

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06085

研究課題名(和文) イエカ属の性決定機構及びその分子進化の解明

研究課題名(英文) Investigating the molecular mechanism and evolution of sex determination in Culex mosquitoes

研究代表者

糸川 健太郎 (Itokawa, Kentaro)

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官

研究者番号：70769992

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)：昆虫類には様々な性決定機構があり、蚊類もその例外では無い。蚊は重要な疾病の媒介者であり、その性決定機構の理解は重要である。本研究の目的は、イエカ属の蚊における性を決定する遺伝子の特定とこのグループの蚊における性決定機構の分子メカニズムを明らかにすることである。本研究において、異なる二つのイエカ属の蚊から雄特異的なミトコンドリア遺伝子の配列が明らかとなり、他の蚊の相同的遺伝子との進化的な関係を明らかにした。また、性決定で遺伝子が発現する胚期におけるトランスクリプトーム解析を行い、雌雄で特異的に発現する遺伝子調べたが、既知の性決定遺伝子と関連する遺伝子は見つからなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イエカ属は日本脳炎やウエストナイル熱といった重要な疾病を媒介する重要な分類群である。特に蚊類においては雌のみが卵を作るために吸血行動を行いその際に様々な病原体を媒介することを鑑みても、この生物群の性決定機構を理解することは非常に重要である。また、近年遺伝子ドライブに代表される技術では蚊の性決定機構を標的として繁殖を抑制し、個体群のコントロールを行うことが考案されており、性決定機構を分子レベルで理解することはさらに重要となる。本研究では性決定そのものを同定するには至らなかったが、雄が特異的に持つゲノム領域の情報が見えられており、イエカ属の蚊において任意のステージで性別の判別が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Insects have evolved various mechanisms of sex determination. Mosquitoes are important vectors of diseases, making understanding their sex determination mechanisms crucial. The aim of this study is to identify genes determining sex in mosquitoes of the genus Culex and elucidate the molecular mechanisms of sex determination in this group of mosquitoes. In this study, we identified sequences of a male-specific gene from two different species of mosquitoes belonging to the genus Culex and investigated their evolutionary relationship with homologous genes in other mosquitoes. Additionally, transcriptome analysis during embryonic stages, when genes are expressed in sex determination, was conducted, revealing genes that are specifically expressed in males and females. However, no genes associated with known sex determination genes were found.

研究分野：昆虫学

キーワード：蚊 性決定 昆虫 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

生物の雌雄の決定は生命の最も根本的な現象の一つであるにも関わらずその機構は驚くほど多様である。特に昆虫類に関しては細胞学的な観点から人と同様の XY 型、鱗翅目の ZW 型、また膜翅目の半倍数性といったような様々な性決定機構が見られるが、分子生物学的にも異なる分類群・種ごとに進化的に全く関連の無い遺伝子が性決定因子として用いられている。蚊 (Culicidae) はマラリアやデング熱といったヒトの重要な疾病を媒介する重要な分類群であるが、蚊類の性決定機構にはいずれの種でも異形 Y 染色体 (染色体の構造が明らかに異なり組み換えを起こさない) あるいは同型の第一染色体上に存在する顕性のオス性決定因子 (M 因子) が関わっていることが古くから知られていた。この M 因子の分子の実体に関しては長年の間不明であったが、2015 年にネッタシマカから遺伝子 Nix が、2016 年にはガンビエハマダラカからは Yob と呼ばれる遺伝子がそれぞれの種における M 因子として特定された (Hall et al. 2015; Krzywinska et al. 2016)。Yob と Nix の間には相同性は見いだされず全く異なる由来の遺伝子であると考えられる。興味深いことに、ガンビエハマダラカと同じハマダラカ属の蚊であるステフェンスハマダラカからは Guy1 と名付けられた M 因子と考えられる遺伝子が 2016 年に分離されたが (Criscione, Qi, and Tu 2016)、Yob と Guy1 の間で二次構造以外の相同性は全く見いだされず、これも進化的に独立に獲得された遺伝子であることが示唆されている。このように蚊類の中で“顕性のオス決定因子”というメカニズムを保存しながらも、M 因子となる遺伝子そのものは、種分化の過程で柔軟に変更していったことを示している。

