

糸状菌病に対するミツバチの防御

Z. Gliński, J. Jarosz

近年の免疫および遺伝学的な研究技術の発達と比較免疫学や発生免疫学の分野の基礎に急激な変化をもたらした。昆虫が微生物の感染、攻撃、寄生や捕食に対して精巧な防御手段を講じているという考え方は今では広く受け入れられている (Rinkevich and Müller, 1996)。ミツバチの免疫系も他の完全変態する昆虫と同様に主なふたつの防御反応に依存している。ひとつは血球が介在する系で異物に対する食細胞作用や包圍化作用などであり (Poinar and Leutenegger, 1968; Salt, 1970; Ratcliffe, 1982; Götz, 1986; Ratcliffe and Götz, 1990), もうひとつは抗微生物免疫タンパク質などに代表される非細胞性の防御機構である (Dunn, 1986; Boman and Hultmark, 1981; Gliński and Jarosz, 1995a; 1995b)。昆虫の体液の抗微生物活性は生まれながら常在するものと誘導される免疫ペプチドおよび小分子のタンパク質からなる。常在型の抗微生物活性は基本的に体液中のリゾチーム (Mohrig and Messner, 1968; Jarosz, 1979) あるいはその他の要素であるレクチン (Olafsen, 1986), 補体類似作用 (Anderson et al., 1972), フェノールオキシダーゼ賦活化作用 (Söderhäll and Smith, 1986) と協働している。誘導性免疫は微生物の感染や昆虫の体腔内への実験的な異物の接種などによって寄主の体内の保全が損なわれた場合に発現する。昆虫の非自己認識による防御の発現は脂肪体中での広い範囲の細菌やカビに対する抗菌性をもつ特異的な免疫 mRNA とリボゾームタンパク質の新規の合成を必要とする (Boman and Hultmark, 1987; Jarosz, 1993)。昆虫の免疫タンパク質の中ではチョウ目 (鱗翅目) 昆

虫のセクロピン類似ペプチド (Boman and Hultmark, 1987) やアタチン類 (Engström et al., 1984), ハエ目 (双翅目) のディプテリシン類 (Keppi et al., 1986), 昆虫ディフェンシン (Dimarcq et al., 1988; Bulet et al., 1996), およびミツバチや他のミツバチ科昆虫のアピダエシン類 (Casteels et al., 1989; 1990; Casteels-Josson et al., 1993), アバエシン類 (Casteels et al., 1990), ヒメノプテリシン類 (Casteels et al., 1993) が研究が進んでいる。

感染部位と感染強度

1000 種以上のカビが昆虫の病原となり得る。ほとんどの昆虫寄生性カビ類が孢子発芽によって感染を開始する。伸長する菌糸が昆虫のクチクラを機械的に、あるいは酵素を利用して通過、体腔内に侵入し、急速に成長して内部器官を覆い尽くす。体内への侵入は、経口的に消化管内に入った孢子の発芽によって中腸や後腸でも起こる。ミツバチにかかる物理的、化学的、あるいは生物学的なストレス、特に外気温や高湿度、環境汚染、農薬中毒、寄生生物の侵入、害敵による捕食などの要因が、糸状菌の感染を促進しやすい要因となっている。こうした要因は昆虫の糸状菌に対する抵抗性を、免疫機構を低下させることによって、あるいは体表や消化器系、器官系の防御機能を損傷させることによって弱らせることになる。

毒生成カビが分泌するカビ毒、とりわけ *Aspergillus flavus* が生成するアフラトキシンはミツバチの中樞神経系に直接作用する。侵入したミツバチの内分泌系とおそらく内部防御機

