

昆虫の生体防御分子機構とその応用

研究代表者：名取 俊二（理化学研究所）

講演要旨

この研究は研究代表者が東京大学薬学部にて在任中に行っていた「センチクバエの生体防御機構に関する研究」の成果をもとに立案したもので、当初提出した提案書には、昆虫の自己と非自己の識別機構、新規生理活性物質 5-S-GAD および抗菌蛋白ザーペシン B 由来の抗菌ペプチドの3項目に焦点を絞って、創薬を意識した基礎研究を実施すると記載されている。研究が終了した時点で振り返ってみると、ほぼこの提案に沿った形で研究が進行したと言える。

当初提出した3項目の提案の背景を若干述べておきたい。まず「昆虫の自己と非自己の識別機構」というテーマであるが、センチクバエは完全変態昆虫であり、蛹の時期には幼虫組織から成虫組織へと組織の交替が起きる。例えば、幼虫の体内で最もよく発達している脂肪体（哺乳動物の肝臓と腎臓の機能を併せ持つ）は崩壊し、新しく成虫型の脂肪体が発生する。この脂肪体の崩壊過程を調べてみると、実は蛹の体液細胞（哺乳動物の白血球やマクロファージに相当）が脂肪体組織に取りついてカテプシン B を放出し、その結果脂肪体を包んでいる基底膜が壊され、組織が崩壊することが分かった。幼虫の時にも体液細胞はあるが、幼虫の体液細胞は脂肪体に取りつくようなことはない。この事実を見て思いついたのが、幼虫の体液細胞と蛹の体液細胞では、自己と非自己の認識が異なるのではないかという考えであった。すなわち、幼虫の時期には体液細胞にとって自己であった脂肪体組織が、蛹の時期には非自己として認識されることになる。この認識転換の分子機構機構の中に‘自己と非自己の識別’という免疫の基本原則を理解する鍵があるという思いが強くなり、このテーマを取り上げることにした。

次に、「新規生理活性物質 5-S-GAD」というテーマについてであるが、それまでの研究で、センチクバエの幼虫に注射針で傷をつけると、脂肪体や体液細胞の中で様々な生体防御蛋白の遺伝子が一斉に転写レベルで活性化され、合成された蛋白が体液中に分泌されること分かっていた。その大部分は抗菌蛋白やレクチンである。このような抗菌蛋白を調べている過程で、体に傷をつけた時のみに出現する、低分子量の抗菌物質の存在に気づいた。この物質を抗菌活性を指標に精製し構造を決定したところ、 β -アラニルドーパの5位にグルタチオンのシステインがSを介して結合した新規物質であった。この物質を5-S-GADと命名した。その後の研究で5-S-GADは抗菌活性以外に、蛋白質チロシンキナーゼを強く阻害することが示された。この事実は、5-S-GADが潜在的

に様々な医薬のリードとなりうることを示している。そこで、新しい医薬の創出を念頭に置いて 5-S-GAD の研究を始めることにした。

最後に、「抗菌蛋白ザーペシン B 由来の抗菌ペプチド」というテーマであるが、ザーペシン B はセンチクバエの抗菌蛋白の一つでアミノ酸 34 個からなり、主としてグラム陽性菌に対して強力な殺菌作用を示す。この蛋白の構造を NMR を用いて解析した結果、アミノ酸 1 番から 6 番までがループ構造、7 番から 17 番までが α -ヘリックス構造、その後の 17 個のアミノ酸が二つの β -シート構造を形成していることが分かった。そこで、各構造に相当する 4 種類のペプチドを合成し、各ペプチドの抗菌活性を測定した。その結果、11 個のアミノ酸よりなる α -ヘリックス相当部分にのみ、もとのザーペシン B と同程度の抗菌活性があることが明らかになった。この事実は、高分子の抗菌蛋白の活性中心を同定することにより、低分子の抗菌ペプチドの作出が可能であることを示している。この研究は、昆虫の抗菌蛋白を基盤とする抗菌剤の創製に手掛かりを与えるのではないかと考え、テーマとして取り上げることにした。

以上、当初構想した研究テーマの背景について説明したが、具体的な研究は研究参加者を三つの研究グループに分け、各グループが一つのテーマを担当することとして研究がスタートした。この研究の前半の 3 年間は東京大学薬学部が研究の本拠地であったが、途中で研究代表者が東京大学を定年退官したため、後半の 2 年間は理化学研究所に本拠地を移して研究を継続した。また、この研究には多くの大学院生が参加した。そして、大学院生の自由で独創的な発想に基づく研究も数多く行われた。このような研究の成果については、「研究実施終了報告」の中に詳しく記載したのでここでは割愛し、本概要では最初提案した 3 項目の研究成果の要約をグループごとに記すこととした。

