

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 断片の取得

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 で一晚培養し、Quantum Prep: Plasmid Miniprep Kit (バイオラッド) 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) によってシーケンシング反応を行い、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。ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene) を用いて cDNA の合成を行った。Poly(A)⁺mRNA から *Xho*I/Oligo-dT プライマー、Strata Script や Superscript II などによって RNA:cDNA の二本鎖を合成した。DNA polymerase I によって二本鎖 cDNA を合成した。次に、*Eco*R I アダプターを緩衝液中で、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。*Xho*I によって *Xho*I 部位を切断した。さらに、S-1000 スピンカラ

ムによって目的の大きさの cDNA を分画し回収した。Uni-ZAP XR/*EcoR* I / *Xho* I に cDNA をライゲーションさせた。

パッケージングは、Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) によって行った。Uni-ZAP XR/*EcoR* I / *Xho* I 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) シアル酸特異的レクチン cDNA のクローニング

グライコホリンによるシアル酸特異的レクチンの検出系を用いた発現クローニングを行った。cDNA ライブラリーからブランクリフティングを行い、グライコホリンを 1 次反応に用い、ビオチン標識の小麦胚芽レクチン (WGA) を 2 次反応に用い、次にアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、基質として 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) / nitro blue tetrazolium (NBT) を発色させた。陽性クローンを *in vivo* excision によってサブクローニングを行い、配列を解析した。

3. 研究成果

1) シアル酸特異的レクチン cDNA 断片の取得

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。PCR 産物をアガロース電気泳動にて解析した。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。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。

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

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。ZAP-cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。さらに、Gigapack III Gold Packaging Extract によってパッケージングを行った。表 1 に示したように、パッケージング効率は 2.60×10^6 pfu/ml と高く、インサートサイズにおいても 8 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 1467 bp と cDNA ライブラリーとして用いるには、十分であった。

	Packaging efficiency (pfu/ml)	Insert size (bp)
<i>Armigeres subalbatus</i>	2.60×10^6	1467

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

3) シアル酸特異的レクチン cDNA のクローニング

グライコホリンを用いたシアル酸特異的レクチン検出系を開発したので、シアル酸特異的レクチン検出系を用いて、発現クローニングを行った。その結果、3つの陽性クローンを得ることができた。遺伝子配列を解析した結果、表2に示したようにクローン1として *Aedes aegypti* cytochrome c oxidase に72%相同性を示すものを得た。クローン2として *Anopheles gambiae* agCP11072 に77%相同性を示すものを得た。また、クローン3として hypothetical protein に47%相同性を示すものを得た。しかしながら、今までに解析したN末端アミノ酸配列や内側のアミノ酸配列と一致するクローンは、得られなかった。

Clone	Homology	% Identity
1	<i>Aedes aegypti</i> cytochrome c oxidase	72
2	<i>Anopheles gambiae</i> agCP11072	77
3	Hypothetical protein	47

Table 2. *Armigeres subalbatus* Genes Isolated from cDNA library

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、動植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、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 (図1)。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。

クローニングを行う予定である。あるいは、シアル酸特異的レクチンのアミノ酸配列の解析を行い、アミノ酸配列の情報をもとに PCR にてプローブの取得を試みる。そして、ブランクハイブリダイゼーション法にてシアル酸特異的レクチン cDNA のクローニングを行う。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がって行きたい。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

- | | |
|------------|----|
| (ア) 特許取得 | なし |
| (イ) 実用新案登録 | なし |
| (ウ) その他 | なし |