

学位論文題名

Studies on the mechanism by which insect cytokine,  
Growth-blocking peptide,  
regulates cellular immunity in insects

(昆虫サイトカインによる細胞性免疫制御機構の研究)

学位論文内容の要旨

Growth Blocking Peptide (GBP)は鱗翅目昆虫アワヨトウ幼虫より単離された昆虫サイトカイン第一号である。GBPは多機能性を持ち、これまでに細胞増殖活性、血球細胞活性化作用、幼虫発育調節作用などが知られているものの、その活性調節機構については不明な点が多い。そこでGBP依存性の血球活性化作用を指標にその調節機構の解明を目的として研究を行った。

GBPは食作用を持つプラズマ細胞の突起伸展反応誘起以外に、他の血球種であるエノシトイドの崩壊を引き起こすことを新たに発見した。エノシトイドは多くの昆虫種で見られる大型の血球細胞で、細胞質中にフェノール酸化酵素前駆体 (proPO) を含むことが知られているが、その生理機能については良く分かっていない。本研究で明らかにしたGBP依存的なエノシトイド崩壊により放出された細胞質成分中に、GBP依存性プラズマ細胞活性化を抑制する作用を見出した。また、同じ抑制作用は血清中にも確認できた。そこで、GBPをリガンドとしたアフィニティーカラムを用い、アワヨトウ幼虫体液よりGBPと特異的に結合する血清蛋白質を精製した。その一次構造を決定し、GBP結合蛋白質 (GBP-binding protein, GBP-BP) と命名した。GBP-BPは分子量が49kDaのシグナルペプチドを持たない新規の蛋白質であった。イムノブロットと免疫電顕解析により、GBP-BPは主にエノシトイドで生合成されることを明らかにした。抗GBP-BP抗体による免疫沈降実験と、死細菌の注入実験により、体液中に放出されたGBP-BPはGBPと結合しその血球活性化作用を不活化させることを明らかにした。昆虫体腔内における細胞性免疫反応は、侵入した異物認識による顆粒細胞（哺乳類の顆粒球に相当する食作用を持つ血球）の脱顆粒によって開始されると考えられている。続いて、プラズマ細胞が活性化し異物のサイズに応じて食食、包囲化、ノジュール形成が起こり異物を排除する。このプラズマ細胞の活性化はGBPによって誘起される。今回明らかにしたGBP誘導性エノシトイドの崩壊は、その崩壊によって体液中へGBP-BPを放出し、GBPを不活化させることで細胞性免疫反応を終了させる、つまり、GBPの負のフィードバック機構と考えられる。

アワヨトウ体液中のエノシトイド数の計測と、体液中のGBP-BPおよびproPOの蛋白質濃度測定の結果、エノシトイドの崩壊はGBP誘導性の細胞性免疫反応の収束時のみでなく、幼虫発育過程で周期的に起こる現象であることがわかった。エノシトイドは最終幼虫脱皮の2日後に最大数となり、その翌日には3分の1にまで急激に減少した。エノシトイドの消失に同調して、体液中のGBP-BPおよびproPO濃度は上昇した。これらの結果は、エノシトイドの崩壊が免疫反応、幼虫発育の両方の調節に関与する重要な現象であることを示

