

平成18年度

# 若手研究者奨励研究報告書

## 目 次

### 政策創薬総合研究

#### 課題番号

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 …… 1
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 …… 12
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 …… 26
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 …… 37
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 …… 50
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 …… 60
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 …… 66
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 …… 79
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 …… 92
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ーの基礎的および応用的研究	川 上 浩 司 …… 101
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 …… 105
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 …… 116
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 …… 126
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 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌 宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村 上 恭 子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵 原 耕 一 郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥 平 桂 一 郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

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 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

## 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

カやダニに代表される吸血性節足動物の中には、吸血を介してヒトや動物に重篤な感染症を引き起こす病原体を媒介するものが多く含まれる。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。具体的には、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関わり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的とする。具体的には、病原体媒介ベクターとして重要なカ・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改変を行い、医薬としての応用可能性を検討する。得られた知見を活用することで、将来的には作用点や作用機構の特異性が

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つながる可能性もある。

### 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を進めてきた。本年度は前年度までの成果を元に、特に④に重点をおいて研究を行った。以下に概要を述べる。

#### 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、トロンピンによる血小板凝集は洗浄血小板を用い、トロンピ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。

トロンピン阻害活性測定：

蛋白質サンプルとトロンピンを混合後、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

前年度までに、各種吸血性節足動物の唾液腺トランスクリプトーム解析によって同定された生理活性分子候補遺伝子の中から、主だった遺伝子の組換え蛋白質を作製した。さらにこれら組換え蛋白質を用いて活性特性を調べることにより、新規生理活性分子の同定を行った。今年

度は、前年に引き続き、特に血液凝固と血小板凝集の2つの重要な生理反応に対する効果に注目して解析を継続した。さらに、同定された唾液腺生理活性分子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試みた。以下に見いだされた生理活性ごとに、本年度の研究結果の概要を述べる。

#### カリクレイン-キニン系阻害蛋白質の同定：

唾液腺の遺伝子産物に対する組換え蛋白質を作製し、血液凝固阻害分子をスクリーニングした。その結果、ヒト標準血漿に対し、著しい凝固時間の延長を引き起こす遺伝子産物が、ステフェンスハマダラカから1分子、ブラジルサシガメから2分子見いだされた。そこで、これら血液凝固阻害活性蛋白質をそれぞれの昆虫の学名にちなみ、ステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*)由来の分子をアノフェンシン (anophensin)、ブラジルサシガメ (*Triatoma infestans*)由来の2分子をトリアフェスチン (triafestin)1, 2と名づけた。アノフェンシンはアミノ酸 142 個からなり、SignalP による解析からN末端の25個のアミノ酸は分泌シグナル配列であることが予測された。従ってこの蛋白質は、唾液腺細胞内で合成後、分泌シグナル配列が除去され、分子量約 14 kDa の分子として唾液中に分泌されることが推定された。また、データベース解析の結果から、アノフェンシンはガンビアハマダラカ (*Anopheles gambiae*)唾液腺のトランスクリプトーム解析で見いだされた機能未知の唾液腺蛋白質の一つである“gSG7”と相同性のある新規な蛋白質であることがわかった。一方、トリエフェスチン 1 は、206 アミノ酸残基からなる蛋白質でN末端の18アミノ酸が分泌シグナルと考えられ、分泌された成熟蛋白質の分子量は約 22 kDa と予想された。同様に、トリブラチン 2 は 206 アミノ酸からなる蛋白質でN末端18アミノ酸がシグナルペプチド、成熟蛋白質の分子量は約 22 kDa と推定された。2つのトリアフェスチンのアミノ酸配列には相同性があり(約90%)、アミノ酸配列の特徴から、これら蛋白質はリポカリンファミリーに属する蛋白質であることも判明した。

続いて、アノフェンシンおよびトリアフェスチンが内因系凝固、外因系凝固のいずれを阻害するのかについて、APTTとPTを計測することによって調べた。その結果、アノフェンシンとトリアフェスチンは共にAPTTのみを延長する

