

吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性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 伊澤 晴彦

研究要旨 吸血性昆虫・吸血性ダニの唾液腺から、ヒトの血液・血管系に特異的に作用する生理活性物質を探索し、それらの分子構造・活性特性・作用機序を解明し、これら有用活性分子を素材とした創薬への応用を目指す。

A. 研究目的

蚊やダニに代表される吸血性節足動物は、その多くが吸血を介してヒトや家畜に重篤な感染症をもたらす病原体を媒介することから、公衆衛生上きわめて重要である。これら吸血性昆虫類・吸血性ダニ類は、宿主動物から迅速かつ効率良く吸血するために、その唾液腺中に様々な生理活性物質を持っている。すなわち吸血昆虫は、唾液に含まれる抗血液凝固・抗血小板凝集・血管拡張・繊維素溶解・抗炎症・免疫抑制などの様々な生理活性物質を利用することで、宿主動物体内で起こる様々な生体反応を巧妙に回避しながら吸血していると考えられる。しかしながら、これら生理活性分子の大部分は、いまだその実体が捉えられておらず、その生物学的機能・意義、ならびに病原微生物との係わりについても十分に解明されていない。

本研究では、吸血性昆虫や吸血性ダニの唾液腺に含まれ、ヒトの血液・血管系あるいは皮下組織に対して特異な生理活性を示す未知の生体分子を網羅的に探索し、その分子構造・活性特性・作用機序および生理的意義の解明を目指す。具体的には感染症媒介ベクターとして重要な「蚊・サシガメ・ダニ」を対象として、これらの唾液腺生理活性分子を網羅的に単離し、これらの標的となる宿主側分子ならびにその相互作用部位を特定することで、生理活性発現に係わる詳細な分子機構を解明することを目的とする。

一方、これら活性分子は動物の血液や血管の生理機能を直接制御する物質であることから、ヒトの循環器系に係わる様々な疾患(静脈血栓, 脳梗塞, 心筋梗塞, DICなど)の予防や治療のための医薬の素材分子として応用可能と考えられる。そこで得られた活性分子について臨床的応用を見据えた遺伝子工学的改変を行い、医薬としての有効可能性を検討する。将来的には、作用点や作用機構の特異性から今までにない新

規な薬理活性を有し、より効果的で副作用の少ない医薬の創出に繋がることを期待される。

また本研究で得られた知見は、感染症媒介ベクターによる唾液腺を介した病原微生物の特異的媒介機構の解明および効果的なワクチン開発に向けた研究に結びつく可能性もあると考えられる。

B. 研究方法

「吸血昆虫・ダニの唾液腺は吸血のために特殊に進化した器官であり、唾液腺細胞に発現する遺伝子の多くは生理活性分子をコードする」という発想のもと、様々な吸血生態を持つ吸血性節足動物の唾液腺遺伝子の大量解析を行って、唾液腺の生理活性分子を網羅的に解析し、得られたクローンの組換え蛋白質を作製し、その活性特性を調べ、新規生理活性分子を同定することを計画した。以下にその方法の概要を示す。

実験材料：

初年度計画では、研究材料として3種の吸血性節足動物(ステフェンスハマダラカ *Anopheles stephensi*、ブラジルサシガメ *Triatoma infestans*、フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis*)を選抜したが、より多くの情報を得るために解析規模をさらに拡大して、新たに2種の吸血性節足動物(ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*)、カズキダニの一種 *Ornithodoros moubata*)を加えることとした。これらは、いずれの種も感染症媒介ベクターとして重要な衛生害虫に含まれる。すなわち、ステフェンスハマダラカはマラリア、ブラジルサシガメはシャガス病、フタトゲチマダニはライム病やピロプラズマ病、ヒトスジシマカはデング熱やウエストナイル熱、カズキダニは回帰熱の媒介者として知られている。

ステフェンスハマダラカ、ブラジルサシガメ、カズキダニは、三重大学医学部医動物学教室において研究用に系統維持されている飼育個体を用いた。フタトゲチマダニは、野外で捕集した単為生殖系統個体を埼玉医科大学短期大学・藤本和義博士より分与していただいた。ヒトスジシマカは、国立感染症研究所昆虫医科学部・津田良夫博士が野外で捕集した個体を分与していただき、これらの次世代を実験に用いた。

