
博士論文 (要約)

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

笠原 良太

目次

緒言	2
第一章	12
序論	13
材料・方法	15
結果	19
考察	22
図表	25
第二章	34
序論	35
材料・方法	37
結果	44
考察	49
図表	54
第三章	73
総合考察	75
謝辞	80
参考文献	81

緒言

有性生殖を行う動物において個体（器官）の性および各器官の分化運命が決定する「性決定・性分化」と、その性に基づく器官の構造・機能の違いである「性的二型」の発達は種の保存に極めて重要であり、幅広い分類群において保存されている現象である。これらは性決定遺伝子といわれる因子を最上流として複数の因子が関与する性決定カスケードと呼ばれる遺伝子カスケードによって厳密に制御されているが、現象の保存性に反してこのカスケードに関与する遺伝子は分類群・動物種によって極めて多様である (Herpin *et al.*, 2015)。例えば脊椎動物の場合、ヒトをはじめとする哺乳類では HMG ボックスといわれる DNA 結合ドメインをもつ転写因子である雄性決定遺伝子 *Sex-determining region Y; SRY* (Sinclair *et al.*, 1990; Kashimada & Koopman., 2010) が、アフリカツメガエルでは DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインをもつ転写因子である雌性決定遺伝子 *DM-W* (Yoshimoto *et al.*, 2008) が、ニジマスでは免疫系の遺伝子である *interferon regulatory factor 9 (IRF9)* との相同性を示す雄性決定遺伝子 *Sex-determining region Y; SdY* (Yano *et al.*, 2012) といった互いに異なる因子が性決定の最上流因子として働いている。線型動物である線虫 (*Caenorhabditis elegans; C.elegans*) の性決定カスケードは極めて複雑であるが、GHMP キナーゼの一種 *XO lethal 1; Xol-1* が雌雄同体化を促進する *Sex determination and Dosage Compensation defective; sdc* という遺伝子群の発現を抑制することで、雄性決定遺伝子として働くことがわかっている (Miller *et al.*, 1988; Rhind *et al.*, 1995; Luz *et al.*, 2003; Zarkower., 2006)。昆虫の一種キイロショウジョウバエでは RNA 結合タンパク質・スプライシング因子をコードする遺伝子 *Sex lethal; Sxl* が下流の、やはり RNA 結合タンパク質・スプライシング因子である *transformer; tra* のメス型スプライシングを誘導することで雌性決定遺伝子として機能している (Robinett *et al.*, 2010)。このように、性決定のシステムは分類群によって様々である (図 0-1 も参照)。

昆虫は特に性決定遺伝子が多様であり、*tra* のパラログであるセイヨウミツバチの *Complementary sex determiner ; Csd* (Beye *et al.*, 2003)、*tra* と共働する遺伝子として知られる *transformer2; tra-2* との関連が指摘されているネッタイシマカの *Male determiner protein Nix; Nix* (Hall *et al.*, 2015)、piRNA であるカイコの *Feminizer; Fem* (Kiuchi *et al.*, 2014)、スプライソソーム構成タンパク質 *CWC22* のパラログであるイエバエの *Musca domestica male determiner:Mdmd* (Sharma *et al.*, 2017)、機能の詳細は不明なペプチドであるガンビエハマダラカの *Yob* (Krzywinska *et al.*, 2016) およびチチュウカイミバエの *Maleness-on-the-Y; MoY* (Meccariello *et al.*, 2019) などやはり由来、構造、場合によっては作用機構までも異なる多様な因子が最上流因子として働いている (表 0-1)。

こうした性決定カスケードの多様性に対して、生殖器や性特異的な斑紋といった雌雄で異なる形質 (性的二型と呼ばれる) を形成する性分化因子には一定の保存性が見られ、特に DMRT (Doublesex-Mab3 related transcription factor) と呼ばれる転写因子群には極めて高い保存性が知られている (Picard *et al.*, 2015)。この DMRT は Zinc-Finger 型 DNA 結合ドメインである DM ドメインをもつことによって特徴づけられる。DM ドメインは、その名の通りショウジョウバエの性決定カスケード最下流因子 Doublesex (Dsx) および線虫の雄化因子 Male-abnormal3 (Mab3)、さらにはヒトの精巣分化因子 DM domain gene expressed in testis1; DMT1 (DMRT1) 間に共通にみられる Zinc-Finger 型の DNA 結合ドメインとして発見された (Burtis & Baker., 1989; Shen & Hodgkin, 1988; Raymond *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 2000)。

DMRT は動物界において海綿動物と襟鞭毛虫を除くほぼ全ての後生動物のゲノム中に保存されており、また一つの生物種のゲノム中に複数のパラログが存在し、これらが異なる機能をもつ複数のアイソフォームを形成することも確認されている (Picard *et al.*, 2015)。

しかしながら、この遺伝子群の最大の特徴はこれら広範な動物種において多くの場合何らかの形で性決定・性分化に関与しているという点である。昆虫種においても、これまで調べられたすべての種に *dsx* が保存されており、複数の種で行われた機能解析も *dsx*

が性分化を制御することを示している(Verhulst & Zande, 2015)。また、哺乳類においては *DMRT1* が精巣分化を促進して直接的に雄分化を制御するマスター因子であることが知られ (Raymond *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2015)、このほか *DMRT6*、*7* は精子形成に必須の因子であることがわかっている (Zhang *et al.*, 2017)。線虫 (*C.elegans*) においては、*Mab3* 遺伝子と *dmd-3* 遺伝子がオス型の遺伝子発現並びに形態形成に寄与することが知られている (Shen & Hodgkin, 1988; Mason *et al.*, 2008)。さらに、前述した *DM-W* や魚類ではメダカの *DM-Y* (Matsuda *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2007)、カラアカシタビラメの *dmrt1* (Cui *et al.*, 2017) などが性決定遺伝子として働いている。無脊椎動物においても甲殻類であるミナミカッチュウイセエビでは Y 染色体にある *iDMY* が雄性決定遺伝子として機能していると考えられており (Chandler *et al.*, 2017)、またオオミジンコでは *dsx1* が胚子期に発現することによって個体のオス化が誘導される (Kato *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2018; Nong *et al.*, 2020)。近年では軟体動物や甲殻類、刺胞動物といった進化的に遠縁な分類群においても性分化を制御していることがわかってきている (Picard *et al.*, 2015)。

DMRT のうち、昆虫種の *dsx* は性決定カスケードの上流遺伝子から伝達されるシグナルに応じて雌雄で異なるスプライシングを受け、雄型の *Dsx^M* および雌型の *Dsx^F* という性特異的なアイソフォームを形成し、性的二型の形成を担う下流遺伝子の発現に性差を形成することで性分化を制御するという点において極めて特徴的な遺伝子である。この *dsx* の機能は特にキイロショウジョウバエでよく調べられており、その変異体は遺伝的な性によらず間性 (雌雄の中間型の性) の表現型を示す (Hildreth., 1965; Baker *et al.*, 1980)。DSX^F によって発現が促進される *yolk protein1 · 2*; *yp1 · 2* (卵黄形成)、*bric a brac 1*; *bab1* (腹部における雄型色素沈着の抑制)、*Flavin-containing monooxygenase 2*; *Fmo2* での実験から、DSX による性特異的な発現制御機構が明らかにされている。すなわち、プロモーター領域の特定のシスエレメントに DSX^F が結合することにより転写が活性化される一方で、DSX^M が結合すると転写が抑制されるのである (Brutis *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2008; Luo & Baker., 2015)。ChIP-seq 解析の結果、*Dsx* の制御を受けると予測される遺

伝子の数はキイロショウジョウバエの全遺伝子の約 4 割にも及ぶとされており (Clough *et al.*, 2014)、*dsx* が昆虫の性分化を網羅的に制御するという見方が有力説であった。

しかし、様々な昆虫種における *dsx* の機能解析が進んだ結果、キイロショウジョウバエ以外の昆虫における *dsx* は予想されていたほど網羅的に性を制御しているわけではないことが示唆されつつある。例えば鞘翅目タウルスエンマコガネでは、生殖器において性特異的発現を示す遺伝子 (雄生殖器特異的な遺伝子;1045 個、雌生殖器特異的遺伝子;2310 個) のうち *Dsx* の予測標的遺伝子の数が極めて少なく (雄生殖器では 17 個、雌生殖器では 34 個)、*dsx* のノックダウンをしても雌雄とも遺伝子発現に変動がほとんどないこと、一方で頭角や胸角 (オスで特徴的に発達する) ではオスにおける標的がメスにおける標的より非常に多い (頭角: オス; 492、メス; 175。胸角: オス; 123 個、メス; 15 個) ことがわかっている (Ledón-Rettig *et al.*, 2017)。また、膜翅目昆虫のカブラハバチや半翅目昆虫のトビイロウンカ、網翅目昆虫のチャバネゴキブリにおいて *dsx* が雌の生殖器の性分化にとって不要であることを示唆する結果が得られている (Mine *et al.*, 2017; Zhuo *et al.*, 2018; Wexler *et al.*, 2019)。このような昆虫群では、*dsx^F* が *dsx^M* に比べて極めて限定的な機能しか有しておらず、メスの性的二型形成は *dsx^F* 以外でかつ *dsx^F* の制御下にもないような遺伝子 (*dsx^F* 非依存性制御因子) が制御していると考えられる。

カイコにおいても *dsx* (*Bmdsx*) は全ての性的二型を制御しているわけではないことがノックアウト個体を用いた当研究室の先行研究により明らかにされている (松岡, 2019; Yuzawa *et al.*, 2020) (図 0-2) が、カイコの場合は上記の例とは少し異なる。カイコでは *dsx* ノックアウト個体において生殖巣や外部生殖器が大幅に間性化・性転換するのに対して、内部生殖器ではオス型器官 (輸精管、貯精囊、射精管など生殖器原基由来の器官) もメス型器官 (卵巣小管) も *dsx* の働きがなくても正常に分化する。すなわち、カイコでは *dsx^M*、*dsx^F* ともに相応の機能を有しているものの、一部性的二型の形成・発達はその制御を受けていないものもあるということになる。以上から、カイコでは *dsx^M* 非依存性制御因子も *dsx^F* 非依存性制御因子も存在していることが予想される。

すなわち、現状明らかとなっている *dsx* による性的二型形質の制御は次のようになる。キイロショウジョウバエをはじめとした双翅目においては *dsx^M*, *dsx^F* とほぼほとんどの性的二型を制御しており、*dsx* はほぼ完全なマスターとして働いていると考えられる (図 0-3. A)。一方でカブラハバチ、トビイロウンカ、チャバネゴキブリ、またエンマコガネといった昆虫では *dsx^M* はオスの性的二型を制御するものの、*dsx^F* はメスの性的二型をほとんど制御しておらず *dsx^F* に依存しないような制御因子が存在するものと仮定されている (図 0-3. B)。それに対して、カイコでは *dsx^M*, *dsx^F* とともに雌雄それぞれの性的二型形成を制御しているが、それらに依存しないような制御因子も両性に存在すると予想される (図 0-3. C)。以上から私はカイコを用いて研究を行うことで、他の昆虫と異なる特有の性的二型形成機構を明らかにできるのではないかと考えた。

では、*dsx* 非依存制御因子の正体は何なのだろうか? この点を明らかにするべく、私は有望な因子を予測し、その機能を調べることにした。上述したように DMRT は一つの生物種のゲノム中に複数のパラログが存在する。同様に、昆虫のゲノムにも *dsx* 以外に 3 種類の DMRT、*dmrt11E*, *dmrt93B*, *dmrt99B* が存在することが知られているが (Pomerantz *et al.*, 2015)、キイロショウジョウバエ以外の昆虫では機能が全くわかっていない。上述したように、哺乳類では *DMRT6*, *7* といった因子が *DMRT1* 非依存的に性分化を行っていることからカイコにおいても *dmrt11E*, *dmrt93B*, *dmrt99B* のいずれかの遺伝子が *dsx* 非依存的な性分化を制御することが期待できる。

一方で、これら DMRT が目的とする機能を有しなかった場合においても機能解析は行われるべきであると考えた。DMRT が広範な動物種に保存され、性という文脈で研究されてきていることは上述したが、DMRT のうちのほとんどは機能がわかっていない。特に昆虫では *dsx* 以外の DMRT にほとんど興味向けられず機能面もほぼ完全に情報が欠失している。一方で、昆虫以外の生物種においては *DMRT3* が競走馬の歩行法と関連しているという報告 (Andersson *et al.*, 2012) やゼブラフィッシュやニワトリにおいて *dmrt2* が胚の体節形成、特に左右相称性を制御しているという報告 (Meng *et al.*, 1999;

Saúde *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009) は性という文脈からは大きく外れるものであったが、当該分野においてブレークスルーをもたらした。また、いくつかの DMRT は性疾患以外のヒト疾患の原因遺伝子としても知られ、先天性の骨形成異常である脊椎肋骨異骨症の原因として DMRT2 の変異が同定されている (Bouman *et al.*, 2018) ほか、先天的な脳形成異常である滑脳症の原因として DMRT5 の変異が確認されている (Urquhart *et al.*, 2016)。こうしたことから、目的としているような *dsx* 非依存性制御因子でない DMRT についても機能を解析することで、DMRT に関する遺伝学的知見のギャップを埋めるのみならず、予想もしなかった生物学的な謎を解き明かすことにつながるかもしれないと考えた。

本研究ではこのような経緯から、*dsx* 非依存的な性的二型形成が確認されているカイコをモデルとして、昆虫ゲノム中において保存されている *dsx* 以外の DMRT についてその機能を明らかにすることを目的とした。本研究では以下のような手順に基づいて研究を進めることとした。まずは、DMRT 遺伝子の探索とその発現解析を行うとともに、CRISPR/Cas9 システムや TALEN を用いたゲノム編集によって各々の DMRT のノックアウトシステムを作成し、それらの機能解析を行うこととした。その結果、*dsx* 非依存性制御因子である可能性が明らかになれば、*dsx* 非依存的な性的二型の形成機構についてより詳細な解析を行う。本研究によって DMRT が *dsx* 非依存性制御因子であることが明らかとなればカイコの性分化制御についての理解がより一層深まるとともに、他の昆虫における *dsx* 非依存性制御因子の重要な手掛かりを得ることにつながる。また、仮に *dsx* 非依存性制御因子でなかった場合においても、その機能を可能な限り明らかにする。これによって昆虫における DMRT についての知見を充実させるとともに、これまで手掛かりを得られなかった生物学的命題の解明に繋がらないかを模索することも目指した。

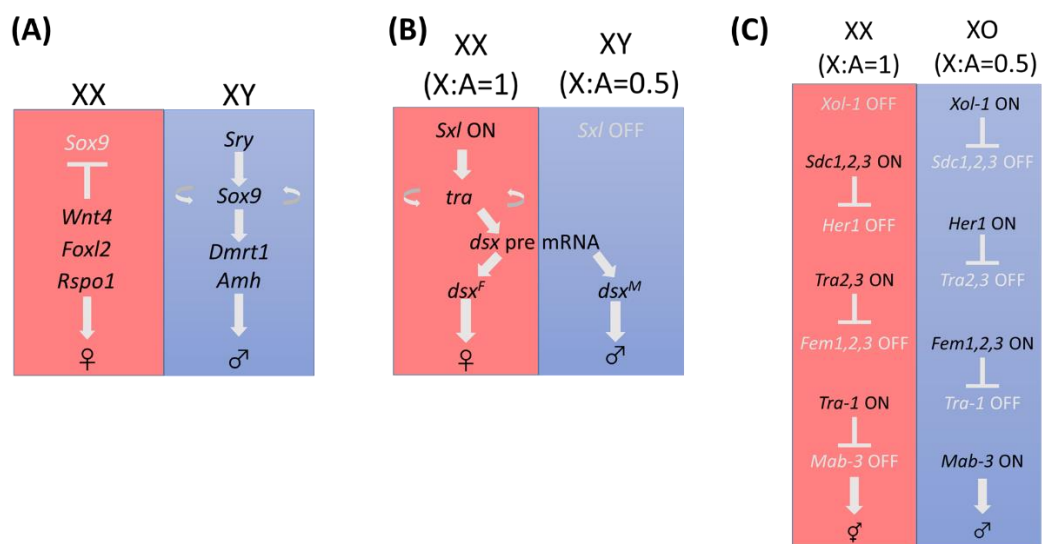


図 0-1. 様々な分類群における性決定遺伝子カスケード

代表的な 3 種のモデル生物における性決定の遺伝子カスケードを示した。(A) マウス、(B) キイロシヨウジョウバエ、(C) 線虫; *C.elegans*。それぞれのカスケードは Kashimada&Koopman., 2010、Robinett *et al.*, 2010、Zarkower, 2006 を参考に作製した (参考文献を参照)。

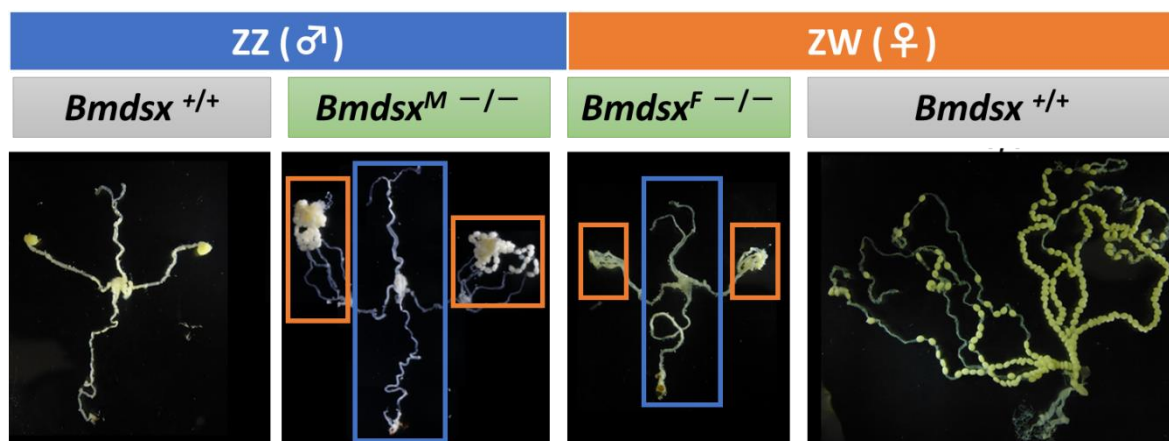


図 0-2. カイコにおける *dsx* 変異体の表現型 (松岡、修士論文より一部改変)

変異体において青で囲んだ部分はオス型の性的二型を示した部位、オレンジ色で囲んだ部分はメス型の性的二型を示した部位を表す。

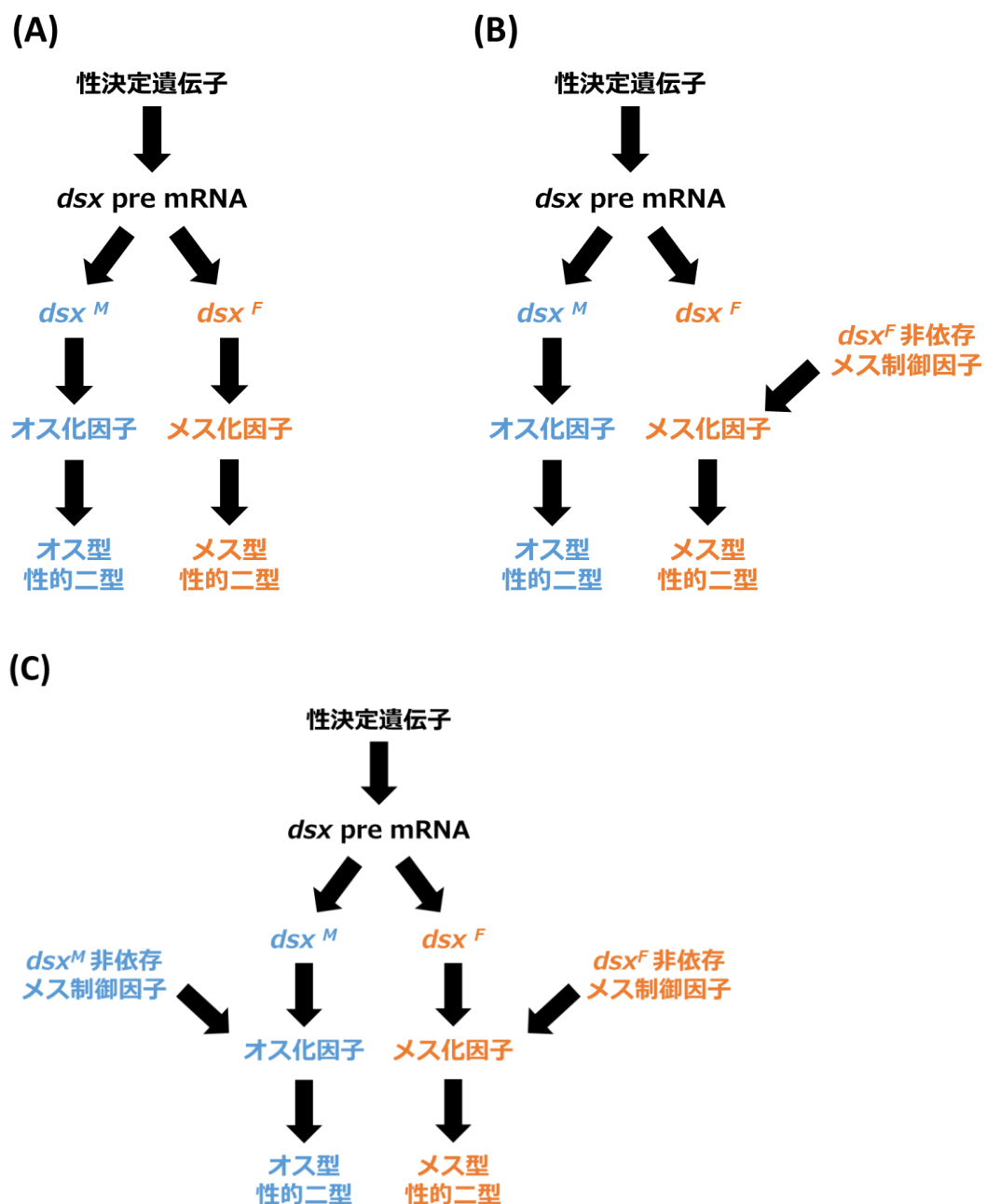


図 0-3. 昆虫分類群ごとの性的二型形成機構のモデル図

(A). キイロショウジョウバエを主とする双翅目昆虫

(B). 膜翅目、半翅目、鞘翅目、網翅目昆虫

(C). 鱗翅目昆虫 (現時点ではカイコでのみ報告された知見に基づく)

表 0-1. これまで同定された昆虫の性決定最上流遺伝子

以前までに明らかにされた昆虫の性決定遺伝子を表に示した。起源遺伝子は性決定遺伝子のパラログである遺伝子あるいは遺伝子群を指す。

分類群	種名	遺伝子名	分子機能	起源遺伝子
双翅目	キイロショウジョウバエ	<i>Sxl</i>	RNA 結合タンパク質	<i>embryonic</i> <i>lethal</i> <i>abnormal</i> <i>vision</i> (<i>elav</i>)
	チチュウカイミバエ	<i>MoY</i>	不明	不明
	イエバエ	<i>Mdmd</i>	スプライシング因子	<i>CWC22</i>
	ガンビエハマダラカ	<i>Yob</i>	不明	不明
	ネッタイシマカ	<i>Nix</i>	RNA 結合タンパク質	<i>tra-2</i>
鱗翅目	カイコ	<i>Fem</i>	piRNA	不明
膜翅目	セイヨウミツバチ	<i>Csd</i>	RNA 結合タンパク質	<i>tra</i>

第一章

カイコ DMRT 遺伝子の発現解析

序論

DMRT 遺伝子は進化の過程で重複を繰り返しており、一つの種に複数存在することが知られている。DMRT は当初、*dmrt2/dmrt11E*、*dmrt4・5/dmrt99B*、*dmrt93B* のセットとして存在し、進化の過程で分類群ごとに多様な獲得・喪失を経験したと考えられている (Mawaribuchi *et al.*, 2019)。節足動物においては *dmrt11E*、*dmrt93B*、*dmrt99B* の 3 種類の DMRT が広く保存され、昆虫ではそれに *dsx* を加えた 4 種類が保存されているようである。*dsx* を除く 3 種のセットは先行研究によると少なくともクモ、ダニ、ムカデ、ヤスデ、カギムシまでは共通のようであり、軟体動物や棘皮動物といった旧口動物全体にも保存されているようであるが、昆虫と異なり他の DMRT を獲得している種もある。昆虫では少なくとも多くのハエ目、カイコ、セイヨウミツバチでは保存されているようである。ただし、コクヌストモドキだけは *dmrt11E* を欠失するようである (Pormantz *et al.*, 2015; Panara *et al.*, 2019)。甲殻類でも同様であるが、*dmrt93B* に関する報告がミジンコ以外にないことから、失われている可能性がある。機能面について、*doublesex* は特に昆虫において雌雄両方の性分化マスター遺伝子として機能しており、様々な昆虫においてその機能が調査されている。一方で、その他の DMRT については昆虫において発現を調査した研究はほとんどない。

dsx 以外の DMRT について、昆虫ではキイロショウジョウバエのみにおいていくつかの研究がなされており、*dmrt11E* と *dmrt93B* は精巣で発現し、その発達を制御していることや (O'Day., 2010)、特に *dmrt11E* については稔性を制御していること (Yu *et al.*, 2015) がわかっている。また、*dmrt99B* は神経系における発現・機能が示唆されている (Fontana & Crews, 2012; Henry *et al.* 2012; Zwarts *et al.* 2015)。