活性を持つことが分かった(図1)。

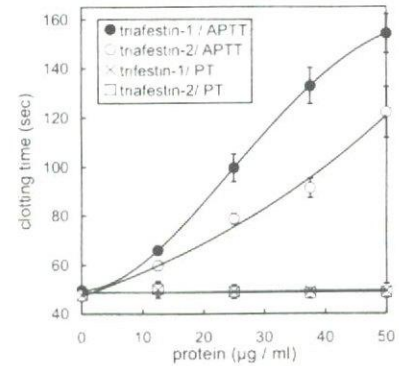


図1 ブラジルサシガメの唾液腺蛋白質による内因系血液凝固反応時間の延長作用

このことは、これら活性蛋白質が内因系血液凝固反応を阻害することにより、血液の凝固阻害を引き起こすことを示している。阻害反応を詳しく調べた結果、これら蛋白質による内因系凝固阻害活性は、カリクレイン-キニン系の阻害が主要因であるらしいことが推定された。

カリクレイン-キニン系とは、血漿蛋白質である血液凝固第XII因子、第XI因子、プレカリクレイン、高分子キニノゲンから構成される酵素反応である。血管内への異物の侵入や周辺細胞組織の破壊が起こると、第XII因子およびプレカリクレインが直ちに活性化される。具体的には、第XII因子は、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てXIIaとなる。一方、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。第XII因子および高分子キニノゲンは共に亜鉛イオン結合蛋白質であり、両因子の活性化表面上への特異的結合には、亜鉛イオンの存在が必須である。続いて、活性化された第XIIa因子はプレカリクレインを活性化してカリクレインとし、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(reciprocal activation)が起こり、両因子の活性化反応が増幅されてゆく。こうして産生された第XIIa因子は、第XI因子を活性化し、内因系の凝固因子が次々と活性化されるカスケード系が作動して、最終的にフィブリンが形成されて血液凝固が起こることになる。一方、カリクレインは、高分子キニノゲンを限定分解することで、分子内部から9個のアミノ酸から成る生理活性ペプチド“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。すなわち、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。このようにカリクレイン-キニン系は多くの因子の活性化が相互に絡み合う複雑な酵素反応である。

そこで、アノフェンシンとトリアフェスチンが、真にカリクレイン-キニン系を特異的に阻害するのか否か、また阻害するのだとすれば、具体的にはカリクレイン-キニン系のどの反応を阻害するのかを調べた。具体的には、精製された血漿蛋白質を用いた再構成系により、阻害の標的となる反応系を検索した。その結果アノフェンシンとトリアフェスチンは、①第 XII 因子とプレカリクレインの相互活性化、②カリクレインによる第 XII 因子の活性化、③第 XIIa 因子プレカリクレインの活性化、④ブラジキニンの産生、といったカリクレイン-キニン系を構成する主要な反応をことごとく阻害することが明らかとなった(図2)。

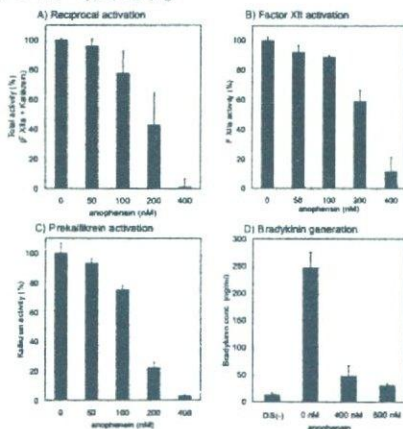


図2 ハマダラカ唾液腺蛋白質によるカリクレイン-キニン系の阻害

しかしながら、これら蛋白質は、カリクレインによる高分子キニノゲンの限定分解反応は全く阻害しなかった。このことから、アノフェンシンやトリアフェスチンによる強力なブラジキニン産生抑制は、直接的なカリクレインの酵素活性阻害ではなく、カリクレイン-キニン系活性化自体の阻害による結果であると考えられた。次に実際の標的分子種を特定するために、カリクレイン-キニン系を構成する各因子と阻害活性分子間の結合を表面プラズモン測定により検討した。その結果、アノフェンシンとトリアフェスチンはいずれも、第 XII (XIIa) 因子、高分子キニノゲンに特異的に結合することが分かった(図3)。一方、いずれの唾液腺蛋白質もプレカリクレインとカリクレインに対しては全く結合しなかった。第 XII 因子は、典型的なセリン型プロテアーゼであり、高分子キニノゲンはヒス

