

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02482

研究課題名(和文) カイコにおける性決定カスケードと遺伝子量補正および組換え抑制機構のクロストーク

研究課題名(英文) Cross talk among sex determination cascade, gene dosage compensation, and recombination suppression in the silkworms

研究代表者

嶋田 透 (Shimada, Toru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：20202111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、カイコの雌性はW染色体に由来する雌特異的な小分子RNA (Fem piRNA) が、Z染色体に座乗する雄決定遺伝子Mascの発現を抑制することによって決定することを明らかにしてきた。本研究では、Mascの分子機能を明らかにするため、改変Mascタンパク質を用いた実験を行った結果、ジンクフィンガードメインは性決定に必要でなく、中央付近のシステイン残基が必須であることが明らかになった。また、カイコに近縁のイチジクカサンもMascが雄の決定をしていることが明らかになった。さらに、Mascをノックアウトしたカイコは胚子期に雄特異的な致死を起こすことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that the femaleness of the silkworm, *Bombyx mori*, is determined by a female-specific small RNA (Fem piRNA) derived from W chromosome, which suppresses expression of the male determining gene, Masc located on the Z chromosome. In this project, in order to clarify the molecular function of Masc, we performed experiments using genetically modified Masc proteins. As a result, we revealed that the zinc finger domain is not necessary, and the cysteine residue near the center is essential for sex determination. In addition, we found that the Masc ortholog in a bombycid, *Trilocha varians*, also determines the maleness. Furthermore, we clarified that the Masc knockout silkworms cause male-specific lethality at the embryonic stage.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：性決定 遺伝子量補正 カイコ チョウ目 性染色体 遺伝子ノックアウト ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

昆虫の性決定様式は多様である。キイロシヨウジョウバエやミツバチにおいてはそのカスケードが既に明らかになっているが、昆虫の種を超えた普遍的な性決定の原理は分かっていない。チョウ目昆虫の性決定については、カイコを用いた遺伝学的研究を中心に研究されてきた。古くは 1933 年に、橋本春雄によって、カイコが雌 WZ、雄 ZZ という性染色体構成を持ち、W 染色体が雌を決定することが明らかにされている。

その後約 80 年にわたって、W 染色体上の仮想雌性決定遺伝子 *Fem* の分子実態は明らかにされていなかったが、研究分担者の勝間らは、2007 年から全く新しいアプローチで「カイコの性決定遺伝子の解明」に取り組んできた。性決定に関与する RNA を同定するため、カイコ初期胚から雌雄別 RNA を調製し、RNA-seq を実行したところ、雌特異的転写産物を発見した。配列解析の結果、その転写産物は W 染色体由来の piRNA (PIWI-interacting RNA) の前駆体であり、一つの piRNA を作り出すことが判明した。インヒビター-RNA を用いた解析から、この piRNA が長年謎であったカイコの性を決める分子であることが明らかになり、*Fem* piRNA と名付けられた。これは小分子 RNA が生物の性を決める初めての例であるとともに、チョウ目昆虫における性決定カスケード最上位遺伝子を発見した初めての報告である (Kiuchi et al., 2014, Nature)。

さらに、*Fem* piRNA は Z 染色体上に存在する遺伝子 *Masc* の mRNA を切断することも明らかになった。RNAi などによる機能解析の結果から *Masc* タンパク質は雄化能力を有する分子であり、雌においては *Masc* mRNA 量が *Fem* piRNA によって抑制されるため、雄化できない。一方で、*Masc* の発現を胚子期で抑制すると、雄特異的に致死することも判明した。RNA-seq 解析の結果、*Masc* mRNA を発現抑制した雄胚子では Z 染色体上の遺伝子の異常な発現上昇が観察された (Kiuchi ら, 同)。このことは、*Masc* タンパク質が遺伝子量補正に関わるタンパク質であり、その機能を阻害すると、遺伝子の発現異常により雄特異的致死が起こることを示している。チョウ目昆虫における遺伝子量補正は、長きにわたりその存否が議論されていたが、この結果は遺伝子量補正が存在することを初めて証明したものであるとともに、*Masc* タンパク質が遺伝子量補正におけるマスター分子であることを示している。

