

センチクバエの生体防御分子 5-S-GAD

西川 毅

昆虫は、地球上の動物種の70%以上を占め、100万種を超えるといわれている。昆虫の生体防御機構はその繁栄を支えていると思われるが、獲得免疫を有する脊椎動物と異なり、自然免疫だけからなっている。昆虫の生体防御機構の研究は自然免疫の理解に役立つ一方で、それぞれの昆虫が作る多彩な生体防御分子は医薬資源になる可能性を秘めている。5-S-GADはセンチクバエの成虫に傷をつけることにより誘導される抗菌物質として同定された。その後の解析から、チロシンキナーゼ阻害作用、抗腫瘍作用、血管新生阻害作用、ラジカルスカベンジャー活性など、さまざまな生理活性を示すことがわかってきた。本稿では、5-S-GADの特徴について、創薬への応用が期待される活性を中心に紹介する。

1. はじめに

センチクバエは、体表に傷をつけることにより、さまざまな生体防御分子を産生する。このハエは、遺伝学実験のモデル動物であるショウジョウバエと同じ双翅目に分類されるが、体が大きく、生化学的な解析が容易である。この特徴を生かして、これまでに抗菌タンパク質、抗真菌タンパク質、レクチンなど、さまざまな生体防御分子がセンチクバエから精製、同定されてきた¹⁾。本稿では、抗菌物質として同定されながら、抗腫瘍活性をはじめ、多彩な薬理活性を示すことがわかってきた生理活性物質 5-S-GAD について紹介する。

2. 体表傷害時に誘導される抗菌物質 5-S-GAD

5-S-GAD (*N*-β-alanyl-5-*S*-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenyl-alanine) は、センチクバエ成虫に傷をつけることにより誘導される抗菌物質として、同定された²⁾。構造決定の結果、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるグルタチオンとβ-アラニルドーパが結合した分子量573の化合物

であることが明らかになった(図1)。実際、この化合物はグルタチオンとβ-アラニルドーパをキノコのチロシンナーゼで処理することにより、*in vitro*で合成できる。この物質は、グラム陰性菌とグラム陽性菌のいずれに対しても抗菌活性を示し、大腸菌や黄色ブドウ球菌の増殖に対する50%阻害濃度(IC₅₀)は20~30 μMである。センチクバエから同定された抗菌タンパク質である、ザルコトキシンIやザルコトキシンIIの分子量がそれぞれ、約4,000, 24,000であるのに対し、5-S-GADの分子量は573と小さいのが特徴である。

一方、5-S-GADの抗菌作用の機序は、センチクバエから同定されたほかの抗菌タンパク質が細菌の膜機能を障害する¹⁾のとは異なっている。5-S-GADの抗菌活性は、過酸化水素(H₂O₂)を分解するカタラーゼにより阻害されることから、この物質は過酸化水素を産生することにより、抗菌活性を示すと考えられている²⁾。実際、培地中に5-S-GADを添加すると、過酸化水素が産生されることが明らかになっている³⁾。過酸化水素は、生体防御に重要な役割を果たすNF-κBのようなRelファミリーの転写因子の活性化に関わる可能性が指摘されている²⁾。5-S-GADが、昆虫や哺乳類の生体防御機能にどのような影響を与えるのか、解析が待たれる。

3. 5-S-GADの抗腫瘍効果

その後の解析から、5-S-GADは、チロシンキナーゼであるv-*Src*のリン酸化を阻害することが見いだされた^{4,5)}。その活性は、チロシンキナーゼを阻害する抗腫瘍薬ハービ

帝京平成大学薬学部・大学院薬学研究科(〒164-8530 東京都中野区中野4-21-2)

Sarcophaga defense molecule 5-S-GAD

Takeshi Nishikawa (Teikyo Heisei University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, 4-21-2 Nakano, Nakano-ku, Tokyo 164-8530, Japan)

