

昆虫の抗菌性タンパク質の生産と利用

東京大学薬学部微生物薬品化学教室 **名 取 俊 二**

はじめに

昆虫は、その種の多さから見ても、個体数の多さから見ても、現在地球上で最も繁栄している生物の一つであることは、まぎれもない事実である。このように昆虫が繁栄しているのは、種を保存するための生殖能力と、個体を保護するための生体防御能力が他の生物に比べて優れているためだといわれている。しかしこれ以外にも、昆虫には人知では測れないような超能力があって、それが彼らの繁栄を支えているのではないかと感ずることがしばしばある。よく経験することであるが、夕方キャベツやブロッコリーなどの苗を移植し、翌朝畑に出てみると、その中の何本かが根元からもの見事に切り倒されて倒れていることがある。これはいわゆるネキリムシの仕業で、切り倒された苗の根元を掘ってみると、薄汚い黒褐色のハダカ虫が丸まっている。いつも不思議に思うのは、この虫が苗の在りかをどのようにして感知しそこへ到達するのかということである。犬も歩けば棒に当たるで、夜どおし畑の中を歩き回っていて、たまたまキャベツやブロッコリーの苗に行き当たるわけではあるまい。この虫には何かセンサーがあって、それがこのような美味しい苗の存在を感知し、遠方からその方向へ移動してくるのではないかと思うのだが、昆虫のこのような不思議な能力についてはどれだけ解析が進んでいるのだろうか。昆虫産業というのは、こういった昆虫の持つ超能力を、システムとして研究したり、あるいは昆虫から有用性の高い物質を取り出したりして、それらを基盤とした新しい産業を開拓するプロジェクト、と理解している。

私たちはもう20年近く、昆虫の生体防御機構について研究をつづけている。昆虫の生体防御機構として注目されるのは、まず第一に、抗菌性タンパク質やレクチンに代表される体液性の生体防御因子が形成する生体防御ネットワークが挙げられる。次いで、体液細胞が関与する生体防御システムがある。もう一つ注目してよいのが、昆虫の持つ組織再生能力である。私は薬学部に所属しているので、どうしても人間の疾病の治療や予防といった観点から昆虫の生体防御機構を論ずることになるが、『そ

れなら何故人間ではなくて昆虫なのか』という質問をもう何十回となく受けてきた。その際の私の回答は、『人間の病気の治療や予防を考えるときに、人間だけを見ていたのではどうしても分からない部分がある。比較生物学的な視点が是非とも必要である』というものであった。今年の初め、ドイツの免疫学者 Jan Klein が『免疫学におけるヒト中心的排他主義』という論文を発表した (Klein, 1995)。この論文の要旨をここで解説するつもりはないが、この論文の中に上の質問に対する模範回答が示されているように思える。

本稿では昆虫、特にセンチニクバエの抗菌性タンパク質について要約を記す。昆虫の抗菌性タンパク質に関する研究はヨーロッパで先鞭がつけられ、広く世界的に行われるようになった。昆虫は一般に、バクテリアの感染や体壁の傷害に応答して、強力な抗菌性タンパク質を体液中に作り出すことが知られている。センチニクバエの場合も、体壁に傷をつけた幼虫の体液からこのような誘導性の抗菌性タンパク質が精製され、その性質が明らかになっている (Natori, 1994)。この種のタンパク質の特徴として、構造的によく似た抗菌スペクトルが少しずつ異なる複数のホモログが存在することが挙げられる。また、センチニクバエの場合、幼虫の体液の中に抗真菌活性を持った構成的なタンパク質が存在する。以下に、この種のタンパク質の主なものについて解説し、その遺伝子発現機構ならびにその医薬への応用について述べる。

I センチニクバエの主要な抗菌性タンパク質

1 グラム陰性菌に作用するタンパク質

現在までに、グラム陰性菌に致死的に作用するタンパク質が4種類ほど見いだされている。センチニクバエの学名が *Sarcophaga peregrina* であることから、このハエが作り出す毒性タンパク質という意味で、これらのタンパク質を総称してザルコトキシンと呼んだ。ザルコトキシンの中で最も抗菌活性が強いのがザルコトキシン I と呼ばれるアミノ酸39個からなるタンパク質である (Okada and Natori, 1983)。ザルコトキシン I には、IA から IE までの5種類のホモログが知られており、その構造を示したのが図-1である。この図から明らかなように、これらのタンパク質はその一次構造はきわめてよく似ている。図-1の一次構造をよく見ると、アミノ末端側

