OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Epigenetic suppression of the male-determining gene doublesex1 in female Daphnia magna
Author(s)	Leim, Junya
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105412
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (LEIM JUNYA)	
Title	Epigenetic suppression of the male-determining gene *doublesex1* in female *Daphnia magna* (メスのオオミジンコにおける性決定遺伝子*doublesex1*のエピジェネティックな抑制)

Abstract of Thesis

Sex determination is a fundamental developmental process that exhibits remarkable evolutionary diversity across taxa, ranging from genetic to environmental mechanisms. In the freshwater microcrustacean *Daphnia magna*, sex is determined environmentally, with the male-determining gene *doublesex1* (*dsx1*) activated in males but stably repressed in females. While transcriptional activator of *dsx1* has been described, the mechanisms responsible for its long-term silencing in females remain poorly understood. Epigenetic repressors such as Heterochromatin Protein 1 (HP1) and Polycomb (Pc) are conserved across metazoans, yet their functional roles in environmental sex determination have not been demonstrated. In this study, the roles of HP1-1 and Pc in regulating *dsx1* expression in *D. magna* were investigated. Four HP1 orthologs and one Pc ortholog were identified, all containing conserved chromatin-interacting domains. Temporal expression profiling of these genes during embryogenesis revealed no sexual dimorphism, with *HP1-1* consistently showing the highest transcript abundance among the *HP1* orthologs. RNA interference-mediated knockdown of *HP1-1* in female embryos resulted in derepression of *dsx1* and the appearance of male-like traits at embryonic and juvenile stages, indicating that HP1-1 is essential for maintaining transcriptional silencing of the male-determining gene. However, lethality prior to adulthood prevented confirmation of complete sex reversal. Overexpression of *HP1-1* in male embryos did not reduce *dsx1* expression, suggesting that HP1-1 functions primarily as a repressor within the female chromatin context. By contrast, *Pc* knockdown did not affect *dsx1* expression under the conditions tested, although it caused embryonic defects and lethality, consistent with a broader developmental role. This result suggests that *dsx1* repression in females may be maintained predominantly through Pc-independent pathways, possibly relying more on HP1-mediated heterochromatin. These findings provide the first functional evidence that the conserved chromatin regulator HP1-1 represses the male-determining gene *dsx1* in females of *D. magna*. The results advance the understanding of epigenetic regulation in environmental sex determination and underscore chromatin-based mechanisms as critical contributors to developmental plasticity.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　LEIM JUNYA　）

	(職)	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	渡邉　肇
	副 査　教授	福崎　英一郎
	副 査　教授	關　光

論文審査の結果の要旨

本論文は生態系において重要な位置を占める動物プランクトンであるオオミジンコ(*Daphnia magna*)における環境による性決定についてクロマチンレベルからの研究をまとめたものであり、緒論、総括を含む４章から構成される。

諸論となる第１章では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。

第２章では、HP1-1 の抑制解除による dsx1 の脱抑制と雌胚の雄様形質誘導について研究を行っている。*D. magna* のゲノムから 4 種類の HP1 オーソログを同定している。いずれも H3K9me3 を認識するクロモドメインと、二量体化に関与するクロモシャドウドメインを備えている (HP1CD のみクロモシャドウドメイン欠損で 3 つのクロモドメインを持つ)。また系統解析により、これらが他種の HP1 と進化的に保存されていることを確認している。

発生過程の発現解析では、4 つのオーソログはいずれも雌雄差なく発現するが、その中でも HP1-1 が最も高発現することを確認している。RNAi による HP1-1 ノックダウンを雌胚に施すと、dsx1-レポーターの蛍光が胚全体で増強し、幼体期には雄特有の第一触角伸長することを観察している。また、dsx1 転写量も有意に増加し、HP1-1 が転写レベルでの抑制に寄与することを示している。ただしこれは成熟前に致死に至るため、完全な性転換の確認には至らない。一方、雄胚で HP1-1 をノックダウンさせると致死が生じるが dsx1 発現には影響がなく、この抑制作用が雌特異的であることを明らかにしている。また、雄胚で HP1-1 を過剰発現させても dsx1 の抑制は起こらないことから、HP1-1 による抑制には雌特有のクロマチン環境または補助因子が必要と考えられる。

第３章では Pc 発現抑制による dsx1 の発現への影響について研究している。*D. magna* の Pc オーソログは 1 種類のみ同定され、クロモドメインおよび PcR-box を備え、昆虫の Pc と近縁であることを確認している。発現量は産卵直後にピークを示すが、雌雄差は確認されない。RNAi による Pc のノックダウンでは、雌雄いずれにおいても胚発生が停止し致死に至るが、dsx1 の発現は変化しない。これは、哺乳類で Pc が性決定関連遺伝子を調節するという知見や、*Daphnia pulex* で dsx1 座位に H3K27me3 が蓄積するという報告とは対照的である。本研究の条件では Pc が dsx1 の主要な抑制因子として働く証拠は得られないが、他の Polycomb 群因子や異なる発生段階での寄与の可能性は残される。

第４章の総括では、これら得られた知見を総括し、今後の展望について総括している。

本研究は、HP1 と Pc が *D. magna* の dsx1 抑制に果たす役割を包括的に検証しており、HP1-1 は雌における dsx1 転写抑制に関与するが、Pc は胚発生には必須である一方、dsx1 の直接制御には関与しないことを示している。

以上のように、本論文は、環境性決定生物 *Daphnia magna* における雄決定遺伝子 dsx1 の雌特異的抑制機構をクロマチンレベルから解明し、その中核因子として HP1-1 を初めて実証するとともに、多層的な性決定制御モデルを提示した点で、高い新規性と独創性を有する研究である。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。