

「特異的な害虫駆除を目指した昆虫 PTH 受容体によるリガンド認識機構の解明」

姫路獨協大学・薬学部・医療薬学科・生物分析化学研究室

齋藤 一樹

1. 研究の背景と目的

昨今の新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の例を見るまでもなく、様々な感染症の拡大阻止は、現代の衛生薬学の喫緊の課題となっている。感染症の中には、ヒトからヒトへ直接飛沫感染したり接触感染したりするものもあるが、媒介昆虫を介して伝染するものも多い。昆虫を媒介して伝染する感染症については、その媒介昆虫を死滅させてしまえば感染を食い止めることができるはずである。しかし、マラリアは、蚊（ハマダラカ）を介して伝染することが明らかになっているにもかかわらず、いまだに今日でも世界で年間 40 万人以上の人々が命を落としている（COVID-19 による現死者数の 5 倍以上）。現在、蚊に対して使用されている殺虫剤のほとんどがその神経系に作用する即効性薬剤である。このような薬剤は人間の生活圏を含む周囲の生態系にも甚大な影響を与えるため、感染地域に無作為に広域散布することはできず、このことがいまだにマラリアを撲滅できないことの一因となっている。周囲の生態系に影響を与えずに、媒介昆虫だけを駆除できる標的的特異性の高い薬剤の開発が急務なのである。

そこで、本研究では、特異性の高い殺虫剤開発に向けて、昆虫に特有の脱皮・変態という発育過程の制御に関わる「前胸腺刺激ホルモン（PTTH）」を研究対象とすることにした。分子進化的にも哺乳類などには PTTH 様ホルモンが存在しないため、PTTH 活性を阻害標的とした薬剤は周囲の生態系への影響が少ない。また、ペプチドホルモンである PTTH はアミノ酸配列の違いによって近隣の昆虫種間であっても交差活性がほとんどなく、PTTH を標的にすれば害虫のみに特異的に効くような薬剤を設計しやすい。本研究では、標的昆虫種に対して特異性の高い殺虫剤（発育制御剤）の開発を目指して、受容体による PTTH 分子の特異的認識機構を明らかにすることを研究目的とした。

2. 研究方法・研究内容

後年の薬剤設計のことを考えると、受容体による PTTH 分子の特異的認識機構を明らかにする上で、詳細な立体構造解析が必須である。そのためには、タンパク質の立体構造解析に利用される物理化学的測定（核磁気共鳴スペクトル、X 線構造解析、クライオ電子顕微鏡解析など）に必要な PTTH とその受容体のある程度のスケール量で確保しなければならない。特に、PTTH は、分子内に 7 本ものジスルフィド架橋を持つホモ二量体であるため（図 1）、菌体内（還元的環境）でタンパク質を産生する大腸菌ではジスルフィド架橋が形成できずに沈殿してしまうことが知られている。

そこで、本研究では、大腸菌の代わりに、数多くのジスルフィド架橋含有タンパク質の産生に実績のあるブレヴィバチルス菌を採用することにした。ブレヴィバチルス菌は、産生したタンパク質を菌体外（酸化環境）に放出する分泌システムを備えているため、培養培地中へ分泌する時点で産生タンパク質に正しいジスルフィド架橋を作らせることができる。

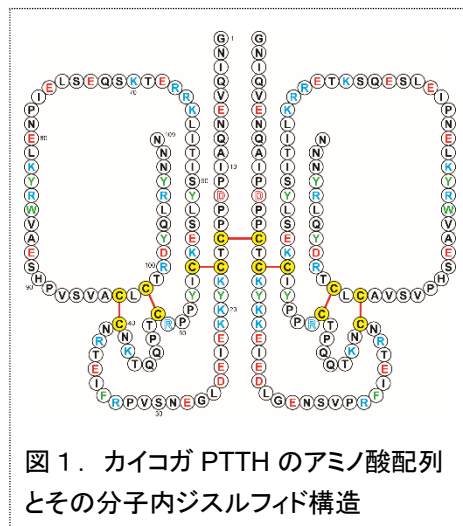


図 1. カイコガ PTTH のアミノ酸配列とその分子内ジスルフィド構造

なお、本来であれば、マラリア等の撲滅に向けて、ハマダラカの PTH を研究対象にすべきところであるが、ここでは、PTH やその受容体の遺伝子クローニングがすでに完了している、モデル昆虫の一つ・カイコガで基盤的研究を行うことにした。