昆虫以外の種においては、主に甲殻類で研究がなされている。オオミジンコにおいて *dmrt11E* と *dmrt99B* が卵巣で、*dmrt93B* が精巣で高く発現していることがわかっている

(Kato *et al.*, 2008)。その他、*dmrt11E* について、オニテナガエビでは精巣で高い発現を示し、雄性ホルモンをコードする *Iag* の発現を維持する機能が報告されている (Yu *et al.*, 2014)他、テナガエビでは精巣・卵巣両方で発現して *Iag* の他に卵黄タンパク質であるビテロジェニンの発現量を維持する機能が示唆されている (Wang *et al.*, 2019)。

甲殻類の例から、発現パターンを知ることが機能を予測することにおいて重要であると思われる。昆虫においてはキイロショウジョウバエにおいてさえ研究状況が曖昧であることから、我々はまずカイコにおける DMRT パラログの発現部位・時期を同定することを目標とした。また、本研究の目的からして *Bmdsx* と各 DMRT の関係を抑えることは極めて重要であると考えられたため、*Bmdsx* 変異体を用いた RNA-seq データから各 DMRT の発現量を確認した。

材料及び方法

供試昆虫・飼育条件

本研究に用いたカイコ N4 系統、および p50 系統 (*Bombyx mori*) は発育ステージを通じて 25±3°C、16 時間明期—8 時間暗期の条件下の部屋で飼育した。産下された卵は適宜 17°C および 4°C のインキュベーター内で発生を抑制し、室温に戻して孵化させた。幼虫期の飼育には人工飼料 (日本農産工業 シルクメイト原種 1-3 齢用 S) を使用した。

total RNA の抽出

カイコの各組織からの total RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン) を用い、添付マニュアルの手順に従って行った。組織のホモジナイズには Homogenization Pestle (フナコシ) およびバイオマッシャー (和光純薬工業) 付属のペッスルを用いた。

RT-PCR

抽出した total RNA を鋳型とした逆転写反応による cDNA 合成は Prime Script® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を使用し、添付マニュアルの手順に従って行った。逆転写反応の鋳型には 1 µg の total RNA を使用し、primer には上述の Kit に付属の Random 6mer を用いた。逆転写反応により合成された cDNA を用いた PCR 反応には Emerald Amp® PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用し、手順は添付のマニュアルに従った。発現解析に用いた primer の塩基配列を表 1-1、逆転写、RT-PCR の PCR 条件を表 1-2 に示した。

qRT-PCR

qRT-PCR による遺伝子発現量の定量には 5 個体分の各組織から上述の方法で Total RNA 抽出し、cDNA 化したものを用いた。PCR 酵素として SYBR Premix Ex Taq II および後継品である TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用い、添付マニュアルの手順に従って行った。定量解析は先行研究の方法 (Suzuki *et al.*, 2012) に従い、 $\Delta\Delta C_t$ 法により *BmEF2* をリファレンス遺伝子として行った。解析に用いた primer の塩基配列を表 1-1、PCR の条件は表 1-2 に示した。

in situ hybridization (ISH)

各 DMRT の局在について Aslam らおよび Kim らの方法を参考にして ISH を行った (Aslam *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2006)。ISH 用の probe は、以下の様に作製した。まず、N4 系統 (*Bmdmrt99B*)、および p50 系統 (*Bmdmrt11E*, *Bmdmrt93B*) の幼虫期 5 齢 3 日目の雌雄の生殖巣から調整した cDNA を鋳型として KOD PLUS ver.2 (東洋紡ライフサイエンス) を用いた PCR により各遺伝子のプローブ領域を増幅した。得られた増幅産物を TA クローニングに供試するため 10x A-attachment mix (東洋紡ライフサイエンス) を用いて PCR 産物の平滑末端に A 付加を行い、pGEM-T (Easy) Vector (Promega) にクローニング後、シーケンスすることにより目的の cDNA がクローニングされているプラスミドを得た。このプラスミドを鋳型として T7 プロモーターを 5' 末端側末端側に不可した sense primer と付加していない antisense primer を用いた PCR 反応を行い、センスプローブ合成用の鋳型 DNA を得た。アンチセンスプローブ合成用の鋳型 DNA を得るためには、T7 プロモーター配列を 5' 末端側に付加した anti-sense primer と付加していない sense primer を用いた。PCR 反応は KOD-PLUS ver.2 (タカラバイオ) を用いて 50 μ L の反応系を 4 連で行い、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて PCR 産物を精製した。この DNA を鋳型として DIG RNA labeling Kit (Roche) を用いて RNA プローブを合成した。ハイブリダイゼーションは RNA プローブを

2ng/μL となるように調整して行い、37°C (*Bmdmrt99B*) および 50°C (*Bmdmrt11E*、*Bmdmrt93B*)、O/N で行った。シグナルの検出は Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments from sheep (Roche) の 1/1000 希釈液を 4°C、O/N で反応させた後に NBT/BCIP Stock Solution (Roche) の 1/50 希釈液を用いて発色させることによって確認した。RNA プローブの合成に使用した primer の塩基配列を表 1-3、PCR 条件を表 1-4 に示した。

シーケンス用 DNA 断片のクローニング・形質転換

in situ hybridization 用プローブのシーケンスをする際、クローニング用のベクターシステムとして pGEM-T (Easy) Vector Systems (Promega) を用い、添付マニュアルの手順に従って TA クローニングを行った。すなわち、当該 DNA 断片と pGEM-T(Easy)Vector のライゲーション反応を行い、この反応液 1 μL を 10 μL の *E. coli* DH5alpha Competent Cells (タカラバイオ) の菌液に加え、on ice 10 分、42°C 30 秒、on ice 2 分の手順で大腸菌の形質転換を行った。形質転換処理後の大腸菌に、上記 Competent cells に付属の SOC medium を加えて 37°C で 1 時間培養した後、20 mg/mL X-Gal と 0.1 M IPTG を 40 μL ずつ塗り広げた LB/カルベニシリン (50 mg/mL) のプレート培地に展開し、37°C、16～18 時間程度培養してコロニーを形成させ、blue/white セレクションによってインサクションの成否を判断した。

大腸菌の液体培養・プラスミド抽出および塩基配列のシーケンス

Blue/white セレクションにより白色を呈したコロニーの中から任意のコロニーを爪楊枝で釣菌し、EmeraldAmp® PCR Master Mix (タカラバイオ) を用いてコロニーPCRを行った。コロニーPCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、増幅産物のサイズに基づいて目的とするインサートが挿入されているかを判断した。目的とするインサートが確認されたコロニーを釣菌し、LB/カルベニシリン (50 mg/mL) の液体培地で 37°C、220 rpm、16～18 時間の振とう培養を行った。この培養液から GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-

Aldrich) および Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favogen) を用いて、添付のマニュアルに従ってプラスミドを回収した。回収したプラスミド DNA を鋳型としては M13 primer またはインサートの増幅に用いた primer を用いてシーケンスを行った。なお、シーケンスはユーロフィンジェノミクスの提供するシーケンス受託サービスに依頼した。コロニーPCR の PCR 条件を表 1-5 に、PCR およびシーケンスに使用した primer の塩基配列は表 1-6 に示した。

結果

カイコゲノム上の DMRT 遺伝子の発現部位解析

本研究開始前に同定されていたカイコの DMRT 遺伝子 (*dmrt11E*: LOC101745391、*dmrt93B*: LOC101740696、*dmrt99B*: LOC101735734、*dsx*: 692415) (Pormantz et al., 2015) について、*dsx* がカイコの学名 (*Bombyx mori*) にちなんで *Bmdsx* (Ohbayashi et al., 2001) と呼称されることから、*Bmdmrt11E*、*Bmdmrt93B*、*Bmdmrt99B* と命名した。

まずは上述の解析により同定された 3 つの DMRT 遺伝子の発現部位と発現時期を調査することにした。このために、カイコ N4 系統の 5 齢 3 日目幼虫においていくつか組織を採取し、RT-PCR により 3 つの DMRT 遺伝子の発現を確認した (図 1-1)。その結果、*Bmdmrt99B* および *11E* は卵巣において高発現することがわかった。一方、*Bmdmrt93B* は精巣における高い発現が見られた。その他、*Bmdmrt99B* は卵巣のほかに雌雄のいずれにおいても脳組織で発現することがわかった。

カイコゲノム上の DMRT 遺伝子の発現解析

続いて、これらの組織における発育に伴う発現量の変化を確認すべく、qRT-PCR を用いて 3 種の DMRT 遺伝子の生殖巣における発現量の変化を調べた。脳において発現がみられた *Bmdmrt99B* については、雌雄の脳における発現量の推移も調査した。その結果、*Bmdmrt11E* と *99B* の卵巣における発現量は、幼虫期において発育に伴って上昇する傾向が見られたのに対し、*93B* の発現量は発育ステージによって激しく増減することがわかった (図 1-2: A, B)。*Bmdmrt99B* の脳における発現量は、雌雄いずれにおいても幼虫期において発育に伴って上昇する傾向がみられ、ステージによって雌雄どちらかに若干高く発現していることはあったが、雌雄差はほとんど見られなかった (図 1-2: C)。以上から、カイコの DMRT は生殖巣において性特異性をもって発現していることが明らかと

なった。

カイコ DMRT 遺伝子の局在解析

各 DMRT が生殖巣および脳に発現することがわかったため、局在を知るべく *in situ* hybridization を行った。まず、卵巢および脳において *Bmdmrt99B* の局在を調べた結果、5 齢 3 日目幼虫の卵巢切片においては Anti-sense probe 特異的にシグナルが見られたが、全体的に染色されてしまい、はっきりとした局在はわからなかった。一方、5 齢 3 日目幼虫の脳においては、ネガティブコントロールである Sense-probe を用いた場合でも全体的に染色されてしまったため、特異的な局在を判断することができなかった (図 1-3 A, B)。続いて、*Bmdmrt11E* の卵巢における局在を調査したが、Anti-sense probe においても全くシグナルを得ることができなかった (data not shown)。

次に、精巣における *Bmdmrt93B* の局在を見るべく 5 齢 3 日目幼虫の精巣切片に対して ISH を行ったところ、Anti-sense probe を用いた場合においてのみ精巣の最も外側の膜 (精巣被膜) にシグナルが見られた (図 1-3 C)。

ISH では *Bmdmrt11E* の局在が得られず、他の DMRT に関してもはっきりとした局在を知るには至らなかった。そこで、生殖巣を用いた qRT-PCR によって補助的な情報を得ようと試みた。生殖巣は精巣・卵巢とも被膜と中身 (生殖細胞と支持細胞群) から構成される。そこで、生殖巣について各 DMRT の発現量を画分毎に見ることで大まかな局在を確認しようと考えた。p50 系統の 5 齢 3 日目生殖巣の被膜と中身の分画から cDNA を調整し、qRT-PCR によって画分ごとの発現量を定量したところ、全ての DMRT において被膜よりも中身の方で高い発現が見られた。特に *Bmdmrt99B* は、被膜に比べ中身において 9.7 倍も高く発現していた (図 1-4: A)。卵巢においてはさらに成虫期において卵と卵巢小管を分けて RT-PCR を行ったところ、*Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* ともに卵に mRNA が局在することがわかった (図 1-4: B)。

***Bmdsx* 変異体における各 DMRT の発現量**

各 DMRT が *Bmdsx* 非依存性制御因子として働くのであれば、それらの発現は *Bmdsx* が変異しても影響を受けないはずである。この仮説を検証するため、当研究室の松岡・湯澤によって作製された *Bmdsx* 変異体 4 齢 1 日目幼虫の生殖巣における RNA-seq データを参照し、各 DMRT の発現量を確認した。その結果、*Bmdsx*^M 変異体においてはどの DMRT も有意な発現変動を示さなかった (図 1-5 A)。*Bmdsx*^F 変異体においても、*Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* は何ら発現に変動を示さなかった。これに対し、*Bmdmrt93B* は *Bmdsx*^F ホモ変異体においてのみ発現を示すことがわかった (図 1-5 B)。

考察

カイコ各 DMRT の発現時期を知る目的で RT-PCR および qRT-PCR を行った。その結果、特に生殖巣において性特異的な発現が認められた。また、*Bmdsx* 変異体における RNA-seq データから *Bmdsx^M*、*Bmdsx^F* が DMRT の発現にどのような作用をもたらすか知ることができた。

Bmdmrt11E は卵巣において継続的に高い発現を示していた (図 1-1, 1-2:B)。キイロシヨウジョウバエにおいて、*dmrt11E* はオス、特に精巣で発現することが知られている (O'Day., 2010)。また、オニテナガエビ、テナガエビの *dmrt11E* も精巣で高く発現するのと報告がある (Yu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019)。一方、オオミジンコの *dmrt11E* は卵巣で高い発現を示すこと (Kato *et al.*, 2008)、テナガエビも精巣に加えて卵巣でも発現するとの報告がなされている (Wang *et al.*, 2019)。以上のことから、何らかの要因で *dmrt11E* の発現する性は種によって頻繁に切り替わっていると考えられる。カイコと同じく卵巣で高い発現が見られたテナガエビでは、*dmrt11E* が卵黄タンパク質であるピテロジェニンの発現を制御するとの知見 (Wang *et al.*, 2019) があることから、カイコにおいても卵黄タンパク質の発現制御、ひいては卵の形成に関与する可能性が考えられた。この仮説は、卵巣分画ごとの qRT-PCR の結果から、*Bmdmrt11E* が卵巣被膜の内部や成虫の卵においてより高い発現を示したことから支持される (図 1-4)。なお、ISH では *Bmdmrt11E* の局在を知る手がかりを得ることができなかったが、これは *Bmdmrt11E* の発現量の低さに起因するものと考えている。

Bmdmrt93B は精巣において幼虫期に高い発現を示し、蛹期以降発現が低下していくという発現動態を示した (図 1-1, 1-2:A)。この発現パターンから、幼虫期の精巣発達および精子形成の進行、開始に重要である可能性が考えられる。なお、キイロシヨウジョウバエおよびオオミジンコの *dmrt93B* は精巣で発現することが知られている (Kato *et al.*,

2008; O'Day., 2010)。以上のことから、*dmrt93B* のオス特異的な発現は進化的に保存されているものと考えられる。キイロショウジョウバエの *dmrt93B* は精巣と輸精管の発達に寄与する (O'Day., 2010) ことからカイコにおいても同様の機能をもつことが予想された。また、ISH の結果から *Bmdmrt93B* は精巣被膜に局在することがわかった (図 1-3:C)。キイロショウジョウバエにおいても ISH を行うと精巣表面に局在することがわかっているが、この局在は将来的に輸精管が伸長してくる部位に特異的なものとなる (O'Day., 2010)。カイコでは必ずしも輸精管伸長部位に局在していたわけではなく、被膜全体に局在していたことからキイロショウジョウバエと必ずしも同じ機能を有しないかもしれないが、いずれにせよ精巣・輸精管の発達に寄与していると期待することはできる。ISH と qRT-PCR の結果 (図 1-3:C と図 1-4:A) が矛盾するよう見えることには注意が必要だが、精子は被膜細胞と比べて細胞数が非常に多量に存在するものであるのに加え、被膜と精子の発現量の差は2倍程度しかないため細胞一個当たりの局在が非常に少なかったことが ISH でシグナルとして現れなかった原因として考えられる。いずれにせよ、精子にも *Bmdmrt93B* が発現することは事実であるためカイコにおいては上述した精巣・輸精管の発達に加えて精子の発達に寄与する可能性も考慮する必要があるだろう。

カイコでは *Bmdmrt99B* が幼虫期の卵巣と脳に高く発現していた (図 1-1, 1-2:B, C)。神経において *dmrt99B* の発現がみられることはキイロショウジョウバエでも認められており、カイコにおいても神経の発達等に関与している可能性が考えられた。カイコでは脳における局在が得られなかったが、キイロショウジョウバエでは脳のキノコ体の発達に寄与するとの報告があるため (Zwarts *et al.*, 2015)、カイコにおいてもキノコ体に局在するかもしれない。また、ISH、qRT-PCR いずれの結果も *Bmdmrt99B* が卵巣内部で高く発現することを示唆していた (図 1-3:A, B, 1-4)。オオミジンコにおいても *dmrt99B* は卵巣で高い発現を示すとの報告がある (Kato *et al.*, 2008)。したがって、*dmrt99B* の卵巣特異的な発現は一定程度保存されているのかもしれない。卵巣内部は将来的に卵となる卵細胞とその支持細胞および将来的に卵を包み産卵管へと運ぶ卵巣小管となる細胞群で構成され

る。*Bmdmrt99B* は成虫期において卵で高い mRNA の局在が見られた (図 1-4: B)。このことから、*Bmdmrt99B* は *Bmdmrt11E* 同様に卵形成等に関与する可能性も考えられるが、一方で卵巣は成虫が産卵を行うために必要な多数の神経投射が起きてくる部位でもあり、幼虫卵巣においてそのような神経に関連した機能をもっている可能性も否めない。

Bmdsx 変異体を用いた RNA-seq データを用いて各 DMRT の発現に対して与える影響を調査することにより、*Bmdsx* 非依存性制御因子の探索を行った (図 1-5)。*Bmdsx^M* の変異が精巣で高い発現を示した *Bmdmrt93B* の発現に影響を与えなかったことから、*Bmdmrt93B* が *Bmdsx^M* 非依存性制御因子である可能性が一つ高まったといえる (図 1-5: A)。一方、*Bmdsx^F* の変異が卵巣で高い発現を示した *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* の発現に影響を与えなかったことから、これらの DMRT が *Bmdsx^F* 非依存性制御因子である可能性が一つ高まったといえる (図 1-5: B)。一方で、*Bmdmrt93B* が *Bmdsx^F* が機能しない条件下 (*Bmdsx^F* ホモ変異体) でしか発現していなかったことから (図 1-5: B)、*Bmdmrt93B* の発現におけるオス特異性は、*Bmdsx^F* による抑制によって成し遂げられていたと推察される。問題は *Bmdmrt11E* と *Bmdmrt99B* である。これらは *Bmdsx* 非依存的な発現を示すにも関わらず、なぜメス (卵巣) に高く発現していたのだろうか? これについては雌雄というより精巣と卵巣の組織的な違いが関与しているのかもしれない。上述したように卵巣は精巣と比べて神経との関わりが強いため *Bmdmrt99B* が高く発現している可能性が考えられる。また、*Bmdmrt11E* も脂質輸送・代謝といったような卵巣特異的な機能に関与しているのかもしれない。

以上第一章の結果から、各 DMRT が雌雄において *Bmdsx* 非依存性制御因子として働く可能性は十分にあると考えられたことから、各遺伝子の機能解析が必要であると考え、以降の実験を行った。

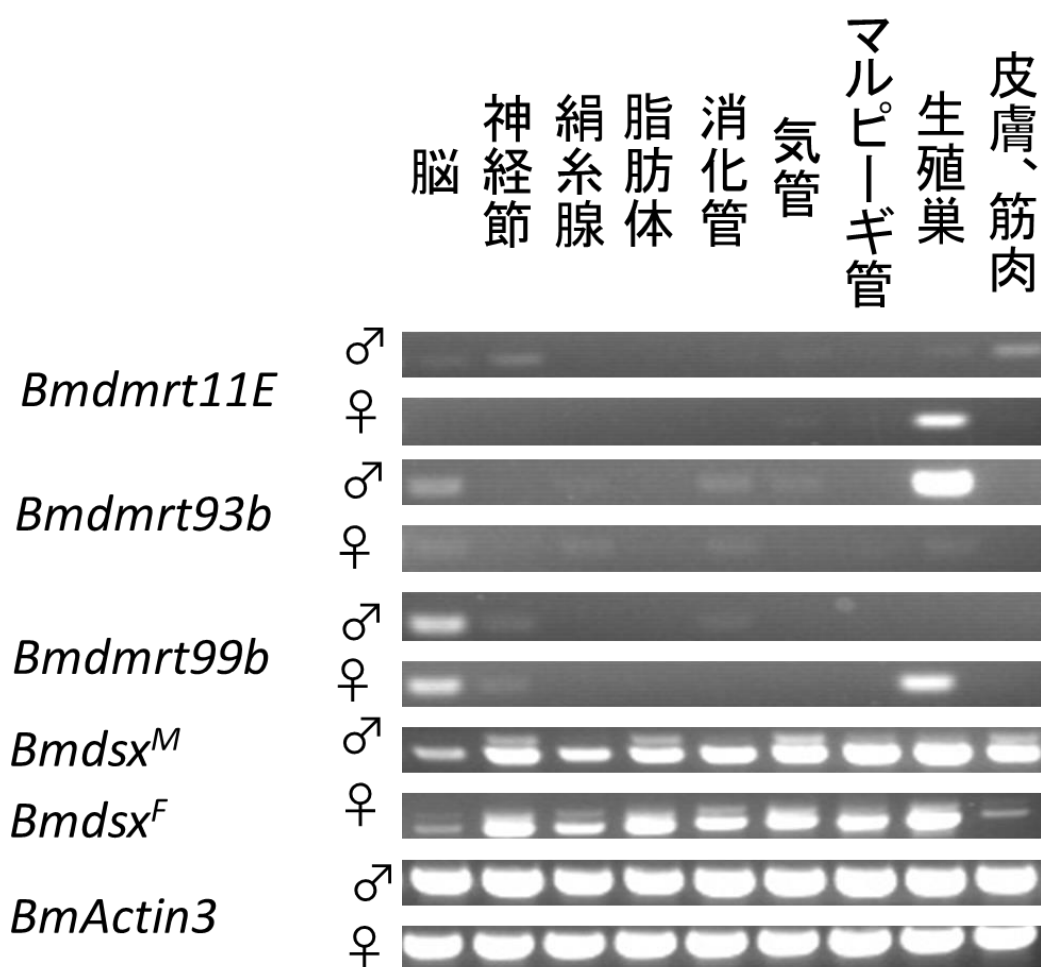
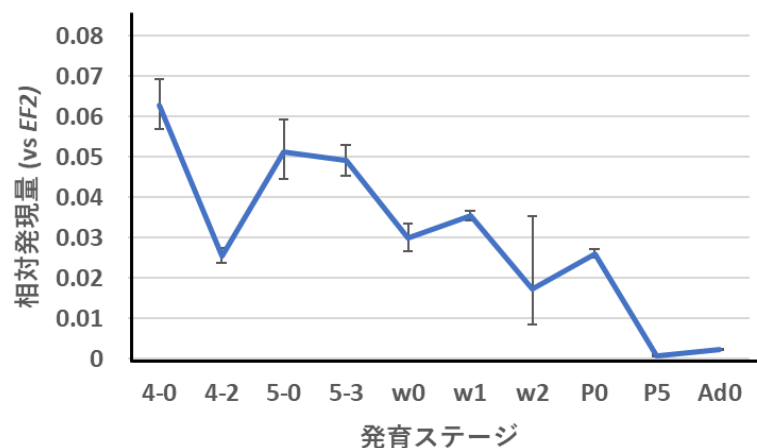


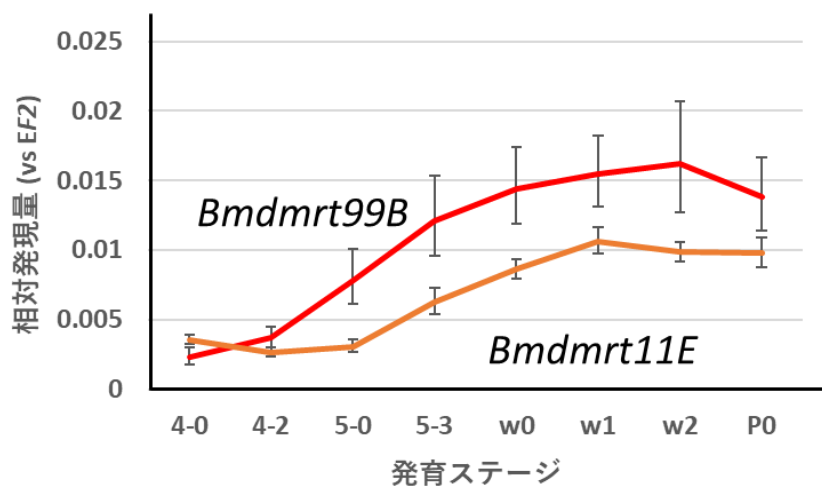
図 1-1. 幼虫 5 齢 3 日目におけるカイコ DMRT 遺伝子の発現解析

実験には N4 系統を用いた。絹糸腺は前・中・後部絹糸腺およびフィリッピ腺を含む。消化管は食道・前腸・中腸・後腸・直腸全てを含む。神経節には、脳、前額神経球以外のすべての神経節を含む。生殖巣については、雄では精巣、雌では卵巣を供試した。*Bmdsx* については、雌では *Bmdsx^F* を、雄では *Bmdsx^M* に該当する増幅産物を示した。

(A)



(B)



(C)