チジン残基に富む一種の補酵素として働き、これら阻害蛋白質が結合能を示した両分子は構造的にも機能的にも全く異なる血漿蛋白質である。

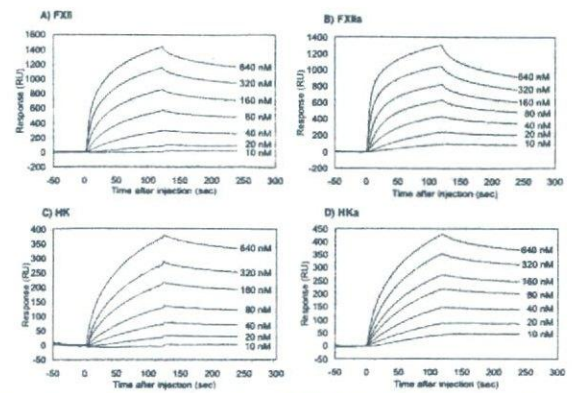


図3 ハマダラカ由来カリクレイン-キニン系阻害蛋白質の血液凝固第XII因子および高分子キニノゲンに対する特異的結合

このようにこれら阻害蛋白質が2種の異種蛋白質に対して特異的な結合を示したことから、これら分子間の相互作用様式とその活性阻害機構に興味を持たれた。そこでこれら阻害蛋白質の第 XII (XIIa) 因子および高分子キニノゲンに対する結合様式を解析したところ、これらいずれの相互作用も単純な1:1の結合ではなく、「早い反応」と「遅い反応」が混在する二相性の結合様式であることが示された(two-state binding)。さらに、第 XII 因子と高分子キニノゲンがともに亜鉛イオン結合蛋白質という共通性があり、なおかつこれら分子の相互作用が亜鉛イオン存在下で認められたため、亜鉛イオンの濃度変化(0-200 μM)の影響も調べた。アノフェンシンを例に挙げると、この蛋白質の第 XII 因子に対する結合は、亜鉛イオンの濃度依存的に増強した。一方、高分子キニノゲンに対する結合はこれとは異なり、亜鉛イオン濃度が150 μM付近で最大結合を示した。一方、トリアフェスチンの第 XII 因子に対する結合と高分子キニノゲンに対する結合はいずれも亜鉛イオン濃度が150 μM付近で最大結合を示した。このように両分子の結合には、亜鉛イオン濃度が大きく影響することが明らかになった。さらにこの事実は、カリクレイン-キニン系活性化における第 XII 因子および高分子キニノゲンの亜鉛イオン依存的な活性化表面上への結合に影響する可能性を示唆していた。そこで、各至適亜鉛イオン濃度下におけるこれら血漿蛋白質の活性化表面(陰性荷電体)への結合に対する各阻害蛋白質の影響を調べた。その結果、これら唾液腺分子は標的分子の陰性荷電表面への結合を濃度依存的に阻害することが明らかとなった。第 XII 因子および高分子キニノゲンの分子内に存在し、陰性荷電の異物表面や血管内皮細胞上のレセプ

ターといった活性化表面への結合に関わる分子内領域は、互いにアミノ酸配列上の相同性は認められないが、いずれも亜鉛イオン結合部位を含んでいる。また、生理条件のカリクレイン-キニン系活性化においては、第 XII 因子と高分子キニノゲンが同一の異物表面を巡って競合することが知られており、このことから両分子の亜鉛イオン結合領域の構造的・機能的な類似性が指摘されている。

以上のことからアノフェンシンとトリアフェスチンは、第 XII (XIIa) 因子および高分子キニノゲンの活性化表面結合領域 (= 亜鉛イオン結合領域) に特異的に結合することにより、活性化表面上への結合を阻止し、これによって接触相の活性化を阻害すると考えられた。

