

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

蚊における生体防御機構の解明と創薬への応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 昆虫医科学部
研究者 佐々木年則

要旨

マラリア原虫に対する蚊の生体防御が知られるようになってきている。しかし、蚊の生体防御機構は不明な点が多い。蚊の生体防御機構を明らかにし、活性化する薬剤の開発に繋げマラリア媒介阻止を目指すため、シアル酸特異的レクチンの構造解析を試みた。

1. 研究目的

マラリアは現在においても熱帯・亜熱帯を中心に猛威をふるっており、アフリカでは毎年200万人以上の乳幼児が死亡している。クロロキンなど抗マラリア剤に対する抵抗性が熱帯熱マラリア原虫に出現し、殺虫剤抵抗性のハマダラカ類の出現など困難な問題が山積している。効果的なワクチン開発も未だ成功しておらず、世界保健機関（WHO）は DDT を染み込ませた蚊帳を流行地の住民に配布することを奨励している。しかしながら、必ずしも住民の協力は得られていない。このような状況を打破するために、マラリア媒介蚊の媒介能力を人為的に変えることを目標として蚊類の生体防御機構の研究が行われている。一部マラリア原虫が発育せず殺される非感受性系統が知られており、米国を中心に、遺伝学的解析で非感受性遺伝子に関連する因子の存在が報告されている。カイコについて生体防御機構の一つであるメラニン化の詳細な機構が生理・生化学的に調べられているが、疾病媒介ということで医学的に重要である蚊において未だにメラニン化を代表とする非感受性機構は解明されていない。

マラリア非媒介蚊オオクロヤブカ (*Armigeres subalbatus*) の病原体認識分子 (シアル酸特異的レクチン) cDNA の塩基配列を決定し、シアル酸特異的レクチン cDNA の塩基配列からアミノ酸配列を推定し構造決定を行う。シアル酸特異的レクチンであるマラリア原虫認識分子を分かることにより、蚊の段階でマラリア原虫を殺す機構の一つであるプロフェノール酸化酵素活性化系の最初の段階を明らかにする。

2. 研究方法

1) シアル酸特異的レクチン cDNA に対するプローブの作製

アミノ酸配列から縮重プライマーを作製し PCR を行い、アガロース電気泳動を行った。コントロールにはないバンドを切り出し、QIAEX II (キアゲン) を用いて PCR 産物を精製した。その後、pCR2.1 ベクター (インビトロジェン) にライゲーションを行い、TOP10F' 細胞に感染させ、βガラクトシダーゼ遺伝子によるブルーホワイトセレクションで、挿入の有無を判定した。さらに、コロニー PCR で挿入の有無を確認した。陽性コロニーを 50 μg/ml アンピシリンを含んだ Terrific broth で一晩培養し、Quantum Prep: Plasmid Miniprep Kit (バイオラド) を用いてプラスミドを精製した。BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ) によってラベリング反応を行い、DNA の配列を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) にて明らかにした。Genetics Computer Group の配列ソフトウェアパッケージにて DNA の配列を解析した。

2) マラリア非媒介蚊 *Armigeres subalbatus* 由来 cDNA ライブラリーの作製

マラリア非媒介蚊 *Armigeres subalbatus* の蛹になって一日以内のものから、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて、総 RNA を抽出した。その後、Oligotex-dT30<Super> Kit (宝酒造) を用いて、Poly(A)⁺mRNA を精製した。TimeSaver cDNA Synthesis Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) や Directional Cloning Toolbox (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて cDNA の合成を行った。Poly(A)⁺mRNA から Not I / Oligo-dT プライマーや First-Strand Reaction Mix によって RNA:cDNA の二本鎖を合成した。Second-Strand Reaction Mix によって二本鎖 cDNA を合成し、スパンカラムを用いて、目的の大きさの cDNA を回収した。次に、EcoR I アダプターをポリエチレングリコール緩衝液中で、T4 DNA リガーゼによって cDNA に結合させた。ATP 存在下で、ポリヌクレオチドキナーゼによってアダプターの末端