唾液腺由来 cDNA ライブラリーの作製：

ステフェンスハマダラカ（未吸血雌成虫）、ブラジルサシガメ（未吸血終齢雌雄若虫）、フタトゲチマダニ（未吸血・Slow feeding 段階・Rapid feeding 段階）、カズキダニ（未吸血雌雄成虫）、ヒトスジシマカ（未吸血雌成虫）より、実体顕微鏡下でピンセットや微針を用いて唾液腺のみを摘出し、これらより mRNA を調製した。mRNA の調製は QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Amersham Bioscience 社製) を用いて行った。まず、摘出した唾液腺を RNase 阻害剤を含む抽出バッファーに入れ、粗抽出液を作製した。次に粗抽出液を Oligo-dT-Cellulose カラムに供し、mRNA のみを吸着させ、余分な核酸・蛋白質等をバッファーによって洗浄、除去した。最後にあらかじめ 65℃ に加温しておいた溶出バッファーをカラムに添加し、mRNA を溶出した。cDNA ライブラリーの作製は SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning Kit (Invitrogen 社製) あるいは Creator SMART cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences 社製) を用いて行った。抽出した mRNA を鋳型として、SuperScript II Reverse Transcriptase あるいは PowerScript Reverse Transcriptase により一本鎖 cDNA を合成し、続いて常法に従って二本鎖 cDNA を合成した。合成した二本鎖 cDNA は両末端を制限酵素消化後、プラスミドベクター pSPORT-I あるいは pDNR-LIB にクローニングし、これを大腸菌へ形質転換して、唾液腺 cDNA ライブラリーを得た。

唾液腺蛋白質遺伝子の大量解析：

作製した各唾液腺 cDNA ライブラリーよりランダムに数百から数千クローンを採取し、塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、キャピラリー DNA シーケンサー ABI PRISM 310 および ABI3100 -Avant (Applied Biosystems 社製) を用いた。決定した塩基配列に基づきコードされる蛋白質のアミノ酸配列を推定した後、遺伝子構造の同一性・類似性を指標にした発現遺伝子の

分類と整理を行った。さらに既知の蛋白質とのアミノ酸配列相同性を Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) プログラムにより検索した (<http://www.blast.genome.ad.jp>)。また、分泌型蛋白質を選抜するために、分泌シグナル配列予測を Signal P プログラムを用いて行った (<http://www.cbs.dk/services/SignalP>)。

昆虫細胞による組換え蛋白質の発現：

目的遺伝子の cDNA をバキュロウイルス発現系のトランスファーベクター pAcYM-I の制限酵素部位 (*Bam*HI もしくは *Sma*I) に組み込んだ。次に組換えトランスファーベクターと市販の直鎖状バキュロウイルス DNA (BaculoGold Linearized Baculovirus DNA, BD Biosciences 社製) をヨトウガの一種 *Spodoptera frugiperda* 由来細胞 (Sf9 細胞) に、リポフェクチン (Invitrogen 社製) を用いてコトランスフェクションした。続いて組換えバキュロウイルスをブランク純化後、選抜した組換えウイルスクローンを Sf9 細胞に繰り返し感染させ、ウイルスの増幅を行った。最終的に増殖した高力価組換えバキュロウイルスをイラクサキンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来細胞 (Tn5 細胞) に感染させ、組換え蛋白質を大量発現させた。

大腸菌による組換え蛋白質の発現：

目的遺伝子を大腸菌発現ベクター pET22-b の制限酵素部位 (*Nde*I 及び *Hind*III) に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換した。次に形質転換した大腸菌を培養し、これに isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して、組換え蛋白質を発現誘導させた。

各種組換え蛋白質の精製：

大量発現させた組換え蛋白質の純化・精製は、各種クロマトグラフィー (イオン交換・ゲル濾過・逆相) を組み合わせて行った。精製度は SDS-PAGE 等で確認した。精製後の蛋白質濃度は Bradford 法あるいは BCA 法により定量した。

(倫理面への配慮)