唆している。また、エノシトイドから放出される GBP-BP および proPO は共にシグナルペプチド配列を持たない血清蛋白質であることに着目し、エノシトイドの崩壊はシグナルペプチドを持たない分泌性蛋白質放出の特異的供給機構であると予想した。こうした観点から、エノシトイドの崩壊を一つの重要な生理現象と位置づけ、その分子機構の解明を試みた。まず、エノシトイド膜蛋白質に対するモノクローナル抗体を作成し、アワヨトウ幼虫血球に反応する 27 種の抗体を得た。モノクローナル抗体をエノシトイドに作用させ、その影響を観察することによって、エノシトイドの崩壊を促進する抗体 mAb19 と、抑制する抗体 mAb1 の作成に成功した。ウェスタンブロット解析より、これらの抗体に対するエノシトイド特異抗原はそれぞれ分子量が 100kDa、290kDa であることがわかった。これらを単離し、それぞれについて配列の一部を決定したところ分子量 100kDa のものは Tetratricopeptide repeat domain の一部と、分子量 290kDa のものは Acyl-CoA dehydrogenase motif の一部と相同性が確認できた。これらのモチーフを持つ蛋白質ファミリーはそれぞれ数多く存在し、現段階では GBP によるエノシトイド崩壊との関連性を明確に推理することは難しい。エノシトイドの崩壊は、細胞の膨張後、細胞膜の一部に穴が空き内容物が放出されることによって起きる。このことから GBP の刺激を受けたエノシトイドでは浸透圧の調節機構が破綻するものと予想される。今回単離された mAb1/ mAb19 に対する抗原は浸透圧の調節機構の破綻を及ぼす GBP シグナリングの重要な構成要素と予想されることから、p100、p290 の 1 次構造の決定はその詳細の解明に大きく寄与するものと期待している。

GBP-BP の発見は、体液中で前駆体からプロセッシングによって活性化される GBP の新たな活性調節機構の存在を提示した。細胞性免疫反応において、GBP-BP は GBP の食細胞活性化作用を停止させるスカベンジャーとして機能することから、GBP の引き起こす一連の細胞性免疫反応は GBP 自身の誘導するエノシトイドの崩壊の結果、収束されることが明らかになった。GBP-BP の産生細胞であるエノシトイドはこれまでその生理機能はほとんど不明であった。フェノール酸化酵素前駆体を内包することから免疫担当細胞である可能性は示唆されていたものの、その証明はなかった。今回の研究で、その事実が明確に示された。

発育過程における周期的なエノシトイドの崩壊も GBP によって誘導される可能性が示唆された。また、エノシトイドの崩壊はシグナルペプチドを持たない蛋白質の細胞外への特異的供給機構と考えられる。崩壊によって体液中へ放出される proPO 及び GBP-BP の生理学的意義については次のように考えられる。同じ鱗翅目昆虫であるカイコにおいてフェノール酸化酵素は体液中だけでなくクチクラ中にも存在しており、体液中へ放出されたフェノール酸化酵素前駆体は生体防御反応に寄与すると考えられていることから、アワヨトウでも同様の生理作用が考えられる。GBP-BP のもう一つの生理機能は、GBP のスカベンジによる幼虫発育の調節であると考えられる。さらに、GBP-BP による物質輸送機能の可能性も考えられる。GBP-BP の C-末端側 3 分の 2 はカイコの 30k lipoprotein や *Manduca sexta* の microvitellogenin と相同性を持つ。これらの蛋白質と GBP-BP との関連性は現段階では不明だが、これらリポ蛋白質の一般的な機能として脂質などの輸送機能があることから、GBP-BP もまた物質輸送を担っている可能性はある。

昆虫の発育は、脱皮時にそれまでの自己組織を壊し、新たな組織を形成することを繰り返して行われる。そのため免疫反応は自己組織の破壊と異物の排除の両方の役割を担うと言える。つまり昆虫の発育と生体防御は免疫反応を介して密接にリンクしている。本研究で明らかになった血球の一種エノシトイドの機能は、まさに昆虫の免疫反応の特徴を色濃く反映したものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 早 川 洋 一  
副 査 教 授 芦 田 正 明  
副 査 教 授 木 村 正 人

学 位 論 文 題 名

## Studies on the mechanism by which insect cytokine, Growth-blocking peptide, regulates cellular immunity in insects

(昆虫サイトカインによる細胞性免疫制御機構の研究)

Growth-blocking peptide (GBP)は多機能性を持つ昆虫から初めて同定されたサイトカインであり、幼虫発育調節、細胞増殖作用、麻痺誘起活性、血球細胞活性化作用などの生理作用が知られる。その cDNA の一次構造解析結果から、GBP は前駆体の形で合成された後、特異的部位で切断されて活性型の GBP となることが分かっている。また、GBP 遺伝子発現は、外部環境からの種々のストレスによって転写レベルで上昇することが明らかになっている。しかし、生体内での GBP の活性調節についてはこうした断片的な情報だけに留まっているのが現状である。本研究では、特に、GBP の細胞性免疫作用に焦点を当て、その活性調節機構を明らかにすることを目指した。

