

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657154

研究課題名（和文） ギボシムシゲノムに見出された昆虫性決定遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of an insect sex determining gene found in *Saccoglossus kowalevskii* genome.

研究代表者

鈴木 雅京 (SUZUKI MASATAKA)

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）：我々は、ギボシムシ (*Saccoglossus kowalevskii*) のゲノムに昆虫性決定において中心的な役割を持つ遺伝子として知られる *tra* の相同遺伝子 *Sktra* を見つけ、その完全長 cDNA の塩基配列並びに遺伝子構造を決定した。RT-PCR 解析の結果、昆虫の *tra* とは異なり、*Sktra* には性特異的なスプライスバリエントが存在しないことが明らかとなった。しかし、*Sktra* は精巣における発現量が卵巣に比べ 9 倍以上高かったことから、*Sktra* がギボシムシの性分化に関与する可能性が示唆された。昆虫培養細胞を利用した splicing assay の結果、*Sktra* を *Sktra-2* と共発現させるとショウジョウバエ *dsx* ミニ遺伝子の splicing を雌型に誘導出来ることが判明した。以上の結果から、*Sktra* がショウジョウバエの *tra* の機能を保持していることが明らかとなった。この研究により、新口動物において昆虫の *tra* 遺伝子と互換性を示す遺伝子を同定するという、世界初の研究成果を収めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have found a gene (here after, depicted as *Sktra*) in *Saccoglossus kowalevskii* genome that is closely similar to a *tra* gene which is known to act as a central role in insect sex determination and determined its full-length cDNA sequence and its exon/intron structure. RT-PCR analyses demonstrated that, differ from the insect *tra* gene, no sex-specific splicing variants were observed in *Sktra* transcripts. The expression level of *Sktra* mRNA in testes is 9-fold higher than in ovaries. This result raises the possibility that *Sktra* is involved in sexual differentiation of *S. kowalevskii*. Splicing assays using insect culture cells revealed that *Sktra* can induce female-specific splicing of *Drosophila dsx* minigene pre-mRNA when co-transfected together with *Sktra-2* cDNA. This result strongly suggests that the splicing activity specifically identified in insect Tra proteins is conserved in SkTra protein. We provide the world's first evidence that demonstrates functional conservation of *tra* gene found in deuterostomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：性決定、性分化、選択的スプライシング、ギボシムシ、進化

1. 研究開始当初の背景

(1) 性決定機構の多様性について

1990 年代、性決定の根幹を担う性決定カスケードの全体像が少しずつ明らかになり始めた。その結果、少なくともショウジョウバエ、線虫、マウスなどのモデル生物において共通

する性決定遺伝子は見当たらず、性決定機構は生物種によって大きく異なると考えられるようになった。2000 年代に入って、性決定カスケードに関する更に詳細な研究が加わることにより、DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインをもつ転写因子 (DMRT) が様々

な生物種において発見され、性決定遺伝子として機能的にもある程度保存されていることが明らかになることにより、性決定機構にも共通の祖先型が存在すると考えられるようになったが、現時点ではそれを想像することも困難なほど情報が限られている。

(2) ギボシムシゲノムにおける昆虫性決定遺伝子の発見

申請者は昆虫の性決定機構に関する研究を専門としているが、ある時昆虫において中心的な役割を担う *transformer* (*tra*) と *doublesex* (*dsx*) が、昆虫以外の生物において保存されているかどうかを確認する目的で blast サーチを行ったところ、半索動物である ギボシムシ (*Saccoglossus kowalevskii*) の EST データベースの中から *tra* と *dsx* に相同性を示す遺伝子を発見した。この発見により我々は、後口動物の祖先種は昆虫に近い性決定機構を有していたとの仮説を立て、それを証明すべく本申請課題を着想するに至った。