構にも影響を与えることによって、そのミツバチのカビの感染に対する抵抗力を失わせる。

病原がいかに早く成長でき、寄主の体成分をどれだけ栄養として利用でき、昆虫の体表のクチクラの解剖学的な防御限界を超えるに足るクチクラ分解酵素を生産できるか、さらに寄主の免疫機構に耐性があるかという遺伝的な能力に依存して感染の結果は決定する。ある昆虫の個体の死は、菌糸が侵入した組織の物理的、あるいは酵素的な損傷、器官の機能異常、体液循環の物理的な停滞、カビ毒への反応などの結果として起こる。成長するカビと寄生されたミツバチとの間での食料の奪い合いは、カビの寄生による病気の発現に関して無視できない問題となる。例えば、ハチノスカビ (*Ascophæra apis*) はミツバチの幼虫がグリコーゲンを合成するのに使っている組織中のグルコースとトレハロースの濃度を急速に低下させる (Gochner and Margetts, 1979)。カビによる攻撃は、細菌の侵入や他のストレス要因と同じく、あきらかに神経-免疫ネットワークに影響し、細胞性、あるいは体液性免疫機構を発現させ、これによってミツバチがカビ病に対して防御力を増すようなことも起こり得る。

カビはミツバチやミツバチの巣の常在的な腐生者である。ミツバチが集めてくるほとんどのカビはミツバチ体内や巣箱の中では成長できない。しかし、蜂児に寄生するハチノスカビ (*Ascophæra apis*) や蜂児と成蜂に影響する *Aspergillus* sp., *Aureobasidium pullulans*, その他のカビ (*Trichoderma lignorum*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus*)、および酵母 (*Torulopsis*) など一部のカビはミツバチの病原生物として考えなければならない。

カビの侵入を防ぐミツバチの防御機構

カビの寄生においてはミツバチ側でも様々な免疫機構が働く (図 1)。よく知られているのはチョコレートブルードやストーンブルードに対するこれらの反応である。なかでも、体表クチクラ、気管系、消化管系の防御機構である (Barr and Shope, 1975; Orihel, 1975)。内部防御系では

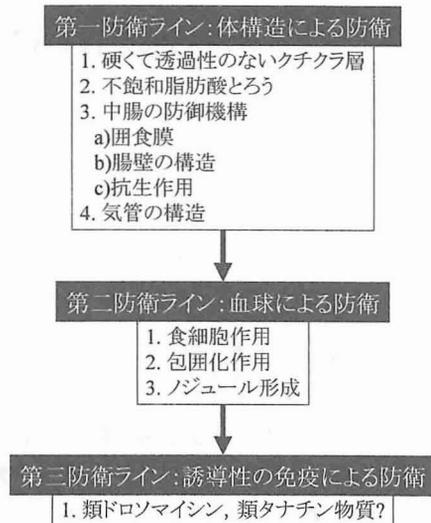


図 1 カビの感染に備えるミツバチの防御ライン

食細胞作用と包囲化作用が主な血球性の防御機構である (Götz, 1986)。リゾチームも誘導性の抗細菌性タンパク質も、侵入を受けたミツバチ体内でカビの胞子を殺したり、菌糸の成長を抑制したりする働きはないようである。チョコレートブルードやストーンブルードに対してはミツバチのコロニーの衛生行動が重要な抵抗性となる (Gilliam et al., 1983; Southwick, 1994)。

透過性のない硬い体表クチクラ、中腸内容物の生化学的環境とその囲食膜、および気管系の機械的かつ生理的な障壁はカビの侵入からミツバチの体腔を効果的に守っている。カビの胞子や菌糸の断片がミツバチの体表についても、脱皮によって外皮ごと機械的に取り除かれる。体表クチクラはワックス分や不飽和脂肪酸によって堅牢となり、あるいはそれらの成分があることで抗カビ効果を維持している。キチナーゼを生成する酵母と糸状菌のみが体表のクチクラ層を通過でき体液中に侵入できる。成長する菌糸によって機械的に、あるいは酵素的に損傷したクチクラは細菌の侵入をも許してしまい、致死的な敗血症の原因となる。

前腸と後腸のキチン層も、キチナーゼ合成者には効果がないものの、経口で侵入した微生物に対する適切な防壁となっている。しかし中腸は、完全にキチン層がなく、そのためここが消

