

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05618

研究課題名(和文)線虫はどのようにして昆虫の細胞性免疫を回避しているのか？

研究課題名(英文)How do nematodes evade insect cellular immunity?

研究代表者

吉賀 豊司 (Yoshiga, Toyoshi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：00312231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：寄生が成立するための重要なステップの一つは、宿主免疫からの回避である。細菌やカビなどに対しては、宿主による異物認識機構の詳細は明らかになっている一方で、線虫などに対する宿主の異物認識機構は未だに明らかになっていない部分が多い。寄生性を獲得した線虫は、宿主免疫を回避や抑制すると考えられているが、その詳細や進化についても不明である。そこで本研究では、昆虫を用いて血球による異物認識とそれに対する線虫の宿主免疫からの回避機構の解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生虫病は20世紀にはほぼ解決したと考えられているが、完全に解決には至っておらず寄生虫に対するワクチンの開発などはいまだに成功していない。その原因の一つは、線虫をはじめとする真核生物の寄生虫に対する異物認識機構が解明されていない点である。本研究では、線虫に対する昆虫による異物認識機構を解明するとともに、線虫による宿主からの異物認識回避機構の解明を行う。これによって昆虫を含めた動物がいかんして線虫をはじめとする真核生物の寄生虫に対して異物認識の進化を解明し、将来的には脊椎動物における寄生虫に対する新たな解決方法の確立につながるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：The existence of a basic mechanism common to nematodes to evade immunity is expected to be one of the reasons why various nematodes have acquired parasitism on insects. In this study, we sought to elucidate such basic mechanisms and their evolution in nematodes. We screened for *C. elegans* mutants that are more likely to enhance or suppress nematode encapsulation, but were unable to obtain mutants corresponding to these mutations. We focused on in vivo screening. The establishment of an in vitro experimental system for more efficient screening should be considered.

研究分野：植物保護

キーワード：線虫 昆虫 自然免疫 血球 包囲反応

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

寄生虫と呼ばれる真核生物の多くは線形動物門(線虫)か扁形動物門(吸虫など)に属する。特に線虫は、様々な動植物に寄生するものが知られている。無脊椎動物を含めた動物寄生の進化はこれまで何度も起こったと考えられる。なかでも昆虫に寄生する線虫は多く、10回以上は独立して昆虫寄生が進化してきたと考えられている。なぜ、様々な線虫において寄生性を獲得できたのであろうか?

寄生が成立する重要な点の一つとして、宿主免疫からの回避がある。様々なグループに属する線虫が昆虫への寄生性のそれぞれ独自に獲得できた背景として、線虫に共通する、免疫を回避するための基盤的機構の存在が予想される。本研究では、線虫のそのような基盤的機構とその進化の解明を試みるものである。また同時に、免疫回避を解明するためには宿主による線虫の異物認識機構の解明が必要であるが、昆虫はどのようにして線虫を異物認識しているのかについても明解な答えが出ていない。

細菌やカビなどに対しては、宿主による異物認識機構の詳細は昆虫や哺乳類で明らかになっている一方で、線虫などの多細胞生物に対する宿主の異物認識機構は未だに明らかになっていない部分が多い。寄生性を獲得した線虫は、宿主免疫を回避や抑制すると考えられているが、その詳細や進化についても不明である。細菌などの微生物に対しては液性免疫が重要であるが、多細胞生物は大型であり、それらを封じ込めるには血球による細胞性免疫が大きな役割を果たす。そこで本研究では、昆虫を用いて血球による異物認識とそれに対する線虫の宿主免疫からの回避機構の解明を目指す。

### 2. 研究の目的

昆虫体内では、細菌のような微小な生物は、血球による貪食やノジュール形成、または液性成分のフェノールオキシダーゼや抗菌ペプチドなどの攻撃によって不活化される。一方、線虫のような大型の異物に対しては、血球が取り囲んで不活化する包囲化が一般的である。チョウ目昆虫において、包囲反応は、先ず顆粒細胞が異物認識し、脱顆粒することでプロテアーゼなどをはじめとする免疫に関する様々な因子を放出し、それによってプラズマ細胞を活性化し、異物の表面をプラズマ細胞が覆う。最初にどのようにして顆粒細胞が異物認識をするのかについては、いくつかの断片的な報告はあるものの、今のところ統一的な理解に至っていない。

本課題では、線虫と昆虫の相互作用について昆虫側と線虫側の両側からの解明を試みるものである。また、モデル線虫の *C. elegans* やカイコを用いて研究を進めるとともに、線虫や昆虫の種類による反応の違いを明らかにするために異なる線虫種と昆虫種の相互作用についても調査する。また、実際に自然界でみられる相互作用を理解するために、昆虫病原性線虫やアワヨトウなども用いて比較しながら得られた結果の意義についても理解しようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 昆虫の血球による異物としての線虫の認識

