

医薬資源としての昆虫由来抗菌ペプチドに関する研究

イエバエ *Musca domestica* 体壁傷害による組織依存的
抗菌ペプチド遺伝子発現誘導解析

安藤 美菜子

(ANDOH Minako)

同志社女子大学大学院

薬学研究科 医療薬学専攻

目次

1 背景・目的	4
2 実験材料と方法	9
2-1 実験材料.....	9
2-2 イエバエ幼虫及び蛹の傷刺激と組織回収.....	9
2-2-1 傷付け処理.....	9
2-2-2 幼虫, 組織及び蛹の回収.....	9
2-3 RNA 抽出と cDNA 合成.....	10
2-4 リアルタイム PCR.....	10
2-5 ドロップレットデジタル PCR (ddPCR)	10
2-6 リアルタイム PCR 及び ddPCR 用プライマーの設計.....	11
2-6-1 ディフェンシン	11
2-6-2 アタシン	12
2-6-3 ディプテリシン	13
2-6-4 ザルコトキシシン II	14
2-6-5 ザルコトキシシン I-B	14
2-6-6 組織マーカー	15
2-7 細菌の培養	15
2-8 最小発育阻止濃度の決定.....	16
2-9 コロニーアッセイ.....	16
2-10 統計処理.....	16
3 結果	17
3-1 傷刺激により幼虫及び蛹での抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導される	17
3-2 傷刺激により幼虫組織特異的な抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導される	17
3-3 defensin 関連ペプチドの合成部分ペプチドは大腸菌に対して抗菌活性を示す .	19

4 考察	21
5 謝辞	27
6 参考文献	28
7 図表	36

本論文で用いた略号

NaCl; sodium chloride

KCl; potassium chloride

CaCl₂; calcium chloride

RNA; ribonucleic acid

DNA; deoxyribonucleic acid

cDNA; complementary deoxyribonucleic acid

PCR; polymerase chain reaction

qPCR; quantitative polymerase chain reaction

ddPCR; droplet digital polymerase chain reaction

NCBI; national center for biotechnology information

LB; luria-bertani

MIC; minimum inhibitory concentration

OD; optical density

CFU; colony formation unit

1 背景・目的

近年、感染症治療目的の抗菌薬の多用による多剤耐性菌の増加が世界中の医療現場で深刻な問題となっている。世界保健機関ではこの現象を、21世紀で最も重要な公衆衛生上の脅威と名付けた (Munita and Arias, 2016)。多剤耐性菌による感染症は死亡率の増加とも関連しており、重大な経済的負担を負っていることから、早急な対応策が必要である。その一つに、広い抗菌スペクトルを持ち、更に細菌が耐性化する発生率が低いという特徴を持つ抗菌ペプチドが、新たな抗菌薬として注目されている (Zaslhoff et al., 2002)。

抗菌ペプチドは先天性免疫システムにおいて重要な分子であり、細菌やウイルスまたは真菌などによる感染から宿主を保護する役割を担っている。これまでに、ヒト、動物、昆虫及び植物など、殆どの生物種から発見されており、その構造やアミノ酸配列の特徴によって様々な種類に分類されている (Koczulla and Bals, 2003)。殆どの抗菌ペプチドはサイズが小さく、豊富に正電荷を含む領域と疎水性の領域を有しているのが特徴である (Andersson et al., 2016)。この抗菌ペプチドの正に荷電した領域が、細菌の細胞膜上のリポポリサッカライドのような、負に荷電した分子と結合する (Gunn et al., 1998; Kawasaki et al., 2007; Vaara and Viljanen, 1985)。その結果、細菌の細胞膜に孔が空き、最終的に細胞溶解または細胞死に導くとされている (Huang, 2006; Matsuzaki, 1999; Shai, 1999)。実際に臨床で使われている抗菌ペプチドとしてはポリミキシン B やコリスチンが有名であり、多剤耐性グラム陰性菌による感染症に対して用いられている (Nation et al., 2015)。しかし、これらの抗菌薬に対しても耐性を持つ細菌が出現する可能性は十分にあるため、新たな抗菌薬の開発が急務であり、現在も様々な種類の抗菌ペプチドが感染症治療薬として臨床開発されている (Andersson et al., 2016)。更に、抗菌ペプチドは抗菌活性だけでなく宿主の免疫システムにも作用することが分かっており (Andersson et al., 2016; Koczulla and Bals, 2003)、アジュバントとしても有用である可能性がある。また、抗菌薬は家畜飼料に混ぜることで、吸収効率が上がることが知られているため (Feighner et al., 1987)、抗菌ペプチドも同様の利用価値があると考えられる。

これまでに、様々な生物種から抗菌ペプチドは発見及び単離されてきたが、昆虫からも見ついている。昆虫は脊椎動物に存在するような獲得免疫システムを有しておらず、そのため、先天性免疫システムを発達させてきた。昆虫の免疫システムについては、1980年代に Kowalevsky と Cuenot らによって、血球による貪食や包囲化作用について初めて報告され、その後 Glaser らによって細菌培養液を注入した昆虫の体液中に、細菌を分解する物質が産生されることが発見された (Hoffmann and Hetru, 1992)。そして1981年に Boman らが、細菌感染させたガの一種 *Hyalophora cecropia* の幼虫の体液から抗菌物質を発見し、これをセクロピンと名付けたのが、昆虫で初めて見つかった抗菌ペプチドである (Hultmark et al., 1980)。続く10年間で、鱗翅目、双翅目、膜翅目及び鞘翅目などに属する昆虫から様々な抗菌ペプチドが単離され、これまでに150種類を超える抗菌ペプチドが同定された。これらの抗菌ペプチドは、殆どが正電荷を帯びており、サイズが小さく、グラム陽性菌及びグラム陰性菌の両方に対して広い抗菌スペクトルを持つことが分かっている。昆虫から発見及び単離された抗菌ペプチドはその構造及びアミノ酸配列の特徴から、高システイン含有ファミリー、高グリシン含有ファミリー、 α -ヘリックスファミリー及び高プロリン含有ファミリーの4つのファミリーに分類されている (Yi et al., 2014)。高システイン含有ファミリーに属している抗菌ペプチドは、哺乳類の血球から見つかったディフェンシンと配列が似ていたことから (Hoffmann and Hetru, 1992)、昆虫ディフェンシンと呼ばれる。哺乳類由来のディフェンシンと同じくシステインを6つ有しているのが特徴であり、グラム陽性菌に対して抗菌活性を示す。高グリシン含有ファミリーはグラム陰性菌に対して活性を示し、アタシンやディプテリシンといった抗菌ペプチドが分類される。 α -ヘリックスファミリーは2つの α -ヘリックス構造を持つのが特徴で、グラム陽性菌及びグラム陰性菌の両方に対して活性を示す。*Hyalophora cecropia* から単離されたセクロピンやセンチニクバエ *Sarcophaga peregrina* から単離されたザルコトキシシン I がこのファミリーに属している (Holak et al., 1988; Iwai et al., 1993)。高プロリン含有ファミリーはグラム陰性菌に対して活性を示し、代表的なものとし

ではショウジョウバエから単離されたドロソシンがある。これらの抗菌ペプチドは細菌感染や傷害によって誘導されることが、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* やセンチニクバエの研究によって報告されている (Gottar et al., 2002; Okada and Natori, 1983)。

昆虫において傷害や細菌感染が起こると、哺乳類の肝臓のように脂質や炭水化物の代謝を行っている、脂肪体と呼ばれる器官で抗菌ペプチドが合成される (Arrese and Soulages, 2010; Boman et al., 1991; Hoffmann et al., 1993)。細菌の侵入をセンサー分子が認識すると抗菌ペプチドの合成が誘導され、そして体液中に分泌された抗菌ペプチドは侵入した細菌の増殖を抑制する重要な役割を担う (Lemaitre et al., 1996)。また抗菌ペプチドは、脂肪体だけでなく唾液腺や消化管でも発現していることが報告されている (Dimopoulos et al., 1998; Vieira et al., 2014; Lehane et al., 1997)。このように、脂肪体だけでなくその他の組織でも抗菌ペプチドを発現させることで、昆虫は自身を細菌感染などから保護していると考えられる。

センチニクバエから単離されたザーペシン B は高システイン含有ファミリーに属する抗菌ペプチドで、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌に対して抗菌活性を示す (Matsuyama and Natori, 1988)。しかし、その部分ペプチドである RSLCLLHCRLK-NH₂ はグラム陽性菌だけでなく、大腸菌などのグラム陰性菌や真菌に対しても抗菌活性を示すことが知られている (Yamada and Natori, 1994)。更に、RSLCLLHCRLK-NH₂ を元にして合成された KLKLLLLLKLK-NH₂ は抗菌活性が強くなるだけでなく、マウスにおける免疫応答を活性化することが報告されている (Fritz et al., 2004; Okuyama-Nishida et al., 2009)。また、KLKLLLLLKLK-NH₂ を全て D 体のアミノ酸で合成すると、更に抗菌活性が強くなることも分かっている (Alvarez-Bravo et al., 1994; Manabe and Kawasaki, 2017)。このように、昆虫由来の抗菌ペプチドは抗菌薬やアジュバントなど、医薬資源のリード化合物として非常に有用であると考えている。本研究で用いたイエバエ *Musca domestica* はセンチニクバエと同じ双翅目に属しており、人間や家畜に対して感染の被害をもたらすような病原体を媒介する衛生害虫として知られている。イエバエがこのような病原体の多い環境下で生育できている

のは、抗菌ペプチド産生などの免疫システムが十分機能しているからと考えられる。そしてゲノム解析によって、イエバエにはセンチクバエで見られる抗菌ペプチドと相同な遺伝子が数多く見つかっている。本研究室では、傷刺激を行ったイエバエ幼虫から採取した体液に抗菌活性があることを明らかにしており (Kawasaki and Andoh, 2017), イエバエでも傷刺激によって抗菌ペプチドが産生されていることが示唆された。また、イエバエ幼虫で抗菌ペプチド遺伝子の発現が細菌感染により誘導されることも報告されている (Tang et al., 2014)。更に Sackton らの研究により、イエバエは双翅目に属している他のハエよりもゲノムにコードされている抗菌ペプチドの数が多く、それらが実際に発現していることも分かっている (Sackton et al., 2017)。他のハエよりも多くの抗菌ペプチドが発現しているということは、イエバエは医薬資源候補となり得る抗菌ペプチドの宝庫である可能性がある。

イエバエは抗菌ペプチドが豊富である可能性があったが、そもそもなぜイエバエでは多くの抗菌ペプチド遺伝子が発現しているのかは不明であった。これについて私は、イエバエでは抗菌ペプチドの主な合成器官である脂肪体以外の組織でも、抗菌ペプチド遺伝子が発現しているためではないかと考えた。しかし、組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現は、一つの組織に絞って解析されている場合が多い。そのため、抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンは組織ごとで同じような挙動を示すのか、そうでないのかは分からなかった。組織ごとでの抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンについて解析すれば、イエバエで抗菌ペプチド遺伝子が多く発現している理由が、更に詳しく分かる可能性がある。また、細菌感染による抗菌ペプチド遺伝子の発現解析では、特定の細菌を一種類だけ注入する方法がとられている。自然界において、このように細菌が一種類だけ昆虫に感染することは稀であり、実際には、昆虫の体に生じた傷から環境中の様々な細菌が侵入して感染が成立することが多いと思われる。組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンを正確に調べるためには、このように一種類の細菌ではなく、様々な細菌が侵入するような状況で調べるのが最も適していると考えた。そこで私は、自然界に近い条件で実験を行い、抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンを組

織ごとで比較することにした。また、センチクバエから単離されたザーペシン B とイエバエのディフェンシンは同じ高システイン含有ファミリーに属している抗菌ペプチドである。ザーペシン B の部分配列に抗菌活性があったので、イエバエのディフェンシンの部分配列でも抗菌活性が見られるか調べ、イエバエ由来の抗菌ペプチドが医薬資源のリード化合物として有用であるかを評価することにした。

2 実験材料と方法

2-1 実験材料

ジメチルスルホキシド及びウシ血清アルブミン (フラクション V)は Sigma-Aldrich 社製 (St. Louis, MO, USA)を使用した。抗菌ペプチドは株式会社東レリサーチセンター (東京, 日本)で合成した。C 末はすべてアミド化修飾した。すべての抗菌ペプチドは最初にジメチルスルホキシドで溶解してから実験に用いた。

2-2 イエバエ幼虫及び蛹の傷刺激と組織回収

2-2-1 傷付け処理

イエバエ 3 齢幼虫 (株式会社イーズ, 東京, 日本より分与)を 30G の注射針 (株式会社デントロニクス, 東京, 日本)で 1 回穿刺し, insect saline (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM CaCl₂)を入れたプラスチック容器に移して 30 °C で 20-24 時間飼育した (図 1A)。タイムコースを取る実験では傷を付けた幼虫を 30 °C で 2, 6 及び 24 時間飼育した。傷なしの幼虫も同じ条件で飼育した。

蛹は, 3 齢幼虫をガーゼと insect saline が入ったプラスチック容器に移し, 蛹になるまで 30 °C で飼育した (図 1B)。蛹化してから 20-24 時間が経過した蛹を 30G の注射針で 1 回穿刺し, プラスチック容器に移して 30 °C で 20-24 時間飼育した。傷なしの蛹も同様の条件で飼育した。