	1	5	10	15	20	25	30	35	40																											
ザルコトキシン IA	G	W	L	K	K	I	G	K	K	E	R	V	G	Q	H	R	D	A	T	I	Q	L	G	I	A	Q	Q	A	N	V	A	A	T	A	R	
ザルコトキシン IB	G	W	L	K	K	I	G	K	K	E	R	V	G	Q	H	R	D	A	T	I	Q	V	I	G	V	A	Q	Q	A	N	V	A	A	T	A	R
ザルコトキシン IC	G	W	L	R	K	I	G	K	K	E	R	V	G	Q	H	R	D	A	T	I	Q	V	L	G	I	A	Q	Q	A	N	V	A	A	T	A	R
ザルコトキシン ID	G	W	I	R	D	F	G	K	R	E	R	V	G	Q	H	R	D	A	T	I	Q	I	A	V	A	Q	Q	A	N	V	A	A	T	L	K	
ザルコトキシン IE	G	W	L	K	K	I	G	K	K	E	R	V	G	Q	H	R	D	A	T	I	Q	L	G	I	A	Q	Q	A	N	V	A	A	T	A	R	

図-1 ザルコトキシンIの構造
ボックスで囲った部分は保存されている配列を示す。

の19残基は比較的親水性であるのに対して、カルボキシル末端側の20残基は疎水性であることがわかる。NMRの解析の結果、ザルコトキシンIは二つの α -ヘリックスがちょうつがいにつながったような構造をしていることが示された。ザルコトキシンIは分子全体としては両親媒性であり、膜と相互作用ができる構造をしている。遺伝子の解析から、これらのホモログはいずれも独立した遺伝子の産物であり、おのおのの遺伝子は比較的狭い領域にクラスターを形成して存在することが示された。以後、最も研究が進んでいるザルコトキシンIAについて述べる。

ザルコトキシンIAは種々のグラム陰性菌に対して、1~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で致死的に作用する。またこのタンパク質は、胃がんや胃かいようを引き起こすのではないかと、今問題になっている病原菌、ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*) に対しても有効である。このタンパク質の作用機構を検討した結果、ザルコトキシンIAはグラム陰性菌の細胞膜に働き、膜の電気化学的なポテンシャルを消失させることが明らかになった。すなわち、大腸菌にザルコトキシンIAを作用させると、ATPの含量が速やかに減少して、数分以内にほとんどゼロになる。このような菌では、プロリンのようなアミノ酸の能動輸送は全く観察されない。ATP合成もプロリンの輸送もともに膜の電気化学的なポテンシャルにより駆動される反応であることが知られている。ザルコトキシンIAは両親媒性であるために容易に膜と相互作用を持ち、膜の電気化学的なポテンシャルを破壊するものと思われる。

基質レベルのリン酸化のみでATP合成を行っている大腸菌の変異株が知られているが、このような変異株ではザルコトキシンIAが効きにくい。このことから、ザルコトキシンIAにより菌が死に至る直接の原因は、膜機能の喪失によると考えられる。ザルコトキシンIAはグラム陽性菌には効果がないが、これはバクテリアの表層構造の問題であろうと思われる。グラム陽性菌のペプチドグリカン層はグラム陰性菌のそれに比べるとはるか

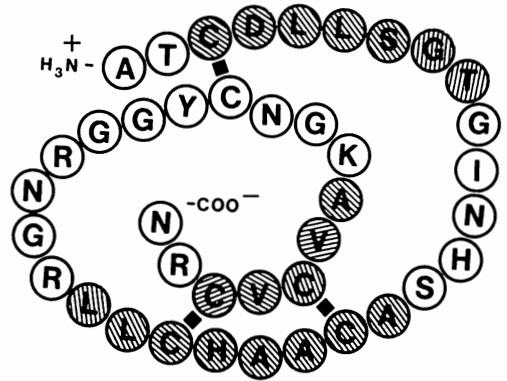


図-2 ザーペシンの構造 (アミノ酸の配列と結合)

