

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658015

研究課題名（和文）寄生蜂胚の宿主に対する「分子擬態」解明のための基礎的研究

研究課題名（英文）Basic study to understand “molecular mimicry” of the host by parasitic wasp embryos

研究代表者

岩淵 喜久男 (IWABUCHI KIKUO)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00203399

研究成果の概要（和文）：多胚性寄生蜂の桑実胚は細胞親和的に宿主に侵入する。ここには宿主に自己と見せかける寄生蜂最外膜分子が関与している可能性がある。本研究では、関与する分子を解明するための培養条件下での侵入阻害実験法を開発し、これを用いることにより、E-cadherin と C-type lectin が侵入に関与していることを明らかにした。さらに「分子擬態」に関わる分子として、Cadherin 遺伝子ならびに他の関連遺伝子を解析した。

研究成果の概要（英文）：A polyembryonic wasp *Copidosoma floridanum* embryo compatibly invades the host embryo. This suggests that the host embryonic cells recognize the invading wasp embryo by molecules on the cell surface. Here we developed an in vitro wasp entry inhibition assay and found that E-cadherin and C-type lectins of the wasp embryo were involved in their invasion into the host embryo. The molecular characterization of *C. floridanum* E-cadherin and related molecules associated with the extracellular matrix were also analysed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	480,000	3,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：社会性昆虫、寄生蜂、発生、擬態、細胞認識

1. 研究開始当初の背景

多胚性寄生蜂では、1卵から無性的に2,000頭以上の個体を形成する。卵割を終えた胚子はすぐには形態形成に進まず、外側を食羊膜（1個の多核細胞）に包まれた約60個の胚細胞から成る桑実胚を形成する。桑実胚は成長と分裂を繰り返して多胚となり、宿主が終齢

幼虫になった時に個々の胚子は幼虫となる。宿主卵に産下された卵のうち、卵黄に産みつけられたものは、その後で宿主体内に入る必要がある。他の寄生蜂では、孵化した幼虫が宿主胚子の一部を破壊して侵入するが、本種では胚子期が極端に長いため、どのようにして胚子の状態で宿主体内に入るのか、長い間謎

であった。申請者らは、桑実胚には運動性があり、培養条件下で宿主胚子上を移動しながら侵入することを世界に先駆けて明らかにし (Nakaguchi et al., 2006)。さらに電子顕微鏡による微細構造の観察では、宿主の組織には侵入による損傷がないばかりでなく、両細胞間には、本来、同種の細胞間でしか観察することのできない接着結合が観察された。このような親和的侵入が系統的に離れた種間で見られる例は昆虫では最初であり、動物界全体でも極めてユニークである。この現象では、細胞認識と接着に関わる細胞膜分子が関与していることが推察され、「分子擬態」の可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

本格的な研究に着手するための基礎的研究として、本研究では、「分子擬態」の有力候補である細胞認識分子と細胞接着分子の関与を明らかにする。細胞認識分子としては、糖結合タンパク質 (レクチン) の関与が示唆されていることから、糖鎖とレクチンのそれぞれについて分子種を明らかにする。また、細胞接着分子については、胚子の侵入がカルシウム依存的な現象であり、インテグリンまたはカドヘリンの関与が示唆されることから、これら分子の関与を明らかにする。さらに、寄生蜂桑実胚の侵入時期に発現する遺伝子について調べ、GenBank の遺伝情報をもとに解析し、カドヘリン関連の候補分子遺伝子を解析するとともに、その他の細胞侵入に関わる可能性のある候補遺伝子を解析する。

3. 研究の方法

(1) 培養胚子を用いた細胞接着分子、細胞認識分子に関わる競合阻害実験の方法

① 供試虫

多胚性寄生蜂としてキンウワバトビコバチ (*Copidosoma floridanum*)、寄主としてキクキンウワバを用いた。飼育には人工試料を与え、25°C、16L-8D の条件下で飼育した。

② 共存培養法

寄生蜂による産卵後 8 時間経過した寄主卵を解剖して寄生蜂胚子を取り出し、改変 MGM450 培地中で培養を行った。培養開始 4 時

間で寄生蜂胚子は桑実胚に発生が進んだ。産卵から 45-55 時間経過した未寄生寄種卵を解剖し、寄種胚子を得た。寄生蜂の桑実胚期胚子と寄種胚子を 20 μ l の培地の一つずつ入れ、25°C で懸滴共存培養した。共存培養後 24 時間目に観察を行い、寄生蜂胚子の寄種への侵入の可否を評価した。

