

博士論文要約（Summary）

平成 23 年入学

連合農学研究科農水圏資源環境科学専攻

氏名 降幡 駿介

タイトル	Molecular biological analysis of parasitic strategies of endoparasitoid wasps (内部寄生蜂の寄生戦略に関する分子生物学的解析)
------	---

キーワード（寄生蜂）（毒液）（免疫）

General Introduction

寄生蜂とその宿主の生理的な相互作用は大変魅力的なテーマである。中でも特に興味深いのが、寄生蜂が宿主への寄生を成功させる戦略を明らかにすることである。内部寄生蜂の成長には宿主が一定の生理状態や発育状態にあることが必要なため、外部寄生蜂に比べて宿主範囲が狭い。また、宿主の免疫応答にさらされるため、これに対抗して毒液をはじめ種々の成分を寄生と同時に注入し、宿主のコントロールや免疫抑制または回避を行うよう進化してきた。

ポリドナウイルス（PDV）もそうした成分の一つである。PDV はコマユバチ科とヒメバチ科の一部の種に共生するウイルスであり、寄生とともに宿主体内に注入されると、免疫や発育、生理状態などに干渉する種々の遺伝子を発現し、これによって寄生蜂の仔が宿主体内で発育することが可能になる。PDV は寄生蜂の寄生に関与する成分としては最も研究が進んでいるものであるが、PDV 粒子の構造や毒液成分との相互座用など、未解明な点も数多く残されている。

寄生蜂全体の中で、PDV を持つ種はほんの一部である。また、それらの宿主は鱗翅目幼虫に限定されている。これら以外の多くの寄生蜂は、PDV に頼らない独自の寄生戦略を進化させてきたと考えられる。本研究では、PDV を持たないとされる *Asobara japonica* の寄生戦略を明らかにし、また PDV を持つカリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* において PDV の構造と機能の関わりを明らかにすることを目的とした。

Chapter 1. Venom components of *Asobara japonica* impair cellular immune responses of host *Drosophila melanogaster*. (*Asobara japonica* の毒液成分は宿主キイロショウジョウバエの細胞性免疫応答を抑制する)

内部寄生蜂 *Asobara japonica* の毒液は、通常注入される量で宿主であるショウジョウバエ幼虫を死に至らしめる強力な殺虫活性を持つ。この殺虫活性は、毒液に続いて注入される側輸卵管液によって中和される。本種の毒液および側輸卵管液の構成成分は一部が明らかにされているが、これらが本種の卵および幼虫の寄生成功にどのように関わっているか

は未だ不明である。本研究において私は、*A. japonica* の毒液は宿主キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 幼虫において、抗菌ペプチドの発現といった液性免疫活性には影響を及ぼさない一方、血球細胞の伸展や貪食といった細胞性免疫活性を顕著に低下させることを明らかにした。また、毒液の注入から 4 時間後の幼虫体液ではセリン型プロテアーゼ活性の著しい上昇が見られた。側輸卵管液は、毒液による細胞性免疫の不活性化には影響しなかったが、セリン型プロテアーゼ活性の上昇を著しく抑制した。毒液と側輸卵管液の活性成分はそれぞれ熱に不安定で、少なくとも 10kDa 以上の分子量を持つことも分かった。広食性の寄生蜂である *A. japonica* の毒液は、狭食性の近縁種 *A. rossica* のそれに比べはるかに高い殺虫活性を有していた。また、*A. japonica* に寄生されないショウジョウバエである *D. ficusphila* に対しては毒液の殺虫活性は発揮されなかった。これらの結果は、高い殺虫活性を持つ *A. japonica* の毒液は、宿主ショウジョウバエの細胞性免疫を抑制することにより、より広範囲の宿主を利用可能にしていることを示している。毒液によるハエ体液中のプロテアーゼ活性の上昇がハエの個体死につながっていること、また側輸卵管液はプロテアーゼ活性の上昇を抑制することにより殺虫活性を中和していることも示唆された。

Chapter 2. Identification of insecticidal factor in the venom of endoparasitoid *Asobara japonica*. (内部寄生蜂 *Asobara japonica* 毒液中の殺虫成分の同定)

内部寄生蜂 *Asobara japonica* は、宿主であるショウジョウバエ幼虫を死に至らしめるほどの強力な毒液を持つ。そして、寄生時に注入される側輸卵管液によって殺虫活性を中和し、宿主を殺すことなく寄生を成立させている。先行研究で、本種の毒液殺虫成分が宿主の細胞性免疫応答を顕著に抑制していることが明らかになった。免疫抑制はよく研究されている PDV においても見られるが、強力な殺虫活性を持ち合わせる点で異なっており、ユニークな寄生戦略といえる。本研究では、殺虫成分の同定を目指し、その性質を明らかにするための実験を行った。その結果、殺虫成分は 0.22 μm より小さいが 100kDa 以上の分子量を持つこと、400,000 \times g、1 時間の超遠心で部分的に沈殿すること、常温で 24 時間以上安定である一方、5 分間の煮沸により失活することが分かった。また、Trypsin, Benzonase といった酵素による処理に対しては抵抗性を示す一方、UV 照射や超音波破碎により容易に失活した。これらのことから、殺虫成分はある程度の大きさがあり、かつ複雑な立体構造をとる分子であると予想される。殺虫成分を同定し、その作用機序を明らかにするためには、今後、さらなる研究が必要である。

