

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14892

研究課題名(和文) 昆虫の性を制御するホルモン依存性miRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of hormone-dependent microRNA that regulates sexual development of insects

研究代表者

鈴木 雅京 (Suzuki, Masataka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：30360572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：性決定時期においてエクダイソンが性分化に関わるかどうか明らかにするため、カイコ胚子期における活性型エクダイソンの量やエクダイソン生合成関連遺伝子、並びにエクダイソンシグナル関連遺伝子の発現量を定量し、雌雄間で比較した。その結果、いずれにおいても有意な雌雄差は認められなかったが、エクダイソン合成に関わるEPP-aseをノックダウンすると、カイコの性分化遺伝子Bmdsxの発現量が下がることが判明した。さらにエクダイソン受容体EcRの発現をノックダウンした場合もBmdsxの発現量が減少した。以上本研究により、胚子期におけるBmdsxの発現はエクダイソンシグナルによって誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether ecdysone is involved in sexual development of the silkworm in the sex-determining embryonic stage, we compared the amount of 20-hydroxyecdysone and expression levels of genes involved in ecdysone synthesis and ecdysone signaling between male and female embryos. Although these levels showed no sexual difference, knockdown of EPP-ase, which is required for ecdysone synthesis during embryonic stages, reduced expression level of Bmdsx in male and female embryos. In addition, knockdown of the ecdysone receptor gene EcR also caused decreased expression of Bmdsx in embryos. These results demonstrate that ecdysone signaling stimulates Bmdsx expression in the embryonic stages.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：性決定 性分化 性ホルモン エクダイソン microRNA カイコ

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う多くの生物において、性ホルモンは性を決める上で不可欠な役割をもつが、昆虫は性ホルモンをもたないといわれている。昆虫のホルモンとしては、エクダイソンが有名であるが、エクダイソンが昆虫の性分化を支配するとの証拠は得られていない。一方ホルモンと同様に、小分子でありながら幅広い生命現象に関わる因子として miRNA が注目を集めている。ところが、性決定や性分化の制御に関わる miRNA の同定は進んでおらず、精巢の分化に必須の *SOX9* 遺伝子の発現制御に関わる miRNA がいくつか同定されているに過ぎない。我々は、長年にわたりカイコの性決定機構に関する研究を行い、性決定のマスター遺伝子 *Fem* の他、その下流で働く遺伝子 *Imp*, *Bmdsx* を発見した (Kiuchi et al., 2014; Suzuki et al., 2013 他)。その後我々は予備実験を通して、*Fem* の発現量がエクダイソン投与により増加すること、また、エクダイソンに反応する miRNA として知られる *let-7* が、カイコの雄性化遺伝子 *Masc* の発現制御に関わることを突き止めた (未発表データ)。その後まもなく、*let-7* を失うとショウジョウバエの性決定遺伝子の発現量や生殖巣の性分化に異常が見られること、さらにエクダイソンの生合成変異体も同様の異常を示すとの報告がなされた (Fagegaltier et al., 2014)。そこで我々は、昆虫の性を制御するホルモン反応性 miRNA が存在すると予想し、そのような miRNA の同定を目指した本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、昆虫の性分化が miRNA を介したエクダイソンと性決定遺伝子のカスケード (性決定カスケード) のクロストークによって制御されるとの大胆な仮説を立て、その制御機構について明らかにすることを主たる研究目的とした。

従来の研究では、性決定カスケードの下流に性ホルモンが位置するという前提に基づいているが、本研究では発想を逆転させ、昆虫では性決定カスケードの上流にホルモンが存在し、そのホルモンの刺激に応じて性決定カスケードによる制御が始動する、と言う全く新しい発想に基づく。この発想は、既に述べたようにカイコの性決定のマスター遺伝子 *Fem* の発現量が、エクダイソンの刺激によって上昇する、との実験的根拠に端を発する。エクダイソンは昆虫の脱皮・変態を始めとする幅広い生命現象に深く関わることは古くから知られていたが、我々はこのホルモンが、昆虫の性決定カスケードのオン・オフやその制御維持にも作用するとの仮説を立て、本研究を通してそれを実証していく。さらに、エクダイソンシグナルと性決定カスケードのクロスト

