

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370034

研究課題名(和文) 昆虫サイトカイン依存的な新しい自然免疫活性化経路の証明

研究課題名(英文) Insect growth-blocking peptide (GBP) signaling pathway mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress

研究代表者

早川 洋一 (Hayakawa, Yoichi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50164926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌ペプチド(AMP)は主要な自然免疫エフェクターであり、微生物の侵入から宿主を守るために誘導される。AMP群は非感染性ストレスによっても誘導されるが、そのシグナル経路は未だに明らかにされていなかった。本研究では発育阻害ペプチド(Growth blocking peptide, GBP)に着目し、一連の解析を行った。その結果、ショウジョウバエのGBPシグナル経路は、感染・非感染に拘らず様々なストレスに対して急性自然免疫反応を仲介することを証明した。したがって、本研究によって、GBPが昆虫における様々なストレス因子誘導性のAMP発現を制御する強力なサイトカインであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial peptides (AMPs), major innate immune effectors, are induced to protect hosts against invading microorganisms. AMPs are also induced under non-infectious stress; however, the signaling pathways of non-infectious stress-induced AMP expression are yet unclear. We demonstrated that GBP overexpression in *Drosophila* elevated expression of AMPs. GBP-induced AMP expression did not require Toll and immune deficiency (*Imd*) pathway-related genes, but *imd* and *basket* were essential, indicating that GBP signaling in *Drosophila* did not use the orthodox Toll or *Imd* pathway but used the JNK pathway after association with the adaptor protein *Imd*. The enhancement of AMP expression by non-infectious physical or environmental stressors was apparent in controls but not in GBP-knockdown larvae. These results indicate that the *Drosophila* GBP signaling pathway mediates acute innate immune reactions under various stresses, regardless of whether they are infectious or non-infectious.

研究分野：昆虫生理・分子生物学

キーワード：昆虫 サイトカイン Growth blocking peptide ストレス 自然免疫 体液性免疫 細胞性免疫

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む全ての生物の免疫活性は、様々なストレスによって変動する。直接的に免疫系へ作用する病原菌感染性のストレスのみならず、感染非依存的なストレスも免疫活性への影響は大きく、様々な疾患にも関係する重要な問題である。哺乳類の免疫系へのストレス作用として、例えば、グルココルチコイド(抗ストレスホルモン)過剰分泌による胸腺の萎縮、あるいは、リンパ球やマクロファージの衰弱・活性低下が知られている。また、ストレス状況下でのアドレナリン分泌がNK細胞などのリンパ球の活性を抑制することも報告されている(1)。こうした感染非依存的なストレス依存的な免疫担当組織・細胞の量的変動や活性低下といった現象論的報告は多数あるものの、その自然免疫活性化経路に対する分子・遺伝子レベルでの影響に関する解析例は極めて限られている(2)。況して、ストレス依存的な自然免疫活性化に関する遺伝子レベルでの研究例は皆無に近い。したがって、獲得免疫系を持たない昆虫は、こうしたストレスによる自然免疫活性への影響を解析する上で絶好の対象と言える。さらに、これまでの哺乳類を中心に進められてきた研究により、ストレス影響下の生体内情報伝達因子としてのサイトカイン分子種の重要性は明らかにされて来たが、昆虫においても、ストレスと密接に関係するサイトカインが漸く同定されるに至った。したがって、昆虫を対象に様々なストレスによる自然免疫活性変動の調節メカニズムを研究する為の下地は十分に整ったと言える。

- (1) Lotzová E. (1991) *Cancer Invest.* 9, 173-184.
- (2) Tournier J.-N., Mathieu J., Mailfert Y., Multon E., Drouet C., Jouan A., Drouet E. (2001) *Immunology*, 102, 87-93

2. 研究の目的

Growth blocking peptide (GBP)は、寄生蜂による寄生によってその発育が遅延したアワヨトウ蛾幼虫から発育阻害因子として発見されたペプチドである(1)。その後の研究によって、免疫活性調節を含む多機能性を有する昆虫特有のサイトカインであることが明らかになった。さらに、最近の予備実験の結果は、このGBPが病原菌の感染や非感染を問わず様々なストレスによって変動する自然免疫活性の調節に関与している可能性が高いことを示唆している。病原菌の侵入による自然免疫活性化機構に関してはショウジョウバエに関する膨大な報告がある。例えば、グラム陽性菌やカビの侵入によってToll経路が活性化しDrosomycinなどの抗菌ペプチドが産生され、グラム陰性菌の感染によってImd経路が活性化するとDiptericinなどの抗菌ペプチドが産生されることが知られてい

る。しかし、細菌や異物侵入を伴わないストレスによる自然免疫活性調節機構は未だに未解明な系であり、上記のTollあるいはImd経路が関与しているか否かについても全く分かっていない。本研究では、GBPに焦点を当てて異物侵入非依存的な自然免疫活性調節機構を解明する。具体的には、先ず、非感染ストレス下でのGBP自体の活性化機構を明らかにし、さらに、ストレス依存的なGBPによる抗菌ペプチド遺伝子発現(自然免疫活性)調節を担う細胞内情報伝達経路を明確に実証する。

- (1) Hayakawa Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 256, 10813-10816.

