HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ショウジョウバエにおける抗菌ペプチドの分子進化
Author(s)	瀬戸, 陽介; 小山, あずさ; 田村, 浩一郎
Citation	低温科学, 69, 157-163 生物進化研究のモデル生物群としてのショウジョウバエ. 北海道大学低温科学研究所編
Issue Date	2011-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/45200
Type	bulletin (article)
File Information	LTS69_018.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 69 （2011） 157-163

ショウジョウバエにおける抗菌ペプチドの分子進化

瀬戸　陽介[1)]，小山あずさ[1)]，田村浩一郎[1)]

2010 年 12 月 17 日受付，2010 年 12 月 29 日受理

抗菌ペプチドはショウジョウバエにおいて主要な生体防御機構の一つであり，キイロショウジョウバエでは，これまでに 7 種類が同定されている．これら抗菌ペプチドは種類によって活性を示す対象の微生物が異なり，バクテリアに対して強い抗菌活性を示すものや真菌類に強い抗菌活性を示すものが知られている．様々な研究から，抗菌ペプチドは，個体レベルでは個体の微生物に対する抵抗性に大きく影響することが，遺伝子レベルでは種類によってその分子進化パターンが異なることが明らかとなっている．そこで，本稿では抗菌ペプチドの分子進化と抗菌活性や個体での抵抗性との関わりについて論じる．

Molecular evolution of antimicrobial peptides in *Drosophila*

Yosuke Seto[1], Azusa Koyama[1], Koichiro Tamura[1]

Antimicrobial peptides (AMPs) are essential components for *Drosophila* innate immune systems against microorganisms. Seven antimicrobial peptides have been identified in *D. melanogaster*, in which some AMPs show strong anti-bacterial activity, but others show anti-fungal activity. Repertoire of AMPs and their expression patterns are important for individual fly to survive under infection of Gram-negative, Gram-positive bacteria and fungi. Many molecular evolutionary analyses show different AMP genes have evolved in different manner. Cecropin and Drosomycin genes, for example, have evolved under frequent gene duplication and deletion event, so-called birth-and-death evolution, while Metchnikwin and Drosocin genes have kept only one copy in their host genome through *Drosophila* evolution. Ecologically, *Drosophila* is distributed among various environments from Tropical to Polar Zone, and some species have more resistance to bacteria or fungi than others have. However, the molecular-based mechanisms which affect a resistance to microorganisms still have not been elucidated clearly. In this paper, we introduce functions of *Drosophila* AMPs and their molecular evolution, and then discuss evolutionary relationship between them.

1. はじめに

抗菌ペプチドは自然免疫の主要な構成要素であり，原核生物から真核生物にわたる広範囲の生物が持つ免疫機構である．免疫機構の大切な機能は微生物を体内に侵入させないことであり，ショウジョウバエなどの昆虫では，クチクラでできた固い殻で体全体を覆うことで微生物の侵入を防いでいる．しかし，外殻に傷がついたり，餌と共に摂食することによって微生物が体内に侵入すると，ショウジョウバエ体内で様々な免疫反応が引き起こされる．免疫反応は細胞性免疫と体液性免疫反応に大きく分けられ，侵入した微生物は第一に，血球細胞による食作用（phagosytosis）や封入（encapsulation）などの細胞性免疫によって除かれ，第二に，脂肪体で産生され，体液内に分泌される抗菌ペプチドやストレス応答タンパク質などによる体液性免疫によって除去される（Tzou et al., 2002a; Lemaitre and Hoffmann, 2007）．このように抗菌ペプチドは，微生物が体内に侵入してきたときに産生される分泌性のタンパク質であり，ショウジョウバエに限らず，あらゆる生物の免疫機構において非常に重要な役割を果たしている．産生される抗菌ペプチドの種類は，体内に侵入してきた微生物の種類によって異なるが，多様な抗菌ペプチドを産生することによってカビなどの真菌類やバクテリア，ウイルスにいたる幅広い侵入者から生体を防御している．

微生物の感染によって，これら抗菌ペプチドが産生されるメカニズムは，キイロショウジョウバエを用いて詳

1）首都大学東京大学院理工学研究科生命科学専攻
[1] Department of Biological Sciences, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan

細に調べられている．ショウジョウバエ体内に微生物が侵入すると，バクテリアの細胞壁成分であるペプチドグリカンに結合するペプチドグリカン認識タンパク質（PGRP）などの受容体によって認識され，Toll シグナル経路や Imd シグナル経路などの細胞内シグナル伝達経路を介して脂肪体での抗菌ペプチドの産生を引き起こす（Tzou et al., 2002a; Lemaitre and Hoffmann, 2007）．ショウジョウバエの Toll 経路や Imd 経路は，哺乳類においてもその類似の経路が存在し，関与する因子のいくつかは進化的に高度に保存されている．このように自然免疫に関わる要素は，その機能によって①体内に侵入してきた微生物の認識，②微生物の侵入に応答する遺伝子群の発現を誘導する細胞内のシグナル伝達，③侵入してきた微生物に対して，直接作用することによる体内からの排除（エフェクター）の大きく 3 つのクラスに分類することができる．

昆虫などの無脊椎動物は脊椎動物が持つ獲得免疫を持たないため，自然免疫のみで非常に多様な微生物から自己を防御しなければならない．そのため，エフェクターである抗菌ペプチドは個体の適応度に深く関わり，生物が多様な環境へ適応する過程で非常に重要な役割を果たしてきたと考えられる．そこで，本稿では，ショウジョウバエの免疫機構の中でも，抗菌ペプチドに着目して，その分子進化メカニズムや，抗菌活性と宿主の微生物に対する抵抗性や生態学的な性質との関連性について論じる．

2．ショウジョウバエにおける抗菌ペプチドの特徴

これまでの研究から，数多くの抗菌ペプチドが動物から植物，バクテリアにいたる多様な生物種から同定されており，それら抗菌ペプチドにはいくつかの共通した特徴が見出されている．まず，多くが 100 アミノ酸以下の低分子量で，正電荷を帯びた両親媒性のタンパク質であるため，負電荷を帯びた微生物の細胞膜に直接作用することで排除するモデルが提唱されている（Matsuzaki, 1999; Shai, 1999）．一方，多くの抗菌ペプチドについては，立体構造が明らかになっており，様々な構造が報告されている．例えば，ヒト（*Homo sapiens*）の Cathelicidin (Wang, 2008) やカイコ（*Bombyx mori*）の Moricin (Hemmi et al., 2002) など，α-ヘリックス構造のみからなるものや，ブタ（*Sus scrofa*）の Protegrin 1 (Fahrner et al., 1996) やニホンカブトガニ（*Tachypleus tridentatus*）の Tachyplesin I (Kawano et al., 1990) など β-シート構造のみから成るもの，また，昆虫から哺乳類に至る広範な生物種で存在している Defensin (Bonmatin et al., 1992; Hoover et al., 2001) やヒドラ（*Hydra magnipapillata*）の Hydramacin-1 (Jung et al., 2009) のように，α-ヘリックスと β-シートの両構造を持ち，それぞれがジスルフフィド結合によって折りたたまれた抗菌ペプチドが知られている．その他にも，双翅目昆虫に幅広く存在している Diptericin のようにグリシンやプロリンなど特定のアミノ酸の割合が高いという特徴も報告されており（Wicker et al., 1990），抗菌ペプチド間ではアミノ酸配列レベルでの類似性はほとんど見られない．このような特徴は，抗菌ペプチドの機能や分子進化メカニズムと深く関わっていることが推測される．

