

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 大島 一正
副査 小保方潤一
副査 川北 篤
副査 佐藤 雅彦
副査 椎名 隆
副査 中尾 史郎

- 1 氏名： GUIGUET, Antoine
- 2 学位の種類： 博士（農学）
- 3 学位授与の要件： 学位規程第3条第3項該当
- 4 学位論文題目

Evolutionary origin and molecular bases of the gall-inducing life-style in the
Gracillariidae

(ホソガ科におけるゴール形成能の進化的起源と遺伝基盤)

- 5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本論文は、昆虫による高度な植物操作能の1つであるゴール形成能の進化とその遺伝基盤を研究したものである。昆虫によるゴール形成は、古くから研究されてきた

テーマではあるが、依然としてゴール形成能の獲得過程やどのような遺伝的変更がゴール形成能の獲得に必要であったのかについては、未解明な部分が多い。この理由としては、実験環境下で累代飼育が可能なゴール形成昆虫がほぼ皆無であり、ゴール形成時特有に見られる遺伝子発現を探るところか、植物体上での詳細なゴール形成過程の観察でさえも困難であったことと、ゴール形成を行う昆虫のグループがあまりにも特殊化しているため、どのような生活史を持った昆虫種から派生したのか、その進化的背景を解くことも極めて困難だったことが挙げられる。

そこで申請者は、ほとんどの種が幼虫時代に葉に潜って生活するが、ごく一部の種でのみゴール形成が見られるホソガ科蛾類の実験系に着目した。ヒサカキホソガ *Borboryctis euryae* とタマホソガ *Caloptilia cecidophora* という2種について、実験室内での累代飼育法を確立し、植物上にゴールが誘導される際の詳細な植物組織の改変過程を組織学的に観察するとともに、得られた観察結果から幼虫がどの齢期からゴール形成を開始するかを特定し、その前後で発現が有意に変わる遺伝子の探索といった、これまでにない野心的な研究を展開した。

第1章では、これまでのゴール研究を俯瞰し、まずゴールの定義についての説明と、昆虫が誘導するゴールである「虫こぶ insect gall」に関して、その形態をレビューし、潜葉性昆虫との違いを議論している。さらに、今回の研究で注目する鱗翅目昆虫のゴールに関する知見をまとめている。これらに引き続き、ゴール形成能の進化的起源に関して、ゴールの適応的意義と合わせてこれまでに提唱されてきた仮説をレビューするとともに、潜葉性からの進化は示唆されてはいるものの、ほぼ証明されていないことを明瞭に説明している。こうした問題提起とともに、ゴール形成能最大の謎であるその誘導メカニズムと、昆虫側の候補因子に関して、特に植物ホルモンに重点を置きながらレビューし、本研究で取り組むべき点を明確に示している。最後に、こうした研究背景を踏まえて、本研究で特に注目する2種のホソガ科蛾類、ヒサカキホソガとタマホソガに関して、これまでに得られている知見をもとに生活史の説明と、これら2種を用いて解明していくべき点を的確に述べており、大変効果的な **General Introduction** となっている。

第2章では、ヒサカキホソガが形成する扁平なゴール様組織に関して、これが単なる潜葉痕ではなくゴールであることを、植物側の組織学的な観察と、幼虫の飼育および移植実験から明瞭に示した。特に、3齢幼虫時に幼虫が必ず葉脈の形成層部を摂食することで植物側に刺激を与えていることを組織学的な観察から突き止めたことは、ゴール誘導時における未分化細胞の重要性を示唆するもので大変興味深い。また、これらの結果を総合して、新たなゴールの一形態として、マインゴール **mine-gall** という名称を提案し、その形態的特徴をまとめ上げた点は学術的にも非常に大きな意義を持つと言える。

第3章では、タマホソガの生活史とゴール誘導プロセスを解明するために、鱗翅

目昆虫では初となるゴール形成種の実験室内における累代飼育法を確立した。その結果、近縁な *Caloptilia* 属の種と同様に、1~2 齢期の幼虫は産卵された葉の表皮層に潜る潜葉性であることが明らかとなった。さらに、3 齢幼虫への脱皮に伴う過変態によって形成される吐糸管から吐き出された糸の付着部から、植物細胞の肥大化と細胞分裂の促進が観察され、本種のゴール誘導において、幼虫が吐き出す糸に重要な役割があることが示唆された。また、3 齢幼虫時に肥大化と細胞分裂の促進が引き起こされた柔組織側が異常分裂を継続することで、柵状組織側へと肥厚したゴール組織が形成される過程が明らかとなった。さらに、寄主植物に潜葉している 2 齢幼虫を人工的に殺した後の植物細胞を観察し、ゴール状組織の形成が一切見られないことから、ゴール組織の誘導は 3 齢幼虫への脱皮以降に開始されることを明確に示した。このようにゴール組織の形成過程をその開始点から観察しただけでなく、ゴール組織の誘導において鍵となる幼虫の行動までも突き止めた点は特筆に値する。

