

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05669

研究課題名(和文)非自己成分認識の新機軸 ターゲットサイズによる免疫反応制御機構の解明

研究課題名(英文)New approach to non-self component recognition: elucidation of immune response regulation mechanisms based on target size.

研究代表者

古川 誠一 (Furukawa, Seiichi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10391583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫体腔内に侵入してきた病原微生物や寄生性昆虫に対して、血球は貪食や包囲化といった細胞性免疫機構を活性化することで対処している。本研究は、トランスクリプトーム解析により、昆虫の細胞性免疫に関わる複数の新規遺伝子群をスクリーニングし、新たな細胞性免疫制御因子を同定するとともに、既知の制御因子との相互作用を明らかにすることで、細胞性免疫システムの全体像を明らかにすることを試みたものである。

その結果、貪食や包囲化をそれぞれ特異的に制御する複数の新規遺伝子群を得ることができた。現在、RNAi法による遺伝子機能解析法もほぼ確立することができ、それら制御遺伝子の機能解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫が地球上に繁栄しつる理由の一つとして、劣悪な環境でも生き延びることを可能とする強力な免疫系の存在が挙げられる。本研究により、体腔内に侵入してきた病原微生物や寄生性昆虫に対して活性化する細胞性免疫制御因子を複数同定することに成功した。これらの知見は、害虫防除において、生物農薬の効果を向上させることに寄与するとともに、病気に強い益虫の作出にも貢献できるだろう。

研究成果の概要(英文)：In response to pathogenic microorganisms and parasitic insects invading the insect hemocoel, hemocytes activate cellular immune reactions such as phagocytosis and encapsulation to deal with them. This study aimed to identify new cellular immune regulatory factors through transcriptome analysis. It also sought to elucidate the interactions between these newly identified factors and known regulatory factors in order to reveal the overall picture of the cellular immune system.

As a result, several novel gene groups that specifically control phagocytosis and encapsulation were obtained. Currently, the gene function analysis of these regulatory genes is being carried out, with the almost established RNAi method being used.

研究分野：応用動物昆虫学

キーワード：細胞性免疫 貪食 包囲化 アワヨトウ トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

昆虫血球細胞は、体内に侵入してきた外敵を適切な生体防御反応により排除する。昆虫では、この外来異物の正体を認識する機構として、「パターン認識」というしくみが発見されている (Lemaitre *et al.* 1996)。「パターン認識」とは、生まれつき備えもつ受容体によって、非自己成分の表面構造を結合・認識するもので、先天性免疫の特徴として広く生物間で保存されている。この非自己成分認識機構は、免疫反応の引き金となる非常に重要機構であり、ショウジョウバエの免疫研究からこの現象発見に大きく貢献した J. A. ホフマン博士は 2011 年度のノーベル医学・生理学賞を受賞している。

血球細胞が行う細胞性免疫反応には、細菌など細胞より小型の異物は細胞内に取りこんで消化(貪食)、大型の寄生性生物などは多数の血球で取り囲んで隔離(包囲化)というように、ターゲットのサイズにより対応が異なる。しかしカイコにおいては、同成分だがサイズが異なるビーズを血球細胞に与えると、小型のビーズなら貪食、大型のビーズなら包囲化という現象が報告されている (Wago 1980; Wago 1983)。このような同じ成分でもサイズが異なる場合には、異なる細胞性免疫反応が引き起こされる現象は、「パターン認識」による制御だけでは説明できない。そこで申請者は「血球細胞は異物の大きさも認識し、適切な細胞性免疫反応を活性化させる」という仮説を立て、「パターン認識」に依らない非自己成分認識機構を探索した。

その結果、カイコ同様のチョウ目アワヨトウから、大型のビーズを注射したときのみ、血球細胞で発現量が増加する、「EPL」と名付けたタンパク質をコードする遺伝子を得た。さらにこのタンパク質の機能解析により、EPL は、包囲化は促進するが逆に貪食は抑制することがわかった (Ishihara *et al.* 2017)。このように血球細胞による細胞性免疫反応をどちらかに進ませるような因子は、これまでに全く知られていないことから、この EPL タンパク質を取りまく研究は、非常に高い研究発展性をもつ。現在のところ EPL が作用する血球細胞種や具体的にどの過程そしてどのようなメカニズムで細胞性免疫反応を制御しているかについては未知であり、精力的な研究が求められる。

2. 研究の目的

研究目的は、カイコやアワヨトウに保存された昆虫血球細胞が非自己成分のサイズを見分けて、包囲化と貪食という細胞性反応を使い分ける分子メカニズムを解明することである。「サイズ認識」から始まる過程で唯一の既知因子である EPL を軸として研究を展開し、EPL 遺伝子の発現制御機構や EPL タンパク質の分子機能、また、トランスクリプトーム解析により細胞性免疫を制御する遺伝子を網羅的に明らかにし、細胞性免疫反応決定に関わる分子機構解明の足がかりを得る。

