カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現と構造解析

1998

吉川　誠一

①

カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現と構造解析

筑波大学大学院
農学研究科
農林学専攻

古川誠一

目次

緒言 ---------- 1

第1章　カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導 ---------- 9

第1節　抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導因子 ---------- 10

材料及び方法 ---------- 10

結果 ---------- 13

考察 ---------- 17

第2節　抗菌性ペプチド遺伝子の発現組織 ---------- 18

材料及び方法 ---------- 18

結果 ---------- 19

考察 ---------- 19

第2章　カイコ抗菌性ペプチドレボシンのゲノムDNA解析 ---------- 23

第1節　レボシンゲノムDNAのクローニングと塩基配列の決定 ---------- 25

材料及び方法 ---------- 25

結果 ---------- 30

考察 ---------- 33

第2節　レボシン遺伝子の発現様式 ---------- 40

材料及び方法 ---------- 40

結果 ---------- 42

考察 ---------- 44

第3章　カイコ抗菌性ペプチドモリシンの遺伝子解析 ---------- 49

第1節　モリシンcDNAのクローニングと塩基配列の決定 ---------- 50

材料及び方法 ---------- 50

結果 ---------- 52
考察 ---------- 56
第2節　モリシン遺伝子の発現様式 ---------- 56
材料及び方法 ---------- 56
結果 ---------- 58
考察 ---------- 62
第3節　モリシンゲノムDNAのクローニングと塩基配列の決定 ---------- 65
材料及び方法 ---------- 65
結果 ---------- 66
考察 ---------- 69

第4章　レボシン及びモリシン遺伝子5'上流のプロモーター解析 ---------- 71
第1節　NF-κB及びNF-IL6結合様配列に結合するタンパク質の探索 ---------- 72
材料及び方法 ---------- 72
結果 ---------- 74
考察 ---------- 83
第2節　遺伝子5'上流領域に結合するタンパク質の探索 ---------- 89
材料及び方法 ---------- 89
結果 ---------- 92
考察 ---------- 102

総合考察 ---------- 104

摘要 ---------- 109

謝辞 ---------- 111

引用文献 ---------- 112

緒言

昆虫類は今から約3億5千年前に地球上に出現し、現在全動物種の7割近くを占めるほど繁栄しているといわれている。またその生息地域は熱帯から寒帯、水中から砂漠のような乾燥地帯までと非常に適応範囲が広く、地球上において最も繁栄している生物種であるといえる。そして、動物界における進化系統樹において無脊椎動物の頂点に位置しており、脊椎動物の頂点に位置するヒトと比肩される。この昆虫類の繁栄の要因として、前述のような高い環境適応能力や優れた生殖能力などがあげられる。また昆虫類はその進化の過程において脊椎動物とは異なる独特の生体防御機構を発達させ、これも現在の繁栄に大きく寄与している要因となっていると考えられる。

昆虫の外敵に対する生体防御機構として、まず外界と接する外骨格が主に物理的な障壁として存在している。この障壁を突破して侵入してきた外敵微生物や寄生性生物などの異物に対し、昆虫はその体液を構成する成分である血球と血漿が防御因子の中心となって、細胞性防御反応と液性防御反応をそれぞれ発動させ防御にあたる。血球による細胞性防御反応は、小型の侵入異物を食作用によって処理する貪食作用、食細胞同士が集合してノジュール（小節）を形成するノジュール形成反応、そして大型の異物を複数の血球が包囲して生体内隔離する包囲化作用が知られている（和合, 1994a）。一方、液性防御反応には通常は前駆体として存在しているフェノールオキシダーゼが、異物の侵入によって活性化されチロシンやドーパなどのフェノール性物質を酸化し、メラニン色素を生成する反応がある。これによって体液は黒化するとともに粘調度が高まり、血球の損失を防ぎ異物を隔離する（和合, 1995）。また、この過程で生じるキノンは細菌に障害を与えることができるので、感染防御反応にも関与していると考えられる（和合, 1994b）。そしてもう1つの液性防御反応として、細菌の侵入によって遺伝子の発現が誘導され、レクチンや抗菌性ペプチド等が合成され分泌される反応がある（Boman and Hultmark, 1987）。レクチンは動植物に広く存在する特定の糖鎖を認識して結合する性質をもつ糖タンパク質であり、センチニクバエでは傷などの刺激によって合成されることが報告されている（Komano *et al.*, 1980）。

昆虫のもつ抗菌性ペプチドとしては、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンを分

解するリゾチームの存在が古くから知られていた (Powning and Davidson, 1973)。しかし、これ以外で細菌の侵入に対して合成が誘導されてくるペプチド性の抗菌性物質は、セクロピアサンから分離されたセクロピン (Hultmark *et al.*, 1980) が最初である。以後、様々な昆虫種から異なるタイプの抗菌性ペプチドが発見されている。これらペプチドは、現在までに 150 種近く単離され、そのアミノ酸配列が明らかにされている (山川, 1998)。抗菌性ペプチドはその構造上の特徴からセクロピン、昆虫ディフェンシン、アタシン、高グリシン含有抗菌性ペプチド、高プロリン含有抗菌性ペプチド及びその他に分類できる。

これまでにカイコからはリゾチーム以外の抗菌性ペプチドとして、セクロピン A、 B、D (Teshima *et al.*, 1986; Shiba *et al.*, 1983; Hara *et al.*, 1994)、レボシン 1、2、3 (Hara and Yamakawa, 1995a)そしてモリシン (Hara and Yamakawa, 1995b) が単離され、またアタシン cDNA もクローニングされている (Sugiyama *et al.*, 1995)。

セクロピンは分子量約 4kDa のペプチドで、カイコ以外にもセンチニクバエ (Kanai and Natori, 1989) やタバコスズメガ (Dickinson *et al.*, 1988) 等からも単離されている。このペプチド群は比較的抗菌スペクトルが広くグラム陽性菌、陰性菌の両者に活性を示すことが知られている。そして、2 個の両親媒性の α-ヘリックスをもち C 末端側には疎水性のアミノ酸が連なり、その末端はアミド化されているという構造上の特徴をもっている。セクロピンは、細菌の細胞膜に穴を開けチャネルを形成することにより、内容物を漏出させると同時に細胞質膜の電気的ポテンシャルを乱し物質の能動輸送を阻止することで殺菌作用を示すと考えられている (Okada and Natori, 1985)。

レボシンは、カイコより単離された 32 アミノ酸残基からなる抗菌性ペプチドであり、特徴としてプロリン残基に富んでいることと糖鎖が付加していることがあげられる。高プロリン含有抗菌性ペプチドとしては、レボシンの他にもセイヨウミツバチのアピダエシン (Casteels *et al.*, 1989) やショウジョウバエのドロソシン (Bulet *et al.*, 1993) 等があり、また糖鎖付加の抗菌性ペプチドとしては他の昆虫からも前述のドロソシンやカメムシの一種から単離されたフィロコリシン (Cociancich *et al.*, 1994) 等が報告されている。レボシンはグラム陰性菌にのみ抗菌活性を示し、糖鎖がその活性発現に必須であることが明らかとなっている。

モリシンは、これまでに発見された抗菌性ペプチドとは相同性をもたない新規のペプチドで 42 アミノ酸残基からなっている。α-ヘリックスをもち、細菌の細胞膜に作用することが明らかとなっており、グラム陽性菌、陰性菌の両者に強い活性を示すことが知られている。

アタシンは、カイコからは現在のところ遺伝子のみしか同定されていないが、20～23kDa の比較的分子量の大きい抗菌性ポリペプチドでセクロピアサン (Hultmark *et al.*, 1983) やセンチニクバエ (Ando *et al.*, 1987) 等から見つかっている。アタシンは、主に増殖期のグラム陰性菌に静菌的に作用することが知られ、細菌細胞外膜を構成するタンパク質の合成を阻害することによって形態形成異常を引き起こし抗菌作用を示すと考えられている (Carlsson *et al.*, 1991)。

昆虫にはこれらの抗菌性ペプチドの他に昆虫ディフェンシンというシステイン残基を６個もち、それらが３対のジスルフィド結合を形成する分子量約４ kDa のペプチドがショウジョウバエ (Dimarcq *et al.*, 1994) やセンチニクバエ (Matsuyama and Natori, 1988) で発見されている。これらは主としてグラム陽性菌に強い抗菌活性を示すことが知られ、作用部位は細菌の細胞質膜であることが明らかとなっている (Cociancich *et al.*, 1993)。

抗菌性ペプチドはそのほとんどが細菌の侵入に対して速やかに合成、分泌されると考えられている。この誘導機構を明らかにするために遺伝子のクローニングとその構造解析も行われている。カイコでは前述のアタシンの他にセクロピン A (Yamano *et al.*, 1994) 、B (Taniai *et al.*, 1992; Yamano *et al.*, 1994) そしてレボシン 1/2 (Chowdhury *et al.*, 1995) で cDNA のクローニングが既に行われている。さらにゲノム DNA の研究も進められ、セクロピン B (Taniai *et al.*, 1995) とアタシン (Taniai *et al.*, 1996a) をコードする領域は既にクローニングされ、また最近セクロピン A をコードする領域についても解析が行われ報告されている (Yamano *et al.*, 1998)。これら遺伝子の 5' 上流のプロモーター領域について塩基配列を決定した結果、NF-κB 結合様配列や IL-6 応答配列と呼ばれる脊椎動物の免疫系において重要な役割を果たしている因子の結合する部位があることが明らかとされた。そしてこれらの領域をプローブにしてセクロピン A や B 遺伝子を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、これらの遺伝子のプロモーター領域に存在する NF-κB 結合様配列に特異的に結合するタンパク質が存在していることが明らかになった (Taniai *et al.*,

1995; Yamano *et al.*, 1998)。この NF-κB 結合様配列は他の昆虫でも誘導性の抗菌性ペプチド遺伝子のプロモーター領域に普遍的に存在し、この部位に結合するタンパク質についてより詳細な研究が行われている。例えばショウジョウバエで現在までにゲノム DNA のクローニングが行われた抗菌性ペプチド遺伝子としてセクロピン A～C (Kylsten *et al.*, 1990; Tryselius *et al.*, 1992)、ディプテリシン (Reichhart *et al.*, 1992)、ドロソシン (Charlet *et al.*, 1996) そしてメチニコフィン (Levashina *et al.*, 1998) 等が報告されているが、これら抗菌性ペプチド遺伝子の 5' 上流領域の塩基配列にも NF-κB 結合様配列や IL-6 応答配列がカイコと同様にみつかっている。そしてセクロピン A やディプテリシン遺伝子上にある NF-κB 結合様配列に結合するタンパク質が存在すること、また NF-κB 結合様配列がこれら遺伝子の転写活性に寄与していることが既に報告されている (Engström *et al.*, 1993; Kappler *et al.* 1993)。この他にも多くの抗菌性ペプチド遺伝子で GATA モチーフと呼ばれる配列が存在していて、ショウジョウバエではこれがセクロピン A 遺伝子の発現に寄与していることや血球培養細胞で特異的にこの配列に結合するタンパク質が存在することが明らかにされている (Kadalayil *et al.*, 1997)。

NF-κB は免疫グロブリン κ 軽鎖 (Igκ) 遺伝子のエンハンサーに結合する因子として発見され (Sen and Baltimore, 1986a)、リポポリサッカライド (LPS) 等の刺激によって誘導されることが明らかにされている (Sen and Baltimore, 1986b)。NF-κB 遺伝子は脾臓に腫瘍を誘発するレトロウイルスの癌遺伝子である rel と構造が類似していることより、Rel ファミリータンパク質に分類されている。NF-κB は正常時には細胞質内に不活性型で存在していて、適当な細胞外刺激に伴って活性型となり核内へと移行し DNA 上の結合配列に結合する。NF-κB が細胞質内で不活性型の状態にあるのは、制御サブユニットである IκB と結合しているためであることが知られている (Baeuerle and Baltimore, 1988)。ショウジョウバエでは胚発生時に背腹軸決定を担う Dorsal がこの Rel ファミリーに属するタンパク質であることが知られ (Steward, 1989)、NF-κB に見られるような制御機構が同様に見られることが知られている。ショウジョウバエでは IκB のホモログとして Cactus があり (Geisler *et al.*, 1992)、これが細胞質内で Dorsal と結合し不活性型の状態で存在している (Kidd, 1992)。また NF-κB や Dorsal で保存されている領域をプローブにシ

ョウジョウバエゲノム DNA ライブラリーよりスクリーニングを行った結果、Dorsal の他に Dif (dorsal-related immune factor) と命名された遺伝子がクローニングされた。この Dif はセクロピン A 遺伝子の NF-κB 結合様配列に結合することや細菌の感染に伴い特に脂肪体において遺伝子が発現すること、そして他の Rel タンパク質と同様に通常は細胞質内に存在しているが細菌の感染によって核内へ移行することが証明された (Ip *et al.* 1993)。また、プロモーター領域に NF-κB 結合様配列を含むセクロピン遺伝子と一緒に Dorsal や Dif を co-transfection した結果、セクロピン遺伝子の発現誘導が確認されたためこれらの因子が抗菌性ペプチド遺伝子の活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された (Petersen *et al.*, 1995)。ショウジョウバエではこの他にも抗菌性ペプチド遺伝子の発現に関与する Rel ファミリーのタンパク質として Relish と命名されたタンパク質が同定されている (Dushay *et al.*, 1996)。

Rel ファミリータンパク質についてはその細胞内シグナル伝達系についても研究されている。ショウジョウバエの Dorsal-Cactus の複合体は、細胞膜上の受容体であり細胞質ドメインが IL-1 受容体と類似した Toll (Hashimoto *et al.*, 1988) の活性化によって引き起こされる細胞内シグナル伝達系により解離することが明らかになっている (Belvin and Anderson, 1996)。Toll 受容体から Dorsal-Cactus 複合体へのシグナルの過程には少なくとも 2 個の細胞質因子、Pelle と Tube が存在していることが報告されている (Letsou *et al.*, 1991; Hecht and Anderson, 1993; Shelton and Wasserman, 1993)。Pelle はセリン/スレオニンキナーゼでほ乳類で IL-1 受容体～NF-κB 系に関与している IRAK キナーゼ (Cao *et al.*, 1996)のホモログである。ショウジョウバエの系の中で Dorsal は Tube、Pelle そして Cactus と多量体を形成し、Pelle のキナーゼ活性によって Dorsal や Tube との相互作用が制御されていることが証明されている (Yang and Steward, 1997; Edwards *et al.*, 1997)。胚発生時に Toll 受容体に結合するリガンドである Spaetzle についても研究されており、このタンパク質は Toll 受容体に結合する前に Easter や Snake というセリンプロテアーゼによるプロセッシングを受けなければならないことが判明している (Stein and Nusslein-Volhard, 1992)。

ショウジョウバエではこの背腹軸を決定する系に関与する遺伝子を変異させた様々な突然変異体を作製し、抗菌性ペプチド遺伝子の発現様式が調べられ報告されている

(Lemaitre *et al.*, 1996)。Toll 受容体や Tube、Pelle そして Spaetzle 遺伝子を欠損した突然変異体では抗真菌性ペプチドであるドロソミシン遺伝子 (Nicolas *et al.*, 1996) の発現が減少し、逆に Toll 受容体遺伝子が常に活性化されている突然変異体では常在していたため、この遺伝子の発現制御には Toll 受容体や Tube、Pelle を介する系が関わっていると思われた。しかし Cactus 遺伝子を欠損したために Dorsal が常に核内に存在する突然変異体 (Lemaitre *et al.*, 1995a) では発現が見られたが、Dorsal を欠損した突然変異体でも発現が誘導されるため、Dorsal がこの制御に関わっていないか、もしくは他の因子が Rel タンパク質の機能を補っている可能性が示唆された。また Spaetzle 遺伝子を欠損した突然変異体でドロソミシン遺伝子の発現は減少したが Easter や Snake 遺伝子を欠損した突然変異体では発現誘導が認められたことからこれらの遺伝子がコードするセリンプロテアーゼはドロソミシン遺伝子の発現に関与していないことや、もしそうならこれらの酵素以外の因子が存在し発現制御に関わっている可能性が示唆された。同様の実験はドロソミシン遺伝子以外の抗菌性ペプチド遺伝子でも行われ、セクロピン A、ディプテリシン、ドロソシン、アタシンそしてディフェンシン (Dimarcq *et al.*, 1994) 遺伝子は Cactus 遺伝子を欠損した突然変異体でもほとんど発現は見られず、ドロソミシン遺伝子で誘導活性が減少した Toll 受容体や Tube、Pelle そして Spaetzle 遺伝子を欠損した突然変異体でその誘導活性に変化は見られなかった。そして Toll 受容体遺伝子が常に活性化されている突然変異体でドロソミシン遺伝子が常に発現しているような状態下でも発現能力は低下していたため、これらの遺伝子発現に Toll 受容体、Tube や Pelle を介する系は関与していないか、さらにこれまでに解析されていない未知の因子による修飾のある可能性が示唆された。最近、Toll 受容体のホモログとして 18-Wheeler 遺伝子がクローニングされ (Eldon *et al.*, 1994)、ショウジョウバエ幼虫の脂肪体で発現することやこの遺伝子を欠損した突然変異体では Dorsal の核への移行は見られないが Dif の核移行は阻害されることが判明している。そしてこの突然変異体ではアタシン遺伝子の発現は野性型と比較して 95%に、セクロピン A 遺伝子は 65%そしてディプテリシン遺伝子は 12%に減少することが示された (Williams *et al.*, 1997)。

ショウジョウバエで細菌感染に対し抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導が見られず、野性型に対し生存率の低下した新規の突然変異体が得られ、この劣性遺伝子は imd (immune

deficiency) と命名されている (Lemaitre *et al.*, 1995b)。しかしこの系統でもドロソミシン遺伝子は正常に発現誘導が見られ、この結果からもドロソミシン遺伝子は抗菌性ペプチド遺伝子と異なるシグナル伝達系によって発現が誘導されることが示唆されている。シグナル伝達系では同じくショウジョウバエで MAP キナーゼと抗菌性ペプチド遺伝子との関連性が報告されており、p38 MAP キナーゼのホモログである D-p38 がクローニングされ、この酵素は抗菌性ペプチド遺伝子が LPS の刺激による発現を弱めるフィードバック系において機能していることが明らかにされている (Han *et al.*, 1998)。

ショウジョウバエ以外の昆虫から見つかっている NF-κB 結合様配列に結合するタンパク質としては、セクロピアサンで CIF と命名された 65kDa のタンパク質が (Sun and Faye, 1992a; Sun and Faye, 1992b)、またセンチニクバエからも 59kDa のタンパク質がそれぞれ精製されている (Kobayashi *et al.* 1993)。そしてハマダラカの 1 種から Dorsal と最も類似した Rel タンパク質である Gambif1 がクローニングされ抗菌性ペプチド遺伝子の発現に関わっている可能性が示されている (Barillas-Mury *et al.*, 1996)。

カイコにおいては、血球細胞の *in vitro* 系におけるセクロピン B 遺伝子の発現について調べられ、LPS による刺激による発現誘導には G タンパク質、サイクリック AMP、カルシウムイオン、プロテインキナーゼ A 及び C がシグナル伝達に関わっていることが明らかとなっている (Choi *et al.*, 1995; Shimabukuro *et al.*, 1996; Taniai *et al.*, 1996b)。また細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンによる抗菌性ペプチド遺伝子の発現で脂肪体ではエイコサノイドが重要な役割を担っていることが報告されている (Morishima *et al.*, 1997)。

昆虫は脊椎動物の抗原抗体反応のような獲得抵抗性免疫機構をもっていない。その反面抗菌性ペプチドのような先天性免疫をより進化させることによって多くの病原体などの外敵の攻撃に対処し、脊椎動物に劣らない生体防御系を獲得している。この生体防御系について理解を深めることは医学的にも応用できることはもちろん、動物のグループや種の相違による免疫機構の違いを比較することによって、動物の多様性や類縁関係、そしてその進化の様相なども考察でき、生物学的に重要な知見や概念が新たに生まれることが期待される。カイコは分子生物学的にも生理生化学的にも情報が豊富に蓄積されている昆虫であることから研究材料として様々な面からアプローチが可能な生物であ

ると思われる。

本研究ではカイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導機構を明らかにするために、その抗菌性ペプチドの遺伝子発現及び遺伝子の構造解析を行った。まず第1章でこれまでにクローニングされたカイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現様式の比較を行った。そして第2章、第3章でゲノムDNAの解析が行われていないレボシンやモリシンについて遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子発現の様式を調べた。そして第4章ではこの両遺伝子についてゲルシフトアッセイを行い、プロモーター領域に結合するタンパク質の存在を確認した。

第1章　カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導

昆虫の抗菌性ペプチドは、細菌の侵入に伴い短時間内で合成され体液中に分泌される主要な液性防御反応因子の中の1つである。昆虫体内に細菌が侵入した際、初期の段階では主に顆粒細胞あるいはプラズマ細胞といった血球細胞による食作用、そしてフェノールオキシダーゼ前駆体カスケード系が働き細菌の排除に努める。血球細胞の食作用によって細胞成分は体液中に遊離する (Taniai *et al.*, 1997) ことから細菌の構成成分、特に細菌細胞壁構成成分が抗菌性ペプチドの合成・分泌の誘導に関わっていることが示唆された。

細菌の細胞壁はグラム陽性菌では主としてペプチドグリカンとタイコ酸から、グラム陰性菌ではリン脂質とリポポリサッカライド (LPS) からなる最外層とリポタンパク質の中層及びペプチドグリカンよりなる内層の3層から構成されている。

本章では、内毒素 (エンドトキシン) とも呼ばれるLPSについて、大腸菌野生株及び変異株由来のものを用いて、これらがカイコの抗菌性ペプチドの合成誘導因子として働いているかを遺伝子の転写レベルで調べた。また、体表面の傷害もしくは脱皮時の旧表皮の消化に伴い、クチクラ層を構成するキチンが体内へ流入したことを想定し、これが抗菌性ペプチド遺伝子の発現に影響を与えるかについても検討した。誘導因子の検定 (第1節) では、細菌による誘導によって抗菌性ペプチド遺伝子が発現する主要な組織として報告されている脂肪体を指標としてノーザンブロッティングを行った。そして第2節では、前節の結果によって確認された遺伝子発現誘導因子を用いて、脂肪体以外の組織についても抗菌性ペプチド遺伝子の発現組織特異性を調べた。

第1節　抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導因子

カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導に関わる因子を検討するために、グラム陰性菌細胞壁構成成分である LPS 及びカイコ表皮のクチクラ層を構成するキチンのオリゴマーを接種したときの、抗菌性ペプチド遺伝子の発現をノーザンブロッティングを行い検討した。

材料及び方法

1．供試昆虫

カイコ（東海×朝日）を人工飼料（シルクメイト 2(S), 3(S), 日本農産工）によって25℃で飼育し、5齢4～5日の幼虫を用いた。

2．誘導因子

抗菌性ペプチド遺伝子発現誘導因子として、以下の LPS 及びキチンオリゴマーを実験に用いた。

(1) LPS；

E.coli 0111:B4 (Wild, Difco), *E.coli* EH100 (Ra mutant, SIGMA), *E.coli* J5 (Rc mutant, SIGMA), *E.coli* F583 (Rd mutant, SIGMA), *E.coli* D31m4 (Re mutant, フナコシ), 合成リピド A(LA-15-PP, 第一化学薬品)

(2) キチンオリゴマー；

Di-N-Acetylchitobiose (2量体, 生化学工業), Tri-N-Acetylchitotriose (3量体, 生化学工業), Tetra-N-Acetylchitotetraose (4量体, 生化学工業), Penta-N-Acetylchitopentaose (5量体, 生化学工業), Hexa-N-Acetylchitohexaose (6量体, 生化学工業)

上記の物質のうち合成リピド A を除き、大塚生食注（大塚製薬, 以下生理食塩水）に LPS は 1mg/ml、キチンオリゴマーは 1μg/ml の濃度に溶解した。合成リピド A は生理食塩水にトリエチルアミン（TEA）を 0.025％に調製（以下 0.025％TEA）し、この溶液に 500μg/ml の濃度になるように溶解した。また、これらの溶媒もコントロールとして試験に用いた。

3．発現誘導試験

発現誘導試験は、誘導因子をカイコ幼虫に注射することで接種し、8 時間後に脂肪体を摘出、そこから RNA を抽出しノーザンブロッティングを行って検定した。

カイコ 5 齢幼虫を氷冷した水の中につけることによって麻酔を行い、腹脚より上記の様に用意した誘導因子を 50μl (リピド A は 25μg, それ以外の LPS は 50μg、キチンオリゴマーは 50ng) ずつ注射した。室温で 8 時間放置した後、解剖を行い脂肪体を摘出した。脂肪体は-80℃で保存した。

摘出した脂肪体を 1.5ml の磨砕溶液 (50mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5, 50mM NaCl, 5mM EDTA (Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetrasodium salt, tetrahydrate) pH8.0, 0.5% SDS (Sodium dodecyl sulfate)) を加え撹拌した後、ヒスコトロン (日音医理科器械製作所) を用いて細胞を磨砕した後、直ちにフェノール/クロロホルム (1:1) を等量混合しボルテックスで撹拌した。この溶液を 15 分間 15,000g で遠心分離した後、上層を回収し再度フェノール/クロロホルム抽出を行った。その後回収した上層に 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100%冷エタノールを加え撹拌後、-80℃に 30 分以上放置した。解凍後 20 分間 15,000g で遠心分離し、沈殿を 70%冷エタノールによって洗浄した (以下エタノール沈殿)。得られた沈殿は DEPC (Dimethyl pyrocarbonate) 処理した滅菌水に溶解した。溶液の RNA 濃度は OD_{260nm} の吸光度を測定することによって算出した。

発現誘導を検定するための抗菌性ペプチド遺伝子として、既にカイコで cDNA 配列が決定されているセクロピン B (Taniai *et al.*, 1992)、アタシン (Sugiyama *et al.*,1995) そしてレボシン (Chowdhury *et al.*, 1995) の遺伝子を用いた。それぞれの cDNA 配列をもとに以下のプライマーを設計し、それぞれクローニングされたプラスミドベクターをテンプレートにして PCR を行った。PCR (Polymerase chain reaction) はサーマルサイクラー (PC-700, ASTEC) を用いて全量 50μl で行い、反応後 10μl を確認のためアガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色後、UV (紫外線) 照射下で産物の確認を行った。そして残りの溶液の 1 部を DNA ラベリングキット (ニッポンジーン) を用いて[α-^{32}P]dCTP (ICN) でランダムラベルした。ラベルした DNA は NICK カラム (Pharmacia) を用いて精製し、これをプローブとして以下のノーザンブロッティングに用いた。

(1)セクロピンB

以下のプライマーを用い、BmcecB3 の 54～245 番目を増幅した。

Forward primer

5'-ATGAATTTCGCAAAGATCCT-3'

Reverse primer

5'-TCATTTTCCGATAGCTTTAG-3'

(2)アタシン

以下のプライマーを用い、Bmatt 632 の 1～639 番目を増幅した。

Forward primer

5'-ATGTCCAAGAGTGTAGCGTTGTTGTTG-3'

Reverse primer

5'-GAATTTCGAGAAGGAGAATCCC-3'

(3)レボシン

以下のプライマーを用い、レボシン cDNA の 126～607 番目を増幅した。

Forward primer

5'-ACAAGCTGGCCAGGAACCGCTATGG-3'

Reverse primer

5'-ACTTAAGTAATTACGATTCAATG-3'

ノーザンブロッティングは、Sambrook *et al.* (1989) の方法に従って行った。10μg の全 RNA を含む溶液に 25μl の変成溶液 (50%ホルムアミド, 16.2%ホルムアルデヒド, 1× MOPS (3-[*N*-morpholino]propanesulfonic acid) 緩衝液) を加え、60℃で 15 分間加熱し熱変成させた後、氷上で急冷した。これに loading buffer (1mM EDTA pH8.0, 0.25%キシレンシアノール FF, 0.25%ブロモフェノールブルー, 50%グリセロール) を 6μl 加えサンプルとした。電気泳動に用いたゲル溶液は、1.2%アガロース S (ニッポンジーン) に MOPS 緩衝液 (最終濃度が 1×になるように) を加えレンジで加熱溶解後冷却し、そこにホルムアルデヒドを最終濃度が 37%になるように加えて作製した。試料はこの溶液より作製したゲルを用いて、1×MOPS 緩衝液中にて 150V 定電圧で泳動した。泳動後のゲルは 20 倍以上の蒸留水中で 40 分間穏やかに振とうし脱塩をした。この後エチジウムブロマイドで 10 分間染色し、紫外線照射下で見える 28S リボゾーム RNA のバンドを RNA 量の

internal marker として用いた。RNA は高速転写装置（NB-1513B，日本エイドー）を用い、0.05×TAE (Tris-acetate/EDTA) 緩衝液（50×/L; 242g Tris Base, 57.1ml 酢酸，100ml 0.5mM EDTA pH8.0）中で 300mA、15 分間の電気泳動によって Gene Screen Plus メンブレン (Dupont) に転写した。メンブレンはハイブリダイゼーションを行うまで 4℃で保存した。

ハイブリダイゼーションは、上記で作製したメンブレンを Kato *et al*.. (1993) の方法に従い、ハイブリダイゼーション溶液（5×SSC, 10%SDS, 25%ホルムアミド, 5×デンハルト溶液, 0.1mg/ml 変成サケ精子 DNA, 20mM リン酸緩衝液 pH6.7）で 42℃、3 時間以上のプレハイブリダイゼーションを行った。この後、ラベルした 3 種のプローブをそれぞれ熱処理後急冷しハイブリダイゼーション溶液に加えた。42℃で 14 時間以上ハイブリダイゼーションを行い、その後メンブレンを 2×SSC, 0.1%SDS 溶液で室温、20 分間の洗浄を 2 回、0.2×SSC, 0.1%SDS 溶液で 60℃、30 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄後のメンブレンはサランラップで包んだ後、X 線フィルムに-80℃で 8 時間以上感光させ暗室にて現像を行った。

結果

細菌の細胞壁成分である LPS の接種によるカイコ幼虫脂肪体での抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導を調べた。細菌由来の誘導因子として種々の構造をもつ大腸菌由来の LPS を用いた。実験に使用した LPS の構造を Fig. 1 に示す。そしてこれによる遺伝子発現誘導の結果を Fig. 2 に示す。セクロピン B、アタシンそしてレボシンの 3 種類のプローブを用いてノーザンブロッティングによる検出を行ったが、生理食塩水や 0.025%TEA を注射したカイコのサンプルにおいては全ての遺伝子のシグナルが検出されず、よって体表面の傷害のみによる誘導は起こらないことが明らかとなった。大腸菌変異株由来の LPS やその基底に位置するリピド A を用い、リピド部分と糖鎖の構造による誘導能力の違いについて検定を行った結果、3 種類の遺伝子に共通して LPS の糖鎖が完全に近い、つまり野性型に近づくほど強く発現する傾向が見られた。しかしリピド A のみでも十分発現は誘導された。

カイコ表皮のクチクラ層を構成するキチンによるカイコ幼虫脂肪体での抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導を調べた結果を Fig. 3 に示す。2 量体から 6 量体までのキチンオ

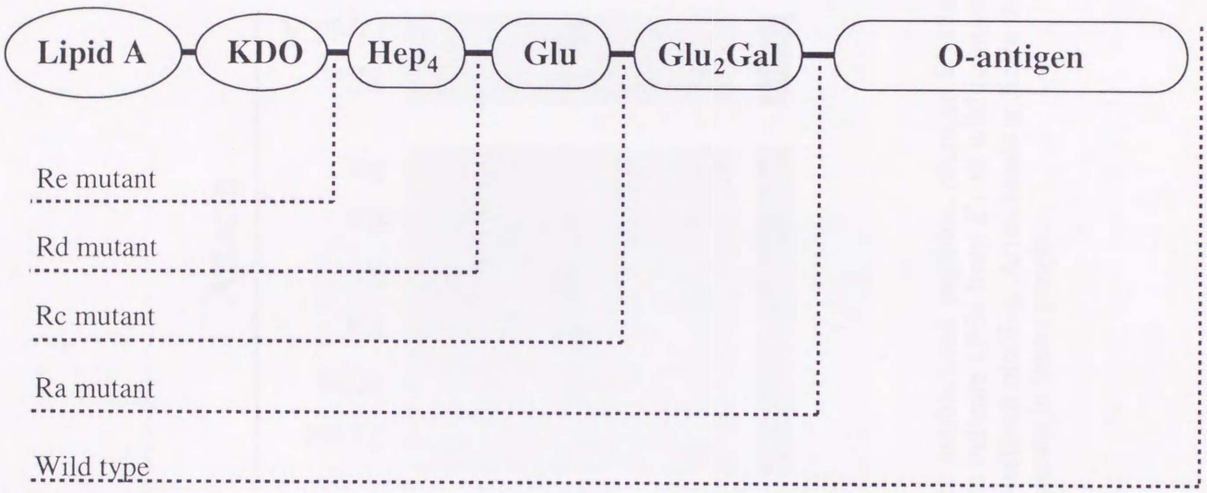


Fig. 1. Schematic illustration of chemotype variants of the core domain of *E. coli* LPS.

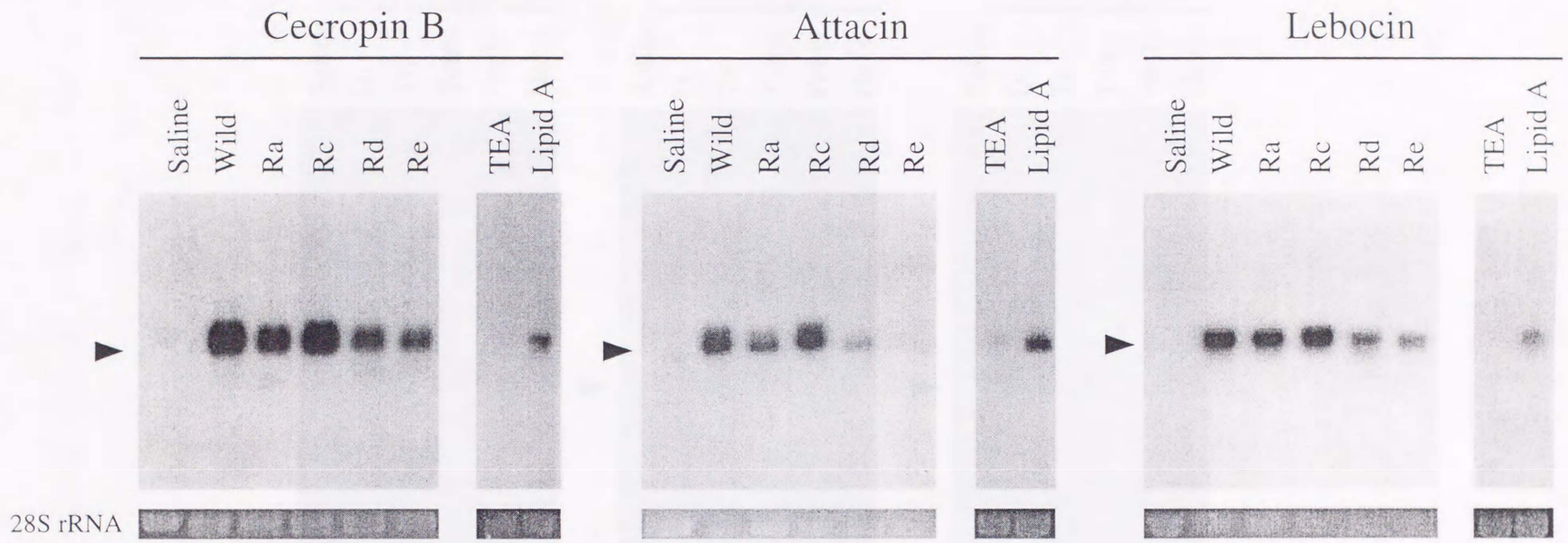


Fig. 2. Induction of gene expression of three antibacterial peptides, cecropin B, attacin and lebocin, by various chemotypes of lipopolysaccharide. Wild, Ra, Rc, Rd and Re indicate LPSs from *E.coli* wild or mutant types as described in Fig. 1. Total RNA extracted from fat bodies was analyzed by Northern blotting. Arrowheads indicate the mRNAs hybridized to the probes denoted above. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels.