化管内で最も微生物が腸管を通過して体液に侵入しやすい場所となる。

中腸内容物の生化学的な環境は多くの種類の細菌の成長と増殖を防いでいる。抗微生物物質としてのフィトンチッドは、消化中の食物に含まれる揮発性の物質で細菌やカビ類の侵入者を死滅させる。腸内細菌とカビによる栄養競争も腸管から大量のカビの胞子を排除するのに効果的である。非細胞性のゼラチン質の囲食膜は中腸表皮を成長中の菌糸による物理的・化学的損傷から保護する働きもあり、きわめて重要な位置づけにある。腸管表皮と筋細胞層は腸管粘膜から体液中へ菌糸が通過するのを制限する防壁を形成している。気管内は相対的に湿度が低く保たれており、このことが気管内でカビの胞子が発芽したり菌糸が伸長したりするのを防ぐ上で重要な要因となっている。いうまでもなく大量のカビの胞子が付着したり、強病原性のカビの感染の場合、ミツバチの解剖学的な、あるいは生理学的な防壁はうち破られる (Gliński and Jarosz, 1995)。カビは体液中に侵入し、感染した蜂児や成蜂に重度の有害な影響を与える。ハチノスカビや *Aspergillus flavus* は腸管経由、あるいは体表クチクラの損傷部から蜂児に感染する。成蜂では消化管が病原性子嚢菌の侵入経路として重要である。

ハチミツ、花蜜、および花粉の抗微生物活性もミツバチのコロニーにとっては重要で、腐生性の細菌やカビ類の貯蔵食糧中での繁殖を抑制する効果を持つ。また数種の病原性微生物を死滅させる働きもある (Burgett, 1978)。高い酸度、浸透圧、過酸化水素の生成と蓄積がハチミツと花蜜の抗微生物活性の主体である (White and Subers, 1963)。ハチミツは高浸透性によって多くの生細胞を殺すことができるが、高浸透圧抵抗性のカビや細菌は例外となる。

ローヤルゼリーは広範囲な細菌種に対する細菌発育阻止性および抗菌性を示す (Rose and Briggs, 1969)。少なくとも、ローヤルゼリー中には2種の抑制物質が知られている。10-ヒドロキシ-デセン酸とグルコースオキシダーゼである。これらはハチノスカビをのぞく多くの

カビ類の成長を抑制、遅延させることもできる。

プロポリスはワックスとヤニ類、香油類、および少量の花粉の複雑な混合物でミツバチのコロニーにおける対微生物防御の一翼を担っている。フラバノン類、フラボン類、カフェ酸およびそのエステルはプロポリスの抗微生物活性の主体と考えられている (Greenaway et al., 1990)。植物上、動物由来、環境中に汚染源としてあるもの、花粉に混入しているもの、あるいはミツバチが集める水にいるものなど、あらゆる外来のカビはプロポリスの生理活性物質によって生物学的に抑制されている可能性が高い。

衛生行動とミツバチの カビ感染症への抵抗性

行動学的な免疫機構は、罹病した、あるいは死亡した蜂児を働き蜂が素早く見いだして、死亡個体を除去し、巣板上の巣房を徹底的に掃除するという一連の行動である。働き蜂は自分の体の、あるいは他個体のグルーミング（毛づくろい）をして、巣の衛生状態を保ち、落ちたゴミは巣箱外に捨てる。この衛生行動はチョコレートやストーンブルードに対する有効な抵抗性である。働き蜂は大あごを用いてミイラ化した幼虫を引きずり出して巣の外に捨てに行く。ミツバチは自分の腸管内に入った胞子や体毛に付着した胞子を取り除くすべがないので、除去作業のあとで給餌をして幼虫に再感染させたり、コロニー内の他の働き蜂に胞子を渡してしまうこともあり得る (Southwick, 1994)。何匹かの働き蜂が胞子や菌糸の断片を前胃弁で濾しとってしまうことで抵抗性が維持され、また働き蜂が分泌する幼虫の餌の強力な抗細菌、抗カビ活性も有効であろう。

行動的な抵抗性には最低ふたつの、いずれも遺伝的な性質による機構がある。衛生行動は2種の劣性遺伝子によって制御されていると信じられている。そのひとつは死んだ蜂児のいる巣蓋の除去に関するもので、もうひとつは中の死体を取り除くことに関するものである。

アピダエシンI前駆体a/b (Proapidaecin Ia/b)

E(AKPEAKP)GNNRPVYIPQPRPPHPR^①/_②

アピダエシンIa (Apidaecin Ia)

GNNRPVYIPQPRPPHPRI

アピダエシンIb (Apidaecin Ib)

GNNRPVYIPQPRPPHPRL

アピダエシンII (Apidaecin II)

