

昆虫性決定遺伝子 *transformer* における自動スプライシング制御機構の解析

2017年3月修了 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野 47-156334 田中有沙

指導教員 鈴木雅京 准教授

【序論】

多くの昆虫において *transformer* (*tra*) 遺伝子は雌性決定遺伝子として働く。これは、*tra* が雌雄で異なるスプライシングを受ける結果、機能をもつ TRA タンパク質が雌だけで作られるためである。一旦 TRA が作られると、TRA は自己の pre-mRNA 上に存在する TRA-TRA2 結合シスエレメント (*dsxRE*) に結合し、雌型スプライシングを誘導することによって、TRA の産生を持続させると考えられている。この TRA における自動スプライシング制御機構モデルはチチュウカイミバエにおいて最初に提唱され、イエバエ、ツエツエバエ、クロバエなどの双翅目昆虫やセイヨウミツバチなどの膜翅目でも同様の報告がなされている。TRA に固有のドメインのうち、種間で最も高く保存されているドメイン 2 (TRA-CAM ドメインと呼ばれる) が自動制御機能を担うとの仮説が立てられている (図 1)。しかし、自動スプライシング制御機構モデルの多くの部分は仮説に基づいており、推測の域を出ないというのが現状である。そこで本研究では、カイコ培養細胞を用いた splicing assay 系を利用し、*tra* にみられる自動スプライシング制御機構について検証することにした。本研究では、自動制御を受けることが報告されているハエ目昆虫の *tra* のうち、身近な衛生害虫であるイエバエ (*Musca domestica*) の *tra* (*Mdtra*) を解析の対象とした。

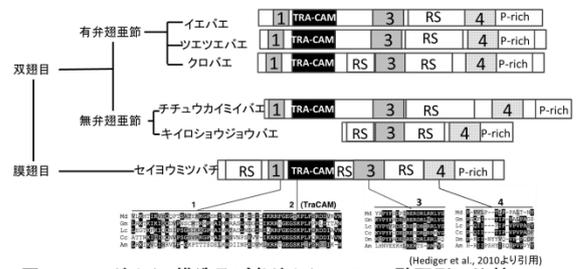


図1. TRAのドメイン構造及び各ドメインのアミノ酸配列の比較。ドメイン1~4はTRAにおいて高度に保存されたドメイン。アルギニン・セリンに富むドメインをRS、プロリンに富むドメインをP-richとして示した。

【結果と考察】

MdTRA は自身の雌型スプライシングを誘導する

MdTRA が自身の pre-mRNA の雌型スプライシングを誘導することができるか評価するため、*Mdtra* のエクソン 1 から 4 までのゲノム断片をカイコ培養細胞発現用ベクターに組み込み、*Mdtra* ミニ遺伝子を構築した (図 2A)。MdTRA タンパク質を発現させるため、*Mdtra* の完全長 ORF を昆虫培養細胞タンパク質発現用ベクターに組み込み、MdTRA 発現コンストラクトとした。これらをカイコ培養細胞 (BmN 細胞) にコトランスフェクションし、*Mdtra* ミニ遺伝子のスプライシングパターンを図 2A に示したプライマーを用いた RT-PCR により確認した。雌型スプライシングは雄特異的なエクソンを含まないため、雄型スプライシングより短い *Mdtra* が増幅される (図 3)。RT-PCR の結果、MdTRA 存在下でのみ雌型のスプライシングがみられることがわかった (図 2B)。

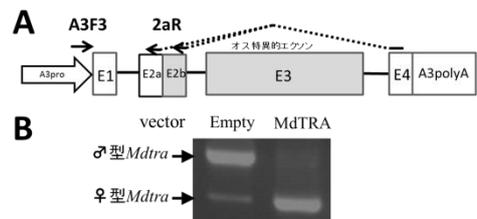


図2. MdTRAはMdtraの雌型スプライシングを誘導する。Mdtraミニ遺伝子とMdTRA発現ベクターをトランスフェクション後、A3F3と雌型雄型両方のスプライシングを検出する2aRプライマーを用いてRT-PCRを行った。

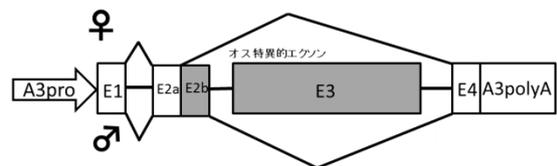


図3. Mdtraミニ遺伝子の構造とスプライシングにみられる雌雄差。ミニ遺伝子はスプライシングに雌雄差がみられるMdtra遺伝子領域からなる。雄特異的なエクソンを灰色のボックスで示した。

