

---

博士論文(要約)

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

峰 翔太郎

---

---

## 目次

緒言.....	2
第一章.....	14
序論.....	15
材料・方法.....	16
結果.....	18
考察.....	21
図表.....	23
第二章.....	29
序論.....	30
材料・方法.....	32
結果.....	38
考察.....	46
図表.....	53
第三章.....	86
第四章.....	88
総合考察.....	90
謝辞.....	91
引用.....	92

---

## 緒言

個体の性別が決まることを「性決定」とよび、性決定において支配的な役割をもつ遺伝子を「性決定のマスター遺伝子」とよぶ。哺乳類の性決定のマスター遺伝子として、*Sry* (*Sex determining region Y*) が知られている。*Sry* は Y 染色体上に座し、*Sry* 遺伝子の有無によってオスかメスかが決まる (Kashimada and Koopman, 2010)。昆虫の性決定のマスター遺伝子として最初に同定されたのはキイロショウジョウバエの *Sex-lethal* (*Sxl*) である。*Sxl* はスプライシング因子をコードしており、下流の標的遺伝子のスプライシングを制御することで個体の性をメスへと決定付ける (Bridges, 1921)。*Sxl* の発現は X 染色体の数と常染色体のセットの数の比 (X:A 比) が 1.0 以上のとき ON になり、SXL タンパク質が *tra* のメス型のスプライシングを誘導し、機能をもつ TRA が産生される (Inoue *et al.*, 1990)。TRA は *dsx* のメス型スプライシングを誘導し、DSX のメス型アイソフォームである DSXF を生産する (McKeown *et al.*, 1988)。DSXF は下流の遺伝子の転写を制御することで体細胞の性をメスへと分化させる (Jursnich and Burtis, 1993)。一方オスでは X:A 比が 0.5 となるため *Sxl* の発現が起らず、機能を持つ TRA が産生されない。TRA 非存在下において *dsx* は基底状態のスプライシングを受け、その結果 DSX のオス型アイソフォームである DSXM が産生される。

哺乳類にも *Sxl* のホモログが存在するが、この遺伝子を性決定に用いているのはショウジョウバエ 属に属する双翅目昆虫だけである。同じ双翅目昆虫であるネッタイシマカでは擬 Y 染色体領域をもつ個体がオスとなるが、この領域に座乗する遺伝子として *Nix* が同定されている (Hall *et al.*, 2015)。*Nix* はキイロショウジョウバエ の *transformer-2* を起源とする遺伝子であり、オスを決めるマスター遺伝子として働く (Hall *et al.*, 2015)。鱗翅目昆虫であるカイコの場合、W 染色体をもつ個体がメスへと分化する。W 染色体に座乗する遺伝子として同定された *Feminizer* (*Fem*) は piRNA を産生して下流のオス分化遺伝子の発現を抑制し、個

---

体の性をメスにするマスター遺伝子として働く (Kiuchi *et al.*, 2014)。 *Fem* はユニークな遺伝子であり、現在までのところ、 *Fem* のホモログはカイコの祖先種といわれるクワコにしか見つかっていない (Kiuchi *et al.*, 2014)。このように、性決定機構や性決定の司令塔となる性決定のマスター遺伝子は種によって大きく異なり、多様性に富んでいるという点で特徴的であるといえる。

なかでも膜翅目昆虫は性染色体をもたず、性決定に性染色体が関わらないという点で興味深い。では、膜翅目昆虫の性はどのようにして決まるのだろうか。膜翅目昆虫の場合、未受精卵である半数体がオスに、受精卵である二倍体がメスになるが、低い確率で二倍体のオスも生まれることが知られていた (Whiting, 1943)。

膜翅目の性決定機構は現在 2 つのモデルが提唱されている。1 つは相補的性決定モデル (complementary sex determination: CSD) である (Whiting, 1943)。このモデル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メスに分化し、ホモあるいはヘミ接合であればオスに分化するというものである。例えば性決定遺伝子座の複対立遺伝子の種類を a、b、c とし、ab の対立遺伝子を持つメスと c の対立遺伝子を持つオスが存在した場合、この雌雄を掛け合わせることで、受精卵からは ac または bc という対立遺伝子を持つ二倍体が出現する。この二倍体は対立遺伝子がヘテロ接合であるためメスに分化する。未受精卵からは b または a という対立遺伝子を持つ半数体が出現する。この半数体は対立遺伝子がヘミであるためオスに分化する。この bc という対立遺伝子を持つメスと、b という対立遺伝子を持つオスを掛け合わせることで、受精卵からは bc または bb という対立遺伝子を持つ二倍体が出現する。bc の二倍体は対立遺伝子がヘテロ接合であるためメスに分化するが、bb の二倍体は対立遺伝子がホモ接合となるためオスに分化する。未受精卵からは b または c という対立遺伝子を持つ半数体が出現し、対立遺伝子がヘミであるためオスに分化する。この様に低い確率で受精卵から二倍体オスが出現することはこの相補的性決定モデルにより説明することができる(図 0-1A)。

---

相補性性決定モデルが正しいことは、交配実験を行うことで検証されてきた。たとえば本研究で用いたカブラハバチ (*Athalia rosae*) では、兄妹交配によって二倍体のオスが生まれる組み合わせが存在し、この組み合わせでは二倍体のオスと二倍体のメスの比率が 1:1 となることが確認されている (Naito and Suzuki, 1991)。また二倍体のオスを兄妹交配に用いると三倍体の雌雄が生まれることから、相補モデルと矛盾しない。これまでにカブラハバチを始め、セイウミツバチ、セイウオオマルハナバチ、アルゼンチンアリなど様々な膜翅目においてこのモデルが証明されており、兄妹交配による二倍体のオスの出現頻度から対立遺伝子の数が推定され、カブラハバチでは約 50 (Naito and Suzuki, 1991)、セイウミツバチでは 121 (Zareba *et al.*, 1977)、セイウオオマルハナバチでは 46 (Duchateau *et al.*, 1994)、アルゼンチンアリでは 86 (Ross *et al.*, 1993) 種類ほど存在すると見積もられている。

もう 1 つの支持されているモデルとして、ゲノムインプリンティングモデル (genomic imprinting sex determination: GISD) が挙げられる (図 0-1B)。ゲノムインプリンティングモデルでは、性決定遺伝子座が受けるゲノムインプリンティングが父親由来か母親由来かによって異なると仮定し、どちらの親からゲノムを受け継ぐかによって性が決定するというものである (Poirie *et al.*, 1993)。例えばメスに分化するためには性決定遺伝子の発現を上昇させる必要があるが、母親由来の性決定遺伝子座はゲノムインプリンティングにより発現が抑制されており、父親由来の性決定遺伝子座にはゲノムインプリンティングによりその発現を上昇させる機能を持つと仮定する。この場合、未受精卵では母親由来の性決定遺伝子座しか持たないため個体は全てオスに分化するが、受精卵では父親と母親両方の性決定遺伝子座を持ち、父親由来のゲノムインプリンティングにより性決定遺伝子の発現が上昇することでメスに分化すると考えられる。

キョウソヤドリコバチでは受精卵において *Nvtra* の発現が上昇することでメス分化が誘導されることが確認されている (Verhulst *et al.*, 2010)。 *Nvtra* の発現を抑制することで受精卵であってもオスに分化する (Verhulst *et al.*, 2010)。これは *Nvtra* の発現を上昇させる因子である

---

womanizer(*wom*)がゲノムインプリンティングにより制御されており、母親由来の *wom* はその機能がゲノムインプリンティングにより抑制されているが、父親由来の *wom* は機能を持つからであると考えられる。

その後の研究により、胚発生初期の受精卵において高く発現する遺伝子であり、かつその遺伝子は SNP 解析により父親由来であることが確認され、これがゲノムインプリンティングモデルの原因遺伝子である *wom* と結論づけられた。しかしながらゲノムインプリンティングモデルは、先で示した相補的性決定モデルで見られる父親由来のゲノムを受け継いだ受精卵から生まれる二倍体のオスを説明できないため、キョウソヤドリコバチが属するコバチ上科の種に特異的である可能性が高い。

膜翅目昆虫の性決定モデルはいずれも交配実験により検証が行われてきたが、その分子機構については全く理解が進んでいない状況であった。しかし、セイウミツバチを用いた研究により、2003 年ついに相補的性決定モデルの責任遺伝子の正体が明らかにされ、*complementary sex determiner (csd)*と名付けられた(Beye et al., 2003)。

上述した相補的性決定機構のモデルと同様に、*csd* にはいくつもの対立遺伝子が存在し、メスではヘテロ接合であり、オスではホモあるいはヘミ接合であることが確認されている(図 0-2)。*csd* の発現には雌雄差は見られず、また性特異的なアイソフォームも存在しない。CSD タンパク質はアルギニンとセリンを豊富に含む領域と末尾にあるプロリンを豊富に含む領域の間に対立遺伝子ごとに異なるアミノ酸配列を示す超可変領域が存在し、この超可変領域のアミノ酸配列の違いが対立遺伝子を形成していると考えられる。またこの超可変領域にはフレームシフトを生じる様な変異は見られない(図 0-3)。

CSD タンパク質に見られるアルギニンとセリンを豊富に含む領域やプロリンを豊富に含む領域は、他の昆虫において mRNA のスプライシングに関わる TRA タンパク質と高い相同性を示すため、CSD タンパク質も mRNA のスプライシングに関わる機能を持つことが考えられている。

---

また Beye らは RNAi 法を用いて *csd* の機能解析を行い、*csd* がメス分化に関わることを明らかにしている。*csd* の対立遺伝子間において保存されている共通領域を標的とした dsRNA を、メスへと分化する *csd* の遺伝子座がヘテロ接合である受精卵に注入することで、本来メスになる個体がオスに分化する。一方でオスに分化する *csd* の遺伝子座がホモ接合である受精卵に dsRNA を注入しても変わらずオスに分化する。この実験により *csd* はヘテロ接合の時にのみ機能を持ち、メス分化を誘導するが、ホモ接合では機能を持たないためオスへと分化することが示唆された。なぜ *csd* がヘテロ接合の時のみ機能を発揮するのか、その詳細な分子機構については明らかにされていない。その後の研究により、*csd* 遺伝子座のすぐ近傍に *csd* と高い相同性を示す *feminizer (fem)* 遺伝子が見つかった。興味深いことに、*fem* はキイロショウジョウバエの *tra* と相同性を示し、雌雄で異なるスプライスバリエントを生じる (Hasselmann *et al.*, 2008) (図 0-4)。この *fem* の機能を RNA 干渉法により阻害すると、*csd* をノックダウンした場合と同様に本来メスになる個体がオスに分化する。*csd* をノックダウンすると、*fem* のスプライシングバリエントがオス化したことから、*fem* は *csd* の下流で働き、*fem* のメス型スプライシングには *csd* が必要であることが示唆された。現在では *fem* が *tra* のオルソログであり、*csd* は *fem* の遺伝子重複によって生じたパラログであることがわかっている (Hasselmann *et al.*, 2008)。FEM タンパク質はスプライシング因子であり、ミツバチの *dsx* オルソログである *Amdsx* のメス型スプライシングを誘導する (Bownes, 1992)。FEM が存在しない場合、*Ardsx* はオス型のスプライシングを受ける。メス型 *Amdsx* とオス型 *Amdsx* から翻訳されたタンパク質はそれぞれ、メス分化とオス分化を引き起こすことがわかっている (Bownes, 1992) (図 0-5)。

このように相補モデルは分子機構においてもその正当性が証明されている。しかしゲノムインプリンティングモデルであるキョウソヤドリコバチを含むコバチ上科の仲間では *csd* が発見されておらず、一概に膜翅目の性は相補モデルにより決まる、とは断言できない。

---

完全変態昆虫の系統樹を見ると、膜翅目は **basal lineage** に位置することから、完全変態昆虫の祖先種と近い形質を持っていると考えられる。本研究で用いたカブラハバチ (*Athalia rosae*) は、膜翅目の中でもより原始的な広腰亜目に属し、ミツバチやスズメバチなどの細腰亜目が出現する 1500 万年以上前からこの地球上に生息していたと推測されている (図 0-6)。従って、この種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。上述したようにカブラハバチもミツバチ同様、相補性性決定機構により性が決まることが交配実験により確認されている (Naito and Suzuki, 1991) が、その原因遺伝子はおろか、性決定や性分化に関わる遺伝子は何一つ同定されていない。2014 年にカブラハバチの全ゲノム情報が公開されたことを踏まえ、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。



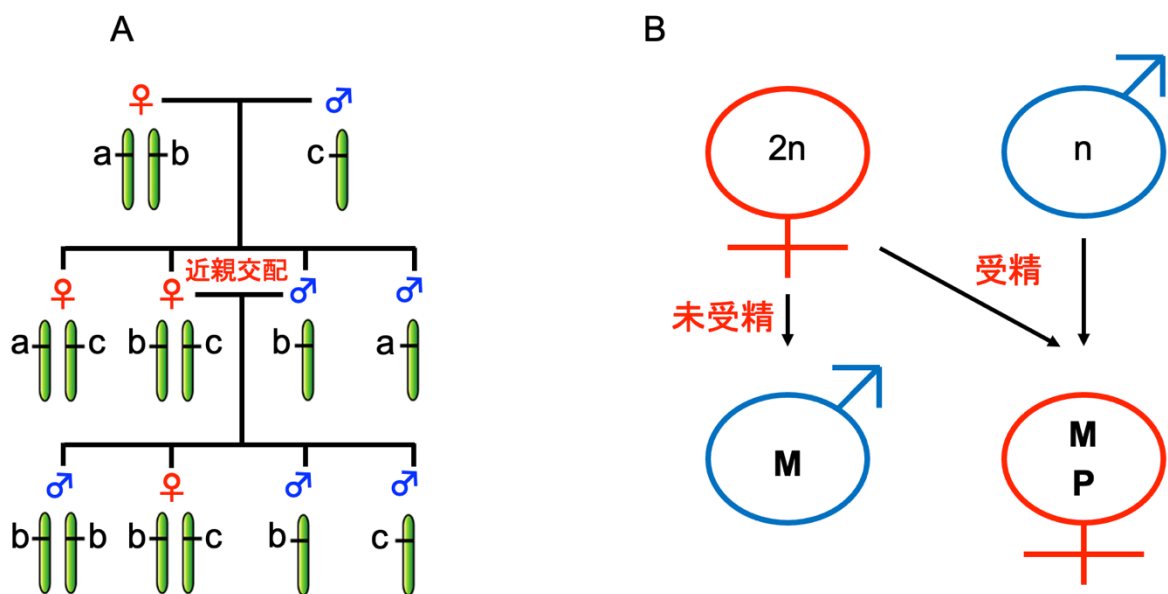


図 0-1 膜翅目昆虫の性決定モデル

A) 相補モデル。単一遺伝子座に位置する複対立遺伝子を示す。a、b、c はそれぞれ性決定遺伝子座の対立遺伝子の種類を示す。(B) インプリンティングモデル。n は核相を示す。P、M はそれぞれ、配偶子の父性インプリンティング、母性インプリンティングを示す。

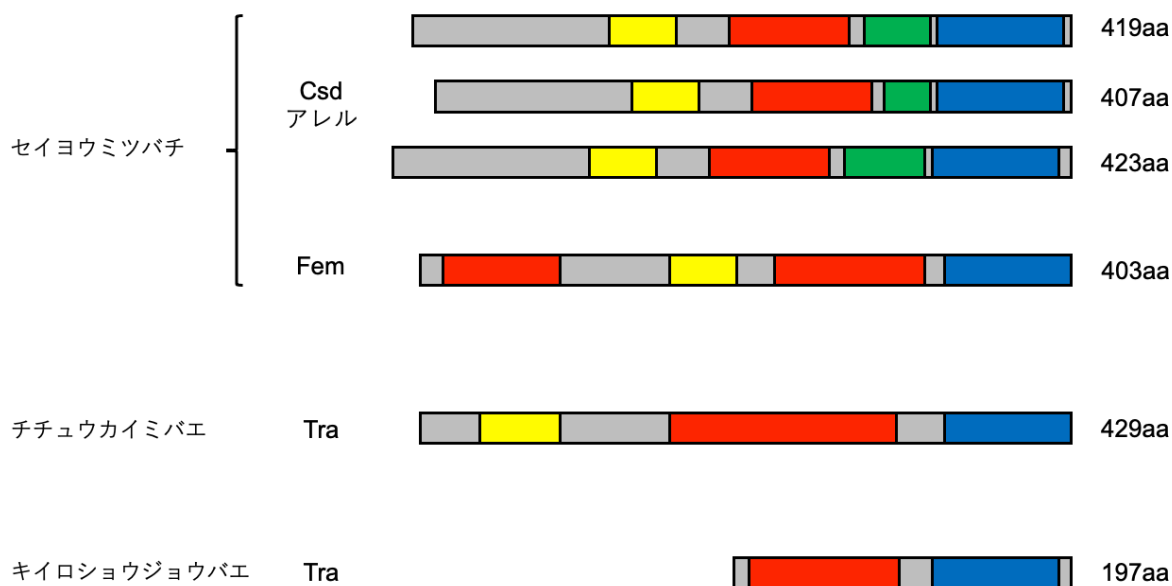


図 0-2 Csd、Fem、Tra タンパク質のドメイン構造

超可変領域を緑、RS リッチドメインを赤、P リッチドメインを青、TRA タンパク質においてキイロショウジョウバエを除く全ての生物種において保存されている TRA-CAMドメインを黄色で示した。

```

CSD a MKRNISNYSYHDEKFKQLRNEDNKIDLSRSTKEERLQHRREAWLIQQEREREHQRIMKMMILEYEL----RRIREIE-KLGSERSKSRSPDSRDRSNTSN 95
CSD b MKRNISNYSYHDEKFKQLRNEDNKIDLSRSTKEERLQHRREAWLIQQEREREHERIMKMMILEYEL----RRIREIE-KLGSERSKSRSPDSRDRSNTSN 95
CDS c MKRNISNYSYHDEKFKQLRNEDNKIDLSRSTKEERLQYRREAWLVQQEREQEYELKRMKMMILEYELYIKYSHTHEKKLVLERSKTKSKSPE SRDRSNTSN 100
CSD d MKRNISNYSYHDEKFKQLRNEDNKIDLSRSTKEERLQYRREAWLVQQEREQEYELKRMKMMILEYELYIKYSHTHEKKLVLERSKTKSKSPE SRDRSNTSN 100
*****

CSD a TSKTFLVLSDKLESSDDISLFRGPEGIQINATELQKIKLEIHRDLPKGKSTTTTVEVKRDIINPEDVILIRRTGEGSKPIFEREEIKNVLTKINKIKEHDTV 195
CSD b TSKTFLVLSDKLESSDDISLFRGPEGIQINATELQKIKLEIHRDLPKGKSTTTTVEVKRDIINPEDVILIRRTGEGSKPIFEREEIKNVLTKINKIKEHDTV 195
CDS c TSKTFLVLSDKLESSDDISLFRGPKGIQINATELQKIKLEIHRDLPKGKSTTTTVEVKRDIINPEDVILIRRTGEGSKPIFEREEIKNVLTKINKIKEHDTV 200
CSD d TSKTFLVLSDKLESSDDISLFRGPKGIQINATELQKIKLEIHRDLPKGKSTTTTVEVKRDIINPEDVILIRRTGEGSKPIFEREEIKNVLTKINKIKEHDTV 200
****

CSD a LVVNIEKSGNESKKYATSSNSLNRNTHGFQHTSSRYSRERSCSRDRNREYREKDRRYEKLHNEKEKLEERTSRKRYSRSREREKKS YKNENS YRKYRET 295
CSD b LVVNIEKSGNESKKYATSSNSLNRNTHGFQHTSSRYSRERSCSRDRNREYREKDRRYEKLHNEKEKLEERTSRKRYSRSREREKONS YKNERE YRKYRET 295
CDS c LVVNIEKSGNESKKYATSSNSLNRNTHGFQHTSSRYSRERSCSRDRNREYREKDRRYEKLHNEKEKLEERTSRKRYSRSREREKQS YKNENS YRKYRET 300
CSD d LVVNIEKSGNESKKYATSSNSLNRNTHGFQHTSSRYSRERSCSRDRNREYREKDRRYEKLHNEKEKLEERTSRKRYSRSREREKQS YKNENS YRKYRET 300
*****

CSD a SKERSRDRKERERSKEPKIISLSSNKTIHNNNNYKKLQYNNINYIEQIPVP---VPVPVPIYCGNFPPRSMGPWISIQEQIPRFRHIGPSTPFPRFIP 391
CSD b SKERSRDRRERERSKEPKIISLSSNNYYSNYYNNNNYNNYKLYNINYIEQIFVPVPVPIYCGNFPPRPMGPWISMQEQIPRFRYIGPPTPFPRFIP 395
CDS c SKERSRDKTERERSKERKIISLSSNNYISNISNNNNN--NYNKLYNINYIEQIFVPVPVPIYCGNFPPRPMGPWISIQEQIPRFRYIGPPTPFPRFIP 399
CSD d SKERSRDKTERERSKERKIISLSSNNYISNISNNNNN--NYNKLYNINYIEQIFVPVPVPIYCGNFPPRPMGPWISIQEQIPRFRYIGPPTPFPRFIP 399
*****

CSD a PNAYRFRPSLNPRFESTHQ 410
CSD b PNAYRFRPPLNPRFGPTHQ 414
CDS c PNAYRFRPPQNPRFGPTHQ 418
CSD d PNAYRFRPPQNPRFGPTHQ 418
*****

```

図 0-3 セイヨウミツバチの Csd のアミノ酸配列

アミノ酸配列が完全一致する領域を黄色で示した。

超可変領域を緑、RS リッチドメインを赤、P リッチドメインを青の直線で示した。便宜上 Csd のアレルの種類を a, b, c, d で示した。

Csd のアミノ酸配列は CSD a:AAQ67418.1 CSD b:ABV56215.1 CSD c:AAQ57657.1 CSD d:DAA06292.1 を参考とした。

## *Amfem*

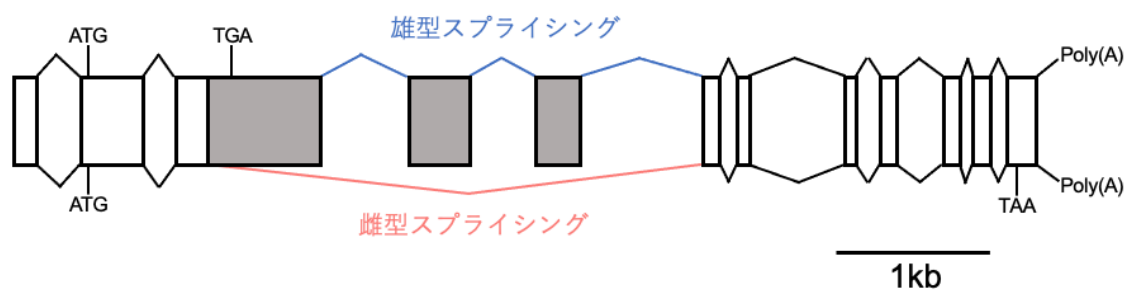


図 0-4 *Amfem* の構造と性特異的なスプライシングバリエント

雌雄共通のエクソンを白、雄特異的なエクソンを灰色で示した。雌は雄特異的なエキソンをスキップすることで機能的な FEM タンパク質を翻訳するが、雄は途中でストップコドンが存在し、機能的な FEM タンパク質が産生されない。

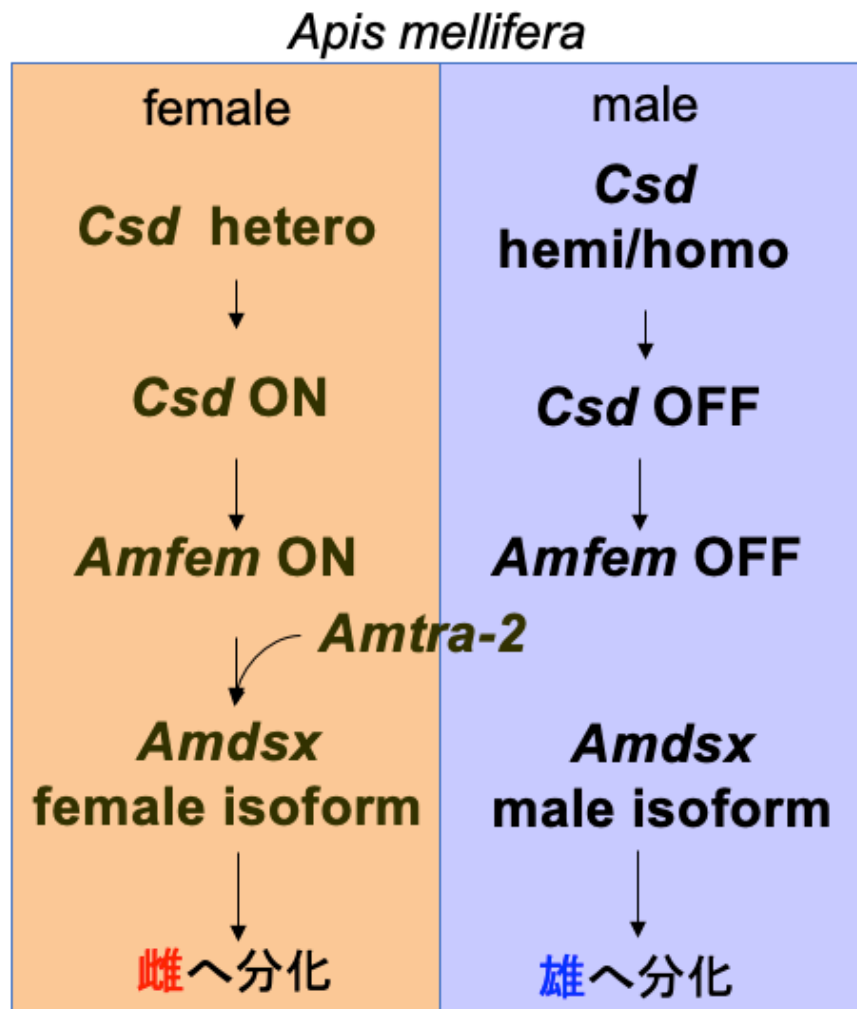


図 0-5 セイウミツバチの性決定カスケード

雌では *csd* をヘテロ接合でもつことにより活性型 *Csd* となり、下流の標的遺伝子である *fem* の雌型スプライシングを誘導し、機能をもつ *FEM* が作られる。*Fem* は *Tra-2* を介して *Amdsx* に結合することにより雌型スプライシングが誘導され、*Amdsx* の雌型アイソフォームが作られ個体は雌となる。雄では *csd* が働かないため機能をもつ *Fem* が生産されず、*Amdsx* の雄型スプライシングが誘導される。その結果作られる *Amdsx* の雄型アイソフォームにより雄分化が誘導される。