GNNRPIYIPQPRPPHPRL

アピダエシンIII (Apididaecin III)

GNNRPVYISQPRPPHPRI

図2 アピダエシン前駆体および各種のアピダエシンのアミノ酸配列
前駆体の配列中“^”はアピダエシン完成時に切断部位となる

②グルタミン酸 ③グリシン ①イソロイシン ④アラニン ⑤アスパラギン ⑥グルタミン
⑦リジン ⑧アルギニン ⑨ヒスチジン ⑩プロリン ⑪バリリン ⑫チロシン ⑬ロイシン
(図3, 4も同じ)

(Tauber, 1992). 衛生行動の発現はミツバチコロニーの強さに依存する. 蜂児巣板とそこにいる働き蜂を取り除いてコロニーサイズを小さくすると, 衛生形質を持つコロニーの衛生行動は見られなくなるが, 衛生形質を持たないコロニーでは変化がない. また衛生行動は衛生形質をもった蜂, あるいはそうでない蜂を加えることで, あるいは両者の比率を変えることでその発現が変動する. Tauber (1992) はチョークブルードに対して衛生行動を示すものは抵抗性であるとしているが, Southwick (1994) は衛生行動の強さとチョークブルードに対する抵抗性には直線的な比例関係はないとしている. チョーク病に罹ったコロニーと衛生行動の発現との間には弱い相関しか見られなかった.

血球介在型の免疫応答

昆虫の体液の抗カビ活性には血球介在型の免疫応答と非細胞型の免疫が含まれる. 食細胞作用と包囲化作用はミツバチにおける侵入する病原糸状菌に対する防御機構の代表的なふたつの普遍的な方式である. これらの血球介在型の免疫反応は, 循環する血球量と体液中の血球種の比率の変動を伴う (Hink, 1972). 一般に, 血球腔への感染は血球分化の促進と血球の化学刺

激への応答としての移動に始まる. 食細胞作用は体腔が少数の細菌やカビの孢子に汚染されたときに真っ先に見られる. 食細胞の最終過程では, 飲み込まれた孢子や細かな菌糸断片がリソソームと食作用胞の結合によってできた消化胞内で消化される. 細菌を分解することが知られているリソソームの加水分解酵素は取り込んだカビの残骸に対しても働く. ほとんどまちがいがなく, 細菌の食作用に関与するプラズマ細胞と顆粒細胞がカビに対する食細胞過程にかかわっている. フェノールオキシダーゼ系の役割, とりわけメラニン昆虫寄生性のカビ類の食細胞作用には欠かせない.

包囲化作用は直径が10 μmを超え, ひとつの血球による食細胞作用の及ばない外来の異物に対してカプセル上の包囲網を形成するものをいう. 包囲化作用は血球腔内のカビの感染に対して最も効果的な血球性の免疫応答である. カプセルは主に顆粒細胞とプラズマ細胞の結合によって形成される. 顆粒細胞はプラズマ細胞を引き寄せる屈血性因子を放出し, カビを取り囲んだカプセルの外装を形成させる. ある場合にはカプセルの内壁のメラニン層にメラニンが見られる.



図3 ショウジョウバエの抗カビタンパク質であるドロソマイシンの基本アミノ酸配列



図4 *Podissus maculiventris* から得られたタナチンのアミノ酸配列

抗微生物活性における免疫ペプチド

ミツバチのリゾチームと誘導性の抗微生物ペプチドや低分子タンパク質は抗カビ活性をもっていない。リゾチーム (N-アセチルムラミルヒドロラーゼ, 訳注ムラミダーゼに同じ) は昆虫数目に共通にみられる。リゾチームは基本的にはグラム陽性菌を攻撃するが, 例外的にグラム陰性菌, 例えば一部の大腸菌 *Escherichia coli* の変異株に対しても効果を示す。正常なミツバチの体液はリゾチームを少量しか含んでおらず, 幼虫や成蜂では 5~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 蛹では 5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である (Mohrig and Messener, 1968; Götz and Trenzcek, 1991)。ミツバチのリゾチームの活性は微生物の感染によって急激に増加する。

