

細胞内共生細菌 *Wolbachia* が
宿主アズキノメイガの性決定に与える影響に関する研究

杉本 貴史

学位論文

細胞内共生細菌 *Wolbachia* が
宿主アズキノメイガの性決定に与える影響に関する研究

東京大学大学院 博士課程

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

応用昆虫学研究室 杉本 貴史

指導教官 石川 幸男

2010 年 12 月 提出

目次

序文	1
第1章 <i>O.scapulalis</i> における <i>doublesex</i> 遺伝子 homolog の同定	
諸言	1 3
実験材料および方法	1 5
実験結果	2 0
考察	2 5
第2章 <i>Wolbachia</i> が誘導する性モザイクの性決定遺伝子 <i>Osdsex</i> の発現解析	
諸言	3 1
実験材料および方法	3 3
実験結果	3 7
考察	4 2
第3章 male-killing を引き起こす <i>Wolbachia</i> は宿主の性決定遺伝子を代替する	
諸言	4 5
実験材料および考察	4 7
実験結果	5 0
考察	5 6

第4章 高温処理による <i>Wolbachia</i> 密度の変化と次世代の性比の関係	
諸言	6 1
材料および考察	6 3
結果	6 5
考察	7 5
総合考察	7 7
謝辞	8 9
引用文献	9 1
摘要	1 0 3

序文

細胞内共生細菌 *Wolbachia* は、宿主の生殖を利己的に操作することで知られるが、その現象の面白さのみならず、害虫防除、天敵の効率的な生産など応用の観点からも注目されている。また、*Wolbachia* による生殖操作と性決定機構やエピジェネティクスの関係も指摘されており、それらの研究を発展させるためのツールとしても期待できる。ここでは、研究の背景となる *Wolbachia* による生殖操作および昆虫の性決定機構についての知見をまとめ、本研究の概要を述べる。

細胞内共生細菌 *Wolbachia* について

Wolbachia 属の細菌（以下、*Wolbachia* と略す）は、 α -proteobacteria に属するリケッチアに近縁な細胞内共生細菌で、非常に広範囲の節足動物およびセンチュウで感染が確認されている（Stouthamer et al., 1999）。とくに昆虫では、複数の研究を統合して解析した結果から、66%にも及ぶ昆虫種が *Wolbachia* に感染していると見積もられている（Hilgenboecker et al., 2008）。*Wolbachia* が非常に広範囲の昆虫に広まった背景には、宿主の生殖を操作することによって自身の感染拡大を有利にする *Wolbachia* の戦略が存在する（Werren et al., 2008）。

Wolbachia は主に宿主の細胞質を通じた母子感染によって、*Wolbachia* 感染メスから次世代へ垂直感染する。一般にオスの配偶子である精子には細胞質がほとんどなく、*Wolbachia* はオスを経由しては次世代に伝搬できない。すなわち、メス親からオスの子に伝搬した *Wolbachia* は次世代に感染拡大することができず『行き止まり』となる（Charlat et al., 2003）。このような背景のもと、*Wolbachia* はしばしば、個体群内での非感染メスの繁殖を不利にすることや、自身を次世代に伝えることのできないオス個体

の生存をメスに比べて不利にすることで、次世代に向けて有利に自身の感染を拡大しようとしている (Mercot and Poinso, 2009)。

非感染メスの繁殖を不利にする生殖操作として、細胞質不和合性 (cytoplasmic incompatibility, CI)が知られている (Figure 0.1a)。CIは *Wolbachia* 非感染のメスが *Wolbachia* 感染オスと交尾したとき、その子が致死となる現象である (Poinso et al., 2003)。そのため、*Wolbachia* 感染オスと交尾するメスは、*Wolbachia* に感染していないと子孫を残せなくなり、感染メスと非感染メスが混じっている状況下では、感染メスのほうが子孫を残しやすくなる (Marcot and Poinso, 2009)。これは、非感染メスのみが不利益を受ける一方的な不和合現象である (Vavre et al., 2009)。 *Wolbachia* 感染によって CI が引き起こされる事例は、非常に広範囲の節足動物で報告されており、 *Wolbachia* が引き起こす生殖操作の中でもっとも一般的な現象と言える (Charlat et al., 2001)。

Wolbachia 感染個体において、オス個体の生存をメスに比べて不利にする現象についてはいくつかの機構が報告されている。代表的なものとして、オス殺し (male-killing)、遺伝的オスのメス化 (feminization)、産雌性単為生殖の誘導 (thelytokous parthenogenesis induction, TPI) が知られている。

Male-killing は、 *Wolbachia* 感染メスの子において、オスのみが致死となり、次世代でメスのみが発生する現象である (Figure 0.1b)。 *Wolbachia* による male-killing はこれまでに双翅目昆虫、鱗翅目昆虫、鞘翅目昆虫で報告されている (Williamson et al., 1999; Hurst et al., 1999, 2000)。生まれてくる子の数が減るため、子の間での資源競争が緩和されることや、共通の親を持つオスが存在しないため、近親交配が起こらなくなることで、娘の適応度を非感染個体よりも上げる戦略である (Mercot and Poinso, 2009)。

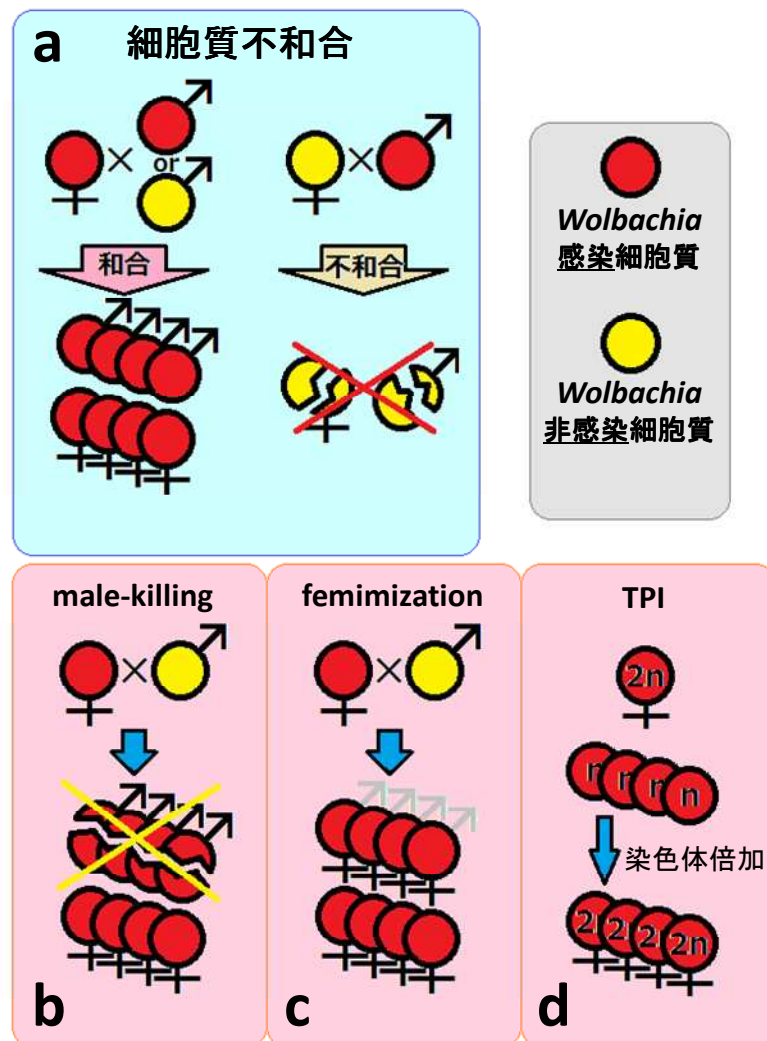


Figure 0.1 *Wolbachia* による各種生殖操作の模式図

a) 細胞質不和合 (CI): *Wolbachia* 非感染メスと *Wolbachia* 感染オスが交尾した際に、その子が不妊化する。b) オス殺し (male-killing): *Wolbachia* 感染メスの子において、遺伝的オスが特異的に致死となる。c) 遺伝的オスのメス化 (feminization): *Wolbachia* 感染メスの子において、遺伝的オスがメス化される。d) 産雌性単為生殖 (TPI): *Wolbachia* 感染メスが交尾しなくても次世代を残せるようになる。a) は非感染メスの生存を不利にさせる戦略であり、b-d) は *Wolbachia* 感染個体を効率よく増殖させるための戦略である。

2009)。卵塊で産卵する虫や、資源量に対して過剰に産卵する虫では、次の feminization と同等の効果が期待できる。

Feminization は、*Wolbachia* 感染メスの子において、遺伝的オスがメス化される現象である (Figure 0.1c)。結果として、*Wolbachia* 感染メスは、細胞質を次世代に伝達させるのに有効な娘を、*Wolbachia* 非感染メスの 2 倍生産することが可能になり、1 : 1 の性比で子を産むよりも効率よく *Wolbachia* 感染メスを増やすことができる (Charlat et al., 2003)。*Wolbachia* による feminization は甲殻類、鱗翅目昆虫、半翅目昆虫で報告されている (Bouchon et al., 1998; Hiroki et al., 2002; Negri et al., 2006)。

TPI は、単数倍数性の性決定システムを持つ膜翅目昆虫、総翅目昆虫で報告がある (Stouthamer et al., 1993; Arakaki et al., 2001)。これらの昆虫では、通常、交尾済みメスが産んだ受精卵のみが二倍体のメスを産生し、未受精卵は半数体のオスになる (畠山, 2003)。しかし、*Wolbachia* が引き起こす TPI では、*Wolbachia* の感染により未受精卵の染色体の倍化が起こり、メスの産生が誘導される (Figure 0.1d)。単為生殖によって効率よく *Wolbachia* 感染メスを生産することで、*Wolbachia* を次世代に効率よく伝搬させることができる (Werren et al., 2008)。

これらの生殖操作は、現象としては大きく異なるように見えるが、*Wolbachia* の系統と生殖操作の表現型の間にはあまり相関がない。特に CI と TPI は非常に近縁な *Wolbachia* 間でも多様に変化していることが知られている (Werren et al., 1995)。また、male-killing を引き起こす *Wolbachia* に感染したショウジョウバエの一種 *Drosophila bifasciata* では、温度処理によって致死を免れた *Wolbachia* 感染オスが、弱い CI を引き起こすことが報告されている (Hurst et al., 2000)。スジマダラメイガ *Cadra cautella* に感染し CI を引き起こす *Wolbachia* は、スジコナマダラメイガ *Ephestia kuehniella*

に移植した際に male-killing を引き起こす (Sasaki et al., 2002)。アズキノメイガ *Ostrinia scapularis* で male-killing を引き起こす *Wolbachia* は、同時に不完全な feminization を行っていることが示されている (Kageyama et al., 2003a, 2003b; Kageyama and Traut, 2004)。このように、*Wolbachia* による生殖操作は、それぞれに関連があるように見えることから、類似した機構が関与している可能性が考えられる。とりわけ、性比を偏らせる生殖操作は、性特異的な因子に働きかける必要があり、その候補として性決定機構や性決定機構の影響を受ける因子が挙げられる (Charlat et al., 2003)。また性比を偏らせない CI に関しても、性決定に関わる因子との関係が示された例が報告されている (Starr and Cline, 2002)。

Wolbachia によるアズキノメイガの性比異常現象について

アズキノメイガ *Ostrinia scapularis* はツトガ科 Crambidae ノメイガ亜科 Pyraustinae アワノメイガ属 *Ostrinia* に属するガの一種で、アズキやホップの害虫として知られる。アワノメイガ属には、トウモロコシの害虫として有名なアワノメイガ *Ostrinia furnacalis* やヨーロッパアワノメイガ *Ostrinia nubilalis* などが含まれる。世界で 21 種が記載されており、日本国内にはそのうち 8 種の生息が確認されている (Mutuura and Munroe, 1970; 大野, 2003)。

アズキノメイガに近縁なアワノメイガでは、1980 年代からすでに子の性比がメスに大きく偏る現象が確認されていた (宮原, 1984) が、最近、これは共生細菌 *Wolbachia* が引き起こす性比異常現象であることが示された (Kageyama et al., 1998, 2002; Sakamoto et al., 2007)。その後、アズキノメイガでも性比異常現象が発見され、ともに、遺伝的オスのみが致死となる male-killing 現象によって性比がメスに偏っているこ

とが示された (Kageyama et al., 2004)。アワノメイガ属ではこの2種以外にも、オナモミノメイガ *Ostrinia orientalis* およびフキノメイガ *Ostrinia zaguliaevi* で *Wolbachia* 感染による性比異常現象が確認されている (Kageyama et al., 2004)。興味深いことに、マルバネキノメイガ *Ostrinia ovalipennis* では性比異常を伴わない *Wolbachia* の感染が報告されており、感染オスの存在も確認されている (大野, 2003)

Wolbachia がアズキノメイガで引き起こす male-killing は独特である (Figure 0.2)。通常、*Wolbachia* によって引き起こされる male-killing 現象では、抗生物質処理によって *Wolbachia* を除くと、*Wolbachia* が原因で致死となっているオスが生存可能となるため、性比は 1 : 1 に戻る (Hurst et al., 1997; Jiggins et al., 2000; Mitsuhashi et al., 2004)。しかし、アズキノメイガでは抗生物質によって *Wolbachia* を除去すると、オスが生存できるようになるかわりに、メスが致死となることが知られている (Kageyama, 2002; Kageyama and Traut, 2004)。また、*Wolbachia* 感染アズキノメイガを成虫期に抗生物質処理することで雌雄の特徴が入り混じった性モザイク個体が出現するが、この性モザイク個体はすべて遺伝的にオスの個体であることが確認されている (Kageyama et al., 2003; Kageyama and Traut, 2004)。

昆虫の性決定機構について

昆虫の性決定機構はキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* において詳細な研究がなされている (Figure 0.3a)。*D. melanogaster* は、通常 XX/XY 型の性染色体を持ち、性染色体の組合せが XY のヘテロ型となるときオスになり、XX のホモ型となるときメスになる (Bridges, 1921)。Y 染色体はオスの性成熟に必要なではあるが、性決定にとっては重要な因子ではない (Casper and Doren, 2006)。*D. melanogaster* の

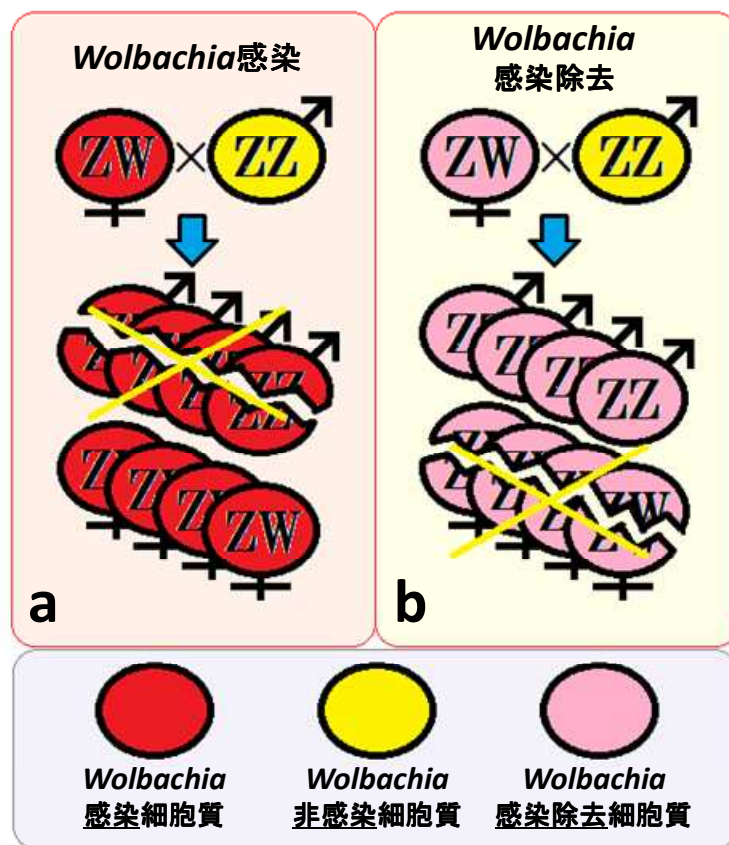


Figure 0.2 *Wolbachia* 感染によるアズキノメイガの性比異常現象の模式図

a) *Wolbachia* に感染したアズキノメイガ *Ostrinia scapulalis* のメスの子では、遺伝的オスが特異的に致死となる male-killing が起こっている。b) 抗生物質処理によって感染メスから *Wolbachia* を除去した際には、逆に、その次世代で遺伝的メスが特異的に致死となる。

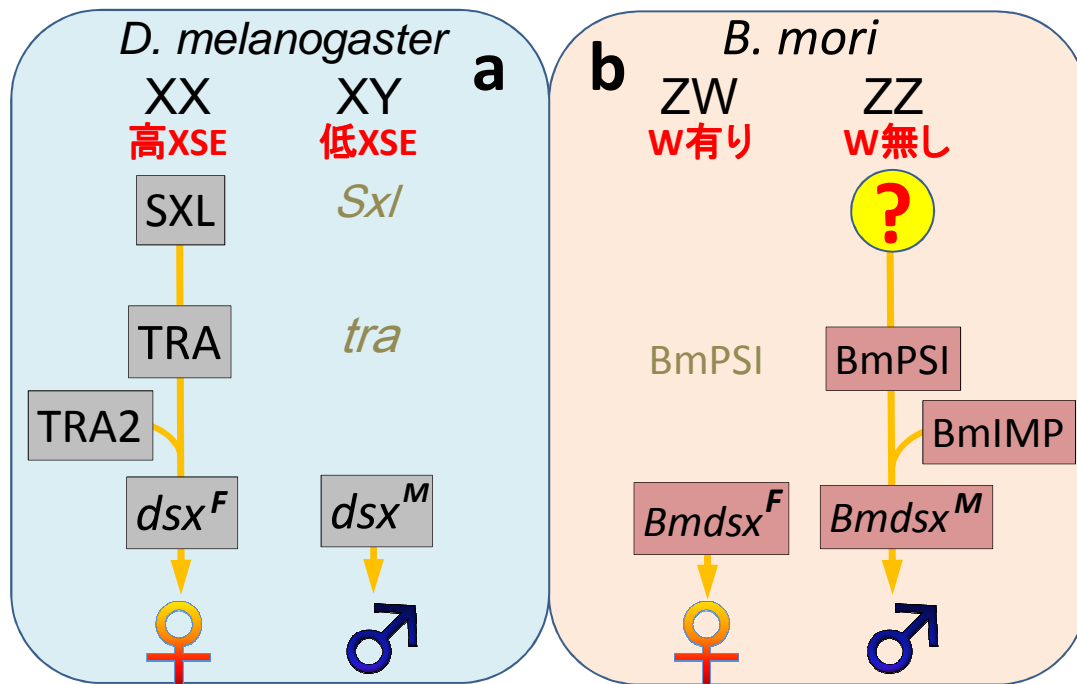


Figure 0.3 *D. melanogaster* および *B. mori* における性決定機構の模式図

a) *D. melanogaster* では、XSE 複合タンパク質が高濃度で存在するとき、メス型 Sxl の発現が誘導され、その翻訳産物 SXL はメス型の tra の発現を誘導する。その翻訳産物 TRA は TRA2 と複合体を形成して dsx^F の発現を誘導する。その産物である DSX^F がメス型の組織分化を促す。逆に、XSE 複合タンパク質が低濃度の場合、タンパク質をコードしないオス型 Sxl が発現する。その場合、下流の tra も機能を持たず、デフォルトの状態では dsx^M が発現し、その産物である DSX^M がオス型の組織分化を促す。b) *B. mori* では、W 染色体が存在する場合に、その下流の性決定遺伝子の発現が抑制され、デフォルトの状態では $Bmdsx^F$ が発現し、その産物である BmDSX^F がメス型の組織分化を促す。W 染色体が存在しない場合には、未知の遺伝子発現を経て、BmIMP によって BmPSI の $Bmdsx$ への結合が促進されることで $Bmdsx$ のオス特異的なスプライシングが誘導され、その産物である BmDSX^M によってオス型の組織分化が促される。

性は X 染色体の数によって決まるが、X 染色体の数は、X 染色体に座する 4 つの遺伝子 *sisA*, *scute*, *unpaired*, *runt* の翻訳産物の複合体である X-linked signal element (XSE) のレベルに依存し、性染色体が XX となるメスでは、XSE レベルが一定以上となり、タンパク質をコードした *Sex-lethal (Sxl)* が誘導され、機能をもつ SXL タンパク質が作られる。性染色体が XY となるオスでは XSE タンパク質群の量が閾値に達しないため、機能をもつ SXL は作られない (Salz and Erickson, 2010)。機能をもった SXL は、その下流に位置する性決定因子 *transformer (tra)* の mRNA 前駆体における選択的スプライシングを制御し、その *tra* からは機能をもつ TRA タンパク質が作られる。SXL の制御がない状態でも *tra* 遺伝子は発現するが、この場合は機能をもつ TRA は作られない。機能をもつ TRA タンパク質は、TRA2 と結合して、その下流に位置する *doublesex* 遺伝子 (*dsx*) の選択的スプライシングを操作し、メス型の DSX を誘導する。TRA もしくは TRA 2 が不在状況では、デフォルト型のオス型 DSX が誘導される (Sanchez, 2010)。雌雄それぞれのタイプの DSX は組織の性的二型の分化に直接関与している (Coschigano and Wensink, 1993, An and Wensink, 1995)。この、性染色体構成にはじまって、最下流の *dsx* 発現によって体細胞の性が決定されるまでの一連の流れを、体細胞の性決定カスケードと呼ぶ。

一方、鱗翅目昆虫の性決定機構では、*B. mori* における研究から、*D. melanogaster* と大きく異なっていることが明らかになってきている (Figure 0.3b)。まず、*B. mori* は、雌ヘテロの ZZ/ZW 型の性染色体構成を持つが、最初の性決定シグナルは W 染色体上に座乗する *Fem* 遺伝子であり、Z 染色体の数は性決定には無関係である (Fujii and Shimada, 2007)。*Fem* 遺伝子の下流にある因子はまだわかっていないが、*D. melanogaster* において性決定のマスタースイッチとなっている *Sxl* のホモログは *B.*

