

センチニクバエ幼虫体液中に存在する
抗真菌性蛋白質の研究

飯島亮介

1992

学位論文

センチニクバエ幼虫体液中に存在
する抗真菌性蛋白質の研究

飯島亮介

目次

序章		1
第1章	抗真菌蛋白質の精製	7
第1節	序	8
第2節	抗真菌活性の精製	10
第3節	精製標品の抗真菌活性	13
第4節	まとめと考察	14
	図表	15
第2章	抗真菌蛋白質の構造	24
第1節	序	25
第2節	組成分析	25
第3節	N末端アミノ酸配列の解析	26
第4節	抗真菌蛋白質cDNAのクローニング	28
第5節	抗真菌蛋白質の構造的特徴	32
第6節	ゲノム遺伝子の構造	36
第7節	まとめと考察	38
	図表	41

第3章	抗真菌蛋白質の性質	52
第1節	序	53
第2節	殺菌的活性の検討	53
第3節	菌体との結合、及び活性に対する塩の影響	55
第4節	ザルコトキシニンIAとの共同作用	57
第5節	細菌に対する作用	59
第6節	まとめと考察	60
	図表	63
第4章	総括	72
第5章	材料と方法	76
参考文献		106
謝辞		112

第 1 章 序 論

生物個体が生存する上において、二つの大きな目的が挙げられる。一つは個体の保存、もう一つが種の保存である。この二者は一見無理なく両立していると考えられがちであるが、実際には種の保存が優先され、それに抵触しない範囲で個体の保存を目的とした機能が働いていると思われる。言葉を変えれば、二者の間には階層性が存在し、種の保存の為に必要とされる限りに於いて個体の保存を行っていると言う事になろう。このことを端的に示すのが個体の寿命である。即ち、生物個体が生殖期を過ぎて種の保存の役割を終えると、個体としての機能が低下する老化現象があらわれ、最終的には死に至って個体が失われる。

このような個体の老化と、最終的には死に至る過程は、種の保存、子孫の世代を生きながらえさせる目的と一致していると考えられる。限られた場所に生活するある生物種にとって、何が生存競争上の最大の脅威になるかを考えたとき、それは食物、棲息場所が全く同一であり、体力、知能等がより優れた生物という回答が得られよう。その様な生物とはその生物種自身であり、若い世代にとっては特に親とそれ以前の世代がそれに当たる。従って、新しい世代が生きてゆくためには、古い世代が消えて場所を空けなければならない。このようなことから生物個体の老化は、種の保存、世代交代を行うためのものであり、そのために各個体の自己保存の機能が衰えていく過程であるかと考えられる。

それに対して成長期及び成熟期の個体は、まだ種の保存に貢献していない、あるいはそれを行う能力が残っていることから、このような時期にある個体にとっては自己保存と種の保存の目的が一致していると考えられる。従って恐らくこの時期には、自らを守る機能が著しく発達し、機能していることが予想される。

ところで、自己保存を目的とした機能の内、生化学の範疇に入るもの

としては生体防御機構が挙げられる。これは生物が体内において自己非自己の識別を行い、非自己と認識される対象を排除する機能を指す。生物の持つ様々な機能が発現するためには、それを可能にする、ある幅を持った状態を維持することが必要であり、これが恒常性の維持と呼ばれるものである。生物の体は、各部ごとには異なった機能を持っているが、個体全体としての機能を損なわないように制御がなされている。この様に保たれている体内に異物、特に細菌、真菌、ウイルス及び原虫等の微生物が侵入した場合には、それら自身が生存するために宿主の恒常性を乱す活動を行う。この攪乱活動に対抗する為には、異物が侵入したことを感知し、それだけを除く機構を持たなければならない。その方法には様々なものが考えられる。

この様な生体防御機構に関しては、主に医学的な見地から脊椎動物について重点的に研究が進められてきたと言える。また、脊椎動物の生体防御は、抗原抗体反応系が代表するように、非常に複雑で高度に発達したものであり、全貌の解明に向けての努力が続けられている。しかし、生体防御機構はその必然性から考えられる通り、脊椎動物以外の生物にも備わっていることが知られている。様々な生物種から生体防御因子が精製、同定されつつあるが、中でもハエ、ゴキブリ、カイコ、ハチ等の昆虫由来の因子の研究が良く知られており、主なものとしては異物認識に働くと考えられるレクチンや、抗細菌性蛋白質が挙げられる。これらは細菌などの異物が体内に侵入するリスクの高まる体表障害時に体液中に出現し、貪食細胞である体液細胞と共に殺菌、排除にあたっていることが示されつつあり、昆虫にとっての免疫機構を構成する要素であると考えられる。

この、液性因子群による生体防御機構は、いくつかの点で昆虫にとつ

て理にかなったものであると考えられる。先ず、それが先天性である点がある。脊椎動物の免疫系は獲得性の機能であるためにその学習、成熟に長い時間が必要となるので、平均的には脊椎動物より寿命の短い昆虫にとってはその様な機構は有効ではないと考えられる。これに対して、あらかじめ持っている因子を使用することには準備期間は必要とせず、事態に即応できることから、より昆虫向きであるといえる。

また、因子のあるものは体液細胞で産生されるが、他の多くが生体防御専門の器官では無い脂肪体で作られることも効率的に有効であろうと考えられる。脊椎動物の免疫系は担当器官以外にも神経系、内分泌系等が関与する非常に複雑なものであることが示されつつあるが、これを持つためには当然ある程度以上大きな体型が必要となる。それに対して昆虫の脂肪体は、肝臓、腎臓に相当する、生体防御以外にもそれ以上に生存に必要な機能を担った必須器官である。その脂肪体が生体防御機能までも担うのであれば、より無駄がなく小さな効率の体型を実現することができよう。また、完全変態昆虫では変態の度に組織の大規模な崩壊、再構成が起きるので、その度に複雑な器官を作り上げるのは先に述べた時間的理由とも併せて昆虫にとっては不適當である理由となろう。更にその昆虫個体が生涯の間に細菌感染、体内への異物侵入を経験しなければ、そのために生体防御因子の産生を行う必要もないので、エネルギー的にもより高い効率が達成されるといえる。この効率性という面を裏付けるのが生体防御因子、生体防御系の2重機能性であるかと考えられる。

センチニクバエを例にとると、ザルコファーガ レクチン、ザルコトキシシン等といった生体防御因子が、個体発生・変態の特定の時期にも誘導、出現してくることが明らかにされている。このことは、異物の認識、排除が、本来外来のものに対してではなく自己の中の不要組織に対して

行われていたことを示唆するものであると解釈されている。生体防御系の発生への関与は脊椎動物においても、貪食細胞による不要組織の排除の例が知られている。言い代えると生体防御は本来自己構築のために働いていた機能が、その有用性から拡大して生じたものと考えられる訳である。従って、脂肪体による生体防御因子の産生は、その成り立ちを考える上で大変興味深いものであり、また、2重機能を持つことによる効率を論ずることは本質的なことであると考えられる。

ところで、この様に解明の進んできた昆虫の生体防御因子の研究であるが、依然未解明の点も多く残っている。そのひとつが細菌以外の感染性微生物に対応する因子の同定である。以後もセンチニクバエを例にとりて述べるが、この昆虫は少なくとも4グループの抗細菌性タンパク質群を持っている。各々がザルコトキシシンI・II・III、ザーベシンと命名された蛋白群は少しずつ異なったサブタイプからファミリーを構成し、幅広い抗菌スペクトルを示す。しかしこれらは細菌に対して作用するものである。他の昆虫からもセンチニクバエ抗菌蛋白質と構造的に類似した蛋白質が見いだされているが、それらについても細菌以外に作用を示したという報告はない。

他の生物に感染する微生物の種類から推測すると、昆虫も細菌以外に真菌、ウイルス、原虫等からも標的にされ得ると考えられる。よって先に述べた昆虫の生体防御系の性質から見て、各感染微生物に対して有効な因子をあらかじめ持っていることが必要である。そこで私はその内の真菌防御因子に着目してその解析を試みることにした。

昆虫の真菌感染防御機構としては、体液中のフェノール酸化酵素とその基質による凝固系が知られているのみである。フェノール酸化酵素は通常前駆体として存在し、空気と接触したとき、あるいは菌体成分であ

る β -1, 3-グルカン、ペプチドグリカンを認識する活性化酵素の働きにより活性型に変化し、フェノール性物質を酸化してメラニンを生成する。このメラニンが、異物を封じ込め、また、その毒性から抗菌的に作用していると考えられている。

このフェノール酸化酵素の系は、先に述べた抗菌性蛋白群による生体防御とはかなり異なったものであることから、更に別の抗真菌因子が存在することが考えられた。その様な物質を見いだすことは昆虫の生体防御機構の解明の上で重要な知見を与えるものであることが期待された。

本研究ではセンチニクバエを材料に、その3令幼虫体液から抗真菌活性を持つ蛋白質を精製し、cDNAクローニングにより全1次構造を決定し、作用の解析を行った。

第 1 章

センチニクバエ抗真菌蛋白質の 精製

第1節 序

本章では、センチニクバエ3令幼虫体液中に抗真菌活性を見だし、その内のフェノール酸化酵素の作用と無関係なものについて精製を行った結果について述べる。

センチニクバエが、ザルコトキシン群、ザーベシンの様な液性因子による抗真菌活性を持つものであれば、その活性は *in vitro* のアッセイ系において検出可能であると考えられた。そこで先ずセンチニクバエの体液を採取し、抗真菌活性の検定を行った。

材料としては、3令幼虫を用いることにした。これは、以下に挙げる理由による。第1に量的な問題がある。センチニクバエが研究材料として適しているのは、飼育が容易で、環境を設定することでライフサイクルの同調が可能であるといったことの他に、個体のサイズがショウジョウバエより遙かに大きいことが理由となっている。遺伝学、遺伝子工学を研究方法の中心とした発生学の研究は、主にショウジョウバエを用いて最も盛んに行われており、成果が挙げられている。しかし、ある機能を持った物質を生体から取り出し、解析するといった方法論には適さない。これはショウジョウバエの個体サイズが小さく、例えばそこからの蛋白質の精製といった作業が困難であることに起因するものである。これに対してセンチニクバエはより大型の昆虫であり、そこからの生理活性物質の精製も可能である。中でも、特に3令幼虫の時期は1個体あたりの体液量が全ライフステージ中最も多く、材料として好適であると考えられた。

次に、この3令の時期の幼虫体液からは既にザルコトキシン群、ザルコファーガレクチンといった生体防御蛋白質が見いだされていること

がある。序論において述べたような考えから、個体が若い間には生体防御能は高い機能を維持していることが期待された、

更に、この時期の幼虫は生涯を通じて最も感染症に罹患するリスクの高いと考えられる環境に置かれていることが挙げられる。当教室で飼育しているセンチニクバエは、1令幼虫をブタのレバーに産みつける。このレバーは27℃恒温室に4日間置かれるため、後期においては腐敗が進行した状態となる。この様な環境下で、常に腐敗したレバーと接し、それを食べるためには、周囲に存在するカビ、酵母などの真菌を含む腐敗菌に対して強い抵抗性を持つことが必要であると考えられた。

よって、上に挙げた様々な要因を根拠として、先ず3令幼虫体液の抗真菌活性を検討することにした。方法は、酵母状真菌であるC. アルビカンス培養液に採取した体液を添加して2時間培養し、後に平板培地状に移して現れるキャンディダ アルビカンスのコロニー数を測定するものである。その結果をFig. 1に示す。体液を添加しない場合に比べて出現コロニー数の減少が認められた。このことは、C. アルビカンス生菌数がセンチニクバエ幼虫体液の添加により減少していることを指している。従って、調べた体液は真菌であるC. アルビカンスに対して殺菌活性を持つと判断された。

ところで、序論で述べたように昆虫の体液中にはフェノール酸化酵素と、その基質が存在していることが知られている。これは昆虫が体に傷を負って体液が空気と触れることにより活性化されて、体液の凝固により傷を塞ぐほかにも、侵入する菌体の表面構造物によっても活性化され、クロッティングを起こす、また生じたフェノール樹脂が細胞障害性であることなどから感染防御に機能するとされている。実際に抗真菌アッセイを行った際にも菌液の黒変、凝固物の生成が肉眼的にも認められ、フ

フェノール酸化酵素が働いていることが窺われた。しかし体液量を0.5 μ lと、黒変が認められない量しか添加しなかった場合にもやはり生菌数は減少していることからフェノール酸化酵素以外にも抗真菌的に働くものが存在すると考えられた。また、この抗真菌活性は幼虫の体表障害時にも変化しなかった。このことは抗真菌活性を他の抗バクテリア蛋白質の活性と区別させる特徴的な点である。センチニクバエ正常幼虫体液には *in vitro* での抗バクテリア活性はなく、体表に傷を付けると始めて遺伝子レベルでの活性化が起き、ザルコトキシン I, II, III, ザーベシンといった抗バクテリア蛋白質が誘導されることが明らかにされている。従って、正常体液にも見られる抗信菌活性は、これまでにセンチニクバエで明らかにされてきた生体防御機構とは異なったタイプのものであると考えられた。ここまでの検討により、センチニクバエ正常3令幼虫の体液中には、抗真菌的に作用する物質が存在することが示唆された。そこでこの抗真菌活性の精製を以下に試みた。

第2節 抗真菌活性の精製

抗真菌活性の精製の指標となるアッセイ方法は、簡便化のために液体培養法にて行った。これは、C. アルビカンス培養液に検体を添加し、37℃で培養した後に濁度を測定して増殖阻害活性を調べるものである。ところで、その条件下でのC. アルビカンスの世代時間は約2時間である。従って濁度を測定する為には培養時間は12から24時間必要となるが、体液、クロマトグラフィー画分等のサンプルは滅菌していないので、バクテリアが混入した場合にはそちらが先に増殖してしまうため、

選択培地を用いることにした。これは真菌用培地であるサブロー培地をベースにして、抗バクテリア剤であるニトロフラゾン0.05%を添加したものであり、臨床検体からのC. アルビカンスの同定、分離に用いられている培地組成に準拠している。

センチニクバエ幼虫体液の蛋白濃度は120から150mg/mlと高いものであるために、そこから物質を精製するためには比活性の上昇が大きなステップを用いる必要が考えられた。また、第1節でも述べたように、フェノール酸化酵素とその基質が存在することにより体液のクロッティングが起こり、菌体の凝集、アッセイ容器への付着等によってコロニー形成単位 (Colony forming unit, CFU) が減少するという問題がある。そこで、まず、体液の熱処理を試みることにした。当然見かけ上の活性は大きく減少する、あるいは全く失われることも予想されたが、活性が残った場合には、それは熱不安定なフェノール酸化酵素の活性によるものではないので、その活性を担う物質を精製することを考えた。

1回の精製あたり10mlの3令幼虫体液を用いた。このままで熱処理すると蛋白量が高すぎるため、熱変性で蛋白質が固化した時に上清画分がほとんど残らないので9倍量の蒸留水で希釈し、100℃10分間処理した後、遠心上清を回収した。この操作により、総蛋白量の90%以上が除かれた。この段階までは体液成分が真菌の栄養源となって直接アッセイすると無添加の対照区より菌の成長がよくなるという問題があり、活性は検出できなかった。そこでこの熱処理上清画分を逆相HPLCを用いて分画し、そのいずれかの画分に活性が存在するかを調べることにした。熱処理上清は、沈澱が柔らかいため上清画分に不溶性粒子が残留していること、及び脂質が浮遊しているので、ポアサイズ0.4

4 μ m のニトロセルロースフィルターを通してそれらを除去した。こうして得た濾液を C₁₈ 逆相カラムにアプライした。溶出は 0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) を添加したアセトニトリルのグラディエントで行った (Fig. 2a, b, c)。

抗真菌活性は複数の位置に認められたが、主要な活性はアセトニトリル濃度 12% の位置に溶出される吸光度のピークと一致して現れた。Fig. 2a ではアッセイに用いた各フラクションの量を減らして 2ヶ所にのみ活性が認められる条件にしてある。更に、主要活性ピークを逆相 HPLC のリクロマトグラフィーにより、活性と対応する単一ピークとなるまで精製した (Fig. 3a)。

Fig. 3b に逆相 HPLC で精製した抗真菌活性フラクションの酢酸尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動像を示す。この様に精製フラクションは分子量約 7 kDa の位置に単一のバンドを与えた。ところで、この時ゲルの染色は Fairbanks の方法に従いクマシー ブリリアント ブルーを用いて行ったが、はじめの試みで染色を 1 晩行なったところ精製した抗真菌物質のバンドは検出されなかった。そこで染色時間を検討したところ、30 分から 1 時間の染色ではバンドが検出されるが、更に長時間染色液に付けておくことにより消失する事が分かった。後に構造解析によって分かったことから考えると、抗真菌活性を担う物質は高次構造を持たない低分子の蛋白であるため、ゲルの内部で保持されず、拡散してバンドが消失してしまったものと思われる。また、SDS ポリアクリルアミド電気泳動では、精製標品のバンドがブロードになる等の問題が生じた。これはこの物質の組成に起因すると考えられる。第 2 章で示すようにこの物質はアミノ酸組成の偏った親水性蛋白質であったが、SDS は疎水性領域に結合するものであるため、親水性蛋白質

ではSDS化が十分に起こらないことが実験的に知られている。この抗真菌蛋白質の場合にもそうした理由から泳動がうまく行われなかったことが考えられる。

以上のように精製した抗真菌物質は220nm, 280nmに吸収を持つこと、Lowry法に対して定量的に反応すること、及び酢酸尿素ポリアクリルアミド電気泳動においてクマシー ブリリアント ブルーで染色されるバンドを与えることから、この時点において蛋白性のものであると考えられた。

次にこの物質が精製されたことを確認するために、更にゲルろ過HPLCを行って比活性が変化するか否かを調べた。同時に分子量の算定も行ったが、その結果、抗真菌蛋白質はチトクローム-Cと同じ時間で溶出されることから13kDaと算定された(Fig. 4)。従って、この条件下では2量体を形成していることが考えられる。

しかしながら、活性測定はこの時溶出に用いたリン酸緩衝液中では、後で述べる理由から行えなかった。そこで、溶出液をアセトニトリル:DDW:TFA=60:40:0.05に換え、溶出後に溶媒を真空遠心エバポレーターで除去して乾燥標品の比活性を逆相HPLC精製標品と比較した。その結果をFig. 5に示すが、比活性の上昇はないことから、精製は充分に行われていると判断した。

