

ペプチドグリカンによる  
抗菌性タンパク質誘導の分子機構

Molecular mechanisms of induction of  
antibacterial protein synthesis by peptidoglycan

池谷政男  
Masao Iketani

1999

# 目次

要旨	1
第 I 章 緒論	5
第 II 章 カイコ脂肪体培養系における抗菌性タンパク質の誘導	
第 1 節 緒言	13
第 2 節 材料及び方法	
2-1 材料	
(1) カイコ	15
(2) バクテリア	15
(3) 試薬	15
2-2 方法	
(1) カイコ幼虫からの脂肪体組織の摘出及び培養	16
(2) 抗菌活性の測定	18
(3) リゾチーム活性の測定	18
(4) タンパク質の定量	18
(5) 脂肪体内への $^3\text{H}$ -リジンの取り込み	18
(6) ポリアクリルアミド電気泳動	19
第 3 節 結果	
(1) $^3\text{H}$ -リジンの取り込みによるタンパク合成の確認	20
(2) 脂肪体培養系における抗菌性タンパク質の誘導	22
(3) バクテリア菌体による抗菌性タンパク質の誘導	28
(4) 可溶性ペプチドグリカンの抗菌性タンパク質誘導効果	30
第 4 節 考察	34
第 III 章 抗菌性タンパク質誘導に必要なペプチドグリカンの最小構造	
第 1 節 緒言	36
第 2 節 材料及び方法	
(1) バクテリア	38
(2) 直鎖状ペプチドグリカンの調製	38
(3) 細胞壁由来ペプチドグリカンの調製	39
(4) 低分子ペプチドグリカンの調製	40
(5) アミノ酸分析	40
(6) 平均糖鎖長の測定	40
(7) ペプチド側鎖架橋度の測定	41

第3節	結果	
(1)	直鎖状ペプチドグリカンによる抗菌性タンパク質の誘導	42
(2)	抗菌性タンパク質誘導に必要なペプチドグリカン最小構造	45
第4節	考察	51

#### 第IV章 抗菌性タンパク質誘導に関するペプチドグリカン認識タンパク質

第1節	緒言	52
第2節	材料及び方法	
2-1	材料	
(1)	バクテリア及びペプチドグリカン	54
(2)	試薬	54
2-2	方法	
(1)	PG-Affinity column の調製	54
(2)	<i>B. megaterium</i> NCIMB 12520( <i>dap</i> , <i>lys</i> )を用いた <sup>3</sup> H-PG の調製	55
(3)	[ <sup>125</sup> I]-Bolton-Hunter 試薬による PG の標識	55
(4)	ASD-PG の調製	55
(5)	[ <sup>125</sup> I]-ASD-PG の調製	55
(6)	[ <sup>125</sup> I]-ASD-PG によるフォトアフィニティラベル	57
(7)	BIACORE システム用センサーチップへの PG の固定	57
(8)	脂肪体細胞膜の調製	57
(9)	カイコ幼虫体液タンパクの調製	58
第3節	結果	
(1)	RI 標識 PG による PG 結合性タンパク質の検索	59
(2)	[ <sup>125</sup> I]-ASD-PG を用いた PG 結合タンパクの検索	60
(3)	BIACORE2000 による PG 結合タンパクの検索及び PG-アフィニティカラムによる精製	68
(4)	PG 結合特異性の検討	69
第4節	考察	74
	総括	76
	謝辞	80
	参考文献	81

## 要旨

昆虫などの無脊椎動物は免疫グロブリンを持たず、生体内に侵入した異物に対して哺乳類に見られるような特異的な獲得性免疫反応を示さない。この昆虫の生体防御反応の一つとして、バクテリア感染によるセクロピン、アタシン及びリゾチームなど一群の抗菌性タンパク質の誘導が知られている。カイコ幼虫にバクテリアを注入すると、数時間後には体液中に抗菌性タンパク質の誘導が観察される。この誘導はバクテリアの細胞壁ペプチドグリカン(PG)やグラム陰性菌外膜成分であるリポ多糖(LPS)を単独で注入することで起こることから、これら細胞壁成分が抗菌性タンパク質の直接の誘導因子であることが明らかとなっている。抗菌性タンパク質誘導には PG 構造の特異性が認められることから、この誘導には一定の PG 構造を認識するシステムが存在する可能性が考えられる。この論文は PG によるカイコ抗菌性タンパク質誘導の分子機構について検討した結果をまとめたものである。

第 I 章では、昆虫の一般的な生体防御機構と、これまでに明らかとなっている抗菌性タンパク質誘導機構に関する知見について述べた。

第 II 章では、抗菌性タンパク質の産生器官であるカイコ幼虫脂肪体を培養し、*in vitro* での抗菌性タンパク質誘導系の確立を行った。あらかじめ PG を注射し免疫化した脂肪体を Grace 培地で培養すると培地中に抗菌活性が検出されたが、無処理の幼虫脂肪体では顕著な抗菌活性は認められなかった。しかし、無処理の脂肪体に PG を添加して培養すると高い抗菌活性が誘導された。電気泳動により同定を行ったところ、誘導された抗菌性タンパク質はリゾチームとセクロピンであった。また、シクロヘキシミドあるいはアクチノマイシン D の添加により完全に阻害されたことから、この誘導は PG の刺激による *de novo* 合成であることが認められた。

この *in vitro* での誘導系を用い、PG 構造の違いによる誘導効果を検討したところ、これまで *in vivo* で得られた結果と一致し *Bacillus megaterium* 及び *Escherichia coli* 由来の細胞壁 PG によって高い抗菌活性が誘導されたが、*Micrococcus luteus* 由来の細胞壁 PG では非常に低い活性しか誘導されなかった。また、血球を含まない脂肪体培養系にバクテリア菌体を直接加えた場合にも顕著な活性の誘導が観察された。これらの結果は、抗菌性タンパク質誘導に血球によるバクテリアの食食は必ずしも必要でないことを示唆している。

PG は哺乳動物においても様々な免疫応答を引き起こすことが知られているが、それに

必要な構造については未だ明らかになっていない。そこで第三章では誘導に必要な PG の最小構造の特定を行った。誘導効果に大きな差のある *B. megaterium* や *E. coli* と *M. luteus* の細胞壁 PG 構造の違いはペプチド架橋部分にあることから、まず架橋の有無と誘導効果について検討した。そのために PG の架橋形成阻害剤であるペニシリン G をグラム陽性菌の培地に加えることにより直鎖状 PG を調製した。*B. megaterium* 及び *M. luteus* より調製した直鎖状 PG はいずれも *B. megaterium* 細胞壁 PG と同様の強い誘導能を有していたことから、抗菌性タンパク質の誘導には PG のペプチド側鎖間の架橋は必要ではなく、*M. luteus* 細胞壁 PG にみられるような Lys を含むかさばるペプチド架橋は逆に PG の認識を妨げるものと考えられる。次にこの直鎖状 PG をリゾチームにより限定分解後、ゲルろ過により分画した分子量の異なる PG 断片を用いて誘導に必要な PG の最小構造を検討した。その結果、ペプチド側鎖を持った GluNAc-MurNAc から成る PG ユニットが2つ結合したものが誘導に必要な最小構造であると決定した。

第四章ではカイコの PG 認識システムの検索を行った。上述のように抗菌性タンパク質誘導効果は PG 構造に依存していることから、カイコにはある特定構造の PG を認識するシステムが存在する可能性が考えられた。また、*in vitro* の実験結果から脂肪体が PG の認識に関与しており、この認識に直接関わる PG 結合タンパク質が脂肪体細胞に存在する可能性が示唆された。また、それ以外にも PG 認識タンパクが体液中に存在する可能性も考えられるため PG と結合するタンパク質の検索を脂肪体と体液について行った。検索方法として、<sup>125</sup>I により標識した光親和性の架橋剤(SASD)と PG を結合させ、これを用いたフォトアフィニティ標識により検索を行った。その結果、体液中に PG と特異的に結合するタンパク質の存在が示され、このタンパク質を部分精製した。しかし、脂肪体の可溶化細胞膜については、この方法では PG 結合タンパク質を検出することができなかった。そこで、別のアプローチとして生体分子間の相互作用を検出する BIACORE システムを用いて検出を行ったところ、可溶化細胞膜に PG と特異的な結合を示すタンパク質の存在が認められた。

以上のように本論文では、カイコにおける抗菌性タンパク質の誘導は一定構造の PG が認識されることで起こることを明らかにし、さらに誘導因子として必要な PG の最小構造を哺乳動物も含め、初めて明らかにした。また、この PG を認識すると思われる PG 結合タンパク質が抗菌性タンパク質の産生器官である脂肪体細胞膜に存在することを示した。

## Summary

Insects respond to bacterial infection with a series of cellular and humoral defensive reactions, including synthesis of antibacterial proteins, such as lysozyme, cecropins and attacins. An injection of bacterial cell wall peptidoglycan (PG) or lipopolysaccharide (LPS), induces antibacterial activity in the hemolymph. The induction by PG is a specific response following recognition of PG of some definite structure in the hemolymph. The specific induction by PG suggests an existence of PG recognition systems in insect. This study aims to explore the molecular mechanisms of induction of antibacterial protein synthesis by peptidoglycan in the silkworm, *Bombyx mori*.

When fat body from immunized larvae was cultured in Grace's medium, antibacterial activity was detected in the culture medium without addition of elicitor. In the culture of fat body from naive larvae, antibacterial activity was not detected during the first 7h of incubation, but the addition of PG to the medium, induced the activity during 24h of incubation. The acidic PAGE of the cultured medium showed that cecropin and lysozyme were synthesized and secreted into the medium. The syntheses of the antibacterial proteins were inhibited by actinomycin D or cycloheximide, indicating *de novo* synthesis of the antibacterial proteins in cultured fat body. PG from *E. coli* or *B. megaterium* had high ability to induce antibacterial proteins, but PG from *M. luteus* was very poor elicitor. The results suggested an existence of PG recognition system in fat body cells.

PGs from *B. licheniformis* and *M. luteus* were different each other in their peptide linkage structures, which might be a cause for the great difference in the inducing ability of these PGs. To prove the possibility, linear uncross-linked PGs were isolated from the bacterial culture media incubated with penicillin G, and tested for the elicitor activity. The linear PGs from *M. luteus* and *B. licheniformis* were similar effective as elicitor. The results suggest that the cross-linkage between adjacent peptide side chains is not essential for the elicitor activity, but a bulky and charged pentapeptide bridge in *M. luteus* PG interferes recognition of the molecule. To determine the minimum structure of PG

required for induction of antibacterial protein synthesis, linear PG fragments with different molecular size were prepared and tested for the elicitor activity. The minimum structure of PG was determined to be two repeating *N*-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramic acid units with peptide side chains.

As the results suggested presence of a PG recognition molecule in the fat body cells, detection of PG binding protein was attempted using [<sup>125</sup>I]-ASD-PG, a photoaffinity cross-linking PG derivative. PG binding protein was detected in the hemolymph after visualized the labeled bands on a gel of SDS-PAGE by autoradiography. In solubilized membrane proteins from fat body cells, however, no specific binding was detected with this method. For more sensitive and specific detection of PG-binding protein in solubilized fat body membrane, BIACORE 2000 was used. With this system, a binding of protein to immobilized PG on a sensor tip was detected. The binding was specific for PG, since the protein showed poor binding for chitin or LPS.

## 第 I 章 序論

### (1) 昆虫の生体防御機構

自然界に存在する動物種は現在までに種として記載されているものだけでも 100 万種にも及ぶが、その中で哺乳類を含めた脊椎動物が約 38000 種であるのに対し、無脊椎動物に属する節足動物は 930,000 種と、全動物種の 90% 以上を占めている。中でも昆虫は 750,000 種が存在している<sup>1)</sup>。この昆虫の繁栄の背景には個体数の多さと環境への適応能力の高さなどがあるが、恒常性の維持や微生物の感染に対する高度な生体防御システムの存在も、その理由の一つと考えられる。一般に生体防御反応は異物の認識から始まり、それに対する無毒化、排除を行う一連の反応を示す。バクテリア感染など異物に対する哺乳類など脊椎動物の防御応答は、非獲得性（自然）免疫反応と、特異的な抗体を介した獲得性免疫反応に大きく分けられる<sup>2)</sup>。一方、昆虫など無脊椎動物には免疫グロブリンに相当するものが無く、異物など非自己に対する免疫記憶が存在しない。つまり、昆虫の生体防御反応は非獲得性免疫反応により成り立っている。しかし、現在までの昆虫の生体防御機に関する研究結果から脊椎動物の免疫機構を単に簡略化したモデルとは言い難く、系統発生的に非獲得性免疫を発達させてきたと考えられる。

完全変態型の昆虫は、幼虫や蛹の脱皮時期にカビやバクテリアを含めた微生物に感染する頻度が成虫時に比べ高くなると考えられる。それら微生物の侵入に対する最初の防御システムは、ワックス、キチン、タンパク質により構成された非細胞構造のクチクラ層と呼ばれる物理的なバリアーを表皮に持つことで成り立っている。また、経口由来の感染に対しては消化管内が高いアルカリ性を示すことでバクテリアの繁殖を抑制する。さらに囲食膜が食物中の微生物と中腸上皮細胞の直接的な接触を防ぐことで経口由来の微生物あるいは腸内細菌の体腔内への侵入を防ぐことが出来る<sup>3)</sup>。開放血管系である昆虫の体腔内には各器官が体液で満たされた同じ空間に存在することから、クチクラ層などの物理的なバリアーが何らかの形で破られ、体腔内に微生物が侵入することは昆虫にとって致命的な出来事である。その体腔内はバクテリアにとって栄養成分や pH など繁殖するには十分な環境ではあるが、実際には体腔内に侵入したバクテリアに対して、体液中に存在する様々な生体防御システムが働き、バクテリアの増殖を防いでいる。



## (2) 細胞性防御反応

昆虫体液内での生体防御反応は大きく二つに分けられ、血球による細胞性防御反応と血漿成分による体液性防御反応により対抗する。血球は体液内に侵入したバクテリア、カビ、線虫類、産みつけられた寄生昆虫の卵などに対し、それら外来性の異物を非自己と認識し、食食作用(phagocytosis)、ノジュール形成(nodule formation)、包圍化作用(encapsulation)などにより排除する<sup>4)</sup>。

食食作用は顆粒細胞とプラズマ細胞によってバクテリアなどの微小な異物をエンドサイトーシスにより血球内に取り込み、殺菌、消化する防御反応である。また、このバクテリアなどを細胞内に取り込んだ顆粒細胞が集合体をつくったり、バクテリアの集塊を顆粒細胞が取り囲むことによって分散を防ぐ反応がノジュール形成として知られている。食作用は対象となる異物が血球よりも小さな異物に対する反応であるのに対し、包圍化と呼ばれる防御反応は血球よりも大型の異物に対し起こる反応で、まず顆粒細胞により異物を取り囲んだ後、プラズマ細胞が反応し、この二種類の血球層を異物の周りに形成することで生体内での異物隔離を行う反応である。

## (3) 体液性防御反応

バクテリアが感染した場合、まず細胞性防御反応である食作用とノジュール形成によりバクテリアの排除が行われ、これに伴い体液性防御反応が働く。体液性防御反応としては、1)抗菌性タンパク質の誘導 2)フェノールオキシダーゼ系の活性化 3)レクチン 4)補体様因子 5)抗ウイルス性因子などがある<sup>5)</sup>。中でも、バクテリアに対する主要な防御システムの一つとして、バクテリア感染によって誘導される数種の抗菌性タンパク群の存在が挙げられる。

### 1. リゾチーム

昆虫から単離された最初の抗菌性タンパクは、*Galleria mellonella* 由来のリゾチームである<sup>6)</sup>。鱗翅目の *Hyalophora cecropia* 由来のリゾチームは 120 アミノ酸残基、分子量 13.8kDa で脊椎動物である卵白リゾチームに非常に似かよっている<sup>7)</sup>。ムラミシダーゼであるリゾチームは数種のグラム陽性菌に対して作用し、細胞壁を加水分解する溶菌酵素として働く。誘導性の抗菌性タンパク質とは異なり、リゾチームは幼虫や蛹の体液中に常に存在し、さらにバクテリアの感染などの刺激によって誘導され、体液中の濃度が増加する

8, 9)。バクテリア感染のない健常な昆虫の体液に含まれるリゾチームはバクテリアの感染に対する昆虫の初期防衛手段の一つであると考えられ、その後誘導されるセクロピン、アタシンと相乗的に働くことで効率よくバクテリア感染に対抗するものと考えられる<sup>10)</sup>。

## 2. セクロピン

セクロピンは Boman らにより *H. cecropia* より最初に単離された分子量約 4,000 の塩基性タンパク質で現在までに同族体 A,B 及びマイナー成分の D タイプの存在が確認されている<sup>11, 12)</sup>。セクロピンタイプの抗菌性タンパク質はその他センチニクバエの *Sarcophaga peregrina*<sup>13)</sup>、カイコ *Bombyx mori*<sup>14, 15)</sup>、タバコスズメガ *Manduca sexta*<sup>16)</sup> など多くの昆虫から単離されている。また、昆虫のみならず哺乳類からの報告もあり、ブタ小腸からもセクロピンタイプの抗菌性タンパク質が見つかった<sup>17)</sup>。

cDNA あるいはゲノム配列から、セクロピンは 22 アミノ酸残基のシグナルペプチドを含んだ 62-64 残基で構成されたプレプロセクロピンの形で合成され、産生細胞から分泌時にシグナルペプチドが離れる。この後、体液中に存在するジペプチダーゼにより、プロリンを含む N 末側のジペプチドが外れ mature なセクロピンとなる。その結果、セクロピンは 35~37 アミノ酸残基から構成されており、N 末端部分は強塩基性を示し、C 末端の半分は疎水性を呈している<sup>18)</sup>。三次構造として N 末側と C 末側の 2 つの  $\alpha$ -ヘリックスが Ala-Gly-Pro を介して結合した構造をとる<sup>19)</sup>。大腸菌にセクロピンを作用させると ATP 量の減少と共に、細胞内  $K^+$  の漏出が認められる<sup>20)</sup>。これはセクロピンがバクテリア内膜にイオンチャンネルを形成することで膜電位を消失させ、物質輸送、ATP 合成を阻害するためであり、C 末端の疎水性の  $\alpha$ -ヘリックスは内膜へ侵入するために必要であると考えられる<sup>21)</sup>。また、リポソームを用いてセクロピンの膜への作用を検討した結果、負に帯電した脂質で構成された膜の場合に効率よく膜電位が消失することより<sup>22)</sup>、N 末側の塩基性がバクテリア内膜への吸着に働くものと考えられ、二つのヘリックスを結ぶ Ala-Gly-Pro の嫌ヘリックスアミノ酸を含むトリペプチドのヒンジ構造により柔軟に曲がることで、それぞれのヘリックスを効率よく働かせている<sup>21)</sup>。

セクロピンの抗菌効果は孔平板法により測定され、その抗菌スペクトルは多くのグラム陽性菌、グラム陰性菌に対して殺菌効果を示す<sup>23)</sup>。このセクロピンタイプの抗菌性タンパク質はリゾチームと異なり通常の体液中には存在せず、バクテリアの感染によって脂肪体および血球で合成され、体液中に分泌される。しかし、セクロピンタイプの抗菌性タン

パク質である *S. peregrina* 由来のサルコトキシン I A はバクテリア感染のみならず特定の発育ステージで発現していることがノーザン分析の結果から明らかとなった<sup>24)</sup>。この結果はセクロピンがある種の昆虫では単にバクテリアに対する生体防御だけではなく変態時に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

### 3. アタシン

セクロピンと同様 *H. cecropia* より単離されたアタシンは当初、A から F の 6 タイプが存在する<sup>23)</sup>。しかし、得られた cDNA クローンよりこれらのアタシンは酸性アタシン (acid attacin) と塩基性アタシン (basic attacin) の 2 つの遺伝子産物であることが明らかとなった<sup>25)</sup>。アミノ酸配列の解析から酸性アタシンは 188 残基、塩基性アタシンは 187 残基から成り、それぞれの C 末端側にある、Ser-Lys-Tyr-Phe のテトラペプチドの部分分解と、酸性アタシンの N 末端 Glu 1 の環状化 (Pyroglutamate) の有無から 6 タイプのアタシンが生じたものと考えられる<sup>26)</sup>。

アタシンの抗菌スペクトルは狭く、*Esherichia coli* と 2 種類の腸内細菌にのみ効果が認められている<sup>23)</sup>。また、バクテリアの定常期には効果が無く、増殖期のバクテリア外膜に働くことで、隔壁合成を阻害する<sup>25, 27)</sup>。実際、アタシンと同族の抗菌性タンパクである *S. peregrina* 由来のサルコトキシン II を作用させたバクテリアを電子顕微鏡によって形態観察すると、菌体の伸長化と共に細胞膜のスフェロプラスト様変化が生じ、菌体の破損が認められる<sup>28)</sup>。

### 4. デフェンシン

デフェンシンは 6 個の Cys を含む 29~35 アミノ酸残基からなり、多くのグラム陽性菌および陰性菌に対して抗菌作用を示す抗菌性ペプチドで、貪食作用を有する多形核白血球であるヒトの好中球より最初に見つかった<sup>29)</sup>。ウサギでは肺胞マクロファージに存在し、呼吸経由のバクテリア感染に対抗する<sup>30)</sup>。同じデフェンシンファミリーである  $\beta$ -デフェンシンはラット<sup>31)</sup>、マウス<sup>32)</sup>、ウシ<sup>33)</sup>などに存在することが明らかとなっており、このタンパクは哺乳類一般の抗バクテリア物質であると考えられた。しかし、これと相同性を持つ抗菌性タンパク質が *Phormia terranova*<sup>34)</sup>、および *S. peregrina*<sup>35)</sup> など数種の昆虫より見つかっており、昆虫デフェンシン、あるいはザーペシンとして知られている。昆虫デフェンシンはグラム陽性菌の細胞膜に働き、膜透過性に変化を与え ATP 合成を阻害するな

どの効果を示すが、グラム陰性菌や真核細胞には影響が少ない<sup>36)</sup>。

#### 5. フェノールオキシダーゼ系

抗菌性タンパク質誘導と同じく、昆虫の体液性防御に関わると考えられる防御機構にフェノールオキシダーゼ系がある。バクテリアやカビの感染によって活性化されたフェノールオキシダーゼにより、体液中のフェノール性物質のチロシンが酸素存在下で酸化されメラニンを形成する。その結果、このメラニンは体表の傷を塞ぐと共に、侵入したバクテリアやカビなど異物の周囲を包囲化し、増殖や分散を防ぐ<sup>37, 38)</sup>。カイコ *B. mori* におけるフェノールオキシダーゼ系カスケードの誘発は、バクテリア細胞壁 PG、あるいはカビの細胞壁成分である  $\beta$ -1,3-グルカンを特定のタンパク質が認識することから始まり、セリンプロテアーゼ前駆体が活性化され、次に、このセリンプロテアーゼによりフェノールオキシダーゼ前駆体(ProPO)が活性化される<sup>39, 40)</sup>。

#### 6. その他、生体防御に関連する体液性因子

ヘモリン(hemolin)は *H. cecropia* と *M. sexta* より単離された免疫グロブリンスーパーファミリー属する分子量 50kDa のタンパク質で、通常は体液中に低いレベルで存在し、バクテリアの感染により *Cecropia* では 18 倍、*Manduca* では 30-45 倍もの濃度の増加が認められる<sup>41)</sup>。このヘモリンはバクテリア感染に対する防御タンパクの一つとして考えられているが、他の誘導性タンパク群のような抗菌性を示さない<sup>42)</sup>。Sun ら<sup>43)</sup>は *in vitro* において、ヘモリンがバクテリアへ特異的に結合することを明らかにし、さらに Ladendorff ら<sup>44)</sup>は、ヘモリンが血球に結合することで血球の凝集が妨げられることを示した。また、Sirlei ら<sup>45)</sup>はヘモリンが LPS、特にその構成脂質であるリピド A に結合することを示したことから、このタンパク質がバクテリアの認識に関与し、オプソニンとしての働きを持つ可能性が考えられる。

#### (4) 抗菌性タンパク質の誘導因子及びその認識機構

抗菌性タンパク質の誘導機構の解明を目的に幾つかの研究グループにより抗菌性タンパク質の誘導因子の特定が行われ、幼虫に様々な物質を注射することで誘導の特異性が検討された。Powning ら<sup>45)</sup>は鱗翅目昆虫の *G. mellonella* と *B. mori* の幼虫にグラム陽性菌である *Micrococcus lysodekiticus* 生菌を注射し、体液中のリゾチーム活性が無処理の幼虫体液