本年度研究計画に含まれる各種実験においては、ヒトまたは各種実験動物を用いた実験・試験等は行わず、すべて *in vitro* 系で行うため倫理面の問題はない。

C. 研究結果

従来、唾液の生理活性物質の探索は蛋白質化学的な手法が用いられてきた。すなわち、唾液

腺抽出物から生理活性を指標にして目的分子を精製していくというものである。しかし、この方法には、大量の唾液腺を必要とするなど非常に困難な問題がある。

そこで本研究では、まず唾液腺のトランスクリプトーム解析を行った。上記吸血昆虫・ダニより唾液腺を摘出し、唾液腺 cDNA ライブラリーを作製した。続いて各唾液腺 cDNA ライブラリーよりランダムに数百から数千個のクローンを選択し、それらの塩基配列を決定して、アミノ酸配列に関する情報を取得し、唾液腺発現遺伝子の大量解析を行った。更に唾液腺由来生理活性分子は分泌型蛋白質であると予想されることから、各クローンについて N 末端の分泌シグナル配列の有無を予測し、分泌型蛋白質をコードするクローンのみを選抜して、生理活性分子の候補とした。選定した生理活性分子候補については既知の蛋白質との相同性、ならびにアミノ酸配列の類似性を考慮して分類・整理し、データベース化した。

次に分類した生理活性分子候補遺伝子について組換え蛋白質を作製した。方法は、バキュロウイルスを用いた昆虫培養細胞発現系、および大腸菌発現系の二通りの手法で行った。発現した組換え蛋白質は各種クロマトグラフィー（イオン交換・ゲルろ過・逆相クロマトグラフィー）により精製した。

以下に各対象生物ごとに、唾液腺遺伝子の大量解析の概要ならびに現時点での進捗状況を示す。

ステフェンスハマダラカ唾液腺遺伝子の大量解析：

ステフェンスハマダラカ雌成虫胸部より唾液腺を摘出し、これを約 300 個体分集めた。これをもとに唾液腺 cDNA ライブラリーを作製した。作製した cDNA ライブラリーから無作為に 1280 個のクローンを選び、塩基配列を決定した。これら遺伝子配列について BLAST を用いて DNA データベースに登録されている配列と比較した。その結果、全体の約 20% に相当する 250 クローンが、他の蚊類で同定されている幾つかの唾液腺蛋白質と高い相同性が認められた。これらの解析結果などから現在までに、38 種類・271 個の生理活性分子候補遺伝子が同定された。38 種類のうち、発現量の多いと予想されたもの 18 種類を選び、このうち一部のものについてはバキュロウイルスを用いた昆虫培養細胞系あるいは大腸菌発現系で組換え蛋白質を作製した。

ブラジルサシガメ唾液腺遺伝子の大量解析：

ブラジルサシガメより唾液腺を摘出し、これらを材料として唾液腺 cDNA ライブラリーを作製した。ライブラリーより 550 個のクローンを無作為に選び、塩基配列を決定したところ、173 種類のクローンが得られた。このうち、シグナル配列をもつ蛋白質 44 種類について全塩基配列を決定した。この中には、血小板凝集を阻害する物質としてすでに報告されているアピラーゼ（ADP 分解酵素）や細胞膜に穴をあけて細胞を破壊する活性を持つトリアライシンも含まれていた。44 種のうち発現量の多いもの 16 種類を選び、このうち一部のものについてはバキュロウイルスを用いた昆虫培養細胞系あるいは大腸菌発現系で組換え蛋白質を作製した。

フタトゲチマダニ唾液腺遺伝子の大量解析：

フタトゲチマダニをはじめとするマダニ類は後気門亜目に属するダニの総称で、分類上大きくマダニ科とヒメダニ科に分類される。一般に二つの科は体の硬さの違いから、マダニ科を hard tick（硬いダニ）、ヒメダニ科を soft tick（柔らかいダニ）と呼び、フタトゲチマダニは hard tick に属する。hard tick による吸血時間は 1～2 週間と非常に長いことが特徴である。吸血は二段階の過程からなっており、吸血開始から吸血終了約 24 時間前までゆっくりと吸血する slow feeding 段階と、最後の約 2 4 時間で急速に吸血する rapid feeding 段階に分けられる。このように吸血には二段階の過程があり、吸血に伴い生理活性分子の遺伝子が新たに発現することが予想された。そこで吸血前、slow feeding 段階、rapid feeding 段階の各ダニより唾液腺を摘出し、これらを材料として 3 つの時期特異的 cDNA ライブラリーを作製した。作製した 3 種の cDNA ライブラリーからは総計で 1889 個（吸血前：418 個、slow feeding 段階：620 個、rapid feeding 段階：851 個）のクローンをランダムに取り、塩基配列を決定した。その結果、64 種類・198 個の生理活性分子候補遺伝子が同定され、更にこれらが 8 種の蛋白質ファミリーを形成することが明らかとなった。64 種のうち、発現量の多いと予想されたもの 12 種類を選び、このうち一部のものについてはバキュロウイルスを用いた昆虫培養細胞系あるいは大腸菌発現系で組換え蛋白質を作製した。

