

# 普遍的な性分化制御機構の解明を目指した *dsx* 新規標的遺伝子の同定

2016年3月修了 47-146348 資源生物制御学分野 我満俊祐

指導教員 鈴木雅京 准教授

## 【序論】

ショウジョウバエの性染色体構成は雄ヘテロ型 (XY 型) であり、性は X 染色体と常染色体 (A) のセット数の比率 (X/A) によって決まる。性決定カスケード最下流に存在する遺伝子 *doublesex* (*dsx*) は雌雄で異なるスプライシングを受けることで雌型と雄型の翻訳産物 (DSX<sup>F</sup>と DSX<sup>M</sup>) を生じる。DSX<sup>F</sup>、DSX<sup>M</sup>は転写因子として性分化に関わる遺伝子群を制御することでそれぞれ雌分化、雄分化を誘導する。*dsx* は形態、行動、生理機能といったあらゆる性的二型を制御する性分化のマスター遺伝子であるにも関わらず、その標的遺伝子はほとんど同定されていない。また、DSX は DM (Doublesex/Mab-3) ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインをもっている。この DM ドメインをもつ転写因子は後生動物において広く保存されており、動物の性的二型を形作る上で極めて重要な役割を果たしている。そこで本研究では、多くの生物において DM ドメイン転写因子の関与が知られている生殖器の分化に関わる *dsx* の新規標的遺伝子を同定することで、ショウジョウバエに留まらず、種を超えて保存された普遍的な性分化制御機構の解明を目指した。

## 【結果と考察】

### *dsx* の標的遺伝子候補のスクリーニング

まず、キョロショウジョウバエの生殖器の分化が始まる後期 3 齢幼虫の生殖器原基において、発現に高い雌雄差が見られる遺伝子に着目し、これら遺伝子の中から生殖器の分化に関わる *dsx* の標的遺伝子を探し出すことにした。雌雄で発現差が高い遺伝子について、転写開始点の上流 2kb までのゲノム配列及びイントロンを含む遺伝子領域を調査対象として DSX 結合配列の存否を調べたところ、6 遺伝子において少なくとも 1 つ以上の DSX 結合配列を見つけ出した (Fig. 1)。

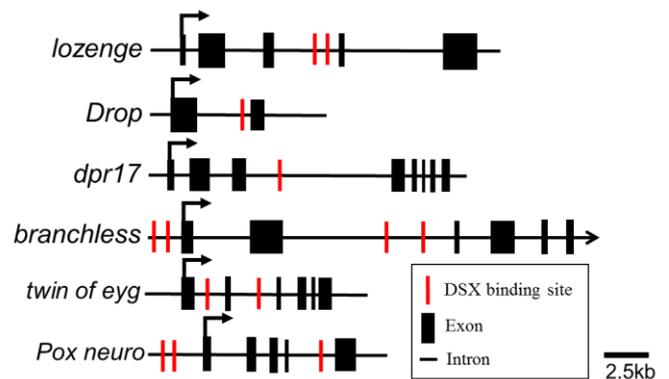


Fig. 1. 生殖器原基において発現に高い性差を示す遺伝子において見出された DSX 結合配列

次に、それらの予想 DSX 結合配列に DSX<sup>F</sup> もしくは DSX<sup>M</sup> 実際に結合しているのかどうかを確認するため、ChIP-qPCR を行った。その結果、*lozenge* (*lz*)、*branchless* (*bnl*) 遺伝子において DSX 結合が見られた (Fig. 2)。*lz* 及び *bnl* は *dsx* 依存的な発現を示すという報告と照らし合わせて考えると、*lz* と *bnl* は *dsx* の標的遺伝子であることが示唆された。

