

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14739

研究課題名(和文) ショウジョウバエ生殖系列における遺伝子量補償の欠如による自律的な性決定機構の解明

研究課題名(英文) Sex determination caused by failure of X-chromosome dosage compensation in *Drosophila* germline

研究代表者

太田 龍馬 (Ryoma, Ota)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・研究員

研究者番号：00647969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ショウジョウバエにおける生殖系列自律的な性決定機構を解明することを目的とする。これまでに私たちは、X染色体上の遺伝子の発現をオス(XY)とメス(XX)で一致させる遺伝子量補償が始原生殖細胞において欠如していることを明らかにしていた。本研究では、1)XY型(オス)の始原生殖細胞において、遺伝子量補償を担うMSL複合体の構成因子を発現させると、遺伝子量補償が付与されること、2)遺伝子量補償を付与したXY型始原生殖細胞がメス化することを示唆する結果を得た。これら成果は、遺伝子量補償の欠如により生み出される、X染色体上の遺伝子の発現性差により、生殖系列自律的な性が決定することを強く示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、未だあらゆる種で十分に明らかになっていない生殖系列自律的な性決定機構に関する重要な知見が得られた。生殖系列自律的な性決定機構は、ショウジョウバエのみならず、ヒトやマウス、メダカなど種を超えて存在することが明らかになりつつある。したがって、本研究の成果は、動物に普遍的な生殖系列の性決定メカニズムを理解するうえで重要な基盤となる。また、本研究で得られた成果は、体細胞系列と生殖系列の性の不一致により起こる不妊の原因究明のための重要な基盤にもなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the cell-autonomous mechanism of sex determination in *Drosophila* germline. We have previously found that dosage compensation equalizing X-linked gene expression between the sexes is absent in primordial germ cells (PGCs). Here, we show that hyperactivation of X-linked genes is induced in XY (male) PGCs by overexpression of the essential components of the MSL complex is responsible for dosage compensation in *Drosophila*. Furthermore, we show a possibility that hyperactivation of X-linked genes induces feminization in XY PGCs. These findings strongly suggest that cell-autonomous sex determination in the germline is resulted from the biased expression of X-linked genes caused by absence of dosage compensation.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖系列 性決定 遺伝子量補償 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

多くの有性生殖を行う動物において、生殖系列(配偶子を生み出す細胞の系譜)は性差を有し、精子と卵という形態的、機能的に異なる配偶子を形成する。多くの動物において生殖系列は、胚発生初期に始原生殖細胞として形成された後、胚内を移動し、胚発生後期に生殖巣へと取り込まれる。生殖巣へ到達する前の始原生殖細胞においては形態的、機能的な性差が見られず、性差が観察されるのは生殖巣に取り込まれた後である。そのため、生殖系列の性は、始原生殖細胞が生殖巣に到達した後、生殖巣を構成する体細胞の性に従い、非自律的に決定されると考えられてきた。しかし、ヒトやマウス、ショウジョウバエにおいては、体細胞の性と生殖系列の性が異なると配偶子形成が正常に進行しないことから、古くから生殖系列自身による自律的な性決定機構があることも示唆されてきた。しかし、未だ生殖細胞系列自律的な性決定機構のメカニズムはほとんど明らかになっていない。

ショウジョウバエは、X染色体の数により性が決定され、XYでオス、XXでメスとなる。私たちが独自に行ったオスとメスの始原生殖細胞の網羅的遺伝子発現解析から、ショウジョウバエ始原生殖細胞において、X染色体上の遺伝子の発現をオス(XY)とメス(XX)で一致させる「遺伝子量補償」が欠如していることが明らかとなった。始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如は、生殖系列におけるX染色体上の遺伝子発現に性差を生み出す。したがって、これにより生殖系列の性が自律的に決定されるのではないかと考えるに至った。そこで本研究では、ショウジョウバエ始原生殖細胞における「遺伝子量補償の欠如によるX染色体上の遺伝子の発現性差」に着目した解析を行い、生殖系列自律的な性決定機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、1) 始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如が、生殖系列の自律的な性決定に関わるのか、2) 始原生殖細胞において遺伝子量補償の欠如を導く分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

ショウジョウバエ体細胞の遺伝子量補償は、Male-specific lethal 1 (Msl1)、Msl2、Msl3、Maleless (Mle)およびMales absent on the first (Mof)の5種類のタンパク質とRNA on the X 1 (roX1)およびroX2の2種類のノンコーディングRNAから成る、Male-Specific Lethal (MSL)複合体により行われる。MSL複合体は、オス体細胞でのみ形成され、X染色体のヒストンH4K16のアセチル化を介して、X染色体上の遺伝子の発現量を倍加させ、XY型のオスとXX型のメスでX染色体上の遺伝子の発現量を一致させる。

