

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780041

研究課題名 (和文) 性決定遺伝子を標的とする害虫防除法の開発

研究課題名 (英文) Development of a new insect pest control method targeting to insect sex determination genes

研究代表者

鈴木 雅京 (MASATAKA G. SUZUKI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：30360572

研究成果の概要 (和文)：オス特異的 RNA 結合蛋白質 MSP55 は、*Bmdsx* の性特異的スプライシング制御因子 BmPSI と相互作用する。この相互作用の意味を明らかにするため、RNA ゲルシフトアッセイを行った結果、MSP55 は BmPSI が RNA から解離する割合を低下させることで BmPSI の標的 RNA に対する結合能を増加させることが判明した。この RNA 結合能の増強には、MSP55 の KH ドメインが不可欠であることを突き止めた。

研究成果の概要 (英文)：The functional consequence of the interaction between MSP55 and BmPSI was examined using RNA mobility shift analysis. MSP55 increased BmPSI RNA binding activity by decreasing the rate of BmPSI dissociation from target RNA. Truncation analysis of MSP55 indicated that KH type RNA binding domains appeared to be responsible for enhancing BmPSI RNA binding activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子昆虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：性決定、doublesex、選択的スプライシング、カイコ

## 1. 研究開始当初の背景

世界の死亡要因の第 1 位は、癌でもなければエイズでもなく「飢餓」である。今もなお 5 秒に 1 人の子供が飢餓で死亡している。また、世界の人口は 2050 年には 100 億人に達すると予測されている一方で、世界の耕地面積は都市化や砂漠化などにより減少傾向にあるため、今後飢餓問題は一層深刻化すると予想されている。従って、人類の科学力の総力を結集してこの危機に対応出来る技術基

盤を確立する必要があることは言うまでもない。既に食糧を増産するために農業生産性の向上を計る数々の取り組みが FAO (国連食糧農業機関) を中心に成されており、その 1 つに病害虫による食害の軽減が挙げられる。なぜなら、毎年約 1/3 もの農業生産物が病害虫によって失われているからだ。このうち約 15% が害虫による食害によって失われており、害虫の約半数を占めるのが蛾類昆虫である。

これに対し申請者は、長年蛾類昆虫のモデル生物であるカイコの性決定機構の研究を行ってきた。言うまでもなく性と生殖・繁殖とは密接な関わりがあり、性の分化を制御することが出来れば、生殖・繁殖も制御出来る。例えばある集団の性を全てメスにしてしまえば、交配相手のオスが不在となるため生殖が不可能となりその集団は絶滅してしまう。この点に着目し、蛾類昆虫の性決定制御に関わる因子を同定し、それらの因子を創農薬ターゲットとした新規害虫防除法の開発を目指した本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では蛾類昆虫の性決定制御に関わる因子を同定し、それらの因子を創農薬ターゲットとした特異的阻害剤の探索を行う。そしてそれらの薬剤を用いて蛾類昆虫の性を人為的に制御することで害虫の過剰な繁殖を抑制することを最終的なゴールに据える。このために本研究では、蛾類昆虫を対象として以下の2点を明らかにすることを目的とする。

### (1) 蛾類昆虫の性決定機構の解明

多くの蛾類昆虫は W 染色体をもつ個体がメスに分化する。このため、W 染色体にはメスの性を決定づける雌性決定遺伝子 (Feminizing factor, *Fem*) が存在すると言われている。*Fem* の単離を目的として、メス組織由来 cDNA-オスゲノム DNA サブトラクション cDNA ライブラリーを作製する。次にこの中からメスゲノム DNA だけにハイブリダイズするクローンを選び出し、遺伝子の全体像を明らかにした後 RNAi による遺伝子の機能阻害実験やトランスジェニックによる強制発現実験を行い、性決定において異常が起こることを確認できた時点で *Fem* との判定を下す。

*Fem* の存否によってメスかオスかの決定付けがなされると、そのシグナルは下流で働く遺伝子 *Bmdsx* に伝えられ、個体のメスもしくはオスへの分化が始まる。この点について申請者は、*Bmdsx* が雌雄で異なるスプライシングを受けることでメス型とオス型の BmDSX タンパク質を生じ、メス型 BmDSX がメスへの分化に、オス型 BmDSX がオスへの分化に関わることを明らかにした。また最近の研究で *Bmdsx* の性特異的スプライシングに必須のスプライシング因子の同定に成功した。そこで本研究では、このスプライシング因子と *Fem* の関わり合いを明らかにし、カイコの性決定機構の全貌を明らかにする。

