

論文の内容の要旨

論文題目

Parasitic endosymbiont *Wolbachia* in the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis*:
its multiple infection and horizontal gene transfer.

(アズキゾウムシにおける細胞内寄生細菌 *Wolbachia* : その多重感染と遺伝子水平転移)

氏名 今藤 夏子

第1章 緒言

昆虫とその体内に生息する共生微生物の関係は、お互いの存在が必須である相利共生から、一方がもう一方から搾取する寄生までと実に様々な様相を示す。昆虫-共生微生物系の成立や維持機構の解明は、宿主-寄生/共生系における相互作用の共進化にとって、より深い理解を与えるだろう。近年、昆虫の細胞内共生細菌として注目されている α プロテオバクテリア綱 *Wolbachia* 属の細菌は、卵を介した垂直感染のみによって伝わり、生まれてくる宿主の性表現をメス偏向にしたり、生殖を操作したりすることで、宿主集団中に蔓延する利己的な細胞質遺伝因子の1つである。また、全昆虫種の20%前後に感染していると考えられているほど一般的な細菌である (Werren et al. 1995)。 *Wolbachia* の利己的戦略の中で、特に多くの昆虫種で見られるのが細胞質不和合性 (CI) という生殖操作で、 *Wolbachia* に感染した雄と非感染の雌の交配では、産まれた卵が全く孵化しない、あるいは孵化率が低下するという現象である。CI をもたらず *Wolbachia* (CI *Wolbachia*) の宿主集団における感染動態は、これまでの理論研究と実証研究により、垂直感染の確実さ/CIの強さ/感染が宿主にもたらす適応度コスト、という3つの要因で規定されることが概ね確認されている。ただし、これは宿主1個体にCI *Wolbachia* が1系統のみ感染している場合である。

近年、複数の系統的に異なる *Wolbachia* が1個体の宿主に同時に感染する多重感染が、

幾つかの昆虫種で報告された。CI *Wolbachia* の多重感染については理論研究が先行していて、感染動態を規定する 3 要因の作用は、単一感染と同じであると予想されている。単純に考えると、異なる *Wolbachia* 系統を持てば持つほど、CI の点では有利になると考えられ、自然界には多重感染が多く見られることが予想されるが、実際には、多重感染は単一感染に比べて報告例が少ない。その原因の 1 つに、多くの *Wolbachia* 系統を保持すればするほど宿主に負担がかかり、その結果宿主の適応度が低下する、という「多重感染のジレンマ」が考えられる。また、多重感染系では、単一感染に比べて、様々な要因が非相加的に作用した結果が感染動態に反映されることが予想される。多重感染個体の体内には、異なる *Wolbachia* 系統間の相互作用があり、いわば一つのコンパクトな生態系が存在すると考えられる。この体内生態系での相互作用の結果は、宿主個体レベルでの適応度や CI の強さに反映されるだろう。そして、異なる *Wolbachia* 系統の組合せをもつ宿主間の競争の結果、最終的に宿主集団中の *Wolbachia* 感染頻度が決定されると考えられる。よって、多重感染のメカニズムを解明するには、宿主体内、宿主個体、そして宿主集団レベルという 3 つの異なるレベルから、*Wolbachia* のふるまいや宿主に与える影響を総合的に調べる必要がある。

本研究は、アズキゾウムシ *Callosobruchus chinensis* における *Wolbachia* 多重感染の実態を上記の 3 つのレベルから把握し、*Wolbachia* の多重感染について包括的に理解することを目的とした。アズキゾウムシからは、*Wolbachia* に特異的な遺伝子 *wsp* について異なる 3 つの配列が既に発見されている (Kondo et al. 2002a)。本研究において、そのうちの 1 つ (wBruAus=以後 Aus または A と略記) は、*Wolbachia* としての実体がなく、宿主 X 染色体に水平転移した遺伝子断片として存在することが明らかになった。また、本研究では、残りの 2 系統 wBruCon (Con または C と略記) および wBruOri (Ori または O と略記) について、上記 3 レベルからの感染の実態を調べた。