(3) ギボシムシとは

ギボシムシについては、世界的にも研究例が非常に乏しいのが現状であり、性決定機構についての研究も成されていない。この点で、本研究の取り組みは斬新且つ独自性が高いと言える。ギボシムシは後口動物の共通祖先に最も近い動物であると考えられており、近年になって進化発生学分野において注目を集めるようになってきた。従って、ギボシムシの性決定機構が明らかとなれば、後口動物の共通祖先がかつて有していた性決定機構について類推することが可能となる。尚かつギボシムシが昆虫と類似した性決定機構をもつことを明らかに出来れば、後口動物の性決定機構は元来前口動物と共通の性決定機構を有していたが、後口動物の進化と共に多様に変化していったと見なすことが可能となる。このように、本研究は性決定機構の進化が辿った道筋について全く新しい可能性を示唆出来るという点で意義深い。

2. 研究の目的

性決定機構は生物種によって大きく異なる。例えば、哺乳類の性決定のマスター遺伝子として知られる *Sry* は、哺乳類以外の生物には見つからない。ショウジョウバエの性決定遺伝子である *Sxl* や *tra* についても、昆虫以外の生物では未だ発見されていない。しかし、現在ではこのように多岐に分化した性決定機構も、祖先型が存在したに違いない。最近我々は、昆虫の性決定において中心的な役割を担う *tra* や *dsx* のホモログと推定される遺伝子を、ギボシムシの EST データベースの中

に見出した。ギボシムシは、我々ヒトや哺乳類を含む後口動物の共通祖先に最も近い動物と言われている。以上の事実から我々は、後口動物の共通祖先は昆虫により近い性決定機構を有していたのではないかと、この大胆な仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説を立証するためにギボシムシにおける性決定機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *Sktra* mRNA の発現パターン性の差解析とスプライシングアイソフォームの探索
我々が *Saccoglossus kowalevskii* のゲノム中に見出した *tra* のホモログと予想される遺伝子 (以後 *Sktra*) が昆虫の *tra* と同様に雌雄で異なるスプライシングを受ける結果、性差を示すスプライシングアイソフォームが生じるか否かを調べる。また、その発現量についても性差が見られるか否か確認する。もし、スプライシングパターンに明確な雌雄差が見られるのなら、*Sktra* はギボシムシの性決定に関与する可能性が高い。

(2) *in vitro* splicing アッセイ系を利用した *Sktra* の機能解析
Sktra がショウジョウバエの *Tra* と同様に *dsx* pre-mRNA の雌型スプライシングを誘導する活性を有するか否かを明らかにする。このために、昆虫培養細胞を用いた *in vitro* splicing アッセイ系を利用して *Sktra* が *Tra* と同様にショウジョウバエの *dsx* の雌型のスプライシングを誘導出来るか否かを評価する。

(3) ギボシムシ生体内における *Sktra* の機能解析
Sktra のギボシムシ生体内における機能を明らかにするため、*Sktra* を標的とする siRNA 処理により、*Sktra* のノックダウン実験を試みる。ギボシムシの RNAi については報告例がないため、ギボシムシを扱った研究に詳しい宮本教生博士 (JAMSTEC 研究員) と共同で RNAi の条件検討を行う。次に RNAi によって *Sktra* の発現を抑制した場合、実際にギボシムシの性分化に性転換を始めとする形態的異常が見られるか否か確認する。

(4) *Skdsx* の機能解析と *Sktra* との関連性の確認
Sktra が性決定遺伝子としての機能を有することが判明したなら、ギボシムシの *dsx* のホモログと予想される遺伝子 (以後 *Skdsx*) と *Sktra* との関連性について調べる。まず、*Skdsx* が昆虫の *dsx* と同様、雌雄で異なるスプライシングを受ける結果、性差を示すスプライシングアイソフォームを生じるか否かについて調べる。*Skdsx* が性特異的スプライ

