

平成17年度

# 若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## HS研究

### 第1分野

#### 課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏 ……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏 ……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 ……	10

### 第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 ……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 ……	22
KH23306	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	伊澤晴彦 ……	27
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 ……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 ……	39

### 第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 ……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル ……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 ……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究	川上浩司 ……	65

### 第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 ……	69
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 ……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 ……	84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

## 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

## 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・ダニ類の唾液腺から、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

蚊やダニなどの吸血性節足動物の多くは、吸血を介してヒトや家畜に重篤な感染症をもたらす各種病原体を媒介することから、疫学上きわめて重要である。これら吸血性昆虫・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つことが知られている。彼らは抗血液凝固・抗血小板凝集・血管拡張・繊維素溶解・抗炎症・免疫抑制など、唾液に含まれる様々な生理活性物質を宿主に注入することで、動物体内で起こる不都合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、未だその実体が捉えられておらず、その生物学的機能・意義、あるいは病原微生物との相互関係についても十分に解明されてはいない。

本研究では、吸血性昆虫や吸血性ダニの唾液に含まれ、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、病原体媒介ベクターとして重要な蚊・サシガメ・ダニを対象とし、これらの唾液腺生理活性分子を単離し、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、医薬としての応用可能性を検討する。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も期待される。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を介した病原微生物の特異的媒介機構の解明や効果的なワクチン開発に向けた研究に繋がる可能性もある。

### B. 研究方法

吸血昆虫・ダニの唾液腺は吸血のために特殊化した器官であり、唾液腺細胞に発現する遺伝子は、生理活性分子をコードするものが多いと予想される。そこで、①様々な吸血生態を持つ各種吸血性節足動物の唾液腺遺伝子の大量解析を行い、②含まれる生理活性分子を包括的に分類・整理し、③主要なものに対して組換え蛋白質を作製し、④これらを用いて活性特性を調べることにより、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：

研究材料として5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*、ヒトスジシマカ *Aedes albopictus*、カズキダニの一種 *Ornithodoros moubata*)を用いた。これらは、いずれも感染症媒介ベクターとして重要な衛生害虫である。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をそれぞれ媒介する。

#### 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 (未吸血成虫)、ヒトスジシマカ (未吸血雌成虫) より、実体顕微鏡下で唾液腺を摘出し、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。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。合成した二本鎖 cDNA は、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、これにより唾液腺 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。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。

#### 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 *Spodoptera frugiperda* 由来細胞 (Sf9 細胞) に、リポフェクシン (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プラーク純化後、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ウイルスを *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 を添加して、組換え蛋白質を発現させた。

#### 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。

#### 血液凝固阻害活性測定：

クエン酸添加正常血漿と蛋白質サンプルを混合し、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT) 測定時にはアクチンを、プロトロンビン時間 (prothrombin time: PT) 測定時にはトロンボプラスチンをそれぞれ添加し、カルシウムを添加して凝固時間を測定した。凝固時間の測定は血液凝固測定計 KC-10 (Heinrich Amelung 社製) を用いて行った。

#### 血小板凝集阻害測定：

血小板凝集の測定には、洗浄血小板と多血小板血漿を用いて行った。まず、血液と acid citrate dextrose を混合し、遠心分離後、上清を多血小板血漿とした。次に多血小板血漿にプロスタグランジン E<sub>1</sub> を添加し、遠心分離後、沈殿を得て、この沈殿をカルシウム不含 Tyrode' s 溶液で 3 回、カルシウム含有 Tyrode' s 溶液で 1 回洗浄して、洗浄血小板を得た。多血小板血漿あるいは洗浄血小板とサンプルを混合後、凝集活性化試薬 (コラーゲン、ADP、アラキドン酸、トロンボキサン A<sub>2</sub> 類縁物質) を添加して、血小板凝集を血小板凝集計 (Chronolog 社製) あるいはマイクロプレートリーダー (東ソー社製) により測定した。一方、トロンビンによる血小板凝集は洗浄血小板を用い、トロンビンとサンプルを混合後、フィブリノゲンを含む洗浄血小板に添加することで、凝集を測定した。

#### 表面プラスモン共鳴測定：

表面プラスモン共鳴測定は BIAcore X (BIAcore 社製) を用いて行った。蛋白質-蛋白質間相互作用の解析には、センサーチップ CM4 もしくは CM5 を用いた。リガンドのチップ表面上への固定化は、アミンカップリングキッ