昆虫における抗菌ペプチドの機能に関する知見は，Hultmark et al. (1980) によって初めて報告された．彼らは鱗翅目の *Hyalophora cecropia* に対して，*Enterobacter cloacae*（グラム陰性菌）をインジェクションにより感染させると，同じグラム陰性菌である大腸菌（*Escherichia coli*）や緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）などに対して *in vitro* で生育阻害を引き起こす低分子のタンパク質の発現が誘導されることを初めて見出した．その後，Steiner et al. (1981) によって，この抗菌活性を示すタンパク質は Cecropin と名付けられた．同様の感染実験によって，Hultmark et al. (1983), Dimarcq et al. (1988) や Lambert et al. (1989) によって Cecropin とは異なる抗菌ペプチドが同定され，それぞれ Attacin, Diptericin, Defensin と名付けられた．これら 4 種類の抗菌ペプチドは，キイロショウジョウバエを用いた感染実験においてもその存在が確かめられ，種を超えて存在することが明らかとなった．これら 4 種類の抗菌ペプチドの抗菌活性は Cecropin の場合と同様に *in vitro* 解析から Attacin と Diptericin はグラム陰性菌に対して，Defensin はグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示すことが確認された（Wicker et al., 1990; Dimarcq et al., 1994; Åsling et al., 1995）．また，ショウジョウバエを用いた詳細な解析により，Cecropin は細菌や真菌類に対して，幅広い抗菌活性を持つことが明らかとなった（Samakovlis et al., 1990; Ekengren and Hultmark, 1999）．一方，キイロショウジョウバエからは，他の昆虫では見つかっていなかった Drosomycin, Metchnikowin, Drosocin の 3 種類の抗菌ペプチドも同定され，*in vitro* の生育阻害実験によって，Drosomycin と Metchnikowin は真菌類に対して，Drosocin はグラム陰性菌に対して強い抗菌活性を示すことが確認された（Bulet et al., 1993; Fehlbaum et al., 1994; Levashina et al., 1995; Charlet et al., 1996）．これらのことから，抗菌ペプチドには種間で共通しているものから，種特異的に存在しているものまで存在すること，また，抗菌ペプチドの種類によって抗菌活性が異なる場合があることが明らかとなった．Tzou et al. (2002b) は，Toll 経路と Imd 経路のノックアウトにより，抗菌ペプチドを産生できなくなったキイロショウ

ジョウバエを作成し，それらにいろいろな抗菌ペプチド遺伝子を導入し強制発現させた．その結果，強制発現させた抗菌ペプチドは，*in vivo* でも *in vitro* で活性を示した微生物種に対して強い抵抗性を示すことが示された．さらに，彼らは，Attacin と Drosocin を共発現させると，大腸菌の感染下における生存率が改善されるなど，発現する抗菌ペプチドの組み合わせによっても微生物への抵抗性は変化することも明らかにし，抗菌ペプチドの発現パターンと微生物の抵抗性の間には深い関係性があることを実験的に証明した．このことから，ある種の微生物の感染から自己を防御するためには，どの抗菌ペプチドを持つかが大きな意味を持つということが分かる．このことから，様々な微生物相を示す環境へのショウジョウバエの適応を理解するためには，ショウジョウバエの進化過程でどのようにして抗菌ペプチド遺伝子のレパートリーが進化してきたかを理解することが大変重要なことであると考えられる．

3．抗菌ペプチドの分子進化

3.1　遺伝子重複による抗菌ペプチド遺伝子の分子進化

2007 年，ショウジョウバエ 12 種の全ゲノム配列が解読され（Drosophila 12 Genomes Consortium, 2007），これら 12 種において免疫に関わる遺伝子がどのように分布し，それぞれがどのような分子進化パターンを示すのかについて網羅的に調べられた（Sackton et al., 2007）．その結果，Toll 経路や Imd 経路を含む細胞内シグナル伝達系に関わる遺伝子はショウジョウバエ 12 種においても高度に保存されており，その多くがゲノム中に単一コピーの遺伝子として存在しているのに対し，PGRP や血球（hemocyte）の細胞膜に存在する nimrod (Kurucz et al., 2007) など，微生物の認識に関わる遺伝子や抗菌ペプチドなどのエフェクターをコードする遺伝子の多くはゲノム中で複数コピー存在し，多重遺伝子族を形成していることが明らかとなった．また，微生物の認識やエフェクターの遺伝子はシグナル伝達系の遺伝子に比べて，系統（種，あるいは種群）特異的に存在するものが多いことも確認された．例えば，キイロショウジョウバエで見つかった 7 種類の抗菌ペプチドについては，Drosomycin はキイロショウジョウバエ種群でのみ，Drosocin は *Sophophora* 亜属でのみ存在が確認されている（図 1）．これらのことから，免疫に関わる遺伝子の中でも，認識やエフェクターの遺伝子はシグナル伝達系の遺伝子とは異なり，進化過程で遺伝子の重複や欠失を繰り返してきたと考えられる．その中でも，抗菌ペプチドは特に多重遺伝子族を形成しているものや，系統特異的なものが多いことが確認されている（Sackton et al., 2007）．

