

総説 (Review Article)

微生物に対する生体防御分子としてのディフェンシン： 節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンの特性

山内 英男^{1)*}、前原 紀敏²⁾、高梨 琢磨¹⁾、中島 忠一¹⁾

Defensins as host defense molecules against microbes: the characteristics of the defensins from arthropods, mollusks and fungi

Hideo YAMAUCHI^{1)*}, Noritoshi MAEHARA²⁾,
Takuma TAKANASHI¹⁾ and Tadakazu NAKASHIMA¹⁾

Abstract

Multicellular organisms have evolved innate immunity to protect efficiently themselves against infection from a wide variety of microorganisms in the habitats. A large number of antimicrobial peptides characterized so far are categorized into a few large groups on the basis of similarities in molecular structure and antimicrobial activity. The antimicrobial peptides stabilized by disulfide bridges between cysteine residues, defensins, are found among fungi, invertebrates (arthropods, mollusks and nematodes), plants and vertebrates (mammals, birds and fishes). The defensins from fungi, invertebrates and plants are characterized by sharing the stabilized conformation called CS $\alpha\beta$ motif. The β -, α - and θ -defensins from vertebrates have different conformations, respectively. More recent evidence provides a novel member of the defensin from the fungus, *Pseudoptectania nigrella*, which exhibits significant similarities to the defensins from mollusks and arthropods in amino acid sequence, three-dimensional structure and anti-Gram-positive bacterial activity. This article reviews the characteristics involving structure, phylogeny and gene expression of the defensins from arthropods, mollusks and fungi. For a full understanding, we present the analysis results of isoelectric points, molecular weights, multiple alignments and molecular phylogenetic trees in their defensins by means of bioinformatics.

Key words : innate immunity, defensins, amino acid sequences, disulfide bridges, fungi

要旨

多細胞生物は、生息環境における多様な微生物の感染から効果的に生体を防御するため、自然免疫を発達させている。今日までに明らかにされた多数の抗菌ペプチドは、分子構造及び抗菌活性の類似性に基づき数種類の大きなグループに区分されている。特に、分子内のシステイン残基のジスルフィド架橋により安定化する抗菌ペプチドはディフェンシンと名付けられ、菌類、無脊椎動物（節足動物・軟体動物・線形動物）、植物及び脊椎動物（哺乳類・鳥類・魚類）から分離されている。菌類、無脊椎動物及び植物に由来するディフェンシンは、CS $\alpha\beta$ モチーフという安定化した高次構造を共有することにより特徴づけられる。脊椎動物に由来する β 、 α 及び θ ディフェンシンはそれぞれ異なる構造特性を示す。最近の研究により、新規ディフェンシンが菌類 *Pseudoptectania nigrella* から発見された。その菌類ディフェンシンは、アミノ酸配列、高次構造及びグラム陽性細菌に対する抗菌活性において、軟体動物及び節足動物に由来するディフェンシンと著しい類似性を示すことが明らかにされている。本総説では、節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンの構造、分子系統及び遺伝子発現等の特性について概説した。さらに理解を十分に深めるため、これら一群のディフェンシンの等電点、分子量、マルチプルアライメント及び分子系統に関して、バイオインフォマティクスによる解析データを示した。

キーワード：自然免疫、ディフェンシン、アミノ酸配列、ジスルフィド架橋、菌類

はじめに

新しい抗菌ペプチドが、生物製剤の探索を目的として北ヨーロッパのマツ林床に生息する腐生性子囊菌クロチャワタケ *Pseudoptectania nigrella* から単離され、構造決定された (Mygind et al., 2005)。そ

のペプチドはプレクタシン (Plectasin) と名付けられ、院内感染の恐れのあるグラム陽性の肺炎連鎖球菌 *Streptococcus pneumoniae* に対して強い抗菌活性を示し、マウス・ヒトの培養細胞並びにマウス個体を用いた両試験で低毒性であり、麹菌 *Aspergillus oryzae* を

原稿受付：平成20年2月18日 Received 18 February 2008 原稿受理：平成21年12月10日 Accepted 10 December 2009

1) 森林総合研究所森林昆虫研究領域 Department of Forest Entomology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) 森林総合研究所東北支所 Tohoku Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

* 森林総合研究所森林昆虫研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1 Department of Forest Entomology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matunosato, Tukuba, Ibaraki 305-8687, Japan, e-mail: yamauchi@ffpri.affrc.go.jp

利用して工業的な生産も可能であることから、特許が出願された。プレクタシンは、抗菌ペプチドの主要グループであるディフェンシン、そのサブグループである軟体動物及び節足動物に由来するディフェンシンの構造と高い類似性を示すことが明らかにされた。今日までに、多数の抗生物質が菌類から分離されてきたが、プレクタシンは菌類から遺伝子にコードされた抗菌ペプチドが単離された初めての例である。従来の研究は比較的高等多細胞生物を対象に行われてきたので、抗菌ペプチドが系統的に遠く離れた菌類から発見された事実は、ディフェンシンの分子進化を再考するうえで、また遺伝子資源を探索する応用面でも衝撃をもって受け入れられた。プレクタシンの発見を契機として、プレクタシンに類似した配列の探索がデータバンクに収録されている菌類ゲノムに対して行われた (Zhu, 2008)。

抗菌ペプチドに関する構造及び機能解析等の一連の研究は、微生物に対する多細胞生物の自然免疫 (innate immunity) に関するメカニズムの解明を目的として、或いはペプチド性生物製剤として抗菌ペプチドの応用を目的として進展してきた。今日まで、内分泌性として体内環境で機能を果たす抗菌ペプチドに対して、また上皮組織で機能を果たす抗菌ペプチドに関して、多数の研究が行われている (Hoffmann, 2003; Bulet et al., 2004)。

筆者らは、未解明な分野である体外環境で機能を果たす外分泌性抗菌ペプチドに関する研究を進めている。マツ材線虫病において、マツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* (以下、ザイセンチュウ) はマツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus* 成虫 (以下、マダラカミキリ) によって健全なマツに運ばれ、樹体内を移動してマツを衰弱・枯死させる。マダラカミキリ成虫が運ぶザイセンチュウ数はマツの衰弱・枯死に大きく影響する。青変菌 (*Ophiostoma* 属等) は衰弱・枯死したマツ樹体内で繁殖可能となり、ザイセンチュウは青変菌を餌として増殖する。青変菌がマダラカミキリ蛹室周辺で繁殖することは、蛹室周辺へ集まるザイセンチュウ数並びにマダラカミキリ成虫の保持するザイセンチュウ数に影響を及ぼす一要因となっている (前原 2002; Maehara et al., 2005)。筆者らは、青変菌が繁殖したマツ材青変部から抽出される抗菌活性を示す分子の解析を進めており、抗菌活性はマダラカミキリ、ザイセンチュウ及び青変菌の3種が生態的に密接な関係を樹立するため、蛹室周辺から競合する微生物の侵入を排除する役割を担っていると予測している。青変菌は、クロチャワンタケと同じ子嚢菌類に属している。

本総説では、菌類に由来するディフェンシンに加え、それと類似性の高い節足動物及び軟体動物に由来するディフェンシンに関する研究の現状と分子特性につい

て理解を深めるため、ディフェンシンの構造、分子系統及び遺伝子発現等の特性に関して概要を紹介する。そのため、文献、タンパク質及びDNA等のデータバンクから既知ディフェンシンを調べ、アミノ酸配列一次構造並びに高次構造に基づき各種の解析を行った。また多様な分子に共通する特性及び変異を示す特性を理解するため、抗菌ペプチドの一般的な解説並びに他生物に由来するディフェンシンの補足的な解説も行った。

抗菌ペプチドの特性

抗菌ペプチドは遺伝子にコードされた転写・翻訳産物であり、細菌、菌類、原虫及びウイルス等を含む異物に対する抗菌活性・不活化活性により、生息環境の微生物感染から生体を守る主要な機能を果たしている。ほとんどの多細胞生物は、種固有の何種類もの抗菌ペプチドを生合成する能力を備えている。

抗菌ペプチドの遺伝子発現は通常が発育状態において極めて低いレベルにある。多細胞生物が微生物感染を受けると、体液中に存在する数種の宿主異物認識タンパク質が、微生物の特異的な菌体細胞壁及び外膜の構成成分、即ちグラム陽性細菌のペプチドグリカン、グラム陰性細菌のリポ多糖 (LPS) 及び菌類の β グルカン等の分子構造に結合し、非自己の分子認識が行われる。その異物認識のシグナルは細胞へ伝達され、キロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で明らかにされた Toll/Dif 及び imd/Relish のような細胞内シグナル伝達経路を介して、抗菌ペプチド遺伝子の活性化が調節される。ヒトでも類似したシグナル伝達経路が解析されており、抗菌ペプチド遺伝子発現を誘導する一連の分子機構は共通の起源をもつと推定されている (Hoffmann et al., 1999; Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003)。抗菌ペプチドはシグナルペプチド、プロペプチド及び成熟ペプチドの各ドメインから構成された前駆体ペプチドとして、細胞質の粗面小胞体で生合成される。シグナルペプチド及びプロペプチドのドメインはプロテアーゼにより前駆体ペプチドから除去され、最終的に成熟ペプチドの立体構造が構築される。この一連のプロセスを経て、機能的な抗菌ペプチドとして細胞外へ分泌される。抗菌ペプチドは、外界と接する上皮組織に生じた傷口のような局所的な防御のために、或いは体液を循環して全身的な防御のために機能を果たし、体内へ侵入する微生物を死滅させる (Hoffmann and Reichhart, 2002)。

今日までに、菌類、無脊椎動物、植物並びに脊椎動物を含む多様な多細胞生物から、多数の抗菌ペプチドが分離されており、cDNA のヌクレオチド配列、アミノ酸配列、ペプチドの高次構造、抗菌活性並びに抗菌作用等が解明されている (Dimarcq et al., 1998; Hetru et al., 1998; Tossi et al., 2000)。それらの研究から、

大多数の抗菌ペプチドは数 kDa の分子量をもつ低分子であり、大きな分子でも約 30kDa のポリペプチドである。多くの抗菌ペプチドの総電荷 (net charge) は水溶液中でプラスに荷電した陽イオンの特性を示し、一般的なペプチド・タンパク質のようにマイナスに荷電した生体分子とは異なる性質を示す。しかし、マイナスに荷電した陰イオンの特性を示す抗菌ペプチドも存在する (Lai et al., 2004; Cytrynska et al., 2007)。抗菌ペプチドの作用様式として、多くの分子は親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸から構成される両親媒性を示し、疎水領域が微生物生体膜のマイナスに荷電しているリン脂質と強く相互作用し、微生物の膜透過性に影響を及ぼすと推定されている (Tossi et al., 2000; Zasloff, 2002; Jenssen et al., 2006)。

抗菌ペプチドの区分

抗菌ペプチドは生物種固有のアミノ酸残基数及び構成を示すが、分子構造及び抗菌活性の類似性に基づき、1) システイン残基のジスルフィド架橋により安定化した高次構造を構築するペプチド、2) α ヘリックスから構成されるペプチド、3) 1 或いは 2 種類のアミノ酸残基 (プロリン、アルギニン、グリシン或いはトリプトファン) が分子内に多く含まれるペプチド、これら 3 種類の大きなグループに区分される (Hetru et al., 1998; Tossi et al., 2000; Bulet et al., 2004; Bulet and Stöcklin, 2005; Jenssen et al., 2006)。

