

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06071

研究課題名(和文)キイロショウジョウバエを用いた精子貯蔵器官数を決定する分子機構の解明

研究課題名(英文)Identification of the mechanism of spermathecal number in *Drosophila*

研究代表者

加藤 容子 (Kato, Yasuko)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授

研究者番号：10534373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キイロショウジョウバエの雌には、交尾で得た精子を貯蔵する左右一対の袋状の受精嚢が存在する。受精嚢数決定の分子機構は未だ不明な部分が多ことから、RNAiシステムを用いた遺伝学的探索によって受精嚢数決定に関与する遺伝子を複数同定した。Wntシグナル伝達経路遺伝子のRNAiシステムを用いた解析から、生殖原基におけるWgとEngrailed (En)の局在パターンが受精嚢形成に重要であることがわかった。また、野外採集システムの表現型の解析から、進化的に保存されているSer/Thrを多く含む領域内のリン酸化修飾が受精嚢数の決定に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの動物は、雄から受け取った精子を受精まで貯蔵する役割を持つ貯精器官を持つ。昆虫においては、種によってその数は様々であり、キイロショウジョウバエ雌の内部生殖器には左右1対の受精嚢と呼ばれる貯蔵と品質管理を行う精子貯蔵器官が存在する。受精嚢の数は遺伝子変異の影響を受けやすいが、その数の決定機構はよくわかっていない。本研究結果から、シグナル伝達経路関連遺伝子とその翻訳後修飾が受精嚢数の決定に重要である可能性が明らかとなった。これらの遺伝子は脊椎動物においても高度に保存されていることから、これらの遺伝子の機能異常が女性不妊の原因となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The *Drosophila melanogaster* females have a pair of spermathecae which store sperm from males. The determination mechanism of spermathecal number is still unknown. The Wingless (Wg) signaling pathway genes, wg and dishevelled (dsh) RNAi females have only a spermatheca. The sterile of wg and dsh RNAi females was caused not by the abnormality in the external genitalia but by other factors such as the rejection of copulation. In the genital discs of wg RNAi females, the ectopic localizations of Wg and Engrailed (En) were observed. The reduction of spermathecal number also observed in RNAi of the downstream transcription factors. These data indicated that the Wg signaling pathway and En are involved in the spermatheca formation via the determination of cell differentiation. We also identified the responsible gene of the fly line which increased the number of spermathecae. In En, the phosphorylation in Ser/Thr stretch seemed to be involved in the determination of spermathecal number.

研究分野：遺伝学

キーワード：精子貯蔵 シグナル伝達 キイロショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの生物の雌は、受精までに受け取った精子を蓄える貯精器官を持つ。昆虫の多くは、受精嚢と呼ばれる貯精期間を持ち、種によってその数は異なっている。キイロショウジョウバエの雌は形態が異なる環状受精嚢と受精嚢の2種類の器官を持つ。左右1対の受精嚢は、単層の分泌細胞に囲まれた袋状の外分泌期間であり、長期的な精子の貯蔵を行う以外に、貯蔵精子の品質管理などにも重要である。興味深いことに、いくつかの昆虫種では、受精嚢数は遺伝子変異の影響を受けやすいことがわかっている。近年、受精嚢形成に関わる分子機構が明らかにされつつあるが、受精嚢形成の根本となる数の決定機構、受精嚢数が遺伝子変異の影響を受けやすい原因はよくわかっていない。また、受精嚢数と生殖能力の関連にも不明な点が多い。

