

## 論文の内容の要旨

論文題目 カブラハバチにおける性決定関連遺伝子の同定と機能解析

氏 名 峰 翔太郎

膜翅目昆虫は性染色体を持たず、未受精卵である半数体が雄に、受精卵である倍数体が雌になるが、低い確率で倍数体の雄も生まれることが知られていた。近年セイヨウミツバチを用いた研究により、膜翅目昆虫はある一遺伝子座に位置する複対立遺伝子がヘテロ接合であれば雌になり、ホモあるいはヘミ接合であれば雄になる相補的性決定機構により性が決まることが明らかになり、その原因遺伝子である*complementary sex determiner (csd)*がセイヨウミツバチから単離された。*csd*はこれまでに11種の膜翅目のゲノムにおいて見つかっており、多くの膜翅目の性は*csd*により決まると予想されている。カブラハバチも交配実験により相補的性決定機構をもつことが確認されているが、性決定に関わる遺伝子はひとつも同定されていない。完全変態昆虫の系統樹を見ると、膜翅目は*basal lineage*に属することから、完全変態昆虫の祖先種と近い形質をもっていると考えられる。本研究で用いたカブラハバチは膜翅目のなかでもより原始的な広腰亜目に属する。従って、カブラハバチの性決定遺伝子を明らかにすることは、完全変態昆虫の性決定遺伝子の起源や性分化の祖先的状況を類推する手がかりを得るうえで鍵となると考えられる。そこで私は、カブラハバチの性決定に関与する遺伝子の同定を行い、その性決定カスケードの作成を本研究の目的とした。

### カブラハバチゲノムにおけるミツバチの性決定遺伝子のホモログの探索

性決定遺伝子について理解が進んでいるセイヨウミツバチの性決定カスケードを構成する*csd*, *feminizer (fem)*, *Apis mellifera transformer-2 (Amtra-2)*, *Apis mellifera doublesex (Amdsx)*のアミノ酸配列をqueryにカブラハバチのgenemodelを対象としたtblastnサーチを行った結果、*Amdsx*と*Amtra-2*のオルソログ(*Ardsx*, *Artra-2*と命名)を同定することができたものの、*csd*と*fem*と有意な相同性を示す遺伝子はみつからなかった。ミツバチの場合*csd*と*fem*はパラログの関係にあることが知られており、*csd*と*fem*のどちらもカブラハバチのゲノムにみつからなかったという結果は妥当であると考えられる。これらのことから、カブラハバチはミツバチと同じ性決定様式をとるものの、そこに関わる性決定遺伝子群はミツバチのそれらとは全く異なる可能性が強く示唆された。*dsx*と*tra-2*は昆虫で広く保存されており、性分化に関わることでよく知られる。そこでカブラハバチの性決定機構を理解する最初の糸口としてこれら2つの遺伝子に着目することとした。

### Ardsx との遺伝子構造の解明と発現解析

RACE法を用いて *Ardsx* の全長cDNA配列を決定した。その結果、他の昆虫の *dsx* と同様、*Ardsx* には雌雄で異なる splice variant が存在し、雄型ではエクソン5の途中で stop コドンを含むのに対し、この stop コドンを含む領域が雌型ではスキップされ、雄型とは異なるアミノ酸配列をコードすることがわかった。RT-PCRの結果、*Ardsx* は産卵直後には発現しておらず、産下17時間後から雌雄の卵において雄型雌型両方の発現が見られ、24時間後以降、雄では雄型の発現が継続的にみられた。一方雌では孵化4日目まで雌型と雄型の両方の発現がみられたが、孵化4日以後になると雌型のみが発現がみられた。以上の結果より、*Ardsx* の発現に性差がみられ始めたのは産卵後17時間から24時間の間であったことから、この時期にカブラハバチの性決定が起こると推察された。

### Ardsx のノックダウンが性分化に及ぼす影響

性決定が起こる時期であり *Ardsx* の発現が始まる胚発生の時期における *Ardsx* の発現を抑制するため、ペアレンタル RNAi を行った。その結果、雌では影響が見られなかったが、雄では外部生殖器と内部生殖器のいずれも消失することが明らかとなった。

次に生殖器原器や外部形態の活発な性分化が行われる終齢幼虫から蛹期における *Ardsx* の発現を抑制するため、蛹期直前の終齢幼虫後期に *Ardsx* dsRNA のインジェクションを行った。ペアレンタル RNAi の時と同様に雌では影響が見られなかったが、雄の外部生殖器が部分的に性転換を起こし、内部生殖器は発育不全を示すことが明らかとなった。