2-2-2 幼虫, 組織及び蛹の回収

飼育後, 全身での解析用の幼虫及び蛹はそのまま -80 °C に保存した。組織での解析用の幼虫は実体顕微鏡下で微細手術用メス, 解剖用ハサミ及びピンセットを用いて, insect saline 中で氷冷麻酔をかけた後に解剖し, 脂肪体, 唾液腺及び消化管を回収した。解剖は *Musca*

domestica larvae の解剖図 (Hewitt, 1908)を参考にして行った。また、消化管は口から肛門に至るまでの管として回収した。血球は、幼虫から回収した体液を 4 °C, 2,000 × g で遠心し沈殿したものを回収した。すべての組織は-80 °C で保存した。

2-3 RNA 抽出と cDNA 合成

幼虫の全身、脂肪体、血球、唾液腺、消化管及び蛹の全身から Nucleic Acid Purification Kit MagExtractor™ (東洋紡株式会社, 大阪, 日本)を用いて、添付のプロトコールに従って RNA を抽出した。抽出した RNA は DNase I (タカラバイオ株式会社, 草津, 日本)処理によりゲノム DNA を分解した。DNase I 処理後の RNA 溶液を PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社)を用いて、キットに添付のオリゴ dT プライマー及びランダムヘキサマーで逆転写を行い、1 本鎖 cDNA を合成した。

2-4 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は Lumino Ct SYBR Green qPCR Ready Mix (Sigma-Aldrich)に添付の試薬と混和し、Eco Real-time PCR system (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)を用いて PCR 反応及び SYBR Green の蛍光の検出を行った。プライマーは株式会社ファスマック (厚木, 日本)または株式会社ニッポンジーン (東京, 日本)で合成した。プライマーの配列は表 1 に示す。PCR 反応は、95 °C で 20 秒、増幅サイクルは 95 °C で 5 秒、アニーリング及び伸長反応は表 1 に示した時間を 45 サイクル行った。内部標準遺伝子として *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)*及び *ribosomal protein 18 (rps18)*の転写産物も同時に測定し、これらに対するそれぞれの遺伝子の相対発現量を算出した (Zhong et al., 2013)。予想長と矛盾しない長さの DNA が増幅されたかは、アガロースゲル電気泳動で確認した。

2-5 ドロップレットデジタル PCR (Droplet digital PCR ;ddPCR)

ddPCR は QX100 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて行った。1×ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad), 900 nM プライマー, 250 nM 加水分解プローブ及び cDNA サンプルを混和し (total 20 µl), DG8 カートリッジに 70 µl の droplet generator oil (Bio-Rad Laboratories)と共に添加した。カートリッジを QX100™ droplet generator (Bio-Rad)にセットし, ドロップレットを作製した。作製したドロップレットは 96 well の PCR プレート (Eppendorf, Hamburg, Germany)に移した。PCR 反応は C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad)を用いて行った。反応後は PCR プレートを QX100™ droplet reader (Bio-Rad Laboratories)にセットし, QuantaSoft analysis software (Bio-Rad)で定量した。PCR のプライマーと加水分解プローブは表 2 に示す。デザインと合成はタカラバイオ株式会社に委託した。

2-6 リアルタイム PCR 及び ddPCR 用プライマーの設計

イエバエの抗菌ペプチド遺伝子 (既知も予測も含む)を National center for biotechnology information (NCBI)のイエバエゲノムデータベースから探し, その配列を取得してプライマーを設計した。その際, 予測された遺伝子を含んでいるため, ショウジョウバエやセンチニクバエで見ついている抗菌ペプチドのアミノ酸配列と比較して, 配列の類似性を確認した。多重アライメントは Clustal Omega で解析し, 編集は Jalview ソフトウェアで行った (Sievers et al., 2011; Waterhouse et al., 2009)。一方で, 組織マーカー遺伝子についてはイエバエでほとんど知られていなかったため, ショウジョウバエで発現していることが分かっている組織マーカー遺伝子の配列を参考にして検索した。検索は NCBI の Protein basic local alignment search tool (BlastP)を用いて行った。各遺伝子のプライマーのデザインの詳細については以下に説明する。

2-6-1 ディフェンシン

ディフェンシンは高システイン含有ファミリーに属しており, そのアミノ酸配列には 6 つ

のシステインを含有する成熟ペプチドが存在している (図 2)。また、ショウジョウバエのディフェンシンには切断部位である Lys-Arg が存在し、ここで切断されることで成熟ペプチドになることが分かっている (Dimarcq et al., 1994; Douglass et al., 1984; Matsuyama and Natori et al., 1988)。NCBI で登録されているイエバエのディフェンシンのうち、今回調べたのは LOC101887540, LOC101887709, LOC101887872, LOC101888225, LOC105261620 及び LOC105261775 である。このうち、LOC101887540, LOC101887709 及び LOC101887872 の 3 つのアミノ酸配列には、切断部位である Lys-Arg 及び成熟ペプチドには 6 つのシステインが存在している。また、これら 3 つのアミノ酸配列とショウジョウバエのディフェンシンのアミノ酸配列の相同性が非常に高く、3 つの遺伝子の塩基配列も非常によく似ていた。従って、これら 3 つの遺伝子をまとめて *defensin* とし、3 つすべてが増幅されるようにプライマーをデザインした。残りの LOC101888225, LOC105261620 及び LOC105261775 についてアミノ酸配列を比較してみると、切断部位が存在していなかった。しかし、成熟ペプチドには 6 つのシステインが存在していることからディフェンシンの特徴を有していると判断し、ショウジョウバエのディフェンシンと相同性が高い順に LOC101888225 を *defensin-like 1*, LOC105261620 を *defensin-like 2*, LOC105261775 を *defensin-like 3* とした。しかし、*defensin-like 1* と *defensin-like 2* は、それぞれの塩基配列が非常に似ていたため、遺伝子の発現を解析する際はこれら 2 つがまとめて増幅されるようにプライマーをデザインした。

2-6-2 アタシン

アタシンは高グリシン含有ファミリーに属しており、そのアミノ酸配列にはシグナルペプチド及びグリシンを多く含有するグリシンリッチドメインが存在している (図 3) (Hojland et al., 2014; Sackton et al., 2017)。このグリシンリッチドメインは 2 つ存在し、グリシンリッチドメイン 1, グリシンリッチドメイン 2 となっているのが特徴である。NCBI のデータベースに登録されているイエバエのアタシンのうち、今回調べたのは LOC101889508

及び LOC101887777 である。ウェブベースのプログラムである SignalP でシグナルペプチドの位置を予測したところ、ショウジョウバエのアタシン及びイエバエの LOC101889508 にはシグナルペプチドが存在しているが、LOC101887777 には存在していないことが分かった (Hedengren et al., 2000)。一方で、2 つのグリシンリッチドメインは LOC101889508 及び LOC101887777 の両方で存在していた。従って、シグナルペプチド及びグリシンリッチドメインの両方を有している LOC101889508 を *attacin*, グリシンリッチドメインのみ有している LOC101887777 を *attacin-like* とした。

2-6-3 ディプテリシン

ディプテリシンもグリシンを多く含有するグリシンリッチドメインが存在しているため、高グリシン含有ファミリーに分類される。グリシンリッチドメインの他に、プロリンを多く含有するプロリンリッチドメインという短いドメインが存在している (図 4) (Wicker et al., 1990)。また、ショウジョウバエのディプテリシンを見ると分かる通り、グリシンリッチドメインには 5 つのグリシンが並んだ特徴的なペンタグリシン構造が存在している。NCBI で登録されているイエバエのディプテリシンのうち、今回調べたのは LOC101896897 及び LOC101897067 である。これら 2 つの遺伝子には、ショウジョウバエのディプテリシンのグリシンリッチドメインに存在しているようなペンタグリシン構造が存在していなかった。しかし、プロリンリッチドメイン及びグリシンリッチドメインが存在することから、ディプテリシンの特徴を有していると判断した。また、LOC101896897 及び LOC101897067 は塩基配列が非常によく似ていたため、2 つがまとめて増幅されるようにプライマーをデザインし、これらをまとめて *diptericin* とした。一方で、LOC101888779 は Sackton らが、その塩基配列の特徴からディプテリシンであると予想した遺伝子である (Sackton et al., 2017)。よって、NCBI のデータベースにはディプテリシンとは登録されていない。実際に、LOC101888779 のアミノ酸配列にはプロリンリッチドメイン及びグリシンリッチドメインが存在していな

かった。よって、LOC101888779 はディプテリシンでない可能性があったが、ディプテリシンではない他のタイプの抗菌ペプチドである可能性があったため、これについても傷刺激によって誘導されるのかを調べることにした。

2-6-4 ザルコトキシシン II

ザルコトキシシン II のアミノ酸配列にはプロリンリッチドメインとグリシンリッチドメインの2つが存在している (図 5)。グリシンリッチドメインは2つ存在し、グリシンリッチドメイン 1 及びグリシンリッチドメイン 2 となっているのが特徴である (Hedengren et al., 2000; Kimbrell, 1991; Wicker et al., 1990)。2つのグリシンリッチドメインはアタシンに特徴的な構造であり、それと似たドメインを持っていることからザルコトキシシン II はアタシン様遺伝子と呼ばれる。従って、ザルコトキシシン II は高グリシン含有ファミリーに属していることになる。NCBI のデータベースに登録されているイエバエのザルコトキシシン II のうち、今回調べたのは LOC101893190, LOC101893350, LOC101893688 及び LOC101893852 の4つである。これら4つのアミノ酸配列にはプロリンリッチドメイン及び2つのグリシンリッチドメインが存在していた。また、4つの遺伝子の塩基配列が非常によく似ていたため、4つすべてが増幅されるようにプライマーをデザインし、これらをまとめて *sarcotoxin II* とした。

2-6-5 ザルコトキシシン I-B

ザルコトキシシン I-B のアミノ酸配列には親水性ドメイン及び疎水性ドメインが存在している (図 6) (Okada and Natori, 1985)。親水性ドメインには電荷を有する9つのアミノ酸が存在しており、そのうち7つのアミノ酸が塩基性であることが特徴である。また、ザルコトキシシン I には α -ヘリックス構造をとる2つの領域が存在し、このことからザルコトキシシン I-B は α -ヘリックスファミリーに属していると言える。NCBI のデータベースに登録されてい

るイエバエのザルコトキシン I-B のうち、今回調べたのは LOC101901352 及び LOC101889632 である。2つのアミノ酸配列には親水性ドメイン及び疎水性ドメインが存在しており、親水性ドメインには電荷を持つ9つのアミノ酸が含まれている。この9つのアミノ酸のうちの7つは塩基性アミノ酸であるという特徴も保存されていた。更に、センチクバエのザルコトキシン I-B とともに非常に相同性が高く、 α -ヘリックス構造をとる領域も保存されていた。また、これら2つの塩基配列が非常に似ていることから、これらをまとめて *sarcotoxin I-B* とし、2つの遺伝子がまとめて増幅されるようにプライマーをデザインした。

2-6-6 組織マーカー

ショウジョウバエ幼虫において、*salivary gland-expressed bHLH (sage)*, *cytochrome P450 4aa1 (cyp4aa1)*, *larvae serum protein 2 (lsp2)* 及び *eater* はそれぞれ唾液腺、消化管、脂肪体及び血球で特異的に発現していることが報告されている (Li and White., 2003; Chung et al., 2009; Deutsch et al., 1989; Kocks et al., 2005)。これらと相同な遺伝子がイエバエでも存在しているか BlastP を用いて検索すると、唾液腺、消化管、脂肪体及び血球ではそれぞれ LOC101900398, LOC101895233, LOC101892543 及び LOC101896200 が該当することが分かった。イエバエで見つかったこれらの遺伝子と、ショウジョウバエの *sage*, *cyp4aa1*, *lsp2* 及び *eater* のアミノ酸配列のアライメントをとると、その一致率は *sage* が 43%, *cyp4aa1* が 69%, *lsp2* が 59%, *eater* が 44% であった。従って、これらの遺伝子が増幅されるようにプライマーをデザインした。

2-7 細菌の培養

大腸菌 *Escherichia coli* W3110 (NBRC12713) は 37 °C, 好気性条件下, Luria-Bertani (LB) 液体培地 (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) で培養し, これを前培養液とした。すべての実験は対数増殖期の細菌を用いて行った。

2-8 最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration ;MIC)の決定

前培養液を LB 液体培地で洗浄し、再懸濁後、OD₆₀₀ が 0.016 になるように調製した。ペプチド溶液は、130 mM NaCl, 0.2 % ウシ血清アルブミン及び 2 % のジメチルスルホキシドを含む 10 mM リン酸バッファー (pH 6.0) で調製した。調製したペプチド溶液 (100 µl) と細菌懸濁液 (100 µl) を 96 well プレートに添加し、37 °C で一晩培養後に細菌の発育を目視で判定した (Andrews, 2001)。

2-9 コロニーアッセイ (Colony formation unit ;CFU)

