

「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

平成11年度は、5-S-GADや種々の抗菌ペプチドの作用機構に関する研究、及び昆虫の非自己認識機構に関する研究を実施した。その結果、5-S-GADの抗癌活性に必要な構造を明らかにし、その抗癌作用には活性酸素が関わることを示唆できた。また、5-S-GADは破骨細胞分化を阻害することを見出した。好中球上の抗菌ペプチドリセプター(カルレティキュリン)に結合する生体内リガンドの候補を見出した。抗菌ペプチドの中に、細胞膜のステロールを識別する可能性のある分子が見出され、また幅広く抗微生物活性を示すアミノ酸9個のペプチドをデザインした。センチニクバエの生体防御に働くと考えられる新規の体液細胞レクチンを同定した。

2. 研究実施内容

1. 新規生理活性物質 5-S-GAD に関する研究

・ 癌細胞に対する作用

5-S-GADはセンチニクバエから見出された誘導性の抗菌物質である。ヒト癌細胞パネルによる制癌効果の検定の結果、5-S-GADには細胞選択性の制癌効果が認められた。昨年度にはヌードマウスを用いた*in vivo*の治療実験を行い、5-S-GADの腹腔投与によって皮下移植したこれらの癌の増殖が抑制されることを明らかにした。問題は、5-S-GADに感受性の細胞と、非感受性の細胞で何が違うのかということである。本年度は、5-S-GADの構造活性相関、およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。5-S-GADの抗癌活性に必要な構造を明らかにするために、5-S-GADの構造の一部を欠いたいくつかの化合物について抗癌活性を比較検討した。その結果、5-S-GADの抗癌活性にはGSHのグルタミルシスチニル(GluCys)側鎖が重要であろうと考えられた。また、-alanyl基が細胞選択性に寄与している可能性が考えられた。5-S-GADの抗癌活性に対するカタラーゼ及びsuperoxide dismutase(SOD)など種々の抗酸化分子の添加効果を検討したところ、感受性の癌細胞の1つであるMDA-MB-435Sに対する抗癌作用には過酸化水素やスーパーオキシドアニオン($O_2^{\cdot-}$)など活性酸素種が関与することが示唆された。一方、LOX-IMV1およびMDA-MB-

231に対する 5-S-GAD の増殖抑制作用は、抗酸化分子添加の影響を受けなかった。さらに、細胞培養時に5-S-GAD から産生される活性酸素を検出し、その量が細胞種によって違いがあるか検討する目的で、細胞の酸化状態を調べた。その結果、5-S-GADは感受性とは無関係に、全ての細胞に対して長時間にわたって酸化ストレスを与えることが分かった。したがって、5-S-GAD の細胞選択的な増殖阻害作用は、細胞側の酸化ストレス対応能力に起因する可能性が考えられた。

- ・ 破骨細胞分化に対する作用

マウス骨髄細胞の*in vitro*の培養系を用いて検討した結果、5-S-GADおよび *l*-alanyl-dopaには幹細胞から破骨細胞に分化する過程を阻害する作用があることを見出した。すなわち、骨髄細胞をODF（破骨細胞分化因子）存在下に培養すると破骨細胞が分化してくるが、この系の中に5-S-GADおよび *l*-alanyl-dopaが存在すると、破骨細胞の出現は著しく抑制された。5-S-GADの作用機構を知る目的で、5-S-GADにより変動する遺伝子および5-S-GAD結合蛋白の探索を進めている。

