

昆虫サイトカインの自然免疫への関与に関する研究

Study on the insect cytokine contributing to innate immunity

(日本動物学会推薦)

研究代表者	佐賀大学	早川 洋一	Saga University	Yoichi Hayakawa
協同研究者	佐賀大学	都築 誠司	Saga University	Seiji Tsuzuki
	佐賀大学	織田 康則	Saga University	Yasunori Oda

Cytokines are central importance in the regulations of many physiological and morphological events such as immunity, inflammation, tissue remodeling, and embryonic development. While a large number of cytokines have been extensively studied in mammals, little is known in the insect system. The first family of insect cytokines found recently was temporarily referred to as the ENF peptides, which is based on their common N terminal sequence, Glu-Asn-Phe-. These are 23-25 amino acid peptides whose functions are diverse: insect growth regulation, paralysis induction, cardioacceleration, morphogenesis and immune cell stimulation. Growth-blocking peptide (GBP) was the first member ever known as this family. Today, at least 16 members belong to this cytokine family, but all of them were found only in Lepidoptera. Recently, we succeeded in identifying orthologous peptides from *Drosophila melanogaster*.

Recently we found that expression of antimicrobial protein genes was enhanced by injection of GBP into silkworm larvae. Further, we demonstrated that GBP enhances antimicrobial protein

gene expression in *Drosophila* by using transgenic flies. Although we do not know yet whether the GBP effect on this gene expression is direct or indirect, further studies of this topic will improve our understanding of the role of insect cytokines in their innate immunity.

研究目的

昆虫では、これまでショウジョウバエのゲノム情報に基づき、哺乳類で報告されている幾つかのサイトカインやサイトカインレセプターの類似体が同定されてきた。しかし、実際にタンパク質・ペプチドレベルでその生理活性が確認され、しかも既知のサイトカインとは構造的に異なる昆虫特有のサイトカインは見つかっていなかった。最近、鱗翅目（ガやチョウの仲間）昆虫で発見された ENF peptide family（アミノ末端に Glu-Asn-Phe-を持つ同族ペプチド）が、多機能性を有する昆虫特有のサイトカインであることが明らかになった。この同族ペプチドのメンバーで、最初に同定・構造決定がなされたペプチドが Growth-blocking peptide（以下、GBP と略す）である。この同族ペプチドは、昆虫の幼虫発育調節、細胞増殖作用、麻痺誘起作用、血球活性化作用、さらに、心筋収縮活性と多機能性を有するサイトカインであることが確認されている。これほど多くの重要な生理的機能を示すペプチドであるにも拘らず、最近までこのペプチドは鱗翅目昆虫のみからしか見つかっていなかった。この分野の研究者の中には、このサイトカインが鱗翅目特有のもので、異目種には存在しないと主張する者も現れた。そこで、本研究は、まず、このサイトカインが鱗翅目以外の昆虫にも広く存在するものかどうか、を検証する研究から開始した。さらに、昆虫体内における生理機能として新たに自然免疫系への関与について解析を進めた。

研究経過

1) ショウジョウバエ GBP の同定

今回の研究で私達の最大の関心事はショウジョウバエの GBP を同定することにあった。なぜなら、ショウジョウバエで GBP 遺伝子が同定できれば、遺伝学は勿論、様々な分子生物学的実験手法を用いることができ、生体内における GBP

の生理機能解析が可能となるからである。最初は、これまで報告されている GBP 及び GBP オーソログ遺伝子の塩基配列情報を基に、PCR プライマーを設計し、それらを用いて PCR によってショウジョウバエ GBP cDNA の単離を試みた。しかし、種々のプライマーをもってしても GBP cDNA 断片を増幅することはできなかった。また、各種鱗翅目昆虫の GBP cDNA をプローブに用いてショウジョウバエ cDNA ライブラリーのスクリーニングを行ったが目的とする遺伝子をクローニングすることはできなかった。