蚊はマラリアやデング熱といったヒトの重要な疾病を媒介する重要な分類群である。特に蚊類においては雌のみが卵を作るために吸血行動を行いその際に様々な病原体を媒介することを鑑みても、この生物群の性決定機構を理解することは非常に重要である。また、近年遺伝子ドライブに代表される技術では蚊の性決定機構を標的として繁殖を抑制し、個体群のコントロールを行うことが考案されており、性決定機構を分子レベルで理解することはさらに重要となる。イエカ属 (*Culex*) は日本脳炎、ウエストナイルウイルス熱、フィラリア症といった人の病気を媒介する種を含む重要な分類群である。イエカ属の性決定機構にも M 因子が第一染色体に存在することは古くから知られていたが (Gilchrist and Haldane 1947)。しかしながらこれまでに見つかっている M 因子 (Yob, Guy1, Nix) に相同性のある遺伝子はゲノム中からは発見されておらず、この属の蚊もまた独自の性決定因子を持っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では日本脳炎、フィラリア症やウエストナイル熱の媒介者であるイエカ (*Culex*) 属の蚊における性を決定する遺伝子 (M 因子) を特定すること、および性決定機構の分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、イエカ属のモデルとしてネッタイエカ (*Culex quiquefasciatus*) を主に用い、次世代シーケンサー等の技術を用いて比較ゲノム、転写物解析等の手法から目的遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 雄特異的なミオシン重鎖様遺伝子の解析

ネッタイエカのゲノムは 2000 年代にサンガー法に基づくアセンブリが行われた (Arensburger et al. 2010)。しかしながら、このプロジェクトによって得られたアセンブリ (CpipJ2) は多くのギャップを含み、また M 領域を含む第一染色の複雑な領域に関してはアセンブリされていない。そこで申請者は近年、開発が進んだロングリードシーケンシング技術 (ナノポアシーケンサー) によるネッタイエカ全ゲノムの再アセンブリを行ってきた。ネッタイエカのオスから抽出した超高分子 DNA のロングリードデータおよびオス・メスそれぞれから抽出したゲノム DNA のショートリードデータから、既存の CpipJ2 と比べ遥かに質の高いアセンブリが得られている。この研究で得られたアセンブリについて、オス・メス由来のショートリードデータをそれぞれマッピング・比較し、オスだけに特異的に存在する染色領域を含むコンティグを見出した。このコンティグにはミオシン重鎖と相同性のある遺伝子が見つかっている。これまでに、別の属の蚊であるネッタシマカの M 因子 Nix が発見された際に、その近傍にやはり雄特異的なミオシン重鎖様遺伝子が発見されており、*myo-sex* と名付けられた。

ネッタイエカから新たに発見したミオシン重鎖様遺伝子も雄特異的な遺伝子であり、この遺伝子を用いて分子的に任意のステージで雌雄の判定が可能となることを確認していることから、Cpip *myo-sex* と名付けた。また、研究期間中に別のイエカ属の蚊であるコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) のゲノムシーケンスを行い、この蚊からも雄特異的な領域を含むコンティグとその中に存在するミオシン重鎖様遺伝子を見つけることができた (Ctri *myo-sex*)。興味深いことにシマカ属 (*Aedes aegypti*, *A. albopictus*) とイエカ属のこれら雄特異的なミオシ

ン重鎖様遺伝子の分子系統関係を調べたところ、進化的には直接的な関係が無いことが示唆された(図1)。また、ネッタイエカ、コガタアカイエカのオス特異的領域には、*myo-sex* 以外に他の既知の M 因子の相同遺伝子やその他の明らかなタンパクコード領域を見つけることはできなかった。*myo-sex* の機能については現在のところ殆ど不明であるが、蚊は性決定にミオシン重鎖様遺伝子を必要としつつ、遺伝的には異なる起源からそのメカニズムを進化させた可能性がある。

