

# 論文の内容の要旨

論文題目      カイコの雌決定遺伝子 *Fem* の同定とその機能解析

氏名          酒井 弘貴

## 【序論】

昆虫の性決定カスケードの最下流で働く *doublesex* (*dsx*)は、雌雄で異なるスプライシングを受けることで雌分化、雄分化を誘導する。ショウジョウバエの場合、*dsx* の雌型スプライシングには *tra* と *tra-2* が必要である (Nagoshi and Baker, 1990)。同様の制御機構は複数の双翅目、膜翅目、甲虫目で報告されている。それゆえ *tra* と *tra-2* による *dsx* のスプライシング制御は、昆虫において広く保存されていると考えられていた。しかし、近年様々な昆虫の全ゲノム解読が進むにつれて、*tra* をもたない昆虫も多数存在することが明らかになりつつある (Geuverink and Beukeboom, 2014)。*tra* をもたない昆虫で、最も性決定機構の研究が進んでいる種としてカイコがあげられる。カイコの性決定カスケードの最下流で働く遺伝子は *dsx* のカイコホモログである *Bmdsx* である。*Bmdsx* は基底状態で雌型のスプライシングを受け (Suzuki et al., 2001)、雄型のスプライシングには *BmPSI* と、あらゆる組織で雄特異的に発現する *Imp<sup>M</sup>* が関与する (Suzuki et al., 2010)。カイコの性は、性染色体構成が ZW であると雌に、ZZ であると雄になることから W 染色体には優性の雌決定遺伝子 *Fem* (*Feminizer*)が存在すると考えられている (橋本 1933, Tazima 1978)。この *Fem* を同定する試みは国内外のグループにより繰り返されてきたが、その正体は依然として謎のままである。W 染色体に座乗する優性雌決定遺伝子の存在は、魚類、両生類、鳥類、爬虫類などでも報告されているが、遺伝子の実体が同定された例は、アフリカツメガエルの *DM-W* だけである。

そこで本研究では、雌決定機構についての理解を深めるため、カイコの *Fem* を同定することにした。複数の動物種において、性決定の最上流遺伝子は性が決まる時期に一過的に発現する場合は報告されている。同様に *Fem* も、性決定の起こる時期に一過的に発現する可能性が考えられるが、カイコの性決定時期は明らかとなっていない。そこで本研究では、カイコの性決定時期を特定すると共に、その時期の雌雄のトランスクリプトームを網羅的に比較し、雌で特異的に発現する遺伝子に焦点を当てた解析をすることにした。その結果、同定された W 染色体特異的遺伝子が *Fem* であることを示唆する結果が得られた。

## 【結果と考察】

### カイコにおける性決定時期の特定

性決定は胚発生の特定の段階で起こると予想される。そこで卵巣卵、並びに産下後 12、24、48、120 時間の卵 1 粒ずつから total RNA を抽出し、各時間において採取した 9 粒の卵における *Bmdsx* 並びに *Imp<sup>M</sup>* の発現パターンを RT-PCR によって解析した。産下後 24 時間では調査したすべての個体で雌型 *Bmdsx*、雄型 *Bmdsx* 並びに *Imp<sup>M</sup>* の発現がみられたが、産下後 48 時間以降では雌型 *Bmdsx*

のみが発現する個体と雄型 *Bmdsx* 及び *Imp<sup>M</sup>* が発現する個体とに分かれた。これは雌型 *Bmdsx* のみが発現する個体が雌であり、雄型 *Bmdsx* 及び *Imp<sup>M</sup>* が発現する個体が雄であると考えるのが最も妥当である。したがって、カイコの性決定は産下後 24 時間から 48 時間の間に起こる可能性が高いと推察することができる。性決定時期を絞り込むために、卵色に基づいて雌雄鑑別可能な S-1 系統を用いて雄卵と雌卵を分け、同様の解析を行ったところ、産下後 29 時間までの雌卵では雌型 *Bmdsx* に加え *Imp<sup>M</sup>* と雄型 *Bmdsx* の発現がみられたが、32 時間の雌卵では雌型 *Bmdsx* の発現だけがみられた (図 1a)。以上の結果は、*Imp<sup>M</sup>* と *Bmdsx* の発現パ

