

博士論文

昆虫を用いた感染抵抗性獲得および配偶者選択に関する研究

宮下 惇嗣

目次

序論	3
本論	4
第一章 腸管出血性大腸菌による動物殺傷メカニズムの解明	4
導入	4
材料と方法	7
結果	9
考察	14
図表	15
文献	25
第二章 カイコにおけるPrimed Immune Response	31
導入	31
材料と方法	33
結果	37
考察	42
図表	44
文献	56
小括	57
第三章 フタホシコオロギの鳴き声における周波数と体サイズの関係	58
導入	58
材料と方法	61
結果	63
考察	65
図表	67
文献	74
総括	76
謝辞	79

序論

すべての生物にとって重要な機能の一つに自己非自己の識別がある。それは、単細胞生物であつても真である。彼らは、細胞内環境を細胞外環境と独立に調節することによって生命活動を維持している。多細胞生物では、細胞レベルだけではなく、個体のレベルで、自己と非自己を認識し、例えば免疫系は非自己由来の物質を異物とみなして排除することによって、感染防御の仕組みを実現している。

私は本論文で述べる研究に着手するにあたり、まず病原微生物と感染宿主動物との相互作用に着目し、特に病原性細菌が動物を感染死に迫りやる仕組みを解明することを目指した（第1章）。次いで、そのような細菌感染現象に対して動物が生存を図るために発達させている免疫系に関して、特に感染経験（病原体への曝露経験）によって応答を調節する仕組みを解析した（第2章）。さらに本論文の後半では、免疫系が他の重要な生体機能（ストレス応答や行動の制御など）と折り合いをつけながら、生存にとって最適なバランスを保つ必要性があることに着目し、特に行動と免疫系の機能的な連関を探るための実験動物を確立することを目指した（第3章）。

本研究を通し、私は昆虫を実験動物として用いることにした。昆虫は、哺乳動物を大量に実験動物として用いることによる倫理的な問題を解決するだけでなく、脊椎動物に比べて単純な生理を有しているという利点を持っている。さらに、私は細菌の病原性や免疫の活性化を論じる際に、個体の生死を判断基準に用いることが重要であると考えて実験を計画した。それは、ある遺伝子が細菌による試験管内での毒素産生に寄与したとしても、その遺伝子は実際に個体を死に至らしめるか否かという点について全く意味のない遺伝子であるという可能性が否定できないからである。免疫の活性化についても同様で、ある処理によって特定の因子の発現上昇が生体内で上昇するからと言って、その処理が個体に感染抵抗性をもたらすという推察には問題がある。私は本研究を通して、個体の生死を重要な判断基準の一つとする姿勢を貫いた。

本論

第一章 腸管出血性大腸菌による動物殺傷メカニズムの解明

導入

腸管出血性大腸菌O157:H7はヒトに感染し、腸管から侵入すると時として脳や腎臓において重篤な炎症を引き起こすことによって、ヒトを死に至らしめることが知られている(29, 43)。腸管出血性大腸菌は、通常の大腸菌と異なり、志賀毒素や溶血毒素などの毒素を産生する。*stx1*と*stx2*は染色体に挿入されたファージ上に存在し、Shiga toxin 1とShiga toxin 2をコードする(40)。*ehxCABD*はpO157に存在し、enterohemolysinをコードする(38)。これらの因子は腸管上皮細胞に対して傷害性を有する(8,35)。さらに、腸管出血性大腸菌の病原性の発現においては、菌の移動と腸管上皮細胞の表層への接着が重要だと考えられている(16, 32)。鞭毛タンパク質遺伝子の転写のレギュレーターをコードする*flhDC*の発現は新たな栄養源に遭遇した際に活性化されることが示されている(44)。腸管出血性大腸菌の腸管上皮細胞表層への接着の際には、attaching and effacing (AE) lesionsが形成される。AE lesionsの形成に必要な遺伝子群の多くは、病原性アイランドのひとつ、locus of enterocyte effacement (LEE)に存在する。LEEには、上皮細胞表層に対する接着に関わる外膜タンパク質インチミンをコードするEaeが存在する(9, 22)。さらに、LEEの遺伝子群の発現は、LEE上にコードされる転写因子Ler、GrlR、GrlA(2, 7)、他の染色体領域にコードされる転写因子PchA、PchB、PchC、LrhAによって制御される(21)。LrhAはLEEの遺伝子群だけでなく鞭毛の遺伝子群の発現を負に制御し、enterohemolysinをコードするehxCABDの

発現を活性化することから、腸管出血性大腸菌が移動から接着と毒素発現へ生理状態を変化させるスイッチに関わると考えられる(17, 19, 30)。この様に、O157:H7の病原性発現メカニズムには多数の因子が働き、宿主動物にたいして強い病原性をもたらすと考えられてきた。しかし、これら腸管出血性大腸菌の毒素、接着、移動に関わる遺伝子群とその制御因子について、どの因子の欠損株もモデル動物を殺傷する能力が低下することは実証されていない。加えて、腸管出血性大腸菌による感染症の重症度と毒素産生能の間に対応は無い(13)。すなわち、大腸菌O157:H7による動物の殺傷に必須の因子が何であるかは明らかになっていないと言ってよい。

細菌が動物を殺傷する分子メカニズムを理解するためにはモデル動物の利用が必要である。感染症の研究においてはこれまでマウスが多用されてきたが、O157:H7は通常マウスを殺傷しない。最近、O157:H7の経口投与によって germ-free マウスが感染死することが報告された(10)ものの、大腸菌O157:H7の多数の遺伝子欠損株の動物殺傷能力を germ-free マウスを用いて検討するのは動物愛護の観点から問題を含むし、さらにいうと費用の面からも現実的ではない。そこで、私はこの研究において、上にあげた二つの問題を克服できる材料として、昆虫をモデル動物に用いることにした。昆虫はほ乳類と多くの共通点を有する自然免疫機構を持つ。私はこれまでに絹糸の生産のために家畜化された昆虫であるカイコをヒトの病原性細菌である黄色ブドウ球菌の感染モデルとして利用してきた(23-26)。カイコは、線虫やショウジョウバエなどの他の無脊椎動物に比べ、注射による感染実験において定量性に優れている(26)。さらに、カイコを用いた感染実験はヒトの体温である37度において可能である(27)。本研究において、私は大腸菌O157:H7の感染による動物殺傷メカニズムを研究するためのモデル動物として利用する事を試みた。

大腸菌O157:H7のヒトに対する感染から発症までの期間は短い(28)ことか

ら、大腸菌O157:H7の病原性を理解する上では乳類の初期免疫応答である自然免疫系と大腸菌O157:H7との相互作用を理解することが重要である。自然免疫による病原性細菌の排除には、血球細胞による貪食による細胞性免疫と抗菌ペプチドによる体液性免疫が知られている。抗菌ペプチドは無脊椎動物と脊椎動物の間で保存されている(31,36)。腸管出血性大腸菌(15)をはじめ、*Shigella* (45)、*Salmonella* (14)、*Burkholderia* (33)、*Actinobacillus* (37)などのグラム陰性細菌(42)において、LPS上のO抗原が抗菌ペプチドに対して耐性を導く。LPSのO高原合成は*rfb*遺伝子群が担い、fructose-6-phosphateを初期出発物質としてO抗原の構成単糖であるGDP- α -perosamineを合成する(1)。最後の段階で*rfbE*にコードされるaminotransferaseはGDP-4keto-6-deoxymannnoseからGDP- α -perosamineを合成する(1)。PerosamineはVibrio cholerae O1、E. coli O157:H7、Caulobacter crescentus CB15のO抗原に特有の構成単糖である(39)。内膜表面上でnucleotideにより活性化された単糖はWecAにより重合され(3)、WaaLによりcore lipidAに結合される(18)。実際、Uropathogenic *Escherichia coli* の*waaL*欠損株はurinary tractにおける生菌数が低下する(4)。大腸菌O157:H7の*rfbE*欠損株はマウス腸管と牛の直腸における生菌数を低下することが報告されている(41)。これらの知見に基づき、本研究で、私は腸管出血性大腸菌のO157抗原が動物に対する殺傷能力に寄与するか検討した。

材料と方法

菌株と培養条件

本研究に用いた細菌とプラスミドはTable 1にまとめた。大腸菌はLuria-Bertani培地中で37°Cで好氣的に培養し、実験に用いた。

大腸菌の遺伝子破壊

大腸菌の遺伝子破壊はOne step inactivation method(6)にしたがって行った。標的遺伝子の上流領域および下流領域に対して相補的な配列をアダプター配列として持つプライマーを用いて、PCR法によりカナマイシン耐性遺伝子kan、もしくはクロラムフェニコール耐性遺伝子catを増幅した。

カイコを用いた感染実験

愛媛蚕種よりカイコ卵 (Fu/Yo × Tsukuba/Ne系統)を購入し、孵化した幼虫は4令幼虫期まで抗生物質を添加したエサを与え、5令幼虫期から抗生物質非添加のエサを与えて27°Cで育成された(24)。5令幼虫2日目のカイコに対して、注射針 (27-gauge) を装着したツベルクリン用の注射器を用いて大腸菌の生菌を体液内に注射し、37°Cのインキュベータ内で餌を与えずに飼育した。

マウスを用いた感染実験

マウスJcl:IcRの雌 (4週齢) は日本クレア社から購入した。マウスは腹腔内に大腸菌の一晩培養液を5% hog gastric mucinに懸濁した溶液を注射された。マウスはオートクレーブによって滅菌した水およびガンマ線を照射したエサを与えて22°C環境下で飼育した。

生菌数測定

試料は0.9%食塩水を用いて適当な濃度まで希釈され、2枚のLB10寒天培地上に塗布された。一晩培養後、形成されたコロニー数が計測された。

カイコ体液のメタノール抽出画分の調製

カイコの体液は氷上で回収され、4°Cにおいて 3000-g、5 分間遠心された。その上清に対して等量のメタノールが加えられ、ボルテックスミキサーで激しく攪拌された。4°Cにおいて 3000-g、5 分間遠心されたあと、上清は遠心エバポレータを用いて蒸発乾固された。乾燥物は水に溶解された。タンパク質量はBradford法により測定された。

リポ多糖の解析

LPS画分の調製はCoyneらの方法に基づいて行った(5)。LPS画分はその半容量のLaemi法のSDSサンプルバッファー(150 mM Tris-HCl [pH 6.8], 6% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.04% bromophenol blue)を加えられ、12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動された。電気泳動後のゲルは抗O157抗体を用いて免疫染色された。

抗菌ペプチドによる増殖抑制

化学合成されたmoricin (operon社) を添加したLuria-Bertani培地に大腸菌株の一晚培養液を1000分の1容量加え、27°Cで5時間静置培養した。その後、生菌数を測定した。

結果

1. EHEC O157:H7による動物の殺傷におけるO抗原の必要性

本研究で私は、腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. Coli*, EHEC) O157:H7の臨床分離株であるSakai株(WT)を用い、Sakai株がカイコを殺傷するかを検討した。Sakai(WT)の生菌懸濁液をカイコの血液内に注射し、37°Cにおいて飼育したところ、それらのカイコは死亡した (Table 2, 3)。生菌を注射してから20時間経過した時点で算出したSakai株のカイコに対するLD₅₀値は 4.3×10^6 CFU/larvaだった(Table 3)。一方、大腸菌K-12株由来の実験室株であるW3110 (ヒトに対して病原性を示さないとされる) のLD₅₀はSakai(WT)のおよそ95倍であった(Table 3)。

さらに私は、Sakai株によるカイコに対する殺傷能力に必要な因子を明らかにするため、これまでにEHEC O157:H7の病原性因子として考えられている因子群のカイコ殺傷に対する寄与を検討した。細胞傷害活性を有するShiga toxin 1および2をコードする遺伝子 $stx1/stx2$ の二重欠損株のカイコに対する病原性をLD₅₀により評価した結果、対照株として用いたSKI-5142株と同程度の殺傷活性を示した(Table 2)。また同様に、腸管溶血毒素をコードする $ehxA$ 、あるいは $ehxA$ と $ehxA$ の発現に必要な遺伝子である $ehxCBD$ を破壊した株のカイコに対する殺傷能力も対照株に比べて低下しなかった (Table 2)。加えて、EHEC O157:H7の細胞接着に必要なタンパク質であるインチミンをコードする eae の欠損株を用いた場合にも、カイコに対する殺傷能は対照株と同程度であった (Table 2)。鞭毛合成遺伝子のマスターレギュレーターである $flhDC$ の欠損株は対照株と同程度のカイコ殺傷能力を示した (Table 2)。さらに、腸管溶血毒素、鞭毛遺伝子、LEEの遺伝子群の発現調節に関わる転写因子をコードする $lrhA$ の欠損株はカイコに対する殺傷能力を低下しなかった (Table 2)。以上の結果はEHEC O157:H7がカイコを殺

傷する過程において、細胞毒素、接着因子、または鞭毛は必要ではないことを示している。

次に私はEHEC O157:H7の外膜上のリポ多糖(Lipopolysaccharide; LPS)のO抗原に着目し、O抗原がカイコ殺傷能力に寄与するかを検討した。LPS上のO157抗原はEHEC O157:H7の分類上の指標であるだけでなく、宿主動物から産生される抗菌ペプチドに対する耐性を導くことが示唆されている(15)。私はSakai(WT)を親株として、O157:H7に特有のO抗原の構成分子であるperosamineの合成酵素をコードする*rfbE*の欠損株を作出した。また、O抗原をcore lipidAに結合するligaseをコードする*waaL*の欠損株を作出した (Fig. 1A-B)。これらの菌株から調製したLPS画分を電気泳動し、抗O157抗体による免疫染色で検出したところ、Sakai(WT)ではシグナルが検出されたのに対し、*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株においてはシグナルが消失していた (Fig. 1C)。したがって、この*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株はLPS上のO157抗原を失っていると考えられる。また、ここでみられたO抗原の消失は、野生型遺伝子を再導入することによって回復した(Fig. 1C)。*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株のカイコに対するLD₅₀はそれぞれ1.4 x 10⁸ CFUと2.1 x 10⁸ CFUであり、これらの値はSakai (WT)のLD₅₀の30倍または50倍程度大きかった (Fig. 2およびTable 3)。さらに、これらの遺伝子欠損株に野生型遺伝子を導入した株のLD₅₀は欠損株のLD₅₀に比べて低下していた(Fig. 2およびTable 3)。以上の結果は、EHEC O157:H7のLPS上のO抗原がカイコに対する殺傷能力に必要であることを示している。

次に私は、EHEC O157:H7に存在するLPS上O抗原が、カイコと同様に哺乳動物の殺傷にも必要かを検討した。Sakai(WT)の生菌を腹腔内に注射することによってマウスは一日以内に死亡した。このとき、生菌を注射してから18時間後の*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株のマウスに対するLD₅₀はSakai(WT)のその10倍

以上高い値を示した (Table 4)。この結果は、EHEC O157:H7のLPS上のO抗原が哺乳動物の殺傷にも必要であることを示唆している。

2. EHEC O157:H7のカイコ体液中における増殖に対するO抗原の必要性

LPS上のO抗原は、様々なグラム陰性細菌の抗菌ペプチドに対する防御に寄与することが報告されている。私はEHEC O157:H7の動物殺傷活性に対するLPS上のO抗原の必要性が、宿主の自然免疫システムにおいて重要な機能を有する抗菌ペプチドに対する防御機能で説明されるのではないかと考え、その仮説を検証することにした。Sakai(WT)、または*rfbE*欠損株をカイコの体液中に注射した後、体液中の生菌数の経時的变化を調べたところ、Sakai(WT)では注射後1.5時間から6時間にかけて生菌数が増加したのに対し、*rfbE*欠損株では注射後0.5時間から6時間にかけて生菌数が減少した (Fig. 3A)。したがって、EHEC O157:H7のLPS上O抗原はカイコ体液中の自然免疫機構に抵抗するために必要であると考えられる。自然免疫による細菌等の外来異物の排除には、体液細胞による貪食ならびに抗菌ペプチド等による殺菌が知られる。Sakai(WT)と*rfbE*欠損株の間でカイコ体液細胞により取り込まれた菌数に差は見られなかった (data not shown)。そこで私は、カイコ体液中の液性因子による細菌の増殖抑制活性に対して、*rfbE*欠損株の感受性が上昇しているかを検討した。私はカイコ体液から遠心によって細胞を除去したplasma画分を添加した栄養培地において、Sakai (WT)と*rfbE*欠損株を5時間培養し、生菌数を測定した。その結果、*rfbE*欠損株の生菌数はplasma画分の添加量依存的に減少した (Fig. 3B)。一方、親株のSakai (WT)の生菌数はplasma画分の添加により変化しなかった。したがって、EHEC O157:H7のLPS上O抗原はカイコ血液plasma画分中の抗菌物質に抵抗するために必要である。このカイコplasma画分のEHEC O157:H7 *rfbE*欠損株に対する増殖抑制活性は100°C、15分の加熱処理によっても失われなかった (data not

shown)。さらに、このカイコplasma中の抗菌活性はメタノールにより抽出されることがわかった (data not shown)。これらの性質は抗菌ペプチドの性質と一致する事から、私はカイコplasma画分の抗菌活性が抗菌ペプチドによると考えた。抗菌ペプチドの発現は菌体による刺激により誘導される(11)。*rfbE*欠損株の増殖を抑制する活性がカイコ体液中の抗菌ペプチドによるかを知るために、*rfbE*欠損株増殖抑制活性がSakai (WT)の注射により上昇するか検討した。生理食塩水またはSakai (WT)の生菌懸濁液をカイコに注射し、8時間後に回収したカイコ体液からメタノール抽出画分を得た。メタノール抽出画分を添加した栄養培地中において、*rfbE*欠損株を培養し、生菌数を測定した。その結果、Salineを注射したカイコ由来のメタノール抽出画分に比べて、Sakai (WT)を注射したカイコ由来のメタノール抽出画分の*rfbE*欠損株に対する増殖抑制活性は増大していた (Fig. 3C)。また、この*rfbE*欠損株に対する増殖抑制活性は*rfbE*欠損株の生菌懸濁液の注射によっても増大した (data not shown)。以上の結果は、カイコ体液中の*rfbE*欠損株に対する増殖抑制活性が抗菌ペプチドによることを示唆している。