*mori*では性決定には関わっていないと考えられる (Niimi et al., 2006; Traut et al., 2006)。また、*D. melanogaster*では *Sxl*の下流に位置する *tra*についても、*tra*の下流因子である *dsx*の *B. mori*におけるホモログ *Bmdsx*に TRA/TRA2 結合領域が存在しないため、*tra*や *tra2*は性決定に関わっていないと考えられる (Suzuki et al., 2001)。*B. mori*の性決定遺伝子は、上流因子についてはあまりわかってないが、比較的下流に位置する因子については研究が進んでいる。*Bmdsx*では、メス特異的 exon には、CE1 と呼ばれる領域が存在し、CE1 領域に BmPSI が結合した場合にメス特異的 exon のスキップが起こり、結果としてオス型の *Bmdsx*発現が誘導される (Suzuki et al., 2008)。このとき、BmPSI と CE1 領域が結合するためには BmIMP が必要であり、BmIMP を阻害するとメス型の *Bmdsx*発現量が増加する (Suzuki et al., 2010)。

*D. melanogaster*と *B. mori*の比較から推測されるとおり、昆虫の性決定機構は多様に変化している。*D. melanogaster*では X 染色体の数が性決定に重要な役割を果たしているが、チチュウカイミバエ *Ceratitis capitata*では Y 染色体上に座乗する male-determination factor が性決定を誘導する (Willhoeft and Gerald, 1996)。また、半翅目昆虫では単数倍数性の性決定様式を持ち、母の染色体のみを 1 セット受けついで単数性の未受精卵からはオスが生まれ、両親の染色体を 1 セットずつ受け継いだ倍数性の受精卵からはメスが産まれる (Cook, 1993)。このように性的 2 型を決定する最初のシグナルは昆虫内で非常に多様であるばかりでなく、イエバエ *Musca domestica*における研究から、容易に変化し、多様な機構を可能にすることが示されている (Dubendorfer et al., 2002)。*D. melanogaster*では性染色体からのシグナルを受けて性決定のマスタースイッチとして働く *Sxl*についても、性決定の調節遺伝子としての役割を持つのは双翅目の中でも *Drosophila* 属のみである (Sanchez, 2010)。また、昆虫以

外の生物では *dsx* のスプライシングを促す因子としての *tra* は確認されない (Kato et al., 2010)。

これらの因子が多様である一方で、性決定カスケードの最下流に位置する *dsx* は広範囲の生物間で普遍的に存在する因子として知られる。これまでに多くの昆虫で *dsx* のホモログが発見されてきたが、すべての昆虫で、選択的スプライシングにより雌雄で異なった mRNA アイソフォームが生産される。これらのアイソフォームは C 末端側に雌雄で異なる配列を持つ、雌雄特異的な DSX タンパク質をコードしている (Sanchez, 2010)。また、昆虫以外の生物でも、無脊椎動物のみならず脊椎動物に至るまで、非常に広範囲の生物で性決定機能への関与が指摘されている (Verhulst et al., 2010)。また、その構造を持つ機能は、種を隔てて保存性が高く、*D. melanogaster* の *dsx* とセンチュウ *Caenorhabditis elegans* の *dsx* ホモログである *mab-3* を入れ替えても、性決定能は保持されることが報告されている (Raymond et al., 1998)。

本研究の内容

本論文の第 1 章では、アズキノメイガの *dsx* ホモログの同定を行い、その詳細な解析を行った。カイコガ上科 Bombycidae 以外の鱗翅目昆虫の *dsx* ホモログが同定されたのは初めてである。第 2 章では、雌雄で異なる *dsx* のスプライシングが行われる点に着目し、*Wolbachia* 感染個体の抗生物質処理によって出現する性モザイク個体の「性」の表現型について詳細に解析を行った。第 3 章では、*Wolbachia* の male-killing 作用により致死となるオス個体における性決定遺伝子発現の解析、および、*Wolbachia* 感染除去によって生存不能となり致死となっているメス個体における性決定遺伝子発現の解析を行った。第 4 章では、容易かつ次世代に影響の残らない新規の *Wolbachia* 除去法の

開発を目的として、温度処理による *Wolbachia* 感染除去を試みた。また温度処理による *Wolbachia* 密度の変化が、*Wolbachia* の持つ生殖操作能に与える影響について検討した。

第1章 アズキノメイガにおける *doublesex* ホモログの同定

1.1. 諸言

昆虫の性決定メカニズムは非常に多様であるが、性決定カスケードの下流に位置する *dsx* は構造的にも機能的にも昆虫間でよく保存されている (Traut et al., 2007)。 *dsx* 遺伝子の昆虫におけるショウジョウバエ類以外でのホモログは、これまでに、クサビノミバエ *Megaselia scalaris* (Sievert et al., 1997; Kuhn et al., 2000)、クイーンズランドミバエ *Bactrocera tryoni* および近縁種 *B. oleae* (Shearman and Frommer, 1998; Lagos et al., 2005)、イエバエ *Musca domestica* (Hediger et al., 2004)、ハマダラカ的一种 *Anopheles gambiae* (Scali et al., 2005)、チチュウカイミバエ *Ceratitis capitata* (Saccone et al., 2008)、ニシインドミバエ *Anastrepha obliqua* (Ruiz et al., 2005)、セイヨウミツバチ *Apis mellifera* (Cristino et al., 2006; Cho et al., 2007)、キョウソヤドリコバチ *Nasonia vitripennis* および近縁の 5 種 (Oliveira et al., 2009)、カイコガ *B. mori* (Ohbayashi et al., 2001)、ヤママユガ的一种 *Antheraea assama* および近縁種 *A. mylitta* (Shukla and Nagaraju., 2010) で同定されている。昆虫で同定された *dsx* のホモログはすべて雌雄で異なった mRNA を生じ、それぞれが雌雄に特異的な DSX タンパク質を作る。昆虫における DSX タンパク質には特徴的な 2 つの構造がある。一つは、DM domain と呼ばれる *dsx* を特徴づける Zinc finger 型の DNA 結合ドメインで、N 末端側に存在する。DM domain は、この領域が *D. melanogaster* の性決定因子 *dsx* と *C. elegans* の性決定因子 *mab-3* の間で共通の配列および機能を持つことから命名された (Raymond et al., 1998)。DM domain を持つ遺伝子は、昆虫やセンチュウといった無脊椎動物から鳥類や哺乳類のような脊椎動物にまで共通に存在しており、それぞれな

んらかの形で性決定に関わっていると考えられている普遍的な因子である(Raymond et al., 1998, 1999, 2000)。もう一つは、C 末端側に存在する OD2 (oligomerization domain 2) domain と呼ばれる DNA 結合ドメインである(An et al., 1996)。OD2 domain は、雌雄共通領域から雌雄特異的領域にまたがって存在し、前半部分にあたる共通領域については昆虫間でよく保存されているが、後半部分にあたる雌雄特異的な部位では保存性は高くない(Ohbayashi et al., 2001; Cho et al., 2007)。

序文で述べたように、共生微生物 *Wolbachia* に感染したアズキノメイガでは male-killing 現象が起こるが、感染成虫を抗生物質処理すると次世代において性モザイク個体が高頻度で出現する (Kageyama et al., 2003b; Kageyama and Traut, 2004)。これは、*Wolbachia* がアズキノメイガの遺伝的オスを部分的にメス化する能力をもつことを示している。

Wolbachia による宿主の性の操作は、それ自体が興味深いが、宿主の性決定機構を知る上でも有用な系を提供していると思われた。私は、本研究を始めるに際し、多様な生物間で保存性が高く、かつ雌雄で異なった isoform を持つ *dsx* のホモログは、1) 雌雄判別が難しい胚（本論文では、個体の形態形成後も孵化直前までを胚と呼ぶ）や幼虫期における個体の性（表現型）を判別するツールとして、2) *Wolbachia* による生殖操作を探索するための指標として、3) *Wolbachia* による生殖操作と宿主の性決定機構との関係を解明するための標的遺伝子候補の一つとして非常に有用であると考え、まずその単離を試みた。

本章の研究では、まず、縮重プライマーを用いてアズキノメイガにおける *dsx* ホモログを単離し、*Osdsx* と名付けた。これは、カイコガ上科 bombycoidea 以外の鱗翅目昆虫では最初の報告となる。また、選択的スプライシングによって雌雄それぞれのタイプ

の isoform が生じていることを確認するために、inverse PCR による exon/intron 境界の決定を試みた。さらに、詳細な発現解析によって、*Osdsx* が発育の各ステージおよび組織や器官で雌雄それぞれに異なった発現を示すことを確認した。

1.2. 実験材料および方法

1.2.1. 供試昆虫

実験に用いたアズキノメイガは、2006 年から 2008 年にかけて千葉県松戸市において成虫を採取した。野外採取したメス成虫は、水を含ませた脱脂綿を入れたカップに 1～2 日入れて産卵させた。この際、ほとんどのメス成虫が受精卵を産んだ。この卵を、それぞれ 1 メスから産まれた卵全体をひとつの系統 (iso-female line) として飼育した。幼虫は、餌としてシルクメイト 2M (日本農産工業)を入れたボトルに入れ、蛹になるまで飼育した。蛹化した個体は形態的特長から雌雄にわけ、別々の容器に移した。羽化した成虫は異なった系統と交配するように選抜し、雌雄を 2 匹もしくは 3 匹ずつ金属製のケージに 2 日間置いた。交配したメスは水を含ませた脱脂綿を入れたカップに産卵させ、次世代の飼育に用いた。飼育はすべて、温度条件が $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光周期条件が 16L8D で行った。

1.2.2. total RNA 抽出と cDNA 合成

total RNA の抽出は、RNAiso plus (タカラバイオ)を用いて行った。抽出に用いた虫体や組織は生体を用い、必要に応じて PBS 中で解剖し、得られた組織は新しい PBS で 3 回ずつ洗浄した。抽出は添付のプロトコルに従って行い、抽出した total RNA は DNA の混入を防ぐため DNase I 処理を行った。得られた total RNA はミリ Q 水に溶かし、

使用時まで-80℃で保存した。

逆転写反応は First-strand cDNA synthesis kit (タカラバイオ)を用いて行った。逆転写には oligo-dT primer を用いた。温度条件は、逆転写反応 42℃60 分、逆転写酵素の失活 70℃15 分とした。抽出はすべて添付のプロトコルに従って行った。逆転写により得られた cDNA は使用するまで-20℃で保存した。

1.2.3. *Osdsx* のクローニング

アズキノメイガの *dsx* ホモログ探索を目的として、degenerate プライマーを用いた touch-down RT-PCR を行った。degenerate プライマーは *B. mori*, *D. melanogaster*, *A. mellifera* の *dsx* 遺伝子配列をもとに、保存性の高い DM domain 内に設計した (Table 1.1)。PCR 用の酵素は Ex Taq polymerase (タカラバイオ)を使用した。PCR 反応溶液の調製は添付のプロトコルに従って行った。PCR 反応の条件は、最初に 95℃5 分、次に 95℃30 秒、70℃30 秒、72℃30 秒を 4 サイクル、95℃30 秒、67℃30 秒、72℃30 秒を 4 サイクル、95℃30 秒、64℃30 秒、72℃30 秒を 4 サイクル、95℃30 秒、61℃30 秒、72℃30 秒を 20 サイクルとし、最後に 72℃10 分の伸長反応を行った。PCR 産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色後、紫外光下で確認できるバンドを切り出し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega, Madison, WI, USA)を用いて PCR 産物を精製した。精製した産物は pGEM-T easy vector (Promega)を用いてサブクローニングし、ABI PRIZM® 310 Genetic Analyzer でシーケンス解析を行った。さらに、得られた遺伝子の全長を知るために、シーケンス情報をもとに、3' -および 5' -RACE を行った。この際、PCR 酵素は MightyAmp DNA Polymerase (タカラバイオ)を用い、RACE 用のキットは GeneRacer™ kit (Invitrogen)

Table 1.1 PCR に用いたプライマーの一覧

Primer name	Primer	sequence from 5' to 3'									
degenerate forward		GCC	CCT	CCT	AAY	TGY	GCN	MGN	TG		
degenerate reverse		CGC	GCT	TCR	TCY	TGN	GCY	TGN	GC		
3'RACE		CGG	CTC	AAG	GTC	GAA	CTG	AAG	GGA	CA	
3'RACE nested		GTG	ATG	GCG	CTC	CAG	ACG	GCT	CT		
5'RACE		TCT	CAG	AGC	CGT	CTG	GAG	CGC	CAT	C	
5'RACE nested		TGC	AGT	ATC	GTT	TGT	GTC	CCT	TCA	GTT	C
(1a) Inverse R129		GAC	GAC	TGC	GAG	GAG	CGC	TCC	GA		
(1b) Inverse R192		TGG	TTG	CGG	CAG	CGG	GCA	CAG	TTG		
(1c) Inverse F290		ATG	GCG	CTC	CAG	ACG	GCT	CTG	AGA		
(1d) Inverse F357		CCG	GCA	TAC	ACC	CGA	CAG	GAG	TTG	A	
(2e) Inverse R620		GAC	AGT	TTT	CCA	CCA	GGG	TTT	CTA	GG	
(2f) Inverse R658		CAT	CTC	CCA	GGA	ATA	GTG	GAA	CTT	CTC	
(2g) Inverse F660		TGC	CCC	TCG	TGC	TGG	TCA	TCC	T		
(2h) Inverse F695		AGC	GAC	CTG	GAC	GAA	GCC	TCG	A		
(3i) Inverse R757		CGC	GTA	CTC	GTT	GAT	GAT	CAT	CTT	C	
(3j) Inverse R786		CCG	TCG	AAG	ATG	TTG	AGG	TTG	TGC		
(3k) Inverse F763		GCA	CAA	CCT	CAA	CAT	CTT	CGA	CGG		
(3l) Inverse F790		AGA	GCT	GAG	GAA	CTC	GAC	TCG	C		
(4m) Inverse R871		CTT	CAT	CGA	CGA	TGA	TAG	TAC	ACC	AC	
(4n) Inverse R906		CAC	ACT	GGT	AAA	ACT	AAG	TAT	CAT	TCG	C
(4o) Inverse F879		GCG	AAT	GAT	ACT	TAG	TTT	TAC	CAG	TGT	G
(4p) Inverse F912		TGA	GGA	CGC	GTG	CTG	TGC	GTC			
(5q) Inverse R1272		AGG	ACC	CGC	TTA	CGA	ACT	GCT	AC		
(5r) Inverse R1333		CAG	TGT	AGC	GTT	AGC	ACA	TAG	CAC	TGT	
(5s) Inverse F1358		GAC	AAA	ACG	GAA	AAT	CGT	GTG	AGA	CAG	
(5t) Inverse F1407		TAC	AGC	ACA	CAG	AAA	AAG	CCG	TTC		
Check-F		GGA	CAC	AAA	CGA	TAC	TGC	AAG	T		
Check-R		TCC	CTA	TCT	CAT	AGA	AAA	AGT	AGC	TA	
exon1-F		CAT	ACA	CCC	GAC	AGG	AGT	TGA	ATT	G	
exon1-R		CAG	CAC	ATC	GAG	TAC	GAG	GAG	C		
actin-F		CCC	ATC	TAC	GAA	GGT	TAC	GCT	CTG		
actin-R		CCG	TGA	TCT	CCT	TCT	GCA	TC			

を用いた。それぞれの工程はすべて添付のプロトコルに従って行った。また、RACEによって得られた配列が実際に発現していることを確認するために、雌雄を特徴づける配列の挿入がある部位を挟んでプライマーを設計し RT-PCR を行った。Forward primer は 5'末端側では ORF の 5' 側に近い部位で、Reverse primer は 3'末端側にある UTR 配列にそれぞれ設計した。プライマー配列は Table 1.1 の Check-F と Check-R に示す。PCR 増幅には KOD FX DNA polymerase (東洋紡)を用い、反応条件は、最初に 98°C2 分、次に 98°C15 秒、60°C15 秒、68°C60 秒を 30 サイクル、最後に 72°C10 分のサイクルで行った。操作はそれぞれ添付のプロトコルに従っておこなった。

1.2.4. exon/intron 境界の決定

dsx は intron 配列がとても長いことで知られる。そこで、nested inverse PCR によって exon/intron 境界を決定した (Triglia et al., 1988; Ochman et al., 1988)。 *Osdsx* の配列は *Bmdsx* と非常によく似ているため、Inverse PCR に用いたプライマーの配列は、*B. mori* の exon/intron 境界を参考に決定した。用いたプライマーの配列およびそれぞれのプライマーの位置は Table 1.1 および Figure 1.3 に示した。PCR に用いた total DNA はアズキノメイガの蛹から DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて抽出した。抽出手順は添付のプロトコルに従っておこなった。抽出した total DNA は *XhoI* と *SacI* の 2 種の制限酵素で 37°C overnight の条件で消化した。制限酵素処理した total DNA は T4 DNA ligase (Promega)を用いてセルフライゲーションさせ、環状 DNA を作り、これを nested inverse PCR のテンプレートとした。PCR には KOD FX DNA polymerase (東洋紡)を使った。また、得られた exon 情報を検討するために exon 内部の配列を増幅する PCR を行った。これによって、想定された exon の内

部に intron が含まれないことを確認した。

1.2.5. RT-PCR による *Osdsx* の発現解析

Osdsx の発現パターンを調べるために、雌雄それぞれの各ステージおよび組織から total RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA を作った。抽出には、5 日齢、10 日齢の幼虫全体、15 日齢、22 日齢の幼虫の、頭、皮膚、中腸、マルピーギ管、蛹の全体、成虫の頭、飛翔筋、足、翅、皮膚、脂肪体、中腸、マルピーギ管、精巢、卵巣、ゲニタリア、フェロモン腺の各組織を用いた。蛹と成虫は形態的特徴から雌雄判別を行った。幼虫は形態的特徴から雌雄を判別することが困難であるため、性染色体の凝集体である性クロマチンの有無を観察によって雌雄判別を行った。性クロマチン観察の詳細については第 2 章 2.2.4、第 3 章 3.2.2. に記述する。発現解析には *Osdsx* のメス特異的部位を挟んだプライマー、exon1-F および exon1-R を用いた。この primer pair は雌雄でサイズの異なる産物が得られるため、電気泳動によって容易に雌雄の表現型が判別可能となる。増幅産物の予定サイズは、*Osdsx^M* で 468 bp、*Osdsx^F* で 725 bp である。cDNA のポジティブコントロールとしては *actin* 遺伝子を用いた。プライマー配列は Table 1.1 に示した。産物の予定サイズは 466 bp である。PCR には KOD FX DNA polymerase (東洋紡) を用い、最初に 98°C 2 分、次に 98°C 15 秒、60°C 15 秒、68°C 60 秒を 30 サイクル、最後に 72°C 10 分の条件で行った。

1.3. 実験結果

1.3.1 *Osdsx* のクローニング

Degenerate プライマーを用いた RT-PCR の結果、雌雄に共通した 179 bp の *Bmdsx* に相同性の高い断片の単離に成功した。さらに、ORF 全長配列を決定することを目的に 3'-および 5'-RACE を行ったところ、オスで 1 種、メスで 2 種(長鎖と短鎖)の配列が得られた(Figure 1.1)。メスの 2 種の配列は 3' 末端側の配列に違いが確認されたが、この部位は stop codon よりも 3' 末端側に位置するため、ORF に違いはなかった。オス特異的な配列を *Osdsx^M*、メス特異的な長鎖の配列を *Osdsx^{FL}*、メス特異的な短鎖の配列を *Osdsx^{FS}* と命名した。*Osdsx^M* の ORF は 852 bp の塩基からなる 284 アミノ酸残基を持ち、アミノ酸レベルでの *Bmdsx* との相同性は 75.6% だった。*Osdsx^{FL}* および *Osdsx^{FS}* の ORF は 813 bp の塩基からなる 271 アミノ酸残基を持ち、アミノ酸レベルでの *Bmdsx* との相同性は 86.6% だった。雌雄の共通領域と、メス特異的領域では特に保存性が高かった(Figure 1.2)。

1.3.2 exon/intron 境界

Table 1.1 および Figure 1.3 に示したプライマーを用いた nested inverse PCR の結果、*Osdsx* は 6 つの exon と 5 つの intron からなることが分かった。この exon/intron 境界の配置は *Bmdsx* とよく似ていた(Figure 1.4)。また、この結果から、*Osdsx* の isoform は選択的スプライシングによって作られていることがわかった。*Osdsx^{FL}* は 1 から 6 のすべての exon を含むが、*Osdsx^{FS}* では exon 5 がスキップされており、*Osdsx^M* では exon 3 および exon 4 がスキップされていた。

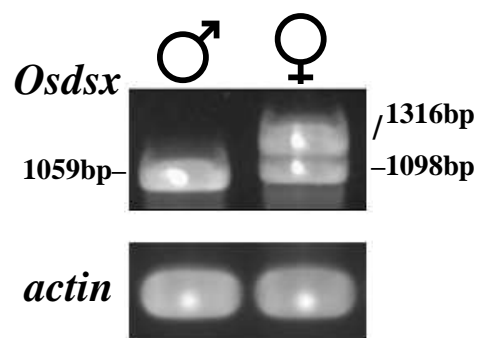


Figure 1.1 *Osdsx* の雌雄における発現の違いを示す RT-PCR の結果。

雌雄ともに蛹由来の cDNA を用いた。オスでは 1 本、メスでは 2 本のバンドが確認された。*Osdsx* を検出するためのプライマーは Check-F および Check-R を用いた。コントロールとしては *actin* 遺伝子を用いた。それぞれのプライマーの塩基配列は Table 1.1 に示す。