に比べ約 10 倍程度高くなることを明らかにした。また、セクロピンタイプの抗菌性タンパク質もリゾチームと同様に幼虫の体腔内にバクテリア菌体を注射することで誘導される<sup>46, 47)</sup>。この鱗翅目昆虫に認められる抗菌性タンパク質誘導は、バクテリア感染のシグナルとしてグラム陰性菌外膜の構成成分であるリポ多糖(LPS)およびグラム陰性、陽性菌に共通して含まれる細胞壁ペプチドグリカン(PG)が誘導因子として働く<sup>48, 49, 50)</sup>。PG は $\beta$ -1,4 結合した N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンの繰り返しから成る糖鎖とムラミン酸に結合した短いペプチド鎖から構成されている。このペプチド鎖はリジン、あるいはジアミノピメリン酸を含み、これらのアミノ酸の持つ  $\epsilon$ -アミノ基を介して他のペプチド鎖の C 末端と架橋を形成している。グラム陰性菌の PG はペプチド側鎖同士が直接結合しているが、グラム陽性菌の場合、架橋部分が種により多様な構造を持つ。カイコ *B. mori* では、注射するバクテリアの種類とそれによって誘導される抗菌活性の間に相関性があり、グラム陰性菌では種に関係なく高い誘導効果を示すが、*M. luteus* を含めた特定のグラム陽性菌では誘導効果が低い。Morishima ら<sup>51)</sup>はこのバクテリアの種類の違いによる誘導効果の違いが PG の構造に依存することを明らかにした。

昆虫の抗菌性タンパク質の誘導因子である LPS は、古くからヒトのバクテリア感染による敗血症の主要因子として特定されておりマクロファージに作用することで腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、IL-1、IL-6 などサイトカインの過剰発現を誘発することが知られている<sup>52, 53, 54)</sup>。しかし、グラム陰性菌の感染によって起こる種々の生体反応が LPS を持たないグラム陽性菌においても同様に起こり、その誘発因子がバクテリア細胞壁 PG であることが明らかとなった<sup>55)</sup>。また、N-アセチルムラミン酸と L-アラニン、D-イソグルタミン酸の二つのアミノ酸から成る muramyl dipeptide(MDP)は、抗体産生を誘発するアジュバントペプチドとして知られているが<sup>56)</sup>、MDP は PG の部分構造であり、PG 自体がアジュバント活性を持ち、免疫系細胞に働き様々な生体反応を引き起こす。これらの結果は昆虫から哺乳類に至るまで、PG や LPS など細胞壁成分がバクテリア感染の共通のシグナルとして働いていることを示唆する。

哺乳類における LPS や PG の認識システムについては、直接ヒトの病態と関連する研究対象として注目され、多くの研究グループにより解明されつつある。LPS に関しては、その認識システムとして CD14 と LPS-binding protein (LBP)が知られている<sup>57)</sup>。血漿中に存在する LBP は生体内に侵入したグラム陰性菌の LPS と結合し、LBP-LPS 複合体を形成する。この複合体はマクロファージ細胞表面上に存在する CD14 によって認識されること

で、細胞内へのシグナル伝達が行われる<sup>58)</sup>。

LPS とは対照的に PG 認識システムについての知見は少ない。Dziarski ら<sup>59, 60, 61)</sup>の報告によればリンパ球細胞の表面上に PG に特異的な結合部位を検出し、しかも LPS もこの部位に結合することを示し、LPS と PG は同じ認識システムを共有すると考えられていた。その後、この PG 結合タンパクは細胞培養時に用いられた血清アルブミン (BSA) であることが明らかとなったが、実際に BSA や、ヒトアルブミンが免疫システム誘発のための PG 認識に関わっているのかは不明である。また、最近になり同じ Dziarski らのグループが、LPS 認識システムである CD14 に PG が特異的に結合することを報告した<sup>62, 63, 64)</sup>。

哺乳動物での PG 認識システムの解明が明らかでないのと同様、昆虫においても PG 認識システムに関する報告は少ない。唯一昆虫の PG の認識システムとして知られているものでは前述した Ashida らによって報告されているフェノールオキシダーゼ系における PG 認識タンパクがある<sup>65)</sup>。バクテリア感染を認識するという共通性から PG 認識系を共有する可能性も考えられるが、フェノールオキシダーゼ系は高分子 PG により活性化され、リゾチーム処理した低分子 PG では活性化されないが<sup>41)</sup>、抗菌性タンパク質は低分子 PG により誘導される<sup>51)</sup>。これらの結果からフェノールオキシダーゼ系と抗菌性タンパク質誘導系は PG を誘因物質とするが、それぞれ異なった認識機構により活性化されるものと考えられる。フェノールオキシダーゼ系での PG 認識タンパクの解明が進む一方で、抗菌性タンパク質誘導系における PG 認識機構についてはこれまで報告例がない。

前述したように、昆虫では、T 細胞、B 細胞などによる特定の抗原に対する獲得性免疫反応は確認されておらず、記憶を伴わない非獲得性の防御反応のみ働くと考えられている。哺乳類の免疫機構の中で、補体系の第二経路活性化やマクロファージの活性化は非獲得性免疫反応の一つであり、バクテリア由来の成分により直接活性化される。これら非獲得性免疫はその後に続く獲得性免疫が働くまでのラグタイムを埋めるための初期防御反応であると考えられる。昆虫にとってラグタイムは致命的な出来事であり、バクテリア感染に対し、即効的で有効的な非自己認識システムと急性期反応を必要とする。それ故、フェノールオキシダーゼ系やヘモリンなどの非自己認識システムや、一度の感染によって数種類の抗菌性タンパク質を誘導させるシステムを進化の上で発達させてきたと考えられる。その一方で、セクロピンやデフェンシンなどの抗菌性タンパク質が哺乳類にも存在するなど、昆虫特有と考えられていた抗菌性タンパク質が生物種を越え、共通して存在することから、昆虫で主要な働きを担う抗菌性タンパクは系統発生的に保存された防御システムの一つで

はないかと考えられる。故に昆虫の抗菌性タンパク質誘導機構の解明は昆虫の枠に留まらず、哺乳類における初期防御反応の解明や、哺乳類の進化の過程で淘汰され休眠している新たな免疫システムの発見につながる可能性が考えられる。

本研究は昆虫において、バクテリア感染により生じる抗菌性タンパク質誘導の経路解明を目的とし、特に誘導因子としてバクテリア細胞壁 PG の必要な最小構造の決定、及び昆虫のみならず哺乳類においても明らかとなっていない PG 認識システムについて検討した。

## 第Ⅱ章 脂肪体培養系を用いた *in vitro* での抗菌性タンパク質誘導

### 第1節 緒言

抗体を介した抗原特異的な生体防御システムを持つ脊椎動物とは対照的に、免疫記憶を伴わない昆虫の生体防御システムを構成する主要な因子の一つである抗菌性タンパク質は、バクテリア感染に対するエフェクター因子として、セクロピンやアタシン、デフェンシンなど様々な種類の抗菌性タンパク質が多く昆虫から見つかった。これまで抗菌性タンパク質は、将来的な有効利用を目的としてタンパク質あるいは遺伝子レベルから多くの情報が得られた。しかし、バクテリア感染から抗菌性タンパク質の誘導に至るまでの経路に関しては今だ完全に解明されていない。

抗菌性タンパク質は、バクテリア菌体を直接昆虫の体腔内に注射することで体液中に誘導される<sup>47, 48)</sup>。Dunn ら<sup>50)</sup>は鱗翅目昆虫である *Manduca sexta* を用いリゾチームや他の抗菌性タンパク質の誘導が、*M. luteus* 由来の細胞壁可溶性ペプチドグリカン(SPG)の刺激によって起こることを示した。また、彼らは、昆虫体腔内に侵入したバクテリアが体液中のリゾチームにより分解を受け、その結果生じた PG 断片が抗菌性タンパク質合成のための誘導因子であると考えた。Morishima ら<sup>51)</sup>はある特定構造のバクテリア細胞壁 PG が抗菌性タンパク質誘導に必要であることを *Bombyx mori* 幼虫を用いて明らかにした。*B. mori* において、ペプチド側鎖同士が直接架橋した構造を持つ *E. coli* や *B. megaterium* の細胞壁 SPG を注射した場合、抗菌性タンパク質の高い誘導効果が得られたが、ペプチド側鎖間にリジンを含むペントペプチド架橋を有する *M. luteus* 由来の SPG による誘導効果は低いものであった。この結果は、バクテリア細胞壁 PG 構造を識別するシステムが宿主であるカイコに存在することを示唆している。

抗菌性タンパク質の合成は、主に脂肪体と呼ばれる哺乳類の肝臓に相当する代謝機能を持った器官によって行われる。Faye ら<sup>60)</sup>は予めバクテリアを注射して免疫化した *H. cecropia* 蛹の脂肪体組織を *in vitro* で培養した場合でも抗菌性タンパク質を合成することを示した。また、Dunn<sup>61)</sup>らは *M. sexta* 幼虫の脂肪体を PG 存在下で培養すると培地中に抗菌性タンパク質が誘導されることを明らかにした。誘導経路を解明する上で昆虫の生体そのままを用いる *in vivo* の条件では体液中の血球の関与を除外できず、明確な答えが得られ難いため、Dunn らのように *in vitro* の条件下で行う実験系は、バクテリア感染から抗菌性タンパク質誘導までの経路を分子レベルで解明する上で、有効な手法であると考えられ



る。

本章では、カイコ生体内のバクテリアに対する複雑な生体防御システムを簡略化し、その解明のための知見を得るためカイコ幼虫脂肪体の *in vitro* での抗菌性タンパク質誘導系を確立し、セクロピン及びビリゾチームの誘導に必要な因子について検討を行った。

## 第2節 材料及び方法

### 2-1 材料

#### (1) カイコ

カイコ (*Bombyx mori* C108) は人工飼料 (ヤクルトクロレラ配合飼料原種稚蚕用) で 28℃、短日条件下にて無菌的に飼育し、5 令 3 日目又は 4 日目の幼虫を用いた。

孵化直前の卵を 70%エタノール (1 分間)、3%ホルマリン (15 分間) 100%エタノール (1 分間) の順で浸すことで無菌処理した後、オートクレーブで滅菌した濾紙で水分を除去し、風乾した。通気性のシリコン栓を施したメリクロン培養用フラスコ (300ml 容) に人工飼料を入れ、オートクレーブしたものを用意し、この中で無菌処理した卵を孵化させ、無照明で飼育を継続した。無菌飼育したカイコ幼虫を転がした栄養寒天培地プレート上で転がし、これを 37℃で 2 日間インキュベートし、バクテリア生育の有無を調べ幼虫体表面が無菌状態であることを確認した。また、以上の無菌操作はすべてクリーンベンチ内にて行った。

#### (2) バクテリア

*Bacillus licheniformis* IFO 12195, *Bacillus megaterium* IFO 3970, *Micrococcus luteus* IFO 3333, *Escherichia coli* K12 IFO 3301, は大阪発酵研究所より入手した。セクロピン感受性菌である *E. coli* D22(st r)は、ストックホルム大学 (スウェーデン) の H. Steiner 博士より譲り受けた。その他のバクテリアは研究室保存菌を用いた。

#### (3) 試薬

[<sup>3</sup>H]-リジンはアマシャム・ジャパン社より、*E. coli* O111:B4 由来リボ多糖、*E. coli* F583 由来リピド A、*Saccharomyces cerevisiae* 由来ザイモサン、*Laminaria digitata* 由来ラミナリン、アジュバントペプチド、*Staphylococcus aureus* のペプチドグリカンを構成するペントペプチド (Ala-D-isoglutaminy-Lys-D-Ala-D-Ala)、シクロヘキシミド、アクチノマイシン D、卵白リゾチーム及び *M. luteus* 凍結乾燥菌体は Sigma 社より購入した。また、キチンオリゴ糖 (4 糖 : 5 糖 : 6 糖 : 7 糖 : 8 糖 : 9 糖) = 6.8% : 46.9% : 16.8% : 12.6% : 10.3% : 6.6% = wt %、キトサンオリゴ糖 (4 糖 : 5 糖 : 6 糖) = 19.6% : 48.2% : 32.2% は、鳥取大学農学部 平野茂博 名誉教授より譲り受けた。

## 2-2 方法

### (1) カイコ幼虫からの脂肪体組織の摘出及び培養

脂肪体摘出に用いるカイコは解剖直前に 70%エタノール、滅菌水の順で体表面を洗浄し、解剖皿内に虫ピンで固定化した後、氷冷した鱗翅目昆虫用 Ringer 液(110mM KCl, 4mM NaCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM K-phosphate pH6.5)を満たした。腹部を縦に切開し、切り口を広げピンで固定化した後、脂肪体以外の組織を除去した。脂肪体の付着したままの体皮を解剖皿に固定化したまま、体液の除去を目的とし氷冷 Ringer 液で 2 回洗浄した。クチクラ層を傷つけない程度で、スパテルを用いて脂肪体を掻き取った。摘出した脂肪体は Grace 培地に移し、27°C、1 時間放置し、残存する血球を除いた。

組織培養に用いた Grace 培地 (GIBCO 社製) はペニシリン G を 10,000 Units/ml、ストレプトマイシン硫酸を 100 μg/ml となるように加えた後、0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌を行ったものを用いた。湿重量で約 50mg 程度の脂肪体を 200 μl の Grace 培地を含むガラス試験管 (15×105mm) に移し、27°C で振とう培養した。一定時間培養後の培地は抗菌活性測定に用い、脂肪体組織は遠心して集め、タンパク定量を行った。また、解剖及び培養に用いた器具類はすべてオートクレーブあるいは乾熱殺菌したものを用いた。

鱗翅目昆虫組織培養用 Grace 培地<sup>68)</sup>

Component	mg/l	Component	mg/l
<b>Inorganic salt</b>		<b>Vitamins</b>	
CaCl <sub>2</sub>	1.000	p-Aminobenzoic acid	0.000020
MgCl <sub>2</sub>	1.068	Biotin	0.000010
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.357	Choline chloride	0.000200
KCl	2.240	Folic acid	0.000020
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.876	myo-Inositol	0.000020
<b>Amino acids</b>		Niacin	0.000020
β-Alanine	0.200	D-Pantothenic acid,hemicalcium	0.000020
L-Alanine	0.225	Pyridoxine HCl	0.000020
L-Arginine,HCl	0.700	Riboflavin	0.000020
L-Aspartic acid,free acid	0.350	Thiamine	0.000020
L-Asparagine,anhydrous	0.350	<b>Other</b>	
L-Cystine, dihydrochloride	0.025	D(-)-Fructose	0.400
L-Glutamic acid	0.600	Fumaric acid,free acid	0.055
Glycine,free base	0.650	D(+)-Glucose	0.700
L-Histidine,free base	2.500	α-Ketoglutaric acid	0.370
L-Isoleucine	0.050	L(-)-Malic acid,free acid	0.670
L-Leucine	0.075	Sucrose	23.680
L-Lysine,HCl	0.625	Sodium Bicarbonate を 0.35 mg/l となるように 加えた後、1N HCl あるいは 1N NaOH を用い pH6.3 とした。(後のフィルターろ過により pH が 0.1~0.3 上昇することを見越して pH を 6.5 とした。実際は最終 pH6.5)	
L-Methionine	0.050		
L-Phenylalanine	0.150		
L-Proline	0.350		
DL-Serine	1.100		
L-Threonine	0.175		
L-Tryptophan	0.100		
L-Tyrosine,disodium	0.072		
L-Valine	0.100		

## (2) 抗菌活性の測定

セクロピン活性の測定には、*E. coli* D22(str)を検出菌とした孔平板法<sup>68)</sup>により行った。まず、40℃に保った1%ブイヨン培地(1%低温ゲル化寒天、1%肉エキス、1%ペプトン、0.5%NaCl、pH7.5) 10mlに 対数増殖期の*E. coli* D22、 $2 \times 10^7$  cellsを加え、シャーレに広げ、検出菌を含んだ寒天プレートを作成した。このプレートに直径2mmの孔をあけ、抗菌活性の測定のための試料を2 $\mu$ l注入し、37℃で一晩インキュベートした後、孔の周りに形成されるバクテリア生育阻止円の直径を測定し、カイコセクロピン<sup>15)</sup>により作成した標準曲線と比較して活性を求めた。1 $\mu$ gのカイコ精製セクロピン相当量を1unitとし、各試料の抗菌活性をセクロピン相当値のunit数で示した。

## (3) リゾチーム活性の測定

リゾチーム活性の測定は*M. luteus*乾燥菌体の濁度減少を測定することで行った。0.05 M phosphate buffer, pH 6.5に*M. luteus*乾燥菌体を0.2mg/mlとなるように懸濁した。リゾチームを含む各試料溶液50 $\mu$ lを950 $\mu$ lの乾燥菌体懸濁液に加え、450nmにおける濁度減少を30℃で継続測定した。1分間に吸光度が1.0減少したときのリゾチーム活性を1unitとして表した。また、1unitはカイコリゾチーム約2 $\mu$ gの活性に相当する。

## (4) タンパク質の測定

培養後の脂肪体に1mlの0.1N NaOHを加え、超音波破碎装置によってソニケーション(10W,30sec)し、可溶化した。ウシ血清アルブミンを標準試料とし、Bradford法<sup>69)</sup>により可溶化した脂肪体タンパク量の測定を行い、各試料中に含まれるセクロピン活性あるいはリゾチーム活性を脂肪体タンパク1mg当たりのunit数で示した。

## (5) 脂肪体内への<sup>3</sup>H-リジンの取り込み

脂肪体培養系へ<sup>3</sup>H-リジンを添加しタンパクへの取り込みを測定する場合、用いた培養液はTrenczekら<sup>70)</sup>の用いたGrace培地改良型を参考にし、リジンを除いた培地組成で調製した。通常の脂肪体の培養と同様、カイコ5令3日目の幼虫より摘出した脂肪体を10 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-リジン及び0.5mMの非標識リジンを含む培養液500 $\mu$ l中、27℃で振とう培養した。また、<sup>3</sup>H-リジンを加えた直後にTCA処理した場合をネガティブコントロール

ルとした。

一定時間インキュベートしたサンプルを 1000rpm で 5 分間遠心し、組織と培養液に分けた。脂肪体組織は 10mM リジンを含む 5%TCA を 1ml 加えた後ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズし、3000rpm で、10 分間遠心した。沈殿物を 1ml の 5%TCA、1ml のエタノール-エーテル(1:1)でそれぞれ 2 回ずつ遠心洗浄し、脂質を除去した。残った脂肪体由来のタンパクの沈殿物に 1ml の 0.1N NaOH を加え可溶化し、これにトライトン-キシレン系のシンチレーション液を 6ml 加え脂肪体への $[^3\text{H}]$ -リジンの取り込み量を測定した。

インキュベート後の培養液中へ分泌された可溶性タンパク質の場合、遠心して得られた培養液に BSA を最終濃度 0.1mg/ml、リジンを 10mM、TCA を 10%になるように添加し、可溶性タンパク質を沈殿させた。これを 3000rpm、10 分間遠心し、得られた沈殿に組織の場合と同様に 5%TCA、エタノール-エーテル (1:1) の順で 2 回遠心洗浄し、0.1N NaOH で溶解後、液体シンチレーションカウンターにより取り込まれた $[^3\text{H}]$ -リジン量を測定した。

#### (6) ポリアクリルアミド電気泳動

タンパクの電気泳動は Hultmark ら<sup>10)</sup>の方法に従い、pH4.3 の酸性電気泳動を行った。 $[^3\text{H}]$ -リジンの取り込まれたタンパクを電気泳動する場合、インキュベート後の培養液に 80% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、得られた沈殿を 30  $\mu\text{l}$  の 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5 に再溶解したものを泳動用試料とした。

Laskey<sup>7)</sup>の方法に従い、フルオログラフィ(DMSO-PPO 系)によって泳動後の $[^3\text{H}]$ 標識されたタンパク質の検出を行った。また、X 線フィルムは前露出し、増感板を用いた。

### 第3節 結果

#### (1) 培養脂肪体によるタンパク質合成の確認

脂肪体組織による *in vitro* での抗菌性タンパク質の誘導系を確立するために、摘出した脂肪体組織を用いて *in vitro* で正常なタンパク合成が行われることを確認した。セクロピンのアミノ酸配列よりリジン含量が高いことに着目し、抗菌性タンパク質の合成を示す指標として培養した組織への $[^3\text{H}]$ -リジンの取り込みを調べた。培地には鱗翅目昆虫の細胞培養に一般的に用いられている Grace 培地より、リジンを除いたものを用いた。

脂肪体組織への $[^3\text{H}]$ -リジンの取り込みは少なくとも培養開始 48 時間まで継続して認められた (Fig. II-1)。また、組織培養液を TCA 沈殿して得られる可溶性画分も脂肪体細胞タンパクの場合と同様に、培養時間の経過に従い $[^3\text{H}]$ -リジンの取り込み量が上昇した。この結果は少なくとも 48 時間は脂肪体組織の培養が可能であり、可溶性タンパクの分泌を含め、生合成系が維持されていることを示唆している。

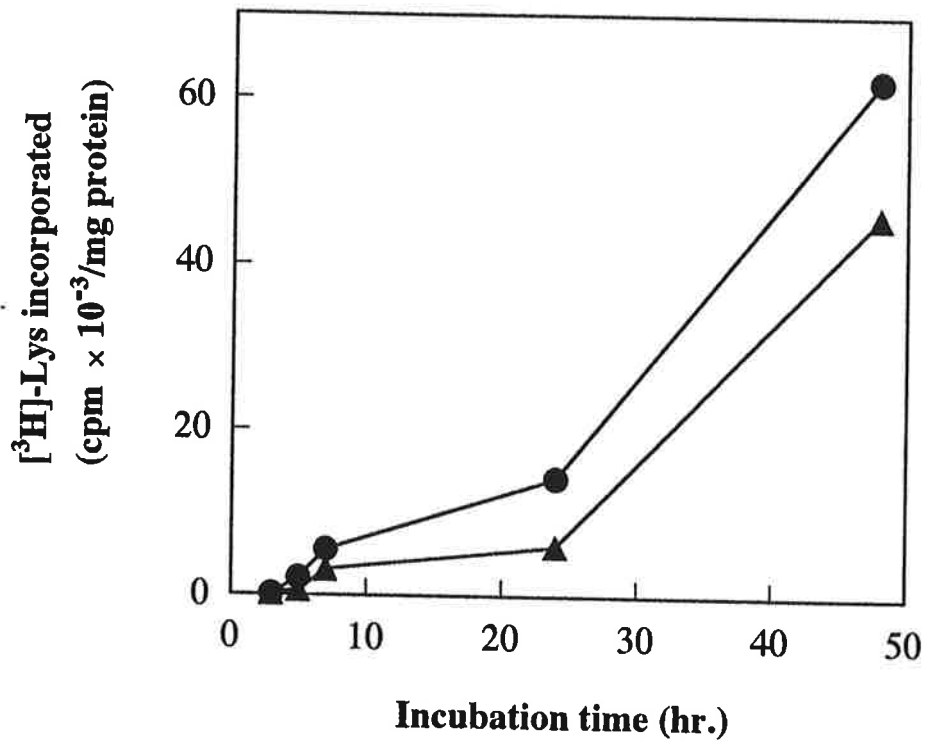


Fig. II -1 Protein synthesis in fat body cultured *in vitro*  
 Fat body isolated from 5th instar larvae was cultured in Grace's medium with addition of [<sup>3</sup>H]-lysine at 27°C for 48 h. At the time indicated, the tissue (●) or the culture medium (▲) was taken and the radioactivities incorporated into TCA precipitated fractions were measured.