3. EHEC O157:H7の抗菌ペプチド耐性におけるLPS上O抗原の寄与

私はカイコ体液中に存在する抗菌ペプチドであるmorcinに対して、*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株が感受性を示すかを検討した。私は*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株をmorcinを添加した栄養培地において増殖させた後、生菌数を測定した。morcinを添加した栄養培地において、*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株の生菌数は親株に比べて低下していた (Fig. 4A)。*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株の生菌数の低下は野生型遺伝子の導入により回復した (Fig. 4A)。一方、morcinを添加しない栄養培地において、*rfbE*欠損株と*waaL*欠損株の生菌数は親株と変わらなかった (Fig. 4A)。以上の結果は、EHEC O157:H7のLPS上のO抗原が抗菌ペプチドmorcinに対する抵

抗性に寄与することを示唆している。

次に私は、EHEC O157:H7のLPS上のO抗原が哺乳動物の体液性免疫因子に対する抵抗性に寄与するかを検討した。その結果、ブタ血清中において *rfbE*欠損株と *waaL*欠損株の生菌数は親株に比べて100分の1以下に低下することが見いだされた(Fig. 4B)。また、この生菌数の減少は、それぞれの欠損株にたいして野生型遺伝子を再導入することによって抑圧された(Fig. 4B)。また、補体系の不活性化に広く用いられる加熱処理によって、ここで見いだされた *rfbE*欠損株と *waaL*欠損株に対する殺菌効果は消失した(Fig. 4B)。これらの結果は、EHEC O157:H7のLPS上のO抗原が哺乳動物の体液性免疫因子に対する抵抗性に寄与することを示唆している。

考察

私は本研究において、カイコが腸管出血性大腸菌O157:H7により感染死すること、ならびに腸管出血性大腸菌O157:H7によるカイコならびにマウス殺傷においてLPS上O抗原が必須の役割を果たすことを明らかにした。本研究は腸管出血性大腸菌O157:H7の動物殺傷能力において必要な因子を初めて同定した例である。カイコの感染モデルは、腸管出血性大腸菌O157:H7の動物殺傷能力を評価する上で有用であり、今後、LPS上のO抗原以外の他の大腸菌O157:H7による動物殺傷に必要な因子が同定されることが期待される。

グラム陰性細菌のLPS上のO抗原は抗菌ペプチドに対する抵抗性に寄与する。本研究で扱った大腸菌O157:H7においてもLPS上のO抗原が抗菌ペプチドに対する抵抗性に寄与することが明らかとなった。また、大腸菌O157:H7がカイコ殺傷を引き起こす前に、大腸菌O157:H7はカイコ体液中で増殖する一方、O抗原の欠損株はカイコ体液中で増殖出来ないことが示された。さらに、カイコ体液中の大腸菌O157:H7増殖抑制活性は宿主の体液性免疫因子によることが示唆された。大腸菌O157:H7がカイコを殺傷する上で菌の体液中での増殖が必要であり、その際にLPS上のO抗原による抗菌ペプチド抵抗性が必要であると考えられる。

また、LPSはエンドトキシンの一つとして知られている。大腸菌のLPSのO抗原はLPSのエンドトキシン活性に必要であると考えられており(46)、本研究で見出されたO抗原欠損株における動物殺傷能力の減弱は、LPSのエンドトキシンとしての活性の低下が寄与している可能性は排除できていない。今後、菌体から宿主への攻撃（エンドトキシン）の側面と、宿主免疫因子（抗菌ペプチドなど）に対する防御の側面の両方から、O抗原の機能を明らかにしていくことが重要である。

図表

Table 1. 本研究で用いた菌株およびプラスミドの一覧表

Strain or plasmid	Genotypes or characteristics ^a	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
Sakai	EHEC O157:H7 (same as RIMD0509952)	(12)
SKI-5142	Sakai $\Delta(lacIZYA)$	(20)
SKI-5171	SKI-5142 $\Delta(ehxA)::kan$	(38)
SKI-5172	SKI-5142 $\Delta(ehxCABD)::kan$	(38)
SKI-5301	SKI-5142 $\Delta(lrhA)::kan$	(17)
SKI-5500	SKI-5142 $\Delta(stx1)::cat, \Delta(stx2)::kan$	This study
SKI-5510	SKI-5142 $\Delta(eae)::kan$	This study
SKI-5201	SKI-5142 $\Delta(flhDC)::kan$	This study
SKI-5440	Sakai $\Delta(rfbE)::kan$	This study
SKI-5441	Sakai $\Delta(waaL)::kan$	This study (34)
Plasmids		
pKD4	Vector for allelic replacement in <i>E. coli</i> , Km ^r	(6)
pKD46	Vector for allelic replacement in <i>E. coli</i> , Cm ^r	(6)
pMW118	<i>E. coli</i> vector, Amp ^r	Nippon Gene
<i>rfbE</i>	pMW118 with intact <i>rfbE</i> from Sakai	This study
<i>waaL</i>	pMW118 with intact <i>waaL</i> from Sakai	This study

a. Km, kanamycin; Cm, chloramphenicol; Amp, ampicillin.

Table 2. 腸管出血性大腸菌O157:H7の溶血毒素欠損株、ならびに接着因子欠損株のカイコに対する病原性

Strain	LD ₅₀ (CFU)	LD ₅₀ ratio
Experiment 1		
Sakai (WT)	6.9×10^5	1
SKI-5500 ($\Delta stx1/stx2$)	8.6×10^5	1.2
Experiment 2		
Sakai (WT)	8.8×10^5	1
SKI-5171 ($\Delta ehxA$)	8.3×10^5	0.9
Experiment 3		
Sakai (WT)	4.8×10^6	1
SKI-5510 (Δeae)	6.5×10^6	1.4
SKI-5301 (ΔrhA)	3.0×10^6	0.6
Experiment 4		
Sakai (WT)	8.4×10^5	1
SKI-5201 ($\Delta flhDC$)	9.5×10^5	1.1

Table 3. 腸管出血性大腸菌O157:H7のO抗原合成酵素欠損株、ならびにLPS O抗原化酵素欠損株のカイコに対する病原性

Strain	LD ₅₀	N	LD ₅₀ ratio	P-value
1. Sakai (WT)	4.3 ± 1.1 × 10 ⁶	3	1	
2. SKI-5440 / pMW118 ($\Delta rfbE$)	1.4 ± 0.44 × 10 ⁸	3	33	0.0382 vs. 1
3. SKI-5440 / <i>prfbE</i> (<i>rfbE</i> ⁺)	8.8 ± 0.31 × 10 ⁶	3	2.1	0.0422 vs. 2
4. SKI-5441 / pMW118 ($\Delta waaL$)	2.1 ± 0.20 × 10 ⁸	2	49	<0.001 vs. 1
5. SKI-5441 / pMW118 (<i>waaL</i> ⁺)	2.8 ± 0.50 × 10 ⁷	2	6.6	0.0126 vs. 4
6. W3110	4.1 ± 0.05 × 10 ⁸	2	94	<0.001 vs. 1

大腸菌株の一晩培養液の二倍希釈系列をカイコ5匹に注射し、37°Cで飼育し、20時間後の生存率を求めた。ロジスティック回帰によりカイコに対するLD50値を求めた。nの列に実験回数を示し、データは平均値 ± standard errorを示す。Sakai (WT)のLD50値と他の菌株のLD50値との間のStudent t-test P-valueを示す。

Table 4. 腸管出血性大腸菌O157:H7のO抗原合成酵素欠損株、ならびにLPS O抗原化酵素欠損株のマウスに対する病原性

Strain	LD ₅₀ (CFU)	LD ₅₀ ratio	P-value
Experiment 1			
Sakai (WT)	<1.0 × 10 ⁷		
SKI-5440 / pMW118 (<i>ΔrfbE</i>)	>1.0 × 10 ⁸	>10	
Experiment 2			
Sakai (WT)	1.1 × 10 ⁷		
SKI-5440 / pMW118 (<i>ΔrfbE</i>)	1.1 × 10 ⁸	11	0.01152
SKI-5441 / pMW118 (<i>ΔwaaL</i>)	1.5 × 10 ⁸	14	0.04495

2倍希釈系列の菌液をマウス5匹に対して注射後18時間の生存数からLD₅₀値を求めた。Sakai (WT)とSKI-5440 (*ΔrfbE*)については2回の実験、SKI-5441(*ΔwaaL*)については1回の実験を行った。ロジスティック回帰によりLD₅₀値を求め、野生株と遺伝子欠損株のLD₅₀値の差について尤度差検定によるP値を求めた。

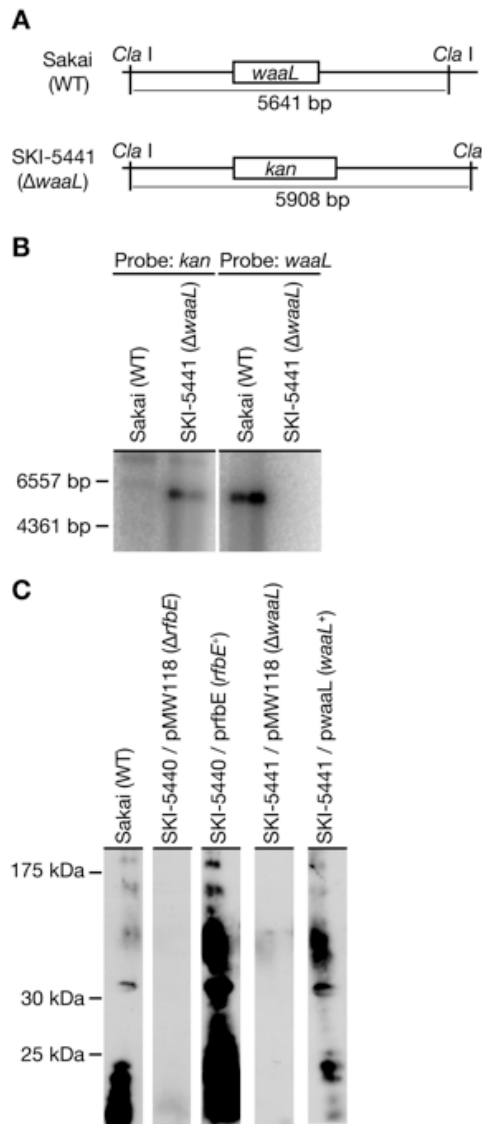


Fig. 1. 腸管出血性大腸菌O157:H7 Sakai株のwaaL遺伝子欠損株の作出

- A. 野生株およびwaaL欠損株のwaaL遺伝子近傍のDNA領域の模式図
- B. 野生株およびwaaL欠損株のゲノムDNAを制限酵素ClaIにより消化し、カナマイシン耐性遺伝子に対するプローブ（写真左側）またはwaaL遺伝子に対するプローブ（写真右側）によりサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。
- C. 大腸菌LPS画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、抗O157抗体による免疫染色を行った。Lane 1, Sakai (WT); lane 2, SKI-5440 / pMW118 ($\Delta rfbE$); lane 3, SKI-5440 / pMW118 (*rfbE*⁺); lane 4, SKI-5441 / pMW118 ($\Delta waaL$); lane 5, SKI-5441 / pwaaL (*waaL*⁺)

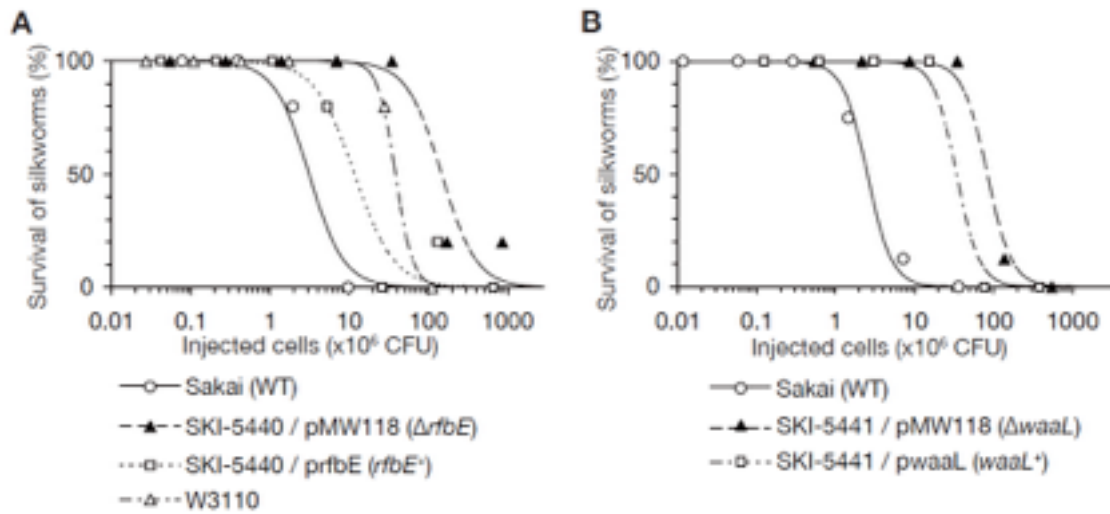


Fig. 2. 腸管出血性大腸菌O157:H7 Sakai株の病原性関連遺伝子欠損株のカイコに対する殺傷能力

横軸はカイコ血液内に注射した生菌数、縦軸は20時間後の生存率を示す。菌液を注射したカイコは37度においた。

- A. カイコ (n = 10) に対して、Sakai (WT)、ベクタープラスミド、もしくは $rfbE$ 遺伝子を有するプラスミド $prfbE$ で形質転換したSKI-5440 ($\Delta rfbE$)、またはW3110株の一晩培養液の2倍希釈系列を注射した。3回の実験のうち1回の実験を代表例として示し、3回の実験結果のまとめはTable 3に示す。ロジスティック回帰によりLD₅₀値を求めた。
- B. カイコ (n = 8) に対して、Sakai株、ベクタープラスミド、もしくは $waaL$ 遺伝子を有するプラスミドで形質転換したSakai $\Delta waaL$ 株の一晩培養液の2倍希釈系列を注射した。2回の実験のうち1回の実験を代表例として示す。2回の実験結果のまとめはTable 3に示す。

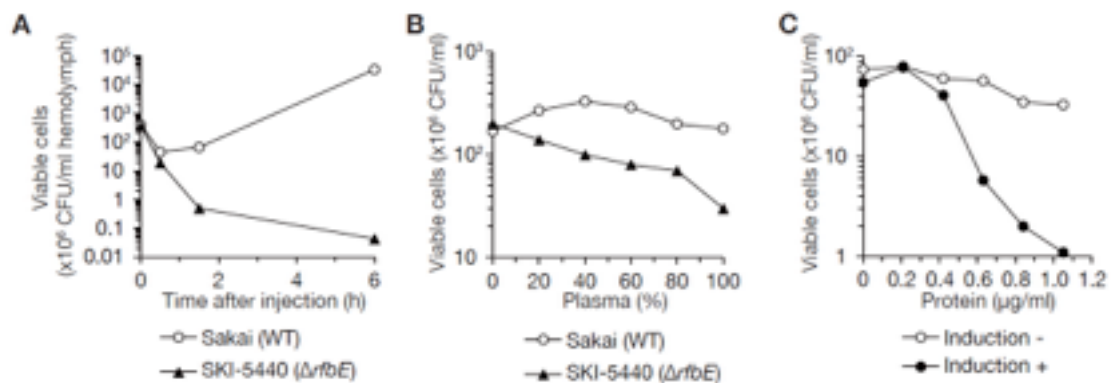


Fig. 3. カイコ体液中の抗菌物質に対する腸管出血性大腸菌O157:H7 Sakai株のO抗原欠損株の感受性

- A. カイコ体内におけるO157 Sakai株 (WT)およびO抗原欠損株(SKI-5440)の生菌数を測定した。カイコ血液中に2 x 10⁸CFUのSakai (WT)もしくはSKI-5440 (ΔrfbE)を注射し、0.5、1.5、6時間後の体液を回収した。横軸は注射後の時間、縦軸はカイコ体液中の生菌数を示す。2回の試行の代表例を示す。
- B. カイコ血液plasma画分を添加した栄養培地中でのO157 Sakai株 (WT)およびO抗原欠損株(SKI-5440)の生菌数を測定した。カイコ血液plasma画分を添加したLB培地に対して、2 x 10⁸CFUの各菌株を接種し、5時間培養後の生菌数を測定した。横軸はLB培地に対するカイコplasmaの添加量を示す。2回実験を行い、その代表例を示す。
- C. 生菌の前投与によるカイコ血液plasma中のSKI-5440 (ΔrfbE)の増殖抑制活性の増大。生理食塩水(Induction -)もしくはSakai (WT)の菌液 (Induction +)を注射し、6時間経過したカイコの血液を採取し、plasma画分から50%メタノール抽出画分を得た。そのサンプルを添加した栄養培地に対して、1-4x 10⁵CFUのSKI-5440 (ΔrfbE)を接種し、5時間培養後の生菌数を測定した。横軸は栄養培地に添加した50%メタノール抽出画分のタンパク質濃度を示す。2回実験を行い、その代表例を示す。

