

# カイコをモデル宿主とする自然免疫・感染症研究の最前線

誌名	蚕糸・昆虫バイオテック = Sanshi-konchu biotec
ISSN	18810551
著者名	石井,健一 浜本,洋 関水,和久
発行元	日本蚕糸学会
巻/号	84巻3号
掲載ページ	p. 173-179
発行年月	2015年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 特集「昆虫の生体防御メカニズムのトピックス」

# カイコをモデル宿主とする 自然免疫・感染症研究の最前線

## —昆虫サイトカイン Paralytic peptide の機能解明を中心に—

石井 健一<sup>1</sup>・浜本 洋<sup>2</sup>・関水 和久<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>The Salk Institute for Biological Studies <sup>2</sup>東京大学大学院薬学系研究科

### 1. はじめに

生物は、環境中の病原性微生物による感染の危険に常時晒されている。重篤な感染症は、宿主となる生物に対し、活動量の低下、恒常性の破綻、または死をもたらす。従って、宿主生物が健康な状態を維持しながら生存する上で、感染症から身を守るための「免疫系」は必要不可欠である。動物の免疫系は、「自然免疫系」と「獲得免疫系」に大別される。そのうち前者は、感染の初期に働き、より特異性の高い種々の応答を順次誘導することにより、病原性微生物の活動を早期に抑え込む。このような自然免疫系の仕組みを解明することは、感染現象を理解し、それを克服する上で重要であると考えられる。

昆虫は、獲得免疫系を担う「抗体」を産生する器官をもたず、自然免疫系に依存している。この自然免疫系の構成要素は、昆虫から哺乳動物まで多くの生物種間で保存されている。これらを念頭に、我々は、昆虫であるカイコをモデル宿主とする自然免疫・感染症研究を通じて、ヒトの感染症に対する新しい創薬基盤の構築を目指している。本稿では、これまでに我々が明らかにしてきたカイコの自然免疫制御機構を中心に、感染現象を多面的にとらえた最新の知見を紹介したい。

### 2. 昆虫の自然免疫系とサイトカイン

昆虫の自然免疫研究は、遡ること四半世紀以上前、ニ

クバエ *Sarcophaga* (Natori, *et al.*, 1999, Okada and Natori, 1983, 1985), 及び大型の鱗翅目昆虫である *Cecropia* (Boman, *et al.*, 1991, Boman, *et al.*, 1974, Faye, *et al.*, 1975) の体液 (hemolymph) に含まれる「抗菌ペプチド」の発見を契機に大きく発展した。抗菌ペプチドは、ヒトを含む幅広い生物種で多数見出され、液性免疫因子としての殺菌効果だけでなく、細菌内毒素の中和 (Okemoto, *et al.*, 2002) やガン細胞の殺傷 (Akiyama, *et al.*, 2000, Akiyama and Natori, 2003) といった多様な生理活性をもつことが知られるようになった。1990年代に入り、ショウジョウバエにおいてそれまで胚発生時の背腹軸形成に必要であると報告されていた Toll 受容体 (Anderson, *et al.*, 1985a, Anderson, *et al.*, 1985b)) が、細菌・真菌感染による抗菌ペプチド産生を制御することが示される (Lemaitre, *et al.*, 1996) と、哺乳動物における Toll 様受容体の報告 (Hoshino, *et al.*, 1999, Poltorak, *et al.*, 1998, Qureshi, *et al.*, 1999, Yang, *et al.*, 1998) が相次ぎ、上述した自然免疫系の高度な保存性が広く提唱されるに至った。さらに、昆虫の体液中に存在する血球細胞 (hemocytes) は、細胞性免疫応答 (包囲または貪食作用) により異物を排除する (Lavigne and Strand, 2002)。これら個々の自然免疫応答の活性化機構については、90年代後半から2000年前半にかけて、ショウジョウバエ、ゴミムシダマシ、及びカイコ等の昆虫を用いて盛んに研究され、液性・細胞性免疫の各経路に関わる分子が多数同定されてきた (Hoffmann and Reichhart, 2002, Lemaitre, *et al.*, 1995, Park, *et al.*, 2010, Tanaka, *et al.*, 2008)。

宿主生物が効率的に病原性微生物を排除する上で、これらの異なる免疫応答の協調的な誘導が重要であると考えられる。哺乳動物においては、「サイトカイン」と呼

\*〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1  
東京大学大学院薬学系研究科 微生物薬品化学教室  
E-mail: sekimizu@mol.f.u-tokyo.ac.jp  
Tel: 03-5841-4820

