

ミツバチの抗菌的防御における アピダエシンの役割

Z. Gliński, J. Jarosz

昆虫の体腔内に外部侵入者が入ると、細胞による活動、リゾチームの高合成 (Mohrig and Messner, 1968), 誘導免疫タンパクの合成と放出 (Boman and Hultmark, 1987), フェノール酸化酵素前駆体機構の活性化 (Soderhall and Smith, 1986) といった反応が起こる。昆虫の免疫は外傷から、あるいは本来微生物の侵入を防いでいる消化管、外皮そして気管などの器官を微生物が通り抜け、体内に侵入したときに誘導される。もし、腐生植物菌のような微生物が体液内に入ったとしても、血球細胞による食作用またはノジュール形成が起こる。しかし、この反応は血液循環の影響で速効性がない。だが、昆虫は非細胞性免疫 (cell-free insect immunity) 応答を誘導できる。誘導される反応のタイプは、昆虫の変態性 (完全変態または不完全変態) や昆虫の種類によって異なる。非細胞性の昆虫免疫は、免疫抗菌性タンパクの合成に特徴づけられる (Chadwick and Aston, 1986)。血球による自己-非自己認識 (Lackie, 1981) は、体液レクチンやフェノール酸化酵素前駆体カスケードの活性化の間に生成する因子などが関係しているように思われる (Sharon, 1989)。

昆虫免疫反応の主な働きには3つの相互作用段階がある。まずは誘導段階で、異物の自己-非自己の識別、次は仲介段階で、脂肪体にある受容細胞集団への刺激、誘導タンパクの生合成、溶解性仲介物質の分泌、仲介物質と受容細胞との相互作用である。免疫反応のエフェクター段階では、活性エフェクター細胞や抗菌性エフェクター物質が生成し、感染因子が排除されることがわかっている (Gliński and Jarosz,

1990a)。昆虫の防御免疫誘導の特徴は、チョウ (鱗翅) 目やハチ (膜翅) 目で調べられている。すなわち防御免疫は数時間で誘導され72~96時間位持続し、種特異性、還元性がない。また分子量の小さな抗菌誘導性タンパク質に依存しており、関与する細胞の存在も知られている。

昆虫の抗菌性免疫タンパクとしての アピダエシン

体液性免疫タンパクは昆虫が感染や外傷を負ったり、細菌を体液中に接種することによって誘導されるタンパク質の一群であると定義され、抗菌性ペプチドとタンパクおよび免疫反応における別の機能を持つタンパクがこれに含まれる。生化学的に特性が明らかになっている昆虫免疫タンパクは、セクロピン cecropins やセクロピン類 cecropin-like substances (Boman and Hultmark, 1987), 昆虫ディフェンシン insect defensins (Matsuyama and Natori, 1990), アタシン attacins やアタシン類タンパク質 attacin-like proteins (Engstrom et al., 1984; Hultmark et al., 1983), プロリン含有ペプチド (Casteels et al., 1988; 1989; 1990; Casteels-Josson et al., 1993), リゾチーム lysozymes (Chadwick, 1970; Powing and Dawidson, 1973; Jarosz, 1977; Jolles et al., 1979), レクチン lectins (Mennick et al., 1986; Olafsen, 1986), そしてヘモリン hemolin (Anderson and Steiner, 1987) などがある。アピダエシン apidaecins (図1) とアバエシン abaecin (図2) はプロリン含有蜂ペプチドグループに属する。