## (2) 脂肪体培養系における抗菌性タンパク質の誘導

細胞内及び分泌性タンパクの合成が *in vitro* での培養脂肪体でほぼ正常に行われていると考えられたことから、*in vitro* での抗菌性タンパク質誘導を試みた。カイコ抗菌性タンパク質は、PG を注射することで誘導されることから、あらかじめ PG により免疫化した幼虫の脂肪体は培養条件さえ整っていれば *in vitro* においても抗菌性タンパク質の合成を行うものと推測される。そこで *E. coli* 可溶性 PG 10  $\mu$ g を幼虫に注射し、体液中に抗菌活性が認められる 6 時間経過後の幼虫脂肪体を培養に用いた。この免疫化した脂肪体を培養すると、培養開始直後から抗菌活性が培地中に検出され、その後 24 時間まで分泌されていることが認められた (Fig. II-2)。この脂肪体培養液に *E. coli* SPG を 50  $\mu$ g/ml となるように添加した場合、培養開始 5 時間までは無添加で培養した場合とほぼ同じ抗菌活性を示すが、24 時間後には数倍高い活性が認められた。

無処理の幼虫から摘出した脂肪体を培養すると、培養開始から、7 時間までは培地中に抗菌活性は検出されなかった。さらに培養を続けると 24 時間後にわずかに抗菌活性が検出された (Fig. II-2)。この無処理の幼虫脂肪体に SPG を添加して培養すると、10 時間後より顕著な抗菌活性が認められ、免疫化した幼虫脂肪体と同様に培養時間に伴う抗菌活性の増加が認められた。

この *in vitro* の培養では抗菌活性と共にリゾチーム活性も誘導された (Fig. II-3A)。培養に伴うリゾチーム活性の分泌は抗菌活性の場合とは異なり、SPG 無添加の場合でも培養開始 30 分から認められた (Fig. II-3B)。また、培養開始から 5 時間経過まででは SPG の添加の有無による違いは認められず、同程度のリゾチーム活性が検出されたが、SPG 添加した場合は 12 時間後からリゾチーム活性の顕著な増加が認められた。その結果、培養から 48 時間経過後の培地中のリゾチーム活性は SPG 無添加にくらべ約 3~4 倍程度高くなった。

この抗菌活性とリゾチーム活性を持つタンパク質の同定を目的とし、SPG 添加培地と無添加培地を用いて脂肪体を 24 時間培養後、それぞれの培地を試料として酸性電気泳動を行った (Fig. II-4)。*in vitro* の培養系において脂肪体から分泌したタンパクの染色パターン (lane 3,4) は、比較対照として用いたカイコ幼虫体液の場合 (lane 1,2) とほぼ同じであった。また、SPG を注射し抗菌性タンパク群を誘導させたカイコ免疫化体液 (lane 2) との比較から、SPG 添加培地を用いて培養した脂肪体からセクロピンとリゾチームが分泌されているこ

とが示された (lane 4)。また、Fig. II-4 のフルオログラフィの結果は培地に添加した  $^3\text{H}$ -リジンが新たに合成されたタンパク質に取り込まれていることを示しており、培地中に分泌されたセクロピンとリゾチームは、培養脂肪体において *de novo* 合成されることが明らかとなった。さらに、予めシクロヘキシミド、あるいはアクチノマイシン D を培地に加え、前培養した脂肪体ではセクロピンとリゾチームの合成が阻害されたことも、これら抗菌性タンパク質の活性発現が細胞内プールから放出されたものではなく、*de novo* 合成であることを支持している (Table. II-1)。

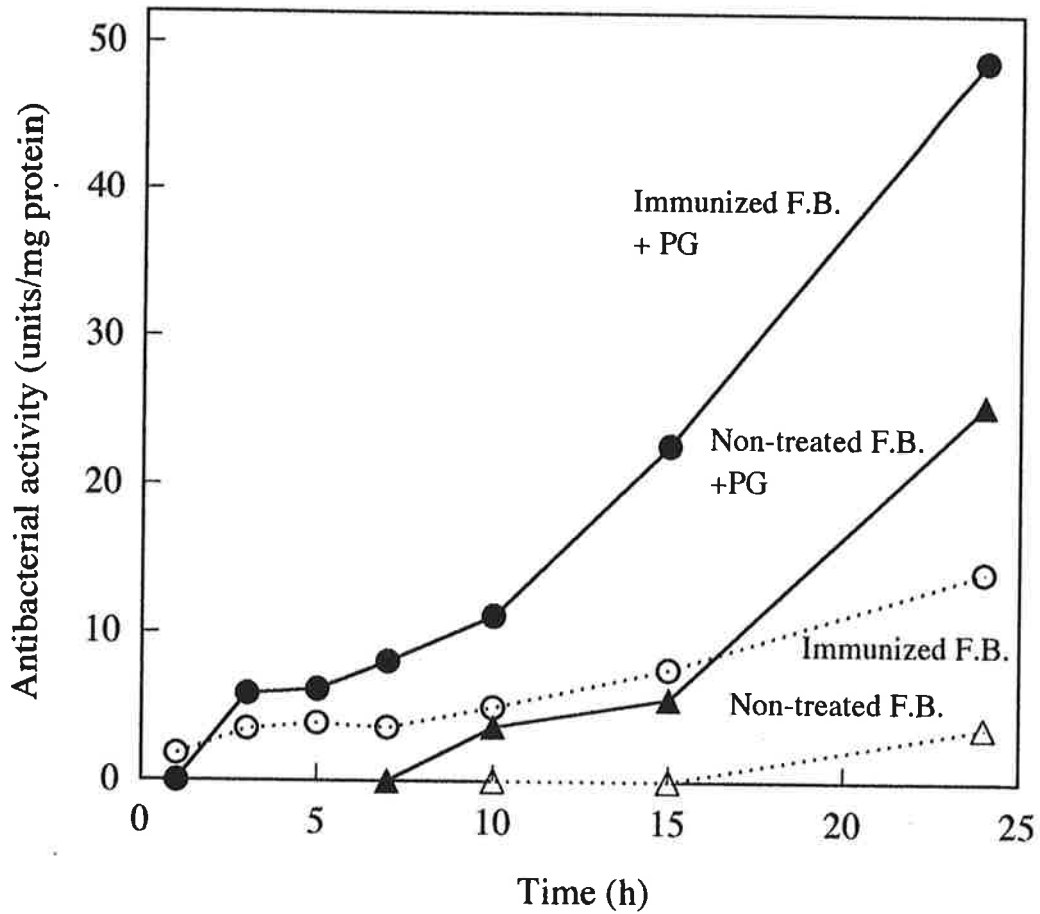


Fig. II-2 Bactericidal activity in fat body cultures. Silkworm larvae were injected with  $10 \mu\text{g}$  of *E. coli* SPG, then kept at  $28^\circ\text{C}$  for 6h. Fat bodies from injected (●, ○) or non-treated (▲, △) larvae were dissected out and incubated in Grace's medium with addition of  $50 \mu\text{g/ml}$  of *E. coli* SPG (solid symbols) or saline (open symbols). Aliquots of medium were withdrawn at intervals and assayed for bactericidal activity against *E. coli* D22. Values are the means of three determinations.

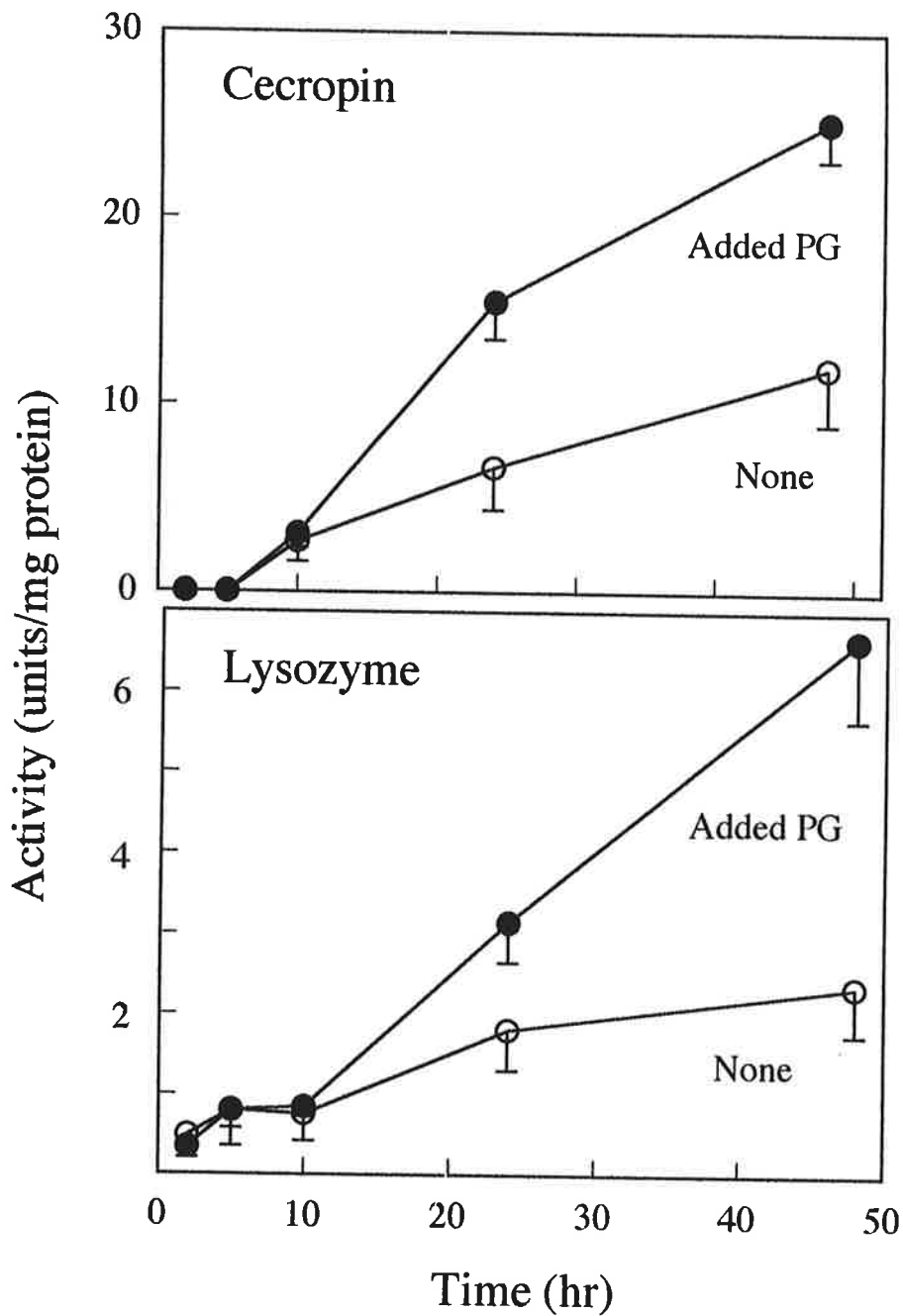


Fig. II-3 Induction of bactericidal and lysozyme activities by SPG in cultured fat body. Fat body from aseptically reared untreated larvae was incubated with (○) or without (●) *E. coli* SPG ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Aliquots of medium were withdrawn at intervals and assayed for bactericidal (A) and lysozyme (B) activities. Values and bars are the means  $\pm$  SD of five determinations.

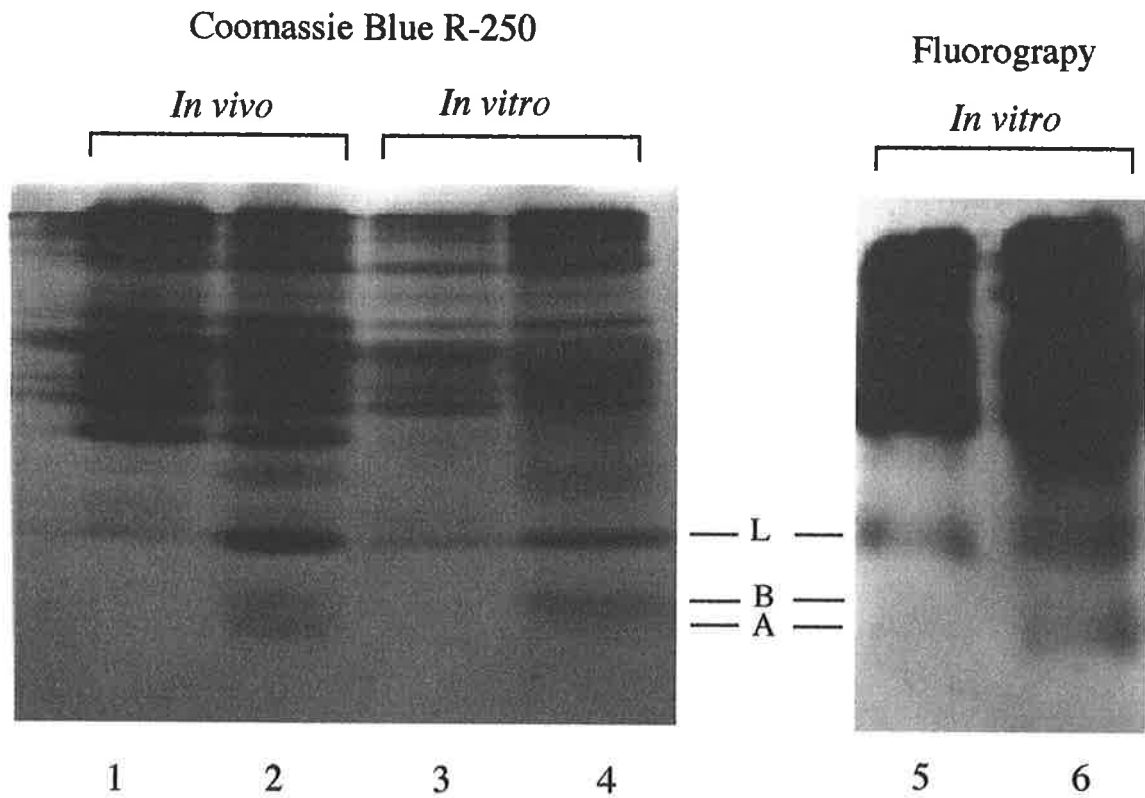


Fig. II-4 Acidic PAGE of the larval hemolymph protein and protein secreted from fat body culture. Left panel: protein was stained with Coomassie Blue R-250. Lane 1 and 2, hemolymph ( $10 \mu\text{l}$ ) from untreated and *E. coli* SPG injected larvae, respectively; lane 3 and 4, fat body culture medium ( $20 \mu\text{l}$ ) incubated for 24 h without and with  $50 \mu\text{g/ml}$  of *E. coli* SPG, respectively. Right panel: fluorography of  $[^3\text{H}]$ -labeled protein synthesized *in vitro* culture without (lane 5) and with (lane 6)  $50 \mu\text{g/ml}$  of SPG for 24 h. A,B: cecropin A and B; L: lysozyme.

Table 1. Effect of actinomycin D and cycloheximide on induction of antibacterial proteins. Fat bodies were preincubated with actinomycin D (50  $\mu$  g/ml) or cycloheximide (1mM) at 27°C for 30min in Grace's medium and then further incubated for 24 hr with or without 50  $\mu$  g/ml PG.

Inhibitor	dose	Activity (units/mg protein)			
		Cecropin		Lysozyme	
		Control	+PG	Control	+PG
None		16.4	38.1	52.2	96.0
Cycloheximide	1m M	N.D.	N.D.	2.4	3.3
Actinomycin D	50 $\mu$ g/ml	N.D.	N.D.	8.7	6.8

N.D.: not detected

### (3) バクテリア菌体による抗菌性タンパク質誘導

抗菌性タンパク質の誘導実験の多くは、カイコ生体に直接バクテリアや PG など誘導因子を注入することで行われた。このような *in vivo* での実験系ではバクテリア感染からそのシグナルが脂肪体に伝わるまでに血球細胞を含め多くの体液成分などが存在し、抗菌性タンパク質の誘導経路を解明する上で血球を含めた体液の関与を除外することが出来ない。そこで抗菌性タンパク質誘導における血球の必要性について検討するため *in vitro* の系にバクテリア菌体を直接加えてこれまでと同様に脂肪体の培養を行った。また、バクテリアは LPS の影響を避けるため、LPS を構成成分に持たないグラム陽性菌の *B. licheniformis* を実験に用いた。*B. licheniformis* の細胞壁 PG は *E. coli* の PG と同じくペプチド側鎖が直接架橋した構造を持ち、高い誘導効果を示すことが明らかとなっている。UV 照射し殺菌した *B. licheniformis* を  $5 \times 10^8$  cell/ml となるように培地に加え、これまでと同様に脂肪体の培養を行った(Fig II-5)。PG 添加の場合 8 時間経過後にセクロピン活性が検出されたが、バクテリア菌体を加えた場合 10 時間以降より検出された。しかし、その後 PG と同様に培養時間に従いセクロピンとリゾチームの顕著な誘導が観察された。この結果はカイコ生体内に侵入したバクテリアによる抗菌性タンパク質誘導に血球は必要でないことを示唆している。

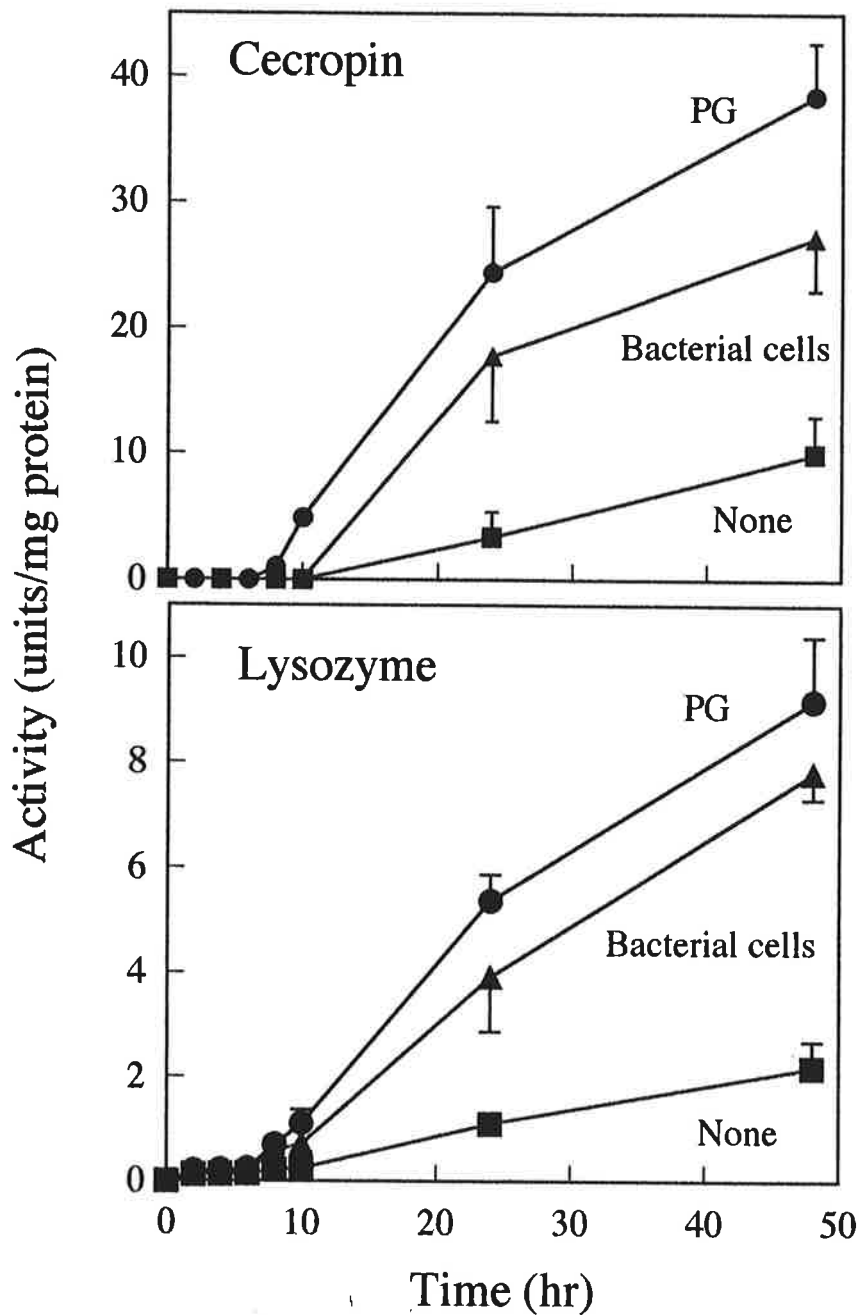


Fig. III-5 Induction of bactericidal and lysozyme activities by SPG or UV-killed bacteria in cultured fat body. Fat body from aseptically reared larvae was cultured with SPG from *B. megaterium* ( $50 \mu\text{g/ml}$ , ●), UV-killed *B. licheniformis* ( $5 \times 10^8$  cells/ml, ▲) or no addition (■). Aliquots of medium were withdrawn at intervals and assayed for cecropin (upper panel) and lysozyme (lower panel) activities. Values and bars are the means  $\pm$  SD of four determinations.



#### (4) 可溶性ペプチドグリカンによる抗菌性タンパク質誘導効果

この *in vitro* での抗菌性タンパク質誘導について、誘導因子である SPG の構造と誘導効果との相関性を検討した。SPG をカイコ幼虫へ注射して検討した *in vivo* の実験結果によると *E. coli* の SPG 注射では高い抗菌活性の誘導が認められるが、*M. luteus* 由来 SPG の誘導効果は低いことが明らかとなっている<sup>51)</sup>。そこで、それぞれのバクテリアより調製した SPG を培地中に 0.05-50  $\mu\text{g/ml}$  となるように加え、脂肪体を 24 時間培養し、培地中に誘導された抗菌活性を調べた (Fig. II-6)。SPG 無添加の場合に比べ、*E. coli* SPG を加えたものは、0.05  $\mu\text{g/ml}$  の濃度より抗菌活性の誘導が認められ、測定した 50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度まで添加量に従い抗菌活性の上昇が認められた。一方、*M. luteus* SPG の場合、5  $\mu\text{g/ml}$  の添加まで、顕著な抗菌活性の誘導は認められず、ほぼコントロールと同じであった。実験で用いた最大添加量である 50  $\mu\text{g/ml}$  において抗菌活性が表れたが、その抗菌活性は  $14 \pm 2$  units/mg protein で、この値は *E. coli* SPG に換算した場合、0.1  $\mu\text{g/ml}$  の SPG 濃度で得られる活性に相当する。このことは *M. luteus* SPG は、*E. coli* SPG に比べ 1/500 程度の誘導効果しかないことを示している。さらに誘導因子の構造特異性を調べるため、その他のグルカンやペプチドを用いて同様に *in vitro* での誘導を検討した (Table. II-2)。先の実験と同様、培地中に各種グルカンなどを 50  $\mu\text{g/ml}$  となるように加え、24 時間培養後の培地中に誘導された抗菌活性を測定した。昆虫の外骨格を構成する  $\beta$ -1,4-グルカンのキチンやその脱アセチル化物のキトサンは哺乳類で免疫賦活作用があることが報告されている<sup>72)</sup>。バクテリア細胞壁 PG の構成糖の一つである N-アセチルグルコサミン (GluNAc) のポリマーであり、PG 糖鎖と同様  $\beta$ -1,4 結合であることからこの糖鎖の誘導効果を検討したが、コントロールと同程度の活性しか得られなかった。また、単独で 50  $\mu\text{g/ml}$  添加しても効果が認められなかった PG のペプチド部分である PG peptide (Ala-D-isoGlu-Lys-D-Ala-D-Ala) をキチンあるいはキトサンと組み合わせ同じ培地中に添加したが、この場合も顕著な誘導は認められなかった。PG と共にフェノールオキシダーゼ系を活性化する誘発因子として知られる  $\beta$ -1,3-グルカンを構成糖に持つラミナリンや酵母細胞壁成分であるザイモサンによっても抗菌性タンパク質の誘導は得られなかった。さらに、PG の部分構造であり、アジュバント活性を持つアジュバントペプチドにおいても効果は認められなかった。これらいずれの PG 類似物質とも抗菌性タンパク質の誘導因子としての効果は無く、この結果は *in vivo* で得られた結果と一致した (Table II-3)。

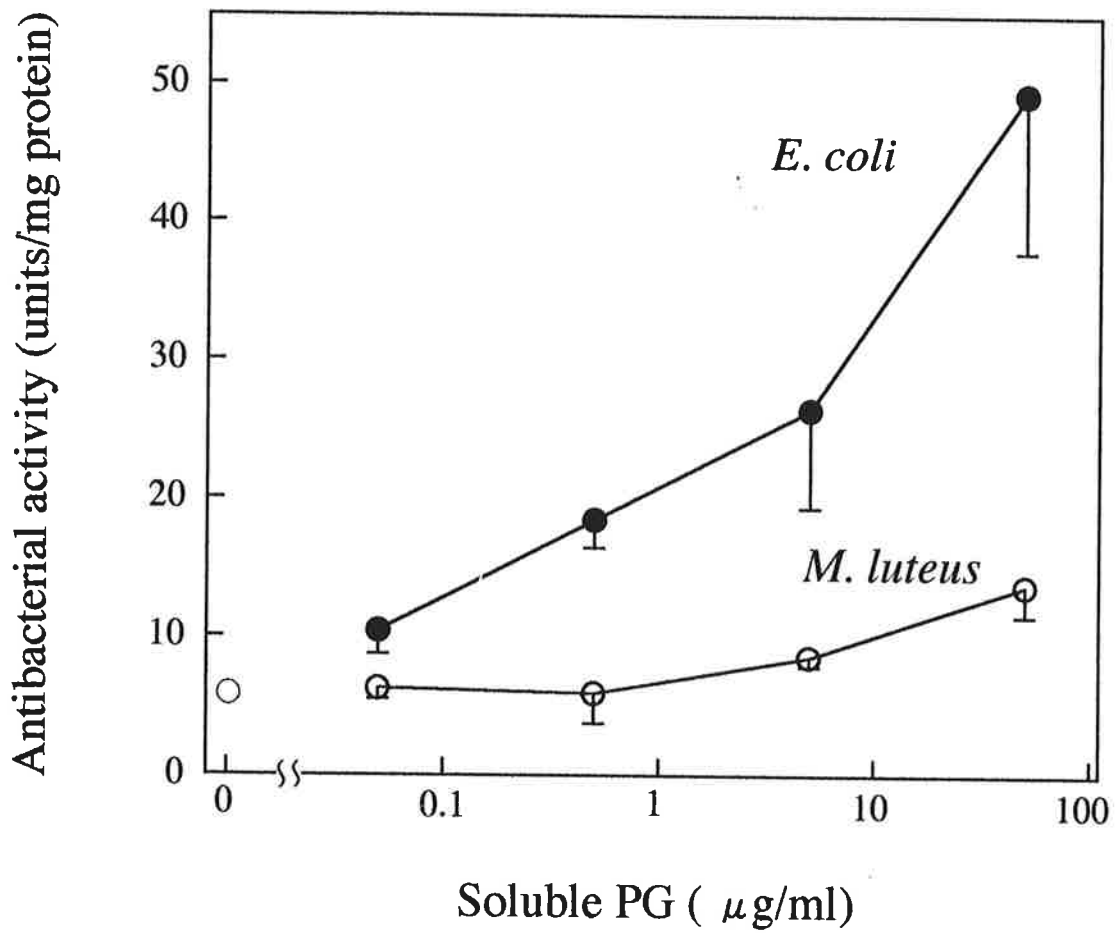


Fig. II -6 Dose dependent induction of bactericidal activity in fat body by SPG from *E. coli* and *Micrococcus luteus*. Fat body from aseptically reared untreated larvae was incubated with the indicated concentrations of SPG from *E. coli* (●) or *Micrococcus luteus* (○) for 24 h. Values and bars are the means  $\pm$  SD of five determinations.