シングを受けることが確認されたなら、それが *Sktra* の働きによって制御されていることを *in vitro* splicing アッセイ系の利用により確認する。また、*Skdsx* が実際にギボシムシの性決定に関与するか否かを RNAi によって確認する。最後に、*dsx* の標的となる遺伝子を ChIP-Seq 法により明らかにし、ショウジョウバエとギボシムシの間で比較することによって、性分化の発現に関わる遺伝子群の進化について考察する。

4. 研究成果

(1) シモダギボシムシを用いたギボシムシ *tra* 遺伝子の単離同定

Saccoglossus kowalevskii はアメリカ産のギボシムシであり、日本近海には生息していない。そこで、日本国内で入手可能であり、発生学の研究材料としての知見の蓄積があるシモダギボシムシ (*Balanoglossus simodensis*) を材料として研究を始めた。*Sktra* の部分配列を参照に設計したプライマーを用いて RT-PCR 及びゲノム DNA を鋳型とした PCR を行ったが、何れも目的の増幅産物を得ることは出来なかった。シモダギボシムシについては、全ゲノム解析がなされていないため、*S. kowalevskii* と同様に *tra* 相同遺伝子を持つか否か判断することができず、その塩基配列も入手することが出来ないため、*Tra* の保存領域をコードする塩基配列に対する縮重プライマーを設計し、再度 RT-PCR 及びゲノム PCR を行ったが、増幅産物を得ることができなかった。このことから、シモダギボシムシの *tra* 相同遺伝子は *Sktra* とは相同性が低いか、もしくは *tra* 相同遺伝子を持たないことが予想された。

(2) *S. kowalevskii* の *tra* 相同遺伝子、*Sktra* の構造決定

そこで、*S. kowalevskii* のゲノムプロジェクトの中心人物である Christopher Lowe 博士に試料の提供を依頼し、*Sktra* の完全長 cDNA を含むプラスミドと精巣、卵巣を提供して頂いた。*Sktra* の完全長 cDNA 含むプラスミド DNA を塩基配列解析に供試し、その全長構造を決定した。その結果、*Sktra* cDNA は全長 6719bp であり、*Tra* に特徴的な SDP-N ドメインの他、RS ドメインを含む 1261 アミノ酸からなる巨大なタンパク質をコードすることが判明した。しかし、*Tra* に特徴的と言われるプロリンリッチドメインは見当たらなかった。ゲノム配列との比較により遺伝子構造を調べた結果、cDNA は 5 つのエクソンからなり、遺伝子のサイズは 17725bp であることが明らかとなった。また、エクソン 2 には *Tra*/*Tra*2 複合体の結合配列として知られる *dsxRE* に非常によく似た塩基配列が 4 コピー存在することがわかった。このことから、昆虫で同定された多くの *Tra* 同様、

SkTra が自身の pre-mRNA に結合し、スプライシングを自己制御する機能をもつ可能性が示唆された。

(3) *Sktra* mRNA の発現パターンと発現量の性差解析

次に *Sktra* cDNA の塩基配列を基に複数のプライマーを設計し、*S. kowalevskii* の成体の精巣と卵巣から調製した Total RNA を鋳型に cDNA を合成後、RT-PCR 解析を行った。その結果、*Sktra* の発現パターンに雌雄差は見られないことが明らかとなった。この結果から、昆虫の *tra* とは異なり、*Sktra* には性特異的のスプライシングバリエーションが存在しないと言える。次に *Sktra* の mRNA の発現レベルを qRT-PCR により定量した結果、*Sktra* の精巣における発現量が卵巣に比べ 9 倍以上高いことがわかった。このことから、*Sktra* がギボシムシの精巣において何らかの機能を有するか、もしくは生殖器官の性分化に関与する可能性が示唆された。