MIC 決定時と同様の方法で細菌を培養、調製した。また、ペプチドも同様の方法で調製した。調製したペプチド溶液 (500 µl) と細菌懸濁液 (500 µl) を混和し、37 °C で 1 時間培養した。培養後、ペプチド/細菌懸濁液を希釈し、LB プレートに 100 µl ずつ播種した。37 °C で一晩培養後、3 枚のプレートに生えたコロニー数の平均から、ペプチド/細菌懸濁液中の CFU を算出した。

2-10 統計処理

統計処理は statcel3 (有限会社オーエムエス出版, 東京, 日本) を用いて一元配置分散分析及びシェッフェの多重比較検定またはウェルチの t 検定を行い, P<0.05 で有意な差があると判断した。

3 結果

3-1 傷刺激により幼虫及び蛹での抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導される

まず傷刺激によって幼虫の体全体で抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られるかを、*defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* の発現を指標にして調べることにした。その結果、イエバエ幼虫において、傷なしの幼虫よりも傷刺激をした幼虫の方が *defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* の発現レベルが 24~300 倍高かった (図 7_Trial 1)。従って、傷刺激により 4 つの抗菌ペプチド遺伝子の発現が顕著に誘導されることが分かった。また、別の日に回収した幼虫で解析を行っても、同様の結果が得られた (図 7_Trial 2)。更に、これが幼虫の時期に特別に見られる現象かを調べるために、蛹でも同様の実験を行った。すると、傷なしの蛹では抗菌ペプチド遺伝子の発現は殆ど見られなかったが、傷刺激をした蛹では傷なしと比べて 68~2600 倍の抗菌ペプチド遺伝子の発現が見られた (図 8_Trial 1)。よって、傷刺激による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導は、幼虫の時期だけでなく蛹の時期でも見られることが分かった。これについても幼虫と同様に、別の日に回収した蛹で解析を行ったところ、同様の結果が得られた (図 8_Trial 2)。

3-2 傷刺激により幼虫組織特異的な抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導される

昆虫において細菌感染や傷害が起こった場合、抗菌ペプチドは主に脂肪体で産生されることが知られている (Boman et al., 1991; Hoffmann et al., 1993)。そこで、イエバエ幼虫で見られた抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が脂肪体で見られるかを調べた。その際、刺激してから何時間で誘導されるかを調べるため、刺激後 2, 6 及び 24 時間経過した脂肪体を回収し抗菌ペプチド遺伝子の発現解析を行った。その結果、刺激後 0 時間の幼虫から回収した脂肪体では、*defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* の発現は殆ど見られなかった (図 9_Trial 1)。一方で、傷刺激をした幼虫から回収した脂肪体では、4 つの抗菌ペプチド遺伝子の発現

が顕著に誘導されていた。最も抗菌ペプチド遺伝子が誘導されていたのは傷刺激してから 6 時間後に回収した脂肪体で、24 時間後には減少する傾向にあった。また、別の日に同じ時間刺激した幼虫から回収した脂肪体でも調べたところ、傷刺激してから 6 時間後に最も発現が誘導されることは再現されたが、24 時間後の発現は 0 時間と殆ど変らなかった (図 9_Trial 2)。バッチ間で発現の程度に若干違いがあるものの、傷刺激後 24 時間でも 0 時間と比較して顕著な差が見られていること、幼虫全身での解析でも刺激後 24 時間で十分な差が見られていたことから、以降の実験は傷刺激後 24 時間経ったものを用いることにした。

組織別の抗菌ペプチド遺伝子の発現を比較するにあたり、各組織が正しく採取できているかを確認するために、組織マーカー遺伝子の発現を解析した。その結果、*sage*, *cyp4a1*, *lsp2* 及び *eater* はそれぞれ唾液腺, 消化管, 脂肪体及び血球で特異的に発現していた (図 10)。従って、各組織を問題なく採取できていると判断した。

幼虫で発現を確認したのは *defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* だが、この 4 つでは昆虫で主に分類されている抗菌ペプチドファミリーの全てを網羅したことはない。そこで、高プロリン含有ファミリーに属している抗菌ペプチドは特殊なものが多いため今回は除外し、 α -ヘリックスファミリーに属している *sarcotoxin I-B* を新たに発現解析する抗菌ペプチド遺伝子に追加した。また、先述した通り、イエバエではゲノム上にコードされている抗菌ペプチド遺伝子が他のハエよりも多い。従って同じタイプの抗菌ペプチドをコードする遺伝子も多く、例えば、ショウジョウバエではディフェンシンをコードしている遺伝子が 2 つであるのに対し、イエバエでは 5 つ存在しているなどが挙げられる。そこで、ゲノムデータベースとアライメント解析により明らかになった *defensin-like 1*, *defensin-like 2* 及び *defensin-like 3*, *attacin-like*, *diptericin* と予想される *LOC101888779* を新たに追加して発現解析を行った。また、この実験についても、別の日に回収した組織を用いて解析を行い、Trial 1 及び Trial 2 とした。その結果、*defensin* は Trial 1 及び Trial 2 のどちらも脂肪体及び血球で傷刺激による発現誘導が見られたが、Trial 2 では唾液腺でも発現が誘導されていた

(図 11A)。更に Trial 1 及び Trial 2 共に、傷刺激で最も発現誘導が見られたのは血球で、傷なしの血球でも他の傷なしの組織より *defensin* が発現していた。一方で、*defensin-like 1/defensin-like 2* 及び *defensin-like 3* は血球でのみ傷刺激による発現誘導が見られ、*defensin-like 1/defensin-like 2* は傷刺激がなくても他の傷なしの組織より発現していた (図 11B, C)。この結果は Trial 2 でも同様であった。*Attacin* は Trial 1 及び Trial 2 共に脂肪体及び血球で傷刺激による発現が見られたが、Trial 2 では唾液腺でもわずかに発現が誘導されていた (図 11D)。傷刺激による発現誘導は脂肪体が最も高かった。一方で、*attacin-like* は血球でしか傷刺激による発現誘導が見られなかった (図 11E)。*Diptericin* は脂肪体及び血球で傷刺激による発現誘導が見られ、誘導の程度は脂肪体及び血球でほぼ同じだった (図 11F)。しかし、Sackton らが塩基配列から *diptericin* であると予測した *LOC101888779* は、脂肪体での発現が最も高かったが、傷なしと傷ありで発現の程度に差はなかった (図 11G)。Trial 2 でも、脂肪体及び血球で傷刺激による誘導がわずかに見られたものの、傷なしと傷ありの誘導の差は他の抗菌ペプチドよりも小さかった。従って、*LOC101888779* は傷刺激誘導性の抗菌ペプチド遺伝子ではないことが示唆された。*Sarcotoxin II* は Trial 1 では脂肪体でのみ傷刺激による発現誘導が見られたが、Trial 2 では唾液腺でも傷刺激によって発現が誘導されていた (図 11H)。*Sarcotoxin I-B* は唾液腺、脂肪体及び血球で傷刺激による発現誘導が見られた (図 11I)。また Trial 1 及び Trial 2 共に、傷刺激を行った幼虫の血球での発現が最も高かった。各組織での抗菌ペプチドの発現についてまとめたものを表 3 に示す。以上の結果より、今回調べた組織のうち、主に傷刺激誘導性の抗菌ペプチドの発現が見られたのは唾液腺、脂肪体及び血球であることが分かった。しかしその発現パターンは組織によって異なることから、これらの抗菌ペプチド遺伝子の発現は複雑な制御を受けていることが示唆された。

3-3 defensin 関連ペプチドの合成部分ペプチドは大腸菌に対して抗菌活性を示す

センチクバエから発見されたザーペシン B はイエバエのディフェンシンと同じファミ

リーに属している抗菌ペプチドである。その合成部分ペプチド RSLCLLHCRLK-NH₂ は黄色ブドウ球菌、大腸菌及びカンジダに対して抗菌活性を示すことが知られている (Yamada and Natori, 1994)。イエバエのディフェンシン及びディフェンシン関連ペプチドはザーペシン B と類似のアミノ酸配列を持っていることから、RSLCLLHCRLK-NH₂ のような抗菌活性を有する部分配列があるのではないかと考えた。そこでザーペシン B とイエバエのディフェンシン及びディフェンシン関連ペプチドのアミノ酸配列をアライメント比較し、RSLCLLHCRLK-NH₂ に相当する部分を選んだ。その際、RSLCLLHCRLK-NH₂ の両端が塩基性アミノ酸であることから、イエバエのディフェンシンでも両端が塩基性アミノ酸になるような配列を選択した。また、細菌の細胞膜を貫通できるように、ある程度の長さを持たせた上で合成部分ペプチドを設計した。合成部分ペプチドの配列は表 4 に示す。まず、これらの合成部分ペプチドの大腸菌に対する MIC を調べたところ、ポジティブコントロールとした sapecin B 由来の合成部分ペプチド RSLCLLHCRLK-NH₂ は 150 µg/ml であった (表 4)。一方で、イエバエのディフェンシン及びディフェンシン関連ペプチド由来の合成部分ペプチドでは、defensin-like 3 由来の合成部分ペプチド KVSCQAHCLLLKKR-NH₂ で MIC が 300 µg/ml となった。しかし、defensin, defensin-like 1 及び defensin-like 2 では抗菌活性は見られなかった。更に、これらの合成部分ペプチドの抗菌活性をコロニーアッセイで調べたところ、MIC を決定した時と同様に defensin-like 3 由来の合成部分ペプチド KVSCQAHCLLLKKR-NH₂ では濃度依存的に生菌数が減少した (図 12)。一方で、defensin, defensin-like 1 及び defensin-like 2 では生菌数の減少は見られなかった。従って、defensin-like 3 由来の合成部分ペプチドは大腸菌に対して抗菌活性を示すことが分かった。

4 考察

本研究では、なぜイエバエの免疫システムが発達しているのかを、抗菌ペプチド遺伝子の組織別での発現及び抗菌活性を指標にして調べた。傷刺激によって、イエバエ幼虫で抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られた。この結果は、イエバエ幼虫に細菌を注入した際に、抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されるという Tang らの報告とも一致する (Tang et al., 2014)。また、傷刺激による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導は、蛹の状態でも観察された。ショウジョウバエの蛹に細菌を注入すると、抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されることが報告されており (Samakovils et al., 1990)、幼虫から成虫への体の作り変えが起こっている蛹でも免疫システムが保存されていると考えられる。イエバエでも同様の現象が見られたことから、イエバエの蛹にも免疫システムが保存されていることが示唆された。一方で、ショウジョウバエやセンチクバエでは細菌を注入していない蛹でも抗菌ペプチド遺伝子の発現が見られていたが (Matsuyama and Natori, 1988; Dimarcq et al., 1994)、今回の傷刺激を与えていないイエバエの蛹では抗菌ペプチド遺伝子の発現は見られなかった。

昆虫において、傷害や細菌感染によって誘導される抗菌ペプチドは主に脂肪体で合成され、体液中に分泌される (Boman et al., 1991; Hoffmann et al., 1993)。しかし、実際に傷刺激をした幼虫から採取した組織で抗菌ペプチド遺伝子の発現を解析したところ、全ての抗菌ペプチドが脂肪体で最も誘導されるわけではないことが分かった。特に、*defensin-like 1/defensin-like 2*、*defensin-like 3* 及び *attacin-like* は血球でのみ発現が見られた。この結果は、*Phormia terranova* の血球において、細菌感染により *defensin* 及び *diptericin* が発現していたという結果とも一致している (Dimarcq et al., 1990)。昆虫の免疫システムにおいて血球は主に、体内に侵入した細菌の貪食や包囲化に関与することが知られており (Tsakas and Marmaras et al., 2010)、抗菌ペプチドの産生に関与しているという知見はこれまであまりされてこなかった。Yakovlev らは、*Calliphora vicina* の幼虫の血球で抗菌ペプチドが合成され

るかについて *in vitro* で調べており、その結果、脂肪体ほどではないが血球でも抗菌ペプチドの合成及び体液への分泌が行われていることを明らかにしている (Yakovlev et al., 2016)。今回の結果及び Yakovlev らの報告から、昆虫の免疫システムにおいて血球は細菌の貪食や包囲化だけでなく、抗菌ペプチドの合成及び分泌の役割も担っていることが新たに示唆された。昆虫において、血球は常に体液中を循環しており、傷害が生じた際にはそこに集積する性質も持っているため、他の組織よりも細菌に遭遇する可能性が高い。傷なしの血球でもある程度 *defensin* が発現していたこと、更に様々な種類の抗菌ペプチドの発現が見られたことは、侵入してきた細菌を直ぐに除去できるようにするためであることが考えられた。