アピダエシン類のペプチド (図2) は, 植物共生細菌, 植物病原細菌, および腸内細菌に対して抗菌活性を持つ誘導性の高プロリン含有低分子 (約 2.0 kDa 免疫ペプチドの大きなグループに属する (Casteels et al., 1989; 1993; 1994)。これがミツバチが細菌の侵入に対して備えている誘導性体液性免疫のなかで最も際だったものである。

アピダエシンの抗細菌性は, アバエシン (Casteels et al., 1991; 1994) やヒメノプテリシン (Casteels-Josson et al., 1994) によって補足されてミツバチの防御機構を形作っている。アバエシンは大分子 (4.0 kDa) の高プロリン含有ペプチドでグラム陰性菌と陽性菌の双方に中程度の効果を示す。ヒメノプテリシンは高グリシン含有小分子タンパク質 (10 kDa) でグラム陽性・陰性両方の細菌に効果を示す。

さらに抗細菌性ペプチドの生産に加えて, 感

染したミツバチの脂肪体は抗カビ活性を持つ環状分子とその他の細菌にもカビにも活性を持つ免疫性の物質を合成している (Bulet et al., 1996; Gliński and Jarosz, 1998)。

抗カビ性環状ペプチドとしては, 今のところ 2 種, ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のドロソマイシン (図3) と *Podissus maculiventris* という甲虫からタナチン (図4) が見つかっている。いずれも植物病原性およびヒトの病原性の糸状菌に対して強力な活性をもっている (Fehlbaum et al., 1994)。ドロソマイシンは 44 のアミノ残基と 8 個のシステインによる 4 か所の分子内ジスルフィド結合を有しており, 広範囲の植物およびヒトの病原性糸状菌に対して活性を示す。しかし細菌に対しては活性がない (Flyg et al., 1987)。タナチンは 21 アミノ残基からなる誘導性ペプチドで分子内に 1 か所ジスルフィド結合があり, 8 アミノ残基のカルボキシル基末端ループを持つ。グラム陽性・陰性両細菌, および植物およびヒトの病原性カビ類に対して活性がある (Bulet et al., 1996)。少なくとも 2 種の高プロリン含有ペプチド, *Palomera prasina* および *Drosophila* から得られたメタルニコウイン (Bulet et al., 1996) と *Drosophila melanogaster* から得られたミエッチニコウイン (Lavaschina et al., 1995) が細菌とカビ類の双方に活性を示す。

チョーク病を防ぐために

以上のようにミツバチには各種の免疫機能が備わっていて, カビ病であるチョーク病に対しては, 自己充足的な耐性が本来はある。前述したように, このような耐病性は, 外界からの種々のストレス, とりわけ巣箱内の温度や湿

度、環境汚染、農薬中毒、ダニなど寄生生物の侵入、スズメバチなど害敵による捕食などの要因によって減衰してしまい、チョーク病を誘発する。つまり病気の予防には、ミツバチがこれらのストレスから解放されるような飼育の実現が望まれる。

(著者の住所は下記参照) (翻訳 中村 純)

