

氏 名 千頭 康彦

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2373 号

学位授与の日付 2022 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The evolutionary history of the sex-determining gene,
doublesex, in Insecta

論文審査委員 主 査 長谷部 光泰
基礎生物学専攻 教授
新美 輝幸
基礎生物学専攻 教授
重信 秀治
基礎生物学専攻 教授
鈴木 雅京
東京大学 大学院新領域創成科学研究科
准教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏 名 Chikami, Yasuhiko

論文題目

The evolutionary history of the sex-determining gene, *doublesex*, in Insecta
昆虫類における性決定遺伝子 *doublesex* の進化史

Alternative splicing is a pervasive mechanism of processing pre-mRNAs among Eukaryotes and underpins the pleiotropic natures of genes due to the functional differences among splicing isoforms. In the last 30 years, there has been evidence of neo-functionalization of splicing isoforms. How did splicing isoforms acquire new functions? This question has been debated since the discovery of mRNA splicing. There are several hypotheses on the neo-functionalization of isoforms. However, it is still unclear what the preadaptive state was before the neo-functionalization and what changes in genomic space led to the new role of the isoform since there are few examples to trace the evolutionary process of isoform function. Here, I focus on *doublesex* (*dsx*) gene as a case to consider this problem.

dsx encodes a transcriptional factor essential for sex determination and sex differentiation in Arthropoda. In Holometabola such as *Drosophila melanogaster*, *dsx* undergoes sex-specific splicing producing either male- or female-specific isoforms. The sex-specific isoforms serve sex-antagonistic roles and promote either male or female differentiation. In contrast, recently, it has been reported from some hemimetabolan species that *dsx* possesses the sex-specific isoforms required only for male differentiation but not for female differentiation. This functional difference suggests the neo-functionalization of genes via alternative splicing. Therefore, *dsx* would provide an example to examine the hypothesis on the neo-functionalization of isoforms. Hence, in this thesis, the subject is to infer the evolutionary history of *dsx* in Insecta. Central questions are: does the sex-specific splicing of *dsx* have a single origin, did the

female-specific isoform of *dsx* come into use for female differentiation, and, if so, what changes are linked to the neo-functionalization.

Over the last decade, some studies have proposed several hypotheses on the functionalizing process of *dsx*. However, its functional evolution has still been ambiguous because of a gap between studied taxa due to the absence of information on the closely related outgroups of winged insects. To fill the gap, I add knowledge of *Zygentoma*, an apterygote taxon that is the sister clade of winged insects, to the evolutionary study of *dsx*. I used the firebrat, *Thermobia domestica*, a species of *Zygentoma*.

First, I found that *T. domestica* has two *dsx* copies and sex-specific isoforms in one of them. Molecular phylogenetic analysis revealed that gene duplication of *dsx* occurred before the emergence of the common ancestor of *Zygentoma* and winged insects and that the copy with the isoforms is the ortholog of *dsx* of winged insects. This result supports that *dsx* of *T. domestica* is under the sex-specific splicing control and that its splicing control has a single origin in insect evolution. This finding emphasizes the utility of *T. domestica* for examining *dsx* evolution since this species would retain the ancestral state of winged insects in terms of the coexistence of the gene copy number and splicing control.

Then, I investigated the roles of *dsx* of *T. domestica* by the nymphal RNAi system and revealed that *dsx* is required for male morphogenesis during post-embryonic development but is not essential for differentiating female traits. This result and previous information on winged insects indicate that the function in female morphology occurred in the common ancestor of Holometabola except for Hymenoptera, i.e., Aparaglossata. Thus, my result strongly supports the earlier argument that *dsx* was necessary only for male differentiation when the isoforms appeared and later became responsible for female differentiation. I also uncovered that *dsx* has sex-antagonistic roles in the female-specific expression of *vitellogenin* homologs. These results show

that *dsx* in females came into use separately among morphogenesis and other biological processes in evolution.

Finally, I found that the C-terminal female-specific region of Dsx is massively different between *T. domestica* and *D. melanogaster*. Then, to trace the evolution of the C-terminal portion, I reconstructed the ancestral sequences of Dsx and compared the exon-intron structure among insects. I then unveiled that the C-terminal motif became longer in the common ancestor of Aparaglossata and that the Aparaglossata-specific portion is not encoded in a novel exon. This result indicates that the emergence of the C-terminal motif correlates with the appearance of the function of *dsx* in female differentiation of morphogenesis and may be due to accumulating coding mutation rather than the appearance of a novel exon.