システイン残基のジスルフィド架橋により安定化した高次構造を構築するペプチドは、アミノ酸配列一次構造並びに高次構造の類似性に基づき、i) ディフェンシン、ii) β ストランドから構成される抗菌ペプチド、iii) β ストランドから構成されたヘアピン状の抗菌ペプチド等のサブグループに細分されている (Dimarcq et al., 1998; Bulet et al., 2004; Bulet and Stöcklin, 2005)。i) ディフェンシンは次項で詳細に記載する。ii) β ストランドから構成される抗菌ペプチドは KNOTTIN に属し、プロテアーゼインヒビター、トキシン、抗菌及び抗ガン等の機能を備えたシステイン残基を保有する分子が KNOTTIN database に収録されている (Gracy et al., 2008)。KNOTTIN に含まれる分子は、3 個の逆平行 β ストランド、3 対以上のジスルフィド架橋及び knottin fold と呼ばれる構造特性を示す。iii) β ストランドから構成されたヘアピン状の抗菌ペプチドは、2、4 或いは 8 個のシステイン残基を保存し、1、2 或いは 4 対のジスルフィド架橋を備え、2 個の逆平行 β ストランドとループから構成された β ヘアピン状の高次構造を示す (Bulet et al., 2004)。

以上のように、抗菌ペプチドのアミノ酸配列一次構造に加え、高次構造の特性を十分に把握することが抗菌ペプチドを理解する鍵となる。

ディフェンシンの主要なグループ並びにサブグループの特性

ディフェンシンは、菌類、節足動物・軟体動物・線形動物等の無脊椎動物、植物並びに哺乳類・鳥類・魚類等の脊椎動物を含む最も広範囲の多細胞生物から発見されている。アミノ酸配列一次構造解析に基づく特性として、ディフェンシンはシステイン残基モチーフを保存しており、さらにシステイン残基の側鎖であるチオール基の間で酸化的に結合 (S-S 結合) して 1 本ペプチド鎖の高次構造を安定化させるジスルフィド架橋を形成している。これらのシステイン残基モチーフ並びにジスルフィド架橋パターンは、ディフェンシンによって顕著な変異を示す (Fig. 1)。ディフェンシンは、アミノ酸残基数及び構成において種特異的な変異を示しており、それぞれの生物種が生息する環境中の微生物フローラの相違を反映し、抗菌機能との関連で多様な変異を生じていると推定される。X線結晶解析並びに核磁気共鳴装置 (NMR) により解析された高次構造に基づく特性として、ディフェンシンは 1 個の右らせん構造 α ヘリックス、2~3 個の逆平行に配置する平面構造 β ストランド及びループから構成され、 $\alpha\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta\beta$ 或いは $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフを保存したディフェンシンが各種の生物から構造決定されている (Fig. 2)。 $\beta\beta\beta$ 構造モチーフ及び $\beta\beta$ 環状構造を保存したディフェンシンも存在するが、これらは $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシンから派生した分子である。分子の折りたたみによるアミノ酸残基の立体的配置は、抗菌機能と密接に関連する。

菌類、無脊椎動物及び植物に由来するディフェンシンは、CS $\alpha\beta$ モチーフを共有している。CS $\alpha\beta$ モチーフは、分子内の 3 或いは 4 対のジスルフィド架橋の中で、特に分子の N 末端側の α ヘリックスと C 末端側の β ストランドが 2 対のジスルフィド架橋によって結合 (Fig. 3A) する重要なモチーフとして解析された (Cornet et al., 1995; Dimarcq et al., 1998)。 γ -core モチーフと名付けられた構造は (Table 2)、ディフェンシンを含むシステイン残基を保有するペプチドに広く共有されており、それぞれのペプチドに特異的な機能と関連する主要な構造と考えられている (Yount and Yeaman 2004)。

ディフェンシンは、構造解析データから得られたアミノ酸配列並びにシステイン残基モチーフに基づく一次構造の類似性により区分されるが、 $\alpha\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta\beta$ 及び $\alpha\beta\beta\beta$ の構造モチーフに基づく高次構造を考慮しないと、誤った解釈を導く恐れがある。本総説では、高次構造の共通性に焦点を当て、ディフェンシンを $\alpha\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta\beta$ 及び $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフに基づいてグループ別に大きく区分する。次に、システイン残基モチーフ、ジスルフィド架橋パターン及びア

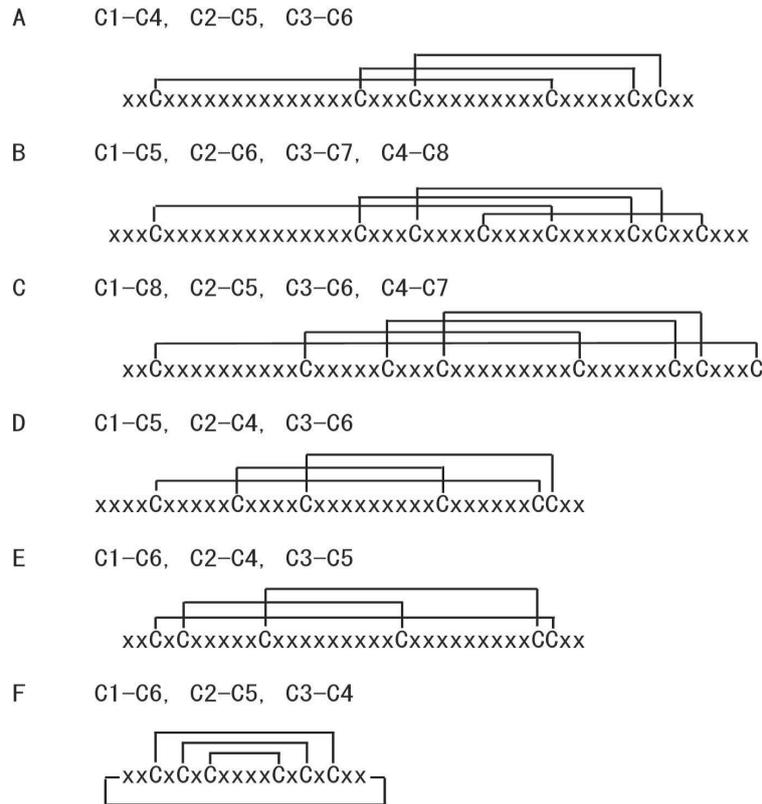


Fig. 1. ディフェンシンのアミノ酸配列一次構造に基づくシステイン残基モチーフ及びジスルフィド架橋パターンを示す模式図。**A.** 昆虫ディフェンシン、**B.** 8システイン残基をもつ軟体動物ディフェンシン、**C.** 植物ディフェンシン及びDrosomycin、**D.** 脊椎動物 β ディフェンシン、**E.** 哺乳類 α ディフェンシン、**F.** 哺乳類 θ ディフェンシン。アミノ酸配列はシステイン残基(C)と他のアミノ酸残基(x)により簡略化して表示され、ジスルフィド架橋するシステイン残基を番号並びに棒線で結ぶ。アミノ酸残基(x)の数は各分子により変異する。
Schematic representation of amino acid sequence primary structures of defensins, showing the motifs of cysteine residues and the spacing patterns of disulfide bridges. **A.** Insect defensins, **B.** Mollusk defensins with 8 cysteine residues, **C.** Plant defensins and drosomycin, **D.** Vertebrate β -defensins, **E.** Mammalian α -defensins, **F.** Mammalian θ -defensins. The amino acid sequences are simply illustrated with cysteine residues (C) and other amino acid residues (x), showing disulfide bridges between cysteine residues by numbers and lines. The amino acid residues (x) are variable in respective defensins.

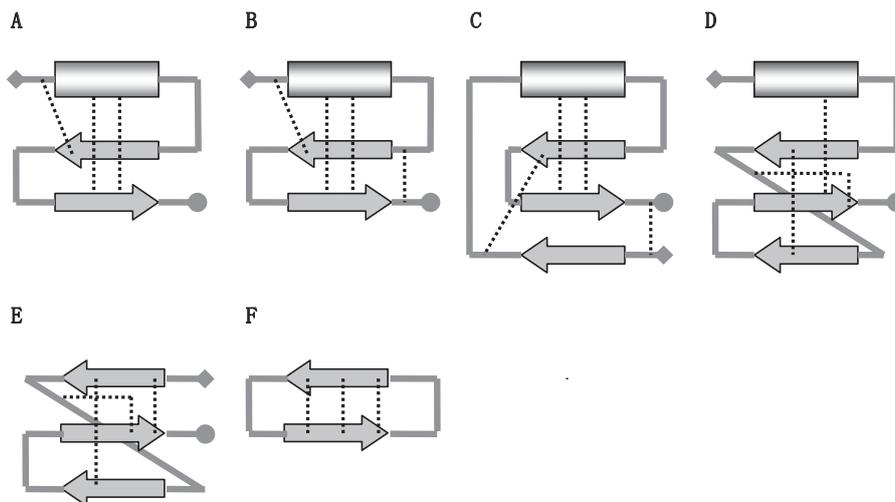


Fig. 2. ディフェンシンの高次構造に基づく模式図。ディフェンシンの1本鎖を構成する α ヘリックス(■)、逆平行 β ストランド(⇐⇒)、ループ(—)、ジスルフィド架橋(.....)、N末端(◆)及びC末端(●)を示す。**A.** 昆虫ディフェンシン、**B.** 8システイン残基を有する軟体動物ディフェンシン、**C.** 植物ディフェンシン及びDrosomycin、**D.** 脊椎動物 β ディフェンシン、**E.** 哺乳類 α ディフェンシン、**F.** 哺乳類 θ ディフェンシン
Schematic representation of three-dimensional structures of defensins. Defensins are a single peptide chains that are composed of a single α -helix (■), antiparallel β -strands (⇐⇒), loops (—), disulfide bridges (.....), N-terminus (◆) and C-terminus (●). **A.** Insect defensins, **B.** Mollusk defensins with 8 cysteine residues, **C.** Plant defensins and drosomycin, **D.** Vertebrate β -defensins, **E.** Mammalian α -defensins, **F.** Mammalian θ -defensins.

ミノ酸配列等の特性を考慮して、さらに類似性の高いディフェンシンをサブグループとして区分し、各サブグループのディフェンシンに関する特徴的な構造並びに抗菌活性等の特性を以下に解説する。

1. $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシン

1.1. 昆虫ディフェンシン (Insect defensins)

昆虫ディフェンシンは不完全変態の半翅目 (カメムシ目)、完全変態の双翅目 (ハエ目)、甲虫目 (コウチュウ目) 及び膜翅目 (ハチ目) 等の昆虫から主として構造決定されており、34 ~ 51 アミノ酸残基から構成され、ATC、VTC、LTC 及び FTC 等のような特徴的な N 末端アミノ酸配列を構成する (Dimarcq et al., 1998; Hetru et al., 1998)。昆虫ディフェンシンは、分子内の 6 システイン残基モチーフ並びに 3 対のジスルフィド架橋パターン (C1-C4, C2-C5, C3-C6) を共有しており (Fig. 1A)、 α ヘリックス、2 個の逆平行 β ストランド及びループから構成され、 $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフ及び CS $\alpha\beta$ モチーフを保存している (Hanzawa et al., 1990; Bonmatin et al., 1992; Cornet et al., 1995)。遺伝子重複によると推定される複数のディフェンシン遺伝子の転写・翻訳産物は、アミノ酸残基の構成に変異のある数種類のアイソフォーム (isoform) として報告されている。その一例として、ドウガネブイブイ *Anomala cuprea* のディフェンシンは 2 種類のアイソフォームが存在し、43 残基の 2 残基においてアミノ酸置換しており、アイソフォームの間で異なる抗菌活性を示す (Yamauchi, 2001)。昆虫ディフェンシンは、主としてグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を示す。

