

Title	クモの寄生バチによる造網行動操作の分子機構解明とクモ系遺伝子探索
Sub Title	Unraveling the molecular mechanism of host web manipulation by ichneumonid parasitoids and seeking for gene for spider silk
Author	高須賀, 圭三(Takasuka, Keizo) 荒川, 和晴(Arakawa, Kazuharu) 河野, 暢明(Kono, Nobuaki) 富田, 勝(Tomita, Masaru) Korenko, Stanislav
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	クモに寄生するクモヒメバチという寄生バチがクモの造網行動を操作し、網を自身にとって有利な形状に改変させる"網操作"という寄主操作現象に着目し、寄主(クモ)と寄生者(ハチ)の両面からRNA-seq解析によってその分子機構解明に着手した。扱った系では、ハチがクモの生得的な造網行動(脱皮前に張る休息網)を操作行動のモデルとしていることがわかっており、比較対象として通常の円網を張っている個体とモデルとなっている休息網造網中の個体を設定した。その結果、操作されている個体と休息網造網中の個体の間で特定のクモ系遺伝子アイソフォームが高発現しており、操作の鍵遺伝子となっている可能性が示唆された。 "Host web manipulation" is one of host behavioral manipulations performed by spider-ectoparasitoids. I undertook a project to elucidate the molecular mechanism of this phenomenon by means of RNA-seq analysis using a parasitoid known to exploit an innate "resting-web" building behavior of its host spider for manipulation. I compared gene expression dynamics of manipulated spiders with normal orb-web building individuals and resting-web building individuals. As a result, I discovered a certain isoform of spider silk that was highly expressed in the phases of both resting-web building and being manipulated. This isoform is expected to be a key-gene directly getting involved with host web manipulation that induced by physiological interference of the parasitoid.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K18620 研究分野：昆虫生態学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K18620seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18620

研究課題名(和文)クモの寄生バチによる造網行動操作の分子機構解明とクモ系遺伝子探索

研究課題名(英文)Unraveling the molecular mechanism of host web manipulation by ichneumonid parasitoids and seeking for gene for spider silk

研究代表者

高須賀 圭三 (TAKASUKA, Keizo)

慶應義塾大学・環境情報学部(藤沢)・特別研究員(RPD)

研究者番号：00726028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：クモに寄生するクモヒメバチという寄生バチがクモの造網行動を操作し、網を自身にとって有利な形状に改変させる“網操作”という寄主操作現象に着目し、寄主(クモ)と寄生者(ハチ)の両面からRNA-seq解析によってその分子機構解明に着手した。扱った系では、ハチがクモの生得的な造網行動(脱皮前に張る休息網)を操作行動のモデルとしていることがわかっており、比較対象として通常の円網を張っている個体とモデルとなっている休息網造網中の個体を設定した。その結果、操作されている個体と休息網造網中の個体の間で特定のクモ系遺伝子アイソフォームが高発現しており、操作の鍵遺伝子となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)："Host web manipulation" is one of host behavioral manipulations performed by spider-ectoparasitoids. I undertook a project to elucidate the molecular mechanism of this phenomenon by means of RNA-seq analysis using a parasitoid known to exploit an innate "resting-web" building behavior of its host spider for manipulation. I compared gene expression dynamics of manipulated spiders with normal orb-web building individuals and resting-web building individuals. As a result, I discovered a certain isoform of spider silk that was highly expressed in the phases of both resting-web building and being manipulated. This isoform is expected to be a key-gene directly getting involved with host web manipulation that induced by physiological interference of the parasitoid.