今回の実験で、傷刺激により唾液腺でも抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られることが分かった。しかし、誘導される抗菌ペプチドの種類はバッチ間で異なり、*sarcotoxin I-B* については再現が得られたものの、*defensin*, *attacin*, *sarcotoxin II* に関しては再現が得られなかった。幼虫及び蛹でも、バッチ間で抗菌ペプチド遺伝子の発現の程度に違いがあったことから、組織別での発現がバッチ間で異なるのは十分有り得ると考えられる。しかし、唾液腺での抗菌ペプチド遺伝子の発現については、今後更なる解析が必要である。唾液腺で抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られたことについて、これは脂肪体や血球からの二次的なシグナルによって誘導されたものか、それとは独立して誘導されたものかが分からない。唾液腺自体に抗菌ペプチドの発現を制御する免疫システムが存在していることは、Ferrandon らがショウジョウバエを用いた実験で示している (Ferrandon et al., 1998)。著者らは、感染を伴う傷害によって脂肪体で抗菌ペプチドが合成され、体液中に分泌されることを全身的な免疫応答と呼んでいる。この反応は体表が傷害されることで体液を介して起こるが、体液を介さずに起こる反応は局所的な免疫応答と呼び、ショウジョウバエの幼虫を細菌培養液につけるだけで誘導される。実際に著者らは、細菌培養液につけて培養したショウジョウバエの幼虫の唾液腺において、抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されることを示している。よって、イエバエ幼虫の唾液腺にも独立した免疫システムが存在している可能性があるが、今回私

は傷刺激を行った幼虫で抗菌ペプチド遺伝子の発現を調べているため、全身的な免疫応答が起こっていると考えられる。また、注射針で傷をつけた際、直接刺激が入っているのは脂肪体で、唾液腺ではないと思われる。唾液腺を直接刺激していないにも関わらず、抗菌ペプチド遺伝子の発現が見られたことから、脂肪体に入った刺激が体液を介して唾液腺に伝わり、その結果、二次的に唾液腺での抗菌ペプチド遺伝子の発現を誘導したことが考えられた。

一方、今回の実験ではイエバエ幼虫の消化管での抗菌ペプチド遺伝子の発現は見られなかった。Muraらは、*Brevibacillus laterosporus* を混ぜたエサを与えたイエバエ幼虫の、消化管での抗菌ペプチド遺伝子の発現について調べており、その結果、いくつかの抗菌ペプチド遺伝子の発現が *Brevibacillus laterosporus* を混ぜていないエサを与えた幼虫の消化管と比較して有意に上昇していることを報告している (Mura and Ruiu, 2017)。また、サシガメの一種 *Rhodnius prolixus* やサシバエの一種 *Stomoxys calcitrans* では、細菌感染により消化管での抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されることが報告されている (Vieira et al., 2014; Lehane et al., 1997)。今回の実験でこのような結果にならなかったのには、腸内細菌が関係している可能性がある。ショウジョウバエの消化管において、腸内細菌は幼虫の生育及び免疫システムに非常に重要であるとされている (Kuraisi et al., 2013)。一方で、ショウジョウバエの消化管は病原性を持つ細菌が侵入してきた場合、抗菌ペプチドや活性酸素を産生し、それらを除去しようとする。しかし、無害な腸内細菌と病原菌をどうやって区別して除去しているのか、その機構は未だに不明である。このことから、イエバエ幼虫の消化管にも幼虫の生育や免疫システムに重要な腸内細菌が存在している可能性がある。そして、今回の実験では傷刺激しか行っていないため、幼虫の消化管に侵入する細菌は直接細菌を注入したときよりも少ないと思われる。少量であれば病原菌であったとしても、免疫に関与している腸内細菌により排除され、更に、腸内細菌の方が幼虫にとって重要であることから、少ない菌量に対しては抗菌ペプチド遺伝子の発現に関わるシグナル経路は働かないのかもしれない。従って、今回のような傷刺激だけでは消化管での抗菌ペプチド遺伝子の発現は見られなかったと考えられ

る。

以上のことから、イエバエ幼虫では傷刺激によって様々な組織で抗菌ペプチドが発現することが明らかになった。マゴットセラピーで用いられているヒロズキンバエ *Lucilia sericata* の幼虫でも、組織によって発現している抗菌ペプチドの種類やパターンが異なっていることが報告されている (Cerovsky et al., 2010; Poppel et al., 2015)。昆虫の抗菌ペプチド混合物は単体の抗菌ペプチドよりも、細菌の耐性化を防ぐ働きがあるとされている (Chernysh et al., 2015)。よって、イエバエ幼虫でも様々な組織で抗菌ペプチドを発現させることにより、自身を細菌感染などから保護していると考えられる。更に、イエバエで発現している *defensin* は Sackton らの論文では 5 つ、NCBI のデータベースでは 8 つ存在しているとされている (Sackton et al., 2017)。今回私が組織別で調べたのは *defensin*, *defensin-like 1/defensin-like 2* 及び *defensin-like 3* の 3 つとなっているが、これはそれぞれの配列が非常によく似ており、似ている配列を持つ *defensin* 及び *defensin* 関連遺伝子はまとめて増幅されるようにプライマーをデザインしたためである。実際に、これらの遺伝子のプライマーを区別して設計できていれば、今回の実験で合計 6 つの *defensin* 及び *defensin* 関連遺伝子の発現を見られていたかもしれない。いずれにせよ、*defensin* をはじめとして、イエバエで発現している抗菌ペプチド遺伝子の数は他のハエよりも多いことから、これがイエバエの免疫システムをより強化している理由であると考えられる。

加えて、イエバエ幼虫での抗菌ペプチドの発現は複雑な制御を受けていることが示唆された。一般に昆虫では、抗菌ペプチドの発現に関わる経路は主に 2 つ知られており、グラム陽性菌または真菌によって活性化される Toll 経路と、グラム陰性菌によって活性化される immune deficiency (Imd) 経路がある。Toll 経路が活性化すると最終的に、ディフェンシンやアタシンまたは真菌に対して抗菌活性を示すドロソマイシンが合成され、Imd 経路が活性化するとディプテリシンなどが合成される。更に Toll 経路と Imd 経路はクロストークしており、Imd 経路が活性化されてもディフェンシンやアタシンが誘導されることから、Toll 経路

と *Imd* 経路は互いに相乗的にはたらいっている可能性もある。脂肪体では *Toll* 経路及び *Imd* 経路の両方が存在していることが分かっているが (Tsakas and Marmaras, 2010), その他の組織で存在しているか詳しいことは明らかにされていない。Tzou らは, ショウジョウバエにおいて, 脂肪体と唾液腺では, 抗菌ペプチド遺伝子の発現制御に関わる受容体が異なること, 更に唾液腺では主に *Imd* 経路の活性化が重要であることを示している (Tzou et al., 2000)。従って, 血球や唾液腺では脂肪体で見られるような *Toll* 経路及び *Imd* 経路とは異なる経路によって, 抗菌ペプチドの発現が制御されている可能性がある。これについては, 例えば既にショウジョウバエで同定されている *Toll* や *Imd* 遺伝子のアミノ酸配列を参考にして, イエバエでもこのような遺伝子が存在しているかを調べ, 傷刺激を行ったときに各組織でこれらの遺伝子が発現しているかをリアルタイム PCR で調べるなど, 今後更なる解析が必要であると言える。

イエバエ幼虫の血球で最も発現が高かった defensin-like 3 由来の合成部分ペプチドである KVSCQAHCLLLKKR-NH₂ が大腸菌に対して抗菌活性を示すことが分かった。同じディフェンシンファミリーに属しているセンチクバエ由来の抗菌ペプチド sapecin B でも, 合成部分ペプチドには抗菌活性があることが既に示されている。従って, イエバエ由来の defensin-like 3 でも抗菌活性を示す部分配列が存在していることが分かった。しかし, defensin, defensin-like 1 及び defensin-like 2 の合成部分ペプチドには抗菌活性が見られなかった。これは, 必ずしもこれらのディフェンシン関連ペプチドに抗菌活性がないことを示すわけではなく, 合成した部分ペプチドの配列の問題であることが考えられた。活性が見られなかったディフェンシン関連ペプチドについては, 合成する部分ペプチドの長さを変えたり, 細菌を変えたりして抗菌活性を調べてみたが, 結果は変わらなかった。また, 長さを変えた場合には溶媒に溶けないなどの物理的な問題も生じてしまい, 正確な抗菌活性の評価はできなかった。よって, 合成部分ペプチドの抗菌活性については更に検討が必要であると言える。今回の結果より, 活性のあった defensin-like 3 由来の合成部分ペプチド KVSCQAHCLLLKKR-

NH₂が大腸菌に対してどのように抗菌活性を示しているか詳しいことは分からないものの、この合成部分ペプチドが新たな医薬資源になり得ることが示唆された。

昆虫由来抗菌ペプチドは単体で用いるよりも、混合物にして使用する方が細菌の耐性化が生じにくく、より有用性が上がると考えられている。そのためには、抗菌ペプチドを合成する際の配合比が重要となってくるが、どのような配合比にすればいいかなど、不明な点が多かった。本研究により、イエバエでの抗菌ペプチドの発現パターンは組織ごとで全く異なること、更に、発現の程度にも違いがあることが分かった。この違いがイエバエの免疫システムをより強化していることを考えると、イエバエの抗菌ペプチドの発現パターンは抗菌ペプチドの配合比を考える上で参考になると考えられる。従って、イエバエの免疫システムの研究によって、昆虫由来の抗菌ペプチドが医薬資源として有用であるということだけでなく、抗菌ペプチドを配合する際にも役に立つことが新たに示唆された。そしてこの研究は、医薬資源としての昆虫由来抗菌ペプチドの可能性を、より確かなものとするきっかけになると考えている。

5 謝辞

本論文は英文学術誌に私が筆頭著名として発表した論文を基に作成したものです (Andoh et al., 2018)。研究活動を通して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました同志社女子大学大学院微生物薬品化学研究室 川崎清史教授に深甚なる感謝の意を表します。川崎教授には、筆者の同志社女子大学在学中より、微生物学および免疫感染症学に関して、親切な御指導と暖かいご支援をいただきました。また、学術論文や学位論文の執筆の際には、ご多忙にも関わらず、御配慮を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

学位論文審査において、終始有益なる御助言と御校閲を賜りました同志社女子大学大学院病態生理学研究室 漆谷徹郎特任教授、ならびに創薬有機化学研究室 山本康友准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数々の有益なる御指導ならびに御助言を賜りました微生物薬品化学研究室 上野貴之特任助教に深く感謝の意を表します。

本研究における実験の実施にあたり、微生物薬品化学研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

6 参考文献

- Alvarez-Bravo, J., Kurata, S., Natori, S., 1994. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 302 (Pt 2), 535-538.
- Andersson, D.I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J.Z., 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat* 26, 43-57.
- Andoh, M., Ueno, T., Kawasaki, K., 2018. Tissue-dependent induction of antimicrobial peptide genes after body wall injury in house fly (*Musca domestica*) larvae. *Drug Discov Ther* 12, 355-362.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1, 5-16.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 55, 207-225.
- Boman, H.G., Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y., Lidholm, D.A., 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem* 201, 23-31.
- Cerovsky, V., Zdarek, J., Fucik, V., Monincova, L., Voburka, Z., Bem, R., 2010. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci* 67, 455-466.
- Chernysh, S., Gordya, N., Suborova, T., 2015. Insect Antimicrobial Peptide Complexes Prevent Resistance Development in Bacteria. *PLoS One* 10, e0130788.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P., Daborn, P.J., 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proc Natl Acad Sci U*

S A 106, 5731-5736.

- Deutsch, J., Laval, M., Lepesant, J.A., Maschat, F., Pourrain, F., Rat, L., 1989. Larval fat body-specific gene expression in *D. melanogaster*. *Dev Genet* 10, 220-231.
- Dimarcq, J.L., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hoffmann, D., Reichhart, J.M., 1990. Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in *Phormia terranova*. *EMBO J* 9, 2507-15.
- Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1994. Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur J Biochem* 221, 201-209.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., Kafatos, F.C., 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J* 17, 6115-23.
- Douglass, J., Civelli, O., Herbert, E., 1984. Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu Rev Biochem* 53, 665-715.
- Feighner, S.D., Dashkevich, M.P., 1987. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Appl Environ Microbiol* 53, 331-336.
- Ferrandon, D., Jung, A.C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J., Hoffmann, J.A., 1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J* 17, 1217-27.
- Fritz, J.H., Brunner, S., Birnstiel, M.L., Buschle, M., Gabain, A., Mattner, F., Zauner, W., 2004. The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. *Vaccine* 22, 3274-3284.

- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D., Royet, J., 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416, 640-644.
- Gunn, J.S., Lim, K.B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., Miller, S.I., 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* 27, 1171-1182.
- Hedengren, M., Borge, K., Hultmark, D., 2000. Expression and evolution of the *Drosophila* attacin/diptericin gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 574-581.
- Hewitt, C.G., 1908. *Memoirs: The Structure, Development, and Bionomics of the House-fly, Musca domestica*, Linn. *Quarterly Journal of Microscopical Science* s2-52, 495-545.
- Hoffmann, J.A., Hetru, C., 1992. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol Today* 13, 411-415.
- Hoffmann, J.A., Hetru, C., Reichhart, J.M., 1993. The humoral antibacterial response of *Drosophila*. *FEBS Lett* 325, 63-66.
- Hojland, D.H., Jensen, K.M., Kristensen, M., 2014. Adaptation of *Musca domestica* L. field population to laboratory breeding causes transcriptional alterations. *PLoS One* 9, e85965.
- Holak, T.A., Engström, A., Kraulis, P.J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T.A., Gronenborn A.M., Clore, G.M., 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27, 7620-7629.
- Huang, H.W., 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 1292-1302.
- Iwai, H., Nakajima, Y., Natori, S., Arata, Y., Shimada, I., 1993. Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by ¹H-NMR. *Eur J Biochem* 217, 639-

644.

