殺菌物質デフェンシンとその作用機構

下田 雅子・大木 一憲・小橋 修

佐賀医科大学微生物学教室
〒849 佐賀県佐賀市鍋島5-1-1

〔受理：1995年2月1日〕

食細胞の示す酸素非依存性殺菌に関与するペプチドの1つであるデフェンシンは好中球一次顆粒の主要構成成分である。デフェンシンはウサギ肺胞マクロファージ、ヒトおよびマウスの小腸Paneth細胞にも存在し、局所における防御機構にも貢献していると考えられている。デフェンシンは細菌・真菌・マイコバクテリア・ウイルス・スピロヘータをはじめ正常細胞および腫瘍細胞に対して殺滅作用を示す。デフェンシンはイオンチャンネルを標的細胞膜上に形成し膜透過性を変える。その細胞膜障害機構は仮説の域を出ないが、基本的に二量体構造をとり、1) 二量体が直接膜に障害を与える、または2) 標的細胞膜内に複数の二量体-二量体複合体から成る孔(pore)を形成し透過性を亢進する等のモデルが提唱されている。また、デフェンシンに対する感受性と菌の病原性との関係、各炎症疾患とデフェンシン血中濃度との関係なども近年明らかにされつつある。

1. はじめに

生物は外界の微生物に対する自己防御のための特異的、非特異的ないろいろな防御機構を進化させている。食細胞による防御機構は生物進化の初期の段階から、免疫機構が進化した生物にも広く温存され、生物の防御機構の中で重要な位置を占めている。食細胞の示す殺菌機構には酸素依存性の活性酸素系及びNO系の殺菌機構と、嫌気性の状態でも作用する酸素非依存性の殺菌機構があり、これらによって多くの病原微生物を効率良く食し殺滅する。一方、病原微生物に対する特異抗体は補体と協調して食細胞の食機能phagocytosisを高めることによって殺菌機構に

協力している。最近注目されている殺菌物質デフェンシンは前述の酸素非依存性の殺菌機構に関与するペプチドの一つで好中球一次顆粒の主要構成成分であり、一次顆粒蛋白総量の30-50%を占めている(19)。ここではデフェンシンの作用機構を中心に最近の話題を提供する。

2. デフェンシンの局在

デフェンシンはまずウサギの肺胞マクロファージ中に見いだされ(48)続いてヒト(18, 51, 58), ウサギ(49), ラット(10), モルモット(50)の好中球にその存在が証明され、最近ではマウス(11, 44-46, 52), ヒト(27, 28)の小腸のPaneth細胞にもその存在が証明されており、腸内局所における防御機構への関与が示唆されている。不思議な事にマウスの好中球にはデフェンシンの存在は証明されていない(9)。デフェンシンに対する抗体を用いた酵素抗体法によるとデフェンシンは前骨髄細胞から成熟好中球までの段

Masako SHIMODA, Kazunori OHKI and Osamu KOHASHI
Defensins, Antimicrobial Peptides, and Their
Mechanism of Actions
Saga Medical School, Department of Microbiology, 5-1-1
Nabeshima, Saga 849

階の細胞に存在し、前述の様にウサギの肺胞マクロファージにも存在するが、他臓器および末梢血中の単球・マクロファージ系にはこの蛋白質の存在が証明されていない (17)。

3. デフェンシンの構造

デフェンシンは29～34個のアミノ酸からなり、3つの S-S 結合を作る6個のシステイン残基を持ち、4～9個のアルギニンをもつ塩基性ペプチドである (図1)。この基本構造と Arg⁶, Glu¹⁴, Gly²⁴は活性に重要な位置を占め、調べられた多くの哺乳動物の顆粒球内殺菌物質に共通である。デフェンシンの結晶構造 (25), NMR (3) の成績から、デフェンシンはアンチパラレルの3つの β -sheet 構造を持ち、 α -helix 構造を持たないペ

プチドで (図2), 結晶は二量体の構造を示すことが解かっている。二量体はバスケット様構造を示し非極性の底部と極性の頭部を有している (図3)。詳細についてはその作用機構の項で述べる。