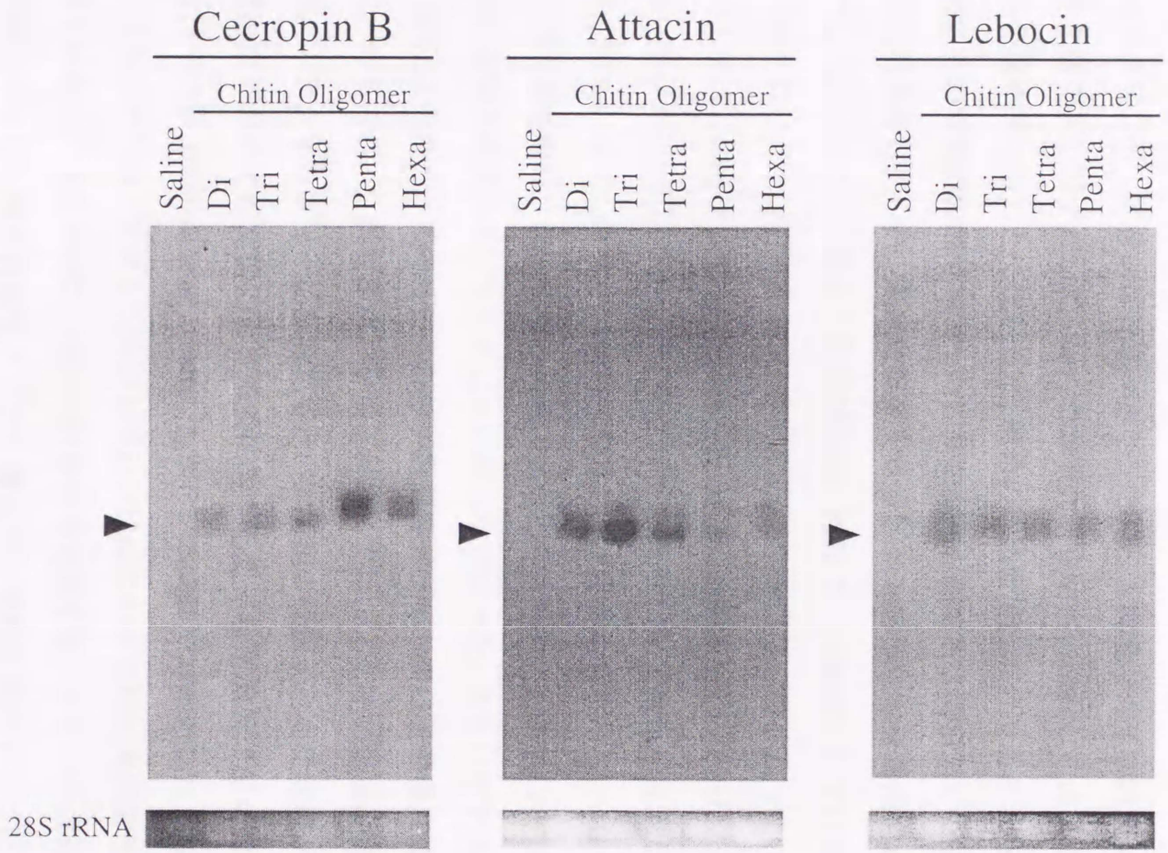


Fig. 3. Induction of gene expression of three antibacterial peptides, cecropin B, attacin and lebocin, by various chitin oligomers. Total RNA extracted from fat bodies was analyzed by Northern blotting. Arrowheads indicate the mRNAs hybridized to the probes denoted above. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels. Di, Tri, Tetra, Penta and Hexa indicate chitin dimer, trimer tetramer, pentamer and hexamer, respectively.

リゴマーを接種し遺伝子発現の誘導の結果を調べてみると、アタシン遺伝子の発現は弱いが3種類の抗菌性ペプチド遺伝子がキチンオリゴマーにより発現誘導されることが確認された。

考察

セクロピンB、アタシン及びレボシンという3種類のカイコ抗菌性ペプチドの遺伝子発現を誘導する因子として、いくつかの物質を幼虫に注射しその誘導能を脂肪体での遺伝子発現を調べることで検定した。細菌の細胞壁構成成分であるLPSは大腸菌の野性株由来のものや糖鎖の部分を削った変異株由来ものでも3種類全ての抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導が見られ、基底に位置するリピドAのみにも誘導活性が認められた。これまでにLPSによって遺伝子発現が誘導されることが確認されている抗菌性ペプチドには、セクロピアサンのアタシン (Sun *et al.*, 1991b)、リゾチーム (Sun *et al.*, 1991a)、ショウジョウバエのセクロピン (Samakovlis *et al.*, 1990)、ディプテリシン (Dimarcq *et al.*, 1988) 等がある。そしてカイコのセクロピンBもLPSで遺伝子発現が誘導されることが報告されている (Kato *et al.*, 1994)。このような点からもカイコにおける抗菌性ペプチドの合成誘導機構は、他の昆虫と共通であると考えられ、一方、LPSが完全な形に近いほど強い発現誘導能をもっていることが明らかとなった。またリピドAのみでも誘導能が見られたことから、このリピド部分が抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導に強く関わっていると考えられ、これに糖鎖が付加されることによってその誘導能は促進されると思われる。キチンオリゴマーを注射すると、3種類の遺伝子ともに発現が誘導された。キチンは植物においては真菌による感染に対する生体防御機構に深く関わっていることが知られている (Nichols *et al.*, 1980)。しかし、本実験で対象とした3種類の抗菌性ペプチド、セクロピンB、アタシン及びレボシンにはこれまでに抗真菌活性があることは報告されていない。またキチンは昆虫の外骨格を形成するクチクラの成分であり、これが生体防御因子として働き抗菌性ペプチド遺伝子の発現を誘導することはキチンを非自己成分として認識しているのか、またはこれを傷害を受けたシグナルとして受け取り細菌の侵入に備えているのかという点において非常に興味深い問題を提供している。

第2節　抗菌性ペプチド遺伝子の発現組織

前節の結果より、細菌の細胞壁構成成分やキチンのオリゴマーに抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導能があることが確認できた。そこで本節では、これらの誘導因子によってカイコ幼虫のどの組織で遺伝子発現が見られるのか、発現の組織特異性の検定を行った。

材料及び方法

1.　供試昆虫

前節と同様に、カイコ（東海×朝日）を人工飼料によって25℃で飼育し、5齢4～5日の幼虫を用いた。

2.　誘導因子

前節の結果より、抗菌性ペプチド遺伝子の発現を誘導する因子としてリピドAとキチン6量体を用いた。

3.　昆虫細胞培養用培地

TC-100昆虫細胞用培地粉末（GIBCO）に炭酸水素ナトリウム（0.35g/L）を加え、滅菌蒸留水に溶解しpH6.2に調製した。この溶液を0.22μmフィルター（マイレクスGV13mm, ミリポア）で濾過し、血球を採取する際に用いた。

4.　遺伝子発現の誘導

方法は前節に従い、リピドAとキチン6量体をそれぞれ前節の濃度で、麻酔したカイコ幼虫に注射した。8時間後に解剖し、脂肪体、中腸、マルピーギ管そして絹糸腺を摘出した。血球については、体液のメラニン化を引き起こすフェノールオキシダーゼ系の活性化を抑制するために0.1%（w/v）フェニルチオ尿素を加えたTC-100培養液を5ml入れた直径6cmのプラスチックシャーレを用意し、70%エタノールで10分間体表殺菌したカイコ幼虫から、腹脚を殺菌した注射針で刺すことによって体液を採集した（Xu *et al.*, 1995)。このシャーレを30分間室温に静置し底面に血球細胞を付着させた後、上清をTC-100で2回洗浄し底面をセルスクレーパーM(住友ベークライト)によって掻き取り付着細胞を採取した。得られた組織は、-80℃で保存した。

5.　全RNAの抽出及びノーザンブロッティング

全 RNA の抽出及びノーザンブロッティングは全て前節に準じて行った。

結果

リピド A と 6 量体のキチンを誘導因子として用いたときのセクロピン B、アタシンそしてレボシン遺伝子の発現組織特異性をノーザンブロッティングを用いて調べた。リピド A による遺伝子発現誘導の結果を Fig. 4 に示す。またキチン 6 量体による結果を Fig. 5 に示す。リピド A を処理したとき、脂肪体では前節の結果のように 3 種類全ての遺伝子の発現が確認でき、また血球についてもセクロピン B では強く、他の 2 種類では多少弱いながらも発現が見られた。この他の組織である中腸、マルピーギ管そして絹糸腺では発現がほとんど見られなかったが、レボシン遺伝子がマルピーギ管においても発現していることが明らかとなった。6 量体のキチンを注射すると、セクロピン B では脂肪体と血球に発現が見られ、血球の方により強いシグナルが見られた。逆にレボシンは脂肪体で強い発現が見られたが、血球ではわずかにしか見られなかった。また、アタシンでは脂肪体と血球で発現が見られたがそれらのシグナルは弱かった 。

考察

リピド A と 6 量体のキチンを誘導因子として遺伝子の発現組織特異性を調べた本実験より、3 種類の抗菌性ペプチド遺伝子の発現様式はそれぞれ異なる特徴をもっていることが分かり、また用いた 2 つの誘導因子についてもそれに伴う発現組織と発現の強弱はそれぞれ異なることを示唆する結果が得られた。遺伝子ごとに解析を行うと、セクロピン B 遺伝子に関しては発現組織は脂肪体と血球に限られ中腸、マルピーギ管や絹糸腺では全く発現が見られなかった。しかし、リピド A に比べ 6 量体のキチンで誘導したときは、脂肪体で血球ほどの強い活性は検出できなかった。アタシン遺伝子の場合には、リピド A で誘導すると脂肪体と血球での発現が確認できたが、発現量は脂肪体に比べ血球は少なかった。そして、6 量体のキチンでの誘導は脂肪体と血球に発現が見られるもののシグナルは非常に弱かった。レボシン遺伝子では、6 量体のキチンでの誘導に関しては脂肪体で特に強い発現が見られ、それに比べると血球での発現はわずかであった。こ

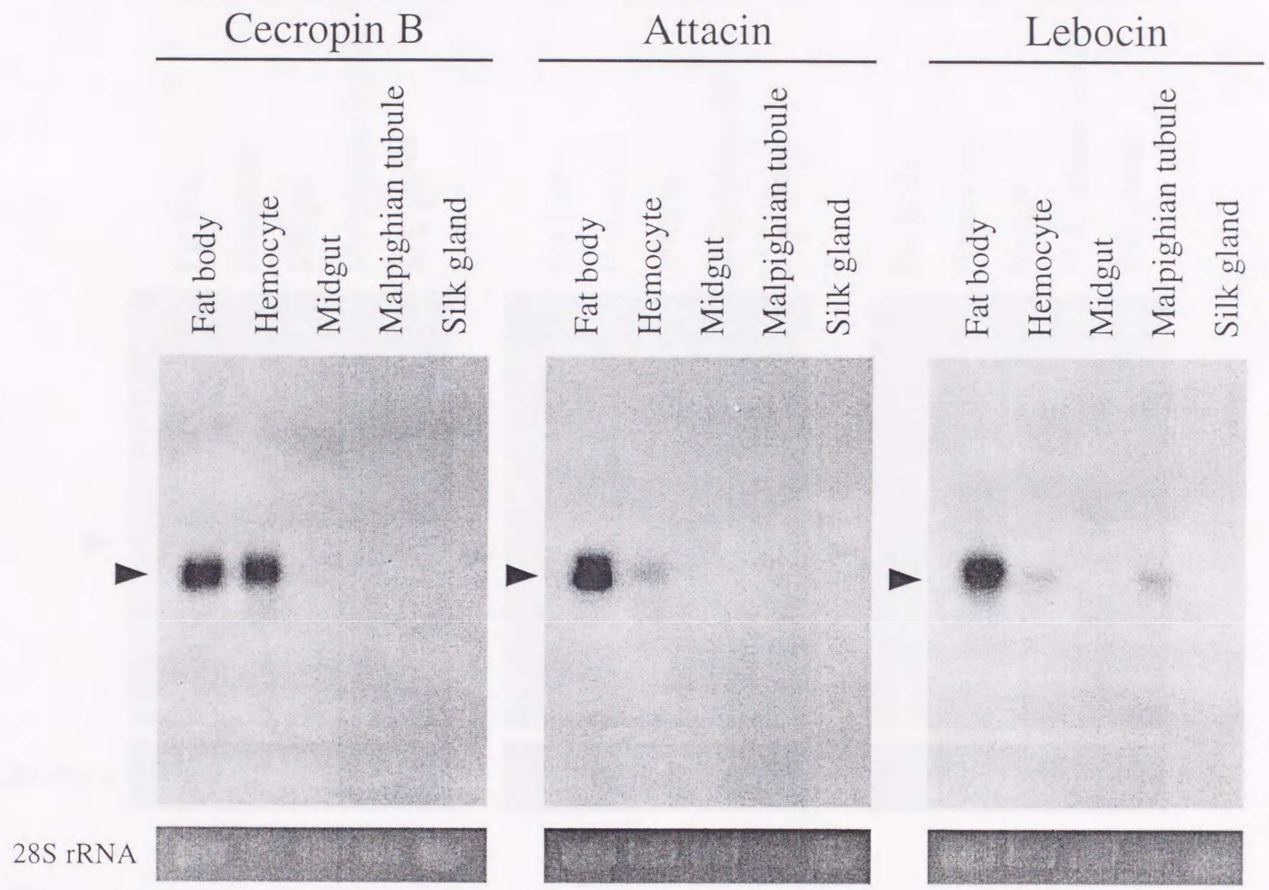


Fig. 4. Tissue specific gene expression of three antibacterial peptides, cecropin B, attacin and lebocin, induced by lipid A. Total RNA extracted from individual tissue indicated above was analyzed by Northrn blotting. Arrowheads indicate the mRNAs hybridized to the probes denoted above. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels.

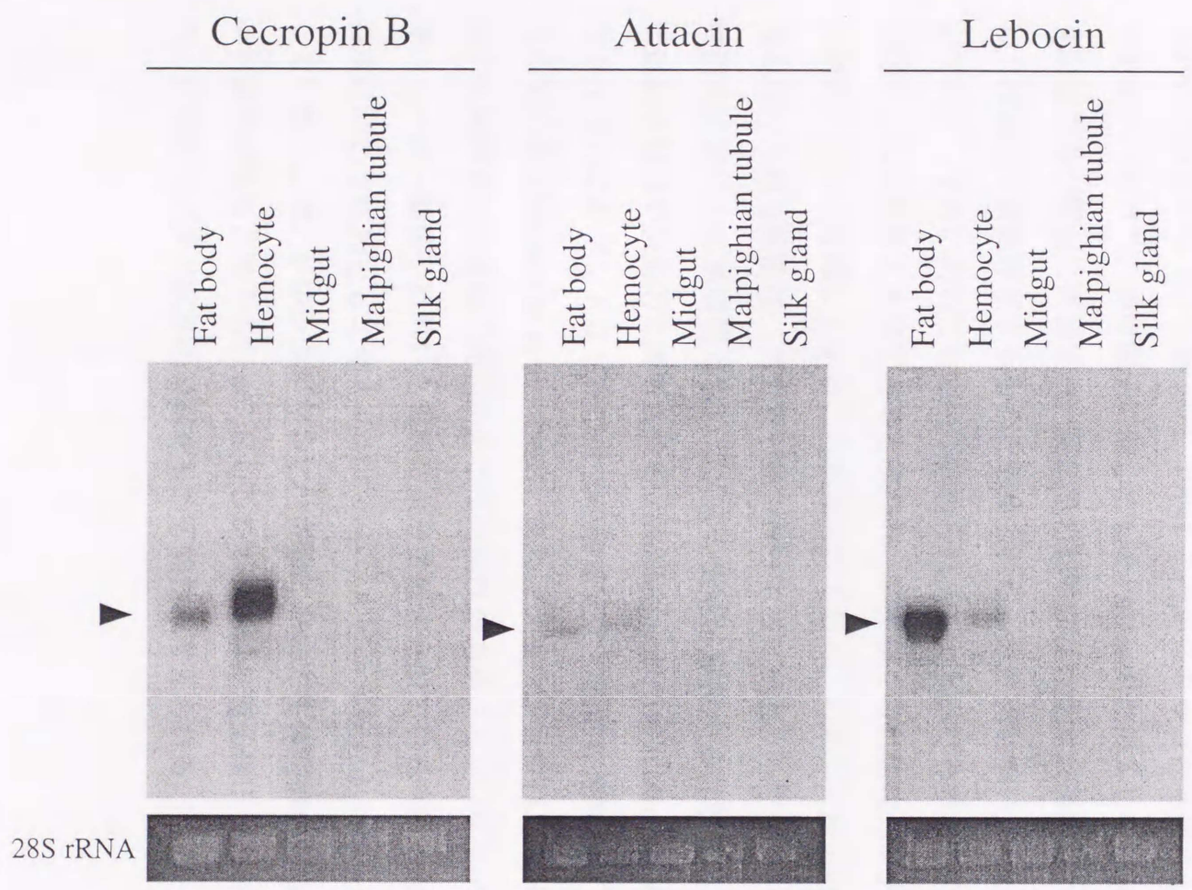


Fig. 5. Tissue specific gene expression of three antibacterial peptides, cecropin B, attacin and lebocin, induced by chitin hexamer. Total RNA extracted from individual tissue indicated above was analyzed by Northrn blotting. Arrowheads indicate the mRNAs hybridized to the probes denoted above. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels.

の両組織の相関はリピド A での誘導に関しても当てはまったがこの誘導によって唯一マルピーギ管での発現が確認された。このようにカイコ体内においてこれら 3 種類の抗菌性ペプチド遺伝子はそれぞれ異なる発現誘導機構をもち、それによって異なる発現の組織特異性を示していることが示唆された。複数の遺伝子発現誘導機構をもつ可能性については既にショウジョウバエでは複数の細胞内シグナル伝達系が存在することが明らかにされている (Lemaitre *et al.*, 1996) ことからカイコにも同じように存在することは十分に考えられる。誘導因子に関してもそれが体内に侵入して抗菌性ペプチド遺伝子の発現能をもつ細胞に認識され、遺伝子の転写が活性化され誘導されるまでの系は 1 つだけとは限らず複数存在するものと考えられる。また興味深い点として、レボシン遺伝子がマルピーギ管においても発現が認められたことがあげられる。これまで昆虫の生体防御の中心は脂肪体と血球であると思われ、事実多くの抗菌性ペプチド遺伝子がこの 2 つの組織において発現していることが知られている。しかし、最近他の組織においても発現の認められる抗菌性ペプチドも見つかってきている。ハマダラバエのセラトトキシンは細菌感染による誘導能はないがメスの生殖付属腺から分離され成熟することによって遺伝子発現が特異的に誘導される (Marchini *et al.*, 1993; Marchini *et al.*, 1995)。またショウジョウバエのアンドロピンはオスの射精管で特異的に発現していることが明らかにされている (Samakovlis et al., 1991)。また、ショウジョウバエのドロソミシンは気管、腸や生殖器官でも遺伝子発現が起こる可能性があることが、クラゲ緑色蛍光色素 (GFP) をリポーター遺伝子に用いた実験によって報告されている (Ferrandon *et al.*, 1998)。主に排泄に関わる組織として考えられているマルピーギ管においてレボシン遺伝子が発現していることは、レボシンがマルピーギ管において生体防御の何らかの役割を担っている可能性があると考えられる。しかしレボシンは生理条件下での抗菌活性が弱いことから、抗菌性ペプチド以外の役割をもつ可能性も考えられる。

第2章　カイコ抗菌性ペプチドレボシンのゲノムDNA解析

レボシンは免疫したカイコ体液より単離された32アミノ酸残基よりなるプロリンに富んだ抗菌性ペプチドである (Hara and Yamakawa, 1995a)。現在までに1から3の3種類が報告されており、全てのペプチドで糖鎖が付加されていることが特徴である (Fig. 6)。

前章で述べたように、カイコの抗菌性ペプチド遺伝子は細菌やその構成成分等の体内への侵入によって発現誘導されることが明らかとなっている。この過程には、誘導因子が発現組織の細胞に認識され、細胞内のシグナル伝達によって核内にある遺伝子のプロモーター活性を上昇させるシグナル伝達系が存在していると思われる。従って、この誘導経路を明らかにするためには抗菌性ペプチド遺伝子をコードしているゲノムDNAの構造解析が必要である。

現在までにカイコにおいてゲノムDNAの解析が行われたものは、セクロピンB (Taniai *et al.*, 1995) とアタシン (Taniai *et al.*, 1996a) であり、それぞれの遺伝子をコードする領域がクローニングされ塩基配列が決定されている。しかし、レボシンについてはレボシン1/2をコードしたcDNAがクローニングされたのみであり (Chowdhury *et al.*, 1995)、ゲノムDNAについての情報は得られていない。従って、この遺伝子をコードする領域について解析を行うことによって、カイコのセクロピンBやアタシン遺伝子、さらにはショウジョウバエ等で解析されている他の抗菌性ペプチド遺伝子と塩基配列の比較検討ができる。そこで、本章ではカイコゲノムDNAライブラリーよりレボシン遺伝子をコードする領域をクローニングし、塩基配列を決定することによってこの遺伝子の構造的特性を調べた (第1節)。また、第2節では第1節で得られた新規のレボシンについてその遺伝子の発現様式を調べ比較した。

Lebocin 1

Galβ3GalNAcα
DLRFLYPRGKLPVP**TP**PPFNPKPIYIDMGNRY

Lebocin 2

GalNAcα
DLRFLYPRGKLPVP**TP**PPFNPKPIYIDMGNRY

Lebocin 3

GalNAcα
DLRFLYPRGKLPVP**TL**PPFNPKPIYIDMGNRY

Fig. 6. Primary structure of lebocin 1, 2 and 3. Structual differences are indicated in bold.

第1節　レボシンゲノムDNAのクローニングと塩基配列の決定

レボシン遺伝子の発現誘導機構を明らかにするために、カイコゲノムDNAライブラリーよりレボシン遺伝子をコードする領域をクローニングし、塩基配列を決定した。

材料及び方法

1. カイコゲノムDNAライブラリー

カイコゲノムDNAライブラリーは、東京都立大学富野士良教授により供与されたものを用いた。これはカイコ（東海×朝日）メス幼虫の脂肪体から抽出したDNAを*Mbo* Iで消化しEMBL 3λファージベクター（Frischauf *et al.*, 1983; Rogers *et al.*, 1988）の*Bam*H I部位に挿入することにより作製したものである（Fujii *et al.*, 1989）。

2. レボシンゲノムDNAのスクリーニング

(1) レボシンプローブの作製

スクリーニングに用いたレボシンプローブは、第1章と同様の方法で作成した。レボシンcDNAの126～607番目をPCRで増幅し、DNAラベリングキットを用いて[α-^{32}P]dCTPでランダムラベルした。これをNICKカラムで精製し、プローブとして用いた。

(2) ゲノムDNAライブラリーからのスクリーニング

ゲノムDNAライブラリー1×10^5個分のファージ溶液に宿主大腸菌（LE392）100μl（0.4%マルトースを含むLB（Luria-Bertani）培養液（10g/L bacto-trypton, 5g/L bacto-yeast extract, 10g/L NaCl）でLE392を1晩37℃で振とう培養後、集菌し2/5量の10mM $MgSO_4$に懸濁）を加え、37℃で15分培養後45℃の0.7%寒天LB培地4mlと混合し直ちに1.5%寒天LB培地に重層した。37℃で12時間培養後、出現したプラークをGene Screen Plusメンブレン（Dupont)を4分間密着させることで転写した。この後メンブレンを変成溶液（0.2N NaOH, 1.5M NaCl）で湿らせた濾紙上に2分間のせることを2回繰り返し、ファージの殻の破壊及びファージDNAの変成を行った。その後中和溶液（2×SSC, 0.4M Tris-HCl pH7.4）で湿らせた濾紙上に2分間のせることによってメンブレンの中和を行った。ハイブリダイゼーション以降は第1章と同様の方法で行った。1次スクリーニングで得られた5個の陽性プラークをSM溶液（5.8g/L NaCl, 2.0g/L $MgSO_4$-$7H_2O$, 50mM Tris-HCl

pH7.5, 0.01％ゼラチン) 500μl に懸濁し 25μl のクロロホルムを加えボルテックスで撹拌した。これを数時間室温に放置後、遠心して得た上清を 2 次スクリーニングに用いるファージ溶液とした。1 次スクリーニングと同様にメンブレンを作製し、ハイブリダイゼーションを行い、2 個の単一の陽性プラーク (Bmleb 1, Bmleb 2) を得た。

3. レボシン遺伝子 5' 上流領域解析のためのプローブの作製

レボシン遺伝子の発現調節領域である 5' 上流の塩基配列を明らかにするためには、サブクローニングする DNA 断片は遺伝子の上流を含むことが必要である。そこで新たにレボシン遺伝子の 5' 上流に近い部分の配列を用いてプローブを作製した。プローブの標識は PCR DIG labeling mix (Boehringer Mammheim) を用い、DIG-conjugated dUTP を PCR 産物に取り込ませた。

(1) 1 本鎖 cDNA の合成

PCR を行う際のテンプレートにするため LPS で免疫したカイコ幼虫脂肪体由来の cDNA を合成した。第 1 章の方法で免疫後摘出した脂肪体より RNA を抽出した。この RNA5μg から First-strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) を用いて cDNA を合成した。

(2) PCR

新プローブ作製のために以下のプライマーを設計した。

Forward primer (レボシン cDNA の-10～+10)

5'-GCCGCTCAACATGTACAAGT-3'

Reverse primer (レボシン cDNA の+217～+236)

5'-TCGAGCTGCACGTCGTCGAT-3'

PCR はサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, PERKIN ELMER, 以下 PCR はこれを用いた) を用い、PCR DIG labeling mix を含む反応溶液中で、94℃で 30 秒反応させた後、94℃ (30 秒)、58℃ (30 秒)、72℃ (1 分) で 30 サイクルの反応を行い、最後に 72℃で 5 分間の伸長反応を行った。反応は全量 50μl で行い、10μl を確認のためアガロース S ゲルで電気泳動を行った。残りをエタノール沈殿し、20μl TE (Tris-EDTA) 緩衝液 (10mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5, 1mM EDTA pH8.0) に溶解しこれをプローブとして用いた。

4. ファージ DNA の精製及びプラスミドへのサブクローニング

スクリーニングによって得られたファージ DNA を解析するためにプラスミドへのサブクローニングを行った。

(1) ファージ DNA の精製

ファージ DNA の精製は QIAGEN Lambda Midi Kit (QIAGEN) を用いて行った。ファージ DNA 溶液は、プラークをコンフルエントになるまで培養した寒天 LB 培地 (直径 9cm のプラスチックシャーレ) を 5 枚作り、そこに SM 溶液を注ぎ 1 晩振とうした後、上清を回収することによって得られた。

(2) メンブレンの作製

プラスミドにサブクローニングするための適当な DNA 断片を得るために、ファージ DNA を制限酵素で処理した。*Apa* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Kpn* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Sac* Ⅱそして *Xba* Ⅰ (以上ニッポンジーン) を用いて切断を行った。切断した DNA 断片は 0.8%アガロース S ゲルで電気泳動し脱塩後、高速転写装置 (NB-1513B, 日本エイドー) を用い、0.05×TAE 緩衝液中で 300mA、15 分間の電気泳動によって Gene Screen Plus メンブレン (Dupont) に転写した。DNA の変成はメンブレンを変成溶液 (0.5N NaOH, 1.5M NaCl) に 30 秒間浸して行い、中和溶液 (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl 緩衝液 pH7.5) に 2 分間浸すことによって中和した。変成後のメンブレンは 4℃で保存した。

(3) サザンハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーションは、上記で作製したメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 (5×SSC, 7%SDS, 50%ホルムアミド, 2% Blocking Reagent (Boehringer Mammheim), 0.1% N-lauroylsarkosine) で 50℃、1 時間以上行った。この後、2. で作製したプローブ 2μl を 5 分間の熱処理後急冷しハイブリダイゼーション溶液に加えた。50℃で 1 晩ハイブリダイゼーションを行い、その後メンブレンを 2×SSC, 0.1%SDS 溶液で室温、5 分間の洗浄を 2 回、0.1×SSC, 0.1%SDS 溶液で 68℃、15 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄後のメンブレンは Boehringer 社の手法に従い、バッファー1 (0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl; pH7.5) で 5 分間洗浄した後、バッファー2 (バッファー1 に Blocking Reagent を 1%に溶解した溶液) で 1 時間振とうした。その後 AP 標識ジゴキシゲニン抗体, Fab フラグメント (Boehringer Mammheim) を 1/10,000 になるように加え 30 分間振とうした。

洗浄液（バッファー1 + 0.3% Tween 20）で15分間、2回洗った後バッファー3（50mM $MgCl_2$, 0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl 緩衝液 pH9.5）で5分間平衡化し、CSPD もしくは CDP-Star をバッファー3で100倍希釈した溶液で5分間反応させた。その後メンブレンをサランラップで包んだ後、化学発光用フィルム（Hyperfilm, Amersham）に1時間感光させ暗室にて現像を行った。

(4) サブクローニング

サザンハイブリダイゼーションの結果、Bmleb 1 クローンは *Xba* Ⅰによる切断で約4.3kbp のレボシン遺伝子をコードする領域を含む断片が、Bmleb 2 クローンも同様に *Sac* Ⅰによる切断で約3.2kbp の断片が得られた。この断片をサブクローニングするため、1%低融点アガロースゲル（Sea Plaque agarose, FMC）で電気泳動後切り出し β-Agarase (FMC) でアガロースを分解した。フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿し DNA を回収した。プラスミドベクター（pBluescript Ⅱ SK (+) phagemid, Stratagene）は、1μg を *Xba* Ⅰ（Bmleb 1）もしくは *Sac* Ⅰ（Bmleb 2）で切断した後 DNA 断片と同様に切り出し、Bacterial Alkaline Phosphatase (TOYOBO) を用いて脱リン酸化を行った（以下 BAP 処理）。このベクター50ng に DNA 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (TAKARA) を用い全量 10μl で 16℃1時間以上ライゲーション反応した。トランスフォーメーションは、ライゲーション溶液 1μl を 20μl の Competent high *E.coli* JM109 (TOYOBO) に加え氷上15分おいた後、42℃1分間熱処理し氷上2分間の後 80μl の SOC 溶液（GIBCO BRL）を加えた。これを 37℃15分間培養した後、1.5%寒天 LB 培地（50μg/ml アンピシリン, 20μg/ml X-gal, 200μg/ml IPTG を含む）にまくことによって行った。この培地を1晩37℃で培養し出現した白色コロニーを 50μg/ml アンピシリンを含む 2×YT 液体培養液 (16g/L bacto-trypton, 10g/L bacto-yeast extract, 5g/L NaCl) で 2ml 培養を 37℃で行った。培養後、(5)に示すアルカリ法（Ish-Horowicz and Burke, 1981）を用いてプラスミド DNA を精製した。このうち 1/10 量を *Xba* Ⅰ（Bmleb 1）、*Sac* Ⅰ（Bmleb 2）で処理し、アガロース S ゲルで電気泳動することでインサート DNA の有無を確認した。

さらにレボシン cDNA の塩基配列より、この遺伝子は内部に *Xho* Ⅰで切断されることが予想されたためこの酵素で切断し、Bmleb 1 の約 4.3kbp の断片を約 1kbp と 3kbp の

DNA 断片に分けた。Bmleb 2 も約 3.2kbp の断片を約 0.8kbp と 2.4kbp の DNA 断片に分け上記と同様の方法でプラスミドベクターにサブクローニングした。

(5) アルカリ法によるプラスミド DNA の精製

2ml 液体培養した大腸菌を 1.5ml エッペンドルフチューブに移し、4℃ 9,500g で 30 秒間遠心分離し集菌した。50μl の Sol Ⅰ (25mM Tris-HCl 緩衝液 pH8.0, 50mM グルコース, 10mM EDTA pH8.0) に懸濁後、100μl の Sol Ⅱ (0.2N NaOH, 1% SDS) を加え撹拌し溶液が透明になったところで 75μl の Sol Ⅲ (3M CH_3COOK, pH4.8) を加えた。激しく撹拌した後 15μl のクロロホルムを加えさらに撹拌した。その後、15,000g で 10 分間遠心分離し上清を回収した後エタノール沈殿した。70%エタノールで洗浄後、沈殿を 20μl の TE 緩衝液 (10μg/ml Rnase を含む) に溶かした。(4)の制限酵素処理を行うサンプルとしてこの溶液の一部を用いた。残りの溶液は 37℃に 30 分間おいた後、3/5 量の PEG 溶液 (20% ポリエチレングリコール 6,000, 2.5M NaCl) を加え撹拌後、氷上に 1 時間おき 15,000g で 20 分間遠心分離し得られた沈殿を 20μl の TE 緩衝液に溶かした。DNA 濃度は OD_{260nm} の吸光度を測定することによって算出した。以下プラスミドの少量調整は全てこの方法を用いた。

5. 塩基配列の決定

4 で作製した 4 種類のプラスミドについて、塩基配列の決定は Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reacton Kit (Applied Biosystems) を用いて dideoxynucleotide chain terminator 法 (Sanger and Coulson, 1975) により行った。伸長反応は 4μl の reacton mixture、10pmol のプライマー、300～400ng の解析するプラスミドを含む全量 13μl の反応液を準備し、サーマルサイクラーで 96℃ (10 秒)、50℃ (5 秒)、60℃ (4 分) の反応を 25 サイクル行った。なお伸長反応に用いたプライマーは、1 回目は pBluescript Ⅱ SK (+) のクローニング部位の両側にある配列である T7 プライマー (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') もしくは T3 プライマー (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3')、または SK プライマー (5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3') を用いた。2 回目以降は、前回の結果を参考に新たにプライマーを設計することによって、さらに上流の塩基配列を決定した。反応後、室温でのエタノール沈殿を行って沈殿を得た。この沈殿を 4μl の

loading solution (dye solution (3% blue dextran, 50mM EDTA pH8.0) と脱イオン化ホルムアミドを 1：5 で混合した溶液) に溶かし、94℃ 2 分間の熱処理後氷冷し電気泳動を行った。泳動は DNA sequencer (ABI 373A) を用い、50%尿素、1×TBE (Tris-borate/EDTA) 緩衝液 (90mM Tris-HCl 緩衝液 pH8.0, 90mM ホウ酸, 25mM EDTA pH8.0) を含む 6%ポリアクリルアミドゲルで 40V 定電圧、1×TBE 緩衝液中にて行った。得られた塩基配列の編集及び解析はコンピューターソフト (GENETYX Ver. 9.0, Software Development) で行った。以下 DNA の塩基配列の決定と解析にはこの方法を用いた。

結果

レボシン cDNA の塩基配列をもとにプライマーを設計し、PCR で 482bp のプローブを作製した。これを用いてカイコ (東海×朝日) ゲノム DNA ライブラリーよりレボシン遺伝子のスクリーニングを行った結果、2 個の陽性プラーク (Bmleb 1, Bmleb 2) が得られた。このファージ DNA をプラスミドベクターへサブクローニングし、レボシン遺伝子をコードする領域を含む約 4.3kbp (Bmleb 1) の断片と約 3.2kbp (Bmleb 2) の断片をもつプラスミドをそれぞれ作製した。そしてさらに後の解析を容易にするために Bmleb 1 は約 1kbp と 3kbp の断片に、Bmleb 2 は約 0.8kbp と 2.4kbp の断片に分けもう一度サブクローニングした。これらクローンのシークエンスより得られた結果を Bmleb 1 は Fig. 7B に Bmleb 2 は Fig. 7A に示す。シークエンスの結果より両遺伝子とも 179 残基のアミノ酸をコードしたオープンリーディングフレームをもち、イントロンはもたないことが判明した。またポリ A 付加シグナル (AATAAA) が翻訳停止コドン (TAG) の後方 182 番目 (Bmleb 1) 、180 番目 (Bmleb 2) にそれぞれ存在していた。翻訳したアミノ酸配列を調べた結果、Bmleb 2 はレボシン 3 をコードした遺伝子であることが判明した。また Bmleb 1 はこれまでに見つかっているレボシンと非常に高い相同性を示したが、新規であったことよりレボシン 4 遺伝子と命名した (以降 Bmleb 2 は *Leb 3*, Bmleb 1 は *Leb 4* とする)。

プロモーター領域の解析を行うため遺伝子の発現調節領域である 5'上流の配列を調べた結果、TATA-box や CAAT-box が両遺伝子に見つかった。そして多くの昆虫の抗菌性ペプチド遺伝子で見つかっている NF-κB 結合様配列も *Leb* 3 で 3 個、*Leb* 4 で 2 個それ

