

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03287

研究課題名(和文) ショウジョウバエ生殖細胞系列におけるX染色体数に依存した自律的な性決定機構

研究課題名(英文) Sex determination depending on X-chromosome dosage in Drosophila germline.

研究代表者

太田 龍馬 (OTA, Ryoma)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：00647969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、始原生殖細胞(生殖細胞系列の前駆細胞)においてX染色体上の遺伝子の発現をオス(XY)とメス(XX)で一致させる遺伝子量補償が欠如しているという発見を基に、生殖細胞系列自律的な性決定機構を解明することを目的としている。本研究では、(1)XY型の始原生殖細胞において遺伝子量補償を担うMSL複合体の構成因子を発現させると、その細胞がメス化すること、(2)始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如にnanos遺伝子が関わることを示唆する結果を得た。さらに、生殖細胞系列のメス化に関わるX染色体上の新規候補遺伝子を同定した。以上の成果は、生殖細胞系列の性決定機構を明らかにする上での新たな基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原始的な動物であるヒドラは、生殖細胞系列のみで性差が観察されることから、生殖細胞系列自律的な性決定機構は、体細胞に依存した非自律的な性決定機構に比べ、進化的に古く、多くの動物で保存されていると考えられる。実際、生殖細胞系列自律的な性決定機構は、ショウジョウバエだけでなく、他の動物種でも存在することが明らかになりつつある。したがって、本研究により得られた成果は、動物に普遍的な生殖細胞系列の性決定メカニズムを理解するうえで重要な基盤になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on our finding that dosage compensation equalizing X-linked gene expression between the sexes is absent in primordial germ cells (PGCs), this study has trying to clarify the cell-autonomous mechanism regulating sex determination of the germline. Here, we report the possibility that overexpression of the essential components of MSL complex, which is required for dosage compensation in Drosophila, causes feminization of XY (male) PGCs, and that nanos gene is involved in the absence of dosage compensation in PGCs. Furthermore, we identified a novel-candidate X-linked gene involved in feminization of PGCs. These results provide a basis for understanding the mechanisms of sex determination in the germline.

研究分野：発生生物学

キーワード：性決定 遺伝子量補償 始原生殖細胞 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う多くの動物において、生殖細胞系列(配偶子を生み出す系譜の細胞)の性差を生み出す機構(性決定機構)は、次世代を生み出すために必須である。多くの動物において、生殖細胞系列は、胚発生初期に始原生殖細胞として形成された後、胚内を移動し、胚発生後期に生殖巣へと取り込まれる。生殖巣へ到達する前の始原生殖細胞においては形態的、機能的な性差は見られず、性差が観察されるのは生殖巣に取り込まれた後である。そのため、生殖細胞系列の性は、始原生殖細胞が生殖巣に到達した後、周りの体細胞の性に従い、非自律的に決定されると考えられてきた。しかし、ヒトやマウス、ショウジョウバエにおいては、体細胞と生殖細胞系列の性の不一致が配偶子形成異常を引き起こすことから、生殖細胞系列自身による自律的な性決定機構も存在することが示唆されていた。しかし、あらゆる動物種においてその仕組みはほとんど明らかになっていない。

ショウジョウバエは、X染色体の数によって性が決定され、X染色体を2本有するとメス(XX)1本のみだとオス(XY)となる。ショウジョウバエ体細胞では、オスでX染色体上の遺伝子の発現が倍加され、X染色体上の遺伝子の発現量がオス(XY)とメス(XX)で等しくなるよう補正される。この現象を「遺伝子量補償」という。一方、私たちが独自に行なったオスとメスの始原生殖細胞におけるトランスクリプトーム解析から、始原生殖細胞においては、遺伝子量補償が欠如しており、X染色体上の遺伝子の発現がオス(XY)に比べ、メス(XX)で2倍高いことが明らかとなった。このことから、始原生殖細胞において遺伝子量補償が欠如していることで、メス化に関わるX染色体上の遺伝子の発現がオス始原生殖細胞に比べメス始原生殖細胞で高く、それにより生殖細胞系列の性が自律的に決定されるのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、「遺伝子量補償の欠如によるX染色体上の遺伝子の発現性差」に着目して解析を行い、ショウジョウバエにおける生殖細胞系列の自律的な性決定機構を解明することを目的とした。

