

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660272

研究課題名(和文)寄生蜂脱出を誘発する宿主昆虫の瀕死マーカー因子

研究課題名(英文)Dying marker of host insects which induces the emergence of parasitoid wasp larvae

研究代表者

早川 洋一 (Hayakawa, Yoichi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50164926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カリヤコマユバチは、宿主アワヨトウ幼虫に寄生の際、宿主体内に数十個の卵を産み込み、孵化した幼虫は寄生後11日目にはほぼ一斉に宿主体外へ脱出し始める。脱出直前の宿主幼虫を腹部中央で結紮すると、寄生蜂幼虫は必ず後部から脱出を開始するが明らかになった。この脱出は体液性の誘導因子によって開始することが確認できたので、その精製・構造決定、分泌器官の特定を試みた。その結果、この因子の構造決定に成功し、さらに、この活性因子の主な分泌組織が血球であることが判明した。また、組織培養実験によって、その分泌は脳 第9腹部神経節由来の新規活性因子によって誘導されるであろうことが推定された。

研究成果の概要(英文)：Female wasps of parasitoid *Cotesia kariyai* oviposit several tens of eggs into the host larvae of armyworm *Pseudaletia separata* at each parasitization and the wasp larvae emerge from their hosts almost simultaneously about 10 days after parasitization. We found that wasp larvae initiated their emergence from the posterior part of the host larvae tightly ligated at around the middle of their abdomen shortly before the wasp emergence. Since the wasp emergence was found to be induced by a host hemolymph factor, we performed the purification and characterization of the factor. The structure of the purified active factor was determined by LC-MS/MS and NMR analyses. Furthermore, we confirmed that the active factor was secreted from hemocytes. The results of a series of incubation experiments suggested that the secretion of the active factor from hemocytes was induced by a novel factor secreted from brain-9th abdominal ganglion.

研究分野：昆虫生化学

キーワード：昆虫 寄生蜂 脱出誘導 生理活性因子

1. 研究開始当初の背景

寄生蜂による寄生戦略に関する研究は様々な観点よりなされており、約一世紀の歴史がある。ただ、分子レベルでの解析は最近20年のことであり、その牽引役を担ってきたのは宿主を鱗翅目とする数種類の内部寄生蜂の研究と言える。鱗翅目昆虫の一種アワヨトウ *Pseudaletia separata* に内部寄生するカリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* のような寄生蜂はその幼虫期のみを宿主体内で過ごし、十分に幼虫発育を終えた後に宿主体表に穴を開けて脱出して来る。しかし、この寄生蜂の脱出開始の分子メカニズムに関する研究は極めて乏しく、Ecdysteroid (1) や ecdysis-triggering hormone (2) がその候補因子として指摘されている程度である。ただ、いずれも間接証拠のみで、本当にこれらのホルモンが直接寄生蜂幼虫に作用し脱出を誘発するという証明はなされていないのが現状と言える。私達は宿主幼虫の結紮実験から、脱出は宿主後部から始まり、脱出を促す因子が腹部神経節から分泌されることを偶然発見した。この因子は、未寄生でも様々な致命的ストレス(傷・温度・振動など)を受けたアワヨトウ幼虫体内で発現することを確認した。即ち、寄生蜂幼虫はこの因子によって宿主幼虫の瀕死状態を察知し、宿主体外への脱出を開始するものと解釈できる。本研究は、こうした予備実験の知見を基に、その作業仮説を検証する為に遂行した。

- (1) Webb & Dahlman, 1986, J. Insect Physiol., 32, 339-345.
- (2) Bechage et al., 2002, J. Insect Physiol., 48, 725-732.

2. 研究の目的

寄生蜂脱出誘導因子は、アワヨトウ腹部神経節から体液中へ分泌されるものと考えられる。これまでの予備実験によって、既寄生宿主幼虫の腹部を結紮し注射による前方からの寄生蜂脱出誘発活性を指標に、逆相 HPLC カラムによるこの因子の精製が可能であることが確認できている。したがって、先ず、この活性因子の単離・精製を行い、その一次構造を決定した後は、発現組織の同定、種々のストレスによる発現誘導機構を明らかにする。化学合成もしくは昆虫培養細胞での発現による活性因子の調製を行い、この生理機能を探る。また、ショウジョウバエで相同因子の同定も試み、そのトランスジェニック体を用いて脱出誘導

