの、明確に 4 つの小胞を観察することができた。次に、卵巢と精巢の断面積の大きさを測定し比較した。孵化 1 日目の幼虫の組織切片の精巢の断面積は $6647 \pm 1060 \mu\text{m}^2$ (平均 \pm 標準偏差, 調査個体数 5 個体) となり、卵巢の断面積は $4354 \pm 288 \mu\text{m}^2$ (平均 \pm 標準偏差, 調査個体数 3 個体) となった。この断面積を比較したところ、卵巢に比べて精巢の方が有意に大きいことが明らかとなった (Welch's t test, $P < 0.05$)。卵巢と精巢の大きさに有意差はあるものの、卵巢、精巢どちらにも 4 つの小胞が形成されるなど形態的な特徴が酷似しており、組織切片を用いた観察ではこれら 2 つを明確に区別する特徴を見出すことができなかった。

次に生体解剖を行い卵巢と精巢を観察した。生体解剖による生殖巣の観察は技術的な問題から、孵化後 2 日目以降の幼虫でしか行うことができなかった。1 齢幼虫の生殖巣は透明なので、視認しやすくするため Calcein-AM を用いた蛍光染色を行った。卵巢では、卵巢と外部生殖器をつなぐ管である紐体が体軸に対して外側の位置に接続していた (図 2-13a)。この卵巢を取り出し、位相差顕微鏡を用いて観察したところ、基底膜の中に 4 つの卵巢小胞が見られた (図 2-13b, c)。次に精巢を観察したところ、紐体が体軸に対して内側の部位に接続していた (図 2-13d)。精巢を取り出し、位相差顕微鏡を用いて観察したところ、基底膜の中に 4 つの精巢小胞が見られた (図 2-13e,

f)。卵巣と精巣のいずれについても、4つの小胞が形成されていることが明らかとなった。これら2つの器官の明瞭な差として、卵巣では紐体が体軸に対して外側の位置に接続する一方、精巣では紐体が体軸に対して内側の部位に接続するという違いがあることがわかった（図 2-13a, d）。

FET-W のノックダウンが卵巣へ及ぼす影響

生体解剖を行い卵巣と精巣を比較すると、紐体の接続位置が異なるという形態的な違いが観察されることがわかったので、この点に着目し *FET-W* のノックダウンが卵巣の形態に及ぼす影響について調査を試みた。S-2 系統の産下卵に LNA-DNA ギャップマーを顕微注入した場合、コントロールでも孵化個体を得られない場合があった。そこで、一般的にインジェクションに用いられているカイコである N4 系統を実験に用いることにした。コントロールギャップマーを顕微注入した場合、19.1%の卵から孵化個体を得られたのに対し、*FET gap1* を顕微注入した場合においてもほぼ同等の割合（12.4%）で孵化個体を得ることができた（3 回行った実験の平均値を孵化率として求めた）。siRNA をインジェクションした場合に比べ孵化卵の割合は少ないものの、孵化個体を得られることがわかったのでこの N4 系統を用いて解析を行うこととした。孵化以降のステージであればゲノム PCR による正確な雌雄鑑別を行うことができる（Sakai et al., 2013）ため、ゲノム PCR によって *FET-W* 遺伝子の有無を調べ、雌雄を判定した。すなわち *FET-W* 遺伝子をもつ個体は雌、もたない個体は雄と判定した。

FET gap1 を用いたノックダウンを行い、孵化後 3 日目の幼虫の卵巣を観察した（図 2-14）。*FET gap1* を顕微注入した N4 系統の卵から孵化した雌 16 個体の卵巣を観察したところ、2 個体において卵巣小胞の数が少なくなるという形態異常が観察された（図 2-14b）。コントロールギャップマーを顕微注入した卵から孵化した雌 15 個体について同様の観察を行ったが、上述のような形態異常は観察されなかった。

次に、よりステージが進んだ 5 齢幼虫における卵巣の観察を行った。コントロールギャップマーの顕微注入により得られた 19 頭の孵化個体のうち 17 個体が 5 齢幼虫まで成育し、この時点で雌個体は 7 個体であった。これに対して *FET gap1* を顕微注入した卵から孵化した 45 個体を飼育したところ、22 個体が 5 齢幼虫まで成育し、このうち雌個体は 5 個体であった。これらの 5 齢幼虫について、コントロールギャップマーを顕微注入した個体と、*FET gap1* を顕微注入した個体を比較したが、性的二型形質やその他の形質において形態的な差は観察されなかった。*FET gap1* を顕微注入した 5 齢幼虫の雌個体の割合は、期待値（50%）に比べ 23%と低かったことから、成長

中にロックダウン効率が高かった雌個体が優先的に致死したため、形態的には正常な個体だけが生存した可能性が考えられる。

考察

本章ではカイコ性決定マスター遺伝子「*Fem*」の同定を試みた。第一章で特定された性決定時期における雌雄の遺伝子発現を *de novo* トランスクリプトーム解析によって比較し、カイコとその近縁種であるクワコの W 染色体特異的な遺伝子をスクリーニングすることで最終的に *FET-W* のみが候補遺伝子として同定された。本研究では、スクリーニングの過程で「常染色体もしくは Z 染色体上にコードされていない」遺伝子を解析の対象から除外した。そのため、仮に常染色体の遺伝子と *Fem* の遺伝子構造が近似していた場合、解析の対象として除外される危険性がある。実際、カイコの W 染色体の遺伝子として、*ZI* と *Z20* とよばれる遺伝子が存在する (Ajimura et al., 2006)。これらの遺伝子は zinc finger protein をコードしており、常染色体にも相同遺伝子が複数存在することが知られている (Gopinath et al., 2016)。しかし、今回のスクリーニングではこれらの遺伝子を W 染色体特異的な遺伝子として同定することはできなかった。おそらく、*ZI* と *Z20* は W 染色体の遺伝子ではあっても、常染色体にも多数の相同遺伝子が存在するため、本研究で採用したスクリーニング法では解析の対象から除外されてしまったと考えられる。同様の理由で、本研究で行ったスクリーニングでは W 染色体の全ての遺伝子を捉えきれていない可能性を排除することはできない。しかし、*FET-W* の機能解析の結果は、あらゆる点で *FET-W* が *Fem* としての機能を備えた遺伝子であることを強く示唆している。

その後の調査で、本研究によって同定された *FET-W* は、東京大学農学部勝間准教授らが同時期に *Fem* の候補として同定した遺伝子 (*HIKARU*) と同一のものであることがわかった。勝間らは、本研究と同様のアプローチにより *Bmdsx* の発現パターンを指標にカイコの性決定時期を予想し、産下後 15、18、21、24 時間のカイコの雌雄の卵のトランスクリプトームを比較することによって *HIKARU* を *Fem* の候補遺伝子として同定し、この遺伝子に piRNA (PIWI-interacting RNA) がコードされていることを見出した (勝間ら 2014; 古賀ら 2014; Kiuchi et al., 2014)。piRNA は小分子 RNA の一種で、PIWI (P-element induced wimpy testis) タンパク質と複合体を形成し、主に生殖巣でトランスポゾンの発現を抑制する働きがある (Malone and Hannon, 2009)。勝間らの研究グループは、卵巢や卵巢起源の培養細胞で特異的に発現する W 染色体由来の piRNA を多数見つけており (Kawaoka et al., 2011)、KG 系統とよばれる突然変異系統においてまれに出現する部分的に雄化した雌では、これらの piRNA の発現量が有意に減少していることが報告されている。これらのことから、彼らは W 特異的 piRNA がカイコの雌化にとって重要な役割をもつとの仮説を立てていた (Hara et al., 2012)。そこで勝間らの研究グループは、上述の *HIKARU* 遺伝子にコードされている piRNA がカイコの雌化に必要であると予想し、

アンチセンス RNA を用いたノックダウンによりこの piRNA の機能解析を行った。その結果、この piRNA をノックダウンすると *Bmdsx* の雄型アイソフォームが雌個体において発現することが明らかとなった（勝間ら 2014; 木内ら 2014; Kiuchi et al., 2014）。この結果は、本研究において *FET-W* をノックダウンした際にみられた結果と全く同じである。ただし、上述の piRNA の機能阻害が生殖巣の分化に及ぼす影響については確認されていない。

以上、*FET-W* が W 染色体特異的遺伝子であること（図 2-2i, j）、*FET-W* をノックダウンすると雌において雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* が誘導され（図 2-10）、卵巣の形態異常（図 2-14）を引き起こすこと、別の研究グループによって同時期に同定された *FET-W* と同一の遺伝子 *HIKARU* から供給される雌特異的 piRNA を特異的に阻害することで、雌において雄型 *Bmdsx* を誘導する（勝間ら 2014; Kiuchi et al., 2014）ことを総合すると、*FET-W* は優性雌決定遺伝子 *Fem* の実体であるとみなすことができる。

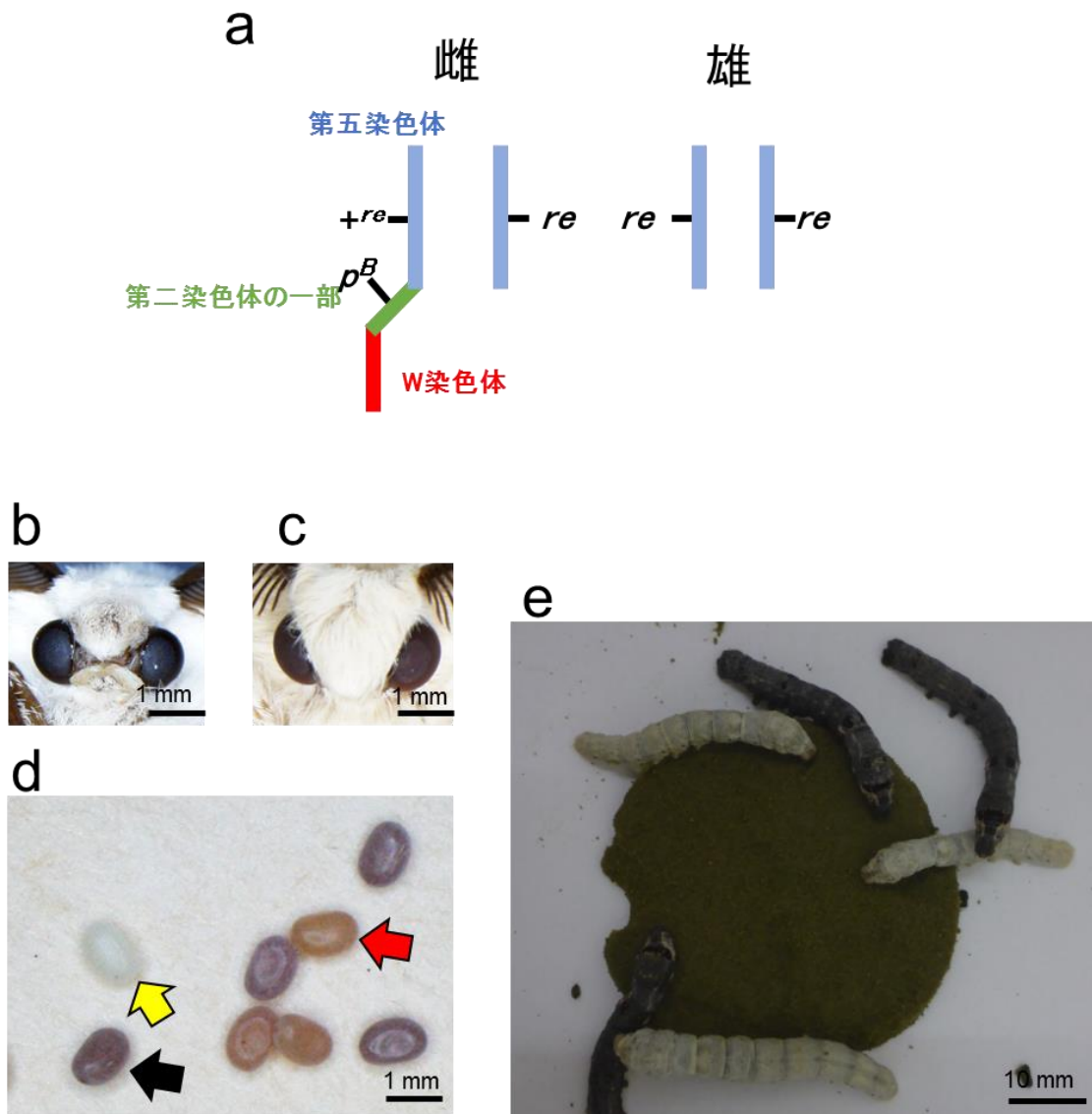
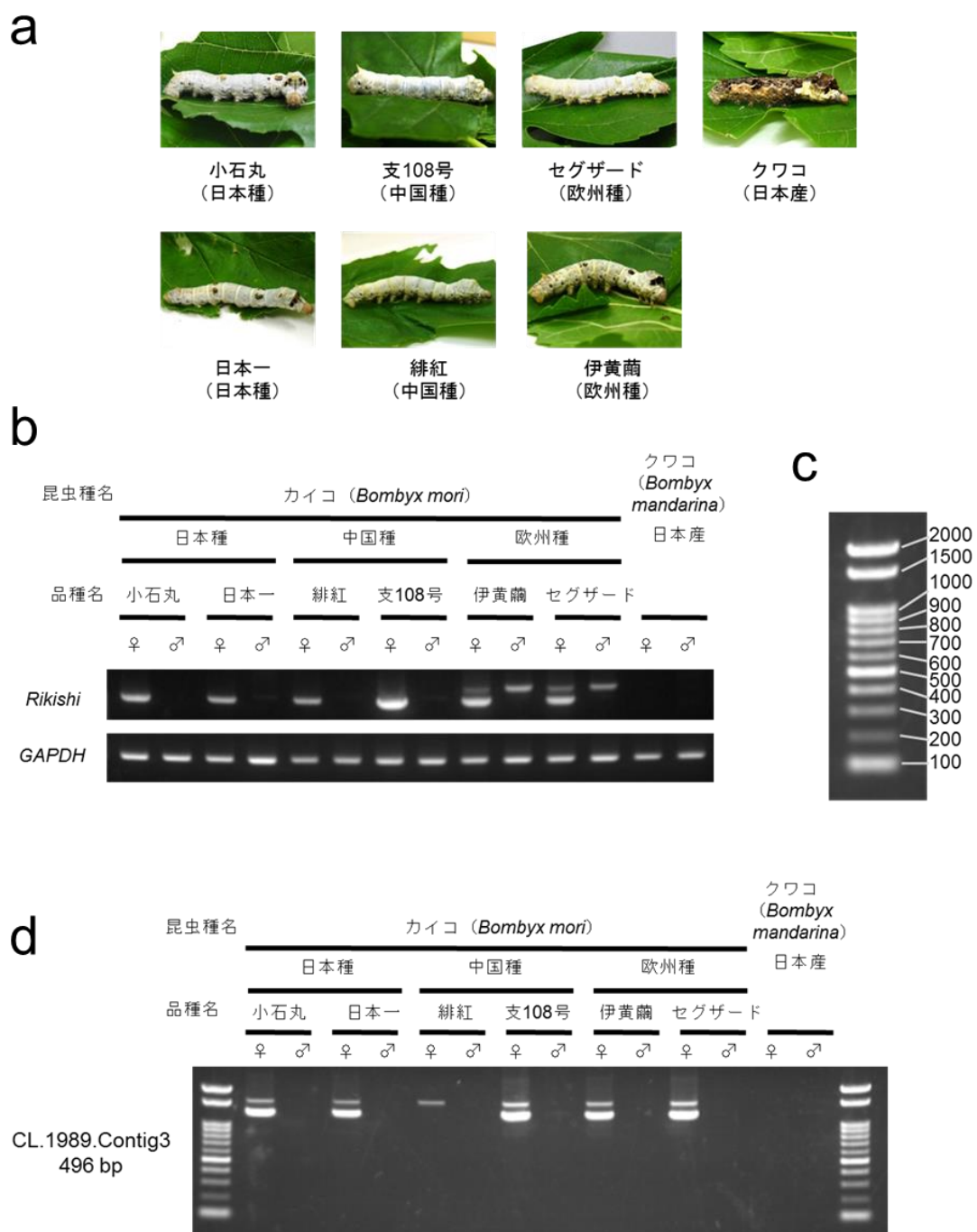
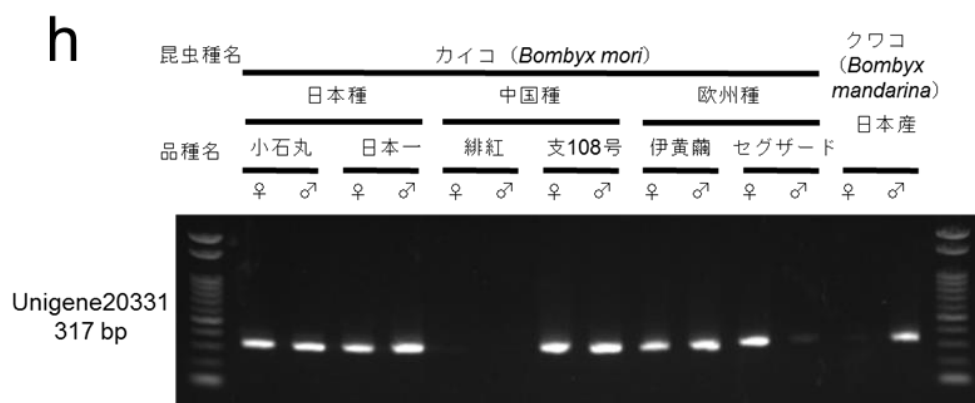
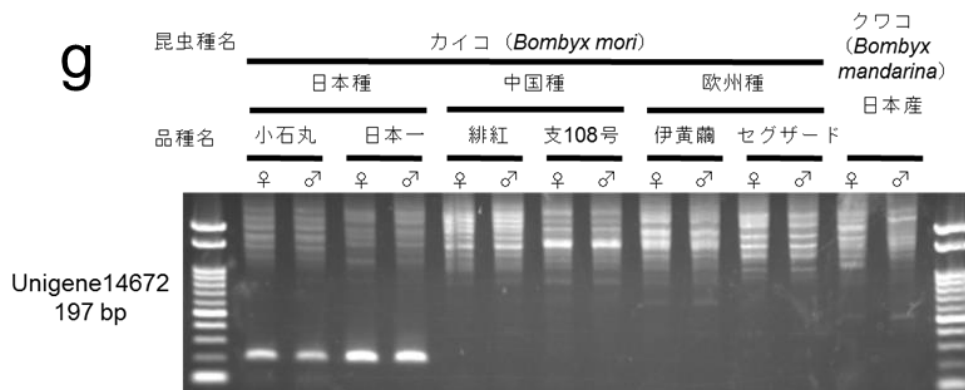
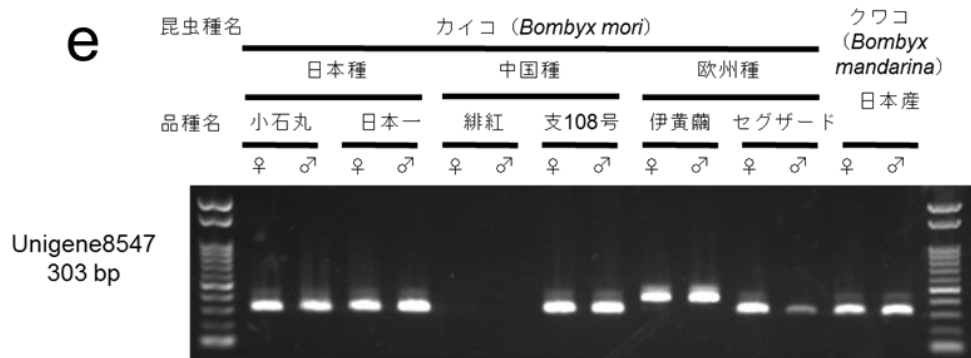
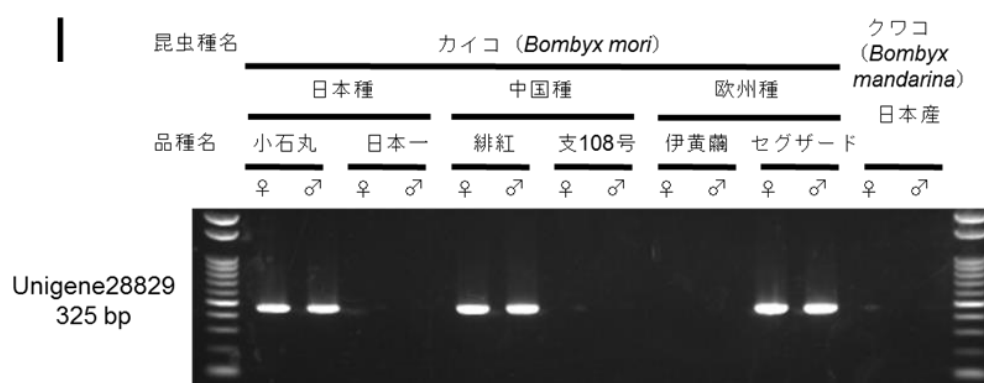
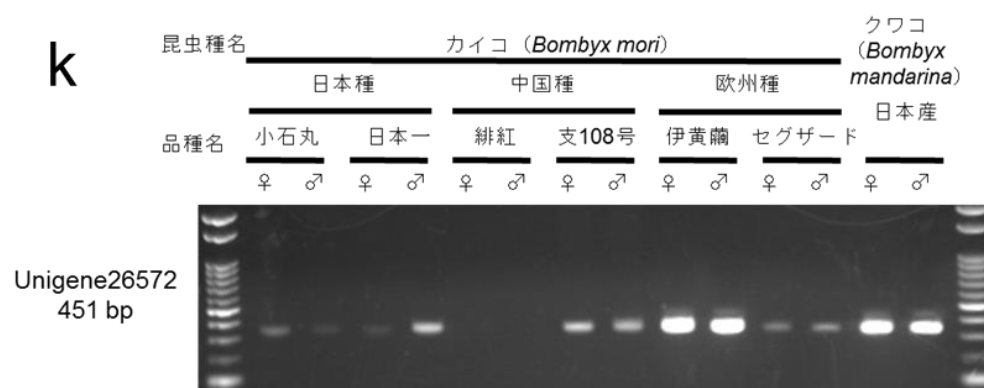
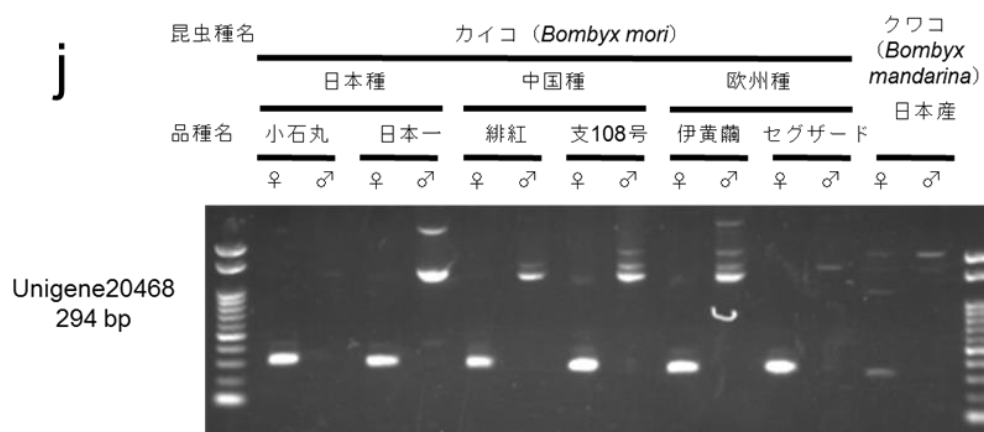
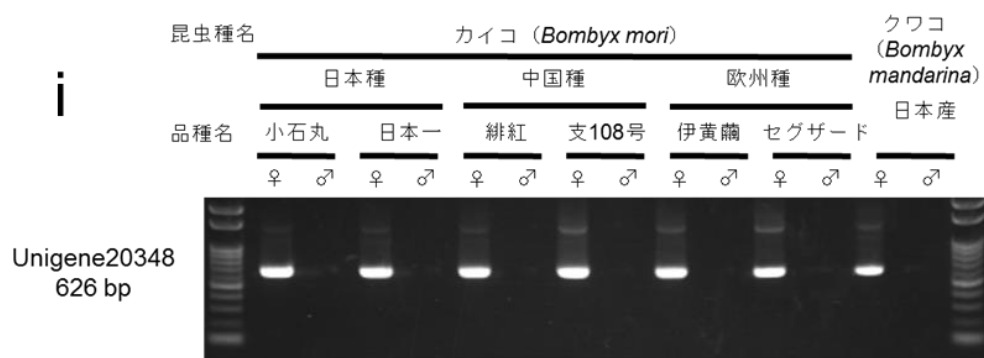


図 2-1. S-2 系統の特徴

(a) S-2 系統の融合染色体と第五染色体。S-2 系統の W 染色体（赤線）には、第二染色体の一部（緑線）と第五染色体（青線）が融合している。雌では劣勢赤眼赤卵遺伝子 (re) がヘテロ ($+re/re$) となり、雄ではホモ (re/re) となる。(b) S-2 系統の雌の成虫眼色。S-2 系統の雌では、遺伝子型が $re/+$ となるため雌の眼色は正常型（黒色）となる。(c) S-2 系統の雄では、遺伝子型が re/re となるため雄の眼色は赤眼となる。(d) S-2 系統の卵。黒い卵は雌（黒矢印）、赤い卵は雄（赤矢印）である。S-2 系統の雄は re 遺伝子をホモでもつため赤卵となる。この系統では未受精卵や発生が停止した卵は未着色卵（黄色矢印）として識別できる。(e) S-2 系統の幼虫。S-2 系統の W 染色体には、 p^B （黒色蚕）遺伝子を含む第二染色体領域が転座しているため雌幼虫は黒色に、雄幼虫は正常体色となる。







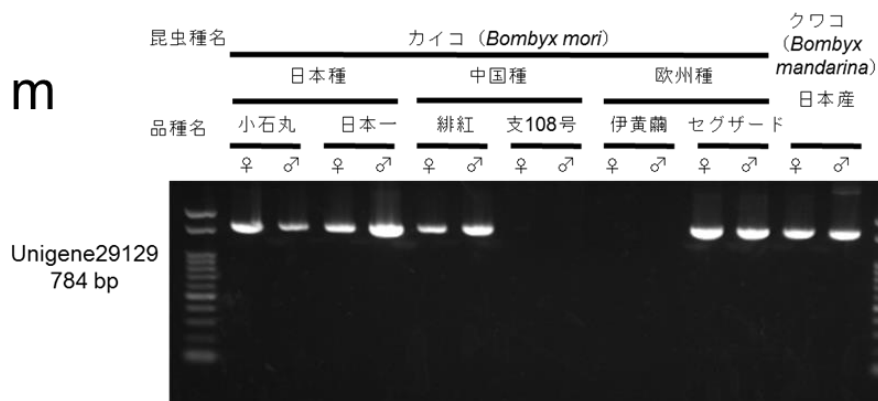


図 2-2. W 染色体に座乗する遺伝子の候補として選び出された 10 個の unigene に関してカイコの複数の系統とクワコ由来のゲノム DNA を鋳型に用いたゲノム PCR の結果

(a) ゲノム PCR に供試したカイコの複数の系統と日本産のクワコ。(b) カイコ W 染色体特異的 DNA マーカーである Rikishi (Abe et al., 2005) と PCR の増幅コントロールとして用いた *GAPDH* のゲノム PCR の結果。PCR 産物はエチジウムブロマイド (1 µg/mL) を含む 1.0% アガロースゲル電気泳動により分離した。(c) 電気泳動の際に使用した DNA サイズマーカーの各バンドのサイズ。(d~m) W 染色体に座乗する遺伝子の候補として選び出された 10 個の unigene に関してゲノム PCR を行った。各 unigene の増幅に用いたプライマーの配列は表 2-1 に示した。電気泳動写真の左側に示した DNA サイズは、PCR 反応によって増幅された各 unigene の予想サイズを示している。アガロースゲルの左右両端のレーンに (c) に示した DNA サイズマーカーを泳動した。各 PCR 産物はエチジウムブロマイド (1 µg/mL) を含む 1.0% アガロースゲル電気泳動により分離した。

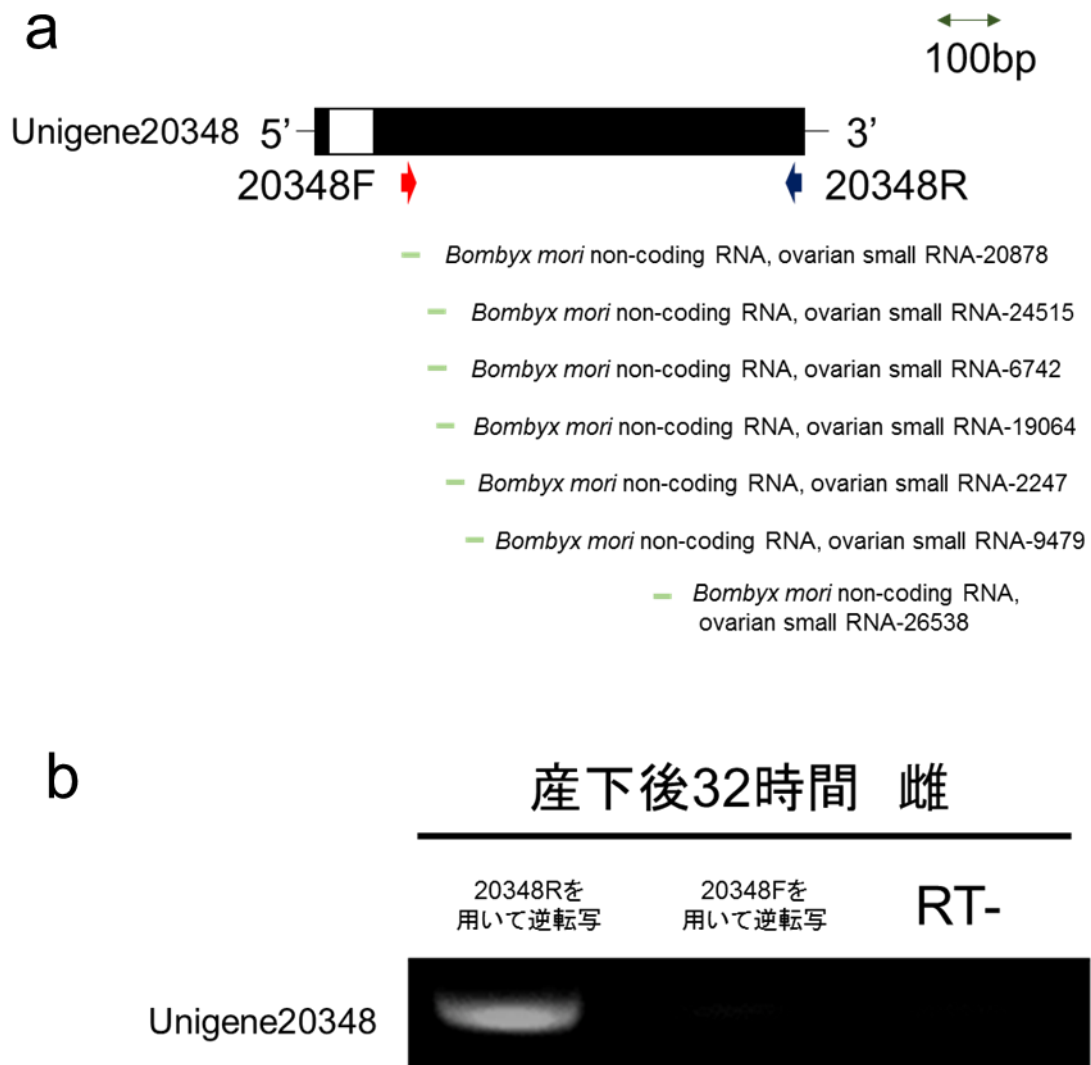


図 2-3. Unigene20348 の構造と転写方向の確認

(a) Unigene20348 の構造。黒色のボックスは、*de novo* トランスクリプトーム解析で示された転写産物を、白色のボックスは予想される最大の ORF を示す。矢印はプライマー 20348F と 20348R の位置を示す。緑色の線は相同性を示した piRNA を示す。(b) Unigene20348 の転写産物の向きを確認するため、産下後 32 時間の雌の卵から total RNA を抽出し、(a) に示した 20348R 並びに 20348F を用いた逆転写により得られた cDNA を鋳型に PCR を行った。逆転写反応を行っていない total RNA を鋳型に PCR を行ったものを RT- とした。20348R を用いて逆転写を行った場合に増幅産物が得られたことから、Unigene20348 の転写産物の向きは (a) で示した通りとなる。