をリン酸化した。NotI によって NotI 部位を切断した。さらに、スパンカラムによって目的の大きさの cDNA を分画し回収した。λ ExCell NotI/EcoRI/CIP に cDNA をライゲーションさせた。

パッケージングは、MaxPlax Lambda Packaging Extract Kit(エアブラウン)によって行った。λ ExCell NotI/EcoRI/CIP にライゲーションされた cDNA は、Packaging Extract と反応させた。その後、ライブラリーの力価を調べた。さらに、PCR を使ってインサートサイズを確認した。

3. 研究成果

1) シアル酸特異的レクチン cDNA 断片に対する取得の試み

シアル酸特異的レクチンの全構造を決定するため、今までに明らかにしてきたシアル酸特異的レクチンの N 末端アミノ酸配列や内側のアミノ酸配列をもとに、縮重プライマーを作製し Nested PCR を行った (Fig. 1)。PCR 産物をアガロース電気泳動にて解析した (Fig.1 A)。N-SS-10C18 プライマーと N-2-8-13C18 プライマーによって特異的に増幅された産物は、354bp、252bp と 134bp の産物であった。また、PCR 産物をアクリルアミド電気泳動にて同様に解析を行った (Fig. 1B)。その結果、N-SS-10C18 と N-2-8-13C18 によって特異的に増幅された産物は、354bp と 134bp の産物であった。

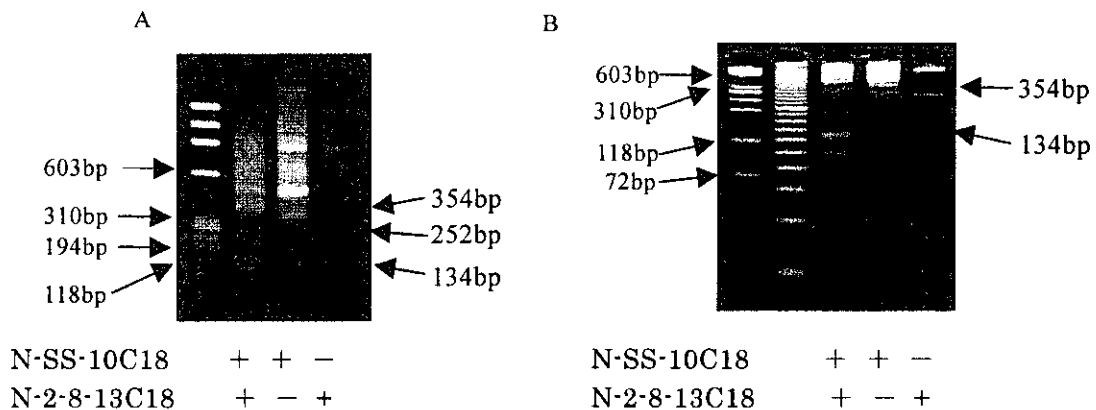


Fig 1. Nested PCR with N-SS-10C18 and S-2-8-13C18 primers

さらに、得られた産物がシアル酸特異的レクチン cDNA の断片であるか PCR 産物を切り出し、精製を行い、TA クローニング法を用いて、クローニングを行った。プラスミドを精製し、サイクルシーケンシング法で遺伝子断片の配列を解析した。遺伝子配列をもとに、アミノ酸配列の推定を行った。その結果、シアル酸特異的レクチンの N 末端アミノ酸配列やペプチド断片のアミノ酸配列と一致するものは、得られなかった。

