

カイコにおける昆虫サイトカイン paralytic peptide を中心とする自然免疫制御機構

1. はじめに

生命体は、細胞および個体レベルで互いの存在を認識し、協調または競争する中で進化を遂げてきた。そのような生命体どうしの攻防が繰り返される局面の一つに「感染」がある。一般に「感染」とは、ある生命体（病原体）がほかの生物（宿主生物）の体内に侵入し、そこで定着および増殖をする過程を指す。不顕性感染を除き、感染を受けた宿主生物は体内に障害を受け、何らかの症状が現れることが多い。このような感染症が細菌等の微生物により引き起こされることは、今日広く受け入れられているが、百余年前には、感染症は非微生物性の発酵素により伝播すると信じられていた。これを Pasteur らが覆した¹⁾ことにより、感染症研究の道が拓かれた。それ以来、感染の場での病原体の精緻な生存戦略と、それに対抗する免疫細胞の動的な振る舞いに魅せられた多くの研究者により、感染症研究が営々と精力的に進められている。

地球上のほとんどすべての動植物は、病原体による感染の危険に常時さらされている。病原体が宿主生物の全身に蔓延した場合、宿主の恒常性維持機能が破綻して活動量の低下を招き、極端な場合は死に至る。これらの事態を防ぎ、宿主生物が健康に生存し繁栄する上で、病原体による感染症に打ち勝つための免疫機構が必要不可欠である。宿主生物が効果的に病原体を排除する上で、機能の異なる多種の免疫細胞を協調的に働かせる必要がある。その際に細胞間の情報伝達を担う分子群がサイトカインである。サイトカインは免疫活性化に必要である一方で、その過剰産生が敗血症や多臓器不全等を引き起こすと考えられている。このような過剰に産生されたサイトカインにより引き起こされる免疫疾患の発症機構には不明な点が多く、有効な治療法がまだ確立されていない。したがって、サイトカインを中心とする免疫機構の働きを解明することは、宿主生物において健康な生命状態が維持される仕組みを理解し、ヒトの感染症や免疫関連疾患の克服を目指す上で重要な課題と考えられる。

2. カイコをモデル動物とした自然免疫研究

脊椎動物の免疫系は、抗体の産生を中心とする獲得免疫

系と、それ以外の自然免疫系に大別される。そのうち後者は感染初期において生体防御の第一線で働き、サイトカインを介して前者を含む多様な免疫応答を制御する。抗体産生器官を持たない無脊椎動物では、自然免疫に依存した病原体排除が行われる。この自然免疫系の根幹をなす仕組みや分子の基本的な性質は、無脊椎動物から脊椎動物まで高度に保存されている²⁾。したがって、自然免疫機構を解明する上で、単純な生理システムを有する無脊椎動物は、研究材料として有用であると考えられる。

上記の考えに基づき、近年では昆虫をモデルとした自然免疫系の解析が多くなされている。昆虫は、哺乳動物の肝臓や脂肪組織に相当する脂肪体と呼ばれる器官を有する。また昆虫の血液中には、ヒトのマクロファージに代表される貪食細胞と同様の働きを担う血球細胞が存在する。ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により、主要な液性免疫応答である、脂肪体での抗菌ペプチド産生に寄与する Toll 経路の存在が示された³⁾。このショウジョウバエでの Toll 経路の解析は、哺乳動物における Toll 様受容体の研究へと発展して自然免疫系の高い保存性を裏づける結果となり、2011年ノーベル医学・生理学賞の授賞対象となった。また、細胞性免疫応答を担う血球細胞による病原体の貪食反応には、接着因子、細胞骨格系因子、並びに消化酵素等が連動して働く。一方で、昆虫の脂肪体や血球細胞といった免疫組織での個々の病原体排除応答を統合的に制御する昆虫サイトカインの研究はほとんどなされておらず、感染時に細胞間での連携がどうなされるか不明な点が多く残されていた。