不完全変態の等翅目 (シロアリ目) に属すキノコシロアリ *Pseudacanthotermes spiniger* から termicin が分離されている。termicin は AC 及び DC のような特徴的な N 末端アミノ酸配列を構成し、 α ヘリックス、2 個の逆平行 β ストランド及びループから構成され、昆虫ディフェンシンと類似する $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフ及び CS $\alpha\beta$ モチーフを保存しているが、グラム陽性細菌に対して弱い活性を示し、菌類に対して強い抗菌活性を示す点で上記の昆虫ディフェンシンと異なる (Lamberty et al., 2001b; Da Silva et al., 2003)。*Nasutitermes* 及び *Drepanotermes* 属のシロアリから単離された 20 種類の termicin は、非同義置換と同義置換 (dn/ds) 及び分子の総電荷との関連に基づき、positive selection (ポジティブ選択) を受けている可能性が推定されている (Bulmer and Crozier, 2004)。

1.2. 節足動物・軟体動物ディフェンシン

(Arthropod and Mollusk defensins)

節足動物・軟体動物ディフェンシンは、トンボ、サソリ、クモ及びダニ等の節足動物、ムール貝及びカキ

等の軟体動物から発見されており、35 ~ 60 のアミノ酸残基から構成されるディフェンシンが構造決定されている。昆虫ディフェンシンと比較して、アミノ酸配列 N 末端にグリシン残基 (G) が付加されており、GFGC、GYGC、GWSC 及び GGYC のような特徴的な N 末端アミノ酸配列を構成する。本グループのディフェンシンは 6 システイン残基を共有しているが、チレニアイガイ *Mytilus galloprovincialis* 及びマガキ *Crassostrea gigas* では 8 システイン残基を保存している (Mitta et al., 1999b, 2000a; Gueguen et al., 2006)。ジスルフィド架橋パターンは昆虫ディフェンシンと基本的に類似し (Fig. 1B)、 α ヘリックス並びに 2 個の逆平行 β ストランドから構成された $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフ及び CS $\alpha\beta$ モチーフが保存されている (Yang et al., 2000; Gueguen et al., 2006)。主として、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す。

ダニ、サソリ及びムール貝等に由来する分子は、上記ディフェンシンと類似するシステイン残基モチーフを示すが、N 末端側のアミノ酸配列は FDNPFGC、YENPYGC、TAHVLDLVC、ASGC、SIVPIR、SC、SHAC 及び PHVC 等から構成され、著しい変異を示す (Lai et al., 2004; Zhou et al., 2007; Ceraul et al., 2007; Ehret-Sabatier et al., 1996; Rodriguez de la Vega et al., 2004; Mitta et al., 1999a)。これらの分子はシステイン残基モチーフに基づきディフェンシンと考えられているが、高次構造の解析は行われていない。

チレニアイガイ等から、グラム陽性及び陰性細菌に対して抗菌活性を示す 5 種類の mytilin が分離されている。mytilin は 8 システイン残基を共有しているが、軟体動物ディフェンシンのシステイン残基モチーフ (Fig. 1B) とは相違を示す (Mitta et al., 2000b)。しかし、mytilin の高次構造解析の結果は (PDB ID: 2EEM)、 α ヘリックスと β ストランドの間に 3 対のジスルフィド架橋が形成される点を除いて、ジスルフィド架橋パターン (C1-5, C2-6, C3-7, C4-8) 並びに $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフにおいて、8 システイン残基を保存した軟体動物ディフェンシン (Fig. 2B, Fig. 3B) と高い類似性を示す (Roch et al., 2008)。

1.3. 線形動物ディフェンシン (Nematoda defensins)

ブタカイチュウ *Ascaris suum* から ASABF (*Ascaris suum* antibacterial factor) と名付けられた 6 種類のディフェンシンが、またモデル生物としての *Caenorhabditis elegans* から abf (antibacterial factor) と名付けられた 6 種類のディフェンシンが、それぞれ発見されている (Kato and Komatsu, 1996; Kato et al., 2002; Andersson et al., 2003; Pillai et al., 2003; Zhang and Kato, 2003)。これらの分子は、8 システイン残基を共有しており、その N 末端及び C 末端のアミノ酸残基数及び構成は各分子の間で著しい変異を示

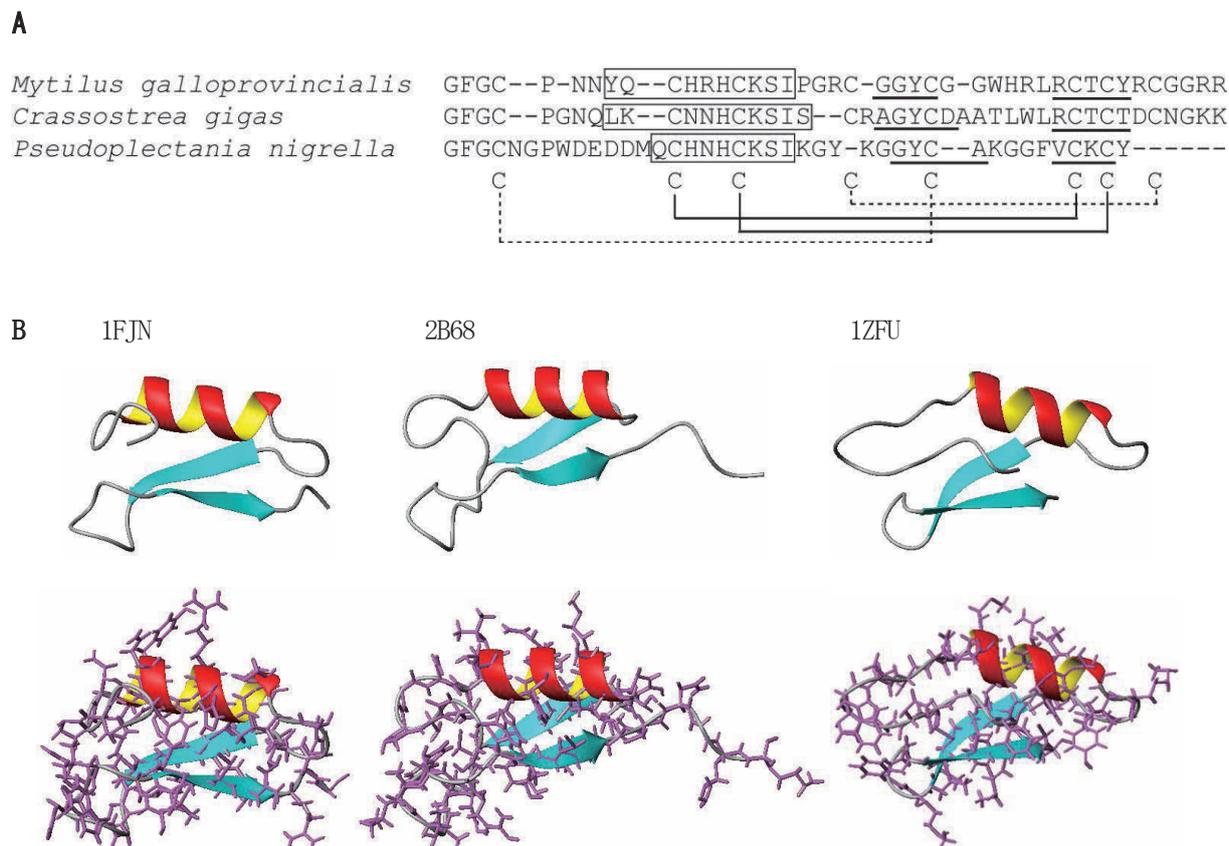


Fig. 3. **A.** 軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンのアミノ酸配列。チレニアイガイ *Mytilus galloprovincialis* (P80571)、マガキ *Crassostrea gigas* (Q4GWV4) 及びクロチャワンタケ *Pseudoplectania nigrella* (Q53106) のアミノ酸配列における α ヘリックス (ボックス)、2 個の β ストランド (下線) 及びシステイン残基 (C) の位置関係を示す。3 或いは 4 対ジスルフィド架橋の中で、特に α ヘリックスと β ストランドを結合する 2 対のジスルフィド架橋 (棒線) は CS α β モチーフとして特徴づけられる。他のジスルフィド架橋は点線で示した。 **B.** 軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンの立体構造。チレニアイガイ (1FJN)、マガキ (2B68) 及びクロチャワンタケ (1ZFU) のディフェンシン骨格は右らせん構造の α ヘリックス、逆平行の平面構造 β ストランド及びループから構成され (上段)、骨格にアミノ酸側鎖を加えて図示した (下段)。1FJN、2B68 及び 1ZFU は立体構造データベースのアクセッション PDB ID 番号。

A. Alignment of amino acid sequences of the defensins from mollusk and fungus. Positions of α -helix (boxes), two β -strands (underline) and the motif of cysteine residues (C) are represented in the amino acid sequences of the defensins from *Mytilus galloprovincialis* (P80571), *Crassostrea gigas* (Q4GWV4) and *Pseudoplectania nigrella* (Q53106). In 3 or 4 pairs of disulfide bridges between cysteine residues, two pairs of the disulfide bridges (lines) linked between the α -helix and the β -strand are characterized as a CS α β -motif. The other disulfide bridges are shown with dotted lines. **B.** Three-dimensional structures of the defensins from mollusk and fungus. The scaffold of the defensins from *M. galloprovincialis* (1FJN), *C. gigas* (2B68) and *P. nigrella* (1ZFU) consists of an α -helix with a right-handed coiled conformation, two antiparallel β -strands and loops (upper figures) and are also shown with branched chains of amino acids (lower figures). The numbers (1FJN, 2B68 and 1ZFU) are accession PDB ID.

す。ASABF- α は、1 個の α ヘリックス並びに 2 個の逆平行 β ストランドから構成された α β β 構造モチーフ、ジスルフィド架橋パターン及び CS α β モチーフを保存している (PDB ID: 2D56)。ASABF- α はグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を、グラム陰性細菌と酵母菌に対して弱い抗菌活性を示す (Zhang et al., 2000)。

2. β α β 構造モチーフから構成されるディフェンシン

2.1. 植物ディフェンシン (plant defensins)

植物ディフェンシンは 45 ~ 54 アミノ酸残基から構成され、8 システイン残基を共有し、特徴的なシステイン残基モチーフ並びにジスルフィド架橋パター

ン (C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7) を示す (Fig. 1C, 2C)。 α ヘリックス及び 3 個の逆平行 β ストランドから構成された β α β β 構造モチーフ及び CS α β モチーフが保存されている (Thomma et al., 2002)。シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* では、植物ディフェンシンに類似する配列がゲノムから探索され、300 を超える遺伝子が検索され、それらの遺伝子から推定されるアミノ酸配列は 6、8 或いは 10 システイン残基を含むアミノ酸から構成され、配列の約 80% に CS α β モチーフ或いは γ -core モチーフが保存されている (Silverstein et al., 2005)。植物ディフェンシンは、主として菌類に対して抗菌活性を示す。

2.2. 他生物から由来する $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを保存したディフェンシン

キイロシヨウジョウバエの drosomycin (Landon et al., 1997) は 8 システイン残基から構成され、植物ディフェンシンに類似するシステイン残基モチーフ並びにジスルフィド架橋パターン (C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7) を示し (Fig. 1C)、 $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフ及び CS $\alpha\beta$ モチーフを保存しており (Fig. 2C)、菌類に対する抗菌活性を示す。しかも、drosomycin と類似する 6 種類の遺伝子が同じ染色体上に重複遺伝子群を形成しており、それらのアイソフォームは異なる抗菌活性を示す (Yang et al., 2006; Tian et al., 2008)。最近、ヒトから drosomycin に類似するディフェンシン (drosomycin-like defensin: DLD) が単離された。DLD は 6 システイン残基モチーフを保存し、皮膚で発現しており、菌類に対する抗菌活性を示す。DLD は $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを共有するディフェンシンとの分子系統解析に基づき、植物ディフェンシン及び下記に記載する鱗翅目 (チョウ目) 昆虫に由来するディフェンシンと比較して、drosomycin とより密接な分子系統の類縁関係が示唆されている (Simon et al., 2008)。