第3節 精製標品の抗真菌活性

精製した抗真菌物質について、精製の指標に用いたアッセイ系における濃度依存性を調べた結果をFig. 6に示す。この様に、初細胞濃度

1×10^6 細胞/ml の C. アルビカンスの増殖を、 $60 \mu\text{g/ml}$ の濃度で精製標品を作用させることにより完全に阻止した。

次に、この抗真菌蛋白質が他の真菌に対しても活性を示すかの検討を行った。その結果を Fig. 7 に示す。この時点では、抗真菌物質精製標品を用いるため、コンタミネーションの危険は低いと考えられたのでニトロフラゾンをアッセイ系から除いて行ったが、3種類の被験菌の内、感受性の認められたのは S. ポンベ1株のみで、これまでに用いていた C. アルビカンスには効果を示さなかった。従って今まで C. アルビカンスに対して見られていた抗真菌活性はニトロフラゾンとの共同作用であったことになる。よって、はじめに体液自体に見られた C. アルビカンス CFU を減少させる活性はこの蛋白質単独での作用では説明できないことになる。

このことから、センチニクバエ体液の抗真菌活性は精製した因子以外の別の要因による、あるいは精製した因子が他の因子と共に働いた結果であることなどが考えられた。しかし、精製した因子は S. ポンベには作用すること、また、第3章で述べるように菌が増殖できない条件下では C. アルビカンスに殺菌的に働き得ることなどからこの因子の抗真菌生体防御因子としての性質について解析を行うことにした。

第4節 まとめと考察

センチニクバエ3令幼虫体液中には、酵母状の真菌に対して作用する生体防御因子が存在することが示された。*in vitro* での体液の抗真菌活性には、フェノール酸化酵素の作用による CFU の減少効果が含まれ

るが、熱処理によってそれを失活させた後にも残る活性が存在した。そして、その活性画分をC₁₈逆相HPLCを用いて分画し、酢酸・尿素ポリアクリルアミド電気泳上状単一のバンドを与えるまでに精製した。

この因子の活性に対する感受性には真菌の種類による感受性の差がみられた。また、この抗真菌蛋白質の作用により、単独では真菌に対して作用しない抗バクテリア剤、ニトロフラゾンがC. アルビカンスに対して殺菌的に働くようになった。ニトロフラゾンは、核酸合成に異常を引き起こす催奇性薬剤であることから、これが作用を示すためには細胞内に入ることが必要であると考えられる。従ってこの場合のセンチニクバエ抗真菌因子の作用は、真菌細胞の選択透過性を変化させ、ニトロフラゾンが細胞内に入ることを可能にするものであると考えられる。単独では抗バクテリア効果しか持たない物質が、センチニクバエ抗真菌蛋白質存在下では抗真菌的に働き得る様になることの意義については、その様な作用が同じセンチニクバエ由来の抗バクテリア蛋白質、ザルコトキシニンIAとの間にも認められたことから、生理的にも意味のあることであると考えられる。これについては第3章で述べる。

物質として考えたときにも、これまでに昆虫からの蛋白性抗真菌因子が見いだされたと言う報告はなく、今回センチニクバエから精製した分子量7kDaの因子が初めての例である。従ってどの様な構造を持つものであるのかに興味を持たれた。第2章では精製した抗真菌因子の構造について解析した結果を述べる。

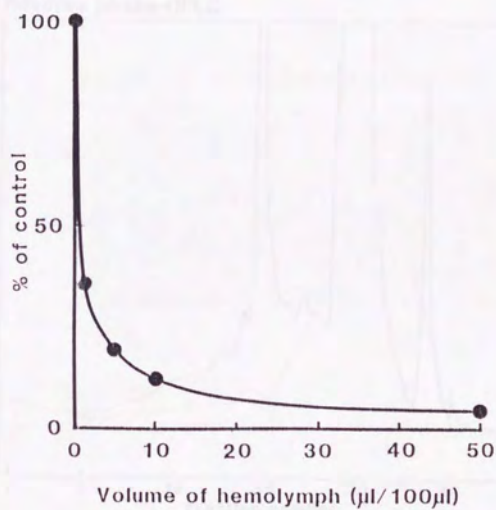


Fig. 1 センチクバエ3令幼虫体液の抗真菌活性。横軸は体液添加量、縦軸は無処理区を100%とした時のCFUを表す。被検菌には *Candida albicans* ATCC36232 を用いた。

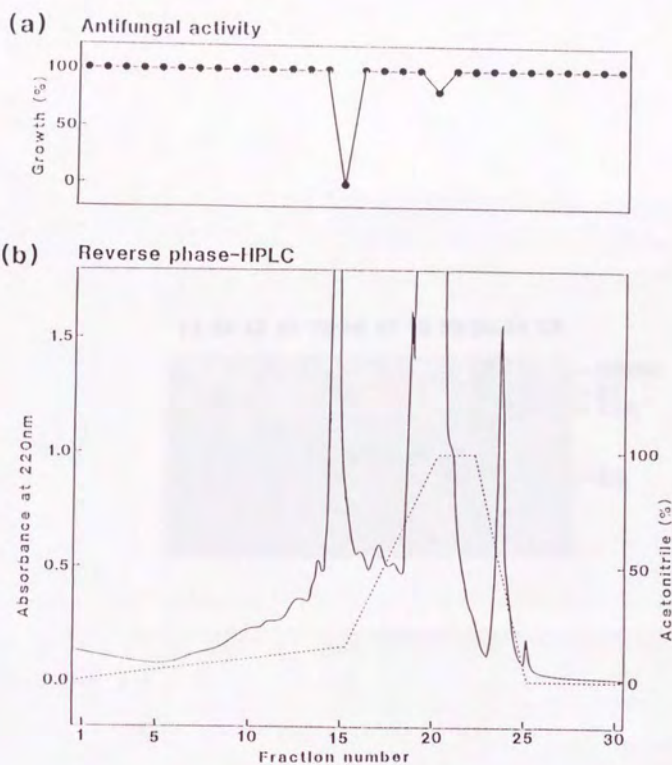


Fig. 2 C_{18} 逆相HPLC。(a) 抗真菌活性の溶出パターン。横軸のフラクションナンバーは(b)と対応する。縦軸は被験菌の増殖率を表す。(b) 220nmにおける溶出パターン。横軸はフラクションナンバー、実線は220nmの吸光度、破線はアセトニトリル濃度を表す。

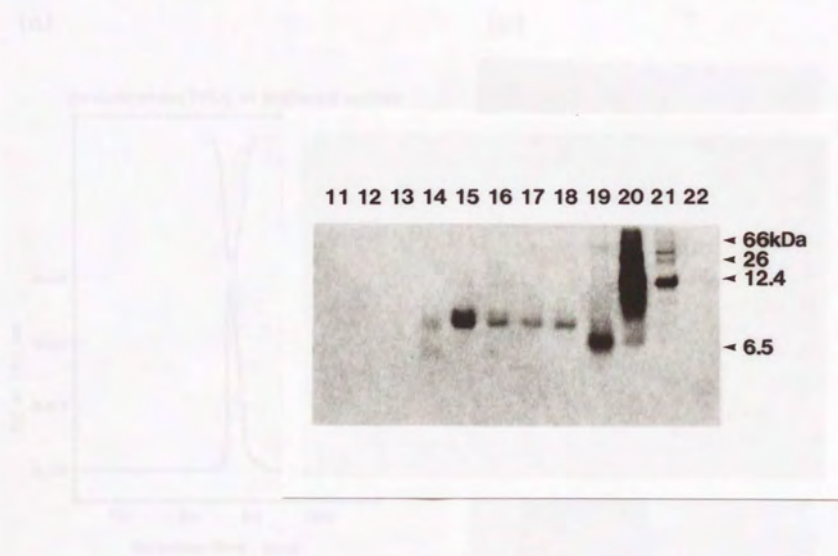
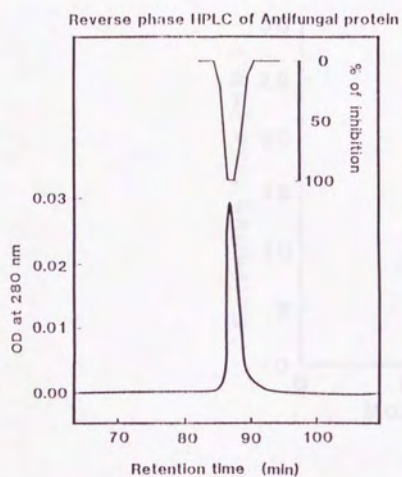


Fig. 2 (c) 逆相HPLCにおける酢酸尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。

(a)



(b)

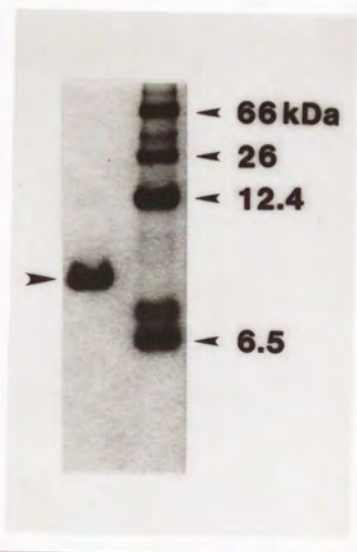


Fig. 3 (a) 逆相HPLCリクロマトグラフィー。図中上のグラフは抗真菌活性、下は280nmにおける吸光度を表す。(b) 精製標品の酢酸尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。

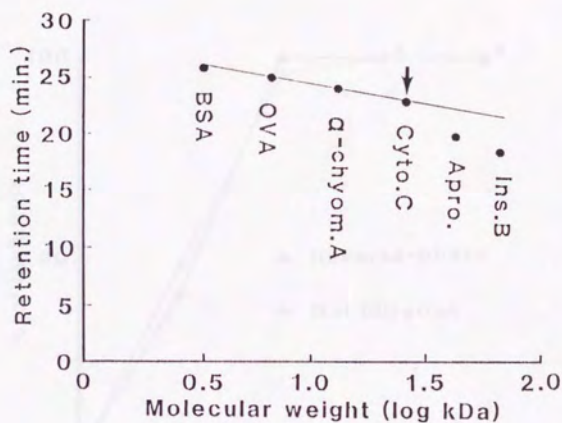


Fig. 4 ゲルろ過HPLCによる分子量算定。矢印が抗真菌蛋白質溶出位置。マーカー蛋白質；ウシ血清アルブミン 66 kDa, 卵白アルブミン 44.6 kDa, α -キモトリプシノーゲンA 26 kDa, シトクロームC 12.4 kDa, アプロチニン 6.5 kDa, インスリンB鎖 3.4 kDa。

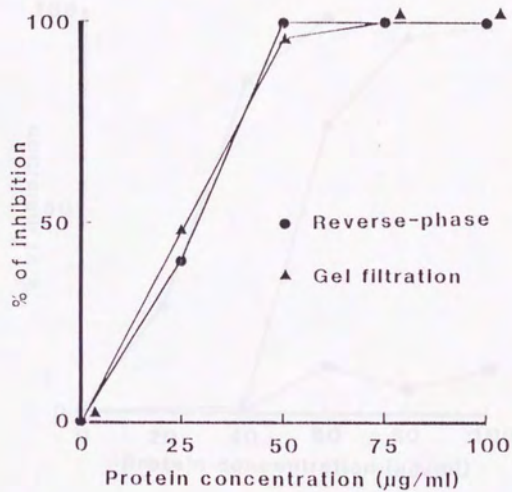


Fig. 5 逆相HPLC, ゲルろ過HPLC精製品の活性。

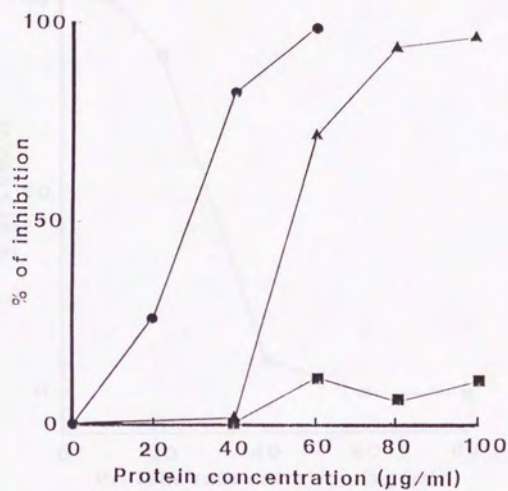


Fig. 6 精製標品のC. アルビカンス増殖阻害活性。アッセイ系にはニトロフラゾンが添加してある。●, 菌数 1×10^5 /ml ; ▲, 5×10^5 /ml ; ■, 1×10^6 /ml。

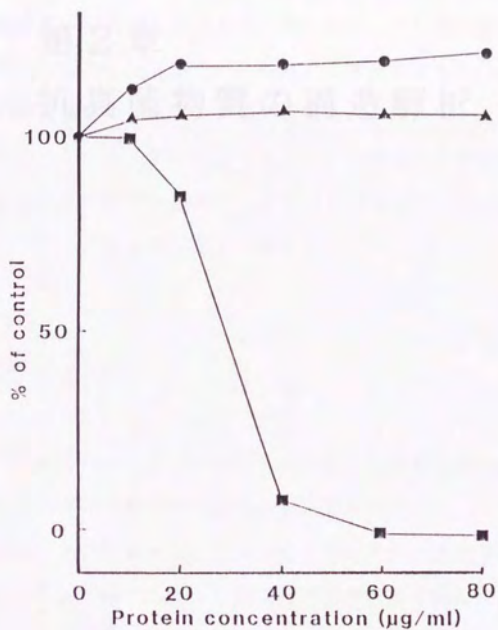


Fig. 7 精製標品の3真菌株に対する増殖阻害活性。ニトロフラゾンは添加していない。●, *C. albicans* ATCC 36232; ▲, *S. cerevisiae* A5-8-1A; ■, *S. pombe* JY-1

第2章

抗真菌物質の構造解析

第1節 序

センチニクバエの抗真菌因子は、昆虫から精製した初めてののものであり、新規の蛋白質であることが予想された。また作用機構を解明する上でも構造を知ることが手がかりを与えると期待された。そこで、精製した抗真菌蛋白質の1次構造決定を試みた。

ストラテジーとしては、先ずエドマン分解法により部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基にして抗真菌蛋白質をコードするcDNAをクローニングして全1次配列を予測することにした。

第2節 組成分析

センチニクバエ3令幼虫体液から精製した抗真菌活性を担う物質は、HPLCからの溶出のモニターにおいて220nm, 280nmに吸収を持つ事、及びLowryの方法により定量的に発色する事から蛋白性であると考えられた。そこで精製蛋白質のアミノ酸組成分析を行った。その結果、実際にこの抗真菌物質は蛋白質である事が示された(Table 1)。更にこの蛋白質の特徴として、構成アミノ酸の種類及び比率に著しい偏りが見られる事が分かった。先ずアミノ酸の種類としては少なくとも7種類が全く含まれず、従って11から13種類のアミノ酸のみで構成されている事が分かった。ここで11から13種類と言ったのは、今回用いた分析法ではアスパラギンとアスパラギン酸、及びグルタミンとグルタミン酸の分別同定が出来ない為である。また、蛋白質を構成するアミノ酸の中でその含量に極端な差が認められた。中でもグリシ

ン、ヒスチジンが各々およそ30%、20%存在し、この蛋白質の主要成分となっている。

この組成分析により抗真菌活性を担う物質が蛋白質である事、またその組成に偏りの見られる興味深いものである事が示された。そこでこの蛋白質がこれまでに知られている物であるかを知るため、一次構造の決定を行った。

第3節 N末端アミノ酸配列の解析

通常、蛋白質を構成するアミノ酸は20種類である事からその組み合わせは非常に大きなものとなる。従って、核酸に比べれば比較的短い配列を決定する事により既知の蛋白質に相同もしくは類似のものが存在するか知る事ができる。また全一次構造を決定するために行うcDNAクローニングでは、アミノ酸配列から核酸配列を予想してオリゴヌクレオチドプローブを作製する必要があるので、精製した蛋白質の部分アミノ酸配列を決定するために、自動エドマン分解法によるN末端排列解析を行った。

最初に分析を試みたときには、始めのサイクルから全くアミノ酸が検出されなかった。これは抗真菌蛋白質のアミノ末端残基が化学的修飾を受ける、いわゆるブロッキングが起こっていると考えられた。体液中に存在する蛋白質の中には末端修飾を受けているという報告のなされているものが数多く存在する。修飾を受けることにより、蛋白質分解酵素の作用を受け難くなり、その結果体液中で安定に存在し得る様になると考えられている。センチニクバエ抗真菌蛋白質が、 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上

という高い濃度で体液中に存在するものであることから、その体液中レベルを保つためにブロッキングを受けている可能性が高いと考えられた。従って、精製した抗真菌蛋白質のデブロッキング処理を行い、再びN末端配列解析を試みることにした。

ところで、蛋白質、ペプチドのアミノ末端のブロッキングには、ホルミル基・アセチル基等のアシル基によるもの、パイログルタミン酸残基によるものなど数種類が知られているが、簡単にいずれの種類のブロッキングがなされているかを知る方法は確立されていない。しかし、これまでにセンチニクバエから見いだされ、cDNAクローニングにより一次構造が決定された体液性蛋白質のうち、ザルコトキシシンIIおよびザルコシスタチンが同じくN末端ブロッキングを受け、それがグルタミンのパイログルタメート化である事が明らかにされている。そこで抗真菌蛋白質のデブロッキング処理を試みるに当たって、ブロッキングの種類はパイログルタメート化であると仮定した。

脱パイログルタメート処理の方法は、試料蛋白質をパイログルタメートデカルボキシラーゼで消化して、N末端のパイログルタメート1残基のみを選択的にきり出すというものである。この方法で抗真菌蛋白質を処理し、反応後、逆相HPLCで酵素及び緩衝液等の除去を行った。こうして得られた試料の、2残基目以降のアミノ酸配列を自動エドマン分解法で分析した。その結果、期待された通りデブロッキングがなされて、2残基目以降36残基目までの配列が決定された(Fig. 8a)。

決定されたセンチニクバエ抗真菌蛋白質のN末端配列は、組成分析で示された偏ったアミノ酸配列を反映して、全体に似通った単調なものであった。そしてこの配列についてNBRFおよびSWISS-PROT蛋白質配列データベースを検索したところ、全長の内の類似する領域の

長さ、及びその中での相似、蛋白質の機能から有意に高い相同性を示すものは報告されていない事が分かった。従ってこの蛋白質の機能、作用様式を知る上で全一次構造を知る事が必要であると考えられた。

第4節 抗真菌蛋白質 cDNA のクローニング

cDNA クローニングに用いるオリゴヌクレオチドプローブの条件として、特異性が高いことが挙げられる。具体的にはハイブリダイゼーションにおける T_m °C が高いこと、ミクスチャー数が少ないことである。N 末端解析により得られたアミノ酸配列から、複数の十分な長さのプローブを作成できることが分かり、先に述べた条件を満たすと考えられる 2 種類のプローブ、pN-1, pN-2 を作成した (Fig. 8b)。