4. def 遺伝子 (デフェンシンをコードした遺伝子) の発現様式

ヒト白血病細胞株 HL-60 を用いてデフェンシン遺伝子の全構造が決定され (7), 既に知られていたヒト第8染色体上にある *mrs* (myeloid-related sequence) 遺伝子と同一であった (39, 55)。

HL-60 や白血病患者由来の白血病細胞その他の細胞を用いてデフェンシンの生合成またはデフェンシンの mRNA 転写活性が調べられた。図4

ヒト	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
	HNP-2	CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
	HNP-3	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
	HNP-4	VCSCRLVFCRRTELRVGNCLIGGVSFITYCCTRV
	HNP-5	ARATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
	HNP-6	TRAFTCHCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCC
ラット	RatNP-1	VTCTYCRRTRCGFRERLSGACGYRGRIYRLCCR
	RatNP-2	VTCTYCRSTRCGFRERLSGACGYRGRIYRLCCR
	RatNP-3	CSCRTSSCRFGERLSGACRLNGRIYRLCC
	RatNP-4	ACYCRIGACVSGERLTGACGLNGRIYRLCCR
ウサギ	NP-1	VVCACRRALCLPRERRAGFCRIRGRIHPLCCRR
	NP-2	VVCACRRALCLPLERRAGFCRIRGRIHPLCCRR
	NP-3A	GICACRRRFCCPNSERFSGYCRVNGARYVRCCSRR
	NP-3B	GRCVCRKQLLCSYRERRIGDCKIRGVRFPFCCRR
	NP-4	VSCTCRRFSCGFGERASGSCTVNGVRHTLCCRR
	NP-5	VFCTCRGFLCGSGERASGSCTINGVRHTLCCRR
モルモット	GPNP	RRCTCTTRTCRFPYRRLGTCTIFQNRVYTFCC
※マウス	cryptdin	VCTCRSRGCKGRERMNGTCRKGHLLYTLCCR
	consensus	C C* C ** G C * CC

図1. デフェンシンファミリーのアミノ酸一次配列
6個のシステインと1個のグリシンはデフェンシンファミリーに共通して保存されている。*は全体にはほぼ共通して良く保存されているアミノ酸。
※マウスの cryptdin に関しては17個のアイソフォームが報告されているが省略した (45)。(文献29を改変)

図2. デフェンシンの分子構造
ジスルフィド結合は太い実線で示す。(文献25を改変)

に示すようにデフェンシンの生合成は前骨髄細胞 (promyelocyte) の段階で認められ、まず def 遺伝子の転写が起こり、94個の前駆体が作られ、蛋白分解酵素の作用を受けて、N末端19アミノ酸 (リーダーペプチド)、さらに19アミノ酸が切断され、C末端ペプチド (75, 56アミノ酸から成る前駆体) が白血球細胞内に蓄積され (2, 24, 57)、一部は細胞外に分泌される (57)。一方、骨髄から末梢血に出た成熟白血球の顆粒中にはこの前駆体の N 末端部位がさらに切断されて出来た成熟デフェンシンが蓄えられているが、こ

の末梢血成熟白血球でのデフェンシン遺伝子の発現は mRNA レベルでは証明できない。従って正常ではデフェンシン遺伝子発現は骨髄での分化の途中段階の細胞でのみ認められるものと理解されている (白血球細胞ではデフェンシン産生が mRNA レベルでも証明されている (7))。

def 遺伝子には多様性があり、近交系ラットでは各個体間でデフェンシンの基本骨格以外の部位でアミノ酸に違いが認められる (12)。def 遺伝子の個体発生、系統発生の知見が今後さらに得られるものと期待される。

図3. デフェンシンダイマーの構造
図2に示したモノマー2分子から成る。バスケット様の構造を成し極性頭部と非極性底部（バスケットの底の部分に当たる）を有する。（文献25を改変）