③ 試薬

糖鎖認識競合阻害剤および細胞接着競合阻害剤として下記の試薬をそれぞれ括弧内の最終濃度になるように培地に添加し実験に用いた。糖の環構造を開裂させる試薬としてメタ過ヨウ素酸ナトリウム (5 mM)、糖鎖切断酵素としてエンドグリコシダーゼ H (12,500 U/ml)、*o*-グリカナーゼ (12.5 mU/ml)、 α 1-2 フルコシダーゼ (200 mU/ml)、および α 1-2,3 マンノシダーゼ (10 U/ml)、競合阻害用の添加糖として (D (+)-マンノース、L(-)-フコース、N-アセチルノイラミン酸、グルコース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース (それぞれ 30 mM)、競合阻害用のレクチン (それぞれ 10 μ g/ml) として AAA (フコース結合性)、WGA (N-アセチルグルコサミン、シアル酸結合性)、jacalin (シアル酸-ガラクトース-アセチルグルコサミン結合性)、カルシウムイオンのキレート剤として EGTA (5, 10, 15 mM)、細胞接着分子の競合阻害剤として HAV ペプチド (カドヘリン結合性、1, 3, 6 mM)、RGD ペプチド (インテグリン結合性、6 mM) を用意した。さらに寄主侵入関連分子のイオン要求性を調べるため、カルシウムイオンのキレート剤である EDTA を最終濃度 5, 10, 15 mM で培地に添加した。また、細胞接着分子の関与を検証するため、カドヘリンと結合して競合阻害する HAV ペプチドと、インテグリンと競合阻害する RGD ペプチドをそれぞれ最終濃度 1, 3, 6 mM で培地に添加した。

(2) 侵入関連遺伝子の解析

① 時期特異的 cDNA ライブラリー作製のための RNA 抽出

被寄生寄主卵を改変 MGM450 培地中で解剖し、寄生蜂胚子のみを新しい培地滴に移して培養した。桑実胚期まで発生が進んだ胚子

80 個、約 5000 細胞相当分から total RNA を抽出した。

② cDNA ライブラリーストックの作製

桑実胚期の胚子 total RNA から Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit (Clontech) を用い、プロトコールに従って完全長 cDNA ライブラリーを行った。本ライブラリーの 3701 クローンについてコロニー PCR により cDNA サイズ数 k bp 以上のものをスクリーニングし、521 クローンを選択した。それぞれについてキャピラリーシーケンサーを用いて forward と reverse 両方向から 650bp 程度の塩基配列を決定した。

③ データベースとの比較によるアノテーション

nucleotide-blast を利用して塩基配列データベースの既知配列と比較した。さらに、タンパク質をコードしていると考えられる部分を推定タンパク質として、塩基配列から予想したアミノ酸配列を protein-blast を利用してタンパク質データベースの既知配列と比較した。

④ RT-PCR によるカドヘリン遺伝子の探索

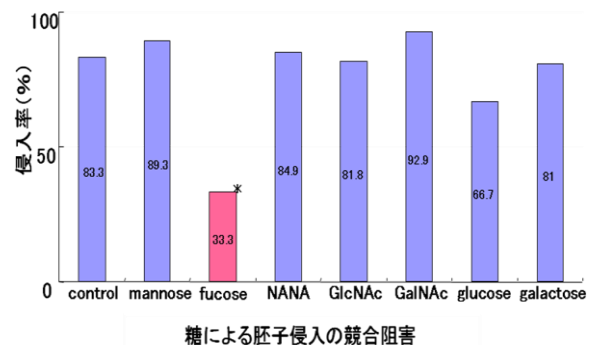
データベースに登録されているカドヘリンの配列より、Basic local alignment search tool (BLAST) の結果からショウジョウバエの表皮カドヘリンと相同性を示した配列を選択した。膜翅目 2 種、双翅目 2 種、鱗翅目 1 種、半翅目 1 種の表皮カドヘリン様タンパク質 mRNA から SOSUI を利用して膜貫通領域を予測した。上記 6 種の配列を、種間で相同性が高いとされる膜貫通領域部分のみを取り出し、clustalW でアライメントを行った。アライメントの結果をもとに、相同性の高かった部分で縮重プライマーを設計し、RT-PCR を行った。

