

研究終了報告書

「宿主内環境を支配する寄生蜂由来生体微粒子の機能解析」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：島田 裕子

1. 研究のねらい

本研究は、寄生蜂ニホンアソバラコマユバチ (*Asobara japonica*) が産生する生体微粒子に含まれる毒成分が、宿主ショウジョウバエ幼虫体内で組織特異的な細胞死を誘導する現象に着目し、生体微粒子が持つ特徴に依拠した寄生感染の分子機構を解明することを目指す。

寄生蜂は、主に他種昆虫(宿主)の栄養やエネルギーを一方的に奪って生活するハチ目昆虫である。その種数は、昆虫種数全体の約20%をも占めるといわれており、宿主の免疫防御機構を打ち破る毒や麻酔等の天然生理活性物質を多く有している。しかしながら、複雑かつ巧妙な寄生戦略を支える分子機構はほとんど未だ不明である。

寄生蜂ニホンアソバラコマユバチ (*Asobara japonica*) は、モデル生物・キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を含むショウジョウバエ属全般の幼虫に産卵する。宿主幼虫体内で孵化したハチ幼虫は、宿主と共に成長し、宿主の蛹化後に捕食し、宿主蛹から羽化する。このように、産卵後直ちに宿主を殺すのではなく、ハチにとって都合の良いタイミングで捕食する寄生のタイプを「飼い殺し型捕食寄生者 (koinobiont)」と呼ぶ。飼い殺し型寄生には、宿主の発生過程を妨げない形で栄養を搾取しながら成長し、最終的には宿主の発生を全て乗っ取る仕組みが必要である。

ニホンアソバラコマユバチを含む複数の飼い殺し型寄生蜂は、ウイルス様粒子 (virus-like particle) と呼ばれる生体微粒子を産生することが報告されている。この生体微粒子は、雌成虫の毒腺で産生されて、産卵と同時に宿主体内に侵入することから、寄生に必要な様々な生理活性物質を含んでいると予測されているが、その実態は未だ不明である。

そこで本研究では、この寄生蜂由来の生体微粒子の構成を明らかにした上で、細胞種特異性・組織特異性・種特異性の特徴に依拠した寄生の分子機構を解明する。さらに、寄生蜂でのゲノム解析を通して、生体微粒子の標識化や寄生蜂のRNAi 個体を作成することで、組織特異的な標的投薬や農業害虫駆除の方策を開発するのに基礎的かつ重要な知見を提供する。以上の研究提案によって、当該研究領域の達成目標に貢献することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、寄生蜂ニホンアソバラコマユバチが産生する生体微粒子を透過型電子顕微鏡による解析、ナノサイトによる粒子解析、脂質粒子に結合する蛍光プローブを用いた捕捉、セルロースナノファイバーを用いた捕捉、等の様々な手法を用いて解析した。この過程で、同領域内の先生方と共同研究を行い、最先端の技術を用いて解析することができた。

また、本研究では、寄生蜂の生体微粒子の構成成分を明らかにする目的で、ニホンアソバラコマユバチの全ゲノム配列を決定し、遺伝子 12,508 個を予測した。この配列情報をもとにし

て、毒腺のトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行い、毒腺遺伝子約 200 個を網羅的に同定することに成功した。その中の大部分は、既知の寄生蜂ゲノム上にも保存性がない機能未知のタンパク質をコードしていた。特に、毒腺で高い発現を示し、ニホンアソバラコマユバチ特有である分子の多くは、分泌タンパク質をコードしていたことから、生体微粒子の構成成分として、分泌タンパク質が含まれることが予想された。

