

論文の内容の要旨

論文題目 カイコのDMRT遺伝子群の機能解明とその性的二型形成における役割

氏名 笠原 良太

【序論】

動物の性決定は極めて多様性に富み共通項がないように見えるが、DMRT という遺伝子群が唯一の共通項として存在する。一方で、機能が明確にされた DMRT は限られており、その高度な保存性にも関わらず大半の DMRT パラログの機能は依然として不明である。昆虫の性的二型(雌雄での形態・生理的差異)形成は性決定遺伝子のシグナルに応じて *doublesex* (*dsx*) という DMRT が性特異的なスプライシングを受け、雌雄で異なるアイソフォームを生じることで始まる。性特異的な DSX タンパク質は標的遺伝子の発現を制御することで性的二型形質の形成を促進する。性決定遺伝子⇒*dsx*⇒下流の性的二型形成遺伝子というモデルが提唱されてきたが、近年の研究から *dsx* では説明がつかないような性的二型形成が報告され始めている。カイコでは *dsx* が変異しても形成されてくるような性的二型の存在が明らかとなっている (松岡美里、H30 年度修士論文)。これらの事実は、性決定から性分化に至る経路には従来のモデルにおいて未記載の多様な経路が存在することを示唆する (図0)。そうした経路に関与する遺伝子の候補として DMRT は非常に有力である。以上を踏まえ、私はカイコを用いて 1. *dsx* では説明がつかない性的二型形成を DMRT が司る可能性について検証する、2. 司っていない場合においても DMRT の機能を明らかにすることを目的に研究を行った。

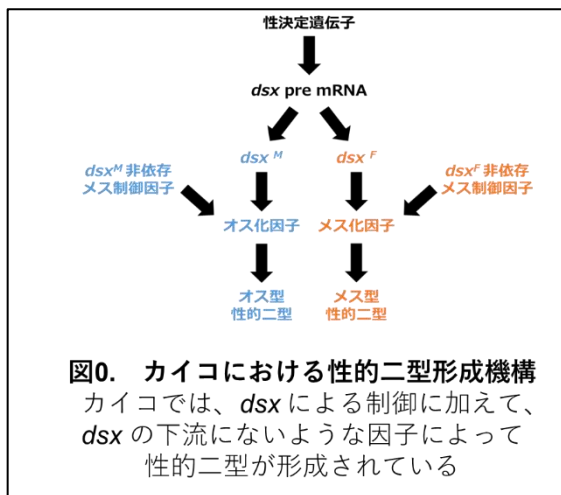


図0. カイコにおける性的二型形成機構
カイコでは、*dsx* による制御に加えて、*dsx* の下流にないような因子によって性的二型が形成されている

【カイコ DMRT の発現解析】

カイコは DMRT として *dsx*, *dmrt11E*, *dmrt93B*, *dmrt99B*、以上 4 種の DMRT をもつことがわかっており、今回これら DMRT を *Bmdmrt11E*, *Bmdmrt93B*, *Bmdmrt99B* と命名した。これら遺伝子の発現組織を調査したところ、*Bmdmrt11E* と *99B* は卵巣、*Bmdmrt93B* は精巣で高い発現がみられた。また、*Bmdmrt99B* では雌雄ともに脳においても高い発現が見られた (図 1)。このことから、これらの DMRT は生殖巣の発達や卵・精子の発達に関与すると予想された。また、*Bmdmrt99B* は神経系の発達にも関わる可能性が示唆された。

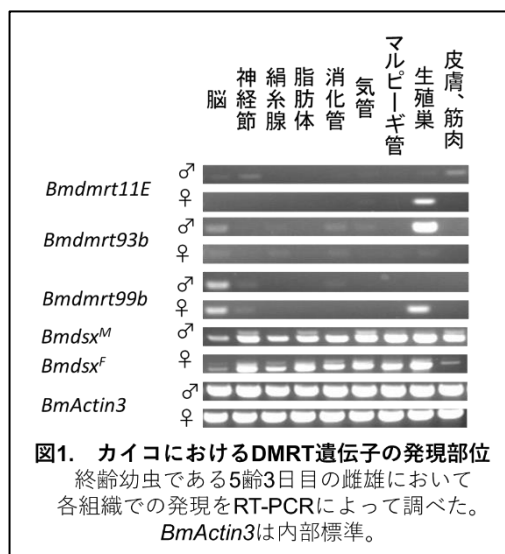


図1. カイコにおける DMRT 遺伝子の発現部位
終齢幼虫である 5 齢 3 日目の雌雄において各組織での発現を RT-PCR によって調べた。
BmActin3 は内部標準。