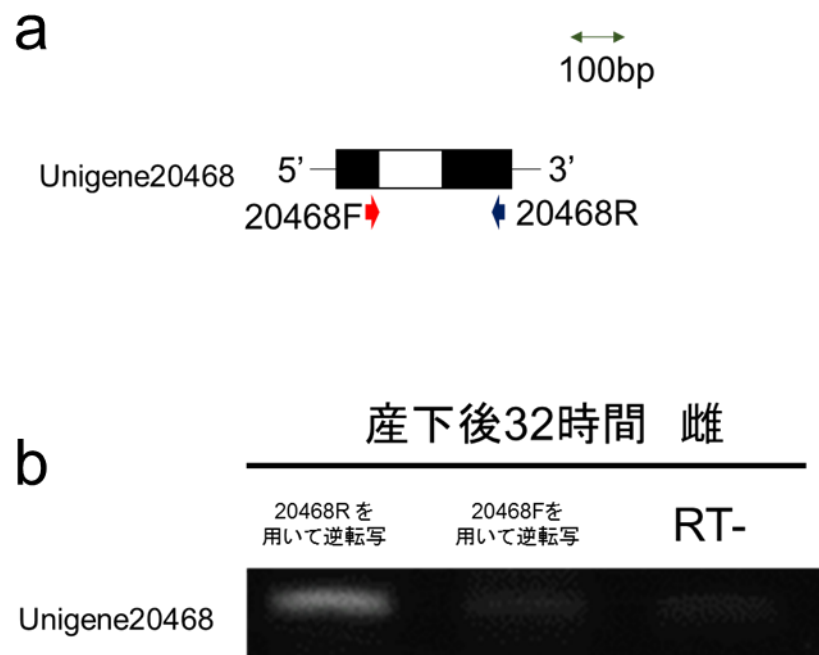


図 2-4. Unigene20468 の構造と転写方向の確認

(a) Unigene20468 の構造。黒色のボックスは、*de novo* トランスクリプトーム解析で示された転写産物を、白色のボックスは予想される最大の ORF を示す。矢印はプライマー 20468F と 20468R の位置を示す。(b) Unigene20468 の転写産物の向きを確認するため、産下後 32 時間の雌の卵から total RNA を抽出し、(a) に示した 20468R 並びに 20468F を用いた逆転写により得られた cDNA を鋳型に PCR を行った。逆転写反応を行っていない total RNA を鋳型に PCR を行ったものを RT- とした。20468R を用いて逆転写を行った場合に増幅産物が得られたことから、Unigene20468 の転写産物の向きは (a) で示した通りとなる。

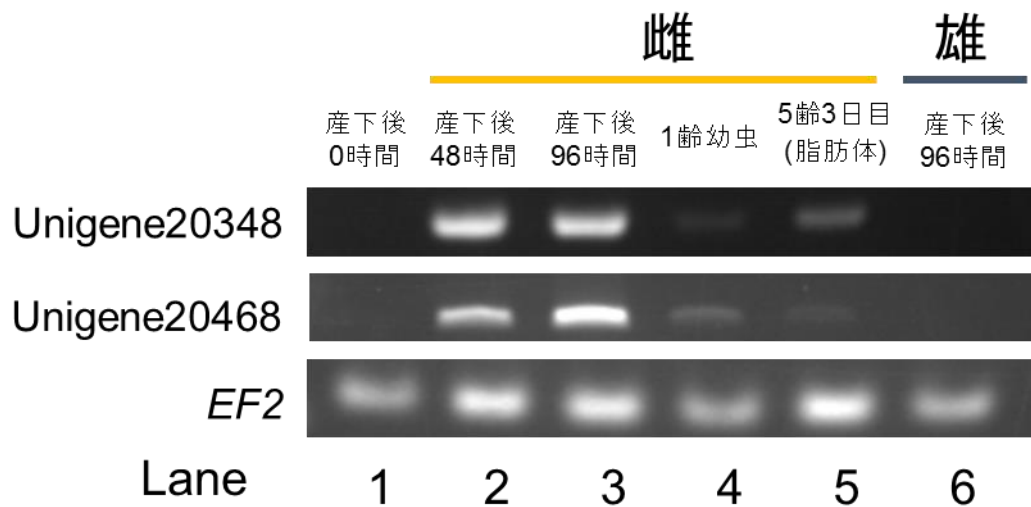


図 2-5. Unigene20348, Unigene20468 の発現パターン

(a) 産下後 0 時間、産下後 48 時間、産下後 96 時間、1 齢幼虫、5 齢幼虫の脂肪体における Unigene20348, Unigene20468 の発現パターンを RT-PCR によって調べた。産下後 0 時間は、産下後 30 分以内の卵を 10 粒混合したのち抽出した total RNA を逆転写反応に用いた。産下後 48 時間、96 時間は、産下後それぞれの時間に関して、S-2 系統を用いて卵色による雌雄鑑別を行い、10 粒混合して抽出した total RNA を逆転写反応に用いた。1 齢幼虫は産下後 96 時間の時点で卵色によって雌雄鑑別した卵を孵化後間もなく回収し、5 頭混合して抽出した total RNA を逆転写反応に用いた。5 齢 3 日目 (脂肪体) は、5 齢 3 日目幼虫の雌個体 1 頭から摘出した脂肪体から抽出した total RNA を逆転写反応に用いた。プライマーと PCR の条件は表 2-1 に示した。

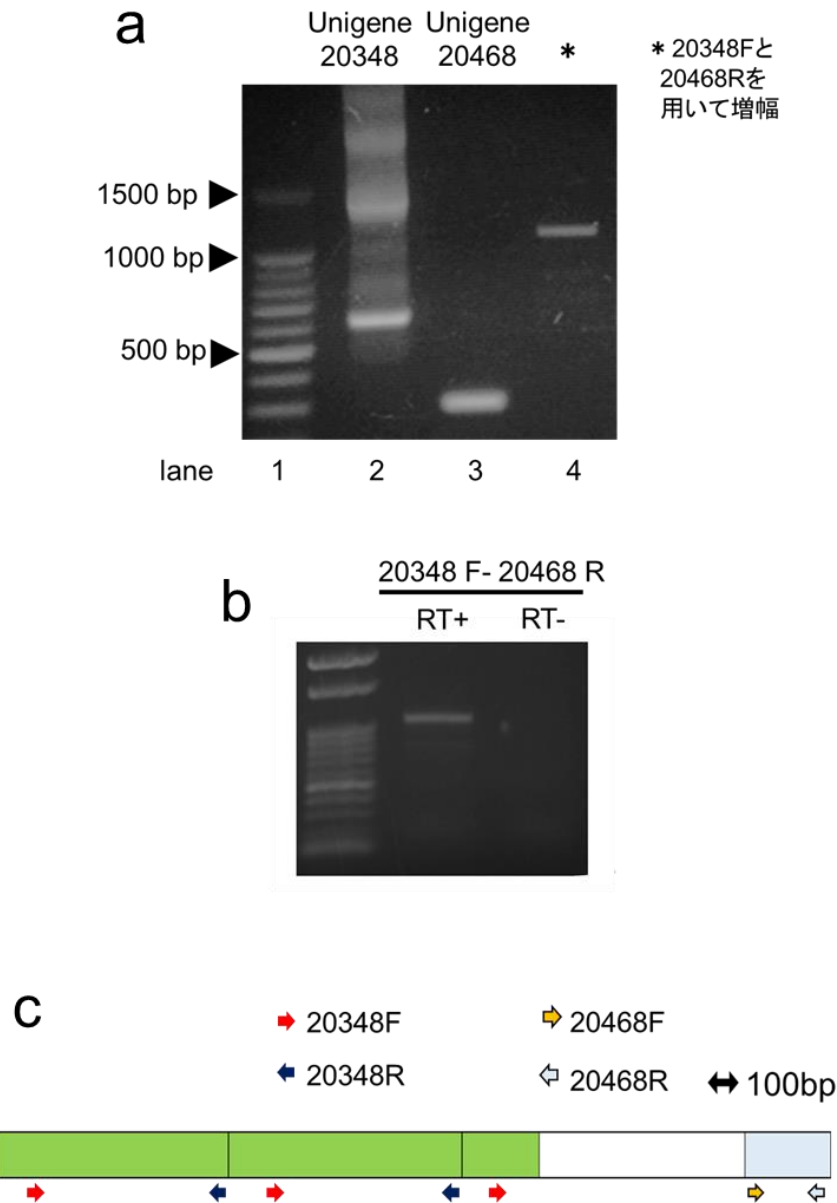


図 2-6. Unigene20348 と Unigene20468 の関係

(a) 産下後 48 時間の雌由来の cDNA を鋳型に (c) で図示したプライマーを用いて PCR を行った。Unigene20348 の増幅には 20348F と 20348R を用い、Unigene20468 の増幅には 20468F と 20468R を用いた。また、20348F と 20468R を用いて PCR を行ったところ lane 4 で示したように、増幅産物が得られた。(b) 産下後 48 時間の雌から調製した cDNA を鋳型に 20348F、20468R を用いて PCR を行った。逆転写反応を行っていない total RNA を鋳型に PCR を行ったものを RT-とした。(c) RT-PCR の結果から予想された Unigene20348 と Unigene20468 の塩基配列を含む遺伝子の構造。Unigene20348 の塩基配列を緑のボックスで、Unigene20468 の塩基配列を水色のボックスで示した。

5' - CCTCTTTTGTCAATTCATAAAGTCATTCAGTGTAGTCAAATTCCTGCAATAACTTTAAT
 GTTGCCTTTGCTAATTTGATGTGCAATTTAGGGAACCTCAAACCAATATATCCTTGGTAA
 GTGTTTTTTTAAAATATACTTCACAATATTTTTCTTGATTGGTCAAGAGCTTCTCTCTTG
 GCATTTGAATATCTGATTCTCAGACTTTTTTCAGTGCACATTTTCATCTAAACAACAAT
 GCATCGTGTGGATTGGTTCTGATGCATTAGAAATCATGGTTGTTGTGGCACCTGATAATA
 CCCAGCCTAAGGTTGTTGCTTGGGCTAGAGTACCGTGCCCTTTTTGTCAATTCATAAAG
 CTGACCTTGCATGATACCATCCCTCATTACTTGGCTGTACTATTTTGACCCCAATAAGAT
 GTCAATATTATTGGAAGTGTGGTAATGTGGATCAGCTAAGGTTAAATCCTTCAGTTCTTT
 CCAGTCTACTAATTCAACTTTACTCGCTGGAAGCATTGATGTGAAGCACTTAAGGACAT
 AGGCTCTTACTGATATGTTGACATTTGGGTAGATTGAGACTTGATTTTTATGATTACCG
 CTGCCTTTGAGATTAAGCCCTTTGGTTTGCCTAATCCACTAATTTGTTTGTGTTGGTA
 TCTTTTTTCAGACCTAAGTATTGTACCGTTGCTTCGGTGACAAATGAACCTTGAGAACCCT
 GATCAAGAAGTTCTCGGATTATATGATCCGACCATTCGGCCATGCCTCGACCGAGCCTT
 TACTAACGCTGTAGCTAGTAGTACTTGTGTACCTTTTCTGTTGAAAAGCATGAAACAAG
 TGGTGTGGATCAGATAACGAGATGGAGTCCTCTTTTAGACTAGTTTTTTTGACCACCTT
 CAGCTATACTGTTACCCATTGTGGGGTGAAAGAGAGTATGATGGTTTCGATTACACTCCT
 TGCATTTAAAGCGAGTTAACTTGCACTCCTTTATAGAGTGATTTGCTCCTAGACAGTTAA
 AACAAATGTTATTTTTTCATAACGAAGTTGCGCCGATTATCCACCGTTGTTTGTGGAAA
 TTGTTGCATGCCTCCTTGCATCGGTTTCCTCATT - 3'

図 2-7. 20348F と 20468R を用いて得られた増幅産物の塩基配列

産下後 48 時間の雌から調製した cDNA を鋳型に 20348F、20468R を用いて増幅された転写産物の塩基配列。Unigene20348 に相当する配列を緑文字で、Unigene20468 に相当する配列を水色文字で示した。

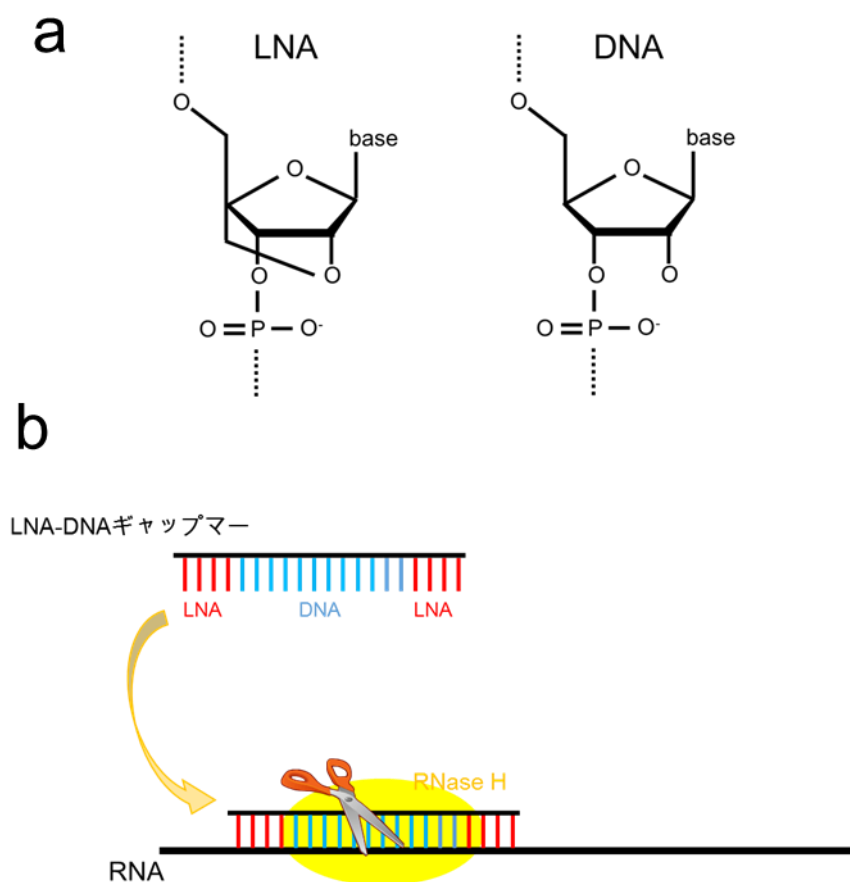
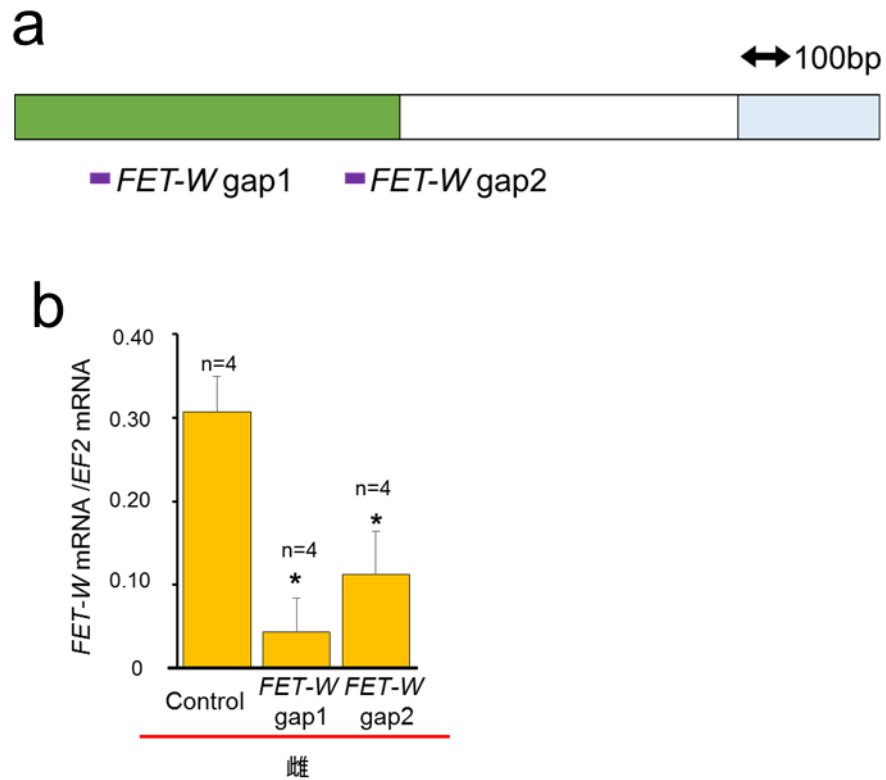


図 2-8. LNA-DNA ギャップマーの構造とそれを用いたノックダウンの原理

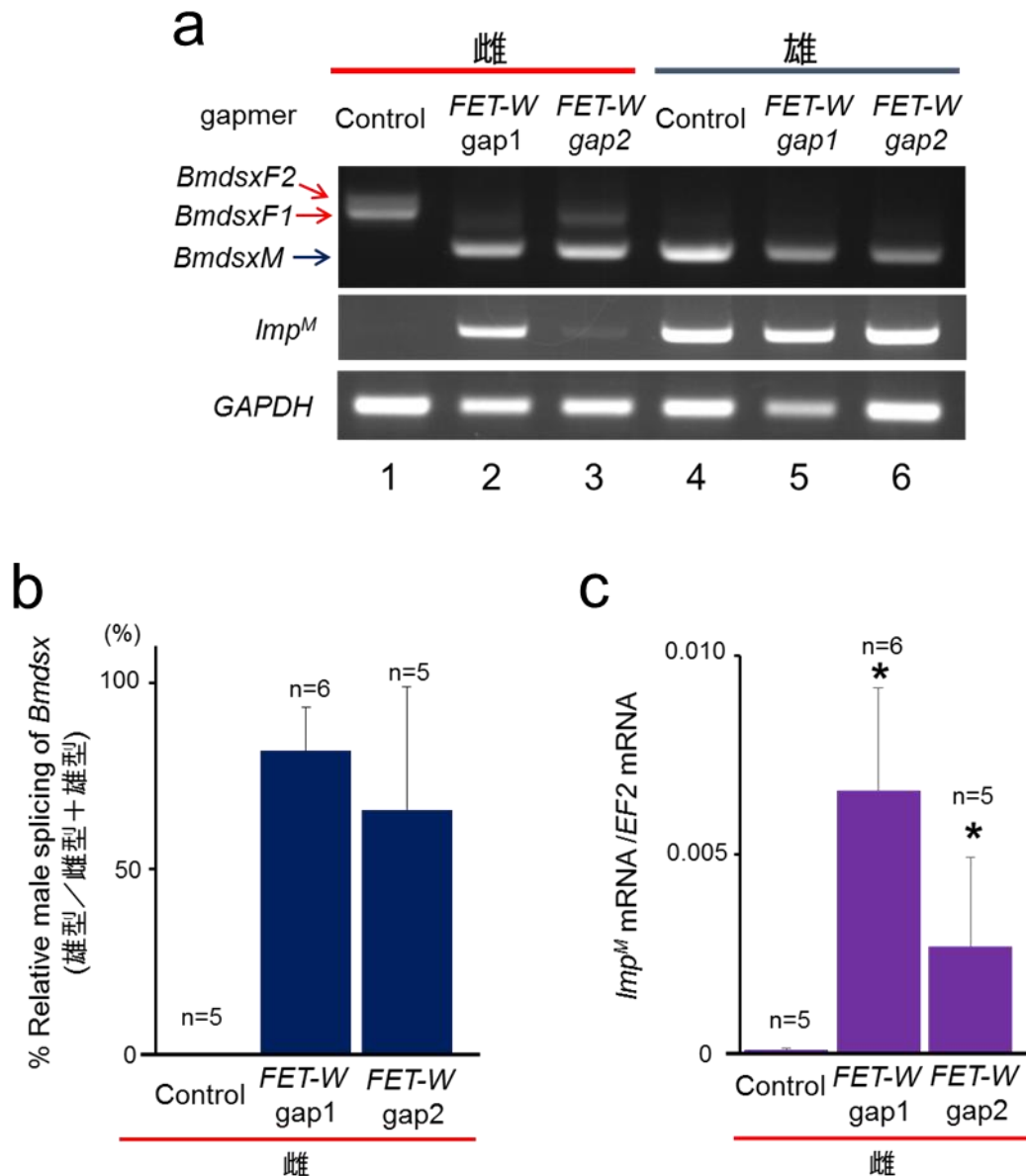
(a) Locked Nucleic Acid (LNA) の構造。LNA はリボース環の 2' 位の酸素原子と、4' 位の炭素原子がメチレン架橋されている。(b) LNA-DNA ギャップマーを用いたノックダウンの原理。本実験で用いた LNA-DNA ギャップマーの長さは 18 塩基であり、10 塩基の DNA が左右両端それぞれ 4 塩基の LNA によって挟まれた構造をもつ。LNA は RNA に対して高い結合親和性をもつため、LNA-DNA ギャップマーが、相補的な塩基配列をもつ標的 RNA に結合する。DNA-RNA ハイブリット鎖は、内在性の RNaseH によって認識され、RNA 鎖が切断を受けた後、分解される。



(Sakai et al., 2015 を改変)

図 2-9. LNA-DNA ギャップマーを用いた *FET-W* のノックダウン

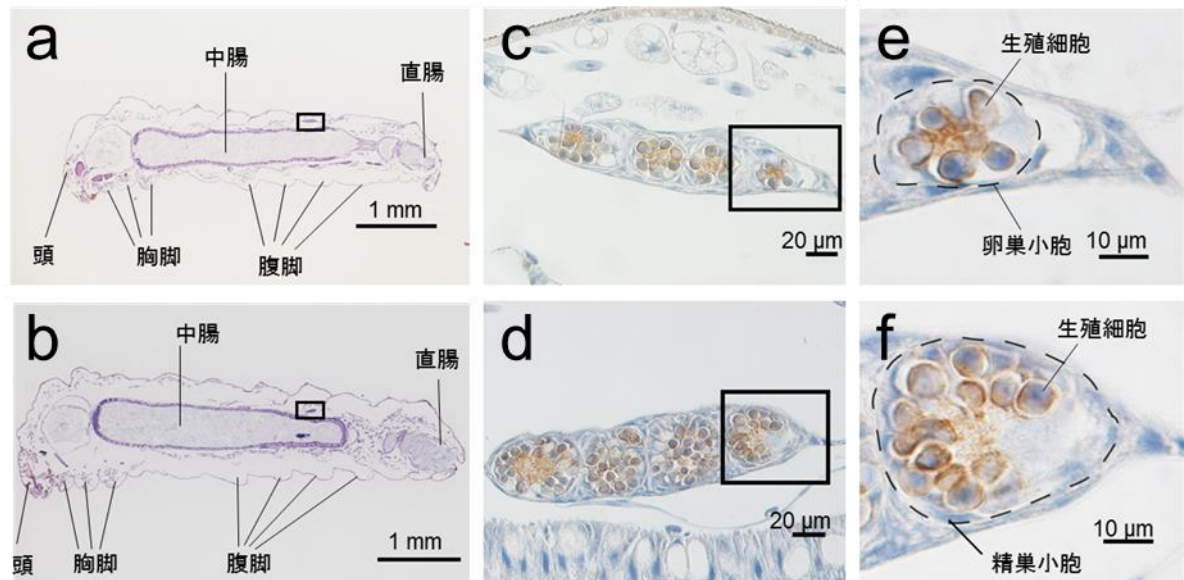
(a) *FET-W* を標的とする 2 種類の LNA-DNA gapmer、*FET-W* gap1、*FET-W* gap2 を設計した。Unigene20348 の塩基配列を緑色、Unigene20348 の塩基配列を水色のボックスで示した。それぞれのキャップマーの位置を青の直線で示した。(b) LNA-DNA ギャップマーを注射した雌の卵における *FET-W* の mRNA 量を qRT-PCR により定量した結果。* student t-test で control と比較して有意差あり ($p < 0.05$)。エラーバーは標準偏差を示す。



(Sakai et al., 2015 を改変)

図 2-10. FET-W のノックダウンが *Bmdsx* と *Imp*^M の性特異的発現に及ぼす影響

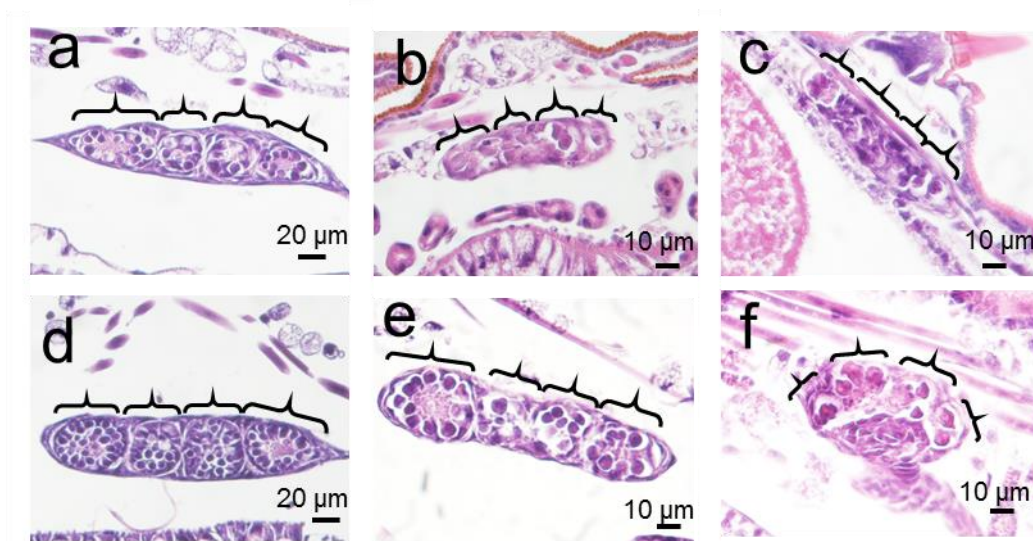
(a) LNA-DNA ギャップマーを顕微注入した卵における *Bmdsx*、*Imp*^M の発現を RT-PCR によって調べた。内部標準として GAPDH を同一の手法により増幅した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*Bmdsx*F1 並びに *Bmdsx*F2)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*Bmdsx*M) のサイズを表している。(b) 雄型 *Bmdsx* の定量解析。RT-PCR の結果、電気泳動像において得られた雄型 *Bmdsx* (*Bmdsx*M)、雌型 *Bmdsx* (*Bmdsx*F1、*Bmdsx*F2) に相当する DNA バンドのシグナル強度を、Image J によって定量し、雄型 *Bmdsx* のシグナル強度を、雌型 *Bmdsx* と雄型 *Bmdsx* のシグナル強度の合計値で割った値をグラフで示した。n は調査したサンプル数を示す。(c) *Imp*^M の発現レベルを qRT-PCR によって定量した。* student t-test で control と比較して有意差あり ($p < 0.05$)。エラーバーは標準偏差を示す。



(Sakai et al., 2016a を改変)

図 2-11. 組織切片による生殖巣の観察

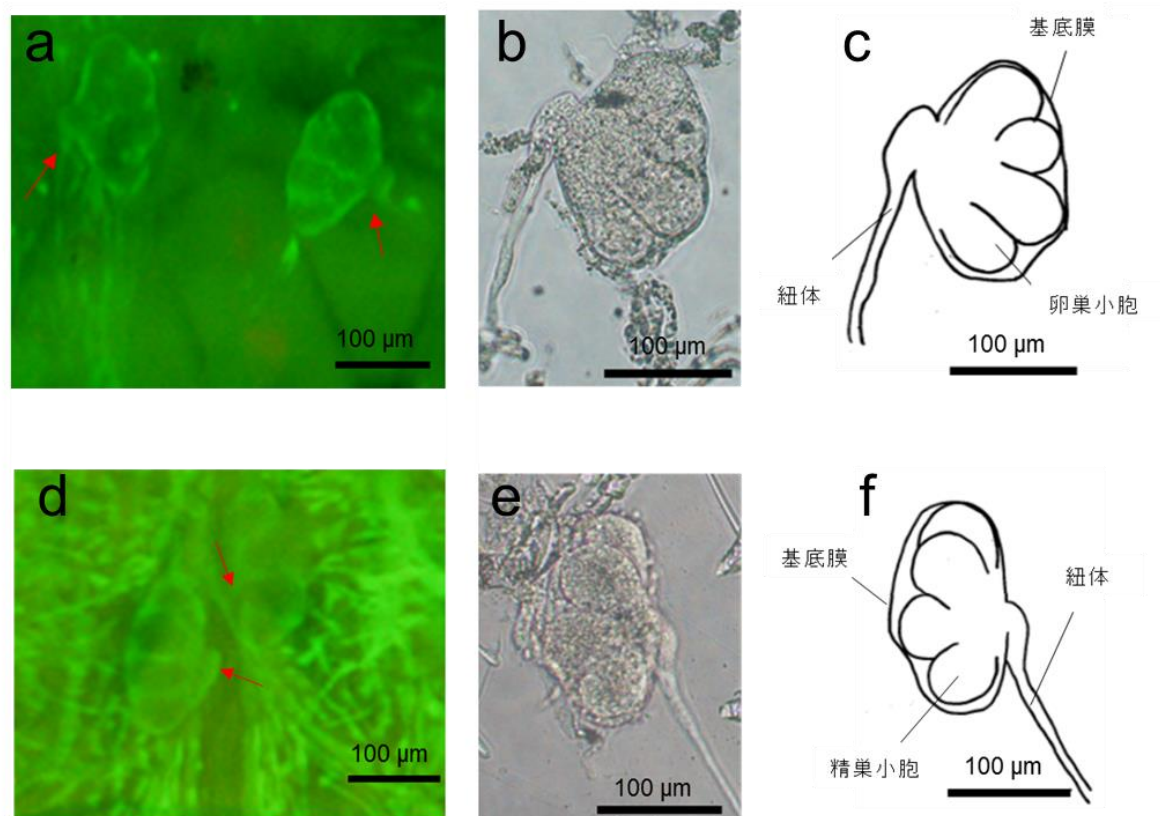
(a, b) 孵化 1 日目 1 齢幼虫の組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色によって観察した。生殖巣だと考えられた組織を黒四角で囲んだ。(a) 雌。(b) 雄。(c, d) 生殖巣だと考えられた組織を抗 BmVLG 抗体によって免疫染色し観察した。茶色く染色された部分が BmVLG の局在を示す。(c) 卵巣。(d) 精巣。(e) (c) の黒四角で囲んだ部分を拡大した。(f) (d) の黒四角で囲んだ部分を拡大した。



(Sakai et al., 2016a を改変)

図 2-12. 1 齢幼虫、催青Ⅱ期胚子、点青Ⅱ期胚子の生殖巣の組織切片

(a) 孵化 1 日目 1 齢幼虫の卵巢。(b) 催青Ⅱ期（孵化 1 日前に相当するステージ）の卵巢。(c) 点青Ⅱ期（孵化 3 日前に相当するステージ）胚子の卵巢。(d) 孵化 1 日目 1 齢幼虫の精巢。(e) 催青Ⅱ期（孵化 1 日前に相当するステージ）の精巢。(f) 点青Ⅱ期（孵化 3 日前に相当するステージ）胚子の精巢。卵巢小胞、精巢小胞の大まかな位置を波括弧で示した。



(Sakai et al., 2016a を改変)

図 2-13. 1 齢幼虫の生殖巣

(a) 孵化 2 日目 1 齢幼虫の卵巢。紐体の接続位置を赤矢印で示した。(b) 孵化 2 日目 1 齢幼虫の卵巢を位相差顕微鏡によって観察した。(c) (b) で観察された卵巢の模式図。(d) 孵化 2 日目 1 齢幼虫の精巢。紐体の接続位置を赤矢印で示した。(e) 孵化 2 日目 1 齢幼虫の精巢を位相差顕微鏡によって観察した。(f) (e) で観察された精巢の模式図。

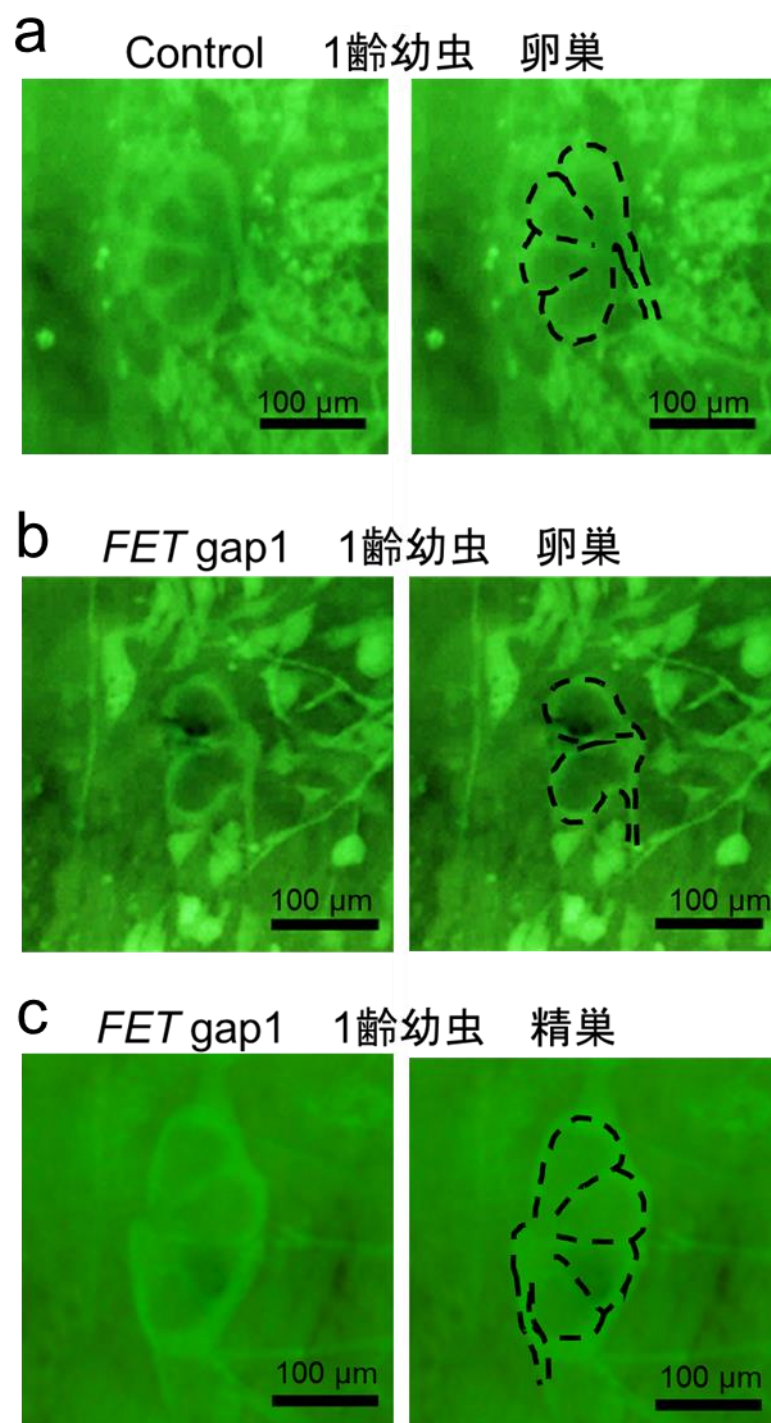


図 2-14. *FET-W* ノックダウンが卵巢の形態に及ぼす影響

(a) コントロール LNA-DNA ギャップマーを注射した卵から孵化した 1 齡幼虫雌の卵巢。
 (b) *FET gap1* を注射した卵から孵化した 1 齡幼虫雌の卵巢。(c) *FET gap1* を注射した卵から孵化した 1 齡幼虫雄の精巢。左の写真において観察された生殖巣を右の写真において点線で図示した。