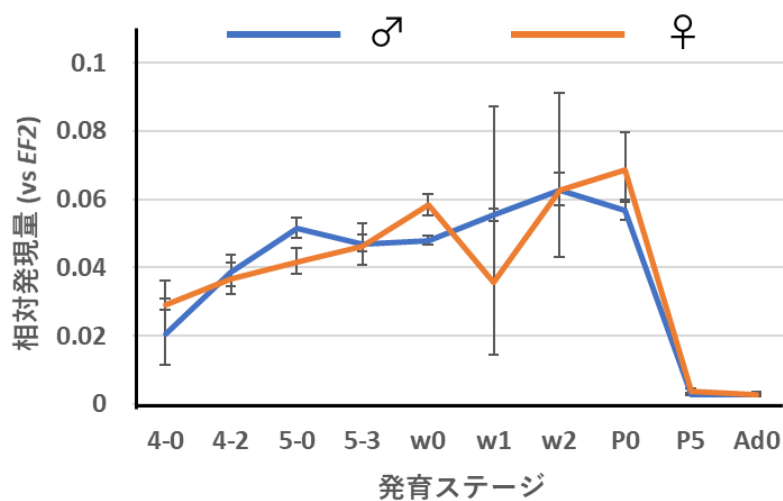


図 1-2. 発育に伴う組織別の各 DMRT 遺伝子の発現量の変化

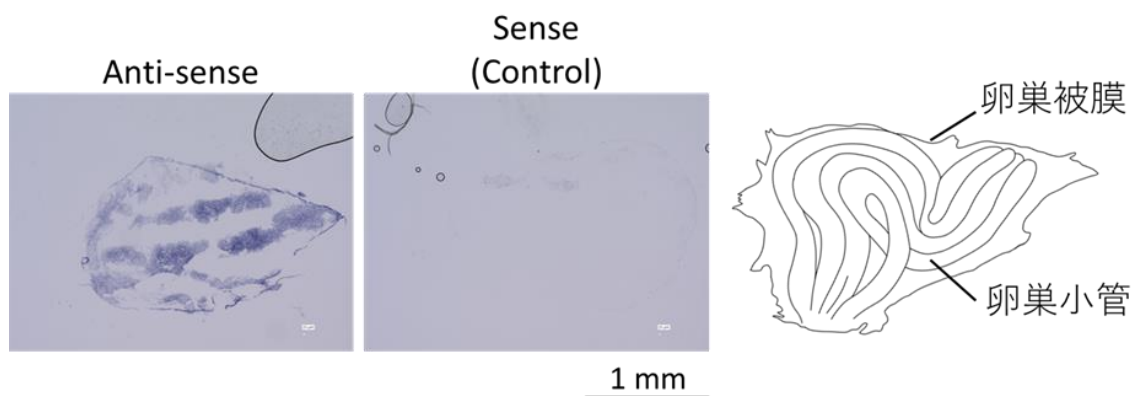
(A) 精巣における *Bmdmrt93B* の発現量の変化

(B) 卵巣における *Bmdmrt99B* および *IIE* の発現量の変化

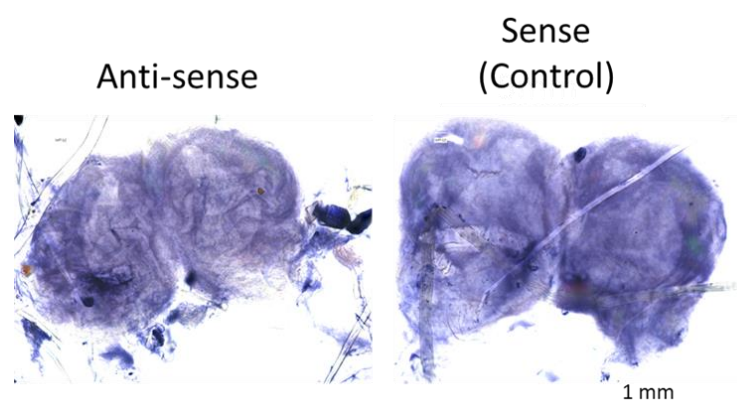
(C) 雌雄の脳における *Bmdmrt99B* の発現量の変化。

4-0・2, 5-0・3; 4 齢 0・2 日、5 齢 0・3 日幼虫、w0-2; ワンダリング 0-2 日、P0・P5: 蛹期 0・5 日目、Ad0: 成虫 0 日目。エラーバーは SD を表す (well effect, n=3)。

(A)



(B)



(C)

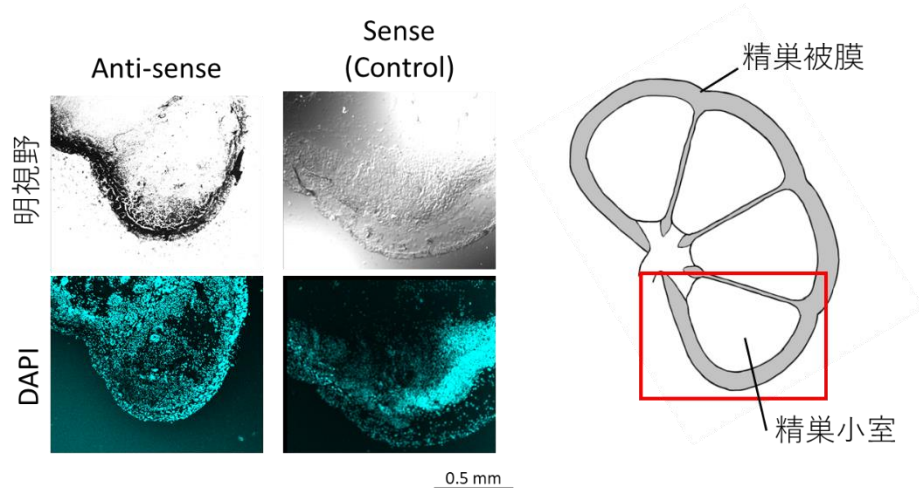


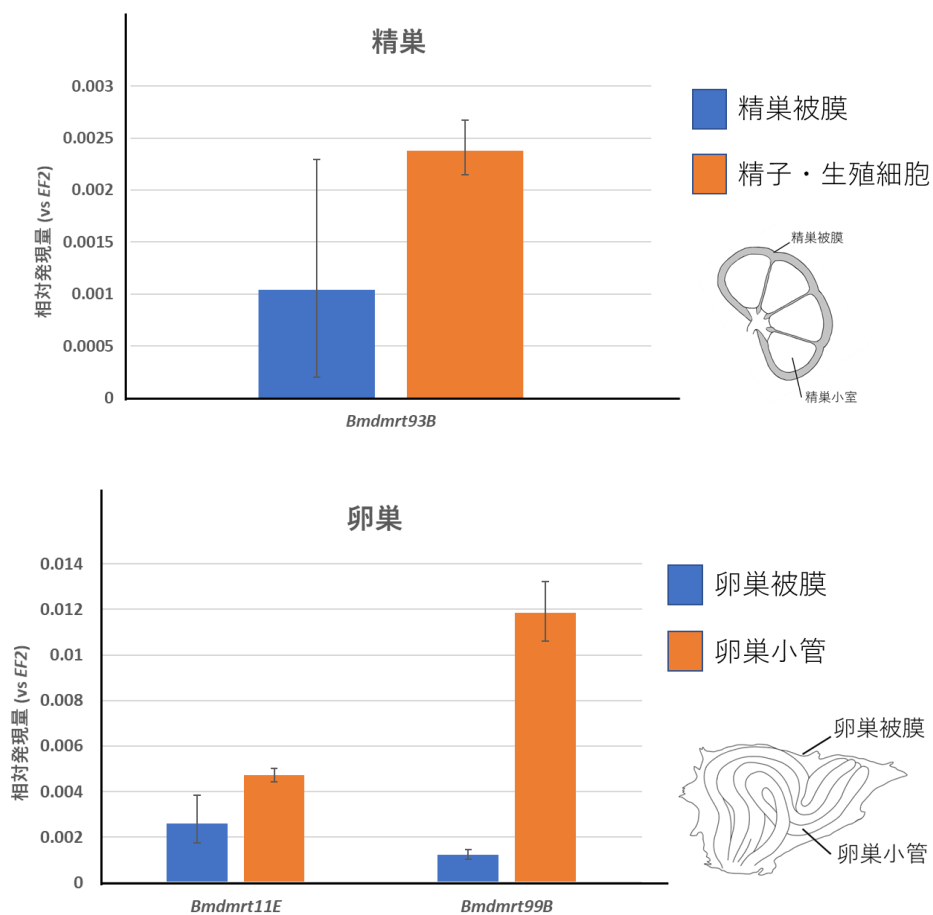
図 1-3. ISH による各 DMRT の局在解析

(A) 卵巢切片に対する *Bmdmrt99B* の ISH 像と卵巢切片の模式図。

(B) 脳に対する *Bmdmrt99B* の Whole-mount ISH 像。

(C) 精巢切片に対する *Bmdmrt93B* の ISH 像と精巢切片の模式図。精巢では精巢小室の中に生殖細胞が大量に封入されている。

(A)



(B)

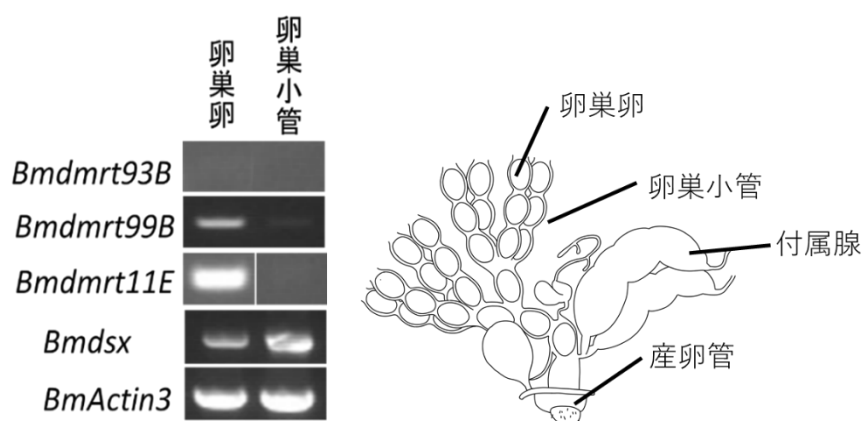
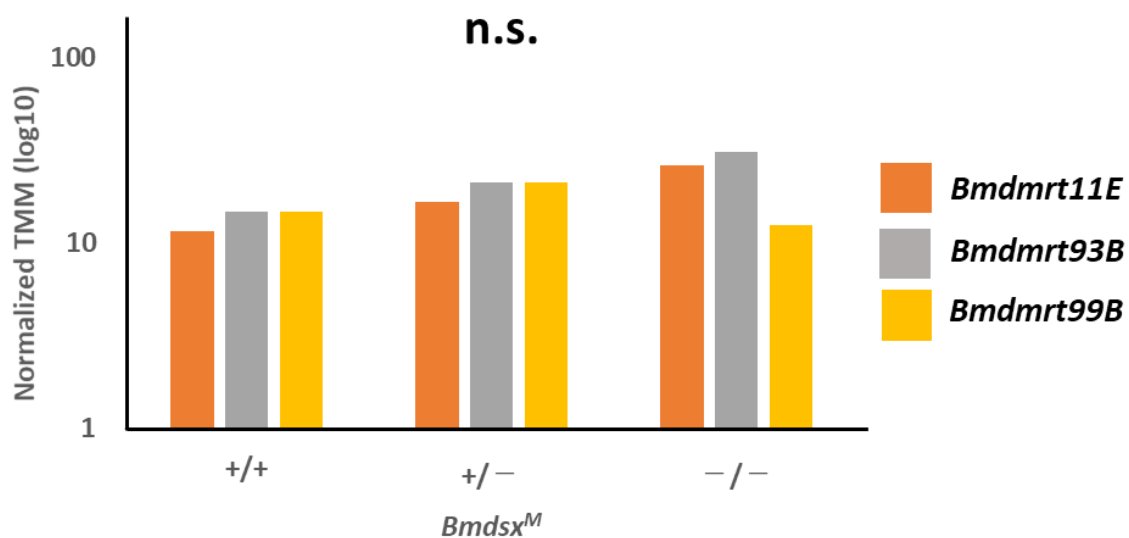


図 1-4. 生殖巣分画における各 DMRT の発現量

- (A) 卵巢における *Bmdmrt11E* と *Bmdmrt99B* の発現、精巣における *Bmdmrt93B* の発現を分画別に定量した。エラーバーは SD を表す (well effect, n=3)。
- (B) 成虫メスの生殖器分画。図に示す卵巢卵と卵巢小管を分画し、qRT-PCR を行った。エラーバーは SD を表す (well effect, n=3)。

(A)



(B)

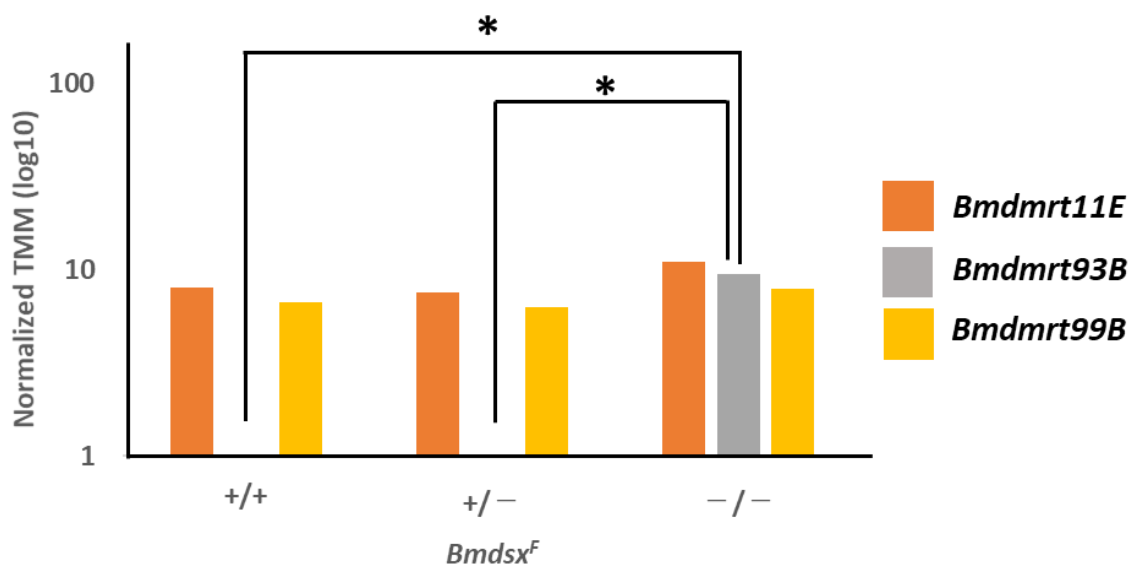


図 1-5. $Bmdsx$ 変異体における各 DMRT の発現量

(A) コントロール (+/+) のオス個体および $Bmdsx^M$ 変異体オスの生殖巣における各 DMRT の発現量。横軸は $Bmdsx^M$ の遺伝子型を表す。統計的有意差は各遺伝子型について+/+ と+/-、-/- 間で求めた。

(B) コントロールのメス個体および $Bmdsx^F$ 変異体メスの生殖巣における各 DMRT の発現量。横軸は $Bmdsx^F$ の遺伝子型を表す。*: $p < 0.05$ 。

表 1-1. RT-PCR および qRT-PCR に用いたプライマー配列

Target gene	Primer	Sequence
<i>Bmdmrt93B</i>	Forward	AACCAGATTCAGCTGCTGATG
	Reverse	AAACTAGCTCCAACACCGAAC
<i>Bmdmrt99B</i>	Forward	GGTTCATAGTTACAAGTTTTGAG
	Reverse	GCAGAGACCACGCCGTGGTTC
<i>Bmdmrt11E</i>	Forward	GAGGACACCGAAATGCGCTC
	Reverse	AGCCTCGCTATTGCGCGATTC
<i>Bmdsx RT-PCR</i>	F2	CGCCTTACCGCAGACAGGCAG
	R4	GCGCAGTGTCGTCGCTACAAGG
<i>Bmdsx</i> qRT-PCR	Forward	TGTACCACCAGTGGTGAAG
	Reverse	TGTGACAGTTCTCCACAAGC
<i>BmActin3</i>	Forward	AGATGACCCAGATCATGTTCCG
	Reverse	GAGATCCACATCTGTTGGAAG
<i>BmEF2</i>	Forward	TCGTACCGTGAGACCGTAGCT
	Reward	ATGTCCTCTGGCAGACCATCA

表 1-2. 逆転写及び RT-PCR、qRT-PCR の PCR 条件

・逆転写条件

Random 6mer extension	reverse transcription	Enzyme inactivation
30°C, 10min	42°C, 60min	75°C, 15min

・RT-PCR 条件

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Final extension	cycles
95°C, 3min	98°C, 10sec	57°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 1min	35

・qRT-PCR 条件

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycles
95°C, 30sec	95°C, 5sec	55°C, 10sec	72°C, 20sec	45

(Dissociation Step; 95°C,15sec⇒60°C,30sec⇒95°C,15sec)

表 1-3. in situ hybridization 用プローブ作製に用いたプライマー配列

Target gene	Primer	Sequence
<i>Bdmrt93B</i>	Forward	TTGGCCTCAGTTGAGACCGG
	T7-Forward	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCG TTGGCCTCAGTTGAGACCGG
	Reverse	GGCTGACCATCGAGACTCTGG
	T7-Reverse	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCG GGCTGACCATCGAGACTCTGG
<i>Bdmrt99B</i>	Forward	CCTTCTTCCTGAGAGCGTCC
	T7-Forward	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCG CCTTCTTCCTGAGAGCGTCC
	Reverse	AGAAGTGGGAGAGGTTCCCG
	T7-Reverse	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCG AGAAGTGGGAGAGGTTCCCG
<i>Bdmrt11E</i>	Forward	CTTGCAACACTCGGAAGGCG
	T7-Forward	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCG CTTGCAACACTCGGAAGGCG
	Reverse	TCAACCGGCAGTCCAGGTTC
	T7-Reverse	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCG TCAACCGGCAGTCCAGGTTC

表 1-4. ISH に用いた PCR 条件

・PCR 条件 (クローニング用)

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Final extension	cycles
94°C, 2min	94°C, 15sec	55°C, 30sec	68°C, 30sec	72°C, 2min	35

・PCR 条件 (IVT 鋳型作製用)

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Final extension	cycles
94°C, 2min	94°C, 15sec	50°C, 30sec	68°C, 30sec	72°C, 2min	35

表 1-5. コロニーPCR、シーケンシングに用いたプライマー配列

Primer	Sequence
M13-Forward	GTTTCCAGTCACGAC
M13-Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

表 1-6. コロニーPCR に用いた PCR 条件

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	cycles
94°C, 3min	98°C, 10sec	55°C, 30sec	72°C, 1min	30

第二章

Bmdmrt11E および *Bmdmrt99B* の機能解析

序論

カイコの卵巢は最終的に卵、卵巢小管となる。卵形成については *Bmdsx* によってかなりの部分が制御されているものと考えられる一方で、卵巢小管については部分的にしかな関与していないものと思われた (松岡修論, 2017; Yuzawa *et al.*, 2020)。第一章での発現解析から *Bmdmrt11E* および *Bmdmrt99B* は *Bmdsx^F* による発現制御を受けておらず、卵巢小管の存在する卵巢内部に高く発現することがわかった。このことから、*Bmdmrt11E* あるいは *Bmdmrt99B* のどちらか、あるいは両方が卵巢小管の形成を司る可能性を探ることは有用であると思われる。

dmrt11E の機能は生物種によって大きく異なっている。節足動物では第一章で上げたキイロショウジョウバエでの精巣発達・稔性制御に関与すること (O'Day., 2010)、オニテナガエビやテナガエビにおける雄性ホルモン遺伝子の発現制御に関わること (Yu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019)、またテナガエビではビテロジェニン発現の制御にも関与することが知られる (Wang *et al.*, 2019)。また、この遺伝子は脊椎動物では *DMRT2* と呼称されているが、序論でも少し述べたように節足動物とは異なり、胚子期の骨格形成や筋形成に関与することが知られている。ヒトにおいては骨形成疾患の原因遺伝子として知られる (Bouman *et al.*, 2018)、マウスにおいては骨格、特に背骨と四肢の形成に関与し (Seo *et al.*, 2006; 2007; Sato *et al.*, 2010; Lourenço *et al.*, 2010)、ゼブラフィッシュやニワトリでは筋・骨格の発育と左右対称性に関与するという報告がある (Meng *et al.*, 1999; Saúde *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Lourenço *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018)。カイコは節足動物の1種であることから、テナガエビのように卵形成あるいは卵巢小管形成において機能しているものと予想されるが、卵巢および卵巢卵において発現していることから脊椎動物のような胚形成における機能をもつことも期待できる。

dmrt99B に関しては、第一章で述べたようにキイロショウジョウバエでもカイコと同様に

神経で発現することがわかっているが、その機能については断片的にしかわかっていない。脊椎動物では *DMRT4/5* と呼ばれ、序論で述べたようにヒトでは先天性の脳形成異常である滑脳症の原因であり (Urquhart *et al.*, 2016)、マウス (Balciuniene *et al.*, 2006; Gennet *et al.*, 2011; Konno *et al.*, 2012; Saulnier *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2017; De Clercq *et al.*, 2018; Desmaris *et al.*, 2018; Ratié *et al.*, 2020)、アフリカツメガエル (Huang *et al.*, 2005)、ゼブラフィッシュ (Graf *et al.*, 2015)、また脊椎動物ではないが新口動物であるユレイボヤ (Tresser *et al.*, 2010) でも神経形成に重要であることがわかっている。カイコにおいても脳で高い発現を示すことから、やはり神経系において機能をもつ可能性は十分に考えられる。

オニテナガエビでは、カイコやオオミジンコと異なり精巣でのみ高い発現を示すが、やはり機能は一切わかっていない。脊椎動物においては、*DMRT4* がマウスの卵巣で発現を示し、これをノックアウトすると卵巣に異常 (卵胞中に複数の卵が形成される) が起こるとの報告がなされている (Balciuniene *et al.*, 2006)。また、魚類であるティラピアの *DMRT4* (*DMO*) は脳にはほとんど局在せず卵巣でのみ高発現することが知られる (Guan *et al.*, 2000)。このことから、*Bmdmrt99B* がメスの生殖において機能する可能性はありうると考えられる。

果たしてカイコの卵巣で高い発現を示していた *Bmdmrt11E* および *Bmdmrt99B* の機能は一体どのようなものであろうか? 第二章ではこれら 2 つの遺伝子に着目し、それらの機能を明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

供試昆虫・飼育条件

ノックアウト系統作成にはカイコの N4 系統を使用した。発育ステージを通じて $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明期—8 時間暗期の条件下の部屋で飼育した。産下された卵は適宜 17°C および 4°C のインキュベーター内で発生を抑制し、室温に戻して孵化させた。幼虫期の飼育には人工飼料 (日本農産工業 シルクメイト原種 1-3 齢用 S) を使用した。

RNA 抽出・cDNA 合成、RT-PCR、qRT-PCR、シーケンス用 DNA 断片のクローニング・形質転換、大腸菌の液体培養・プラスミド抽出および塩基配列のシーケンス

第一章の材料および方法で記述したのと同様の方法で実施した。RT-PCR、qRT-PCR、コロニー PCR に用いたプライマーは第一章の表 1 で示したものと同一ものを使用した。

Bmdmrt99B の CRISPR/Cas9 によるノックアウト

CRISPR/Cas9 system に用いた Single guide RNA (sgRNA) と Cas9 mRNA は Hwang らの方法に従って合成した (Hwang *et al.*, 2013)。ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>) に各 DMRT 遺伝子の塩基配列を入力し、標的配列として提案された部位のセンス鎖、アンチセンス鎖の塩基配列をもつオリゴ DNA (センス鎖, 5-TAGGCGGCAGGGCGGC GAGCAC -3; アンチセンス鎖, 5-AAACGTGCTCGCCGCCCTGCCG-3、下線部が *Bsa* I サイト) を Invitrogen に依頼して合成した。これらをアニーリングさせて二本鎖にした後、sgRNA expression vector pDR274 (Addgene) の *Bsa*I サイトに挿入した。上述の二本鎖オリゴ DNA と pDR274 のライゲーションは Ligation high verII (東洋紡) を用い、添付マニュアルの指示に従って行った。得られたライゲーション産物を大腸菌に形質転換 (方法は前述) 後、LB/カナマイシン培地 (20mg/mL) で増幅し、各々の二本鎖オリゴ DNA の