異物認識に伴う顆粒細胞の脱顆粒の有無を調べるため、血球を分離し、線虫体表面抽出物でカバーした96穴プレートのウエルまたは対照区として溶媒だけを塗布したウエルに撒いたあと、脱顆粒の様子を顕微鏡下で観察した。実験には、感受性のハチノスツツリガ幼虫、抵抗性のアワヨトウ幼虫、ならびに将来的な遺伝子解析を行うためにカイコを用いた実験系についても検討した。さらに、異なるグループの昆虫において線虫に対する反応の差異を比較するため、釣り餌として市販されていて入手しやすいヨーロッパコオロギ、チャバネゴキブリ、クリムシなどを用いて昆虫血体腔内に線虫を人為的に注入した後の線虫に対する血球反応を調査した。

#### (2) 昆虫の細胞性免疫に対して異なる反応を示す *C. elegans* 変異体のスクリーニング

線虫における免疫回避に関する共通基盤を解明するには、線虫側の遺伝子レベルでの解析が欠かせない。そこでアワヨトウに注入することで包囲されない *C. elegans* 変異体およびハチノスツツリガで包囲される変異体のスクリーニングを行った。変異体の *in vivo* スクリーニング法として、EMS 処理して得られた変異体の集団を昆虫血体腔内に注入し、一定時間後に線虫を回収し、血球の付着に変化がみられる線虫個体を単離し、人工培地上で培養した。雌雄同体である *C. elegans* は1頭からでも容易にクローンとして増やすことができる。また、*in vitro* でのスクリーニング法としては、昆虫体液を採取し、その中に *C. elegans* 変異体を入れ、血球の付着が異なる個体を選抜した。このような方法でスクリーニングすることで得られた *C. elegans* 変異体は、2次スクリーニングにおいて結果の再現性を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 昆虫の血球による異物としての線虫の認識

我々は線虫の体表面物質が血球の spreading を抑制することを明らかにしてきた。本課題ではこれまでの結果をもとに、アワヨトウとハチノスツツリガの幼虫の血球を用いて、実際にどの

部分を阻害しているのかについて研究を進めた。継代維持していたアワヨトウが絶えてしまったため、カイコを用いて同様の実験系の条件検討を行い、カイコにおける実験系を確立した。また、昆虫の種類による異物反応の違いを明らかにするためヨーロッパコオロギ、チャバネゴキブリ、クリムシなどの比較を行った。昆虫の種類によって血球反応に違いがみられたが、血球の多さや観察のしやすさからチョウ目幼虫が最も使いやすいことが明らかとなった。ペトリ皿内に入れてアワヨトウに昆虫病原性線虫 *Steinernema carpocapsae* を接種して自然感染させた後、昆虫体内から取り出したところ、包囲化の初期に体表面に小さい顆粒の付着が見られ、これは顆粒細胞の脱顆粒に由来するものと考えられた(図1)。昆虫病原性線虫であってもアワヨトウ体内でこのように脱顆粒した物質が体表面に付着することが明らかとなった。現在までの情報や結果をもとに、線虫の昆虫免疫からの回避機構について図2に示す。

(2) 昆虫の細胞性免疫に対して異なる反応を示す *C. elegans* 変異体のスクリーニング  
 今回の研究において、ハチノスツツリガ幼虫において包囲化が促進される変異体ならびにアワヨトウ幼虫やカイコにおいて包囲化されにくい変異体のスクリーニングを行った。1次スクリーニングでは包囲されていない、または血球の付着を受けた個体を得られたものの、その個体から増殖させた個体群を用いて実験を行っても再現性の高い結果は得られなかった。結果として、これらに相当する変異体を得ることができなかった。このことは、包囲されやすいような線虫の変異は線虫の生存にとって不可欠な因子が関係しているために得られなかった可能性がある。また、線虫の体表面の構造自体がハチノスツツリガ幼虫の血球では基本的に包囲されない状態である可能性を示唆している。また、アワヨトウ幼虫やカイコ幼虫体内で包囲されにくい変異体については、線虫を血球が認識する際には線虫体表面に存在する糖鎖のようなものを認識していると予想していたが、今回のスクリーニングでは体表面の糖鎖に関係する遺伝子に変異が生じた変異体を得ることができなかった可能性はある。もしくは体表面の認識には複数の因子が関係しておりそれら全ての変異が生じなければ包囲を回避することができなかった可能性も考えられる。