4. 研究成果

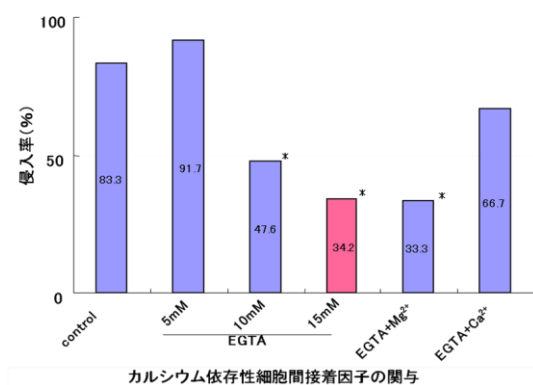
(1) 寄生蜂胚子による寄種侵入における糖鎖認識の関与

共存培養アッセイでは、コントロールとして設けた阻害剤無添加の培地中において

80%以上の寄生蜂胚子が寄主胚子に侵入した。糖鎖分解酵素の添加試験では、メタ過ヨウ素酸ナトリウムとエンドグリコシダーゼ H のそれぞれの添加時に有意に侵入率が低下した。このことから、寄主侵入時に N 型糖鎖の認識が関わっていることが示唆された。また、添加糖による競合阻害ではフコース添加時に侵入が阻害され、フコシダーゼによってフコースを分解する培地中においても侵入が阻害されたため、この認識はフコースを介して行われているものであると考えられた。EDTA 添加で低下した侵入率が EDTA とカルシウムイオンの同時添加で回復した事と総合すると、Cf の寄主侵入において、フコース認識のカルシウムイオン依存型レクチンが関与していることが強く示唆された。



さらに、細胞接着分子の競合阻害剤の添加試験においては、HAV ペプチド添加時には侵入率の低下が起こったのに対し、RGD ペプチド添加時には侵入率の低下が起こらなかった。このことから、細胞接着分子に関してはカドヘリンが関与していることが示唆された。



(2) 寄生蜂胚子の寄種侵入時期特異的 cDNA ライブラリー解析による関連分子の探索

既知の塩基配列データベースと比較した結果、221 本が rRNA、99 本が該当なしもしくはタンパク質をコードしていない部分の塩基配列と相同性を示した。上記以外の 199 本に関して、推定タンパク質のアミノ酸配列を既知のタンパク質アミノ酸配列データベースと比較し、Conserved domain database (CDD) によるドメイン検索の結果と総合した予想機能分類を行った。HSP を含むシャペロンやユビキチン、ユビキチン脱離酵素などタンパク質修正機構の分子群、RNA polymerase やヘリカーゼなどの RNA 合成系、ribosomal protein などのタンパク質合成系、ATP synthase やピルビン酸キナーゼなどの ATP 合成系、DNA 修復系、細胞骨格、細胞周期制御機構に関わる因子などが多く確認された。推定タンパク質のアミノ酸配列全てについて SOSUI と TMHMM を利用して膜貫通予測を行った結果、BLAST と CDD によって膜状に存在しているタンパク質との相同性を示した配列、ATP synthase やプロヒビチン、糖やイオンのトランスポーター、odorant receptor や leptin receptor などの受容体タンパク質と相同性があったものが膜タンパクであると予想された。

塩基配列を決定したクローンのほとんどは新規配列であった。また、初期発生を維持する分子だけでなく、本種胚子におけるダイナミックな細胞運動や寄主胚子侵入という特殊な胚行動への関与が期待される分子も確認された。感覚受容体関連遺伝子の発現が見られたが、これは桑実胚における寄主探索と侵入行動の解発に関与するものと推察された。特にこの時期の胚子の食羊膜は、外部環境情報を受容する機構を備えていることが想定される。odorant receptor は G タンパク共役型受容体であり、リガンドである嗅覚物質を受容すると、G タンパク質を活性化させ、活性化 G タンパク質は AC (アデニル酸シクラーゼ) を活性化する。AC によって ATP から合成された cAMP がイオンチャネルを開き、細胞内にカルシウムイオンの流入を引き起

こす。この電位変化を嗅上皮では匂い刺激として受容している。嗅覚受容体は嗅上皮以外にも様々な器官での発現が確認されており、それぞれについて働きが検証されてきている分子である。マウスとヒトの精子では中片部の細胞膜上に嗅覚受容体が存在し、リガンド結合による局所的なカルシウムイオン流入による電位変化で鞭毛のビートに変化が引き起こされ、結果リガンドの濃度勾配に従って泳動の配向性を決定させるということが知られている。