ばれる一群の分子が免疫細胞間の情報伝達を担っている。さらに、哺乳動物では、「サイトカインネットワーク」と呼ばれる情報網が形成され、多岐にわたる免疫応答間の複雑な制御を実現している。自然免疫だけに依存する昆虫において、サイトカイン様分子を同定しその働きを解明することは、自然免疫系における情報伝達の根幹の理解に繋がると期待される。しかし、2000年代後半まで、「昆虫サイトカイン」の報告例は殆どなく、昆虫において複数の自然免疫応答がどのように統合されているか、不明な点が多く残されていた。

### 3. 昆虫サイトカイン Paralytic peptide による自然免疫制御機構

#### 3.1. カイコにおける微生物感染と Paralytic peptide 活性化反応の関係

後述のように、我々はカイコを感染モデル宿主として、ヒトに対する病原性微生物による病態ならびに抗生物質の治療効果に関する解析を進めていた (Hamamoto, *et al.*, 2004, Kaito, *et al.*, 2005)。その過程で我々は、高濃度の細菌ならびに真菌をカイコ幼虫の体液中に注射すると、全身の筋肉が収縮し、カイコが麻痺する現象を見出していた。この細菌・真菌注射によるカイコの麻痺は、神経伝達物質を直接投与した場合にみられる迅速な筋肉収縮 (Sekimizu, *et al.*, 2005) とは異なる一方で、カイコの paralytic peptide (PP, 麻痺ペプチド) により誘導される緩やかな、5-10 分間で進行する麻痺 (Ha, *et al.*, 1999) と類似していた。この PP は元来、カイコの体液を別のカイコに注射した際にみられる麻痺活性を指標として精製された生理因子である (Ha, *et al.*, 1999, Skinner, *et al.*, 1991)。PP は、不活性な前駆体として体液中に存在し、何らかの刺激に応じてタンパク質切断を受けると、23 アミノ酸からなる活性型ペプチドを生じる (Kamimura, *et al.*, 2001)。また PP は、血球細胞の伸展や筋肉の収縮といった生理作用を示す (Nakahara, *et al.*, 2003) ことから、カイコの生体防御に寄与すると推測されてきたが、その生理的意義は不明であった。

我々は、上述の微生物感染により誘導される、カイコの筋肉収縮を伴う麻痺に、PP の活性化反応が関与するとの仮説を立て、その検証に着手した。初めに、筋肉収縮活性を定量的に解析するため、カイコ断頭筋肉標本に重しを吊るし、試料注射前後の体長変化を測定する実験系を構築した (図 1A)。この系を用いて、細菌と真菌の細胞壁に含まれる糖鎖構造である peptidoglycan (PG) または beta-glucan (BG) が、カイコの筋肉収縮を用量依存的に誘導することが示された。次に我々は、この反

応における活性型 PP の関与について検討した。カイコ断頭筋肉標本に対する抗 PP 抗血清 (活性型 PP の生理活性を阻害する) による前処理は、PG および BG による筋肉収縮の誘導を抑制した。また、これらの微生物由来因子を生きたカイコに体液内注射すると、その体液中で活性型 PP の産生が認められた。さらに、PG および BG による PP 活性化反応の誘導には、体液中の生きた血球細胞の存在、活性酸素種の産生、ならびにセリンプロテアーゼの働きが必要であることが、各種阻害剤による解析により判明した (Ishii, *et al.*, 2008)。これらの結果より、微生物感染により体液中で PP 活性化反応が誘導され、それにより生じた活性型 PP がカイコの筋肉収縮を引き起こすと考えられる (図 1B)。

カイコへの微生物感染により PP 活性化反応が誘導されることから、PP が免疫因子としてカイコの感染抵抗性に関わると推測された。ヒトの日和見感染症の原因となる黄色ブドウ球菌をカイコに体液内注射すると、カイコは殺傷された。一方、化学合成された活性型 PP を菌液と同時にカイコへ注射したところ、カイコの殺傷が遅延した。それに対し、抗 PP 抗血清による処理は、カイコの黄色ブドウ球菌による感染死を早めた。これらの結果より、PP 活性化反応が細菌感染に対するカイコの抵抗性発揮に寄与すると考えられる (Ishii, *et al.*, 2008)。

#### 3.2. 活性型 Paralytic peptide により誘導される液性・細胞性免疫応答

次に我々は、PP がどのような仕組みで宿主感染抵抗性に寄与するか検討した。活性型 PP を体液内注射したカイコから、主要な免疫組織である脂肪体と血球細胞を摘出し、マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、多数の機能未知遺伝子と共に、脂肪体では抗菌ペプチド、並びに血球細胞では貪食作用に関わる接着因子や細胞内シグナル因子等の免疫関連遺伝子が、活性型 PP の投与により発現上昇することが判明した (Ishii, *et al.*, 2010b)。さらに我々は、これら液性・細胞性免疫応答への PP の影響をそれぞれ検討した。活性型 PP を体液内注射したカイコの脂肪体において、一酸化窒素 (NO) 合成酵素の遺伝子発現が誘導され、セカンドメッセンジャーである NO の体液内濃度が上昇した。この NO が、ストレス応答性の細胞内シグナル経路である p38 MAP kinase の活性化を引き起こし、抗菌ペプチド産生を導くことが示唆された (Ishii, *et al.*, 2013)。NO (Foley and O'Farrell, 2003) 及び p38 MAP kinase (Shinzawa, *et al.*, 2009) は、昆虫の自然免疫に寄与することが個々に報告されていたが、NO の産生経路は特定されておら

