

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790063

研究課題名（和文）昆虫サイトカインPPの活性化機構、及び免疫応答における役割に関する研究

研究課題名（英文）Activation mechanism and functional analysis of insect cytokine PP on innate immune response

研究代表者

浜本 洋 (HAMAMOTO HIROSHI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90361609

研究成果の概要（和文）：

カイコの昆虫サイトカインPPが活性化されることにより、脂肪体ではp38 MAPK経路を介する抗菌ペプチド関連遺伝子の発現上昇が、血球では貪食反応が活性化することを見いだした。また、PPの活性化において、腸管が細胞壁成分を認識し、活性化因子を放出するなどの重要な役割を果たすことを見いだした。本研究により、微生物感染における昆虫サイトカインPPの活性化機構、及び自然免疫活性化機構の全体像の概略を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Insect cytokine PP (paralytic peptide) induce expression of genes for antimicrobial peptide via p38 MAPK pathway in fat body, and activate the phagocytic activity of hemocytes. Regarding the activation of PP, midgut has important role for recognition of cell wall components of bacteria and secret PP-activating factors. In this research, outline of function and activation mechanism of PP in innate immunity response was revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：自然免疫、カイコ、麻痺ペプチド、昆虫サイトカイン、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

生物は、微生物などの侵入物に対する防御のための免疫機構を有しており、個体を健康に維持し活動させるために極めて重要である。なかでも、自然免疫応答は異物侵入に対する、生体防御の第一応答として昆虫から哺乳動物まで高度に保存されている。自然免疫は、微生物を構成する細胞壁成分などを、Toll-like receptor(TLR)やペプチドグリカン

認識酵素(PGRP)等が認識し、下流にシグナルを伝達することにより活性化されることが明らかになっている。一方、我々は、カイコにおいて、ペプチドグリカンやβグルカンなどの細菌の細胞壁成分により、セリンプロテアーゼが活性酸素種(ROS)により活性化し、麻痺ペプチド(paralytic peptide、以下PP)が活性型に変換され、さらに活性型PPがサイトカインとして細菌感染に対する生体防御

において重要な役割を果たすという、自然免疫応答における新たな経路を見いだした。また、カイコ幼虫体液中に抗 PP 抗体を投与し PP の活性化を阻害すると黄色ブドウ球菌感染に対し感受性を示し、逆に活性化型 PP の投与により抵抗性を示したことから、PP 活性化経路は生体防御に重要な役割を果たす新たな自然免疫応答機構であると考えられる。しかしながら、PP によって活性化される免疫関連因子については、いくつかの抗菌ペプチドの遺伝子発現の上昇などは明らかとなっていたが、その全体像や、そのシグナル伝達経路は全く明らかになっていなかった。さらに、ペプチドグリカンやβグルカンの投与によって引き起こされる PP の活性化機構の詳細については明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では昆虫サイトカイン PP によって誘導される免疫反応、そのシグナル伝達経路の解明を行う。また、微生物の細胞壁成分による PP の活性化メカニズム、及び惹起される免疫応答について明らかにする。以上の解析により、PP 活性化経路の入力から出力までの一連の経路を明らかにし、本経路の自然免疫応答における役割を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析

活性化型 PP を投与前後のカイコの脂肪体や血球細胞から mRNA を抽出し、農業生物資源研究所の野田博明先生と共同でマイクロアレイ解析を行い、遺伝子の発現変動を解析した。本解析によって変動が見られた免疫関連遺伝子について、リアルタイム PCR によって発現変動率を求めた。

(2) 食食アッセイ

血球の食食活性については、カイコに PP を投与後、蛍光ラベルした黄色ブドウ球菌を注射し、血球に取り込まれた細胞数をカウントした。

(3) シグナル伝達経路の解析

活性化型 PP による p38 MAPK 経路の関与に関する解析においては、p38 のリン酸化体の抗体によるウェスタンブロット解析を行った。また、p38 の特異的阻害剤を処理した個体における、脂肪体での抗菌ペプチド遺伝子の発現変動、及び黄色ブドウ球菌感染に対する生存率を経時的に測定した。

(4) 歯周病菌のペプチドグリカンによるアポトーシス誘導の解析

歯周病菌のペプチドグリカンをカイコに投与 8 時間後に、組織全体をホモジナイズし遠心によりデブリを除いた後、上清に DEVD-p-nitroanilide を加え OD₄₀₅ を測定しカスペーゼ活性を測定した。