表2-1. PCRに用いたプライマーの配列（第二章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')	Denaturation	Annealing	Elongation	n°cycle
<i>Bmdsx</i>	FDSX-F2 FDSX-R4	CGCCTTACCGCAGACAGGCAG GCGCAGTGTGTCGCTACAAGG	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
<i>Imp^M</i>	BmIMP-F BmIMP-R	ATGGACGGTGACATGTCTCAAG TCATCCCGCCTCAGACGATTG	98°C10sec	55°C30sec	72°C60sec	30
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F GAPDH-R	CATGAACAGTAGTCATCAAGC GCCGCATTGGCCGTTTGTGC	98°C10sec	55°C30sec	72°C60sec	26
Rikishi	RikishiA1 RikishiB2	GGCGATGCTGTGTACCCAGAATGT GTTCTCTGCGATGGGTGGACATA	98°C10sec	55°C30sec	72°C60sec	30
EF2	EF2F EF2R	TCGTACCGTGAGACCGTAGCT ATGTCCTCTGGCAGACCATCA	98°C10sec	55°C30sec	72°C60sec	30
CL 1989 contig3	CL1989R1 CL1989F1	GATAAGGAGTTCCTTTCGCTTG CTCAGCATTATATACTTACAG	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene8547	8547F1 8547R1	GTGCGAAATTATAATCTAATATG TGGCTTACAATACTTCCTTCC	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene11202	11202F1 11202R1	GTCAAATTTTGTACCATTTGTG ACGTATTAAAAACCAAGACC	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene14672	U14672F1 U14672R1	GAAGTCTGCCGGTTCAGATAG CAGATAACAATATCGGCTATAG	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene20331	20331F1 20331R1	ACATTTGCTATACAAACAGGG CGCACTAAAATAAACCCATTC	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene20348	20348F1 20348R1	CCTCTTTTTGTCAATTCATAAAG CGCGAACTAATAAAGTTTAGC	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene20468	20468F1 20468R1	TGTTGAAAAGCATGAAACAAG AATGAGGAAACCGATGCAAGG	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene26572	U26572F1 U26572R1	CAATAGCTTAAAAAAGTCGAG GATTTCAAGTTTCCGTGTATC	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene28829	U28829F1 U28829R1	GTCGCTACATATTAACAAAGC AAGATCCATTATAAAGTCCAC	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35
Unigene29129	29129F1 29129R1	GAAGTCTGTGCTGCTTTATAC CCGTCCTTCTCAGACCTCCTAG	98°C10sec	57°C30sec	72°C60sec	35

表2-2. qRT-PCRに用いたプライマーの配列（第二章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')
<i>FET-W</i>	FemQ-F	TGGTTTATACAATCGATCCACTG
(<i>Fem</i>)	FemQ-R	CTGACTCACTTAAATTCGATCTC
<i>Imp^M</i>	BmIMPE7-F BmIMP-R	ATGCGGGAAGAAGGTTTATG TCATCCCGCCTCAGACGATTG

表2-3. LNA-DNAギャップマーの配列

LNA-DNA gapmers	Sequence (5'→3')
Fem gap1	aattGACAAAAAGagta
Fem gap2	gataAT AAACAAAAtgc

小文字はLNAの部分を示す

"c"は通常のシトシンではなく、メチルシトシンである。

第三章

序論

前章において同定された *Fem* の分子機構の詳細な解析は勝間らのグループによって行われた。勝間らが明らかにした *Fem* の機能について図 3-1、3-2 で示す。カイコの W 染色体には、12 種類の W 染色体特異的 PCR マーカーがマップされているが、阿部らは X 線照射により W 染色体切断を誘発し、12 種類の W 染色体特異的 PCR マーカーのうち、1 個のマーカー（Rikishi マーカー）だけをもつ断片化した W 染色体保有系統を作出した（Abe et al., 2008）。この系統では正常な雌が生まれることから、断片化した W 染色体の中にカイコの雌決定領域が存在することが明らかとなった（Abe et al., 2008）。*Fem* はマルチコピー遺伝子で 30~50 コピーの遺伝子がタンデムに並んだ状態で W 染色体の雌決定領域に存在する。*Fem* から転写された *Fem* mRNA は small RNA の一種である piRNA の前駆体として働き、PIWI タンパク質の一種である Siwi と複合体を形成し *Fem*-piRNA となる。この *Fem*-piRNA は Z 染色体上の新規遺伝子 *Masc* (*Masculinizer*) 由来の mRNA を分解する（Kiuchi et al., 2014）。*Masc* をノックダウンすると雄で *Bmdsx* の雌型スプライシングが誘導されることから、*Masc* はカイコの雄化に関わることが予想されている。しかし、*Masc* がどのように *Bmdsx* の雄型スプライシングを誘導しているのかは明らかとされていない。*Bmdsx* の雄型のスプライシングには雌雄両方で発現している *BmPSI* と、雄特異的に発現する *Imp^M* が関与することが明らかとなっている（Suzuki et al., 2010）。これらのタンパク質は複合体を形成し、*Bmdsx* の第 4 エクソンの 5' 端から 15~34nt の領域に存在する CE1 と呼ばれるシスエレメントに結合し、雄において雌型スプライシングを抑制する。以上のことから、*Masc* が *Imp^M* の雄特異的な発現を引き起こし、それによって *Bmdsx* の雄型のスプライシングが誘導されるのではないかと考えた。そこで本章では *Fem*、*Masc*、*Imp^M* の関係を明らかにするため、個々の遺伝子の発現解析を行うと共に、それぞれの遺伝子のノックダウンが他の遺伝子の発現パターンに及ぼす影響を調べることにした。

材料・方法

供試蚕

カイコの飼育は $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明期－8 時間暗期の条件下の部屋で行った。発生中の卵は湿度が十分に足りたプラスチックの容器内に保存し、幼虫の飼育には人工飼料（日本農産工製シルクメイト）を使用した。実験には、前章で使った S-2 系統（図 2-1）を用いた。

RNA の抽出

カイコ卵からの RNA 抽出は、ISOGEN（ニッポン・ジーン）を使用し、鈴木ら（2012）の方法にしたがって行った（Suzuki et al., 2012）。

RT-PCR

逆転写反応による cDNA 合成には PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ）を用い添付マニュアルの手順にしたがった。逆転写反応の鋳型には、1 μg の total RNA もしくは、卵 1 粒から抽出した全量の total RNA を使用し、逆転写反応の際には cDNA Synthesis Kit に添付されている random hexamer プライマーを使用した。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ）を使用し、添付マニュアルにしたがった。使用したプライマーの配列と PCR の条件は表 3-1 に示した。得られた反応産物はエチジウム（0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含む 1%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、電気泳動像は E-Shot（ATTO）を用いて撮影した。

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量は、Suzuki ら（2012）の方法にしたがった（Suzuki et al., 2012）。PCR 反応に用いたプライマーの塩基配列は表 3-2 に示した。内部標準に用いた *EF2* 遺伝子の増幅には、Koike ら（2003）の用いたプライマーを使用した（Koike et al., 2003）。

卵へのインジェクション

インジェクションの方法と卵の回収は、鈴木ら（2012）の方法にしたがった（Suzuki et al., 2012）。LNA-DNA ギャップマーを用いた *Fem* (*FET-W*) のノックダウンは第二章と同様の方法で行った。siRNA による *Masc* のノックダウンは、木内ら（Kiuchi et al., 2014）

で用いられた 2 種類の siRNA を用いた。siRNA の negative control は、Silencer negative control #1 siRNA (Ambion) を用いた。50 μ M の siRNA をインジェクションした。

結果

性決定時期における *Fem*、*Masc*、*Imp^M* の遺伝子発現パターン

Fem、*Masc* の遺伝的相互関係についての理解を深める目的で、第一章で性決定時期と予想された胚発生初期におけるこれらの遺伝子の発現動態を qRT-PCR によって詳しく調べることにした。その結果、*Fem* は雌で産下後 12 時間の分割期以降に発現レベルが上昇し、産下後 36 時間のへら形期で発現がピークに達することがわかった（図 3-3a 赤線）。一方、*Masc* は雌において産下後 24 時間まで発現するものの、*Fem* の発現上昇とともに急激に減少した（図 3-3a 青線）。雄における *Masc* の発現は、産下後 24 時間以降、雌で観測されたような急激な減少を示すことはなく、*Bmdsx* の発現が雄型に安定した産下後 36 時間以降においても雌に比べ約 5~6 倍高い値で持続的に発現していた（図 3-3b 青線）。*Imp^M* は、産下後 24 時間あたりまで雌雄両方で同程度の低いレベルの発現を示したが、雌ではその後発現しなくなり（図 3-3a 紫線）、雄では急激に上昇した（図 3-3b 紫線）。産下後 36 時間には *Imp^M* の発現量は雄においてピークに達し、同時期の雌に比べ約 45 倍高い発現量を示した。産下後 24 時間から 32 時間の間に *Masc*、*Imp^M*、*Bmdsx* の発現パターンが雌雄に分かれた。この時間の実際の発生ステージを確認するため胚子を卵から生体解剖しステージングを行った（図 3-4）ところ、産下後 24 時間から 32 時間はだるま形期からへら形期に相当した。このステージは胚帯形成後から体節の形成が始まる前に対応する。よって、カイコの性決定は胚帯形成後から体節形成前までの間に行われると予想される。

Fem のノックダウンが *Masc* の発現に及ぼす影響

木内らの報告によって *Fem* から供給される *Fem*-piRNA が *Masc* mRNA を標的にしていることが明らかとなっている（Kiuchi et al., 2014）が、*Fem* 自体のノックダウンが *Masc* の発現量に影響を与えるのかという点については確認されていなかった。そこで、第二章で用いた *FET-W gap1*、*FET-W gap2* の LNA-DNA ギャップマーを顕微注入した雌卵における *Masc* の発現を qRT-PCR によって定量した。その結果、コントロールギャップマーを顕微注入した雌個体と比較して、*FET-W gap1*、*FET-W gap2* を顕微注入した雌個体において、*Masc* の発現レベルが有意に増加した（図 3-5）。特に *FET-W gap1* を顕微注入した雌では、*Masc* の発現がコントロールに比べて約 2.5 倍高い値を示した。この結果は、木内らが行った *Fem*-piRNA 機能阻害実験の結果とほぼ一致する（Kiuch et al., 2014）。以上のように、*Fem* (*FET-W*) のノックダウンにより *Masc* の発現レベルが上昇したことから、*Fem* は *Masc* の発現を抑制する機能をもつ

と考えられる。また、*Fem* 自体をノックダウンした場合に得られた結果と、*Fem*-piRNA をノックダウンした先行研究の結果が一致したことから、*Fem*-piRNA の供給源は確かに *Fem* 遺伝子であることが明らかとなった。

Masc のノックダウンが *Imp^M* の発現に及ぼす影響

第二章で述べたように、*Fem* (*FET-W*) のノックダウンが雌における *Imp^M* の発現を誘導した (図 2-10c) ことから、*Fem* は直接もしくは間接的に *Imp^M* の発現を抑制することが明らかとなった。*Fem*-piRNA は *Masc* mRNA を直接分解していることから、この *Masc* が *Imp^M* の上流の制御因子として働き、*Imp^M* の発現を誘導しているのではないかと考えた。木内らの報告によって *Masc* を siRNA でノックダウンすると雄において雌型 *Bmdsx* が誘導されることが示されている (Kiuchi et al., 2014)。しかし、木内らの実験では *Masc* のノックダウンが *Imp^M* の発現に及ぼすの影響については調べられていない。そこで木内ら (Kiuchi et al., 2014, 図 3-6a) と同様の方法で *Masc* のノックダウンを行い、*Imp^M* の発現に及ぼす影響を調査した。*Masc* を標的とした siRNA を顕微注入した胚子について *Bmdsx* と *Imp^M* の発現を RT-PCR によって調べた (図 3-6b)。*Masc* siRNA1 もしくは *Masc* siRNA2 を顕微注入した雌の胚子において、*Bmdsx* の発現パターンにコントロールとの差異はみられなかった (図 3-6b, lanes 2 と 3)。一方雄の胚子では、コントロールでは雄型 *Bmdsx* のみが検出されるのに対して、*Masc* siRNA1 もしくは *Masc* siRNA2 を顕微注入した雄胚子では雌型 *Bmdsx* が検出された (図 3-6b, lanes 5 と 6)。この結果を定量的に評価するため、雌型、雄型 *Bmdsx* に相当する DNA バンドのシグナル強度を画像解析ソフト Image J により測定したところ、コントロール雄では雌型 *Bmdsx* のシグナルがみられなかったのに対して、*Masc* をノックダウンした雄個体では雌型 *Bmdsx* のシグナルの割合が雌型、雄型両方の *Bmdsx* のシグナルの合計に対して 80%以上となっていた (図 3-6c)。以上の結果から、木内らが報告したように (Kiuchi et al., 2014)、本研究でも *Masc* のノックダウンは雄における雌型 *Bmdsx* の発現を誘導することが確認できた。次に *Imp^M* の発現を調査したところ、*Masc* siRNA2 を顕微注入した雄個体において、RT-PCR では検出できないほど *Imp^M* の発現が減少することがわかった (図 3-6b, lane 6)。この結果を定量的に評価するため、qRT-PCR によって *Imp^M* の発現量を定量したところ、*Masc* siRNA1 もしくは *Masc* siRNA2 を顕微注入した実験区では、コントロールと比較して有意に *Imp^M* の発現が減少していた (図 3-6d)。特に *Masc* siRNA2 を注射した雄における *Imp^M* の発現量は、コントロール雄における発現レベルに対して 5%以下まで減少していた (図 3-6d)。*Masc* をノックダウンすると *Imp^M* の発現が減少したことから、*Masc* は *Imp^M* の発現を誘導すると考えられる。

考察

昆虫の性決定は胚発生のごく初期に行われる

本研究によって、カイコでは胚帯形成後から体節が出現する前の段階においてに性決定が行われることがわかった。キイロショウジョウバエでは、発生開始後 3~4 時間の雌の胚子で性決定マスター遺伝子である *Sxl* が特異的に発現し、発生開始後 4~5 時間にはその発現が減少する (Salz et al., 1989)。この産下後 3~4 時間は、胚帯が伸長し、体節が分化し始めるステージにあたる。よって、ショウジョウバエの性決定が行われるステージと、カイコの性決定がなされるステージは発生学的にほぼ同時期であり、これらの種は、胚発生のごく初期に性決定が行われているといえる。同様に、ガンビアハマダラカは、胞胚葉形成期前で *zygotic* な遺伝子発現が始まり、これとほぼ同時期にあたる胚発生初期の産下後 2~6 時間の間に雄決定遺伝子である *Yob* が発現し、*dsx* の発現パターンに性的二型が現れるようになる (Krzywinska et al., 2016)。このように昆虫では、器官形成前の胚発生のごく初期に性決定が行われると考察できる。昆虫以外の動物における性決定は、器官形成後の生殖巣の性分化が始まる時期におこる。たとえば哺乳類のマウスでは、生殖巣の雌雄分化が始まる直前の胎生 10.5 日から 12.5 日に雄決定遺伝子 *SRY* が生殖巣で高発現する (Kashimada and Koopman, 2010)。また、アフリカツメガエルの性決定マスター遺伝子である *DM-W* は、生殖巣の雌雄分化が始まる前のステージである st. 48~st. 50 に生殖巣で高発現する (Yoshimoto et al., 2008, 2011)。よってこれらの動物では、生殖巣の性分化が始まる時期に性決定遺伝子が発現するといえる。これに対して、昆虫では、器官形成すら始まっていない胚発生初期で性決定が行われる。マウスやアフリカツメガエルは、生殖腺から分泌される性ホルモンによって性分化が進行するため、生殖腺の分化時期に性決定遺伝子の発現が生殖巣で起こることは理に叶っているといえる。これに対して、昆虫は性ホルモンをもたず、細胞自律的な性決定機構によって性が決まるといわれている。細胞自律的な性決定を行うことと、胚発生のごく初期に性決定が起こることとの間には何らかの関係があるのかもしれない。昆虫以外では、鳥類において細胞自律的な性決定が起こり得ることが報告されている (Zhao et al., 2010)。鳥類のニワトリは性ホルモンをもち、雄性ホルモンのアンドロゲンと雌性ホルモンのエストロゲンに変換する酵素であるアロマターゼを阻害すると雌から雄へ性転換が引き起こされ (Elbrecht and Smith 1992)、逆にアロマターゼ遺伝子を過剰発現すると雄から雌への性転換が引き起こされる (Lambeth et al., 2013)。このことから鳥類では性ホルモンによる性分化が引き起こされると考えられているが、一方で

自然界において雌雄モザイクの個体がしばしばみられることも知られていた。この点に関して、Zhao らがニワトリにおいて昆虫と同様の雌雄型の性モザイクが生じることを明らかにした (Zhao et al., 2010) ことをきっかけに、性ホルモンをもつ生物種でも細胞自律的な性決定が起こり得ると考えられるようになった。この鳥類の性決定機構の詳細はいまだ明らかとされていないが、性決定が胚発生のごく初期に行われるは昆虫に限ったことなのなのか、それとも細胞自律的な性決定を行う種に特異的なものなのかという点を明らかにするためにも、今後鳥類において性決定機構の解明がなされることを期待してやまない。

本研究により予想されるカイコの性決定カスケード

本研究と現在までの報告を総括することで考えられるカイコ性決定カスケードのモデルを図3-7において紹介する。雌では雌特異的な染色体であるW染色体上から*Fem*が転写される。*Fem*はsmall RNAであるpiRNAを介してZ染色体上から転写される*Masc*を分解する。性決定カスケード最下流に位置する*Bmdsx*は、スプライシング因子が存在しない定常状態の時、雌型スプライシングが誘導されることが知られており

(Suzuki et al., 2001)、雌において雌型*Bmdsx*が誘導される。雌型*Bmdsx*の発現はカイコの体細胞の雌分化を誘導する。雄の場合、Z染色体から転写される*Masc*は*Fem*による分解を受けない。さらに雄ではZ染色体が2本なので、もともと*Masc*の転写量が雌に比べて2倍になることが予想される。次に、*Masc*は下流の遺伝子である*Imp^M*の発現を直接もしくは間接的に誘導する。*Imp^M*の発現は、*Bmdsx*の雄型スプライシングを誘導し、体細胞の雄分化を誘導する (Suzuki et al., 2008, 2010)。以上のことからカイコでは*Fem*が発現することによって*Masc*が分解されると雌に分化し、*Fem*非存在下では*Masc*が機能し、下流の*Imp^M*が発現することで雄分化が進行すると考えられる。

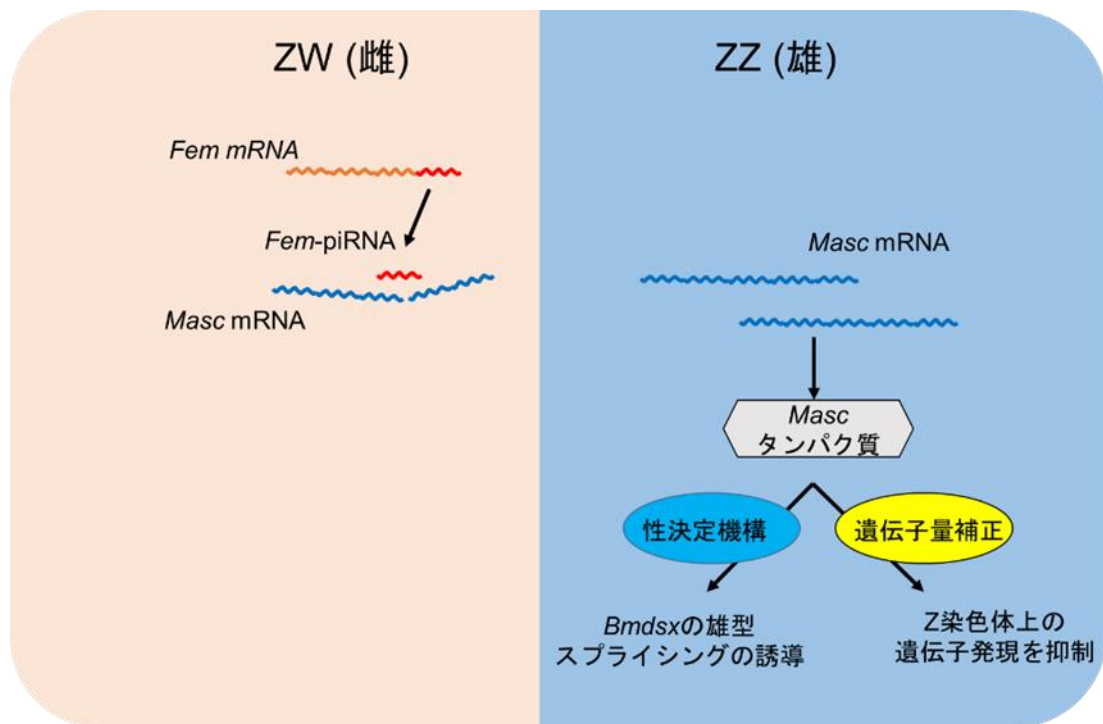


図 3-1. *Fem* と *Masc* の機能

W 染色体から転写される *Fem* mRNA は、small RNA の一種である piRNA の前駆体として働き、編集を受け *Fem*-piRNA となる。この *Fem*-piRNA は、Z 染色体から転写される *Masc* mRNA を分解する。この piRNA による *Masc* の分解機構は図 3-2 で示す。一方、雄では *Masc* mRNA が *Fem* による分解を受けない。また雄では、Z 染色体が 2 本存在するため、*Masc* の転写量は雌に比べて 2 倍高くなる。*Masc* はタンパク質へと翻訳され、*Bmdsx* の雄型スプライシングの誘導と、Z 染色体上の遺伝子発現量を抑制することによって遺伝子量補正機構を制御するという 2 つの機能をもつ。

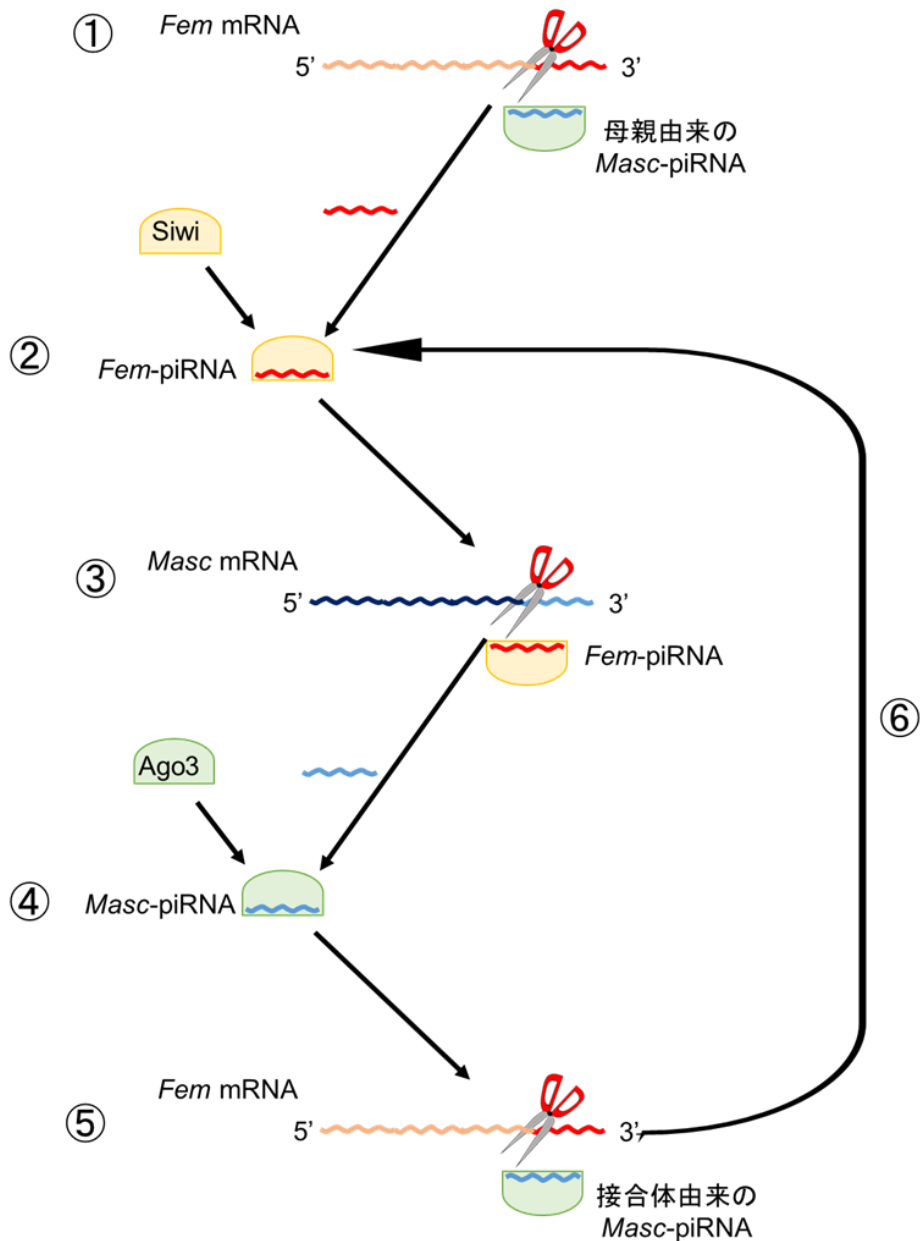


図 3-2. *Fem* による *Masc* の分解機構モデル

①W 染色体から転写された *Fem* mRNA は、母親由来の *Masc*-piRNA によって分解を受ける。②*Fem* の分解産物が、PIWI タンパク質である *Siwi* に取り込まれ、*Fem*-piRNA となる。③*Fem*-piRNA は *Masc* mRNA を分解する。④*Masc* の分解産物が PIWI タンパク質である *Ago3* に取り込まれ、*Masc*-piRNA となる。⑤*Fem* mRNA は、*Masc*-piRNA によって分解を受ける。⑥*Fem* の分解産物が、再び *Siwi* に取り込まれ *Fem*-piRNA となる。この piRNA の増幅経路はピンポンサイクルと呼ばれている。

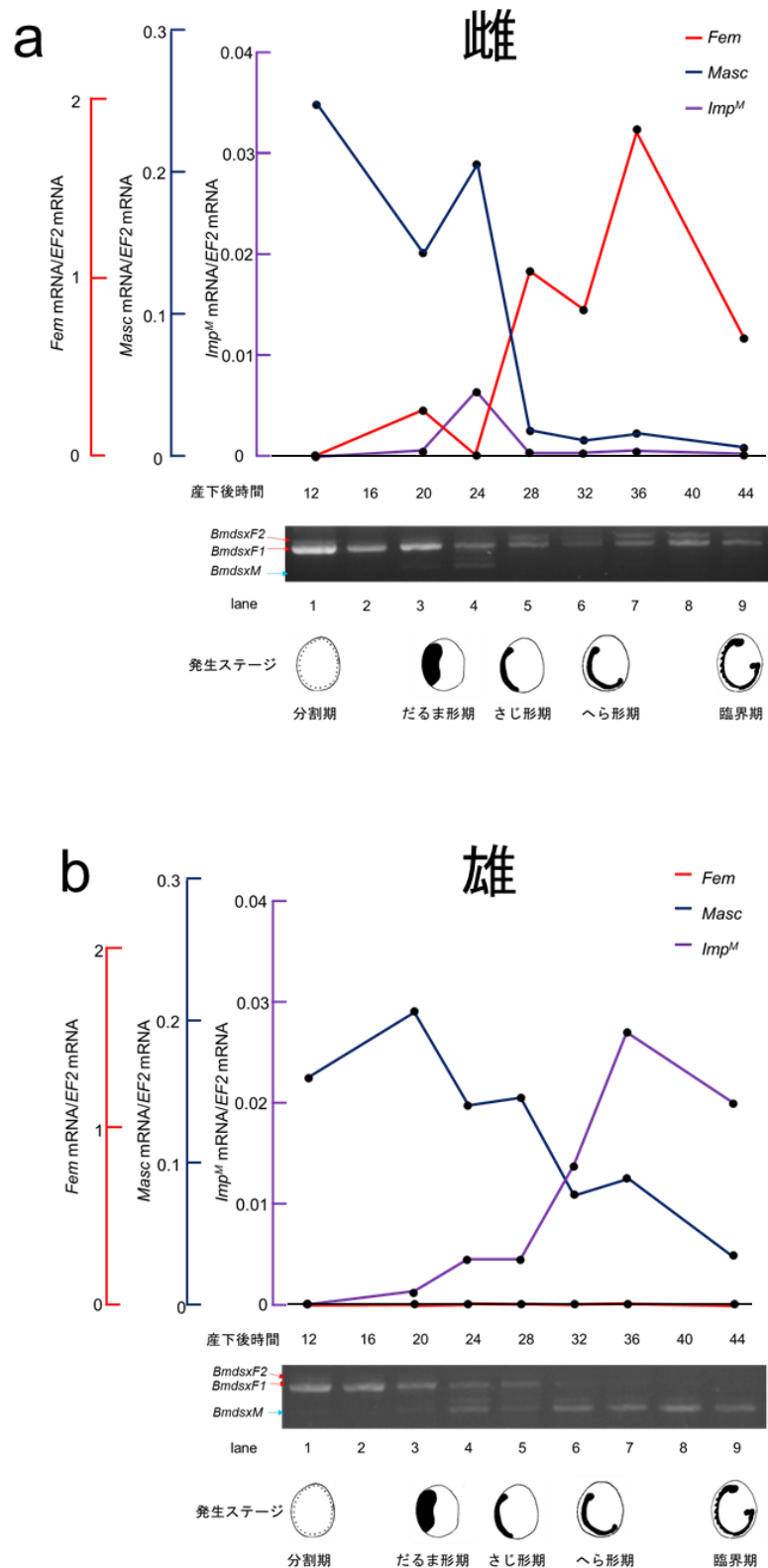


図 3-3. 胚発生の進行に伴う *Fem*、*Masc*、*Imp^M*、*Bmdsx* の遺伝子発現の変化

限性黒卵系統である S-2 系統を用いて、産下後 12 時間、20 時間、24 時間、28 時間、32 時間、36 時間、44 時間における *Fem*、*Masc*、*Imp^M* の発現量を qRT-PCR によって定量し、折れ線グラフで図示した。また、*Bmdsx* の産下後 12 時間、16 時間、20 時間、

24 時間、28 時間、32 時間、36 時間、40 時間、44 時間の発現パターンを RT-PCR により調べ、電気泳動写真で示した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1*、*BmdsxF2*)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) のサイズを表している。産下後の経過時間に伴う発生ステージの変化については、図 3-4 で示した生体解剖の結果高見、北沢 (1960)、高見 (1969)、Sakaguchi (1978a) の文献を参考にして予想した。雌雄の判定については、産下後 36 時間までは *Fem* の発現の有無を RT-PCR により確認し、*Fem* が高発現した卵を雌、発現していない卵を雄とした。産下後 36 時間以降は、卵色による雌雄鑑別を行った。(a) 雌。(b) 雄。