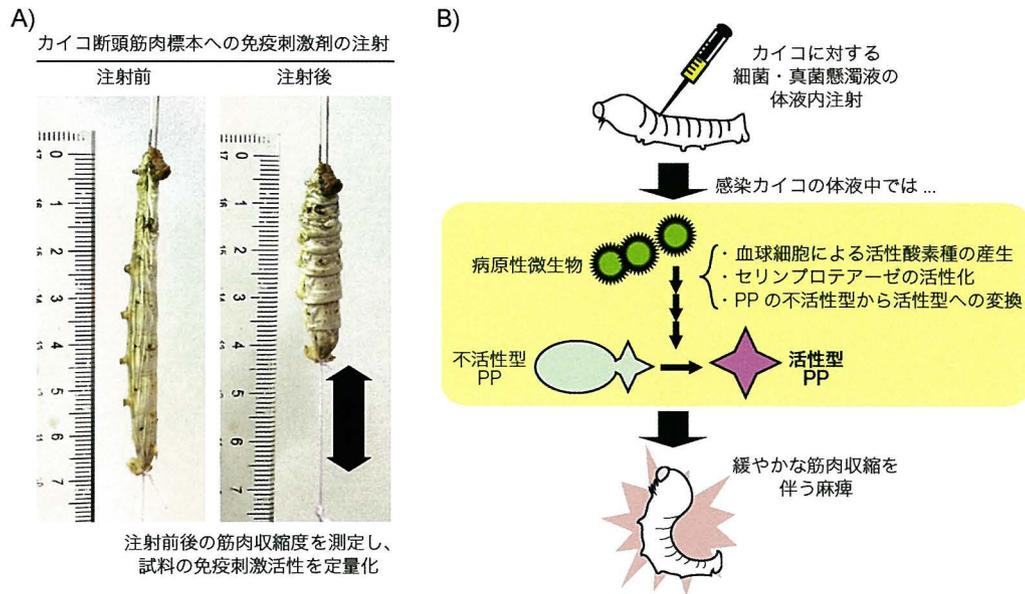


図 1. 病原性微生物により誘導されるカイコ Paralytic peptide の活性化反応

ず (Rivero, 2006), 昆虫サイトカインを介して両者が連携して液性免疫系の情報伝達を担うことは知られていなかった。また, 血球細胞に関して, *in vitro* で黄色ブドウ球菌と血球細胞を共培養したところ, PP の添加濃度に依存して細胞に取り込まれる細菌数が増大した。この血球細胞による細菌貪食能の上昇は, *in vivo* でカイコに PP を体液内注射した場合にも見られた (Ishii, *et al.*, 2010b)。これらの結果は, PP が複数の免疫組織において液性・細胞性免疫応答を活性化することにより, 宿主体内からの病原性微生物の排除が促進されることを示唆している (図 2)。このように複数の免疫応答を同時に制御しながら, 宿主の感染抵抗性に寄与する昆虫サイトカインとして, PP は初めての報告例である。

最近, カイコと近縁の鱗翅目昆虫において, PP の相同因子に関する知見が報告されている。*Spodoptera exigua* の plasmatocyte-spreading peptide (PSP) は, eicosanoid 類の産生に依存して血球細胞の伸展反応を促進する (Srikanth, *et al.*, 2011)。また, ショウジョウバエにおける PP 様因子が同定され, 抗菌ペプチド産生経路への寄与が示唆されている (Tsunami, *et al.*, 2014, Tsuzuki, *et al.*, 2012)。PP とそのホモログ因子群は, epidermal growth factor (EGF) の受容体結合領域と立体構造上の類似性を示し, 哺乳動物の EGF 受容体と交差反応する (Aizawa, *et al.*, 2002, Clark, *et al.*, 2001, Strand, *et al.*, 2000, Tada, *et al.*, 2003)。PP と相互作用する昆虫由来因子の報告がある一方で (Ohnishi, *et al.*, 2001), これらが機能的な内因性受容体として働くか, 更なる検証が待たれる。推定上の PP 受容体を初めとして, 上流で活性化反応を担うセ

