

論文の内容の要旨

論文題目 カイコにおける昆虫サイトカインによる自然免疫制御機構の解明

氏名 石井健一

【序】

生物が病原体による感染に対抗する上で、免疫機構は必要不可欠である。その免疫機構において、サイトカインと呼ばれる細胞外因子が免疫担当細胞間での迅速な情報伝達を担うことにより、効率的に病原体が排除される。一方で、サイトカインの働きを抑制し、免疫機構をかく乱することにより病原性を発揮する病原体が存在する。従って、サイトカインを中心とする免疫制御機構を解明することは、宿主生物が病原体との攻防を通して健康な状態を維持する仕組みを理解し、感染症に対する治療法を確立する上で重要な課題であると考えられる。しかしながら、免疫応答におけるサイトカインの働き、並びに病原体による免疫応答の抑制機構には未だ不明な点が多い。

抗体産生器官を持たない無脊椎動物では、抗体を介さない自然免疫機構による病原体排除が行われる。無脊椎動物の自然免疫応答(抗菌ペプチドによる溶菌反応、血球細胞による病原体の貪食反応等)と哺乳類のそれとの間には、多くの共通点がある。従って、哺乳類と比べ単純なシステムを持つ無脊椎動物は、自然免疫機構の根幹を理解する上で有用な研究材料であると考えられる。そこで私は、生化学的解析に適し、かつ注射や臓器摘出等の薬理実験が容易なカイコ *Bombyx mori* [1]をモデル動物として用いた。

これまでに私は、カイコの血液中に存在する昆虫サイトカインparalytic peptide (PP)が病原体由来成分により活性化され、カイコの細菌感染抵抗性に寄与することを報告している[2]。さらに私は、活性型PPがカイコの脂肪体及び血球細胞における免疫関連遺伝子の発現を誘導し、液性免疫及び細胞性免疫を共に活性化することを明らかにした[3]。従って PP は、

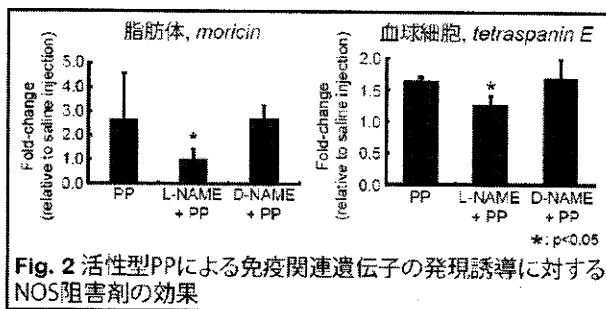
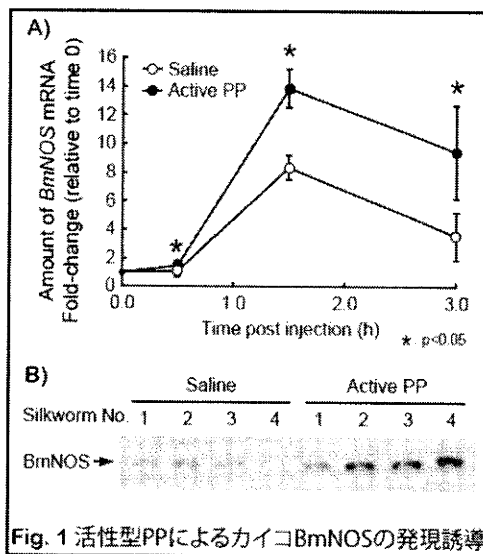
自然免疫応答を統合的に制御し、個体の感染抵抗性に寄与すると考えられる。しかしながら、PP がどのようなメカニズムにより免疫担当細胞における遺伝子発現を誘導するかは不明であった。私は、PP 注射後のカイコの免疫組織における遺伝子発現変動を網羅的に解析する中で、一酸化窒素合成酵素をコードする遺伝子(*BmNOS*)の発現量がPPにより上昇することを見出している[3]。NOは、即時型の情報伝達物質として免疫応答の活性化に寄与することが知られている。これらの知見から、PPが免疫組織におけるNOの産生を誘導し、それにより自然免疫系の活性化が引き起こされる、という仮説を立てるに至った。さらに私は、血球細胞による細胞性免疫応答の分子機構について解析を進める中で、日和見感染症の原因菌であるセラチア菌がカイコの血球細胞を殺傷することを見出した[4]。これまでの研究により、病原体認識に引き続くPP活性化反応には血球細胞が必要であることが示されている[2]。そこで私は、セラチア菌が血球細胞を殺傷することにより、昆虫サイトカインPPを中心とする免疫機構を抑制し、高い病原性を発揮すると考えた。

