

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20945

研究課題名(和文) 内部寄生蜂感染による宿主ショウジョウバエのアンバランスな発生と恒常性攪乱システム

研究課題名(英文) Imbalanced host development and homeostasis of *Drosophila* larva by endoparasitic wasp infection

研究代表者

島田 裕子 (Shimada, Yuko)

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：30722699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内部寄生蜂 *Asobara japonica* が、宿主キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の幼虫に感染した際に、将来の成虫組織(成虫原基)が退縮する一方、幼虫の発育に必要な脳神経系、脂肪体、ステロイドホルモン生合成器官は正常に保たれるというアンバランスな発生現象を見出したことから、宿主の発生プログラムが、寄生蜂によって都合よく操作され、組織や器官の成長や個体全体の発育を協調させる恒常性システムが破たんする可能性が支持された。宿主で細胞死抑制遺伝子p35を過剰発現させたところ感染成功率が低下したことから、成虫原基の退縮が寄生に必要なことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：An endoparasitic wasp, *Asobara japonica*, affects on the larval development of its host, *Drosophila melanogaster*. Upon infection, the host adult tissues, known as imaginal discs were degenerated. Overexpression of antiapoptotic gene p35 partially suppressed the successful parasitism, suggesting that the degeneration of imaginal discs is required for successful parasitism. To identify the bioactive molecule of *A. japonica*, we are trying to make the fractions of the whole body of wasp or the body fluid of host larvae by using the molecular weight-based filters.

研究分野：発生生物学

キーワード：*Asobara japonica* 内部寄生蜂 ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 細胞死 成虫原基 免疫応答 感染

### 1. 研究開始当初の背景

地球上には、ある種の個体を宿主としてその体内に侵入し、宿主から得られる栄養を資源として成長する捕食寄生者が存在する。多くの場合、寄生者は宿主を直ちに殺すのではなく、寄生者と宿主が共に成長した挙句、寄生者にとって都合の良いタイミングで捕食する。従来の研究では、複雑かつ巧妙な生活史を持つ寄生者の生態に着目し、種の多様性、宿主選択性、生存戦略モデル、宿主の免疫系を破壊するウイルスや毒の成分、異種間共進化といった視点での研究が多くなされてきた。また、宿主の防御行動や免疫応答に着目した研究も多く進められてきた。

昆虫では多くの捕食寄生者が独立に進化しており、その種数は全種の10%以上を占める。そして、自然界での寄生捕食率は決して低くない。例えば、ショウジョウバエ属では野外集団の約50%以上が内部寄生蜂に感染しているという報告がある。一部の内部寄生蜂は、ハエの幼虫(宿主)体内に卵を産み付ける(図1)。卵は宿主体内で孵化し、寄生蜂の幼虫は宿主と共に発育する。そして、宿主が蛹化した後に、寄生蜂の幼虫が宿主個体を徐々に捕食し、最終的に約2週間かけて、寄生が宿主個体と置き換わる形で、ハエの蛹から寄生蜂が羽化する。

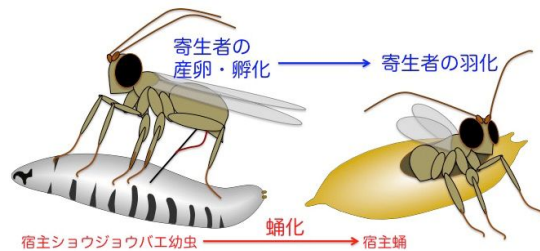


図1: 内部寄生蜂 *Asobara japonica* は宿主ショウジョウバエ幼虫に産卵し、宿主蛹から羽化する。

重要なのは、寄生蜂が感染した後も宿主ハエ幼虫の成長・蛹化プログラムが滞り無く進行する点である。一旦スタートした発生が進行することは一見当たり前だが、宿主にとっては寄生者を退治しない限り発生の進行は死に向かうことに他ならないので、発生を遅らせてでも免疫防御応答を発動することが生命の恒常性である。一方、寄生者にとっては宿主が成長し続けることが自らの生存に必須であり、宿主の蛹化プログラムを妨げないように免疫応答を回避しなくてはならない。この利益相反の図式から、申請者は、宿主の発生は寄生感染に応答する形で進行しており、正常発生とは異なる遺伝プログラムが作動しているのではないかと仮説を立てている。

これまで私は、昆虫ステロイドホルモン・エクジステロイド生合成機構を研究してきた。2014年、エクジステロイド生合成器官・前胸腺に投射するセロトニン産生神経を同定し、栄養依存的にエクジステロイド生合