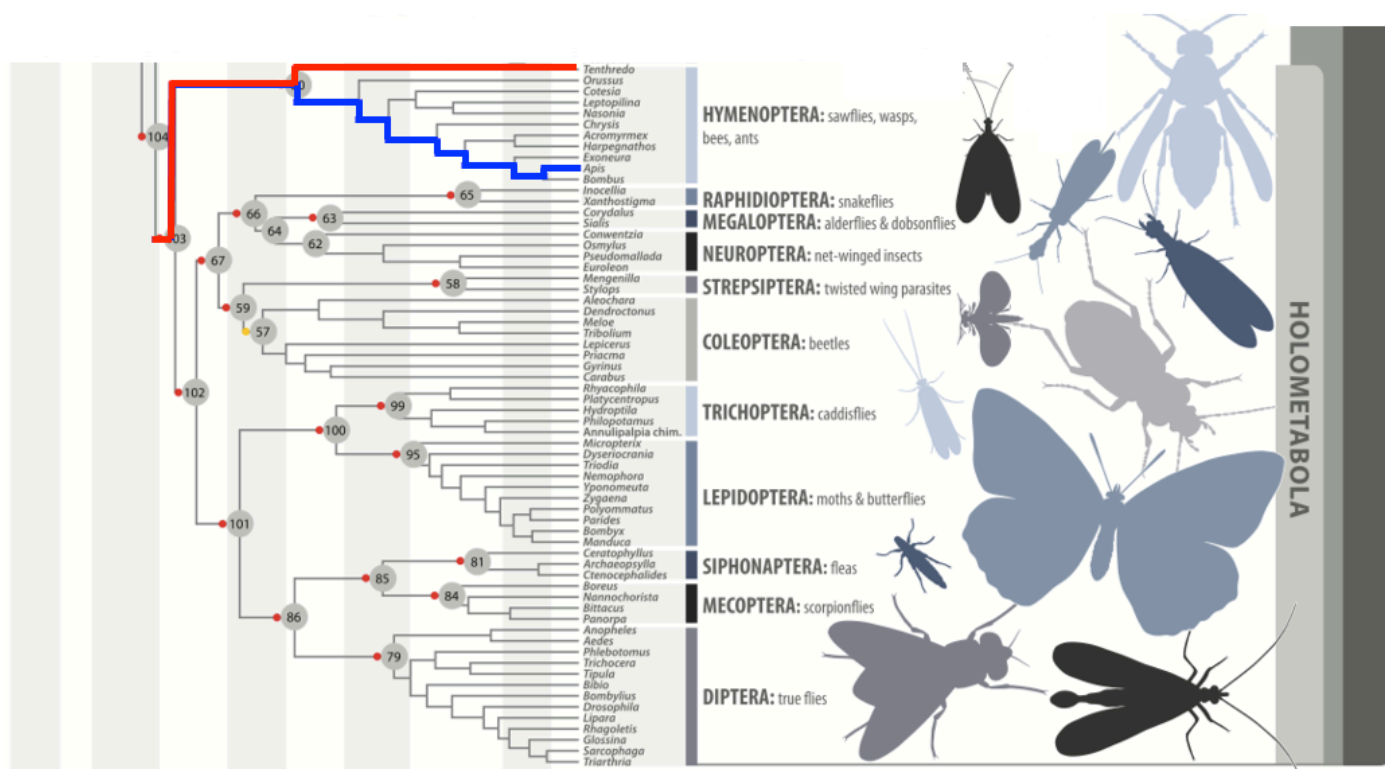


図 0-6 完全変態昆虫の系統樹

Misof (2014) より引用改変。赤線はカブラハバチが属するクレード、青線はセイヨウミツバチが属するクレードを指す。

---

## 第一章

カブラハバチにおけるミツバチの性決定遺伝子

ホモログの探索

---

## 序論

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オスに、受精卵である倍数体がメスになるが、低い確率で倍数体のオスも生まれることが知られていた (Whiting 1943)。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メスになり、ホモあるいはヘミ接合であればオス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 (Beye *et al.*, 2003)。*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 (Schmieder *et al.*, 2011)、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 (Naito and Suzuki, 1991) が、性決定に関わる遺伝子はひとつも同定されていない。セイヨウミツバチでは CSD がヘテロ二量体を形成することで機能を持ち、性決定カスケードの下流に位置する *tra* (セイヨウミツバチでは *Amfem* と表記) のメス型スプライシングを誘導する。*Amfem* は *Amtra-2* と結合し *Amdsx* のエクソンに存在する結合配列を認識しメス型スプライシングを誘導する。

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った。



---

## 材料及び方法

### 昆虫

本研究で用いたカブラハバチ (*Athalia rosae*) は、野生型の形質をもつ個体の他、劣性白眼 *cec* 系統 (ホモ接合体の成虫複眼が白眼となる) (図 1-1A)、不完全優性黄色脂肪体 *yfb* 系統 (成虫の脂肪体が黄色を帯びる不完全優性形質をもつ) (図 1-1B) であり、いずれも国立研究開発法人農業・食品生産技術総合研究機構、畠山正統上級研究員より分与されたものである。上述の不完全優性遺伝形質の表現型に基づき、個体が受精卵由来であるか未受精卵由来であるかを見分けた。カブラハバチの飼育は  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明期－8 時間暗期の条件下のインキュベーター内で行った。発生中の卵は湿度が十分に足りたプラスチックの容器内に保存し、幼虫の飼育には葉大根 (サカタのタネ) を使用した。葉大根の栽培は水耕栽培キット Green Farm を用い、濃縮液用肥料である大塚ハウス 1 号、2 号混合比 1:1 の混合液を 200 倍希釈し使用した。

### RNA の抽出

カブラハバチからの total RNA の抽出は ISOGEN (ニッポン・ジーン) を用い、鈴木らの方法に従って行った (Suzuki *et al.*, 2012)。ホモジナイズする際は Homogenization Pestle (フナコシ) を使用した。産卵直後卵から孵化 2 日後の幼虫までの個体は、鈴木らの方法に改変を加え、total RNA をイソプロパノール沈殿する際にグリコーゲン (20mg/mL, 和光純薬) を各サンプルにつき  $1\ \mu\text{l}$  加えた。

### RT-PCR

---

逆転写反応による cDNA 合成には PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を使用した。実験の手順は添付マニュアルの方法に従った。逆転写反応の鋳型には、1 $\mu$ g の total RNA もしくは、卵 1 粒から抽出した全量の total RNA を使用した。逆転写反応の際にはキットに添付されていた random 6 mer プライマーを使用した。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用し、添付マニュアルの指示に従って行った。得られた反応産物は EtdBrd (0.5 $\mu$ g/mL) を含む 2% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、電気泳動像は E-Shot (ATTO) を用いて Luminance が 16383 以下になるように撮影した。使用したプライマーと PCR の条件は表 1 に示した。

### 系統樹の作製

Ardsx と Artra-2 および既知の *doublesex* と *transformer-2* の系統樹作成には Clustal X 2.0.11 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Clustal-X.shtml>) を用いて、以下の設定 (pairwise alignment parameters: gap opening penalty 17.00, gap extension penalty 0.2, identity protein weight matrix; multiple alignment parameters: gap opening penalty 17.00, gap extension penalty 0.2, delay divergent cutoff 30%, identity protein weight matrix) で行った。配列間の距離は p-distance を用いて MEGA version 4.0 を使用して計算した。p-distance と近隣結合法を用いてブートストラップ値 1000 で比較系統樹を作成した。

---

## 結果

### 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 (予測遺伝子) に対して NCBI の提供する相同性検索プログラム tblastn を用いた相同性検索を行い、E 値が  $e-10$  以下である遺伝子をカブラハバチにおけるホモログとみなした。その結果、*csd* と *fem* に有意な相同性を示す遺伝子はみつからなかった。*fem* は *tra* のオルソログであると言われており、*csd* は *fem* のパラログであることがわかっている (Hasselmann *et al.*, 2008)。TRA タンパク質はキイロショウジョウバエ を除く全ての生物種において保存されている TRA-CAM ドメインをもつ (Pane *et al.*, 2002)。FEM の TRA-CAM ドメイン内の中でも最も保存されている 18 アミノ酸配列 (LKRRTGEGSKPIFEREEI) を query として再度 tblastn サーチを行ったが、この場合も有意な相同性を示す genemodel を見つけることはできなかった。一方、*Amdsx* のメス型アイソフォーム及びオス型アイソフォームどちらのアミノ酸配列を query にした場合も、ほぼ同じ tblastn の検索結果を得ることができた (図 1-2A,B)。どちらの場合も「*Athalia rosae protein doublesex (LOC105689658), transcript variant X2, mRNA, Accession number XM\_012406840.1*」がトップヒットを示し、その E value は  $2e-62$  以下であり、total score は 207 以上、query cover は 86% 以上と非常に高い値を示した。2番目と3番目にヒットしてきた genemode も上記と同一の遺伝子由来の異なるアイソフォームであった。この相同性検索で見出されたカブラハバチの genemodel は「doublesex」と定義されていることから、カブラハバチの *dsx* ホモログである可能性が極めて高いといえる。そこでこの遺伝子を *Athalia rosae doublesex (Ardsx)* と名付けた。

---

また *Amtra-2* のアミノ酸配列を query にした場合「*Athalia rosae* protein transformer-2 (LOC105686732), transcript variant X4, mRNA, Accession number XM\_012401832」がトップヒットを示し、その E value は  $2e-107$  以下であり、total score は 269 以上、query cover は 89%以上と非常に高い値を示した(図 1-3) 。2番目と3番目と4番目にヒットしてきた genemode も上記と同一の遺伝子由来の異なるアイソフォームであった。この相同性検索で見出されたカブラハバチの genemodel は「transformer-2」と定義されていることから、カブラハバチの *tra-2* ホモログである可能性が極めて高いといえる。そこでこの遺伝子を *Athalia rosae* transformer-2 (*Artra-2*) と名付けた。

#### *Ardsx* と *Artra-2* の系統樹による解析

今回同定した *ArDSX* と *ArTRA-2* のアミノ酸配列が、他の昆虫の *DSX* と *TRA-2* との間に類似性を持つかを明らかにするために、*ArDSX* がコードする全長アミノ酸配列と、双翅目・甲虫目・鱗翅目・膜翅目など 13 種類の完全変態昆虫から同定された既知のメス型 *DSX* タンパク質のアミノ酸配列及び、*ArTRA-2* がコードする全長アミノ酸配列と、哺乳類・鳥類・爬虫類・両生類・魚類・半索動物・刺皮動物・鰓脚目・膜翅目・甲虫目・双翅目から同定された既知の *TRA-2* タンパク質のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成した。*DSX* は外群として、昆虫の姉妹群である甲殻類オオミジンコの *dmagDSX $\alpha$*  を用いた。その結果、*DSX* オロソログは主に4つのクレード、すなわち双翅目、鞘翅目、鱗翅目、膜翅目に分類された(図 1-4)。作成された系統樹のトポロジーは、昆虫の分類学上の関係を概ね反映していた。

*ArDSX* は同じ膜翅目昆虫であるセイヨウミツバチの *AmDSX* と同じクレードに属していた。以上の結果から、*ArDSX* はセイヨウミツバチの *AmDSX* と最も近い関係にあることが明らかとなった。*TRA-2* オロソログも同様に哺乳類・鳥類・爬虫類・両生類・魚類・半索動物・刺皮動物・鰓脚目・膜翅目・甲虫目・双翅目がそれぞれのクレードを形成した(図 1-5)。こちらも作成された系統樹のトポロジーは、生物の分類学上の関係を概ね反映していた。*ArTRA-2*

---

は同じ膜翅目昆虫であるセイヨウミツバチの AmTRA-2 と同じクレードに属していた。以上の結果から、ArTRA-2 はセイヨウミツバチの AmTRA-2 と最も近い関係にあることが明らかとなった。

---

## 考察

### カブラハバチの性決定遺伝子の特定

*csd*と*fem*はセイヨウミツバチだけではなく、同じハナバチ上科であるアリの仲間やマルハナバチや、一部の寄生蜂類など多くの膜翅目で発見されている(Jia *et al.*, 2016)。これらの種類では*fem*の重複により*csd*が誕生し、*csd*と*fem*はパラログの関係にあることが知られている(Hasselmann, 2008)。したがって、今回の相同性検索において、カブラハバチのゲノム上にセイヨウミツバチの*csd*と*fem*に相同性をもつ遺伝子がどちらも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。

セイヨウミツバチにおいて同定されている*fem*は多くの昆虫で同定されている*tra*のオロログであり、現在ゲノムが解読されている昆虫の中では*tra*を持つ種が多く知られているが、*tra*を持たない種もその分類上の位置に関係なく混在して存在している(Geuverink and Beukeboom, 2014)。これら*tra*を持たない昆虫は、以前は*tra*を持っていたが、本来*tra*が持つ機能を他の遺伝子が担う様になるなどして、後から*tra*を失ったと考えられる。膜翅目に限定して注目すると、セイヨウミツバチやセイヨウオオマルハナバチなど膜翅目の中でも派生的な種が属する細腰亜目では*tra*が見つかっているが(Hassekman, 2008)、カブラハバチが属する原始的なグループである広腰亜目では現在*tra*が見つかっている種は存在していない(Oeyan, *et al.*, 2020)。このことから、祖先的な膜翅目も他の昆虫と同様に*tra*を持っていたが、細腰亜目と広腰亜目に分岐したのちに、広腰亜目では*tra*を失ったと考えられる。

上述の通りカブラハバチには*tra*が存在しなかったが、*tra*と結合して*dsx*のスプライシングを制御すると言われている*tra-2*は見つけることができた。*tra-2*は哺乳類から昆虫まで幅

---

広い生物種で保存されており、キイロショウジョウバエやセイヨウミツバチでは *dsx* のメス型スプライシングに必要であることが知られている(Nissen *et al.*, 2012; Hoshijima *et al.*, 1991)。しかし全ての昆虫において *dsx* の性特異的なスプライシングに *tra-2* が関わるわけではない。カイコでも同様に *tra-2* (*Bmtra-2*) が見つかっており、キイロショウジョウバエの *dsx* ミニ遺伝子を導入したカイコ培養細胞を用いた RNAi 実験の結果から、*Bmtra-2* はキイロショウジョウバエの *dsx* のメス型スプライシングを誘導する働きを持つことが明らかとなっている(Suzuki *et al.*, 2012)。しかし、カイコにおいて *Bmtra-2* をノックダウンしても *Bmdsx* のメス型スプライシングは誘導されない(Suzuki *et al.*, 2012)。これらの事実は、*Bmtra-2* はキイロショウジョウバエの *dsx* のメス型スプライシングを誘導できるにもかかわらず、*Bmdsx* のメス型スプライシングには関与しないことを示している。カイコには *tra* が存在せず、また *Bmdsx* の pre-mRNA 上には TRA/TRA-2 結合配列が存在しないことが知られている(Suzuki *et al.*, 2001)。

TRA/TRA-2 によらない *dsx* の性特異的なスプライシング制御が行われている前例があることから、カブラハバチでは *tra* は存在しないが *tra-2* が存在したことは不思議ではない。

*dsx* は多くの昆虫で見つかっており、雌雄で異なるスプライシングを受け、メスではメス型 *dsx* が、オスではオス型 *dsx* が生産され、それぞれメス分化・オス分化を誘導している。カブラハバチも同様に *dsx* が同定されたことから、*Ardsx* は性分化に必要な機能を持つと考えられる。

これらのことから、カブラハバチはセイヨウミツバチと同じ性決定様式である相補的性決定機構をもつものの、そこに関わる性決定遺伝子群はミツバチのそれらとは共通する部分と、全く異なる部分があることが強く示唆された。

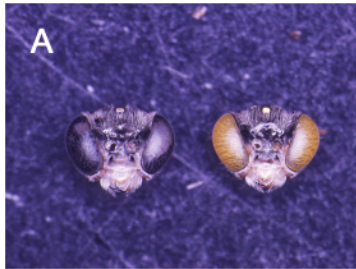


図 1-1 カブラハバチ劣性白眼 **cec** 系統と不完全優性黄色脂肪体 **yfb** 系統

(A) **cec** 遺伝子をホモ接合体でもつ成虫は白い複眼を持つ。左が野生型雄で右が **cec** 雄  
 (B) 蛹化直後の野生型と **yfb** 遺伝子を持つ蛹。左が 2 倍体雄で右が 2 倍体雌を示す。野生型 (+/+) の蛹は青味がかかった色をしている。**yfb** 遺伝子をホモ接合体でもつ個体 (**yfb/yfb**) の蛹は全身が黄色味を帯びる。**yfb** 遺伝子をヘテロ接合体でもつ個体 (+/**yfb**) の蛹はその中間色である緑色を示す。



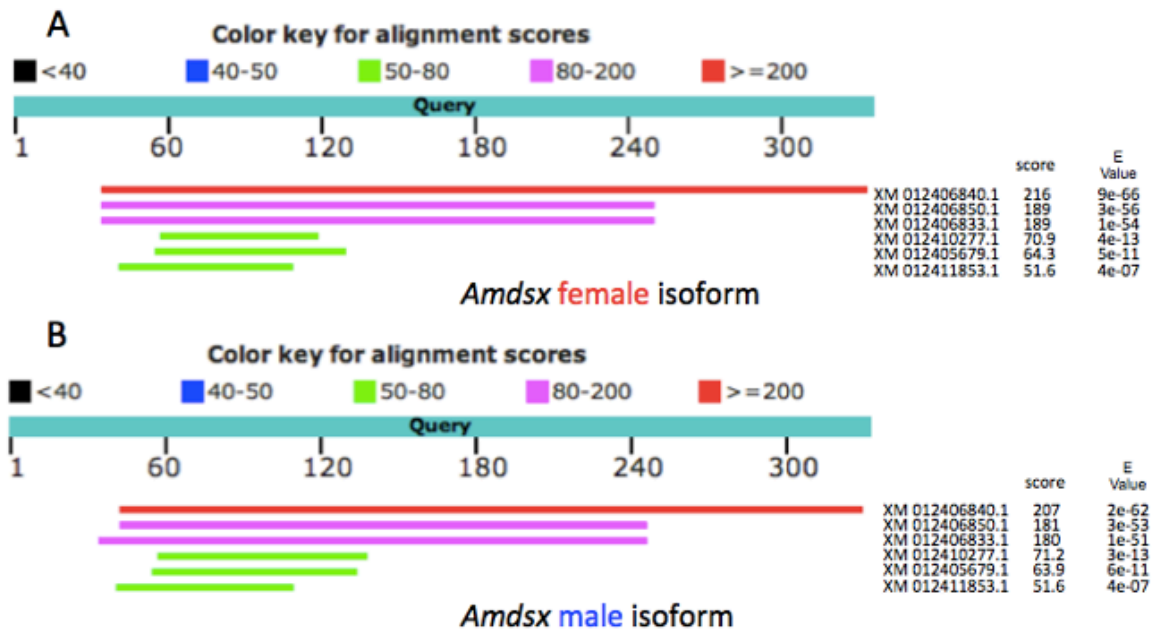


図 1-2 カブラハバチの genemodel に対して AmDsx のアミノ酸配列を query に用いた tblastn の検索結果

(A) *Amdsx* 雌型アイソフォームを用いた検索結果。(B) *Amdsx* 雄型アイソフォームを用いた検索結果。

tblastn の結果得られた Graphic summary において直線で表されたそれぞれの mRNA の accession number と hit score および E value を示した

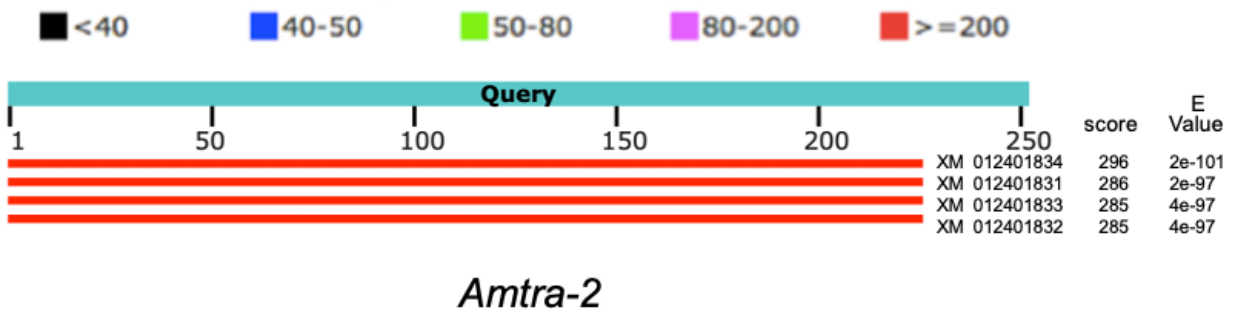


図 1-3 カブラハバチの **genemodel** に対して **AmTRA-2** のアミノ酸配列を **query** に用いた **tblastn** の検索結果

tblastn の結果得られた Graphic summary において直線で表されたそれぞれの mRNA の accession number と hit score および E value を示した

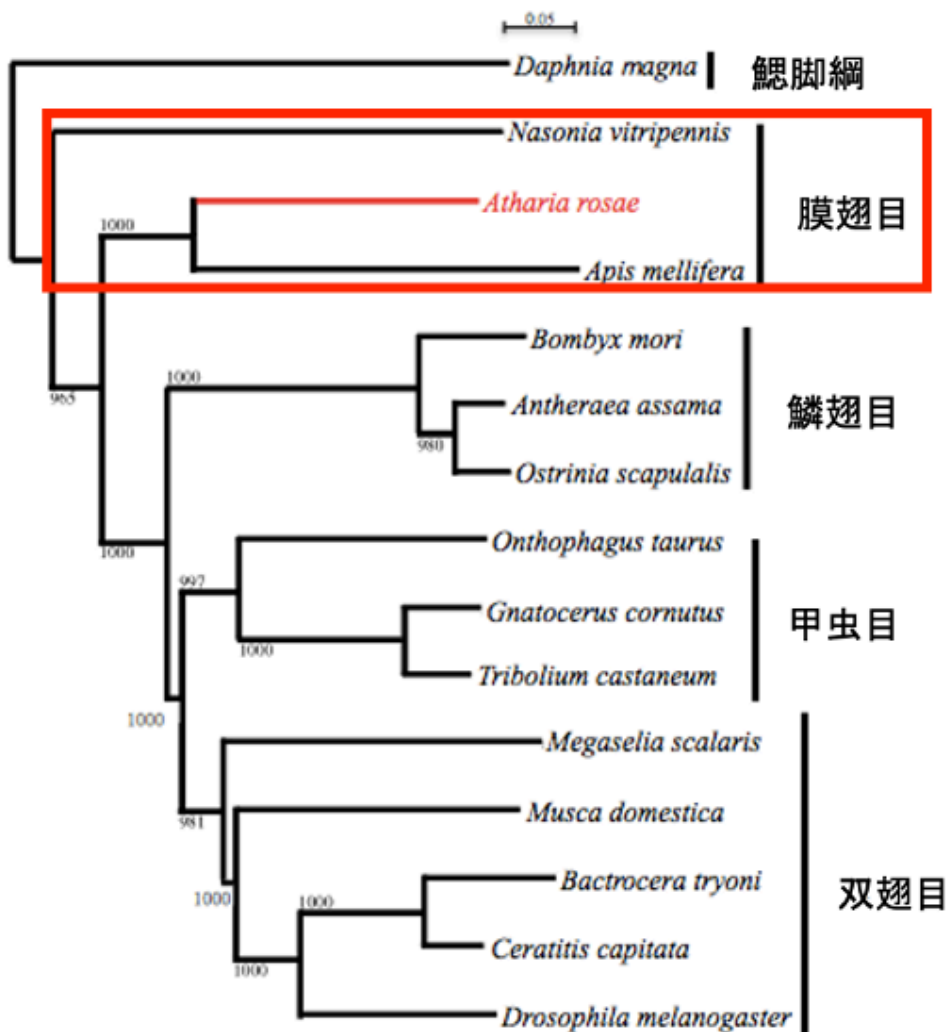


図 1-4 完全変態昆虫における DSX の系統樹

DSXF タンパク質のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成した。カブラハバチが属する膜翅目を赤枠で囲った。カブラハバチ (*Athalia rosae*) を赤文字で示した。

系統樹作製には以下の DSX の完全長アミノ酸配列を用いた。

*Daphnia magna* DSX beta BAJ78308 *Nasonia vitripennis* DSXF NP\_001155990

*Apis mellifera* DSXF1 ABW99105 *Bombyx mori* BmDSXF NP\_001036871

*Antheraea assama* DSXF ADL40852 *Ostrinia scapularis* DSXF BAJ25852

*Onthophagus taurus* DSXF1 AEX92939 *Gnatocerus cornutus* DSXF BAW32685

*Tribolium castaneum* DSXF AFQ62106 *Megaselia scalaris* DSXF AAK38831

*Musca domestica* DSXF AAR23812 *Bactrocera tryoni* DSXF AAB99948 *Ceratitis capitata* DSXF AAN63598 *Drosophila melanogaster* DSXF NP\_001287220



図 1-5 TRA-2 の系統樹

TRA-2 タンパク質のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成した。カブラハバチが属する膜翅目を赤枠で囲った。カブラハバチ (*Athalia rosae*) を赤文字で示した。

系統樹作製には以下の TRA-2 の完全長アミノ酸配列を用いた。

*Homo sapiens* NP\_001230808.1 *Mus musculus* NP\_001334138.1 *Pseudoces humilis* XP\_005529582.1 *Gallus gallus* XP\_015132297.1 *Alligator mississippiensis* XP\_019345401.1  
*Anolis carolinensis* XP\_008104612.1 *Xenopus tropicalis* XP\_012825765.1 *Latimeria chalumnae* XP\_005997166 *Takifugu rubripes* XP\_029685594.1 *Xenopus laevis* NP\_001080216.1 *Saccoglossus kowalevskii* XP\_006814075.1 *Strongylocentrotus Purpuratus* XP\_030846241.1  
*Daphnia magna* KHJ36916.1 *Nasonia vitripennis* ATD84850.1 *Athalia rosae*

---

XP\_012257257.1 *Apis mellifera* AFJ15566.1 *Tribolium castaneum* KYB25516.1  
*Musca domestica* AAW34233.1 *Lucilia cuprina* ACS34688.1 *Bactrocera oleae*  
XP\_014085273.1 *Ceratitis capitata* NP\_001266337.1 *Anastrepha sororcula*  
CBJ17287 *Drosophila erecta* XP\_015012383.1 *Drosophila sechellia*  
XP\_002033866.1 *Drosophila melanogaster* NP\_995835.1

---

## 第二章

カブラハバチ *doublesex* (*Ardsx*) の機能解析

---

## 序論

キイロショウジョウバエの性決定カスケードの最上流遺伝子である *Sxl* は、常染色体のセックスト数と性染色体の数の比により発現が制御される (Bridges, 1921)。SXL はその下流に位置する *transformer (tra)* の pre-mRNA に結合し、メス特有のスプライシングを引き起こす (Inoue *et al.*, 1990)。オスでは機能的な TRA タンパク質は作られず、メスでのみ機能的な TRA タンパク質が作られる。TRA タンパク質も SXL と同様にその下流に位置する *doublesex (dsx)* の pre-mRNA に結合し、メス特有のスプライシングを誘導することによってメス型 DSX タンパク質 (DSXF) が作られる (McKeown *et al.*, 1988; Nagoshi *et al.*, 1988, 1990)。DSXF は転写因子として働き、メスをメスたらしめる遺伝子の発現を制御しメス分化を誘導する (Inoue *et al.*, 1992)。一方オスでは SXL タンパク質が作られず、その下流の TRA タンパク質も作られない。その結果デフォルトの状態ではオス特有のスプライシングが誘導されオス型 DSX タンパク質 (DSXM) が作られる (Hoshijima *et al.*, 1991)。DSXM も転写因子として働き、メス分化に必要な遺伝子の発現を抑制したり、オスをオスたらしめる遺伝子の発現を制御しオス分化を誘導する (Raymond *et al.*, 1998)。*dsx* のメス特異的エクソンの塩基配列の中には TRA/TRA-2 が *dsx* に結合するために必要なシスエレメントが存在し、TRA 非存在下では *dsx* のメス特異的エクソンはスプライシングにより除外されてしまうため、TRA がないと *dsx* はメス型のスプライシングを受けることができない (Hoshijima *et al.*, 1991)。

TRA オロソログである FEM を持つセイヨウミツバチでも同様に FEM/TRA-2 による *dsx* の性特異的なスプライシング制御が行われていることが確認されている (Nissen *et al.*, 2012)。

第 1 章で行った研究の結果、カブラハバチゲノムには *tra* の膜翅目オロソログである *fem* が存在しないことが明らかとなった。このことから、キイロショウジョウバエ やセイヨウミツバチ