研究分野：昆虫生態学

キーワード：造網行動操作 寄主操作 クモ 網 クモヒメバチ

1. 研究開始当初の背景

クモに寄生するクモヒメバチという寄生バチがクモの造網行動を操作し、本来捕虫に用いられる網を自身にとって有利な形状に改変させる“網操作”という寄主操作現象が発見されたのは2000年である(Eberhard 2000)。その後、多数の種で網操作が世界各国から報告される中、日本においても研究代表者らがギンメッキゴミグモ *Cyclosa argenteoalba* に寄生するニールセンクモヒメバチ *Reclinervellus nielsenii* による網操作を見出し、本来脱皮前のクモが張る休息網と形状が同じ網を作らせることを発見した(Takasuka *et al.* 2015)。さらに、ギンメッキゴミグモが作る休息網および操作網(操作によって作られた網)には特徴的な装飾糸が共に施されており、ハチがクモの生得的行動を転用していることがより強固に裏付けられた。この装飾糸は紫外線を反射することがわかり、本来脱皮するクモがこの装飾糸によって紫外線をよく視認できる飛翔昆虫に網の存在を認識させ、衝突をさせないようにしていると考えられ、ハチもその機能を自分のために転用していると考えられた。

操作行動の起源をはっきりと特定したこの発見を受け、分子生物学的なアプローチから網操作現象の分子機構の解明に着手した。

2. 研究の目的

主にRNA-seq解析を用い、時系列間や条件間の発現動態比較によって、ハチとクモの両面から操作にまつわる発現を調べ、網操作の分子機構の解明を目指した。同時に、表現型として顕れる行動学的な知見の集積にも当たった。

3. 研究の方法

用いた材料は、Takasuka *et al.* (2015)の材料ともなったギンメッキゴミグモとニールセンクモヒメバチの操作系と、比較対象としてクモ・ハチともに同属のゴミグモ *Cyclosa octotuberculata* とその寄生バチ(マサムトクモヒメバチ *Reclinervellus masumotoi*)である。サンプリングとそれに続く室内飼育によって、寄生するハチ幼虫を成長させ、操作が起るフェイズを軸に複数のタイムポイントでクモとハチ幼虫をそれぞれ液体窒素によって固定し、RNA-seq解析に供試した。どちらもTRIzol + RNeasy Plus Mini KitによってRNAを抽出・精製し、NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illuminaによってライブラリを調整した。シーケンスはIllumina社製NextSeq500 HighOutput Kit (300 cycles)で行ない、アセンブリにはBridgerを用いた。

ギンメッキゴミグモは操作が開始してから装飾糸(操作の後半で現れる)が紡糸されるまでの中盤と装飾糸が紡糸された後の終盤の2フェイズを識別した。比較対象としては、ギンメッキゴミグモの系では通常円網造網中に加え操作行動の起源とされる休息網

造網中を設定した。これらの発現遺伝子配列を決定し比較することで、被操作のクモや操作中のハチにのみ特異的に発現する遺伝子を絞り込み、行動操作の因子を探ることを目的とした。

(1) クモは、マップ率の網羅性などより、全リードからランダムな60Mリードをアセンブルした。全遺伝子の発現量によるクラスタリングを行い、当初は操作網造網中と休息網造網中の間の共通因子を探ることを試みたが、クラスタリングがうまくいかなかったため、円網造網中に対し統計的に有意に発現変動(Fisherの正確確率検定およびFDR 0.05補正)を起こし、かつ休息網造網中と操作網造網中に共通する糸腺別クモ系遺伝子を検出、操作にまつわる発現ダイナミクスを検討した。

(2) ハチは、リファレンスのアセンブリにおいて、各条件(タイムポイント)の中で全個体から10Mリードずつサブサンプリングし、条件ごとにマージした上で、60Mリードをアセンブルし、その結果を用いてCD-HIT-ESTでリファレンスを作成した。このリファレンスに対してKallistoで発現量定量し、サンプル間のSpearman's correlation coefficientを算出してサンプル間の相関を見た。またFDR < 0.05の基準で条件別共通発現変動遺伝子を探索した。

(3) クモヒメバチ類は、その個体数の少なさとクモの飼育の困難さから、生態学的情報が多いとは言えず、サンプリングや飼育の過程で得られる基礎的なデータも重要なものとなる。本研究では、野外サンプリングによって新しい寄主クモやクモヒメバチの産卵様式などについても調べ、知見の集積を行った。

4. 研究成果

(1) ギンメッキゴミグモの条件別発現遺伝子クラスタリングでは、不都合なことに試験区内でも発現のばらつきが比較的大きく、条件ごとにクラスタリングされなかった。また休息網は発現プロファイリングから見ると、どちらかと言えば円網造網中に近かった。すなわち、休息網造網中と操作中の発現動態が酷似するという当初の仮説は棄却された。