セクロピンは分子量が約4kDaの強塩基性誘

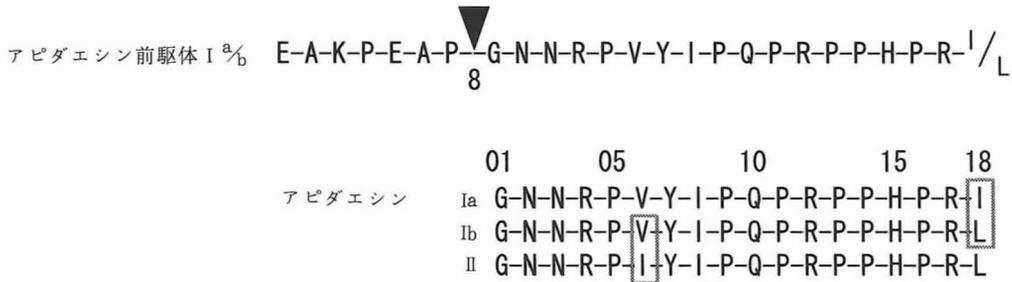


図 I セイヨウミツバチのアピダエシン Ia と Ib の前駆体のアミノ酸配列とアピダエシン Ia, Ib と II のアミノ酸配列。四角い囲いはアミノ酸残基の異なる部分。矢印は完成した時のアピダエシンのアミノ末端アミノ酸の略号 (図 2, 3 と共通)

A アラニン	C シスチン	D アスパラギン酸	E グルタミン酸	F フェニルアラニン
G グリシン	H ヒスチジン	I イソロイシン	K リジン	L ロイシン
M メチオニン	N アスパラギン	P プロリン	Q グルタミン	R アルギニン
S セリン	T スレオニン	V バリン	W トリプトファン	

導タンパクのグループである。アミノ酸配列の特徴から 6 種 (主要な 3 つ A, B, D と、稀に見られる 3 種の C, E, F) に分けられている (Boman and Hultmark, 1987)。チョウ目やハエ (双翅) 目からのセクロピンは、マイクロモル (μM) レベルの濃度で多くの微生物、グラム陽性およびグラム陰性の両方の細菌を殺すことができる。セクロピンは細菌の細胞膜の均整さを乱して、カルシウムイオンの漏れを生じさせ、ATP の合成を妨げる (Okada and Natori, 1985)。目標は細菌の細胞膜であるが、他の一般的な膜の破壊に作用しないとは言い切れない。昆虫ディフェンシンは、シスチン含有の塩基性抗菌ペプチド類で、他にホルミシン phormicin やザーペシン sapecin, ローヤリシン royalisin (図 3) (Fujiwara et al., 1990) が同グループに属し、いずれも分子量は 4kDa である。これらの抗菌スペクトルはグラム陰性菌に強い抗菌性を示すハエ目昆虫のセクロピンとは相補的でグラム陽性菌への抗菌性が際だって高い。ディフェンシン細菌の細胞膜を膜したはリポゾームに浸透することが確かめられているが、細菌を殺すためにはかなり高い濃度が必要である (Matsuyama and Natori, 1990)。

アタシンとアタシン類 (ザルコトキシン II sarcotoxin II, ハエ目のディプテリシン diptericsin, コウチュウ (鞘翅) 目のコレオプ

テリシン coleoptericin) はグラム陰性、特に大腸菌に対して強い活性を示す。アタシンの分子量は 23kDa であり、ザルコトキシンは 28 kDa, コレオプテリシンは 8kDa である。アタシンは、セクロピンとリゾチームの活性を促進すると言われている (Engstrom et al., 1984)。

昆虫リゾチームは多くの昆虫や他の無脊椎動物の体液中に見られる普遍的なタンパク質である。体液リゾチームの分子量は 14kDa の塩基性タンパクで、卵白リゾチーム (C タイプ) と同じ特性を持つ。リゾチームは感染した昆虫の体内で急激に増加する傾向があり、防御免疫や抗菌活性より持続性がある (Chadwick, 1970)。昆虫においてリゾチームは免疫反応の重要な部分を占めていると考えられる。リゾチームの活性はグラム陽性菌の細胞壁のみに制限される。リゾチーム活性による細菌の総合的破壊は、セクロピンとの相助作用によって起こる。すなわち、セクロピンの作用の後に細菌細胞のペプチドグリカン層を酵素的に破壊するのである。