5. デフェンシンの殺菌作用について

1) バクテリア

デフェンシンはグラム陽性・陰性菌（10, 18, 31, 49, 50）に対し幅広い殺菌活性を有している。pH, イオン強度, 血清の有無, アッセイ時間等様々の条件がデフェンシンの殺菌力に影響し（21, 26）, 又, その殺菌活性は塩基性の強さに比例している。一方, デフェンシンを代表とする宿主の殺菌ペプチドに対する菌側の抵抗性と菌の病原性との関係が *Salmonella typhimurium* で良く研究されている（13, 22, 23, 40, 41）。デフェンシンに高感受性の *pho P*（転写活性因子）もしくは *pho Q*（membrane sensor kinase）の変異株は *in vitro* でマウスのマクロファージ内では生存できず, マウスに対して病原性を持たない。デフェンシン感受性を決定している *pho P* 遺伝子が *Salmonella* の病原性, マクロファージ内生存をもコントロールしていることは非常に興味深い。又, *S. typhimurium* の *pho P-pho Q* 変異株はデフェンシンだけでなくマガイニン, セクロピン, メリチンなどの他の殺菌性物質にも高感受性であることは菌側が種々の殺菌性物質に対して共通の防御機構を有している事を示唆しているのかもしれない。現在徐々に菌側の宿主の殺菌ペプチドに対する抵抗因子の存在, 及び役割が明らかにされてきている。しかし未知の部分も未だ多く今後の研究が待たれる。このように殺菌物質に対する細菌側の感受性・抵抗性の解明においてデフェンシン

は一つの重要な研究材料として注目される。

2) 真菌

ウサギのデフェンシンは *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* に対し殺菌活性を持つ（1, 53）。デフェンシンの真菌に対する結合に関しては詳細に検討がなされている（33）。ウサギデフェンシン NP-1 は *C. albicans* に二相性に結合し, 結合第一相はイオン強度の増強によって阻害されるが, 0°C 下での反応, 及び Ca^{2+} 添加では阻害されず, この相は可逆性である。それに続く第二相は低温度により阻害され直接デフェンシンの殺滅作用に関与すると考えられている。

3) スピロヘータ

ウサギのデフェンシンは *Treponema pallidum* に対し殺菌活性を示す（5）。その作用は正常のウサギ血清により増強されるが, C-6 欠損血清, 及び熱処理を加えた血清によってはその増強効果が認められない（補体との共同作用が示唆される）。

4) マイコバクテリア

ヒトデフェンシンは *Mycobacterium avium*, 及び *Mycobacteria intracellulare* に対し殺菌活性が認められている（42）。*Mycobacterium tuberculosis* に対しての殺菌活性は現在の所報告はない。

5) ウイルス

ウサギ（32）, ラット（10）, ヒト（8）, モルモット（50）のデフェンシンが単純ヘルペスウイルスを中和する。殺ウイルス活性はバクテリアに対する場合とほぼ同じ条件で阻害される。

6. デフェンシンの細胞破壊作用

ヒト好中球の顆粒成分のなかで, デフェンシンはヒト白血病細胞（36）, ヒト繊維芽細胞（43）, 及びヒト内皮細胞（43）, ヒト肺癌細胞（43）に対し最も強い破壊作用を示す。好中球顆粒の細胞破壊作用のほとんどをデフェンシンが担っているといえる。ヒトデフェンシンの作用は腫瘍細胞に特異的であるわけではなく, 前述の細胞の他にヒトリンパ球, 好中球, マウス胸腺細胞, 脾細胞（35）も破壊しうる。又, デフェンシンは抗腫瘍細胞効果において H_2O_2 と相乗作用を示す事も報告されており（35）, この両者が好中球を介した細胞破壊作用において大きく貢献していることが

図4. 前駆体が蛋白分解を受けて成熟デフェンシンになる過程

94個のアミノ酸から成るデフェンシン前駆体がまず産生され、続いて N 末端の疎水性アミノ酸の多い19個のアミノ酸から成るシグナルペプチドが切断され、さらに次々と蛋白分解を受け最終的に29-34個のアミノ酸から成る成熟デフェンシンになる。(文献2, 57を改変)