Overall, I infer the evolutionary history that the female-specific isoform of *dsx* was initially responsible for promoting *vitellogenin* transcription and later acquired its feminizing roles in morphogenesis via the elongation of its C-terminal region. Our model provides insight that isoforms have some function as a preadaptation before neofunctionalization and that mutations to the C-terminal region might result in the recruitment of isoforms.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 千頭 康彦Title
論文題目 The evolutionary history of the sex-determining gene, *doublesex*, in
Insecta

真核生物に広く存在する pre-mRNA の選択的スプライシングにより生じたアイソフォームは、遺伝子の多面的な機能をもたらす。近年、スプライシングアイソフォームより新規機能が獲得された事例が蓄積されてきたが、スプライシングアイソフォームの新規機能獲得の進化プロセスの詳細は不明であった。申請者は、この問題にアプローチするため、*doublesex* (*dsx*) 遺伝子に着目した。*dsx* は節足動物において性分化に不可欠な転写因子をコードしている。ショウジョウバエなどの完全変態昆虫では、*dsx* は性特異的なスプライシングを受け、雌雄それぞれに特異的なアイソフォームが生成される。このような完全変態昆虫の *dsx* 性特異的アイソフォームは、雌雄で拮抗する機能を担い、雄または雌の分化を促進する。一方、最近、数種の不完全変態昆虫において、*dsx* の性特異的アイソフォームは、雄分化にのみ必須であり、雌分化には必要ないことが報告されている。この機能的な差異は、選択的スプライシングを介した遺伝子の新機能獲得を示唆するものである。しかし、昆虫類で有翅昆虫類より基部で分岐した分類群に関する情報が欠如していたため、*dsx* の性特異的アイソフォームの出現時期及び機能獲得の進化プロセスについて理解が進んでいなかった。

申請者は、昆虫進化の初期段階に分岐した有翅昆虫類の姉妹群である無翅昆虫類シミ目のマダラシミを材料に用い、上記の問題に取り組んだ。マダラシミの *dsx* は 2 コピー存在し、そのうちの 1 つに性特異的アイソフォームが存在することを発見した。続いて、分子系統学的解析を行った結果、*dsx* の遺伝子重複は、シミ目と有翅昆虫類の共通祖先が出現する以前に生じたことが判明した。加えて、性特異的アイソフォームをもつコピーが有翅昆虫類の *dsx* のオルソログであることが明らかになった。この結果は、マダラシミの *dsx* は性特異的なスプライシング制御を受けており、そのスプライシング制御は昆虫類の進化において単一の起源であることを支持するものである。

次に、申請者は、マダラシミ *dsx* の機能を幼虫期 RNAi 法により検証した。その結果、性特異的アイソフォームをもつ *dsx* は後胚発生期において雄の生殖器形態形成に必要であるが、雌の生殖器形態形成には必須でないことを見出した。この結果と有翅昆虫類に関するこれまでの知見から、雌の生殖器形態形成に関わる *dsx* の機能は、ハチ目を除く完全変態昆虫 (Aparaglossata) の共通祖先で獲得されたことが明らかとなった。さらに、マダラシミ *dsx* は卵黄タンパク質の一種をコードする *vitellogenin* ホモログの性特異的発現において、雌雄で拮抗する役割を担うことも判明した。これらの結果は、*dsx* の雌特異的アイソフォームは、進化の過程で形態形成とそれ以外の側面で別々に獲得された機能をもつようになったことを示すものである。

さらに、申請者は、マダラシミ *Dsx* の C 末端の雌特異的領域が、ショウジョウバエと比較して短いことを見出した。そこで、C 末端領域の進化プロセスを推定するために、*Dsx* の祖先配列を再構築し、昆虫間でエクソン-イントロン構造を比較した。その結果、C 末端領域は *Aparaglossata* の共通祖先で伸長したこと、また *Aparaglossata* に特異的な配列は新規のエクソンに由来しないことが示唆された。*Dsx* の C 末端雌特異的領域の出現は、*dsx* の形態形成における雌性分化能の出現と関連しており、新規エクソンの獲得ではなくコーディング領域の変異の蓄積によるものである可能性が示された。

以上の結果に基づき、*dsx* は昆虫進化の初期段階において性特異的な選択的スプライシングを受け、*vitellogenin* などの遺伝子の転写促進を担う機能を獲得し、*Aparaglossata* の出現以降に C 末端領域の伸長を経て雌の形態分化に関与する機能を獲得したという進化プロセスを申請者は提唱した。本研究は、有翅昆虫類と昆虫類以外の節足動物との間にあった知見のギャップを埋め、*dsx* の新規機能獲得の進化プロセスを理解する上で新たな洞察を与えるものであり、審査委員会は学位の授与に値すると判断した。