

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02483

研究課題名(和文) 寄生蜂の性特異的な防御機構の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of sex-specific defenses in a social parasitoid

研究代表者

岩淵 喜久男 (IWABUCHI, KIKUO)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：00203399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,800,000円

研究成果の概要(和文)：多胚性寄生蜂では、兵隊幼虫の攻撃能と増員能だけでなく、液性排除因子にも性的差異が存在することが明らかとなった。多胚のトランスクリプトーム解析と質量分析の結果、多胚が分泌する因子として、タンパク分解に関わるタンパク質が特定された。兵隊幼虫の雌特異的な増員メカニズムについて、コマユバチが産卵時に寄主体内に注入する毒液が生殖細胞の細胞死と二次的なvasaの発現低下、あるいは細胞死とvasaの発現低下の両方を誘導することで、胚子の運命転換により生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多胚性寄生蜂では、多胚生殖の発達と並行して不妊の兵隊幼虫による社会性を進化させてきた。申請者らは外敵に対するこれら防御機構に性的差異が存在することをこれまでに明らかにしてきた。本研究はその分子基盤を明らかにすることで、社会性の発達、ならびに生殖とは関係のない場面での性的差異の発達についての理解を深化させた。これらの知見は論文のほか、「Polyembryonic Insects」として上梓し、広く社会に学術的意義を伝えた。

研究成果の概要(英文)：In polyembryonic parasitoids, it was revealed that sexual differences exist not only in attacking and increasing in soldier larvae but also in humoral toxic factors. As a result of transcriptome analysis and mass spectrometry of polyembryos, proteins involved in proteolysis were identified as factors secreted by the polyembryos. Regarding the mechanism of female-specific increase in soldier larvae, the venom injected by the heterospecific parasitoid into the same host during egg laying induces both germ cell death and secondary vasa down-regulation, or both of cell death and vasa down-regulation. That is, it was clarified that the increase in soldier larvae is caused by the fate conversion of the embryo.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：社会性昆虫 寄生蜂 生殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多胚性寄生蜂では、寄主卵に産下された1個の卵から多数のクローン胚子と不妊の兵隊幼虫が作られる。兵隊幼虫は、同一宿主に寄生してきた他の寄生蜂を攻撃するが、雌雄で攻撃力に差異があり、雌のほうが強く、しかも雌では増員が起こる。このような雌雄両方に存在するカーストにおける性的差異は極めてユニークな現象である。さらに、外敵排除に関わる液性因子も存在し、ここにも性的差異が示唆されるなど、本種の外敵防御には随所で性的差異が散見される。一般に、外敵防御における性的差異の例はまれで、その分子基盤と意義の解明は社会性進化の理解に貢献することができる。

2. 研究の目的

本研究では、異種寄生蜂卵および幼虫に対する液性排除因子の性特異性、ならびにトランスクリプトーム解析、質量分析、胚子培養等の技術を統合した排除因子の特定を行うとともに、兵隊幼虫で特に性的差異が顕著な増員の現象について分子メカニズムの解明を目指す。また、トランスクリプトーム解析と分子生物学の定法を用いて、性的差異をもたらす性決定遺伝子、標的となる多胚生殖関連遺伝子等の特定を行うことで分子基盤の概要解明を目指す。さらに、液性排除因子と兵隊幼虫の2種類の外敵防御システム、ならびに外敵防御システムの性的差異、の進化的要因の理論的推定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 異種寄生蜂卵および幼虫に対する液性排除因子の作用

コマユバチの卵または幼虫を昆虫細胞培養用培地で培養し、培地に多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの雌または雄に寄生された寄主ミツモンキンウワバ幼虫より採取した血液を添加することで、トビコバチの液性排除因子の作用を調べた。

(2) 液性排除因子の特定

寄主より摘出した多胚子を無タンパク質で調整したトビコバチ専用培地で培養、培地中に分泌されたタンパク質を電気泳動により分離、質量分析によりアミノ酸配列を推定した。また、同時期の雌雄多胚子のトランスクリプトーム解析を行い、タンパク質のデータ情報と統合することで液性排除因子を特定した。

