

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840105

研究課題名(和文) 環境による性決定遺伝子の発現調節メカニズムの解明 甲殻類ミジンコをモデルとして

研究課題名(英文) Analysis of environmental control of a sex-determining gene in crustacean Daphnia magna

研究代表者

加藤 泰彦 (Kato, Yasuhiko)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60415932

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)：生物の性決定の方法は、性染色体により性が決まる遺伝性決定と環境により決まる環境性決定に大きく分類される。以前に我々は、ミジンコを用いて世界で初めて環境性決定に必須の性決定遺伝子を同定した。興味深いことにこの遺伝子は、遺伝性決定を行う動物と同じ性決定遺伝子であることを発見し、性決定の普遍性を見いだした。本研究では、環境依存的に活性化されるミジンコの性決定遺伝子を制御する因子を明らかにすることを目的とした。RNA-Seq法による網羅的な遺伝子発現解析、また他の生物の性決定遺伝子の相同遺伝子の解析を行い、候補制御因子を複数見いだすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Sex-determining systems can be broadly divided into two categories: genetic and environmental. We previously identified a gene that regulates environmental sex determination in Daphnia. Interestingly this gene was homologous to doublesex genes that are regulators of genetic sex determination, suggesting that there is a previously unidentified link between genetic and environmental sex determination. In this study, we aimed to find factors that control doublesex gene expression of Daphnia. RNA-seq analysis and comparative studies of the genes involved in sex determination enabled us to find candidates of regulators of doublesex gene.

研究分野：環境分子生物学

キーワード：環境性決定 幼若ホルモン RNA-Seq doublesex 遺伝子 FTZ-F1 ミジンコ TALEN 2A ペプチド

1. 研究開始当初の背景

生物の根幹的な基本システムである性決定の様式は、遺伝性決定と環境性決定に大きく分類される。我々は最近ミジンコの環境性決定の制御に、他の動物の遺伝性決定を制御する転写因子 *Dsx* のオーソログが機能していることを発見し、遺伝子レベルでの性決定の普遍性を見いだした。また、環境の悪化を感知した個体が体内の幼若ホルモン (Juvenile hormone: JH) のレベルを上昇させ *Dsx* 遺伝子の発現を誘導していることを示唆する結果も得た。

図1に、JH作用と *Dsx* 発現の時間的関係をまとめた。一般的なホルモン応答遺伝子とは異なり、*Dsx* の JH 応答は遅い。そこで、本研究では、環境性決定機構を明らかにするために、幼若ホルモン作用と *Dsx* 発現の間のミッシングリンクを解明するという着想に至った。

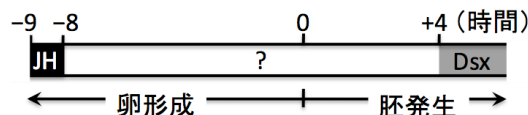


図1 幼若ホルモン (JH) による性決定の臨界期 (-9 ~ -8 時間) とオス特異的に *Dsx* が発現する時期 (+4 時間以降) との関係 (排卵のタイミングを 0 時間とした)

2. 研究の目的

ミジンコの環境性決定において、幼若ホルモン (JH) によるダブルセックス遺伝子の制御機構を明らかにし、環境性決定メカニズムを解明する。*Dsx* の JH に対する応答は遅いことから、*Dsx* 遺伝子が JH の直接のターゲットではなく、JH に直接制御される別の遺伝子があるのではないかと仮説を立て、*Dsx* を制御する候補遺伝子を明らかにすることを目的とした。また並行して、遺伝子機能解析法の基盤技術であるゲノム編集技術を開発することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ftz-f1 オーソログの解析

オーファン核内受容体である Ftz-f1 は、遺伝性決定を行う生物で性決定、性分化で機能することが知られている。また、近年になって、幼若ホルモン (JH) のシグナル伝達において、JH 受容体 MET と相互作用することで MET の標的遺伝子の発現を制御することがショウジョウバエを用いた実験で発見された。これらの知見から、ミジンコの性決定においても Ftz-f1 が機能していると仮説を立て、オオミジンコの Ftz-f1 のクローニング、性決定時期における JH 応答性の解析、RNAi を用いた機能解析を行った。