【*Bmdmrt11E*, *Bmdmrt99B* の機能解析】

卵巣において高発現を示した

Bmdmrt11E, *Bmdmrt99B* の機能を明らかにするため CRISPR/Cas9 によるノックアウト (KO) を試みた。その結果、それぞれの遺伝子について変異系統の樹立に成功した。

まず、*Bmdmrt11E*, *Bmdmrt99B* それぞれの変異をホモにもつメスの卵巣を観察したところ、形態的な異常は見当たらなかったが、*Bmdmrt11E* 変異ホモ個体では内部に空胞をもつ異常な卵の形成が認められた。これらの異常な卵に含まれるタンパク質の SDS-PAGE 像では、卵黄タンパクの一部の分解産物と思われるバンドが見うけられた。脂質成分を GC-MS 解析に供試したところ、いくつかの脂肪酸において有意な減少が見られた。また、*Bmdmrt11E* 変異ホモ個体の産んだ卵は有意に低い孵化率 (約 15%、正常個体では約 90%) を示すことが判明した (図 2)。*Bmdmrt11E* 変異ホモ個体で卵黄脂質に影響が出たことから、この遺伝子は卵形成過程において脂質の代謝や取り込みを制御する因子であると考えられた。事実、*Bmdmrt11E* 変異ホモ個体の卵巣では脂質代謝に関与するキモトリプシンインヒビターの発現量が有意に減少しており、関連が疑われた。

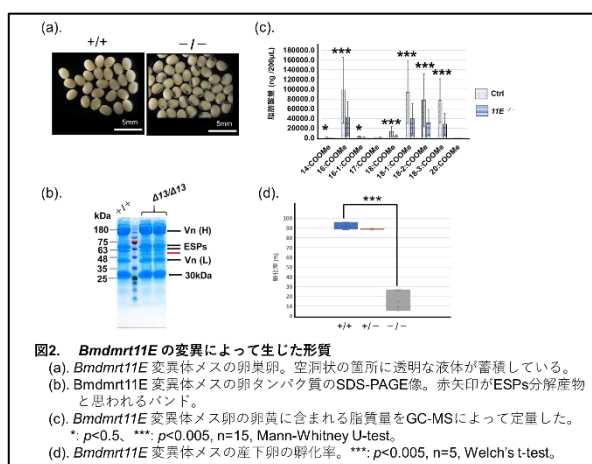


図2. *Bmdmrt11E* の変異によって生じた形質
(a) *Bmdmrt11E* 変異メスの卵巣卵。空洞状の箇所に透明な液体が蓄積している。
(b) *Bmdmrt11E* 変異メスの卵タンパク質の SDS-PAGE 像。赤矢印が ESPs 分解産物と思われるバンド。
(c) *Bmdmrt11E* 変異メス卵の卵黄に含まれる脂質量を GC-MS によって定量した。
(d) *Bmdmrt11E* 変異メスの産下卵の孵化率。***: $p < 0.005$, $n = 5$, Welch's t-test.

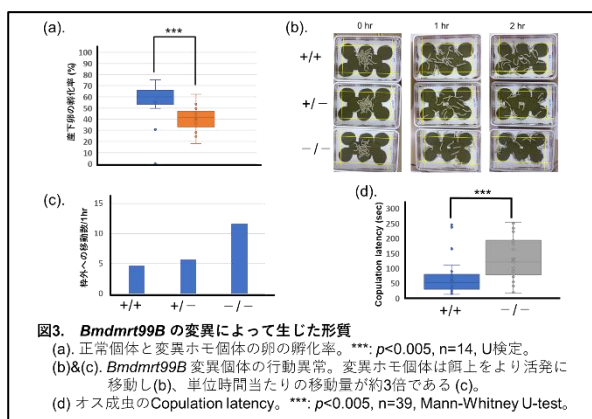


図3. *Bmdmrt99B* の変異によって生じた形質
(a) 正常個体と変異ホモ個体の卵の孵化率。***: $p < 0.005$, $n = 14$, U 検定。
(b)&(c) *Bmdmrt99B* 変異個体の行動異常。変異ホモ個体は餌上をより活発に移動し (b)、単位時間当たりの移動量が約 3 倍である (c)。
(d) オス成虫の Copulation latency。***: $p < 0.005$, $n = 39$, Mann-Whitney U-test.

