

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450486

研究課題名(和文) ショウジョウバエ以外の昆虫種における液性免疫応答の機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of humoral immune signaling pathways in non-Drosophila insect species

研究代表者

三浦 健 (Miura, Ken)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60219582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の免疫系の研究は、学術的な意義に加え、昆虫病原微生物の害虫管理への応用などといった側面からも重要であるが、免疫系、特に感染時の液性免疫応答が包括的に理解されているのはモデル生物・ショウジョウバエのみであった。そこで我々はゲノムが明らかでRNA干渉も効きやすいコクヌストモドキを用いてショウジョウバエ以外の昆虫種での液性免疫応答の全体像の解明に取り組み、研究期間内にほぼそれを明らかにした。その結果、これら2種では液性免疫応答惹起の微生物種特異性が大いに異なっており、さらに感染シグナル伝達の種々の階層で異なった分子種を用いていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The investigation on insect immune systems is indeed required from the view point of comparative immunology as well as more practical applications like the use of entomopathogenic microbes for pest control, while the comprehensive information on insect immunity, especially regarding humoral immune signaling pathway activation upon microbial infection was available only in the model organism, Drosophila. Thus, we got started this project using Tribolium beetle, which is RNA interference-friendly and the genome information of which was available, to delineate the entire picture of humoral immune pathways in this beetle species. So far, we have elucidated the nearly whole image of the pathways, which shows distinct microbial specificity and different usage of molecular species at several levels of signal transduction in comparison with the Drosophila ones, giving another reference of insect immune signaling pathways.

研究分野：昆虫生理生化学

キーワード：昆虫 免疫

1. 研究開始当初の背景

昆虫の微生物感染時の免疫シグナル伝達経路に関する研究は当時、ショウジョウバエにける知見の集積が突出しており、他の昆虫種については包括的に全体像を示した研究がなかった。そのため、昆虫の免疫学の成果の応用面でもある、たとえば昆虫病原微生物を用いた害虫管理法開発などにおいても、その有効性評価時の解釈についてはショウジョウバエでの知見に頼ることが少なくなく、ショウジョウバエ以外の昆虫種における包括的な情報が求められていた。我々は当時すでにコクヌストモドキを用いて、以下の3に述べた知見を得ており、それをベースにこの昆虫種における液性免疫の全体像を明らかにすることを思い立った。

2. 研究の目的

そこで、コクヌストモドキを用いて、昆虫の免疫、特に液性免疫応答の機序の全体像を研究期間内に明らかにし、ショウジョウバエ以外の昆虫種での免疫シグナル伝達経路についての新たなリファレンスを提供することを目的として研究を開始することとした。研究遂行上、材料とする昆虫種は、網羅的な解析およびRNA干渉法を利用した遺伝子ノックダウン時の表現型解析がともに容易であることが大変有利に働いたため、コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*, 完全変態昆虫であるがショウジョウバエとは近縁ではない) の利用は非常に理にかなったものであったと考えている。

3. 研究の方法

主としてコクヌストモドキの蛹のステージを用いて研究を行った。本研究の開始に先立つフェイズの研究により、以下の内容を明らかにしており、この実験系を用いてさらなる解析を進めた。すなわち、まず、グラム陰性菌2種、グラム陽性菌2種および出芽酵母をモデル病原体として用いた場合の、ゲノムにコードされている9種すべての抗微生物ペプチド(以下AMPと略)遺伝子の発現誘導を調査し、急性の激しい誘導がおこるグループI遺伝子、急性の応答を示すが誘導レベルが劣るグループII遺伝子、穏やかかつ持続性の誘導が起こるグループIIIに分類した。続いて、細胞内アダプタータンパク質遺伝子およびNF- κ Bファミリー転写因子の遺伝子ノックダウンを行った個体へのモデル微生物感染を行い、上記の3つのグループのAMP遺伝子の発現誘導の表現型を調査した。その結果、昆虫の液性免疫応答の主要経路であるToll経路およびIMD経路がコクヌストモドキにも存在し、上記のグループI遺伝子はIMD経路の、グループIII遺伝子はToll経路、グループII遺伝子は両経路の制御下にあること、また両経路の活性化特異性については、感染微生物の種類に応じて使い分けがなされているショウジョウバエとは異なり、コク