ークを可能にする媒体として miRNA を想定し、そのような働きをもつ miRNA の同定を目指すことをもう一つの目的とする。

3. 研究の方法

我々は *Fem* の発現量が、エクダイソンの刺激によって上昇する、という予備実験結果を得ている。*Fem* はカイコの性決定カスケードの最上流に位置する遺伝子であり、性決定時期の雌胚子において最初の発現ピークを迎える (Kiuchi et al., 2014)。この点に着目し、性決定が起こる胚子期においてエクダイソンが性決定カスケードに及ぼす働きについて検証する。このために卵色で雌雄を判別できるカイコ系統を用い、雌雄の胚子におけるエクダイソン及びその活性型である 20-ヒドロキシエクダイソン (20E) 量を測定し、雌雄間で比較する。さらにエクダイソン生合成やエクダイソンシグナル伝達に関わる遺伝子の胚子期におけるノックアウトや 20E アナログ処理を実施し、性決定遺伝子の発現や性分化に及ぼす影響を観察することで、エクダイソンと性分化の関係性について徹底的に検証する。

以上の実験結果によりエクダイソンと性決定カスケードの間にクロストークが存在することを示唆する結果が得られたら、それらを媒介する働きをもつ miRNA の探索を行う。このために性決定時期に性特異的な発現を示す miRNA を網羅的に同定し、その過剰発現と発現抑制が性決定カスケードを構成する遺伝子群の発現や、組織・器官の性分化に影響を及ぼすものを選び出す。続いてこれらの miRNA の中からその発現が 20E 刺激により誘導されるものを探し出し、miRNA を介したエクダイソンと性決定カスケードのクロストークによる性分化制御機構の全貌を明らかにする。

4. 研究成果

(1) カイコの胚子期における 20E 量並びにエクダイソン生合成関連遺伝子の発現量には雌雄差がないことを明らかにした

エクダイソンやその活性型である 20-ヒドロキシエクダイソン (20E) が昆虫の性的二型の分化に関わるとのいくつかの知見に基づき、De Loof ら (1998) は性決定時期における 20E 量とエクダイソンの比の性差が性分化に決定的な役割をもつとの仮説を立てたが、この点について検証した研究は存在しなかった。一方、我々は卵色に基づいて雌雄を判別可能なカイコ系統を用いてカイコの性決定時期を明らかにした実績をもつ (Sakai et al., 2014)。そこで、雌雄の卵を産下後経時的にサンプリングし、それぞれの発生ステージにおけるエクダイソンと 20E の量を LC-MS/MS により測定することにした。その結果、エクダイソンについては測定できなかったが、20E 量については産下後 6 日目にピークを迎え、その後減少

することが明らかとなった。しかし、20E 量に明確な雌雄差は認められなかった。

この結果を遺伝子レベルで確認するため、カイコの卵においてエクダイソン供給に主要な役割を果たすリン酸化エクダイソン脱リン酸化酵素 (EPP-ase) 遺伝子と、エクダイソンから 20E を産生するエクダイソン 20-水酸化酵素 (20EOHase) 遺伝子の発現量を qRT-PCR により定量したが、やはり雌雄差はみられなかった。その他、エクダイソン生合成に関わるハロウィン遺伝子群の発現量についても同様の方法で調べたが、雌雄差はみられなかった。(Chorach ら、第 38 回日本分子生物学会年会; 松島ら、第 86 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会)

(2) カイコの胚子期におけるエクダイソンシグナル関連遺伝子の発現量には雌雄差がないことを明らかにした

20E 量やエクダイソン生合成関連遺伝子の発現量に雌雄差が存在しない場合でも、エクダイソンシグナルの伝達に関連する遺伝子の発現量に雌雄差が存在すれば、エクダイソン応答に性差が生じる可能性がある。そこで我々は、エクダイソンの受容及びシグナル伝達に関連する主要な遺伝子及びそれらのアイソフォーム (EcRA, EcRB1, EcRB2, E74, E75A, E75B, FTZ-F1, BrcZ1, BrcZ2, BrcZ4 など) の胚子期における発現量を qRT-PCR により定量し、雌雄差がみられるか確認した。その結果、いずれにおいても有意な雌雄差を認めることはできなかった。(Chorach ら、第 38 回日本分子生物学会年会; 松島ら、第 86 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会)