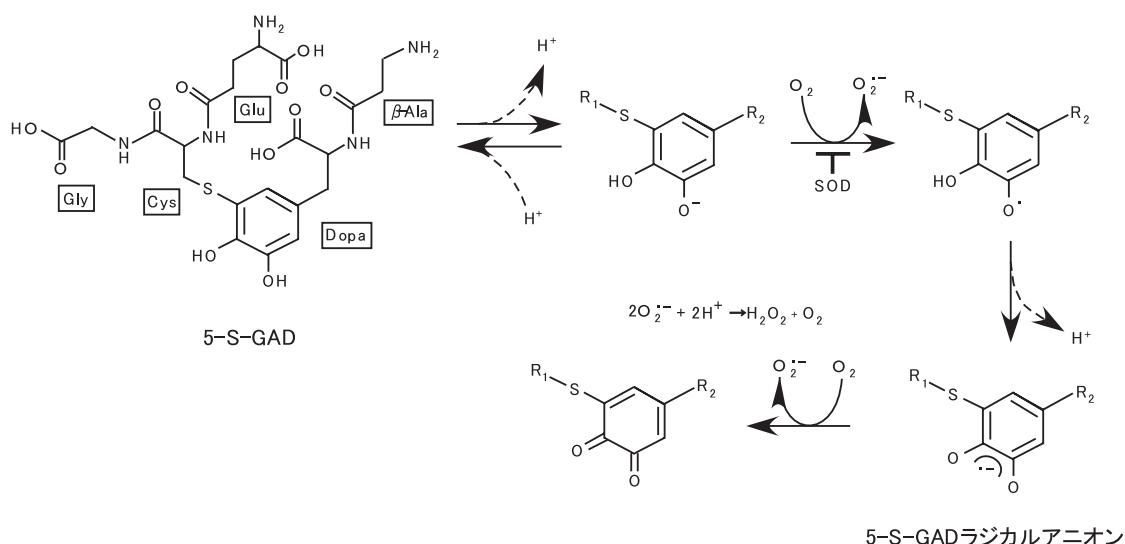


図1 5-S-GADの構造および5-S-GADラジカルアニオンと過酸化水素の予想される産生機構
SOD:スーパーオキシドジスムターゼ。

マイシンAと同程度であった。チロシンキナーゼは、細胞増殖に重要な役割を果たしていることから、5-S-GADが、がん細胞の増殖を阻害する可能性が考えられた。

38株のヒトがん細胞に対する増殖阻害効果を調べたところ、メラノーマ細胞(LOX-IMV1)、乳がん細胞(MDA-MB-231, MDA-MB-435S)の3株に対し、5-S-GADは選択的な増殖阻害活性を示した⁶⁾。このとき、抗腫瘍薬であるマイトマイシンCやハービマイシンAは、解析したすべての細胞株に対して、増殖阻害活性を示した。したがって、5-S-GADは、特定のがん細胞の増殖を選択的に抑制すると考えられる。

ちなみに、上記の細胞に対する5-S-GADのIC₅₀は、マイトマイシンCやハービマイシンAと同程度であった。また、5-S-GADの部分構造体であるβ-アラニルドーパ、5-S-システニルドーパについても、同様な解析がなされた。5-S-GAD感受性の3株に対して、β-アラニルドーパは5-S-GADと同等の増殖阻害活性を示したが、5-S-システニルドーパの活性は弱かった。したがって、β-アラニルドーパの構造は、増殖阻害活性に重要だと考えられる。

さらに、LOX-IMV1, MDA-MB-435S細胞をヌードマウスに移植して、5-S-GADの抗腫瘍効果が調べられた⁶⁾。5-S-GADを腹腔内投与することにより、どちらの腫瘍の増殖も抑制された。1回の投与量は、それぞれ100~500 mg/kg, 100~200 mg/kgであるが、単回投与で8 g/kgまで毒性はみられていない。以上の結果から、5-S-GADの毒性は低く、ある種のがんの治療に利用できる可能性が示された。この系における抗腫瘍効果は、マイトマイシンCより弱い。静脈内投与を行うなど、投与経路の変更により効果は増強するかもしれない。

5-S-GADが、特定のがん細胞に対して、増殖阻害活性を示すのはなぜだろうか。細胞レベルの実験において、がん細胞に対する増殖阻害活性も、抗菌活性と同様、カタ

ラーゼの添加により阻害されることがわかった³⁾。したがって、抗腫瘍活性についても、抗菌活性と同様に、5-S-GADが産生する過酸化水素によって担われている可能性がある。

そこで、がん細胞におけるカタラーゼの発現量が、5-S-GADの感受性に影響を与えている可能性が検討された。がん細胞のカタラーゼの発現量をイムノブロットにより調べてみると、5-S-GADに感受性であるLOX-IMV1, MDA-MB-231, MDA-MB-435S細胞では発現量が低く、非感受性のT47D, MDA-MB-468細胞ではカタラーゼの発現量が高いことがわかった⁷⁾(表1)。