ト(BIAcore 社製)を用いて行った。まず、センサーチップ表面上のカルボキシデキストランを N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride と N-hydroxysuccinimide により活性化した。次に 10 mM 酢酸バッファーに溶解したリガンド分子を添加して、これを固定化した。さらにセンサーチップ上に残る未反応なカルボキシル基をエタノールアミンで不活性化し実験に使用した。リガンド-アナライト間の会合・解離反応はそれぞれ 2 分間ずつ測定した。センサーチップ表面の再生は NaCl もしくは EDTA を用いて行った。一方、蛋白質-リン脂質間相互作用の解析には、センサーチップ HPA を使用した。前処理として、リボソーム (ホスファチジルコリン : ホスファチジルイノシトールリン酸 = 6:4) を添加し、センサーチップ表面上にリン脂質 1 重層を形成させた後に実験に供した。センサーチップの再生は NaOH を用いて行った。ここではカリクレイン-キニン系因子と阻害分子を混合し、阻害分子によるカリクレイン-キニン系関連因子-リン脂質間相互作用の抑制効果を調べた。

トロンビン阻害活性測定 :

蛋白質サンプルとトロンビンを混合後、フィブリノゲン基質溶液 (フィブリノゲン : 15% アラビアゴム = 7:1) に添加し、フィブリンが形成される時間を血液凝固測定計 KC-10 で測定した。

血漿中カリクレイン-キニン系活性化阻害測定 :

クエン酸添加正常血漿を塩酸もしくはアセトンで処理し、血漿内のセリンプロテアーゼ阻害分子を失活させた。酸処理血漿は第 XII 因子の活性化阻害測定に用い、アセトン処理血漿は第 XI 因子及びカリクレイン活性化阻害測定に用いた。処理した血漿にサンプルを加え、アクチンを添加してカリクレイン-キニン系を活性化した。その後、第 XI 因子、第 XII 因子、カリクレインの産生阻害をそれぞれの市販の合成基質を用いて測定した。また、産生したプロテアーゼの活性を正確に測定する目的で、大豆トリプシン阻害剤 (SBTI) あるいはトウモロコシトリプシン阻害剤 (CTI) を加えた。

再構成系でのカリクレイン-キニン系活性化阻害測定 :

カリクレイン-キニン系を、精製された第 XII 因子・第 XIIa 因子・プレカリクレイン・カリクレインを用いて試験管内で再構成し、活性化に対する阻害分子の影響を調べた。第 XII 因子-

カリクレイン間の相互活性化阻害実験は以下のように行った。まず、第 XII 因子とサンプルを混合し、インキュベートして第 XII 因子を自己活性化させた。続いてプレカリクレインとデキストラン硫酸を添加して相互活性化反応を開始し、合成基質 S-2302 を添加して、活性化阻害を測定した。カリクレインによる第 XII 因子の活性化阻害実験では、第 XII 因子とサンプルを混合後、カリクレインとデキストラン硫酸を添加し、XIIa 因子の産生阻害を SBTI 存在下で S-2302 を用いて測定した。最後に第 XIIa 因子によるプレカリクレインの活性化阻害実験では第 XIIa 因子とサンプルを混合後、プレカリクレインとデキストラン硫酸を添加し、カリクレインの産生阻害を CTI 存在下で S-2302 を用いて測定した。

(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個体を用いた実験・試験等は含まれず、すべて *in vitro* 系で行われた。

### C. 研究結果

従来、唾液の生理活性物質の探索は、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手法が専ら採られてきた。しかしこの方法には、大量の唾液腺を必要とするなど困難な問題がある。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。初めに供試吸血昆虫・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包括的解析を行った。更に唾液腺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、各々について 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もののみを選抜して、以後の解析候補とした。選定した候補分子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。次に分類した候補遺伝子について組換え蛋白質を作製した。発現した組換え蛋白質は各種クロマトグラフィーより精製し、各種生理活性のスクリーニングに用いた (図 1)。

ハマダラカ唾液腺生理活性分子の探索 :