予想される。細胞破壊のメカニズムについても詳細に検討されている。デフェンシンによる細胞破壊は数分以内に細胞膜に穴をあけるパーフォリン (分子量 75,000) とは異なり、3時間から5時間後に認められる (37)。デフェンシンの標的細胞への結合は *C.albicans* に対する結合 (33) と類似して二相性に起こる (37)。結合は塩基性デフェンシンと陰性に荷電した細胞表面との弱い静電力的な力によると考えられており、低温での反応、血清やヘパリンの添加によって阻害される。デフェンシンの標的細胞への結合は反応60分以降に非可逆性となり、膜にデフェンシンが深く入り込み膜中で構造的な変化を起こしていることが予想される (37)。この様に初期の標的細胞への結合は破壊作用において必須であっても十分条件ではないといえる。標的細胞への結合後の変化である

が、デフェンシン作用後10分以内に細胞膜の透過性は変化し始めるが細胞内容物が外界に放出され始めるのは3-4時間後である (36)。又、初期の細胞膜透過性の変化はデフェンシンの接触後30分以内は可逆的であることより、初期のこの変化はその後の破壊作用にとって十分なきっかけにならず、細胞が死に至るには細胞の持続的なデフェンシンへの暴露が必要であることが考えられている (38)。

細胞外の K 濃度を上げ、標的細胞の膜電位を上げることでデフェンシンによる膜の透過性変化を阻害できる (38)。このことは後述するようにデフェンシンにより引き起こされる膜の変化が膜電位依存性であることを示唆している。さらに、アジ化ナトリウム、2-デオキシグルコースなどの代謝阻害剤がデフェンシンによる細胞破壊を阻害

することはデフェンシンによる細胞障害には標的細胞膜の活発な代謝が必要であることを示している (38)。これらの報告よりデフェンシンの細胞破壊作用における最初のステップは標的細胞の膜上で起こることは間違いない。ヒトデフェンシンは標的細胞の DNA にも障害を与えることが解かっている (20)。又、ウサギデフェンシンは HL-60 細胞における DNA 合成を抑制しうる (4) という報告もあり、デフェンシンの DNA への作用が細胞破壊作用の一部を担っている可能性も示唆される。

7. デフェンシンのチャンネル形成機構

デフェンシンを人工脂質二重膜の一侧に加えると膜電位依存性でなお且つ弱い陰イオン選択性を

図 5 A: デフェンシンダイマーと脂質二重膜表面との初期接触モデル
デフェンシンダイマーの正に電荷したアルギニンと二重膜の負に電荷した脂質頭部とが引き合う。

持つイオンチャンネルが膜内に形成される (30)。Kagan ら (30) はこのデフェンシンにより形成される単一のイオンチャンネルのコンダクタンスが極めて多様であることを証明し、様々な数よりなるデフェンシン分子の種々の大きさの多量体によってイオンチャンネルが形成されている可能性を示唆した。デフェンシンのかなり広域な殺菌スペクトラムはこのイオンチャンネルを介した膜の透過性亢進により説明されると考えられている。*Escherichia coli* を用いた実験 (34) よりイオンチャンネルの形成によると考えられる細胞膜の透過性の変化に引き続き、細菌の DNA, RNA, および蛋白合成の障害が起こることが解かっている。塩基性のデフェンシンは静電的な力により負に電荷した膜に結合し、デフェンシンの三次元構造を変化させることなく膜中に入り込む (15) (図 5 A)。この際にデフェンシン (おそらく多量体) の疎水性部位と膜の疎水部位との関係が重要であると考えられる (図 5 B)。つまり図 3 の様にデフェンシンは基本的に二量体として存在し、この二量体は疎水性底部と親水性頭部を有したかまもバスケットの様な構造をとると考えられている (25)。結晶構造から解析するとさらにデフェンシン二量体は疎水性部位で結合し、二量体自身がさらにいくつかの集合体を作りながら膜に入り込んでいるモデルが提唱されている (59) (図 6)。まず、単一のデフェンシン二量体が標的細胞膜に

図 5 B: デフェンシンダイマーが膜に入り込むモデル
デフェンシンダイマーの疎水性部位が脂質二重膜に入り込み脂質間のひずみを生じさせる。(文献25を改変)

その電荷を利用して結合し、膜に入り込み小チャンネルを形成する (図5B)。続いて、膜中で徐々に二量体同志の結合が起こりさらに大きな図6のような孔 (pore) が形成されるという一連のモデルが想定されている。以上のようにデフェンシンが標的細胞膜に変化を起こすためには 1) 静電的な力 2) 疎水性部位 3) 三次元的な両親媒性構造が必須の条件である。デフェンシンによるチャンネル形成がどのように細胞の死に結びついていくかの詳細についてはまだまだ不明の点が多くこれからの解析が期待される。