この知見を再確認するため、5-S-GADに感受性のMDA-MB-435S細胞にカタラーゼを過剰発現すると、5-S-GADに耐性になるかどうか解析した。親株と比較して、カタラーゼを2倍過剰発現するMDA-MB-435S細胞を樹立し、5-S-GADに対する感受性を調べたところ、親株と比較して、5-S-GADに対して耐性を示した⁷⁾。

一方、5-S-GADに耐性を示すT47D細胞で、カタラーゼの発現を低下させると、5-S-GADに対する感受性が高まるかどうか解析した。RNA干渉によりカタラーゼの発現を40%に下げると、その細胞は無処置の細胞と比較して、明らかに5-S-GADに感受性を示すことがわかった⁷⁾。

以上の結果から、5-S-GADは、カタラーゼの発現が低いがん細胞に選択的に細胞傷害活性を示すと考えられた。カタラーゼの発現はがん細胞の悪性度に関わるという報告がある^{8,9)}。すなわち、カタラーゼの発現が低い細胞は悪性度が高く、発現が高い細胞は、悪性度が低いといわれている。したがって、5-S-GADはより悪性度の高いがん細胞に対し、増殖抑制効果を示すと考えられる。

表1 がん細胞におけるカタラーゼの発現量と5-S-GADの増殖阻害活性の相関

細胞	相対的なカタラーゼの発現量 ¹	IC ₅₀ (μ M) ²
メラノーマ		
LOX-IMV1	1	0.5
乳がん		
MDA-MB-231	1.5	2
MDA-MB-435S	2	15
T47D	5	>100
MDA-MB-468	10	>100

¹ LOX-IMV1のカタラーゼの発現量を1としたときの、相対的なカタラーゼの発現量を示す。

² 細胞増殖を50%阻害する5-S-GADの濃度を示す。

4. 5-S-GADの血管新生阻害効果

生体内における腫瘍の増殖において、血管新生は重要な役割を果たしている。そこで、5-S-GADが血管新生を阻害するかどうか、検討した¹⁰⁾。最初に、マウスの背部皮下法(dorsal air sac法)により、がん細胞に依存した血管新生を阻害するかどうか調べた。その結果、12.5~200 mg/kgの5-S-GADは、腹腔内投与することにより、マウス肉腫細胞(S180)依存の血管新生を阻害することが明らかになった。

血管内皮細胞増殖因子(VEGF:vascular endothelial growth factor)は、血管新生を促進する因子の一つである。5-S-GADがVEGFにより誘導される血管新生を抑制するかどうか、マトリゲルプラグアッセイにより解析した。その結果、VEGF依存の血管新生を抑制することが明らかになった。

さらに、受精鶏卵漿尿膜法(CAM法:chorioallantoic membrane assay)を用いて、鶏胚の血管新生を抑制するかどうか、調べた。この方法は、発生時の血管新生に対する作用を評価するものであり、血管新生阻害剤のスクリーニングにも利用されている。5-S-GADは、この系において、用量依存的に血管新生を阻害した。

血管新生においては、血管を構成する血管内皮細胞が重要な役割を果たしている。5-S-GADの血管新生阻害作用の機序を知る目的で、5-S-GADが血管内皮細胞の増殖、遊走、管形成に影響を与えるかどうか解析されたが、これらの現象には影響を与えないことがわかった。

また、血管内皮細胞の遊走に関わると考えられるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の酵素活性や、血管内皮細胞からのMMP-2の分泌に対して、5-S-GADは阻害効果を示さなかった。さらに、腫瘍内の低酸素環境に反応して活性化する転写因子、HIF-1(hypoxia-inducible factor 1)はVEGFの発現を制御することが知られているが、5-S-GADは、この転写因子の活性にも影響を与えなかった。

一方、5-S-GADがVEGF依存の血管新生を阻害するこ

と、また、チロシンキナーゼ活性を阻害することから、この化合物が、VEGF受容体の一つで、チロシンキナーゼ活性を持つFlt-1のチロシンリン酸化を阻害する可能性が考えられた。実際、5-S-GADは、Flt-1のリン酸化を阻害することが示された¹⁰⁾。しかし、その作用は弱く、この機序だけで5-S-GADの血管新生阻害作用のすべてを説明することはできない。ほかのVEGF受容体もしくはほかの作用機序も考えられ、さらなる解析が必要である。

