

研究終了報告書

「クモ寄生バチによる造網行動操作の分子機構解明」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：高須賀 圭三

1. 研究のねらい

捕食者であるクモに寄生するクモヒメバチという寄生蜂が存在し、寄生する幼虫はクモを殺して網の管理がなくなる蛹期の安全を確保するために、クモを殺す前日に造網行動を操作し蛹期を耐えうる網に改変する網操作の能力を備えている。「延長された表現型」の代表例としても取り上げられるこの現象への注目度は高く、近年様々なクモヒメバチ - クモ系で多様な網操作例が世界の各地から報告されているが、その分子機構は解明されていない。

本プロジェクトでは、ギンメッキゴミグモを操作し脱皮用の網と同じ特徴を持った網を強制的に発現させるニールセンクモヒメバチの系(Takasuka *et al.* 2015)を材料に、メタボローム解析によって操作期のハチ幼虫とクモに高く検出される代謝物質を絞り込むことで、ハチ幼虫からクモに移っているはずの網操作責任物質を探索する。さらに得られた候補の物質をマイクロインジェクションによってクモに打ち込み、操作された際に生み出される網と同じ網が得られるかどうかを基準にバイオアッセイ試験を行う。

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 behaviour for its cocoon protection. *Journal of Experimental Biology* **218** 2326–2332.

2. 研究成果

(1) 概要

大きな流れとしては、ニールセンクモヒメバチに寄生されたギンメッキゴミグモを採集・飼育・目的齢でのサンプル化→IC-MS(アニオンを検出)および LC-MS(カチオンを検出)を用いたメタボローム解析による親水性代謝物質の網羅的検出→ドライ解析によって操作期のハチとクモに高まっている物質のスクリーニング→選出された候補物質のマイクロインジェクションによるバイオアッセイで影響の検証、となる。その結果、条件を満たす 21 の物質を選出することができ、バイオアッセイを実施する段階まで進むことができたが、実際の網操作と同様の影響を及ぼす物質はまだ見つかっていない。

また、メタボローム解析で得られた物質群のうち、最初のスクリーニングに回せたものはリファレンスされた既知物質のみだったが、同時に検出された未知化合物をノンターゲット解析によって既知物質と同様の解析デザインでスクリーニングしており、129 種のシグナルを選出できている。今後は、これらのさらなる絞り込みと物質特定の後、当該物質の購入や合成を経てマイクロインジェクションによるバイオアッセイを行っていきたい。

(2) 詳細

研究テーマ A 「メタボローム解析による親水性“既知”代謝物質の網羅的検出、スクリーニングおよびマイクロインジェクションバイオアッセイ」

ニールセンクモヒメバチに寄生されたギンメッキゴミグモを採集し、クモを飼育下で造網させ給餌し、ハチの幼虫が目的の齢(中齢・操作期(亜終齢)・終齢)に達したところで幼虫をクモから取り外し、液体窒素による凍結処理を施し実験に供試するサンプルとした。このとき操作期の幼虫によって操作されているクモも同様にサンプルとした。操作期クモの比較対象として、寄主として選ばれやすい亜成体の未寄生クモを同地域から採集しサンプルとした。反復数は、中齢 9、亜終齢(操作期)11、終齢 9、操作期クモ 11、未寄生クモ 12 となった。

メタボローム解析は、前処理によって液状になったサンプルをそれぞれ 2 分割し、IC-MS および LC-MS によって実施した。まずは、当研究所で作成されている既知物質リファレンスを参照した既知物質の検出を行い、189 種のカチオンおよび 189 種のアニオンが検出され、各代謝物質の検出量が得られた。検出量を基にしたヒートマップ分析では 5 つの実験区間でほぼきれいにクラスタリングされたため、各実験区内の画一性が得られており、かつメタボローム解析がうまく実施されたことが示唆された。