本研究の出発点には、申請者による GBP の新たな生理作用の発見があった。上述のように、GBP には免疫担当細胞であるプラズマ細胞を活性化し突起伸長や凝集塊形成誘起作用が確認されているが、申請者は、これとは異なる血球細胞種エノシトイドが GBP によって細胞崩壊することを発見した。しかも、このエノシトイド細胞溶解物中に GBP によるプラズマ細胞活性化を阻害する成分が存在することも見出した。また、単離したプラズマ細胞とエノシトイドの共存培養系に GBP を添加した場合、GBP によるプラズマ細胞活性化よりも遅れること約 20-30 分にしてエノシトイド崩壊が始まることに気付いた。これらの結果から、申請者は、GBP 依存のエノシトイド崩壊現象を GBP による細胞性免疫活性化系のフィードバック調節と予想するに至った。そこで、この仮説を実証するために、エノシトイド由来の GBP 活性阻害因子の単離、精製を試みた。一連の研究の末、精製された阻害因子は、分子量 49kDa のタンパク質であり、そのカルボキシル末端側の約 260 アミノ酸残基配列が昆虫のリポタンパク質に約 30%程度の相同性を示すものの、残りのアミノ末端側のアミノ酸配列にはデータベース上に既知タンパク質との相同性が見られないことが分かった。したがって、この因子は明らかに新規のタンパク質であると結論した。また、ピアコアを用いた速度論的解析結果や抗体を用いた *in vivo*, *in vitro* 条件下の免疫学的解析結果に基づき、この GBP 阻害因子は GBP に特異的かつ強固

な結合力を示し、一種のスカベンジャーとして機能する結合タンパク質であることを明らかにした。以上の研究結果は、すなわち、GBP が細胞性免疫制御過程においても機能上の多面性を持っていることを示している。すなわち、免疫担当細胞のプラズマ細胞を活性化した後に、異なる血球細胞種であるエノシトイド崩壊を誘起し、GBP 結合タンパク質の放出を促すことによって GBP 依存的細胞性免疫作用を速やかに終息させる。

申請者は、さらに、この GBP 結合タンパク質が普段血清中に存在しているにも拘わらず、多くの分泌タンパク質に見られるアミノ末端のシグナルペプチド配列を持たないタンパク質であることに注目した。偶然、フェノールオキシダーゼ前駆体が同様の性質を持つ血清タンパク質であり、しかも、エノシトイドに存在することが報告されていた。そこで、両タンパク質に対する抗体を作成し、それらの抗体を用いて生体内でもこれらのタンパク質が GBP 依存的なエノシトイド崩壊によって放出されることを証明した。すなわち、特定の細胞の恒常的崩壊による血清中へのタンパク質供給がなされている全く新しい分泌系を発見したことになる。しかも、この細胞崩壊がサイトカインで誘起される点も注目に値する事実と言える。申請者は、つぎに、GBP によるエノシトイド崩壊がエノシトイド細胞膜に存在する特定のタンパク質を介して誘起するものと予想した。この細胞膜タンパク質を同定する為、単離したエノシトイド細胞に対するモノクローナル抗体を作成し、最終的に、GBP による細胞崩壊を阻害する抗体と GBP なくしても細胞崩壊を誘起する抗体を各々1 種類調製することに成功した。現在、これらの抗体の抗原となる膜タンパク質の構造決定を急いでいる。両抗原タンパク質の構造が明らかになれば、GBP による生体内でのエノシトイド崩壊機構が説明できる可能性も十分あるものと期待される。

こうした申請者による一連の研究は、昆虫サイトカインの生体内での活性調節機構の解析に始まり、最終的には、生物種を超えた細胞学、あるいは、タンパク質分泌機構の研究へと発展した。したがって、これらの研究成果は、昆虫生理学に留まらず広い意味での生命科学の基礎研究に新しい概念を提起し得るものと考えられる。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資質を有するものと判定した。