完全変態昆虫に広く分布している Cecropin 遺伝子は全ゲノム配列が決定されたショウジョウバエ 12 種全てで見つかっているが，その数はキイロショウジョウバエで 4 コピー（CecA1，CecA2，CecB，CecC），オナジショウジョウバエ（*D. simulans*）で 3 コピー，*D. grimshawi* で 7 コピー存在し，種間で異なっている．また，これら重複遺伝子はゲノムの狭い領域（10 kb 以内）にタンデムに並んで存在しており，その領域には偽遺伝子化しているコピーも存在している．このことはショウジョウバエの進化過程で活発な遺伝子重複と欠失を繰り返していることを強く示唆している（Ramos-Onsins and Aguade, 1998; Quesada et al., 2005; Sackton et al., 2007）．また，CecA1 遺伝子の上流 600 bp の領域には Cecropin とは異なり，オスの成虫射精管特異

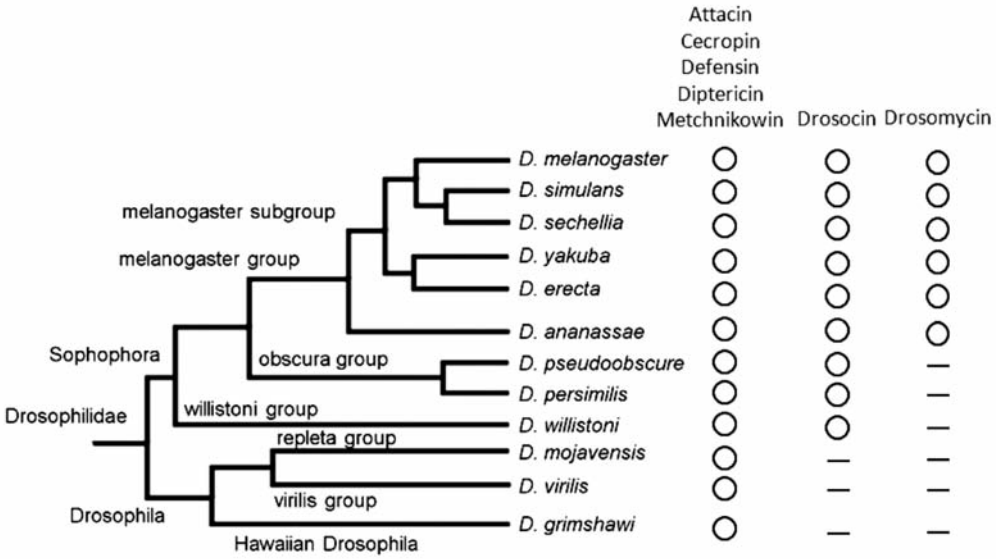

図 1：全ゲノムが解読されたショウジョウバエ 12 種の系統関係と抗菌ペプチドの分布．各ショウジョウバエ種のゲノム中に存在する抗菌ペプチドには丸（○）を，見つかっていないものはマイナス（－）で示してある．

