

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660265

研究課題名(和文) 昆虫性決定カスケードの起源の解明

研究課題名(英文) Analysis of insect-specific sex determination mechanisms

## 研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI, TERUYUKI)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授

研究者番号：00293712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫のみが獲得した昆虫特異的な分子メカニズムとして、性特異的スプライシングが中心的な役割を果たす性決定カスケードに着目し、昆虫に特異的な性決定メカニズムの進化的起源の解明に挑んだ。

その結果、これまでに報告のなかった不完全変態昆虫のコオイムシおよびフタホシコロオギ、無変態昆虫のマダラシミから、doublesex (dsx) 遺伝子のクローニングに成功した。さらに、マダラシミ dsx の発現解析の結果、マダラシミの dsx はこれまでに報告のない新規の発現様式を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In insects, sex-specific alternative splicing plays central roles on sex determination. As an initial step to understand the evolution of insect-specific sex determination mechanisms, we focused on the sex determination gene doublesex (dsx).

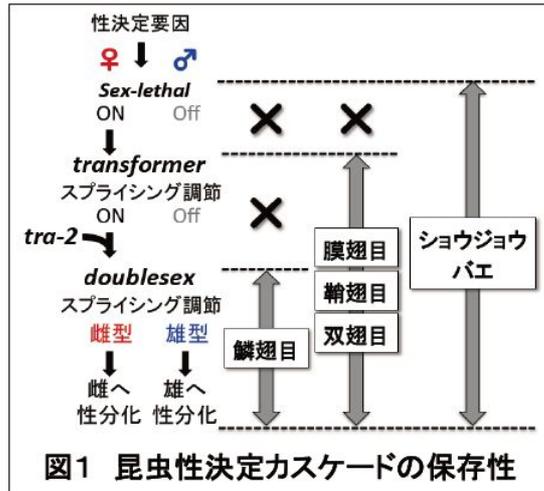
In this study, we successfully cloned dsx from two hemimetabolous insects such as the ferocious water bug, *Appasus japonicas* and the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*, and the ametabolous insect, *Thermobia domestica*. Interestingly, the dsx of *T. domestica* showed a novel expression pattern between males and females.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：性決定カスケード doublesex

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫の性決定カスケードは、性特異的なスプライシング調節が中心的な役割を果たす点で、他の生物群には存在しない昆虫特異的な分子メカニズムであると考えられる。ショウジョウバエや他の完全変態昆虫で解明された性決定カスケード(図1)は、“ボトムアップ仮説”(Wilkins, 1995)に従い、下位の遺伝子ほど広く保存されている。最下



流において性的二型形質を支配する転写因子をコードする *doublesex* (*dsx*) は、昆虫のみならず線虫や脊椎動物まで進化的に非常に高く保存されている (Kopp, 2012)。

(2) 昆虫に特徴的なのは、*dsx* は雌雄で異なるスプライシング調節を受け、雌雄でC末端のみが異なるタンパク質が翻訳され、雌雄それぞれの性分化を支配する点である。興味深いことに、昆虫に最も近縁な姉妹群である甲殻類のオオミジンコの *dsx* は、性特異的なスプライシング調節を受けず、昆虫とは異なるメカニズムで性分化を支配することが判明した (Kato et al., 2011)。従って、昆虫に特異的な *dsx* の雌雄で異なるスプライシング調節メカニズムは、甲殻類と完全変態昆虫の間に位置する系統で獲得されたと予想される。しかしながら、無変態昆虫および不完全変態昆虫の性決定カスケードに関する研究は皆無である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、昆虫のみが獲得した昆虫特異的な分子メカニズムとして、性特異的なスプライシングが中心的な役割を果たす性決定カスケードに着目した。これまでに行われた甲殻類と完全変態昆虫を用いた研究から、*doublesex* (*dsx*) 遺伝子の性特異的なスプライシング調節の起源は、これらの系統間に存在することが予想された。

(2) 本研究では、申請者が無変態昆虫のマダラシミ (*Thermobia domestica*) において確立した embryonic RNAi (RNA interference) 法 (細胞膜が生じる以前の初期胚への RNA 干

渉法) ならびに nymphal RNAi 法 (幼虫体腔への二本鎖 RNA のインジェクションによる RNAi 法) などの遺伝子機能解析法を背景に、重要な系統に位置する各種昆虫の *dsx* 遺伝子を解析することにより、昆虫に特異的な性決定メカニズムの進化的起源の解明に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) 供試生物

