

令和元年6月26日現在

機関番号：14601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K01018
 研究課題名(和文) 生体防御システムを含むカイコ実験教材の体系化

研究課題名(英文) Innate immune responses in the silkworm

研究代表者

森本 弘一 (MORIMOTO, Koichi)

奈良教育大学・理科教育講座・教授

研究者番号：70243350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の免疫系は主として2種類に大別でき、細胞性と液性応答がある。実際に、これら応答反応についてカイコ幼虫を低温麻酔した後、種々の接種源を注射して調べた。細胞性防御応答として、墨汁の注射後3時間目には血球の食作用活性が観察され、1日後では血球に墨炭素粒子の蓄積が認められた。液性応答である化学的防御についても、煮沸処理した大腸菌または大腸菌由来のリポ多糖(LPS)を注射した幼虫を用いて調べた。寒天平板カップ法で体液の抗菌活性を調べると、注射後6-24時間目では安定的に抗菌活性が検出された。本研究結果から、昆虫の免疫応答は有益な教材として高校で受け入れられるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコ卵や幼虫はインターネットを通じて購入でき、人工飼料でも飼育できるため、周年に亘り飼育できる。また、カイコ5齢幼虫は大きいので(体長7cm位)、取り扱いが容易である。また、1頭から400μL体液が採取できるので、数名の生徒で共有して、実験を進めることができ、免疫実験の昆虫として都合がよい。本研究を基に、細胞性防御応答である食作用の観察と液性の化学的防御応答である抗菌タンパク質の検出を統合した実験を提案した。

研究成果の概要(英文)：Insect immune system is divided into two major reaction types, cellular and humoral immune responses.

Actual protective responses were shown in the silkworm larvae, *Bombyx mori*, which had been anaesthetized on a frozen thermal gel and subsequently injected with various inocula. As a cellular response, phagocytic activity of hemocytes was observed 3 hr after injection of India ink, followed by accumulation of the ink carbon particles in hemocytes for successive 1 day. Chemical protection induced by humoral immune response was also examined, using larvae injected with heat-killed bacteria and bacterial lipo-polysaccharide (LPS). Antibacterial activities in hemolymph were detected constantly 6-24 hr after injection, which were assayed by the agar cup-plate method. Based on the present study, the topic of insect immune responses is thought to be accepted as a useful teaching material in high school.

研究分野：生物教育

キーワード：免疫 カイコ 高等学校

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで教員養成の理科教育カリキュラムの一環として、カイコを取り上げてきた経験がある。例えば、カイコ飼育とメンデル遺伝の教材である。さらに、カイコを用いた新しい教材開発に取り組んできた(科研基盤 C 採択研究、2013-2015 年度)。例えば、カイコ消化液を用いた酵素教材、カイコ DNA の抽出・分離と手動ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による雌雄判別教材などである。加えて、本申請の研究から得られると思われるカイコ生体防御システムの教材化が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究は、生体防御システム教材を含んだ初等・中等教育に有用なカイコ実験教材の体系化を目指すものである。Part I 研究では、カイコを用いて生体防御システムの基礎を体得できる教材を開発する。高校生物では、ヒトでの免疫機能が学習対象となっており、そのバックグラウンドが理解できる具体的な実験教材の提案を目的とする。Part II 研究では、カイコを用いた小・中・高校別の実験教材メニューを体系的にまとめ、教育現場への応用を考察する。これまで申請者はカイコを用いた教材開発を推進してきた。これら成果に加え、Part I での成果と新しいカイコ研究の知見を組み入れた学年別の実験プログラムを立案し、学習指導要領に対応した新しい生物教材の提案を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌の調製

大腸菌 (*Escherichia coli* JM 109) (タカラバイオ) は、市販 LB 培地「ダイゴ」(和光純薬) で振盪培養 (37°C, 1 日~2 日) して増殖した。

(2) カイコの飼育

カイコ卵 (*Bombyx mori* ‘錦秋’ x ‘鐘和’ の交雑種) (愛媛蚕種) を孵化させ、クワ葉を与えて恒温器 (25~28°C) で飼育した。3 齢幼虫までは、スチロール製容器 (22 x 15.5 cm, 高さ 4 cm) の底にプラスチック網 (網目 0.8 cm) を敷き、その上で飼育した。4 齢幼虫以降は、スチロール製容器 (27.5 x 20 cm, 高さ 6 cm), プラスチック網 (網目 1.2 cm) を用いて飼育した。飼育密度は 20~30 頭/容器とし、朝晩 2 回給桑し、毎日糞を取り除いた。

