

## 細胞性免疫に関わるアワヨトウレクチンの機能解析

石原 輝人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 誠一 (筑波大学 生命環境系)

## 1. 背景・目的

昆虫の自然免疫は細胞性免疫と液性免疫に大別できる。細胞性免疫には、異物のサイズの違いに応じた使い分けが存在しており、寄生性昆虫のような大型異物を多数の血球による囲い込みにより排除する包囲化と細菌のような小型異物を直接血球細胞に取り込み排除する貪食に分けられる。

免疫応答の対象異物の認識は異物表面の分子を認識するパターン認識受容体 (PRR) によって行われると言われている。アワヨトウ (*Mythimna separata*) を用いた先行研究において、貪食もしくは、包囲化の時に発現しているレクチン遺伝子 (*CTL1*, *CTL5*) が Subtraction 法によって発見された。レクチンはある特定の糖鎖を認識して結合するタンパク質であり、動物だけでなく植物にも存在しており、昆虫では PRR として働くと考えられている。上述したように、PRR は異物表面の分子パターンの認識を担うと考えられていることから、サイズのような三次元的構造の認識は不可能であるといえる。そこで、異物サイズの違いに基づく細胞性免疫の制御機構を明らかにすることを本研究の目的とし、二種類のレクチンのより詳細な遺伝子発現解析及び機能解析を行った。

## 2. 材料・方法

## 供試昆虫

アワヨトウは筑波大学応用動物昆虫学研究室内で継代飼育してきたものを用いた。飼育室内の温度は 25°C に保ち、光条件は明期 16 時間、暗期 8 時間で飼育した。実験には最終齢 (6 齢) になって 3 日経過した幼虫を用いた。

## Real time RT-PCR

血球細胞に対して大型と小型の同成分でできたビーズを準備した。アワヨトウ幼虫にそれらを注射した後、血球を回収して、遺伝子発現定量を行った。コントロールとして生理食塩水を注射した処理区と無処理区を作成した。

## 組換えタンパク質発現・精製

GSTtag を付加したレクチン遺伝子を大腸菌 (BL21 株) に導入し、Overnight express で遺伝子発現の誘導を行った。GST とグルタチオンセファロースビーズの親和性を利用して目的のレクチンタンパク質を分離した。その後、プロテアーゼによって GSTtag 部分を切断し、目的タンパク質を精製した。

## 貪食試験

カルチャーディッシュにおいて血球と小型ビーズを混合したものにレクチンを加えた処理区とコントロールとして BSA を加えた処理区を準備した。混合して 30 分後の 1 個の血球細胞中に含まれるビーズの数を数えた。

## 包囲化試験

カルチャーディッシュにおいて血球と大型ビーズを混合したものにレクチンを加えた処理区とコントロールとして BSA を加えた処理区を準備した。混合して 30 分後と 60 分後の包囲化の進行具合を比較した。

包囲化に以下のような段階を設定して該当するビーズに対する包囲化を評価した。

- Adhesion : 血球細胞が接しているように見えるビーズ
- Level 1 : 血球細胞がわずかに変形して付着しているビーズ
- Level 2 : 血球細胞が扁平になり、付着しているビーズ
- No adhesion : 血球細胞の付着のないビーズ

## 3. 結果・考察

Real time RT-PCR の結果、無処理区、生理食塩水を注射した処理区、大型のビーズを注射した処理区で *CTL1* 遺伝子の発現量が高く、小型のビーズを注射した処理区で発現量が低くなっていた。一方、*CTL5* 遺伝子は、小型のビーズを注射した処理区でその他の処理区に比べて高い発現量を示した。

小型ビーズの貪食をコントロールの BSA と比較したところ、*CTL1* を加えた処理区では 1 個の血球細胞あたりに含まれるビーズの数が減少した。一方、*CTL5* を加えた処理区ではその数が増加した。

包囲化試験を行ったところ、*CTL1* を加えた処理区では他の処理区よりも以下の図 1 の矢印のように変形してビーズに付着している細胞が多く見られた。



図 1, ビーズと付着した血球細胞

以上の結果から、*CTL1* は包囲化対象となる大型のビーズで高い発現量を示し、包囲化を促進して貪食を抑制する。逆に、*CTL5* は貪食対象となる小型のビーズで高い発現量を示し、貪食を促進させると考えられた。したがって、アワヨトウには *CTL1* と *CTL5* の二種類のレクチンタンパク質を介した表面分子パターンによらない細胞性免疫を制御する未知の系が存在することが示唆された。