

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21299

研究課題名(和文)核のない精子をどのように作るのか？無核精子形成の分子機構の解明に挑む

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for apyrene sperm differentiation

研究代表者

金児 雄 (Kaneko, Yu)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90633610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：カイコに代表される進化的なチョウ目昆虫では、核を持たない精子が形成される。しかもこの核のない“無核精子”が正常な受精には不可欠である。無核精子の形成メカニズムは、有核精子と無核精子の形成時期が異なることに着目して研究が進められてきた。チョウ目昆虫における二型精子は、まず有核精子が形成され、その後無核精子形成が開始される。つまり、有核精子から無核精子形成へと切り替わることで二型精子形成が行われるが、その分子メカニズムは十分に解明されていない。そこで二型精子形成の切り替えの機構について、昆虫ホルモンとの関係に焦点をあてて研究を進めた。その結果、精子形成の機構への昆虫ホルモンの関与が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チョウ目昆虫は進化の過程で、遺伝物質を持たない無核精子を作るようになった。なぜこのように進化してきたのか？無核精子形成の分子機構を解明することは、チョウ目昆虫における進化、種分化を考える上で大きな役割を果たし得る。一方で、チョウ目昆虫は多くの農業害虫が属する分類群である。無核精子は受精に必須であることから、その形成機構を明らかにすることは、チョウ目の生殖を選択的に制御する全く新しい害虫防除技術への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In lepidopteran testis, two types of sperms are produced. One type of sperm is eupyrene sperm that has a nucleus, and the other is apyrene sperm which lacks a nucleus. The eupyrene sperm are involved in normal fertilization, while apyrene sperm have assisting roles which are necessary for fertilization. Both types of sperm are produced in the same follicle of testis, while the differentiation of both types are different stages. Eupyrene sperms differentiate during last larval stage followed by apyrene sperm differentiation. The mechanisms of switchover induction from eupyrene sperm production to apyrene sperm production are not fully elucidated. In the present study, we showed that insect hormones play a critical role on the switchover.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：精子形成 カイコ

## 1. 研究開始当初の背景

進化的なチョウ目昆虫は、核のある精子（有核精子）と核のない精子（無核精子）の二種類を産生する。遺伝物質を有する有核精子は卵との接合に必須であることは自明であるが、一方で遺伝物質を欠落した無核精子も正常な受精に必要であることが報告されている。つまり進化的なチョウ目昆虫は、積極的に無核精子を産生し、受精に利用するようになったと考えられる。なぜチョウ目昆虫では、無核精子を産生するようになりそれが定着したのか？その問いに迫るために、本研究では無核精子産生の分子機構の解明に取り組んだ。

有核精子と無核精子は、同一の精巣内の同一の精室内で同所的に産生される。一方で、両者が産生される時期には違いがあることがわかっている。蛹変態が行われる幼虫期である終齢幼虫へと脱皮すると、まず有核精子が産生される。その後、蛹変態の直前から蛹期にかけて無核精子が産生されるようになる。つまり終齢期から蛹期にかけて、有核精子形成から無核精子形成へと切り替わりが起こる。このことから、有核精子形成から無核精子形成への切り替えを行うための因子があると考えられてきた。血中に存在するとされる”apyrene spermatogenesis inducing factor”が、無核精子形成への誘導を促す因子として想定されたものの、その実態は明らかになっていない。

一方で、2019年に無核精子形成が *Sex lethal* 遺伝子 (*BmSxl*) をターゲットにした TALEN mutant では、カイコ無核精子の形態異常により、受精能力が無くなることが明らかとなった。このことから *BmSxl* を中心とした無核精子形成に関わる制御系の存在が強く示唆されたものの、その全貌は依然として不明瞭なままであった。

