

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658053

研究課題名(和文)寄生蜂は宿主の死をどのように防ぐか？

研究課題名(英文)The mechanism by which parasitoid wasp *Asobara japonica*

研究代表者

早川 洋一 (Hayakawa, Yoichi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50164926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：内部寄生蜂 *Asobara japonica* は、ユニークな寄生戦略を用いて、様々な種のショウジョウバエ属昆虫を宿主として利用する。*A. japonica* メス成虫は宿主に対し致死量の強毒性の毒液を寄生時に注入する。そして、直後に、卵とともに毒液の殺虫活性を中和する側輸卵管液を注入する。本研究では、毒液成分が宿主の液性免疫活性には影響を及ぼさないものの、血球の伸展や貪食といった細胞性免疫活性を抑制することが明らかにした。また、毒液注入により宿主体液中でセリンプロテアーゼ活性が約100倍も上昇することも分った。側輸卵管成分はプロテアーゼ活性化を阻害するものの、細胞性免疫の抑制には影響を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：Endoparasitoid wasp *Asobara japonica* utilizes *Drosophila melanogaster* and the other broadly related *Drosophila* species as habitual hosts by using a notable feature of parasitism strategy. *A. japonica* females possess highly toxic venom and they inject the venom components with a lethal dose for the hosts at parasitism. A few seconds after the venom injection, they introduce eggs together with the lateral oviduct components that neutralize the detrimental effects of the venom toxin. In the present study, we demonstrated that the venom components impaired the host cellular immunity but did not affect the humoral immunity. Furthermore, injection of the venom components activated a serine protease-like enzyme activity approximately 100 times in the plasma 4 h after the injection. The neutralizing factor in the oviduct blocked the protease-like enzyme activation, while it was unable to neutralize the venom-induced detriment of the host hemocytes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：寄生蜂 毒液 細胞性免疫 体液性免疫 セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

寄生蜂の寄生戦略に関する研究の歴史は古く 1920 年代にまで遡る。しかし、分子レベルでの解析は最近 20 年のことであり、その牽引役を担ってきたのは宿主を鱗翅目とする数種類の内部寄生蜂の研究と言える。その主な理由は、この種の雌寄生蜂が生殖器官内で生産するポリドナウイルスと呼ばれる共生ウイルスの存在と言える。寄生蜂の寄生を補助するこの共生ウイルスが示す生理機能への強い関心がこの分野での分子生物学的研究の原動力になったからである(1,2)。ただ、ほとんどの研究の視点は寄生蜂による宿主制御に置かれ、如何に宿主の発育調節や免疫系が寄生蜂に都合良く機能阻害されるか、を競って証明して来た観がある。寄生蜂-宿主間では、あらゆる面で前者が優位なだけに、従来の研究の方向も無理からぬ傾向と言える。しかし、両者の関係を少しでも微視的に眺めた場合、これまで着目されなかった一面も浮かび上がる。それは、『寄生蜂による宿主の保護』という観点である。寄生蜂は自らが宿主から脱出する前に宿主を殺す事はなく、むしろ、積極的に宿主の死を防ぐ必要がある。なぜなら、脱出前の宿主が死んでしまえば、寄生蜂幼虫も運命を共にすることになるからである。従って、この間、様々な角度から宿主を防御しているはずであり、この分子レベルでの解析は、これまで寄生蜂を対象とする分子レベルでの研究では、ほとんど着手されてこなかった研究テーマと言える。

- (1) Stoltz, D.B. et al. (1988) Intervirology, 21, 1-4.
- (2) Webb B.A. and Strand M.R. (2005) Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 6 (Gilbert, L. I., Iatrou, and Gill, S. S., eds). Elsevier, pp. 323-360.