第2章 アズキゾウムシの地理的個体群における *Wolbachia* の多重感染の蔓延

アズキゾウムシが属するマメゾウムシ科で、アズキゾウムシを除く 12 種 20 系統について診断 PCR を用いて調べた結果、全て *Wolbachia* に非感染であった。次に、診断 PCR により旧大陸各地 9 カ国 26 地域 76 個体のアズキゾウムシについて *Wolbachia* 感染の有無を調べたところ、72 個体が 3 系統の *wsp* 遺伝子配列を全て持ち、三重感染 (Con と Ori の二重感染と、宿主核に水平転移している可能性の高い Aus の保有) が非常に広範な地域にわたり見られることがわかった。さらに、日本の 9 地域個体群 410 個体において 3 系統の *wsp* 遺伝子の頻度を調べたところ、3 系統とも保有する系統が 90% 以上と圧倒的に高い頻度を示した (図 1)。従って、アズキゾウムシには非常に高い頻度で、広範な地域において多重感染が蔓延していることが明らかになった。

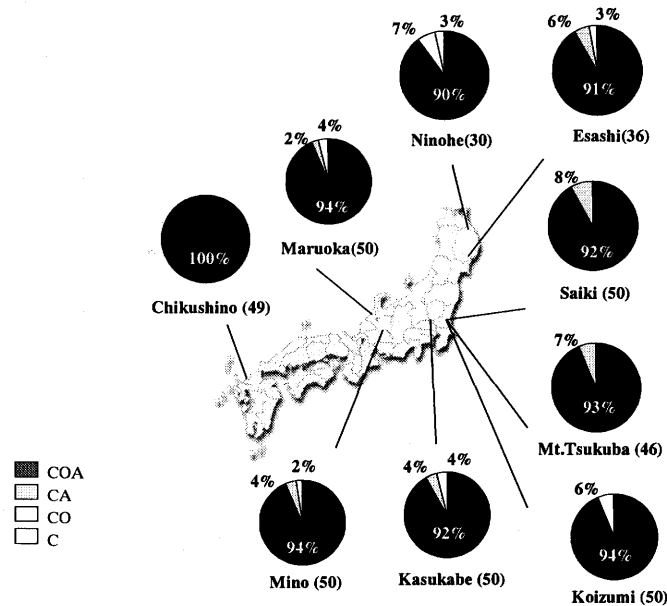


図1 アズキゾウムシの日本野外個体群における *Wolbachia* 感染頻度

第3章 *Wolbachia* 感染がもたらす宿主の適応度コストと細胞質不和合性

感染タイプ別（宿主が持つ *Wolbachia* 系統の組合せ）に、産卵数や羽化数などの適応度成分の比較を行った。宿主の遺伝的背景を揃えた異なる感染タイプの系統を確立し、適応度成分の比較を行ったところ、二重感染（感染タイプ：CO）＜非感染＜単一感染（C）の順に適応度が有意に高いことがわかった。よって、Con の単一感染は宿主適応度の利益になる可能性が示唆された。一方、Ori が加わった多重感染になると宿主の適応度に対し負の効果が大きいことが示唆された。

次に、各 *Wolbachia* 系統による CI の程度を、交配実験において産下された卵の孵化率によって調べた。その結果、Con は孵化率 0% の完全な CI、Ori は中程度（孵化率 60%）の CI、そして Aus は CI を示さなかった。よって、各 *Wolbachia* 系統がそれぞれ異なる強さの CI を示すことがわかった。

第4章 存在量からみた *Wolbachia* 系統間の相互作用

体内における *Wolbachia* 系統間の相互作用の有無を、*Wolbachia* の存在量（定量 PCR により測定した *wsp* コピー数）の比較から調べた。日本 9 地域個体群で採集した感染タイプ COA 個体における存在量は、いずれの個体においても Con と Ori が $10^7 \sim 10^8$ コピーであるのに対し、Aus はその 1/10 である $10^6 \sim 10^7$ コピーと非常に少ないことがわかった。次に、同じく宿主一個体における Con の存在量を、Ori との二重感染時（CO）と Ori のいない単一感染時（C）で比較した。すると、単一感染個体において、Con の存在量は二重感染時に比べて有意に増加し、その増加分は二重感染における Ori の存在量と同じか、それを上回る量であることがわかった。よって、二重感染個体における Con は、Ori の存在量の分以

