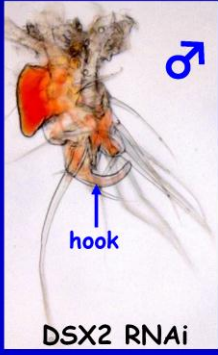
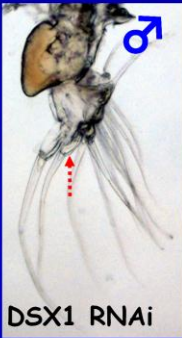
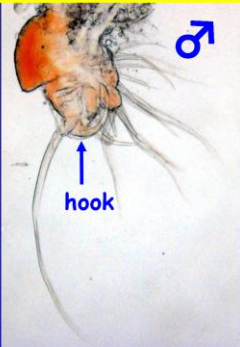
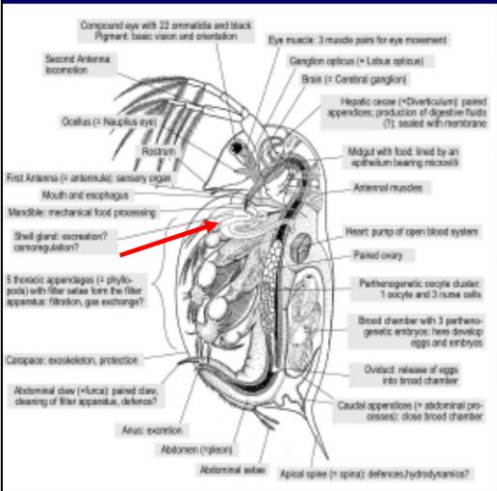


# RNAi : 第一腹脚のフック

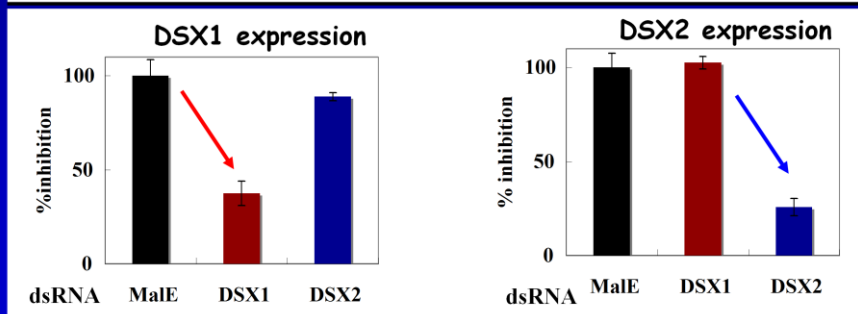


DSX1 のRNAi によりオスの特徴であるフックの形成がなくメス化

フックも同じです。

## RNAi (Loss-of-Function) 実験の結果 DSX1 と DSX2

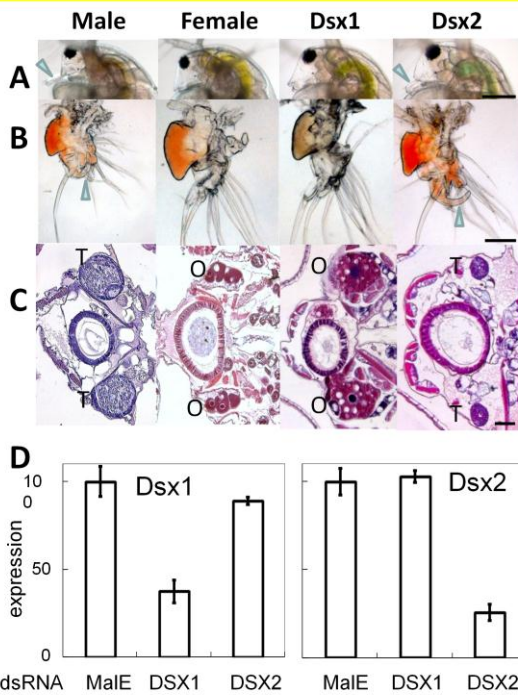
dsRNA	性	第一触覚の メス化	卵巢発達
MalE	♂	0% (0/27)	0% (0/18)
	♀	100% (28/28)	100% (11/11)
DSX1	♂	100% (36/36)	100% (36/36)
DSX2	♂	0% (0/20)	0% (0/20)



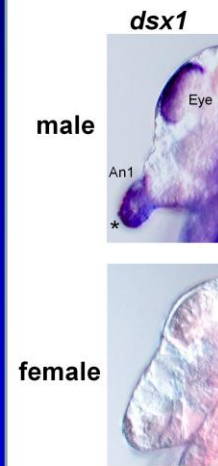
DM domain 遺伝子の DSX1 遺伝子 はオオミジンコの環境依存性成分化に重要な働きを持つ  
PLoS Genetics, 2011.

ということで、DSX1と名前を付けた遺伝子がないと雄にならないということ—

## Loss-of-Function 実験のまとめ (*Dsx1*, *Dsx2*)

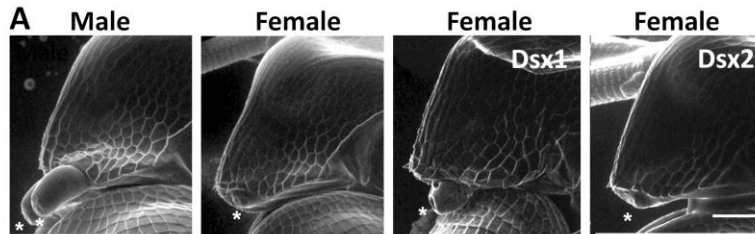


### *In situ* hybridization



今のところのミジンコの性決定遺伝子はDSX1ということになります。

## Gain-of-Function 実験のまとめ (*Dsx1*, *Dsx2* Genes)



**B**

mRNA injected	Amounts (pg)	Embryos injected	Juveniles	Viability	Elongation of 1st antennae
DSX1- $\alpha$	1000	128	81	63%	21% (17/81)*
DSX1- $\beta$	1000	124	98	79%	8% (8/98)
DSX2	500	94	54	58%	0% (0/54)
EGFP	1000	61	50	82%	0% (0/50)

\*P < 0.05 vs EGFP (Fisher's exact probability test)

PLoS Genetics 2011.