<i>O.scapularis</i>	1	MVSVGAWRRRAPDDCEERSEPGTSSSGVHRAPPNCARCRNHRLKVELKGHKRYCKYRYCT ***:*:*:**.*****:*****:*****:*****:***	60
<i>B.mori</i>	1	MVSMGSWKRRVPDDCEERSEPGASSSGVHRAPPNCARCRNHRLKIELKGHKRYCKYQHCT	60
<i>O.scapularis</i>	61	CEKCRLTADRQVRMALQTALRRAQAQDEARARSMESC ***** **:*****:~* ~*:~*~*~* *****:	120
<i>B.mori</i>	61	CEKCRLTADRQVRMAKQTAIRRAQAQDEARARAELGIQPPGMELDRPVPPVVKAPRSPM	120
<i>O.scapularis</i>	121	VPPPPPSRLSGASCDSPVGPSPGVSPYAPPPPPSSAPPPPNMPPLLPQPQPAVSLETIV :~*	180
<i>B.mori</i>	121	IPPSAPRSLSGASCDSPVGPSPGVSPYAPPP-----SVPPPTMPPLIPTPQQPPVPSETIV	175
<i>O.scapularis</i>	181	ENCHKLEKFHYSWEMMLVLVILNYAGSDLDEASRKIDE 220 *****:*****:*** ***** *	
<i>B.mori</i>	176	ENCHRLLEKFHYSWEMMLVLVIMNARSDDLDEASRKIYE 215	
Female-specific region			
<i>O.scapularis</i>	221	GKMIINEYARKHNLNIFDGLELRNSTRQKMLQSEINNISGLVSSSMKLFCF 271 *****:*****:***** *****	
<i>B.mori</i>	216	GKMIVDEYARKHNLNVFDGLELRNSTRQKML—EINNISGLVSSSMKLFCF 264	
Male-specific region			
<i>O.scapularis</i>	221	AHWVVHOWRLYERSLCS-LLELOARKGSSYSMCCSPRYVLAPEYAPHILPLPLTTQRPSF 279 .:~*	
<i>B.mori</i>	216	GYWMMHQWRLQQYSLCYGALELSARK-DVAALCLRDTCWRPR-----SRRVWC 263	
<i>O.scapularis</i>	280	PPAHL 284 *~*	
<i>B.mori</i>	264	PSS-- 266	

両方で共通するアミノ酸配列は”*”で示す。図中の”.”および”.”はアミノ酸が置換されているが、ある程度保存性を残している部位を示す。ボックスになっている部位は DM domain を、下線が引いてある部位は OD2 domain をそれぞれ示す。

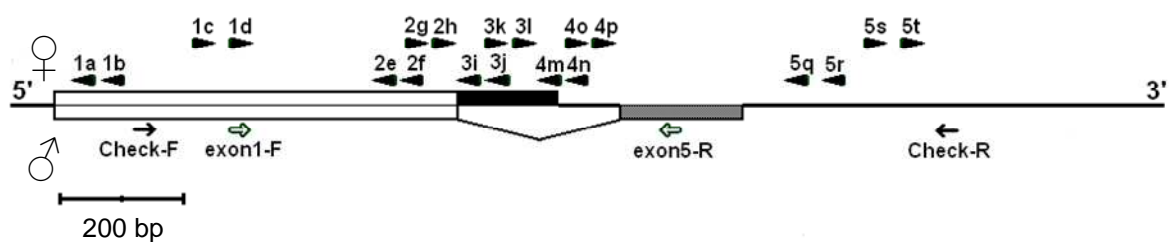


Figure 1.3 雌雄の *Osdsx* 配列および使用したプライマー配列を示した模式図。

上はメス、下はオスの塩基配列を示しており、ボックスになっている部位は翻訳される部位を示す。白抜きの部位は雌雄共通部位で、黒塗りはメス特異的、網掛けはオス特異的的部位を示す。白抜きと網掛けをつなぐ線は、その間の配列がオス特異的にスキップされることを示している。黒塗りの矢先 5 セット(1a-1d, 2e-2h, 3i-3l and 5q-5t)は、nested inverse PCR に用いたプライマーを示す。黒塗りの矢印は exon1 と exon6 にまたがって設計されたプライマー、白抜きの矢印は雌雄に特異的な部位をまたがって設計されたプライマーを示す。それぞれのプライマーの塩基配列は Table 1.1 に示す。

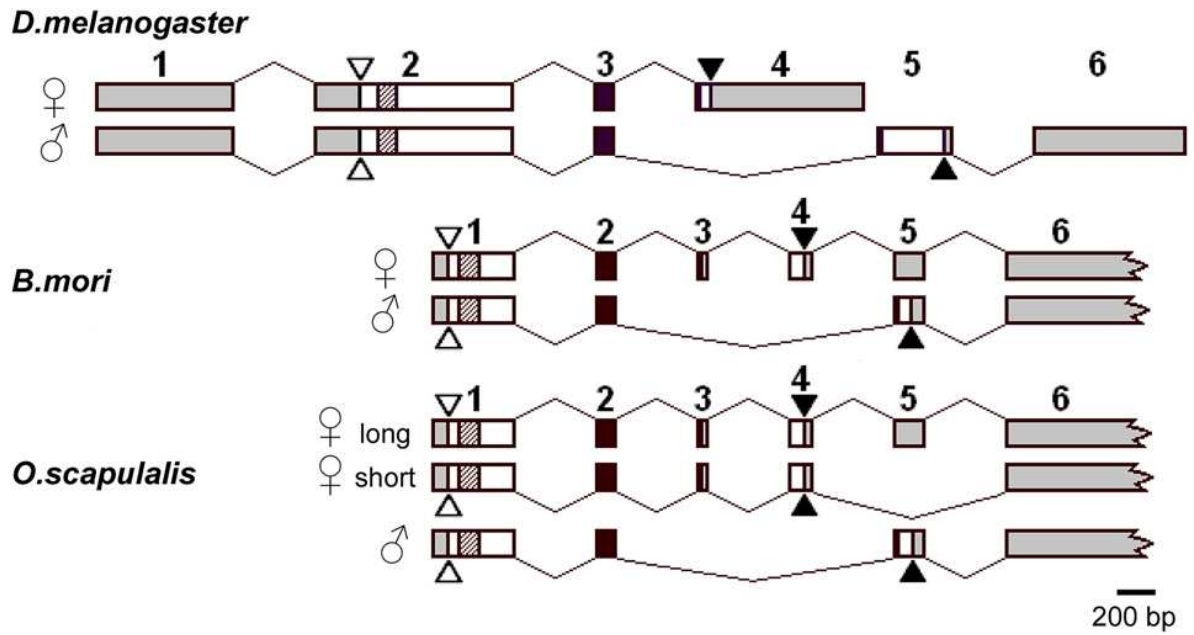


Figure 1.4 *Osdsx* の exon/intron 境界を *dsx* および *Bmdsx* と比較した図。

それぞれの exon は独立したボックスで示し、数字は exon の番号を示す。灰色の部位は UTR を、網掛けの部位は DM domain を、黒塗りの部位は OD2 domain をそれぞれ示す。白抜き三角は開始コドンの位置を示し、黒塗り三角は終止コドンの位置を示す。スケールバーは exon 領域のみを対象としている。

1.3.3 *Osdsx* の発現解析

雌雄の選択的スプライシングの違いを利用して、雌雄異なった産物が得られるプライマー pair を作って幼虫で PCR を行ったところ、良好な結果が得られた (Figure 1.5a)。そのため、このプライマーを応用して、各ステージおよび組織で発現解析を行ったところ、幼虫から成虫までのすべてのステージおよび組織で、オスではオス型の *Osdsx^M*、メスではメス型の *Osdsx^F* が発現していた (Figure 1.5b)。ほとんどの組織で雌雄それぞれに固有のタイプの *Osdsx* のみが発現していたが、例外的にオスの生殖器官である精巣ではオス型だけでなくメス型の *Osdsx^F* の発現が、同様にメスの生殖器官である卵巣ではメス型だけでなくオス型の *Osdsx^M* の発現が確認された (Figure 1.5c)。

1.4. 考察

dsx のホモログである *Osdsx* は、選択的スプライシングを通じて雌雄で異なった isoform を生じた。メスでは長鎖と短鎖の 2 種の isoform があり、この 2 つの違いは exon 5 を含むか否かで決まる。オスでは exon 3 および exon 4 がスキップされ、exon 1, 2, 5, 6 からなる isoform を生じる。メスの長鎖 isoform とオスの isoform は *Bmdsx* とアミノ酸レベルで保存性が非常に高く、DM domain および OD2 domain の雌雄共通部分では特に保存性が高かった (Figure 1.2)。Exon/intron 境界およびスプライシングパターンも *Bmdsx* と類似していた (Figure 1.4)。DM domain には CCHC と HCCC の 2 種のアミノ酸配列からなる亜鉛結合部位、Zn⁺⁺ binding motif の存在が知られているが、これらも完全に保存されていた (Zhu et al., 2000; Zhang et al., 2006)。

Bmdsx では exon 4 に 20 塩基からなるオス特異的な *cis*-acting element 1 (CE1) が存在し、CE1 に *trans*-acting factor として BmPSI が結合することで、exon 3 および exon

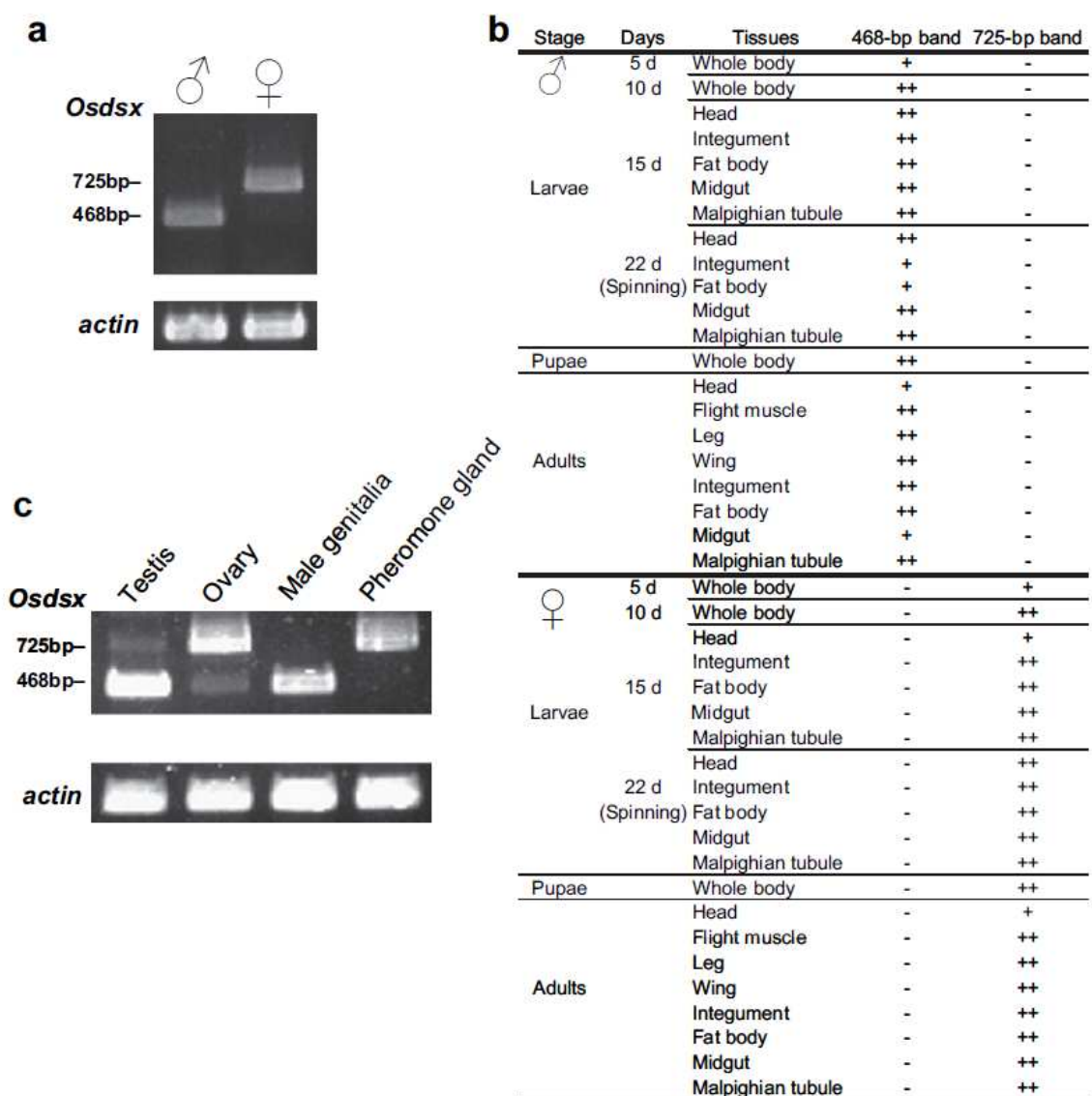


Figure 1.5 RT-PCR によるステージおよび組織ごとの *Osdsx* 発現チェック

(a) 雌雄それぞれの幼虫由来 cDNA を鋳型として *Osdsx* の発現チェック RT-PCR を行った結果の電気泳動写真。(b) 雌雄の各ステージおよび組織で雌雄共通な組織の *Osdsx* 発現のチェック RT-PCR を行った結果。"+"および"++"は発現強度を示す。(c) 成虫における雌雄それぞれに特異的な器官での *Osdsx* 発現チェックの結果の電気泳動写真。(a)-(c)のすべての実験で、*Osdsx* 検出用プライマーとして exon1-F と exon5-R を、actin 検出用プライマーとして Actin-F と Actin-R を用いた。それぞれの配列は Table 1.1 に示す。

4のスキップを促進し、オス型の *Bmdsx* 発現を促している (Suzuki et al., 2008)。 *Osdsx* でも 20 塩基の CE1 配列は完全に保存されていた。また、アズキノメイガにも *Bmpsi* のホモログが存在し、部分配列ながらその単離に成功した (Figure 1.6)。得られた配列を比較したところ、OsPSI と BmPSI は 83.2%と高い相同性を示した。

以上の知見から、 *Osdsx* は配列の保存性が高いだけでなく、機能的にも *dsx* のホモログと推定される。また、鱗翅目昆虫の中で、アズキノメイガが属するメイガ上科 (Pyraloidea) は、 *B. mori* が属するカイコガ上科 (Bombycoidea) とは系統的にかなり遠い存在である (Regier et al., 2009)。そのため、性決定カスケードの下流に位置するいくつかの因子は、鱗翅目昆虫間で広く保存されている可能性があると考えられる。

Osdsx はすべてのステージのすべての体細胞組織で性特異的な発現を示した (Figure 1.5b)。この特徴は、外見的に雌雄判別が難しい幼虫や、各組織などでも、PCR によって簡便に雌雄を判別することが可能であることを示しており、性比異常や性転換等の現象が報告されているアズキノメイガにおいて、それらの現象のチェックや、より詳細な解析に有効なツールとなることが期待される。また、 *B. mori* ではオスでもわずかにメス型の *Bmdsx* が発現していた (Ohbayashi et al., 2001) のに対し、アズキノメイガではオスではオス型、メスではメス型のみの *Osdsx* 発現しか見られなかった (Figure 1.5ab)。一方、アズキノメイガでは、生殖器官である精巣でわずかにメス型の *Osdsx^F* が、卵巣でわずかにオス型の *Osdsx^M* が発現していた (Figure 1.5ab) が、とくに卵巣でのオス型発現については *B. mori* では観察されなかった現象である (Ohbayashi et al., 2001)。このように、 *Bmdsx* と異なる点がいくつか観察された。 *D. melanogaster* における研究から、生殖細胞系の性決定機構は、体細胞の性決定機構と大きく異なることが示されている (Casper and Doren, 2006)。精巣および卵巣には、


```

Ospsi      EEIMLPGPVKVGLIIGKNGKTIKQLQEESGAKMVVIQDGPN----TEYEKPLRISGDPKAV
Bmpsi      EEIMIPGAKVGLIIGKNGKTIKQLQEQTGAKMVVIQDGPNENSFKPQEKPLRISGDPKAV
          ****:*.*.*****:*****:*****.*****

Ospsi      EHAKQLVHELLADKDMQPGGGPRSQYDDYG-SDPGNGLAT
Bmpsi      EHAKQLVFELLANKDMQEP--PRPYDDGYGGSDPGNGLAT
          *****.*.****:*.*.***.*.*.***.*****

```

Figure 1.6 OsPSI の部分配列と *B. mori* の BmPSI の比較。

両者で共通するアミノ酸配列は”*”で示す。図中の”:”および”.”はアミノ酸が置換されているが、ある程度保存性を残している部位を示す。

体細胞と、次世代を形成するための生殖細胞の両方が存在する。ゆえに、この現象については、体細胞はすでに性的に分化済みであるためそれぞれに固有のタイプの *Osdsx* が強く発現する一方で、性的に未分化の生殖細胞では体細胞組織とは異なった *Osdsx* 発現が起こっている可能性が考えられる。

第2章 性モザイク個体における *Osdsex* の発現解析

2.1 諸言

多くの昆虫で、まれに同一個体内に雌雄それぞれの特徴をもつ組織が入り混じった性モザイク個体が発現することが知られている。また、昆虫では性決定に関わる性ホルモンは存在しないとされ、性モザイク個体の出現は、昆虫の性決定が細胞自律的に行われている証左であるとされている。鱗翅目昆虫では、性モザイク個体は Z と W の両方の性染色体を持つ二核卵子から発生することが知られている (Cockayne, 1935)。ショウジョウバエ *D. melanogaster* では、性染色体である X 染色体の変異によって性モザイク個体が発生する (Hinton, 1955)。また、甲殻類のホウネンエビでは、胚発生のごく初期に染色体が失われることで性モザイク個体が発現することが報告されている (Sassaman and Fugate, 1997)。これらのことから、性モザイク個体の出現には性染色体上の遺伝子の変異が大きな要因の一つとなっていると考えられる。

アズキノメイガに感染する *Wolbachia* は、male-killing を引き起こし、結果として感染メスの子の性比が大きくメスに偏る (Kageyama et al., 2003a)。逆に、抗生物質処理によって *Wolbachia* の感染を除去すると、その次世代で遺伝的メスが致死となり、結果としてオスのみが発生する現象が確認されている (Kageyama et al., 2003a, 2004)。また、成虫期の抗生物質処理による *Wolbachia* の不完全除去によって、性モザイク個体が発生することが報告されている (Kageyama et al., 2003b)。この性モザイク個体はすべて遺伝的にはオスであるが、メス特異的器官である交尾嚢が形成される個体も観察されることから、*Wolbachia* は不完全ながら遺伝的オスのメス化現象を引き起こしていることがわかる (Kageyama and Traut, 2004)。共生生物によって性転換が起こる例と

しては、*Wolbachia* による feminization が知られているが、feminization が引き起こされるキチョウ *Eurema hecabe* においても抗生物質処理による性モザイク個体の出現が報告されている (Narita et al., 2007)。また、膜翅目昆虫では、ネジレバネ類の寄生によって性転換が起こっている (Salt, 1927)。この場合は、オス個体ではメス型に、メス個体ではオス型に、それぞれ不完全に変化するため、中性化という表現が用いられる。このように、現象としての性モザイクや性転換の観察報告はいくつも存在するが、昆虫において、分子レベルで性転換が起こっていることはまだ示されていない。

昆虫で広くホモログの存在が確認されている性決定遺伝子 *dsx* は、性選択的スプライシングによって雌雄で異なった isoform を生じる (第 1 章参照)。*dsx* 遺伝子は、*D. melanogaster* の *yolk protein 1, 2* を用いた実験から、*dsx* の翻訳産物である DSX によって直接的に体細胞の性的な発現を制御していることが示されている (Burtis et al., 1991)。これらの特徴から、*dsx* のホモログは、性的二型の表現型を知るための分子マーカーとして、また、性決定カスケードに関わる遺伝子への影響を調べるツールとして有効である。本項では、*Wolbachia* 感染および感染除去が宿主アズキノメイガに与える性的な影響を、アズキノメイガにおける *dsx* のホモログである *Osdsx* 発現を通して解析した。その結果、*Wolbachia* 感染個体の不完全な感染除去によって誘導される性モザイク個体では、雌雄両タイプの性決定遺伝子が発現していた。*Wolbachia* 感染メスや、*Wolbachia* 感染除去によって出現するオスでは、遺伝子型と *Osdsx* 発現タイプが一致していた。また、性モザイク個体においても、性特異的な組織では、性特異的な *Osdsx* が発現することを示した。本研究は、*Wolbachia* 感染によって遺伝的オスであるアズキノメイガがメス化作用を受けていることを分子レベルで示した最初の報告である。

2.2. 実験材料および方法

2.2.1. 供試昆虫

実験に用いたアズキノメイガは、2008 年から 2009 年にかけて千葉県松戸市から成虫を採取したものをを用いた。飼育法は第 1 章 1.2.1.に記載した内容で行った。選抜した系統 (iso-female line) の中に、メスのみが発現するものが確認されたため、すべての産卵後のメス親について、Zhou et al. (1998) の方法に従って total DNA を用いた診断 PCR による *Wolbachia* 感染確認を行った。*Wolbachia* の検出に用いたプライマー、wsp-F81 および wsp-R691 の配列は Table 2.1 に示した。total DNA は DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いて抽出し、PCR の酵素は Ex taq polymerase (タカラバイオ)を使用した。

2.2.2. 抗生物質処理による *Wolbachia* 感染除去虫の作出

感染除去は Kageyama et al. (2002) の方法に従って行った。*Wolbachia* 感染アズキノメイガの孵化直後の幼虫は、0.06% w/v のテトラサイクリン塩酸塩を含んだ人工飼料シルクメイト 2M (日本農産工業) で飼育することで *Wolbachia* 感染除去を行った。その結果、*Wolbachia* 感染が解除されたメス成虫のみが発現した。この感染除去メス成虫を交尾させて、その子を飼育したところ、*Wolbachia* に感染していないオス成虫のみが発現した。*Wolbachia* 感染が解除されたメス成虫は感染除去メスとして、その次世代で出現した *Wolbachia* 非感染のオス成虫は感染除去オスとして実験に用いた。

Table 2.1 PCR に用いたプライマーの一覧

Primer name	Primer sequence from 5' to 3'
exon1-F	CAT ACA CCC GAC AGG AGT TGA ATT G
exon5-R	CAG CAC ATC GAG TAC GAG GAG C
actin-F	CCC ATC TAC GAA GGT TAC GCT CTG
actin-R	CCG TGA TCT CCT TCT GCA TC
wsp 81F	TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC
wsp 691R	AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA

2.2.3. 抗生物質処理による性モザイク個体の作出

性モザイク個体は、Kageyama et al. (2003b) の方法に従って、*Wolbachia* 感染アズキノメイガメス成虫の抗生物質処理によって作出した。まず、羽化した *Wolbachia* 感染アズキノメイガメス成虫をオスと 2 日間同じケージに入れて交配させ、交尾済み *Wolbachia* 感染メスに 0.24% w/v のテトラサイクリン塩酸塩を含んだ 3%スクロース溶液を 1 日間投与した。その後、テトラサイクリン処理を行った交尾済み *Wolbachia* 感染メスが 3–4 日目に産卵した卵を採卵し、通常通りに飼育した。その後、卵が成虫に育つまで飼育し、成虫の形態を目視で観察したところ、通常の雌雄に混じって雌雄の組織が入り混じった性モザイク個体が確認された。性モザイク個体の判別は、翅、中脚および交尾器の形態的特徴から行った。

2.2.4. 性クロマチン観察

アズキノメイガはメスで ZW、オスで ZZ の性染色体を持つが、性染色体型は組織染織によってメス特異的に存在する W 染色体の凝集体である性クロマチンを観察することで判別した (Figure 2.1)。性クロマチン観察は、Kageyama et al. (2004) の方法に従って行った。サンプルとなる成虫を解剖してマルピーギ管を取り出し、直接スライドグラスに乗せ、メタノール：酢酸 (3:1) で混ぜた固定液を数滴たらして数十秒間固定した。固定液がほぼ乾燥した状態になったところに酢酸乳酸オルセイン溶液を数滴たらし、ただちにカバーガラスをかけ、数分間染色させ、光学顕微鏡で観察した。

2.2.5. total RNA 抽出と逆転写反応

Wolbachia 感染メス成虫、感染除去メス成虫、感染除去オス成虫、性モザイク成虫、

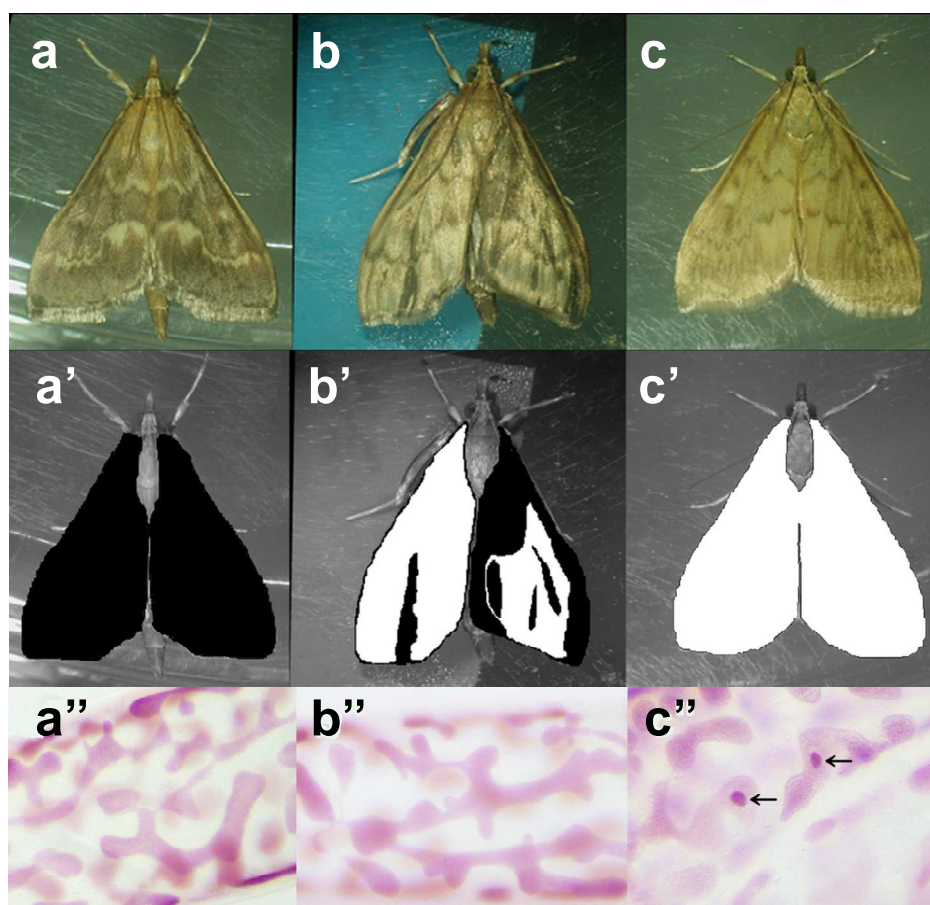


Figure 2.1 *O. scapulalis* の雌雄および性モザイク個体と性クロマチン

(a-c) は左からオス、性モザイク、メスを示す。(a'-c') は翅を形態的特徴にしたがって色分けしたもので、黒塗りの部分がオス型、白抜きの部分がメス型の形態を示す。真ん中の性モザイク個体では両タイプが混じっている。(a''-c'') はそれぞれの個体で性クロマチン観察を行った結果。c'' ではメス特異的遺伝子である W 染色体の凝集体である性クロマチンが観察できることから、メス型の遺伝子型を持つことがわかる。一方、オスおよび性モザイク個体では性クロマチンは存在しないため、オス型の遺伝子型を持つことがわかる。

また、コントロールとして非感染のオス成虫およびメス成虫のそれぞれから total RNA を抽出した。性モザイク成虫では、さらに解剖によって頭、飛翔筋、脚、翅、絹糸腺、中腸、マルピーギ管、ゲニタリア、精巢、交尾嚢をわけ、組織ごとに total RNA 抽出を行った。total RNA 抽出を行ったすべての個体で、マルピーギ管を用いた性クロマチン観察による遺伝的雌雄の判別を行った。抽出した total RNA は、ただちに逆転写反応を行って cDNA を作った。Total RNA 抽出および cDNA 合成は第 1 章 1.2.2 の項に記載されている方法で行った。

2.2.5. RT-PCR による *Osdsx* の発現解析

2.2.4 で抽出し、逆転写反応を行った cDNA を用いて、*Osdsx* の発現パターンを調べた。解析には、*Osdsx* の雌雄に特異的部位を挟んだプライマー、exon1-F および exon1-R を用いた (Table. 2.1)。この primer pair は雌雄でサイズの異なる産物が得られるため、電気泳動によって容易に雌雄の表現型が判別可能となる。増幅産物の予定サイズは、*Osdsx^M* で 468 bp、*Osdsx^F* で 725 bp である。cDNA のポジティブコントロールとしては *actin* 遺伝子を用いた。プライマー配列は Table 2.1 に示す。反応に用いた酵素および PCR 増幅のサイクルは第 1 章 1.2.5. と同じ方法で行った。

2.3. 実験結果

2.3.1 RT-PCR による *Osdsx* 発現解析

RT-PCR による *Osdsx* 発現チェックの結果、*Wolbachia* 感染アズキノメイガ成虫は、形態的特徴、性染色体型、*Osdsx* 発現のすべてがメス型であった (Figure 2.2)。また、*Wolbachia* 感染除去されたメス成虫も同様に、形態的特徴、性染色体型、*Osdsx* 発現の

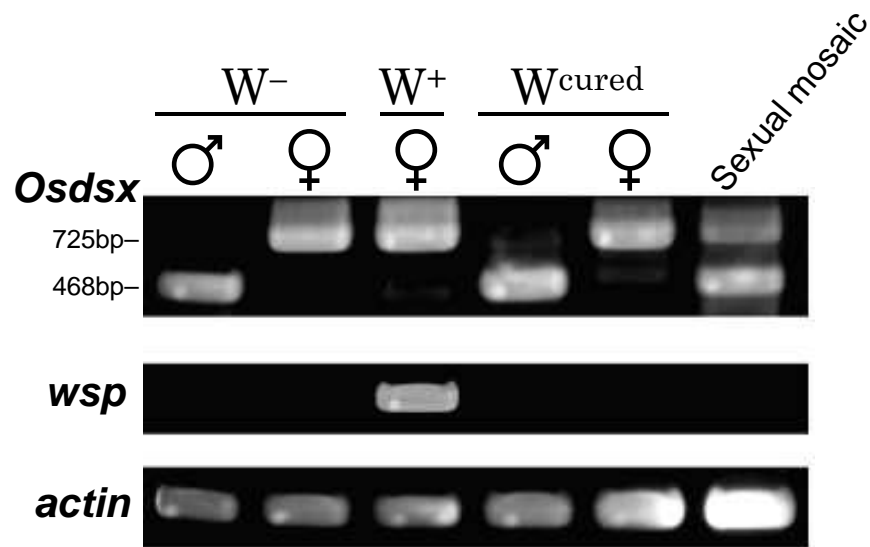


Figure 2.2 RT-PCR による *Osdsex* 発現のチェック

左から、*Wolbachia* 非感染のオス、*Wolbachia* 非感染のメス、*Wolbachia* 感染のメス、*Wolbachia* 感染除去オス、*Wolbachia* 感染除去メス、性モザイク個体を示す。*Wolbachia* 感染の有無をチェックするための診断 PCR には *wsp* 遺伝子を検出するプライマーとして *wsp*-81F および *wsp*-691R を用いた。コントロールとして、*actin* 遺伝子を用いた。用いたプライマーの配列は Table 2.1 に示した。

すべてがメス型であった。*Wolbachia* 感染除去オス成虫では、形態的特徴、性染色体型、*Osdsx* 発現のすべてがオス型を示した。

性モザイク個体は、染色体型はオス型であるが、雌雄の特徴が入り混じった形態的特徴を示す。この性モザイク個体では、雌雄両タイプの *Osdsx* 発現が確認された (Figure 2.1, 2.2)。これは、共生細菌の感染によって性決定遺伝子が干渉を受けることを示した最初の発見である。また、形態的特徴から観察した性と、*Osdsx* 発現型から判別した性は、すべてのサンプルで一致していた。性モザイク個体で *Wolbachia* 感染が確認されなかったことから、*Wolbachia* 感染が除去された後にも遺伝的オスにおいてメス型に操作された *Osdsx* 発現が維持されることがわかった。

2.3.2 性モザイク個体の各組織における *Osdsx* 発現解析

性モザイク個体を解剖し、雌雄に共通な組織を用いて、組織ごとの *Osdsx* 発現パターンを確認した結果、観察したすべての体細胞組織で雌雄両方の *Osdsx* の発現が確認された (Figure 2.3)。アズキノメイガにおける性モザイク個体では、オス特異的な組織である精巣とメス特異的な組織である交尾嚢が同じ個体中に出現することがあるが、今回解剖した性モザイク個体の中には、この2つの組織を持つものが存在した。そこで、その個体から、精巣および交尾嚢を摘出し、それぞれの組織から抽出した cDNA を用いて *Osdsx* 発現をチェックしたところ、精巣ではオス型の *Osdsx^M* が、交尾嚢ではメス型の *Osdsx^F* がそれぞれ強く発現していた (Figure 2.4)。精巣と交尾嚢が同時に存在する性モザイク個体は3個体得られたが、そのすべての個体で同様の発現パターンが確認された。

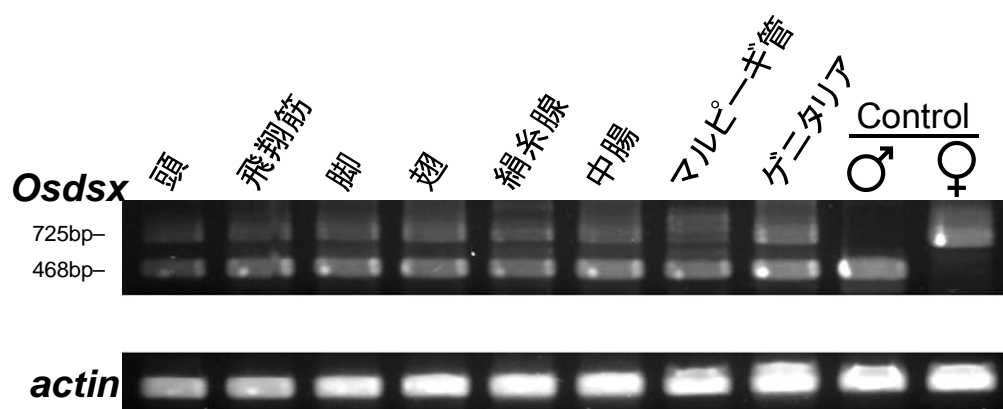


Figure 2.3 RT-PCR による性モザイク個体各組織の *Osdsx* 発現のチェック

性モザイク個体の各組織から抽出した cDNA を用いて、RT-PCR による *Osdsx* 発現をチェックした結果。*Osdsx* の検出には exon1-F および exon5-R のプライマーを用いた。右端の雌雄はコントロールとして用い、cDNA の有無を確かめるためのコントロールとして *actin* 遺伝子のプライマーを用いた。用いたプライマーの配列は Table 2.1 に示した。

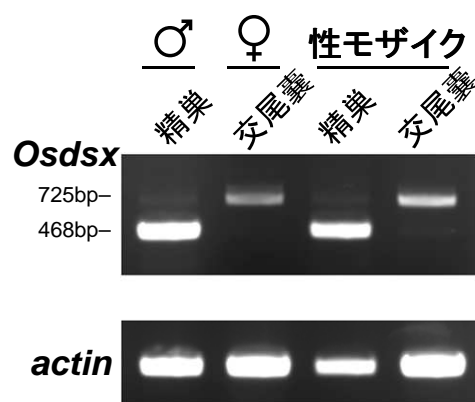


Figure 2.4 *Wolbachia* 非感染と性モザイクの性特異的器官での *Osdsx* 発現

左から、*Wolbachia* 非感染オスの精巣、*Wolbachia* 非感染メスの交尾嚢、性モザイク個体の精巣、性モザイク個体の交尾嚢、の各組織から抽出した cDNA を用いて RT-PCR による *Osdsx* 発現をチェックした結果。*Osdsx* の検出には exon1-F および exon5-R のプライマーを用いた。コントロールには *actin* 遺伝子を用いた。それぞれのプライマーの配列は Table 2.1 に示した。

2.4. 考察

アズキノメイガでは、*Wolbachia* 感染個体の成虫期における抗生物質処理によって次世代で性モザイク個体が出現する。本研究の結果から、この性モザイク個体では、遺伝的オスが、その形態だけでなく分子レベルでもメス化されていることが示された。この結果から、*Wolbachia* は性決定カスケードそのものか、性決定カスケードに干渉しうる因子を操作していることがわかる。*Wolbachia* による生殖操作の標的候補としては *Osdsex* そのもの、もしくはその上流にあたる因子が考えられる。その具体的な因子は不明であるが、性モザイク個体において、*Wolbachia* 感染が除去されているにも関わらずメス型の *Osdsex^F* 発現が見られることから、エピジェネティックな因子の関与が考えられ、その因子は *Osdsex* よりも上流の因子と考えるのが妥当であろう (Figure 2.2)。また、性モザイク個体以外の *Wolbachia* 感染および感染除去によって得られた雌雄は、そのすべてにおいて、見た目、遺伝的な性と、*Osdsex* 発現パターンから調べた分子レベルでの雌雄が一致していた。これらの結果から、*Wolbachia* は致死や発育不全を引き起こす個体のみで性決定遺伝子に変化が生じさせていると推測される。この点に関しての詳細な検討は第3章で行う。

Wolbachia 感染したアズキノメイガを成虫期に抗生物質処理することで得られる性モザイク個体では、翅や中脚、ゲニタリアなどで雌雄特徴が入り混じった構造が確認される (Kageyama et al., 2003b; Kageyama and Traut, 2004)。外見的にはほぼメス化した組織や、ほぼオスの状態のままの組織も観察されるが、組織ごとの *Osdsex* 発現解析の結果からは、各組織でメス化の度合いは同程度であることが推定された (Figure 2.3)。とくに、翅において、メス化が顕著な翅とオスの特徴が多く残っている翅からそれぞれ RNA 抽出を行って発現比較を行ったが、顕著な差は見られなかった (データ未記載)。

一方で、性モザイク個体内で発達した性特異的な器官である精巣および交尾嚢では、それぞれの表現型の性と同じ *Osdsx* が発現していた (Figure 2.4)。 *Osdsx* のホモログである *dsx* の翻訳産物は標的となる遺伝子のプロモーターのシスエレメントに直接結合して体細胞の性的な分化を促していると考えられている (Burtis et al., 1991)。また、鱗翅目昆虫は、完全変態昆虫であり、終齢幼虫から蛹を経て成虫になる過程でダイナミックな組織崩壊および組織形成を経て成虫になる。同一個体内に形成された精巣と交尾嚢で、それぞれ異なった *Osdsx* 発現が示されるようになる原因についてはわからないが、性特異的な器官における性特異的な *Osdsx* 発現は、蛹期において成虫原基の性に依存して組織の再編成が行われた結果である可能性が考えられる。

D. melanogaster では、体細胞組織および体細胞組織からなる部分の生殖器官の発達には、 *Osdsx* のホモログである *dsx* の翻訳産物 DSX が重要な役割を果たしているが、生殖細胞の成熟には DSX の存在は重要ではなく、独自の性決定機構が存在する (Waterbury et al., 2000; Hempel and Oliver., 2007)。また、生殖細胞系の性決定には性染色体のカウンティングシステムが重要な役割を果たしており、性染色体型の性と遺伝子発現レベルでの性が一致することで正常な生殖細胞系の性決定が起こる (Waterbury et al., 2000)。よって、アズキノメイガにおいて性モザイク個体でメス型の器官である交尾嚢が通常通り形成され、メス型の *Osdsx* 発現を示しているにも関わらず、卵巣を持つ個体が出現しない理由としては、 *Wolbachia* の持つメス化能が不十分なものである可能性が考えられる一方、 *Wolbachia* によって遺伝的オスのメス化作用を受けても、性染色体型はオス型のままであることが理由で正常に卵巣発育が起こらない可能性も考えられる。

第3章 アズキノメイガの *Wolbachia* は宿主の性決定因子を代替する

3.1 諸言

宿主のオス殺し *male-killing* を引き起こす共生細菌は広範囲の昆虫に存在する (Bandi et al., 2001)。感染したオスの多くは胚もしくは発生初期に致死となるが、これは、限られたエサ資源を巡る子同士の競合を避け、共生細菌自身の伝搬に有利な感染メスを効率よく発生させるために発達したと考えられている (Hurst and Werren, 2001)。共生細菌による宿主の生殖操作は、メスの適応度を上げる戦略として行われるため、その機構は、何らかの形で宿主の性決定機構もしくは性決定に関係する因子に関わっているはずである (Sharlat et al., 2003)。

Drosophila では、X 染色体の数が性決定に決定的な役割を果たしているが、*male-killing* を引き起こす *Spiroplasma* では、宿主が持つ X 染色体の数によって *male-killing* が制御される (Sakaguchi and Poulson, 1963)。また、*Drosophila* の X 染色体は雄で 1 本、雌で 2 本なので、雄の X 染色体上の遺伝子発現を倍加させることで、X 染色体に座乗する遺伝子の発現量を雌雄でそろえる遺伝子量補償システムがあるが、遺伝子量補償を誘導するタンパク質複合体の形成に関わる遺伝子に機能欠失があると *male-killing* は抑制される (Veneti et al., 2005)。また、性決定のマスタースイッチ遺伝子である *Sxl* の変異によって妊性を失った *D. melanogaster* に *Wolbachia* を移植してやると妊性が回復するという事例が報告されている (Starr and Cline, 2002)。

アズキノメイガの *Wolbachia* 感染系統では、メス成虫の抗生物質処理によって *Wolbachia* を不完全に除去すると、次世代で性モザイク個体が出現する (Kageyama et al., 2003b)。この性モザイク個体はすべて遺伝的にはオスであったことから、*Wolbachia*

は宿主の性を転換させているが、完全な feminization には至らずに死んでいると考えられている (Kageyama and Traut, 2004)。また、幼虫期における抗生物質処理で完全に *Wolbachia* を除去すると、その次世代で遺伝的メスが特異的に致死となる現象が観察されている (Kageyama et al., 2004)。これらの現象を総合すると、アズキノメイガに感染する *Wolbachia* は、宿主との共生関係の中で、宿主メスの生存に必須の機能を代替するようになったと考えられる。その結果、宿主側の当該遺伝子が機能を喪失しても生存に不利にならないため淘汰されず、結果的にメスの生存に *Wolbachia* が必須となってしまったのであろう。

本項では、アズキノメイガの *Wolbachia* 非感染個体、感染個体（オス致死）および感染除去個体（メス致死）の胚子において、W染色体の観察による遺伝的な「性」と、性決定遺伝子から判別した表現型の「性」を比較することで、male-killing および遺伝的メスの特異的致死の要因の解明を試みた。また、*Wolbachia* によって操作を受ける因子は、確実に次世代に伝達し、かつ、組み換えによって機能を喪失しない必要がある。アズキノメイガでは細胞質因子および W 染色体が候補として考えられるが、細胞質因子はオスの子にも伝わるため性特異的な操作には向かず、また細胞質因子が性決定に関わるとは考えにくい。ゆえに、生殖操作の影響を受ける因子を W 染色体上の因子と考え、W 染色体上の塩基配列が *Wolbachia* 感染個体と非感染個体で異なっていることを想定し、*Wolbachia* 感染個体と非感染個体における W 染色体特異的マーカーによる PCR を用いた比較を行った。

本研究の結果から、アズキノメイガに感染し male-killing を引き起こす *Wolbachia* は、宿主のメス化遺伝子を代替していることが示された。また、*Wolbachia* 感染メスでは、非感染個体と比較して W 染色体の構造が変化していることが推測された。

3.2. 実験材料および方法

3.2.1. 供試昆虫

実験に用いたアズキノメイガは、2008 年から 2009 年にかけて千葉県松戸市で採集した成虫の子孫である。飼育は第 1 章に記述した方法で行った。飼育は単一メス由来の系統 (iso-female line) ごとにわけて行い、メスのみが出現する系統に関しては第 2 章 2.2.1 に記述した診断 PCR で *Wolbachia* 感染の確認を行った。本章の研究では、*Wolbachia* に非感染の 3 系統と *Wolbachia* 感染が確認された 3 系統を用いた。

3.2.2. 性クロマチン観察

性クロマチン観察は、Kageyama et al. (2004) の方法に準じて行った。5 日齢以降の幼虫および成虫では、ピンセットでマルピーギ管を取り出し、取り出した組織をメタノール：酢酸 (3 : 1) 固定液で数十秒間固定した。固定液がほぼ蒸発した後に酢酸乳酸オルセイン溶液で組織の染色を行い光学顕微鏡で観察した。孵化前の胚については、眼点が出現したものもしくはヘッドカプセルが黒化したものをピンセットで卵から注意深く取り出し、マルピーギ管もしくは絹糸腺の一部を摘出して性クロマチン観察を行った。残りの組織は total RNA 抽出や DNA 抽出に用いた。