これらの毒腺遺伝子群が、宿主成虫原基に対する細胞死誘導に関連するかどうかを検討するため、本研究では、寄生蜂幼虫への 2 本鎖 RNA 注入による遺伝子ノックダウン法を確立し、寄生蜂遺伝子の機能解析を可能とした。63 個の毒腺遺伝子に対して RNAi を行い、その RNAi 個体を用いて感染実験を行ったところ、2 個の遺伝子のノックダウンによって、宿主での細胞死誘導が顕著に抑えられることを見出した。また、その細胞死が抑制された宿主の一部では、ハエが羽化することを確認した。以上の結果から、毒腺遺伝子のノックダウンにより、細胞死が抑制された結果、寄生蜂が成立しなくなる可能性が示唆された。

今後、本研究では、細胞死誘導活性に関連することが予測された当該遺伝子産物をリコンビナントで調製し、細胞死誘導活性があるかどうかを検討する予定である。また、遺伝子産物に対する抗体を作製し、寄生蜂毒腺内あるいは宿主幼虫体内での分布を調べる予定である。これらの実験により、寄生蜂が産生する生体微粒子と細胞死誘導活性の関係を深く追究できると考えられる。

(2) 詳細

研究課題 A. 寄生蜂由来生体微粒子の細胞生物学的解析

透過型電子顕微鏡を用いた観察とナノサイト NS300 による粒子解析によって、寄生蜂の毒腺には直径 200-500 nm の分泌小胞様の構造があることが強く示唆された。また、東北大学の佐藤雄介博士が開発した ApoC-NR プローブを用いた解析においても、脂質粒子の存在が確認された。さらに、寄生蜂に感染した宿主幼虫の翅細胞において特徴的な膜構造が検出されたことから、寄生蜂の生体微粒子が翅細胞に直接取り込まれる可能性が示唆された。

しかしながら、寄生蜂感染による細胞死誘導がそれらの粒子に起因するかどうかの直接の証拠を得るために、複数の手段を用いて粒子の単離・精製を試みたが、成功には至らなかった。その主たる原因は、細胞死誘導活性を定量する手段が生物検定であったことで、粒子を精製する際に用いるバッファーの持ち込みによって、生物が死んでしまったり、組織の細胞死が非特異的に誘導されてしまったりしたことが挙げられる。例えば、名古屋大学の安井隆雄博士が開発したセルロースナノファイバーを用いて毒腺分泌物を分離したところ、ネガティブコントロールの PBS のみで処理したファイバー液の注入によって、ショウジョウバエ幼虫の成虫原基での細胞死が誘導された。また、ApoC-NR プローブを用いた捕捉では、プローブから粒子を外す時に用いる尿素によって、細胞死誘導活性そのものが失活してしまった。

今後は、細胞死誘導活性に関与する遺伝子産物(後述)を認識する抗体を用いて、微粒子を標識することを試みる計画である。生体微粒子の捕捉方法について、同領域内の先生方と共同研究を行い、最先端の技術を使用してきた経験を活かしていけると考えている。

研究課題 B. 寄生蜂の全ゲノム解析と毒腺遺伝子群の同定

寄生蜂ニホンアソバラコマユバチの毒腺由来の細胞死誘導活性成分を同定するために、先進ゲノム支援のご助力の下、全ゲノム配列を決定し、12,508 遺伝子を予測した(代表的な論文1: Kamiyama et al., 2022)。そして、これらの遺伝子情報を基にして、毒腺のトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行い、毒腺で高発現する遺伝子約 200 個を網羅的に同定した。質量分析は、熊本大学発生医学研究所の中村輝教授と谷直紀博士との共同研究で行った。