これまでに我々は、カイコを感染モデル動物とする創薬基盤研究を進めてきた。カイコは哺乳動物と比べて飼育コストが安く、動物愛護の観点からの倫理的規制が小さい。また、ショウジョウバエや線虫等の無脊椎動物と比べサイズが大きいこと、注射や組織の摘出といった薬理的・生化学解析が容易である。これらカイコの実験動物としての利点を生かして我々は、抗生物質の治療効果の評価⁴⁾、並びに細菌の病原性発現機構の解明を行ってきた^{5,6)}。本稿では、上記研究の過程で我々が進めてきた、カイコの病原体に対する防御機構、特に昆虫サイトカインを中心とする新しい自然免疫活性化機構に関連した研究を紹介する。

3. 昆虫サイトカイン paralytic peptide の活性化機構

我々が自然免疫研究に着手する以前より、カイコにおいて paralytic peptide (PP) と呼ばれるペプチドの存在が知られていた。PP は不活性な前駆体タンパク質としてカイ

コは血液中に存在し、プロテアーゼによる切断を受けると活性型ペプチドとなる⁷⁾。また、活性型PPはカイコの傷口から漏出した血液中で生じる⁷⁾。もともとPPは、カイコの血液をほかのカイコへ血液内注射した際に引き起こされる、全身の筋肉の硬直を伴う麻痺 (paralysis) を誘導する活性因子として同定されていた⁸⁾。活性型PPは麻痺以外に、血球細胞の形状を変化させる活性を有することから⁹⁾、免疫応答への寄与が推測されていたが、その活性化機構並びに生理的意義は不明であった。我々は、上述のカイコを用いた感染症研究を行う過程で、高濃度の細菌および真菌の熱処理死菌をカイコに血液内注射すると、PPによる麻痺と類似した緩やかな筋肉収縮を伴う麻痺が起こることを見いだした。この知見から我々は、病原体感染によりPP活性化反応が誘導され、それにより生じた活性型PPが自然免疫応答に寄与するという仮説を立て、それを検証した。

まず我々は、細菌および真菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンおよびグルカンが、カイコの筋肉収縮を誘導することを示した (図1A)。一方で、抗PP血清は上記のカイコにおける筋肉収縮を抑制した。さらに、ペプチドグリカンおよびグルカンは血液中での活性型PPの産生を誘導し (図1B)、その反応には生きた血球細胞の働き、活性酸素種の生成、並びにセリンプロテアーゼの活性化が必要であることがわかった。さらに我々は、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデル系を用いて、PPが個体の細菌感染抵抗性に寄与することを示した (図1C)¹⁰⁾。

4. 昆虫サイトカイン paralytic peptide による自然免疫応答の制御機構

その後我々は、活性型PPがカイコの複数の免疫組織に情報を伝達し、下流の自然免疫応答を制御する仕組みについて解析した。まず、活性型PPを血液内注射したカイコの免疫組織である脂肪体および血球細胞について、マイクロアレイ法による遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。その結果、PPの投与により、脂肪体では抗菌ペプチド遺伝子が、また血球細胞では貪食関連遺伝子が発現上昇することが明らかとなった。さらに、PPが脂肪体においてストレスシグナル因子 p38 MAPK の活性化を介して抗菌ペプチドの発現を誘導すること、並びにPPがカイコ血球細胞による細菌の貪食を促進することが見いだされた。これまで昆虫の自然免疫系に寄与するサイトカイン様因子として、Spaetzle, Eiger, および Unpaired-3 などが報告されていた。PPは、複数の免疫組織に作用して種々の免疫応答

を統合的に制御し、個体の感染抵抗性に寄与するという点で、上記の因子群と異なる性質を示す昆虫サイトカインであると考えられる¹¹⁾。

さらに最近我々は、上記の網羅的解析の過程で、PPを注射したカイコの脂肪体において一酸化窒素合成酵素をコードする遺伝子 *BmNOS* が発現上昇していることを見いだし、PP経路におけるNOの寄与を明らかにした。NOは病原体に対して直接的な殺菌効果を示すだけでなく、細胞における遺伝子発現の変動を誘導することが知られている。我々は、活性型PPを注射したカイコの脂肪体において *BmNOS* の発現量が増大し (図1D)、NO産生が亢進することを示した。さらに我々は、PPによる免疫関連遺伝子の発現誘導 (図1E)、p38 MAPK の活性化、並びに細菌感染抵抗性の上昇が、いずれも NOS 阻害剤により抑制されることを示した。したがって、PPはNO産生を介して複数の免疫組織における遺伝子発現を誘導し、自然免疫応答を促進すると考えられた (図1F)¹²⁾。これまで無脊椎動物において、NOの自然免疫系への寄与は知られていたが、その産生を誘導する機構は不明であった。本結果は、無脊椎動物において、サイトカインによりNO産生機構が作動し、宿主感染抵抗性に寄与することを示した初めての例である。