(5) 自然免疫活性化物質の精製と同定

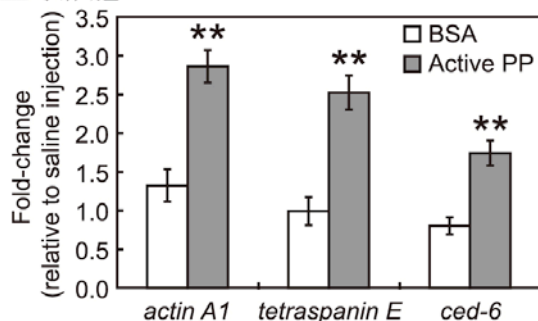
植物の熱水抽出物から、エタノール沈殿、及びイオン交換カラム、ゲル濾過カラム等を用いて、カイコ断頭標本における筋収縮活性を指標に精製した。精製した化合物は、HPLC によって構成糖の解析、及び NMR によって構造を解析した。

4. 研究成果

(1) PP による自然免疫の活性化

カイコ体液中への活性化型 PP の投与前後において、脂肪体で cecropin A や moricin などの抗菌ペプチドの遺伝子、及び血球細胞において食食に関わる actin A1 や、tetraspanin などの遺伝子の発現上昇が認められた(図 1)。これらの結果を基に、血球においては、活性化型 PP は、カイコ血球による細菌の食食を活性化することを明らかにした(図 2)。また、脂肪体における抗菌ペプチドの生産において、p38 MAPK 経路が知られているが、PP の処理によって p38 が活性化することを見いだした。また、p38 の特異的阻害剤によって、抗菌ペプチドの遺伝子発現の阻害、及び黄色ブドウ球菌感染に対する抵抗性が減弱した。これらの結果は、昆虫サイトカイン PP が、食食という体細胞成分による免疫応答、及び抗菌ペプチドという液性成分による免疫応答の両方をグローバルに制御していることを示している。

血球細胞



脂肪体

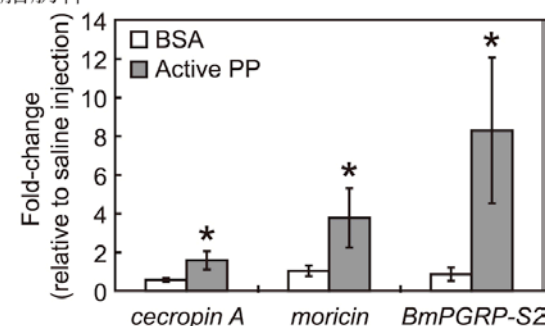


図 1 PP による免疫関連遺伝子の発現上昇

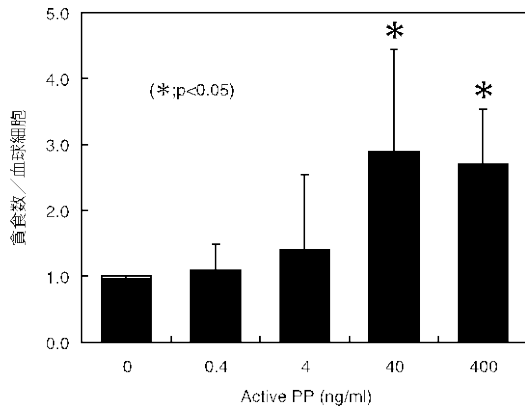


図2 PPによる血球細胞の黄色ブドウ球菌貪食の促進

(2) 細胞の細胞壁成分によるカイコの自然免疫応答

昆虫サイトカインは微生物の細胞壁成分によって活性化される。その活性化において血球細胞が重要な働きをすることがわかってきたが、その上流については明らかではなかった。一方で、腸管は経口で摂取した微生物の侵入から体を守る最前線の臓器である。そこで、腸管の本経路における役割を明らかにする目的で、カイコ標本に真菌の細胞壁成分(βグルカン)を投与したところ、腸管の除去によってPPの活性化型への変換が起こらなくなることを見いだした。そこで、腸管からβグルカンによってPPの活性化型への変換を引き起こす因子が生産されるのではないかと考え、腸管培養系からβグルカンによって誘導されるPP活性化因子をPPの活性化反応を指標に部分精製したところ、ペプチドと考えられる成分を同定した。従って、腸管が細菌の細胞壁成分を認識して、PP活性化因子を分泌していると考えられる(図3)。