本研究開始前までに、私たちは、1)MSL複合体を構成する因子のうち、*mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2*の発現がオス始原生殖細胞において非常に低いこと、2)これら因子をオス始原生殖細胞において強制発現すると、通常観察されない、オス始原生殖細胞におけるヒストンH4K16のアセチル化が観察されるようになることを明らかにしていた。これらの結果を基に、(研究1)オス始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与に必要なMSL複合体因子の同定、(研究2)遺伝子量補償を付与したオス始原生殖細胞がメス化するかの解明、(研究3)研究1で同定した因子の始原生殖細胞における発現制御機構の解明を行うことで、上記目的の達成を目指した。

3. 研究の方法

研究1. オス始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与に必要なMSL複合体因子の同定

mSl1、*mSl2*、*mSl3*、*roX2*のうち、オス始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与に必要な因子を同定する。同定した因子をオス始原生殖細胞において強制発現した場合に、X染色体上の遺伝子の発現量が倍加されているかをRNAシーケンシング法により調べ、実際に遺伝子量補償が付与されているかを調べる。それら因子の強制発現でオス始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与ができない場合には、他のMSL複合体因子の強制発現も試みる。

研究2. 遺伝子量補償を付与したXY型(オス)始原生殖細胞のメス化の検証

遺伝子量補償を付与したXY型(オス)始原生殖細胞がメス化するかについて以下のように調べる。ショウジョウバエにおいて、メス個体に移植されたXY型(オス)始原生殖細胞は決して卵形成を進行しないが、メス化すると卵を形成する。そこで、遺伝子量補償を付与したXY型(オス)始原生殖細胞をメス個体へと移植し、その始原生殖細胞が卵を形成するかを調べる。

研究3. MSL複合体因子の始原生殖細胞における発現制御機構の解析

mSl1、*mSl2*、*mSl3*および*roX2*は、体細胞においてRNAが発現しているが、始原生殖細胞においてはRNAの発現が観察されない。したがって、1) 始原生殖細胞においてMSL複合体因子の転写が抑制される、あるいは2)MSL複合体因子のRNAが始原生殖細胞特異的に分解されるといふ二つの可能性が考えられる。そこでまず、始原生殖細胞と体細胞間で、発現に差のある転写制御因子および、RNAの安定性に関わる遺伝子を明らかにする。さらに、それら遺伝子の機能

欠損変異体、あるいはRNA干渉法によるノックダウンを行った場合の、上記研究1で同定したオス始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与に必要なMSL複合体因子の発現を調べる。

4. 研究成果

研究1

mssl1, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*のうち、オス始原生殖細胞の遺伝子量補償の付与に必要な因子を明らかにするため、Gal4/UASシステムを用い、オス始原生殖細胞において、これら因子を様々な組み合わせで強制発現させ、ヒストンH4K16のアセチル化が誘導されるかを調べた。その結果、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*の全てを強制発現した場合にのみ、全てのオス始原生殖細胞において強いヒストンH4K16のアセチル化が観察されることが明らかとなった。そこで次に、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*を強制発現したオス始原生殖細胞において、遺伝子量補償が付与されているのかをRNAシーケンシング法により調べた。その結果、野生型オス始原生殖細胞に比べ、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*を強制発現したオス始原生殖細胞では、完全な倍加ではないものの、有意なX染色体上の遺伝子の発現上昇が観察された(図1)。一方、常染色体上の遺伝子の発現は、野生型オス始原生殖細胞に比べ、有意な変化は観察されなかった(図1)。これらの結果から、オス始原生殖細胞の遺伝子量補償の付与には、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*が必要であることが明らかとなった。さらに、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*を強制発現したオス始原生殖細胞において、1)メス生殖系列の発生に関わることが明らかになっている *ovarian tumor (otu)*および *ovo* 遺伝子の発現が有意に上昇すること、2) オス始原生殖細胞のマーカー遺伝子である *disc proliferation abnormal (dpa)*, *CG9253*, *no child left behind (nclb)*, *Ran GTPase activating protein (RanGAP)*, *Rs1*, *CG6693*, *Kinesin-like protein at 61F (Klp61F)*, および *Minichromosome maintenance 5 (Mcm5)*のうち、*dpa*, *CG9253*, *RS1*, *Klp61F*の発現が有意に低下することが明らかとなった。以上の成果は、MSL複合体の構成因子を強制発現することで、オス始原生殖細胞に遺伝子量補償が付与され、メス化が誘導されることを示唆している (Ota et al., Scientific reports, 2021)。