これらの 200 個の遺伝子を BLAST 検索したところ、寄生蜂他種ゲノムに保存されているものもあれば、何もヒットしなかったものもあった。そして、後者の多くが、N 末にシグナル配列を持つ分泌タンパク質をコードしていた。この結果は、ニホンアソバラコマユバチの毒腺には、種特異的な分泌成分が多く含まれていることを示唆する。その一方、毒腺で高発現する遺伝子の上位にはセリンプロテアーゼをコードすると予測された遺伝子が複数あって、それらは寄生蜂他種にも保存されているものが多かった。例えば、哺乳類のセリンプロテアーゼの 1 種である Granzyme B と相同な配列を持つ遺伝子が 7 個あった (E-value = 3e-10)。逆に、プロテアーゼ以外の酵素の機能ドメインとして既知であるものはほとんどなく、例えば、何かの低分子化合物の代謝経路を想起させるような酸化還元反応に関与する遺伝子は全く見つけられなかった。以上の結果から、ニホンアソバラコマユバチ特有の細胞死誘導活性成分は、分泌タンパク質が関与する可能性が強く支持された。

研究課題 C. 寄生蜂感染による細胞死誘導シグナル伝達経路の解析

寄生蜂の感染によって、宿主幼虫の成虫原基(将来成虫組織となる上皮組織)が顕著に縮退することから、組織が縮退する過程を時間経過を追って詳細に解析した。その結果、感染後 30 分でオートファジーが誘導され、感染後 1 時間から細胞分裂が減少し、感染後 2 時間からアポトーシスが誘導されることがわかった。このアポトーシスは、ショウジョウバエのアポトーシス実行遺伝子の 1 つである *reaper* によって介されており、*reaper* の内在の発現パターンに従って誘導される。翅原基の場合は、最初に背腹軸の境界部分にカスパーゼ活性化のシグナルが検出され、時間経過とともにシグナルが翅パウチ全体に広がっていく。*reaper* の機能喪失変異体では、アポトーシス誘導が完全に抑えられた。また、感染後 1 時間から、DNA2本鎖切断修復に関わる γ H2AV に対する抗体染色のシグナルや TUNEL 染色のシグナルが検出されたことから、寄生蜂感染によって誘導されるアポトーシスは、DNA 切断を伴うことが示唆された。このアポトーシスのタイムコースは、X 線照射(4,000R)によるアポトーシス誘導の時間経過と遜色ない速さである。

寄生蜂感染によるアポトーシス誘導が、X 線照射による *reaper* を介したアポトーシス誘導と似ていたことから、細胞分裂周期を止める実験を行った。先行研究によって、X 線照射によるアポトーシスは、細胞分裂停止後の多倍体化した細胞 (post-mitotic, polyploid cells) では起こらないことが知られている (Ruiz-Losada et al., 2021, *Cell Death & Differentiation* 29:832-845)。そこで、翅原基において *fizzy-related* 遺伝子を過剰発現させることによって、細胞周期を止めて、DNA の多倍体化を誘導した。驚いたことに、寄生蜂感染によるアポトーシスは、多倍体化した細胞でも誘導されることがわかった。この結果から、寄生蜂感染では、従来知られているアポトーシス誘導経路とは異なるメカニズムが働いており、分裂期の細胞がアポト

ーシスの標的ではないことが強く示唆された。

寄生蜂感染による細胞死シグナル伝達経路に関わる遺伝子を探索したところ、*Target of rapamycin (TOR)* のノックダウンによって、アポトーシスが抑制されることを見出した。一方、細胞分裂の抑制やオートファジーの誘導には影響がなかった。現在、TOR 経路がどのようにアポトーシス誘導経路に関与するのかを精査中である。

研究課題 D. RNAi 法による寄生蜂毒腺遺伝子の機能解析

毒腺で高発現する遺伝子約 195 個のうち、細胞死誘導に関与する遺伝子を絞り込むために、2021 年度に中国のグループが発表した寄生蜂他種の *Leptopilina heterotoma* のゲノムに対して BLAST 検索を行い、*L. heterotoma* にオースログが見つからなかった遺伝子を 63 個選んだ (Huang et al., 2021, *Nat. Commun.*, 12, 1-16)。*L. heterotoma* はタマバチ科に属しており、ニホンアソバラコマユバチ(コマユバチ科)と近縁ではないが、同じショウジョウバエ属の幼虫を宿主とする飼育殺し型寄生蜂である。*L. heterotoma* では、成虫原基の細胞死が誘導されないことから、ニホンアソバラコマユバチにのみ存在する遺伝子が、細胞死誘導に関係すると考えた。