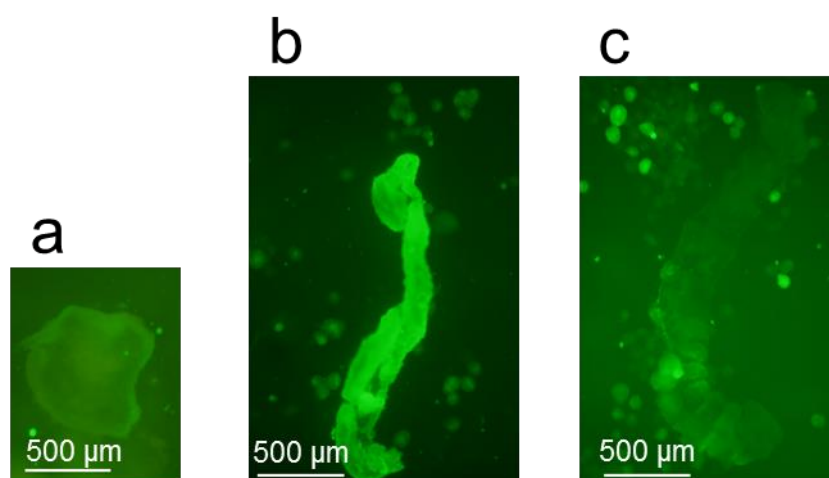
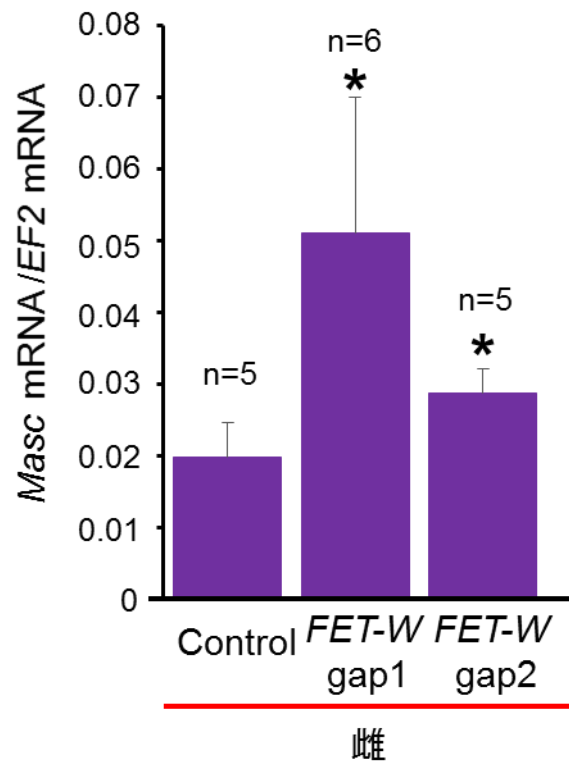


図 3-4. 胚子のステージング

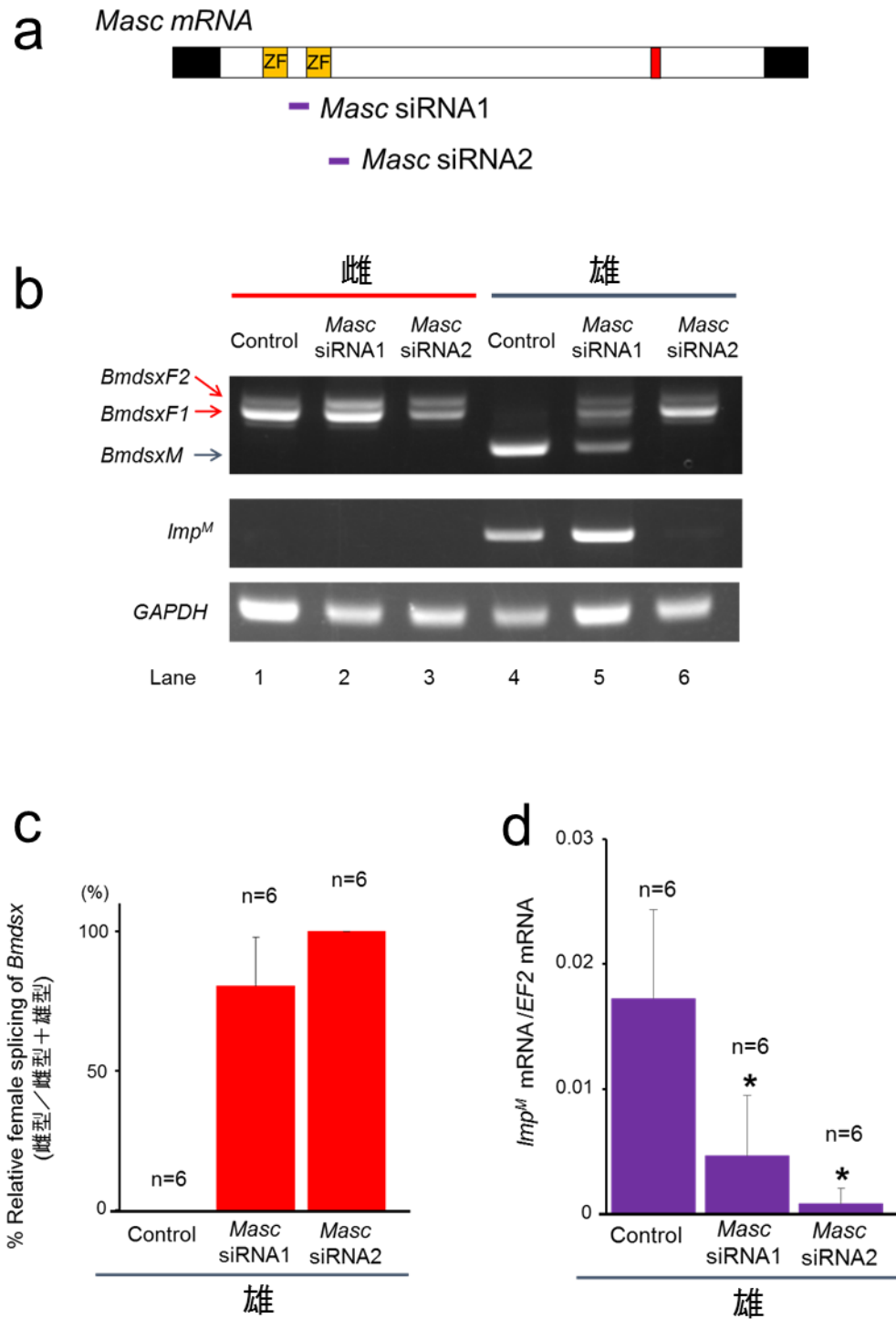
図 3-3 の解析に用いた S-2 系統の胚子の発生のステージを確認するため生体解剖を行った。卵殻や漿液膜を切除したのち、生細胞を特異的に染色することができる Calcein-AM 蛍光染色試薬によって染色し、実体顕微鏡下で胚子を観察した。(a) 産下後 21 時間の胚子。だるま形期と判断した。(b) 産下後 32 時間の胚子。へら形期であると判断した。(c) 産下後 44 時間の胚子。臨界期であると判断した。



(Sakai et al., 2015 を改変)

図 3-5. LNA-DNA ギャップマーを用いた *Fem* (*FET-W*) のノックダウンが *Masc* の発現量に及ぼす影響

図 2-9 で示した *Fem* (*FET-W*) を標的とする 2 種類の LNA-DNA gapmer、*FET* gap1、*FET* gap2 を注射した雌の卵における *Masc* の mRNA 量を qRT-PCR により定量した結果。* student t-test で control と比較して有意差あり ($p < 0.05$)。エラーバーは標準偏差を示す。

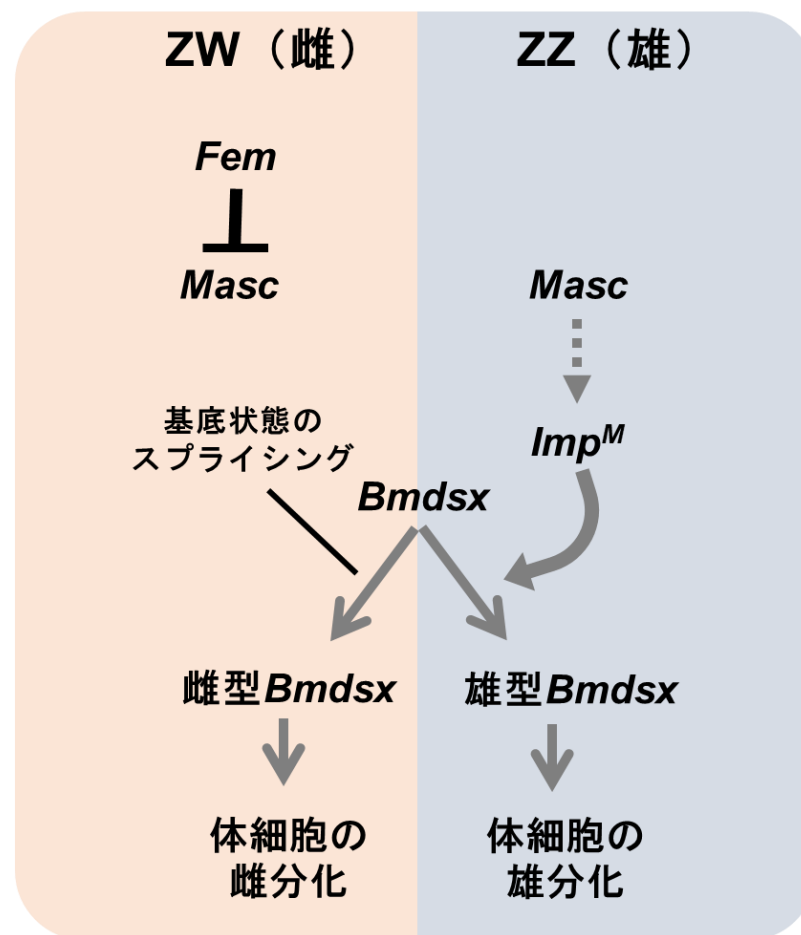


(Sakai et al., 2015 を改変)

図 3-6. *Masc* のノックダウンが *Bmdsx* と *Imp*^M の性特異的発現に及ぼす影響

(a) *Masc* mRNA の構造と実験に用いた siRNA の位置。白色のボックスはタンパク質のコード領域を示す。黄色のボックスはジンクフィンガードメイン (ZF)、赤色のボックスは *Fem*-piRNA の標的配列を示す。実験に用いた 2 種類の siRNA (*siRNA*、*Masc* siRNA1、*Masc* siRNA2) を青色の直線で示した。(b) siRNA を顕微注入した卵における *Bmdsx*、

*Imp^M*の発現を RT-PCR によって調べた。内部標準として *GAPDH* を同一の手法により増幅した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1* 並びに *BmdsxF2*)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) のサイズを表している。(c) siRNA 注射雄卵における雌型 *Bmdsx* の定量解析。RT-PCR の結果、電気泳動像において得られた雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1*、*BmdsxF2*)、雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) 各々に相当する DNA バンドのシグナル強度を Image J によって定量し、雌型 *Bmdsx* のシグナル強度を、雌型 *Bmdsx* と雄型 *Bmdsx* のシグナル強度の合計値で割った値を算出し、グラフで示した。n は調査したサンプル数を示す。(d) siRNA 注射雄卵における *Imp^M* の発現レベルを qRT-PCR によって定量した。* student t-test で control と比較して有意差あり (p<0.05)。エラーバーは標準偏差を示す。



(Sakai et al., 2015 を改変)

図 3-7. 本研究により予想されるカイコの性決定カスケード

雌では W 染色体上から *Fem* が転写される。*Fem* は *Masc* mRNA の分解を引き起こし、*Masc* の発現を抑制する。性決定カスケード最下流に位置する *Bmdsx* は、基底状態では雌型のスプライシングを受ける。このため雌では雌型 *Bmdsx* の発現が誘導される。雌型 *Bmdsx* の発現はカイコの体細胞の雌分化を誘導する。雄の場合、*Masc* は *Fem* による分解を受けない。*Masc* は下流の遺伝子である *Imp^M* の発現を直接もしくは間接的に誘導する。*Imp^M* によって、*Bmdsx* の雄型スプライシングが誘導される。雄型 *Bmdsx* の発現はカイコの体細胞の雄分化を誘導する。

表3-1. PCRに用いたプライマーの配列（第三章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')	Denaturation	Annealing	Elongation	n°cycle
<i>Bmdsx</i>	FDSX-F2 FDSX-R4	CGCCTTACCGCAGACAGGCAG GCGCAGTGTGTCGCTACAAGG	98°C 10sec	57°C 30sec	72°C 60sec	35
<i>Imp^M</i>	BmlMP-F BmlMP-R	ATGGACGGTGACATGTCTCAAG TCATCCCGCCTCAGACGATTG	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec	30
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F GAPDH-R	CATGAACAGTAGTCATCAAGC GCCGCATTGGCCGTTTGGTGC	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec	26

表3-2. qRT-PCRに用いたプライマーの配列（第三章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')
<i>Fem</i>	FemQ-F	TGGTTTATACAATCGATCCACTG
(<i>FET-W</i>)	FemQ-R	CTGACTCACTTAAATTCGATCTC
<i>Masc</i>	MascF	GCTAAAATTGCTGGGATTGCTA
	MascR	CAGCAATCGGAATTTCTTCTG
<i>Imp^M</i>	BmlMPE7-F	ATGCGGGAAGAAGTTTATG
	BmlMP-R	TCATCCCGCCTCAGACGATTG

第四章

序論

性決定最上流遺伝子 *Fem* の標的遺伝子として *Masc* が同定されている。現在までの研究で、siRNA による *Masc* のノックダウンを行うと雄で、*Imp^M* の発現が抑制され雌型 *Bmdsx* が誘導されることがわかっている (Kiuchi et al., 2014; Sakai et al., 2016b)。さらに、木内らは *Masc* のノックダウンによって、遺伝子量補正の破綻が原因だと考えられる雄特異的な致死が引き起こされることを明らかにしている (Kiuchi et al., 2014)。カイコの雌と雄には数多くの生理学的、形態学的な違いがある。例えば、卵黄タンパク質の前駆体であるビテロジェニン¹は雌の脂肪体で特異的に合成され (Mine et al., 1983)、生殖巣は雌では卵巢に分化し卵を形成するのに対して雄では精巣に分化し精子を形成し (高見 1969)、カイコ成虫の雌は第 7 腹節までしか形成されないのに対して雄では第 8 腹節が形成される (Sakaguchi, 1978b)。このようにカイコの雌と雄には様々な違いがあるにも関わらず、現在までの研究では *Masc* が *Bmdsx* や *Imp^M* といった性決定に関わる遺伝子の発現に影響を及ぼすことしか明らかとされていない。第三章で示したように *Masc* が雄における性決定カスケードの最上流に位置するならば、*Masc* の過剰発現は通常雌に分化する ZW 個体において雄特有の表現型をもたらすはずである。この点について遺伝子組み換え系統を用いた解析が、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) の炭谷らによって行われている (Sakai et al., 2016b)。炭谷らは、GAL4 転写活性化因子の認識配列である UAS (upstream activator sequence) の下流に、*Fem*-piRNA 耐性型 *Masc* (*Masc-R*) をもつ遺伝子組換えカイコ系統 Sumi 13-1 系統、Sumi 13-3 系統を作出している (図 4-1 a)。*Masc-R* は、*Masc* 内の *Fem*-piRNA 標的配列に塩基置換が施されているため、*Fem*-piRNA による分解を受けないことがわかっている (Kiuchi et al., 2014)。また、この *Masc-R* mRNA から翻訳されるタンパク質は *Masc* と同じアミノ酸配列となるよう工夫されているため、*Fem*-piRNA 標的配列の塩基置換が *Masc* タンパク質の機能に影響を及ぼさない (Kiuchi et al., 2014)。この *Masc-R* をもつ Sumi 13-1 系統もしくは Sumi 13-3 系統を全身性のドライバー系統である *Bombyx mori Actin3* (*A3*) - GAL4 系統と交配させると、幼虫期における雌特異的な致死が引き起こされる (図 4-1 b, c)。図 3-1 で示したように、*Masc* はカイコにおける *Bmdsx* の雄型スプライシングの誘導だけでなく、Z 染色体上の遺伝子の発現量を抑制することで Z 染色体の遺伝子発現量を雌雄間で補正する遺伝子量補正機構にも関わる。このため *Masc* をノックダウンすると、遺伝子量補正の破綻が原因だと考えられる雄特異的な致死が引き起こされる (Kiuchi et al., 2014)。上述の全身性 GAL4 ドライバーを用いた *Masc-R* の過剰発現により雌特異的な致死が起きたのも、本来なら雌で発現しないはずの *Masc* が発現したことで、雌において不要な遺伝子量補正が起きたことに起因すると

考察されている。

GAL4-UAS を利用した *Masc-R* の過剰発現は雌特異的致死を引き起こすため、この方法では *Masc* の性決定における機能を解析できない。この問題を解決するため、UAS-*Masc-R* 組換え遺伝子をもつ系統のうち Sumi13-3 系統に着目した。Sumi13-3 は、GAL4 系統と交配していない場合でも、ドライバー非依存的に弱く *Masc-R* が発現することがわかっている（図 4-1b lane5 と 6）。そこで本章では、Sumi13-3 系統におけるドライバー非依存的な *Masc-R* の発現が、性分化にどのような影響を及ぼすかを詳細に解析することにより、*Masc* の性決定における機能を明らかにしようと試みた。

材料・方法

供試蚕

カイコの人工飼料育は $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明期－8 時間暗期の条件下の部屋で行った。発生中の卵は湿度が十分に足りたプラスチックの容器内に保存し、幼虫の飼育には人工飼料（日本農産工製シルクメイト）を使用した。カイコの桑養育は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）に依頼し、 25°C 、16 時間明期－8 時間暗期の条件下の部屋で飼育を行った。実験には、UAS-*Masc-R* 組換え遺伝子（図 4-1a）をもつ Sumi13-3 系統、限性 DsRed 系統である Suzu19-1（図 4-2）を用いた。

ゲノム PCR

カイコのゲノム DNA は、SimplePrep reagent for DNA（タカラバイオ）を用いて成虫の脚より精製した。実験の手順は添付マニュアルの指示にしたがった。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ）を使用し、添付マニュアルにしたがった。使用したプライマーの配列と PCR の条件は表 4-1 に示した。

RNA の抽出

カイコ卵からの RNA 抽出は、ISOGEN（ニッポン・ジーン）を使用し、鈴木ら（2012）の方法にしたがった（Suzuki et al., 2012）。

RT-PCR

逆転写反応による cDNA 合成には PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ）を用い添付マニュアルの手順にしたがった。逆転写反応の鋳型には、1 μg の total RNA もしくは、卵 1 粒から抽出した全量の total RNA を使用し、逆転写反応の際には cDNA Synthesis Kit に添付されている random hexamer プライマーを使用した。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ）を使用し、添付マニュアルにしたがった。使用したプライマーの配列と PCR の条件は表 4-1 に示した。得られた反応産物はエチジウム（0.5 $\mu\text{g/mL}$ ）を含む 1% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、電気泳動像は E-Shot（ATTO）を用いて撮影した。

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量は、Suzuki ら（2012）の方法にしたが

った (Suzuki et al., 2012)。PCR 反応に用いたプライマーの塩基配列は表 4-2 に示した。内部標準に用いた *EF2* 遺伝子の増幅には、Koike ら (2003) の用いたプライマーを使用した (Koike et al., 2003)。

SDS-PAGE

SDS-PAGE によるカイコ蛹の体液の分析は、Mine らの方法にしたがった (Mine et al., 1983)。カイコ蛹化後 3 時間以内の体液 1 μL を 95°C 2 分間 SDS サンプルバッファーで処理した。処理した試料を 10%SDS-ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により分離し Quick-CBB PLUS (Wako) で染色した。

内部形態、外部形態の観察

内部形態、外部形態の観察は、実体顕微鏡 (SZX7, Olympus) または、位相差顕微鏡 (IX70, Olympus) を用い観察した。撮影には写真撮影装置 (DP73, Olympus)、または、デジタルカメラ (LUMIX DMC-FT5, Panasonic) を用いた。

精子束の観察

精子束に対して位相差顕微鏡 (IX70, Olympus) による観察もしくは、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, DOJINDO LABORATORIE) 3.3 $\mu\text{g/ml}$ を含む Vectashield (Vector Laboratories) を用いてプレパラートに封入し共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 EXCITER, Carl Zeiss) による観察を行った。

結果

遺伝子組換え系統 Sumi13-3 の特徴

遺伝子組換え系統 Sumi13-3 の雌を *Masc* の機能解析に用いることができるか調査するため、1) 組換え遺伝子の挿入により挿入部位周囲の遺伝子が破壊されていないか、2) 実際に *Masc-R* 遺伝子が発現しているのか、3) 致死せず成虫まで成育できるのか、以上の 3 点について調べた。まず、性染色体構成による正確な雌雄鑑別を可能にするため、限性 DsRed 系統である Suzu19-1 と Sumi13-3 を交配させた。Suzu19-1 系統は、W 染色体に *DsRed* 組換え遺伝子が挿入されている。この系統の *DsRed* 遺伝子の発現は 3×P3 プロモーターによって制御されているため、幼虫の単眼もしくは成虫の複眼において発現する *DsRed* をマーカーとして雌を特定することができる (図 4-2)。

そこで、Suzu19-1 系統の雌を Sumi13-3 の *Masc-R* 組換え遺伝子をヘテロで保持する雄と交配させ、次世代を得ることにした。*Masc-R* 組換え遺伝子には、3×P3 プロモーターによる発現制御を受ける *EGFP* マーカーが組込まれている (図 4-1a)。このため、この交配で得られる次世代には、*DsRed*、*EGFP* の両方が発現し、故に *Masc-R* をヘテロでもつ雌 (*Masc-R*/+ 雌)、*DsRed* のみが発現し、故に *Masc-R* をもたない雌 (+/+ 雌)、*EGFP* のみが発現し、故に *Masc-R* をヘテロでもつ雄 (*Masc-R*/+ 雄)、そしてマーカー遺伝子の発現がみられない、すなわち組換え遺伝子をもたない雄 (+/+ 雄) の 4 種類の遺伝子型をもつ個体が含まれる。本研究では、*Masc-R*/+ 雌の妊性が低かったことが原因で *Masc-R*/*Masc-R* の雌個体を得ることが困難であったことから、ほとんどの解析に *Masc-R*/+ 雌を用いた。

Sumi13-3 系統では組換え遺伝子が第 9 番染色体に挿入されている (図 4-3a)。組換え遺伝子が挿入された位置から上流、下流それぞれ 100kbp 以内のゲノム領域には Bmgn012517、Bmgn012518、Bmgn015522 の 3 つ予測遺伝子が存在した。これらの遺伝子の発現が、組換え遺伝子の挿入によって影響を受けていないか調べるため qRT-PCR を行った。+/+ と *Masc-R*/+ で、これら 3 つの遺伝子の発現に有意な差異は得られなかった (図 4-3b)。このことから、遺伝子挿入による遺伝子の破壊は起きていないと考えた。

次に、実際に *Masc-R* 遺伝子が発現しているか調査するため、5 齢 3 日目の幼虫の組織における *Masc-R* の発現を RT-PCR によって調べた。その結果、+/+ 雌では発現していない *Masc-R* 遺伝子が、脂肪体、絹糸腺、生殖巣、マルピーギ管といった様々な組織で発現していることがわかった (図 4-4a)。*Masc* と *Masc-R* 遺伝子の発現量を同時に検出できるプライマーを用いて、1 齢幼虫における *Masc* と *Masc-R* の発現量の合計値を qRT-PCR に

よって調査した。*Masc-R/+* 雌において、コントロールとして用いた $+/+$ 雌に比べて *Masc* と *Masc-R* の mRNA 量の合計が約 1.5 倍の値を示した (図 4-4b)。この値は雄の *Masc* の発現量の約 70%に相当した (図 4-4b)。

A3-GAL4 でドライブした *Masc-R* の発現が雌特異的致死を引き起こすことから、*Masc-R/+* 雌の成育に異常が認められるか調査した。まず、*Masc-R/+* 雌個体が正常に孵化できるのか調査するため、 $+/+$ 雌と *Masc-R/+* 雄を交配させ、得られた同一蛾区内から孵化してきた 1 齢幼虫の雌の遺伝子型を調査した。メンデルの法則にしたがって正常に孵化した場合、雌のうち 50%の個体は *Masc-R/+*になることが予想される。しかし、孵化した雌個体にしめる *Masc-R/+*個体の割合は 25%以下となった (図 4-5a)。このことから、*Masc-R/+* 雌の孵化率は $+/+$ 雌に比べて低いと考えられる。次に、幼虫期から成虫までの *Masc-R/+* 雌の生存率を調査したところ、*Masc-R/+* 雌の生存率は 90%と高い値を示すことがわかった。したがって、孵化した *Masc-R/+* 雌は幼虫期から成虫にかけて正常に成育するといえる (図 4-5b)。

以上の結果から、Sumi13-3 系統が保有する組換え遺伝子は、その挿入部位周辺の予想遺伝子を破壊していないこと、*Masc-R* があらゆる組織で発現すること、*Masc-R* 雌は孵化後成虫まで正常に成育することが確認できたため、Sumi13-3 系統を今後の解析に用いることにした。

Masc-R/+ 雌における性決定遺伝子の発現

カイコの卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞で *Masc-R* を過剰発現すると、雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の発現が誘導されることがわかっている (Katsuma et al., 2015)。同様の現象が *Masc-R/+* 雌においてみられるのか確かめるため、*Masc-R/+* 雌における *Imp^M* の発現と *Bmdsx* のスプライシングパターンを RT-PCR によって調査した。1 齢 1 日目の幼虫全身から調製した cDNA を鋳型に用いた RT-PCR の結果、*Masc-R/+* 雌において雄型 *Bmdsx* と *Imp^M* の発現が確認された (図 4-6a, lane2)。*Bmdsx* のスプライシングの変化について定量的に評価するため、雌型、雄型 *Bmdsx* それぞれに相当する DNA バンドのシグナル強度を画像解析ソフト Image J により測定したところ、 $+/+$ 雌では雄型 *Bmdsx* のシグナルがみられなかったのに対して、*Masc-R/+* 雌では雄型 *Bmdsx* のシグナルの割合が雌型、雄型両方の *Bmdsx* のシグナルの合計に対して約 18%となっていた (図 4-6b)。次に qRT-PCR によって *Imp^M* の発現量を定量したところ、*Masc-R/+* 雌では、 $+/+$ 雌と比較して 28 倍高く発現していた (図 4-6c)。これらの結果から、*Masc-R* の発現は雌において *Imp^M* 並びに雄型 *Bmdsx* の発現を誘導することがわかった。

Masc-R/+雌の脂肪体におけるビテロジェニンの合成

次に、*Masc-R* の発現がビテロジェニンの合成に及ぼす影響を調査する目的で、*Masc-R/+* 雌の脂肪体について調査した。ビテロジェニンは、昆虫の卵黄タンパク質の主要成分であるビテリンの前駆体である。カイコのビテロジェニンは、蛹化前後の雌の脂肪体で大量に合成される (Mine et al., 1983; Yano et al., 1994)。RT-PCR による調査の結果、*Masc-R/+* 雌の脂肪体において、*Imp^M* と雄型 *Bmdsx* の発現が確認された (図 4-7, lane 2)。次に、*Masc-R* の発現が、脂肪体におけるカイコビテロジェニン遺伝子 (*BmVg*) の発現に及ぼす影響について調べるため、*BmVg* の発現量を qRT-PCR によって定量した。その結果、*Masc-R/+* 雌の脂肪体における *BmVg* の発現量は+/+の雌と比較して 100 分の 1 以下にまで低下していた (図 4-8a)。脂肪体で合成されたビテロジェニンタンパク質 (*BmVg*) は、蛹化前後に体液中へ放出される (Mine et al., 1983; Yano et al., 1994)。*Masc-R/+* 雌の体液中に分泌された *BmVg* の存在量を調べるため、SDS-PAGE による解析を行った。*BmVg* は、同一の遺伝子から約 203 kDa の *BmVg* heavy chain (*BmVg-h*) と、約 42 kDa の *BmVg* light chain (*BmVg-l*) が作られる (Yano et al., 1994)。SDS-PAGE による解析の結果、*BmVg-h* に対応すると考えられるタンパク質が+/+ 雌の体液中に特異的に検出された (図 4-8b, lane 1)。これに対して、*Masc-R/+*の雌では *BmVg-h* に対応するタンパク質は検出されなかった (図 4-8b, lane 2)。また、*BmVg-l* も *Masc-R/+* 雌の体液中にはほとんどみられなかった (図 4-8b, lane 2)。SDS-PAGE によって得られた *Masc-R/+* 雌の体液のバンドパターンは、雄で見られたパターンと酷似していた (図 4-8b, lane 2 と 3)。以上の結果から、*Masc-R* の発現が、雌の脂肪体におけるビテロジェニンの合成を阻害したと考えられる。

Masc-R/+雌の卵巣にみられた形態異常

雌における *Masc-R* の発現が卵巣の分化に及ぼす影響を調査するため、実体顕微鏡を用いて卵巣を観察することにした (図 4-9)。*Masc-R/+* 雌の 3 齢期の卵巣を観察したところ、図 4-9b に示す形態異常が観察された。+/+ 雌の卵巣では、卵巣小管がチューブ状に伸長していた (図 4-9a) のに対して、*Masc-R/+* 雌の卵巣小管は+/+ 雌のそれと比べて短く、また小管の先端には肥大化した組織が形成されていた (図 4-9b)。RT-PCR の結果から、*Masc-R/+* 雌の卵巣において *Masc-R* の発現が確認され、これに伴い雄型 *Bmdsx* 並びに *Imp^M* が明瞭に発現していた (図 4-10, lane 2)。次に 5 齢幼虫の卵巣を観察したところ、+/+ 雌の 5 齢幼虫の卵巣では卵巣小管がさらに伸長していた (図 4-9c, d)。これに対して、*Masc-R/+* 雌の卵巣では、卵巣小管の伸長がみられず、その代わりに先端部が肥大化していた (図 4-9e, f)。この肥大化した組織内には複数の小胞が含まれていた (図 4-9g)。これらの小胞は、精巣内で精原細胞を取り囲むシストと呼ばれる組織と形態的特徴が酷似

していた（図 4-9h, i）。

Masc-R/+ の卵巣で観察された異常な組織が、卵巣の精巢化に起因するものであることを確かめるために、精巢マーカーである *B. mori* homolog of radial spoke head protein 1 gene (*BmR1*) の発現 (Xu et al., 2015) を調べることにした（図 4-11）。Xu ら（2015）が報告したプライマーでは *BmR1* の増幅が得られなかったので、表 4-1 で示したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、約 850 bp の位置に *BmR1* 由来だと考えられる増幅産物が *+/+* 雄及び *Masc-R/+* 雄の精巢において検出された（図 4-11b, lane 3 と 4）。この *BmR1* は、*+/+* 雌の卵巣では検出されなかった（図 4-11b, lane 1）ことから、*BmR1* は Xu ら（2015）の報告通り精巢特異的に発現することが確認された。続く RT-PCR の結果から、*BmR1* は精巢だけでなく *Masc-R/+* の卵巣においても発現していることがわかった（図 4-11b, lane 2）。*BmR1* が発現する部位を明らかにするため、*Masc-R/+* 卵巣の肥大化した組織とそれ以外の部分とを切り分け（図 4-11a）、上述と同様の RT-PCR により発現解析を行った。その結果、他の組織と比較して *BmR1* の発現は肥大化した組織で高いことがわかった（図 4-11b, lane 5 と 6）。これらの結果から、*Masc-R* の発現は卵巣の部分的な精巢化を引き起こし、その結果卵巣の形態に異常が生じたと考えられる。

***Masc-R* の発現は卵巣における精子束の形成を促進した**

Masc-R の発現によって卵巣が精巢化しているのならば、精子形成が起きている可能性がある。この点について詳細に解析するため、よりステージが進んだ蛹期において、*Masc-R/+* 雌にみられた上述の精巢類似組織を観察した。蛹化後 3 日目の *+/+* 雌の卵巣では卵巣小管のさらなる伸長が観察され、卵巣小管内部には複数の卵原基が形成されていた（図 4-12a）。*Masc-R/+* 雌の卵巣小管は、*+/+* 雌の卵巣小管と比較して短かった（図 4-12b）。図 4-9f で観察された精巢類似の組織は、依然として卵巣小管先端部に観察され、さらに肥大化していた（図 4-12b, 点線内）。この *Masc-R/+* 雌において形成された精巢類似の組織について位相差顕微鏡を用いて調査した。その結果、この精巢類似の組織内には形態的特徴が精子束によく似た組織が多数みられた（図 4-12d）。これらの精子束に似た組織について DAPI による核染色を行ったところ、核が散在するもの（図 4-13a）と核が中心部に局在するもの（図 4-13b）とが観察された。カイコの精巢では、直接受精に関与する有核精子束（図 4-13c）と、有核精子の受精を補助する無核精子束（図 4-13d）の 2 種類の精子束が形成されることが知られている（山舗, 鴻上 2012）。図 4-13a に示した組織の核は散在するものの、組織の先端部に多くの核が局在しており、比較的有核精子束に似ているようにみえた。一方、図 4-13b で示した組織は、染色のパターンから無核精子束だと考えられる。このことから、*Masc-R/+* 雌では、ほぼ完全な無核精子束が形成される