A

```
TTTAGTCTTTACACGAAAATAGTCTTTAAATTCACACCATCAGCACATCTTTAACATTAC    60
CTAATGCTGCTCCCGTACTTACATAATTCAACTCAAGCTATCAACAGCAGTCGTTCCACA   120
ACAAAGCGGCATCGTAGTCTTAAGGGACCCAAAGTCGGTTATTCATCATGCCCCCTGGTT   180
CGACGGCATTCTTACTTCATCATCAGGCCAGCACAGCCCTAGCAGCCCACGACTGAATCT   240
TCAGCATTCGGAATTTCACATCGCCGATACGGTAGCTCTGCACCACATCGACTATTCTCG   300
GCACTGACGCAGCATTCAAGCACAGTTTCGACTCACGGCAGATTTGGAGCAACACTGGAA   360
AAACGGTAACACGATCTCCACACTCAGATGGGAGTGATGTAAGATGTAGTGATGTAGCTA   420
TCATAGAACATCTTTGAATCGCGTTAACGACATTTTAAAGGTAATCTTTGTATACGAGTT   480
TCATACAATAACATTCGGACAGTAAGTAGATCTACAAAGAAATGATACCTCCTCGGTGGA   540
AATCATCCCTTTGCCTATCCCAAAGCGCCACAGTAGGTATACATACAGTATTTATTGTGT   600
GTAATTATTGATTTTTTCAATTTTATTTTTCTTCATTACTGATTAATATATTGAAAGTTT   660
TGGTCTAATTTAATAGTCCTATCTCTATTTTTATTATTGTTACCTAGTACACTGCAATGT   720
ACCTGGAGCATTTTTTTAGAATTTCCCCATGTGCAAATTGATATACCAGAACAGAGTGCT   780
TTTATCGATAAGATCGTCCATTGTAGAAATTATCCTGCTTATTTACTAACATTCTTGTTA   840
GGCATCAAAGTATAATCTTTCTCTCATAATTTATATGAAACATTATAATATCTACGTATT   900
GATTGTATTAGGTACGTATATGCAACAGTAATGAGGAAACAAATCATGAAAAATGTTTTG   960
AGATGAATCTTTGTCATAATAAGCCAGGACTTCCCCTTATCAATCGTAATAATTAATATC  1020
GCTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAGACTTTCCTCAAGACTGTGTATAAATACCGATCATTG  1080
TGATAGTTACTCACATTACCGGTGTTCAATCGATACAATCAACATGTACAAGTTTTTAGT  1140
                                              M  Y  K  F  L  V
ATTCAGTTCAGTTCTGGTGCTGTTCTTTGCTCAGGCTTCGTGCCAGAGGTTCATCCAGCC  1200
 F  S  S  V  L  V  L  F  F  A  Q  A  S  C  Q  R  F  I  Q  P
GACCTTCAGGCCACCGCCAACACAGCGCCCGATAACACGTACAGTGCGACAAGCTGGCCA  1260
 T  F  R  P  P  P  T  Q  R  P  I  T  R  T  V  R  Q  A  G  Q
GGAACCGCTATGGCTGTATCAAGGTGACAATGTTCCTCGTGCGCCAAGTACCGCAGACCA  1320
 E  P  L  W  L  Y  Q  G  D  N  V  P  R  A  P  S  T  A  D  H
TCCGATTCTTCCTTCGAAAATCGACGACGTGCAGCTCGATCCAAACCGAAGGTATGTTCG  1380
 P  I  L  P  S  K  I  D  D  V  Q  L  D  P  N  R  R  Y  V  R
CAGTGTCACCAATCCAGAAAATAACGAGGCGTCCATTGAACATTCACATCATACAGTTGA  1440
 S  V  T  N  P  E  N  N  E  A  S  I  E  H  S  H  H  T  V  D
TATTGGACTTGACCAGCCGATCGAGAGCCACCGTAACACAAGGGACCTGCGGTTTTTGTA  1500
 I  G  L  D  Q  P  I  E  S  H  R  N  T  R  D  L  R  F  L  Y
CCCTCGAGGGAAACTGCCTGTTCCAACGCTTCCTCCGTTTAACCCCAAGCCAATATATAT  1560
 P  R  G  K  L  P  V  P  T  L  P  P  F  N  P  K  P  I  Y  I
TGATATGGGAAACCGTTACCGACGACATGCGTCGGAGGATCAAGAAGAATTGCGGCAATA  1620
 D  M  G  N  R  Y  R  R  H  A  S  E  D  Q  E  E  L  R  Q  Y
TAATGAGCACTTTCTGATTCCGAGGGATATTTTCCAAGAATAGGGAAAGTTCCAGAAACA  1680
 N  E  H  F  L  I  P  R  D  I  F  Q  E ***
AAAGATTTCGGAGTGCACTCCTATATTCATTGAATCGTAATTACTTAAGTTTAAGAGATA  1740
TTTTTAATAGTTCTGCATAAAAATACAAAGTATTTTAAAGTGGCCGTTTCAATTCAAATA  1800
ATGTAAGTACTCGTACGTATTGTTTACCATGATAATATCAAATTAAATAAATCTCAACCA  1860
ATATTGAACTTATGTTTTGTTAATTTGCTTTGCAACAAATTTCTCTCACCTGTTGTAAAA  1920
AATATTTTATAATTGTGCTGTGTATTTAAAGTGTAATTAAAGTGTGTAATTAAAAGAAAT  1980
CATTTTGAATAATTGTTGTTTCTGTTTTTCTTTTCGCCAACACTATACTGTAGTGTTATA  2040
CCACGAGTACATGTCACTCCCACTGCTGAG                                2075
```

B

```
CCTTTAGAGGCAGTGAATCCGTCATTCCTAACCATGACGTAATTCGCGACTTTCGGGTCA    60
CGATGCGAGGGCTTCAGGCAGGTCTCTTGCACTAACAGAATATCTATTAGATTGTCGCGG   120
AGAAATTCGTATATTTTATCGCGTTGCCGCGCGAGTCCGTTAGCATTGTAGAATGTTAAC   180
TTACGGGAATATGGTTTTTCTCTACCGTTTCGCGCCATTGATTACCGGTAAAGATTTATA   240
ACGTACGGGATACGGACTCGTAAACGTCCATGAGGTCAAAAGCGGCCGCGAGCCGCTGTT   300
CGGGGGGCGGGTCACTAGTAATTTATATGAAACATTGTAATACTATGTGATTACTAATAC   360
TATGTATTGATTATTGTATTAGGTACGTATAGGCAACAGTAATGAGGAAACAAATCATGA   420
GAATTTTTTGGGGTGAACCTTTGTGTCATGATAAACTAGGACTTCCCCTTATCAATCGTA   480
ATAATTAATATCGCTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAGACTTTCCTCAAGACAGTGTATAAA   540
TACCGATCATTGTGATAGTTACTCTCATTACCGGTGCTCAATCGATACAATCAACATGTA   600
                                                        M  Y
CAAGTTTTTAGTATTCAGTTCAGTTCTGGTGCTCTTCTTTGCTCAGGCTTCGTGCCAGAG   660
 K  F  L  V  F  S  S  V  L  V  L  F  F  A  Q  A  S  C  Q  R
GTTCATCCAGCCGACCTACAGGCCACCACCGACACGGCGCCCGATAATACGTACAGCGCG   720
 F  I  Q  P  T  Y  R  P  P  P  T  R  R  P  I  I  R  T  A  R
ACAAGCTGGCCAGGAACCGCTATGGCTGTATCAAGGTGACAATATTCCTCGTGCGCCGAG   780
 Q  A  G  Q  E  P  L  W  L  Y  Q  G  D  N  I  P  R  A  P  S
TACTGCAGACCATCCGATTCTTCCTTCGAAAATCGACGATGTGAAGCTCGATCCAAACAG   840
 T  A  D  H  P  I  L  P  S  K  I  D  D  V  K  L  D  P  N  R
AAGGTATGTTCGCAGTGTTACCAATCCAGAAAATAACGAGGCATCCATTGAATCTTCCCA   900
 R  Y  V  R  S  V  T  N  P  E  N  N  E  A  S  I  E  S  S  H
TCATACAGTTGATATTGGACTTGACCGGCCGATCGAGAGCCACCGTAACACAAGGGACCT   960
 H  T  V  D  I  G  L  D  R  P  I  E  S  H  R  N  T  R  D  L
GCGGTTTTGGAACCCTCGAGAGAAACTGCCTCTTCCAACGCTTCCTCCGTTTAACCCCAA  1020
 R  F  W  N  P  R  E  K  L  P  L  P  T  L  P  P  F  N  P  K
GCCAATATATATTGATATGGGAAATCGTTACCGACGACATGCATCGGACGATCAAGAAGA  1080
 P  I  Y  I  D  M  G  N  R  Y  R  R  H  A  S  D  D  Q  E  E
ATTGCGGCATCATAATGAGCACTTTCTGATTCCGAGGGATATTTTGCAAGACTAGGAAAA  1140
 L  R  H  H  N  E  H  F  L  I  P  R  D  I  L  Q  D  ***
GTTCCTGAAACAAAAGATTTCGGAGTGCACTTCTTTATTCATTGAATCGTAATTACTTAA  1200
GCTTACTTGATATTTTTAATAGTTCTGCATTAAAATACAAAATATTTTAAAGTGGCCGTG  1260
TCAATTCAAATAATGTAAGTACTCGTACATTGTATATCATGATAATATCAAATTAAATAA  1320
ATCTCAACAAACATAGAACTTACATTTTGTTTATTTGCTTTGCAACAAATCACCTATTGT  1380
AAAAATATTTTATAATTGTGCTGTGTATATTAAAAGAAATACTTTTGAATAATTGATGTT  1440
TCTGTTTTTCTTTTCGCCAACACTATACTGTAGTGTCAGACTACACGTCCCTCCCACACG  1500
ATTCTAATGACACCTCATATAATTGGAATCATTCAACATGC                     1541
```

Fig. 7. Nucleotide sequences of two lebocin genomic clones. The nucleotide sequences of *Leb* 3 (A) and *Leb* 4 (B) clones along with the deduced amino acid sequences are shown. The nucleotide numbers are indicated in the right margin of the panels. TATA box and CAAT box and polyadenylation signal (AATAAA) is shown by bold italic letters. Putative NF-κB responsive element and GATA motif are indicated by double and dot underline, respectively. NF-IL6 responsive element is shown by single underline. Stars denote the translation stop codon. Amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is expressed by a single letter and mature (*Leb* 3) and putative mature (*Leb* 4) peptides are shown in bold letters.

ぞれ見つかった。さらにその中のそれぞれ1個の近傍にはGATAモチーフも認められた。また、NF-IL6結合様配列についても検索した結果、*Leb 3*ではTGTAGAAATという配列が見つかったが、*Leb 4*ではそれに当てはまる配列は認められず、1塩基だけ不足したTGTGGAATが存在していることが確認された。

5'上流領域についてさらに検討するために*Leb* 3、*Leb* 4両遺伝子についてハープロット法を用いて比較を行った。その結果をFig. 8に示す。翻訳開始点上流-1bp～-500bpについて比較した結果、-1bp～-250bp付近までは両遺伝子間においてかなり保存され、それよりも上流域に関してはほとんど相同性が見られないことが明らかとなった。これに並行して同じ領域 (-1bp～-500bp) の塩基配列を並べた結果をFig. 9に示す。前図と同様に-1bp～-250bp付近までが保存されていることが分かり、この領域中にはTATA-boxやCAAT-box、そしてNF-κB結合様配列のうち翻訳開始点に近い2個は両遺伝子で同じ位置に同じ配列で保存されていた。しかし、より上流に存在するNF-IL6結合様配列や*Leb* 3にのみ認められた3個目のNF-κB結合様配列は非保存領域に存在しているため両遺伝子で全く異なっていた。

考察

現在までに数多くの抗菌性ペプチドが同定され分類されてきた。その中でレボシン (Hara and Yamakawa, 1995) は高プロリン含有タイプの抗菌性ペプチドに分類することができる。このグループには、ミツバチのアピダエシン (Casteels *et al.*, 1989) やアバエシン (Casteels *et al.*, 1990)、ショウジョウバエのドロソシン (Bulet *et al.*, 1993) やメチニコフィン (Levashina *et al.*, 1995)、ホシカメムシのフィロコリシン (Cociancich *et al.*, 1994)、カメムシのメタルニコフィン (Chernysh *et al.*, 1996) 等が含まれている。これらの中でスレオニン残基に糖鎖をもつことが知られているのは、ドロソシン、フィロコリシンそしてレボシンのみである。このような糖鎖をもつという点で非常に特徴的であるペプチド群の中で、現在までにドロソシンにおいて遺伝子の解析が行われ、この遺伝子はイントロンがなくゲノム内で1コピー存在する遺伝子であることが報告されている (Charlet *et al.*, 1996)。

今回レボシンの遺伝子のクローニングを行い、*Leb* 3と*Leb* 4という2種類のクローン

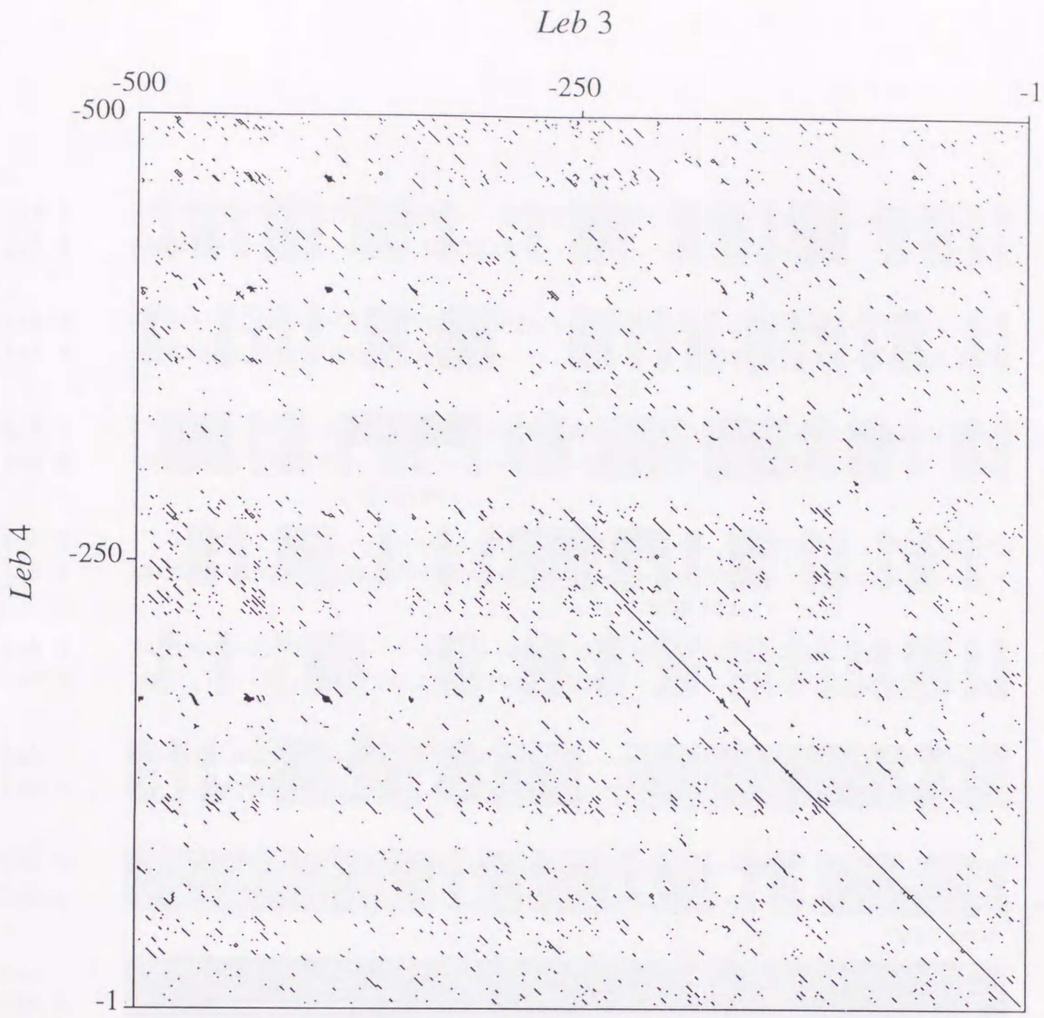


Fig. 8. Harr Plot comparison of 5'-upstream regulatory region of *Leb* 3 with that of *Leb* 4. The comparison was made with Harr Plot application program (Software Development) with a window of 5 and a matching nuclotide number of 4. Horizontal line and vertical line show the nucleotide sequence of *Leb* 3 and *Leb* 4, respectively. The numbers above horizontal line and beside the vertical indicate the position from the A in the translation start codon (ATG).

```
Leb 3   -TTTTCTTCATTACTGATTAAT---ATATTGAAAGTTTTGGTCTAATTTAATAGTC-C-T   -447
Leb 4   AATATC-T-ATTA--GATT-GTCGCGGA--GAAA---TTCGTAT-ATTT--TA-TCGCGT   -455

Leb 3   AT----CTCTA-T-TTTTATTATTGTTACCTAGTACACTG-CAA-TGTACCTGG---A-G   -399
Leb 4   -TGCCGCGCGAGTCCGTTAGCATTG-----TAG-A-A-TGTTAACT-TA-CGGGAATATG   -406
                                     NF-IL6 RE

Leb 3   CATTTTT-T-TA--GAATTTCCCCATGTGCAAATTGATATACCAG-AACAGAGTGCTT-T   -345
Leb 4   -GTTTTTCTCTACCG--TTT---C--GCGC-CATTGAT-TACCGGTAA-AGA-T--TTAT   -360
                 NF-κB RE

Leb 3   ----TATC--GATA---A---G--ATCGTCCATTGTA-G--AAATTATC--CTGCTTATT   -304
Leb 4   AACGTA-CGGGATACGGACTCGTAAACGTCCA-TG-AGGTCAAA--AGCGGCCGC-GA--   -308
                                         NF-IL6 RE

Leb 3   TACTAACATTCTTGTT----AGGC--ATCA-AAGTATAATCTTTCTCTCATA-ATT-T-A   -254
Leb 4   -GC---C--GC-TGTTCGGGGGGCGGGTCACTAG--TAA--TTTATATGAAACATTGTAA   -259

Leb 3   TA-TGA-AACATTA-TAATATCTACGTATTG---ATTGTATTAGGTACGTATATGCAACA   -200
Leb 4   TACT-ATGTGATTACTAATA-CTATGTATTGATTATTGTATTAGGTACGTATAGGCGACA   -201

Leb 3   GTAATGAGGAAACAAATCATGAAAAATGTTTTGAGATGAA--TCTT-TGTCATAATAAGC   -143
Leb 4   GTAATGAGGAAACAAATCATG-AGAATTTTTGGGGTGAACCT-TTGTGTCATGATAAAC   -143
                                                      GATA motif

Leb 3   CAGGACTTCCCCTTATCAATCGTAATAATTAATATCGCTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAG   -83
Leb 4   TAGGACTTCCCCTTATCAATCGTAATAATTAATATCGCTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAG   -83
        NF-κB RE, GATA motif, CAAT box                NF-κB RE

Leb 3   ACTTTCCTCAAGACTGTGTATAAATACCGATCATTGTGATAGTTACTCACATTACCGGTG   -23
Leb 4   ACTTTCCTCAAGACAGTGTATAAATACCGATCATTGTGATAGTTACTCTCATTACCGGTG   -23
                         TATA-box

Leb 3   TTCAATCGATACAATCAACATGATG                                      +3
Leb 4   CTCAATCGATACAATCAACATGATG                                      +3
```

Fig. 9. Comparison of nucleotide sequences of the 5'-upstream regulatory region of lebocin genes. Sequence identities are shadowed. Gaps were included to obtain maximal sequence similarity. The numbers in the right margin of the panels indicate the position from the A in the translation start codon (ATG).

を得た (Fig. 7)。ここで得られたアミノ酸配列について、既に明らかにされているレボシン 1/2 も含め比較を行った結果、新規であるレボシン 4 は成熟ペプチドに相当するアミノ酸配列がレボシン 1/2 と 84.3%、レボシン 3 とは 87.5%の相同性であることが明らかとなった (Fig. 10A)。またこのレボシン 4 はシグナルペプチド (16 残基) とプロセグメント (104 残基) と推定される N 末端の部分、そして C 末端につながる 27 残基と成熟ペプチド以外の部分でもこれまでに報告されているレボシンと高い相同性をもっていることが明らかとなった。

レボシンは糖鎖をもつことが抗菌活性を発揮するために非常に重要であることが知られ、レボシン 1～3 は糖鎖付加 (O-glycosylation) 部位とされる (Pro-Thr/Ser-Xaa-Xaa-Pro) (Wilson *et al.*, 1991) の配列を全てもっている。この部分の配列はレボシン 4 においても保存されていることから、このペプチドも糖鎖をもつ抗菌性ペプチドとして機能していると考えられる。

これらレボシンの配列を参考に系統樹を作製した (Fig. 10B)。これよりレボシンは、まずレボシン 1/2、3 共通するペプチドとレボシン 4 の属するペプチドの 2 つのグループに分かれ、それより後にレボシン 1/2 とレボシン 3 に分岐したことが予想された。

今回得られたレボシンのアミノ酸配列をもとにこれまでに見つかっている高プロリン含有抗菌性ペプチドのアミノ酸配列の比較を行った (Fig. 11)。その結果、残基数等はペプチドによってかなりばらつきがあるが、プロリンの数や位置については類似している点が認められた。さらに Fig. 12 でこれらのペプチドについて系統樹を作製した。これに従えばレボシンはまずミツバチの膜翅目と分かれた後、双翅目や半翅目のグループと分かれたことが推測できた。そしてカイコの中で 3 種類のレボシンに分かれたのは目間で分かれた時点よりもかなり後であると思われた。

Leb 3 と *Leb* 4 の 5' 上流の配列を比較した結果、-1bp～-250bp 付近までの配列は非常に保存され (Fig. 8)、その中に TATA-box、CAAT-box、NF-κB 結合様配列、GATA モチーフが含まれていることが明らかとなった。しかし、これより上流は両遺伝子間でかなり異なっていて、NF-IL6 結合様配列は *Leb* 4 では不完全であったり、NF-κB 結合様配列、GATA モチーフの数も異なったりしていた。ドロソシンの遺伝子上流には NF-κB 結合様配列が存在し、これが発現誘導を制御していることが明らかとなっている (Charlet *et al.*,

A

```
Lebocin 1/2     1 : MYKFLVFSSVLVLFFAQASCQRFIQPTFRPPPTQRPIIRT
Lebocin 3       1 : MYKFLVFSSVLVLFFAQASCQRFIQPTFRPPPTQRPITRT
Lebocin 4       1 : MYKFLVFSSVLVLFFAQASCQRFIQPTYRPPPTRRPIIRT

Lebocin 1/2    41 : ARQAGQEPLWLYQGDNVPRAPSTADHPILPSKIDDVQLDP
Lebocin 3      41 : VRQAGQEPLWLYQGDNVPRAPSTADHPILPSKIDDVQLDP
Lebocin 4      41 : ARQAGQEPLWLYQGDNIPRAPSTADHPILPSKIDDVKLDP

Lebocin 1/2    81 : NRRYVRSVTNPENNEASIEHSHHTVDTGLDQPIESHRNTR
Lebocin 3      81 : NRRYVRSVTNPENNEASIEHSHHTVDIGLDQPIESHRNTR
Lebocin 4      81 : NRRYVRSVTNPENNEASIESSHHTVDIGLDRPIESHRNTR

Lebocin 1/2   121 : DLRFLYPRGKLPVPTPPPFNPKPIYIDMGNRYRRHASDDQ
Lebocin 3     121 : DLRFLYPRGKLPVPTLPPFNPKPIYIDMGNRYRRHASEDQ
Lebocin 4     121 : DLRFWNPREKLPLPTLPPFNPKPIYIDMGNRYRRHASDDQ

Lebocin 1/2   161 : EELRQYNEHFLIPRDIFQE
Lebocin 3     161 : EELRQYNEHFLIPRDIFQE
Lebocin 4     161 : EELRHHNEHFLIPRDILQD
```

B

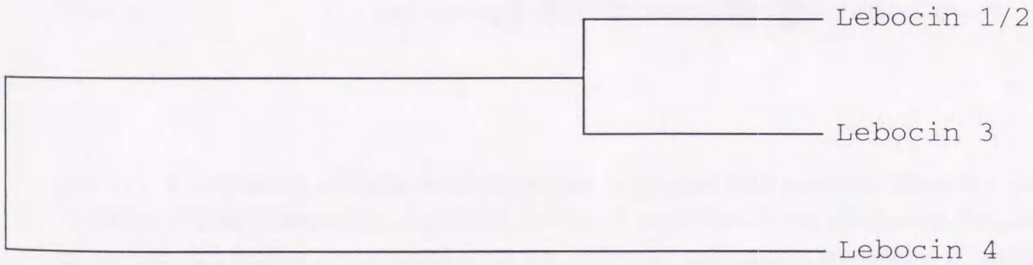


Fig. 10. Sequence identity and phylogenetic relationship of three members of the lebocin family. Amino acid sequences of lebocin 1/2, 3 and 4 were aligned and compared (A). Identical amino acid residues in one letter are shadowed. Bold letters indicate a mature portion of lebocins. Numbers of amino acid residues are shown on the left margin of the panel. The phylogenetic relationship (B) was analyzed by the unweighted pair-group method using aristmetic advantages (Software Demelopment).

```
Lebocin 1/2        1 --DL-RFLYP-RGKLP-VPTPPPFNPKPI-YIDMGNRY  32
Lebocin 3          1 --DL-RFLYP-RGKLP-VPTLPPFNPKPI-YIDMGNRY  32
Lebocin 4          1 --DL-RFWNP-REKLP-LPTLPPFNPKPI-YIDMGNRY  32
Apidaecin Ia       1 --EAKPEAKPG-NNRPVY-IPQPRPPHP-R-------I  26
Apidaecin Ib       1 --EAKPEAKPG-NNRPVY-IPQPRPPHP-R-------L  26
Apidaecin II       1 ----------G-NNRPIY-IPQPRPPHP-R-------L  18
Drosocin           1 --GKPRPYSP-R---PT------SHPRPI-------RV  19
Pyrrhocoricin      1 -VDKG-SYLP-R---PT------P-PRPI---Y--NRN  20
Metalnikowin I     1 -VDK-PDYRP-R---P--------RP-P-------NM-  15
Metalnikowin IIA   1 -VDK-PDYRP-R---P--------WPRP-------N--  15
Metalnikowin IIB   1 -VDK-PDYRP-R---P--------WPR--------NMI  16
Metalnikowin III   1 -VDK-PDYRP-R---P--------WPRP-------NM-  16
Abaecin            1 YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQGPFNPK-IKWPQ-G--Y  34
```

Fig. 11. Comparison of anino acid sequences of proline-rich peptides. Gaps are introduced to obtain maximal sequence alignment. Identical amino acids are shadowed. Sequence data of proline-rich peptides were cited from the following references: apidaecins (Casteels *et al.*, 1989), drosocin (Bulet *et al.*, 1993), pyrrhocoricin (Cociancich *et al.*, 1994), metalnikowins (Chernysh *et al.*, 1996) and abaecin (Casteels *et al.*, 1990).

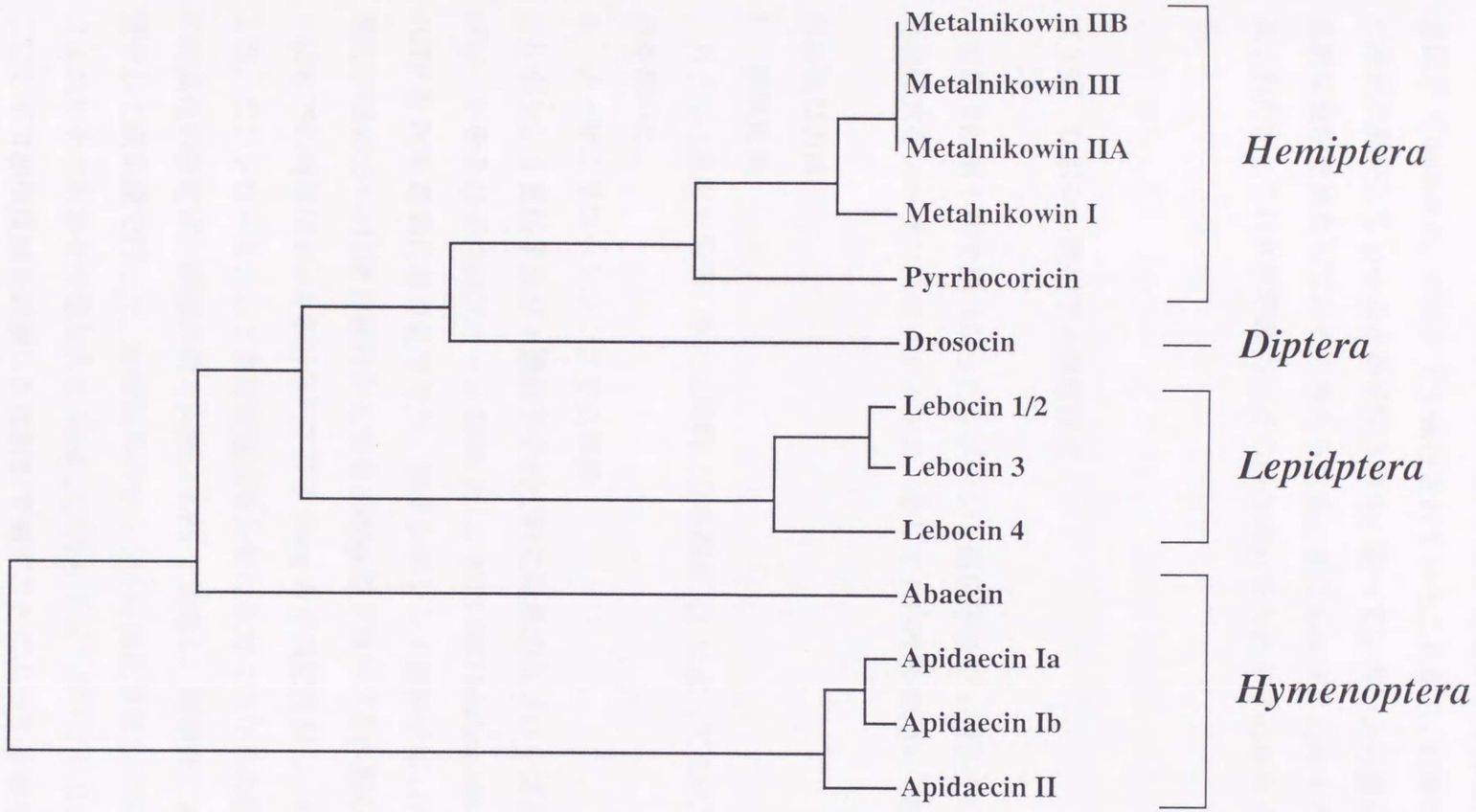


Fig. 12. Phylogenetic tree of insect antibacterial proline-rich peptides analyzed by the unweighted pair-group method using aristmetic advantages (Software Demelopment) .

1996)。この配列はカイコにおいてもセクロピンB遺伝子 (Taniai *et al.*, 1995) やアタシン遺伝子 (Taniai *et al.*, 1996a) でも保存されていることから、抗菌性ペプチド遺伝子の発現に共通に関与していることが示唆される。従ってレボシンの遺伝子発現にもこの部位は重要な役割を果たしていると考えられる。また *Leb* 3 と *Leb* 4 で 5'遺伝子上流に差異が見られたが、これが発現能力にどの様な違いをもたらすのかも非常に興味深い問題である。

第2節　レボシン遺伝子の発現様式

本節では第1節で見つかったレボシン3遺伝子及び4遺伝子について、その遺伝子の発現様式をノーザンブロッティング、そしてRT-PCRを用いて検討した。

材料及び方法

1.　供試昆虫

カイコ (東海×芙蓉) を人工飼料 (日本農産工) によって25℃で飼育し、5齢3日の幼虫を用いた。

2.　ノーザンブロッティングでの解析

レボシン3遺伝子及び4遺伝子それぞれに特異的なプローブを作製するために、テンプレートをそれぞれのファージDNAとし、PCR DIG labeling mixを用い、DIG-conjugated dUTPをPCR産物に取り込ませた。結果レボシン3遺伝子は+1181～+1706、レボシン4遺伝子は+653～+1178の断片からなる526bpのプローブを作製した。

LPSでの誘導は *E.coli* 0111:B4のLPS 20μgカイコに注射し、8時間後に脂肪体を摘出した。コントロールとして生理食塩水を注射したカイコからの脂肪体も摘出した。発現の特異性の検定は、誘導の時と同様にLPSで誘導し、脂肪体、血球、中腸、マルピーギ管そして絹糸腺で行った。血球以外のサンプルは摘出後直ちに-80℃で保存した。血球は、フェニルチオ尿素を少量加えた50mlコニカルチューブ (ファルコン) を氷上に立て、そこにカイコ幼虫腹脚を殺菌した注射針で刺すことによって体液を採集した。このチューブを10分間500gで遠心分離し、沈殿を生理食塩水に懸濁、1.5mlエッペンチューブに

移しもう1度10分間600gで遠心分離することによって回収した。得られた血球は同様に-80℃で保存した。

RNAの抽出にはISOGEN（ニッポンジーン）を用いた。適当量の（300～500μl）のISOGENを保存しておいたサンプルに加え懸濁した。これをヒスコトロンを用いて細胞を磨砕した後、1度5分間9,500gで遠心分離し上清を回収した。そこに全量の0.25倍量のクロロホルムを加えボルテックスで撹拌した。その後9,500gで10分間遠心分離し水層を回収した後、等量のイソプロパノールを加え撹拌し9,500gで15分間遠心分離しRNAを沈殿させた。得られた沈殿はDEPC処理した滅菌水に溶解し、ノーザンブロッティングに用いた。

定量したRNAのサンプル、7μg（LPSでの誘導）もしくは5μg（発現の組織特異性）を含む溶液に1.8倍量の変成溶液（65.6％ホルムアミド，21.3％ホルムアルデヒド，1.3×MOPS緩衝液）を加え、65℃で20分間以上加熱し熱変成させた後、氷上で急冷した。これにloading buffer（1mM EDTA pH8.0，0.25％キシレンシアノールFF，0.25％ブロモフェノールブルー，50％グリセロール）を1/5～1/10量加えノーザンブロッティングの試料とした。以降の電気泳動、メンブレンへの転写は第1章1節に準じて行った。ハイブリダイゼーションは、前節プラスミドへのサブクローニングの際に行ったサザンハイブリダイゼーションの方法に準じて行ったが、ハイブリダイゼーションの温度はプローブの特異性をあげるためプレハイブリダイゼーションと共に68℃で行った。その後前節の方法に従ってDIGの発光検出を行った。

3．RT-PCR

PCRの原理より、プライマーの3'末端の塩基が異なっていれば他の塩基配列が相補でもDNAの伸長は起こらないことを利用し、レボシン3と4の両遺伝子で3'末端の塩基が異なるようにプライマーの位置を設定した。なお、これらのプライマーによってレボシン1/2遺伝子は増幅されないことも確認した。

(1)レボシン3遺伝子

以下のプライマーを用い、レボシン3遺伝子の1228～1439番目を増幅した。

Forward primer

5'-CCCGATAACACGTACAGT-3'

Reverse primer

5'-CAACTGTATGATGTGAATG-3'

(2)レボシン4遺伝子

以下のプライマーを用い、レボシン遺伝子の700～911番目を増幅した。

Forward primer

5'-CCCGATAATACGTACAGC-3'

Reverse primer

5'-CAACTGTATGATGGGAAGA-3'

PCRを行う際のテンプレートにするため、ノーザンブロッティングで用いた組織より抽出したRNAをDeoxyribonuclease (ニッポンジーン) 処理し、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出そしてエタノール沈殿を行い、DEPC処理水に溶解した。このRNAからFirst-strand cDNA Synthesis Kitを用いてcDNAを合成し、40ngをテンプレートとして用いた。

PCRは上記のプライマー、テンプレートを用い、94℃ (1分)、58℃ (2分)、72℃ (3分) の反応を30サイクル行った。全量50μlの反応溶液のうち7.5μlを2%アガロースSゲルで電気泳動した。なおinternal markerとしてカイコアクチン遺伝子 (accession no. K00667) を利用し、5'-AGCAGGAGATGGCCACC-3' (Forward primer)、5'-TCCACATCTGCTGGAAGG-3' (Reverse primer) を作製し、レボシン遺伝子のPCRと同量のテンプレートを用い、94℃ (1分)、50℃ (2分)、72℃ (3分) の反応を25サイクル行い、電気泳動した。

結果

前節において*Leb* 3と*Leb* 4の5'上流にはNF-κB結合様配列が存在していることが明らかとなったことから、LPSによって遺伝子発現が誘導されることが予想された。そこでノーザンブロッティングを用いてLPSによる誘導性を調べた。その結果をFig. 13に示す。両遺伝子とも無処理のカイコ脂肪体では全くシグナルは検出されなかった。従って、レボシンは常在性ではないと考えられる。そしてLPSで処理したカイコ脂肪体ではどちらのプローブを用いた場合でもシグナルが検出され、これらの遺伝子はLPSの体内への侵入によって誘導されてくる特性をもっていることが確認された。なお両者の遺伝

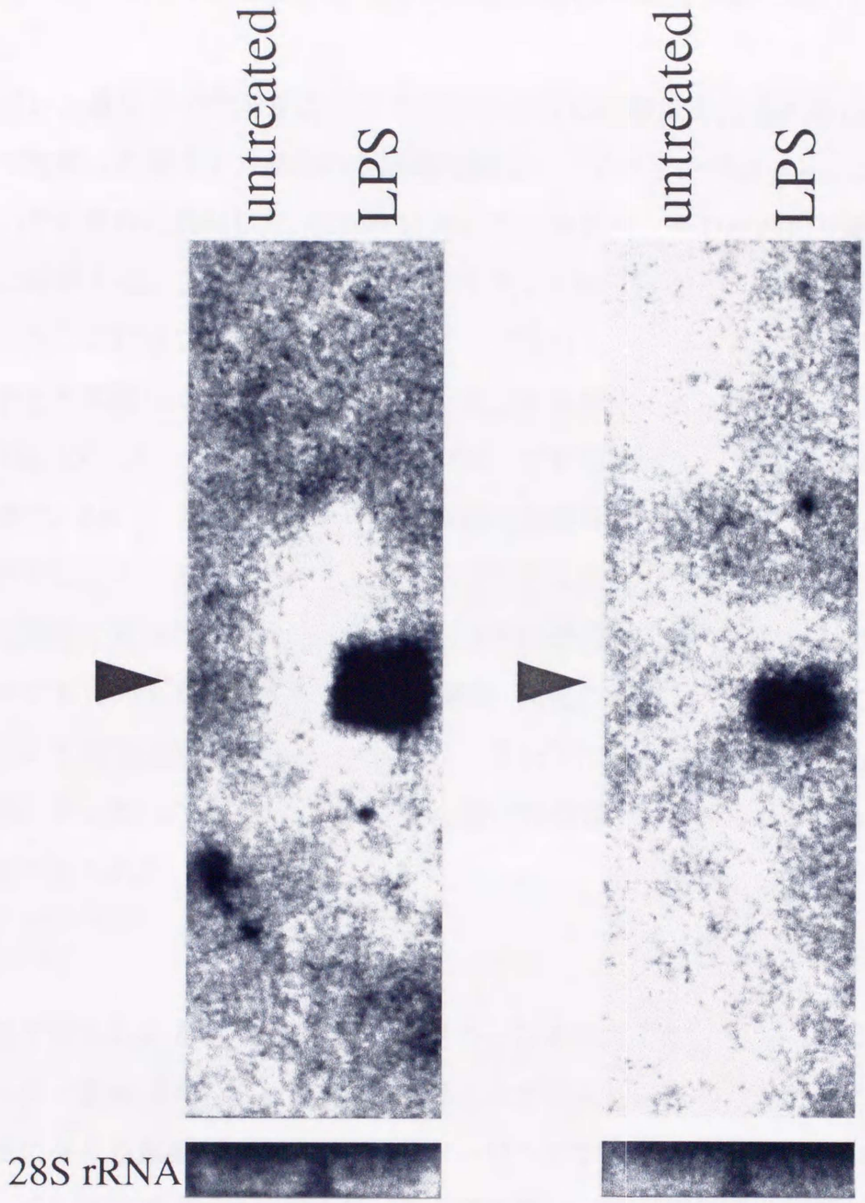


Fig.13. Inducibility of lebocin gene expression by LPS. Total RNA extracted from fat bodies were analyzed by Northern blotting. Arrowheads indicate the mRNAs hybridized to the probes denoted below. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels.

