

博士論文の要旨

論文題目 攻撃性の高いミツバチの脳から検出された新規昆虫ピコルナ様ウイルス、
Kakugo ウイルスの同定と解析

氏名 藤 幸 知 子

序論

攻撃性は、多くの動物が自己保存や種保存のために備える性質だが、その制御機構には不明な点が多い。私は、こうした動物の攻撃性に関わる脳内の分子的基盤を探るため、セイヨウミツバチに着目した。ミツバチは、多くの個体が1つの集団（コロニー）を構成して生活する社会性昆虫である。雌の成虫が女王蜂と働き蜂にカースト分化し、女王蜂が生殖行動を行なう一方、働き蜂はコロニーの維持のための労働に従事し、羽化後の日齢に伴って育児（幼虫や女王蜂の世話）から門番（外敵からの防衛）、採餌（蜜や花粉の採集）へと分業する。中でも巣の入口にいる門番蜂は攻撃性が高く、捕食者であるスズメバチ等からコロニーを防衛する役割を担う。このように、ミツバチでは攻撃行動が分業されているため、攻撃性の高い個体を明確かつ容易に分離できる。また、針を用いたミツバチの攻撃は攻撃個体自身に致命傷を与えてしまう自己犠牲的（＝利他的）行動であり、動物の社会行動の進化を考える上でも興味深い。

私は修士課程において、門番蜂の中でスズメバチを攻撃した働き蜂（攻撃蜂、図1）と、巣の中におり、スズメバチから逃避した働き蜂（逃避蜂）を採集し、攻撃蜂の脳に選択

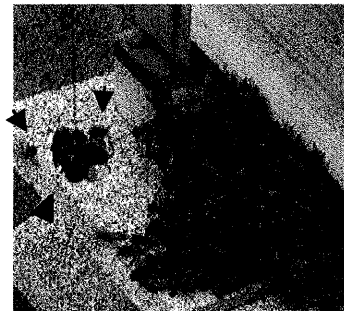


図1 巣の入口でスズメバチ（矢頭）に攻撃する攻撃蜂（矢印）

的に存在する RNA を Differential display 法を用いて検索した。その結果、新規な RNA を同定し、*Kakugo* RNA と名付けた（修士課程では *Agg-2* として発表）。この RNA の部分配列（約 6.6kb）を解析した結果、様々なピコルナ様ウイルスのゲノム RNA の 3' 側の領域と有意な相同性を示したことから、*Kakugo* RNA が新規なピコルナ様ウイルスのゲノム RNA であり、ミツバチの攻撃性にウイルス感染が関与する可能性を提示した。しかしながら、*Kakugo* RNA は部分配列しか決定されておらず、機能的なウイルスゲノム RNA であるかは不明だった。本研究では、まず *Kakugo* RNA が新規なピコルナ様ウイルスのゲノム RNA として機能することを示した。また、このウイルスの感染と攻撃行動との関連をさらに調べるため、様々な棲息条件下のコロニーの働き蜂を用いて疫学的解析を行ったので以下に報告する。

1. *Kakugo* cDNA の全塩基配列の決定と解析

5' RACE 法により決定した cDNA (10,152bp) にコードされたタンパク質のアミノ酸配列は、

既知のピコルナ様ウイルスのゲノムにコードされるポリプロテインと高い相同性を示した（図 2）。ピコルナ様ウイルスでは、ゲノム RNA に由来するポリプロテインが切断され、ビリオンタンパク質やヘリカーゼ等、ウイルスの増殖に関わる複数の機能タンパク質が生成

する。*Kakugo* RNA がコードするタンパク質は、機能タンパク質と予想される全てのドメインを含んでいた。系統解析の結果、*Kakugo* RNA は昆虫に感染する昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノムと特に近縁だった（図 3）。また、*Kakugo* RNA がミツバチのゲノム DNA 上にコードされている可能性を排除するために、ミツバチゲノム DNA を用いてサザンブロット解析を行った結果、*Kakugo* RNA に対応するシグナルは検出されず、*Kakugo* RNA が新規な昆虫



図 2 *Kakugo* RNA がコードするタンパク質の構造
数字は 5' 末端からの塩基番号。VP ; ビリオン (キャプシド) タンパク質, Hel ; ヘリカーゼ, Pro ; プロテアーゼ, RdRp ; RNA 依存 RNA ポリメラーゼ。

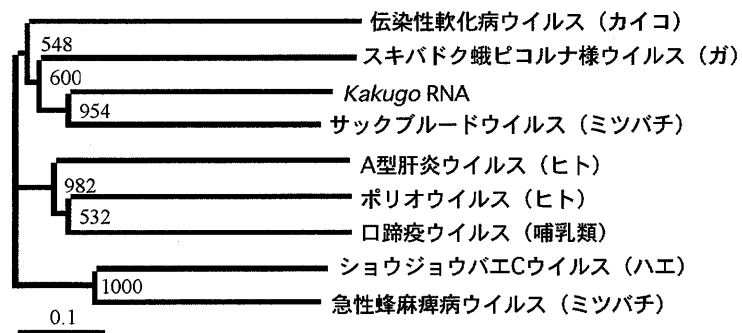


図 3 *Kakugo* RNA と他のウイルスゲノム RNA との系統解析
ウイルス名に続けて宿主を () で記す。各分岐点の数値はブートストラップ値を示す。枝の長さはアミノ酸置換数の推定値に比例している。