成のタイミングを調節する分子機構を報告した。この研究成果を踏まえて私は、栄養に限らず、様々な外環境に応じて、発育のタイミングを柔軟に調節する遺伝プログラムを追究したいと考えた。そして、生物の発生プログラムを攪乱する外的要因の1つとして、内部寄生蜂の感染システムに着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、寄生によって発現変動が顕著な遺伝子群の機能解析を行い、宿主ハエの発生プログラムへの影響を遺伝子レベルで明らかにする。また、発生プログラムの進行(脱皮と変態)に必須のステロイドホルモン、エクジステロイドの生合成経路の調節機構に着目し、宿主のエクジステロイド生合成を *A. japonica* が促している分子実態の証拠を得る。

### 3. 研究の方法

本研究は、内部寄生蜂 *A. japonica* が宿主キロショウジョウバエ *D. melanogaster* に感染した時に変動する遺伝子群の機能解析を行うことで、寄生が宿主の発生プログラムに与える影響を評価する。また、宿主ハエにおける「成虫組織の発育不全と幼虫組織(脳神経系・前胸腺)の正常発達」というアンバランスな発生現象に着目し、細胞死と細胞増殖、エクジステロイド生合成、恒常性維持ホルモンの変化を細胞生物学的に解析する。そして、本来蛹化できない変異体やコレステロール代謝異常変異体を宿主として用いた際の蛹化のタイミングを測定する。さらに、非感染個体と感染個体の体液中の糖濃度や脂肪体に蓄積した脂質量の変化を比較する。

### 4. 研究成果

私は、*A. japonica* が寄生した宿主の成虫原基(将来の成虫組織)が顕著に縮退することを新たに見出した。その一方で、幼虫組織である脳神経系やステロイドホルモン生合成器官(前胸腺)および脂肪体には何の異常も検出されず、幼虫は概ね正常に発育して蛹化した。細胞死マーカーである抗 cleaved Dcp1 抗体で免疫化学組織染色を行ったところ、感染後2時間から翅原基の囊部分と肢原基の円盤中央部分にシグナルが検出されて、時間経過とともに原基全体が縮退する特徴的なパターンを示した。このような細胞死のパターンは、私が調べた限りにおいてこれまでに報告はなく、各成虫原基の形態形成を司るシグナル伝達経路が、細胞死誘導の標的となる可能性があった。そこで、成虫原基で細胞死抑制遺伝子 *p35* を過剰発現させた個体に寄生蜂を感染させると、その寄生成功率が低下した。この結果は、成虫原基で起こる細胞死が寄生の結果ではなく、寄生の成立に必要なことを示唆している。

さらに私は、オートファジーマーカーの1

つである Atg8a::GFP で標識されるドット状のシグナルが、感染後 30 分～2 時間で検出されることを新たに見出した。この結果から、寄生蜂由来の毒性成分が、宿主体内の成虫原基のみで細胞死とオートファジーを誘導することにより、宿主幼虫の発育そのものは阻害しない形で、成虫原基分の栄養を搾取する「飼い殺し型捕食寄生」に寄与することが示唆された。実際に、宿主幼虫の体液中のグルコース濃度やトレハロース量を測定したところ、非感染幼虫の体液と比較して有意に減少していた。そこで、この細胞死とオートファジーを誘導する分子機構が寄生成立に寄与するという仮説を検証するために、以下の実験を行った。

まず、*A. japonica* の毒性成分を分画することを試みた。*A. japonica* 成虫雌の腹部、あるいは感染した宿主ショウジョウバエ幼虫から体液を抽出し、非感染の幼虫に注入する生物検定の実験系を新たに構築した。宿主体液を注入された非感染幼虫では、注入後 4 時間で成虫原基の細胞死が誘導され、かつ個体死に至ることを確認した。一方、非感染幼虫体液の注入では細胞死は誘導されなかったことから、寄生蜂の毒性成分が宿主体液中に存在することが強く示唆された。

次に私は、宿主体液や寄生蜂抽出物を大量に調製して、アミコンフィルターを用いて分画し、成虫原基の細胞死誘導活性がある分画を生物検定によって調べた。すると、100K 以上の分画において細胞死誘導活性が検出された。すなわち、寄生蜂の毒性成分は、100K 分画分子量以上の大きなタンパク質、あるいは複数のタンパク質複合体から成るウイルス様粒子である可能性が示された。現在は、超遠心機を用いた分画とゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を計画しており、*A. japonica* のウイルス様粒子を濃縮・精製できる条件を絞り込む予定である。