と考えられる。以上の結果から、卵巣における *Masc-R* の発現は、精子束の形成を誘導するものの、完全な有核精子束の形成にはいたらないことが明らかとなった。

Masc-R の発現が雌の外部形態に及ぼす影響

Masc-R/+ 雌の外部形態について調査したところ、*+/+* 雌個体との形態的な差は観察されなかった。外部形態の雄化を引き起こすには *Masc-R* の発現量が足りなかった可能性があると考え、*Masc-R/Masc-R* の雌個体について観察を行うことを試みた。人工飼料で育てた場合、*Masc-R/+* 雌から産下卵が得られなかったため、桑養育によって育てられた *Masc-R/+* 雌と *Masc-R/+* 雄とを交配させて得られた F1 世代の個体について観察を行った。その結果、*+/+* 雌ではみられることのない、尾部が黒色化する雌個体が出現した（図 4-14a, b）。これらの個体の遺伝子型を判定するために、組換え遺伝子が挿入されている近傍のゲノム配列（TG⁻）を増幅するプライマーと、ゲノムの一部と組換え遺伝子が含まれる配列（TG⁺）を増幅するプライマーを設計し、ゲノム PCR によって遺伝子型を判定した（図 4-14c）。この PCR を行うと、遺伝子型が *+/+* の場合は TG⁻ のバンドのみが増幅され（図 4-14d, lane 1）、*Masc-R/+* の場合は TG⁻、TG⁺ 両方のバンドが増幅され（図 4-14d, lane 2）、*Masc-R/Masc-R* の場合は TG⁺ のバンドのみが増幅される。上述の尾部が黒色化した個体の遺伝子型をこのゲノム PCR によって調査したところ、すべての個体が *Masc-R/Masc-R* であることがわかった（図 4-14d, lane 3~19）。

次にカイコの成虫腹部の観察を行った（図 4-15a）。カイコの成虫の腹節の数には雌雄差があり、雌では第 7 腹節（A7）までしか形成されないのに対して、雄では雄特異的な第 8 腹節（A8）が形成される（図 4-15b, c）。*Masc-R/Masc-R* 雌の成虫体節について調査したところ、雄特異的腹節である第 8 腹節（A8）が形成されていた（図 4-15d, e）。次に外部生殖器の観察を行った（図 4-16）。*Masc-R/Masc-R* 雌において、外部生殖器を観察するとフェロモン腺の周囲がメラニン化しており（図 4-16c）、フェロモン腺上部に雄の外部生殖器でみられる構造物と類似の構造物が形成されていた（図 4-16d）。以上のことから、*Masc-R/Masc-R* 雌の成虫の外部形態において雄化が引き起こされることがわかった。

Masc-R の発現が卵形成に及ぼす影響

Masc-R/+ 雌における卵形成について調査した。人工飼料で育てた *Masc-R/+* 雌の成虫 18 個体から産下された卵は、合計で 17 粒となり、平均産下卵数は 0.94 粒となった。これに対して同一飼育環境で育てた *+/+* 雌の平均産下卵数は 268.25 粒であった。このことから、*Masc-R/+* 雌では、著しく卵形成が阻害されていることがわかった。

カイコでは成育環境によって産下卵数が増減することがあるので、よりカイコの成育

に適した桑養育を行い同様の解析を行った。その結果、*Masc-R/+* 雌の平均産下卵数は 57.0 粒であるのに対して、*+/+* 雌では 483.8 粒であった (図 4-17a)。産下卵数の減少の原因が、卵形成の異常によるものか、もしくは卵は正常に造られているものの産卵できないことによるものかを明らかにするため、*Masc-R/+* 雌の造卵数について調べた。*Masc-R/+* 雌の造卵数 (卵巣内の残存卵数と産下卵数との合計) を調べたところ、65.35 粒となり、残存卵数を合計しても *+/+* 雌の産下卵数を大きく下回ったことから、*Masc-R/+* では、卵形成が阻害されていることがわかった (図 4-17a)。これらの *Masc-R/+* 雌の卵巣小管は、*+/+* 雌と比較して著しく短かった (図 4-17b, c)。また、蛹期において精子束の形成がみられた精巣様組織が、成虫においても卵巣小管先端部に観察された (図 4-17d)。卵巣小管の長さを定量的に測定したところ、*Masc-R/+* 雌の卵巣小管は *+/+* 雌と比較して約 6 分の 1 の長さしかなかった (図 4-17e)。*Masc-R/+* 雌が産下した卵の孵化率を調査したところ、正常に孵化することがわかった (図 4-17 f)。これらのことから、*Masc-R* の発現は卵形成に深刻な影響を引き起こすが、形成された卵は正常な受精能力をもつことが明らかとなった。

考察

Sumi13-3 系統の特徴

Sumi13-3 系統の *Masc-R/+* 雌において、BmVg タンパク質の合成がほぼ完全に阻害され (図 4-8b)、卵巣に形態異常が引き起こされ (図 4-9b, f)、精巣様組織が形成された (図 4-9g)。また蛹期の精巣様組織の中には複数の精子束の形成が確認された (図 4-12d)。さらに *Masc-R/Masc-R* 雌では、第 8 腹節の形成 (図 4-15d, e) や外部形態の雄化が観察された (図 4-16d)。これらの結果から、*Masc-R* の発現が雌から雄への部分的な性転換を引き起こすと考えられる。UAS-*Masc-R* 組換え系統と全身性の GAL4 ドライバー系統とを交配させた場合、幼虫期における雌特異的致死が引き起こされる (Sakai et al., 2016b) が、本研究で用いた、*Masc-R* 組換え遺伝子が GAL4 非依存的に発現する Sumi13-3 では、*Masc-R* の発現量がすべての雌個体を致死させるには不十分であり、部分的な雄化を引き起こすには十分であったと考えられる。

Masc-R の過剰発現は、雌特異的致死を引き起こす

Masc ノックダウン実験の結果、遺伝子量補正の破綻による致死は胚子期にもたらされることがわかっている (Kiuchi et al., 2014)。Sumi13-3 の雌において *Masc-R/+* の孵化個体が減少する (図 4-5a) という結果は胚子期に致死が起こることを意味しており、致死が引き起こされるステージは以前の報告と一致する。上述したように、UAS-*Masc-R* 組換え系統と全身性の GAL4 ドライバー系統とを交配させると、5 齢幼虫までにすべての雌個体が致死することがわかっている (Sakai et al., 2016b)。これに対して、本研究で用いた Sumi13-3 の *Masc-R/+* 雌は、成虫まで生存する個体も得られるため、この系統では *Masc-R* の発現量がすべての雌個体を致死させるためには不十分であったと考えられる。これらの結果は、致死の程度に違いがあるものの、雌で *Masc-R* が高発現すると雌特異的致死が引き起こされるという点で一致している。*Masc* タンパク質は Z 染色体上の複数の遺伝子を抑制することで、Z 染色体の遺伝子発現量を雌雄間で補正する遺伝子量補正機構に関わっている (Kiuchi et al., 2014)。遺伝子量補正機構の破綻が死につながるという報告は、マウス、線虫およびキイロショウジョウバエといった複数の種でなされている (Belote and Lucchesi, 1980; Plenefisch et al., 1989; Takagi and Abe, 1990) ことから、*Masc-R* の過剰発現が引き起こす雌特異的致死の原因は、おそらく雌 (ZW) 個体の Z 染色体上の遺伝子の発現量の低下によるものではないかと考えられる。具体的に、Z 染色体上のどの遺伝子の発現量の低下が致死を引き起こしたのかは不明であるが、例えば、ショウジョウバ

エのエクダイソン合成に関わる酵素の転写活性化に必要な *FTZ-F1* (Parvy et al., 2005) は、カイコの Z 染色体上に座し、*Masc* のノックダウンによって発現量が増えることが報告されている (松島ら 2016)。*Masc-R* の過剰発現によって、Z 染色体に座する *FTZ-F1* のような遺伝子の発現量が減少したために正常な発生や成育が阻害され、致死が引き起こされたのではないかと考察した。*Masc-R* の発現による遺伝子量補正機構の破綻がどのように雌致死につながるのか、今後より詳細な研究が必要とされる。

Masc-R は *Imp^M* の発現を誘導する

Sumi13-3 の *Masc-R/+* 雌では遺伝的には雌個体であるのにも関わらず *Imp^M* の発現がみられた (図 4-6a lane 2, 図 4-7 lane 2, 図 4-10 lane 2)。この結果は、BmN4 細胞における *Masc-R* の過剰発現が *Imp^M* の発現をもたらすという先の報告と一致している (Katsuma et al., 2015)。これらの結果から、*Masc* が上流の遺伝子として働き、*Imp^M* の発現を制御することがより明確となった。しかし、*Masc* がどのような分子メカニズムを介して *Imp* の雄特異的スプライシングを制御しているのかは依然として不明である。*Masc* は、CCCH 型ジンクフィンガータンパク質をコードする (Kiuchi et al., 2014)。CCCH 型ジンクフィンガータンパク質は、DNA だけでなく RNA にも直接結合する (Gao et al., 2002; Wang et al., 2008) ことから、*Masc* が *Imp* の pre-mRNA に結合して直接スプライシングを制御しているのかもしれない。*Masc* がどのように *Imp^M* の発現を制御するのか、その分子メカニズムを明らかにすることは今後の課題であるといえる

Masc-R の発現は、雌の脂肪体におけるビテロジェニンの合成を抑制する

ビテロジェニンの前駆体は、蛹化前後で雌の脂肪体で合成される (Mine et al., 1983; Yano et al., 1994)。カイコでは、雌の脂肪体におけるビテロジェニンの合成が *Bmdsx* により直接制御されることが以下の様々な報告によって明らかにされている。例えば、ゲルシフトアッセイの結果から、BmDSX タンパク質が、ビテロジェニン転写開始点の上流 95nt -89nt の位置に存在するシスエレメント (ACATTGT) に結合することがわかっている (Suzuki et al., 2003)。雌型 *Bmdsx* の雄における異所的発現が、雄の脂肪体における *BmVg* の発現を誘導する一方、雄型 *Bmdsx* を雌で発現させると脂肪体における *BmVg* の発現は抑制される (Suzuki et al., 2003, 2005)。TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を利用して作製された雌型 *Bmdsx* のノックアウト雌では、*BmVg* の発現レベルがコントロールと比較して約 25% まで低下する (Xu et al., 2014)。本研究で観察された *Masc-R/+* 雌の脂肪体では雌型 *Bmdsx* が発現していた (図 4-7) にも関わらず、*BmVg* の発現レベルが +/+ と比較して 1% 以下まで減少しており (図 4-8a)、雌型 *Bmdsx* のノックアウト個体を用

いた Xu ら (2014) の実験と比較して、より顕著に *BmVg* の発現レベルが低下した。*Masc-R/+* 雌の脂肪体では雄型 *Bmdsx* の発現がみられた (図 4-7) ことから、*Masc-R/+* 雌における劇的な *BmVg* の減少は、おそらく *Masc-R* の発現によって誘導された雄型 BmDSX による *BmVg* の発現抑制によるところが大きいのではないかと考察した。

Masc-R の発現は、雌において外部形態の雄化を誘導する

Masc-R/Masc-R 雌で外部生殖器に部分的な雄化が観察された (図 4-16d)。この結果は、雄型 BmDSX を過剰発現する遺伝子組換えカイコ雌においてみられた外部生殖器の部分的な雄化と酷似している (Suzuki et al., 2005)。キイロショウジョウバエでは雌の外部生殖器は幼虫の第 8 腹節から形成されるのに対して、雄の外部生殖器は幼虫の第 9 腹節から形成される (Freeland and Kuhn, 1996 ; Casares et al., 1997)。この雌雄の違いは、*dsx* のスプライシングの違いによって生じることが知られている。すなわち、雌では雌型 *dsx* が *Wg* (*Wingless*) シグナルを活性化し、*Dpp* (*Decapentaplegic*) シグナルを抑制することで第 8 腹節が外部生殖器に、第 9 腹節が附属腺へと分化する。これに対して、雄では雄型 *dsx* が *Wg* シグナルを抑制し、*Dpp* シグナルを活性化させることで第 8 腹節が背板に、第 9 腹節が外部生殖器へと分化する (Vincent et al., 2001)。カイコの場合、成虫雌の腹節の数は 7 つである (図 4-15b)。従って、カイコの雌の外部生殖器にみられる背板と側唇 (図 4-16a) は、それぞれ第 8 腹節、第 9 腹節に由来すると考えられる。*Masc-R/Masc-R* の雌では、側唇の上部に付随するかたちで雄の外部生殖器に類似した構造が形成されていた (図 4-16d)。このことから、雄の外部生殖器は第 9 腹節から形成されると考えることができる。ショウジョウバエの雄の外部生殖器も第 9 腹節に由来する。おそらく *Masc-R/Masc-R* の雌では、雄型 *Bmdsx* の発現が誘導されたことによって、*Wg* シグナルが抑制され、*Dpp* シグナルが活性化した結果、第 9 腹節から雄の外部生殖器の類似構造が形成されたのかもしれない。*Wg* シグナルや *Dpp* シグナルがカイコの外部生殖器の形成に関与するかどうか、今後の研究により明らかにする必要がある。

また *Masc-R/Masc-R* の雌では、雄特異的な腹節である第 8 腹節が形成された (図 4-15 d, e)。キイロショウジョウバエの成虫腹節における性的二型は、*dsx* と *Abdominal-B* (*Abd-B*) の発現の組合せによって制御されており、雄型 *dsx* と *Abd-B* が共局在することで雌に比べて雄の腹節の数が少なくなることがわかっている (Duncan, 1996; Williams et al., 2008)。カイコでも腹節で *Abd-B* が発現することから (Duan et al., 2014)、*Masc-R/Masc-R* 雌において誘導された雄型 *Bmdsx* と腹節で発現する *Abd-B* との相互作用によって、雄特異的な第 8 腹節が形成されたと推察できる。

Masc-R の発現によりみられた雌から雄への性転換は不完全である

Masc-R/+ 雌では、部分的な雌から雄への性転換はみられたものの、完全な雌から雄への性転換は引き起こされなかった。*Masc-R/+* 雌では雄型 *Bmdsx* だけでなく雌型 *Bmdsx* も発現した (図 4-6a lane 2, 図 4-7 lane 2, 図 4-10 lane 2)。これは、*Masc-R/+* 雌における *Masc-R* の発現量が不十分であったか、もしくは *Masc-R* の発現部位や発現時期が内在性の *Masc* のそれらとは異なっていたことに起因すると考えられる。雌型 BmDSX と雄型 BmDSX の両方が存在する場合、標的配列に対して互いに競合することが報告されている (Suzuki et al., 2003)。*Masc-R* の発現が内在性の *Masc* の発現を反映していないため、雌型 *Bmdsx* と雄型 *Bmdsx* の両方の発現が誘導され、雄型 BmDSX による雄化と雌型 BmDSX による雌化機能の競合の結果、*Masc-R/+* 雌では不完全な性転換が引き起こされたのではないかと考察した。

また、W 染色体に *Fem* 以外の遺伝子が座乗し、その遺伝子が雄化を抑制している可能性も考えられる。カイコでは、雌決定に必要最小限の W 染色体領域だけをもつ系統が阿部らによって樹立されている (Abe et al., 2008)。この系統と Sumi13-3 を交配させ、雌から雄への完全な性転換が引き起こされるかどうかを調べることによって、上述の仮説の妥当性について評価できるかもしれない。

Masc-R を全身で過剰発現させると個体の致死を招く (図 4-1c) ため、組織特異的なプロモーターによってドライブされる GAL4 系統を開発し、これを用いて組織特異的に *Masc-R* を過剰発現させることで、組織ごとで完全な性転換が引き起こされるのかを調べることで *Masc* の発現が雄化にとって必要十分であるのかを明らかにすることができるだろう。

Masc-R の発現は精子形成を誘導した

Masc-R/+ 雌では驚くことに精子束を含む部分的に精巢化した異常な卵巣が形成された (図 4-12b, d)。過去の研究において、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を利用して *Bmdsx* の雌特異的なエクソンに変異を導入し、雌型 *Bmdsx* だけを破壊したノックアウト個体が作成されている (Xu et al., 2015, 2016; Sakai et al., 2016b)。これらの 5 齢雌幼虫においても、本研究によって観察された精巢類似の組織が卵巣先端部に観察されている。このことは、雌型 *Bmdsx* の機能が失われるだけで卵巣の精巢化が引き起こされることを示唆している。キイロショウジョウバエでは、雌型 DSX タンパク質が、雄分化に対して抑制的に働くことが知られている (Waterbury et al., 1999)。これらの事実から、雌型 BmDSX の機能が失われると、雄分化を抑制することができなくなり、その結果、精巢類似の組織が形成される可能性が考えられる。*Masc-R/+* 雌の卵巣では、*Bmdsx* のス

プライシングが雌型から雄型へとシフトしていた（図 4-10）。もしかすると *Masc-R/+* 雌では雄型 *BmDSX* の発現レベルが増加し、それに伴って雌型 *BmDSX* の発現レベルが減少したため、このことがきっかけとなって精巢類似の組織が形成されたのかもしれない。

一方で、雌における精巢類似の組織の形成には雄型 *BmDSX* の発現が重要であるとの見方もある。たとえば、上述した *TALEN* を用いたノックアウト個体（Xu et al., 2015, 2016; Sakai et al., 2016b）では、雌特異的なエクソンが欠損した変異型 *BmDSX* が雄型 *BmDSX* として機能した可能性が考えられる。*Bmdsx* は *Dmrt-1* ファミリーに属し、この *Dmrt-1* は複数の動物で雄分化に関わることが知られている（Raymond et al., 1999）。昆虫では、雄で雄型 *dsx* によって雄分化だけが引き起こされるだけではなく、雌で雌型 *dsx* が誘導され雌分化を誘導する（Bopp et al., 2014）。この昆虫でみられる雌型 *dsx* による制御が、新規に獲得された制御機構であると仮定すると、*dsx* のデフォルトの機能は雄分化を誘導することであると考えられる。もしかすると、雌型 *BmDSX* の雌特異的領域を欠損することで、デフォルトである雄分化の機能が発揮され、その結果 *TALEN* による雌型 *Bmdsx* ノックアウト個体において精巢類似の組織が形成されたのかもしれない。精巢類似の組織の形成に、雄型 *Bmdsx* もしくは雌特異的領域が欠損した雌型 *Bmdsx* の発現が必要であるのかは、*Bmdsx* の様々な変異体を作成し、その表現型を解析することができれば明らかとなるだろう。

雌型 *Bmdsx* の雌特異的エクソンの破壊は雌における精巢様組織の形成をもたらす（Xu et al., 2015, 2016; Sakai et al., 2016b）が、これらの精巢様組織が成熟精子を含むかどうかは依然として報告がない。キイロショウジョウバエでは、*dsx* の発現が生殖細胞の雄化、雌化に必要なではない（Marsh and Wieschaus, 1978; Schupbach, 1982）。同様に、*Bmdsx* も生殖細胞の性分化に必ずしも必要でない可能性が考えられる。その場合、*Masc-R* が *Bmdsx* を介さずに *ZW* の性染色体構成をもつ生殖細胞の雄化を誘導したのかもしれない。

本研究によって、*Masc-R* の発現により *ZW* 生殖細胞から精子束の分化誘導が起こることがわかった。しかし、*Masc-R/+* 雌で観察された精子束には、完全に成熟した有核精子束がみられなかったこと（図 4-13a）から、完全な精子形成を誘導するには、*Masc-R* 単独での発現では不十分であると考えられる。カイコの *W* 染色体からは *Fem-piRNA* 以外の *piRNA* が転写されていることが知られており（Kawaoka et al., 2011）、もしかするとそれらが成熟精子への分化を阻害するのかもしれない。

鱗翅目昆虫における *Masc* の働き

Masc ホモログは複数の鱗翅目において同定されており、カイコと同じ *Bombycidae* family に属するイチジクカサン（*Trilocha varians*）の *Masc* ホモログ（*TvMasc*）について

は、既に解析が行われている (Lee et al., 2015)。 *TvMasc* を RNAi でノックダウンすると、イチジクカサンの *dsx* ホモログのスプライシングパターンは雄型から雌型へとシフトすることがわかっている。さらに、BmN4 細胞において *TvMasc* cDNA を過剰発現すると、雄型 *Bmdsx* および *Imp^M* の発現が誘導されることも確認されている。これらの結果は、Bombycidae の性決定経路において、*Masc* の機能が進化的に保存されていることを示唆している。*Masc* は CCCH 型ジンクフィンガータンパク質をコードする (Kiuchi et al., 2014) が、*Bmdsx* の性特異的スプライシングの制御にはこのジンクフィンガードメインは必要ではなく、C 末端側に位置する鱗翅目で保存性の高い 2 つのシステイン残基が重要であることがわかっている (Katsuma et al., 2015)。しかし、*Masc* タンパク質がどのような分子メカニズムを介して下流の遺伝子を制御しているのか、という点については依然として謎である。鱗翅目昆虫における遺伝子補正と性決定の分子メカニズムを探るために、この *Masc* タンパク質の直接の標的を同定することが今後の課題である。

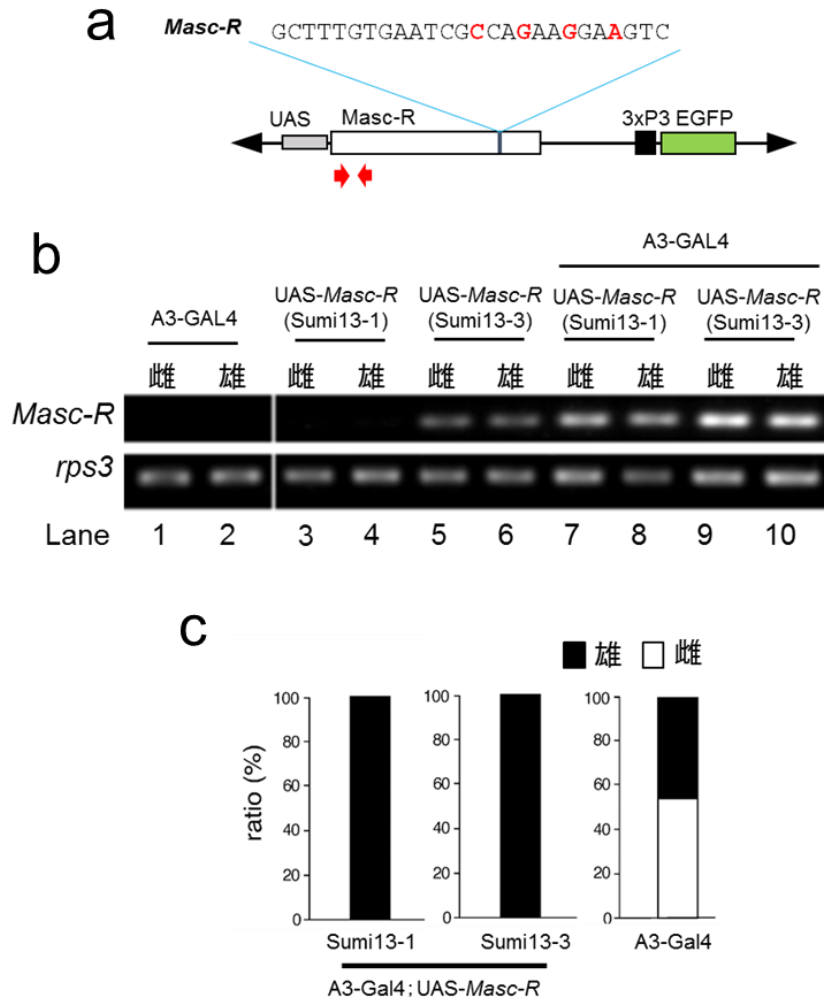


図 4-1. GAL4-UAS システムを用いた *Masc-R* の過剰発現は雌特異的致死を引き起こす

(a) *piggyBac* ベクター pBacMCS [UAS-*Masc-R*, 3xP3-EGFP] の構造 (Sakai and Sumitani et al., 2016b, Fig. 1 より一部改変して抜粋)。白色のボックスは *Masc* の ORF (open reading frame)、緑色のボックスは、3xP3 プロモーターによって発現制御される *EGFP* を示す。赤矢印は *Masc-R* の検出に用いたプライマーの位置を示す。青色のボックスは *Fem*-piRNA の標的配列が存在する位置を示す。*Masc-R* は *Fem*-piRNA 標的配列内の赤字で示した塩基に塩基置換が施されているため、*Fem*-piRNA の分解を受けない。

(b) RT-PCR による *Masc-R* の発現解析 (Sakai and Sumitani et al., 2016b, Fig. 2 より一部改変して抜粋)。Lane1~2, 全身性のドライバーである *BmActin3* (A3)-GAL4 組換え遺伝子をもつ系統 (A3-Gal4 系統) 由来の個体。Lane 3~6, UAS-*Masc-R* 組換え遺伝子をもつ系統由来の個体。Lane 7~10, A3-Gal4 と Sumi13-1 もしくは Sumi13-3 の交配によって得られた A3-Gal4 と *Masc-R* 両方の組換え遺伝子をもつ個体。RT-PCR のコントロールとして *ribosomal protein S3* (*rpS3*) が用いられている。(c) A3-GAL4 と *Masc-R* 両方の組換え遺伝子をもつ集団 (A3-Gal4 ; UAS-*Masc-R*) の 5 齢幼虫期における雌雄の割合 (Sakai and Sumitani et al., 2016b, Table 1 より一部改変して抜粋)。コントロールとして、A3-Gal4 系統の集団が用いられている。

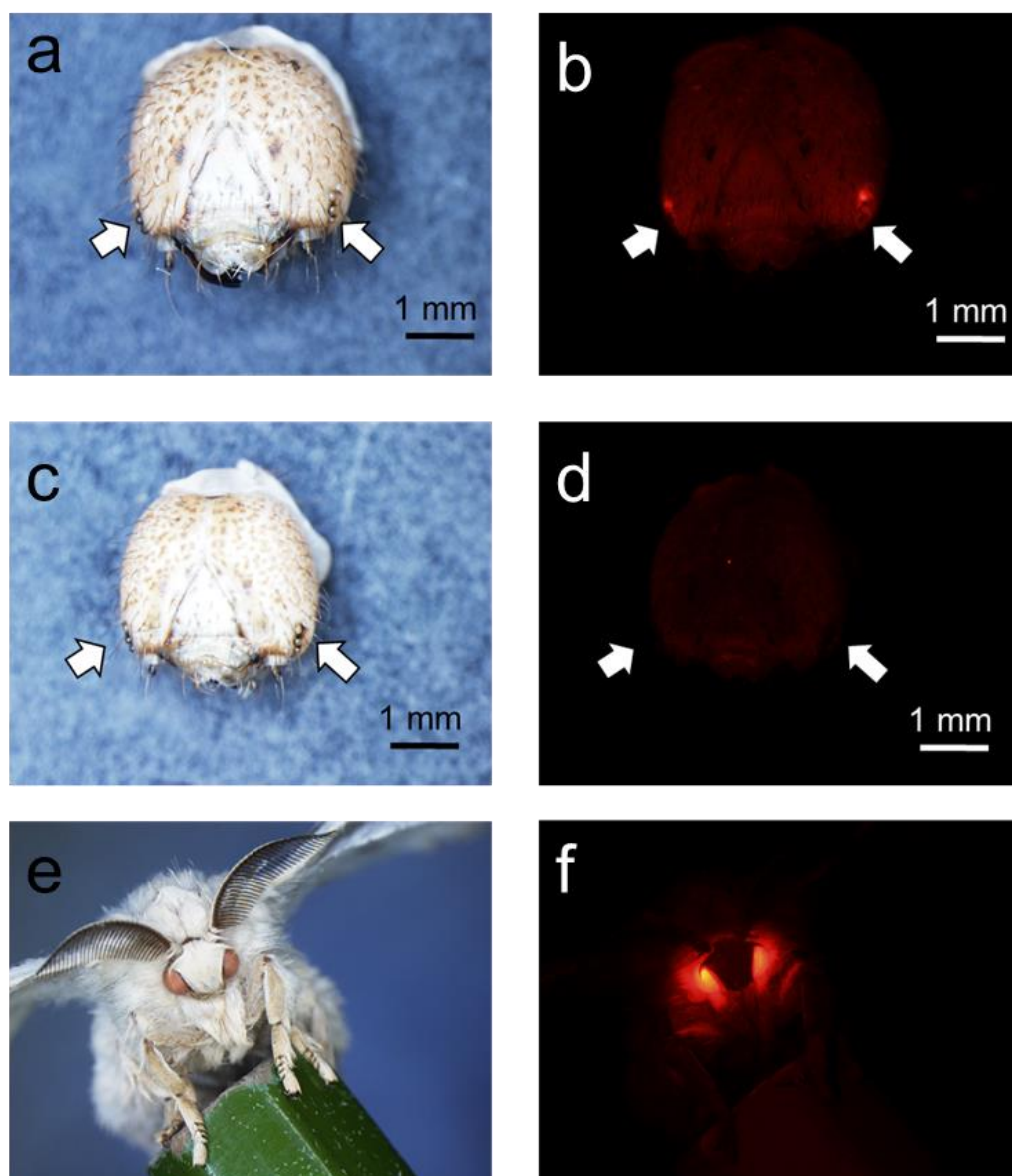


図 4-2. 限性 DsRed 系統、Suzu19-1 における *DsRed* マーカーの発現

Suzu19-1 は、3xP3 プロモーターによって制御される *DsRed* 遺伝子を、雌特異的染色体である W 染色体にもつ。(a, b) Suzu19-1 の雌の幼虫頭部。(a) 明視野。(b) 蛍光像。

(c, d) Suzu19-1 の雄の幼虫頭部。(c) 明視野。(d) 蛍光像。(e, f) Suzu19-1 の雌の成虫。(e) 明視野。(f) 蛍光像。白矢印で幼虫の単眼の位置を示した。

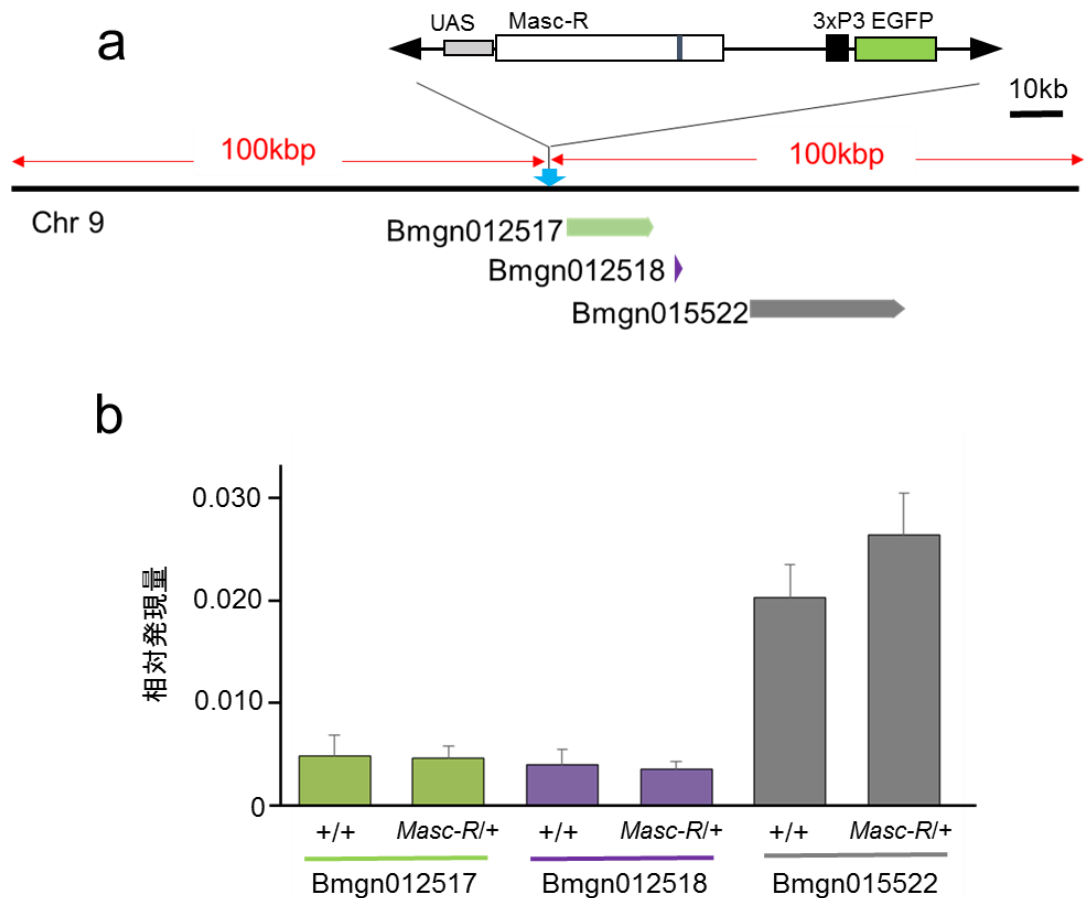
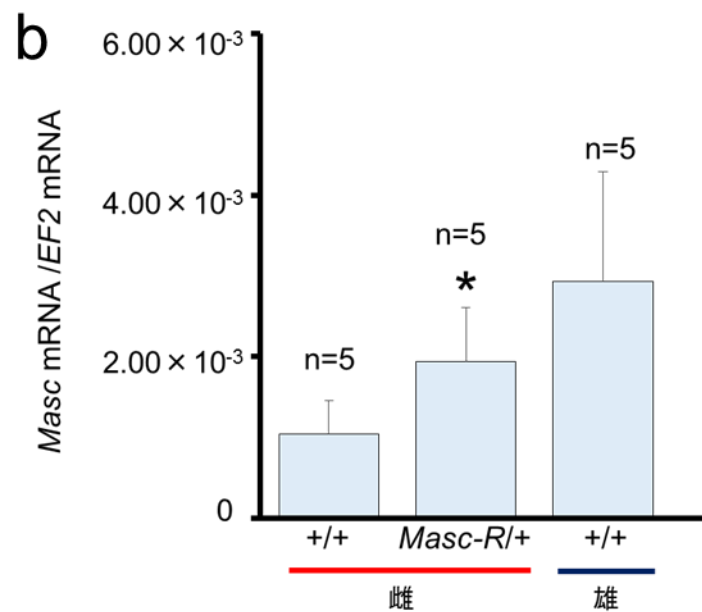
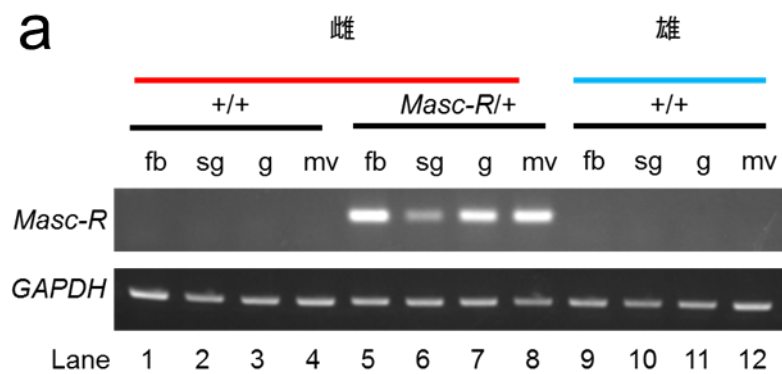