- Kawasaki, K., Andoh, M., 2017. Properties of induced antimicrobial activity in *Musca domestica* larvae. *Drug Discov Ther* 11, 156-160.
- Kawasaki, K., China, K., Nishijima, M., 2007. Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 189, 4911-4919.
- Kimbrell, D.A., 1991. Insect antibacterial proteins: not just for insects and against bacteria. *Bioessays* 13, 657-663.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., Ferrandon, D., Rämét, M., Ezekowitz, R.A., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335-46.
- Koczulla, A.R., Bals, R., 2003. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 63, 389-406.
- Kuraishi, T., Hori, A., Kurata, S., 2013. Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front Physiol* 4, 375-387.
- Lehane, M.J., Wu, D., Lehane, S.M., 1997. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11502-11507.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Li, T.R., White, K.P., 2003. Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, 59-72.

- Manabe, T., Kawasaki, K., 2017. D-form KLKLLLLLKLK-NH₂ peptide exerts higher antimicrobial properties than its L-form counterpart via an association with bacterial cell wall components. *Sci Rep* 7, 43384.
- Matsuyama, K., Natori, S., 1988. Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem* 263, 17117-17121.
- Matsuyama, K., Natori, S., 1988. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem* 263, 17112-17116.
- Matsuzaki, K., 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta* 1462, 1-10.
- Munita JM, Arias CA., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4, 481-551.
- Mura, M.E., Ruiu, L., 2017. *Brevibacillus laterosporus* pathogenesis and local immune response regulation in the house fly midgut. *J Invertebr Pathol* 145, 55-61.
- Nation, R.L., Li, J., Cars, O., Couet, W., Dudley, M.N., Kaye, K.S., Mouton, J.W., Paterson, D.L., Tam, V.H., Theuretzbacher, U., Tsuji, B.T., Turnidge, J.D., 2015. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect Dis* 15, 225-234.
- Okada, M., Natori, S., 1983. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem J* 211, 727-734.
- Okada, M., Natori, S., 1985. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J Biol Chem* 260, 7174-7177.

- Okuyama-Nishida, Y., Akiyama, N., Sugimori, G., Nomura, K., Ogawa, K., Homma, K.J., Sekimizu, K., Tsujimoto, M., Natori, S., 2009. Prevention of death in bacterium-infected mice by a synthetic antimicrobial peptide, L5, through activation of host immunity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 2510-2516.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8, 785-786.
- Poppel, A.K., Vogel, H., Wiesner, J., Vilcinskas, A., 2015. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59, 2508-2514.
- Sackton, T.B., Lazzaro, B.P., Clark, A.G., 2017. Rapid Expansion of Immune-Related Gene Families in the House Fly, *Musca domestica*. *Mol Biol Evol* 34, 857-872.
- Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., Kylsten, P., Engström, A., Hultmark, D., 1990. The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J* 9, 2969-76.
- Schellack, C., Prinz, K., Egyed, A., Fritz, J.H., Wittmann, B., Ginzler, M., Swatosch, G., Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1462, 55-70.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., Boman, H.G., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.

- Tang, T., Li, X., Yang, X., Yu, X., Wang, J., Liu, F., Huang, D., 2014. Transcriptional response of *Musca domestica* larvae to bacterial infection. *PLoS One* 9, e104867.
- Tasakas, S., Marmaras, V.J., 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invert Surv J* 7, 228-238.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737-48.
- Vaara, M., Viljanen, P., 1985. Binding of polymyxin B nonapeptide to gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 27, 548-554.
- Vieira, C.S., Waniek, P.J., Mattos, D.P., Castro, D.P., Mello, C.B., Ratcliffe, N.A., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2014. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors* 7, 232-246.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2 a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- Wicker, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, C., Hoffmann, J.A., 1990. Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterecin family of immune peptides. *J Biol Chem* 265, 22493-22498.
- Yakovlev, A.Y., Nesin, A.P., Simonenko, N.P., Gordya, N.A., Tulin, D.V., Kruglikova, A.A., Chernysh, S.I., 2016. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 53, 33-42.
- Yamada, K., Natori, S., 1994. Characterization of the antimicrobial peptide derived from

sapecin B, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem J* 298 Pt 3, 623-628.

Yi, H.Y., Chowdhury, M., Huang, Y.D., Yu, X.Q., 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 5807-5822.

Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Zhong, M., Wang, X., Wen, J., Cai, J., Wu, C., Aly, S.M., 2013. Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in the house fly (*Musca domestica* L.) using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45, 1069-1073.

7 図表

表1 リアルタイムPCR用のプライマー配列及び反応条件

Gene definition	Gene symbol in NCBI	Primer sequence	Annealing and extension condition
<i>defensin</i>	LOC101887540, LOC101887872,	Fw: 5'-GCAGTTGGAGCCTGAGTTAC-3'	60 °C for 90 sec
	LOC101887709	Rv: 5'-CAGTTACGGCAAACACAAAAC-3'	
<i>defensin-like 1/</i>	LOC101888225, LOC105261620	Fw: 5'-GCTCGTCCAGAGTCGGTAG-3'	60°C for 60 sec
<i>defensin-like 2</i>		Rv: 5'-CACCGAATCTTTGACACCC-3'	
<i>attacin</i>	LOC101889508	Fw: 5'-GTCGCACCAATTTAGATAATG-3'	63°C for 60 sec
		Rv: 5'-CATCGACGGTGTTCATATTC-3'	
<i>attacin-like</i>	LOC101887777	Fw: 5'-GTGAAAATCTGCGCAITTAATACC-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-GGAAATATGTTTATTTGCAAAGGC-3'	
<i>diptericin</i>	LOC101897067, LOC101896897	Fw: 5'-CCATTGTTCTCTTGTGTGCTC-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-TGCTGTGGCATCAAACGAATG-3'	
	LOC101888779	Fw: 5'-CTCAAACATTGAACATAGGCAC-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-CCGTTTCATCCTCCTTCTC-3'	
<i>sarcotoxin II</i>	LOC101893190, LOC101893350	Fw: 5'-CCCAAAGTAAAACCTATTTTC-3'	60°C for 60 sec
	LOC101893688, LOC101893852	Rv: 5'-TCATTGTTGAAGATGTTGAC-3'	
<i>sarcotoxin I-B</i>	LOC101901352, LOC101889632	Fw: 5'-CGGGTTGGTTGAAAAAGATT-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-GCAGGTTTCTCATTTCCCTTT-3'	
<i>sage</i>	LOC101900398	Fw: 5'-CAATATCAATACCACCACCAACAC-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-CCTCTAAGCGAACATTTGTTACG-3'	
<i>cyp4aa1</i>	LOC101895233	Fw: 5'-TCTTTGGGTGCAICTGAAATC-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-GCATTCAATTCCTCTCTTATC-3'	
<i>lsp2</i>	LOC101892543	Fw: 5'-TCAACGAAGTGTCATCAAAGAC-3'	60°C for 20 sec
		Rv: 5'-CGACATCACCCGTAACG-3'	
<i>eater</i>	LOC101896200	Fw: 5'-CTGGAAAATGTCAATGTAATGATG-3'	60°C for 60 sec
		Rv: 5'-GTTGCAAACAAACACCATTC-3'	
<i>gapdh</i>	LOC101887935	Fw: 5'-CATCATCTCCGCTCCATCT-3'	63 °C for 15 sec and 72 °C for 30 sec
		Rv: 5'-AAGCCATACCAGTGAGTTTACC-3'	
<i>rps18</i>	LOC101887462	Fw: 5'-CATTGCACTACAAAGTTCCCAAC-3'	66 °C for 30 sec
		Rv: 5'-TTCAAGCGTCCAATCGTC-3'	

表 2 ddPCR 用のプライマー及び DNA プローブ配列

Gene definition	Gene symbol in NCBI	Sequence
<i>defensin-like 3</i>	LOC105261775	Fw Primer: 5'-GATGGTTCCAACACCGAAGC-3' Rv Primer: 5'-CACGTTTCTTCAGCAACAGACA-3' Probe: 5'-CGCCTGACATGACACTTTGCCAATTCCAAG-3'

表3 イエバエ組織別での抗菌ペプチド遺伝子の発現一覧

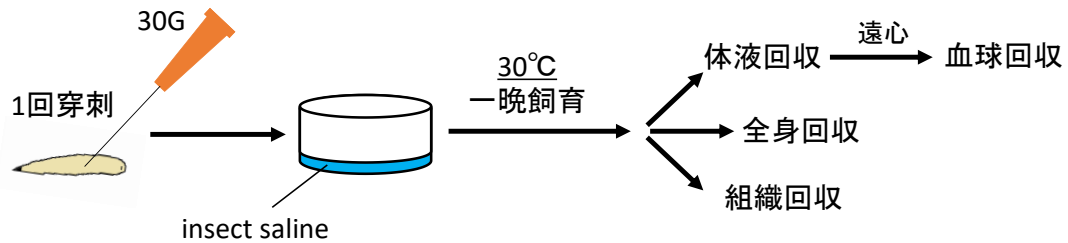
	唾液腺	消化管	脂肪体	血球
<i>defensin</i>	誘導性?	なし	誘導性	誘導性
<i>defensin-like 1/ defensin-like 2</i>	なし	なし	なし	誘導性
<i>defensin-like 3</i>	なし	なし	なし	誘導性
<i>attacin</i>	誘導性?	なし	誘導性	誘導性
<i>attacin-like</i>	なし	なし	なし	誘導性
<i>diptericin</i>	なし	なし	誘導性	誘導性
<i>LOC101888779</i>	なし	なし	恒常的?	恒常的?
<i>sarcotoxin II</i>	誘導性?	なし	誘導性	なし
<i>sarcotoxin I-B</i>	誘導性	なし	誘導性	誘導性

表4 イエバエのディフェンシン関連ペプチド由来合成部分ペプチドの大腸菌に対する抗菌活性

Gene designation	Sequence	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>sapecin B</i>	RSLCLLHCRLK	150
<i>defensin</i>	HSACAAHCLLRGNR	>300
<i>defensin-like 1</i>	KDSVCAAHCLLIGKS	>300
<i>defensin-like 2</i>	HSVCAAHCLLLGKS	>300
<i>defensin-like 3</i>	KVSCQAHCLLLKKR	300

図 1

A



B

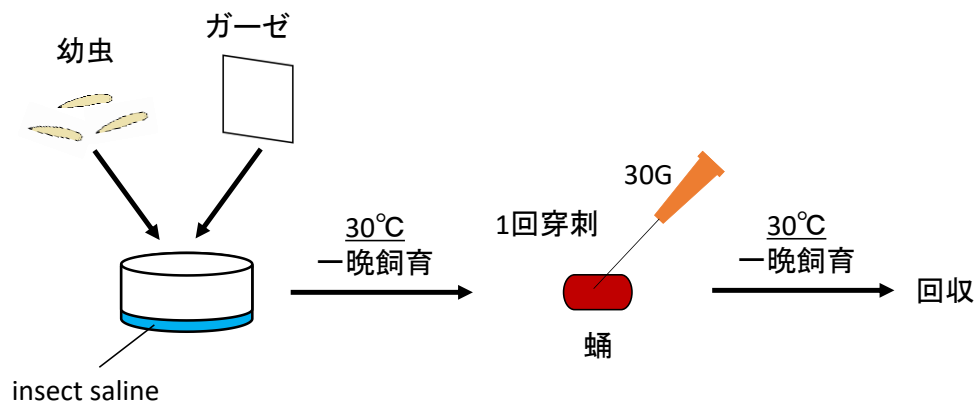


図 1. イエバエ幼虫及び蛹の傷刺激の模式図

幼虫 (A)及び蛹 (B)の傷刺激について示す。イエバエの3 齢幼虫を 30G のディスプレイニードルで 1 回穿刺し、insect saline を入れた容器に約 70-80 匹入れて 30 °C で一晩飼育した。飼育後、体液を回収し、遠心後に沈殿したものを血球として-80 °C に保存した。また、幼虫の本体、解剖後の唾液腺、消化管及び脂肪体も-80 °C で保存した。イエバエ 3 齢幼虫を insect saline とガーゼを入れた容器に移して 30 °C で一晩飼育し、蛹化を促した。蛹を 30G のディスプレイニードルで 1 回穿刺し、再び 30 °C で一晩飼育後、-80 °C に保存した。傷なしの幼虫及び蛹も同様に行った。

切断部位 成熟ペプチド

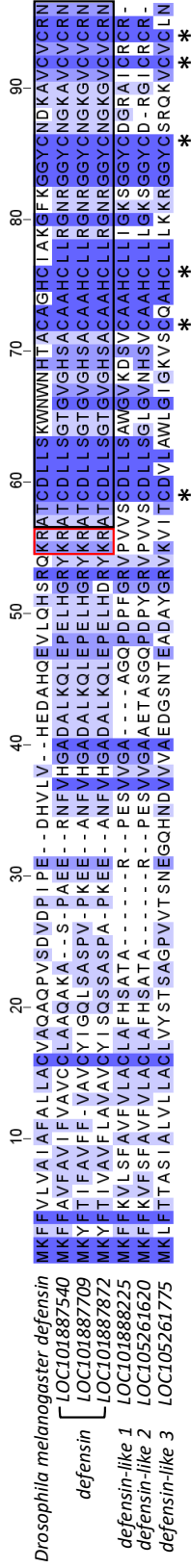


図 2. イエバエ由来防御素または防御素関連遺伝子とシヨウジョウバエ由来防御素 (ResSeq accession number : NM_078948) の多重アライメント