3. 研究の方法

本研究は主に以下のA-Cの3項目の小課題について研究を遂行した。

(A) ショウジョウバエGBPの同定

前述のように、キロショウジョウバエの免疫系研究は、Toll受容体の発見以来、哺乳類を含む自然免疫研究全体の進展を牽引してきた。ただ、同じ昆虫と言えども、ショウジョウバエ以外の昆虫における自然免疫活性調節に関する研究知見は十分とは言えず、したがって、本研究はショウジョウバエを主要研究材料に据える必要があった。その為、先ず、これまで、鱗翅目昆虫種からしか報告されていなかったGBPのショウジョウバエオースログ(あるいはホモログ)の同定を目指した。鱗翅目昆虫GBP遺伝子の構造情報を基に、ショウジョウバエオースログ遺伝子の同定を試みたが、残念ながら目的の遺伝子を見出すことはできなかった。そこで、生理機能的類似ペプチドの同定を目指し、生化学的実験に切り替えることにした。精製実験に供する実験材料ゆえに、サイズ、さらに、血球の扱い易さを考慮して同じ双翅目でもショウジョウバエより遥かに大型のヒツジギンバエを用いることにした。その上で、ギンバエGBPと相同なはずのショウジョウバエGBPの同定を目指した。

(B) ストレスによるGBP活性化機構の解析

GBPは前駆体precursor GBP (proGBP)として主に脂肪体で合成され体液中に分泌される。非ストレス条件下の昆虫幼虫体内では、比較的高濃度のproGBPが体液中に存在していることは確認できている。従って、本研究では、ストレスによってproGBPからGBPへの活性化分子機構を解析する。こうした解析には、主に生化学的手法を用いることになる為、比較的少量の体液が必要となる。従って、実験材料は主にアワヨトウ幼虫を用い、最終的にそうした解析結果をショウジョウバエ幼虫の系に還元する事とする。

(C) ショウジョウバエ幼虫におけるストレス依存的な自然免疫活性化機構の解析

上述の小課題(A)で同定されたショウジョウバエGBP遺伝子関連のトランスジェニック体

を作成し、*UAS/Gal4*システムを用いて GBP の強制発現、発現抑制システムを構築する。その上で、GBP 遺伝子の発現操作による抗菌ペプチド遺伝子発現レベルへの影響を評価する。予備実験の結果は、GBP 遺伝子の強制発現によって複数の抗菌ペプチド遺伝子の発現上昇を示した。従って、この結果の再現性を確認した上で、GBP による抗菌ペプチド遺伝子発現誘導に至る細胞内情報伝達経路の同定を目指す。

4. 研究成果

上記の3つの小課題について、それぞれ研究成果を以下に詳述する。

(A) ショウジョウバエ GBP の同定

先ず、ヒツジギンバエ幼虫体液から、鱗翅目昆虫 GBP の機能的類似ペプチドの同定を試みた。精製過程では、単離した血球への活性化（突起伸張誘導）を活性指標とした。最終濃度 50%のアセトニトリルによって抽出した画分を4段階の逆相系 HPLC によって最終的に目的のペプチド精製に成功した。ヒツジギンバエ GBP 様ペプチドはアミノ酸 19 残基からなり、分子内に鱗翅目昆虫 GBP 同様 2 残基のシステイン残基し、さらに 2 残基のアミノ酸も同位置に保存されていた。また、その cDNA を単離し、構造決定したところ、やはり鱗翅目昆虫 GBP 同様に短い前駆体として合成され、活性型 GBP はカルボキシル末端にコードされている事が明らかになった。こうした鱗翅目昆虫 GBP との生理活性さらに構造上の共通性から、当該ペプチドはヒツジギンバエ GBP であると結論した。

次に、ヒツジギンバエ GBP のアミノ酸配列を基にキイロショウジョウバエゲノム上に類似遺伝子を探索した結果、全部で5種類の遺伝子が見つかった。これらの候補遺伝子について、ショウジョウバエ幼虫体内での発現パターン、活性型ペプチド分子内のアミノ酸配列、さらには、活性化の際のプロセッシング部位のアミノ酸配列情報を踏まえ、最終的に *CG15917* 遺伝子が、鱗翅目昆虫 GBP に類似のキイロショウジョウバエ GBP ホモログと結論した。