第 4 章は、タマホソガとその近縁種において、ゴール形成能がどのように進化してきたのかに関して、系統解析で迫ったものである。まず、過去の文献記録の精査と野外での精力的なフィールドワークから、タマホソガの近縁種には、タマホソガ以外にも未記載のゴール形成種が複数、東南アジアからオセアニア区にかけて分布していることを突き止め、これらのうち 3 種を解析に含めることに成功した。また、同様にタマホソガに近縁ではあるがゴールを形成しない種においても、6 種の未記載種を確認し、既知のゴール非形成種 6 種とともに解析を行っている。その結果、タマホソガを含むゴール形成種は、日本から東南アジア、そしてオセアニアと広域に渡って分布しているにも関わらず、単一の起源を持つことが示唆された。また、解析に用いたタマホソガとその近縁種においては、まずコミカンソウ科 *Phyllanthaceae* への寄主転換が生じ、その後にタマホソガの寄主でもあるカンコノキが含まれるカンコノキ属 *Glochidion* への寄主転換が生じ、最後にゴール形成能が獲得されたことが示唆された。このように、ゴール形成能の獲得過程と寄主植物の変遷過程を同時に議論している点は非常に独創性の高い研究成果と言える。

第 5 章は、タマホソガとその近縁種の 1 つでゴール形成能を持たないリュウキュウハマキホソガを用いて、種内と種間での転写産物の比較から、ゴール組織の誘導に関わる昆虫側の候補遺伝子を探索したものである。3 章で得られた結果をもとに、ゴール形成が開始される 3 齢幼虫時に、前後の齢期に比べて有意に発現が上昇する遺伝子を絞り込んだ。さらにこれらの候補遺伝子から、リュウキュウハマキホソガの 3 齢幼虫において発現が低くなっている遺伝子を抽出し、ゴール組織の誘導に関わる可能性のある合計 58 のエフェクター候補遺伝子を見つけ出した。こうした発現比較による候補遺伝子の絞り込みは、用いる手法によって様々な結果が得られるため、より精度の高いエフェクターの探索には、異なる解析手法の併用や、最終的にはゲノム編集技術を用いた機能解析が不可欠となるが、申請者自身が考え出した、

「同種内でゴール形成期と非形成期が見られる種」と「ゴール形成種にごく近縁なゴール非形成種」間で種内および種間比較を行うという戦略で、候補遺伝子の絞り込みが効果的に行えることを示した点で大きな学術的価値を持つと言える。

最終章の第 6 章は、以上の結果を踏まえた総合考察となっているが、自身が 2 章にて見つけた mine-gall に関して、過去の文献の精査によるレビューも展開している。この中で、mine-gall という概念を導入することで、単純に葉に潜っているだけの潜葉性昆虫から複雑なゴールを形成する昆虫まで、その植物操作能の程度を連続的に捉えることができるのではないか、という議論を展開している。これまでの研究においては、ゴール形成能の特殊性が特に強調され、そして注目を集めてきたが、植食性昆虫に見られる様々な摂食様式とそれに伴う植物操作能の強弱として、連続的に解釈しようという視点は、今後の当該分野において非常に重要になると考えられる。

以上、本論文はゴール組織の誘導過程を詳細に明らかにすると共に、その進化プロセスとゴール形成に関わる候補遺伝子に関して新たな情報を提供した。以上より、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価出来る。

6 最終試験の結果の要旨

本論文の内容は、令和元年 8 月 20 日午前 10 時より、稲盛記念会館 104 号室において、公開の博士学位論文発表会として発表された。口頭発表後、質疑応答が行われ、ゴール形成能の獲得時における幼虫のボディープランの進化、mine-gall の位置付け、ゴールの構造に関する進化、植物側遺伝子との比較や水平伝播の可能性、ゴールが形成されることに伴う植物側へのコスト、ゴール研究を基軸としたより学際的な研究展開の可能性など、非常に多岐にわたる内容が質問されたが、それぞれ適切に回答した。最終試験の結果としては、審査委員全員一致で合格とした。

以上