

## 활성 산소 메커니즘을 거친 세균 및 곰팡이 세포벽 성분에 의한 누에 사이토카인 활성화

*Activation of the Silkworm Cytokine by Bacterial and Fungal Cell Wall Components via a Reactive Oxygen Species-triggered Mechanism*

켄이치 이시이<sup>1</sup>, 히로시 하마모토<sup>2</sup>, 마나부 카미무라<sup>3</sup>, 카즈히사 세키미즈<sup>1</sup>

*Kazuhiisa Sekimisu et al., 2008, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 283, NO. 4, pp. 2185–2191*

1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan (도쿄대학교 의학부 대학원)
2. Genome Pharmaceuticals Institute Co., Ltd., Tokyo, Japan (게놈 창약 연구소)
3. National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki 305-8634, Japan (국립 농업 생물학 연구소)

---

곤충 사이토카인 마비성 펩티드는 누에 유충 근육 수축을 유발하며, 세균 그리고 곰팡이 세포벽 성분들인 펩티드글리칸과 글루칸이 혈액 림프에서 마비성 펩티드의 활성화를 통하여 근육 수축을 활발하게 한다. 반 마비성 펩티드 항체는 마비성 펩티드, 펩티드글리칸, 또는 글루칸에 의해 유발된 근육 수축을 억제한다. 근 또한 산화방지제와 세린 프로테아제 억제제는 근육 수축을 억제하였다. 게다가, 살아있는 누에에 펩티드글리칸 또는 글루칸을 주입하는것은 마비성 펩티드의 활성형을 발생시켰다. 펩티드글리칸 또는 글루칸이 전구체가 함유된 혈액림프와 함께 배양했을때, 마비성 펩티드 활성형은 또한 시험관 내에서 생산되었다. 산화방지제와 세린 프로테아제 억제제는 마비성 펩티드 활성형 발생을 억제했다. 뿐만 아니라, 마비성 혈액 림프에서 청산가리가 펩티드 활성화를 억제하였으며, 이는 세포 활동이 수반되었다는 점을 말한다. 펩티드글리칸에 의한 자극은 누에 혈구에 의한 활성산소 발생을 증진시킨다. 누에 유충에 투여한 황색포도알균에 마비성 펩티드 활성형 또는 반 마비성 펩티드 항체를 투여한 것은 황색포도알균의 파괴효과를 각각 지연하거나 높였으며, 이는 활성화된 마비성 펩티드는 감염된 병원균에 대한 내성을 만드는데 기여한다는 점을 말한다. 연구 결과들은 펩티드글리칸 또는 글루칸과 같은 면역 자극제들이 유충 혈액세포에서 활성 산소 생산이후 마비성 펩티드 처리 반응을 중재하고 방어 반응으로 이끄는 세린 프로테아제 활성화를 유발한다.

## 1. 서론

면역 체계는 생물을 감염으로부터 보호하는 분자와 세포의 복잡한 망으로 구성된다. 이 면역체계는 후천 면역과 선천 면역으로 나뉜다. 면역 연구의 발전은 두 면역 체계 모두 사이토카인 분비를 유도함으로써 밀접하게 작용한다는 점을 시사한다. 사이토카인 망은 자체방어에 필수적이지만, 면역 체계가 통제 불능이고, 과도한 양의 사이토카인 분자가 생산되면, 패혈증과 같은 심각한 손상이 발생한다. 사이토카인 망의 복잡한 성질 때문에, 장애의 근본이 되는 분자 매커니즘은 아직 밝혀지지 않았다. 선천 면역의 많은 특징들은 척추동물과 무척추동물 모두에서 나타난다. 무척추동물들은 후천면역이 부족하므로, 선천 면역만을 이용하여 박테리아와 곰팡이들과 같은 침입자들로부터 자신들을 보호한다. 따라서, 무척추동물들은 선천 면역 조사를 위해 사용하기 간단하고 편리한 모델이다. <중략> 이번 연구에서 우리는 선천 면역 자극이 활성산소 생성으로 이끄는지, 그리고 나서 마비성 펩티드의 활성형을 생산하는 세린 프로티아제가 활성화되는지 연구하였다. 연구 결과는 누에 혈액 림프에서 펩티도글리칸 또는 글루칸이 마비성 펩티드 처리를 유발하였고 활성산소와 세린 프로티아제가 이 반응을 중재하였다.