これまでPPの一次配列上のホモログは、カイコを初めとする鱗翅目昆虫の間に見いだされていた¹³⁾。最近、ショウジョウバエにおいてもPPのホモログ因子が存在することが報告されており¹⁴⁾、今後これらの自然免疫応答における役割が遺伝学的・生化学的に解析されると期待される。PPの立体構造中には、epidermal growth factor (EGF) のC末端領域と共通した部分が見いだされ、さらにPPのホモログ因子が *in vitro* でEGF受容体と相互作用することが示されている。また、EGFは培養細胞に対し *NOS* 遺伝子の発現を誘導し、上皮創傷部の修復を促す。これらの知見から、カイコのPPおよび哺乳動物のEGFは、ともにNOを介して情報伝達するという点で、機能的な共通性を有していると考えられる。今後、PPとEGFの類似性という観点から、昆虫サイトカインの機能解明の道が開かれると期待される。

5. カイコを用いたセラチア菌による自然免疫抑制機構の解明

我々はこれまでに、ヒトに対するさまざまな病原性細菌をカイコに注射すると、カイコが殺傷されることを報告している^{5,15)}。中でも *Serratia marcescens* (セラチア菌) はき

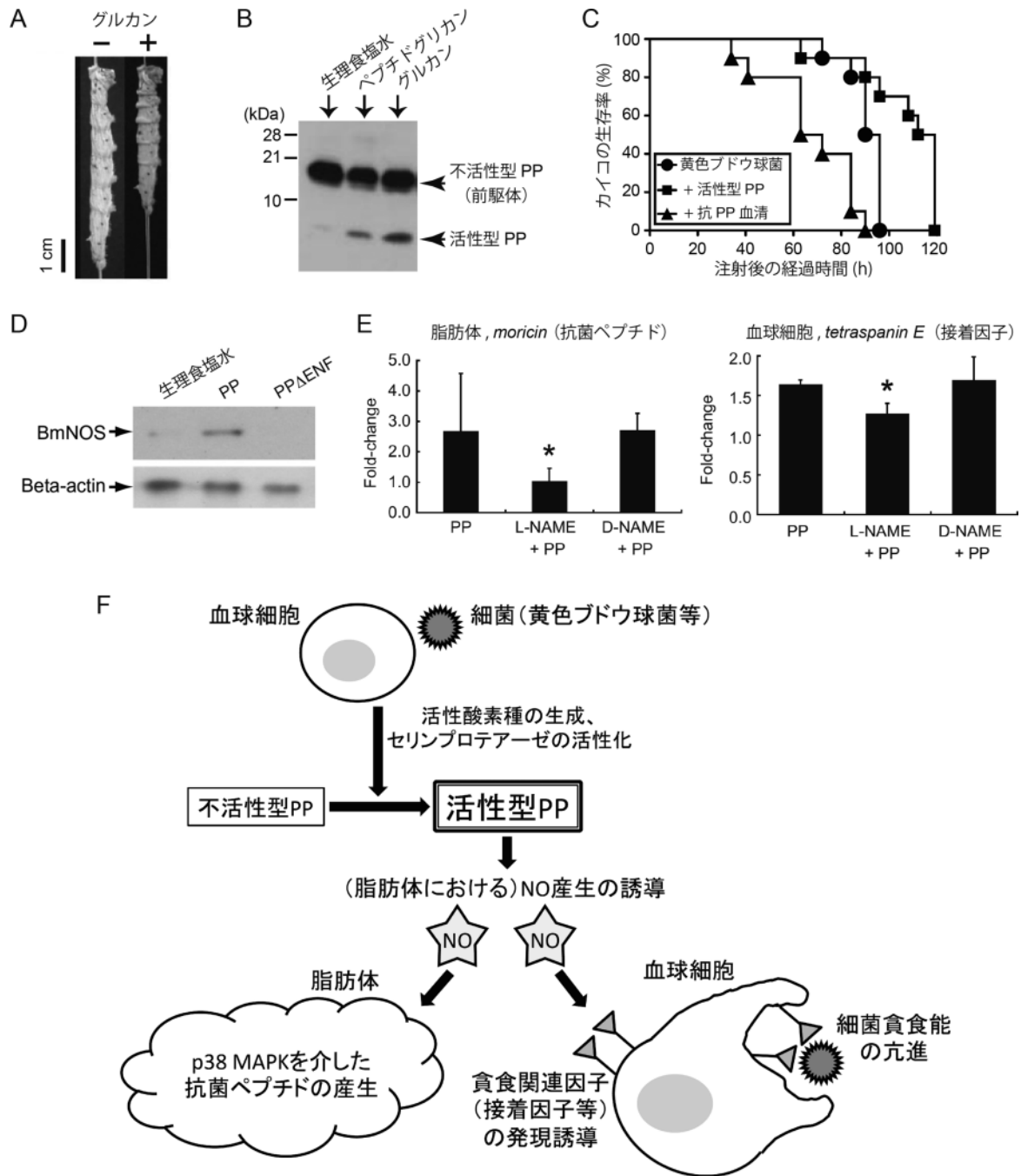


図1 カイコにおける昆虫サイトカイン PP を中心とする自然免疫制御機構

(A) カイコ断頭筋肉標本における、酵母由来グルカンの体腔内注射による筋肉収縮の誘導。(B) 病原体由来成分によるカイコ血液中での活性型 PP の生成。(C) カイコの黄色ブドウ球菌に対する感染抵抗性における PP の寄与。