(3) カイコ幼虫体への接種

「注射液・接種液の調製」

免疫応答を誘導するものとして、墨汁、ポリスチレンビーズ (平均直径 3 μm) (Latex beads, Polystyrene LB30, Sigma-Aldrich), 煮沸処理した大腸菌 (死菌), 大腸菌由来のリポ多糖 (LPS) (Sigma-Aldrich) を用いた。墨汁の調製は、硯に 0.8% NaCl 液を加え、墨を磨った。得られた墨汁の 500 倍希釈液を分光光度計で測定し、A600=0.2~1.0 の墨汁を注射液とした。ポリスチレンビーズ液を 0.8% NaCl で希釈し、5 mg/mL 濃度の懸濁液を調製した。死菌の調製は、増殖した大腸菌を数回 0.8% NaCl で遠心洗浄 (8,000 x g, 5 分間) した後、10 分間煮沸したものを接種源とした。LPS は、0.05 μg/μL になるように 0.8% NaCl で溶かしたものを使用した。

(4) 体液の採取と顕微鏡観察、体液の熱処理

幼虫の腹部が外側に配置されるように、頭部と尾部末端を親指と人差し指の腹ではさみ、腹脚の根元を鉋で部分的に切断した。切断部位から流出する体液をマイクロチューブに直接採取した。体液は短時間の内に褐変するので、予めマイクロチューブに 1-phenyl-2-thiourea 粉体 (片山化学) を 5 μg 入れて置き、採取した体液と混合した。細胞性防御応答である血球の食作用を調べるために、この混合体液をスライドグラスに載せ、検鏡した。観察した血球細胞数は 150 個以上であり、(墨炭素粒子またはポリスチレンビーズを取り込んだ血球細胞数) を (観察した全血球細胞数) で除して、取り込み細胞率を算出した。一方、液性の化学的防御応答を調べるため、この混合体液を 80°C 熱水で 4 分間処理したのち、遠心分離 (8,000 x g, 8 分間) した。その上清を体液サンプルとして回収し、実験に供するまで -20°C で保存した。

(5) 体液のプロテアーゼ処理

LPS 接種体液に等量の 20 mg/mL プロテアーゼ (Proteinase from *Aspergillus melleus*, Type XXIII) (Sigma-Aldrich) を加えたのち、37°C で 30 分間保温した。プロテアーゼを失活させるために、80°C, 15 分間保温したのち、遠心分離 (8,000 x g, 8 分間) した。この上清 30 μL の抗菌活性を調べた。

(6) 寒天平板カップ法による抗菌活性の検定

二層寒天平板カップ法を用いて、大腸菌 (*E. coli* JM 109) に対する抗菌活性を調べた。内径 9 cm プラスチックペトリ皿に 1.5% アガロース LB 培地, 17 mL を分注した。ゲルが固化した後に、直径 5.5 mm, 高さ 8.0 mm のステンレス製の円柱を置き、大腸菌 (10⁵ 細胞/mL) を含む 0.7% アガロース LB 培地, 11 mL を均一に流し込んだ。固化後、円柱を取り除き、円形カップを形成した。

一方、0.25% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (和光純薬) を含む 0.8% NaCl 液で 2 倍希釈した体液希釈液を調製し、カップ当たり 20 μL または 30 μL を注いだ。このようにセットした検定用ペトリ皿を湿室容器に収納し、37°C で一昼夜保温した後、カップ周辺に形成された阻止円の直径を測定し、抗菌活性を評価した。なお、熱融解した高温寒天ゲルによる大腸菌の死滅が懸念されたので、寒天の代わりに低温融解性のアガロース S (ゲル化温度: 37-39°C,

和光純薬) を使用した。

(7) 電気泳動による抗菌タンパク質の分離

「未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE)」

15%ポリアクリルアミドゲルで体液サンプルを分離した。分離用ゲル (pH 3.8) は, Gabriel (1971) の方法に準じて作製した。濃縮ゲル層を設けることなく, 体液サンプルを直接分離用ゲルのウェルに入れた (Hultmar ら 1980)。抗菌タンパク質の対照試薬として, cecropin A (フナコシ) を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞性防御応答—食作用の観察

墨汁を注射後3時間目および1日目に採血し, 血球細胞を観察した。3時間目において, 既に墨粒子が細胞内に取り込まれていた。その取り込み細胞率は47~62%であった。さらに, 1日後では, 細胞内への墨粒子の蓄積が確認され, 細胞全体が黒色化していた。また, ポリスチレンビーズを注射した後, 1日目に血球細胞を観察した。その結果, 51~65%の細胞が細胞内に1~7個のビーズを取り込んでいた異物の取り込み過程や細胞内存在を調べるために, 注射液として蛍光 pH インジケーターを用いて蛍光顕微鏡で観察する方法, 墨粒子を取り込んだ血球をパラフィン包埋後, 切片作成し染色する方法が報告されている。本研究で用いたポリスチレンビーズは光学顕微鏡下で容易に識別できるので, 細胞内取り込み過程—細胞膜へのビーズ接着→ビーズの細胞内への取り込み→ビーズの細胞内移動—を容易に追跡できると考えられる。