センス鎖側のオリゴ DNA と M13 primer を用いてコロニーPCR (条件は前述の変異体シーケンスと同一) を行い、インサートの有無を確認した。インサートの挿入が確認できたコロニーから上述の方法によりプラスミド DNA を抽出した後、制限酵素 *DraI* (タカラバイオ) で切断して直鎖状にした。制限酵素処理後の DNA をゲル抽出によって精製し、これを鋳型として T7-Scribe™ Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) を用い、添付のマニュアルに従って *in vitro* 転写を行った。*in vitro* 転写産物はフェノールクロロホルム抽出による除タンパク処理の後に mini Quick Spin mRNA columns (Roche) を用いて精製後、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿物を RNase-free water に溶解し sgRNA 溶液とした。この sgRNA 溶液が入ったチューブを、沸騰させた熱湯に浮かべ、70 分ほど室温で放置して徐々に冷却することで熱変性による sgRNA の二次構造の解消を行った。作成された sgRNA が目的とする転写産物となっているかは、1%アガロースゲルを用いた電気泳動により確認した。Cas9 mRNA の合成には、Cas9 nuclease expression plasmid pMLM3613 (Addgene) を *PmeI*(NEB) によって切断して直鎖状にした DNA を鋳型として用いた。Cas9 mRNA の *in vitro* 転写は、mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit (Ambion) を用いて、添付マニュアルの手順に従って行った。この転写産物に Poly (A) Tailing Kit (Ambion) を用いて poly (A) 付加を行い、キャップ構造をもつ Cas9 mRNA を合成した。sgRNA、Cas9 mRNA の最終濃度をそれぞれ 20 ng/μL, 500 ng/μL となるように調整し、先行研究の方法 (Suzuki *et al.*, 2012) に従って図 2-1:A に示すように産卵後 6 ~8 時間以内のカイコ卵に顕微注入した。

Bmdmrt11E の CRISPR/Cas9 によるノックアウト

CRISPR/Cas9 系に用いたオリゴ RNA (CRISPR RNA: crRNA) および Cas9 タンパク質 (S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3) は Integrated DNA Technologies 社から購入したものをを用いた。まず、crRNA 設計ツールである CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて *Bmdmrt11E* に特異的なターゲット候補配列を同定した。それらの中から、IDT 社の

提供する crRNA 設計ツール

(https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM) で算出された on-target score に基づいてノックアウトに用いる crRNA を 2 種類 (5'-CTAGCACCAGAAGACAACCAG -3'; アンチセンス鎖, 5'-TCTAGCACCAGAAGACAACCG -3') 設計した。各遺伝子特異的な 2 種類の crRNA とトランス活性化型 CRISPR RNA (tracrRNA) および Cas9 タンパク質を IDT 社 HP に掲載されたクイーンズランドミバエ (*Bactrocera tryoni*) に対して作製されたプロトコールを参考に混合し、Cas9 蛋白質 gRNA 複合体 (RNP) を形成させてから、先行研究の方法 (Suzuki *et al.*, 2012) に従って図 2-1:A に示すように産卵後 6~8 時間以内のカイコ卵に顕微注入した。

標的ゲノム DNA 部位の変異検出

標的とした遺伝子領域に変異が導入されていることを確認するため、卵および成虫の脚からゲノム DNA を抽出した。卵からのゲノム DNA 抽出は Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) の公開する方法 (<https://stockcenter.vdrc.at/images/downloads/GoodQualityGenomicDNA.pdf>) に従って行い、成虫の脚からのゲノム DNA 抽出は大門ら (2014) の方法に従って行った。ターゲット配列を挟み込むように設計した primer を用いて PCR 反応を行い、得られた増幅産物を 1%もしくは 2%アガロースゲル、10%アクリルアミドゲル電気泳動に供試することで欠失もしくは挿入変異の有無を確認した。成虫の脚由来のゲノム DNA を鋳型に用いた PCR 反応には EmeraldAmp®PCR Master Mix (タカラバイオ) を、卵由来のゲノム DNA を鋳型として用いた PCR 反応には TaKaRa LA Taq® (タカラバイオ) を使用し、操作手順は添付マニュアルに従った。コントロール用の primer として *BmGAPDH* primer を用いた。卵由来のゲノム DNA については、上述の PCR によって得られた増幅産物を Surveyor Mutation Detection Kits (Integrated DNA Technologies) を用いたエンドヌクレア

一ゼ反応に供試し、キットに添付のマニュアルの手順に従って変異検出を行った。得られた反応産物は 0.01% 臭化エチジウムを含む 2%アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離・可視化し、変異導入がされている場合に見られる DNA 断片の有無を確認した。使用した primer の塩基配列を表 2-1、PCR の条件を表 2-2 に示した。

変異系統の樹立

Bmdmrt11E および *Bmdmrt99B* の変異系統樹立は以下の様に行った。*Bmdmrt11E* および *Bmdmrt99B* のエクソンを標的としたインジェクションを行った卵から孵化個体 (G_0 世代) を得た。 G_0 個体同士あるいは G_0 個体と正常個体 (N4 系統) の交配によって得られた各蛾区の産下卵 (G_1 世代) のおよそ 1/4 に相当する数の卵からゲノム DNA を抽出し、上述の方法により標的部位の変異の有無を検出することで変異をもつ個体を含む蛾区を選出した。選出した蛾区から得たゲノム DNA を鋳型に用いて、標的部位を含む DNA 断片を PCR によって増幅後、上述の方法に従ってクローニングとシーケンスを行い、変異の詳細を確認した。その結果、フレームシフトやエクソン欠失等の有用な変異を高頻度にもつことが確認された蛾区を選抜した。これらの蛾区から羽化した成虫 (F_1 世代) の脚から DNA を抽出し、上述した方法で PCR 反応による変異の有無の確認 (ジェノタイプング) を行った。得られた PCR 産物を上述の方法に従ってクローニングおよびシーケンスすることで各個体のもつ変異を同定し、有用な変異をもつ個体の次代 (G_2 世代) を選抜した。これを繰り返すことにより、最終的に 1 種類の変異をホモまたはヘテロでもつ系統を樹立し、表現型の解析に用いた。

Bmdmrt11E, *Bmdmrt99B* 変異体雌の妊性解析

Bmdmrt11E, *Bmdmrt99B* の卵巣における機能を探索するべく、造卵数と産下卵の孵化率を調査した。*Bmdmrt11E* については、変異をホモまたはヘテロにもつメスを N4 系統のオスと交配し、調査を行った。*Bmdmrt99B* については変異をホモにもつメスを、同じく変

異をホモにもつオスと交配させた。それぞれについて、その結果を N4 系統同士の交配結果と比較した。

Bmdmrt99B の異常行動についての解析

Bmdmrt99B が幼虫期の脳において高発現すること、及び飼育中の行動観察により *Bmdmrt99B* 変異個体が幼虫期・成虫期ともに異常行動を示すことがわかったことから、行動への影響を探るべく以下の実験を行った。

幼虫期の行動を見るため、先行研究の方法 (Nagata&Nagasawa,2006; Tanaka *et al.*, 2009) を参考に図 2-2; A の様な実験系を用いた。すなわち、278×203×54 のスチロール箱 (サンプラテック) 内に 3 cm×3 cm×1 cm 大の人工飼料を正方形面が中心を向くように箱の一端に設置し、箱の中央部に 5 匹の幼虫 (雌雄別) を配置し、30 分間行動を観察した。30 分後に箱の中心から各個体の頭までの距離を記録し、箱の中心から餌までの距離を 1 としたインデックスとしてあらわした。

また、幼虫期の行動実験として摂食量を調査した。5 齢 2 日目の幼虫を 24 時間絶食させ、2 匹を 1 つのプラスチックシャーレに入れて人工飼料を 18 時間摂食させた。残った餌を 65°C で 24 時間乾燥させて計量し、摂食した乾重量を算出した。

成虫の行動実験として、図 2-2; B のような実験系を用いて 221×161×43 cm のスチロール箱(サンプラテック) の底に厚紙を敷き、箱の片側の半径 5 cm の半円に羽化当日の処女雌蛾を 6 頭置いた。反対側の端に仕切りで区切られた幅約 3 cm の区画を設け、そこに羽化当日または羽化後 17°C で 1 日経過した雄蛾を 10 頭配置した。この状態で仕切りを外し、雌蛾をおいた半径 5 cm の円内に雄蛾が脚を踏み入れるまでの時間を計測した。すべての行動実験は飼育室内で行った。

Bmdmrt11E 変異体雌における卵巣卵内容物の解析

卵巣卵を N4 系統および *Bmdmrt11E* Δ13 系統ホモメスから取り出し、卵を 20 粒ずつ

1.5mL チューブに入れて-80°Cで凍結保存した。

卵内のタンパク質は次の様に行った。まず、タンパク質抽出バッファー (0.15 M NaCl, 1% NP-40, 50 μ M Tris-HCl [pH8.0]) を 200 μ L ずつチューブに加えてペッスル(フナコシ)でホモジナイズを行った。15,000 rpm, 20 min, 4°C の遠心を行って得た上清をタンパク質抽出液として-20°Cで保存した。この抽出液を用いて Protein Assay Kit (BIO RAD) による定量と SDS-PAGE による定性的な解析を行った。

脂質の抽出は、卵の入ったチューブに懸濁バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris [pH7.5], 2 mM EGTA [pH8.0]) を 350 μ L 入れてペッスルでホモジナイズした後、350 μ L のヘキサンを加えて 15 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、15,000 rpm, 10 min, 4°C で遠心し上清を脂質抽出液として-20°Cで保管した。

SDS-PAGE には上記のタンパク質抽出液 20 μ L を用いた。20 μ L のタンパク質抽出液に 20 μ L の SDS サンプルバッファー (125mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% BPB。1/9 量の 2-メルカプトエタノールを使用直前に添加) を加えて 95°C, 5min で変性を行った。事前に 20 mA, 30min の pre-run を行った 10%アクリルアミドゲルにサンプルを全量アプライし、20 mA, 1h の泳動を行った。泳動後のゲルをクイック CBB (Wako) で染色してバンドを確認した。

脂質成分の分析・定量には GC-MS 装置 (QP2010, 島津製作所)を用いた。先行研究における方法 (Foster, 2001) を参考に試料をエステル化した後、カラム (DB-Wax, 30 m \times 0.25 mm i.d.; J&W Scientific) を用いてクロマトグラフィーを行い分析・定量を行った。クロマトグラフィーの条件、定量の方法は先行研究に従った (McLafferty, 1959; Fujii *et al.*, 2010)。

RNA-seq による *Bmdmrt11E* 下流遺伝子の探索

Bmdmrt11E の下流で働く遺伝子を特定するため、RNA-seq 解析を行った。コントロールである N4 系統および *Bmdmrt11E* の変異系統 (*11E^{A13/A13}*) の 5 齢 4 日目

(L5D4)の卵巣および蛹期 1 日目(PD1)の卵巣から総 RNA を抽出し、TURBO™ DNase (Invitrogen) を用いて 37°C、30 分の条件で DNA を除き 5 μ g の RNA を供試した。RNA-seq 解析のライブラリ調整、シーケンシング、マッピング、発現量解析・比較はユーロフィンジェノミクスに依頼した。

下流遺伝子の特定には以下の条件を用いた。時期 (N4 L5D4 vs N4 PD1) で発現に有意差をもつ遺伝子、幼虫期において発現が変異の影響を有意に受ける遺伝子 (N4 L5D4 vs *IIE*^{*Δ13 Δ13*} L5D4) 、蛹期において発現が変異の影響を有意に受ける遺伝子 (N4 P1 vs *IIE*^{*Δ13 Δ13*} P1) を p -value <0.05 で抽出し、すべての条件を満たす遺伝子を同定した (図 2-11)。その結果、対象遺伝子が多数に及んだため対象を絞るべく蛹期以外の抽出条件を False Discovery Rate (FDR) <0.05 に変更した。

以上の条件で絞り込んだ 9 遺伝子 (表 2-3) に対して qRT-PCR によって精巣・卵巣での発現を確認した。精巣と卵巣で 1.5 倍以上の差がある遺伝子を *Bmdmrt11E* の下流遺伝子の候補とした。下流候補遺伝子の qRT-PCR に用いたプライマー配列は表 2-4 に示した。

結果

Bmdmrt11E、*Bmdmrt99B* 変異系統の作出

Bmdmrt11E、*Bmdmrt99B* の機能を明らかにするため、エクソン部分を標的とした gRNA (図 2-1:B) を用いて CRISPR/Cas9 による変異導入を行った。Cas9 タンパク質と gRNA をコインジェクションし、得られた個体を用いて選抜を行った結果、*Bmdmrt11E* では標的的部位に 13 塩基の欠失をもつ系統 ($\Delta 13$) および 14 塩基の挿入をもつ系統 (+14) を得た (図 2-3: A, C)。 $\Delta 13$ および+14 どちらの変異においても DNA 結合部位である DM ドメインに変異が起こり、ドメイン内でストップコドンが入るものと予想された (図 2-4:A)。予想アミノ酸配列によると、両変異体ともに DM ドメインが機能するのに重要な CCCH-HCC アミノ残基 (Zhu *et al.*, 2000) の最後のシステインを欠失すると予想された。

Bmdmrt99B では標的的部位を 14 塩基欠失した系統 ($\Delta 14$) およびエクソン 1 の大部分を欠損した 678 塩基を欠失した系統 ($\Delta 678$) を得た (図 2-3:B,D)。 $\Delta 14$ 系統では frame-shift によって DM ドメイン全体が異なる配列に置き換わっているものと予想され (図 2-4: B)、160 アミノ酸をコードしたところでストップコドンが入っていた。一方、 $\Delta 678$ 系統では翻訳開始部位をもたないこと、また *Bmdmrt99B* の mRNA では ATG が DM ドメインをコードする部位よりも 3' 側にしかないことから転写因子として機能するタンパク質は作られないものと予想された。

続いて 5 齢 4 日目幼虫の卵巣における各変異系統における mRNA の発現を RT-PCR により確認した。*Bmdmrt11E* の変異系統ではそれぞれの欠失・挿入変異に対応したサイズの *Bmdmrt11E* mRNA が発現していた (図 2-5:A)。qRT-PCR によってそれぞれの mRNA の発現量を定量したところ、+14/+14、 $\Delta 13/\Delta 13$ 個体ではそれぞれコントロールに対して 0.89 倍、0.42 倍程度減少する傾向が見られたが、+/ $\Delta 13$ 個体では 1.4 倍程度高く発現する傾向だった (図 2-5:B)。

5 齢 3 日目幼虫の卵巣において *Bmdmrt99B* の $\Delta 14$ 系統では、やはり 14 塩基を欠失していると思われる mRNA が発現していたが、 $\Delta 678$ 系統ではプライマーがアニーリングする部位を欠失していることもあってか (図 2-1: B)、増幅産物が認められなかった。一方で、脳では両変異体ともに増幅産物は認められなかった (図 2-5:C)。卵巣、脳において $\Delta 14$ 系統における mRNA の発現量を qRT-PCR によって定量したところ卵巣では $\Delta 14$ 系統においてコントロール (N4 系統) より 1.6 倍程度高い発現が見られたのに対し、脳では $\Delta 14$ 系統においてコントロールと比較して約 1/10 程度にまで発現が低下していた (図 2-5:D)。なお、 $\Delta 678$ 系統については発現量の測定は行わなかった。

***Bmdmrt11E*, *Bmdmrt99B* 変異体の形態的な表現型について**

Bmdmrt11E および *Bmdmrt99B* の変異が卵巣の形態、特に卵巣小管にもたらす影響を調査するため、各変異体の成虫卵巣の形態を観察した。その結果、両遺伝子の変異体ともに卵巣の外観に異常は認められなかった (図 2-6:A)。一方で、*Bmdmrt11E* 変異体の卵巣にある卵 (卵巣卵) をより詳細に観察したところ正常個体にはほとんど見られない、一見すると空洞があるように見える、透明な液体の混入した卵 (図 2-6: B) が多数観察された。

***Bmdmrt11E*, *Bmdmrt99B* 変異体雌の妊性試験**

Bmdmrt11E, *Bmdmrt99B* の変異体は卵巣小管の発達には影響を与えなかったが、幼虫期の卵巣で高発現を示していたことから、卵形成や雌の妊性には影響を与える可能性が考えられた。そこで、この可能性について検証するためにコントロールメス個体および変異ホモメスの造卵数 (産卵数+腹腔内卵数) と、孵化率について調査した。その結果、コントロール (N4 系統) と比較して、*Bmdmrt11E* 変異系統および *Bmdmrt99B* $\Delta 678$ 系統では造卵数に異常はなかったが、*Bmdmrt99B* $\Delta 14$ の変異をホモにもつ雌の造卵数が有意に減少することがわかった (図 2-7; A, B)。

孵化率は *Bmdmrt11E* +14 ホモにもつメスでは何ら影響がなかったが、 $\Delta 13$ をホモにもつメスではコントロールと比較して有意な減少を示していた (図 2-7: C)。オスにおける変異はどの遺伝子型・アレルでも孵化率に影響は与えなかった。

Bmdmrt99B $\Delta 14$ 、 $\Delta 678$ いずれの変異をホモにもつペアにおいても孵化率の有意な低下が認められた (図 2-7: D)。コントロールペアのデータが取れなかったため参考値とはなるが、ホモ変異体とコントロールのペアを交配した蛾区における孵化率はホモ変異体としてメスを用いた場合に孵化率の低下が認められたことから *Bmdmrt99B* 変異体における孵化率低下の原因はメスにあるものと考えられた (図 2-7: E)。

Bmdmrt11E、*Bmdmrt99B* ともに孵化しなかった卵の多くが黄色い卵 (N4 は卵巣卵および未授精卵は黄色い) であった (図 2-7: F)。

***Bmdmrt99B* 変異体の行動試験**

Bmdmrt99B は幼虫期の脳においても発現がみられたことから、その変異が行動に何らかの影響を及ぼす可能性がある。実際、飼育中の観察により変異体は幼虫・成虫ともに行動に異常を示すようにみえた。そこでこれらの点について検証するため、Tanaka ら (2009) の方法を参考にして幼虫が餌に到達する能力を数値化することにした (詳細は図 2-1: A 及び材料と方法の項目を参照)。その結果を図 2-8: A に示す。1 日間の絶食後、試験用の容器の所定の位置に置かれた幼虫は、N4 系統もホモ変異体も同程度に活発な徘徊行動を示したが、コントロールとして用いた N4 系統の幼虫のほとんどが餌へと到達しているのに対し、変異ホモ幼虫は雌雄どちらにおいても餌に到達できない個体や餌とは反対の方向へ向かう個体が有意に多くみられ、高い拡散性が認められた (図 2-8: A)。また、幼虫は餌の上においても活発な拡散行動を示すことがわかった (図 2-8: B)。加えて、幼虫の摂食量を定量したところ変異体では有意に低下していることがわかった (図 2-8: C)。

次に成虫における行動を評価するため、フェロモン源に成虫オスが到達するまでに要

する時間 (Copulation latency) を計測することにした (詳細は図 2-2: B 及び材料と方法の項目を参照)。フェロモン源としては、羽化直後もしくは 1 日後の N4 系統の処女雌を用いることにした。その結果、N4 系統の成虫雄は約 2 分以内にはフェロモン源に到達していたが、変異ホモ雄がフェロモン源に到達するまでに要する時間は N4 系統と比べ有意に長くなっていた (図 2-8: D)。

***Bmdmrt11E* 変異体の異常卵についての調査**

Bmdmrt11E 変異体の卵巣においては、先述したように透明な液体の混じった異常な卵が形成されていた。このような卵にどのような異常が起きているかを確かめるべく、いくつかの解析を行った。

まず、*Bmdmrt11E* 変異個体の産生する卵のうちどの程度が異常卵となるのかを計数した。その結果、*Bmdmrt11E* +14 系統においては解剖時には異常卵が認められたものの、その割合は全体の 4%程度にとどまっていた。これに対し、 Δ 13 系統ではヘテロでも 2.5%、ホモでは半分程度が異常卵であった (図 2-9: A)。興味深いことに、異常卵は卵巣の中でも産卵管に近い方に多く、産卵管から遠ざかるほど少なくなっていた (図 2-9: B)。産卵管から遠位の卵というのはより後期に産生された卵であることから、*Bmdmrt11E* の影響は卵形成の早期に起こることが予想された。そのことを遺伝子発現レベルで確認すべく、*Bmdmrt11E* の発現量を qRT-PCR によって定量したが、むしろ蛹期以降も高いレベルで発現が維持されていることがわかった (図 2-9: C)。また、 Δ 13 ホモメスからもわずかだが孵化個体が得られることから、生まれた個体について 4 齢までの生存数を確認したところ、孵化時より 10%程度減少していた (図 2-9: D)。

卵黄は主に不透明な顆粒 (卵黄顆粒) を形成するタンパク質と脂質によって構成されている。透明な液体はそのどちらでもないと思われたことから、これら卵黄構成成分の量が減少しているのではないかと考えて、それらの定量を試みた。

まず、コントロールメスの卵巣卵とシビアな形質が見られた *Bmdmrt11E* Δ 13 系統ホ

ホモスの卵巣卵を用いてブラッドフォード法による簡易なタンパク質定量を実施したが、量的な差異は見られなかった (図 2-10: A)。続いて、定性的な違いの有無を検出する目的で SDS-PAGE を実施したところ、*Bmdmrt11E* Δ13 系統において 50-60kDa 付近にコントロールと比べて高いレベルのバンドが認められた (図 2-10: B)。脂質量についても GC-MS によって定量を行ったところいくつかの脂肪酸について *Bmdmrt11E* Δ13 における有意な減少が見られた (図 2-10: C)。

***Bmdmrt11E* 変異体卵巣の RNA-seq 解析**

Bmdmrt11E 変異体では卵の外観および内容物の組成に異常が見られた。こうした形質にどのような遺伝子が関与しているのかを明らかにするべく、コントロール (N4) 系統と *Bmdmrt11E* Δ13 ホモスの卵巣を用いて RNA-seq 解析を行った。検出された 15,884 遺伝子のうち、N4 系統において生育ステージで差のあった遺伝子が 1,520 遺伝子、幼虫期において *Bmdmrt11E* 変異の影響を受けた遺伝子が 161 遺伝子、蛹期において変異の影響を受けた遺伝子が 87 遺伝子見出された。これら 3 条件すべてを満たす遺伝子として 9 つの遺伝子を同定することができた (図 2-11: A、表 2-3)。

Bmdmrt11E は生殖巣において顕著な性的二型発現を示す遺伝子であるので、その下流にある遺伝子も何らかの形で発現に性的二型性をもつはずであると期待される。そこで、同定した 9 つの遺伝子について精巣・卵巣における qRT-PCR 解析を行い、発現量に 1.5 倍以上の性差を示す遺伝子を *Bmdmrt11E* の下流で働く遺伝子とみなして探索を行った。その結果、6 遺伝子が下流遺伝子の候補として同定された (図 2-11: B)。このうち、2 遺伝子は精巣で高い発現を示す機能不明遺伝子であり、4 遺伝子は卵巣で高い発現を示す遺伝子群で機能既知遺伝子のホモログも含まれていた。その中でもキモトリプシンインヒビター13 (*Ci-13*) は高い発現レベルを示し、その発現が卵巣に偏っていたことから *Bmdmrt11E* 変異体における異常の少なくとも一端は *Ci-13* の発現量低下に起因するものと考えられた。

考察

本研究から *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* ともに卵巣小管の形成には関与しないことがわかった (図 2-6: A) が両者とも変異させると孵化率の低下を招き (図 2-7: C-E)、*Bmdmrt11E* は卵内容物に (図 2-6: B)、*Bmdmrt99B* は行動にも異常を示すことがわかった (図 2-8)。

Bmdmrt11E については変異体として crRNA のターゲット部位を 13 塩基欠失した系統 ($\Delta 13$) と 14 塩基の挿入を持つ系統 (+14) を得ることができた (図 2-3: A, C)。どちらの変異も DMドメインの途中にストップコドンが入っており、DMドメインの亜鉛結合部位 CCHC-HCC の最後のシステインを欠失するものと予想された (図 2-4: A)。両変異体とも対応した挿入・欠失をもつ cDNA が確認はできたが、ホモ変異体では mRNA レベルの低下が認められた (図 2-5: A, B)。この mRNA レベルの低下はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) によるものであろうと考えている (Karamyshev & Karamysheva., 2018)。NMD は本来のストップコドンの位置より 5'側にあるストップコドン (Premature Termination Codon: PTC) を認識して起こるため、両変異体で発現している mRNA は NMD を受けるものと考えて差し支えないだろう。注意すべきは、+14 系統が $\Delta 13$ 系統に比べて非常に緩い分解しか受けていないように見えることである (図 2-5: C)。NMD の効率にはいくつか知られている法則があり、PTC の位置により分解効率に違いが生じることが知られている (Lindeboom *et al.*, 2016)が、 $\Delta 13$ と+14 のアレル間には PTC の位置にほとんど差はない。しかしながら、PTC の位置にほとんど差がなくても NMD 効率に差のある例 (Sarkar *et al.*, 2019) も知られることから、NMD 効率にはいまだ明らかになっていない因子があるものと思われる。

Bmdmrt11E $\Delta 13$ 系統、+14 系統どちらにおいても変異体では卵の外観に影響が見られた (図 2-6: B、図 2-9: A)。一方で、孵化率に関しては+14 系統は殆ど異常を示さなかった (図 2-7: C)。この差が生じる原因として、+14 系統は $\Delta 13$ 系統と異なり挿入され

た塩基によって追加のアミノ酸がコードされていることが考えられる。両変異体ともに DM ドメインの亜鉛結合配列のうち一つのシステインを欠失していることを述べたが、+14 系統に見られる挿入アミノ酸にはシステインが 2 つみられる (図 2-4: A)。このシステインが、挿入変異によって失われた本来のシステインの代わりを果たしている可能性があると考えている。