2. 研究の目的

内部寄生蜂による寄生は複数の生理現象の絶妙なバランスの上に成立する。寄生蜂 *Asobara japonica* は、寄生の際、宿主シヨウジョウバエ幼虫にまず毒液を注入し、直後に卵と側輸卵管成分を注入するが、産卵行動初期(数秒以内)に寄生蜂を宿主から引き離すと宿主は数時間で全て死亡する。勿論、寄生を完了させた場合には、こうした宿主の死亡はない。従って、寄生妨害により宿主体内に毒液のみが注入され、その殺虫効果によって死亡したものと解釈した。ならば、卵か側輸卵管成分には殺虫効果に対する中和活性があるはずである。予想通り、側輸卵管の液性成分中に毒液による宿主個体死を防ぐ生理

活性を確認した。本研究では、この側輸卵管および毒液成分について分子レベルでの解析を行い、さらに、昆虫個体死誘発の分子メカニズム解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、*A. japonica* の寄生戦略に関する生理的実験に重点を置いて行ったが、併せて、側輸卵管内活性因子に関する生化学的実験(側輸卵管因子)と毒液成分に関する生化学・分子遺伝学的実験(毒液成分)を同時並行的に進めた。寄生戦略に関する解析については、研究成果の項で実験方法と共に解説するので、ここでは主に側輸卵管・毒液の両活性因子の分子レベル解析の実験方法を記す。

< 側輸卵管因子 >

寄生蜂 *A. japonica* の毒液には、約 0.2 雌等量の注射によって宿主シヨウジョウバエ幼虫を 24 時間以内に完全に殺すだけの強毒性成分を含む。一方、側輸卵管内には宿主幼虫に作用し、毒液による殺虫作用を打ち消す生理活性因子が存在する。本研究では、この側輸卵管の活性因子を単離し、構造を決定することを目標とした。これまでの予備実験によって、この活性因子は恐らくタンパク質であることが予想されていたので、この単離は 2 つの方向から進める。まず、オーソドックスに、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティー、疎水系の順相カラムクロマトグラフィーによる精製を試行した。この際、出発材料が非常に少ないため、前処理以降は HPLC システムを用いた。精製は、毒液と同時にシヨウジョウバエ幼虫に注射することによって毒液による殺虫作用の阻害効果を生理活性の指標として進めた。

一方、カラムクロマトグラフィーによる精製とは別の方法で側輸卵管活性因子の単離も試みた。それは、側輸卵管液性成分に対するモノクローナル抗体を作成し、その中から活性因子の抗体を単離し最終的に因子自体の精製を目指すというものである。側輸卵管液性成分を抗原とする免疫は、*in vivo*, *in vitro* 両方法で進めた。即ち、前者はマウスへの抗原注射、後者は単離したマウス脾臓細胞の培養系で直接抗原を感作させる方法である。いずれも、ハイブリドーマのスクリーニングは、得られる抗体と側輸卵管成分を予め反応させた後で、毒液と共にシヨウジョウバエ幼虫に注射することにより、毒液由来の殺虫作用に対する阻害効果測定によって進めた。

