

カイコ胚子期におけるエクダインとその関連遺伝子に関する性差の解析

2017年 47156352 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野 松島大二朗

指導教員 鈴木雅京 准教授

【序論】

哺乳類では、性決定シグナルによって生殖巣が形成され、生殖巣内で産生された性ホルモンによって性分化が誘導される。これに対して、昆虫は雌雄モザイクとなる個体が存在することから細胞自律的に性分化が誘導されると考えられており、性ホルモンをもたないというのが通説である。しかしながら昆虫はエストロゲンやテストステロンなどの性ホルモンと同じステロイドホルモンであるエクダインをもつことが知られており、エクダインの活性型である 20-hydroxyecdysone (20E) が昆虫の性的二型の性分化に関わるといふ知見が存在する。例えば、直翅目では 20E が雌の成虫において oocyte や vitellogenin の早熟を誘導すること、双翅目では 20E 量が雌の成虫において雄よりも多いこと、鱗翅目では蛹期において雄の成虫においてエクダイン量が雌よりも多く、エクダインと 20E の比が 4 倍であることなどが報告されている。こうした知見に基づき、De Loof (1998) は胚発生時期における 20E 量の性差が性分化に決定的な役割をもつとの仮説を立てたが、これを支持する証拠は得られていない。

本研究では、この仮説を検証するために卵色に基づいて雌雄を見分けることのできるカイコ系統を用い、胚子期における 20E 量やエクダイン関連遺伝子の発現量を雌雄間で経時的に比較することによって、エクダインと性分化の関係を明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

胚子期における 20E の定量

まず、胚子期におけるエクダインと 20E 量を雌雄間で比較するために質量分析装置 LC-MS/MS を用いた定量分析を試みた。卵色で雌雄鑑別することが可能である S-2 系統を用いて、産下後 2~10 日目の雌雄の卵を経時的にサンプリングし、ブタノール・ヘキサン抽出により得られた抽出物を LC-MS/MS で分析した。その結果、エクダインを正確に同定することができなかったが、20E 量については雌雄いずれの卵においても発生が進むにつれて増加し、産下後 6 日でピークを迎え、その後は減少することがわかった(図 1)。しかし 20E 量に明瞭な雌雄差はみられなかった。

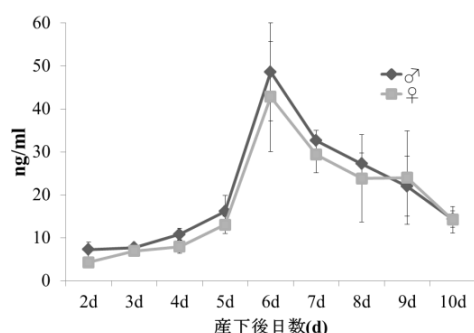


図1 カイコ胚子期における20E量の経時変化
エラーバーは標準偏差。

エクダイン関連遺伝子の経時的な発現量解析

次に、卵においてエクダインと 20E の生合成に関わる酵素遺伝子の発現量について調べた。卵において大量に蓄積されているエクダイン 22-リン酸を脱リン酸化し、遊離型エクダインを産生するエクジステロイドリン酸脱リン酸化酵素 (EPPase) と、エクダインから 20E を産生するエクダイン 20-水酸化酵素 (20EOHase) 各々をコードする遺伝子の発現量を qRT-PCR により

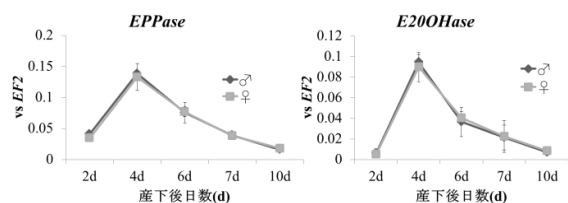


図2 胚子期におけるエクダイン合成関連酵素遺伝子の発現量の経時変化
エラーバーは標準偏差。

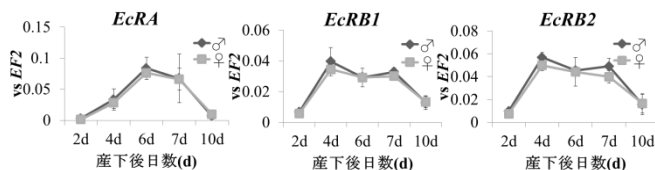


図3 胚子期における20E受容体遺伝子の発現量の経時変化
エラーバーは標準偏差。

定量したところ、いずれにおいても性差はみられなかった(図2)。20E量に応じて発現量が変動する20Eの受容体遺伝子 *EcR* のアイソフォームや、エクダイソン初期応答遺伝子として知られる *E75* などについても同様の解析を行ったが、いずれの遺伝子についても発現量に性差はみられず、発現パターンも雌雄で概ね一致していた(図3、4)。以上の結果から、胚子期における20E量やエクダイソン関連遺伝子の発現量には性差がないと考えられる。