スクリーニングのストラテジーは、1st スクリーニング及び 2nd スクリーニングのコロニーハイブリダイゼーションでは、2つのプローブのうち N 末端側の pN-1 を用いて陽性クローンをシングルアイソレーションし、3rd スクリーニングのサザンブロットハイブリダイゼーションでは選択した陽性クローンが pN-1, pN-2 両者にたいして共にポジティブシグナルを与えるかを検定することとした。1st 及び 2nd スクリーニングにおいて N 末端側のプローブ pN-1 を用いるのは、より全長の長い、完全に近い cDNA クローンを得るためである。即ち、岡山・バーグの方法で cDNA ライブラリーを構築する際の mRNA の逆転写は 3' 末端から 5' 末端へ方向に伸長反応が進むため、5' 末端側が不完全なままで止まってしまうクローンが生じる傾向がある。従って蛋白質の N 末端側配列を基にして作成したプローブを用いる

ことにより、より長い5'末端領域を持ったcDNA、つまりmRNAの全長に近いcDNAを得ることが出来る。

N末端側のプローブを用いるデメリットとしては、蛋白質のより内側の配列から作成したプローブであればスクリーニングできる5'側が不完全なクローンを逃してしまうこと、並びにpBR-322由来の岡山・バーグのプラスミドベクターは長いインサートを持つことが出来ないで、限度より長く伸長したcDNAをインサートに持つクローンは存在しないため、いずれにせよそれらの様なクローンはスクリーニングできないことが考えられる。しかしセンチニクバエから精製した抗真菌蛋白質は分子量が7kDaであることから、cDNAもベクターに組み込まれ得る程度に短いことが予想された、また量的にも体液中含有量が250 μ g/ml以上と豊富な蛋白質であるのでcDNAクローンのライブラリー内コンテンツも高いことが期待されることから、この蛋白質のcDNAをクローニングする場合にはN末端側プローブを用いることが適当であると考えられた。

また、今回決定した36アミノ酸残基の領域内から、位置的に隣合わず、且つ先に述べた条件を満たすと考えられる2種類のプローブ、pN-1及びpN-2が作製できたことから、N末端以外のアミノ酸配列を決定することは行わなかった。

スクリーニングを行ったcDNAライブラリーは、当研究室高橋等によって、センチニクバエが3令幼虫の時期に注射針で体表に傷を付けて6時間後に採取したポリA-RNAから作製されたものを用いた。抗真菌蛋白質は傷を付けない正常3令幼虫体液中に存在し、そこから精製されたことから、体表障害誘導性ではないが、体表障害幼虫体液にも正常幼虫体液と同様に抗真菌活性がみられたことから、上記のライブラリー

中に抗真菌蛋白質 cDNA が存在すると考えた。

1st スクリーニングにおいてプレート上で培養するスクリーニングサイズは 10000 クローンとした。これは、抗真菌蛋白質の体液中含量が $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であること、及び、これまでに同一ライブラリーからクローニングされている体液性蛋白質のコンテンツから算出したものである。センチニクバエの体液蛋白濃度は 120 から $150 \text{ mg}/\text{ml}$ であるから、抗真菌蛋白質の占める割合は 0.2% 程度かそれ以上である。ところで、この cDNA ライブラリーからは既にザルコトキシニン I、II、ザーベシン、ザルコファーガレクチン、ザルコシスタチン等の体液性蛋白質の cDNA クローンが単離されている。誘導時のザルコトキシニン I、II、ザーベシンの体液内濃度は数 μg から数十 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、抗真菌蛋白質より 1 から 2 オーダー低いが、それらの cDNA クローンの陽性クローン/スクリーニングサイズは、各々、 $20/50000$ 、 $20/30000$ 、 $37/24000$ であった。従って抗真菌蛋白質の cDNA クローンを得るためにはスクリーニングサイズは 20000 クローンで充分であると考えられた。

実際の操作に当たっては、その 5 倍程度、約 100000 クローンから 1st スクリーニングを行った。その結果、プローブ pN-1 に対して陽性シグナルを与える約 200 個のクローンが得られた。これは cDNA コンテントとして 0.2% に当たり、抗真菌蛋白質のコンテンツと見合うものであると思われた。この 1st スクリーニングにおける陽性クローンのうちの 10 クローンを任意に選択し、シングルクローン化を目的として同一プローブを用いて 2nd スクリーニングを行い、均一であると考えられる 10 個のクローンを得た。

次に、3rd スクリーニングとして、これらのクローンが 1st 及び

2ndスクリーニングに用いたpN-1以外のプローブに対しても陽性シグナルを与えるものであるかの検討を、大腸菌クローンから精製したプラスミドcDNAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法により行った。その結果、9個のクローンが、ネガティブコントロールクローンは全くシグナルを与えない条件下においてpN-1及びpN-2いずれのプローブともハイブリダイズする事が確認された。そしてこの内の7クローンについて塩基配列の決定を行ったところ、6クローンの5'側約150bpの配列が完全に一致しており、しかも抗真菌蛋白質のN末端側配列をコードしていることが分かった。そこでこの内のpAFP1と命名したクローンについてそのインサート領域の塩基配列を決定し(Fig. 9)、そこから抗真菌蛋白質の全一次構造を予測した(Fig. 10)。

pAFP1のインサート領域の全長はボリアを含めて477bp、1stメチオニンから終止コドンまでの翻訳領域は258bpで、85アミノ酸残基をコードしていた。このうち20残基目のヒスチジンから54残基目のグリシンまでのアミノ酸配列は精製抗真菌蛋白質のN末端解析の結果と完全に一致していた。従って体液中に存在する形態での抗真菌蛋白質は19残基目から85残基目までの67アミノ酸配列部分であると考えられる。この部分の分子量は7118と算定され、抗真菌蛋白質の精製の確認として行った酢酸尿素ポリアクリルアミド電気泳動の結果の7kDaという値とよく一致する。

Table 2に塩基配列から予想される蛋白質のアミノ酸組成と、精製した抗真菌蛋白質を実際にアミノ酸組成分析した結果を比較して示す。両者のアミノ酸組成の間には大きな相違は存在せず、個々のアミノ酸ごとの比率、特徴的な偏り及び含有しないアミノ酸の種類といった点いず

れにおいてもよく一致した。

上記のアミノ酸配列、分子量及び組成の3つの点において、精製した抗真菌蛋白質と、cDNAにコードされているアミノ酸配列がよく一致することを持って、目的とした抗真菌蛋白質cDNAクローンを単離し、蛋白質の全一次構造を決定できたものと判断した。

第5節 抗真菌蛋白質の構造的特徴

センチニクバエから精製した抗真菌蛋白質には、3つの構造的特徴が挙げられる。一つは、前に述べたアミノ酸組成上の著しい偏りである。第1に注目される点は、グリシン、ヒスチジンの含量が特に高い点である。抗真菌蛋白質を構成する67アミノ酸残基のうち、グリシンが21個、ヒスチジンが14個と、全体の半分を占める。この様な、ある種のアミノ酸に富むという性質は、ザルコトキシシンIII、ヒスチジンリッチポリペプチド、タキプレシン等いくつかの抗菌性蛋白質についても知られている特徴である。これらの抗菌蛋白質が、なぜ特定のアミノ酸に富むのかとの問に対する回答は得られていない。しかし多くの場合アルギニン、ヒスチジン、リジンの塩基性アミノ酸であることが多い点から、このプラスチャージが重要である可能性が考えられる。この事は、アミノ酸組成に目だった偏りの見られないザルコトキシシンI及びIIにも見られる。センチニクバエの抗真菌蛋白質の場合には、先ほど述べたように1分子内にヒスチジンが14個存在する。塩基性アミノ酸全てを合わせると合計17残基となる。一方、アスパラギン酸、グルタミン酸の酸性アミノ酸はそれぞれ4残基、1残基の合計5残基存在する。従って全体の

チャージを差引すると、塩基性アミノ酸の方が13残基多く、抗真菌蛋白質は塩基性蛋白質であることになる。

この様に多くの抗菌蛋白質が塩基性であるのは、これらの蛋白質が菌体に作用する時に、菌体表面の酸性チャージを利用して接近、接触している為であることがサルコトキシシンIの研究等で示唆されている。センチニクバエ抗真菌蛋白質の場合には特に、後に述べるハイドロバシープロフィールとも関連して塩基性チャージを持つことが重要であると考えられる。

ところで、抗真菌蛋白質の場合の偏りは、ヒスチジン1種類だけでなく存在するだけではなく、更にグリシンの含有率が高く、逆に7種類のアミノ酸は全く含まれない。この7種類には蛋白質が高次構造を取る上で重要となるシステイン、プロリン及び疎水性アミノ酸が含まれる。また、グリシンは20種類のアミノ酸中で側鎖が最も小さい為、その残基部分での蛋白質鎖の折れ曲がりをする。従って抗真菌蛋白質はジスルフィド結合、ターン、1次構造上の疎水領域の集合等による折り畳み構造を持たないランダムな構造であることが予想された。Fig. 11に抗真菌蛋白質のハイドロバシープロフィールを示す。この様に抗真菌蛋白質cDNAから予測された1次配列上において、シグナルシーケンスであると考えられる1残基目から18残基目までを除くと、明瞭な疎水の領域は存在せず、全体としては親水的であることが予想された。これは、センチニクバエ抗真菌蛋白質がこれまでに単離、精製された既知抗菌蛋白質と異なる点である。即ち、抗菌的作用を持つ蛋白質は、いずれも1次構造上の疎水の領域を持ち、例えばザルコトキシシンIにおいては、それを基に高次構造を作っていることが示唆されている。そして、その疎水的構造部を脂質二重膜である細胞膜に組み込ませることにより

浸透性の変化などの膜機能障害、さらには膜構造の破壊などを引き起こすといった作用機構のモデルが提唱されている。また、ザルコトキシニン I、ザーベシンは共に塩基性蛋白質であり、酸性リン脂質膜を強く攻撃する、また結合するといったことが調べられている。このことも、それらの抗菌蛋白質が菌体表面に作用する上で重要な性質であることが示唆されている。そして、1 次構造上の疎水領域を持たない抗真菌蛋白質の場合にはこの塩基性であることがより重要であると考えられる。抗真菌蛋白質が真菌細胞表面に作用する第 1 段階では、蛋白質と細胞の疎水的インタラクションではなく、ヒスチジンを始めとする塩基性アミノ酸のチャージが特に重要であると考えられた。これは第 3 章で述べるように、抗真菌蛋白質を C. アルビカンスに作用させるとき、その蛋白質と細胞間の結合及び殺菌活性が塩の添加により阻害されることから支持された。そして、菌体と結合する際には、グリシン残基が多い為に自由に折れ曲がることが可能であり、その結果初めて疎水性アミノ酸残基同士が接近して細胞膜に作用する形態になるといった可能性が考えられる。この可能性を示唆する情報として以下のことが挙げられる。先ず抗真菌蛋白質が、真菌細胞膜の透過性を増大させていると考えられる点である。抗真菌蛋白質によって処理した C. アルビカンスの菌体外には、細胞内から漏出したと考えられる物質が検出される。従って抗真菌蛋白質は細胞膜障害性を持つ蛋白質であると考えられる。この様な作用から考察すると、抗真菌蛋白質の真菌細胞上の作用点の内、少なくとも一つは細胞膜である可能性があり、このためには細胞膜に作用し得る形態を取る必要があると考えられる。また、次に溶媒の極性を変えることにより、抗真菌蛋白質の CD スペクトルが変化することが挙げられる。Fig. 12 にその結果を示すが、溶媒の TFE 濃度 (a)、メタノール濃度 (b)

を変えることにより僅かながらスペクトルのパターンがシフトした。従って抗真菌蛋白質が細胞膜と接触することにより作用を発現するための形態に変化する可能性が示唆された。

センチニクバエ抗真菌蛋白質の第3番目の特徴として、分子内に繰り返し配列、あるいは類似配列が見受けられることが挙げられる。一般に蛋白質はその構成単位のアミノ酸の種類が20であるため、4種類の塩基の組み合わせより成る核酸配列に比べて、任意の配列を比較したとき同一あるいは類似である確率は遙かに低いものとなる。従って、機能的に似た蛋白質同士の中、あるいは蛋白質一分子の中に充分な長さの同一もしくは類似の配列がみられる場合には、それはその蛋白質の機能発現に重要な配列であると考えられる。

センチニクバエ抗真菌蛋白質の1次構造上には、最大7アミノ酸残基の繰り返し単位を始め、多くの繰り返し及び類似配列が見いだされた (Fig. 13, Table 3)。既に述べたように蛋白質においては長い配列が繰り返し出現する可能性は低く、7アミノ酸残基の配列を例にとるとその出現頻度は20の7乗分の1、 1.28×10^9 分の1である。ところで、センチニクバエのゲノムサイズをショウジョウバエと同一であると仮定した場合、それは 1.4×10^8 bpであり、全てがアミノ酸をコードしても 4.67×10^7 残基にすぎない。従って7アミノ酸残基の繰り返し配列は、偶然ではなく抗真菌蛋白質の機能発現に必須であることが強く示唆される。現時点ではこれらの相同もしくは類似の繰り返し配列の意味は分からないが、何らかの役割を持った機能単位である可能性が考えられ、これらの部分が真菌細胞に接近する、あるいは障害を与える作用部位であることも期待される。

第6節 ゲノム遺伝子の構造

センチニクバエ抗菌蛋白質に共通する特徴として、少しずつ構造の異なった類似の蛋白質により、ファミリーを形成していることが挙げられる。センチニクバエからはザルコトキシンⅠ、Ⅱ、Ⅲ、及びザーベシンと命名された、それぞれ1次構造的に異なる4グループの抗バクテリア性蛋白質が見いだされている。これらの内、ザルコトキシンⅠ及びⅡにおいては、精製の段階から抗菌作用すベクトル及び精製ステップにおける挙動の違いによって、各3種類ずつの少しずつ異なった蛋白質として分離された。更にゲノム遺伝子の解析がザルコトキシンⅠ及びⅡに対して行われ、各々の蛋白質の遺伝子がゲノム上の複数の領域に存在すること、少しずつ異なるサブタイプはセンチニクバエ幼虫間の個体差ではなく、各個体が複数種のザルコトキシンⅠ及びⅡを合わせ持つこと、また、蛋白質としては同定されていないサブタイプが他にも存在することが示された。ザルコトキシンⅠ、ザーベシンのサブタイプについては、他にもセンチニクバエ胚由来の培養細胞NIH-Sape4が細胞外に分泌しているものとしても見いだされている。ザルコトキシンⅢについては、まだその全1次構造が決定されていないが、類似配列をコードするcDNAが複数種単離され、また体表傷害を受けた幼虫の脂肪体で合成が強く誘導される蛋白質の中に、分子量、部分アミノ酸配列の比較上類似性を示す物が見いだされている。

この様にセンチニクバエという1種類の昆虫が、4種類の抗菌蛋白質を持ち、しかもその4種類全てにサブタイプが存在する理由として、感染菌に対する作用すベクトルを広くするためであることが考えられる。

ザルコトキシシン I, II, III は主にグラム陰性菌に対して抗菌作用を強く示し、一方ザーベシンの作用は黄色葡萄球菌等のグラム陽性菌に対して強く発揮される。先に述べた抗菌蛋白質の中で、物質として単離精製された物については抗菌スペクトルの比較が行われ、バクテリアの種差に対する作用に違いが認められている。また、特にザルコトキシシン I 及び II の各々のサブタイプの遺伝子は近接した領域にクラスター状に配列する、タンデムリピート構造を形作っていることも明らかにされており、これらの蛋白質の特徴となっている。

これまでにセンチニクバエから見いだされた全ての抗菌蛋白質が、サブタイプを持つことによるファミリーを構成していることから、センチニクバエから抗真菌活性を持つ蛋白質として精製された 67 アミノ酸より成る蛋白質も、作用スペクトルを広げる為にサブタイプを持つ可能性が考えられ、また実際に、第 1 章で述べたように抗真菌活性は複数の画分に現れたこともそれを示唆すると思われた。そこでサザンブロット解析による、センチニクバエゲノム上の抗真菌蛋白質遺伝子の解析を行うことにした。

プローブに用いる cDNA は、特異性を高めるために翻訳領域以外をできるだけ含まないように制限酵素 *Dra*I で切り出した、全長 292 bp のものを用いた (pAFP1 シークエンス中 18-310 の領域)。そしてセンチニクバエ幼虫脂肪体から取り出したゲノム DNA を被検材料に用いて 3 種類の制限酵素による消化を行い、アガロースゲル電気泳動後、ナイロンフィルターにブロットして、上記のプローブにより抗真菌蛋白質遺伝子を含む断片を検出した。その結果を Fig. 14 (a) に示す。いずれの制限酵素で消化した場合にも単一のシグナルのみが検出されたまた、Fig. 14 (b) に示す別の実験で *Dra*I 消化した

場合にも、やはりシグナルは単一であった。

Fig. 13 (a) の実験ではザルコトキシシン I 遺伝子をサザンブロット解析したときと全く同じ制限酵素を用いた結果となっているが、ザルコトキシシン I の場合には用いたいずれの制限酵素で消化した場合にも、2 本からそれ以上の数のシグナルが検出されている。サザンブロットハイブリダイゼーションによる検出は定性的な実験方法であるため、何種類の制限酵素を用いれば真の解答を得るのに充分であるかは分からない。しかし同じセンチニクバエの他の蛋白質、ザルコトキシシン I, II, ザーベシン等の遺伝子がマルチ遺伝子構造であることを検出することができたのと近い条件であることから、抗真菌タンパク質遺伝子はゲノム上単一であることが強く示唆される結果であると考えられる。

また、Fig. 14 (b) の実験では cDNA 上に認識・切断部位の存在する *Dra* I でゲノム DNA と cDNA を切断したものを比較しているが、cDNA 断片 (レーン 2) の 292 bp よりも長い位置にゲノム断片 (レーン 1) のシグナルが現れており、このことは抗真菌蛋白質遺伝子上にイントロンが存在することを意味している。この様にイントロンが遺伝子上に存在することはザルコファーガレクチン、ザルコトキシシン I・II についても既に知られている。

第 7 節 まとめと考察

本章においては、センチニクバエ 3 令幼虫体液中から精製した抗真菌物質が蛋白質であったこと、そして、cDNA クローニングにより全 1 次構造を推定したことと、構造上の特徴、ゲノム遺伝子のサザンブロッ

