

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658047

研究課題名（和文）

寄生バチのウイルス様粒子：ノックダウンハチを用いた機能解明と有用遺伝子資源の探索

研究課題名（英文） Virus-like particles of parasitoid wasps: functional analyses via gene knockdown and the search for genetic resources

研究代表者

三浦 健 (MIURA KEN)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60219582

研究成果の概要（和文）：寄生バチであるギンケハラボソコマユバチが宿主制御に用いるウイルス様粒子（VLP）に関連した因子の機能を解明するため、VLPを産生する蛹の毒液腺で発現する mRNA のレパートリーを網羅的に取得し、続いていくつかの因子について RNA 干渉を利用した遺伝子ノックダウンを行って特定の因子を欠損した VLP を産生するハチを作成した。これら欠損 VLP の機能解析を通じて、細胞性生体防御を担う宿主血球の機能を阻害する、タンパク化学的な性質を共有する 2 種類の因子を発見した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate functions of factors associated with virus-like particles (VLPs), which are used for host regulation by a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis*, mRNA repertoire of pupal venom gland that produces VLPs were comprehensively obtained. By utilizing RNA interference-based approaches, a series of knockdown wasps that produce VLPs deficient in specified factors were prepared. Through the functional analyses of these altered VLPs, two novel VLP constituents that share some physicochemical properties with each other were found to suppress immune responses of host hemocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：昆虫生理生化学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：RNA 干渉

1. 研究開始当初の背景

内部寄生バチは宿主となる昆虫の体腔内に産卵を行う。ハチの卵は宿主にとっては外来の異物であり、ハチは宿主の生体防御系から受ける攻撃を避けるため、様々な手段を用いる必要がある。具体的には、寄生蜂は産卵時に共生ウイルスや毒液を宿主に注入することにより宿主の生理を制御する例が多く知られており、共生ウイルスにコードされる因子や毒液の構成因子についてもいくつかの報告がある（Lavine and Strand, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32,

1295-1309, 2002)。一方、本研究で材料として用いたギンケハラボソコマユバチ（*Meteorus pulchricornis*）は、共生ウイルスを持たず、代ってウイルス様粒子（超微細形態はウイルス粒子に似るが遺伝子としての核酸を含まない）を産卵時に宿主となる幼虫に注入する。我々の研究グループではこれまで、VLP によって宿主幼虫の免疫応答が抑制されることを明らかにしてきた（Suzuki et al, *J. Insect Physiol.* 54, 1015-1022, 2008; *Appl. Zool. Entomol.* 44, 115-125, 2009)。VLP を構成する種々の因子

の機能を解明すべく、VLP の産生器官であるこのハチの毒液腺で発現する因子の網羅的な取得と解析をスタートした。

2. 研究の目的

上述のようにホストの生理の制御に共生ウイルスを用いる寄生バチの例は多く、実際にそれらの共生ウイルスにコードされている因子についての報告も、ウイルスの全ゲノム配列の決定を含めて複数ある (Desjardins et al, *Genome Biol.* 9, R183, 2008 など)。共生ウイルスを用いる戦略では、ウイルスは宿主血球を含む様々な組織に感染して、急性のものから後期のものまで個々のプロモーターの文脈に応じて比較的長期間に渡って種々の因子を経時的に的確に発現させることにより宿主制御を実現していると考えられる。一方、本研究で対象とした VLP については、遺伝子を持たずに機能性タンパク質を含む粒子であるため、長期間に渡ってホストの生理を制御するというよりむしろ、寄生の比較的初期にホストの生理に大きなインパクトを与えることにより、ホストの生体防御系による排除を免れる戦略をとっていると推定できる。従って、VLP に含まれるタンパク質のレパートリーは、他種の寄生バチの持つ共生ウイルスがコードする因子のレパートリーとは機能的に異なっているはずである。本研究では、VLP に含まれる因子の機能解析を通じて、生物間相互作用における新たな分子戦略を解明すること、また、新たな有用遺伝子資源を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) まず、VLP を産生するギンケハラボソコマユバチの蛹期の毒液腺の cDNA ライブラリーのクローンをランダムに配列決定することにより、一連の 5' EST を得た。次いでこれらの EST をクラスタリングし、それぞれのクラスターの代表クローンのアミノ酸配列を BLAST 解析にかけ、アノテーションおよびキュレーションを行った。

(2) 次に、アノテーション作業を通じて得た、それぞれのクラスターを構成する因子の推定される機能と EST の出現頻度を指標として、さらなる解析を進める因子を選別した。これら因子の全長の配列を決定するとともに、蛹初期および羽化直後の成虫での mRNA を比較することにより、毒液腺特異的に発現する因子であるかを検討した。さらに、これらの因子の配列に基づく 2 本鎖 RNA を合成して蛹に注入することにより RNA 干渉による遺伝子ノックダウンを試みた。mRNA のレベルを定量することにより、ノックダウンが確認された因子については、それを欠損する

