



Title	Identifying environmental sex-determining genes in the branchipod crustacean <i>Daphnia magna</i>
Author(s)	Mohamad Ishak, Nur Syafiqah
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69535
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Nur Syafiqah Mohamad Ishak)

Title

Identifying environmental sex-determining genes in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*
(甲殻類鰓脚綱ダフニアマグナにおける環境性決定遺伝子の同定)

Sex determination is a fundamental biological process that governs development of sex characteristic. In contrast to ubiquity of sex, sex-determining mechanisms are diverse among organisms and they can be broadly divided into two categories according their primary causal factor: genetic sex determination (GSD) and environmental sex determination (ESD). In contrast to GSD, there is a limited knowledge about the molecular mechanism of ESD because organisms obligating the ESD system are poor genetic models. To understand how diverse sex determination mechanisms evolve, investigation of ESD mechanisms is necessary. The branchiopod crustacean *Daphnia magna* (water flea) is a newly emerged model organism for ESD study. In favorable environment, *Daphnia* population is entirely female, but it produces males in response to adverse living conditions. In *Daphnia* male sex determination, juvenile hormone (JH) is known as a key initial component. It acts on developing oocytes at 4 to 10 h before ovulation and induces *Doublesex1* (*Dsx1*) gene, a transcription factor that regulates male traits development. However, factors that mediate between JH signaling and male-specific *Dsx1* expression are still remain unknown and this study aimed to identify those factors to understand the mechanism of environmental sex determination in *D. magna*.

To understand how *Dsx1* responds to JH signaling, I investigated the stage at which male-specific *Dsx1* expression begins during early embryogenesis. *Dsx1* isoforms, α and β , are produced by the alternative promoter usage, and temporal expression level of each isoform was measured by qPCR. As a result, *Dsx1*- α transcript was detected to be up-regulated in males earlier than β -transcript expression. This finding indicates that JH signaling first activates *Dsx1*- α promoter. Importantly, the analysis result showed that there is a significant time lag between the critical period of the JH action and the onset of *Dsx1*- α up-regulation, suggesting that *Dsx1* is not a primary JH-responsive gene regulated by the JH receptor protein, Methoprene-tolerant, but unknown transcription factors control its male-specific up-regulation.

To identify the unknown transcription factor responsible for male-specific up-regulation of *Dsx1*- α transcription, potential binding sites of transcription factors were searched in an upstream region of the α -transcription start site using bio-computational analysis. In this study, I finally focused on an enhancer element 1 that contains a *Dsx* binding site and an overlapping bZIP protein binding-site. The bZIP protein binding-site matched to a consensus binding-site for an ortholog of Vriille (*Vri*). Interestingly, male-specific expression of *Vri* was detected at 3 h before *Dsx1*- α promoter up-regulation. *Vri* gene knockdown and overexpression showed that *Vri* is necessary and sufficient for *Dsx1* activation. Additionally, disruption of the enhancer on the genome reduced male-specific *Dsx1* activation. These results indicate that *Vri* functioned as a transcriptional activator of *Dsx1* in environmental sex determination of *D. magna*.

To identify other candidates of sex-determining genes in *D. magna*, I also examined a transcription factor *Ftz-F1* because it involves with sex determination mechanism in mammals and it was discovered as a mediator for JH signaling in *Drosophila*. The temporal expression pattern of *Ftz-F1* during embryogenesis showed male-specific expression before *Dsx1* is activated. This result indicated that *Ftz-F1* gene might function as *Dsx1* regulator in sex-determining pathway. However, gene silencing of this gene led to lethality at an early embryonic stage. To investigate a role of *Ftz-F1* in *Daphnia* sex determination, further investigation will be needed.

Taken all together, I discovered co-option of the transcription factor *Vri* into the *Daphnia* sex-determining pathway as the activator of *Dsx1* gene. Sex-specific role of *Vri* has not been reported in any organisms although it has been known to be involved in various general development processes such as circadian clock. I proposed a hierarchy of signal transduction for *Daphnia* ESD where the JH first stimulates expression of *Vri*, which in turn activates *Dsx1* expression by binding to the enhancer region on *Dsx1*- α promoter. I also revealed the conservation sequence and sexually dimorphic expression of *Ftz-F1* in *D. magna*. These findings add new knowledge both about the molecular mechanism that underlies environmental sex determination (ESD) and about evolution of sex-determining pathways. In addition, this study provides molecular insights into sex determination of commercially important crustaceans, which, in turn, could contribute to development of the monosex culture in aquaculture fields.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Nur Syafiqah Mohamad Ishak)			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	福崎英一郎
	副 査	教授	村中俊哉
	副 査	教授	紀ノ岡正博
	副 査	教授	永井 健治
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	仁平 卓也

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の 1 種であるオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いて、環境が性の決定におよぼす影響に関する研究をまとめたものであり、緒言、総括を含む 5 章から構成される。

緒言となる第 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、まずオオミジンコにおいて性を決定する上で重要なダブルセックス遺伝子の経時的な変化について解析を行なっている。特に性が決まる初期胚の時期における変化をアイソタイプごとに詳細に解析を行ない、性決定遺伝子は最初の 6－9 時間では雌雄差がないものの、その後オスでのみ発現が見られることを明らかにしている。。その

第 3 章では、ダブルセックス遺伝子の発現を初期胚において制御している新たな遺伝子の探索と同定を行なっている。その結果、日周期の応答に関与しているブリル遺伝子が、ダブルセックス遺伝子の発現の誘導に関与していることを明らかにしている。オオミジンコにおいては、完全な遺伝子情報がなかったブリル遺伝子についてその構造を明らかにしたあと、ブリル遺伝子が初期胚の 6 時間という早い時期にオスのみで発現していること、このブリル遺伝子をメスの胚に導入するとオスの形質が発現すること、ブリル遺伝子の発現を抑制した場合にはオスになるはずの胚はメスの形質を示すことなどを、種々の遺伝子操作技術を駆使して証明している。

第 4 章では、オオミジンコの初期胚において、雌雄で発現の異なる別の転写因子 Ftz-F1 の遺伝子の解析を行なっている。Ftz-F1 遺伝子については、ショウジョウバエなど他の生物種では解析されていたもののオオミジンコにおいては未だ知見がなかった。まずこの Ftz-F1 遺伝子のクローニングを行いその遺伝子の構造を明らかにし、進化的な系統を解析した。さらにオスとメスの初期胚における Ftz-F1 遺伝子の発現状態を解析することにより、この Ftz-F1 遺伝子が基本的にはオスで高い発現をしめす性的二型の遺伝子であることを明らかにした。

第 5 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。

生態系を構成する上で重要な位置を占める動物プランクトンは、環境変化に応じた生殖戦略をとっていることは古くから知られていたが、本論文ではこの環境による性決定に関与する遺伝子を明らかにすることより、性決定の分子メカニズムの解明に寄与している。また生態系を構成する種々の生物の中で、一次消費者である動物プランクトンは重要な位置を占めていることから、動物プランクトンの個体群動態に影響を与える生殖戦略の分子メカニズムを明らかにすることは、環境保全や環境影響評価などにおいても非常に重要であり、本論文の意義は大きい。以上のように、本論文では、

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。