

【キーワード】 ショウジョウバエ、doublesex、branchless、性分化

【序論】

性的二型はあらゆる生物種の行動・形態・生理において広くみられ、それらは多様性に富んでいるが、広く共通して見られる性的二型が生殖器である。有性生殖を行う生物にとって、生殖器の正常な性分化は雄と雌の間で配偶子の交換を行う上で非常に重要である。故に、生殖器の性分化に関わる発現制御機構の一部はあらゆる生物種間で広く保存されていると考えるのは妥当である。DM(doublesex and mab-3)ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを持つ転写因子(DMRT: doublesex and mab-3 related transcription factor) は無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存され、その多くが生殖器の性分化を制御する上で重要な役割をもつことが知られている。DMドメインはショウジョウバエの doublesex (dsx) 遺伝子から産生される DSXタンパク質において初めて見つけられた DNA 結合モチーフであり、ショウジョウバエの体細胞の性分化の大部分も DSX によって決まる。DSX の標的遺伝子のうち、生殖器の性分化に責任をもつ遺伝子を同定することは、多くの生物に共有されている性的二型を生み出す共通の制御機構を理解する助けとなるはずだ。しかし、これまでに同定された DSX の標的遺伝子のうち、雄の生殖器の性分化に関わる遺伝子は同定されていない。この点に注目し、当研究室の先行研究では生殖器原基において性特異的発現を示す遺伝子の中から DSX の直接の標的遺伝子の探索が行われた。その結果、*lz* (*lozenge*) と *branchless* (*bnl*) が候補遺伝子として選抜された。雌の内部生殖器の分化に関わる *lz* については DSX の直接の標的遺伝子であることが明らかにされたが、*bnl* については未だ DSX の直接の標的であるかどうかわかっていない。*bnl* は輸精管などの形成に必須であり、雄の生殖器原基において特異的に発現することが知られている。そこで本研究では、*bnl* の生殖器原基における雄特異的発現が DSX によって直接制御されているかどうかを検証することにした。

【結果と考察】

bnl における予測 DSX 結合部位の探索

bnl が DSX により直接制御されるのであれば、*bnl* 遺伝子上、もしくはその周辺に DSX が結合するはずである。DSX の結合コンセンサス配列の中心部に位置するコア配列 (ACAATGT/ACATTGT) は非常によく保存されていることが知られている。そこで、*bnl* gene body 及びその上流・下流 5 kbp の区間のゲノム配列を対象に、DSX 結合コア配列を探索することにした。その結果、図 1 に示した

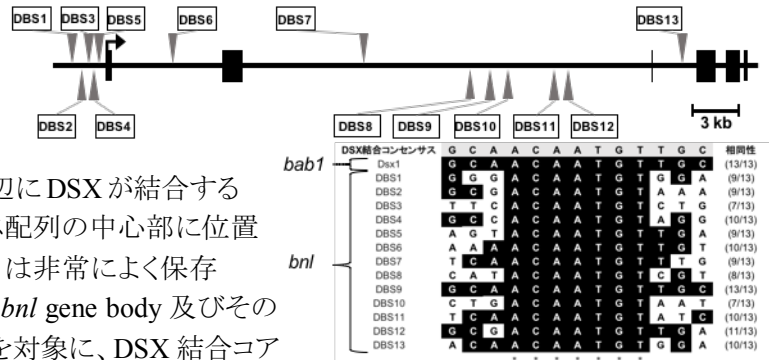


図1. branchless において見出された予測DSX結合部位の位置と塩基配列

ように合計 13 箇所の DSX 結合コア配列を見出すことができた。以後、これらを予測 DSX 結合部位とみなし、便宜上 *bnl* DBS (DSX Binding Site) 1~13 と呼ぶことにした。これらのうち *bnl* DBS9 の塩基配列は 13 塩基からなる DSX 結合コンセンサス配列と完全に一致することが明らかとなった。

予測 DSX 結合部位と DSX との相互作用解析

上述の予測 DSX 結合部位に DSX が結合するかどうか評価するため、DSX の DNA 結合ドメインからなるリコンビナント

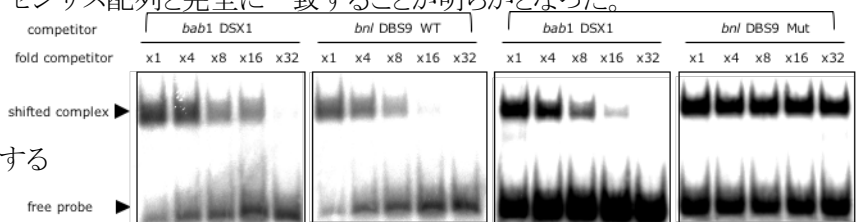


図2. Competition AssayによるDSX-DBDリコンビナントタンパク質とbnl DBS1~13の相互作用解析

タンパク質 (DSX-DBD) を用いた competition assay を行うことにした。DNA プローブには、既知の DSX の標的遺伝子として知られる *bric-à-brac1* (*bab1*) において見出された DSX 結合配列 (Dsx1、図 1) を用い、competitor には上述の予測 DSX 結合部位を含む塩基配列を用いた。その結果、予測 DSX 結合部位 DBS9 の配列を含む competitor が、Dsx1 と同等もしくは約 2 倍高い競合力を示すことがわかった (図 2、

bnl DBS9 WT)。他にも DBS6、8、10、11、12、13 において弱い競合力が見られた。また DBS の DSX 結合コアコンセンサス配列 7 塩基に、塩基置換を導入するとこれらの競合は見られなくなった(図 2, *bnl* DBS9 Mut)。以上の結果から、DSX は特に DBS9 に塩基配列特異的に結合すること、また、その結合親和性は既知の DSX 結合配列である *Dsx1* と同等もしくはそれ以上であることが予想された。