リンプロテアーゼ群, 並びに下流で働く細胞内シグナル系を解明することにより, 多機能な昆虫サイトカインである PP がどのように宿主生物の感染抵抗性へ寄与するかが明らかとなるであろう。また, PP により発現変動を受ける機能未知遺伝子には, サイトカイン様因子をコードするものが複数含まれていた (Ishii, *et al.*, 2010b)。さらに, PP 遺伝子周辺のゲノム領域は, 他に 2 種のサイトカイン様遺伝子をポリシストロニックにコードすることが報告されている (Kanamori, *et al.*, 2010)。これらの PP と関連するサイトカイン様因子を詳細に解析することにより, 昆虫でのサイトカインネットワークの存在

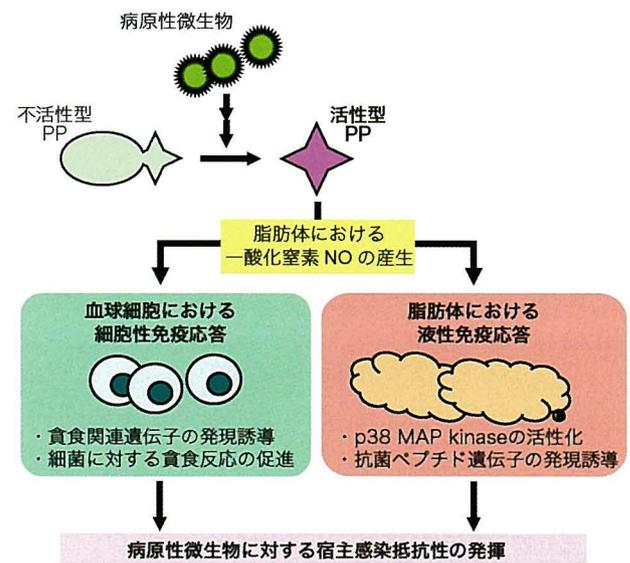


図 2. 活性型 Paralytic peptide により誘導される自然免疫応答

が示され、自然免疫系における時空間的制御の全体像が浮かび上がると期待される。

#### 4. セラチア菌による自然免疫抑制と Paralytic peptide の関係

昆虫は哺乳動物と比べて飼育コストと倫理的障壁が低いことから、多数の実験動物を必要とする感染症研究に有用であると考えられる。さらに、カイコには、体サイズが大きいため血球細胞や組織の摘出 (Nakahara, *et al.*, 2009) や注射等の薬理実験が容易であること (Hamamoto, *et al.*, 2004, Hamamoto, *et al.*, 2009), また、国内での養蚕業の歴史から飼育環境が整備され、突然変異系統の維持や遺伝子組み換え技術の開発が盛んになされていること (Kiya, *et al.*, 2014, Osanai-Futahashi, *et al.*, 2012, Tamura, *et al.*, 2000, Tsubota, *et al.*, 2014a, Tsubota, *et al.*, 2014b), といった他のモデル昆虫には無い利点がある。そこで我々は、カイコをモデル宿主として、ヒトの感染症を引き起こす種々の病原性微生物に関する病態モデルを構築し、それらの病原性発現機構の解明 (Ishii, *et al.*, 2010a, Kaito, *et al.*, 2005, Kaito, *et al.*, 2011, Matsumoto, *et al.*, 2012, Matsumoto, *et al.*, 2010), 並びに治療活性物質の探索 (Hamamoto, *et al.*, 2015, Orihara, *et al.*, 2008, Paudel, *et al.*, 2012, Paudel, *et al.*, 2013) を進めている。最近我々は、乳幼児等の易感染患者に対して重篤な感染症を引き起こすセラチア菌 (*Serratia marcescens*) について、カイコ感染モデルを用いた解析を進める過程で、本細菌が自然免疫応答を抑制することにより病原性を発揮する局面を捉えることに成功した (Ishii, *et al.*, 2014a, Ishii, *et al.*, 2014b, Ishii, *et al.*, 2012)。PP を中心とする自然免疫系と病原性細菌との攻防、また医薬分野におけるカイコの新しい利用法の一例として、以下に研究成果を紹介したい。

ヒトの感染症を引き起こす病原性細菌をカイコ幼虫の体液内に注射すると、カイコは数日以内に感染死する。代表的な病原性細菌である黄色ブドウ球菌、緑膿菌、及び腸管出血性大腸菌に至るまで、5 齢 2 日目のカイコ 1 匹を殺傷するために必要な菌数は、殆どの場合  $10^6$  から  $10^7$  のオーダーである (Kaito, *et al.*, 2002, Miyashita, *et al.*, 2012, Miyashita, *et al.*, 2014, Miyashita, *et al.*, 2015)。一方、カイコに対するセラチア菌の  $LD_{50}$  (lethal dose 50; 感染個体の半数を殺傷するのに要する菌数) は 10 前後と測定され、数個の細菌が体液中に侵入すると翌日には個体が死亡することが判った。一方、セラチア菌の培養上清をフィルター濾過してカイコに注射しても、カイコは殺傷されなかった。これらの結果より我々は、セラチア菌は宿主の免疫系を回避する能力を有し、そのために高い

