

吸血昆虫唾液腺の特異な活性分子と医薬素材の開発

三重大学医学部 教授

鎮西康雄

(〒514-0001 三重県津市江戸橋 2-174 三重大学医学部医動物学教室)

Unique Bio-active Molecules in the Salivary Glands of Blood-Sucking Insects and Development of Material for Medical Drug

Yasuo Chinzei

(Department of Medical Zoology, School of Medicine, Mie University
Edobashi 2-174, Tsu, 514-0001, Japan)

Key words: blood sucking insects, ticks, salivary glands, bio-active substances,
Rhodnius prolixus, anti-coagulant, Prolixin-S

Abstract: Blood-sucking insects have bio-active substances in the salivary glands. These substances have activities on host blood coagulation system, hemostasis and blood vessel. Recently many of those molecules were isolated and characterized, and some of their genes have been cloned. We extracted and purified multiple hemoproteins from the salivary glands of reduviid bug, *Rhodnius prolixus*, and the cDNA of these proteins were cloned. We clarified that one of these proteins with a molecular weight of approximately 20,000 (designated as Prolixin-S) is not only an anti-coagulant that inhibits an intrinsic coagulation factor (IX/IXa), but also a relaxant of vascular smooth muscle. We found that Prolixin-S binds with the smooth muscle relaxant nitric oxide NO that is synthesized in the salivary glands, and is injected into host during blood sucking, then release NO and relaxes the host blood vessel. That is, Prolixin-S reversibly binds with NO and function as a NO carrier.

はじめに

吸血性昆虫・ダニ類は病原体媒介・刺咬吸血・アレルギーなど「医動物学」では特異で重要な位置を占めている。これら昆虫・ダニ類の吸血によって、動物体内では様々な生体反応が起こる。これらの反応の多くは吸血継続にとって不都合で、唾液を注入してこれを回避・阻止し、あるいは和らげて吸血を継続する。吸血性昆虫・ダニ類の唾液腺は動物の血管や血液に働きかけその機能を調節するような各種の活性物質を含んでいる。こうした吸血昆虫・ダニの唾液腺の生理活性物質に関する研究は

古くから行われてはいたが、特に最近では、微量分析技術や遺伝子クローニング技術の発展を背景に活発に研究が行われ、注目される分野になっている。これらの研究の主なものは創薬の観点からのものであり、必ずしも吸血生理を理解し、上で述べた「医動物学」上の様々な問題の解決を目指したものであるとは言えない。しかし、これらの研究成果が総合されて、吸血昆虫・ダニの生きていく上での術（テクニック）を明らかにし、生き様を示すことができれば、間接的ではあるが、「医動物学」に貢献することになるだろう。加えて、媒介する病原体との関連といったことを明らかにする材料を提供するこ

とになれば、より直接的に「医動物学」に関連する医学医療上の問題の解決に役立つはずである。

この総説では吸血性昆虫・ダニの唾液腺の持つ生理活性物質とその機能について概説し、我々の研究室で行ってきた研究の一部を紹介する。

1. 吸血による動物の反応

まず、吸血するときに動物体内でどんな反応が起こっているのかを概観する。Fig. 1 にその全体の概略を示してある (Ribeiro, 1987 参照)。吸血による反応は皮膚の破壊の後、血管への傷害から始まる。血管が破壊されるとこれを修復する様々な反応が動物体内で開始される。蚊などの吸血行動を観察すると、吸血の開始時には何度か口吻 (プロボース) を皮膚に刺し、血管の探索行動と思われる行動をする。皮膚での血管分布は必ずしも多くはなく、一度では血管に行き当たらないためであろう。うまく血管が見つかれば吻の先端で血管壁を破壊し、口吻を血管内に挿入することになる。

1) 血栓の形成と止血

血管を構成する細胞が破壊されると、内容物が血管内に流れ込むことになる。細胞内の ATP や ADP は血液の数千倍の濃度を保っている。これらが、血管内に流入することで、部分的に ATP や ADP が高濃度になる。この結果、局所において血小板が活性化され、活性化された血小板は自ら血小板凝集因子を出し仲間の血小板を

集め次々と活性化する。また傷ついた血管細胞のコラーゲンが血液に露出する。コラーゲンも血小板の活性化に関わる。活性化された血小板では phospholipases が活性化され、アラキドン酸が代謝されて、トロンボキセン A₂ (TXA₂) となり放出される。TXA₂ は強力な血小板凝集活性・血小板脱顆粒活性及び血管収縮活性を持つ。血小板の顆粒には ADP, ATP の他セロトニンがありこれらも放出されることになる。ADP は血小板凝集を誘導し、セロトニンは血管収縮を誘導する。これらの反応はいずれも止血を促進することになる。

