

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular and Evolutionary Studies on the Endosymbiotic Bacteria

Wolbachia

(細胞内共生細菌 *Wolbachia* に関する分子ならびに進化生物学的研究)

氏名 升井 伸治

Wolbachia 属のリケッチア様の細菌は主に節足動物の細胞内で密接に共生しており、宿主雌の卵を通じて次世代へと垂直感染する。現在 *Wolbachia* の感染は広く見られ、昆虫においてはその全種のうち76%が感染しているといわれる。また昆虫以外の宿主生物種もダニ類や甲殻類、さらには線虫に至るまで幅広く報告されている。一方で、*Wolbachia* はその宿主に様々な生殖異常を引き起こすことで知られている。細胞質不和合、産雌性単為生殖、雌化、雄殺しなどの例があるが、これらの生殖異常は全て、次世代の *Wolbachia* 感染雌の割合を増加させる。*Wolbachia* は感染雌が産む卵を通じて垂直伝播するため、これが結果として *Wolbachia* にとって有利に働くと考えられている。*Wolbachia* 単独での培養は現在のところ不可能であることなどから、分子生物学的な研究はほとんど進展しておらず、これらの現象の分子機構は全く不明である。

第一章 *Wolbachia* における可動遺伝因子とその進化

トランスポゾンやプラスミド、バクテリオファージなどの可動遺伝因子は細菌の性質に関与する様々な遺伝子を乗せて種間を水平移動することにより、細菌に遺伝子の多様性を与え、病原性などの進化を促していると考えられている。*Wolbachia* やその近縁種であるリケッチアではこれまで可動遺伝因子の存在は報告されていなかった。第一章では、*Wolbachia* においてトランスポゾン ISW1 とバクテリオファージ WO を初めて同定し、これらの可動遺伝因子から *Wolbachia* の進化を考察した。

Wolbachia の *groEL* 下流に見い出された ISW1 はサルモネラ属の IS200 に近縁で、ゲノム上に 20 コピー以上挿入されていた。それぞれのコピーの塩基配列は完全に同一であったことから、ISW1 はアクティブであり、ごく最近に転移したと考えられた。一方、ISW1 挿入サイト近傍の塩基配列解析から、ファージ様遺伝子群を発見し、これをファージ WO と名付けた。様々な *Wolbachia* 系統を用いてゲノミックサザン解析を行ったところ、調べた全ての *Wolbachia* の系統がファージ WO に感染していることが明らかになった。また、これらの *Wolbachia* の系統におけるファージ WO 遺伝子の分子系統解析を行ったところ、その分子系統樹は *Wolbachia* の染色体遺伝子のものと全く一致しなかった。さらに、同一宿主に感染している 2 系統の *Wolbachia* 由来のファージ WO 遺伝子が非常に近縁であることもわかった。以上の結果は、ファージ WO がアクティブであり、活発に *Wolbachia* 系統間を転移していることを強く示唆する。ファージ WO ゲノム上には様々なファージやプラスミド、さらに真核生物由来と見られる遺伝子が混在していた。これらの結果からは、細胞内共生をしているために遺伝子水平転移の機会が少ない *Wolbachia* にファージ WO が遺伝子多様性を与え、進化を促してきたことが想像できる。

第二章 *Wolbachia* における 4 型分泌機構遺伝子の同定

Wolbachia が引き起こす生殖異常のうち、最も多くの宿主昆虫種で見受けられるのが細胞質不和合という現象である。細胞質不和合は *Wolbachia* 感染雄と非感染雌との間での受精卵が発生しない不妊現象で、感染雄と感染雌の間には正常な発生がみられる。細胞質不和合の分子機構はほとんど分かっていないが、*Wolbachia* は精巣内で何らかの物質を分泌しており、正常な精子の活動がその物質に障害され、細胞質不和合を引き起こされると考えられている (図 1)。

