

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05670

研究課題名(和文) 内部寄生蜂が宿主ショウジョウバエ幼虫に誘導する組織特異的細胞死シグナル経路の解析

研究課題名(英文) A hijack strategy of an endoparasitoid wasp on *Drosophila* larvae

研究代表者

島田 裕子 (Shimada, Yuko)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：30722699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、内部寄生蜂ニホンアソバラコマユバチが産生する毒成分が、宿主ショウジョウバエ幼虫体内で引き起こす細胞死に着目し、寄生の分子機構を解明することを目指した。まず、クロマトグラフィーと質量分析によって、毒腺抽出液中のタンパク質成分を網羅的に同定した。次に、ゲノム解析とRNAseq解析によって、毒腺で高発現する遺伝子を同定した。その結果、毒腺に存在する遺伝子産物約200個を同定した。また、寄生蜂遺伝子の機能解析を行う目的で、寄生蜂でのRNA干渉法を構築した。昆虫の体色決定遺伝子を標的とするRNAを注入したところ、寄生蜂の体色が変化したことから、RNA干渉に成功したことが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上で最も繁栄している昆虫類において、寄生蜂の種数は、昆虫全体の20%を占めると推定されている。この種数の多さは、様々な宿主に対する寄生戦略の多様性と有効性を反映しているといつて過言ではない。そして、その寄生成立の鍵となるのが、多種多様な毒成分の進化である。しかし、その大部分は未知である。そのような中、本研究は、ニホンアソバラコマユバチのゲノム解析とトランスクリプトーム解析により、寄生蜂の毒遺伝子候補を同定した。また、RNAi法の構築により、遺伝学的手法による毒遺伝子の機能解析を可能とした。新たな毒成分の発見は、既知の生物毒と同様に、医学的応用や農薬開発のシーズとして強く期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify the venom components in the endoparasitoid wasp *Asobara japonica*, to explore the molecular mechanism of parasitization. By using anion exchange chromatography and LS-MS/MS analysis, we successfully identified most venom proteins in the venom gland. We also performed the genome analysis and RNA seq analysis to identify about 200 genes that are predominantly expressed in the venom glands. Furthermore, we devised a protocol of RNA interference (RNAi) in *A. japonica*. This technique enables us to perform the functional analysis of venom genes in parasitism. When double-strand RNA was microinjected in larvae of parasitoid wasps, we confirmed a significant decrease of target gene expression by qPCR analysis and phenotypic analysis. Taken together, this study has established a platform for the genetic approach, as well as functional analysis of genes in the endoparasitoid wasp.

研究分野：発生生物学、分子遺伝学、昆虫科学

キーワード：内部寄生蜂 ゲノム解析 トランスクリプトーム解析 質量分析 陰イオン交換クロマトグラフィー  
ショウジョウバエ RNAi 寄生

### 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。この「寄生者が宿主を巧妙に乗っ取る仕組み」を分子レベルで問うことが、本研究課題の核心である。

従来の研究は、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、ウイルスや毒成分、異種間共進化をよく取り上げてきた。特に昆虫では、内部寄生蜂の種数が全種数の 20% を占めるほど多く、各々が宿主の感染防御機構を打ち破る・あるいは免れるための生理活性物質や分子機構を数多く有している。これらの寄生感染成立を担う分子群を理解することは、生態学的な理解の発展に留まらず、農業害虫や病原菌に対する有用物質を同定する上で必須の知見として貢献する。しかしながら、内部寄生蜂の多くは、試料サイズが小さい上に、宿主の種特異的な生活環のために研究室でのモデル系の構築が困難であることから、生化学的アプローチや分子生物学的アプローチによる研究が大きく立ち後れている。

そのような中、申請者は、ショウジョウバエ属全般を宿主とする内部寄生蜂 *A. japonica* が、宿主の発育に与える影響を調べてきた。*A. japonica* に産卵された後の宿主幼虫は正常に発育し、蛹化する。そして、宿主蛹の中でハエとハチが置き換わる形で寄生が進行し、感染から約 17 日後にハチ成虫が羽化する。これまでの研究によって申請者は、(1) 感染後 2 時間以内に宿主幼虫の成虫原基 (将来成虫となる組織) において細胞死が誘導されること、(2) 宿主の細胞死を抑制すると寄生感染率が低下すること、(3) 宿主の蛹化に必要な脳神経系、脂肪体、そしてステロイドホルモン合成器官では細胞死は誘導されず、寄生蜂にとって必要な幼虫の発育は正常に進行すること、を見出した。この結果から申請者は、寄生蜂が産卵時に宿主体内に何らかの生理活性物質を注入し、成虫原基のみを細胞死によって破壊することで、宿主幼虫の発育は何ら阻害しない一方、本来は成虫原基の成長に充てられるべき栄養分を寄生蜂幼虫のために搾取するのではないかと仮説を立てた (図 1)。



