

【序論】

膜翅目昆虫は性染色体をもたず、性染色体が性決定に関わらないという点で興味深い。膜翅目昆虫として有名なセイヨウミツバチの性決定様式は相補モデルによって説明することができる。相補モデルでは、1つの性決定遺伝子座に多数の対立遺伝子が存在し、対立遺伝子がヘテロになると雌、ヘミまたはホモになると雄になる。セイヨウミツバチではこのモデルで想定されている性決定遺伝子として、*csd* (*complementary sex determiner*) が単

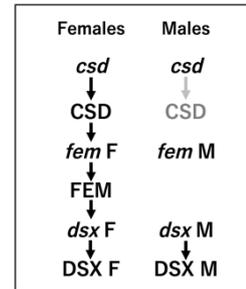


図1. セイヨウミツバチの性決定カスケード

離されている。*csd*には少なくとも15種類以上の対立遺伝子の存在が確認されており、雌決定に支配的な役割をもつことがわかっている。ミツバチの性決定カスケードにおいて*csd*は最上流に位置し、下流に位置する*fem*のスプライシングを制御する(図1)。*fem*は性別によって異なるスプライシングを受ける(図2)。*fem*はデフォルトでは雄型のスプライシングを受けるが、*csd*がヘテロ接合の場合にのみ雌型スプライシングを受ける。雌型*fem*はFEMタンパク質を産生し、FEM存在下では*dsxF*、非存在下では*dsxM*の発現が誘導される。DSXFとDSXMは個体の性をそれぞれ雌、雄へと分化させる。このように、*csd*がヘテロになると個体が雌になるのは、*csd*がヘテロの時のみ*fem*の雌型スプライシングを誘導する機能をもつCSDタンパク質が作られるからだと考えられているが、これは

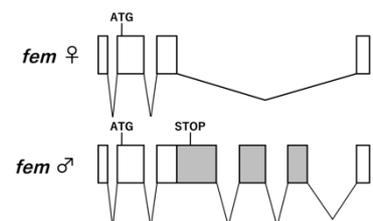


図2 *fem*の雌雄スプライシング様式

RNAiによって得られた状況証拠に立脚して立てられた仮説に過ぎず、単一アレルから作られるCSDタンパク質と、複数アレルから作られるCSDとの間にどのような機能的差異が存在するのか、という点について実験的な検証はなされていない。そこで本研究では、様々なアレル由来のCSD発現コンストラクトを多数作成し、カイコ培養細胞を用いた*in vitro*スプライシングアッセイ系によって*fem*スプライシング制御機構の解明を目指した。

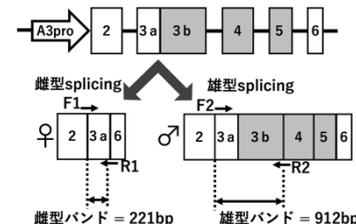


図3. *fem*ミニ遺伝子の構造とスプライシングの検出に用いたプライマーの位置

【結果と考察】

カイコ培養細胞を用いたCSDスプライシングアッセイ系の構築

CSDがその下流の標的である*fem*の雌型スプライシングを誘導することができるか評価するため、*fem*の雌型スプライシングが起こるエクソン2から6までを含むゲノム断片をカイコ培養細胞発現用ベクターに組み込み、*fem*ミニ遺伝子を構築した。異なるアレル由来のCSDタンパク質を発現させるため、野外で採取したセイヨウミツバチの雌から得られた異なる*csd*アレル(便宜上*csd*²⁻⁶と*csd*⁵⁻⁴とする)の完全長ORFを昆虫培養細胞タンパク質発現用ベクターに組込

