

論文審査の結果の要旨

氏名 富澤 真

本論文は3章からなり、第1章ではツマグロヨコバイの共生器官、バクテリオームで特異的に発現する遺伝子を探索した。ツマグロヨコバイの各種器官別に調製された EST ライブラリーに登録されている塩基配列をクラスタリングした後、各遺伝子の出現頻度を器官別に調べて選抜している。第2章ではバクテリオームで多数検出されたペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) 遺伝子の発現解析を行った。18種類の PGRP 遺伝子の全長 cDNA 配列を決定し、うち2種類 (NcPGRP1, NcPGRP12) については宿主発育段階に関わらず常に発現していること、RNAi による発現抑制が可能なことを確認した。NcPGRP12 については抗体も作成し、実際にタンパク質としてバクテリオームに存在することも示した。また、これら PGRP を RNAi により発現抑制をかけた際の共生細菌数に及ぼす影響、および外来菌接種時のツマグロヨコバイ免疫応答に対するこれら PGRP の関与の有無について解析されている。さらに、ツマグロヨコバイでは長鎖 dsRNA 注入による RNAi が極めて効率的に作用することも述べており、他のカメムシ目昆虫で使用されている濃度で dsRNA 注入を行うと生存率に悪影響があることも明らかにしている。第3章では、第1章で発見したバクテリオームで特異的に発現する機能未知遺伝子の断片配列情報をもとに全長 cDNA 配列を得て、虫体内発現解析、RNAi による機能解析、共生細菌数に及ぼす影響について述べている。

昆虫の中には体内に共生微生物を生息させ、アミノ酸やビタミンなどの生合成を担わせていると考えられる例が多く知られている。これらの共生微生物は宿主昆虫側への栄養素の供給を担うために必須の存在であり、高度に発達した共生関係を構築していると考えられており、その機構の解明に興味を持たれてきた。しかし、虫体が小さく生化学的な解析を行い難いことから共生の分子機構については殆ど未解明な状態であった。ツマグロヨコバイには *Nasuia* 属と *Sulcia* 属の2種類の共生細菌がバクテリオームの内層と外層の細胞にそれぞれ感染している。本論文は共生細菌の生息器官であるバクテリオームで特異的に発現する遺伝子に着目して、宿主昆虫のどのような分子が共生系の維持に関わるのかを解明しようと試みたものである。発育ステージによる虫体内での各共生細菌の菌数変動を調べた上で、バクテリオームで特異的に発現する候補遺伝子を長鎖

dsRNA 注入によるノックダウン実験で機能抑制を図った後に、共生細菌数や影響を受ける宿主側遺伝子をマイクロアレイ解析で検出するという手法で解析を試みている。

まず、ツマグロヨコバイでは他種昆虫に比較して膨大な PGRP 遺伝子群を持つことが明らかになった。PGRP は、一般には、体内に侵入した細菌を認識する免疫関連遺伝子として知られており、これまでにゲノム解析された昆虫では多い場合でも 10 種類程度の分子種しか検出されていない。しかし、ツマグロヨコバイでは少なくとも 100 種類を超える PGRP 遺伝子があること、その殆どがバクテリオームで発現していること、それらは接種した大腸菌やヨコバイの全身に分布するリケッチア菌の認識にはさほど関与しないことを示した。体内に侵入した細菌ではなく、バクテリオームに共生している細菌との関わり合いに強く作用する PGRP 遺伝子が多数存在することを示しており、昆虫における PGRP の新たな機能を見出した。

次に、PGRP の他にバクテリオームで高発現している遺伝子の中にプロリンが多く含まれるもの (prorine rich protein, PrP) を見出した。PrP をノックダウンしたツマグロヨコバイにおける PGRP 発現量と共生細菌の菌数を測定したところ、PrP 発現量が減少すると PGRP 発現量も減少し、*Nasuia* 菌も減少した。この結果は、宿主遺伝子 (PrP) が共生細菌の菌数維持に関与することを具体的に示したはじめての例である。

ツマグロヨコバイなど植物吸汁性の昆虫は農業上の重要な害虫となる場合が多く、実益上の問題から様々な研究が行われてきており、宿主の生存に必須な存在である共生微生物を標的にした防除法の開発なども考えられている。今後、ツマグロヨコバイの共生細菌の維持に関わる機構を解明していく上で必要となる糸口を本論文は提供したと判断される。

尚、本論文第 2 章の一部、ツマグロヨコバイに対する dsRNA 注入による RNAi 効果の検証については (独) 農業生物資源研究所 野田博明 (元指導教員) との共同研究であり投稿論文として発表されているが、論文提出者が主体となって実験・解析・とりまとめを行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上 1991 字