#### 血小板凝集阻害物質の同定：

血液凝固とならんで重要な止血機構に血小板凝集がある。血小板は傷ついた組織から分泌された ADP や血管内皮下組織中のコラーゲン、血液凝固のカスケードによって活性化されたトロンビン、コラーゲンと結合して活性化されたフォンヴィルブラント因子、ホルモンのエピネフリンなどによって活性化される。活性化された血小板は、血小板膜のリン脂質からアラキドン酸を経てトロンボキサン  $A_2$  を生成するとともに、様々な物質を分泌して周囲に存在する不活性な血小板を活性化する。血小板が分泌する物質には ADP、フォンヴィルブラント因子などの血小板を活性化する物質だけでなく、血管の収縮や血液凝固反応を促進する物質も含まれる。

さらに、活性化された血小板では、血小板膜中に解離していたインテグリンの  $\alpha$ IIb と  $\beta$ 3 のサブユニットが会合してインテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (glycoprotein IIb/IIIa [GP IIb/IIIa] 複合体) を形成し、血中のフォンヴィルブラント因子やフィブリノーゲンと結合する。フィブリノーゲンにはインテグリン結合部位が 2 つあるので、インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-フィブリノーゲン-インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の結合によって、血小板どうしが結合し凝集塊を形成する。また、コラーゲンは血小板を活性化するだけでなく、血小板が凝集塊を形成するための足場にもなる。

ブラジルサンガメの唾液には、血小板凝集阻害活性があることは分かっていたが、その機能を担う分子は明らかになっていない。そこで、主要な血小板活性化物質である、ADP、トロンビン、U46619 (トロンボキサン  $A_2$  類縁物質)、アラキドン酸、コラーゲンを惹起物質として用いたときの血小板凝集を指標に、ヒト多血小板血

漿を用いて、ブラジルサンガメの凝集阻害物質の同定を試みた。その結果、2 つの物質がコラーゲンによる血小板の凝集を抑制することがわかり、トリプラチン (Triplatin) 1、2 と名づけた。トリプラチン 1 は、182 アミノ酸残基からなる蛋白質で N 末端の 18 アミノ酸が分泌シグナルだと考えられ、分泌された成熟蛋白質の分子量は 17.9 kDa であると予想された。同様に、トリプラチン 2 は 178 アミノ酸からなる蛋白質で N 末端 22 アミノ酸がシグナルペプチド、成熟蛋白質の分子量は 17.1 kDa と推定された。2 つのトリプラチンのアミノ酸配列には相同性があり (53%)、これら蛋白質はリポカリンファミリーに属する蛋白質であることが分かった。

トリプラチンはコラーゲンによる血小板凝集を抑制することが判明したが、次に標的分子の同定を試みた。血小板に存在するコラーゲンに関わる主要なものとして 4 種類の受容体が報告されている。このうち、インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と GP Ib/V/IX 複合体はフォンヴィルブラント因子を介してコラーゲンと結合し、インテグリン  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (GP Ia/IIa) と GP VI は直接コラーゲンと結合する。トリプラチンが、これら受容体に関わる血小板凝集にどのような影響を及ぼすかについて一つずつ検証した。

まず、インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を介する結合は血小板が活性化した結果起こるものである。もしこの受容体がトリプラチンの標的であるならば、トリプラチンはコラーゲンによる凝集ばかりでなく、他の活性化因子による凝集も阻害できるはずである。しかし実際には、トリプラチンはコラーゲン凝集のみを阻害し、ADP や U46619 などによる凝集を阻害しないことから、インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 はトリプラチンの標的ではないと考えられた。

一方、GP Ib/V/IX 複合体はコラーゲンによって活性化されたフォンヴィルブラント因子と結合する。抗生物質として見つけられたリストセチンは、副作用として GP Ib/V/IX 複合体とフォンヴィルブラント因子の結合を強力に促進し、血小板の凝集を引き起こすことが知られている。そこで、リストセチンによる凝集をトリプラチンが抑制するかどうかを調べた。その結果、トリプラチンはリストセチン凝集を抑制しなかったことから、GP Ib/V/IX 複合体もトリプラチンの標的ではないと考えられた。