3.2.3. total RNA 抽出と逆転写反応

孵化前の胚から、RNAiso plus (タカラバイオ)を用いた total RNA の抽出を行った。試料が非常に微量であるため、抽出の操作は添付プロトコルの 1/10 の系で行った。得られた total RNA はミリ Q 水に溶かし、ただちに逆転写反応を行った。逆転写反応は第 1 章 1.2.2 に記載した方法で行った。

3.2.4. total DNA 抽出

孵化前の胚からの total DNA 抽出は、平衡化フェノールを用いて行った。まず、抽出に用いる組織を 1.5ml チューブに移し、DNA 抽出用のバッファ（150mM NaCl、10mM Tris-HCl、10mM EDTA、0.1% SDS）を加えてしっかりと破碎した。破碎液に proteinase K を 100 μ g/ml となるように加え、37°Cで一晩インキュベートした。これに等量の平衡化フェノールを加え、シェーカーで1時間振盪した。これを 8000 \times g で20分遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。これにフェノール/クロロホルム/イソミルアルコール（25 : 24 : 1）を加え、シェーカーで1時間穏やかに振盪した。その後、8000 \times g で20分遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。得られた上清の量を見積もり、約2倍量の100%エタノールを加えて混合し、15分間静置した。12000 \times g で15分遠心し、上清を捨てた。これに70%エタノールを200ml加え、穏やかに転倒混和し、12000 \times g で5分以上遠心し、上清を捨てた。減圧遠心機で水分を飛ばし、乾燥したものにミリ Q 水を加え、total DNA を溶解させた。

3.2.5. W 染色体特異的マーカーを用いた PCR

W 染色体特異的マーカーはヨーロッパアワノメイガ *Ostrinia nubilalis* の W 染色体に存在するマイクロサテライト配列の検出を目的として Coates and Hellmich (2003) が設計した ONW1-F、ONW1-R を用いた (Table 3.1)。このマーカーは坂本 (2006) による検討により、同属のアワノメイガ *Ostrinia furnacalis* でも有効であることが示されている。PCR 増幅には KOD FX DNA polymerase を用い、反応条件は、最初に 98°C 2分、次に 98°C15秒、53°C15秒、68°C60秒を30サイクル、最後に 72°C10分のサイクルで行った。

Table 3.1 PCR に用いたプライマーの一覧

Primer name	Primer sequence from 5' to 3'
exon1-F	CAT ACA CCC GAC AGG AGT TGA ATT G
exon5-R	CAG CAC ATC GAG TAC GAG GAG C
actin-F	CCC ATC TAC GAA GGT TAC GCT CTG
actin-R	CCG TGA TCT CCT TCT GCA TC
ONW1-F	TGG AAG TTG ATC GGA ATA AGA AGT C
ONW1-R	TGG AAG AGC GGT AAC CTC CT

3.3. 実験結果

3.3.1. *Wolbachia* 非感染個体の性比

Wolbachia 非感染個体、つまり通常個体の次世代において、孵化前の胚（産卵後 100～120 時間）、5 日齢、10 日齢、成虫の 4 ステージで、性クロマチン観察を行うことで性染色体型、つまり遺伝的な性の比を確認した。性クロマチン観察は孵化前の胚でも問題なく行うことができた (Figure 3.1)。それぞれのステージで、3 つの *Wolbachia* 非感染母系を用いて 3 反復ずつデータを取ったところ、すべてのステージのすべてのサンプルで性比はほぼ 1 : 1 であった (Table 3.2)。また、性クロマチン観察を行った胚で、同一サンプルから同時に total RNA を抽出し、RT-PCR によって *Osdsx* の発現タイプを確認したところ、こちらも性比がほぼ 1 : 1 となり、そのパターンは性クロマチン観察の結果、つまり遺伝的な性と完全に一致していた (Table 3.2, Figure 3.2)。

3.3.2. *Wolbachia* 感染メスの子の性比

Wolbachia 感染系統において、孵化前の胚（産卵後 100～120 時間）、5 日齢、10 日齢、成虫の 4 ステージで、性クロマチン観察を行うことで遺伝的な性の性比を確認した。それぞれのステージで、3 つの異なった *Wolbachia* 感染母系を用いて 3 反復ずつデータを取ったところ、胚では雌雄の割合がほぼ 1 : 1 であったが、5 日齢、10 日齢と、発育ステージが進むごとにメスの割合が増加していき、成虫では全メスとなった (Table 3.2)。また、性クロマチン観察を行った胚から同時に total RNA を抽出し、RT-PCR によって *Osdsx* の発現タイプを確認したところ、遺伝的な性に関係なく、すべての個体でメス型の *Osdsx^F* のみが発現していた (Table 3.2, Figure 3.2)。5 日齢以降に見られた遺伝的オスの生存個体についても、胚と同様にメス型の *Osdsx^F* のみが発現していた。

Table 3.2 ステージごとの *Wolbachia* 非感染、感染、感染除去虫の子の性比

		メス型の割合				
母のW感染		卵クロマチン	卵の <i>Osdsx</i>	5日齢クロマチン	10日齢クロマチン	成虫クロマチン
<i>Wolbachia</i> 非感染	-	0.57 (n=14)	0.57 (n=14)	0.54 (n=24)	0.47 (n=15)	0.61 (n=46)
	-	0.40 (n=15)	0.40 (n=15)	0.61 (n=18)	0.39 (n=18)	0.48 (n=25)
	-	0.44 (n=16)	0.44 (n=16)	0.44 (n=18)	0.38 (n=21)	0.43 (n=21)
	合計	0.47 (n=45)	0.47 (n=45)	0.53 (n=60)	0.41 (n=54)	0.53 (n=92)
<i>Wolbachia</i> 感染	+	0.50 (n=18)	1.00 (n=18)	1.00 (n=18)	1.00 (n=15)	1.00 (n= 8)
	+	0.50 (n=18)	1.00 (n=18)	0.71 (n=17)	1.00 (n=12)	1.00 (n= 9)
	+	0.47 (n=17)	1.00 (n=17)	0.83 (n=18)	0.93 (n=15)	1.00 (n=18)
	合計	0.49 (n=53)	1.00 (n=53)	0.85 (n=53)	0.98 (n=42)	1.00 (n=35)
<i>Wolbachia</i> 感染除去	-	0.56 (n=18)	0.00 (n=18)	0.00 (n=15)	0.00 (n= 9)	0.00 (n= 5)
	-	0.44 (n=18)	0.00 (n=18)	0.07 (n=15)	0.00 (n=12)	0.00 (n=14)
	-	0.43 (n=14)	0.00 (n=14)	0.00 (n=12)	0.00 (n= 8)	0.00 (n= 4)
	合計	0.48 (n=50)	0.00 (n=50)	0.02 (n=42)	0.00 (n=29)	0.00 (n=23)

実験には 1 メス由来の卵から発生した虫を用い、その親となったメス個体はそれぞれ診断 PCR によって *Wolbachia* 感染の有無をチェックした(母の W 感染)。実験に用いた卵、幼虫 (5 日齢および 10 日齢)、成虫はそれぞれ同じメス由来の卵から発生したものをを用いた。*Wolbachia* 非感染および感染では、それぞれ 3 つの異なった母系由来のメスの次世代を用いて実験を行い、*Wolbachia* 感染除去虫としては、上記の感染母系からそれぞれ抗生物質処理によって *Wolbachia* を除去したものをを用いた。

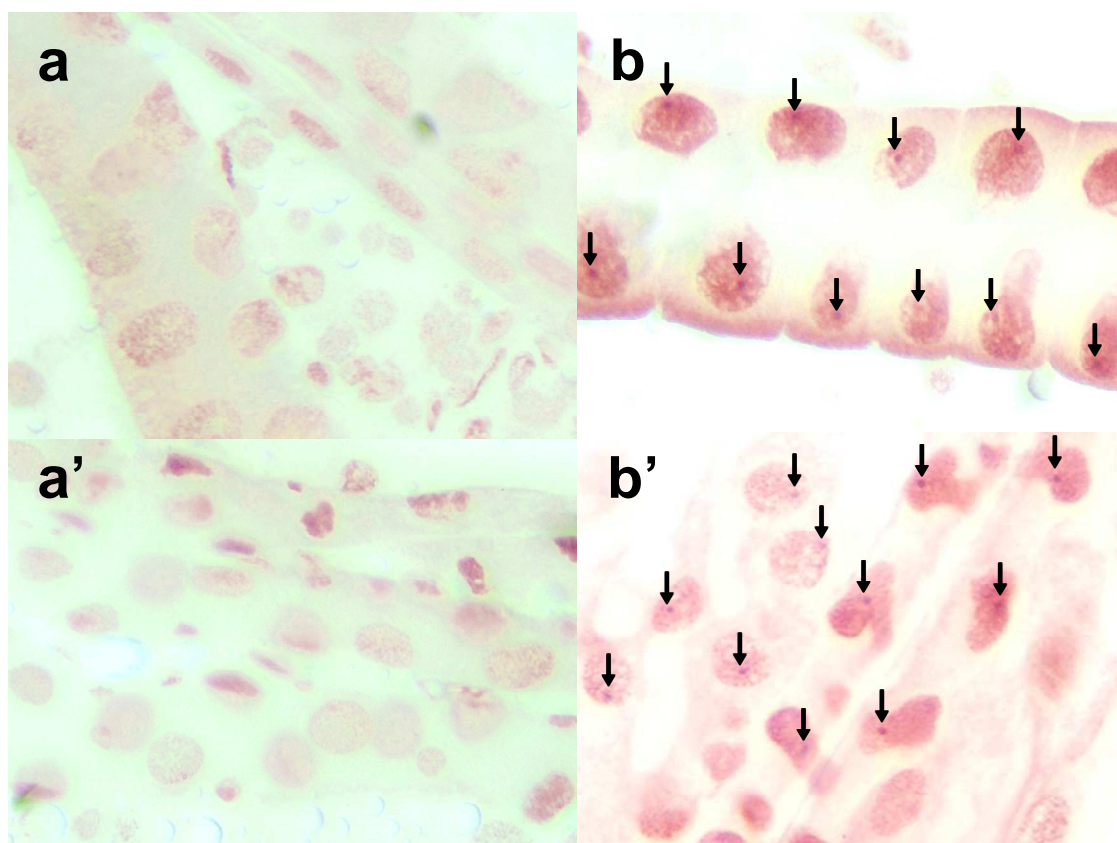


Figure 3.1 孵化前の胚における性クロマチン観察の結果

それぞれ、オス型(ZZ)の性染色体を持つ個体の絹糸腺(a)およびマルピーギ管(a')。メス型(ZW)の性染色体を持つ個体の絹糸腺(b)およびマルピーギ管(b')を示す。メス型の性染色体を持つ個体のみで、W 染色体が凝集した性クロマチンが観察される (矢印で示した部分)。

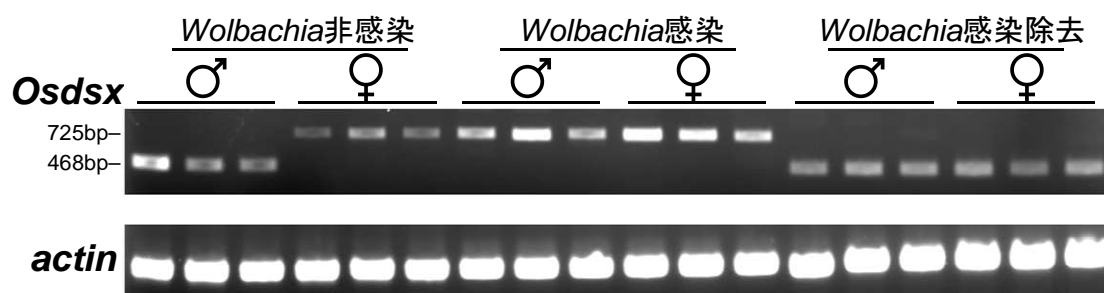


Figure 3.2 *Wolbachia* 非感染、感染、感染除去の胚における *Osdsx* 発現

左から3つずつ、*Wolbachia* 非感染オス、非感染メス、感染オス、感染メス、感染除去オス、感染除去メスにおける、孵化前の胚の *Osdsx* 発現パターンを示す。725 bp はメス型の *Osdsx^F* が、468 bp はオス型の *Osdsx^M* が観察される部位を示す。コントロールには *actin* を用いた。それぞれの PCR にもちいたプライマーは Table 3.1 に示す。

なお、いくつかの初齢幼虫サンプルで、*Wolbachia* 感染を確認したところ、雌雄に関わらずすべての個体で *Wolbachia* 感染が確認された（データ未記載）。また、幼虫期に死亡したと見られる遺伝的オスの個体においても *Osdsx* 発現は完全にメス型を示していた（データ未記載）。

3.3.3. *Wolbachia* 感染除去メスの子の性比

Wolbachia 感染除去個体の次世代において、孵化前の胚（産卵後 100～120 時間）、5 日齢、10 日齢、成虫の 4 ステージで、性クロマチン観察を行うことで遺伝的な性の性比を確認した。それぞれのステージで、3 つの *Wolbachia* 感染母系から、それぞれ抗生物質処理によって *Wolbachia* を除去した 3 つの母系を用いて 3 反復ずつデータを取ったところ、胚では雌雄の割合がほぼ 1 : 1 であったが、5 日齢の段階で 98% の個体がオスになり、10 日齢以降ではオス個体のみとなった。また、性クロマチン観察を行ったサンプルから同時に total RNA を抽出し、RT-PCR によって *Osdsx* の発現タイプを確認したところ、*Wolbachia* 感染系統とまったく逆の現象が起こっていた。つまり、遺伝的な性に関係なく、すべての個体でオス型の *Osdsx^M* のみが発現していた（Table 3.2, Figure 3.2）。5 日齢以降の遺伝的メスでは、生存個体は非常に少なかったため、*Osdsx* 発現確認については行えなかった。

3.3.4. W 染色体検出用マーカーによる PCR の結果

W 染色体特異的マーカーの有効性を調べるために、*Wolbachia* 非感染の 3 系統からそれぞれ抽出した雌雄のゲノム DNA をサンプルとして PCR を行ったところ、メスのみでバンドが確認された（Figure 3.3）。したがって、この W 染色体特異的マーカーは

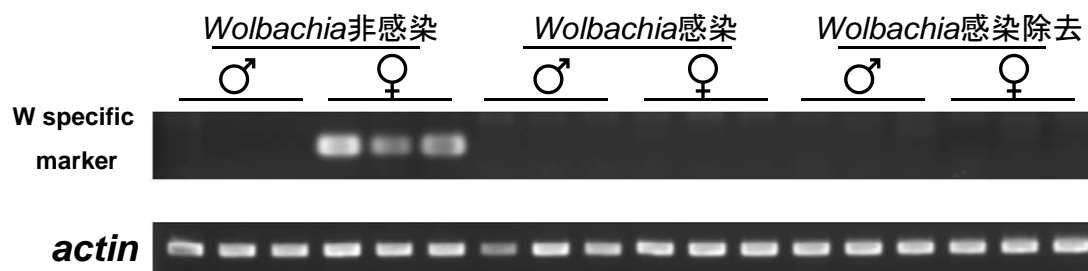


Figure 3.3 W 染色体特異的マーカーを用いた PCR の結果。

左から3つずつ、*Wolbachia* 非感染オス、非感染メス、感染オス、感染メス、感染除去オス、感染除去メス。非感染メスのみで増幅産物が確認できる。コントロールには *actin* を用いた。それぞれの PCR にもちいたプライマーは Table 3.1 に示す。

アズキノメイガでも有効であることが示された。異なる 3 系統を用いたのは、W 染色体特異的マーカーが由来の異なる W 染色体を持つ個体でも有効か確かめるためである。また、得られたバンドサイズは、ヨーロッパアワノメイガ *O. nubilalis* のものとは異なっていたが、アワノメイガ *O. furnacalis* のもの（坂本, 2006）とは同じであった。そこで、このマーカーを用いて *Wolbachia* 感染個体、*Wolbachia* 感染除去個体から抽出したゲノム DNA を用いて PCR を行ったところ、これらのサンプルでは増幅産物は得られなかった（Figure 3.3）。

3.4. 考察

本研究の結果から、*Wolbachia* 感染メスの子では遺伝的オスがメス化されている一方で、*Wolbachia* 感染除去メスの子では遺伝的メスがオス化されていることがわかった。*Wolbachia* がアズキノメイガになんらかの操作を加えて致死を引き起こしていると考えられるが、致死運命にあるオス個体で性決定遺伝子が完全にメス化していたことから、その要因がメス化因子と関わりの深い因子であるか、メス化因子そのものである可能性を示している。また、*Wolbachia* 除去によって致死となったメス個体で性決定遺伝子が完全にオス化していたことは、*Wolbachia* が代替している因子がアズキノメイガのメスが持つメス化因子そのものであることを示している。

以上の知見から、*Wolbachia* はアズキノメイガのメス化遺伝子を代替しており、その結果、感染オスではメス化が起こり、結果として生存不能になっていると考えられる。一方、感染メスではメス化機能の一部、もしくは全部を *Wolbachia* が代替することとなった結果、宿主側のメス化遺伝子の機能が失われることになり、*Wolbachia* 感染メスは *Wolbachia* 無しでは生存できなくなってしまうと考えられる。*Wolbachia* が宿主

側の遺伝子機能を獲得した経緯については、宿主ゲノムの一部が *Wolbachia* に水平転移した可能性が考えられる。しかし、*Wolbachia* のゲノムが宿主に挿入された事例については報告があるが、その逆については知られていない(Kondo et al., 2002)。また、エピジェネティックな操作や micro RNA のように昆虫と細菌で類似の機構を持ちうる因子であれば、比較的容易に独自の操作系を確立できる可能性があると考えられる。とくに micro RNA は 20 塩基前後の短い RNA 配列で遺伝子発現を制御できるため、有力な候補の一つと考えている。

この操作の対象として考えられる宿主側因子は、諸言(3.1)でも触れたようにメス親から子へと受け継がれ、かつ雌雄で異なった表現型を達成することが可能な因子に座乗している必要がある。ゆえに、雌雄で逆の致死現象を引き起こす *Wolbachia* に由来する 2 つの致死現象は、*Wolbachia* が宿主の W 染色体上の遺伝子機能を代替することで引き起こされることが考えられる。また、2 つの異なった致死現象がそれぞれ性転換を伴っていることから、アズキノメイガの W 染色体上には、メス化を決定する性決定因子があり、その因子が *Wolbachia* による操作を受けていると考察する。アズキノメイガおよび近縁種アワノメイガ *O. furnacalis* で同じサイズの産物を増幅できる W 染色体特異的マーカーが、*Wolbachia* 感染個体のみで有効でなかったことは、*Wolbachia* 感染母系の W 染色体の配列が非感染母系とは異なっていることを示している(Figure 3.3)。アズキノメイガでは、ミトコンドリアの *CO1* および *CO2* 遺伝子を用いた系統解析から、ミトコンドリア配列が *Wolbachia* 感染母系と非感染母系で大きく異なっていることが分かっている(星崎、未発表)。*Wolbachia* 感染母系では W 染色体上の機能を *Wolbachia* 代替していると仮定した場合、*Wolbachia* 感染母系の W 染色体は生存に不利な変異の蓄積や、他集団の適応進化による淘汰圧の影響を受けなかったために W 染色体の構造

そのものが *Wolbachia* 感染母系と非感染母系で大きく異なるものになってしまった可能性が考えられる。一方で、RAPD マーカーが生存必須な部位にクリティカルに存在しているために、マーカーを含む部位で特異的に保存性が高い可能性も考えられる。

また、*Wolbachia* 除去により、遺伝的メス個体の *Osdsx* 発現がオス型に変化したことは、アズキノメイガではデフォルトの性決定タイプがオス型であることを示しており、同時に、W 染色体上のメス化遺伝子は、アズキノメイガの性決定をメス型に誘導する優性因子であると考えられる。これは同じ鱗翅目昆虫のカイコガ *B. mori* においても共通であり、メス化を決定する因子が座乗するとされる W 染色体が存在しない状態、つまり、デフォルトの状態では性決定カスケードはオス型になる (Traut et al., 2007)。なお、カイコガにおいて、*Osdsx* のホモログである *Bmdsx* の発現がデフォルトではメス型となることが示されているが、これは *Bmdsx* を単独で発現させた事象での報告であり、上流因子の影響を考慮に入れる必要がある性決定カスケードの話とは異なるため、矛盾しない (Suzuki et al., 2001)。

Wolbachia 感染および感染除去次世代における性クロマチン観察による性染色体型の判別によって、日齢を追って生存幼虫の性比を確認したところ、*Wolbachia* 感染メスの子ではオスが次第に減っていく傾向がみられた (Table 3.2)。一方、*Wolbachia* 感染除去メスの子では 5 日齢の段階でほぼオスばかりとなっており、10 日齢では完全にオスのみとなっていた。この観察結果は、相対的にメス致死現象ではオス致死現象よりも強い致死効果を持つことを示している。卵の発育を目視で観察したところ、*Wolbachia* 感染除去メスの子のみで、胚の成熟が遅れる卵が確認されたが、これについても、メス致死効果のほうが強力であるためにより発育の早い時期から生育に影響が出始めていると考えることができる (データ未記載)。

共生細菌によるオス殺しの機構が、性決定機構に関係する因子と深い関わりがある可能性については、これまでも指摘されている (Charlat et al., 2003)。共生細菌が宿主の雌雄で異なった現象を引き起こすためには、性決定機構そのものか、それによって影響を受ける因子を操作する必要があるためである。*Spiroplasma* によるオス殺しでは、遺伝子量補償の機構が関わっていることが指摘されているが、*Wolbachia* によるオス殺し現象では、具体的な機構については報告が無い。Kageyama et al. (2004) は、性的な表現型と性染色体型 (Z 染色体の本数) の不一致が致死の原因となる可能性を指摘している。本研究の結果から、アズキノメイガに感染する *Wolbachia* は、宿主の遺伝的オスを遺伝子発現レベルでは完全にメス化することに成功しており、この仮説には矛盾しない。また、*Wolbachia* による遺伝的オスのメス化現象にはエピジェネティックな機構が関わっている可能性が指摘されていることから、エピジェネティックな機構が原因因子として存在する可能性も考えられる (Negri et al., 2009)。