上にその存在量が抑制されていることが示唆された。さらに、二重感染 (CO) における *Wolbachia* の体内分布を系統別に調べた。すると、体細胞系列の組織・器官では Con が、生殖細胞系列においては Ori が、それぞれ全 *Wolbachia* 量に占める割合を伸ばすことがわかった。これらの知見から、Con と Ori は宿主体内の存在量において何らかの制御を受けていること、また、相互作用をしていることが示唆された。

第5章 *Wolbachia* から宿主 X 染色体への遺伝子水平転移

アズキゾウムシから発見された 3 系統の *wsp* 遺伝子配列のうち、Aus は、CI を示さないことや宿主体内における遺伝子コピー数が少ないなどの特徴を持つことが本研究で示された。そこで、さらに Aus に注目し、まず、三重感染の宿主 (COA) に抗生物質処理を行ったところ、他の 2 系統は 1 世代の抗生物質処理で容易に除去されたが、Aus は 5 世代にわたる処理でも除去されなかった。次に、Aus を持つ個体と持たない個体を用いた正逆交配実験により、宿主子孫に伝わる Aus の遺伝様式を調べた。その結果、Aus の遺伝様式は宿主 X 染色体との伴性遺伝と一致することが示された (図 2)。アズキゾウムシの核型は XY 型であることが既に確認されており、これらの知見を総合すると、Aus は細菌である *Wolbachia* としての実体を持たず、宿主の X 染色体上に存在する遺伝子断片である可能性が示唆された。また、共同研究者の実験からも、Aus からの宿主 X 染色体への遺伝子水平転移が結論された。本研究は、原核生物から真核生物へのゲノム遺伝子の水平転移を示した初の報告例である。

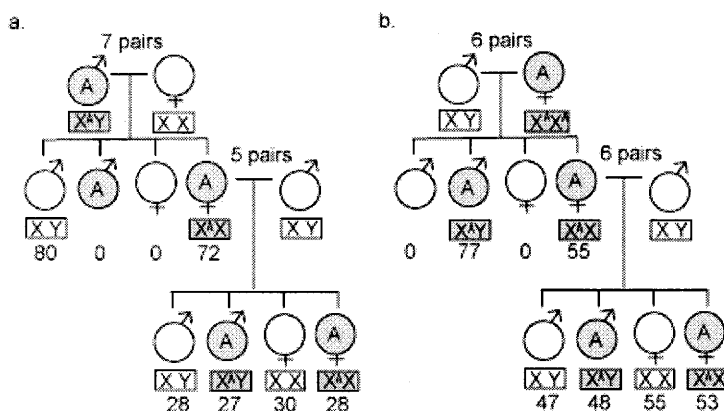


図 2 *wBruAus* の遺伝様式

第6章 総合考察

本研究における宿主体内レベル、宿主個体レベル、宿主集団レベルという 3 つの視点からの *Wolbachia* 多重感染の実態の総合的な把握は、これまでに例がない。本研究により、アズキゾウムシにおいては、宿主体内において *Wolbachia* 同士が相互作用をしていること、感染タイプ・*Wolbachia* 系統によって宿主適応度や CI の強さに与える影響が異なることが明らかになり、多重感染の複雑さが改めて示された。なぜアズキゾウムシにおいて多重感染が蔓延したのかを解明するには、さらに Ori の単一感染系統を確立して宿主への影響を

調べたり、宿主と共生細菌の相互作用の現実性を取り込んだシミュレーション解析などが必要となるだろう。

また、本研究が初の報告例となった原核生物から真核生物へのゲノム断片の水平転移は、異なる生物間において遺伝子がやり取りされる可能性を大きく示唆した。水平転移のメカニズム解明に向けた更なる研究は、生物進化に関わるあらゆる生物分野のみならず、生物工程などの応用分野にも影響を与えるだろう。