引用文献

- Anderson, R. S. et al. 1972. *Infect. Immun.* 5: 55-59.
- Barr, A. R. and R. E. Shope. 1975. *IN Invertebrate Immunity* (ed. by K. Maramorosch and R. E. Shope). pp. 113-114.
- Boman, H.G. and D. Hultmark. 1981. *Trends in Biochem. Sci.* 6: 306-309.
- Boman, H.G. and D. Hultmark. 1987. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 103-126.
- Bulet, P. et al. 1996. *IN Entomopathogenic Nematodes. Workshop, Ponta del Gada Univ. of Azores*, pp. 1-14.
- Burgett, D. M. 1978. *IN Honey Bee Pests, Predators, and Diseases* (ed. by R. A. Morse). pp. 297-308.
- Casteels, P.R. et al. 1989. *EMBO J.* 8: 2387-2391.
- Casteels, P.R. et al. 1990. *Eur. J. Biochem.* 187: 381-386.
- Casteels, P. R. et al. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 7044-7054.
- Casteels-Josson, K. et al. 1993. *EMBO J.* 12: 1569-1578.
- Dimarcq, J.L. et al. 1988. *Eur. J. Biochem.* 171: 17-22.
- Dunn, P. E. 1986. *Ann. Rev. Ent.* 31: 321-339.
- Engström, A. et al. 1984. *EMBO J.* 3: 2119-2122.
- Fehlbaum, P. et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 33156-33163.
- Flyg, C. et al. 1987. *Insect Biochem.* 17: 153-160.
- Götz, P. 1986. *IN Immunity in Invertebrates* (ed. by M. Brehelin and N. Boemare). pp. 153-170.
- Götz, P. and T. Trenczek. 1991. *IN Immunology of Insects and other Arthropods* (ed. by A. P. Gupta). pp. 323-348.
- Gilliam, M. et al. 1983. *Apidologie* 14: 29-39.
- Gliński, Z. and J. Jarosz. 1995a. *Bee World* 76: 195-205.
- Gliński, Z. and J. Jarosz. 1995b. *Immunobiology of the Honey Bee* (In Polish).
- Gliński, Z. and J. Jarosz. *Folia Vet.* 42: 33-41.
- Gochnauer, T. A. and V. J. Margetts. 1979. *J. Apic. Res.* 18: 212-218.
- Greenaway, W. et al. 1990. *Bee World* 71: 107-118.
- Hink, W. F. 1970. *Transplantation Proc.* 2: 233-235.
- Jarosz, J. 1979. *Biol. Zentralbl.* 98: 459-471.
- Jarosz, J. 1993. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 415-421.
- Keppi, E. et al. 1986. *Insect Biochem.* 16: 395-402.
- Levaschina, E. et al. 1995. *Eur. J. Biochem.* 233: 694-700.
- Mohrig, W. and B. Messner. 1968. *Biol. Zentralbl.* 87: 439-470.
- Olafsen, J. A. 1986. *IN Immunity in Invertebrates* (ed. by M. Brehelin and N. Boemare). pp. 94-111.
- Orihel, T. C. 1975. *IN Invertebrate Immunity*, (ed. by K. Maramorosch and R. E. Shope). pp. 67-73.
- Poinar, G. O., jr. and R. Leutenegger. 1968. *J. Ultrastruct. Res.* 25: 293-306.
- Ratcliffe, N. A. 1982. *IN Immune Reaction to Parasites* (ed. by W. Frank). pp. 233-244.
- Ratcliffe, N. A. and P. Götz. 1990. *Res. Immunol.* 141: 919-923.
- Rinkevich, B. and W. E. G. Müller. 1996. *Progr. in Mol. Subcell. Biol.* 15.
- Rose, R. I. and J. D. Briggs. 1969. *J. Invert. Pathol.* 13: 74-80.
- Söderhäll, K. and V. J. Smith. 1986. *IN Immunity in Invertebrates* (ed. by M. Brehelin and N. Boemare). p. 208-223.
- Salt, G. 1970. *Cambridge Monogr. Exp. Biol.* No. 16.
- Southwick, E. E. 1994. *Am. Bee J.* 134: 751-752.
- Taber, S. 1992. *Am. Bee J.* 132: 327-328.
- White, J. W. and M. H. Subers. 1963. *J. Apic. Res.* 2: 93-100.

GLIŃSKI, Z. AND JAROSZ J.* The honeybee defense in mycotic diseases. *Honeybee Science* (2000) 21 (2): 69-74. Faculty of Veterinary Medicine, Department of Bee Diseases, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland; *Department of Insect Pathology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland.

The haemocyte-mediated defense mechanisms, lysozyme and the inducible antimicrobial peptides offer the honeybee a very impressive set of immune reactions protecting well the insect against bacterial invaders. Usually, these defense responses have a broad activity spectrum directed against a large variety of bacteria. Phagocytosis and encapsulation are a key element in the immune defense of the honeybee to fungal infections. Up to now, neither antifungal immune peptides such as drosomycin in fruit fly (*Drosophila melanogaster*), thanatin in the bug (*Podissus maculiventris*) nor mietchnikowins and metalnikowins that exhibit activity against both bacteria and fungi have been found in the honeybee defense against *Ascosphaera apis* and *Aspergillus*. It is reasonable to conclude that hygienic behaviour, antimicrobial entities secreted by workers and protective barriers of the body coverings form the effective thresholds protecting the bee against mycotic invasions. Under the above circumstances, it can be assumed that the protection of bees to mycotic diseases is realized by the neural-immune-endocrine network.