ヌストモドキではいずれのモデル微生物種を用いてもこの二つの免疫シグナル伝達経路が同時に活性化されることを見出した。これらの知見および確立した実験系をベースとし、本研究では、感染時のシグナル伝達経路の他の階層に関しても包括的な調査を行った。具体的に解析対象としたものは、IMD経路の細胞膜上のレセプターをコードすると考えられるロングタイプのペプチドグリカン認識タンパク質(以下、PGRP)遺伝子群、Toll経路の体液中での微生物認識に与るとされるショートタイプのPGRP遺伝子群、Toll経路の細胞膜上のレセプターをコードするであろうToll遺伝子群、さらにはTollのリガンドとなるspätzleの遺伝子群である。これらに加え、他のいくつかの細胞内シグナル伝達関連遺伝子群、さらにはAMP産生応答に並んで重要な昆虫の液性免疫応答とされるメラニン生成を触媒する2つのフェノール酸化酵素前駆体(以下PPOと略)についても解析を行った。

これらについての共通の研究手法は以下の通りである。まず解析対象とする遺伝子群のリストを作り、同族のもの遺伝子数が多い場合には、分子進化学的アプローチを用いて対象とする遺伝子の数をある程度絞る。ついでそれらに対する2本鎖RNAを用いてノックダウン昆虫を作製する。ノックダウン効率を定量PCR法で確認した後に、同様のノックダウン昆虫に対してモデル微生物での攻撃を行いTollおよびIMD経路のリードアウトとして選んだAMP遺伝子の発現誘導に対する、それぞれの候補遺伝子のノックダウンの影響を定量PCR法を用いて評価する。続いて、その産物の免疫シグナル伝達経路への関与が明らかになった遺伝子については別途モデル病原微生物(細菌および糸状菌)を用いた感染・生存実験を行い、実際の防御についての寄与を評価するというものである。PPO遺伝子については発育に伴う構成的発現の変動、感染時の挙動とノックダウン時の防御の表現型についての調査を行った。

4. 研究成果

(1) ロングタイプ PGRP 遺伝子群

上述のように、コクヌストモドキの2つの感染シグナル伝達経路は、ショウジョウバエとは異なり、微生物種に対する活性化の特異性が低い。その理由として、それぞれの経路のセンサーの階層において特異性の低い微生物種認識が行われていることが考えられる。そこでまずIMD経路については、ロングタイプのPGRPに着目し、遺伝子ノックダウンに伴う微生物感染時のAMP発現誘導の表現型のシフトについて調査を行った(発表論文)。

コクヌストモドキのゲノムには、ロングタイプのPGRPが5種類コードされている。分子進化学的解析を行ったところ、コクヌストモドキには、ショウジョウバエIMD経路の細

胞膜レセプターである PGRP-LC の直接のオソログは存在しないが、同経路で補助的に働く PGRP-LE の直接のオソログは存在した。また、ショウジョウバエの PGRP-LC に存在する、IMD タンパク質など下流コンポーネントにシグナルを伝えるのに重要とされる RHIM-like モチーフは、コクヌストモドキの PGRP-LA、PGRP-LC、PGRP-LE の細胞内ドメインに見出された。まず、これら因子のシングルノックダウンと微生物感染時の AMP 遺伝子誘導に関する表現型の調査を行い、続いて冗長性が推定された場合にはマルチプルノックダウンを行った。

包括的な表現型アッセイの結果、コクヌストモドキの IMD 経路においては、PGRP-LA が中心的なレセプターとして機能し、この分子種がグラム陰性細菌とグラム陽性細菌の感染シグナルをいずれも受容することにより、感染微生物種に対する特異性の低い IMD 経路の活性化が起こることが示唆された。その他、PGRP-LC も両者の感染シグナルを受容して IMD 経路に補助的に関わり、PGRP-LE はグラム陰性細菌の感染シグナル受容に補助的に働くことが示唆された。なお、Toll 経路の最上流に位置すると推定されるショートタイプの PGRP についても検討を進めており、ショウジョウバエの例とは異なり、これらの Toll 経路の活性化への寄与は小さく、むしろ IMD 経路のネガティブフィードバックループを形成しているようである（北本篤志ら、論文準備中）。