---

とは異なる機構により *dsx* の性特異的なスプライシングが制御されていると考えられる。カブラハバチの性決定カスケードを構成する遺伝子の同定を行う初めの足がかりとして、昆虫で広く保存されている性分化に関わる遺伝子である *dsx* に着目しその機能解析を行った。



---

## 材料及び方法

### 昆虫

本研究で用いたカブラハバチ (*Athalia rosae*) は、野生型の形質をもつ個体の他、劣性白眼 *cec* 系統 (ホモ接合体の成虫複眼が白眼となる) (図 1-1A)、不完全優性黄色脂肪体 *yfb* 系統 (成虫の脂肪体が黄色を帯びる不完全優性形質をもつ) (図 1-1B) であり、いずれも国立研究開発法人農業・食品生産技術総合研究機構、畠山正統上級研究員より分与されたものである。詳細は第一章の材料と方法の項目を参照。

### 近親交配による 2 倍体オスの作出

2 倍体のオスを得るために、上記の *yfb* 遺伝子をホモ接合体 (*yfb /yfb*) で持つ 2 倍体のメスと野生型の半数体のオス (+) を交配させた。生まれてきた 2 倍体のメス (+ */yfb*) と半数体のオス (+ または *yfb*) をさらに交配させた。この様な近親交配を繰り返し行い、得られた *yfb* 遺伝子のヘテロ接合体 (+ */yfb*) のオスを 2 倍体のオスとした (図 2-1)。

### RNA の抽出

カブラハバチからの total RNA の抽出は ISOGEN (ニッポン・ジーン) を用い、鈴木らの方法に従って行った (Suzuki *et al.*, 2012)。ホモジナイズする際は Homogenization Pestle (フナコシ) を使用した。産卵直後卵から孵化 2 日後の幼虫までの個体は、鈴木らの方法に改変を加え、total RNA をイソプロパノール沈殿する際にグリコーゲン (20mg/mL, 和光純薬) を各サンプルにつき 1  $\mu$ l 加えた。

---

## **RT-PCR**

逆転写反応による cDNA 合成には PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を使用した。実験の手順は添付マニュアルの方法に従った。逆転写反応の鋳型には、1 $\mu$ g の total RNA もしくは、卵 1 粒から抽出した全量の total RNA を使用した。逆転写反応の際にはキットに添付されていた random 6 mer プライマーを使用した。PCR 反応は EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用し、添付マニュアルの指示に従って行った。得られた反応産物は EtdBrd (0.5 $\mu$ g/mL) を含む 2% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、電気泳動像は E-Shot (ATTO) を用いて Luminance が 16383 以下になるように撮影した。使用したプライマーは表 2-1 に示した。

## **定量的 PCR**

定量的 PCR による遺伝子発現量の定量は、鈴木ら (2012) の方法に従って行った (Suzuki *et al.*, 2012)。内部標準として供試した *EF-1 alpha* 遺伝子の増幅に用いたプライマーは、国立研究開発法人農業・食品生産技術総合研究機構、畠山正統上級研究員より分与されたものを使用した。使用したプライマーの条件は表 2-2 に示した。

## **RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法**

RACE 法の鋳型に用いた poly(A)+RNA は、雌雄の蛹から FastTrack MAG mRNA Isolation Kits (Life technology) を用い、添付マニュアルの指示に従って抽出した。5'RACE 並びに 3'RACE は Gene Racer kit (Invitrogen) を用い、実験の操作は添付マニュアルに従った。cDNA 増幅のための PCR には LA-Taq (タカラバイオ) を用い、94°C2 分、94°C30 秒 72°C2 分 $\times$ 5 サイクル、94°C30 秒 70°C2 分 $\times$ 5 サイクル、94°C30 秒 68°C30 秒 72°C2 分 $\times$ 25 サイクル、72°C10 分の条件にて増幅反応を行った。その後、nested PCR を 94°C2 分、

---

94°C30 秒 65°C30 秒 68°C2 分×25 サイクル、68°C10 分の条件で行った。使用したプライマーの条件は表 2-3 に示した。

### dsRNA の合成

カブラハバチの *dsx(Ardsx)* の DNA 断片を、5'側に T7 プロモーターの配列が付加されたプライマーと KOD-Plus (東洋紡) を用い、94°C3 分、98°C10 秒 50°C30 秒 68°C30 秒×30 サイクル、68°C5 分の条件にて増幅反応を行い、得られた PCR 産物を EtdBrd (0.5µg/mL) を含む 1%アガロースゲルにて電気泳動した。目的の PCR 産物を含むゲル部分を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を使用し、キットに添付のマニュアルに従って精製した。その後、AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit(Epicentre) を用い、添付マニュアルの指示に従って *in vitro* 転写を行った。*in vitro* 転写産物はフェノールクロロホルム抽出による除タンパク質処理を施し、mini Quick Spin RNA Columns(Roche) を用いて精製した後、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿物を水に溶かした。その後、合成された RNA をアニーリングさせるため、沸騰水に浸して熱変性を加えた後、室温になるまでゆっくりと冷却し、これを dsRNA 溶液とした。使用したプライマーの条件は表 2-4 に示した。

### RNA 干渉(RNAi)

*Ardsx* ターゲットとした dsRNA を、最終濃度 100ng/µl または 1000ng/µl の濃度に調製し、30 分間氷冷麻酔処理を施したワンダリング状態の終齢幼虫に 1 個体あたり 3µl ずつ注射した。3µl 以上の dsRNA をインジェクションすると、dsRNA の濃度や種類に関係なく幼虫が蛹化する以前に死亡、または蛹化直後に死亡することが確認されたので、dsRNA のインジェクション量は 3µl を限界量とした。コントロール用の dsRNA には同濃度に調製した EGFP を標的とする断片を用いた。dsRNA は、終齢幼虫前胸部気門上にある窪み、または蛹期メ

---

スの第 6 腹節と第 7 腹節の間にガラス製のキャピラリーを 1cm 程度刺し、体液中に注入した。その他の部位にインジェクションを行うと羽化せず死ぬ個体や羽化不全を引き起こす個体が多く見られたため当該部位であれば重要な器官を損傷する可能性が低いと考えたからである。注入後一時間乾燥したシャーレの中で保存し、幼虫の注射痕から注入した dsRNA や体液が漏れていないのを確認したのちに、4 枚重ねたキムワイプ(日本製紙クレシア)上に置き、蛹化させた。ガラス製のキャピラリーは Disposable micro-pipette (Microcaps 25  $\mu$ l, Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA)を用い、これをプラー(SUTTER INSTRUMENT P-97/IVF)にセットし、熱変性後引き伸ばしたものを用いた。dsRNA を注入するために、上述のキャピラリーをシリコン製のチューブを介してツベルクリンシリンジ(テルモ)の先端に取り付けた手製の注射装置を使用した。

*Ardsx* の時期特異的な機能解析を行うために 3 種類の RNAi 方法を用いた。まず、胚発生初期において knockdown (KD)を行うためにペアレンタル RNAi を行った(ペアレンタル RNAi, 図 2-2A)。ペアレンタル RNAi とは観察対象とする世代の 1 つ前の世代である蛹期のメスに dsRNA のインジェクションを行い、卵形成時に dsRNA を卵に取り込ませることで、胚発生初期から標的の遺伝子の KD を行う手法である(Yoshiyama *et al.*, 1998)。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、終齢幼虫に *Ardsx* の dsRNA のインジェクションを行った(終齢 RNAi, 図 2-2B)。最後に *Ardsx* の発現を全発生ステージで KD するために、ペアレンタル RNAi を行った個体に対して *Ardsx* を標的とする dsRNA を 3 齢幼虫と終齢幼虫において追加でインジェクションを行った(完全 RNAi, 図 2-2C)。

### 外部生殖器と内部生殖器の観察

外部生殖器のクチクラ標本を製作する際、試料の解剖は 70%エタノールの中で行った。余分な器官を除去し、外部生殖器部分の成形が完了したら 100%エタノールに浸して脱水し、

---

カナダバルサムとサリチル酸メチルの混合液に浸し、クチクラ以外の組織を除去した。カバーガラスを被せ、60°Cで24時間保温し、実体顕微鏡(OLYMPUS SZX7)による観察を行った。画像の取り込みは、実体顕微鏡にCCDカメラ(OLYMPUS DP7)を装着し、専用のソフトウェア cellSens standard(OLYMPUS)を用いて行った。成虫の内部生殖器については、羽化直後の成虫を1×PBS中にて解剖、摘出したものを用い、上述と同様の方法で観察及び画像の取り込みを行った。

### 交尾行動の解析

交尾行動の観察には、羽化5日後の処女メスと、終齢幼虫にてdsRNAの注射を行った羽化5日後のオスを供試した。交尾観察前日の正午から観察直前までクサギ(*Clerodendrum trichotomum*)を与え、交尾行動を活性化させた。カブラハバチの成虫メスは羽化直後から産卵可能な成熟卵をもたず、卵の成熟には羽化後5日から1週間程度の期間が必要である。また羽化直後の成虫オスの精子は精巣に溜まっており、貯精囊まで精子が移動するのに5日から1週間程度の期間が必要である。これらにより雌雄ともに交尾に最適な時期が羽化後5日と考えられたため、この時期の成虫を用いて観察を行なった。カブラハバチはクサギ(*Clerodendrum trichotomum*)の葉の毛状突起を摂食し、オスは交尾行動への活性化、メスは成熟卵が増加することが知られている(Shimokawa, 2013)。通常交尾はオス主体で行われ、オスが脚を伸ばしてメスを探す様な体勢をとる。その際、近くにメスが通りかかるとオスはメスに飛びつき、メスの背後からオスが自身の腹部を屈曲させ、交尾を試みる。交尾が成功すると雌雄は互いの腹部先端同士で接合し、背を向けあった状態となる。2~3分経過するとオスがメスの方を向き腹部同士の接合が離れ、交尾が終了する。交尾行動を解析するにあたり、交尾観察前日の正午から観察直前までの24時間クサギを与え、交尾行動を十分に活性化させた。行動観察の際には、一つのバイアル(Sample Vialds SP-50A 35mm×75mm 50ml)に雌雄1個体ずつ入れ、iPhoneを使って15分間撮影を行った。交尾行動の

---

指標として、Courtship index: 15 分間のうち求愛行動を示していた割合。Copulation latency: オスがメスに対して初めて交尾行動を示すまでの時間。Mating success: 交尾成功率の 3 つを観察した。

### Ardsx 完全 RNAi 個体の雌雄判別方法

近親交配系統を用いることで受精卵から発生する二倍体の個体の性比は雌雄が 1:1 となる。しかし *Ardsx* 完全 RNAi を行うと、遺伝的にオスであっても完全にオスからメスへの性転換が引き起こされるため、羽化個体は見かけ上全てメスとなる。しかし、*Ardsx* ノックダウン処理個体であっても、羽化 3 週間以上生育させることで dsRNA の効果が消え、本来の性に因んだ *Ardsx* の発現が見られることを確認している (図 2-3)。そこで、本研究では、*Ardsx* ノックダウン処理個体の遺伝学的な性を判別するため、上述した RT-PCR 法により *Ardsx* の発現パターンを調べ、*ArdsxF* を発現する個体をメス、*ArdsxM* を発現する個体を雄と判定した。

---

## 結果

### *Ardsx* の遺伝子構造の決定

上述の相同性検索の結果得られた「*Athalia rosae* protein doublesex (LOC105689658), transcript variant X2, mRNA, Accession number XM\_012406840.1」の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、雌雄の蛹全身から調製した cDNA を鋳型に RT-PCR を行い、この遺伝子が実際にカブラハバチの生体内において発現しているか否かを確認した。その結果、どのプライマーを用いた場合においても、増幅産物の長さがオスとメスで異なることがわかった(図 2-4)。そこでこれらの増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した結果、メスで発現が確認された cDNA は、オスで発現が確認された cDNA のうち途中 119bp を欠いていることが明らかとなった(図 2-5)。この結果から、*Ardsx* が雌雄で異なるスプライシングを受けることが示唆された。

*Ardsx* が実際に発現していることが確認されたため、RACE 法を用いて、全長 cDNA 配列を決定することにした。RACE に用いた鋳型 cDNA は雌雄それぞれの蛹全身から精製した poly(A)+RNA より合成した。その結果、XM\_012406840.1 に登録されている cDNA 配列の 5'末端のさらに上流を含む以下の 7 種類の断片を得ることができた(図 2-6A)。便宜上、増幅されたエクソンの長さが 680bp のものを①(図 2-7)、835bp を②(図 2-8)、712bp を③(図 2-9)、1685bp を④(図 2-10)、517bp を⑤(図 2-11)、1317bp を⑥(図 2-12)、137bp を⑦(図 2-13)とし、得られた 5'RACE 産物とゲノム配列を比較することにより、*Ardsx* の遺伝子領域の構造を明らかにした。これら 5'末端側で同定された 7 種類の 5'RACE 断片のうち、どれがメジャーなものであるか確認を行うため、それぞれの 5'RACE 断片に対応するプライマー

---

を設計し、RT-PCR による発現解析を行った。その結果、②、⑤、⑦の 3 種類で発現が確認され、それぞれ雌雄差はみられなかった(図 2-6B)。

3'RACE の結果、XM\_012406840.1 に登録されている cDNA 配列と一致した 502bp の断片が増幅された。この塩基配列には poly(A)付加シグナル AATAAA がみられ、その 45bp 下流に polyA が付加していた(図 2-14)。オス由来の cDNA を用いた 3'RACE でも全く同じ塩基配列を取得することができた。

以上の結果から得られた cDNA の塩基配列を、カブラハバチゲノム配列と比較することによって明らかとなった *Ardsx* の遺伝子構造を図 2-15 に示す。5'RACE の結果から、*Ardsx* には転写開始部位の異なる3つのアイソフォームが存在することがわかった。アイソフォーム 1 は最も上流に存在する転写開始部位から転写が起こり、アイソフォーム 2 はその下流の転写開始部位から転写が始まる。アイソフォーム 3 はエクソン 3 の途中で転写開始部位が存在する。また、*Ardsx* には雌雄で異なるアイソフォームも存在する可能性が示唆された。性差を示す領域は、エクソン 5 の領域内に存在し、オスでみられたアイソフォームではエクソン 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 119bp の領域がメス型ではイントロンとしてスキップされるため、これらのアイソフォームがコードするアミノ酸配列は C 末端側で異なることがわかった。

### *Ardsx* の発現解析

上述の解析により、*Ardsx* のエクソン5は雌雄で異なるスプライシングを受けることが明らかとなった。そこで、この領域を挟み込むプライマーを設計し、それらを用いた発現解析を行うことにした(図 2-16A)。産下卵由来の個体(通常はメスに分化)と、卵巣卵の解剖により単為発生処理を施した個体(オスに分化)において、産卵直後(解剖直後)から 1 時間ごとのサンプリングを 24 時間後まで行い、胚発生初期における詳細な発現解析を行った。さらに産卵直後(解剖直後)から孵化まで 24 時間ごとに 5 回、孵化直後から終齢幼虫まで 24 時間ごと



---

にオスで7回、メスはオスよりも幼虫の齢数が1つ多く幼虫期間が1日長いので8回、蛹と成虫で各1回ずつ、オスで合計14回、メスで合計15回経時的にサンプリングを行い、全身から抽出したRNAを基に鋳型cDNAを合成しRT-PCRを行った。その結果、*Ardsx*は産卵直後(解剖直後)には発現しておらず、産卵(解剖)から17時間後から雌雄どちらの卵においても269bpの増幅産物と150bpの増幅産物両方の発現が確認され、オスでは269bpの増幅産物が解剖24時間後から成虫まで一貫して継続的にみられた(図2-16B)。一方、メスでは孵化4日目までは150bpの増幅産物とオスでもみられた269bpの増幅産物の両方が検出されたが、孵化4日以後になると269bpの増幅産物は次第に消失し、150bpのDNAの増幅が強く検出された。これらの増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した結果、269bpのDNAはRACEの結果からオス型と予想されたアイソフォームの塩基配列と一致し、150bpのDNAはメス型と予想されたアイソフォームの塩基配列に相当することがわかった。以上の結果から、オス型アイソフォームはオスで一貫して発現しているものの、メスでも孵化4日目までは発現がみられることがわかった。これに対し、メス型の発現は性決定時期を除けばメス特異的であることが明らかになった。

次に*Ardsx*の発現量の経時的推移を調べるため、上述のサンプルを用いてqRT-PCRにより*Ardsx*の発現量を定量した。PCRには全てのアイソフォームの共通領域に設計したプライマーを用いた(図2-17A)。その結果、*Ardsx*の発現量には性差がなく、孵化6日後以降の雌雄で共に高く発現していることが明らかになった(図2-17B)

### *Ardsx*を標的としたペアレンタルRNAiが性分化に及ぼす影響

*dsx*は昆虫から甲殻類に至る幅広い動物種において保存されており、性分化に関わることでよく知られる。そこでdsRNAを用いたノックダウン(KD)が生殖器の性分化に及ぼす影響について調べることにした。

---

*Ardsx* の性分化における機能を正確に理解するためには *Ardsx* の発現を時期特異的に KD していく必要がある。まず *Ardsx* の発現が始まる胚発生初期における *Ardsx* の機能を明らかにするために、ペアレンタル RNAi を行った。

ペアレンタル RNAi を行った個体における孵化 2 日目の幼虫における *Ardsx* の発現量を qRT-PCR により定量した結果、コントロール (*EGFP dsRNA* を同様の手法により注射した個体) に比べ 1/2 程度まで有意に低下することがわかった(図 2-18)。これらペアレンタル RNAi 個体について、羽化直後の成虫の腹部を背中側から展開し、クチクラ標本を作成して外部生殖器の形態的観察を行った結果、コントロールの雌雄は野生型のオスおよびメスで観察される様な正常な外部生殖器を有していた(図 2-19A,C)。また同様に内部生殖器についても観察を行った結果、コントロールの雌雄は野生型のオスとメスで観察される様な正常な内部生殖器を有していることがわかった(図 2-19E,F)。

*Ardsx* ペアレンタル RNAi メスでは外部生殖器と内部生殖器のいずれにおいても影響が見られず、コントロールメスと同じ表現型を示したが(図 2-19D,G)、*Ardsx* ペアレンタル RNAi オスでは外部生殖器である把握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(図 2-19B)。これらの結果により胚発生初期における *Ardsx* の発現はオスの外部生殖器と内部生殖器の分化に必須であることが明らかとなった。

### *Ardsx* を標的とした終齢 RNAi が性分化に及ぼす影響

次に生殖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、終齢幼虫に *Ardsx* の dsRNA のインジェクションを行った。注射部位としては、幼虫の前胸部気門上を選んだ。終齢幼虫の頭部は膨張していて体腔部分に余裕があり、注射針によって中腸などの重要な器官を損傷する可能性が低いと考えたからである。dsRNA のターゲット領域や濃度と量はペアレンタル RNAi の時と同じ条件とした。

---

*Ardsx* dsRNA を注射した個体の注射後 24 時間における *Ardsx* の発現量を qRT-PCR により定量した結果、コントロール (*EGFP* dsRNA を同様の手法により注射した個体) に比べ 1/4 程度まで有意に低下することがわかった (図 2-20)。

これら終齢 RNAi 個体についても同様にクチクラ標本を作成し、外部生殖器の観察を行った結果、コントロールの雌雄は野生型のオスおよびメスで観察される様な正常な外部生殖器を有していた。また同様に内部生殖器についても観察を行った結果、コントロールの雌雄は野生型のオスおよびメスで観察される様な正常な内部生殖器を有していた。(図 2-21A,C,E,G)

*Ardsx* 終齢 RNAi メスでは外部生殖器と内部生殖器のいずれにおいても影響が見られず、コントロールメスと同じ表現型を示した (図 2-21D,H) が、*Ardsx* 終齢 RNAi オスの外部生殖器にはメス特有の器官である産卵管とそれを覆う鞘状の構造が見られた。メスの産卵管はノギリ状の刃が左右で 2 枚ずつ対合し、合計 4 枚の刃から構成される (図 2-21C)。これに対し、*Ardsx* 終齢 RNAi オスの外部生殖器にみられた産卵管の刃は左右で 1 枚ずつであり、不完全な状態であった (図 2-21B)。またオスの外部生殖器に特徴的な把握器 (図 2-19A) と似た構造をもつ器官が、*Ardsx* 終齢 RNAi オスの不完全な産卵管の下に確認された (図 2-21B)。

内部生殖器に関しても観察を行ったところ、コントロールオスと比べ *Ardsx* 終齢 RNAi オスは精巣が顕著に萎縮していることが明らかとなった (図 2-21F)。そこで精子について位相差顕微鏡を用いて観察した結果、コントロールと比較してわずかに少ないが精子自体は形成されていることが明らかとなった (図 2-22)。また、コントロールオスにおいても見られたように、オスの貯精嚢は本来細く螺旋状の構造をもつ (図 2-21E) が、*Ardsx* 終齢 RNAi オスの貯精嚢は細くならず、螺旋の構造ももたず、太いままであった (図 2-21F)。

### *Ardsx* を標的とした完全 RNAi が性分化に及ぼす影響

---

次に *Ardsx* の発現を全発生ステージで KD するために、ペアレンタル RNAi を行った個体に対して *Ardsx* を標的とする dsRNA を 3 齢幼虫と終齢幼虫において追加でインジェクションした。この処理により *Ardsx* の発現は胚発生期だけではなく幼虫期や蛹期においても抑制されると期待される。

その結果、メスの性分化に異常はみられなかったが、オス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オスからメスへの性転換を示し、産卵管とそれを覆う鞘状の構造などのメス特有の器官が形成された(図 2-23B)。これら完全 RNAi オスは精巣を発達させず、見かけ上成熟した卵を持つ卵巣を形成することが明らかとなった(図 2-23E)。カブラハバチは成熟卵を賦活化処理する(卵を低調液に浸漬する)ことで胚発生を誘導することができる(Sawa and Oishi 1989)。この場合成熟卵は未受精であるため全てオスへと分化する。この完全 RNAi オスが形成した卵の発生能を確認するため、成熟卵に賦活化処理を施したが孵化個体は得られなかった。

通常膜翅目のオス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(Hoage *et al.*, 1968; Sekine *et al.*, 2014)。一方 2 倍体であるメスは減数分裂を経て卵形成を行う。今回完全 RNAi を行ったオスは半数体であったため、メスへの性転換が起きても減数分裂が正常には進まず、それが原因で完全 RNAi オスの産生した卵は正常に発生しなかった可能性が考えられる。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 2 倍体オスを作成し(図 2-1)、同様に完全 RNAi 処理を行った。その結果、完全 RNAi 2 倍体オスの外部生殖器は完全に性転換を起こし、メス特有の器官である産卵管やそれを覆う鞘状の構造が完全に形成された(図 2-24B)。また本来精巣になる生殖巣は卵巣へと分化した(図 2-24E)。この卵巣が形成した卵は、コントロールのメスと比較すると造卵数は少ないが(図 2-25A)、賦活化処理によってコントロールのメスとほぼ同等の発生率を示した(図 2-25B)。これらの結果から、2 倍体であることが正常な卵形成にとって重要であることが明らかとなった。

---

## *Ardsx* のノックダウンがオスの交尾行動に及ぼす影響

上述の外部生殖器と内部生殖器に形態変化を示したオスの交尾行動についての解析を行った。交尾行動の観察には、羽化 5 日後の処女メスと、ペアレンタル RNAi のみを行った半数体オス、完全 RNAi を行った半数体オス、完全 RNAi を行った 2 倍体オス、コントロールとして *EGFP* を標的とした dsRNA をインジェクションしたオス、それぞれ羽化 5 日後のものを供試した。

*Ardsx* の KD が性行動に及ぼす影響を明らかにするために、*Ardsx* の KD を行ったオスが野生型のメスに対して交尾行動を示すか確認を行なった。ペアレンタル RNAi、完全 RNAi のどの条件のオスであってもメスに対して交尾行動を示し、最初に交尾行動を示すまでの時間 (copulation latency) に有意差は見られなかった (図 2-26A)。しかし、ペアにしてから最初の 15 分間のうち求愛行動を提示していた時間の割合 (courtship index) は *Ardsx*KD オスのメス化の度合いによって徐々に減少することが明らかとなった (図 2-26B)。これらの結果により、*Ardsx* の KD はオスの交尾行動に影響を与えないが、その活性を有意に低下させることが明らかとなった。これら *Ardsx*KD オスは全て交尾に成功しなかった (図 2-26C)。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、メス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。

次に、*Ardsx* の KD を行ったオスがメス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オスに対して野生型のオスが交尾行動を示すか確認を行なった。その結果、野生型のオスは *Ardsx* 完全 RNAi 2 倍体オスに対してのみ交尾行動を示すことが明らかとなり (図 2-27A, B)、交尾にも成功した (図 2-27C)。そればかりでなく、この *Ardsx* 完全 RNAi 2 倍体オスは野生型のメスと同様に産卵管を葉の縁に差し込んで葉の中に産卵を行った (図 2-28A, B)。この卵からは雌雄の正常な孵化個体が得られた (図 2-28C)。メスは受精卵からのみ発生する。すなわち *Ardsx* 完全 RNAi 2 倍体オスは交尾によ

---

って野生型のオスから精子を受け取ることに成功し、野生型のメスと同様にその精子を使って卵を受精させることができたことを意味している。

以上の結果から、*Ardsx* はカブラハバチのオス分化にとって必須の機能をもち、その機能抑制は2倍体オスにおいてオスからメスへの完全な性転換をもたらすこと、また *Ardsx* はカブラハバチのメス分化に不要であることの2点が明らかとなった。

---

## 考察

### カブラハバチの *dsx* オルソログ *Ardsx* の特徴

今回我々が同定した *Ardsx* は他の多くの昆虫で同定されている *dsx* 同様に、雌雄で異なるスプライシングを受けており、雌雄で異なるアミノ酸配列をコードする転写産物を生じていた。また基本的にはメスではメス型が、オスではオス型が全てのステージで発現している点も他の昆虫と同じであった。しかし雌雄で異なるスプライシングを受けるものの、そのスプライシングパターンは他の昆虫の *dsx* とは大きく異なっていた。キイロショウジョウバエの *dsx* は 6 つのエクソンから構成され、メス型 *dsx* は stop コドンを含むエクソン 4 を含むため、1 から 4 までの 4 つのエクソンから構成されるのに対し、オス型 *dsx* は stop コドンを含むエクソン 4 がスキップされ、メスでは転写されない 5 番目と 6 番目のエクソンの転写を行うため、エクソン 4 を含まない 5 つのエクソンから構成される(図 2-29A)。セイヨウミツバチの *dsx* でも同様に stop コドンを含むエクソンがオスではスキップされる(図 2-29B)。カイコの *dsx* は 6 つのエクソンから構成され、メス型 *dsx* は 1 から 6 まで全てのエクソンから構成されるのに対し、オス型 *dsx* はエクソン 3 と 4 がスキップされ、4 つのエクソンから構成される(図 2-29C)。一方カブラハバチのオス型 *dsx* はエクソン 5 の途中で stop コドンを含むのに対し、メス型 *dsx* ではエクソン 5 は転写されるがその途中にある stop コドンを含む 119bp の領域がスキップされるため、C 末端側が雌雄で異なるアミノ酸配列をコードする(図 2-29D)。このように他の昆虫では対象となるエクソン全てがスキップされるのに対し、カブラハバチでは対象のエクソンの途中のみスキップされるという特徴を持つ。また他の昆虫ではオスにおいて stop コドンを含むエクソンのスキップが見られるのに対し、カブラハバチではメスにおいて stop コドンを含むエクソンの部分的なスキップが見られる。セイヨウミツバチの *dsx* の性特異的スプライシング制