的に発現する抗菌ペプチドであるAndropinの存在が明らかとなっている．Andropinはキイロショウジョウバエ種亜群でのみ見つかっており，2つのエクソンが短いイントロンによって分割される遺伝子構造や，2つのヘリックスを形成するなど，タンパク質の二次構造がCecropinと類似していることから，AndoropinはCecropinの遺伝子重複によって生じ，異なる発現パターンを獲得した新規抗菌ペプチドであることが示唆されている（Date-Ito et al., 2002）．同様にキイロショウジョウバエ種群特異的に存在しているDrosomycinも多重遺伝子族を形成し，キイロショウジョウバエでは7コピー，*D. yakuba*では6コピー，アナナスショウジョウバエ（*D. ananassae*）では4コピー存在し，Cecropin遺伝子と同様に活発な遺伝子重複と欠失によって進化してきたことが示唆されている（Jiggins and Kim, 2005; Sackton et al., 2007）．このように，抗菌ペプチドの進化は，重複と欠失を繰り返す〝birth-and-death evolution″（Nei et al., 1997）であることが示唆される．しかし，その進化パターンは抗菌ペプチドによって異なる．例えば，Cecropin遺伝子やDrosomycin遺伝子の分子系統解析によると，Cecropin遺伝子は亜群内の近縁な種分化後に高頻度で重複が起こっているのに対し，Drosomycin遺伝子はキイロショウジョウバエ亜群やアナナス亜群の分岐時期に高頻度の重複が起こっていることが明らかとなっている（Jiggins and Kim, 2005; Quesada et al., 2005; Sackton et al., 2007）．これまでに，これら重複抗菌ペプチド遺伝子のコピー間の抗菌活性の違いやコピー数が及ぼす宿主の微生物に対する抵抗性についても調べられてきており，Drosomycinは，コピー数が増加することで真菌類の*Fusarium oxysporum*や*Aspergillus fumigatus*に対する抵抗性が向上することが（Tzou et al., 2002b），また，様々な菌類を用いた*in vitro*での発育阻害実験から，それぞれのコピー間で抗菌活性を示す菌種が異なることが実験的に確認されている（Yang et al., 2006; Tian et al., 2008）．これらのことから，ショウジョウバエの進化過程において，遺伝子重複によって抗菌ペプチド遺伝子のレパートリーやコピー数が変化することが，いろいろな微生物への抵抗性獲得につながってきたと考えることができる．

対照的に，MetchnikowinやDrosocin遺伝子はこれらを持つショウジョウバエのゲノム中，単一コピーで存在しており，CecropinやDrosomycinとは異なる分子進化パターンを示すことも示唆されている（Sackton et al. 2007）．

3.2　抗菌ペプチドにかかる自然選択

免疫に関わる遺伝子は体内に侵入してくる様々な微生物に適応するため，正の選択が働き，進化速度が速くなる傾向があることが分かっている．例えば，脊椎動物において，体内に侵入してきた抗原を認識する主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex, MHC）の抗原認識サイト（antigen recognition site, ARS）は，非同義置換率（dN）が同義置換率（dS）に比べ有意に高い．一方で，MHCのARS以外の領域ではdSの方がdNよりも大きく，同じMHC分子内でも抗原と結合するARSだけが正の選択によって進化していることが明らかとなっている（Hughes and Nei, 1988）．MHCと同様に，哺乳類のDefensinやCathelicidin，ニワトリノのGallinacin，シロアリのTermicinなどの抗菌ペプチドにおいても，dN/dS比の解析から正の選択（dN/dS＞1）が検出されている（Hughes and Yeager, 1997; Bulmer and Crozier, 2004; Lynn et al., 2004; Patil et al., 2004; Tennessen, 2008）．しかし，全ての抗菌ペプチドが正の選択によって進化しているわけではない．ショウジョウバエにおいては，DrosomycinやMetchikowin，Defensinなど，多くの抗菌ペプチド遺伝子では正の選択は検出されていない（Clark and Wang, 1997; Lazzaro and Clark, 2003; Jiggins and Kim, 2005; Obbard et al., 2009）．この要因として，MHCが働く獲得免疫とは異なり，特定の微生物の感染によって様々な抗菌ペプチドが産生されることや，個々の抗菌ペプチドが広範囲の微生物に対する効果を持つことから，抗菌ペプチドは，広い抗菌スペクトルを維持しながら，感染時に効率的に転写・翻訳されることが重要で，そのための純化選択が抗菌ペプチドの進化過程で大きく作用してきた可能性が考えられている（Sackton et al. 2007）．一方，様々な微生物に対する抵抗性の獲得は，進化の過程でそれぞれの種がもつ抗菌ペプチドのレパートリーが変化することによって実現されてきたと思われる．