2) *Armigeres subalbatus* 由来 cDNA ライブラリー作製の試み

Armigeres subalbatus 由来 cDNA ライブラリーの作製を試みた。*Armigeres subalbatus* の蛹になって 1 日以内のものをポルトロンで粉砕し、ISOGEN を用いて総 RNA を抽出し、Oligotex-dT30<Super> Kit を用いて、Poly(A)⁺mRNA を精製した。TimeSaver cDNA Synthesis Kit や Directional Cloning Toolbox を用いて、cDNA を合成した。さらに、MaxPlax Lambda Packaging Extract Kit によってパッケージングを行った。パッケージング効率は、 1.71×10^4 pfu/ μ g (1.30×10^4 pfu/ml) と低く、インサートサイズにおいても 10 プラークをランダムにピックアップして PCR で大きさを調べると平均して 570 bp と小さく cDNA ライブラリーとして用いるには、不十分であった。

	Packaging efficiency (pfu/ μ g)	Packaging efficiency (pfu/ml)	Insert size (bp)
<i>Armigeres subalbatus</i>	1.71×10^4	1.30×10^4	570

Table 1. Construction of cDNA library from *Armigeres subalbatus*

4. 考 察

以前に、シアル酸特異的レクチンの全構造を決定するために、内側のアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列からFASTAでホモロジー検索を行った。特に一致する物はなく、興味深かったものとして、ペプチド断片2とアブラナ科の植物由来の抗菌作用を持つことが知られているthionin variant Thi2Ca1の間で、19残基中42.1%の相同性を示した。システイン残基が活性を示すところで、よく保存されていた。従って、シアル酸特異的レクチンは、チオニン様の領域が存在することが示唆された。

チオニンの機能として知られていることは、様々な細菌、カビに対する植物の抗病原性ペプチドであり、動物の細胞に対して毒性を示す。また、溶血活性を示し、カビの細胞壁構成成分であるキチンや β -1,3-グルカンのような多糖に結合することが最近になって報告された。その他、陰性荷電の粒子に対して凝集活性を示すことも報告されている。

我々は、以前よりシアル酸特異的レクチンが、ミクロフィラリアやマラリア原虫のオーシストに対して結合し、プロフェノール酸化酵素活性化系を活性化し、活性化されたフェノール酸化酵素によってメラニン化が形成され、寄生虫を封じ込めるメラニン化作用を持つことを報告した。また、赤血球にシアル酸特異的レクチンが結合し、相互作用蛋白が結合し、溶血の系が活性化され、溶血が起こる溶血作用を報告してきた。メラニン化作用と溶血作用を説明するのに、シアル酸特異的レクチンの中に、チオニン様の領域が存在することは話が合うのではないかと考えている。

今のところ、まだシアル酸特異的レクチン cDNA のクローニングに成功していない。しかしながら、以上を蚊の体内で考えてみると(Fig. 2)、中腸の基底膜側にマラリア原虫のオーシストが形成される。近年、哺乳類において補体系の第三経路としてレクチン経路が報告されている。マンナン binding lectin (MBL)が MBL-associated serine protease (MASP) と結合し、補体系を活性化することが知られている。

我々は今のところ考えていることとして、寄生虫であるマラリア原虫の表面上のシアル酸をシアル酸特異的レクチンが認識するだろうと考えている。シアル酸特異的レクチンに相互作用するようなセリンプロテアーゼのプロフェノール酸化酵素活性化酵素があり、それによりプロフェノール酸化酵素が活性化するのではないかと想定している。そして、メラニン化が進行するだろうと考えている。

