

氏名	ばお えん えん 鮑 艶 原
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲第373号
学位授与年月日	平成17年 3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Immune-related genes in the eri-silkworm, <i>Samia cynthia ricini</i> (エリ蚕の免疫に関する遺伝子)
学位論文審査委員	(主査) 森嶋伊佐夫 (副査) 松田英幸 加藤昭夫 東 政明 山野好章

学位論文の内容の要旨

昆虫にバクテリアが感染すると、その細胞壁成分であるペプチドグリカン(PGN) やリポ多糖(LPS)などが認識され、一群の抗菌性タンパク質の合成が誘導されることが知られている。バクテリアの感染に対する生体防御反応には、抗菌性タンパク質遺伝子の他にも様々な遺伝子が関与していると考えられるが、その詳細についてはまだ十分に理解されていない。本研究では、鱗翅目昆虫の生体防御の全体像を明らかにすることを目的として、無菌的に飼育したエリ蚕 (*Samia cynthia ricini*) 5 令幼虫を用いて、バクテリアによって誘導される遺伝子を suppression subtractive hybridization (SSH) 法を用いて検索し、得られた免疫化脂肪体で特異的に発現する cDNA 断片をプローブにして免疫化脂肪体 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、完全長 cDNA を得た。

これらの遺伝子には、セクロピン、アタシン、リゾチームなどの抗菌性タンパク質をコードするものの他に、パターン認識タンパク質 (ペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) および hemolin)、prophenoloxidase 活性化カスケードに関与すると思われる proteinase (PAP) および機能未知タンパク質 (Hdd11 と lebocin-like protein) をコードするものが含まれており、これら cDNA について解析を行った。

Lebocin はカイコの免疫化血リンパから単離されたプロリン残基に富む 32 アミノ酸の抗菌性ペプチドである。エリ蚕の lebocin-like 遺伝子はカイコ lebocin 前駆体 cDNA の 104 アミノ酸残基に及ぶ “prosegment” 領域とは高い相同性があったが、lebocin ペプチドに相同する配列を含ん

でいなかった。この lebocin-like タンパク質の機能は不明であるが、長大な “prosegment” の役割を考える上で興味深い。

免疫グロブリンスーパーファミリーの一つである hemolin、機能未知の Hdd11 と prophenoloxidase activating proteinase (PAP) はいずれも脂肪体で強く発現誘導が認められ、シグナルペプチドを有していることから脂肪体で合成後体液中に分泌されるものと考えられる。PGRP は中腸で非常に強く誘導されており、バクテリア感染の危険の最も大きい中腸でのバクテリア認識に関与していることが考えられる。

これら五つの遺伝子および数種の抗菌性タンパク質遺伝子並びに未同定の 10 数種遺伝子の発現は無処理幼虫では全く認められず、バクテリア菌体あるいは PGN 注射後数時間以内に一齐に誘導されることが明らかになった。このようにバクテリア認識タンパク質、活性化カスケードに関与するタンパク質、さらに最終エフェクターとしての抗菌性タンパク質遺伝子の発現が短時間に同時に誘導されることから、これら免疫系遺伝子に共通の転写調節因子とその応答エレメントの存在が考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、昆虫生体防御機構の解明を目的として、鱗翅目昆虫であるエリ蚕 (*Samia cynthia ricini*) を用いて、バクテリアにより誘導される免疫関連遺伝子を網羅的にクローニングし、その構造解析を行うとともに、それら遺伝子の発現誘導を詳細に解析したものである。

昆虫にバクテリアが感染すると、その細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) やリポ多糖 (LPS) などが認識され、一群の抗菌性タンパク質の合成が誘導されることが知られている。脊椎動物のような獲得免疫系を持たない昆虫では、バクテリアの感染に対して抗菌性タンパク質の他にも様々な生体防御タンパク質が関与していると考えられるが、その詳細についてはまだ十分に理解されていない。本研究では、無菌的に飼育したエリ蚕において、バクテリアにより誘導される遺伝子を suppression subtractive hybridization (SSH) 法により検索し、バクテリア感染幼虫脂肪体に特異的に発現する cDNA を多数クローニングし、それらの構造と発現を解析している。

これらのバクテリアにより誘導される遺伝子には、セクロピン、アタシン、リゾチームなど既知の抗菌性タンパク質をコードするものの他に、既知の遺伝子ではあるが生体防御に関与することが知られていないもの、および多くの新規遺伝子が含まれていた。これらの内、2種のパターン認識タンパク質 (ペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)、ヘモリン)、セリンプロテアーゼおよび2種の機能未知タンパク質をコードする遺伝子 (Hdd11, lebocin-like gene) の cDNA の全構造を明らかにすると共に、それらの性質を詳細に検討した。

これらの中で、lebocin-like gene は、プロリンに富む抗菌性ペプチド、lebocin、をコードするカイコの lebocin 前駆体遺伝子と、その長大な prosegment 部分で相同性を有するが、lebocin の部分をすべて欠くという特異な構造をした新規遺伝子である。このタンパク質の機能は不明であるが、"prosegment" の役割を考える上で特に興味を持たれる。免疫グロブリンスーパーファミリーの一つであるヘモリン、機能未知の Hdd11 および prophenoloxidase activating proteinase (PAP) 遺伝子は、いずれも脂肪体で強く発現が認められ、シグナルペプチドと思われる配列をコードしていることから、これらのタンパク質は脂肪体で合成され体液に分泌されるものと思われる。これに対して、PGRP は中腸で特に強い発現が認められ、バクテリア感染の危険の最も大きい中腸でのバクテリア認識と排除に関与していることが考えられる。

これら5つの遺伝子および数種の抗菌性タンパク質遺伝子、ならびに10数種の未同定遺伝子の発現は、無処理幼虫では認められず、バクテリア菌体またはPGNを注射後一斉に誘導されることを明らかにした。このように、最終エフェクターとしての抗菌性タンパク質遺伝子のみならず、バクテリア認識タンパク質、シグナル活性化カスケードに関与するタンパク質など多種多様なタンパク質が、昆虫生体防御に関与しており、これら遺伝子の発現が、単一の誘導因子により短時間に同時に誘導されることを明らかにした。

これらの成果は、昆虫生体防御機構を分子レベルで解明する上で大いに寄与するものであり、博士学位論文として十分な価値があるものと判定する。