以上の結果をまとめると、5-S-GADは、がん細胞依存の血管新生だけでなく、胚発生過程の血管新生も阻害することが明らかになった。昆虫由来の生理活性物質で、血管新生阻害活性が見いだされたのは、5-S-GADが初めての例である。血管新生を阻害することにより、幅広い腫瘍に対し、抗腫瘍活性を示す可能性がある。細胞レベルでは5-S-GADに対して耐性を示す細胞でも、個体レベルでは5-S-GADにより治療が可能かどうか、今後の検討が必要である。

一方で、過剰な血管新生は、がんのほかに、関節リウマチ、乾癬、動脈硬化症、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性の特徴もしくは原因として知られている。5-S-GADがこれらの疾患に対しても治療効果を示すのか、さらなる解析が待たれる。

5. 5-S-GADラジカルアニオンの形成と過酸化水素の産生

これまで述べてきたように、5-S-GADの抗菌作用やがん細胞の増殖抑制効果には、過酸化水素が関与している。それでは、5-S-GADは、どのような機構で過酸化水素を産生するのだろうか。

電子スピン共鳴法による解析から、5-S-GADは、オルトセミキノラジカルアニオンを生じることがわかった¹¹⁾(図1)。この過程で、ほかにもラジカルが生じているか調べたところ、スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)が生じることがわかった。一方、5-S-GADからのラジカル形成は、窒素を吹き込むことで酸素を除くと検出されなくなることから、5-S-GADラジカルアニオンの形成には酸素との反応が寄与していると予想される。

さらに、5-S-GADラジカルアニオンの形成は、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(CuZnSOD)により阻害され、それにより過酸化水素産生も起きなくなることがわかった。スーパーオキシドジスムターゼはスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を消去することが知られているが、5-S-GADラジカルアニオンの形成過程を阻害すると考えられた。現在、想定されている5-S-GADラジカルアニオンの形成と過酸化水素産生の機構¹¹⁾を図1に示す。

5-S-GADラジカルアニオンの形成は、過酸化水素産生に関与していると考えられるが、この過程はpHの影響を受ける。哺乳類の生理的条件であるpH7.4で5-S-GADラジカルアニオンの形成はみられるが、カテコールからの脱

プロトン化を促進する塩基性条件下 (pH 9.5) でさらに促進される¹¹⁾。このとき、過酸化水素の産生速度も上昇するが、最終的に産生される過酸化水素は、加えた 5-S-GAD と当量である。

5-S-GAD のようにカテコール骨格を有する L-ドパミン (L-dopamine) や L-ドーパ (L-dopa) も、塩基性条件下で同様なラジカルアニオンを生じることが知られている。pH 9.5 で測定すると、L-ドパミンや L-ドーパ由来のラジカルアニオンが 2 分で消失していくのに対し、5-S-GAD 由来のラジカルアニオンは 2 分で最大値を示し、その後、ゆっくりと消失した。5-S-GAD ラジカルアニオンは、生成速度や安定性の点で、L-ドパミンや L-ドーパ由来のラジカルアニオンとは異なることが示唆される。

6. 5-S-GAD のラジカルスカベンジャー活性

5-S-GAD から生じるオルトセミキノンラジカルアニオンは、それ自身が、不安定な対電子を捕捉するラジカルスカベンジャーとして機能する可能性がある。実際に、5-S-GAD は、DPPH (1,1-diphenylpicrylhydrazyl) アニオン、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) を消去することが示された¹²⁾。

その活性は、ラジカルスカベンジャーとして知られる、TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) や N-アセチルカルノシンよりも強力であった。ちなみに、N-アセチルカルノシンは、5-S-GAD と同様に β -アラニル基を持っている。これらの化合物は、抗酸化物質として知られており、5-S-GAD も同様な活性を持つかどうか、さらに解析が進められた。その結果、5-S-GAD は、銅イオン依存の低密度リポタンパク質 (LDL: low-density lipoprotein) の過酸化を、N-アセチルカルノシンよりも強く、抑制することがわかった¹²⁾。さらに、鉄イオン依存の脂質の過酸化を抑制することが示された¹³⁾。