3. 研究成果

(1) ブレヴィバチルス菌の培養とカイコガ PTH の分泌産生

先行研究の結果にしたがって、カイコガ PTH は、N 端には分泌のために「*B. brevis* 細胞壁タンパク質由来のシグナル配列」を付加し、C 端には精製を簡便に行うために「His₆ タグ配列」を付加して発現させた。該当する発現ベクターで形質転換したブレヴィバチルス菌 *Brevibacillus choshinensis* HPD31 株を 10 mg/L のネオマイシンを含む TM 培地に植菌し、30°C で 24 時間前培養を行った。さらに、同培地中に希釈して植え継ぎ、続けて 30°C で 24 時間本培養を行った。培地中に発現された PTH-His₆ は、硫酸沈殿により回収・濃縮してから次の Ni⁺-NTA カラムを用いた精製過程に持ち込んだ。

(2) Ni⁺-NTA カラムを用いた精製

ブレヴィバチルス菌の培養液 1000 mL 分の硫酸沈殿を約 45 mL の HBS に溶かし直し、全量を Ni⁺-NTA カラム HisTrap HP (1 mL, GE Healthcare) にロードし、じゅうぶんに 20 mM のイミダゾールを含む HBS でカラムを洗った後、流速 0.5 mL/min で 96 分間かけて、溶離液のイミダゾール濃度を直線的に 500 mM まで上昇させた。0.5 mL ずつ分画して非還元 SDS-PAGE で確認したところ、天然と同じ二量体の PTH は、おおまかに *pool-A* と *pool-B* の二箇所に溶出されることがわかった (図 2)。

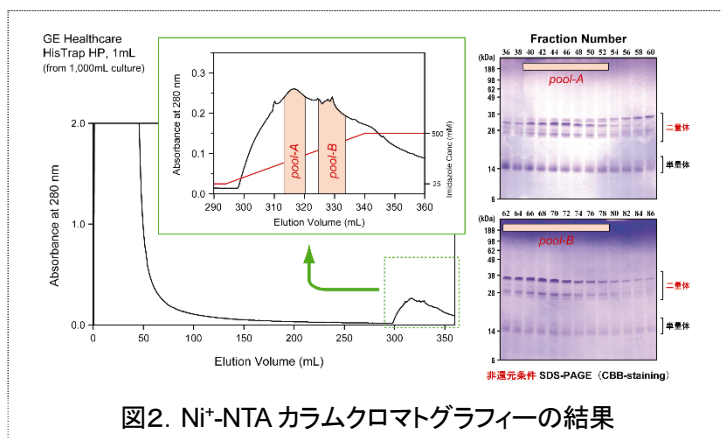


図2. Ni⁺-NTA カラムクロマトグラフィーの結果

0.5 mL ずつ分画して非還元 SDS-PAGE で確認したところ、天然と同じ二量体の PTH は、おおまかに *pool-A* と *pool-B* の二箇所に溶出されることがわかった (図 2)。

(3) ゲルろ過カラムを用いた単量体 PTH の除去

図 2 の非還元 SDS-PAGE を見ると、*pool-A* および *pool-B* のいずれにも、15 kDa 付近に単量体 PTH のバンドも観測された。そこで、次に、ゲルろ過カラムを用いて単量体 PTH を取り除くことにした。*pool-A*、*pool-B* をそれぞれ硫酸沈殿で濃縮し、ゲルろ過カラム COSMOSIL 5Diol-300II (7.5 φ × 300 mm, Nacalai Tesuque) にかけた。先行研究において、単量体 PTH は低温で会合体を形成しやすいことがわかっていたので、このゲルろ過精製は 35°C で行った (図 3)。