ピコルナ様ウイルスのゲノム RNA であることが強く示唆された。

2. Kakugo RNA のウイルスゲノムとしての機能解析

まず、Kakugo RNA が生体内で、ウイルスゲノム RNA としてウイルス粒子内に存在することを確認するため、Kakugo RNA を含む組織粗抽出液をシヨ糖密度勾配遠心法によって分画した。各画分中の RNA 量を定量した結果、遊離の Kakugo RNA 以外に Kakugo

RNA を含む画分が検出され、後者はマーカーとして用いたポリオウイルス粒子の画分と一致した。このことは、Kakugo RNA がウイルス粒子内にゲノム RNA として存在することを示唆している。

次に、ウイルスとしての感染性を検討するため、攻撃蜂の組織粗抽出液を Kakugo RNA が検出されない採餌蜂頭部へ注射し、経時的に頭部から RNA を抽出し、Kakugo RNA を定量的 RT-PCR 法により定量した。その結果、注射 3 日後に Kakugo RNA の増加が認められた。一方、採餌蜂の組織粗抽出液を用いた場合は Kakugo RNA の増加は認められなかった。以上の結果は、Kakugo RNA が感染性のウイルス粒子 (Kakugo ウイルス) のゲノム RNA であることを示している。

3. Kakugo ウイルス (KV) の疫学的解析

これまでの実験では約 100 匹の攻撃蜂をまとめて Kakugo RNA を検出していたため、攻

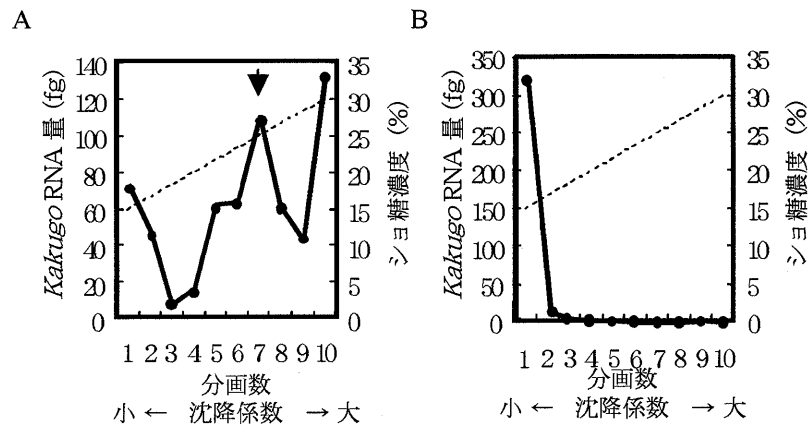


図4 シヨ糖密度勾配遠心法による Kakugo RNA の分画
A; Kakugo RNA の検出される細胞粗抽出液を用いた結果。矢印はマーカーに用いたポリオウイルス粒子の検出画分の位置を示す。B; A で用いた細胞粗抽出液由来の total RNA を用いた結果。

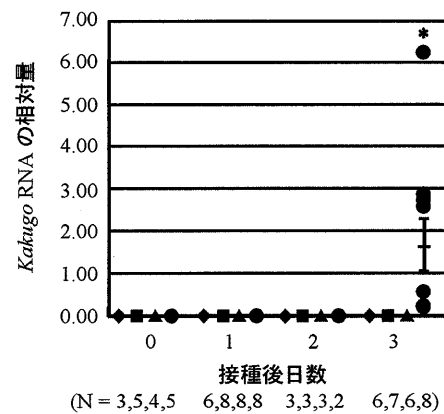


図5 Kakugo ウイルスの感染性
採餌蜂の頭部に攻撃蜂由来細胞粗抽出液 (●)、採餌蜂由来細胞粗抽出液 (▲)、バッファー (■) を接種し、経時的に Kakugo RNA を定量した。縦軸は Kakugo RNA の量を *actin* mRNA 量で補正した値を相対値として示す。(◆) は無処理の個体。N; 用いた個体数、bar; 平均値±SEM、*; $p < 0.05$ 。

撃蜂における KV の感染率は不明であった。そこで、個体毎に *Kakugo* RNA を定量し、ウイルスの感染率や量を調査することで、KV 感染とミツバチの攻撃性との関連性をさらに解析した。本郷キャンパス内と本学部附属薬用植物園内において 2003 年 4 月から 2004 年 8 月までに複数のコロニーから採集した攻撃蜂、のべ 100 匹以上について KV 感染量を調べた。KV 感染量は、定量的 RT-PCR 法によって *Kakugo* RNA と *actin* mRNA を定量し、*actin* mRNA 量に対する *Kakugo* RNA 量の相対量として算出した。本実験系の検出感度を考慮し、KV 量が 0.001 以上を示した個体を感染個体としてその数を調べた。その結果、感染が認められたのは 1 匹のみだった。このことから、攻撃蜂のほとんどは KV に感染しておらず、KV 感染は攻撃行動に必須ではない可能性が考えられた。

