

論文の内容の要旨

論文題目 **Identification and characterization of a novel bacteriophage that infects *Wolbachia*, an intracellular symbiont of insects**
昆虫の細胞内共生細菌ボルバキアに感染する
新規なバクテリオファージの同定と解析

氏名 藤井由紀子

ボルバキア属の細菌は、昆虫を中心とした節足動物に広く感染する細胞内共生細菌で、卵の細胞質を通じて母虫から仔虫へと垂直感染する。この細菌は全昆虫種の半数以上に感染していると推定されており、節足動物でもっとも普遍的な共生細菌といえる。このようなボルバキアの圧倒的な進化的成功は、宿主の性と生殖を操作することで昆虫集団内で感染雌個体を増加させ、自らの感染分布を拡大するという卓越した戦略によるものと考えられる。しかし、生殖異常の分子機構の解明はほとんど進んでいない。

近年、スジコナマダラメイガ (*Ephesia kuehniella*) に感染するボルバキア *wKue* のゲノム上にファージ様遺伝子群 *WO* が発見された。また、調べた限りにおいてすべての種類のボルバキアにファージ様遺伝子群が保存されていた。共生細菌は不要な遺伝子を捨て、ゲノムを最小化する傾向がある。にも関わらずファージ様遺伝子群が維持されていることから、ファージ *WO* のゲノム上にボルバキアにとって必須な因子が存在する可能性が高い。また、その因子が多様な宿主への感染・適応、あるいは宿主に引き起こす生殖異常に関わっているかもしれない。

溶原性ファージは宿主ゲノムと共に複製されるというライフサイクルの中で多くの遺伝子を失った結果、不完全なプロファージ断片として細菌ゲノム中に散在する傾向がある。そこで、本研究の第1部では、ファージの完全なゲノムセットを得ることを目的として、まずボルバキアに感染した *E. kuehniella* からのファージ粒子の単離を試みた。

用いた *E. kuehniella* は3系統で、それぞれ *wKue*、*wCauA*、*wCauB* という遺伝的に異なる

るボルバキアに感染している。wKue は本来 *E. kuehniella* に自然感染しているボルバキアである。wCauA および wCauB は、本来スジマグラメイガ (*Cadra cautella*) に二重感染していたもので、これをボルバキア非感染の *E. kuehniella* に移植して、wCauA のみに感染した系統、wCauB のみに感染した系統を得た。

これら3系統の *E. kuehniella* およびボルバキア非感染の *E. kuehniella* をホモジェナイズし、PEG 沈殿によってファージ粒子を回収した。その結果、ボルバキア非感染の *E. kuehniella* から調製したサンプルでは粒子様構造は観察されず、wCauA または wCauB に感染した *E. kuehniella* から調製したサンプルでは、直径 40 nm ほどのファージ様粒子が観察された。これらの粒子からゲノムDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、確かにファージ遺伝子 *orf7* を含むことが示された。またそのゲノムはおよそ 20 kbp の直鎖状2本鎖 DNA であることが示唆された。以上の結果より、ボルバキアに感染するファージ WO (WOcauA、WOcauB) の粒子が単離されたことが示された。wKue のゲノム上にはプロファージ様遺伝子群 WOkue が存在するにも関わらず、wKue に感染した *E. kuehniella* からはファージ粒子が単離されなかった。このことは、WOkue が粒子形成能をもたない不完全なプロファージ断片であるか、または何らかの生理条件の下で溶原状態に留められている可能性が考えられる。

本研究の第2部では、粒子を形成するファージ WO の遺伝子を解析した。以前の研究により、ボルバキア・ゲノム上にはプロファージ様配列が複数種存在することが示唆されていたため、まず、粒子形成能をもつファージの遺伝的タイプを調べた。初めに、wCauA または wCauB に感染した *E. kuehniella* から抽出した DNA を鋳型として、ファージ遺伝子 *orf7* を PCR によって増幅したところ、それぞれ4種類の配列が増幅された。次に、WOcauA および WOcauB から抽出した DNA を鋳型として同様の PCR を行ったところ、WOcauA からは3種類、WOcauB からは2種類の配列が増幅された。この結果は、ボルバキアのゲノム上に存在する複数種のプロファージのうち、粒子をまったく、あるいはほとんど形成しないものと、多く形成するものがある可能性を示唆している。