変異型の VLP を産生するノックダウンハチの作成を行った。

(3) 上記で作成したノックダウンハチから特定の因子を欠損した VLP を生成し、野生型の VLP とともに宿主であるアヨトウ (*Mythimna separata*) 幼虫から調整した接着性血球種・プラズマ細胞と顆粒細胞に処理して、その表現型についての検討を行った。また変異型 VLP を産生するそれぞれのノックダウンハチについて宿主への産卵後の寄生の成功率について野生型のものとの比較を行った。

4. 研究成果

(1) 蛹毒液腺の cDNA ライブラリーからランダムに選んだ 480 クローンを 5' からシーケンシングして 5' EST を得た。次に配列に基づいて EST のクラスタリングを行ったところ、241 のクラスターに分類され、そのうち 183 個は一つの EST から構成されていた。これら 480 個の EST のうち、シーケンシングクオリティの低い EST および rRNA 配列の EST の合計 45 個を除いた残り 435 個の EST (219 クラスター) について GSDB, DDBJ, EMBL, NCBI データベースへの登録を行った。アクセッション番号は FY736475 から FY736909 である。これら 219 個のクラスターからそれぞれ代表クローンを選んでそのアミノ酸配列を BLAST サーチにかけることにより、機能の推定を行った。その結果を図 1 にまとめる。

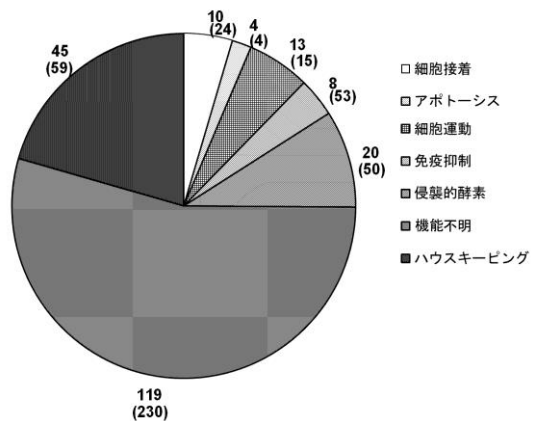


図 1. 推定される機能に基づいた毒液腺 EST クラスターの分類と頻度。

10 個のクラスター (24 個の EST) は細胞接着あるいは細胞の融合 (AD) に関する機能を持つと推定された。4 個のクラスター (4 個の EST) はアポトーシス (AP) との関係が示唆され、13 個のクラスター (15 個の EST) は低分子量 G タンパクなど細胞運動 (CM) と関連する機能が推定された。8 個のクラスター (53 個の EST) はセリンプロ

テアーゼインヒビターなど、宿主免疫の抑制 (IS) との関連が推定されるものであった。20 個のクラスター (50 個の EST) についてはヒアルロニダーゼなどおそらく宿主への侵襲性に関連する酵素類 (VE) であった。一番多くを占める 119 個のクラスター (230 個の EST) は E-value が高い、すなわち既知因子に対する類似度が低い機能未知 (ND) の新規因子であった。また、55 個のクラスター (59 個の EST) は種々のリボソームタンパク質や代謝酵素などをコードするハウスキーピング遺伝子の mRNA であった。これらの因子のうち、侵襲性酵素群や低分子量 G タンパクの一部、またテトラスパニンなど一部の接着因子については VLP を持たない寄生バチの毒液腺のレパートリー (Crawford et al, *Insect Mol. Biol.*, 17, 313-325, 2008) と共通するものも少しは存在したが総じて異なる因子および新規因子によって構成されたレパートリーであり、さらには寄生バチの共生ウイルスのゲノムにコードされる因子群とはほとんど共通性がなかった (Vincent et al, *BMC genomics*, 11, 693, 2010 など)。このことから、VLP を用いたホストの生理の制御の戦略は共生ウイルスを用いるそれとは異なるものであることがわかる。なお、VLP を産生する寄生バチの毒液腺のレパートリーは本研究によって初めて明らかにされたものである。

(2) 続いて、これらのうちから 21 クラスターを選び、次のステップの解析に供した。上で機能を推定した 7 つの群のうちハウスキーピング系を除く 6 群から表 1 に示すようにそれぞれ複数の因子を選出した。まず最初にこれら 21 クラスターについて代表クローンの全長の配列決定を行なったのち、全長のアミノ酸配列を用いて再び BLAST 解析を行った。表 1 にそれぞれの因子の類縁因子を示す。イタリックで表記されたものは E-value が小さい、すなわち直接のオーソログであることを示しており、通常の手書体で記されたものは E-value が大きく、かつ分子の一部の領域にのみ相同性が示されたものである。

