

「生体防御のメカニズム」

平成7年度採択研究代表者

名取 俊二

(理化学研究所 特別招聘研究員)

「昆虫の生体防御分子機構とその応用」

1. 研究実施の概要

生体防御機構はすべての生物に備わっている自己防御のためのシステムで、種によってバリエーションはあるが、基本的には自己と非自己を識別して、非自己のみを選択的に排除する機構と言える。最もよく研究されているのがヒトを含む脊椎動物の免疫系であるが、そのルーツを理解するには、進化的、比較生物学的に研究する必要がある。本研究では、動物種の70%を占める昆虫の生体防御機構を解明し、その中で見出した新しい物質やシステムの応用を目指している。

本研究グループは3つのサブグループから構成される。「昆虫の自己非自己の認識機構」グループは、不要となった幼虫組織が選択的に排除される蛹の時期に、体液細胞表面に出現する120-kDa蛋白を見出し、この分子のcDNAクローニングに成功した。また、非自己細胞の崩壊に関与する体液細胞プロテアーゼの翻訳制御に関与するRNA結合蛋白のcDNAクローニングにも成功した。「新規生理活性物質5-S-GADに関する研究」グループは、昆虫の生体防御分子の1つとして見出された5-S-GADの制癌剤と骨粗鬆症薬としての有用性の検討を行っている。これまでに細胞選択的に制癌効果を示すことを明らかにし、*in vivo*における制癌治療効果を示した。「好中球の抗菌ペプチドのリセプターに関する研究」グループは、昆虫で見出された抗菌蛋白をリードとして改変した抗菌ペプチドが、ヒトの好中球を活性化することを明らかにした。さらに、好中球上の抗菌ペプチド結合蛋白を精製し、これまで分子シャペロンと考えられていたcalreticulinが好中球の活性化に重要であることを明らかにした。今後は昆虫の生体防御機構と脊椎動物の生体防御機構の接点を探るとともに、昆虫特有の生体防御分子の医薬としての応用をさらに追究する予定である。

2. 研究実施内容

(1) 虫の自己と非自己の認識機構の研究

蛹の時期には、体液細胞の表面に、不要となった自己を非自己と認識する分子(蛋白)が新たに出現するという仮説に基づき、前年度までに蛹体液細胞表面に

特異的に出現する 120kDa 蛋白を同定し、cDNA を単離してその一次構造を明らかにした。本年度には、この分子が哺乳類のスカベンジャー受容体に構造が似ていることに着目して、この分子がアセチル化 LDL の体液細胞への取り込みに機能しているかどうかを検討した。その結果、この分子に対するモノクローナル抗体の添加により、蛹体液細胞へのアセチル化 LDL の取り込みは、阻害されることが明らかになった。このことから、120kDa 蛋白の機能の 1 つとして不要となった自己分子の排除にかかわることが考えられた。

一方、非自己の排除に働くプロテアーゼが変態時には翻訳のレベルで遺伝子発現制御を受けていることに着目し、前年度までにその制御に関わる RNA 結合蛋白について cDNA を単離した。しかしながらこのクローンは決定した部分アミノ酸配列をすべて含んでいたものの、予想アミノ酸配列から計算される分子量は精製標品の SDS-PAGE 上での分子量と大きな差が見られた。本年度はリコンビナント蛋白を調製し、求める cDNA であることの確認と今後の解析に必要な蛋白を得た。

(2) ヒト好中球上の抗菌ペプチド L5 のリセプターの研究

前年度までに、センチニクバエの抗菌性蛋白ザーペシン B の研究から得られた二つの抗菌ペプチド、KLKLLLLLKLK-NH₂ (L5 と略す) および KLKLLLKLK-NH₂ (L3 と略す) の抗菌活性および MRSA 感染マウスに対する治療効果を検討した。その結果、L5 よりも L3 の方が抗菌活性は強いにもかかわらず、L3 には感染症治療効果は認められなかった。

一方、L5 はヒトの好中球を活性化するが L3 には好中球活性化能がないことが分かった。すなわち、これらの抗菌ペプチドの MRSA 感染マウスに対する治療効果と好中球活性化能の間には正の相関関係があることが判明した。この事実は好中球上に L5 の特異的なリセプターが存在すること、このリセプターが新しい感染症治療薬のターゲットとなりうることを示唆している。そこで本年度は、ヒト好中球の膜画分から L5 に特異的な結合蛋白の単離を試みた。ヒト好中球から膜画分を調製し、Triton-X 100 により蛋白を可溶化した。この蛋白を L5 をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーにより解析したところ、分子量 55 kDa の蛋白 (P55) が L5 と特異的に結合することが明らかになった。P55 の N-末端側のアミノ酸配列を 15 残基決定したところ、その配列は驚くべき事に ER に存在する分子シャペロンである calreticulin の N-末端の配列と完全に一致した。この事実は、calreticulin が細胞の表面にも存在し、L5 のシグナルを細胞内に伝達している可能性を示唆する。そこで calreticulin の抗体が L5 による好中球の活性化を阻害するかどうか調べたところ、予想どおり阻害が認められた。この結果、従来 ER に存在する分子シャペロンと考えられていた calreticulin にペ

