

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380032

研究課題名(和文) 昆虫の細胞性免疫機構における包囲作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of encapsulation in cellular defence mechanism of lepidopteran larva

研究代表者

田中 利治 (TANAKA, Toshiharu)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30227152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫類は、体内に侵入した異物が血球より大きな場合は、多くの血球が集合して取り囲み包囲化することで侵入した異物を封じ込める細胞性防御反応を持つが、寄生可能な内部寄生蜂は、寄主体内でその防御反応を回避できる。寄生蜂が寄生時に寄主体内に注入するポリドナウイルスには寄主血球の異物への接着を阻止する働きをもつ遺伝子が存在し、毒液にも存在、さらに寄生蜂が孵化後に漿膜細胞由来のテラトサイトが同様な遺伝子を持つことが明らかになり、寄生直後から脱出まで働いていた。さらには寄主の血球に異物に付着して血球の周りにメラニンを形成し、異物にマークをつける細胞が存在し、寄生蜂が持つ因子で消失していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Insects have cellular defence system against parasites or foreign substances invaded into the body hemocoel. However, some endoparasitoids can avoid the encapsulation of the host by polydnavirus (PDV) plus venom injected into the host hemocoel at oviposition and teratocytes (Tc) that develop from serosal cells of the egg during larval stage. It was found that hyper spread cells of the *Mythimna separata* host (Ms-HSC) attached on the surface of the foreign substance like glass slide or of parasitoid larva, and made melanin formation that works as marker to another hemocytes. On the other hand, both PDV and venom also teratocytes produced factor inhibiting the function of HSC, especially venom worked in very early stage of parasitization.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：細胞性免疫 包囲作用 メラニン化 免疫レクチン *Cotesia kariyai* *Meteorus pluchricornis*

1. 研究開始当初の背景

昆虫類の中でもチョウ目は幼虫期間も長く、多くのバクテリアや寄生蜂等の攻撃にさらされるために、血球種も豊富で、高度に発達した細胞性免疫と液性免疫による免疫システムをもち、体内に侵入した異物を排除する。異物が血球より小さいバクテリアのようなものに対しては、血球による食作用で処理されるが、大きな異物に対しては、(1)体腔中を循環する血球が異物認識を行い、(2)その血球内の異物認識シグナルを介して他の血球を引き寄せる物質を放出する(3)液性免疫応答であるメラニン形成が異物表面でおこり(4)顆粒細胞とさらに外側にプラズマ細胞が集まり異物が包囲化され、(5)包囲化を受けた異物が消化されると考えられている。特に異物認識の初期過程では、細胞表面の糖タンパク質や糖鎖認識及び血球の付着過程に關与する糸状仮足や膜状仮足の伸張が重要な要因となる。包囲化ではタバコスズメガの研究で脂肪体で生産された c-type lectin の一種である immulectin が異物に付着し、さらにセリンプロテアーゼ、フェノール酸化酵素などが關連して異物表面にメラニンが形成されるとされているが、包囲化初期に付着する血球も同定されておらず、付着した血球がどのようにメラニン化を誘導するかわかっていない。

2. 研究の目的

チョウ目の幼虫を寄主とする幼虫寄生蜂は寄生可能な寄主では、寄生蜂の卵や幼虫のみを異物として認識させない寄主制御機構を持っている。そこで本研究は、我々が今まで扱ってきた寄生バチのもつ寄主制御要因であるポリドナウイルス(PDV)やウイルス様顆粒(VLP)の機能を利用することで、従来の方法では明らかにできなかった点を特異的な免疫機能細胞の除去や抑制などの方法から明らかにする。異物表面にパッチ状にメラニンを形成するハイパー伸展細胞(HSC)がPDVの作用で壊れるか付着できないことで寄生蜂の卵が異物として認識できないという仮説を立て、初期異物認識に關わる細胞及び異物表面にマークをつける細胞の働きや血球の異物認識リセプターのリン酸化や糖鎖の変化を明らかにする。さらに異物表面に付着し細胞の周囲に分泌された物質が immulectin とどのような関係なのかを明らかにすることで、チョウ目幼虫の包囲作用における異物処理機構を分子レベルで明らかにしていく。