さらに私は、感染した宿主幼虫の遺伝子発現の変化を調べるために、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの矢嶋俊介博士及び内山博充博士との共同研究によって、宿主幼虫と非感染幼虫の RNA-seq 解析を行った。その結果、感染後 2 時間で免疫応答経路の 1 つである Imd 経路に属する抗菌ペプチド遺伝子群の発現が著しく増加することと、感染後 24 時間で *wingless* 遺伝子や *Notch* 遺伝子の発現が減少する傾向を見出した。このことは、寄生蜂の感染によって宿主の免疫経路が応答するものの、その後に成虫原基の形態形成プログラムが重篤な影響を受けることを示唆する。そこで、宿主の免疫応答を抑制する目的で、Imd 経路の 1 つである NF- $\kappa$ B をコードする *relish* 遺伝子の変異体を宿主に用いて感染実験を行った。すると意外なことに、宿主の免疫不全にも関わらず、寄生成功率は逆に低下した。これは、本来寄生を抑制すべき免疫経路が寄生に必要なという一見矛盾した結果であった。しかしな

がら、*A. japonica* の寄生成功率はほぼ 90% 以上であり、宿主の免疫応答がほぼ無効であることを考えると、寄生蜂が宿主の発育プログラムのみならず、免疫応答経路をも乗っ取り、寄生成立に逆に利用している可能性があった。

以上の結果から、今後、寄生蜂毒腺由来の成分の分子実体を解明し、宿主の免疫応答経路や発育プログラムを都合よく操る仕組みを追究することで、これまで全くわかっていなかった寄生感染成立の新しい分子機構が解明できることが強く示唆された。

## 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 5 件、全て査読あり)

1. Enya S, Yamamoto C, Mizuno H, Esaki T, Lin H, Iga M, Morohashi K, Hirano Y, Kataoka H, Masujima T, Shimada-Niwa Y, Niwa R. “Dual roles of glutathione in ecdysone biosynthesis and antioxidant function during the larval development in *Drosophila*.” *Genetics*, 207(4), 1519-1532, 2017. doi: 10.1534/genetics.117.300391
2. Imura E, Yoshinari Y, Shimada-Niwa Y, Niwa R. “Protocols for visualizing steroidogenic organs and their interactive organs with immunostaining in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.” *Journal of Visualized Experiments*, 122, e55519, 2017 doi: 10.3791/55519
3. 井村英輔、鳥田(丹羽)裕子、丹羽隆介「環境に応じて昆虫の発育を司るステロイドホルモンの生合成調節メカニズム」*生物科学* 67(3), 177-183, 2016 <https://ci.nii.ac.jp/naid/40020847540> 10.3791/55519
4. Niwa YS, Niwa R. “Ouija board: A transcription factor evolved for only one target in steroid hormone biosynthesis in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.” *Transcription*, 7(5), 196-202, 2016 <https://doi.org/10.1080/21541264.2016.1210370>
5. Niwa YS, Niwa R. “Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis.” *Development*,

*Growth & Differentiation*, 58(1):  
94-105, 2016  
<https://doi.org/10.1111/dgd.12248>

〔学会発表〕(計2件)

1. 島田(丹羽)裕子、井村英輔、林信光、丹羽隆介「栄養と発育をつなぐ神経内分泌機構の研究」日本分子生物学会第40回年会(ConBio2017) ワークショップ「富澤純一先生メモリアル 分子生物学の原点から未来は見えるか」2017年
2. Shimada Y. “Exploring a neuroendocrine link between feeding, wandering, and pupariation” Janelia Conference “Behavioral Neurogenetics of *Drosophila larva*”、米国ハワードヒューズ医学研究所、2016年

〔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  
<https://sites.google.com/site/niwashimadalab/>  
[https://www.researchgate.net/profile/Yuko\\_Shimada-Niwa](https://www.researchgate.net/profile/Yuko_Shimada-Niwa)

6. 研究組織

(1)研究代表者  
島田 裕子 (Shimada Yuko)  
筑波大学・生命領域学際研究センター・助教  
研究者番号：30722699

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

丹羽 隆介 (Niwa Ryusuke)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：60507945

(4)研究協力者

竹股 ひとみ (Takemata Hitomi)  
筑波大学・生命環境科学研究科

片山 南美 (Katayama Minami)

筑波大学・生命環境科学研究科