コラーゲンと直接結合する受容体のうちインテグリン  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 は、コラーゲンの Asp-Gly-Glu-Ala という配列を認識して結合し、血小板がコラーゲンに接着するときにも機能す



る。実際、このインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  に対する抗体 (Gi9) は血小板のコラーゲンへの接着を阻害する。そこで、トリブラチンが血小板のコラーゲンへの接着を阻害するかどうかを調べたところ、トリブラチンは血小板の接着を阻害しなかった。したがって、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  もトリブラチンの標的ではなかった。

GP VI はコラーゲンと直接結合して血小板内へシグナルを伝える重要な分子として知られているが、遺伝子のクローニングが行われたのはごく最近になってからである。コラーゲンが GP VI に結合すると血小板内の FcR $\gamma$  がリン酸化され、シグナル伝達のカスケードが進行する。コラーゲンは Gly-Xaa-Hyp (Xaa: 任意のアミノ酸、Hyp: ヒドロキシプロリン) の繰り返し配列をもつ長い分子が 3 重螺旋を形成したものである。この繰り返し構造を模して Gly-Pro-Hyp の繰り返しからなるペプチドを 3 重螺旋にして架橋した collagen-related peptide (CRP) と呼ばれる合成ペプチドがある。これまでにこの CRP は、GP VI のみを介して血小板を活性化することが知られている。そこで、この CRP による血小板の凝集に対するトリブラチンの効果を調べたところ、トリブラチンが濃度依存的に CRP による凝集を抑制することが明らかになった。さらに、コラーゲンによる凝集をトリブラチンで抑制したとき、血小板中の FcR $\gamma$  のリン酸化も抑制されていた。これらの結果から、トリブラチンの標的分子は GP VI であることが強く示唆された。

以上のことからトリブラチンは、GPVI に特異的に作用することにより、コラーゲンによる血小板活性化を阻止し、これによって血小板凝集を阻害すると考えられた (図 4)。

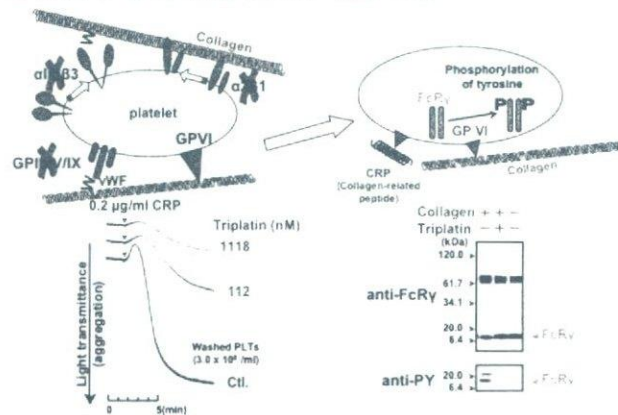


図 4 ブラジルサシガメ唾液腺蛋白質のGPVIを標的とした血小板凝集阻害作用

トロンビン活性阻害蛋白質の同定:

これまでにフタトゲチマダニ唾液腺より、新規トロンビンインヒビターであるマダニン (madanin) 1, 2 を同定した。今年度は、ステフェ

ンスハマダラカの唾液腺蛋白質をスクリーニングしたところ、新規トロンビンインヒビターが 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で報告されているアノフェリン (anophelin) に相同性のある分子であった。この新規蛋白質は、トロンビ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。現在、トロンビン阻害に関わる機能領域の特定を進めているところである。

#### D. 考察

唾液腺発現蛋白質のスクリーニングを行った結果、ステフェンスハマダラカとブラジルサシガメからカリクレイン-キニン系を阻害する新規生理活性分子が同定された。カリクレイン-キニン系 (接触相) 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。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。今回見つかっ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。これらの生理機能は吸血行動を助け、吸血が継続的にできるようにするためと考えられ、理にかなった適応戦略といえる。

