

博士論文要約 (Summary)

平成 29 年入学

連合農学研究科農水圏資源環境科学専攻

氏 名 小野 雅弥

タイトル	The evasion mechanism of bacterial-feeding nematodes from insect immunity
------	--

キーワード (nematode) (insect) (immunity)

1.非昆虫寄生性線虫に対する昆虫の細胞性免疫および昆虫に対する線虫の影響

細菌や真菌などの微生物に対する免疫研究は比較的進んでいるが、線虫や寄生蜂などの寄生性の多細胞生物に対する免疫は情報が不足しており、その詳細については不明な点が多い。線虫に対する宿主の細胞性免疫を明らかにするために、非寄生性の細菌食線虫である線虫 *Caenorhabditis elegans* と昆虫病原性線虫 *Heterorhabditis bacteriophila* に対するハチノスツグリガ (*Galleria mellonella*) 幼虫 (以下ハチミツガ幼虫) の免疫反応を比較した。 *C. elegans* の 1 期幼虫または耐久型幼虫をハチミツガ幼虫に注入した場合、ほとんどの線虫は生存しており、病原性線虫と同様に、昆虫の血球による包囲 (包囲化) を受けなかった。他の非寄生性線虫も包囲化を受けなかった。さらに、昆虫の血体腔に注入された *C. elegans* は、生きている昆虫の中で成長・繁殖し、昆虫を死亡させた。一方で、オートクレーブ処理された線虫を注入した場合は、両種ともに包囲化を受けた。このことは、生きた *C. elegans* がハチミツガの免疫を回避し、血体腔で成長するいくつかの基本的なメカニズムを持っていることを示唆している。

2. *In vitro* での線虫に対する昆虫の血球反応

昆虫の血球による異物の認識は、多細胞生物の侵入に対する昆虫免疫の重要なステップである。認識メカニズムを明らかにするために、異物の代用としてクロマトビーズとオートクレーブ処理した非寄生性線虫 *C. elegans* に対するハチミツガ幼虫の血球反応をタイムラプスで観察した。包囲化を行う血球の顆粒細胞とプラズマ細胞の両方が、ビーズや線虫の表面に付着し、spread した。さらに、spread したプラズマ細胞は活発にビーズや線虫の表面を移動した。これらの結果は、顆粒細胞だけでなくプラズマ細胞も昆虫血漿の存在下で異物を認識することができ、spread したプラズマ細胞が積極的に異物を探索できることを示唆している。 *Ex vivo* でのビーズおよび線虫への血球反応は、 *in vitro* の結果と類似していた。また、 *in vitro* 条件下で二価カチオンキレート剤を添加すると、線虫に対するプラズマ細胞の spread と付着を阻害したが、顆粒細胞の付着には影響しなかった。この *in vitro* 包囲化 assay 系と先行研究においてビーズに対して確立されていた包囲化 assay 系を用いて、免疫能力の異なる 2 種の昆虫、ハチミツガ幼虫とアワヨトウ (*Mythimna separata*) 幼虫の *C. elegans* に対する包囲化反応を比較した。ハチミツガ血球は死んだ線虫を部分的に付着したが、生きた線虫にはほとんど付着しなかった。一方で、アワヨトウ血球は、死んだ線虫だけでなく生きた線虫にも付着した。また、包囲化に重要なファクターを含む昆虫の血漿を除去した場合にも、アワヨトウ血球は生きた線虫に付着した。これらの結果は、2 つの昆虫間で線虫に対する免疫力に違いがあり、その違いは血球の異物認識能力に大きく依存することを示している。

3.昆虫血球に対する線虫の影響

これまでの実験で、生きた *C. elegans* がハチミツガ血球に包囲化されないことを明らかにした。このことは、線虫が包囲化を回避するメカニズムを有していることを示唆している。線虫が包囲化回避のため、昆虫の血球に影響を与えていると考え、ハチミツガ幼虫の血球に対する *C. elegans* の影響を調査した。線虫を注入すると、昆虫の血体腔内の血球数の減少が減少したが、死亡した血球は見られず、血球生産を行う造血器官への影響も見られなかった。血球と線虫を *in vitro* で共培養すると、血球数が減少し、線虫による血球の摂食が観察された。生体内でも線虫の摂食が原因で血球数が減少していることを検証するため、*C. elegans* 摂食遅延変異体を昆虫に注入したところ、血球数の減少が抑えられた。このことから、血球数の減少は、線虫の血球摂食が原因であると判明した。さらに、昆虫病原性線虫および他の細菌食線虫も同様の摂食行動を示した。線虫の血球摂食能力は、細菌食線虫における寄生の進化において重要な役割を果たした可能性が高い。

4.昆虫血球の Spreading に対する線虫の影響

昆虫の血球は異物を認識し、表面に付着する際に活性化して **Spreading** と呼ばれる形態変化を起こす。血球の **Spreading** は異物を包囲化する際の重要な反応である。線虫が包囲化を受けない原因として、線虫の体表物質が、付着しようとする血球の **Spreading** を阻害しているのではないかと考え、ハチミツガ幼虫の血球の **Spreading** に対する *C. elegans* の影響を調査した。*C. elegans* のヘキササン/メタノール抽出物は、ハチミツガ幼虫の血球の **Spreading** を抑制した。2次元薄層クロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーを使用して、血球の **Spreading** を阻害する単一のピークを検出した。さらに、線虫を注入すると、昆虫体内の血球の **Spreading** が大幅に遅延することが確認された。ウエスタンブロッティング分析により、血球内のリン酸化 ERK（細胞外シグナル調節タンパク質キナーゼ）（血球の **Spreading** に必須のシグナル伝達成分）が線虫の注入により減少した。更なる研究により、線虫注入後の昆虫の血漿中に ERK のリン酸化阻害を引き起こす因子が存在することが確認された。また、他の非寄生性の細菌食性線虫においても同様の現象が観察された。このような因子が非寄生線虫に保存されていることから、因子の獲得は寄生の前適応である可能性を示唆している。