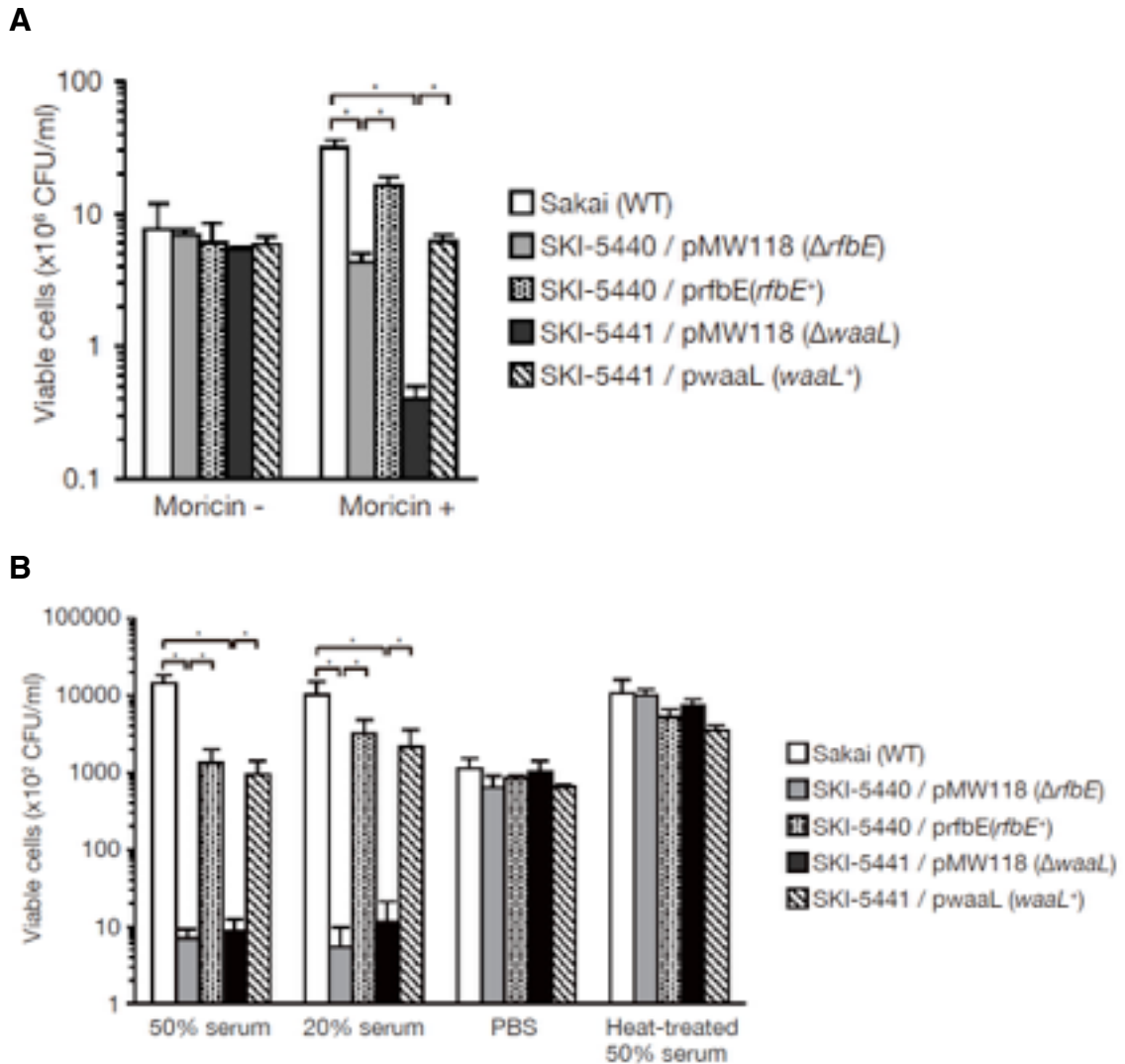


Fig. 4. 宿主動物の抗菌因子に対する腸管出血性大腸菌O157:H7 Sakai株のLPS上O抗原の防御的機能

- A. カイコの抗菌ペプチドmoricinを100 μ g/ml添加した栄養培地に、 $1-2 \times 10^5$ CFUの Sakai (WT)、ベクタープラスミド、もしくは*rfbE*遺伝子を有するプラスミド*prfbE*で形質転換したSKI-5440 ($\Delta rfbE$)を接種して、27°Cで5時間培養後の生菌数を測定した。2回実験を行い、その代表例を示す。★印は $p < 0.05$ を示す。
- B. 新鮮なブタ血清を添加したPBS中に $1 \times 10^5-10^6$ CFU/mLとなるようにSakai (WT)、ベクタープラスミド、もしくは*rfbE*遺伝子を有するプラスミド*prfbE*で形質転換したSKI-5440 ($\Delta rfbE$)を接種し、37°Cで90分培養後の生菌数を測定した。グラフは生菌数とその標準誤差を2回の実験の代表例として示す。★印は $p < 0.05$ を示す。

文献

1. Albermann, C., and W. Piepersberg. 2001. Expression and identification of the RfbE protein from *Vibrio cholerae* O1 and its use for the enzymatic synthesis of GDP-D-perosamine. *Glycobiology* 11:655-661.
2. Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay, and J. L. Puente. 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 187:7918-7930.
3. Bengoechea, J. A., E. Pinta, T. Salminen, C. Oertelt, O. Holst, J. Radziejewska-Lebrecht, Z. Piotrowska-Seget, R. Venho, and M. Skurnik. 2002. Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O-antigen polymerase) of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J Bacteriol* 184:4277-4287.
4. Billips, B. K., A. J. Schaeffer, and D. J. Klumpp. 2008. Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder. *Infect Immun* 76:3891-3900.
5. Coyne, M. J., Jr., K. S. Russell, C. L. Coyle, and J. B. Goldberg. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J Bacteriol* 176:3500-3507.
6. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-6645.
7. Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68:6115-6126.
8. Figueiredo, P. M., C. F. Catani, and T. Yano. 2003. Serum high-density lipoprotein (HDL) inhibits in vitro enterohemolysin (EHly) activity produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38:53-57.

9. Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30:911-921.
10. Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J. M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, and H. Ohno. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543-547.
11. Furukawa, S., H. Tanaka, H. Nakazawa, J. Ishibashi, T. Shono, and M. Yamakawa. 1999. Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm (*Bombyx mori*). *Biochem J* 340 (Pt 1):265-271.
12. Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8:11-22.
13. Hermos, C. R., M. Janineh, L. L. Han, and A. J. McAdam. 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: diagnosis and clinical manifestations of O157:H7 and non-O157:H7 infection. *J Clin Microbiol* 49:955-959.
14. Ho, N., A. N. Kondakova, Y. A. Knirel, and C. Creuzenet. 2008. The biosynthesis and biological role of 6-deoxyheptose in the lipopolysaccharide O-antigen of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 68:424-447.
15. Ho, T. D., and M. K. Waldor. 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 gal mutants are sensitive to bacteriophage P1 and defective in intestinal colonization. *Infect Immun* 75:1661-1666.
16. Holden, N. J., and D. L. Gally. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J Med Microbiol* 53:585-593.
17. Honda, N., S. Iyoda, S. Yamamoto, J. Terajima, and H. Watanabe. 2009. LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in

enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol Microbiol* 74:1393-1341.

18. Hug, I., and M. F. Feldman. 2011. Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology* 21:138-151.

19. Iyoda, S., N. Honda, T. Saitoh, K. Shimuta, J. Terajima, H. Watanabe, and M. Ohnishi. 2011. Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*.

20. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:4086-4094.

21. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2004. Positive effects of multiple pch genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* 150:2357-2571.

22. Jerse, A. E., K. G. Gicquelais, and J. B. Kaper. 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 59:3869-3875.

23. Kaito, C., N. Akimitsu, H. Watanabe, and K. Sekimizu. 2002. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb Pathog* 32:183-190.

24. Kaito, C., K. Kurokawa, Y. Matsumoto, Y. Terao, S. Kawabata, S. Hamada, and K. Sekimizu. 2005. Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Mol Microbiol* 56:934-944.

25. Kaito, C., D. Morishita, Y. Matsumoto, K. Kurokawa, and K. Sekimizu. 2006. Novel DNA binding protein SarZ contributes to virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 62:1601-1617.

26. Kaito, C., and K. Sekimizu. 2007. A silkworm model of pathogenic bacterial infection. *Drug Discoveries & Therapeutics* 1:89-93.

27. Kaito, C., K. Usui, T. Kyuma, and K. Sekimizu. 2011. Isolation of mammalian pathogenic bacteria using silkworms. *Drug Discoveries & Therapeutics* 5:66-70.
28. Keene, W. E., J. M. McAnulty, F. C. Hoesly, L. P. Williams, Jr., K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller, and D. W. Fleming. 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 331:579-584.
29. Law, D. 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 88:729-745.
30. Lehnen, D., C. Blumer, T. Polen, B. Wackwitz, V. F. Wendisch, and G. Unden. 2002. LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45:521-532.
31. Lehrer, R. I., and T. Ganz. 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14:96-102.
32. Levine, M. M., J. B. Kaper, R. E. Black, and M. L. Clements. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* 47:510-550.
33. Loutet, S. A., R. S. Flannagan, C. Kooi, P. A. Sokol, and M. A. Valvano. 2006. A complete lipopolysaccharide inner core oligosaccharide is required for resistance of *Burkholderia cenocepacia* to antimicrobial peptides and bacterial survival in vivo. *J Bacteriol* 188:2073-2080.
34. Matsuo, M., K. Kurokawa, S. Nishida, Y. Li, H. Takimura, C. Kaito, N. Fukuhara, H. Maki, K. Miura, K. Murakami, and K. Sekimizu. 2003. Isolation and mutation site determination of the temperature-sensitive *murB* mutants of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 222:107-113.
35. Obrig, T. G., P. J. Del Vecchio, J. E. Brown, T. P. Moran, B. M. Rowland, T. K. Judge, and S. W. Rothman. 1988. Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun* 56:2373-2378.
36. Okada, M., and S. Natori. 1983. Purification and characterization of an

antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem J* 211:727-734.

37. Ramjeet, M., V. Deslandes, F. St Michael, A. D. Cox, M. Kobisch, M. Gottschalk, and M. Jacques. 2005. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 280:39104-39114.

38. Saitoh, T., S. Iyoda, S. Yamamoto, Y. Lu, K. Shimuta, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe. 2008. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:4822-4830.

39. Samuel, G., and P. Reeves. 2003. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr Res* 338:2503-2519.

40. Sato, T., T. Shimizu, M. Watarai, M. Kobayashi, S. Kano, T. Hamabata, Y. Takeda, and S. Yamasaki. 2003. Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J Bacteriol* 185:3966-3971.

41. Sheng, H., J. Y. Lim, M. K. Watkins, S. A. Minnich, and C. J. Hovde. 2008. Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen deletion mutant and effect of the deletion on bacterial persistence in the mouse intestine and colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Appl Environ Microbiol* 74:5015-5022.

42. Skurnik, M., and J. A. Bengoechea. 2003. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia*. *Carbohydr Res* 338:2521-2529.

43. Tarr, P. I. 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20:1-8; quiz 9-10.

44. Tobe, T., N. Nakanishi, and N. Sugimoto. 2011. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 79:1016-1024.

45. West, N. P., P. Sansonetti, J. Mounier, R. M. Exley, C. Parsot, S. Guadagnini, M. C. Prevost, A. Prochnicka-Chalufour, M. Delepierre, M. Tanguy, and C. M. Tang. 2005. Optimization of virulence functions through glucosylation of Shigella LPS. *Science* 307:1313-1317.
46. Zhao, L., Y. Ohtaki, K. Yamaguchi, M. Matsushita, T. Fujita, T. Yokochi, H. Takada, and Y. Endo. 2002. LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood* 100:3233-3239.

第二章 カイコにおけるPrimed Immune Response

導入

ヒトを含めた全ての動物は常に微生物に暴露されている。その中で病原性を持つ微生物は動物の生命を脅かす。したがって、外来微生物に対する防御応答システムは、動物の生死に直結する極めて重要なシステムであると言える。

動物は免疫系を発達させることによって、病原性を持つ外来微生物から自身を守っている。動物に存在する免疫システムはその機能的観点から、外来微生物に対する応答が先天的に決まっているとされる自然免疫と、外来微生物に対する応答が後天的に調節される適応免疫に分けて考えられている。脊椎動物では自然免疫と適応免疫の双方の機能が知られており、特に脊椎動物の適応免疫においては、Bリンパ球から産生される抗体分子がその中核的な役割を担っている。

Bリンパ球から抗体を産生するシステムは、病原体への曝露によって応答の調節増強が起こるが、一方でそれ以外の免疫システムではそのような増強効果は一般的ではない。実際これまで、動物が同じ病原体に複数回暴露されても抗体産生と関連のない経路の応答は変化しないと考えられてきた (Janeway, C.A., et al. 2002)。この事実から、抗体産生能力を持たない動物種である昆虫などの無脊椎動物は、病原体への曝露経験によらず常に一定の反応を示すような、比較的未熟な免疫機構に頼っていると想定されてきた。しかしながら、昆虫は土壌や水圏といった生息環境下において、脊椎動物と同等あるいはそれ以上の感染リスクに曝されており、それらの動物種が未熟で弱い免疫系しか持たないと考えるのは不自然である。言い換えると、無脊椎動物にも病原体への曝露経験によって応答を調節する機構が備わっていると考えるのが妥当である。

実際これまでに、Benらは膜翅目昆虫であるマルハナバチに対してグラム陰性菌のPseudomonasまたはグラム陽性菌のPaenibacillusを予め致死量以下の菌量で

感染させると、同じ菌を再度感染させた場合におけるマルハナバチの生存時間が延長することを見出した(Ben M. Sadd et al., 2006)。さらにPhamらは双翅目昆虫であるショウジョウバエにおいてグラム陽性菌の*Streptococcus pneumoniae*に対して特異的に応答する免疫経路が存在する事を示した (Pham LN et al., 2007)。これらの知見から、無脊椎動物においても外来微生物の侵入を記憶し、特異的な感染防御を行うシステムが機能していると推察される。しかしながらその分子メカニズム、特にいかなる菌体由来分子が無脊椎動物における感染抵抗性の上昇をもたらすかは不明であった。私はハエやハチと同様にNeopteran（新翅下綱＝完全変態をする昆虫のグループ）に属するカイコ（鱗翅目）を用いてこの疑問に答える研究に着手した。

私はこれまでにカイコを用いた感染症モデルを確立してきた(Miyashita et al., 2012)。カイコは巨大昆虫であり、その利点を生かしてLD₅₀を用いた定量的な感染抵抗性の評価が可能である。本研究において私はカイコを用い、O-157の熱処理菌体をあらかじめ注射しておくことによってO-157の生菌による感染死を防ぐことができるかどうかを検討した。さらに、その特異性及び持続的について検討し、カイコに対してO-157感染抵抗性を付与する菌体由来の分子を同定することを試みた。

材料と方法

菌株と培養条件

腸管出血性大腸菌O-157:H7臨床分離株 Sakai株、大腸菌実験室株W3110はLuria-Bertani培地を用いて好氣的に37°Cで培養した。黄色ブドウ球菌臨床分離株NCTC8325-4株はTryptic Soy Brothを用いて37°Cで好氣的に培養した。セラチア菌2170株はBrain Heart Infusion を用いて30°Cで好氣的に培養した。いずれの菌株も、50 mL disposable tubes に10 mLの培地を入れるか、225 mL disposable tubes に50 mLの培地を入れて培養した。

カイコ

本研究に用いたカイコは、愛媛蚕種より卵(Hu Yo × Tukuba Ne系統)を購入し、4令幼虫期まで抗生物質を添加したエサを与え無菌的な環境で飼育した。5令幼虫期から抗生物質非添加のエサを与えて27°Cで飼育した。

カイコ幼虫並びに蛹に対する感染実験

カイコ幼虫の感染実験はKaitoらの方法に基づいて行った。1 mLシリンジおよび注射針 (27gauge) を用いて生菌を血液内に注射し、その後37°Cのインキュベータ内で餌を与えずに飼育した。また、カイコ蛹に対する感染実験は、幼虫と同様の方法で菌液を調製し、蛹の腹部背側から液量50uLを注射し、その後27°Cのインキュベータ内で餌を与えずに飼育した。

免疫実験

免疫に用いる菌株を液体培地で培養後、菌液を室温において5000rpmで8分間遠心(Kubota, Table Top Refrigerated Centrifuge 5500)して沈殿を得た。遠心後すぐに等容量の生理食塩水 (0.9 % NaCl) に懸濁し、オートクレーブによって熱処理菌体を調製した(121°C, 15 min.)。熱処理菌体は生理食塩水を用いて希釈し、カ

イコ幼虫一匹当たり25 μ Lを1 mLシリンジおよび注射針（27 gauge）を用いて血液内に注射した。注射後から感染実験までの間は、抗生物質非添加餌を与えて27°Cで飼育した。

体液サンプルの調製

抗菌活性の測定に用いるカイコ体液は、幼虫の擬足を消毒したハサミで切って回収した。回収には1.5 mL tubes (eppendorf) を用い、メラニン化阻害剤であるPhenylthioureaを終濃度100 μ Mとなるように添加した。体液の回収後は室温において15000 rpmで5分間遠心(Hitachi, CT15RE Tabletop Centrifuges)し、遠心上清画分を得た。

試薬

生理食塩水の調製に用いるガラス試薬瓶は使用前に300°Cで2時間乾熱滅菌した。その後塩化ナトリウム(Wako) 0.90% w/vとなるように超純水に溶解させ、121°Cで20分間オートクレーブした。本研究に用いる生理食塩水は、菌体成分またはその他の免疫活性化物質による汚染に特に注意して調製、保管した。本研究で用いたO-157由来lipopolysaccharide (LPS)はWakoPure Chemical Industries社製の精製品を (Lipopolysaccharide, from E.coli O-157, by ultracentrifugation, 129-05461)を用いた。また、Salmonella enterica serotype minnesota由来のLPSはSigma社製の精製品 (Lipopolysaccharides from Salmonella enterica serotype minnesotaまたはLipopolysaccharides (rough strains) from Salmonella enterica serotype minnesota Re 595 (Re mutant)) を用いた。

抗O-157分子の精製

A. Cation Exchange Column Chromatography.

カイコにFull Growthを100倍希釈したO-157熱処理菌体懸濁液を注射し、餌を与

えて27度で飼育した。熱処理死菌を注射してから12時間後に、phenylthiourea存在下で体液45mLを氷上のPP tubeに回収した。体液は遠心(5krpm, 5min, 4°C)し、上清を直ちに氷冷しておいた225mLの0.1 M ammonium acetate, pH=7で希釈した。このサンプルをCarboxymethyl(CM)-TOYOPEARL (Tosoh, CM-650M) column (100 mL, 2.5x16 cm)にアプライし、500mLの0.3M ammonium acetate, pH=7でwashした後、0.3M-1.0M ammonium acetate, pH=7 (150mL each)でグラジエント溶出させた。溶出画分は10mLずつ分取した。各フラクションはタンパク質量とO-157に対する抗菌活性を測定した後、活性画分を凍結乾燥して次の精製段階に供した。