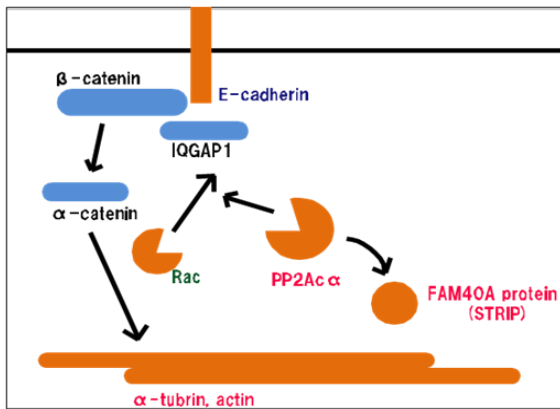
寄主胚子侵入行動に重要と考えられる細胞接着分子カドヘリンとその関連シグナル伝達因子の遺伝子発現がこの時期の胚子に予想された。カドヘリンは、細胞内ドメインにおいてカテニンと結合しており、さらに下流のシグナル伝達系を介して様々な変化を引き起こし、最終的に actin や α -チューブリンに作用する。カドヘリンからの伝達を受けたチューブリンはその伸長や重合を行い、細胞の形状変化、細胞運動を引き起こす。シグナル伝達関連分子として serine/threonine protein phosphatase (PP2A) が挙げられる。PP2A は Rac が結合する E-カドヘリン-カテニン複合体に IQGAP1 を補填させることによって細胞間接着を保持する役割を持つとされている。さらに PP2A と協働すると考えられる L1221 スーパーファミリータンパク質 (FAM40A) も確認されている。他にも、serine/threonine protein kinase (STKs) が確認されている。こちらもカテニンのリン酸化により細胞間接着の制御を司っていることが示唆されている。

侵入時期特異的 cDNA ライブラリーの解析からは、カドヘリンならびにカテニンに相当する塩基配列は現在まで確認できていない。しかし、その周辺のシグナル伝達因子が多く確認され、細胞接着分子を利用した細胞運動、侵入行動の関与が支持された。

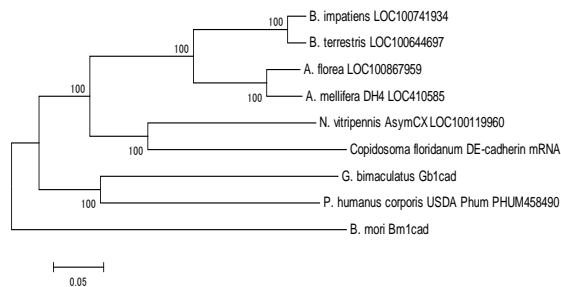
(3) *C. floridanum* カドヘリンの塩基配列

寄生蜂の桑実胚期 mRNA を鋳型にして、独自に設計したカドヘリンユニバーサルプライマーを用いて RT-PCR を行った。出現したバンドをダイレクトシーケンスによって塩

基配列を決定したところ、ショウジョウバエの表皮カドヘリンと高い相同性が認められ、CfDE-カドヘリンと推察された。決定した塩基配列から特異的プライマーを設計し、さらにプライマーウォーキングを行うことにより2321bp（推定全コード領域の約50%）の塩基配列を決定した。細胞内領域には細胞内カドヘリンモチーフ、細胞外領域にはラミニンドメインや細胞外カドヘリンリピートなど、他種のカドヘリンと共通の保存的なドメインが確認された。各ドメインの繰り返し数も、他の昆虫の表皮カドヘリンに類似する回数であることが確認された。相同部分の塩基配列に基づいた分子系統解析の結果、CfDE-カドヘリンは他の膜翅目由来のカドヘリンと同じクラスターに分類された。以上の結果から今回新規に決定されたCfカドヘリンmRNAは表皮性カドヘリンである可能性が高く、寄生蜂の寄主侵入に関与する候補分子と考えられた。この結果は、今後のRNA干渉等を用いた侵入抑制による関与の実証、ならびに寄主カドヘリン遺伝子との相同性評価等の研究に資する。



カドヘリンシグナル伝達関連分子（■本研究で発現が確認された分子） 確認された分子



昆虫類のカドヘリン遺伝子配列に基づく系統樹

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 A. Takahashi-Nakaguchi, T. Hiraoka, K. Iwabuchi, The carbohydrate ligands on the host embryo mediate intercellular migration of the parasitic wasp embryo. FEBS letters, 585: 2295-2299. (2011) 査読有 DOI:10.1016/j.febslet.2011.05.055

〔学会発表〕（計5件）

- ① 井上 普、岩淵 喜久男、多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの寄主侵入における関連分子の探索、第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月、近畿大学
- ② 井上 普、岩淵 喜久男、多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの寄主侵入における関連分子の探索、第83回日本動物学会大会、2011年9月、大雪クリスタルホール
- ③ 井上 普、岩淵 喜久男、多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの寄主侵入における免疫関連分子の探索、第23回日本比較免疫学会学術大会、2011年8月、独立行政法人海洋研究開発機構
- ④ 井上 普、岩淵 喜久男、多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの寄主胚子侵入行動における分子動態解析、第55回日本応用動物昆虫学会大会、2011年3月、九州大学
- ⑤ 井上 普、岩淵 喜久男、多胚性寄生蜂の寄主胚子侵入行動における遺伝子発現解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩淵 喜久男 (IWABUCHI KIKUO)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00203399