今度は逆に、DSX1という遺伝子を雌になる卵に注射して雄になるか。完全な雄にするのは非常に難しいのですが、雄っぽい顔になります。

これが産まれたばかりの雄の第一触覚。雌はこれです。DSX1を雌になる卵に打ち込むと、これの半分ぐらい伸びてきます。

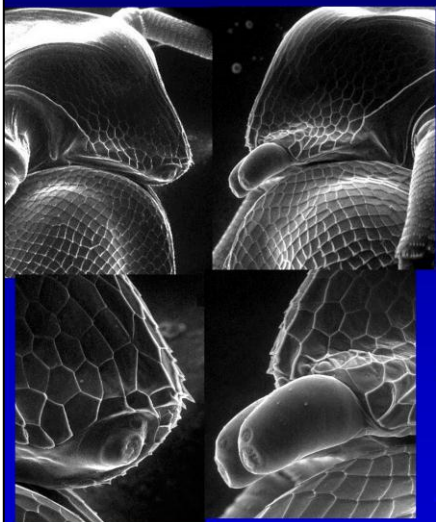
ということで、DSX1が性決定遺伝子ということが認められました。

# 走査電顕像

生後24時間

メス

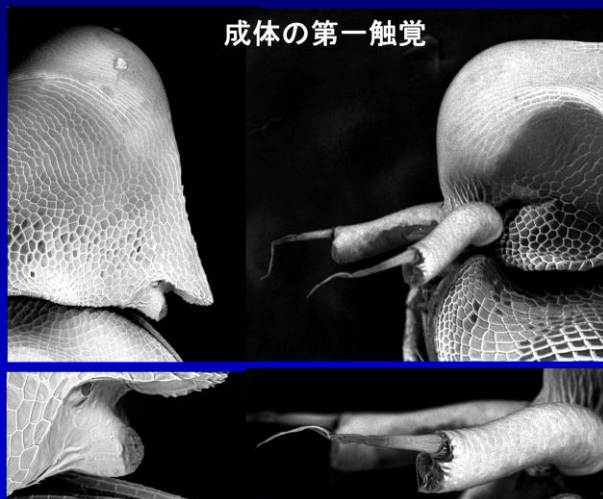
オス



成体

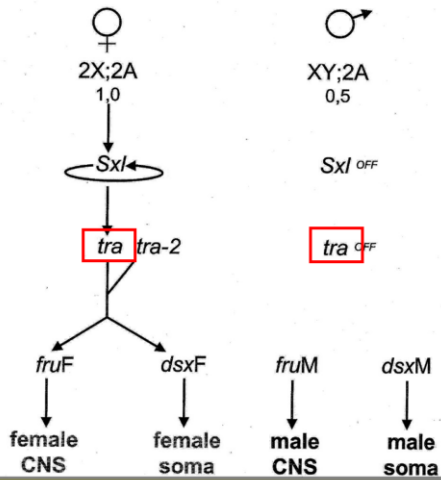
メス

オス



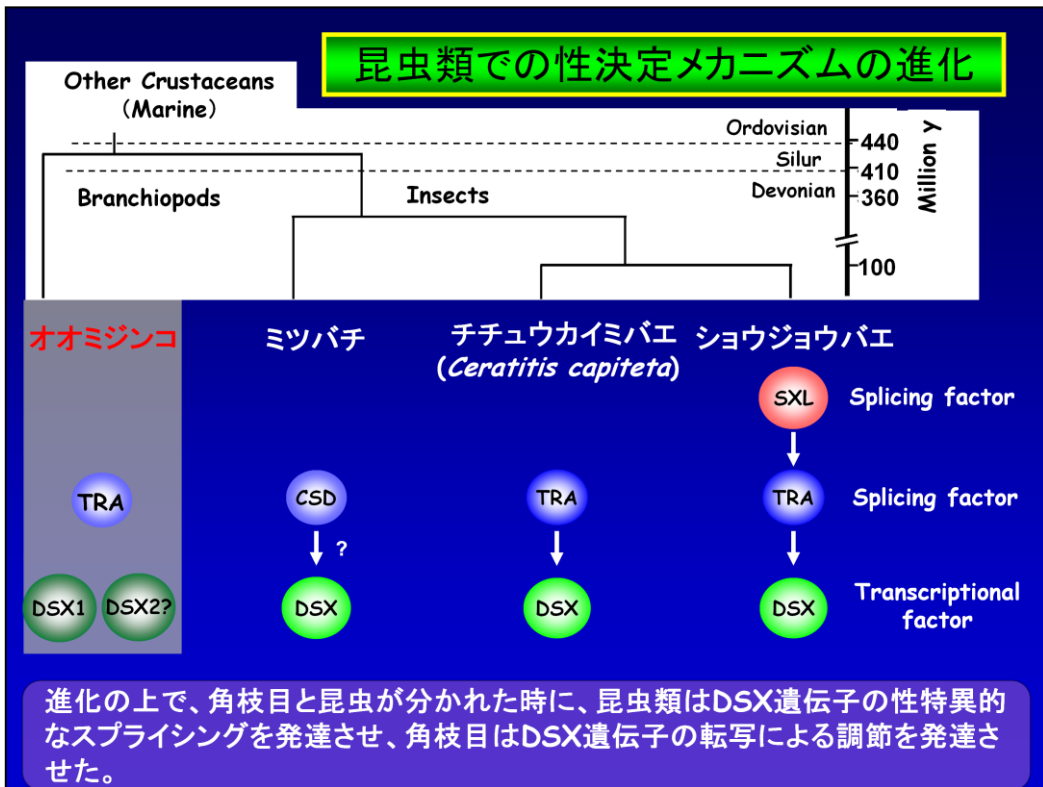
第一触覚は、大人になるとこんなに長くなります。

## ショウジョウバエの性決定: transformer (tra)が重要



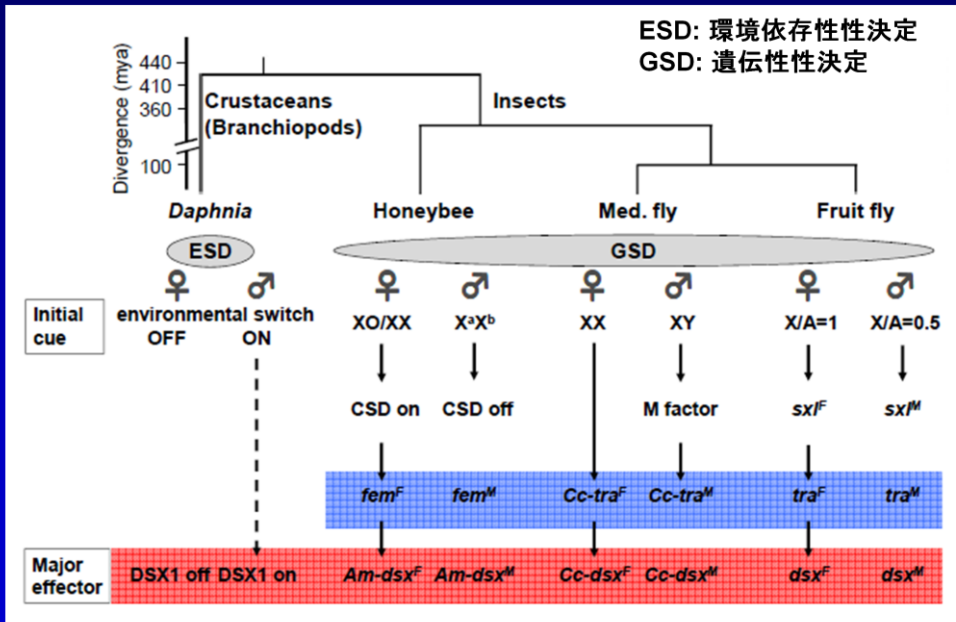
Need to understand control mechanism of Dsx gene expression by juvenile hormone or its analogs.  
→ transformer regulate Dsx gene expression in *D. magna*?