アミノ酸配列のアライメントは Clustal Omega を用いて解析し、アライメントの図は Jalview で作成した (Sievers et al., 2011; Waterhouse et al., 2009)。相同性のあるアミノ酸残基を青い網掛けで示し、相同性が高いほど濃い色で示している。

切断部位 (Lys-Arg) を赤字で、成熟ペプチドを黒字で示し、特徴的な 6 つのシステインは * で示している。

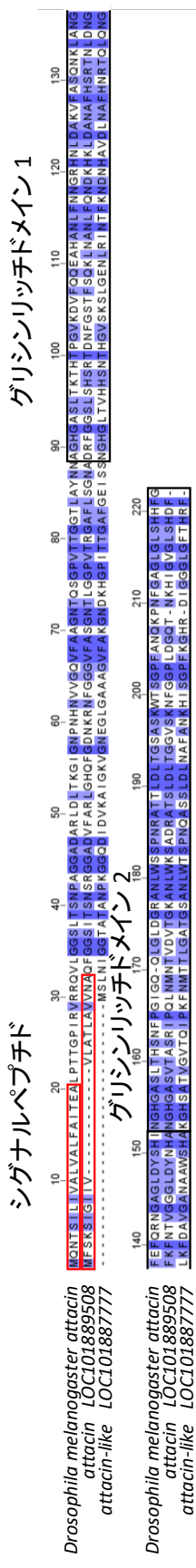


図 3. イエバエ由来アタシンまたはアタシン関連遺伝子とシヨウジョウバエ由来アタシン (RefSeq accession number : NM_079021)の多重アライメント
 相同性のあるアミノ酸残基を青い網掛けで示し、相同性が高いほど濃い色で示している。シグナルペプチドは SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011)を用いて解析し、赤枠で示した。グリシンリッチドメインは黒枠で示している (Hedengren et al., 2000; Kimbrell, 1991; Wicker et al., 1990)。

プロリンリッチドメイン グリシンリッチドメイン

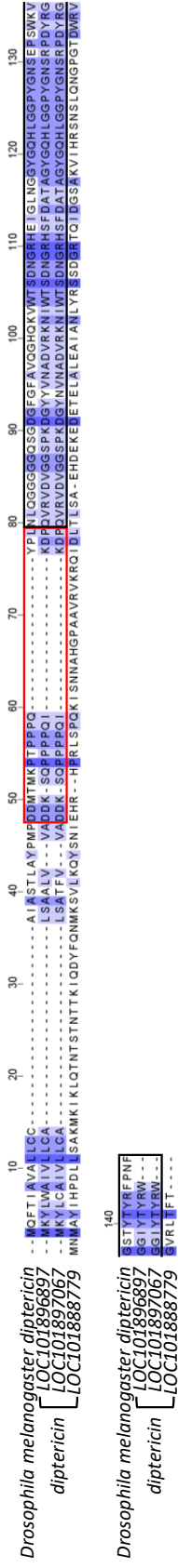


図 4. イエバエ由来デプテリシンまたは LOC101888779 と ショウジョウバエ由来デプテリシン (RefSeq accession number : NM_057460)の多重アライメント

相同性のあるアミノ酸残基を青い網掛けで示し，相同性が高いほど濃い色で示している。プロリンリッチドメインは赤枠で，グリシンリッチドメインは黒枠で示している (Hedengren et al., 2000; Kimbrell, 1991; Wicker et al., 1990)。

図 5

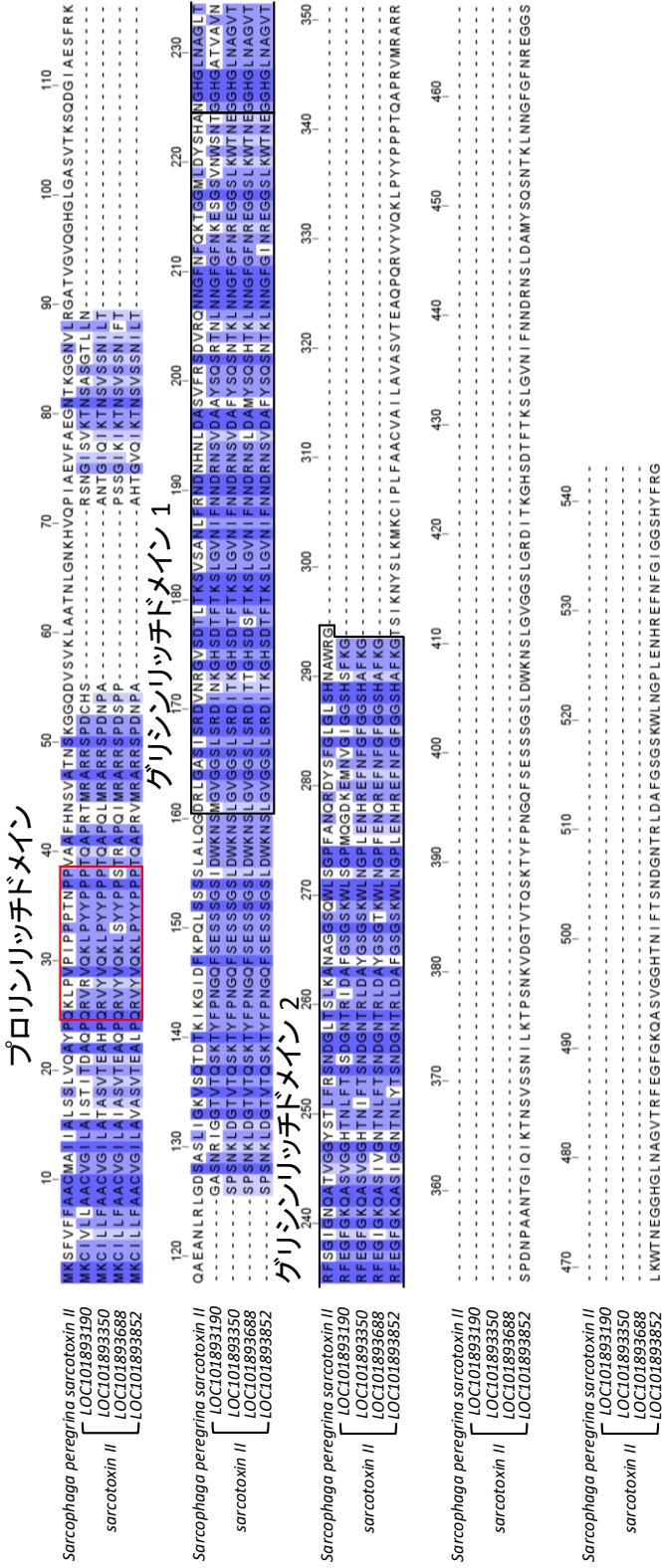


図 5. イエバエ由来ザルコトキシン II とセンチニクバエ由来ザルコトキシン II (RefSeq accession number : M18873)の多重アライメント
 相同性のあるアミノ酸残基を青い網掛けで示し、相同性が高いほど濃い色で示している。プロリンリッチドメインは赤枠、2 つのグリニン
 リッチドメインは黒枠で示している (Hedengren et al., 2000; Kimbrell, 1991; Wicker et al., 1990)。

図 6

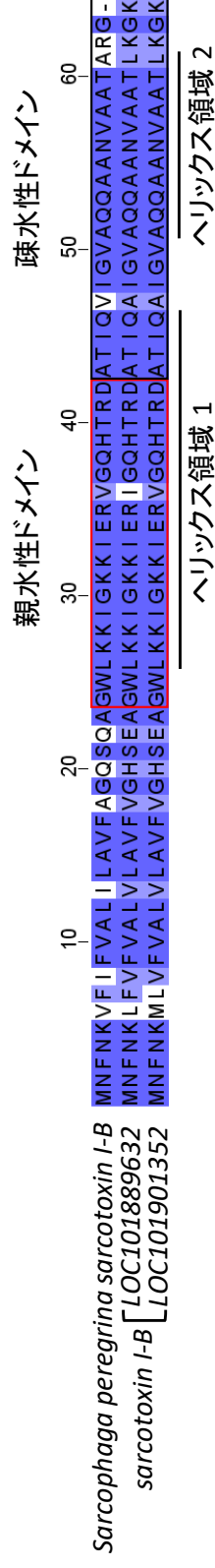
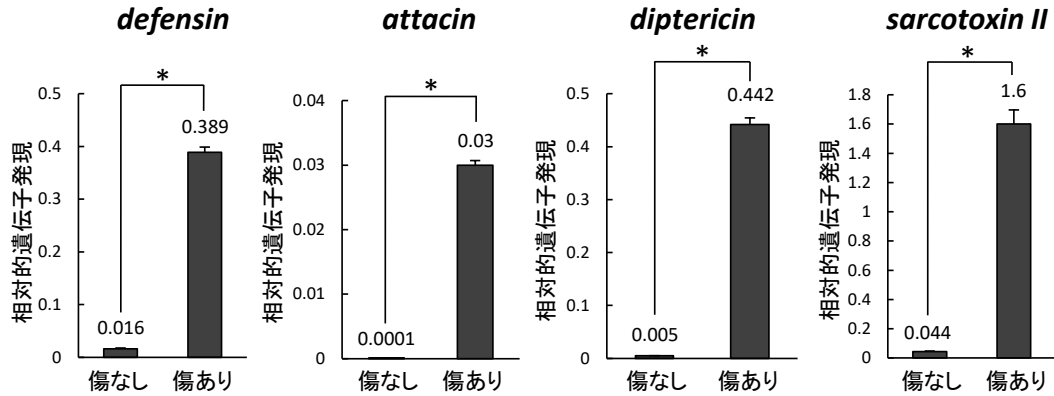


図 6. イエバエ由来ザルコトキシン I-B とセンチニクバエ由来ザルコトキシン I-B (RefSeq accession number : X17315)の多重アライメント
 相同性のあるアミノ酸残基を青い網掛けで示し、相同性が高いほど濃い色で示している。親水性ドメインを赤枠で、疎水性ドメインを黒枠
 で示している (Okada and Natori, 1985)。センチニクバエ由来ザルコトキシン I-A の α -ヘリックス領域と相同性の高い部分を下線で示す (Iwai
 et al., 1993)。

図 7

Trial 1



Trial 2

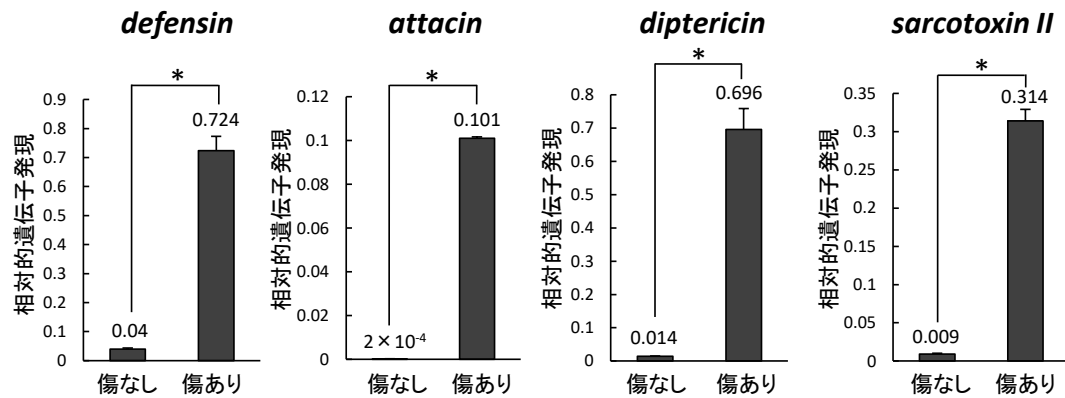
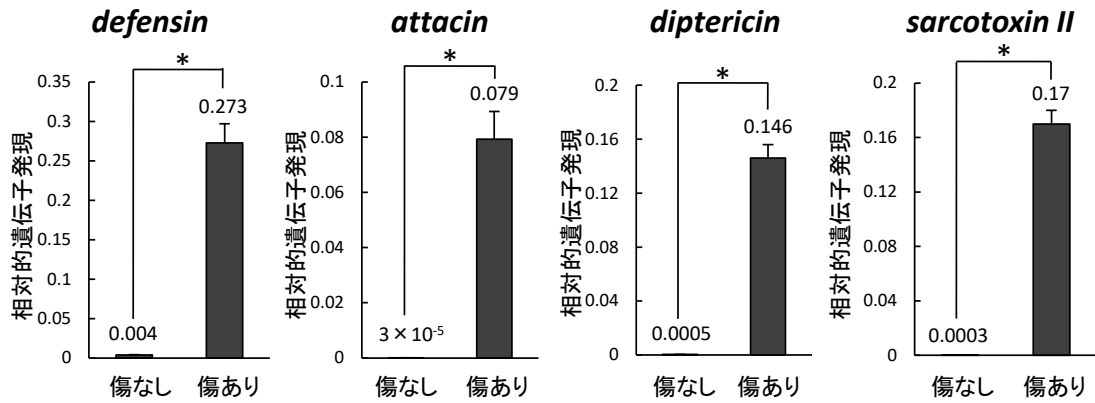