2) 血液凝固:

動物の血液凝固の機構は良く研究されており、多くの因子が絡んだ複雑な機構である。その概略を示したものが Fig. 2 である。内因系・外因系・共通系と呼ばれるルートがあってそれぞれ蛋白分解酵素 (ほとんどがセリンプロテアーゼ)・補酵素などの因子で構成され、活性化された因子が一つ下位の因子の前駆体の一部を分解して活性化するという反応が連続して起るカスケード系となっている。またそれらを抑制する因子もあって、血液凝固はプラスとマイナスの微妙なバランスを保ちながら機能している。吸血によって血管が傷害を受けると、血液凝固カスケード系が動き出し、最終的にはフィブリンが作られて血液が凝固する。吸血・血管傷害によってこのカスケード系が活性化される (Fig. 1)。

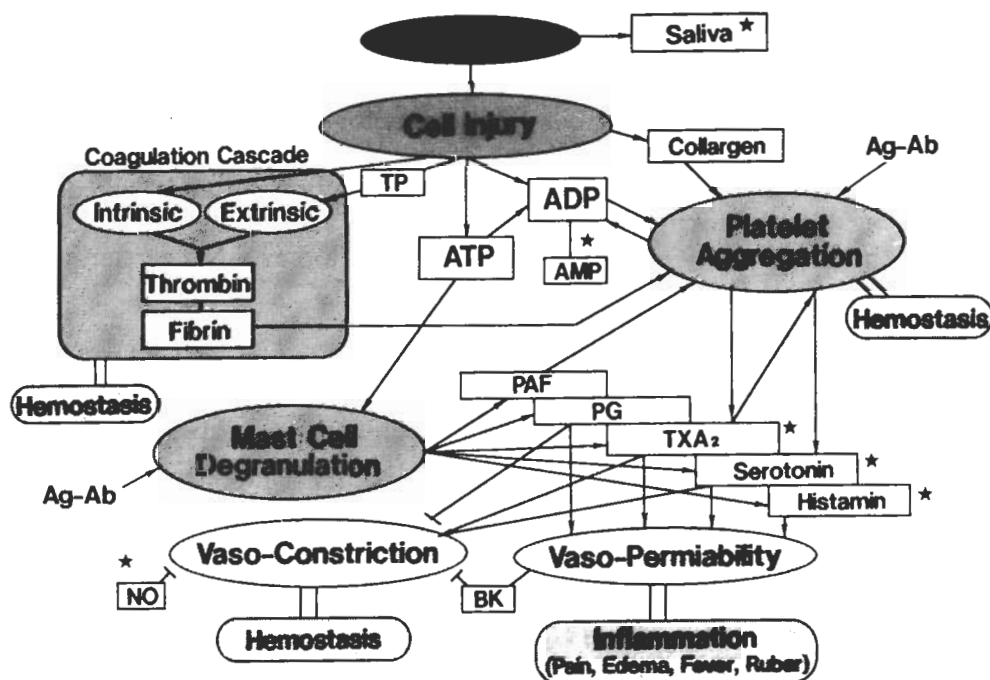


Fig. 1. Schematic diagram of hemostasis and inflammation. Blood sucking associates with cell injury and immuno-reaction in the host animal which induce platelet aggregation, coagulation and mast cell degranulation. The factors from mast cells and platelet induce vaso-permiability and inflammation.

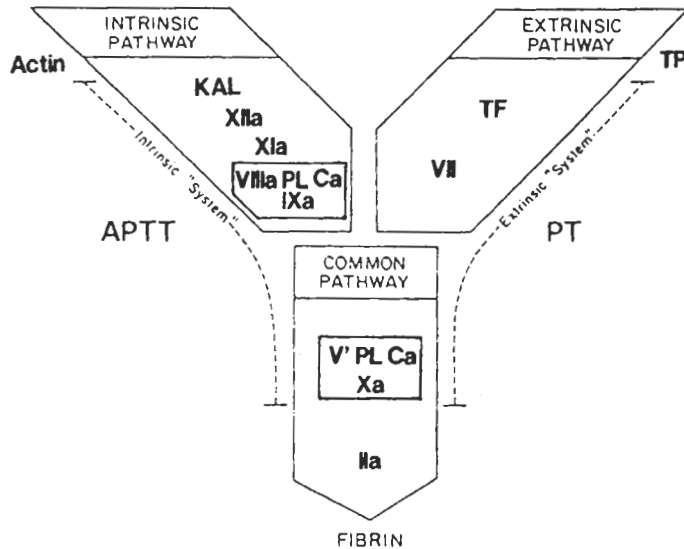


Fig. 2. Outline of blood coagulation pathways. Pathways contain intrinsic, extrinsic and common pathways. APTT (activated partial thromboplastin time) and PT (prothrombin time) indicate intrinsic and extrinsic coagulation times, respectively.