ト解析の結果を述べた。

今回クローニングし、塩基配列を決定した cDNA クローン pAFP1 は以下に挙げる 3 点を根拠として精製した抗真菌蛋白質をコードするものであると判断した。

精製した蛋白質と cDNA にコードされている蛋白質について、

- ①分子量が一致する。
- ②アミノ酸組成が一致する。
- ③1 から 36 残基目までのアミノ酸配列が一致する。

得られた cDNA から推定された抗真菌蛋白質の 1 次構造は、これまでに報告の無い新規のものであった。また、既知の抗バクテリア性蛋白質、抗真菌性蛋白質と比較した場合には、共通すると考えられる点とセンチニクバエ抗真菌蛋白質独自の点両者が認められた。共通点はアミノ酸組成上での偏りであり、あるアミノ酸が特に多く含まれるということである。センチニクバエ抗真菌蛋白質の場合にはグリシン・ヒスチジンがそれに当たる。このアミノ酸組成の偏りには、アミノ酸の種類が様々である、程度にばらつきがあるといった不明確な点があるが、非常に多くの抗菌性蛋白質に見られることからその重要性が示唆される。

一方、センチニクバエ抗真菌蛋白質に独特の点は 1 次構造上は明瞭な疎水性領域が存在しないこと、最大 7 アミノ酸単位の繰り返し配列を持つことである。これらの構造上の特徴と蛋白質の作用の関係はまだ明らかになっていないが、第 1 章でのニトロフラゾンや、第 3 章で述べるザルコトキシシン I といった抗バクテリア活性を持つ物質と相互作用して抗真菌的に働くといったメカニズムの解明のためにも着目すべき点であると考えられる。

また、多くのヒスチジン残基を持つことから金属結合蛋白質である可

能性が考えられたので精製標品の金属分析を行ったが、一般的な金属は全く検出されなかった。しかし、この蛋白質を精製する逆相HPLCの段階で、リクロマトグラフィーを繰り返す内に回収されるフラクションの色が褐色から無色へと退色して行くのが観察されたことなどから、体液中では何らかの金属を保持している可能性が考えられる。このことも、抗真菌活性、あるいはセンチクバエの生体防御蛋白質に特徴的な2重機能といった点からも興味もたれる。

Amino acid	Mol%
Asp Asn	10.8
Ser	1.2
Glu Gln	17.5
Gly	30.9
Ala	3.5
Val	3.0
Leu	1.6
Tyr	7.1
Lys	2.9
His	20.1
Arg	1.4
Thr Cys Met Ile Phe Pro Trp	0.0

Table 1 精製抗真菌蛋白質のアミノ酸組成。

(a)

1	5	10
(Gln)-His-Gly-His-Gly-Gly-Gln-(Asp)-Gln-His		
	15	20
<u>-Gly-Tyr-Gly</u> -His-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Tyr		
	25	30
-Gly-Lys-Gly-His-Glu-Gly-His-Gly-Val-Asn		
	35	
-Asn-Leu-Gly-Gln-()-Gly		

(b)

Probel (pN-1) 5'- GGICAAGATCAACATGGITATGG -3'

G C G C C

Probe2 (pN-2) 5'- AAAGGICATGAAGGICATGG -3'

G C G C

F i g . 8 抗真菌蛋白質のN末端アミノ酸配列。(a)アミノ酸配列。数字はN末端からのポジション、下線はプローブ作製に用いた領域を表す。()の残基は推定によるもの、または測定感度以下だったもの。(b) c D N A クローニングに使用したプローブ。上が p N - 1 , 下が p N - 2 。

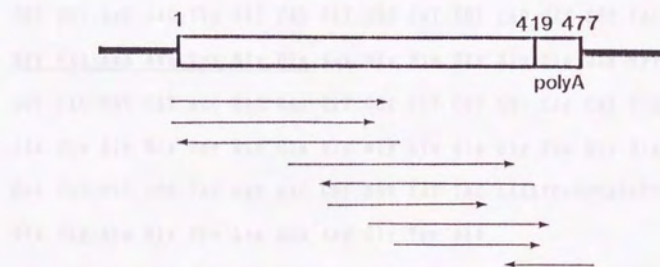


Fig. 9 cDNAクローンpAFP-1のシーケンスストラ
テジー。ボックスはインサート領域を、上の数字はコーディング鎖
5'側からのポジションを表す。下の矢印はシーケンス各回毎の
方向と決定した長さを表す。

```

AGTAAGAATTGAATTTTAAAAAGACACAAA -1
ATG GTT AAA TTA TTC GTC ATT GTT ATT TTG GCA CTA ATT GCA GTT 45
Met Val Lys Leu Phe Val Ile Val Ile Leu Ala Leu Ile Ala Val 15
GCC TTT GGG CAA CAT GGT CAC GGA GGT CAG GAT CAG CAT GGT TAT 90
Ala Phe Gly Gln His Gly His Gly Gly Gln Asp Gln His Gly Tyr 30
GGA CAT GGT CAA CAG GCC GTT TAC GGT AAA GGT CAT GAA GGA CAT 135
Gly His Gly Gln Gln Ala Val Tyr Gly Lys Gly His Glu Gly His 45
GGT GTT AAC AAC TTA GGT CAG GAT GGC CAT GGT CAG CAT GGC TAT 180
Gly Val Asn Asn Leu Gly Gln Asp Gly His Gly Gln His Gly Tyr 60
GCC CAC GGT CAT AGC GAT CAA CAT GGT CAT GGT GGT CAA CAT GGA 225
Ala His Gly His Ser Asp Gln His Gly His Gly Gly Gln His Gly 75
CAA CAT GAT GGC TAT AAA AAC CGT GGT TAT TAG AAAATCAATTAGATT 273
Gln His Asp Gly Tyr Lys Asn Arg Gly Tyr *** 85
TTGATTTAAAAATTAAAAATTTGCATTTAAAAACCAATGTGCAAGCAGATCAAGGTTTT 332
TTTTTTTTAAATTATACGTTTGTGTACATAAAAAATAATAAGAAATCTTTTCTTACAA 391
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 447

```

Fig. 10 抗真菌蛋白質cDNAクローンpAFP1の塩基配列と、そこから予想されるアミノ酸配列(太字)。数字は各々の配列上の位置を表す。アミノ酸配列中ボックスで囲んだ部分はシグナルペプチド、下線部は精製蛋白質配列と一致した部分を表す。塩基配列中の下線はポリA付加シグナルと考えられる配列を表す。

Amino acid	Mole %	
	Predicted from nucleotide sequence	Direct analysis
Asp Asn	10.4	10.8
Ser	1.5	1.2
Glu Gln	16.4	17.5
Gly	31.3	30.9
Ala	3.0	3.5
Val	3.0	3.0
Leu	1.5	1.6
Tyr	7.5	7.1
Lys	3.0	2.9
His	20.9	20.1
Arg	1.5	1.4
Thr Cys Met Ile	0.0	0.0
Phe Pro Trp		

Table 2 アミノ酸組成の比較。左カラムはアミノ酸の種類、中央のカラムはcDNA上にコードされている蛋白質の組成、右カラムは精製した抗真菌蛋白質のアミノ酸組成分析の結果を表す。単位はモル%で表示した。

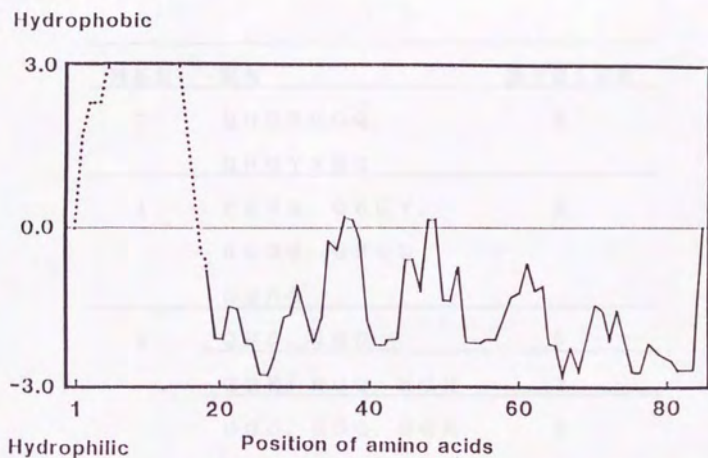


Fig. 11 抗真菌蛋白質のハイドロパシーブプロフィール。横軸は1sもメチオニンからのポジションに対応する。破線はシグナルペプチド部分、実線は蛋白質本体部分を表す。

残基数	配列	繰り返し回数
7	QHGHGGQ,	2
	QHGYXHG	
4	DQHQ, QHGY,	2
	HGQH, GHGQ	
	GQHG	
3	QHG, GHG	5
	GQH, HGQ, HGH	3
	HGG, GGQ, DQH,	2
	HGY, GQD	

Table 3 抗真菌蛋白質分子内の繰り返し単位。

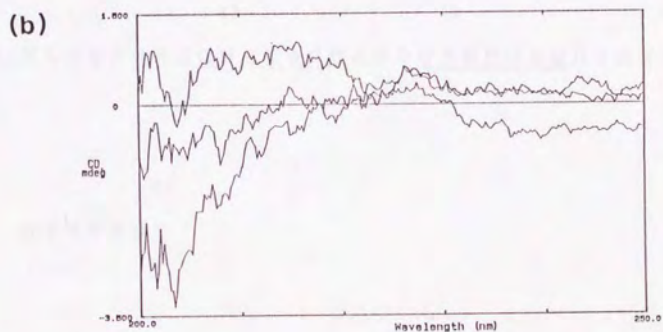
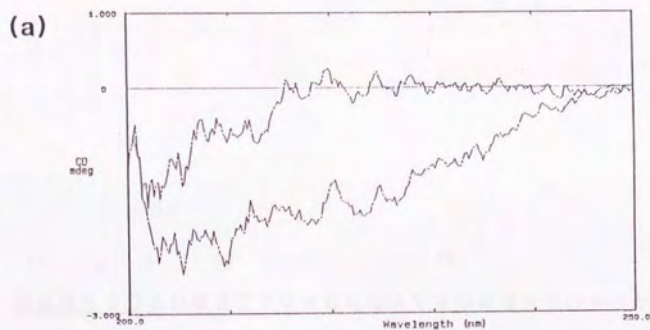


Fig. 12 抗真菌蛋白質のCDスペクトル。(a) TFE中。
上線, 10% TFA中; 下線, 80% TFA中。(b) メタノール
中。上線, 90% メタノール中; 中線, 50% メタノール中; 下線,
H₂O中。

(a)



(b)

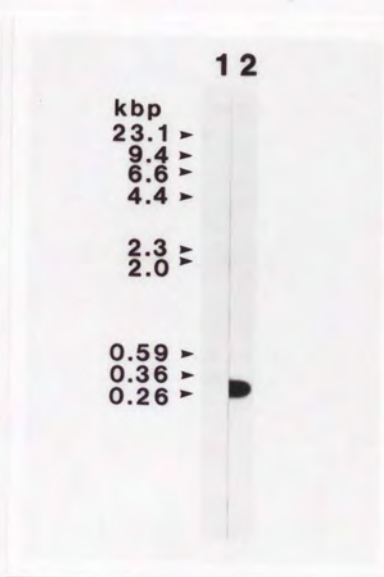


Fig. 14 抗真菌蛋白質遺伝子のサザンブロット解析。(a) ゲノムDNAを、レーン1, *Eco*RI; レーン2, *Hind*III; レーン3, *Pst*I 消化したもの。(b) レーン1, ゲノムDNAを*Dra*I消化したもの。; レーン2, cDNAクローンpAFP1を*Dra*I消化したものを各々泳動した。

第3章

抗真菌蛋白質の性質

第1節 序

センチニクバエから精製した抗真菌蛋白質は、第2章で述べたように、いくつかの構造的特徴点を持つ新規蛋白質であった。また、第1章で触れたように、通常では抗バクテリア活性しか持たないニトロフラゾンと抗真菌蛋白質が共存することにより、C. アルビカンズに対して作用を示すことが見いだされた。本章では抗真菌蛋白質が真菌細胞に対して示す作用とその条件、また、センチニクバエ自身が持っている抗バクテリア蛋白質の内、ザルコトキシニンIと命名されている40アミノ酸からなる蛋白質が、やはり抗真菌蛋白質と共同的に作用し得ることを見いだしたことについて述べる。

第2節 殺菌的活性の検討

一般に抗菌活性と言われるものは静菌活性と殺菌活性に分けて考えられる。即ち菌の発育を抑制するものと文字通り菌を殺す活性である。更に、物質によってはある濃度までは静菌的、それ以上は殺菌的に作用するもの、いくら高濃度を用いても増殖を抑制するだけで、後にその物質を系から除けば菌の増殖が起こるものなど様々なタイプに分けることができる。センチニクバエ抗真菌蛋白質がどの様なタイプに属するものであるのかの検討を行った。

この様な検討を行うときの方法としては、培地中ではなく、栄養成分の含まれない塩類溶液中等で菌体と試料物質をブレインキューバートし、後に培地に移して生菌数、立ち上がりの増殖速度等を測定する。こうす

ることにより、菌はブレインキューベートの間は増殖できないので何も加えなくとも菌数は変化しない。後に移された培地中あるいはプレート上において始めて増殖可能となるので、ブレインキューベートの間に生菌数が減少していたか否かが判定される。この場合にはC. アルビカンスを生理食塩水ならびに蒸留水に懸濁して、精製抗真菌蛋白質と24時間ブレインキューベートした後、平板培地上に移して出現するコロニー数を数えて生菌数の変化を測定する方法をとった。その結果をFig. 15に示す。生理食塩水、蒸留水いずれの場合にも生菌数の減少が認められた。従って抗真菌蛋白質の作用はこの場合殺菌的であると言える。また、ペニシリン、ザルコトキシシンII等の一部の抗菌物質は増殖中の菌体にしか作用せず、塩類溶液中でのブレインキューベーションでは活性を示さないことが知られている。これは抗菌物質の作用点が菌の増殖関連機構であるためと理解されており、従って菌が静止している状態では働き得ない。これに対して菌体の構造破壊を行う、あるいは呼吸、代謝等に作用点を持つ抗菌物質であればその様な条件下でも作用を示し得る。この分類方法においてはセンチニクバエ抗真菌蛋白質は後者のタイプに属すると言える。

また、このブレインキューベーションの間に、菌体に透過性の変化が起こっているのではないかと考えてその検討を行った(Fig. 16)。方法は抗真菌蛋白質をC. アルビカンスに蒸留水中で12時間作用させ、菌体外溶液に現れる紫外部吸収を測定するものである。結果は260nmで検出される物質が抗真菌蛋白質添加量依存に増加した。よって、抗真菌蛋白質はC. アルビカンスの細胞表面の透過性を変化させ、内容物を漏出させていることが示唆された。また、第1章で述べたニトロフラゾンとの共同作用も、ニトロフラゾンが核酸合成に異常を起こさせる作

用を示すためには細胞内に入る必要があり、それが抗真菌蛋白質の存在によって可能になっていると考えられることから、透過性変化を裏付けていると考えられる。

ここで生理食塩水中以外に蒸留水中における活性を測定したのは、第1章で触れたように抗真菌蛋白質の活性が、塩を含むゲルクロマトグラフィーの溶出液の存在下で弱まることを観察していたためであるが、ここに示したように蒸留水中で作用させた場合に比べて活性が低下することが認められた。この様に塩の存在下では活性が弱まる抗真菌蛋白質としてはウサギ顆粒球由来のNP-1の例が知られている。NP-1においてもなぜ塩が活性を阻害するのかの答は得られていないが、この時点でセンチニクバエ抗菌蛋白質の場合には2通りの解釈が考えられた。1つ目は透過性増大の考え方からのものであり、浸透圧の違いによるものとする見方である。細胞の透過性が増大している場合には、細胞外液の浸透圧によって物質の移動が左右されることが予想される。従って等張に近い程出入りが少なく、活性も弱まると考えられる。

2つ目は特にアミノ酸組成上の偏り、ヒスチジンに富む塩基性蛋白質であることによるのではないかと考えられる。第2章で述べたように抗真菌蛋白質は1次構造上の疎水性領域はもっていないことから、真菌細胞との接触にはイオン性のインタラクションが重要ではないかと考えられる。イオン性の結合であれば塩の存在により阻害され、結果として活性が低下することになる。この塩と抗真菌活性の関連については次節で言及する。

第3節 菌体との結合、及び活性に対する温度と塩の影響

ここまでの検討から、センチニクバエから精製した抗真菌蛋白質は細胞障害性を持つ蛋白質であると考えられる。しかしながらその活性は培地中、生理食塩水中では弱くなることも観察された。このことは何に起因するのかを検討した。ここで先ず考えられるのは、抗真菌蛋白質と真菌細胞との間に起こるであろう何らかの相互作用が塩等に影響を受けるのではないかということである。第2章で述べたように抗真菌蛋白質が真菌細胞に接近、接触する機構は、抗真菌蛋白質が1次構造上の疎水領域を持たないこと、ヒスチジンに富む塩基性蛋白質であること等からそのチャージによるイオン性のものであることが考えられた。抗真菌蛋白質と真菌細胞の結合がイオン性のものであれば、それは周囲の塩などのイオン濃度に影響を受けるはずである。先ずこのことを検討するために ^{125}I 標識した抗真菌蛋白質がC、アルビカンスと結合するか、またそれが塩の添加により影響を受けるかの検討を行った。

抗真菌蛋白質はチロシン残基を持つのでこれにクロラミンT法で ^{125}I を結合させて用いた。この溶液を終濃度 $35000\text{ cpm}/1\mu\text{g}$ 蛋白質で蒸留水中で菌体と30分間インキュベートし、遠心上清を除いた後に菌体画分の放射活性を測定した。結果をFig. 17(a)に示す。この時はインキュベーション温度を0, 20, 37℃に変化させたが、いずれの場合にも細胞数依存に、ほぼ同様に細胞画分に放射活性が回収された。従って、この条件下において抗真菌蛋白質はC、アルビカンスとインタラクションを持つと考えられる。この時の蛋白質と細胞の比率は 8.5×10^6 分子/細胞であった。この数字は特異的な結合サイトではなく細胞壁や膜などに結合していることを意味していると考えられる。また、あらかじめ菌を100℃10分間の熱処理で殺して遠心洗浄した

菌に対しては、細胞画分に回収される放射活性量が生菌の場合を上回った。生菌では能動的に抗真菌蛋白質とのインタラクションを防いでいる、あるいは熱処理によって細胞表面の妨害物が除かれたことなどが考えられる。次に 2.5×10^6 生細胞に固定し、 NaCl , KCl , CaCl_2 , MgCl_2 の4種類の塩を添加して細胞画分に回収される放射活性量が変化するかを調べた。その結果が Fig. 17 (b) である。4種類の塩いずれの添加によっても細胞画分の放射活性は減少した。その効果は2価金属塩の方が強いものであった。

