

審査の結果の要旨

氏名 藤 幸 知 子

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。本論文では、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、セイヨウミツバチを用いた研究を行なっている。ミツバチは社会性昆虫であり、雌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から門番、採餌へと分業する。中でも巣の入口にいる門番蜂は攻撃性が高く、スズメバチ等からコロニーを防衛する役割を担う。針を用いるミツバチの攻撃は、攻撃個体自身にも致命傷を与える利他的行動であり、動物の社会行動の進化を考える上でも興味深い。

申請者は修士課程において、ミツバチの攻撃性に関わる遺伝子候補を同定するため、門番蜂の中でスズメバチを攻撃した働き蜂（攻撃蜂）と、巣の中にいて、スズメバチから逃避した働き蜂（逃避蜂）を採集し、攻撃蜂の脳に選択的に存在する RNA を Differential display 法を用いて検索した。その結果、様々なピコルナ様ウイルスのゲノム RNA と相同性を示す RNA (*Kakugo* RNA) の cDNA 断片を同定し、ミツバチの攻撃性にウイルス感染が関与する可能性を指摘した。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 かは不明だった。そこで本研究ではまず、*Kakugo* RNA が新規なピコルナ様ウイルスのゲノム RNA として機能するか検討した。また、このウイルスの感染と攻撃行動との関連を詳細に調べるため、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ている。

まず、5' RACE 法により、ほぼ全長と思われる 10,152bp の cDNA を単離した。その結果、コードされる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。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。このことは、*Kakugo* RNA が新規な昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノム RNA であることを強く示唆している。

次に *Kakugo* RNA が生体内で、ウイルス粒子内に存在することを確認するため、*Kakugo* RNA を含む攻撃蜂の組織粗抽出液をショ糖密度勾配遠心法によって分画し

た。その結果、遊離の *Kakugo* RNA 以外に、ポリオウイルス粒子と同じ沈降係数の分画に *Kakugo* RNA を含む画分が検出され、*Kakugo* RNA がウイルス粒子内にゲノム RNA として存在することが示唆された。

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腹部へ注射し、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。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。

さらに *Kakugo* ウイルスの疫学調査により、働き蜂の個体毎、また分業に伴う分布を検討した。ウイルス量は、RT-PCR 法で定量した *actin* mRNA 量に対する *Kakugo* RNA 量の相対量として算出した。その結果、コロニーレベル (約 100 匹の働き蜂をまとめて測定) での感染量が低い (0.1 以下) 状況では攻撃蜂特異的に *Kakugo* ウイルスが検出されたが、感染量が高い (7 以上) の状況では、攻撃蜂以外の働き蜂からも検出される例があった。このことから、*Kakugo* ウイルスの攻撃蜂選択的な感染は、コロニーレベルのウイルス感染量が低い状況で生じる可能性が考えられた。

Kakugo ウイルス感染量の高いコロニーの 1 つにおいて、働き蜂における感染率を検討した結果、2004 年 11 月 24 日での感染率は 1.6%だったが、12 月 3 日には 12% に上昇し、感染の拡大が推定された。このコロニーは、ミツバチの疾病の 1 つであるチョーク病の徴候を示しており、コロニーが病的な状態では、攻撃蜂以外の働き蜂にも感染が拡大する可能性が考えられた。ただし、現時点では *Kakugo* ウイルスに極く近縁の Deformed wing ウイルス (最近、データベースに登録されたもの) を一緒に検出している可能性があり、両者を区別した検出法の検討が、今後の課題として残っている。

以上、本研究では、攻撃蜂の脳から発見された *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、攻撃性の高い働き蜂の脳に *Kakugo* ウイルスが感染していたことを明らかにした。また、疫学調査の結果から、攻撃蜂選択的な感染が生じるには、コロニーレベルでのウイルス感染量が重要な要因になる可能性を指摘した。本研究は、新規ウイルスを同定し、ウイルス感染が宿主昆虫の攻撃性と関連する局面を見出した点で、ウイルス学、動物行動学への寄与があり、博士 (薬学) の学位に値すると判断した。