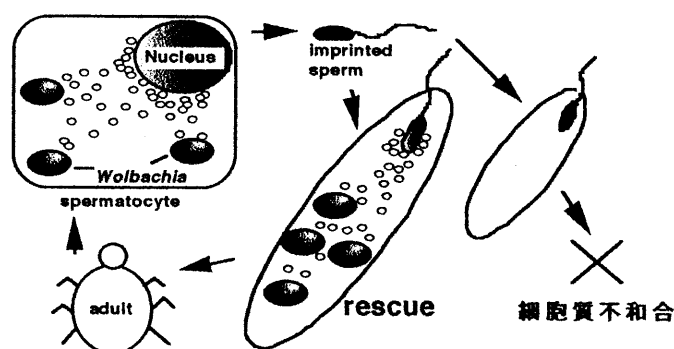


図 1 細胞質不和合 (CI) とそのrescue。

spermatocyteで修飾を受けた精子は *Wolbachia* 非感染卵と受精すると細胞質不和合を起こすが、感染卵と受精すると修飾が解除され、正常に発生する (rescueされる)。

細菌の巨大分子分泌機構には、大きく分けて 1 型から 4 型までが知られている。4 型分泌機構は、アグロバクテリウム、ヘリコバクター、レジオネラ、リケッチアなど、真核細胞と相互作用する病原性細菌にしばしば見られるが、分泌される巨大分子およびその機能はそれぞれ全く異なる。そこで第二章では、*Wolbachia* が宿主に与える影響の分子的理解へのアプローチとして、*Wolbachia* の 4 型分泌機構遺伝子を同定した。

リケッチアの 4 型分泌機構をコードする遺伝子をプローブとして *Wolbachia* 感染昆虫の DNA ライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンの塩基配列を決定したところ、種々の細菌の 4 型分泌機構と相同な遺伝子群を発見した (図 2)。アグロバクテリウムとの比

較から、これらの遺伝子は 5'側から *virB8*、*virB9*、*virB10*、*virB11*、*virD4* と名付けられた。これらの遺伝子は 4 型分泌機構としての最小の要素をほぼカバーしている。

次に、RT-PCR 解析により、*vir* 遺伝子群は単一のメッセンジャー RNA (全長約 6 kb) に転写されることを証明した。また 5'RACE 解析の結果から、*virB8* の 5'上流 50bp のサイトが転写開始点であると推測された (図 2)。したがって *Wolbachia* における 4 型分泌機構の遺伝子群はオペロンとして発現制御されていると考えられた。コンピューターによるタンパク質局在解析により、これらの *vir* 遺伝子産物群はアグロバクテリウムのホモログと同じ位置に局在すると予測された。また、*vir* 遺伝子産物群が巨大分子分泌装置としての複合体を形成しうるかどうかを酵母ツーハイブリッド法を用いて検証した。その結果、VirB8-B8、B8-B9、B8-D4、B9-B9、B11-B11 の組み合わせで相互作用する可能性が示唆され、アグロバクテリウムにおけるモデルと一致した。以上の結果から、*Wolbachia* の 4 型分泌機構は生体内で実際に機能しており、宿主細胞へ何らかの影響を与えていることが示唆された。

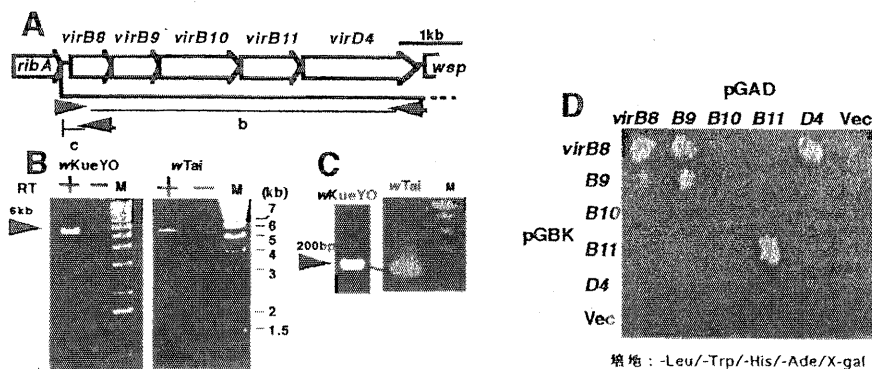


図 2 *Wolbachia* 4 型分泌機構遺伝子群の発現と相互作用の解析。

同定した遺伝子群を *vir* オペロンと名付け、*Wolbachia* の 2 系統 *wKueYO*, *wTai* について発現解析を行った。b、c はそれぞれ図の B、C で用いた領域を表す。D: 酵母ツーハイブリッドアッセイ。相互作用する組み合わせではコロニーが生育し、青く染まっている。pGBK、pGAD はそれぞれ GAL4 DNA-binding domain と activation domain を融合して発現する。Vec; ベクターのみ。