子発現の強さを比較したところ、*Leb* 3 の発現の方が *Leb* 4 に比べ強いことが明らかとなった。

レボシン遺伝子の発現がカイコの脂肪体以外の組織でも見られるかを調べるためにLPS で免疫した後カイコ幼虫の各組織を摘出し、ノーザンブロッティング及び RT-PCR を行いその発現を検討した。RT-PCR を行うにあたり、それぞれのレボシン遺伝子が特異的に増幅するようにプライマーを設計した。実際に用いたプライマーの位置を Fig. 14 に示した。これらプライマーを用いることによってレボシン 3、4 遺伝子はレボシン 1/2 遺伝子とも区別して増幅できるようにした。その結果をノーザンブロッティングとあわせて Fig. 15 に示す。A は前図と同様のプローブを用いてノーザンブロッティングを行った結果で、*Leb* 3、*Leb* 4 ともに前図と同様に脂肪体で発現が見られ、Fig. 14 同様 *Leb* 3 の発現が *Leb* 4 に比べ強かった。しかしここでは血球、中腸、マルピーギ管そして絹糸腺での発現は見られなかった。そこで、さらに遺伝子間の特異性と検出の感受性を上げるために B に示した RT-PCR を行った結果、両遺伝子とも脂肪体以外に微量ながら血球においても PCR 産物が確認され、レボシン遺伝子はこの組織においても発現していることが明らかとなった。そして脂肪体と同様に発現量も *Leb* 3 の方が *Leb* 4 より多いという結果が得られた。

考察

前節で得られた *Leb* 3 と *Leb* 4 の 2 クローンの解析より、この両遺伝子の 5' 上流のプロモーター領域は両遺伝子で違いがあることが明らかとなった。そこでこの違いが遺伝子発現に与える影響を調べるために、ノーザンブロッティング及び RT-PCR を用いて発現量、そして発現様式の比較を行った。抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導については前章をはじめ、これまでに発見され解析された様々な抗菌性ペプチド遺伝子で調べられており、細菌やその細胞壁成分である LPS やペプチドグリカンで発現が誘導されるものが非常に多いことが知られている。レボシン遺伝子についても前章でレボシン 1/2 をコードする cDNA よりプローブを合成し実験を行ったところ、セクロピン B やアタシン等、他の抗菌性ペプチド遺伝子と同様に LPS やリピド A によって発現が誘導されることが明らかになっている。

```
Leb 3      TCAACATGTACAAGTTTTTAGTATTCAGTTCAGTTCTGGTGCTGTTCTTTGCTCAGGCT  1177
Leb 4      TCAACATGTACAAGTTTTTAGTATTCAGTTCAGTTCTGGTGCTCTTCTTTGCTCAGGCT   649
Leb 1/2    TCAACATGTACAAGTTTTTAGTATTCAGTTCAGTTCTGGTGCTGTTCTTTGCTCAGGCT    54

TCGTGCCAGAGGTTCATCCAGCCGACCTTCAGGCCACCGCCAACACAGCGCCCGATAACACGTACAGTGC  1247
TCGTGCCAGAGGTTCATCCAGCCGACCTACAGGCCACCACCGACACGGCGCCCGATAATACGTACAGCGC   719
TCGTGCCAGAGGTTCATCCAGCCGACCTTCAGGCCACCGCCAACACAGCGTCCGATAATACGTACAGCGC   124
                                                  ******************

GACAAGCTGGCCAGGAACCGCTATGGCTGTATCAAGGTGACAATGTTCCTCGTGCGCCAAGTACCGCAGA  1317
GACAAGCTGGCCAGGAACCGCTATGGCTGTATCAAGGTGACAATATTCCTCGTGCGCCGAGTACTGCAGA   789
GACAAGCTGGCCAGGAACCGCTATGGCTGTATCAAGGTGACAATGTTCCTCGTGCGCCAAGTACTGCAGA   194

CCATCCGATTCTTCCTTCGAAAATCGACGACGTGCAGCTCGATCCAAACCGAAGGTATGTTCGCAGTGTC  1387
CCATCCGATTCTTCCTTCGAAAATCGACGATGTGAAGCTCGATCCAAACAGAAGGTATGTTCGCAGTGTT   859
CCATCCGATTCTTCCTTCGAAAATCGACGACGTGCAGCTCGATCCAAACCGAAGGTATGTTCGCAGTGTC   264

ACCAATCCAGAAAATAACGAGGCGTCCATTGAA-CATTCACATCATACAGTTGATATTGGACTTGACCAG  1456
ACCAATCCAGAAAATAACGAGGCATCCATTGAATC-TTCCCATCATACAGTTGATATTGGACTTGACCGG   928
ACTAATCCAGAAAATAACGAGGCGTCCATTGAA-CATTCACATCATACAGTTGATACTGGACTTGACCAG   333
                                  ********************

CCGATCGAGAGCCACCGTAACACAAGGGACCTGCGGTTTTTGTACCCTCGAGGGAAACTGCCTGTTCCAA  1526
CCGATCGAGAGCCACCGTAACACAAGGGACCTGCGGTTTTGGAACCCTCGAGAGAAACTGCCTCTTCCAA  1068
CCGATCGAGAGCCACCGTAACACAAGGGACCTGAGGTTTTTGTACCCTCGAGGGAAACTGCCTGTTCCAA   403

CGCTTCCTCCGTTTAACCCCAAGCCAATATATATTGATATGGGAAACCGTTACCGACGACATGCGTCGGA  1596
CGCTTCCTCCGTTTAACCCCAAGCCAATATATATTGATATGGGAAATCGTTACCGACGACATGCATCGGA  1068
CGCCTCCTCCGTTTAACCCCAAGCCAATATATATTGATATGGGAAACCGTTACCGACGACATGCGTCGGA   473
```

Fig. 14. Comparison of nucleotide sequences of *Leb* 3, 4 and 1/2. Numbers in the right margin denote the nucleotide numbers. Identical nucleotides are shadowed. Astarisks indicate the positions of forward and reverse primers, respectively. Nucleotides corresponding to 3'-end of the primers and the translation start codon (ATG) are shown by bold letters, respectively.

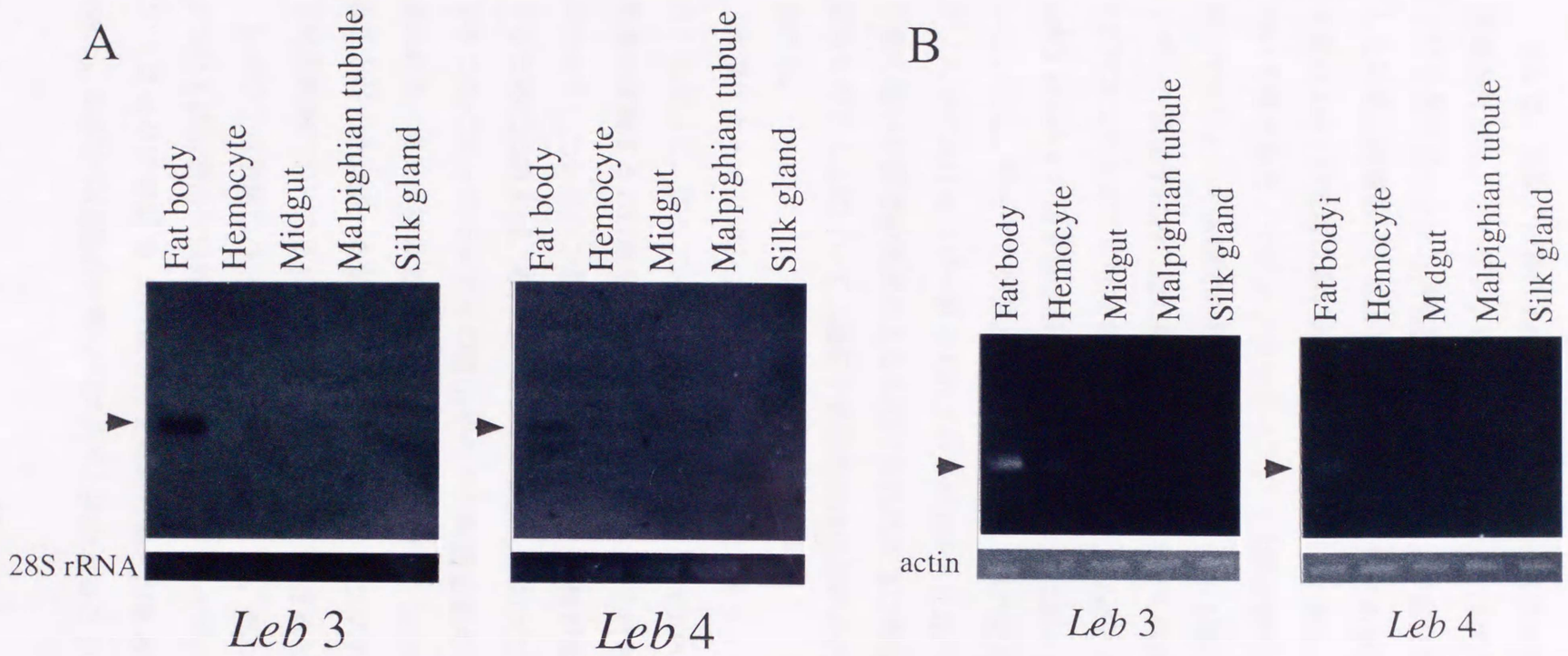


Fig. 15. Tissue specific expression of lebocin 3 and 4 genes. The sites of lebocin gene expression were analyzed by both Northern blotting (A) and RT-PCR (B). The tissues were excised from *B. mori* larvae immunized with LPS. As an internal marker for Northern blotting, 28S rRNA is shown in lower panels (A). In addition, actin gene was used for a PCR internal marker as shown in lower panels (B). Arrowheads indicate the mRNAs hybridized to the probes denoted below (A) and PCR products amplified by specific primers for two lebocin genes (B).

そこで、本節では特に *Leb* 3 と *Leb* 4 の発現量に差があるかという点に焦点を当てて実験を行った。ノーザンブロッティングにおいてはプローブの特異性をあげるためにハイブリダイゼーションの温度を通常よりも高く設定した。LPS での誘導性について検討した結果、両遺伝子ともに LPS に対して誘導性であることが確認できた。そして *Leb* 3 に比べ *Leb* 4 の発現は弱いという結果が得られた (Fig. 13)。また、発現の組織特異性について調べるとノーザンブロッティングでは脂肪体での発現しか検出できなかったが RT-PCR によって血球での発現も検出できた (Fig. 14)。前章での結果も含め考察すると、レボシン遺伝子は特に脂肪体で多く発現し血球でも発現していると結論できる。そして RT-PCR での血球での発現を見ても *Leb* 3 に比べ *Leb* 4 の発現量は少ないことから、この *Leb* 3 と *Leb* 4 の発現量は脂肪体においても血球においても、*Leb* 3 の転写活性の方が強いといえる。そしてこの差は前節での 5' 上流領域の配列の違いに起因するか、もしくはゲノム中におけるコピー数が *Leb* 3 の方が *Leb* 4 に比べ多いことが考えられる。この発現量の違いが前者の原因によるものであれば非常に興味深い対象であり、転写因子等の研究を行うことによって、遺伝子発現誘導機構解明のための貴重なサンプルになると思われる。

本章によってレボシンはカイコにおいて遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった。従ってノーザンブロッティングや RT-PCR によって *Leb* 3 と *Leb* 4 の発現量の比較するのは厳密ではない可能性もある。これらの方法では、他の非常に高い相同性をもったレボシン遺伝子を拾ってしまう可能性があるためである。この問題を解決するためには例えば、それぞれのレボシン遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子をつなぐことによってその遺伝子のみの動態を追えるようにしなければならないと思われる。また今回のスクリーニングでは、レボシン 1/2 をコードするゲノム DNA を得ることができなかったが、この遺伝子をクローニングすることができればレボシン遺伝子発現機構についてさらに理解を深めることができると思われる。

レボシンは抗菌性ペプチドとして発見されたが、その抗菌活性は弱いため生理条件下においては抗菌活性以外に別の役割を担っているペプチドである可能性がある。レボシン 3 はセクロピン D の抗菌活性を強める働きがあることから (Hara and Yamakawa, 1995c), レボシンは他の抗菌性ペプチドと共力することによって生体防御に貢献してい

るのかも知れない。またレボシン遺伝子はどれも全て成熟ペプチドの前後に前駆体を形成するペプチド鎖をもっていた。これらのペプチドが何らかの機能を有しているペプチドである可能性もあるが、これに関する知見は今のところ得られていない。遺伝子プロモーター領域には、抗菌性ペプチドとして機能していると予想できる共通配列があり、その遺伝子発現様式も抗菌性ペプチドとして機能しているであろう特性をもっていた。従って、少なくとも細菌の侵入に対する生体防御に関わっていることはおそらく間違いないと思われるが、抗菌活性以外の機能という点に関しては今後の研究課題である。

第 3 章　カイコ抗菌性ペプチドモリシンの遺伝子解析

免疫したカイコ幼虫体液より黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を指標として抗菌性ペプチドの探索を行った結果、42 アミノ酸残基からなる高塩基性のペプチドが単離された (Hara and Yamakawa, 1995b)。モリシンと命名されたこの抗菌性ペプチドは、現在までに見つかっているものとは全く相同性が見られない新規の抗菌性ペプチドである。そしてこのモリシンは、グラム陽性、陰性両細菌に非常に強い抗菌活性をもつこと、その作用部位は細菌の膜でありその膜に穴を開けることが示されている。

これまでに人工的にモリシン遺伝子を設計しそれを大腸菌で発現させた系が既に報告されており (Hara and Yamakawa, 1996)、これによって得られた組み換えモリシンは天然由来のモリシンと同じ生物活性をもつことが明らかにされている。また組み換えモリシンはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対して成長抑制効果があることが報告されており (Hara *et al.*, 1996)、医学面の応用についても強い関心を集めている。

現在カイコから単離された抗菌性ペプチドについては cDNA のクローニング及びその遺伝子発現の特性について調べられ明らかにされている。そして前章においてレボシン遺伝子についてゲノム解析を行い結果、遺伝子のプロモーター領域に免疫系に関与する NF-κB 結合様配列や IL-6 応答配列といった抗菌性ペプチド遺伝子に共通に見られる配列が存在することが明らかになった。そこでモリシン遺伝子についても同様の解析を行うことによって、カイコの生体防御機構についてより詳細に考察することができると思われる。特にモリシンは他の昆虫種においても類似の抗菌性ペプチドは見られないことから、これまでにない新しい知見が得られる可能性がある。そこで本章では、カイコ cDNA ライブラリーからモリシン cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した (第 1 節)。さらにこのモリシン遺伝子の発現様式について検討した (第 2 節)。そして第 3 節ではモリシンをコードするゲノム DNA のクローニングと解析を行い、これまでの知見と比較し検討した。

第1節　モリシン cDNA のクローニングと塩基配列の決定

モリシン遺伝子の発現誘導機構を明らかにするために、まずカイコ cDNA ライブラリーからモリシン cDNA のクローニングを行い、塩基配列を決定した。

材料及び方法

1.　カイコ cDNA ライブラリー

カイコ cDNA ライブラリーは、農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所生体防御研究室元非常勤職員 楊峻博士により供与されたものを用いた。これは大腸菌を注射し免疫したカイコ（東海×朝日）幼虫の脂肪体から抽出した mRNA より cDNA を合成し、λgt10 ファージベクターに挿入することによって作製したものである。

2.　モリシン cDNA のスクリーニング

モリシンは既にアミノ酸配列が決定されているので、その配列より下記のプライマーを設計し、PCR を用いて増幅を試みた。Forward primer は Ala-1～Ala-7 より、Reverse primer は Lys-36～His-42 より作製した。なお両プライマー共に 5'末端に *Eco*R Ⅰ部位を付加した。

Forward primer

5'-CGGAATTCGC(G/A/T/C)AA(G/A)AT(A/T/C)CC(G/A/T/C)AT(A/T/C)AA(G/A)GC-3'

Reverse primer

5'-CGGAATTCCA(G/A)TG(T/C)TT(G/A/T/C)C(G/T)(T/C)TT(T/C)TT(G/A/T/C)GG(T/C)TT-3'

これらのプライマーと、テンプレートとして第2章1節で作製したカイコ幼虫脂肪体由来 cDNA を用いて PCR を行った。反応は 94℃1 分間の後、94℃（30 秒）、50℃（30 秒）、72℃（3 分）を 25 サイクル行った。この結果得られた 130bp の PCR 産物を T-vector (Original TA Cloning Kit, Invitrogen) にサブクローニングし、第2章の方法に従い塩基配列を決定した。

シークエンスの結果、PCR 産物がモリシンをコードしていることが確認できたため、さらに前回よりも内側で下記のプライマーを作製し、前回の PCR 産物をテンプレートに

94℃1 分間の後、94℃ (30 秒)、50℃ (30 秒)、72℃ (3 分)の PCR を 25 サイクル行った。なお、Forward primer は Pro-4～Val-11、Reverse primer は Phe-34～Arg-40 に相当する部位で作製した。

Forward primer

5'-CGATAAAGGCCATTAAGACTG-3'

Reverse primer

5'-TCGTTTCTTAGGCTTCAAGAA-3'

ここで得られた 110bp の PCR 産物も同様に T-vector にサブクローニングし、塩基配列を決定した。そしてモリシンをコードしていることを確認した後、PCR DIG labeling mix を用い DIG-conjugated dUTP を PCR 産物に取り込ませ、スクリーニングに用いるプローブとした。

メンブレンの作製法は第 2 章第 2 節にほぼ準じて行った。宿主大腸菌に NM514 を用い、1×10^5個分のプラークを Gene Screen Plus メンブレンに転写した。転写は培地の上にメンブレンを 1 分間密着させることによって行い、この後メンブレンを変成、中和した。ハイブリダイゼーション以降は第 2 章 4 と同様の方法で行った。上記で作製したメンブレンをハイブリダイゼーション溶液で 50℃、1 時間以上プレハイブリダイゼーションを行った後、熱処理後急冷したプローブを加えた。50℃で 1 晩ハイブリダイゼーションを行い、その後 DIG の発光検出を行った。このスクリーニングで得られた陽性プラークを SM 溶液 500μl に懸濁し 25μl のクロロホルムを加えボルテックスで撹拌した。これを数時間室温に放置後、遠心して得た上清を 2 次スクリーニングに用いるファージ溶液とした。1 次スクリーニングと同様にメンブレンを作製し、ハイブリダイゼーションを行い、10 個の単一の陽性プラークを得た。

3. ファージ DNA の精製及びプラスミドへのサブクローニング

スクリーニングによって得られたファージ DNA を解析するためにプラスミドベクターへのサブクローニングを行った。ファージ DNA の精製は第 2 章と同様に QIAGEN Lambda Midi Kit を用いて行った。精製した DNA を *Eco*R Ⅰ処理によって切り出し、アガロース S 電気泳動をすることによってインサート DNA のサイズを確認した。その結果、比較的サイズの大きかった 4 つのクローンのインサート DNA のサブクローニングを行

った。サブクローニングも第2章を参考に*Eco*R Ⅰ部位をBAP処理したプラスミドベクター (pBluescript Ⅱ SK (+) phagemid) にライゲーションした。大腸菌にトランスフォーメーションし、白色コロニーよりプラスミドDNAの抽出後、インサートDNAを調べた。結果インサートDNAの確認されたプラスミドについて、塩基配列を決定した。

結果

モリシンcDNAクローンをスクリーニングするためのプローブを作製するために、モリシンのアミノ酸配列を参考にして混合プライマーを作製した。モリシン成熟ペプチドの配列とそこからデザインした混合プライマーの配列をFig. 16に示す。このプライマーを用いRT-PCRを行い、さらに内側にプライマーを作製しもう一度PCRをすることによってモリシンをコードした110bpのDNA断片を得た。これをプローブとしcDNAライブラリーから、モリシン全長を含むcDNAのスクリーニングをした結果、1×10^5プラークより10個の陽性プラークが得られた。そのうちモリシンcDNAの全長を含むと思われる長いインサートDNAの入った4クローンについて解析を行った結果、2種類のモリシンクローンが得られた (Fig. 17A, B)。この2種類はともに66残基のアミノ酸をコードしたオープンリーディングフレームをもち、両方ともに成熟ペプチドのモリシンをコードしていた。よってこれらcDNAをそれぞれ*Mor* 1と*Mor* 2と命名した。両者における塩基配列の相同性は97.2%と非常に高く、アミノ酸配列の比較では翻訳開始点のメチオニンから6個目のアミノ酸残基が*Mor* 1ではPhr-6であるのに対し、*Mor* 2ではLys-6となっている部分以外は全く等しかった(Fig. 17C)。そして3'末端側の非翻訳領域には両モリシンcDNAともにポリA付加シグナル (AATAAA)をもっていた。この両モリシンに関し親水性・疎水性のアミノ酸配列を調べた結果 (Fig. 18)、成熟ペプチドの前部には疎水性のアミノ酸残基が並んでおり、これがシグナルペプチドであることが予想できた。また6残基目のアミノ酸が異なった結果、その領域ではモリシン2の方が若干疎水性となったが大きな変化は認められなかった。

A

```
1                   6                   11                  16                  21
A   K   I   P   I   K   A   I   K   T   V   G   K   A   V   G   K   G   L   R   A   I   N

GCT AAA ATT CCT ATT AAA GCT ATT AAA ACT GTT GGT AAA GCT GTT GGT AAA GGT TTA CGT GCT ATT AAT
GCC AAG ATC CCC ATC AAG GCC ATC AAG ACC GTC GGC AAG GCC GTC GGC AAG GGC TTG CGC GCC ATC AAC
GCA     ATA CCA ATA     GCA ATA     ACA GTA GGA     GCA GTA GGA     GGA CTT CGA GCA ATA
GCG         CCG         GCG         ACG GTG GGG     GCG GTG GGG     GGG CTC CGG GCG
                                                                        CTA AGA
                                                                        CTG AGG

        24                  31                  36                  41
I   A   S   T   A   N   D   V   F   N   F   L   K   P   K   K   R   K   H

ATT GCT TCT ACT GCT AAT GAT GTT TTT AAT TTT TTA AAA CCT AAA AAA CGT AAA CAT
ATC GCC TCC ACC GCC AAC GAC GTC TTC AAC TTC TTG AAG CCC AAG AAG CGC AAG CAC
ATA GCA TCA ACA GCA         GTA             CTT     CCA         CGA
    GCG TCG ACG GCG         GTG             CTC     CCG         CGG
        AGT                                 CTA                 AGA
        AGC                                 CTG                 AGG
```

B

Forward primer

5'-CGGAATTCGC(G/A/T/C)AA(G/A)AT(A/T/C)CC(G/A/T/C)AT(A/T/C)AA(G/A)GC-3'

Reverse primer

5'-CGGAATTCCA(G/A)TG(T/C)TT(G/A/T/C)C(G/T)(T/C)TT(T/C)TT(G/A/T/C)GG(T/C)TT-3'

Fig. 16. Strategy for the synthesis of primers to amprify a moricin cDNA fragment. A. Translation of amino acid sequence of moricin mature peptide into nucleotides. Shadowed regions indicate nucleotides used for degenarate primers. B. Degenerate primers for PCR.

A

```
GCAAAAACAGTAAACCGCGCAGTTATTTAAAACATGAATATTTTAAAATTTTTCTTTGTT   60
                                   M  N  I  L  K  F  F  F  V
TTTATTGTGGCAATGTCTCTGGTGTCATGTAGTACAGCCGCTCCAGCAAAAATACCTATC  120
 F  I  V  A  M  S  L  V  S  C  S  T  A  A  P  A  K  I  P  I
AAGGCCATTAAGACTGTAGGAAAGGCAGTCGGTAAAGGTCTAAGAGCCATCAATATCGCC  180
 K  A  I  K  T  V  G  K  A  V  G  K  G  L  R  A  I  N  I  A
AGTACAGCCAACGATGTTTTCAATTTCTTGAAACCGAAGAAAAGAAAGCATTAACAAAAG  240
 S  T  A  N  D  V  F  N  F  L  K  P  K  K  R  K  H ***
AAATTGAGTGAATGGTATTAGATATATTACTAAAGGATCGATCACAATGATATATAGATA  300
GGTCATAAGATGTCAACGTGAATTTATGGATTTTTGTTTTACCCTGTGTAGTACTTACTT  360
ATAGTCAGTAGGTACATATATTGATTGCAACGACAACTGTGTACTATTTTTTATATTTGG  420
TTCGAAAAGTTGCATTATTAACGATTTTAGAAAATAAAACTACTTTACTTTTAC        474
```

B

```
AAACCGCGCAGTTATTTAAAATATGAATATTTTAAAACTTTTCTTTGTTTTTATTGTGGC   60
                          M  N  I  L  K  L  F  F  V  F  I  V  A
AATGTCTCTGGTGTCATGTAGTACAGCCGCTCCAGCAAAAATACCTATCAAGGCCATTAA  120
 M  S  L  V  S  C  S  T  A  A  P  A  K  I  P  I  K  A  I  K
GACTGTAGGAAAGGCAGTCGGTAAAGGTCTAAGAGCCATCAATATCGCCAGTACAGCCAA  180
 T  V  G  K  A  V  G  K  G  L  R  A  I  N  I  A  S  T  A  N
CGATGTTTTCAATTTCTTGAAACCGAAGAAAAGAAAGCATTAAGAAAAGAAATTGAGTGA  240
 D  V  F  N  F  L  K  P  K  K  R  K  H ***
ATGGTATTAGATATATTACTAAAGGATCGATCACAATGATATATAGATAGGTCATAGATG  300
TCAACGTGAATTTATGGATTTTTGTTTTCCCCTTTGTAGTACTTACTTATAGTCAGTTCT  360
TAAATTGATTGCAACGACAACTGTGTACTATTTTTTATATTTGGTTCGAAAAGTTGCATT  420
ATTAACGATTTTAGAAAATAAAACTACTTTACTTTTACACGAAAAAAAAA            470
```

C

```
moricin 1   MNILKFFFVFIVAMSLVSCSTAAPAKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIASTANDVFNFLKPKKRKH
moricin 2   MNILKLFFVFIVAMSLVSCSTAAPAKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIASTANDVFNFLKPKKRKH
```

Fig.17. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNAs encoding moricin 1 and moricin 2. The nucleotide sequences of *Mor* 1 (A) and *Mor* 2 (B) along with the deduced amino acid sequences are shown. Numbers in the right margin denote the nucleotide numbers. Mature peptide is indicated by bold letters. The translation stop codon, TAA, is depicted as three stars. The polyadenylation signal, AATAAA, is underlined. Panel C shows a comparison of deduced amino acid sequences of the two moricin genes. Different amino acids are boxed in black.

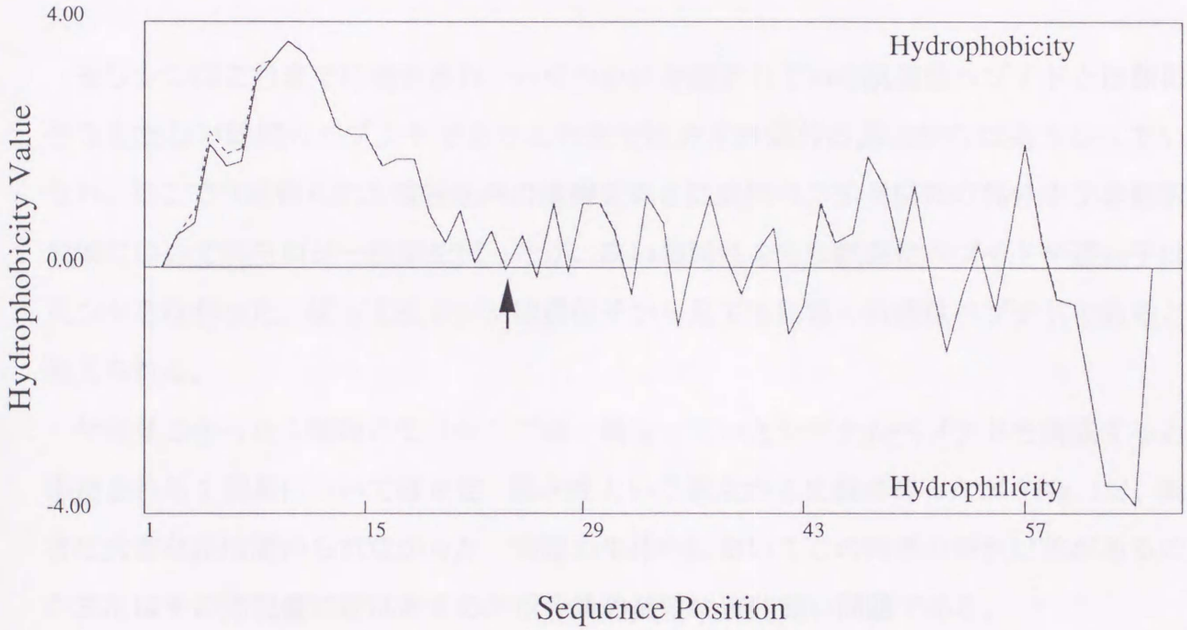


Fig. 18. Hydropathy profile of deduced amino acid sequences of moricin 1 and that of moricin 2. The distributions of hydrophobic and hydrophilic domains were analyzed by the method of Kyte and Doolittle (1982). The amino acid numbers are indicated under the horizontal line. Single line and dot line show moricin 1 and 2, respectively. An arrowhead indicates the start position of mature peptide.

考察

カイコで発見されている抗菌性ペプチドのほとんどは cDNA やゲノム DNA のクローニングが行われ塩基配列が決定されている。しかしモリシンについてはまだ遺伝子に関する情報は全く得られていない。そこで既に得られているモリシンのアミノ酸配列よりプローブを作製し、cDNA のクローニングを行った。その結果、成熟ペプチドに違いはないがシグナルペプチドと推定される領域に 1 残基だけ違いのある 2 種類のモリシン cDNA クローンが得られた。従ってこのモリシンもセクロピン B (Taniai *et al.*, 1995) や前章で解析を行ったレボシンと同様に遺伝子ファミリーを形成していることが示唆された。

モリシンはこれまでに報告され、いくつかに分類されている抗菌性ペプチドとは類似性をもたない新規のペプチドでありこれまでにカイコ以外の昆虫からは見つかっていない。そこで今回得られた塩基配列の情報をもとに成熟ペプチド以外の部分や 3'非翻訳領域についてホモロジー検索を行ったが、高い相同性をもつ抗菌性ペプチドや遺伝子は見つからなかった。従ってモリシンは遺伝子から見ても新規の抗菌性ペプチドであると考えられる。

今回見つかった 2 種類のモリシンで唯一異なっていたシグナルペプチドを構成すると推定される 1 残基について疎水性・親水性という観点から比較を行ったが (Fig. 18)、両者に大きな差は認められなかった。実際の生体内においてこの両者の特性に差があるのかまたはその発現量に差はあるのかは今後の非常に興味深い問題である。

第 2 節　モリシン遺伝子の発現様式

本節では第 1 節で見つかったモリシン 1 遺伝子及び 2 遺伝子について、その遺伝子の発現様式をノーザンブロッティング、そして RT-PCR を用いて検討した。

材料及び方法

1.　供試昆虫

カイコを人工飼料 (日本農産工) によって 25℃で飼育し、5 齢 3 日の幼虫を用いた。

カイコの系統は、誘導性の確認は日 140 号×中 145 号、組織特異性の検定は東海×芙蓉で行った。

2. ノーザンブロッティングでの解析

ノーザンブロッティングに用いたプローブとしてハイブリダイゼーションの特異性をあげるために新たに長いプローブを合成した。新しいプライマーとして、5'-TTGTGGCAATGTCTCTGGTG-3' (Forward primer, *Mor* 1 の 65～84 番目に相当, *Mor* 2 の 54～73 番目に相当)、5'-TAGTACACAGTTGTCGTTGC-3' (Reverse primer, *Mor* 1 の 387～406 番目, *Mor* 2 の 371～390 番目) を設計した。テンプレートとして第 2 章 1 節で作製したカイコ幼虫脂肪体 cDNA を用いて、94℃ (30 秒)、50℃ (30 秒)、72℃ (30 秒) の PCR を 30 サイクル行い、DIG-conjugated dUTP を PCR 産物に取り込ませた。

大腸菌は JM109 を LB 液体培地で培養後、遠心分離で集菌し生理食塩水に懸濁した。これをオートクレーブで殺菌しカイコ幼虫に 1 頭あたり 2×10^7 個注射した。LPS とリピド A の接種量は前章、前々章に従った。カイコは接種後 8 時間で解剖し脂肪体を摘出した。組織特異性の検定は前述同様に大腸菌によって免疫し、8 時間後前章の方法で各組織を摘出した。摘出した組織から前章第 2 節に準じて RNA を抽出し 7μg をサンプルとして電気泳動した。ハイブリダイゼーションは 50℃で行い、前節と同様にして DIG の発光検出をした。

3. RT-PCR

モリシン両遺伝子で Forward primer は共通、Reverse primer が 3'末端の塩基が異なるようにプライマーを設計し、*Mor* 1 は 68～358 番目、*Mor* 2 は 57～346 番目がそれぞれ特異的に増幅するようにした。

Forward primer

5'-TGGCAATGTCTCTGGTGT-3'

Reverse primer

(1) *Mor* 1

5'-GTAAGTACTACACAGGGT-3'

(2) *Mor* 2

5'-GTAAGTACTACAAAGGGG-3'

テンプレートは大腸菌、LPS そしてそれらの溶媒を注射し、8 時間後摘出した脂肪体よ

り抽出したRNAをDeoxyribonuclease処理し、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出そしてエタノール沈殿を行い、DEPC処理水に溶解した。このRNAからFirst-strand cDNA Synthesis Kitを用いてcDNAを合成した。PCRは50ngをテンプレートとして全量55μlで行った。反応は94℃8分間の後、94℃ (30秒)、55℃ (30秒)、72℃ (30秒)で27、31、35サイクルで10μlずつ回収し、電気泳動のサンプルとした。電気泳動は2%アガロースSゲルで行った。また前章と同様にinternal markerとしてカイコアクチン遺伝子を用い、モリシン遺伝子のときと同様のテンプレートでPCRを行い、電気泳動した。

結果

大腸菌によって免疫したカイコ幼虫より脂肪体、血球、中腸、マルピーギ管そして絹糸腺を摘出し、ノーザンブロッティングを行った。結果をFig. 19に示す。これよりモリシン遺伝子の発現は脂肪体が主要組織として機能し、他組織では血球やマルピーギ管でも発現していることが明らかとなった。

そこで、このモリシン遺伝子発現の主要組織である脂肪体におけるモリシン遺伝子の計時的変化を追った (Fig. 20)。大腸菌によって免疫した結果、接種後1時間で弱い発現が見られた。その発現は徐々に強まり8時間後に最大量に達し、以降48時間後においても発現の持続が観察された。

次にモリシン遺伝子が他のカイコ抗菌性ペプチド遺伝子と同様に細菌の細胞壁成分のみでも発現誘導が起こるかを検討した (Fig. 21.)。LPSやリピドAをカイコに接種し、脂肪体における遺伝子発現を観察した結果、LPSやリピドAにも大腸菌と同様にモリシン遺伝子発現を誘導する因子になり得ることが判明した。また、無処理のカイコ脂肪体と誘導因子のコントロールとして処理した生理食塩水等と比較した結果、両者ともモリシン遺伝子の発現は見られなかった。従ってこれらの遺伝子は、細菌等の接種によってはじめて発現するのであって、表皮の傷害のみでは発現が誘導されないことが明らかとなった。

前節においてモリシン遺伝子は、1と2の2種類が存在することを明らかにした。しかしノーザンブロッティングによる解析では、両者のcDNA配列の相同性が非常に高いために特異的なプローブを作製できず区別することができなかった。そこで両モリシン

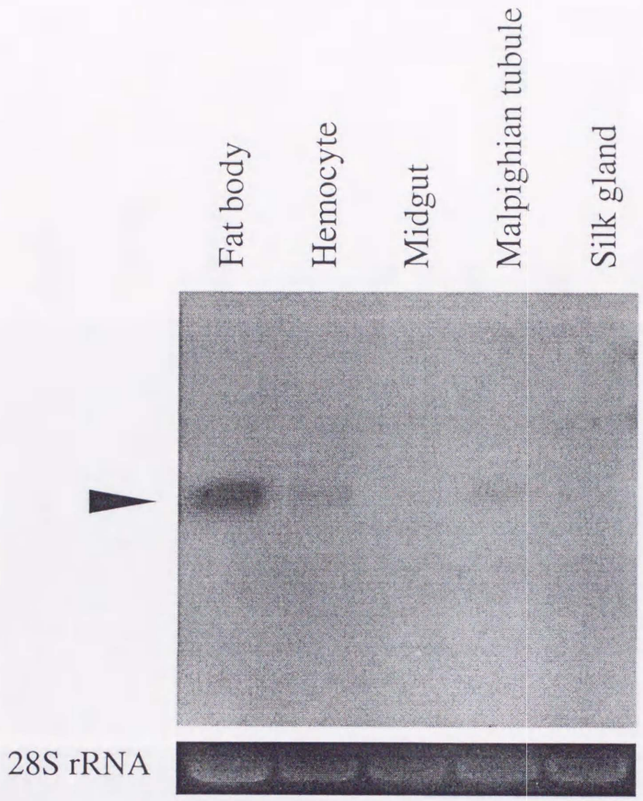


Fig. 19. Tissue specific gene expression of moricin induced by *E. coli*. Total RNA extracted from fat bodies was analyzed by Northern blotting. An arrowhead indicates the mRNAs hybridized to the probes denoted above. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels.