「昆虫の自己と非自己の識別機構」研究グループ

このグループは、センチクバエの幼虫の体液細胞と蛹の体液細胞の間で、表面に露出している蛋白に質的な相違があるかどうかを中心に検討した。まず、蛹の体液細胞のみと反応するモノクローナル抗体の取得を試みた。マウスの腹腔に蛹の体液細胞を接種し免疫する。常法に従ってハイブリドーマを樹立し、ハイブリドーマの培養上清と体液細胞との反応性を指標にドットプロット法で陽性クローンをスクリーニングした。その結果、蛹体液細胞特異的な抗体を産生するハイブリドーマが得られ、その抗原は蛹の体液細胞の表面だけに発現する分子量 120 kDa の蛋白であった。複数のハイブリドーマが得られたが、すべて抗原は同一蛋白に落ちた。次に、モノクローナル抗体の一つ 9C8 をリガンドとするアフィニティーカラムを作製し、このカラムを用いてセンチク

バエの蛹体液細胞の膜画分から 120kDa 蛋白の精製を行った。ついで、精製蛋白の部分アミノ酸配列を手掛かりに 120kDa 蛋白の cDNA クローニングを行った。cDNA の解析から 120kDa 蛋白は 1 回膜貫通型の蛋白で、C-末端側 47 残基が細胞内にあり、細胞外に突き出している部分には 18 個の EGF 様構造が存在することが分かった。現在この蛋白の機能の解析が進行中であるが、この蛋白は崩壊した幼虫組織の断片や、不要となった幼虫細胞を掃除するために蛹の時期だけに出現するスカベンジャーリセプターであることを示唆する知見が得られつつある。これまでにこのようなスカベンジャーリセプターの報告はなく、全く新しい知見と言える。

「新規生理活性物質 5-S-GAD」研究グループ

5-S-GAD が v-src の自己リン酸化反応を強く阻害することから、この物質のヒト癌細胞に対する増殖阻害効果を検討した。その結果、試験した 38 株の癌細胞の中、2 株の乳癌細胞と 1 株のメラノーマ細胞の増殖を顕著に抑制した。ヌードマウスにこれらの癌細胞を接種し、5-S-GAD で治療を試みると有意な治療効果が得られることが分かった。詳しく解析した結果、5-S-GAD 中の β -アラニル基が癌細胞選択性に寄与すること、この物質が産生する活性酸素種が細胞毒性発現に重要であること、などが明らかになった。そして、5-S-GAD に抵抗性の癌細胞では抗酸化分子の産生量が多いことも示された。しかし、活性酸素種だけで 5-S-GAD の抗癌活性を説明出来ないことも実験的に明らかになり、この物質のチロシンキナーゼ阻害活性が抗癌活性にどのように寄与するのか、現在検討中である。

一方、5-S-GAD はマウスの骨髄細胞から破骨細胞（TRAP 陽性細胞として検出）が分化する過程を著しく阻害することが分かった。この間、培養中の細胞の細胞死は殆ど認められなかった。おそらく、5-S-GAD により幹細胞のある種の蛋白質チロシンキナーゼが阻害され、破骨細胞への分化が停止するものと思われる。現在までに、マウスの破骨細胞の分化途上で発現する遺伝子の中で 5-S-GAD により発現に影響が見られるものを DNA マイクロアレーを用いていくつか同定している。

「抗菌蛋白ザーペシン B 由来の抗菌ペプチド」研究グループ

このグループはザーペシン B に限ることなく、センチニクバエの抗菌蛋白由来の活性ペプチドの研究を行った。特に、ザーペシン B の活性中心を改変して得られたペプチド L5 および L3 の研究から、L5 のみが好中球を活性化して活性酸素を放出させ、マウスの MRSA 感染症の発症を抑制する能力があることが明らかになった。そして、好中球上の L5 のリセプターを調べた結果、意外にも小胞体の分子シャペロンとして知られている calreticulin が好中球の細

胞表面にも一部発現しており、この分子に L5 が結合すると G-蛋白を経由する形でシグナルが細胞内に入り、活性酸素の放出が起きることが判明した。calreticulin がシグナル伝達にかかわることを見出したのはこれが初めての知見であり、この結果は分子シャペロンの研究にも新しい切り口を与えることになった。

この研究を遂行するために雇用した研究員は総計で 3 名、研究補助員 1 名、事務員 1 名であり、研究参加者の大部分は大学院生と大学におけるスタッフでその数は総計約 40 名であった。また、この研究は当初「創薬を意識した基礎研究」として提案しているので、終了に当たり、5 年間の成果をもとにどのような創薬が考えられるか項目のみを列記する。その具体化については、今後の課題である。

1. 5-S-GAD をリードとする細胞選択性のある制癌剤
2. 新規抗菌性ペプチドを基盤とする感染症治療薬
3. β -アラニルドパをリードとする骨粗鬆症治療および予防薬の開発
4. 腸管マクロファージの *Sarcophaga* レクチンリセプターを抑制する薬物
(クローン病の治療薬)