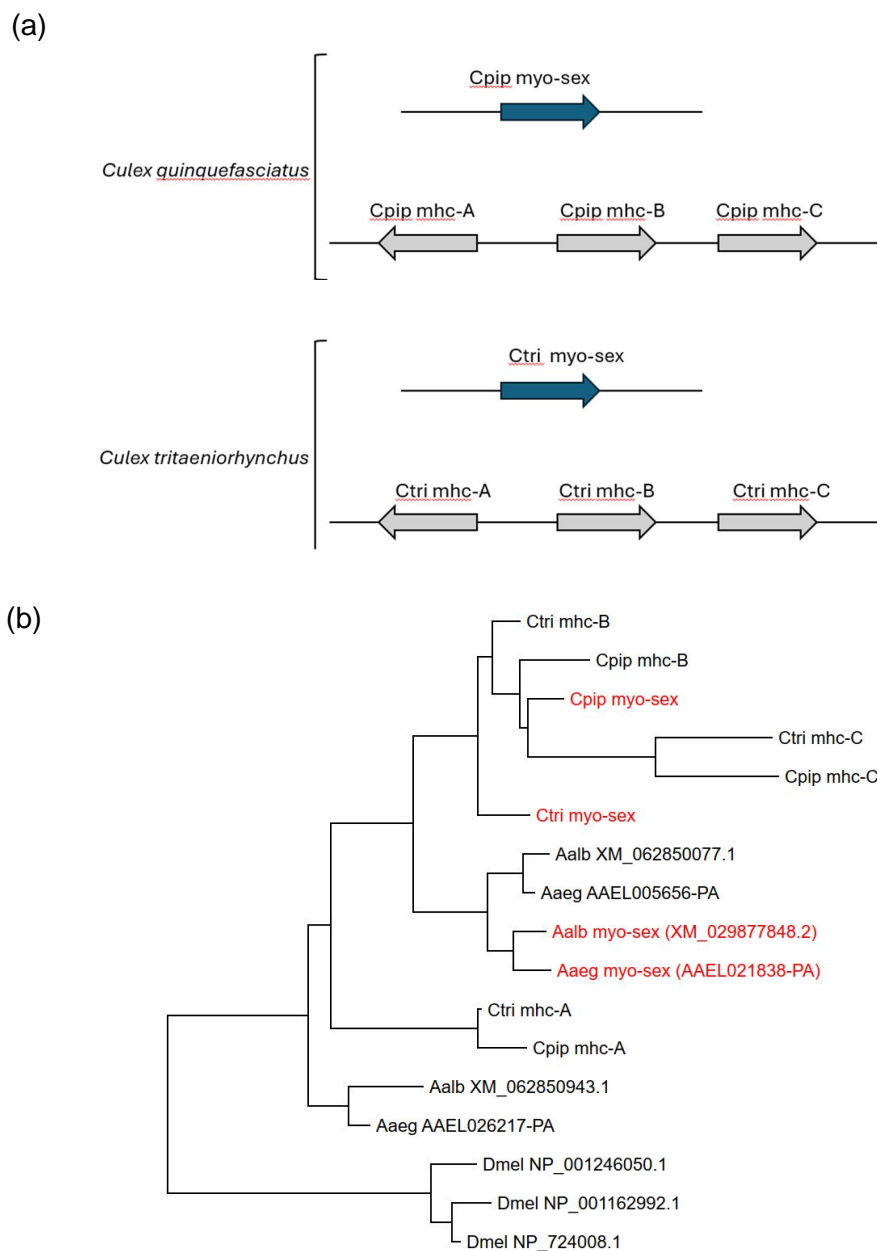


図1 A イエカ属の雄特異的なミオシン重鎖様遺伝子(*myo-sex* 遺伝子)と通常ミオシン重鎖様遺伝子(*mhc*)のゲノム上の構造. B イエカ属、シマカ属(*Aaeg*, *Aalb*)およびショウジョウバエ(*Dmel*)の *mhc* 遺伝子の分子系統樹。