WOcauA および WOcauB のゲノム DNA からはそれぞれ、配列が完全に一致する *orf7* 遺伝子断片が1種類増幅された。wCauA および wCauB は本来 *C. cautella* に二重感染していたことから、ファージ WO が、同一宿主に感染している wCauA と wCauB の間で水平感染していた可能性が高い。

wCauA と wCauB は遺伝的にかなり異なったボルバキアである。これら2系統のボルバキアに感染しうるファージは幅広い系統のボルバキアへの感染能力をもつと考えられ、ボルバキアの形質転換ベクターとしての高い汎用性が期待される。これまでにボルバキアへの分子生物学的アプローチが制限されていた主な理由は、形質転換法が確立されていない

ためであった。本研究で発見されたファージを利用した形質転換法を開発することにより、生殖異常の分子基盤の解明を初めとするボルバキアの研究へ大きく寄与すると期待される。

本研究では続いて、粒子を形成するファージ WO の遺伝子構成を明らかにする目的で、1種類の WO に着目し、末端構造を除くほぼすべての塩基配列を決定した。多くの粒子が単離された wCauB 由来のファージのうち、wCauA 由来のファージと共通する *orf7* 遺伝子をもつファージ WOcauB1 ゲノムの塩基配列を、次のようにして決定した。wCauB 由来のファージからゲノム DNA を抽出し、EcoRI または SacI による制限酵素処理を行った。得られた断片をプラスミド中にサブクローニングして読みつなぐことにより、約 20 Kbp に渡る WOcauB1 ゲノムの塩基配列を得た。

得られた配列はゲノムの予想長をほぼカバーしており、23 の open reading frame をもっていた (表)。構造遺伝子の中には感染に必要と考えられる尾部構造遺伝子群や Baseplate 集合遺伝子群、 capsid タンパク質をコードする遺伝子群が揃っていた。その他に多くの機能未知遺伝子が存在した。注目すべきことに、機能未知遺伝子 *Gp16* のコードするタンパク質は、羊の病原細菌 *Dichelobacter nodosus* がもつファージ由来の病原性遺伝子アイランドに存在する遺伝子産物とおおよそ 20% の相同性を示した。*Gp16* の塩基配列から予測されるアミノ酸配列に保存されているモチーフを検索したところ、多くのグラム陰性病原細菌が分泌する毒素輸送タンパク質に保存されているロイシンリッチモチーフ (RyLLpYkLePVLEQLlqTkGE) が発見された。*Gp16* タンパク質は、何らかの分子と共にボルバキアから宿主細胞内に分泌され、宿主細胞の機能を修飾している可能性が考えられる。ボルバキアはゲノム上に 4 型分泌機構と呼ばれる巨大分子分泌機構に関わる遺伝子群をもつことが明らかになっているが、分泌される分子は不明である。今後、*Gp16* タンパク質を初めとするファージにコードされたタンパク質の機能を解析することにより、ボルバキア感染・共生の成立、または宿主昆虫に引き起こされる生殖異常の分子的基盤が明らかになると期待される。

本研究の第 1 部で、*E. kuehniella* に自然感染しているボルバキア wKue がもつプロファージ WOkue がファージ粒子を形成していない可能性が考えられた。WOkue が粒子形成能をもたない不完全なプロファージ断片であるかどうかを検証するために、粒子形成能をもつ WOcauB1 と WOkue のゲノム構成を比較した。その結果、尾部構造遺伝子群のうち WOcauB1 がもつ尾部鞘遺伝子、および尾部管遺伝子が WOkue においては欠損していた。このことから、WOkue は粒子形成能を失ったプロファージ断片である可能性が強く示唆された。

WOkue 遺伝子群の中には分泌タンパク質をコードすると予想される *Gp16* と相同性のある遺伝子は存在しなかったが、wKue ゲノムを鋳型として PCR を行ったところ、*Gp16* と高