*C. elegans* のクチクラ構造については、これまで走査電子顕微鏡や透過電子顕微鏡などによる観察結果があるものの、生物間相互作用を解明していくためには、最外部のクチクラの微細構造についてさらなる情報が必要である。また、今回は解明できなかったものの本研究のようなアプローチを繰り返して研究を進めていくことによって、そのような体表面微細構造の解明が進むのと考えられる。また、今回は *in vivo* でのスクリーニングを行う一方で、取り出した昆虫の体液の中に線虫を添加することで *in vitro* でのスクリーニング方法の検討も行ったものの、効率よく包囲される、または包囲されない個体を得る条件を見出すことはできなかった。そのため *in vivo* でのスクリーニングを中心に行った。カイコのような大型のチョウ目幼虫の終齢幼虫を使うことで大量の血球を得ることができると明らかとなったが、それを用いてより効率的にスクリーニングを行うための *in vitro* 実験系の確立が不可欠であると考えられるため、今後も引き続きアッセイ系を検討する必要がある。

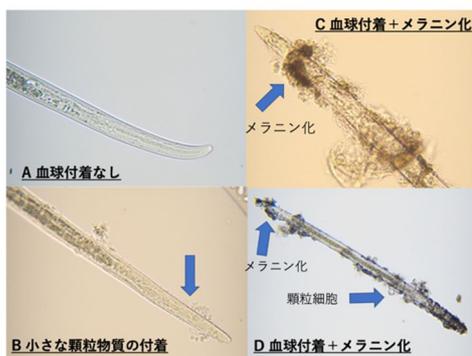


図1. アワヨトウ幼虫体内における昆虫病原性線虫 *Steinernema carpocapsae* に対する認識

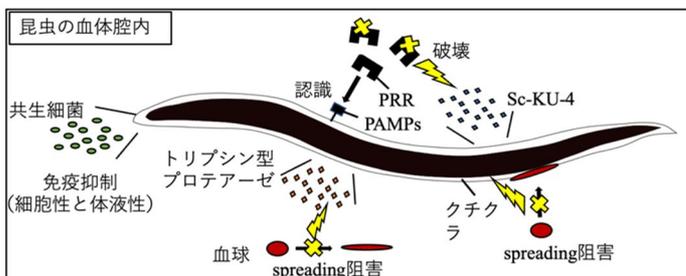


図2. 線虫によるチョウ目昆虫の免疫からの回避機構  
 昆虫病原性線虫は宿主昆虫の血体腔に侵入後、共生細菌を放出し、免疫を抑制する。線虫もまたプロテアーゼなどの分泌物により、血球のspreading阻害や線虫のPAMPs認識を行うPRRを破壊することにより免疫を抑制する。また、線虫のクチクラは線虫に付着しようとする血球のspreadingを阻害する機能を有する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Lai Cheng Kuo, Lee Yi Chien, Ke Huei Mien, Lu Min R., Liu Wei An, Lee Hsin Han, Liu Yu Ching, Yoshiga Toyoshi, Kikuchi Taisei, Chen Peichen J., Tsai Isheng Jason | 4. 巻<br>23              |
| 2. 論文標題<br>The <i>Aphelenchoides</i> genomes reveal substantial horizontal gene transfers in the last common ancestor of free living and major plant parasitic nematodes    | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Ecology Resources   | 6. 最初と最後の頁<br>905 ~ 919 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/1755-0998.13752  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Li Jingjing, Li Yang, Wei Xianqin, Cui Yonghe, Gu Xinghui, Li Xingyue, Yoshiga Toyoshi, Abd-Elgawad Mahfouz M., Shapiro-Ilan David, Ruan Weibin, Rasmann Sergio   | 4. 巻<br>484             |
| 2. 論文標題<br>Direct antagonistic effect of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria on root-knot nematodes migration toward tomato roots                       | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Plant and Soil  | 6. 最初と最後の頁<br>441 ~ 455 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s11104-022-05808-4   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Ekino Taisuke, Yoshiga Toyoshi, Kanzaki Natsumi   | 4. 巻<br>24              |
| 2. 論文標題<br>Cuticle ultrastructure differences among the four adult forms of <i>Deladenus nitobei</i> (Tylenchomorpha: Allantonematidae)                                     | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Nematology  | 6. 最初と最後の頁<br>491 ~ 498 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1163/15685411-bja10144  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Sugita Yoshitaka, Sobagaki Tomoo, Yoshiga Toyoshi   | 4. 巻<br>57              |
| 2. 論文標題<br>Low-oxygen tolerance of <i>Ditylenchus destructor</i> (Tylenchida: Anguinidae)   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Applied Entomology and Zoology  | 6. 最初と最後の頁<br>131 ~ 136 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s13355-021-00769-z   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>小野雅弥, 吉賀豊司                   | 4. 巻<br>90          |
| 2. 論文標題<br>チョウ目昆虫に対する線虫の病原性と害虫防除などへの利用 | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>蚕糸・昆虫バイオテック                  | 6. 最初と最後の頁<br>67-72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>仲井 まどか, 日本 典秀     | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>朝倉書店              | 5. 総ページ数<br>200 |
| 3. 書名<br>バイオリジカル・コントロール 第2版 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|