病原性を発揮できると推測した。

初めにカイコの自然免疫系とセラチア菌の病原性との関係について解析する中で、セラチア菌と共培養したカイコ血球細胞が早期に死滅することが見出された。そこで、セラチア菌のゲノム中にトランスポゾンがランダムに挿入された変異体約 1000 株の中から、カイコ血球細胞に対する殺傷能が低下したものを探索した。その結果、細菌に特有の表層構造である lipopolysaccharide (LPS) と鞭毛の合成遺伝子が、カイコの血球細胞と個体に対する殺傷効果に必要であることが判明した (Ishii, *et al.*, 2012)。上述の PP 活性化機構の解析により、病原体由来成分による PP 活性化の誘導には生きた血球細胞が必要であることが判っていた (Ishii, *et al.*, 2008)。このことから、カイコの血球細胞がセラチア菌により死滅させられた場合、免疫刺激による PP 活性化が抑制される、と予想される。そこで、カイコ断頭筋肉標本にセラチア菌と BG (上述の PP 活性化反応を誘導する真菌細胞壁成分) を共注射したところ、PP の活性化反応を伴う筋肉の収縮が抑制された。一方、セラチア菌は、活性型 PP による筋肉収縮を抑制しなかった (Ishii, *et al.*, 2012)。これらの実験結果は、セラチア菌による血球細胞殺傷が、宿主の自然免疫系を抑制し、病原性の発揮に寄与することを支持している (図 3A)。

次に我々は、セラチア菌をカイコに体液内感染させた際、体液中に遊離している血球細胞の数が大幅に増大することを見出した。この反応はセラチア菌の培養上清の体液内注射によっても誘導され、注射後 30 分以内の早期にみられた。このことから、セラチア菌が血球細胞の接着性を低下させる物質を分泌するために、カイコ体内の組織上から血球細胞が剥離してくる、と予想された。そこで、生きたカイコの血液中で遊離血球細胞の数を増大させる生理活性を指標に、セラチア菌培養上清からカラムクロマトグラフィーによるタンパク質精製を行ったところ、Serralysin と呼ばれるメタロプロテアーゼが同定された。Serralysin のリコンビナントタンパク質は、カイコ体液中の遊離血球数を増大させ、*in vitro* における血球細胞の固相面への接着を阻害した (Ishii, *et al.*, 2014a)。一方、先の遺伝子発現解析により、PP はカイコの血球細胞における接着因子の発現を誘導し、細菌に対する貪食反応を促進することが示されていた (Ishii, *et al.*, 2010b)。Serralysin により *in vitro* で処理した血球細胞から膜画分を調製し、二次元電気泳動により分析したところ、タンパク質の検出パターンに変化が見られた。これらの Serralysin 処理により消失したシグナルを解析したところ、血球細胞の接着性に関わる因子が同定され

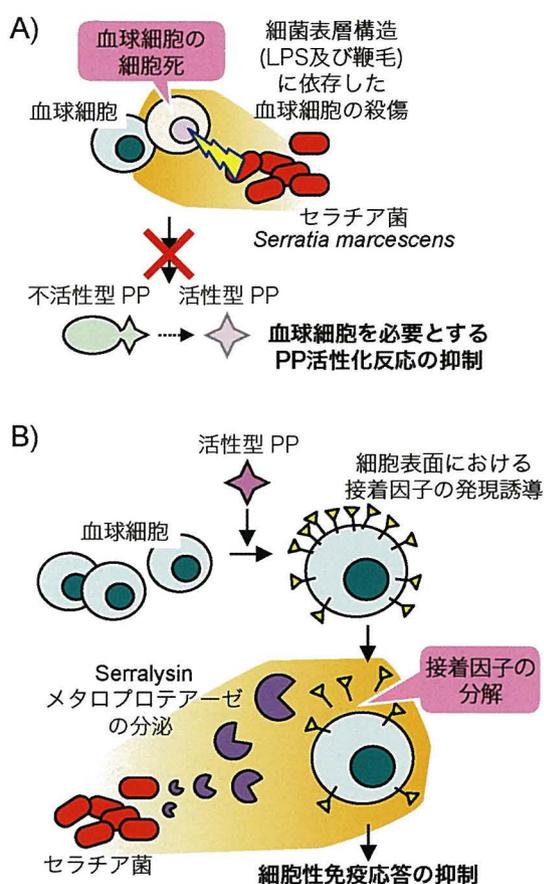


図 3. セラチア菌による自然免疫抑制機構

た。さらに、Serralysin は体液中での細菌の排除を抑制し、*serralysin* 遺伝子を破壊したセラチア菌変異株ではカイコ殺傷能が低下していた (Ishii, *et al.*, 2014a)。従って、セラチア菌は Serralysin メタロプロテアーゼを細胞外分泌することにより、血球細胞の接着因子を分解し、宿主生物の細菌排除能を低下させて重篤な感染症を引き起こすと考えられる (図 3B)。

