

論文審査の結果の要旨

氏名 升井 伸治

本論文は2章からなり、第一章は *Wolbachia* における可動遺伝因子とその進化について、第二章は *Wolbachia* における4型分泌機構遺伝子の同定について述べられている。

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、その宿主生物種はダニ類や甲殻類、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効果をもっている。*Wolbachia* は感染雌が産む卵を通じてのみ垂直伝播するため、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。

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* 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とバクテリオファージ様遺伝子群を初めて同定し、これらの可動遺伝因子とみられる配列から *Wolbachia* の進化を考察している。*Wolbachia* の *groEL* 下流に見い出された ISW1 はゲノム上に20コピー以上挿入されていた。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、これを暫定的にファージ WO と名付けた。様々な *Wolbachia* 系統を用いてのゲノミックサザン解析から、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示唆され、その分子系統解析から、ファージ WO は活発に *Wolbachia* 系統間を転移していることが示唆された。また、ファージ WO ゲノム上には様々なファージや真核生物由来と見られる遺伝子が混在していたことから、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、進化を促してきたという可能性が示唆された。

Wolbachia が引き起こす生殖異常のうち、最も多くの宿主昆虫種に見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阻害され、細胞質不和合を引き起こすと考えられている。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やリケッチアなど、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。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ている。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することで、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。これらの遺伝子には他の細菌の *virB8*、*virB9*、*virB10*、*virB11*、*virD4* との相同性が認められ、また 4 型分泌機構としての最小の要素をほぼカバーしていた。次に RT-PCR 解析により、*vir* 遺伝子群はオペロンとして発現制御されていることを証明した。さらに、*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。

なお、本論文第一章は鴨田聡、佐々木哲彦、石川統との、第二章は佐々木哲彦、石川統との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。