プチドリセプターという新しい機能があることが明らかになった。

一方、L5 による好中球の活性化は百日咳毒素 (IAP) により阻害されることが分かり、この反応には G-蛋白が関与することが示された。calreticulin が直接 G-蛋白とカップルしているのか、calreticulin と G-蛋白の間に別の蛋白が介在するのは今後明らかにすべき課題である。

(3) 5-S-GAD の抗腫瘍活性

5-S-GAD はセンチニクバエ成虫が作り出す低分子性抗菌物質で、ハービマイシンAに匹敵するチロシンキナーゼ阻害活性を持っている。前年度までの検討結果から、38 種のヒト培養がん細胞を用いた抗癌スクリーニングの結果、5-S-GAD はメラノーマおよび一部の乳がん細胞に選択的に作用することが明らかとなった。さらに、検討した乳がん細胞 5 株の中でも、ホルモンリセプター陰性の転移性の高い悪性腫瘍 2 株により強く作用することが示された。現在、乳がんの治療には、抗エストロゲン作用を持つ薬剤が中心に用いられており、エストロゲン依存に増殖する乳がんには治療効果をあげている。しかし、エストロゲン非依存に増殖し、骨や他の臓器に転移する悪性化した乳がんに対しては有効な治療法は確立されていない。したがって、5-S-GAD のこのような薬剤特性は大変興味深い。

そこで本年度はヌードマウスを用いた *in vivo* の抗がん作用を検討した結果、5-S-GAD がヒトメラノーマおよび乳がんの増殖を有意に抑制することを見い出した。ヒトメラノーマ LOX-IMV1 をヌードマウス (BALB/c、6 週齢、雌) の右わき腹に皮下移植し、2 週間観察した。メラノーマの増殖は非常に早く、2 週間で 10,000 mm³ に及んだ。5-S-GAD は、500 mg/kg の用量で、移植後 4, 7, 11, 14 日の 4 回間欠腹腔内投与により、移植したメラノーマの増殖を約 50% 抑制した。また、100 mg/kg の用量で、移植 4 日目から 5 日間連続投与することにより、有意な増殖抑制効果を示した。5-S-GAD の毒性は弱く、1,000 mg/kg の用量で 5 日間連続投与しても、体重減少などの副作用は見られなかった。次に、ヒト乳がん細胞で悪性度の高い MDA-MB-435S を用いて同様の実験を行った。MDA-MB-435S のヌードマウス乳腺における増殖は、メラノーマの皮下における増殖と比較して遅く、移植後 3 ヶ月で 500mm³ 程度であった。

このような条件下で 5-S-GAD を、100 および 200 mg/kg の用量で、週 3 回、合計 20 回腹腔内に投与すると、MDA-MB-435S の増殖は約 60% 抑制された。投与スケジュールや投与経路など、さらなる検討を要するが、今年度の研究結果から、5-S-GAD が細胞選択性の高い抗腫瘍剤であることが示された。今後は、5-S-GAD の作用機序を解明していく予定である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- T. Ito, M.F. Seldin, M.M. Taketo, T. Kubo and S. Natori. Gene organization and chromosome mapping of the testis-specific S-II. *Mamm Genome* 11 (1998) 915-917
- Z-B. Zheng, S. Nagai, N. Iwanami, A. Kobayashi, M. Hijikata, S. Natori and U. Sankawa. Selective inhibition of src protein tyrosine kinase by analogues of 5-S-glutathionyl- β -alanyl-L-dopa. *Chem. Pharm. Bull.* (1998) 46, 1950-1951
- T. Arai, T. Kubo and S. Natori. Cloning of cDNA for regenectin, a humoral C-type lectin of *Periplaneta americana*, and expression of the regenectin gene during leg regeneration. *Insect Biochem. Molec. Biol.* (1998) 28, 987-994
- J-Y. Leem, H-Y. Park, H. Fukasawa, Y. Uehara and S. Natori. Inhibitory effect of 5-S-GAD on phosphorylation of V-SRC and BCR-ABL tyrosine kinase. *Biol. Pharm. Bull.* (1998) 21, 784-785
- J. Nakajima-Shimada, S. Natori and T. Aoki. Effects of synthetic undecapeptides on *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Parasitology International* (1998) 47, 203-209
- S. Yamaguchi, K. Homma and S. Natori. A novel egg-derived tyrosine phosphatase (EDTP), that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Eur. J. Biochem.* (1999) 259, 946-953
- M. Ohshima, I. Mitsuhara, M. Okamoto, S. Sawado, K. Nishiyama, H. Kaku, S. Natori and Y. Ohashi. Enhanced resistance to bacterial diseases in transgenic tobacco leaf overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *J. Biochem.* (1999) 125, 431-435
- H.-S. Lee, M.-Y. Cho, K.-M. Lee, T.-H. Kwon, K. Homma, S. Natori and B.-L. Lee. The prophenoloxidase of coleopteran insect larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS Letts.* (1999) 444, 255-259
- Y. Fujimoto, A. Kobayashi, S. Kurata and S. Natori. Two subunits of 26/29-kDa proteinase are probably derived from a common precursor protein. *J. Biochem.* (1999) 125, 566-573
- I. Fujii, Y. Tanaka, K. Homma and S. Natori. Induction of *Sarcophaga* central nervous system remodeling by 20-hydroxyecdysone in vitro. *J. Biochem.* (1999) 125, 613-618