## 2. 실험과정

**실험 대상** : 에히메 산수 지방에서 누에 알을 구입했다. 인공사료를 먹이면서 섭씨 27도에서 누에 유충들을 키웠다.

**근육수축분석** : 누에 유충의 머리를 자르고, 연막 세포막을 제거하였다. 수축 정도를 측정하기 위해 각 견본을 묶고, 변환기에 부착시켰다. 실험 견본들은 0.9% 염화트륨에 녹이거나 매달았고, 27-게이지 바늘에 부착된 1ml 주사기를 가지고 견본 체액에 주사를 놓았다. 근육 수축 강도는 수축 값으로 표현하였으며,  $(x - y) / x$  수식을 사용하여 주입 전 (x cm)과 주입 후 (y cm) 각 견본의 최대 길이를 측정하여 계산했다. <중략> 억제제 효과를 실험하기 위해, 2개 견본들 (억제제와 자극제)를 각각 50  $\mu$ l를 5초에서 10초 사이 간격으로 연속해서 주입했다.

**살아있는 누에 유충의 혈액 림프에서 마비성 펩티드 활성형 발견** : 실험 견본들 (50 $\mu$ l)을 제5열 누에 유충 체액에 주입했다. 실온에서 10분간 배양 한 후, 복부 다리를 가위로 절단하고, 상처에서 나온 혈액을 1.5ml 플라스틱 튜브에 수집했다. 견본들을 즉시 끓는 물에서 5분간 가열하고 10,000  $\times$  g에서 10분간 원심분리했다. 아래 설명한 바와 같이, 생성된 상청액은 웨스턴 블롯 분석 대상이었다. 또한 이를 통제하기 위해서, 화학적으로 합성된 마비성 펩티드 활성형 (4kDa)를 사용했다. 단백질 견본들은 16.5% 젤에서 폴리아크릴아미드 겔 영동법을 사용하여 분석하였고, Immobilon®-P PVDF Membrane로 옮겼다. 블로킹 용액에서 1:6000 비율로 희석된 비 마비성 펩티드를 사용하여 막을 조사했다. 조사를 위해, 당나귀에서 나온 Horseradish peroxidase-linked anti-rabbit Ig'를 가지고 막을 조사했으며, 그 후 Western Lightning™ 화학 발광 시약 (PerkinElmer Life Sciences)에 반응시킨 다음, Hyperfilm-ECL (Amersham Biosciences, UK)에 노출시켰다.

**분리된 혈액림프에서 시험관 마비성 펩티드 활성형 발견** : 제5열 누에 유충 복부다리를 절단하여 혈액 림프를 수집하였고, 혈액 림프를 섭씨 25도에서 3분간 실험 견본들과 함께 배양한 후 5분동안 끓였다. 견본들은 10분동안 10,000  $\times$  g에서 원심분리하였

고, 웨스턴 블롯 분석의 대상이었다.

**누에 혈액세포에서 나온 활성산소 생성 발견** : 이진에서 설명했듯이 활성산소 생성은 NBT 감소 분석을 사용하여 발견했다. 간단히 말하면, 100- $\mu$ l 혈구액 (106 cells/ml) 을 100  $\mu$ l of NBT 용액 (14 mm NBT, 1 mm EDTA, 1 mm phenylthiourea)와 섞은 후, 60분동안 섭씨 25도에서 포볼 미리스테이트 아세테이트 또는 펩티도글리칸과 함께 배양했다. 세포내에서 NBT와 활성산소에 대한 반응 생성물인 NBT 포르마잔 입자들을 발견하기 위해 망원경을 사용하여 혈구를 발견했다. 활성산소의 정량적 측정을 위해, 견본들은 10분동안 at 1000  $\times$  g에서 원심분리하였고, 알갱이들을 70% 메탄올 500  $\mu$ l에서 재현탁했다. 견본들을 1000  $\times$  g에서 10분동안 더 원심분리하였고, 생성된 알갱이를 추출용액에 재현탁했다. 견본들을 3500  $\times$  g에서 20분동안 원심분리하였고, 630 nm에서의 광학 밀도 값을 광도계로 측정 하였다.