---

御因子である *fem* がカブラハバチゲノムには見つからなかったことを合わせて考えると、*Ardsx* の性特異的スプライシング制御機構はセイヨウミツバチや他の昆虫とは異なる可能性が高いと考えられる。

### *Ardsx* の発現パターンについて

胚発生初期の *Ardsx* の発現パターンを調べた結果、産卵(もしくは賦活後)17 時間の時点では雌雄どちらの胚においてもオス型メス型両方の発現がみられたが、24 時間後には *Ardsx* の発現パターンに性的二型が現れ始め、オス胚ではオス型 *Ardsx* (*ArdsxM*) の発現のみが見られるようになった(図 2-16B)。このことから、カブラハバチの性決定は産卵後(賦活後)17 時間から 24 時間の間に起こると推察される。

メスでは孵化後 4 日目まで *ArdsxM* の発現が確認された(図 2-16B)。何故メスであるにも関わらず、*ArdsxM* の発現がこの時点まで確認されたのか。おそらくカブラハバチにおける *dsx* の default の splicing はオス型であるため、特別な因子が存在せずとも起きてしまいやすいのではないかと考えられる。一方、メス型は特別な因子の存在がない限り起こらないため、オスではメス型スプライシングが全く起こらず、結果的にオス型 *Ardsx* の発現だけが見られるようになるのかも知れない。

*Ardsx* の発現量を定量した結果、孵化 6 日目以降の雌雄で高い発現を示すことが明らかとなった(図 2-17)。この時期以降、蛹化を経て、成虫の器官が形成されるため、*Ardsx* の発現の上昇に伴い性分化が行われていると考えられる。

### ペアレンタル RNAi による内部生殖器と把握器の喪失について

何故 *Ardsx* のペアレンタル RNAi オスは性転換ではなく内部生殖器と把握器の喪失が見られたのか(図 2-19)。これは *Ardsx* の発現と生育時期に関係があると考えられる。ペアレンタル RNAi の場合、内部生殖器の性決定時期に *Ardsx* の発現が見られないため、内部生



---

生殖器はメスに分化しようとする。その後ダイナミックに性分化がおこなわれる終齢幼虫から蛹期には *Ardsx* の発現が回復しており、初期の段階で決まった性にしたがって分化ができなかったため、内部生殖器はそのまま消失したのではないかと考えられる(図 2-30)。

一方、メスにおいては *Ardsx* をノックダウンしても外部生殖器に変化は認められず、いずれの個体も正常に交尾、産卵し、次世代を得ることができた。このことは、*Ardsx* がカブラハバチのメスの性分化に関与しないことを示している。ヒトやアフリカツメガエルでは発生学的な特徴から、メスがデフォルトの性であると考えられており(Moore *et al.*, 2003; 回渕, 伊藤 2014)、カブラハバチの性も発生学的にはメスがデフォルトであるのかも知れない。

### 終齢 RNAi による外部生殖器と内部生殖器の変化

何故外部生殖器はメス化したが生内部生殖器はメス化しなかったのか(図 2-21)。こちらもペアレタル RNAi の結果と同様に *Ardsx* の発現と生育時期に関係があると考えられる。終齢 RNAi の場合、ダイナミックに性分化がおこなわれる終齢幼虫から蛹期には *Ardsx* の発現が抑制されているため外部生殖器におけるオスからメスへの性転換を誘導するには十分ではあるけれども、内部生殖器の性決定がおこる胚発生初期では *Ardsx* が発現しているため、内部生殖器の性転換は起こらなかったと考えられる(図 2-31)。

*Ardsx* の終齢 RNAi オスは、把握器と似た構造をもつ器官が、ほぼ完全に産卵管と化した器官の下に確認された。この *ArdsxKD* オスの把握器を由来とすると考えられる器官の先端は、ノギリ状の構造がみられたことから、本来ならこの不完全な把握器から1対の産卵管が形成され、外側の1対の産卵管と合わさることで4枚の刃からなる完全な産卵管を形成すると考えられる(図 2-21B)。

一方、外胚葉由来の産卵管や鞘状の構造物はほぼ完全にメス化したことから、これらのメス特有の器官の分化には *Ardsx* が不要であると考えられる。これらのことから、オス型 *Ardsx* が、産卵管の形成に必要なと言われる *Abd-B* の働きを抑制し、産卵管がオスで形成される

---

のを抑制している可能性がある。*Ardsx* KD オスでは、オス型 *Ardsx* による抑制が解除されるため、産卵管や鞘状の構造などメス特有の器官に分化したのかも知れない。

### 完全 RNAi による外部生殖器と内部生殖器の変化

*Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスは、完全に性転換を示し正常な発生能を有する卵を形成することが明らかとなった(図 2-28C)。キイロショウジョウバエ では生殖細胞の性分化は生殖細胞特有の性決定カスケードにより制御されている。メスの生殖細胞(XX)では周囲の体細胞の性がオスであっても卵形成が起こる。DSX は卵形成には必要ではない。*Ardsx* の KD により正常な卵形成が引き起こされたことから、カブラハバチの卵形成も DSX が必要ではないという点ではキイロショウジョウバエ と類似している。しかしキイロショウジョウバエ とは異なり、カブラハバチでは生殖細胞の遺伝的性別がオスであっても正常に卵形成が引き起こされた。カブラハバチの生殖細胞における性分化は、体細胞と同様に制御されている可能性が考えられる。これはカブラハバチが性染色体を持たないことと関係しているのかもしれない。この仮説を検証するためには今後性染色体を持たない昆虫の生殖細胞の性分化に関する研究が必要であると考えられる。

### *Ardsx* のノックダウンが性行動に及ぼす影響について

*Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスは、オスからの交尾を受け入れ産卵するなどメスとしての行動を示すことが明らかとなった(図 2-27)。これらの結果は外部生殖器や内部生殖器の形成と同様に *Ardsx* がメスの性特異的な行動を制御する中枢神経系の分化には不要であることを強く支持するものである。*ArdsxM* を野生型のオスで発現させると、メス特有の中枢神経系の発達が抑制されると考えられる。

*Ardsx* の KD を行ったオスはほぼ完全に性転換を引き起こしているのもかかわらずオスとしての性行動を示した(図 2-26)。キイロショウジョウバエ ではオスの性行動を制御する中枢

---

神経系の発達には *fruitless* (*fru*) の発現が極めて重要な役割を持つことが知られている (Ryner *et al.*, 1996; Heinrichs *et al.*, 1998)。オス特異的な *fru* を欠失させると、オスの求愛行動及び性指向性の欠陥を引き起こす (Ryner *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2000; Anand *et al.*, 2001; Lee and Hall 2001; Lee *et al.*, 2001; Demir and Dickson 2005)。近年はイエバエ・ガンビエハマダラカ・ネッタイシマカ・キョウソヤドリコバチ・サバクトビバッタ・チャバネゴキブリなど、キイロショウジョウバエ 以外の昆虫でも Fru タンパク質の役割が保存されていることが報告されている (Meier *et al.*, 2013; Salvemini *et al.*, 2013; Gailey *et al.*, 2006; Bertossa *et al.*, 2009; Boerjan *et al.*, 2011; Clynen *et al.*, 2011)。カブラハバチも *genemodel* により「*fruitless*」と定義されている遺伝子を持ち、*fru* ホモログとして働いている可能性が考えられる (図 2-32A)。RT-PCR の結果、この *fru* ホモログは成体の頭部で発現していることが明らかとなった (図 2-32B)。これらの知見を合わせると、カブラハバチのオスの中枢神経系の分化には *dsx* ではなく *fru* が必須の役割を果たしていると考えられる。

しかし *Ardsx* KD オスの Courtship index は野生型のオスよりも有意に低かった (図 2-26B)。これはキイロショウジョウバエ の *dsx* 変異体に見られる求愛行動の低下を彷彿とさせる (Rideout *et al.*, 2007; Vilella *et al.*, 1996)。キイロショウジョウバエ において DSX の特異的なアイソフォーム (DSXM) はオスの求愛行動のほとんどの局面では必要ではないが、オスの求愛歌には必要である (Rideout *et al.*, 2007; Vilella *et al.*, 1996)。DSXM はオスの経験に依存する求愛行動の獲得に必要なかつ十分である (Pan and Baker 2014)。オス特異的な中枢神経系の正常な発達には FruM と DSXM のどちらも必要であることが知られている (Rideout *et al.*, 2007)。また DSXM と FruM は腹部神経節のオス特異的なニューロンの分化にも作用している (Billeter *et al.*, 2006)。キイロショウジョウバエ の *dsx* と同様に *Ardsx* はカブラハバチのオスの求愛行動に必要なかつ十分であると考えられる。

---

## カブラハバチの性分化に倍数性が及ぼす影響について

*Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスの外部生殖器および内部生殖器はオスからメスへの完全な性転換を示し、野生型のオスと交尾を行った(図 2-27C)。対照的に、*Ardsx* 完全 RNAi 半数体オスの外部生殖器および内部生殖器は完全とはいかないまでもオスからメスへ性転換を示したが、野生型のオスとは交尾を行わなかった(図 2-27C)。これらの結果は二倍体であることが、正常な外部生殖器と内部生殖器を形成するために不可欠だけでなく、正常なメスとしての行動を行うためにも必要であることを示唆している。何故二倍体であるということがオスからメスへの完全な性転換に必要なのか。これはキョウソヤドリコバチに見られる性決定様式で説明できるかもしれない。

膜翅目に属するキョウソヤドリコバチもオスが半数体でありメスが二倍体という見かけ上は半数倍数性による性決定様式を採用しているが、実際にはゲノムインプリンティングにより性決定が行われ、ミツバチなどが性決定遺伝子として利用している *csd* 遺伝子座は持たないことが知られている(Beukeboom *et al.*, 2007)。キョウソヤドリコバチではメス分化に必要な因子である *Nasonia vitripennis transformer* (*Nvtra*) は母方のゲノムと父方のゲノムもどちらも存在しないと発現しない(Verhulst *et al.*, 2010)。母方ゲノムのみ持つ未受精卵では母方由来の *Nvtra* の転写活性因子が母方のインプリンティングにより不活性化されるため、*Nvtra* の転写が起こらずオスに分化する。カブラハバチではメス分化に重要である遺伝子の発現がゲノムインプリンティングにより制御され、母方ゲノムと父方ゲノムの両方を持つ個体でのみ正常なメスとして発生できるのではないかと考えられる。

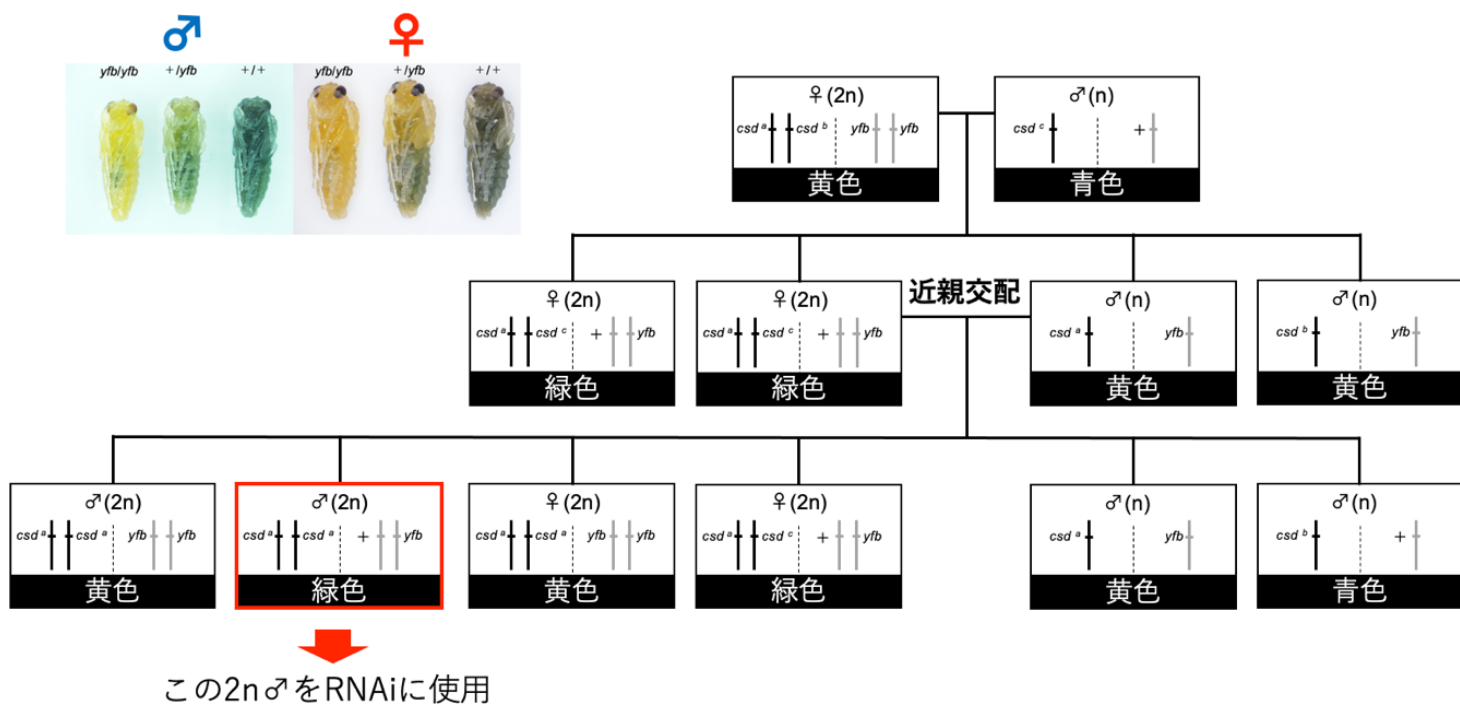


図 2-1 不完全優性黄色脂肪体系統を用いた 2 倍体オスの作出とその判別方法

左上の写真は各遺伝子型の蛹を示す。不完全優性黄色脂肪体 *yfb* 遺伝子をホモで持つ個体 (*yfb/yfb*) は脂肪体の色が黄色、ヘテロで持つ個体 (*+/yfb*) は緑色、野生型個体 (*+/+*) は青色を呈する(第一章の材料と方法参照)。

脂肪体の色に基づき、参照することにより、雄が受精卵由来(すなわち 2 倍体)であるか、未受精卵由来(すなわち半数体)であるかを識別することができる。RNAi に供試した 2 倍体オスを赤枠で囲んだ。

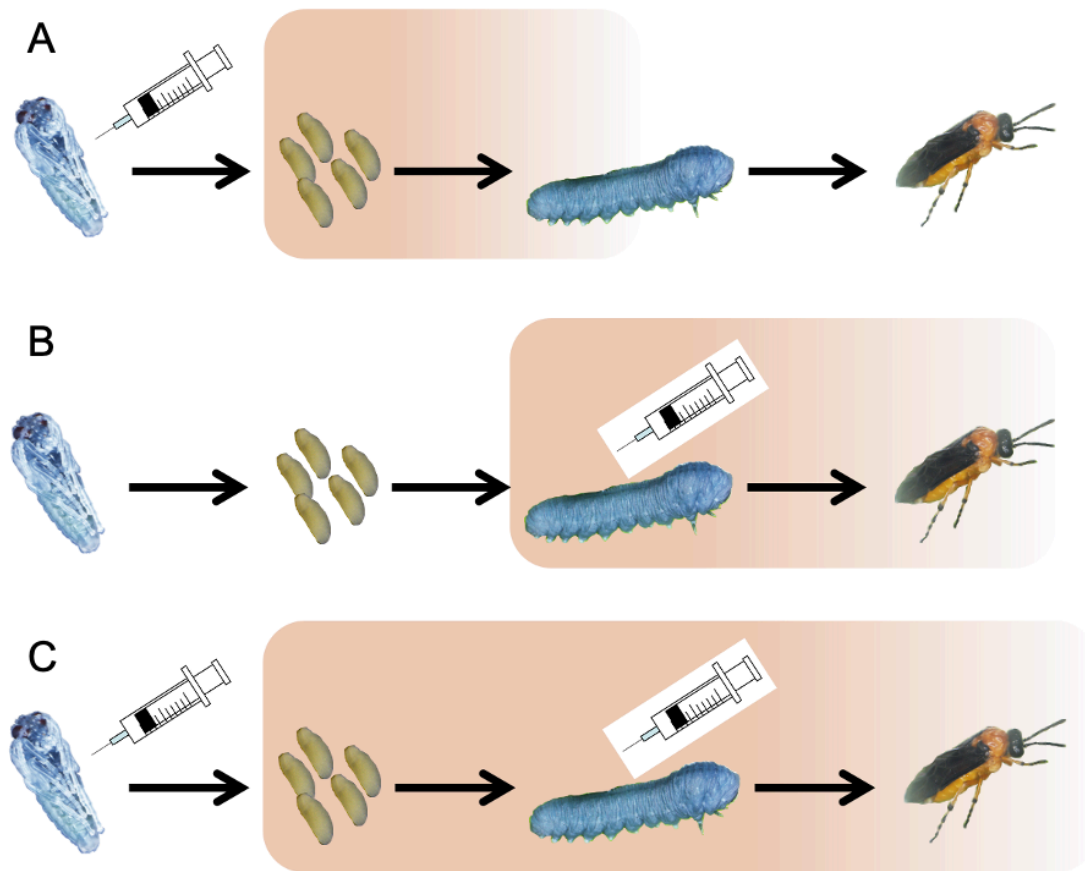
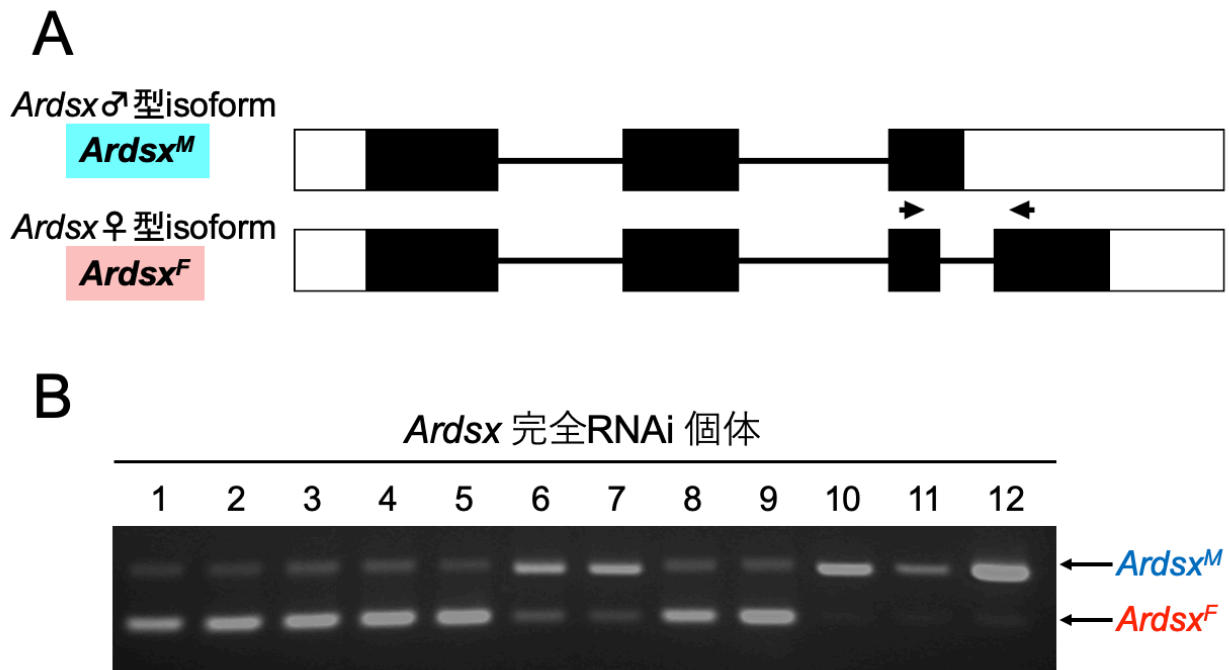


図 2-2 3 種類の RNAi 方法

(A) ペアレンタル RNAi: 胚発生初期から幼虫中期まで標的とする遺伝子の KD を行うことができる。(B) 終齢 RNAi: 終齢幼虫から成虫期まで標的とする遺伝子の KD を行うことができる。(C) 完全 RNAi: 胚発生初期から成虫まで標的とする遺伝子の KD を行うことができる。グラデーションは遺伝子の KD されている期間を示す。注射器のイラストは、dsRNA をインジェクションした時期を示す。



**図 2-3 *Ardsx* の発現による *Ardsx* KD 個体の雌雄判別方法**

(A) *Ardsx* メス型 (*Ardsx<sup>F</sup>*) 及びオス型アイソフォーム (*Ardsx<sup>M</sup>*) の構造。エクソン 3 の途中から表示。ボックスはエクソンを示す。直線はイントロンを示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。矢印はプライマーの位置を示す。

(B) A に示したプライマーを用いた *Ardsx* KD 個体の RT-PCR の結果。*Ardsx<sup>F</sup>* の増幅が見られた 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 番を遺伝的なメス、*Ardsx<sup>M</sup>* の増幅が見られた 6, 7, 10, 11, 12 番が遺伝的なオスであるとした。*Ardsx<sup>M</sup>* (269bp) と *Ardsx<sup>F</sup>* (150bp) に相当する増幅産物の位置を電気泳動像の右側に矢印で示した。

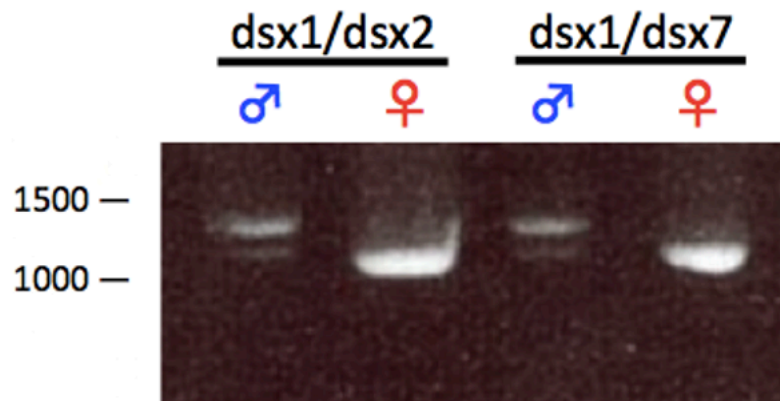


図 2-4 *Ardsx* の発現確認

*Athalia rosae* protein doublesex (LOC105689658), transcript variant X2, mRNA, Accession number XM\_012406840.1 の塩基配列情報からプライマー (forward primer, dsx1; reverse primer dsx2 及び dsx7) を作成し、蛹期における *Ardsx* の発現を RT-PCR により調べた。転写産物の長さは左からそれぞれ dsx1 と dsx2 を用いたオスで 1144bp、メスで 1025bp。dsx1 と dsx7 を用いたオスで 1137bp、メスで 1018bp を示した。



female	68	CATAATGGAT	CAAAACGACA	ACATTTTAGC	GGTCAAATG	GATTCCAACG	CTTCGTCGTC	GAACGCAGCG	CTGAGTCCAC
male	1	CATAATGGAT	CAAAACGACA	ACATTTTAGC	GGTCAAATG	GATTCCAACG	CTTCGTCGTC	GAACGCAGCG	CTGAGTCCAC
female	148	GTACACCACC	GAATTGTGCG	CGTTGTAGAA	ATCATAGACT	AAAAATAGCA	CTCAAGGGAC	ACAAGAGATA	CTGCAAATAC
male	81	GTACACCACC	GAATTGTGCG	CGTTGTAGAA	ATCATAGACT	AAAAATAGCA	CTCAAGGGAC	ACAAGAGATA	CTGCAAATAC
female	228	CGTAGCTGTA	ATTGCGAGAA	GTGTAGGTTG	ACCGCGGAAC	GGCAAAGAGT	TATGGCGCTG	CAAACCTGCAC	TCAGAAGGGC
male	161	CGTAGCTGTA	ATTGCGAGAA	GTGTAGGTTG	ACCGCGGAAC	GGCAAAGAGT	TATGGCGCTG	CAAACCTGCAC	TCAGAAGGGC
female	308	GCAGGCCACG	GACGAAGCCA	GGGTCGGGG	CCCGGAAGAA	CAGGTGGACC	CACGTTCCGT	GGTAGTTGAA	GGTGATCGTT
male	241	GCAGGCCACG	GACGAAGCCA	GGGTCGGGG	CCCGGAAGAA	CAGGTGGACC	CACGTTCCGT	GGTAGTTGAA	GGTGATCGTT
female	388	TGATATCAGT	TCCTCAACCT	GCGGAAAGAA	TTAGTTTAGA	AGGTAGTTGT	GACAGTAGCA	GCGGAGGTTT	GCCAGCGAGT
male	321	TGATATCAGT	TCCTCAACCT	GCGGAAAGAA	TTAGTTTAGA	AGGTAGTTGT	GACAGTAGCA	GCGGAGGTTT	GCCAGCGAGT
female	468	AATCATGACA	GTAACGGTGG	ACACAGCGGT	ATCGGTGGAC	CGATCGTTAC	GATACCAACG	TCCCAGAAAT	TGCCGCCAT
male	401	AATCATGACA	GTAACGGTGG	ACACAGCGGT	ATCGGTGGAC	CGATCGTTAC	GATACCAACG	TCCCAGAAAT	TGCCGCCAT
female	548	CTACCCCCAC	GCGGCTGCAG	GCGCGTACCT	ACCCCAACGA	CGAAACGGTG	AAAATATCGA	AGTATTACTC	GAGTACAGTA
male	481	CTACCCCCAC	GCGGCTGCAG	GCGCGTACCT	ACCCCAACGA	CGAAACGGTG	AAAATATCGA	AGTATTACTC	GAGTACAGTA
female	628	CGACACTGTT	GCAGAGATTT	CGATACCCTT	GGGAAATGTT	ACCTCTGATG	CTCGTTATCC	TGAAAGATGC	ACAAGCCGAT
male	561	CGACACTGTT	GCAGAGATTT	CGATACCCTT	GGGAAATGTT	ACCTCTGATG	CTCGTTATCC	TGAAAGATGC	ACAAGCCGAT
female	708	TTGGAAGAAG	CATCTCGACG	AAATTGCGGAA	G-----	-----	-----	-----	-----
male	641	TTGGAAGAAG	CATCTCGACG	AAATTGCGGAA	GTTAAGCTCG	GTGGATTGAT	TTTTTTCATT	AATTAACGAG	ACTCTATATG
female	751	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTGACTTCAC
male	721	ACCGAGAGTC	AGGTATACCT	TCATCAGATA	ATTGAAATAC	GAATTCCTAT	AGATCCTGTA	TAAATTCAG	CTGACTTCAC
female	751	TGCTGCAGCG	CGGCTGAAA	TTATTTATTT	TATCGCGCCA	TTTTGGCCTG	TCGATAATAC	CGAAAAAAT	GATGAGCCTT
male	801	TGCTGCAGCG	CGGCTGAAA	TTATTTATTT	TATCGCGCCA	TTTTGGCCTG	TCGATAATAC	CGAAAAAAT	GATGAGCCTT
female	829	GTTCATCAGC	CAATTGCAGA	TTGCTGCATT	TCTCGCGCGA	TGAATGTAAA	ATTTTTTGCA	TGATCTTCTC	GTATTTTCTA
male	881	GTTCATCAGC	CAATTGCAGA	TTGCTGCATT	TCTCGCGCGA	TGAATGTAAA	ATTTTTTGCA	TGATCTTCTC	GTATTTTCTA
female	909	TACACTGCAA	CTGCTATTCG	CCGTATCGCA	GTGATATGTG	CAGCAGAATC	GATAAAATTT	CACCTTTTCT	CAATCCGCCG
male	961	TACACTGCAA	CTGCTATTCG	CCGTATCGCA	GTGATATGTG	CAGCAGAATC	GATAAAATTT	CACCTTTTCT	CAATCCGCCG
female	989	TTACCGTATG	AGTCGGAGTA	ACGTTCAATA	TCGAATCAAA	CATCGTCTGG	AAGATTACAA	AAGCATCAAT	GAAGATTTAT
male	1041	TTACCGTATG	AGTCGGAGTA	ACGTTCAATA	TCGAATCAAA	CATCGTCTGG	AAGATTACAA	AAGCATCAAT	GAAGATTTAT
female	1069	ACGATTTATC	GGGATAATCA	C					
male	1121	ACGATTTATC	GGGATAATCA	C					