Bmdmrt11E Δ13 系統では孵化率の大きな低下が見られたが (図 2-7: C)、これは卵巣卵の半分近くを占める異常卵によるものだと考えられた (図 2-9: A)。興味深いことに、異常卵は卵形成早期に出来たと思われる産卵管に近いものにより多く、遠ざかるほど少なくなっていた (図 2-9: B)。Δ13 系統ホモメスの産下卵から孵化した個体は産卵管から遠位に多い非異常卵から孵化したものと思われるが、孵化後の個体減少率はそれほど大きいものではなく (図 2-9: D)、産卵管から遠位に多いような正常卵は外観以外も正常なものであると考えられた。*Bmdmrt11E* の発現自体は蛹期以降も高い水準を保つ一方で (図 2-9: C)、後期に出来た卵に変異の影響が少ないというのは矛盾するように思える。後述するように *Bmdmrt11E* の異常卵というのは脂質の安定的な保持に問題があるものと考えられ、脂質の喪失量は卵ができてからの時間に比例するものなのかもしれない。

より強い形質を示した Δ13 系統では卵内のタンパク質量には差がないながら、コントロールには見られないタンパク質の蓄積が確認され、脂質量の減少が見られた (図 2-10)。Δ13 で蓄積が認められたタンパク質は卵特異的タンパク質 (ESPs) の下に見られるが、このバンドの大きさは胚の成長過程において ESPs が分解を受けてできる産物の大きさ (55kDa) と非常に似ている (Indrasith *et al.*, 1987)。ESPs は卵黄タンパク質として知られる機能不明タンパク質であるが、脂質分解酵素であるリパーゼファミリーに属しており、脂質のキャリアタンパク質として機能するのではないかと考えられている (Irie&Yamasita.,1983)。以上の事実から、Δ13 系統ではなんらかの要因で卵内の ESPs が卵巣卵の段階、あるいはもっと早期から分解を受けてしまい、ESPs によって保持されていた脂質が離れてしまったことが卵内脂質量の減量につながったのではないかと予想で

きる。

RNA-seq によって *Bmdmrt11E* の下流候補遺伝子として 9 遺伝子を選定し、qRT-PCR によってキモトリプシンインヒビター13 (Ci-13) を最有力候補として同定した (図 2-11)。実は、上述した ESPs を分解する酵素はキモトリプシンと同じセリンプロテアーゼファミリーであり (Izumi *et al.*, 1994)、卵内にあるキモトリプシンインヒビターはこうしたセリンプロテアーゼの働きをしかるべき時期まで抑制していると考えられている (Aratake *et al.*, 1990)。

以上から、*Bmdmrt11E* Δ13 系統で見られた形質について、次のようなモデルが立てられる (図 2-12)。この系統では通常卵巣で高く発現しているはずの *Ci-13* の発現量が減少し、卵内の *Ci-13* レベルの低下を招いた。それによって、通常胚発生時期まで活性化しないはずのセリンプロテアーゼの活性化が誘導されてしまい、卵形成の過程から ESPs の分解が生じてしまった。そのために、ESPs が保持していた脂質を卵内にとどめおくことができなくなり、結果として卵脂質量の低下が引き起こされた。異常卵で見られた空洞部分は透明な液体で満たされているようであった (図 2-6: B)。この点について、卵胞は形成時期にアクアポリンを介した水分吸収を行うことで膨張することが知られており (Maruyama *et al.*, 2015)、失われた脂質の体積分の水分が余計に吸収されたものと予想できる。LC-MS による異常卵の卵黄タンパク質の解析や *Ci-13* 遺伝子のノックアウト等を行うことでこのモデルを検証していく必要があるだろう。

Bmdmrt99B では変異体として sgRNA のターゲット部位を 14 塩基欠失 (Δ14) したものと 678 塩基欠失 (Δ678) を得ることができた (図 2-3: B, D)。どちらの変異も DMRT が転写因子として機能するのに重要な DM ドメインを完全に欠失するタンパク質しかコードしないものと予想された (図 2-4: B)。mRNA レベルでは Δ14 系統の卵巣において欠失に対応した大きさの mRNA が確認されたが、Δ678 系統および Δ14 系統の脳では mRNA 自体が確認されなかった (図 2-5: C)。Δ14 系統では卵巣で mRNA 量がわずかに増加していたのに対して、脳では 1/10 程度の発現しか確認できなかった (図 2-5: D)。

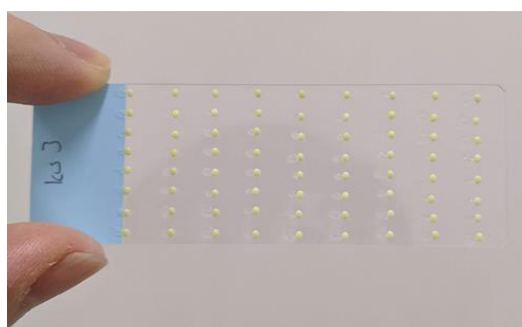
Δ 678 変異体で mRNA が確認できなかったのは欠失部位が大きいためにプライマーがアニールできなかったからであるが、Δ 14 系統の脳において発現量の低下が見られたのはなぜであろうか? これについても、上述したようにナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) によるものであろうと考えている (Karamyshev & Karamysheva., 2018)。Δ 14 においてはフレームシフトによって PTC が生じ、正常 (370AA) よりも短いタンパク質 (160AA) をコードすると予想され、この PTC を認識して NMD が起こったものと思われる。では、なぜ Δ 14 系統の卵巣において NMD が起きなかったのだろうか? NMD は mRNA がリボソームに結合し、翻訳される際に起きると考えられている (Karamyshev & Karamysheva., 2018)。この理論が正しいのであれば、リボソームに結合しない、つまり翻訳が行われない mRNA には NMD は起きないと考えられる。これは仮説の域を出ないが、卵巣において *Bmdmrt99B* は翻訳を受けていないのではないかと予想している。この仮説が正しいければ、*Bmdmrt99B* は卵巣において積極的に働いているわけではなく、変異体で見られた造卵数の減少や孵化率の低下も別の要因によるものと考えられる。事実、造卵数の減少も有意ではあるが卵形成そのものが阻害されているとは考えずらい程度の減少率である (図 2-7: B)。孵化率が低下した原因に関しては、*Bmdmrt99B* mRNA が卵に局在する (図 1-4: B) ことから、この遺伝子が胚発生に関わるマターナルな機能を有すると想像できるが、30-40%の孵化してきた個体がなぜ孵化できたのかについて説明できない (図 2-7: D, E)。*Bmdmrt99B* 変異体では行動の異常と関連して幼虫の摂食量が減少していた (図 2-8: C)。幼虫期における摂食量の減少は造卵数や卵タンパク質量に影響を与えることが知られており (Kawaguchi *et al.*, 1991)、*Bmdmrt99B* 変異体の卵巣に関連した異常は行動異常による摂食量減少の影響を受けたものと考えるのが妥当だと思われる。造卵数の有意な減少を示した Δ 14 系統メスの摂食量が、Δ 678 系統のメスに比べて少なかった (図 2-7: B、図 2-8: C) ことからこの仮説は支持される。

Bmdmrt99B の変異体では幼虫でも成虫でも行動に異常が見られた (図 2-8)。変異体幼虫は餌を摂食し、変異体成虫オスはメスを前にするとフェロモン感受時の行動を示した

ことから、この行動異常は餌が認識できない、あるいはフェロモンを感知していないといったものではないと思われる。餌の上においてすら活発な拡散を示すといった形質から (図 2-8: B)、行動異常の本質は極めて活発な運動指向性であると考えられた。序論で述べたように、キイロショウジョウバエや脊椎動物において *dmrt99B* オルソログは神経形成に関与することが知られているが、行動に異常が生じるかどうかという点までは調べられてはいない。本実験では、*Bmdmrt99B* によって神経形成がどのような影響を受けているのか、どのような遺伝子が *Bmdmrt99B* の下流にいるのかといった点については明らかにできなかった。カイコではオス成虫におけるフェロモン感受刺激に関連する神経ネットワークが詳細にわかっており、触覚で受容された刺激は最終的に前大脳と呼ばれる部位で処理され、行動指令となる (Namiki *et al.*, 2014)。よって、*Bmdmrt99B* がこういった神経領域の形成に関与している可能性が考えられる。

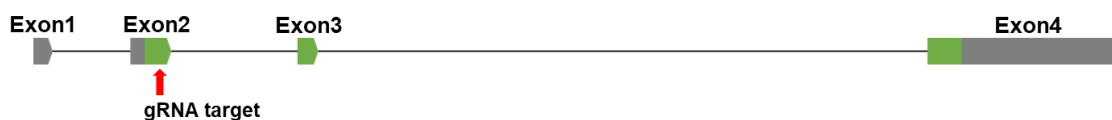
以上から、本研究によってカイコの DMRT である *Bmdmrt11E* と *Bmdmrt99B* の機能の一端を明らかにすることができた。

(A)



(B)

• *Bmdmrt11E* genomic



• *Bmdmrt99B* genomic

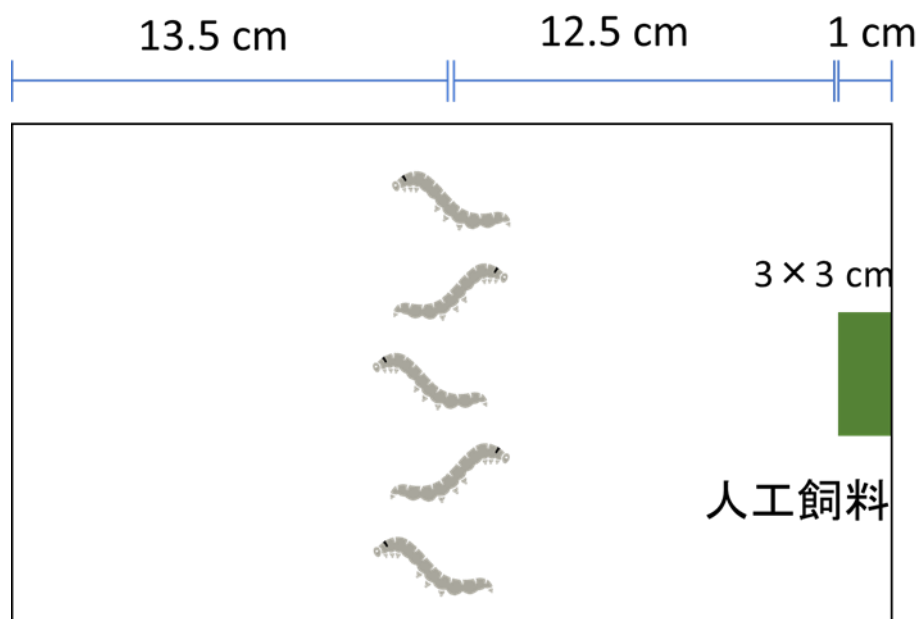


図 2-1. *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* に対する変異誘導

(A) スライドガラス上に並べられたカイコの卵 (左) とカイコ卵にインジェクションを行っている様子 (右)。

(B) *Bmdmrt11E* および *Bmdmrt99B* のゲノム領域に対して、赤矢印で gRNA がターゲットとしている領域を表した。また、青矢印で qRT-PCR 用プライマーのターゲット部位を示した。線はイントロン、箱で表した部分がエクソン。また、緑で表した領域が CDS、灰色で表した部分が UTR を指す。

(A)



(B)

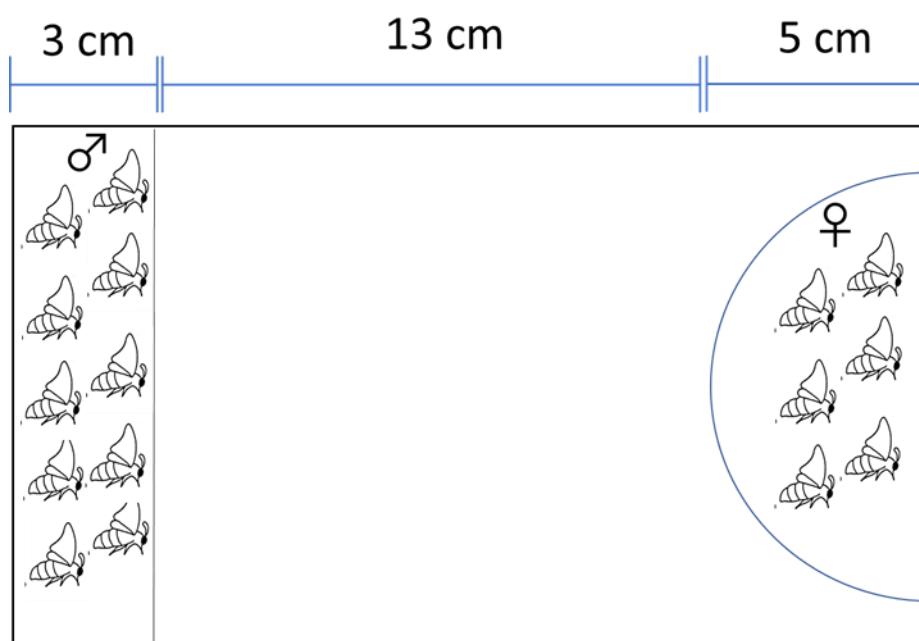


図 2-2. *Bmdmrt99B* 変異体に対する行動実験系

(A) 幼虫に対する行動実験系。箱の中央に幼虫を置き、30 分後の位置を計測した。

(B) 成虫に対する行動実験系。箱の端に成虫オスと成虫メスを配置し、オスを一斉にメスに向かわせて到達するまでの時間を計測した。実験の詳細は材料と方法を参照。

(A)

Bmdmrt11E⁺ CGGGATTGCCGTTGCCCTGGTTGTCTTCTGGTGCTAGAAAGACAGCGAGTCATGGCTGCTCAG
Bmdmrt11E^{Δ13} CGGGATTGCCGTTGCCCTG-----GCTAGAAAGACAGCGAGTCATGGCTGCTCAG
Bmdmrt11E⁺¹⁴ CGGGATTGCCGTTGCCCTGGTCTTCTGGTCTGCCTTGTCTTCTGGTGTAGAAAGACAGCGAGTCATGGCTGCTCAG

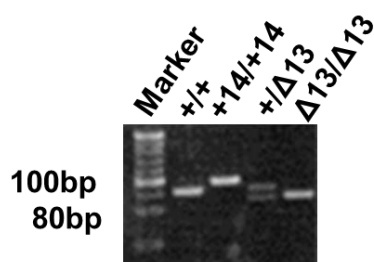
(B)

Bmdmrt99B⁺ GGTGCAGCATCCCGTGCTCGCCGCCCTGCCGCCCTTCTTCTGAGAGCGTCCGAAAGATATCAG
Bmdmrt99B^{Δ14} GGTGCAGCATCCCG-----CCGCCCTTCTTCTGAGAGCGTCCGAAAGATATCAG

Bmdmrt99B⁺ GTTATTGACTTTAATTATAATGAAATGTCACCTCCGAACGGTGTAGACGTGTCTCAG
Bmdmrt99B^{Δ578} -----

Bmdmrt99B⁺ iTTGGTGCAGCATCCCGTGCTCGCCGCCCTGCCGCCCTTCTTCTGAGAGCGTCCGAAAGATATCAG
Bmdmrt99B^{Δ578} -----AGCGTCCGAAAGATATCAG

(C)



(D)

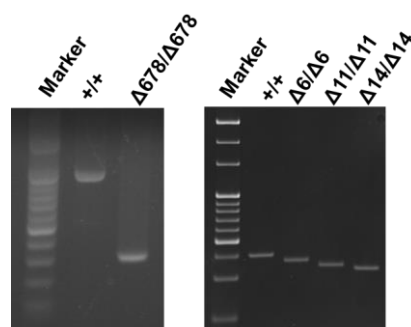


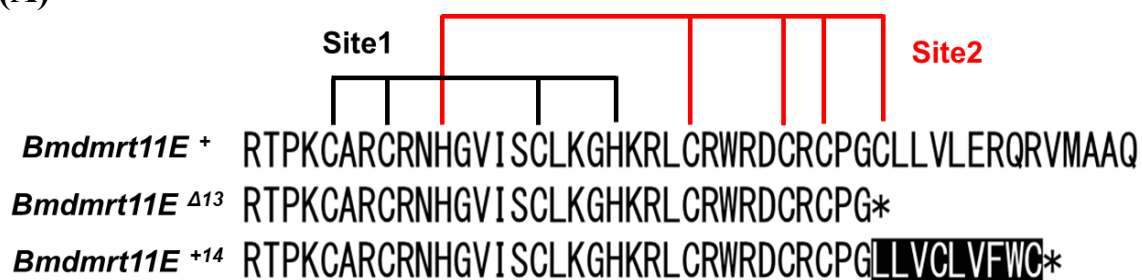
図 2-3. 本実験によって得られた変異

(A) 本実験によって得られた *Bmdmrt11E* の変異系統の塩基配列。下線部が gRNA のターゲット領域、黒く囲った部分が挿入配列。

(B) 本実験によって得られた *Bmdmrt99B* の変異系統の塩基配列。下線部が gRNA のターゲット領域、赤字が *Bmdmrt99B* mRNA 上の翻訳開始部位。

(C)、(D) *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* 変異体の genotyping 時の泳動像。*Bmdmrt99B* Δ6、Δ11 は固定することができなかつた変異。

(A)



(B)



図 2-4. 変異から予測されるタンパク質配列

(A) *Bmdmrt11E* の各変異アレルから翻訳されると予想されるタンパク質の DM ドメイン部のアミノ酸配列。黒くかこった部分が異常な挿入配列。Site1、Site2 は亜鉛イオンと結合して Zinc-finger を形成するアミノ酸領域。

(B) *Bmdmrt99B* の変異アレルから翻訳されると予想されるタンパク質の DM ドメイン部のアミノ酸配列。黒く囲った部分が異常な配列。

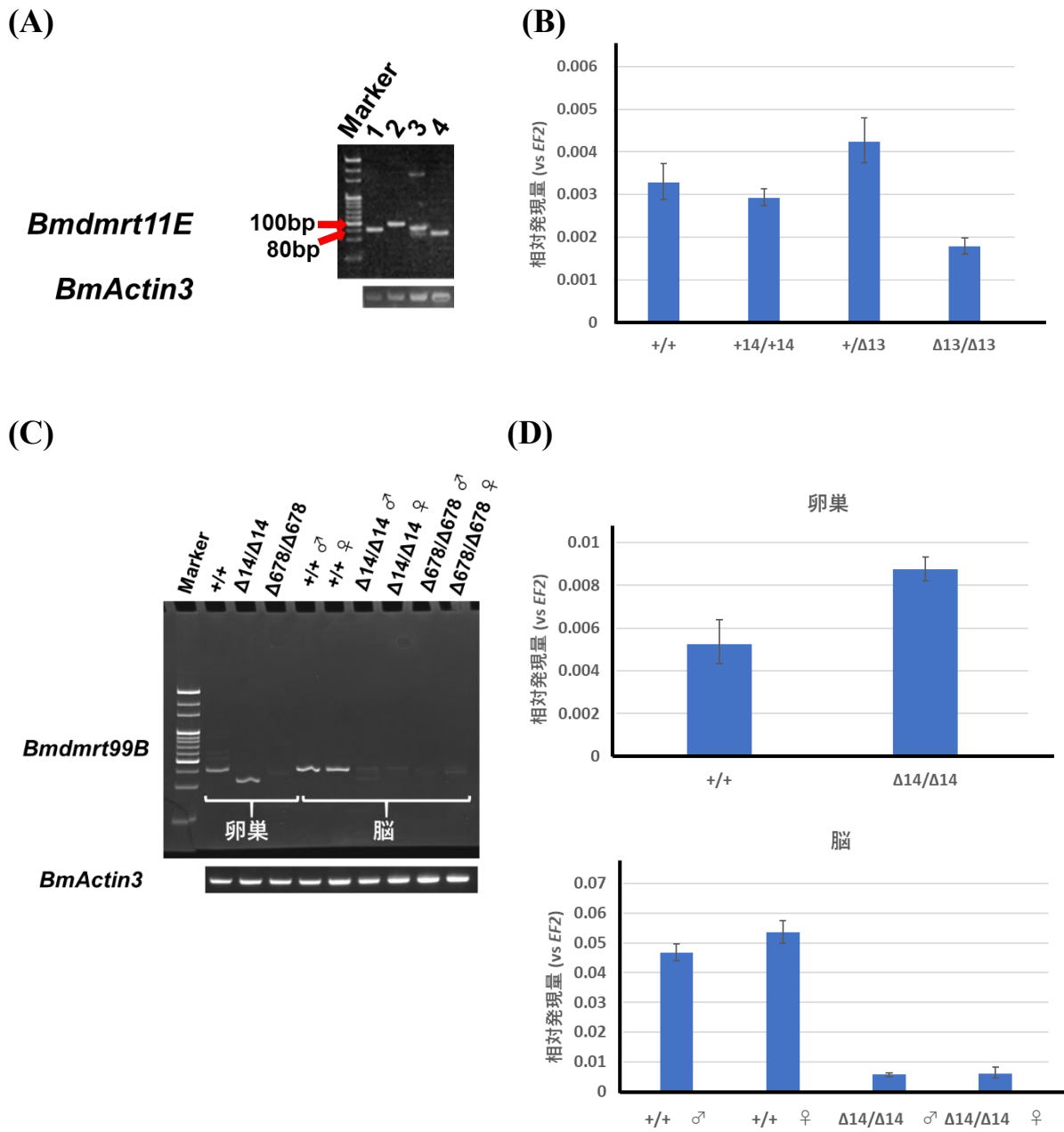


図 2-5. 変異体における mRNA 発現パターンと発現量

(A) コントロールおよび *Bmdmrt11E* 変異体の卵巣を用いた RT-PCR の泳動像。1:

Control, 2: *Bmdmrt11E*^{+14/+14}, 3: *Bmdmrt11E*^{Δ13/+}, 4: *Bmdmrt11E*^{Δ13/Δ13}。

(B) コントロールおよび *Bmdmrt11E* 変異体の 5 齢 4 日目幼虫卵巣における *Bmdmrt11E* の発現量。エラーバーは SD を表す (well effect, n=3)。

(C) *Bmdmrt99B* 変異体の卵巣および脳を用いた RT-PCR の泳動像。

(D) コントロールおよび *Bmdmrt99B*^{Δ14/Δ14} メスの卵巣および脳における *Bmdmrt99B* の発現量。エラーバーは SD を表す (well effect, n=3)。

(A)

Control *Bmdmrt11E*^{Δ13/Δ13} *Bmdmrt99B*^{Δ14/Δ14}



(B)

+ / +

Δ13/Δ13

+14/ +14

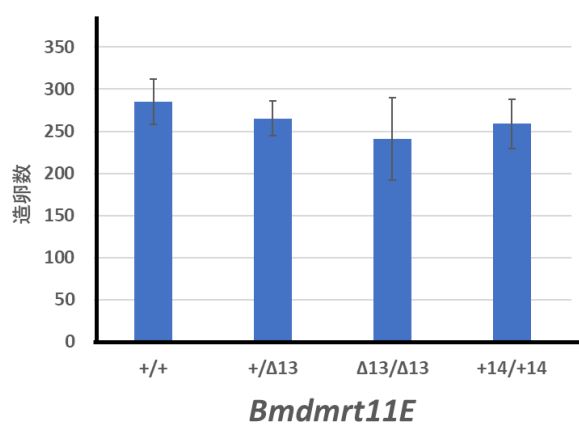


図 2-6. *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* 変異体における卵巣の観察

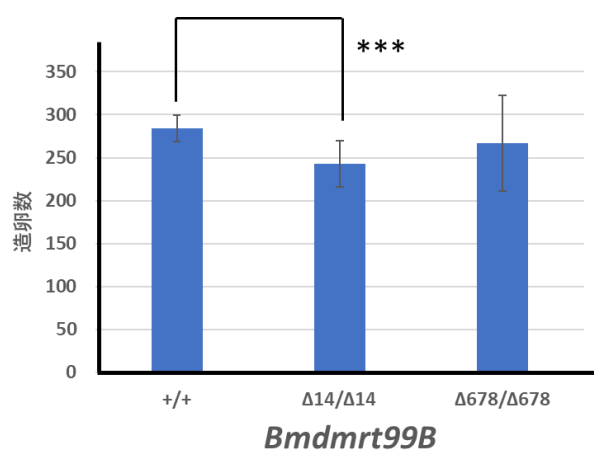
(A) コントロールおよび *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* 変異体の成虫卵巣の観察像。図では一種類ずつの変異を示しているが、他の変異でも同様であった。

(B) コントロールおよび *Bmdmrt11E* 変異体の卵巣卵の外観。矢印で示した部分が異常卵内に蓄積された透明な液体。

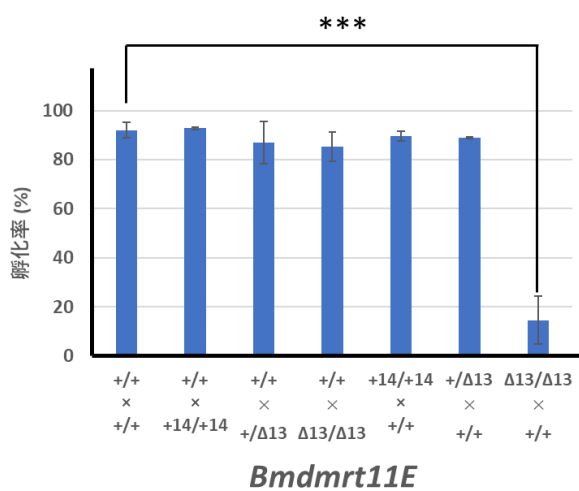
(A)