- 不完全変態昆虫
  - コオイムシ (*Appasus japonicas*; 半翅目)
  - レッドローチ (*Blatta lateralis*; 蜚蠊目)
  - フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*; 直翅目)
- 無変態昆虫
  - マダラシミ (*Thermobia domestica*; 総尾目)
- 甲殻類
  - オカダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*)

(2) 各種昆虫および甲殻類からの性決定遺伝子のクローニング

上記の供試生物の成虫の雄雌それぞれ1個体から付属腺を含む精巢と付属腺を含む卵巣を解剖摘出したものをサンプルに用いた。全 RNA を抽出し、ファーストストランド cDNA を合成した。プライマーは、キロショウジョウバエの *dsx*、*transformer-2* (*tra-2*) および *ribosomal protein 49* (*rp49*) 遺伝子のアミノ酸配列を元に相同性検索を行い、各種昆虫から得られた配列を Clustal W 解析を用いて多重整列して、複数の昆虫種間で高く保存された領域から作製した。これらプライマーを使用して、RT-PCR 法により目的とする遺伝子の部分配列を得た。さらに、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を行い全長 cDNA のクローニングを試みた。

(3) RT-PCR 法を用いたマダラシミ *dsx* (*Tdom-dsx*) およびレッドローチ *tra-2* (*Blat-tra-2*)、マダラシミ *tra-2* (*Tdom-tra-2*)、オカダンゴムシ *tra-2* (*Avul-tra-2*) の発現解析

PCR テンプレートの調整

*Tdom-dsx* の発現解析には、9、10 齢の雌雄から頭部、胸部と腹部 1-7 節、腹部 8-10 節、生殖巣をサンプルに用い、前述と同様の方法でファーストストランド cDNA を調整した。また、各種生物の *tra-2* の発現解析には、前述の項目 (2) で調整したファーストストランド cDNA を発現解析のテンプレートに使用した。

RT-PCR 法

各種生物から得られた塩基配列情報に基づき、センスプライマー、アンチセンスプライマーを設計し、AmpliQ Gold® 360 (Thermo

Fisher Scientific)を用いて PCR を行った。内部標準コントロールには、それぞれの生物の *rp49* を用いた。

(4) マダラシミおよびフタホシコロギにおける nymphal RNAi 法を用いた *dsx* の機能解析

#### 二本鎖 RNA の合成

RACE 法により得られた配列内で PCR 産物の長さが 300-500 bp になるよう二本鎖 RNA 合成用のプライマーを設計し、T7 プロモーター (TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC) をプライマーの 5 側に付加した。これらプライマーを使用して、前述のファーストストランド cDNA をテンプレートに用い、二本鎖 RNA 合成用のテンプレートを調整した。MEGAscript™ T7 Kit (Ambion) を用いて、キットのプロトコルに従い二本鎖 RNA を合成した。

#### マイクロインジェクション

フタホシコロギについては 7 齢 (終前齢) の幼虫、またマダラシミについては脱皮後 24 時間以内の 6 齢幼虫を使用した。インジェクター (FemtoJet; Eppendorf) を用いて、二本鎖 RNA をマイクロインジェクションした。なお、コントロールには *gfp* の二本鎖 RNA を使用した。

## 4. 研究成果

(1) 各種昆虫からの *dsx* cDNA の部分配列のクローニング

不完全変態昆虫のコオイムシ、レッドロチ、フタホシコロギ、無変態昆虫のマダラシミ、および甲殻類のオカダンゴムシから *dsx* cDNA の部分配列のクローニングを試みた。様々なプライマーの組み合わせで RT-PCR 法を行った。その結果、いずれの生物種においても約 60 bp の PCR 産物が得られた。

(2) 各種昆虫からの *dsx* cDNA の全長配列のクローニング

完全変態昆虫の *Dsx* は、性特異的スプライシングにより、雌雄で異なるアイソフォームが存在することが知られている。そこで、今回得られた *Dsx* においても雌雄で異なるアイソフォームの存在を確認するため、RACE 法を行い、全長 cDNA のクローニングを試みた。

その結果、コオイムシからは *dsx* の 3 側において雄のサンプルから 3 種類の塩基配列が、雌のサンプルから 2 種類の塩基配列が得られた。フタホシコロギからは *dsx* の 3 側において雄のサンプルから 1 種類の塩基配列が、雌のサンプルから 3 種類の塩基配列が得られた。マダラシミからは *dsx* の 3 側において、雌雄それぞれのサンプルから 4 種類の塩基配列が得られた。また、マダラシミの

*dsx* の 5 側において、雄のサンプルから 1 種類の塩基配列が、雌のサンプルから 2 種類の塩基配列が得られた。オカダンゴムシの雌からは 1 種類の塩基配列が得られた。