図 2-5 *Ardsx* のクローニングにより得られた塩基配列

メスで発現が確認された cDNA は、オスで発現が確認された cDNA のうち 119bp を欠いていることが確認され、*Ardsx* は雌雄で異なるスプライシングを受けることが示唆された。黒のハイライトは雌雄で同じ配列を示す。欠失部分は-で示した。

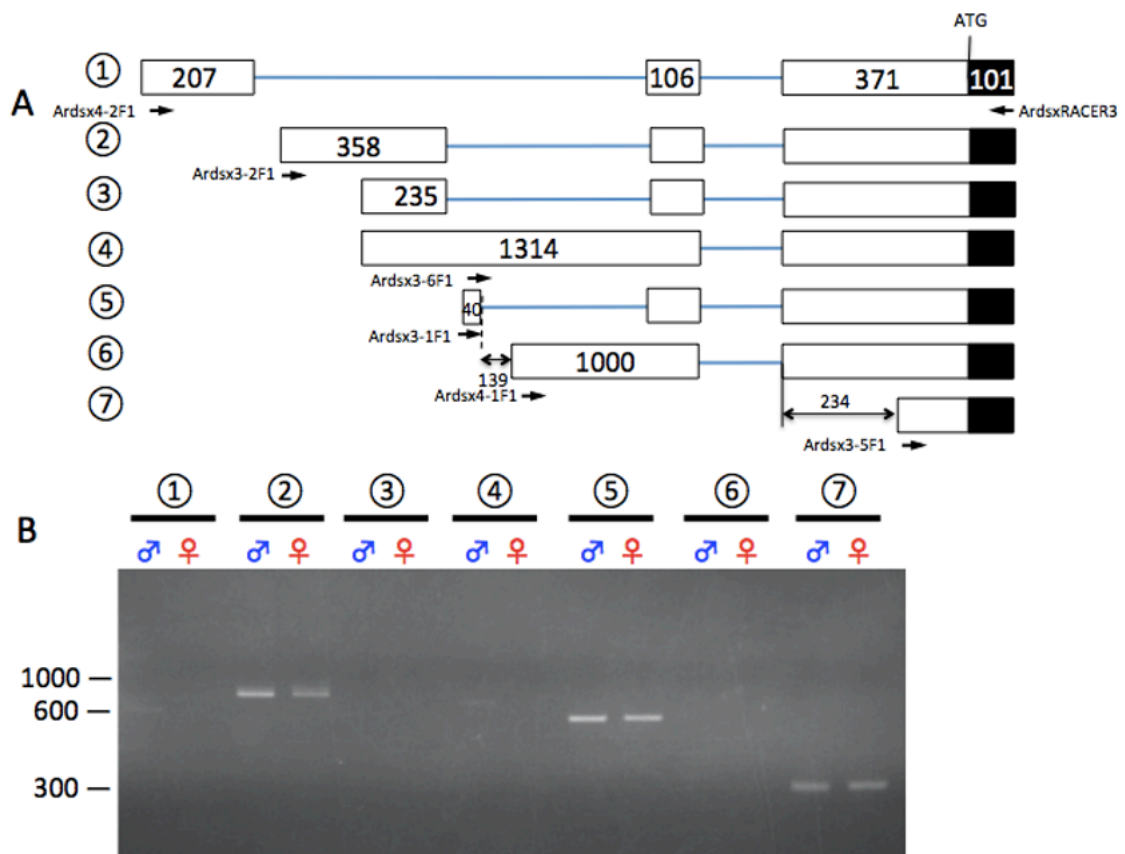


図 2-6 *Ardsx* 5' RACE により得られた遺伝子の構造と発現解析

(A) 5' RACE により得られた DNA 断片をカブラハバチのゲノム配列と比較し、エクソンイントロン構造を明らかにした。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。矢印は B に示した RT-PCR で用いたプライマーの位置を示す。

(B) A で得られた遺伝子構造をもとに 7 種類のプライマーを設計し、雌雄の蛹由来の cDNA を鋳型として用いた RT-PCR によりどの 5'RACE 産物が発現しているか確認を行った。



5'- GAAAAACACGTCGCGCGTTTTCAAAGACACGAAGATACCGCGC  
 TTACGGAAAAGATAGGGAGTCATGTGGATATGTAGGAAATAATG  
 AAGTACGTATACGACGTTTTCGTTCCGGACGGATAGAGAGGAGCG  
 GTGGTAGAGTGGCGCGCGGACGAGCGAATCGTCGGGGTTCGGTAG  
 CGACTGCTTCGCTGCACCGAAGTGCATACTATGGTTGGATAGACA  
 CGGAGAAGGATCGAGAGCTCGTGAGAAGAATAAAGAAATGAAGA  
 AAGAGGAAGAATGTGATACTTTTGGTGACGAATACGACCGTTTCA  
 AAATCACTACATCAGGATGAAGATCCAGCTGCCTCGGGACGATCG  
 AACGGCTCGGGCAGCAACGGCAGCAAAAGTAGCGATACCGATAG  
 GACGCCGTCGATGATCTAAAATTTTTTTCATCTAAAATCGACATACT  
 CTGTACAAGTGAAAAAAGTGGTTTGTACGAGAGAATTGCAAAAT  
 TGAAAAGAAAAAATTACAATAATACCGAGTAAACGAAAAAAGTT  
 AAACTAGAGAATCAAAGAGCAAAAAACAAATCTGTGTTAACGC  
 AATTGGTGGCAATTGACTGAAAGAAGATCGAATAGACTGTCGATA  
 AAAATAAGAATAAAAAAAAAAAAAANCTTAAAAAANGAAGTAAA  
 AATCAAATCATAATGGATCAAACGACAACATTTTAGCGGGTCA  
 AATGGATTCCAACGCTTCGTCGTCGAACGCAGCGCTGAGTCCACG  
 TACACCACCGAATTGTGCGCGTTG -3'

**図 2-7 5' RACE によって得られた増幅産物①の塩基配列**

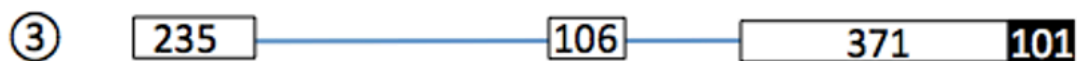
雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物①の塩基配列。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。



5'- GAAATCGTAAAACCGCTGCCTCTGGGTACCCGAGGCGCACCAGACGCGA  
 CTGCGAGGCTCGGGGGTGTGTTGGTGCGGTCCGCGGCTGTGTGGTCGTC  
 GTTCAAGTCCGGCGCTGATCCTGTAGCCCTCTCCCTTCTTCTCCTCTCTA  
 CAACGTCCGAGCGTTCGCCGTCCACACTCTGCCGCATGCATTTGCTGCG  
 GCGTGCCTCGTACGAGTTCGGTGTGCGGTCTGTCTCGTTCTTTCTTTATCC  
 GCCTGATTCGTCCGTAAGTCCGTCTCGTAGCGTCTGTGTGATACCGCGCG  
 CGACTCAAACCTCCACCCGAGTCACCCGAGTCCCGAACAGCCTCTGAAAA  
 CCGAACGATTGGTTGGATAGACACGGAGAAGGATCGAGAGCTCGTGAG  
 AAGAATAAAGAAATGAAGAAAGAGGAAGAATGTGATACTTTTGGTGACG  
 AATACGACCGTTTCAAATCACTACATCAGGATGGAGATCCAGCTGCCTC  
 GGAACGATCGAACGGCTCGGGCAGCAACGGCAGCAAAAAGTAGCGATAC  
 CGATAGGACGCCGTGATGATCTAAAATTTTTTTCATCTAAAATCGATATA  
 CTCTGTACAAGTGAAAAAAGTGGTTTGTACGAGAGAATTGCAAATTTGA  
 AAAGAAAAAATTACAATAATACCGAGTAAACGAAAAAAGTTAAACTA  
 GAGAATCAAAGAGCAAAAAACAAATCTGTGTTAACGCAATTGGTGGCA  
 ATTGACTGAAAGAAGATCGAATAGACTGTCGATAAAAAATAAGAATAAAA  
 AAAAAAAAAACTTAAAAAAGAAGTAAAAATCAAATCATAATGGATC  
 AAAACGACGACATTTTAGCGGGTCAAATGGATTCCAACGCTTCGTGCTCG  
 AACGCAGCGCTGAGTCCACGTACACCACCGAATTGTGCGCGTTG -3'

図 2-8 5' RACE によって得られた増幅産物②の塩基配列

雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物②の塩基配列。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。



5'-GAAAACACTCTGCCGCATGCATTCGCTGCGGCGTGCCTCGTA  
 CGAGTTCGGTGTGCGGTCTGTCTCGTTCTTTCTTTATCCGCCTG  
 ATTCGTCCGTAAGTCCGTCTCGTAGCGTCTGTGTGATACCGCG  
 CGCGACTCAAACCTCCACCCGAGTCAACCCGAGTCCCGAACAGC  
 CTCTGAAAACCGAACGATTGGTTGGATAGACACGGAGAAGGA  
 TCGAGAGCTCGTGAGAAGAATAAAGAAATGAAGAAAGAGGA  
 AGAATGTGATACTTTTGGTGACGAATACGACCGTTTCAAATC  
 ACTACATCAGGATGAAGATCCAGCTGCCTCGGAACGATCGAA  
 CGGCTCGGGCAGCAACGGCAGCAAAAAGTAGCGATACCGATA  
 GGACGCCGTCGATGATCTAAAATTTTTTTCATCTAAAATCGAT  
 ATACTCTGTACAAGTGAAAAAAGTGGTTTGTACGAGAGAAT  
 TGCAAAATTGAAAAGAAAAAATTACAATAATACCGAGTAAA  
 CGAAAAAAGTTAAAACCTAGAGAATCAAAGAGCAAAAAACAA  
 ATCTGTGTTAACGCAATTGGTGGCAATTGACTGAAAGAAGAT  
 CGAATAGACTGTCGATAAAAATAAGAATAAAAAAAAAAAAAAA  
 ANCTTAAAAAANGAAGTAAAAATCAAATCATAATGGATCAA  
 AACGACAACATTTTAGCGGGTCAAATGGATTCCAACGCTTCGT  
 CGTCGAACGCAGCACTGAGTCCACGTACACCACCGAATTGTG  
 CGCGTTG -3'

図 2-9 5' RACE によって得られた増幅産物③の塩基配列

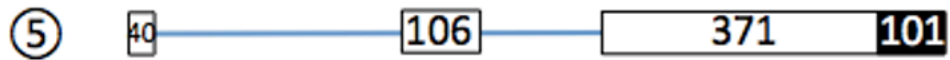
雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物③の塩基配列。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。



5'-<sup>|</sup>GAAAACACTCTGCCGCATGCATTTTCGCTGCGGCTTAGTGACGCGGCTCACCACACTTTGGCAA  
 CGGTTTTGGGCTTTTCGTCTTTAGTTTTGTGATTTCTCTAGTTATTTTTAGGTGCTAAGTCCTTAT  
 AATGAGCGATATAGAGCGAAGCGGCAGTCGAAGCGCTAGTCCCAGACGTCCCCGTACAGCAG  
 ATGGGGGTCCGAGAGACTCACGATCGAGGTCGAGGTCCCCAAAGTCGAGGGAGAGGAAGGA  
 GAGCCACCGTCCAAAACAGGAATATTCAAGGTCGAGGAGCAGGTCGGGGTCCAAAAGACGTA  
 AATCATACCGTAGCAGCAAATATGCAGGAACTGGTCACCGAGGAAGTAGCCGCAGTCGCAGCC  
 GCTCGCCCTATAGGGGTGGGCGCTACTCTCGCAGCAGCCCCATGTCTTCAAGACGGCGCCAT  
 GTCGGAAACCGGGACAACCCATGCCCTCCAGATGTCTTGAGTCTTTGGTCTATCCATCTAC  
 ACAACTGAGCAGCAGATCCACCACATCTTCTCGAAATACGGGCCGGTGGAGCGGGTGCAGGT  
 CGTCATCGATGCAAAGACTGGACGGTCGAGAGGCTTTTGCTTCGTTTACTTTGAATCGTCTGAG  
 GACGCCAAAGTTGCCAAGGAACAATGTACAGGAATGGAAATCGACGGTCGAAGGATACGGGTA  
 GATTTTTCTATTACGCAACGAGCACATACGCCAACACCAGGCATTTATATGGGCAAACCAACCC  
 ATTTACACGATAGAAGTTGGGAAGGACCCAGGCGAAGAGAAGGCAGCGGGTACAGAGGAAGC  
 TACAGGAGGTCACCAAGTCCGTATTATAATAGTAGTAGCCGTCGCCGCTCACGCTACGAACGT  
 TCGAGGTCACGATCCTACTCTCCTCGTAAGTCAGATCTTCAATTTTCTTATCAAGTGTAAATGTGA  
 TTATTATTATTATTATTTCGCTGTCTATCATCCTCATAAGTCATATCAATAAGGGGTGCCAC  
 AGGGGTTTATAGTCACAACACTATTATTTCTAGTCGCTCGGATAATATTTAAGTCAGCGAATGCCC  
 ACCTTAGTTTCACAAGCAACTACGAGATAGACCCCAACGAAAGAAATTTGTTCAACAACCTTCTC  
 CTGTATTGTTTTTTTTTTTTTTTGTTCAAATCAAAGGAGGGATCGAGTGATTTCTTTCAGTTTGT  
 CAAAATCATTAACTTCATCCTTTTTTTCTTTACGAGAAGGCCATTCAACCCACCCATTTCA  
 ACGTTCGAAATATCACGTCGATTCGGAATGCTGGCTAGGGGTTTGTAGATTTTTATTTAATGTCA  
 AGAGCTACCGGGGGAGGCTGCGGATGTGAACTGTTTTATTTCGGCGTGGGCACCCTGCGGAT  
 TAGTTCATTCTACCTGGACAGTTTTATGTTTATCGAGGAGTTCGTATTTTGACTTTTCTTTCT  
 GCGCGGTAACCGTTTGTTCACTCAGAACCCAACGGAAAGGCAGCCAGAAATGCGTCCAATGAG  
 GCTAGTGGTAGTATCTAAGTGCGATCATTGACATTAGTCAAACAATCATTGTTTTTGTGCTTAA  
 TGAATTTGAGGTCGATATTAAGTGACGCGAGTGTGACGCGAGAGGCCAGGTGTTGGGAGCCAT  
 TTGTGACTTGATCCTTTACCTCCCTTCTTACCCCTAAC -3'

図 2-10 5' RACE によって得られた増幅産物④の塩基配列

雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物④の塩基配列。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。



5'-GAAAAGTATATACGCGAATGTCGTA  
 CAGTTCAATGGTAAACTTTTCGCGTTTCTCGCAATCACGTTTT  
 TCTCCCATCGTAAATAAATAAACACGCGTGAACACCGATTCA  
 CGGCGGATCGATATATTCATTCGTACATCCGGCGCACGATCG  
 CGAATACCGTACGATGTTCCGGTCCCCCGTCGCTTCTCACGC  
 ATCCCTGTCGTTCGAAATATAAATTTTCCGAACGCCGTCGATA  
 CGCGGTGAATTGTCGGGAATCGGTTCCCGATTGCTCGCGA  
 TTCATCCTCCGCCTCGCCACTGATTCTACTACTCTCGAAGCGA  
 AACGACTTCTGTTGGTCCCGCCGCCGGTGGTGTTCACCGC  
 TACCGATGGTCGTCGTGCCACTATGACAGTACTTCTCTTGCT  
 ACCATCGCTAACCACATCTACACGAACACTTGTGCACTTTCGT  
 ATGTAGTCAGTAGTTTAATGTACGTTACAACCTTGCACACTAT  
 GACGATGTAAAAGAACGCCCTCTTCTTCATTCCCCTTCACT  
 TCTTCACGTCCCCATTTATTATTTTACCCAACACACGCACGC  
 ACACACACATACGACCGTCTCCTCGTATCTCTCGGTCTCTACG  
 AGACGAAGAACGCGAGGGTATCATCTATGTGCGATGCCAAT  
 CATCTCCACAAAGATCGCTGTCACATTATACTAT -3'

図 2-11 5' RACE によって得られた増幅産物⑤の塩基配列

雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物⑤の塩基配列。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。



5'- GAAAAGTTTGATACGGCTACCGTTCCTCCTCGCACCGATTGCACCCGCGCCCGCGATTCTTTCCATCAATTTTCGCACGAAGAAACATCATTGTTTTGTTTTTTTCCAACGATTTTTCA  
 CCGTCACCGACGATCCTCGTGCCGAGAAATTTTTCTCGTAATATCGTCCTTCATTTTTTT  
 CGAATTTTTTCGCGTCCGTTCCGAAGGGCGAGATCGGTATCTCCGTTGGAATCGCATCC  
 GCGTTTCGTCGTCGAACGTGCGAATTGTTTTATTGGGCATCGGAAAAAATTGAGACATCG  
 TGATACCCGCGCTGCAGTTGCGGCTGCACCTTCTCCGTCCTGTAACACATTGTACTAA  
 GTGCACACGCGGCAACATTGTTGCGGGCTAATTATAAACGCGTAACACGATTTTAAAAACA  
 CGCAATCTACGTAACCAAATAATTCCGAGATTATTCCGTACTCGGATTAATAAAAAATCAT  
 GTGATAAGGCGCACGTAATTACGAATGAGATTTTGAATTCGACAAATTTTTGTAACCAG  
 AAAAAAGTGGTGTGTTTAAATCTGAAAAATACGTGCGTTCGTAATTTTGA  
 TTTGAACTCGATACCGATTGCGGTGTCGTTTGCATTTGAAAAATTTGTCATTCTTCAAAA  
 TTTTCTCGTCATTTTGTGATGAAATTACAAATTCAACTGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG  
 CAGCTGGAAGCAATGGGAATTGGATAATCGAGTGATCGGATGTCGCGTTTGGATATTTG  
 GTTTTTCTACAACCTCAGTTTCGATTTTGATAAAGTTTTTTTTTTTTTCACTTCTGTTTTCA  
 TCCTCGGACATCAGATTGGTTGGATAGACACGGTGAAGGATCGAGAGCTCGTGAGGAG  
 AATAAAGAAATGAAGAAAGAGGAAGAATGTGATACTTTTGGTGACGAATACGACCGTTT  
 CAAAATCACTACATCAGGATGAAGATCCAGCTGCCTCGGAACGATCGAACGGCTCGGGC  
 AGCAACGGCAGCAAAAGTAGCGATACCGATAGGACGCCGTCGATGATCTAAAATTTTTT  
 TCATCTAAAATCGATATACTCTGTACAAGTGAAGAAAAAGTGGTTTGTACGAGAGAATTGC  
 AAAATTGAAAAGAAAAAAATTACAATAATACCGAGTAAACGAAAAAAGTTAAAAGTAGA  
 GAATCAAAAGAGCAAAAAACAATCTGTGTTAACGCAATTGGTGCAATTGACTGAAAG  
 AAGATCGAATAGACTGTCGATAAAAAATAAGAATAAAAAAAAAAAAAACTTAAAAAAGAA  
 GTAAAAATCAAAATCATAATGGATCAAAACGACAACATTTTAGCGGGTCAAAATGGATTCC  
 AACGCTTCGTCGTCGAACGCAGCGCTGAGTCCACGTACACCACCGAATTGTGCGCGTTG -3'

図 2-12 5' RACE によって得られた増幅産物⑥の塩基配列

雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物⑥の塩基配列。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。



---

⑦

137 101

5'-GAAAAAACAATCTGTGTTAACGCA  
ATTGGTGGCAATTGACTGAAAGAAGA  
TCGAATAGACTGTCGATAAAAATAAG  
AATAAAAAAAAAAAAAAAAACTTAAAAA  
AAGAAGTAAAAATCAAATCATAATG  
GATCAAACGACAACATTTAGCGGG  
TCAAATGGATTCCAACGCTTCGTCGTC  
GAACGCAGCGCTGAGTCCACGTACAC  
CACCGAATTGTGCGCGTTG -3'

**図 2-13 5' RACE** によって得られた増幅産物⑦の塩基配列

雌雄の蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 5' RACE 産物⑦の塩基配列。  
⑦はデータベースに登録されている *dsx* の 5' 末端側の塩基配列と一致していた。塩基配列の上には、5' RACE 産物の塩基配列とカブラハバチゲノム配列を比較した結果明らかとなったエクソンイントロン構造を示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。

---

5'- CGCAGTGATATGTGCAGCAGAATCGATAAAAATTT  
CACTTTTTCTCAATCCGCCGTTACCGTATGAGTCG  
GAGTAACGTTCAATATCGAATCAAACATCGTCTG  
GAAGATTACAAAAGCATCAATGAAGATTTATACG  
AATTATCGGGATAATCACGTCAACGCATCACTGA  
AGATTTGACCACCAAATTGAAAATGAAGGAGG  
AAACGGAGAGGAACGGTTCAGAGATTAGCTCCG  
TTGTTCCACTCATTTCAGATACGATCGACGTATA  
GTCCCCGTTGCTTTCCTTCGTCTCTGACTTCTCAAT  
TTTGATGATCCGCAATTTTTTGCAAATTGCATCA  
CGATTAATGACGCGATTTATTCGCGTGCAGAGC  
AACACTGAAGATATGATCCTGATTCGCTCCGAA  
ACATCGTTACTTATTCCAAGGCCGCAAGATCAATT  
TCGAAACTGCACGGAAATAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AATATTCTCAATATACCTTCTGGATTA AAATGCAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA -3'

**図 2-14 3' RACE** によって得られた増幅産物の塩基配列

メスの蛹から調整した cDNA を鋳型に用いて増幅された 3' RACE 産物の塩基配列。XM\_012406840.1 に登録されている cDNA 配列と一致した 502bp の断片が増幅された。この塩基配列には poly(A)付加シグナル AATAAA がみられ、その 45bp 下流に polyA が付加していた。メスの ORF に相当する配列を赤文字で、poly(A)付加シグナルを水色文字で示した。オス由来の cDNA を用いた 3' RACE でも全く同じ塩基配列であった。

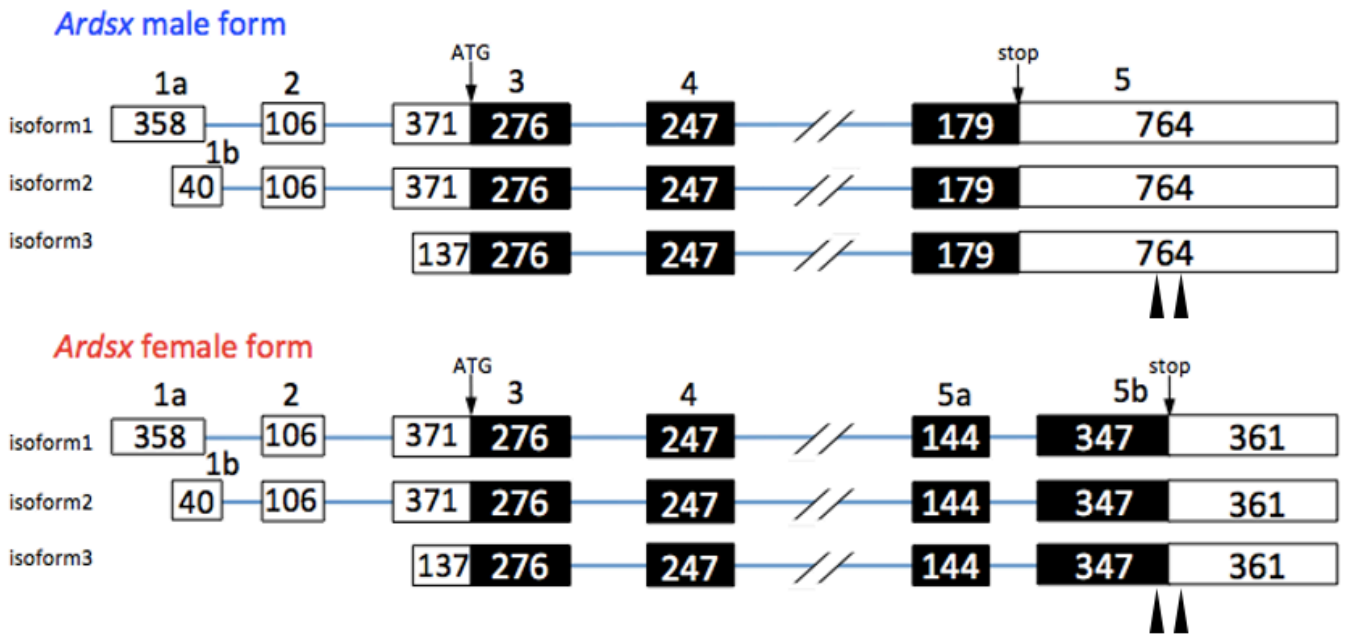
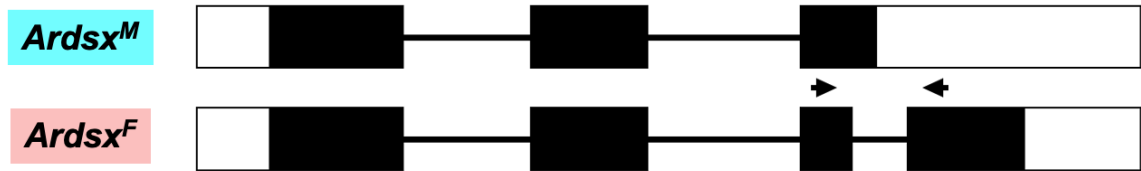


図 2-15 *Ardsx* の遺伝子構造

*Ardsx* メス型およびオス型アイソフォームのエクソンイントロン構造。雌雄共に 5' 末端側の転写開始部位の異なる 3 つのアイソフォームが存在した。エクソンをボックスで、イントロンを直線で示す。ボックスの上に示した数字はエクソン番号。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。ボックスの中の数字は塩基配列の長さを示す。矢尻は FEM/TRA-2 binding consensus (UGAAGAUU) と一致した塩基配列の位置を示す。

A



B

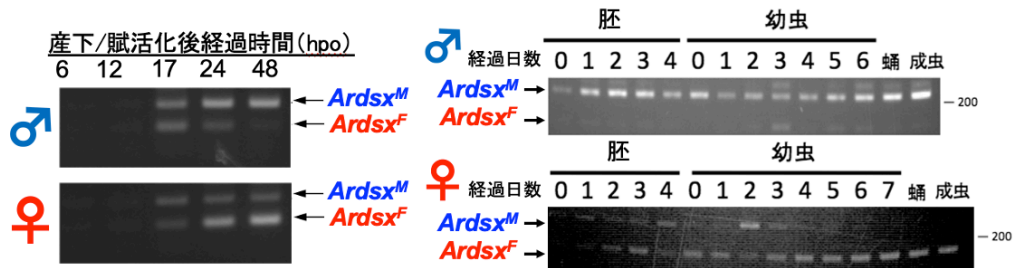


図 2-16 成長に伴う *Ardsx* の発現パターンの変化

(A) *Ardsx* メス型 (*Ardsx<sup>F</sup>*) およびオス型アイソフォーム (*Ardsx<sup>M</sup>*) の構造。エクソン 3 の途中から表示。ボックスはエクソンを示す。直線はスプライシングを示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。矢印はプライマーの位置を示す。(B) A に示したプライマーを用いた RT-PCR の結果。左のパネルの電気泳動像の上に示した数字は産下後、もしくは卵巣卵の賦活化処理後の経過時間を示した。右のパネルのそれぞれの電気泳動像の上に示した数字は、産下後(メス)、もしくは卵巣卵の賦活化処理後(オス)の経過日数(胚 0~4) および孵化後の経過日数(オス幼虫:0~6、メス幼虫:0~7)を示す。*Ardsx<sup>M</sup>* (269bp)と *Ardsx<sup>F</sup>* (150bp) に相当する増幅産物の位置をそれぞれの電気泳動像の右側に矢印で示した。