同様の検討を殺菌活性、細胞内容物の漏出についても行った。Fig. 18 は活性に及ぼすインキュベーション温度と、塩添加の影響についての結果である。Fig. 18 (a) は蒸留水中での殺菌活性に及ぼす温度の影響を示したものであるが 37°C 、 20°C ではほとんど差がみられないが、 0°C ではその半分程度で活性が飽和している。先ほどの放射標識の実験では差がみられなかったことから、菌体との接触以後の、細胞を殺す作用までには、ある程度温度依存の段階があることが予想される。第2章で述べたような抗真菌蛋白質の形態変化などが考えられる。Fig. 18 (b) は、インキュベーション温度 37°C 、抗真菌蛋白質濃度 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に固定して先程と同じ4種類の塩を添加した場合の殺菌活性の変化を示している。2種類の塩についての結果はばらつきの多いものとなったが、他の2種類は2から4 mM の濃度で殺菌活性を完全に抑制し、4種類いずれもが傾向としては殺菌活性を阻害するものであった。Fig. 19 (a) は Fig. 16 と同様に抗真菌蛋白質を作用させた時の細胞内容物漏出を調べた結果であるが、Fig. 19 (b) では、活性の飽和していない抗真菌蛋白質 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ での作用に対する NaCl を示している。細胞内容物漏出もまた塩の添加により阻害され

た。

従って、抗真菌蛋白質は、菌体とインタラクシオンを持つはじめの段階で塩の影響を受けて作用を現せなくなると考えられた。このことは、構造から考えられた抗真菌蛋白質のイオンとしての性質と矛盾しないものであると思われた。

第4節 ザルコトキシシンⅠAとの共同作用

抗真菌蛋白質がセンチニクバエの体内で真菌に作用するときの環境は当然蒸留水中ではなく、ニトロフラゾンも存在しない。それではその代わりにどのような要因が抗真菌蛋白質の作用に影響を与えるであろうか。考えられるのは他の生体防御因子、機構との相互作用である。結合活性の実験で抗真菌蛋白質は真菌細胞と結合し得ることが分かった。塩以外にも複雑な成分を持つ体液中においても抗真菌蛋白質が真菌と結合し得るかは未解明であるが、仮に結合したとすればオブソニン活性を持つこと等も期待される。また、他の抗菌蛋白質との共同作用も考えられる。抗真菌蛋白質は常在性因子であるが、感染微生物が侵入する体表障害時にはザルコトキシシン群、ザーベシンが誘導産生され、体液中に出現する。従って感染防御に抗真菌蛋白質が働くとすれば、それは誘導性抗菌蛋白質存在下であることになる。そして、その内のザルコトキシシンⅠAとⅡAの間に相互的活性増強効果が見られること、更に抗真菌蛋白質の活性が抗バクテリア性物質ニトロフラゾンにより増強されたことから、他の抗菌蛋白質との間にも共同作用がみられることが期待された。そこで比較的入手の容易なザルコトキシシンⅠAとザーベシンを用いてそれらと

の間に活性の増強作用がみられるかの検討を行ったところ、ザルコトキシニン I A と共存させたときに活性の増強が認められた。。

方法は、培地中の C. アルビカンスに各蛋白質を単独、あるいは組み合わせて添加し、6 時間培養した後にプレート上に移して出現コロニー数を数えた。結果を Fig. 20 (a) に示す。抗真菌蛋白質単独では培養時間が短いことから 40 % 程度の増殖の遅れが認められる。ザルコトキシニン I A は、誘導時の体液内濃度に近く、且つ抗バクテリア作用の発現には充分な $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いているがほとんど作用はみられなかった。しかしこの 2 つの蛋白質を共に添加した区ではそのコロニー数は無処理区の 10 % 以下にまで減少した。Fig. 20 (b) に抗真菌蛋白質濃度を一定にして、ザルコトキシニン I A の濃度を変化させた場合の結果を示すが、ザルコトキシニン I A 濃度依存に出現コロニー数は減少した。尚、この条件での C. アルビカンスの世代時間は約 2 時間であるのでコロニー数が 10 % 以下ということは培養開始時より生菌数が減っており、殺菌的活性であることを意味する。しかし、1 晩培養を続けると生き残った菌が増殖してくることも観察された。Fig. 21 にその様な条件下において 6 種類の真菌に抗真菌蛋白質単独、あるいはザルコトキシニン I A と共に作用させたときの結果を示す。C. アルビカンスにおいてはザルコトキシニン I A との共存区も既に無処理区の 80 % 程度まで増殖しているが、S. シェルヴィシェ 3 株の内 2 株は抗真菌蛋白質単独区においても 60 % 程度増殖が遅れており、ザルコトキシニン I A を添加すると増殖は 90 % 程度まで遅れた。第 1 章で触れたように S. ポンベは感受性が高く、その 2 株は抗真菌蛋白質単独で増殖を完全に阻害された。

このことによって抗真菌蛋白質はセンチニクバエの他の生体防御因子

との共同作用を示し得ることが分かった。しかも単独では抗真菌活性の無いザルコトキシシン I A と共に働くことは、作用機構を考えていく上で何らかの手がかりを与えることが期待される。

第5節 細菌に対する作用

抗真菌蛋白質は酵母状真菌に対する作用を持つ因子として見いだしたものである。しかし、ヒトなどの哺乳動物から取り出されたディフェンシン、あるいはカプトガニ由来のタキプレシン等の様に一つの蛋白質が抗バクテリア、抗真菌活性を持つ例もある。そこでセンチニクバエ抗真菌蛋白質が細菌の増殖に対して阻害的作用を示すか否かの検討を行った。方法は、グラム陽性菌として黄色葡萄球菌を、グラム陰性菌としては大腸菌を用い、抗真菌蛋白質を添加して培養し、後に濁度を測定することにより増殖に変化が生ずるかを調べた。結果は、いずれの菌に対しても抗真菌蛋白質の添加は増殖に何等の変化を与えなかった (Fig. 22)。

しかし、真菌の中でも *C. アルビカンス* 等のように抗真菌蛋白質単独での作用に感受性の低いものもある。そこで、センチニクバエが持っている抗細菌性蛋白質との間に、先に真菌に対して抗真菌蛋白質とザルコトキシシン I との間にみられた共同作用がみられるのではないかと考えられた。ザルコトキシシン I は抗グラム陰性菌蛋白質であるのに、これが抗真菌蛋白質と共同で働くのであれば、本来の抗バクテリア活性も増強されることが予想されるということである。方法は、大腸菌に対してザルコトキシシン I A の、抗真菌蛋白質存在下、非存在下での濃度依存性を比較し、活性の増強が起こるかを調べた。その結果を Fig. 23 に示す

が、大腸菌に対するザルコトキシシンⅠAの活性の濃度依存性に変化は認められなかった。このことは、抗真菌蛋白質の作用は抗バクテリア蛋白質自体の活性を増強するものではないことを示している。従ってザルコトキシシンⅠAと抗真菌蛋白質が共同して真菌に作用するときには、先ず抗真菌蛋白質が真菌細胞に働きかけて、真菌細胞膜に含まれるリン脂質膜を傷害することが実験的にはしられていることから、ポテンシャル的には障害を与えられるが単独ではそれを行えないザルコトキシシンⅠAにも作用できる状態にする、と言った様式が考えられる。

第6節 まとめと考察

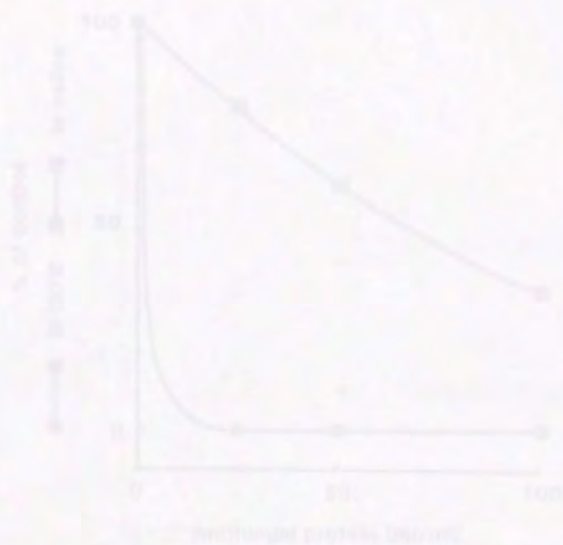
センチニクバエ抗真菌蛋白質は、培地中で生育している真菌に対しては限られた菌株に対してしか抗真菌活性を現さないが、菌が増殖できない蒸留水中では殺菌的に働くことが見いだされ、その時には、菌体内容物と考えられる物質が細胞外に検出された。従って、抗真菌蛋白質は、活性発現に条件を要するが、ポテンシャル的には細胞障害活性を持つものと言える。但し、真菌細胞の死と内容物漏出との因果関係は、細胞ではなく、再構成膜や真菌の膜組成を模したりボソームを用いた実験で、今後更に検討する必要がある。

また、抗真菌蛋白質の殺菌活性、細胞内容物の菌体からの漏出は塩が存在することによって抑制された。このことは放射標識した抗真菌蛋白質を用いた実験で、抗真菌蛋白質が真菌細胞に結合していると考えられること、及びそれがやはり塩により阻害されたことから、細胞と抗真菌蛋白質が接触する機構は、イオン性のものであることが考えられた。こ

のことは、抗真菌蛋白質がヒスチジンに富む塩基性蛋白質であることと関係があるものと思われた。この様に抗菌蛋白質と菌体との結合及び抗菌活性が塩により阻害されることは、ウサギ顆粒球由来抗真菌蛋白質であり、これもまた塩基性アミノ酸に富むNP-1の例が実験的に確かめられている。これらの蛋白質の生理的作用が抗真菌生体防御であるとするれば、その作用は生理的濃度の塩、また更に多くの物質が存在する環境下で行われるはずである。従ってその活性が塩により阻害されることは不都合と考えられ、またどうしてその様な性質を持つのかは明かではない。抗真菌蛋白質の例に限って考えてみると、1つには生体内濃度が250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上と高いものであるため、生理的塩濃度下でもその活性は完全には阻害されないことが挙げられる(Fig. 15)。更に重要と考えられるのが、ザルコトキシシンIAと共同で作用を持ち得ることである。誘導性の生体防御因子が出現することによって抗真菌活性が增强されることは、実際に感染菌が侵入してくる状況と対応していることから考え得ることである。

生体防御因子間に協調的作用が存在することは、生体防御機構をより有効にするための手段としても効率的に優れたものであると言える。抗体に比べれば種類の遙かに少ないと考えられる抗菌性蛋白質によって多くの感染微生物に対応するには、個々の蛋白質が幅広い有効スペクトルを持つことと、それらを組み合わせることにより単独では成し得ない機能を発揮することなどが要求されよう。産地に区場枝の抗菌蛋白質群、ザルコトキシシンI, II, III, ザーベシンは、各々が少しずつ1次構造の異なるサブタイプから成るファミリーを形成し、それによって作用スペクトルを広げていると考えられている。今回見いだした抗真菌蛋白質とザルコトキシシンIAとの共同作用は、異なったものの組み合わせにより

新しい機能を引き出すことを始めて示唆した知見であると考えられる。



また、この「経済的価値」の概念は、企業が社会に与える利益を指し、
 単に利益のみならず、社会的責任や環境への配慮なども含む。

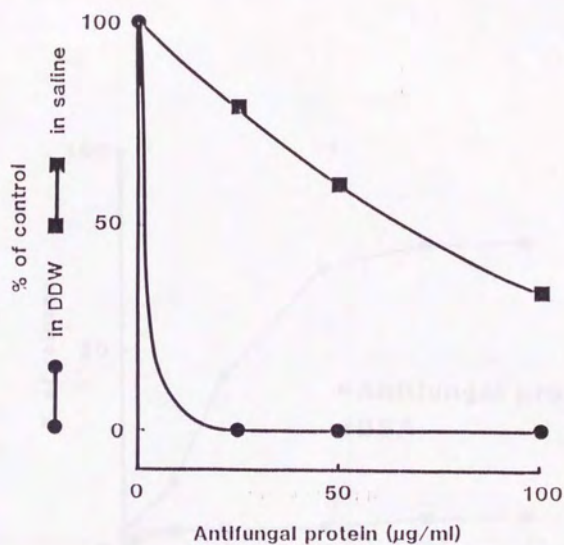


Fig. 15 抗真菌蛋白質のC, アルビカンスに対する殺菌活性。

●, 蒸留水中; ■, 生理食塩水中 (154 mM NaCl)。

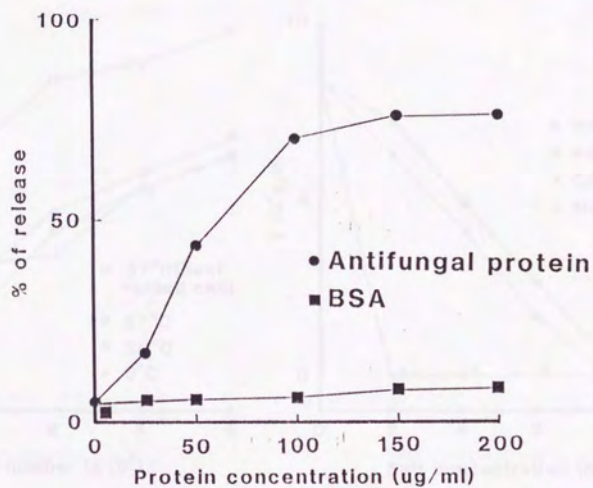


Fig. 16 抗真菌蛋白質を作用させたC. アルビカンスからの細胞内容物の漏出。

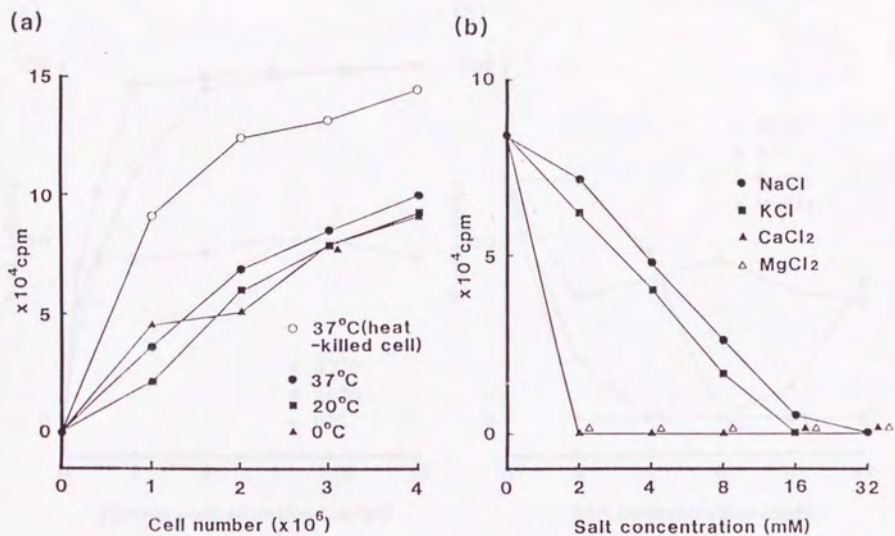


Fig. 17 ^{125}I 標識抗真菌蛋白質と *C. アルビカンス* との結合。

(a) 横軸；細胞数，縦軸；細胞画分に回収された放射活性。(b)

横軸；添加した塩濃度。抗真菌蛋白質量はいずれも一定。

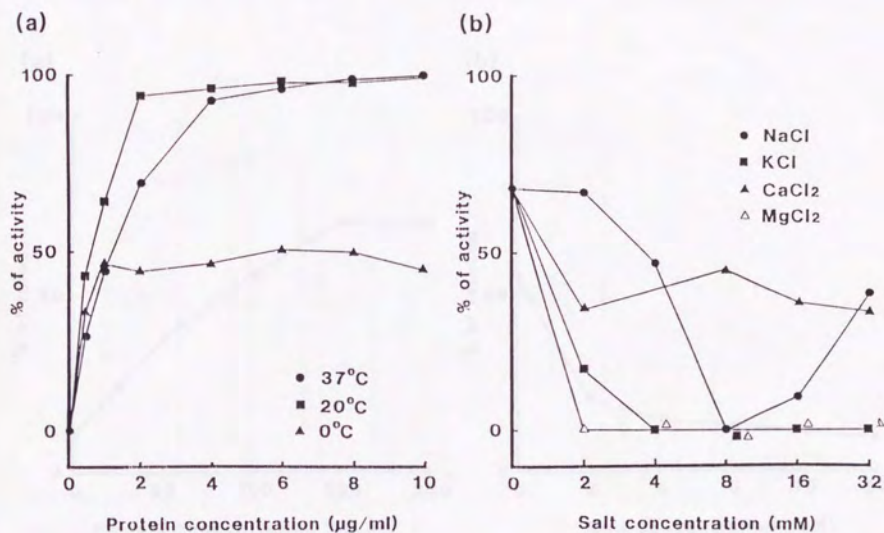


Fig. 18 抗真菌蛋白質の殺菌活性。(a) 横軸；抗真菌蛋白質濃度，縦軸；殺菌活性。数字が大きいほど活性が高い。(b) 横軸；添加した塩濃度。抗真菌蛋白質濃度は $2 \mu\text{g/ml}$ 一定。

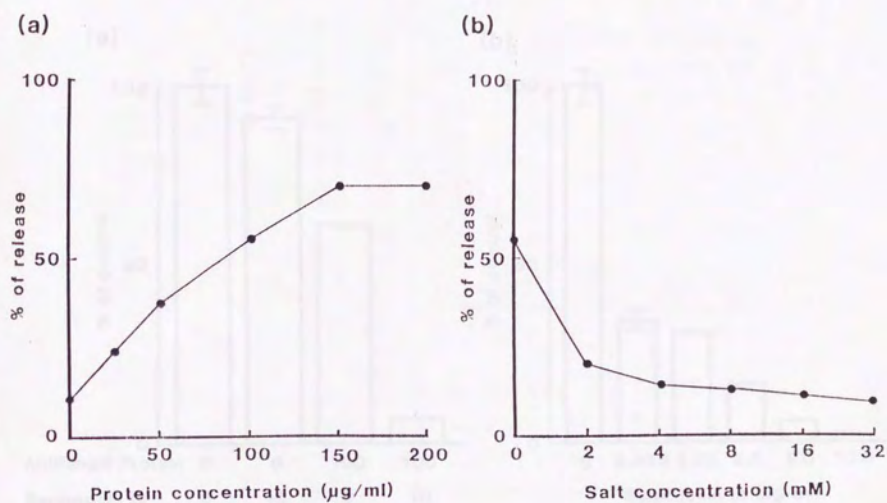
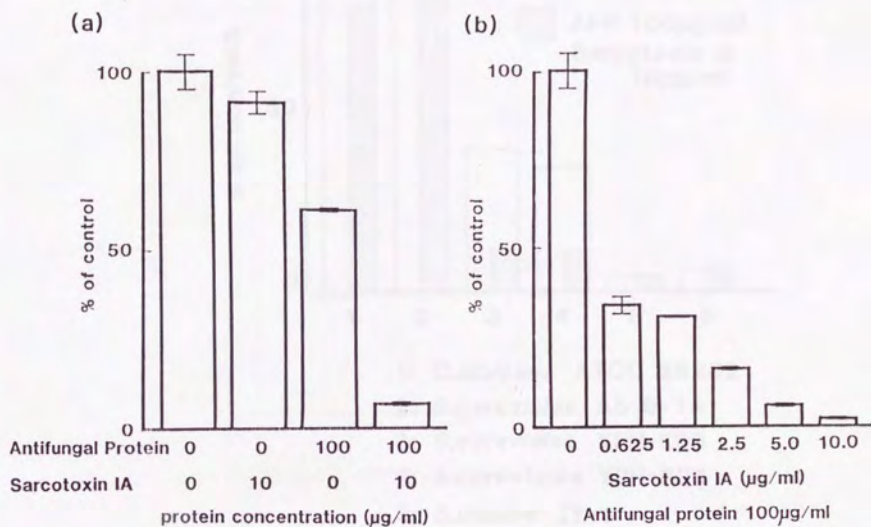