N-アセチルカルノシンや TEMPOL は、白内障の進行を抑制することが知られている。白内障は、水晶体の混濁により、視力が低下する疾患である。そこで、5-S-GAD も、白内障の進行を抑制するか、解析が進められた。

鶏胚を用いたグルココルチコイド誘発性の水晶体の混濁に対する影響が解析された。このアッセイ系は、白内障治療薬のスクリーニングに使用されているが、5-S-GAD は水晶体の混濁を抑制することがわかった¹²⁾。5-S-GAD は、N-アセチルカルノシンや TEMPOL よりも低用量で効果を示した。また、培養されたラット水晶体におけるジアミド誘発性の混濁を抑制した¹²⁾。

さらに、ラットにおいて、ガラクトース負荷による白内障¹²⁾、紫外線誘発白内障を、5-S-GAD の点眼により抑制できることがわかった¹⁴⁾。

白内障の原因は、加齢、遺伝的要因、喫煙、紫外線、栄養失調、副腎皮質ホルモンの使用、高血糖などさまざまであるが、発症には、酸化ストレスが主要な役割を果たして

いると考えられている。

水晶体における酸化ストレスの一つの指標として、水晶体を構成する α -クリスタリンのカルボニル化があげられる。5-S-GAD は、ラットのジアミド誘発性白内障やガラクトース負荷による白内障モデルにおいて、 α -クリスタリンのカルボニル化を抑制した¹²⁾。

以上の結果をまとめると、5-S-GAD はラジカルスカベンジャー活性、抗酸化作用を有し、白内障の進行阻止に利用できる可能性がある。

7. 5-S-GAD の神経細胞や破骨細胞分化に対する作用

その他の作用として、5-S-GAD の神経細胞に対する影響が解析されている。ラットにおいて、5-S-GAD の眼内注射により、グルタミン酸受容体サブタイプのアゴニストである NMDA (N-methyl-D-aspartate) 誘発性および視神経挫傷による網膜神経節細胞死を抑制することが報告されている¹⁵⁾。このとき、細胞の生存に関わるリン酸化 Akt や Bcl-2 の増加が検出されており、これらの機構が 5-S-GAD による細胞死抑制効果の一因であると思われる。さらに、ラット由来の網膜神経節細胞 (RGC-5) を用いた細胞レベルの実験によっても、5-S-GAD がリン酸化 Akt や Bcl-2 の増加をもたらすことが示されている¹⁶⁾。それに加えて、ラットの PC12 細胞において、5-S-GAD が脂質の過酸化を抑制することにより、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制することが示されている¹³⁾。

網膜神経節細胞の細胞死は、緑内障や糖尿病性網膜症などの網膜神経変性疾患の病因として知られており、5-S-GAD はこれらの疾患の治療に応用できる可能性がある。その他、5-S-GAD は破骨細胞の分化を阻害することが知られており¹⁷⁾、骨粗鬆症の治療に利用できるか、さらなる検討が必要である。

8. おわりに

5-S-GAD は、もともと、抗菌物質として同定されたが、哺乳類に対し、さまざまな生理活性を示すことがわかってきた (表 2)。その多様な生理活性は、5-S-GAD それ自身だけではなく、5-S-GAD から生じる 5-S-GAD ラジカルアニオン、過酸化水素によって担われていると思われる。5-S-GAD の生理活性発現の機序についてはいまだ不明な点

表 2 5-S-GAD の機能のまとめ

- | |
|------------------|
| 1. 抗菌作用 |
| 2. チロシンキナーゼ阻害作用 |
| 3. 抗腫瘍作用 |
| 4. 血管新生阻害作用 |
| 5. ラジカルスカベンジャー作用 |
| 6. 脂質の過酸化抑制作用 |
| 7. 白内障抑制作用 |
| 8. 神経細胞保護作用 |
| 9. 破骨細胞分化阻害作用 |

が多く、さらなる解析が必要である。

これまで、センチニクバエからは、抗菌活性を指標として、さまざまな抗菌タンパク質、抗真菌タンパク質が同定されてきた。それに比べると、この昆虫において、脂質の解析はほとんど行われておらず、生体防御に関与する生理活性脂質については、解析の余地がある。

近年、質量分析計に代表されるように、解析技術や検出感度が飛躍的に進歩している。また、ゲノム情報の蓄積や新しいアッセイ系の構築も進んでいる。これらの技術を駆使することにより、新しい生理活性物質が見つかるだろう。

