

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450473

研究課題名(和文) 捕食寄生性者にとって寄主範囲とは：寄主免疫作用とヤドリバエ

研究課題名(英文) What is the host range for parasitoids? : Tachinid flies and host immune reactions

研究代表者

中村 達 (Nakamura, Satoshi)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究員

研究者番号：40373229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：寄生蜂が様々な方法で寄主の免疫作用に対抗し、寄生に成功するのが知られているのに対して、同じ捕食寄生性昆虫である寄生バエについてはほとんど研究されていない。本研究では、ヤドリバエがどのように寄主免疫作用をくぐり抜けて寄生成功するのか明らかにするため、寄主体内での幼虫周辺や寄主の変化について経時的に調査した。寄主に侵入後、ハエ幼虫はバリア構造物と名付けた寄主組織からなる構造物に包囲されることがわかった。このバリア構造物は内側が寄主の血球由来、外側が脂肪体細胞由来で、ハエ幼虫はこの構造により、寄主によるメラニン化などの免疫反応から逃れていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Whereas many studies have been carried out how parasitoid wasps suppress the immune reactions of their hosts, there are few studies on parasitoid flies that have the different origin but evolved as the same parasitoid as the wasps. In this study, we observed changes around the fly larvae within the host and host blood cells. Although the fly larvae penetrated into the host, the cellular immune reaction by the host blood cell did not occur. The fly larvae were surrounded by a unique structure named the barrier structure that contained not only host hemocytes but also fat body: hemocytes assembled around the maggots first, and then the fat body cells covered the hemocyte layer. Thereafter, the fly larvae used the structure to protect themselves from the host immune reactions such as melanization.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：ヤドリバエ 寄主免疫作用

1. 研究開始当初の背景

幼虫期を他の昆虫に寄生し、最終的にその昆虫を殺し、成虫期は自由生活を送る捕食寄生性昆虫は、その生活史の独自性や生物的防除資材としての有効性から、古くから注目されてきた研究対象である。この捕食寄生性は、膜翅目、双翅目、鞘翅目などの主要な分類群で獲得された形質である。しかしながら、その研究のほとんどは膜翅目の寄生蜂を材料としたものであり、その他の分類群の捕食寄生性昆虫に関する研究は驚くほど少ない。特に双翅目の捕食寄生者は、他の分類群のものに比べて多様な寄主を利用することが知られており、脊椎動物の両生類(カエル類)をはじめ、陸生貝類、甲殻類や昆虫類を利用し、様々な手段で寄主免疫反応に適応して寄生に成功していることが予想される。中でも、記載種だけで10,000種以上、双翅目で最も大きなグループのひとつであるヤドリバエは、我々が住む周辺環境に多数生息し、研究の重要性を古くから指摘されながらほとんど研究されていない。ヤドリバエは全ての種が、寄主の内部に潜り込み寄主を食べる内部寄生性捕食寄生者だが、一般的に内部寄生者はそれぞれの種に特有の限られた生物種の免疫反応からしか回避できない結果、寄生できる寄主範囲が狭いとされている。にもかかわらず、逆にヤドリバエは寄主範囲が広いことが知られており、その点からもいかに寄主に適応してきたか進化を理解する上で興味深い材料である。また、ほとんどの寄生蜂が寄主昆虫の体内または体表に直接産卵して寄生する方法(直接型)をとるのに対し、ヤドリバエではこれ以外にも、寄主の生息場所や食草に産卵・孵化した幼虫が寄主を自ら探索するもの(探索型)、寄主が近くを通りかかるのをじっと待つもの(待機型)、さらには食草に産み付けられた卵が寄主に摂食されることで寄生するもの(微小卵型)等、多様な寄生様式が見られる。また、卵生や卵胎生を示す種が存在し、それぞれに寄主免疫に対抗する手段を持っていることが予測される。寄主と捕食寄生者はお互いに競争的關係にあるため、寄主は寄生から逃れようとする生理的変化が進化的に選択されやすく、寄生者では寄主の生理的変化に対応できるような選択が働く。行動的な逃避や生態的な要因による寄主の寄生回避も当然見られるが、寄主適合は生理的な寄主範囲を決定しているに違いない。

2. 研究の目的

ヤドリバエの幼虫は寄生蜂が寄主内で皮膚呼吸するのと異なり、寄主に侵入直後から、または幼虫期後半に、身体の後部に位置する専用器官である気門を使っ

て呼吸するといわれている。このために、幼虫期にはシュノーケルのような役割をする呼吸管(ファネル)を自らの気門と寄主の気管または寄主体外に接続して呼吸する。Salt (1968)は、このファネル形成を、寄主血球による包囲網から逃れ、これを逆に利用して自らの呼吸に役立てているとし、ヤドリバエの寄主免疫対抗手段について日本語を用いて「Ju-jitsu=柔術」のようだと形容した。しかし、これは証明されているわけではなく、推測の域を出ておらず、その後もまったく研究されていない。