2. 研究の目的

キイロショウジョウバエの受精嚢数の決定機構の分子機構を明らかにするために、GAL4-UAS システムを用いて生殖原基特異的に遺伝子ノックダウン (KD) を行い、受精嚢数に影響を与える遺伝子の探索を行った。*dachsous (ds)* の KD 系統は受精嚢数が増加するのに対し、Ds を含む Fat/Ds シグナル経路は、進化的に高度に保存された経路であり、組織成長や、細胞の平面内極性を制御する PCP 経路を介した形態形成を制御する。Ds 以外の Fat/Ds 経路因子では受精嚢数の増加が観察されないことから、既知の Fat/Ds 経路とは異なる経路が受精嚢数決定に関与している可能性が考えられた。一方、形態形成などに関わる細胞内シグナル伝達経路 Wnt 経路因子である *wingless (wg)* の KD 系統では受精嚢数の減少が観察された。この結果は、Ds と Wg が受精嚢数の決定に関して拮抗した関係にあること、既知の PCP-Wnt シグナル経路とは異なる結果であり、新たな細胞シグナル伝達経路が存在する可能性が示唆された。よって、受精嚢数の異常に関連する Ds と Wg を中心とした分子ネットワークの解明と、受精嚢数と妊性の関連について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) KD が及ぼすショウジョウバエ雌の受精嚢数の解析

ショウジョウバエの生殖原基特異的に GAL4 を発現する AbdB-GAL4 系統と二本鎖 RNA を発現する RNAi 系統を交配し、その F1 個体の生殖原基特異的に遺伝子 KD を行った。F1 雌の成虫個体の内部生殖器を 70% エタノール中で解剖し、受精嚢数を数え、表現型が現れる頻度を算出した。さらに、全身で遺伝子 KD を行い、RNAi 系統における標的遺伝子の発現抑制効果を qRT-PCR により定量的に解析した。

(2) KD が及ぼすショウジョウバエ雌の受精嚢数と妊性の関連解析

F1 雌個体と野生型雄とを交配し、F2 個体数を数えるとともに、受精嚢数と妊性の関連について調べた。また、妊性の低下が確認された場合、外部生殖器の形態を電子顕微鏡で観察した。KD 系統の雌と精子頭部特異的に GFP を発現する *protamin-eGFP* 系統の雄と交配後、雌の内部生殖器を解剖し、受精嚢と環状受精嚢内の貯蔵精子の有無を観察した。

(3) KD 系統における生殖器形成異常の細胞学的解析

3 齢後期の幼虫から生殖原基を解剖し、形態形成因子 Wg および Engrailed (En) に対する抗体、および Lozenge (Lz) 抗体による免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により観察し、コントロールと KD 系統における局在パターンの比較を行った。

(4) Wg の下流で働く遺伝子の網羅的探索

受精嚢数決定における Ds、Wg の制御ネットワークを遺伝学的アプローチにより明らかにする。RNAi 系統を用い、受精嚢数に影響する Fat/Ds シグナル経路および Wnt 経路関連遺伝子の同定を行った。ショウジョウバエの生殖原基特異的に GAL4 を発現する AbdB-GAL4 系統と二本鎖 RNA を発現する RNAi 系統を交配し、F1 雌個体の内部生殖器を解剖し、受精嚢数を数えた。

(5) 受精嚢数異常を示す野外採集系統の責任遺伝子の同定

受精嚢を3つ持つ野外採集系統と受精嚢数異常を示す *en^{spt}* 系統との交配による相補性実験を行った。また、野外採集系統における原因遺伝子候補の遺伝子座の塩基配列解析により遺伝子変異を同定した。さらに RT-PCR により野外採集系統の遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 標的配列の異なる2つの *wg* KD 系統を用いて、受精嚢数を解析したところ、2つの系統で現れる表現型の頻度が異なっていた。qRT-PCR の結果から、頻度が低い系統においては *wg* mRNA の発現抑制効果が弱かったことから、表現型の頻度は *wg* 遺伝子の KD 効率と相関していることが示唆された。