**박테리아 감염에 대해 Host resistance에 관한 마비성 펩티드 활성형과 비 마비성 펩티드 면역형성 영향** : 염분, 합성 마비성 펩티드, 항 마비성 펩티드 항혈청 또는 normal rabbit serum을 멸균된 0.22 $\mu$ m 폴리비닐리덴 플루오라이드 필터 (Millipore)를 통해 여과했고 S. aureus MSSA1 (LB10 medium)에서 18 시간 동안 배양) 또는 염분과 각각 혼합했다. 시험 견본 들을(50  $\mu$ l) 제 5열 누에 유충의 체액에 투여하였다 (1 일째). 감염된 누에를 27 °C에서 배양하고 생존 가능한 유충의 수를 세었다.

## 3. 실험결과

### 3.1. 박테리아 및 곰팡이 세포벽 성분에 의한 누에 유충 근육 수축 유발

이전에, 우리는 병원성 박테리아와 병균의 내부 혈액 림프 주사를 가지고 누에 유충을 사용하여 패혈증모델을 보고했다. 연구 과정에서, 우리는 박테리아 또는 병균의 고농축 배양된 주사를 유충에 투여한후 마비가 발생한다는 점을 발견했다. 심지어 열에 의해 치사된 박테리아 또는 병균들에 주사를 투여 했음에도, 마비를 발견하였다. 마비는 누에 신체 수축과 동반되기때문에, 우리는 박테리아 또는 병균들이 누에 근육 수축을 유발할 것이라고 의심했다. 우리는 이 연구에 집중하였고, 우리가 이전에 말했던 누에 유충 근육 수축의 정량적 측정을 이용하여 좀 더 연구했다. 유충 근육에 열사 황색포도알균 주사 투여는 근육 수축을 유발했다. 그람양성 박테리아 세포 벽의 주요 성분인 펩티도글리칸은 이 반응에 연관이 있다. 왜냐하면, 황색포도알균에서 정화된 펩티도글리칸은 근육 수축을 유발하기 때문이다. 게다가, 황색포도알균에서 나온 글루칸도 근육 수축을 유발한다. 우리는 이전에 누에에서 카인산이 근육 수축을 중재한다고 보고했다. 이 처리는 빠르게 진행되고, 이점은 카인산이 신경근육접합에서 수용체작용제로 역할한다는 점을 말한다. 하지만, 위에서 설명한 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 유발된 수축은 카인산에 의해 중재된 수축과 달랐다. 먼저 반응이 매우 느렸다. 카인산이 2초안에 수축을 유발하는 반면, 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 최대 수축에 걸리는 시간은 10분정도 였다. 두 번째로, L-글루탐산이 카인산에 의한 근육 수축을 강하게 억제한 반면 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의한 반응은 그러지 않았다. 그러므로, 우리는 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의한 근육 수축은 신경 전달물질 수용체 효능약인 카인산에 의해 중재된 근육 수축과는 다른 과정이라는 점을 결론내렸다.

### 32. 누에 유충에서 마비성 펩티드가 유발한 근육 수축

원래 마비성 펩티드는 마비를 일으키는 펩티드로 알려졌다. 최근 연구들은 마비성 펩티드의 생리학적 기능은 자체방어와 연관되어 있다는 점을 시사한다. 박테리아나 병원균 주입으로 인한 마비가 마비성 펩티드에 의한 마비와 유사하다는 것을 관찰했기 때문에, 우리는 마비성 펩티드가 펩티도글리칸이나 글루칸에 의해 유발된 누에 유충 근육을 중재한다는 가설을 세웠다. 우리가 유충 견본에 합성 마비성 펩티드를 주입 할 때, 근육은 투여 의존적인 방식으로 수축했다. 이번 분석에서 근육 수축을 촉발하는데 필요한 마비성 펩티드 최소량은 살아있는 유충에서 마비를 유발하는 데 필요한 마비성 펩티드의 양과 비슷한 2 ng이었다. 마비성 펩티드에 의해 유발된 근육 수축은 견본에 이전 항 마비성 펩티드 항혈제를 주입 함으로써 억제했다. 펩티도 글리 칸이나 글루칸에 의해 유발 된 근육 수축도 항-PP 항혈청의 사전 주사에 의해 억제되었다. 이러한 결과들은 마비성 펩티드가 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 유발된 근육 수축을 중재한다는 점을 시사한다.