昆虫は、地球上に100万種以上存在するといわれ、創薬資源の可能性を秘めている。また、昆虫の60%が有するといわれている共生菌に目を向けると、さらに未知の生理活性物質が見つかる可能性がある¹⁾。昆虫は、脊椎動物と異なり、自然免疫のみで体を守っている。昆虫の生体防御分子の研究は、生体防御機構の多様性を理解するためだけでなく、創薬資源の探索にも役立つと思われる。

謝辞

本稿の執筆にあたり、ご指導をいただきました名取俊二東京大学名誉教授に感謝申し上げます。また、抗腫瘍活性、血管新生阻害活性など、本稿に述べた5-S-GADの生理活性の多くは、秋山伸子博士が測定したものです。記して御礼申し上げます。

著者寸描

●西川 毅 (にしかわ たけし)

帝京平成大学薬学部講師。博士(薬学)。

■略歴 2002年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。理化学研究所を経て、08年オックスフォード大学博士後研究員。10年より現職。

■研究テーマと抱負 生体防御分子に関する研究。アルパカー本鎖抗体を利用した抗腫瘍薬の研究。それぞれの生物の生体防御機構、生体防御分子の特徴を理解し、創薬に生かしたい。

■ウェブサイト <http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dd.html>

■趣味 散歩。

文 献

- 1) Natori, S. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **86**, 927-938.
- 2) Leem, J.Y., Nishimura, C., Kurata, S., Shimada, I., Kobayashi, A., & Natori, S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 13573-13577.
- 3) Akiyama, N. & Natori, S. (2003) *Cancer Sci.*, **94**, 400-404.
- 4) Hijikata, M., Kobayashi, A., Leem, J.Y., Fukasawa, H., Uehara, Y., & Natori, S. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 423-426.
- 5) Leem, J.Y., Park, H.Y., Fukazawa, H., Uehara, Y., & Natori, S. (1998) *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 784-785.
- 6) Akiyama, N., Hijikata, M., Kobayashi, A., Yamori, T., Tsuruo, T., & Natori, S. (2000) *Anticancer Res.*, **20**, 357-362.
- 7) Nishikawa, T., Nishikawa, S., Akiyama, N., & Natori, S. (2004) *J. Biochem.*, **135**, 465-469.
- 8) Kahlos, K., Soini, Y., Sormunen, R., Kaarteenaho-Wiik, R., Pääkkö, P., Linnainmaa, K., & Kinnula, V.L. (2001) *Cancer*, **91**, 1349-1357.
- 9) Glorieux, C., Dejeans, N., Sid, B., Beck, R., Calderon, P.B., & Verrax, J. (2011) *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 1384-1390.
- 10) Nishikawa, T., Akiyama, N., Kunimasa, K., Oikawa, T., Ishizuka, M., Tsujimoto, M., & Natori, S. (2006) *Eur. J. Pharmacol.*, **539**, 151-157.
- 11) Akiyama, N., Nakanishi, I., Ohkubo, K., Satoh, K., Tsuchiya, K., Nishikawa, T., Fukuzumi, S., Ikota, N., Ozawa, T., Tsujimoto, M., & Natori, S. (2007) *J. Biochem.*, **142**, 41-48.
- 12) Akiyama, N., Umeda, I.O., Sogo, S., Nishigori, H., Tsujimoto, M., & Natori, S. (2009) *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 511-519.
- 13) Takadera, T., Koriyama, Y., Kimura, T., & Kato, S. (2011) *Neurotox. Res.*, **20**, 26-31.
- 14) Kawada, H., Kojima, M., Kimura, T., Natori, S., Sasaki, K., & Sasaki, H. (2009) *Jpn. J. Ophthalmol.*, **53**, 531-535.
- 15) Koriyama, Y., Tanii, H., Ohno, M., Kimura, T., & Kato, S. (2008) *Brain Res.*, **1240**, 196-203.
- 16) Koriyama, Y., Ohno, M., Kimura, T., & Kato, S. (2009) *Brain Res.*, **1296**, 187-195.
- 17) Hijikata, M., Matsumoto, H.N., Kobayashi, A., Nifuji, A., Noda, M., & Natori, S. (1999) *FEBS Lett.*, **457**, 405-408.