(説明を省略)



(説明を省略)

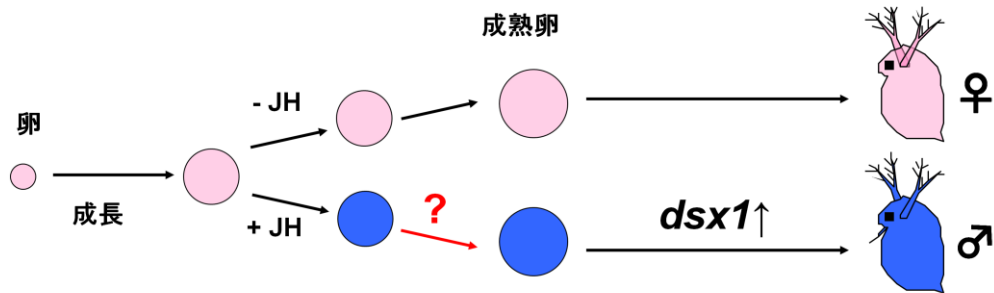
# 甲殻類角枝目のミジンコ類と昆虫類の性決定



(説明を省略)



## ミジンコの性決定モデル



PLoS Genet 2011 (7) e1001345

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS GENETICS

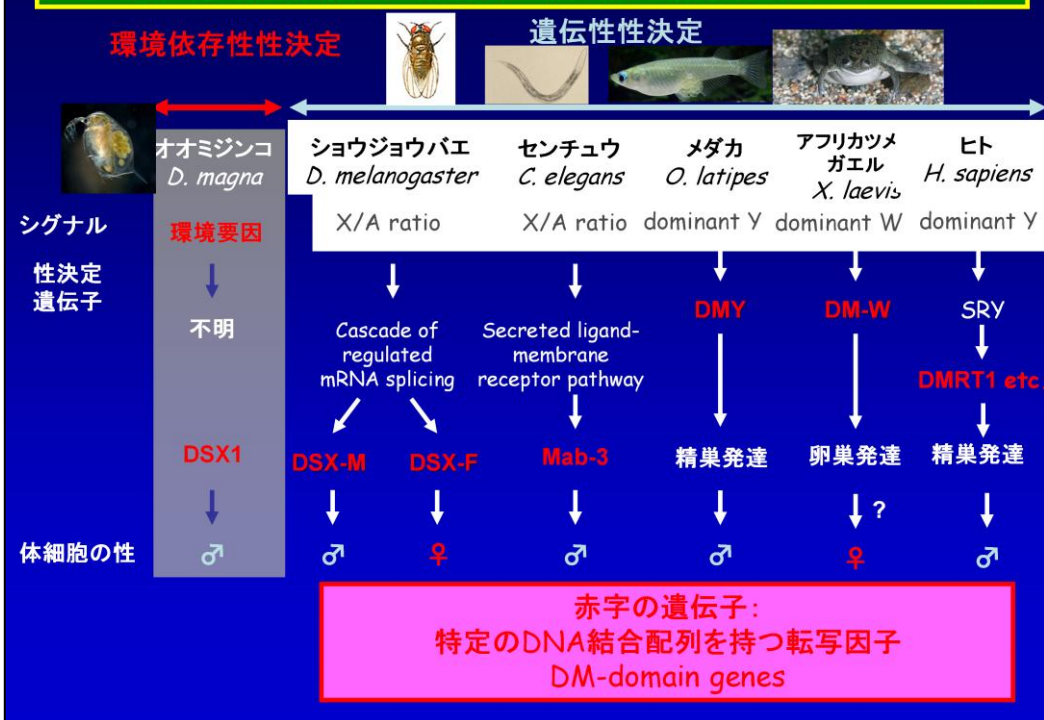
### Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*: Deep Conservation of a *Doublesex* Gene in the Sex-Determining Pathway

Yasuhiko Kato<sup>1</sup>, Kaoru Kobayashi<sup>2,3</sup>, Hajime Watanabe<sup>1</sup>, Taisen Iguchi<sup>2,3\*</sup>

1 Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan, 2 Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences, Aichi, Japan, 3 Department of Basic Biology, The Graduate School for Advanced Studies, Aichi, Japan

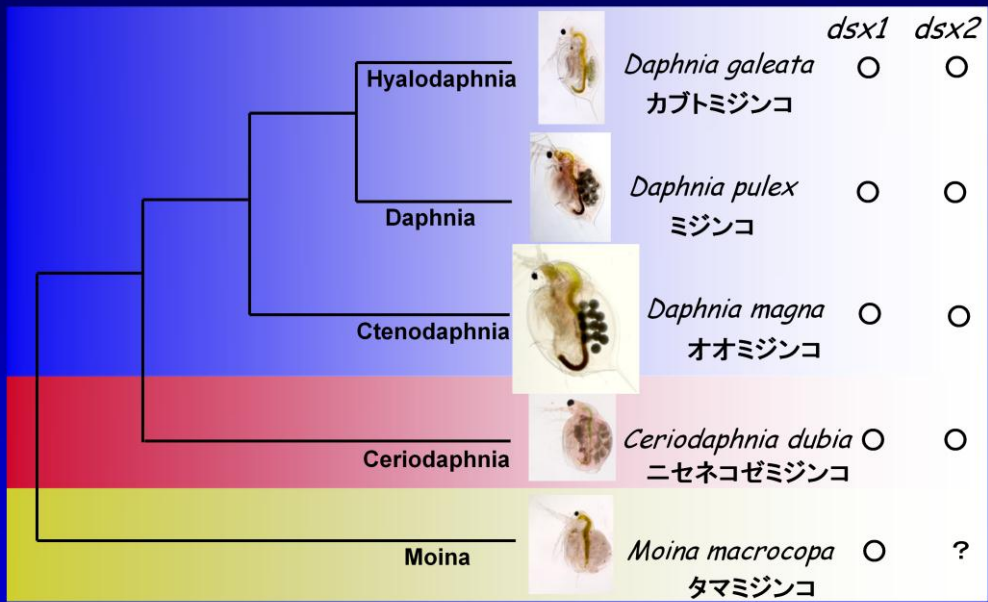
卵巣の中にある卵で産まれる7～8時間前に幼若ホルモンが働くと、この卵は雄になります。雄になって発生の途中にはDSX1という遺伝子の発現がある。