一方、以上の手法により同定することの出来ない性決定関連因子を同定する目的で、申請者らが独自に樹立したオス/メス培養細胞に様々な低分子化合物を投与し、*Bmdsx* の性特異的スプライシングに影響を与える化合物を探索する。次にこれらの化合物のターゲットタンパク質を単離同定し、カイコの性決定カスケードを構成する遺伝子を明らかにする。

### (2) 性決定因子を創農薬ターゲットとする特異的阻害剤の探索

上記の研究により同定された性決定制御因子の阻害活性を指標に化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、性決定因子特異的阻害剤の候補を見つけ出す。更にいくつかの蛾類昆虫にこれらの阻害剤を投与し、阻害活性の強度や種特異性を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛾類昆虫の雌性決定因子 (*Feminizing factor*, *Fem*) の同定

多くの蛾類昆虫は W 染色体をもつ個体がメスに分化する。このため、W 染色体にはメスの性を決定づける雌性決定遺伝子 (*Fem*) が存在すると言われているが、その正体は未だ不明である。そこで本研究では *Fem* の単離を目的として、独自に考案したサブトラクション cDNA ライブラリーを作製する。本研究ではメス組織由来 cDNA-オスゲノム DNA という独自のサブトラクションを行う。このようにして作製されたサブトラクション cDNA ライブラリーの中からメスゲノム DNA だけにハイブリダイズするクローンを選び出し、遺伝子の全体像を明らかにした後 RNAi による遺伝子の機能阻害実験やトランスジェニックによる強制発現実験を行い、性決定において異常が起こることを確認できた時点で *Fem* との判定を下す。

もし仮にサブトラクション法によって得られた cDNA が *Fem* としての機能を有しないと判断された場合は、全く異なるアプローチによって *Fem* を同定する。即ち W 染色体由来のゲノム断片を含む BAC クローンをオス由来培養細胞にトランスフェクションによって導入し、それによって *Bmdsx* のスプライシングパターンがオス型からメス型に変化した BAC クローンを選定する。このスクリーニングによってポジティブと判定されたクローンのコンセンサス領域をサブクローニングし、個々のサブクローンについて同様のスクリーニングを繰り返し、*Fem* を含む領域を絞り込む。

*Fem*を含む領域について複数のプライマーを設計し、これらのプライマーを用いてRT-PCRを行い、雌特異的に転写されている部分を明らかにする。更にこの部分を足場にRACE法を行うことで全長cDNAを取得し、遺伝子構造を明らかにすると共にこの遺伝子が*Fem*としての機能を有することを上述のRNAi法により診断する。

#### (2)*Bmdsx*の性特異的スプライシング制御機構の解明

*Bmdsx*が雌雄で異なるスプライシングを受けることでメス型とオス型のBmDSXタンパク質を生じ、メス型BmDSXがメスへの分化に、オス型BmDSXがオスへの分化に関わる(Suzuki et al., 2001, 2003, 2005)。更に最近の研究によって、*Bmdsx*のオス型のスプライシングを誘導するスプライシング因子として、BmPSIを同定した(論文投稿中)。興味深いことにBmPSIはメスでのみセリンリン酸化を受ける。そこでこのリン酸化がBmPSIの機能の制御にどのように関与しているのかを明らかにすると共に、BmPSIのセリンリン酸化活性を有するキナーゼの探索を行う。また、このキナーゼの活性を阻害するリン酸化阻害剤を投与することで、*Bmdsx*のスプライシングパターンに変化がみられるか否かを検証すると共に、性分化異常を誘発することが出来るか否かについても観察する。

#### (3)特異的阻害剤を利用したケミカルジェネティクスによる性決定因子の探索

性決定に関与する因子を網羅的に同定する目的でケミカルジェネティクスによるアプローチをとる。即ち、選択的スプライシングに影響を与えることが知られる様々な特異的阻害剤をオスもしくはメス由来培養細胞に投与し、*Bmdsx*の性特異的スプライシングパターンの変化をモニタリングする。実際に*Bmdsx*の性特異的スプライシングに影響を及ぼした阻害剤が見つかった場合、その阻害剤をリード化合物としてコンビナトリアルライブラリーを合成し、構造活性相関を明らかにする。得られた構造活性相関を利用して設計した選択分離用アフィニティープローブを合成し、特異的に結合するタンパク質の単離同定を行う。このようにして同定された遺伝子が、*Fem*や*Bmdsx*の性特異的スプライシング制御因子とどのような関係にあるのか、トランスジェニックを利用した過剰発現実