### 33. 박테리아 그리고 곰팡이 세포 벽 구성들에 의해 유발된 근육 수축에서의 활성산소 관여

누에 혈액 림프에서 펩티도글리칸 또는 글루칸 용해성 수용체들을 확인했다. 이 수용체들은 세린 프로테아제 캐스케이드를 활성화시키고 멜라닌화를 유발한다. 게다가, 또다른 나방의 세린 프로테아제 억제제는 공기에 노출된 혈액 림프에 있는 활성 마비성 펩티드형성을 억제한다. 따라서, 우리는 세린 프로테아제가 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 촉발된 누에 마비성 펩티드 활성화에 관여한다는 가설을 세웠다. 세린 프로테아제 억제제, 벤즈아미딘 또는 p-아미딘페닐 메탄설폰닐플루오라이드를 사용한 유충 근육 표본 사전처리는 펩티도글리칸 또는 글루칸 유도 근육 수축을 엄청나게 억제 했다. 반면, 이러한 세린 프로테아제 억제제들은 마비성 펩티드 유발 근육 수축을 억제하지 않았다. 따라서, 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 자극되었을 때, 세린 프로테아제들은 마비성 펩티드를 활성화시킨다.

### 34. 박테리아 그리고 곰팡이 세포 벽 구성들에 의한 살아있는 누에 유충 혈액 림프에서의 마비성 펩티드 생성

마비성 펩티드는 누에 혈액 림프에서 불활성 상태로 존재한다. 몸에서 출혈된 혈액 림프가 공기에 노출되면, 세린 프로테아제가 pro 마비성 펩티드를 쪼개고 결과적으로 활성 마비성 펩티드가 형성된다. 우리는 펩티도 글리칸 또는 글루칸에 의해 근육 수축이 유도 될 때 마비성 펩티의 활성형이 생성되는지 여부를 조사했다. 살아있는 누에 유충에 펩티도글리칸 또는 글루칸을 주입한 후, 혈액 림프를 수집하고 항 마비성 펩티드 항체를 가지고 웨스턴 블롯 분석 대상으로 조사를 진행했다. 성숙 마비성 펩티드는 투여 의존적 방법에서 이들 자극제들에 반응하면서 나타났다. 과산화수소가 살아있는 유충의 혈액 림프에 주입되었을 때, 성 마비성 펩티드 생성을 또한 발견했다. 그러므로, 유충 혈액 림프에서 과산화수소로부터 생긴 활성산소는 마비성 펩티드 프로세싱을 자극할 수도 있다. 우리는 살아있는 누에의 혈액 림프에서 과산화수소에 의해 유발된 마비성 펩티드 처리에 대한 세린 프로테아제 억제제 영향을 좀 더 조사했다. 살아있는 유충의 혈액 림프에 과산화수소와 함께 벤즈아미딘 또는 p-APMS 주입은

성숙한 마비성 펩티드가 형성되는 것을 억제하였다. 이 결과들은 혈액 림프에서 활성산소에 의해 활성화된 세린 프로테아제가 pro 마비성 펩티드를 쪼개는 점을 시사한다.