4．ショウジョウバエの生態学的特徴と抗菌ペプチド

一般的に，キイロショウジョウバエの仲間は果実が発酵した，酵母菌が多い餌を食物としているが，クロショウジョウバエの仲間は川辺や腐敗した樹木などで生育し，バクテリアやカビが多い餌を食物としている．このような生活環境の違いから，クロショウジョウバエはキイロショウジョウバエよりもカビ類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る．実際にアオカビの一種を生やした培地で両方の種の生存率を比較してみたところ，クロショウジョウバエの方が明らかに強い抵抗性を示した（図2）．ところが，これまでにクロショウジョウバエで見つかっている抗菌ペプチド遺伝子の数はキイロショウジョウバエよりも少なく，特に，真菌類に対して強い抗菌活性を示すDrosomycin遺伝子を持っていないことがゲノムデータ解析から示唆されている（表1）．しかし，Sackton and Clark (2009) は，ク

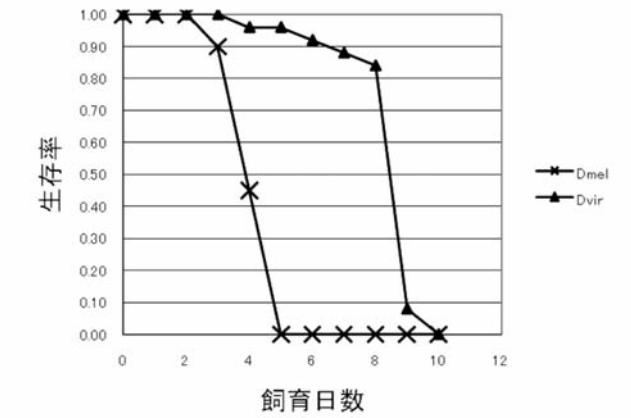

図2：カビの生えた培地で飼育したキイロショウジョウバエとクロショウジョウバエの生存率の差．生存率は各ショウジョウバエの1日目の成虫25個体をアオカビの一種を生やした飼育瓶に入れて測定した．×がキイロショウジョウバエ（Dmel）の生存率を，▲がクロショウジョウバエ（Dvir）の生存率を表している．

表1：キイロショウジョウバエで同定されている抗菌ペプチドの一覧

抗菌ペプチド	主な抗菌活性	遺伝子のコピー数
Attacin	グラム陰性菌	4
Cecropin	グラム陰性菌	4
Defensin	グラム陽性菌	1
Diptericin	グラム陰性菌	2
Drosocin	グラム陰性菌	1
Drosomycin	真菌類	7
Metchnikowin	真菌類	1

ロショウジョウバエにグラム陰性菌の *Serratia marcescens* とグラム陽性菌の *Enterococcos faecalis* を感染させ，それによって発現が誘導された遺伝子を網羅的に解析したところ，クロショウジョウバエにはキイロショウジョウバエでは見つかっていない新規の抗菌ペプチド遺伝子が存在することを示唆した．我々は，アオカビの一種を摂食させることによって発現が誘導される遺伝子をスクリーニングしたところ，同様に新規抗菌ペプチドの可能性がある遺伝子を得た（未発表）．これらの結果から，クロショウジョウバエでは独自の抗菌ペプチドを持つことで，強い抗真菌耐性を獲得した可能性が推察できる．

ショウジョウバエの中には，クロショウジョウバエ以外にも，*Hirtodrosophila* 属や *Mycodrosophila* 属のように菌類のみを食べる菌食性であったり，ハワイ産の *Scaptomyza* 属のショウジョウバエのように菌類や腐敗した樹木，落ち葉や果実などあらゆるものを餌とするなど，非常に多様な食性を示すことが分かっている（Throckmorton, 1975）．また，ショウジョウバエは熱帯から寒帯に至る非常に広い範囲に生息しており，それら生息地における微生物相も多岐にわたると思われる．クロショウジョウバエを用いた実験から示唆されたように，多様な生態的特性を示すショウジョウバエには，未だに同定されていない抗菌ペプチドが数多く存在していることが考えられる．広い範囲のショウジョウバエ種について，それらが持つ抗菌ペプチド遺伝子の特性を調べ，その分子進化がショウジョウバエの生態的特性の進化にどのように関わったのかを明らかにすることにより，ショウジョウバエがどのようにして環境に適応し，進化してきたかを分子レベルで解明することができると期待される．そのためには，クロショウジョウバエとキイロショウジョウバエのように明らかに微生物に対する抵抗性が異なる種を材料に，それぞれが持つ抗菌ペプチドについて分子進化学的解析を行い，また，Tzou et al. (2002b) が行ったように，抗菌ペプチドを産生できないようにしたキイロショウジョウバエ個体に，別の種から得られた抗菌ペプチド遺伝子を導入し，その個体の微生物に対する抵抗性の変化を調べる実験などが有効であると考えられる．

参考文献

Åsling, B., M. Dushay, and D. Hultmark (1995) Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the *Attacin A* gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 511–518.