寄生蜂遺伝子の機能解析を行うため、ゲノム情報を元に目的遺伝子をクローニングした。そして、その 1 部を標的とする 2 本鎖 RNA(dsRNA)を合成し、寄生蜂の幼虫に顕微注入する遺伝子ノックダウン法を確立した。コントロールの dsRNA として、GFP の配列に対する dsRNA を用いた。当該遺伝子の特異的な低下は、qPCR によって確認した(代表的な論文1:Kamiyama et al., 2022)。

上述の手法を用いて、63 個の毒腺遺伝子に対して遺伝子ノックダウン実験を行い、寄生蜂の RNAi 個体をショウジョウバエ幼虫に感染させて、その寄生成功率を調べた。すると、一部の RNAi 個体の感染において、ハチではなく、ハエが羽化するケースが確認された。野生型の *A. japonica* の感染によって、ハエが羽化することはほとんど全く無いことから、遺伝子ノックダウンによって寄生が阻害された可能性が高い。そこで、宿主幼虫の翅原基でのアポトーシス誘導をアポトーシスレポーターGC3Ai を用いて可視化したところ、2 つの遺伝子のノックダウンによって、翅原基でのアポトーシス誘導が顕著に抑制されることがわかった。アポトーシス誘導が抑制された宿主の 1 部からハエが羽化した、という結果から、アポトーシス誘導が寄生成立に関連することが強く支持された。

3. 今後の展開

現在の地球で最も繁栄している昆虫約 10 万種の中で、寄生蜂の種数は、その 20%をも占めると推定されている。種数の多様性は、生存戦略の多様性を反映していると考えて差し支えなく、寄生蜂はそれぞれの宿主に合わせた毒成分や麻酔成分などの天然生理活性物質を多く産生していると推定される。その中には、これまでの生物毒がそうであったように、人間の医療や農業に活用できる物質が含まれている可能性がある。しかしながら、試料サイズの小ささゆえに、その大部分は未同定である。

近年の NGS 技術の発展に伴って、小さな試料サイズの非モデル生物のゲノムが高品質で解読されるようになりつつある。本研究では、ニホンアソバラコマユバチの単為生殖系統を利

用して、高品質のゲノム構築に成功した。そして、毒腺遺伝子群をトランスクリプトーム解析とプロテオミクス解析で網羅的に探索したところ、195 個の遺伝子が同定された。興味深いことに、その大部分は、機能未知のタンパク質をコードしており、寄生蜂他種にもオーソログが見出されないものが多かった。同じ種の宿主を標的とするにも関わらず、寄生蜂ごとに毒成分は全く異なっており、宿主の免疫防御機構の攻略方法も異なっている。これらの結果から、寄生蜂の毒成分は、種ごとに多様かつ独特の配合で構成されて、宿主に注入されることが示唆された。

本研究の成果を踏まえた上でのさらなる展開としては、寄生蜂の毒成分の多様性を明らかにし、毒の作用機序を明らかにすることによって、創薬シーズを広げることである。この寄生蜂毒の特徴は、「殺さない毒」であることである。従来生物毒として有名なヘビ毒・フグ毒・スズメバチ毒・クモ毒は、神経系や血球系に致命的な作用を持つものに対して、寄生蜂毒は神経系や血球系には作用せず、上皮組織を標的とする。この分子機構を追究することで、組織特異的な投薬や上皮がんを標的とする細胞死誘導システムに新たな知見を得ることができる。また、農薬においても、特定種を標的とする農薬シーズの開発に貢献できる。

将来的な社会実装に繋がるために必要な展開(シナリオ)は、より多くの寄生蜂種のゲノム配列を解読し、比較ゲノム解析によって、多様な毒成分のライブラリーを構築することである。今後 5~10 年間で、医学薬学農学方面の研究者に提供できる形にしていく予定である。