3) 肥満細胞の脱顆粒と炎症の誘導

吸血によって傷害を受けた血管細胞や血小板から放出された ATP は肥満細胞の脱顆粒を誘導する。また、繰り返し吸血されると唾液成分に対する IgE が誘導され、抗原抗体反応が肥満細胞の脱顆粒を促す。この時肥満細胞はトロンボキセン A₂、血小板活性化因子 (PAF) などと共に大量のヒスタミンやセロトニンを血中に放出する。これらの因子が微小血管の透過性を高め、発赤・浮腫・痛みなどを伴う炎症が起こることになる (Fig. 1)。

吸血に伴う動物体内で起こるこれらの反応は吸血する昆虫やダニにとっては血管の探索や吸血の継続のためには不都合なことになる。血管が収縮し細くなれば、血管探索は困難になるし、血液の流量も減るだろう。口吻を挿入した局所で血小板が凝集し血栓が形成されれば吸血には不都合だろう。血液凝固が起きれば口吻が詰まることになるかも知れない。また炎症が起こり痛みやかゆみを吸血相手の動物に与えれば、追い払われたり叩きつぶされるかも知れない。吸血するムシの唾液腺にはこうした吸血にとって不都合な動物の反応を抑えたり和らげたりする物質が入っている。

2. 吸血性昆虫・ダニの唾液腺に含まれる生理活性物質

吸血昆虫やダニの唾液腺に含まれる動物の血液や血管に対して活性を持つ因子は古くから報告がある。それらの主なものをまとめたものが Table 1 である。よく調べられているのが、サンガメ、カ、ブユ、サンバエと数種のダニである。いずれも唾液腺は小さい組織で、分析

にはたくさんのムシを必要とし、飼育できるものでないと十分量の材料を集めて分析するのは困難である。

これらの中にはすでに遺伝子がクローニングされ、構造や活性の特性についても分析が進んでいるものもあるが、活性の存在が指摘されているだけのものも多い。これらの因子は活性の特性からは大きく3つのグループにわけられ、1) 血液凝固阻害活性物質、2) 血小板凝集阻害活性物質、3) 血管拡張活性物質となる。このほかにも活性物質の結合タンパク質としての機能を持つものが知られている。

抗凝固活性物質ではトロンビンの阻害活性物質 (Anti-IIa) が最も一般的にみられ、第 X 因子、第 V 因子、第 IX 因子の阻害活性を持つ因子が報告されている。血小板凝集阻害では apyrase が一般的で、ほとんどの吸血昆虫・ダニが持っている。この酵素は血小板凝集を誘導する ATP、ADP を AMP に分解する。血管拡張活性物質としていくつかのタンパク質が知られているが、そのほかにも血管拡張活性を持つプロスタグランジンや一酸化窒素 NO の結合タンパク質が報告されている。

我々の研究室でもサンガメ (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*)、ハマダラカ (*Anopheles stephensi*)、カズキダニ (*Ornithodoros moubata*) を対象にして、唾液腺から生理活性物質の分離とクローニングを試み、いくつかの面白い物質を得ることができた (Table 1 の中では下線を引いた物質)。以下、その中から特に注目すべき活性を持つ Prolixin-S と命名した物質に焦点を当てて少し詳しく紹介することとしたい。

Table 1. Bio-active substances in the blood-sucking insects and ticks.