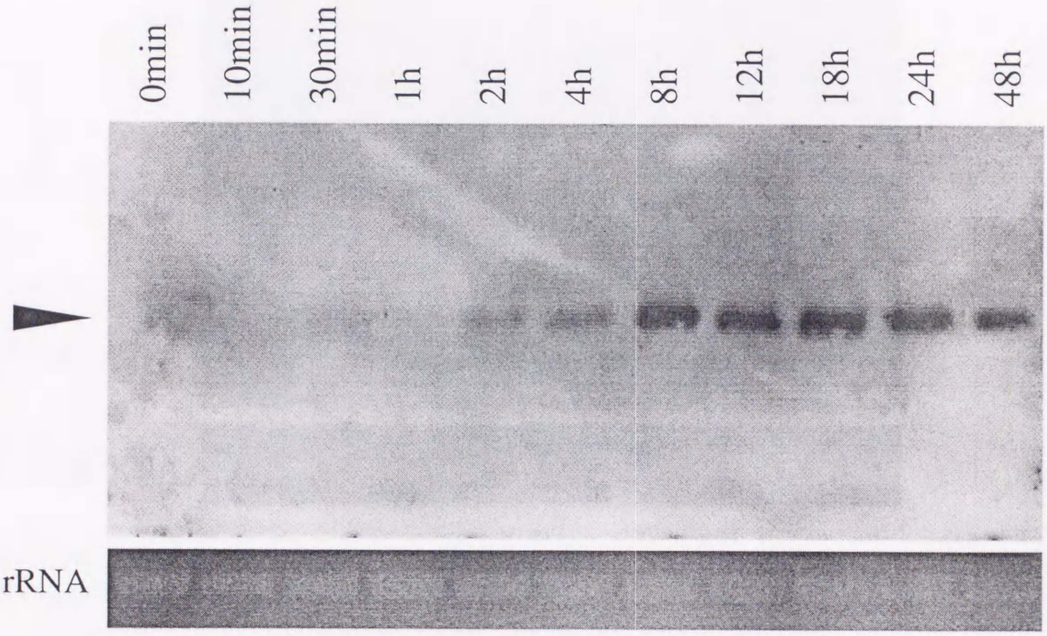


Fig. 20. Time course of accumulation of moricin gene transcripts after immunization with *E. coli*. Silkworm larvae were immunized with *E. coli* and fat bodies were excised at indicated time intervals. An arrowhead indicates the mRNAs hybridized to the probes. An internal marker, 28S rRNA is shown in lower panel.

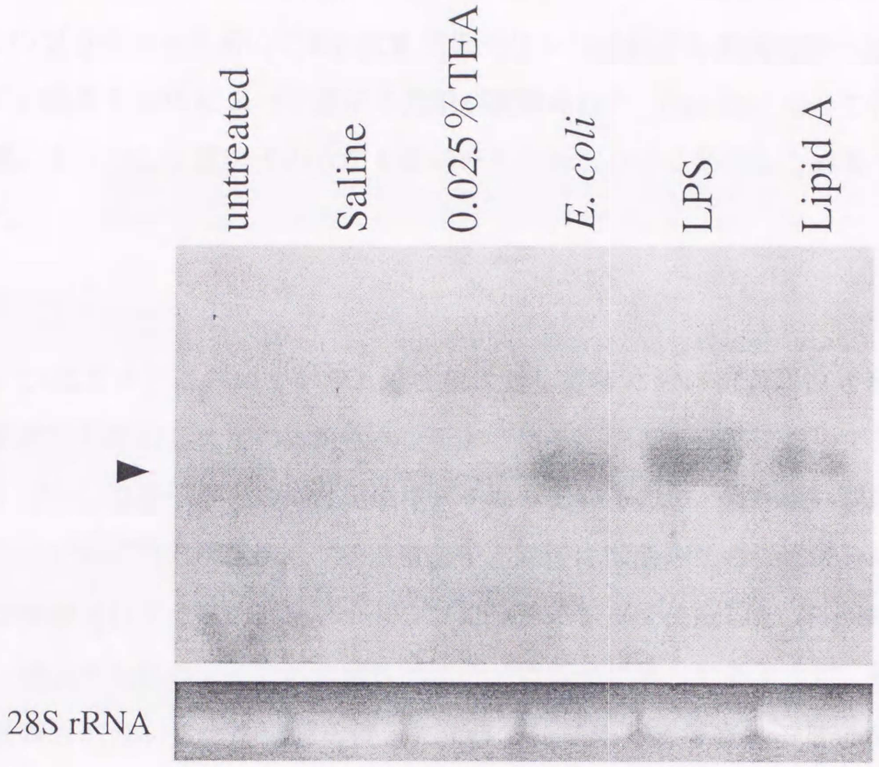


Fig. 21. Effects of LPS and lipid A from *E. coli* on the induction of moricin gene expression. Total RNA extracted from individual tissues indicated above was analyzed by Northern blotting. An arrowhead indicates the mRNAs hybridized to the probes denoted above. As an internal marker, 28S rRNA is shown in lower panels.

遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーを作製することによって、RT-PCR を行い遺伝子発現量の比較をした。モリシン cDNA と設計したプライマーの配列について Fig. 22 に示した。このプライマーを用いて RT-PCR で両モリシン遺伝子の発現を調べた結果、*Mor* 1, 2 ともに大腸菌や LPS によって遺伝子発現が誘導された (Fig. 23)。そして発現量を比較した結果、モリシン 2 遺伝子の方が 1 遺伝子よりもより多く発現していることが明らかとなった。

考察

モリシンはカイコにおいてグラム陽性菌に対して特に強い抗菌活性を示すペプチドとして単離されたはじめての抗菌性ペプチドである。そこで前節において見つかった 2 種類のモリシン遺伝子がどの様な発現様式をもっているのか、興味深い問題を提示していた。そこでまず他の抗菌性ペプチド遺伝子と同様に細菌やその構成成分によって遺伝子発現が誘導されてくるのかをノーザンブロッティングで確認した (Fig. 21)。その結果モリシン遺伝子も他のカイコの抗菌性ペプチド遺伝子に見られるように、傷害のみでは発現が誘導されないことや細菌の侵入によってはじめて誘導されることが明らかとなった。モリシンはグラム陽性菌に対してはもちろん、陰性菌に対しても強い抗菌活性をもっている。従って大腸菌や LPS 等グラム陰性菌由来の物質に対しても誘導されてくることは、カイコにとって非常に効率的な生体防御戦略であると考えられる。

抗菌性ペプチドは一般に細菌感染によって急速に合成分泌されてくる一過性の特性をもっていることが知られている。そこでモリシンについてもこの点についての検討を行った。結果よりモリシン遺伝子は細菌感染後、1 時間辺りから急速に発現が誘導され 8 時間後には最大量に達することが明らかとなった。このような誘導は大腸菌を接種したときのセクロピンB (Kato *et al.*, 1993)、アタシン (Sugiyama *et al.*, 1995) そしてレボシン (Chowdhury *et al.*, 1995) にも見られるものであり、カイコの抗菌性ペプチド遺伝子はこの点においては共通の遺伝子発現機構をもっていることが示唆された。しかし、発現の持続という観点からは LPS やペプチドグリカンを接種したときには上記の 3 種類の抗菌性ペプチド遺伝子は 26 時間で減少しているという報告がある (Taniai *et al.*, 1996)。これに関し、カイコは脂質輸送タンパク質であるリポフォリンが LPS に結合し体液中より速

```
Mor 1     AAACCGCGCAGTTATTTAAAACATGAATATTTTAAAATTTTTCTTTGTT   60
Mor 2     AAACCGCGCAGTTATTTAAAATATGAATATTTTAAAACTTTTCTTTGTT   49

TTTATTGTGGCAATGTCTCTGGTGTCATGTAGTACAGCCGCTCCAGCAAAAATACCTATC  120
TTTATTGTGGCAATGTCTCTGGTGTCATGTAGTACAGCCGCTCCAGCAAAAATACCTATC  109
      ******************

AAGGCCATTAAGACTGTAGGAAAGGCAGTCGGTAAAGGTCTAAGAGCCATCAATATCGCC  180
AAGGCCATTAAGACTGTAGGAAAGGCAGTCGGTAAAGGTCTAAGAGCCATCAATATCGCC  169

AGTACAGCCAACGATGTTTTCAATTTCTTGAAACCGAAGAAAAGAAAGCATTAACAAAAG  240
AGTACAGCCAACGATGTTTTCAATTTCTTGAAACCGAAGAAAAGAAAGCATTAAGAAAAG  229

AAATTGAGTGAATGGTATTAGATATATTACTAAAGGATCGATCACAATGATATATAGATA  300
AAATTGAGTGAATGGTATTAGATATATTACTAAAGGATCGATCACAATGATATATAGATA  289

GGTCATAAGATGTCAACGTGAATTTATGGATTTTTGTTTTACCCTGTGTAGTACTTACTT  360
GGTCAT-AGATGTCAACGTGAATTTATGGATTTTTGTTTTCCCCTTTGTAGTACTTACTT  348
                                        ******************

ATAGTCAGTAGGTACATATATTGATTGCAACGACAACTGTGTACTATTTTTTATATTTGG  420
ATAGTCAGT---T-CTTAAATTGATTGCAACGACAACTGTGTACTATTTTTTATATTTGG  404

TTCGAAAAGTTGCATTATTAACGATTTTAGAAAATAAAACTACTTTACTTTT--AC----  474
TTCGAAAAGTTGCATTATTAACGATTTTAGAAAATAAAACTACTTTACTTTTACACGAAA  464
```

Fig. 22. Comparison of nucleotide sequences of *Mor* 1 and *Mor* 2. Numbers in the right margin denote the nucleotide numbers. Identical nucleotides are shadowed. Astarisks indicate the positions of forward and reverse primers, respectively. Nucleotides corresponding to the translation start codon (ATG) and the 3'-end of the reverse primer are shown by bold letters.

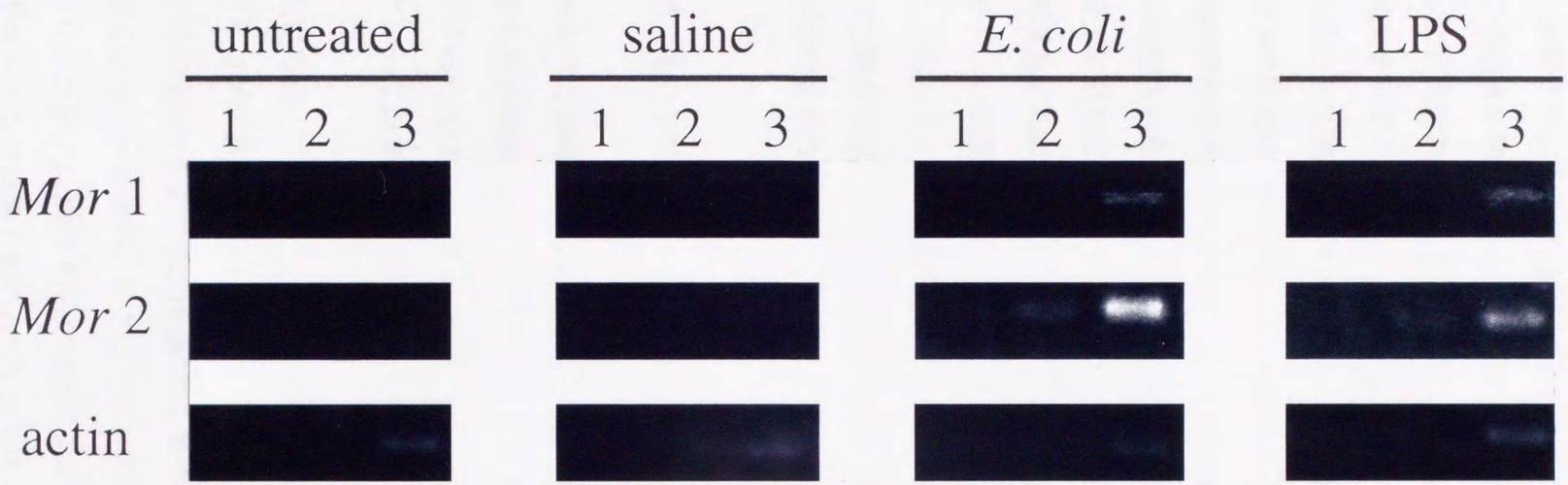


Fig. 23. Comparison of the degree of two moricin gene expression. RT-PCR was performed using specific primers to distinguish two moricin gene transcripts. Lanes indicate the number of PCR cycles. Lane 1: 27 cycles. Lane 2: 31cycles. Lane 3: 35 cycles. Actin gene transcripts were used for PCR internal marker as shown in lower panels.

やかに排除されることが知られ (Kato *et al.*, 1994)、抗菌性ペプチド遺伝子の発現量減少にはこの機構が関連していると思われている。今回の実験ではモリシンについてLPSを接種したときの計時的発現については確認しなかったが、おそらく他のペプチドと同じ様な傾向を示すのではないかと思われる。

第1章そして第2章での抗菌性ペプチド遺伝子の発現解析によってこれらの遺伝子の発現は主に脂肪体と血球において見られることが明らかとなっている。モリシン遺伝子の組織特異的発現を調べた結果、他の抗菌性ペプチド遺伝子と同様に脂肪体と血球での発現が確認された。またマルピーギ管でも発現していることが明らかとなった。マルピーギ管での発現は第1章においてレボシン遺伝子で唯一確認されている。脂肪体と血球での発現量の比較から脂肪体での発現が多いという観点から、モリシン遺伝子の発現様式はカイコの抗菌性ペプチド遺伝子の中では特にレボシン遺伝子に類似していると思われた。従って、この両抗菌性ペプチド遺伝子はその抗菌活性のスペクトルや活性の強さという観点では大きく異なっているが、遺伝子発現誘導機構は非常に類似している可能性が示唆された。

第3節　モリシンゲノムDNAのクローニングと塩基配列の決定

前節までの解析でモリシン遺伝子も他のカイコ抗菌性ペプチド遺伝子、特にレボシンと類似した発現様式をもつことが明らかとなった。そこで本節ではモリシンゲノムDNAを解析するためにカイコゲノムDNAライブラリーよりモリシン遺伝子をコードする領域をクローニングし、その塩基配列を決定した。

材料及び方法

1. カイコゲノムDNAライブラリー

ゲノムDNAライブラリーは、前章で用いたカイコ（東海×朝日）メス幼虫の脂肪体由来のライブラリーを用い、スクリーニングを行った。

2. モリシンゲノムDNAのスクリーニング

スクリーニングは第1節のcDNAのスクリーニングの方法に準じて行った。またスク

リーニングに用いたプローブは、第2節のノーザンブロッティングの際に作製したものを用いた。

ゲノムDNAライブラリーを宿主大腸菌にNM514を用いて培地にまき、メンブレンを作製した。ハイブリダイゼーションは50℃で行い、1次スクリーニングの結果 6×10^4 プラークから2個の陽性プラークを得た。これを2次スクリーニングを行うことによって純化した。

ファージDNAの精製はQIAGEN Lambda Midi Kitを用いて行い、プラスミドにサブクローニングするために適当なDNA断片を得るために、ファージDNAを制限酵素処理した。DNAを*Apa* Ⅰ, *Eco*R Ⅰ, *Hin*d Ⅲ, *Sal* Ⅰもしくは *Hin*d Ⅲ＋*Sal* Ⅰで処理し、泳動、メンブレンを作製後、スクリーニングに用いたものと同様のプローブでサザンハイブリダイゼーションを行った結果、両クローンは同じ領域をコードしていることが判明した。そして、*Hin*d Ⅲ＋*Sal* Ⅰによって得られた約5.7kbpの断片をマルチクローニングサイトの*Hin*d Ⅲと*Sal* Ⅰ部位で切断したプラスミドベクター (pBluescript Ⅱ SK (+) phagemid) にライゲーションした。

大腸菌にトランスフォーメーションした後、DNA断片の入ったプラスミドについて塩基配列決定を行った。塩基配列決定はまずプライマーを作製する際に用いたプライマーを用いて行い、さらに得られた情報よりプライマーを合成しモリシン遺伝子をコードする領域を含む領域について塩基配列を決定した。得られた塩基配列はコンピューターソフト (GENETYX Ver. 9.0) で編集及び解析を行った。

結果

スクリーニングによって得られたファージクローンを*Hin*d Ⅲ＋*Sal* Ⅰで切断し、プラスミドベクターにサブクローニングを行った。そして、モリシンをコードしている領域に着いてシークエンスをした結果をFig. 23に示す。このシークエンスよりモリシンをコードしたオープンリーディングフレームを含む2,462bpについて塩基配列が得られた。モリシンcDNAの配列を参考にアミノ酸配列に翻訳した結果、このクローンは*Mor* 2をコードしていることが明らかとなった。そして、Val-39とGly-40の間に883bpのイントロンが存在していることが明らかになった。イントロン内の一番最初の2塩基 (GT) と

AGTATTAAATTTTAATATATCTCGTCGATTACTACCGTGAAGATGCAATGCGTATCGATT 60

CAGAATATCGGTTATATTTTAGTTAAAATTTAGATCTCGTATGCAAATATCGGTGGTCGC 120

TCTCATGTCTGTGATTTTTATGATTTCACTTGTATCCACTTGTGGGTAACTGGTTGTTCA 180

TGAGCTCGCTAGTGGGTCATGAGCTTTTCGACTCAGGAAATTAAACAAATAAACAATAGC 240

AATCTATGTACGCTACGCCAACAATAACAACAAGTCTGCTCCTGTACTAACTTTAGATAG 300

GGAGGCATTACAAAATAGAGATATATTATTATCATATAGGCTATTTCGTCCTAAAAGCAA 360

ATATTCGATTGGCACACAAATTATTGTCTGTCGCACATGCTAAAATTCTGTTTAAATATA 420

ACCTGCTAATTGTGCTCTATATTACTGATAAACATATTGTAAATAATTCTCAGTCTGCAG 480

TGAGTGGAAATCTTACGAAATCCACTTAATAGCGATAACTGATATCACATCGTTGCGTTG 540

TTCTAATGTTTACCCGGTATAATTTATTTCTTGATTTTAATGAATATAACCGATCTATAA 600

GTATCAAATAAGCAAAAACAATTCTATTCATTATTTCTCGCAGTTCACAAACATCTAACC 660

TGCACTTCATTTCACGTATAAACAATTATTCATTTAAGATTTTGCACTCGACCGATAACA 720

TTATTTTTTATGAGGATTAACCTCTTAAAAGATGAAGTACTTATCTGTTTTATCTTTTAC 780

GATGTTATGACGTTCACAAGAATACACACATATTTAAACAAACTTGTGATGATGACCCAA 840

CCGTTCATTGGGATTCAGTAAAGTCCCGGAGTTACA**TATAAAA**CGATTGGTAACGGCGGA 900

ATCAATTCATTGTGTTCTAAAAATTTGCAAAAACAGTAAACCGCGCAGTTATTTAAAATA 960

TGAATATTTTAAAACTTTTCTTTGTTTTTATTGTGGCAATGTCTCTGGTGTCATGTAGTA 1020
M N I L K L F F V F I V A M S L V S C S

CAGCCGCTCCAGCAAAAATACCTATCAAGGCCATTAAGACTGTAGGAAAGGCAGTCGTAA 1080
T A A P **A K I P I K A I K T V G K A V**

GTAAAAATAAATTTATCTAGAAATATATTTAATTCATTTTCTCAATAATATACTTTTTTC 1140

TTTATTTCGGTTGATTTTCTGGAACAAAATATGCTTGCCTTAATACAGGCTATTTGTTAT 1200

GATTTTTGTGTTTCAGTGAACAGTATCGAAATGCATATGTTATATATGTATAATAAAAAA 1260

AAATTGTGCATAGTTGTATATGTAATTGTTGGTAACGTGAAAGCACTAATGGTTTGAAAA 1320

ATATGAGAATATTTTAGATTACTTAATTGCGTAATGGTTAGCATCTCACCTGAGTCTTAA 1380

TGGATGTAATGGAGGTTTAAATAAGGTGAACTACACCAGAAAAAAAACGTATACTGTACT 1440

TAAAATTCAAGTTTTGAGGAAATTTTCCAGTATAAAATTTTAATATGATACAGACTTTTT 1500

AAAATTGCATTTGTAGGCAGACGAGCATACGGTCTACCTGATGGTAAGTGGTTACCGTCG 1560

CTCATGGACGTCAGCAATGCCAGGGGCAGAGCCAAGCCGCTGCCTACAACTGTCTATTAC 1620

TCTTCGACGTTTATAGTTTTCGTAAGCGTGGACAATTAATCATAAAGCCTCCTCCTCCTT 1680

CCTTGCGTCTTATTCCTCACTGCTGAGGGTAGTGACCACCCCTTTGTATCACGTTCGCAC 1740

GCACCATCTTTCTCCATCTATTCTTGTCTCTGGCGGTGTGGAGAGCGTTGTGAAATGTGG 1800

AATCAAGAGCGGTGCGGATCTGGTCGGACTAACGTATTGGGCTGCGCCCCCGAGGACTTT 1860

TTCCATCTACCTTACCAGTCATGATGAGCCTCTCGAGATTGCTACCATCCTTATATAGTC 1920

GTTCCAAGAAATTATATATTAATATGTTTTTTTTTTCAGGGTAAAGGTCTAAGAGCCATC 1980
G K G L R A I

AATATCGCCAGTACAGCCAACGATGTTTTCAATTTCTTGAAACCGAAGAAAAGAAAGCAT 2040
N I A S T A N D V F N F L K P K K R K H

TAAGAAAAGAAATTGAGTGAATGGTATTAGATATATTACTAAAGGATCGATCACAATGAT 2100
***

ATATAGATAGGTCATAGATGTCAACGTGAATTTATGGATTTTTGTTTTCCCCTTTGTAGT 2160

ACTTACTTATAGTCAGTTCTTAAATTGATTGCAACGACAACTGTGTACTATTTTTTATAT 2220

TTGGTTCGAAAAGTTGCATTATTAACGATTTTAGAA**AATAAA**ACTACTTTACTTTTACAC 2280

```
GATGTGTTTGTTTTGAATTGAAATCTTAAATATGAAAGAATAATTTCGTAAATTTACATT  2340
TTTATGGATTCCTTGTCATTCGATTTTCTTGTTTACCTGTGAACTTTTATTGTAAGCTTT  2400
GTGCTCAGTAGTAGTGACATACCTTATATTTTATACTTTGTACCTACCCGTTTTACGAAA  2460
AT                                                            2462
```

Fig. 23. Nucleotide sequences of a genomic clone encoding moricin 2 . The nucleotide sequences of the clone along with the deduced amino acid sequences are shown. The nucleotide numbers are indicated in the right margin of the panel. TATA box and polyadenylation signal (AATAAA) is shown by bold italic letters. Putative NF-κB responsive element indicated by a double underline. NF-IL6 responsive element is shown by a single underline. Stars denote the translation stop codon. Amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is expressed by a single letter and mature peptides are shown in bold letters.

最後の 2 塩基（AG）は真核生物で普遍的に見られる配列であり（Padgett *et al.*, 1986）、モリシン遺伝子でもこの配列は保存されていた。また、5' 上流域の配列も決定し検討したところ、翻訳開始点の上流に TATA-box、そして NF-κB 結合様配列が 2 個、NF-IL6 結合様配列が 1 個見つかった。しかし、レボシン遺伝子で見られたよう CAAT-box や、NF-κB 結合様配列の近傍で機能するといわれる GATA モチーフは認められなかった。

考察

抗菌性ペプチドのうち、どのグループにも属さない新規のモリシンのゲノム DNA についての情報を得るためにライブラリーからのスクリーニングを行った結果、モリシン 2 をコードするクローンを得ることができた。しかし、モリシン 1 をコードする領域の遺伝子については今回はクローニングできなかった。前節の結果から、この両モリシン遺伝子はシグナルペプチドに相当すると思われる 1 アミノ酸残基以外は配列が一致しているが、発現量には差があるので、これがクローニングできればさらに多くの情報が得られるものと思われる。

Mor 2 をコードする領域のシークエンス結果では、この遺伝子はイントロンを 1 個もっていた。前章のレボシンの遺伝子解析でこの遺伝子はイントロンをもたないことが分かったが、同じカイコでも 2 個クローニングされているセクロピン B 遺伝子はイントロンを 868bp と 2,318bp それぞれもつことが報告されている（Taniai *et al.*, 1995）。

遺伝子の発現機構を明らかにするために必要であるプロモーター領域の塩基配列も決定した結果、真核生物において急速に転写される遺伝子のプロモーター領域に保存されている TATA-box、そして昆虫の抗菌性ペプチド遺伝子に高頻度に存在する NF-κB 結合様配列や NF-IL6 結合様配列が認められた。NF-κB 結合様配列については既述したように、他の昆虫でも抗菌性ペプチド遺伝子発現に大きく寄与している。従って、カイコにおいてもこれまでに解析された抗菌性ペプチド遺伝子の情報をもとに発現誘導機構を研究していく上で、これらの配列は貴重な手がかりとなる。データには示さないが、*Mor* 2 と *Leb* 3 または *Leb* 4 の 5' 上流域についてハープロット法で相同な領域の存在を検討したが、これらの遺伝子間で保存配列は見いだせなかった。しかし昆虫は脊椎動物と分かれ、無脊椎動物の中で最も進化を遂げていると思われる生物群であり、先天性免疫

で脊椎動物とは異なる進化を遂げてきていることから、昆虫独自の応答配列もここに存在している可能性は十分考えられる。

第4章　レボシン及びモリシン遺伝子5'上流のプロモーター解析

第2章及び第3章において、現在までにカイコのみで報告されている抗菌性ペプチドであるレボシン、そしてモリシンの遺伝子をコードするゲノムDNAのクローニング及びその遺伝子発現解析を行った。その結果、これらの遺伝子間において発現様式は基本的にほとんど差はないことが明らかとなった。カイコの抗菌性ペプチド遺伝子の発現解析はセクロピンB (Kato *et al.*, 1993) やアタシン (Sugiyama *et al.*,1995) で既に報告されており、レボシンやモリシン遺伝子の脂肪体での発現誘導とこれら遺伝子の発現様式を比較しても全ての遺伝子間で大きな差はないと思われた。セクロピンBやアタシンは遺伝子のプロモーター領域の存在する5'上流の配列も報告もされており (Taniai *et al.*, 1995, Taniai *et al.*, 1996a)、NF-κB結合様配列やIL6応答配列 (タイプⅡエレメント) のようなほ乳類に見られる共通配列が存在することも知られている。レボシンやモリシン遺伝子にもNF-κB結合様配列やNF-IL6結合様配列 (IL6応答配列タイプⅠエレメント)が見られたことより、これらの配列が遺伝子の転写活性に重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで本章ではレボシン3、4遺伝子及びモリシン2遺伝子の5'上流の配列を参考にゲルシフトアッセイを行い、カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の転写活性に関わる領域について検討を行った。第1節ではNF-κB結合様配列及びNF-IL6結合様配列を中心にプローブを作製し、そこに結合するタンパク質について検討した。そして第2節では5'上流域595bpを3～4個のフラグメントに分けこれらを標識することでプローブとし、これらの領域に結合するタンパク質の存在について検討し、NF-κB結合様配列及びNF-IL6結合様配列以外の領域も転写に関わっている可能性について調べた。

第1節　NF-κB 及び NF-IL6 結合様配列に結合するタンパク質の探索

第2章と第3章でレボシン及びモリシン遺伝子のプロモーター領域に NF-κB 結合様配列及び NF-IL6 結合様配列の存在していることが明らかとなった。そこで本節ではこれらの配列を含むプローブを合成し、ゲルシフトアッセイを行うことによってここに結合するタンパク質の有無を確認した。

材料及び方法

1.　核抽出物の調整

カイコの系統は中 602 を用い、5 齢幼虫の脂肪体より核抽出物を調整した。実験には LPS を注射したものとしないカイコ幼虫を用い、核抽出物の調整は、Mine *et al.* (1995)と Suzuki *et al.* (1990)の方法を改変して以下のように行った。

LPS の処理は第 2 章と同様に行った。ただし脂肪体は LPS 処理後 4 時間で摘出した。以下の作業は氷上にて行った。摘出した脂肪体は PBS (Phosphate buffer saline, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 1.5mM KH_2PO_4) で 2 回ほど洗浄し、約 7g に対し 1mM DTT ((±)-Dithiothreitol) を加えた 10ml の BufferA (10mM Hepes-NaOH 緩衝液 pH7.9, 10mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$) で懸濁した。さらに 0.5%NP40 を加えた Buffer A を 10ml 加えることによって細胞膜を膨潤させた。10 分間軽く振った後、6,300g で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿に 10ml の Extraction Buffer (40mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.9, 5mM $MgCl_2$, 12.5%スクロース, 25%グリセロール, 2mM DTT) を加え懸濁した。この溶液をダウンスホモジナイザーのタイトタイプを用い 2～3 回磨砕した。これを 6,300g で 10 分間遠心分離して得られた沈殿 (粗核画分) にもう一度 Extraction Buffer を加え懸濁し、前回と同じホモジナイザーを用いて今度は 15 回ほど磨砕を行い核膜を破壊した。この磨砕液に飽和硫酸アンモニウムを 1ml 加えることによって塩抽出を行い 170,000g で 3～4 時間遠心分離して上清を 2/3 量回収した。この溶液に粉末の硫酸アンモニウムを最終濃度が 0.33g/ml になるように加え硫安沈殿を行った。30 分後 7,200g で 20 分間遠心分離し得た沈殿を Dialysis Buffer (20mM Hepes-NaOH 緩衝液 pH7.9, 100mM KCl, 12.5mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 17%グリセロール, 2mM DTT) に懸濁し透析を 2 回行うことによっ

て脱塩した。120,000g で 1 時間遠心分離し、得られた上清を核抽出物として-80℃で保存した。

タンパク質の定量は BIO-RAD PROTEIN ASSAY (BIO-RAD) の Dye Reagent Concentrate を用い、核抽出物の希釈系列溶液を作り OD_{595nm} の吸光度を測定することによって行った。スタンダードとして BSA (Bovine Serum Albumin)を用いタンパク質濃度を算出した。

2. プローブの作成

ゲルシフトアッセイを行うにあたりレボシン及びモリシン遺伝子の転写活性を調節している可能性があると考えられる NF-κB 結合様配列と NF-IL6 結合様配列の配列をもとに 2 本鎖のプローブを作製した。各遺伝子の配列を参考に応答配列とその前後の配列を含むそれぞれ 30mer の下記の 1 本鎖 DNA を合成した。

L3κB1

5'-TAATAAGCCAGGACTTCCCCTTATCAATCG-3'

L3κB2

5'-CATTTTTTTAGAATTTCCCCATGTGCAAAT-3'

LκB

5'-CTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAGACTTTCC-3'

L3IL6

5'-GATCGTCCATTGTAGAAATTATCCTGCTTA-3'

L4κB

5'-TGATAAACTAGGACTTCCCCTTATCAATCG-3'

L4IL6

5'-TCCGTTAGCATTGTAGAATGTTAACTTACG-3'

M2κB

5'-TTCATTGGGATTCAGTAAAGTCCCGGAGTT-3'

M2IL6

5'-CTGCAGTGAGTGGAAATCTTACGAAATCCA-3'

(下線部は NF-κB 結合様配列と NF-IL6 結合様配列をそれぞれ示す)

これらの配列と並行してそれぞれの相補鎖となる DNA も合成した。この後 2 本鎖の

DNA プローブとするために、それぞれの組を 1×M Buffer (50mM NaCl, 10mM Tris-Hcl 緩衝液 pH7.5, 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT) 中で 60℃の熱処理を 15 分間行った後、徐々に室温に戻すことによってアニールさせた。反応後 7.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することで 2 本鎖 DNA が合成されていることを確認した。これら DNA はエタノール沈殿させた後、滅菌水に溶かし 10pmol を T4 polynucleotide kinase (ニッポンジーン) を用い、DNA の 5'-OH 末端へ [γ-^{32}P]ATP (ICN) の γ 位リン酸を転移させることによって標識した。標識したプローブは NICK カラムで精製した。

3. ゲルシフトアッセイ

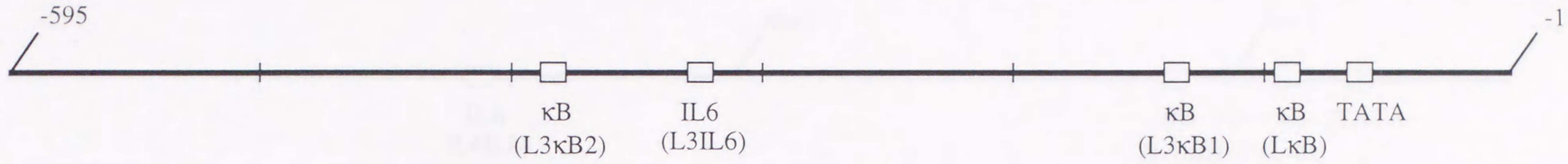
核抽出物と DNA プローブとの結合反応は、核抽出物 2.6μg、DNA プローブ 50fmol を用いた。核抽出物を 5×Binding Buffer (0.1M Hepes-NaOH 緩衝液 pH 7.8, 0.5M NaCl, 5mM EDTA, 25%グリセロール, 2.5mM DTT) を 4μl、そして非特異的な結合を防ぐため dI·dC (1mg/ml) を 2μl と BSA (2mg/ml, ニッポンジーン) を 1μl 含む全量 18μl の溶液中で室温で 10 分間インキュベートした。確認できたバンドが特異的な結合によるものであることを確認するために行った競合試験に用いた非標識の DNA プローブはこの核抽出物を加える際に一緒に加えた。インキュベート後、標識した DNA プローブ (25fmol/ml) を 2μl 加えさらに 20 分間室温にてインキュベートした。

電気泳動は、0.5×TBE 緩衝液、5%グリセロールを含む 5%ポリアクリルアミドゲルを用い、4℃下において 18～25mA の定電流、0.5×TBE 緩衝液中にて行った。泳動後のゲルは 3MM 濾紙にうつしとり、ゲル面をラップで覆った後、ゲル乾燥機 (ATTO) で 80℃の真空乾燥を行った。乾燥したゲルはフィルムカセットに入れ X 線フィルムに-80℃で感光させ、暗室にて現像を行った。

結果

レボシン及びモリシン遺伝子の 5'上流領域に存在する NF-κB 結合様配列と NF-IL6 結合様配列に結合するタンパク質の存在を明らかにするために両領域に前後約 10bp をそれぞれ付加したプローブを作製した。レボシン 3、4 遺伝子とモリシン 2 遺伝子の 5'上流域の模式図と作製したプローブの関係を Fig. 24, 25, 26 に示す。レボシン 3 遺伝子は NF-κB 結合様配列が 3 個、NF-IL6 結合様配列が 1 個についてそれぞれプローブを作製

A



B

L3κB1

-102 TAATAAGCCA**GGACTTCCCC**TTATCAATCG -73

L3κB2

-147 CATTTTTTTA**GAATTTCCCC**ATGTGCAAAT -118

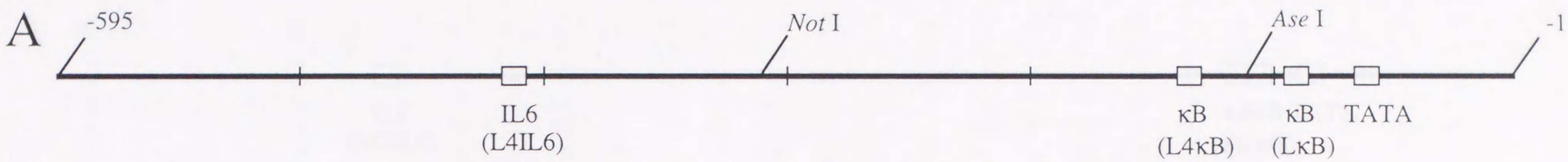
LκB

-332 CTAAAGCGGA**GGGAAGTACC**AAGACTTTCC -303

L3IL6

-395 GATCGTCCAT**TGTAGAAAT**TATCCTGCTTA -366

Fig. 24. 5'-upstream region of *Leb* 3. A. The distribution of sequences homologous to NF-κB sites and NF-IL6 site in the 595bp *Leb* 3 promoter fragment. B. Nucleotide sequences of the DNA probes in this study. The consensus sequences are indicated with bold letters.