一方で、操作による発現変動はかなり多くの遺伝子に大きな影響を与えていることがわかり、ハチによる操作的作用が少なくともクモの発現ダイナミクスにまで及んでいることが裏付けられた。そこで、休息網造網中と被操作中で、共通して円網造網中との発現量の差が統計的に大きい特定のクモ系遺伝子(既存の他種のクモ系遺伝子DBを基に)のみに注目して解析を行うという次善策を採った。なお、クモの糸腺は最大7種類あり(ギンメッキゴミグモ含むコガネグモ上科

で最大) それらは用途によって使い分けられていることがわかっている。これら糸腺に特異的な7遺伝子について、条件ごとに発現しているものをアイソフォームで検出した。その結果、休息網造網中と被操作中(中盤・終盤)に共通する107遺伝子および休息網造網中と被操作終盤にのみ共通する391遺伝子が見出された(図1)。

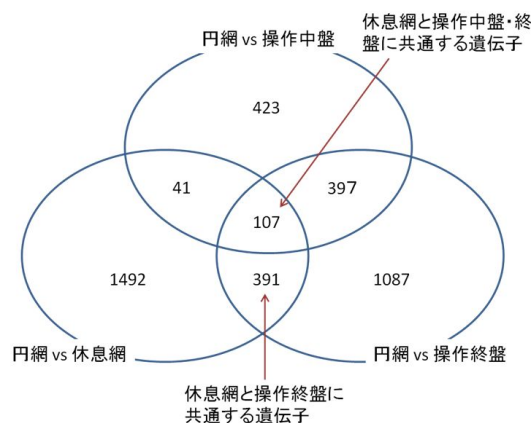


図1 条件別の共通発現変動遺伝子の数

最も注目すべき107遺伝子の中でも特徴的な挙動を示したのが、鞭状腺系のアイソフォーム(場合によってはパラログ)が、円網造網中でほとんど発現していないのに対し、とりわけ休息網造網中で顕著に発現し、被操作中においてもかなり高く発現していることがわかり、この遺伝子が操作におけるカギとなっている可能性が示唆された(図2, 13番アイソフォーム・黄緑バー)。なお、鞭状腺系とは本来円網の捕虫スパイラルの材料となる系である。円網造網時に発現していないこのアイソフォームが(円網造網時には他の鞭状腺系遺伝子のアイソフォーム(1-4番・紫バー)が高く発現している)スパイラルが一切ない休息網や操作網において高く発現しているということは、違う機能を担っている可能性が高く、操作に密に関わる遺伝子である可能性も十分にある。

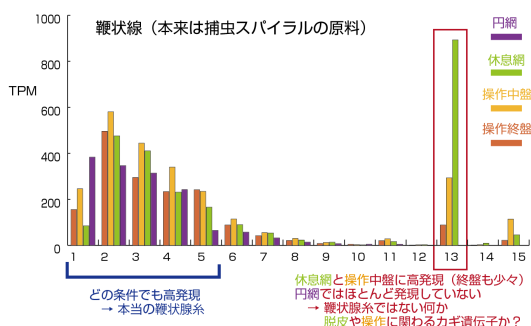


図2 鞭状腺系遺伝子各アイソフォームの発現量

もう一つ重要な系遺伝子に、休息網と操作網で実際に多く発現し、両者が同じ由来の網

であるという仮説の根拠でもある“装飾系”の原料となるブドウ状腺系がある。この遺伝子も、二つのアイソフォームでそれぞれ被操作終盤と休息網造網中に高く発現しているという傾向を得た(図3, 1,2番アイソフォーム)。前述の通り、操作中盤は装飾系が実際に紡出される前であり、この発現量の結果には実際の行動ときれいに一致したと言える。二つのアイソフォームがアセンブルミスによって期せずして二つに分かれた(本当は同一の遺伝子)可能性もあり、精査の必要がある。