3. 研究の方法

アワヨトウ幼虫の血球細胞が、細胞性免疫反応活性化時に発現する遺伝子を網羅的に解析する。その中で EPL 遺伝子の発現に注目し、この遺伝子が包囲化のどの過程で働いているのかを予測する。

EPL のペプチド抗体を作成することで、このタンパク質の局在を明らかにする。

アワヨトウ幼虫における RNAi 実験系を確立し、トランスクリプトームによって得られた新規細胞性免疫制御する候補遺伝子の機能解析を行うとともに、EPL との相互作用も明らかにする。

4. 研究成果

EPL 遺伝子の転写制御領域は、アワヨトウゲノム DNA を制限酵素処理し、アダプター配列を結合し、EPL 遺伝子のコーディング領域に作成したプライマーとで PCR を行うことで増幅した。その結果、EPL 遺伝子の約 1 kbp の 5' 上流域の配列を決定することができた。上流配列を検索した結果、免疫系遺伝子の転写制御領域に多く保存されている NF- κ B 結合配列や C/EBP 結合配列などが見つかり、これらの転写因子が EPL 遺伝子の転写に関わることが示唆された。また EPL 遺伝子のプロモーター解析を行うため、アワヨトウの血球由来培養細胞へのトランスフェクションの検討を行い、遺伝子導入を可能とする試薬を見つけることができた。

EPL 遺伝子の発現と、そのタンパク質の局在を調べた結果、この遺伝子は包囲化に直接関わらない周囲の血球細胞で発現後、包囲化による血球カプセル状に局在することが明らかとなった。これは全く予想できなかった結果であり、現在さらに詳細な制御メカニズムの解明に取り組んでいる。

一方で、アワヨトウ幼虫の血球において、細胞性免疫反応の特に初期に関わる遺伝子

を同定するための血球細胞サンプル回収を試み、それらのサンプルに対し、トランスクリプトーム解析を実施することで、貪食や包囲化をそれぞれ特異的に制御する複数の新規遺伝子群を得ることができた。免疫標的として用いた異物、同一成分でサイズのみが異なる物質であるために、血球はそのサイズを認識して異なる遺伝子発現を誘導していることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xiaofei Tonga, Saki Yoshimura, Tetsuhiko Sasaki, Seiichi Furukawa	4. 巻 24
2. 論文標題 Influence of Wolbachia infection on antimicrobial peptide gene expressions in a cell line of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asia-Pacific Entomology	6. 最初と最後の頁 1164-1169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aspen.2021.09.012	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 Nicholas Schwier, Kai Zhang, Satoshi Nakamura, Seiichi Furukawa	4. 巻 24
2. 論文標題 Larvae of the tachinid fly, <i>Drino inconspicuides</i> (Diptera: Tachinidae), suppress melanization in host lepidopteran insects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asia-Pacific Entomology	6. 最初と最後の頁 1050-1054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aspen.2021.10.015	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 Thitaree Yooboon Kazumu Kuramitsu Vasakorn Bullangpoti Yooichi Kainoh Seiichi Furukawa	4. 巻 102
2. 論文標題 Cytotoxic effects of asarone on Sf9 insect cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of insect biochemistry and physiology	6. 最初と最後の頁 e21596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/arch.21596	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 該当する

1. 著者名 Mahardika Gama Pradana, Giyanto, Seiichi Furukawa, Satoshi Nakamura and Damayanti Buchori	4. 巻 41
2. 論文標題 Detection of Wolbachia Endosymbiont in Several Agriculturally Important Insect Parasitoids in Bogor, Indonesia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AGRIVITA	6. 最初と最後の頁 364-371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17503/agrivita.v41i2.1855	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nakamura S, Furukawa S, Tanaka T
2. 発表標題 The microtype tachinid, <i>Pales pavidus</i> (Meigen): escaping from host's immune responses resulting in different parasitization rates between host sexes
3. 学会等名 The 6th International Entomophagous Insects Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張 凱・一木 良子・中村 達・古川 誠一
2. 発表標題 ヤドリバエ幼虫の宿主脂肪体誘引物質分泌器官を突き止める
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 Schwier N, Kai Z, Nakamura S, Furukawa S
2. 発表標題 The Effect of <i>Drino inconspicuosides</i> Larvae on Suppressing the Immune System of the Hosts
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 松元 咲樹, 古川 誠一.
2. 発表標題 アワヨトウの包圍化促進レクチン遺伝子のプロモーター解析と発現局在解析
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------