2. 研究の目的

本研究は、申請者のグループが世界にさきがけて発見したカイコの性決定カスケードと遺伝子量補正、および組換え抑制機構とのクロストークを分子レベルで明らかにすることである。カイコにおける遺伝子量補正は、キイロシヨウジョウバエと異なり Z 染色体上

の遺伝子の発現を半分に低下させることで達成されている (Kiuchi ら, 同)。その実行メカニズムを解明するために、Z 染色体上の遺伝子発現とヒストン修飾などのエピジェネティックマークとの関連を ChIP-seq や RNA-seq で調査する。また、*Masc* の遺伝子量補正における作用機序を調査するため、相互作用分子の同定を試みる。最終的には、カイコにおける遺伝子量補正の分子機序の全貌を明らかにする。

一方、ほとんどの昆虫において、性染色体構成がヘテロである方の性で減数分裂時の組換えが起きないことが知られている。カイコでは、雌で組換えが起きない。本研究では、その組換え抑制システムと性決定カスケードとの関係を、間性系統や卵色変異系統、および *Fem* や *Masc* の改変カイコを用いて明らかにし、性決定と組換えカスケードのハブ分子の同定を目指す。

チョウ目昆虫における性決定研究は、カイコを材料として申請者のグループが中心となり進められてきた。これまで、カスケードの下流の分子である *Bombyx mori doublesex* (*Bmdsx*) やそのスプライシング制御因子である *BmIMP* や *BmPSI* の同定と機能解析が行われてきたが、カスケード最上位の仮想雌性決定遺伝子 *Fem* が未同定であったため、この分野の研究は難航していた。しかし、申請者のグループは、2014 年に長年未解明であった *Fem* の分子実体が小分子 RNA であることを突き止め、そのカスケードの最上流を明らかにした (Kiuchi ら, 同)。このブレイクスルーにより、様々な研究が展開可能になった。その中でも大きなテーマが本研究に取りあげる遺伝子量補正と組換え抑制機構の解明である。特に、遺伝子量補正はその存否でさえはっきりしていなかったが、申請者らの研究で少なくとも初期胚においてその存在が証明された。また、その制御因子として *Masc* を同定したことで、*Masc* 依存的シグナリングから遺伝子量補正機構に迫ることが可能となった。本研究の実施により、チョウ目昆虫におけるブラックボックスの一つである遺伝子量補正システムの全貌が世界にさきがけて解明される。

3. 研究の方法

本研究では、カイコを用いて性決定カスケードと遺伝子量補正、および減数分裂時における組換えの有無との関係を分子レベルで明らかにする。そのために、まず、RNA-seq および ChIP-seq によって、遺伝子量補正を制御する雄化タンパク質 *Masc* のターゲット分子、および作用機序を明らかにする。また、性決定カスケードと組換え機構の関係を調査するため、既存の突然変異間性系統と卵色変異系統を用いた交配実験を行う。続いて、*Fem* や *Masc* のノックアウト、トランスジェニックなど、カイコの性決定関連因子の変異システムを作成する。それらにおける形質や遺伝

子発現プロフィールを調査する。

4. 研究成果

[平成 27 年度]

(1) カイコと同じカイコガ科に属するイチジクカサン (*Trilocha varians*) を用い、*Masc* 相同遺伝子 (*TvMasc*) の siRNA を初期胚へ導入し、遺伝子をロックダウンした結果、雄の胚子の *dsx* 相同遺伝子の発現が雌化することが明らかになった。カイコの培養細胞 BmN4 へ *TvMasc* を導入した結果、*Bmdsx* と *BmIMP* の性特異的なスプライシングが雄化していた。したがって、*TvMasc* も雄化の機能を支配していると考えられる。

(2) *Masc* タンパク質がどのように雄化と遺伝子量補正という 2 つの機能を発揮しているかを明らかにするために、培養細胞に組換え *Masc* タンパク質を発現させてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、得られた DNA の配列データを取得した。また BmN4 細胞に、欠失等の変異を入れた *Masc* タンパク質を発現させ、*Bmdsx* と *BmIMP* のスプライシングを指標にして判定したところ、zinc finger ドメインは性決定には関与しておらず、タンパク質の中央付近にある 2 つのシステイン残基が雄化に必須であることが判明した。