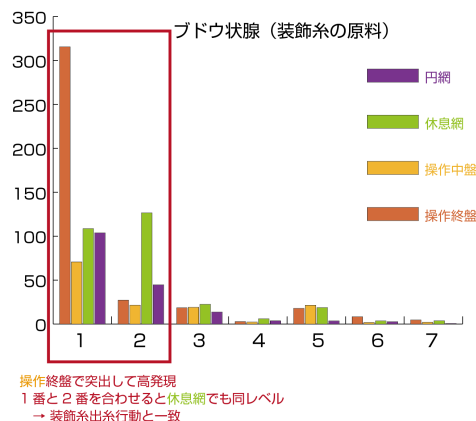


図3 ブドウ状腺系遺伝子各アイソフォームの発現量

時間的な問題で被寄生クモの時系列比較や種間比較(ゴミグモ)はできていないが、現在配列データは揃いつつあり、近い内に実現する予定である。期待されることは、操作が始まる2日前までは未寄生個体の発現変動と酷似すること、ゴミグモの操作では装飾系が現れないため、ブドウ状腺系の発現が低いことなどが挙げられる。

(2)ハチの解析では、操作が開始した後(操作中)操作が開始する直前(操作直前・幼虫の大きさで判断)操作が始まる2日前(中齢後半・今のところニールセンクモヒメバチのみ)の3フェイズで時系列比較を2種行った。

クモの場合と同じく押し並べてサンプル間の相関が低く、条件をきれいに反映したクラスタリングとはならなかった。条件別共通発現変動遺伝子は、ニールセンクモヒメバチでは操作の直前と後の間に一切なく、操作後と操作の推定二日前(中齢後半)に比較的多く見られるという結果を得た(図4)。

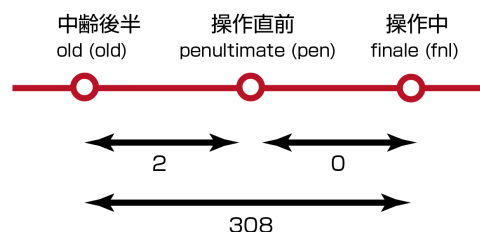


図4 ニールセンクモヒメバチの条件別共通発現変動遺伝子の数 (FDR < 0.05)

マスマトクモヒメバチでは、中齢後半が間に合わなかったため、二条件間の比較にとどまった。この種でも操作の前後で検出された共通発現変動遺伝子の数は顕著ではなく、誤差の範囲に収まる程度しか検出されなかった。

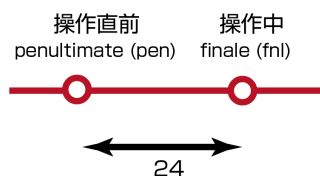


図 5 マスマトクモヒメバチの条件別共通発現変動遺伝子の数 (FDR < 0.05)

比較ポイントの少なさが問題として残っているが、現時点で言えることとして、操作の前後で発現ダイナミクスに大きな違いがないこと、すなわち操作が開始する直前にはハチ側からのアクションは終わっている可能性が挙げられる。そうであるとすれば、ニールセンクモヒメバチにおいて操作開始後と中齢後半の間に見出された発現変動遺伝子は網操作に関わる鍵遺伝子である可能性もある。マスマトクモヒメバチにおいて中齢後半を解析に加えること、また両種において中齢後半以前のさらに若い条件を加えることが今後の課題である。クモと同じく一部のサンプルはすでに配列データが揃いつつある。

(3) チェコ共和国の Korenko 博士らの研究チームと共同で、ニールセンクモヒメバチの分布や寄主利用様式、網操作様式等の生活史の研究にも着手した (Takasuka *et al.* 2017, 発表論文 3)。その結果、欧州で記録されていたコゴミグモ *Cyclosa conica* への寄生がチェコ共和国およびスロバキアから初めて発見され (新産地記録) また日本においてキジログミグモへの寄生が発見された (図 6、新寄主記録)。