そこで申請者は、感染個体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、感染幼虫と非感染個体の 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。さらに申請者は、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、寄生蜂の感染率は逆に低下した。これは、本来寄生を抑制すべき免疫経路が寄生に必要であるという一見矛盾した結果である。しかしながら、*A. japonica* の感染率はほぼ 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ると考えた。

以上の結果を踏まえて申請者は、寄生者が巧妙に宿主に乗っ取る「毒」の分子機構を追究することが重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、内部寄生蜂 *Asobara japonica* が、宿主キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の幼虫に産卵する際に、宿主内部にある将来成虫となる組織 (成虫原基) でのみ選択的に細胞死を誘導する生理活性物質 “*Asobara*-derived imaginal disc apoptosis inducible factors (Adidas)” を同定することを目指す。そして、Adidas が標的とする成虫原基での細胞死シグナル伝達経路と免疫応答経路を解析することにより、宿主の発育プログラム依存的に寄生感染を成立させる新たな分子機構を発掘する。Adidas の同定を通して、寄生感染応答の新たな分子機構を明らかにすると共に、ショウジョウバエの遺伝学的アプローチを利用できる寄生感染応答機構のモデル系を新たに立ち上げる。

### 3. 研究の方法

#### (1) “*Asobara*-derived imaginal disc apoptosis inducible factors (Adidas)” の同定

*A. japonica* の全身あるいは毒腺の抽出物を作製し、陰イオン交換クロマトグラフィーで分

離・精製した後に、質量分析を行った (LC-MS/MS)。質量分析の解析は、熊本大学発生医学研究所との共同研究によって行った。

### (2) *A. japonica* のゲノム解析とトランスクリプトーム解析

Adidas やその他の毒成分関連タンパク質コードする遺伝子を同定する目的で、*A. japonica* の全ゲノム配列を解読し、寄生蜂の遺伝子を予測した。次世代シーケンス及び解析は、先進ゲノム支援プラットフォームとの共同研究にて行った。また、毒腺で高発現することが予測される毒成分関連遺伝子を同定するために、全身や毒腺から RNA を抽出し、RNAseq 解析を行った。

### (3) *A. japonica* 幼虫への 2 重鎖 RNA 顕微注入による RNA 干渉法の構築

*A. japonica* の毒成分をコードする遺伝子の機能を調べるために、RNA 干渉法による遺伝子機能ノックダウンをする実験手法を考案した。内部寄生蜂の幼虫は、宿主体内で生育することから、宿主の蛹殻を取り除いて、2 重鎖 RNA を顕微注入した後に、寒天培地上で発生が進行するかどうかを丁寧に観察した。

## 4. 研究成果

### (1) “*Asobara*-derived imaginal disc apoptosis inducible factors (Adidas)” の同定

50 mM HEPES buffer, pH 8.5 の条件で、ニホンアソバラコマユバチ 1,000 匹分の毒腺を解剖し、抽出液を作製した。抽出液を 50°C で 5 分間処理した後、陰イオンカラムに通した (図 2)。そして、各分画を限外濾過フィルター 100K を用いて脱塩・濃縮した後、ショウジョウバエ幼虫に顕微注入し、細胞死誘導活性の有無を検討した。その結果、チューブ No. 13~16 の分画において、アポトーシス誘導活性があることを確認した。

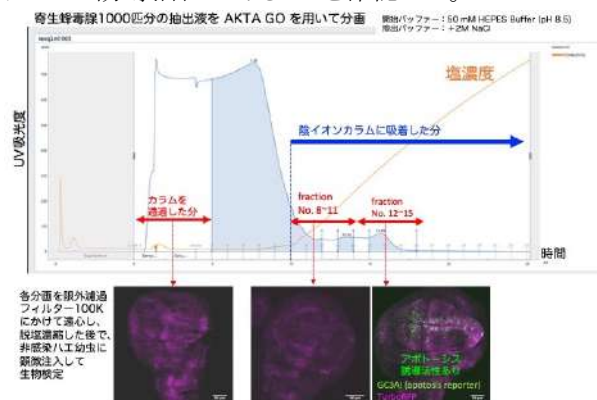


図 2: 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた寄生蜂毒腺の抽出液を分画。50mM HEPES buffer pH8.5 の条件において、アポトーシス誘導活性は、分画 No. 12~15 に濃縮した。