上記のセラチア菌カイコ感染モデルによる研究は、日和見感染菌の病原性発現機構の理解を深めるだけでなく、宿主生物に備わる自然免疫制御機構の重要な側面を照らし出すものである。

## 5. おわりに

人類は有史以来、感染症との戦いに挑み続け、その仕組みを理解し如何に克服するか、試行錯誤を重ねてきた。それら先達の成果は、ワクチンや抗生物質の開発につながり、人類に貴重な恩恵をもたらしてきた。しかしその一方で、近年では新興感染症や薬剤耐性菌の出現が取り沙汰され、感染症との戦いに終焉は見えていない。新たに上市される抗生物質の数が年々減少している現況を鑑みるに、これからは既存の知識体系に囚われず、感染症

に対する新しいコンセプトを追い求める研究姿勢が、人類を救う新規医薬品の創製を導くと感じられる。我々は、過去に類を見ないカイコをモデル生物とした創薬基盤研究を提案することにより、免疫学・細菌学・薬学の垣根を超えて感染症研究を推進したいと考えている。

## 謝 辞：

Paralytic peptide に関する自然免疫研究の開始初期より、独立行政法人 農業生物資源研究所の神村学博士には格別のご厚情と丁寧なご指導を頂き、ここに心よりの感謝を申し上げたい。カイコを利用した創薬基盤研究は、同研究所の田村俊樹博士、瀬筒秀樹博士を中心とする遺伝子組み換え研究センター・遺伝子組み換えカイコ研究ユニットとの連携により推進されている。同ユニットの方々の、これまでのご協力とご指導に深く感謝申し上げます。また、カイコを用いた研究の遂行にあたり、様々なご助言を頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科の嶋田透先生に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Aizawa, T., Hayakawa, Y., Nitta, K., Kawano, K. (2002) Structure and activity of insect cytokine GBP which stimulates the EGF receptor. *Mol Cells* **14**, 1-8.
- Akiyama, N., Hijikata, M., Kobayashi, A., Yamori, T., Tsuruo, T., Natori, S. (2000) Anti-tumor effect of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel anti-bacterial substance from an insect. *Anticancer Res* **20**, 357-362.
- Akiyama, N., Natori, S. (2003) Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in the cytotoxicity of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel insect-derived anti-tumor compound. *Cancer Sci* **94**, 400-404.
- Anderson, K.V., Bokla, L., Nusslein-Volhard, C. (1985a) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-798.
- Anderson, K.V., Jurgens, G., Nusslein-Volhard, C. (1985b) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**, 779-789.
- Boman, H.G., Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y., Lidholm, D.A. (1991) Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem* **201**, 23-31.
- Boman, H.G., Nilsson-Faye, I., Paul, K., Rasmuson, T., Jr. (1974) Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect Immun* **10**, 136-145.
- Clark, K.D., Volkman, B.F., Thoetkiattikul, H., Hayakawa, Y., Strand, M.R. (2001) N-terminal residues of plasmatocyte-spreading peptide possess specific determinants required for biological activity. *J Biol Chem* **276**, 37431-37435.
- Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, H.G., Boman, I.A. (1975) Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial ac-