B. Gel-Filtration Chromatography

上記活性画分を0.1 M ammonium acetate, pH=7に溶解し、同じバッファーで平衡化したFPLC用ゲルろ過カラム(GE Healthcare Life Sciences, Superose 12 10/300 GL) にアプライした。その後0.1 M ammonium acetate, pH=7を用いて流速0.5min / minで分画した。0.5 mLずつ分取した画分のタンパク質量とO-157に対する抗菌活性を測定した。また、活性のピーク付近の画分は、15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresisに供した。

O-157に対する抗菌活性の測定

Mueller Hinton Broth に懸濁したO-157生菌(10^{-3} full growth)を96 well plate (round bottom, 100 μ L/well)に分注し、活性測定するサンプルを一つのwellに100uL加えた。その後順次希釈して2倍希釈系列を作製し、37°Cで終夜培養した。増殖が抑制されたwellのうち最も希釈率が高いものからサンプルの力価または最小阻止濃度を決定した。また、精製における活性測定に用いたO-157の生菌懸濁液は、活性測定の感度を高める目的で 10^{-6} full growthを用いた。精製における活性の量は、100 μ Lのスケールにおいて力価1/nを示す抗菌活性の量をn unitと定義

した。すなわち、100 μ Lの活性測定系で力価1/4であるサンプルの活性量は40 units/mLと算出される。

結果

1. カイコにおける特異的な免疫の成立

私はこれまでに、腸管出血性大腸菌O-157がカイコを殺傷することを見出している(Miyashita A. et al., 2012)。私はこのカイコO-157感染モデル系において、適応免疫の現象を見いだせるかを検討した。カイコに対し、熱処理によって死滅させたO-157の菌体または生理食塩水を注射した。それらのカイコのO-157感染に対する抵抗性を検討したところ、熱処理菌体の投与から8時間以内において、死菌の投与量依存的なO-157感染抵抗性の獲得が見られた(Fig. 1)。私はこの現象をカイコにおける適応免疫であると考えた。このとき、生理食塩水には免疫効果が見られなかった事から、カイコに対する創傷又は液体の注射による非特異的な刺激は、上記の免疫効果を誘導しないと私は判断した。

次に私は、この免疫効果の強さを定量的に評価した。私はカイコに対する病原体の病原性を定量的に評価する方法が確立されている(Kaito et al., 2005)。私は、O-157熱処理菌体による免疫効果を定量的に評価する目的で、熱処理菌体または生理食塩水を前投与してから6時間後のカイコを用いてO-157生菌による殺傷の用量依存性について検討し、18時間後におけるカイコの生存曲線からLD₅₀を推定した。まず、生理食塩水を前投与したカイコに対するO-157のLD₅₀値は 6.7×10^5 (CFU/larva)と推定された(Table 1)。この値は私がこれまでに報告している値 (Miyashita A. et al. 2012)と同程度の値である。次に、O-157の熱処理菌体を前投与したカイコに対するO-157生菌のLD₅₀値を推定したところ、その値は生理食塩水を前投与したカイコにおけるそれと比較して顕著に増大していた(Table 1)。

2. O-157熱処理菌体によるカイコの免疫効果における感染菌種の特異性

次に私は、ここで見られた免疫効果がカイコに感染させる病原体の種類に特異性を示すか否かを検討した。私はこれまでに黄色ブドウ球菌がカイコを感染死

させる事を見出している (Kaito C. et al.)。そこで私はO-157熱処理菌体または生理食塩水を前投与したカイコに対して、黄色ブドウ球菌の生菌を感染させる実験を行った。その結果、O-157の熱処理菌体を前投与したカイコは、生理食塩水を前投与したカイコと同様に黄色ブドウ球菌によって感染死した(Fig. 2)。したがって、O-157熱処理菌体の投与は黄色ブドウ球菌感染に対する抵抗性をカイコに獲得させないと私は判断した。この結果は、カイコにおいて特異的な免疫効果をもたらす機構がある事を示唆している。

次に私はO-157熱処理菌体の他にカイコに対して免疫効果をもたらす死菌体が存在する否かを知る目的で、大腸菌実験室株、セラチア菌、または黄色ブドウ球菌の熱処理菌体の免疫効果を検討した。その結果、大腸菌実験室株およびセラチア菌の熱処理菌体はO-157熱処理菌体と同様にカイコに対してO-157感染抵抗性を導いた(Fig. 1)。一方で黄色ブドウ球菌の熱処理菌体はカイコに対してO-157感染抵抗性を導かなかった(Fig. 1)。以上の結果は、カイコに対して免疫効果をもたらす菌体には特異性がある事を示唆している。私はグラム陰性菌である大腸菌およびセラチア菌の熱処理菌体が免疫効果を有する一方、グラム陽性菌の熱処理菌体は免疫効果を示さなかった事から、カイコに免疫効果をもたらす物質はグラム陰性菌において選択的に存在する菌体成分であると考えた。

3. カイコにおける免疫の持続性

動物における免疫では、その持続性が動物の生死を分ける重要な性質である。私はこれまでに見出したO-157熱処理菌体による免疫効果が、カイコにおいて持続的な効果を持つか否か検討した。私はカイコにO-157の熱処理菌体または生理食塩水を投与してから長期間飼育後に、O-157の生菌感染実験を行った。その結果、カイコは熱処理菌体の投与後4日経過した時点(5齢6日目)においてもO-157に対する感染抵抗性を有している事が分かった(Table 1)。O-157熱処理菌体の投与から3日後におけるO-157感染のLD₅₀値は 6.3×10^7 CFU/larvaであり、生理

食塩水を前投与した群では 5.0×10^5 CFU/larvaであった。さらに、O-157の熱処理菌体による免疫効果は、カイコが変態を経て蛹になった後においても見出された(Fig. 3A-C)。以上の結果は、O-157熱処理菌体によるカイコへの免疫効果が持続的に働き、変態をまたいでカイコの体内に記憶されることを示唆している。

4. カイコにおける免疫の誘導分子同定

細胞壁に存在するリポ多糖(Lipopolysaccharide; LPS)は、グラム陰性菌に特有の細胞成分である。そこで、私はO-157熱処理菌体のカイコに対する免疫効果がLPSによって説明されるか否かを検討した。カイコにO-157由来のLPSを前投与するとカイコはO-157に対する感染抵抗性を獲得し、その効果は用量依存的だった(Fig. 4)。しかしながら、一般に用いられているLPSサンプル (hot-phenol法で調製したもの) には微量のペプチドグリカンが混入していることが知られている。そこで私は、上記に見出されたLPS画分の活性が、混入しているペプチドグリカンによる可能性を検討するため、ペプチドグリカンの分解酵素であるムタノライシンで処理したLPS画分をカイコに注射し、O-157に対する感染抵抗性を検討した。その結果、ムタノライシンで処理したLPS画分はカイコに対する免疫活性を著しく低下させていた(Fig. 4)。この結果は、LPS画分で見出された免疫活性が、混入しているペプチドグリカンによって説明されることを示唆している。実際、大腸菌由来のペプチドグリカンによって免疫されたカイコはO-157に対する感染抵抗性を獲得した一方で、黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカンによって免疫されたカイコはO-157に対する感染抵抗性を示さなかった(Fig. 4)。以上の結果から、カイコはペプチドグリカンの認識を介して、グラム陰性菌に対する感染抵抗性を獲得する能力を有していると判断した。

5. O-157熱処理菌体によるカイコ体液性免疫応答

私は次に、O-157熱処理菌体がカイコに対して免疫効果をもたらすメカニズムの

研究に着手した。私は、O-157熱処理菌体によってO-157に対する感染抵抗性を獲得したカイコの体内では、O-157生菌の排除が亢進していると考えた。この仮説について検討する目的で、O-157熱処理菌体で免疫したカイコ又は生理食塩水を投与したカイコに対してO-157の生菌を注射し、それらのカイコから経時的に体液を回収して体液中の生菌数を測定した。その結果、生理食塩水を投与したカイコの体内ではO-157が増殖していたのに対して、O-157熱処理菌体で免疫したカイコの体内ではO-157の生菌数が素早く減少した(Fig. 5A)。この結果は、O-157熱処理菌体によって免疫されたカイコの体内では、O-157生菌の排除が亢進しているということを示唆する。

私は、ここで見出したO-157生菌の排除効果をもたらすメカニズムとして、カイコの体液性免疫因子に着目した。カイコでは、大腸菌の菌体成分によって誘導される抗菌ペプチドが存在し、その抗菌ペプチドは大腸菌に対する抗菌活性を有する事が知られている(Yamakawa M. et al.)。私はO-157熱処理菌体または生理食塩水を前投与したカイコから体液を回収し、遠心によって細胞や組織片を除いた上清中のO-157抗菌活性を微小希釈法(microdilution method)によって定量的に測定した。その結果、O-157熱処理菌体の投与によって、カイコの体液中にO-157の増殖を阻害する物質が産生されていることが分かった(Fig. 5B)。一方、生理食塩水を投与したカイコの体液中にはそのような活性は見出されなかった(Fig. 5B)。本研究において私は、カイコの体液性因子がO-157熱処理菌体による免疫現象において重要な役割を果たしていると考えた。

次に私は、上で見られたカイコ体液中へのO-157抗菌活性誘導のタイムコースを検討した。その結果、O-157熱処理菌体の投与後4~6時間の時点でカイコ体液中にO-157抗菌活性が現れ、その後12時間の時点で活性の強さは極大に達し、それ以降は活性が減弱し、O-157熱処理菌体の投与後4~8時間以内に体液中のO-157抗菌活性は消失する事が分かった(Fig. 5B)。私は、ここで誘導された

抗菌活性の実体を知る目的で、この抗菌活性を指標にして抗菌活性物質の精製を試みた。陽イオン交換カラムであるCM-TOYOPEARLカラム (Tosoh)、およびゲル濾過FPLCカラムであるSuperose 12 カラム (GE Healthcare)を用いて精製を試みた(Fig. 6A-B)ところ、比活性が9230倍に上昇し、活性の回収率は1100%となる画分が得られた(Table 2)。この画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、4kDa付近の単一バンドが見られた(Fig. 6C)。この結果から私はO-157の熱処理菌体によって誘導される抗菌活性物質の精製が完了したと判断した。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを呈したバンドを切り出してPeptide mass fingerprinting 解析に供したところ、カイコに存在する抗菌ペプチドであるCecropin(4.3kDa)の理論断片と質量が一致する断片が検出された。また、上記の電気泳動におけるタンパク質のバンドは、抗cecropin抗体によって検出された。以上の結果から、O-157の熱処理菌体によって誘導される抗菌活性物質の主要な物質はCecropinであると考えられる。

6. カイコ適応免疫におけるprimed immune response

私は、カイコの体液性因子が持続的な感染抵抗性の獲得に寄与する分子であるならば、免疫によって体液性因子誘導の応答性が高まっているはずだと考えた。この仮説について検討するため、私は以下においてO-157の熱処理菌体を複数回注射する実験を行った。私はO-157熱処理菌体または生理食塩水を前投与してから48時間経過したカイコに対し、再度O-157の熱処理菌体を投与し、体液遠心上清中の抗菌活性を経時的に測定した。その結果、生理食塩水を前投与したカイコと比べて、O-157熱処理菌体を前投与したカイコにおける抗菌活性の誘導は著しく増強されることが見出された (Fig.7)。この結果は、カイコの体液性因子の誘導にあずかる免疫経路は菌体成分の侵入を記憶し、二度目には体液性免疫応答を増強させることを示している。

考察

本研究において私は、カイコ(*Bombyx mori*)の免疫系がグラム陰性菌の菌体成分であるペプチドグリカンに応答し、カイコ殺傷性の細菌である腸管出血性大腸菌O-157感染に対する持続的な感染抵抗性を獲得する事を明らかにした。これまでにKurtz et al.は、copepodを用いて特異的な外来微生物認識が無脊椎動物に存在する事を提唱している(Kurtz et al., 2003)。また、導入で述べたようにPhamらは*Drosophila*で(Pham et al., 2007)、Saddらは*Bombus terrestris*で(Sadd et al., 2006)で特異的な病原体認識が昆虫に存在することを示している。私は本研究においてカイコ感染症モデルを用い、昆虫における感染抵抗性の獲得をLD₅₀によって定量的に評価した。その結果カイコでは、上記の報告と比較して、LD₅₀値が数千倍に上昇する明瞭な感染抵抗性獲得のメカニズムが存在することが明らかになった。なぜカイコにおいてたのモデル動物に比べて明瞭な効果が観察されたかの説明としては、カイコが無菌的に飼育されていることが理由としてあげられるかもしれない。すなわち、常に無菌環境で飼育されているカイコは、菌体の侵入にたいしてより鋭敏に反応するという説明が考えられるが、この点については今後の研究課題として残されている。

また、私はカイコにおける免疫の効果が極めて長期間にわたり持続する事を見出した。特に、幼虫から変態をまたいで蛹へと変態した後もO-157に対する感染抵抗性は高く維持されていた。通常、蛹化に伴って殆どの幼虫組織は分解、消化されることが知られているが、私の結果は、免疫記憶を担うコンパートメントが蛹化時に分解されずに保持されている事を示している。そのような組織・細胞群の同定が今後重要な課題である。

さらに、私が見出したカイコに対する免疫効果は、少なくともグラム陰性細菌とグラム陽性細菌を区別する選択性を示した。すなわち、O-157の熱処理菌体による免疫では黄色ブドウ球菌の生菌による感染死を免れることはできな

い。昆虫はグラム陰性菌またはグラム陽性菌の菌体成分を特異的に識別する受容体を有する事が知られており、ショウジョウバエではそれぞれ*imd*または*toll*という遺伝子にコードされている。私は同様のメカニズムがカイコにも存在し、O-157の菌体成分を認識していると考えている。

私はO-157の熱処理菌体によるカイコに対する免疫効果を説明する分子としてペプチドグリカンと同定した。ペプチドグリカンは主にグラム陰性細菌に存在するタイプ（DAP型）と主にグラム陽性細菌に存在する（Lys型）で化学構造が異なることから、この化学構造の違いによってカイコの応答性の違いがもたらされていると考えることができる。

さらに私は、カイコの液性免疫経路がO-157の菌体成分に暴露された事を記憶し、菌体成分への応答性を高めることを見出した。私はこれをカイコの体液性免疫応答におけるprimed immune responseと名付けた。この効果は動物の感染防御において合理的な性質であると考えられる。Haineらも昆虫の抗菌ペプチドは初回感染ではなく、二度目以降の感染に備えるための機構であると推察しており(Haine et al., 2008)、私の仮説を支持している。カイコでは大腸菌の細胞壁成分によって産生誘導される抗菌ペプチドのmoricin (Hara et al. 1995; Furukawa et al., 1999)またはcecropin (Morishima et al., 1995)が知られている。今回、カイコの体液中に存在する抗菌ペプチドとしてcecropinが同定されたが、cecropinは大腸菌にたいして抗菌活性を示す一方で黄色ブドウ球菌には抗菌活性を示さず (data not shown)、グラム陰性細菌に対する防御応答を担う免疫因子であるとかんがえられる。また、カイコにおいて大腸菌の菌体成分に応答する免疫経路は体液性経路に加えて、細胞性経路が知られている。細胞性免疫の経路が本研究におけるカイコの免疫現象に寄与するか否かは、現段階では不明のままであり、今後の検討が待たれる。

図表

Immunized with	LD ₅₀ values [CFU/larva]		
	Time After Immunizations		
	6 hrs	24 hrs	56 hrs
O-157 Heated Cells	$5.3 \cdot 10^8$	$3.2 \cdot 10^8$	$6.3 \cdot 10^7$
Saline	$6.7 \cdot 10^5$	$5.6 \cdot 10^5$	$5.0 \cdot 10^5$

Table 1. O-157熱処理菌体による免疫効果の定量的評価

O-157 熱処理菌体を注射したカイコのO-157 感染抵抗性をLD₅₀ 値によって定量的に評価した。 O-157 の熱処理菌体 (approx. 10^6 cells) または生理食塩水を予め注射したカイコに対してO-157 の生菌を感染させた。表中の値は、免熱処理菌体を注射してから6, 24, 56 時間後にO-157 感染実験を行い、その生存曲線から推定したLD₅₀値。

Fractions	Protein [mg]	Activity [Units]	Specific Activity [Units/mg]	Fold [times]	Yield [%]
Hemolymph Plasma	450	10800	24		
Cation Exchange	13.4	280000	21000	870	2600
Gel Filtration	0.58	128000	221000	9230	1100