2. 好中球上の抗菌ペプチドリセプターの研究

- ・ calreticulinを介したシグナル伝達機構の解析

センチクバエの抗菌性蛋白ザーペシンBの活性ドメインからデザインした合成抗菌ペプチド、KLKLLLLLKLK-NH₂（L5と略す）は、MRSA感染モデルにおいて感染症治療効果を持ち、この効果はヒト好中球の活性化能と正の相関がある。昨年度は、好中球上にL5に特異的なリセプターが存在し、実は分子シャペロンの一つであるカルレティキュリンであったこと、L5が細胞表面にあるこのカルレティキュリンに結合すると、G-蛋白を介してシグナルが細胞に伝達され、好中球は活性化されて活性酸素を産生するようになることを明らかにした。この結果は、カルレティキュリンが従来から言われている蛋白の成熟過程に関与するだけでなく、細胞表面にも存在してL5のリセプターを構成している可能性を示している。しかしながらこの分子には膜貫通ドメインがないので、細胞表面のカルレティキュリンとG-蛋白の間に第三の分子が介在することを想定し、今年度はカルレティキュリンと結合する膜蛋白の同定を目指した。好中球方向に分化させたU937細胞株の膜分画を調製し、蛋白を可溶化して、リコンビナントのカルレティキュリン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かけた。その結果、主な結合蛋白として分子量64 kDaと26 kDaが見出された。N末端アミノ酸配列を決定したところ、64 kDa蛋白のN-末端は、ヒトのprotein disulfide isomerase（PDI）と一致し、26 kDaのバンドからは二種類の配列（ミエロプラスチンとアズロシチン）が検出された。今までに見つかった

分子は、いずれも膜蛋白ではないが、今回の解析により、好中球が自ら分泌するミエロプラスチンやアズロシチンによって活性化するという可能性が新たに考えられた。これらの、炎症に深く関わる蛋白とカルレティキュリンが結合するという知見は、カルレティキュリンが初期免疫応答時において重要な機能を果たすことを示唆するものであり、非常に興味深い。

- ・ 抗菌ペプチドの作用メカニズムの解析

ザルコトキシシン Aはアミノ酸 39個からなる塩基性の両親媒性分子で、バクテリアの細胞膜を傷害して殺菌作用を示すことがわかっている。今年度の研究で、ザルコトキシシン Aは真菌に対しても殺菌的に作用し、恐らく細胞膜を標的にしていることを明らかにした。真菌も真核細胞であるが、同じ真核細胞でもマウスのような哺乳動物の繊維芽細胞株や腹腔細胞には800 μ Mまで全く毒性を示さなかったことから、真菌と動物細胞の細胞膜の差に注目してザルコトキシシン Aの細胞選択性を検討した結果、真菌と動物細胞のステロールの違いを識別していることが示唆された。

私たちはこれまでに、変態時期の中腸の中に一過性に出現する分子量 26 kDaのセリンプロテアーゼを見出し、またこの分子にはプロテアーゼ活性とは独立に強い抗菌活性を持つことを明らかにしてきた。おそらくこのプロテアーゼは、変態時に幼虫の中腸を崩壊させると同時に、漏出する腸内バクテリアを殺すという二つの機能を持つと思われる。その抗菌活性にプロテアーゼ活性は必要ないことから、抗菌活性を担うドメインを予想し、今年度の研究で元の分子と同程度の比活性を持つアミノ酸20個の部分を見出した。このペプチドを作用させた黄色ブドウ球菌の電顕像を観察すると、26 kDaプロテアーゼと同様に菌体の構造は保ったものの表面にたくさんの突起が出現していることがわかった。大腸菌膜の透過性変化の実験やリポソーム膜の傷害性の実験から、作用点はバクテリアの細胞膜であり、細胞膜の低分子物質の透過性を変化させて致死作用を発揮するものと考えられた。

センチクバエの抗菌性蛋白ザーペシンBよりデザインしたL3ペプチドは、宿主介在型の感染症治療効果は認められないものの、抗菌活性そのものはL5に比較して強い。そこで、L3をより低分子化できるかどうかを検討した。アミノ酸の置換や除去をした11種のペプチドを合成して抗菌活性を調べた結果、アミノ酸 9 個のKVKLLLLKVK-NH₂ (VL3) が強い抗菌活性を示し、末端のアミノ酸を1つ除去したものがこれに次ぐ活性を示した。KVKLLLLKVK-NH₂ (VL3) とKVKLLLLKV-NH₂を作用させた大腸菌の走査型電顕像を観察した結果、どちらのペプチドもコントロールに比べて大腸菌の表面構造を変化させていたが、興味深いことに両者の大腸菌の様子は全く異なっていることがわかった。これま