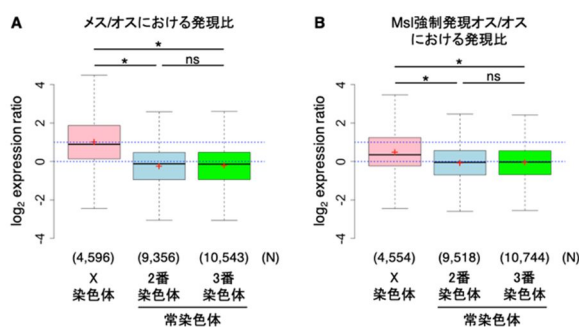


図1. *mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*を強制発現したオス始原生殖細胞(Msl1,2,3,roX2強制発現オス)における各染色体上の遺伝子の発現比
(A) 野生型のメスとオス始原生殖細胞における各染色体上の遺伝子の発現比。X染色体上の遺伝子の発現は平均して、オス(XY)に比べメス(XX)でほぼ2倍(log₂メスの発現量/オスでの発現量 = 1)となる。(B) Msl1,2,3,roX2強制発現オスと野生型オス始原生殖細胞における各染色体上の遺伝子の発現比。常染色体上の遺伝子の発現は、Msl1,2,3,roX2強制発現オスと野生型オスでほぼ変化がないが、それに比べ、X染色体上の遺伝子の発現は、Msl1,2,3,roX2強制発現オスにおいて有意に上昇する。Nは調べた遺伝子数。*はP < 0.05 (Fisher's exact test), nsは有意差なしを示す。

研究2

研究1の成果をもとに、遺伝子量補償の付与したXY型(オス)始原生殖細胞が、実際にメス化しているのかを明らかにする研究を行った。*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*を強制発現したXY型の始原生殖細胞をメス個体に移植した結果、移植したXY型の始原生殖細胞由来の細胞を有するメス成虫が16個体得られ、そのうち1個体の卵巣において、移植した細胞が正常に卵形成していた。この結果から、遺伝子量補償が付与されたXY型(オス)始原生殖細胞が、実際にメス化することが示唆された。以上の成果から、始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如により生み出される、X染色体上の遺伝子の発現性差により、生殖系列の自律的な性が決まることが強く示唆される。この成果は、生殖細胞系列自律的な性決定機構を解明するための重要な基盤になると考えられる。

また、研究1および研究2から、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*の強制発現では、XY型(オス)始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与、およびそのメス化には不十分であることも明らかとなった。そこで、*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*以外のMSL複合体構成因子のXY型(オス)始原生殖細胞における発現を調べた結果、*Mle*と*roX1*の発現が低いことが明らかとなった。*roX1*と*roX2*は互いに相補的に働くことが知られていることから、XY型(オス)始原生殖細胞におけるX染色体上の遺伝子の発現倍加、およびそのメス化には*mssl1*, *mssl2*, *mssl3*, *roX2*に加え*Mle*の強制発現も必要であると考えられる。今後、この可能性を検証することで、始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如が、生殖系列の自律的な性決定に関わることを明確にできると考えている。

研究3

MSL複合体因子の発現を制御する遺伝子を同定するため、始原生殖細胞と体細胞間での網羅的な遺伝子発現データの解析を行った。その結果、始原生殖細胞と体細胞間で発現に差のある転写制御因子として46個、RNAの安定性に関わる遺伝子として26個の候補遺伝子を同定した。今後、XY型(オス)始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与に必要な遺伝子群が完全に明らかになったのち、これら候補遺伝子の機能欠損変異体、あるいはRNA干渉法によるノックダウンを行い、遺伝子量補償の付与に必要な遺伝子群の発現が変化するのかを明らかにする。それにより始原生殖細胞において遺伝子量補償の欠如を導く分子メカニズムを明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ota Ryoma, Hayashi Makoto, Morita Shumpei, Miura Hiroki, Kobayashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Absence of X-chromosome dosage compensation in the primordial germ cells of Drosophila embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84402-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ota Ryoma, Kobayashi Satoru	4. 巻 3
2. 論文標題 Myc plays an important role in Drosophila P-M hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0923-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田龍馬、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける生殖系列の品質管理機構
3. 学会等名 新学術領域「配偶子インテグリティの構築」「全能性プログラム」合同公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田龍馬、森田俊平、林誠、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ生殖系列におけるX染色体の数に依存した自律的な性決定機構
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦博樹、太田龍馬、林誠、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に関する新規遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田龍馬、林誠、森田俊平、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如による生殖系列の性決定機構
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関