得られた検出量データから統計解析によって、(1) 操作期幼虫で他の齢よりも高まっている物質、(2) 操作期クモで未寄生クモよりも高まっている物質、(3) 1と2に共通する物質、をそれぞれ絞り込み、マイクロインジェクションによるバイオアッセイに用いる物質 21 種を決定した。同時に、ガラスキャピラリーを使ったマイクロインジェクションシステムを確立するため、ACT-X の財源を用いて実体顕微鏡、マイクロマニピュレーター、ガラスキャピラリー作成器(プラー)等比較的高価な機器を購入し、構築することができた。これにより、実際にクモの腹部(ハチ幼虫がアクセスする唯一の部位)に最小限の外傷で液体を外部から注入し、その後もクモは生きた状態を保てることが可能となった。

寄生される範囲の齢(幼体～亜成体)のクモを採集し、インジェクション実験に供試するが、小さめの個体(約 2-3mg)ではインジェクション可能な容量は 0.5 μ l が限界だった。溶液に対する物質の可容量が限られるため、候補代謝物質は実際の検出量の 2 倍の量が 0.5 μ l の溶液に溶けるように設定し、十分に溶けやすいものはアッセイの回数を減らすため 3-4 種をプールしてカクテルとした。その結果、カクテル 4 種と単品溶液 7 種という構成となった。供試されたクモの体重に合わせてこれらのインジェクション量を検討し、1 溶液当たり 8 個体を基準として注入を行っている。逆流もなくうまく注入できた後に張られる網の形状から、当該代謝物質の造網行動への影響を調べ、通常の間網が張られた場合は影響なしと判断する。しかし、何も網が張られない場合が大多数であり、それも影響がない部類と考えられるが(もし操作責任物質であったら、何らかの造網行動が強制的に誘発されると予想)、ひとまず保留と判断し、追加で同溶液の注入を行っている。現在までに単品溶液 7 種とカクテル 1 種のインジェクションが終了し、操作網と同一の網が張られるという反応は得られていない。

研究テーマ B 「メタボローム解析による親水性“未知”代謝物質の網羅的検出とスクリーニ

ング」

既知代謝物質と並行し、既知物質と同じ解析デザインでノンターゲット解析による未知代謝物質の探索にも取り組んでおり、該当するシグナル 129 種が得られている。今後は文献情報及び統計解析、シグナル同士の関連性の有無に着目し、これらから 1 桁まで慎重に絞り込んでいく予定である。

3. 今後の展開

メタボローム解析による網羅的検出とドライ解析による絞り込みによって候補物質を選出・バイオアッセイする段階までは来られたが、有望な因子には辿り着いておらず、目下の展開としてはマイクロインジェクション実験によるバイオアッセイを繰り返し、実際の効果を検証することである。もし、明らかに網操作に関与する物質が特定できれば、その段階で網操作研究の一つの命題とも言える分子機構解明となり、論文として世に公表することができる。責任因子発見の成否に依存するが、場合によっては 1-2 年以内にこのような展開ができるかもしれない。

操作責任物質解明を果たせた先の展開はまさに末広がりと言うことができ、同じ因子を他の網操作系のクモ(=他種ハチが利用・操作する寄主クモ)や寄主ではないクモに打ち込むとどのような反応が得られるか、また同様のオミクス実験デザインを他の網操作系に適用することで操作責任因子の違いや共通性を検討することができるようになる。クモヒメバチ類の中に網操作系はすでに多数報告されており、その因子を系統的に広く突き止め、比較することで、クモヒメバチ類の中で独自に進化した網操作が同一の起源のものなのか、あるいは独立に何度も生じているのかという、網操作研究のもう一つの命題に迫れる可能性を秘めている。