# いろいろな動物種で解明されている性決定メカニズム



ということで、DSX1が、こういった仲間と同時にここに書き入れることができるということです。

## いろいろなミジンコ類での *Dsx* 遺伝子

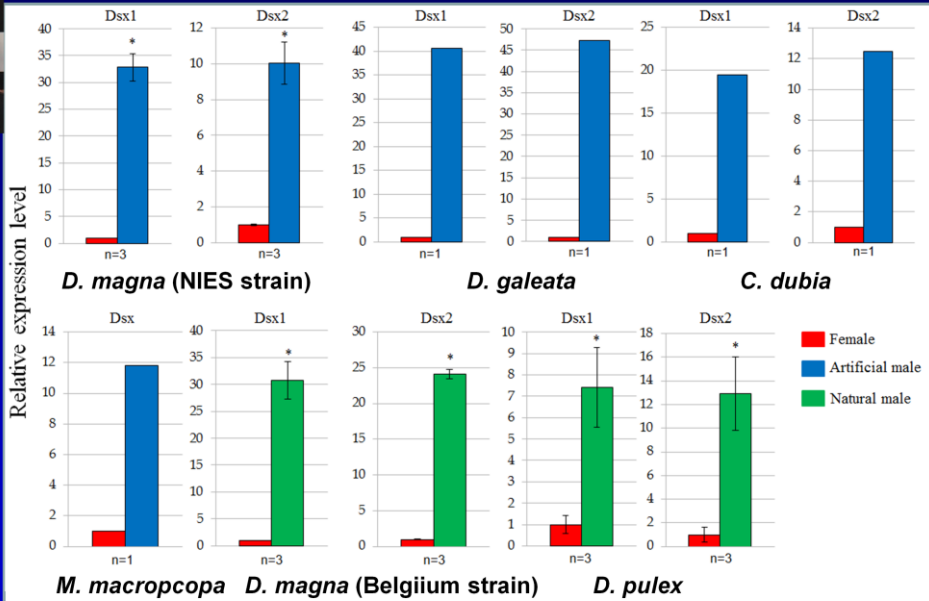


ミジンコ類でクローニングした *Dsx* 遺伝子。オスでの発現を解析する必要がある。

DSX1は、日本にいる他のミジンコにもちゃんと発現しています。

# ミジンコ類の性決定

Toyota et al., BMC Genomics, 2013.



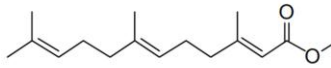
Relative expression levels of *Dsx1* and *Dsx2* genes in adult males compared with females in *D. magna*, *D. pulex*, *D. galeata*, *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*.

これも同じことを言っているのですが、化学物質で誘導したものの、あるいはこの辺のたまたま出てきた雄と雌を比べると、雄だけに発現が強く出てきます。

## 幼若ホルモン (Juvenile Hormones)

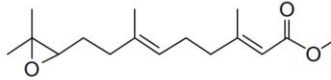
・各種の節足動物のいろいろな発生現象、脱皮、変態や表現系多型に関わる  
主要なホルモンの1つ

甲殻類の JH



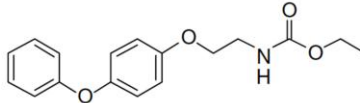
Methyl farnesoate (MF)

昆虫類の JH



Juvenile hormone III  
(JH III)

JH analog (insecticide)



Fenoxycarb

幼若ホルモンにより調節されている表現系多型

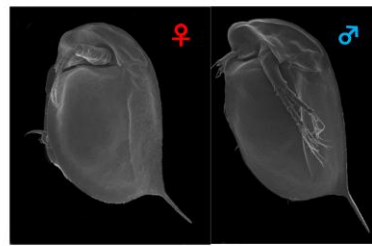
*D. magna* (male)



(Suzuki & Nijhout, 2006)



(Cornette et al., 2008)



(Hiruta et al.,)

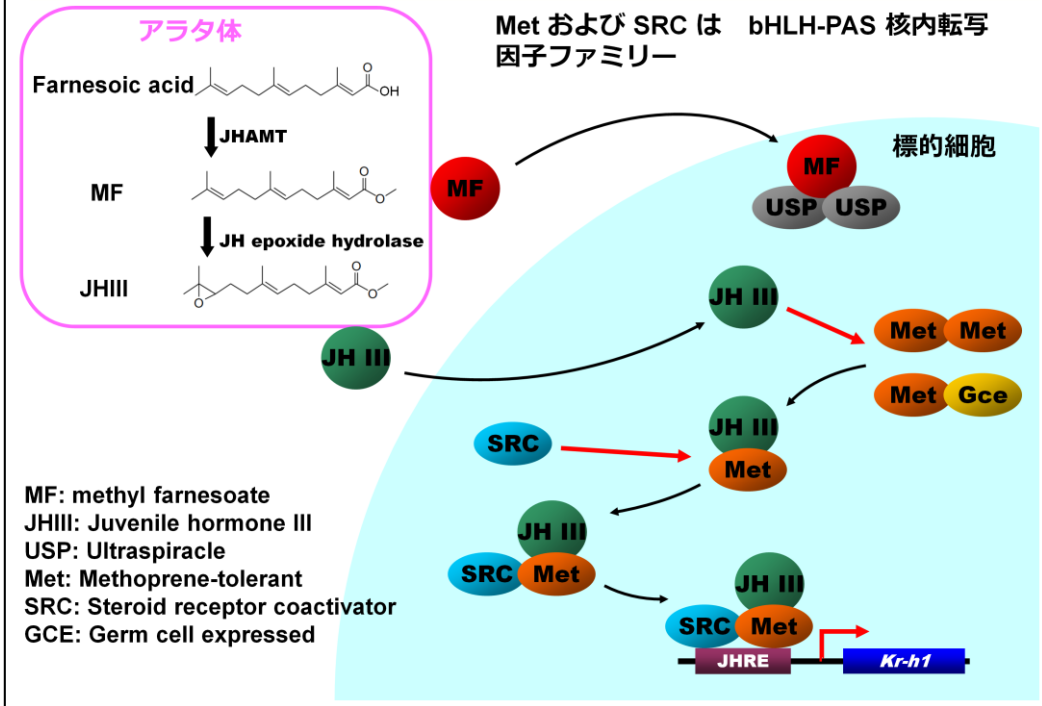
今度は、幼若ホルモンの受容体の方がつい最近の話なので、昆虫ではアラタ体というところで幼若ホルモンのⅢというのができます。