ところで、FXII の機能欠損において過剰な出血傾向は認められないことはよく知られている。この事実から、カリクレイン-キニン系は生理的な止血には余り関与しないとこれまで考えられてきた。一方、FXII は内因系および外因系を通して病的血栓を誘導することが知られている。特に最近の研究では、FXII ノックアウトマウスや FXII インヒビターを投与したマウスでは、動脈血栓や脳卒中の発生が抑えられる事が分かり、FXII が *in vivo* における病的血栓形成に深く関与することが報告された。これらのデータは、唾液腺のカリクレイン-キニン系阻害蛋白質が *in vivo* では FXII 因子による病的血栓形成に対抗するための抗凝固剤として働いていることを示唆している。これが正しいとすれば、吸血昆虫の刺咬は血管内での病的血栓に類似した血栓形成の一要因である可能性も考えられる。当然、吸血時の血栓形成は吸血昆虫にとって不利であるため、カリクレイン-キニン系阻害活性を備える合目的性が理解できる。

血小板凝集は止血において特に重要な反応である。今回、ブラジルサシガメ唾液腺から、新規な血小板凝集阻害物質であるトリプラチンが同定された。この生理活性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。実際、トリプラチンは血小板に存在する主要なコラーゲン受容体 GP VI の拮抗阻害物質（アンタゴニスト）であることが明らかとなった。最近、コラーゲンによる血小板凝集は、コラーゲンと結合して活性化された vWF と GP Ib/V/IX 複合体の結合を足場として、GP VI がコラーゲンを認識しそのシグナルを血小板内へ伝えることによって、血小板を活性化し、インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 や  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 の活性化を通じて凝集することが明らかになってきた。トリプラチンはコラーゲンのシグナル伝達に関わる受容体の拮抗阻害物質であり、血小板凝集を効果的に抑制し、ブラジルサシガメの吸血を円滑にしていると考えられる。これまでに、血小板のコラーゲン凝集を抑制する物質として別のサシガメから同定された“パリディピン”の阻害機構は全く不明であった。パリディピンは本研究でその機構が明らかになった

トリプラチンと相同性があることから、パリディピンもトリプラチンと同様の機構によって血小板のコラーゲン凝集を阻害している可能性がある。

これまでに、GP VI に対する天然物由来の阻害物質は報告されておらず、トリプラチンが最初の報告といえる。血小板活性化機構には未だに不明な部分が多く、今後、トリプラチンが血小板活性化・凝集機構を解明する上で重要なツールとして利用でき、血小板の生理学的研究に大きく貢献すると考えられる。また、トリプラチン分子の構造機能相関の解析や、トリプラチンと GP VI との複合体の立体構造解析によって、リード化合物の合成など創薬面での応用が期待される。

## 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た。

本研究により、各種吸血性節足動物の唾液腺からカリクレイン-キニン系阻害物質、血小板凝集阻害物質、トロンビン阻害物質など、いくつかの興味深い新規生理活性物質を同定することができた。これらのほとんどは、その標的分子に対しこれまでに報告のない新規な阻害作用機構を持っていた。これらは新規医薬の素材分子として応用可能と考えられる。今後、さらに新規生理活性分子の探索を進めると同時に、見つかった新規活性分子と標的分子の結合様式を詳細に検討し、相互作用に直接関わる最小機能部位の特定を試みる。これにより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していくことで、そのユニークな特性を利用した新規創薬のリード分子として応用・開発を検討していくことが今後の課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Morita, A., Isawa, H., Orito, Y., Iwanaga, S., Chinzei, Y. and Yuda, M. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. FEBS Journal. 273, 2955-2962. 2006

Isawa, H., Orito, Y., Iwanaga, S., Jingushi, N., Morita, A., Chinzei, Y. and Yuda, M. Identification and characterization of a new kallikrein-kinin system inhibitor from the salivary glands of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. in press. (2007).

岩永史朗・伊澤晴彦. マダニ成分の分子生理学. ダニと新興再興感染症 p. 83-86. (2007).

## 2. 学会発表

伊澤晴彦・森田明広・織戸由貴・岩永史朗・鎮西康雄・油田正夫. ブラジルサシガメの唾液腺に見いだされた血小板凝集を抑制する新規生理活性物質の性状解析. 第58回日本衛生動物学会大会, 2006年4月2日. 長崎市.

## 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18年度

政策創薬総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成19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