鱗翅目昆虫から 6 システイン残基を保存する heliomicin (Lamberty et al., 1999, 2001a)、ARD1 (Landon et al., 2004a)、galiomicin (Lee et al., 2004) 及び Gm defensin-like peptide (Cytrynska et al., 2007) が知られている。これらの分子は、アミノ酸配列一次構造に基づき比較すれば昆虫ディフェンシンと類似するシステイン残基モチーフを示す。しかし、高次構造に基づき比較すれば $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフから構成される昆虫ディフェンシンと明確な相違を示し、分子の N 末端側アミノ酸配列は β ストランドを構成し (PDB ID: 1I2U, 1OZZ)、植物ディフェンシン及び drosomycin に類似する $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを保存している (Lamberty et al., 1999, 2001a; Landon et al., 2004)。しかも、これらの分子はグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す昆虫ディフェンシンと異なり、植物ディフェンシン及び drosomycin と類似して菌類に対して抗菌活性を示す。

3. $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシン及び派生分子

脊椎動物から、構造の異なる β 、 α 及び θ の 3 種類のディフェンシンが明らかにされている (Selsted & Ouellette, 2005; Semple et al., 2006)。 β 、 α 及び θ ディフェンシンは 6 システイン残基を共有しているが、ジスルフィド架橋パターン (Fig. 1D, 1E, 1F) 並びに高次構造の相違に基づいて区分されている (Fig. 2D, 2E, 2F)。

β 、 α 及び θ ディフェンシンはグラム陰性細菌、グラム陽性細菌、菌類、原虫及びウイルス等に対す

る抗菌活性・不活化活性を示すことが知られている。脊椎動物は自然免疫に加え獲得免疫 (adaptive immunity) を備えており、哺乳類のディフェンシンは獲得免疫を誘導する機能も担っている (Chertov et al., 2000)。

3.1. β ディフェンシン (β -defensins)

β ディフェンシンは、ジスルフィド架橋パターン (C1-C5, C2-C4, C3-C6) を共有し (Fig. 1D)、 α ヘリックス、3 個の逆平行 β ストランド及びループから構成される $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフを保存している (Bauer et al., 2001; Hoover et al., 2001; Landon et al., 2004b; Zou et al., 2007)。 β ディフェンシンは positive selection を受けており、特にループ及び α ヘリックスのアミノ酸構成において多様な変異を生じる原因と推察されている (Semple et al., 2006)。 β ディフェンシンは哺乳類 (Semple et al., 2005, 2006)、鳥類 (Lynn et al., 2007; van Dijk et al., 2008) 及び魚類 (Zou et al., 2007) から発見されており、 β ディフェンシン遺伝子群は染色体上に局在した遺伝子座を示す。このように、 β ディフェンシンは魚類、鳥類及び哺乳類へと派生する脊椎動物の系統進化において広く保存されている分子である。

3.2. β ディフェンシンから派生した分子: α ディフェンシン (α -defensins)

α ディフェンシンは β ディフェンシンと異なるジスルフィド架橋パターン (C1-C6, C2-C4, C3-C5) を示し (Fig. 1E)、 α ヘリックスを欠き、逆平行 β ストランド及びループから構成される $\beta\beta\beta\beta$ 構造モチーフを共有している (Fig. 2E)。 α ディフェンシンは、ヒト、マウス、アカゲザル、ラビット、モルモット及びラット等の哺乳類からのみ発見されている (Xie et al., 2005)。 α ディフェンシン遺伝子は β ディフェンシン遺伝子と染色体上に隣接した遺伝子座を示し、 β ディフェンシンの遺伝子重複と多様化により派生した分子と推定されている (Selsted & Ouellette, 2005; Semple et al., 2006)。 β ディフェンシンと α ディフェンシンの遺伝子数は、ヒトでは 39 と 10、マウスでは 52 と 6、フクロネズミでは 32 と 1、ニワトリでは 13 と 0 である (Belov et al., 2007)。

3.3. α ディフェンシンから派生した分子: θ ディフェンシン (θ -defensins)

θ ディフェンシンは旧世界ザル及びオラウータンから発見されており、2 個の逆平行 β ストランドから構成される $\beta\beta$ 構造モチーフを保存し、3 対のジスルフィド架橋パターン (C1-C6, C2-C5, C3-C4) を有する特異的な環状構造を示す (Fig. 1F, 2F)。2 種類の α ディフェンシン前駆体はスプライシングにより 2 種

類の配列を生じ、それらはライゲーションにより環状構造が構築される (Tang et al., 1999; Leonova et al., 2001; Trabi et al., 2001)。

ディフェンシンの構造特性に基づく起源の推定

ディフェンシンは多細胞生物に広く保存され、1個の α ヘリックス、2~3個の逆平行 β ストランドから形成された β シート及びループから構築され、分子内にシステイン残基を保有し、システイン残基間のジスルフィド架橋により高次構造を安定化させる基本構造を保存している。① $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシンは、節足動物、軟体動物及び線形動物の無脊椎動物に主として保存されている。② $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシンは、植物、昆虫及びヒトに保存されている。③ $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシンは、魚類、鳥類及び哺乳類の脊椎動物に主として保存されている。しかも、④ $\alpha\beta\beta$ 及び $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを保存したディフェンシンは、菌類からも発見されている (Mygind et al, 2005; Zhu 2008)。すでに記載した、昆虫、節足動物、軟体動物、線形動物及び植物に由来するディフェンシン名は、各生物に主として保存されているため簡便的に命名されている。しかし、ディフェンシンは分子進化により発達した分子であり、分子データの類似性から得られる分子系統と従来の表現形質に基づく生物系統との関連は必ずしも一致しない。特に、 $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフから構成されるディフェンシンは、生物の系統進化から判断すれば植物、昆虫、ヒト及び菌類のように著しく遠縁の種に保存されている。

これらのディフェンシンが共通の祖先から分子進化してきたかどうか、その起源を推定する研究も行われている。分子系統解析はアミノ酸配列或いはヌクレオチド配列の一次構造に基づき、分子系統の類縁関係の推定に広く用いられている。同時に高次構造の類似性に着目することによって、より根拠の高い類縁関係の推定が可能となる。ディフェンシンの構造特性に基づいて、無脊椎動物及び植物に由来する各ディフェンシンは構造モチーフ ($\alpha\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta\beta$) 及びジスルフィド架橋パターンにおいて異なるが、次項で記述する菌類に由来するディフェンシンを含めて、CS $\alpha\beta$ モチーフ (Fig. 2A, 2B, 2C, Fig. 3A) を共通に保存している。この共通性に着目して、菌類、無脊椎動物及び植物に由来するディフェンシンはCS $\alpha\beta$ モチーフを保存したより大きなグループとして考えられている。脊椎動物の β ディフェンシンは $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフを備え (Fig. 2D)、 α ヘリックスと β ストランドのジスルフィド架橋パターンにおいてCS $\alpha\beta$ モチーフと差異を示す。しかし、 β ディフェンシンは α ディフェンシンと比較して昆虫ディフェンシンとより高

い一次構造の類似性を示すこと、またCS $\alpha\beta$ ディフェンシンと β ディフェンシンは全体的な高次構造の類似性を示すこと等に基づいて、共通の祖先を有する可能性が考察されている (Hughes, 1999; Thomma et al., 2002; Aerts et al., 2008)。 $\beta\beta\beta$ 構造モチーフを保存する α ディフェンシンは $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフを保存する β ディフェンシンから、 $\beta\beta$ 構造モチーフを保存する環状構造の θ ディフェンシンは α ディフェンシンから哺乳類進化の途上で派生してきた分子である。ディフェンシンの分子進化を考えるうえで、 $\alpha\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta\beta$ 及び $\alpha\beta\beta\beta$ 構造モチーフを保存したディフェンシンを比較対象としなければならない。次に述べる菌類に由来するディフェンシンが新規に構造決定されたことで、より根拠の高い推定がディフェンシンの分子進化に対して可能となった。

子囊菌類から分離された菌類ディフェンシン (Fungus defensins)

子囊菌クロチャワンタケから分離されたプレクタシンの研究 (Mygind et al, 2005) により、次のことが明らかにされた。前駆体プレクタシンは、分泌のために必須の23アミノ酸残基のシグナルペプチド及び32アミノ酸残基のプロペプチドを含み、成熟プレクタシンは40アミノ酸残基から構成される。このプレクタシンのアミノ酸配列は6種類の節足動物及び軟体動物ディフェンシンと比較され、アミノ酸配列の類似性が確認された。NMRを用いた高次構造解析から、プレクタシンは α ヘリックス並びに2個の逆平行 β ストランドから構成されること、6システイン残基の間で3対のジスルフィド架橋が存在すること、 $\alpha\beta\beta$ 及びCS $\alpha\beta$ モチーフが保存されていること等が明らかにされた。その高次構造は8システイン残基の間でジスルフィド架橋を有する軟体動物のチレニアイガイディフェンシン (P80571) と高い類似性を示した。上記のデータに基づき、節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンは分子進化において共通の祖先を有する可能性が示唆された。

本総説では、NMR解析により高次構造が明らかとなっている軟体動物及び菌類に由来する3種類のディフェンシンについて、 α ヘリックスと2個の β ストランドを構成するアミノ酸残基及びシステイン残基のジスルフィド架橋について位置関係をアミノ酸配列一次構造で示し、特にCS $\alpha\beta$ モチーフの特徴としてN末端側の α ヘリックスとC末端側の β ストランドを結合する2対のジスルフィド架橋を図示した (Fig. 3A)。これらのディフェンシンが、高次構造の高い類似性を保存していることを理解するため、タンパク質PDBデータバンクに収録されているデータを立体構造解析ソフトMOLMOLにより処理し、各分子の高次構造を表示した (Fig. 3B)。

バイオインフォマティクスによるデータ解析

本総説では、節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンについてより理解を深めるため、文献、タンパク質及びDNAの各データベースからディフェンシンを検索し、節足動物13種20分子、軟体動物4種9分子及び菌類3種4分子のアミノ酸配列をバイオインフォマティクスによる解析対象とした。菌類の *Aspergillus clavatus* と *Aspergillus terreus* に由来する3種類のディフェンシンは、ゲノムデータベースから探索されたプレクタシンと類似性の高い配列である (Zhu 2008)。昆虫、節足動物、軟体動物及び線形動物等に由来する多数のディフェンシンは、6~8システイン残基、ジスルフィド架橋パターン及びCS α β モチーフを共有する無脊椎動物ディフェンシンの大きなグループに含まれると考えられるが、アミノ酸残基数及び構成において著しい変異を示す。特に、cDNAの構造解析から導かれたアミノ酸配列は、一次構造のシステイン残基モチーフを根拠としてディフェンシンに区分されている。しかし、必ずしも高次構造並びに抗菌活性について解析されていない。生物界からシステイン残基を保存した機能の異なる多様な分子が広く発見されているので、ディフェンシンのN末端配列、分子量及び等電点を考慮して、本総説では類似性の高いディフェンシンに限定して解析を行った。

節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンの化学的性質を知るため、各分子の等電点 (pI) 並びに平均分子量 (MW) の理論値について解析ツールを用いて計算した。次にマルチプルアライメント (多重配列整列) 解析のため、Clustal W の Protein Weight Matrix として Gonnet の設定により解析を行った。これらの結果を Table 2 にまとめた。