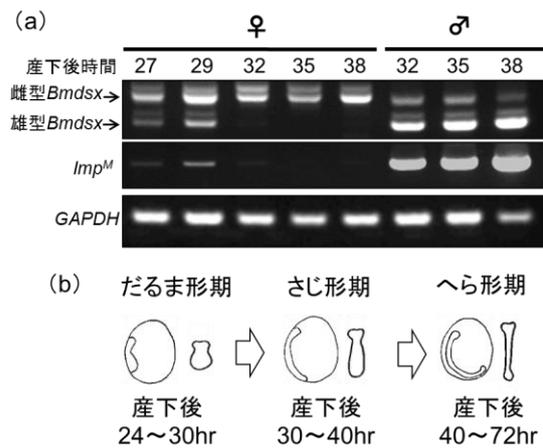


図1. *Bmdsx*及び*Imp<sup>M</sup>*の発現パターンを指標とした性決定時期の推定。(a)産下後の時間経過に伴う*Bmdsx*及び*Imp<sup>M</sup>*の発現パターンの推移。32時間より前の時点では雄卵を識別できないため、雄については32時間以後の結果のみ掲載。(b)カイコの胚発生段階と、各段階における胚子の形の模式図

ターンに完全な性的二型が現れるのは産下後 32 時間以後であり、性決定が起こるのはそれより前の時期、即ち産下後 29 時間から 32 時間の間であることを示している。この時期はさじ形期の初期にあたることから、カイコにおいて性決定はさじ形期に起こると推察できる (図 1b)。また、胚発生初期の雌では雄分化に関わる雄型 *Bmdsx* と *Imp<sup>M</sup>* が一旦発現し、やがて消失することもわかった。このことから、カイコでは性決定カスケードの上流の遺伝子である *Fem* の働きにより雄型 *Bmdsx* や *Imp<sup>M</sup>* など雄分化に関わる遺伝子発現が抑制を受け、その結果雌への分化が起こると予想された。

## W 染色体特異的遺伝子の同定

性決定時期であることが判明したさじ形期に相当する卵より精製した total RNA を *de novo* トランスクリプトーム解析に供試した。*de novo* アセンブリの結果得られた 54,438 個の推定遺伝子 (unigene) のうち、雄に比べ雌で 8 倍以上の高い FPKM 値を示した unigene は 149 個であった。W 染色体の遺伝子を選抜するため、これらの unigene の塩基配列を query としてカイコの雄ゲノムシーケンスが登録されている KAIKOBASE を対象とする blastn サーチを行い、常染色体と Z 染色体の遺伝子を除外した。その結果、10 個の unigene が W 染色体由来であると推察された。これらの unigene についてゲノム PCR による解析を行った結果、2 つの unigene がカイコ及びその近縁種であるクワコのメスゲノムにのみ存在することが判明した (図 2)。また、RT-PCR の結果からこれら 2 つの unigene が実際には同一の遺伝子由来であることが明らかとなった。そこでこれら 2 つの

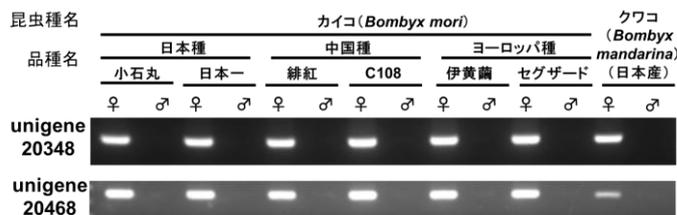


図2. カイコとクワコのゲノムDNAを鋳型に用いたPCR解析。カイコについては、6種類の蚕品種の雌雄から抽出したゲノムDNAを用いた。クワコはカイコの近縁種であり、本実験では日本の在来種を供試した。10個のunigeneのうち、2個のunigene (図中unigene20348と20468) が雌ゲノム特異的であることがわかった。

unigene をコードする遺伝子を *Female Expressed Transcript-W-chromosome (FET-W)* と名付けた。*FET-W* がコードする ORF の長さは短く、相同性を示すタンパク質がみられなかったため non-coding RNA として機能している可能性が考えられた。