Table II-2 Effect of various glucans and peptides on induction of bactericidal activity in cultured fat body. Fat body from aseptically reared larvae was cultured with the additions of various materials at a concentration of 50  $\mu$ g/ml, and incubated for 24 h. Values are the means  $\pm$  SD of five determinations.

Materials added (50 $\mu$ g/ml)	Bactericidal activity (units/mg protein)
Exp. 1	
None	14.2 $\pm$ 2.8
Chitin oligomer	18.9 $\pm$ 4.7
Chitosan oligomer	14.0 $\pm$ 1.6
PG peptide	18.7 $\pm$ 10.0
Chitin oligomer + PG peptide	18.3 $\pm$ 4.1
Chitosan oligomer + PG peptide	18.1 $\pm$ 2.6
<i>E. coli</i> PG	46.5 $\pm$ 0.6 *
Exp. 2	
None	9.0 $\pm$ 2.0
Laminarin	10.0 $\pm$ 3.8
Zymosan	7.7 $\pm$ 3.0
Adjuvant peptide	5.9 $\pm$ 1.6
<i>E. coli</i> PG	31.6 $\pm$ 7.0 *

\*Significantly greater than control,  $P < 0.01$   
 PG peptide: Ala-D-isoGlu-Lys-D-Ala-D-Ala

Table II-3 Specific induction of cecropin and lysozyme by SPG and LPS.

Silkworm larvae were injected with various bacterial cell wall components or non-bacterial sugars. Hemolymph was collected 24 h after the injection and assayed for bactericidal and lysozyme activities. Values are the means  $\pm$  SD of five determinations.

Materials injected	Dose ( $\mu$ g/larva)	Cecropin Activity (units/ml)	Lysozyme Activity (units/ml)
Exp. 1			
Saline		N.D.	20 $\pm$ 5
PG			
<i>Escherichia coli</i>	10	252 $\pm$ 31	218 $\pm$ 45
<i>Micrococcus luteus</i>	10	20 $\pm$ 12	72 $\pm$ 18
Chitin oligomer	10	N.D.	59 $\pm$ 9
Chitosan oligomer	10	N.D.	57 $\pm$ 11
Laminarin	10	N.D.	53 $\pm$ 12
Zymosan	10	N.D.	54 $\pm$ 9
Exp. 2			
Saline		N.D.	22 $\pm$ 4
PG			
<i>Bacillus licheniformis</i>	10	324 $\pm$ 66	151 $\pm$ 34
LPS			
<i>Serratia marcescens</i>	10	232 $\pm$ 85	143 $\pm$ 50
Exp. 3			
Saline		N.D.	56 $\pm$ 12
PG			
<i>Bacillus licheniformis</i>	10	262 $\pm$ 56	154 $\pm$ 48
Teichoic acid			
<i>Bacillus subtilis</i>	10	N.D.	68 $\pm$ 23
	100	N.D.	70 $\pm$ 15
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10	N.D.	75 $\pm$ 13
	100	N.D.	77 $\pm$ 19

N.D. : not detected

#### 第4節 考察

SPG を注射し免疫化したカイコ幼虫から抽出した脂肪体を Grace 培地中で無菌的に培養すると誘導因子を添加しなくても培養開始直後から培地中に抗菌活性が検出され、その後少なくとも 24 時間まで抗菌活性の増加が観察された (Fig. II-2)。これは一度、SPG などバクテリア感染のシグナルを受け取り合成を開始した脂肪体細胞は、その後誘導因子の刺激が存在しなくても継続して抗菌性タンパク質の合成を行うことを示している。無処理の幼虫から抽出した非免疫化脂肪体は、培地中に SPG を加えることで抗菌活性が誘導された。この結果は抗菌性タンパク質誘導に SPG が直接脂肪体細胞に作用している可能性が考えられた。また、この時誘導される抗菌性タンパク質には少なくともセクロピンとリゾチームが含まれていた。セクロピン活性の *in vitro* での誘導にはラグタイムが認められ、セクロピン活性が培養開始から 5~7 時間までは検出されないが、リゾチーム活性は培養開始直後より認められた (Fig. II-3)。バクテリア感染によって初めて誘導されるセクロピンと異なり、リゾチームは正常体液中にも存在している<sup>79)</sup>。これはリゾチーム発現系において、バクテリア感染のシグナルを必要としない、誘導性とは別の合成経路の存在する可能性を示している。Faye らは *H. cecropia* および *Drosophila* のセクロピン遺伝子上流域に哺乳類  $\kappa$ B エlement と相同性を示す 10~11bp の調節 Element の存在を明らかとした<sup>74)</sup>。75)。 $\kappa$ B エlement は多くの哺乳類免疫系遺伝子に存在し、転写因子である NF- $\kappa$ B の結合サイトとして知られている。その後、この  $\kappa$ B エlement は同じく *H. cecropia* のアタシン及びリゾチーム遺伝子<sup>76)</sup>、*B. mori* セクロピン A<sup>77)</sup> 及び B<sup>78)</sup> にも見いだされ、LPS やプロテインキナーゼ C 活性化剤であるホルボールエステルによって誘導された転写因子がこの Element へ結合することが示されている<sup>79)、80)</sup>。セクロピンとリゾチーム遺伝子上流域に共通してこの調節 Element が存在することは、少なくとも誘導性のリゾチームとセクロピンは転写調節機構を共有する可能性を示唆している。

恒常的に合成されるリゾチームはバクテリア感染に対する初期防御手段の一つと考えられる。UV 照射により殺菌したバクテリア菌体を培地に加え *in vitro* で脂肪体を培養すると SPG 添加の場合より少し遅れるが、SPG と同様に高い抗菌活性の誘導が認められた。この結果は、抗菌性タンパク質誘導に血球によるバクテリアの食食、分解は必ずしも必要ではないことを示唆している。バクテリア菌体による誘導は脂肪体へバクテリア菌体が直接接触するとも考えられるが、グラム陽性菌の細胞壁には PG 層外部にテイコ酸や共有結合したタンパク質成分などが突出して存在し、PG 層が直接脂肪体と接触する可能性は低

いと考えられる。最も考えられる可能性は、培養開始直後より脂肪体から分泌されるリゾチームがバクテリアの細胞壁に働き PG を遊離させた結果、抗菌性タンパク質が誘導されたと考える方が適切である。リゾチームは感染初期の抗バクテリアとしての働きのみならず、抗菌性タンパク質誘導にシグナル分子として働く PG 断片の生成に関与する可能性が考えられる。この可能性を証明するには何らかの形でリゾチーム活性を特異的に阻害した条件で、同様にバクテリア菌体による誘導実験を検討する必要がある。

一般的に、バクテリア感染に対する無脊椎動物の防御反応は非特異的な異物認識システムによるものと考えられていたが、少なくともカイコ抗菌性タンパク質誘導に関すれば、誘導因子である SPG の構造に対して高い特異性を示し、キチンやキトサン、PG ペプチド単独あるいはそれらの混合物では誘導されなかったことから、PG の基本ユニットである糖鎖とペプチドが結合した構造が必要であると推測される。さらに、*M. luteus* 由来の SPG と *B. megaterium* 由来の SPG では誘導効果に違いが認められたことから、産生器管である脂肪体には PG 構造の違いを識別するシステムが存在する可能性が明らかとなった。誘導効果の低い *M. luteus* 細胞壁 PG の架橋部分にはリジンを含むペントペプチドが存在することから、この架橋構造が PG 認識システムにとって妨げになると考えられる。しかし、Dunn らの *M. sexta* 脂肪体を用いた *in vitro* での実験結果では *M. luteus* 細胞壁由来の PG が誘導因子として用いられ、高い誘導効果を示すことが明らかとなっている。この結果は同じ鱗翅目昆虫においても誘導因子に対する認識システムの違いを反映しているのかもしれない。誘導経路の解明を目的とした実験として、cell-line を用いた抗菌性タンパク質の誘導が最近試みられている。胚や血球より樹立された細胞はバクテリア感染により生じる防御反応を直接反映しているとは考えにくい。が、*Drosophila* 由来の mbl-2 cell ではバクテリア成分による抗菌性タンパク質誘導の発現が確認されている<sup>80)</sup>。この結果はカイコとは異なる昆虫由来の細胞の示す結果ではあるが、少なくとも抗菌性タンパク質を合成する昆虫の細胞にはバクテリア成分を認識し、そのシグナルを細胞内に伝達するレセプター様の働きをするものが存在する可能性が考えられる。さらに、本研究結果において示されたように PG 構造特異的に抗菌性タンパク質が誘導されることから、*B. mori* 脂肪体細胞に PG 構造を認識するレセプターの存在する可能性が考えられる。

### 第Ⅲ章 抗菌性タンパク質誘導に必要なペプチドグリカンの最小構造

#### 第1節 緒言

一般的に、哺乳類でのバクテリア感染によって起こる発熱、炎症、睡眠誘起、マクロファージやリンパ球の活性化など様々な急性期生体反応に、グラム陰性菌細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)<sup>52, 53, 54)</sup>と共に、細胞壁 PG が関与していることが知られている<sup>82)</sup>。また、PG の部分構造であるアジュバントペプチドは特定の抗体産生の賦活剤と知られている。

PG は全てのバクテリアに共通して存在する細胞壁主要成分であり、その基本構造は N-アセチルグルコサミン (GluNAc) と N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) の  $\beta$ -1,4 結合から成る糖鎖と、ムラミン酸に結合する短いペプチド鎖から構成されている。ペプチド鎖にはリジン残基あるいは meso-ジアミノピメリン酸 (m-Dap) が存在し、それらの  $\epsilon$ -アミノ基を介し、隣接するペプチドの C 末端と架橋することでバクテリア細胞壁の網目状構造を形成している。グラム陰性菌の場合、その構造は種を通じてほぼ同じで、m-Dap とテトラペプチドの C 末端である D-Ala が直接架橋した、DAP ダイレクト型構造を取っている。一方、グラム陽性菌にはさまざまな架橋構造を持つものがあり、ブリッジと呼ばれる数個のアミノ酸を介して架橋するタイプが多い。

これまで Morishima ら<sup>51)</sup> はカイコ抗菌性タンパク質誘導において、グラム陰性菌及び *Bacillus megaterium* など、一部のグラム陽性菌に共通する m-Dap ダイレクト型構造を持つ PG に高い誘導効果があり、*M. luteus* のようにブリッジにリジンを含む数個のアミノ酸を介して架橋する PG では低い誘導効果しか無いことを明らかにした。この結果はカイコがある特定構造の PG をバクテリア侵入のシグナルとして認識していることを示しており、さらに、前章で示した結果からも、この PG 構造を認識するシステムが抗菌性タンパク質産生器官である脂肪体に存在する可能性が考えられる。今までにカイコで知られている PG 認識システムとしては、カイコフェノールオキシダーゼ系における PG 認識タンパク質(PGRP)がある<sup>65)</sup>。しかし、抗菌性タンパク質の誘導がリゾチーム処理して得られる低分子 PG によって起こるのに対し、このフェノールオキシダーゼ系のカスケードを活性化する PG は高分子であり、低分子 PG では活性化されない。また、実験に用いられている PG は *M. luteus* 由来であり、それ以外の PG 構造の特異性についての知見はない。故に、フェノールオキシダーゼ系と

抗菌性タンパク質誘導系ではそれぞれ異なった PG 認識システムが働いている可能性が考えられる。

本章では、カイコ抗菌性タンパク質誘導系における誘導因子としての PG の構造と誘導効果との相関を明らかにし、誘導に必要な PG の最小構造を決定するために糖鎖のみで結合した直鎖状 PG を調製し、リゾチームで部分加水分解することにより、さまざまな糖鎖長の PG 断片を調製しそれらの誘導効果を調べた。



## 第 2 節材料と方法

### (1) バクテリア

*B. icheniformis* IFO 12195、*Micrococcus luteus* IFO 3333、

*Escherichia coli* D22、*Arthrobacter viscosus* の入手は第 II 章に記載のものを用いた。

### (2) 直鎖状ペプチドグリカンの調製

直鎖状 PG は Mirelman ら<sup>83)</sup> の方法に従い、グラム陽性菌にペニシリン G を添加し架橋形成を阻害することによって直鎖状 PG の調製をした。

対数増殖初期まで培養したバクテリアを 6,000×g、10 分間の遠心によって集菌した後、生理食塩水により 2 回洗浄遠心を行った。次ページに示す最少生育培地に 10 μg/ml となるようにペニシリン G を加え、先に集めた菌体を懸濁し一晚 37℃で振とう培養を行った。培養後、遠心によって菌体を除去し得られた培養液を 10 分間煮沸した。この時生じた沈殿は再び遠心して除去した。上澄みをエバポレーターにより 37℃で吸引しながら 1/10 量まで濃縮した後、低分子量用透析膜 (M.W. 8,000)に移し、0.01M 酢酸アンモニウム緩衝液、pH6.5 に対し 4℃で透析を行った。透析内液を 0.01M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH6.5 によって平衡化した DEAE-Toyopearl 650M(東ソー)カラム(15×40mm)に供した後、0.01-0.3M の酢酸アンモニウム緩衝液 pH6.5 の濃度勾配により溶出を行い分画した。各フラクションの一部を Morgan-Elson 法<sup>84)</sup>を用いて N-アセチルヘキソサミン定量を行い、PG を含む画分を集め凍結乾燥した。

最少生育培地

1mM glycine

1mM L-glutamic acid

0.5mM L-alanine

0.17mM uracil

0.2mM L-lysine

3  $\mu$  M thiamin

1mM MgCl<sub>2</sub>

8.2  $\mu$  M nicotinamide

0.1mM MnCl<sub>2</sub>

28.5mM glucose

---

0.08 mM phosphate buffer pH 6.8

(3) 細胞壁由来ペプチドグリカンの調製

直鎖状 PG 調製時に得られたバクテリア菌体を回収し、これより Heilmann ら<sup>85)</sup>の方法に従い、細胞壁由来の架橋構造を持つ PG を調製した。

バクテリア菌体を、菌体湿重量の3倍量の蒸留水に懸濁し、等量のガラスビーズ(0.1mm 径、GMB-10)と合わせ、Beads Beater を用いて菌体を氷冷しながら破碎した。菌体の破碎を顕微鏡にて確認後、静置することでガラスビーズを沈降させた。上澄を回収し 450×g、10 分間遠心し、残存するガラスビーズと未破碎細胞を除去し、さらに 4℃で 14,000×g、30 分間遠心することで沈殿した白色層の PG 画分を得た。この PG 画分を遠心洗浄した後、約 10 倍量の 2% SDS に懸濁し、37℃、12 時間処理した。これを蒸留水にて 2 回遠心洗浄することで SDS を除去し、次に 5mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.05M Tris-Cl 緩衝液、pH7.5 に懸濁し、ここへ DNase I を 5  $\mu$ g/ml となるように加え、37℃、2 時間処理し核酸を除去した。DNase 処理後、終濃度 100  $\mu$ g/ml のアクチナーゼ E にて 37℃、12 時間処理し、蒸留水にて 2 回遠心洗浄した後、再び 0.05M Tris-Cl、pH7.5 に懸濁し、終濃度 200  $\mu$ g/ml のトリプシンを加え、37℃、2 時間処理することで除タンパクを行った。

細胞壁 PG にはテイコ酸が共有結合しているため、これを除去する目的で終濃度 10% TCA により 4℃で 24 時間攪拌した後、遠心し、得られた沈殿に再び 10% TCA を加え、60℃で 90 分間加熱しテイコ酸を除去した。

以上の操作の後、蒸留水で 5 回遠心洗浄を繰り返し、得られた沈殿を細胞壁由来高

分子 PG とした。

#### (4) 低分子ペプチドグリカンの調製

細胞壁由来 PG 及び直鎖状 PG をそれぞれ 10mg/ml となるように 0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液, pH6.5 に懸濁し、ここへ卵白リゾチームを 100  $\mu$ g/ml の濃度で加え、振とうしながら 37 $^{\circ}$ C、6 時間インキュベートし加水分解を行った。反応液を 14,000 $\times$ g で 30 分間遠心し、得られた上澄みを希釈したアンモニア水を用い pH8.0 に合わせ、CM-Toyopeal カラム(12 $\times$ 15mm)を通しリゾチームを除去した。未吸着画分を再び凍結乾燥した後、0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH7.0 に溶解し、次のゲルろ過分画のための試料とした。

細胞壁由来 PG のゲルろ過は Cellulofine GCL-90m カラム (生化学工業) によって行い、分子量 10,000 以上の可溶性 PG を実験に用いた。

直鎖状 PG の場合、Superdex75HR カラム (10 $\times$ 300mm, ファルマシア) を用い、0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH7.0 により、流速 0.5ml/min で溶出を行った。ペプチド結合に由来する 220nm の吸収をモニターし、5ml ずつ分取した。カラムのキャリブレーションは Blue dextran(ファルマシア) と chitin hexamer を用いて行った。

#### (5) アミノ酸分析

試料に 4N HCl を加え、マイクロキャピラリーチューブ内に封管し、105 $^{\circ}$ C、12 時間加水分解した。キャピラリーチューブをエッペンドルフチューブに移し、遠心することで加水分解後の試料を回収した。これを凍結乾燥とミリポア水による洗浄を繰り返すことで HCl を除去した後、アミノ酸試料希釈液に溶かし、島津 LC-6A アミノ酸分析システムにより分析した。

#### (6) 平均糖鎖長の測定

PG の平均糖鎖長は、還元末端の N-アセチルムラミン酸を水素化ホウ素ナトリウムで還元し糖アルコールにして末端の N-アセチルムラミン酸含量を定量することで算出した。

凍結乾燥した 10  $\mu$ g の PG に 0.2M 水素化ホウ素ナトリウム溶液を 200  $\mu$ l 加え、室温で 15 時間反応させた後、さらに 60 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートし、還元末端を糖

アルコール化した。これに 2M 酢酸を 100 $\mu$ l 加え反応を停止させた後、凍結乾燥し、アミノ酸分析のための処理を行った。平均糖鎖長は N-アセチルムラミン酸と N-アセチルムラミシトールのモル濃度を算出した後、以下の式により求めた。

$$\text{平均糖鎖長} = \frac{\text{N-acetylmuramic acid} + \text{N-acetylmuramitol}}{\text{N-acetylmuramitol}} \times 2$$

#### (7)架橋度の測定

ペニシリン G 存在下で調製した PG が架橋のない直鎖状の構造であることを確認するため遊離アミノ基の lysine 含量を測定した。10 $\mu$ g の PG を 20 $\mu$ l の 80mM 炭酸水素ナトリウムに溶解し、これに Fluorodinitrobenzene(FDNB)エタノール溶液(40 $\mu$ l/ml)を 2 $\mu$ l 加え混合し、室温で 12 時間反応させた。これを凍結乾燥後、塩酸で加水分解し、アミノ酸分析により遊離のリジンを定量した。架橋度は FDNB 処理した試料と無処理の試料中のリジンのモル比により求めた。

### 第3節 結果

#### (1) 直鎖状ペプチドグリカンによる抗菌性タンパク質の誘導

抗菌性タンパク質の誘導因子である PG をカイコ幼虫に注射し、体液中に誘導される抗菌活性を測定することで PG 構造と誘導効果との相関性を推察した。Table III-1 に示されるように高い抗菌活性の誘導が認められる *Bacillus licheniformis* と *Arthrobacter viscosus* 由来の細胞壁 PG に比べ *M. luteus* の細胞壁 PG の誘導効果は低いものであった。この誘導効果の異なる二種類の PG 構造を比較すると、*B. licheniformis* と *A. viscosus* のペプチド鎖は、直接架橋しているの対し、*M. luteus* の細胞壁 PG のペプチド鎖はペンタペプチドを介して架橋している (Fig. III-1)。それぞれのバクテリアから架橋構造を欠いた直鎖状 PG を調製し、細胞壁由来の PG と比較した場合、*B. licheniformis* と *A. viscosus* は細胞壁由来 PG と同程度の誘導効果を示したが、*M. luteus* の場合は他のバクテリアとは異なった結果を示し、ペプチド間架橋を欠くことにより、顕著な誘導効果を持つようになることが明らかとなった。

この結果は、PG の側鎖間架橋はカイコにおける抗菌性タンパク質誘導にとって必ずしも必要ではないことを示している。さらには、*M. luteus* の細胞壁 PG の場合、架橋部分にあるリジンを含むペンタペプチドが逆に認識を阻害していると考えられる。

Table III -1. Induction of antibacterial activity by cross-linked and uncross-linked PGs. Cross-linked PGs from the cell wall or uncross-linked linear PGs (lysozyme non-treated) from the culture medium were injected into larvae at a dose of 10  $\mu\text{g/larva}$ . Values are the means  $\pm$  SD of 4 determinations.

Bacteria	Antibacterial activity (units/ml)	
	Cell wall PG	Linear PG
<i>Bacillus licheniformis</i>	171 $\pm$ 14	163 $\pm$ 4
<i>Arthrobacter viscosus</i>	132 $\pm$ 26	102 $\pm$ 37
<i>Micrococcus luteus</i>	15 $\pm$ 2	212 $\pm$ 37



## (2) 抗菌性タンパク質誘導に必要なペプチドグリカン最小構造の決定

ペニシリン G 存在下で培養した *M. luteus* から培地中に分泌された直鎖状 PG は Fig. III-1(C)に示されるようにペンタペプチド側鎖の C 末端に D-Ala が付加した前駆体の形となる。得られた直鎖状 PG の平均糖鎖長は 22 であった。また、アミノ酸分析の結果より約 75% の MurNAc に 6 個のアミノ酸からなるヘキサペプチド側鎖が結合した形を成していた (Table III-2)。

この直鎖状 PG を 37℃ で 3 時間卵白リゾチーム処理し、Superdex 75HR のゲルろ過によって分画した (Fig. III-2)。断片化された PG は溶出位置からフラクション I ~ V に分けた。フラクション I、II 及び IV の GluNAc, MurNAc, Ala, Glu, Gly, Lys のモル比は 1:1:3:1:1:1 であり、これは典型的な *M. luteus* の直鎖状 PG 前駆体を構成しているアミノ糖及びアミノ酸の比率と一致する。

最も大きなピークを示すフラクション IV は、平均糖鎖長が約 2 であり、溶出位置が分子量 1236 の chitin hexamer とほぼ同じであることから、Fig. III-1C に示されるような GluNAc - MurNAc を 1 ユニットとした二糖からなる PG モノマーであると考えられる。また、リゾチーム処理を延長し 48 時間処理するとフラクション I、II、III のピークが減少し、フラクション IV が増加する (Fig. III-3)。これらの結果はフラクション IV が PG のリゾチーム分解によって生じる最終産物であることを示している。

フラクション I 及び II は糖鎖長と溶出位置から推定される分子量より考えて、二糖で構成される PG ユニットの繰り返しそれぞれ 3 の trimer と 2 の dimer であると推測される。Table III-3 に示すようにフラクション III の GluNAc と MurNAc 含量は Glu に対し、約 1.4 程度であった。これはフラクション III 中の MurNAc に、ヘキサペプチド側鎖を欠いた PG 断片が含まれていることを意味する。さらにフラクション III の平均糖鎖長は 4.2 であるが溶出位置がフラクション II の後であることと考え合わせると、フラクション III はヘキサペプチドを 2 つ持つ dimer とヘキサペプチドが一つ欠けた dimer の混合物であると推測される。フラクション V はリゾチーム分解による最小単位であるフラクション IV よりも分子量が小さく、アミノ酸に比べ糖含量が高いこと、また、アミノ酸組成はヘキサペプチドと一致することからヘキサペプチド断片とペプチド側鎖を欠いた二糖との混合物であると推測される。

これらの PG 断片の誘導効果を検討するため、それぞれ 10  $\mu$ g をカイコ幼虫へ注射し、24 時間後に体液中に誘導される抗菌活性を測定した。それぞれのフラクション



によって得られる抗菌活性を同じく Table.Ⅲ-3 に示した。平均糖鎖長 6 のフラクション I により誘導される抗菌活性は  $168 \pm 67$  units/ml と糖鎖長 22 の高分子 PG の場合の  $185 \pm 72$  units/ml とほぼ同程度の高い誘導効果を示した。平均糖鎖長約 4 のフラクション II 及び III により誘導される抗菌活性はそれぞれ  $60 \pm 33$  及び  $44 \pm 16$  とフラクション I よりも低い十分な抗菌活性が得られた。これらのフラクションとは対照的にフラクション IV 及び V では抗菌活性は検出されなかった。この結果は、抗菌性タンパク質誘導にペプチド側鎖を持った GluNAc-MurNAc のユニットが少なくとも二つ結合した構造が必要であることを示している。また、Dap の代わりにリジンを持つペプチド側鎖で構成される *B. licheniformis* の直鎖状 PG を用いた場合でも同様の結果が得られたことから、ジアミノ酸は Lys あるいは Dap のいずれでも良いと考えられる。また、フラクション I と II の誘導効果の違いより、最大の誘導効果を得るには PG ユニットの繰り返しが 3 個以上即ち糖鎖長 6 以上が必要であると考えられる。さらに、水素化ホウ素ナトリウムを用いて、還元末端の MurNAc を還元し、muramititol としたフラクション I と II を用いて同様に誘導効果を調べた結果、抗菌活性は検出されなかったことから、末端の MurNAc は誘導に必要であると考えられる。

以上の結果から、*Bombyx mori* における抗菌性タンパク質誘導に必要な PG 最小構造は、 $(\text{GluNAc-MurNAc})_2$  の糖鎖にペプチドが結合した Fig.Ⅲ-4 に示される構造であることが決定された。

Table III-2. Composition and inducing ability of uncross-linked PG fragments. Fractions I to V (Fig. III-2) and high molecular weight uncross-linked PG (lysozyme non-treated) were hydrolyzed with 4N HCl, and the amino acid and amino sugar were analyzed as described in Methods. Antibacterial activity was determined after injection of the larvae with 10  $\mu$ g each of the PG fragments, and the means  $\pm$  SD of 4 determinations are shown. GlcN, glucosamine; Mur, muramic acid.