## 幼若ホルモンパスウェイの進化

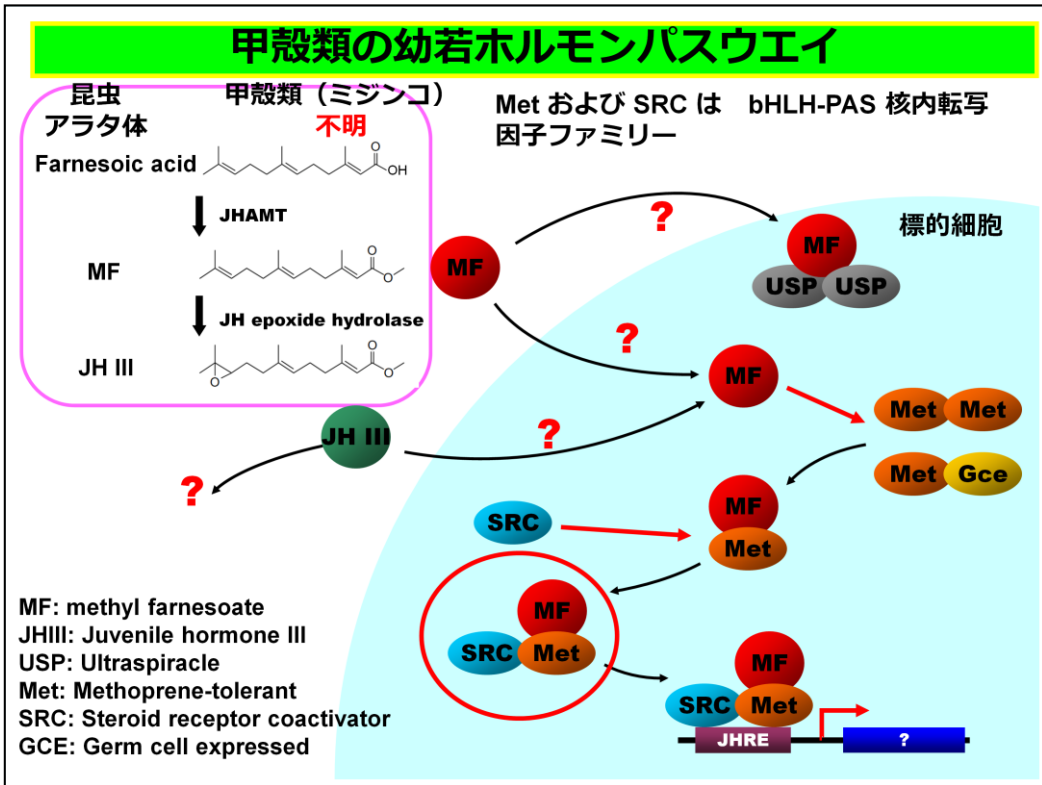


これが働いて幼若ホルモン作用をするのですが、これは競争に負けて、昆虫の方が早く出てしまったのですが——

# 昆虫類での幼若ホルモンパスウェイ



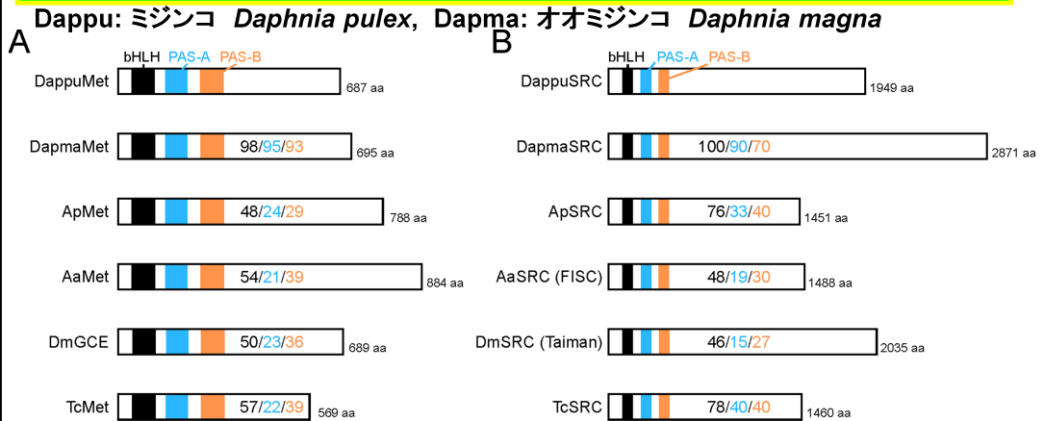
幼若ホルモンⅢは、Methoprene-tolerantに結合して、結合すると、steroid receptor coactivatorというのをリクルートして、ヘテロダイマーになって遺伝子にくっついて遺伝子発現を引き起こすことがちょっと前にわかりました。



我々は、ミジンコの方はどうかと。ミジンコは、幼若ホルモンⅢではなくて、メチルファーネゾエートというのを使います。この構造です。これがやはりMethoprene-tolerantにくっついて、steroid receptor coactivatorをリクルートして、これが遺伝子のプロモータのところぽんと乗ると、幼若ホルモンが動かす遺伝子が動いてくる。