因子—幼虫個体死相関の証明をする。

3. 研究の方法

本研究では、寄生蜂脱出誘導因子の<単離・精製・構造決定>と<分泌組織の同定・分泌機構解析>を同時並行的に進めた。

<活性因子の単離・精製・構造決定>

寄生蜂カリヤコマユバチは、寄生後約10日目に宿主アワヨトウ幼虫体外へ脱出する。脱出予定日の宿主幼虫体液には、寄生蜂幼虫脱出誘導活性が確認できる。すなわち、脱出予定日(寄生後10日目)に、宿主幼虫の腹部中央で結紮した前方体腔へ上記体液を注射すると寄生蜂脱出は前方から始まる(上述のように、対照の(何も注射していない)幼虫では、例外なく結紮後方から脱出が開始する)。この結紮腹部前方からの寄生蜂脱出を生理活性の指標とした。まず、有機溶媒(アセトニトリル)添加による生理活性の安定性を検証した結果、少なくとも50%アセトニトリル混合による失活は認められなかった。そこで、逆相系カラムクロマトグラフィーによる精製を試行した。この際、出発材料が非常に少ないため、前処理以降は HPLC システムを用いた。精製は、全部で4段階のカラムクロマトグラフィーを用いた。

精製サンプルは、先ず、LC-MS によって大凡の分子量を推定した。その後、LC-MS/MS 解析、さらに、C-NMR と H-NMR を併用して構造を決定した。構造の詳細については、関連する研究の特許申請内容に密接に関係するため、現時点で公開することはできない。

<分泌組織の同定・分泌機構解析>

カリヤコマユバチによって寄生された寄生後10日目の宿主アワヨトウ幼虫の各組織抽出液を調製し、これを上記の結紮宿主幼虫の前方に注射して寄生蜂脱出活性を調べた。その結果、血球、脳、腹部第9神経節の抽出液に寄生蜂脱出誘導活性を確認できた。血球と中枢神経細胞共に寄生蜂脱出誘導活性因子を分泌するかどうかを HPLC 分析によって検討した。それぞれの組織から50%アセトニトリル抽出液を調製し、真空遠心濃縮機を用いて乾固した後、純水に再溶解した液を逆相系 HPLC カラム(Mightysil RP-18 250 x 4.6 mm)によって分析した。溶出成分中に活性因子のピークが存在するかどうかを確認した。

また、それぞれの組織を種々の条件で培養し、組織内、また、培養液中に脱出誘導活性因子が存在するかどうかを分析した。この分析も上記同様、HPLC によって行った。

4. 研究成果

<活性因子の単離・精製・構造決定>

カリヤコムバチは寄生の際に複数の卵を宿主体内に産卵する多寄生性の内部寄生蜂である。宿主アワヨトウが終齢幼虫の場合は、通常一度に 50 卵以上の産卵となり、寄生後 10 日目に寄生蜂幼虫は下図 1 のようにほぼ一斉に宿主体外へ脱出を始める。



図 1

予備実験により、寄生後 10 日目の寄生蜂脱出前宿主幼虫の腹部中央で結紮すると、結紮部後方から寄生蜂脱出が開始することが明らかになった (下図 2)。



図 2

そこで、結紮腹部後方の体液を前方に注射したところ、結紮前部からの脱出を誘導することが確認できた (下図 3)。



図 3

これらの実験結果から、宿主幼虫からの寄生蜂の脱出には宿主腹部後方で何らかの体液性因子が分泌され、この因子の影響下に寄生蜂幼虫は脱出を開始することが明らかになった。そこで、この因子の精製に着手した。

まず、この体液中の脱出誘導因子は、最終濃度 50%のアセトニトリルでは失活しないことが確認できたので、逆相系のカラムクロマトグラフィーによって精製を進めることとした。様々な予備実験によって、出来上がった精製スキームは以下の通りとなった。体液のアセトニトリル抽出→Disposable ODS カラム(Bakerbond Spe C₁₈)を用いる粗精製→Aminopropyl HPLC column (Mightysil, 250 x 4.6 mm, 5 μm, 120 nm)による精製→ODS HPLC column (Unison (Imtakt) UK-C18, 250 x 4.6 mm, 3 μm, 130 nm)による最終精製。図 4 のように、UK-C18 カラムから約 24 分後に溶出してくるメインピークが寄生蜂

脱出誘導因子であることが確認できた。

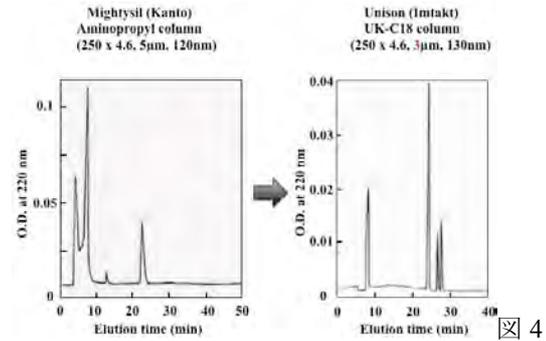


図 4

精製した活性因子の構造を決定するため、先ず、精製ピーク分画について高感度アミノ酸分析を行った。次に、LC-MS 分析を行い、その後、LC-MS/MS 分析、さらに、C-NMR と H-NMR 分析を行って最終的に構造決定を完了した。その結果、活性因子は、N-Acetyl tyrosine であることが判明した。