8. デフェンシンと疾患

敗血症、細菌性髄膜炎、急性胆道炎の患者の血漿中のデフェンシン濃度は著増していることが報告されている (47, 54)。又、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与後においても血漿中のデフェンシン濃度の増加が認められている (54)。このように炎症性疾患の診断、および予後判定に血中デフェンシン濃度測定が有用である可能性も示唆されてきている。

9. 殺菌および細胞破壊作用以外の活性

デフェンシンには殺滅作用の他に単球走化活性 (56)、肥満細胞からの脱顆粒促進作用 (60)、ラットの副腎細胞におけるACTH刺激性コルチコステロイド合成の阻害 (61)、細菌のオプソニン化への関与 (14)、in vitro におけるプロテインキナーゼ C のインヒビター活性 (6) などが証明されており幅広い生物活性を有していることが報告されている。

10. お わ り に

白血球のリゾーム顆粒中に最も豊富に含まれている低分子量 (3500-4000) 塩基性ペプチドデフェンシンが強い殺菌活性物質として細菌、真菌、ウイルス、癌細胞に殺滅的に作用することを述べた。作用機序としては2量体またはそれ以上の多量体として細胞膜に作用し、細胞膜の透過性亢進をもたらすことによるとされているが、いまだ不明の点も多い。def 遺伝子は骨髓細胞および好中球系の白血病細胞にも発現しているが、正常の成熟好中球系ではほとんど発現が見られない。ま

図6. デフェンシン孔 (pore) のモデル

6つのデフェンシンダイマーより成るチャンネルを上部より描いた。太線は一組のデフェンシンダイマーを示す。この孔の内径は約20-Åである。脂質鎖に接している孔の外側は主に図3に示したダイマーの非極性部位より成る。(文献59を改変)

た def 遺伝子はウサギ肺胞マクロファージに発現しているが他の調べられたマクロファージ系細胞には発現していない。しかしマウスおよびヒトの腸粘膜上皮細胞 Paneth 細胞には発現していることなどから個体発生のある段階で def 遺伝子を ON/OFF する機構があることが示唆されている。近交系のラットにおいてデフェンシンのアミノ酸配列に個体差 (polymorphism) があることなどから、ヒト白血球においてはさらに大きな多様性が予測される。生体防御機能の一端を担う殺菌物質はここで述べた白血球デフェンシン以外に、植物、昆虫、爬虫類など自然界に広く存在し、デフェンシンは進化の過程で良く温存されてきたものの一つであろう。免疫機構が進化していない生物と同様に、免疫機構を進化させた脊椎動物であっても病原微生物に対する強力な武器として最終的な病原微生物の殺滅処理は食細胞が担っている。また人においてデフェンシン欠損が重症の感染症を招く (16) ことから、デフェンシンファミリーは重要な感染防御機能の一翼を担っていることは間違いない。