**Table 2. O-157の熱処理菌体によってカイコ体液遠心上清中に誘導されるO-157
抗菌活性物質のPurification Table**

最終精製画分の比活性はおよそ9000 倍に上昇していた。最終精製画分のO-157 に対する最小阻止濃度(MIC) は0.47 μ g/mL だった。

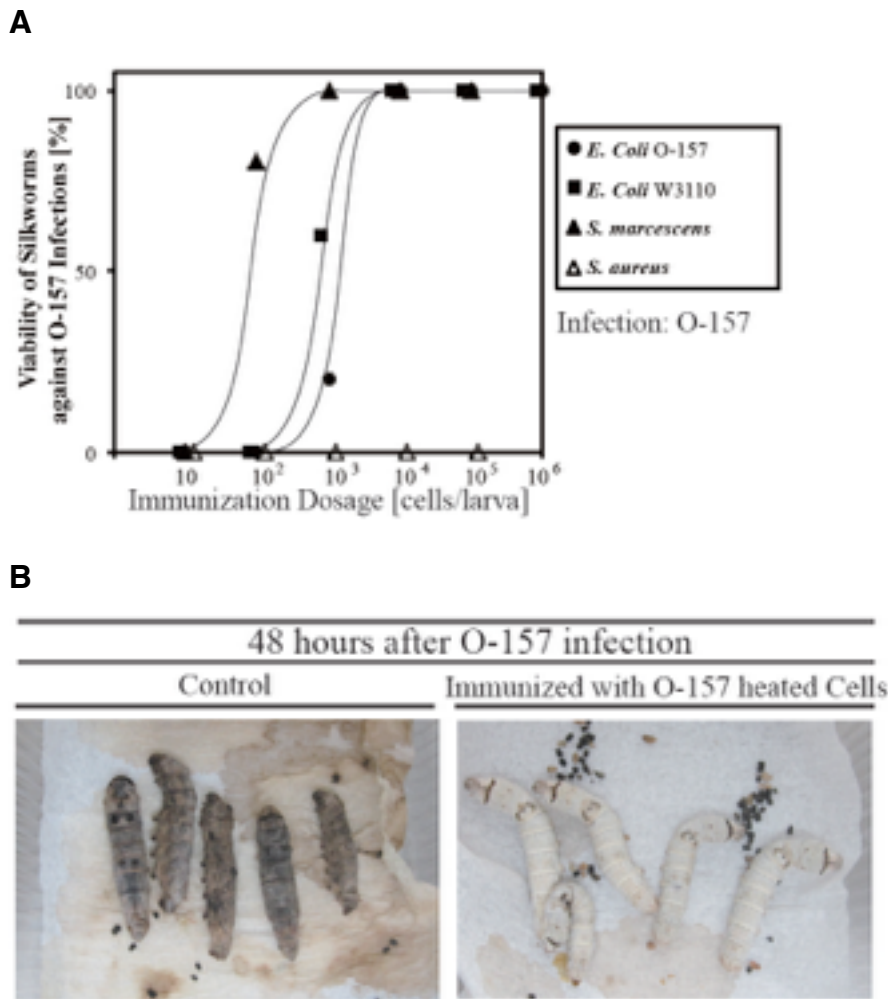


Fig. 1 カイコにおける適応免疫

- A. O-157 感染に対する熱処理菌体の免疫効果を、用量作用曲線で示した。腸管出血性大腸菌O-157(●)、大腸菌実験室株3110(■)、セラチア菌(▲) または黄色ブドウ球菌(△) の熱処理菌体を注射したカイコに対し、O-157 の生菌を血液内感染させた。縦軸はO-157 感染後のカイコ生存率を表す。横軸は免疫に用いた菌体懸濁液の濃度を表し、各菌体懸濁液を25 μ L/larva の用量で注射した。
- B. O-157 の血液内感染によるカイコの感染死は、O-157 の熱処理菌体を予め投与しておくことにより回避される。写真左は生理食塩水を注射後にO-157 を感染させたカイコ。O-157 の血液内感染によって、メラニン化による黒変を伴うカイコの感染死が観察される。写真右はO-157 の熱処理菌体を注射後にO-157 を感染させたカイコ。カイコはO-157 の血液内感染に対して抵抗性を獲得し、O-157 の生菌を感染させてから48 時間以上経過しても全てのカイコが生存していた。

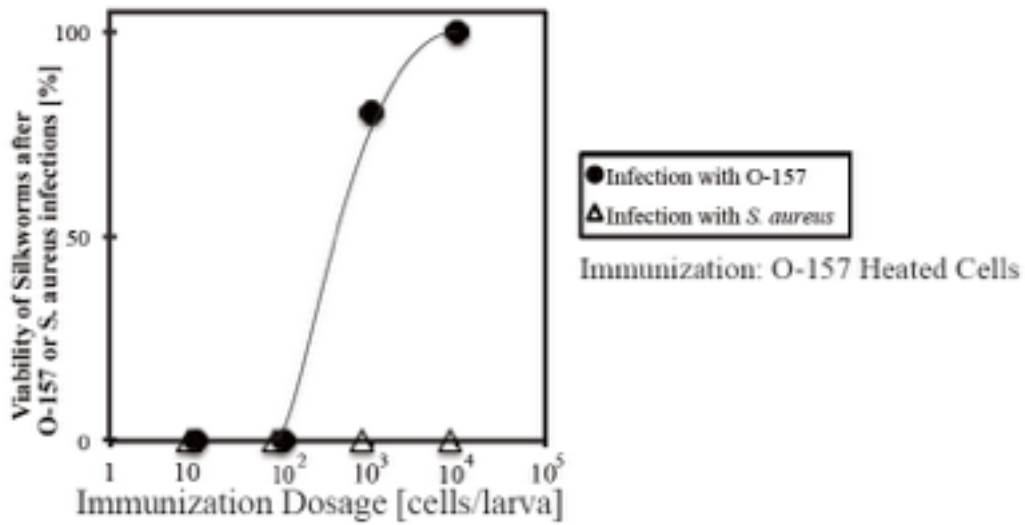
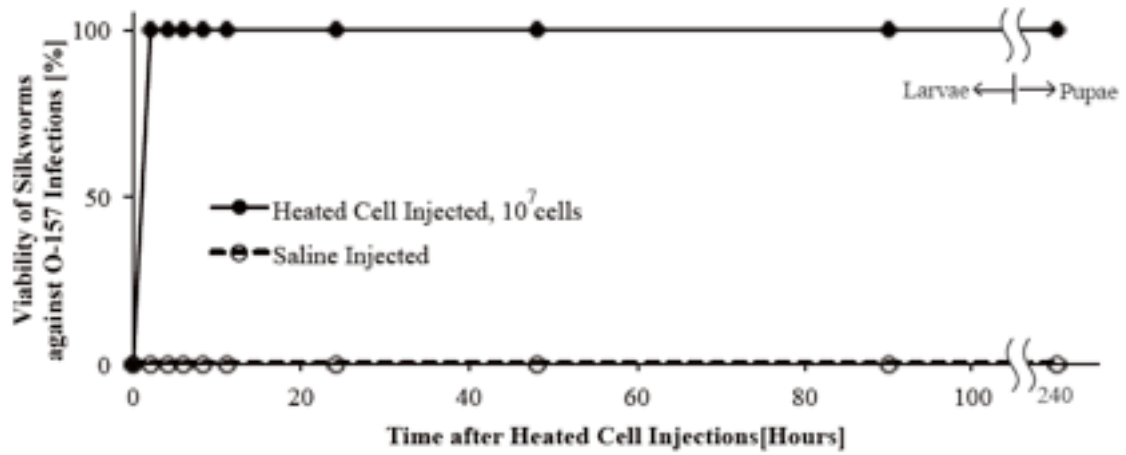


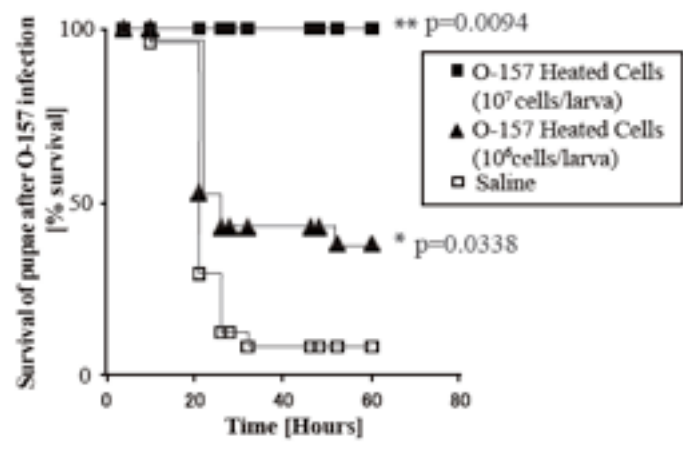
Fig. 2 カイコにおける適応免疫の特異性

黄色ブドウ球菌感染に対するO-157 熱処理菌体の効果。O-157 熱処理菌体で免疫したカイコに対して、O-157(●)または黄色ブドウ球菌(△)の生菌を感染させた。縦軸は感染後のカイコ生存率を表す。横軸は免疫に用いた死菌の希釈率を表す。O-157 感染に対する免疫効果が見られる一方で、黄色ブドウ球菌感染に対しては免疫効果が見られない。

A



B



C

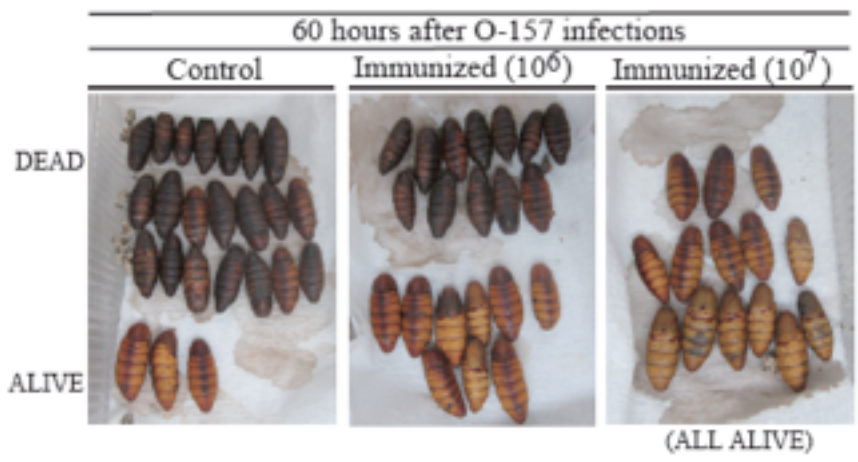


Fig. 3 カイコ適応免疫の持続性

A. O-157 熱処理菌体による持続的な免疫効果。縦軸はO-157 感染実験におけるカイコ生存率を表す。横軸は熱処理菌体を注射してからの経過時間を表す。240 hours の点はカイコが蛹に変態した後の感染実験における生存率であり、O-157 の熱処理菌体による免疫効果は蛹まで持続することを示している。

B. 蛹感染実験における生存曲線。幼虫期にO-157 の熱処理菌体または生理食塩水を注射したカイコの蛹に対して、O-157 の生菌を感染させた。縦軸はO-157 の生菌を感染させたカイコ蛹の生存率を表す。横軸は蛹にO-157 を感染させてからの経過時間を表す。いずれの免疫用量においても、生理食塩水を前投与した群に対してO-157 感染後の生存時間が延長していた。統計学的検定にはlog-rank 検定を用いた。

C. O-157 によるカイコ蛹の感染死と、O-157 熱処理菌体による免疫効果。カイコ蛹も、幼虫と同様にO-157 の生菌によって感染死する。蛹は感染死に伴い、メラニン化による黒変が観察される。幼虫期にO-157 熱処理菌体を投与すると、O-157 による蛹の感染死が抑圧される。

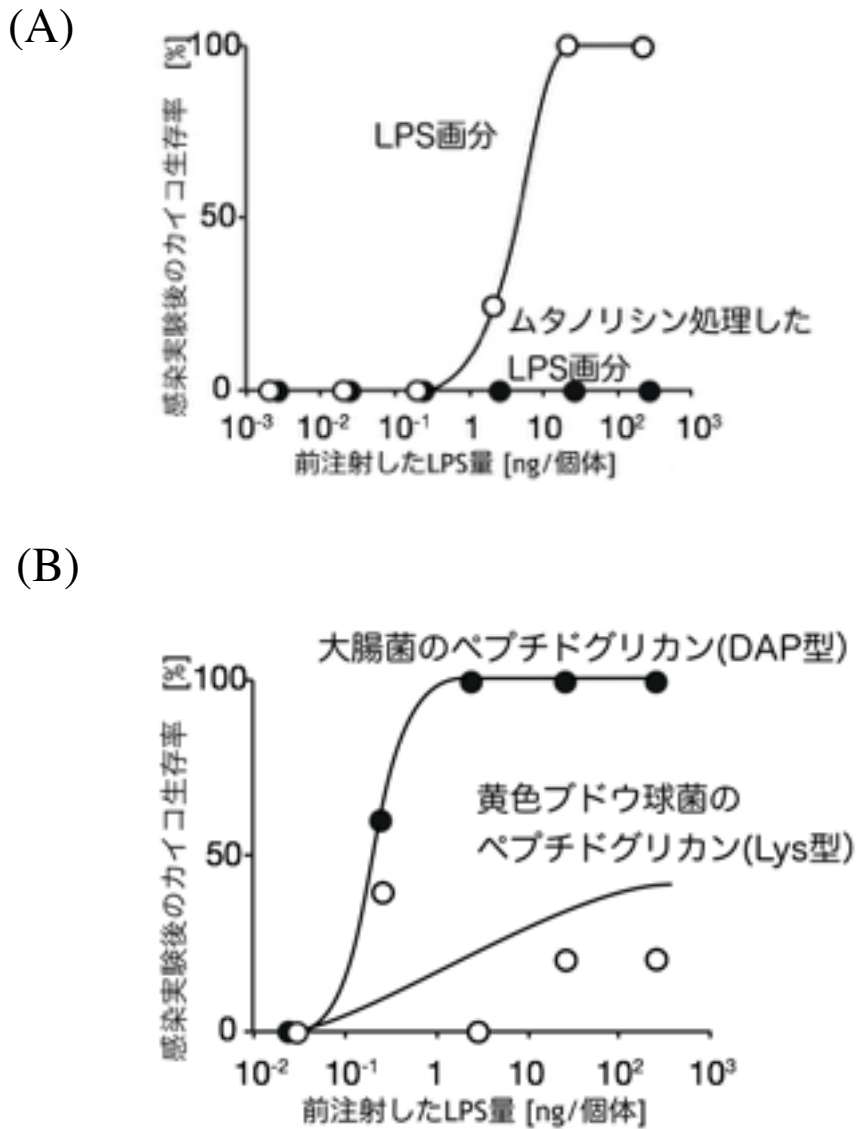
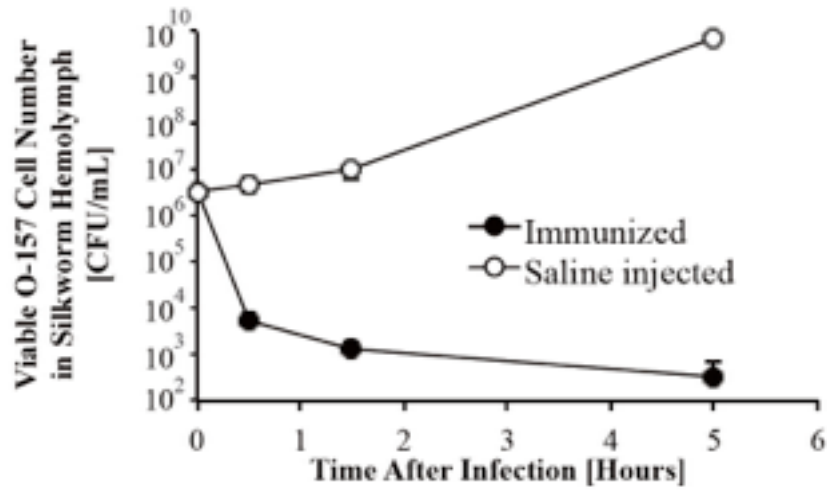


Fig. 4 リポ多糖(LPS)による免疫効果

(A)カイコにO-157由来LPSまたはムタノライシン処理をしたO-157由来LPS画分を注射してから8時間後にO-157生菌による感染実験をした際の生存率を示す。横軸はあらかじめ注射したLPSサンプルの用量を示す。(B) 大腸菌または黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカンをカイコにあらかじめ注射し、その後O-157による感染実験を行った。縦軸は感染実験におけるカイコの生存率、横軸は免疫に用いたペプチドグリカンの用量を対数スケールで示した。

A



B

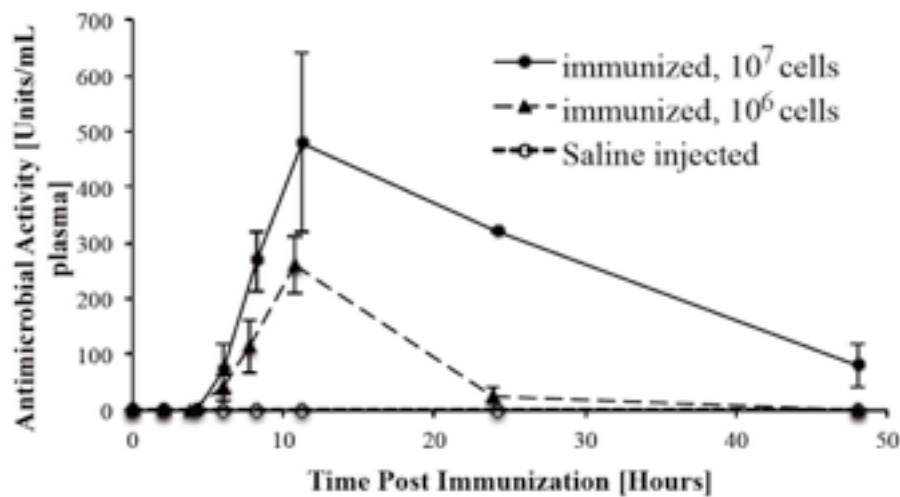


Fig. 5 カイコにおけるO-157熱処理菌体に対する免疫応答

A. カイコ体内におけるO-157の殺菌効果(in vivo)。O-157の熱処理菌体(●)または生理食塩水(○)を予め注射したカイコに対してO-157の生菌を注射し、その後経時的に体液を回収して生菌数を測定した。縦軸はカイコ体液中の生菌数を表す。横軸はO-157生菌注射からの経過時間を表す。

B. O-157 熱処理菌体によるカイコ体液中への抗菌活性の誘導。縦軸は体液中の抗菌活性を表す(体液100 μ L のスケールにおいて、O-157 に対する抗菌活性の力価 $1/n$ を $n[\text{units}]$ と定義した)。横軸は免疫後の経過時間を表す。