3. 研究の方法

包囲作用初期に異物表面に付着し、糖タンパク質で異物に対しマークをつける細胞を特定する。レーザーダイセクション法によりRNAの抽出や、アフィニティークロマトなどを用い、分泌している物質を粗精製し、泳動バンドの切り

出し、その一部配列決定により活性化しているタンパク及びその遺伝子を特定する。この細胞が脂肪体由来かどうかを in situ 法や抗体を使って調べる。同時に寄生蜂が持つ寄主制御因子としてのポリドナウイルス(PDV)やウイルス様顆粒(VLP)の作用でこの細胞が消失することを確かめるために付着血球からRNA抽出、cDNA合成を行って、血球の異物表面への付着に關与する遺伝子を特定する。異物認識に糖鎖が重要な働きをすることから c-type lectin に着目し、寄生蜂が寄生体内で発現する lectin との關与を形態学とタンパク解析から明らかにする。

4. 研究成果

1. アワヨトウの顆粒細胞(Gr)とプラズマ細胞(PL)を分ける方法を検討し、かなりの確率で2種の血球を別々のスライドグラス上にとれることが可能となり、HSCを分画するとプラズマ細胞の方に分画され、最初の予想とは異なり、顆粒プラズマ細胞として分類される血球であることがわかった。

2. 異物の表面に付着するHSCは、その血球の周辺にメラニンを形成することで、他の血球に対する目印としての作用を持っている。異物に対して包囲化が起こった場合、多くは異物の表面だけにメラニン化が起こり、その周りに血球が付着し包囲化が起こっている。この現象はいままで全く説明できていなかった。HSCが多く付着した glass slide からタンパクを回収し SDS-PAGE により分画したところ、主なバンドとして arylphorin と同定される sequence が存在していた。そこでその抗体を作成し、HSC 周辺の沈着物質が染まることを確かめた上で、脂肪体の切片の染色を行ったが、脂肪体中に存在する arylphorin を染めることはなかった。いちぶ arylphorin と同じ sequence を所有するが異物認識に關与する物と思われるが、今後ゲノムから遺伝子配列を決めていく予定。さらに SDS-PAGE Profile タンパク質の解析から 200k, 83k, 46kDa のタンパク質に対する抗体も作成し、一部 sequence を明らかにしたが、多くの血球が染色されたにとどまった。

3. 内臓脂肪体に免疫担当細胞が存在するかどうかを切片を上記抗体で染め、さらに背脈管に沿った周辺脂肪体である背脈管脂肪体に、HSCがあるかを確かめたが、検出できていない。非常に薄く細胞間に存在しているとしたら光顕レベルではわかりにくい可能性があり、今後の検討を要する。

4. 寄生蜂の毒液は寄生初期に働き、その後をポリドナウイルス(PDV)またはウイルス用顆粒(VLP)が、その働きを引き継ぐと考えられる。まずはスライドグラスに毒液をコートすることで血球の接着がおこらないことをあきらかにした。さらに毒液腺で発現している遺伝子を鑄型にして、細胞接着にかかわる因子としての Calreticulin(CRT)がPDVやVLPの注入によりどのように変化するかを RT-PCR を使って明らかにした。形態的には、抗CRT抗体で血球を

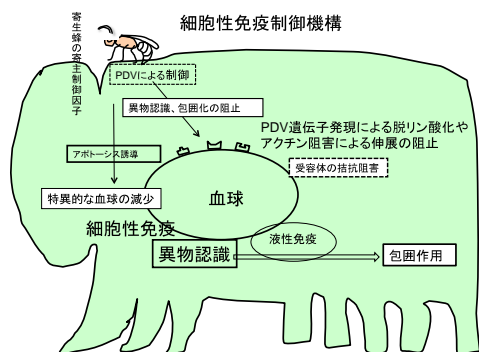
染めようとしたが満足のいく像は得られていない。

5. PDV に存在する脱リン酸化酵素 (PTP) のクローニングを行い5種類のシークエンスを決定した。これを使ってGrとPLのどちらに多く発現しているのかを明らかにし、血球の接着性に関連して細胞の足場がリン酸化されるときに働いていると推測し、関連性をいま明らかにしているところである。