一方、様々な働き蜂について、多くの個体数をまとめて KV 量を検討した結果、コロニーレベルでの KV 量が 0.101 以下の状況下で攻撃蜂に特異的な KV の感染が生じていたが、コロニーレベルでの KV 量が 7.626 以上の状況では攻撃蜂以外の働き蜂からも KV が検出される例が見い出された。このことから、KV の攻撃蜂特異的な感染が、コロニーレベルでの KV 量が少ない状況に限定して成立している可能性が考えられた。

KV 量の高いコロニーの一つにおいて、巢内の働き蜂における KV 感染率・量を経時的に検討した結果、2004 年 11 月 24 日の時点での感染率は約 1.6% だったが、2004 年 12 月 3 日には約 11.9% に上昇した。また、1 個体当たりの KV 感染量にも増加傾向が見られ、感染の拡大が推定された (図 6)。このコロニーでは、ミツバチのコロニーに寄生するミツバチヘギイタダニが繁殖していた他、幼虫の死骸が多数存在し、ミツバチの疾病であるチョーク病様の徴候も見られた。コロニーが病的な状態にある場合に、攻撃蜂以外の働き蜂にも KV の感染が拡大し、感染率が上昇する可能性が考えられた。また、このダニからも KV が検出されたことから、ダニを介した KV の感染経路も想定された。

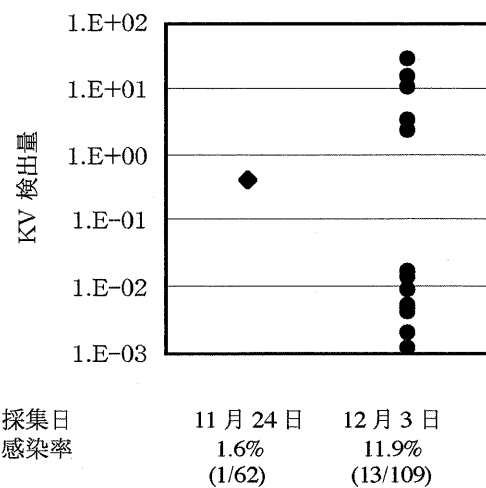


図 6 KV 感染率と各感染個体における KV 感染量の変動
KV 量は *Kakugo* RNA の *actin* mRNA に対する相対量として示す。() 中は感染個体数/調べた個体数。

まとめと今後の展望

本研究において私は、攻撃蜂の脳から見出した *Kakugo* RNA が新規な昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノム RNA であることを示し、攻撃性の高いミツバチの脳に KV が感染していたことを明らかにした。

また、KV の疫学調査の結果から、攻撃行動と KV の関係は、(1) コロニーにおける KV 量が少ない場合には攻撃蜂特異的な KV 感染が見られる、(2) コロニーにおける KV 量が多い場合には攻撃蜂以外にも KV 感染が見られる、という、2 つの段階に分かれる可能性が考えられた。これは、KV 感染と攻撃性との関連について、感染の有無だけでなく、感染量という要素を考慮する必要があることを示唆した点で、重要な知見である。

KV 量が少ない条件においては、KV の感染が、働き蜂の攻撃性を亢進している可能性がある。また逆に、攻撃蜂が KV に感受性になっている可能性も考えられる。いずれの場合も、KV 感染個体による自己犠牲的攻撃行動は、コロニーからの病原体 (= KV) の排除に寄与する、コロニーレベルでの防御応答として機能する可能性がある。コロニーが病的な状態におかれた条件では、KV をコロニーから排除しきれなくなり、コロニー全体に KV 感染が拡大する可能性も、今回提示された。

一方、ごく最近、ミツバチの病原性ウイルスとして知られていた deformed wing virus (DWV) のゲノムが他の研究グループによってデータベースに登録され、KV と 98% の相同性が持つことが考えられた。今後は、今回検出されたウイルスの中に DWV が混入していた可能性についても検討する必要があると考えている。今後は、より広範な疫学調査によって、KV 感染と攻撃行動やコロニーの病理状態、また個体差や環境条件などの交絡因子との関連を解明するとともに、クローン化 KV を用いた感染実験によって攻撃行動との因果関係を証明していくことが重要であろう。

動物の攻撃性とウイルス感染との関連については不明な点が多いが、近年、ヒトの攻撃性にもウイルス感染が関与する可能性が指摘されている。今後、KV 研究の進展によって、動物の本能行動とウイルス感染との関連の一端が解明されると期待している。

<参考文献> Fujiyuki T, et al., (2004). *J. Virol.* **78**, 1093-1100.