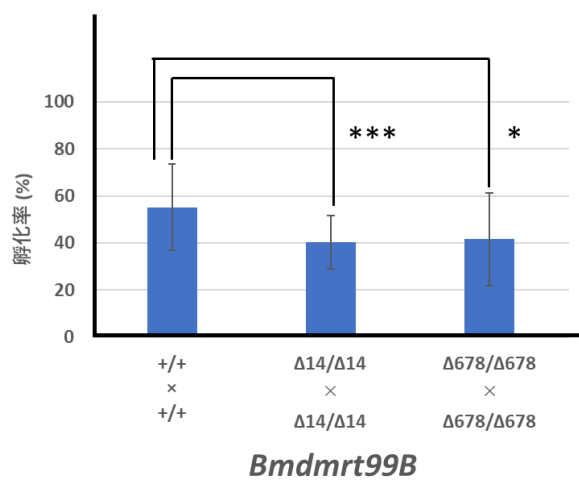
(B)



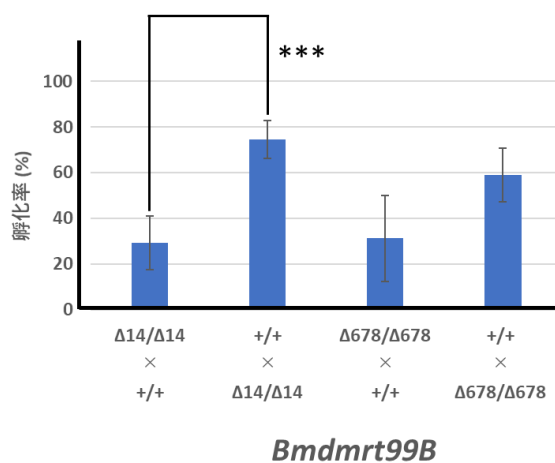
(C)



(D)



(E)



(F)

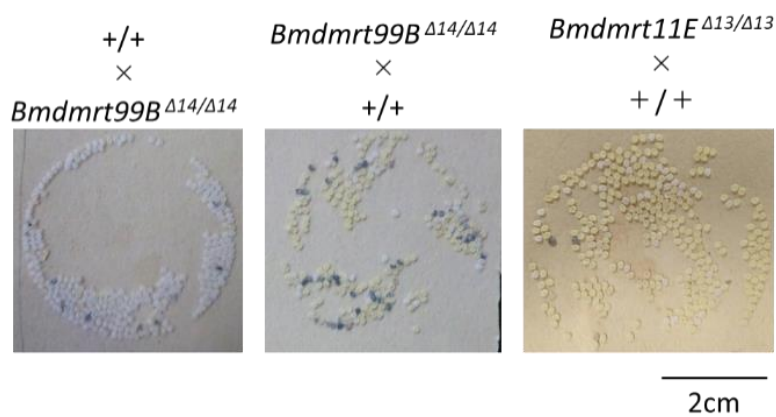


図 2-7. *Bmdmrt11E*、*Bmdmrt99B* 変異体における妊性試験

(A) *Bmdmrt11E* 変異体の造卵数。n=6。

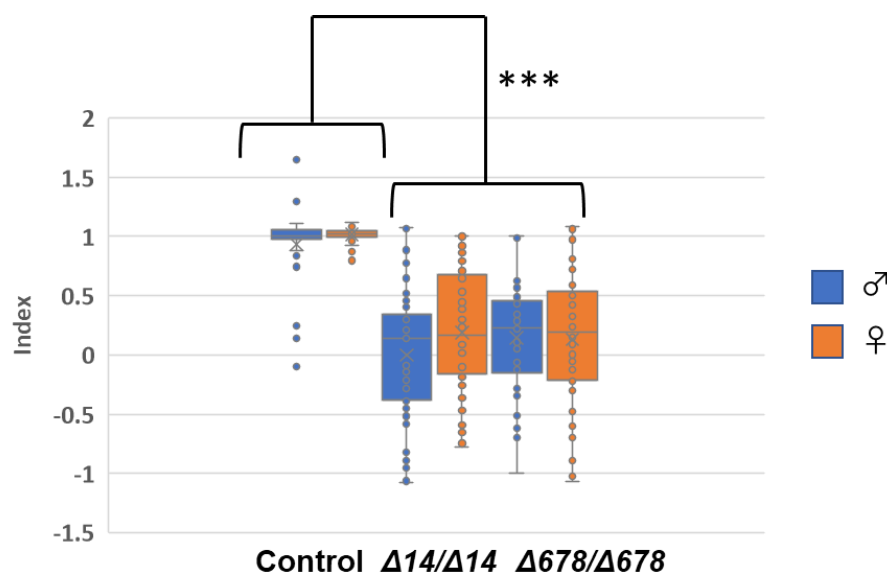
(B) *Bmdmrt99B* 変異体の造卵数。n=14 (Δ 678 系統のみ n=13)。***: $p < 0.005$ 、Student's t-test。

(C) *Bmdmrt11E* 変異体の産下卵の孵化率。メス (上)×オス (下) で表記している。n=5。***: $p < 0.005$ 、Welch's t-test。

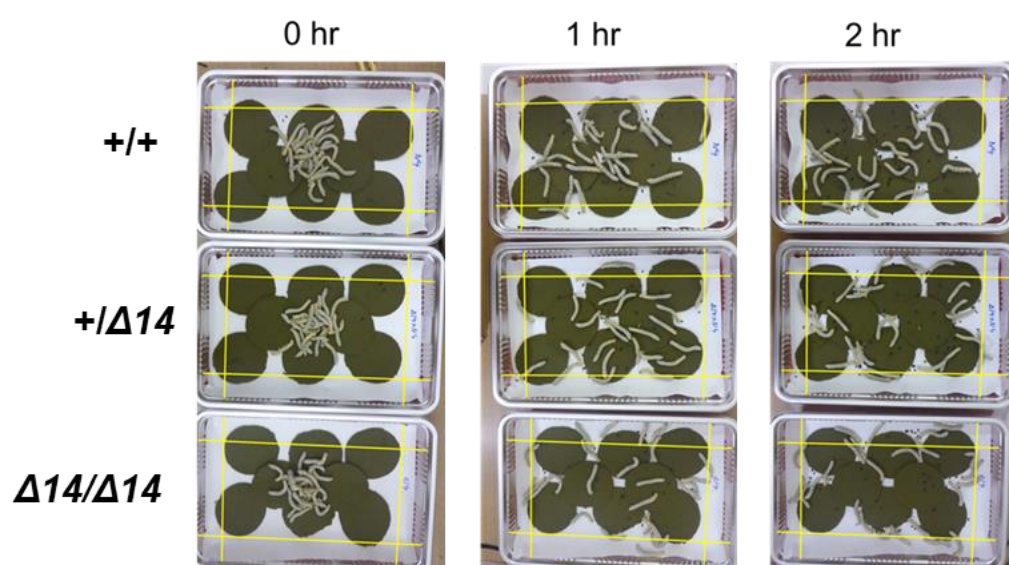
(D), (E) *Bmdmrt99B* 変異体産下卵の孵化率。n=14 (Δ 678 系統のみ n=13) (D)、n=5, 6, 5, 4 (E、左のペアから)。*: $p < 0.05$ 、***: $p < 0.005$ 、Mann-Whitney U-test (D)、Student's t-test (E)。以上、統計データのエラーバーは全て SD を表す。

(F) *Bmdmrt11E* および *Bmdmrt99B* 変異体産下卵の孵化後像。変異ホモメスの産下卵では黄色い卵が非常に多くなっていることがわかる。

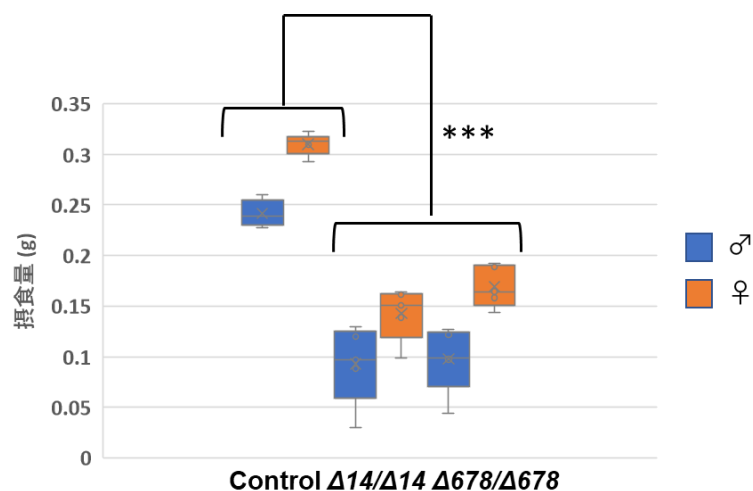
(A)



(B)



(C)



(D)

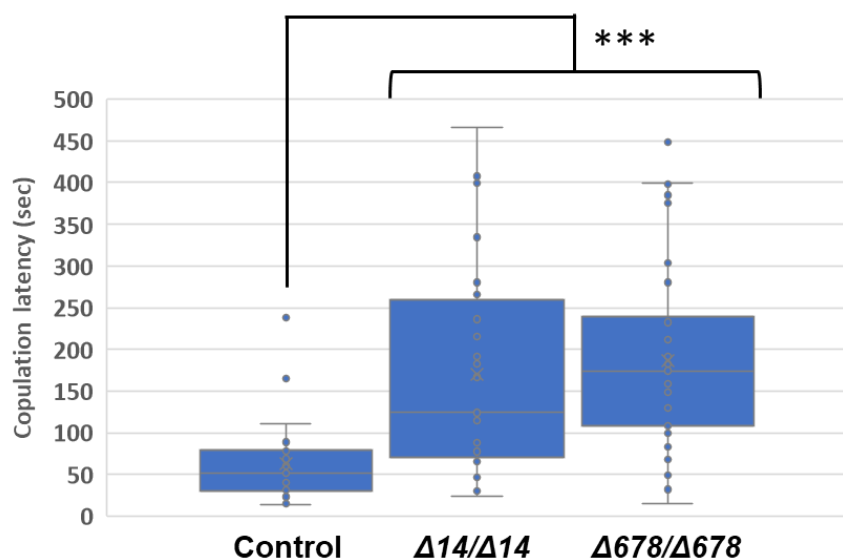


図 2-8. *Bmdmrt99B* 変異体における行動試験

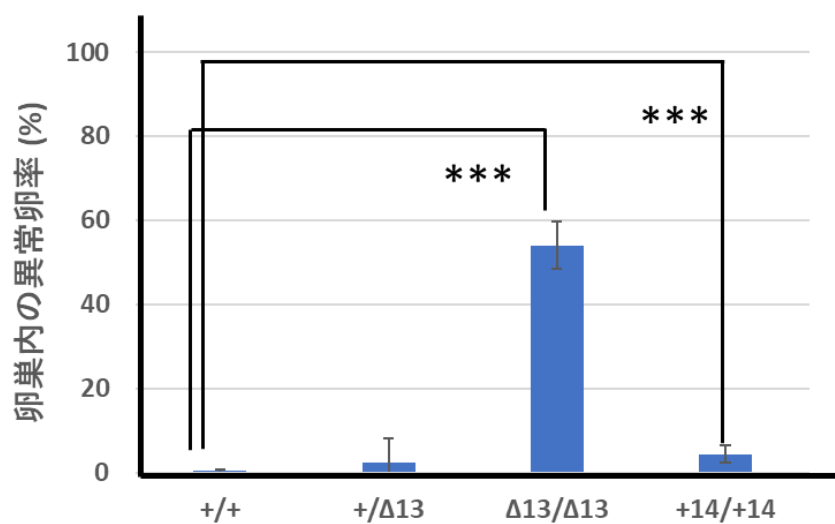
(A) 変異体およびコントロール個体における幼虫の餌に対する到達試験。変異体は全体に広く拡散していることがわかる。n=50 (Control メスのみ n=40)。検定はオス同士、メス同士で行った。***: $p < 0.005$ 、Mann–Whitney U-test。

(B) 変異体およびコントロール個体の餌上での挙動。上の hr は餌の上においてからの経過時間。変異体は非常に早期から餌上を活発に移動していることがわかる。

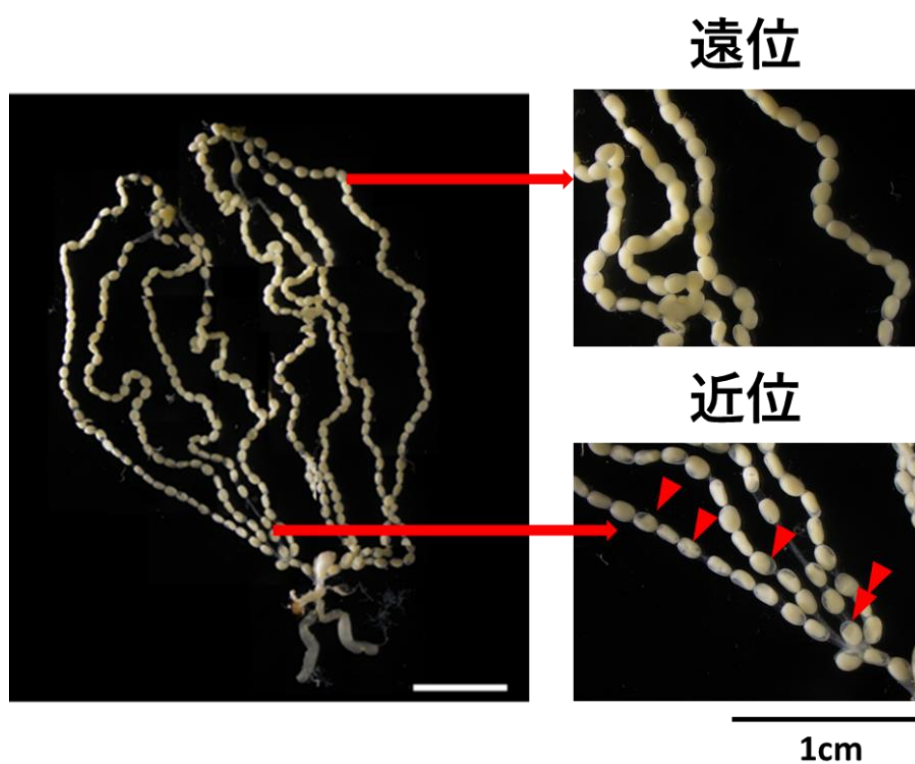
(C) 変異体およびコントロール個体の餌摂食量。n=5。***: $p < 0.005$ 、Student's t-test。

(D) 変異体およびコントロール個体の成虫オスのコントロール成虫メス個体に対する到達試験。***: $p < 0.005$ 、Mann–Whitney U-test。A, C, D のエラーバーは SD を表す。

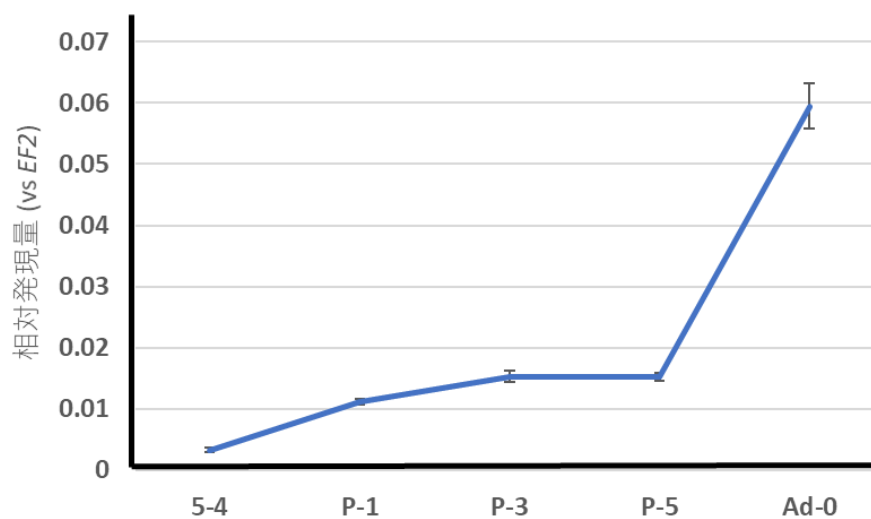
(A)



(B)



(C)



(D)

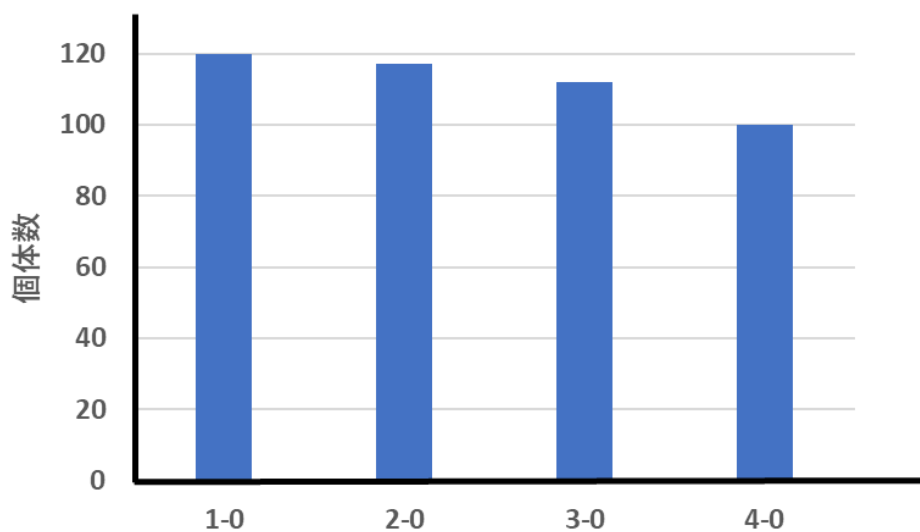


図 2-9. *Bmdmrt11E* 変異体における異常卵の解析

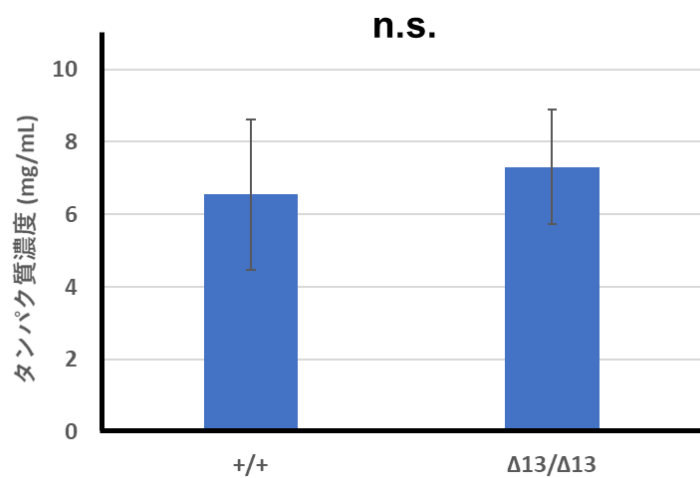
(A) 変異体およびコントロール個体の成虫卵巣に占める異常卵の割合。n=6。***: $p < 0.005$ 、Student's t-test。エラーバーは SD を表す。

(B) *Bmdmrt11E*^{Δ13/Δ13} メスの卵巣における産卵管から近位と遠位の異常卵分布の違い。矢印は異常卵を示す。

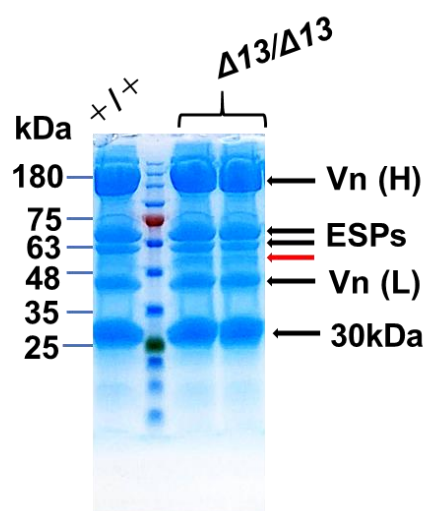
(C) 卵巣における蛹期以降の *Bmdmrt11E* の発現量推移。5-4: 5 齢幼虫 4 日目、P1~5: 蛹期 1-5 日目、Ad-0: 成虫羽化初日。

(D) *Bmdmrt11E*^{Δ13/Δ13} メスの産下卵から孵化した個体の 4 齢までの生存個体数。1~4 は齢を表し、各齢初日における個体数を表す。

(A)



(B)



(C)

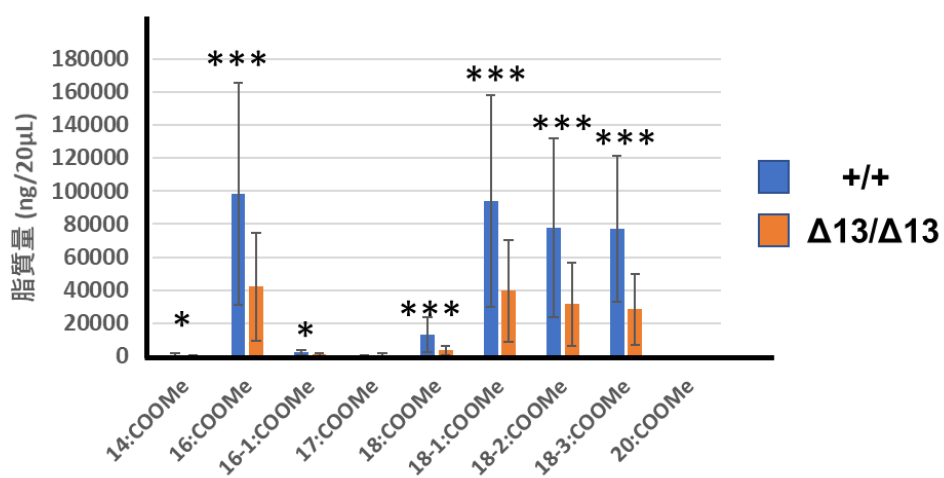
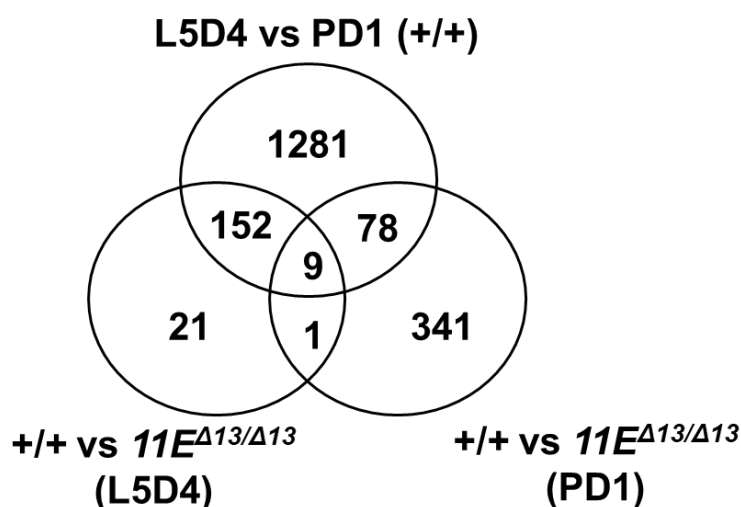


図 2-10. *Bmdmrt11E* 変異体における異常卵の生化学的解析

- (A) $\Delta 13$ 系統およびコントロール個体の卵のタンパク質濃度。n=16。エラーバーは SD を表す。
- (B) $\Delta 13$ 系統およびコントロール個体の卵タンパク質を用いた SDS-PAGE 像。赤矢印は $\Delta 13$ 系統でのみ高いレベルで見られたバンドを表す。
- (C) $\Delta 13$ 系統およびコントロール個体の卵における脂質量。卵巣卵 20 粒に対しての量である。n=15。*: $p < 0.05$ 、***: $p < 0.005$ 、Mann-Whitney U test。エラーバーは SD を表す。

(A)



(B)

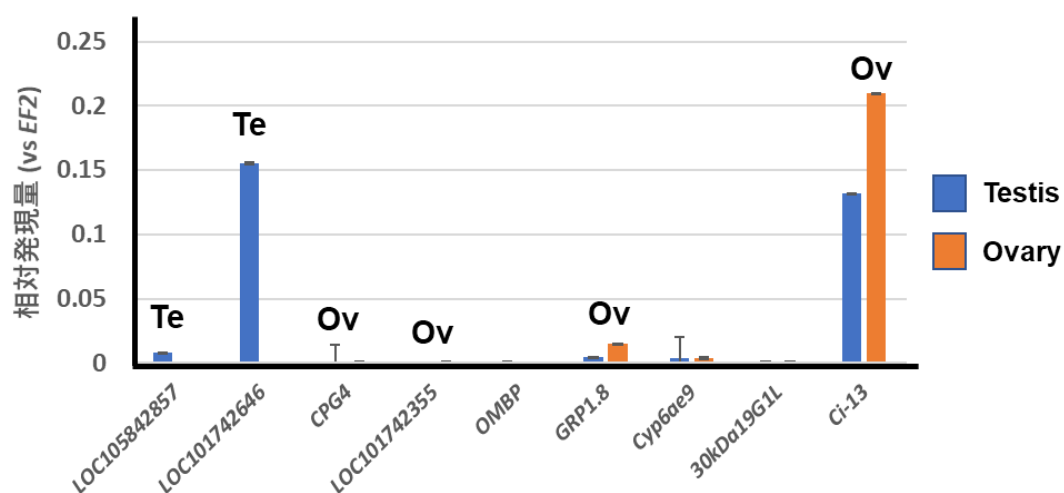


図 2-11. RNA-seq による *Bmdmrt11E* 下流遺伝子の探索

(A) RNA-seq データの解析条件ごとの該当遺伝子数。今回用いた 3 条件を全て満たす *Bmdmrt11E* の下流候補遺伝子は表 2-3 に示した 9 遺伝子であった。