カイコの黄色ブドウ球菌による感染死が、活性型 PP の投与により遅延した一方で、PP の作用を抑制する抗 PP 血清により早まった。(D) 活性型 PP によるカイコ脂肪体における BmNOS タンパク質の発現誘導。近縁種の間で保存されている N 末端の ENF 残基を欠失させた変異型 PP (PPΔENF) の血液内注射では、BmNOS タンパク質の誘導はみられなかった。(E) 活性型 PP による免疫関連遺伝子の発現誘導に対する NOS 阻害剤 (L-NAME) の効果。L-NAME の不活性な光学異性体である D-NAME では、PP による遺伝子発現の抑制効果がみられなかった。(F) 昆虫サイトカイン PP の活性化機構並びに自然免疫制御機構のモデル図。(B, C) は文献 10 より、(D, E) は文献 12 よりそれぞれ改変して記載している。

わめて少ない菌数でカイコを殺傷する。セラチア菌は、ヒトの易感染者に対し敗血症等を引き起こす日和見感染菌である。我々は、セラチア菌が宿主生物の自然免疫系を破壊させ、病原性を示すのではと考えた。セラチア菌は、カイコの血球細胞に対してアポトーシスを誘導し(図2A)、上述のPP活性化反応(生きた血球細胞の動きを必要とする)を抑制した(図2B)。またセラチア菌は、マウス腹腔内マクロファージに対しても殺傷効果を示した。さらに我々は、セラチア菌トランスポゾン挿入株のスクリーニングにより、細菌の運動性に寄与する鞭毛およびリポ多糖合成系因子がこの菌による血球細胞の殺傷に必要であることを見いだした(図2C)。以上の結果は、セラチア菌が血球細胞を殺傷することによりサイトカインの活性化をはじめとする自然免疫応答を抑制し、病原性を発揮することを示唆している(図2D)¹⁶⁾。

