

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

平成18年度 博士課程 進学

氏名 杉本 貴史

指導教員名 石川 幸男

論文題目

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

Wolbachia 属の細菌(以下、*Wolbachia* と略す)は、非常に広範囲の節足動物およびセンチユウで感染が確認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。*Wolbachia* の中には自身の増殖に有利になるよう宿主の生殖を操作するものが存在する。*Wolbachia* は、その特性から、現象の面白さのみならず、害虫防除、天敵の効率的な生産、防疫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、それらの研究を進展させるためのツールとしても期待できる。

アズキノメイガ *O. scapulalis* に感染する *Wolbachia* は、宿主の子においてオスのみを選択的に殺す male-killing という現象を引き起こす。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* によって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。しかし、*O. scapulalis* では抗生物質によって *Wolbachia* を除去した際に、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 *O. scapulalis* 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わかっている。

これらの知見から、*Wolbachia* は宿主の性決定機構になんらかの影響を与えることで生殖操作を行っていると考えた。本研究では、*O. scapulalis* に感染する *Wolbachia* の生殖操作の機構を、性決定という観点から追及し、その解明を試みた。その概要を以下に述べる。

第一章 *O. scapularis* における *doublesex* 遺伝子 homolog の同定

O. scapularis は、共生微生物 *Wolbachia* に感染することで、male-killing 現象が引き起こされることが報告されているが、この *Wolbachia* は遺伝的オスをメス化している兆候を示す。そこで、雌雄判別が難しい胚や幼虫期において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、究極的には、*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 isoform を持つ *dsx* の homolog は有効なツールとなりうるを考え、第一章では、その単離を試みた。まず、縮重プライマーを用いて *O. scapularis* における 3 つの *dsx* ホモログを単離し、それぞれ *Osdsx^M*, *Osdsx^{FL}*, *Osdsx^{FS}* と命名した。これは、鱗翅目昆虫では、bombycidae 以外では最初の報告となる。また、inverse PCR によって exon/intron 境界を決定し、雌雄それぞれの isoform が選択的スプライシングによるものであることを確認した。さらに、詳細な発現解析によって、*Osdsx* が各ステージおよび組織において、雌雄で異なった発現を示すことを示した。*Bmdsx* との間での構造的、機能的な領域の保存性について検討を行った結果、*Osdsx* と *Bmdsx* は構造的によく似ているだけでなく、機能的にも類似の遺伝子であることが示唆された。

第二章 *Wolbachia* が誘導する性モザイクにおける性決定遺伝子 *Osdsx* の発現解析

Wolbachia に感染した *O. scapularis* では、成虫期の抗生物質処理による不完全な *Wolbachia* 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。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。共生生物によって性転換が起こる例としては、*Wolbachia* 感染によって Feminization が引き起こされるキチョウ *Eurema hecabe* が知られており、*E. 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。また、ウンカやハチ類では、ネジレバネ類の寄生によって外見的には性転換が起こっているように見える事例が報告されているが、この場合は、オス個体ではメスに、メス個体ではオスに、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。他にも、現象としての性モザイクや性転換の報告は多く存在するが、分子レベルで性転換が行われていることを示した例はまだ存在しない。

昆虫で広く homolog の存在が確認されている性決定遺伝子 *dsx* は、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。*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

な発現の差を制御していることが示されている。これらの特徴は、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、体細胞の表現型を決める性決定遺伝子として性決定カスケードへの影響を調べるツールとして有効である。

第二章では、*Wolbachia* 感染および感染解除が宿主 *O. scapularis* に与える性的な影響を、*dsx* の *O. scapularis* における homolog である *Osdsx* 発現を通して解析した。その結果として、*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ることを確認した。その一方で、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、それぞれに性特異的な *Osdsx* が発現することが示された。本研究は、*Wolbachia* 感染によって遺伝的オスである *O. scapularis* 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。

第三章 male-killing を引き起こす *Wolbachia* は宿主の性決定遺伝子を代替している

O. scapularis では、*Wolbachia* 感染により、male-killing が引き起こされる。また、この *Wolbachia* では、成虫期に抗生物質処理によって不完全に *Wolbachia* を除去した際に、その次世代で性モザイク個体が発現する。この性モザイク個体はすべて遺伝的にはオス型であることから、*Wolbachia* は宿主を性転換させているが、完全な Feminization には至らず致死となっていると考えられている。一方、幼虫期における抗生物質処理で完全に *Wolbachia* を除去した際に、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。この現象は、宿主が *Wolbachia* との共生関係の中で、宿主メスの生存に必須の機能を *Wolbachia* が代替するようになったため、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結果と考えられる。

第三章では、*Wolbachia* 非感染個体、*Wolbachia* 感染個体(オス致死)および *Wolbachia* 感染除去個体(メス致死)の *O. scapularis* 胚において、遺伝的性と遺伝子発現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を推定した。また、*Wolbachia* によって操作を受ける因子を 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、*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、*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* 感染オスの致死現象である male-killing は *Wolbachia* が宿主に対して能動的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、感染除去メスの致死現象

では、共生関係の中で *O. scapularis* が生存に必須な因子の一部を *Wolbachia* に依存するようになったため、結果的に *Wolbachia* 無しでは宿主のメスが生存不能になっていると考えられる。また、その原因となる因子は、どちらも共通で、W 染色体上に存在するメス化を促す優性の性決定因子がそれにあたると考えられる。また、W 染色体特異的マーカーで *Wolbachia* 感染および非感染 *O. scapularis* のゲノムを比較したところ、感染 *O. scapularis* のみで増幅断片が得られなかったことから、W 染色体は *Wolbachia* 感染個体で特異的に変化が起きていると考えられる。

第四章 高温処理による *Wolbachia* 密度の変化と次世代の性比の関係

Wolbachia に感染した *O. scapularis* では male-killing 現象が引き起こされるが、male-killing は生殖操作の結果がオスの致死というわかりやすい効果として現れるため、密度と性比の関係を調べるのに適した形質と言える。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。その他の知見も含めて、母の *Wolbachia* 密度は子の *Wolbachia* 密度に影響を与えることが複数の種で確認されている。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。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。

以上の知見から、*O. scapularis* 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考えた。また、抗生物質によらない *Wolbachia* 除去法を用いることで、*Wolbachia* 密度に依存して起こる現象の観察が容易になる。

本研究では、*Wolbachia* 感染メスを 60℃ という超高温で短時間の処理を行うと言う、これまでにない処理方法によって、次世代で *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。また、高温処理によって、*Wolbachia* の male-killing 能に影響を与えるだけでなく、密度の低減効果も確認された。この結果は、*O. scapularis* に感染する *Wolbachia* は、高温短期の温度処理によって密度を減少させることが可能であることを示している。また、高温処理メスの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 は厳密に密度に依存しており、低密度では次世代の伝達がうまくいかなくなっていると考えられる。また、温度処理によって雌雄両個体が出現した際に、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* に感染している。この結果は、オスでは *Wolbachia* 感染から免れた個体は生存可能となり、*Wolbachia* の侵入したオスは致死か性モザイク個体となることを示している。