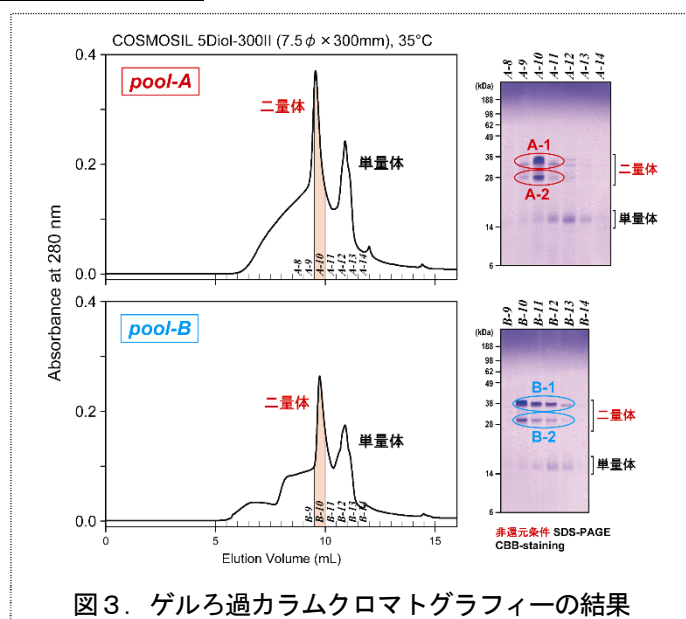


図3. ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果

pool-A、*pool-B* いずれをゲルろ過したものも、9.5~10.0 mL 付近に二量体 PTTH がメインピークとして溶出され、10.5~11.0 mL 付近に溶出されている単量体 PTTH と分離することができた。しかし、*pool-A*、*pool-B* のいずれをゲルろ過精製した場合にも、非還元 SDS-PAGE 上で (図 3)、二量体 PTTH はおもに 2 本のバンドを示すことがわかった。そこで、SDS-PAGE 上で比較的の上の方に現れたバンドの成分をそれぞれ A-1、B-1、比較的の下の方に現れたバンドの成分をそれぞれ B-1、B-2 と呼ぶことにして、A-1 と A-2 とを、B-1 と B-2 とを逆相 HPLC で分離することにした。

(4) 逆相カラムを用いた二量体 PTTH の最終精製

pool-A、*pool-B* のそれぞれからゲルろ過精製で得られた二量体 PTTH 画分を、逆相カラム YMC-Pack PROTEIN-RP (4.6 φ × 150 mm, YMC) にかけて (35°C、流速 1 mL/min)、移動相中のアセトニトリル含量を 5% から 45% まで 40 分かけて直線的に上昇させたところ、*pool-A* 由来の二量体 PTTH では 29.5~30.2 分付近に、*pool-B* 由来の二量体 PTTH では 28.7~29.5 分付近にメインピークが溶出され、その少し前にサブピークが溶出された (図 4)。そこで、それらのピーク周辺を 10 秒毎に分取したフラクション a~l を非還元 SDS-PAGE でチェックしたところ、それぞれメインピークが A-1、B-1 に、サブピークが A-2、B-2 に相当することがわかった。

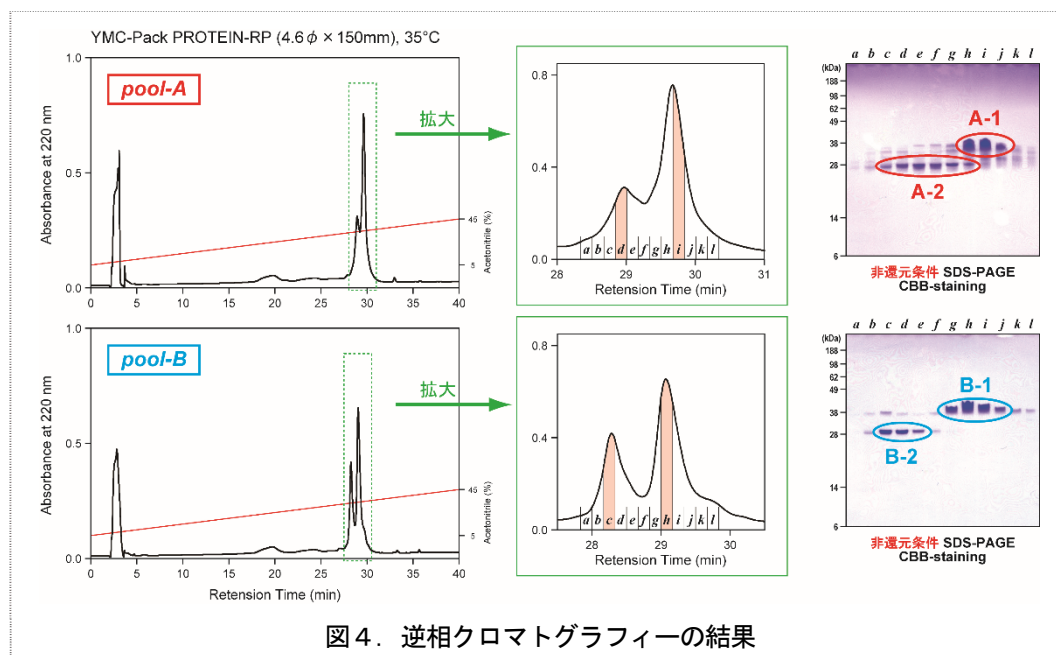


図 4. 逆相クロマトグラフィーの結果

(5) *pool-A* と *pool-B* との違い

二量体 PTTH と思われる 4 種のタンパク質 (A-1、A-2、B-1、B-2) の質量を、MALDI-TOF-MS を用いて調べたところ、1 価イオンの平均質量として、A-1 は 25,623、A-2 は 25,626、B-1 は 27,108、B-2 は 27,111 を示した。A-1 と A-2 同士、B-1 と B-2 同士では似通った m/z 値を示し、A-1・A-2 は B-1・B-2 よりも約 1,485 小さかった。もし計画通りに、C 端に His₆ タグが付加したカイコガ二量体 PTTH が調製できていれば、その 1 価イオンの平均質量の計算値は、27,108 になる。したがって、B-1、B-2 の方が調製しようとしたカイコガ二量体 PTTH ではないかと考えられた。