Fig. 19 細胞内容物の漏出に対するNaCl添加の影響。

Synergistic activity of antifungal protein and sarcotoxin IA



F i g. 20 抗真菌蛋白質とザルコトキシシン I A との共同作用。

(a) 縦軸；無処理区を 1 0 0 % とした時の相対的生菌数。(b) 縦軸；抗真菌蛋白質単独添加区の生菌数を 1 0 0 % とした。いずれにおいてもカラム下の数字は各蛋白質の濃度を示す。

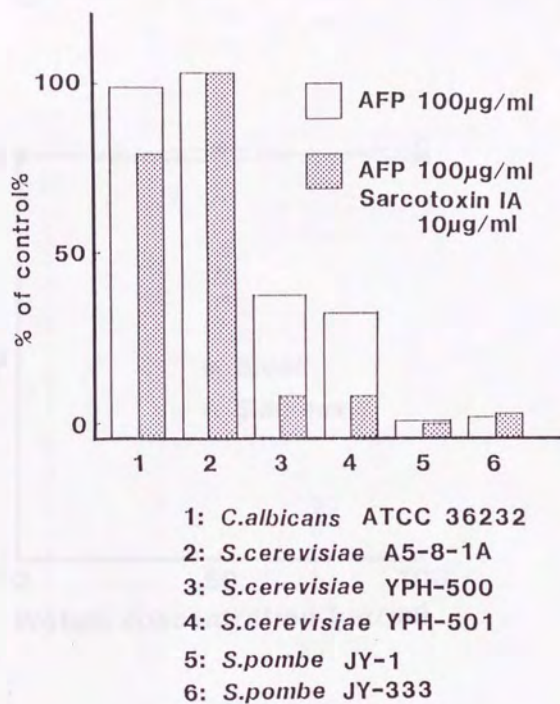


Fig. 21 真菌細胞5菌株に対する抗真菌蛋白質とザルコトキシニンIAの作用。縦軸は各菌株について無処理区の菌数を100%とした時の相対率。

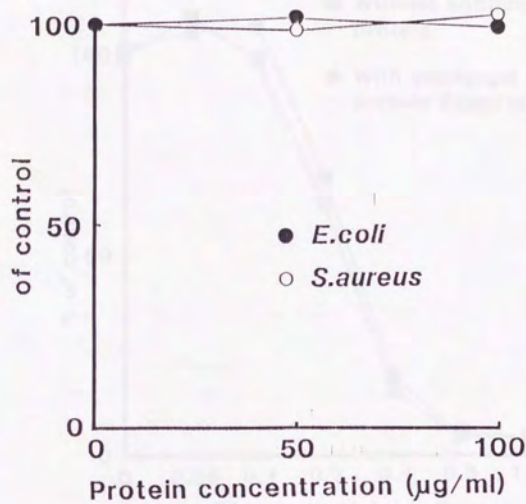


Fig. 22 抗真菌蛋白質の細菌に対する効果。

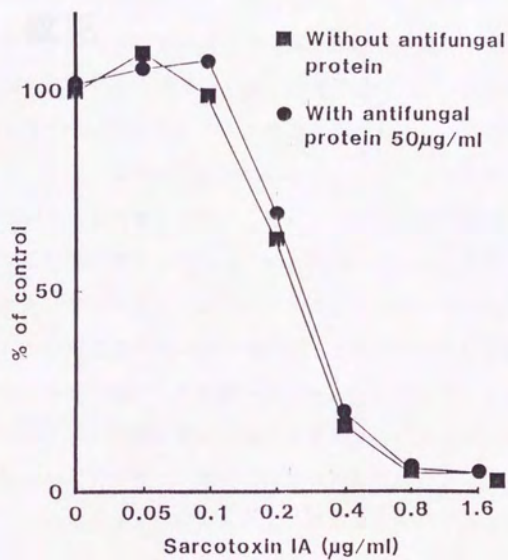


Fig. 23 ザルコトキシニン I A の活性に対する抗真菌蛋白質の効果。

第4章

総括

本研究は、昆虫の持つ生体防御機構について着目し、抗菌性蛋白質による感染防御の仕組みの一側面を明らかにする目的で行った。これまで当教室で系統的に研究の進められてきているセンチニクバエを材料にして、その新しい生体防御因子、特に他の昆虫からもまだ得られていなかった抗真菌因子を同定することを考えた。

センチニクバエ3令幼虫体液に真菌生細胞数を減少させる活性を見だし、この体液を出発材料として、抗真菌活性を持つ因子の精製を行い、cDNAクローニングにより1次構造を明らかにした。。得られた因子は67アミノ酸より成る蛋白性因子であった。この因子は、はじめに体液に見られた活性全てを説明するものではなかった。これは、精製の途中で活性が複数に分かれたこと、体液の活性を見ると、精製時に用いたアッセイ方法が異なったことによると考えられた。

得られた抗真菌蛋白質は第2章に示した様な構造的特徴を持つ、これまでに報告の無い新しい蛋白質であった。その特徴は、アミノ酸組成に偏りがあること、抗菌活性を持つ蛋白質としては異例な親水性であること、分子内に最大7アミノ酸残基単位からなる繰り返し配列がみられることなどである。また、偏ったアミノ酸組成の内、ヒスチジンがモル比で約20%占めることから全体としても塩基性蛋白質であると考えられた。

抗真菌蛋白質の活性は、菌体表面の透過性を変えるものであると考えられた。その根拠としては、作用点が細胞内にあり、且つ単独では真菌に作用しないニトロフラゾンが抗真菌蛋白質と共存することによりC、アルビカンスに殺菌的に作用したこと、抗真菌蛋白質の作用を受けたC、アルビカンス菌体から内容物の漏出が認められたことが挙げられる。また、この抗真菌蛋白質の作用は塩が存在することにより阻害を受けたが、

これは、抗真菌蛋白質がイオン性のインタラクションで菌体に結合しているためと解釈された。

抗真菌蛋白質の活性上での大きな特徴は、同じセンチニクバエ由来の抗バクテリア蛋白質であるザルコトキシニン I A と共存することにより活性が増強されることである。このことは、センチニクバエに限られた種類の生体防御蛋白質を組み合わせることにより、効率的な感染防御を行っていることを示唆するものであると考えられた。

今後の研究課題としては2つの方向がある。一つは作用機構の解明である。抗真菌蛋白質は真菌細胞に結合すると考えられ、またその作用を受けた菌体からは内容物の漏出が起こることも観察されていることから、作用点の内の少なくとも1つは細胞表面構造にあるのではないかと考えられる。このことを明らかにするためには真菌細胞から抽出した膜成分、更にはリン脂質、ステロール標品等を用いて作製した再構成膜、リボソームに対する抗真菌蛋白質の結合、障害活性、特異性など調べることが必要であると考えられる。また、この抗真菌蛋白質は、真菌と同じ真核生物であるセンチニクバエから得られたものであるから、その作用点は真菌にのみあってハエには無いことが予想される。現在までに開発された抗真菌薬が少ないのは、真菌に対する選択毒性の高いものがなかなか見いだされないためである。従って、抗真菌蛋白質の真菌に対する作用点及び作用機構を解明することは、選択性の高い安全な抗真菌薬を開発するための基礎試料となることが期待される。

研究のもう1つの方向は、抗真菌蛋白質の生体内における役割、作用の解明である。まずは抗真菌蛋白質がハエの体内においても真菌と結合し得るか、また結合した菌が死ぬかの検討が必要である。このことは、*in vitro* での活性を指標にして見いだした抗真菌蛋白質が実際に生体

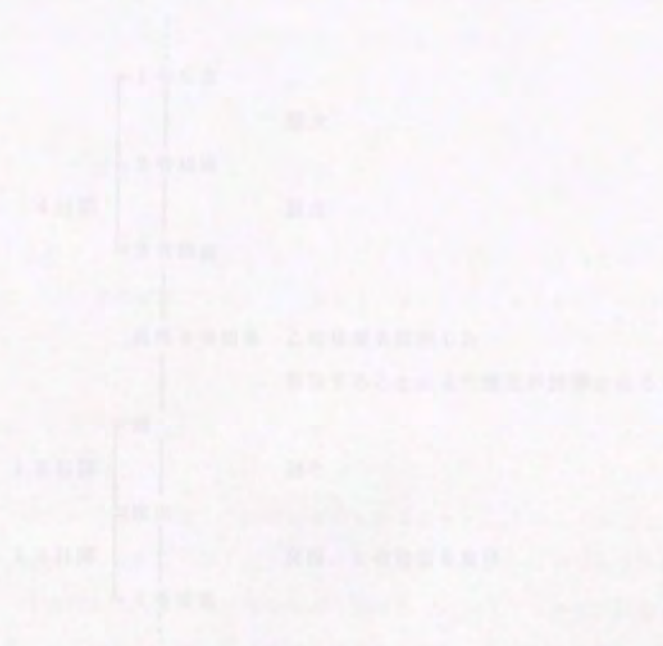
防御因子であるかを知るために必要である。次に、真菌感染防御機構の中での役割、位置づけを知るための実験が必要であろう。繰り返し述べてきたように抗真菌活性を担い得るものとしては、フェノール酸化酵素系、貪食細胞等がある。メラニンが菌体表面に形成されるとそれがオブソニン様の作用をして、貪食細胞に処理され易くなるのではないかという考えを持つ研究者もいるが、抗真菌蛋白質が生体内でも真菌細胞に結合できれば、抗真菌蛋白質自体の構造が変わること等によって貪食細胞に対して非自己の存在を知らせる働きを持ち得るのではないかということも期待される。

更に、この蛋白質は誘導性ではなく、正常な3令幼虫の体液中に少なくとも $250\mu\text{g}/\text{ml}$ という高い濃度で存在することから、他にも何らかの機能を持っていることが予想される。ザルコトキシン、ザーベシン、ザルコファーガレクチン等他の生体防御蛋白質が2重機能性を示すことなどからも、発生・分化との関連について検討を行うことが必要であろう。また、抗真菌蛋白質は、金属結合蛋白質である可能性を指摘したが、異なった方法で精製することによって、生体内ではどのような形で存在するかを知ることにも興味を持たれる。

以上述べた方向で研究を進めることにより、昆虫の生体防御にとどまらず、大きな意味での異物排除機構の解明を目指した研究全体に対して何らかの情報を提供できるものと期待される。

第 5 章

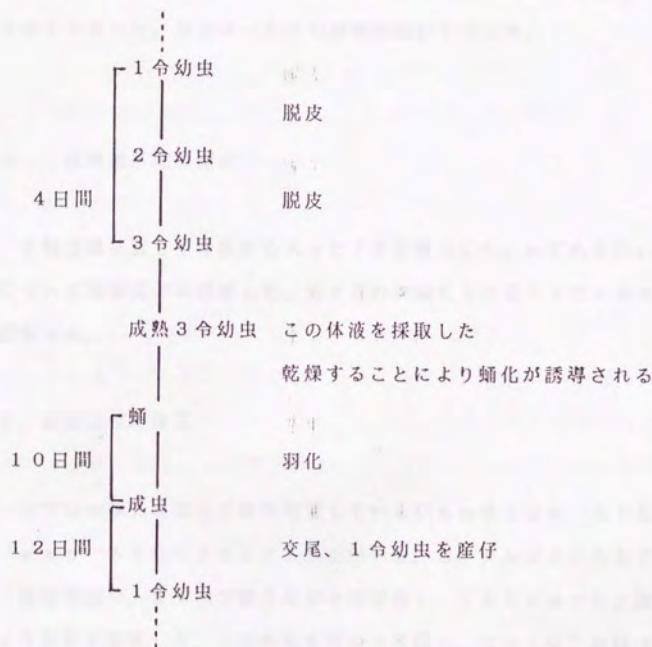
方法と材料



1. センチニクバエ3令幼虫体液の採取

当教室において継代飼育しているセンチニクバエの、成熟3令幼虫の体液を採取した。

センチニクバエのライフサイクル



3令幼虫を飼料であるブタレバーから離した後1日以上絶食させ、消化管内を空にする。そしてレバーから離して2日目から5日目までの幼

虫のみを用いた。体表を水道水で洗った幼虫を氷上に置いて麻痺させ、頭部を外科用鋏で切断、胴体を圧して体液を絞り出し、コーニング社のポリエチレン製スピッツ管に受けた。続いて3000回転/分×10分間の遠心操作により体液細胞を沈澱させて液相のみを他の容器に移した。この体液採取の間には必然的に空気との接触が起こり、体液中のフェノールオキシデースが活性化されて、体液の凝固及び褐変が起こる。それを防ぐために以上の操作は全て氷上において、もしくは4℃に保った遠心機を用いて行った。3令幼虫1000匹当たり得られた体液量は約20mlであった。保存は-80℃冷凍庫内にて行った。

2. 抗真菌活性の測定

実験全体を通しては複数のアッセイ系を使用した。いずれを用いたかについては本文中に記載した。第3章の実験におけるアッセイ系は別に記載した。

I. 体液活性の測定

サブロー寒天培地上で継代培養している *Candida albicans* ATCC 36232 株を用いた。*C. アルビカンス*をサブロー液体培地中、37℃で振りながら前培養し、650nmでの比濁法により菌数を測定した。この菌液を培地で希釈し、 2×10^6 細胞（実際にはコロニー形成単位，CFU）/mlの濃度に調製した。

上記菌液50μlをエッペンドルフチューブに取り、ここにセチニク

バエ体液を最大 $50\mu\text{l}$ 加え、 $100\mu\text{l}$ に足りないものについては昆虫用生理食塩水で液量を合わせた。これをよく混合した後、攪拌しながら 37°C 2 時間インキュベートした。インキュベート後、反応液を生理食塩水で 100 倍希釈し、その $100\mu\text{l}$ をニトロフラゾンを含むサブロー寒天培地に蒔いて 37°C 2 日間培養し、オリンパス社製コロニーカウンター、OL-502A 型で現れたコロニー数を測定した。

Sabouraud agar; 4% glucose, 1% peptone, 1.5% agar pH5.8
(0.05% nitrofurazone)

Sabouraud broth; Sabouraud agar without agar

Insect saline; 130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl_2

II. 液体培養法

I. と同様に菌を培養して 1 オーダー低い 2×10^5 細胞/ ml の菌液を調製し、その $50\mu\text{l}$ を Nunc 社製 V 底 96 穴マルチタイタープレートに入れた。これに最大 $50\mu\text{l}$ の験体を、それ以下の場合には験体と同じ溶媒を加えて $100\mu\text{l}$ とし、 37°C 12 から 16 時間培養した。これに $100\mu\text{l}$ の蒸留水を加えて攪拌し、 650nm の比濁により菌数を測定した。

3. 抗真菌蛋白質の精製

I. 熱処理

-80℃で保存してあったセンチニクバエ3令幼虫体液を解凍して、500ml容のガラス製ビーカーに移して蒸留水で10倍に希釈し、沸騰水浴上で10分間処理した。体液を希釈するのはセンチニクバエ幼虫体液の蛋白質濃度は140から160mg/mlと高いため、そのまま熱処理すると固形になり、溶液画分をほとんど得ることができなかったためである。

続いてビーカーを氷上に置いて冷却し、熱処理したポリプロピレン製スピッツチューブに移して3500r.p.m.、20分間遠心操作を行い、上清画分を得た。このとき、沈査がくずれて細かい固形成分が混入するのと、脂質が浮遊しているので、上清画分をミリポア社製、ポアサイズ0.44μmφのニトロセルロースフィルターに通してそれらを除いた。

II. 逆相HPLC

Gilson社製のポンプ×2、ミキサー、圧力計、UVディテクター、フラクションコレクターより成るシステムに、Cynchrom社製C₁₈逆相カラム Cynchropak RP-P (4.1mmID×250mmL)を接続した装置を使用した。グラディエントプログラムのコントロールはNEC社製コンピューター PC-100と、M&S機器側のソフトウェアによって行った。

カラムは、Barnstead社製 NANOpure II純水製造装置で作製した純水に0.05%トリフルオロ酢酸を添加したもので平衡化した。また、溶出に用いたアセトニトリルにも同濃度のトリフルオロ

酢酸を添加した。

熱処理、遠心操作、及びろ過を終えた画分を、システムのインジェクションループの容量にあわせて約5 mlずつ4回、計20 mlアブライした。溶出パターンのモニターは220 nm, 280 nmの2波長で行い、素通り画分の吸収が低下した後、アセトニトリルグラジエントにより吸着画分の溶出を行った。

溶出画分は1 ml、もしくは0.5 mlずつ分取し、遠心式真空エバポレーターで乾燥させた後蒸留水に溶解して抗真菌アッセイの被検材料とした。蛋白の定量はLowry等の方法に従った。

III. ゲルろ過HPLC

II. と同一システムにTosoh社製ゲルろ過カラムTSK-G3000 SW_{XL} (7.8 mm×30 cm)を接続して使用した。溶出液にはアセトニトリル:DDW:トリフルオロ酢酸=60:40:0.05を用いた。分子量の算定時には50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(20 mM塩化ナトリウム、pH 7.5)を溶出液に用いた。

4. アミノ酸組成分析

東レリサーチセンター㈱に依頼して行った。逆相HPLCにより精製した抗真菌蛋白質15 µgをガラス管内にて減圧下、6N-HCl(4%チオグリコール酸添加)、110℃×22時間の条件で加水分解し、日立製835型アミノ酸分析計で定量を行った。