Fraction	Composition						Average sugar chain length	Antibacterial activity (units/ml)
	GlcN	Mur	Ala	Glu	Gly	Lys		
High MW	1.27	1.34	3.25	1.00	0.98	0.96	22	185 $\pm$ 72
I	1.10	1.12	3.00	1.00	1.05	0.74	6.2	168 $\pm$ 67
II	1.09	1.05	3.20	1.00	1.06	0.91	4.7	60 $\pm$ 33
III	1.40	1.45	3.25	1.00	0.96	0.86	4.2	44 $\pm$ 16
IV	1.08	1.12	3.46	1.00	1.02	0.84	2.2	N.D.
V	3.75	3.91	2.47	1.00	0.86	0.86	2.3	N.D.

N.D. : not detected.

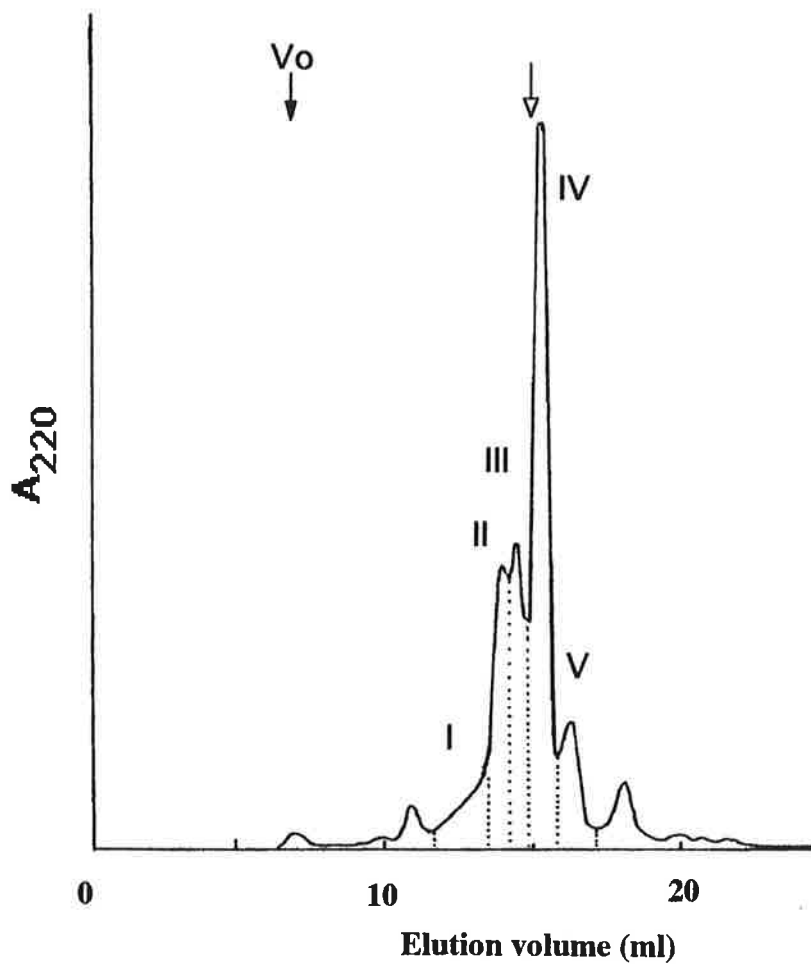


Fig. III-2 Superdex 75HR gel-filtration chromatography of uncross-linked PG fragments. Uncross-linked PG from *M. luteus* was digested with lysozyme at 37°C for 3hr and purified as described in Methods. An aliquot was applied onto a Superdex 75HR column and eluted with 0.05 M ammonium acetate, pH 7.5. PG was monitored by measuring the absorbency at 220 nm. Fractions I to V were collected and lyophilized. Void volume ( $V_o$ ) and the elution position of chitin hexamer are shown by black and white arrows, respectively.

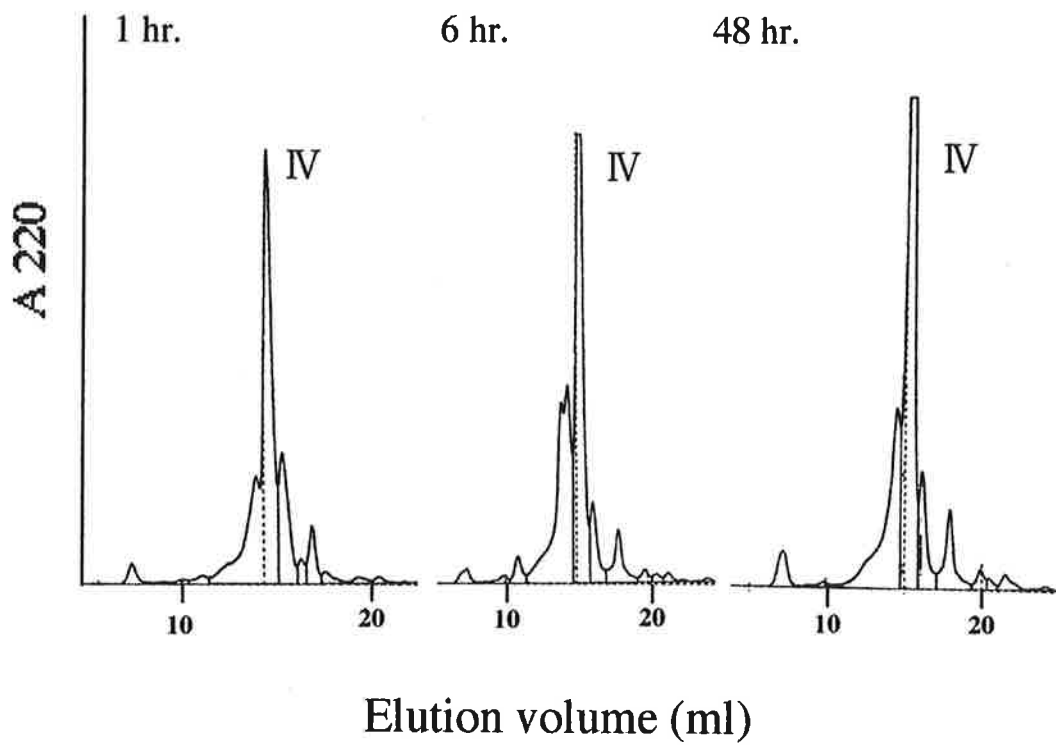


Fig. III-3 Effects of lysozyme treatment on elution pattern of uncross-linked PG fragment. Uncross-linked PG from *M. luteus* was digested with hen egg lysozyme at 37°C for the indicated time period and chromatographed on a Superdex 75HR column as described in Fig. III-2

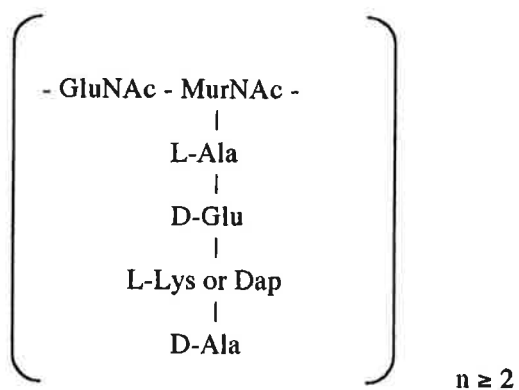


Fig. III-4. Minimum PG structure required for induction of antibacterial protein synthesis in *Bombyx mori*.

#### 第4節 考察

哺乳類において、PG の持つ免疫学的効果についての報告は多く、マイトジェン効果<sup>86)</sup>や B 細胞活性化<sup>87)</sup>、あるいはマクロファージに働き IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  など各種サイトカインの誘発を促す<sup>88、89、90)</sup>。最近の報告ではマウスのマクロファージにおいて PG が IL-12 の合成を誘導することが示された<sup>91)</sup>。この IL-12 の誘導では PG 構造に特異性が認められ、*B. megaterium* 由来の細胞壁 PG では誘導効果が認められたが *M. luteus* 由来の細胞壁 PG では 100  $\mu$ g/ml の濃度においても IL-12 mRNA の発現は認められなかった。この結果は本章で示した PG 構造特異性と一致する。さらに、このマウスにおける IL-12 の誘導は PG をリゾチームにより一晚処理した場合、その効果が消失する事から、このマウスの IL-12 誘導系においてもある程度の分子量を持つ PG 構造が必要であると考えられる。また、MurNAc-L-Ala-D-isoGlu (MDP) はアジュバント活性をもつ PG の最小構造として知られているが、PG あるいは可溶性高分子 PG では補体活性化効果が認められるのに対し、MDP やモノマーの PG ユニットののではその効果が認められない<sup>92)</sup>。その一方で、MDP や muramly tripeptide ではアナフィラキシー反応の誘発を起こすのに対しテトラペプチドを持つモノマーの PG ユニット以上や高分子 PG ではそのような効果が認められない<sup>93)</sup>。

カイコにおいても第 II 章で示したように MDP では抗菌性タンパク質誘導が認められず、さらに本章の結果では抗菌性タンパク質誘導には一定構造の PG が必要であることが明らかとなった。また、フェノールオキシダーゼカスケード系の PG による活性化に高分子の不溶性 PG が必要であり、リゾチーム処理した低分子 PG では活性化が起こらない<sup>41)</sup>。また、カイコ一匹当たり 1  $\mu$ g の高分子 PG を注射した場合、体液の激しいメラニン化が起こるが、フラクシオン II やリゾチーム処理した細胞壁 PG では 50  $\mu$ g の注射でもメラニン化は認められなかった。これらの結果はカイコにはフェノールオキシダーゼ系と抗菌性タンパク質誘導系の二つの異なった PG 認識システムの存在する可能性が考えられる。

## 第IV章 カイコ抗菌性タンパク質誘導におけるペプチドグリカン認識タンパク質について

### 第1節 緒言

第II章及び第III章に述べた結果より、カイコ抗菌性タンパク質誘導に特定構造の PG がバクテリア感染のシグナルとして働いていることが明らかとなった。また、血球をほとんど含まない *in vitro* の脂肪体培養系で、添加した PG により抗菌性タンパク質が誘導された。PG が親水性でありそれ自体が細胞膜を通過するとは考えられないことから、PG による抗菌性タンパク質の誘導には、その細胞外シグナルを細胞内に伝達する経路が必要となり、脂肪体細胞表面に PG を認識するレセプターの存在する可能性が考えられる。また、脂肪体はカイコ体液の血漿タンパク質の合成を行っていることから、脂肪体より分泌された体液成分の中に PG 認識タンパク質が含まれている可能性も考えられる。哺乳動物において LPS はバクテリア感染のシグナルとして働き、さまざまな免疫反応を引き起こすが、ここでの LPS 認識システムは液性成分である LPS binding protein (LBP) が LPS と結合し、LPS-LBP 複合体を形成した後マクロファージ細胞表面に存在する CD14 によって認識されるものである<sup>62, 63)</sup>。もしこれと同じ様なシステムがカイコに存在するなら、体液中にある PG 結合タンパク質が PG と複合体を形成した後、脂肪体細胞に存在するレセプターに結合する可能性も考えられる。これまでに昆虫におけるバクテリア構成成分の認識システムとして明らかにされているものにはフェノールオキシダーゼ系の  $\beta$ -1,3-グルカン認識タンパクおよび PG 認識タンパクがある<sup>65)</sup>。また、一部の昆虫では体液中に存在するレクチンが糖タンパクを認識しオプソニンとして働くと考えられている。しかし、前述したように抗菌性タンパク質の誘導因子である PG をリゾチーム処理し低分子化した場合ではフェノールオキシダーゼ系の活性化は認められない。また、レクチンによる糖認識に比べ、誘導に必要な PG 構造の特異性が極めて高いことなどから、抗菌性タンパク質誘導系の認識システムはこれらのシステムとは明らかに異なると考えられる。PG は哺乳類の免疫担当細胞にも直接作用しサイトカイン誘発など、さまざまな免疫反応を活性化する。そのため、哺乳動物においても PG 結合タンパクの検索を含め PG 認識システム全般の解明が試みられているが現在までほとんど明らかになっていない。また、マウスマクロファージの IL-12 誘導に必要な PG が、カイコの場合と似かよった構造特異性を示すという報告<sup>91)</sup>があることから PG 認識システムは昆虫に限らず哺乳類にまで共通して存在する可能性が

考えられる。そこで本章では抗菌性タンパク質誘導に関わるバクテリア認識システムの解明を目的とし、PG 結合タンパク質の検出系の確立ならびに、それを用いたカイコの PG 認識タンパクの検索と同定を試みた。



## 第2節 材料および方法

### 2-1 材料

#### (1) バクテリア及びペプチドグリカン

*B. megaterium* NCIMB 12520 (*dap<sup>+</sup>,lys<sup>+</sup>*)は The National Collection of Industrial and Marine Bacteria LTD より入手した。これ以外のバクテリアは第Ⅱ章、第Ⅲ章に記載したものをを用いた。細胞壁由来 PG 及び直鎖状 PG は第Ⅲ章に記載したものをを用いた。

#### (2) 試薬

Sulfosuccinimidyl N-(D-biotinyl)-6-aminohexanoate (Biotin-AC<sub>5</sub>-Sulfo-Osu), 6-(6-Hydrazidohexyl) amidoethyl D-biotinamide (Bio-Sulfo-Osu), 1-phenyl-2-thiourea, ethylenediamin-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA-2Na) 以上の試薬については和光純薬工業(株)より購入した。Sulfosuccinimidyl 2-(*p*-azidosalicylamido) ethyl-1-3'-dithiopropionate, (SASD) 及び 1,3,4,6-tetrachloro-3  $\alpha$  -6  $\alpha$  -diphenylglycouril (IODO-GEN Iodination Reagent) 以上の試薬については PIERCE 社より購入した。3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid N-hydroxysuccinimide, (Bolton-Hunter Reagent)は Aldrich chem.co.より phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) は sigma 社より 1,10-phenanthroline monohydrate はナカライテスク(株)より Na [<sup>125</sup>I]、 [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬は Du Pont, NEN Reserch Products よりそれぞれ購入した。アフィニティーカラムの担体である Formyl-cellulofine は生化学工業(株)より購入した。3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)は(株)同仁化学研究所 より購入した。

#### 1) 方法

##### (1) PG-Affinity column の調製

*M. luteus* 直鎖状 PG は第Ⅲ章で述べたようにペプチド間側鎖を欠いているため、ペプチド側鎖に含まれるリジン残基は遊離の  $\epsilon$ -アミノ基を持っている。そこで、PG と結合するタンパク質を得るために PG をリガンドとし、遊離のアミノ基を介して担体に結合させたアフィニティークラムを調製した。平均糖鎖長 22 の *M. luteus* 直鎖状 PG を使用し、カラムの調製は担体購入時付随のテクニカルマニュアルに従った。湿重量 7mg のホルミルセルロファイン担体に *M. luteus* 直鎖状 PG 溶液 (4mg/ml, 0.2M リン酸緩衝液 pH7.0) 7ml を

加え、室温にて 12 時間振とうしながらインキュベートした。還元剤の Sodium cyanoborohydride (SCBH) を 49mg 加え、さらに室温で 2 時間インキュベートした。プフナー漏斗を用いてゲルを蒸留水で洗浄した後、ブロッキング緩衝液 (0.2M Tris-HCl, pH7.0) を 14ml 加え、再び室温で 3 時間振とうした。ゲルを蒸留水で洗浄し 0.1M リン酸緩衝液, pH7.0, に懸濁した。調製した担体は BIO-RAD 社の Poly-Prep chromatography column (0.8×4cm) に充填し、4°C にて保存した。

(2) *B. megaterium* NCIMB 12520 (*dap<sup>+</sup>lys<sup>+</sup>*) を用いた [<sup>3</sup>H]-PG の調製

*B. megaterium* のジアミノピメリン酸(Dap)要求性変異株である *B. megaterium* NCIMB 12520(*dap<sup>+</sup>lys<sup>+</sup>*) を対数増殖期まで生育させた後 PBS に懸濁した菌体( $1.0 \times 10^7$  cells) を 3.7MBq の [<sup>3</sup>H]-Dap を加えた 1000ml のペプトン-グルコース培地中 (2% ポリペプトン、0.2% グルコース、0.5% NaCl、20  $\mu$ g/ml DAP, pH7.2) にて一晩培養した。培養後、第 II 章に記載した方法により細胞壁可溶性 [<sup>3</sup>H]-PG を調製した。

(3) [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬による PG の標識

[<sup>125</sup>I]標識した PG を用いて結合するタンパク質を検索するために *M. luteus* 直鎖状 PG を [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬を用いて標識した。Bolton-Hunter 試薬は水溶液中では不安定で分解するため、[<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬はベンゼン溶液として出荷される。まず、ベンゼンを留去するため、乾燥用 CaCl<sub>2</sub> を充填したトラップを介して N<sub>2</sub> ガスをエッペンチューブ内の [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬 (9.25MBq) に吹きかけた。ベンゼンの留去を確認の後、ここへ 1mg/ml の濃度で 50mM ホウ酸緩衝液 pH8.5 に溶解した *M. luteus* 直鎖状 PG 溶液を 50  $\mu$ l 加え、室温にて一晩反応させた。その後 2M グリシンを 50  $\mu$ l 加え、反応を停止させた。標識された PG は Sephadex G-25 により精製した。

(4) ASD-PG の調製<sup>94)</sup>

分子内に活性アジド基を持ち UV 照射によりタンパク質と架橋する Sulfosuccinimidyl 2-(*p*-azidosalicylamido)ethyl-1-3'-dithiopropionate, (SASD) を用いて PG 結合タンパクを検索するため、(2-*p*-azid-salicylamido-1,3-dithiopropionate)-PG (ASD-PG) を調製した。500  $\mu$ l の *M. luteus* 直鎖状 PG 溶液 (1mg/ml, 0.1M ホウ酸緩衝液, pH8.5) に、10  $\mu$ l の SASD 溶液 (40mg/ml, DMSO) を加え、室温にて 30 分間インキュベートした。ここへ再び SASD 溶液を加え、同

様にインキュベートすることで PG と SASD を反応させた。1M アルギニン溶液 (0.1M ホウ酸緩衝液, pH8.5) を 50  $\mu$ l 加え未反応の SASD をブロックした後、2000 $\times$ g で 2 分間遠心を行い上澄みを回収し 2 l の phosphate buffered saline, (PBS) pH7.2 に対して透析を 3 回繰り返した。透析後、100  $\mu$ l ずつ分注し、使用時まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。また、以上の操作は全て暗所、赤色灯下にて行った。

#### (5) [ $^{125}$ I]-ASD-PG の調製

ASD-PG を Na[ $^{125}$ I]にて標識した。標識の方法はクロラミン T 法とヨードゲン法により行ったが、結果的にヨードゲン法<sup>95)</sup>により比活性の高い標識が可能であったため、以降の実験で用いた [ $^{125}$ I]-ASD-PG はすべてヨードゲン法によって標識した。

100  $\mu$ l のヨードゲン溶液 (40mg/ml,ジクロロメタン) をガラスチューブ(10 $\times$ 75mm)に入れ N<sub>2</sub> ガス置換しながら溶媒のジクロロメタンを留去し、チューブの底をヨードゲンにてコーティングした。予め 10  $\mu$ l (37MBq) の Na[ $^{125}$ I] (3.7GBq/ml)と 100  $\mu$ l の ASD-PG 溶液 (1mg/ml) の混合液をチューブに移し、室温にて 30 分間反応させた。未反応の Na[ $^{125}$ I] は Sephadex G-25 によるゲルろ過によって分離し、[ $^{125}$ I]-ASD-PG の精製を行った。

#### (6) [ $^{125}$ I]-ASD-PG によるフォトアフィニティラベル

検出対象のタンパク質溶液と [ $^{125}$ I]-ASD-PG (0.41  $\mu$ g/tube  $\approx$  1.0 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm) をエッペンドルフチューブ内にて混合した後、暗所 27 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。チューブのふたを開け、約 5cm 上から短波長 UV (260 nm) を室温にて 10 分間照射した。ここへ等量の SDS sample buffer (6% SDS, 8M urea, 20% glycerol, 0.04% bromphenyl blue, 0.2M dithioerythitol を含む 125mM Tris-HCl buffer, pH6.5) を加えて 3 分間煮沸し、この 20  $\mu$ l を 7.5% SDS-PAGE に供し、100V の定電圧にて泳動した。ゲルは銀染色キット (和光純薬) にて染色した後、ゲルを乾燥させてオートラジオグラフィーにより [ $^{125}$ I]-ASD-PG と結合したタンパク質の検出を行った。

#### (7) BIACORE システム用センサーチップへの PG の固定

生体分子間相互作用を測定する BIACORE2000 (Biacore AB) で PG 結合タンパクを検索するため、システムで使用するセンサーチップに PG を固定した。センサー表面にストレプトアビジンがコーティングされたセンサーチップ SA (Biacore AB) に PG を固定化するためにはまず、これまでと同様 *M. luteus* 直鎖状 PG の  $\epsilon$ -アミノ基をビオチン化した。PG は平均糖鎖長 22 と平均糖鎖長 6 のものを用いた。10  $\mu$ g の PG を 500  $\mu$ l の 10mM HEPES 緩衝液, pH8.5 に溶解し、ここに等しいモル濃度になるように Biotin-AC<sub>5</sub>-Sulfo-OS を加え、25°C で 4 時間反応させた。未反応のビオチンとの分離は NAP-5 カラム (アマシャムファルマシアバイオテック(株)) により行った。

直鎖状 PG と同様に細胞壁 PG をセンサーチップに固定化するため平均糖鎖長 4 の *B. licheniformis* 由来細胞壁 PG をビオチン化した。細胞壁由来の PG はペプチド側鎖間架橋のため、遊離アミノ基が少なく直鎖状 PG を用いた方法ではビオチン化の程度が極めて低くなることが予想されたため、糖鎖の還元末端をビオチン化した。10  $\mu$ g の *B. licheniformis* PG を 150mM NaCl を含む 10mM MES 緩衝液, pH5.5 に溶解し、氷上にて同緩衝液の 0.1M 過ヨウ素酸ナトリウム溶液を 2  $\mu$ l 加え 30 分間反応させた。次に NAP-5 カラムを用い、蒸留水による溶出にて PG を回収し、これに PG と等しいモル濃度になるように DMSO に溶かした Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-hydrazide を加え、25°C にて 4 時間反応させた。再び NAP-5 カラムを用いてビオチン化した PG を精製した。

センサーチップへの固定化は BIACORE システムにセンサーチップ SA を装着した後、ビオチン-PG をシステムにインジェクトし、センサー表面上のストレプトアビジンと特異的な結合をさせることで行った。それぞれのビオチン化した 10  $\mu$ g の PG を 200  $\mu$ l の HBS 緩衝液 (10mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005% Tween20) に溶かし、このうち 40  $\mu$ l をそれぞれ 2 回ずつインジェクトして固定化した。

#### (8) 脂肪体細胞膜の調製

5 令 4 日目のカイコ幼虫より第 II 章に記載した方法で脂肪体を摘出し、湿重量の 5 倍量の 150mM NaCl, 0.1mM PMSF, 1mM benzamidine を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液, pH7.5, を加え、テフロン-ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズした。この組織破碎液を 1000  $\times$ g, 10 分間、4°C にて遠心分離を行い、沈殿した未破碎の組織と膜画分を含む上澄みを分

離した。上澄みには組織からの脂肪分が含まれており後の精製に不都合なためガーゼを3枚重ねてろ過することで除去した。ろ液を  $100,000\times g$ , 60 分間、 $4^{\circ}C$  にて遠心分離し、沈殿を前述の緩衝液にて遠心洗浄を3回繰り返した。得られた沈殿を同緩衝液に懸濁し、これを脂肪体粗膜画分とした。

脂肪体細胞膜画分の可溶化は 1% CHAPS にて行った。タンパク濃度を 10 mg/ml に合わせた膜画分懸濁液に 10% CHAPS を 1/10 量加え、攪拌した。これに NaCl を 0.35M, PMSF を 0.5mM となるように加え  $4^{\circ}C$ 、1 時間緩やかに攪拌することで膜タンパク質の可溶化を行い、 $100,000\times g$ , 60 分間遠心分離して得られた上澄みを可溶性膜画分とした。