プロリン含有抗菌性蜂ペプチドとしてのアピダエシンとアバエシン

チョウ目やハチ目の非細胞性誘導免疫は、昆虫が生物的と非生物的因子と接触してからの免

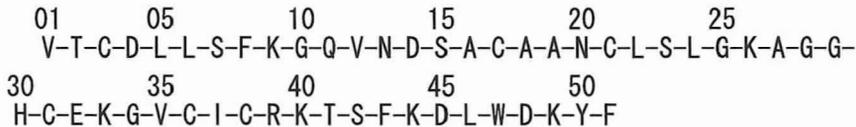


図2 セイヨウミツバチのアピダエシンのアミノ酸配列 (アミノ酸の略号は図1を参照)

疫抗菌性ペプチドとタンパクの急速な新規合成を特徴とする (Dunn, 1986; Boman and Hultmark, 1987). 一般的に抗原によって, 昆虫のタンパク合成の中心的な場所である脂肪体で特定の mRNA の合成が誘導される. アラキドン酸のエイコサン代謝産物が細菌感染シグナルを昆虫の免疫を構成する細胞および体液反応の複合作用に変換するのを仲介しているとする仮説は, Stanley-Samuelson ら (1991) の実験結果から強く支持されている.

アピダエシンはミツバチの細菌に対する体液防御の主要構成成分であり, プロリンを含有するペプチドグループに属し, ミツバチの成虫と, さほど多くはないが終令幼虫でも誘導される抗菌活性物質である. 抗菌活性はミツバチの体内に致死量に近い生きた大腸菌を接種すると約8時間で体腔内の体液中に現れる. さらに, インディアンインクやラテックスビーズでも細菌類と同じようにアピダエシンを誘導できる. アピダエシンにはペプチド鎖が18アミノ酸残基からなる, 3つのよく似た構造体 (それぞれアピダエシン I a, I b, II) があり, 分子量は約2kDaである. アピダエシン I a と I b の比率は1:20であり, 体液中に含まれている3種のアピダエシンの総合濃度は50nM (100 μ) / mlである. これら陽イオンペプチドは, 低pH (2.0), 高温 (100 $^{\circ}$ C) に対して非常に安定である. この安定性は, 6つのプロリン基が含まれていることによる.

3種のアピダエシンは, いずれもほんの少数ずつアミノ酸残基が異なっているが, ほとんど

同じ構造をしている (図1). アピダエシン I と II ではアミノ酸残基の6番目の部分が違っている. アピダエシン I a と I b の分子中ではバリンが存在しているが, アピダエシン II ではその部分がイソロイシンに入れ代わっている. 一方, アピダエシン I a と I b を見ると18番目のアミノ酸残基が違っていて, アピダエシン I a のイソロイシンがアピダエシン I b ではロイシンに代わっている.

ミツバチの成虫で見られる生理活性ペプチド (アピダエシン I a, I b, II) の前駆物質であるアピダエシン前駆体 proapidaecins は, 不活性な状態で幼虫の体液中に存在している. アピダエシン前駆体から活性を持つペプチドへの変換はプロリンかアラニンいずれかを末端とするジペプチドの段階的な解離を経て進む. アピダエシン前駆体の分解が単独で行われるのか, またさらにアピダエシン前駆体自体の前駆体物質 pre-proapidaecin が加水分解されてアピダエシン前駆体が生成される過程が先行しているのかは確かめられていない (Casteels et al., 1989). セクロピン類やディプテリシンあるいはメリチン前駆体同様にアピダエシン前駆体は生成されるに際してアミドペプチターゼを必要とする.

このようにアピダエシンは単一の前駆体となるタンパク質の変成によって生成される (Casteels-Josson et al., 1993). ある前駆体由来するペプチドの数と性質は様々である. これはアピダエシンの多重遺伝子群が存在するためである. この多重アピダエシン遺伝子は, ミ



図3 セイヨウミツバチのローヤリシンのアミノ酸配列 (アミノ酸の略号は図1を参照)