験やRNAiによる機能阻害実験を組み合わせることによって明らかにする。

#### (4)性決定関連因子を創薬ターゲットとする特異的阻害剤の探索

上記の研究により同定された性決定制御因子に特異的に結合する化合物を、低分子マイクロアレイを利用して網羅的にスクリーニングする。この手法によって同定された化合物をオス/メス培養細胞に投与し、*Bmdsx*の性特異的スプライシングパターンに及ぼす影響を指標として阻害活性を評価する。阻害活性のみられた化合物については、いくつかの蛾類昆虫の虫体に経口・経皮投与することで性転換などの異常がみられるか、またどの程度の種特異性がみられるのか等について検証する。

## 4. 研究成果

### (1) *Bmdsx*の性特異的スプライシング制御に関わる性特異的因子の同定

まず、*Bmdsx*の性特異的スプライシング制御に関わる性特異的因子の同定を試みた。研究代表者が発見した*Bmdsx*はカイコの性分化に関わる遺伝子であり、雌雄で異なるスプライシングを受ける結果、オス型とメス型のタンパク質を生ずる。*Bmdsx*のメス型のスプライシングは基底状態で起こるが、オス型のスプライシングには、*Bmdsx*のエクソン4に存在するシスエレメントCE1が不可欠である。CE1に結合するスプライシング因子として、既に我々はBmPSIを同定している。BmPSIは*Bmdsx*のオス型スプライシングに不可欠な因子であるが、その発現パターンに雌雄差はみられない。そこで、*Bmdsx*の性特異的スプライシングに関わるオスもしくはメス特異的因子を新たに単離する目的で、CE1を含む*Bmdsx*のエクソン4と、その前後のイントロン配列から成るRNAをリガンドに用いたpull-downアッセイを行った。その結果、約55kDaのタンパク質がオス特異的にpull-downされることが明らかとなった。そこでこの55kDaのタンパク質を単離する目的で、CE1 RNA配列をリガンドに用いたRNA affinity chromatographyを行った結果、オス特異的に存在する分子量約55kDaのタンパク質を精製することが出来た。このオス特異的タンパク質の内部アミノ酸配列を解析した結果、insulin-like growth factor II mRNA binding protein (IMP)と相同性を示すこと

がわかった (BmIMP と命名)。BmIMP をコードする遺伝子は Z 染色体に座乗しており、様々な組織においてオス特異的に発現していることが RT-PCR の結果明らかとなった。RNAi によってオス細胞 (NIAS-Bm-M1 細胞) における BmIMP の発現を抑制すると、*Bmdsx* のメス型のスプライシング産物の量が増加することがわかった。抗 BmPSI 抗体を用いた免疫沈降実験の結果、BmIMP は BmPSI と相互作用することがわかった。BmIMP の欠失変異型タンパク質を用いた GST-pull down 解析により、BmIMP と BmPSI の相互作用には BmIMP のもつ 4 つの KH ドメインが重要であることを明らかにすることが出来た。その後、この相互作用の機能的な意味を明らかにするため、CE1 RNA をプローブに用いた RNA ゲルシフトアッセイを行った。その結果、BmIMP は BmPSI の CE1 RNA に対する結合活性を増加させることが明らかとなった。また、KH ドメインを欠いた変異型 BmIMP を供試した場合は BmPSI・CE1 RNA 結合活性の増加がみられなくなることもわかった。BmPSI・CE1 RNA 解離試験を行った結果、BmIMP 非存在下では反応開始後 1 分以内に大半の BmPSI が RNA から解離してしまうが、BmIMP 存在下では反応開始後 10 分を経過した時点でも 60% を越える BmPSI が RNA に結合した状態にあることが確認された。以上の結果から、オス特有の因子である BmIMP が BmPSI と CE1 の結合を安定化し、*Bmdsx* のオス型のスプライシングを促進していると考えられる。

## (2) *Bmtra2* の機能解析

キイロショウジョウバエの *tra2* はメス分化に必須の遺伝子であり、*dsx* のメス型のスプライシングを誘導する。一方、*Bmtra2* はキイロショウジョウバエの *tra2* のホモログとして同定された遺伝子であるが、その機能については明らかにされていない。そこで、本研究では *Bmtra2* が *Bmdsx* の性特異的スプライシングに関与するか否かを調べることにした。雌雄の培養細胞で *Bmtra2* の発現を RNAi によってノックダウンし、RNA を回収後 RT-PCR を行うことによって *Bmdsx* のスプライシングパターンを確認した結果、雌雄ともに *Bmdsx* のスプライシングに影響はなかった。しかし、メスの細胞にキイロショウジョウバエの *dsx* ミニ遺伝子を導入した実験から、*Bmtra2* は *dsx* のメス型のスプライシングを誘導する働きを持つことが分かった。蛹化 0~1