Figure 6

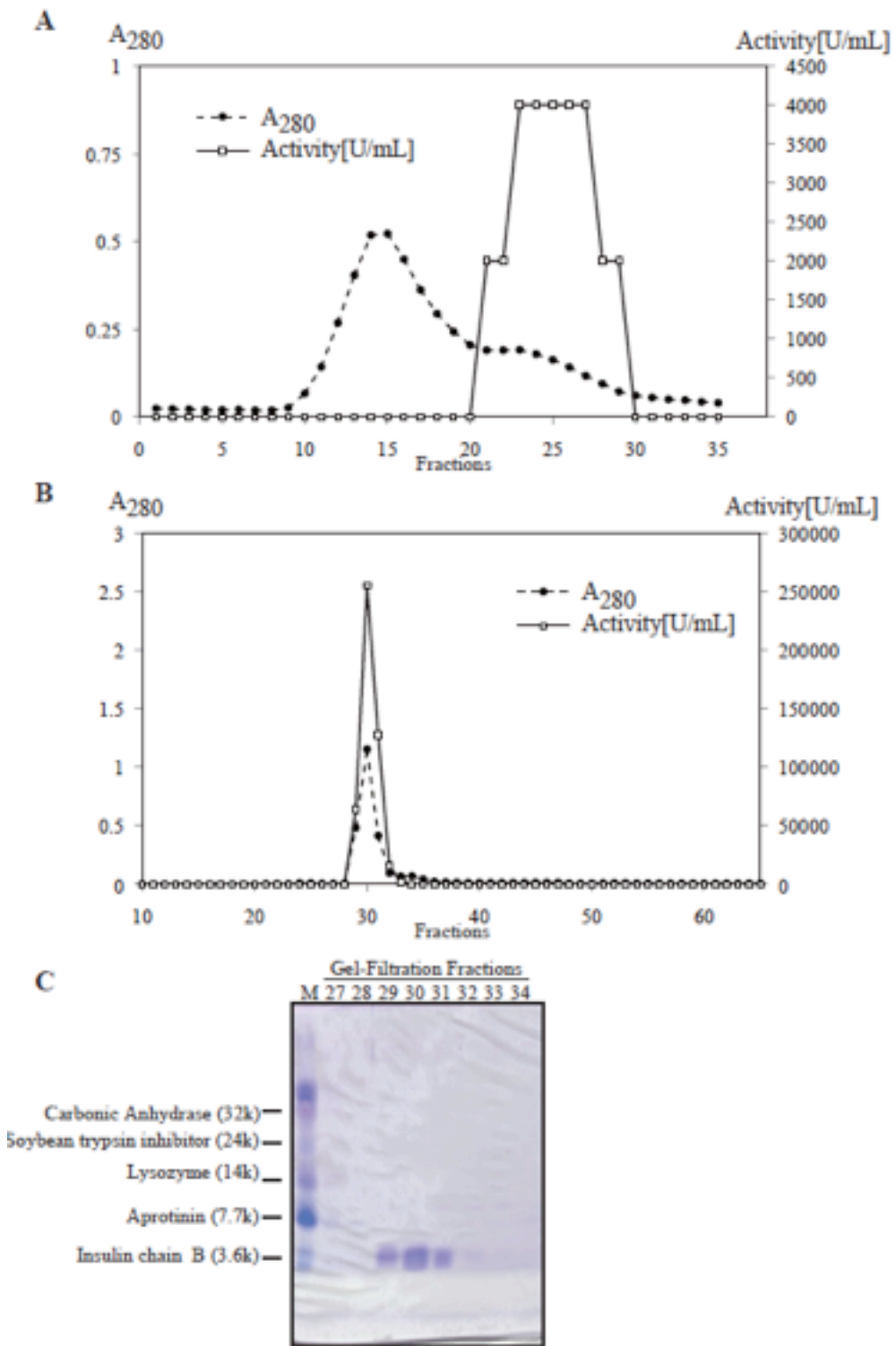


Fig. 6 O-157熱処理菌体によって誘導される抗菌活性物質の精製

- A. Carboxymethyl(CM, cation exchange) column chromatography による抗菌活性物質の精製。カイコ体液サンプルをCM カラムに中性pH で吸着させ、高塩濃度で溶出させた。図中21-29 番の画分を活性画分とし、凍結乾燥して次の精製段階に供した。
- B. Gel Filtration による抗菌活性物質の精製。CM column chromatography における活性画分を凍結乾燥し再溶解したサンプルをGel Filtration FPLC 用カラムで分画した。図中30 番の画分を最終精製画分とした。
- C. Gel Filtraion 画分の電気泳動像。15% SDS polyacrylamide gel electrophoresis を行い、電気泳動後のゲルをcoomasie brilliant blue で染色した。活性画分は4kDa 付近に単一のバンドを示し、このバンドの挙動は活性の挙動と一致していた。

Figure 7

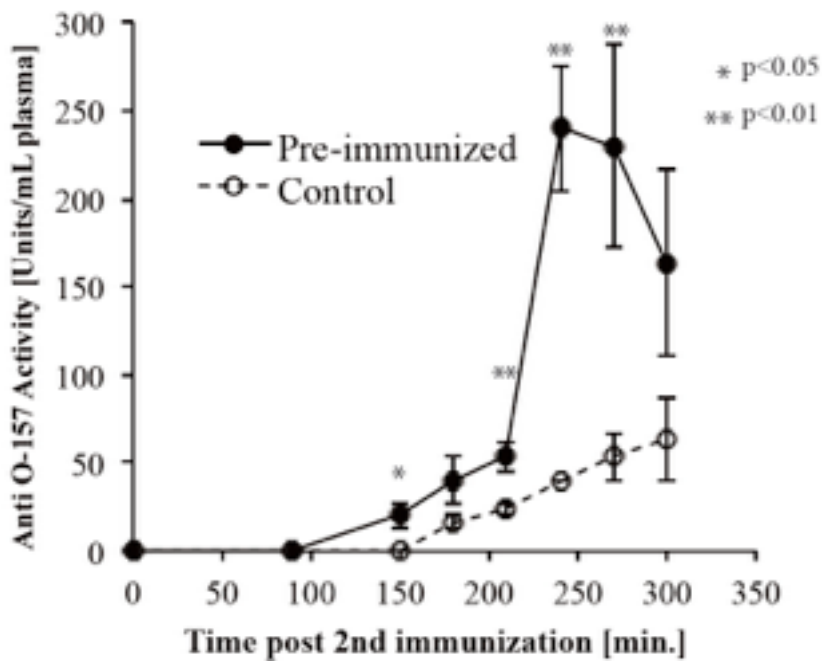


Fig. 7 カイコ適応免疫におけるprimed immune response

カイコにO-157 熱処理菌体(●) または生理食塩水(○) を注射してから50 時間後に、再びそれらのカイコにO-157 の熱処理菌体を注射した。縦軸はカイコ体液中のO-157 に対する抗菌活性を表す。横軸は2 回目にO-157 の熱処理菌体を注射してから経過時間を表す。図中の20unit/mL という活性の強さは、サンプルを2 倍に希釈してもO-157 の増殖を抑制する活性を有することを示す。

文献

- Furukawa, S., Tanaka, H., Nakazawa, H., Ishibashi, J., Shono, T., & Yamakawa, M. (1999). Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm (*Bombyx mori*). *Biochem J*, 340 (Pt 1), 265-271.
- Haine, E. R., Moret, Y., Siva-Jothy, M. T., & Rolff, J. (2008). Antimicrobial defense and persistent infection in insects. *Science*, 322(5905), 1257-1259. doi: 10.1126/science.1165265
- Hara, S., & Yamakawa, M. (1995). Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, 270(50), 29923-29927.
- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Kaito, C., Kurokawa, K., Matsumoto, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Hamada, S., & Sekimizu, K. (2005). Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Mol Microbiol*, 56(4), 934-944. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04596.x
- Kurtz, J., & Franz, K. (2003). Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425(6953), 37-38. doi: 10.1038/425037a
- Miyashita, A., Iyoda, S., Ishii, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., & Kaito, C. (2012). Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol Lett*, 333(1), 59-68. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02599.x
- Morishima, I., Horiba, T., Iketani, M., Nishioka, E., & Yamano, Y. (1995). Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol*, 19(5), 357-363.
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog*, 3(3), e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0030026
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol*, 16(12), 1206-1210. doi: 10.1016/j.cub.2006.04.047

小括

本研究により、O-157熱処理菌体の前投与はカイコのO-157感染に対する抵抗性を著しく上昇させることが明らかになった。さらに、O-157熱処理菌体の免疫効果はO-157の細胞壁構成成分であるLPSによって説明されることが明らかとなった。以上の結果は、カイコにおいてグラム陰性細菌細胞表層のLPSに応答する適応免疫機構が存在することを示唆している。

また本研究において私は、カイコの適応免疫が特異性と持続性を有すること、ならびに免疫原の再曝露時に反応を早めるブースト効果を持つ事を見出した。これらの適応免疫の特徴は脊椎動物ににおいてB細胞およびT細胞によって担われる適応免疫と共通している。現在のところ適応免疫機能を担う無脊椎動物の細胞が何であるのかは不明であり、カイコにおける適応免疫を担う機構の解明が今後の重要な課題である。

ここで見出した免疫の活性化（感染抵抗性の獲得）が、自然環境下において生存に有利に働くかどうかは、実際の自然環境下やそれを模擬した実験室環境での検討が必要である。特に、免疫の活性化は多くのエネルギーを要する事から、他の重要な生物機能を阻害することが想定される。実際、上記のカイコ免疫実験においては、免疫されたカイコにおける摂食量の低下や成長抑制が観察される(data not shown)。この観点からは、免疫の活性化が他の生物機能（行動やストレス応答など）を抑制する可能性に着目し、免疫系と他の生物機能のバランスを調節しているシステムの解明が重要である。そこで私は次章に述べるように、コオロギをモデル動物として、特に求愛行動について、行動を観察・記録・解析する実験系を構築することを目標にして研究を進めることにした。

第三章 フタホシコオロギの鳴き声における周波数と体サイズの関係

導入

音声による情報伝達は、動物のコミュニケーションにおいて重要な手段のひとつである。音声による個体間コミュニケーションは、ヒト、ネズミ、コウモリ、イルカ、トリといった脊椎動物から、セミ・キリギリス・コオロギ・ハエ・カといった無脊椎動物まで、広く知られている。音（空気の振動）を感知するための聴覚器官は、脊椎動物では鼓膜と蝸牛管およびそれに繋がる神経系によって成り立っている(Katsuki, 1965)。無脊椎動物の聴覚器官は、脊椎動物のそれと進化的には起源を異にするが、機能的には驚くほど類似している(Katsuki, 1965)。すなわち脊椎動物ならびに無脊椎動物はいずれも、聴覚器官を用いて空気の振動を感じ取り、それを中枢神経系へと伝達する複雑なシステムを有している。

脊椎動物の聴覚系において、蝸牛管は個体が発する声に含まれる様々な高さ（空気の振動の周波数に対応する）の音を弁別する(Robles and Ruggero, 2001)。一方で、無脊椎動物の聴覚系が音の高低を聞き分けることができるか否かは長年議論されてきたが、そのエビデンスは乏しかった。近年キリギリス(Rainforest katidids)の聴覚器官が音の高低を聞き分ける能力を持っていることが示された(Montealegre et al., 2012)。このことは、無脊椎動物の声においても、脊椎動物の声と同様に、音の高さが生物学的な意味を持ちうることを示している。

動物の声の高さが持つ生物学的な意味については諸説ある。ヒトを含む霊長類では声の高さに性的二型が存在し、声の高さ自体が性別の情報を持っていると考えられる(Rendall et al., 2005)。鳥やほ乳類は、空気の振動を気道に反響させて声を発する。マカクザル(Fitch, 1997)やヒヒ(Pfefferle and Fischer, 2006)で

は、声の高さが体サイズと相関するという知見が得られている。これらは、声の高さを規定する声道のサイズが、体サイズと相関しているためであると考えられている(Fitch, 1997)。ヒトでも、その相関は弱いながらも、体サイズと声の高さの相関が見出されている(Rendall et al., 2005)。一方でSongbird (fairy-wren, *Malurus coronatus coronatus*)においては、音域の下限は体サイズとの関連が示唆されているものの、鳴き声の平均の高さは体サイズと相関しないことが見出されている(Hall et al., 2013)。また二種のスズメ(*Junco hyemalis* and *Serinus serinus*)においても同様に、体サイズと鳴き声の高さに相関は見出されていない(Cardoso et al., 2008)。従って、霊長類では声の高さが体サイズに関する情報を伝達し得るものの、鳥類およびそれより下等な動物においてもそのセオリーが当てはまるかどうかはcontroversialなままである。

さらに、無脊椎動物において声の高さが個体の体サイズを伝達し得るかはよく解っていない。無脊椎動物の発声は脊椎動物のそれとは異なるメカニズムで行われる。無脊椎動物である昆虫の中でもコオロギは、翅をこすりあわせることによって得られる振動を空気に伝えて音を発している(Bennet-Clark, 1998)。昆虫の翅の構造は種ごとに異なり、発せられる鳴き声には種ごとに特徴的な周波数成分が含まれることが知られている(Bennet-Clark, 1998)。昆虫の鳴き声の高さが(脊椎動物で観察されたように)体サイズを反映して変化するか否かについて、*Acheta domesticus* のBody massとcalling song (Gray, 1997), *Gryllus firmus* のfemur length とcalling song(Webb and Roff, 1992) , *Gryllus campestris* のpronotum sizeとcalling song(Simmons, 1995), および*Gryllus bimaculatus*のpronotum size とcalling song(Ferreira and Ferguson, 2002)との相関が検討されたが、いずれも否定的な結果であった。私は今回、*Gryllus bimaculatus*が発する鳴き声について、体サイズと鳴き声の高さとの相関について更なる検討を行った。*Gryllus bimaculatus*の鳴き声（オスが発する）には、遠くに位置するメスを誘引する

calling songに加えて、至近距離に接近したメスの交尾を誘うcourtship songがある。Courtship songは15~20kHzを超える高音成分を含み、録音には高いサンプリングレート(>40kHz)を必要とする。私はcalling songに加えて、これまで体サイズとの相関について検討例の無いcourtship songについても、鳴き声の高さが体サイズを反映して変化するか否かについて検討した。

材料と方法

コオロギ

実験に用いたフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) は月夜野ファーム (Gumma, Japan)から購入した。飼育はプラスチックケージを用いて27°Cでこない、コオロギフード(Tsukiyono Farm, Gumma, Japan)を与えた、水はペーパータオルに水道水をしみ込ませて与えた。

録音・解析機器

録音にはタブレットPC端末(NEXUS 7, ASUSTEC)を用い、解析には統計解析言語であるR(ver. 2.15.3)を用いた。解析に用いた計算機はMacbook pro (2.5 GHz Intel Core i5, 8GB memory, OS X ver. 10.9)である。解析においては、Rに組み込みのパッケージの他、音声解析の目的で”seewave”パッケージ(Sueur et al., 2008)を用いた。

録音および体重測定

フタホシコオロギのメス5頭およびオス1頭 (いずれも羽化後7-14days経過した個体) をひとつのケージ (oo cm x oo cm, height= oo cm) に入れ、オスが発した鳴き声を録音(48,000kHz, 16 bit, wav file)した。録音した音声から、各個体について3秒間のcalling songおよびcourtship songを切り取った。音声ファイルの編集にはaudacity (free software)を用いた。また、録音の直前に、電子天秤(Mettler Toledo AB54-S)を用いてコオロギ各個体の体重を測定した。

主要周波数の分布

Calling songおよびcourtship songそれぞれ2 secの録音データを10 msecごとに分割し、10 msecにおける主要周波数(dominant frequency, 最も強度の高い周波数)を求めた。Dominant frequency の算出にはR package “Seewave”のdfreq関数を用いた(amplitude threshold = 10%)。56個体(calling)または58個体(courtship)の結果を全

てプールし、主要周波数の分布をヒストグラムで描いた。ヒストグラムの作成にはRに組み込まれたhist関数を用いた。得られたdominant frequency のデータから、Rのdensity関数を用いて密度分布曲線を求め、ヒストグラムに重ねて描いた。

各帯域のmean dominant frequencyと体サイズとの相関

2 secのcalling song およびcourtship songの各帯域におけるdominant frequency (最も強度の高い周波数)を、10 msec ごとにR package “Seewave”のdfreq関数を用いて計算した(amplitude threshold = 10%)。このとき、bandpass filterの上限と下限 (callingについては4~9kHz、courtshipについては0.5~4, 4~10, 12~18, または18~24kHz) を設定することにより、各帯域のdominant frequencyを求めた。2secのデータから求められた各帯域のdominant frequency (200 calculations for 10-msec intervals)の平均値を、各帯域のmean dominant frequencyとした。各個体 (n=56 for calling, n=58 for courtship) の主要周波数と体重との関係をプロットした。

結果

Calling song と体サイズの相関

56個体のコオロギが発したcalling song（鳴き声の波形とスペクトログラムの代表例は図1に示す）（2sec/個体）の主要周波数を集積したところ、5.7kHzにピークを持つ分布を示した(図2)。さらに、そのピーク付近の音の高が個体の体サイズによって変動するかを知る目的で、各個体の2秒間のcalling songにおける平均主要周波数を算出し、体重との関係をプロットした(図3)。その結果、コオロギ各個体の体重と、callings songの5.7Hz近傍(4-9 kHz)帯域の平均主要周波数との間には相関が見出されず($p=0.572$, $n=50$)、各個体の平均主要周波数は体重によらず一定の値を示していた（図3）。以上の結果は、フタホシコオロギのcalling songの高さは体サイズによる影響を受けないことを示唆している。

Courtship song と体サイズの相関

58個体のコオロギが発したcourtship song（鳴き声の波形とスペクトログラムの代表例は図4に示す）（2 sec/個体）の主要周波数を集積したところ、5.7, 14.3 kHzにピークを持つ分布を示した（図5）。さらに、それら2つのピーク付近の帯域において、音の高さが各個体の体サイズによって変動するかを知る目的で、各個体の2秒間のcourtship songにおける平均主要周波数を2つの帯域について算出し、体重との関係をプロットした(図6)。その結果、コオロギ各個体の体重と、courtship songの4つの帯域における平均主要周波数との間には相関が見出されず($p=0.241$ and 0.0422 respectively; $n=53$, 有意水準はBonferroniによる補正を適用)、各個体の平均主要周波数は体重によらず一定の値を示していた（図6）。以上の結果は、フタホシコオロギのcourtship songの高さは体サイズによる影響を受けないことを示唆している。

