

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

平成9年度博士課程入学

大林 富美

指導教官 東京大学助教授 嶋田 透

論文題目 ショウジョウバエの性決定遺伝子 *doublesex* および *fruitless* に
相同なカイコの遺伝子の構造と発現

昆虫の雌雄は、体液性のホルモンに依存せず、遺伝的機構によって細胞自律的に決定される。昆虫の性決定機構は、ショウジョウバエを用いて詳しく研究されている。キイロショウジョウバエの体細胞では、X染色体の数と常染色体の数の比が、性決定の最初のシグナルであり、それが *SXL* と *TRA* という雌特異的な RNA 結合タンパク質を次々に誘導し、*TRA* の存否が最終的な性決定遺伝子 *doublesex* (*dsx*) および *fruitless* (*fru*) の性特異的な発現をもたらす。一方、カイコは、雌 ZW、雄 ZZ の性染色体構成を有し、W 染色体上に存在する仮想上の雌決定遺伝子 *Fem* によってエピスタティックに雌性を決定することが知られているが、*Fem* の下流にある性決定機構は不明である。本研究は、キイロショウジョウバエとは異なる性決定システムを持つカイコから、性決定遺伝子 *dsx* や *fru* に相同な遺伝子を単離し、それら相同遺伝子の構造と発現を解析することによって、カイコの性決定機構の一端を解明しようとしたものである。

1. ショウジョウバエの *dsx* に相同なカイコの遺伝子 *Bmdsx* の cDNA の構造と雌雄差

キイロショウジョウバエの性決定遺伝子 *dsx* は、標的遺伝子の性特異的な転写を制御する DNA 結合タンパク質をコードする。*dsx* の pre-mRNA は選択的スプライシングを受けて性特異的な mRNA を生じ、それらが雌雄で異なるタンパク

質を翻訳する。カイコの EST (Expressed sequence tags) データベースを探索した結果、キイロショウジョウバエの *dsx* に相同な塩基配列をもつ cDNA を 2 個発見した。その cDNA をプローブとしてカイコの BAC ライブラリーフィルターのハイブリダイゼーションおよびゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションを行った結果、遺伝子はハプロイドゲノムあたり 1 コピーで存在することが明らかになった。そこでこの遺伝子を *Bmdsx* と命名した。カイコークワコ間で *Bmdsx* の一部に PCR で検出できる変異があることを見だし、その変異を利用して連鎖解析を行った結果、*Bmdsx* は第 25 染色体に座乗することが判明した。

Bmdsx の mRNA の 1 次構造に、ショウジョウバエ *dsx* と同様の雌雄差が生じているか否かを検討するため、雌成虫フェロモン腺と雄幼虫精巣の cDNA ライブラリーから 1 個ずつ陽性クローンを得た。それぞれの塩基配列 3249bp および 3000bp を決定して比較したところ、精巣由来の *Bmdsx* cDNA の塩基配列では、フェロモン腺 cDNA の配列の 713~961 塩基に相当する領域が抜けていることが明らかになった。いろいろな発育段階の脂肪体、中腸など種々の組織の RNA を鋳型にして RT-PCR を実行したところ、フェロモン腺—精巣間の差異と同じ 249bp の長さの違いが常に検出された。よって、*Bmdsx* mRNA の塩基配列の差は、組織や発現時期の差ではなく、雌雄差によって生じることが証明された。遺伝子は 1 コピーしか存在しないので、雌雄で異なる *Bmdsx* mRNA は、同一の pre-mRNA から選択的スプライシングによって生じると考えられる。

雌型 *Bmdsx* cDNA の ORF は 795nt であり、265 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていた。一方、雄型 *Bmdsx* cDNA の ORF は 801nt の長さで、267 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていた。雌雄のタンパク質 (BmDSX) の推定アミノ酸配列を比較したところ、N 末端側 215 残基は雌雄共通であったが、C 末端側 (雌 50 残基、雄 52 残基) は雌雄で異なっていた。BmDSX の N 末端側には、ショウジョウバエ DSX の DM ドメインと呼ばれる DNA 結合領域に 80% の相同性を示すアミノ酸配列が存在した。また、DSX の多量体形成に必要とされる OD2 ドメインも BmDSX で保存されていた。

2. *Bmdsx* mRNA および BmDSX タンパク質の発現時期、発現組織、およびその雌雄差

Bmdsx mRNA の発現量の組織や発育段階による差異を検討するため、幼虫、蛹、成虫の種々組織から RNA を抽出し、ノーザンブロットングを行った。その結果、*Bmdsx* mRNA の発現量は組織や発育段階で大きく異なり、終齢幼虫の生殖巣と脂肪体、および成虫のフェロモン腺において最も多量の mRNA が存在することが判明した。*Bmdsx* mRNA は、いずれの組織でも雌で 10.6kb、雄で 10.4kb の 1 本のバンドとして検出された。脂肪体における *Bmdsx* mRNA の発現を経時的に調査したところ、*Bmdsx* mRNA の量は雌雄とも 4 齢幼虫期から 5 齢の吐糸期に向けて急増し、蛹化後にやや減少した。一方、タンパク質の解析のため、BmDSX

の雌雄共通領域のアミノ酸配列に基づいて 20 アミノ酸残基のペプチドを合成し、それをウサギに免疫して抗体を得た。その抗体を利用して、脂肪体における BmDSX タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析したところ、終齢幼虫では雌雄ともに約 39kDa のバンドが検出されたが、蛹期にはこのバンドが雌のみで検出され雄にはほとんど認められなくなった。カイコでは終齢幼虫や蛹の脂肪体でピテロジェニンなどの雌特異的タンパク質が合成されることが知られており、*Bmdsx* の発現量がこの時期に多いことと関係がある可能性がある。