カズキダニ唾液腺遺伝子の大量解析：

soft tick に属するカズキダニの一種 *Ornithodoros moubata* の唾液より新規生理活性

物質を同定することを目的として、唾液腺遺伝子大量解析を行った。その結果、合計 303 種類・545 個の生理活性物質候補の遺伝子を得ることに成功し、さらにこれらが 14 種類の蛋白質ファミリーへと分類されることが明らかになった。

ヒトスジシマカ唾液腺遺伝子の大量解析：

ヒトスジシマカ雌成虫より約 200 対の唾液腺を摘出し、これらを材料として唾液腺 cDNA ライブラリーを作製した。現在順次、クローンの塩基配列とアミノ酸配列の解析を進めている段階である。

D. 考察

吸血性昆虫や吸血性ダニが吸血行動を行うとき、吸血源動物の血管を構成する平滑筋と内皮細胞を傷つける。破壊された血管構成細胞からは ATP や ADP, コラーゲンなどが漏れ出し、これらによって血小板が活性化され、血管修復のため凝集し、血栓形成が起こる。また、活性化された血小板からはプロスタグランジンが放出され血管を収縮して止血を助ける。一方、損傷を受けた血管構成細胞から出された組織因子が外因系血液凝固のカスケードを始動させ、血栓形成が起こる。加えて、陰性に帯電した異物面あるいは挿入された昆虫の口器そのものが異物面として働き、内因系血液凝固カスケードの活性化が起き、これによっても血栓形成が起こると予想される。さらに吸血が繰り返し起こると、注入された唾液腺成分に対して抗体ができ、吸血のたびに抗原抗体反応を起こし、その結果、肥満細胞の脱顆粒によりトロンボキサン A₂, セロトニン、ヒスタミンなど各種サイトカインが放出される。これらの肥満細胞の因子は血管の透過性を上げ、浮腫や痛み、痒みなどの炎症を誘導することとなる。

こうした吸血に伴う血栓形成や炎症反応などは、吸血の継続を阻害するため、吸血昆虫は十分な吸血ができなくなると考えられる。そのために、吸血昆虫は唾液中に上で述べたような生体反応を抑え、血液や血管を制御するための様々な生理活性分子を持っている。吸血昆虫は吸血時にこれらの生理活性分子を宿主動物体内へと注入し、吸血を容易にしていると考えられる。

これら生理活性分子の同定・作用機序解明は吸血昆虫の吸血機構解明に大きく貢献する。このことは吸血という特異な食餌法の生理的意義の理解および生物の多様性を示すという点で学術的意義が大きいといえる。加えて、生理活性

分子はユニークな薬理活性を持つことから、医薬素材となる可能性を秘め、新規医薬開発に貢献すると期待される。以上のことから、吸血昆虫の唾液由来生理活性分子は多くの研究者の興味を惹いたが、吸血昆虫の唾液腺は小さく、また含まれる生理活性分子は極微量であることから、活性を指標とした生理活性分子の単離・同定は困難を極め、また、生理活性そのものを調べるのに適したアッセイ系がない場合もあり、多くの生理活性分子が未開拓のままである。

本研究は、動物の血管や血液に働きかけてその機能を調節する吸血昆虫唾液腺の活性物質を遺伝子の網羅的解析法によって効率的に探索し、その機能特性を解明することを目的として開始した。本年度は、これらの唾液腺蛋白質遺伝子の網羅的解析と組換え蛋白質の作製を中心に実験を行った。すなわち、①それぞれの唾液腺 mRNA の抽出と cDNA ライブラリー作製による唾液腺発現遺伝子の網羅的クローニング、②ランダムに採取した唾液腺由来 cDNA のキャピラリ DNA シーケンサーを用いた大量解析、および遺伝子構造の同一性・類似性を指標にした発現遺伝子の分類と整理、③大腸菌およびバキュロウイルス発現系による主要な分泌型蛋白質の組換え体の大量発現、ならびに HPLC 等によるこれら組換え蛋白質の高純度精製を行った。

