

学 位 論 文 題 名

Studies on symbiont virus of endoparasitoid wasp

(寄生バチ共生ウイルス (ポリドナウイルス) に関する研究)

学位論文内容の要旨

寄生バチの一種であるカリヤコマユバチ (*Cotesia kariyai*) はアワヨトウ (*Pseudaletia separata*) の幼虫を宿主とする。雌バチによりポリドナウイルス・毒液と共にアワヨトウ幼虫体内に産下された卵は、翌日には孵化し宿主体内で幼虫発育を完了し11日後に体外に脱出する。さらに、6日間の蛹期を経て成虫となり再び宿主アワヨトウ幼虫を求めて活動する。この一連の生活史の中で、共生ウイルスであるポリドナウイルスはカリヤコマユバチが寄生を成功させるために必要不可欠な働きを担っている。ポリドナウイルスはカリヤコマユバチの卵・幼虫が宿主アワヨトウ幼虫の生体内で生存し続けるために、その生体防御反応の回避や生理状態のコントロール等様々な現象に関与しているが明らかにされている。

本研究ではこのポリドナウイルスのエンベロープタンパク質の一種である免疫回避タンパク質 (IEP; immunoevasive protein) が、宿主アワヨトウ幼虫の血球細胞による包囲化作用を回避するタンパク質であることを証明した。さらに、免疫回避タンパク質の一次構造の決定、遺伝子の所在や発現様式等について詳細に調べた。また、このエンベロープタンパク質とポリドナウイルスのキャプシドタンパク質との発現様式の違いについても明らかにした。そして、カリヤコマユバチの卵巣内におけるポリドナウイルスの存在とそのゲノム DNA 合成の時間経過を明確に解析した。これら一連の研究により、カリヤコマユバチとその共生ウイルス・ポリドナウイルスの関係を理解する上で重要な知見が得られた。具体的には、雌バチ卵巣部の cDNA ライブラリーから IEP cDNA クローン (IEP-1) と IEP のホモログ (IEP-2) を単離するのに成功した。これらのクローンのシーケンスの結果、IEP-1 と IEP-2 はそれぞれ全長 1088、1050 base pairs で、coding region の長さは 278、272 アミノ酸残基であった。推定される一次構造上ではどちらもシステイン残基が全体の 10% にも及ぶシステインリッチなタンパク質であった。また、それぞれ5つの EGF 様モチーフの繰り返しと3つの N-glycosylation site が見いだされた。Western blot と Northern blot 解析の結果、産生された IEP タンパク質は雌バチ卵巣部において見られ、その mRNA の発現は卵巣部の側輸卵管細胞に限定されていることを *in situ* hybridization を行うことによって明らかにした。Genomic Southern blot 解析の結果では、IEP 遺伝子は寄生バチの染色体上にもみコードされていることを示した。IEP とポリドナウイルスキャプシドタンパク質のそれぞれに対する抗体を用いて免疫組織染色を行いそれらの発現様式を比較したところ、キャプシドタンパク質はポリドナウイルスが産生されるカリックス細胞を含む側輸卵管中に、IEP はカリックス細胞

以外の側輸卵管中にシグナルが検出された。また、蛹時期での雌バチ卵巢カリックス細胞におけるポリドナウイルスゲノム DNA の合成をチミジンの取り込みにより、キャプシドタンパク質の発現、IEP の発現を Western blot 解析により比較したところ、これらの間には時間的な隔たりが見られた。すなわち、蛹化1日後にポリドナウイルスのゲノム DNA 合成が開始され、2日後にキャプシドタンパク質の合成が、さらに、3日後に IEP の合成が開始されることによってウイルス粒子が形成されることを明らかにした。

以上の実験結果から、IEP 遺伝子は元々寄生バチ・カリヤコマユバチのゲノムにコードされる遺伝子であり、ポリドナウイルスはこの遺伝子産物 IEP をエンベロープタンパク質として表面にまとうことによって宿主アワヨトウ幼虫の血球細胞による免疫反応を回避しているものと結論付けられた。これは、共生関係を長期間維持する過程で元々宿主である寄生バチの遺伝子産物をポリドナウイルスが自らの構造タンパク質として利用し始めた可能性を示すものであり、寄生バチとポリドナウイルスの共生進化を考える上で重要な知見と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 芦 田 正 明
副 査 教 授 東 正 剛
副 査 助 教 授 早 川 洋 一