(2) Toll 遺伝子

次いで Toll 経路の細胞膜上のレセプターをコードする Toll 遺伝子群についても同様の検討を行った。コクヌストモドキゲノムには Toll のバリエーションが 9 種類コードされており、網羅的な調査は作業量が多くなりすぎるため、他の昆虫種で AMP 産生応答に与ることが報告されている分子種、具体的にはショウジョウバエの Toll-1 と Toll-5、ならびに糸状菌に対する防御に関わるとされるネッタシマカの Toll-5A と分子進化学的に近いコクヌストモドキの分子種、すなわち Toll-1、Toll-2、Toll-3、Toll-4 の 4 種を選出し、ノックダウン実験を行った。まず、シングルノックダウン個体では、いずれモデル微生物で攻撃した場合においても、Toll-4 のシングルノックダウンにより、Toll 経路の制御下にあるグループ III 遺伝子の発現レベルが低下することが明らかとなった。さらに、網羅的なダブルノックダウンを行うことにより、コクヌストモドキの Toll 経路においては Toll-4 遺伝子産物が中心的な役割を担い、その他の 3 種の Toll 遺伝子産物は、感染微生物種の文脈に応じてそれぞれ補助的なはたらきをすることが明らかになった（加藤大貴ら、論文準備中）。このことは、初期発生での背腹軸決定に機能する Toll-1 を引き続き免疫系のレセプターとして再利用しているショウジ

ョウバエの系と際立った対照をなす。

(3) Spätzle 遺伝子

ショウジョウバエで Toll-1 のリガンドとされているのは Spätzle-1 である。コクヌストモドキゲノムには Spätzle が 7 種類コードされている。そこで Toll に用いた方法論と同様に、ショウジョウバエの Spätzle-1、ならびに生体防御応答への関わりが報告されているタバコスズメガの Spätzle と類縁性の高い、コクヌストモドキの Spätzle-1 と Spätzle-2 のシングルおよびダブルノックダウンをした後、モデル微生物で刺激し、Toll 経路制御下にあるグループ III AMP 遺伝子の挙動を調査した。しかし、予想に反してノックダウンの効果は全く観察されなかった。

そこで、少し異なったノックダウン戦略を試してみることにした。複数のノックダウンターゲットがある場合に、1 分子種を除いた残り全てを同時にノックダウンするというものである。Spätzle の場合には 7 種のバリエーションがあるので、それぞれ異なる 1 種類を除いた 6 種の 2 本鎖 RNA の混合液 7 通りを虫に注入することとなる。まず 7 種すべての同時ノックダウンを行った群では、グラム陰性細菌で刺激した場合を除いて、グループ III AMP 遺伝子の発現が低下することが示された。続いて、1 種類をのぞく残り 6 種の同時ノックダウン（すなわち特定の 1 分子種のみが生き残るようにする）の 7 通りの組み合わせを試験すると、Spätzle-7 以外の 6 種を同時ノックダウンした場合にのみ Spätzle 7 種の同時ノックダウンで観察されたグループ III AMP 遺伝子の発現抑制がレスキューされることが確認された。引き続き行った Spätzle-7 のシングルノックダウンが 7 種の Spätzle の同時ノックダウンと同様の表現型を示すことも確認され、コクヌストモドキの場合にはショウジョウバエと異なり、Spätzle-7 が Toll 経路への感染シグナルの入力を行うことが明らかとなった（横井翔ら、論文準備中）。

なお、ショウジョウバエと比較した場合のより重要な違いは、コクヌストモドキの Toll 経路において、Spätzle-7 を経由するのはグラム陽性細菌と出芽酵母の感染シグナルの一部であり、他は Spätzle-7 を経由しないこと、またグラム陰性細菌の場合にはその感染シグナル伝達は一切 Spätzle-7 に依存しないことが示唆されたことである。このことは、コクヌストモドキの Toll が、Spätzle をリガンドとするサイトカインレセプターとしての側面よりも、哺乳類の Toll-like レセプターに見られるような PAMP レセプターとしての性質を色濃く持つことを暗示しているのかも知れない。