表1 アピダエシン I a, I b および II の抗菌活性

細菌名	最小阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) アピダエシン同族体		
	I a	I b	II
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (根頭がんしゅ病菌)	0.2	0.2	0.2
<i>Erwinia salicis</i> (軟腐病菌)	0.02	0.02	0.02
<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	0.1	0.1	0.2
<i>Pseudomonas syringae</i> (縮葉細菌病, 黒節病菌)	0.2	0.1	0.1
<i>Rhizobium meliloti</i> (根粒菌)	0.1	0.02	0.02
<i>Salmonella typhimurium</i> (サルモネラ菌)	0.1	0.1	0.1
<i>Serratia marcescens</i> (霊菌)	>200.0	>200.0	>200.0
<i>Shigella flexneri</i> (赤痢菌)	0.1	0.1	0.1
<i>Corynebacterium insidiosum</i> (アルファルファ萎凋病菌)	50.0	50.0	100.0
<i>Bacillus alvei</i> (ヨーロッパ腐蛆病菌)	>200.0	>200.0	>200.0
<i>Bacillus megaterium</i> (巨大菌)	150.0	100.0	100.0
<i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌)	>200.0	>200.0	>200.0
<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i> (卒倒菌)	>200.0	>200.0	>200.0

ツバチのゲノムの 15kb 領域に集中している。感染に続いて、転写の時期と量に関して異なる賦活化がこれらの遺伝子に働くのであろう。アピダエシン多重遺伝子族とその前駆体の可変多重ペプチド形質は遺伝子増幅と再配列に由来している。ミツバチの体液中のアピダエシンの濃度のピーク ($360\mu\text{g}/\text{ml}$) は感染後 36 時間以内で、続く 3~4 日のうちに徐々に低下する。ペプチドの量は日齢やストレスのようなミツバチの生理的条件によって決まる。

現在知られている 3 つのアピダエシン同族体は、グラム陰性菌に対して有効である。人間や動物の腸の病原菌であるサルモネラ菌やシゲラ菌 (赤痢菌) などはアピダエシン感受性であるのに対して、昆虫の病原菌である *Bacillus thuringiensis* (卒倒菌), *Bacillus alvei* (ヨーロッパ腐蛆病菌), *Pseudomonas aeruginosa* (緑脳菌), *Serratia marcescens* (霊菌) は抵抗性を示す (表 1)。さらに、いくつかの植物病原菌たとえば *Pseudomonas syringae* (縮葉細菌病, 黒節病菌), *Erwinia salicis* (軟腐病菌) や、植物共生菌の *Rhizobium meliloti* (根粒菌), *Agrobacterium tumefaciens* (根頭がんしゅ病菌) に対しても強い活性を示す (Casteels et al., 1989; Glinski and Jarosz, 1992)。アピダエシン類は $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でグラム陰性菌の増殖を十分に抑制することができる。イースト (酵母) 菌やカビ類はアピダエシンの毒性に対

して完全に抵抗性である。

アピダエシンの活性はどちらかといえば静菌作用といえる。これらの免疫ペプチドは、溶解作用によって急激に細菌を殺すのではなく、細胞の伸長を妨げている。セクロピンに対するのと同様に、真核細胞は全般にアピダエシンの活性に対して抵抗性である。

アピダエシンが腸内細菌や植物病原菌、そして植物共生菌に対しても抗菌活性を示すことから、ミツバチは、彼らが生活している環境にごく普通に存在している微生物の攻撃から、直ちに身を守るため防御機構を発達させたと考えられる。幼虫の体液に含まれている完成したアピダエシンの量や蜂児の体液に存在する不活性な前駆体の量はかなり低いが、幼虫と成虫の免疫機構は同じである。ミツバチの幼虫は細菌の侵入が最も抑えられた環境 (有蓋蜂児, 巣房が集まった巣) で育つので、成虫以前のステージで病原菌に感染する恐れはまず少ない。また病原菌の蜂児への感染は、ローヤルゼリー (ローヤリシンを含む (Fujiwara et al., 1990)) やハチミツ, 花蜜や花粉 (Burgett, 1978) の抗菌活性の作用によっても減少する。さらに働きバチは食料を前胃 (にある前胃弁) で濾過し、無菌的になった餌を幼虫に与える。幼虫は体液中のリゾチムを増加させたり、血球作用によって細菌の感染に対応している。もちろん一方では、花蜜や花粉, 水などを集めるミツバチの成