有核精子から無核精子へと産生が切り替わるのが終齢期であることに着目すると、蛹変態に付随した現象が関与することが想定される。蛹変態は、昆虫が持つホルモンの状態が変化することによって引き起こされる。これまでも昆虫ホルモンと精子形成の関係性については検証されてきたものの、有核精子と無核精子の区別がなされないなど、十分に満足できる検証は行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、無核精子形成の分子機構の解明を目指すために、昆虫ホルモンと無核精子形成の関係性に着目した。特に有核精子形成から無核精子形成への切り替えに関わる機構の解明に注目し、その機構を遺伝子のレベルで解き明かすための基盤形成を目的とした。その検証の過程で、無核精子形成への関与が指摘された *BmSxl* を一つの指標とした。そして、明らかにされる無核精子形成の分子機構を、有核精子のみを作る種と比較することによって、なぜそれぞれの種が、単一の精子、または複数の異形な精子を利用するに至ったのかについて、はじめて遺伝子レベルでの議論が可能になる。

## 3. 研究の方法

はじめに、昆虫ホルモンの無核精子形成への関与を検証するために、チョウ目昆虫のモデル昆虫であるカイコガを用いて、昆虫ホルモン投与による無核精子形成への影響を検証した。そのために、昆虫ホルモンを終齢幼虫へと時期を変えて投与し、無核精子の数を数えることで影響を検証した。

次に、無核精子形成に関わる遺伝子の探索のために、蛹変態に関わることが知られている遺伝子の精巣内での発現変動を定量 PCR によって行なった。さらに網羅的な候補遺伝子の探索のために RNA シークエンスを行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 昆虫ホルモンの無核精子形成への関与を検証

昆虫ホルモンを投与した結果、コントロールと比較して、無核精子の数が変動した。このことから昆虫の変態を制御している昆虫ホルモンが、無核精子形成に関与することが強く示唆され、昆虫ホルモンを軸としての今後の研究の方向性に検証が持てた。

### (2) 定量 PCR による精巣内で変態関連遺伝子の発現解析

昆虫の変態には、複数のホルモン応答遺伝子群の継時的な発現変動が関与することが知られている。そこで、終齢期から蛹期にかけて、精巣内での既知のホルモン応答遺伝子群の発現変動を解析した。その結果、個体の変態にตอบสนองするように、ホルモン応答遺伝子群の発現量が変動した。このことから、精巣内でホルモン応答遺伝子が特異に変動しているのではなく、他の組織と同様な変動であることが示唆された。そのため、今回対象にしたホルモン応答遺伝子群の中から、無核精子形成への明確な関与を示す遺伝子は見つけれなかった。今後候補遺伝子を増やした上で、さらに細かい発現変動解析を行うことで、精巣内で特異的に働くホルモン応答遺伝子の探索ができると考えている。一方で、本検証で用いたサンプルにおいて *BmSxl* の発現解析を行なっ

たところ、先行研究と同様の発現量の変動が認められたことから、用いたサンプルには問題がなかったことが確認できた。

### (3) RNA シークエンスによる無核精子形成関連遺伝子の探索

上述のように、ホルモン応答遺伝子群の中からは、明確な候補遺伝子が得られなかった。そこで、RNA シークエンスによる網羅的な解析を行うことで、候補遺伝子の探索を試みた。昆虫ホルモン投与区と無処理区の精巣から抽出した RNA を用いて、RNA シークエンスを行なった。その結果、処理区と無処理区の間で発現量が異なる遺伝子が多数得られた。これらの中には、まだ機能未知の遺伝子が多数含まれていた。一方で、すでに機能が推定されている遺伝子群も多数認められたが、その中には精巣での機能が報告されていない遺伝子も含まれていた。

本研究の遂行により、無核精子形成と昆虫ホルモンとの関係が推定され、かつ無核精子形成に関わる可能性のある候補遺伝子が多数得られた。今後は、これらの候補遺伝子の解析を行うことにより、これまで詳細が明らかになっていない無核精子形成の分子機構を解明できると考えている。つまり、本研究により無核精子形成の分子機構の解明へ向けた足掛かりができたと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	佐原 健  (Sahara Ken)  (30241368)	岩手大学・農学部・教授    (11201)	

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