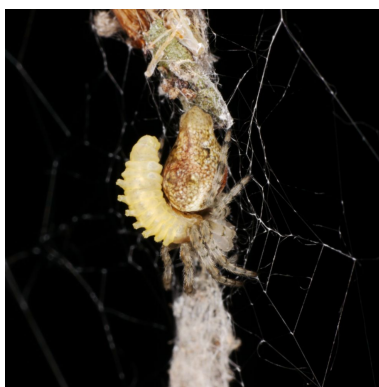


図 6 キジログミグモの腹部に寄生するニールセンクモヒメバチ終齢幼虫

それぞれの寄主クモに対する操作様式も詳細に調べ、両種のクモで枠糸を維持した操作網となった一方で、ギンメッキゴミグモの

操作網に現れる装飾系が一切作られないことがわかった。ニールセンクモヒメバチがクモの休息網を操作網のモデルにしているという仮説を前提とした場合、この差異はおそらく両種のクモに装飾系を作る習性が元々備わっておらず、休息網にも装飾系が使われていないからだと考えられる。しかしながら、実際に未寄生のクモを飼育し、休息網や装飾系の有無を調べる必要がある。

クモヒメバチ幼虫がクモに寄生する部位 (すなわちメスパチによる産卵部位) は種によって一定で、さらに系統群によって大きく異なり、その形質も安定して保存されている。幼虫の付く位置は、網操作を行う上でクモへの化学的干渉をするスターティングポイントであり、形質として重要な意味を持つ。

これまでクモヒメバチ類が大きく 2 つの単系統群によって形成され、祖先群 (クモの卵のうの寄生バチ) との形態的および生態的な形質の共通性から 2 群の極性が予想されている (Matsumoto 2016)。ここでは祖先群をクレード 1、派生群をクレード 2 とする。クレード 1 は、もっぱら RTA 群と呼ばれる非常に多数の種を抱える単系統群のクモを利用し、かつクモの頭胸部に寄生すること、クレード 2 は、もっぱらコガネグモ上科のクモを利用し、かつクモの腹部に寄生することが知られていた。また、クレード 2 による産卵行動様式はいくつかの種ですでに知られており、どの例でも産卵時にクモの腹部に自身の腹部末端を押し付けて自分側に引きながら産卵することがわかっていた。

本研究によって、クレード 1 の産卵行動様式が 5 属 5 種で新たに発見され、その動きがクレード 2 とは真逆で、クモの頭胸部上で自分側に引き込んだ腹部を後方に伸ばしながら卵を排出することがわかった (図 7、Takasuka *et al.* 2018, 発表論文 1)。



図 7 クモの頭胸部上で腹部を後方に伸ばしながら卵を排出するクレード 1 のハチ (ニッコウクモヒメバチ *Brachyzapus nikkoensis*)

クモヒメバチは、寄主の体外から何らかの行動誘引物質を注入し、寄主操作を実現して

いるが、腹部と頭胸部では神経系へのアクセスに違いが生じ、操作する場合においても大きな差異になると考えられる（過去に産卵部位を違えた際に、操作を起こすために新しい進化が要求される）。腹部への産卵・寄生が派生形質だと予想されているが、本研究で扱ったニールセンクモヒメバチ（クレード2）のように実際には多数の網操作が報告されており、その障壁は十分に乗り越えられているようである。今後は、頭胸部寄生のクレード1の網操作系を発現解析に組み込み、表現型の差異に注目してクレード2との種間比較を行なって分子機構の違いを検出して行く必要がある。

〈引用文献〉

Eberhard W.G. (2000) Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* **406** 255-256.
Matsumoto R. (2016) Molecular phylogeny and systematics of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). *Systematic Entomology* **41** 854-864.
Takasuka K., Yasui T., Ishigami T., Nakata K., Matsumoto R., Ikeda K. & Maeto K. (2015) Host manipulation by an ichneumonid spider-ectoparasitoid that takes advantage of preprogrammed web-building behaviours for its cocoon protection. *Journal of Experimental Biology* **218** 2326-2332.