(4) *in vitro* splicing アッセイ系を利用した *Sktra* の機能解析

申請者は以前の研究で、*tra* 及び *tra-2* の機能を評価するため、昆虫培養細胞を利用した *in vitro* assay 系の構築を報告した (Suzuki et al., 2012)。そこで、*SkTra* がショウジョウバエの *Tra* と同様に *dsx* pre-mRNA の雌型スプライシングを誘導する活性を有するか否かについて、この *in vitro* splicing assay 系を用いて評価することにした。その結果、*SkTra* を単独で発現させた場合は目的とする活性が見られなかった。そこで *Tra* の補因子として知られる SR タンパク質をコードする *tra-2* の相同遺伝子 *Sktra-2* を *S. kowalevskii* ゲノム中から探し出し、その cDNA を *SkTra* と共に共発現させたところ、非常にわずかではあるものの *dsx* の雌型のスプライシングを確認することができた。以上の結果は、*SkTra* がショウジョウバエの *Tra* の機能を保持していることを示している。また、*SkTra* 単独の発現では *dsx* の雌型のスプライシングを誘導出来なかったことから、昆虫の *Tra-2* は *SkTra* とは相互作用出来ない可能性が示唆された。

(5) 生体内における *Sktra* の機能解析

Sktra が実際にギボシムシの性決定に関与することを示すためには、ギボシムシ生体内において *Sktra* の機能を評価する必要がある。しかし、現時点ではギボシムシにおける RNAi や遺伝子組換え体の作成が不可能なこと、さらに *S. kowalevskii* は日本近海には生息せず入手が困難であるなどの理由から、当初計画していた RNAi による機能抑制実験を行うことを断念せざるを得なかった。そこで、*SkTra* が *Tra* と同様の機能をもつか否かについて、ショウジョウバエ個体を用いた解析を行うことにし

た。このために、GAL4-UAS発現システムを利用して*Sktra*を強制発現させることのできる遺伝子組換えショウジョウバエ系統を複数樹立した。マーカー遺伝子の発現による雌雄を判別でき、なおかつ全身でGAL4をドライブさせることが可能なBsY, Act-GAL4系統も合わせて樹立した。今後はこれら2つの系統を交配し、雄個体において*SkTra*を強制発現させることにより、性転換を引き起こすことが出来るか否かについて確認する予定である。

(6) 半索動物近縁種における *Sktra* 相同遺伝子の探索

上述したとおり、シモダギボシムシにおける *Sktra* 相同遺伝子を取得することが出来なかったことから、今回我々が同定した *Sktra* が示した *tra* に対する相同性は偶然である可能性も否めない。そこで、半索動物に近縁であり、ゲノム解析も進んでいる動物のゲノム中に *Sktra* と相同性を示す遺伝子が存在するか否か調べることにした。フロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*)、アメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratustra*)、カサガイの1種 (*Lottia gigantea*)、ゴカイの1種 (*Capitella teleta*)、イソギンチャクの1種 (*Nematostella vectensis*)、平板動物の1種 (*Trichoplax adhaerens*) のゲノムブラウザを利用して、*SkTra* のアミノ酸配列を query とした tblastn サーチを行った結果、アメリカムラサキウニのゲノム中に *SkTra* の SDP-N ドメインと高い相同性を示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を見出すことができた。調査の対象とした動物のうち、アメリカムラサキウニは半索動物であるギボシムシと最も近縁の棘皮動物に属する。以上の結果は、*Sktra* が半索動物と棘皮動物が分岐する以前から存在していたことを強く支持している。

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 1 件)

(1) Kawamura M, Akiyama T, Tsukamoto S, Suzuki MG, Aoki F. (2012) The expression and nuclear deposition of histone H3.1 in murine oocytes and preimplantation embryos. 査読有, *Journal of Reproduction and Development*. Vol. **58**, 2012, pp. 557-562.

[学会発表] (計 1 件)

(1) 鈴木雅京、カイコにおける遺伝的性決定機構、日本進化学会第14回大会(招待講演)、2012年08月23日、首都大学東京南大沢キャンパス

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 雅京 (SUZUKI MASATAKA)

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