(3) カイコでは W 染色体による雌性決定機構が弱くなった間性系統が存在する。この系統を用いて、常染色体におけるマーカー遺伝子の組換えが雌でも起きるかどうかを検定するための交配を行った。

[平成 28 年度]

(1) *Masc* タンパク質が結合するゲノム配列および RNA の同定: 前年度の行った BmN4 細胞における *Masc* の ChIP-seq を行った結果について、インフォマティクス解析を行ったが、*Masc* に結合する特異的な DNA 領域やそれらの Z 染色体への偏りは確認されなかった。一方、*Masc* の一部を変異させたタンパク質を BmN4 細胞に発現し、核移行シグナルを同定した。その結果、核移行と性決定とは無関係であることが判明した。

(2) CRISPR-Cas9 システムで作出した *Masc* KO カイコについて形質の調査を行った。その結果、*Masc* KO の雄のホモ個体は胚期に致死することが明らかになった。また、piRNA が結合するタンパク質である *BmAgo3* に関しても、その遺伝子の KO カイコを作出している。*BmAgo3* KO のホモ個体は幼虫期の発育が遅延するとともに、変態期の形態形成に異常が生じ、羽化できなかった。

3. *Masc*-R TG カイコを用いた組換え抑制機構の解明: 他研究機関との共同研究によって、*Fem* piRNA 抵抗性 *Masc* (*Masc*-R) を過剰発現する TG カイコを作出した結果、この系統のメス個体は部分的にオス化することが確認された。

[平成 29 年度]

piRNA の合成に関与するタンパク質をコードする複数の遺伝子について、作出された

ノックアウト系統の表現型の解析を進めた。また、他大学との共同研究により、W 染色体上での *Fem* 遺伝子の位置を FISH 法によって明らかにすることに成功した。

カイコ以外の近縁の昆虫における性決定システムを解明し比較するため、雌 Z0/雄 ZZ の性染色体構成を有するエリサン (*Samia ricini*) の *Masc* 相同遺伝子の構造と機能についても解析するとともに、Z 染色体の構造を明らかにした。

[総括]

以上の通り、3 年間の研究により、*Fem* piRNA の生成機構、および *Masc* による性決定・遺伝子量補正の分子機構の理解を深めることができた。また、イチジクカサンおよびエリサンにおける *Masc* 相同遺伝子を発見した。今後、カイコおよび近縁昆虫で、性決定および遺伝子量補正における *Masc* の標的分子の特定を進めるとともに、雌の減数分裂における組換え抑制への性決定遺伝子の関与の仕方を明らかにする必要がある。

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 7 件)

- ① Katsuma, S., Kawamoto, M., Shoji, K., Aizawa, T., Kiuchi, T., Izumi, N., Ogawa, M., Mashiko, T., Kawasaki, H., Sugano, S., Tomari, Y., Suzuki, Y., and Iwanaga, M. (2018) Transcriptome profiling reveals infection strategy of an insect maculavirus. DNA Res. (in press). [査読あり]
doi: 10.1093/dnares/dsx056.
- ② 勝間進 (2018) カイコ性決定遺伝子の同定とチョウ目昆虫における性操作技術の開発. (特集: 農林水産業・食品産業科学 技術研究推進事業の研究成果—基盤技術編—). JATAFF ジャーナル. 6 (5). [査読なし]
<https://www.jataff.jp/books/order/journal/yousi/JATAFFj0605.htm>
- ③ Katsuma, S., Kiuchi, T., Kawamoto, M., Fujimoto, T., and Sahara, K. (2018) Unique sex determination system in the silkworm, *Bombyx mori*: current status and beyond. Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences (日本学士院欧文紀要). 94: 205-216. [Review] [査読あり]
doi: 10.2183/pjab.94.014
- ④ Shoji, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Shimada, T., and Katsuma, S. (2017) Artificial "ping-pong" cascade of PIWI-interacting RNA in silkworm cells. RNA. 23: 86-97. [査読あり]
doi: 10.1261/rna.058875.116
- ⑤ Sugano, Y., Kokusho, R., Ueda, M., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Shimada, T., Kiuchi, T., and

Katsuma, S. (2016) Identification of a bipartite nuclear localization signal in the silkworm Masc protein. *FEBS Lett.* 590: 2256-2261. [査読あり]
doi: 10.1002/1873-3468.12246