全分子の等電点は pI 7.71 から 9.69 の範囲にあり、各生物種の中性及び弱酸性の体液中ではプラスに荷電する抗菌ペプチドの特性を示した。平均分子量は 4kDa であり、チレニアイガイ由来の3種類のディフェンシンはC末端に伸長鎖をもつため 6.9kDa である。2システイン残基のチオール基の間でジスルフィド結合すると、水素2元素が失われる ($R-SH + HS-R = R-S-S-R + 2H$)。計算された平均分子量には、3或いは4対のジスルフィド結合による水素 (質量 1.007825) の6或いは8元素を失うことが反映されていない。そのため、平均分子量から 6.04695 或いは 8.0626 を減算すれば、TOF-MS 及び ESI-MS 等の質量分析計で得られる実測値 $[M + H]^+$ と近似の値を示す。*Mytilus edulis* に由来するディフェンシン (P81610, P81611) は解析できなかった不明のアミノ酸残基 (X) を含むため、それらの実測値 (4392.4 及び 4314.3) と Table 2 に表記した平均分子量から 6.04695 を減算しても近似しない。プレクタシンでは、計算されるモノアイソトピック質量 (4404.82) から 6.04695 を減

算すれば実測値 (4398.80) と近似する。

マルチプルアライメント解析の結果から、6システイン残基が解析した33の全分子において共通にアライメントされた。8システイン残基を有するチレニアイガイ及びマガキのディフェンシンは、模式的に示したジスルフィド架橋パターン (Fig. 1B) と矛盾なくアライメントされた。6システイン残基モチーフ、 γ -coreモチーフ及びN末端からギャップを含めて2番目のグリシン残基 (G) は33の全分子で共通に保存されていた。N末端から4番目のグリシン残基は acasin 及び *Ixodes ricinus* のディフェンシン以外の29分子で、8番目のプロリン (P) は acasin 以外の32分子で保存されていた。抗菌ペプチドの特徴であるリジン (K)、アルギニン (R) 及びヒスチジン (H) の等電点の高い塩基性アミノ酸が分子内に多く、特にN末端から2、3及び4番目のシステイン残基の領域に高い密度で配列する傾向を示し、N末端から19番目のヒスチジン (H) は2種類の atesin を除いた31分子で保存されていた。アミノ酸配列は、近縁の生物種で同じアミノ酸残基が保存される傾向を示したが、分子間で著しい変異も示した。

ディフェンシンはシグナルペプチド、プロペプチド及び成熟ディフェンシンの各ドメインから構成された前駆体ペプチドとして m-RNA から翻訳される。シグナルペプチド及びプロペプチドから構成されるプレプロ領域はプロテアーゼにより切断され、成熟ディフェンシンが抗菌ペプチドとして機能を果たす。節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンについて、プレプロ領域を Table 1 に示し、ディフェンシン領域を Table 2 に示した。最初に、Table 2 に示したディフェンシン領域を対象として分子系統解析を行った。MEGA ver. 4 (Kumar et al., 2008) を用いて、33分子のマルチプルアライメント解析結果に基づいて近隣接合法により分子系統解析を行い、同時にブートストラップ解析も併用し、Substitution Model として p-distance により分子系統樹の推定を試みた (Fig. 4)。分子系統樹から、4種類の菌類ディフェンシン及びムール貝 *Mytilus* 属に由来する5種類のディフェンシンはそれぞれ分岐グループを構成し、高い分子系統の類縁関係を示した。一方、カキ *Crassostrea viruginica* と *C. gigas* に由来する4種類のディフェンシンは異なる分岐を示した (Fig. 4)。このことは Table 2 から明らかのように、種間でアミノ酸構成が著しく相違するためと推察される。菌類ディフェンシンは、トンボ、サソリ、クモ及びダニに由来する節足動物ディフェンシンと比較して、二枚貝に由来する軟体動物ディフェンシンとより高い分子系統関係が示唆された。

次に、プレプロ領域を含むディフェンシンの翻訳領域 (ORF) を対象として分子系統解析を行った。トンボ、サソリ、二枚貝及び菌類の一部はプレプロ領域に

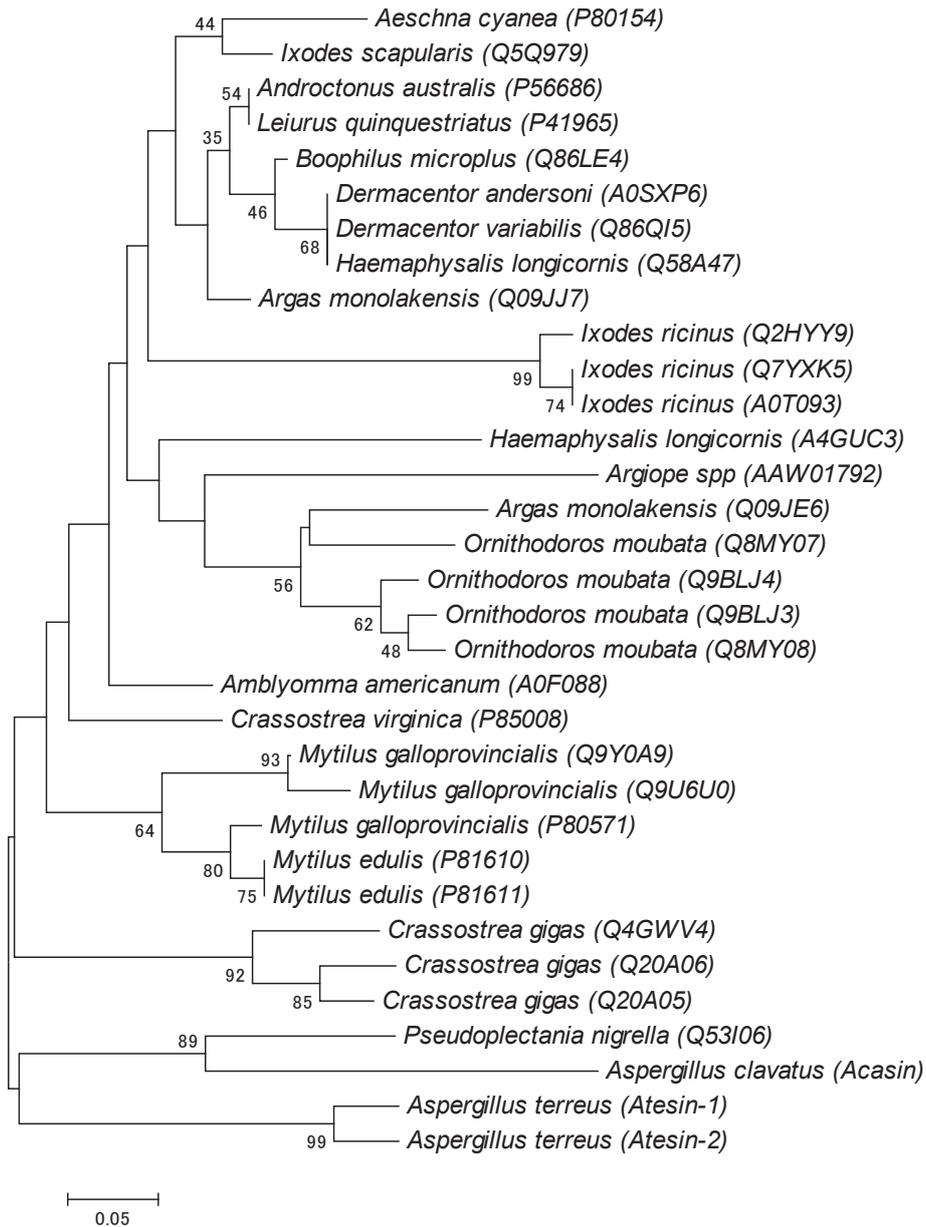


Fig. 4. 節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシン領域を解析対象とした分子系統樹。MEGA (ver. 4) を用いて p-distance 及び 1000 回のブートストラップにより近隣接合法により推定された。Phylogenetic tree of the defensins from arthropods, mollusks and fungi, which are constructed by the neighbor-joining method with p-distance and 1000 bootstrap replicates by using the MEGA software package (ver. 4).

ついて未解明なので、それらの分子を除外し、クモ、ダニ、二枚貝及び菌類に由来する 23 分子を解析対象とした。プレプロ領域において、菌類に由来するプレクタシンは長いアミノ酸配列を示し、二枚貝とダニでは大きなギャップを生じ、菌類の顕著な特性を示した (Table 1)。プロペプチド領域の C 末端はプロテアーゼ切断部位であり、そのアミノ酸残基はダニではアルギニン・アルギニン (RR)、クモ及び二枚貝ではアラニン (A)、菌類ではリジン・アルギニン (KR) であり、由来する生物種のディフェンシンの間で明確な相違を示した (Table 1)。ORF から推定される分子系統樹は

(Fig. 5)、ディフェンシン領域を解析対象として推定された分子系統樹 (Fig. 4) と全体的に類似しており、菌類の ORF はクモ及びダニと比較して、軟体動物とより密接な分子系統関係を示した。ブートストラップ値は全体的に高く、これはプレプロ領域にアミノ酸置換が少なく、アミノ酸配列が分子系統において保存されていることを示唆している。一方、微生物との攻防に機能を果たすディフェンシン領域では、システイン残基モチーフを除いて、アミノ酸配列に変異が蓄積していることを示唆している。

子嚢菌は菌界に属し、動物界である軟体動物及び節

Table 1. 節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンのプレプロ領域アミノ酸配列
Amino acid sequences of prepro-regions of the defensins from arthropods, mollusks and fungus

生物	学名	AN ¹⁾	プレプロ領域のアミノ酸配列
Organisms	Scientific names		Amino acid sequences of prepro-regions
クモ	<i>Argiope</i> spp	AAW01792	M---CVTFIMALSYP-----PLVDA
ダニ	<i>Boophilus microplus</i>	Q86LE4	M-RGIYICLXFLVXGGLVADVPAES-----EMAHLRVR
	<i>Ixodes scapularis</i>	Q5Q979	M-RVIAVTLIALLVAGALMTSSAQEEEN-----QVAHVRVR
	<i>Ixodes ricinus</i>	Q7YXK5	M-KVLAVSLAFLLIAGLI STSLAQNEEGG-----EKELVRVR
	<i>Ixodes ricinus</i>	AOT093	M-KVLAVSLAFLLIAGLI STSLAQNEEGG-----EKELVRVR
	<i>Ixodes ricinus</i>	Q2HY99	M-KVLAVSLAFLLIAGLI STSLAENDEGG-----EKELVRVR
	<i>Amblyomma americanum</i>	AOF088	M-KVLAVAFIVLVLVAGLVSTADE-EDKS-----QVPLVRVR
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	A4GUC3	M-KVSALFLVGLLLAFLAFAAGDEEDS-----SKPLVRVR
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Q58A47	M-KVLAVALIFVLVAGLFTAAQDDDES-----DVPVVRVR
	<i>Dermacentor variabilis</i>	Q86Q15	M-RGLCLVFLVLLVGLVSTATAAPAES-----EVAHLRVR
	<i>Dermacentor andersoni</i>	AOSXP6	M-RGLCLVFLVLLVGLVSTATAAPAES-----EVAHLRVR
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q9BLJ3	MNKLFI VALVVALAVATMAQEVHNDVEE-----QSVPRVR
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q9BLJ4	MNKLFI VALVVALAVATMAQEVHDDVEE-----QSVPRVR
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q8MY08	MNKLFI VALVVALAVATMAHEVYDDVEE-----PSVPRVR
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q8MY07	MNKLFI VALVVALAVATMAHEVHDDIEE-----PSVPRVR
	<i>Argas monolakensis</i>	Q09JE6	MNKSIVLVLVAIVAATTAQSVDEPE-----RSHGRVR
	<i>Argas monolakensis</i>	Q09JJ7	M-KYLAV-LVFLLLI SSVTVQVSAQDDDDGDD-----DAALTRVR
二枚貝	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Q9U6U0	M-KAVFVLLVGLCIMMM-----DVATA
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Q9Y0A9	M-KAAFVLLVGLCIMT-----DVATA
	<i>Crassostrea gigas</i>	Q4GIV4	M-KVFVLLTAVLLMVSA-----DMAFA
	<i>Crassostrea gigas</i>	Q20A06	-----LLTAVLLMVSA-----DMAFA
	<i>Crassostrea gigas</i>	Q20A05	-----LFTLVLLMVSA-----DMAFA
子囊菌	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	Q53106	M-QFTTILSITGVFLLNTGAFAPQVPEAYVSDPEAHPDDFAGMDANGLQKR

¹⁾ タンパク質データベースのアクセッション番号 ¹⁾ Accession number of protein data banks.

