

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05676

研究課題名(和文) 線虫による細胞性免疫回避メカニズムの解明

研究課題名(英文) Evasion mechanisms from insect cellular immunity by nematodes

研究代表者

吉賀 豊司 (Yoshiga, Toyoshi)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：00312231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：線虫による昆虫の細胞性免疫回避機構について検討した。昆虫の血球活性化を抑制する因子について分離を行い、脂質様物質を部分精製した。同様の物質は昆虫病原性線虫だけでなく、複数の自活性線虫でも検出され、この抑制因子は様々な線虫に存在することが示唆された。また、非寄生性線虫の *C. elegans* はハチノスツヅリガ幼虫の体内で包囲化されないことに関して、包囲される変異体のスクリーニングを行なったが、変異体は得られなかった。さらに、*C. elegans* をハチノスツヅリガ幼虫に注入したところ血球数が減少する現象について検討したところ、線虫が血球を摂食しているためであることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物に寄生する線虫が寄生を成立させるためには宿主免疫を回避する必要がある。しかし、線虫による免疫回避機構やその進化は不明な点が多い。そこで、昆虫を宿主として用い、線虫が細胞性免疫を回避する機構の解明を試みた。線虫から抽出した体表面物質の脂質様物質が細胞の活性化を阻害することで免疫からの回避にはたらいていることが明らかとなった。また、細菌食性線虫は昆虫体内で血球を摂食し、それによって血球数が減少することも明らかとなった。さらに線虫と昆虫血球の相互作用を観察するための実験方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The evasion mechanism of nematodes from insect cellular immunity was studied. Immune suppressive factor from nematodes was partially isolated. The similar factor was detected not only from insect pathogenic nematodes but also from non-parasitic nematodes. Injection of the *Caenorhabditis elegans* nematode into the *Galleria mellonella* insect larvae resulted in the decrease of hemocyte number, which was caused by feeding of hemocytes by the nematode.

研究分野：線虫学

キーワード：自然免疫 昆虫 線虫 血球 包囲反応 細胞性免疫 spreading

### 1. 研究開始当初の背景

生物は病原体などの異物を認識し、攻撃する「免疫」というシステムを発達させてきた。昆虫には人間のような獲得免疫は存在せず、昆虫体内に侵入してきた病原体に対して自然免疫で対処する。昆虫の自然免疫には、昆虫体内を循環する血球を使用した細胞性免疫と抗菌ペプチドやメラニン色素などを用いた液性免疫の2通りが存在する。細菌などの比較的小さな異物に対しては、抗菌ペプチドや血球による貪食が重要なはたらきを果たすことがよく知られている。一方、線虫のように血球よりも大きな異物に対しては主に細胞性免疫がはたらき、血球が異物を取り囲む包囲反応で異物を封じ込め、無害化することが知られているが、その機構については未だに不明な点が多い。

一方、寄生者は寄生を成功させるために、進化の過程で宿主の免疫から逃れる能力を獲得してきた。例えば、カリヤコマコバチなどの内部寄生蜂は、産卵時に注入する毒液とポリドナウイルスによって卵を昆虫免疫による攻撃を回避するシステムを獲得している。昆虫寄生性線虫の一つである昆虫病原性線虫は、腸内に保有する共生細菌を昆虫血体腔に放出し、その力によって血球による包囲化を抑制する。このように微生物などが免疫回避に関係している例もあるが、多くの寄生性線虫においてはこのような微生物などが関与しておらず、何らかの免疫回避システムが存在すると考えられる。昆虫病原性線虫の一種では宿主体内のタンパク質を体表に纏いうことで自身を昆虫の一部として偽装することによって血球から異物として認識されることを防いでいるという報告(Mastore and Brivio, 2008)などもあるが、様々なグループの線虫が寄生性を獲得していることを説明できるような線虫による昆虫免疫の回避については未だに明確になっていない。

研究代表者は、血球による線虫の認識や包囲反応の過程を明らかにするため、昆虫免疫の実験によく用いられる昆虫であるハチノスツツリガ幼虫に様々な線虫を注入したところ、寄生性線虫だけでなく非寄生性の線虫でも昆虫体内で血球による包囲反応をほとんど受けないという現象を発見した。この発見や昆虫寄生は線虫の様々なグループで独立して何度も進化していることなどから、線虫には異物認識されにくい基盤的構造や機能が前適応的に存在し、そのため様々なグループの線虫においても寄生性を獲得しやすいのではないかと、という考えに至った。