(3) 兵隊幼虫増員の分子メカニズム

コマユバチ成虫より毒線を摘出し、培養条件下で形成された桑実胚に毒腺抽出物を処理、その後新鮮培地に移して培養し、処理後所定の時期に桑実胚からRNAを抽出した。トビコバチの生殖細胞決定因子の主要因子 Cf-vasa と細胞死関連遺伝子 Cf-dronc の発現量を qRT-PCR を用いて解析した。また、兵隊幼虫増員を誘導する要因の特異性を調べるため、環境要因として温度刺激の効果を調べた。温度刺激には、長期の不適温度の影響、一過性的高温刺激を用いた。

(4) 関連遺伝子の解析

雌雄の多胚子を寄主体内から摘出、RNAを抽出し、発現変動遺伝子を解析する。この解析では、寄主の遺伝子情報を差分することでトビコバチの遺伝子情報を選別し、性的差異の概要を把握した。また、性特異性をもたらす上流遺伝子である性決定遺伝子 dsx の配列解析を行う。さらに、トビコバチの性的差異は初期胚子期にはすでに顕れているため、多胚化に関わる遺伝子の特定を行った。この解析では、桑実胚の分割は培養条件下で再現でき、培地に幼若ホルモンを添加することで多胚形成が1日早まり、しかも形成率が増加することから、この差を利用して桑実胚からRNAを抽出して行った。

(5) 進化的要因の理論的推定

野外条件では、雌成虫は1個の寄主卵に雌雄の卵を1個ずつ産むことが多く、そのため多くは雌雄が混在する brood となる。この際、兵隊幼虫の攻撃により性比は著しく雌に偏り、これが兵隊幼虫の進化原因であるとする仮説がある。この仮説の再考、ならびに2種類の性的差異のある外敵防御システムの進化について推論した。

4. 研究成果

(1) 液性排除因子の性的差異と因子の特定

コマユバチ *Glyptapanteles pallipes* の卵または幼虫を昆虫細胞培養用培地 IPL-41 で培養し、培地に多胚性寄生蜂キンウワバトピコバチの雌または雄に寄生された寄主ミツモンキンウワバ終齢幼虫より採取した血液を添加することで、トピコバチの液性排除因子の作用を調べた。すでに雄のトピコバチでは幼虫に対する排除因子の存在が確認されているが、本研究では、雌にも存在すること、ただし、熱安定性に劣ること、雄特異的に卵に対する毒性が存在することが明らかとなった。また、生物検定法の改良を試みた結果、コマユバチ由来の培養細胞に対するアポトーシス誘導を指標とする短時間かつ簡便な判定方法を開発することができた。さらに、寄主より摘出した多胚子を無タンパク質で調整したトピコバチ専用培地で培養、培地中に分泌されたタンパク質を電気泳動により分離、質量分析によりアミノ酸配列を推定、また、同時期の雌雄多胚子のトランスクリプトーム解析を行い、これらの情報を統合することで液性排除因子の一つとしてタンパク質分解に関わるタンパク質を特定した。

(2) 兵隊幼虫増員の分子メカニズム

同一寄主にコマユバチが寄生することで雌特異的に兵隊幼虫の増員が起こることがすでにわかっている。また、トピコバチの兵隊カースト分化は胚子に生殖細胞決定因子が分配されないことで起こることが知られている。コマユバチが寄生する際には雌成虫は寄主体内に卵とともに毒液を注入するが、これが生殖細胞決定因子に悪影響を及ぼすことで兵隊幼虫が増員すると想定されたことから、これを検証した。コマユバチ成虫より毒線を摘出し、培養条件下で形成された雌または雄の桑実胚に毒腺抽出物を処理し、それがトピコバチの生殖細胞決定因子の主要因子 Cf-vasa と細胞死関連遺伝子 Cf-dronc の発現量に影響を及ぼすか調べた。qRT-PCR を用いた解析の結果、コマユバチの毒液により雌でのみ生殖細胞決定因子を有する細胞の細胞死または Cf-vasa そのものの発現低下が起こり、それが本来生殖幼虫になる胚子を兵隊幼虫になる胚子に運命転換させることで兵隊幼虫の増員が起こることが強く示唆された。この結果は、不妊のカースト数が環境適応的に変化する分子機構を明らかにした初めての例である。しかし、これがなぜ雌特異的に起こるかは今後の課題である。また、兵隊幼虫増員を誘導する要因の特異性を調べるため、温度刺激の効果を調べた結果、毒液に対するのと同様に、雌でのみ長期の不適温度ならびに一過性の高温刺激によって兵隊幼虫の増員が認められた。カイコなど、他の昆虫種を用いて行った付帯実験により、これらの現象は環境ストレスに対するシステムが関与していることが示唆された。