レポーターアッセイによるエンハンサー領域の探索

雄の生殖器原基における *bnl* の発現に責任を持つエンハンサーを同定するため、*bnl* gene body 及びその上流配列を対象とした網羅的レポーターアッセイを行なった。上述の DBS1~13 のうち、少なくとも 1 つを含む約 4~7 kb のゲノム配列をレポ

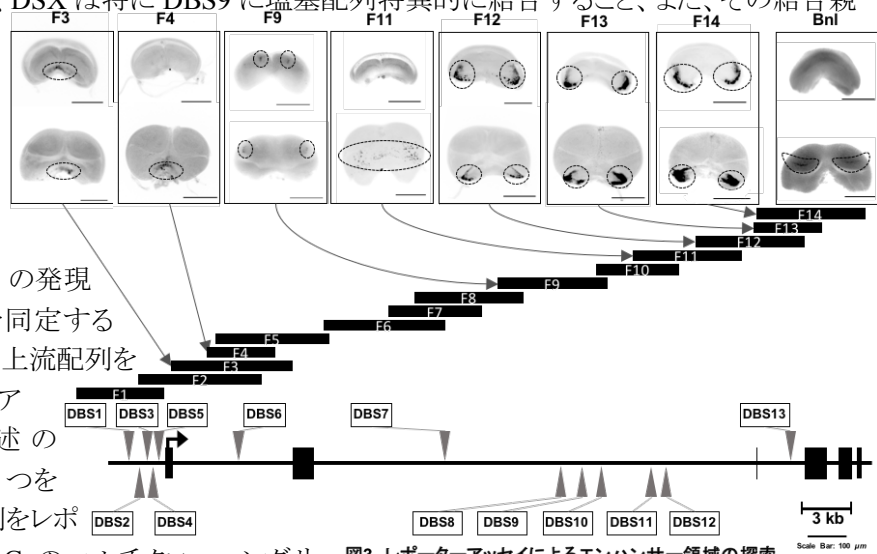


図3. レポーターアッセイによるエンハンサー領域の探索

ーターアッセイ用ベクター pS3aG のマルチクローニングサイトに挿入したコンストラクトを作製し、部位特異的リコンビナーゼにより染色体の特定の部位 (68A4) に挿入した。それぞれのコンストラクトをホモにもツショウジョウバエ系統について、後期 3 齢幼虫の生殖器原基におけるレポーター (EGFP) の発現を、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色によって観察した(図 3)。DBS6 を含むゲノム断片 F2~F5 をもつ系統のうち F3 と F4 については、肛門を形成する embryonic segment A11 領域において EGFP の発現が認められた。このうち F4 については、EGFP の発現が雄特異的に見られた。一方、competition assay により DSX の結合が示唆された DBS9 の他、DBS8 及び DBS10 を含むゲノム断片 F9 をもつ系統については、雌では A8 領域の上部にて二箇所で見られ、雄では生殖器原基外から誘引される中胚葉由来の細胞の一部で見られ、雄では生殖器原基外から誘引される中胚葉由来の細胞の一部で見られた。DBS11、12 を含むゲノム断片 F11 をもつ系統では、将来的に雄生殖器の大部分へと発達する embryonic segment A9 領域の腹部側表面にて、広い範囲で雄特異的な EGFP の発現が観察された。DBS13 を含むゲノム断片 F12、F13、F14 をもつ系統については、いずれも雌雄共に A8 領域の左右両端においてレポーターの発現が観察された。F9 と F11 の場合を除き、レポーターの発現は主に A8 領域において見られた。いずれの場合も雄生殖器原基の A9 領域にて特異的に発現する内在性 *Bnl* の発現パターン(図 3, *Bnl*)と異なっていたが、F4 と F11 については雄の生殖器原基特異的に遺伝子の発現を活性化する機能を有することがわかった。

F4、F9、F11 については、雄特異的もしくは雌雄で異なるレポーターの発現パターンがみられたため、他の組織においても性特異的な発現がみられるかを観察したところ、F9 と F11 については、後期 3 齢幼虫の dorsal trunk において雄特異的な発現がみられた(図 4)。このことから、F9 に存在する DBS8、DBS9、DBS10、および F11 に存在する DBS11、DBS12 が DSX の働きによって雄特異的な発現を活性化

考察

本研究により、DSX が DBS9 に強く結合することが予想されたが、DBS9 を含むゲノム断片 (F9) は内在性 *bnl* の発現を反映するエンハンサー活性をもたないことが示唆された。雄の生殖器原基において *bnl* の発現を誘導するエンハンサーは、今回調べた領域とは異なる領域、たとえば *bnl* からかなり離れた領域に存在すると考えるのが妥当だと思われる。あるいは、F9 と F11 のゲノム断片には雄特異的な遺伝子発現制御に関わるシスエレメントが存在することが示唆されたため、この F9 もしくは F11 領域と他の領域を組み合わせたゲノム断片をレポーターアッセイに用いれば、内在性の *bnl* の発現を反映するようなレポーターの発現がみられた可能性も考えられる。

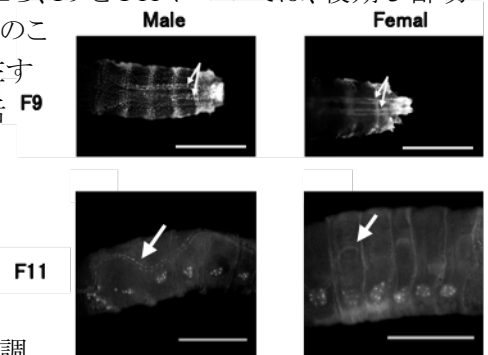


図4. 生殖器原基以外の組織で見られた性特異的なレポーター発現