本研究では、これまでに発育期間などが明らかになっている「直接型」のヤドリバエについて、ヤドリバエ幼虫が寄主体内に侵入した後、この幼虫の発育と寄主体内のどの部位に存在するかを経時的に調べ、その時点での寄主免疫作用がどのようにヤドリバエに働いているかを明らかにしようとするものである。鱗翅目幼虫の寄生性生物に対する免疫反応として、付着能をもつ血球細胞である顆粒細胞とプラズマ細胞による包囲化作用が考えられる。この反応は、顆粒細胞からの糸状突起の伸長と対象生物への付着、顆粒細胞による薄い包囲化カプセルの形成、プラズマ細胞による厚膜化、そしてメラニン化による殺傷というプロセスで行われている。ヤドリバエ幼虫はこのいずれかのプロセスを阻害することによって寄生を成立させていると予想されることから、この点について検証し、寄生できる寄主とできない寄主の違いについて考察しようとするものである。

3. 研究の方法

ヤドリバエは、卵胎生で寄主の表皮に産卵された卵が1分以内に孵化する *Drino inconspicuides* もしくは卵生で寄主の表皮に産卵された卵が4日後に孵化し、寄主に侵入するブランコヤドリバエ *Exorista japonica* を用いた。それらの寄主としてアワヨトウ *Mythimna separata* 終齢(6齢)の幼虫を用いた。また、寄生できない寄主といわれているシロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* 幼虫を用いた。

(1) 寄主2種への寄生実験

ヤドリバエ *D. inconspicuides* をアワヨトウに寄生させた場合の寄生率等については、我々のグループによる詳しい報告がある。一方、シロイチモジヨトウ幼虫には寄生できないという不確かな情報があるため、これを検証する必要がある。

(2) 寄生による寄主の血球細胞変化

D. inconspicuides もしくはブランコヤドリバエの雌成虫にアワヨトウ幼虫へ産卵させ、孵化幼虫が寄主体内に侵入することが、寄主体内で免疫作用を担う顆

粒細胞、プラズマ細胞などを含む血球細胞の種類や数に、影響を与えるかを経時的に調べた。

(3) 寄主内のヤドリバエ幼虫の観察

D. inconspicuides もしくはブランコヤドリバエに、アワヨトウ幼虫に寄生させた後、寄主を解剖することで、これらのヤドリバエ幼虫の体腔中での寄生状況を観察した。

(4) バリア構造物を構成する細胞の同定

上記の観察により見つかри、我々が名付けた「バリア構造物」を構成する由来細胞を明らかにするために、分子生物学的手法を用いた解析を行った。

(5) バリア構造物の詳細な形成過程の観察

D. inconspicuides が寄生後の寄主を継時的に解剖することで、バリア構造物の形成の詳細な形成過程を観察及び分子生物学的手法を用いた解析を行った。

4. 研究成果

(1) 寄主2種への寄生実験

寄生できないといわれていたシロイチモジヨトウ幼虫に産卵させた結果、アワヨトウと同じように問題なく寄生できることがわかった。また、この他にチャハマキ *Homona magnanima*、チャノコカクモンハマキ *Adoxophyes honmai* についても試したが、寄生することが明らかになり、当初予定していた寄生不可能な寄主についての観察はできなかった。

(2) 寄生による寄主の血球細胞変化

D. inconspicuides やブランコヤドリバエが寄主に侵入した2日後に寄主血球細胞を取り出して、総血球数や各血球種の割合を調べた結果、非寄生幼虫由来のコントロールと比較して有意な差は認められなかった。さらにガラスプレートへ附着する血球細胞の割合にも変化がなかったことから、ヤドリバエの寄生は寄主の血球による細胞性免疫反応に、大きな影響を与えていないことが示唆された。

(3) 寄主内のヤドリバエ幼虫の観察

寄主体内に侵入した *D. inconspicuides* やブランコヤドリバエ幼虫は、ファネル構造とは異なる白色の構造物に包囲されていることが確認された。我々はこの構造物を、バリア構造物と名付けた。

(4) バリア構造物を構成する細胞の同定

D. inconspicuides とブランコヤドリバエ幼虫の周りに形成されるバリア構造物について、DAPI による核染色を行った結果、この構造物は細胞の集合によって形成されていることが示唆された。そこで、まずバリア構造物を形成する細胞が、ヤドリバエ由来か寄主由来かを調べるため、ヤドリバエとアワヨトウの Internal