に厚いため、ザルコトキシンIAが細胞膜に容易に到達できないのかもしれない。

2 グラム陽性菌に作用するタンパク質

ザーペシンは主としてグラム陽性菌に対して抗菌性を示すタンパク質である (MATSUYAMA and NATORI, 1988)。ザーペシンには現在3種類のホモログが知られており、ザーペシン及びザーペシンCはアミノ酸40個よりなるが、ザーペシンBはアミノ酸34個よりなるタンパク質である。いずれも分子内に3対のジスルフィド結合が存在する。このうち、ザーペシンに関して研究がいちばん進んでいるので、以後このタンパク質について解説する。ザーペシンの構造を図-2に示した。ザーペシンの黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する最小生育阻止濃度 (MIC) を比較すると、5 $\mu\text{g/ml}$ および 100 $\mu\text{g/ml}$ で20倍もの差がある。NMR解析の結果このタンパク質はアミノ末端側から順に、ループ構造、 α -ヘリックス構造及び二つの β -シート構造を持っていることが判明した。ザーペシンの標的もバクテリアの膜で、膜構成リン脂質の一つカルジオリピンと強い親和性を持つことが示されている。おそらくザーペシンは、ザルコトキシンIAと同様に膜機能に損傷を与えることにより、バクテリアを死に至らしめるものと思われる。その際にカルジオリピンの存在が重要であることは、大腸菌のカルジオリピン合成酵素を欠く変異株では、ザーペシンに対する感受性が低下しているという事実からも支持される。

3 真菌に作用するタンパク質

昆虫に感染する病原性微生物は細菌だけではない。ウイルス、真菌、原虫など様々な微生物が存在する。いままで述べてきたタンパク質はすべて抗細菌性のタンパク質であるが、センチニクバエはいわゆるカビを殺す抗真菌性のタンパク質を産生していることが明らかになった (IUIIMA et al., 1988)。図-3は幼虫の体液中の抗真菌活性

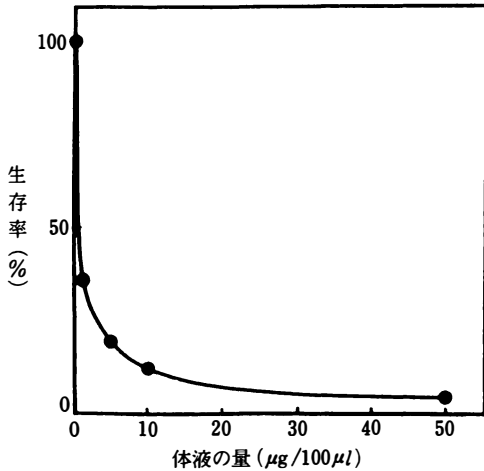


図-3 幼虫体液の抗真菌活性
一定数のカンジダアルビカンスに対して種々の濃度の幼虫体液を加えインキュベーション後、生菌数の変化を調べた。

を、カンジダアルビカンス (*Candida albicans*) を標的菌として調べたものである。加えた体液の量に依存して菌が死んでいくのがわかる。ここで注意すべきは、この体液は正常な幼虫から採取したもので、体表に傷害を受けた幼虫の体液ではない。したがって、この抗真菌活性は誘導性のものではなく、常に体液中に存在する活性ということになる。体液を 100°C で加熱しても抗真菌活性は失われなかった。そこで、体液を 100°C で加熱して大部分のタンパクを変成させて除去した上清から、抗真菌活性を持つタンパク質の精製を行った。精製したタンパク質の分子量は約 7,000 で、電気泳動的に単一であった。このタンパク質を AFP と命名した (antifungal protein の略)。

精製したタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、その配列をもとに AFP の cDNA を単離した。cDNA を解析した結果、AFP は 67 個のアミノ酸からできていた。そしてそのアミノ酸組成には偏りがあり、グリシンとヒスチジンが全体の 50% 以上を占めている。また分子内いくつかの繰り返し配列が存在する。AFP の作用機構についてはほとんどわかっていないが、カンジダにこのタンパク質を作用させると、細胞内から物質の漏出が起きることがわかった。これは、AFP の標的が多くの抗細菌性タンパク質と同様に細胞の膜である可能性を示唆するが、AFP は大変溶解性の高いタンパク質で、分子内に疎水性のドメインは存在しない。