(3) 性的差異関連遺伝子の解析

雌雄の多胚子を寄主体内から摘出、RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析した結果、複数の発現変動遺伝子を特定した。また、性特異性をもたらす上流遺伝子である性決定遺伝子 Cf-doublesex の配列を明らかにした。さらに、トピコバチの性的差異は初期胚子期にはすでに顕れ、雌に比べて雄胚子の方が多胚化のスピードが速いことが知られている。多胚化の分子機構につ

いて培養胚子を用いて検討し、ここのイベントに関わる遺伝子の特定を行った。

(4) 進化的要因の理論的推定

野外条件では、多くの既寄生寄主は雌雄が混在する mixed-brood である。Mixed-brood の性比は雌の兵隊幼虫による攻撃の結果、著しく雌に偏ることから、不妊の兵隊幼虫は雌雄の両方に対する意地悪行動によって進化したとする理論がある。この理論を数理モデルより再考した結果、極端に雌に偏った性比は雄にとっても有益であることを証明した。また、液性排除因子と兵隊幼虫という2種類の性的差異のある外敵防御システムについて検討した結果、排除因子は雄で強く、一方、兵隊幼虫は雌で強くしかも増員もすることから、両者は相補的な関係にあり、両者が共存する mixed-brood は外敵に対してより強力な防御システムを備えていることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Ohno, H., Sakamoto, T., Okochi, R., Nishiko, M., Sasaki, S., Bono, H., Tabunoki, H., Iwabuchi, K. | 4. 巻 456 |
| 2. 論文標題 Apoptosis-mediated vasa down-regulation controls developmental transformation in Japanese <i>Copidosoma floridanum</i> female soldiers. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 226-233 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.09.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Otsuki, T., Uka, D., Ito, H., Ichinose, G., Nii, M., Morita, S., Sakamoto, T., Nishiko, M., Tabunoki, H., Kobayashi, K., Matsuura, K., Iwabuchi, K., Yoshimura, J. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Mass killing by female soldier larvae is adaptive for the killed male larvae in a polyembryonic wasp. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7357 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43643-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nojima, Y., Bono, H., Yokoyama, T., Iwabuchi, K., Sato, R., Arai, K., Tabunoki, H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Superoxide dismutase downregulation and the oxidative stress is required to initiate pupation in <i>Bombyx mori</i> . | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 14693 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51163-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sakamoto, T., Nishiko, M., Bono, H., Nakazato, T., Yoshimura, J., Tabunoki, H., Iwabuchi, K. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Analysis of molecular mechanism for acceleration of polyembryony using gene functional annotation pipeline in <i>Copidosoma floridanum</i> . | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMC Genomics | 6. 最初と最後の頁 152 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-020-6559-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi, Y., Nojima, Y., Sakamoto, T., Iwabuchi, K., Nakazato, T., Bono, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kanost, MR., Tabunoki, H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Comparative analysis of seven types of superoxide dismutases for their ability to respond to oxidative stress in <i>Bombyx mori</i> . | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 2170 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38384-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Takano Y, Ono H, Sakamoto T, Yoshimura J, Iwabuchi K. | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Effects of heat shock and ambient temperature on female soldier production in a polyembryonic parasitic wasp | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Physiological Entomology | 6. 最初と最後の頁 133-139 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/phen.12281 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Kikuchi, A., Nakazato, T., Ito, K., Nojima, Y., Yokoyama, T., Iwabuchi, K., Bono, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Sato, R., Tabunoki, H. | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Identification of functional enolase genes of the silkworm <i>Bombyx mori</i> from public databases with a combination of dry and wet bench processes | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 BMC Genomics | 6. 