4. 自己評価

目的の条件に即したサンプルを生み出し、メタボローム解析にかけるという 1 つ目の大きなステップと、ドライ解析によって絞り込んだ代謝物質をクモの体内にマイクロインジェクションするバイオアッセイ系構築するという 2 つ目のステップを期間中に完了することができたことには一定の評価をしてよいと考えている。一方、インジェクション実験には、野外からクモを採集し終日をかけて 1 溶液を複数の個体にインジェクションし、翌日に様子を見るものの造網が起きないことも多々あり再度インジェクションを実施する、といった過程の繰り返しの思いの外時間を要した。さらに、時期によっては目的の齢のクモが見つからないなどの悪条件もあって、バイオアッセイが律速段階となってしまう、期間中に目的の反応を誘発する物質の特定には至れなかった。また、サンプルを準備してメタボローム解析にかけるという一連の過程に 1 年を要するため、期間中解析の対象にできたのは親水性のイオン性代謝物質に限られてしまった。研究期間は満了したが、今回築けた実験系や蓄積したデータを基に、研究目的達成に向けて引き続き尽力していきたい。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、大きな成果がまだ得られていないため実現したものは無い。だが、本提案が成功した暁には、“クモの造網行動操作”という“小学生でも理解できるのに驚くような生態のメカニズム”が科学的に解き明かされることに一般社会へ与えるインパクトが期待でき、予想はできないがその規模は小さくないものであると考えている。

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:2件

1. Keizo Takasuka. The northernmost record of *Eriostethus rufus* (Uchida, 1932) (Hymenoptera, Ichneumonidae) with an indication of new host, *Trichonephila clavata* (Koch, 1878) (Araneae, Araneidae) and its web manipulation. *Entomological Communications*. 2021, 3, ec03015, doi: 10.37486/2675-1305.ec03015.

サンプリング調査の過程で山形県鶴岡市内にある善賢寺境内において、クモヒメバチによって操作されそのクモヒメバチのまゆがぶら下がっている50cm超の操作網を発見した。寄主クモの遺骸は見つからなかったため、クモの完全な種同定はできなかったが、網の大きさに加え操作網に残された特徴(特にジョロウグモが網に吊るす食べかす)からジョロウグモとみなした。羽化したハチは形態と分子(mt COI)によってアカクモヒメバチと同定され、本種の新寄主記録と分布最北端更新となった。

2. Keizo Takasuka. A feeding aid for web-building spiders reluctant to build a web. *American Arachnology*. 2021, 86, 3-4.

造網性、特に円網性のクモを飼育下で造網させて飼育しようとしても網を張らない個体が多く、飼育が困難となる。そこには、クモが餌を捕るためには網が必要だが、網を張るためには餌を捕って体力を確保する必要があるというジレンマがある。この問題を打開するためには、網を張っていない個体に手渡しで獲物を与えるという方法が有効であるが、基本的にクモは臆病で特に小さい種は手渡しで給餌しても逃げることが多い。この問題を解決するために、殺したばかりの餌昆虫を蜂蜜水に浸けてから口元にあてがうと捕食しやすくなるという手法を確立し、報告した。

(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. 高須賀圭三, 平山明由, 曾我朋義, 富田勝, 河野暢明, 荒川和晴. メタボローム解析を用いたクモ寄生バチによる造網行動操作の責任物質探索. 第43回日本分子生物学会年会, 3P-0435, オンライン(2020年12月2-4日).

2. 吳安真耶子, 高須賀圭三, 早坂亮祐, 平山明由, 曾我朋義, 富田勝, 河野暢明, 荒川和晴. メタボローム解析を用いたクモヒメバチによる造網行動操作の責任物質探索. 第44回日本分子生物学会年会, 1P-0635, オンライン(2021年12月1-3日).

3. Takasuka K., Takahashi N., Yamamoto P., Kono N., Nakamura H., Maeto K. & Arakawa K. Web manipulation of a cobweb-weaving theridiid house spider by *Zatypota albicoxa* (Hymenoptera, Ichneumonidae). 第69回日本生態学会大会, 一般講演 A02-01, オンライン

(2022年3月14-19日).

4. Takasuka K. Recent topics of spider web manipulation by ichneumonids (Pimplinae, the *Polysphincta* genus-group). HYMATHON2022: A 24 hour marathon of Hymenoptera, Invited talk, Online (31 Mar-1 Apr 2022).