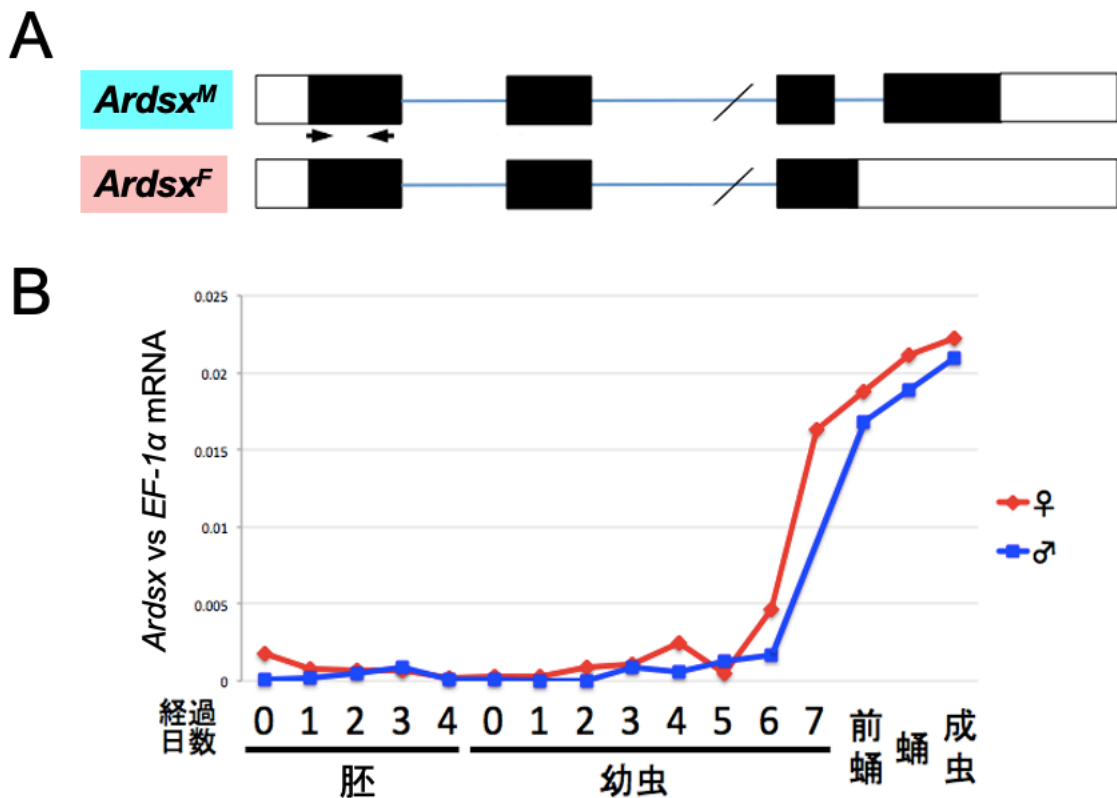


図 2-17 *Ardsx* の発現量の推移とその雌雄差

(A) *Ardsx* メス型 (*Ardsx<sup>F</sup>*) およびオス型アイソフォーム (*Ardsx<sup>M</sup>*) の構造。エクソン 3 の途中から表示。ボックスはエクソン、直線はイントロンを示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。黒の矢印は qRT-PCR で用いたプライマーの位置を示す。(B) A に示したプライマーを用いた qRT-PCR の結果。グラフの縦軸は内部標準に用いた *EF-1α* の mRNA 量に対する相対値を示している。グラフの横軸に示した数字は、産下後(メス)、もしくは卵巣卵の賦活化処理後(オス)の経過日数(胚 0~4)および孵化後の経過日数(オス幼虫:0~6、メス幼虫:0~7)を示す。

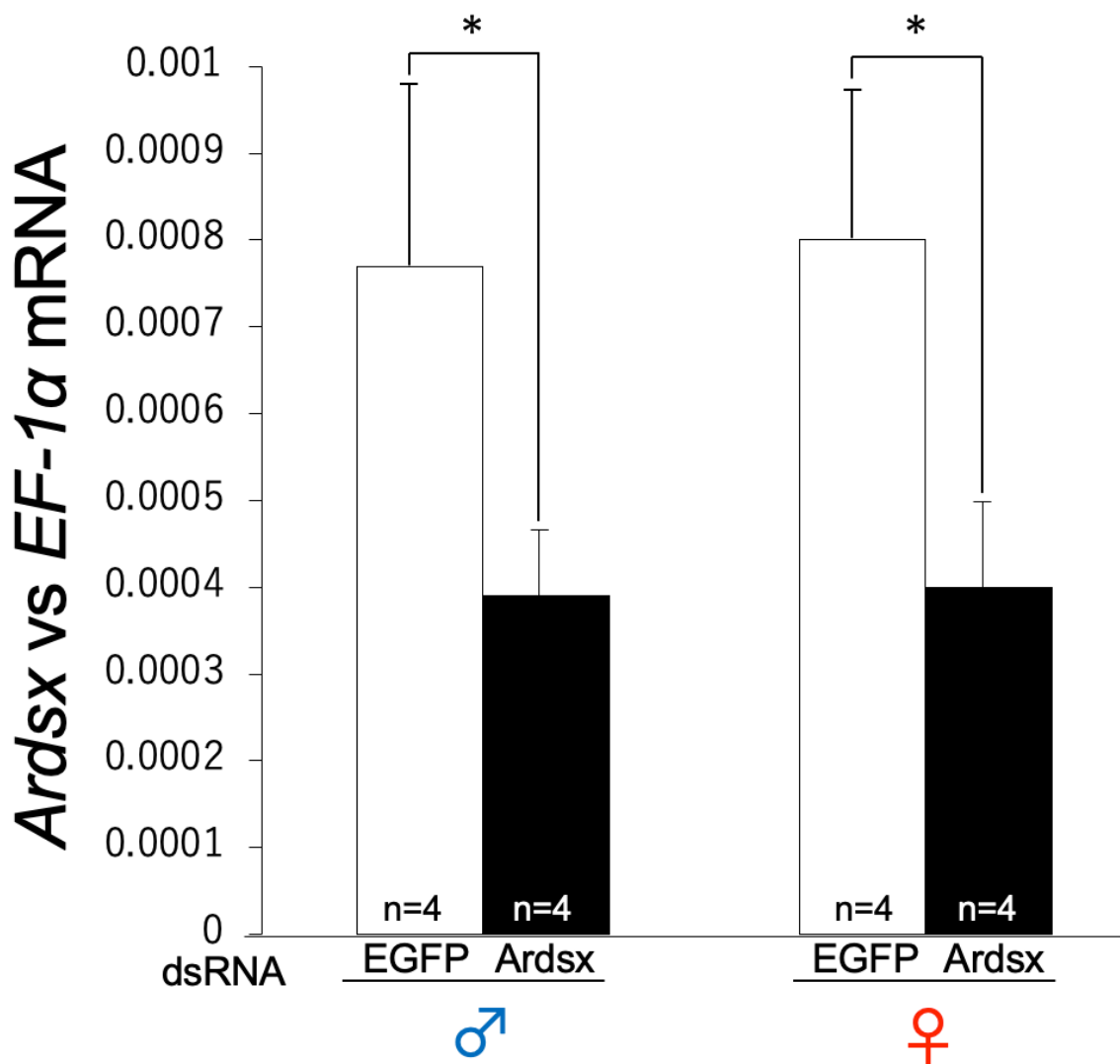


図 2-18 *Ardsx* ペアレンタル RNAi のノックダウン効率の確認

グラフの縦軸は内部標準に用いた *EF-1 α* の mRNA 量に対する相対値を示している。

control として *EGFP dsRNA* を注射した個体を用いた。n は調査個体数を示す。

\* student t-test で control と比較して有意差あり ( $p < 0.05$ )。エラーバーは標準偏差を示す

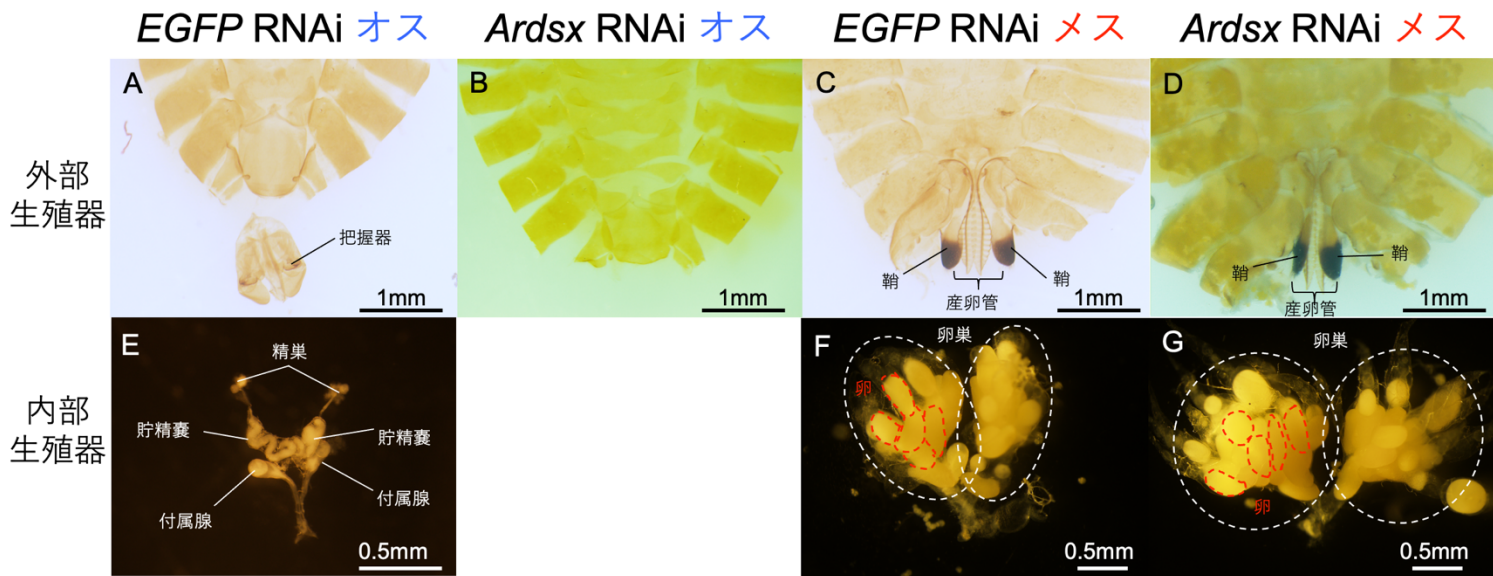


図 2-19 *Ardsx* ペアレンタル RNAi 個体の外部生殖器と内部生殖器の観察

(A~D) 成虫の外部生殖器についてクチクラ標本を作成し実体顕微鏡で撮影を行った。

(E~G) 成虫の内部生殖器について解剖により摘出し実体顕微鏡で撮影を行った。

(A, E) control オス (B) *Ardsx* RNAi オス (C, F) control メス (D, G) *Ardsx* RNAi メス。

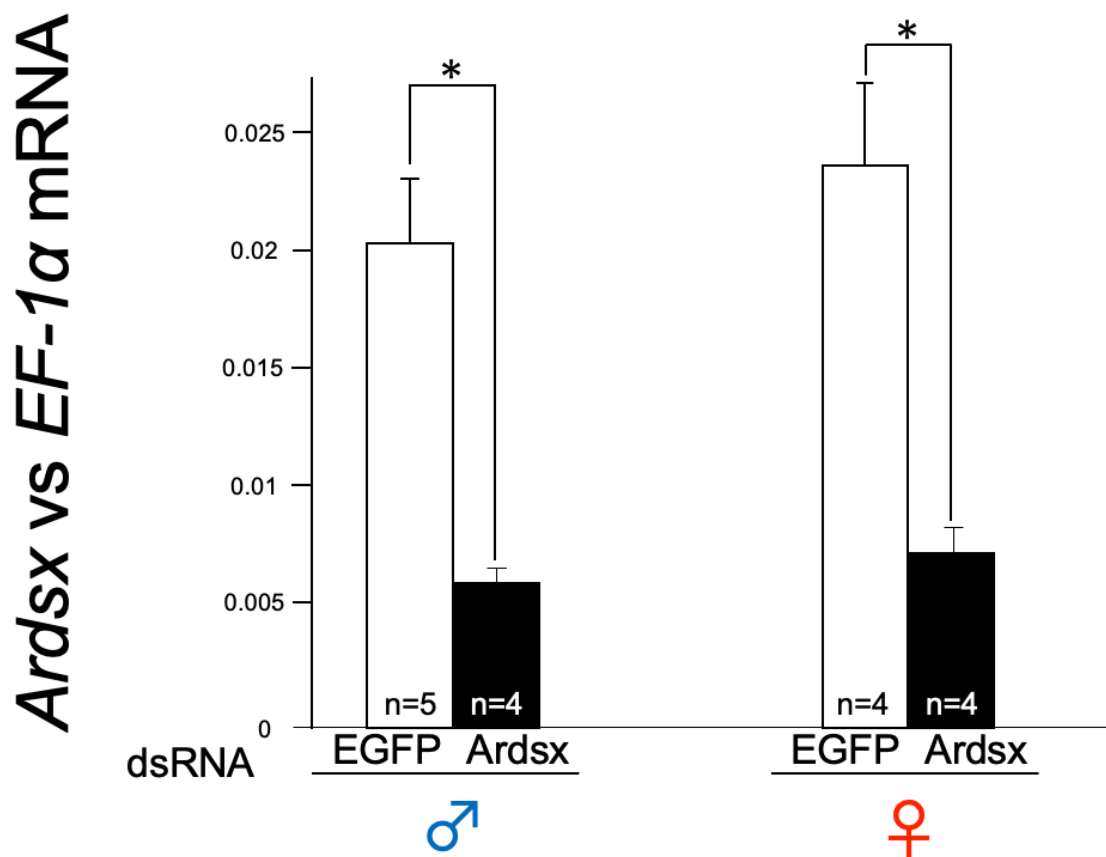


図 2-20 *Ardsx* 終齢 RNAi のノックダウン効率の確認

グラフの縦軸は内部標準に用いた *EF-1 α* の mRNA 量に対する相対値を示している。control として *EGFP* dsRNA を注射した個体を用いた。n は調査個体数を示す。

\* student t-test で control と比較して有意差あり ( $p < 0.05$ )。エラーバーは標準偏差を示す。



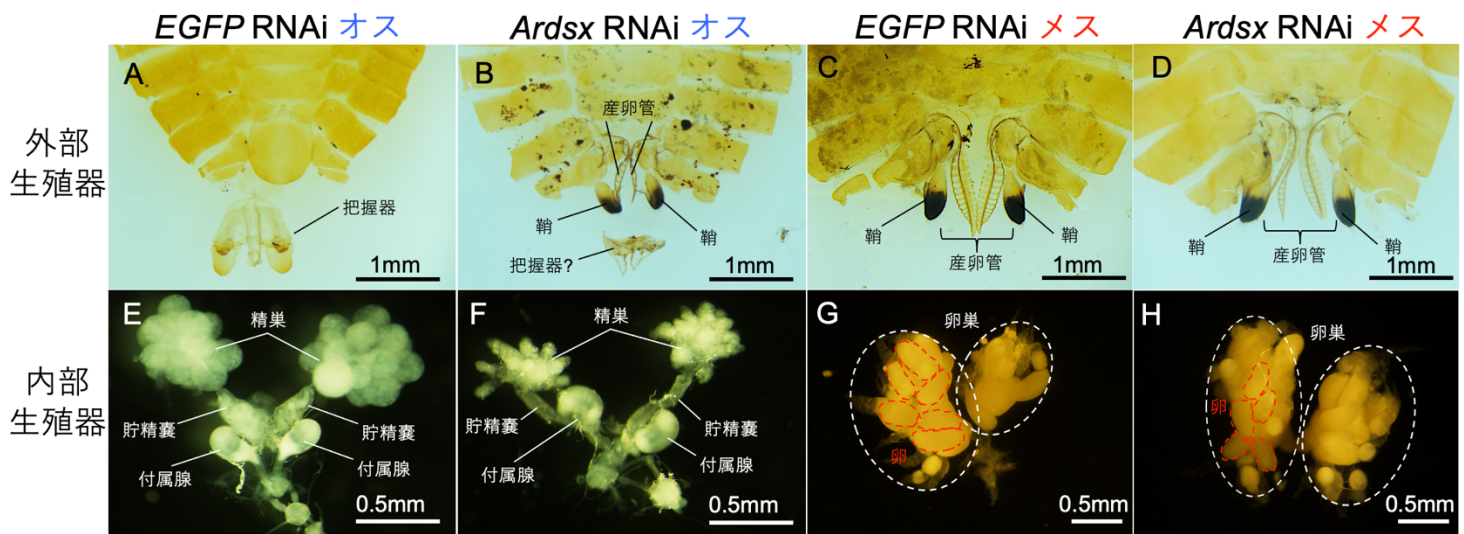
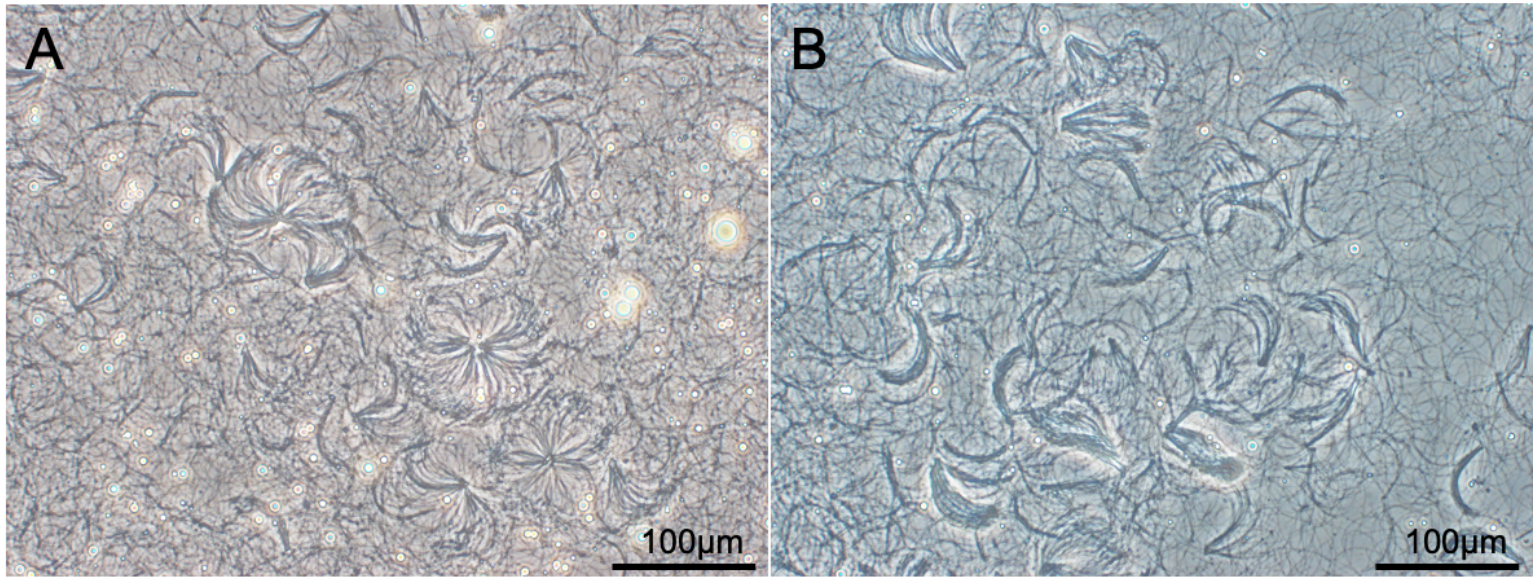


図 2-21 *Ardsx* 終齢 RNAi 個体の外部生殖器と内部生殖器の観察

(A~D) 成虫の外部生殖器についてクチクラ標本を作成し実体顕微鏡で撮影を行った。

(E~H) 成虫の内部生殖器について解剖により摘出し実体顕微鏡で撮影を行った。

(A, E) control オス (B, F) *Ardsx* RNAi オス (C, G) control メス (D, H) *Ardsx* RNAi メス。