そこで、鱗翅目 GBP の生理機能（細胞増殖活性と血球活性化作用）を指標に生理活性ペプチドの精製を試みた。出発材料としてショウジョウバエ幼虫の代わりに大型のニクバエ幼虫体液を用い、数段階の逆相系 HPLC によって GBP 様ペプチドの精製に成功した。これまで、鱗翅目昆虫から単離された ENF ペプチドはアミノ酸 23 – 25 残基であるが、ニクバエ由来の GBP 様ペプチドはアミノ酸が僅か 19 残基とさらに短いものであった。恐らく、現在このペプチドが動物界で最小のサイトカインと言える。このニクバエ由来 GBP の cDNA を単離し塩基配列を決定した。この配列と相同なショウジョウバエ遺伝子がゲノム上に 5 種類同定できた。それぞれの遺伝子に特有のプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、この内 3 種類がショウジョウバエ幼虫体内で発現していることが確認できた。

2) GBP の自然免疫作用

こうしたショウジョウバエ GBP の同定と並行して、GBP の新規生理機能として自然免疫への関与の可能性を検討していた。というのも、予備実験によって、カイコ GBP が血球を活性化し、その過程で抗菌ペプチドの分泌を促す可能性が示唆されたからであった。まず、カイコの終齢幼虫に 10 pmol/larva GBP を注射したところ、Cecropin A, Attacin, Moricin といった抗菌ペプチド遺伝子の発現上昇が観察された。さらに、異物パターン認識受容体であるペプチドグリカン認識タンパク質 (peptidoglycan recognition protein, PGRP) の発現上昇も観察された。

カイコにおいて GBP による抗菌ペプチド誘導活性が確認できたことから、次に、この分野の研究が最も進んでいるショウジョウバエで検証することにした。前述のように、ショウジョウバエの生体内での発現が確認できた 3 種類の GBP の内、構造的に最も鱗翅目 GBP に近い CG15917 遺伝子に焦点を絞って解析を進めた。UAS-Gal4 のエンハンサートラップ法を用いることにし、UAS-CG15917 遺

伝子コンストラクトを導入したトランスジェニック系統を作成した。この系統と熱ショックエレメントを持つ Gal4 系統とを交配させ、F1 世代の幼虫を実験に用いた。F1 世代幼虫に熱ショックを与えて GBP を強制発現させたところ、Diptericin, Cecropin, Drosomycin といった抗菌ペプチド遺伝子発現上昇が観察された。さらに、カイコの場合と同様に異物認識受容体である PGRS-SA と Gram-negative binding protein-1 (GNBP-1) の発現上昇が観察された。

考察

以上の結果は、昆虫には同一ファミリーを形成する低分子ペプチド性サイトカインが広く存在し、多くの重要な生理機能を担っていることを証明した。今回、明らかにした双翅目昆虫（ハエやカの仲間）の GBP 様サイトカインと鱗翅目昆虫 GBP の一次構造上での類似性は低く約 20% 程度であるが、その遺伝子の全体構造やペプチドの骨格構造には以下のような共通性が存在することが明確になった。

- 1) 活性ペプチドは 19-25 残基のアミノ酸からなる。
- 2) cDNA の ORF はアミノ酸 110-220 残基からなる GBP 前駆体をコードする。
- 3) 活性ペプチド領域は前駆体のカルボキシル末端に位置する。
- 4) ペプチドにはコンセンサス配列 “ $x_{6-8}Cx_2Gx_2G(K/R)C(K/R)x_{0-4}$ ” が存在する。

現在、鱗翅目、双翅目に加え甲虫目にもこうした共通性を有する GBP 様サイトカインが存在することを確認できている。また、NMR による立体構造解析から、鱗翅目昆虫 GBP は哺乳類の上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) の C 末端ベーターヘアピン構造と非常に良く似た構造を取っていることが明らかになっている。今回構造決定した他の昆虫種 GBP にも分子内にシステインが 2 残基存在し、しかも、その位置も鱗翅目 GBP とほぼ一致していることから、溶液中では全て類似の立体構造を取っているものと予想される。したがって、一次構造上では高い相同性を持たないペプチドファミリーではあるが、特定の立体構造がそれらペプチドメンバーの共通する生理機能発現に寄与している可能性が高い。