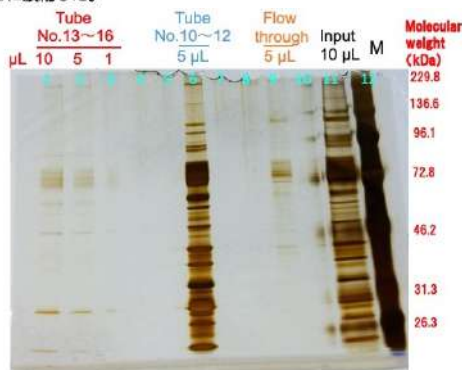


図 3: 寄生蜂毒腺抽出液の各分画物を NuPAGE にて展開して銀染色した。毒腺抽出物の各分画に多数のバンドが検出されたが、アポトーシス誘導活性が検出された分画 (Tube No. 13~16) と検出されなかった分画 (Tube No. 10~12) で、差があるバンドは見出せなかった。

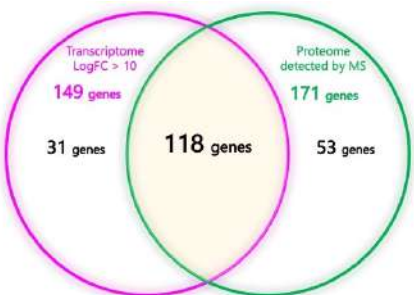


図 4: トランスクリプトーム解析と質量分析の結果の比較。RNA seq 解析で毒腺で高発現すると予想された遺伝子群 (ピンク円) と、質量分析で同定された遺伝子群 (緑円) は、7割以上一致していた。特に、毒腺で高発現する遺伝子上位 100 個のうち、91 個が、質量分析においても同定された。

次に、各分画を SDS-PAGE に流して、銀染色を行い、タンパク質成分を調べたところ、多くのバンドが検出された (図 3)。アポトーシス誘導活性がある分画 No. 13~16 と、アポトーシス誘導活性がない分画 No. 8~11 で、差があるバンドが見つからなかったため、バンドを切り出さずに全ての分画試料を熊本大学発生医学研究所に送り、網羅的な質量分析を行った。そして、質量分析によって同定された部分的なアミノ酸配列に対して BLAST を行い、寄生蜂遺伝子アノテーションデータ (後述) に照合することで、毒腺に含まれる遺伝子産物を同定した。

その結果、各分画で差がある産物は見出だせなかったものの、合計 171 個の遺伝子産物を同定することができた。そのうち、118 個の遺伝子産物が、毒腺での RNA seq 解析によって高発現すると同定された遺伝子と重複していた (図 4)。また逆に、RNA seq 解析において、毒腺で高発現する遺伝子上位 100 個のうち、91 個が質量分析によっても同定された。毒腺のプロテオーム解析とトランスクリプトーム解析の結果の 7 割以

上が一致したことから、毒腺で高発現する遺伝子、およびその遺伝子産物の網羅的な同定にはほぼ成功したことが強く示唆された。一方

で、この 200 個近い遺伝子産物のうちのどれが、細胞死誘導活性と関連するのかわからず、さらなる分画条件の絞り込みが必要だと考えられた。

そこで、イオン交換クロマトグラフィーに加えて、ゲルろ過サイズクロマトグラフィーを行うことで、分子の大きさによっても分画することを計画し、サイティバ社製 Superdex200 Increase 10/300GL を用いて 2 段目の分画と精製を行った (図 5)。しかしながら、ゲル濾過カラムを通った全ての分画に弱い活性が分散する結果となった。以上の結果から、細胞死誘導



活性が部分的な複合体を形成しており、サイズ別の分画では絞り込めないことが示唆された。

## (2) *A. japonica* のゲノム解析とトランスクリプトーム解析

*A. japonica* の新規ゲノム構築のために、単為生殖系統 Tokyo を利用して、単一の *A. japonica* メス個体を起源とするクローン集団(ゲノム #3) を作出した。このクローン 300 個体を用いてサンプリングすることでより均質なゲノム DNA を抽出した。そして、先進ゲノム支援プラットフォームとの共同研究体制の下に、国立遺伝学研究所の豊田敦教授のグループがニホンアソバラコマユバチの全ゲノム配列を決定した。次いで、東京工業大学の伊藤武彦教授のグループが、ゲノム解析を行った結果、コマユバチ科の近縁他種を圧倒的に上回る高品質ゲノムの構築に成功した(全長 322.18 Mbp, N50: 2.6 Mbp, GAP 率: 0%)。さらに、遺伝子のアノテーションを行った結果、12,508 遺伝子の存在が予測された。

