

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658046

研究課題名（和文）

鞘翅目昆虫キクイムシにおける半数一倍数性による性決定機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis of sex determination mechanism by haplo-diploidy in scolytine beetles

研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：00293712

研究成果の概要（和文）：本研究では、明瞭な性的二型を示すファイルキクイムシ（*Xyleborus pfeili*）などの Xyleborini 族キクイムシを主たる材料に、鞘翅目昆虫のキクイムシ亜科内で独立に 1 回進化した半数-倍数性による性決定機構を分子レベルで解明することに挑んだ。数種のキクイムシから *transformer-2* や *doublesex* などの性決定遺伝子を単離し、larval RNAi 法を用いた遺伝子機能解析法をキクイムシにおいて確立した。

研究成果の概要（英文）：In the tribe Xyleborini, all species are haplodiploid. The origin of this sex determination mechanism was occurred once in the lineage of Scolytinae. To understand the molecular mechanisms of haplo-diploidy in coleopteran insects, we cloned sex determination genes from several scolytine beetles and established larval RNAi method for these beetles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：性決定・半数-倍数性・キクイムシ

## 1. 研究開始当初の背景

（1）半数-倍数性による性決定は、膜翅目昆虫の性決定様式としてよく知られているが、昆虫類の中では独立に 7 回、全動物では 17 回進化したことが示されている (Mable et al., 1998)。半数-倍数性による性決定に関与する分子レベルの研究は、主にセイヨウミツバチを用いて行われてきた (Hasselmann et al., 2008)。一方、本研究で扱うキクイムシでは、完全な産雄性単為生殖であることが明らかにされているものの (Kirkendall, 1993)、そのメカニズムについては全く不明である。

（2）半数-倍数性の代表種であるミツバチ

の性は、単一の complementary sex determination (CSD) 遺伝子座の 19 の複対立遺伝子によって性が決定される。従って、CSD は同系交配（兄弟姉妹間の交配）の頻度が低いミツバチなどによく当てはまるが、同系交配の頻度が高い寄生蜂の一種キョウソヤドリコバチなどでは CSD が存在しない (Beukeboom and Zande, 2010)。キョウソヤドリコバチの性決定メカニズムも不明であり、ミツバチにおいて原因遺伝子が同定された CSD の根本的なメカニズムについては依然不明のままである。Xyleborini 族キクイムシは、飛翔不能な雄の移動が困難であるため坑道内で確実に同系交配する（交尾した雌は新

たな産卵場所を求めて飛翔移動する)。従って、ファイルキクイムシにもCSDは適応できないと考えられ、一般的な半数-倍数性の性決定メカニズムは、ミツバチとは異なる新しい原理によってもたらされるものと予想される。

(3) 昆虫の性決定機構は、同属別種間ですら最上位の要因は異なる場合があるほど極めて多様性に富む (Sanchez, 2008)。しかしながら、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) で詳細に解明された性決定遺伝子カスケード (後述の図) の中で、性決定の最下流において性分化形質を支配する *doublesex* (*dsx*) は広い昆虫目にわたって保存され、*dsx* の雌雄で異なるスプライシングを制御する上位の *transformer* は雌への性を決定する機能が双翅目と膜翅目において保存されている (Verhulst et al., 2010)。これに対し、鞘翅目昆虫では、一般に性決定要因すら不明であり分子メカニズムに関する研究は皆無である。

(4) Xyleborini 族キクイムシは、未交尾の雌が産む卵はすべて雄になる点、性的二型形質が明瞭である点から性決定研究の格好の材料と考えられる。さらに、世代期間が約一ヶ月と短く、交配が容易であり産卵数も比較的多いことは、研究材料として有利な条件となる。この様な魅力的な研究材料であるにもかかわらず実験に用いられてこなかった唯一の理由は、飼育の困難さにあった。研究分担者は世界で初めて本研究材料の人工飼育法を確立した (Mizuno and Kajimura, 2002; Mizuno and Kajimura 2009) ことにより、本研究の実施が可能となった。