(B) 表 2-3 に示した下流候補遺伝子の精巣と卵巣における発現量。Te は卵巣に比べて精巣で、Ov は精巣に比べて卵巣で 1.5 倍以上高く発現している遺伝子を示す。

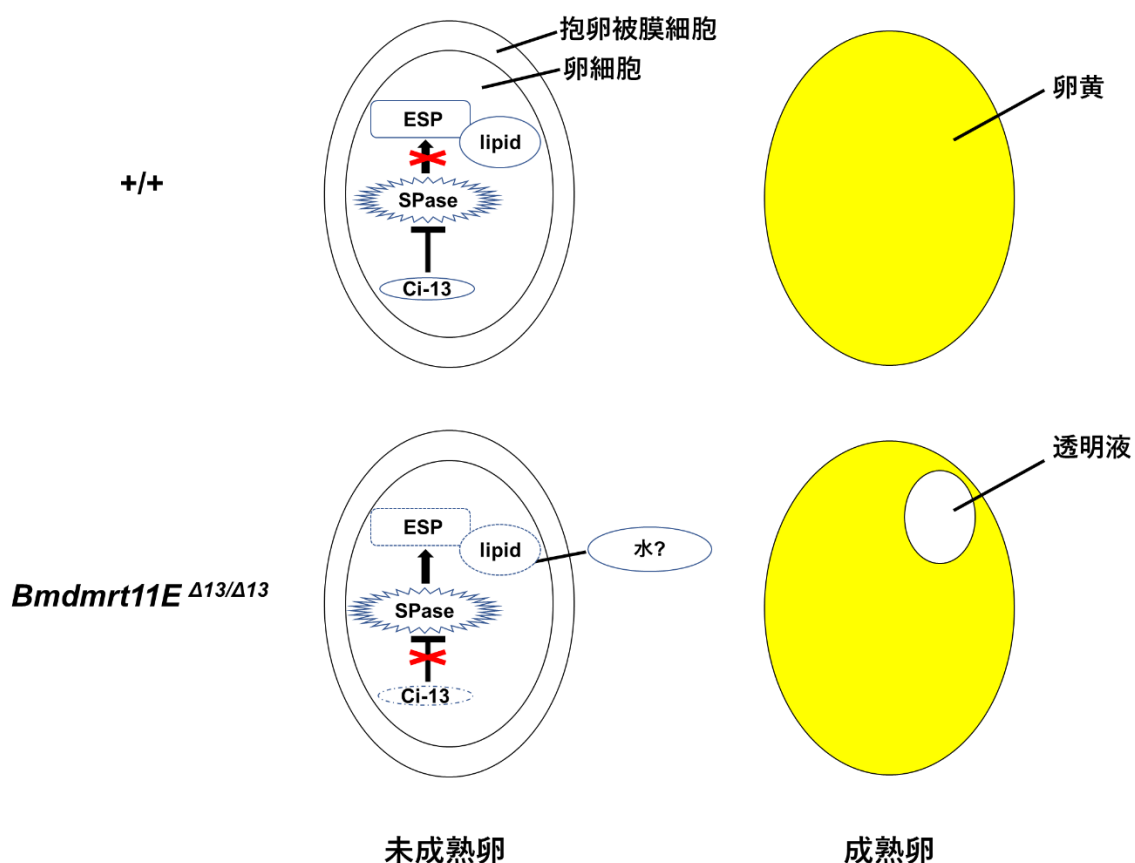


図 2-12. *Bmdmrt11E* 変異体における異常卵発生モデル

Bmdmrt11E 変異体では *Ci-13* の発現量が下がることで、セリンプロテアーゼの活性が抑制されず ESP が卵形成後極めて早期に分解されてしまう。それによって、ESP が保持していた脂質が分解あるいは卵外に遊離することで卵内の脂質量が減少し、その不足分だけ外部から水分が取り込まれることで透明な液体 (おそらく水) が蓄積した脂質の不足した異常卵が形成される。ESP: 卵特異的タンパク質、SPase: セリンプロテアーゼ、lipid: 脂質。

表 2-1. 変異検出に用いた primer の塩基配列

Target gene	Primer	Sequence
<i>Bmdmrt11E</i>	Forward	CACAAGCGGCTGTGTCGATG
	Reverse	AGCAGCCATGACTCGCTGTC
<i>Bmdmrt99B</i>	Forward-large	ACGCTTGGAAGGCAAACGTG
	Reverse-large	TCAAGGTGGGTGGCGGATTT
	Forward-short	CCGAACGGTGTAGACGTGTC
	Reverse-short	TCGGACGCTCTCAGGAAGAA

表 2-2. 変異検出用の PCR 条件

・卵由来 DNA の PCR 条件

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Final extension	cycles
95°C, 3min	98°C, 10sec	57°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 1min	35

・成虫脚由来 DNA の PCR 条件

Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Final extension	cycles
95°C, 4min	98°C, 10sec	57°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 1min	30

表 2-3. RNA-seq によって見つかった *Bmdmrt11E* 下流候補遺伝子

GeneID	Reference	GeneSymbol	Description
105842857	XR_001140260.1	<i>LOC105842857</i>	uncharacterized LOC105842857
101742646	XR_001139882.2, XR_002430998.1	<i>LOC101742646</i>	uncharacterized LOC101742646
692437	NM_001043428.1	<i>CPG4</i>	cuticular protein glycine-rich 4
101742355	XM_012692921.2	<i>LOC101742355</i>	uncharacterized LOC101742355
101745519	XM_021347804.1	<i>LOC101745519</i> (<i>OMBP</i>)	ommochrome-binding protein
101738200	XM_012688899.2	<i>LOC101738200</i> (<i>GRP1.8</i>)	glycine-rich cell wall structural protein 1.8
100126548	NM_001110534.1	<i>Cyp6ae9</i>	cytochrome P450 CYP6AE9
101747018	NM_001279437.1	<i>LOC101747018</i> (<i>30kDa19GIL</i>)	low molecular mass 30 kDa lipoprotein 19G1-like

100147699	NM_001126265.1	<i>Ci-13</i>	chymotrypsin inhibitor CI13
-----------	----------------	--------------	-----------------------------

表 2-4. *Bmdmrt11E* 下流候補遺伝子の qRT-PCR に用いた primer の塩基配列

Target gene	Primer	Sequence
<i>LOC105842857</i>	Forward	ACAGTCCCGATGGCGAAGTC
	Reverse	TTTCGCCGCCATCACGGTAC
<i>LOC101742646</i>	Forward	CACCGTAGTGATCCTGAGGTCC
	Reverse	CCACTTGATAAGAGTCGAGACGG
<i>CPG4</i>	Forward	TACCACAGTCGCCGTCAACAAG
	Reverse	TGGGCTGGCTGACTACCTTG
<i>LOC101742355</i>	Forward	TCGTGGCTGGATATCAGAAAGAC
	Reverse	ACCATCTTCCGAGAGAGCAGC
<i>OMBP</i>	Forward	TTTCAGTCTATCCAATGGTCCC
	Reverse	GGATGAGTTCCGAAGTCCGG
<i>GRP1.8</i>	Forward	GCCATAGCAGTACAAGGCTTACC
	Reverse	TCCAGCGTCGCCGTGCTTATG
<i>Cyp6ae9</i>	Forward	GCCCACGAATTTGCATTGGG
	Reverse	GCTGCCATCCTTCACGTTCC
<i>30kDa19G1L</i>	Forward	TTGCGCGATGACAGCAACAAC
	Reverse	GCCATGTGGTTTTGGGTCGG
<i>Ci-13</i>	Forward	GGTCATGAGTGATGAGCCAACG
	Reverse	CCTTGGCAGCCTCCGTAAATG

第三章

Bmdmrt93B の機能解析

第三章は雑誌掲載の形で刊行される予定の未発表の内容を含むため、インターネット公表できません。

総合考察

Bmdmrt11E、*Bmdmrt99B* について

統本研究から、*Bmdmrt11E* は卵形成、特に卵内の脂質代謝に関与することが明らかとなった。また、*Bmdmrt99B* は卵巣で発現してはいるが、むしろ神経に起因すると思われる行動制御に関与しているものと思われた。

dmrt11E は無脊椎動物では生殖に関与するが、脊椎動物では *Dmrt2* (Mawaribuchi *et al.*, 2019) と呼称され、生殖よりむしろ胚発生・筋骨格形成に関与することは第二章の緒言で述べた。カイコにおいても構造タンパク質を制御して器官の形成に関与するというよりは機能タンパク質を制御することで卵形成に関与していたことから、脊椎動物と無脊椎動物の間で機能が全く異なる DMRT であるという知見がまた一つ蓄積されたこととなる。脊椎動物では生殖に関与するとされる遺伝子、例えば *Sox* なども生殖器以外の器官・組織形成に関与するものが多く知られており (Marco&Véronique., 2019)、もともと幅広く器官形成を行う遺伝子群であることが予想できる。*Dmrt2* との関連で言えば筋骨格形成においてオスの性決定カスケード上流因子でもある *Sox9* と協働することが pre-print ではあるが報告されている (Ono *et al.*, 2020)。すなわち、DMRT は結果的に生殖器の形成にも関与するようになったのであって、生殖器専門というわけではないのであろうと考えられる。一方、無脊椎動物では内骨格や骨格筋といったものが存在しない、臓器等の構造も異なるなど器官形成が全く異なる調節系となっていることから *dmrt11E* は節足動物においてはもはやほとんどの器官形成には関与することができず、結果的に生殖に関する機能だけが残ったのかもしれない。節足動物以外の *dmrt11E* については全く知見がないが、内骨格をもたない生物ではやはり同様の機能的進化をして生殖に関する機能を持っていることが予想できる。

今回、*Bmdmrt11E* の機能として卵内の脂質代謝が疑われ、そこに卵特異的タンパク

質 (ESPs) の関与が疑われた。ESPs の機能についてリポタンパク質ではないかと予想もされてきたが (Irie&Yamasita.,1982)、現在まで結局機能不明である。また、*Bmdmrt11E* の下流として同定された *Ci-13* もキモトリプシンインヒビターの研究から卵巣に局在することは知られていたが (Aratake *et al.*, 1990)、機能面は長らく調べられてこなかった。本研究において、DMRT の機能を幅広く調べた結果、長年不明だったこれら 2 者を初めて引き合わせることができた。我々が当初掲げた DMRT に関する遺伝学的知見のギャップを埋めること、そして予想もしなかった生物学的な謎を解き明かすことにつなげることができたと考えている。今後、本研究を契機として ESPs や *Ci-13* の機能、ひいては卵巣内の脂質代謝についての知見がより深まることが期待できる。

dmrt99B は脊椎動物では *Dmrt4/5* と呼ばれ (Mawaribuchi *et al.*, 2019)、どちらも神経系で機能することが知られてきた (Fontana & Crews, 2012; Henry *et al.* 2012; Zwarts *et al.* 2015) (Urquhart *et al.*, 2016; Balciuniene *et al.*, 2006; Gennet *et al.*, 2011 ; Konno *et al.*,2012; Saulnier *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2017; De Clercq *et al.*, 2018; Desmaris *et al.*, 2018; Ratié *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2005; Graf *et al.*, 2015; Tresser *et al.*, 2010)。カイコにおいても *Bmdmrt99B* は神経で機能していたことから DMRT と神経というのは密接な関係をもっているものと考えられる。*dmrt99B* は DMRT の中でも DMA モチーフという機能不明ドメインをもつ DMRTA というグループに属する。このグループには神経形成への関与が知られる *Dmrt3* (Andersson *et al.*, 2012)、*dmd-4* (Bayer *et al.*, 2020) といった遺伝子が含まれる。DMRT は進化の過程で刺胞動物より高等な動物がもつことが知られ、逆に海綿動物はもっていないことが知られている (Picard *et al.*, 2015)。この両者を分ける進化学的指標はいくつかあるが、特に大きなものが胚葉性の獲得に関連した神経系の獲得である (小泉., 2016)。実際に刺胞動物の DMRT はそのほとんどが DMRTA であることが知られていることから (Chen *et al.*, 2016)、DMRTA と神経というのは進化的に極めて密接な関連があるものと思われる。より踏み込んでいえば、DMRT は祖先的にそのほとんどが DMRTA であり、そもそも神経形成因子として誕生したと考えても矛盾はない。

前述の *Sox* 遺伝子も神経形成に関与することが知られており (Marco&Véronique., 2019)、神経に関与する遺伝子群が他の器官形成にも関与するようになり、その一部が生殖器系の制御を行うようになったという生殖制御遺伝子の進化史を垣間見ることができる。

カイコ の *Bmdmrt99B* を変異させると、やはり神経に起因すると思われる行動異常を示した。カイコが馴化される過程で失った形質というものはいくつかあるが、その一つに高い運動指向性 (拡散性) があげられる。野外昆虫に比べてカイコは餌さえあればほとんどその場を動くことがなく、脱走することもない飼育しやすい昆虫であるが、カイコに近縁な野生種であるクワコは逆に運動指向性が高い。事実、クワコとカイコを交雑させることで極めて運動指向性が高い系統を得たという報告もある (荒武・栢村., 1973)。この運動指向性についてはカイコの系統間差のあることが知られ、現在までに多系統で調査がなされているが (Nagasaka *et al.*, 1998; 清水ら., 1998)、研究史に対して成果はそれほど多くない。本研究から我々は偶然、運動指向性の高い変異体を得ることができたが、これは本研究が DMRT の機能を幅広く調査した結果であると考えている。本研究を契機として、運動指向性を制御する遺伝子の同定が進んでいくことを期待する。

***Bmdmrt93B* の機能および *Bmdsx* 非依存性制御因子について**

Bmdmrt93B は精巣および生殖器原基のオス型発達に関与することが本研究から明らかとなった。節足動物の *dmrt93B* に関してはキイロショウジョウバエでしか知見がないが、やはり精巣の発達に寄与していたことから一定の機能保存性があると思われた。

Bmdmrt93B の発現は *Bmdsx^F* にのみ依存し、*Bmdsx^M* には何ら依存しないことが RNA-seq の結果からわかった (図 1-5)。残念ながら、カイコにおいて *BmDSX^F* が *Bmdmrt93B* 近傍に結合しているかはわからなかったが、キイロショウジョウバエでは *DSX^F* が *dmrt93B* 上流に結合することがわかった。これら事実を組み合わせると、*dmrt93B* は進化的に *dsx^M* 非依存、*dsx^F* 依存な因子であることが保存されている遺伝子であることがうかがい知れる。また、カイコでは結果的に 3 つの DMRT のうち唯一の

Bmdsx 非依存性制御因子であることもわかった。*dmrt11E*、*dmrt99B* とともに進化をしてきた *dmrt93B* のみがどうして *dsx* とこのような関係性を構築できたのであろうか?

dmrt93B はミジンコから昆虫まで精巣で高い発現を示す遺伝子である一方、*dsx* については初めオス化遺伝子であったものが昆虫からメス化の機能を徐々に獲得していったものと考えられている (Ledón-Rettig *et al.*, 2017; Wexler *et al.*, 2019)。*dmrt93B* がより原始的な生物種でもオスに偏って発現しているかは定かでないが、*dmrt93B* のオス型発現が進化的に保存されているものであるならば、*dsx* のオス化ターゲットとしては *dmrt93B* を促進する必要はない。一方で、メス化のターゲットとして抑制する必要があったものと予想される。昆虫では性ホルモンが失われ、*dsx* による細胞自律的な性決定がなされるとされているが、その *dsx* の発現を促進する 20E の下流に *dmrt93B* も存在すると考えられる (図 3-8: A) ことも両者の特殊な関係を維持するのに一役買ったとも考えられる。つまり、*dmrt93B* は *dsx* による促進を受けなくとも発現でき、性的二型が発達する時期において、同じ組織で共発現することが可能だからである。

以上、DMRT の機能を図にまとめた (図 4-1)。本研究にから、*Bmdmrt11E* は同じ昆虫であるキイロショウジョウバエとは異なり、メスにおいて卵内の脂質保持に重要な因子であることがわかった。また、*Bmdmrt99B* はキイロショウジョウバエおよび脊椎動物オルソログと同じく神経で高く発現し、カイコでは行動、特に拡散行動を制御していることまでも突き止めることができた。また、*Bmdmrt93B* は我々が探し求めていた *Bmdsx^M* 非依存性制御因子であることがほぼ確実となり、*Bmdsx^F* によるメス特異的な発現抑制と 20E による発現促進という制御系モデルを構築することに成功した。このように、本研究によってカイコの DMRT の機能について一通りの知見を得ることができ、また当初掲げていた *Bmdsx^M* 非依存性制御因子として機能する DMRT を 1 種類同定し、さらにほかの 2 種についても諦めずに研究を継続し、予想していなかった生物学的命題へのヒントを提供することができた。

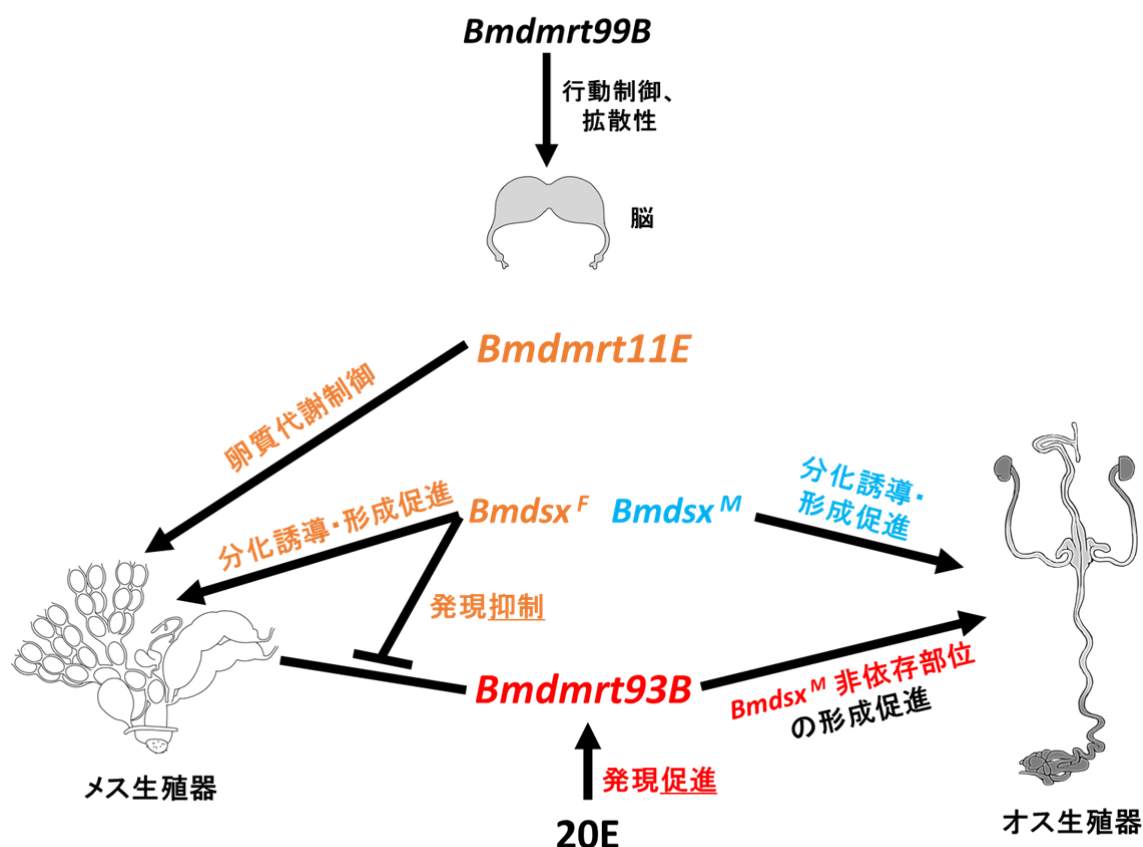


図 4-1. カイコにおける各 DMRT 遺伝子の機能

本研究で初めて明らかとなった *dmrt11E*、*dmrt93B*、*dmrt99B* の機能について表した。*Bmdmrt11E* は同じ昆虫であるキイロショウジョウバエとは異なり、メスにおいて卵内の脂質保持に重要な因子であることがわかった。また、*Bmdmrt99B* はキイロショウジョウバエおよび脊椎動物オルソログと同じく神経で高く発現し、カイコでは行動、特に拡散行動を制御していることまでも突き止めることができた。また、*Bmdmrt93B* は我々が探し求めている *Bmdsx^M* 非依存性制御因子であることがほぼ確実となり、*Bmdsx^F* によるメス特異的な発現抑制と 20E による発現促進という制御系モデルを構築することに成功した。オス生殖器の黒くなっている箇所が *Bmdsx^M* 依存的な領域、白くなっている箇所が *Bmdsx^M* 非依存的かつ *Bmdmrt93B* によって制御される領域。

謝辞

本研究の遂行に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科資源生物制御学分野の鈴木雅京准教授に心からの尊敬と深い感謝の念を表します。また、本研究の遂行に際し貴重な助言、ご協力を賜りました同研究室の青木不学教授に深く感謝いたします。

カイコの飼育や実験についての基礎知識や研究に対する姿勢、考え方を懇切丁寧に指導して頂いた同研究室 OB の酒井弘貴さんに最大限の感謝を表したいと思います。

カイコの DSX 変異体などについてのデータ提供や飼育面で協力していただいた同研究室の山本芙美子さん、OG の松岡美里さん、OB の湯澤知久くんをはじめ、研究の遂行に際して終始ご協力を賜り、貴重な時間を割いて議論していただきました峰翔太郎さん、船屋智史さん他の資源生物制御学研究室の皆様には深く御礼申し上げます。

Bmdmrt11E 変異体卵の GC-MS 解析においてご協力を賜った摂南大学の藤井毅先生並びに東京大学農学部応用昆虫学研究室、摂南大学農学部応用昆虫学研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

Bmdmrt93B のノックアウト解析にご協力を賜った国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の笠嶋めぐみ研究員、瀬筒秀樹先生、並びに実験やカイコ卵へのインジェクションにおいて協力・助言をいただいた同研究所カイコ機能改変技術開発ユニットの研究員、技術職員の皆様には心より感謝を申し上げます。

参考文献

Andersson LS, Larhammar M, Memic F, Wootz H, Schwochow D, Rubin CJ, Patra K, Arnason T, Wellbring L, Hjälml G, Imstrand F, Petersen JL, McCue ME, Mickelson JR, Cothran G, Ahituv N, Roepstorff L, Mikko S, Vallstedt A, Lindgren G, Andersson L, Kullander K. (2012)

Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature*. 488(7413):642-646.

Angelozzi M, Lefebvre V. (2019)

SOXopathies: Growing Family of Developmental Disorders Due to SOX Mutations. *Trends Genet*. 35(9):658-671.

Aratake H, Li RD, Fujii H, Kawaguchi Y, Koga K. (1990)

Chymotrypsin inhibitors in haemolymph and eggs of the silkworm, *bombyx mori*: developmental changes in inhibitory activity.

Comp Biochem Physiol A. Physiol. 97(2), 205-209.

Aslam AF, Kiya T, Mita K, Iwami M (2011).

Identification of novel bombyxin genes from the genome of the silkworm *Bombyx mori* and analysis of their expression.

Zoolog Sci. 28(8):609-616.

Baker BS, Ridge KA. (1980)

Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*.

Genetics. 94(2):383-423.

Balciuniene J, Bardwell VJ, Zarkower D. (2006)

Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles.

Mol Cell Biol. 26(23), 8984-8991.

Bayer EA, Stecky RC, Neal L, Katsamba PS, Ahlsen G, Balaji V, Hoppe T, Shapiro L, Oren-Suissa M, Hobert O. (2020)

Ubiquitin-dependent regulation of a conserved DMRT protein controls sexually dimorphic synaptic connectivity and behavior.

Elife. 9: e59614.

Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW. (2003)

The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein.

Cell. 114(4):419-429.

Bouman A, Waisfisz Q, Admiraal J, van de Loo M, van Rijn RR, Micha D, Oostra RJ, Mathijssen IB. (2018)

Homozygous DMRT2 variant associates with severe rib malformations in a newborn.

Am J Med Genet A. 176(5):1216-1221.

Burtis KC, Baker BS. (1989)

Drosophila doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides.

Cell. 56(6):997-1010.

Burtis KC, Coschigano KT, Baker BS, Wensink PC. (1991)

The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer.

EMBO J. 10(9):2577-82.

Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. (2011)

Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.

Nucleic Acids Res. 39(12): e82.

