

カイコ *Imp* 遺伝子の雄特異的スプライシング維持機構の解明

学生証番号:126327 資源生物制御学分野 小林彩也香

【序論】

カイコ (*Bombyx mori*) の性決定は *Bombyx mori-doublesex* (*Bmdsx*) の性特異的選択的スプライシングにより制御されており、エクソン 3 および 4 がスキップされることで雄分化が引き起こされる。カイコ *insulin-like growth factor II mRNA-binding protein* (*Imp*) は *Bmdsx* の雄型スプライシングに関与する。今研究では、雄特異的 *Imp* mRNA は遠位側の poly(A)付加サイトの選択によるエクソン 8 のインクルージョンの結果によるものであり、エクソン 7 下流にある近位側の poly(A)付加サイトでは非性特異的にポリアダニル化が引き起こされることを発見した。近年、性決定の中心的役割を担うショウジョウバエの *Sxl* や数種の双翅類と膜翅目昆虫の *tra*、ミツバチの *fem* は自動制御機構により自身の産物の発現の維持をすることが明らかとなっている。そしてこれらの遺伝子が自律的に発するシグナルによって個体の性が決定されるため、これらの遺伝子は性決定の記憶素子としての役割をもつといわれている。*Imp* は上述の *tra* と同様にカイコの *dsx* の性特異的スプライシングの制御に関わる。従って、*Imp* も *tra* と同様に性決定の記憶素子として働いている可能性があるとして仮説を立て、*Imp* のノックダウンや過剰発現が雄特異的スプライシングに及ぼす影響を調べるとともにカイコの性決定機構における *Imp* の役割を考察した。

【結果と考察】

雄特異的 *Imp* の mRNA 産物はエクソン 8 の雄特異的取り込みの結果生じる
 3'RACE により、2 つのアイソフォームの存在が明らかとなった。1 つはエクソン 7 下流に存在する近位側の poly(A)サイトで転写が終結し、残る1つはエクソン 8 の 3'端に存在する poly(A)サイトで転写が終結する(図 1 上段)。雌雄別に組織ごとの *Imp* の発現を RT-PCR により検出した結果、a/e の primer においてのみ各組織で雄特異的発現が見られた(図 1 下段)。以上の結果から、雄型 *Imp* はエクソン 7-エクソン 8 間のスプライシングが雄でのみ起こることによって、エクソン 8 が取り込まれる結果生じることが明らかとなった。

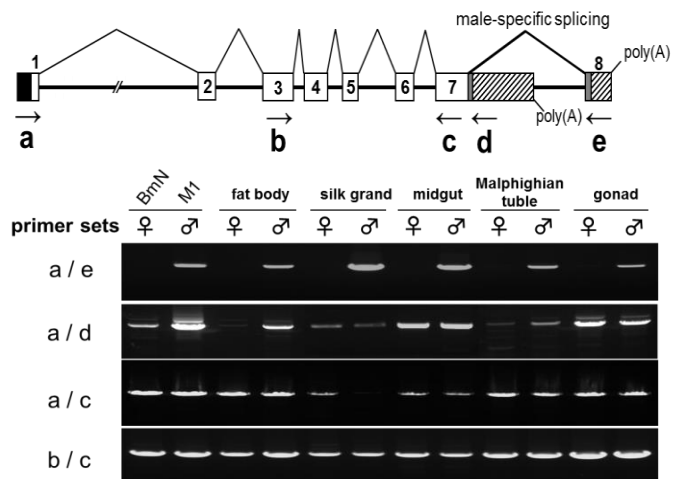


図1. RT-PCRによる組織ごとの*Imp*の発現解析結果 *Imp*の遺伝子構造の模式図およびRT-PCRの結果を示す。primerの位置を矢印、5'UTRを黒、ORFを白のボックスで示した。また、3'RACEで見つかった各バリエーションに特異的なORFを灰色で、3'UTRを斜線で示した。

Imp のノックダウンと過剰発現が雄特異的スプライシングに及ぼす影響 内在性雄型 *Imp* のノックダウン

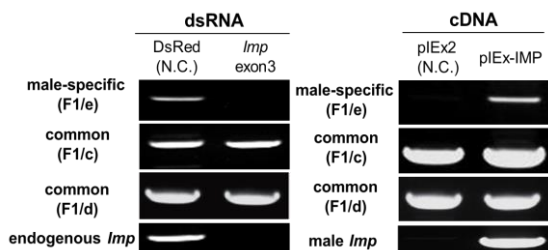


図2. *Imp*のノックダウンと過剰発現が*Imp*ミニ遺伝子の雄特異的スプライシングに及ぼす影響

により、*Imp* ミニ遺伝子の雄特異的スプライシングの顕著な減少が確認された(図 2, 左パネル)。一方、エクソン 6-エクソン 7 間におけるスプライシングについては *Imp* ノックダウン後も変化は見られなかった。この結果から、雄型 *IMP* タンパク質が自身の pre-mRNA の雄特異的スプライシングの維持に必要であることが示唆された。次に、雌細胞内において雄型 *Imp* cDNA を過