ショウジョウバエ体細胞における遺伝子量補償は、Male-Specific Lethal (MSL) 複合体により行われる。MSL 複合体は、Male-specific lethal 1 (Msl1)、Msl2、Msl3、Maleless (Mle)、Males absent on the first (Mof) の5つのタンパク質と、RNA on the X 1 (roX1) および roX2 の2つのノンコーディングRNA から成る。MSL 複合体は、オス(XY)体細胞でのみ形成され、X染色体におけるヒストン H4K16 のアセチル化を誘導することで、X染色体上の遺伝子の発現を倍加し、XY型のオスとXX型のメスでX染色体上の遺伝子の発現量を一致させる。

私たちは研究開始前までに、(1)MSL 複合体を構成する因子のうち、Mof以外の因子のRNAの発現が、性決定期のオス始原生殖細胞において観察されないこと、(2)Msl1、Msl2、Msl3、roX2をオス始原生殖細胞において強制発現すると、通常観察されない、ヒストン H4K16 のアセチル化が誘導されることが明らかしていた。しかし、これら因子の強制発現では、ヒストン H4K16 のアセチル化の程度は低く、オス始原生殖細胞のメス化もほとんど起こらないことが明らかとなっていた。これらの結果を基に、本研究では、(研究1)オス始原生殖細胞における遺伝子量補償の付与に必要なMSL 複合体因子の同定および遺伝子量補償を付与したオス始原生殖細胞がメス化するかの検証、(研究2)オス始原生殖細胞における遺伝子量補償欠如の分子メカニズムの解明、(研究3)始原生殖細胞のメス化に関与するX染色体上の新規遺伝子の同定を行うことで、上記目的の達成を目指した。

## 3. 研究の方法

### 研究 1. オス始原生殖細胞への遺伝子量補償の付与に必要な MSL 複合体因子の同定および遺伝子量補償を付与したオス始原生殖細胞がメス化するかの検証

*msl1*、*msl2*、*msl3*、*roX2* の強制発現において、ヒストン H4K16 のアセチル化の程度が低かった原因として、(1)これら因子の発現量が遺伝子量補償の付与に不十分であること、(2)他のMSL 複合体因子の強制発現も遺伝子量補償の付与に必要であることが考えられる。そこで、*msl1*、*msl2*、*msl3*、*roX2* の発現量を上昇させた場合、あるいは他の因子も強制発現させた場合の、オス始原生殖細胞におけるヒストン H4K16 のアセチル化を調べる。さらに、高レベルのヒストン H4K16 のアセチル化が観察された条件において、XY型(オス)始原生殖細胞がメス化するかを以下のように調べる。

ショウジョウバエにおいて、メス個体に移植されたXY型(オス)始原生殖細胞は決して卵形成を進行しないが、メス化すると卵を形成する。そこで、遺伝子量補償を付与したXY型(オス)始原生殖細胞をメス個体へと移植し、その始原生殖細胞が卵を形成するかを調べる。

### 研究 2. MSL 複合体因子の始原生殖細胞における発現制御機構の解析

*Mof* を除くMSL 複合体因子は、オス体細胞においてRNAが発現しているが、オス始原生殖

細胞においては RNA の発現がほとんど観察されない。したがって、MSL 複合体因子の RNA がオス始原生殖細胞特異的に分解されるという可能性が考えられる。そこで、始原生殖細胞において高発現する RNA 分解に関わる遺伝子に着目し、それら遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンした場合の、オス始原生殖細胞における MSL 複合体因子の発現を調べる。

### 研究 3. 始原生殖細胞のメス化に關与する X 染色体上の新規遺伝子の同定

これまでの研究から、メス始原生殖細胞がメスの性質を失うと、卵巣内で生殖細胞系列が腫瘍化することが知られている。そこで、オスに比べ、メスの始原生殖細胞において高発現する X 染色体上の遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンし、卵巣内で生殖細胞系列が腫瘍化するかを調べる。候補遺伝子の選定には、オスとメスの始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析結果を用いる。

## 4. 研究成果

### 研究 1

オス始原生殖細胞における MSL 複合体の構成因子の強制発現は、Gal4/UAS システムを用いて行った。Gal4/UAS システムで用いられる UAS ベクターとして、UAS<sub>t</sub>、UAS<sub>p</sub>、UAS<sub>z</sub> の三種類がある。これまで、MSL 複合体の構成因子の強制発現では UAS<sub>p</sub> を用いていたものの、私たちの研究から、始原生殖細胞における発現効率は UAS<sub>p</sub> に比べ UAS<sub>z</sub> の方が高いことが明らかとなった (Masukawa et al., *Scientific reports*, 2021)。そこで、UAS<sub>z</sub> を用いて *mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2* および *Mle* を強制発現させた結果、これまでの UAS<sub>p</sub> を用いて *mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2* を強制発現させていた場合に比べ、高レベルのヒストン H4K16 がオス始原生殖細胞において観察された (図 1)。