Bonmatin, J. M., J. L. Bonnat, X. Gallet, F. Vovelle, J. M. Reichhart, J. A, Hoffmann, E. Keppi, M. Legrain, and T. Achstetter (1992) Two-dimensional ‘H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *J. Biomol. NMR*, **2**, 235–256.

Bulet, P., J. L. Dimarcq, C. Hetru, M. Lagueux, M. Charlet, G. Hegy, A. Van Dorsselaer, and J. A. Hoffmann (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution, *J. Biol. Chem.*, **268**, 14893–14897.

Bulmer, M. S., and R. H. Crozier (2004) Duplication and diversifying selection among termite antifungal peptides. *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 2256–2264.

Charlet, M., M. Lagueux, J. Reichhart, D. Hoffmann, A. Braun, and M. Meister (1996) Cloning of the gene encoding the antibacterial peptide drosocin involved in Drosophila immunity. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 699–706.

Clark, A. G., and L. Wang (1997) Molecular population genetics of *Drosophila* immune system genes. Expression studies during the immune response. *Genetics*, **147**, 713–724.

Date-Ito, A., K. Kasahara, H. Sawai, and S. I. Chigusa (2002) Rapid evolution of the male-specific antibacterial protein *Andropin* gene in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, **54**, 665–670.

Dimarcq, J., D. Hoffmann, M. Meister, P. Bulet, R. Lanot, J. Reichhart, and J. A. Hoffmann (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encod-

ing an insect defensin. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 201–209.

Dimarcq, J. L., E. Keppi, B. Dunbar, J. Lambert, J. M. Reichhart, D. Hoffmann, S. M. Rankine, J. E. Fothergill, and J. A. Hoffmann (1988) Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 17–22.

Drosophila 12 Genomes Consortium, (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, **450**, 203–218.

Ekengren, S., and D. Hultmark (1999) *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 965–72.

Fahrner, R. L., T. Dieckmann, S. S. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg, and J. Feigon (1996) Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem. Biol.*, **3**, 543–550.

Fehlbaum, P., P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux, W. Broeckaert, C. Hetru, and J. A. Hoffmann (1994) Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.*, **269**, 33159–33163.

Hemmi, H., J. Ishibashi, S. Hara, and M. Yamakawa (2002) Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *FEBS Lett.*, **518**, 33–38.

Hoover, D. M., O. Chertov, and J. Lubkowski (2001) The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39021–39026.

Hughes, A. L., and M. Nei (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, **335**, 167–170.

Hughes, A. L., and M. Yeager (1997) Coordinated amino acid changes in the evolution of mammalian defensins. *J. Mol. Evol.*, **44**, 675–682.

Hultmark, D., Å. Engström, K. Andersson, H. Steiner, H. Bennich, and H. G. Boman (1983) Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, **2**, 571–576.

Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H. G. Boman (1980) Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, **106**, 7–16.

Jiggins, F. M., and K. W. Kim (2005) The evolution of antifungal peptides in *Drosophila*. *Genetics*, **171**, 1847–1859.

Jung, S., A. J. Dingley, R. Augustin, F. Anton-Erxleben, M. Stanisak, C. Gelhaus, T. Gutsmann, M. U. Hammer, R. Podschun, A. M. Bonvin, M. Leippe, T. C. Bosch, and J. Grotzinger (2009) Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the Basal metazoan hydra. *J. Biol. Chem.*, **284**, 1896–1905.

Kawano, K., T. Yoneya, T. Miyata, K. Yoshikawa, F. Tokunaga, Y. Terada, and S. Iwanaga (1990) Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). *J. Biol. Chem.*, **265**, 15365–15367.