虫は、水源や植物体を汚染している人間の病原菌や植物病原菌および植物共生細菌に常にさらされている。

ミツバチの体液中で感染後に誘導される、もう一つの抗菌タンパクであるアバエシンは、分子量が4kDaでプロリン含有のペプチドであり、グラム陽性菌および陰性菌に中程度の成長阻害活性を示す(Casteels et al., 1990)。分子中には10個のプロリンが含有されており(全体の33%)、酸残基やシスチンは含まれていない。アバエシンのアミノ酸配列にはアピダエシンIa, Ib, IIのはじめの18アミノ酸が存在している(図2)。アバエシンの抗菌作用は非生理学的な条件下で、イオン強度の低い場合にのみ確かめられているが、これもまた体液中の他要因の共同作用を受けている可能性がある。アバエシンの活性は静菌的ではあるが、グラム陽性菌と陰性菌に対して同等の活性を示す。アピダエシンに較べて *Agrobacterium tumefaciens* (根頭がんしゅ病菌), *Erwinia salicis* (軟腐病菌), 大腸菌類に対する活性は、いずれも200倍ほど低い。アバエシンはミツバチが病原菌に感染すると誘導されるが、抗菌性防御に寄与しているかはまだはっきりしない。

まとめ

ミツバチは外来の材料と抗菌性免疫ペプチドのような内発的な物質を利用して、高度な総合的防御機構を進化させてきたようである(図4)。外因的戦略には、狭食性寄生ダニであるミツバチヘギイタダニに対する防衛行動、また一般的な衛生行動があげられる(Ruttner and Hanel, 1992)。解剖学および生理学的な防御バリア、体腔内の抗感染血球や体液性の免疫応答などがもう一方の機構をなす(Glinski and Jarosz, 1990b, 1994)。これらすべての微生物防御機構の効果はいずれも重要である。

アピダエシンやアバエシンは、ミツバチの非細胞性抗菌免疫が進歩した形であると表現することができる。この二つはミツバチの生活している生態学的ニッチェに遍在している植物病原生物や腸内細菌などを排除するためのセイヨウミツバチの適応における最高のものであるともいえる。高度に発達した社会構造もミツバチ特有の防御反応を創り出している。社会生活、巣の形態、食物の化学的性質、ハチミツ、花粉、あるいは花蜜の抗菌システムは、巣箱や花粉や蜜の貯蔵場所を汚染する可能性のある微生物の数を減らし、コロニーへの微生物の感染を防い

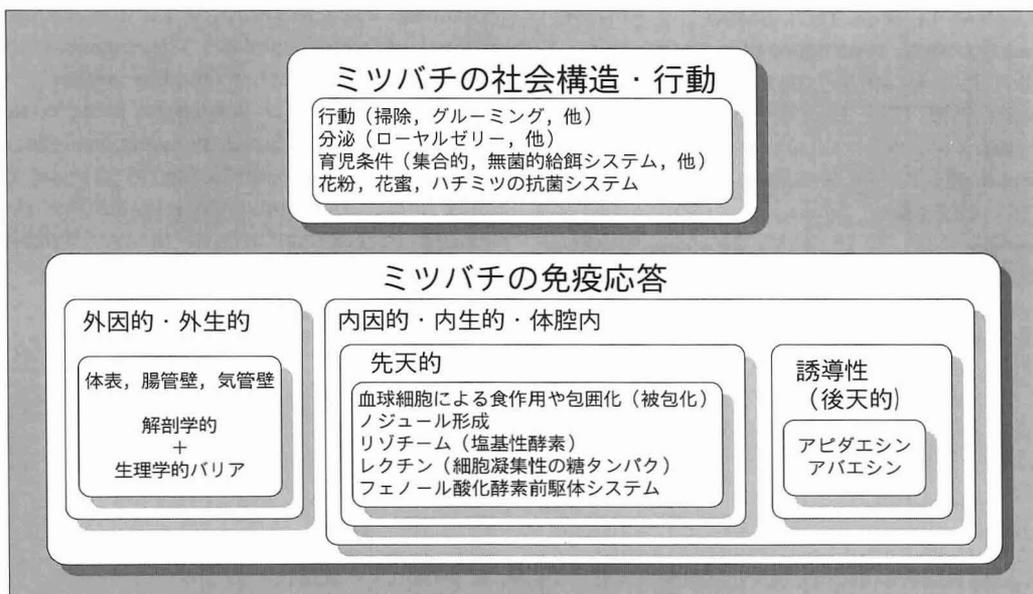


図4 セイヨウミツバチの抗菌性戦略

でいる (Glinski and Jarosz, 1994).