(3) *Dsx* アミノ酸配列の比較

得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、既知の *Dsx* および *Dmrt* のアミノ酸配列も含めて数種昆虫種間で比較した。その結果、今回クローニングしたコオイムシ、フタホシコロギ、マダラシミの *Dsx* の雌雄共通領域では、数種昆虫の *Dsx* と高い相同性を示した。従って、本研究によりクローニングした cDNA は確かに *dsx* であると判断した。

一方、今回クローニングしたオカダンゴムシのアミノ酸配列には、*Dsx* で保存された OD ドメイン (oligomerization domain) と相同性のある配列は認められなかった。さらにキイロショウジョウバエの *Dmrt* (Doublesex-and mab-3-related transcription factor) と比較した結果、比較的高い相同性を示すことが判明した。従って、本研究でクローニングしたオカダンゴムシの cDNA は *dmrt* であると判断した。

(4) RT-PCR 法を用いた *Tdom-dsx* の発現解析

*Tdom-dsx* mRNA の発現の性差を調査するため、9 および 10 齢幼虫の雌雄それぞれから、頭部、胸部と腹部 1-7 節、腹部 8-10 節、生殖巣をサンプルに用いて RT-PCR 法に基づく発現解析を行った。

その結果、雌雄それぞれにおける *Tdom-dsx* mRNA の発現は、RACE 法によって得られた配列情報も含め、これまでに報告のない新規の発現様式を示すことが示唆された。したがって、甲殻類と有翅昆虫の間に位置する系統に属する無翅昆虫のマダラシミにおいて、これまでに報告のない *dsx* の発現様式を示唆する結果が得られたことは、昆虫に特異的なスプライシング制御による性決定メカニズムの進化を考える上で大変興味深い。今後、本研究結果をあらゆる角度から検証し、昆虫に特異的なスプライシング制御による性決定メカニズムの進化プロセスが明らかにされることが期待される。

(5) nymphal RNAi 法を用いたフタホシコロギにおける *dsx* の機能解析

フタホシコロギ成虫の翅脈パターンには、明瞭な雌雄差が存在する (図 2)。この雌雄を特徴付ける翅脈パターンを指標に、nymphal RNAi 法を用いた遺伝子機能解析を行った。また、幼虫期の雌雄鑑別は産卵管の有無によって行った。

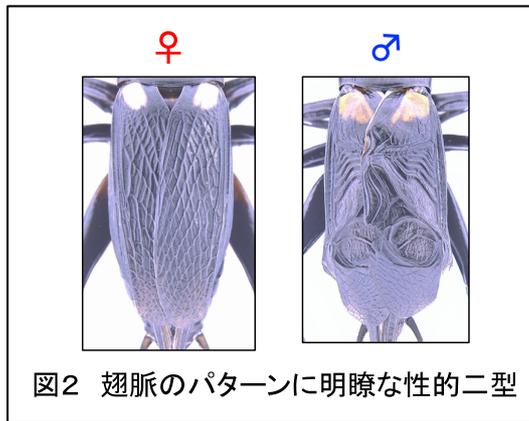


図2 翅脈のパターンに明瞭な性的二型

フタホシコロオギ *dsx* (*Gbim-dsx*) の機能解析を行うために、7 齢（終前齢）幼虫の雌雄それぞれに *Gbim-dsx* の二本鎖 RNA をインジェクションし、成虫での表現型を観察した。コントロールとして *gfp* の二本鎖 RNA をインジェクションした。その結果、*Gbim-dsx* 二本鎖 RNA をインジェクションした個体の外部形態は *gfp* 二本鎖 RNA をインジェクションした個体との差異は認められなかった。今回、7 齢幼虫にインジェクションを行ったが、*dsx* が翅脈形成において雌雄で異なる転写制御を引き起こし、翅脈に雌雄差が既に生じていた可能性が考えられる。今後は、5 齢幼虫および 6 齢幼虫を材料として *Gbim-dsx* 二本鎖 RNA をインジェクションし、成虫での表現型を検討する必要がある。

(6) nymphal RNAi 法を用いたマダラシミにおける *dsx* の機能解析

*dsx* の RNAi 法を行う際には、いずれの昆虫においても雌雄鑑別法の確立が必要不可欠である。そこでまず、詳細な形態観察に基づき、十分な数の個体を解析することにより、マダラシミの幼虫期における雌雄鑑別法の確立を試みた。その結果、マダラシミでは、腹側尾端において明瞭な性的二型が存在することが明らかとなった（図3）。

