

論文審査結果の要旨

氏名 藤井 由紀子

ボルバキア (*Wolbachia*) は、昆虫等の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から子へ垂直感染する。ボルバキアに感染した宿主昆虫では雄殺し、雌化、細胞質不和合などの現象が起き、結果として、感染雌の分布が拡大するが、ボルバキアによる宿主昆虫の生殖操作のメカニズムは不明である。近年、スジコナマダラメイガ (*Ephestia kueniella*) に感染しているボルバキア *wKue* のゲノム配列中にファージ様遺伝子が見出された。通常、共生細菌は生存に不要な遺伝子を棄て、そのゲノムを最小化する傾向があるので、このことはファージ様遺伝子が、ボルバキアの生存にとって何らかの有利な形質をもたらす可能性を示唆している。加えて、仮にボルバキアに感染するファージが同定できれば、将来的には、ボルバキアの形質転換の可能性も拓ける。本論文は、これらの背景の下にボルバキアから新規なバクテリオファージを同定し、その遺伝子の構造及び発現を解析した結果について報告している。

実験に用いたスジコナマダラメイガは 3 系統で、それぞれ *wKue*、*wCauA*、*wCauB* という異なるボルバキアに感染したものである。*wKue* は、スジコナマダラメイガに自然感染しているボルバキアで、*wCauA* と *wCauB* は、元々スジマダラメイガ (*Cadra cautella*) に二重感染していたものを、スジコナマダラメイガに移植することで、それぞれに単感染した系統を得ている。これら、3 系統のスジコナマダラメイガからファージ粒子の単離を試みたところ、*wCauA* や *wCauB* に感染した系統からは、直径 40nm のファージ粒子が単離されたが、*wKue* に感染した系統からは粒子は得られなかった。このことは、*wCauA* や *wCauB* ではファージ粒子が形成されるが、*wKue* ではファージ様遺伝子は存在するものの、ファージ粒子が形成されないことを示唆している。ファージ粒子からゲノム DNA を抽出することで、そのゲノムは約 20kbp の直鎖状 2 本鎖 DNA であることが判明した。

次に、ファージゲノムの構造を検討した。まず、PCR により *wCauA* と *wCauB* に感染したスジコナマダラメイガのゲノム DNA を鋳型とし、ファージ遺伝子の一部 (*orf7*) を増幅したところ、それぞれから似て非なる 4 種類の配列が得られた。次に、それぞれから得られたファージ粒子、*WOcauA* と *WOcauB* からゲノム DNA を抽出し、同様な PCR を行ったところ、3 種類と 2 種類の配列が増幅された。またその内の 1 つは *WOcauA* と *WOcauB* の双方から増幅された。このことは、*wCauA* と *wCauB* が複数のファージに感染しており、その内の一つ (*WOcauB1*) は、*wCauA* と *wCauB*

の両方に感染していたことを示している。wCauA と wCauB は元々、スジマダラメイガに二重感染していたことを考えると、このファージは、この間に両者の間を水平感染した可能性がある。

ファージ WOcauB1 についてゲノムクローニングを行ったところ、ほぼ全長に渡る約 20kbp の塩基配列が決定され、23 個の ORF が見出された。この中には、ファージの構造タンパク質遺伝子の他に、多くの機能未知遺伝子が含まれていたが、中でも Gp16 がコードするタンパク質は、ヒツジの病原細菌 *Dichelobacter nodosus* がもつ、ファージ由来の病原性遺伝子アイランドにコードされるタンパク質と約 20% の相同性を示し、多くのグラム陰性細菌が合成する毒素タンパク質に共通なロイシンリッチモチーフを有していた。このことは、Gp16 が分泌タンパク質をコードしており、ボルバキアが引き起こす生殖異常の要因となる可能性が考えられる。そこで、ファージ粒子が単離できなかった wKue に感染したスジコナマダラメイガについても、RT-PCR 法により Gp16 の発現を調べたところ、Gp16 は発現していることが判明した。このことは、ボルバキアが示す生殖異常の表現型には、ファージ粒子の形成能より、Gp16 などのファージ由来遺伝子の機能が重要である可能性を示唆している。

以上、本論文では、昆虫に生殖異常を引き起こす細胞内共生細菌、ボルバキアに感染するファージを世界で初めて同定し、その遺伝子構造と系統に応じたユニークな遺伝子の発現様式が述べられており、昆虫生理学の発展に寄与する点大きい。なお、本論文は佐々木哲彦、石川統、久保健雄との共同研究として行われているが、全編に渡って、論文提出者が主体となり実験計画の立案、実験の遂行、論文の作成を行っており、論文提出者の寄与は充分であると判断できる。従って、博士（理学）の学位を授与できるものと認める。