

ヤドリバエ *Drino inconspicuides* のメラニン化抑制因子の探索

市川 和人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 誠一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

内部捕食寄生バエ *Drino inconspicuides* (以下、ヤドリバエ) は、多くのチョウ目の昆虫内部に寄生する昆虫であり、高い栄養価を持つ生体組織を餌にして効率的に成長し、蛹化時に寄主昆虫を殺して脱出する。一方で、寄主となる昆虫では、病原生物に対する血体液内免疫防御機構として、体液中に分泌された因子による体液性免疫反応と、血体液中の血球による細胞性免疫反応がある。体液性免疫反応の1つであるメラニン反応では、病原生物に侵入されると、セリンプロテアーゼが関わるフェノールオキシダーゼ前駆体カスケード (ProPO: prophenol oxidase) が活性化し、フェノールオキシダーゼが活性化する。これにより異物の周囲にメラニンを形成し隔離する。これに対し、ヤドリバエは寄主の体腔内でメラニン化を回避している。しかし、メラニン化回避の分子的機構については未解明である。

過去の我々のグループの研究により、ヤドリバエは寄主のフェノールオキシダーゼ活性を抑制する (Schwier et al., 2021) ことが解明され、またトランスクリプトーム解析により、ヤドリバエ幼虫の唾液腺にはフェノールオキシダーゼの活性化を抑制する可能性のあるセリンプロテアーゼ阻害タンパク質の部分配列をコードする遺伝子 (以下、Serp27A-like) が発現していることがわかってきた。本研究では、Serp27A-like の全塩基配列を特定し、またその遺伝子発現が行われていることの確認を試みた。捕食寄生性昆虫の研究は膜翅目を材料としたものがほとんどであり、本研究のような双翅目の捕食寄生性昆虫に関する研究は稀少である。

【材料・方法】

Serp27A-like のクローニング

アワヨトウ幼虫に寄生後 48 時間のヤドリバエ幼虫から RNA を抽出し、5'RACE adapter をライゲーションさせてから cDNA 合成を行なった。5'RACE PCR には、既知の Serpin27A-like の配列から設計した遺伝子特異的プライマー (5'-GCACCAGCAAGTATTGCGAAGAGG-3') を用いた。増幅された PCR フラグメントのサイズをアガロースゲルによる電気泳動で調べた。その後、PCR 産物を T-vector にライゲーションし、大腸菌を形質転換して寒天プレートに塗布した。培養後 PCR フラグメントの挿入を確認するため、コロニー PCR を行なった。

Serp27A-like の発現確認

ヤドリバエの幼虫全体 (寄生後 2, 24, 48, 72 h、もしくは唾液腺のみ (寄生後 24, 48, 72 h) から、それぞれの RNA を抽出し cDNA の合成を試みた。また、Serp27A-like 遺伝子特異的プライマーを設計した。

【結果】

Serp27A-like のクローニング

他種の塩基配列と比較すると、Serp27A-like の 5'末端側には 240 bp 以上の未知配列があった。既知配列から遺伝子特異的プライマーに相補的な配列までの部分配列には 131 bp あることから、Serp27A-like は少なくとも 370 bp 以上のフラグメントがあると予測された。本研究における 5'RACE PCR の結果、約 500 bp の PCR フラグメントが増幅された。また、コロニー PCR によって PCR フラグメントがライゲーションされた T-vector を持つ大腸菌を確認することに成功した。

Serp27A-like の発現確認

rRNA 遺伝子のプライマーセットを用いた PCR により、ヤドリバエの幼虫 (寄生後 2, 24, 48, 72 h) とその唾液腺 (寄生後 24, 48, 72 h) の cDNA の合成に成功した。また Serpin27A-like の 163 bp を増幅することができる遺伝子特異的プライマーとして、5'-TTTGGCGACGGTGAAGCATC-3' と 5'-GGCTGAATCCCAATGACCACAAG-3' の設計を達成した。

【展望】

今後、5'RACE PCR によって得られた PCR 産物の DNA シーケンスにより、既知配列より上流の配列の特定が期待され、Serp27A-like の全アミノ酸配列を明らかにする。また、作成した cDNA と遺伝子特異的プライマーを用いて、Serp27A-like の発現確認をする予定である。