7. VLP のMp17 は、細胞の接着および細胞が接着した場合それをはがす働きを持つが、その遺伝子がテラトサイトの中にも存在し、ハチの卵期間および幼虫期の異物認識血球の接着を阻害している可能性を PCR および抗体を作成し示した。

8. 結局本研究の結果より、寄生蜂は寄主の生体防御機構を避けるために即効性の因子として毒液による細胞の接着を阻止、PDV 遺伝子が寄主血球や脂肪体で発現した寄生 1.5-2 時間後までに、脱リン酸化酵素の発現により血球細胞接着面のリン酸化の阻害、CRT のような細胞伸展に関与する遺伝子の発現を抑制、異物認識に関わる寄主の immulectin である c-type lectin の働きを混乱させるために、配列がよく似た遺伝子の発現により競合阻害をおこなっている可能性が示された。

9. 今回の研究では、機器類による分析(特にレーザーダイセクション法による RNA 抽出が、かけた時間の割にあまりうまくいかず、予測通りに進展できなかったが、現在これまでに得られた結果を論文にまとめている。



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10件)

1. Matsukawa, M., K. Ito, K. Kawakita, T. Tanaka
Farmer perceptions and management of the rice planthopper in Cambodia. JARQ 49, 103-109 (2015)
2. Matsukawa, M., K. Ito, K. Kawakita, T. Tanaka
Current status and farmer perceptions of the rice planthopper in Cambodia. JARQ 48, 167-173 (2014)
3. Sonoda, S., Shi, X., Song, D., Liang, P., Gao, X., Zhang, Y., Li, J., Liu, Y., Li, M., Matsumura, M., Sanada-Morimura, S., Minakuchi, C., Tanaka, T. and Miyata, T. Duplication of acetylcholinesterase gene in diamondback moth

strains with different sensitivities to acephate. Insect Biochem. Mol. Biol. 48, 83-90 (2014).

4. Minakuchi, C., T. Ohde, K. Miura, T. Tanaka, T. Niimi. Role of scalloped in the post-embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) Appl. Entomol. Zool. 50,17-26 (2015)
5. Kato, Y. T. Yoshida, K. Miura, T. Tanaka, Y. Nakamatsu, M. Ochiai. A novel type of hemocytes localizing melanization with high-spreading behavior in *Mythimna separata*. Archiv. Insect Biochem. Physiol. 86, 220-239 (2014)
6. Peter M. Magdaraog, T. Tanaka, J. A. Harvey. Inter- and intraspecific host discrimination in gregarious and solitary endoparasitoid wasps. BioControl 58: 745-754 (2013)
7. Jeffrey A. Harvey, Erik H. Poelman, Toshiharu Tanaka Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasps Annu. Rev. Entomol. 58, 333-351. (2012)
8. Yokoi, K., Koyama, H., Ito, W., Minakuchi, C., Tanaka, T. and Miura, K. Involvement of NF- κ B transcription factors in antimicrobial peptide gene induction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Dev. Comp. Immunol. 38, 342-351 (2012).
9. Yokoi, K., Koyama, H., Minakuchi, C., Tanaka, T. and Miura, K. Antimicrobial peptide gene induction, involvement of Toll and IMD pathways and defense against bacteria in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Results in Immunology 2, 72-82 (2012).
10. Magdaraog, P.M., Harvey, J.A., Tanaka, T. and Gols, R. Intrinsic competition among solitary and gregarious endoparasitoid wasps and the phenomenon of resource sharing. Ecological Entomology 37, 65-74 (2012).