### ゲルシフトアッセイによる DNA-DSX 間相互作用解析

実際に DSX<sup>F/M</sup> が上述の領域内に存在する DSX 結合配列に結合するかどうかを検証するために、ゲルシフトアッセイを行うことにした。その結果、probe として用いた全ての DNA に DSX<sup>F/M</sup> が特異的に結合することが確認された (Fig. 3A, 3B)。また、DSX<sup>F</sup> と DSX<sup>M</sup> が異なる DNA 結合特異性をもつことを示唆するこれまでに例の無い実験結果が得られた。

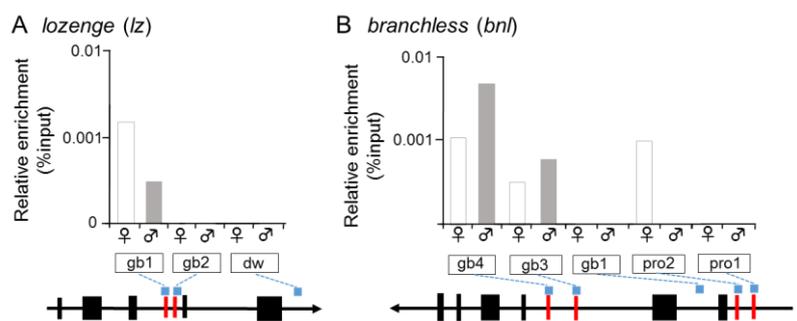


Fig. 2. ChIP-qPCRによるDSX結合の検証  
*lozenge* (A) *branchless* (B) 遺伝子の転写開始上流とイントロンを含む遺伝子領域におけるDSXタンパク質の存在量をChIP-qPCRにより定量した

## レポーターアッセイによる DSX 結合配列の機能解析

本研究で同定された DSX 結合配列の機能を解析するために、レポーターアッセイを行った。上述の実験結果から、DSX 結合部位を含む 1kb のゲノム配列の下流にレポーター遺伝子を連結したコンストラクトをもつ組換えショウジョウバエを作製後期 3

齢幼虫の生殖器原基におけるレポーター遺伝子の発現を解析した。*lz gb1* WT のレポーターの発現部位を観察した結果、雌の生殖器原基においてのみ内在性 *lz* の発現パターンと類似した発現が見られた (Fig. 4A, 4B)。

つまり、*lz gb1* を含む 1kb のゲノム配列は、生殖器原基における *lz* の性的二型発現を制御するシスエレメントを含むことが明らかになった。しかし、DSX 結合配列に変異を加えた *lz gb1* KO のレポーター遺伝子の発現は

変化しなかった (Fig. 4C)。一方、*bnl gb3* WT のレポーターの発現を観察したところ、内在性 *bnl* の発現とは異なり、雌の生殖器原基において発現が確認された (Fig. 4D)。*bnl gb3* の DSX 結合配列に変異を加えた場合、レポーターの発現は消失したことから (Fig. 4E)、*bnl gb3* の DSX 結合配列は雌の生殖器原基において転写活性化能をもつことがわかった。但しこれらの結果にはいくつかの問題点が見られたため、現在さらにレポーターアッセイを継続している。

### *lz*、*bnl* のマウスホモログにおける DMRT1 結合の検証

*lz* 及び *bnl* のマウスホモログである *RUNX1*、*FGF10* において DMRT1 の結合が見られるかどうかを ChIP-qPCR により検証した。その結果、*FGF10* と *RUNX1* の遺伝子領域において見出された DMRT1 結合領域における DMRT1 の存在量は、ネガティブコントロール領域にくらべ、高い傾向を示すことがわかった。ショウジョウバエの DSX の標的遺伝子のマウスホモログは、マウスにおいても DMRT1 の標的遺伝子である可能性が高いと予想された。

### 【まとめ】

*bnl* と *FGF10* はどちらも雄の生殖器の一部の形成に必要であることが知られている。また *lz* は雌の生殖器の一部の分化に関わり、そのオルソログである *RUNX1* はミューラー管や雌の生殖結節において特異的に発現することがわかっている。以上のことから、本研究では DM ドメイン関連転写因子を研究の糸口として、昆虫とマウスの間で保存されている普遍的な性分化制御機構の一端を明らかにすることができたといえる。

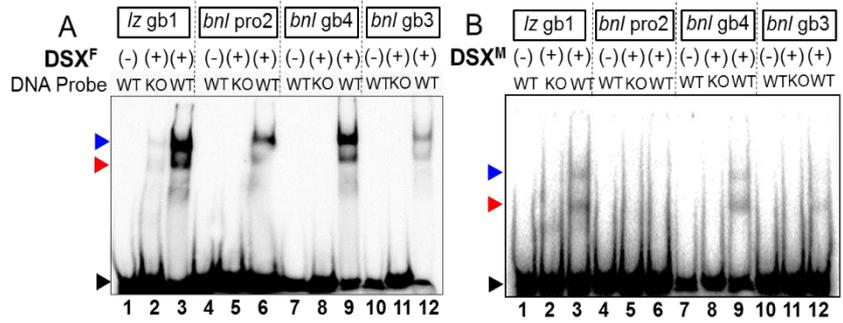


Fig. 3. ゲルシフトアッセイによる DNA-DSX 間の相互作用解析  
各反応には DSX 結合配列を含む 31bp の DNA プロブ (WT) もしくは DSX 結合配列に 7 塩基の塩基置換を導入した DNA プロブ (KO) と完全長の組み換えタンパク質 DSX<sup>F</sup> (A)、もしくは DSX<sup>M</sup> (B) を加えた。青色の矢尻は 2 量体 DSX と DNA プロブの複合体、赤色の矢尻は単量体 DSX と DNA プロブの複合体、黒色の矢尻はフリープロブを表している。

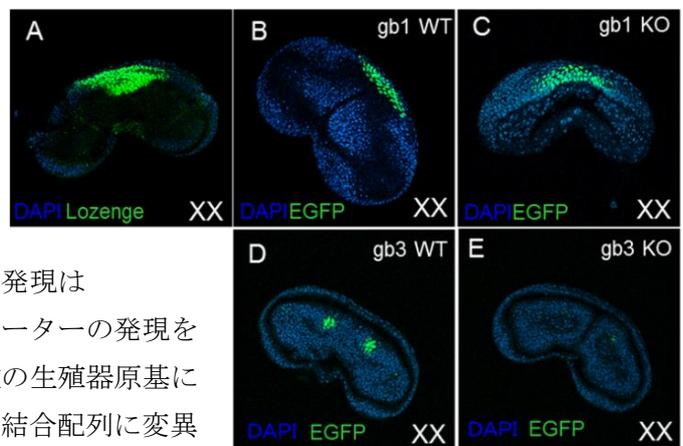


Fig. 4. レポーターアッセイによる DSX 結合配列の機能解析

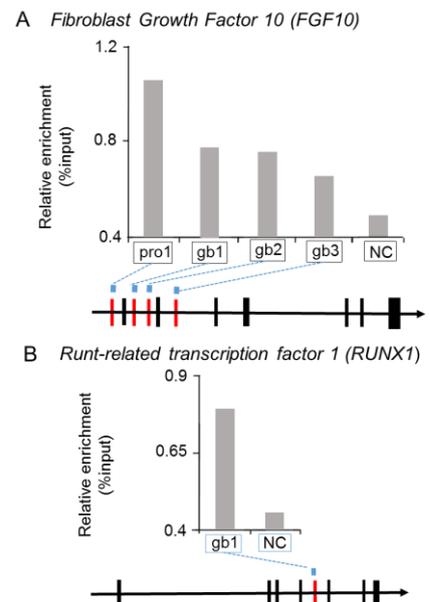


Fig. 5. ChIP-qPCR による *FGF10* 及び *Runx1* において見つかった DMRT1 結合領域への DMRT1 結合の検証