(3) 胚子期における *Bmdsx* の発現にはエクダイソンシグナルが重要な働きをもつことを突き止めた

カイコの性決定時期における性決定遺伝子の発現にエクダイソンが関与するか否かを明らかにするため、カイコの卵においてエクダイソン供給に主要な役割を果たす EPP-ase 遺伝子のノックダウンが性決定遺伝子 *Fem*, *Masc*, 及び *Bmdsx* の発現に及ぼす影響について調べることにした。その結果、*Fem* 及び *Masc* の発現量に変化は認められなかったものの、*Bmdsx* の発現量については雌雄いずれの胚子においても減少することが確認された。

雌雄の胚子において EPP-ase 遺伝子をノックダウンすると、エクダイソン応答遺伝子のうち EcR と E75 の発現量が顕著に減少することがわかったため、これら 2 つの遺伝子のいずれかが *Bmdsx* の発現量を制御している可能性が考えられた。そこで、これらの遺伝子のノックダウンが雌雄の胚子における *Bmdsx* の発現に及ぼす影響を調べたところ、EcR の発現をノックダウンした場合にのみ *Bmdsx* の発現量が減少することを突

き止めることができた。

雌雄の胚子における *Bmdsx* の発現量を経時的に調べたところ、産下後 6 日目にピークを迎え、その後減少することが明らかとなった。この変動パターンは 20E 量の変動パターンと一致する。以上の結果から、胚子期における *Bmdsx* の発現は、エクダイソンシグナルの制御下にあることが強く示唆された。(松島ら、第 86 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会)

(4) カイコの *let-7* miRNA は E75 を介してエクダイソンシグナルに応答することを発見した

胚子期における *Bmdsx* の発現にとって、エクダイソンシグナルが重要な働きをもつことが示唆されたため、エクダイソンシグナルが miRNA によって伝達される可能性について検証することにした。

ショウジョウバエでは、*let-7* miRNA の発現がエクダイソン受容体である EcR によって直接制御されることが知られている。そこでまず、*let-7* miRNA がカイコにおいてもエクダイソン刺激に応答するかどうかを確認することにした。カイコの培養細胞である BmN 細胞において *let-7* miRNA の発現が確認できたため、20E アナログであるポナスステロンを BmN 細胞に処理した際に *let-7* miRNA の発現がどのように変化するかを調べることにした。その結果、1nM のポナスステロンを処理後 24 時間の細胞における *let-7* miRNA の発現量が対照区に比べ 2 倍以上増加することが判明した。しかし、この増加は EcR の発現をノックダウンした細胞においても見られたため、カイコでは *let-7* miRNA の発現が EcR の制御下にはないことが予想された。一方、E75 の発現をノックダウンすると、*let-7* miRNA の発現がポナスステロン処理により誘導されなくなったことから、カイコの *let-7* miRNA は E75 を介したエクダイソンシグナルにより、その発現が誘導されることがわかった。(Chorach ら、第 38 回日本分子生物学会年会)

胚子期における *let-7* miRNA の働きを LNA gapmer を用いて抑制したところ、性決定遺伝子 *Fem*, *Masc*, 及び *Bmdsx* の発現に変化はみとめられなかった。以上の結果から、カイコの *let-7* miRNA はエクダイソンシグナルに応答するものの、性決定遺伝子の発現制御に関与しないことが明らかとなった。(松野ら、第 38 回日本分子生物学会年会)

(5) 胚子期における *Bmdsx* の発現に関わる miRNA を同定した

let-7 miRNA が胚子期における *Bmdsx* の発現に関与しないことが明らかとなったため、*Bmdsx* の発現制御に関わる miRNA を新たに探索することにした。まず、miRNA