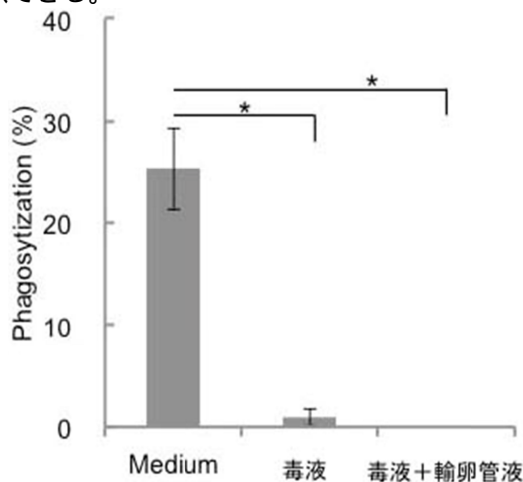
< 毒液成分 >

Asobara japonica 毒液によるシヨウジョウバエ幼虫個体死決定の分子機序を明らか

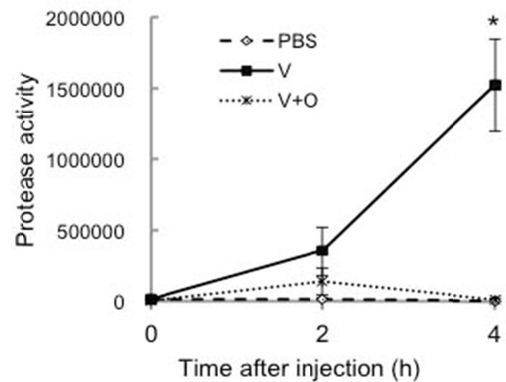
にする目的で、まずは、その毒性成分の単離を試みた。側輸卵管成分の精製同様、種々のカラムを用いてカラムクロマトグラフィーを行ったが、後述のように、このカラムクロマトグラフィーによる精製では精製度を上昇させることができなかった。そこで、毒液成分の性状解析に力点を置いた。抽出した毒液に対して温度、有機溶媒、タンパク質分解酵素などの種々の物理的・化学的処理を行い、その後の宿主ショウジョウバエ幼虫に対する毒性を評価した。さらに、電子顕微鏡、あるいは、次世代シーケンサーを用いる遺伝子解析手法を用いて毒液成分の構造解析を遂行した。

4. 研究成果

上述のように、内部寄生蜂 *Asobara japonica* は、ユニークな寄生戦略を用いて、ショウジョウバエ属昆虫の広範な種を宿主として利用する。*A. japonica* メス成虫は強毒性の毒液を持ち、寄生時に宿主に対し致死量の毒液を注入する。そして、毒液の注入直後、卵とともに毒液の殺虫活性を中和する側輸卵管液を注入する。まず、本研究では、毒液成分が宿主の液性免疫活性には影響を及ぼさないものの、血球の伸展、包囲化、貪食といった細胞性免疫活性を顕著に抑制することを明らかにした(下図参照)。しかも、この毒液による細胞性免疫の抑制は側輸卵管成分によって影響を受けることもなかった - これは、既寄生宿主体腔内における寄生に寄る宿主細胞性免疫の阻害を再現しているものと解釈できる。



さらに興味深いことに、毒液(V)の注入により宿主の体液中でセリン型プロテアーゼ活性が約 100 倍ほども上昇することもわかった。しかも、細胞性免疫の抑制には影響を及ぼさなかった側輸卵管液中の解毒成分(O)はセリンプロテアーゼ活性化を完全に阻害することも明らかになった(下図参照)。



また、宿主である *D. melanogaster* 血中で観察された *A. japonica* 毒液によるセリン型プロテアーゼの活性化は、宿主として利用できないショウジョウバエ *Drosophila ficusphila* 血中では見られなかった。これらの一連の実験結果は、*A. japonica* 毒液の強力な殺虫活性は、本種が広範囲なショウジョウバエ属昆虫を宿主として利用可能たらしめていること、さらに、毒液単独(側輸卵管成分がない場合)による宿主殺虫活性と血中セリン型プロテアーゼ活性化との密接な関係を示唆しているものと解釈できる。こうした事実は、今後、昆虫個体死誘発の分子メカニズムを解析して行く上で、貴重な研究知見となり得る。

さらに、興味深いことに、*A. japonica* 毒液は *A. japonica* が宿主として利用できないショウジョウバエ *D. ficusphila* に対して毒性を示さない反面、異目種であるハスモンヨトウ幼虫には高い毒性を示すことが確認された。これは *D. ficusphila* 血清成分は毒液中和活性があるのに対して、ハスモンヨトウ血清にはそうした活性がないためであった。すなわち、進化の過程で、*D. ficusphila* は、*A. japonica* による寄生を免れるために *A. japonica* の毒液中和成分を獲得した可能性も有り得る。