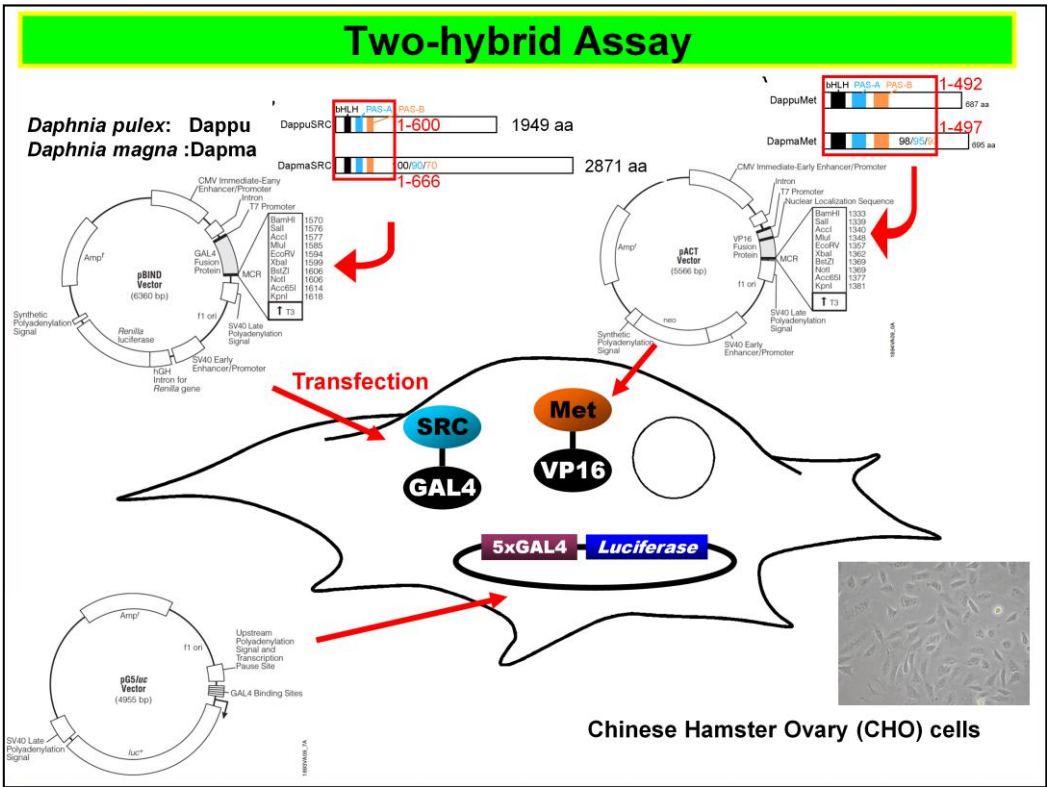
## Met と SRC の構造



ミジンコのMet (A) とSRC (B) は配列中に bHLH ドメイン と PAS (PAS-A および PAS-B) ドメインをもつ。数値はミジンコの配列との相同性のパーセンテージ。ミジンコおよびオオミジンコのSRCのC末端領域に、SRC ファミリーに特徴的な LXXLL と glutamine-rich (Q-rich) 領域をもつ。

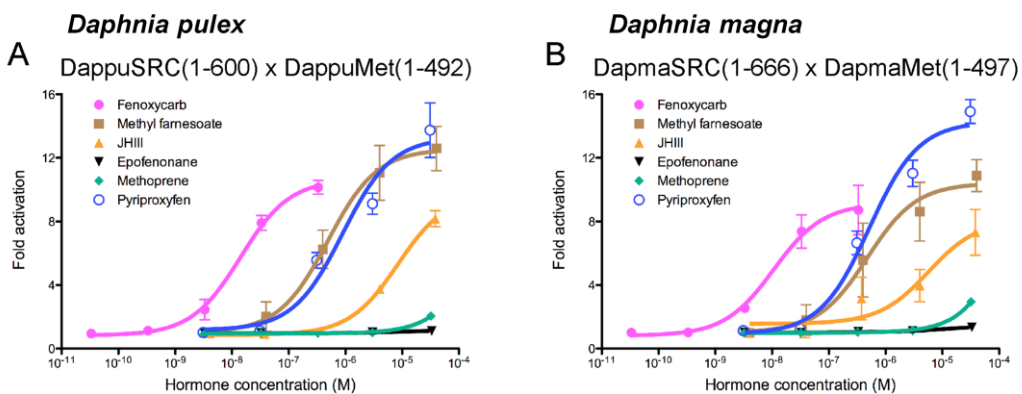
Ap: アブラムシ (*Acyrtocyphon pisum*), Aa: ネットタイシマカ (*Aedes aegypti*), Dappu: ミジンコ (*Daphnia pulex*), Dapma: オオミジンコ (*Daphnia magna*), Dm: ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*), Tc: コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*)

これは非常に巨大な、例えばsteroid receptor coactivatorと、*Daphnia magna*のやつはアミノ酸が2,871個並んでいますから、遺伝子配列として3倍です。今こういうのはできます。これを使ってレポーターアッセイを作ろうとしています。



(説明を省略)

## Two-hybrid Assayの結果



ほとんどの幼若ホルモン類似物質は用量依存的にMetとSRCのヘテロダイマーを形成

(説明を省略)

## コクヌストモドキMet中のJHIII結合ポケット

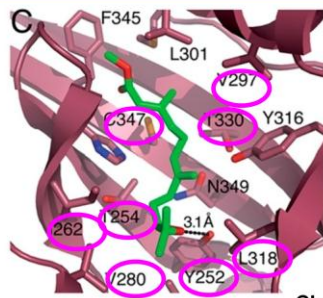
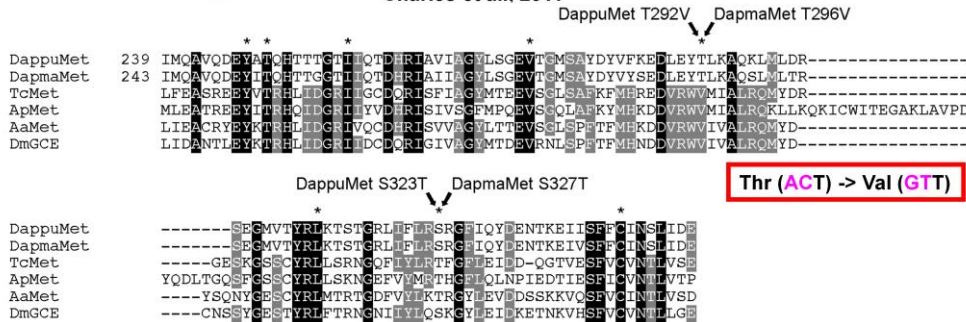


Table 1. Effect of mutations within the PAS-B domain of *Tribolium Met* on JH III binding

Mutation	WT Met(240-516) binding, %	n	WT Met(1-516) binding, %	n
WT	100 ± 11.8	9	100 ± 3.4	3
Y252F	110.9 ± 15.2	6		
Y252W	21.5 ± 3.1	7		
T254Y	0.4 ± 0.7	3		
I262F	14.9 ± 2.3	7		
V280F	1.0 ± 0.9	3	0.9 ± 0.3	3
V297F	0.7 ± 0.8	9	1.4 ± 1.3	4
L318F	29.7 ± 8.6	7		
T330Y	2.0 ± 1.5	3		
V346F	85.3 ± 7.2	5	90.0 ± 5.8	3
C347M	2.1 ± 2.6	4		
V348F	91.2 ± 5.3	6		
Mock	0.6 ± 1.1	6		

Charles et al., 2011

D

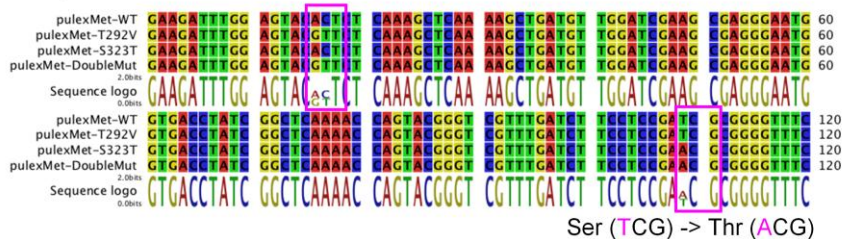


Two of 8 amino acid residues constructing JH III-binding pocket were substituted by other residues in *Daphnia Met*.