<分泌組織の同定・分泌機構解析>

上記のように、体液抽出液を出発材料に精製した寄生蜂脱出誘導因子の構造決定が完了した。しかし、これがどの組織から、また、どのような調節下に分泌されるかについては全く不明であった。先ず、前者の分泌組織の同定から着手した。アワヨトウ幼虫の腹部後方に存在する組織- 中腸末端、後腸、マルピーギ管、脂肪体、皮膚、血球、腹部神経節など-からアセトニトリル抽出液を調製し、その寄生蜂脱出誘導活性を調べた。その結果、血球、脂肪体、第 9 神経節に活性を確認することができた。ただ、脂肪体の活性は血球や神経節の活性に比べて明らかに低かったため、脂肪体表面に付着する血球の存在を検証した。摘出した脂肪体を生理塩水で繰り返し洗浄した結果、脱出誘導活性は顕著に減少した。従って、脂肪体の生理活性は表面に付着した血球に依るものと結論した。

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 8 件)

以下は全て査読有り論文。

1) Duressa, T.B, Boonen, K., Hayakawa, Y., Huybrechts, R., 2015, Identification and functional characterization of a novel locust peptide belonging to the family of insect growth blocking peptides. *Peptides*, 74, 23-32.

2) Kawano, T., Ryuda, M., Matsumoto, M.,

Ochiai, M., Oda, Y., Tanimura, T., Csikos, G., Moriya, M. and Hayakawa, Y., 2015, Function of *Desiccate* gustatory sensilla of *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 5, 17195.

3) Furihata, S., Hirata, M., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., 2015, Bacteria endosymbiont, *Wolbachia*, promotes parasitism of parasitoid wasp *Asobara japonica*. *Plos One*, 10(10), e0140914.

4) Furihata, S., Tanaka, K., Ryuda, M., Ochiai, M., Matsumoto, H., Csikos, G. and Hayakawa, Y., 2014, Immuno-evasive protein (IEP)-containing surface layer covering polydnavirus particles is essential for viral infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 115, 26-32

5) Tsuzuki, S., Matsumoto, H., Furihata, S., Ryuda, M., Tanaka, H., Sung, E.-J., Bird, G.S., Zhou, Y., Shears, S.B., and Hayakawa, Y., 2014, Switching between humoral and cellular immune responses in *Drosophila* is guided by the cytokine GBP. *Nature Communications*, 5, 4628.

6) Kiyotake, H., Matsumoto, H., Nakayama, S., Sakai, M., Miyatake, T., Ryuda, M., Hayakawa, Y., 2014 Gain of long tonic immobility behavioral trait causes the red flour beetle to reduce anti-stress capacity. *J. Insect Physiol.*, 60, 92-97.

7) Matsumoto, H., Nomura, S., Hayakawa, Y., 2014, Changes of RNA virus infection rates and gut microbiota in young worker *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) of the chalkbrood-infected colony after a pollination task in a greenhouse. *Applied Entomology and Zoology*, 49, 395-402.

8) Khaeso, K., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., and Tojo, S. 2014, Stimulation of Vitellogenin gene expression by permethrin in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Delphacidae). *J. Pesticide Sci.*, 39, 98-104.

〔学会発表〕(計 2件)

1) 日本応用動物昆虫学会第59回大会(大阪府立大) 2016年3月28日 小野雅哉, 吉賀豊司, 早川洋一 「非寄生性線虫 *Caenorhabditis elegans* による昆虫血球の摂食

2) 日本応用動物昆虫学会第57回大会(高知大) 2014年3月28日, 砂山貴志, 内川雄貴, 落合正則, 早川洋一 「宿主アワヨトウ幼虫からのカリヤコマユバチ脱出誘導因子の発見」

〔図書〕(計 1件)

Yoichi Hayakawa, 2015, Growth blocking peptide, *Handbook of Hormones* (eds. by Y. Takei, H. Ando, and K. Tsutsui). Academic Press, New York, 469-472.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: ストレス耐性付与組成物、ストレス耐性付与方法、ストレス耐性体内増殖方法、及びストレス評価方法

発明者: 早川洋一

権利者: 佐賀大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/59169

出願年月日: 2016年03月23日

国内外の別: 国内

○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

<http://extwww.cc.saga-u.ac.jp/~hayakayo/FRAME/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA, Yoichi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号: 50164926

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

松本 均 (MATSUMOTO, Hitoshi)