体サイズと翅のミラー部のサイズとの相関

鳴き声の高さが体サイズによる影響を受けない理由として考えられるものひとつは、発声器官の大きさが体サイズとの比例関係に無いという可能性である。私はこの可能性について検討するために、コオロギの翅のミラー部に着目した。翅のハープおよびミラー部は、翅の振動と強く共振して空気の振動すなわち音を産み出すと考えられている{Webb, 1992 #81}。体サイズと、コオロギの鳴き声を産み出す翅のハープおよびミラー部のサイズの間には正の相関関係（ハープ部： $p=2.27E-06(n=29)$ 、ミラー部： $p = 7.81E-04, (n = 28)$ ）が見出された（図7）。この結果は、フタホシコオロギの翅のハープおよびミラー部の大きさは体サイズに比例することを示唆している。

考察

体サイズの変化に対するコオロギの鳴き声の高さの頑健性

本研究において、コオロギの二つの鳴き声（calling songとcourtship song）の高さは、体サイズによる影響を受けず一定に保たれていることが明らかとなった。フタホシコオロギの近縁種である*Gryllus pennsylvanicus*を用いた最近の検討でも我々の結果と同様に、*G. pennsylvanicus*のcalling songの高さ(carrier frequency)に対する体サイズの効果は有意($p=0.004$)であるが極めて小さく（coefficient=-0.004, すなわち 1000 mgの体重変化にたいして 4 Hz (0.004 kHz) の差異をもたらす効果）、courtship songにおいては体サイズによる有意な効果は見出されていない(Harrison et al., 2013)。また、本研究は鳴き声の音源となっているハープおよびミラー部のサイズが体サイズと相関していることを見出し、ハープおよびミラー部のサイズが変化しても、*G. bimaculatus*のcalling songおよびcourtship songの高さは一定に保たれることを示した。

鳴き声の高さに対する体サイズ効果について、哺乳動物との比較

コオロギや鳥類とは対照的に、ヒヒやマカクでは声道のサイズが体サイズと比例することによって、声の高さが体サイズと相関すると考えられている(Fitch, 1997; Pfefferle and Fischer, 2006)。その場合、声帯の振動によって産み出された空気の振動は声道で共鳴し、共鳴によって増幅された空気の振動が最終的な声となって発せられることになる。一方コオロギにおいても同様に、翅の振動によって空気の振動が産み出された後、どこかしらでの共鳴を経て最終的な鳴き声が生成されると考えられる。おそらくその過程で、calling songおよびcourtship songの高さを一定に保つような機構が働いていると推察される。コオロギの鳴き声の高さがいかなる物理的メカニズムによって規定されるかは今後の検討課題である。

コオロギの声の高さが一定に保たれることの生物学的意味

コオロギのメスの耳はオスの鳴き声に最も強く含まれる音に対して最も効率よく応答するようにできている(Katsuki and Suga, 1960)。メスの求愛行動はスピーカーから再生したcourtship songによって誘導できるが、再生する音の周波数を変えるとメスの求愛行動が誘導されなくなることが知られている(Libersat et al., 1994)。したがってコオロギの鳴き声の高さが一定に保たれていることは、聞き手であるメスを効率よく引き寄せせる上で有効であると推定される。この場合、集団の平均から外れた音を発するオス個体はメスとの求愛において不利であることが予想される。これらの点について今後の検討が必要である。いくつかの研究においてオスの体サイズがメスの好みに関与することが知られている(Bateman et al., 2001; Simmons, 1986; Simmons, 1995)。一方で今回の結果(コオロギの鳴き声の高さはcourtship song においても体サイズにより変わらないことを示した)は、体サイズの情報は鳴き声の各成分の高さ以外のパターンとしてコードされていることを示唆している。コオロギのメスの好みに関わる情報が、オスの鳴き声における高さ以外のパターンにコードされているか、あるいはフェロモンや視覚情報などの鳴き声以外のコミュニケーション手段により伝達されるか、今後の検討が必要である。

図表

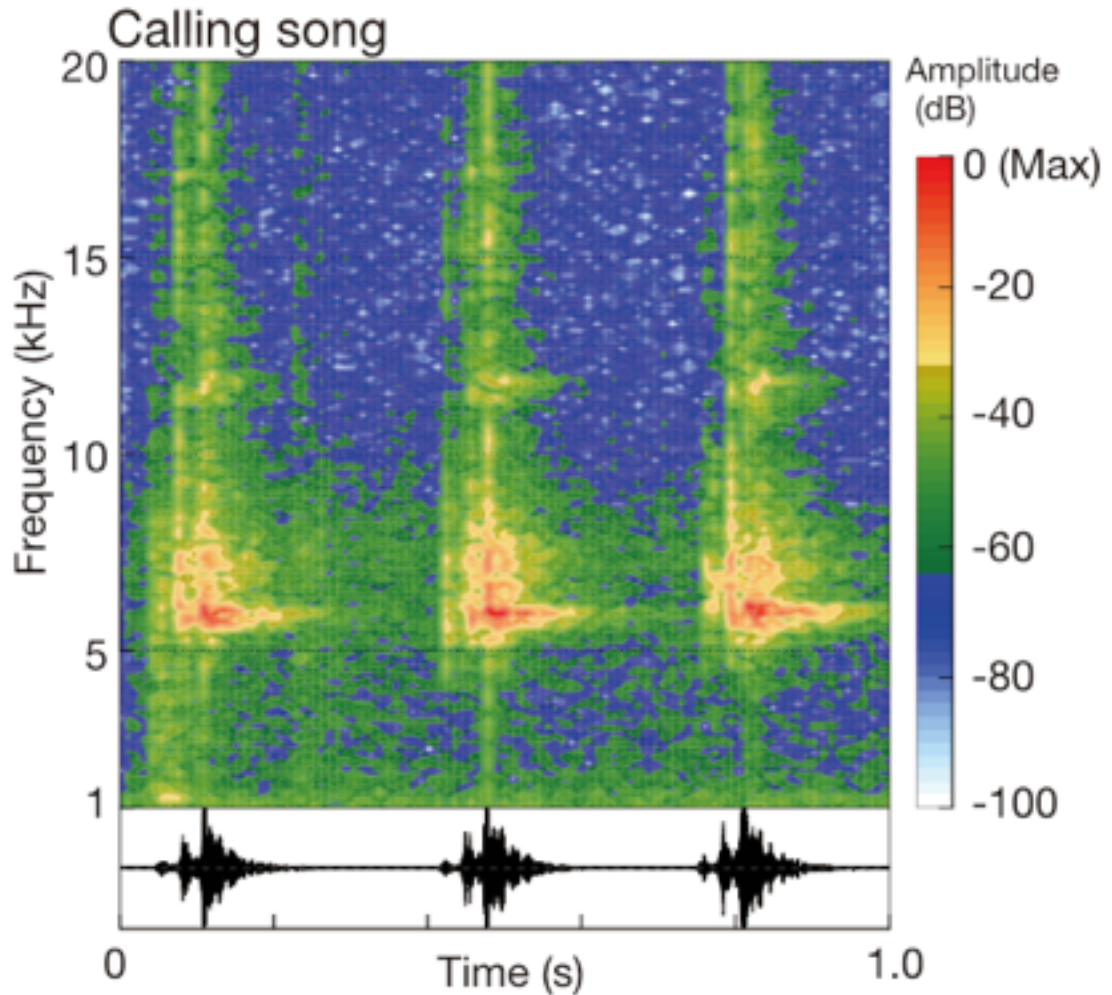


図 1

フタホシコオロギのCalling Songのスペクトログラム。横軸は時刻、縦軸は周波数を示す。色は右に示したスケールでの強度を表している。図の下部には録音された鳴き声の波形（オシログラム）を示している。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

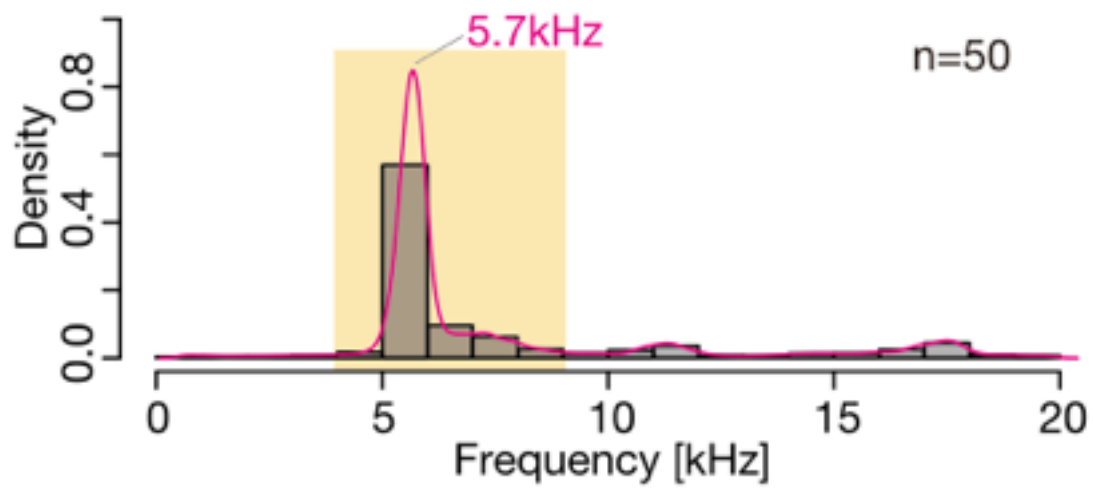


図2

複数のフタホシコオロギ個体から得られたスペクトログラム (Calling song)から求めた、鳴き声の周波数分布 (n= 50)。Calling songの周波数分布は、5.7kHzにピーク周波数を示す。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

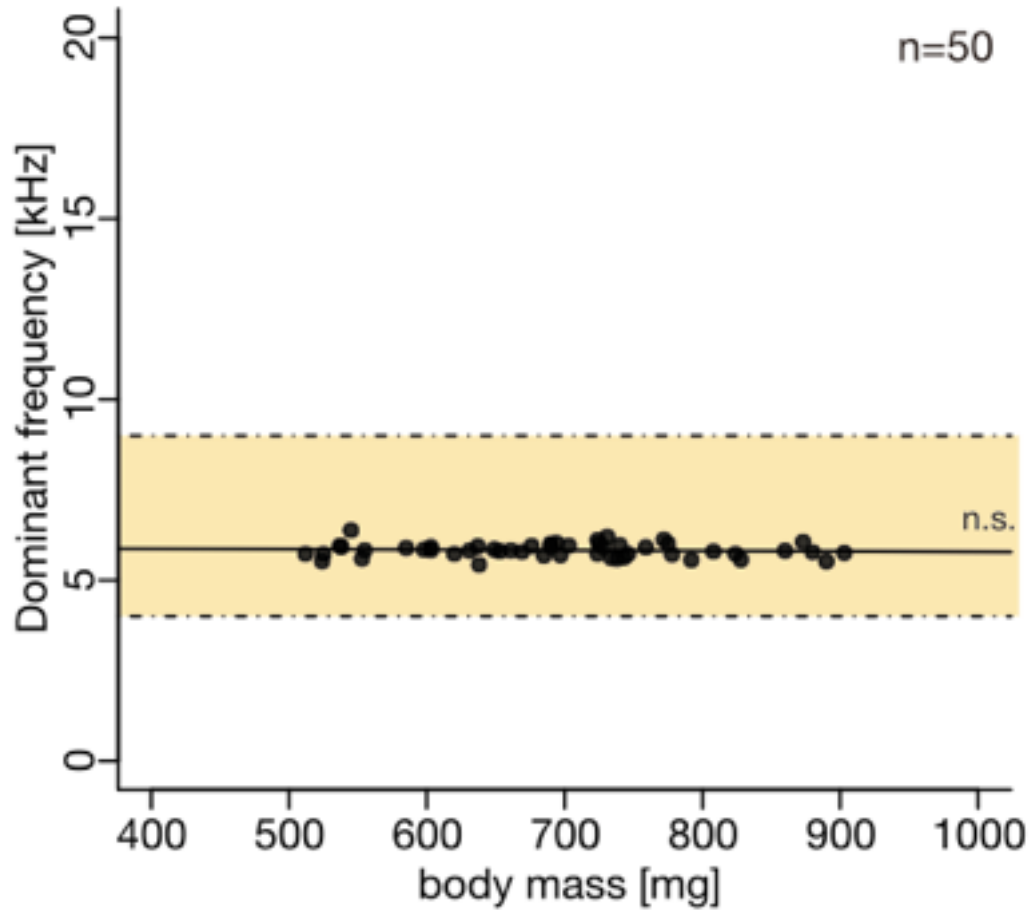


図3

フタホシコオロギの各個体から録音されたcalling songのピーク周波数(kHz)と体サイズ(質量,単位はmg)との関係。縦軸にピーク周波数、横軸に体重を示す。体サイズとピーク周波数との間に有意な相関は見出されない。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

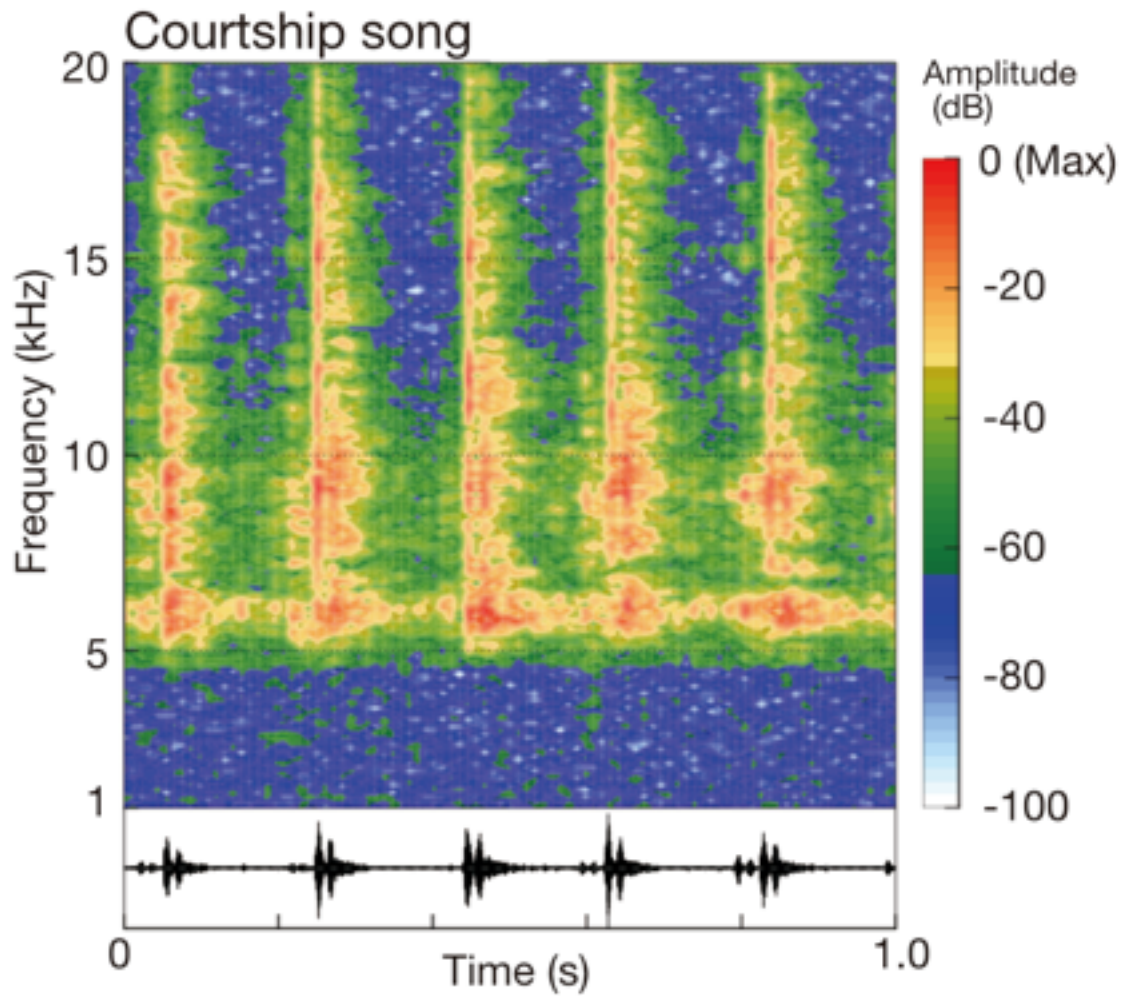


図4

フタホシコオロギのCourtship Songのスペクトログラム。横軸は時刻、縦軸は周波数を示す。色は右に示したスケールでの強度を表している。図の下部には録音された鳴き声の波形（オシログラム）を示している。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

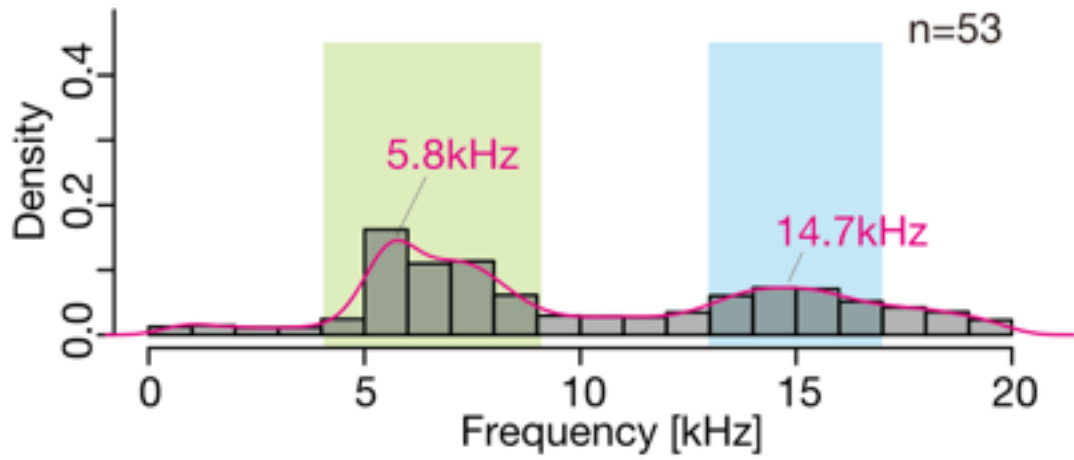


図5

複数のフタホシコオロギ個体から得られたスペクトログラム (Courtship song)から求めた、鳴き声の周波数分布 (n= 53)。Courtship songの周波数分布は、5.8kHzおよび14.7kHzにピーク周波数を示す。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