日目のメスの蛹に *Bmtra2* の dsRNA を注射したところ、その個体は内部・外部生殖器に異常は見られず、正常に交尾・産卵したが、孵化率はコントロールよりも、10  $\mu$ g 注射した場合は約 50% 低下し、20  $\mu$ g 注射した場合は約 90% 低下した。以上の結果は、*Bmtra2* はキイロショウジョウバエの *dsx* のメス型のスプライシングを誘導できるにもかかわらず、カイコの *dsx* のスプライシングには関与していないことを示唆している。また、*Bmtra2* はカイコの胚発生に必要な遺伝子であると考えられる。

## (3) RNAi による *Bmdsx* の性特異的スプライシングに関わるスプライシング因子の網羅的探索

*Bmdsx* の性特異的スプライシングに関わる因子は、何らかの RNA 結合タンパク質やスプライシング因子である。そこで、カイコのゲノムにコードされている RNA 結合タンパク質関連遺伝子のそれぞれについて RNAi を行い、*Bmdsx* の性特異的スプライシングに影響を及ぼす遺伝子を網羅的に探索することにした。カイコの全ゲノムシーケンズデータベース (KAIKObase) に登録されている 16,329 個の遺伝子のうち、RNA binding、RNA recognition、ribonucleoprotein、splicing 何れかの機能アノテーションが付与されている遺伝子を抽出した結果、143 個の遺伝子を抽出することが出来た。それぞれについて dsRNA を合成し、雌雄の培養細胞にトランスフェクション後、RT-PCR を行い、*Bmdsx* の性特異的スプライシングパターンの変化を調べた。これまでに 12 種類のスプライシング因子に関するスクリーニングが終了している。その結果、SRp30c と Tra についてポジティブな反応がみられた。即ち、オスの細胞における SRp30c と Tra 各々の発現を RNAi によって抑制すると、*Bmdsx* のメス型スプライシングの増加が認められたのである。今後、これらの因子について、*Bmdsx* pre-mRNA のどの領域に結合するのか、BmPSI や MSP55 とはどのような関係にあるのか等について、詳細な解析を進める予定である。

## 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 3 件)

① Suzuki, M. G., Imanishi, S., Dohmae, N.,

Nishimura, T., and Matsumoto, S. (2010) Identification of a male-specific RNA binding protein that regulates sex-specific splicing of *Bmdsx* by increasing RNA binding activity of BmPSI. 査読有、*Mol. Cell. Biol.*, **30**:5776-5886.

- ② Masataka G. Suzuki (2010) Sex determination: insights from the silkworm. *Journal of Genetics*, 査読無、**89** (3): 357-363.
- ③ Suzuki, M. G., Imanishi, S., Dohmae, N., Nishimura, T., Shimada, T., and Matsumoto, S. (2008) Establishment of a novel in vivo sex-specific splicing assay system to identify a trans-acting factor that negatively regulates splicing of *Bombyx mori dsx* female exons. 査読有、*Mol. Cell. Biol.*, **28**:333-343.

[学会発表] (計4件)

- ① 鈴木雅京、今西重雄、松本正吾、オス特定の RNA 結合タンパク質 MSP55 による *Bmdsx* の性特異的スプライシング制御、日本蚕糸学会第80回大会、2010年4月3日、信州大学農学部
- ② 鈴木啓二、青木不学、鈴木雅京、*tra2* のカイコホモログ *Bmtra2* の機能解析、日本蚕糸学会、2010年3月21日、東京大学農学部
- ③ 鈴木雅京、松本正吾、昆虫培養細胞を利用した性決定機構の解析、バイオアーキテクト研究推進グループ、2010年2月24日、静岡県熱海市
- ④ 鈴木雅京、今西重雄、松本正吾、*Bmdsx* の性特異的スプライシングに関わるオス特定の RNA 結合タンパク質、日本蚕糸学会、2009年3月21日、東京農工大学農学部

[図書] (計1件)

- ① 鈴木雅京 (2009) 昆虫の性決定機構-性決定の鍵を握るスプライシング. 生物の科学 遺伝, **63** (1): 49-56

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seigyo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 雅京 (Masataka G. Suzuki)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授  
研究者番号：30360572