がカイコの性決定遺伝子の発現パターンや発現量の制御に関与するかどうかを検証するため、miRNAによる翻訳抑制に必須の因子である *Ago1* のノックダウンを行い、miRNA経路を遮断した場合に性決定遺伝子の発現量に変化がみられるか調査した。その結果、*Bmdsx* の発現量が雌雄どちらにおいても著しく減少することが判明したことから、miRNAが *Bmdsx* の発現量の維持に関わることが強く示唆された。そこで、*Bmdsx* の発現量の制御に関わるmiRNAを同定するため、性決定時期に高発現するmiRNAを網羅的に同定した結果、miR-2733iファミリーに属する3つのmiRNAのみが性決定時期において最も発現量が高いことが判明した。しかも、miR-2733ファミリーの働きをLNAにより阻害した卵における *Bmdsx* の発現量は雌雄どちらにおいても減少することが判明した。miR-2733ファミリーは鱗翅目昆虫特有のmiRNAであり、脱皮変態に応じて高発現することが既に知られている (Liu et al., 2010)。このことは、miR-2733ファミリーの発現がエクサイソシグナルにตอบสนองする可能性を示唆している。(松野ら、第1回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会; 松野ら、第38回日本分子生物学会年会)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Wagamitsu, S., Takase, D., Aoki F, Suzuki MG, Identification of the Doublesex protein binding sites that activate expression of lozenge in the female genital disc in *Drosophila melanogaster*. Mech Dev, 査読有, vol 143, 2017, 26-31. DOI: 10.1016/j.mod.2017.01.001

鈴木雅京, カイコの *doublesex* の機能とその性特異的スプライシング制御機構, 査読有, vol 84, 2015, 25-35. DOI: http://doi.org/10.11416/konchubiotec.84.1_25

[学会発表](計7件)

笠原良太, 青木不学, 鈴木雅京, カイコのDMRT遺伝子とその機能解析, 日本蚕糸学会第87会大会, 2017年3月21日~2017年3月22日, 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター(茨城県つくば市)

田中有沙, 青木不学, 鈴木雅京, イエバエの雌決定遺伝子 *transformer* は自己の雌型スプライシングを制御する, 日本蚕糸学会第87会大会, 2017年3月21日~2017年3月22日, 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター(茨城県つくば市)

峰 翔太郎, 畠山正統, 炭谷めぐみ, 青

木不学, 鈴木雅京, カブラハバチの *doublesex* オルソログの同定とその機能解析, 第61回日本応用動物昆虫学会大会, 2017年3月27日~2017年3月29日, 東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)

澤本東海, 青木不学, 鈴木雅京, ショウジョウバエの雄生殖器原基における *branchless* の発現に必要なDSX結合シスイレメントの探索, 第61回日本応用動物昆虫学会大会, 2017年3月27日~2017年3月29日, 東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)

松島大二郎, 青木不学, 鈴木雅京, カイコ胚子期における *ecdysone* 量及び *ecdysone* 関連遺伝子発現量の性差解析, 平成28年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2016年3月17日~2016年3月18日, 京都工芸繊維大学(京都府京都市)

松野久美子, 酒井弘貴, 青木不学, 鈴木雅京, カイコの性決定遺伝子の発現量を制御するmicroRNAの同定, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日~2015年12月4日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Chorach, S., Suzuki, M.G., Matsuno, K., E75 regulates the steroid-hormone induced expression of *let-7* microRNA in the silkworm, *Bombyx mori*, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日~2015年12月4日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

資源生物制御学分野ホームページ

<http://park.its.u-tokyo.ac.jp/seigyoo/>

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻ホームページ

<http://www.ib.k.u-tokyo.ac.jp/>

アウトリーチ活動

東京農業大学第二高等学校 1年進路ガイダンス系統別模擬授業 出前講義, 2016年10月21日, 群馬県高崎市

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 雅京 (SUZUKI, Masataka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 30360572

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

青木不学 (AOKI, Fugaku)

片岡宏誌 (KATAOKA, Hiroshi)

松野久美子 (MATSUNO, Kumiko)

松島大二郎 (MATSUSHIMA, Daijiro)