6. おわりに

昆虫は種数が多く全生物種の約8割を占めており、多様

な進化を遂げてきた。一方で、免疫系は生物が健康を維持し繁栄する上で不可欠な機構であり、その根幹は広く保存されていると考えられる。我々はカイコを用いて昆虫サイトカインを中心とする新しい免疫制御機構の存在を明らかにし、解析を進めてきた。PPにより発現変動する遺伝子群には、新規なサイトカイン様因子が複数含まれていた¹¹⁾。これらの知見より、これまで単純な異物認識・排除機構しか備わっていないと考えられてきた昆虫において、複雑な「サイトカインネットワーク」が存在し、多種の免疫細胞どうしが情報交換しているという見方を我々は提案したい。今後、昆虫におけるサイトカインネットワークの全体像を明らかにすることを通じて、生物種間で保存された新しい免疫制御機構の発見が期待される。その一方で、病原体も免疫系による攻撃にさらされながら進化を続けている。宿主生物と病原体がどのような攻防を繰り返すかを解明することが、感染症の全貌を捉えた新しい治療法の確立につながると我々は考えている。

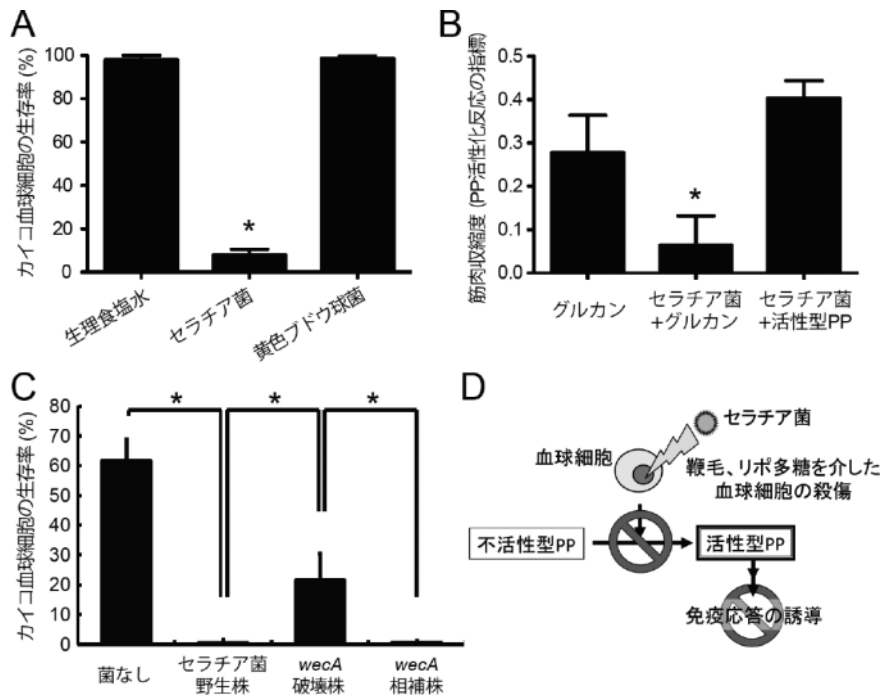


図2 セラチア菌による自然免疫抑制機構

(A) セラチア菌によるカイコ血球細胞の殺傷。セラチア菌または黄色ブドウ球菌の生菌懸濁液をカイコへ血液内注射した後、分離された血球細胞の生存率を trypan blue 染色により測定した。(B) セラチア菌によるカイコ筋肉標本における筋肉収縮の抑制。(C) セラチア菌によるカイコ血球細胞の殺傷における *wcaA* 遺伝子(リポ多糖合成系因子)の必要性。(D) セラチア菌による血球細胞の殺傷を介した自然免疫抑制機構のモデル図。(A~C)は文献16より改変して記載している。