(5) 分子機構の解明には遺伝子機能解析が必要不可欠である。研究代表者がこれまでにナミテントウを用いて確立した larval RNAi 法 (Niimi et al., 2005) は、後胚発生期における遺伝子機能解析に極めて有効であり、これまで遺伝子機能解析手段のなかった非モデル昆虫研究の飛躍的な発展につながることが大いに期待されている。最近、研究代表者は、多様な系統の各種鞘翅目昆虫において larval RNAi 法が遺伝子機能解析に有効であることを実証した。従って、本研究で扱うキクイムシにおいてもこの方法が有効であり、これまで行われることのなかった斬新な切り口からの研究展開が可能になった。

## 2. 研究の目的

本研究では、明瞭な性的二型を示すファイルキクイムシ (*Xyleborus pfeili*) などの Xyleborini 族キクイムシを材料に、鞘翅目昆虫のキクイムシ亜科内で独立に1回進化した

半数-倍数性による性決定機構を分子レベルで解明することに挑んだ。

研究代表者が鞘翅目昆虫において確立した遺伝子機能解析法、さらに研究分担者らが新規に開発したキクイムシの人工飼育法や FISH 法などの染色体観察技術を背景に、Xyleborini 族などのキクイムシの半数-倍数性による性決定の分子メカニズム、並びに性決定様式の異なる近縁種間との比較解析を通してその進化プロセスの解明に挑戦した。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試昆虫

- ① ユズリハノキクイムシ (*Xyleborus volvulus*)
- ② ファイルキクイムシ (*Xyleborus pfeili*)
- ③ クリノミキクイムシ (*Coccotrypes cardamomi*)

### (2) キクイムシの性決定遺伝子のクローニング

各種キクイムシから全 RNA を抽出し、ファーストストランド cDNA を合成し、RT-PCR 法により目的とする遺伝子の部分配列を得た。さらに、RACE 法を行い全長 cDNA のクローニングを試みた。

### (3) キクイムシにおける larval RNAi 法を用いた性決定遺伝子の機能解析

#### ① 二本鎖 RNA の合成

RT-PCR 法にて得られた各種 cDNA がサブクローニングされたプラスミド DNA をテンプレートに用い、MEGAscript™ T7 Kit (Ambion) を用いて、キットのプロトコルに従い二本鎖 RNA を合成した。

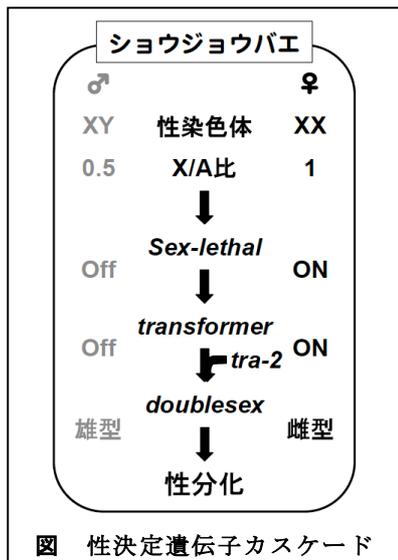
#### ② マイクロインジェクション

インジェクター (FemtoJet; Eppendorf) を用いて、1 個体あたり 0.01~0.08  $\mu$ g の二本鎖 RNA を各種キクイムシの雌の終齢幼虫、または蛹にマイクロインジェクションを行った。なお、コントロールには *egfp* の二本鎖 RNA を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) キクイムシの性決定遺伝子のクローニング

キイロショウジョウバエで明らかにされた性決定カスケード (図) の遺伝子のなかで、双翅目昆虫や膜翅目昆虫で機能が保存された *transformer* (*tra*) と *transformer-2* (*tra-2*)、さらに鱗翅目昆虫を含む広範な昆虫種で保存された *doublesex* (*dsx*) のクローニングを Xyleborini 族などのキクイムシ数種から試みた。*tra* は昆虫種間での相性が極めて低いため、RT-PCR 法でのクローニングは困難が予想されたが、これまでに数種の双