Bmdmrt99B 変異体の卵と卵巣の外見には異常はみられなかったが、有意な孵化率の低下が認められた。*Bmdmrt99B* は脳でも発現を示したことから、*Bmdmrt99B* 変異ホモ個体の行動に異常が見られるか調べたところ、幼虫が過度の徘徊行動を示す、オス成虫の copulation latency (交尾成立までに要した時間)に遅延が見られるといった行動異常が見られた (図 3)。

【*Bmdmrt93B* の機能解析】

精巣において高発現を示した *Bmdmrt93B* の機能を明らかにするため TALEN、CRISPR/Cas9 を用いた KO を試みた。その結果、変異当代(G₀)において精巣の萎縮が見られたほか、オス型生殖器の一部 (生殖器原基由来の部分)に形成異常が生じた (図 4: A, B)。先行研究により、この部位は *Bmdsx* 変異の影響を受けることなく正常に形成される部位と一致する (松岡美里, H30 年度修士論文) ため、*Bmdmrt93B* が *Bmdsx* で説明できない生殖器形成を制御している可能性が高いと考えた。

そこで、オスの生殖器原基における *Bmdmrt93B* の発現を調査したところ、幼虫期後期にかけて発現が上昇することがわかった。以上から、*Bmdmrt93B* はオスの生殖器全体の形成を制御していることが示唆された (図 4: C)。

上記から *Bmdmrt93B* が *Bmdsx* では説明できない生殖器形成を司る重要な因子であることが予測された。では、既知の性分化経路と *Bmdmrt93B* とはどのような関係にあるのだろうか。この点についての洞察を得るため、*Bmdmrt93B* の発現がどのように制御されているのか調べることにした。

まず、当研究室の湯澤・山本による *Bmdsx* 変異体生殖巣の RNA-seq データを用いて *Bmdsx* の変異が DMRT の発現に及ぼす影響を調査した。その結果、*Bmdsx* の変異は卵巣における *Bmdmrt93B* の発現を有意に増加させることがわかった。一方で、*Bmdmrt93B* 以外の DMRT の発現には有意な変動はみられなかった (図 5)。このことから、*Bmdmrt93B* は卵巣あるいはメスの細胞において *Bmdsx* により抑制的な制御を受けている可能性が高いと考えられた。実際、キイロショウジョウバエの *dmrt93B* 上流にはメス型の BmDSX が結合していることがわかった。

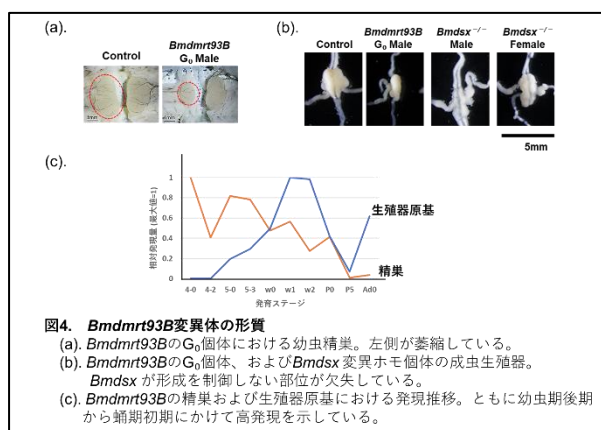


図4. *Bmdmrt93B*変異体の形質
(a). *Bmdmrt93B*のG₀個体における幼虫精巣。左側が萎縮している。
(b). *Bmdmrt93B*のG₀個体、および*Bmdsx*変異ホモ個体の成虫生殖器。
*Bmdsx*が形成を制御しない部位が欠失している。
(c). *Bmdmrt93B*の精巣および生殖器原基における発現推移。ともに幼虫期後期から蛹期初期にかけて高発現を示している。

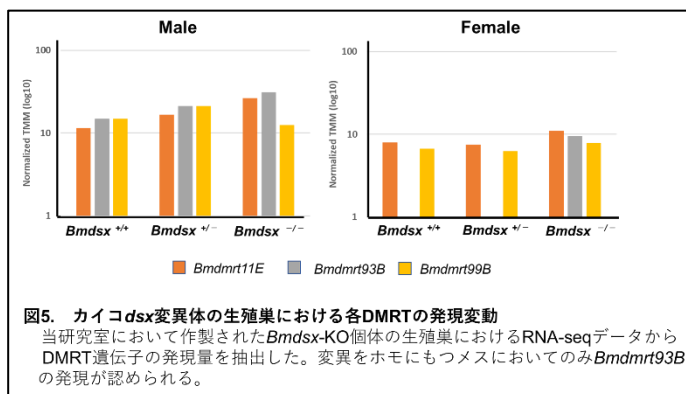


図5. カイコ*dsx*変異体の生殖巣における各DMRTの発現変動
当研究室において作製された*Bmdsx*-KO個体の生殖巣におけるRNA-seqデータからDMRT遺伝子の発現量を抽出した。変異をホモにもつメスにおいてのみ*Bmdmrt93B*の発現が認められる。