II 抗菌性タンパク質の遺伝子発現機構

以上述べてきた抗菌性タンパク質は AFP を除きすべて誘導性で、幼虫の体壁に傷をつけたときに、遺伝子レベルで活性化されることが分かっている。この遺伝子の活性化には、*Rel* ファミリーの転写因子が関与することが、明らかになった。*Rel* ファミリーの転写因子の代表的なものとして、ほ乳動物の NF- κ B がよく知られている。事実、これらの抗菌性タンパク質の遺伝子の 5' 上流には例外なく NF- κ B の結合配列が存在する (KOBAYASHI et al., 1993)。また、実際に *Rel* ファミリーの転写因子と考えられる、この配列に結合する分子量 59 kDa のタンパク質が精製されている。これらの遺伝子は、バクテリアやカビの細胞壁成分である LPS や、 β -1, 3-グルカンによって活性化され、転写が開始されることが示されている。しかし、これらの物質の刺激がどのような経路で遺伝子の活性化を引き起こすかという、いわゆるシグナル伝達の経路については、今後の研究に待たなければならない。

III 抗菌性タンパク質の活性中心の同定と医薬への応用

以上述べてきた昆虫の抗菌性タンパク質を、ヒトの感染症の治療あるいは予防のために使用しようとするとき、まず問題になるのがその抗原性である。ザルコトキシニン IA にしてもザーペシンにしても、アミノ酸残基数から見て当然ヒトの体内で抗体ができると思われる。そこで、この種の抗菌性タンパク質の抗菌活性部位の同定を試みた。もしアミノ酸残基の活性中心が同定できれば、それは低分子のペプチドであるので、抗原性の心配はなくなることになる。ザーペシン B はザーペシンのホモログで、アミノ酸残基数はザーペシンより 6 残基少ない。ザーペシン B も構造的にはザーペシン同様、ループ構造、 α -ヘリックス構造及び二つの β -シート構造を持っているので、おのおのの構造に相当するペプチドを合成し、いずれかのペプチドに抗菌活性が認められるかどうかを調べた (YAMADA and NATORI, 1994)。その結果、7 番目のアルギニンから 17 番目のリジンまでのアミノ酸 11 残基よりなるペプチド (RSLCLLHCRLK) に、もとのザーペシン B とほぼ同程度の抗菌活性が認められた。この部分はザーペシン B の α -ヘリックス構造に相当し、このタンパク質の活性中心と考えられる。

このペプチドの性質を調べた結果、カルボキシル末端をアミド化すると抗菌活性が上昇すること、アミノ酸配列を変えることにより、より活性の強いペプチドを作出

表-1 様々な細菌に対する合成ペプチドの最性育阻止濃度 (MIC)

合成ペプチド	MIC (μg/ml)		
	黄色ブドウ球菌	大腸菌	薬剤耐性黄色ブドウ球菌
RLKLLLLRLK-NH ₂	1	20	30
RLKLLLLRLK-NH ₂	2	20	>35
RLKLLRLK-NH ₂	2	30	>35
KLKLLLLKLK-NH ₂	2	20	30
RLRLLLLRLR-NH ₂	2	>35	>35
HLHLLLLHLH-NH ₂	>16	>35	>35
KKLLLLLKK-NH ₂	>16	>35	>35
KLLLLLK-NH ₂	>16	25	>35
KLKLLLL-NH ₂	8	20	>35

することが可能であることなどが明らかになった。そこで、このペプチドを種々改変した結果、RLKまたはKLKというモチーフを両端に持ち中間にLが5個並ぶ構造のペプチドが黄色ブドウ球菌に対して強い抗菌活性を示し、大腸菌に対しても有効であることがわかった。この結果をまとめたものが表-1である。