このことから、*Mdtra* の雌型スプライシングは MdTRA 自身により誘導されることが明らかとなった。

MdTRA の雌型スプライシング活性に必要なドメインの同定

MdTRA は種間で保存された機能未知ドメインを4つもつ。雌型スプライシングに必要なドメインを特定するため、様々な欠失変異型 MdTRA (図 4) を作製し、*Mdtra* ミニ遺伝子の雌型スプライシングに及ぼす変化を RT-PCR により調べた。その結果、これら4つのドメインのうち TRA-CAMドメインを含むドメイン2が雌型スプライシングにとって最も重要であることが判明した(図 5)。

MdTRA の雌型スプライシング活性には TRA-CAMドメイン内の3アミノ酸が必須である

TRA-CAMドメインにおいて最も保存されている18アミノ酸領域について様々な欠失変異型 MdTRA (図 6A) を作製し、雌型スプライシングに及ぼす変化を RT-PCR により調べた。その結果、18アミノ酸領域において唯一 3アミノ酸が連続して保存されている領域(65番目から67番目のGEG)を欠失すると、雌型スプライシングが起こらなくなることがわかった。このGEGをAAAに置換した変異型 MdTRA も雌型スプライシング能をもたないことから、この3アミノ酸が雌型スプライシングにとって必須であることが判明した(図 6B)。

MdTRA は dsxRE を介して自己の pre-mRNA に結合する

MdTRA が dsxRE を介して自身の pre-mRNA に結合するか否かを検証するため、MdTRA と先行研究によって同定されたシスエレメント(dsxRE1 と dsxRE2)の間の相互作用を RIP-qPCR によって確認した(図 7A)。その結果、MdTRA は dsxRE1 に比べ dsxRE2 により強く結合することが明らかとなった。さらに、上述の GEG 欠失変異型 MdTRA 及び GEG を AAA に置換した変異型 MdTRA はいずれも dsxRE2 への結合能をもたないことが判明した(図 7B)。

【結論】

本研究により、MdTRA が dsxRE を介して自己の pre-mRNA に結合し、雌型スプライシングを誘導する自動制御機能をもつことを明らかにすることができた。また、MdTRA が雌型スプライシングを誘導する上で、TRA-CAMドメインを含むドメイン2が最も重要な役割をもつこと、さらに TRA-CAMドメイン内において最も保存されている3アミノ酸が dsxRE に結合する上で必須であることがわかった。以上本研究により、*tra* における自動スプライシング制御機構モデルが妥当であることを証明することができた。

キーワード: 性決定遺伝子, *transformer*, スプライシング, イエバエ

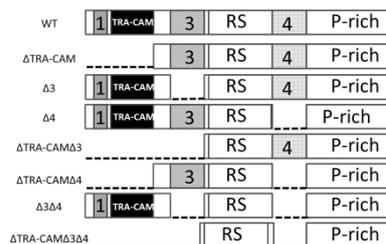


図4.構築した欠失変異型MdTRAの構造



図5.各ドメインの欠失がMdtraミニ遺伝子のスプライシングに及ぼす影響 Mdtraミニ遺伝子と図4に示した欠失変異型MdTRA発現コンストラクトをコトランスフェクション後、図2に示した方法と同様のRT-PCRを行った。

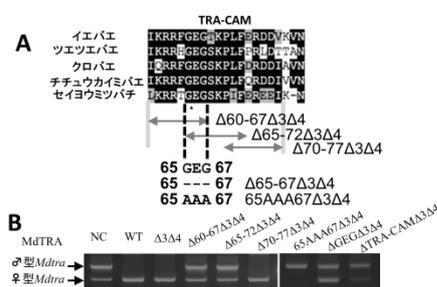


図6.雌型スプライシングに重要なTRA-CAM内アミノ酸配列の同定 Mdtraミニ遺伝子とTRA-CAMドメイン内のアミノ酸配列に変異をもつMdTRA発現コンストラクトをコトランスフェクション後、図2に示した方法と同様のRT-PCRを行った。

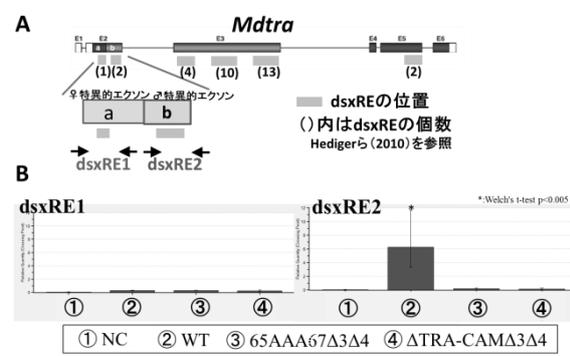


図7. RIP-qPCRによるMdtra pre-mRNAとMdTRAの結合の確認 (A)Mdtra pre-mRNA上のdsxREの位置を示す。dsxRE1とdsxRE2において結合の確認を行った。(B)Mdtraミニ遺伝子と変異型MdTRA発現コンストラクトをコトランスフェクション後、RIPを行い、図に示したプライマーを用いたqPCRを行った。