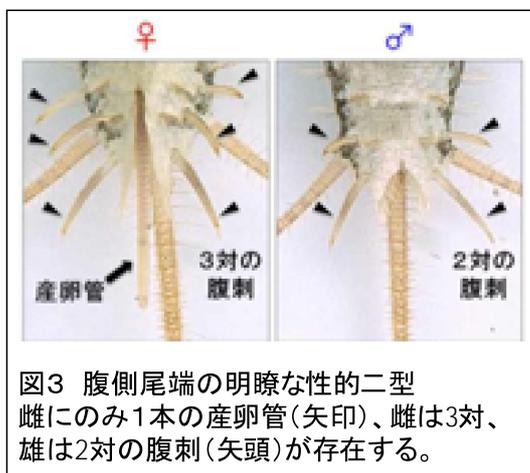


図3 腹側尾端の明瞭な性的二型  
雌にのみ1本の産卵管(矢印)、雌は3対、雄は2対の腹刺(矢頭)が存在する。

マダラシミ *dsx* (*Tdom-dsx*) の機能解析機能解析を行うために、6 齢の雄雌に *Tdom-dsx* の二本鎖 RNA をインジェクションした。その結果、雌個体においては、*gfp* の二本鎖 RNA を

インジェクションした雌個体との差異は認められなかった。一方、雄個体では、正常な雄には存在しない雌に特徴的な 3 対目の腹刺の形成が確認された。以上の結果より、マダラシミにおいても *dsx* は、完全変態昆虫や甲殻類のミジンコと同様に性分化に関わることが示唆された。

(7) レッドローチ、マダラシミ、オカダンゴムシにおける *transformer-2* のクローニングおよび発現解析

不完全変態昆虫のレッドローチ、無変態昆虫のマダラシミ、甲殻類のオカダンゴムシから、Transformer と二量体を形成し、*dsx* の性特異的なスプライシングを制御する Transformer-2 (Tra-2) をコードする cDNA の部分配列のクローニングを試みた。その結果、いずれの生物からも目的のサイズの PCR 産物が得られた。

次に、得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、昆虫数種および甲殻類のミジンコの Tra-2 と比較した。その結果、RNA recognition motif (RRM) ドメインにおいて高い保存性が認められることが判明した。従って、本研究によりクローニングした cDNA は、いずれの生物においても確かに *tra-2* であると判断した。

続いて RT-PCR 法による発現解析を行ったところ、今回調査したいずれの生物種の *tra-2* においても精巣と卵巣における発現はほぼ同程度であることが判明した。したがって、他の昆虫と同様に発現に雌雄差が認められないことが示唆された。

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)

宮崎智史・新美輝幸 (2013) 昆虫類の性決定. 生物科学, 65, 163-171. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

小西勇輔・大出高弘・柳沼利信・新美輝幸: マダラシミにおける RNAi 法の確立. ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県・岡崎市, 2015 年 8 月 18 日.

新美輝幸: 性決定遺伝子で探る甲虫の形態的雌雄差. 新学術領域研究「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」公開シンポジウム「動物における性分化機構の進化」, 東京大学柏キャンパス・生命棟地階講義室, 千葉県・柏市, 2014 年 12 月 12 日.

小西勇輔・柳沼利信・新美輝幸: マダラシミ *doublesex* 遺伝子のクローニング. 日本蚕糸学会中部支部第 70 回・東海支部第 66

回 研究発表会ならびに特別講演会，岡谷商  
工会議所 大ホール，長野県・岡谷市，2014  
年 10 月 25 日．

新美輝幸：非モデル昆虫の遺伝子機能解  
析．基調講演，日本アブラムシ研究会 第 4  
回研究集会，岡崎コンファレンスセンター，  
愛知県・岡崎市，2014 年 8 月 9 日．

小西勇輔・石黒真以・渡辺崇人・三戸太  
郎・鈴木智也・東城幸治・柳沼利信・新美輝  
幸：不完全変態昆虫、無変態昆虫、甲殻類に  
おける *doublesex* 遺伝子のクローニングの試  
み．平成 26 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講  
演会 - 日本蚕糸学会第 84 回大会，神奈川  
県・藤沢市，日本大学生物資源科学部，2014  
年 3 月 11 日．

小西勇輔・柳沼利信・新美輝幸：レッド  
ローチ、マダラシミ、オカダンゴムシからの  
*transformer-2* 遺伝子の単離．日本蚕糸学会  
中部支部第 69 回・東海支部第 65 回 研究発  
表会ならびに特別講演会，長野県・松本市，  
信州大学理学部，2013 年 11 月 9 日．

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/niimilab/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI, TERUYUKI)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門  
・教授

研究者番号：00293712

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：