B

LκB

-102 CTAAAGCGGA**GGGAAGTACC**AAGACTTTCC -73

L4κB

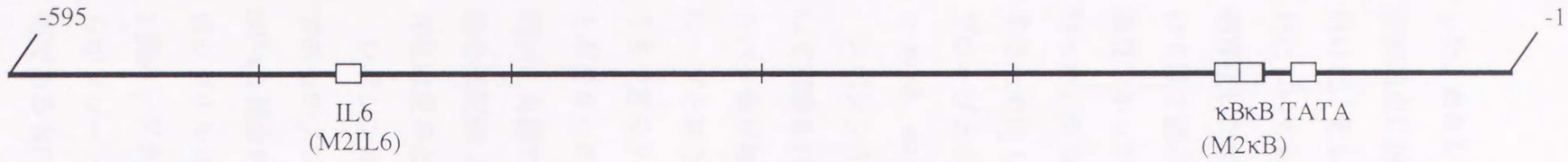
-147 TGATAAACTA**GGACTTCCCC**TTATCAATCG -118

L4IL6

-440 TCCGTTAGCAT**TGTAGAAT**GTTAACTTACG -411

Fig. 25. 5'-upstream region of *Leb* 4. A. The distribution of sequences homologous to NF-κB sites and NF-IL6 site in the 595bp *Leb* 4 promoter fragment. B. Nucleotide sequences of the DNA probes in this study. The consensus sequences are indicated with bold letters.

A



B

M2κB

-116 TTCATT**GGGATTCAGTAAAGTCCC**GGAGTT -87

M2IL6

-485 CTGCAGTGAG**TGGAAATCT**TACGAAATCCA -456

Fig. 26. 5'-upstream region of *Mor* 2. A. The distribution of sequences homologous to NF-κB site and NF-IL6 site in the 595bp *Mor* 2 promoter fragment. B. Nucleotide sequences of the DNA probes in this study. The consensus sequences are indicated with bold letters.

した。またレボシン4遺伝子にはNF-κB結合様配列が2個あるが、下流の方、つまり翻訳開始点に近い結合様配列 (LκB) はレボシン3遺伝子と共通であったので同じものを用いた。そして不完全な形であるがNF-IL6結合様配列が1個見つかっているため、これについてもプローブを作製した。モリシン2遺伝子についてはNF-κB結合様配列が2個存在したが、互いに隣接し3'末端の1塩基は重なり合っている。そこでこの領域については2個の配列の前後にそれぞれ6bpずつを付加し、1個のプローブとした。そして1個見つかったNF-IL6結合様配列についてもプローブを作製し、ゲルシフトアッセイを行った。ゲルシフトアッセイは遺伝子発現誘導の時に特異的に現れるタンパク質を検出するためにLPS処理と無処理のカイコ脂肪体からの抽出物で比較した。またそのDNAプローブとタンパク質の結合が特異的であることを確認するために非標識のプローブを20倍、60倍ずつ加えた競合試験も行った。その結果をFig. 27, 28, 29に示す。

レボシン3遺伝子のプロモーター領域に存在する配列を参考に作製したプローブについて実験を行った結果、-128にあるNF-κB結合様配列 (L3κB1) に特異的に結合するタンパク質が検出された(Fig. 27C)。この図よりカイコ脂肪体の核抽出物の中に特異的にプローブと結合するタンパク質が少なくとも2個あることが明らかとなった。さらにこのうち1方のタンパク質はLPSの刺激があったときのみ核内に存在しているものであることが分かった。この他のNF-κB結合様配列 (LκB, L3κB2) をモチーフとしたプローブを用いた実験では特異的にシフトしたバンドは見られなかった(Fig. 27A, D)。またNF-IL6結合様配列 (L3IL6) についても行ったが、プローブに結合しシフトさせるタンパク質の存在は見あたらなかった(Fig. 27B)。

レボシン4遺伝子のプローブのうち、LκBについてはレボシン3遺伝子の結果と共通であるがプローブに結合するタンパク質は見られなかった(Fig. 27D)。残りのもう1つのNF-κB結合様配列 (L4κB) についてアッセイを行った結果、L3κB1と同じ様なパターンのシグナルが得られ、無処理のカイコで1個、LPSを処理したカイコでもう1個加えた2個のシグナルが見られた(Fig. 28B)。競合試験でこれらのバンドは消えることからこれらがプローブに特異的に結合しているタンパク質であると判断できた。そして、不完全型であるNF-IL6結合様配列を含む配列 (L4IL6) に結合するタンパク質は観察されなか

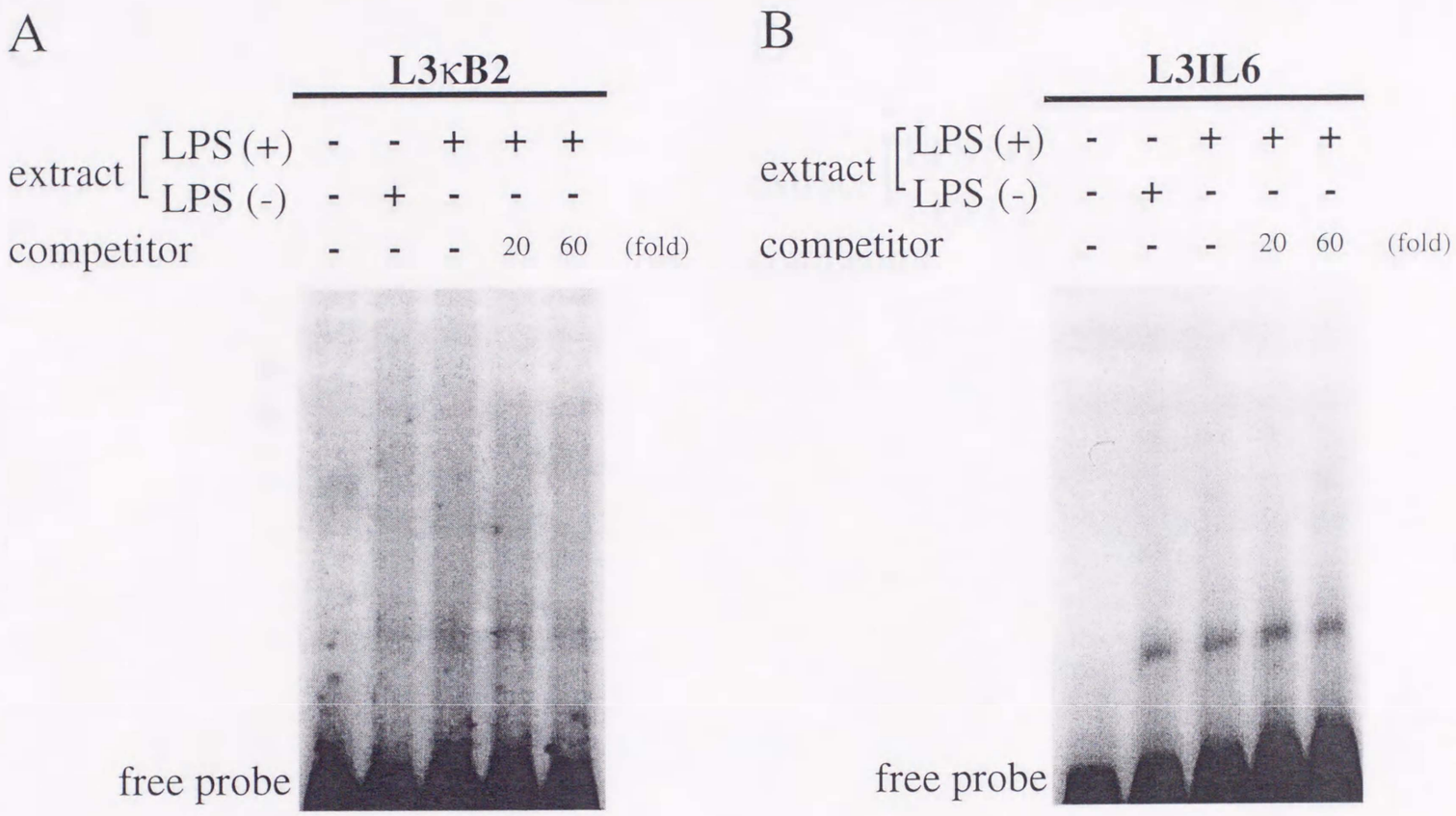
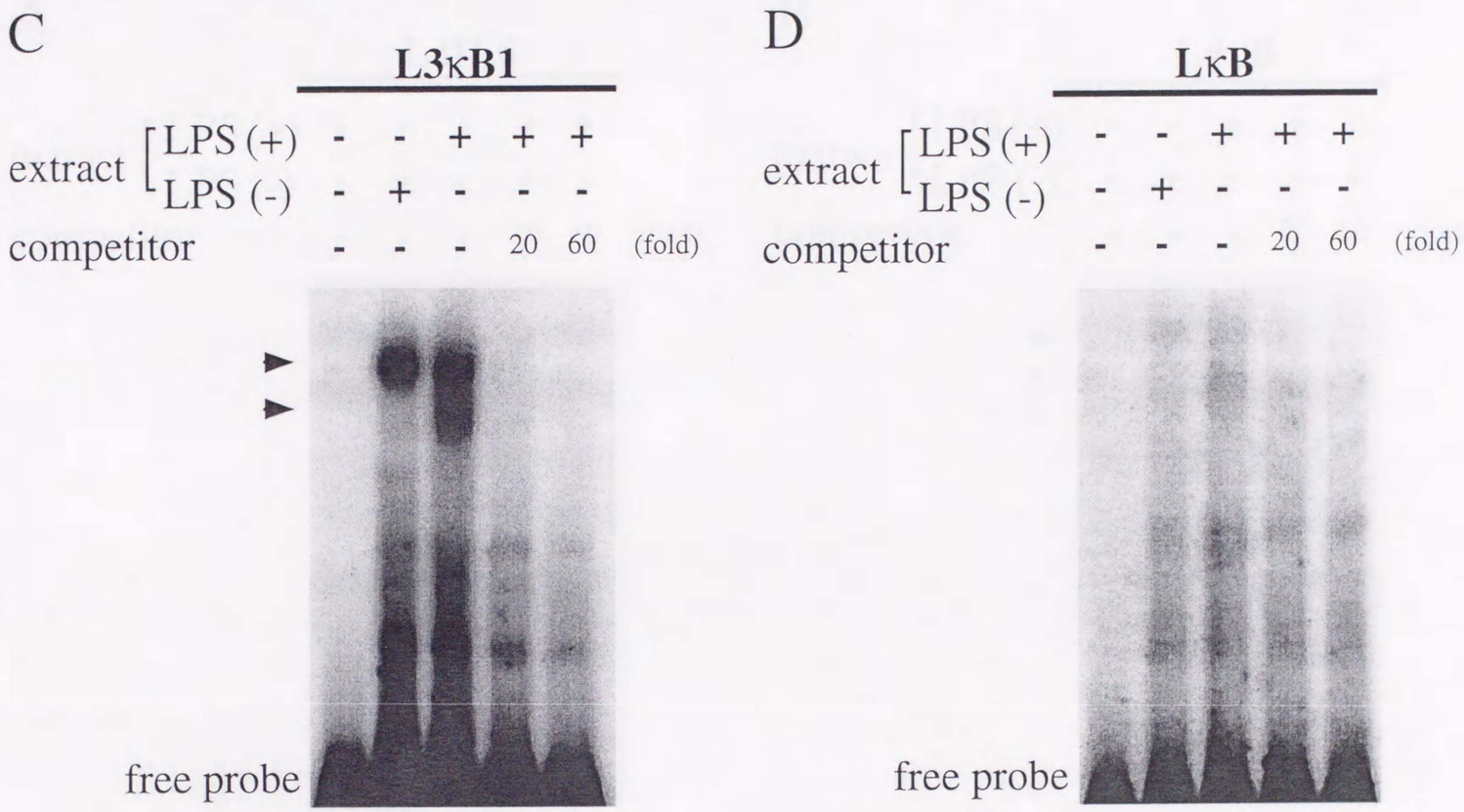


Fig. 27. An electrophoretic mobility shift assay with fat body nuclear proteins and the labeled oligonucleotides corresponding to *Leb* 3 5'-upstream region. The probes were L3κB2 (A), L3IL6 (B), L3κB1 (C) and LκB (D). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) or non-immunized larval fat bodies (LPS(-)) were used. For the competition experiments, 20 or 60 fold molar excess of the cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.


C
L3κB1
extract
LPS (+) - - + + +
LPS (-) - + - - -
competitor - - - 20 60 (fold)
free probe
D
LκB
extract
LPS (+) - - + + +
LPS (-) - + - - -
competitor - - - 20 60 (fold)
free probe

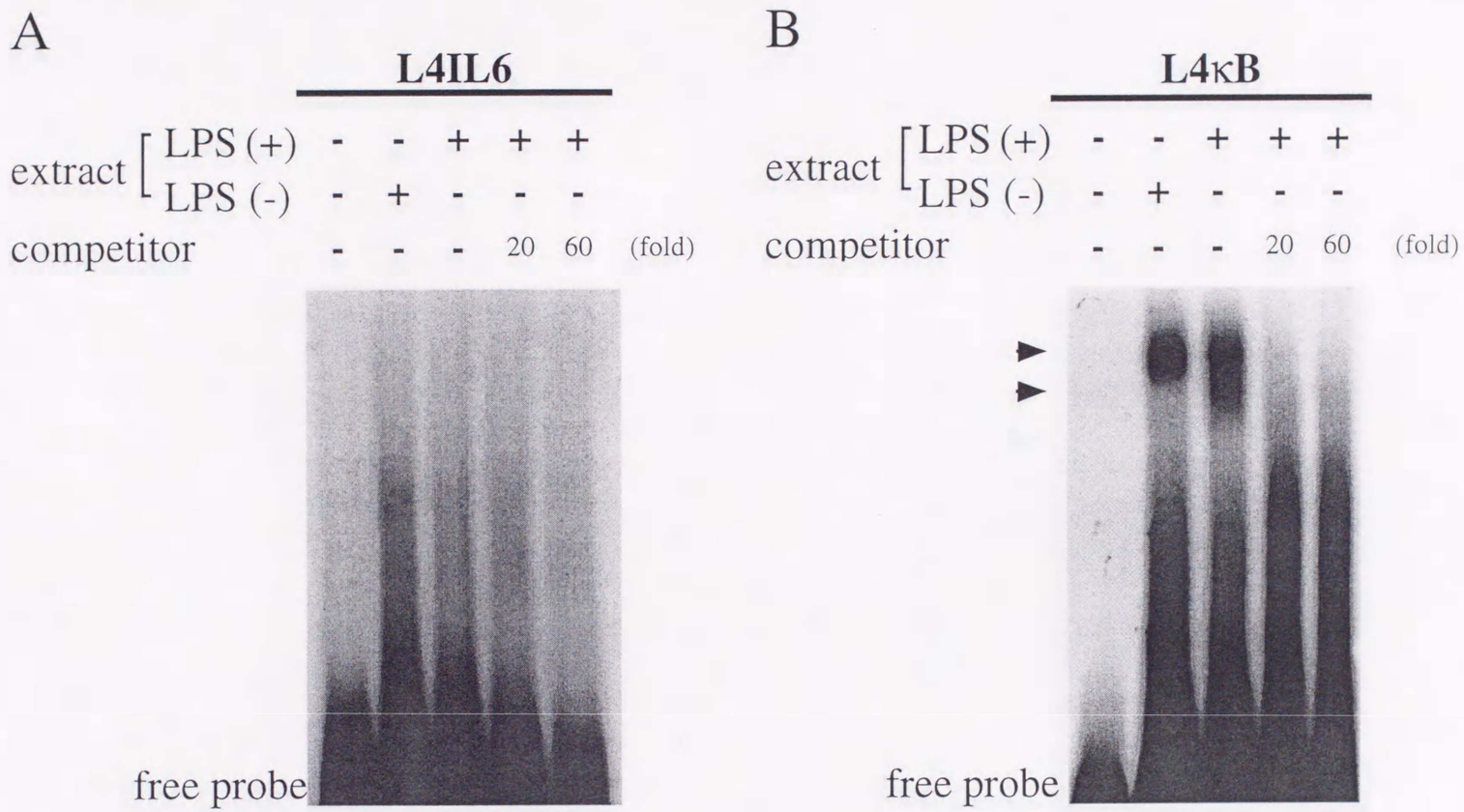


Fig. 28. An electrophoretic mobility shift assay with fat body nuclear proteins and the labeled oligonucleotides corresponding to *Leb* 4 5'-upstream region. The probes were L4IL6 (A) and L4κB (B). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) or non-immunized larval fat bodies (LPS(-)) were used. For the competition experiments, 20 or 60 fold molar excess of the cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

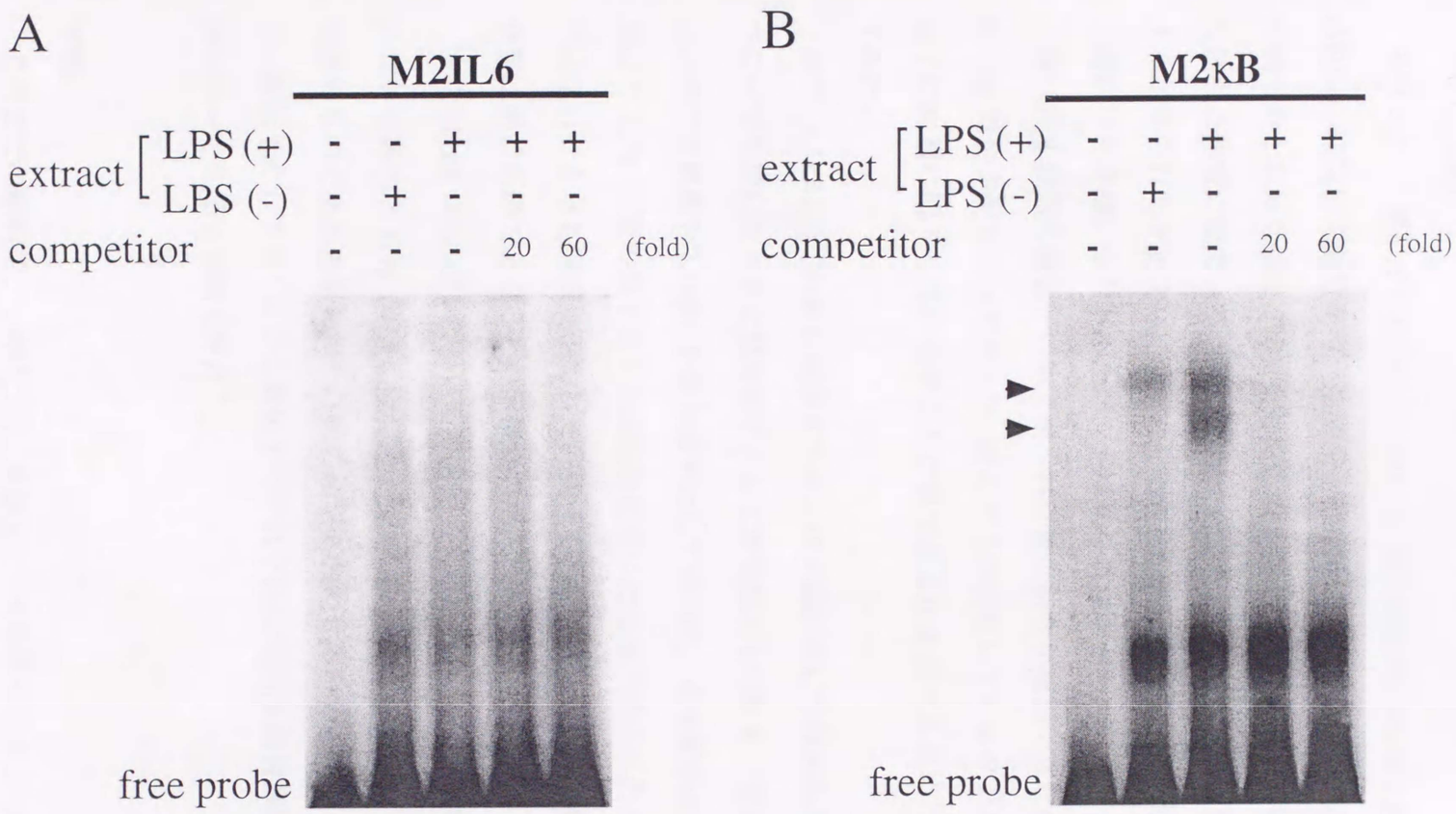


Fig. 29. An electrophoretic mobility shift assay with fat body nuclear proteins and the labeled oligonucleotides corresponding to *Mor* 2 5'-upstream region. The probes were M2IL6 (A) and M2κB (B). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) or non-immunized larval fat bodies (LPS(-)) were used. For the competition experiments, 20 or 60 fold molar excess of the cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

った(Fig. 28A)。

モリシン 2 遺伝子に存在した NF-κB 結合様配列 (M2κB) 及び NF-IL6 結合様配列 (M2IL6) について解析を行った結果、M2κB に結合するタンパク質が存在していることが明らかとなった(Fig. 29B)。そしてこのシグナルのパターンは L3κB1 や L4κB で見られた結果と非常に似ていて、無処理のカイコで 1 個、LPS を処理したカイコで 2 個のシグナルが見られた(Fig. 29A)。しかし、NF-IL6 結合様配列を含んでいる M2IL6 ではレボシン遺伝子と同様にシフトしたバンドは見られなかった。

調べた 3 種類の遺伝子の中でタンパク質の結合が確認できたのはそれぞれ 1 つずつの NF-κB 結合様配列のみであった。そこでこの結合しているタンパク質が 3 種類全ての遺伝子に共通に関与しているタンパク質であるかを調べるために競合試験を行い検討してみた。

まず、L3κB1 と L4κB に結合するタンパク質が同じ性質のものか調べるために L3κB1 プローブを用いたときに競合因子として非標識の L4κB を、逆に L4κB プローブを用いたときに非標識の L3κB1 を競合因子として用いた。その結果を Fig. 30 に示す。この結果より LPS 処理のカイコの核抽出物を用いたときに見られたバンドはお互いの競合因子を用いたときも同様に消失した。従って、L3κB1 と L4κB に特異的に結合したタンパク質は同じものであることが示唆された。

次に M2κB と L3κB1 についても同様の実験を行い、同じ性質のタンパク質が結合しているかを調べた (Fig. 31)。この結果、M2κB と L3κB1 に結合しているタンパク質も同じ性質のものであると思われた。前の結果も合わせてみると、レボシン 3 遺伝子、レボシン 4 遺伝子そしてモリシン 2 遺伝子のそれぞれの NF-κB 結合様配列に結合するタンパク質は同一であると推察できた。

考察

これまでの研究で、レボシン 3、4 遺伝子、そしてモリシン 2 遺伝子のゲノム DNA の配列を決定した。そこでこれら遺伝子の発現誘導機構を明らかにするため、まず遺伝子

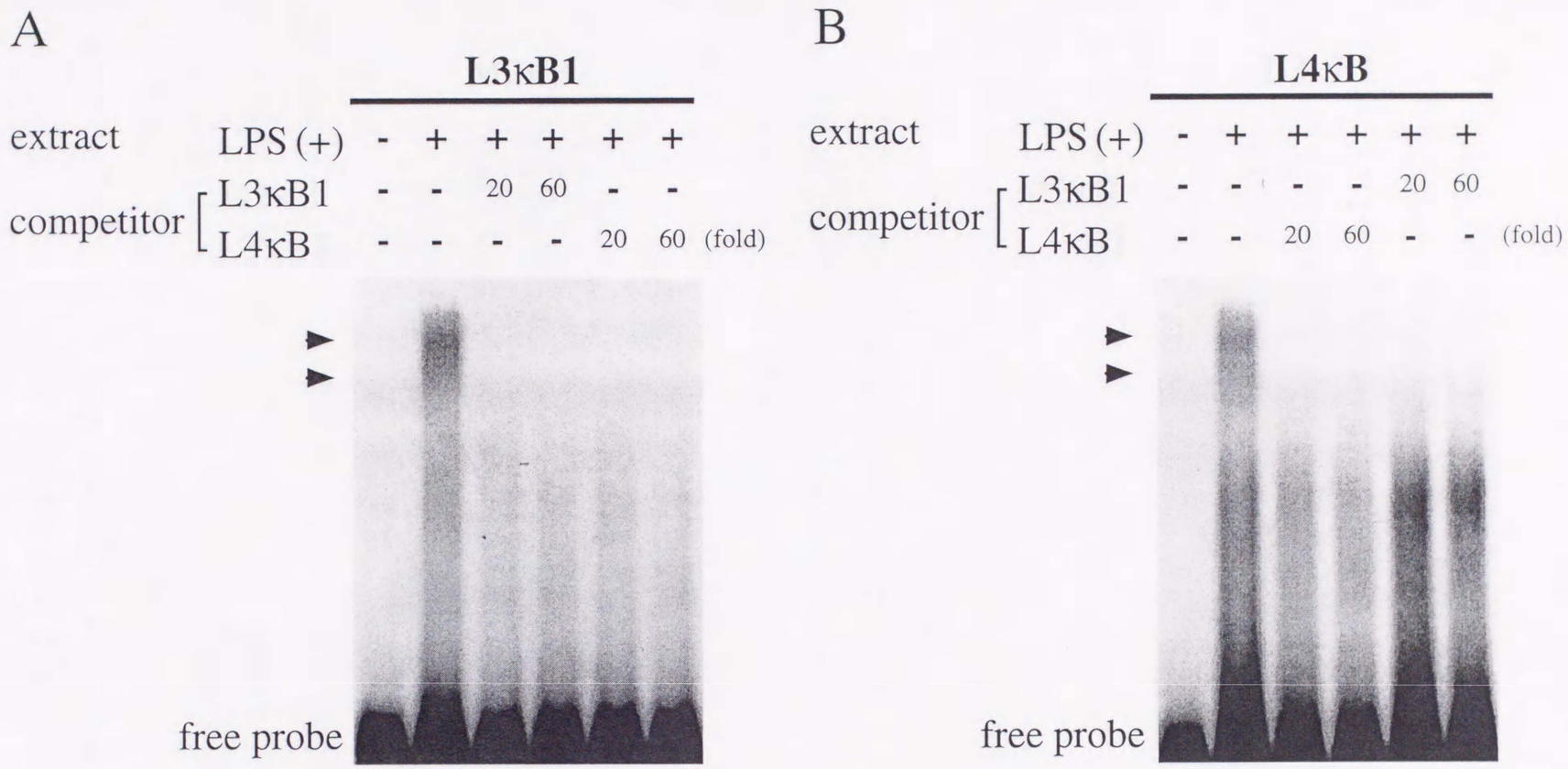


Fig. 30. Effects of competitor DNA in an electrophoretic mobility shift assay. The probes were L3κB1 (A) and L4κB (B). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) were used. For the competition experiments, 20 or 60 fold molar excess of the indicated cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

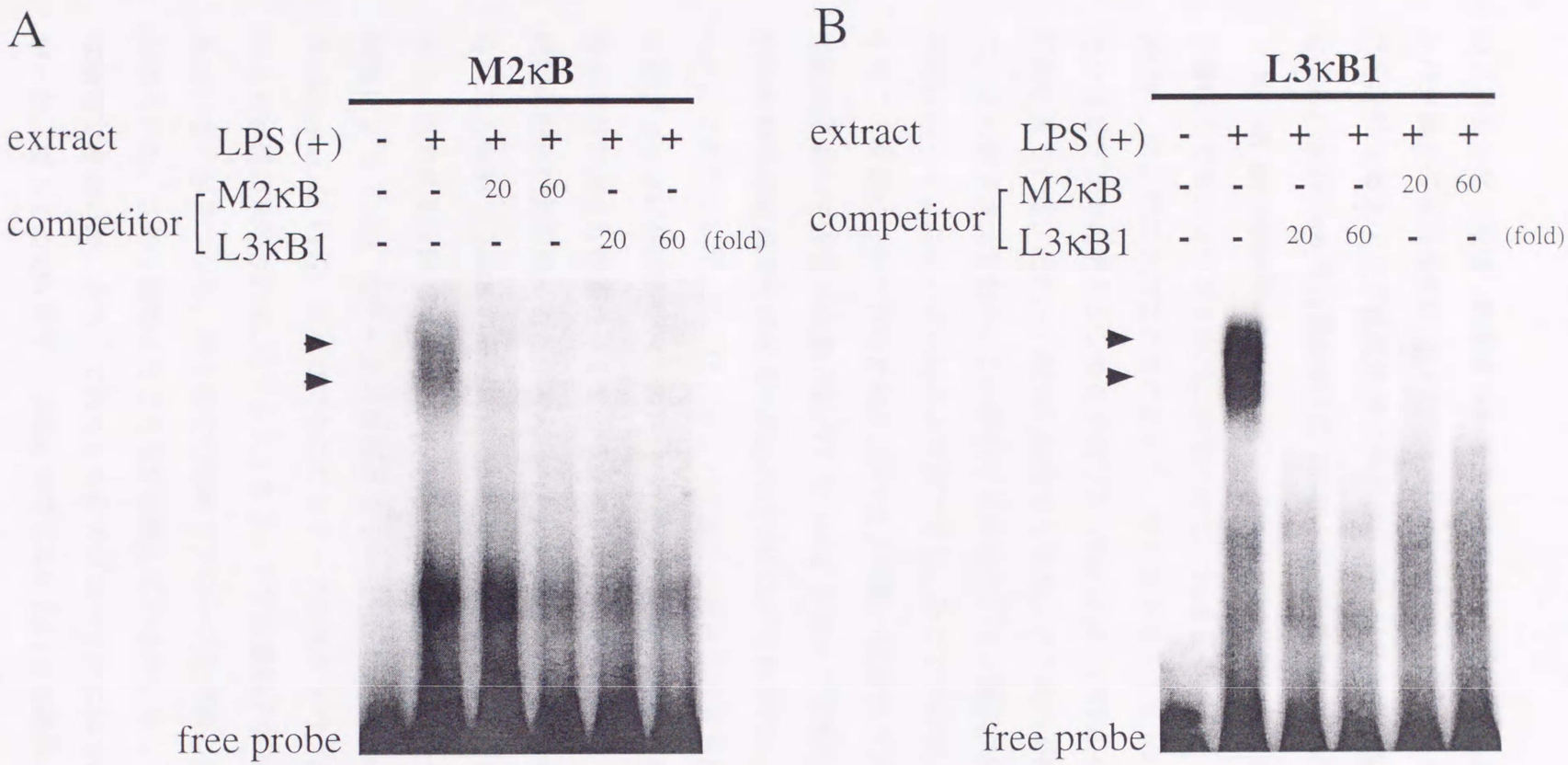


Fig. 31. Effects of competitor DNA in an electrophoretic mobility shift assay. The probes were M2κB (A) and L3κB1 (B). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) were used. For the competition experiments, 20 or 60 fold molar excess of the indicated cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

のプロモーター領域に結合する転写因子を探索する必要がある。そこで DNA と核内タンパク質との相互作用について調べるためにゲルシフトアッセイを行った。DNA プローブを設計する上でまず抗菌性ペプチド遺伝子の転写活性に関わっている可能性があると思われる NF-κB 結合様配列及び NF-IL6 結合様配列について検討を行った。

NF-κB 結合様配列はヒトやマウスで共通配列が分かっており、昆虫の抗菌性ペプチド遺伝子でもショウジョウバエのセクロピン A、B そして C、ディプテリシン (Hultmark, 1993) 、センチニクバエのセクロピン、ザルコトキシンⅡ (Kobayashi *et al.*, 1993)、及びセクロピアサンのアタシンやセクロピン (Sun *et al.*, 1991b) のプロモーター領域にこの配列が見られる。これらの配列に結合する核タンパク質の単離、そして遺伝子のクローニングも報告されており、この配列が抗菌性ペプチド遺伝子発現に重要な役割を果たす可能性はカイコにおいても高いと推測できた。そこで本研究においてゲルシフトアッセイをこの配列について行った結果、調べた 3 種類の抗菌性ペプチド遺伝子の NF-κB 結合様配列においてタンパク質の結合した DNA プローブが検出できた。しかし、全ての NF-κB 結合様配列でそれが見られたわけではなくそれぞれの遺伝子につき 1 個ずつであった。これについて、Fig. 32 にタンパク質との複合体の見られたプローブと見られなかったプローブに分けて並べてみた。これを見ると NF-κB 結合様配列自体はタンパク質結合の有無に大きな影響を与えるような違いを見いだすことはできなかった。むしろその周囲の配列に差があることが考えられた。レボシンの両遺伝子に注目すると複合体が見られた L3κB1 と L4κB の周囲には GATA モチーフが存在していたことが明らかとなっており、残りの L3κB2 や LκB にこのモチーフは見つからなかった。NF-κB 結合様配列の周囲にある GATA モチーフの重要性についてはショウジョウバエで報告されており (Kadalayil *et al.*, 1997)、カイコでもこのモチーフが核タンパク質の結合性に影響を与えている可能性が示唆される。モリシン 2 をコードする遺伝子の NF-κB 結合様配列は 2 個並んでいるのが見つかり、両方を含む領域でプローブを作製し実験を行った結果シグナルが得られた。この 2 個のうちどちらが機能しているか、もしくは両方が機能しているかは断定できないが、どちらであってもこのプローブ内には GATA モチーフは見つからなかった。従って GATA モチーフは必須ではないという可能性とレボシンとモリシン

```
L3κB1          -118 CGATTGATAAGGGGAAGTCCTGGCTTATTA -147
L4κB           -118 CGATTGATAAGGGGAAGTCCTAGTTTATCA -147
M2κB           -120 ACCGTTCATTGGGATTCAGTAAAGTCCCGG  -91
               -83  ATGTAACTCCGGGACTTTACTGAATCCCAA -112

L3κB2          -366 ATTTGCACATGGGGAAATTCTAAAAAAATG -395
LκB            -102 CTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAGACTTTCC  -73

Insect consensus                GGGRANNNNY
Mammalian consensus             GGGRNNYYCC
```

Fig. 32. Comparison of NF-κB sites found in lebocin 3, 4 and moricin 2 gene. Upper three elements, L3kB1, L4kB and M2κB, formed complexes with proteins and lower two elements, L3κB2 and LkB, did not. NF-κB consensus sequenses indicated by bold letters and identical nucleotides were shadowed. Consensus sequence data were cited from Taniai *et al.* (1996a).