## FET-W の機能解析

FET-W が性決定に関わるのか調査するため、non-coding RNA のノックダウンに有効な LNA-DNA gapmer を用いた機能抑制実験を行った。その結果、FET-W ノックダウン雌胚子において対照区の雌ではみられなかった雄型 *Bmdsx* と *Imp<sup>M</sup>* の発現が誘導された (図 3a,b)。FET-W の機能抑制が性分化に及ぼす影響を調べるため、1 齢幼虫の生殖巣を Calcein-AM 染色試薬を用いた観察法で調査した結果、FET-W LNA-DNA gapmer を注射した卵から孵化した幼虫の卵巢において、卵巢小管の数が減少し、残った卵巢小管が肥大化する形態異常が観察された (図 3c)。

FET-W が W 染色体特異的遺伝子であること、その機能を抑制すると雌において雄型 *Bmdsx* と *Imp<sup>M</sup>* の発現が誘導され、卵巢に異常が引き起こされたことから、FET-W は *Fem* の有力候補だと考えられる。FET-W は、東京大学農学部勝間准教授らが同時期に *Fem* の候補として同定した遺伝子と同一のものであることがわかったため、FET-W を *Fem* の実体であるとみなしてさらに解析を続けた。

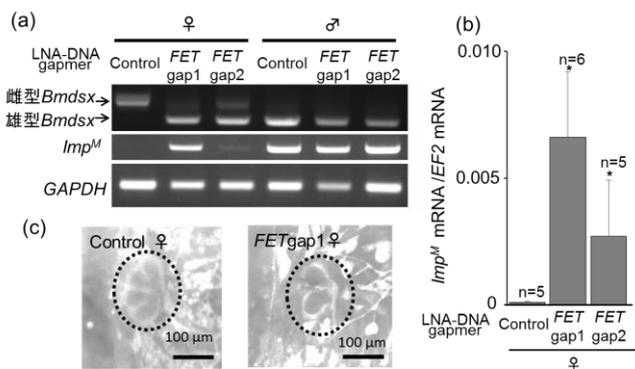


図3. FET-Wノックダウンが性分化に及ぼす影響。(a) FET-Wを標的とするLNA-DNA gapmer (図中FETgap1、FETgap2)を注射した雌雄の卵における*Bmdsx*と*Imp<sup>M</sup>*の発現をRT-PCRにより調べた。(b) *Imp<sup>M</sup>*の発現量についてはqRT-PCRによる定量も行った。(c) FETgap1を注射した卵から孵化した1齢幼虫雌の卵巢(右写真、点線内)。左の写真点線内はcontrol雌の卵巢。通常、正常な卵巢では4つの卵巢小管が形成される。

## Fem-piRNA 耐性型 Masc の発現が雌の性分化に及ぼす影響

*Fem* は small RNA の一種である piRNA の前駆体として働き、この *Fem*-piRNA は Z 染色体上の新規遺伝子 *Masc* (*Masculinizer*) 由来の mRNA を分解することがわかっている (Kiuchi et al., 2014)。Masc の発現をノックダウンすると雄で *Bmdsx* の雌型スプライシングが誘導されることから、Masc はカイコの雄化に関わると予想されている。そこで私は、Masc を雌において発現させれば雄化が誘導されるのではないかと考え、Fem-piRNA による分解を受けない *Fem*-piRNA 耐性型 *Masc* (*Masc-R*) をもつ遺伝子組換え系統 Sumi13-3 を用いた解析を行うことにした。この Sumi13-3 は第 9 番染色体上に組換え遺伝子が挿入されており、全身で *Masc-R* の発現を示す