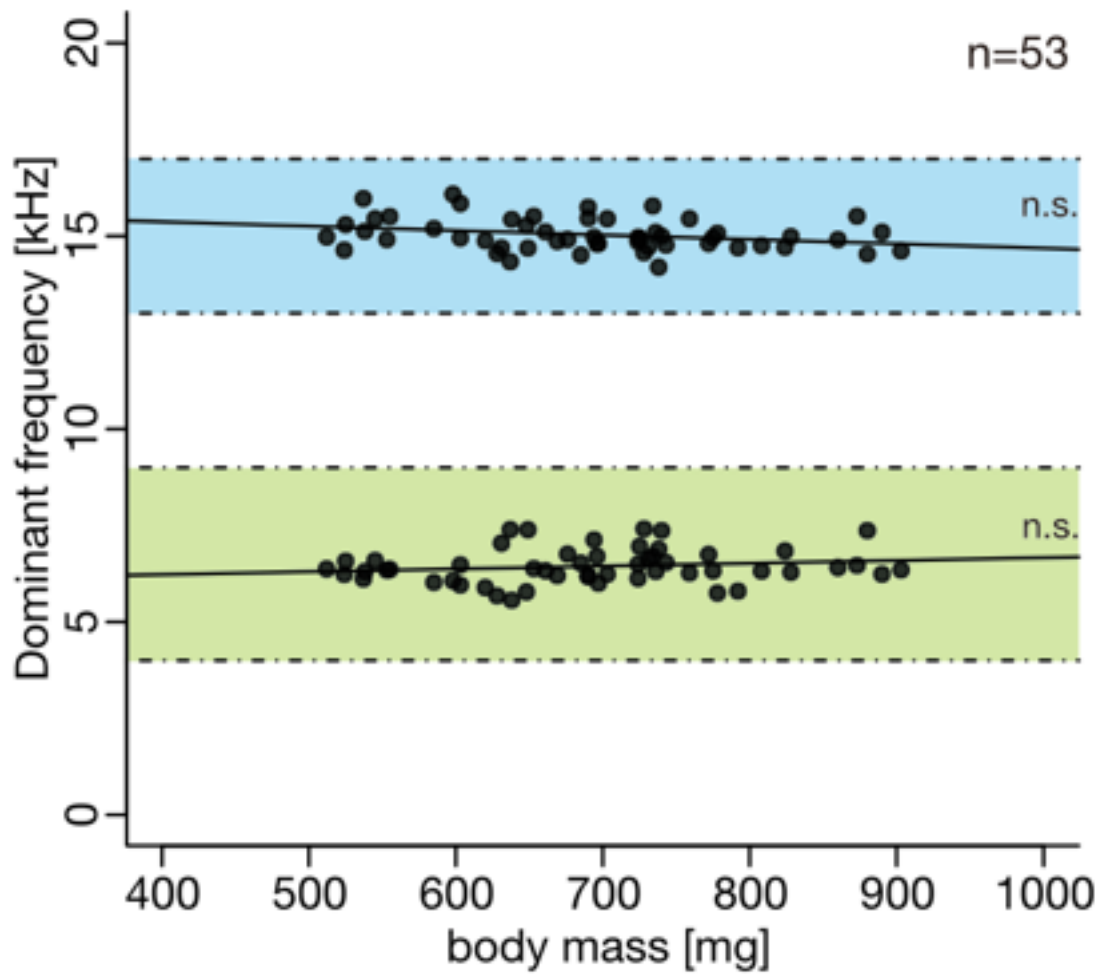


図6

フタホシコオロギの各個体から録音されたcourtship songのピーク周波数(kHz)と体サイズ (質量,単位はmg)との関係。縦軸にピーク周波数、横軸に体重を示す。体サイズと、courtship songの二つのピーク周波数との間に有意な相関は見出されない。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

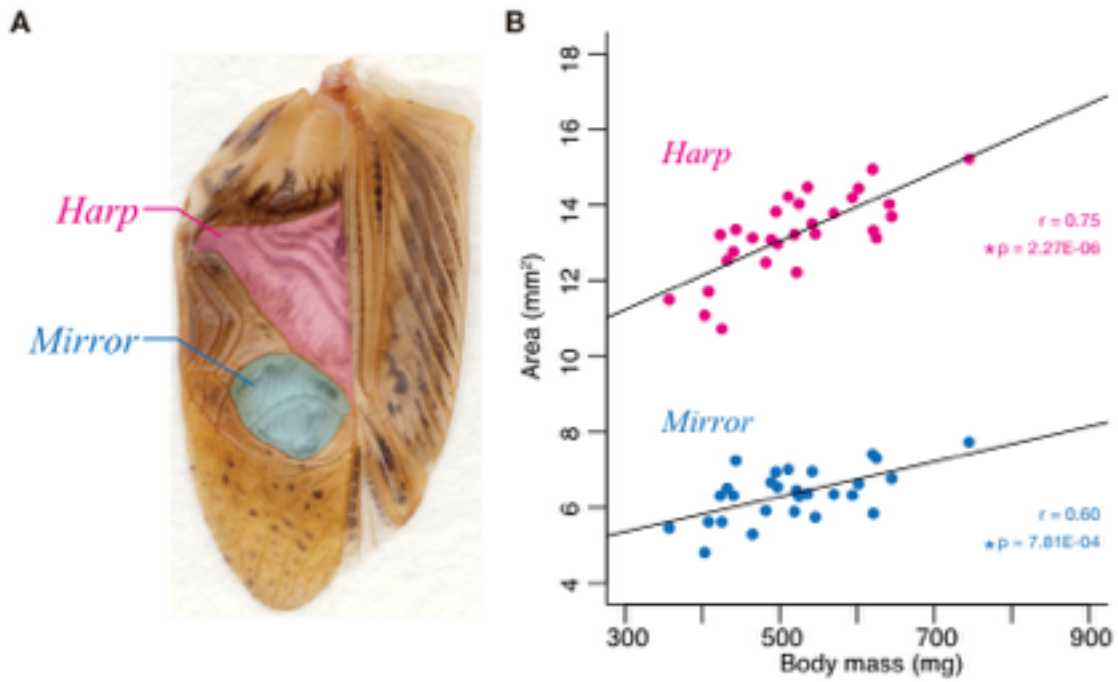


図 7

(A)コオロギの翅（前翅）の写真。赤色で示した部分がHarp、青色で示した部分がMirror領域である。(B)MirrorおよびHarpの面積と、各個体の体サイズとの関係。MirrorおよびHarp領域はいずれも体サイズと正の相関を示す。

※Miyashita et al., (2016) PLOS ONE に掲載の図を改変して使用

文献

- Bateman, P. W., Gilson, L. N., & Ferguson, J. W. H. (2001). Male size and sequential mate preference in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Animal Behaviour*, 61, 631-637. doi: DOI 10.1006/anbe.2000.1617
- Bennet-Clark, H. C. (1998). Size and scale effects as constraints in insect sound communication. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 353(1367), 407-419. doi: DOI 10.1098/rstb.1998.0219
- Cardoso, G. C., Mamede, A. T., Atwell, J. W., Mota, P. G., Ketterson, E. D., & Price, T. D. (2008). Song Frequency Does Not Reflect Differences in Body Size among Males in Two Oscine Species. *Ethology*, 114(11), 1084-1093. doi: DOI 10.1111/j.1439-0310.2008.01552.x
- Ferreira, M., & Ferguson, J. W. H. (2002). Geographic variation in the calling song of the field cricket *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera : Gryllidae) and its relevance to mate recognition and mate choice. *Journal of Zoology*, 257, 163-170. doi: 10.1017/S0952836902000766
- Fitch, W. T. (1997). Vocal tract length and formant frequency dispersion correlate with body size in rhesus macaques. *J Acoust Soc Am*, 102(2 Pt 1), 1213-1222.
- Gray, D. A. (1997). Female house crickets, *Acheta domesticus*, prefer the chirps of large males. *Animal Behaviour*, 54, 1553-1562. doi: DOI 10.1006/anbe.1997.0584
- Harrison, S. J., Thomson, I. R., Grant, C. M., & Bertram, S. M. (2013). Calling, Courtship, and Condition in the Fall Field Cricket, *Gryllus pennsylvanicus*. *PLOS ONE*, 8(3). doi: ARTN e60356 DOI 10.1371/journal.pone.0060356
- Katsuki, Y., & Suga, N. (1960). Neural Mechanism of Hearing in Insects. *Journal of Experimental Biology*, 37(2), 279-290.
- Libersat, F., Murray, J. A., & Hoy, R. R. (1994). Frequency as a Releaser in the Courtship Song of 2 Crickets, *Gryllus-Bimaculatus* (De Geer) and *Teleogryllus-Oceanicus* - a Neuroethological Analysis. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 174(4), 485-494.
- Montealegre, Z. F., Jonsson, T., Robson-Brown, K. A., Postles, M., & Robert, D. (2012). Convergent evolution between insect and mammalian audition. *Science*, 338(6109), 968-971. doi: 10.1126/science.1225271

- Pfefferle, D., & Fischer, J. (2006). Sounds and size: identification of acoustic variables that reflect body size in hamadryas baboons, *Papio hamadryas*. *Animal Behaviour*, 72, 43-51. doi: DOI 10.1016/j.anbehav.2005.08.021
- Rendall, D., Kollias, S., Ney, C., & Lloyd, P. (2005). Pitch (F0) and formant profiles of human vowels and vowel-like baboon grunts: the role of vocalizer body size and voice-acoustic allometry. *J Acoust Soc Am*, 117(2), 944-955.
- Robles, L., & Ruggero, M. A. (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev*, 81(3), 1305-1352.
- Simmons, L. W. (1986). Female Choice in the Field Cricket *Gryllus-Bimaculatus* (DeGeer). *Animal Behaviour*, 34, 1463-1470. doi: Doi 10.1016/S0003-3472(86)80217-2
- Simmons, L. W. (1995). Correlates of male quality in the field cricket, *Gryllus campestris* L: Age, size, and symmetry determine pairing success in field populations. *Behavioral Ecology*, 6(4), 376-381. doi: DOI 10.1093/beheco/6.4.376
- Sueur, J., Aubin, T., & Simonis, C. (2008). Seewave, a Free Modular Tool for Sound Analysis and Synthesis. *Bioacoustics-the International Journal of Animal Sound and Its Recording*, 18(2), 213-226.
- Webb, K. L., & Roff, D. A. (1992). The Quantitative Genetics of Sound Production in *Gryllus firmus*. *Animal Behaviour*, 44(5), 823-832. doi: Doi 10.1016/S0003-3472(05)80578-0

総括

本研究において私は、腸管出血性大腸菌O-157とカイコを用いた感染症モデルを構築して研究に着手した。その中で、O-157によるカイコの（並びにマウスの）殺傷にはO-157のLPSに存在するO抗原が必須の役割を果たすことを見出した。さらに、O-157によるカイコの感染死は、O-157の熱処理菌体をあらかじめカイコに注射しておくことにより、完全に抑圧されることを見出した。その時、カイコの体内では、脂肪体からの抗菌ペプチドの産生が増強されていることを示した。このような機能は、常に一定の活性化・沈静化応答を示すと思われる自然免疫系の新たな一側面を示唆するものであり、先行研究にならってカイコに置けるprimed immune responsesと呼ぶことにした。一方で、哺乳動物を含む脊椎動物には、外来抗原に対して特異的に結合する抗体分子を産生する細胞を記憶細胞として保持し、2回目の以降の感染に備える獲得免疫(Acquired Immunity)の機能が備わっている。上記のPrimed immune responsesは、一見すると脊椎動物の獲得免疫と類似する機能（持続性・選択性・体液性免疫応答の増強）を有しているが、脊椎動物に存在する抗体分子をコードする遺伝子は見つかっておらず、さらに脊椎動物の獲得免疫において重要な機能を担っているBリンパ球やTリンパ球のような免疫担当細胞やそれらの相同因子も見つからない。したがって、現時点においてはカイコのprimed immune responsesを脊椎動物の「獲得免疫」と同一視するのは問題がある。むしろ上記の研究は、近年脊椎動物でも明らかになりつつある「自然免疫が個体の免疫学的文脈（菌体への曝露経験など）に合わせて応答を変化させる」という機能の無脊椎動物における保存性を見たものだと捉える方が、現時点では適切であろうと思われる。ただし、このことは、無脊椎動物に病原体や病原体由来分子を特異的に認識してその記憶を保持するシステムが存在するという考えを否定するものではない。特に近年では、無脊椎動物に存在するDown syndrome cell adhesion

molecule (Dscam)が数万種類以上のアイソフォームを有し、それぞれ膜貫通タンパク質として細胞表面で異なる分子に対する親和性を示すと考えられている (Hattori et al., Nature (2007) 449, 223-227)。Dscamはマウスで神経回路の形成における機能が示唆されている (Amano et al., J Neurosci (2009) 29(9): 2984-2996)が、同分子をノックアウトするとマウスでは胎性致死となることから、成体における免疫系への寄与は検討できていない。しかし現在多くの研究者が無脊椎動物におけるDscamの機能に着目し、神経回路形成や免疫系における機能に着目して研究をおこなっている。

また本研究の後半ではコオロギの行動観察を行う実験系の構築を目的として研究を行った。その理由は、免疫系は個体が置かれた様々な環境・文脈に合わせてその機能を調節すると考える蓋然性があり、その機能について研究を展開するためには行動観察を行うための実験系を構築することが必須の課題だからである。個体や生物集団が置かれた環境や文脈と免疫系の機能的な連関に関する研究領域は近年Eco-immunologyと呼ばれ注目を集めている。私は今後、本研究で構築した免疫学実験・行動学実験のシステムを発展・拡張させながら、生物が変わりゆく環境の中でいかにして病原体（非自己）と向き合い、同時に種（アイデンティティ＝自己）の保存を図っているのかということを中心に大きな課題として取り組んでいきたいと考えている。生物学は多様性の学問という見方がある一方で、ひとつの生物種の中では多様性が常に一定の範囲内に収まるような調節が存在する。多様性を高めればそれだけ多様な環境下での生存可能性が高まるけれども、多様性は遺伝子セットの制約の中でしか実現できないし、多様性が高まりすぎると種としてのアイデンティティが失われてしまう。このような多様性と相反する性質は斉一性と呼ばれるが、斉一性を担保するプロセスの一つに性淘汰（求愛行動）がある。求愛行動においては一般に、集団の平均からより外れた個体が好まれやすいという結果をもたらす尺度と、逆に集団の平均に近い個体が好まれやすいという結果をもたらす尺度の両者が混在し、微妙なバランスを保ちながら配偶者選別の原理として機能している。そのような

仕組みは、多様性と斉一性とのバランスを巧妙に保ちながら生存を続けてきた生物に備わっている基本原理と考えて良い。実際、私が本研究の後半で見出した「コオロギの鳴き声の高さが一定に保たれている」という性質も、ある一定の高さ（平均的な高さ）から外れた鳴き声を発する個体を性淘汰の過程で排除するシステムであると見ることができる（メスの耳は特定の高さがよく聞こえる様にチューニングされている）。発生における細胞分化のプロセスや、がん細胞が発生するプロセスも同様の見方で捉えることができる。全身のシステムの中には多様な細胞種が存在するが、その多様性は常に一定の範囲内に収まる様に調節されており、その範囲を逸脱した一つの例ががん細胞である。発生や発がんのプロセスにおいて、近年では免疫系が重要な役割を果たしていることが知られている。免疫系は一般に「自己・非自己」の認識・確立が根幹的な機能であると考えられているが、同時に「多様性・斉一性」のバランスを担保するシステムと見ることもできる。私は今後、生命現象を捉えるさいにこの「多様性・斉一性」を大きな軸として、生命科学の新たな地平を切り拓いていきたいと考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員としてご指導を賜りました堀昌平先生（2016年度からの指導教員）ならびに関水久先生（2010年度から2015年度までの指導教員）に感謝の意を表します。私は2009年に東大薬学部に進学してからの8年あまりの期間を微生物薬品化学教室（現：免疫微生物学教室）で過ごしました。研究者としての人生の早い段階で関水先生の指導を受けられたことは、今後の私の研究者としてのあり方を決める大きな経験であったと思います。特に、実験科学における実験の重要性（当然ですが）と、研究記録のつけ方、プレゼンテーションの方法論に関してひとつの「型」を叩き込まれたことは、大きな自信につながりました。また、大学院生活の最終段階において堀先生に出会えたことにより、さらに新しい道を見出すことができました。堀先生から私は「問いを立てて、それに答える」という科学者としての初心の大切さを見出しました。

また、直接研究を指導していただいた垣内先生からは、研究者が論文を執筆して自らの意見を公にすることの重要性を、大学院生活を通し強く説いていただきました。松本靖彦先生および浜本洋先生には、関水研究室時代を通して日常から研究や研究室生活の相談にのっていただき、その後も学位取得まで多大なる支援を賜りました。

研究室の先輩後輩諸兄にも重ねて御礼申し上げます。挙げればきりがありませんが、特に、時には深夜早朝までに至る研究室生活を研究室の内外において共にして下さった安川淳一郎博士、安達健朗博士、久間達彦博士、田淵史晃博士、石井雅樹博士、福永ディミトリ広修士、扇喜秀修士に厚く御礼申し上げます。皆様の支えなくして今日の私はないと確信しております。

また、最後になりますが、長年にわたり私に修学の機会を与えてくださった私の家族に感謝の意を表します。

2017年2月 宮下惇嗣