Activity	Species	Mode of action (Substance)
Anticoagulant	Tick: <i>Ornithodoros moubata</i>	Anti-Xa, Anti-IIa
	<i>Dermacentor andersoni</i>	Anti-V, anti-VII
	Bug: <i>Rhodnius prolixus</i>	Anti-Xase (Prolixin-S)
	<i>Triatoma infestans</i>	Anti-V
	Blackfly: <i>Simulium vittatum</i>	Anti-X, Anti-IIa
	Tsetsefly: <i>Glossina morsitans</i>	Anti-IIa
Mosquito: <i>Anopheles stephensi</i>		Anti-IIa
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Anti-Xa
Antiplatelet	Tick: <i>Ornithodoros moubata</i>	Apyrase, Moubatin
	<i>Ixodes dammini</i>	Apyrase, PGI ₂
	Bug: <i>Rhodnius prolixus</i>	Apyrase, NO
	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Disintegrin
	Flea: <i>Xenopsylla cheopis</i>	Apyrase
	Mosquito: <i>Anopheles stephensi</i>	Apyrase
	<i>Aedes aegypti</i>	Apyrase
	Deerfly: <i>Chrysops</i> spp.	Disintegrin
	Blackfly: <i>Simulium vittatum</i>	Apyrase
	Sandfly: <i>Phlebotomus papatasi</i>	Apyrase
Tsetsefly: <i>Glossina morsitans</i>	Apyrase	
Vasodilaor	Tick: <i>Ixodes dammini</i>	PGE ₂ , PGI ₂
	<i>Boophilus microplus</i>	PGE ₂
	Bugs: <i>Rhodnius prolixus</i>	NO (Prolixin-S)
	<i>Cimex lectularius</i>	NO
	Mosquito: <i>Aedes aegypti</i>	Tachykinin
	<i>Anopheles albimanus</i>	Peroxidase
	Blackfly: <i>Simulium vittatum</i>	Marydilan
	Sandfly: <i>Lutzomyia longipalpis</i>	Maxidilan

3. オオサンガメ唾液腺の抗凝固活性とその作用機構

我々はオオサンガメ *R. prolixus* (脚注参照) を材料として、唾液腺から抗凝固活性物質を単離し、分子構造や活性特性を明らかにした。この物質は血液凝固系 IX 因子と結合し、この因子が関連する反応の全てを阻害することで血液凝固阻害をする。また同時にヘムタンパク質で、一酸化窒素 NO を結合し、この NO の作用により血管拡張作用を持つという極めて特異な物質であることが判ってきた。

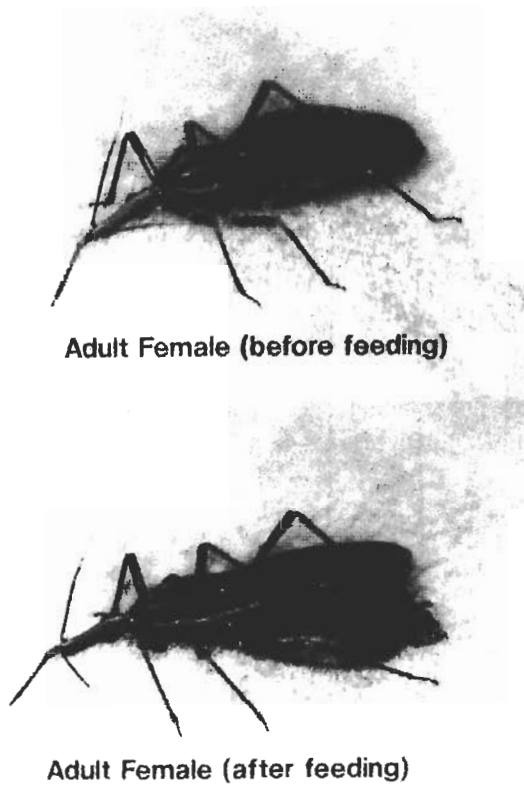
Rhodnius prolixus に対する和名をオオサンガメとしたのは、「昆虫ホルモン」(V. B. Wigglesworth 著 伊藤・小林 訳 南江堂 1971) によった。原著は著名な昆虫生理学者 Wigglesworth によって著されており、訳書である本書も昆虫生理学の古典的存在であり、この総説では本書に依ったこととお断りしたい。しかし、オオサンガメという和名は熱帯亜熱帯に広く分布するサンガメ *Triatoma rubrofasciatus* に対してすでに使用されており(素木得一著「衛生昆虫」北隆館 1958)、不適切かもしれない。篠永らは *R. prolixus* がベネズエラに多く分布することから、ベネズエラサンガメという和名を提唱している(節足動物と皮膚疾患、加納六郎編 東海大学出版会、1999)。