(2) 体液での化学的防御

—抗菌活性の検定と抗菌物質の検出—

「体液の抗菌活性」

熱処理した死菌 (108 細胞/mL) をカイコ幼虫に接種し, 24 時間後に採取した体液を用いて抗菌活性を調べた。供試した6個体の全ての体液に抗菌活性が検出され, その阻止円直径が11~15 mmであった。また, 大腸菌 LPS を接種した全個体の体液からも, 直径12.5~13 mmの阻止円が検出された。

「抗菌活性の経時的变化」

LPS 接種後2時間, 4時間, 6時間目の体液を採取し, 各体液の抗菌活性を調べた。その結果, 2時間および4時間目では, 個体間差異があり, すべての個体で抗菌活性が誘導されず, 誘導率が低かった。しかし, 6時間目になると全個体で抗菌活性が検出された。それ以降の抗菌活性を調べるために, 接種後6時間, 12時間, 18時間, 24時間目に体液を採取し, その抗菌活性を調べた。6時間目以降になると安定的に全個体で抗菌活性が検出され, 阻止円直径に有意差がなかった。

「プロテアーゼ処理した体液の抗菌活性」

上述したように死細菌およびLPSを接種した個体の熱処理体液中に抗菌物質が存在することが明らかになった。その物質の性質を調べるために, LPS 接種体液をプロテアーゼで処理した。その結果, 抗菌活性が消失したことから, その本体は耐熱性抗菌タンパク質であることが明らかになった。

(3) 電気泳動による抗菌タンパク質の分離

無接種, 熱処理死菌接種, LPS 接種した個体の体液タンパク質を電気泳動したのち, その泳動ゲルをタンパク質 (CBB) 染色したが, それらの染色バンドパターンには, 大きな差異はなかった。また, cecropin A 1 μg を同時に泳動したとき, バンドは検出できなかったが, 120 $\mu\text{g}/\text{well}$ の注入では, 単一バンドが明確に検出された。cecropin バンド位置に, 体液タンパク質のバンドは出現しなかった。すなわち, 抗菌タンパク質の合成量が量的に少なく, CBB 染色では接種特異的バンドを検出することができなかった。そこで, 同一条件下で体液サンプルを泳動したゲルに, 大腸菌を含むアガロースプレートを重ねる抗菌プレートアッセイをした。その結果, CBB 染色で検出できなかった cecropin A 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ に透明の抗菌バンドが現れた。死菌接種の体液およびLPS接種体液にも, cecropin A の抗菌バンド位置に幅のある抗菌バンドが検出された。このことは, 接種によって誘導合成された抗菌タンパク質の量は, CBB 染色の検出限界以下の量であったが, 抗菌プレートアッセイの結果から, 体液中に cecropin A を含む種々の抗菌タンパク質が誘導合成されていることが明らかになった。

(4) 授業実践への情報

カイコ卵や幼虫はインターネットを通じて購入でき, 人工飼料でも飼育できるため, 周年に亘り飼育できる。また, カイコ5齢幼虫は大きいので (体長7 cm位), 取り扱いが容易である。また, 1頭から300~400 μL 体液が採取できるので, 数名の生徒で共有して, 実験を進めることができ, 免疫実験の昆虫として都合がよい。

本研究を基に, 細胞性防御応答である食作用の観察と液性の化学的防御応答である抗菌タンパク質の検出を統合した実験日程案を図10に示す。墨汁, ポリスチレンビーズ, 死菌, LPSの注射は実験の前日に行い, 2つの応答反応を4日間で調べることができるが, 授業の時間配分に応じて, 食作用とカップ法による抗菌活性に限定すると2日間で終了できる。

電気泳動によるDNAの分離は, 高校教科書に掲載されているが, タンパク質を分離する教材は見当たらない。酵素類や生理活性タンパク質などの分離には, ポリアクリルアミドゲル電気泳動は有力な分離手法であり, バイオテクノロジー分野で広く利用されており, 高校現場でも

取り入れられる手法と思われる。なお、重合前のアクリルアミドには神経毒があり、ゲル調製時にはゴム手袋を着用する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

杉村順夫、森本弘一、尾山廣、カイコの自然免疫、生物教育、査読有、Vol.59, No.1, pp. 10-18

〔学会発表〕（計 件）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：杉村順夫

ローマ字氏名：SUGIMURA, yukio

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。