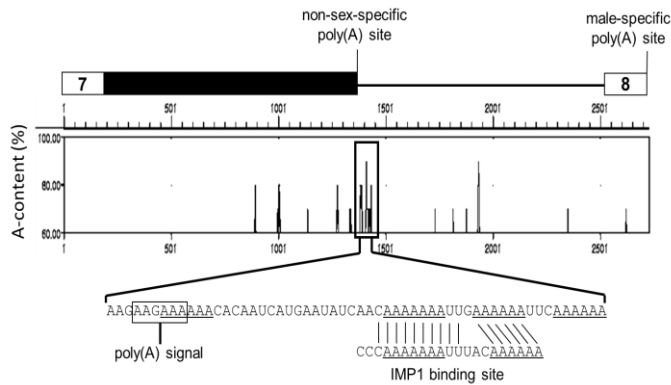


図3. *Imp*の雄特異的スプライシング領域を対象としたA-rich配列の探索

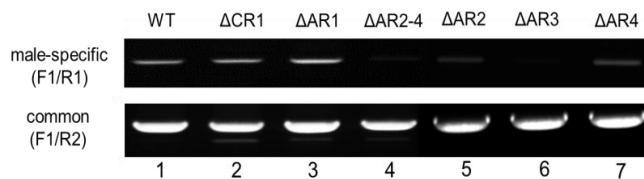


図4. A-rich配列に導入した変異が*Imp*の雄型スプライシングに及ぼす影響
ΔCR1はエクソン8中のC-rich配列に変異を導入したもの

A-rich 配列に導入した変異が *Imp* の雄型スプライシングに及ぼす影響

カイコ IMP のホモログであるヒト IMP1 は poly(A) binding protein (PABP) の UTR の A-rich 配列に結合することが報告されている。そこでカイコ *Imp* の雄特異的スプライシングが起こるエクソン 7 からエクソン 8 の間の 2728 塩基の RNA 配列について、アデニン (A) に富む領域を調べてみた。すると 4 か所の A リッチ配列 (A が 6 塩基以上連続する配列) が密集した領域をイントロン 7 の中間に存在する poly (A) 付加サイトのすぐ下流に発見することができた (図 3)。これら 4 つの A リッチ配列 (AR1, AR2, AR2, AR4) が雄特異的スプライシングに重要かどうかを調べるため、*Imp* ミニ遺伝子である pA3IMPmini の各 A-rich 領域に変異を導入したコンストラクトを作製し、雄型スプライシングの有無を調べた。その結果、AR2 から AR4 に渡る領域が雄特異的スプライシングに必要であることが判明した (図 4)。

組換え IMP は AR2-4 配列に特異的に結合する

雄型 IMP が上述の A-rich 配列と特異的に相互作用できるのかどうかを調べるために、組換え雄型 IMP タンパク質を精製し、RNA ゲルシフトアッセイを行った (図 5)。その結果、雄型 IMP は AR2 から AR4 を含む RNA 配列に特異的に結合することを支持する結果が得られた。

Imp はカイコの性決定の記憶素子として働く

以上の実験結果は、*Imp* の雄型スプライシングが自動制御機構によって維持されることを強く示唆している。従って、*Imp* は他の昆虫における *tra* と同様、性決定の記憶素子として働く可能性が高い。雄では *Imp* の発現開始後、まず近位側 poly(A) サイト利用による IMP が生産され、それが AR 配列に結合することにより雄型スプライシングを引き起こす。その結果雄型 IMP が生産され、それが再び AR 配列に結合することにより雄型スプライシングの維持が自動的に制御される。雌では、雌性決定遺伝子 *Fem* から供給される miRNA が *Imp* の翻訳を抑制すると考えている。

剰発現させると、*Imp* の雄特異的スプライシングが誘導されるか調べることにした。*Imp* ミニ遺伝子の雌雄共通領域のスプライシングパターンはネガティブコントロール (N.C.) と pIEx-IMP をトランスフェクションした細胞との間で同等だった (図 2, 右パネル)。また、予想した通り N.C.細胞において *Imp* ミニ遺伝子の雄特異的スプライシングは検出されなかった。一方、雄型 IMP を過剰発現させた細胞では、トランスフェクションされた *Imp* ミニ遺伝子の雄特異的スプライシングが見られた (図 2, 右パネル)。以上の結果、雄特異的 IMP タンパク質が自身の pre-mRNA の雄特異的スプライシングの誘導に必要であることが示唆された。

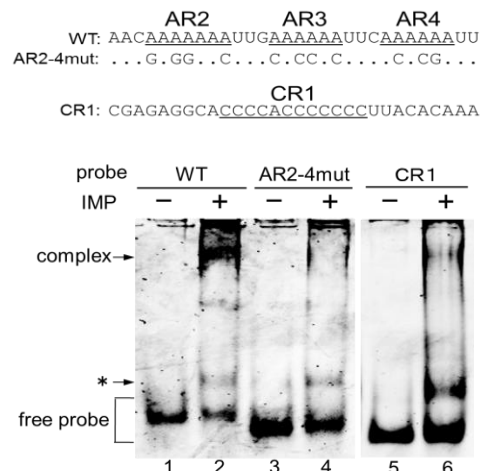


図5. 組換え雄型IMPとAR2-4領域との結合
* は非特異的結合を示す