ことがわかっている。まず、*Masc-R* をヘテロにもつ ZW 雌 (*Masc-R/+*雌) における性的二型について以下の調査を行った。卵黄タンパク質の前駆体で *Bmdsx* の直接の標的遺伝子として知られる vitellogenin 遺伝子 (*BmVg*) は、雌の脂肪体で合成される。脂肪体における *BmVg* の発現量を qRT-PCR によって定量した結果、+/+雌と比較して *Masc-R/+*雌では *BmVg* の発現量が有意に減少していた (図 4a)。体液中に分泌された *BmVg* タンパク質の発現量を SDS-PAGE によって調査したところ、+/+雌でみられた *BmVg* タンパク質が *Masc-R/+*雌ではほとんど検出されず、体液タンパク質のパターンは+/+雄に酷似していた (図 4b)。次に、*Masc-R/+*雌の生殖巣を観察したところ、

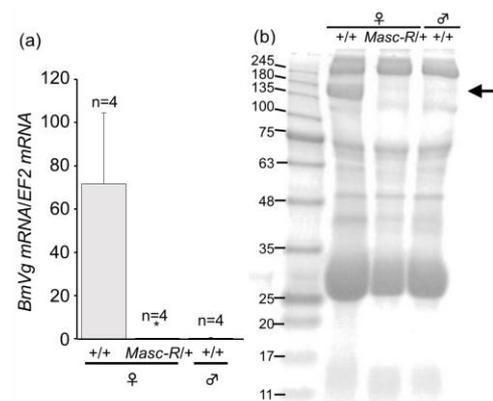


図4. 脂肪体における*BmVg*遺伝子の発現解析と体液中の*BmVg*タンパク質の発現量。(a) 蛹化直後の脂肪体における*BmVg* mRNAの発現量をqRT-PCRにより定量した結果。(b) 蛹化直後の体液をSDS-PAGEによる分離後CBB染色した結果。*BmVg*タンパク質を矢印で示した。

供試した全ての5齢3日目幼虫の卵巣において卵巣小管端部に精巣に類似した組織が認められた(図5a)。RT-PCR解析の結果、この精巣類似の組織では雄型 *Bmdsx* の発現がみられただけでなく、精巣特異的遺伝子として知られる *BmR1* が発現していた(図5d)。さらに蛹期においてこの精巣類似の組織を解剖したところ、内部に精子束を含むことが確認された(図5e)。以上の結果は、*Masc-R/+*雌の卵巣が部分的に精巣化したことを示している。次に成虫における外部形態を観察したところ、*Masc-R/+*雌には異常がみられなかったものの、調査した全ての *Masc-R/Masc-R* 雌において雄に特異的な第8腹節の形成が認められた(図6)。さらに、*Masc-R/Masc-R* 雌の外部生殖器を詳細に調査したところ、雄の外部生殖器で特異的に形成される鉤器と類似の組織が形成されていた。このように、*Masc-R* を雌で強制発現させることで脂肪体や生殖巣、生殖細胞や外部形態に雄化の特徴が誘発されたことから、*Masc* はカイコにおいて雄化にかかわる重要な遺伝子であると推察できる。