Chapter 3. Immuno-evasive protein (IEP)-containing surface layer covering polydnavirus particles is essential for viral infection. (ポリドナウイルス表面を覆う、免疫回避タンパク (IEP) を含む層は、ウイルスの感染に不可欠である)

ポリドナウイルス (PDV) は寄生蜂に随伴するユニークな共生ウイルスである。PDV 粒子は寄生蜂の卵とともに宿主の鱗翅目幼虫に注入され、宿主の免疫応答や発達に干渉す

る種々の遺伝子を発現する。近年の PDV のゲノム比較研究により、そのゲノム構成はもちろん、PDV の起源についても多くの知見が得られてきている。しかしながら、PDV 粒子の構造的な特徴に関しては未だ不明な点が多い。カリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* PDV (CkPDV) の構造を明らかにするために私が焦点を当てたのは、PDV 粒子の表面に存在しカリヤコマユバチ卵の免疫回避のメディエーターである免疫回避タンパク (Immunoevasive protein, IEP) である。私は、IEP がポリマーを形成し、CkPDV を覆うこれまで知られていなかった薄い表層を構成していることを明らかにした。この表層は壊れやすく、振とうといった物理的刺激により容易に CkPDV 本体から除去された。表層を除去された CkPDV 粒子は、宿主の脂肪体や血球などの標的細胞に感染して遺伝子を発現させる能力を失った。さらに今回、カリヤコマユバチの貯毒囊からも新たに IEP のホモログが検出された。このことは、IEP が寄生蜂や寄生された宿主において、これまでに知られている以外にも機能を持つ可能性を示唆している。今回の結果は、カリヤコマユバチのメス成虫は CkPDV 表面を覆う、IEP を含む薄膜を作っており、それがなければ CkPDV は宿主細胞への感染能力を持つことができないことを示している。また、IEP ファミリータンパクが貯毒囊と側輸卵管の双方で発現しているという事実は、両者が寄生蜂の寄生戦略の進化において密接な関連を持つことを示唆するものである。

General Discussion

本研究では、まず PDV を持たないとされる *A. japonica* に焦点を当てた。本種の毒液は宿主ショウジョウバエに対する強力な殺虫活性を持ち、わずか 0.0075 匹分の毒液で宿主を死に至らしめるほどである。こうした強力な毒液を持つ例は、内部寄生蜂では知られていない。本研究において、本種の毒液殺虫成分が宿主の細胞性免疫を顕著に抑制するとともに体液中のセリン型プロテアーゼ活性の上昇を引き起こすこと、解毒成分を持つ側輸卵管液は細胞性免疫の抑制には関わらないがセリン型プロテアーゼ活性の上昇は抑制することが明らかになった。このことから、毒液によるセリン型プロテアーゼ活性時の上昇が宿主の個体死につながっている可能性が示唆される。また、本種に対して抵抗性を持つハエ *D. ficusphila* に対しては本種の毒液殺虫活性は発揮されなかったこと、本種に近縁ながら狭食性の寄生蜂 *A. rossica* では毒液の殺虫活性が見られなかったことから、本種の殺虫成分が持つ細胞性免疫抑制機能が、本種が広範囲の宿主を利用できることに貢献していると考えられる。殺虫成分はある程度複雑な立体構造をとる成分であると考えられるが、その同定にはさらなる研究が必要である。

カリヤコマユバチを用いた研究において、CkPDV 粒子表面には IEP を含むこれまで知られていなかった薄層が存在すること、この薄層は CkPDV が宿主細胞に感染する上で必須であることを明らかにした。IEP は end-binding (EB) モチーフと呼ばれる配列を分子中に持ち、他の分子とポリマーを形成している。そのため、これまで IEP によるものと考えられてきた免疫回避機能は、IEP と相互作用する別のタンパクによるものの可能性もある。また、側輸卵管で発現する IEP とは別に、貯毒囊において IEP のホモログの発現が確認された。これは、同一もしくは相同な成分が側輸卵管と貯毒囊の両方に存在していることが

確認された初めての例であり, 寄生蜂の寄生戦略において毒液と PDV が協調的に進化してきたとする考え方を支持するものと言える.

※注 1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注 2 特許、知的財産等に係る部分は記載しないでください。

※注 3 全体で 4 頁～5 頁を目処にしてください。

※注 4 10.5 ポイントで作成。(本様式を使用する。文字数、行数は変更しない。)