実際には、それぞれ数百から数千個の唾液腺 cDNA の塩基配列を決定した。内訳は、ステフェンスハマダラカ 1280 個、ブラジルサンガメ 550 個、フタトゲチマダニ 1889 個、カズキダニ 545 個である（ヒトスジシマカは現在塩基配列解析中）。これら中には、ハウスキーピング遺伝子、リボゾーム遺伝子あるいはミトコンドリア遺伝子も多く含まれていたが、これらの中から各吸血生物種の唾液腺で特異的に高発現している分泌型蛋白質をそれらの分泌シグナル配列を指標にすることで複数同定することができた。内訳は現時点では、ステフェンスハマダラカ 38 種類、ブラジルサンガメ 44 種類、フタトゲチマダニ 64 種類、カズキダニ 303 種類である。興味深いことにこれら遺伝子のほとんどは構造的・機能的にも全く新規な蛋白質をコードしていた。これらから次年度以降に予定している生理活性のスクリーニングにかかる候補分子（発現量が高い分泌型蛋白質をコードする遺伝子）を複数選抜した。内訳は現時点では、ステフェンスハマダラカ 18 種類、ブラジルサンガメ 16 種類、フタトゲチマダニ 12 種類である。作製された組換え蛋白質を用いて、血液・血管に対する様々な生理活性（血液凝固因子や補体系因子との結

合特性や反応阻害活性、血小板凝集阻害活性、血管拡張活性などを臨床検査技法や *in vitro* の再構成系、あるいは血管内皮等の初代培養細胞系を用いて検討し、これにより新規活性分子をスクリーニングする予定である。生理活性が見出された分子に関しては、標的分子との結合様式および阻害反応様式といった生体分子間相互作用について解析機器等を用いて反応速度論的に詳細に検討する。さらに新規活性分子と標的分子の分子間相互作用に直接関わる最小機能部位の特定を試みる。具体的には、各分子の機能ドメインや部位特異変異を導入した組換え蛋白質を遺伝子工学的に作製し、これらを用いて具体的な相互作用部位とその結合様式の特徴を明らかにすることを計画している。

E. 結論

本研究では、吸血性昆虫や吸血性ダニの唾液腺に含まれ、吸血源動物の血液や血管系あるいは皮下組織に特異的に作用する新規生理活性物質を網羅的に探索し、それらの分子構造・活性特性・作用メカニズムを解明し、これら有用活性分子を新規な医薬の素材として開発・利用することを目的としている。

本年度は、これらの唾液腺蛋白質遺伝子の網羅的解析と組換え蛋白質の作製を中心に実験を行った。実際には、それぞれ数百から数千個の唾液腺 cDNA の塩基配列を決定し（内訳は、ステフェンスハマダラカ 1280 個、ブラジルサシガメ 550 個、フタトゲチマダニ 1889 個、カズキダニ 545 個、ヒトスジシマカは現在解析中）、これら cDNA データベースの解析から、各生物種の唾液腺で特異的に高発現している分泌型蛋白質を複数同定することができた。これら遺伝子のほとんどは構造的・機能的にも全く新規な蛋白質をコードしており、それぞれの分子の特異で新規な生理活性が期待された。これらから次年度以降に予定している生理活性のスクリーニングにける候補分子を複数選抜した。現在、これら一部の遺伝子に関しては、生理活性検定に用いる組換え蛋白質の作製と精製を順次進めているところである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M. and Chinzei, Y. Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick,

Haemaphysalis longicornis.

Thrombosis and Haemostasis. 93(2):359-367. (2005).

2. 学会発表

岩永史朗・伊澤晴彦・油田正夫・鎮西康雄. フタトゲチマダニ由来トロンビン阻害剤の同定および機能解析. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 6 日. 福井市.

伊澤晴彦・油田正夫・織戸由貴・神宮司成弘・岩永史朗・加藤紀子・鎮西康雄. ブラジルサシガメ唾液腺に見いだされた接触相活性化を阻害する新規生理活性蛋白質の性状解析. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 6 日. 福井市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(なし)

2. 実用新案登録

(なし)

3. その他

(なし)