### 2. 研究の目的

昆虫を含めた動物の自然免疫に関する研究は、これまで主にショウジョウバエにおいて精力的に研究が行われ、細菌や菌類などの異物を認識するタンパク質が存在し、それによって活性化が起こる Toll 経路と Imd 経路と呼ばれる2つのシグナル伝達経路を活性化させることで自然免疫を誘導させることなどが明らかとなっている(Hetru and Hoffmann, 2009)。一方、線虫を用いた実験にはショウジョウバエは小さすぎて扱いにくい等の問題もあることから、線虫などの多細胞生物に対する異物認識の研究はあまり進んでいない。また、様々な線虫が脊椎動物に寄生することが知られているが、脊椎動物では多細胞生物の寄生に対しては IgE 抗体値が上昇し、好酸球が増えることなどがよく知られているものの、線虫に対する認識機構や自然免疫活性化機構、さらには線虫によるその回避機構については、非常に複雑なシステムであるために解析が難しく、断片的な情報に止まっている。さらに、植物においても近年、病原体分子パターン(PAMPs/MAMPs)誘導型免疫(PTI)やエフェクター誘導型免疫(ETI)の研究が盛んに行われており、植物寄生性線虫に対する反応なども解明されつつあるが、線虫による植物免疫回避機構についてはまだ研究が始まったばかりである。

昆虫寄生性線虫がいかにして昆虫宿主の免疫を回避しているかについてはいくつかの研究が行われてきたものの(Qiang et al 2009; Toubarro et al 2013)、その具体的な機構については断片的な情報のみである。寄生性線虫は他の動物に比べて体サイズが小さく、また、培養が難しいものが多く、生化学的、遺伝的解析を行いにくいいため、寄生者として多様で重要なグループであるにも関わらず、寄生の際の宿主免疫からの回避気候やその進化に関する研究は進んでいない。本研究では、昆虫病原性線虫の1グループと分類学的に同じクレードに属する、非寄生性で培養や解析の行いやすい線虫 *C. elegans* を寄生性線虫のモデルとして実験に用い、物質、遺伝子、微細形態からアプローチすることにより線虫による免疫回避機構を明らかにしようとする点が特色である。*C. elegans* が昆虫体内で包囲されないという現象は申請者が初めて発見したものであり、このような観点から生体防御機構の解明を目指した研究は国内外においてこれまでない。

### 3. 研究の方法

これまでの研究代表者の研究結果より、非寄生性の線虫も昆虫体内で包囲されにくいことから、線虫の体表は包囲を回避するために昆虫の血球に認識されにくい物質や構造を持つ可能性が示唆された。そこで、モデル線虫 *C. elegans* を用いて以下の3点を中心に研究を進め、特に本課題では血球による包囲を回避する線虫のメカニズムの解明を目指す。

(1) 血球活性化抑制因子の分離と同定

これまでの研究より、クロロホルムなどの有機溶媒で処理した線虫を昆虫体内に注入すると、これらに対して血球は激しい包囲反応を示すが、生きた線虫を注入しても線虫は血球によって包囲を受けないことが明らかにしている。このことから、生きた線虫体表に有機溶媒で抽出される因子が存在し、それが包囲を回避していると推察される。そこで、*C. elegans* から体表物質を抽出し、プレート上での昆虫血球の spreading 反応を指標として、体表に存在する活性化阻害因子の分離・同定を行う。これまでの予備的な実験で、体表面の有機溶媒抽出物中に昆虫血球の spreading 阻害活性があり、抽出物質の希釈によって阻害効果が低下することから阻害物質が存在することを見出している。また、その活性は脂質画分に認められており、本課題ではそれらの情報を基に物質の同定をガスクロマトグラフ質量分析計などを用いて行う。

#### (2) 包囲を受ける *C. elegans* 変異体の解析

*C. elegans* が包囲反応を受けない原因について、宿主と直接接する体表物質や体表構造が重要な役割を果たしている可能性が大きい。これについて遺伝子からのアプローチを行うため、*C. elegans* 変異体を用いた解析を行う。体表構造や体表物質に関する既知の *C. elegans* 変異体を CGC (Caenorhabditis Genetics Center) 等から入手し、それを昆虫体内に注入することで血球による包囲反応がみられる変異体を見つけ出し、包囲の回避に関する遺伝子ならびに因子を特定する。また、EMS などの変異原を用いて突然変異体を誘導し、昆虫体内で包囲化を受ける変異体を網羅的にスクリーニングする。新規変異体についてはその遺伝子同定までには時間がかかるため、本研究期間中はまずは変異体を得ることに集中する。

包囲を受ける *C. elegans* 変異体については、透過電子顕微鏡 (TEM) および走査電子顕微鏡 (SEM) を用いてその角皮ならびに体表構造を観察し、野生型との微細構造の違いを比較する。包囲反応回避に関する遺伝子の変化が実際に体表の微細構造にどのような影響を与えているかを明らかにする。