- tivity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect Immun* **12**, 1426-1438.
- Foley, E., O'Farrell, P.H. (2003) Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* **17**, 115-125.
- Ha, S.D., Nagata, S., Suzuki, A., Kataoka, H. (1999) Isolation and structure determination of a paralytic peptide from the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides* **20**, 561-568.
- Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Manitra Razanajatovo, I., Kusuhara, H., Santa, T., Sekimizu, K. (2004) Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 774-779.
- Hamamoto, H., Tonoike, A., Narushima, K., Horie, R., Sekimizu, K. (2009) Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**, 334-339.
- Hamamoto, H., Urai, M., Ishii, K., Yasukawa, J., Paudel, A., Murai, M., Kaji, T., Kuranaga, T., Hamase, K., Katsu, T., *et al.* (2015) Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. *Nat Chem Biol* **11**, 127-133.
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* **3**, 121-126.
- Hoshino, K., Tsutsui, H., Kawai, T., Takeda, K., Nakanishi, K., Takeda, Y., Akira, S. (1999) Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol* **162**, 5041-5044.
- Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., Oonishi, T., Kamimura, M., Imamura, K., Sekimizu, K. (2013) Insect cytokine paralytic peptide activates innate immunity via nitric oxide production in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol* **39**, 147-153.
- Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., Sekimizu, K. (2014a) *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. *J Biol Chem* **289**, 5876-5888.
- Ishii, K., Adachi, T., Hara, T., Hamamoto, H., Sekimizu, K. (2014b) Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Invertebr Pathol* **117**, 61-67.
- Ishii, K., Adachi, T., Imamura, K., Takano, S., Usui, K., Suzuki, K., Hamamoto, H., Watanabe, T., Sekimizu, K. (2012) *Serratia marcescens* induces apoptotic cell death in host immune cells via a lipopolysaccharide- and flagella-dependent mechanism. *J Biol Chem* **287**, 36582-36592.
- Ishii, K., Hamamoto, H., Imamura, K., Adachi, T., Shoji, M., Nakayama, K., Sekimizu, K. (2010a) Porphyromonas gingivalis peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem* **285**, 33338-33347.
- Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Nakamura, Y., Noda, H., Imamura, K., Mita, K., Sekimizu, K. (2010b) Insect cytokine paralytic peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **285**, 28635-28642.
- Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Sekimizu, K. (2008) Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. *J Biol Chem* **283**, 2185-2191.
- Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., Sekimizu, K. (2002) Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb Pathog* **32**, 183-190.
- Kaito, C., Kurokawa, K., Matsumoto, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Hamada, S., Sekimizu, K. (2005) Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Mol Microbiol* **56**, 934-944.
- Kaito, C., Usui, K., Kyuma, T., Sekimizu, K. (2011) Isolation of mammalian pathogenic bacteria using silkworms. *Drug Discov Ther* **5**, 66-70.
- Kamimura, M., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Tsuzuki, S., Hayakawa, Y., Kiuchi, M. (2001) Molecular cloning of silkworm paralytic peptide and its developmental regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 67-73.
- Kanamori, Y., Hayakawa, Y., Matsumoto, H., Yasukochi, Y., Shimura, S., Nakahara, Y., Kiuchi, M., Kamimura, M. (2010) A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. *J Biol Chem* **285**, 36933-36944.
- Kiya, T., Morishita, K., Uchino, K., Iwami, M., Sezutsu, H. (2014) Establishment of tools for neurogenetic analysis of sexual behavior in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One* **9**, e113156.
- Lavine, M.D., Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1295-1309.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1995) A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Matsumoto, Y., Miyazaki, S., Fukunaga, D.H., Shimizu, K., Kawamoto, S., Sekimizu, K. (2012) Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. *J Appl Microbiol* **112**, 138-146.
- Matsumoto, Y., Xu, Q., Miyazaki, S., Kaito, C., Farr, C.L., Axelrod, H.L., Chiu, H.J., Klock, H.E., Knuth, M.W., Miller, M.D., *et al.* (2010) Structure of a virulence regulatory factor CvfB reveals a novel winged helix RNA binding module. *Structure* **18**, 537-547.
- Miyashita, A., Iyoda, S., Ishii, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Kaito, C. (2012) Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol Lett* **333**, 59-68.
- Miyashita, A., Kizaki, H., Kawasaki, K., Sekimizu, K., Kaito, C. (2014) Primed immune responses to gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms. *J Biol Chem* **289**, 14412-14421.
- Miyashita, A., Takahashi, S., Ishii, K., Sekimizu, K., Kaito, C. (2015) Primed immune responses triggered by ingested bacteria lead to systemic infection tolerance in silkworms. *PLoS One* **10**, e0130486.
- Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., Kamimura, M. (2003) Ef-