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3件中3件）

- (1) Takasuka K., Fritzén N.R., Tanaka Y., Matsumoto R., Maeto K. & Shaw M.R. (2018) The changing use of the ovipositor in host shifts by ichneumonid ectoparasitoids of spiders (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). *Parasite* **25** 17 (doi: 10.1051/parasite/2018011). (査読有)
- (2) Korenko S., Hamouzová K., Kysilková K., Kolářová M., Kloss T.G., Takasuka K. & Pekár S. (2018) Divergence in host utilisation by two spider ectoparasitoids within the genus *Eriostethus* (Ichneumonidae, Pimplinae). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* **272** 1-5 (doi: 10.1016/j.jcz.2017.11.006). (査読有)
- (3) Takasuka K., Korenko S., Kysilková K., Štefánek M., Černecká L., Mihál I., Dolejš P. & Holý K. (2017) Host utilization of koinobiont spider-ectoparasitoids (Ichneumonidae, Ephialtini, *Polysphincta* genus-group) associated with *Cyclosa* spp. (Araneae, Araneidae) across the Palaearctic. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* **267** 8-14 (doi: 10.1016/j.jcz.2017.01.001). (査読有)

〔学会発表〕（計11件中10件）

- (1) 高須賀圭三, 前藤薫, 河野暢明, 富田勝, 荒川和晴. RNA-seq 解析によるクモヒメバチのクモ網操作の分子機構探索. 日本応用動物昆虫学会第62回大会, ポスターPG219, 鹿児島大学 (2018年3月25-27日).
- (2) 高須賀圭三, 前藤薫, 河野暢明, 富田勝, 荒川和晴. クモの寄生バチによる造網行動操作の分子機構探索: クモとハチ両方向からの RNA-seq 解析. 第40回分子生物学会年会, 3P-1370, 神戸国際会議場等 (2017年12月6-9日).
- (3) Takasuka K. Host web manipulation by an ichneumonid koinobiont ectoparasitoid of spiders taking advantage of preprogrammed web-building behaviour. The 5th International Entomophagous Insects Conference. Oral, Kyoto, Japan (16-20 Oct 2017).
- (4) 高須賀圭三. 行動から見るクモの寄生バチの適応進化. 日本昆虫学会第77回大会, 日本昆虫学会2017年度若手奨励賞受賞講演, 愛媛大学 (2017年9月2-4日).
- (5) 高須賀圭三, 前藤薫, 河野暢明, 荒川和晴. 寄生バチに造網行動を操作されるクモの遺伝子発現変動解析. 第5回NGS現場の会, ポスター3-17, 仙台国際センター (2017年5月22-24日).
- (6) 高須賀圭三, 前藤薫, 河野暢明, 荒川和晴. クモヒメバチによるギンメッキゴミグモ行動操作の発現変動解析. 日本応用動物昆虫学会第61回大会, 一般講演, 東京農工大学 (2017年3月27-29日).
- (7) 高須賀圭三, 前藤薫, 河野暢明, 荒川和晴. 寄生バチに行動操作されるクモの RNA-Seq による遺伝子発現変動解析. 日本生態学会第64回大会, 口頭発表 E01-05, 早稲田大学 (2017年3月15-18日).
- (8) 高須賀圭三. ヒメグモ類の捕食様式に特化したクモヒメバチ近縁二種の種特異的産卵行動. 日本動物行動学会第35回大会, ビデオ講演 V6, 新潟大学五十嵐キャンパス (2016年11月11-13日).
- (9) 高須賀圭三. 延長された表現型を操る延長された表現型: クモ寄生バチによる造網行動操作. 進化群衆生態学シンポジウム 2016, 京都大学 (2016年10月7日).
- (10) 高須賀圭三, 松本史樹郎, 前藤薫. ニホンヒメグモのノックダウン式不規則網に特化したキマダラクモヒメバチ *Zatypota maculata* の産卵行動. 日本蜘蛛学会第48回大会, 一般講演 O-24, 東京大学柏キャンパス (2016年8月19-21日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須賀 圭三 (TAKASUKA, Keizo)

慶應義塾大学・環境情報学部・日本学術振興会 特別研究員 RPD

研究者番号: 00726028

(4)研究協力者

荒川 和晴 (ARAKAWA, Kazuharu)

河野 暢明 (KONO, Nobuaki)

富田 勝 (TOMITA, Masaru)

Stanislav Korenko