Transcribed Spacer (ITS) 領域のクローニングを行い、それぞれの種を識別できるようなプライマーの作成を行った。このプライマーを用いてゲノム PCR を行った結果、両種のものとも寄主由来であることが明らかになった。さらにこの物質の由来が、寄主の血球か脂肪体かを明らかにするため、アワヨトウ幼虫の血球特異的もしくは脂肪体特異的に発現する遺伝子の探索を行い、血球特異的に発現する遺伝子として、C-type レクチンファミリーに属する EPL をコードする遺伝子を、脂肪体特異的に発現する遺伝子としてアルデヒド脱水素酵素をコードする遺伝子を発見した。これらの遺伝子に特異的なプライマーを用いて、*D.*

inconspicuides 幼虫の周りに形成されたバリア構造物を構成する細胞から合成した cDNA に対し PCR を行った。その結果、バリア構造物は血球の他、脂肪体も含むことがわかり、寄主による包囲化反応の産物（血球細胞のみから構成）とは異なっていることが明らかとなった。

(5) バリア構造物の詳細な形成過程の観察

D. inconspicuides 幼虫周囲に形成されるバリア構造物の継時的な形成過程を観察した結果、寄生2時間後に雲状の物質がヤドリバエ幼虫を取り囲むことがわかった。さらに時間経過とともに、綿状の物質がその周囲を覆う様子が観察され、4時間後には外側から幼虫を観察できない厚さの構造物が形成された。ヤドリバエ幼虫が3齢になり大型化する侵入72時間以降では、バリア構造物は幼虫全体を覆うことができず、幼虫体の前半部が寄主体腔内に完全に露出しているのが確認された。PCR により、バリア構造物を形成する細胞の継時変化を調べた結果、内側の雲状の物質は血球由来、そして外側の綿状の物質は脂肪体由来であることがわかり、バリア構造物が、まずは血球細胞に取り囲まれることから始まり、その後、脂肪体が集まって形成されることが示された（図1参照）。24時間後のバリア構造物内にいる *D. inconspicuides* 幼虫は、包囲化された異物とは異なり、メラニン化されていなかった。従って、このヤドリバエはバリア構造物の形成という、これまでに知られていない新しい戦略によって、寄主免疫から身を守っていると考えられた。その一方で、ヤドリバエ幼虫が3齢になった以降では、このバリア構造物が機能しているとは考えにくいことから、この時期に幼虫がどのように身を守っているのか、現時点では不明である。

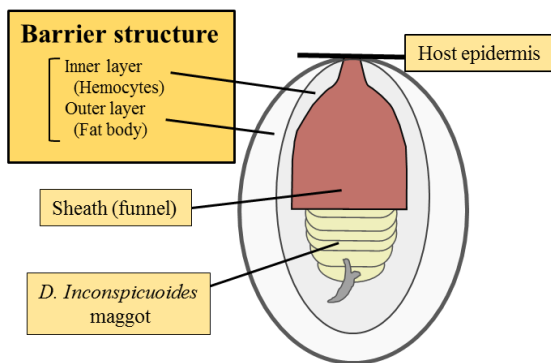


図 1

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 1 件)

- ① Yamashita K, Zhang K, Ichiki RT, Nakamura S, Furukawa S
Barrier structure: novel host immune evasion strategy of an endoparasitoid larvae, *Drino inconspicuides* Journal of Insect Physiology 査読有り、投稿中

[学会発表] (計 9 件)

- ① 一木良子・中原雄一・古川誠一・田端純・中村達 (2015) In vitro 実験系を用いたヤドリバエ幼虫の発育と行動観察 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、山形市
- ② 山下華緒里・中村達・一木良子・古川誠一 (2015) ヤドリバエによる寄生が寄主の免疫に与える影響 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、山形市
- ③ 一木良子・中原雄一・古川誠一・田端純・中村達 (2015) 寄主昆虫に寄生させずに in vitro でヤドリバエを無菌飼育する方法、日本昆虫学会第 75 回大会、福岡市
- ④ Nakamura S, Ichiki R (2015) Development and inter-specific competition within a host between two microtype tachinid flies. 4th International Entomophagous Insects Conference, Malaga, Spain.
- ⑤ 山下華緒里・中村達・一木良子・古川誠一 (2016) ヤドリバエ幼虫の膜状構造物の正体に迫る!、日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合、堺市
- ⑥ Nakamura S, Tanaka T (2017) Where are they hiding in a host? Comparison between two microtype tachinid species escaping from their host's immune responses. 5th International Entomophagous Insects Conference, Kyoto.

- ⑦ Ichiki TR, Nakahara Y, Furukawa S, Tachi T, Tabata J, Nakamura S (2017) Direct observation of immature behavior and development of the endoparasitoid fly *Exorista japonica* (Diptera: Tachinidae) by using an in vitro rearing technique. 5th International Entomophagous Insects Conference, Kyoto.
- ⑧ 中村達・田中利治 (2018) 微小卵型ヤドリバエ幼虫は寄主内でどのように隠れるべき特定器官を見つけるのか 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会、鹿児島市
- ⑨ 張凱・一木良子・中村達・古川誠一 ヤドリバエはホストの脂肪体を誘引する! 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会、鹿児島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 達 (NAKAMURA Satoshi)
国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究員
研究者番号：40373229

研究者番号：

(2) 研究分担者

古川 誠一 (FURUKAWA Seiichi)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：10391583