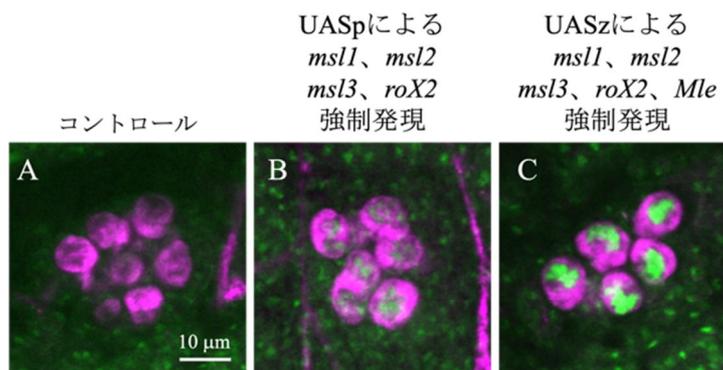


図1. UAS<sub>p</sub>あるいはUAS<sub>z</sub>を用いてMsl複合体因子を強制発現させたオス始原生殖細胞におけるヒストンH4K16アセチル化

胚発生ステージ14のコントロールの始原生殖細胞 (A)、UAS<sub>p</sub>を用いて *mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2* を強制発現させた始原生殖細胞 (B)、UAS<sub>z</sub>を用いて *mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2*、*Mle* を強制発現させた始原生殖細胞 (C) におけるヒストンH4K16アセチル化。緑がヒストンH4K16アセチル化、マゼンタが始原生殖細胞を示す。

次いで、UAS<sub>z</sub> を用いて *mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2* および *Mle* を強制発現した XY 型 (オス) 始原生殖細胞がメス化するかを調べるため、それら因子を強制発現した XY 型 (オス) 始原生殖細胞をメス個体に移植した。その結果、移植した XY 型の始原生殖細胞由来の細胞を有するメス成虫が 18 個体得られ、そのうち 1 個体の卵巣において、移植した細胞が正常に卵形成していた。このことから、遺伝子量補償が付与された XY 型 (オス) 始原生殖細胞が、メス化することが示唆された (論文未発表)。これは、始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如により生み出される、X 染色体上の遺伝子の発現性差により、生殖細胞系列の自律的な性が決まることを示唆するものである。

しかし、*mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2* および *Mle* を強制発現した XY 型 (オス) 始原生殖細胞がメス化する割合は 5% 程度と低かったことから、さらに UAS<sub>z</sub> を用いて全ての MSL 複合体の構成因子の強制発現も行った。その結果、*mSl1*、*mSl2*、*mSl3*、*roX2*、*Mle* を強制発現させた場合と同レベルのヒストン H4K16 がオス始原生殖細胞において観察された。しかし、その XY 型 (オス) 始原生殖細胞のメス化は観察されなかった (移植した XY 型の始原生殖細胞由来の生殖細胞系列を有するメス成虫が 4 個体中、移植した細胞が正常に卵形成していたものは 0 個体)。

以上の結果から、MSL 複合体の構成因子の強制発現だけでは XY 型 (オス) 始原生殖細胞の高効率でのメス化には不十分であることも明らかとなった。このことは、XY 型 (オス) 始原生殖細胞においてメス化を抑制する仕組みが存在することを示唆している。最近、マウスを用いた研究から、Y 染色体が存在すると生殖細胞系列のメス化が阻害されることが報告されていることから、ショウジョウバエ始原生殖細胞においても Y 染色体が同様の機能を有している可能性が考えられる。そこで現在、Y 染色体を持たない XO 型のオス始原生殖細胞において MSL 複合体を強制発現し、メス化が高効率で誘導されるのかを解析中である。