この毒液殺虫成分本体の性状、さらに、構造については現在論文準備中ということもあり、現時点でこれ以上詳細について紹介することはできない。

一方、側輸卵管液の毒液中和因子は、性状解析の結果、分子量 10kDa~100kDa の高分子タンパク質であること、さらに、種々のカラムクロマトグラフィーを試行した結果、Heparin アフィニティーカラムが有効であることは分かった。しかし、活性を保持させたまま複数回のカラムクロマトグラフィーによる精製は困難を極めた。しかも、雌寄生蜂の側輸卵管を十分量調製することも極めて難しく、現時点でも一次構造を決定できるまでの精製度には至っていない。また、モノクローナル抗体を用いての側輸卵管活性因子の同定についても試みた。毎週、マウス 1 頭あたり約 100-200 匹分の *A. japonica* 雌蜂の側輸卵管抽出液を注射し、3 回目の注射の後に

最終ブースターを行った。その後、脾臓を摘出し、マウスミエローム細胞 P3U1 と細胞融合を行った。ELISA 法による側輸卵管抽出液との交差反応を指標に、抗体のスクリーニングを繰り返し、最終的に約 50 種類のクローン細胞を得た。全ての抗体について一度ずつ毒液中和活性に対する阻害作用を測定したものの、現時点では、顕著な阻害を示すモノクローナル抗体の同定はできていない。ただ、この毒液中和反応は、不純物の混入によって大きく影響を受ける可能性も十分に有り得るので、現在、処理条件の最適化を進めており、この最適化完了後に、再び全てのモノクローナル抗体について中和反応阻害活性を評価する予定である。多少でも中和反応阻害活性のある抗体が同定できた場合は、その抗体を用いて抗原タンパク質を単離精製し、一次構造決定を行う。

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 7 件)

以下は全て査読有り論文。

1) Khaeso, K., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., and Tojo, S. 2014, Stimulation of Vitellogenin gene expression by permethrin in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Delphacidae). *J. Pesticide Sci.*, In press.

2) Matsumoto, H., Nomura, S., Hayakawa, Y., 2014, Changes of RNA virus infection rates and gut microbiota in young worker *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) of the chalkbrood-infected colony after a pollination task in a greenhouse. *Applied Entomology and Zoology*, in press.

3) Kiyotake, H., Matsumoto, H., Nakayama, S., Sakai, M., Miyatake, T., Ryuda, M., Hayakawa, Y., 2014 Gain of long tonic immobility behavioral trait causes the red flour beetle to reduce anti-stress capacity. *J. Insect Physiol.*, 60, 92-97.

4) Furihata, S.X., Matsumoto, H., Kimura, M.T., Hayakawa, Y., 2013, Venom components of *Asobara japonica* impair cellular immune responses of host *Drosophila melanogaster*. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology*, 83, 86-100.

5) Furihata, S., Tanaka, K., Ryuda, M., Ochiai, M., Matsumoto, H., Csikos, G. and Hayakawa, Y., 2014, Immuno-evasive protein (IEP)-containing surface layer covering polydnavirus particles is essential for viral

infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 115, 26-32.

6) Zhou, Y., Wu, S., Wang, H., Hayakawa, Y., Bird, G.S., and Shears, S.B., 2012, Activation of PLC by an endogenous cytokine (GBP) in *Drosophila* S3 cells and its application as a model for studying inositol phosphate signalling through ITPK1. *Biochem. J.*, 448, 273-283.

7) Matsumoto, H., Tsuzuki, S., Date-Ito, A., Ohnishi, A., and Hayakawa, Y., 2012 Characteristics common to a cytokine family spanning five orders of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 446-454.

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (高知大) 2014 年 3 月 28 日, 砂山貴志, 内川雄貴, 落合正則, 早川洋一 「宿主アワヨトウ幼虫からのカリヤコマユバチ脱出誘導因子の発見」

2) 日本動物学会第 84 回大会 (岡山大) 2013 年 9 月 28 日, 嬉正勝, 早川洋一 「フタホシコオロギ雄の性的不能期における TAG の 5-HT 量変化」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://extwww.cc.saga-u.ac.jp/~hayakayo/FRAME/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA, Yoichi)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：50164926

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

降幡 駿介 (FURIHATA, Shunsuke)