吐糸開始日と蛹化当日の精巣と卵巣からパラフィン切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学的手法により、*Bmdsx* mRNA と BmDSX タンパク質の発現部位を特定した。卵巣では吐糸開始日、蛹化当日とも卵巣被膜や卵管膜で mRNA およびタンパク質が多く検出され、精巣では精巣被膜や精室内の体細胞において mRNA およびタンパク質が多く見いだされた。したがって、*Bmdsx* mRNA および BmDSX タンパク質は生殖細胞よりも体細胞において強く発現していると言える。

また、胚子における *Bmdsx* mRNA の雌雄差を、限性黒卵系統を利用して RT-PCR 法で解析した結果、発生初期においては雌雄とも雌型・雄型いずれの mRNA も検出されたが、産下後 90 時間頃から後は、雌は雌型の、雄は雄型の mRNA が優勢になり、雌雄差が明瞭になった。一方、卵の温湯処理によって作出した 3 倍体 ZZW♀および 4 倍体 ZZZW♀の幼虫からは、いずれも雌型の *Bmdsx* mRNA のみが検出された。これらは、胚子発生中期以降において、W 染色体の存否が *Bmdsx* の性特異的な発現を支配することを示唆している。

以上の結果から、カイコは、性決定機構がショウジョウバエと異なるにもかかわらず、ショウジョウバエと同じように *doublesex* 相同遺伝子を性のスイッチとして使っているものと考察される。

3. キイロショウジョウバエの *fru* に相同なカイコの遺伝子 *Bmfru* の cDNA の構造とその多様性

fru はキイロショウジョウバエの神経系の性決定遺伝子であり、性行動や雄特異的筋肉（ローレンス筋）の形成を制御することが知られている。カイコの EST データベースを探索した結果、*fru* に相同な塩基配列を持つ cDNA クローンを 2 つ発見した（以下 NV 型および e40 型と称する）。cDNA をプローブとして BAC ライブラリーフィルターのハイブリダイゼーションおよびゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、遺伝子はハプロイドゲノムあたり 1 コピーで存在すること推定されたので、*Bmfru* と命名した。なお、カイコークワコ間の塩基配列多型を利用して連鎖解析を行ったところ、*Bmfru* は第 6 染色体に座乗することがわかった。

キイロショウジョウバエ *fru* mRNA には少なくとも 7 種類のアイソフォームが存在するとされているので、カイコでも多くの mRNA アイソフォームが存在す

る可能性がある。そこで、さらに終齢吐糸開始日の精巣および、蛹化当日の脳の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、新たに3種類の cDNA クローンを得た（以下 tes4 型、br6 型、br9 型と称する）。これら5つの *Bmf_{fru}* cDNA クローンは5'寄りの931bp（NV型の85~1015ntに相当）にほぼ完全に一致する塩基配列を共有していた。しかし、5'非翻訳領域の一部、ORFの3'側、および3'非翻訳領域の塩基配列は、各クローンごとに大きく異なっていた。cDNAの塩基配列より予想されるORFは、NV型が386アミノ酸残基、e40型が410アミノ酸残基よりなるポリペプチドを、それぞれコードしていた。また、tes4型、br6型、br9型のORFはそれぞれ410、390、457残基より成るポリペプチドをコードしていた。5通りのアミノ酸配列は、いずれもN末端側に二量体形成に必要なBTBドメインが認められ、BTBドメインを含む301残基のアミノ酸配列は全5クローンで完全に一致していた。C末端側には3タイプの異なるジンクフィンガーモチーフが存在していた。BTBドメインのアミノ酸配列におけるキイロシヨウジョウバエ *fru* との相同性は89%と顕著に高く、ジンクフィンガーモチーフにおいても *fru* と74~91%の相同性を示した。5'RACE およびその産物の塩基配列決定の結果、少なくとも3種類の5'非翻訳領域が存在することが明らかになったが、キイロシヨウジョウバエ *fru* の場合のように翻訳開始点に雌雄差が見られることはなかった。*Bmf_{fru}* 遺伝子は1コピーしかないので、その mRNA に見られる多様性は、選択的スプライシングあるいは選択的転写開始部位によって生じると考えられる。

4. *Bmf_{fru}* mRNA の発現に関する解析

Bmf_{fru} cDNA をプローブにし、幼虫期・蛹期の種々の組織から抽出した RNA のノーザンブロットングを行った。その結果、*Bmf_{fru}* mRNA は生殖巣と頭部に偏って発現していることが明らかになった。精巣では4.6kb、3.6kb、2.8kb、2.6kbの4種類の mRNA が検出されたのに対し、卵巣や頭部では4.6kb以外の3種類の mRNA はほとんど検出されなかった。一方、複数の cDNA に対応する mRNA アイソフォームの発現を RT-PCR により解析したが、雌雄間での量的・質的な差異は認められなかった。シヨウジョウバエ *fru* においては、選択的スプライシングだけでなく性特異的な翻訳抑制が知られているので、*Bmf_{fru}* が性分化に関与するか否かを結論するには、さらにタンパク質レベルでの解析が必要である。

以上要するに、本研究は、シヨウジョウバエの性決定遺伝子 *dsx* および *fru* に対するカイコの相同遺伝子 *Bmdsx* および *Bmf_{fru}* を発見し、cDNA の構造ならびに mRNA の発現について解析したものであり、*Bmdsx* からは雌雄で異なる mRNA アイソフォームが生成すること、*Bmf_{fru}* からは雌雄共通の複数の mRNA アイソフォームが生じることを、それぞれ明らかにした。