### 35. 시험관 외진 혈액 림프에서 마비성 펩티드의 활성형 생성

그리고 나서 우리는 원상태 유충에서 수집한 혈액 림프를 사용하여 체외에서 마비성 펩티드 조사하였다. 펩티도글리칸 또는 글루칸은 분리된 혈액 림프를 배양했으며, 비 마비성 펩티드 항체를 가지고 웨스턴 블롯 분석의 대상인 견본들을 조사하였다. 활성형 마비성 펩티드는 체외에서 펩티도글리칸 또는 글루칸으로 배양된 혈액 림프에서 생성되었다 N-아세틸시스테인, 벤즈아미딘 및 p-APMSF는 이 반응을 억제했으며, 활성산소와 세린 프로테아제가 박테리아 또는 곰팡이의 성분에 의해 유발된 마비성 펩티드 처리를 중재한다는 점을 시사했다. 포유류 동물의 선천 면역계에서 대식세포와 림프구는 박테리아에 반응하여 활성산소를 분비한다. 우리는 누에 혈액 림프에서 마비성 펩티드 활성화가 세포과정을 포함하는지 여부를 조사했다. 세포 ATP 합성의 억제제인 시안화칼륨은 혈액 림프에서 마비성 펩티드 활성형 생성을 억제했다. 무세포 누에 혈장에서 일어나는 멜라닌화와 달리, 이 결과는 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 유발된 마비성 펩티드 활성화는 혈구에 의해 중재되는 세포과정을 포함한다는 점을 시사한다.

### 36. 살아있는 누에 유충의 혈액 림프에서의 mature 마비성 펩티드 생성

제5월 누에 유충에 표시된 양의 펩티도글리칸 또는 글루칸을 주입하고 수집 된 혈액 림프는 웨스턴 블롯 분석 대상이었다. 살아있는 누에의 혈액 림프에 염분, 100mm 벤즈아미딘, 또는 100 mmp-APMSF를 주입하고, 그 후 100mm 과산화수소를 주입하였다.

### 37. 분리된 혈액 림프에서 체외 mature 마비성 펩티드 생성

제5월 누에 유충에서 채취 한 혈액 림프를 펩티도 글리 칸 (1 mg/ml) 또는 글루칸 (1 mg/ml)과 함께 25 °C에서 3 분 동안 배양하였다. 라디칼 스캐빈저, N- 아세틸 시스테인 (B), 세린 프로테아제 억제제, 벤즈아미딘 또는 p-APMSF (C) 또는 시안화칼륨 (D) 의 영향을 체외에서 시험 하였다.

### 38. 박테리아 감염 Host resistance에 관한 비 마비성 펩티드 항체 그리고 마비성 펩티드 활성형 영향

비록 마비성 펩티드가 선천 면역에 관여한다고 여겨지지만 마비성 펩티드의 활성형이 박테리아 감염 내성에 기여하는지 여부는 불분명하다. 우리는 황색포도균에 감염된 누에 생존에 마비성 펩티드와 비 마비성 펩티드 항체의 활성형이 미치는 영향을 조사했다. Kaplan-Meier 방법을 이용한 분석은 누에 생존에 대한 활성 마비성 펩티드 및 비 마비성 항혈청 효과가 통계적으로 컸었던 반면 natural rabbit serum 효과는 그러지 않았다 ( $p > 0.05$ ). 이러한 결과는 마비성 펩티드 활성화가 감염성 박테리아 존재하에서 보호에 결정적인 역할을 한다는 점을 시사한다.