(著者の住所は下記参照) (翻訳 吉垣 茂)

主な引用文献

- Andersson, K. and H. Steiner. 1987. *Insect Biochem.* 17: 133-140.
- Boma, H. G. and D. Hultmark. 1987. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 103-126.
- Burgett, D.M. 1978. IN *Honey Bee Pests, Predators and Diseases* (ed. by R.A. Morse). p. 297-308.
- Casteels, P.R. et al. 1989. *EMBOJ.* 8: 2387-2391.
- Casteels, P.R. et al. 1990. *Eur. J. Biochem.* 187: 381-386.
- Casteels, P.R. et al. 1988. IN *European Research on Varroa Control* (ed. by R. Cavalloro). p. 105.
- Casteels, P.R. et al. 1993. *EMBO J.* 12: 1569-1578.
- Chadwick, J. 1970. *J Invertebr. Pathol.* 15: 455-456.
- Dunn P.E. 1986. *Ann. REv. Entomol.* 31: 321-339.
- Engstrom, P., et al. 1984. *EMBO J.* 3: 3347-3351.
- Fujiwara, S., et al. 1990. 265: 11333-11337.
- Glinski, Z. and J. Jarosz. 1990a. *Post. Mikrobiol.* 29: 233-251.
- Glinski, Z. and J. Jarosz. 1990b. *Post. Mikrobiol.* 29: 59-75.
- Glinski, Z. and J. Jarosz. 1994. *Apiacta* 29: 107-120.
- Hultmark, D., et al. 1983. *EMBO J.* 2: 571-576.
- Jarosz, J. 1977. *Post. Mikrobiol.* 16: 87-96.
- Jolles, J., et al. 1979. *J. Mol. Evol.* 14: 267-271.
- Lackie, A.M. 1981. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 191-204.
- Matsuyama, K. and S. Natori. 1990. *J. Biochem.* 108: 128-132.
- Minnick, M.F., et al. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 729-735.
- Mohrig, W. and B. Messner. 1968. *Biol. Zentralbl.* 87: 439-470.
- Okada, M. and S. Natori. 1985. *Biochem. J.* 229: 453-458.
- Powing, R.T.F. and W.J. Davidson. 1973. *Com. Biochem. Physiol.* 45B: 669-681.
- Ruttner, F. and H. Hanel. 1992. *Apidologie* 23: 173-187.
- Sharon, N. and H. Lis. 1989. *Science* 246: 227-234.
- Soderhal, K. and V.J. Smith. 1986. IN *Humoral and Cellular Immunity in Arthropods* (ed. by A.P. Gupta). p. 251.
- Stanley-Samuels, D., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1064-1068.
- GLIŃSKI, Z. and J. JAROSZ*. The role of apidaecins in antibacterial defenses of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Honeybee Science* 16 (3): 105-110. Faculty of Veterinary Medicine, Department of Bee Diseases, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland; *Department of Insect Pathology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland.

The honeybee responds to bacterial infection of body cavity by synthesis of antibacterial proline-rich immune peptides, the apidaecins and abaecin. Apidaecins represent inducible in adults and to a lower extent in last instar larvae closely-related basic antibacterial peptides of activity directed against enteric and plant-associated bacteria. The bee workers collecting nectar, pollen and water are exposed potentially to these groups of bacteria polluting plants and water sources. The enhanced efficiency of the honeybee immune response to infection generated by apidaecins protects well the bee hemocoel invaded by saprophytic bacteria. However, the contribution of abaecin, another proline-rich inducible immune bee peptide, to antibacterial defense of *Apis mellifera* remains still unclear.