

## ニホンアソバラコマユバチの「飼い殺し型寄生」を支える分子機構の解明

桑原 嵩佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員：島田 裕子 (筑波大学 生命環境系)

### 《背景・目的》

地球上で最も繁栄している昆虫類において、他種に寄生するハチ目、寄生蜂は、全昆虫種の約 1/5 を占める。これは、寄生蜂の生存戦略の進化と、寄生される宿主の免疫防御機構の進化がいたちごっこを繰り返すことで種の多様性が増したと考えられ、巧妙な寄生戦略の生態学的な知見が多く報告されている。しかしその一方で、寄生戦略の分子機構が詳細に調べられた例は未だ少ない。そこで本研究は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, 以下ハエと略す) を宿主とする寄生蜂ニホンアソバラコマユバチ (*Asobara japonica*, 以下ハチと略す) を用いて研究を行った。

ハチは宿主幼虫に産卵する。宿主体内で孵化したハチ幼虫は、は宿主と共に成長し、宿主が蛹化した後で、宿主の体を食べつくす。このような、寄生蜂が宿主の免疫を回避することで、宿主との共存期間を経て、宿主を殺す寄生様式を「飼い殺し型寄生」という。所属研究室において、ハチ感染後、宿主幼虫の成虫原基(将来の成虫組織)で細胞死が顕著に誘導されることが見出されていた。一方、宿主幼虫のホルモン合成器官や脳神経系では細胞死が起こらないため、宿主は蛹化する。そこで本研究では、この成虫原基特異的な細胞死が飼い殺し型寄生と関連すると仮説を立て、飼い殺し型寄生を支える分子機構の解明のため、細胞死誘導物質ならびに細胞死誘導シグナル伝達因子の同定を目指した。

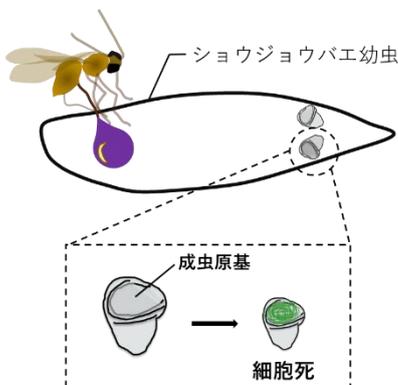


図 1. 成虫原基の細胞死  
ハチに寄生された宿主ハエ幼虫では、成虫原基で細胞死が起こる。

### 《方法》

#### ・ハエおよびハチの飼育と系統

ハエは、乾燥酵母、砂糖、コーンミール、寒天を煮て固めた培地で 25°C の恒温器内で飼育した。野生型として、Oregon R 系統を用いた。ハチは、ハエの 2~3 齢幼虫がいるバイアルに入れて寄生させた。世代時間は、ショウジョウバエが約 10 日であるのに対して、ニホンアソバラコマユバチは約 17 日である。系統は、両性生殖を行う系統 (久米島産) と、ボルバキア (*Wolbachia pipientis*) に感染し単為生殖を行う系統 (東京産) を用いた。

#### ・ハチ抽出液の調製と、ハエへの注入

ハチ成虫 5 匹を 100  $\mu$ l のリン酸緩衝液 (PBS) に入れ、ペッスルですり潰した。その後、遠心分離により夾雑物を沈殿させ、上清のみを回収し、これをハチ抽出液とした。ハチ抽出液に 1  $\mu$

l の染色液 (Erioglaurine Disodium Salt) を加えて着色した後、ガラスニードルを用いて、ハエ 3 齢幼虫 (寄生されていない個体) の腹腔に約 0.5  $\mu$ l 注入した。この際、青く着色されたハチ抽出液がハエ幼虫腹腔に注入されたことを視覚的に確認した。その後、幼虫を餌培地に戻して、25 °C で 4 時間飼育した。

#### ・細胞死の検出

ハチ抽出液注入後 4 時間経過したハエ幼虫を解剖し、成虫原基を観察した。成虫原基における細胞死の検出には、免疫組織化学染色を用いた方法と、アポトーシスレポーター GC3Ai を用いた方法の 2 種類の方法を用いた。免疫組織化学染色では、アポトーシスの実行因子として知られる *Drosophila death caspase 1 (Dcp-1)* の切断型 (プロテアーゼ活性型) を特異的に認識する抗体を 1 次抗体として用いた。GC3Ai を用いた方法では、ショウジョウバエで利用可能な遺伝子発現誘導システム (GAL4/UAS システム) を用いて、細胞死が起こると GFP 蛍光を発するレポータータンパク GC3Ai を成虫原基で発現したハエを作成した。どちらの方法においても、解剖によりハエ幼虫から取り出した翅原基を蛍光顕微鏡で観察することで、細胞死の有無を検出した。

### 《結果・考察》

ウイルス由来の細胞死抑制遺伝子 *p35* を成虫原基で過剰発現させたハエ幼虫を宿主とした場合、ハチの羽化タイミングに遅れがみられた。このことから、宿主成虫原基で誘導される細胞死はハチの発生に寄与することが示唆された。

細胞死誘導物質の同定にあたり、方法の欄に示した生物検定の手法を確立した。雄ハチ抽出液では細胞死は誘導されず、雌ハチ抽出液でのみ細胞死が誘導されたことから、細胞死誘導物質は雌ハチの組織に由来すると予想した。そこで、雌特異的組織である卵巣と毒腺を解剖し、各抽出液をハエ幼虫に注入した結果、毒腺抽出液でのみ細胞死が誘導された。以上の結果から、宿主幼虫の成虫原基に細胞死を誘導する成分は、雌ハチの毒腺器官に由来することが強く示唆された。

また、細胞死誘導シグナル伝達因子を同定するために、データベースを用いて翅原基で高く発現する受容体をコードする遺伝子の探索を行った。その結果得られた全 9 個の候補遺伝子の中で、ストレス耐性に関わる遺伝子を含む *methuselah-like (mthl) family* に着目した。*mthl* family の一種、*mthl3* を成虫原基でノックダウンしたところ、ハチ抽出液注入による細胞死誘導が有意に抑制された。このことから、*mthl3* が成虫原基での細胞死誘導に関与する可能性が示唆された。

### 《参考文献》

1. Shunsuke, F. et.al. *Plos one* 11(7):4-7 (2016).
2. Shunsuke, F. and Masahito, K. *Physiol entomol* 34 (3): 292-95 (2009).