

審査の結果の要旨

氏名 峰 翔太郎

性決定機構はオスとメスを決めるという点で普遍的といえるが、そのメカニズムは意外にも多岐にわたる。性決定機構に見られる多様性がどのようにして生じたのか、その問いに答えるためには、現存する性決定機構がどのような進化経路を経て今に至ったのかを理解する必要がある。系統進化学的に原始的とされる分類群に属する生物種を研究材料として用いることは、地球上に生息する生物がもつ体制制御機構がどのような過程を経て進化したかを解き明かす上でしばしば有効である。昆虫は地球上で最も繁栄している生物といわれ、現存する生物種の半分は昆虫によって占められている。性決定機構も多様性に富み、その進化を明らかにする上で好都合な生物と言える。

カブラハバチは膜翅目広腰亜目に属する昆虫であり、完全変態昆虫の中では最も原始的な分類群に属する。カブラハバチはセイヨウミツバチなどいくつかの膜翅目昆虫と同様、相補性性決定様式（ある1遺伝子座がヘテロ接合の場合はメス、ホモ・ヘミ接合の際はオスとなる）を採用するが、性決定や性分化に関わる遺伝子は全く明らかにされていなかった。2014年にはi5k計画により本種の全ゲノムシーケンスが公開され、RNAi法などの遺伝子解析ツールも揃いつつあった。以上の点に着目し、峰翔太郎氏はカブラハバチの性決定カスケードの全容を明らかにすると共に、そこから見えてくる昆虫性決定機構の進化過程についての洞察を得ることをもう一つの目的とした。

峰翔太郎氏が博士論文研究により以下の点を明らかにした。

【カブラハバチ *doublesex* 遺伝子を同定しユニークな機能を明らかにした】

doublesex (*dsx*)は昆虫の性分化を制御する転写因子としてショウジョウバエにおいて1957年に最初に同定された。*dsx*には性特異的スプライシングによって生じる雌雄で異なるアイソフォーム (*dsxF*および*dsxM*)を生じ、それぞれがメス分化、オス分化を誘導することが多くの完全変態昆虫において報告されてきた。本遺伝子の機能阻害は雌雄両性における性分化異常をもたらし、間性を示すことが常とされてきた。峰翔太郎氏はカブラハバチゲノムから*dsx*の相同遺伝子を*Ardsx*と命名した。RACEによる*Ardsx*の完全長cDNAの取得、発生直後の卵から成虫にいたる全日齢の雌雄における*Ardsx*の発現パターンの解析から*Ardsx*も他の昆虫同様雌雄で異なるスプライシングアイソフォーム (*ArdsxF*, *ArdsxM*)を生じることを突き止めた。次に*Ardsx*が性分化に及ぼす影響を詳細に調べるため、様々な発生段階においてRNAiを施し、*Ardsx*の各発生段階における性分化において果たす役割を明確にした。複数のRNAi法を組みあわせ、発生段階毎に*Ardsx*のノックダウンが性分化に及ぼす影響を詳細に調べた例は他に例がない。さらに半数体のオス（通常、ハチのオスは半数体である）だけでなく、近親交配を繰り返すという地道なやり方で二倍体オスを作成し、両者をRNAiに供試して性分化に及ぼす影響を詳細に調べた、という点でも他に例がない。既往研究では無視されてきた点を丁寧に解析することにより、*Ardsx*のノックダウンがメス分化には何ら影響を及ぼさないこと、オスからメスへの性転換をもたらすこと、さらにその性転換の度合は二倍体オスを供試した時の方がより完全な性転換を示すことを形態、配偶子形成、妊性、行動など多角的な解析により明らかに

した。*Ardsx*がメス分化に不要であること、また*Ardsx*のノックダウンが完全なオスからメスへの性転換をもたらすとの発見は従来の*dsx*の機能の解釈に一石を投じる発見であり、この内容を報じた投稿論文は、その後海外の研究者により数多く引用され、第7回日本応用動物昆虫学会論文章を授与されるに至った。昆虫姉妹群の甲殻類における*dsx*の機能やカブラハバチよりも原始的な昆虫において近年報告された*dsx*の機能と峰翔太郎氏が明らかにしたカブラハバチの*dsx*の機能を総合し、完全変態昆虫における*dsx*の機能的進化について説得力のある考察を導き出した。

【カブラハバチ *transformer-2*を同定しその機能を明らかにした】

セイヨウミツバチの *transformer-2* (*tra-2*) は *dsx*の雌型スプライシングを誘導する上で不可欠なスプライシング因子である。峰翔太郎氏はこの遺伝子のオルソログをカブラハバチゲノムから同定し、*Artra-2*と命名した。RACEによる*Artra-2*の完全長cDNAの取得、発生直後の卵から成虫にいたる全日齢の雌雄における*Artra-2*の発現パターンの解析から*Artra-2*の発現パターンに性差が見られないことを突き止めた。*Ardsx*の機能解析の際に威力を発揮したRNAi法を駆使し、*Artra-2*の機能解析を行った結果、この遺伝子が胚発生にとって必須の役割をもつこと、またメスの外部生殖器の一部に矮小化をもたらすことを発見した。ミツバチの場合と同様、*tra-2*が*dsx*の雌型スプライシングの誘導に関わるかを明らかにするため、*Artra-2*ノックダウンが*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*は*Ardsx*のスプライシング制御に変化をもたらさないことを突き止めた。以上の結果から、性決定カスケードにおいて*Artra-2*は*Ardsx*の上流遺伝子として機能しないことを明らかにした。

【カブラハバチの相補性性決定機構の責任遺伝子の探索】

セイヨウミツバチでは*dsx*の上流に位置する*tra-2*が、カブラハバチでは*dsx*の性特異的スプライシング制御に関わらないことが明らかとなったこと、さらにセイヨウミツバチの性決定カスケードの上流遺伝子である*feminizer*や相補性性決定機構の責任遺伝子として同定された*csd*がカブラハバチゲノムには見当たらなかったことから、峰翔太郎氏は独自にカブラハバチの相補性性決定責任遺伝子の同定に取り組んだ。近親交配を10世代以上繰り返し、理論上は相補性性決定責任遺伝子座位のみメスでヘテロ、オスでホモとなるような系統を作り出し、それらの集団の娘、息子のバルクゲノムDNAと父親ゲノムとのWGSを比較し、GWAS解析を行うことで、lncRNAをコードするある遺伝子が、全遺伝子の中で最も多くのメスヘテロSNPsを保有することを突き止めた。性決定時期に発現が見られたことから、相補性性決定の有力な候補遺伝子であると予想されたが、博士論文研究中にその機能まで明らかにできなかった。

以上より、峰翔太郎氏は当時全く明らかにされていなかったカブラハバチの性決定機構について数々の知見をもたらしただけでなく、*dsx*が雌雄両性の性分化に不可欠との当時の見解を覆す新たな発見をもたらした。彼の発見は完全変態昆虫における*dsx*の祖先的状況を理解する上で示唆に富み、今後昆虫の性分化研究に携わる多くの研究者が彼の知見を大いに参考とするだろう。

よって本論文は博士（生命科学）の学位請求論文として合格と認められる。