図 4-3. Sumi13-3 における *Masc-R* 組換え遺伝子挿入部位と近傍の遺伝子の発現

(a) Sumi13-3 における *Masc-R* 組換え遺伝子挿入部位 (Sakai and Sumitani et al., 2016b, Fig. 1 より一部改変して抜粋)。染色体 DNA を黒線で示した。染色体 DNA 上の青矢印は組換え遺伝子の挿入部位を示す。カイコゲノムブラウザ KAIKOBASE に登録されている予想遺伝子を緑色 (Bmgn012517)、紫色 (Bmgn012518)、灰色 (Bmgn015522) のボックスで示した。(b) 孵化後 1 日目の 1 齢幼虫における Bmgn012517、Bmgn012518、Bmgn015522 の遺伝子発現量を qRT-PCR によって定量した。Masc-R/+ (*Masc-R* をヘテロでもつ Sumi13-3); +/+ (Sumi13-3 の同一蛾区内の *Masc-R* をもたない雌)。qRT-PCR の内部標準として *EF2* を用い、*EF2* の発現量を 1 として比較したときの各遺伝子の発現量を縦軸に示した。エラーバーは標準偏差を示す。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-4. Sumi13-3 雌における *Masc-R* 遺伝子の発現量

(a) Sumi13-3 系統の 5 齢 3 日目幼虫の複数の組織における *Masc-R* の発現を RT-PCR により調査した。*Masc-R/+* (*Masc-R* をヘテロでもつ Sumi13-3); *+/+* (Sumi13-3 の同一蛾区内の *Masc-R* をもたない雌)。fb, 脂肪体。sg, 絹糸腺。g, 生殖巣。mv, マルピーギ管。(b) 1 齢 1 日目幼虫の *Masc* と *Masc-R* を合わせた発現量を qRT-PCR によって調べた。*EF2* を内部標準として用いた。* Welch's t-test で *+/+* 雌と比較して有意差あり ($p < 0.05$)。エラーバーは標準偏差を示す。

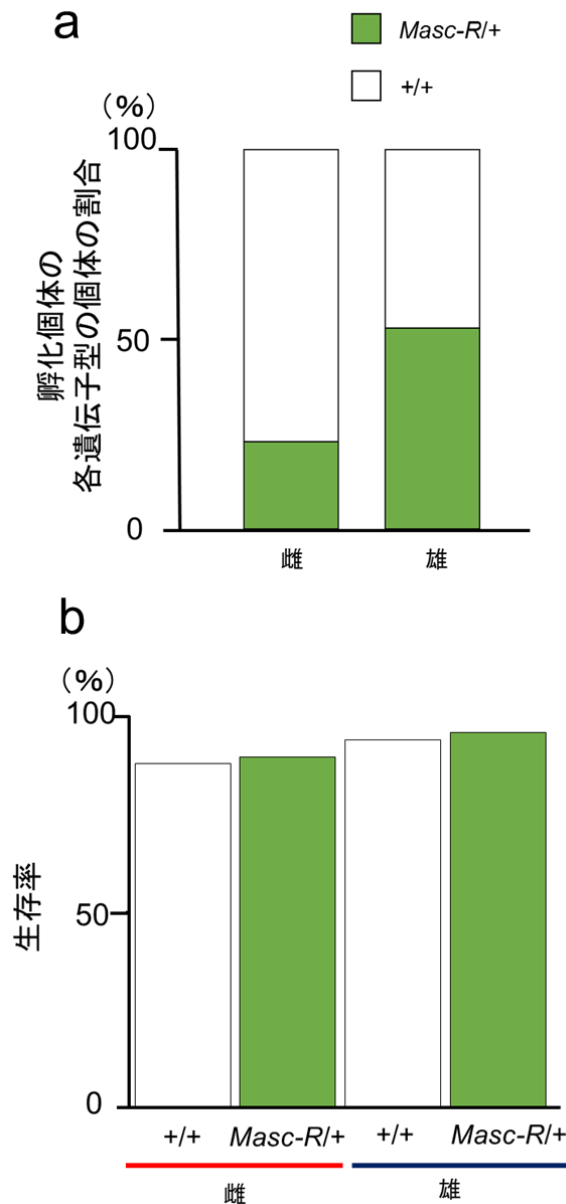


図 4-5. Sumi13-3 の生存率

(a) Suzu19-1 雌 (+/+) × Sumi13-3 雄 (*Masc-R/+*) の交配によって得られた 1 蛾区内から孵化した孵化後 2 日目の 1 齢幼虫を雌雄に分けた後、各遺伝子型 (+/+, *Masc-R/+*) の個体の割合を調査した。4 蛾区について調査し、それぞれの遺伝子型の割合の平均値を棒グラフで示した。孵化した個体の遺伝子型は、雌雄の判断を *DsRed* マーカーの有無で、*Masc-R* 遺伝子の有無を *EGFP* マーカーによって判断した。(b) Sumi13-3 の孵化以降の生存率。Suzu19-1 雌 × Sumi13-3 雄の交配によって得られた各遺伝子型 (+/+ 雌, *Masc-R/+* 雌, +/+ 雄, *Masc-R/+* 雄) をもつ個体をそれぞれについて 50 匹ずつ飼育し、成虫まで生存した個体の割合を棒グラフで示した。+/+ を白、*Masc-R/+* を緑の棒グラフで示した。

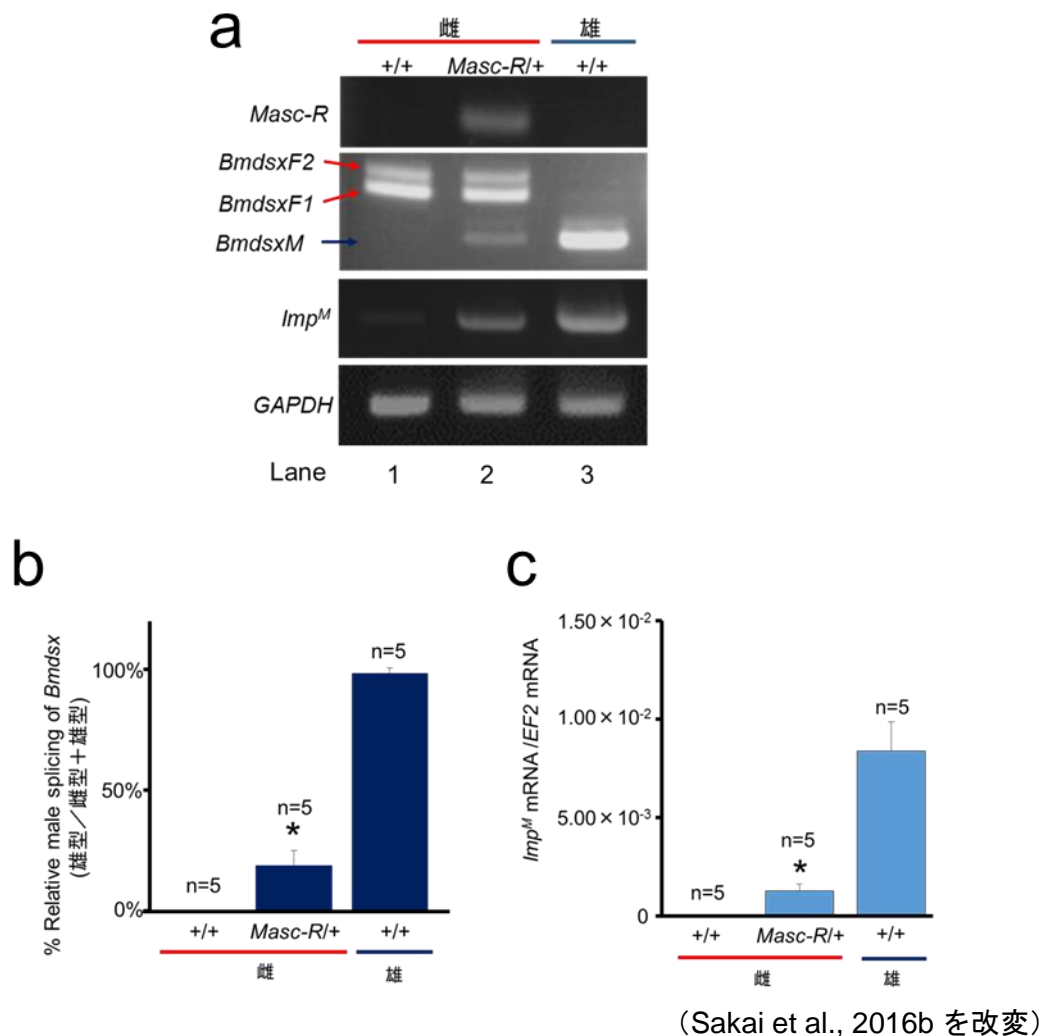
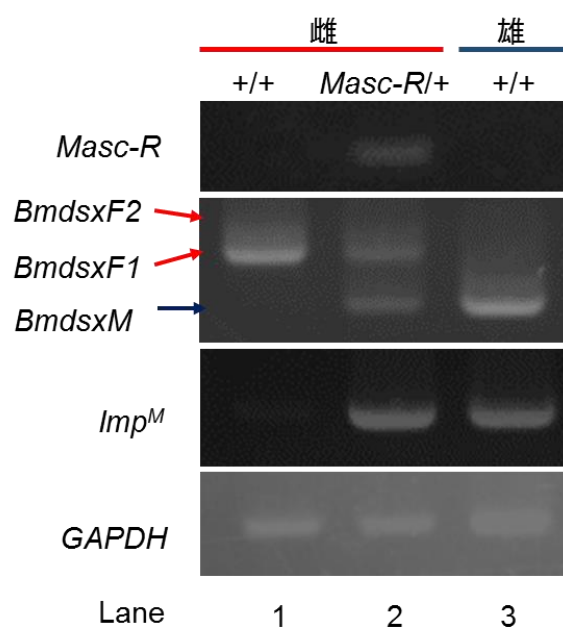


図 4-6. 1 齢 1 日目の *Masc-R/+* 雌における性決定遺伝子の発現

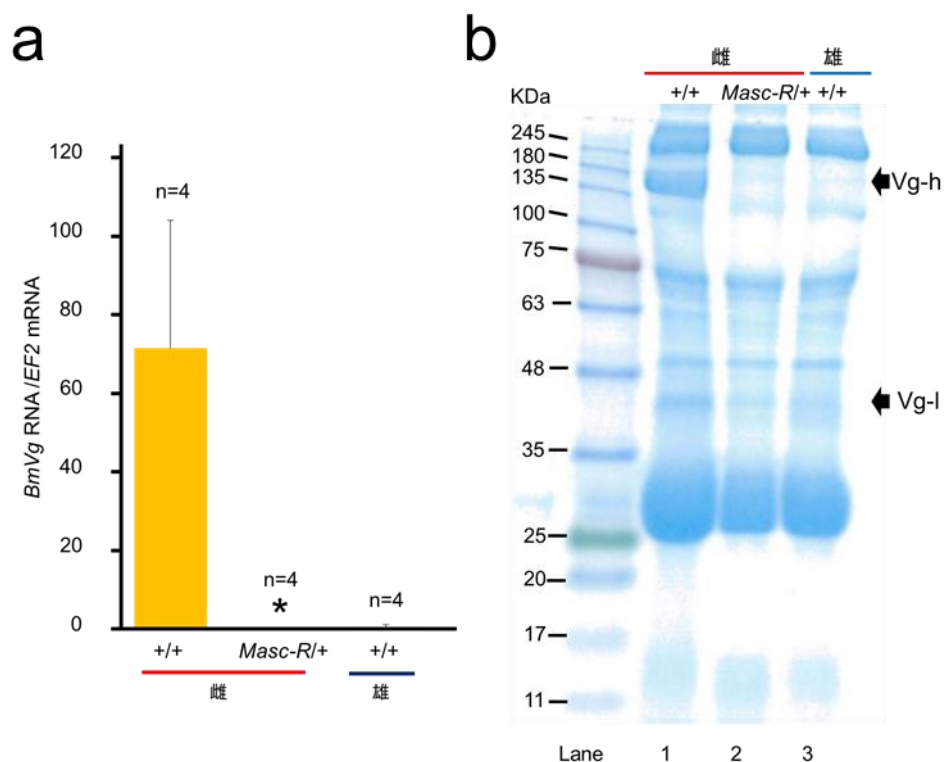
(a) *Masc-R/+* 雌における *Masc-R*、*Bmdsx*、*Imp^M* の発現を RT-PCR によって調べた。内部標準として *GAPDH* を同一の手法により増幅した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1* 並びに *BmdsxF2*)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) のサイズを表している。(b) *Masc-R/+* 雌における雄型 *Bmdsx* の定量解析。RT-PCR の結果、電気泳動像において得られた雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*)、雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1*、*BmdsxF2*) それぞれに相当する DNA バンドのシグナル強度を Image J によって定量し、雄型 *Bmdsx* のシグナル強度を、雌型 *Bmdsx* と雄型 *Bmdsx* のシグナル強度の合計値で割った値を算出し、グラフで示した。n は調査したサンプル数を示す。* Mann-Whitney U test で +/+ 雌と比較して $p < 0.05$ で有意差あり。エラーバーは標準偏差を示す。(c) *Imp^M* の発現量を qRT-PCR によって定量した。* student t-test で +/+ 雌と比較して $p < 0.05$ で有意差あり。エラーバーは標準偏差を示す。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-7. 蛹化直後の脂肪体における *Masc-R*、*Bmdsx*、*Imp^M* の発現

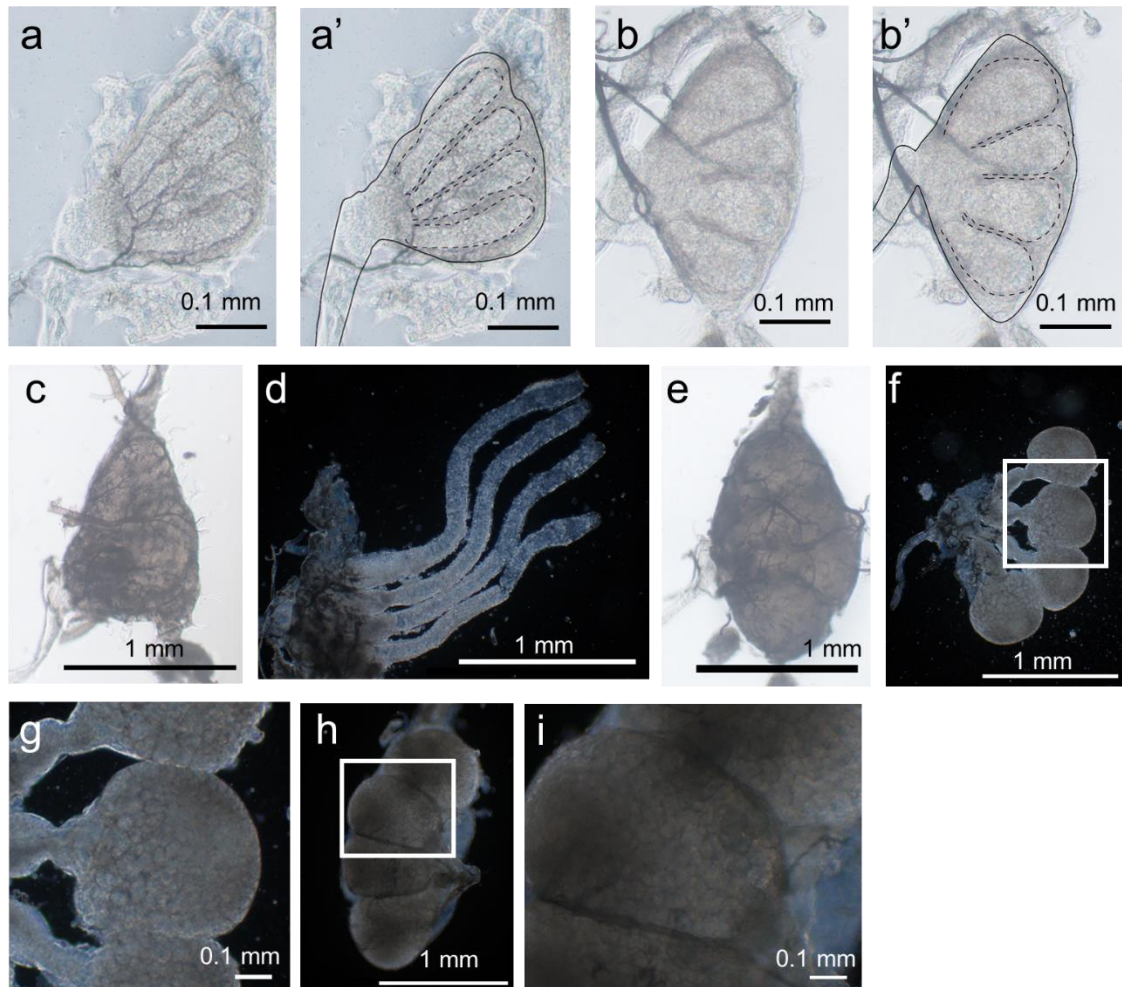
蛹化後 3 時間以内の蛹の脂肪体から調製した cDNA を鋳型に RT-PCR を行い、*Masc-R*、*Bmdsx*、*Imp^M* の発現を調べた。内部標準として *GAPDH* を同一の手法により増幅した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1* 並びに *BmdsxF2*)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) のサイズを表している。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-8. Sumi13-3 の脂肪体におけるビテロジェニン合成

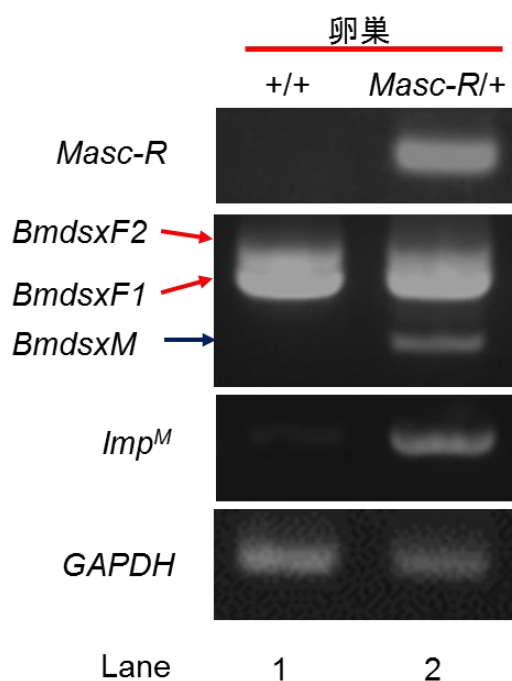
(a) 蛹化後 3 時間以内の蛹の脂肪体における *BmVg* の発現レベルを qRT-PCR によって定量した。* Welch's t-test で *+/+* 雌と比較して有意差あり。エラーバーは標準偏差を示す。(b) 蛹後 3 時間以内の蛹の体液中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE によって調べた。分子量から *BmVg* heavy chain (Vg-h) 並びに *BmVg* light chain (Vg-l) だと考えられるタンパク質を矢印で示した。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-9. *Masc-R/+* 雌で観察された卵巣の形態異常

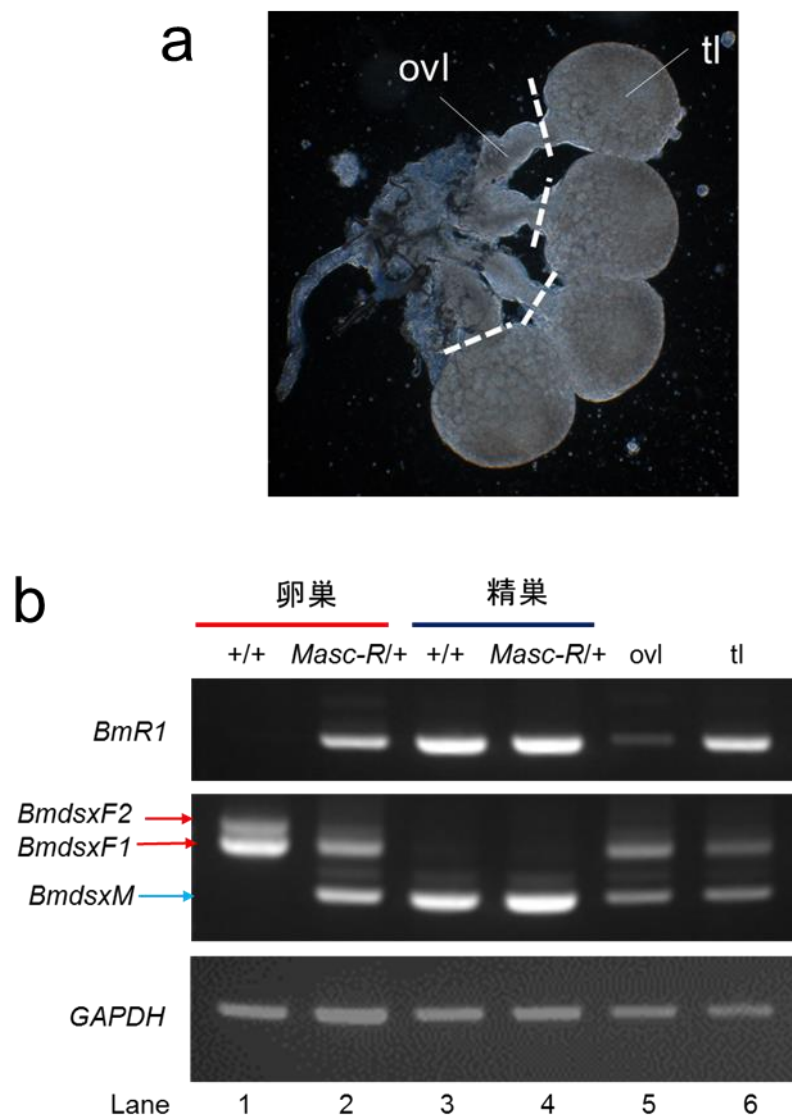
(a) 3 齢 0 日目の+/+ 雌の卵巣。(b) 3 齢 0 日目 *Masc-R/+* 雌の卵巣。(a', b') (a) (b) で示した卵巣の基底膜を実線で、卵巣小管を点線で囲んだ。(c) 5 齢 0 日目における+/+ 雌の卵巣。(d) (c) で示した卵巣の基底膜を取り除いた。(e) 5 齢 0 日目における *Masc-R/+* 雌の卵巣。(f) (e) で示した卵巣の基底膜を取り除いた。(g) (f) において白ボックスで示した部分を拡大した。(h) 5 齢 0 日目における+/+ 雄の精巣。(i) (h) において白ボックスで示した部分を拡大した。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-10. 卵巢における *Masc-R*、*Bmdsx*、*Imp^M* の発現

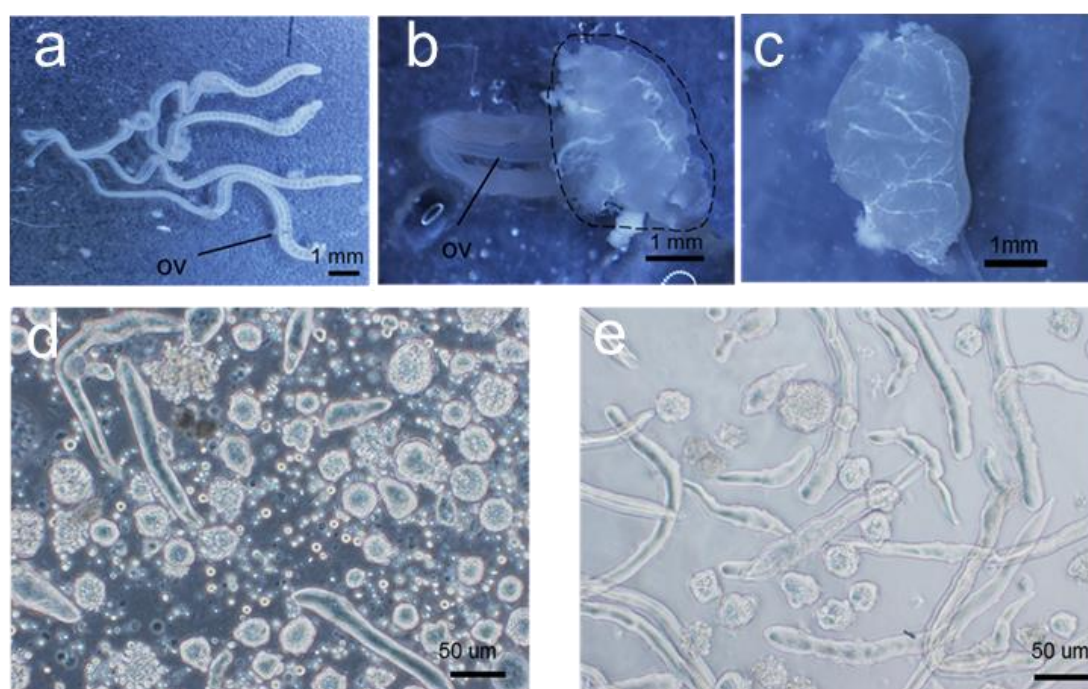
3 歳の卵巢における *Masc-R*、*Bmdsx*、*Imp^M* の発現を RT-PCR によって調べた。内部標準として *GAPDH* を同一の手法により増幅した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1* 並びに *BmdsxF2*)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) のサイズを表している。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-11. *Masc-R/+* 雌にみられた精巣類似組織における *BmR1* の発現

(a) 5 齢 0 日目における *Masc-R/+* 雌の卵巣を点線部で切り取り、卵巣小管 (ovl) と精巣類似組織 (tl) とに分け、(b) で示した RT-PCR に供試した。(b) 卵巣、精巣、及び (a) で示した卵巣小管 (ovl) と精巣類似組織 (tl) における *BmR1* 遺伝子と *Bmdsx* の発現を RT-PCR によって調べた。内部標準として *GAPDH* を同一の手法により増幅した。電気泳動写真の左に示した赤矢印は雌型 *Bmdsx* (*BmdsxF1* 並びに *BmdsxF2*)、青矢印は雄型 *Bmdsx* (*BmdsxM*) のサイズを表している。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-12. 精巢類似組織内にみられた精子束

(a) 蛹化 0 日目の+/+ 雌蛹における卵巣。ov, 卵巣小管。(b) 蛹化 0 日目の *Masc-R/+* 雌蛹における卵巣。精巢類似組織を点線で囲んだ。ov, 卵巣小管。(c) 蛹化 0 日目の+/+ 雄蛹における精巣。(d) (b) で示した精巢類似組織において観察された精子束。位相差顕微鏡によって観察した。(e) +/+ 雄の精巣内で観察された精子束。

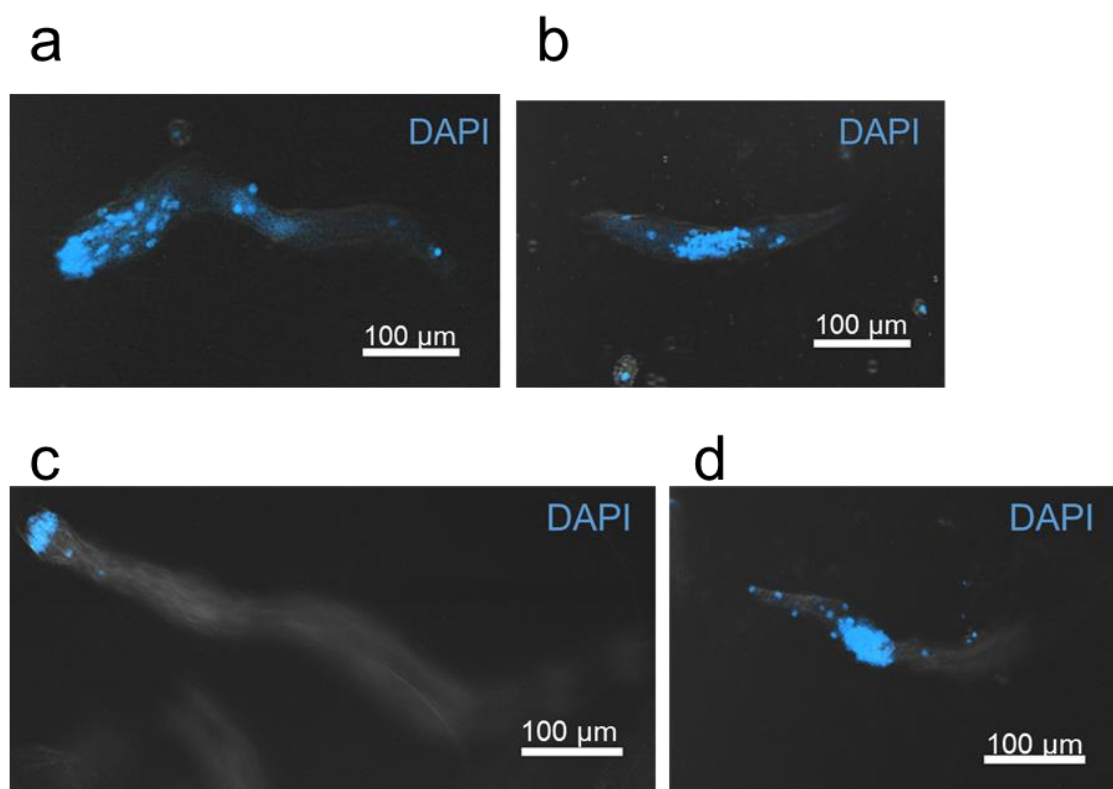
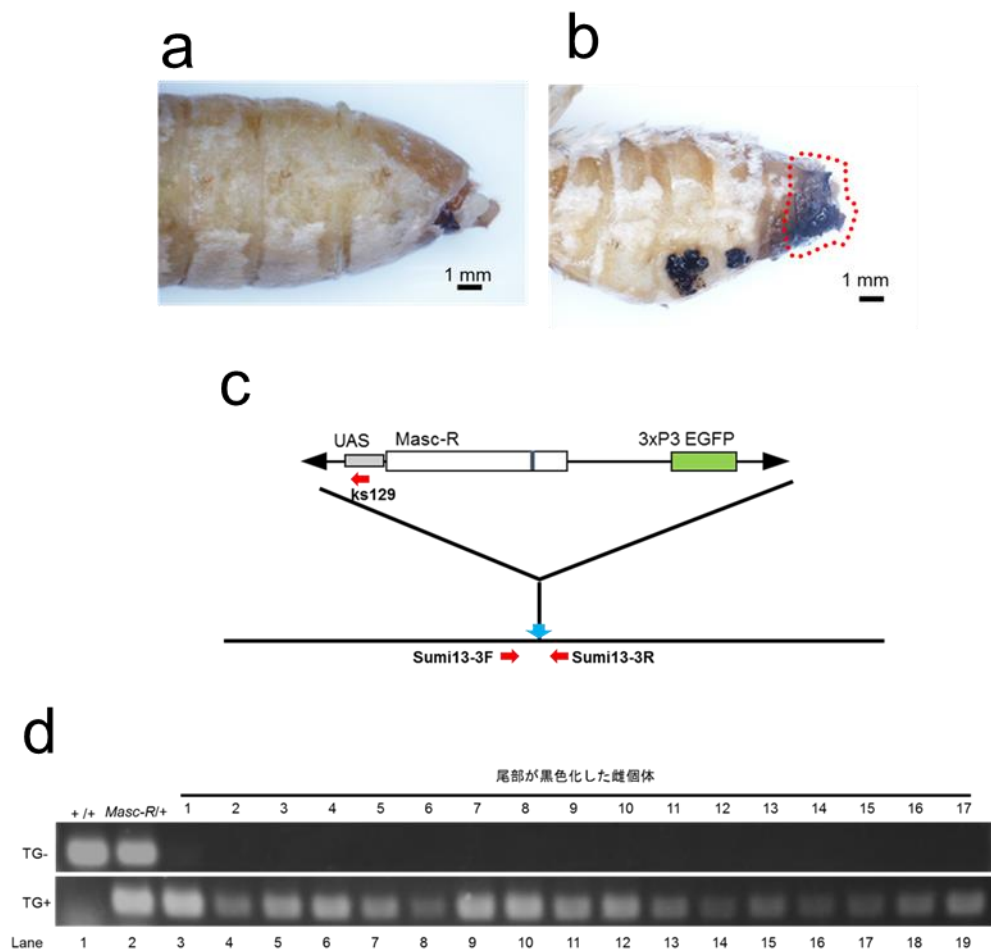