(2) 成虫期および胚期におけるトランスクリプトーム解析

これまでに見つけている雄特異的ゲノム領域から転写物を産する配列を見つけるため、ネッタイエカ雄及び雌成虫の全 mRNA 配列の mRNA-seq 解析を行った。雌雄で特異的に発現している遺伝子群を見出したが、一方で、これまで特定している雄特異的な染色体領域に存在している遺伝子については *myo-sex* 以外で発現している遺伝子を見出すには至らなかった。イエカ属の場合、卵は産下後約 48 時間で孵化し一令幼虫となる。イエカ属の未知の M 因子はこの間のみ特異的に発現していると考え、産下 24 時間後の胚から抽出した RNA を元に mRNA-seq 解析を行った。しかしながら、この解析においてもやはり雄特異的ゲノム領域から *myo-sex* 以外で発現している遺伝子を見出すには至らなかった。

(3) *dsx* 遺伝子のスプライシングパターンの解析

昆虫の性決定において大本の性決定因子は様々であるが、その下流に存在する機構は比較的保存されている。Doublesex (*dsx*) 遺伝子は多くの昆虫で性決定に関し重要な役割を担っていることが知られており、その転写物で性特異的なスプライシングパターンを示す。胚期における *dsx* の性特異的なスプライシングパターンを調べることで、M 因子が発現するタイミング絞り込むことができると考えた。ネッタイエカの *dsx* 遺伝子は、性特異的なエクソン周辺で、少なくとも 4 種類のスプライシングバリエーションがあることが分かった(図 2A)。このうち 4 つは終止コドンを含む雌特異的なエクソンを含み、残りの一つが雄特異的なエクソンを含んでいた。胚期の産下後の各時点において各バリエーションの存在比を調べた。この際に、*myo-sex* 遺伝子をマーカーとして各胚の遺伝的雌雄を同時に決定した。産下直後から f1 というバリエーションが存在していることが分かったがこれは恐らく、母性因子に由来する RNA と考えられる(図 2B)。雄特異的なバリエーションである m1 は雌の胚では終止発現が見られなかったが、雄の胚では産下後 15 時間程度から発現が観察された。