(説明を省略)

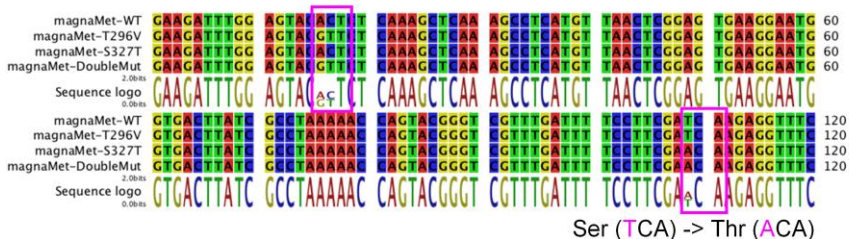
## ミジンコDaphnia Metのポイントミューテーション

### *Daphnia pulex* Thr (ACT) -> Val (GTT)



Ser (TCG) -> Thr (ACG)

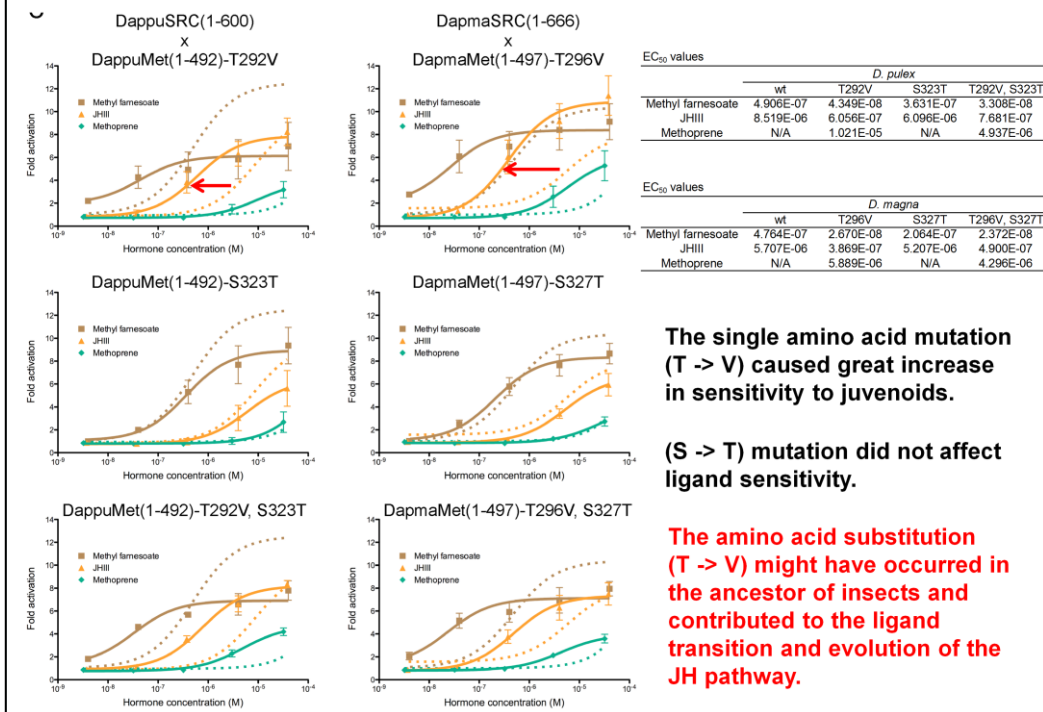
### *Daphnia magna* Thr (ACT) -> Val (GTT)



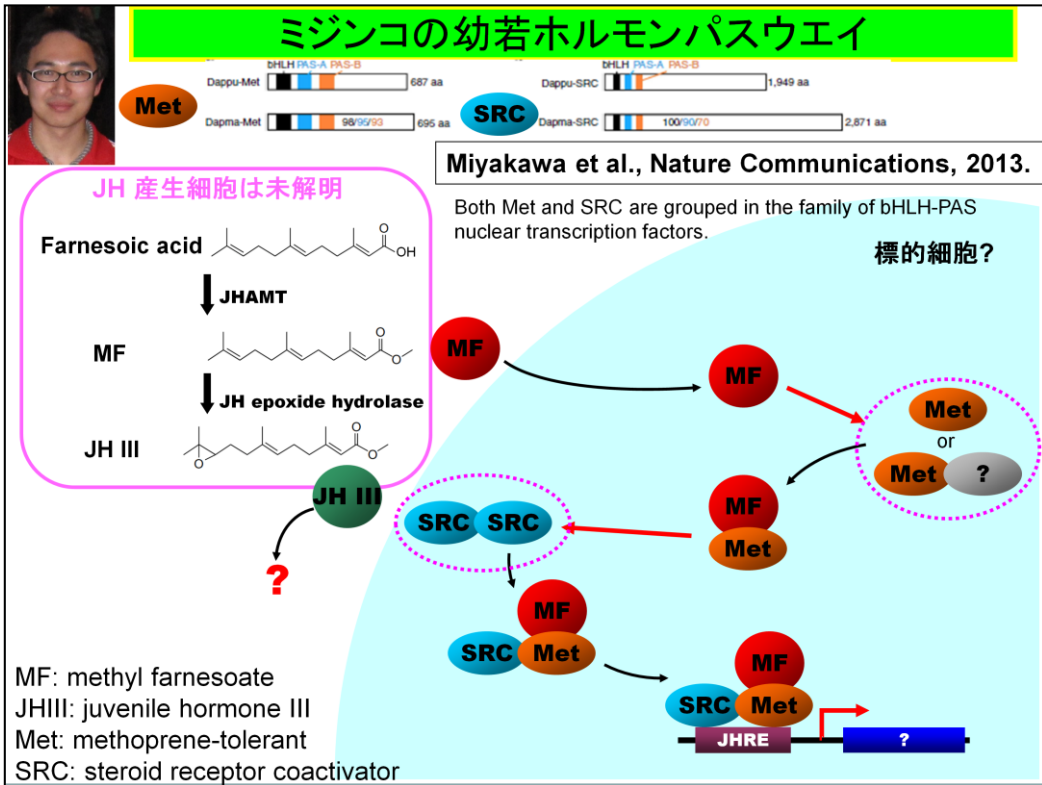
Ser (TCA) -> Thr (ACA)