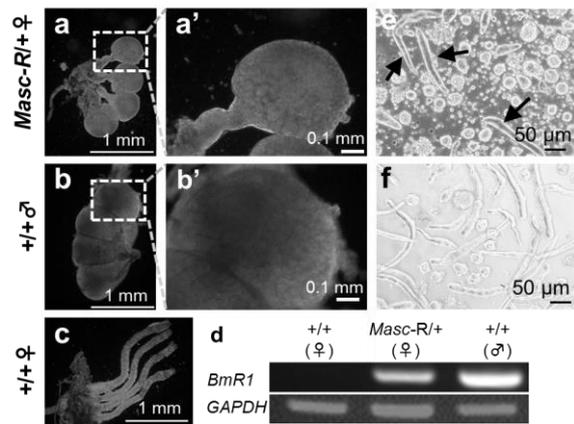


図5. 生殖巣の観察。(a-c)5齢3日目幼虫における生殖巣。(a') (a)の点線部の拡大写真。(b') (b)の点線部の拡大写真。(d)それぞれの生殖巣における精巣特異的遺伝子 *BmR1* の発現。(e) *Masc-R/+*雌の精巣類似組織内にみられた精子束(図中矢印)。(f) *+/+*雄の精巣内にみられた精子束。精子は集まって細長い形状の束を形成する。

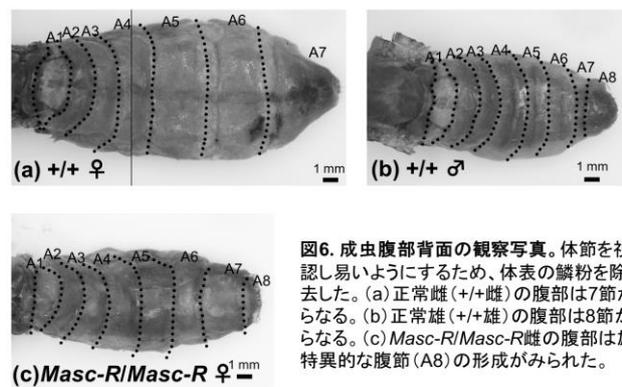


図6. 成虫腹部背面の観察写真。体節を視認し易いようにするため、体表の鱗粉を除去した。(a)正常雌(+/+雌)の腹部は7節からなる。(b)正常雄(+/+雄)の腹部は8節からなる。(c) *Masc-R/Masc-R*雌の腹部は雄特異的な腹節(A8)の形成がみられた。

## 【まとめ】

本研究の結果から考えられるカイコ性決定カスケードのモデルを図7に示した。雌において *Fem* は雌特異的な染色体である W 染色体から転写され、piRNA を介して *Masc* mRNA を分解する。*Masc* 非存在下では *Imp<sup>M</sup>* の発現が起こらず、その結果 *Bmdsx* は基底状態のスプライシングを受け、雌型のスプライスアイソフォームを生じ雌分化が誘導される。これに対して雄では、*Masc* が *Fem* による分解を受けない。*Masc* は、下流の遺伝子である *Imp<sup>M</sup>* の発現を直接もしくは間接的に誘導する。*Imp<sup>M</sup>* は *Bmdsx* の雄型スプライシングを引き起こし、その結果雄分化が誘導される。本研究の成果より、*Masc* がカイコの生殖細胞や体細胞における雄分化にとって極めて重要な働きをもつことが明らかとなった。したがって、W 染色体に座乗し、雄化遺伝子 *Masc* の発現を直接抑制する機能をもつ *Fem* は、かつて橋本が 1933 年に報告した優性の雌決定遺伝子の実体であるといえる。以上本研究により、100 年近く謎であったカイコの *Fem* の正体が明らかとなり、その下流の標的遺伝子である *Masc* がカイコの雄化にとって重要な機能をもつことを明らかにすることができた。

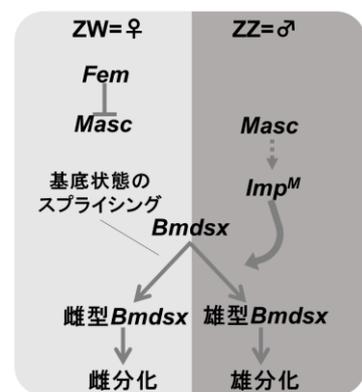


図7. カイコの性決定カスケードモデル