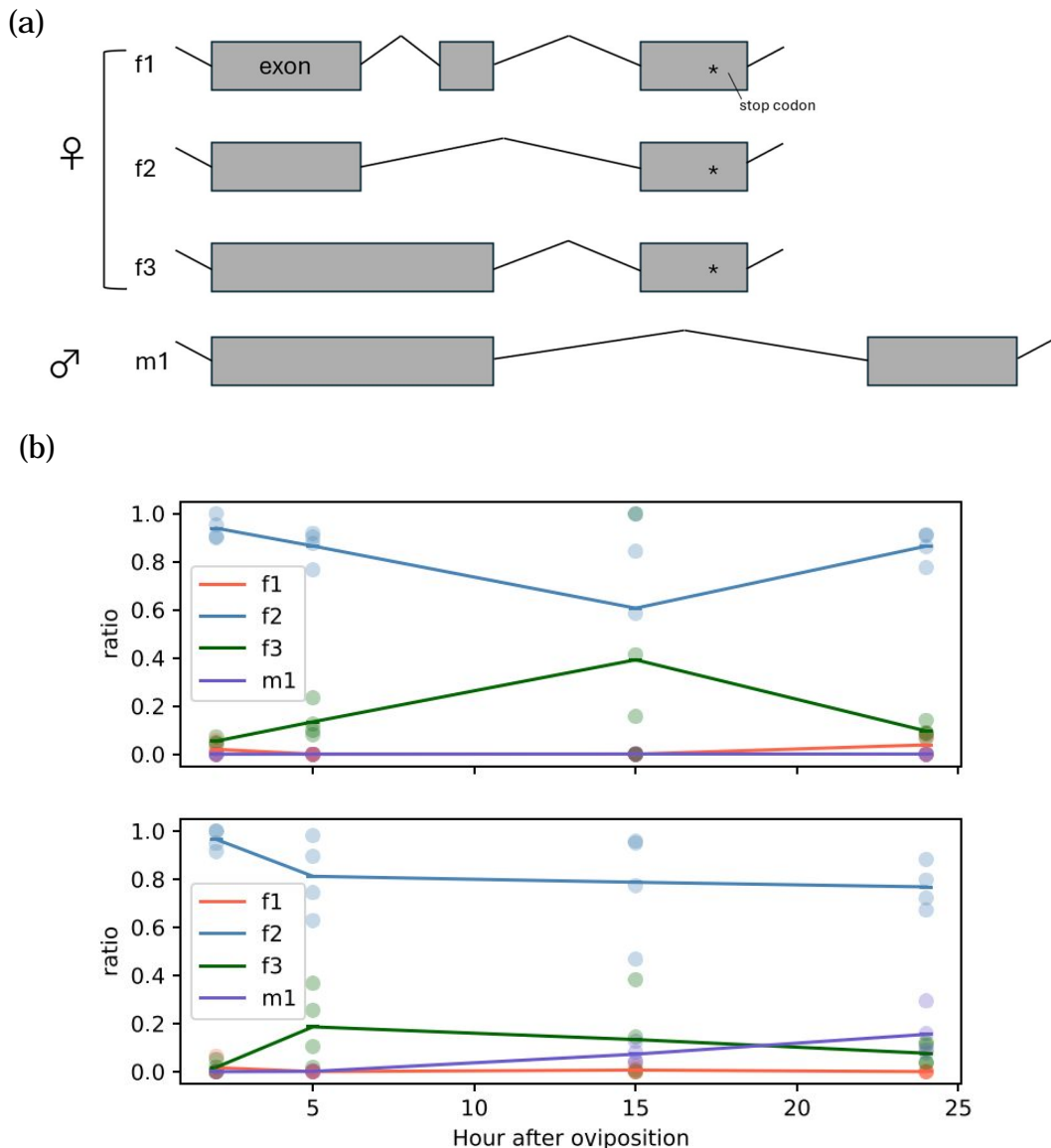


図 1 A ネッタイエカ *dsx* 遺伝子のスプライシングバリエーション. B 各 *dsx* スプライシングバリエーションの胚期における存在比。

Quinquefasciatus Establishes a Platform for Mosquito Comparative Genomics.”
Science 330: 86-88.

Criscione, F., Y. Qi, and Z. Tu. 2016. “GUY1 Confers Complete Female Lethality and Is a Strong Candidate for a Male-Determining Factor in *Anopheles Stephensi*.”
ELife 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19281>.

Gilchrist, B. M., and J. B. S. Haldane. 1947. “SEX LINKAGE AND SEX DETERMINATION IN A MOSQUITO, *CULEX MOLESTUS*.” *Hereditas* 33: 175-90.

Hall, Andrew Brantley, Sanjay Basu, Xiaofang Jiang, Yumin Qi, Vladimir A. Timoshevskiy, James K. Biedler, Maria V. Sharakhova, et al. 6 2015. “SEX DETERMINATION. A Male-Determining Factor in the Mosquito *Aedes Aegypti*.” *Science* 348: 1268-70.

Krzywinska, E., N. J. Dennison, G. J. Lycett, and J. Krzywinski. 2016. “A Maleness Gene in the Malaria Mosquito *Anopheles Gambiae*.” *Science* 353: 67-69.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Itokawa
2. 発表標題 New genomics technologies and their applications to vector research
3. 学会等名 23rd National Parasitology Congress of Turkey (招待講演)
4. 発表年 2023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
研究分担者	駒形 修 (Komagata Osamu) (20435712)	国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長 (82603)	

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