い相同性を示す遺伝子断片が検出された。これは *wKue* ゲノム上で *WO_{kue}* とは別の場所に *Gp16* 相同遺伝子が存在していることを示す。おそらく *wKue* ゲノムに挿入された *WO* プロファージは、溶原サイクルを繰り返すうちに、構造遺伝子を初めとする多くの遺伝子を欠損し、粒子形成能を失って断片化した結果、ボルバキアにとって必須な因子を含む部分がゲノム上に残されているものと考えられる。

以上の結果から、宿主に単感染しているボルバキア *wKue* の *WO* は粒子形成能を失い、同一宿主に二重感染しているボルバキア *wCauA*・*wCauB* の *WO* は粒子形成能を維持していることが示唆された。近年の比較ゲノム解析により、細菌の種分化に溶原性ファージが深く関与することが示唆されている。ある種の溶原性ファージは新しい宿主細菌に感染する際、細菌の適応度を上げる遺伝子群を導入することによって自らの適応度も上げるといふ戦略をとると考えられている。*WO* の水平感染による遺伝子獲得が新しいボルバキア種の誕生に寄与し、広汎な宿主域への適応を促進しているのかもしれない。本研究は、細胞内共生細菌の多様性獲得にも溶原性ファージが深く関わっていた可能性を示唆する最初の報告である。

表 1 ボルバキア *wCauB* に感染するバクテリオファージ *WO_{cauB1}* に存在する予想 ORF

Gene product	Amino acids	Similar protein	% identity	E value ^a	Putative function
Gp1	182	Similar to terminase large subunit of lambda [bacteriophage WO]	93% in 181 aa	5.00E-91	DNA packaging protein
Gp2	475	Similar to portal protein GPB of phage lambda [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	94% in 245 aa	1.00E-136	Capsid protein
Gp3	363	Similar to minor capsid protein GPC of phage lambda [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	74% in 334 aa	1.00E-116	Capsid protein
Gp4	141	Hypothetical protein [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	88% in 109 aa	7.00E-48	
Gp5	481	Similar to unknown protein of phage Felix 01 [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	82% in 274 aa	1.00E-153	
Gp6	54	Hypothetical protein [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	71% in 45 aa	9.00E-12	
Gp7	162	Hypothetical protein [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	44% in 104 aa	8.00E-11	
Gp8	173	Similar to hypothetical protein of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	70% in 151 aa	1.00E-54	
Gp9	151	Similar to GPV of phage P2 [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	75% in 154 aa	3.00E-57	Baseplate assembly protein
Gp10	84	Probable transmembrane protein [<i>Ralstonia solanacearum</i>]	34% in 81 aa	1.00E-08	
Gp11	111	Similar to GPW of phage P2 [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	61% in 108 aa	9.00E-31	Baseplate assembly protein
Gp12	265	Similar to GPJ of phage P2 [Wolbachia sp. <i>w Kue</i>]	67% in 264 aa	2.00E-91	Baseplate assembly protein
Gp13	223				
Gp14	228				
Gp15	644	Hypothetical protein [<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20]	24% in 386 aa	3.00E-18	
Gp16	293	VrlC protein [<i>Dichelobacter nodosus</i>]	27% in 301 aa	2.00E-16	Probable secretory protein
Gp17	473				
Gp18	185				
Gp19	178	Phage tail sheath protein FI [<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon]	54% in 172 aa	3.00E-46	
Gp20	298	Probable transposase [Nostoc sp. PCC7120]	33% in 268 aa	5.00E-30	
Gp21	114	ORF39 [Vibrio harveyi bacteriophage VHML.]	59% in 108 aa	9.00E-32	Probable contractile tail sheath protein
Gp22	166	Probable bacteriophage protein [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01]	50% in 167 aa	2.00E-41	Probable tail tube protein
Gp23	71	Hypothetical protein [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01]	44% in 58 aa	2.00E-04	
Gp24	468	Phage-related tail protein [<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Drosophila melanogaster</i>]	54% in 395 aa	1.00E-103	

^a E-value is the expected value as defined by the NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).