### 研究 2

MSL 複合体の構成因子の発現を抑制する候補遺伝子を選定するため、始原生殖細胞と体細胞間でのマイクロアレイデータを用いて、体細胞に比べ始原生殖細胞で発現の高い RNA の分解に関わる 8 遺伝子を選定した。次に、それら遺伝子を始原生殖細胞においてノックダウンした場合の MSL 複合体の構成因子の発現を *in situ* hybridization 法により調べた。その結果、コントロールと比較して、*nanos* 遺伝子をノックダウンした始原生殖細胞において、*mSl1* mRNA の発現が上

昇した(図2)。このことから、*nanos* 遺伝子がコードする Nanos タンパク質が *msl1* mRNA を分解することが、始原生殖細胞において遺伝子量補償が欠如している原因の一つであることが示唆された(論文未発表)。現在、Nanos タンパク質による *msl1* mRNA の分解機構の詳細をさらに解析している。

一方で、RNA の分解に関わる遺伝子のノックダウンでは、*msl1* 以外の因子の発現に影響は観察されなかった。オス始原生殖細胞におけるそれら因子の発現制御(抑制)の仕組みとして、転写が抑制されている可能性が考えられる。そこで今後は、解析対象を始原生殖細胞において高発現する転写抑制因子にも広げ、それらをコードする遺伝子を始原生殖細胞においてノックダウンした場合に、MSL 複合体の構成因子の発現が上昇するのかを調べる。

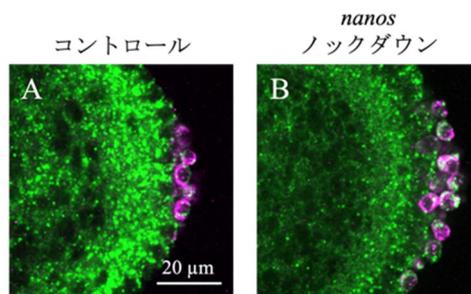


図2. *nanos* をノックダウンした始原生殖細胞における *msl1* mRNA の発現

胚発生ステージ5のコントロール (A) および *nanos* をノックダウン (B) した始原生殖細胞における *msl1* mRNA の発現。緑が *msl1* mRNA、マゼンタが始原生殖細胞を示す。

### 研究3

これまでに、X 染色体上に存在する *Sex-lethal* (*Sxl*) 遺伝子が、始原生殖細胞のメス化に関与することが明らかとなっている。しかし、*Sxl* だけでは効率よくメス化を誘導できない。このことから、*Sxl* 以外にも始原生殖細胞のメス化に関与する X 染色体上の遺伝子が存在すると考えられた。そこで、オスとメスの始原生殖細胞におけるトランスクリプトーム解析データから、オスに比べ、メス始原生殖細胞で 2.5 倍以上発現が高い X 染色体上の 30 遺伝子を、始原生殖細胞のメス化に関わる新規候補遺伝子として選定した。次いで、これら候補遺伝子を始原生殖細胞においてノックダウンした結果、*CG1677* 遺伝子をノックダウンした場合に、卵巣でのみ生殖細胞系列が腫瘍化することが明らかになった(図3)。さらに、(1) 始原生殖細胞における *Sxl* のノックダウンによって起こる卵巣の生殖細胞系列の腫瘍化を、*CG1677* の強制発現ではレスキューできないこと、(2) *CG1677* は始原生殖細胞のオス化に関わる *PHD finger protein 7* (*Phf7*) の発現を抑制することもわかった。

以上の結果は、*CG1677* が、始原生殖細胞のオス化を抑制するとともに、*Sxl* とは独立あるいはその上流で機能し、始原生殖細胞のメス化を誘導することを強く示唆している(論文未発表)。今後は、始原生殖細胞のメス化経路における *CG1677* と *Sxl* との関係を明確にするとともに、始原生殖細胞のメス化における *CG1677* の作用機序を明らかにする研究を展開する予定である。