次にこれらの因子の発現解析を定量 PCR 装置を用いて行い、毒液腺が発達する時期に対応して発現量が爆発的に増加する因子、すなわち毒液腺に特異的な因子を検索した。その結果、05_G01、05_C10、01_C03、02_F07、02_G09、02_D09、04_A07、03_H10、03_G06、02_A06、03_D01、03_A09 の 12 クローン (ここからはクラスター名ではなく全長の配列を決定したクローン名を因子名として用いる) については、毒液腺の発達に伴ってその発現量が少なくとも 250 倍以上増加したことから、毒液腺特異的な因子であると考えた。

また、VLP を構成する一部のタンパク質の配列決定により、04_A07 と 03_A09 については VLP の構成因子であることを確認した。

PF	cluster	direct homolog or related protein	representative EST	accession
			(EST nos. in cluster)	number
AD	01_F07	<i>tetraspamin</i>	05_D10 (3)	FY736866
	01_D07	<i>laminin</i>	05_G01 (10)	FY736890
AP	05_C10	<i>TNF superfamily, member5-induced protein 1</i>	05_C10 (1)	FY736854
	05_D08	<i>CARD containing protein</i>	05_D08 (1)	FY736864
CM	01_A09	<i>Rab40 Ras-like GTPase</i>	01_A09 (1)	FY736481
	01_C03	<i>rabaptin</i>	01_C03 (3)	FY736498
	03_B02	<i>specifically Rac-1-associated protein</i>	03_B02 (1)	FY736661
	03_D03	<i>Ras-like GTP-binding protein Rho1 isoform</i>	03_D03 (1)	FY736684
IS	01_A02	<i>macroglobulin complement-like protein</i>	02_F07 (25)	FY736619
	01_B04	<i>serine protease inhibitor</i>	01_B04 (1)	FY736488
	01_B05	<i>serine protease inhibitor</i>	01_B05 (1)	FY736489
VE	02_E05	<i>hyaluronidase</i>	02_G09 (4)	FY736632
	01_D09*	<i>hemolysin-like</i>	04_A07 (16)	FY736740
	02_D09	<i>chitinase</i>	02_D09 (5)	FY736597
	04_A10	<i>ADAM metalloproteinase</i>	04_A10 (1)	FY736743
ND	01_B03	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>	03_D01 (9)	FY736682
	01_E06	<i>matrilin</i>	03_G06 (22)	FY736716
	01_B10	<i>no homology</i>	03_H10 (21)	FY736731
	01_D06	<i>iron transporter</i>	02_A06 (8)	FY736563
	01_E04*	<i>no homology</i>	03_A09 (5)	FY736656
	02_A04	<i>Ferredoxin</i>	02_A04 (7)	FY736561

表 1. 次のステップの解析に供したクラスターとの性質と代表クローンおよびそのアクセッション番号。

続いてこれらから 10 因子を選定し、それぞれの配列に由来する 2 本鎖 RNA を作成してハチの蛹を処理し、RNA 干渉を通じた遺伝子発現抑制が起こるかどうかなを確認した。残念ながらすべての因子では RNA 干渉を引き起こすことはできなかったが、半数にあたる 01_C03、04_A07、03_H10、03_G06、03_A09 の 5 因子については mRNA レベルで有効なノックダウンが認められ、また 04_A07 と 03_A09 の 2 因子についてはタンパク質レベルでのノックダウンも確認した。

(3) 最後にノックダウンが確認できた因子 5 種類を用いてノックダウンハチを作成し、そこから調整した VLP を用いて宿主幼虫の血球の動態に与える影響を検討し、野生型 VLP の場合との比較を行った。またそれぞれノックダウンハチに宿主への産卵を行わせ、寄生の成功率に関して野生型との比較を行った。なお、用いた因子のうち 04_A07 と 03_A09 がコードする因子はいずれも分子量 2 万程度の塩基性ポリペプチドであり、リシン、アルギニン、アスパラギン酸などの荷電性アミノ酸に富み、N 末付近に疎水性アミノ酸のストレッチを持つなど互いに共通する

性質を持っていた。因子をそれぞれ単独であるいは2種類を組み合わせてノックダウンしたハチから調整した VLP が宿主幼虫の接着性血球にあたる影響を調査したところ、04_A07 と 03_A09 をダブルノックダウンした場合のみ、野生型の VLP を処理した場合にみられる宿主血球の仮足の伸展阻止が緩和されることが分かった (図 2)。一方、寄生の成功に関してはこのダブルノックダウンによってもその率が低下する傾向は認められなかったことから、最終的な寄生の成功はより複合的な要因によって決定されることが示唆された。