(2) 性決定時期の卵巣及び胚の RNA-Seq 解析

ミジンコの性決定時期に JH に応答する遺伝子を網羅的に明らかにするために RNA-Seq により JH 曝露から *Dsx* 発現に至

るまでの性決定期における JH 応答遺伝子の探索を、「ゲノム支援」活動による支援を受け行った。

性決定の臨界期である産卵の 8 ~ 9 時間前の卵形成中のオオミジンコ親個体に JH アナログであるフェノキシカルブを曝露した。曝露前の卵巣、曝露後 3 時間の卵巣、曝露後 8 時間時間の産卵直後の卵、曝露後 14 時間の胚をサンプリングし、これらのサンプルから total RNA を調製した。「ゲノム支援」を担当する東京大学の菅野・鈴木研究室シーケンスチームに依頼し、total RNA から Ribozero Kit により rRNA の除去、鋳型調製を行った。そして、Illumina HiSeq2500 にて single end 36 bp でシーケンスを行った。

(3) ゲノム編集技術の開発

標的遺伝子を切断できる人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたゲノム編集技術を開発した。オオミジンコの眼の形成に必須である *eyeless* 遺伝子、オオミジンコの形質転換体が有する *dsRed2* 遺伝子を標的とし、TALEN mRNA を産卵直後の卵にインジェクションし、表現型及び遺伝子型を解析した。さらに、標的配列に 67 bp の DNA フラグメントを相同組換えにより挿入する技術の開発も行った。*eyeless* 遺伝子座に両アレル変異を有する変異体を利用し、片方のアレルに存在する 1 bp 欠失によるフレームシフトをフラグメントの挿入により復帰させる実験をデザインし、相同組換えの頻度を解析した。

一方で、ポリシストロニックな発現を可能にする 2A ペプチドがオオミジンコで機能するか否かについて、膜挿入型 mCherry と核移行型 GFP を 2A ペプチドで連結したキメラ遺伝子を利用して解析した。

4. 研究成果

(1) Ftz-f1 オーソログの解析

degenerate primer を利用した Ftz-f1 断片のクローニングと 5' RACE、3' RACE 実験により、オオミジンコ Ftz-f1 cDNA 全長の塩基配列を決定した。その結果、ショウジョウバエと同様に、オオミジンコは N 末端のアミノ酸配列が異なる 2 種類の Ftz-f1 スプライシングバリエントを発現していることを見出した。

これらのバリエントそれぞれに特異的なプライマーを設計し性決定期の卵、胚での遺伝子発現を解析した。両バリエント共にオスで高発現することが判明し、Ftz-f1 が性決定に機能することが示唆された。そこで、Ftz-f1 の機能を明らかにするために、ヒストン H2B 融合型 GFP を発現し胚発生過程を可視化できる形質転換体を用いて Ftz-f1 の RNAi を行った。siRNA を産卵直後の卵に注入したところ、雌雄ともに囊胚期から発生に異常が生じ、胚性致死になった。

(2) 性決定時期の卵巣及び胚の RNA-Seq 解

析

シーケンスにより、全てのサンプルで1000万以上のリード数を得た。続いて、基礎生物学研究所情報解析室内の山グループとの共同研究により、RNA-Seqデータの解析を行った。近年解読されたオオミジンコ *Xinb* 系統のリファレンスゲノムへの TopHat によるマッピング、Cufflinks 及び Cuffmerge によるトランスクリプトのアセンブル、Cuffquant 及び Cuffdiff による遺伝子発現解析、CummeRund によりデータの可視化を行った。その結果、2倍以上有意に発現が上昇、減少した遺伝子をそれぞれ、曝露後3時間で2967個、86個、曝露後8時間で206個、72個、曝露後14時間で182個、196個見出した。以前に定量PCR解析を行った *Dsx* 等の遺伝子の発現パターンと本解析結果が一致していることが確認できた。また、性決定期に JH に応答して発現が変動している遺伝子を見出すことにも成功した。

(3) ゲノム編集技術の開発

第一に、TALEN がミジンコゲノムを切断し塩基の挿入/欠失を引き起こすことができるか調べた。形質転換体が有する *dsRed2* 遺伝子を標的遺伝子として Homodimeric TALEN ペアを構築し、これらの mRNA を産卵直後の卵に注入した。しかしながら、Homodimeric TALEN ペアの FokI ドメインがオオミジンコ胚に対して毒性を持っていることを示唆する結果を得た。そこで、次に Heterodimeric となる TALEN ペアを、標的遺伝子 *dsred2* と *eyeless* に対して作製し、それぞれの mRNA のインジェクションを行った。その結果、外来遺伝子 *dsRed2* と内在性遺伝子 *eyeless* のどちらに関しても、G1 において変異体を得ることができた。この結果は、オオミジンコ胚において、TALEN が標的配列に変異を導入したこと、かつその変異導入は生殖系列でも起こっており、次世代にも伝達可能であることを意味している。