第4章 高温処理による *Wolbachia* 密度の変化と次世代の性比の関係

4.1. 諸言

垂直感染によって伝搬する細胞内共生細菌にとって、自身の密度を十分量確保することは、次世代に感染を伝えるために重要である。一方で、高い菌密度は宿主にとってコストとなり、その影響は共生細菌にも及ぶため、宿主と共生細菌の相互作用による最適密度が存在すると考えられる (Ebert and Bull, 2003)。

実際、*Drosophila* で細胞質不和合 (CI) を引き起こす *Wolbachia* は、近縁種 (宿主) への移植実験の結果から、菌密度が宿主との相互作用により決まることが示され、菌密度が低いと CI を引き起こす能力も弱まることが示された (O'Neill et al., 1992)。また、アカイエカ *Culex pipiens* における研究から、自然条件化においても *Wolbachia* 密度が高くなるほど宿主の生存が不利になることが示されている (Duron et al., 2006)。ここに示したのは一例であるが、多くの昆虫において菌密度と生殖操作能は密接に関係しており、また、菌の異常増殖は宿主を死に至らしめる (Sinkins et al., 1995; Noda et al., 2001; McGraw et al., 2002)。このように、*Wolbachia* にとっては、生殖操作能と宿主への負荷はトレードオフの関係にあると言え、結果的に菌密度が最適になるようにセレクションがかかっていると考えられている (Dyer et al., 2005)。

Wolbachia に感染したアズキノメイガの系統ではオス殺し (male-killing) が引き起こされる (Kageyama et al., 2003a; Kageyama and Traut, 2004)。また、*Wolbachia* に感染したアズキノメイガを成虫期に抗生物質処理を行うと、次世代に性モザイク個体やオス個体が発生する (Kageyama et al., 2003b)。メス親の抗生物質処理によって性モザイク個体やオスが同時に出現することは、アズキノメイガにおいてもメス親における

Wolbachia の密度が子の性比や生殖操作に影響を与えることを示している。

Male-killing を引き起こす *Wolbachia* に感染した *Drosophila innubila* では、抗生物質処理により *Wolbachia* 密度を下げると、male-killing 能も下がる (Dyer et al., 2005)。また、母の *Wolbachia* 密度は子の *Wolbachia* 密度に影響を与える。この傾向は実験環境下のみならず、自然条件化においても観察された (Unckless et al., 2009)。また、male-killing を引き起こす *Wolbachia* に感染した *Drosophila bifasciata* では、高温処理によって male-killing 能が低下する現象が報告されている (Hurst et al., 2000)。

以上の知見から、アズキノメイガにおいても、*Wolbachia* 感染メス親の温度処理により菌密度を下げることで、次世代における *Wolbachia* 密度や生殖操作能に影響を与えることができると考えた。また、抗生物質などの薬剤によらない *Wolbachia* 除去法の開発は、残効などに対する考慮が不要となるため、*Wolbachia* による生殖操作の機構を研究する上で重要である。しかし、Sakamoto et al. (2007) による知見では、アズキノメイガの *Wolbachia* 感染系統の幼虫の高温処理ではあまり良好な結果は得られていない。そこで、幼虫の高温短時間処理による *Wolbachia* 除去法の開発を試みた。この新規の *Wolbachia* 除去法は、*Wolbachia* と宿主の相互作用の研究や、*Wolbachia* 感染性モザイク個体の観察による致死要因の推定、*Wolbachia* 密度と male-killing 能の関連などの調査などに応用できると考えている。

4. 2. 実験材料と方法

4. 2. 1 供試昆虫

実験に用いたアズキノメイガは、2008 年から 2009 年にかけて千葉県松戸市で採集した成虫の子孫である。性比異常の起こる系統を選抜し、*Wolbachia* 感染を確認した。飼育は第 1 章に記述した方法で行った。

4. 2. 2 アズキノメイガの高温処理

高温処理には *Wolbachia* に感染したアズキノメイガの終齢幼虫を用いた。幼虫は急激な温度変化に弱いため、エサを敷き詰めたプラスチックカップを用意し、その上に幼虫を置いて温度処理を行った (Figure 4.1)。温度は 50°C もしくは 60°C に設定し、処理時間は実験に応じて変えた。処理後の幼虫は通常通りに飼育し、無事に蛹化したものを生存虫として評価した。その後、羽化に成功したメス成虫は交配させ、産卵させた。得られた卵は第 1 章に記述の方法に従って飼育し、性比を確認した。

4. 2. 3 定量 PCR

Wolbachia 密度はゲノム DNA を用いた定量 PCR によって推定した。温度処理した *Wolbachia* 感染メスを交尾させ、産卵させた後の成虫を菌密度の定量に用いた。定量に用いた DNA サンプルは、成虫の腹部末端 2~3 mm 部分から Blood & Tissue Genomic DNA Extraction Miniprep System (Viogene-Biotek, Taipei, Taiwan) を用いて抽出した。メスの腹部末端をサンプリングした際、その大部分は卵巣で占められることになる。抽出手順は製品に添付のプロトコルにしたがって行った。*Wolbachia* の定量には、*Wolbachia* 固有のタンパク質 *Wolbachia surface protein (wsp)* の DNA 配列をもとに



Figure 4.1 温度処理を行う際の虫の処理法を示した模式図

プラスチックカップにエサであるシルクメイト 2M を薄切りにして並べ、その上にアズキノメイガ *O. scapulalis* の終齢幼虫を置いた。高温処理時には、このカップごとインキュベータに入れた。

設計したプライマーを用いた。内部標準には宿主側の *ribosomal protein subunit 3* (*RPS3*) の DNA 配列をもとに設計したプライマーを用いた。定量 PCR に用いたプライマーはすべて Table 4.1 に記載した。定量には Applied Biosystems 7300 Realtime PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて定量 PCR を行った。定量用の試薬は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用い、反応溶液は添付のプロトコルにしたがって 20 μ l に調整し、反応条件は、初期変性 95°C 30 秒、次に PCR 反応を、95°C 15 秒、60°C 30 秒で 40 サイクル行った。

4.2.4 統計解析

温度処理メスの子の性比と、温度処理メス親の *Wolbachia* 密度の相関を調べる目的で、以下の手法で統計解析を行った。温度処理個体において、各 1 メス由来の子におけるメスの数を目的変数とし、それぞれの親のゲノム DNA を用いて定量した *Wolbachia* の密度を説明変数とし、ポアソン回帰をおこなった。共変数として、各 1 メス由来の子の総数（オスとメスの合計数）を用いた。

4.3. 実験結果

4.3.1 温度処理条件の検討

幼虫の高温耐性を調べるために、終齢幼虫を 50°C で処理したところ、55 分までの処理区で生存虫が得られ、60°C で処理した際には、30 分処理区では生存虫が得られたが、60 分処理区では生存虫は得られなかった (Table 4.2)。

Table 4.1 PCR に用いたプライマーの一覧

Primer name	Primer sequence from 5' to 3'
actin-F	CCC ATC TAC GAA GGT TAC GCT CTG
actin-R	CCG TGA TCT CCT TCT GCA TC
wsp 81F	TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC
wsp 691R	AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA
wsp-Q-F	CTG GTG GTG GTG CAT TTG GTT A
wsp-Q-R	TGG AGT GAT AGG CAT ATC TTC AAT C
RPS3-Q-F	TGC TAT GGT GTG CTG AGG TTC
RSP3-Q-R	TAG TCG TTG CAT GGG TCT CC

4.3.2 *Wolbachia* 感染個体の温度処理による性比への影響の検討

温度処理を生き延びた幼虫から得られるメス成虫を交尾させて、次世代を飼育したところ、50℃処理では、生存可能な限界処理時間である 55 分処理区でも次世代はメスのみだった。ゆえに、50℃では *Wolbachia* 除去効果は無いと判断し、以降の実験では 60℃処理のみを行った。次に、*Wolbachia* 感染終齢幼虫を 60℃20 分および 60℃40 分の処理し、生存虫を羽化後に交配させ、その次世代で性比を観察した。20 分処理区では健全な成虫が多く得られたが、40 分処理区では健全に発育できない個体が多かった。その結果、20 分処理区で 3 頭の温度処理メスから雌雄両方が出現する次世代が得られ、そのうち 1 つでは性モザイクが出現した (Table 4.3)。なお、性モザイク個体で遺伝的な性を確認したところ、オスであったため、表の中では便宜上オスに含めた。40 分処理区では子が得られたメスが少なかったが 1 頭のメスから雌雄両方が出現する次世代が得られた (Table 4.3)。温度処理によって得られた雌雄および性モザイク個体の *Wolbachia* 感染を調査したところ、オス個体では *Wolbachia* 感染は確認されなかったが、メスおよび性モザイク個体では *Wolbachia* 感染が確認された (Figure 4.2)。なお、抗生物質処理によって出現した雌雄および性モザイク個体では、そのすべてで *Wolbachia* は除去されている (Figure 4.2)。

4.3.3 *Wolbachia* 密度と子の性比の関係

Wolbachia 感染幼虫を 60℃で処理すると、次世代の性決定が影響を受けることが示されたが、これは、温度負荷によって *Wolbachia* が減少したか、もしくは増加が抑えられた結果だと考えられる。そこで、温度処理による *Wolbachia* 密度の変化が次世代の性比に与える影響を調べるために、60℃で 20~30 分処理した終齢幼虫の次世代の性

Table 4.2 終齡幼虫に温度負荷をかけた際の生存虫の有無（それぞれ n=10）

処理温度	処理時間	生存虫	処理温度	処理時間	生存虫
50°C	0 min	9	60°C	0 min	9
	40 min	8		30 min	7
	55 min	3		60 min	0
	70 min	0		100 min	0
	100 min	0			

Table 4.3 高温処理幼虫の次世代における性比とモザイク出現の有無

処理温度	処理時間	オス	メス	性モザイク
60°C	20 min	1*	31	+
		9	12	—
		8	10	—
	40 min	32	16	—

*) この1頭は遺伝的にはオスであったが形態的には性モザイクとなっていた。

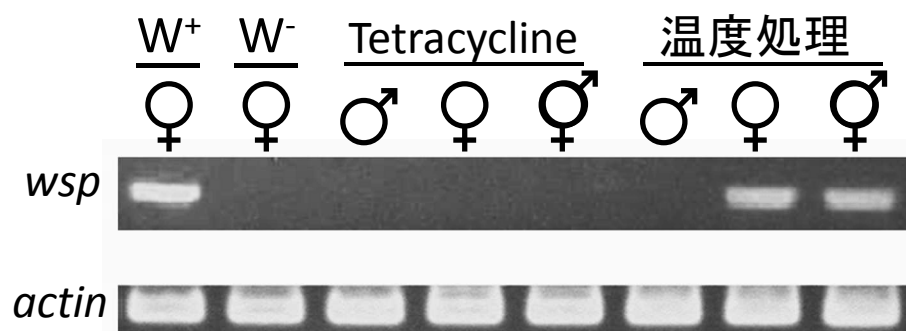


Figure 4.2 抗生物質処理と温度処理が *Wolbachia* 感染に与える影響

抗生物質処理(tetracycline)と高温処理が *Wolbachia* に与える影響を *wsp* 遺伝子を用いた診断 PCR によって比較した。性モザイク個体は便宜的に『♂』の印で示した。

サンプルは左から、*Wolbachia* 感染メス成虫、非感染メス成虫、感染除去オス成虫（抗生物質処理次世代）、感染除去メス成虫（抗生物質処理世代）、メス成虫の抗生物質処理により次世代で得られた性モザイク成虫、高温処理メスの次世代で出現したオス成虫、高温処理メスの次世代で出現したメス成虫、高温処理メスの次世代で出現した性モザイク成虫をそれぞれ示す。コントロールには *actin* 遺伝子を用い、用いたプライマーはそれぞれ Table 3.1 に示した。

比と、産卵直後のメス親の *Wolbachia* 密度の相関を調べた。*Wolbachia* 密度は定量 PCR によって求め、宿主の *RPS3* 遺伝子の量で除して相対値とした。コントロールとして高温処理していない *Wolbachia* 感染メスおよび非感染メスを用いた (Table 4.4)。サンプリングに用いた部位は腹部末端で、その多くが卵巣で占められており、実質的には生殖巣における *Wolbachia* 密度と近似すると考える。高温処理した感染メスと、高温処理していない感染メスの *Wolbachia* 密度を比較したところ、高温処理した感染メスで有意に *Wolbachia* の密度が減少していることがわかった (Figure 4.3; t 検定 $P < 0.005$)。また、7 頭の高温処理メスから次世代を得ることに成功したが、1 メス由来の子では性比がほぼ 1 : 1 になり、3 メス由来の子では全オス、残りの 3 メス由来の子では全メスになった。この、7 頭の高温処理感染メスの *Wolbachia* 密度を定量 PCR によって調べ、その子のメスの比率を縦軸に、得られた *Wolbachia* 密度を横軸にとってプロットした結果、メスの比率は *Wolbachia* 密度と正の相関があった (Figure 4.4; $Z = 7.4$, $P < 0.001$)。雌雄ともに出現したサンプルでは性モザイク個体も出現したが、性モザイク個体は遺伝的にオスであったため、データとしてはオスに加えてある。

Table 4.4 温度処理メスの子の性比および *Wolbachia* 密度

	番号	<i>Wolbachia</i>	オス	メス	メスの割合	性モザイク	<i>Wolbachia</i> 密度
温度処理した <i>Wolbachia</i> ⁺	1	+		70	100%	–	1.003
	2	+		36	100%	–	0.805
	3	+		48	100%	–	0.756
	4	+	24	25	51%	+	0.621
	5	+	42		0%	–	0.445
	6	+	34		0%	–	0.061
	7	+	44		0%	–	0.021
<i>Wolbachia</i> ⁺	8	+		9	100%	–	1.809
	9	+		18	100%	–	1.548
<i>Wolbachia</i> [–]	10	–	13	12	48%	–	–

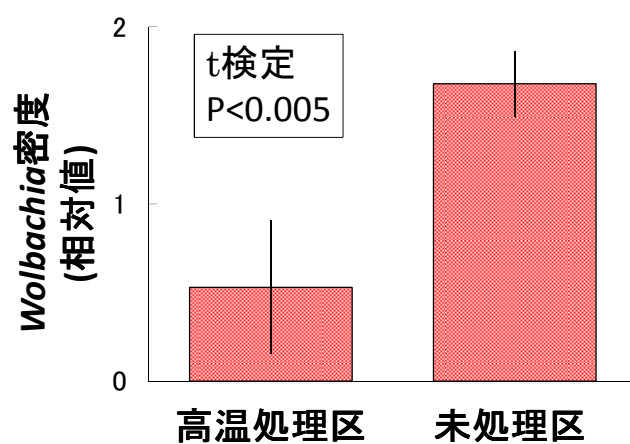


Figure 4.3 高温処理が *Wolbachia* 密度に与える影響についての図

Table 4.4 に示したデータを基に、高温処理した *Wolbachia* 感染メス(高温処理区)と高温処理していない *Wolbachia* 感染メス(未処理区)の *Wolbachia* 密度を t 検定により比較した($P<0.005$)。

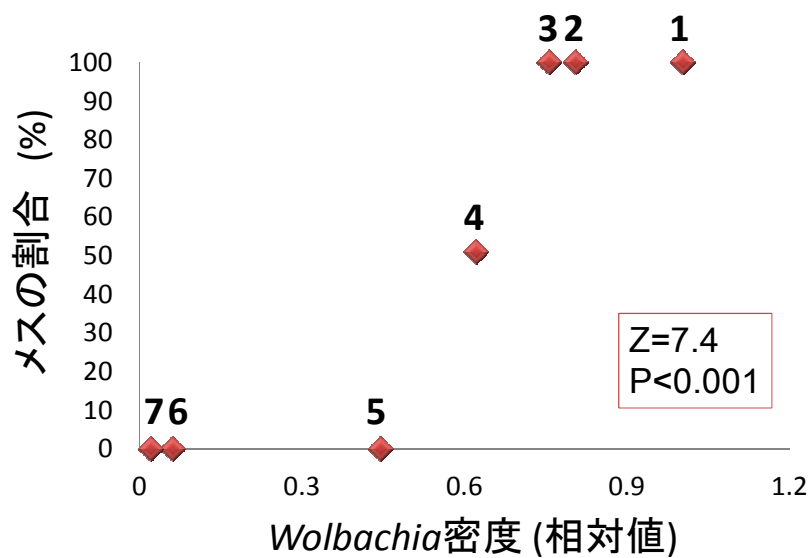


Figure 4.4 *Wolbachia* 密度とメスの割合の相関を示す図

Table 4.4 に示したデータを基に、温度処理メスの *Wolbachia* 密度とその子の性比を表にしたもの。温度処理メスの子の割合を縦軸、*Wolbachia* 密度を横軸としてプロットし、ポアソン回帰分析を行った ($Z=7.4$, $P<0.001$)。図の中の数字は Table 4.4 の表中にあるサンプルごとに与えられた番号を示す。

4.4. 考察

宿主の温度処理によって *Wolbachia* の密度が変化する例は多く報告されており、その結果として *Wolbachia* の生殖操作が影響を受けることも多くの *Wolbachia* 感染昆虫で報告されている。通常、温度処理によって *Wolbachia* 密度を変化させる実験は、宿主が耐える温度条件の中で継続的に飼育を行い、菌密度や生殖操作の有無を確認するという方法をとる。しかし、本研究では、*Wolbachia* 感染幼虫を高温短時間（60℃、20～30 分）処理することで、*Wolbachia* による male-killing 能を低減させ、また、性モザイク個体を発生させることに成功した（Table 4.3）。この方法は特殊な装置や薬剤を必要とせず、温度処理後の幼虫や蛹、成虫すべてを通常通りの飼育条件で飼育できることが大きな特徴である。また、処理によって終齢幼虫は一時的に動きが鈍くなるが、蛹化率・羽化率や羽化後の成虫の行動や生殖に問題はなく、未処理個体と同様に容易に交尾させることが可能である。この方法は、操作手順も簡便であるため、宿主と *Wolbachia* の相互作用の研究への応用が期待できる。

高温処理メスの *Wolbachia* 密度と次世代の性比に高い正の相関が確認されたことから、*Wolbachia* による male-killing はその密度に強く依存しており、低密度では次世代への伝搬がうまくいかなくなっていると考えられる（Figure 4.4）。*Wolbachia* による male-killing の機構はよくわかっていないが、高温短時間処理実験において、温度処理を行うステージを変えることで、*Wolbachia* が次世代に伝搬する上で重要な時期を推定することが可能になるかもしれない。

温度処理によって雌雄両個体が出現した場合、オスは *Wolbachia* 非感染であるが、性モザイク個体およびメス個体は *Wolbachia* に感染していた（Figure 4.2）。この結果は、*Wolbachia* 感染から免れたオス個体は生存可能となり、*Wolbachia* が伝搬したオス

は致死または性モザイク個体となることを示している。性モザイク個体は多くの部位で奇形を示し生殖に適さないため、*Wolbachia* からみると実質的に致死と同じ効果がある。したがって、*Wolbachia* によるアズキノメイガの male-killing 効果は、密度よりも、胚の段階における感染の有無が重要になっていると考えられる。一方、メスについては、感染除去メスは生存しなかったことから、*Wolbachia* を受け継ぐことに成功したメス個体のみが生存可能になっていると言える。

ここで性モザイク個体の発生について仮説を提示したい。通常、初期胚の段階で *Wolbachia* が入った個体では、遺伝型がオスであれば致死となり、遺伝型がメスであれば生存可能となる。温度処理による性モザイク個体では、高温負荷によって母メス体内の卵母細胞内の *Wolbachia* 密度が低下した結果、卵母細胞の分裂に *Wolbachia* の増殖が追いつかなくなり、結果として性的運命が決定される時期において *Wolbachia* の入ったメス化細胞と *Wolbachia* を持たないオス細胞が入り混じった状態となった可能性を考えた。この仮説が成り立つならば、胚に *Wolbachia* が入るか否かで雌雄の生存が決定されるという仮説に矛盾がなくなる。

総合考察

本研究の目的は、細胞内共生細菌 *Wolbachia* が宿主アズキノメイガの性決定に与える影響について調査し、その生殖操作機構に迫ることであった。そのためにまず、宿主アズキノメイガの性決定に関わる因子として、また、雌雄の分子レベルでの性をチェックするための指標となる遺伝子として *doublesex* のホモログ (*Osdsx*) の単離を行い、そのクローニングに成功した。アズキノメイガは、鱗翅目の実験昆虫として知られるカイコガ *Bombyx mori* と系統的に離れた存在であるにもかかわらず、*Bmdsx* と *Osdsx* の配列や構造、発現パターンはともによく保存されていた (第1章)。 *Wolbachia* に感染したアズキノメイガを成虫期に抗生物質処理して不完全に *Wolbachia* を除去すると、次世代で性モザイク個体が発生する。この性モザイク個体で *Osdsx* 発現をチェックしたところ、ほとんどの組織や器官で雌雄両方の *Osdsx* が発現していた。これにより、アズキノメイガでは *Wolbachia* 感染による生殖操作の作用で遺伝的オスがメス化されていたことが分子レベルで証明された (第2章)。次に、 *Wolbachia* 感染によって致死となったオス個体で *Osdsx* の発現を調べたところ、 *Osdsx* の発現が完全にメス化されていることを確認した。一方、 *Wolbachia* 感染系統のアズキノメイガを幼虫期に抗生物質処理して感染を完全に除去すると、次世代ではメスの選択的致死が起こりオス個体のみが発生する (Table 5.1)。この致死となったメス個体では、 *Osdsx* の発現は完全にオス化されていた。これらを総合した結果、 *Wolbachia* は宿主のメス化遺伝子機能を代替する因子を持っており、アズキノメイガでは、そのメス化遺伝子の有無が性決定に重要な役割を果たしていると考えられた (第3章)。また、 *Wolbachia* による性比異常はメス親の *Wolbachia* 密度に依存して起こることを確認した。その際に、 *Wolbachia* 感染