では異なるタンパク質がNF-κB結合様配列に結合しているという可能性が考えられた。そこでこれらのプローブを互いに競合因子として用いて実験を行った (Fig. 30, 31)。その結果、3種類のNF-κB結合様配列に結合するタンパク質は同じ性質をもつものであるという可能性が高いと思われた。従って、GATAモチーフがカイコでも重要な部位であるかは現段階では分からないが、変異を入れたプローブを作製し実験を行い情報を得ることでタンパク質結合に重要な部位の同定ができると思われる。また、全てのシグナルが見られたプローブで免疫をしないもので1個、したものでこれに加えてもう1個特異的なバンドが見られた。これらが実際にどの様な機能を有しているかは不明だが、免疫をしなくても見られるバンドは常に核内に存在しているタンパク質との結合で、免疫誘導によって新たにタンパク質が核内に移行してくか、もしくは刺激によって複合体の一部が修飾を受けているものと推測される。

NF-IL6は肝細胞をIL-1で刺激したときにIL-6のプロモーター領域に結合してIL-6の発現を促進する転写因子としてクローニングされたタンパク質であり、正常組織では発現は見られず、感染や炎症などが刺激となって誘導されてくることが知られている (Akira, *et al.*, 1990)。本実験ではこのNF-IL6結合様配列に結合するタンパク質は検出することを試みたが作製した3種類のプローブで複合体は見られなかった。昆虫の抗菌性ペプチド遺伝子においてプロモーター領域にこの結合様配列が存在することは数多く知られているが、まだこの領域に結合するタンパク質の存在は報告されていない。そこでレボシン3遺伝子と4遺伝子の発現量の違いがここの領域にあると予想されたためとモリシン2遺伝子にも同じようにこの配列が保存されていたため実験を行った。ほ乳類ではNF-κB結合様配列とNF-IL6結合様配列が互いに隣接し共存することが重要であるという報告があり (Mukaida *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1994; Dunn *et al.*, 1994)、今回のレボシン遺伝子やまたモリシン遺伝子は両結合様配列が互いに独立して存在しているので機能できないことが予想された。

本節の研究によって、レボシン3、4両遺伝子とモリシン2遺伝子のNF-κB結合様配列は遺伝子の発現調節に関わっている可能性が高いことが分かった。ここに結合したタンパク質と各プローブに用いた結合様配列との親和性の差が遺伝子の転写量に関わっているのかもしれない。いずれにしてもこの領域に結合するタンパク質を同定すること

で抗菌性ペプチド遺伝子の発現を調節する細胞内シグナル伝達系についてより理解できると考えられる。

第2節　遺伝子5'上流領域に結合するタンパク質の探索

本節では、レボシン及びモリシン遺伝子の5'上流域の-1bp～-595bpをフラグメントに分け、プローブを合成、ゲルシフトアッセイを行うことによって前節で見つかったタンパク質以外にも結合するタンパク質が存在するかを検討した。

材料及び方法

1. プローブの作製

プローブを作製するためのフラグメントを作製するために下記のプライマーを設計し、レボシン3遺伝子、レボシン4遺伝子そしてモリシン2遺伝子の-1bp～-595bpを増幅した。プライマーには、5'末端側 (Forward primer) に *Xho* Ⅰ、3'末端側 (Reverse primer) に *Hin*d Ⅲ切断部位を付加した。

(1)レボシン3遺伝子

Forward primer

5'-CGGCTCGAGCTCCTCGGTGGTAATCAT-3'

Reverse primer

5'-CCGAAGCTTGTTGATTGTATCGATTGA-3'

(2)レボシン4遺伝子

Forward primer

5'-CGGCTCGAGCCTTTAGAGGCAGTAAAT-3'

Reverse primer

5'-CCGAAGCTTGTTGATTGTATCGATTGA-3'

(3)モリシン2遺伝子

Forward primer

5'-CGGCTCGAGTCGATTGGCACACAAATT-3'

Reverse primer

5'-CCGAAGCTTATTTTAAATAACTGCGCG-3'

(下線部は *Xho* Ⅰ, *Hin*d Ⅲ切断部位をそれぞれ示す)

PCR は第 2 章及び第 3 章でそれぞれクローニングしたプラスミド DNA をテンプレートに、94℃ (30 秒)、50℃ (30 秒) を 25 サイクル行い、最後に 72℃で 5 分間の伸長反応を行った。

595bp の増幅を電気泳動で確認した後、PCR 産物を T-vector (Original TA Cloning Kit) にサブクローニングし、シークエンスすることによって塩基配列が正しいことを確認した。

それぞれのフラグメント DNA を大量調整するために LB 培養液で少量の前培養を行った後、坂口フラスコを用いて 100ml 培養を行った。37℃で 1 晩振とうした後、QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA の精製を行った。精製後の DNA は 1×M Buffer 中で *Hin*d Ⅲ部位での切断を行った後、1×H Buffer (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5, 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT) 中で *Xho* Ⅰ部位の切断を行った。切断後の DNA は 2%低融点アガロースゲルで電気泳動をした後 595bp フラグメントを切り出し、β-Agarase を用いて回収を行った。この後それぞれの遺伝子について適当な制限酵素処理を行い、4%低融点アガロースゲルで電気泳動をした後、β-Agarase で回収を行った。各フラグメントについて他のフラグメントのコンタミを防ぐため、電気泳動による精製は 2 回ずつ行った。

レボシン 3 遺伝子の 595bp フラグメントは、*Hin*f Ⅰ処理の後電気泳動し 437bp と 158bp のフラグメントを回収した。次に 437bp の方は *Taq* Ⅰ処理によって 257bp と 180bp に、158bp の方は Ase Ⅰ処理によって 47bp と 111bp に分けそれぞれ回収した。この方法で作成したフラグメントをそれぞれ L3-a、b、c そして d フラグメントとした。

レボシン 4 遺伝子の 595bp フラグメントは、*Not* Ⅰ及び *Ase* Ⅰ処理によって、282bp、202bp そして 111bp のフラグメントに分けた。これらのフラグメントをそれぞれ L4-a、b そして c フラグメントとした。

モリシン 2 遺伝子の 595bp フラグメントは、*Pst* Ⅰ及び *Sca* Ⅰ処理によって、111bp、281bp そして 203bp のフラグメントに分けた。これらのフラグメントをそれぞれ M2-a、b そして c フラグメントとした。

作製した各フラグメントは L3-c 以外のフラグメントについては Klenow Fragment を用いて RI ラベルし、プローブとしてゲルシフトアッセイに用いた。各フラグメントを

10pmol ずつ溶かした溶液 18.5μl に 10×H Buffer を 2.5μl 加え、65℃で 5 分間熱処理した後氷上におくことによって DNA が 2 次構造をとらないようにした。この溶液に d(ATG)TPs 混合液 (5mM dATP, 5mM dTTP, 5mM dGTP) を 1μl と [α-^{32}P]dCTP (ICN) を 2ml、そして Klenow Fragment (ニッポンジーン) を 1μl 加え、37℃で 15 分間反応した後 75℃10 分間することによって酵素を失活させた。L3-c は切断部位にグアニンをもたないために[α-^{32}P]dCTP を取り込めない。従って BAP 処理を行った後、前節と同様に T4 polynucleotide kinase で [γ-^{32}P]ATP の γ 位リン酸を転移させることによって標識した。全ての標識したプローブは NICK カラムで精製した。

ラベルした後、アクリルアミドゲルで電気泳動を行った結果、まだ 2 次構造をとっているフラグメントが確認されたことから、それについては Sambrook *et al.* (1989) の方法に従い、アクリルアミドゲルからの DNA フラグメントの回収を行った。NICK カラムによって精製したプローブをエタノール沈殿によって回収し、前節のゲルシフトアッセイに用いたゲルにて泳動を行った。泳動後ゲルの片面をラップで覆い、その上に約 1 分間 X 線フィルムをのせ感光させた。そしてフィルムのシグナルの部分にあたるゲルを切り出した。切り出したゲル片は 2.5ml シリンジ (TERUMO) で押し出すことによって粉々にした。そこに Crush & Soak Buffer (0.1%SDS, 0.5M 酢酸アンモニウム, 10mM 酢酸マグネシウム) を 400μl 加え、37℃で 1 晩振とうさせた。振とう後遠心分離を行い溶液のみを回収し、フェノール抽出、クロロホルム抽出をした後、エタノール沈殿で DNA プローブを回収した。必要に応じて Ethachinmate (ニッポンジーン) を加え、DNA の損失を防いだ。

2. ゲルシフトアッセイ

用いた核抽出物、ゲルシフトアッセイの方法は前節に準じて行った。競合試験はそれぞれ非標識の DNA をプローブの 10 倍と 50 倍 (モル比)、プローブを加える前に混ぜた。また前節において結合因子の存在が確認された領域を含むフラグメント (L3-c, L4-b, M2-b) については、それぞれに相当するフラグメント (L3κB1, L4κB, M2κB) も競合因子として用いた。

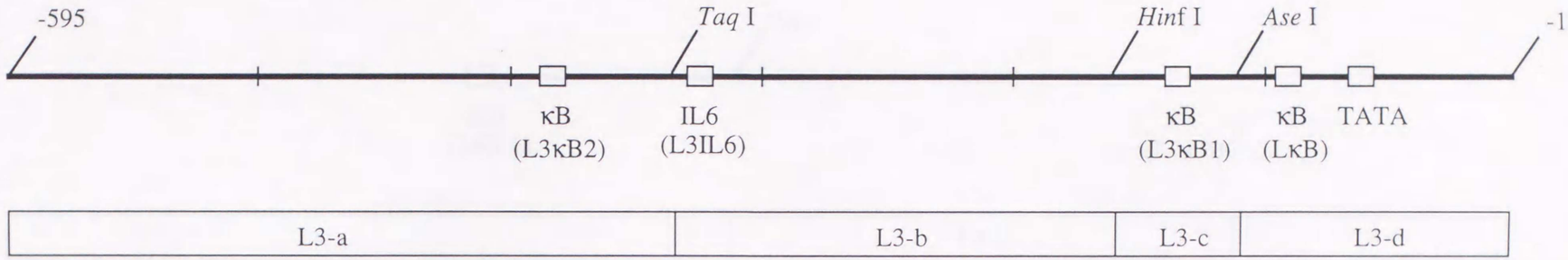
結果

レボシン3、4遺伝子そしてモリシン2遺伝子の翻訳開始点より上流595bpについて、転写因子の存在する可能性を検討する目的でゲルシフトアッセイを行った。作製した3～4個のフラグメントを、作製に用いた制限酵素と前節で検討した各結合様配列を重ねた模式図とともにFig. 33, 34, 35に示す。これらのフラグメントをRIでラベルし、プローブとして用いたアッセイの結果をFig. 36, 37, 38に示す。

レボシン3遺伝子より作製した4個のフラグメントについて検討したところ、最も上流に位置するL3-a以外のフラグメントにおいて、このプローブと特異的に結合すると思われるタンパク質によるバンドの移動が見られた。L3-bではLPSを処理したカイコ脂肪体の核抽出物を用いたときにシグナルが得られ、競合試験によってそのシグナルの消失が認められた。そしてLPS処理を行わなかったカイコの場合にはLPS (+) で見られたバンドの位置でのシグナルは非常に弱かった。L3-cでは比較的高分子のところにLPS (+) で2本バンドが見られ、それは非標識のL3-cを加えることにより消失した。またこのフラグメントは前節で調べ、特異的なDNA-タンパク質複合体の形成が見られたNF-κB結合様配列を含む領域であるため、L3κB1も競合因子として試験した結果、同じようにバンドの消失が見られた。そしてL3-dでは競合試験によって薄くなるバンドが発見された。そしてこのシグナルもLPS (-) では (+) よりも弱かった。

レボシン4遺伝子より作製した3個のフラグメントを用いて実験を行った結果、全てのプローブでそれぞれシグナルが見られ、特異的に結合すると思われるタンパク質の存在が示唆された。L4-aではLPS (+) を用いたときに強いシグナルが3本ほど見られ、これらは競合試験によって徐々に弱いシグナルとなった。前節で見つかったタンパク質の結合するNF-κB結合様配列を含むL4-bを用いたとき、高分子側にこれに相当すると思われるシグナルが2本見られた。これらは競合因子としてL4-bを加えた場合やL4κBを加えた場合でも同じようにシグナルがほとんど消失した。この他に低分子側に競合因子にL4-bを加えた場合は消失するが、L4κBを加えた場合には変わらないバンドが見られ、これはNF-κB結合様配列以外の場所に結合しているタンパク質によるものであることが示唆された。L4-cをプローブにしたときには、LPS (+) で特異的にシフトするバンド

A



B

L3-a (-595～-337)
TCGAGCTCCTCGGTGGAAATCATCCCTTTGCCTATCCCAAAGCGCCACAGTAGGTATACATACAGTATTTATTGTGTGTAATTATTGATTTTTTCAA
TTTTATTTTTCTTCATTACTGATTAATATATTGAAAGTTTTGGTCTAATTTAATAGTCCTATCTCTATTTTTATTATTGTTACCTAGTACACTGCAA
TGTACCTGGAGCATTTTTTTAGAATTTCCCCATGTGCAAATTGATATACCAGAACAGAGTGCTTTTATCG

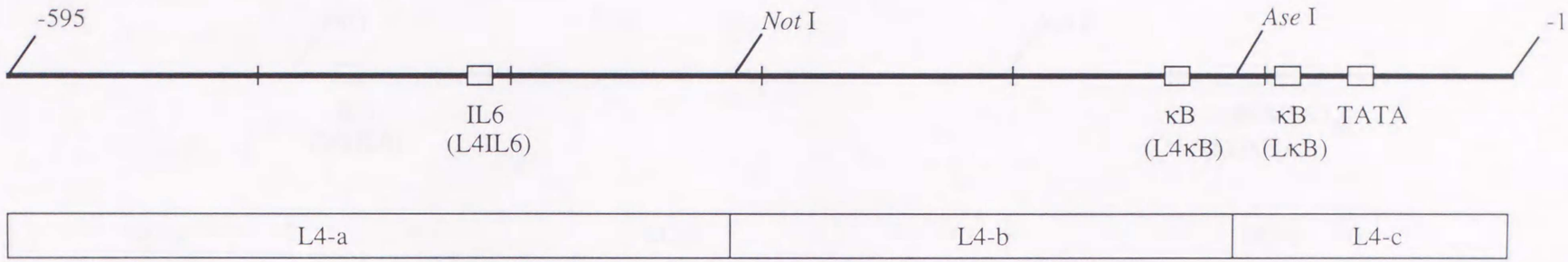
L3-b (-338～-156)
CGATAAGATCGTCCATTGTAGAAATTATCCTGCTTATTTACTAACATTCTTGTTAGGCATCAAAGTATAATCTTTCTCTCATAATTTATATGAAACA
TTATAATATCTACGTATTGATTGTATTAGGTACGTATATGCAACAGTAATGAGGAAACAAATCATGAAAAATGTTTTGAGATGAAT

L3-c (-158～-110)
AATCTTTGTCATAATAAGCCAGGACTTCCCCTTATCAATCGTAATAATT

L3-d (-111～-1)
TTAATATCGCTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAGACTTTCCTCAAGACTGTGTATAAATACCGATCATTGTGATAGTTACTCACATTACCGGTGTTCAA
TCGATACAATCAACAAGCT

Fig. 33. *Leb* 3 5'-upstream region. A. The distribution of sequences homologous to NF-κB sites and NF-IL6 site in the 595bp *Leb* 3 promotor region and the longer DNA fragments used as probes in this study. The probes fragments were prepared by the digestion of the *Leb* 3 595bp fragment with *Hinf* I, *Taq* I and *Ase* I. B. Nucleotide sequences of the probe DNA fragments, L3-a, b, c and d. *Xho*I and *Hin*d III sites were underlined.

A



B

L4-a (-595～-309)

TCGAGCCTTTAGAGGCAGTGAATCCGTCATTCCTAACCATGACGTAATTCGCGACTTTCGGGTCACGATGCGAGGGCTTCAGGCAGGTCTCTTGCA
CTAACAGAATATCTATTAGATTGTCGCGGAGAAATTCGTATATTTTATCGCGTTGCCGCGCGAGTCCGTTAGCATTGTAGAATGTTAACTTACGGG
AATATGGTTTTTCTCTACCGTTTCGCGCCATTGATTACCGGTAAAGATTTATAACGTACGGGATACGGACTCGTAAACGTCCATGAGGTCAAAAGC
GGCC

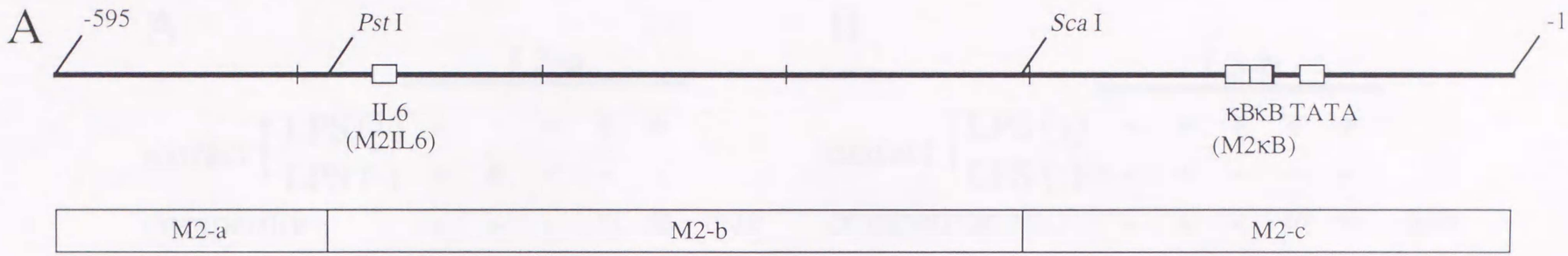
L4-b (-312～-110)

GGCCGCGAGCCGCTGTTCGGGGGGCGGGTCACTAGTAATTTATATGAAACATTGTAATACTATGTGATTACTAATACTATGTATTGATTATTGTAT
TAGGTACGTATAGGCGACAGTAATGAGGAAACAAATCATGAGAATTTTTTGGGGTGAACCTTTGTGTCATGATAAACTAGGACTTCCCCTTATCAA
TCGTAATAATT

L4-c (-111～-1)

ATTAATATCGCTAAAGCGGAGGGAAGTACCAAGACTTTCCTCAAGACAGTGTATAAATACCGATCATTGTGATAGTTACTCTCATTACCGGTGCTC
AATCGATACAATCAACAAGCT

Fig. 34. *Leb* 4 5'-upstream region. A. The distribution of sequences homologous to NF-κB sites and NF-IL6 site in the 595bp *Leb* 4 promotor region and the longer DNA fragments used as probesin this study. The probe fragments were prepared by the digestion of the *Leb* 4 595bp fragment with *Not* I and *Ase* I. B. Nucleotide sequences of the probe DNA fragments, L4-a, b and c. *Xho*I and *Hin*d III sites were underlined.



B

M2-a (-595～-481)

TCGAGTCGATTGGCACACAAATTATTGTCTGTCGCACATGCTAAAATTCTGTTTAAATATAACCTGCTAATTGTGCTCTATATTACTGATAAACATA
TTGTAAATAATTCTCAGTCTGCA

M2-b (-484～-202)

TGCAGTGAGTGGAAATCTTACGAAATCCACTTAATAGCGATAACTGATATCACATCGTTGCGTTGTTCTAATGTTTACCCGGTATAATTTATTTCTT
GATTTTAATGAATATAACCGATCTATAAGTATCAAATAAGCAAAAACAATTCTATTCATTATTTCTCGCAGTTCACAAACATCTAACCTGCACTTCA
TTTCACGTATAAACAATTATTCATTTAAGATTTTGCACTCGACCGATAACATTATTTTTTATGAGGATTAACCTCTTAAAAGATGAAGT

M2-c (-203～-1)

ACTTATCTGTTTTATCTTTTACGATGTTATGACGTTCACAAGAATACACACATATTTAAACAAACTTGTGATGATGACCCAACCGTTCATTGGGATT
CAGTAAAGTCCCGGAGTTACATATAAAACGATTGGTAACGGCGGAATCAATTCATTGTGTTCTAAAAATTTGCAAAAACAGTAAACCGCGCAGTTAT
TTAAAATAAGCT

Fig. 35. *Mor* 2 5'-upstream region. A. The distribution of sequences homologous to NF-κB sites and NF-IL6 site the 595bp *Mor* 2 promotor region and the longer DNA fragments used as probes in this study. The probe fragments were prepared by the digestion of the *Mor* 2 595bp fragment with *Pst* I and *Sca* I. B. Nucleotide sequences of the probe DNA fragments, M2-a, b and c, *Xho*I and *Hin*d III sites were underlined.

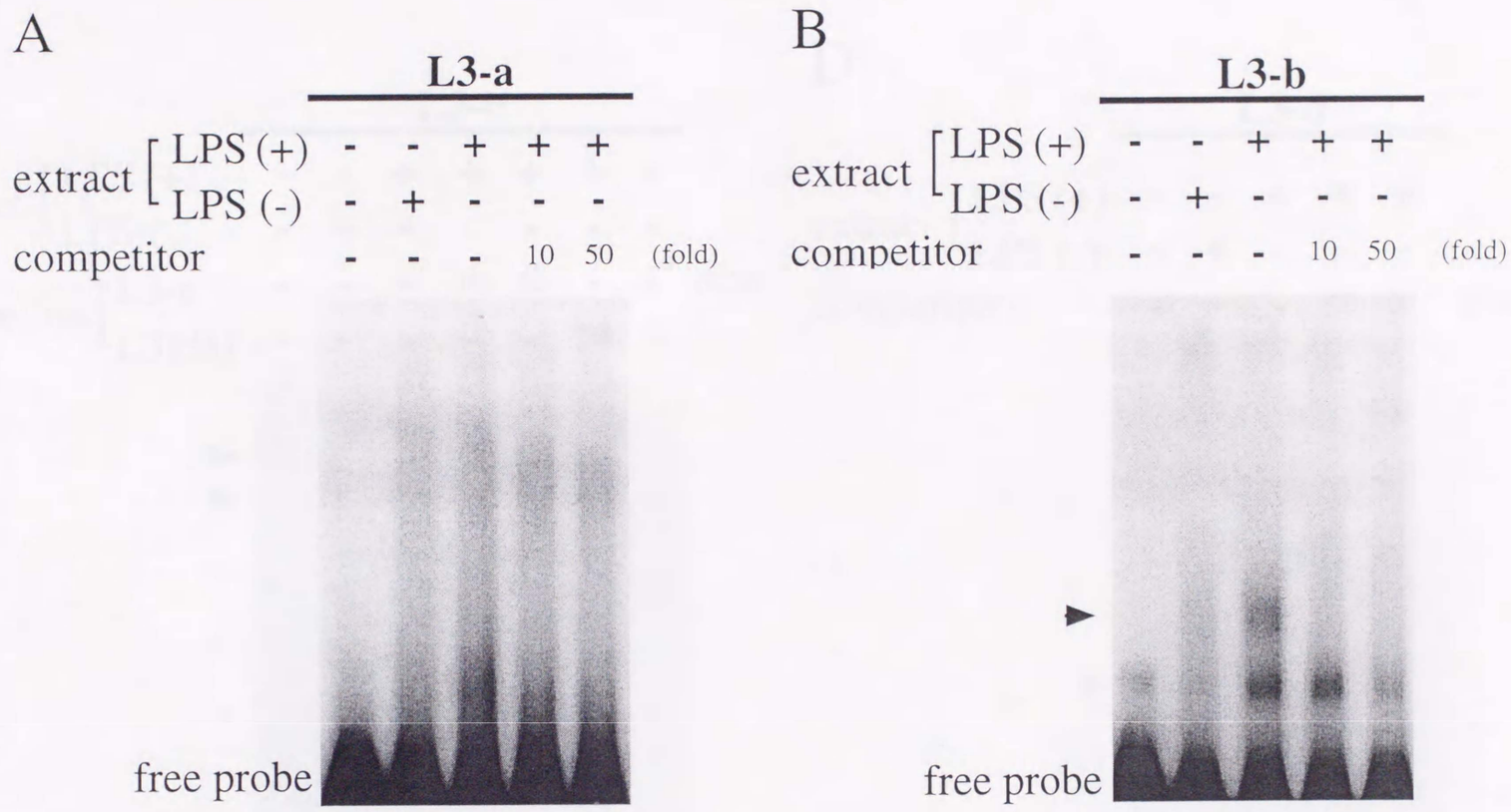
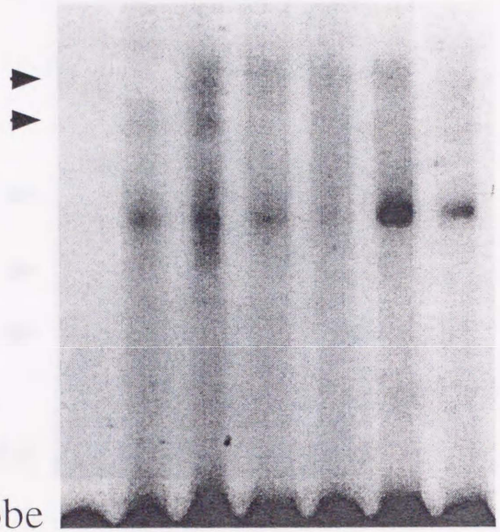


Fig. 36. An electrophoretic mobility shift assay with fat body nuclear proteins and the labeled DNA corresponding to *Leb* 3 5'-upstream region. The probes were L3-a (A), L3-b (B), L3-c (C) and L3-d. The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS (+)) or non-immunized larval fat bodies (LPS(-)) were used. For the competition experiments, 10 or 50 fold molar excess of the cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

C

L3-c

extract	LPS (+)	-	-	+	+	+	+	+
	LPS (-)	-	+	-	-	-	-	-
competitor	L3-c	-	-	-	10	50	-	- (fold)
	L3κB1	-	-	-	-	-	10	50

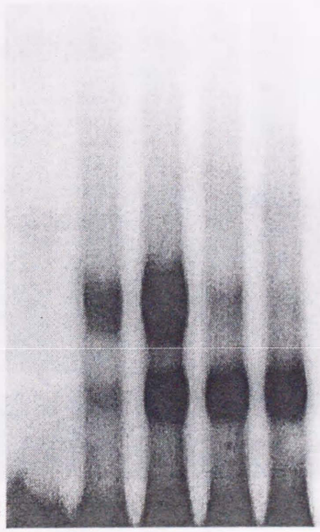


free probe

D

L3-d

extract	LPS (+)	-	-	+	+	+
	LPS (-)	-	+	-	-	-
competitor		-	-	-	10	50 (fold)



free probe

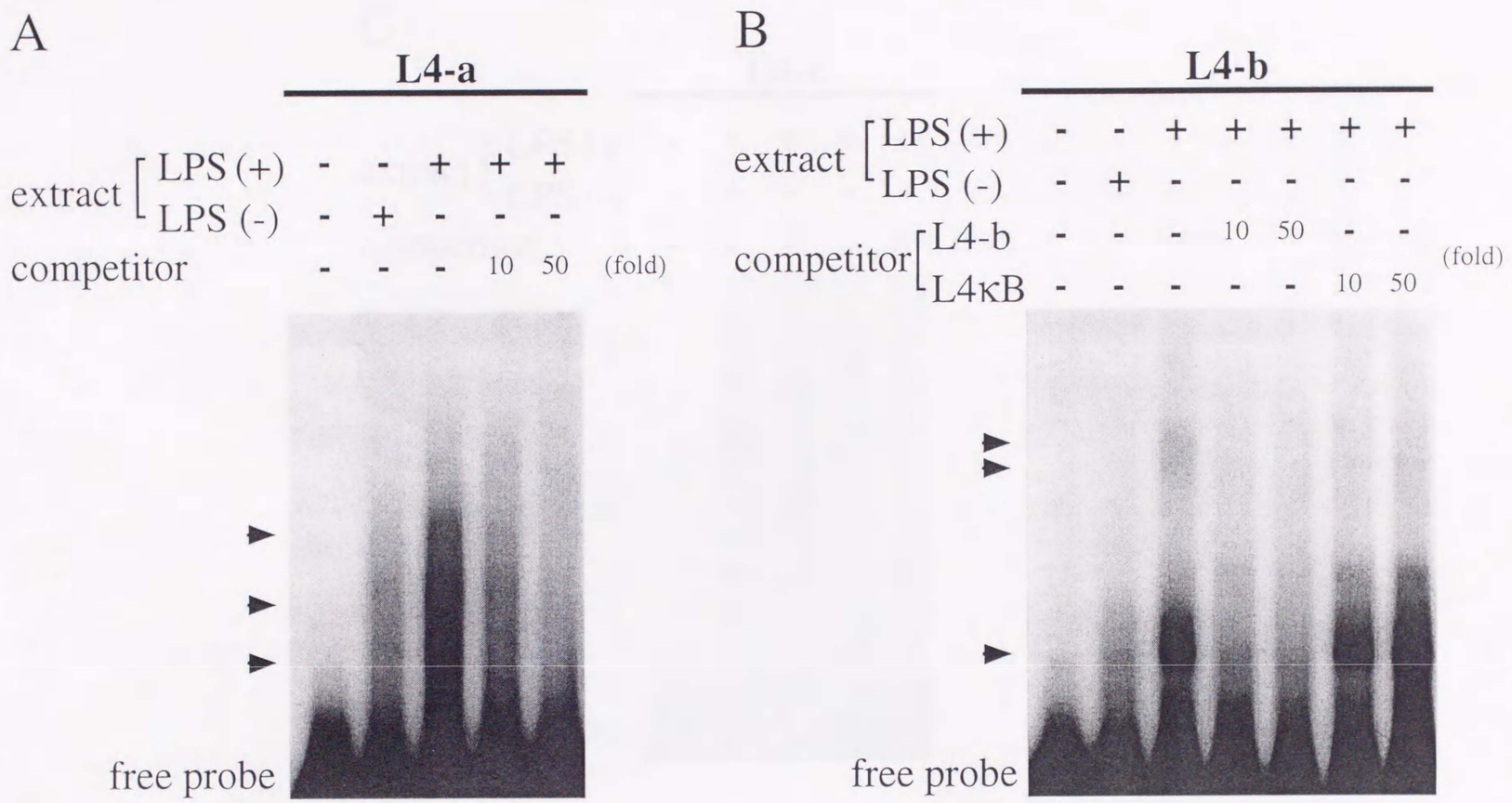
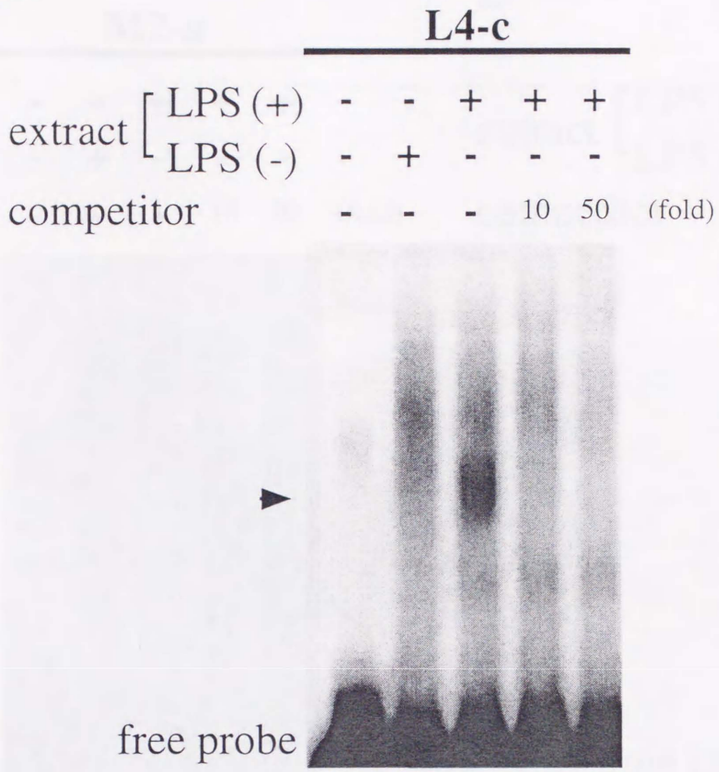


Fig. 37. An electrophoretic mobility shift assay with fat body nuclear proteins and the labeled DNA corresponding to *Leb* 4 5'-upstream region. The probes were L4-a (A), L4-b (B) and L4-c (C). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) or non-immunized larval fat bodies (LPS(-)) were used. For the competition experiments, 10 or 50 fold molar excess of the cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

C



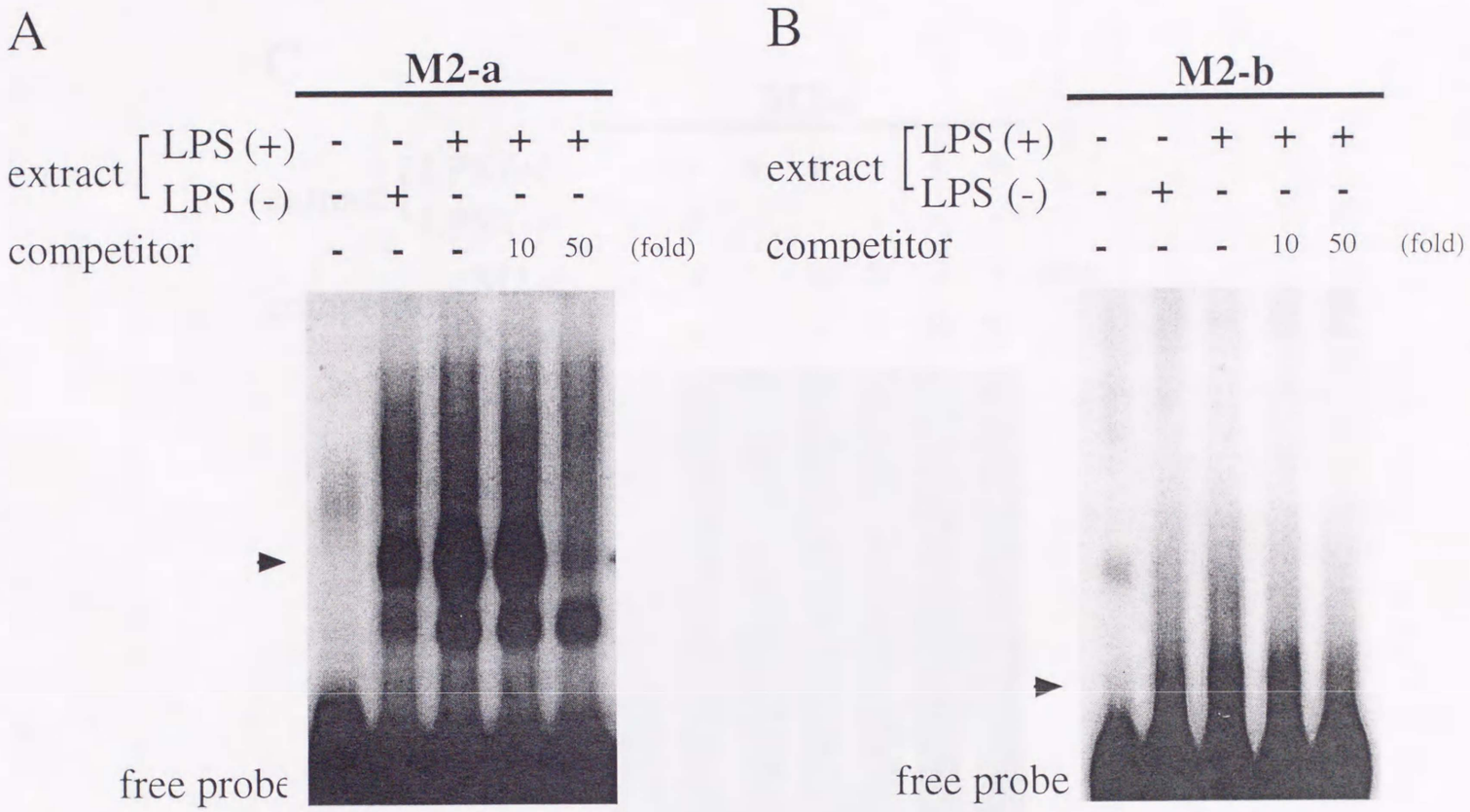
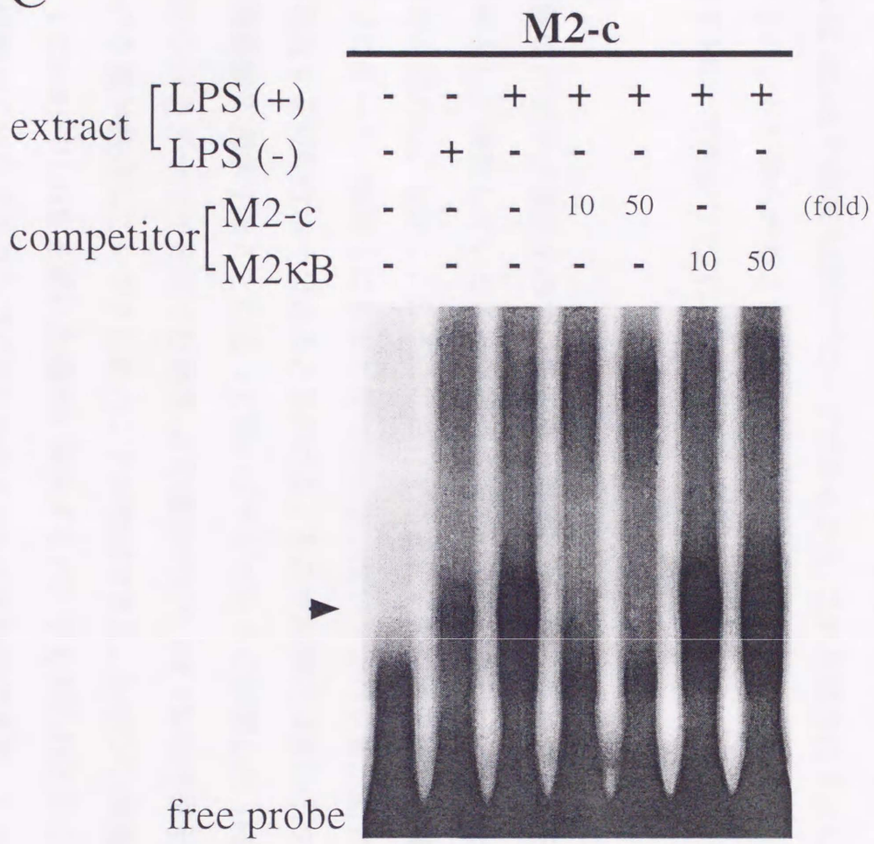


Fig. 38. An electrophoretic mobility shift assay with fat body nuclear proteins and the labeled DNA corresponding to *Mor* 2 5'-upstream region. The probes were M2-a (A), M2-b (B) and M2-c (C). The nuclear proteins of LPS-induced larval fat bodies (LPS(+)) or non-immunized larval fat bodies (LPS(-)) were used. For the competition experiments, 10 or 50 fold molar excess of the cold probe were added before the addition of the labeled probe. Arrows indicate position of the specific DNA-protein complexes.