## 4. 논의

누에 나방으로부터의 사이토카인 유사 인자 마비성 펩티드는 원래 혈액 림프에 주입 할 때 누에의 마비를 일으키는 펩타이드 특

장이 있다. 남방은무늬밤나방의 애벌레, 담배나방 애벌레, 박각시나방 유충, 파밤나방 애벌레, 참나무산누에나방과 같은 갑상선 곤충으로부터 동종 펩티드를 발견했다. 나중에, 곤충 선천 면역에 관련있는 책임있는 혈구 확장 활동을 유도하기 위하여 활성 마비성 펩티드를 보고하였다. 그럼에도 불구하고, 생리학적 요인에 의한 마비성 펩티드 활성화의 메커니즘은 알려지지 않았다. 우리의 현재 연구 결과는 (i) 선천성 면역의 자극제로 잘 알려진 펩티도글리칸과 글루칸이 누에 혈액 림프에서 마비성 펩티드 활성화를 유도하고, (ii) 그 과정이 활성산소와 세린 프로테아제가 그 과정을 중재하며, (iii) 세포 과정이 관여함을 시사한다. 무척추 동물에서, 펩티도글리칸이나 글루칸을 인식하는 몇몇 수용체가 있다. 예를 들어, PGRP는 잘 특성화되어 있으며, 항균성 펩타이드 멜라닌화 및 생성을 중재한다.  $\beta$ GRP, 그람 - 음성 세균 결합 단백질 및 아포지질단백질은 글루칸에 결합한다. 이 수용체는 마비성 펩티드 활성화 첫 번째 단계에 관여할 수 있는 후보 물질이다. 누에 PGRP와  $\beta$ GRP에는 2개 isoforms가 있는데 하나는 유리형식이며 다른 하나는 막결합형식이다. 최근, *Drosophila melanogaster*는 내부세포 유형 존재를 증명하였다. T  $\beta$ GRP와 PGRP의 유리형식은 멜라닌화를 중재하는 점을 시사하지만 면역망에서 세포 수용체의 역할은 알려져 있지 않다. 우리 결과는 혈구 수용체가 곤충 사이토카인 유사 인자 인 마비성 펩티드 처리에 기여한다는 것을 제시한다. 활성산소는 박테리아와 곰팡이 세포 벽 구성들에 의해 유발된 마비성 펩티드 프로세싱을 중재한다. 활성산소는 자극된 면역 세포에 의해 생성되며, 선천 면역에서 다양한 활동을 보인다. 활성산소는 세포막 지질을 산화시켜 미생물을 직접 죽일뿐만 아니라, 세포간 전달자로서의 역할도 한다. 활성산소는 핵 인자 - $\kappa$ B 매개 염증성 사이토카인 생산, 항균 펩타이드 합성 그리고 심하게 감염된 세포 사멸을 유발한다 활성산소생성은 면역 세포의 내외부 모두에서 일어난다. 세포가 외부 물질을 인식하면, 세포 표면의 NADPH 산화 효소가 과도하게 활성화되어 활성산소 생성이 일어나는 산화 폭발이라는 과정을 거친다. 이 현상은 포유류 호중구에서 특징이 잘 보이며, 기간테우스황금부키 및 갈러리아 멜로넬라와 같은 일부 곤충 혈구들에서도 보여진다. 비록 우리는 펩티도글리칸 자극 혈구 내에서 활성산소 생성을 관찰하였지만, NBT 분석을 사용하여 글루칸으로 배양된 혈구에서 활성산소를 발견하는데 실패했다. 이 결과는 NBT와 활성산소 반응 특수함을 보여줄 수 있다. 다른 수용체들이 펩티도글리칸이나 글루칸을 인식하기 때문에, 이 두 가지 면역 자극제에 의해 생성된 활성산소의 유형이 다를 수도 있다는 말은 타당해보인다. 마비성 펩티드 활성화 과정에서, 활성산소를 생성하는 세포 유형과 펩티도글리칸 또는 글루칸 자극에 반응하여 생성된 활성산소 유형을 밝히기 위해서는 보다 상세한 연구가 필요하다.

펩티도글리칸 (peptidoglycan)에 의한 활성산소 세포 생산을 보여주는 우리의 연구 결과는 우리의 가설을 뒷받침 할 수 있을지도 모르지만 다른 해석들을 배제 할 수는 없었다. 예를 들어, 세포 외에서 생성된 활성산소는 면역 세포를 침투할 수 있고, 세포 이하 프로테아제를 활성화시킬 수 있다. 활성산소 생산 및 프로테아제 활성화가 실제로 일어나는 구획을 알아보기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. 세린 프로테아제는 박테리아와 곰팡이 세포 벽 구성들에 의해 유발된 마비성 펩티드를 중