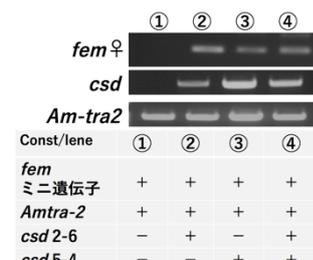


図4. *fem*ミニ遺伝子と*csd*発現ベクターをトランスフェクション後RT-PCRにより雌型スプライシングを検出

み、CSD 発現コンストラクトとした。これらをカイコ培養細胞 (BmN 細胞) にコトランスフェクションし、ミニ遺伝子のスプライシングパターンを RT-PCR により確認した (図 4)。その結果、CSD²⁻⁶ のみ、CSD⁵⁻⁴ のみ、CSD²⁻⁶ と CSD⁵⁻⁴ 両方をトランスフェクションした場合に *fem* の雌型のスプライシングが起こることがわかった。以上の結果から、本実験系により CSD のスプライシング活性を評価できることが明らかとなった。また、単一アレルのみでも *fem* の雌型スプライシングを起こせる可能性が示唆された。

CSD は単一アレル由来であっても雌型スプライシングを引き起こすことができる

CSD の雌型スプライシング活性にアレル間で違いがあるのか検証するため、10 種類のアレルを野生のミツバチから単離し、上述のスプライシングアッセイ系を用いて各 CSD の雌型スプライシング活性の有無を評価した (図 5)。その結果、2 つのアレル由来の CSD (CSD²⁻³ と CSD³⁻¹) を除く全ての CSD について *fem* の雌型スプライシングが確認された。これらのア

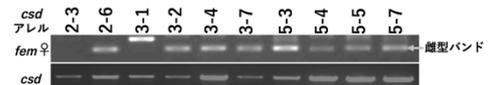


図5. 単一の *csd* アレル発現ベクターをトランスフェクションした場合の *fem* 雌型スプライシング (*fem*♀) を RT-PCR により検出

レルを様々な組合せで発現させた場合、どの組合せの場合も *fem* は雌型スプライシングを受けることが明らかとなった (図 6)。単一の CSD を発現させた場合と二種類の組合せで発現させた場合とで雌型スプライシングの強さに差がみられるか確認するため、雌型スプライシング産物を定量したところ、雌型スプライシングの強さに違いはみられないことがわかった (図 7)。



図6. 2種類の *csd* アレル発現ベクターをトランスフェクションした場合の *fem* 雌型スプライシング (*fem*♀) を RT-PCR により検出

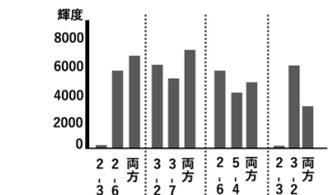


図7 *fem* 雌型スプライシングレベルの比較
いくつかの代表的な *csd* アレルについて示した

CSD が異なるアレル由来であることは正確な雌型スプライシングにとって必要である

次に、単一アレル由来の CSD を発現させた場合と異なる2種類のアレル由来の CSD を発現させた場合において、雄型スプライシングが起きているかどうかを調べることにした (図 8)。その結果、CSD が単一アレル由来の場合は、CSD²⁻³ と CSD³⁻¹ を除く全ての例において雄型スプライシングが起きていることがわかった。一方、異なる2種類のアレル由来の CSD を発現させた場合は、ほとんどの組合せにおいて雄型スプライシングがみられなかった。

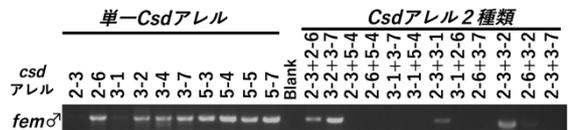


図8. 単一もしくは2種類の *csd* アレル発現ベクターをトランスフェクションした場合の *fem* 雄型スプライシング (*fem*♂) を検出

【考察】

従来の仮説では、*fem* の雌型スプライシングを誘導するには異なる 2 種類の *csd* アレルが必要不可欠であると考えられていた。しかし、今回の実験から単一アレルのみでも *fem* の雌型スプライシングを誘導することが可能であることが示唆された。しかし、CSD が単一アレル由来の場合、雄型スプライシングも同時に起きており、スプライシングの正確性に欠けることがわかった。これに対し、CSD をヘテロで発現させると、雌型スプライシングの効率自体は単一アレル由来の場合と変わらないものの、スプライシングの正確性において優れていることが判明した。このことから、*csd* アレルが2種類あることによる機能として、従来の仮説で言われているような雌型スプライシングを誘導する、というのではなく、雌型スプライシング以外のスプライシングバリエーションを生じにくくする機能があることが示唆された。