⑥ Katsuma, S., Sugano, Y., Kiuchi, T., and Shimada, T. (2015) Two Conserved cysteine residues are required for the masculinizing activity of the silkworm Masc protein. *J. Biol. Chem.* 290: 26114-26124. [査読あり]
doi: 10.1074/jbc.M115.685362

⑦ Lee, J., Kiuchi, T., Kawamoto, M., Shimada, T., and Katsuma, S. (2015) Identification and functional analysis of a *Masculinizer* orthologue in *Trilochoa varians* (Lepidoptera: Bombycidae). *Insect Mol. Biol.* 24: 561-569. [査読あり]
doi: 10.1111/imb.12181

[学会発表] (計 10 件)

① 李允求・木内隆史・勝間進・嶋田透：エリサンにおけるゲノム編集の現状(2017 年度版). 第 62 回 日本応用動物昆虫学会大会小集会 (カイコと近縁蛾類におけるゲノム編集と系統保存-NBRP プロジェクトの取組み). 2018 年 3 月 27 日～29 日、鹿児島大学.

② 木内隆史・庄司佳祐・川本宗孝・菅野純夫・嶋田透・鈴木穰・勝間進：カイコの PIWI タンパク質遺伝子 *BmAgo3* のノックアウトが生体へ及ぼす影響. 日本蚕糸学会第 87 回大会 (平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会). 2017 年 3 月 21 日～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.

③ Lee, Y., Kiuchi, T., Shimada, T., and Katsuma, S.: Functional analysis of *Masculinizer* homolog in *Samia cynthia ricini*. The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI 2017). February 28 - April 2, 2017, Bangkok, Thailand.

④ Kiuchi, T., Sugano, Y., Shimada, T., and Katsuma, S.: Genome editing in the masculinizing gene of the silkworm *Bombyx mori*. XXV International Congress of Entomology. (Symposium: Genomics and Genome Engineering in the Silkworm). 2016 年 9 月 25 日～9 月 30 日, Orlando, Florida, U.S.A.

⑤ 木内隆史・菅野雄大・嶋田透・勝間進：CRISPR/Cas9 システムによるカイコのオス化遺伝子 *Masc* の機能解析. 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会合同大会. 2016 年 3 月 26 日～3 月 29 日、大

阪府立大学.

⑥ 李允求・木内隆史・川本宗孝・鈴木穰・菅野純夫・笠原雅弘・西山智明・柴田朋子・重信秀治・山口勝司・嶋田透・勝間進：カイコの雄化誘導遺伝子 *Masc* の進化に迫る. 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会合同大会. 2016 年 3 月 26 日～3 月 29 日、大阪府立大学.

⑦ 李允求・木内隆史・川本宗孝・西山智明・鈴木穰・菅野純夫・笠原雅弘・重信秀治・山口勝司・嶋田透・勝間進：エリサン *Samia cynthia ricini* の *Masc* ホモログは遺伝子量補償に関与するが、性決定には関与しない. 日本蚕糸学会第 86 回大会 (平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会). 2016 年 3 月 17 日～18 日、京都工芸繊維大学.

⑧ 勝間進・木内隆史・菅野雄大・嶋田透：カイコ雄化因子 *Masc* の雄化能に必須なアミノ酸残基の同定. 日本蚕糸学会第 85 回大会 (平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会). 2015 年 9 月 26 日～27 日、北海道大学.

⑨ 菅野雄大・庄司佳祐・古賀光・木内隆史・嶋田透・勝間進：カイコ雄化因子 *Masc* の細胞内局在解析および標的の探索. 日本蚕糸学会第 85 回大会 (平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会). 2015 年 9 月 26 日～27 日、北海道大学.

⑩ 李允求・木内隆史・嶋田透・勝間進：イチジクカサン *Trilochoa varians* の性決定機構の解明と、カイコガ科における性決定機構の進化に関する考察. 日本蚕糸学会第 85 回大会 (平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会). 2015 年 9 月 26 日～27 日、北海道大学.

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 透 (SHIMADA, Toru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号 20202111

(2) 研究分担者

勝間 進 (KATSUMA, Susumu)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号 20378863

木内 隆史 (KIUCHI, Takashi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号 60622892

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし