

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14901

研究課題名(和文) 免疫記憶に関わる昆虫宿主因子の探索・同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of factors involved in acquired immunity system in silkworm

研究代表者

田中 博光 (TANAKA, Hiromitsu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域・ユニット長

研究者番号：30391577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の免疫機構には、一度侵入・感染した病原体に対する免疫記憶はないとされる。しかし我々は最近、昆虫にも記憶を伴った免疫機構があることを示唆する知見を得た。本研究ではカイコを用い、免疫記憶に関わる昆虫側の因子の解析を行った。候補因子としてダウン症細胞接着性因子(Dscam)に着目し、in silicoクローニングし、第4エキソンが15種類、第6エキソンが23種類あることを見いだした。さらに、カイコで発現するこれらエキソンの発現パターンが接種する細菌の種類によって異なる傾向にあることが示された。また、大腸菌接種によるカイコ幼虫のメラニン化の度合いは、大腸菌の一次接種で低下することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Insects are believed to lack an acquired immune reaction with immunological memory. However, recently we have obtained the data that support the hypothesis that insects also possess an acquired immune reaction with immunological memory. In this study, we analyzed the factors involved in acquired immunity system in silkworm. First, we performed in silico cloning of Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) genes, and found that this gene has 15, and 23 variable isoforms in 4th and 6th exons, respectively. Furthermore, we indicated that expression patterns of these isoforms might be dependent on the kinds of injected bacteria. We further indicated that degree of melanization was decreased by pre-injection of bacteria.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：昆虫病理

1. 研究開始当初の背景

昆虫は全動物種の約 70%を占め、地球上でもっとも繁栄した生物種の一つであるといえる。その繁栄の理由の一つとして卓越した生体防御機構を発達させたことが考えられる。一般に昆虫を始めとする無脊椎動物は、哺乳類にみられるような多様性に富む抗体産生及びリンパ球受容体の形成と記憶を伴う獲得免疫機構を持たず、侵入した異物に対し非特異的かつ迅速に行われる自然免疫機構のみを有していると考えられている。我々を含めたこれまでの多くの研究成果の蓄積により、昆虫には異物特異的な免疫記憶はないとするのが常識的な概念となっていた。しかし最近、昆虫や他の無脊椎動物も免疫記憶を有するという報告がなされ始めている。我々も最近、カイコ幼虫を用いて、3 齢期に大腸菌を接種させたものは、させなかったものと比較し、5 齢期に大腸菌を再接種させた後の体内での大腸菌数がより迅速に減少することを見いだした。液性免疫能については両者で差がなかったこと、再接種させる直前において体内に残存する菌が確認されなかったことから、昆虫にも以前感染・侵入した細菌を記憶し、同じ細菌が再度侵入した場合、より迅速に排除できる細胞性免疫機構があることが示唆された。

2. 研究の目的

昆虫の記憶を伴った細胞性免疫機構を解明するためにカイコを用い、細菌の再接種による細胞性免疫能の向上に寄与するカイコ側の因子を明らかにする。そのためまず、選択性スプライシングによって1万種類以上もの翻訳産物を潜在的に形成しうることが知られ、昆虫種で保存されておりかつ、異物を認識するレセプターとしての機能があることが知られているダウン症細胞接着性因子(Dscam)に着目し、免疫記憶のキー因子として作用するかを発現解析及び機能解析によって明らかにする。また、細菌感染によって引き起こされる体液のメラニン化も、細菌の一次接種の有無によってその度合いが影響されるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) カイコ

カイコ (p50あるいは東海×朝日) は、

25 (11時間明、13時間暗) で人工飼料 (日本農産工業) を与えて飼育した。

(2) ダウン症細胞接着性因子(Dscam) 遺伝子の in silico クローニング

KAIKO base

(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) を用い、既に配列が報告しているキイロシヨウジョウバエの Dscam 遺伝子をクエリーとして、カイコの Dscam 遺伝子の抽出を行った。

(3) Dscam 遺伝子エキソンの発現パターン解析

4 齢カイコに大腸菌 (死菌) 黄色ブドウ球菌 (死菌) を注射 (いずれも 5×10^2 cells/larva) し、24 時間後に体液を回収した。遠心により血球を沈殿させて回収したのち、この血球から全 RNA を抽出した。cDNA を合成後、PCR によって第4あるいは第6エキソン領域を含む領域を増幅し、クローニングベクターにサブクローニング、大腸菌への形質転換を行った。その後寒天培地上の大腸菌コロニーの一部をかきとり、ダイレクトシーケンスにより、配列を確認した。

(4) Dscam エキシソンの qRT-PCR 発現パターン解析

上記(3)の通り、cDNA を調製後、第4エキソンのアイソフォームをそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いて、定量 RT-PCR 解析を行った。

(5) メラニン化度合いの定量

カイコ3 齢幼虫に大腸菌 (5×10^2 cells/larva) を経皮接種後、5 齢幼虫まで飼育し、5 齢2 日目に大腸菌 (1×10^6 cells/larva) を再接種した。接種して1 時間後に体液を回収し、室温に1.5 時間放置後、PBS 緩衝液で10 倍に希釈したものを、470nm の波長で吸光度を測定した。対照区として、一次接種せず5 齢時に大腸菌を接種したカイコを用いた。

4. 研究成果

(1) ダウン症細胞接着性因子(Dscam) 遺伝子の in silico クローニング

KAIKO base を用い、既に配列が報告しているキイロシヨウジョウバエの Dscam 遺伝子をクエリーとして、カイコの Dscam 遺伝子を抽出した。カイコ Dscam 遺伝子はエキソンが37 個存在すること、そのうち第4エキソンが

15種類、第6エキソンが23種類、第9エキソンが19種類、第31エキソンが2種類あることが示唆された。

(2) Dscam 遺伝子の第4エキソンの発現パターン解析

4齢幼虫カイコに大腸菌あるいは黄色ブドウ球菌を接種し、24時間後に血球を回収して、Dscam 遺伝子の第4エキソンの発現パターンを解析した。その結果、無処理カイコの発現パターンは大腸菌や黄色ブドウ球菌を接種したカイコの発現パターンとは異なる傾向があること、大腸菌接種カイコと黄色ブドウ球菌カイコ間でも発現パターンが異なる傾向にあることが示された。

これらの発現パターンをさらに正確に調べるため、定量RT-PCR解析を行ったところ、エキソンバリエーションごとによって発現量が大きく異なることが示された。しかしながら、細菌処理カイコ、ペプチドグリカン処理カイコ、無処理カイコ、生理食塩水処理カイコ間で発現量が大きく異なるエキソンバリエーションは見出されなかった。

(3) Dscam 遺伝子の第6エキソンの発現パターン解析

Dscam 遺伝子の第6エキソンに着目し、このエキソンのクローニングを進めたところ、少なくとも27種類あることを見いだした。

4齢幼虫カイコに大腸菌あるいは黄色ブドウ球菌を接種し、24時間後に血球を回収して、Dscam 遺伝子の第6エキソンの発現パターンを解析した結果、無処理カイコの発現パターンは大腸菌や黄色ブドウ球菌を接種したカイコの発現パターンとは異なる傾向があること、大腸菌接種カイコと黄色ブドウ球菌接種カイコ間でも発現パターンが異なる傾向にあることが示された。しかしながら、大腸菌あるいは黄色ブドウ球菌接種カイコいずれにおいても特定のエキソンバリエーションのみが特異的に発現しているわけではないことが示唆された。さらに、第6エキソンを含まないバリエーションも見いだされ、細菌処理をしたカイコでより多く発現している傾向にあることが分かった(表1)。

	無処理	生理食塩水	E. c.	S. a.
Exon6.1		3		1
Exon6.2	1	1		1
Exon6.3	2		4	2
Exon6.4		2		
Exon6.5		2	1	
Exon6.6			1	
Exon6.7			1	
Exon6.8	3			1
Exon6.9	2			
Exon6.10		2	2	1
Exon6.11				
Exon6.12	1			1
Exon6.13		1	1	1
Exon6.14			1	
Exon6.15				1
Exon6.16			2	1
Exon6.17			1	1
Exon6.18		1		
Exon6.19				
Exon6.20		1	1	
Exon6.21	1			
Exon6.22	2	1	1	
Exon6.23	1		1	1
Exon6.24				2
Exon6.25				
Exon6.26	4			
Exon6.27		1		
Exon6 less	3	1	5	4

表1 大腸菌(E.c.)、黄色ブドウ球菌(S.a.)、あるいは生理食塩水のみを接種した場合のDscam 遺伝子第6エキソンバリエーションの発現パターン

(4) メラニン化の解析

3齢幼虫に大腸菌を接種(一次接種)した後、5齢4日まで飼育し再度大腸菌を接種して体液を回収し、血球を除去した後の体液中のメラニン化の度合いを測定し、一次接種をしない対照区と比較した結果、一次接種した実験区は対照区よりメラニン化の度合いが低いことが示された(図1)。

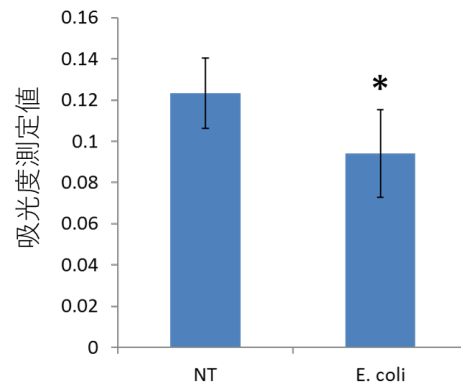


図1 5齢幼虫に大腸菌を接種した場合のメラニン化の度合い
NT:一次接種をしなかった場合。
E. coli: 3齢時に大腸菌を接種した場合。
両者で有意差あり (p<0.05)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

田中 博光、核多角体病ウイルスや細菌に対するカイコの応答性防御機構、第24回病害動物の生理分子生物談話会 2016.4.15 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 博光 (TANAKA, Hiromitsu)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門、昆虫制御研究領域・ユニット長
研究者番号：30391577