図 7. イエバエ幼虫での針刺激による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導

傷あり及び傷なしでの *defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。Trial 1 及び Trial 2 はそれぞれ、別の日に処理した幼虫の解析結果を表す。幼虫の RNA は傷刺激後 20-24 時間経ってから抽出し、幼虫 10 匹を 1 バッチとして用いた。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *gapdh* で補正した。棒グラフは一つのバッチにつき 3 回測定した結果で、棒グラフの上にその平均値を示す。エラーバーは標準偏差を表す。データはウェルチの t 検定によって解析した。*P<0.05。

図 8

Trial 1



Trial 2

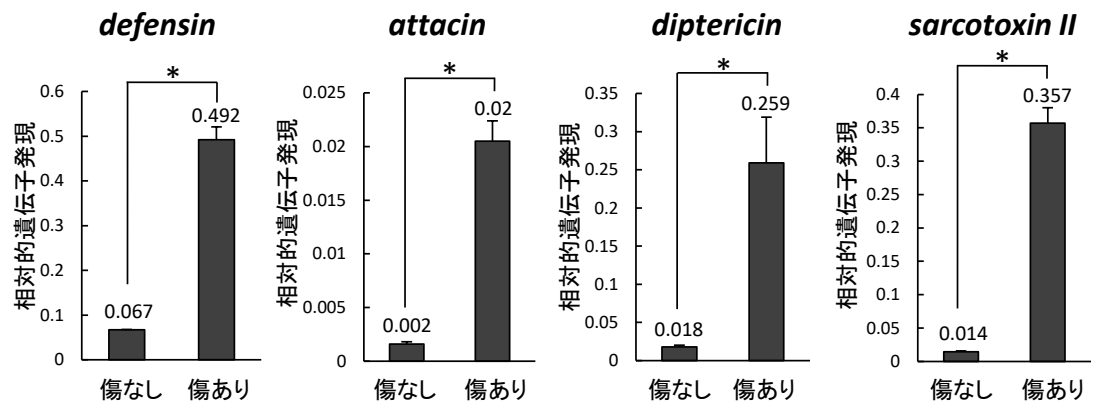
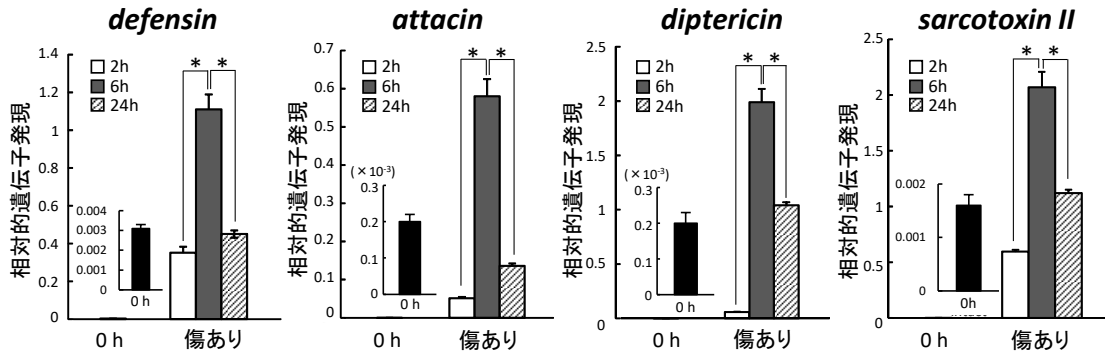


図 8. イエバエ蛹での針刺激による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導

傷あり及び傷なしでの *defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。Trial 1 及び Trial 2 はそれぞれ、別の日に処理した幼虫の解析結果を表す。幼虫の RNA は傷刺激後 20-24 h 経ってから抽出し、蛹 20 匹を 1 バッチとして用いた。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *gapdh* で補正した。棒グラフは一つのバッチにつき 3 回測定した結果で、棒グラフの上にその平均値を示す。エラーバーは標準偏差を表す。データはウェルチの t 検定によって解析した。*P<0.05。

図 9

Trial 1



Trial 2

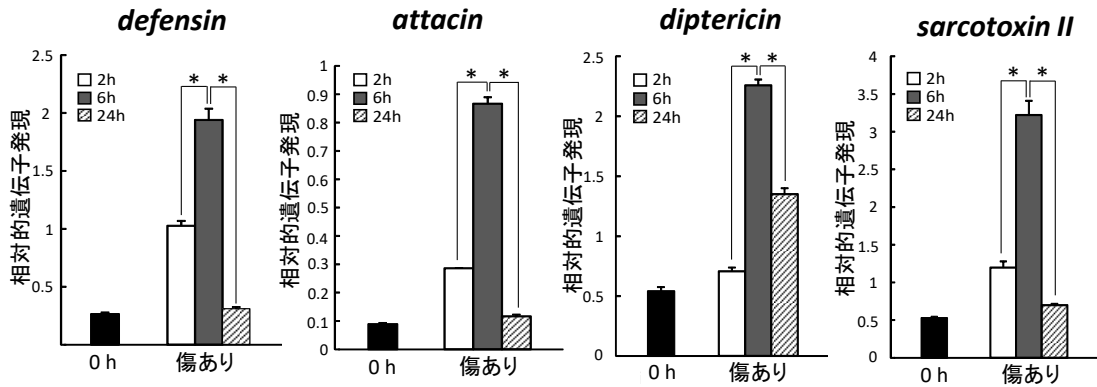


図 9. 傷刺激によるイエバエ幼虫脂肪体での抗菌ペプチドの発現

脂肪体での *defensin*, *attacin*, *diptericin* 及び *sarcotoxin II* の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。Trial 1 及び Trial 2 はそれぞれ、別の日に処理した幼虫の解析結果を表す。脂肪体は傷刺激してから 2, 6 及び 24 h 後に回収し、RNA 抽出を行った。0 h も同様。脂肪体は各時間に幼虫 40 匹から回収し、これを 1 バッチとした。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *gapdh* で補正した。棒グラフは一つのバッチにつき 3 回測定した結果を、エラーバーはその時の標準偏差を表す。データは一元配置分散分析及びシェッフエの多重比較検定によって解析した。* $P < 0.05$ 。Trial 1 については、0 h の結果を部分的に拡大して別パネルで表示している。

図 10

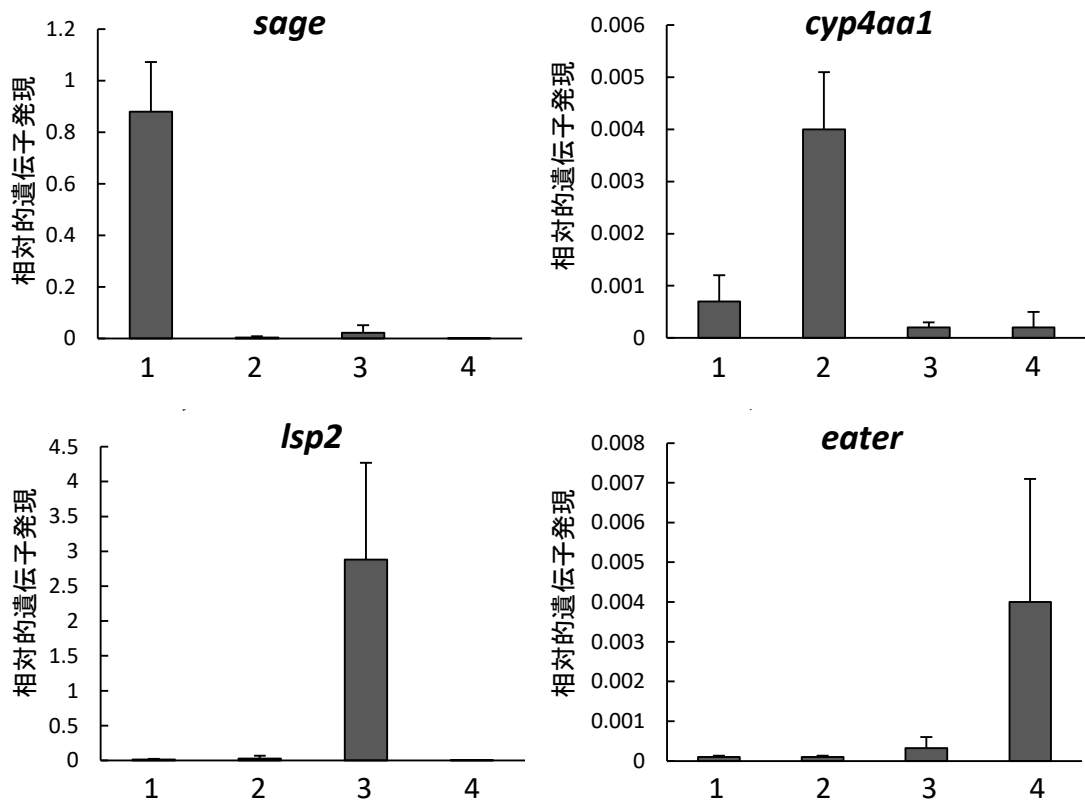


図 10. イエバエ幼虫組織での組織マーカー遺伝子の特異的発現

傷なしの幼虫の唾液腺 (1), 消化管 (2), 脂肪体 (3)及び血球 (4)での *sage*, *cyp4aa1*, *lsp2* 及び *eater* の発現レベルをリアルタイム PCR によって解析した。各組織は傷なしの幼虫から回収し, RNA を抽出して用いた。唾液腺, 消化管及び脂肪体は幼虫 5-15 匹から, 血球は幼虫 100-400 匹から回収し, これを 1 バッチとした。グラフの縦軸は遺伝子の発現を, 横軸は組織の種類を示す。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *rps18* で補正した。棒グラフは 3 バッチ分の平均を, エラーバーはその標準偏差を示す。

図 11

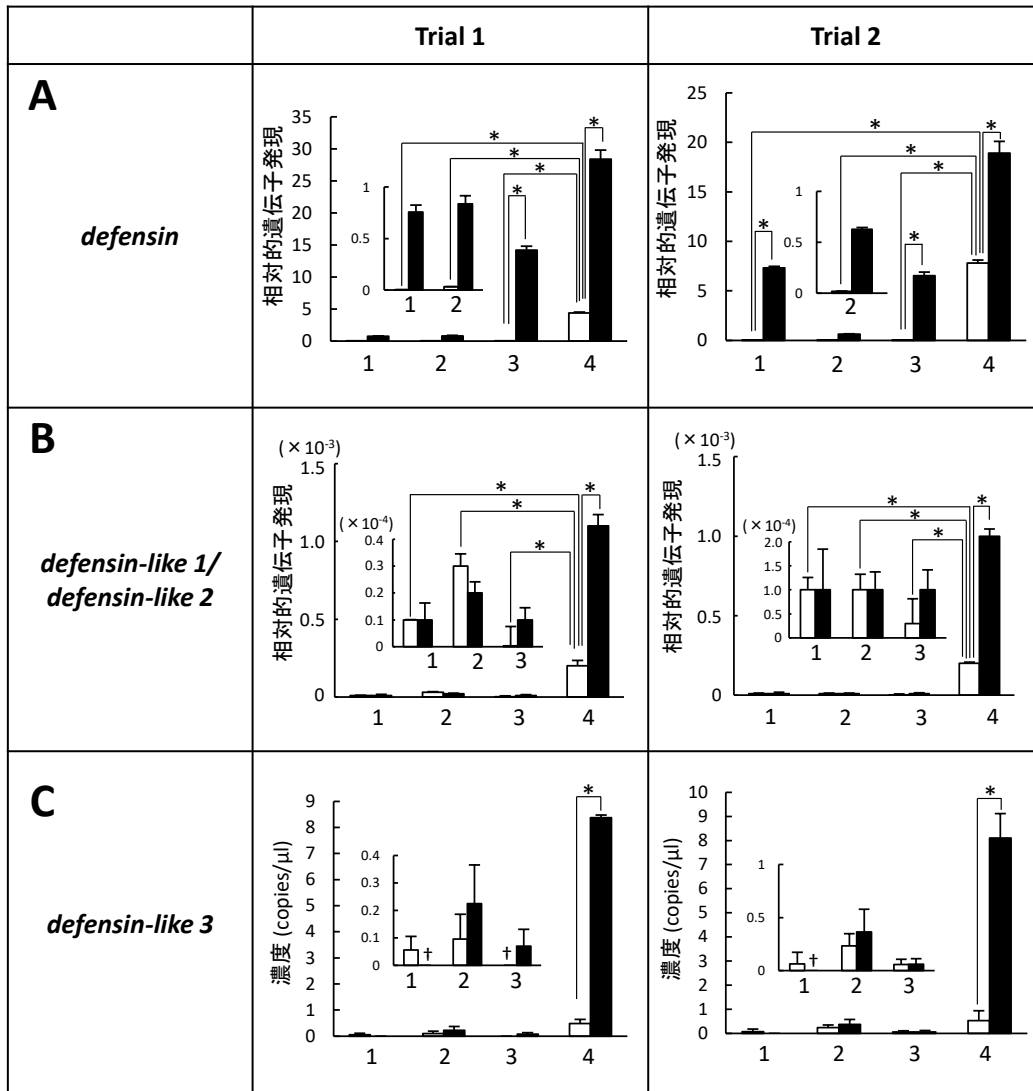


図 11. 傷刺激によるイエバエ幼虫組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現

イエバエ幼虫の唾液腺 (1), 消化管 (2), 脂肪体 (3)及び血球 (4)での, *defensin* (A), *defensin-like 1/defensin-like 2* (B), *defensin-like 3* (C)の発現レベルをリアルタイム PCR (A, B)またはドロップレットデジタル PCR (C)で解析した。Trial 1 及び Trial 2 はそれぞれ, 別の日に処理した幼虫の解析結果を表す。各組織は傷刺激後 20-24 h 経ってから回収し, RNA を抽出して用いた。傷なしも同様。唾液腺, 消化管及び脂肪体は幼虫 5-15 匹から, 血球は幼虫 100-400 匹から回収し, これを 1 バッチとした。グラフの縦軸は遺伝子の発現を, 横軸は組織の種類を示す。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *rps18* で補正した。ドロップレットデジタル PCR の結果は, cDNA 溶液 (μl)中のコピー数を示す。白い棒グラフは傷なし, 黒い棒グラフは傷ありの幼虫組織について, 1 バッチあたり 3 回測定を行った時の結果を表す。エラーバーはその時の標準偏差を表す。ダガー (\dagger)は検出限界以下を示す。一部のグラフでは, 結果を拡大して別パネルで表示している。データは一元配置分散分析及びシェッフェの多重比較検定によって解析した。* $P < 0.05$ 。