(B) ストレスによる GBP 活性化機構の解析

非ストレス条件下のアワヨトウ幼虫体液中には比較的高濃度の proGBP が存在する。これがストレスによって GBP へ活性化されるかを確かめる為、熱ストレス (40°C, 0-30 分) を幼虫体液について Western blotting を行った。その結果、熱ストレス 20 分以降の体液中には活性型 GBP が産生することが分かった。即ち、非ストレス条件下において、proGBP processing enzyme は不活性型で存在し、ストレスによって活性化して proGBP を GBP へと活性化するものと解釈できる。この予想を確認する為、非ストレス条件下のアワヨトウ幼虫から調製した血清あるいは血球を proGBP とそれぞれ混合し、25°C で 10-60 分間で反応を試みた。しかし、こうした条件

では一向に proGBP から GBP への活性化は観察されなかった。そこで、血清と血球を混合した後に proGBP と反応させたところ、10 分以内に GBP への活性化が進行することが分かった。また、反応液中に予めセリン型プロテアーゼ阻害剤を添加した場合、血清と血球を同時に反応させてもプロセッシングは観察されないことも確認した。これらの実験結果は、血球由来の成分中に血清中のセリン型プロテアーゼである不活性型 processing enzyme を活性化する因子が含まれることを示唆していた。この解釈を検証する為、血球由来活性化因子の性質とその分泌動態を調べたところ、当該活性化因子は分子量 20kDa 程度のタンパク質であり、血球への過酸化水素の作用によって分泌されることが明らかになった。即ち、種々のストレスによって発生する活性酸素が血球からの活性化因子の分泌を促し、これが不活性型で存在する血清中のセリンプロテアーゼを活性化するものと解釈できる。現在、血球由来の活性化因子の単離・精製が完了し、その一次構造決定を目指している。

(C) ショウジョウバエ幼虫におけるストレス依存的自然免疫活性化機構の解析

ショウジョウバエ GBP 様遺伝子 *CG15917* の *UAS* 系統 (*UAS-GBP*)、さらに、2本鎖 RNA 発現用の *UAS* 系統 (*UAS-dsGBP*) を作成した。これらをそれぞれ *heat shock-Gal4* 系統バエと交配させ、温度依存的な GBP 強制発現と発現抑制トランスジェニック体を構築した。実験の結果、GBP 強制発現によって2種類の抗菌ペプチド遺伝子 (*Metchnikowin* と *Diptericin*) の発現上昇、また、RNAi による GBP 発現抑制によって病原菌感染に伴う両抗菌ペプチド遺伝子発現の阻害が明らかになった。さらに、RNAi-GBP 発現抑制システムでは、熱ストレスあるいは感染を伴わない傷害による抗菌ペプチド遺伝子 (*Metchnikowin* と *Diptericin*) の発現上昇を顕著に阻害することも実証した。即ち、GBP は体液性自然免疫活性の指標と言える抗菌ペプチド遺伝子発現を感染・非感染を問わず調節する昆虫サイトカインであることを証明した。

次に、GBP による抗菌ペプチド遺伝子発現調節に関与する細胞内情報伝達経路について解析した結果、GBP は Imd をアダプターとして利用するものの従来知られた Imd 経路とは異なる新規の情報伝達経路を活性化することが判明した。この経路は JNK も必須とすることから GBP-GBPR/Imd-JNK を介するストレス応答性情報伝達経路であることが明確になった。以上の一連の研究結果より、キイロショウジョウバエの自然免疫活性化には、従来より知られる Toll や Imd 経路の他に、昆虫サイトカイン GBP が引き金を引くストレス情報伝達経路 (GBP 経路) が存在することを実証した。

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 12 件)

- 1) Tsuzuki, S., Matsumoto, H., Furihata, S., Ryuda, M., Tanaka, H., Sung, E.-J., Bird, G.S., Zhou, Y., Shears, S.B., and Hayakawa, Y., 2014, Switching between humoral and cellular immune responses in *Drosophila* is guided by the cytokine GBP. *Nature Communications*, 5, 4628. (査読有り)
- 2) Khaeso, K., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., and Tojo, S. 2014, Stimulation of Vitellogenin gene expression by permethrin in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Delphacidae). *J. Pesticide Sci.*, 39, 98-104. (査読有り)
- 3) Matsumoto, H., Nomura, S., Hayakawa, Y., 2014, Changes of RNA virus infection rates and gut microbiota in young worker *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) of the chalkbrood-infected colony after a pollination task in a greenhouse. *Applied Entomology and Zoology*, 49, 395-402. (査読有り)
- 4) Kiyotake, H., Matsumoto, H., Nakayama, S., Sakai, M., Miyatake, T., Ryuda, M., Hayakawa, Y., 2014, Gain of long tonic immobility behavioral trait causes the red flour beetle to reduce anti-stress capacity. *J. Insect Physiol.*, 60, 92-97. (査読有り)
- 5) Furihata, S., Tanaka, K., Ryuda, M., Ochiai, M., Matsumoto, H., Csikos, G. and Hayakawa, Y., 2014, Immuno-evasive protein (IEP)-containing surface layer covering polydnavirus particles is essential for viral infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 115, 26-32. (査読有り)
- 6) Furihata, S.X., Matsumoto, H., Kimura, M.T., Hayakawa, Y., 2013, Venom components of *Asobara japonica* impair cellular immune responses of host *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 83, 86-100. (査読有り)
- 7) Zhou, Y., Wu, S., Wang, H., Hayakawa, Y., Bird, G.S., and Shears, S.B., 2012, Activation of PLC by an endogenous cytokine (GBP) in *Drosophila* S3 cells and its application as a model for studying inositol phosphate signalling through ITPK1. *Biochem. J.*, 448, 273-283. (査読有り)
- 8) Matsumoto, H., Tsuzuki, S., Date-Ito, A., Ohnishi, A., and Hayakawa, Y., 2012, Characteristics common to a cytokine family spanning five orders of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42, 446-454. (査読有り)
- 9) Yamaguchi, K., Nomura, S., Matsumoto, H., Tsuzuki, S., and Hayakawa, Y., 2012, A stress-responsive cytokine-like gene regulates insect larval growth. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42, 183-192. (査読有り)
- 10) Tsuzuki, S., Ochiai, M., Matsumoto, H., Kurata, S., Ohnishi, A. and Hayakawa, Y., 2012, *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Scientific Reports*, 2, 210. (査読有り)
- 11) Kawano, T., Matsumoto, H., Nakano, F., Maekawa, E., Kanuka, H., Tsuzuki, S., and Hayakawa, Y., 2011, Cells expressing *Desiccate* are essential for morphogenesis of labial sensilla in *Drosophila melanogaster* adults. *Entomol. Sci.*, 14, 183-191. (査読有り)
- 12) Ryuda, M., Tsuzuki, S., Matsumoto, H., Oda, Y., Tanimura, T., and Hayakawa, Y., 2011, Identification of a novel gene, *Anorexia* regulating feeding activity via insulin signaling in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 286, 38417-38426. (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

- 1) 日本昆虫学会第74回大会 (広島大) 2014年9月15日 降幡駿介・平田真紀子・早川洋一「共生細菌 *Wolbachia* は寄生蜂の若い時期の寄生行動を促進する」
- 2) 日本応用動物昆虫学会第57回大会 (高知大) 2014年3月28日, 砂山貴志, 内川雄貴, 落合正則, 早川洋一「宿主アワヨトウ幼虫からのカリヤコマユバチ脱出誘導因子の発見」
- 3) 日本動物学会第84回大会 (岡山大) 2013年9月28日, 嬉正勝, 早川洋一「フタホシコオロギ雄の性的不能期におけるTAGの5-HT量変化」
- 4) 日本応用動物昆虫学会第56回大会 (近畿大) 2012年3月28日, 早川洋一「昆虫自然免疫活性調節の新しい情報伝達経路」
- 5) 日本応用動物昆虫学会第56回大会 (近畿大) 2012年3月28日, 中野史洋, 早川洋一「ハスモンヨトウの幼虫発育速度に及ぼすサイトカインの影響評価」

[図書](計 1 件)

- 1) Yoichi Hayakawa, 2015, "Growth blocking peptide" in *Handbook of Hormones*, Elsevier, in press

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：ストレス耐性付与組成物、ストレス耐性付与方法、ストレス耐性体内増殖法、及びストレス評価法

発明者：早川洋一

権利者：国立大学法人佐賀大学

種類：

番号：特願 2015-059490

出願年月日：2015年3月23日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://extwww.cc.saga-u.ac.jp/~hayakayo/FRAME/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA, Yoichi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50164926

(2) 連携研究者

相沢 智康 (AIZAWA, Tomoyasu)

北海道大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40333596

(3) 研究協力者

松本 均 (MATSUMOTO, Hitoshi)

佐賀大学・農学部・非常勤研究員

降幡 駿介 (FURIHATA, Shunsuke)

鹿児島大学連合大学院・農学研究科・院生