Table 5.1 *Wolbachia* 感染および非感染虫における致死効果と *dsx* 発現型の一覧

	虫	染色体型	<i>Wolbachia</i> 感染	発育	<i>dsx</i> type
<i>Wolbachia</i> 感染系統	感染♀	ZW ^a	+	正常	female
	感染除去♀	ZW ^a	−	致死	male
	感染♂	ZZ	+	致死	female
	感染除去♂	ZZ	−	正常	male
<i>Wolbachia</i> 非感染系統	通常♀	ZW	−	正常	female
	通常♂	ZZ	−	正常	male

W^a: *Wolbachia* 感染母系特有の W 染色体を示す

を免れた遺伝的オスは生存可能であるが、*Wolbachia* が除去されずに残っている遺伝的オスでは致死もしくは性モザイクになることがわかった（第4章）。これらの結果を踏まえて、以下に総合的な考察を行う。

アズキノメイガの性決定機構について

鱗翅目昆虫では、カイコガの性決定機構についての研究が最も進んでいる。カイコガは雌ヘテロ型（ZZ/ZW）の性染色体を持つが、W 染色体上に *Fem* という配列未知の性決定遺伝子が存在し、その有無によって性決定がなされる（Fujii and Shimada, 2007）。ゆえに、カイコガのデフォルトの性はオスであり、W 染色体の存在によってメス化が促される（Traut et al., 2007）。アズキノメイガもまた雌ヘテロ型（ZZ/ZW）の性染色体構成を持つ（Kageyama and Traut, 2004）。第3章の研究から、*Wolbachia* は宿主のメス化遺伝子を代替していることが示された。

カイコガにおいて性決定カスケードの最下流因子と位置づけられる *Bmdsx*（Ohbayashi et al., 2001; Suzuki et al., 2001; 2003）とアズキノメイガの *Osdsex* は、配列や構造が非常によく保存されていた。また、*Bmdsx* では、メス特異的 exon には、CE1 と呼ばれる領域が存在し、CE1 領域に BmPSI が結合した場合にメス特異的 exon のスキップが起こり、結果としてオス型の *Bmdsx* 発現が誘導されるが、この CE1 領域の配列は *Osdsex* において完全に保存されており、また *Bmpsi* のホモログ *Ospsi* は配列がよく保存されていた（Suzuki et al., 2008）。

これらの知見から、アズキノメイガとカイコガの性決定機構は、その最上流の因子および下流の因子で共通性が高いことが示唆された。また、アズキノメイガの *Wolbachia* 感染系統における感染除去実験から、アズキノメイガにおけるデフォルトタイプの性決

定遺伝子発現型がオス型であることがわかったが、この現象もまたカイコガと共通である。ゆえに、カイコガとアズキノメイガの性決定機構は高度に類似している可能性が高いと言える。また、アズキノメイガとカイコガは鱗翅目昆虫の中では系統的に遠縁である (Regier et al., 2009)。そのため、鱗翅目昆虫では、*dsx* ホモログよりも上流にある性決定因子においても、広範囲の種で類似の機構が存在する可能性が考えられる。

アズキノメイガにおいて性モザイク個体が発生するメカニズムについて

アズキノメイガの *Wolbachia* 感染成虫を抗生物質処理すると次世代で性モザイク個体が出現することがある (Kageyama et al., 2003b)。また、発生のごく初期に非感染個体に *Wolbachia* を transfection することでも性モザイク個体が出現する (Kageyama and Traut, 2004)。成虫の抗生物質処理は、処理後、次第に *Wolbachia* の効果が減少していく処理であり、transfection は、処理後、次第に *Wolbachia* が増加していく処理である。ゆえに、アズキノメイガにおいて性モザイクが出現するために重要な時期は、発生初期の胚の時期であり、それより前の時期に *Wolbachia* が消失しても、ある程度発生が進んだ後に *Wolbachia* に感染しても性モザイクは発生しない。

本研究では、幼虫期における高温処理によって、次世代で性モザイク個体を出現させることに成功したが、この性モザイク個体では *Wolbachia* 感染が確認された (Figure 4.2)。これは、一つの細胞からなる受精卵が性モザイク成虫として発育するまでの間、常に *Wolbachia* に感染していたことを明白に示す結果である。また、抗生物質処理と違い、胚発生時に薬剤の影響などの外的な要因は存在しない。これらの背景を基に、性モザイク個体が出現する要因を次のように考察した。

Wolbachia 感染メスの子では、特殊な処理を施さなくても、稀に *Wolbachia* 非感染

オスが出現することがある。*Wolbachia* は移動能を持たないため、卵母細胞の段階で *Wolbachia* が少しでも入っていた場合には、卵成熟までに十分に増殖するが、逆に卵母細胞の段階で *Wolbachia* が存在しなかった場合には外部から侵入ができないため、そのまま非感染の卵になると推定される。これが、自然条件下で *Wolbachia* 感染メスから非感染オス（子）が稀に出現する要因になっていると考えられる。

本研究において、温度処理によって性モザイク個体が発生したが、温度処理を行った時期は終齢幼虫期であり、この時期にはすでに体内に雌雄ともに生殖巣が目視で確認できるほど発達している。通常、この時期には、卵母細胞内の *Wolbachia* は十分に増殖しているか、逆に非感染オスが出現する状態の卵母細胞では早い段階で *Wolbachia* が抜け落ちており *Wolbachia* 濃度に関わらず *Wolbachia* が存在しない状態となっているはずである。ゆえに、温度処理などによって、終齢幼虫の時期の卵母細胞内から *Wolbachia* が不自然に減少した場合、産卵後の *Wolbachia* 増殖が胚の細胞分裂に追いつかなくなる、もしくは生殖操作に十分な *Wolbachia* 量を確保できなくなることで、性モザイク個体が発生すると考えられる。

Drosophila では、メス型の XX 染色体構成を持つ虫で、最初の卵割時に 2 つの細胞から片方の X 染色体が消失した場合、染色体の消失が無かった XX 側がメスになり、染色体の消失が起こった X 側がオスになるため、雌雄の特徴が半分ずつの明瞭な性モザイクになる (Hotta and Benzer, 1970)。その後においても、この方法によって出現する *Drosophila* における性モザイクは、細胞分裂のステージに依存し、卵において細胞分裂がはじまった初期に X 染色体が抜け落ちた細胞に由来する組織のみがオス型に変化するため、明瞭に雌雄の部位がわかれる傾向にある。一方、アズキノメイガにおける性モザイク個体は、各組織において雌雄の特徴が入り混じった状態となる点で、*Drosophila*

において観察される性モザイクとは大きく異なる。

性モザイク個体における特徴の違いを、前述の仮説を当てはめて考察すると、*D. melanogaster* の例では、卵割初期に雌雄それぞれのタイプの性染色体型を持った細胞が生じることに起因するため、成長するに従ってメスの部位とオスの部位が明瞭に分割するようになるが、アズキノメイガでは、細胞が分割される過程で *Wolbachia* による生殖操作因子が不足する細胞が出現した結果、*Wolbachia* 量が性転換に不十分となった細胞がオスになることで、各部位で雌雄の特徴が入り混じるようになると思われる（Figure 5.1）。便宜的に前者を *Drosophila* 型性モザイク、後者を *Ostrinia* 型性モザイクと呼ぶ。その一方で、胚発生の特定の時期において性的運命は完全に決定され、それ以降は性染色体型の変化や *Wolbachia* の有無に関わらず性転換は起こらないと考えられる。このような変化は、宿主ゲノムがなんらかの要因によって後天的に修飾を受けることで可能になると考えられることから、性決定へのエピジェネティックな機構の関与が考えられる。エピジェネティックな機構によって性的運命が決定づけられるのであれば、幼虫期に *Wolbachia* の transfection を行っても遺伝的オスのメス化は起こらず、また、感染個体を幼虫期に抗生物質処理して *Wolbachia* の除去を行っても性モザイク化や性転換が起こらない理由が説明可能であり、性決定機構の有力な候補の一つだと考えている。

一般に、カイコガやショウジョウバエで確認されている性モザイク個体は gynandromorph と呼ばれ、雌雄それぞれの特徴を持つ部位が明確に分かれているが、アズキノメイガでは、全体がモザイク状に見える性モザイク個体が発達することから、その出現機構には大きな違いがあると考えられる。しかし、アズキノメイガで観察される性モザイク個体においても、その一部では、精巣や交尾嚢が通常通り発達し、性決定

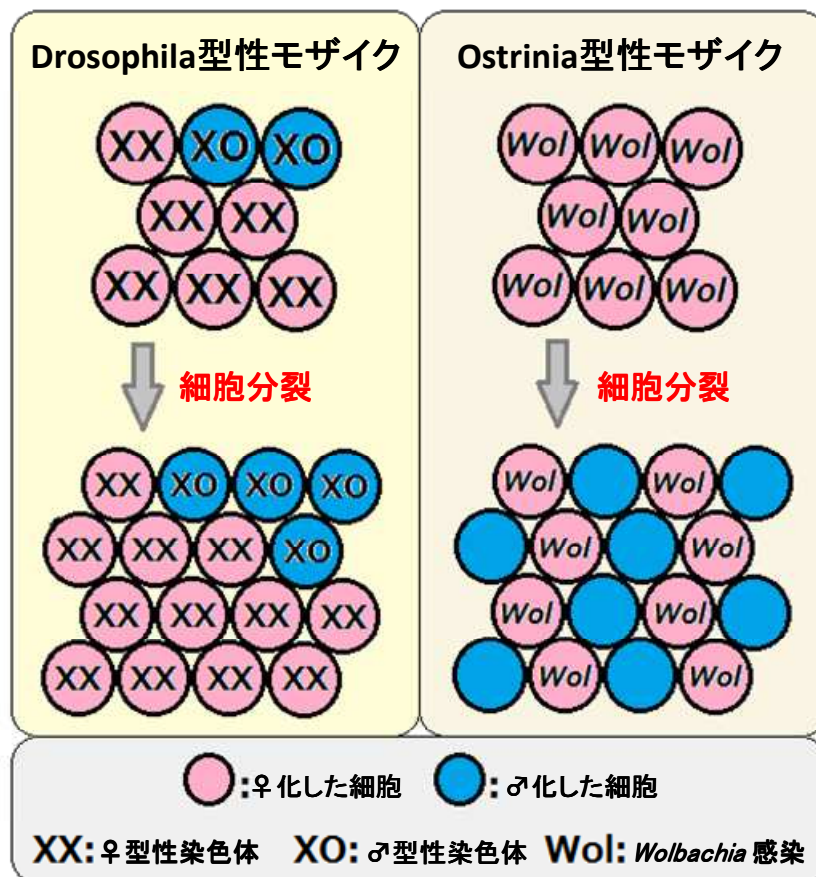


Figure 5.1 性モザイク個体の発生に関する仮説の模式図

- a) *Drosophila* 型では、細胞分裂期の一部の胚で性染色体を消失させることにより性モザイク個体出現する。この場合、雌雄の部位が明瞭にわかれた gynandromorph となることから、この図のような形で性モザイクが作られていると考えられる。
- b) *Ostrinia* 型では、初期胚における *Wolbachia* の密度低下により性モザイク個体が誘導されると考えられる。この性モザイク個体においても *Wolbachia* 感染は維持されていることから、図のような形で性モザイク個体が作られていると考察した。

遺伝子もそれぞれの組織特有の *Osdsx* の発現がみられる (Figure 2.4)。その一方で、交尾器や脚、翅の形状などは雌雄それぞれの特徴が入り混じった状態となることから、この 2 つの組織は他の組織とは異なった機構によって制御されている可能性が考えられる。また、メス化の度合いが強い性モザイク個体においても、メス型の生殖器官である卵巢が発達する個体は見られない。

昆虫では、細胞自律的に性決定が起こっているとされる一方で、同一組織内や近隣の細胞間にはシグナルを受け渡ししながら遺伝子発現等を調節する細胞間シグナル伝達という機構が存在し、細胞自律的な組織や細胞間のメンテナンスに寄与していると考えられている (Maves and Schubiger, 1999)。ゆえに、細胞自律的な性決定が行われていることと、細胞の集合体である組織のレベルで性的運命が改変されることは必ずしも矛盾しない現象だと考えられる。アズキノメイガの性モザイク個体において、交尾囊および精巢以外の組織では、組織を形成するそれぞれの細胞が細胞自律的に性決定された状態となるため、雌雄両タイプの *Osdsx* 発現が観察されるが、一方で、精巢および交尾囊では組織を維持するために何らかの形で細胞間シグナル伝達のような相互作用が働き、結果的に性特異的な組織を形成し、*Osdsx* も性特異的な発現を示すようになっているのかもしれない。精巢や交尾囊のみでこのような現象がみられる背景についてはよくわからないが、これらの組織は幼虫後期から成虫期にかけて急速に発達する組織であることから、組織が形成される時期が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、発生初期に組織全体で性的運命が決定された後に、性的運命が決定された 1 細胞を由来として分化した際には、組織全体で性特異的な *Osdsx* 発現が起こりうると考えられる。

アズキノメイガにおける *Wolbachia* の生殖操作について

本研究の結果から、*Wolbachia* は宿主アズキノメイガの性決定因子を代替していることが明らかになり、その性決定因子は W 染色体に座乗していると想定された。

Wolbachia 感染アズキノメイガにおいて male-killing を引き起こす因子と *Wolbachia* 感染除去によって遺伝的メスが生存不能となる原因因子は共通で、ともに性決定因子もしくは性決定に関係するなんらかの因子であると考えられる。ただし、性決定遺伝子 *dsx* およびそのホモログを異なった性で強制発現させても致死現象は起こらないことが報告されている (Waterbury et al., 1999; Suzuki et al., 2005)。そこで、体細胞以外の性決定に関わる因子を、*Wolbachia* による生殖操作のターゲット因子と想定して、以下のように考察を行った。

性決定因子によって雌雄で異なった分化が起こる機構は、体細胞系の性決定以外では神経系の性決定、生殖細胞系の性決定、遺伝子量補正機構が考えられる。この中で、神経系の性決定遺伝子である *fruitless* の変異は致死を引き起こさない (Billeter et al., 2006)。生殖細胞系の性決定に関しては、その機構の変異によって致死となる可能性は低い。が、*Wolbachia* と生殖細胞系の関係についてはいくつか報告がある。寄生蜂の一種 *Asobara tabita* では、*Wolbachia* に感染している虫の中の 1 系統において、*Wolbachia* 除去によって卵巣が発達しなくなり、不妊化するという現象が報告されている (Dedeine et al., 2001)。また、*Drosophila* では、*Sxl* 遺伝子の変異によって妊性を失ったメスに *Wolbachia* を移植すると妊性が回復するという報告がある (Starr and Cline, 2002)。前者の例では *Wolbachia* 除去によってアポトーシスに異常が起こり、結果として不妊化が引き起こされていると考えられる現象が観察されている (Pannebakker et al., 2007)。しかし、アズキノメイガでは、*Wolbachia* によって性モザイク個体が誘導

される場合においても、卵巣が正常に発育する個体が見られないことから、アズキノメイガに感染する *Wolbachia* が宿主の生殖細胞系の性決定に関わっていることは考えにくい (Kageyama et al., 2003b; Kageyama and Traut, 2004)。また、これらの知見との共通性を見出すことも難しい。

Kageyama and Traut (2004) は、*Wolbachia* に感染したアズキノメイガにおいて、遺伝的オスのメス化が完全に行われず male-killing となっている理由について、ZZ 型の性染色体を持つ遺伝的オスの個体では完全なメス化を受けた時に、性染色体型と性決定遺伝子発現が和合しないため、生存不能となるという仮説を立てた。また、*Spiroplasma* が引き起こす male-killing では、*Drosophila willistoni* において、宿主の性染色体の数に依存して起こることが報告されている (Sakaguchi and Poukson, 1963)。*Spiroplasma* による male-killing では、雌雄で数の異なる性染色体に座乗する遺伝子の発現量を補正する機構である遺伝子量補償という機構が操作されていると考えられ、実際に *D. melanogaster* において、X 染色体上の遺伝子をオスのみで過剰発現させるために必須の因子である dosage compensation complex というタンパク質複合体を構成する 5 つのタンパク質をコードする遺伝子のうち、どれか一つに変異が生じても、*Spiroplasma* 感染による male-killing 活性は低下することがわかっている (Veneti et al., 2005)。ただし、鱗翅目昆虫では、カイコガにおける研究から、染色体単位で遺伝子発現量を調節する機構を持たないことがわかっている (Suzuki et al., 1998, 1999)。しかし、遺伝子量補償の機構が存在しないと考えられていた鳥類のニワトリ (♂=ZZ, ♀=ZW) において、Z 染色体上の遺伝子が部分的に発現の調整を受けている可能性が示されている (Arnold et al., 2008)。カイコガにおいても性染色体全体で遺伝子量の補正が行われていないとは結論付けられていない (Zha et al., 2009)。また、ショウジョウ

バエにおける研究において、遺伝子量補償機構の異常は、オスのみならず、メスにおいても致死を引き起こすことが知られている (Cline, 1983; Kelley et al., 1995; Hilfiker et al., 1997)。これは、性染色体構成と遺伝子発現型の不一致が致死を引き起こすという仮説にも合致していることから、アズキノメイガにおいて、遺伝子量補償、もしくはそれに準ずるよう機構が存在しても不思議ではない。そのため、*Wolbachia* と遺伝量補償の関係を検証することを目的として、*Wolbachia* 非感染雌雄を用いて Z 染色体に座する遺伝子の発現量に差があるか確認を行っていくことは重要な課題と考える。

また、近年の研究から、ウンカの一種 *Zyginidia pullula* において feminization を引き起こす *Wolbachia* が、宿主ゲノムのメチル化を操作しているという報告がなされた (Negri et al., 2009)。この発見は、*Wolbachia* が宿主の生殖操作を行う際の宿主側のターゲット候補として大きなインパクトを持つ。また、宿主ゲノムのメチル化の有無が feminization を引き起こす原因となっているのであれば、性決定機構そのものがエピジェネティックな機構を含む可能性を考えることができる。オナジショウジョウバエ *Drosophila simulans* では、CI を引き起こす *Wolbachia* に感染した際に、CI 胚で有糸分裂異常が起こるときに父親由来の染色体のみが特異的にアセチル化されている様子が観察された (Landmann et al., 2009)。また、*Drosophila* において、*Spiroplasma* による male-killing のターゲットと考えられている遺伝子量補償機構では、X 染色体特異的にヒストンのアセチル化が起こることでその機構が誘導されている (Bone et al., 1994)。このように、エピジェネティックな機構は、*Wolbachia* による複数の生殖操作においてその関与が示唆されるだけでなく、CI および male-killing を引き起こす際に影響を受けるという報告がある宿主側の機構である遺伝子量補償機構においてもヒストン H4 のアセチル化が重要な役割を果たしている。このように、エピジェネティック

な機構が広く雌雄の性差に影響を与えている可能性が示されており、アズキノメイガにおいても、共生微生物などの外的な因子がその機構を操作することによって効率的な生殖操作を行っている可能性は考えられうる。

Wolbachia による生殖操作機構は多種多様であるが、序文で触れたように、その生殖操作手法と *Wolbachia* の系統の間にはあまり相関が無く、また、その生殖操作機構は容易に入れ替わったり、ひとつの *Wolbachia* が複数の生殖操作に関わったりすることが可能である。ゆえに、*Wolbachia* によって生殖操作を受ける宿主側の因子は、普遍的かつ多様な操作に関わる因子で、しかも宿主の性決定に重要な役割を果たす因子である可能性が高いと考えている。これまでの考察から総合して、短期的には、*Wolbachia* が male-killing を引き起こすために重要な宿主側の機構は遺伝子量補償と想定されるため、アズキノメイガにおける遺伝子量補償の機構を調べることでその関与を示すことができると思う。また、長期的には、*Wolbachia* による生殖操作のターゲットの本丸と考える W 染色体上の性決定遺伝子を特定することを目的として、エピジェネティクス研究という切り口から、アズキノメイガの性決定機構に迫っていくことが必要であると考えている。

謝辞

本研究を進めるに当たり、多大なるご指導ご鞭撻をいただきました石川幸男教授に深く感謝を申し上げます。また、なかなか成果の上がらない研究を根気強く見守ってくださったこと、重ねて御礼申し上げますとともに、多大なるご迷惑、ご心配をおかけしましたこと、ここに深くお詫び申し上げます。研究室において、研究全般から私生活に至るまで、たびたびご指導をいただきました、田付貞洋名誉教授ならびに星崎杉彦助教に厚く感謝を申し上げます。実験の方向性に悩んでいた時に、方向性を示して頂き、有用な多くのご助言を頂きました、嶋田透教授、勝間進准教授、田上陽介准教授、篠田徹郎主任研究員、大門高明助教ならびに鈴木雅京講師に深く感謝申し上げます。

陰山大輔博士ならびに坂本洋典博士には、研究の基礎となるご指導、また研究を遂行するにあたっての多大なるご助言を頂きましたこと、ここに厚く御礼申し上げます。実験手法や統計解析では、粥川琢巳博士、砂村栄力博士、小島渉氏、長峯啓佑氏、鈴木俊氏のご指導を頂きましたこと、深く感謝申し上げます。論文執筆にあたってご助言を頂きました藤井毅博士に厚く感謝申し上げます。また、さまざまなご助言、ご助力を頂きました東京大学応用昆虫学研究室の皆様、決して急かさず根気よく支えてくださった私の家族に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

- An, W. and Wensink, P. C. (1995) Integrating sex- and tissue-specific regulation within a single *Drosophila* enhancer. *Genes Dev.* 9: 256-266.
- An, W. Q., Cho, S. Y., Ishii, H. and Wensink, P. C. (1996) Sex-specific and non-sex-specific oligomerization domains in both of the *doublesex* transcription factors from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 16: 3106-3111.
- Arakaki, N., Miyoshi, T. and Noda, H. (2001) *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Fanklinothrips vespiformis* (Thysanoptera : Insecta). *Proc Biol. Sci.* 268: 1011-1016.
- Arnold, P. A., Ito, Y. and Melamed, E. (2008) A Bird's-Eye View of Sex Chromosome Dosage Compensation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 109-127.
- Bandi, C., Dunn, A. M., Hurst, G. D. and Rigaud, T. (2001) Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends Parasitol.* 17: 88-94.
- Billeter, J. C., Rideout, E. J., Dornan, A. J. and Goodwin, S. F. (2006) Control of male sexual behavior in *Drosophila* by the sex determination pathway. *Curr. Biol.* 16: 766-776.
- Bouchon, D., Rigaud, T. and Juchault, P. (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc Biol. Sci.* 265: 1081-1090.
- Bridges, C. (1921) Triploid intersex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 54: 252-254.
- Bone, J. R., Lavender, J., Richman, R., Palmer, M. J., Turner, B. M. and Kuroda, M. I. (1994) Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. *Genes. Dev.* 8: 96-104.