今回、GBP の新規生理機能として昆虫体内における抗菌ペプチド誘導活性が明らかになった。カイコ幼虫に GBP を注射することによって 24 時間後に Cecropin A, Attacin, Moricin といった抗菌ペプチドの転写レベル上昇が確認された。さらに、パターン認識受容体と言われる PGRP-S1 遺伝子の発現上昇も確認された。

こうした抗菌ペプチド及びパターン認識受容体遺伝子の発現上昇は、ショウジョウバエ幼虫で GBP を強制発現させることによって再現することができた。すなわち、Diptericin, Cecropin, Drosomycin といった抗菌ペプチドと PGRP-SA, GGBP-1 というパターン認識受容体遺伝子の発現上昇が GBP 強制発現して 4 時間後に確認された。後者の PGRP-SA と GGBP-1 は Toll 経路と呼ばれるグラム陽性菌（真菌）に対するショウジョウバエの自然免疫系の活性化構成成分と考えられている。したがって、ショウジョウバエ幼虫体内で GBP の濃度上昇が起きるとグラム陽性菌を認識するタンパク質 PGRP-SA や GGBP-1 の濃度上昇し、最終的に Toll 経路由来の抗菌ペプチドである Drosomycin や Cecropin が誘導される。ただ、ここで気になる点は、GBP によって Diptericin 遺伝子発現上昇も観察されてことである。なぜなら、Diptericin は Toll 経路ではなく Imd 経路という異なる抗菌ペプチド誘導経路の産物と考えられているからである。しかも、今回の行った GBP 強制発現では、この Imd 経路の活性化構成成分である PGRP-LE や PGRP-LC の遺伝子発現レベルには影響が認められなかった。したがって、GBP は Toll 経路と Imd 経路両方に影響するものの、その活性化機構は異なっている可能性が高い。Toll 経路は PGRP-SA や GGBP-1 といったパターン認識タンパク質遺伝子発現を上昇させることによって活性化すると予想されるが、Imd 経路については全く異なる可能性が高い。この活性化機構については、今後さらに多角的に検証する必要がある。

研究発表

a. 口答発表

1. 早川洋一；「発育阻害ペプチド（昆虫サイトカイン）の発見とその作用機構に関する研究」、日本応用動物昆虫学会（つくば、2006）
2. 早川洋一；「昆虫サイトカイン(Growth-blocking peptide, GBP)の多様な生理機能」、公開シンポジウム -昆虫研究最前線（京都、2006）

b. 誌上発表

1. Tsuzuki, S., Sekiguchi, S. and Hayakawa, Y. 2005, Regulation of growth-blocking peptide expression during embryogenesis of the cabbage armyworm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 1078-1084.
2. Watanabe, S., Tada, M., Aizawa, T., Yoshida, M., Sugaya, T., Taguchi, M., Kouno, T., Nakamura, T., Mizuguchi, M., Demura, M. Hayakawa, Y. and Kawano, K. ,2006. N-Terminal Mutational Analysis of the Interaction Between Growth-Blocking Peptide (GBP) and Receptor of Insect Immune Cells.

Protein & Peptide Letters, 13, 815-822.

3. Hayakawa, Y. (2006) Insect cytokine growth-blocking peptide (GBP) regulates insect development. *Appl. Entomol. Zool.* 41, 545-554.
4. Ninomiya, Y., and Hayakawa, Y. (2006) Insect cytokine, growth-blocking peptide, is a primary regulator of melanin-synthesis enzymes in armyworm larval cuticle. *FEBS J.*, in press