第二に、TALEN を用いた相同組換えによる外来遺伝子導入 (HR ノックイン) がミジンコに応用可能か調べた。67 bp の外来 DNA 配列を *eyeless* 遺伝子座の1塩基欠損部位に HR ノックインで組み込み、復帰変異体を得ることを目指した。そのために、TALEN mRNA と外来 DNA 配列を含むドナーDNA を胚に共注入したところ、約2%の効率で期待通りに外来 DNA 配列が組み込まれ、正常な複眼をもつ復帰変異体を樹立できた。このとき、ドナーDNA として plasmid DNA、ssODN (single strand oligo DNA) のどちらを用いても HR ノックインを達成することができた。以上の結果から、TALEN を用いた HR ノックイン技術をミジンコで確立することができた。

第三に、ミジンコ体内での 2A ペプチドの機能を調べるために、昆虫のウィルス *Thosea asigna* 由来の T2A ペプチドの上流に GFP、下流に mCherry を連結したレポーター

遺伝子を卵にインジェクションした。その結果、蛍光顕微鏡により緑色と赤色の蛍光を確認することができた。現在ウェスタンブロット解析により、2A ペプチドにより mCherry と GFP が切断されているかを解析している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① 中西貴士、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、TALEN-mediated homologous recombination in *Daphnia magna*. Scientific Reports, Vol. 5, pp. 18312, DOI:10.1038/srep18312
- ② 内藤彰子、加藤泰彦、中西貴士、松浦友亮、渡邊肇、Heterodimeric TALENs induce targeted heritable mutations in the crustacean *Daphnia magna*. Biology OPEN, Vol. 13, 2015, pp. 364-369, DOI: 10.1242/bio.20149738

[学会発表] (計13件)

- ① 熊谷仁志、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、Use of the bicistronic expression involving viral T2A peptide in *Daphnia magna*, 第63回日本生態学会大会、2016年3月20日~2016年3月24日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ② 熊谷仁志、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、Use of the bicistronic expression involving viral T2A peptide in *Daphnia magna*, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日~2015年12月4日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ③ Syafiqah Ishak、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、Analysis of Transcription Activation of the Environmental Sex Determining Gene Doublesex1 in *Daphnia magna*, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日~2015年12月4日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ④ Nur Izzatur Binti Ismail、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、Eye Color Gene Scarlet as a Visible Marker for *Daphnia magna* Transgenesis, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日~2015年12月4日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ⑤ 中西貴士、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、Efficient DNA integration into germline genome via TALEN in *Daphnia magna*, Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, 2015年11月17日~2015年11月20日、奈良春日野国際フォーラム 麓~I・RA・KA~ (奈良県・奈良市)
- ⑥ 加藤泰彦、中西貴士、渡邊肇、ミジンコ

- のゲノム操作による環境性決定メカニズムの解明、「細胞を創る」研究会 8.0、2015年11月13日～2015年11月13日、大阪大学（大阪府・吹田市）
- ⑦ 中西貴士、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、環境指標生物オオミジンコにおけるTALENを用いた外来遺伝子導入技術の開発、第67回日本生物工学会大会、2015年10月27日～2015年10月27日、城山観光ホテル（鹿児島県・鹿児島市）
 - ⑧ 中西貴士、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、Efficient DNA integration into germ line genome via programmable nucleases in *Daphnia magna*、Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program " GENOME ENGINEERING: THE CRISPR/CAS REVOLUTION"、2015年9月24日～2015年9月27日、New York (USA)
 - ⑨ 加藤泰彦、An lncRNA regulates an environmental sex determining gene doublesex1 in *Daphnia*、16th Tokyo RNA Club、2014年11月28日～2014年11月28日、東京大学（東京都・文京区）
 - ⑩ 内藤彰子、加藤泰彦、中西貴士、松浦友亮、渡邊肇、Heterodimeric TALENs induce targeted heritable mutations in the crustacean *Daphnia magna*、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日～2014年11月25日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
 - ⑪ 中西貴士、内藤彰子、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、CRISPR/Cas9、TALENを利用したオオミジンコのゲノム編集技術の開発、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日～2014年11月25日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
 - ⑫ 内藤彰子、中西貴士、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇、CRISPR/Cas9、TALENを利用したオオミジンコのゲノム編集技術の開発、第66回日本生物工学会大会、2014年9月9日～2014年9月9日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）
 - ⑬ 加藤泰彦、須藤優海、渡邊肇、An lncRNA regulates an environmental sex determining gene doublesex1 in *Daphnia*、第16回日本RNA学会年会、2014年7月23日～2014年7月23日、ウイנק愛知（愛知県・名古屋市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 泰彦 (KATO, Yasuhiko)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60415932

(2) 研究協力者