【結果・考察】

1. Paralytic peptideによる一酸化窒素NOを介した免疫関連遺伝子の発現誘導

定量的RT-PCR解析の結果、活性型PPを注射してから0.5-3 h後の脂肪体において、*BmNOS*遺伝子のmRNA量が增大することが判った(Fig. 1A)。また、脂肪体における*BmNOS*タンパク質の発現量を調べたところ、活性型PPによる発現上昇が見られた(Fig. 1B)。これらは、PPにより免疫関連遺伝子の発現が3時間以内の早い時期に誘導されるというこれまでの結果と一致する[3]。

次に、PPによる免疫関連遺伝子の発現誘導に対する*BmNOS*の寄与について検討した。脂肪体における抗菌ペプチド遺伝子(*moricin*)、及び血球細胞における貪食関連遺伝子(*tetraspanin E*)の発現量は、活性型PPの血液内注射により増加した(Fig. 2)。一方、NOS阻害剤であるL-NAMEをPPと同時に注射した場合、上記遺伝子の発現上昇率は低下した(Fig. 2)。それに対し、L-NAMEの不活性



型光学異性体であるD-NAMEは、これらの遺伝子のPPによる発現誘導を抑制しなかった(Fig. 2)。この結果は、PPによる複数の免疫関連遺伝子の発現誘導がNOを介することを示唆している。

2. PPによるNOを介したp38 mitogen-activated protein kinaseの活性化

これまでに私は、活性型PPがカイコの脂肪体においてp38 MAPKを活性化し、それを介して抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導を引き起こすことを示している[3]。また前項で私は、活性型PPによる脂肪体での抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導に、NOSの働きが必要であることを示唆した。そこで次に、活性型PPによるp38 MAPKの活性化反応にNOSが寄与するかについて検討した。その結果、活性型PPの血液内注射により誘導されるp38 MAPKのリン酸化は、L-NAMEとの共注射により阻害されていた(Fig. 3)。従って、PPのp38 MAPKを介した免疫応答に、NO産生が寄与すると考えられる。

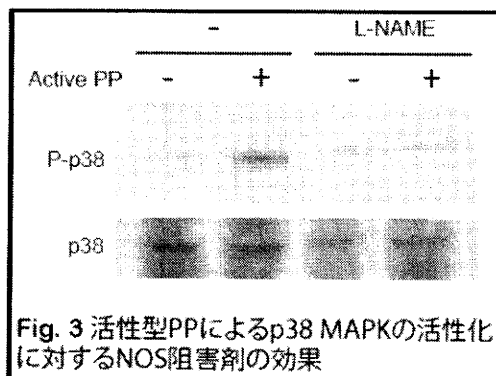


Fig. 3 活性型PPによるp38 MAPKの活性化に対するNOS阻害剤の効果

3. セラチア菌による、カイコ血球細胞の殺傷を介した病原性発現機構

セラチア菌はカイコに対して高い病原性を示す。この理由として、セラチア菌が宿主の自然免疫系を攻撃し、破壊することが考えられる。セラチア菌をカイコに血液内注射した後、血球細胞を分離したところ、大部分の血球細胞がトリパンブルー染色に対して陽性となり、殺傷されていた(Fig. 4A)。さらに、セラチア菌を注射したカイコにおいては、PPの活性化反応が抑制されていた。従って、セラチア菌はカイコ血球細胞を殺傷することにより、PPによる免疫応答の活性化を抑制すると考えられる。

次に、上述のセラチア菌による宿主免疫細胞の殺傷に必要な遺伝子群を同定する目的で、トランスポゾン挿入変異株のスクリーニングを行った。その結果、セラチア菌トランスポゾン挿入変異株1049株のうち、*in vitro*におけるカイコ血球細胞に対する殺傷能が低下した16株を得た。これらには、LPSへのO抗原付加に必要な*wecA*や鞭毛の