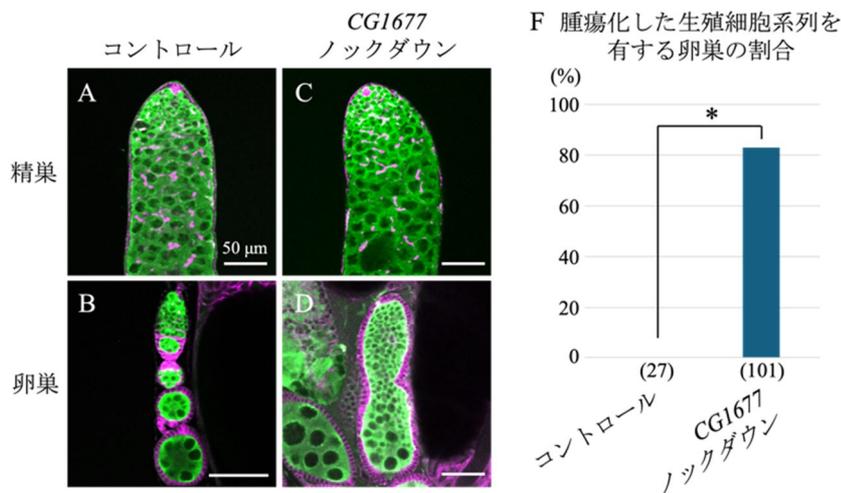


図3. *CG1677* をノックダウンした場合の成虫生殖巣の表現型

(A-D) コントロール (AとB) および *CG1677* を始原生殖細胞でノックダウンした場合 (CとD) の成虫精巣 (AとC) および卵巣 (BとD)。緑が生殖細胞系列、マゼンタが体細胞を示す。(F) 腫瘍化した生殖細胞系列を有する卵巣の割合。カッコ内は観察した卵巣数を示す。\*:  $P < 0.05$  (Fisher's exact test)

以上の本研究で得られた知見は、ショウジョウバエ生殖細胞系列の自律的な性決定機構を明らかにするうえでの新たな基盤となると考えられる。さらに、生殖細胞系列の自律的な性決定は、魚類などでも存在することが明らかになっていることから、進化的にも保存されていると考えられ、本研究は、生殖細胞系列の性決定機構の普遍性を明らかにする研究にもつながると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Mai, Ota Ryoma, Kobayashi Satoru, Yamakawa-Kobayashi Kimiko, Miura Takeshi, Ido Atsushi, Ohhara Yuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Bioproduction of n-3 polyunsaturated fatty acids by nematode fatty acid desaturases and elongase in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transgenic Research	6. 最初と最後の頁 411 ~ 421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11248-023-00363-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ota Ryoma, Miura Hiroki, Masukawa Masaki, Hayashi Makoto, Kobayashi Satoru	4. 巻 48
2. 論文標題 Identification of novel candidate genes leading to sex differentiation in primordial germ cells of <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 119321 ~ 119321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gep.2023.119321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masukawa Masaki, Ishizaki Yuki, Miura Hiroki, Hayashi Makoto, Ota Ryoma, Kobayashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Male-biased protein expression in primordial germ cells, identified through a comparative study of UAS vectors in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00729-1	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 -
1. 著者名 Ota Ryoma, Hayashi Makoto, Morita Shumpei, Miura Hiroki, Kobayashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Absence of X-chromosome dosage compensation in the primordial germ cells of <i>Drosophila</i> embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84402-7	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 印南花奈、前田隼佑、金沢幹太、村田悠太、脇田峻太郎、林誠、小林悟、太田龍馬
2. 発表標題 始原生殖細胞のメス化に関わるCG1677の同定とその役割
3. 学会等名 日本動物学会第76回関東支部大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 太田龍馬、前田隼佑、印南花奈、金沢幹太、村田悠太、脇田峻太郎、林誠、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における新規メス化遺伝子の同定
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増川 柁樹、石崎 優希、林 誠、太田 龍馬、小林 悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における翻訳活性の性差形成機構
3. 学会等名 日本分子生物学会第45回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田龍馬、Fazratul Hasanah Binti Muzayyan、森田俊平、林誠、小林悟
2. 発表標題 Sex determination depending on X-chromosome dosage in primordial germ cells of Drosophila
3. 学会等名 日本発生生物学会第55回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田龍馬、Fazratul Hasanah Binti Muzayyan、森田俊平、林誠、小林悟
2. 発表標題 Sex determination depending on X-chromosome dosage in Drosophila germline
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤真維、大原裕也、井戸篤史、三浦猛、太田龍馬、佐藤昌直、小林公子
2. 発表標題 発育過程のカイコを対象とした脂肪酸組成の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増川 柁樹、石崎 優希、林 誠、太田 龍馬、小林 悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における翻訳活性の性差
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田龍馬、森田俊平、林誠、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ生殖系列におけるX染色体の数に依存した自律的な性決定機構
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田龍馬、小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける生殖系列の品質管理機構
3. 学会等名 新学術領域「配偶子インテグリティの構築」「全能性プログラム」合同公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------