表から明らかなようにこれらのペプチドは、薬剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対してもある程度有効であった。また、両末端の塩基性モチーフはKLKまたはRLKという構造が重要で、HLHやKKあるいはKのみでは活性は著しく低下することがわかった。表の最下段にカルボキシル末端のKLKを除いたペプチドの活性を示してあるが、このようなペプチドにも有意な抗菌活性が認められた。したがって、カルボキシル末端側のKLKは、活性にそれほど重要な寄与はしていないように思われる。KLKLLLLKLK-NH₂はアミノ酸が2種類で合成が容易であり活性が比較強いいため、以後はこのペプチドを使って研究を進めた。このペプチド (KLK-NH₂と略す) はリジンを多く含むために、トリプシンのようなプロテアーゼによって容易に分解されてしまうことが分かった。そこで、KLK-NH₂のすべてのアミノ酸をD-アミノ酸で置き換えたD-エナンチオマーを合成した。KLK-NH₂とそのD-エナンチオマーのトリプシンに対する感受性を比較すると、KLK-NH₂が完全に分解される条件下でもD-エナンチオマーは全く分解されなかった。

この二つのペプチドのMRSAに対する活性を見たのが図-4である。KLK-NH₂を15 μg/ml添加すると、菌の成長は12時間目までは80%程度抑えられるが、その後菌は成長を開始し24時間目ではほぼ100%まで回復する。一方、D-エナンチオマーを同量添加した場合には、24時間培養しても菌の成長は認められなかった。この事

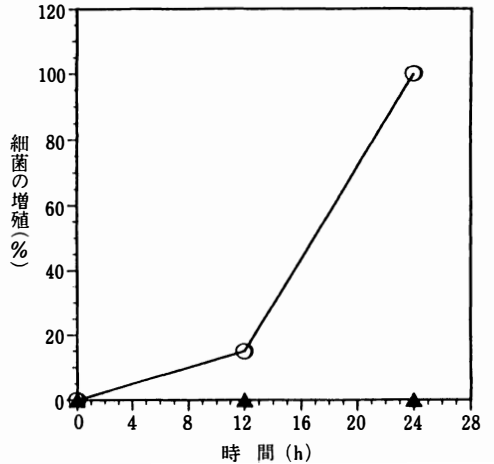


図-4 MRSAの成育に及ぼすペプチドの効果
15 μg/mlのペプチドを添加した培地でのMRSAの成育を調べた。
○: KLK-NH₂, ▲: D-エナンチオマー

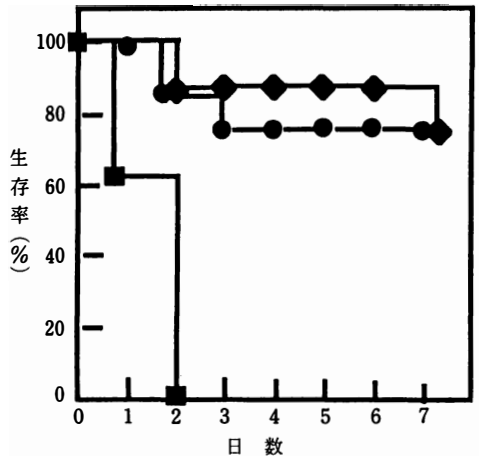


図-5 抗菌ペプチドによるMRSA感染マウスの治療実験
MRSAを静脈内に接種し、15分後にKLK-NH₂またはそのD-エナンチオマーを100 μg静注し経過を観察した。一群8匹のマウスを使用した。
■: 生理食塩水投与群, ◆: KLK-NH₂投与群, ●: D-エナンチオマー投与群

実は、MRSAが培地中に分泌するプロテアーゼによってKLK-NH₂は12時間目までに完全に分解されてしまい、生き残っていた菌が増殖するのに対して、D-エナンチオマーはプロテアーゼによる分解を受けないために持続的に菌の増殖が抑えられるものと解釈される。したがって、抗菌性という点ではD-エナンチオマーのほうが優れているといえる。