当研究室では、伊藤研の指導の下に、RNAseq 解析用の Local BLAST を構築し、ショウジョウバエ遺伝子のアミノ酸配列データを query にすることで、昆虫に保存されている遺伝子 (*cinnabar*, *ebony*, *actin*, *RpL32*, *white*) を複数同定することができた。実際、これらの遺伝子の一部をクローニングして、自分でシーケンス(サンガー法、ABI)して配列を調べたところ、次世代シーケンスと全く同じ配列であったので、ゲノムデータの正確性を一部確認することができた。

次に、毒腺 100 匹分と毒腺以外の組織 100 匹分それぞれ RNA を抽出し(独立に3回解剖)、RNA-seq データを取得した(筑波大学医学部村谷研究室に依頼)。そして遺伝子発現差解析を行い、毒腺で高発現する候補遺伝子リストを作成した。特に、リスト上位の遺伝子の発現量は、毒腺以外の組織のそれと比較して 1,000 倍以上高いことがわかった。このことは、毒腺特異的に機能する遺伝子が存在する可能性を支持している。特に、上位 50 位の遺伝子については、プライマーを独自に設計し、RNAseq 解析の結果を qPCR で検証して、ほとんどが毒腺で高発現することを確認した。

毒腺で高発現する候補遺伝子リスト上位 100 遺伝子の BLAST 解析を行ったところ、哺乳類のセリンプロテアーゼの 1 種である Granzyme B と相同な配列を持つ遺伝子が 7 個含まれていた ( $E$ -value =  $3e-10$ )。Granzyme B は、哺乳類の細胞性免疫応答経路において、細胞傷害性 T 細胞から放出されて、標的細胞に取り込まれ、アポトーシス実行因子であるカスパーゼファミリー分子の直接的な切断と、Bcl-2 ファミリー分子経路の活性化を介して、アポトーシスを誘導する。他には、トリプシンドメイン、リパーゼドメイン、ホスホリパーゼ A2 ドメイン等を持つ分子で、他の寄生蜂種の毒成分と相同性がある分子も見出された。それ以外の大部分は、機能未知のタンパク質をコードしていた。興味深いことに、毒腺で高発現する遺伝子群の多くには、シグナルペプチド配列が存在しており、分泌性タンパク質をコードすることが強く示唆された。実際、毒腺をすりつぶした抽出液と、毒腺を2時間培養して培養液を SDS-PAGE によって展開して銀染色したところ、ほとんど同じバンドパターンを示した(図6)。さらに、毒腺分泌液を、ネガティブ染色法によって透過型電子顕微鏡によって観察したところ、タンパク質の複合体と思われる構造や分泌小胞が多く観察された(図7)。以上の結果から、毒腺に含まれるタンパク質成分の殆どは分泌性であり、酵素活性を有するものが多いことが明らかとなった。

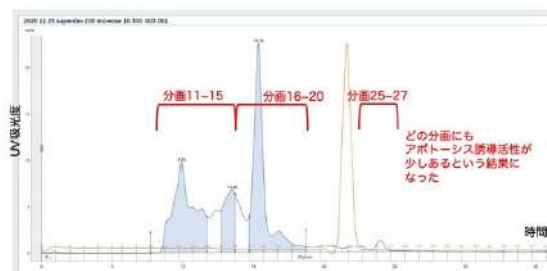


図5：イオン交換カラム通過後サンプルを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる2段階分画の試み  
寄生蜂1000匹の全身から抽出液を作製し、陰イオン交換クロマトグラフィーに通過してアポトーシス誘導活性がある分画を用いて、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、分子のサイズ別に分画した。分画を3つに分けて生物検定を行ったところ、どの分画にも弱いアポトーシス誘導活性が検出された。