Chandler JC, Fitzgibbon QP, Smith G, Elizur A, Ventura T. (2017)

Y-linked *iDmrt1* paralogue (*iDMY*) in the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*: The first invertebrate sex-linked *Dmrt*.

Dev Biol. 430(2):337-345.

-
- Chen CJ, Shikina S, Chen WJ, Chung YJ, Chiu YL, Bertrand JA, Lee YH, Chang CF. (2016)
A Novel Female-Specific and Sexual Reproduction-Associated *Dmrt* Gene Discovered in the Stony Coral, *Euphyllia ancora*.
Biol Reprod. 94(2):40.
- Clough E, Jimenez E, Kim YA, Whitworth C, Neville MC, Hempel LU, Pavlou HJ, Chen ZX, Sturgill D, Dale RK, Smith HE, Przytycka TM, Goodwin SF, Van Doren M, Oliver B. (2014)
Sex- and tissue-specific functions of *Drosophila* doublesex transcription factor target genes.
Dev Cell. 31(6):761-773.
- Cui Z, Liu Y, Wang W, Wang Q, Zhang N, Lin F, Wang N, Shao C, Dong Z, Li Y, Yang Y, Hu M, Li H, Gao F, Wei Z, Meng L, Liu Y, Wei M, Zhu Y, Guo H, Cheng CH, Schartl M, Chen S. (2017)
Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*).
Sci Rep. 7:42213.
- De Clercq S, Keruzore M, Desmaris E, Pollart C, Assimacopoulos S, Preillon J, Ascenzo S, Matson CK, Lee M, Nan X, Li M, Nakagawa Y, Hochepped T, Zarkower D, Grove EA, Bellefroid EJ. (2018)
DMRT5 together with DMRT3 directly controls hippocampus development and neocortical area map formation.
Cereb Cortex. 28(2), 493-509.
- Desmaris E, Keruzore M, Saulnier A, Ratié L, Assimacopoulos S, De Clercq S, Nan X, Roychoudhury K, Qin S, Kricha S, Chevalier C, Lingner T, Henningfeld KA, Zarkower D, Mallamaci A, Theil T, Campbell K, Pieler T, Li M, Grove EA, Bellefroid EJ. (2018)
DMRT5, DMRT3, and EMX2 cooperatively repress GSX2 at the pallium–subpallium boundary to maintain cortical identity in dorsal telencephalic progenitors.
J Neurosci. 38(42), 9105-9121.
- Diana O'Day (2010)
GENETIC ANALYSIS OF THE FUNCTION OF THE DROSOPHILA DOUBLESEX-RELATED FACTOR *dmrt93B*.
UT GSBS Dissertations and Theses (Open Access). 54.

-
- Fontana JR, Crews ST. (2012)
Transcriptome analysis of *Drosophila* CNS midline cells reveals diverse peptidergic properties and a role for *castor* in neuronal differentiation.
Dev Biol. 372(1):131-142.
- Foster SP. (2001)
Fatty acyl pheromone analogue-containing lipids and their roles in sex pheromone biosynthesis in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker).
J Insect Physiol. 47(4-5), 433–443.
- Fujii T, Nakano R, Takubo Y, Qian S, Yamakawa R, Ando T, Ishikawa Y. (2010)
Female sex pheromone of a lichen moth *Eilema japonica* (Arctiidae, Lithosiinae): components and control of production.
J Insect Physiol. 56(12), 1986–1991.
- Fujinaga D, Kohmura Y, Okamoto N, Kataoka H, Mizoguchi A. (2017)
Insulin-like growth factor (IGF)-like peptide and 20-hydroxyecdysone regulate the growth and development of the male genital disk through different mechanisms in the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Biochem Mol Biol. 87:35-44.
- Gennet N, Gale E, Nan X, Farley E, Takacs K, Oberwallner B, Chambers D, Li M. (2011)
Doublesex and mab-3-related transcription factor 5 promotes midbrain dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate.
Proc Natl Acad Sci U. S. A. 108(22), 9131-9136.
- Gonsalves SE, Neal SJ, Kehoe AS, Westwood JT. (2011)
Genome-wide examination of the transcriptional response to ecdysteroids 20-hydroxyecdysone and ponasterone A in *Drosophila melanogaster*.
BMC Genomics. 12:475.
- Graf M, Teo Qi-Wen ER, Sarusie MV, Rajaei F, Winkler C. (2015)
Dmrt5 controls corticotrope and gonadotrope differentiation in the zebrafish pituitary.
Mol Endocrinol. 29(2), 187-199.

-
- Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. (2000)
Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*).
Biochem Biophys Res Commun. 272(3):662-666.
- Hall AB, Basu S, Jiang X, Qi Y, Timoshevskiy VA, Biedler JK, Sharakhova MV, Elahi R, Anderson MA, Chen XG, Sharakhov IV, Adelman ZN, Tu Z. (2015)
SEX DETERMINATION. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*.
Science. 348(6240):1268-1270.
- Henry GL, Davis FP, Picard S, Eddy SR. (2012)
Cell type-specific genomics of *Drosophila* neurons.
Nucleic Acids Res. 40(19), 9691-9704.
- Herpin A, Schartl M. (2015)
Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpaters.
EMBO Rep. 16(10):1260-1274.
- Hildreth PE. (1965)
DOUBLESEX, RECESSIVE GENE THAT TRANSFORMS BOTH MALES AND FEMALES OF DROSOPHILA INTO INTERSEXES.
Genetics. 51(4):659-78.
- Huang X, Hong CS, O'Donnell M, Saint-Jeannet JP. (2005)
The doublesex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system.
Proc Natl Acad Sci U. S. A. 102(32), 11349-11354.
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. (2013)
Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system.
Nat Biotechnol. 31(3):227-229.
- Indrasith LS, Furusawa T, Shikata M, Yamashita O. (1987)
Limited degradation of vitellin and egg-specific protein in *Bombyx* eggs during embryogenesis.
Insect Biochem. 17(4), 539-545.

-
- Irie K, Yamashita O. (1983)
Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titer changes during oogenesis and embryogenesis.
Insect Biochem. 13(1), 71-80.
- Izumi S, Yano K, Yamamoto Y, Takashi SY. (1994)
Yolk proteins from insect eggs: Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis
J Insect Physiol. 40(9), 735-746.
- Kashimada K, Koopman P. (2010)
Sry: the master switch in mammalian sex determination.
Development. 137(23):3921-3930.
- Kato Y, Kobayashi K, Oda S, Colbourn JK, Tatarazako N, Watanabe H, Iguchi T. (2008)
Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*.
Genomics. 91(1):94-101.
- Kato Y, Kobayashi K, Watanabe H, Iguchi T. (2011)
Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a *Doublesex* gene in the sex-determining pathway.
PLoS Genet. 7(3): e1001345.
- Kato Y, Perez CAG, Mohamad Ishak NS, Nong QD, Sudo Y, Matsuura T, Wada T, Watanabe H. (2018)
A 5' UTR-Overlapping LncRNA Activates the Male-Determining Gene *doublesex1* in the Crustacean *Daphnia magna*.
Curr Biol. 28(11):1811-1817.e4.
- Karamyshev AL, Karamysheva ZN. (2018)
Lost in Translation: Ribosome-Associated mRNA and Protein Quality Controls.
Front Genet. 9:431.
- Kawaguchi Y, Banno Y, Koga K, Fujii H. (1991)
Effects of starvation stress at the Fifth larval instar on the egg formation of *Bombyx mori*.
Sci Bull Fac Agr Kyushu Univ. 453 (4):145-151.

-
- Kawamura N, Sahara K, Fugo H. (2003)
Glucose and ecdysteroid increase apyrene sperm production in in vitro cultivation of spermatocysts of *Bombyx mori*.
J Insect Physiol. 49(1):25-30.
- Kim YJ, Zitnan D, Cho KH, Schooley DA, Mizoguchi A, Adams ME (2006).
Central peptidergic ensembles associated with organization of an innate behavior.
Proc Natl Acad Sci U S A. 103(38):14211-14216.
- Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H, Arai Y, Ishihara G, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Suzuki MG, Katsuma S. (2014)
A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm.
Nature. 509(7502):633-636.
- Konno D, Iwashita M, Satoh Y, Momiyama A, Abe T, Kiyonari H, Matsuzaki F. (2012)
The mammalian DM domain transcription factor *Dmrt2* is required for early embryonic development of the cerebral cortex.
PLoS One. 7(10), e46577.
- Krzywinska E, Dennison NJ, Lycett GJ, Krzywinski J. (2016)
A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.
Science. 353(6294):67-69.
- Lourenço R, Lopes SS, Saúde L. (2010)
Left-right function of *dmrt2* genes is not conserved between zebrafish and mouse.
PLoS One. 5(12), e14438.
- Ledón-Rettig CC, Zattara EE, Moczek AP. (2017)
Asymmetric interactions between *doublesex* and tissue- and sex-specific target genes mediate sexual dimorphism in beetles.
Nat Commun. 8:14593.
- Li L, Mao A, Wang P, Ning G, Cao Y, Wang Q. (2018)
Endodermal pouch-expressed *dmrt2b* is important for pharyngeal cartilage formation.
Biol Open. 7(12), bio035444.

-
- Lindeboom RG, Supek F, Lehner B. (2016)
The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers.
Nat Genet. 48(10), 1112-1118.
- Liu S, Li Z, Gui JF. (2009)
Fish-specific duplicated *dmrt2b* contributes to a divergent function through Hedgehog pathway and maintains left-right asymmetry establishment function.
PLoS One. 4(9): e7261.
- Luo SD, Baker BS. (2015)
Constraints on the evolution of a *doublesex* target gene arising from *doublesex*'s pleiotropic deployment.
Proc Natl Acad Sci U S A. 112(8): E852-61.
- Luz JG, Hassig CA, Pickle C, Godzik A, Meyer BJ, Wilson IA. (2003)
XOL-1, primary determinant of sexual fate in *C. elegans*, is a GHMP kinase family member and a structural prototype for a class of developmental regulators.
Genes Dev. 17(8):977-990.
- Makka T, Seino A, Tomita S, Fujiwara H, Sonobe H. (2002)
A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*.
Arch Insect Biochem Physiol. 51(3):111-120.
- 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. 13(3):151-163.
- Maruyama M, Kambara K, Naka H, Azuma M. (2015)
Insect water-specific aquaporins in developing ovarian follicles of the silk moth *Bombyx mori*: role in hydration during egg maturation.
Biol Bull. 229(1), 58-69.
- Mason DA, Rabinowitz JS, Portman DS. (2008)
dmd-3, a *doublesex*-related gene regulated by *tra-1*, governs sex-specific morphogenesis in *C. elegans*.
Development. 135(14):2373-2382.

-
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2002)
DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish.
Nature. 417(6888):559-563.
- Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y. (2007)
DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish.
Proc Natl Acad Sci U S A. 104(10):3865-3870.
- Mawaribuchi S, Ito Y, Ito M. (2019)
Independent evolution for sex determination and differentiation in the *DMRT* family in animals.
Biol Open. 8(8): bio041962.
- McLafferty FW. (1959)
Mass spectrometric analysis. Molecular rearrangements.
Anal Chem. 31 (1): 82–87.
- Meccariello A, Salvemini M, Primo P, Hall B, Koskinioti P, Dalíková M, Gravina A, Gucciardino MA, Forlenza F, Gregoriou ME, Ippolito D, Monti SM, Petrella V, Perrotta MM, Schmeing S, Ruggiero A, Scolari F, Giordano E, Tsoumani KT, Marec F, Windbichler N, Arunkumar KP, Bourtzis K, Mathiopoulos KD, Ragoussis J, Vitagliano L, Tu Z, Papathanos PA, Robinson MD, Saccone G. (2019)
Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests.
Science. 365(6460):1457-1460.
- Meng A, Moore B, Tang H, Yuan B, Lin S. (1999)
A *Drosophila doublesex*-related gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates.
Development. 126(6):1259-1268.
- Miller LM, Plenefisch JD, Casson LP, Meyer BJ. (1988)
xol-1: a gene that controls the male modes of both sex determination and X chromosome dosage compensation in *C. elegans*.
Cell. 55(1):167-183.

-
- Mine S, Sumitani M, Aoki F, Hatakeyama M, Suzuki MG. (2017)
Identification and functional characterization of the sex-determining gene *doublesex* in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthredinidae).
Appl Entomol Zool. 52(3):497-509.
- Nagasaka K, Mase K, Okada E, Yamamoto T (1998)
Analyzing dispersal of silkworm larvae as a random process.
J Seric Sci Jpn. 67 (2): 101-107.
- Nagata S, Nagasawa H. (2006)
Effects of diet-deprivation and physical stimulation on the feeding behavior of the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.
J Insect Physiol. 52:807-815
- Namiki S, Iwabuchi S, Pansopha Kono P, Kanzaki R. (2014)
Information flow through neural circuits for pheromone orientation.
Nat Commun. 5: 5919.
- Nishita Y. (2014)
Ecdysone response elements in the distal promoter of the *Bombyx Broad-Complex* gene, *BmBR-C*.
Insect Mol Biol. 23(3):341-356.
- Nong QD, Matsuura T, Kato Y, Watanabe H. (2020)
Two *Doublesex1* mutants revealed a tunable gene network underlying intersexuality in *Daphnia magna*.
PLoS One. 15(8): e0238256.
- Ohbayashi F, Suzuki MG, Mita K, Okano K, Shimada T. (2001)
A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*.
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 128(1):145-158.
- Ono K, Hata K, Nakamura E, Ishihara S, Kobayashi S, Nakanishi M, Yoshida M, Takahata Y, Murakami T, Takenoshita S, Komori T, Nishimura R, Yoneda T. (2020)
Dmrt2 promotes transition of endochondral bone formation by linking Sox9 and Runx2.
Research Square. PREPRINT (Version 1).

-
- Panara V, Budd GE, Janssen R. (2019)
Phylogenetic analysis and embryonic expression of panarthropod *Dmrt* genes.
Front Zool. 16, 23.
- Picard MA, Cosseau C, Mouahid G, Duval D, Grunau C, Toulza È, Allienne JF, Boissier J. (2015)
The roles of *Dmrt* (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom.
C R Biol. 338(7):451-462.
- Pomerantz AF, Hoy MA, Kawahara AY. (2015)
Molecular characterization and evolutionary insights into potential sex-determination genes in the western orchard predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Chelicerata: Arachnida: Acari: Phytoseiidae).
J Biomol Struct Dyn. 33(6):1239-1253.
- Ratié L, Desmaris E, García-Moreno F, Hoerder-Suabedissen A, Kelman A, Theil T, Bellefroid EJ, Molnár Z. (2020)
Loss of *Dmrt5* Affects the Formation of the Subplate and Early Corticogenesis.
Cereb Cortex. 30(5), 3296-3312.
- Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. (1998)
Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes.
Nature. 391(6668):691-695.
- Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. (2000)
Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation.
Genes Dev. 14(20):2587-2595.
- Rhind NR, Miller LM, Kopczynski JB, Meyer BJ. (1995)
xol-1 acts as an early switch in the *C. elegans* male/hermaphrodite decision.
Cell. 80(1):71-82.
- Robinett CC, Vaughan AG, Knapp JM, Baker BS. (2010)
Sex and the single cell. II. There is a time and place for sex.
PLoS Biol. 8(5): e1000365.

Sakai H, Oshima H, Yuri K, Gotoh H, Daimon T, Yaginuma T, Sahara K, Niimi T. (2019)
Dimorphic sperm formation by *Sex-lethal*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 116(21):10412-10417.

Sarkar H, Mitsios A, Smart M, Skinner J, Welch AA, Kalatzis V, Coffey PJ, Dubis AM, Webster AR, Moosajee M. (2019)
Nonsense-mediated mRNA decay efficiency varies in choroideremia providing a target to boost small molecule therapeutics.
Hum Mol Genet. 28(11), 1865-1871.

Sato T, Rocancourt D, Marques L, Thorsteinsdóttir S, Buckingham M (2010)
A Pax3/Dmrt2/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis.
PLoS Genet. 6(4), e1000897.

Saúde L, Lourenço R, Gonçalves A, Palmeirim I. (2005)
terra is a left-right asymmetry gene required for left-right synchronization of the segmentation clock.
Nat Cell Biol. 7(9):918-920.

Saulnier A, Keruzore M, De Clercq S, Bar I, Moers V, Magnani D, Walcher T, Filippis C, Kricha S, Parlier D, Viviani L, Matson CK, Nakagawa Y, Theil T, Götz M, Mallamaci A, Marine JC, Zarkower D, Bellefroid EJ. (2013)
The doublesex homolog *Dmrt5* is required for the development of the caudomedial cerebral cortex in mammals.
Cereb Cortex. 23(11), 2552-2567.

Seo KW, Wang Y, Kokubo H, Kettlewell JR, Zarkower DA, Johnson RL. (2006)
Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor *Dmrt2* reveals an essential role in somite patterning.
Dev Biol. 290(1), 200-210.

Seo KW. (2007)
Dmrt2 and *Pax3* double-knockout mice show severe defects in embryonic myogenesis.
Comp Med. 57(5), 460-468.

Sharma A, Heinze SD, Wu Y, Kohlbrenner T, Morilla I, Brunner C, Wimmer EA, van de Zande L, Robinson MD, Beukeboom LW, Bopp D. (2017)

Male sex in houseflies is determined by *Mdmd*, a paralog of the generic splice factor gene *CWC22*.

Science. 356(6338):642-645.

Saúde L, Lourenço R, Gonçalves A, Palmeirim I. (2005)

terra is a left-right asymmetry gene required for left-right synchronization of the segmentation clock.

Nat Cell Biol. 7(9):918-920.

Shen MM, Hodgkin J. (1988)

mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*.

Cell. 54(7):1019-1031.

Shinbo H, Happ GM. (1989)

Effects of ecdysteroids on the growth of the post-testicular reproductive organs in the silkworm, *Bombyx mori*.

J Insect Physiol. 35 (11): 855-861, 863-864.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990)

A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif.

Nature. 346(6281):240-244.

Suzuki MG, Suzuki K, Aoki F, Ajimura M (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(9):693-699.

Tanaka K, Uda Y, Ono Y, Nakagawa T, Suwa M, Yamaoka R, Touhara K. (2009)

Highly Selective Tuning of a Silkworm Olfactory Receptor to a Key Mulberry Leaf Volatile.

Curr Biol. 19:881-890.

-
- Tresser J, Chiba S, Veeman M, El-Nachef D, Newman-Smith E, Horie T, Tsuda M, Smith WC. (2010)
doublesex/mab3 related-1 (dmrt1) is essential for development of anterior neural plate derivatives in *Ciona*.
Development. 137(13), 2197-2203.
- Urquhart JE, Beaman G, Byers H, Roberts NA, Chervinsky E, O'Sullivan J, Pilz D, Fry A, Williams SG, Bhaskar SS, Khayat M, Simanovsky N, Shachar IB, Shalev SA, Newman WG. (2016)
DMRTA2 (*DMRT5*) is mutated in a novel cortical brain malformation.
Clin Genet. 89(6):724-727.
- Verhulst EC, van de Zande L. (2015)
Double nexus--*Doublesex* is the connecting element in sex determination.
Brief Funct Genomics. 14(6):396-406.
- Wang Y, Jin S, Fu H, Qiao H, Sun S, Zhang W, Jiang S, Gong Y, Xiong Y, Wu Y. (2019)
Identification and Characterization of the DMRT11E Gene in the Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense*.
Int J Mol Sci. 20(7):1734.
- Wexler JR, Plachetzki DC, Kopp A. (2014)
Pan-metazoan phylogeny of the DMRT gene family: a framework for functional studies.
Dev Genes Evol. 224(3):175-181.
- Wexler J, Delaney EK, Belles X, Schal C, Wada-Katsumata A, Amicucci MJ, Kopp A. (2019)
Hemimetabolous insects elucidate the origin of sexual development via alternative splicing.
Elife. 8: e47490.
- Williams TM, Selegue JE, Werner T, Gompel N, Kopp A, Carroll SB. (2008)
The regulation and evolution of a genetic switch controlling sexually dimorphic traits in *Drosophila*.
Cell. 134(4):610-623.

Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O, Fostier A, Guiguen Y. (2012)

An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Curr Biol. 22(15):1423-1428.

Yi W, Zarkower D. (1999)

Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. *Development.* 126(5):873-881.

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. (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(7):2469-2474.

Young FI, Keruzore M, Nan X, Gennet N, Bellefroid EJ, Li M. (2017)

The doublesex-related Dmrta2 safeguards neural progenitor maintenance involving transcriptional regulation of Hes1.

Proc Natl Acad Sci U. S. A. 114(28), 5599-5607.

Yu YQ, Ma WM, Zeng QG, Qian YQ, Yang JS, Yang WJ. (2014)

Molecular Cloning and Sexually Dimorphic Expression of Two *Dmrt* Genes in the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.

Agric Res. 3:181–191.

Yu J, Wu H, Wen Y, Liu Y, Zhou T, Ni B, Lin Y, Dong J, Zhou Z, Hu Z, Guo X, Sha J, Tong C. (2015)

Identification of seven genes essential for male fertility through a genome-wide association study of non-obstructive azoospermia and RNA interference-mediated large-scale functional screening in *Drosophila*.

Hum Mol Genet. 24(5):1493-1503.

Yuzawa T, Matsuoka M, Sumitani M, Aoki F, Sezutsu H, Suzuki MG. (2020)

Transgenic and knockout analyses of *Masculinizer* and *doublesex* illuminated the unique functions of *doublesex* in germ cell sexual development of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Dev Biol.* 20(1):19.

-
- Zarkower D. (2006)
Somatic sex determination.
WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Zhao L, Svingen T, Ng ET, Koopman P. (2015)
Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of *Dmrt1*.
Development. 142(6):1083-1088.
- Zhang T, Zarkower D. (2017)
DMRT proteins and coordination of mammalian spermatogenesis.
Stem Cell Res. 24:195-202.
- Zhu L, Wilken J, Phillips NB, Narendra U, Chan G, Stratton SM, Kent SB, Weiss MA. (2000)
Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers.
Genes Dev. 14(14), 1750-1764.
- Zhuo JC, Hu QL, Zhang HH, Zhang MQ, Jo SB, Zhang CX. (2018)
Identification and functional analysis of the *doublesex* gene in the sexual development of a hemimetabolous insect, the brown planthopper.
Insect Biochem Mol Biol. 102:31-42.
- Zwarts L, Vanden Broeck L, Cappuyns E, Ayroles JF, Magwire MM, Vulsteke V, Clements J, Mackay TFC, Callaerts P. (2015)
The genetic basis of natural variation in mushroom body size in *Drosophila melanogaster*.
Nat Commun. 6, 10115.
- 荒武義信・栢村鶴雄 (1973)
クワコとカイコとの交雑後代から選出された”ちらばる蚕”および”小蚕”.
日本蚕糸学雑誌. 42 (4): 331-339.
- 北沢敏男・高見丈夫 (1963)
家蚕の胚発生段階表 (2).
蚕糸試験場彙報. 81: 1-3.
- 小泉修 (2016)
神経系の起源と進化: 散在神経系よりの考察.
比較生理生化学. 33(3): 116-125.
-

-
- 清水久仁光・小瀬川英一・黄川田隆洋・岡島輝雄 (1998)
蚕の行動に関する変異系統の探索と遺伝性.
蚕糸・昆虫農業技術研究所研究報告. 20: 7-18.
- 須貝悦治. (1965)
カイコにおける精子ニ型の形成と精巣皮膜のグリコーゲン.
動物学雑誌. 74: 276-282.
- 大門高明 (2014)
実践編 9 「カイコにおける TALEN を用いた遺伝子改変」
『実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ 今すぐ始めるゲノム編集 TALEN & CRISPR/Cas9 の必須知識と実験プロトコール』 (山本卓/監)
p146-147、羊土社
- 高見丈夫/著 (1968)
『蚕種総論』、I. 家畜の生殖器官
全国蚕種協会
- 高見丈夫・北沢敏男 (1960)
家蚕の胚発生段階表 (1).
蚕糸試験場彙報. 75: 1-31.
- 松岡美里. (2019)
doublesex ノックアウトカイコを用いた性分化における *Bmdsx* 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 平成 30 年度修士論文.
- 山舗直子・鴻上 (松田) 有未. (2012)
カイコの精子形成における二型性.
蚕糸・昆虫バイオテック. 81(1): 31-40.
- なお、一部を除く第一章の図 1-1, 1-2, 1-4、第二章の図 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-7, 2-8 の *Bmdmrt99B* に関するデータの出典は以下の通り
- Kasahara R, Aoki F, Suzuki MG. (2018)
Deficiency in *dmrt99B* ortholog causes behavioral abnormalities in the silkworm, *Bombyx mori*.
Appl Entomol Zool. 53, 381–393.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13355-018-0569-5>
-

一部を除く第一章の図 1-1, 1-2, 1-4, 第二章の図 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-9, 2-10, 2-11
の *Bmdmrt11E* に関するデータの出典は以下の通り

Kasahara R, Yuzawa T, Fujii T, Aoki F, Suzuki MG. (2021)

dmrt11E ortholog is a crucial factor for oogenesis of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*.

Insect Biochem Mol Biol. 129, 103517. Epub ahead of print.

[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965-1748\(20\)30206-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965-1748(20)30206-X)