#### (3) 線虫注入に伴う体液中の血球数減少の解明

これまでの研究で、線虫を昆虫体内に注入すると昆虫の血球数が減少するという興味深い現象を発見している。血球数の減少は、血球による包囲反応に影響を与えている可能性が高いため、その原因解明を行う。予備実験では、*C. elegans* と昆虫血球を *in vitro* で共存させると血球数が激減し、その際に *C. elegans* が血球を捕食している様子が観察された。血球が生体防御のために細菌やカビなどの異物を貪食することは知られているが、逆に寄生者が免疫から逃れるために、血球を捕食するという事は知られていない。そこで本研究では、線虫が血球を捕食することにより、包囲を抑制している可能性について検討する。摂食しないステージである *C. elegans* 耐久型幼虫さらに摂食異常がある *C. elegans* の eat-2 変異体 (Mckay et al, 2004) などを昆虫に注入し、血球数の変化を調べることで、この仮説を検証する。

血球数減少の他の原因として、昆虫の血球を産生する造血器官に線虫が影響を及ぼしている可能性や線虫から分泌される体表物質が直接または間接的に血球の崩壊を引き起こしている可能性もある。そこで、*in vitro* および *in vivo* において、線虫注入が造血器官の血球産生能や *in vitro* で血球に及ぼす反応を観察し、線虫体表面物質の影響を検討する。影響が見られた場合には、その物質の分離および同定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 血球活性化抑制因子の分離と同定

これまでの研究より、クロロホルムなどの有機溶媒で処理した線虫を昆虫体内に注入すると、これらに対して血球は激しい包囲反応を示すが、生きた線虫を注入しても線虫は血球によって包囲を受けないことが明らかにしている。このことから、生きた線虫体表に有機溶媒で抽出される因子が存在し、それが包囲を回避していると推察される。そこで、*C. elegans* から体表物質を抽出し、プレート上での昆虫血球の spreading 反応を指標として、体表に存在する活性化阻害因子の分離・同定を行った。主に、昆虫の血球の包囲反応で重要なはたらきをするプラズマ細胞のスピレディングを指標に物質の分離を進めてきた。これまで非寄生性線虫 *C. elegans* の体表面物質をヘキサソームタノールで抽出し、2次元薄層クロマトグラフィーによって分画したところ、血球の spreading を抑制するスポットが得られ、それは脂質様物質であることが明らかとなった。その後、異なるカラムを用いた液体クロマトグラフィーによる分離を進め、単一のピークとして精製ができたと思われるがガスクロマトグラフ質量分析計などを用いて物質の同定を試みたが、同定までには至らなかった。

物質の同定には至らなかったものの、線虫体表面に存在する脂質分画についてその活性を明らかにした。体表面の脂質分画の血球の spreading 抑制効果は昆虫病原性線虫だけでなく、*Caenorhabditis elegans*、*Pristionchus pacificus*、*Oscheius miliophila* などの自活性線虫のものにも同様に効果が見られた。また、*C. elegans* をハチミツガ幼虫に注入すると、回収した血球の spreading は対照区に比べて遅れた。血球の spreading に必要なシグナル伝達経路に関わる ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase) のリン酸化が *C. elegans* の注入によって減少することが明らかとなった。*C. elegans* を注入した昆虫の血漿を分離し、活性を調べたところ、血漿成分に ERK のリン酸化を抑制する効果が検出された。同様の血球 spreading 抑制効果は、他の非寄生性や寄生性の線虫でも見られた。以上のことから、血球の異物への付着や血球の spreading を遅延させる因子は少なくとも細菌食性線虫で共通してみられ、寄生への前適応である可能性が示された。

## (2) 包囲を受ける *C. elegans* 変異体の解析

*C. elegans* が包囲反応を受けない原因について、宿主と直接接する体表物質や体表構造が重要な役割を果たしている可能性が大きい。これについて遺伝子からのアプローチを行うため、*C. elegans* 変異体を用いた解析を行った。体表構造や体表物質に関する既知の *C. elegans* 変異体を CGC (Caenorhabditis Genetics Center) 等から入手し、それを昆虫体内に注入することで血球による包囲反応がみられる変異体を用いてアッセイを行なったが、既知の変異体には包囲化が見られる変異体は見つからなかった。また、EMS などの変異原を用いて突然変異体を誘導し、昆虫体内で包囲化を受ける変異体を網羅的にスクリーニングすることにした。スクリーニングをより効率的に行うための実験系を検討し、線虫に対する昆虫血球の反応について詳細に解析するため、昆虫の生体外で線虫に対する昆虫血球の反応を観察できる *ex vivo* のアッセイ系を確立した。昆虫から体液を取り出し、血清成分を分離せずに血球を体液のままオートクレーブによって殺した線虫と反応させ、time lapse を用いて血球の反応を観察すると、血球による異物認識が起こり、部分的な包囲反応が観察できた。一方、生きた線虫に対しては生体内と同様に異物認識が起こらないことを示すことができた。これによって生体外に取り出した血球を用いて、線虫に対する反応を解析できる様になった。