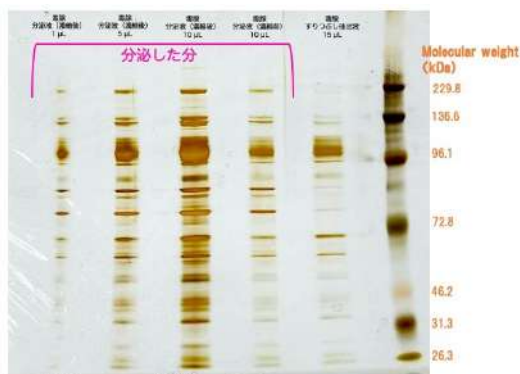


図6：毒腺分泌液と抽出液のバンドパターンの比較  
毒腺分泌液 (1, 5, 10  $\mu$ L) と、毒腺をすりつぶして作製した抽出液 (1 番右レーン) を共にNuPAGEにて展開し、銀染色によって可視化したところ、ほぼ同じパターンのバンドが検出された。

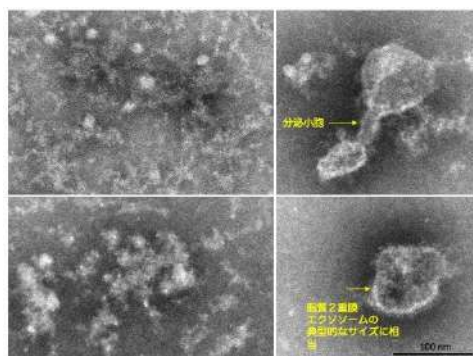
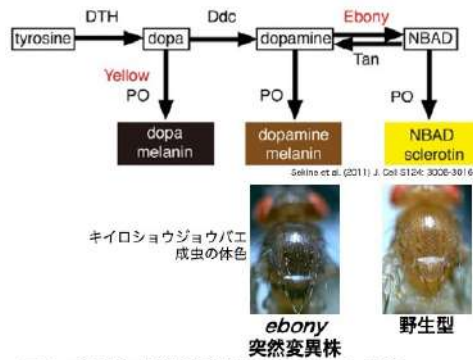


図7：ネガティブ染色法による毒腺分泌液の電子顕微鏡像  
寄生蜂毒腺50個を解剖し、PBS中で2時間培養した後、そのPBSを回収し、ネガティブ染色によって、電子顕微鏡で可視化したところ、タンパク質複合体のような構造や分泌小胞の構造が多く観察された。この試料の一部は、生物検定に用いて、アポトーシスとオートファジー誘導活性があることを確認している。試料の観察は、東海電子顕微鏡解析・伊藤優氏によって行われた。

### (3) 2重鎖RNA 顕微注入による 寄生蜂での RNAi 干渉法の開発

寄生蜂において毒腺遺伝子の機能解析を行うために、2重鎖RNA (dsRNA) を寄生蜂幼虫に顕微注入することによって RNA 干渉 (RNAi) を行う実験系を構築した。これまでに、内部寄生蜂での RNAi は、*L. heterotoma* で報告されており (Colinet et al., 2014, *Journal of Insect physiology* 63:56–61)、そのプロトコルが *A. japonica* にも適用できるのではないかと考えた。

まず、RNAi が効いたことを示すポジティブコントロールとして、昆虫の眼の色や体色を司ることが知られている遺伝子のオーソログを、遺伝子アノテーションのデータベースを BLAST をかけて探索して、1 つだけヒットしたもの (寄生蜂で遺伝子重複が起きていないもの) を選んだ。white、



*yellow*, *cinnabar*, *ebony* 等の複数遺伝子を試した結果、チロシン代謝経路でドーパミンを N-β-alanyldopamine (NBAD) に変換する酵素遺伝子 *ebony* をクローニングすることができた (図8)。ショウジョウバエの *ebony* 突然変異体では、黄色の色素が合成されないために、体色が黒くなる。*Ajebony* 全長をクローニングしてシーケンスを行ったところ、次世代シーケンサーで読んだ配列と 100%一致したことから、データベースの信頼性が再確認された。

図8：色素合成酵素遺伝子 *Ajebony* の同定  
体色変化に関わる遺伝子の1つ *ebony* のオーソログを *A. japonica* において同定した。RNAi 実験のポジティブコントロールとして使用。