C


M2-c
extract
LPS (+) - - + + + + +
LPS (-) - + - - - - -
competitor
M2-c - - - 10 50 - - (fold)
M2κB - - - - - 10 50
free probe

が 1 本観察された。

モリシン 2 遺伝子についても 3 個に分けたフラグメントをプローブとして用い実験を行った結果、M2-a では LPS (+) で特に強く現れるバンドが検出された。このバンドは 10 倍の競合因子を加えても変化はなかったが 50 倍加えることによって薄くなった。M2-b を用いたときには、1 本特異的なバンドがフリーのプローブに近い場所にあり、50 倍の競合因子によって弱くなった。そして M2-c を用いたときには、LPS (+) で強いシグナルのバンドが見られた。このバンドは M2-c を競合因子として用いたとき消失した。M2-c は M2κB の領域も含むプローブであるから、これを競合因子として用いた場合に消失するバンドが得られることを期待したが、その様な特性をもつバンドは得られず、競合因子 M2-c で消失したバンドは M2κB では消失しなかった。

考察

抗菌性ペプチド遺伝子のプロモーター領域において、これまでにその核タンパク質結合配列として機能していることが報告されているのは NF-κB 結合様配列と GATA モチーフのみである。しかし、カイコにおいても遺伝子発現誘導機構は複数存在すると思われ、プロモーター領域上にもまだ見つかっていないタンパク質が結合するような結合配列が存在する可能性は十分あると思われる。そこで本節では遺伝子 5' 上流の配列を適当な制限酵素で切断することによって長いフラグメントを作製した (Fig. 34, 35, 36)。

ゲルシフトアッセイを行った結果、どの遺伝子にも NF-κB 結合様配列以外の部位にもタンパク質が結合してシフトしたバンドが検出できた。レボシン両遺伝子では競合因子として L3κB1 や L4κB を用いた場合に消失するバンドも見られこれらのバンドは NF-κB 結合様配列に結合するタンパク質に由来するものと結論できた。しかしモリシン 2 遺伝子でも同様に M2κB を競合因子として用いることによって消失するバンドが見られることを期待したのだが、それを見つけることはできなかった。高分子側のバックグラウンドが高いことも考えられるが、その他に考えられる原因として 1 つは M2-c に他のタンパク質が結合したことによって、この中の NF-κB 結合様配列に結合していたはずのタンパク質の結合が阻害されたこと、もう 1 つは用いた M2κB は NF-κB 結合様配列が 2 個

連なったものであるために個々の応答配列としてみた場合、両末端側に付加したうちの片方は 6bp と他のものより短くなってしまっている。これによってタンパク質との親和性が M2-c に比べ大幅に低下し競合因子として働き得なかったことがあげられる。

今回の実験で NF-κB 結合様配列以外の配列にも結合するタンパク質が存在することが判明した。しかしこれらが本当に遺伝子発現の制御に関わっているかを明らかにするためには、さらに結合領域を絞り込みその領域がプロモーターとして機能しているかを調べていく必要があると思われる。

総合考察

1970年代後半から昆虫における抗菌性ペプチドについての研究が始まり (Faye *et al.*, 1975)、セクロピアサンから抗菌性ペプチドが単離されたのが昆虫から見つかった最初の例となった (Pye and Boman, 1977)。そして現在では鱗翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目そして半翅目と非常に幅広い分類目より様々な抗菌性ペプチドが単離され、解析が行われている。

カイコは5,000～6,000年前に既に中国大陸で人間に利用されていたと考えられ、記録上でも中国で約4,600年前に黄帝がカイコを飼育させたという記述や、日本では約1,000年前から飼育が始められたという記述がある。繭糸を作ることからその研究の歴史も長く、昆虫の中でも生理機能に関する情報が最も蓄積している生物の1つである。その中で生体防御という観点から見ても細胞性免疫、そして液性免疫とこれまでに色々な知見が得られている。

本研究はカイコの生体防御系の中で抗菌性ペプチドに焦点をあて、この誘導機構を明らかにするためにこれまでの知見をもとに実験を行った。カイコで最初に見つかった抗菌性ペプチドは1983年に報告されたセクロピンBであるが (Shiba *et al.*, 1983)、これ以降いくつかの抗菌性ペプチドが見つかり、昆虫の中で抗菌性ペプチドについても最も解析されているものの1つであろうと思われる。これまでの研究の結果、体内に細菌が侵入した際に抗菌性ペプチド遺伝子の発現が誘導される系について様々な情報が得られている。

細菌がカイコ体内に侵入した際、まず血球細胞による食作用を受ける (和合, 1994a)。この食作用によって破壊された細菌の成分としてその細胞壁成分であるLPSやリピドAが遊離することが明らかにされた。これらの物質によって抗菌性ペプチド遺伝子の発現が誘導されてくることを第1章、第2章そして第3章で証明した。本研究で解析を行ったセクロピン、アタシン、レボシンそしてモリシンは正常な条件下では遺伝子の発現は見られず、細菌やLPS、またはリピドA等の刺激因子によってセクロピン遺伝子、アタシン遺伝子、レボシン遺伝子、モリシン遺伝子は脂肪体で強く発現し、ペプチドによっては血球でも発現することが明らかとなった。これらの遺伝子は傷害のみでは発現しな

いことから細菌の侵入に特異的に反応する遺伝子であると考えられる。センチニクバエやショウジョウバエ等の双翅目昆虫では傷害だけで抗菌性ペプチド遺伝子の発現が誘導されてくることが報告されていることから (Ando and Natori, 1988; Lemaitre *et al.*, 1997)、これら双翅目昆虫とは抗菌性ペプチド遺伝子発現の調節機構は大きく異なっている可能性がある。しかしカイコにおいても表皮を削るように傷つけたときにはセクロピン遺伝子の発現誘導が見られている (Brey *et al.*, 1993)。傷害の大きさによって発現の有無は決定されているものと考えられる。

今回の研究で細菌由来ではない誘導因子としてキチンのオリゴマーが同定された。この成分をカイコに接種した場合、セクロピン遺伝子やレボシン遺伝子の発現が誘導された。アタシン遺伝子においても発現量は少ないもののシグナルが得られた。モリシン遺伝子で発現誘導の試験は行わなかったが、キチンはカイコにおいて抗菌性ペプチド遺伝子を発現誘導させる共通の因子であると思われる。キチンは真菌の構成成分であり、抗菌性ペプチド遺伝子を発現した脂肪体や血球細胞はこれを外敵として認識し、遺伝子転写活性を上昇させた可能性も考えられた。しかし、セクロピン B、アタシンそしてレボシンに抗真菌活性があることは知られておらず、ショウジョウバエでは真菌の胞子を成虫に振りかけることによって感染させた場合、抗真菌活性をもつドロソミシンやメチニコフィンの遺伝子発現は誘導されたが、この活性を有しないセクロピン A やディプテリシンの遺伝子発現は見られないことが報告されている (Lemaitre *et al.*, 1997)。このような観点からカイコで見られたキチンによる誘導現象はなぜ抗真菌活性をもたない抗菌性ペプチド遺伝子が誘導されてくるのかという新たな問題を提起する結果となった。キチンは節足動物においては表皮を形成するための重要な構成成分であることから、これが抗菌性ペプチドの誘導になぜ関与するのかその生体防御における意味は何であるのかという疑問が生じてくる。カイコは脱皮直後は皮膚が柔らかく微生物の侵入の危険にさらされるため、生活史の中でその脱皮期のみに生じる分解産物が抗菌性ペプチド遺伝子の発現を誘導するのは細菌感染に対し、あらかじめ予防線を張っておく戦略をもっているのかもしれない。またキチンの認識という点から見るとセクロピン遺伝子とアタシン遺伝子では細菌成分で誘導したとき、血球での発現量の変化に比べ脂肪体での発現が特に減少していることが分かる。レボシン遺伝子にこのような徴候は見られず、脂肪体で

のこの減少の理由は断定できないが、これらの問題は今後の詳細な研究で明らかにされるだろうと思われる。

細胞が異物認識を行ってから抗菌性ペプチド遺伝子の転写活性を上昇させるまでの細胞内シグナル伝達機構を明らかにするため、まずこれまでにカイコにおいて十分に遺伝子解析が進められていなかったレボシンとモリシンについて cDNA 及びゲノム DNA のクローニングを行った。その結果、レボシンで 2 個そしてモリシンで 1 個プロモーター領域を含むゲノム DNA クローンが得られた。これまでにセクロピンＢで 2 個の遺伝子が得られ報告されているが (Taniai *et al.*, 1995)、この 2 個の遺伝子は 12kbp 以内に隣接し、イントロンのサイズは異なっているが、コードしているアミノ酸配列は等しくまた 5' 上流領域の塩基配列を比較しても 800bp で約 90％は一致しており、かなり保存性が高いと思われた。今回得られたレボシン 3、4 遺伝子はコードされているアミノ酸配列の相同性は 87.5％という違いがあったが、イントロンが存在しなかったことや 3' 非翻訳領域も翻訳領域と変わらない相同性をもっていた。従って 5' 上流領域の塩基配列に関してもかなり上流まで保存されていると思われたが、-250bp までの領域はほぼ保存されているもののそれよりも上流の配列ではほとんど一致する領域は確認できなかった。

レボシン遺伝子やモリシン遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、NF-κB 結合様配列や NF-IL6 結合様配列という保存配列が存在していることが明らかとなった。NF-κB 結合様配列はカイコセクロピン B 遺伝子 (Taniai *et al.*, 1995)、アタシン遺伝子 (Taniai *et al.*, 1996a) そしてセクロピン A 遺伝子 (Yamano *et al.*, 1998) で保存されていることが知られている。

NF-κB 結合様配列について第 4 章第 1 節でゲルシフトアッセイを行った結果、免疫によってバンドのパターンが変化する特異的な結合が見られた。調べた全ての遺伝子でこれが認められ、競合因子を用いた試験によりここに結合する核タンパク質は同じ性質のものであるという結果が得られた。従ってこの結合様配列と核タンパク質が遺伝子の転写活性化に寄与しているとすれば、レボシンとモリシンはシグナル伝達系において部分的に共通であると結論できる。抗菌性ペプチド遺伝子の発現において異なる抗菌性ペプチドが同じシグナル伝達系を共有していることは既にショウジョウバエでも知られており (Lemaitre *et al.*, 1996)、抗菌性ペプチドをより効率的に誘導するのに貢献していると

考えられる。この競合試験をセクロピン遺伝子やアタシン遺伝子にも応用すればNF-κB結合様配列に結合する核タンパク質の重要性についてさらに考察できると考えられる。

NF-IL6 結合様配列は IL-6 応答配列タイプⅠエレメントだがこの配列はセクロピン A 遺伝子には存在しているが、セクロピン B 遺伝子やアタシン遺伝子には見つかっていない。その代わりこの 2 種類の遺伝子には IL-6 応答配列タイプⅡエレメントが存在している。これらは両方とも炎症に伴って誘導されてくる血清タンパク質 (急性期タンパク質) の誘導系に関与する応答配列である。第 4 章において NF-IL6 結合様配列に結合する核タンパク質は検出されなかった。しかし、他の配列や因子との相乗作用がある可能性もある。そしてセクロピン B 遺伝子やアタシン遺伝子で見つかっているタイプⅠエレメントが機能していれば、タイプⅡをもつ遺伝子との発現様式に影響を与えるかもしれない。昆虫からはまだサイトカインが抗菌性ペプチド遺伝子の発現に関与しているというデータは報告されていないことからもこのような配列が保存されていることは非常に興味深いと思われる。

ショウジョウバエのディプテリシン遺伝子では TATA-box のすぐ上流に位置する NF-κB 結合様配列や IL6 応答配列、そして ICRE (インターフェロン-γ 応答配列) を含む 17bp を 8 個つないでレポーター遺伝子につないだプラスミドと、5' 上流のプロモーター領域 -0.6kb にレポーター遺伝子をつないだプラスミドの発現量を比較したとき後者の方が 2～3 倍大きな数値を示すことが明らかとされている (Meister *et al.*, 1994)。従ってレボシン遺伝子でも-250b より上流の領域が異なっていることは転写活性に大きく影響を与えると思われる。また先程の研究でディプテリシン遺伝子において、-0.6kb のプロモーター領域は最大発現量の 20%にしか貢献せず 100%にするには 2.2kb 必要であると報告されている(Meister *et al.*, 1994)。そして、ドロソシン遺伝子でも 2.5kb のプロモーター領域で実際の発現が再現できることが示されている (Charlet *et al.*, 1996)。従って、今回得られたレボシン遺伝子やモリシン遺伝子のさらに上流にも制御領域が存在する可能性は大きいと思われる。第 4 章第 2 節においてその可能性に関連してこれまでに知られていない応答配列とそこに結合するタンパク質について検討してみた。その結果かなり多くの核タンパク質が結合することが明らかとなった。このゲルシフトアッセイは DNA と核タンパク質との結合性を調べるための手法であり、ここで検出されたタンパク質が遺

伝子の転写活性に本当に関与しているかは不明である。しかし、まだ昆虫におけるこれら転写因子の研究は発展途上でありこれらが重要な役割を担っている可能性は十分に考えられる。

第1章で明らかになったキチンが抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導因子として働くということに関して、この遺伝子転写活性化の機構も興味深い問題である。前でも述べたように細菌成分で誘導した場合とキチンで誘導した場合ではその発現量や組織特異性に差が見られたことから、この誘導系はLPSによるものとは異なる系である可能性がある。生物は外界からの刺激に対し、最も効率的である生体防御機構を身につけている。従ってカイコにおいても複数の誘導経路が組み合わせられて用いられている可能性が考えられる。

昆虫の生体防御機能の中で抗菌性ペプチドの研究は農薬や医薬用の新規抗菌物質としての応用利用が期待されることから今後の研究成果の注目される分野である。最近ヒトのcDNAライブラリーからToll受容体のホモログが同定され (Rock *et al.*, 1998)、脊椎動物においても先天性免疫機構は獲得抵抗性免疫機構である抗体による攻撃に移るまでに異物に対する評価を行うという点で生体防御系において非常に高い重要度を占めていることが示唆されている (Fearon, 1997)。脊椎動物は複雑に進化した故に免疫機能も多岐に分化しているのに比較し、無脊椎動物の免疫機構は脊椎動物のそれの基本形を数多く備えているためにその解明そのものが脊椎動物の複雑な免疫機構の理解に貢献できると思われる。従って今後カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導機構についてより詳細な研究を行うことにより、昆虫ではもちろん生物界全体における抗菌性ペプチドの生理的役割や生物的意義が明らかにされると考えられる。

摘要

カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導機構について研究を行い、以下の事項が明らかとなった。

1. 細菌の細胞壁構成成分であるLPSやリピドA、またはカイコ表皮のクチクラ層を構成するキチンの多量体をカイコ幼虫に注射した結果、セクロピンB、アタシン及びレボシンという3種類のカイコ抗菌性ペプチド遺伝子発現が誘導された。

2. リピドAもしくは6量体のキチンをカイコ幼虫に注射した結果誘導されるセクロピンB、アタシン及びレボシン遺伝子の発現は、主に脂肪体や血球で見られた。しかし、他の組織における発現やその強弱はそれぞれ異なっていた。

3. カイコ抗菌性ペプチドレボシンのゲノムDNAのクローニングを行い、レボシン3とレボシン4と命名した新規のレボシンをコードした遺伝子の塩基配列を決定した。

4. レボシン遺伝子の5'上流の塩基配列を調べた結果、TATA-boxやCAAT-box、またNF-κB結合様配列やGATAモチーフが見られた。NF-IL6結合様配列はレボシン3遺伝子に存在し、レボシン4遺伝子は1塩基不足した配列が存在していた。両遺伝子間で-250bまでは配列が保存されていたが、それより上流は全く異なっていた。

5. レボシン3及び4遺伝子はLPSによる刺激によって脂肪体や血球で発現が誘導され、その発現量は3遺伝子の方が4遺伝子よりも多かった。

6. カイコ抗菌性ペプチドモリシンのcDNAのクローニングを行い、塩基配列を決定した結果、シグナルペプチドと推定されるアミノ酸配列の1残基のみが異なる2種類のモリシン(モリシン1と2)が得られた。

7. 大腸菌の注射によってモリシン遺伝子は脂肪体で特に多く発現し、血球やマルピーギ管でも発現が誘導されることが明らかとなった。そして刺激後1時間で遺伝子発現が見られ、8時間後に最大量に達し48時間後においても発現の持続が確認された。

8. モリシン遺伝子はLPSやリピドAによっても発現が誘導された。またモリシン2遺伝子の方がモリシン1遺伝子よりもより多く発現誘導された。

9. ゲノムDNAのクローニングを行い、モリシン2遺伝子をコードする領域の塩基配列を決定した。5'上流の塩基配列を調べた結果、TATA-boxやNF-κB結合様配列そしてNF-IL6結合様配列が見つかった。

10. レボシン3、4遺伝子及びモリシン2遺伝子のNF-κB結合様配列及びNF-IL6結合様配列についてゲルシフトアッセイを行った結果、全ての遺伝子においてNF-κB結合様配列に結合するタンパク質の存在が認められた。

11. 競合試験の結果、レボシン3、4遺伝子及びモリシン2遺伝子のNF-κB結合様配列に結合するタンパク質は同じ性質を有するものであることが示唆された。

12. レボシン3、4遺伝子及びモリシン2遺伝子のプロモーター領域より約50～300bpのフラグメントを作製しこれらをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った結果、NF-κB結合様配列以外の配列にも結合するタンパク質が存在することが判明した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導を賜りました筑波大学農林学系応用動物学研究室 正野俊夫教授に御礼申し上げます。また本研究は農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所にて行ったものであり、生体防御研究室室長 山川 稔博士には研究遂行にあたり的確な御指導、御鞭撻を賜り謹んで謝意を表します。筑波大学農林学系応用動物学研究室 本田 洋助教授、戒能洋一講師、外国人教師 D. Taylor 博士、永田啓一講師には日頃から多大なご助言を賜りましたことに対して御礼申し上げます。農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所生体防御研究室室員 谷合幹代子博士、石橋 純博士、生体防御研究室非常勤職員 田中博光博士、中澤 裕博士、楊 峻博士、同研究所代謝調節研究室室員 加藤祐輔博士、同研究所細胞工学研究室室員 冨田秀一郎氏、生体防御研究室元非常勤職員 S. Chowdhury 博士、山本眞則博士、崔 洪圭博士、徐 金華博士、石井貴明博士、宮ノ下明大博士そして行弘文子女史には実験手法をご伝授していただき、また有益な議論と御鞭撻をいただきました。また、生体防御研究室非常勤職員 松尾由希子女史には供試虫の飼育をしていただき、深く感謝いたします。最後になりましたが、本研究は、農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 竹田 敏博士、新川 徹博士、杉村雅広博士そして角田文雄氏をはじめとする同研究所の皆様、そして筑波大学農林学系応用動物学研究室 荒野多門氏、葛西真治博士、張 力博士をはじめとする研究室の皆様の多大な御支援、御協力によって遂行することができました。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* **9**: 1897-1906.

Ando, K., Okada, M. and Natori, S. (1987) Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Biochemistry* **26**: 226-230.

Ando, K. and Natori, S. (1988) Molecular cloning, sequencing, and characterization of cDNA for sarcotoxin IIA, an inducible antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochemistry* **27**: 1715-1721.

Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1988) IκB: a specific inhibitor of the NF-κB transcription factor. *Science* **242**: 540-546.

Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J. A. and Kafatos, F. C. (1996) Immune factor Gambif 1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* **15**: 4691-4701.

Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 393-416.

Boman, H. G. and Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 103-126.

Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., François, M. and Ashida M (1993) Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6275-6279.

Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A. and Hoffmann, J. A. (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* **268**: 14893-14897.

Cao, Z., Henzel, W. J. and Gao, X. (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* **271**: 1128-31.

Carlsson, A., Engström, P., Palva, E. T. and Bennich, H. (1991) Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli*

by interfering with *omp* gene transcription. *Infect. Immun.* **59**: 3040-3045.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* **8**: 2387-2391.

Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F. and Tempst P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* **187**: 381-386.

Charlet, M., Lagueux, M., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Braun, A. and Meister, M. (1996) Cloning of the gene encoding the antibacterial peptide drosocin involved in *Drosophila* immunity. Expression studies during the immune response. *Eur. J. Biochem.* **241**: 699-706.

Chernysh, S., Cociancich, S., Briand,. J.-P., Hetru, C. and Bulet, P. (1996) The Inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palomena prasina*: identification of a unique family of proline-rich peptides and of a novel insect defensin. *J. Insect Physiol.* **42** : 81-89.

Choi, H. K., Taniai, K., Kato, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, M., Chowdhury, S., Xu, J., Sugiyama, M., Choi, S. K., Debnath, N. C., Miyanoshita, A., Asaoka, A., Ishii, T. and Yamakawa, M. (1995) Induction of activity of protein kinase C and A by bacterial lipopolysaccharide in isolated hemocytes from the silkworm, *Bombyx mori. J. Seric. Sci. Jpn.* **64**: 450-456.

Chowdhury, S., Taniai, K., Hara, S., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Xu, J., Choi, S. K., Debnath, N. C., Choi, H. K., Miyanoshita, A., Asaoka, A., Ishii,. T. and Yamakawa, M. (1995) cDNA cloning and gene expression of lebocin, a novel member of antibacterial peptides from the silkworm, *Bombyx mori. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 271-278.

Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Bulet, P. (1994) Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus. Biochem. J.* **300**: 567-575.

Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Letellier, L. (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus. J. Biol. Chem.* **268**: 19239-19245.

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.

Dimarcq, J. L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Rankine, S. M., Fothergill, J. E. and Hoffmann, J. A. (1988) Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A. *Eur. J. Biochem.* **171**: 17-22.

Dimarcq, J. L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur. J. Biochem.* **221**: 201-209.

Dunn, S. M., Coles, L. S., Lang, R. K., Gerondakis, S., Vadas, M. A. and Shannon, M. F. (1994) Requirement for nuclear factor (NF)-κB p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter. *Blood* **83**: 2469-2479.

Dushay, M. S., Åsling, B., Hultmark, D. (1996) Origins of immunity: *Relish*, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10343-10347.

Edwards, D. N., Towb, P. and Wasserman, S. A. (1997) An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development* **124**: 3855-3864.

Eldon, E., Kooyer, S., D'Evelyn, D., Duman, M., Lawinger, P., Botas, J. and Bellen, H. (1994) The *Drosophila 18 wheeler* gene is required for morphogenesis and has striking similarities to *Toll*. *Development* **120**: 885-899.

Engström, Y., Kadalayil, L., Sun, S. C., Samakovlis, C., Hultmark, D. and Faye, I. (1993) κB-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* **232**: 327-333.

Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, H. G. and Boman, I. A. (1975) Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect. Immun.* **12**: 1426-1438 .

Fearon, D. T. (1997) Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* **388**: 323-324

Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1998) A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.* **17**: 1217-1227.

Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. and Murray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.

Fujii, T., Sakurai, H., Izumi, S. and Tomino, S. (1989) Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein SP 2 of *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **264**: 11020-11025.

Geisler, R., Bergmann, A., Hiromi, Y. and Nusslein-Volhard, C. (1992) *cactus*, a gene involved in dorsoventral pattern formation of *Drosophila*, is related to the IκB gene family of vertebrates. *Cell* **71**: 613-621.

Han, Z. S., Enslen, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I. H., Barrett, T., Davis, R. J. and Ip, Y. T. (1998) A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3527-3539.

Hara, S., Taniai, K., Kato, Y. and Yamakawa, M. (1994) Isolation and α-amidation of the non-amidated form of cecropin D from larvae of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **108B**: 303-308.

Hara, S. and Yamakawa, M. (1995a) A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. J.* **310**: 651-656.

Hara, S. and Yamakawa, M. (1995b) Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **270**: 29923-29927.

Hara, S. and Yamakawa, M. (1995c) Cooperative antibacterial relationship between lebocin and cecropin D, antibacterial peptides isolated from the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entmol. Zool.* **30**: 606-608.

Hara, S., Asaoka, A. and Yamakawa, M. (1996) Effect of moricin, a novel antibacterial peptide of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), on the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Appl. Entmol. Zool.* **31**: 465-466.

Hara, S. and Yamakawa, M. (1996) Production in *Escherichia coli* of moricin, a novel type

antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 664-669.

Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988) The *Toll* gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**: 269-79.

Hecht, P. M. and Anderson, K. V. (1993) Genetic characterization of *tube* and *pelle* genes required for signaling between *Toll* and *dorsal* in the specification of the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Genetics* **135**:405-417.

Hultmark, D. (1993) Immune reactions. In *Drosophila* and other Insects: a model for Innate Immunity. *Trend Genet.* **9**: 178-183.

Hultmark, D., Engström, Å., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H. and Boman, H. G. (1983) Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* **2**: 571-576.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. and Boman, H. G. (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**: 7-16.

Ip, Y. T., Reach, M., Engström, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K. and Levine, M. (1993) *Dif*, a *dorsal*-related gene that mediates an immune response in Drosophila. *Cell* **75**: 753-763.

Ish-Horowicz, D., and Burke, J. F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2998.

Kadalayil, L., Petersen, U. M. and Engström, Y. (1997) Adjacent GATA and κB-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1233-1239.

Kanai, A. and Natori, S. (1989) Cloning of gene cluster for sarcotoxin I, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*. *FEBS Lett.* **258**: 199-202.

Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gateff, E., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (1993) Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a κB-related sequence confer inducibility to the diptericin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *EMBO J* **12**: 1561-1568.

Kato, Y., Motoi, Y., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, M., Hiramatsu, M. and Yamakawa, M. (1994) Clearance of lipopolysaccharide in hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*: its role in the termination of cecropin mRNA induction. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**: 539-545.

Kato, Y., Taniai, K., Hirochika, H. and Yamakawa, M. (1993) Expression and characterization of cDNAs for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**: 285-90.

Kidd, S. (1992) Characterization of the Drosophila *cactus* locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell* **71**: 623-635.

Kobayashi, A., Matsui, M., Kubo, T. and Natori S. (1993) Purification and characterization of a 59-kilodalton protein that specifically binds to NF-κB-binding motifs of the defense protein genes of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *FEBS Lett.* **289**: 167-170.

Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S. (1980) Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* **255**: 2919-2924.

Kylsten, P., Samakovlis, C. and Hultmark D. (1990) The cecropin locus in *Drosophila*: a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J.* **9**: 217-224.

Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1995a) Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in Drosophila. *EMBO J* **14**: 536-545.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1995b) A recessive mutation, *immune deficiency*, defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9465-9469.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983.

Lemaitre, B., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. (1997) *Drosophila* host defense: differential

induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14614-14619.

Letsou, A., Alexander, S., Orth, K. and Wasserman, S. A. (1991) Genetic and molecular characterization of tube, a *Drosophila* gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 810-814.

Levashina, E. A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J. M., Hetru, C. and Hoffmann, J. A. (1995) Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.* **233**: 694-700.

Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B., Imler, J. L. (1998) Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J. Mol. Biol.* **278**:515-527.

Marchini, D., Giordano, P. C., Amons, R., Bernini, L. F. and Dallai, R. (1993) Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta:Diptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**: 591-598.

Marchini, D., Manetti, A. G., Rosetto, M., Bernini, L. F., Telford. J. L., Baldar, C. T. and Dallai, R. (1995) cDNA sequence and expression of the ceratotoxin gene encoding an antibacterial sex-specific peptide from the medfly *Ceratitis capitata* (diptera). *J. Biol. Chem.* **270**: 6199-204.

Matsuyama, K. and 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.

Meister, M., Braun, A., Kappler, C., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1994) Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* defines several functional domains in the diptericin promoter. *EMBO J.* **13**: 5958-5966.

Mine, E., Sakurai, H., Izumi, S., and Tomino, S. (1995) The fat body cell-free system for tissue-specific transcription of plasma protein gene of *Bombyx mori. Nucleic Acids Res.* **23**: 2648-2653.

Morishima, I., Yamano, Y., Inoue, K. and Matsuo, N. (1997) Eicosanoids mediate induction of

immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* **419**: 83-86.

Mukaida, N., Mahe, Y. and Matsushima, K. (1990) Cooperative interaction of nuclear factor-κB- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **265**: 21128-21133.

Nichols, E. J., Beckman, J. M. and Hadwiger, L. A. (1980) Glycosidic enzyme activity in pea tissue and pea-*fusarium solani* infections. *Plant Physiol.* **66**: 199-204.

Nicolas, E., Nappi, A. J., Lemaitre, B. (1996) Expression of antimicrobial peptide genes after infection by parasitoid wasps in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* **20**: 175-181.

Okada, M. and Natori, S. (1985) Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* **229**: 453-458.

Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S., and Sharp, P. A. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1119-1150.

Petersen, U. M., Bjorklund, G., Ip, Y. T. and Engström, Y. (1995) The *dorsal*-related immunity factor, Dif, is a sequence-specific trans-activator of *Drosophila Cecropin* gene expression. *EMBO J.* **14**: 3146-3158.

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. [B]* **45**: 669-686.

Pye, A. E. and Boman, H. G. (1977) Insect immunity. III. Purification and partial characterization of immune protein P5 from hemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Infect. Immun.* **17**: 408-14.

Reichhart, J. M., Meister, M., Dimarcq, J. L., Zachary, D., Hoffmann, D., Ruiz, C., Richards, G. and Hoffmann, J. A. (1992) Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* diptericin promoter. *EMBO J.* **11**: 1469-1477.

Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R.A. and Bazan, J. F. (1988) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **95**: 588-593.

Rogers, J., Goedert, M. and Wilson, P. W. (1988) An extra sequence in the lambda EMBL3 polylinker. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1633.

Samakovlis, C., Kimbrell, D. A., Kylsten, P., Engström, Å. and Hultmark, D. (1990) The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J.* **9**: 2969-2976.

Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Engström, A. and Hultmark, D. (1991) The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **10**: 163-169.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sanger, F., and Coulson, A. R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**: 441-448.

Sen, R. and Baltimore, D. (1986a) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**: 705-716.

Sen, R. and Baltimore, D. (1986b) Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-928.

Shelton, C. A. and Wasserman, S. A. (1993) *pelle* encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **72**: 515-525.

Shiba, T., Kubota, I., Teshima, T., Sugiyama, Y., Oba, Y. and Kikuchi, M. (1983) Structure of Lepidpteran, a self-defence substance produced by silkworm. *Peptide Chem.* (E. Munekata, ed.) pp. 209-214. Protein Research Foundation, Osaka.

Shimabukuro, M., Xu, J., Sugiyama, M., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Chowdhury, S., Choi, S. K., Choi, H. K., Miyanoshita, A., Debnath, N. C. and Yamakawa, M. (1996) Signal transduction for cecropin B gene expression in hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori. Appl. Entomol. Zool.* **31**: 135-143.

Stein, D. and Nusslein-Volhard, C. (1992) Multiple extracellular activities in *Drosophila* egg perivitelline fluid are required for establishment of embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell* **68**: 429-40.

Sugiyama, M., Kuniyoshi, H., Kotani, E., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., Xu, J., Choi, S. K., Kataoka, H., Suzuki, A. and Yamakawa, M. (1995) Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member

of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 385-392.

Suzuki, Y., Obara, T., Takiya, S., Hui, C. Matsuo, K., Suzuki, T., Suzuki, E., Ohkubo, M. and Tamura, T. (1990) Differential transcription of the fibroin and sericin-1 genes in cell-free extracts. *Develop. Growth & Differ.* **32**: 179-187.

Steward, R. (1989) *Dorsal*, an embryonic polariry gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, *c-rel*. *Science* **238**: 692-694.

Sun, S. C., Åsling, B. and Faye, I. (1991a) Organization and expression of the immuno-responsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. *J. Biol. Chem.* **266**: 6644-6649.

Sun, S. C., Lindström, I., Lee, J. Y. and Faye, I. (1991b) Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **196**: 247-254.

Sun, S. C. and Faye, I. (1992a) *Cecropia* immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor κB. *Eur. J. Biochem.* **204**, 885-892.

Sun, S. C. and Faye, I. (1992b) Affinity purification and characterization of CIF, an insect immunoresponsive factor with NF-κB-like properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**: 225-233.

Taniai, K., Ishii, T., Sugiyama, M., Miyanoshita, A. and Yamakawa, M. (1996a) Nucleotide sequence of 5'-upstream region and expression of a silkworm gene encoding a new member of the attacin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 594-599.

Taniai, K., Furukawa, S., Shono, T. and Yamakawa, M. (1996b) Elicitors triggering the simultaneous gene expression of antibacterial proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**: 783-790.

Taniai, K., Kato, Y., Hirochika, H. and Yamakawa, M. (1992) Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1132**: 203-206.

Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., Xu, J., Kotani, E., Tomino, S. and Yamakawa, M. (1995) Structure of two cecropin B-encoding genes and bacteria-inducible DNA-binding proteins which bind to the 5'-upstream

regulatory region in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* **163**: 215-219.

Taniai, K., Wago, H. and Yamakawa, M. (1997) *In vitro* phagocytosis of *Escherichia coli* and release of lipopolysaccharide by adhering hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**: 623-627.

Teshima, T., Ueki, Y., Nakai, T., Shiba, T. and Kikuchi, M. (1986) Structure determination of lepidpteran, self-defence substance produced by silkworm. *Tetrahedron* **42**: 829-834.

Tryselius, Y., Samakovlis, C., Kimbrell, D. A., Hultmark, D. (1992) CecC, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila* pupae. *Eur. J. Biochem.* **204**: 395-399.

和合 治久 (1994a) 昆虫の食細胞と生体防御. 植物防疫 **48**: 9-14.

和合 治久 (1994b) 節足動物の免疫系. 動物免疫学入門 (和合 治久編), pp.150-157. 朝倉書店

和合 治久 (1995) 昆虫の生体防御反応. 日本応用動物昆虫学会誌 **1**: 1-13.

Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. and Eldon, E. D. (1997) The *18-wheeler* mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* **16**: 6120-6130.

Wilson, I. B., Gavel, Y. and von Heijne, G. (1991) Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochem. J.* **275**: 529-534.

山川 稔 (1998) 昆虫抗菌性蛋白質: その合成制御機構と新規抗生物質としての可能性. 日本蚕糸学雑誌 **67**: 163-182.

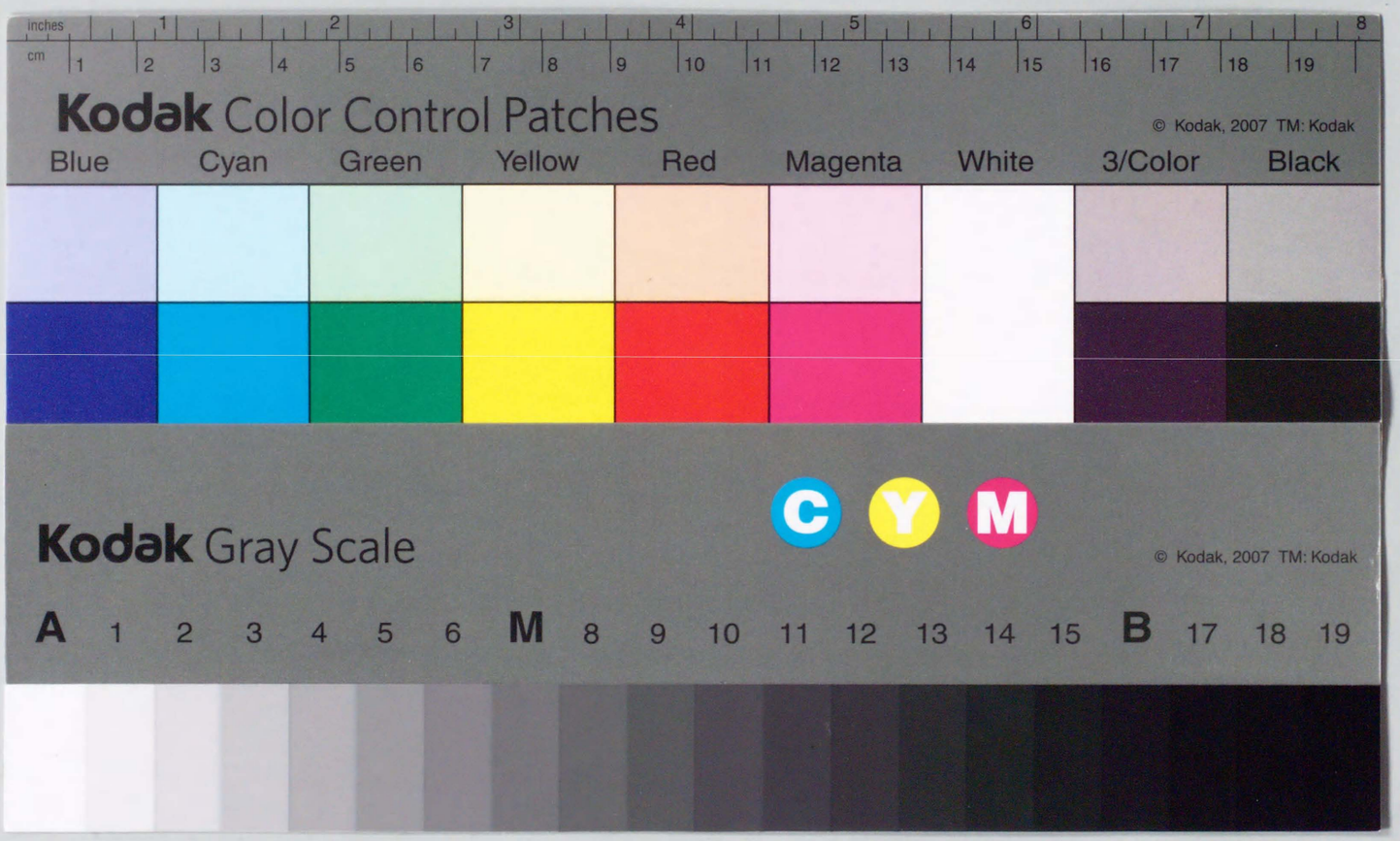
Yamano, Y., Matsumoto, M., Inoue, K., Kawabata, T. and Morishima, I. (1994) Cloning of cDNAs for cecropins A and B, and expression of the genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1476-1478.

Yamano, Y., Matsumoto, M., Sasahara, K., Sakamoto, E. and Morishima, I. (1998) Structure of genes for cecropin A and an inducible nuclear protein that binds to the promoter region of the genes from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 237-241.

Yang, J. and Steward, R. (1997) A multimeric complex and the nuclear targeting of the *Drosophila* Rel protein Dorsal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14524-14529.

Zhang, Y., Broser, M. and Rom, W. N. (1994) Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and

NF-κB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2225-2229.


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19