※図 11, 次のページに続く

図 11, 続き

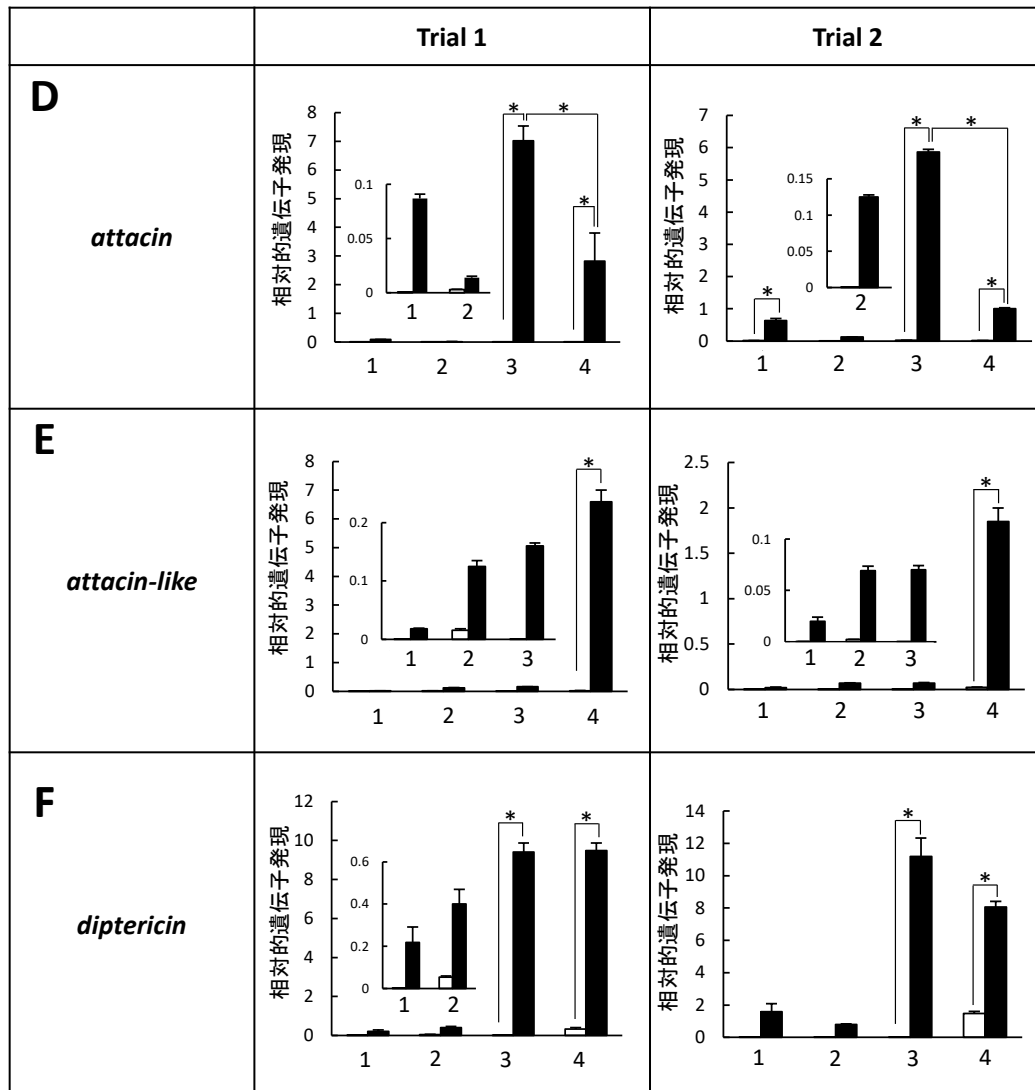


図 11. 傷刺激によるイエバエ幼虫組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現

イエバエ幼虫の唾液腺 (1), 消化管 (2), 脂肪体 (3)及び血球 (4)での, *attacin* (D), *attacin-like* (E)及び *diptericin* (F)の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。Trial 1 及び Trial 2 はそれぞれ, 別の日に処理した幼虫の解析結果を表す。各組織は傷刺激後 20-24 h 経ってから回収し, RNA を抽出して用いた。傷なしも同様。唾液腺, 消化管及び脂肪体は幼虫 5-15 匹から, 血球は幼虫 100-400 匹から回収し, これを 1 バッチとした。グラフの縦軸は遺伝子の発現を, 横軸は組織の種類を示す。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *rps18* で補正した。白い棒グラフは傷なし, 黒い棒グラフは傷ありの幼虫組織について, 1 バッチあたり 3 回測定を行った時の結果を表す。エラーバーはその時の標準偏差を表す。一部のグラフでは, 結果を拡大して別パネルで表示している。データは一元配置分散分析及びシェッフェの多重比較検定によって解析した。*P<0.05。

※図 11, 次のページに続く

図 11, 続き

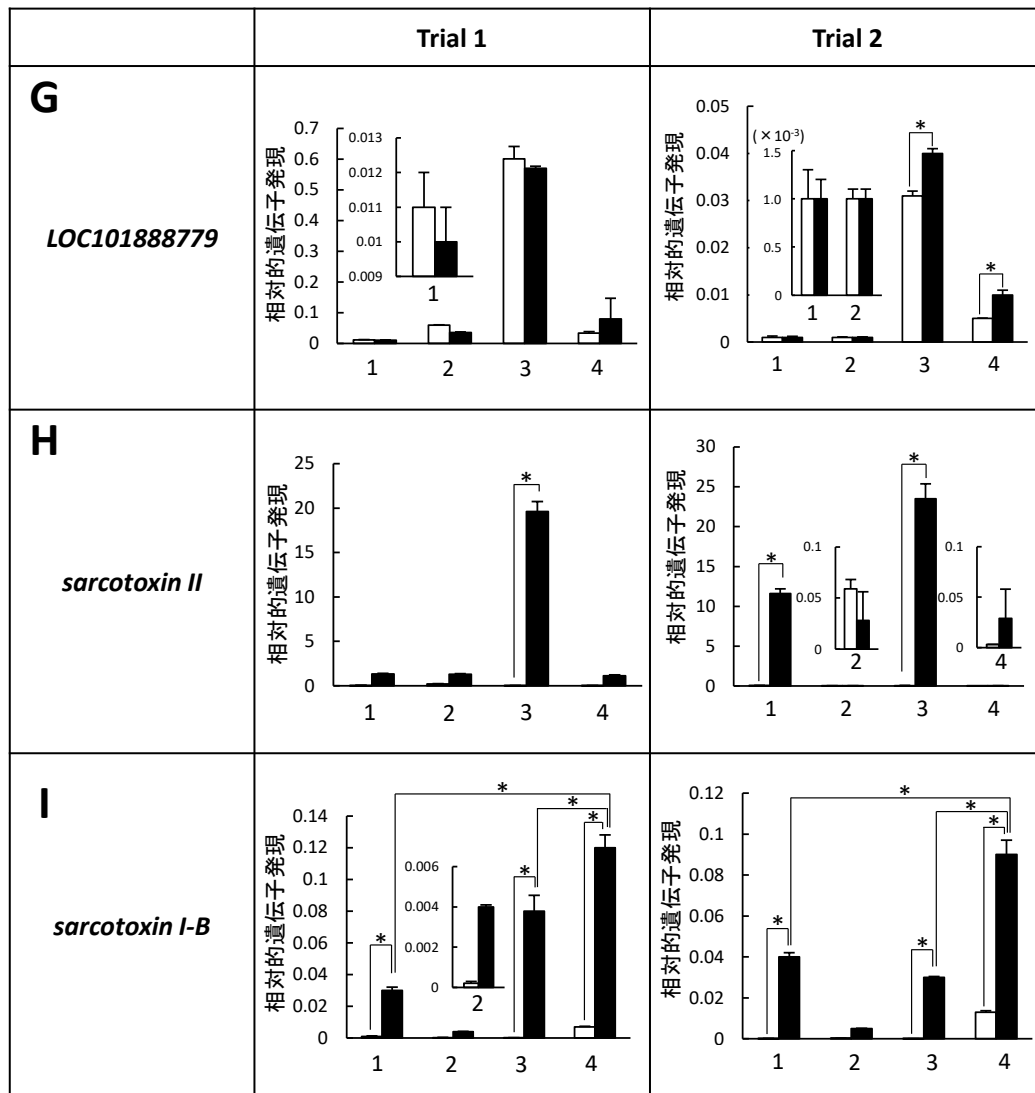


図 11. 傷刺激によるイエバエ幼虫組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現

イエバエ幼虫の唾液腺 (1), 消化管 (2), 脂肪体 (3)及び血球 (4)での, *LOC101888779* (G), *sarcotoxin II* (H)及び *sarcotoxin I-B* (I)の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。Trial 1 及び Trial 2 はそれぞれ, 別の日に処理した幼虫の解析結果を表す。各組織は傷刺激後 20-24 h 経ってから回収し, RNA を抽出して用いた。傷なしも同様。唾液腺, 消化管及び脂肪体は幼虫 5-15 匹から, 血球は幼虫 100-400 匹から回収し, これを 1 パッチとした。グラフの縦軸は遺伝子の発現を, 横軸は組織の種類を示す。すべての遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子である *rps18* で補正した。白い棒グラフは傷なし, 黒い棒グラフは傷ありの幼虫組織について, 1 パッチあたり 3 回測定を行った時の結果を表す。エラーバーはその時の標準偏差を表す。一部のグラフでは, 結果を拡大して別パネルで表示している。データは一元配置分散分析及びシェッフェの多重比較検定によって解析した。*P < 0.05。

図 12

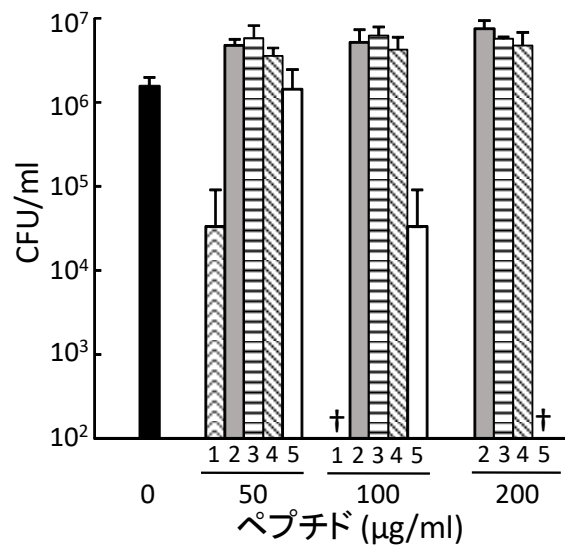


図 12. イエバエ ディフェンシン関連ペプチド由来合成部分ペプチドの抗菌活性

ポジティブコントロールである sapecin B の部分ペプチド (1), イエバエ由来の合成部分ペプチド defensin (2), defensin-like 1 (3), defensin-like 2 (4) 及び defensin-like 3 (5) の大腸菌に対する抗菌活性は, コロニーアッセイ法によって決定した。すべての合成部分ペプチドの配列は表 3 に示す通り。グラフの縦軸は 1 ml あたりの CFU を, 横軸は加えたペプチドの濃度 (µg/ml) を示す。棒グラフは一つのサンプルにつき 3 回測定した結果を, エラーバーはその時の標準偏差を示す。ダガー (†) は検出限界以下を示す。