ステフェンスハマダラカ雌成虫の唾液腺 mRNA から cDNA ライブラリーを作製した。ライ



図1) 吸血昆虫・ダニ唾液腺の生理活性物質の検索

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 個が、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、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組換え蛋白質を作製し、生理活性を調べた(図 2, 3)。



	ブラジルサシガメ	ステファニスハマダラカ	フタトゲチマダニ	カズキダニ	ヒトスジシマカ
塩基配列の解析 (総クローン数)	550	1280	1889	1001	(進行中)
分泌シグナルを持つ分子 (重複を省いた)	44	38	93	303	-
全塩基配列を解析した分子	44	27	90	303	-
組換え蛋白質として発現させた分子	16	18	12	4	-
生理活性が確認された分子	5	3	3	4	-

図2) 唾液腺遺伝子の大量解析結果

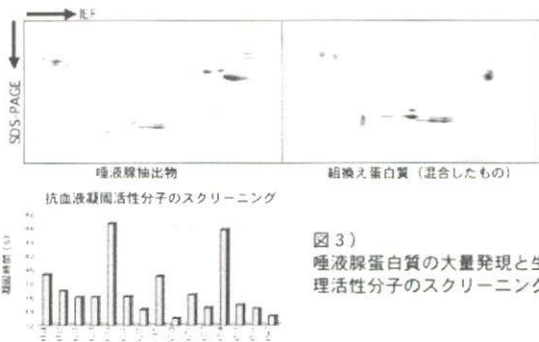


図3) 唾液腺蛋白質の大量発現と生理活性分子のスクリーニング

その結果、新規トロンピンインヒビターが 1 種類同定された。これは、比較的 low molecular weight の蛋白質で、近縁のガンビアハマダラカ *An. gambiae* で報告されている anophelin に相同性のある分子であった。この新規蛋白質は、トロンピンの

活性を阻害することで抗血液凝固活性を示すことが示唆された。一方、以前に同種の蚊で既に報告しているカリクレイン-キニン系阻害蛋白質である hamadarin とは、一次構造が異なる新規カリクレイン-キニン系阻害活性蛋白質が同定された。この唾液腺分子は、血液凝固第 XII/XIIa 因子および高分子キニノゲン上の異物結合部位に特異的に結合することで、内因系凝固反応およびカリクレイン-キニン系活性化を強く阻害することが判明した(図 4)。

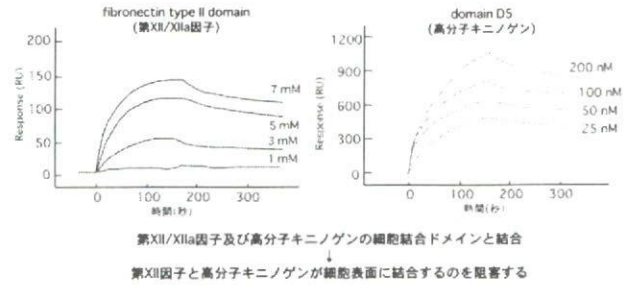


図4) 唾液腺のカリクレイン-キニン系阻害活性蛋白質の同定

ブラジルサシガメ唾液腺生理活性分子の探索:

ブラジルサシガメ唾液腺 mRNA より作製された cDNA ライブラリーから、550 個を無作為に選び塩基配列を決定したところ、これらは 173 種類に分類された。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既に報告されている apyrase や細胞膜障害活性を持つ trialysin 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、組換え蛋白質を作製し、生理活性を調査した。

まず、リポカリンファミリーに属する新規カリクレイン-キニン系阻害活性蛋白質を 2 種類同定した。これら唾液腺分子は、互いに一次構造がよく似ており、共に血液凝固第 XII/XIIa 因子および高分子キニノゲン上の異物結合部位に特異的に結合することで、内因系凝固反応およびカリクレイン-キニン系活性化を強く阻害することが明らかになった。さらに、血小板凝集を強く抑制する新規生理活性蛋白質を 2 分子同定した。この蛋白質は ADP やトロンボキサンにより惹起される血小板凝集は抑制しなかったが、コラーゲンによる凝集を特異的に強く抑制することが判明した。

フタトゲチマダニ唾液腺生理活性分子の探索:

フタトゲチマダニはマダニ科 (hard tick) に属する。この種のダニの吸血時間は 1~2 週間と非常に長いことが特徴である。吸血は 2 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 24 時間で急速に吸血する rapid feeding 段階に分けられる。このため、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 段階の各ステージ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 種のライブラリーから総計で 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選び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、これらは 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、組換え蛋白質を作製し、生理活性を調べた。