このペプチドの作用機構についてはまだ詳しく解析していない。しかし、大腸菌の膜のリン脂質組成を模して作製したリポソームにグルコースを封入し、このペプチドを添加すると、濃度依存的にグルコースの漏出が起きることから、膜作用性であることが推察された。そこで、羊の赤血球を使ってこのペプチドの溶血活性を調べたところ、二つのペプチドともに溶血活性は全く認められなかった。おそらく、これらのペプチドはバクテリアの膜に選択的に作用し、動物細胞に対する毒性は低いように思われる。

最後に、この二つのペプチドを使って MRSA 感染防御の実験を行った。マウスにあらかじめサイクロフォスファミドを投与し MRSA の感染を可能にしておいて、静脈内に MRSA を感染させた。15 分後にこれらのペプチドを一匹当たり 100 μg を 1 回静注した。その後、感染の経過を 7 日間観察した結果を図-5 に示した。図から明らかのように、生理食塩水を投与した群は 2 日以内にすべてのマウスが感染症を起こして死んだが、ペプチド投与群では 70% 以上のマウスが生存していた。興味深いことにプロテアーゼ感受性の KLK-NH₂ の方がその D-エナンチオマーよりも成績が良かった。この結果には再現性があり、抗菌ペプチドの有用性が個体レベルの実験でも実証されたことになる。この結果がすぐヒトの感染症に適用されるものではないが、この種の抗菌ペプチドは将来の医薬のシーズとして有用であると思われる。

おわりに

以上、本稿ではセンチニクバエの抗菌性タンパク質について解説したが、この昆虫の防御システム全般について次のようなことがいえる。まず第一に、一つの抗菌性タンパク質には複数のホモログが存在する。おそらく、個々のタンパク質はそれぞれ少しずつ異なる抗菌スペクトルを持っていて、全体として多様なバクテリアに対応できるようになっているのではないと思われる。

第二に、AFP 以外のすべてのタンパク質が誘導性であった。すなわち、この種のタンパク質は通常は存在せず、体表に傷ができたような緊急時に一過性に出現することになる。これを昆虫サイドから見ると、一過性にこの種のタンパク質を発現させ、必要がなくなると速やか

に消失させることで耐性菌の出現を防いでいる可能性が考えられる。

最後に、この種の抗菌性タンパク質は全体として大きなネットワークを形成している可能性がある。というのは、本稿ではふれなかったが、ザルコトキシシン IA には抗真菌活性は認められないが、このタンパク質を少量 AFP に加えると、AFP の抗真菌活性が著しく増強されることがわかっている。すなわち、AFP は常時体液中に存在してあるレベルの抗真菌活性を維持しているが、緊急時にザルコトキシシン IA が産生されると相乗的に AFP の抗真菌活性が高められることになる。これは昆虫の生体防御機構の優れた特質であり、昆虫が自己防御のために獲得した巧妙な戦略なのかもしれない。

このように見てくると、昆虫には体の中に薬を作り出す能力があるということになる。これらの抗菌性タンパク質は遺伝子レベルで活性化を受けることがわかってきたが、他の動物にこのような機構が備わっているかどうかは不明である。スウェーデンの微生物学者 Hans Boman はブタの小腸からザルコトキシシン IA と構造的によく似たタンパク質を取り出している。ブタにあるならヒトにあってもおかしくはない。もしヒトにも、昆虫と同じような生体防御機構があつて、なんらかの方法でそれを活性化することができれば、われわれは必要なときに強力な抗菌性タンパク質のネットワークを体の中に作り出すことができる。抗菌タンパク質の活性中心の同定も重要であるが、ヒトのこのような抗菌性タンパク質の遺伝子を探索し、その活性化を考えることも、これからの重要な課題のように思われる。

引用文献

- 1) IJIMA, R. et al. (1993): J. Biol. Chem. 268: 12055~12061.
- 2) KLEIN, J. (1995): 科学, 65: 55~62.
- 3) KOBAYASHI, A. et al. (1993): Mol. Cell. Biol. 13: 4049~4056.
- 4) MATSUYAMA, K. and S. NATORI (1988): J. Biol. Chem. 263: 17112~17116.
- 5) NATORI, S. (1994): *in* Antimicrobial Peptides (Boman H. G. ed.) John Wiley & Sons, New York, pp. 123~134.
- 6) OKADA, M. and S. NATORI (1983): Biochem. J. 211: 727~734.