では、*Bmdmrt93B* の発現を促進する因子は何であろうか。脱皮ホルモンとして知られる 20E はオス型生殖器形成を全般的に促進する機能をもつことが知られている。そこで、*Bmdmrt93B* の発現組織である精巣を取り出し 20E と同様の生理活性をもつポナステロン A を添加した培地で培養し、ポナステロン A による刺激が *Bmdmrt93B* の発現量に及ぼす影響を調査した。その結果、*Bmdmrt93B* の発現量はポナステロン A の濃度に依存して発現が上昇することがわかった (図 6)。このことから、*Bmdmrt93B* は 20E によって発現が促進されている可能性が高いことがわかった。

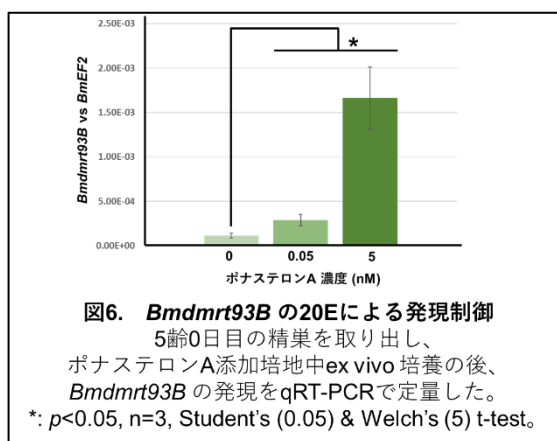
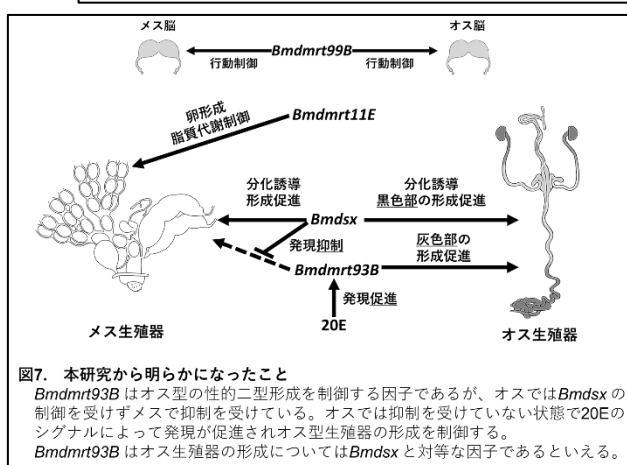


図6. *Bmdmrt93B* の20Eによる発現制御
5齢0日目の精巣を取り出し、ポナステロンA添加培地中ex vivo 培養の後、*Bmdmrt93B* の発現をqRT-PCRで定量した。
*: $p < 0.05$, $n = 3$, Student's (0.05) & Welch's (5) t-test.

本研究から明らかになったカイコ DMRT の機能について図 7 にまとめた。メスにおいて、*Bmdmrt11E* と *Bmdmrt99B* は卵形成や卵の妊性に関与していた。メスの生殖に関与する DMRT



の報告例は少なく、この点で本研究は新規性が高いといえる。特に、*Bmdmrt11E* については卵形成時の脂質代謝に関わるとの前例のない機能を明らかにしたほか、*Bmdmrt99B* については具体的に行動に及ぼす影響を記述することに初めて成功した。本研究成果は、今後の DMRT の研究分野の開拓に大いに貢献しうると考えている。

カイコのもつ *dsx* 以外の全ての DMRT の機能を明らかにすることで、数ある DMRT のうち *Bmdmrt93B* がオスの生殖器形成を制御する機能をもつことを突き止めることができた。さらに、*Bmdmrt93B* は卵巣(もしくはメスの体細胞)において *Bmdsx* による抑制的な制御を受けること、20E によって発現が促進されていることがわかった。

発表論文

Kasahara R, Aoki F, Suzuki MG (2018) Deficiency in *dmrt99B* ortholog causes behavioral abnormalities in the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl Entomol Zool.*, Jun 53(3):381-393.

Matsushima D, Kasahara R, Matsuno K, Aoki F, Suzuki MG (2019) Involvement of Ecdysone Signaling in the Expression of the *doublesex* Gene during Embryonic Development in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Sex Dev.*, Sep 13(3):151-163.

Kasahara R, Yuzawa T, Fujii T, Aoki F, Suzuki M (2021) *dmrt11E* ortholog is a crucial factor for oogenesis of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Molec.*, in press.