その結果、2 種類の新規トロンビンインヒビターが同定された。これらは、分子量 6-7kDa の蛋白質で吸血後期に大量に発現し、トロンビンによるフィブリノゲンからフィブリンへの転換を阻害することが判明した。さらにトロンビンのフィブリノゲン結合部位に特異的に結合することから、トロンビン-フィブリノゲン間の相互作用を阻害することで抗血液凝固活性を示すことが示唆された（図 5）。

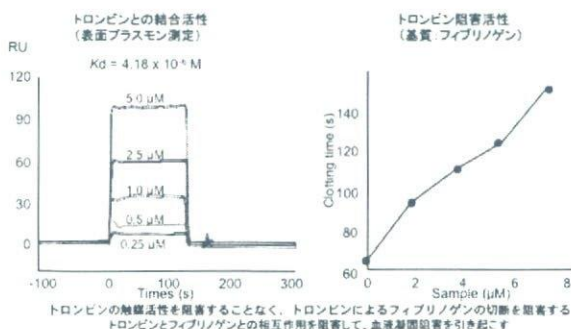


図 5) 唾液腺のトロンビン阻害活性蛋白質の同定

また、分子内に Kunitz 型プロテアーゼインヒビター構造を持つ新規生理活性蛋白質を同定した。この唾液腺分子は、血液凝固第 XII/XIIa 因子および高分子キニノゲン上の異物結合部位に特異的に結合することで、内因系凝固反応およびカリクレイン-キニン系活性化を強く阻害することが明らかになった。

カズキダニおよびヒトスジシマカ唾液腺遺伝子の大量解析：

ヒメダニ科 (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遺伝子を得た。また、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。これらのうち、発現量の多いと予想された 4 種類を選び、組換え蛋白質を作製した。

また、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遺伝子の大量解析を行った。現在、塩基配列とアミノ酸配列の解析を進めている。

#### D. 考察

吸血性昆虫やダニが吸血を行うとき、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、コラーゲン等が漏出し、これにより血管修復のため血小板が活性化・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補助する。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 A<sub>2</sub>、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不可能になると考えられる。そのために、吸血昆虫は唾液中に種々の生体反応を抑え、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寄与すると考えられ、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興味深い。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。しかしながら吸血昆虫の唾液腺は小さく、含まれる生

理活性分子は極微量であることから、活性を指標とした目的分子の単離・同定は一般に困難である。さらに生理活性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。

まず、唾液腺蛋白質遺伝子の包括的解析と組換え蛋白質の作製を中心に実験を進めた。実際には、供試昆虫・ダニ各種より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、ブラジルサシガメ 550 個、フタトゲチマダニ 1889 個、カズキダニ 545 個である。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と考えられる分泌型蛋白質を複数見出すことができた（ステフェンスハマダラカ 38 種類、ブラジルサシガメ 44 種類、フタトゲチマダニ 64 種類、カズキダニ 303 種類）。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。これらから生理活性のスクリーニングに供する候補分子を複数選抜した（ステフェンスハマダラカ 18 種類、ブラジルサシガメ 16 種類、フタトゲチマダニ 12 種類、カズキダニ 4 種類）。これら一部の遺伝子に関しては活性検定に用いる蛋白質の大量作製と精製を行い、これらを用いて、血液・血管に対する様々な生理活性を臨床検査法や *in vitro* の再構成系、あるいは血管内皮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のスクリーニングを試みた。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・阻害反応様式について解析した。

まず、蚊とダニからトロンビンインヒビターを複数種同定した。これらの分子は、トロンビンと特異的に結合することで、内因系及び外因系血液凝固反応の共通経路を阻害して、血液凝固阻害を引き起こすことが示唆された。トロンビンは、血栓主成分フィブリンの生成に直接関わり、止血・血栓形成過程で中心的な役割を演じている。トロンビンインヒビターの存在は、効率的な血液凝固阻害にはトロンビンを阻害するのが有効であることを強く示唆している。