- fects of silkworm paralytic peptide on in vitro hematopoiesis and plasmacyte spreading. *Arch Insect Biochem Physiol* **52**, 163-174.
- Nakahara, Y., Shimura, S., Ueno, C., Kanamori, Y., Mita, K., Kiuchi, M., Kamimura, M. (2009) Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. *Dev Comp Immunol* **33**, 439-448.
- Natori, S., Shiraishi, H., Hori, S., Kobayashi, A. (1999) The roles of Sarcophaga defense molecules in immunity and metamorphosis. *Dev Comp Immunol* **23**, 317-328.
- Ohnishi, A., Oda, Y., Hayakawa, Y. (2001) Characterization of receptors of insect cytokine, growth-blocking peptide, in human keratinocyte and insect Sf9 cells. *J Biol Chem* **276**, 37974-37979.
- Okada, M., Natori, S. (1983) Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of Sarcophaga peregrina (flesh-fly) larvae. *Biochem J* **211**, 727-734.
- Okada, M., Natori, S. (1985) Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of Sarcophaga peregrina (flesh fly) larvae. *J Biol Chem* **260**, 7174-7177.
- Okemoto, K., Nakajima, Y., Fujioka, T., Natori, S. (2002) Participation of two N-terminal residues in LPS-neutralizing activity of sarcotoxin IA. *J Biochem* **131**, 277-281.
- Orihara, Y., Hamamoto, H., Kasuga, H., Shimada, T., Kawaguchi, Y., Sekimizu, K. (2008) A silkworm baculovirus model for assessing the therapeutic effects of antiviral compounds: characterization and application to the isolation of antivirals from traditional medicines. *J Gen Virol* **89**, 188-194.
- Osanai-Futahashi, M., Ohde, T., Hirata, J., Uchino, K., Futahashi, R., Tamura, T., Niimi, T., Sezutsu, H. (2012) A visible dominant marker for insect transgenesis. *Nat Commun* **3**, 1295.
- Park, J.W., Kim, C.H., Rui, J., Park, K.H., Ryu, K.H., Chai, J.H., Hwang, H.O., Kurokawa, K., Ha, N.C., Soderhill, I., et al. (2010) Beetle immunity. *Adv Exp Med Biol* **708**, 163-180.
- Paudel, A., Hamamoto, H., Kobayashi, Y., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Sekimizu, K. (2012) Identification of novel deoxyribofuranosyl indole antimicrobial agents. *J Antibiot (Tokyo)* **65**, 53-57.
- Paudel, A., Kaneko, K., Watanabe, A., Matsunaga, S., Kanai, M., Hamamoto, H., Sekimizu, K. (2013) Structure-activity relationship study of novel iminothiadiazolo-pyrimidinone antimicrobial agents. *J Antibiot (Tokyo)* **66**, 663-667.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., Malo, D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189**, 615-625.
- Rivero, A. (2006) Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol* **22**, 219-225.
- Sekimizu, K., Larranaga, J., Hamamoto, H., Sekine, M., Furuchi, T., Katane, M., Homma, H., Matsuki, N. (2005) D-Glutamic acid-induced muscle contraction in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biochem* **137**, 199-203.
- Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M., Kanuka, H. (2009) p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*. *Cell Host Microbe* **6**, 244-252.
- Skinner, W.S., Dennis, P.A., Li, J.P., Summerfelt, R.M., Carney, R.L., Quistad, G.B. (1991) Isolation and identification of paralytic peptides from hemolymph of the lepidopteran insects *Manduca sexta*, *Spodoptera exigua*, and *Heliothis virescens*. *J Biol Chem* **266**, 12873-12877.
- Srikanth, K., Park, J., Stanley, D.W., Kim, Y. (2011) Plasmacyte-spreading peptide influences hemocyte behavior via eicosanoids. *Arch Insect Biochem Physiol* **78**, 145-160.
- Strand, M.R., Hayakawa, Y., Clark, K.D. (2000) Plasmacyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *J Insect Physiol* **46**, 817-824.
- Tada, M., Aizawa, T., Shinohara, Y., Matsubara, K., Miura, K., Yoshida, M., Shitara, K., Kouno, T., Mizuguchi, M., Nitta, K., et al. (2003) Roles of aromatic residues in the structure and biological activity of the small cytokine, growth-blocking peptide (GBP). *J Biol Chem* **278**, 10778-10783.
- Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., et al. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* **18**, 81-84.
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., et al. (2008) A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 1087-1110.
- Tsubota, T., Uchino, K., Kamimura, M., Ishikawa, M., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Sezutsu, H. (2014a) Establishment of transgenic silkworms expressing GAL4 specifically in the haemocyte oenocytoid cells. *Insect Mol Biol* **23**, 165-174.
- Tsubota, T., Uchino, K., Suzuki, T.K., Tanaka, H., Kayukawa, T., Shinoda, T., Sezutsu, H. (2014b) Identification of a novel strong and ubiquitous promoter/enhancer in the silkworm *Bombyx mori*. *G3 (Bethesda)* **4**, 1347-1357.
- Tsuzuki, S., Matsumoto, H., Furihata, S., Ryuda, M., Tanaka, H., Sung, E.J., Bird, G.S., Zhou, Y., Shears, S.B., Hayakawa, Y. (2014) Switching between humoral and cellular immune responses in *Drosophila* is guided by the cytokine GBP. *Nat Commun* **5**, 4628.
- Tsuzuki, S., Ochiai, M., Matsumoto, H., Kurata, S., Ohnishi, A., Hayakawa, Y. (2012) *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Sci Rep* **2**, 210.
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., Godowski, P.J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288.