

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 チョウ目昆虫で見いだされた新規血球種の、細胞性および液性免疫機序における役割に関する研究

氏名 加藤 良晃

## 論文内容の要旨

免疫システムは一般に、生殖系列の細胞にコードされるレセプターを異物あるいは非自己の認識に用いる自然免疫と、体細胞系列での組換えにより天文学的な多様性を与えられた抗原レセプターを用いる獲得免疫に分類される。本研究で対象とした昆虫を含めた無脊椎動物は獲得免疫のシステムを持たないことが知られている。自然免疫および獲得免疫は便宜的に液性の因子の働きが中心となる液性免疫と、主として細胞の働きが重要となる細胞性免疫にさらに分類されるが、これらは単独で機能するものではなく、互いに連携し合って異物の排除にはたらくと考えられている。自然免疫のカテゴリーに属する液性免疫応答として、例えば構成的に発現しているリゾチーム等の酵素による溶菌や、異物に特異的な表面構造の分子パターンが種々のパターン認識レセプター（PRR）に認識されることを端緒とする、炎症関連因子や抗菌性因子の誘導的な産生を挙げることができ、これらは脊椎動物、無脊椎動物を問わずに見られる応答である。加えて、昆虫および一部の節足動物では、フェノール酸化酵素（PO）によってそのいくつかのキーとなるステップが触媒されるメラニン生成応答が、自然免疫機序の重要な構成要素であると云われる。POの不活性な前駆体（PPO）の活性化型酵素への改変は、上述の抗菌性物質の産生と同様に、侵入した異物表面のペプチドグリカンやリポポリサッカライド等の分子パターンをペプチドグリカン認識タンパクやimmulectin（IML）に代表されるC-typeレクチン等のPRRが認識することにより開始され、続いて連続的なセリンプロテアーゼの活性化カスケードを経て、最終的にPPOがPPO活性化酵素（PPAE）あるいはPPO活性化プロテアーゼ（PAP）により部分消化されることにより、活性化型のPOが生成される。なお、PAPがPOの活性化にはたらく場合には、補助因子としてセリンプロテアーゼホモログ（SPH）が必須とされている。活性化されたPOはフェノール性の物質を基質とし、細胞毒性を持つキノン類を中間生成物とし、最終的に、POおよび

他の酵素によって触媒されるステップに加え、非酵素的なものを含めた反応の結果、高度に重合したポリマーであるメラニンが生ずる。中間産物であるキノン類はその反応性の高さから、細菌等の病原体のみならず宿主自身にも害があることが知られており、PPOの活性化は炎症局所でのみ、かつ制御可能なかたちで起こるように、セリンプロテアーゼインヒビター（セルピン）類やPO活性の阻害因子類などの機能を通じた過剰な反応の進行の抑制や、異物認識に与るC-typeレクチンであるIML-2がSPHやPAP、PPOと複合体を形成し、メラニン化の場を異物表面上に限定するなど、厳密な反応の制御がなされていると考えられている。

一方の細胞性免疫応答としては、液性免疫同様にPRRを介した病原体の貪食とそれに続くライソゾーム系酵素による水解、また細胞内に侵入した病原体についてはオートファジーやアポトーシスの誘導などによる病原体の増殖抑制が脊椎動物および昆虫を含めた無脊椎動物で知られている。特に、ガス交換に血液を利用しないため赤血球に相当する細胞種を持たない昆虫類では、その全ての血球種が生体防御に関わっていると考えられており、昆虫の示す細胞性免疫応答は、侵入する異物の種類や量に応じて機能する、以下の主要な3つに分類される。まず、小型の異物を食作用により処理する貪食、次いで、貪食できない大型の異物を血球が取り囲んで体腔内で隔離して殺滅する包囲化、また小型の異物でも大量に侵入した場合には包囲化と似た機序で血球が集積して異物を包み込むノジュール形成である。これらのうち包囲化およびノジュール形成はメラニン化を伴うことが多く、細胞性および液性の免疫機序が協奏的に機能するメカニズムを研究する事例として適していると著者は考えた。そこで本研究では、細胞性免疫応答を担う血球のはたらきと主要な液性免疫応答であるメラニン化の連携のメカニズムを明らかにすることを目的とし、材料としたチョウ目昆虫の*Mythimna separata*（和名：アワヨトウ）で新規に見出したhyper-spread cell（HSC）がこの連携において中心的な役割を担うという作業仮説に基づき、分子的・形態学的手法を用いて研究を進めた。

チョウ目昆虫の血球はその形態学的特徴と機能から、一般に以下の5種類に分類されている。すなわち、1) 異物に対する接着能および貪食能を有する顆粒細胞、2) 顆粒細胞と比較すると貪食能には乏しいが異物表面でよく伸展するプラズマ細胞、3) 接着能を持たず大型の顆粒を有する小球細胞、4) 造血細胞と考えられている原白血球、5) PPOを産生するエノシトイドである。

本研究ではまず、生体外に取り出した血球の挙動を経時的に追跡することにより、*Mythimna separata*の幼虫より新規の血球種（hyper-spread cell; HSC）を発見した。このHSCは異物表面に特異的に接着・伸展し、その外縁に種々のタンパク質性の物質を集積させ、最終的に褐色のメラニンの生成と沈殿が観察される。この外縁部にはメラニン化のキー酵素であるPPOをはじめ、その活性化に重要な機能を果たすタンパク質であるIML、PAP、SPHが含まれていた。これらのうちIML、PAPは主として血球で、PPOは特にエノシトイドで産生され、SPHは血球と脂肪体（脊椎動物の肝臓に相同）の両方で産生され

る事が分かった。加えて、IML、SPHおよびPPOは反応開始前に血漿中に、PAPは血球と血漿の両者に存在している事が明らかとなった。つまり、HSCの周囲で血漿中からリクルートされたPPOが、同様に血漿由来のIMLとSPH、加えて血球から新たに放出された、あるいは血漿中にもともと存在したPAPの集積により活性化された結果、メラニンの局所的な生成と沈殿が起こったことが示唆された。加えて、人工の異物であるカバーガラスや生物的な異物である寄生蜂の幼虫に対する、メラニン化を伴う包囲化をよく観察すると、これら異物の表面にはHSCの周囲にできるものと類似した褐色のリングが見られた。また、熱処理した大腸菌や出芽酵母を *M. separata* 幼虫に注入してノジュール形成を誘導すると、接着血球に占めるHSC数が減少した。このことからノジュール形成によってHSCが消費されたと推測できる。これらの結果により、HSCは包囲化やノジュール形成といった、メラニン生成応答を伴う細胞性免疫応答に大きく関与することが強く示唆された。すなわち、HSCはまず包囲化やノジュール形成の初期に、異物表面を認識して（あるいは異物表面に集合しつつある細胞の層を認識して）接着伸展しつつ、その周囲にPPOおよびPPO活性化に関連するタンパク質を集積させ、自身の近傍でPO反応を引き起こし、メラニンを沈殿させる。言い換えれば、異物表面に接着したHSCは自身を起点としてPPOの活性化およびそれに続くメラニン生成応答を惹起することにより、無秩序な反応の暴走によって宿主自身にも害が及ぶことを回避し、反応を異物上に限定する役割を担っていると考えられる。このようにHSCは、細胞性免疫応答と液性免疫応答が効果的に連携する場を提供する重要な血球種であることが強く示唆された。

また、*M. separata*を宿主とする寄生蜂の1種である *Cotesia kariyai*は、自身が持つ共生ウイルスと毒液を卵と同時に注入することで、HSCの機能を特異的に阻害し、寄生を成功させる戦略を用いることが示唆された。

