

審査の結果の要旨

氏名 笠原 良太

Doublesex (Dsx)は昆虫の性分化を制御する転写因子としてショウジョウバエにおいて1957年に最初に同定された。Dsxには性特異的スプライシングによって生じる雌雄で異なるアイソフォームが存在し、それぞれが雄分化、雌分化を制御する。1999年、この因子のDNA結合ドメインに特徴的なZinc finger motifが線虫の雄分化に関わるMab-3と呼ばれる転写因子にも見つかри、このDNA結合ドメインはこれら2つの転写因子の頭文字に因んでDMドメインと呼ばれるようになった。DMドメインを保有する転写因子はDM domain related transcription factor (DMRT)と呼ばれ、1999年以後現在に至るまで、サンゴからヒトにいたるほとんどの動物において見いだされている。DMRTは雄分化に関わる機能をもつことが多くの動物種において立て続けに報告され、性決定カスケードにおいて唯一保存された因子とみなされていた。しかしDMRTには多数のパラログ(サンゴでは15個、ヒトでは8個)が存在することがわかり、それらは全て性分化に関わる機能をもつのか、互いに相補的に機能しうることなのか、またそれらの機能は種を超えて保存されているのか、など依然として多くの謎が残されている。

一方、Dsxについてもこれまでの知見を覆すいくつかの報告が近年相次いでいる。たとえば膜翅目、網翅目、半翅目昆虫のいくつかの種ではDsxが雌分化に不要であることが報告された。当研究室においてもカイコの内部生殖器の一部の雄分化と雌分化がDsxノックアウトの影響を受けないことを発見していた。以上の事実から、笠原氏はDsxでは説明がつかない新奇の性分化制御機構が存在するとの仮説を立て、その制御因子の候補としてDMRTパラログに注目し、その機能解明を博士論文研究の目的とした。

カイコなど多くの昆虫は3つのDMRTパラログ(DMRT11E、DMRT93B、DMRT99B)をもつことが知られていた。笠原氏はこれら3つのDMRTのどれが性分化に関わるかを明らかにするため、CRISPR/Cas9およびTALENを駆使し、これら3つの遺伝子のノックアウト変異系統を複数樹立した。笠原氏は独自に作出したこれらの変異系統を用いた多角的な解析を実施し、以下の点を明らかにした。

【DMRT11E】

幼虫期から蛹期までの卵巣小管において特異的に発現することを突き止めた。DMRT11Eホモ変異雌の産生する卵は内部に空洞が見られ、孵化率も15%程度にまで減少することを明らかにした。これらの異常の原因を突き止めるため、卵巣におけるトランスクリプトームを解析し、DMRT11Eの制御下にある候補遺伝子としてキモトリプシンインヒビターCi13を同定し、ホモ変異雌の卵巣ではこの遺伝子の発現量が減少することを見いだした。この結果を裏付けるかのように、ホモ変異雌の産生する卵は脂質のキャリアタンパク質として機能すると予想されて

いる egg storage protein の分解産物と思しき 50-60 kDa のタンパク質の蓄積が見られること、さらに脂肪酸の有意な減少がみられることを発見した。脂肪酸の減少が卵内における空洞や孵化率の低下を招くとの独自の結論を導き出した。

【DMRT99B】

幼虫期から成虫期にかけて脳と卵巣において特異的に発現することを突き止めた。DMRT99B ホモ変異雌の卵巣には異常がみられず、わずかながら孵化率や造卵数の減少を招くのみだった。脳において発現がみられたことから、幼虫と成虫を用いた詳細な行動解析実験を行い、DMRT99B 変異個体は過度な徘徊行動を示し、エサやフェロモン源に到達する能力が著しく低下することを発見した。これに伴い、摂食量が減少し、これが造卵数や孵化率の低下を招いたとの結論を導き出した。

【DMRT93B】

幼虫期から蛹期までの精巣被膜、生殖器原基で高発現することを突き止めた。*Bmdsx* 変異体の生殖巣におけるトランスクリプトームを解析した結果、DMRT93 の発現が DMRT の中で唯一 *Bmdsx* の制御下にある（具体的には雌型 *Bmdsx* により抑制的な制御を受ける）ことを明らかにした。DMRT93B ホモ変異は胚致死をもたらすことから、胚発生にとって必須の機能をもつことを明らかにした。DMRT93B G0 体細胞モザイク変異体を解析した結果、*Bmdsx* 変異では異常を示さなかったオスの内部生殖器において矮小化、奇形、欠失などの異常が見られることを突き止めた。さらに DMRT93B の精巣における発現が 20 ヒドロキシエクダイソンの制御下にある証拠を *ex vivo* 実験により明らかにした。

以上より、笠原氏は当初の予定通りカイコの 3 つの DMRT 全ての機能を明らかにし、さらにそれらのうち DMRT93B が *Dsx* では説明がつかない新奇の性分化制御を担う因子であることを突き止めるに至った。DMRT93B が雄分化に関わることを明解に示した報告は誌上に公開された例としては世界初となる。また、DMRT99B が行動制御に関わることを明らかにしたのも本研究が初めてである。DMRT11E については、卵形成に関わるとの報告が既に存在していたが、笠原氏の研究はホモ変異体を用いたこと、トランスクリプトーム解析により下流候補遺伝子を明らかにしたこと、卵形成異常の原因因子を特定したことなどの点において秀でていいる。一つの生物種のゲノムに存在する DMRT パラログ全ての機能を一挙に明らかにした、という点でも本研究が初めての例であるといえる。本研究により、生物体内における DMRT の機能を体系的に理解することが可能となり、DMRT 因子の研究分野にブレークスルーをもたらした。今後 DMRT 研究に携わる多くの研究者に引用されるような、メルクマールとなる研究といえる。

よって本論文は博士（生命科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 2418 字