**図 2-22 *Ardsx* 終齢 RNAi オスの精子の観察**

*Ardsx* 終齢 RNAi により内部生殖器が萎縮した個体の精巣を摘出し、精巣内に精子が存在するか実体顕微鏡で観察を行った。

(A) control オスの精子束 (B) *Ardsx* KD オスの精子束

*EGFP RNAi* ♂ *Ardsx RNAi* ♂ *Ardsx RNAi* ♀

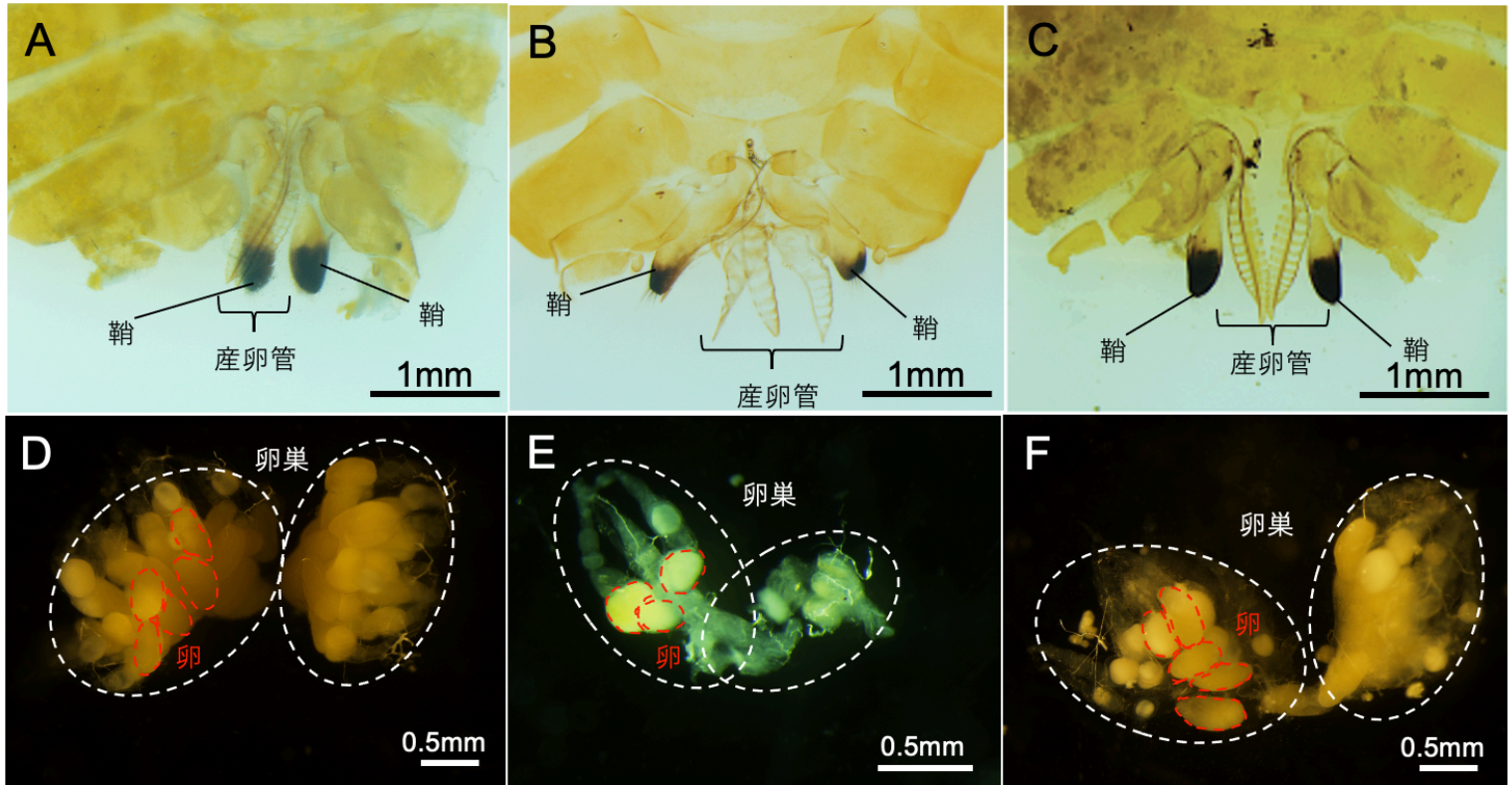


図 2-23 *Ardsx* 完全 RNAi 個体の外部生殖器と卵巣の観察

(A~C) 成虫の外部生殖器についてクチクラ標本を作成し実体顕微鏡で撮影を行った。

(D~F) 成虫の卵巣について解剖により摘出し実体顕微鏡で撮影を行った。

(A, D) control オス (B, E) *Ardsx RNAi* オス (C, F) *Ardsx RNAi* メス。

*EGFP* RNAi ♀♂ *Ardsx* RNAi 2n♂♂ *Ardsx* RNAi ♀♀

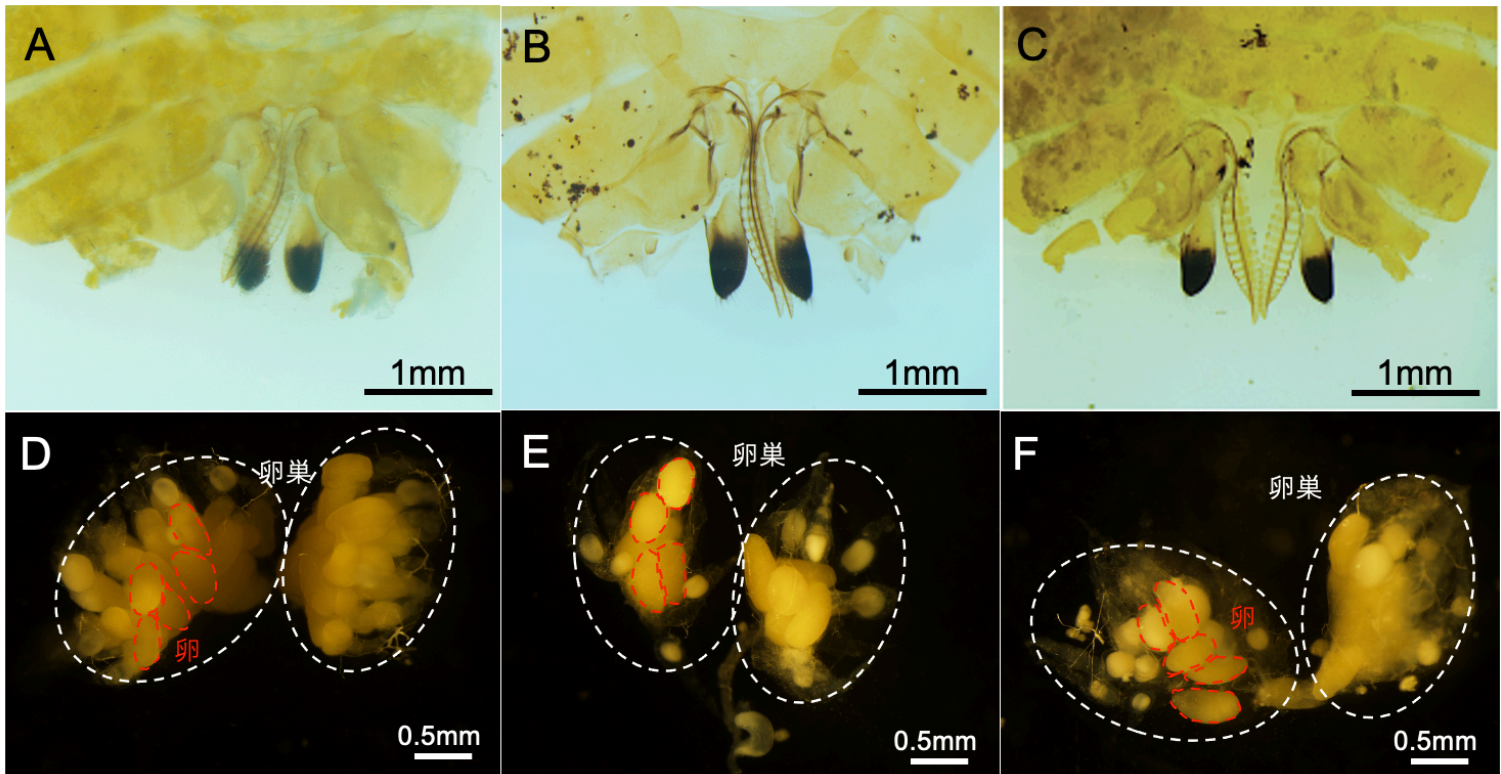


図 2-24 近親交配によって得られた2倍体オスを用いた *Ardsx* 完全 RNAi 個体の外部生殖器と卵巣の観察

(A~C) 成虫の外部生殖器についてクチクラ標本を作成し実体顕微鏡で撮影を行った。

(D~F) 成虫の卵巣について解剖により摘出し実体顕微鏡で撮影を行った。

(A, D) control オス (B, E) *Ardsx* RNAi 2 倍体オス (C, F) *Ardsx* RNAi メス。

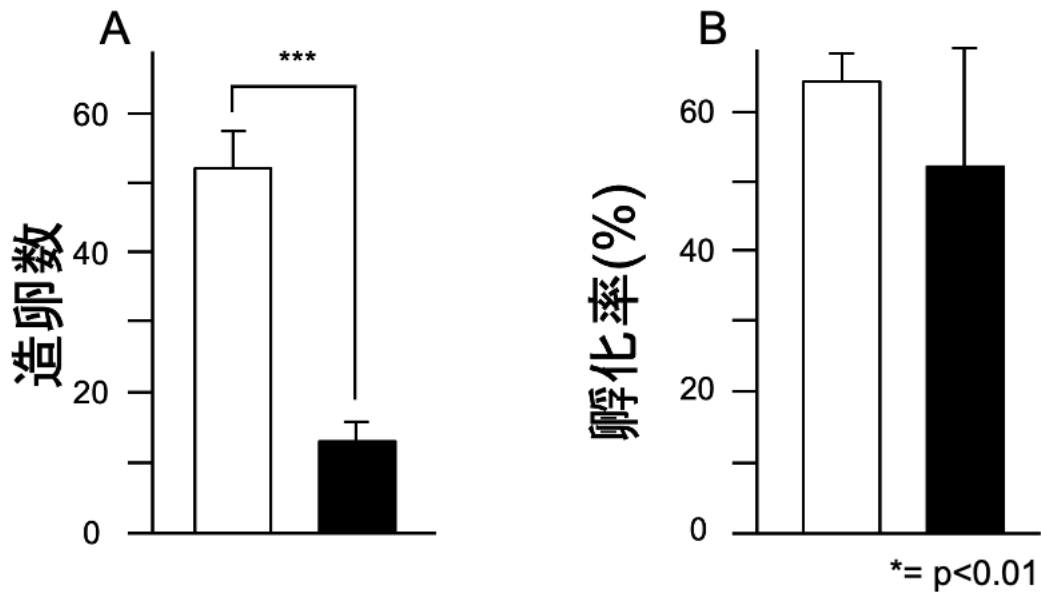


図 2-25 *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスが産生した卵の造卵数と孵化率

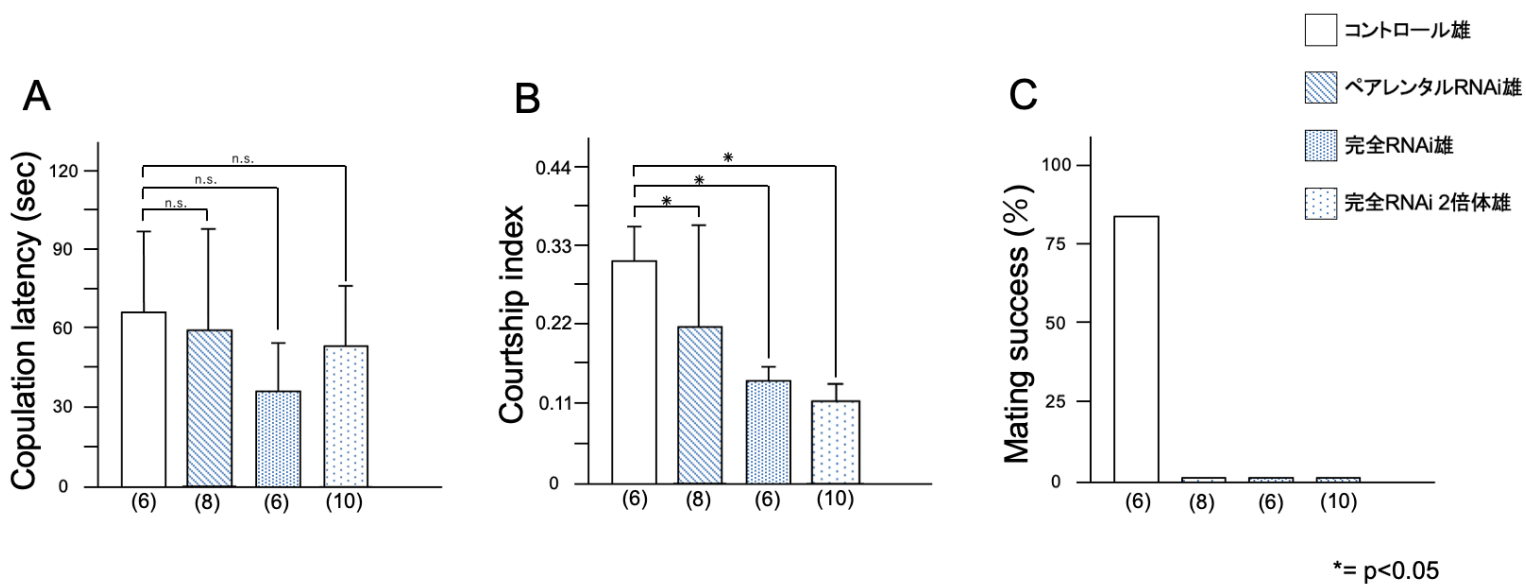
白色は *EGFP* RNAi メス 黒色は *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスから得られた卵について示す

(A) control メスと *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスから得られた卵の平均数。

(B) control メスと *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスが産生した卵巣卵の単為発生処理によって得られた孵化個体数の割合を孵化率として示した。

\*\*\* student t-test で control と比較して有意差あり ( $p < 0.01$ )。

エラーバーは標準偏差を示す。



## 図 2-26 *Ardsx* KD オスのオスとしての性行動

*Ardsx* KD オスが野生型の処女メスに対して交尾行動を行うかを評価するために同じ容器に1個体ずつ入れ観察を行った(第二章 材料と方法参照)。

(A) Copulation latency: オスがメスに対して初めて交尾行動を示すまでの時間。(B)

Courtship index: ペアにした後の最初 15 分間のうち求愛行動を示していた時間の割合。

(C) Mating success: 交尾成功率。

\* ダネット検定で control と比較して有意差あり ( $p < 0.05$ )。エラーバーは標準偏差を示す。

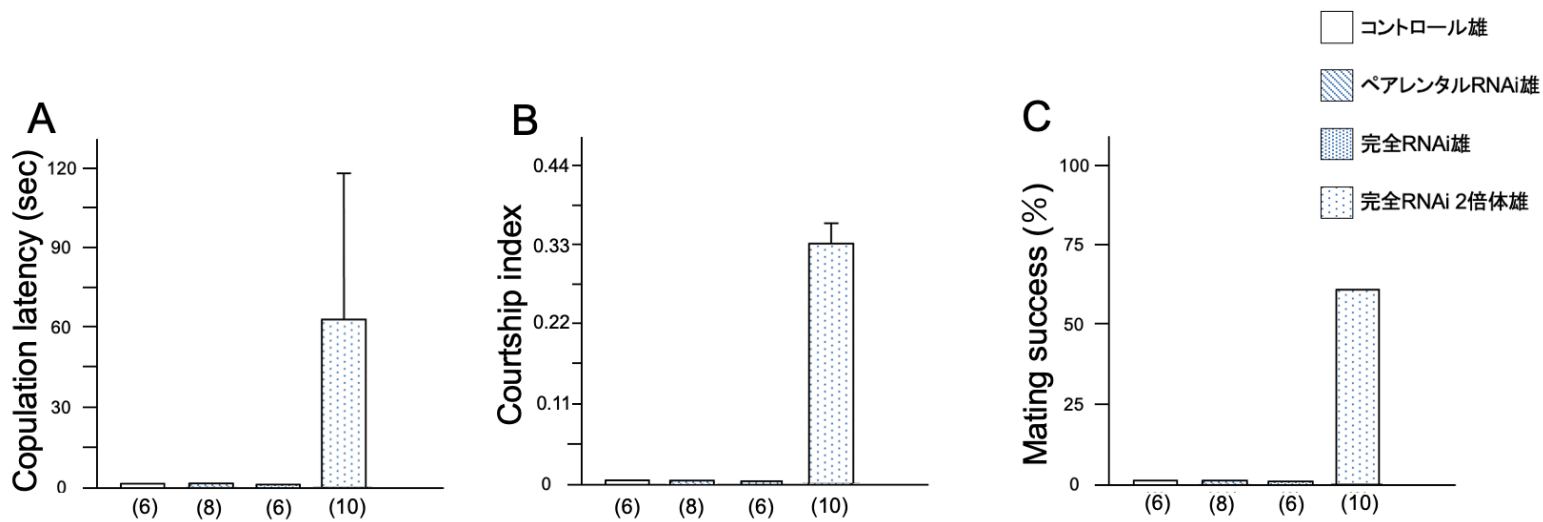


図 2-27 *Ardsx* KD オスのメスとしての性行動

野生型のオスが *Ardsx* KD オスに対して交尾行動を行うかを評価するために同じ容器に 1 個体ずつ入れ観察を行った。

(A) Copulation latency: オスがメスに対して初めて交尾行動を示すまでの時間。(B)

Courtship index: ペアにした後の最初 15 分間のうち求愛行動を示していた時間の割合。

(C) Mating success: 交尾成功率。エラーバーは標準偏差を示す。

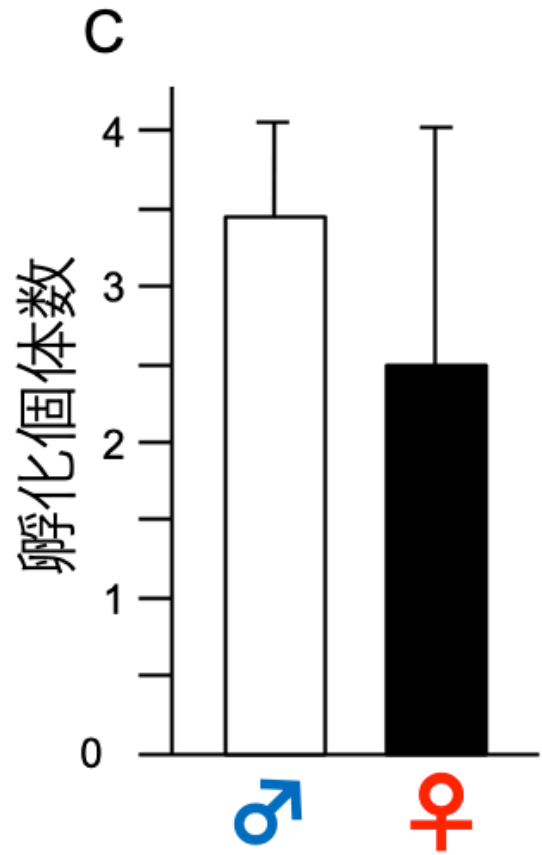
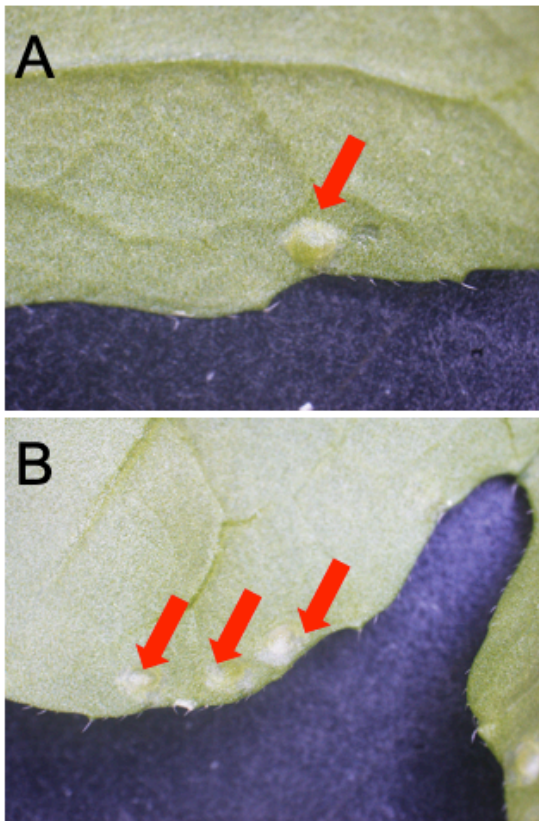


図 2-28 *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスが産卵した卵について

(A) *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスの産卵痕 (B) 野生型メスの産卵痕。図中矢印はハダイコンの葉内に産卵された卵を示す。

(C) *Ardsx* 完全 RNAi 二倍体オスが産んだ卵から孵化した個体の雌雄の数。成虫になった時点でカウントした。エラーバーは標準偏差を示す。



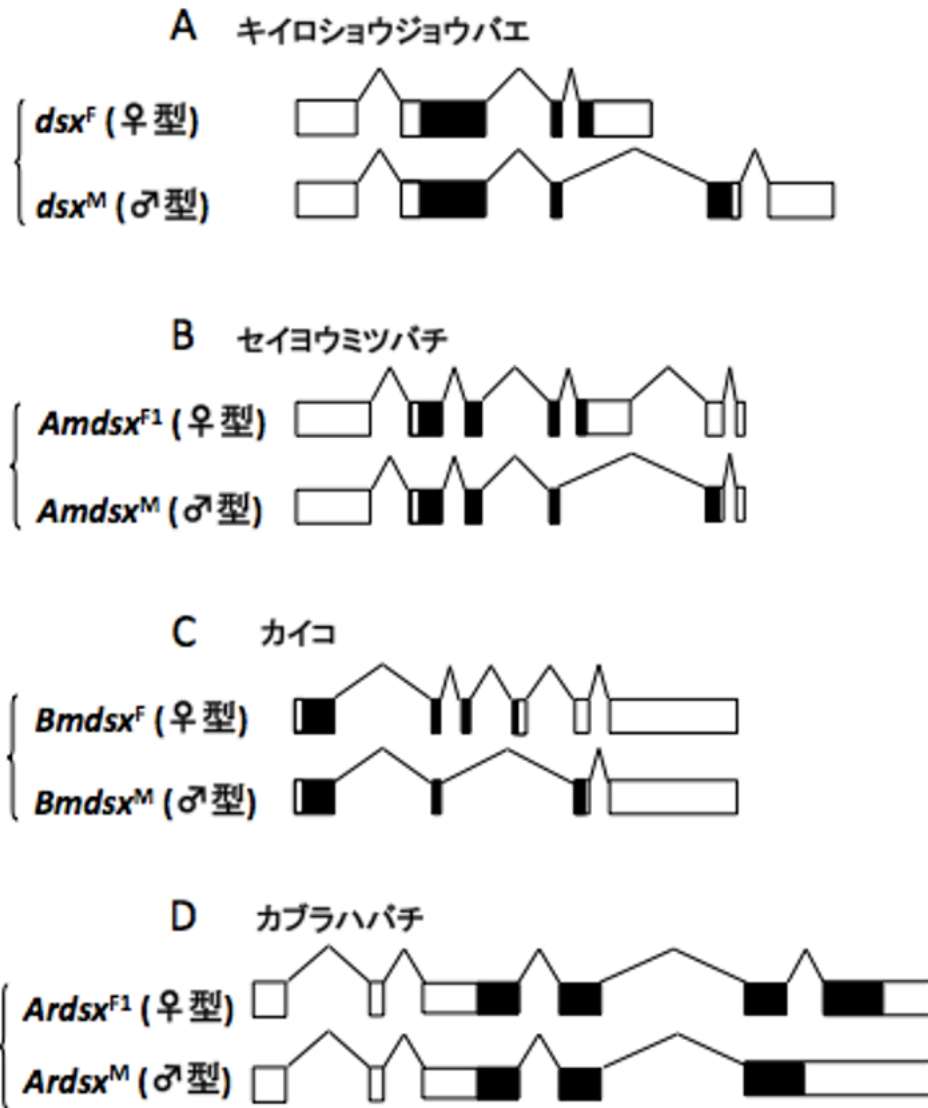


図 2-29 4 種類の完全変態昆虫における *dsx* の性特異的スプライシングパターン

ボックスはエクソン、逆 V 字型の直線はスプライシングを示す。黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。

(A)キイロショウジョウバエ、(B)セイヨウミツバチ、(C)カイコ、(D)カブラハバチの *dsx* について示す。

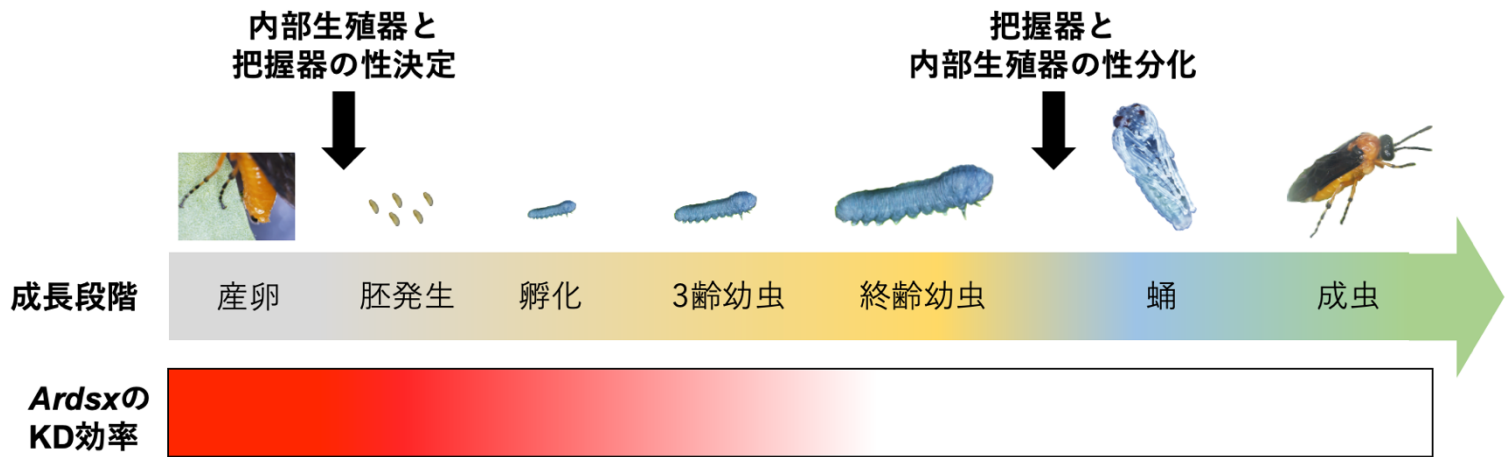


図 2-30 ペアレンタル RNAi による *Ardsx* の KD 時期が性分化に及ぼす影響

今回の研究により予想される組織の性決定が起こる時期と性分化が起こる時期を矢印で示す。赤色は発生過程における *Ardsx* が KD されている時期を示す。

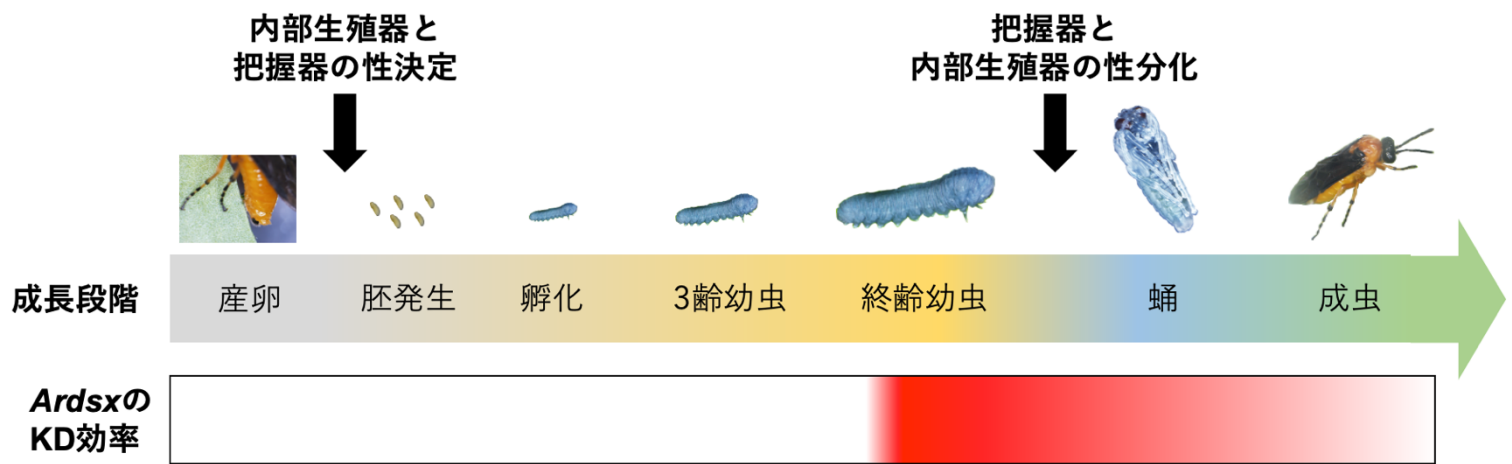
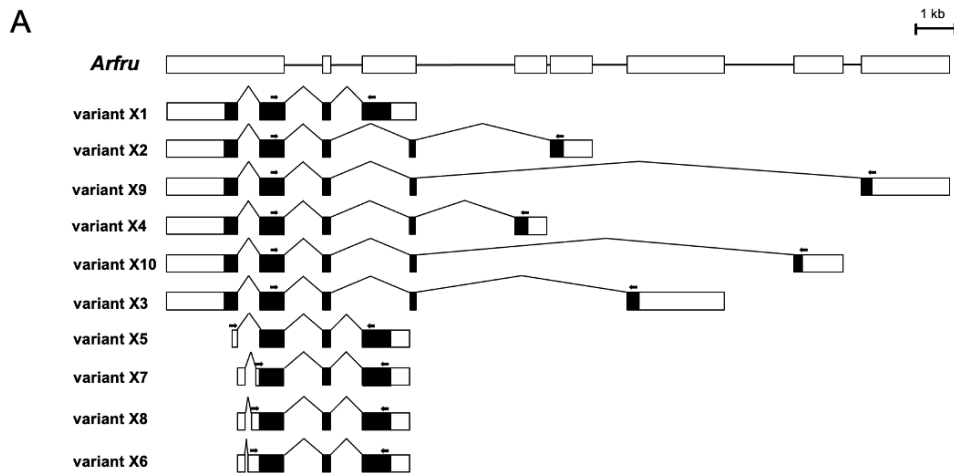
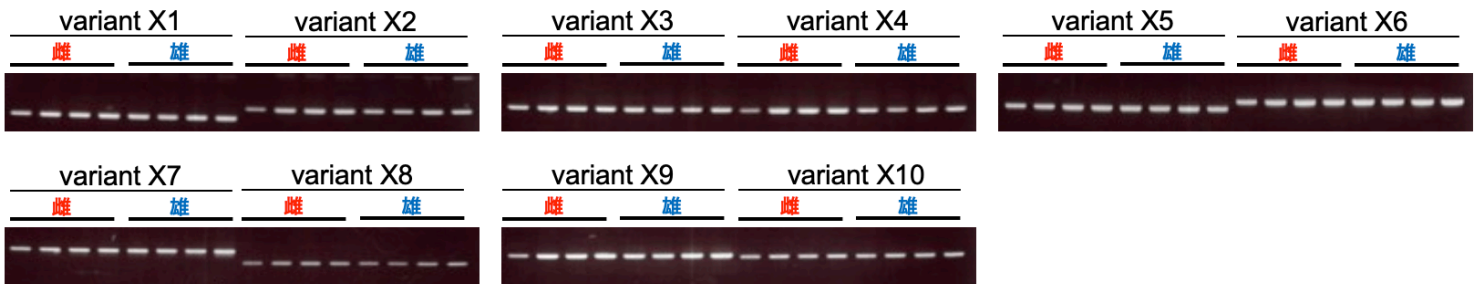


図 2-31 終齢 RNAi による *Ardsx* の KD 時期が性分化に及ぼす影響

今回の研究により予想される組織の性決定が起こる時期と性分化が起こる時期を矢印で示す。赤色は発生過程における *Ardsx* が KD されている時期を示す。



**B**



## 図 2-32 カブラハバチにおける *fruitless* ホモログの発現解析

(A)カブラハバチゲノムから同定された *fruitless* ホモログ (*Arfru* と命名) のスプライシングバリエーションの構造。

これらの転写物は、"Athalia rosa sex determination protein fruitless" と定義された予測遺伝子 LOC105688642 に由来する。

各バリエーションの mRNA の配列は、XM\_012405117.2 (variant X1), XM\_012405117.8.2 (variant X2), XM\_012405126.2 (variant X9), XM\_012405121.2 (variant X4), XM\_012405128.2 (variant X10), XM\_012405120.2 (variant X3), XM\_020853877.1 (variant X5), XM\_012405124.2 (variant X7), XM\_012405123.2 (variant X8), and XM\_012405122.2 (variant X6) を参考とした。