また、蚊・サシガメ・マダニそれぞれからカリクレイン-キニン系を阻害する新規生理活性分子を複数種同定した。カリクレイン-キニン系

は、血管内への異物の侵入や周辺細胞組織の破壊により活性化され、内因系凝固の開始や発痛物質ブラジキニンの産生に深く関わる。まず、第 XII 因子が、陰性荷電を帯びた異物表面や血管内皮表面に結合することで自己活性化される。高分子キニノゲンと複合体を形成しているプレカリクレインも血管内皮細胞表面に結合し、そこである種の活性化物質の作用で活性型のカリクレインに変換される。続いて、活性化された第 XII 因子はプレカリクレインを活性化し、逆にカリクレインは第 XII 因子を活性化するという相互活性化が起こり、反応が増幅されていく。こうして産生された活性化第 XII 因子は、第 XI 因子を活性化し、これにより内因系凝固反応が進む。一方、カリクレインは、高分子キニノゲンに作用することで、分子内部からブラジキニンを遊離させる。ブラジキニンは、現在知られている最も強力な発痛物質であり、急性炎症の主要因となる生理活性ペプチドである。ブラジキニンは血管内皮細胞の収縮を強く誘導することで血管透過性を亢進させ、血液成分の組織への漏出を促す。その結果として、発熱・発赤・腫脹を誘導するとともに、特異的受容体を介して痛み（疼痛）を引き起こす。今回見つけた各生理活性分子は、互いにアミノ酸配列の相同性は認められないが、どの分子も第 XII 因子と高分子キニノゲンに結合してカリクレイン-キニン系の作動を阻止するという共通的作用機構を持ち、ブラジキニンの産生を強く抑える活性を示した。これら活性分子は常時唾液腺に蓄えられ、吸血時に唾液と共に宿主に注入されと考えられる。そして、口針の血管内への刺入とそれに伴う周辺細胞組織の破壊によりカリクレイン-キニン系の活性化が起こるのを未然に阻止する。これにより、内因系凝固の開始を阻止することで血栓形成を防いで吸血を容易にし、ブラジキニンの産生を阻止することで急性炎症の発生を抑える機能を担っていると考えられる。

さらに、サシガメより血小板凝集を抑制する新規な生理活性分子が同定された。これまでの解析で、この分子はこれまでに報告されている血小板凝集阻害物質とは異なる阻害作用機構を有すると予想された。血小板活性化機構には未解明な部分が多く存在していることから、今後この唾液腺分子が血小板活性化・凝集機構を解明する上で重要なツールとして利用できる可能性も期待される。

今後は、さらに新規生理活性分子の探索を進めると同時に、見つけた新規活性分子と標的分子の分子間相互作用を詳細に検討し、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性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素材として開発・利用することを目的としている。

初めに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研究を行った。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、これら cDNA データベースの解析から、各生物種の唾液腺特異的な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。これら候補分子の一部に対して生理活性のスクリーニングを行ったところ、トロンビン阻害、カリクレイン-キニン系阻害、血小板凝集阻害など興味深い生理活性分子が複数同定された。すでに一部の分子については、その特異な生理活性機構を明らかにすることができた。今後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、これにより具体的な相互作用部位とその結合様式の特性を明らかにしていく予定である。

#### 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).

Kato, N., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., Chinzei, Y. and Iwanaga, S. Contribution of N-terminal and C-terminal domains of Haemaphysalin to inhibition of activation of the plasma kallikrein-kinin system. *Journal of Biochemistry*. 138(3):225-235.

(2005).

伊澤晴彦・岩永史朗. 昆虫の特異機能の解析とその利用:吸血昆虫の唾液腺生理活性物質による抗止血機構の解析と利用. *昆虫テクノロジー研究とその産業利用* p.174-181. (2005).

##### 2. 学会発表

加藤紀子・岩永史朗・伊澤晴彦・鎮西康雄・油田正夫. フタトグチマダニ唾液腺由来カリクレイン-キニン系インヒビターに関する研究. 第57回日本衛生動物学会大会, 2005年6月2日. 札幌市.

伊澤晴彦・岩永史朗. マダニ成分の吸血源動物への影響 - マダニ唾液腺中の生理活性物質について. 第13回 Seminar on Acari-Diseases Interface (ダニと疾病のインターフェースに関するセミナー), 2005年9月23日. 下田市.

#### 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)

---

平成17年度

創薬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18年7月31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