- 1) Pasteur, L. (1882) *Br. Med. J.*, 1, 489.
- 2) Hoffmann, J.A. (2003) *Nature*, 426, 33–38.
- 3) Lemaître, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996) *Cell*, 86, 973–983.
- 4) Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Razanajatovo, I.M., Kusuhara, H., Santa, T., & Sekimizu, K. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 774–779.
- 5) Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., & Sekimizu, K. (2002) *Microb. Pathog.*, 32, 183–190.
- 6) Kaito, C., Kurokawa, K., Matsumoto, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Hamada, S., & Sekimizu, K. (2005) *Mol. Microbiol.*, 56, 934–944.
- 7) Kamimura, M., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Tsuzuki, S., Hayakawa, Y., & Kiuchi, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286, 67–73.
- 8) Ha, S.D., Nagata, S., Suzuki, A., & Kataoka, H. (1999) *Peptides*, 20, 561–568.
- 9) Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., & Kamimura, M. (2003) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 52, 163–174.
- 10) Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., & Sekimizu, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 2185–2191.
- 11) Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Nakamura, Y., Noda, H., Imamura, K., Mita, K., & Sekimizu, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 28635–28642.
- 12) Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., Oonishi, T., Kamimura, M., Imamura, K., & Sekimizu, K. (2013) *Dev. Comp. Immunol.*, 39, 147–153.
- 13) Clark, K.D., Volkman, B.F., Thoetkiattikul, H., Hayakawa, Y., & Strand, M.R. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 37431–37435.
- 14) Tsuzuki, S., Ochiai, M., Matsumoto, H., Kurata, S., Ohnishi, A., & Hayakawa, Y. (2012) *Sci. Rep.*, 2, 210.
- 15) Ishii, K., Hamamoto, H., Imamura, K., Adachi, T., Shoji, M., Nakayama, K., & Sekimizu, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 33338–33347.
- 16) Ishii, K., Adachi, T., Imamura, K., Takano, S., Usui, K., Suzuki, K., Hamamoto, H., Watanabe, T., & Sekimizu, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 36582–36592.

石井 健¹, 浜本 洋², 関水 和久²

¹ 東京大学大学院理学系研究科,

² 東京大学大学院薬学系研究科)

Regulation of innate immunity by the insect cytokine paralytic peptide in the silkworm *Bombyx mori*
Kenichi Ishii¹, Hiroshi Hamamoto² and Kazuhisa Sekimizu²
(¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo; ²Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

生物間における細胞質スプライシングの保存性と多様性

1. はじめに

真核生物では多くの遺伝子において転写と共役したスプライシングが起こり、イントロンが除去され、翻訳可能な成熟した mRNA となる。このスプライシングは、核内に存在するタンパク質と RNA の複合体スプライセオソームで起こる。一方、スプライシングを含むプロセッシングを受けた mRNA が細胞質に運ばれた後に起こる「細胞質スプライシング」が知られている¹⁾。現在まで、細胞質スプライシングは真核生物で保存されている小胞体ストレス応答においてのみ観察されている。小胞体ストレス応答とは、小胞体で合成されるタンパク質のフォールディングに支障が起こると、その回避のために小胞体シャペロンや小胞体関連分解に関わる遺伝子の発現が協調的に起こる現象で、酵母から動物、植物に至るまで広く保存されている²⁾。小胞体ストレス応答では、小胞体内でのタンパク質のフォールディング状況を検知し、核へ伝えるセンサーとその下流の情報伝達系が存在する。IRE1 は、酵母から動物、植物まで唯一保存されている小胞体ストレスセンサーで、細胞質スプライシングにおける mRNA の切断を触媒する。植物 IRE1 ホモログは 10 年以上前に報告されていたが、細胞質スプライシングの標的は 2011 年まで不明であった³⁾。本稿では、植物で明らかになった事実を踏まえ、生物間における細胞質スプライシングの保存性と多様性について概説する。

2. 細胞質スプライシングを触媒する IRE1 と標的となる bZIP 型転写因子 mRNA

IRE1 は小胞体内腔に存在するセンサードメイン、膜貫通ドメイン (TMD) に続き、細胞質側にタンパク質キナーゼドメインさらにリボヌクレアーゼドメインを持つ I 型膜タンパク質である (図 1)。出芽酵母 IRE1 は bZIP 型転写因子 *HAC1* mRNA の細胞質スプライシングを触媒し、その結果生じた *HAC1* mRNA (*HAC1s*) からのみ転写活性化能を持つ *HAC1* タンパク質が翻訳される。本稿では、mRNA, タンパク質ともに細胞質スプライシング前の構造を u (unspliced) フォーム, 細胞質スプライシング後の構造を s (spliced) フォームと表記する。哺乳動物には IRE1 α