黒のボックスは ORF、白のボックスは UTR を示す。矢印は B の RT-PCR に用いたプライマーの位置を示す。

(B) 羽化 1 週間後の成虫の頭部における *Arfru* の発現パターンを RT-PCR により調べた結果。雌雄それぞれ 4 匹を RT-PCR に供試した。

target gene	primers	sequence(5'→3')
<i>Ardsx</i>	ArdsxFMF1	AAAGATGCACAAGCCGATTTG
	ArdsxFMR1	GGCTGATGAACAAGGCTCATC
	Ardsx1	CATAATGGATCAAACGACAAC
	Ardsx2	GACGTGATTATCCCGATAAAT
	Ardsx7	TTATCCCGATAAATCGTATAAATCTTC
<i>Arfru</i>	Fru X1 F	GAGACGCAAACCAGTGCAAG
	Fru X1 R	TGCTGGCGATACGCATTAGA
	Fru X2 F	CCCAACCCTACATCACACCC
	Fru X2 R	TGCCTCTGCCCTCTCATTA
	Fru X3 F	CCCAACCCTACATCACACCC
	Fru X3 R	GCTTGACCTGTGAAGGTTG
	Fru X4 F	CCCAACCCTACATCACACCC
	Fru X4 R	CCTACATCCGATACCGGCAC
	Fru X5 F	GTTTGCGAAAGGGCCCATAG
	Fru X5 R	CTTGCACTGGTTTGCGTCTC
	Fru X6 F	CAACGTGTTCAAGTGTACCT
	Fru X6 R	CTGCGCTAAACTATGGGCCT
	Fru X7 F	AAGGGTTGCTTGTATCCGCA
	Fru X7 R	TCTCTGACTCAGGGGATGGG
	Fru X8 F	AGAGATTGTGGAGGTTGGGAC
	Fru X8 R	TTTGCAATGCTTCCGCAGTC
	Fru X9 F	CCCAACCCTACATCACACCC
	Fru X9 R	GTGCAGGACTGCTCAAGGAT
	Fru X10 F	TGAGCTCAAGCATTGGAGGA
	Fru X10 R	TGTTAAGCTGAGCGCTACGA
<i>elongation factor 1<math>\alpha</math></i>	ArEF1-LP	CTTCACTCTTGGTGTCAAGCAGCTC
	ArEF1-RP	ACATCCTGAAGAGGAAGACGGAGAG

target gene	primers	sequence(5'→3')
<i>Ardsx</i>	Ardsx Real Time F1	GCGGGTCAAATGGATTCCAAC
	Ardsx Real Time R1	GCCCTTCTGAGTGCAGTTTGC
<i>elongation factor 1<math>\alpha</math></i>	ArEF1-LP	CTTCACTCTTGGTGTCAAGCAGCTC
	ArEF1-RP	ACATCCTGAAGAGGAAGACGGAGAG

target gene	primers	sequence(5'→3')
<i>Ardsx</i>	ArdsxRACEF1	ACTGCAACTGCTATTGCGCGTATCG
	ArdsxRACER1	CCGAACGTGGGTCCACCTGTTCTTC
	ArdsxRACEF2	CGCAGTGATATGTGCAGCAGAATCG
	ArdsxRACER2	GCAGTTTGCAGCGCCATAACTCTTTG
	ArdsxRACEF3	GCGCCATTTTGGCCTGTGCGATAATAC
	ArdsxRACER3	CAACGCGCACAATTCGGTGGTGTAC
	Ardsx4-2F1	CGTCGCGCGTTTTCAAAGAC
	Ardsx3-2F1	GCTGTGTGGTCGTCGTTCAAG
	Ardsx3-3F1	ACACTCTGCCGCATGCATTTTC
	Ardsx3-1F1	GAGTTACCGACTGCATGGAAG
	Ardsx4-1F1	AGTTTGATACGGCTACCGTTC
	Ardsx3-5F1	TTGGTGGCAATTGACTGAAAG
	Ardsx3-6F1	CGCGCATCGGAGGTTTCGCAAC

target gene	primers	sequence(5'→3')
<i>Ardsx</i>	ArdsxdsRNAF1	CCGGATCCTAATACGACTCACTATA
		GGGCGGAAGAACAGGTGGACCCAC
	ArdsxdsRNAR1	CCGGATCCTAATACGACTCACTATA
		GGGCGCAATTCGTCGAGATGCTTC
	ArdsxdsRNAF2	CCGGATCCTAATACGACTCACTATAG
		GGCGCTGACTTCACTGCTGCAGCGC

---

## 第三章

### カブラハバチ *transformer-2* (*Artra-2*) の機能解析

---

本章は東京大学が認める「やむを得ない事由」にある「博士論文の全部または一部が、単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定」に該当するため、インターネットでの公表をすることができません。



---

## 第四章

### カブラハバチにおける性決定マスター遺伝子の探索

---

本章は東京大学が認める「やむを得ない事由」にある「博士論文の全部または一部が、単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定」に該当するため、インターネットでの公表をすることができません

---

## 総合考察

本章は東京大学が認める「やむを得ない事由」にある「博士論文の全部または一部が、単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定」に該当するため、インターネットでの公表をすることができません

---

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、この6年間、昆虫の飼育から研究内容まで多くの場面において、終始ご丁寧なご指導ご鞭撻を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 鈴木雅京准教授に心より感謝を申し上げます。また、貴重なご助言を頂きました同研究科 青木不学教授に深く感謝致します。

また、本論文を作成するにあたり、国立研究開発法人農業・食品生産技術総合研究機構、畠山正統上級研究員、並びに炭谷めぐみ研究員には、実験の試料であるカブラハバチを提供して頂いただけでなく、研究においても多くのご助言を頂き深く感謝申し上げます。

最後に、よりよい研究のため一緒に切磋琢磨した資源制御学分野のみなさんに深く感謝申し上げます。

---

## 参考文献

- Akagi,T., I. M. Henry, R. Tao and L. Comai. 2014. "Plant Genetics. A Y-Chromosome-Encoded Small RNA Acts as a Sex Determinant in Persimmons." *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 346. No. 6209. pp. 646-650.
- Anand,A., A. Villella, L. C. Ryner. 2001. "Molecular Genetic Dissection of the Sex-Specific and Vital Functions of the Drosophila Melanogaster Sex Determination Gene Fruitless." *Genetics*. Vol. 158. No. 4. pp. 1569-1595.
- Bertossa,R. C., L. van de Zande and L. W. Beukeboom. 2009. "The Fruitless Gene in Nasonia Displays Complex Sex-Specific Splicing and Contains New Zinc Finger Domains." *Molecular biology and evolution*. Vol. 26. No. 7. pp. 1557-1569.
- Beukeboom,L. W., A. Kamping and L. van de Zande. 2007. "Sex Determination in the Haplodiploid Wasp Nasonia Vitripennis (Hymenoptera: Chalcidoidea): A Critical Consideration of Models and Evidence." *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 18. No. 3. pp. 371-378.
- Beye,M., M. Hasselmann, M. K. Fondrk, R. E. Page and S. W. Omholt. 2003. "The Gene Csd is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein." *Cell*. Vol. 114. No. 4. pp. 419-429.
- Biewer,M., F. Schlesinger and M. Hasselmann. 2015. "The Evolutionary Dynamics of Major Regulators for Sexual Development among Hymenoptera Species." *Frontiers in genetics*. Vol. 6. pp. 124.
- Billeter,J. C., A. Villella, J. B. Allendorfer. 2006. "Isoform-Specific Control of Male Neuronal Differentiation and Behavior in Drosophila by the Fruitless Gene." *Current biology : CB*. Vol. 16. No. 11. pp. 1063-1076.
- Boerjan,B., J. Tobback, A. De Loof, L. Schoofs and R. Huybrechts. 2011. "Fruitless RNAi Knockdown in Males Interferes with Copulation Success in Schistocerca Gregaria." *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol. 41. No. 5. pp. 340-347.
- B Bownes, M. 1992. "Molecular aspects of sex determination in insect. In: Insect" Molecular Science, Crampton, J. M.and Eggleston, P. (eds), Academic Press, London pp. 76-100.

- 
- Bridges, C. B. 1921. "Triploid Intersexes in *Drosophila Melanogaster*." *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 54. No. 1394. pp. 252-254.
- Cao, W., S. F. Jamison and M. A. Garcia-Blanco. 1997. "Both Phosphorylation and Dephosphorylation of ASF/SF2 are Required for Pre-mRNA Splicing in Vitro." *RNA (New York, N.Y.)*. Vol. 3. No. 12. pp. 1456-1467.
- Carpenter, S., D. Aiello, M. K. Atianand. 2013. "A Long Noncoding RNA Mediates both Activation and Repression of Immune Response Genes." *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 341. No. 6147. pp. 789-792.
- Clynen, E., L. Ciudad, X. Belles and M. D. Piulachs. 2011. "Conservation of Fruitless' Role as Master Regulator of Male Courtship Behaviour from Cockroaches to Flies." *Development genes and evolution*. Vol. 221. No. 1. pp. 43-48.
- Cooper, D.R., Carter, G., Li, P., Patel, R., Watson, J.E. and Patel, N.A. 2014. "Long non-coding RNA NEAT1 associates with SRp40 to temporally regulate PPAR2 splicing during Adipogenesis in 3T3-L1 cells." *Genes*. Vol. 5. 1050-1063.
- Dauwalder, B., F. Amaya-Manzanares and W. Mattox. 1996. "A Human Homologue of the *Drosophila* Sex Determination Factor Transformer-2 has Conserved Splicing Regulatory Functions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 93. No. 17. pp. 9004-9009.
- Demir, E. and B. J. Dickson. 2005. "Fruitless Splicing Specifies Male Courtship Behavior in *Drosophila*." *Cell*. Vol. 121. No. 5. pp. 785-794.
- Dobson, S. L. and M. A. Tanouye. 1998. "Evidence for a Genomic Imprinting Sex Determination Mechanism in *Nasonia Vitripennis* (Hymenoptera; Chalcidoidea)." *Genetics*. Vol. 149. No. 1. pp. 233-242.
- Duchateau MJ, Hoshiba H, and Velthuis HHW, 1994. "Diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*." *Entomol Exp No*. 71. pp. 263–269.
- Erickson, J. W. and T. W. Cline. 1993. "A bZIP Protein, Sisterless-a, Collaborates with bHLH Transcription Factors Early in *Drosophila* Development to Determine Sex." *Genes & development*. Vol. 7. No. 9. pp. 1688-1702.
- Erickson, J. W. and J. J. Quintero. 2007. "Indirect Effects of Ploidy Suggest X Chromosome Dose, Not the X:A Ratio, Signals Sex in *Drosophila*." *PLoS biology*. Vol. 5. No. 12. pp. e332.

- 
- Gailey, D. A., J. C. Billeter, J. H. Liu, F. Bauzon, J. B. Allendorfer and S. F. Goodwin. 2006. "Functional Conservation of the Fruitless Male Sex-Determination Gene Across 250 Myr of Insect Evolution." *Molecular biology and evolution*. Vol. 23. No. 3. pp. 633-643.
- Gempe, T., M. Hasselmann, M. Schiott, G. Hause, M. Otte and M. Beye. 2009. "Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway." *PLoS biology*. Vol. 7. No. 10. pp. e1000222.
- Geuverink, E. and L. W. Beukeboom. 2014. "Phylogenetic Distribution and Evolutionary Dynamics of the Sex Determination Genes Doublesex and Transformer in Insects." *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*. Vol. 8. No. 1-3. pp. 38-49.
- Gomez, J. A., O. L. Wapinski, Y. W. Yang. 2013. "The NeST Long ncRNA Controls Microbial Susceptibility and Epigenetic Activation of the Interferon-Gamma Locus." *Cell*. Vol. 152. No. 4. pp. 743-754.
- Hall, A. B., S. Basu, X. Jiang. 2015. "SEX DETERMINATION. A Male-Determining Factor in the Mosquito *Aedes Aegypti*." *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 348. No. 6240. pp. 1268-1270.
- Hasselmann, M., T. Gempe, M. Schiott, C. G. Nunes-Silva, M. Otte and M. Beye. 2008. "Evidence for the Evolutionary Nascence of a Novel Sex Determination Pathway in Honeybees." *Nature*. Vol. 454. No. 7203. pp. 519-522.
- Hatakeyama M., Sawa M., Oishi K. 1990. "Ovarian development and vitellogenesis in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* Jakovlev (Hymenoptera, Tenthredinidae). *Invertebrate Reproduction & Development*. Vol. 17. No. 3. pp. 237-245
- Hediger, M., G. Burghardt, C. Siegenthaler. 2004. "Sex Determination in *Drosophila Melanogaster* and *Musca Domestica* Converges at the Level of the Terminal Regulator Doublesex." *Development genes and evolution*. Vol. 214. No. 1. pp. 29-42.
- Heinrichs, V., L. C. Ryner and B. S. Baker. 1998. "Regulation of Sex-Specific Selection of Fruitless 5' Splice Sites by Transformer and Transformer-2." *Molecular and cellular biology*. Vol. 18. No. 1. pp. 450-458.
- Hisanaga, T., K. Okahashi, S. Yamaoka. 2019. "A Cis-Acting Bidirectional Transcription Switch Controls Sexual Dimorphism in the Liverwort." *The EMBO journal*. Vol. 38. No. 6. pp. 10.15252/embj.2018100240. Epub 2019 Jan 4.
-

- 
- Hoage, T. R. and R. G. Kessel. 1968. "An Electron Microscope Study of the Process of Differentiation during Spermatogenesis in the Drone Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) with Special Reference to Centriole Replication and Elimination." *Journal of ultrastructure research*. Vol. 24. No. 1. pp. 6-32.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. "Insights into Social Insects from the Genome of the Honeybee *Apis Mellifera*." *Nature*. Vol. 443. No. 7114. pp. 931-949.
- Hoshijima, K., K. Inoue, I. Higuchi, H. Sakamoto and Y. Shimura. 1991. "Control of Doublesex Alternative Splicing by Transformer and Transformer-2 in *Drosophila*." *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 252. No. 5007. pp. 833-836.
- Imamura, K., N. Imachi, G. Akizuki. *et al.* 2014. "Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli." *Molecular cell*. Vol. 53. No. 3. pp. 393-406.
- Inoue, K., K. Hoshijima, I. Higuchi, H. Sakamoto and Y. Shimura. 1992. "Binding of the *Drosophila* Transformer and Transformer-2 Proteins to the Regulatory Elements of Doublesex Primary Transcript for Sex-Specific RNA Processing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 89. No. 17. pp. 8092-8096.
- Inoue, K., K. Hoshijima, H. Sakamoto and Y. Shimura. 1990. "Binding of the *Drosophila* Sex-Lethal Gene Product to the Alternative Splice Site of Transformer Primary Transcript." *Nature*. Vol. 344. No. 6265. pp. 461-463.
- Ito, H., K. Fujitani, K. Usui, K. Shimizu-Nishikawa, S. Tanaka and D. Yamamoto. 1996. "Sexual Orientation in *Drosophila* is Altered by the Satori Mutation in the Sex-Determination Gene Fruitless that Encodes a Zinc Finger Protein with a BTB Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 93. No. 18. pp. 9687-9692.
- Ito, Y., A. Harigai, M. Nakata. 2013. "The Role of Doublesex in the Evolution of Exaggerated Horns in the Japanese Rhinoceros Beetle." *EMBO reports*. Vol. 14. No. 6. pp. 561-567.
- Ji, Q., L. Zhang, X. Liu. 2014. "Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Tumour Growth and Metastasis in Colorectal Cancer through Binding to SFPQ and Releasing Oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 Complex." *British journal of cancer*. Vol. 111. No. 4. pp. 736-748.



- 
- Jia, L. Y., J. H. Xiao, T. L. Xiong, L. M. Niu and D. W. Huang. 2016. "The Transformer Genes in the Fig Wasp *Ceratosolen solmsi* Provide New Evidence for Duplications Independent of Complementary Sex Determination." *Insect molecular biology*. Vol. 25. No. 3. pp. 191-201.
- Jursnich, V. A. and K. C. Burtis. 1993. "A Positive Role in Differentiation for the Male Doublesex Protein of *Drosophila*." *Developmental biology*. Vol. 155. No. 1. pp. 235-249.
- Kashimada, K. and P. Koopman. 2010. "Sry: The Master Switch in Mammalian Sex Determination." *Development (Cambridge, England)*. Vol. 137. No. 23. pp. 3921-3930.
- Kato, Y., K. Kobayashi, H. Watanabe and T. Iguchi. 2011. "Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*: Deep Conservation of a Doublesex Gene in the Sex-Determining Pathway." *PLoS genetics*. Vol. 7. No. 3. pp. e1001345.
- Kato, Y., C. A. G. Perez, N. S. Mohamad Ishak. *et al.* 2018. "A 5' UTR-Overlapping LncRNA Activates the Male-Determining Gene *Doublesex1* in the Crustacean *Daphnia magna*." *Current biology : CB*. Vol. 28. No. 11. pp. 1811-1817.e4.
- Kiuchi, T., H. Koga, M. Kawamoto. 2014. "A Single Female-Specific piRNA is the Primary Determiner of Sex in the Silkworm." *Nature*. Vol. 509. No. 7502. pp. 633-636.
- Kleinhesselink, K., C. Conway, D. Sholer, I. Huang and D. A. Kimbrell. 2011. "Regulation of Hemocytes in *Drosophila* Requires Dappled Cytochrome B5." *Biochemical genetics*. Vol. 49. No. 5-6. pp. 329-351.
- Ledón-Rettig, C. C., E. E. Zattara and A. P. Moczek. 2017. "Asymmetric Interactions between Doublesex and Tissue- and Sex-Specific Target Genes Mediate Sexual Dimorphism in Beetles." *Nature communications*. Vol. 8. pp. 14593.
- Lee, G. and J. C. Hall. 2001. "Abnormalities of Male-Specific FRU Protein and Serotonin Expression in the CNS of Fruitless Mutants in *Drosophila*." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Vol. 21. No. 2. pp. 513-526.
- Lee, G., A. Vilella, B. J. Taylor and J. C. Hall. 2001. "New Reproductive Anomalies in Fruitless-Mutant *Drosophila* Males: Extreme Lengthening of Mating Durations and Infertility Correlated with Defective Serotonergic Innervation of Reproductive Organs." *Journal of neurobiology*. Vol. 47. No. 2. pp. 121-149.

- 
- Li, Z., Chao, T.C., Chang, K.Y., Lin, N., Patil, V.S., Shimizu, C., Head, S.R., Burns, J.C., Rana, T.M. 2014. "The long noncoding RNA THRIL regulates TNF $\alpha$  expression through its interaction with hnRNPL." *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 111. pp. 1002-1007.
- Lynch, K. W. and T. Maniatis. 1995. "Synergistic Interactions between Two Distinct Elements of a Regulated Splicing Enhancer." *Genes & development.* Vol. 9. No. 3. pp. 284-293.
- Lynch, K. W. and T. Maniatis. 1996. "Assembly of Specific SR Protein Complexes on Distinct Regulatory Elements of the Drosophila Doublesex Splicing Enhancer." *Genes & development.* Vol. 10. No. 16. pp. 2089-2101.
- 松岡美里. 2017. "doublesex ノックアウトカイクを用いた性分化における *Bmdsx* の機能解析." 修士論文
- Matson, C. K. and D. Zarkower. 2012. "Sex and the Singular DM Domain: Insights into Sexual Regulation, Evolution and Plasticity." *Nature reviews. Genetics.* Vol. 13. No. 3. pp. 163-174.
- Matthey-Doret, C., van der Kooij, C J, D. L. Jeffries. *et al.* 2019. "Mapping of Multiple Complementary Sex Determination Loci in a Parasitoid Wasp." *Genome biology and evolution.* Vol. 11. No. 10. pp. 2954-2962.
- 回瀬修治, 伊藤道彦. 2014. "アフリカツメガエルの性決定・性分化システム." *比較内分泌学.* Vol. 40. No. 152. pp. 71-73
- McKeown, M., J. M. Belote and R. T. Boggs. 1988. "Ectopic Expression of the Female Transformer Gene Product Leads to Female Differentiation of Chromosomally Male Drosophila." *Cell.* Vol. 53. No. 6. pp. 887-895.
- Meier, N., S. C. Kappeli, M. Hediger Niessen, J. C. Billeter, S. F. Goodwin and D. Bopp. 2013. "Genetic Control of Courtship Behavior in the Housefly: Evidence for a Conserved Bifurcation of the Sex-Determining Pathway." *PloS one.* Vol. 8. No. 4. pp. e62476.
- Moore L. K., & T. V. N. Persaud. 2003. "The developing human: " *clinically oriented embryology.* Seventh Edition.
- Murata, C., F. Yamada, N. Kawauchi, Y. Matsuda and A. Kuroiwa. 2012. "The Y Chromosome of the Okinawa Spiny Rat, Tokudaia muenninki, was Rescued through Fusion with an Autosome." *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology.* Vol. 20. No. 1. pp. 111-125.

- 
- Nagoshi,R. N. and B. S. Baker. 1990. "Regulation of Sex-Specific RNA Splicing at the *Drosophila* Doublesex Gene: Cis-Acting Mutations in Exon Sequences Alter Sex-Specific RNA Splicing Patterns." *Genes & development*. Vol. 4. No. 1. pp. 89-97.
- Nagoshi,R. N., M. McKeown, K. C. Burtis, J. M. Belote and B. S. Baker. 1988. "The Control of Alternative Splicing at Genes Regulating Sexual Differentiation in *D. Melanogaster*." *Cell*. Vol. 53. No. 2. pp. 229-236.
- Naito, T. and Suzuki, H. 1991. "sex determination in the sawfly *Athalia rosae ufcornis*: occurrence of triploid male." *J. Hered.* Vol. 82. pp. 101-104.
- Nissen,I., M. Muller and M. Beye. 2012. "The Am-Tra2 Gene is an Essential Regulator of Female Splice Regulation at Two Levels of the Sex Determination Hierarchy of the Honeybee." *Genetics*. Vol. 192. No. 3. pp. 1015-1026.
- Oeyen,J. P., P. Baa-Puyoulet, J. B. Benoit. *et al.* 2020. "Sawfly Genomes Reveal Evolutionary Acquisitions that Fostered the Mega-Radiation of Parasitoid and Eusocial Hymenoptera." *Genome biology and evolution*. Vol. 12. No. 7. pp. 1099-1118.
- Ouyang,J., X. Zhu, Y. Chen. 2014. "NRAV, a Long Noncoding RNA, Modulates Antiviral Responses through Suppression of Interferon-Stimulated Gene Transcription." *Cell host & microbe*. Vol. 16. No. 5. pp. 616-626.
- Pan,Y. and B. S. Baker. 2014. "Genetic Identification and Separation of Innate and Experience-Dependent Courtship Behaviors in *Drosophila*." *Cell*. Vol. 156. No. 1-2. pp. 236-248.
- Poirie, M., Periquet, G. and Beukeboom, L. W. 1993. "The hymenopteran way of determining sex." *Semin. Dev. Biol.* Vol. 3. pp. 357-361.
- Raymond,C. S., C. E. Shamu, M. M. Shen. 1998. "Evidence for Evolutionary Conservation of Sex-Determining Genes." *Nature*. Vol. 391. No. 6668. pp. 691-695.
- Rideout,E. J., J. C. Billeter and S. F. Goodwin. 2007. "The Sex-Determination Genes Fruitless and Doublesex Specify a Neural Substrate Required for Courtship Song." *Current biology : CB*. Vol. 17. No. 17. pp. 1473-1478.
- Ross,K. G., E. L. Vargo, L. Keller and J. C. Trager. 1993. "Effect of a Founder Event on Variation in the Genetic Sex-Determining System of the Fire Ant *Solenopsis Invicta*." *Genetics*. Vol. 135. No. 3. pp. 843-854.

- 
- Ryner, L. C., S. F. Goodwin, D. H. Castrillon. 1996. "Control of Male Sexual Behavior and Sexual Orientation in *Drosophila* by the Fruitless Gene." *Cell*. Vol. 87. No. 6. pp. 1079-1089.
- Salvemini, M., R. D'Amato, V. Petrella. 2013. "The Orthologue of the Fruitfly Sex Behaviour Gene Fruitless in the Mosquito *Aedes Aegypti*: Evolution of Genomic Organisation and Alternative Splicing." *PloS one*. Vol. 8. No. 2. pp. e48554.
- Salz, H. K., E. M. Maine, L. N. Keyes, M. E. Samuels, T. W. Cline and P. Schedl. 1989. "The *Drosophila* Female-Specific Sex-Determination Gene, Sex-Lethal, has Stage-, Tissue-, and Sex-Specific RNAs Suggesting Multiple Modes of Regulation." *Genes & development*. Vol. 3. No. 5. pp. 708-719.
- Sawa, M., Oishi, K. 1989. "Studies on the Sawfly, *Athalia rosae* (Insecta, Hymenoptera, Tenthredinidae). II. Experiment Activation of Mature Unfertilized Eggs." *Zoological Science*. Vol. 6. No. 3. pp. 549-556
- Schenkman, J., B. Jansson, I. 2003. "The many roles of cytochrome b5." *Pharmacol Ther* Vol. 97. pp. 139-152.
- Schmieder, S., D. Colinet and M. Poirie. 2012. "Tracing Back the Nascence of a New Sex-Determination Pathway to the Ancestor of Bees and Ants." *Nature communications*. Vol. 3. pp. 895.
- Sekine, K., T. Furusawa and M. Hatakeyama. 2015. "The Boule Gene is Essential for Spermatogenesis of Haploid Insect Male." *Developmental biology*. Vol. 399. No. 1. pp. 154-163.
- Sutou, S., Y. Mitsui and K. Tsuchiya. 2001. "Sex Determination without the Y Chromosome in Two Japanese Rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis* Spp." *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. Vol. 12. No. 1. pp. 17-21.
- Suzuki, M. G., F. Ohbayashi, K. Mita and T. Shimada. 2001. "The Mechanism of Sex-Specific Splicing at the Doublesex Gene is Different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*." *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol. 31. No. 12. pp. 1201-1211.
- Suzuki, M. G., K. Suzuki, F. Aoki and M. Ajimura. 2012. "Effect of RNAi-Mediated Knockdown of the *Bombyx mori* Transformer-2 Gene on the Sex-Specific Splicing of

- 
- Bmdsx Pre-mRNA." *The International journal of developmental biology*. Vol. 56. No. 9. pp. 693-699.
- Usui-Aoki,K., H. Ito, K. Ui-Tei. 2000. "Formation of the Male-Specific Muscle in Female *Drosophila* by Ectopic Fruitless Expression." *Nature cell biology*. Vol. 2. No. 8. pp. 500-506.
- Verhulst,E. C., L. W. Beukeboom and L. van de Zande. 2010. "Maternal Control of Haplodiploid Sex Determination in the Wasp *Nasonia*." *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 328. No. 5978. pp. 620-623.
- Villella,A. and J. C. Hall. 1996. "Courtship Anomalies Caused by Doublesex Mutations in *Drosophila Melanogaster*." *Genetics*. Vol. 143. No. 1. pp. 331-344.
- Wexler,J., E. K. Delaney, X. Belles. 2019. "Hemimetabolous Insects Elucidate the Origin of Sexual Development Via Alternative Splicing." *eLife*. Vol. 8. pp. 10.7554/eLife.47490.
- Whiting,P. W. 1943. "Multiple Alleles in Complementary Sex Determination of *Habrobracon*." *Genetics*. Vol. 28. No. 5. pp. 365-382.
- Wilkins,A. S. 1995. "Moving Up the Hierarchy: A Hypothesis on the Evolution of a Genetic Sex Determination Pathway." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. Vol. 17. No. 1. pp. 71-77.
- Xiao,S. H. and J. L. Manley. 1997. "Phosphorylation of the ASF/SF2 RS Domain Affects both Protein-Protein and Protein-RNA Interactions and is Necessary for Splicing." *Genes & development*. Vol. 11. No. 3. pp. 334-344.
- Xiao,S. H. and J. L. Manley. 1998. "Phosphorylation-Dephosphorylation Differentially Affects Activities of Splicing Factor ASF/SF2." *The EMBO journal*. Vol. 17. No. 21. pp. 6359-6367.
- Yoshiyama,N., K. Tojo and M. Hatakeyama. 2013. "A Survey of the Effectiveness of Non-Cell Autonomous RNAi Throughout Development in the Sawfly, *Athalia Rosae* (Hymenoptera)." *Journal of insect physiology*. Vol. 59. No. 4. pp. 400-407.
- Zareba,J., P. Blazej, A. Laszkiewicz, et al. 2017. "Uneven Distribution of Complementary Sex Determiner (*Csd*) Alleles in *Apis Mellifera* Population." *Scientific reports*. Vol. 7. No. 1. pp. 2317-9.
- Zhuo,J. C., Q. L. Hu, H. H. Zhang, M. Q. Zhang, S. B. Jo and C. X. Zhang. 2018. "Identification and Functional Analysis of the Doublesex Gene in the Sexual

---

Development of a Hemimetabolous Insect, the Brown Planthopper." *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol. 102. pp. 31-42.