昆虫とミジンコの違いは、Methoprene-tolerantという蛋白質のアミノ酸の1個が違う。ミジンコタイプ、昆虫タイプというのがわかりましたので、それを入れ替えてやると、ミジンコの遺伝子が昆虫タイプのようになって幼若ホルモンⅢをもっと強くアクセプトします。

## ポイントミュレーションの結果



ミジンコの配列の中に、1つ外して昆虫のアミノ線を入れ込んでやると、幼若ホルモンⅢではなくて、メチルファルネゼートという甲殻類の幼若ホルモン受容が非常に強くなるということがわかりました。

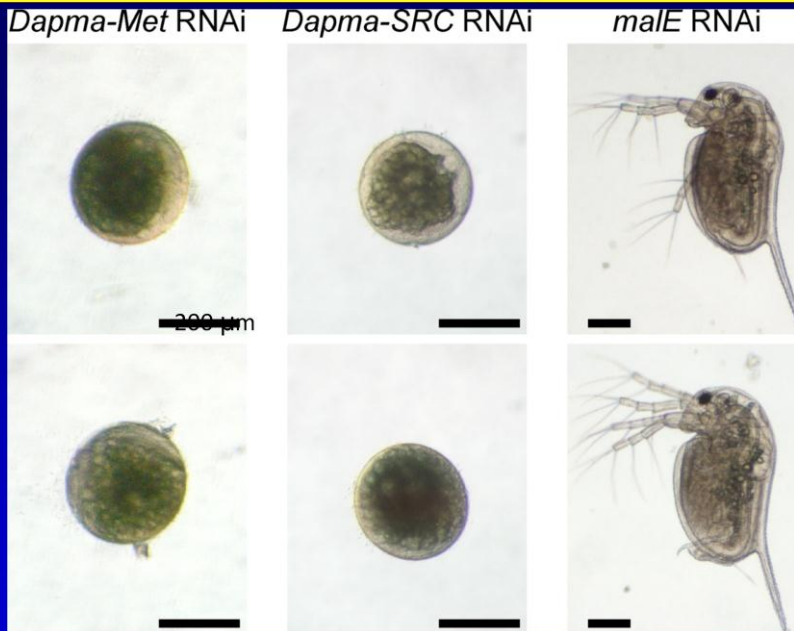


ということで、ミジンコの場合は、幼若ホルモンを作っている場所はわかりません。腸管の近くあるいは腸管の細胞かもしれないということは今わかってきました。

メチルファルネゼートは、さっきも言いましたが、Methoprene-tolerantという蛋白質にくっついて、steroid receptor coactivatorをリクルートして、こういうセットになって、おそらく幼若ホルモンで動く遺伝子のどこかにくっつくはずなんです。残念ながら幼若ホルモン応答配列というのがまだミジンコではとれていません。これさえとればレポーターアッセイができるということになります。



## RNAi : *Dapma-Met* と *Dapma-SRC*

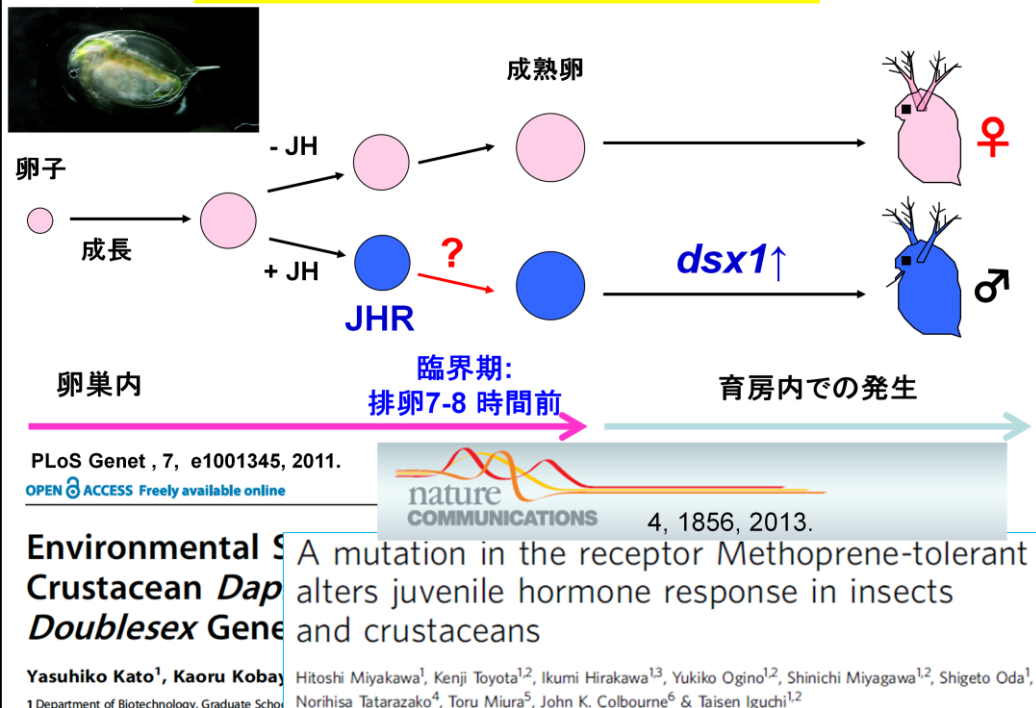


**Met と SRC はミジンコの発生に必須**

それぞれとったMethoprene-tolerantの働きを止めた、あるいはsteroid receptor coactivatorの働きを、産まれたばかりの卵にRNA干渉で発現しないようにしてやると、死んでしまいます。だから、リセプターの一部であるけれども、何か発生に非常に重要な働きをしているのだろう。ただ、どんな働きかと言われても、今のところわかりません。



## ミジンコの性決定・性分化のモデル



ということで、ミジンコの性分化のところには、幼若ホルモンが来て、たぶん幼若ホルモン受容体に結合して雄になるというふうにインプリントされて、DSX1が発現して雄になる。この辺の時間もわかってきましたし、今このリセプターがわかったという段階です。

研究面ばかりの話でいきましたが。