文 献

- 1) Alcouloumre, M.S., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Selsted, M.E., Edwards, J.E., Jr. (1993): Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **37**, 2628-2632.
- 2) Andrew, B., Ava, S., Chaim, S., Mars, W.M., Solomon, S. (1991): The isolation and identification of multiple forms of the neutrophil granule peptides from human leukemic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 7524-7530.
- 3) Bach, A.C.II., Selsted, M.E., Pardi, A. (1987): Two-dimensional NMR studies of the antimicrobial peptide NP-5. *Biochem.* **26**: 4389-4397.
- 4) Bateman, A., Singh, A., Congote, F., Solomon, S. (1991): The effect of HP-1 and related neutrophil granule peptides on DNA synthesis in HL60 cells. *Regulatory Peptides.* **35**, 135-143.
- 5) Borenstein, L.A., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., Miller, J.N. (1991): Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect. Immun.* **59**, 1359-1367.
- 6) Charp, P.A., Rice, W.G., Raynor, R.I., Reimund, E., Kinkade, J.M.Jr., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., Kuo, J.F. (1988): Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* **37**, 951-956.
- 7) Daher, K.A., Lehrer, R.I., Ganz, T., Kronenberg, M. (1988): Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7327-7331.
- 8) Daher, K.E., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1986): Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* **60**, 1068-1074.
- 9) Eisenhauer, P.B., Lehrer, R.I. (1992): Mouse neutrophils lack defensins. *Infect. Immun.* **60**, 3446-3447.
- 10) Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S.L., Szklarek, D., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1989): Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect. Immun.* **57**, 2021-2027.
- 11) Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S.L., Lehrer, R.I. (1992): Cryptdins: antimicrobial defensins of the small intestine. *Infect. Immun.* **60**, 3556-3565.
- 12) Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S.L., Szklarek, D., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1990): Polymorphic expression of defensins in neutrophils from outbred rats. *Infect. Immun.* **58**, 3899-3902.
- 13) Fields, P.I., Groisman, E.A., Heffron, F. (1989): A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**, 1059-1062.
- 14) Fleischman, J., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1985): Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages. *Diagn Microbial Infect. Dis.* **3**, 233-242.
- 15) Fujii, G., Selsted, M.E., Eisenberg, D. (1993): Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci.* **2**, 1301-1312.
- 16) Ganz, T., Metcalf, J.A., Gallin, J.I., Boxer, L.A., Lehrer, R.I. (1988): Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: chediak-higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J. Clin. Invest.* **82**, 552-556.
- 17) Ganz, T., Rayner, J.R., Valore, E.V., Tumolo, A., Talmadge, K., Fuller, F. (1989): The structure of the rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression. *J. Immunol.* **143**, 1358-1365.
- 18) Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S.L., Daher, K. (1985): Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**, 1427-1435.
- 19) Ganz, T. (1987): Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **55**, 568-571.
- 20) Gera, J.F., Lichtenstein, A. (1991): Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cell. Immun.* **138**, 108-120.
- 21) Greenwald, G.I., Ganz, T. (1987): Defensins mediate the microbicidal activity of human neutrophil granule extract against *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect. Immun.* **55**, 1365-1368.
- 22) Groisman, E.A., Chiao, E., Lipps, C.J., Heffron, F. (1989): *Salmonella typhimurium* *pho P* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7077-7081.
- 23) Groisman, E.A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M., Lipps, C.J., Heffron, F. (1992): Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11939-11943.
- 24) Harwing, S.S.L., Park, A.S.K., Lehrer, R.I. (1992): Characterization of defensin precursors in mature human neutrophils. *Blood* **79**, 1532-1537.