図 4-13. *Masc-R/+* 雌にみられた精子束

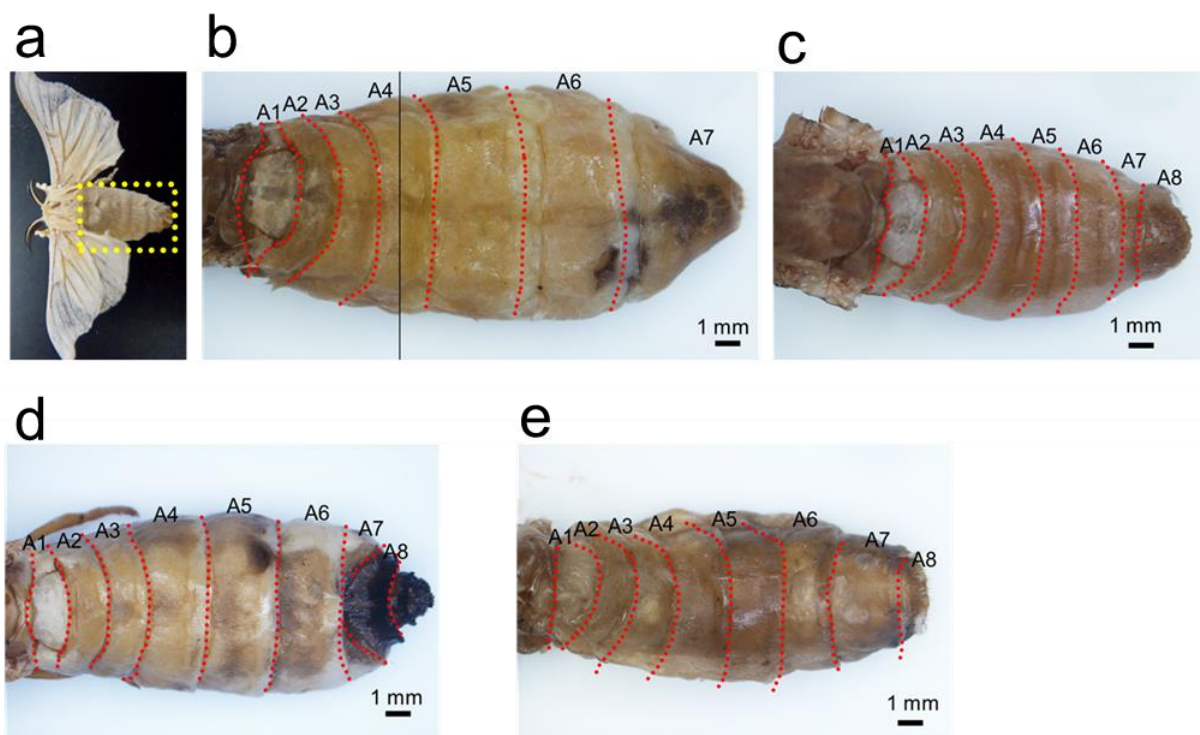
精子束を DAPI により染色し、共焦点顕微鏡によって観察した。(a) (b) *Masc-R/+* 雌にみられた精子束。(c, d) *+/+* 雄の精巣内にみられた精子束。(c) 有核精子束。(d) 無核精子束。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-14. 尾部が黒色化した雌個体の遺伝子型 (*Masc-R* ホモ・ヘテロ) の判定

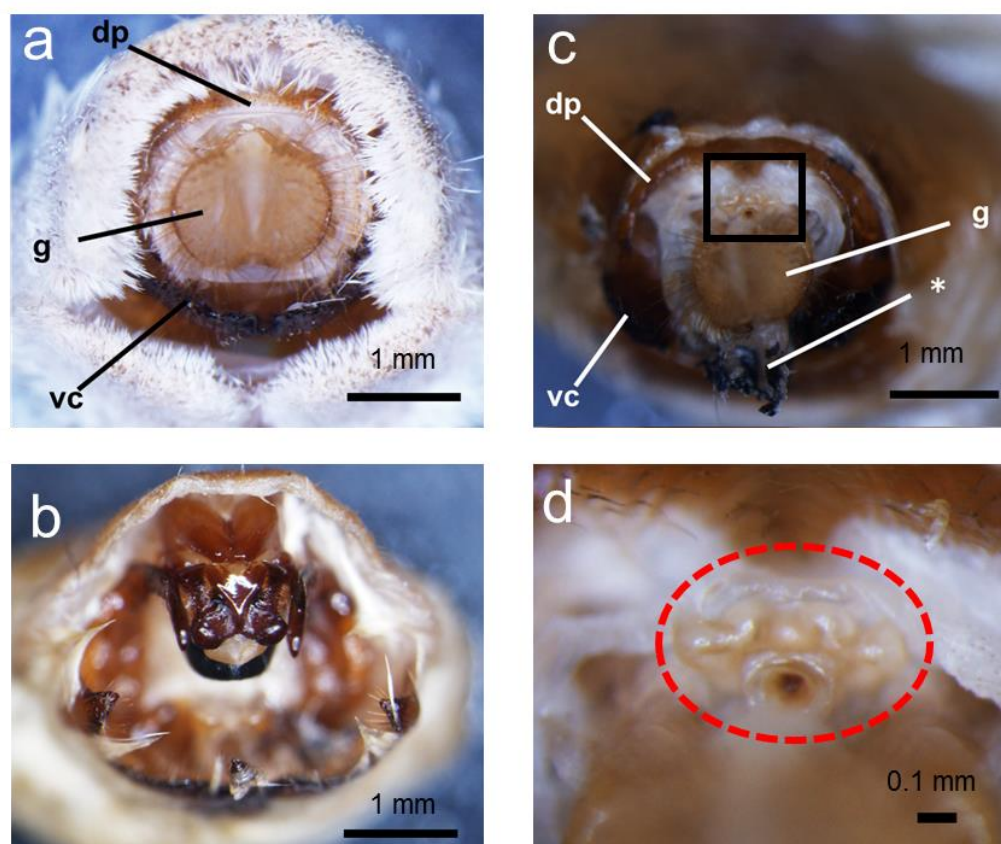
(a) +/+ 雌の尾部。(b) *Masc-R* をもつ雌においてみられた黒色化した尾部。黒色化した部位を赤点線で囲んだ。(c) 遺伝子型 (*Masc-R* ホモ・ヘテロ) の判定に用いたプライマーの位置。プライマーの位置を赤い矢印で示した。黒線が染色体 DNA を表し、黒線上の青い矢印は、*Masc-R* 組換え遺伝子の挿入部位を示す。(d) (c) で示したプライマーを用いてゲノム PCR を行った。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動で分離した。上のパネル (TG-) は、*Masc-R* 組換え遺伝子の挿入部位に隣接するゲノム領域に設計した Sumi13-3F および Sumi13-3R を用いて、ゲノム PCR を行ったときの増幅産物を示す。下のパネル (TG+) は、*Masc-R* 組換え遺伝子内と、挿入部位に隣接するゲノム領域に設計した Sumi13-3F および ks129 を用いた PCR 増幅産物を示す。+/+ は、*Masc-R* 組換え遺伝子をもたない雌由来のゲノム DNA を PCR の鋳型に用いた。*Masc-R*/+ は *Masc-R* をもヘテロにもつことが遺伝学的に明らかとされた雌由来のゲノムを PCR の鋳型に用いた。尾部の黒色化が観察された雌 17 個体を実験に供試した。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-15. *Masc-R/Masc-R* の成虫腹部の観察

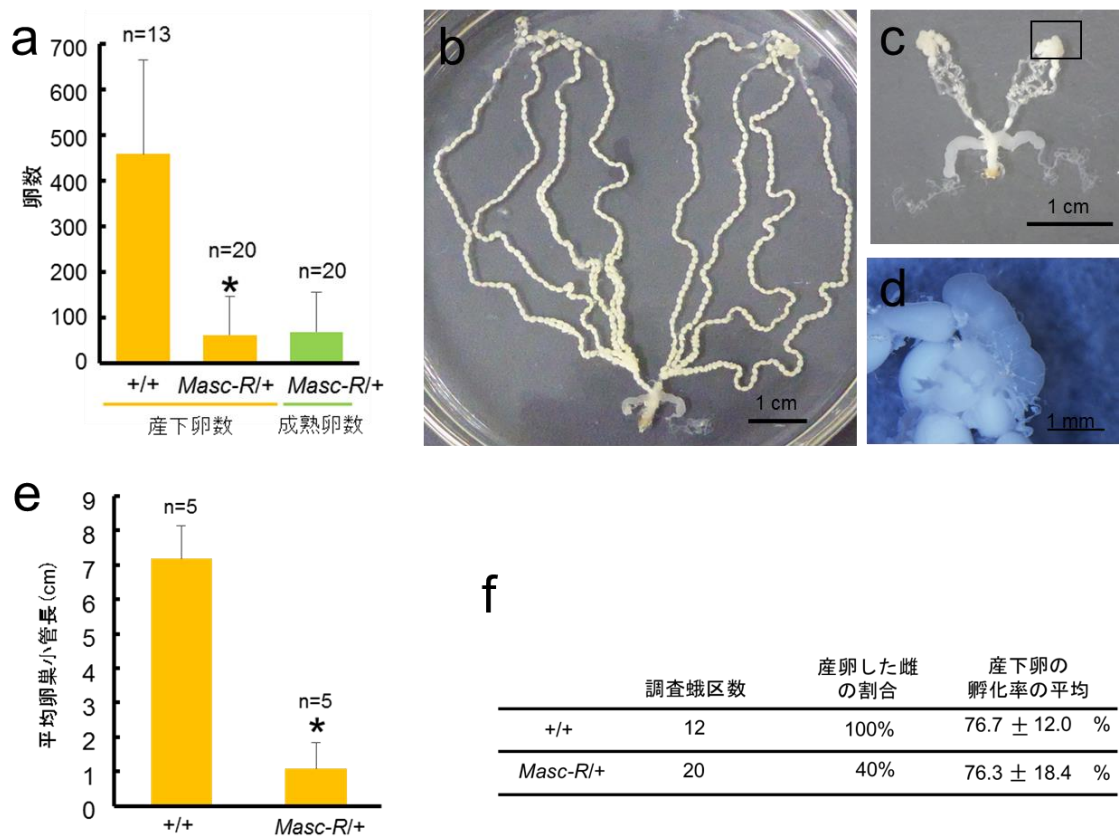
(a) カイコの成虫を上から撮影した写真。観察した腹部を黄色の点線で示した。(b) $+/+$ 雌の成虫腹部。(c) $+/+$ 雄の成虫腹部。(d) (e) *Masc-R/Masc-R* 雌の成虫腹部。赤の点線で各腹節の境界を示した。A1~A8, 第1腹節~第8腹節。腹節を観察しやすくするため鱗毛と成虫翅を除去した。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-16. カイコ成虫の外部生殖器

(a) +/+ 雌の外部生殖器。(b) +/+ 雄の外部生殖器。(c) *Masc-R/Masc-R* 雌の外部生殖器。(d) (c) において四角で囲んだ領域を拡大したもの。雄の外部生殖器と類似の構造を赤点線で囲んだ。dp, 背板。g, 側唇。vc, 腹面キチン板。*, 黒色化したキチン質の組織。



(Sakai et al., 2016b を改変)

図 4-17. *Masc-R* の発現が卵形成へ及ぼす影響

(a) 産下卵数およびの卵巣内に残存する成熟卵数の平均値。n は調査個体数。エラーバーは標準偏差を示す。* Welch's t-test で+/+ 雌の産下卵数と比較し有意差あり。(b) +/+ 成虫雌の内部生殖器。(c) *Masc-R/+* 成虫雌の内部生殖器。(d) (c) において四角で囲んだ部分を拡大して撮影。(e) 平均卵巣小管長。1 個体において 8 本ある卵巣小管の長さを測定し、その平均値を調べた。n は調査個体数。エラーバーは標準偏差を示す。* Welch's t-test で+/+ 雌と比較し有意差あり。(f) 産卵した雌の割合と産下卵の孵化率。1 粒以上産卵した雌個体を“産卵した雌”として判定した。産下卵の孵化率の平均は、産卵が認められた蛾区(1 組の雌雄の交配により産下された卵塊)の孵化率を調査し、平均値±標準偏差で示した。

表4-1. PCRに用いたプライマーの配列（第四章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')	Denaturation	Annealing	Elongation	n°cycle
<i>Bmdsx</i>	FDSX-F2	CGCCTTACCGCAGACAGGCAG	98°C 10sec	57°C 30sec	72°C 60sec	35
	FDSX-R4	GCGCAGTGTGTCGCTACAAGG				
<i>Imp^M</i>	BmMP-F	ATGGACGGTGACATGTCTCAAG	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec	30
	BmMP-R	TCATCCCGCCTCAGACGATTG				
<i>BmR1</i>	BmR1F	GCTGGGCTGTTCTACCGAAT	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec	35
	BmR1R	TCCCAACATCTAATCCTTCTG				
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F	CATGAACAGTAGTCATCAAGC	98°C 10sec	55°C 30sec	72°C 60sec	26
	GAPDH-R	GCCGCATTGGCCGTTTGGTGC				
TG-	Sumi13-3F	TGCCGATGTTTATGAAGAACGGTAGTC	98°C 10sec	57°C 30sec	72°C 60sec	30
	Sumi13-3R	CCTTAATCGTGGAAAGTGATTCTGTG				
TG+	Sumi13-3F ks129	TGCCGATGTTTATGAAGAACGGTAGTC AAATCAGTGACACTTACCGCATT	98°C 10sec	57°C 30sec	72°C 60sec	30
	Masc-RF	ATGGATTACAAGGATGACGAC				
<i>Masc-R</i>	Masc-RR	CCAGAGGAAGTTGCGACAAAG	98°C 10sec	57°C 30sec	72°C 60sec	30

表4-2. qRT-PCRに用いたプライマーの配列（第四章）

Target	Primers	Sequence (5'→3')
<i>BmVg</i>	BmVgF	CAGCGGAAGTGCTTTCAAAGC
	BmVgR	TTGAGATCAACAGGCAGTTCC
<i>Bmgn</i>	012518F	GTGTTTGTCTCGCATCATTC
<i>012518</i>	012518R	AATTGCATGCCGCAAACGTC
<i>Bmgn</i>	012517F	TGACTATCTCGGAGATCTTTG
<i>012517</i>	012517R	GACGACTTTAAACGCAGCCG
<i>Bmgn</i>	015522F	TCCACAACGATCCACTTATTG
<i>015522</i>	015522R	TCTCAGGGGTCTAATGGAG
<i>Fem</i>	FemQ-F	TGGTTTATACAATCGATCCACTG
	FemQ-R	CTGACTCACTTAAATTCGATCTC
<i>Masc</i>	MascF	GCTAAAATTGCTGGGATTGCTA
	MascR	CAGCAATCGGAATTTTCTTCTG
<i>Imp^M</i>	BmMPE7-F	ATGCGGAAAGGTTTATG
	BmMP-R	TCATCCCGCCTCAGACGATTG

総合考察

本研究では、第一章でカイコの性決定時期がへら形期であることを明らかにし、第二章でへら形期の雌雄の遺伝子発現を比較することで *Fem* を同定した。また、第三章では *Fem* とその直接の標的遺伝子である *Masc* (Kiuchi et al., 2014)、*Bmdsx* の雄型スプライシングに必要な *Imp^M* (Suzuki et al., 2010) との関係を調べることでカイコの性決定カスケードのモデルを提唱することができた。第四章では *Masc-R* の過剰発現系統を用いた解析から、*Masc* がカイコの生殖細胞や体細胞における雄分化にとって極めて重要な働きをもつことを明らかにした。*Masc* がカイコの雄化にとって重要な遺伝子であることから、*Masc* の発現を直接抑制し、W 染色体に座上する *Fem* は、かつて橋本が 1933 年に報告した優性の雌決定遺伝子 (橋本 1933) の実体であるといえる。

カイコの性決定マスター遺伝子である *Fem* は、piRNA の前駆体として働き *Masc* を分解する (Kiuchi et al., 2014)。*Masc* のホモログは複数の鱗翅目において同定されており、少なくともカイコが属する Bombycidae family の性決定において、*Masc* の機能が進化的に保存されていることが示唆されている (Lee et al., 2015)。*Masc* がほかの鱗翅目で同定されているのに対して、*Fem* はカイコとクワコにしか存在しない (Kiuchi et al., 2014)。このことから *Fem* は種間で保存性が低い遺伝子と考えられ、これは「性決定カスケードは上流ほど変化しやすい」という Wilkins の仮説に一致している (Wilkins, 1995)。Wilkins は、性決定マスター遺伝子が座位する染色体領域は相同染色体との組換えが起こらなくなるため、その結果機能を失いやすい状態となり、新しい遺伝子に性決定機能をとって変わられることを予想している。この予想に一致して、これまでに同定された性決定マスター遺伝子は多様性に富む。たとえば哺乳類の雄決定遺伝子 *Sry* は HMG (High Mobility Group) ボックスをもつ転写因子ファミリーに属するタンパク質であり (Kashimada and Koopman, 2010)、トラフグの雄決定遺伝子 *Amhr 2* (*anti-Müllerian hormone receptor type II*) はホルモン受容体 (Kamiya et al., 2012) の一種である。一方、キイロショウジョウバエの雌決定遺伝子 *Sxl* はスプライシング因子 (Salz and Erickson, 2010) であり、マメガキの雄決定遺伝子 *OGI* は siRNA の前駆体 (Akagi et al., 2014) として働く。

このように性決定遺伝子が多種多様であることから、新規の性決定遺伝子の獲得は頻繁に起こることが考えられる。実際、オカダンゴムシでは、ゲノム中に共生細菌の一種であるボルバキアのゲノムの一部が水平伝播することで新たな性決定遺伝子を

獲得している集団が存在する (Leclercq et al., 2016)。この集団は同種内の一部にすぎないことからこの新規性決定機構の獲得はつい最近起きたと考えられている。また、哺乳類ではほとんどの哺乳類がY染色体上の*Sry*遺伝子を性決定マスター遺伝子として利用しているが、アマミトゲネズミとトクノシマトゲネズミはY染色体も*Sry*も持たない (Otake and Kuriwa, 2016)。Y染色体と*Sry*の喪失は、近縁種であるオキナワトゲネズミ (XX/XY型の性決定を行う) から上記2種が分岐した250~270万年前以後に起きたと推定されている。トクノシマトゲネズミは、*Sry*の代替遺伝子として

CBX2 (*chromobox homolog 2*) を性決定遺伝子として利用しているのではないかと予想されている (Kuroiwa et al., 2011)。マウスにおいて*CBX2*をノックアウトすると、XY個体に卵巣と雌型外部生殖器が形成される (Katoh-Fukui et al., 1998)。またヒトの場合、*CBX2*に突然変異をもつ男性はY染色体をもつにも関わらず外部生殖器が女性化する

(Biason-Lauber et al., 2009)。これらの報告から、*CBX2*が*Sry*の代替遺伝子として機能する可能性は十分に考えられるが、*CBX2*がトクノシマトゲネズミにおいて*Sry*の代替遺伝子として機能するかどうか、今のところ確証は得られていない。カイコではpiRNAによって性決定が行われるが、piRNAは主に動物の生殖細胞におけるトランスポゾンを分解する働きをもつ。このpiRNAは、piRNA前駆体をコードするゲノム領域 (piRNAクラスター) から転写されるRNAがPiwiタンパク質に取り込まれることによって産出される (Girard et al., 2006, Brennecke et al., 2007)。カイコのW染色体はpiRNAの供給源となっていることから (Kawaoka et al., 2011)、おそらくW染色体上のpiRNAクラスター配列の中に、*Masc*を標的とする塩基配列が偶発的に獲得されたか、あるいは*Masc*遺伝子内にpiRNAの標的となる塩基配列が偶発的に生じた結果、piRNAによる性決定というユニークな制御機構が進化したと考えられる。現時点では、*Fem*はカイコの祖先種であるクワコにしかみつかっていない (Kiuchi et al., 2014)。他の鱗翅目昆虫のW染色体の塩基配列が決定されれば、*Fem*をもつ種とそうでない種が明らかとなり、それにより*Fem*がいつごろ出現したのか、よりはっきりとしたことがわかるであろう。

性決定カスケードの上流の遺伝子に変化しやすいのであれば、過去に用いられていた性決定遺伝子の痕跡がゲノム上に存在するはずである。カイコには、*Masc*以外にも *CCCH type Zinc-finger protein* の *Znf* (*Z-linked CCCH type zinc finger*) 遺伝子がゲノム上に複数存在し、そのうちの一つの *Znf-2* は *dsx* の性特異的スプライシングを制御する機能をもつ (Gopinath et al., 2016)。さらに、それらのうちの一つの *Z1* と名付けられた遺伝子は、カイコ W 染色体上に存在する (Ajimura et al., 2006; Gopinath et al., 2016)。これらの遺伝子が、カイコの性決定に関与しているのかは不明であるものの、*Fem-Masc* の従属関係が支配的ではなかった時代において、性決定に支配的な役割を

もっていたのかもしれない。これらの遺伝子がまだカイコで性決定や性分化に関わっているのか、それとも偽遺伝子として存在しているだけなのか、RNAi やノックアウトなどの機能解析によって明らかとなるだろう。

Wilkinsの仮説では、性決定マスター遺伝子が増化しやすいのに対して、性決定カスケード下流の遺伝子は保存されていることが述べられている (Wilkins, 1995)。これは、下流の遺伝子は正常な性分化をもたらす上で発生学上重要であることから、通常の形態形成遺伝子のように種間で保存されることによる。実際、これまで調べられてきたほとんどの昆虫では、*dsx*が性決定カスケードの最下流で働く遺伝子として機能することがわかっている (Saccone et al., 2002; Bopp et al., 2014)。それでは、性決定マスター遺伝子と*dsx*とを結ぶ、カスケードの中間をなす遺伝子は種間で保存されているのだろうか。ショウジョウバエでは*tra*がカスケードの中間を占める遺伝子として働くが、その後、ショウジョウバエ以外の双翅目昆虫や鞘翅目昆虫、膜翅目昆虫において*tra* オルソログの同定が相次いだことから、*dsx*の上流で働く遺伝子は保存されているとの考え方が支配的であった (Saccone et al., 2002; Bopp et al., 2014)。しかし、昆虫5000種類の全ゲノム配列の決定を目指したi5k計画が進むにつれ、ゲノム中に*tra* オルソログをもたない種も少なからず存在することが明らかになるにつれ、*tra*を介さない性決定カスケードの存在が予想されるようになった (Geuverink and Beukeboom, 2014)。これまで全ゲノム配列が公開されているカイコを含む3種の鱗翅目昆虫のいずれにおいても*tra*は見つかっていないが、本研究によって*dsx*のスプライシング制御に*tra*を用いない昆虫性決定カスケードを初めて具体的に示すことができたといえる (図 5-1)。

TRA、TRA-2の働きによって*dsx*の性特異的スプライシングを行う種では、*dsx*のスプライシングが基底状態では雄型となりTRA、TRA-2といったスプライシング因子が存在して初めて雌型となる (Hoshijima et al., 1991; Saccone et al., 2002; Bopp et al., 2014)。このことから、昆虫の性は雄がデフォルトであると言われていた。しかし、カイコでは*Bmdsx*が基底状態で雌型のスプライシングを受ける (Suzuki et al., 2001) ことから、カイコの性は雌がデフォルトであるといえる。第四章で、*Masc-R*を過剰発現させることで、雌において雄化を誘導できたことから、カイコでは雌がデフォルトの性であり、*Masc*という特別な因子の発現によって雄分化が誘導されとみなすことができる。自然界には、単為発生などの手段を通じて雌だけで繁殖を行う生物種が多数存在する (Kirkendall and Normark, 2003; Neaves and Baumann, 2011)。カイコも、未受精卵に温湯処理などの物理的刺激を加えるだけで簡単に単為発生を誘発することができる (Sakaguchi, 1978a)。このことは雌がデフォルトの性である方が種の繁殖にとって有利であることを示唆している。ヒトでは将来卵管や子宮、膣など雌の内部生殖

器に分化するミューラー管と、精巢上体管、精管、精囊、射精管に分化するウォルフ管が一旦は男性、女性両方の胎児に形成されるが、男性ホルモンや抗ミューラー管ホルモンが正常に作用しない場合、胎児は遺伝学的には男性であっても見かけ上正常な女性へと成長する (Moore and Persaud, 2003)。このことは、ヒトの個体発生がデフォルトでは雌になるようプログラムされていることを示唆している。また、ZW型の性決定を行うアフリカツメガエルでも形態的な特徴から、発生学的には雌がデフォルトであると考えられている (回渕, 伊藤 2014)。進化学的に雌が先に存在したのか、それとも雄が先に存在したのかという議論については、同型配偶子形成を行うクラミドモナスと、その近縁種で異型配偶子形成を行う *Pleodorina starrii* とを比較した研究によって雌がデフォルトの性であり、進化の過程で雄分化遺伝子 *PlestMID* を獲得することによって雄が出現したとの報告がなされている (Nozaki et al., 2006)。以上の事実から、カイコでは雌がデフォルトであるとの見方は進化的にも発生学的にも理に叶っているといえる。

Masc は雄化遺伝子であるものの、雌でも雄の 1/4 程度のレベルで低く発現している (図 3-3)。また、*Masc-R/+* 雌は様々な雄化の兆候を示したものの、*Masc-R/+* 雌における *Masc* の発現量は、*+/+* 雌と比較して 1.5 倍程度高いだけであった (図 4-4b)。これらのことから、*Masc* は遺伝子発現量の微妙な違いにより表現型に差が現れると考えられる。カイコと同様に ZW、ZZ の性決定様式をとるニワトリでは、精巢分化に関わる *DMRT-1* 遺伝子が Z 染色体に座乗し、雌 (ZW) に比べて雄 (ZZ) で Z の本数に応じて *DMRT-1* が 2 倍高く発現することが、雄決定に重要であると考えられている (Smith et al., 2009)。鱗翅目の近縁種のトビケラ目と、鱗翅目の中でも祖先的な種では Z0 が雌、ZZ が雄となる (佐原ら 2015)。これらの種では W 染色体が存在しないことから、Z 染色体上に座乗している遺伝子の 2 倍の発現量が雄決定にかかわることが予想される。カイコでは、*Fem* による *Masc* の分解が行われるが、*Fem* による *Masc* の分解が行われない他の鱗翅目昆虫では、*Masc* もしくは *Masc* と似たような雄化遺伝子が Z 染色体に座乗しており、この遺伝子の発現量が雌に比べ雄で 2 倍以上高いことが雄決定の要因として働くのかも知れない。これに対し、カイコやクワコは *Fem* をもち、それが雌決定のマスター遺伝子として働く。前述したとおり、*Fem* は複数のコピーが存在する (Kiuchi et al., 2014)。おそらくこれらの種では *Fem* を獲得したのち、何らかのメカニズムによってそのコピー数が増え、次第に *Masc* を分解する能力が向上した結果、*Fem* が雌決定にとって支配的な遺伝子となったと考えられる

(図 5-2)。また、Z0 が雌に分化する鱗翅目の祖先的な種とは異なり、カイコでは Z0 が著しく虚弱ではあるものの雄に分化することが知られている (田中 1939)。このこと

から、カイコでは Z 染色体上に、遺伝子型が Z0 となっても雄決定を誘導することができる強力な雄決定遺伝子が存在すると考えられ、本研究で雌における *Masc-R* の発現が様々な雄化を引き起こしたことから、この強力な雄決定遺伝子は *Masc* であると予想できる。雌が *Fem* による *Masc* の抑制機能を獲得し、雌で *Masc* がほとんど機能しなくなったため、*Masc* がより強力な雄化機能を獲得できるようになった結果雄決定に支配的な遺伝子となったと考えられる。

W 染色体上の雌決定遺伝子は、カイコの *Fem* 以外ではアフリカツメガエルの *DM-W* のみが報告されている。*DM-W* は、精巣分化にかかわる *DMRT-1* 遺伝子の働きを抑制することで雌決定を誘導すると考えられている (伊藤 2009)。*DM-W* は雄化遺伝子の働きを抑制すること、*Fem* も雄化遺伝子である *Masc* を抑制することから、W 染色体上の雌決定遺伝子は雄化遺伝子の働きを抑制することで性決定を行う、という共通点をもつのかかもしれない。今後、新しく W 染色体上の雌決定遺伝子が同定されることによって、そのような共通点がみられるか明らかとなるだろう。

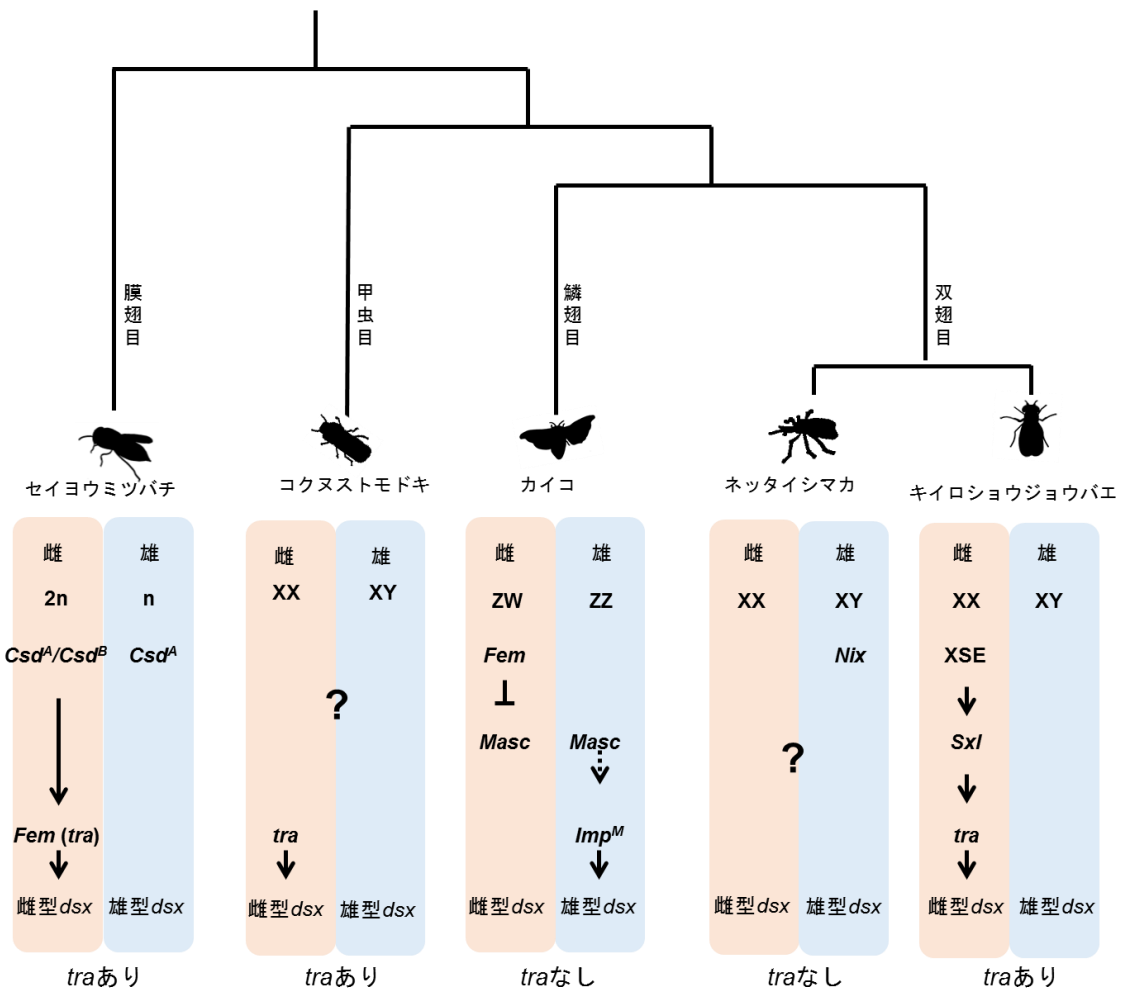


図 5-1. セイヨウミツバチ、コクヌストモドキ、カイコ、ネットアイシマカ、キイロショウジョウバエの性決定カスケード

セイヨウミツバチは、2 倍体 (2n) が雌、半数体 (n) が雄となる。正確には *tra* と相同性を示す *Csd* (Complementary sex determiner) 遺伝子がヘテロ接合 (Csd^A/Csd^B) だと雌に、ヘミ接合 (Csd^A) だと雄に分化する。 Csd^A/Csd^B の場合、その下流の遺伝子である *Fem* は雌特異的スプライシングを受け、その結果機能をもつ FEM タンパク質が産生される。FEM はスプライシング因子として働き、*dsx* の雌型スプライシングを誘導する。セイヨウミツバチの *Fem* は *tra* のオルソログでありカイコの "*Fem*" とは異なる。コクヌストモドキは XX が雌に、XY が雄に分化するが、性決定マスター遺伝子は同定されていない。コクヌストモドキの雌型 *dsx* のスプライシングは *tra* によって誘導される。カイコは ZW が雌に、ZZ が雄に分化する。雌では W 染色体から転写される *Fem* が *Masc* を分解する。雄では、*Masc* が *Fem* による分解を受けず、下流の遺伝子である *Imp^M* の発現を誘導する。*Imp^M* は *dsx* の雄型スプライシングに関与し、*dsx* の雄型アイソフォームの発現を誘導する。ネットアイシマカでは XX が雌に、XY が雄に分化する。Y 染色体に座する *Nix* によって雄決定がなされるが、その直接の標的となる下流遺伝子についてはわか