で、塩基性の抗菌ペプチドは、バクテリアの細胞膜を傷害することが致死作用のメカニズムであると考えられてきたが、ペプチドによっては膜以外の標的分子が存在する可能性が考えられる。

3. 昆虫の自己と非自己の認識機構の研究

- ・ 非自己の排除に働くプロテアーゼの翻訳制御

蛹の時期には、非自己の排除に働くプロテアーゼ（カテプシンB）が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（110kDa）についてcDNAの単離、リコンビナント蛋白の調製を行った。本年度は調製したリコンビナント蛋白を用いて、翻訳の抑制活性の確認とmRNAへの結合を調べた。その結果、110kDa蛋白依存に翻訳の抑制が見られ、110kDa蛋白はカテプシンB mRNAの翻訳領域にも結合することが新たにわかった。

- ・ センチクバエの新規レクチンの同定

我々はすでに、センチクバエで非自己細胞の排除に関わる *Sarcophaga* レクチンを見出し、昆虫内で生体防御に働くと同時に、種を越えてマウスなどの免疫担当細胞を活性化することを明らかにしている。本年度の研究では、新たに昆虫の生体防御担当細胞である体液細胞が産生するレクチンを見出し、解析した。白血球にあたる体液細胞が生体防御にどのように関与するかを知る目的で、体表を傷害して異物侵入の危険性が増した幼虫の体液細胞を特異的に認識する抗体を調製した。そして、その抗体の認識する抗原を精製してcDNAクローニングを行い、新規のレクチン様構造を持つ分子であることを見出した。この分子は、173個のアミノ酸からなり、*Sarcophaga* レクチンとホモロジーを有していた。さらにこの分子は、構造から予想されたようにカルシウムイオン存在下でウサギ赤血球を凝集させる活性を持つことがわかった。現在までに阻害糖は明確にできていないが、かなり複雑な糖鎖を認識していると思われた。体液細胞の一つである顆粒細胞（granulocyte）に存在することから、このレクチンを granulocytin と命名した。

- ・ *Sarcophaga* レクチンのマウス細胞に対する作用

マウスマクロファージからのTNF産生を確認する目的で、コントロールとして、TNF感受性の培養細胞L929に対する *Sarcophaga* レクチンの効果を検討した。その結果、L929細胞は10 μ g/ml以上の *Sarcophaga* レクチンによって強く凝集し、増殖が止まることを見出した。この効果は可逆的で、培養液からレクチンを除くと細胞は再び遊離して増殖を開始した。これらの結果から、L929細胞には *Sarcophaga* レクチンに対するリセプターがあり、この分子を介して情報が伝わって細胞周期を止めていることが考えられる。他に2種類の培養細胞を検討

したが、増殖抑制の見られるのはこのL929細胞だけであり、細胞によって反応性が異なることがわかった。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Kazuaki Ohashi et al. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.) *Eur.J.Biochem* 265,127-133(1999)

Mariko Hijikata et al. Induction of apoptosis of monocyte-macrophage lineage cells by 5-S-GAD *FEBS Letters* 457,405-408 (1999)

Jang-Hyun Cho et al. Activation of human neutrophils by a synthetic anti-microbial peptide, KLKLLLLLKLK-NH₂, via cell surface calreticulin *Eur.J.Biochem.* 266,878-885(1999)

Ryoko Iijima et al. Stage-Specific Inhibition of *Xenopus* Embryogenesis by Aprotinin, a Serine Protease Inhibitor *J.Biochem.* 126, 912-916 (1999)

Nobuko Akiyama et al. Anti-tumor effect of N- α -alanyl-5-S-glutathionyl-dehydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel anti-bacterial substance from an insect *Anticancer Research* 20,357-362 (2000)

Yuki Nakajima et al. Identification and Characterization of an Anterior Fat Body Protein in an Insect *J.Biochem.* 127, 901-908 (2000)