- 25) Hill, C.P., Yee, J., Selsted, M.E., Eisenberg, D. (1991): Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*. **251**, 1481-1485.
- 26) Joelle, E.G., Randy, W.S., Campanelli, D., Griffith, J., Wilde, C., Marra, M.N., Seeger, M., Nathan, F. (1989): Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5610-5614.
- 27) Jones, D.E. Bevins, C.L. (1992): Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 23216-23225.
- 28) Jones, D.E. Bevins, C.L. (1993): Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett.* **315**, 187-192.
- 29) Kagan, B.L., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1994): Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* **87**, 131-149.
- 30) Kagan, B.L., Selsted, M.E., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1990): Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 210-214.
- 31) Kohashi, O., Ono, T., Ohki, K., Soejima, T., Moriya, T., Umeda, A., Meno, Y., Amako, K., Funakoshi, S., Masuda, M., Fujii, N. (1992): Bactericidal activities of rat defensins and synthetic rabbit defensins of *Staphylococci*, *Klebsiella pneumoniae* (Chedid, 277, and 8N3), *Pseudomonas aeruginosa* (mucoid and nonmucoid strains), *Salmonella typhimurium* (Ra, Rc, rd, and re of LPS mutants) and *Escherichia coli*. *Microbial. Immunol.* **36**, 369-380.
- 32) Lehrer, R.I., Daher, K.A., Ganz, T., Selsted, M.E. (1985): Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J. Virol.* **544**, 467-472.
- 33) Lehrer, R.I., Szklarek, D., Ganz, T., Selsted, M.E. (1985): Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity. *Infect. Immun.* **49**, 207-211.
- 34) Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Selsted, M.E. (1989): Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* **84**, 553-561.
- 35) Lichtenstein, A.K., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1986): In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocyte. *Blood* **68**, 1407-1410.
- 36) Lichtenstein, A.K., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1988): Synergistic cytotoxicity mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cell. Immun.* **114**, 104-116.
- 37) Lichtenstein, A.K., Ganz, T., Nguyen, T.M., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1988): Mechanism of target cytotoxicity by peptide defensins. *J. Immunol.* **140**, 2686-2694.
- 38) Lichtenstein, A.K. (1991): Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. *J. Clin. Invest.* **88**, 93-100.
- 39) Mars, W.M., Tuinen, P.V., Drabkin, H., White, J.W., Saunders, G.F. (1988): A myeloid-related sequence that localizes to human chromosome. *Blood* **71**, 1713-1719.
- 40) Miller, S.I., Kukral, A.M., Mekalanos, J.J. (1989): A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5054-5058.
- 41) Miller, S.I., Pulkkinen, W.S., Selsted, M.E., Mekalanos, J.L. (1990): Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **58**, 3706-3710.
- 42) Ogata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz, T., Lehrer, R.I., Catanzaro, A. (1992): Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infect. Immun.* **60**, 4720-4725.
- 43) Okrent, D.G., Lichtenstein, A.K., Ganz, T. (1990): Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* **114**: 179-185.
- 44) Ouellette, A.J., Lualdi, J.C. (1990): A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* **265**, 9831-9837.
- 45) Ouellette, A.J., Hsieh, M.M., Nosek, M.T., Canogauci, D.F., Huttner, K.M., Buick, R.N., Selsted, M.E. (1994): Mouse paneth cell defensins: Primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect. Immun.* **62**, 5040-5047.
- 46) Ouellette, A.J., Greco, R.M., James, M., Frederick, D., Naftilan, J., Fallon, J.T. (1989): Developmental regulation of cryptdin, a corticosteroid/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J. Cell Biol.* **108**, 1687-1695.
- 47) Panyutich, A.V., Panyutich, E.A., Krapivin, V.A.,

- Baturevich, E.A., Ganz, T.: Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* **122**, 202–207.
- 48) Patterson-Delafield, J., Martineez, R.J., Lehrer, R.I. (1980): Microbicidal cationic protein in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infect. Immun.* **30**, 180–192.
 - 49) Selsted, M.E., Szklarek, D., Lehrer, R.I. (1984): Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* **45**, 150–154.
 - 50) Selsted, M.E., Harwig, S.S.L. (1987): Purification, primary structure, and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin. *Infect. Immun.* **55**, 2281–2286.
 - 51) Selsted, M.E., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Schilling, J.W., Lehrer, R.I. (1985): Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* **76**, 1436–1439.
 - 52) Selsted, M.E., Miller, S.I., Henschen, A.H., Ouellette, A.J. (1992): Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J. Cell Biol.* **118**, 929–936.
 - 53) Selsted, M.E., Szklarek, D., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1985): Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **49**, 202–206.
 - 54) Shiomi, K., Nakazato, M., Ihi, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Matsukura, S. (1993): Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increases in plasma and neutrophil in infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1336–1344.
 - 55) Sparkes, R.S., Kronenberg, M., Heinzmann, C., Daher, K.A., Klisak, I., Ganz, T., Mohandas, T. (1989): Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. *Genomics*. **5**, 240–244.
 - 56) Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1989): Monocyte chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**, 2017–2020.
 - 57) Valore, E.V., Ganz, T. (1992): Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* **79**, 1538–1544.
 - 58) Wilde, C.G., Griffith, J.E., Marra, M.N., Snable, J.L., Scott, R.W. (1989): Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J. Biol. Chem.* **264**, 11200–11203.
 - 59) Wimley, W.C., Selsted, M.E., White, S.H. (1994): Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**, 1362–1373.
 - 60) Yamashita, T., Saito, K. (1989): Purification, primary structure and biological activity of guinea pig neutrophil peptides. *Infect. Immun.* **57**, 2405–2409.
 - 61) Zhu, Q.Z., Hu, J., Mulay, S., Esch, F., Shimasaki, S., Solomon, S. (1988): Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 592–596.