続いて、ペアレンタル RNAi 処理個体において3齢幼虫と終齢幼虫の時期に追加で dsRNA を注射し、全成長過程で *Ardsx* のノックダウン(完全 RNAi と命名)を行った。その結果、雌の性分化に異常はみられなかったが、雄の外部生殖器は終齢幼虫におけるノックダウンの時よりもさらに強く雄から雌への性転換を示し、産卵管とそれを覆う鞘状の構造などの雌特有の器官が形成された。これら完全 RNAi オスは精巣を発達させず、卵で満たされた卵巣を形成することが明らかとなった。これらの卵の妊性を確認するため、賦活化処理を施したが孵化個体は得られなかった。

通常カブラハバチの雄は半数体であるため、減数分裂を伴わずに精子形成を行う。一方倍数体である雌は減数分裂を経て卵形成を行う。今回完全 RNAi を行った雄は半数体であったため、雌への性転換が起きても減数分裂が進まず、それが原因で完全 RNAi 雄の産生した卵は正常に発生しなかった可能性がある。上記の仮説が正しいかどうかを検証するために、近親交配を繰り返すことにより二倍体雄を作出し、同様に完全 RNAi 処理を行った。その結果完全 RNAi 二倍体雄の外部生殖器は完全に性転換を起こし、本来精巣になる内部生殖器は卵巣へと分化した。この卵巣が形成した卵は、正常な雌と比較すると数は少ないが、賦活化処理によって通常雌とほぼ同等の発生率を示した。これらの結果から、倍数性が正常な卵形成にとって重要であることが判明した。*Ardsx* のノックダウンが性行動に及ぼす影響を明らかにするために、*Ardsx* のノックダウンを行った雄が正常な雌に対して交尾行動を示すか確認を行なった。終齢幼虫での RNAi、ペアレンタル RNAi、完全 RNAi のどの条件の雄であってもメスに対して交尾行動を示したが、交尾は成功しなかった。これは *Ardsx* のノックダウンにより外部生殖器の性転換が引き起こされたため、雌との交接が物理的に不可能であったからであると考えられる。以上より、

*Ardsx* は雄の交尾行動を制御する中枢神経系の性分化には関与しないことが明らかとなった。次に、*Ardsx* のノックダウンを行った雄が雌としての性行動を示すかを明らかにするために、*Ardsx* のノックダウンを行った雄に対して正常な雄が交尾行動を示すか確認を行なった。その結果、正常な雄は *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体雄に対してのみ交尾行動を示すことが明らかとなり、交尾にも成功した。そればかりでなくこの *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体雄は正常な雌と同様に大根の葉の縁に産卵を行った。この卵からは雌雄の正常な孵化個体が得られた。以上の結果から、*Ardsx* はカブラハバチの雄分化にとって必須の機能を持ち、その機能抑制は 2 倍体雄において雄から雌への完全な性転換をもたらすこと、*Ardsx* はカブラハバチの雌分化に不要であること、以上 2 点が明らかとなった。

### Artra-2の遺伝子構造の解明と発現解析及び機能解

*tra-2* はミツバチを含む多くの昆虫において *dsx* の性特異的スプライシング制御に不可欠な因子として知られることから、カブラハバチの *tra-2* (*Artra-2*) も同様の機能をもつ可能性がある。RACE法を用いて *Artra-2* の全長 cDNA 配列を決定したところ、複数の splice variant が存在することが明らかとなった。しかし、*Ardsx* の場合とは異なり、*Artra-2* には性特異的な splice variant は見られなかった。RT-PCR の結果、雌雄共に胚発生初期から成虫まで発現していることがわかった。TRA-2 の発現パターンに性差はみられないことがショウジョウバエやミツバチにおいて知られていることから、この結果は妥当であると考えられた。