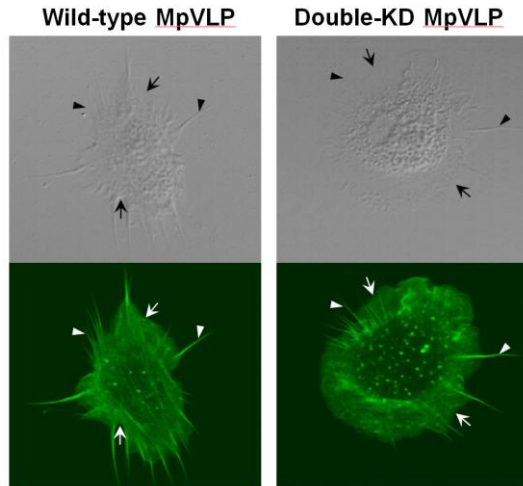


図 2. 野生型あるいは 04_A07 および 03_A09 をダブルノックダウンしたハチから調整した VLP が宿主幼虫の血球の接着進展に及ぼす影響。それぞれ上段が微分光学系による明視野像、下段が蛍光標識ファロイジンで染色した蛍光像。ここではプラズマ細胞での結果を示す。葉状仮足の伸展阻害がノックダウンにより緩和されていることが見て取れる。

本研究では、ギンケハラボソコマユバチが用いる主要分子レパートリーを初めて明らかにし、続いて VLP に含まれる新規因子が実際にホストの生体防御応答を抑制することを初めて実験的に証明し、その抑制の様式から、血球を含めた細胞の運動を制御できる可能性を持った新規遺伝子 2 種を得た。これはいずれも新規な結果であり、学術的にも将来的な応用の観点からも一定の価値を持つものである。また派生的な成果として、ギンケハラボソコマユバチでの研究を通じて確立した手法を適用することにより、貯穀害虫・コクヌストモドキの生体防御系についても複数の新知見を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

(1) Kakeru Yokoi, Hiroaki Koyama, Wataru Ito, Chieka minakuchi, Toshiharu Tanaka, Ken Miura. Involvement of NF- κ B transcription factors in antimicrobial peptide gene induction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Developmental and Comparative Immunology* (2012) 38, 342-351. (査読有) 10.1016/j.dci.2012.06.008

(2) Kakeru Yokoi, Hiroaki Koyama, Chieka minakuchi, Toshiharu Tanaka, Ken Miura. Antimicrobial peptide gene induction, involvement of Toll and IMD pathways and defense against bacteria in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Results in Immunology* (2012) 2, 72-82. (査読有) 10.1016/j.rinim.2012.03.002

〔学会発表〕 (計 6 件)

(1) 横井翔・吉田龍博・小山裕明・伊藤渉・水口智江可・田中利治・三浦健、貯穀害虫・コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) のフェノール酸化酵素前駆体 (PPO) 遺伝子の細菌感染防御への寄与。第 57 回日本応用動物昆虫学会大会、2013 年 3 月 28 日、日本大学生物資源科学部湘南キャンパス

(2) 小山裕明・横井翔・伊藤渉・水口智江可・田中利治・三浦健、コクヌストモドキの抗微生物ペプチド遺伝子の発現制御機構の解析 III-ペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) ファミリー分子による制御。第 57 回日本応用動物昆虫学会大会、2013 年 3 月 28 日、日本大学生物資源科学部湘南キャンパス

(3) 横井翔・小山裕明・水口智江可・田中利治・三浦健、貯穀害虫コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) の抗微生物ペプチド (AMP) 遺伝子発現誘導に関する研究。第 57 回日本応用動物昆虫学会大会、2013 年 3 月 28 日、日本大学生物資源科学部湘南キャンパス

(4) 佐野健志、横井翔、田中利治、三浦健、RNA 干渉を用いた寄生蜂の毒液腺で発現する遺伝子の機能解析。第 56 回日本応用動物昆虫学会大会、2012 年 3 月 29 日、近畿大学奈良キャンパス

(5) 小山裕明、横井翔、伊藤渉、水口智江可、田中利治、三浦健、コクヌストモドキの抗微生物ペプチド遺伝子の発現制御機構の解析 II - NF- κ B family 転写因子による制御。第 56 回日本応用動物昆虫学会大会、2012 年 3

月 29 日、近畿大学奈良キャンパス

(6) 横井翔、小山裕明、水口智江可、田中利治、三浦健、コクヌストモドキの抗微生物ペプチド遺伝子の発現制御機構の解析 I-抗微生物ペプチド遺伝子のグループ分けと Toll, IMD 経路による制御。第 56 回日本応用動物昆虫学会大会、2012 年 3 月 29 日、近畿大学奈良キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 健 (MIURA KEN)
名古屋大学・生命農学研究科・准教授
研究者番号：60219582

(2) 研究分担者

なし