学 位 論 文 題 名

Studies on symbiont virus of endoparasitoid wasp

(寄生バチ共生ウイルス (ポリドナウイルス) に関する研究)

寄生バチの一種であるカリヤコマユバチ (*Cotesia kariyai*) はアワヨトウ (*Pseudaletia separata*) の幼虫を宿主とする。寄生の際、雌バチは卵と共にポリドナウイルス・毒液を宿主アワヨトウ幼虫体内に注入する。宿主体内に入った卵は2日後には孵化し宿主体内で幼虫発育を完了し11日後に体外に脱出する。さらに、6日間の蛹期を経て成虫となり再び宿主アワヨトウ幼虫を求めて活動する。この一連の生活史の中で、共生ウイルスであるポリドナウイルスはカリヤコマユバチが寄生を成功させるために必要不可欠な働きを担っている。ポリドナウイルスは、カリヤコマユバチの卵・幼虫が宿主アワヨトウ幼虫の生体内で生存し続けるために、宿主の生体防御反応の攪乱や宿主幼虫発育の制御など様々な現象に関与しているが報告されている。本研究はこのカリヤコマユバチのポリドナウイルスについて生化学的・分子生物学的解析を通してその役割や進化的背景を明らかにすることを目的としたものであり、申請論文は全部で3章より構成されている。

第1章では、ポリドナウイルスのエンベロープタンパク質の一種である免疫回避タンパク質 (IEP; immunoevasive protein) が、宿主アワヨトウ幼虫の血球細胞による包囲化作用を回避する活性を有するタンパク質である確証を提示した。さらに、IEP の cDNA の単離を通して一次構造の決定、遺伝子の所在や発現様式等について詳細に調べた。また、この IEP とポリドナウイルスのキャプシドタンパク質との発現部位の違いについても明らかにした。具体的には、キャプシドタンパク質はポリドナウイルスが産生されるカリックス細胞を含む側輸卵管中に、IEP はカリックス細胞以外の側輸卵管中に存在し異なる部位での合成が示唆された。続く第2章では、カリヤコマユバチの卵巣内カリックス細胞におけるポリドナウイルスの存在を証明し、さらに、ゲノム DNA、キャプシドタンパク質、IEP の合成の時間経過を正確に解析した。ウイルスゲノム DNA の合成をチミジンの取り込みにより、キャプシドタンパク質の発現、IEP の発現を Western blot 解析により比較したところ、これらの間には時間的な隔たりが見られた。すなわち、蛹化1日後にポリドナウイルスのゲノム DNA 合成が開始され、2日後にキャプシドタンパク質の合成が、さらに、3日後に IEP の合成が開始されることによってウイルス粒子が形成されることを明らかにした。これら一連の実験結果でも IEP と他のウイルス構成成分との違いを明らかにし、カリヤコマユバチとその共生ウイルス・ポリドナウイルスの関係を理解す

る上で重要な知見を得た。第3章では、ポリドナウイルスの培養細胞とアワヨトウ幼虫血球細胞への感染について解析し、この結果から IEP がウイルス感染時に直接関与する可能性の無いことを証明した。また、培養細胞で発現する3種類のウイルス遺伝子を同定、構造決定し、これらの遺伝子が寄生されたアワヨトウ幼虫血球細胞でも発現していることを明らかにした。

以上の実験結果から、IEP 遺伝子は元々寄生バチ・カリヤコマユバチのゲノムにコードされる遺伝子であり、ポリドナウイルスはこの遺伝子産物 IEP をエンベロープタンパク質として表面にまとうことによって宿主アワヨトウ幼虫の血球細胞による免疫反応を回避している可能性が強く示唆された。これは、共生関係を長期間維持する過程で元々宿主である寄生バチの遺伝子産物をポリドナウイルスが自らの構造タンパク質として利用し始めた可能性を示すものであり、寄生バチとポリドナウイルスの共生進化を考える上で重要な知見と考えられる。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資質を有するものと判定した。