そこで、これら 4 種の二量体 PTTH がどのようなペプチド鎖で構成されているのかを確かめるため、これまで非還元条件下で行ってきた SDS-PAGE を還元条件下で行い、非還元条件下と還元条件下でバンドの現れ方がどのようになるかを比較した (図 5)。

非還元条件下で行った SDS-PAGE (図 5 左) では、これまで通りの位置に A-1、A-2、B-1、B-2 が泳動された。これに対して、これらを還元剤を用いてジスルフィド架橋を切断した状態で行った還元条件下の SDS-PAGE (図 5 右) では、A-1、A-2 からは 2 本のバンド、B-1、B-2 からは 1 本のバンドが観測された。このことから、A-1、A-2 は異なる 2 種のペプチド鎖からなるヘテロ二量体で、B-1、B-2 は同一のペプチド鎖からなるホモ二量体であることがわかった。また、バンドの位置の比較から、A-1、A-2 の片方のペプチド鎖は、B-1、B-2 と共通するペプチド鎖であろうと推測された。MALDI-TOF-MS で A-1・A-2 の方が B-1・B-2 よりも平均質量が約 1,485 小さかったことから、A-1・A-2 では、片方のペプチド鎖の C 端 11 残基が欠落したものと思われる。今回 PTTH-His₆ の発現に用いた *Brevibacillus choshinensis* HPD31 株は、菌体表面のプロテアーゼ活性が低い菌株として知られているが、残存する活性によって C 端 11 残基が切断されてしまったものと考えられる。Ni⁺-NTA クロマト (図 2) で、*pool-A* (A-1、A-2) は、片方のペプチド鎖の C 端にあるべき His₆ タグが欠落したために分子内に His₆ タグが 1 つしかなく Ni⁺-NTA カラムへの吸着力が弱まり、分子内に His₆ タグが 2 つある *pool-B* (B-1、B-2) よりも先に溶出してしまったものと考えられる。

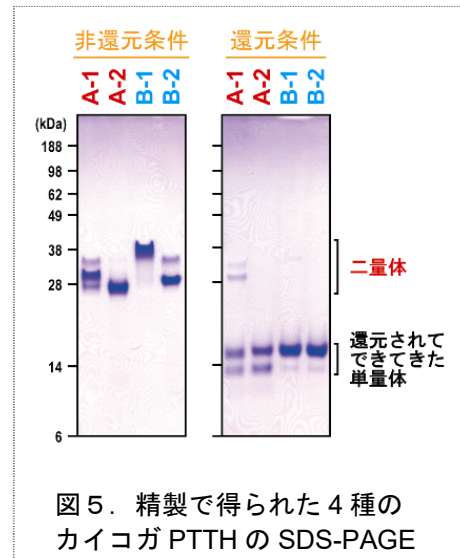


図 5. 精製で得られた 4 種の
カイコガ PTTH の SDS-PAGE

(6) 残された課題と今後の展望

A-1 と A-2 の間、B-1 と B-2 の間の違いは、内部のジスルフィド架橋のかかり方が異なっているのではないかと考え、現在、これらのジスルフィド架橋の架かり方を解析している。また、カイコガ PTTH の立体構造や受容体による認識機構について核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを用いて解明するために、PTTH を安定同位体で標識する作業の条件検討を同時に行っているところである。

さらに、本報告書には詳細を述べないが、PTTH の受容体である Torso と呼ばれる膜タンパク質についても調製を進めている。カイコガ Torso をショウジョウバエ胚由来の培養細胞 (S2 細胞) に一過的に発現させ、可溶化条件を検討したところ、界面活性剤としてはコール酸が有効であることを見出した。現在は、Torso の精製条件の検討を進めている。

これらの条件検討が済めば、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを解析することにより、安定同位体ラベルされた PTTH-His₆ がどのような立体構造を取り、どのように受容体 Torso に認識されているのかを、原子レベルで明らかにすることができるだろう。

4. 生活や産業への貢献および波及効果

PTTH がその受容体 Torso によってどのような様式で認識され、どの残基・原子を介して相互作用しているのかを明らかにすることができれば、そのような情報を化学会社や製薬会社に開示・提供し、従来の創薬過程と同様に、その相互作用を阻害する薬剤を探索し設計することに大きく貢献できるだろう。安価でかつ標的害虫に特異性の高い薬剤を開発できれば、衛生害虫を介した感染症の撲滅も夢ではなくなるだろう。