

# ノックアウトカイクを用いた Doublesex 関連転写因子 Dmrt の機能解析

学生証番号:166315 資源生物制御学分野 笠原良太

## 【序論】

有性生殖を行う動物において、性分化が正常に行われることは種の存続に必須の現象である。性分化因子には分類群を超えて一定の保存性がみられ、特に DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインによって特徴づけられる DMRT (Doublesex-Mab3 related transcription factor) という転写因子群はほぼすべての動物種のゲノムに保存され性分化に重要な役割を果たす。DMRT の名称の由来でもある昆虫種の *doublesex (dsx)* は、ショウジョウバエの *dsx* 変異体が雌雄の中間型の形質を示すため、昆虫の性分化を包括的に制御する因子とみなされていたが、近年ショウジョウバエ以外のいくつかの昆虫において *dsx* によらない性分化の存在が示唆されつつある。たとえばカイクの *dsx* ノックアウト個体を用いた解析によって、いくつかの生殖器官の性分化が *dsx* 非依存的に起こることが確認されている。しかし、こうした *dsx* 非依存的な性分化を制御する因子についての解析は全く行われていない。そこで本研究では、*dsx* 非依存的な性分化因子を明らかにすべく、*dsx* の同属遺伝子である DMRT に着目し、*dsx* 非依存的な性分化が確認されているカイクを用いてその機能を明らかにしようと考えた。

## 【結果と考察】

### カイク DMRT 遺伝子の発現解析

カイクゲノム上の DMRT 遺伝子を同定するため、カイクゲノムデータベースである KAIKObase 上で DM ドメインを含む遺伝子を検索し、*Bmdsx* 以外に 3 種を同定した。他生物の DMRT との相同性に基づき、これらをそれぞれ *Bmdmrt93B*, *Bmdmrt99B*, *Bmdmrt11E* と命名した (以降、これら遺伝子をそれぞれ *93B*, *99B*, *11E* と呼称する)。RT-PCR によりこれらの遺伝子の 5 齢幼虫における発現部位を調べたところ、*99B* と *11E* が卵巣、*93B* が精巣で高発現することがわかった (図 1)。それに加え *93B* と *11E* では脳を除く頭部、*99B* では脳において雌雄共通の発現が見られた (図 1, 頭部 (脳以外)、脳)。これら遺伝子は幼虫期特異的に発現しており、蛹・成虫期には発現がほとんど見られなかった。

### ノックアウトカイクを用いた *Bmdmrt99B* の機能解析

卵巣特異的な発現を示した *99B* の機能を推定するため、5 齢 3 日目幼虫の卵巣を用いた *in situ* hybridization により *99B* の発現部位を調べた。その結果、*99B* は卵巣小管内で発現していることがわかった。さらに *99B* の機能を解析するため、CRISPR/Cas9 による変異誘導を行った。その結果、開始コドンを含む上流配列 678 塩基を欠失した系統 ( $\Delta 678$ ) と 14 塩基を欠失した系統 ( $\Delta 14$ ) を樹立することができた。*99B* が卵巣特異的な発現を示したことから、*99B* 変異が卵巣の形態や卵形成に及ぼす影響について調べることにした。その結果、卵巣の形態には異常が認められなかったものの、 $\Delta 14$  ホモ雌における造卵数の有意な減少が

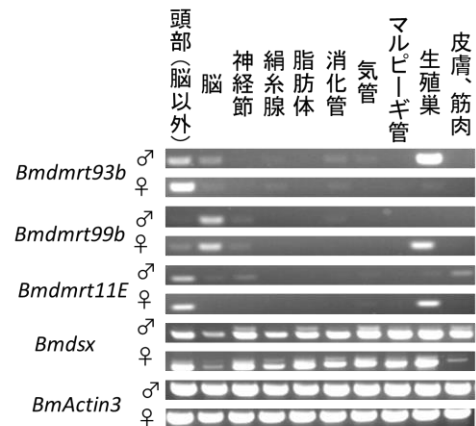


図1. カイクDMRT遺伝子の発現解析  
カイクN4系統の5齢3日目幼虫の各種組織におけるDMRT (*Bmdmrt93B*, *99B*, *11E*) の発現をRT-PCRにより調べた

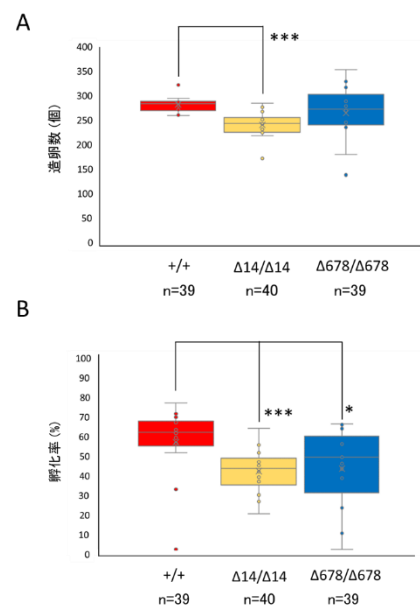


図2. *99B*変異体雌の造卵数(図中A)と産下卵の孵化率(図中B)