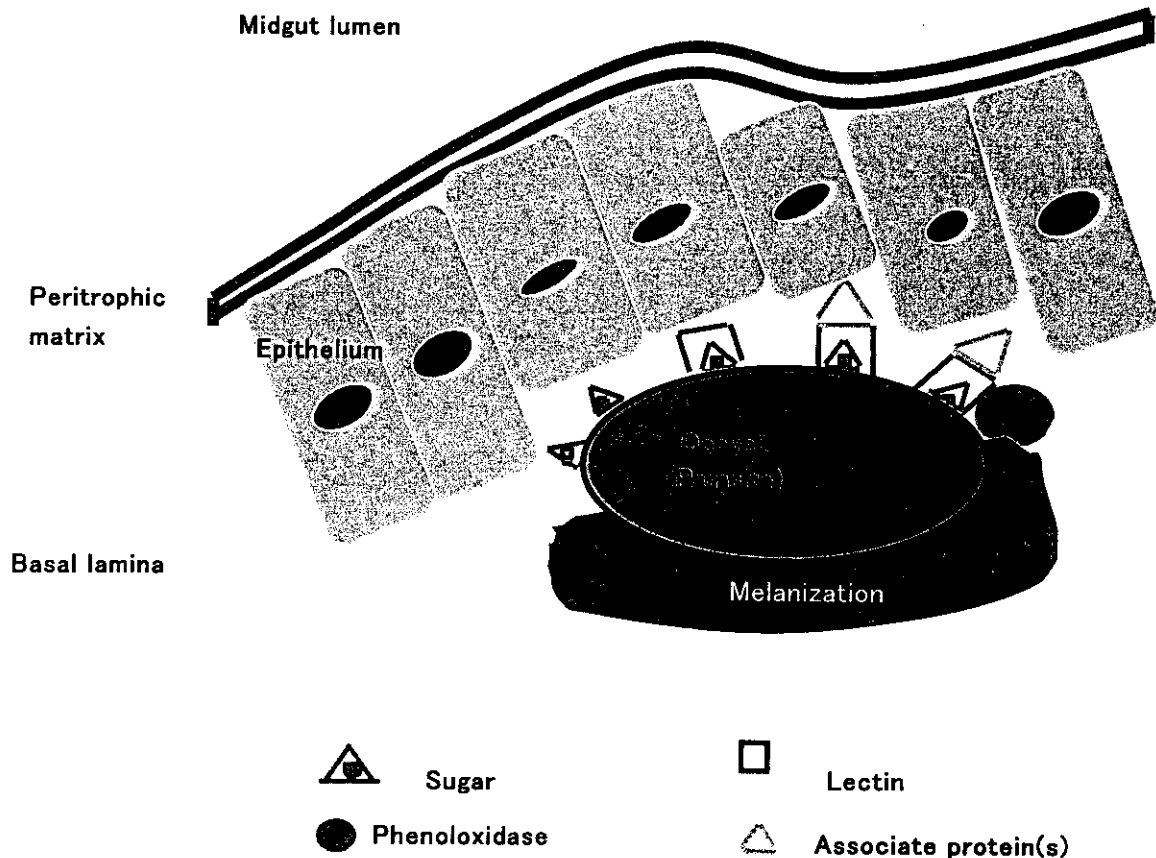


Fig 2. Hypothesis for Melanization of Parasite in Mosquitoes

5. まとめ

本年度は、蚊における生体防御機構の解明と創薬への応用に関する研究において以下のことを行った。

- 1) シアル酸特異的レクチン cDNA をクローニングするために、プローブの作製を試みたが、目的とする遺伝子断片を得ることが出来なかった。
- 2) シアル酸特異的レクチン cDNA のクローニングを行うため、*Armigeres subalbatus* の cDNA ライブラリーの作製を試みたが、ライブラリーの力価が低くまたインサートサイズ小さく、十分な cDNA ライブラリーを作製することが出来なかった。

今後は、再度 cDNA ライブラリーの作製を試み、以前にグライコホリンを用いたシアル酸特異的レクチンの検出系を開発したことより、発現クローニングを行う予定である。さらに、シアル酸特異的レクチン cDNA のクローニングが成功した後、さらに下流の因子つまりシアル酸特異的レクチン相互作用因子をファーウエスタンプロット法あるいは、two-hybrid system 法によって、明らかにして行きたい。そのようにして、マラリア原虫を殺す機構の一つであるプロフェノール酸化酵素活性化系を明らかにして行きたい。そして、マラリア原虫を殺す誘導剤の開発に繋げていきたい。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

平成13年度

創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社