### Artra-2 のノックダウンが性分化に及ぼす影響

ミツバチでは *Amtra-2* は *Amdsx* の性特異的スプライシングに関与し、その発現をノックダウンすると *Amdsx* の雌型のスプライシングが雄型に切り替わるという報告がある。ショウジョウバエでは *tra-2* をノックダウンすると雌から雄への性転換が誘発される。同様にカブラハバチでも *Artra-2* が *Ardsx* のスプライシングに関与するか解析を行うため、終齢幼虫において *Artra-2* を標的とする dsRNA を注射し、*Ardsx* の性特異的スプライシングに及ぼす影響を調べた。その結果、*Artra-2* の発現は十分にノックダウンされていたにも関わらず雌雄の *Ardsx* の発現パターンには変化が見られなかった。これらの個体の外部生殖器の形態を観察したところ、雄では影響が見られなかったが、雌の外部生殖器の一部(産卵管を格納する鞘)にわずかな矮小化がみられた。一方、雌雄の内部生殖器には異常がみられなかった。さらにペアレントアル RNAi による *Artra-2* のノックダウンを行ったが、ほとんどの個体が胚致死を示したため、性分化に及ぼす影響を調べるができなかった。確認以上の結果から、*Artra-2* はミツバチの *Amtra-2* のように性決定に関わる機能をもたないと考えられる。ミツバチにおいても *tra-2* のノックダウンは胚致死をもたらすことが知られていることから、*tra-2* は膜翅目の胚発生に必須の役割をもつと考えられた。

### カブラハバチゲノムにおける相補性性決定遺伝子の同定

前述の通りカブラハバチはミツバチと同じ相補的性決定機構を持つが、*csd* を持たなかったことから、カブラハバチの相補性性決定機構の責任遺伝子はミツバチの *csd* とは異なると考えられる。そこでカブ

ラハバチの相補性性決定責任遺伝子を同定するため、10 世代以上近親交配を行い遺伝子座のホモ化を誘導し、雌では常にヘテロ接合であり、雄ではホモ接合となる遺伝子座の同定を行った。

その結果、上記の条件を満たす SNPs を 298 箇所見いだすことができた。これらの SNPs を翻訳領域に含み、なおかつ性決定時期に発現している遺伝子を選抜したところ、2 つの遺伝子、LOC105691363 (histone-lysine N-methyltransferase 2C-like)と LOC105683351 (TOX high mobility group box family member 3-like)に絞られた。LOC105691363 はヒストン H3 のメチル化によりエピジェネティックな転写活性に関わる遺伝子であり、上記 SNP は 1 アミノ酸欠失を招くことがわかった。LOC105683351 は哺乳類の性決定遺伝子 *Sry* や *SOX9* などと同じ HMG box ファミリーに属する転写活性化因子をコードし、上記 SNP はフレームシフトを引き起こすことがわかった。以上の結果から、雌ヘテロとなる SNPs がこれらのタンパク質の機能に変化をもたらすことが予想された。現在これら 2 遺伝子についてペアレントル RNAi による機能解析を行っている。

### まとめ

本研究では、カブラハバチが完全変態昆虫の中で最も原始的な部類に属するという特性に着目し、本種の性決定カスケードの解明を目的とした研究を行った。その結果、幅広い昆虫種において保存されている性分化遺伝子 *dsx* のオルソログ *Ardsx* を同定することができた。*dsx* は性特異的スプライシングを受け、雌雄特異的なアイソフォームを生じ、それぞれが雌分化と雄分化に関わることが知られている。ところが本研究により、カブラハバチの *dsx* は雌分化に不要であるとの意外な結果が得られた。しかも、*Ardsx* の機能阻害は雄から雌への完全な性転換をもたらした。これは、*dsx* の機能阻害が両性において間性をもたらす、という他の昆虫種で報告されてきた例と全く異なる。これらの違いは、カブラハバチが完全変態昆虫の中で最も原始的な部類に属することに起因するのかもしれない。すなわち、*dsx* は元々雄分化にのみ必須の遺伝子であり、後に性特異的スプライシングの獲得により産生されるようになった雌型アイソフォームには機能がなかったのかもしれない。

本研究により、カブラハバチはミツバチ同様相補性性決定機構を採用するものの、その責任遺伝子である *csd* とその下流遺伝子 *fem* をもたないことが明らかとなった。この事実を裏付けるかのように、*fem* と協働して *dsx* の性特異的スプライシング制御に関わるとされる *Amtra-2* のカブラハバチオルソログ *Artra-2* をノックダウンしても、*dsx* のスプライシングに変化はみられず、性転換などの異常は起こらなかった。そこで *csd* や *fem* に代わる遺伝子を探索したところ、2 つの有力な候補遺伝子を見いだすことができた。いずれも既知のどの性決定遺伝子とも異なることから、これらの遺伝子がカブラハバチの性決定に関わることを証明できれば、新たな性決定制御機構の発見に繋がると期待できる。

Mine S, Sumitani M, Aoki F, Hatakeyama M, Suzuki MG. (2017) Identification and functional characterization of the sex-determining gene doublesex in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthredinidae)Appl. Entomol. Zool. (Jpn.). 2017;52(3):479-509. doi: 10.1007/s13355-017-0502-3. Epub 2017 Jun 3