#### (9) カイコ幼虫体液タンパク質の調製

カイコ 5 令 3 日目幼虫のすべての腹足先端を解剖用ハサミにて切断し、プロフェノールオキシダーゼの阻害剤である 1-phenyl-2-thiourea を数 mg 程度加え氷冷したガラス試験管にカイコ体液を滴下させ採取した。これを  $1,000\times g$ , 10 分間、 $4^{\circ}C$  にて遠心分離し、血球を除いた体液を使用時まで  $-30^{\circ}C$  で保存した。

この体液 175ml を 308ml の 100% 飽和硫酸アンモニウム、pH6.5, と混合し、一晚  $4^{\circ}C$  にて放置した。 $14,000\times g$ , 20 分間遠心し、得られた沈殿を、EDTA, 1,10-phenanthroline monohydrate, PMSF をそれぞれ 1mM, 1-phenyl-2-thiourea 5mM, 及び EtOH を 1% 含む 0.2M リン酸緩衝液に溶解し、2 時間攪拌した。これを  $4,200\times g$ , 20 分間遠心して上澄みを得た。この上澄み 362ml に 25% 飽和になるように再び硫酸を加え 2 時間攪拌した後、 $14,000\times g$ , 20 分間遠心して 2 度目の硫酸沈殿を行った。再び上述の緩衝液に溶解した後、Spectra/Por 1 (限外分子量 6,000-8,000, Medical Industries, Inc) の透析チューブに移し 0.1M リン酸緩衝液、pH6.5, に対して透析を 3 回繰り返した。透析終了後、 $2,000\times g$ , 10 分間遠心して得られた上澄みを実験に用いる体液タンパクとした。

### 第3節 結果

#### (1) RI 標識 PG による PG 結合性タンパク質の検索

一般的なレセプターなどの検索方法として RI 標識したリガンドを用いた結合実験が行われている。抗菌性タンパク質の誘導には PG 認識タンパクの存在が考えられたことから RI 標識した PG を用いることで結合するタンパク質を検索することを試みた。タンパク質やペプチドの標識の場合、分子中に含まれるチロシン、ヒスチジン、トリプトファン残基あるいは SH 基に直接的に放射性ヨウ素を導入することで行われるが、PG は構造上これらのアミノ酸を含んでいない。そこでまず Dap 要求株である *B. megaterium* NCIMB 12520 (*dap<sup>-</sup>lys<sup>-</sup>*) を [<sup>3</sup>H]-Dap 存在下で培養することで PG 中の Dap を [<sup>3</sup>H]標識し [<sup>3</sup>H]-PG を調製した。リゾチーム処理し、得られた可溶性細胞壁 [<sup>3</sup>H]-PG の比放射活性は 74kBq/mg PG (=1.0 × 10<sup>6</sup>cpm/mg PG) であった。この [<sup>3</sup>H]-PG を用いてカイコ脂肪体膜画分に対する結合実験を行った。これにはエッペンチューブ内の膜タンパク質に [<sup>3</sup>H]-PG を加えインキュベートした後、TCA 沈殿した膜タンパク質を吸引しながらガラスフィルターにてろ過した。フィルター上に残った膜タンパク質を TCA で吸引ろ過しながら洗浄して余剰の [<sup>3</sup>H]-PG を除去し、フィルター上に残った [<sup>3</sup>H]-PG のトータルカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。膜タンパク質への PG の特異的な結合は、最大で 100 倍量の非標識 PG 存在下にて同様に結合実験を行い、トータルカウントから非標識 PG 存在下によって得られたカウントを差し引いた値を特異的結合量とした。膜タンパク質濃度、 [<sup>3</sup>H]-PG 量及び非標識 PG 量などの検討を行ったがいずれの場合も特異的結合を得ることができなかった。この原因として [<sup>3</sup>H]-PG の比放射活性に問題があると考え、さらに高い比放射活性を得るため次に [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬による PG 標識を行った。

[<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬による標識の場合、 [<sup>3</sup>H]-PG のように PG に直接標識する場合と異なり [<sup>125</sup>I]標識された化合物を PG の ε-アミノ基に結合させることで間接的に [<sup>125</sup>I]標識することになる。一般的に、間接的に標識する場合は余分な化合物をリガンドに結合させることで本来リガンドの持つ生理活性を消失させる可能性がある。そこで過剰量の非標識 Bolton-Hunter 試薬で処理した PG を調製し、これを用いて *in vitro* での誘導系にて抗菌性タンパク質の誘導効果を検討した。その結果、Bolton-Hunter 試薬の結合した PG は無処理の PG と同程度の誘導効果を有していたことから PG 結合タンパクへの結合能を保持していると考えられ、 [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 試薬による PG 標識物を調製した。500 μg の *B.*

*Megaterium* 細胞壁由来 PG (M.W.  $\geq 10,000$ ) を 9.25MBq の [ $^{125}$ I]-Bolton-Hunter 試薬により標識した結果、比放射活性は約  $5.0 \times 10^8$  cpm/mg PG となり、 [ $^3$ H]-PG の 500 倍高い比放射活性が得られた。この [ $^{125}$ I]-Bolton-Hunter-PG を用い、これまでと同様の方法にて結合実験を行った。 [ $^3$ H] の場合より非放射活性が高いことから、特異的結合が得られるものと考えたが過剰量の非標識 PG 存在下で得られるカウント数は標識 PG を用いて得られるカウント数とほぼ同じであり PG の特異的な結合を示す結果は得られなかった。

ここまで行った実験では PG と特異的に結合する膜タンパク質の存在を明らかにすることができなかった。この要因として以下の 3 つの理由を考えた。1) 目的とするタンパク質が極めて微量であり、細胞を破碎して遠心により分画した程度では検出されない。2) 粗膜画分ではその他の雑多なタンパク質を多く含むため非特異的な結合が大部分を占めてしまう。3) PG が脂肪体細胞と結合するためには可溶性タンパク質の介在が必要である。1) と 2) については粗膜画分からさらに進んだ膜タンパク質の精製が必要であると考えられた。3) については哺乳類マクロファージ細胞表面上の CD14 への LPS の結合に血漿中の LBP を必要とすることから考察され、カイコにおいては体液成分に PG と脂肪体を結ぶタンパク質が存在する可能性が考えられる。第 II 章の *in vitro* による誘導系では脂肪体のみでの培養であり体液は存在しない。しかし、脂肪体はカイコ体液タンパク合成の場であり、*in vitro* で培養中に体液タンパクを分泌している可能性も考えられる。よって以上の考察のもとに膜タンパク質の精製および体液中の PG 結合タンパクの検索を検討した。

また、新たな検索方法として PG に UV 架橋剤の SASD を結合させた後  $^{125}$ I 標識して調製した [ $^{125}$ I]-ASD-PG を用い、これと結合するタンパク質を SDS-PAGE により検出することを試みた。まず始めに [ $^{125}$ I]-ASD-PG による検出系の確立を行った。

## (2) [ $^{125}$ I]-ASD-PG を用いた PG 結合タンパクの検索

哺乳動物の免疫系細胞で PG 結合タンパクの検索を試みた Dziarski ら<sup>59, 60, 61)</sup>の一連の実験結果より、PG が細胞培養に用いた血清タンパク中のウシ血清アルブミン (BSA) あるいはマウス血清アルブミン (MSA) と結合することが明らかとなった。そこで [ $^{125}$ I]-ASD-PG によるカイコ PG 結合タンパク検索のため BSA をポジティブコントロールとして検出系の確認を行った。

[ $^{125}$ I]-ASD-PG による検出は四段階で行われる (Fig. IV-1)。まず、1) [ $^{125}$ I]-ASD-PG とレセプタータンパク質の結合、2) UV 照射によるリガンドとレセプタータンパク質の架橋、

3) DTT 処理による架橋の分断、4) SDS-PAGE によるリガンドの解離及び、最終的にレセプタータンパク質へ  $^{125}\text{I}$  標識が移り、オートラジオグラフィーによる検出が可能である。

$^{125}\text{I}$ -ASD-PG と BSA を  $27^\circ\text{C}$  にて 30 分間インキュベートした後、UV 照射及び DTT 処理の有無について条件検討した試料を SDS-PAGE に供した (Fig. IV-2)。泳動後のゲルをオートラジオグラフィーすることで  $^{125}\text{I}$  標識された BSA の検出を行った結果、UV 照射した条件で  $^{125}\text{I}$ -ASD-PG との結合を示す BSA のバンドが検出された (lane 1, 2, 5, 6)。また、本来なら DTT 処理と SDS によりリガンドである PG が外れ、全体の分子量が小さくなるためバンドの位置が下がるはずである lane 1, 2 のバンドが DTT 無処理の lane 5, 6 よりも高い位置に認められたが、この結果についての理由は不明である。分子量マーカーとして用いたウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ、炭酸デヒドラターゼ、トリプシノーゲン、トリプシンインヒビター、 $\alpha$ -ラクトアルブミンを含むタンパク混合液に  $^{125}\text{I}$ -ASD-PG を加えインキュベート後、UV 照射及び DTT 処理したものを SDS-PAGE に供したところ、BSA にのみ結合が認められた (Fig. IV-2B)。さらに、BSA の濃度を 2, 0.2, 0.02  $\mu\text{g}/\text{tube}$  として同様に  $^{125}\text{I}$ -ASD-PG の結合を検討した結果、BSA 濃度が 0.02  $\mu\text{g}/\text{tube}$  の場合、 $^{125}\text{I}$ -ASD-PG の BSA への結合が非標識 PG によって阻害され BSA への結合を示すバンドが薄くなった (Fig. IV-3)。これらの結果は BSA に対して PG が特異的に結合することを示唆し、Dziarski の結果<sup>61)</sup> と一致した。以上のことから  $^{125}\text{I}$ -ASD-PG を用いた SDS-PAGE による PG 結合タンパク検索のためのシステムが確立されたものと考え、以降の実験を行った。

カイコ幼虫体液を用いた場合に PG との結合を示すバンドが認められた (Fig. IV-4)。血球を遠心により除いただけの血漿体液 (lane 3) ではほとんど検出されなかったが、硫酸分画によって調製した体液タンパク (lane 5) については BSA と同じ位置に PG と結合するバンドが確認された。

この反応液中に約 500 倍量の非標識 PG を加えると  $^{125}\text{I}$ -ASD-PG の結合が妨げられ、 $^{125}\text{I}$ -ASD-PG との結合を示していたバンドが薄くなった (Fig. IV-5, lane 2)。さらに、この結合は LPS によって阻害された (lane 3)。その他、 $\beta$ -1,3-グルカンのラミナリン、 $\beta$ -1,4-グルカンのキチン及びその脱アセチル化物であるキトサン、さらに PG の構成糖である N-アセチルグルコサミンについて同様に反応液に加えて検討したが、これらは  $^{125}\text{I}$ -ASD-PG の結合を阻害しなかった (lane 4, 5, 6, 7, 8)。これらの結果は、体液中に PG と特異的に結合するタンパク質の存在を示唆した。また、硫酸分画によって部分精製し、濃縮すること



で初めて検出されたことから、体液中に極めて微量しか存在しないものと考えられる。さらに、PG の結合が抗菌性タンパク質の誘導因子の一つである LPS によって阻害されたことから、このタンパク質が PG と LPS の認識に働いている可能性が考えられた。

また、脂肪体細胞膜について同様にフォトアフィニティー結合実験を行ったが、 $[^{125}\text{I}]$ -ASD-PG と結合するタンパク質は認められなかった。

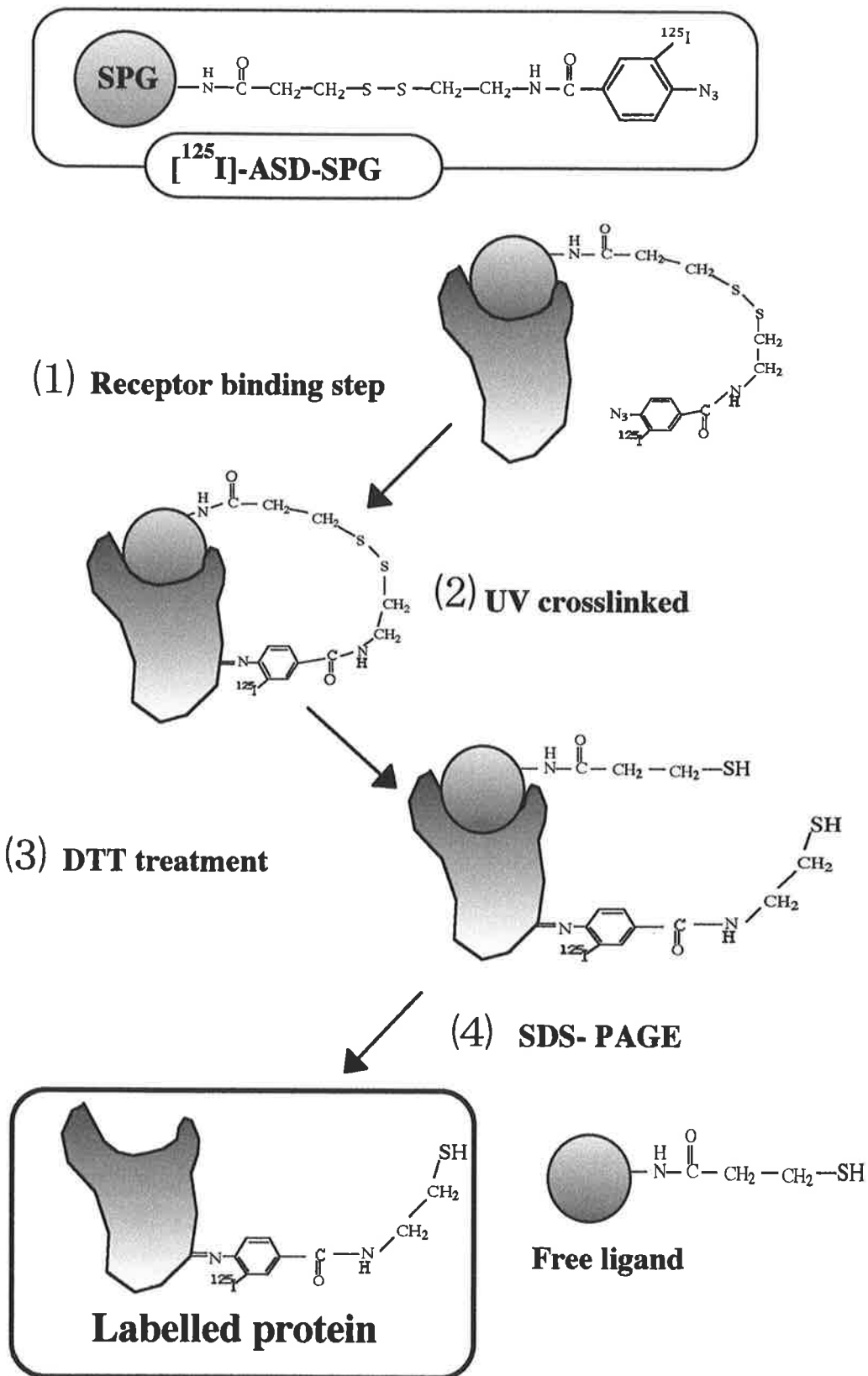
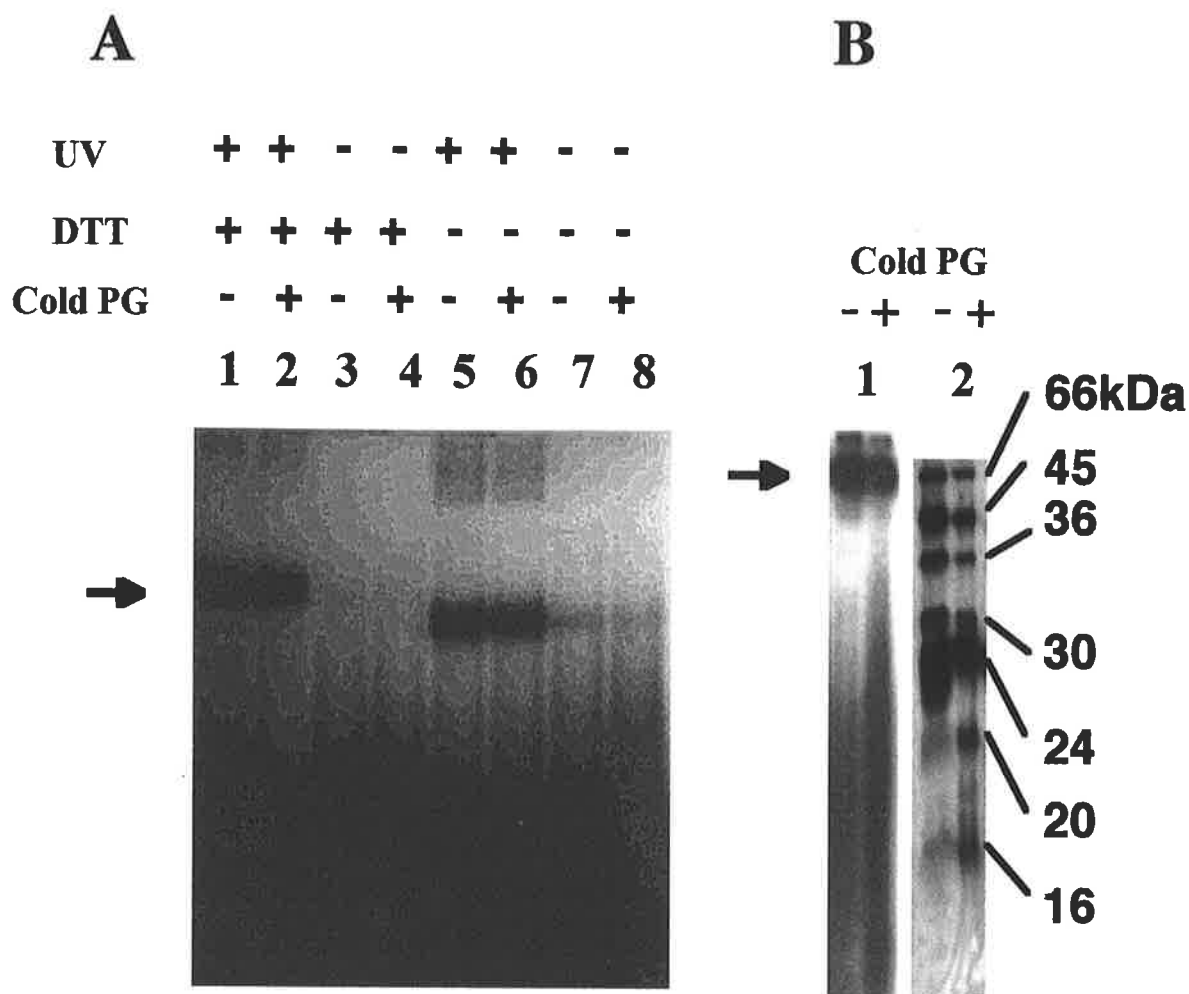


Fig. IV-1 Reaction scheme for detecting PG-binding protein with [<sup>125</sup>I]-ASD-PG



**Fig. IV-2 Binding of [<sup>125</sup>I]-ASD-PG to BSA.**

A, [<sup>125</sup>I]-ASD-PG (0.2 μg/tube, 1.0 × 10<sup>6</sup> cpm) was incubated with BSA (0.2 μg/tube) with (lane 2, 4, 6 and 8) or without (lane 1, 3, 5 and 7) addition of cold PG (20 μg/tube) at 27°C for 30min. After incubation, each sample was irradiated with UV (lane 1, 2, 5 and 6) or not (lane 3, 4, 7 and 8) then treated with DTT (lane 1, 2, 5 and 6) or not (lane 3, 4, 7 and 8). Samples were then analyzed on 7.5 % SDS-PAGE and radioactive bands were visualized with autoradiography.

B, Molecular weight marker proteins (BSA, hen egg albumin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, carbonic anhydrase, trypsinogen, trypsin inhibitor) were incubated with [<sup>125</sup>I]-ASD-PG with or without 100 μg of cold PG. lane 1, autoradiography; lane 2, silver stained. The arrow indicates the band of BSA.

BSA ( $\mu\text{g}/\text{tube}$ )	<u>2</u>		<u>0.2</u>		<u>0.02</u>	
	—	+	—	+	—	+
Cold PG	1	2	3	4	5	6

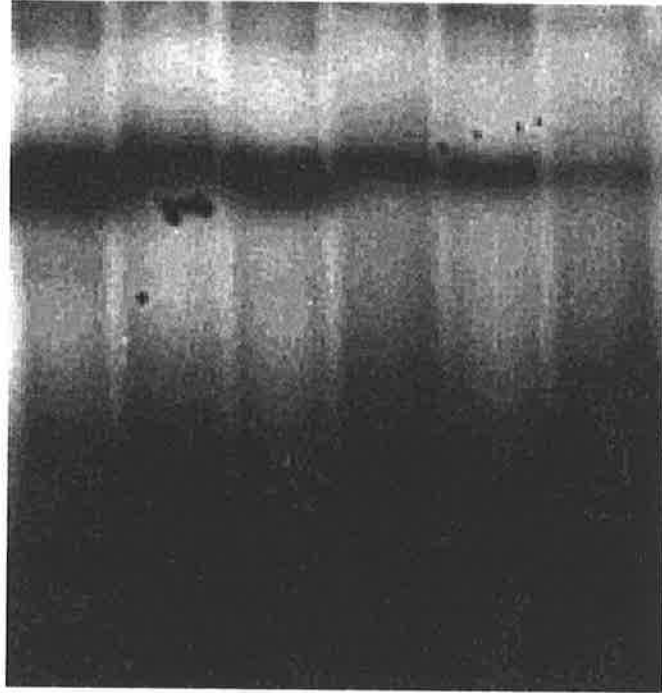


Fig. IV-3 Inhibition of binding of [ $^{125}\text{I}$ ]-ASD-PG to BSA by cold PG. [ $^{125}\text{I}$ ]-ASD-PG was incubated at  $27^\circ\text{C}$  for 30 min with 0.02, 0.2 or 2  $\mu\text{g}$  of BSA in the presence of 100  $\mu\text{g}$  of cold PG. Samples were treated as described in Fig. IV-2 and analyzed on 7.5 % SDS-PAGE. The radioactive bands were visualized by autoradiography.

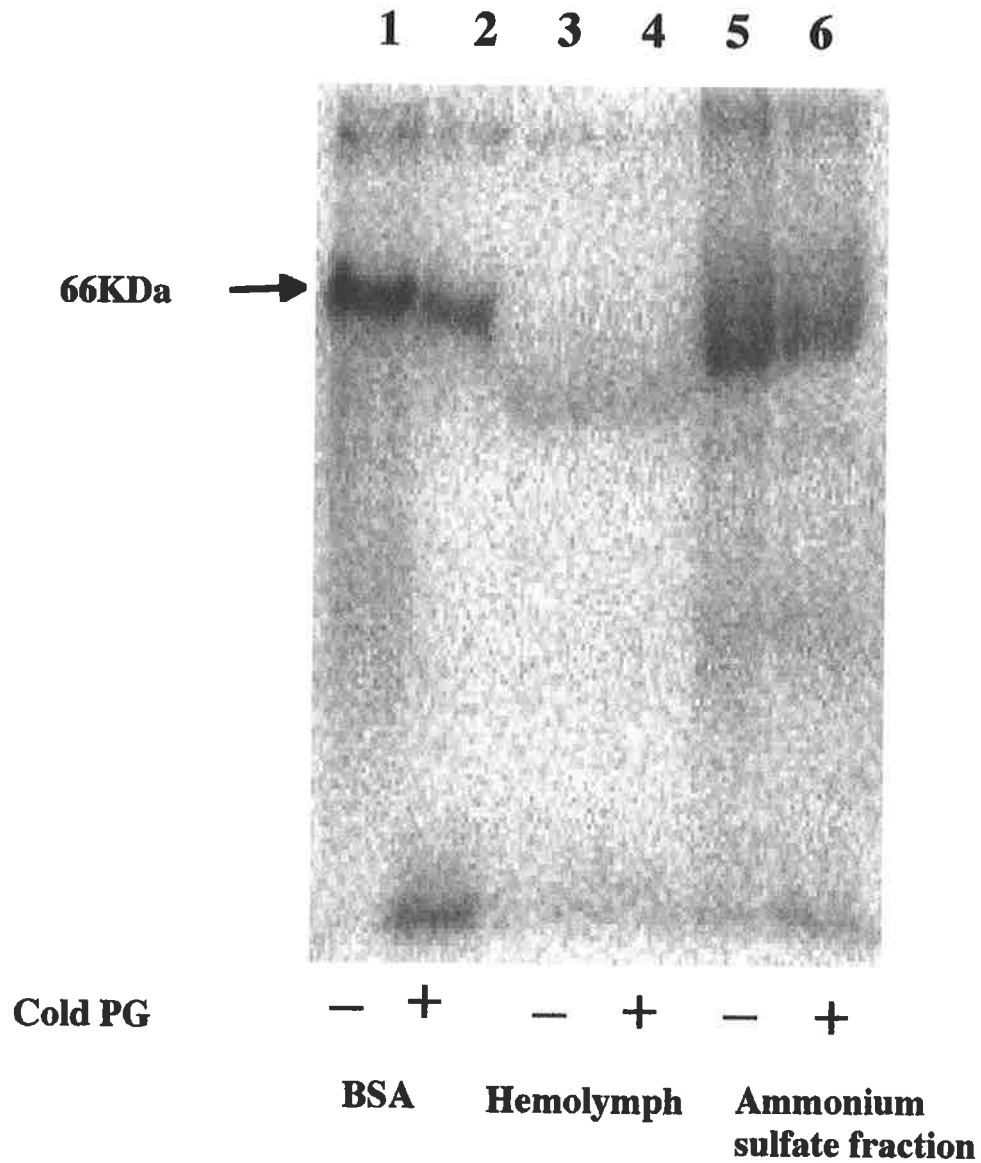


Fig. IV-4 Binding of [<sup>125</sup>I]-ASD-PG larval hemolymph protein.