- Burtis, K. C., Coschigano, K. T., Baker, B. S. and Wensink, P. C. (1991) The *doublesex* proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific *yolk protein* gene enhancer. *EMBO J.* 10: 2577-2582.
- Casper, A. and Doren, M. V. (2006) The control of sexual identity in the *Drosophila* germline. *Development* 133: 2783-2791.
- Charlat, S., Calmet, C. and Mercot, H. (2001) On the mod resc model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types. *Genetics* 159: 1415-1422.
- Charlat, S., Hurst, G. D. D. and Mercot, H. (2003) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet.* 19: 217-223.
- Cho, S., Huang, Z. Y. and Zhang, J. Z. (2007) Sex-specific splicing of the honeybee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics* 177: 1733-1741.
- Cline, T. W. (1983) The interaction between daughterless and sex-lethal in triploids: a lethal sex-transforming maternal effect linking sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 95: 260-274.
- Cristino, A. S., do Nascimento, A. M., Costa, L. D. and Simoes, Z. L. P. (2006) A comparative analysis of highly conserved sex-determining genes between *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Res.* 5: 154-168.
- Coates, B. S. and Hellmich, R. L. (2003) Two sex-chromosome-linked microsatellite loci show geographic variance among North American *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Sci.* 3: 29.
- Cockayne, E. A. (1935) The origin of gynandromorphs in the Lepidoptera from binucleate ova. *Trans. ent. Soc. Lond.* 83: 509-521.
- Coschigano, K. T. and Wensink, P. C. (1993) Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. *Genes Dev.* 7: 42-54.

Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M. E. and Bouletreau, M. (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6247-6252.

Dübendorfer, A., Hediger, M., Burghardt, G. and Bopp, D. (2002) *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 75-79.

Duron, O., Labbé, P., Berticat, C., Rousset, F., Guillot, S., Raymond, M. and Weill, M. (2006) High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution* 60: 303-314.

Dyer, K. A., Minhas, M. S. and Jaenike, J. (2005) Expression and modulation of embryonic male-killing in *Drosophila innubila*: opportunities for multilevel selection. *Evolution* 59: 838-848.

Ebert, D. and Bull, J. J. (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends Microbiol.* 11: 15-20.

Fujii, T. and Shimada, T. (2007) Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 379-388.

畠山 正統 (2003) ハチ目昆虫の性決定機構. 日本比較内分泌学会ニュース 111: 111-131.

Hediger, M., Burghardt, G., Siegenthaler, C., Buser, N., Hilfiker-Kleiner, D., Dubendorfer, A. and Bopp, D. (2004) Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Genet. Mol. Res.* 214: 29-42.

Hempel, L. U. and Oliver, B. (2007) Sex-specific *Doublesex^M* expression in subsets of *Drosophila* somatic gonad cells. *BMC Dev. Biol.* 7: 113.

Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Pannuti, A. and Lucchesi, J. C. (1997) *mof*, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO J.* 16: 2054-2060.

Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. and Werren, J. H. (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281: 215-220.

Hinton, C. W. (1955) The behavior of an unstable ring chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 40: 951-961.

Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T. and Miura, k. (2002) Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera : Pieridae). *Naturwissenschaften* 89: 167-170.

Hotta, Y. and Benzer, S. (1970) Genetic dissection of the *Drosophila* nervous system by means of mosaics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1156-1163.

Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M., von der Schulenburg, J. H. G. Bertrand, S. A., West, I., Goriacheva, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R. and Majerus, M. E. N. (1999) Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc Biol. Sci.* 266: 735-740.

Hurst, G. D. D., Johnson, A. P., von der Schulenburg, J. H. G. and Fuyama, Y. (2000) Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: A temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* 156: 699-709.

Hurst, G. D. D. and Werren, J. H. (2001) The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2: 597-606.

Kageyama, D., Hoshizaki, S. and Ishikawa, Y. (1998) Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity* 81: 311-316.

- Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S. and Ishikawa, Y. (2002) Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity* 88: 444-449.
- Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S. and Ishikawa, Y. (2003a) Two kinds of sex ratio distorters in a moth, *Ostrinia scapularis*. *Genome* 46: 974-982.
- Kageyama, D., Ohno, S., Hoshizaki, S. and Ishikawa, Y. (2003b) Sexual mosaics induced by tetracycline treatment in the *Wolbachia*-infected adzuki bean borer, *Ostrinia scapularis*. *Genome* 46: 983-989.
- Kageyama, D. and Traut, W. (2004) Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapularis*. *Proc Biol. Sci.* 271: 251-258.
- Kageyama, D., Nishimura, G., Ohno, S., Hoshizaki, S. and Ishikawa, Y. (2004) *Wolbachia* infection and an all-female trait in *Ostrinia orientalis* and *Ostrinia zaguliaevi*. *Entomol. Exp. Appl.* 111: 79-83.
- Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. and Iguchi, T. (2010) Sequence divergence and expression of a *transformer* gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*. *Genomics* 95: 160-165.
- Kelley, R. L., Solovyeva, I., Lyman, L. M., Richman, R., Solovyev, V. and Kuroda, M. I. (1995) Expression of *msl-2* causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* 81: 867-877.
- Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M. and Fukatsu, T. (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 14280-14285.
- Kuhn, S., Sievert, V. and Traut, W. (2000) The sex-determining gene *doublesex* in the fly *Megaselia scalaris*: Conserved structure and sex-specific splicing. *Genome* 43: 1011-1020.

Lagos, D., Ruiz, M, F., Sánchez, L. and Komitopoulou, K. (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 348: 111-121.

Landmann, F., Orsi, G, A., Loppin, B. and Sullivan, W. (2009) *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS Pathog.* 5: e1000343.

Maves, L. and Schubiger, G. (1999) Cell determination and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Curr. Top Dev. Biol.* 43: 115-151.

McGraw, E, A., Merritt, D, J., Droller, J, N. and O'Neill, S, L. (2002) *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2918–2923.

Mercot, H and Poinso, D. (2009) Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *C.R. Biol.* 332: 284-297

宮原 義雄 (1984) アワノメイガの異常性比現象. 日本応用動物昆虫学会誌 28: 131-136.

Mutuura, A. and Munroe, E. (1970) Taxonomy and distribution of the European corn borer and allied species: genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Pyralidae). *Mem. Entomol. Soc. Can.* 71: 1–112.

Narita, S., Kageyama, D., Nomura, M. and Fukatsu, T. (2007) Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4332-4341.

Negri, I., Pellicchia, M., Mazzoglio, P.J., Patetta, A. and Alma, A. (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex-determination system. *Proc Biol. Sci.* 273: 2409-2416.

Negri, I., Franchini, A., Gonella, E., Daffonchio, D., Mazzoglio, P. J., Mandrioli, M. and Alma, A. (2009) Unravelling the *Wolbachia* evolutionary role: the reprogramming of the host genomic imprinting. *Proc. Biol. Sci.* 276: 2485-2491.

Niimi, T., Sahara, K., Yasukochi, Y., Ikeo, K. and Traut, W. (2006) Molecular cloning and chromosomal localization of the *Bombyx Sex-lethal* gene. *Genome* 49: 263-268.

Noda, H., Koizumi, Y., Zhang, Q. and Deng, K. (2001) Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 727-737.

Ochman, H., Gerber, A. S. and Hartl, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics* 120: 321-323.

Ohbayashi, F., Suzuki, M. G., Mita, K., Okano, K. and Shimada, T. (2001) A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 128: 145-158.

大野 豪 (2003) 形態・DNA・性フェロモンに基づくウスジロキノメイガ種群の体系的な研究. 博士学位論文 東京大学.

Oliveira, D. C. S. G., Werren, J. H., Verhulst, E. C., Giebel, J. D., Kamping, A. Beukeboom, L. W. and van de Zande, L. (2009) Identification and characterization of the *doublesex* gene of *Nasonia*. *Insect. Mol. Biol.* 18: 315-324.

Poinsot, D., Charlat, S. and Mercot, H. (2003) On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *Bioessays* 25: 259-265.

Raymond, C. S., Shamu, C. E., Shen, M. M., Seifert, K. J., Hirsch, B., Hodgkin, J. and Zarkower, D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.

- Raymond, C, S., Kettlewell, J, R., Hirsch, B., Bardwell, V, J. and Zarkower, D. (1999) Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215: 208-220.
- Raymond, C, S., Murphy, M, W., O'Sullivan, M, G., Bardwell, V, J. and Zarkower, D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14: 2587-2595.
- Regier, J, C., Zwick, A., Cummings, M, P., Kawahara, A, Y., Cho, S., Weller, S., Roe, A., Baixeras, J., Brown, J, W., Parr, C., Davis, D, R., Epstein, M., Hallwachs, W., Hausmann, A., Janzen, D, H., Kitching, I, J., Solis, M, A., Yen, S, H. and Bazinet, A, L., Mitter, C. (2009) Toward reconstructing the evolution of advanced moths and butterflies (Lepidoptera: Ditrysia): an initial molecular study. *BMC Evol. Biol.* 9: 280.
- Ruiz, M, F., Stefani, R, N., Mascarenhas, R, O., Perondini, A, L, P., Selivon, D. and Sanchez, L. (2005) The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics* 171: 849-854.
- Ruiz, M, F. and Sánchez, L. (2010) Effect of the gene *transformer* of *Anastrepha* on the somatic sexual development of *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* 54: 627-633.
- Saccone, G., Salvemini, M., Pane, A. and Polito, L, C. (2008) Masculinization of XX *Drosophila* transgenic flies expressing the *Ceratitis capitata Doublesex*(M) isoform. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 1051-1057.
- Sakaguchi, B. and Poulson, D, F. (1963) Interspecific transfer of the “sex-ratio” condition from *Drosophila willistoni* to *D. melanogaster*. *Genetics* 48: 841-61.
- Sakamoto, H. (2006) Studies on the reproductive alteration induced by *Wolbachia* infection in the genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Crambidae). Ph. D. Dissertation. Tokyo, The University of Tokyo.
- Sakamoto, H., Kageyama, D., Hoshizaki, S. and Ishikawa, Y. (2008) Heat treatment of the Adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* infected with *Wolbachia* gives rise to sexually mosaic offspring. *J Insect Sci.* 8:1-5.

Salt, G. (1927) The effects of stylopisation on Aculeate Hymenoptera. *J. Exp. Zool.* 48: 223-331.

Salz, H, K. and Erickson, J, W. (2010) Sex determination in *Drosophila*: The view from the top. *Fly* 4: 60-70.

Sasaki, T., Kubo, T. and Ishikawa, H. (2002) Interspecific transfer of *Wolbachia* between two lepidopteran insects expressing cytoplasmic incompatibility: A *Wolbachia* variant naturally infecting *Cadra cautella* causes male killing in *Ephestia kuehniella*. *Genetics* 162: 1313-1319.

Sassaman, C. and Fugate, M. (1997) Gynandromorphism in Anostraca: multiple mechanisms of origin? *Hydrobiologia* 359: 163-169.

Scali, C., Catteruccia, F., Li, Q, X. and Crisanti, A. (2005) Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae doublesex* gene. *J. Exp. Biol.* 208: 3701-3709.

Shearman, D, C, A. and Frommer, M. (1998) The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene *doublesex*. *Insect Mol. Biol.* 7: 355-366.

Shukla, J, N. and Nagaraju, J. (2010) Two female-specific DSX proteins are encoded by the sex-specific transcripts of *dsx*, and are required for female sexual differentiation in two wild silkmoth species, *Antheraea assama* and *Antheraea mylitta* (Lepidoptera, Saturniidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 672-682.

Sievert, V., Kuhn, S., Paululat, A. and Traut, W. (2000) Sequence conservation and expression of the *Sex-lethal* homologue in the fly *Megaselia scalaris*. *Genome* 43: 382-390.

Sinkins,, S, P., Braig, H, R. and O'Neill, S, L. (1995) *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc Biol. Sci.* 261: 325-330.

Starr, D, J. and Cline, T, W. (2002) A host-parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. *Nature* 418: 76-79.

- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J. and Hurst, G. D. D. (1999) *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 71-102.
- Stouthamer, R., Breeuwer, R. F., Luck, R. F. and Werren, J. H. (1993) Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361: 66-68.
- Straub, T. and Becker, P. B. (2007) Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nat Rev Genet.* 8: 47-57.
- Suzuki, M. G., Shimada, T. and Kobayashi, M. (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity*. 81: 275-283.
- Suzuki, M. G., Shimada, T. and Kobayashi, M. (1999) *Bm kettin*, homologue of the *Drosophila kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* 82: 170-179.
- Suzuki, M. G., Ohbayashi, F., Mita, K. and Shimada, T. (2001) The mechanism of sex-specific splicing at the *doublesex* gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 1201-1211.
- Suzuki, M. G., Funaguma, S., Kanda, T., Tamura, T. and Shimada, T. (2003) Analysis of the biological functions of a *doublesex* homologue in *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.* 13: 345-54.
- Suzuki, M. G., Funaguma, S., Kanda, T., Tamura, T. and Shimada, T. (2005) Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori*. *Evol Dev.* 7: 58-68.
- Suzuki, M. G., Imanishi, S., Dohmae, N., Nishimura, T., Shimada, T. and Matsumoto, S. (2008) Establishment of a novel *in vivo* sex-specific splicing assay system to identify a *trans*-acting factor that negatively regulates splicing of *Bombyx mori dsx* female exons. *Mol. Cell. Biol.* 28: 333-343.

- Suzuki, M, G., Imanishi, S., Dohmae, N., Asanuma, M. and Matsumoto, S. (2010) Identification of a male-specific RNA binding protein that regulates sex-specific splicing of *Bmdsx* by increasing RNA binding activity of BmPSI. *Mol. Cell. Biol.* 30: 5776-5786.
- Traut, W., Niimi, T., Ikeo, K. and Sahara, K. (2006) Phylogeny of the sex-determining gene *Sex-lethal* in insects. *Genome* 49: 254-262.
- Traut, W., Sahara, K. and Marec, F. (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Dev.* 1: 332-346.
- Triglia, T., Peterson, M, G. and Kemp, D, J. (1988) A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.
- Unckless, R , L., Boelio, L, M., Herren, J, K. and Jaenike, J. (2009) *Wolbachia* as populations within individual insects: causes and consequences of density variation in natural populations. *Proc Biol Sci.* 276: 2805–2811.
- Vavre, F., Mouton, L. and Pannebakker, B, A. (2009) *Drosophila*-parasitoid communities as model systems for host-*Wolbachia* interactions. *Adv. Pathobiol.* 70: 299-331.
- Verhulst, E, C., Beukeboom, L, W. and van de Zande, L. (2010) Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. *Science* 328: 620-623.
- Veneti, Z., Bentley, J, K., Koana, T., Braig, H, R. and Hurst, G, D, D. A functional dosage compensation complex required for male killing in *Drosophila*. *Science* 307: 1461-1463.
- Waterbury, J, A., Jackson, L, L. and Schedl, P. (1999) Analysis of the Doublesex female protein in *Drosophila melanogaster*: Role in sexual differentiation and behavior and dependence on intersex. *Genetics* 152: 1653-1667.

- Waterbury, J. A., Horabin, J. I., Bopp, D. and Schedla, P. (2000) Sex determination in the *Drosophila* germline is dictated by the sexual identity of the surrounding soma. *Genetics* 155: 1741-1756.
- Werren, J. H., Zhang, W. and Guo, L. R. (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia* – reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol. Sci.* 261: 55-63.
- Werren, J. H., Baldo, L. and Clark, M. E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 741-751.
- Willhoeft, U. and Franz, G. (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737-745.
- Zhang, W., Li, B. R., Singh, R., Narendra, U., Zhu, L. Y. and Weiss, M. A. (2006) Regulation of sexual dimorphism: Mutational and chemogenetic analysis of the *doublesex* DM domain. *Mol. Cell. Biol.* 26: 535-547.
- Zha, X., Xia, Q., Duan, J., Wang, C., He, N. and Xiang, Z. (2009) Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 315-321.
- Zhu, L. Y., Wilken, J., Phillips, N. B., Narendra, U., Chan, G., Stratton, S. M., Kent, S. B. and Weiss, M. A. (2000) Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev.* 14: 1750-1764.

摘要

Wolbachia は、非常に広範囲の節足動物およびセンチュウで発見されている細胞内共生細菌で、宿主の細胞質を通じた母子感染によって感染を拡大させる。基本的に細胞質を通じてメス親から子へのみしか伝搬できないため、感染したメス親の適応度を生殖操作によって高めることで、自身の伝播を有利にする利己的な因子として知られている。アズキノメイガに感染する *Wolbachia* は、male-killing を引き起こすことが知られている。逆に、抗生物質処理によって *Wolbachia* を除去すると、メス個体のみが致死となる現象が確認されている。また、*Wolbachia* 感染系統のアズキノメイガを成虫期に抗生物質処理すると次世代において雌雄の特徴が入り混じった性モザイク個体が発見されるが、この性モザイク個体はすべて遺伝的にオスの個体であることがわかっている。本研究は、これまで検証が困難であった *Wolbachia* による生殖操作機構を、宿主の性決定遺伝子という新しい切り口から解析し、さらに多方面からの検討を加えたものであり、4 章から構成されている。

1. アズキノメイガにおける *doublesex* ホモログの同定

アズキノメイガに感染する *Wolbachia* は不完全ながら遺伝的オスをメス化している。そこで、表現型としての性を判別するツールとして、また、*Wolbachia* による生殖操作を検証するための指標として、さらには *Wolbachia* による生殖操作と宿主の性決定機構との関係を解明するための標的遺伝子候補の一つとして、多様な生物間で保存性が高く、かつ雌雄で異なった mRNA isoform を発現する *dsx* のホモログの単離を試み、結果として、オスで 1 種類、メスで 2 種類のアイソフォームを確認した。*Osdsx* は各ステージおよび組織で雌雄に特異的なアイソフォームが選択的スプライシングによって生

じていることがわかった。また、*Osdsx* と *Bmdsx* に配列のみならず構造的にも非常に高い保存性が確認された。

2. 性モザイクにおける *Osdsx* の発現解析

Wolbachia 感染系統のアズキノメイガでは、感染メス成虫を抗生物質処理すると次世代で性モザイク個体が発生する。この性モザイク個体は遺伝的オスが不完全なメス化を受けたものである。*Wolbachia* によって性転換が起こる例は、ヨコバイの一種やキチョウで報告されているが、分子レベルで性転換が行われていることを示した例はない。本研究では、性モザイク個体において *Osdsx* 発現解析を行った結果、雌雄両タイプの *Osdsx* が発現していることが示された。一方、性モザイク個体の中に、オス特異的組織である精巣と、メス特異的組織である交尾嚢が同時に発生することがあるが、これらの性特異的な組織では、それぞれで異なった性特異的 *Osdsx* が発現していた。この結果、*Wolbachia* 感染によってアズキノメイガの遺伝的オスがメス化作用を受けていることが分子レベルで示された。

3. アズキノメイガの *Wolbachia* は宿主の性決定遺伝子を代替する

アズキノメイガの *Wolbachia* 感染系統では、幼虫期に抗生物質処理で完全に *Wolbachia* を除去してやると、次世代で遺伝的メスのみが特異的に致死となる。この現象は、宿主メスの生存に必須の機能を *Wolbachia* が代替可能となり、宿主側の遺伝子機能が喪失しても生存に不利にならないため淘汰されず、結果的にメスの生存に *Wolbachia* が必須となってしまった結果と考えられる。本研究では、非感染個体、*Wolbachia* 感染個体（オス致死）および感染除去個体（メス致死）のアズキノメイガの孵化前の卵を用いて、遺伝的性と性決定遺伝子発現の比較検討を行ったところ、

Wolbachia 感染メスの子では遺伝的オスがメス化されているが、逆に、感染除去メスの子では遺伝的メスがオス化されていることがわかった。また、W 染色体特異的マーカーで *Wolbachia* 感染および非感染アズキノメイガのゲノムを比較したところ、*Wolbachia* 感染アズキノメイガでは増幅断片が得られなかった。これらの結果から、*Wolbachia* は遺伝的オスをメス化する因子を持ち、メスのアズキノメイガではその機能が *Wolbachia* によって代替され宿主側から失われていることがわかった。

4. 高温処理による *Wolbachia* 密度の変化と次世代の性比の関係

アズキノメイガでは、抗生物質処理によって *Wolbachia* 感染を除去することが可能である。しかし、抗生物質処理では残効があるため *Wolbachia* による致死効果やメス化作用の解析が難しく、残効のない *Wolbachia* 除去法、性モザイクの作出法の開発が課題である。本研究では、*Wolbachia* 感染メスを 60℃という高温で短時間処理するという、これまでにない処理方法を試み、結果として、次世代で *Wolbachia* による male-killing 能を低減させ、性モザイク個体を発生させることに成功した。さらに、定量 PCR によって、male-killing 能が低下している子の親では、相対的に *Wolbachia* 密度が低くなっていることを明らかにした。この結果から、male-killing 強度が *Wolbachia* 密度に依存することがわかった。また、温度処理次世代の *Wolbachia* 感染確認を通して、*Wolbachia* の侵入したオスは致死か性モザイク個体となり、正常な発育が不可能になる可能性が示された。

以上の研究により、アズキノメイガの共生細菌 *Wolbachia* は宿主の性決定機構を代替していることが示された。その遺伝子は W 染色体に座乗するメス化遺伝子で、カイコガの *Fem* 遺伝子に相当するものと推測される。また、温度処理実験の結果から、

Wolbachia 感染が除去されない状態でもアズキノメイガの性モザイク個体が致死とならないことから、*Wolbachia* そのものは致死作用を持たないことが示された。これらの知見から、致死を引き起こす原因としては遺伝子量補償の異常が有力視される。また、male-killing を引き起こすには発生初期における十分量の *Wolbachia* が必須であることがわかった。