Kurucz, E., R. Márkus, J. Zsámboki, K. Folkl-Medzihradszky, Z. Darula, P. Vilmos, A. Udvardy, I. Krausz, T. Lukacsovich, E. Gateff, C. J. Zettervall, D. Hultmark, and I. Andó (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.*, **17**, 649–654.

Lambert, J., E. Keppi, J. L. Dimarcq, C. Wicker, J. M. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A. Van Dorsselaer, J. A. Hoffmann, and J. Fothergill (1989) Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **86,** 262–266.

Lazzaro, B. P., and A. G. Clark (2003) Molecular population genetics of inducible antibacterial peptide genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, **20**, 914–923.

Lemaitre, B., and J. A. Hoffmann (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 697–743.

Levashina, E., S. Ohresser, P. Bulet, J. Reichhart, C. Hetru, and J. A. Hoffmann (1995) Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 694–700.

Lynn, D. J., R. Higgs, S. Gaines, J. Tierney, T. James, A. T. Lloyd, M. A. Fares, G. Mulcahy, and C. O'Farrelly (2004) Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. *Immunogenetics*, **56**, 170–177.

Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 1–10.

Nei, M., X. Gu, and T. Sitnikova (1997) Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7799–806.

Obbard, D. J., J. J. Welch, K. W. Kim, and F. M. Jiggins (2009) Quantifying adaptive evolution in the *Drosophila* immune system. *PLoS Genet.*, **5**, e1000698.

Patil, A., A. L. Hughes, and G. Zhang (2004) Rapid evolution and diversification of mammalian a-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol. Genomics*, **20**, 1–11.

Quesada, H., S. E. Ramos-Onsins, and M. Aguadé (2005) Birth-and-death evolution of the *Cecropin* multigene family in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, **60**, 1–11.

Ramos-Onsins, S., and M. Aguade (1998) Molecular evolution of the *Cecropin* multigene family in *Drosophila*: Functional genes vs. pseudogenes. *Genetics*, **150**, 157–171.

Sackton, T. B., and A. G. Clark (2009) Comparative profiling of the transcriptional response to infection in two species of *Drosophila* by short-read cDNA sequencing.

BMC Genomics, **10**, 259.

Sackton, T. B., B. P. Lazzaro, T. A. Schlenke, J. D. Evans, D. Hultmark, and A. G. Clark (2007) Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. *Nature Genet.*, **39**, 1461–1468.

Samakovlis, C., D. A. Kimbrell, P. Kylsten, Å. Engström, and D. Hultmark (1990) The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J.*, **9**, 2969–2976.

Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by a-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 55–70.

Steiner, H., D. Hultmark, Å. Engström, H. Bennich, and H. G. Boman (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, **292**, 246–248.

Tennessen, J. A. (2008) Positive selection drives a correlation between non-synonymous/synonymous divergence and functional divergence. *Bioinformatics*, **24**, 1421–1425.

Throckmorton, L. H. (1975) The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: King, R. C. (ed) *Invertebrates of Genetic Interest*: 421–469. Plenum Press, New York.

Tian, C., B. Gao, M. C. Rodriguez, H. Lanz-Mendoza, B. Ma, and S. Zhu (2008) Gene expression, antiparasitic activity, and functional evolution of the *drosomycin* family. *Mol. Immun.*, **45**, 3909–3916.

Tzou, P., E. De Gregorio, and B. Lemaitre (2002a) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 102–110.

Tzou, P., J. M. Reichhart, and B. Lemaitre (2002b) Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2152–2157.

Wang, G. (2008) Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J. Biol. Chem.*, **283**, 32637–32643.

Wicker, C., J. M. Reichhart, D. Hoffmann, D. Hultmark, C. Samakovlis, and J. A. Hoffmann (1990) Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the diptericin family of immune peptides. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22493–22498.

Yang, W. Y., S. Y. Wen, Y. D. Huang, M. Q. Ye, X. J. Deng, D. Han, Q. Y. Xia, and Y. Cao (2006) Functional divergence of six isoforms of antifungal peptide Drosomycin in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, **379**, 26–32.