Hemolymph protein was partially purified as described in "Material and Methods". Hemolymph (115 μg/tube) or ammonium sulfate fraction (36 μg/tube) was incubated with [<sup>125</sup>I]-ASD-PG (0.41 μg/tube, 1.0 × 10<sup>6</sup> cpm) at 27 °C for 30 min. Samples were similarly treated as described in Fig. IV-2. The arrow indicates the band of BSA.

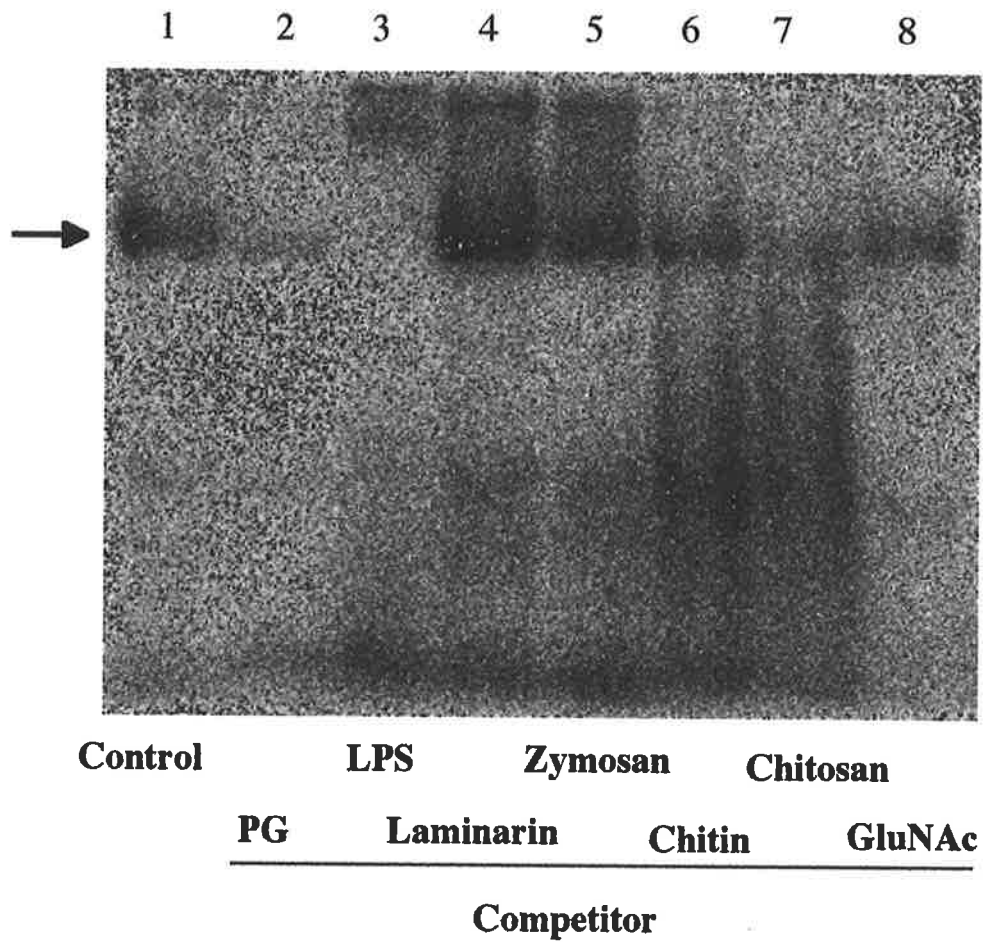


Fig. IV-5 Inhibition of the binding of PG to hemolymph protein by various glucans and LPS. Partially purified hemolymph protein ( $36 \mu\text{g}/\text{tube}$ ) was incubated with  $[^{125}\text{I}]\text{-ASD-PG}$  ( $0.41 \mu\text{g}/\text{tube}$ ,  $1.0 \times 10^6$  cpm) in the presence of various glucans and LPS ( $200 \mu\text{g}/\text{tube}$ ) as indicated at  $27^\circ\text{C}$  for 30 min. Samples were similarly treated as described in Fig. IV-2.

### (3) BIACORE2000 による PG 結合タンパクの検索及び PG-アフィニティカラムによる精製

上記の方法では脂肪体細胞膜由来の PG 結合タンパク質の検出には至らなかった。そこで新たな検出法として BIACORE2000 を用いて検索を行った。BIACORE システムはセンサーチップ上に固定化したリガンドに特定のタンパク質が結合するとその質量変化を検出することから、一般にレセプターとリガンドの分子間相互作用を解析する目的で使われる。本章の目的である脂肪体細胞膜に存在すると考えられる PG 結合タンパク質の検出のため、リガンドとして PG をセンサーチップに固定化し、ここへ脂肪体可溶性タンパク質を供することで検索を行った。センサーチップへの固定化には平均糖鎖長 22 及び 6 の *M. luteus* 直鎖状 PG 及び平均糖鎖長 4 の *B. licheniformis* 細胞壁由来の PG を用いた。このシステムでは、一つのセンサーチップ上に 4 種類のリガンドの固定化ができ、検索の対象となる一つのタンパク質溶液について同時に 4 種類のリガンドに対する相互作用が測定可能である。そこで PG に特異的な結合を示す指標として、センサーチップ上の No.1~3 の 3 箇所種々の PG を固定化し、No.4 はブランクとして用いた。PG に対する結合は PG を固定化した No.1~3 のそれぞれより得られた値とブランク値との差で表した。まず始めに、1% CHAPS により可溶性化した膜タンパク質を pH5.5~9.0 の緩衝液を用いて透析した後、それぞれをタンパク質濃度として 100  $\mu$ g/ml に調製したものについてセンサーチップへの結合を測定した。その結果、全ての固定化 PG との相互作用が認められ、pH5.5 で最も高い値が得られた (Fig. IV-6)。さらに、5~40  $\mu$ g/ml の範囲内でタンパク質の濃度依存的に結合量の増加が認められた (Fig. IV-7)。

以上の結果から 1% CHAPS により可溶性化した脂肪体膜タンパクに PG 結合タンパクが含まれている可能性が考えられたため、次に PG をリガンドとして用いたアフィニティカラムを用い精製を試みた。1% CHAPS を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液, pH7.5, により可溶性化した膜タンパク質 10mg を 0.5% CHAPS を含む 50mM MES 緩衝液, pH5.5, に対して透析し、同緩衝液にて平衡化した PG-アフィニティカラムに流速 13.5ml/h にて一晚循環して吸着させた。未吸着画分の洗浄は 280nm の吸収を測定しながら平衡化緩衝液にて行った。溶出は 0.5M KCl を含む平衡化緩衝液を用い 0~0.5M KCl の濃度勾配により行った。1ml を 1 フラクションとして集め、それぞれのフラクションについて BIACORE による PG 結合性を測定した (Fig. IV-8)。未吸着フラクションに PG と結合を示すタンパク質

は認められず、約 100mM の KCl により溶出されたフラクションに PG 結合性を示すタンパク質が検出された。この結合はセンサーチップ上の 3 種類の PG のいずれにも結合性を示したが、Fig. IV-7 では低分子直鎖状 PG に対する結合についてのみ表示した。この結合性の認められたフラクション 51~53 を集め、約 200 $\mu$ g のタンパク質が得られた。

#### (4) PG 結合特異性の検討

PG-アフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製した脂肪体細胞膜由来の PG 結合タンパク質について、*M. luteus* 高分子直鎖状 PG, *B. licheniformis* 細胞壁 PG、キチン及び LPS による固定化 PG への結合阻害を測定した。*M. luteus* 高分子直鎖状 PG 及び *B. licheniformis* 細胞壁 PG は、それぞれ 250 $\mu$ g/ml、キチン及び LPS は 500 $\mu$ g/ml となるように膜タンパク質溶液(10 $\mu$ g/ml)に加え、それぞれについて BIACORE にて測定した(Fig. IV-8)。コントロールである膜タンパク質のみを測定して得られた値を 100 とし、各多糖存在下で得られた値を%にて示した。その結果、細胞壁 PG により固定化 PG との結合がコントロールに比べ約 50%程度阻害されたが、その他の糖では顕著な阻害は認められなかった。これは PG-アフィニティカラムにより得られた膜タンパク質に PG 特異的に結合するタンパク質が存在することを示唆する結果であった。



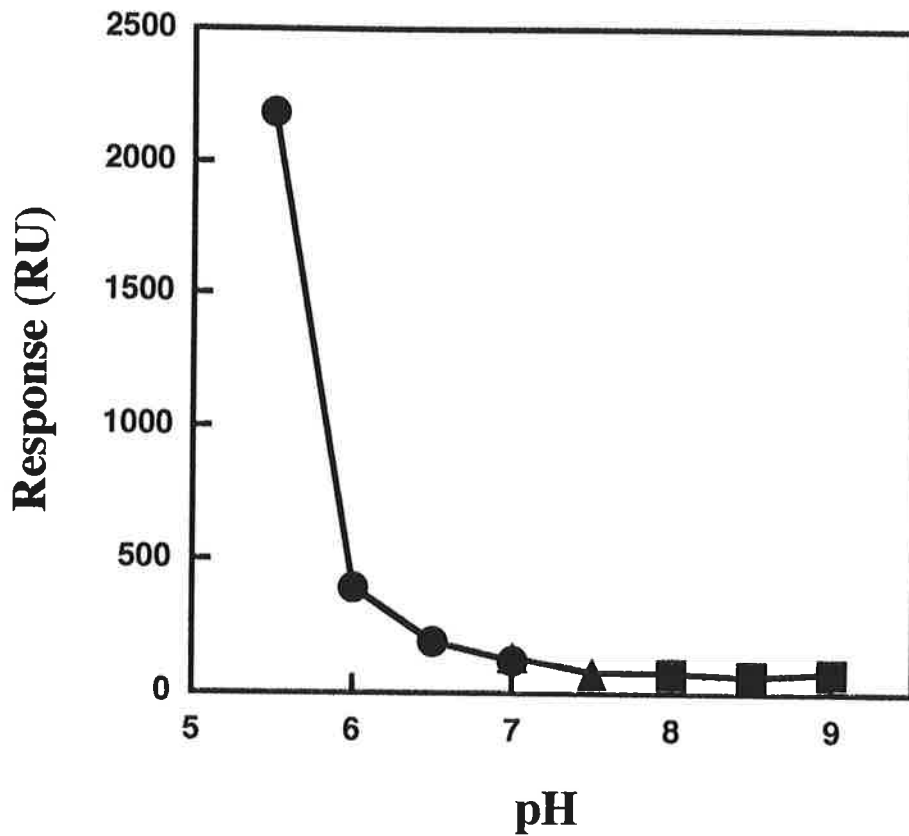


Fig. IV-6 Effect of pH on the binding of solubilized fat body membrane protein to immobilized PG. Fat body cell membrane was solubilized with 1% CHAPS. An aliquots was taken and the pH of the solution was adjusted to 5.5~9.0 as indicated with MES buffer (●), HEPES buffer (▲) or BICIN buffer (■). Samples ( $4 \mu\text{g}$  protein in  $40 \mu\text{l}$ ) were used for measuring the binding to immobilized PG with BIAcore 2000.

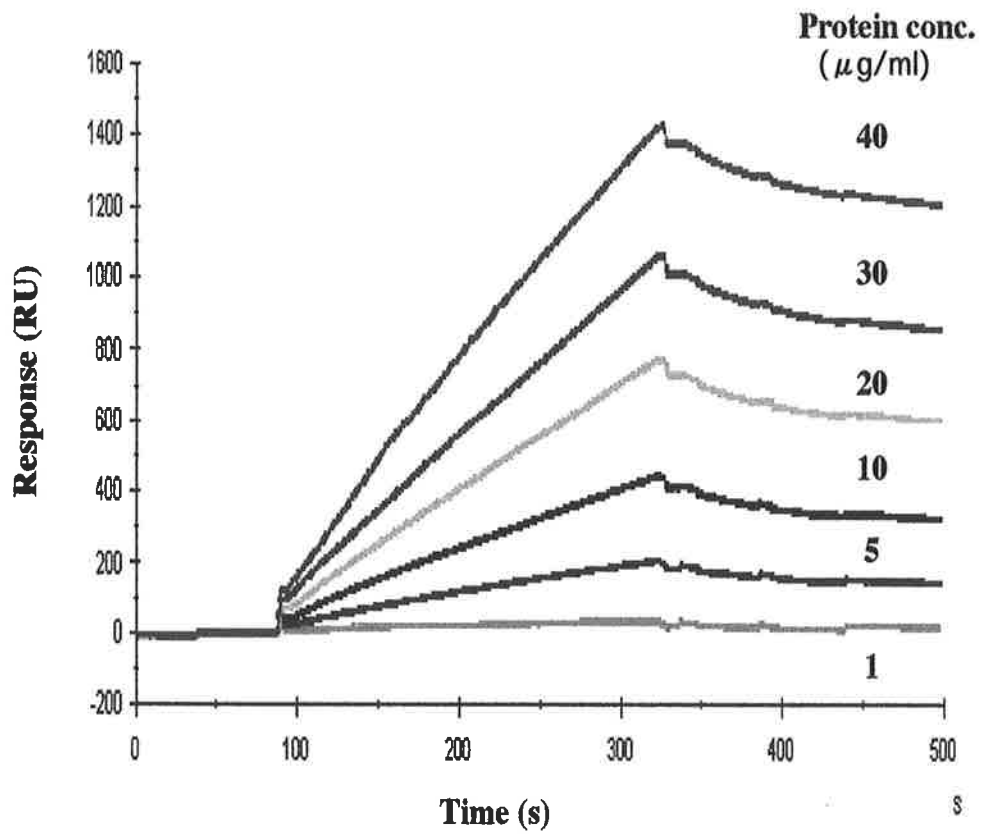


Fig. IV-7 Dose dependent binding of solubilized membrane proteins. Solubilized membrane protein ( $40 \mu\text{l}$ ) of the indicated concentration was injected in BIAcore 2000 and the binding to low molecular weight linear PG was measured.

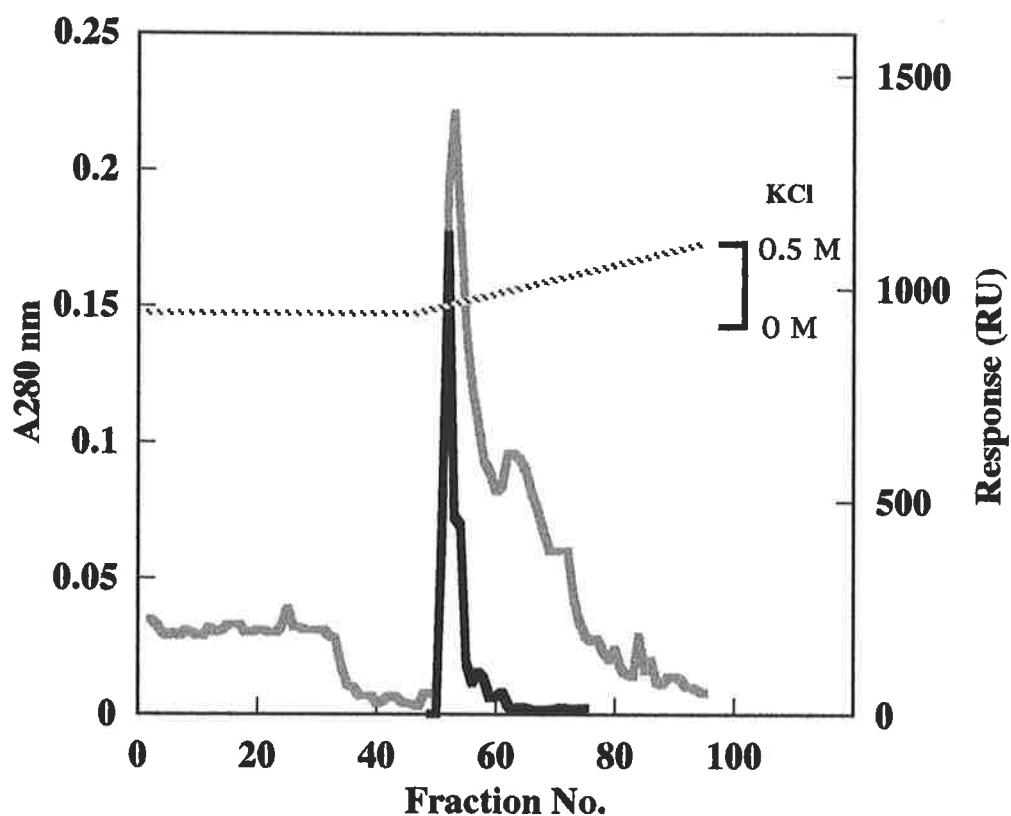


Fig. IV-8 PG-formyl-cellulofine column chromatography of solubilized fat body membrane protein. Fat body cell membrane was solubilized with 1% CHAPS and applied to a column ( $0.8 \times 4$  cm) of PG-formyl-cellulofine equilibrated with 50mM MES buffer, pH5.5, containing 0.5% CHAPS. The column was washed with the same buffer and eluted with 40ml of a linear gradient formed with 0 and 0.5M KCl in the same buffer. 1ml fractions were collected. Each fraction was diluted ten times with the same buffer, and analyzed by BIACORE 2000. (—), A280; (—), binding to immobilized PG; (.....), KCl.

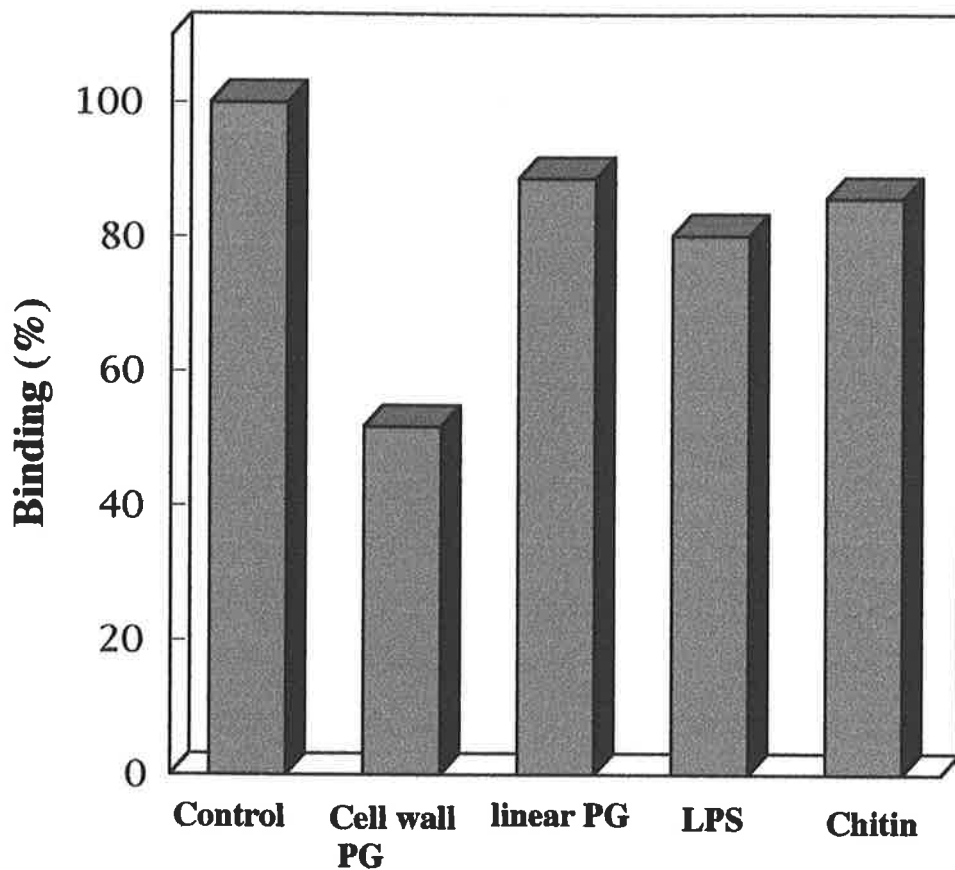


Fig. IV-9 Effect of various glucans and LPS on the binding of solubilized membrane protein to immobilized PG. PG-binding protein was purified by PG-affinity column chromatography. Cell wall PG, linear PG, LPS or chitin was added to the protein solution ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) and the binding to the immobilized cell wall PG was measured in BIACORE 2000. The value was expressed as a percentage of the maximum binding in the absence of added competitor. Cell wall PG, *B. licheniformis* cell wall PG ( $250 \mu\text{g/ml}$ ); Linear PG, *M. luteus* linear PG ( $250 \mu\text{g/ml}$ ); LPS from *E. coli* O111:B4 ( $500 \mu\text{g/ml}$ ); Chitin, ( $500 \mu\text{g/ml}$ ).

#### 第4節 考察

これまでに知られている昆虫におけるバクテリア認識に関わるタンパク質は主に LPS の認識に関するものがほとんどであり、PG に関する報告は少ない。カイコにおいてこの PG 認識システムの検索を試みた結果、体液中と脂肪体細胞膜に PG と結合するタンパク質が存在することが明らかとなった。体液に含まれる PG 結合性タンパク質は $[^{125}\text{I}]$ -ASD-PG と SDS-PAGE を用いたフォトアフィニティ実験の結果、70kDa 付近に存在していた。Ashida ら<sup>65)</sup>の単離したフェノールオキシダーゼ系の PG 認識タンパク質(PGRP)は 11kDa の分子量であることから、今回検出された体液の PG 結合タンパクはフェノールオキシダーゼ系の PGRP とは異なるものと考えられる。しかし、 $[^{125}\text{I}]$ -ASD-PG の結合が LPS 存在下で競合的に阻害されたことから、このタンパク質は PG に特異的とは言えない。

脂肪体細胞膜の PG 結合タンパクは RI 標識した PG を用いた検索が困難であった。恐らくこのタンパク質は極めて微量にしか存在しないか、PG との親和性が低く、一般的なレセプター検索方法では検出され難いのではないかと考えられた。本研究では無菌飼育した健常カイコの脂肪体を材料として検索を試みたが、最近 *B. mori* より見つかったグラム陰性菌結合タンパク質(GNBP)の場合<sup>96)</sup>、バクテリアの注射により免疫化した体液中から検出されていることから、目的とする PG 結合タンパク質もバクテリアの感染により誘導され、脂肪体細胞表面上の数が増える可能性が考えられる。

最終的に BIACORE システムを用いた結果、1%CHAPS により可溶化した膜タンパク質の中に PG と相互作用するタンパク質が検出された。センサーチップに固定化した *B. megaterium* 細胞壁 PG 及び平均糖鎖長 6 と 22 の *M. luteus* 由来の直鎖状 PG のいずれの PG にも結合が認められ、pH 5.5 の酸性条件で高いレスポンスが得られた。一般的に BIACORE で表されるレスポンスは溶媒の pH や共存する塩濃度の影響を受けるため、pH 5.5 の条件はこのタンパク質と PG の結合の至適 pH を表すと言うよりも BIACORE システムで高い検出感度を得るための条件であると考えられる。

可溶化した膜タンパク質からの精製を目的とし、PG をリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィを行った結果、100mM の KCl により単一のピークが溶出された。このタンパク質とセンサーチップに固定化した PG との結合は遊離の細胞壁 PG により阻害され、LPS では阻害されなかったことからこの結合が PG に特異的であることが明らかとなった。本研究により検出された脂肪体細胞膜由来の PG 結合タンパク質は現段階では

抗菌性タンパク質誘導に関与する確証は得られていない。しかし、少なくともフェノールオキシダーゼカスケード系の PGRP とは異なり、可溶性の低分子 PG に特異的な結合を示し、脂肪体細胞膜に存在することから、バクテリア感染のシグナルを PG の形で認識し、そのシグナルを細胞内へ伝達する働きを持つと考えられる。

## 総括

昆虫の生体防御反応の一つである抗菌性タンパク質の誘導は、バクテリアの生体内への侵入の結果、その細胞壁ペプチドグリカン(PG)あるいはリポ多糖(LPS)が誘導因子として働くことで生じる。これまで様々な昆虫より抗菌性タンパク質が数多く発見され、薬理的なアプローチからその抗菌性や有効性に関する研究が盛んに行われた。その一方で、バクテリア感染から抗菌性タンパク質合成までの誘導経路に関する分子生物学的な立場からの明確な解明を得るまでには至っていない。

本研究では抗菌性タンパク質誘導機構の解明を目的として、哺乳類免疫系でも LPS とは異なる新たな免疫活性化因子として注目されている PG について、カイコにおける抗菌性タンパク質誘導効果と PG 構造の相関性およびカイコ生体内に存在すると考えられる PG 認識システムの特定を試みた。