Table 2. 節足動物、軟体動物及び菌類に由来するディフェンシン

Defensins from arthropods, mollusks and fungi						
生物	学名	AN ¹⁾	ディフェンシン領域のアミノ酸配列	等電点 ²⁾	分子量 ³⁾	文献
Organisms	Scientific names		Amino acid sequences of defensins	pI	MW	References
トンボ	<i>Aeschna cyanea</i>	P80154	-GFGC-PLDQMQ-QHRHQTI TGRSGGYQSG-PLKLTQTYR----	8.68	4179.83	1)
サソリ	<i>Leiurus quinquestratus</i>	P41965	-GFGC-PLNQA-QHRHQRSIR-RRGGYQAG-FFKOTQTYR----	9.69	4325.97	2)
	<i>Androctonus australis</i>	P56686	-GFGC-PFNQGA-QHRHQRSIR-RRGGYQAG-LFKOTQTYR----	9.69	4211.87	3)
クモ	<i>Argiope</i> spp	AAW01792	-GFGC-PFCQGE-QNLHQHVVKARGGFQIG-AFKOTQKQNR----	9.03	4136.85	-
ダニ	<i>Boophilus microplus</i>	Q86LE4	-GFGC-PFNQGA-QHRHQRSIR-RRGGYQAG-LIKOTQTYR----	9.69	4291.96	4)
	<i>Ixodes scapularis</i>	Q5Q979	-GFGC-PFDQGA-QHRHQSI-GRGGYQAG-FIKOTQTYHN----	8.68	4237.77	5)
	<i>Ixodes ricinus</i>	Q7YXK5	GGYYQ-PFFQDK-QHRHQRSF-GRKAGYQGG-FLKKTQIQVMK----	9.42	4497.35	6)
	<i>Ixodes ricinus</i>	AOT093	GGYYQ-PFFQDK-QHRHQRSF-GRKAGYQGG-FLKKTQIQV----	9.27	4237.98	6)
	<i>Ixodes ricinus</i>	Q2HY99	GGYYQ-PFRQDK-QHRHQRSF-GRKAGYQGG-FLKKTQIQV----	9.46	4247.00	-
	<i>Amblyomma americanum</i>	AOF088	-GFGC-PFNQYQ-QHSHQLSI-GRGGYQGG-SFKTTQTYN----	8.66	4054.55	7)
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	A4GUC3	-GFGC-PFDERA-QHAHQSV-GRGGYQAG-G-NFRMTQYKYN----	8.66	4195.75	8)
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Q58A47	-GFGC-PLNQA-QHNHQRSIR-GRGGYQAG-I IKOTQTYRK----	9.38	4130.79	9)
	<i>Dermacentor variabilis</i>	Q86Q15	-GFGC-PLNQA-QHNHQRSIR-RRGGYQSG-I IKOTQTYRNR----	9.43	4231.85	10)
	<i>Dermacentor variabilis</i>	AOSXP6	-GFGC-PLNQA-QHNHQRSIR-RRGGYQSG-I IKOTQTYRNR----	9.43	4231.85	-
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q9BLJ3	-GYGC-PFNQYQ-QHSHQSIIRGYKGGYQGG-TFKOTQKQY----	9.04	4174.75	11)
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q9BLJ4	-GYGC-PFNQYQ-QHSHQSIIRGYKGGYQGG-TFKOTQKQY----	9.24	4271.87	11)
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q8MY08	-GYGC-PFNQYQ-QHSHQSIIRGYKGGYQGG-LFKOTQKQY----	8.86	4172.73	12)
	<i>Ornithodoros moubata</i>	Q8MY07	-GFGC-PFNQYE-QHAHQSGVPGYKGGYQGG-LFKOTQKQY----	8.30	4068.62	12)
	<i>Argas monolakensis</i>	Q09JE6	-GYGC-PFNQYQ-QHNHQSGVPGYKGGYQGG-FLKMTQKQY----	8.30	4200.80	-
	<i>Argas monolakensis</i>	Q09JJ7	-GFGC-PFNQGA-QHRHQSI-GRKGGYQSG-LFKOTQTYRH----	9.15	4209.80	-
二枚貝	<i>Mytilus edulis</i>	P81610	-GFGC-P-NDYP-QHRHQSIIPGRGGYQGG-XHLRQTYR----	9.15	4151.16	13)
	<i>Mytilus edulis</i>	P81611	-GFGC-P-NDYP-QHRHQSIIPGRGGYQGG-XHLRQTYR----	8.92	3883.64	13)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	P80571	-GFGC-P-MNYQ-QHRHQSIIPGRGGYQGG-WHLRQTYRGGRR----	7.73	6919.71	14)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Q9U6U0	-GFGC-P-MNYA-QHQHCKSIIRGYGGYQAS-WFLRQTYRGGRR----	7.71	6968.82	16)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Q9Y0A9	-GFGC-P-MNYA-QHQHCKSIIRGYGGYQAG-WFLRQTYRGGRR----	7.71	6938.80	-
	<i>Crassostrea virginica</i>	P85008	-GFGC-PWNRQY-QHSHQSI-GRGGYQAG-SLRLTQTYRS----	9.18	4270.89	17)
	<i>Crassostrea gigas</i>	Q4GIV4	-GFGC-PGNQLK-QNHNCKSI-S-GRAGYQDAATLWLRQTYRGGK----	8.73	4642.35	18)
	<i>Crassostrea gigas</i>	Q20A06	-GFGC-PRDQYK-QNHNCKSI-S-GRAGYQDAVTLWLRQTYRGGK----	8.50	4763.44	19)
	<i>Crassostrea gigas</i>	Q20A05	-GFGC-PGDQYE-QNRHQSI-GRAGYQDAVTLWLRQTYRGGK----	8.51	4677.35	19)
子囊菌	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	Q53106	-GFQNGPWEEDMQQHCKSIIRGYKGGYQAG-A-KGGFVQKQY----	7.77	4407.99	20)
	<i>Aspergillus clavatus</i>	Acasin	-GWSQ-GFFGGNDEPQHCKSIIRGYRGGYQ-K-FGG-IQKQY----	8.64	4222.80	21)
	<i>Aspergillus terreus</i>	Atesin-1	-GYGC-PNDYS-QSNYQSI-GRNGGYQGG-FLWOTQKQNEKK----	8.30	4164.62	21)
	<i>Aspergillus terreus</i>	Atesin-2	-GYGC-PNDYA-QSSYQSI-GRNGGYQGG-FLWOTQKQNEKK----	8.30	4121.59	21)
システイン残基モチーフ			C C C C C C			
γ-coreモチーフ			G G C C			

¹⁾ タンパク質データベースのアクセッション番号。アミノ酸構成から計算される ²⁾ 等電点 (pI) 及び ³⁾ 分子量 (Da) の理論値。M. galloprovincialis の 3 種類ディフェンシンについて C 末端伸長鎖のアミノ酸配列は省略、データベースを参照。

¹⁾ Accession number of protein data banks. ²⁾ Isoelectric point (pI) and ³⁾ molecular weight (Da) calculated from amino acid sequences. C-terminal amino acid sequences of M. galloprovincialis are omitted from this table. Please refer to protein data banks for additional sequences.

文献 (References) : 1) Bulet et al., (1992), 2) Cociancich et al., (1993), 3) Ehret-Sabatier et al., (1996), 4) Fogaca et al., (2004), 5) Hynes et al., (2005), 6) Rudenko et al., (2005), 7) Todd et al., (2007), 8) Zhou et al., (2007), 9) Tsuji et al., (2007), 10) Ceraul et al., (2003), 11) Nakajima et al., (2001), 12) Nakajima et al., (2002), 13) Charlet et al., (1996), 14) Mitta et al., (1999b), 15) Yang et al., (2006), 16) Mitta et al., (2000a), 17) Seo et al., (2005), 18) Gueguen et al., (2006), 19) Gonzalez et al., (2007), 20) Mygind et al., (2005), 21) Zhu, S. (2008)

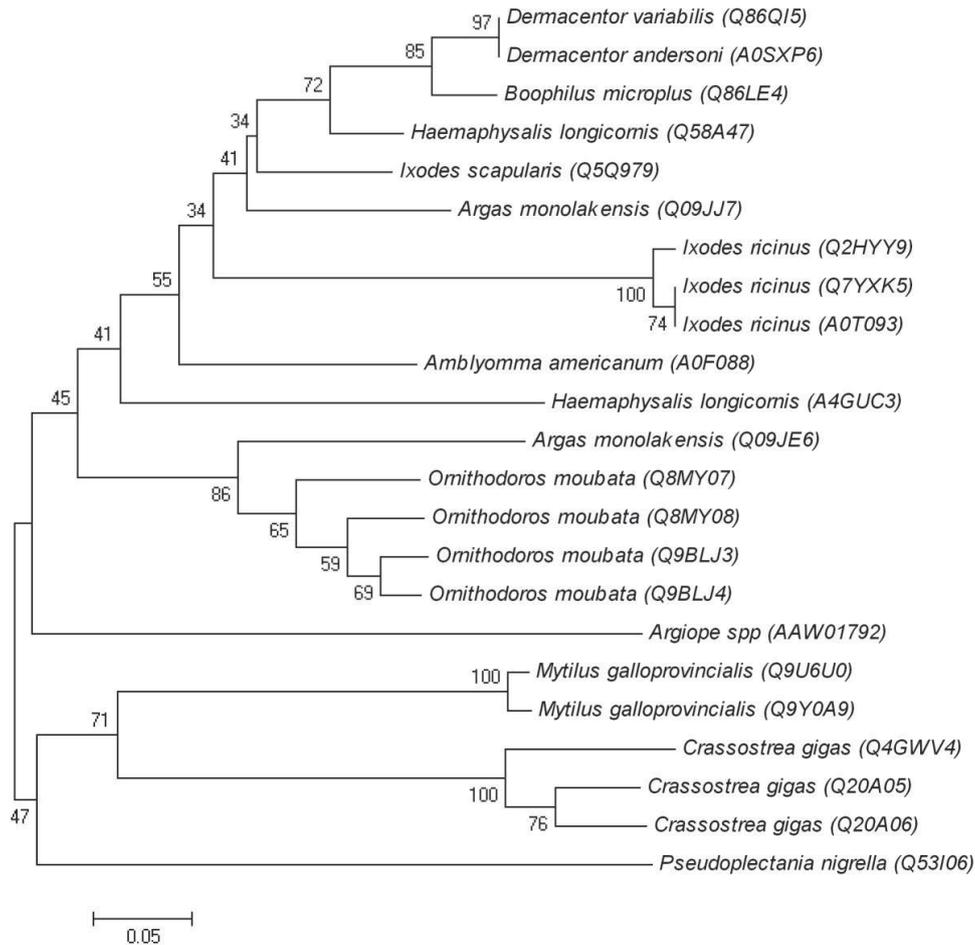


Fig. 5. 節足動物、軟体動物及び菌類に由来するプレプロ領域を含むディフェンシン翻訳領域（ORF）を解析対象とした分子系統樹。MEGA (ver. 4) を用いて p-distance 及び 1000 回のブートストラップにより近隣接合法により推定された。
Phylogenetic tree of open reading frames (ORFs) of the defensins from arthropods, mollusks and fungi, which are constructed by the neighbor-joining method with p-distance and 1000 bootstrap replicates by using the MEGA software package (ver. 4).

足動物から系統進化において遠く離れた生物である。菌類ディフェンシンが軟体動物及び節足動物に由来するディフェンシンと高い分子系統関係を示すことから、菌類と動物の分岐する以前に共通の祖先をもつ遺伝子から分子進化してきたことが推察される。軟体動物及び節足動物へ系統的に派生する他の生物門の種において、ディフェンシンは現在のところ構造決定されていない。これらの生物からディフェンシンが新規に構造決定されたならば、それらの分子を加え、より総合的な分子系統解析が期待できる。

Zhu (2008) は、プレクタシンに類似する 25 分子の配列を菌類ゲノムから探索し、i) プレクタシンと類似するファミリー I の分子は節足動物・軟体動物ディフェンシンと、ii) ファミリー II の分子は昆虫ディフェンシンと、iii) ファミリー V の分子は植物ディフェンシン及び drosomycin と、それぞれ高い類似性を示

すことを一次構造から推定した。また Zhu (2008) は、CS $\alpha\beta$ モチーフを保存したディフェンシンのルーツを生物の系統進化との関連において、コンピュータモデリングにより解析した高次構造に基づいて推定している。この仮説に従えば、菌類は、1) $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを保存した節足動物・軟体動物ディフェンシン、2) 進化した昆虫から発見されている $\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを保存した昆虫ディフェンシン、3) 植物、昆虫及びヒトから発見されている $\beta\alpha\beta\beta$ 構造モチーフを保存したディフェンシンを保有していることになる。更に Zhu (2007) は、プレクタシンに類似する配列を細菌ゲノムから探索し、4 システイン残基を保存した配列に基づきコンピュータモデリングによる高次構造をプレクタシンと比較し、粘液細菌の配列が菌類、無脊椎動物及び植物の CS $\alpha\beta$ モチーフを保存したディフェンシンの共通祖先と推定している。これら Zhu

の一連の研究は、ゲノムデータバンクからコンピュータにより探索された配列なので、実験的に cDNA を単離してリコンビナントペプチドを合成し、高次構造解析並びに抗菌活性の結果に基づき、抗菌ペプチドとして実証することが望まれる。

節足動物、軟体動物及び菌類に由来する ディフェンシンの遺伝子発現

抗菌ペプチド遺伝子は、異物に反応して遺伝子発現の活性化が誘導されると広く認識されている。しかしながら、下記のように抗菌ペプチド遺伝子は異物・刺激の種類と寄生体の感染等により特異的な発現を示し、また常時発現している例もあり、必ずしも一樣な発現様式を示さない。

トンボ *Aeschna cyanea* では、コントロール個体の体液から抗菌活性は検出されず、細菌注射によりディフェンシン遺伝子の発現が誘導され、グラム陽性細菌に対する抗菌活性が検出された (Bulet et al., 1992)。一方、サソリ *Leiurus quinquestriatus* 及び *Androctonus australis* では、コントロール個体の体液から細菌に対する抗菌活性が検出され、ディフェンシンを含む抗菌ペプチド遺伝子は常時発現していた (Cociancich, et al., 1993; Ehret-Sabatier, et al., 1996)。

マダニ科において、フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* では、LPS (リポ多糖) の注射により、中腸及び唾液腺のディフェンシン遺伝子発現が活性化された (Zhou et al., 2007)。アメリカイヌカクマダニ *Dermacentor variabilis* では、血球は体液ディフェンシンの主要な発現組織であり、RNA 干渉によりその発現は著しく減少した (Hynes et al., 2008)。中腸及び脂肪体におけるディフェンシン (Q86Q15) は常時弱い発現を示しており、細菌注射により 24 時間以降に高い発現が誘導された (Ceraul et al., 2007)。アナプラズマ病の病原体 *Anaplasma marginale* に感染したアメリカイヌカクマダニでは、RNA 干渉により血球、中腸及び唾液腺のディフェンシン遺伝子発現は抑制され、このディフェンシン遺伝子の発現抑制により病原体は増加せず、むしろ著しく減少した (Kocan et al., 2008)。ライム病の病原体 *Borrelia burgdorferi* に感染した *Ixodes ricinus* では、中腸においてディフェンシン遺伝子の発現が高く誘導された (Rudenko et al., 2005)。

ヒメダニ科において、*Ornithodoros moubata* では、4 種類のディフェンシンアイソフォーム A, B, C 及び D が存在する。コントロールにおいて、4 種類のアイソフォーム遺伝子発現は中腸で、アイソフォーム D の遺伝子発現は脂肪体で検出された。吸血或いは細菌注射により、遺伝子発現は中腸及び血球 (granulocyte) において高く誘導された (Nakajima et al., 2001, 2002, 2003)。

チレニアイガイでは、血球細胞においてディフェンシン遺伝子は常時発現しており、物理的ストレス及びヒートショックにより遺伝子発現は活性化されたが、細菌注射により遺伝子発現はむしろ低下した (Mitta et al., 1999b, 2000a)。

マガキでは、ディフェンシン (Q4GWV4) は外套 (mantle) の縁に抗菌活性が検出され、細菌を注射しても遺伝子発現がより高く誘導されないことから、常時発現している遺伝子と推定された (Gueguen et al., 2006)。一方、マガキの他種類のディフェンシン (Q20A05) は血球で常時発現しており、細菌投与後に遺伝子発現は血球において著しく減少し、鰓 (gill) 及び外套ではむしろ増加した (Gonzalez et al., 2007)。

以上のように、節足動物及び軟体動物に由来するディフェンシン遺伝子は、細菌注射、吸血、病原体感染、刺激或いは RNA 干渉等により遺伝子発現が誘導される場合、抑制される場合、或いは常時発現している場合など種特異的な特性を示し、遺伝子発現は生物種の組織、生物体の構造並びに生活様式との関連で相違する可能性が推察される。

クロチャワンタケにおいては、プレクタシンの遺伝子発現に関する研究は行われていない。菌体構造並びに分泌に必須のシグナルペプチドをもつ前駆体構造から考察すると、プレクタシンは菌糸の細胞外へ分泌性されると推定される。プレクタシンは、i) 常時発現している遺伝子であるのか、ii) 菌糸及び子実体へ感染する微生物に対して防御機能を担うのか、iii) 菌糸の伸長に伴い競合する微生物を排除するのか、それとも iv) 菌類は別種の微生物を分子認識できるメカニズムを備えているのか、という疑問が生じる。プレクタシンは、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を示すことから判断して、クロチャワンタケの生息環境では細菌からの防御に機能を果たすと推定される。体腔及び開放血管系を備えた軟体動物及び節足動物に対して、菌糸及び子実体の菌体構造を考慮すると、菌類の抗菌ペプチド遺伝子は常時発現しており、生合成された抗菌ペプチドは外界へ分泌されて菌糸表面並びにその近傍に防御バリアーを常時構築していると推定される。また、動物と同じように菌類でも細菌に対して分子認識を行い、細菌感染に連動した遺伝子発現の活性化が誘導されるのか、大いに興味を抱かせる。即ち、異物を認識し、抗菌ペプチドの活性化した遺伝子発現を誘導する一連のメカニズムが、組織、体腔及び血管系の分化に伴う生物体構造の発達と共に進化してきたかどうか、このような問題が浮上する。菌類における抗菌ペプチドに関する研究は、生物進化との関連において、多細胞生物が備えている自然免疫における抗菌ペプチド、異物認識タンパク質及び遺伝子発現の調節等について祖先型を明らかにする可能性を秘めている。

おわりに

筆者らは、マツ材青変部から抽出される抗細菌活性は青変菌の外分泌に由来すると推定している。広く概観すると、抗菌ペプチド以外にも抗生物質、性フェロモン及び植物精油等のように抗菌活性を示す物質が知られている。どの多細胞生物においても、生存を脅かす生息環境の微生物フローラとの間で攻防の進化史を必然的に歩んできたことを反映し、生物から産生される多様な分子が抗菌機能を備えている可能性も予測される。筆者らは、青変菌由来と推定される抗菌活性は、遺伝子にコードされた抗菌ペプチドであるのか、或いは遺伝子に直接コードされない物質であるのか、また両方の分子による防御バリアーを構築しているものなのか、それらの可能性を想定して研究を進めている。

謝辞

ダニの分類、学名及び和名について、森林総合研究所森林昆虫研究領域の岡部貴美子博士にご助言をいただいた。ここに感謝の意を申し上げます。

引用文献

- Aerts, A. M., Francois, I. E., Cammue, B. P. and Thevissen, K. (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins, *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 2069-2079.
- Andersson, M., Boman, A. and Boman, H. G. (2003) *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides, *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 599-606.
- Bauer, F., Schweimer, K., Kluver, E., Conejo-Garcia, J. R., Forssmann, W. G., Rosch, P., Adermann, K. and Sticht, H. (2001) Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity, *Protein Sci.*, **10**, 2470-2479.
- Belov, K., Sanderson, C. E., Deakin, J. E., Wong, E. S., Assange, D., McColl, K. A., Gout, A., de Bono, B., Barrow, A. D., Speed, T. P., Trowsdale, J. and Papenfuss, A. T. (2007) Characterization of the opossum immune genome provides insights into the evolution of the mammalian immune system, *Genome Res.*, **17**, 982-991.
- Bonmatin, J. M., Bonnat, J. L., Gallet, X., Vovelle, F., Ptak, M., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., Keppi, E., Legrain, M. and Achstetter, T. (1992) Two-dimensional 1H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding, *J. Biomol. NMR*, **2**, 235-256.
- Bulet, P., Cociancich, S., Reuland, M., Sauber, F., Bischoff, R., Hegy, G., Van Dorselaer, A., Hetru, C. and Hoffmann, J. A. (1992) A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata), *Eur. J. Biochem.*, **209**, 977-984.
- Bulet, P. and Stöcklin, R. (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation, *Protein Pept. Lett.*, **12**, 3-11.
- Bulet, P., Stocklin, R. and Menin, L. (2004) Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates, *Immunol. Rev.*, **198**, 169-184.
- Bulmer, M. S. and Crozier, R. H. (2004) Duplication and diversifying selection among termite antifungal peptides, *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 2256-2264.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnick, S. M., Gillespie, J. J., Rahman, M. S. and Azad, A. F. (2007) New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge, *Infect. Immun.*, **75**, 1973-1983.
- Ceraul, S. M., Sonenshine, D. E., Ratzlaff, R. E. and Hynes, W. L. (2003) An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 1099-1103.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Bulet, P. (1996) Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 21808-21813.
- Chertov, O., Yang, D., Howard, O. M. and Oppenheim, J. J. (2000) Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses, *Immunol. Rev.*, **177**, 68-78.
- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A. and Hoffmann, J. (1993) Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 17-22.
- Cornet, B., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M. and Vovelle, F. (1995) Refined three-dimensional solution structure of insect defensin

- A, Structure, **3**, 435-448.
- Cytrynska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P. and Jakubowicz, T. (2007) Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph, Peptides, **28**, 533-546.
- Da Silva, P., Jouvencal, L., Lamberty, M., Bulet, P., Caille, A. and Vovelle, F. (2003) Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite *Pseudacanthotermes spiniger*, Protein Sci., **12**, 438-446.
- Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C. and Hoffmann, J. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates, Biopolymers, **47**, 465-477.
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J. A., van Dorsselaer, A. and Bulet, P. (1996) Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood, J. Biol. Chem., **271**, 29537-29544.
- Fogaca, A. C., Lorenzini, D. M., Kaku, L. M., Esteves, E., Bulet, P. and Daffre, S. (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile, Dev. Comp. Immunol., **28**, 191-200.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B. and Bachere, E. (2007) Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*, Dev. Comp. Immunol., **31**, 332-339.
- Gracy, J., Le-Nguyen, D., Gelly, J. C., Kaas, Q., Heitz, A. and Chiche, L. (2008) KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007, Nucleic Acids Res., **36**, D314-319.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J. M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P. and Bachere, E. (2006) Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression, J. Biol. Chem., **281**, 313-323.
- Hanzawa, H., Shimada, I., Kuzuhara, T., Komano, H., Kohda, D., Inagaki, F., Natori, S. and Arata, Y. (1990) 1H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin, FEBS Lett., **269**, 413-420.
- Hetru, C., Hoffmann, J. and Bulet, P. (1998) Antimicrobial peptides from insects, In Brey, P.T. and Hultmark, D (eds.) "*Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*", Chapman & Hall, 40-66.
- Hoffmann, J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*, Nature, **426**, 33-38.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity, Science, **284**, 1313-1318.
- Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective, Nat. Immunol., **3**, 121-126.
- Hoover, D. M., Chertov, O. and Lubkowsky, J. (2001) The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins, J. Biol. Chem., **276**, 39021-39026.
- Hughes, A. L. (1999) Evolutionary diversification of the mammalian defensins, Cell Mol. Life Sci., **56**, 94-103.
- Hultmark, D. (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns, Curr. Opin. Immunol., **15**, 12-19.
- Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Todd, S. M., Seguin, K. C. and Sonenshine, D. E. (2005) A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*, Med. Vet. Entomol., **19**, 339-344.
- Hynes, W. L., Stokes, M. M., Hensley, S. M., Todd, S. M. and Sonenshine, D. E. (2008) Using RNA interference to determine the role of varisin in the innate immune system of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), Exp. Appl. Acarol. **46**, 7-15.
- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E. (2006) Peptide antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev. **19**, 491-511.
- Kato, Y., Aizawa, T., Hoshino, H., Kawano, K., Nitta, K. and Zhang, H. (2002) *abf-1* and *abf-2*, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*, Biochem. J., **361**, 221-230.
- Kato, Y. and Komatsu, S. (1996) ASABF, a novel cysteine-rich antibacterial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Purification, primary structure, and molecular cloning of cDNA, J. Biol. Chem., **271**, 30493-30498.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Hynes, W. L. and Sonenshine, D. E. (2008) Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections, Exp. Appl. Acarol. **46**, 17-28.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K.

- (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences, *Brief. Bioinform.* **9**, 299-306.
- Lai, R., Lomas, L. O., Jonczy, J., Turner, P. C. and Rees, H. H. (2004) Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*, *Biochem. J.*, **379**, 681-685.
- Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J. A. and Bulet, P. (1999) Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity, *J. Biol. Chem.*, **274**, 9320-9326.
- Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P. and Vovelle, F. (2001a) Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities, *Biochemistry*, **40**, 11995-12003.
- Lamberty, M., Zachary, D., Lanot, R., Bordereau, C., Robert, A., Hoffmann, J. A. and Bulet, P. (2001b) Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect, *J. Biol. Chem.*, **276**, 4085-4092.
- Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Menin, L., Guenneugues, M., Schott, V., Vovelle, F. and Dimarcq, J. L. (2004a) Lead optimization of antifungal peptides with 3D NMR structures analysis, *Protein Sci.*, **13**, 703-713.
- Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J. and Ptak, M. (1997) Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects, *Protein Sci.*, **6**, 1878-1884.
- Landon, C., Thouzeau, C., Labbe, H., Bulet, P. and Vovelle, F. (2004b) Solution structure of spheniscin, a beta-defensin from the penguin stomach, *J. Biol. Chem.*, **279**, 30433-30439.
- Lee, Y. S., Yun, E. K., Jang, W. S., Kim, I., Lee, J. H., Park, S. Y., Ryu, K. S., Seo, S. J., Kim, C. H. and Lee, I. H. (2004) Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*, *Insect Mol. Biol.* **13**, 65-72.
- Leonova, L., Kokryakov, V. N., Aleshina, G., Hong, T., Nguyen, T., Zhao, C., Waring, A. J. and Lehrer, R. I. (2001) Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity, *J. Leukoc. Biol.*, **70**, 461-464.
- Lynn, D. J., Higgs, R., Lloyd, A. T., O'Farrelly, C., Herve-Grepinet, V., Nys, Y., Brinkman, F. S., Yu, P. L., Soulier, A., Kaiser, P., Zhang, G. and Lehrer, R. I. (2007) Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update, *Immunol. Lett.*, **110**, 86-89.
- 前原紀敏 (2002) マツノサイセンチュウのマツノマダラカミキリへの乗り移り, *森林防疫*, **51**, 169-176.
- Maehara, N., Hata, K. and Futai, K. (2005) Effect of blue-stain fungi on the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), *Nematology*, **7**, 161-167.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrzynda, E. A., Boudry, P. and Roch, P. (2000a) Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis, *Dev. Comp. Immunol.*, **24**, 381-393.
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. and Roch, P. (1999a) Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Eur. J. Biochem.*, **265**, 71-78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. and Roch, P. (1999b) Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge, *J. Cell. Sci.*, **112** (Pt 23), 4233-4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. and Roch, P. (2000b) Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense, *J Biol Chem.* **275**, 12954-12962.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sonksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jorgensen, S. G., Sorensen, M. V., Christensen, B. E., Kjaerulff, S., Frimodt-Moller, N., Lehrer, R. I., Zasloff, M. and Kristensen, H. H. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus, *Nature*, **437**, 975-980.
- Nakajima, Y., Saido-Sakanaka, H., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2003) Up-regulated humoral immune response in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae), *Parasitol. Res.*, **91**, 476-481.
- Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2002) Antibacterial

- peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, Insect Mol. Biol., **11**, 611-618.
- Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2001) Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae), Insect Biochem. Mol. Biol., **31**, 747-751.
- Pillai, A., Ueno, S., Zhang, H. and Kato, Y. (2003) Induction of ASABF (*Ascaris suum* antibacterial factor)-type antimicrobial peptides by bacterial injection: novel members of ASABF in the nematode *Ascaris suum*, Biochem. J., **371**, 663-668.
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M. and Aumelas, A. (2008) NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides, Dev. Comp. Immunol., **32**, 227-238.
- Rodriguez de la Vega, R. C., Garcia, B. I., D'Ambrosio, C., Diego-Garcia, E., Scaloni, A. and Possani, L. D. (2004) Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus* limpidus in response to septic injury, Cell Mol. Life Sci., **61**, 1507-1519.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Edwards, M. J. and Grubhoffer, L. (2005) Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection, J. Med. Entomol., **42**, 36-41.
- Selsted, M. E. and Ouellette, A. J. (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, Nat. Immunol., **6**, 551-557.
- Semple, C. A., Gautier, P., Taylor, K. and Dorin, J. R. (2006) The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of beta-defensins, Mol. Divers., **10**, 575-584.
- Semple, C. A., Maxwell, A., Gautier, P., Kilanowski, F. M., Eastwood, H., Barran, P. E. and Dorin, J. R. (2005) The complexity of selection at the major primate beta-defensin locus, BMC Evol. Biol., **5**, 32. (online), available from <<http://www.biomedcentral.com/1471-2184/5/32>>, (accessed 2009-2-23).
- Seo, J. K., Crawford, J. M., Stone, K. L. and Noga, E. J. (2005) Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 1998-2004.
- Silverstein, K. A., Graham, M. A., Paape, T. D. and VandenBosch, K. A. (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*, Plant Physiol., **138**, 600-610.
- Simon, A., Kullberg, B. J., Tripet, B., Boerman, O. C., Zeeuwen, P., van der Ven-Jongekrijg, J., Verweij, P., Schalkwijk, J., Hodges, R., van der Meer, J. W. and Netea, M. G. (2008) Drosomycin-like defensin, a human homologue of *Drosophila melanogaster* drosomycin with antifungal activity, Antimicrob. Agents Chemother., **52**, 1407-1412.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J. and Selsted, M. E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins, Science, **286**, 498-502.
- Thomma, B. P., Cammue, B. P. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins, Planta, **216**, 193-202.
- Tian, C., Gao, B., Rodriguez Mdel, C., Lanz-Mendoza, H., Ma, B. and Zhu, S. (2008) Gene expression, antiparasitic activity, and functional evolution of the drosomycin family, Mol Immunol. **45**, 3909-3916.
- Todd, S. M., Sonenshine, D. E. and Hynes, W. L. (2007) Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*, Med. Vet. Entomol., **21**, 141-147.
- Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides, Biopolymers, **55**, 4-30.
- Trabi, M., Schirra, H. J. and Craik, D. J. (2001) Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from *Rhesus macaque* leukocytes, Biochemistry, **40**, 4211-4221.
- Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J. H., Jr. and Fujisaki, K. (2007) Babesial vector tick defensin against Babesia sp. parasites, Infect Immun., **75**, 3633-3640.
- van Dijk, A., Veldhuizen, E. J. and Haagsman, H. P. (2008) Avian defensins, Vet. Immunol. Immunopathol., **124**, 1-18.
- Xie, C., Prahl, A., Ericksen, B., Wu, Z., Zeng, P., Li, X., Lu, W. Y., Lubkowski, J. and Lu, W. (2005) Reconstruction of the conserved beta-bulge in mammalian defensins using D-amino acids, J. Biol. Chem., **280**, 32921-32929.
- Yamauchi, H. (2001) Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea*: purification, amino acid sequences and antibacterial activity, Insect Biochem. Mol. Biol.,

- 32, 75-84.
- Yang, Y. S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J. F., Roch, P. and Aumelas, A. (2000) Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1), *Biochemistry*, **39**, 14436-14447.
- Yang, W. Y., Wen, S. Y., Huang, Y. D., Ye, M. Q., Deng, X. J., Han, D., Xia, Q. Y. and Cao, Y. (2006) Functional divergence of six isoforms of antifungal peptide Drosomycin in *Drosophila melanogaster*, *Gene*, **379**, 26-32.
- Yount, N. Y. and Yeaman, M. R. (2004) Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 7363-7368.
- Zaslloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, **415**, 389-395.
- Zhang, H. and Kato, Y. (2003) Common structural properties specifically found in the CS α β defensin-like antimicrobial peptides in nematodes and mollusks: evidence for the same evolutionary origin?, *Dev. Comp. Immunol.*, **27**, 499-503.
- Zhang, H., Yoshida, S., Aizawa, T., Murakami, R., Suzuki, M., Koganezawa, N., Matsuura, A., Miyazawa, M., Kawano, K., Nitta, K. and Kato, Y. (2000) In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2701-2705.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2007) Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*, *Peptides*, **28**, 1304-1310.
- Zhu, S. (2007) Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins, *Immunogenetics*, **59**, 949-954.
- Zhu, S. (2008) Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS α β defensins, *Mol. Immunol.*, **45**, 828-838.
- Zou, J., Mercier, C., Koussounadis, A. and Secombes, C. (2007) Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish, *Mol. Immunol.*, **44**, 638-647.