翅目昆虫およびミツバチからクローニングされた *tra* 相同遺伝子およびコクヌストモドキのゲノム情報から見出した *tra* 相同遺伝子間でわずかに保存されたアミノ酸配列に基づき、可能な限り複数のプライマーを設計し、クローニングを試みた。予測通り、この方法ではクローニングはできなかつたため、キクイムシ以外の数種の鞘翅目昆虫を用いて同様にクローニングを試みた。様々な試行錯誤を行った結果、幸いにもナミテントウから *tra* 相同遺伝子のクローニングに成功した。また、*tra-2* についてはユズリハノキクイムシから相同遺伝子の部分配列をクローニングした。さらに、*dsx* についてはユズリハノキクイムシ、ファイルキクイムシおよびクリノミキクイムシから相同遺伝子の部分配列をクローニングした。得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、数種昆虫間で比較した。その結果、今回クローニングしたユズリハノキクイムシ、ファイルキクイムシおよびクリノミキクイムシの cDNA は *dsx*、*tra-2* 両方の遺伝子で他昆虫と高い相同性を示した。したがって、本研究でクローニングした cDNA はユズリハノキクイムシの *dsx*、*tra-2*、ファイルキクイムシおよびクリノミキクイムシの *dsx* であると判断した。

部分配列をクローニングした性的二型形成を司る性決定遺伝子 *dsx* について cDNA の構造上の特徴から Tra と Tra-2 による *dsx* 遺伝子の選択的スプライシングによる調節メカニズムに関するヒントを得るため、ファイルキクイムシの *dsx* の全長 cDNA のクローニングを試みた。この結果、大変興味深いことにファイルキクイムシの *dsx* cDNA には雌雄共通領域においても複数のスプライシングバリエーションが存在することが判明した。さらに、ファイルキクイムシの雌では、雌型 *dsx* cDNA から少なくとも3種類の異なるタンパク質が発現する可能性が示された。以上の結果

より、ファイルキクイムシの *dsx* 遺伝子は、これまでに報告されている昆虫種の *dsx* 遺伝子にはない特徴を備えていることが判明した。すなわち、Tra と Tra-2 タンパク質による選択的スプライシングの調節メカニズムの点においてこれまでの報告にない興味深いメカニズムが存在する可能性が示唆された。

### (2) キクイムシにおける larval RNAi 法を用いた性決定遺伝子の機能解析

本研究によりクローニングした各種 cDNA の遺伝子機能解析を行うために、各種キクイムシの終齢幼虫、または蛹に RT-PCR 法でクローニングした領域に基づき作製した二本鎖 RNA をインジェクションした。また、コントロールとして *egfp* の二本鎖 RNA をインジェクションした。その結果、いずれのキクイムシにおいても全ての遺伝子の二本鎖 RNA のインジェクション後すぐに致死となった。この結果は、コントロールの *egfp* の二本鎖 RNA をインジェクションした個体においても致死となったことから、性決定遺伝子の機能阻害によってもたらされた効果ではなく、キクイムシの幼虫や蛹はインジェクションによるダメージによる影響が大きいことが原因であると考えられた。

そこで、本実験遂行に適した飼育条件の検討を行うと共に、何度も試行錯誤を行ってインジェクション法を改良することにより、羽化率が 100% 近く得られる条件を見出すことに成功した。現在、本研究により確立したインジェクション法を用いることにより、キクイムシの性決定遺伝子の機能解析を進めている。今後、これら性決定遺伝子の機能を解明することにより、半数-倍数性による性決定メカニズムの解明が大きく進展することが期待される。

### (3) 配偶子形成過程の染色体観察

異なる性決定様式のキクイムシ間での配偶子形成過程の染色体観察を行うための予備実験として、既に染色体観察法の確立した数種の鱗翅目昆虫を用いて条件検討を行った。本成果をキクイムシに応用することにより、異なる性決定様式を示すキクイムシ間での相違点を明らかにする予定である。

さらに、性決定遺伝子の RNAi によって完全に性転換が生じた場合、染色体構成が半数あるいは倍数であるかを配偶子形成過程で FISH 法により染色体を観察することにより、染色体構成にかかわらず性転換が生じたことを証明する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

① Nguyen P., Sykorova M., Sichova J., Kuta V., Dalikova M., Capkova, Frydrychova R., Neven L. G., Sahara K. and Marec F. (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, in press. 査読有  
10.1073/pnas.1220372110