認められた(図 2A)。また、変異体雌の産下した卵の孵化率も野生型と比べ有意な減少が認められた(図 2B)。

次に、*99B* が脳でも高発現していた点に着目し、*99B* の変異が行動に及ぼす影響を調べることにした。幼虫期においては餌の探索能力を、成虫期においては性フェロモン源に対する探索能力を定量し、嗅覚刺激に対する応答行動を評価した。その結果、 $\Delta 678$  ホモ個体、 $\Delta 14$  ホモ個体どちらの場合でも嗅覚刺激源を探索する能力が有意に低下していることがわかった(図 3A、B)。

### TALEN による *Bmdmrt93B* の機能解析

精巣特異的な発現を示した *93B* の機能解析を行うべく、TALEN を用いて第 1 エキソンを標的とした変異誘導を行った。G<sub>0</sub>世代において 5 齢幼虫の精巣を観察したところ、標準系統に比べて顕著な萎縮が見られた。特に強く萎縮が認められた精巣内の精子を観察したところ、精子数の減少や精子形成の遅延が見られた(図 4A)。次に G<sub>0</sub>雄成虫の内部生殖器を観察した結果、付属腺や輸精管、射精管の縮退や貯精嚢の萎縮が認められた(図 4B)。これらの雄の内部生殖器官の性分化は、*Dsx<sup>M</sup>* 非存在下でも正常に起こることが本研究室の先行研究により確かめられている。以上の結果から、*Bmdsx* 非依存的に起こる雄内部生殖器の性分化が *93B* により制御される可能性が強く示唆された。

精子成熟にエクダインによる刺激が必要であることが古くから知られている。上述の解析により精子形成に関わることが示唆された *93B* の発現がエクダイン刺激に応じて増加することを確認するため、精巣を培養し、培地中にエクダインアナログであるポナステロン A を添加したところ、ポナステロン A の濃度依存的に *93B* の発現量が増加することがわかった(図 5)。以上の結果は、*93B* がエクダイン刺激に応答することで精子形成を制御する可能性を示唆している。

### 【結論】

カイコでは、雄の内部生殖器のほかいくつかの生殖器官の性分化が *Bmdsx* 非依存的に起こる。本研究により、こうした *dsx* 非依存的な性分化を制御する因子として DMRT に着目し、実際に *Bmdmrt93B* が精子形成や雄の内部生殖器の分化に関わる機能をもつことを明らかにすることができた。一方、DMRT は多くの生物で性分化だけでなく、神経系の分化を制御する上で重要な機能をもつことが近年明らかになりつつある。本研究においても、*Bmdmrt99B* が嗅覚刺激に応答する行動を制御する上で重要な機能をもつことを明らかにすることができた。

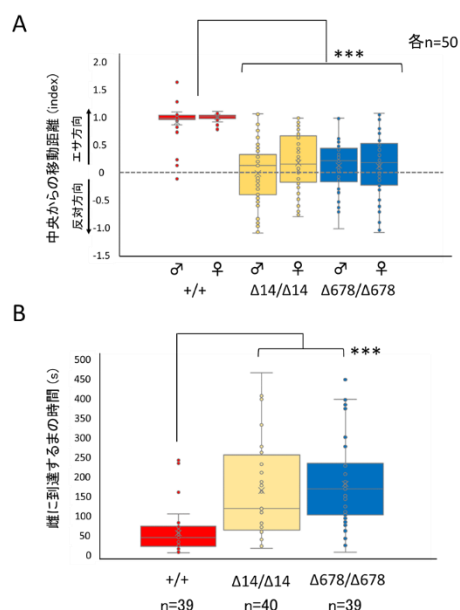


図3. *99B*変異幼虫の餌探索行動の評価(図中A)と同変異雄のフェロモン源探索行動の評価(図中B)

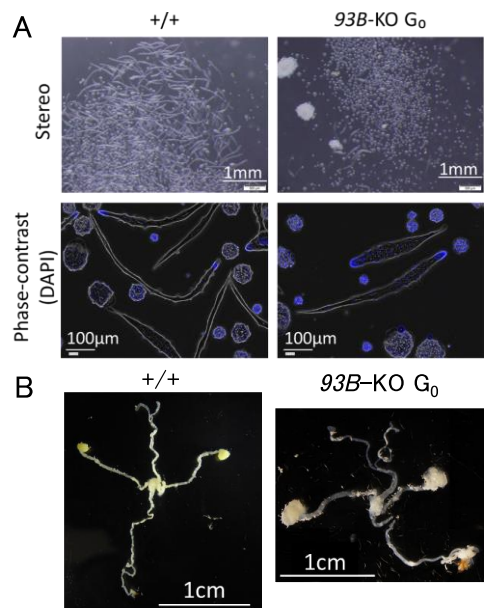


図4. *93B* TALEN G<sub>0</sub>個体にみられた萎縮した精巣内の精子(図中A)と雄の内部生殖器(図中B)

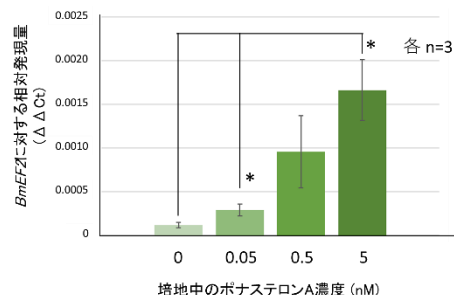


図5. ポナステロンAによる刺激が精巣における *93B* の発現量に及ぼす影響