〔学会発表〕(計16件)

1. Isabelle Veà, Shiotuki Takahiro, Joraku Akiya, Tanaka, Toshiharu, Minakuchi Chieka, Role of the juvenile hormone in the establishment of sexual dimorphism in the Japanese mealybug. (2015) 日本応用動物昆虫学会第59回大会、山形大学
2. Minakuchi Chieka, Shiotuki Takahiro, Joraku Akiya, Tanaka Toshiharu, Veà Isabelle,

Expression analysis of the doublesex gene in the Japanese mealybug. (2015)日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、山形大学

3. 佐藤礼菜・加藤良晃・田中利治、*Meteorus pulchricornis* teratocyte の役割 (2015)日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、A221、山形大学

4. 澤友美・物部隆・中松豊・加藤良晃・田中利治、カリヤサムライコマユバチのポリドナウイルスが寄主の免疫反応に及ぼす影響 (2015)日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、PG031、山形大学

5. 横井翔・伊藤渉・加藤大貴・水口智江可・田中利治・三浦健、貯穀害虫コクヌストモドキの IMD 経路の分子解剖-続報 (2015)日本応用動物昆虫学会第 58 回大会、PG034、山形大学

6. 鈴木洋平、塩月孝博、上樂明也・三浦健・田中利治・水口智江可、ミカンキイロアザミウマにおける転写因子 e93 の cDNA 単離および発現解析 (2015)日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、PS089、山形大学

7. 加藤大貴・早川優輝・水口智江可・田中利治・横井翔・神谷克巳・三浦健、コクヌストモドキの昆虫病原性糸状菌に対する免疫応答-I (2015)日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、PS095、山形大学

8. 早川優輝・加藤大貴・森彩乃・水口智江可・田中利治・横井翔・神谷克巳・三浦健、コクヌストモドキの昆虫病原性糸状菌に対する免疫応答-II (2015)日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、PS097、山形大学

9. 鈴木洋平・横井翔・三浦健・田中利治・古田賢次郎・水口智江可 (2014)ミカンキイロアザミウマに対する JH 様活性物質の生理活性評価系の構築、日本応用動物昆虫学会第 58 回大会、高知大学

10. 向 冨子・成合宏之・西尾直人・加藤良晃・田中利治・中松豊 (2014)ギンケハラボソコマユバチの venom と virus-like particles の寄主幼虫の成長・発育および生体防御反応に影響を及ぼす physiological dose について、日本応用動物昆虫学会第 58 回大会、PS208、高知大学

11. 横井翔・加藤大貴・伊藤渉・水口智江可・田中利治・三浦健 (2014)コクヌストモドキの Spzle 遺伝子の微生物感染防御への寄与、日本応用動物昆虫学会第 58 回大会、PA031、高知大学

12. Magdaraog Peter・田中利治 (2013)種間競争における蜂が持つ生理的效果、日本応用動物昆虫学会第 57 回大会、高知大学

13. 澤友美・山際桃子・加藤久・藤本竜志・向冨

子・加藤良晃・立石剣・田中利治・中松豊 (2013)蜂の寄生が脂肪体の細胞遊出に及ぼす影響、日本応用動物昆虫学会第 57 回大会、PS066、高知大学

14. 米本和生・澤友美・田中利治・中松豊 (2013)外部寄生蜂アワヨトウスマユヒメコバチの毒液が寄主アワヨトウ幼虫の精巣に及ぼす影響、日本応用動物昆虫学会第 57 回大会、PS067、高知大学

15. 山路拓也、澤友美・田中利治・中松豊 (2013)シロヘリクチブトカメムシに適した餌食と唾液腺分泌物が餌食の行動や生体防御に及ぼす影響、日本応用動物昆虫学会第 57 回大会、PS068、高知大学

16. 小山裕明・横井翔・伊藤渉・水口智江可・田中利治・三浦健 (2013)コクヌストモドキの抗微生物ペプチド遺伝子の発現制御機構の解析 III-ペプチドグリカン認識タンパク (PGRP) ファミリー分子による制御、日本応用動物昆虫学会第 57 回大会、PS078、高知大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中利治 (TANAKA, Toshiharu) 名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授
研究者番号：302271521

(2) 研究分担者

川北一人 (KAWAKITA, Kazuhiro) 名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授
研究者番号：901860651

(3) 研究分担者

北島 健 (KITAJIMA Ken) 名古屋大学生物機能開発利用センター・教授
研究者番号：80192558

(4) 研究分担者

水口智江可 (MINAKUCHI, Chioka) 名古屋大学大学院・生命農学研究科・助教
研究者番号：90509134