

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 杉本 貴史

Wolbachia は、節足動物およびセンチュウで広く感染が確認されている細胞内共生細菌で、主に宿主の細胞質を通じた母子感染によって伝搬する。この細菌はしばしば、自己の増殖を有利にするため宿主のメスの適応度を上げる生殖操作を行うことが知られている。アズキノメイガに感染する *Wolbachia* は、オスの子のみが致死となる「オス殺し」現象を引き起こす。興味深いことに、アズキノメイガの *Wolbachia* 感染系統から抗生物質処理によって *Wolbachia* を除去すると、逆にメス個体のみが致死となる。また、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出現がするが、この性モザイク個体はすべて遺伝的にオスであることがわかっている。本研究は、これらの現象を踏まえて、*Wolbachia* による宿主の生殖操作機構を宿主の性決定遺伝子の発現解析という新しい切り口から研究したものであり、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 アイソフォームを発現する *doublesex* (*dsx*) 遺伝子のホモログの単離を試みた。その結果、オスで1種類 (*Osdsx^M*)、メスで2種類のアイソフォーム (*Osdsx^{FL}*, *Osdsx^{FS}*) を確認し、雌雄に特異的な *Osdsx* 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* とカイコのホモログ *Bmdsx* との間には、配列のみならず遺伝子の構造にも非常に高い保存性が認められた。

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、性モザイク個体では雌雄両タイプの *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巢と、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* を除去すると、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な機能を *Wolbachia* が代替することで、宿主側の遺伝子機能が喪失しても生存可能なため淘汰されず、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染色体特異的のマーカで *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失われ *Wolbachia* によって代替されていることが示唆された。

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* を感染個体から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時間的解析が難しく、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った。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た結果、次世代で *Wolbachia* によるオス殺し能を低減させ、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、オス殺し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、オス殺しの強度が *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。

上記の結果を総合して考えると、*Wolbachia* 感染系統のメスでは、カイコガの *Fem* に相当するメス化遺伝子 (W染色体に座乗) が機能を失っていると考えられた。また、*Wolbachia* 感染性モザイク個体が生存可能であることから、*Wolbachia* 自体は致死作用を持たず、致死現象は性染色体型と性決定遺伝子の性が異なる場合に引き起こされると考えられる。致死となるメカニズムについては、遺伝子量補償などが関与していると考えられた。

以上、本研究はアズキノメイガの共生細菌 *Wolbachia* が宿主の性決定能を代替していることを示すなど、*Wolbachia* による宿主の生殖操作についての理解を格段に深めたものであり、学術上、応用上の価値が高い。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。