最初と最後の頁 83 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-016-3455-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Uka, D., Sakamoto, T., Yoshimura, J., Iwabuchi, K. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Sexual complementarity between host humoral toxicity and soldier caste in a polyembryonic wasp | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1038/srep29336 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Norichika Ogata, Toshinori Kozaki, Takeshi Yokoyama, Tamako Hata, Kikuo Iwabuchi | 4. 巻 なし |
| 2. 論文標題 Comparison between the Amount of Environmental Change and the Amount of Transcriptome Change | 5. 発行年 2015年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0144822 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Eisuke Hasegawa, Yasunori Ishii, Koichiro Tada, Kazuya Kobayashi & Jin Yoshimura | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Lazy workers are necessary for long-term sustainability in insect societies. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep20846 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 石井宗一郎、岩淵喜久男、野村昌史 |
| 2. 発表標題 キンウワバトビコバチの交尾行動に血縁関係が及ぼす影響に関して |
| 3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂本琢磨、坊農秀雅、天竺桂弘子、岩淵喜久男 |
| 2. 発表標題 多胚性寄生蜂の胚子期トランスクリプトームに基づくヒトホモログのパスウェイ解析 |
| 3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------|
| 1. 発表者名 岩淵喜久男 |
| 2. 発表標題 多胚性寄生蜂のカースト多型 |
| 3. 学会等名 日本生態学会第65回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 坂本卓磨、天竺桂弘子、岩淵喜久男 |
| 2. 発表標題 多胚性寄生蜂における多胚形成期遺伝子の発現動態解析 |
| 3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 岩淵喜久男 |
| 2. 発表標題 昆虫類の寄生蜂による宿主免疫攪乱機構 |
| 3. 学会等名 日本比較免疫学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sakamoto, T., Ono, H., Iwabuchi, K. |
| 2. 発表標題 Transcriptome analysis of a polyembryonic parasitoid <i>Copidosoma floridanum</i> |
| 3. 学会等名 XXV International Congress of Entomology (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sakamoto, T., Ono, H., Iwabuchi, K. |
| 2. 発表標題 Comparative transcriptome analyses of male and female polyembryos of the polyembryonic parasitic wasp |
| 3. 学会等名 the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoology Society of Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ono,H., Sakamoto, T., Iwabuchi, K. |
| 2. 発表標題 Vasa expression in morulae and polyembryos of a polyembryonic parasitic wasp <i>Copidosoma floridanum</i> treated with competitive parasitic wasp venom in vitro |
| 3. 学会等名 the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoology Society of Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 坂本卓磨、岩淵喜久男 |
| 2. 発表標題 多胚性寄生蜂のトランスクリプトーム解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会 第86回大会 |
| 4. 発表年 2015年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 Iwabuchi, K. | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 199 |
| 3. 書名 Polyembryonic Insects | |

| | |
|----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 前藤薫（編）、岩淵喜久男ら（著） | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 一色出版 | 5. 総ページ数 324 |
| 3. 書名 寄生バチと狩りバチの不思議な世界 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 吉村 仁 (YOSHIMURA JIN) (10291957) | 静岡大学・創造科学技術大学院・教授 (13801) | |
| 研究分担者 | 佐藤 令一 (SATO RYOICHI) (30235428) | 東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605) | |
| 研究分担者 | 松浦 健二 (MATSUURA KENJI) (40379821) | 京都大学・農学研究科・教授 (14301) | |
| 研究分担者 | 野村 昌史 (NOMURA MASASHI) (50228368) | 千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授 (12501) | |
| 研究分担者 | 天竺桂 弘子 (TABUNOKI HIROKO) (80434190) | 東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605) | |