次に、*Ajebony* 遺伝子を標的とした dsRNA と、ネガティブコントロールとして *GFP* 遺伝子に対する

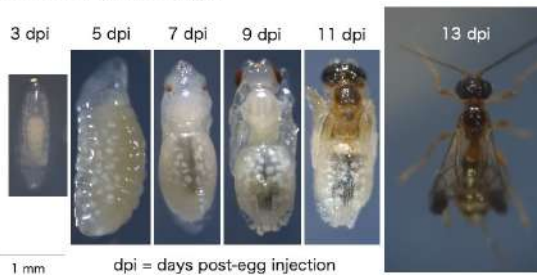


図9：Asobara japonica 発生過程と色素沈着の過程  
ハエの3齢幼虫に感染させた後、ハエ蛹殻を剥いて、ハチ幼虫を寒天培地上で育成した。色素沈着が感染7日目から生じたことから、感染6日のタイミングで dsRNA の顕微注入を行った。

dsRNA を合成し、寄生蜂幼虫に顕微注入した。寄生蜂幼虫は、寄生後6日目の宿主ハエの蛹殻を取り除いて、寒天培地上に置いた個体を用いた (図9)。顕微注入後も、寒天培地で飼育することで約10日後には寄生蜂の成虫となった。*GFP* dsRNA 注入個体と *Ajebony* dsRNA 注入個体とで、成虫の胸部背板表面の色を比べたところ、*Ajebony* dsRNA 注入個体の方が赤みが減少しており、ショウジョウバエの *ebony* 変異体と同様の表現型を示した (図10)。この結果により、幼虫期での dsRNA 顕微注入によって、標的遺伝子の機能をノックダウンした際の表現型が成虫で見られることが示唆された。

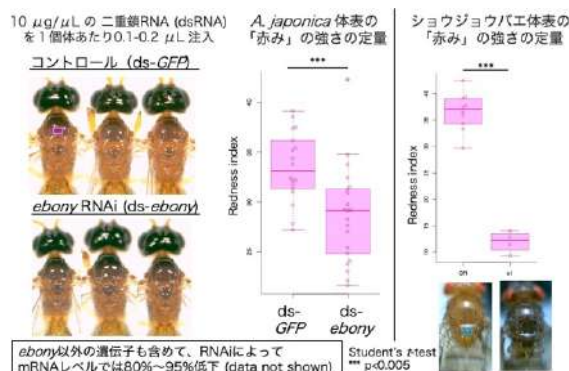


図10：*ebony* RNAi によって、ハチ成虫の体色が黒化した。  
*GFP* dsRNA 注入した個体と *ebony* dsRNA を注入した個体の体色を定量したところ、赤みが減少した。これは、ショウジョウバエの *ebony* 変異体と同様の表現型であることから、RNAi 効果があったと示唆される。

現在は、毒腺で高発現をしている遺伝子群を標的として、dsRNA 合成と顕微注入を行っている。標的遺伝子候補の絞り込みについて、最近中国のグループから発表された *L. heterotoma* の遺伝子アノテーションデータベースを利用した (Huang et al., 2021, *Nature Comm.* 12:234)。*L. heterotoma* の感染では、成虫原基に細胞死が誘導されないことは確認済みであったので、*L. heterotoma* の毒腺には存在せず、*A. japonica* の毒腺に特異的な遺伝子のみを探索したところ、約70個の遺伝子が挙げられた。

さらに、これらの遺伝子のうち、質量分析で遺伝子産物が同定されたものから優先順位をつけて、RNAi を行うこととした。実験の効率化のため、70遺伝子を7グループに分けて、10個の遺伝子の dsRNA を混ぜて顕微注入する。そして、その RNAi 個体を感染実験に用いることで、寄生成功率が低下するかどうかを調べる。RNAi 個体は、感染実験後にすりつぶして、標的遺伝子の発現低下を確認する。既に、初期実験での qPCR 解析では、毒腺遺伝子の発現が90%以上低下していたので、RNAi によって毒成分の機能は十分阻害されていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島田裕子、上山拓己、田中裕之、豊田敦、伊藤武彦、丹羽隆介
2. 発表標題 ショウジョウバエを宿主とする内部寄生蜂 <i>Asobara japonica</i> のゲノム解析
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 島田裕子
2. 発表標題 内部寄生蜂が宿主ショウジョウバエ幼虫に誘導する組織特異的細胞死シグナル経路の解析
3. 学会等名 「先進ゲノム支援」2019年度拡大班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami Katayama, Takayoshi Kuwahara, Ryusuke Niwa, Yuko Shimada
2. 発表標題 A hijack strategy of a parasitoid wasps on <i>Drosophila</i> larvae: A characteristic apoptosis in imaginal discs
3. 学会等名 Japanese <i>Drosophila</i> Research Conference 13
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	丹羽 隆介  (Niwa Ryusuke)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授  (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------