(4) PPO 遺伝子

AMP 産生応答と並ぶ、重要な液性免疫の要素とされる PPO 遺伝子群によるメラニン生成

応答についても、ノックダウン個体の示す表現型について調査を行った。PPO の活性化とそれに続くメラニン生成は昆虫の生体防御にとって重要であるとされてきたが、近年 PPO 活性化カスケードの構成要素の突然変異系統あるいはノックダウン個体を用いた実験により、特にショウジョウバエを含む一部のハエ目昆虫では PPO の機能は微生物に対する防御に必須ではないという報告も散見されるようになっていた。そこで我々は、コクヌストモドキの PP01 および PP02 遺伝子のシングルあるいはダブルノックダウン個体を作製し、種々の微生物に対する防御の表現型について調査を行った。その結果、細菌種・*Bacillus subtilis* および糸状菌種・*Beauveria bassiana* の感染時の防御機構として PPO が実際に機能していることが示され、PPO の重要性は感染する微生物種に応じたものであることが示唆された(発表論文)。

(5)

以上、コクヌストモドキの液性免疫応答を担う因子について、我々が得た結果をショウジョウバエの系と比較しながら紹介してきた。まとめると、まずコクヌストモドキではショウジョウバエとは違い、感染微生物種に対する特異性が低く、Toll 経路と IMD 経路が同時に活性化される。つづいて、コクヌストモドキでは微生物感染を検知する階層の分子種として、ショウジョウバエとは異なるタイプを用いており、それらがより幅広い認識特異性を示すことが、感染微生物種に対する特異性の低い免疫シグナル伝達経路の活性化の分子的背景であることが示唆された。これらの結果については、発表論文(総説)も併せて参照されたい。またメラニン生成のキー酵素をコードする PPO 遺伝子についても、その微生物感染防御への寄与が感染する微生物種に依存することを明確に示すことができた。

以上のように、当初の研究目的であった、ショウジョウバエ以外の昆虫種を用いて、液性免疫応答の機序の全体像を明らかにし、新たなリファレンスを提供することをほぼ達成できたと考えている。今後はこれまで得た知見および構築した実験系をベースとし、生物農薬としても用いられる微生物種をより多く系に組み込んで、昆虫の免疫系とのせめぎ合いについて詳しく解析し、学術的および害虫管理に役立つ知見を蓄積していきたい。

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)

Yokoi, K., Hayakawa, Y., Kato, D.,
Minakuchi, C., Tanaka, T., Ochiai, M.,
Kamiya, K., Miura, K.
Prophenoloxidase genes and

antimicrobial host defense of the model beetle, *Tribolium castaneum*. J. Invertebr. Pathol., 132, 190-200. (査読有) doi:10.1016/j.jip.2015.10.008

Koyama, H., Kato, D., Minakuchi, C., Tanaka, T., Yokoi, K., Miura, K. (2015) Peptidoglycan recognition protein genes and their roles in the innate immune pathways of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. J. Invertebr. Pathol., 132, 86-100. (査読有) doi:10.1016/j.jip.2015.09.003

三浦健、加藤大貴、小山裕明、横井翔(2014)貯穀害虫コクヌストモドキの比較免疫学：抗微生物ペプチド産生応答におけるシグナル伝達。蚕糸・昆虫バイオテック、83, 143-152. (査読無)

Yokoi, K., Kamezaki, M, Yoshida, T., Tanaka, T., Miura, K. (2013) Sensitivity to RNA interference-mediated gene silencing in intact and ligated larvae of the armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Entomol. Zool., 48, 431-439. (査読有) doi:10.1007/s13355-013-0201-7

〔学会発表〕(計 10 件)

— 加藤大貴、早川優輝、北本篤志、志賀正太郎、神谷克巳、水口智江可、三浦健(代表)、コクヌストモドキ-糸状菌感染モデルにおける Toll 経路と IMD 経路の働き、日本昆虫学会第 76 回大会 第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、2016 年 3 月 26 日、大阪府立大学(大阪府・堺市)

— 森彩乃、早川優輝、加藤大貴、水口智江可、田中利治、横井翔、神谷克巳、三浦健(代表)、コクヌストモドキの免疫系と他の系との干渉と発育に伴う変化、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015 年 3 月 27 日、山形大学(山形県・山形市)

— 三浦健(代表)、加藤大貴、小山裕明、水口智江可、田中利治、横井翔、コクヌストモドキの免疫シグナル伝達経路の特性について、第 58 回日本応用動物昆虫学会大会、2014 年 3 月 27 日、高知大学(高知県・高知市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 健 (MIURA, Ken)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：60219582

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし()
研究者番号：