(2) *ds* KD 系統においても、*wg* KD 系統にもいて、著しい F1 数の減少が観察された (表 1)。*ds* KD 系統は外部生殖器のクチクラ異常を含む外部生殖器の形成異常が観察されたことから、F1 数の減少は、外部生殖器形成異常が交尾行動に影響を与えた結果であることが考えられた。また、*wg* KD 系統および Wnt シグナル伝達経路因子 *disheveled* (*dsh*) KD 系統においても大幅な F1 数の減少が観察されたが、*ds* KD 系統のような外部生殖器形成異常は観察されなかった。KD 効率が低い *wg* KD 系統においてはコントロールの半分程度の F1 数となったが、受精嚢を 2 個持つ個体においても 1 個持つ個体と同程度の F1 数であったことから、受精嚢数と F1 数に関連がないことが示唆された。さらに、F1 数の減少の原因として *wg* KD 系統雌と野生型雄の交配実験の結果、交尾行動を途中で中止することによる交尾成功率の低下が原因であることがわかった。Protamine-GFP 雄との個配実験により、コントロールと同様に交尾を行った *wg* KD 系統雌の受精嚢内には、精子貯蔵が行われていた。

	受精嚢数	F1
EGFP RNAi (n=33)	2	44.9 ± 13.1
<i>wg</i> RNAi #1 (n=32)	1	1.1 ± 4.5
<i>wg</i> RNAi #2	2 (n=4)	20.5 ± 18.0
	1 (n=28)	29.0 ± 18.3
<i>dsh</i> RNAi (n=33)	1	0

表1 各系統の受精嚢数と妊性

(3) *wg* KD 系統および *dsh* KD 系統における、生殖原基でのシグナル伝達因子の局在を免疫染色法により解析した。*wg* KD 系統において、著しく Wg の発現が低下しており、En の異所的な発現がみられた。*dsh* KD 系統においては *wg* KD 系統で観察されるような局在異常は観察されなかった。Wg の局在異常により、受精嚢形成に関与する領域のシグナル伝達が変化することにより受精嚢数に影響がでたと考えられた。

(4) Wg シグナル下流遺伝子のスクリーニングの結果、Wg ファミリー遺伝子群や、受容体の遺伝子 KD 系統においては、受精嚢数の変化は観察されなかった。しかし、Wnt シグナルの下流で機能する転写因子である *pangolin* (*pan*)、*legless* (*leg*) の KD 系統ではほぼ全ての個体が受精嚢数の減少あるいは、内部生殖器の形成不全を示した (図 1)。この結果から、受精嚢形成において、受容体の機能の重複あるいは組織特異的な受容体が存在する可能性が示唆された。

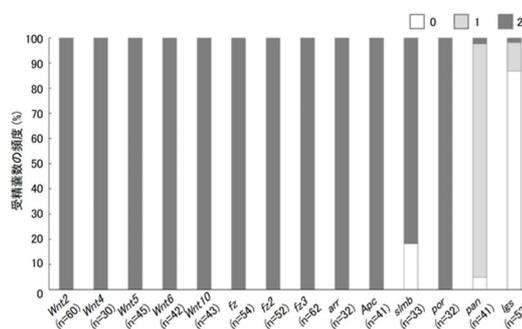


図1 Wgシグナル関連遺伝子KDによる受精嚢数変化

(5) 受精嚢数異常を示す野外採集系統と *en^{spt}* 系統との交配により、表現型の相補性が観察されなかったことから、原因遺伝子が *en* であることが考えられた。*en* 遺伝子座の塩基配列を解析したところ、野外採集系統においては、1 アミノ酸置換と 5 アミノ酸の欠損が、*en^{spt}* 系統においては 1 アミノ酸置換が起きていた。これらの変異箇所は En タンパク質の Ser 残基を多く含む領域に位置しており、リン酸化修飾を受けることが予想された。野外採集系統は受精嚢数異常に加え、貯蔵精子数は増加するものの F1 数が大幅に減少することがわかった。このことから、*en* 遺伝子は受精嚢数決定のほかに、精子貯蔵においても何らかの役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuko Kato, Akiko Sawada, Kazuki Tonai, Hisashi Tatsuno, Takahisa Uenoyama, Masanobu Itoh	4. 巻 96
2. 論文標題 A new allele of engrailed, enNK14, causes supernumerary spermathecae in Drosophila melanogaster	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 259, 269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.21-00030	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	伊藤 雅信 (Itoh Masanobu) (60221082)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授 (14303)	

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