5. N末端アミノ酸配列の決定

東レリサーチセンター(株)に依頼して行った。精製した抗真菌蛋白質 μg を Applied Biosystems 社製 477A 型気相式シーケンサーにてエドマン分解を行い、生じた PTH-アミノ酸を同社製 120A 型 PTH-アナライザー (PTH-アミノ酸同定用 HPLC システム) にて分析した。始めに抗真菌蛋白質をそのまま試料に用いた場合には、1 番目のサイクルから全く PTH-アミノ酸が検出されなかった。そこで、以下に述べる処理を行った。

アミノ末端のデブロッキングは、Podell 等の方法に従い、蛋白質をパイログルタメートアミノペプチデース処理することにより行った。この酵素で消化することにより、N末端のパイログルタミン酸 1 残基のみが蛋白質から切り出される。

遠心式真空エバポレーターにて乾燥させた抗真菌蛋白質 $8\mu\text{g}$ をエッペンドルフチューブ内にて $80\mu\text{l}$ の DDB 緩衝液に溶解し、同じ緩衝液に 2mg/ml の濃度に溶解した Boehringer Mannheim Biochemicals 社製パイログルタメートアミノペプチデース $4\mu\text{l}$ を添加した。反応液の入ったチューブ内を窒素ガスに置換し、 4°C にて 時間消化を行った。そして反応が行われたかの確認、酵素及び緩衝液成分を除く目的で、反応液を逆相 HPLC を用いて分画し、N末端配列解析の試料とした。

DDB buffer; 0.1M Na-phosphate buffer (pH 8.0), 5mM dithio-

threitol, 10mM EDTA · 2Na, 5% glycerol

6. オリゴヌクレオチドプローブの作製

cDNAクローニング、サザンブロットハイブリダイゼーションに用いるプローブ、及びDNA塩基配列決定に用いるプライマーとして、合成オリゴヌクレオチドを作製した。

Applied Biosystems社製381A型DNA合成機によって合成したオリゴヌクレオチドを、同社製オリゴヌクレオチド精製カートリッジによって精製し、反応副産物等を除いた。得られたオリゴヌクレオチドは、カートリッジからの溶出に用いたアセトニトリルを遠心式真空エバポレーターで除いた後、蒸留水に溶解し、260nmの紫外外部領域の吸光度を測定することにより定量した。

プローブとして用いるオリゴヌクレオチドの放射線標識は、5'末端への ^{32}P -ATPのカイネーションにより行った。反応は、以下の反応系により行った。

oligonucleotide	1 μ l
10x kinase buffer	6 μ l
γ - ^{32}P -ATP	5 μ l
T4 polynucleotide kinase	4 μ l
steriled DDW	44 μ l
(total 60 μ l)	

10x kinase buffer; 0.5M Tris-HCl buffer (pH 7.6), 0.1M

MgCl₂, 50mM dithiothreitol, 1mM EDTA

反応液をエッペンドルフチューブ内で37℃で30分間反応させ、70℃、10分間の熱処理により、酵素を失活させて反応を停止させた。次に、キャリアーとして大腸菌tRNAを20mg×10μl添加して吸着を防ぎ、ベッドボリューム約3mlのセファデックス G-50を詰めたカラムを用いてクロマトグラフィーを行い、末端標識されたオリゴヌクレオチドと未反応のγ-³²P-ATPを分画した。フラクションサイズは約200μl×20本とした。各フラクションの放射活性測定はシンチレーションカウンターによるチェレンコフ光測定で行った。また、全てのフラクションをWhatmann社製DE75濾紙上で2.2% 蟻酸アンモニウム溶液を展開液としたペーパークロマトグラフィーで展開し、そのラジオオートグラムを撮ることにより、移動度の異なる標識オリゴヌクレオチドと未反応γ-³²P-ATPを識別し、標識オリゴヌクレオチドのみを含むフラクションを集めた。この操作により、1.5×10⁸ cpm/400pmolのプローブを得ることができた。

7. cDNAクローニング

当教室高橋等によって、Okayama & Bergの方法に従って構築されたセンチニクバエ体表障害6時間後の3令幼虫脂肪体由来cDNAライブラリーから、精製した抗真菌蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングを行った。このcDNAライブラリーはMorrison

の方法により大腸菌 HB101 株を形質転換し、それによって獲得されるアンピシリン耐性により選択が行われている。従って、cDNA は pBR-322 由来の Okayama & Berg のプラスミドベクターに組み込まれた形であるため、大腸菌 DNA をフィルター上にトラップし、オリゴヌクレオチドプローブで陽性クローンを選択するコロニーブロットハイブリダイゼーション法を行った。

I. 1st スクリーニング

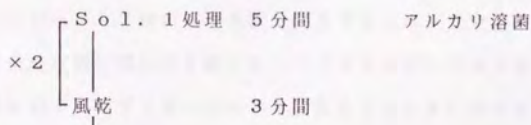
1st スクリーニングにおいては、合成した2種類のオリゴヌクレオチドプローブの内、 T_m °C の高い pN-1 のみを用いた。1枚のマスターフィルター当たり2枚のレプリカフィルターを作製してコロニーブロットハイブリダイゼーションを行い、デュプリケートで検出されるシグナルに対応するコロニーを選択することにした。尚、この1st スクリーニングの段階では陽性クローンの純化までは目的としない。

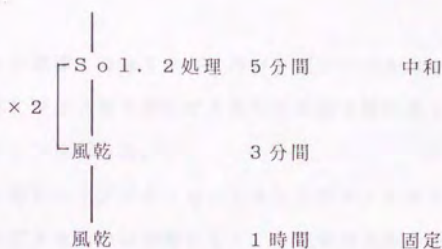
a. ナイロンフィルター上への DNA の固定

オートクレーブを用いて滅菌した NEN 社製 9 cm 径ナイロンフィルターを、アンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した LB (Luria-Bertani) 培地プレート上に乗せ、cDNA ライブラリーで形質転換した大腸菌を1プレート当たり10000クローン、10プレートに蒔いた。以下、アンピシリン-LB 培地プレートを LB-AMP プレート、cDNA ライブラリーで形質転換した大腸菌をライブラリーと略記する。この10枚のプレートを 37°C で一晩培養し、レプリカフィルターを作

製するときのマスタープレートとした。次にマスタープレートをLB-AMPプレートから剥し、ライブラリーの存在する面に新しいナイロンフィルターを強く押しつけてライブラリーを転写し、レプリカフィルターを作製した。後にマスタープレート上のクローンとハイブリダイゼーションのシグナルを対応させるために、各々のフィルターの同一位置にボールペンでマークを付けた。また、ハイブリダイゼーションのシグナルをデュプリケートで検出するために、各マスタープレートにつき2枚のレプリカフィルターを作製した。続いて、マスター及びレプリカフィルター全てを新しいLB-AMPに乗せて、つぶれたコロニーが盛り上がった形状になるまで、5時間程度培養した。マスタープレートはビニールテープでシールして、4℃にたもって保存した。レプリカフィルターはLB-AMPプレートから剥してLB-CMプレート（クロラムフェニコール200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地プレート）に乗せ換え、更に37℃、一晚培養した。このクロラムフェニコール処理によりプラスミドが増幅される。

次にレプリカフィルターをプレートから離して、以下の手順で大腸菌のアルカリ処理による溶菌、ナイロンフィルター上へのDNAの固定操作を行った。ナイロンフィルターを用いた場合にはUVクロスリンク及びベイクンを行わなくても、乾燥させるだけでDNAがフィルターに固定される。





Sol. 1; 0.5M NaOH

Sol. 2; 1M Tris-HCl (pH 7.4)

LB-broth; 1% peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH7.0

LB-plate; add 1.5% agar for LB-broth

LB-AMP; add 50 μ g/ml ampicillin for LB-plate

LB-CM; add 200 μ g/ml chloramphenicol for LB-plate

b. ハイブリダイゼーション

最初にDNAを固定したフィルターをブローウッシュSol. 1. に一晩60℃で振盪しながら浸し、スポンジで軽く擦って付着した菌体残渣を取り除いた。このフィルターを10枚ずつ20mlのブレイブリダイゼーション溶液と共にビニールバッグに入れ、気泡を除いてポリシーラーで密封した。インキュベーション中に溶液が漏れないよう、ビニールバッグは2重にした。溶液が全体に行き渡るようフィルターを入れたビニールバッグを2枚のガラス板で挟んでゴムバンドで止め、60℃に保った恒温水層に浸して1晩ブレイブリダイゼーションを行った。

ブレイブリダイゼーションを終えたフィルターをバッグから取り出し、10枚ずつ放射標識したpN-1プローブを含むハイブリダイゼー

ション溶液 10 ml と共に再び 2 重ビニールバッグにいれて気泡を除き、密封、ガラス板で挟んで 50 °C の恒温水層に浸して 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。

一般にハイブリダイゼーション及びフィルターウォッシュを行う温度を決定するための指針として、2 種類の方法が使用されている。その 1 つが Schildkraft, C. and Lifson, S. 及び, Lathe, R. による計算式、他方が Itakura's rule と呼ばれる経験則である。

オリゴヌクレオチドプローブ pN-1 について上の 2 種類の方法で T_m を計算した。Schildkraft らの計算式は

$$T_m^{\circ}\text{C} = 16.6 \log M + 0.41 (\%G+C) + 81.5 - 820/l$$

M ; 塩濃度、 %G+C ; プローブ中の G+C 含量、

l ; プローブの塩基数

というものである。ハイブリダイゼーション溶液には 4 × SSC が含まれており、従って塩濃度は

$$4 \times 0.15 M = 0.6 M$$

pN-1 の %G+C は、I を計算から除外するため

$$10 / (23 - 2) \times 100 \div 47.62 \%$$

全長は 23 b から I の 2 を引いて 21 b ある。これらを上式に当てはめると、

$$T_m^{\circ}\text{C} = 16.6 \log 0.6 + 0.41 (47.62) + 81.5 - 820/21 \div 58.29$$

という値が算出された。

Itakura's rule は、A と T による結合の T_m °C を 2 °C、

GとCによるものを4℃として、プローブの全塩基分を足し合わせるものである。pN-1のTm℃は

$$T_m^{\circ}\text{C} = 2 \times 11 + 4 \times 10 = 62$$

と算定される。しかし、この経験則は6×SSCを用いた場合であり、塩濃度が低い場合には値はより小さくなる。この場合は4×SSCを用いるので60℃程度となる。

以上の2つの計算方法で、pN-1のTm℃は58から60℃と算定された。Tmの温度ではプローブとcDNAのハイブリッドは50%解離の状態となり、不安定であるためハイブリダイゼーションは数度低い温度で行うものとされている。実際の実験上においては、プローブの非特異的吸着及びマッチングの少ない相手とのハイブリッド形成がなされない条件であることが必要である。今回用いたcDNAライブラリーからは既に多くのcDNAが、同一の方法でクローニングされている。例えばザルコトキシニンIIA cDNAの場合には、20mer、Tm℃=42のプローブをもちいてクローニングがなされている。従ってpN-1を用いたスクリーニングの場合には、Tmよりかなり低い温度でハイブリダイゼーションを行っても、バックグラウンドは問題にならないと考えられたので50℃とした。

ハイブリダイゼーションの後フィルターをバッグから取り出し、フィルターウォッシュ溶液を用いて、室温で5分間×3回、50℃で10分間×2回洗浄した。この時の放射活性は、5から7kcpm/フィルターであった。このフィルターをWattman社製3MM濾紙の台紙に貼ってビニールラップを掛け、-70℃、3時間オートラジオグラフィを行った(Kodak社製X-OMAT ARフィルム)。現像後、フィルターの番号とポジションマーカをマジックペンでフィルム

上に写し取った。

Pre-wash sol.; 3x SSC, 0.1% SDS

Pre-hybridization sol.; 3x SSC, 10x Denhardt's sol., 50 μ g
/ml sssDNA

Hybridization sol.; 4x SSC, 10X Denhardt's sol., 25 μ g/ml
ssDNA, 32 P-labelled probe

Filterwash sol.; 4x SSC, 0.1% SDS

x20 SSC; 3M NaCl, 0.3M Sodium citrate

c. 陽性クローンの選択

2枚のレプリカフィルターから撮ったオートラジオグラフを、ポジションマークに従って重ね合わせ、2枚共に現れたもののみを陽性シグナルと判断した。このポジションマークと陽性シグナルの位置をビニールシート上に書き移した。

4℃で保存してあったマスタープレートからフィルターを剥して、先のビニールシート上にポジションマークを合わせて乗せ、陽性シグナルを与えるクローンの位置を求めた。1stスクリーニングにおいてはフィルター上の菌の密度が高いため、この段階で単一クローンのみを選別するのは困難である。従って、陽性シグナル位置付近の数クローンを滅菌した爪楊枝でピックアップし、2ndスクリーニングにおいてクローンの純化を行うことにした。

II. 2ndスクリーニング

1stスクリーニングで選択したクローンをLB液体培地で10倍系列で5段階に希釈し、LB-AMPプレート上のナイロンフィルターにブレーティングし、37℃、1晩培養した。希釈系列中、1プレート上のコロニー数が100から200に近いものを選んでマスタープレートとした。以下のレプリカブレーティング、DNAの固定、コロニープロットハイブリダイゼーション、及びコロニー選択は1stスクリーニングと同様に行った。1stスクリーニングで選択したクローンが純化されたと考えられた。

III 3rdスクリーニング

2ndスクリーニングで選択したクローンからプラスミドを精製し、2種類のオリゴヌクレオチドプローブに対する反応性をサザンプロットハイブリダイゼーション法により検定した。その結果、2種類いずれのプローブともハイブリダイズするものを選別し、塩基配列決定を行うことにした。

a. プラスミドの調製

2ndスクリーニングで純化したpN-1陽性クローン大腸菌を、50ml容のチューブ中、5mlのLB液体培地で1晩培養し、そこからLiCl-煮沸法によりcDNAをインサートにもつプラスミドを以下の手順で精製した。

大腸菌クローン

- 遠心操作 3,500 rpm 10分間
- ペレット
 - TELT緩衝液 100 μ l に懸濁
 - リゾチーム処理
 - 氷上で攪拌 5分間
 - 沸騰水浴 90秒間
 - 氷冷 5分間
 - 遠心操作 15,000 rpm 10分間
- 沈澱画分
 - RES II 抽出
- 水層
 - CIA 抽出
- 水層
 - エタノール沈澱
- 沈澱画分
 - 70%エタノールリンス
- 沈澱画分
 - TE緩衝液
- プラスミド溶液

プラスミドが得られたかの確認は、エチジウムブロマイドを含むアガロースゲル電気泳動で行った。

TELT buffer; 50mM Tris-HCl (pH7.5), 62.5mM EDTA, 0.4%

Triton X-100, 2.5M LiCl

Lysozyme sol.; 10mg lysozyme/ml TELT Buffer

RES II; buffered phenol:CIA =1:1

CIA; CHCl₃:isoamylalcohol=24:1

Buffered phenol; phenol saturated with 0.1M Tris-HCl (pH8.0)

TE buffer; 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH7.4)

b. サザンブロットハイブリダイゼーション

3rdスクリーニングにおいては、陽性クローンからプラスミドを抽出し pN-1, pN-2 の2種類のプローブにたいする反応性をサザンブロットハイブリダイゼーション法により検定した。

2ndスクリーニングで得た陽性クローンを、ベクター上に認識部位のある制限酵素 *Hind* III, *Pvu* II で消化し、1%濃度のアガロースゲル電気泳動を行った。2種類のプローブを用いるため同じ泳動を2回行った。ブロッティングはSouthernの方法に従って、以下の手順で行った。

アガロースゲル

— 0.25N HCl 処理 10分間

— DDWで洗浄

— 1.5M NaCl, 0.5M NaOH 処理 15分間 × 2

— DDWで洗浄

— 1.5M NaCl, 1M Tris-HCl 処理 15分間

× 2

ニトロセルロースフィルターにブロッティング

1枚のゲルあたり、ガラス板2枚、ゲルと同じ大きさにカットした3MM濾紙6枚、ニトロセルロースフィルター1枚、ペーパータオルを厚さ5cm程用意する。これらを次の順番の通りに重ねてブロットティングを行った。まずガラス板を水平な場所におき、 $20 \times SSC$ に浸した3MM濾紙3枚を乗せる。この上にゲルを置き、ニトロセルロースフィルターを密着させる。更に $20 \times SSC$ に浸した3MM濾紙1枚、乾燥した3MM濾紙2枚、ペーパータオル、ガラス板、100から200gの重しを乗せて1晩放置した。ブロットティング終了後フィルターにゲルのスロット位置、全体の形を書き込み、 $6 \times SSC$ で洗浄した後、乾燥、 $80^\circ C$ 5時間のベイクングを行いDNAをフィルター上に固定した。

ハイブリダイゼーションは、pN-1を用いた場合が $55^\circ C$ 、pN-2では $49^\circ C$ の温度で行った。プローブの放射ラベル、ハイブリダイゼーション、フィルターウォッシュ、オートラジオグラフィーはコロニーハイブリダイゼーションの時と同様に行った。

得られたクローンはグリセロールストック法により保存した。

8. cDNAの塩基配列決定

スクリーニングされたcDNAは、その全長が0.5kbpと比較的短いためサブクローニングせず、プラスミドベクターに組み込まれた形のままシーケンスを行った。

シーケンスに用いるDNAにはRNA及びゲノムDNAが混入していないことが要求される。また量的にもハイブリダイゼーション法で検

出する場合に比べて多く使用するため、アルカリ法とPEG沈澱法を組み合わせてプラスミドの精製を行った。

大腸菌クローンをSuper broth (250ml/500ml 坂口コルベン) で5時間培養し、終濃度300 μ g/mlのクロラムフェニコールを加えて更に1晩培養してプラスミドを増幅させた。この菌を5krpm、5分間の遠心操作により集菌し、以下の手順でプラスミドを抽出、精製した。

大腸菌クローン

- Sol. 1 4ml に懸濁
- リゾチーム処理
- Sol. 2 10ml
- 氷上で攪拌 5分間
- 5M KOAc 緩衝液 7.5ml
- 氷冷 25分間
- 遠心操作 8krpm 5分間

上清画分

- イソプロパノール沈澱

沈澱画分

- TE 緩衝液 1.5ml に溶解
- RNase 処理
- RES II 抽出

水層

- PEG 沈澱
- TE 緩衝液 100 μ l に懸濁

|
 | RES II 抽出
 水層
 |
 | CIA 抽出
 水層
 |
 | エタノール沈澱
 | TE 緩衝液 100 μ l に懸濁
 プラスミド溶液

Super broth; trypton 33g, yeast extract 20g, NaCl 7.5g,

10N NaOH 1ml, DDW up to 1000ml

Sol.1; 50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA \cdot 3Na

Sol.2; 0.2M NaOH, 1% SDS

5M KOAc buffer; KOAc 147.2g, AcOH 57.5ml, DDW up to 500ml

lysozyme sol.; 25mg lysozyme/ml Sol.1

こうして得たプラスミドのインサートの-20から40b上流のベク
 ターの配列に相補的なプライマーを作製し、下流の配列を決定すること
 にした。続いて、決定した配列をもとに新たなプライマーを作製して読
 み伸ばして行く方法をとる。これを3', 5'両方向から行い、いずれの
 向きからも全長をカバーするようにした。シーケンスには Unite
 d states Biochemicals 社製の 7-deaza-
 sequencing kit、Sequenase Ver. 2.0
 を用いた。

2本鎖プラスミドDNA溶液 (5 μ g / 16 μ l) に1N NaOH
 4 μ lを加えて室温で5分間放置し、1本鎖に解離した。このアルカリ

変性プラスミドをエタノール沈澱法により回収し、 $7\mu\text{l}$ のDDWに溶解した。続いて 2.5pmol のプライマーを、総量 $10\mu\text{l}$ の反応系、Sequenase緩衝液中で 65°C 15分間、その後30分間かけて室温に戻しアニーリングさせた。続いて、以下に示す方法でシーケンス反応を行った。

└ Annealing sol.	$10\mu\text{l}$
└ 0.1M DTT	$1\mu\text{l}$
└ labelling sol.	2μ
└ 32P-dCTP	1μ
└ Sequenase	2μ

└ 3min. at. r.t.