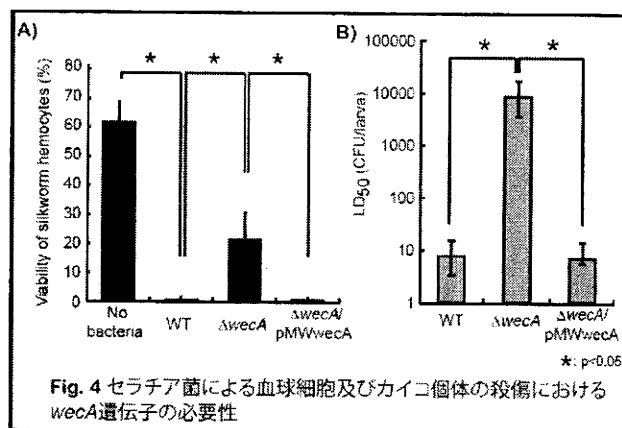


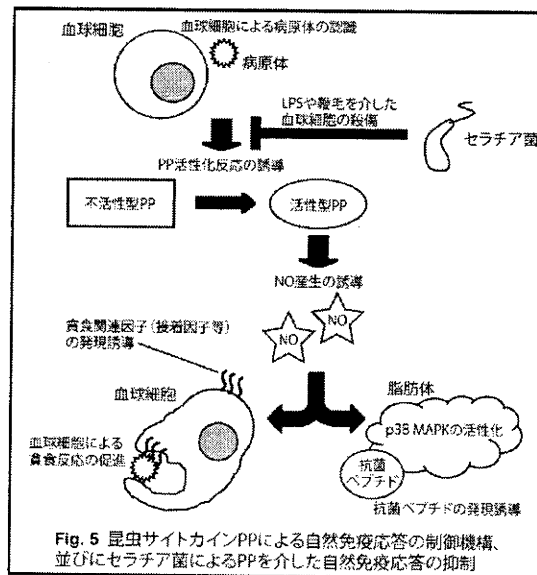
Fig. 4 セラチア菌による血球細胞及びカイコ個体の殺傷における*wecA*遺伝子の必要性

合成に必要な*flhD*及び*fliR*遺伝子の変異株が含まれていた。セラチア菌の*wecA*, *flhD*, または *fliR* 遺伝子破壊株は、カイコ血球細胞(Fig. 4A)、及びマウス腹腔内マクロファージに対する

殺傷能が野生株より低下していた。さらに *wecA* 遺伝子破壊株において、カイコ個体に対する殺傷能が著しく低下していた (Fig. 4B)。これらの結果は、セラチア菌による血球細胞の殺傷が病原性に寄与することを示唆している。

【総括】

本研究において私は、昆虫サイトカインPPが一酸化窒素合成酵素の発現を誘導し、その働きを介して血球細胞及び脂肪体において免疫関連遺伝子の発現及びp38 MAPKの活性化を引き起こすことを示した (Fig. 5)。これまで無脊椎動物の自然免疫系においてNO産生を誘導する仕組みは明らかにされていない。また、サイトカインがNO産生を亢進させることによりp38 MAPKの活性化を誘導し、免疫系を活性化することを示した例はない。本結果に



より、無脊椎動物においてNOが液性免疫及び細胞性免疫を同時に制御することが初めて示唆された。拡散性の情報伝達物質であるNOがPPの下流で働くことは、複数の組織での免疫応答を即時的に活性化する上で合理的であると考えられる。

本研究ではさらに、セラチア菌がLPSや鞭毛を介して血球細胞を殺傷することによりPPを介した免疫応答を抑制し、病原性を発揮することが示唆された (Fig. 5)。セラチア菌に関して免疫応答から回避することは報告されておらず、本研究により見出された *wecA* を初めとする病原性遺伝子産物がセラチア菌感染症治療の新規標的になると考えられる。このような免疫応答を抑制する病原体に関する研究を通して、細菌の病原性発現機構、並びに病原体との攻防を担う免疫系の重要性とその分子機構が解明され、新しい感染症治療法の確立につながると期待される。

【発表論文】

- [1] Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K, Sekimizu K. (2010) *J Biol Chem* 285(43): 33338-47.
- [2] Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Sekimizu K. (2008) *J Biol Chem* 283(4):2185-91.
- [3] Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Nakamura Y, Noda H, Imamura K, Mita K, Sekimizu K. (2010) *J Biol Chem* 285(37):28635-42.