4. 自己評価

本研究は、寄生蜂ニホンアソバラコマユバチの全ゲノム解読と RNAi 法の開発を論文発表し、筑波大学と JST を通してプレスリリースを行った。また、DDBJ に全配列を登録し、世界中の研究者が研究リソースを活用できるように整備した。論文発表後に、中国の研究者から複数の問い合わせがあり、当該研究分野において注目される成果であったと考えている。本研究において、非モデル生物を用いて全遺伝子の配列と遺伝子の機能解析の技術を整備したことは、今後の生命科学分野の裾野を広げる効果があると考えている。

当初の研究目的であった寄生蜂由来の細胞死誘導活性成分の同定について、その候補となる遺伝子の同定に成功したという点で良かったと思う。この遺伝子産物を抗体によって標識することができれば、生体内で毒成分、あるいは、毒成分を含む生体微粒子の挙動を可視化することができる。一方で、期間内に注力したのにも関わらず、細胞死誘導活性と生体微粒子の関係を明らかにできなかった点では、本領域が掲げる達成目標に到達できずに不十分であったと思う。しかしながら、寄生蜂の生体微粒子の捕捉方法について、領域内で様々なご助言をいただき、共同研究を行ったりすることができて、実験の技術的には非常に勉強になった。今後の研究においても引き続き、毒成分の可視化とともに、生体微粒子の標識手段の開発を試みたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Kamiyama T, Shimada-Niwa Y, Tanaka H, Katayama M, Kuwabara T, Mori H, Kunihisa A,

Itoh T, Toyoda A, Niwa R. Whole-genome sequencing analysis and protocol for RNA interference of the endoparasitoid wasp *Asobara japonica*. *DNA Research*. 2022, 29(4), 1-14, dsac019

著者らは、ショウジョウバエ属を宿主とする内部寄生蜂ニホンアソバラコマユバチの全ゲノム配列を解読し、12,508 遺伝子の予測を行った。単為生殖系統1匹からクローン集団 200 匹を増やすことによって、均質なゲノム DNA を抽出した。その結果、ゲノムサイズ 322 Mbp・ヘテロ接合性 0.132%という優れたゲノム構築に成功した。また、RNAi 法によって寄生蜂ノックダウン個体の作出に成功した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件 (特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Endocrinology: Non-insulin-producing cells secrete insulin under nutrient shortage. *Current Biology* 32, R380-R382, 2022. **Niwa YS***, Niwa R* (*Corresponding authors).
2. Mizuno Y, Imura E, Kurogi Y, **Shimada-Niwa Y**, Kondo S, Tanimoto H, Hückesfeld S, Pankratz MJ, Niwa R. A population of neurons that produce hugin and express the diuretic hormone 44 receptor gene projects to the corpora allata in *Drosophila melanogaster*. *Development, Growth, and Differentiation* 63: 249-261, 2021
3. Seong KH, Matsumura T, **Shimada-Niwa Y**, Niwa R, Kang S. The *Drosophila* Individual Activity Monitoring and Detection System (DIAMonDS). *eLife* 9: e58630, 2020
4. Yoshinari Y, Ameku T, Kondo S, Tanimoto H, Kuraishi T, **Shimada-Niwa Y**, Niwa R. Neuronal octopamine signaling regulates mating-induced germline stem cell increase in female *Drosophila melanogaster*. *eLife* 9: e57101, 2020
5. Imura E*, **Shimada-Niwa Y*§**, Nishimura T, Hückesfeld S, Schlegel P, Ohhara Y, Kondo S, Tanimoto H, Cardona A, Pankratz MJ, Niwa R. The Corazonin-PTTH neuronal axis controls systemic body growth by regulating basal ecdysteroid biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 30: 2156–2165, 2020 (*Co-first, §Corresponding author).