っていない。キイロショウジョウバエでは、XX が雌に、XY が雄に分化する。X 染色体上の複数の遺伝子 (X-signal elements; XSE) の発現量が十分量に達した場合 (すなわち X 染色体の数が 2 本のとき) *Sxl* の発現が誘導される。SLX タンパク質は雌において *tra* の発現を誘導する。TRA タンパク質はスプライシング因子として働き、*dsx* の雌型スプライシングを誘導することで *dsx* の雌型アイソフォームを産生する。セイヨウミツバチ、コクヌストモドキ、キイロショウジョウバエでは *tra* が同定されており、*tra* が機能すると雌型 *dsx* の発現が誘導され、雌分化が起こる。*tra* が存在しないときは雄型 *dsx* の発現が誘導され、雄分化が起こる。カイコやネッタイシマカは *tra* をもたない。カイコでは、*Imp^M* が発現する場合は雄型の *dsx* の発現が誘導され、雄分化が起こるが、*Imp^M* が存在しない場合、*dsx* は基底状態のスプライシングを受け、その結果雌型 *dsx* アイソフォームが生産され、雌分化が起こる。ネッタイシマカでは、どのように *dsx* の性特異的スプライシングが制御されているのか現時点では不明である。

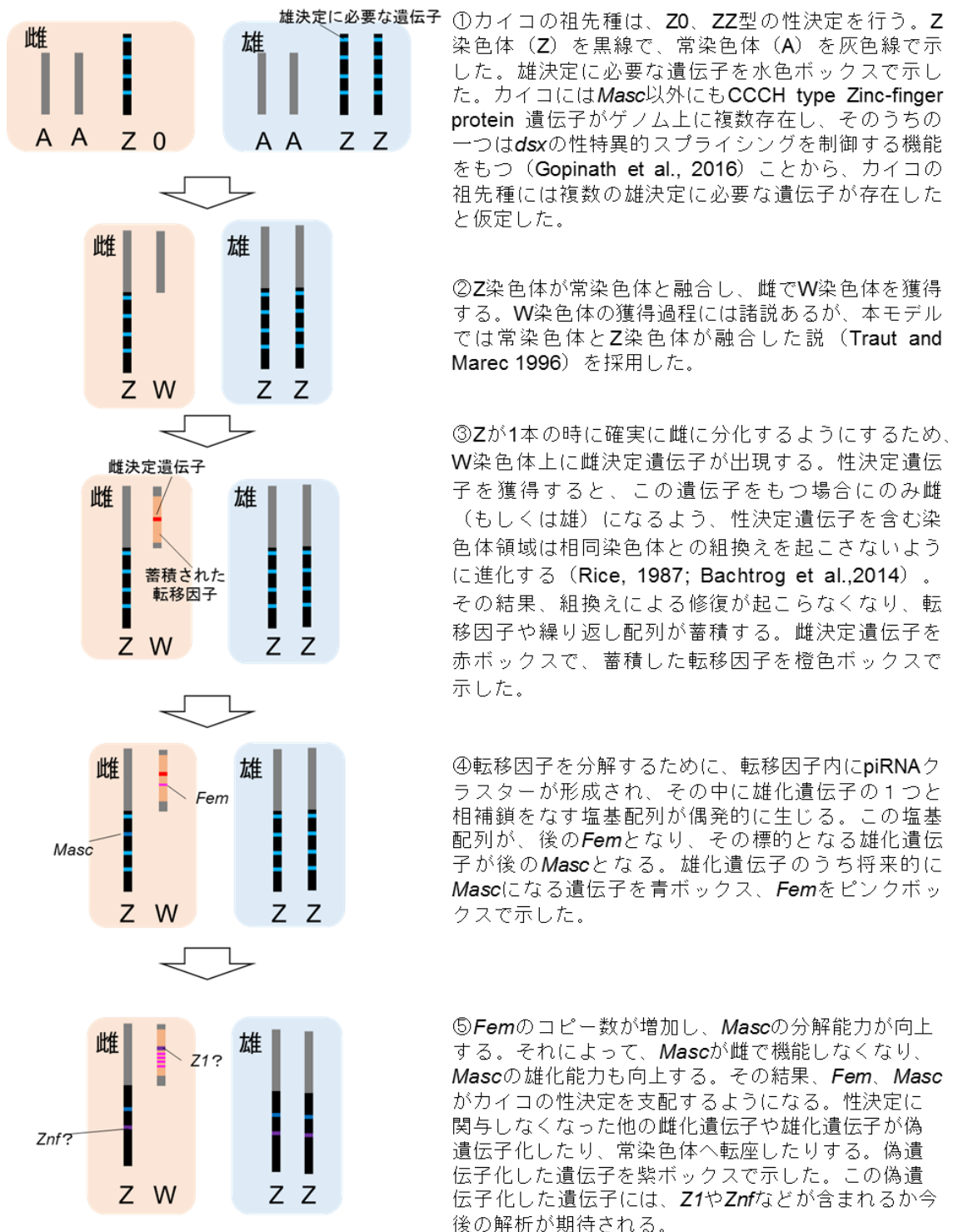


図 5-2. カイコの雌決定遺伝子獲得までのモデル図

謝辞

本論文は筆者が、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資源生物制御学分野に在籍中に作成されたものである。本論文作成にあたり同分野 准教授 鈴木雅京先生から、終始ご丁寧なご指導、ご助言頂きました。心より感謝申し上げます。同分野 教授 青木不学先生からは、研究に関して貴重なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。また、資源生物制御学分野研究室の皆さんのおかげで充実した研究生活を送れたことに感謝申し上げます。

本論文で用いられた遺伝子組換えカイコは、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 カイコ機能改変技術開発ユニットによって作成されました。ここに同開発ユニットの炭谷めぐみ研究員、瀬筒秀樹ユニット長に感謝申し上げます。

東京大学大農学部 昆虫遺伝研究室 勝間進准教授、木内隆史助教授からは、実験についての様々なご助言をいただきました。ここに感謝申し上げます。

実験の試料を提供していただいた東京農工大学蚕学研究室 横山岳准教授、独立行政法人理化学研究所の本賢一専任研究員、九州大学 ナショナルバイオリソースプロジェクト 藤井告先生、Thomas Jefferson 大学 桐野陽平先生に深く感謝申し上げます。

最後にこの場を借りて、私の研究生活を支援してくれた家族に感謝を申し上げます。

引用

- Abe, H., M. Seki, F. Ohbayashi, N. Tanaka, J. Yamashita, T. Fujii, T. Yokoyama, M. Takahashi, Y. Banno, K. Sahara, A. Yoshido, J. Ihara, Y. Yasukochi, K. Mita, M. Ajimura, M. G. Suzuki, T. Oshiki & T. Shimada (2005) Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 14, 339-52.
- Abe, H., T. Fujii, N. Tanaka, T. Yokoyama, H. Kakehashi, M. Ajimura, K. Mita, Y. Banno, Y. Yasukochi, T. Oshiki, M. Neno, T. Ishikawa & T. Shimada (2008) Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica*, 133, 269-82.
- Abe, H., T. Fujii, T. Shimada & K. Mita (2010) Novel non-autonomous transposable elements on W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Genet*, 89, 375-87.
- Adelman, Z. N. & Z. Tu (2016) Control of mosquito-borne infectious diseases: sex and gene drive. *Trends Parasitol*, 32, 219-29.
- Ajimura, M., K. Sahara, H. Abe, T. Tamura, T. Shimada & K. Mita (2006) Are the zincfinger motif genes, *z1* and *z20*, located in the W chromosome involved in the sex-determination of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*? Abstracts from Seventh International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. *J. Insect Sci.* 7, 4e5.
- Akagi, T., I. M. Henry, R. Tao & L. Comai (2014) Plant genetics. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science*, 346, 646-50.
- Bachtrog, D., J. E. Mank, C. L. Peichel, M. Kirkpatrick, S. P. Otto, T. L. Ashman, M. W. Hahn, J. Kitano, I. Mayrose, R. Ming, N. Perrin, L. Ross, N. Valenzuela & J. C. Vamori (2014) Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol*, 12, e1001899.
- Barbash, D. A. & T. W. Cline (1995) Genetic and molecular analysis of the autosomal component of the primary sex determination signal of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 141, 1451-71.
- Bell, L. R., J. I. Horabin, P. Schedl & T. W. Cline (1991) Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell*, 65, 229-39.
- Belote, J. M. & J. C. Lucchesi (1980) Control of X chromosome transcription by the maleless gene in *Drosophila*. *Nature*, 285, 573-5.
- Biason-Lauber, A., D. Konrad, M. Meyer, C. DeBeaufort & E. J. Schoenle (2009) Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am J Hum Genet*, 84, 658-63.

-
- Bopp, D., G. Saccone & M. Beye (2014) Sex determination in insects: variations on a common theme. *Sex Dev*, 8, 20-8.
- Bownes, M., A. Scott & A. Shirras (1988) Dietary components modulate yolk protein gene transcription in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 103, 119-28.
- Brennecke, J., A. A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam & G. J. Hannon (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128, 1089-103.
- Bridges, C. B. (1921) Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 54, 252-4.
- Casares, F., L. Sánchez, I. Guerrero & E. Sánchez-Herrero (1997) The genital disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol*, 207, 216-228.
- Cline, T. W. (1993) The *Drosophila* sex determination signal: how do flies count to two? *Trends Genet*, 9, 385-90.
- Concha, C. & M. J. Scott (2009) Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the Transformer gene. *Genetics*, 182, 785-98.
- Crain, D. A. & L. J. Guillette, Jr. (1998) Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim Reprod Sci*, 53, 77-86.
- Doira, H. (1978) Genetic stocks of the silkworm. In: the silkworm an important laboratory tool, Y. Tazima, ed. Kodansha Press, pp.53-81.
- Duan, J., H. Xu, S. Ma, H. Guo, F. Wang, L. Zhang, X. Zha, P. Zhao & Q. Xia (2014) Ectopic expression of the male BmDSX affects formation of the chitin plate in female *Bombyx mori*. *Mol Reprod Dev*, 81, 240-7.
- Duncan, I. (1996) How do single homeotic genes control multiple segment identities? *Bioessays*, 18, 91-4.
- Elbrecht, A. & R. G. Smith (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 255, 467-70.
- Erickson, J. W. & T. W. Cline (1993) A bZIP protein, sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in *Drosophila* development to determine sex. *Genes Dev*, 7, 1688-702.
- Erickson, J. W. & J. J. Quintero (2007) Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol*, 5, e332.
- Freeland, D. E. & D. T. Kuhn (1996) Expression patterns of developmental genes reveal segment and parasegment organization of *D. melanogaster* genital discs. *Mech Dev*, 56, 61-72.
- Fujii, T., N. Tanaka, T. Yokoyama, O. Ninaki, T. Oshiki, A. Ohnuma, Y. Tazima, Y. Banno, M. Ajimura, K. Mita, M. Seki, F. Ohbayashi, T. Shimada & H. Abe (2006) The female-killing chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*, was generated by translocation between the Z and W chromosomes. *Genetica*, 127, 253-65.
- Gao, G., X. Guo & S. P. Goff (2002) Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a
-

-
- CCCH-type zinc finger protein. *Science*, 297, 1703-6.
- Geuverink, E. & L. W. Beukeboom (2014) Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of the sex determination genes *doublesex* and *transformer* in insects. *Sex Dev*, 8, 38-49.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon & M. A. Carmell (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442, 199-202.
- Gopinath, G., K. P. Arunkumar, K. Mita & J. Nagaraju (2016) Role of *Bmznf-2*, a *Bombyx mori* CCCH zinc finger gene, in masculinisation and differential splicing of *Bmtra-2*. *Insect Biochem Mol Biol*, 75, 32-44.
- Hara, K., T. Fujii, Y. Suzuki, S. Sugano, T. Shimada, S. Katsuma & S. Kawaoka (2012) Altered expression of testis-specific genes, piRNAs, and transposons in the silkworm ovary masculinized by a W chromosome mutation. *BMC Genomics*, 13, 119.
- 橋本春雄 (1933) 蚕に於ける W 染色体の性決定に対する役割. 遺伝学雑誌, 8, 245-247
- Hediger, M., G. Burghardt, C. Siegenthaler, N. Buser, D. Hilfiker-Kleiner, A. Dubendorfer & D. Bopp (2004) Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Dev Genes Evol*, 214, 29-42.
- Hediger, M., C. Henggeler, N. Meier, R. Perez, G. Saccone & D. Bopp (2010) Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics*, 184, 155-70.
- Hoshijima, K., K. Inoue, I. Higuchi, H. Sakamoto & Y. Shimura (1991) Control of *doublesex* alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science*, 252, 833-6.
- Inoue, K., K. Hoshijima, H. Sakamoto & Y. Shimura (1990) Binding of the *Drosophila sex-lethal* gene product to the alternative splice site of *transformer* primary transcript. *Nature*, 344, 461-3.
- Inoue, K., K. Hoshijima, I. Higuchi, H. Sakamoto & Y. Shimura (1992) Binding of the *Drosophila transformer* and *transformer-2* proteins to the regulatory elements of *doublesex* primary transcript for sex-specific RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 8092-6.
- 伊藤道彦 (2009) アフリカツメガエルの ZZ/ZW 型性決定の分子機構-脊椎動物初の♀決定遺伝子 DM-W の発見と性決定システム進化. 比較内分泌学, 35, 134, 165-174.
- Jursnich, V. A. & K. C. Burtis (1993) A positive role in differentiation for the male *doublesex* protein of *Drosophila*. *Dev Biol*, 155, 235-49.
- 回瀬修治 & 伊藤道彦 (2014) アフリカツメガエルの性決定・性分化システム. 比較内分泌学, 40, 152, 71-73
- Kamiya, T., W. Kai, S. Tasumi, A. Oka, T. Matsunaga, N. Mizuno, M. Fujita, H. Suetake, S.

-
- Suzuki, S. Hosoya, S. Tohari, S. Brenner, T. Miyadai, B. Venkatesh, Y. Suzuki & K. Kikuchi (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet*, 8, e1002798.
- Kashimada, K. & P. Koopman (2010) *Sry*: the master switch in mammalian sex determination. *Development*, 137, 3921-30.
- Kato, Y., K. Kobayashi, H. Watanabe & T. Iguchi (2011) Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a *Doublesex* gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genet*, 7, e1001345.
- Katoh-Fukui, Y., R. Tsuchiya, T. Shiroishi, Y. Nakahara, N. Hashimoto, K. Noguchi & T. Higashinakagawa (1998) Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*, 393, 688-92.
- 勝間進, 木内隆史, 古賀光, 川本宗孝, 庄司佳祐 & 嶋田透 (2014) カイコの性決定・性分化における piRNA カスケードの関与. 日本蚕糸学会第 84 回大会講演要旨集, pp.28.
- Katsuma, S., Y. Sugano, T. Kiuchi & T. Shimada (2015) Two conserved cysteine residues are required for the masculinizing activity of the silkworm Masc protein. *J Biol Chem*, 290, 26114-24.
- Kawaoka, S., K. Kadota, Y. Arai, Y. Suzuki, T. Fujii, H. Abe, Y. Yasukochi, K. Mita, S. Sugano, K. Shimizu, Y. Tomari, T. Shimada & S. Katsuma (2011) The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs. *RNA*, 17, 2144-51.
- Kirkendall, L. R. & B. Normark (2003) Parthenogenesis in insects and mites. In: encyclopedia of insects, Vincent H. Resh & R. T. Carde, eds. Academic Press, pp. 851–856.
- Kiuchi, T., H. Koga, M. Kawamoto, K. Shoji, H. Sakai, Y. Arai, G. Ishihara, S. Kawaoka, S. Sugano, T. Shimada, Y. Suzuki, M. G. Suzuki & S. Katsuma (2014) A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509, 633-6.
- 木内隆史, 古賀光, 川本宗孝, 庄司佳祐, 嶋田透 & 勝間進 (2014) *Fem* piRNA のターゲット分子の同定とカイコ性決定カスケードへの関与. 日本蚕糸学会第 84 回大会講演要旨集, pp.29.
- 古賀光, 木内隆史, 川本宗孝, 庄司佳祐, 新井祐二, 河岡慎平, 菅野純夫, 鈴木穰, 嶋田透 & 勝間進 (2014) W 染色体由来の雌特異的 piRNA がカイコの性を決定する. 日本蚕糸学会第 84 回大会講演要旨集, pp.28.
- Koike, Y., K. Mita, M. G. Suzuki, S. Maeda, H. Abe, K. Osoegawa, P. J. deJong & T. Shimada (2003) Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a kettin ortholog. *Mol Genet Genomics*, 269, 137-49.
- Krzywinska, E., N. J. Dennison, G. J. Lycett & J. Krzywinski (2016) A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 353, 67-9.
-

-
- Kuroiwa, A., S. Handa, C. Nishiyama, E. Chiba, F. Yamada, S. Abe & Y. Matsuda (2011) Additional copies of CBX2 in the genomes of males of mammals lacking SRY, the Amami spiny rat (*Tokudaia osimensis*) and the Tokunoshima spiny rat (*Tokudaia tokunoshimensis*). *Chromosome Res*, 19, 635-44.
- Lambeth, L. S., D. M. Cummins, T. J. Doran, A. H. Sinclair & C. A. Smith (2013) Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoS One*, 8, e68362.
- Leclercq, S., J. Theze, M. A. Chebbi, I. Giraud, B. Moumen, L. Ernenwein, P. Greve & C. Gilbert (2016) Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome. 113, 15036-15041.
- Lee, J., T. Kiuchi, M. Kawamoto, T. Shimada & S. Katsuma (2015) Identification and functional analysis of a *Masculinizer* orthologue in *Trilocha varians* (Lepidoptera: Bombycidae). *Insect Mol Biol*, 24, 561-9.
- Liu, G., Q. Wu, J. Li, G. Zhang & F. Wan (2015) RNAi-mediated knock-down of *transformer* and *transformer2* to generate male-only progeny in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *PLoS One*, 10, e0128892.
- Malone, C. D. & G. J. Hannon (2009) Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, 136, 656-68.
- Marsh, J. L. & E. Wieschaus (1978) Is sex determination in germ line and soma controlled by separate genetic mechanisms? *Nature*, 272, 249-51.
- 松島大二郎, 青木不学 & 鈴木雅京 (2016) カイコ胚子期における ecdysone 量及び ecdysone 関連遺伝子発現量の性差解析. 日本蚕糸学会第 86 回大会講演要旨集, pp.30.
- Mayer, C., K. M. Schmitz, J. Li, I. Grummt & R. Santoro (2006) Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell*, 22, 351-61.
- McKeown, M., J. M. Belote & R. T. Boggs (1988) Ectopic expression of the female transformer gene product leads to female differentiation of chromosomally male *Drosophila*. *Cell*, 53, 887-95.
- 峰翔太郎, 畠山正統, 笠嶋めぐみ, 青木不学 & 鈴木雅京 (2016) カブラハバチの *tra-2* 及び *dsx* の同定とその発現解析. 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会講演要旨集 pp.171.
- Mine, E., S. Izumi, M. Katsuki & S. Tomino (1983) Developmental and sex-dependent regulation of storage protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Biol*, 97, 329-37.
- Mita, K., M. Kasahara, S. Sasaki, Y. Nagayasu, T. Yamada, H. Kanamori, N. Namiki, M. Kitagawa, H. Yamashita, Y. Yasukochi, K. Kadono-Okuda, K. Yamamoto, M. Ajimura, G. Ravikumar, M. Shimomura, Y. Nagamura, I. T. Shin, H. Abe, T. Shimada, S. Morishita & T. Sasaki (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*.
-

-
- DNA Res*, 11, 27-35.
- Miya, K. (1958). Studies on the embryonic development of the gonad in the silkworm, *Bombyx mori* L. Part II. Formation of the gonad. *J. Fac. Agric. Iwate Univ.*, 4, 126-151.
- Moore L. K., & T. V. N. Persaud (2003) *The developing human: clinically oriented embryology Seventh Edition*, Elsevier Press.
- Nagengast, A. A., S. M. Stitzinger, C. H. Tseng, S. M. Mount & H. K. Salz (2003) *Sex-lethal* splicing autoregulation in vivo: interactions between SEX-LETHAL, the U1 snRNP and U2AF underlie male exon skipping. *Development*, 130, 463-71.
- Nagoshi, R. N., M. McKeown, K. C. Burtis, J. M. Belote & B. S. Baker (1988) The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in *D. melanogaster*. *Cell*, 53, 229-36.
- Nagoshi, R. N. & B. S. Baker (1990) Regulation of sex-specific RNA splicing at the *Drosophila doublesex* gene: cis-acting mutations in exon sequences alter sex-specific RNA splicing patterns. *Genes Dev*, 4, 89-97.
- Nakao, H. (1999) Isolation and characterization of a *Bombyx vasa-like* gene. *Dev Genes Evol*, 209, 312-6.
- Nakao, H., M. Hatakeyama, J. M. Lee, M. Shimoda & T. Kanda (2006) Expression pattern of *Bombyx vasa-like* (BmVLG) protein and its implications in germ cell development. *Dev Genes Evol*, 216, 94-9.
- Neaves, W. B. & P. Baumann (2011) Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends Genet*, 27, 81-8.
- Nong Q. D., Y. Kato & 渡邊肇. TALEN-mediated knock-in of a reporter gene for visualizing expression of the sex-determining gene *dsx1* in *Daphnia magna*. 第39回日本分子生物学会年会.
- Nozaki, H., T. Mori, O. Misumi, S. Matsunaga & T. Kuroiwa (2006) Males evolved from the dominant isogametic mating type. *Curr Biol*, 16, R1018-20.
- Omura, S. (1936). Studies on the reproductive system of the male of *Bombyx mori*.-I. Structure of the testis and the intratesticular behaviour of the spermatozoa. *J. Fac. Agric. Hokkaido*, 38, 151-179.
- Otake, T. & A. Kuroiwa (2016) Molecular mechanism of male differentiation is conserved in the SRY-absent mammal, *Tokudaia osimensis*. *Sci Rep*, 6, 32874.
- Pane, A., M. Salvemini, P. Delli Bovi, C. Polito & G. Saccone (2002) The transformer gene in *Ceratitidis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development*, 129, 3715-25.
- Parvy, J. P., C. Blais, F. Bernard, J. T. Warren, A. Petryk, L. I. Gilbert, M. B. O'Connor & C. Dauphin-Villemant (2005) A role for betaFTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 282,

- 84-94.
- Plenefisch, J. D., L. DeLong & B. J. Meyer (1989) Genes that implement the hermaphrodite mode of dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 121, 57-76.
- Probst, A. V., I. Okamoto, M. Casanova, F. El Marjou, P. Le Baccon & G. Almouzni (2010) A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell*, 19, 625-38.
- Raymond, C. S., J. R. Kettlewell, B. Hirsch, V. J. Bardwell & D. Zarkower (1999) Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*, 215, 208-20.
- Raz, E. (2000) The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol*, 1, Reviews1017.
- Rice, W. R. (1987) Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics*, 116, 161-7.
- Saccone, G., A. Pane & L. C. Polito (2002) Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. *Genetica*, 116, 15-23.
- 佐原健, 松橋伊織 & 吉戸敦生 (2015) チョウ目昆虫の性染色体進化. 蚕糸・昆虫バイオテック, 84, 1, 37-49.
- Sakai, H., T. Yokoyama, H. Abe, T. Fujii & M. G. Suzuki (2013) Appearance of differentiated cells derived from polar body nuclei in the silkworm, *Bombyx mori*. *Front Physiol*, 4, 235.
- Sakai, H., F. Aoki & M. G. Suzuki (2014) Identification of the key stages for sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol*, 224(2), 119-23.
- Sakai H., H. Sakaguchi, F. Aoki & M. G. Suzuki (2015) Functional analysis of sex-determination genes by gene silencing with LNA-DNA gapmers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mech Dev*, 137, 45-52.
- Sakai, H., Y. Kirino, S. Katsuma, F. Aoki, & M. G. Suzuki (2016a) Morphological and histomorphological structures of testes and ovaries in early developmental stages of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Biotechnol Sericol*, 85, 15-20.
- Sakai, H., M. Sumitani, Y. Chikami, K. Yahata, K. Uchino, T. Kiuchi, S. Katsuma, F. Aoki, H. Sezutsu & M. G. Suzuki (2016b) Transgenic expression of the piRNA-resistant *Masculinizer* gene induces female-specific lethality and partial female-to-male sex reversal in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genet*, 12, e1006203.
- Sakaguchi, B. (1978a) Gametogenesis, fertilization and embryogenesis of the silkworm. In: *the silkworm an important laboratory tool*, Y. Tazima, ed. Kodansha Press, pp.5-29.
- Sakaguchi, B. (1978b) Postembryonic development of the silkworm. In: *the silkworm an important laboratory tool*, Y. Tazima, ed. Kodansha Press, pp.31-52.
- Sakurai, H., T. Fujii, S. Izumi & S. Tomino (1988) Structure and expression of gene coding for sex-specific storage protein of *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, 263, 7876-80.

-
- Salz, H. K., E. M. Maine, L. N. Keyes, M. E. Samuels, T. W. Cline & P. Schedl (1989) The *Drosophila* female-specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. *Genes Dev*, 3, 708-19.
- Salz, H. K. & J. W. Erickson (2010) Sex determination in *Drosophila*: The view from the top. *Fly (Austin)*, 4, 60-70.
- 佐藤春太郎 (1926) 蚕卵の成熟分裂及極体の行動. 農学会報, 284, 277-305.
- Schupbach, T. (1982) Autosomal mutations that interfere with sex determination in somatic cells of *Drosophila* have no direct effect on the germline. *Dev Biol*, 89, 117-27.
- Shukla, J. N. & J. Nagaraju (2010) *Doublesex*: a conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators. *J Genet*, 89, 341-56.
- Shukla, J. N., S. Jadhav & J. Nagaraju (2011) Novel female-specific splice form of *dsx* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica*, 139, 23-31.
- Shukla, J. N. & S. R. Palli (2012) Sex determination in beetles: production of all male progeny by parental RNAi knockdown of transformer. *Sci Rep*, 2, 602.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, T. Ohnesorg, D. M. Cummins, P. G. Farlie, T. J. Doran & A. H. Sinclair (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461, 267-71.
- Suzuki, M. G., F. Ohbayashi, K. Mita & T. Shimada (2001) The mechanism of sex-specific splicing at the *doublesex* gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 31, 1201-11.
- Suzuki, M. G., S. Funaguma, T. Kanda, T. Tamura & T. Shimada (2003) Analysis of the biological functions of a *doublesex* homologue in *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol*, 213, 345-54.
- Suzuki, M. G., S. Funaguma, T. Kanda, T. Tamura & T. Shimada (2005) Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori*. *Evol Dev*, 7, 58-68.
- Suzuki, M. G., S. Imanishi, N. Dohmae, T. Nishimura, T. Shimada & S. Matsumoto (2008) Establishment of a novel in vivo sex-specific splicing assay system to identify a trans-acting factor that negatively regulates splicing of *Bombyx mori dsx* female exons. *Mol Cell Biol*, 28, 333-43.
- Suzuki, M. G., S. Imanishi, N. Dohmae, M. Asanuma & S. Matsumoto (2010) Identification of a male-specific RNA binding protein that regulates sex-specific splicing of *Bmdsx* by increasing RNA binding activity of BmPSI. *Mol Cell Biol*, 30, 5776-86.
- Suzuki, M. G., K. Suzuki, F. Aoki & M. Ajimura (2012) Effect of RNAi-mediated knockdown of the *Bombyx mori transformer-2* gene on the sex-specific splicing of *Bmdsx* pre-mRNA. *Int J Dev Biol*, 56, 693-9.
- Takagi, N. & K. Abe (1990) Detrimental effects of two active X chromosomes on early mouse development. *Development*, 109, 189-201.
-

- 高見丈夫, 北沢敏男 (1960) 家蚕の胚発生段階表 I. 日 122 号, 日 124 号, 支 122 号, 支 124 号. 蚕糸試験場彙報, 75, 1-31.
- 高見丈夫 (1969) 蚕種総論. 全国蚕種協会.
- Takeuchi, S. (1969) Endocrinological studies on spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Dev Growth Differ* 11(1), 8-28.
- Tanaka, N., T. Yokoyama, H. Abe, K. Tsuchida, O. Ninagi & T. Oshiki (2000) Cytogenetic analysis shows that the unusually large chromosome in the sex-limited *pB* silkworm (*Bombyx mori*) strain consists of three chromosomes. *Hereditas*, 133, 95-103.
- Tanaka, Y. (1916) Genetic studies in the silkworm. *J Coll Agric Sapporo*, 6:1-33.
- 田中義麿 (1939) 蚕の性染色体不分離. 遺伝学雑誌, 15, 359-361.
- Traut, W. & F. Marec (1996) Sex chromatin in lepidoptera. *Q Rev Biol*, 71, 239-56.
- Verhulst, E. C., L. W. Beukeboom & L. van de Zande (2010) Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. *Science*, 328, 620-3.
- Vincent, S., L. A. Perkins & N. Perrimon (2001) *Doublesex* surprises. *Cell*, 106, 399-402.
- Wang, L., Y. Xu, C. Zhang, Q. Ma, S. H. Joo, S. K. Kim, Z. Xu & K. Chong (2008) OsLIC, a novel CCCH-Type zinc finger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinosteroids signaling. *PLoS One*, 3, e3521.
- Waterbury, J. A., L. L. Jackson & P. Schedl (1999) Analysis of the *doublesex* female protein in *Drosophila melanogaster*: role on sexual differentiation and behavior and dependence on intersex. *Genetics*, 152, 1653-67.
- Wilkins, A. S. (1995) Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *Bioessays*, 17, 71-7.
- Williams, T. M., J. E. Selegue, T. Werner, N. Gompel, A. Kopp & S. B. Carroll (2008) The regulation and evolution of a genetic switch controlling sexually dimorphic traits in *Drosophila*. *Cell*, 134, 610-23.
- Wrischnik, L. A., J. R. Timmer, L. A. Megna & T. W. Cline (2003) Recruitment of the proneural gene *scute* to the *Drosophila* sex-determination pathway. *Genetics*, 165, 2007-27.
- Xia, Q., Z. Zhou, C. Lu, D. Cheng, F. Dai, B. Li, P. Zhao, X. Zha, T. Cheng, C. Chai, G. Pan, J. Xu, C. Liu, Y. Lin, J. Qian, Y. Hou, Z. Wu, G. Li, M. Pan, C. Li, Y. Shen, X. Lan, L. Yuan, T. Li, H. Xu, G. Yang, Y. Wan, Y. Zhu, M. Yu, W. Shen, D. Wu, Z. Xiang, J. Yu, J. Wang, R. Li, J. Shi, H. Li, G. Li, J. Su, X. Wang, G. Li, Z. Zhang, Q. Wu, J. Li, Q. Zhang, N. Wei, J. Xu, H. Sun, L. Dong, D. Liu, S. Zhao, X. Zhao, Q. Meng, F. Lan, X. Huang, Y. Li, L. Fang, C. Li, D. Li, Y. Sun, Z. Zhang, Z. Yang, Y. Huang, Y. Xi, Q. Qi, D. He, H. Huang, X. Zhang, Z. Wang, W. Li, Y. Cao, Y. Yu, H. Yu, J. Li, J. Ye, H. Chen, Y. Zhou, B. Liu, J. Wang, J. Ye, H. Ji, S. Li, P. Ni, J. Zhang, Y. Zhang, H. Zheng, B. Mao, W. Wang, C. Ye, S. Li, J. Wang, G. K. Wong & H. Yang (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*,

-
- 306, 1937-40.
- Xu, J., Y. Wang, Z. Li, L. Ling, B. Zeng, A. A. James, A. Tan & Y. Huang (2014) Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated female-specific sterility in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 23, 800-7.
- Xu, J., H. Bi, R. Chen, A. F. Aslam, Z. Li, L. Ling, B. Zeng, Y. Huang & A. Tan (2015) Transgenic characterization of two testis-specific promoters in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 24, 183-90.
- Xu, J., S. Zhan, S. Chen, B. Zeng, Z. Li, A. A. James, A. Tan & Y. Huang (2016) Sexually dimorphic traits in the silkworm, *Bombyx mori*, are regulated by *doublesex*. *Insect Biochem Mol Biol*, 80, 42-51.
- Yamaguchi, J., T. Mizoguchi & H. Fujiwara (2011) siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos. *PLoS One*, 6, e25469.
- 山舖直子, 鴻上有未 (2012) カイコの精子形成における二型性. 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー, 81, 1 31-40.
- Yano, K., M. T. Sakurai, S. Watabe, S. Izumi & S. Tomino (1994) Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*, 1218, 1-10.
- Yoshimoto, S., E. Okada, H. Umemoto, K. Tamura, Y. Uno, C. Nishida-Umehara, Y. Matsuda, N. Takamatsu, T. Shiba & M. Ito (2008) A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2469-74.
- Yoshimoto, S. & M. Ito (2011) A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS J*, 278, 1020-6.
- Zhao, D., D. McBride, S. Nandi, H. A. McQueen, M. J. McGrew, P. M. Hocking, P. D. Lewis, H. M. Sang & M. Clinton (2010) Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature*, 464, 237-42.