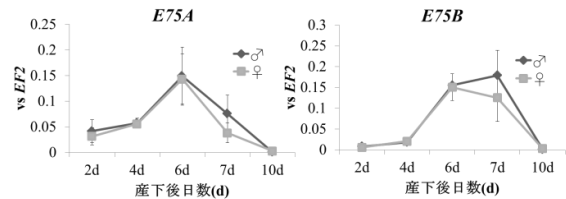


図4 胚子期におけるエクダイソン応答遺伝子の発現量の経時的変化
エラーバーは標準偏差。

***EPPase* のノックダウンが *Bmdsx* の発現に及ぼす影響**

次に、エクダイソン合成量を人為的に変化させた場合に性分化にどのような影響がみられるか調べることにした。そこで、卵内のエクダイソン供給に関わる *EPPase* のノックダウンが性分化のマスター遺伝子 *Bmdsx* の発現に及ぼす影響を調べた。図5に示したように、*EPPase* をノックダウンに伴い、エクダイソン応答遺伝子である *EcR* と *E75* の発現量の減少がみられた。同様に、雌雄の胚子において *Bmdsx* の発現量も有意に減少することが明らかになった(図6)。

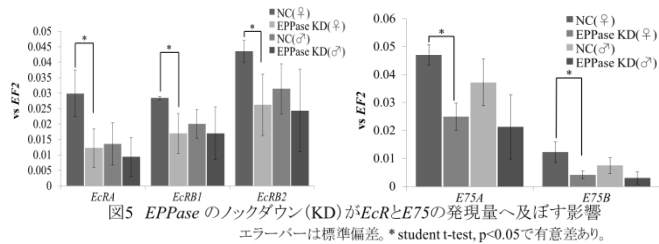


図5 *EPPase* のノックダウン(KD)が *EcR* と *E75* の発現量へ及ぼす影響
エラーバーは標準偏差。* student t-test, p<0.05で有意差あり。

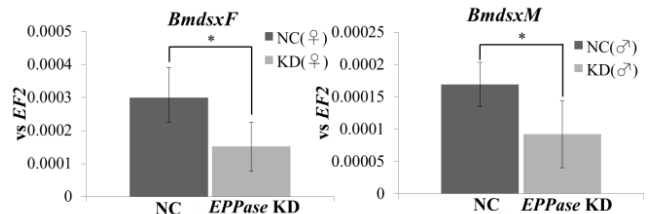


図6 *EPPase* のKDが *Bmdsx* の発現量に及ぼす影響
エラーバーは標準偏差。* student t-test, p<0.05で有意差あり。

***EcR* と *E75* のノックダウンが *Bmdsx* の発現量に及ぼす影響**

EPPase ノックダウンにより *Bmdsx* の発現量が減少したことから、*EPPase* の下流の遺伝子が *Bmdsx* の発現量を制御している可能性がある。そこで、*EPPase* をノックダウンした際に発現量が顕著に減少した *EcR* もしくは *E75* をノックダウンしたときの *Bmdsx* の発現量を調べた。その結果、*EcRA* をノックダウンすると、雌雄の胚子における *Bmdsx* の発現量が有意に減少することがわかった(図7)。

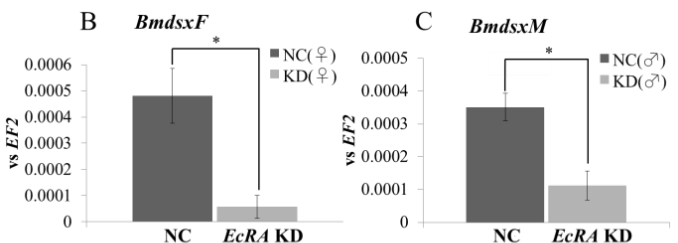


図7 *EcR* のKDが *Bmdsx* の発現量に及ぼす影響
エラーバーは標準偏差。* student t-test, p<0.05で有意差あり。

【結論】

本研究により、胚子期における20E量やエクダイソン関連遺伝子の発現量に性差がみられなかったことから、少なくともカイコについてはDe Loofが提唱した仮説は当てはまらないことが明らかになった。一方で、本研究の結果はエクダイソンシグナル伝達経路が *Bmdsx* の発現量の制御に関わることを強く示唆していた。*Bmdsx* の発現量は、胚発生の進行に伴い20E量の増減に同調した形で変化することが確認された(図8)ことから、エクダイソンシグナル伝達経路は胚発生に伴う *Bmdsx* の発現量を制御することで、性分化の誘導に助力すると予想される。

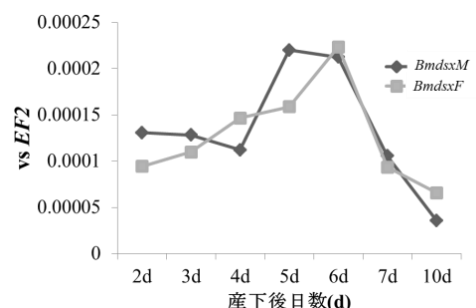


図8 胚発生の進行に伴う雌雄の胚子における *Bmdsx* の発現量の変化

キーワード: エクダイソン、性分化、*Bmdsx*、カイコ