

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 加藤良晃

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

論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	三浦 健
委員	名古屋大学教授	山本直之
委員	名古屋大学教授	池田素子
委員	名古屋大学助教	山田早人

我々人間の免疫システムは、無脊椎動物においても見出される、パターン認識レセプターを用いる自然免疫と、天文学的な多様性を持つ抗原レセプターを用いる獲得免疫の2つから構成されている。これにより、たとえば病原体の侵入時には初動としてまず自然免疫に属する機序がはたらき、それによって病原体の排除ができない場合には引き続いて適応免疫が発動してより精緻な異物排除の機序がはたらくという二階層構造を取っている。一方、本論文での研究対象である昆虫を含めた無脊椎動物の免疫システムは自然免疫のみから構成されている。しかしながら、昆虫においても病原体や異物の排除は十分に機能していることが知られている。

自然免疫および獲得免疫はいずれも、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よりむしろ互いに連携し合うことにより、より効率的に異物排除にはたらくと考えられている。従って、昆虫において液性免疫と細胞性免疫が連携するメカニズムを明らかにすることは、自然免疫のみで病原体の感染に対抗し得る昆虫の特性の理解に繋がる学術的な意義に加え、たとえば害虫防除に昆虫に病原性を持つ生物を利用する際の有用な知見が得られる可能性もあると考えられる。さて、自然免疫のカテゴリーに属する液性免疫応答の例としては、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、微生物の表面構造の分子パターンを認識するレセプター (PRR) によって開始される、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。一方、昆虫および一部の節足動物では、フェノール酸化酵素 (PO) によって触媒されるメラニン生成応答が、自然免疫における液性の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) の活性型酵素への変換は、上述の抗菌性物質の産生と同様に、侵入した異物表面の分子パターンをペプチドグリカン認識タンパクやイミュレクチン (IML) 等の PRR が認識することにより開始され、数段階の反応カスケードの後、最終的に PPO 活性化プロテアーゼ (PAP) により PPO が部分消化されて活性型 (PO) となる。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、キノン類を中間産物として生成し、最終的には高度に重合したポリマーであるメラニンの生成に与る。これらのうち、キノン類は細胞毒性を持ち、過剰に産生されれば宿主自身にも害がある。そこで、PPO の活性化およびその触媒する反応が炎症局所でのみ、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、過剰な反応の進行を抑制する機構、また異物認識に与る C-type レクチンである IML-2 が SPH や PAP、PPO と複合体を形成してメラニン化の場を異物表面上に限定する機構、などにより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細胞内消化、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。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以下の3つに大別される。すなわち、小型の異物は貪食により処理される。次いで、貪食できない大型の異物は多数の血球に取り囲まれ、体腔内で隔離・殺滅される（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）。これら3つのうち、包囲化とノジュール形成は高頻度でメラニン化を伴うことが知られる。このメラニン化を伴う細胞性の応答は上で述べた、細胞性および液性の免疫機序が連携してより効率的な異物排除に機能する好例である。そこで本論文ではこれらの系を用い、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との連携のメカニズムを明らかにすることを目的として一連の研究を行った。材料としてはチョウ目害虫の *Mythimna separata* (和名:アワヨトウ) を用い、形態学および分子的手法を利用して以下のような知見を得た。

第二章と第三章ではまず、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、*M. separata* の幼虫より新規血球種を発見し、hyper-spread cell (HSC) と名付けた。さらに、この HSC に関しての詳細な解析を行い、その結果、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を引き起こすことを明らかにした。続いて、免疫化学的手法を用いて、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 が含まれることを証明した。さらに、免疫化学および in situ hybridization 法を用いて、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と呼ばれる血球種で産生され、SPH は血球と脂肪体（脊椎動物の肝臓に相同）の両方で産生された上、HSC の周囲に集積することを明らかにした。すなわち、HSC が中心となり、その周囲に PPO が血漿中から、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 がリクルートされて集積し、これらの複合体中で PPO が活性化された結果、メラニンの局所的な生成が起こることが示された。これはまさに、異物に接着・進展するタイプの血球である HSC が、代表的な液性免疫応答であるメラニン化を、自身の周囲に空間的に限定するメカニズムを示唆するものである。

これらの知見は in vitro での解析により得られたものであるが、第四章においては、in vivo での解析を進め、まず、人工的な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を *M. separata* の幼虫に移植し、それらに対して起こる、メラニン化

を伴う包囲化を形態学的に観察した。その結果、これら異物の表面に HSC の周囲にできるものと類似した褐色のリングを見出し、in vivo でのメラニン化を伴う包囲化への HSC の関与を示唆する結果を得た。さらにこれらの章では、ノジュール形成に関しても研究を進めた。たとえば、熱処理した大腸菌や出芽酵母を *M. separata* 幼虫に注入してメラニン化を伴うノジュール形成を誘導した場合、循環血球中の HSC の数が減少した。これらの結果により、HSC は包囲化およびノジュール形成という in vivo でのメラニン化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 によるメラニン化反応を引き起こし、メラニンを沈殿させる。つまり、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察した。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。

上述のように本論文においては、*M. separata* における新規の血球種の発見から、それに続くこの血球種の性格付けを通じて、自然免疫しか持たない昆虫においての、細胞性と液性の機序が巧みに連携して異物排除に働くしくみの一端が解明されている。本論文で得られたこれらの知見はいずれも、比較免疫学および昆虫の生理生化学の発展に大きく貢献した。従って、当審査委員会は、本論文が博士（農学の）学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	加藤 良晃
試験担当者	主査 三浦 健 山本 直之 池田 素子 山田 早人			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成28年8月3日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				