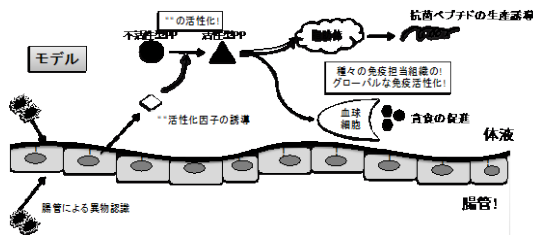


図3 PP活性化の想定されるモデル

本研究において、ペプチドグリカンの中でも、歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)のものは、他の病原性細菌のものとは異なり、少量の投与によってカイコが殺傷されることを見いだした。このとき、PPの活性化も引き起こされるが、液性免疫と考えられている血液のメラニン化が強く促進された。さらに、歯周病菌のペプチドグリカンの投与後、カイコ個体の細胞においてアポトーシスが誘導された。さらにカイコのペプチドグリカン投与による殺傷が、ラジカル消去剤、及びアポ

トーシス阻害剤によって抑制された。メラニン化はその反応過程で多量のラジカルを生産することが知られている。従って、歯周病菌のペプチドグリカンによってカイコが殺傷されるのは、過剰にメラニン化反応が起こる過程でラジカルが生成され、細胞がアポトーシスを引き起こすためではないかと考えられる。自然免疫だけを有する昆虫で、免疫の過剰活性化によって個体が殺傷される例は初めての報告である。

(3) カイコ自然免疫活性化モデルを用いた自然免疫活性化物質の精製と同定

カイコのPPの活性化を伴う、自然免疫の誘導は、ゆっくりとした筋収縮を伴う。そこで、その筋収縮を指標とした自然免疫の活性化物質の精製ができるか否かを検討した。その結果、お茶やブロッコリーなどの野菜から筋収縮を指標に自然免疫を活性化する物質を精製し、それらがペクチンであることを明らかにした。精製したペクチンは、マウスのマクロファージにおいてもIL-6の生産を誘導することから、哺乳類の自然免疫も活性化すると考えられる。以上の結果は、カイコのPPの活性化に伴う筋収縮を指標として、自然免疫活性化物質を同定することができることを示している。

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4件)

(1) Hemocytes and humoral factors in silkworm blood are cooperatively involved in sheep erythrocyte aggregation

Imamura K, Ishii K, Hamamoto H, Sekimizu K: *Drug Discoveries and Therapeutics*, inpress

(2) Purification of innate immunostimulant from green tea using a silkworm muscle contraction assay, Dhital S, Hamamoto H, Urai M, Ishii K, Sekimizu K:

Drug Discoveries and Therapeutics, 5, 18-25, (2011)

(3) *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae,

Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K, Sekimizu K: *J Biol Chem*, 285, 33338-33347, (2010)

(4) The insect cytokine paralytic peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*,

Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Nakamura

Y, Noda H, Imamura K, Mita K, Sekimizu K:
J Biol Chem, 285, 28635-28642, (2010)

〔学会発表〕 (計 4 件)

(1) Insect cytokine paralytic peptide activates innate immunity via nitric oxide production in *Bombyx mori*

Kenichi Ishii, Hiroshi Hamamoto, Manabu Kamimura, Kazuhisa Sekimizu

The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity

淡路

2010年9月7日-10日

(2) カイコ幼虫体液に存在する細胞増殖抑制因子の精製と機能解析

安達達朗

第9回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム

名古屋

2010年10月2日

(3) セラチア菌のO抗原によるカイコ血球細胞の細胞死誘導

石井 健一、臼井公人、今村亮俊、浜本洋、鈴木一史、渡邊剛志、関水と久

第32回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会合同年会(BMB2010)

神戸

2010年12月7日-10日

(4) カイコにおいて昆虫サイトカイン paralytic peptide により誘導される自然免疫応答

石井健一、浜本洋、神村学、中村有希、野田博明、三田和英、関水と久

第32回分子生物学会、横浜、2009年12月9日~12月12日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：自然免疫機構を活性化／抑制する作用を有する物質の評価方法及びスクリーニング方法、並びに、自然免疫機構を活性化／抑制するための薬剤、食品及びそれらの製造方法

発明者：関水と久、浜本洋

権利者：関水と久、浜本洋

種類：特許

番号：特願 2009-509376

出願年月日：平成 20 年 4 月 10 日

国内外の別：国内

名称：自然免疫機能活性化組成物の製造方法

及び自然免疫機能活性化組成物

発明者：関水と久、浜本洋

権利者：関水と久、浜本洋

種類：特許

番号：特願 2009-148108

出願年月日：平成 20 年 7 月 2 日

国内外の別：国内

名称：植物体由来の自然免疫活性化作用が増強された自然免疫活性化組成物

発明者：関水と久、浜本洋、小方康至

権利者：関水と久、浜本洋、小方康至

種類：特許

番号：PCT/JP2009/061332

出願年月日：平成 21 年 6 月 22 日

国内外の別：国際

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/research_hamamoto.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜本 洋 (HIROSHI HAMAMOTO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90361609

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし