

特集：昆虫バイオ〔4〕

# 昆虫の抗菌タンパク質とその利用

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 たにあい き よ こ やまかわ 谷合幹代子・山川 みのる 稔

## はじめに

無脊椎動物の進化の頂点に位置する昆虫は、脊椎動物における免疫系で主役を演ずる抗原・抗体反応を持たない。その代わりに、細菌に対して非特異的に働く抗菌物質のうち、特に抗菌タンパク質類を発達させてきた。これらのタンパク質は、細菌の侵入に伴い一過的に体液中に分泌される主要な液性防御反応因子として注目され、その研究が世界各地で急速に進んでいる。これらのタンパク質の構造や遺伝子解析、さらにタンパク質の改変などの分子的研究成果は、産業面への利用からも大きく期待されている。本稿では、これまでに分離された、主な抗菌タンパク質とその作用メカニズムについて紹介し、それらの活用面での可能性と基礎研究の将来を展望する。

## I 昆虫抗菌タンパク質の発見

昆虫のクチクラに抗カビ物質としてリポドが存在することや、体液中にリゾチームが存在することは、古くから知られていた。その他、ミツバチのメリチン、スズメバチやアシナガバチのマストラパン類など、複数のハチが毒ペプチドを持っていることはよく知られている。最近ではミバエの一種の雌成虫の生殖器付属腺に抗菌ペプチドが存在することが報告された。これらの抗菌物質は生体防御機構の一つとはいえ、いずれも常在性のものである。それに対し、細菌の侵入に対し誘導される積極的な防御因子として、リゾチーム以外のタンパク質性の抗菌物質が発見されたのはごく最近で、HULTMARKらが1980年にセクロピアサンの蛹から分離したセクロピンが最初である。以後、様々な昆虫種から次々と異なるタイプの抗菌タンパク質が発見された。これらは細菌の侵入後きわめて早く誘導されるため、哺乳類の急性期タンパク質に相当する反応といえる。これまでの例では、昆虫は一種類だけではなく、抗菌作用や標的細菌の異なるいくつかの抗菌タンパク質を組み合わせて使っている。現在までに、アミノ酸配列まで明らかになった抗菌タンパク質が分離された昆虫種は、チョウの仲間である鱗翅目から

4種、ハエの仲間である双翅目から4種、コガネムシなどの仲間である鞘翅目から2種、ハチの中間の膜翅目から1種、トンボの仲間である蜻蛉目から1種報告されている。これら以外の目から新しいタイプの抗菌タンパク質が発見される可能性が高いことから、今後もさらに多くの種類が付け加わっていくと思われる。これまで報告されたものを以下に紹介する。

## II 抗菌タンパク質の種類と活性範囲

### 1 セクロピン

セクロピアサンのセクロピンに類似する抗菌タンパク質が、多くの昆虫種からみつがっている。カイコ幼虫 (SHIBA et al., 1983)、タバコスズメガ幼虫 (DICKENSON et al., 1988)、サクサン蛹 (QU et al., 1982) やセンチニクバエ幼虫 (KANAI and NATORI, 1989)、ショウジョウバエ幼虫 (KYLSTEN et al., 1990)、ツエツエバエ蛹 (KAAYA et al., 1987) などからである。これらは分子量が4 kDaの前後の耐熱性ペプチドで、通常一種類の虫から複数種のセクロピンが分離されており、アミノ酸配列の特徴からA, B, C, Dに分けられたり、また分離昆虫種や発現特異性から、ザルコトキシン、バクテリシジン、アンドロピンなどと命名されている。これらの抗菌スペクトルはそれぞれ異なるが、カイコとセクロピアサンのセクロピンBやザルコトキシンIなどは、昆虫の抗菌タンパク質の中で最もスペクトルが広く、グラム陽性菌及びグラム陰性菌の両者に幅広く殺菌活性がある。セクロピン類は発見当初は昆虫特異的な生体防御因子であると考えられていたが、最近ブタの小腸からもセクロピンファミリーに属するペプチドがみつがったため、動物界に広く分布することがわかった。

### 2 ディフェンシン

最初ヒトやマウス、ウサギなどの哺乳類の白血球やマクロファージ及び小腸から発見され、その後昆虫にも存在することがわかった抗菌タンパク質に、ディフェンシン類がある。ディフェンシンは、ニクバエの一種 (*Phormia terranova*) の幼虫体液やセイヨウミツバチのロイヤルゼリーからも分離された。ニクバエから分離されたものはホルミシン (LAMBERT et al., 1991)、センチニクバエからのものはザーペシン (MATSUYAMA and

NATORI, 1988), セイヨウミツバチのものはそれぞれロイヤリシン (FUJIWARA et al., 1990) と呼ばれている。その他, ゴミムシダマシの一種 (*Zophobas atratus*) の幼虫 (BULET et al., 1991) やマダラヤンマ幼虫 (BULET et al., 1992) からも報告された。これらの分子量はセクロピンと同様約 4 kDa でやはり耐熱性であるが, 抗菌活性はグラム陽性菌に対して高く, グラム陰性菌に対しては低い。

**3 アタシン及びその他の高グリシン含有タンパク質**  
分子量の大きいものでは, セクロピアサン蛹のアタシン (20 kDa~23 kDa) (HULTMARK et al., 1983) があり, 類似のものにセンチニクバエ幼虫のザルコトキシン II (24 kDa) (ANDO et al., 1987) がある。その他, ニクバエ幼虫のディプテリシン (9 kDa), セイヨウミツバチ成虫のヒメノプタエシン (CASTEELS et al., 1993; DIMARCO et al., 1988) は, グリシン残基に富むドメインがあることがアタシン類と共通である。ヒメノプタエシンはグラム陽性・陰性両菌に活性があるが, アタシンやザルコトキシン II は一部のグラム陰性菌にのみ活性があり, その作用は静菌的である。アタシンはグラム陰性細菌の外膜タンパク質の合成阻害であることが証明されており (CARLSSON et al., 1991), ザルコトキシン II はペプチドグリカン合成阻害であると考えられている。

#### 4 高プロリン含有タンパク質

セイヨウミツバチ成虫から分離されたアピダエシン (2.0 kDa) (CASTEELS et al., 1989) とアバエシン (4.0 kDa) (CASTEELS et al., 1990), ショウジョウバエ幼虫から分離されたドロソシン (2.4 kDa) (BULET et al., 1993) の共通点は, プロリン残基に富むことである。ドロソシンは以上に紹介した中で唯一糖鎖を持ち, 糖鎖を除くと抗菌活性が減少する。最近我々の研究室で, カイコからもドロソシンと同様にプロリンに富み, 糖鎖を有するタンパク質が分離されており, やはり糖鎖が活性発現に必要なことがわかっている (未発表)。

### III 昆虫の抗菌タンパク質の作用機作と応用的利用

上記の様々な抗菌タンパク質の中で, 現在最も実用化の候補とされているのは, セクロピン類とディフェンシン類だろう。

#### 1 セクロピンの作用と利用

図-1にセクロピン類のアミノ酸配列とそれらの共通部位を示した。セクロピン類は, 2個の $\alpha$ -ヘリックスを持つ両親媒性の陽イオンタンパク質で, N末端側は親水性かつ塩基性のアミノ酸が, C末端側には疎水性のアミ

ノ酸が並んでおり, C末端はアミド化されていることが多い。この構造から, おそらく塩基性部位で細菌細胞膜のリン脂質に親和性を示し, 疎水部位で膜を貫通して細菌を殺すのであろうと予想されている。また, ザルコトキシン IA において, アミド化された合成標品と非アミド化標品との比較がなされ, アミド化が抗菌活性に重要であることが明らかになった (NAKAJIMA et al., 1987)。

セクロピンはアミノ酸残基 31~39 の短いペプチドであるため, 合成が容易であり, 抗菌スペクトルをより拡大するため, ミツバチ毒であるメリチンとのハイブリッドの合成が試みられた (ANDREU et al., 1992)。また, 真核生物の培養細胞に対して損傷を与えないこと (STEINER et al., 1988; CHRISTENSEN et al., 1988), すべてのアミノ酸を D 型に置き換えて合成しても天然型と同様の抗菌活性を有していたこと (WADE et al., 1990) が確かめられている。そこで, 人体に安全かつ自然界のプロテアーゼによって分解されにくい新規抗生物質として注目されている。

天然型セクロピンの大量生産のために, バキュロウイルスベクターを用いたタンパク質発現実験が行われ, 既に 3 例が成功している。ザルコトキシン I (YAMADA et al., 1990) 並びにセクロピアサンセクロピン A (ANDERSONS et al., 1991) とカイコセクロピン B (KADONO-Okuda et al., 未発表) である。

また, セクロピン遺伝子を植物へ導入することによる耐病性植物の育種が試みられている。表-1にカイコのセクロピン B の植物病原菌に対する抗菌活性を示した。バラ科, キク科など多犯性重要病原の一つである, 根頭がんしゅ病菌をはじめ, 腐敗病菌やイネ白葉枯病菌に対し

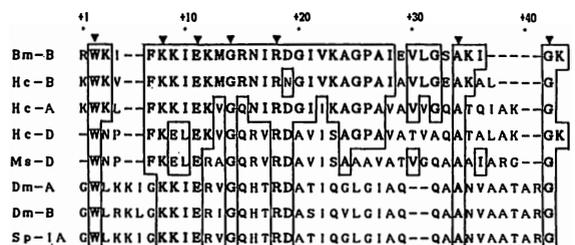


図-1 セクロピン類のアミノ酸配列

Bm-B: カイコセクロピン B, Hc-B: セクロピアサンセクロピン B, Hc-A: セクロピアサンセクロピン A, Hc-D: セクロピアサンセクロピン D, Ms-D: タバコスズメガセクロピン D, Dm-A: ショウジョウバエセクロピン A, Dm-B: ショウジョウバエセクロピン B, Sp-1A: センチニクバエザルコトキシン IA

て有効であった。ここでは、*Pseudomonas solanacearum* (青枯病菌) に対する活性は低いが、既にセクロピアサンのセクロピン B を組み込んだトランスジェニック (形質転換) タバコがアメリカで成功しており、この報告によると、同菌による立枯病に対して抵抗性を示した (JAYNES et al., 1993)。したがって、セクロピンの中でもそれぞれの植物に適したタイプを選んだり、アミノ酸置換などの改変ペプチドとして導入することにより、各種病原菌に抵抗性の植物が作出できると期待される。

2 ディフェンシンの作用と利用

哺乳類や昆虫から分離されたすべてのディフェンシンの共通構造は、システイン残基を 6 個持ち、分子内に 3 個のジスルフィド結合を持つことである。ヒトやマウスのディフェンシンは大腸菌の膜透過性を変化させ、おそらくイオンチャンネルを形成するものと考えられている。その作用は殺菌的である。センチニクバエのザーペシンは、セクロピンと同様に細菌細胞膜に傷害を与えて殺菌することが報告されている (MATSUYAMA and NATORI, 1990)。ザーペシンが結合する部位は酸性脂質のカルジオリピンである。センチニクバエの胚由来培養細胞の培養上清から精製されたザーペシン B のアミノ酸配列をもとに数種の部分ペプチドが作製され、抗菌活性が調べられた (YAMADA and NATORI, 1994)。天然のザーペシン (アミノ酸 34 残基) がグラム陽性菌のみに効果が高いのに対し、部分配列の一つは、グラム陰性菌や真菌にも高い活性を示すことがわかった。この部分配列はわずか 11 アミノ酸から成り、C 末端はアミド化されていることが

活性発現に重要であった。さらにいくつかのアミノ酸置換によって疎水性を高めたペプチドでは、より活性が増大した。

哺乳類のディフェンシンは細菌や真菌だけでなく、ヘルペスウイルスや水疱性口内炎ウイルスなどのエンベロープウイルスにも効果がある。したがって、今後タンパク質工学の手法により、既知のディフェンシンを改変して、植物ウイルスや昆虫ウイルスにまで標的範囲を広げた抗菌ペプチドの開発が考えられる。

3 昆虫抗菌タンパク質の利点

これまでに開発された抗生物質は、栄養競合的に働いたり、細菌の細胞壁やタンパク質の合成を阻害する作用を持ち、その欠点として、耐性細菌がしやすいことがあげられる。特に臨床で深刻な問題となっている抗生物質耐性の黄色ブドウ球菌 (MRSA) や緑膿菌は、ほとんどの抗生物質に抵抗性である。ところが、昆虫の抗菌タンパク質の中には、上記 2 種の耐性細菌に効果を示すものがある。ザーペシンは MRSA によく効くし、セクロピアサンのセクロピン B は緑膿菌を低濃度で殺す。これらの抗菌タンパク質は細胞膜に直接作用することから、耐性が獲得されにくいのではないかとと思われる。

IV 抗菌タンパク質の基礎研究の成果

昆虫の抗菌タンパク質遺伝子を解析するうちに、生体防御機構において脊椎動物と共通性があることが明らかになってきた。昆虫のセクロピン類や生体防御レクチンは、グラム陰性菌の外膜リポ多糖 (LPS) によって誘導されるが、哺乳類でも、LPS によって TNF (tumor necrosis factor) やインターロイキン 1 などが誘導される。LPS によって活性化される、哺乳類の免疫グロブリン L 鎖の遺伝子の 5' 上流にある転写調節配列 (NF- $\kappa$ B 結合配列) や、急性期タンパク質遺伝子類の 5' 上流にあ

表-1 カイコセクロピン B の植物病原菌に対する活性

細菌の種類	50%生育阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> N 1001 (根頭がんしゅ病菌)	0.4 $\pm$ 0.0
<i>Clavibacter michiganense</i> pv. <i>michiganense</i> (トマトかいよう病)	3.1 $\pm$ 0.3
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (軟腐病菌)	4.2 $\pm$ 0.7
<i>Pseudomonas cichorii</i> NL 7630 (腐敗病菌)	1.7 $\pm$ 0.5
<i>Pseudomonas glumae</i> N 1169 (イネもみ枯細菌病菌)	>50
<i>Pseudomonas solanacearum</i> N 1023 (青枯病菌)	>50
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> S 6804 (クワ縮葉細菌病菌)	2.1 $\pm$ 0.7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i> (ムギ黒節病菌)	0.5 $\pm$ 0.0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> N1076 (アブラナ科野菜黒腐病菌)	1.8 $\pm$ 0.5
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> N 1086 (イネ白葉枯病菌)	1.8 $\pm$ 0.2

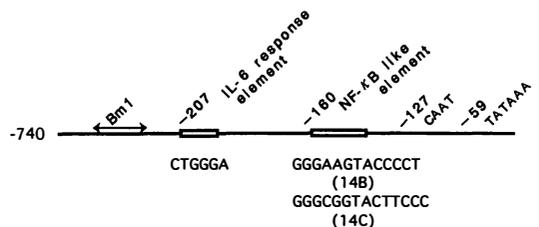


図-2 カイコセクロピン B 遺伝子の 5' 上流域模式図

転写開始点からそれぞれ-160, -207 bp 上流に NF- $\kappa$ B 結合配列に似た配列 (NF- $\kappa$ B), インターロイキン 6 応答配列 (IL-6RE) が存在する。14 B, 14 C は二つのセクロピン B 遺伝子の名前である。Bm 1 はさらに上流に位置するカイコの高頻度反復配列。

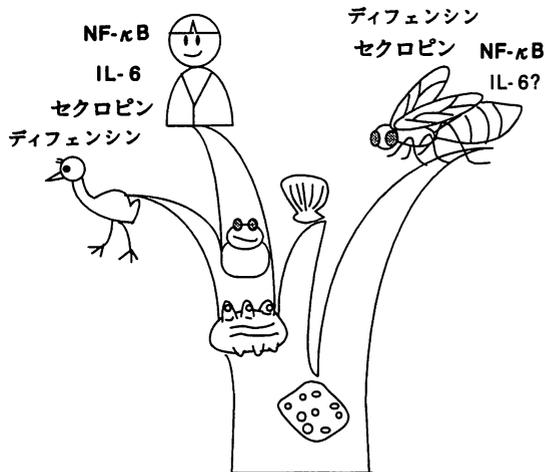


図-3 生体防御機構の系統進化

るインターロイキン6 (IL6) 応答配列などが、昆虫の抗菌タンパク質遺伝子上流にもあることがわかった (谷合, 1993) (図-2 参照)。また、LPS の活性部位もリポド A 部分にあることや、血液細胞が大腸菌を捕食した結果、免疫活性を持つ LPS が遊離することなどは、哺乳類とカイコに共通の現象である (谷合, 1993)。昆虫の生体防御関連遺伝子の発現調節機構や、それに至るまでの情報伝達機構については、まだ明らかにすべき部分が多く残されている。例えば、脊椎動物のようにサイトカインを介する免疫機構のネットワーク系が存在するかどうか、また異物認識のしくみについては、今後の研究課題である。

引用文献

1) ANDO, K. et al. (1987) : Biochemistry 26 : 226~230.  
 2) ANDERSONS, D. et al. (1991) : Biochem. J. 280 : 219~224.

3) ANDREU, D. et al. (1992) : FEBS Lett. 296 : 190 ~ 194.  
 4) BULET, P. et al. (1991) : J. Biol. Chem. 266 : 24520~24525.  
 5) ——— et al. (1993) : ibid. 268 : 14893~14897.  
 6) CARLSSON, A. et al. (1991) : Infect. Immun. 59 : 3040~3045.  
 7) CASTEELS, P. et al. (1989) : EMBO J. 8 : 2387~2391.  
 8) ——— et al. (1990) : Eur. J. Biochem. 187 : 381~386.  
 9) ——— et al. (1993) : J. Biol. Chem. 268 : 7044~7054.  
 10) CHRISTENSEN., B. (1988) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5072~5076.  
 11) DICKENSON, L. et al. (1988) : J. Biol. Chem. 263 : 19424~19429.  
 12) DIMARCQ, J. L. et al. (1988) : Eur. J. Biochem. 171 : 17~22.  
 13) FUJIWARA, S. et al. (1990) : J. Biol. Chem. 265 : 11333~11337.  
 14) ——— et al. (1992) : Eur. J. Biochem. 209 : 977~984.  
 15) HULTMARK, D. et al. (1980) : ibid. 106 : 7~16.  
 16) ——— et al. (1983) : EMBO J. 2 : 571~576.  
 17) JAYNES, J. M. et al. (1993) : Plant Sci. 89 : 43~53.  
 18) KAAVA, G. P. et al. (1987) : Insect Biochem. 17 : 309~315.  
 19) KANAI, A. and S. NATORI (1989) : FEBS Lett. 258 : 199~202.  
 20) KYLSTEN, P. et al. (1990) EMBO J. 9 : 217~224.  
 21) LAMBERT, J. (1989) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 262~266.  
 22) MATSUYAMA, K. and S. NATORI (1990) : J. Biochem. 108 : 128~132.  
 23) ——— (1988) : J. Biol. Chem. 263 : 17117~17121.  
 24) NAKAJIMA, Y. et al. (1987) : ibid. 262 : 1665~1669.  
 25) QU, X.-m. et al. (1982) : Comp. Biochem. Physiol. 45B : 669~681.  
 26) SHIBA, T. et al. (1983) : Peptide Chem. (E. Munkata. ed.) . pp.209~214.  
 27) STEINER, H. (1988) : Biochim. Biophys. Acta. 939 : 260~266.  
 28) 谷合幹子 (1993) : 九州大学農学部学位論文  
 29) YAMADA, K. and S. NATORI (1994) : Biochem. J. 291 : 275~279.  
 30) ——— et al. (1990) : ibid. 272 : 633~636.  
 31) WADE, D. et al. (1990) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 4761~4765.

日本植物防疫協会の生物農薬関連図書

「生物農薬開発の手引き」

B5判 111頁 定価 2,000円 送料 310円

生物農薬の実用化促進に社会的な期待が寄せられており、行政面でも農薬登録のガイドライン (微生物農薬検査基準) の検討が進められている。当協会でも「生物農薬検討委員会」を設置し、適切な試験研究をすすめるための諸問題の検討を始めた。本書はその事業の一環として作成されたもので、これまでの知見や議論を集約し、開発や試験研究の参考とするべく資料を集成し、解説を加えたものである。

雑誌「植物防疫」特別増刊号 No.2

「天敵微生物の研究手法」

B5判 222頁 定価 3,000円 送料 140円

生物農薬の中で一番研究開発の進んだ天敵微生物について、その採集から各種実験法までを詳しく解説。

「天敵農薬」

—チリカブリダニその生態と応用—

森 樊須 (北海道大学名誉教授) 編

A5判 130頁 定価 2,400円 送料 310円