4x $3.5\mu\text{l}$

ddNTP-dNTP mix. $2.5\mu\text{l}$

(A, T, G, C)

└ 5min. at 37°C

Formamide dye $4\mu\text{l}$

└ 3min. 95°C

keep on ice

5x Sequenase buffer; 200mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl_2 ,

250mM NaCl,

Labelling sol.; $7.5\mu\text{M}$ 7-deaza dGTP, $7.5\mu\text{M}$ dATP, $7.5\mu\text{M}$

dTTP

^{32}P -dCTP; 3000mCi/m mol

Formamide dye; 95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% BPB, 0.05%

XC

電気泳動は8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル(60cmH, 30cmW, 0.35mmD)、70ワット一定電圧で行い、泳動後ゲルを濾紙に張り付けて乾燥させ、オートラジオグラフィーを行った(Kodak X-OMAT AR5フィルム)。

読みとった塩基配列の編集、アミノ酸配列への翻訳、ハイドロパシープロット、高次構造予測などは、SDCソフトウェア開発㈱の遺伝情報処理プログラム GENETYX Ver. 7.00 を用いて行った。

9. ゲノミックサザンプロットハイブリダイゼーション

センチニクバエ3令幼虫脂肪体よりDNAを抽出し、制限酵素で切断した後アガロースゲル電気泳動を行い、抗真菌蛋白質cDNAの翻訳領域全てを含むプローブを用いて目的遺伝子断片の検出を行った。

I. ゲノムDNAの抽出

センチニクバエ3令幼虫60匹を解剖し、脂肪体のみを得て、以下の手順でDNAを抽出した。定量は紫外吸光度測定により行い、収量は480μgであった。

脂肪体

- Buffer I 8 ml に懸濁
- ホモジナイズ
- 遠心操作 3 k r p m 10 分間

沈澱画分

- Buffer I 20 ml に懸濁
- 遠心操作 3 k r p m 10 分間

沈澱画分

- Buffer II 2 ml に懸濁

核懸濁液

- 12.5 mM EDTA, 0.5% SDS
- P. C. I. 等量に懸濁
- 遠心操作 3 k r p m 10 分間 (3 層に分かれる)

上層, 中間層

- C. I. 等量に懸濁
- 遠心操作 3 k r p m 10 分間 × 3 回

上層, 中間層 (3 回目上層を得る①)

- DDW 等量
- 遠心操作 3 k r p m 10 分間

上層②

① + ②

- RNase (熱処理済) 処理
- P. C. I. 抽出
- C. I. 抽出 × 3 回

|
 上層
 | エタノール沈澱
 沈澱画分
 | T E 緩衝液に溶解
 D N A 溶液

BufferI; 10mM Tris-HCl (pH7.9), 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 130mM
 sucrose

BufferII; 15mM Tris-HCl (pH7.4), 60mM KCl, 15mM NaCl, 3mM
 MgCl_2 , 0.05mM CaCl_2 , 0.5mM dithiothreitol, 250mM
 sucrose

P.C.I.; buffered phenol:chloroform:isoamil alcohol=25:24:1
 C.I.; chloroform:isoamil alcohol=50:1

II. プローブの作製

シークエン스에用いたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して c D
 N A を P C R 法により増幅し、制限酵素 *Dra*I で消化した後、低融点
 アガロースゲル電気泳動により c D N A 5' 末端からかぞえて + 1 8 か
 ら + 3 1 0 の領域 2 9 2 b p を切り出して回収した。この c D N A 断片
 2 5 n g を宝酒造社製ランダムプライマー-DNAラベリングキットを用
 いて ^{32}P 標識した。比活性は $2.6 \times 10^7 \text{ cpm} / 25 \text{ ng}$ であった。

D N A 2 5 n g
 | - ランダムプライマー 2.5 μ l

- 95℃ 3分間
 - 氷冷 5分間¹⁾
 - 10×緩衝液 2.5 μ l, dNTP 2.5 μ l,
³²P-dCTP 4 μ l, DDW 7 μ l
 - 攪拌
 - klenow酵素液 1 μ l
 - 37℃ 3時間
 - 0.5M EDTA
 - ゲルろ過 (セファデックス G-50)
- ブローブ

³²P-dCTP; Amersham, 370MBq/ml

III. ハイブリダイゼーション

センチニクバエゲノムDNA各5 μ gを制限酵素で消化し、1%アガロースゲル電気泳動を行った。このゲルをNEN Research Products社製のナイロンメンブレン、ジーンスクリーンにブロッティングし、トランスイルミネーター上、2.5分間のUVクロスリンクによりDNAを定着させた。ハイブリダイゼーション反応はAmersham社製のラビッド・ハイブリダイゼーションシステムを用いて行った。

ナイロンフィルター

- ラビッド・ハイブリダイゼーション溶液 (5ml/100

cm²フィルター)。

— プレハイブリダイゼーション 65℃ 15分間

— ハイブリダイゼーション (プローブ 25 ng)

65℃ 12時間

— フィルター洗浄 (0.1×SSC, 0.1% SDS, 42℃)

オートラジオグラフィー

10. 殺菌活性測定

2. で述べたのと同様にC, アルビカンスを培養し、生理食塩水もしくは蒸留水で4回遠心洗浄して培地成分を除いてから 2×10^8 細胞/mlの菌液を調製した。この $50 \mu\text{l}$ をV底96穴マルチタイタープレートにいれ、生理食塩水もしくは蒸留水に溶解した抗真菌蛋白質を添加して37℃24時間インキュベートした。この液 $10 \mu\text{l}$ をサブロープレート上に蒔いて37℃2日間培養し、生菌数を計測した。

内容物の漏出の検出は感度の問題から、菌の濃度を 1×10^8 細胞/mlとして、これに各濃度抗真菌蛋白質溶液を等量添加して37℃12時間インキュベートした後、この液の遠心上清の260nmの吸光度を測定した。

菌体内容物漏出の100%コントロールとしては、同量の菌体を1% SDS存在下、100℃10分間処理した時の遠心上清を用いた。この条件よりSDS濃度を上げてても上清の吸光度は高くないことを確認した。

11. ザルコトキシシンIAとの共同作用

1. 2.5×10^5 細胞/ml サブロー培地の菌液 $80 \mu\text{l}$ に、抗真菌蛋白質水溶液 $10 \mu\text{l}$ 、ザルコトキシシンIA 水溶液 $10 \mu\text{l}$ もしくは蒸留水を加えて $100 \mu\text{l}$ とした。これをV底96穴マルチタイタープレート上、 37°C 6時間培養し、これを $10 \mu\text{l}$ 取ってサブロープレート上に蒔き、 37°C 2日間培養後出現したコロニー数を数えた。

12. 結合活性測定

クロラミンT法により抗真菌蛋白質を ^{125}I 標識した。放射比活性は 2.7×10^5 cpm/ μg であった。標識蛋白質を、非標識の抗真菌蛋白質で希釈して 3.5×10^5 cpm/ μg / $10 \mu\text{l}$ として、この $10 \mu\text{l}$ を蒸留水中に懸濁したC. アルビカンスとエッペンドルフチューブ中でインキュベートした後、遠心上清を除いてγ-カウンターで放射活性を測定した。抗真菌蛋白質がチューブ壁についた分を知るために細胞マイナスで同じ操作を行い、その値を差し引いて細胞との結合量とした。インプットの約半分の活性が壁に付着していた。

抗真菌蛋白質水溶液 $30 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$

— Na ^{125}I $5 \mu\text{l}$ (Amersham, $3.4 \text{ GBq}/\text{ml}$)

— クロラミンT溶液 $50 \mu\text{l}$ ($1 \text{ mg}/\text{ml}$ 0.5M リン

酸緩衝液, pH 7.5)

混合、1分間室温放置

停止液 100 μ l (2 mg/ml NaHSO₃)

2 M NaI 10 μ l

ゲルろ過 (セファデックス G-15, キャリヤーとして終濃度 0.2% BSA を加えておいた)

γ -カウンターによる測定、酢酸尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動、オートラジオグラフィーにより放射活性、標識の確認を行った。

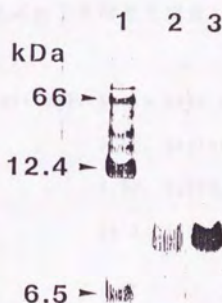


Fig. 24 標識蛋白質の酢酸尿素ポリアクリルアミド電気泳動像とオートラジオグラフィー。レーン1、分子量マーカー；レーン2、抗真菌蛋白質のCBB染色像；レーン3、レーン2のラジオオートグラフィー。

13. 抗細菌アッセイ

Difco laboratories社製antibiotic medium 3中で前培養し、同じく希釈した大腸菌K12-594株及び黄色葡萄球菌FDA109Pを用いた。650nmの濁度を0.021に合わせた菌液70 μ lをV底96穴プレートに入れ、抗真菌蛋白質を加えて100 μ lとし、2時間培養した後濁度を測定した。

抗真菌蛋白質とザルコトキシニンIAの共同効果は、同じ前培養液70 μ lにザルコトキシニンIAのみ濃度を変えて加えたものと、そこに抗真菌蛋白質を50 μ g/mlを併せて用意し、その培養結果を比較した。

Antibiotic medium3; bacto beef extract 1.5g, yeast extract
1.5g, peptone 5g, dextrose 1g, NaCl
3.5g, K_2HPO_4 3.68g, KH_2PO_4 1.32g, DDW
up to 1000ml

参考文献

(1) 和文参考文献

- 標準実験法 第6版 (1983) 東京大学薬学部微生物薬品化学教室編
- DNA標準実験法 (1988) 東京大学薬学部微生物薬品化学教室編
- 岡田雅之 学位論文 (1985) 東京大学薬学部
- 安藤敬一 学位論文 (1988) 東京大学薬学部
- 松山研治 学位論文 (1990) 東京大学薬学部
- 金井昭夫 学位論文 (1990) 東京大学薬学部
- 村松正実 編 実験医学 (1987) Vol. 5, No. 11, バイオテクノロジー実験法シリーズ 遺伝子工学総集編 羊土社
- 芦田正明 化学と生物 Vol. 26, 425-435
- 徳永文穂 岩永貞昭 代謝 (1989) Vol. 25, No. 5, 429-439
- 泉美治 中川八郎 三輪谷俊夫 編 生物化学実験の手引き 2, タンパク質の分離・分析法 化学同人
- 同 生物化学実験の手引き 3, 核酸の分離・分析法
- 田村善蔵 由岐英剛 編 生化学分析法 南江堂
- Fallon, R. H. 編 大沢利昭 監訳 生化学実験法9, 高速液体クロマトグラフィー 東京化学同人
- 江川朝生 山口英世 内田勝久 平谷民雄 山本 容正 岩田和夫
(1977) Japan. J. Med. Mycol. Vol. 18, No. 1,
65-73
- 江川朝生 山口英世 岩田和夫 (1978) Japan. J. Med.

Mycol. Vol.19, No. 4, 303-315
同 (1979) Japan. J. Med. Mycol. Vol.20, No.1,
20-30

(2) 英文参考文献

- Ando, K., Okada, M., and Natori, S. (1987) Biochemistry 26,
226-230
- Ando, k., and Natori, S. (1987) J. Biochem. 103, 735-739
- Ando, K., and Natori, S. (1988) Biochemistry 27, 1715-1721
- Baba, K., Okada, M., Kawano, T., Komano, H., and Natori, S.
(1987) J. Biochem. 102, 69-74
- Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C.,
Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Barkholt, V., and Apel, K.
(1988) EMBO J. 7, 1559-1565
- Boyer, H. W., and Roulland-Dussois (1969) J. Mol. Biol. 41,
459-472
- Carroll, S. F., and Martinez, R. J. (1981) Biochemistry 20,
5973-5981
- Carroll, S. F., and Martinez, R. J. (1981) Biochemistry 20,
5981-5987
- Carroll, S. F., and Martinez, R. J. (1981) Biochemistry 20,
5988-5995
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., and Tempst, P.
(1989) EMBO J. 8, 2387-2391

- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276
- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) *Adv. Enzymol.* 47, 45-148
- Fairbanks, G., Stech, T. L., and Wallach (1971) *Biochem.* 10, 2606
- Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., and Romeo, D. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18871-18874
- Gabriel, O. (1971) *Method in Enzymology* 22, 565-578
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 97-120
- Goldberg, D. A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5794-5798
- Greenwald, G. I., and Ganz, T. (1987) *Infection and Immunity* 55, 1365-1368
- Halmes and Quigley (1981) *Biochem.* 114, 193
- Hanahan, D., and Meselson, M. (1980) *Gene* 10, 63-67
- Jomori, T., Kubo, T., and Natori, S. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190, 201-206
- Jomori, T., and Natori, S., (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13318-13323
- Jomori, T., and Natori, S., (1991) *J. Biol. Chem.* submitted.
- Kanai, A., and Natori, S. (1989) *FEBS LETTERS* 258, 199-202
- Komano, H., Mizuno, D., and Natori, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2919-2924
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-

- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680
- Lathe, R. (1985) *J. Mol. Biol.* 183, 1-12
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I., and Mundy, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 1564-1573
- Lee, J. Y., Boman, A., Chuanxin, S., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, V., and Boman, H. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9159-9162
- Lehrer, R. I., Szklarek, D., and Ganz, T. (1985) *Infection and Immunity* 49, 207-211
- Lifeson, S., and Sander, C. (1979) *Nature* 282, 109-111
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Matuyama, K., and Natori, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17112-17116
- Matuyama, K., and Natori, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17117-17121
- Matuyama, K., and Natori, S. (1990) *J. Biochem.* 108, 128-132
- Meinkoth, J., and Wahl, G. (1984) *Anal. Biochem.* 128, 393-397
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yosikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., and Shimonisi, Y. (1989) *J. Biochem.* 106, 663-668
- Morvissey, J.H. (1981) *Anal. Biochem.* 117, 307-310
- Nakajima, Y., Qu, X. -M., and Natori, S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1665-1669

- Nakamura, t., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta ,T.,
and Iwanaga, F. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16709-16713
- Oaklay, B. R. (1980) Anal. Biochem. 105, 361-363
- Okayama, H., and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 161-170
- Okada, M., and Natori, S. (1983) Biochem. J. 211, 727-734
- Okada, M., and Natori, S. (1984) Biochem. J. 222, 119-124
- Okada, M., and Natori, S. (1985) Biochem. J. 229, 453-458
- Okada, M., and Natori, S. (1985) J. Biol. Chem. 260, 7174-7177
- Palham, H. (1985) Trends Genet. 1, 31-34
- Podell, D. N., and Abraham, G.N. (1978) Biochem. Biophys. Res.
Com. 81, 176-185
- Pollock, J. J., Denepitiya, L., Mackay, B. J., and Iacono, V.
J. (1984) Infection and Immunity 44, 702-707
- Raj, P. A., Edgerton, M., and Levine, M. (1990) J. Biol. Chem.
265, 3898-3905
- Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C. P. (1990) J. Gen.Micro-
biol. 136, 1771-1778
- Saito, H., Suzuki, T., Ueno, K., Kubo ,T., and Natori ,S. (1989)
Biochem. 28, 1749-1755
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular
cloning 2nd ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F., Nickien, S., and Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Schildkraft, C., and Lifson, S., (1965) Biopolymers 3, 195-208

- Schulz, G. E., Barry, C. D., Freidman, Chou, P. Y., Fasman, G. D., Finkelstein, A. V., Lim, V. I., Ptitsyn, O. B., Kabat, E. A., Wu, T. T., Levitt, M., Robson, B., and Nagano, M. (1974) *Nature* 250, 140
- Selsted, M. E., and Harwig, S. S. L. (1987) *Infection and Immunity* 55, 2281-2286
- Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., and Lehrer, R. I. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14485-14489
- Shigenaga, T., Muta, T., Toh, Y., Tokunaga, F., and Iwanaga, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 21350-21354
- Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
- Suggs, S. V., Wallance, R. B., Hirose, T., Kawasima, E. H., and Itakura, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6613-6617
- Takahasi, H., Komano, H., and Natori, S., (1986) *J. Insect Physiol.* 32, 771-779
- Thomas, C. A. Jr., and Dancis, B. M. (1973) *J. Mol. Biol.* 77, 43-55
- Walker, J. M. (1984) *Method in Molecular Biology Vol. 1, Proteins*
- Wilimzig, M. (1985) *Trends Genet.* 1, 158

謝 辞

本研究を行うに当たって始終変わらぬ御指導を賜り、また科学を行う者の姿勢を身を持って御示し下さいました 東京大学薬学部微生物薬品化学教室 名取俊二教授に深く感謝の意を表します。

本研究に対して適切な御助言、御批判を頂きました 東京大学薬学部微生物薬品化学教室 関水和久助教授、駒野宏人助手、久保健雄助手、倉田祥一郎助手に深く感謝の意を表します。

また研究の進め方、考え方について快く議論に応じて頂きました 三和化学研究所(株) 城森孝人博士、東レ(株) 山田勝成氏、シオノギ製薬(株) 野村和秀氏、ペンシルバニア大学ウィスター研究所 堀越信夫氏、アメリカ合衆国国立衛生研究所 金井昭夫博士を始め、微生物薬品化学教室の教室員の方々に深く感謝致します。

最後になりましたが、抗真菌蛋白質の構造解析に当たって、機器分析を引き受けて下さいました 東京大学薬学部薬品物理学教室 荒田洋治教授、嶋田一夫助教授に深く感謝の意を表します。