재한다. 억제제를 사용함으로써, 우리는 세린 프로테아제가 펩티도글리칸 또는 글루칸에 의해 유발된 마비성 펩티드 처리에 관여함을 보였다. 세린 프로테아제는 일반적으로 높은 기질 특이성을 가지고 있으며 자체 방어 시스템에서 다양한 과정을 조절한다. 무척추 동물의 선천 면역 반응에서, 세린 프로테아제는 혈액 림프 응고, 항균 펩티드 생산 및 멜라닌화를 중재한다. 성숙 마비성 펩티드의 일차 구조는 성장 차단 펩타이드, 플라즈마 세포 증식 펩티드 및 심혈관 기능 단백질과 같은 다른 ENF 펩티드의 일차구조와 매우 상응한다. 이들 성숙 펩타이드 모두는 23-25 아미노산 잔기를 가지며 더 큰 전구체로부터 생성되지만, 절단 효소는 확인되지 않았다. 절단 부위 근처의 4개 아미노산 잔기는 ENF 펩타이드군 사이에서 고도로 보존되어있다. 그러므로, 누에에서 마비성 펩티드 활성형 생성에 관여하는 세린 프로테아제는 다른 ENF 펩타이드 군 활성화에 관여할 수 있다. 이러한 세린 프로테아제의 생화학적 특징은 마비성 펩티드를 포함한 ENF 펩타이드 군의 생산 메커니즘에 대한 더 깊은 이해가 필요하다. 활성산소 매개 산화는 일부 효소들을 활성화시킨다. 예를 들어 과산화수소 또는 활성산소를 생산하는 크산틴 / 크산틴산화효소는 콜라겐을 분해하는 전형적인 금속단백질분해효소의 활성을 자극한다. 여기에서 우리는 과산화수소에 의해 유발된 마비성 펩티드 처리와 근육 수축이 세린 프로테아제 억제제에 의해 억제됨을 입증하였다. 결과들은 활성산소가 마비성 펩티드 전구체를 쪼개는 세린 프로테아제를 활성화시켜 근육 수축을 일으킨다는 점을 시사한다. 일반적으로, 활성산소는 단백질의 시스테인과 메티오닌 잔기에 작용하여 이들을 산화시킨다. 따라서 우리는 활성산소에 의한 세린 프로테아제에서 아미노산 잔기의 산화가 성숙 마비성 펩티드를 생성하기위해 효소 활성을 자극할 수도 있다는 가능성을 고려했었다.

우리는 선천성 면역 자극제들인 펩티도글리칸과 글루칸이 곤충 사이토카인 유사 인자 마비성 펩티드의 활성화를 유발하고 이어서 누에 근육 수축을 유발한다는 것을 입증했다. 선천 면역과 근육 수축 사이 결합은 이전에 포유류에서 입증되었다. 사이토카인 인터루킨 -4는 소화관에서 평활근의 수축을 유발한다. 이 과정은 병원성 기생충에 대한 면역 반응으로 간주한다. 우리는 미생물의 침입에 대응하여 활성화된 마비성 펩티드가 host insect에서 비슷한 방어 효과를 제공할 것으로 예상한다. 감염된 누에들의 마비성 펩티드 활성화는 감염성 병원균에 대한 저항성에 중요하였다. 따라서 우리는 사이토카인 유사 인자 마비성 펩티드가 host animal에서 자체 방어를 기여하는 진정한 "사이토카인"으로써 다시 정의 내리는 것을 제안한다. 비록 사이토카인은 host가 규제된 조건 하에서 병원성 병원균들과 싸우는 것도 중요하지만, 활성화된 사이토카인에 의한 과장된 반응은 host에게서 심각한 문제를 일으킨다 예를 들어, 포유 동물의 소화관에서 생성된 과도한 사이토카인은 장 질환을 일으킨다. 게다가, 패혈증 환자에서 과도한 사이토카인 생성은 다양한 장기 문제를 일으킨다. 활성화된 마비성 펩티드에 의한 심한 근육 수축은 과장된 반응의 결과일 수도 있다. 우리는 이전에 마비성 펩티드 살충된 누에의 과다 복용을 보고한 적이 있다. 선천 면역 자극에 의한 마비성 펩티드 활성화가 근육 수축을 일으키는 결과는 체액에서의 과도한 사이토카인 생산으로 인한 장애 분자 메커니즘을 밝히는 단서가 될 것이다.