② Yoshido A., Sichova J., Kubickova S., Marec F. and Sahara K. (2013) Rapid turnover of the W chromosome in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. *Chromosome Research*, in press. 査読有  
10.1007/s10577-013-9344-1

③ Sahara K., Yoshido A. and Traut W. (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, **20**, 83-94. 査読有  
10.1007/s10577-011-9262-z

④ Masuya, H., Kajimura, H., Tomisawa, N. and Yamaoka, Y. (2012) Fungi associated with *Scolytogenes biosimensis* (Coleoptera: Curculionidae) infesting *Pittosporum tobira*. *Environmental Entomology*, **41**, 255-264. 査読有  
10.1603/EN11090

⑤ Yoshido A., Sahara K., Marec F. and Matsuda Y. (2011) Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. *Heredity*, **106**, 614-624. 査読有  
10.1038/hdy.2010.94

⑥ Yoshido A., Yasukochi Y. and Sahara K. (2011) *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, **41**, 370-377. 査読有  
10.1016/j.ibmb.2011.02.005

⑦ 水野孝彦・梶村 恒 (2011) 検疫終了材を加害する ファイルキクイムシの穿孔特性. *中部森林研究*, **59**, 227-230. 査読無

〔学会発表〕(計10件)

①黒田慶子・梶井千永・森田剛成・軸丸祥大・山岡裕一・梶村 恒 (2013) イチジク株枯病

における *Ceratocystis* 属菌と養菌性キクイムシの連携. 第124回日本森林学会, 2013年3月27日, 岩手大学学生センターA棟(盛岡).

② 西村朋也・梶村 恒: ウリハダカエデ伐倒木における養菌性キクイムシ穿孔孔の時空間分布. 第124回日本森林学会, 2013年3月26日, 岩手大学第1体育館(盛岡).

③和田健志・中田萌・柳沼利信・新美輝幸: 角を有する数種鞘翅目昆虫における *doublesex* 遺伝子のクローニング. 平成25年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会—日本蚕糸学会 第83回大会—, 2013年03月19日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所本館(つくば).

④ 梶井千永・森田剛成・軸丸祥大・梶村 恒・黒田慶子 (2012) アイノキクイムシの樹幹内行動はイチジク株枯病の発病にどう影響するのか. 日本生態学会近畿地区会 2012年度第1回例会, 2012年6月9日, 京都大学生態学研究センター(大津).

⑤ 水野孝彦・梶村 恒: 水面貯木場におけるファイルキクイムシの発消長とその温度依存性の実証. 第123回日本森林学会大会, 2012年3月28日, 宇都宮大学基盤教育D棟(宇都宮).

⑥ 伊藤昌明・梶村 恒: ハンノキキクイムシ (*Xylosandrus germanus*) の共生菌の培養形質に基づく種内系統と外部形態形質の関係. 第123回日本森林学会大会, 2012年3月28日, 宇都宮大学第1体育館(宇都宮).

⑦ 吉戸敦生・安河内祐二・佐原 健: シンジュサンにおける染色体の同定と性染色体進化の解明. 日本染色体学会, 2011年11月11日, 神奈川大学平塚キャンパス(平塚).

⑧ Niimi, T.: Towards the understanding of sex determination in Coleoptera. Noethiger Meeting, 2011年10月6日, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

⑨ Kajimura, H., Kokado, T., I'eda, M., Ito, M., Mizuno, T., Morita, T. and Jikumaru, S.: Ecology and management of *Euwallacea interjectus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) associated with *Ceratocystis* canker on fig trees in Japan. IUFRO WP. 7.03.05 Ecology and Management of Bark and Wood Boring Insects: Novel risks with bark and wood boring insects in broadleaved and conifer forests, 2011年9月9日, Sopron, Hungary.

⑩ Kawasaki, Y., Kajimura, H., Stauffer, C. and Lakatos, F.: Infection pattern of Wolbachia strains in Scolytinae. 4th Workshop on the Genetics of Bark Beetles and Associated Microorganisms, 2011年9月5-6日, Sopron, Hungary.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~yousan/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：00293712

### (2) 研究分担者

梶村 恒 (KAJIMURA HISASHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：10283425

佐原 健 (SAHARA KEN)

岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：30241368

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：