まず、脂肪体組織を培養し、*in vitro* での抗菌性タンパク質誘導系を確立することから初め、以下のような結果を得た。

これまでカイコ生体内に侵入したバクテリアは血球による食作用を受け、それにより生じた PG 断片が誘導因子として働く場合や哺乳類に代表されるような免疫担当細胞による抗原提示を経た結果、抗菌性タンパク質が誘導される可能性が考えられた。しかし、*in vivo* での実験系では血球や体液などの役割を明確にすることが不可能であった。脂肪体を組織培養した *in vitro* での実験結果から血球の直接的関与が無くても抗菌性タンパク質が誘導されたことから、この誘導系に血球は必ずしも必要ではなく、体液中に恒常的に存在するリゾチームによる細胞壁分解を経て誘導因子である PG 断片が生じ、これが直接のエリシターとして働くのではないかと考えられる。故にリゾチームは感染初期の抗バクテリアとしての働きのみならず、誘導性の抗菌性タンパク質誘導に必要な PG 分子の生成に関与する可能性が考えられる。この可能性を証明するには何らかの形でリゾチーム活性を特異的に阻害した条件で、同様にバクテリア菌体による誘導実験を検討する必要がある。

この *in vitro* の実験ではさらに抗菌性タンパク質誘導が PG 構造に依存することを示唆した。また、その結果をもとに *M. luteus* より調製した直鎖状の PG を用いた一連の実験結果から抗菌性タンパク質誘導に必要な PG の最小構造が特定された。GluNAc-MurNAc の糖鎖部分とテトラペプチドからなる PG の最小ユニットの繰り返しが 2 である糖鎖長 4 の PG 構造が誘導因子としての最小構造であることが特定され、さらに *M. luteus* のような

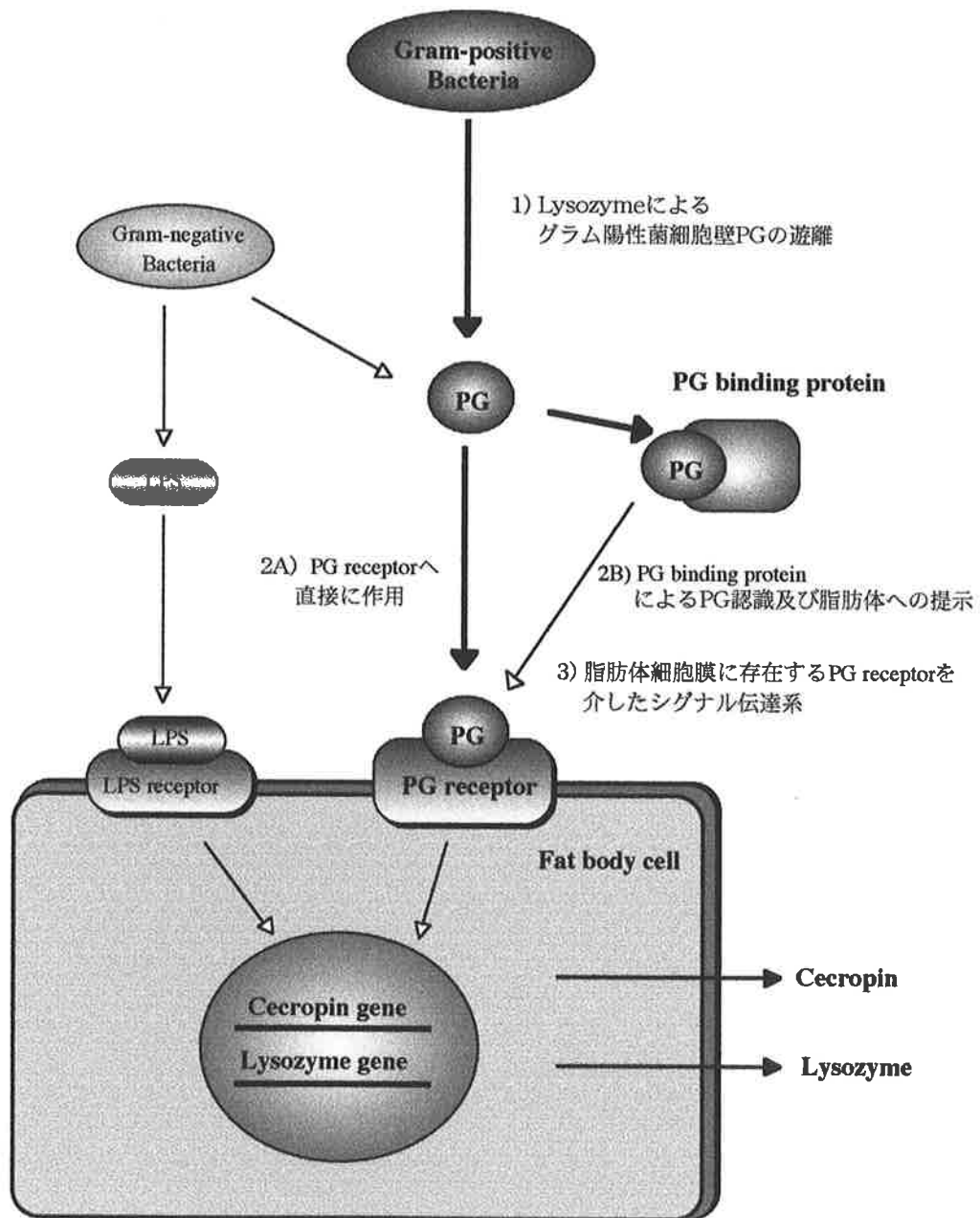
グラム陽性菌細胞壁 PG に認められる PG ユニット間を結ぶ特定の架橋構造が誘導因子としての働きを阻害する可能性が考えられた。これらの結果はカイコ生体内にある PG 認識システムの PG 構造に対する特異性の高さを裏付けるものであった。哺乳動物においても PG はバクテリア感染による発熱や睡眠あるいはサイトカインの過剰分泌に伴う炎症などの誘発因子として働き、あるいは補体系の活性化やアジュバント効果を持つことが明らかとなっている。さらに、これまでグラム陰性菌により生じる感染症の原因が LPS だけではなくグラム陰性及び陽性菌に共通して存在する PG も要因の一つであることが明らかとなり、グラム陽性菌の PG 構造とそれにより生じる免疫反応の相関性に着目した報告が最近になり見受けられる。これらの報告のほとんどは PG を構成するペプチド組成のみに注目し、架橋構造について触れたものは少ない。*M. luteus* 由来の PG に関する例に、ネズミマクロファージの IL-12 誘導の効果に関する報告がある。さらに、種々のグラム陽性菌の感染による *Drosophila* の抗菌性タンパク質遺伝子の発現効果を検討した報告もある。これらの結果はいずれも本論の結果と一致し、*M. luteus* の PG には生体防御反応の誘発効果が低いことを示している。

PG 認識システムの特定を目的として<sup>125</sup>I-標識した PG を用いて PG と特異的に結合する生体分子の検索を試みた結果、体液中に PG と結合するタンパク質の存在が確認された。SDS-PAGE の結果、この体液タンパク質は約 70kDa の分子量から成り、<sup>125</sup>I-PG の結合が非標識の PG および LPS によって阻害された。この<sup>125</sup>I-PG を用いた実験系では脂肪体組織からの PG 結合タンパク質の検出には至らなかったが、BIAcore2000 を用いることで存在が確認された。脂肪体細胞膜を 1%CHAPS により処理し PG-アフィニティカラムを用いて精製することで得られた可溶化膜タンパク質はセンサー上に固定化した PG と相互作用を示し、脂肪体細胞膜に PG と結合する膜タンパク質の存在することが明らかとなった。センサーチップ上に固定化した PG との結合は遊離の PG により阻害され、LPS では阻害効果は認められなかった。抗菌性タンパク質産生器官である脂肪体細胞膜の PG 結合タンパク質は誘導因子である PG を認識し細胞内へのシグナル伝達に関わるレセプターとして働く可能性が高いと考えられる。体液中にはフェノールオキシダーゼ系に関わる PG 認識タンパク(PGRP)の存在が報告されているが本研究によって検出されたタンパク質とは分子量が異なる点及び LPS と結合を示すことから PGRP とは異なると考えられる。この体液中に存在する PG 結合タンパク質が抗菌性タンパク質誘導に関わるとした場合、哺乳動物における LPS 認識システムである LPS binding protein (LBP)と CD14 のように PG を



脂肪体細胞上のレセプターへ提示する担体として働く場合や、PG との複合体形成がレセプターによる認識に必要であるという可能性が考えられる。

以上の本研究の結果を基に考察された、バクテリア感染から抗菌性タンパク質誘導に至るまでのカイコ生体内の分子機構についての概略を次ページに図示した。



## 謝辞

本研究を遂行するあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました鳥取大学農学部 森嶋伊佐夫 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、懇切なる御助言、御教示を賜りました島根大学生物資源科学部 松田英幸 教授並びに鳥取大学農学部 甲斐英則 教授に心から感謝致します。さらに細かな御指導、御教授を賜りました鳥取大学農学部 東 政明 助教授、並びに本研究室にて日々御指導を頂きました 山野好章 助教授に心から感謝致します。また、本研究を進めるにあたり、御協力頂きました石田正義 教授を初め鳥取女子短期大学 食物栄養専攻の教員の皆様に感謝致します。さらに本研究をお手伝い下さいました機能生化学研究室の卒業生及び在校生の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 名取俊二、野本亀久雄、古田恵美子、村松 繁、無脊椎動物の生体防御、  
2.免疫系の進化、11-13
- 2) Roitt, I., Brostoff, L., Male, D. Immunology, Third edition. (免疫学イラストレ  
イテッド、第3版、多田富雄 監訳、南江堂、東京)
- 3) 名取俊二、野本亀久雄、古田恵美子、村松 繁、無脊椎動物の生体防御、  
7.昆虫の細胞性防御反応、213-229
- 4) Wago, H., Phagocytic recognition in *Bombyx mori*, in Immunology of insects and  
other arthropods, Gupta, A.P., Ed, CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London
- 5) Boman, H. G., Faye, I., Gudmundsson, G. H., Lee, J. Y., and Lidholm, D. A.,  
(1991) Cell-free immunity in *Cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **201**, 23-31
- 6) Powning, R. F. and Davidson, W. J. (1973) Studies on insect bacteriolytic enzymes.  
I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. *Comp.  
Biochem. Physiol.* **45B**, 669-686.
- 7) Engstrom, A., Xanthopoulos, K. G., Boman, H. G., Bennich, H. (1985) Amino  
acid and cDNA sequences of lysozyme from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*  
**4**, 2119-2122
- 8) Anderson, R. S., and Cook, M.L. (1979) Induction of lysozyme-like activity in the  
hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eridania*. *J. Invertebr. Pathol.*  
**33**, 197-203.

- 9) Dunn, P. E. and Drake, D. R. (1983) Fate of bacteria injected into naive and immunized larvae of tobacco horn worm. *J. Invertebr. Pathol.* **41**, 77-85.
- 10) Engstrom, A., Xanthopoulos, K. G., Boman, H. G., Bennich, H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **3**, 3347-3351.
- 11) Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H. G. (1980) Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**, 7-16.
- 12) Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H, Kapur, R., Boman, H. G. (1982) Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *Eur. J. Biochem.* **127**, 207-217.
- 13) Matsumoto, N., Okada, M., Takahashi, Ming, Q. X., Nakajima, Y., Nakanishi, Y., Komano, H. and Natori, S. (1986) Molecular cloning of a cDNA and assignment of the C-terminal of Sarcotokin I A, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrine*. *Biochem. J.* **239**, 717-722.
- 14) Teshima, T., Ueki, Y., Nakai, T. and Shiba, T. (1986) Structure determination of lepidopteran, self-defense substance produced by silkworm. *Tetrahedron* **42**, 829-834.
- 15) Morishima, I., Suginaka, S., Ueno, T. and Hirano, H. (1990) Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides from *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **95B**, 551-554.
- 16) Dickinson, L., Russell, V. and Dunn, P. E. (1988) A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **263**, 19424-19429.

- 17) Lee, J. Y., Boman, A., Sunn, C., Anderson, M., Jornvall, H., Mutt, V. and Boman, H. G. (1989) Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. *Pro. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 9159-9162.
- 18) Boman, H. G., Boman, I. A., Andreu, D., Li, Z., Merrifield, R.B., Schlenstedt, G. and Zimmermann, R. (1989) Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropin A and B. *J. Biol. Chem.* **264**, 5852-5860.
- 19) Holak, T. A., Engstrom, A., Kraulis, P. J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T. A., Gronenborn, A. M. and 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.
- 20) Okada, M., Natori, S. (1985) Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* **229**, 453-458
- 21) Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. and Mauzerall, D. (1988) Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into Planar lipid membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **85**, 5072-5076
- 22) Steiner, H., Andreu, D. and Merrifield, R. B. (1988) Binding and action of cecropin and cecropin analogues. *Biochem. Biophys. Acta* **939**, 260-266
- 23) Hultmark, D., Engstrom, A., Andersson, K., Steiner, H., Benich, H. and Boman, H. G. (1983) Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **2**, 571-576.
- 24) Tryselius, Y., Samakovlis, C., Kimbrell, D. A., and Hultmark, D. (1992) CecC, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila* pupae. *Eur. J. Biochem.* **204**, 395-399

- 25) Kockum, K., Faye, I., von Hofsten, P., Lee, J. Y., Xanthopoulos, K. G. and Boman, H. G. (1984) Insect immunity. Isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic and basic attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **3**, 2071-2075
- 26) Engstrom, A., Engstrom, P., Tao, Z. J., Calsson, A., Bennich, H. (1984) Insect immunity. The primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **3**, 2065-2070
- 27) Engstrom, A., Engstrom, P., Tao, Z.J., Calsson, A., Bennich, H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membranes of *Echerichia coli*. *EMBO J.* **3**, 3347-3351
- 28) Ando, K., Natori, S. (1988) Inhibitory effect of sarcotoxin II A, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Echerichia coli*. *J. Biochem.* **103**, 735-739
- 29) Zeyz, H., Spitzenagel, J. K. (1963) *Science*, **142**, 1085-1087
- 30) Selsted, M. E., Brown, D. M., Delong, R. J., Lehrer, R. I., (1983) Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils, *J. Biol. Chem.* **258**, 14485-14488
- 31) Harwig, S. S., Szklarek, D., Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. I. (1989) Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect Immun.* **57**, 2021-2027
- 32) Selsted, M. E., Miller, S. I., Henschen, A. H., Ouellette, A. J. (1992) Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J. Cell. Bio.* **118**, 929-936

- 33) Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H., Cullor, J. S. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of  $\beta$ -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 6641-6648
- 34) Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J. L., Wicker, C., Reichhart, J. M., Dunbar, B., Lepage, P., Van-Dorsselaer, A., Hoffmann, J., Fothergill, J. (1989) Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 262-266
- 35) 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
- 36) Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., et al. (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptides forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245
- 37) Ashida, M. and Yamazaki, I. (1990) Biochemistry of the phenoloxidase system in insect with special reference to its activation. In: Molting and Metamorphosis (Ohnishi, E. and Ishizaki, H., Ed.) 239-265, Springer-Verlag, Berlin.
- 38) Ashida, M. and Brey, P. T. (1995) Role of the integument in insect defense: Prophenol oxidase cascade in the cuticula matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10698-10702
- 39) Ashida, M. (1981) A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **11**, 57-65



- 40) Yoshida, H. and Ashida, M. (1986) Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **16**, 539-545
- 41) Daffre, S., Faye, I. (1997) Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig- superfamily. *FEBS. Lett.* **408**, 127-130
- 42) Andersson, K., Steiner, H. (1987) Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* **17**, 133-140
- 43) Sun, S. C., Lindstrom, I., Boman, H. G., Faye, I., Schmidt, O. (1990) Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science.* **250**, 1729-1732
- 44) Ladendorff, N. E., Kanost, M. R. (1991) Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin. superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **18**, 285-300
- 45) Powning, R. F., Davidson, W. J. (1973) Studies of insect bacteriolytic enzyme- I : Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **B45**, 669-686
- 46) Boman, H. G., Faye, I., Paul, K., Rasmuson, T. Jr. (1974) Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immun.***10**, 136-145
- 47) Gotz, P., Boman, H.G., (1985) In comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, 453-485, Pergamon Press, Oxford.

- 48) Chadwick, J. S., Uilk, K. E. (1986) Antibacterial and antiviral factor in arthropod hemolymph in hemocyte and humoral immunity in *Arthropods*, Gupta, A.P., Ed., John Wiley & Sons, New York, 287
- 49) Chadwick, J. S., Uilk, E. (1969) Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Psthol.*, **13**, 410
- 50) Kanost, M. R., Dai, W., Dunn, P. E. (1988) Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **8**, 147-164
- 51) Morishima, I., Yamada, K., Ueno, T. (1992) Bacterial peptidoglycan as elicitor of anitibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **22**, 363-367
- 52) Dinarello, C. A. (1991) Interlukin-1 and Interlukin-1 antagonism. *Blood*, **77**, 1627-1652
- 53) Tracey, K. J., Lowry, S. F. (1990) The role of cytokine mediators in septic shock., *Adv. Surg.* **23**, 21-56
- 54) Galanos, C., Freudenberg, M. A., Matuura, M. (1990) Mechanisms of the lethal action of endotoxin and endotoxin hypersensitivity, 603-619, In Friedman, H., Klein, T. W., Nakano, M., Nowotny, A. ed., *Endotoxin*, Plenum Press, New York.
- 55) Heumann, D., Barras, C., Severin., A., Glauser, M. P., Tomasz, A. (1994) Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* **62**, 2715-2721

- 56) Ohkuni, H., Norose, Y., Ohta, M., Hayama, M., Kimura, Y., Tsujimoto, M., Kotani, S., Shiba, T., Kusumoto, S., Yokogawa, K., Kawata, S. (1979) Adjuvant activities in production of reaginic antibody by bacterial cell wall peptidoglycan or synthetic N-acetylmuramyl dipeptides in mice. *Infect. Immun.* **24**, 313-318
- 57) Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249**, 1431-1433
- 58) Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 437-457
- 59) Dziarski, R. (1991) Demonstration of peptidoglycan-binding sites on lymphocytes and macrophages by photoaffinity cross-linking. *J. Biol. Chem.* **266**, 4713-4718
- 60) Dziarski, R. (1991) Peptidoglycan and lipopolysaccharide bind to the same binding site on lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 4719-4725
- 61) Dziarski, R. (1994) Cell-bound albumin is the 70-kDa peptidoglycan-, lipopolysaccharide-, and lipoteichoic acid-binding protein on lymphocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**, 20431-20436
- 62) Weidemann, B., Brade, H., Rietschel, ET., Dziarski, R., Bazil, V., Kusumoto, S., Flad, H. D., Ulmer, A J. (1994) Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures. *Infect. Immun.* **62**, 4709-4715

- 63) Gupta, D., Kirkland, T. N., Viriyakosol, S., Dziarski, R. (1996) CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **271**, 23310-23316
- 64) Weidemann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S., Stelter, F., Rietschel, E. T., Flad, H. D., Ulmer, A. J. (1997) Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect. Immun.* **65**, 858-864
- 65) Yoshida, H., Kinoshita, K., Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Bio. Chem.* **271**, 13854-13860
- 66) Faye, I., Wyatt, G. R. (1980) The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia* silkworm pupae. *Experientia.* **36**, 1325-1326
- 67) Dunn, P. E., Dai, W., Kanost, M. R., Geng, C. X. (1985) Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* **9** 559-568
- 68) Jungreis, A. M., Jatlow, P., Wyatt, G. R. (1973) Inorganic ion composition of haemolymph of the cecropia silkworm: changes with diet and ontogeny. *J. Insect. Physiol.* **19**, 225-233
- 69) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54
- 70) Trenczek, T., Faye, I. (1988) Synthesis of immune protein in primary cultures of fat body from *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* **18**, 299-312

- 71) 寺田 弘 編集、電気泳動法—基礎と実験—、279-281, 廣川書店
- 72) Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Numata, F., Tono, Y., Tokuya, S., Azuma, I. (1985) Adjuvant activity of chitin derivatives in mice, *Vaccine*, **3**, 379-384
- 73) Morishima, I., Horiba, T., Yamano, Y. (1994) Lysozyme activity in immunized and non-immunized hemolymph during the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **108A**, 311-314
- 74) Sun, S. C., Lindstrom, I., Lee, J. Y., Faye, I., (1991) Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **196**, 247-54
- 75) Engstrom, Y., Kadalayil, L., Sun, S. C., Samakovlis, C., Hultmark, D., Faye, I. (1993) kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* **232**, 327-333
- 76) Sun, S. C., Asling, B., Faye, I. (1991) Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. *J. Biol. Chem.* **266**, 6644-6649
- 77) Yamano, Y., Matsumoto, M., Inoue, K., Kawabata, T., Morishima, I. (1994) Cloning of cDNAs for cecropin A and B, and expression of the genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1476-1478
- 78) Taniai, K., Kato, Y., Hirochika, H., Yamakawa, M. (1992) Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*, *Biochem. Biophys. Acta.* **1132**, 203-206

- 79) Sun, S. C., Faye, I. (1992) *Cecropia* immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor kappa B. *Eur. J. Biochem.* **204**, 885-892
- 80) Kobayashi, A., Matsui, M., Kubo, T., Natori, S. (1994) Purification and characterization of a 59-kilodalton protein that specifically binds to NF-kappa B-binding motifs of the defense protein genes of *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly). *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4049-4056
- 81) Samakovlis, C., Asling, B., Boman, H. G., Gateff, E., Hultmark, D. (1992) In vitro induction of cecropin genes--an immune response in a *Drosophila* blood cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 1169-1175
- 82) Dziarski, R., (1986) Effect of peptidoglycan on the cellular components of the immune system, 229-247, In P. H. Seidl and K.H. Schleifer , ed., Biological properties of peptidoglycan. Walter de Gruyter , Berlin, Germany.
- 83) Mirelman, D., Bracha, R., Sharon, N. (1974) Penicillin-induced secretion of soluble, uncross-linked peptidoglycan by *Micrococcus luteus* cells. *Biochemistry.* **13**,5045-5053
- 84) Chuyson, J. M. (1966) *Meth. Enzymol.* **8**, 685-699
- 85) Heilmann, H. D. (1972) On the peptidoglycan of the cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* **31**, 456-630
- 86) Damais, C., Bona, C., Chedid, L., Fleck, J., Nauciel, C., Martin, J. P. (1975) Mitogenic effect of bacterial peptidoglycans possessing adjuvant activity. *J. Immunol.* **115**, 268-271

- 87) Dziarski, R. (1980) Polyclonal activation of immunoglobulin secretion in B lymphocytes induced by staphylococcal peptidoglycan. *J. Immunol.* **125**, 2478-2483
- 88) Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P., Tomasz, A. (1994) Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* **62**, 2715-2721
- 89) Vacheron, F., Guenounou, M., Nauciel, C. (1983) Induction of interleukin 1 secretion by adjuvant-active peptidoglycans. *Infect. Immun.* **42**, 1049-1054
- 90) Vacheron, F., Guenounou, M., Zinbi, H., Nauciel, C. (1986) Release of a cytotoxic factor by macrophages stimulated with adjuvant-active peptidoglycans. *J. Natl. Cancer. Inst.* **77**, 549-553
- 91) Lawrence, C., Nauciel, C. (1998) Production of Interleukine-12 by murine macrophages in response to bacterial peptidoglycan, *Infect. Immun.* **66**, 4947-4949
- 92) Kawasaki, A., Takada, H., Kotani, S., Inai, S., Nagaki, K., Matsumoto, M., Yokogawa, K., Kawata, S., Kusumoto, S., Shiba, T. (1987) Activation of the human complement cascade by bacterial cell walls, peptidoglycans, water-soluble peptidoglycan components, and synthetic muramylpeptides--studies on active components and structural requirements. *Microbiol. Immunol.* **31**, 551-569
- 93) Takada, H., Kawabata, Y., Kawata, S., Kusumoto, S. (1996) Structural characteristics of peptidoglycan fragments required to prime mice for induction of anaphylactoid reaction by lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **64**, 657-659.

- 94) Wollenweber, H. W., Morrison, D. C. (1985) Synthesis and biochemical characterization of a photoactivatable, iodlatable, cleavable bacterial lipopolysaccharide derivative. *J. Biol. Chem.* **260**, 15068-15074
- 95) Fraker, P. J., Speck, J. C. Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-857
- 96) Lee, W. J., Lee, J. D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J., Brey, P. T. (1996) Purification and molecular cloning of inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 7888-7893



学位論文の基礎となる論文リスト

1) Masao Iketani, Isao Morishima

Induction of antibacterial protein synthesis by soluble peptidoglycan in isolated fat body from larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

*Insect Biochemistry and Molecular Biology* **23**, 913-917 (1993)

2) Isao morishima, Tomoki Horiba, Masao Iketani, Eri Nishioka, Yoshiaki Yamano

Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

*Developmental and comparative immunology* **19**, 357-363 (1994)

3) Masao Iketani, Hitomi Nishimura, Koichi Akayama, Yoshiaki Yamano, Isao Morishima,

Minimum structure of peptidoglycan required for induction of antibacterial protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*

*Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 19-24 (1999)

本学位論文の第Ⅱ章は1) 及び2)、第Ⅲ章は3) の論文に基づいた。