## (3) 線虫注入に伴う体液中の血球数減少の解明

*C. elegans* を昆虫体内に注入すると血球数が減少する現象について、これが線虫による血球捕食に起因することを検証した。in vitro 実験で、*C. elegans* は血球を丸呑みしていく様子が観察され、実際に血球数が有意に減少することを明らかにした。また、その際に、線虫はプラズマ細胞や顆粒細胞などの血球の種類を選択は見られず、口の近くにあるものを飲み込んでいくことが観察された。*C. elegans* の滲出液を集めて昆虫に注入しても血球数には変化が見られなかったため、摂食が大きな要因である可能性が高まった。*C. elegans* 摂食変異体 *eat-2* などを用いて実験を行なった結果、摂食に異常がある変異体では野生型に比べて血球数が現象しないことが in vitro および in vivo 実験で明らかとなった。また、野生型を注入した際にも、造血器官や造血器官での血球生産能力には影響がないことが明らかとなった。さらに、線虫注入による血球数の現象は、*C. elegans* 以外の細菌食性線虫においても観察された。このことから、血球の捕食は、細菌食性線虫で保存され、細菌食性線虫が昆虫病原性や昆虫寄生性へ進化する際に重要な性質であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono M, Hayakawa Y, Hama Y, Yoshiga T	4. 巻 153
2. 論文標題 The suppressive effect of bacterial-feeding nematodes on hemocyte spreading of <i>Galleria mellonella</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 104742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2021.104742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tonogawa U, Matsumura T, Ono M, Yoshiga T	4. 巻 -
2. 論文標題 Abnormal increases in reactive oxygen species in dying insects infected with nematodes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Insect Biochem Physiol.	6. 最初と最後の頁 e21758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/arch.21758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono M, Arimatsu C, Kakinoki A, Matsunaga K, Yoshiga T.	4. 巻 55
2. 論文標題 Comparison of cellular encapsulation with nematodes in two lepidopteran insects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 337-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-020-00687-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono, M., Arimatsu, C. and Yoshiga, T.	4. 巻 55
2. 論文標題 Ex vivo observation of insect hemocyte behavior against beads and nematodes in the presence of insect plasma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-019-00654-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono, M. and Yoshiga, T.	4. 巻 146
2. 論文標題 Cellular immunity in the insect <i>Galleria mellonella</i> against insect non-parasitic nematodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 708-715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S003118201800210X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iryu T, Tanaka R, Yoshiga T	4. 巻 50
2. 論文標題 Mermithid nematodes isolated from the shield bug <i>Parastrachia japonensis</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nematological Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3725/jjn.50.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono, M. Hayakawa, Y. and Yoshiga, T.	4. 巻 147
2. 論文標題 Bacterial feeding nematodes ingest haemocytes in the haemocoel of the insect <i>Galleria mellonella</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 279-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-019-00654-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono, M. Arimatsu, C. and Yoshiga, T.	4. 巻 55
2. 論文標題 Ex vivo observation of insect hemocyte behavior against beads and nematodes in the presence of insect plasma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology.	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0031182019001550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Masaya, Yoshiga Toyoshi	4. 巻 146
2. 論文標題 Cellular immunity in the insect <i>Galleria mellonella</i> against insect non-parasitic nematodes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S003118201800210X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小野雅弥・有松知里・吉賀豊司
2. 発表標題 2種のチョウ目昆虫の線虫に対する包圍化
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野 雅弥・早川 洋一・吉賀 豊司
2. 発表標題 非寄生性線虫は昆虫血球の活性化を遅らせる
3. 学会等名 第27回日本線虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono, M; Hayakawa, Y; Yoshiga, T.
2. 発表標題 Effects of bacterial feeding nematodes on hemocytes after injection into the hemocoel of the insect <i>Galleria mellonella</i>
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaya Ono, Yoichi Hayakawa and Toyoshi Yoshiga
2. 発表標題 Caenorhabditis elegans preys on hemocytes in the insect Gelleria mellonella
3. 学会等名 European Society of Nematologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野雅弥・早川洋一・吉賀豊司
2. 発表標題 非寄生性線虫によるチョウ目昆虫の死亡原因の解明
3. 学会等名 日本線虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野雅弥・早川洋一・吉賀豊司
2. 発表標題 自活性線虫Caenorhabditis elegansによる昆虫の包囲化回避機構の解明
3. 学会等名 昆虫病理研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	早川 洋一  (Hayakawa Yoichi)  (50164926)	佐賀大学・農学部・教授    (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------