1) サンガメ

カメムシは半翅目昆虫で、植物から吸汁するものがほとんどであるが、サンガメは動物から吸血するように進化した一群のカメムシである。サンガメは Reduviid 科に属し、reduviid bug、あるいは一般に kissing bug と呼ばれ、オオサンガメ *R. prolixus*、ブラジルサンガメ *T. infestans*、アカモンサンガメ *Panstrongylus megistus* などが南米・中米のラテンアメリカ地域に分布している。これらのサンガメはアメリカ型トリパノソーマ症(シャガス病 Chagas disease) の病原体 *Trypanosoma cruzi* (鞭毛虫類の原虫) の媒介者として重要で、古くから研究対象となってきた。これらのサンガメは幼虫も成虫も吸血し、オオサンガメでは終齢(5 齢)期最も多くの血液を吸い、満腹すると 1 ml 近くの血液を吸うという (Fig. 3)。

2) オオサンガメ唾液腺の抗血液凝固活性

血液凝固系は上の Fig. 2 に概略を示してあるが、APTT (activated partial thromboplastin time) は内因系の凝固時間をさし、PT (prothrombin time) は外



Adult Female (before feeding)

Adult Female (after feeding)

Fig. 3. *Rodnius prolixus*: Adult female during feeding (before and after feeding).

因系凝固時間をさす。オオサンガメの唾液腺には血液凝固系を阻害する活性がある。凝固時間の測定系にオオサンガメ唾液腺の抽出液を加えて、APTT と PT とを測定したところ、APTT を著しく延長することが判り、唾液腺の抗凝固活性物質は内因系の阻害物質であることが判明した (Yuda *et al.*, 1996 a)。また PT についても多量の抽出液によって弱いながら延長があり、詳細な研究の結果、サンガメ唾液腺による外因系凝固系の阻害の機構についても明らかになった (Isawa *et al.*, 2000)。

3) 抗血液凝固活性物質の精製と活性

オオサンガメの唾液腺を集め、抽出液を作った。ゲルろ過とイオン交換クロマトグラフィーによって、血液凝固時間の延長を指標にして、抗血液凝固活性物質の精製を行い、凝固阻害活性をもつ単一のバンドが得られた。この分子の分子量は約 2 万 (20 kDa) で赤い色をもった物質であった。吸収スペクトルをとると 400 nm に特徴的な peak をもち、ヘムタンパク質であることが判った。我々はこの蛋白質に Prolixin-S という名前をつけた (Sun *et al.*, 1996)。

精製した Prolixin-S を用いて、血液凝固カスケードを構成するすべての因子に対する蛋白分解酵素活性の阻害を克明に検討した。その結果、内因系の最下位の因子 Xase の阻害活性をもつことが判明した。Xase は IX 因子・VIII 因子・リン脂質で構成される複合体で、共通系最上位にある X 因子を活性化する酵素群である。Prolixin-S は動物の血液以外から単離された最初の Xase 阻害物質であることも判った (Sun *et al.*, 1996)。

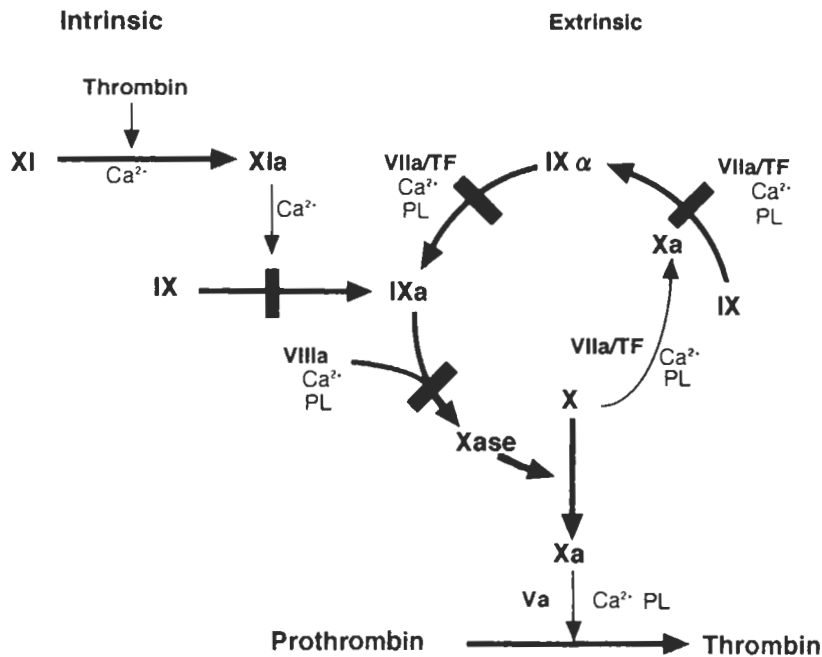


Fig. 4. Schematic diagram of Prolixin-S inhibition sites in coagulation pathways. Black bars indicate inhibition sites.

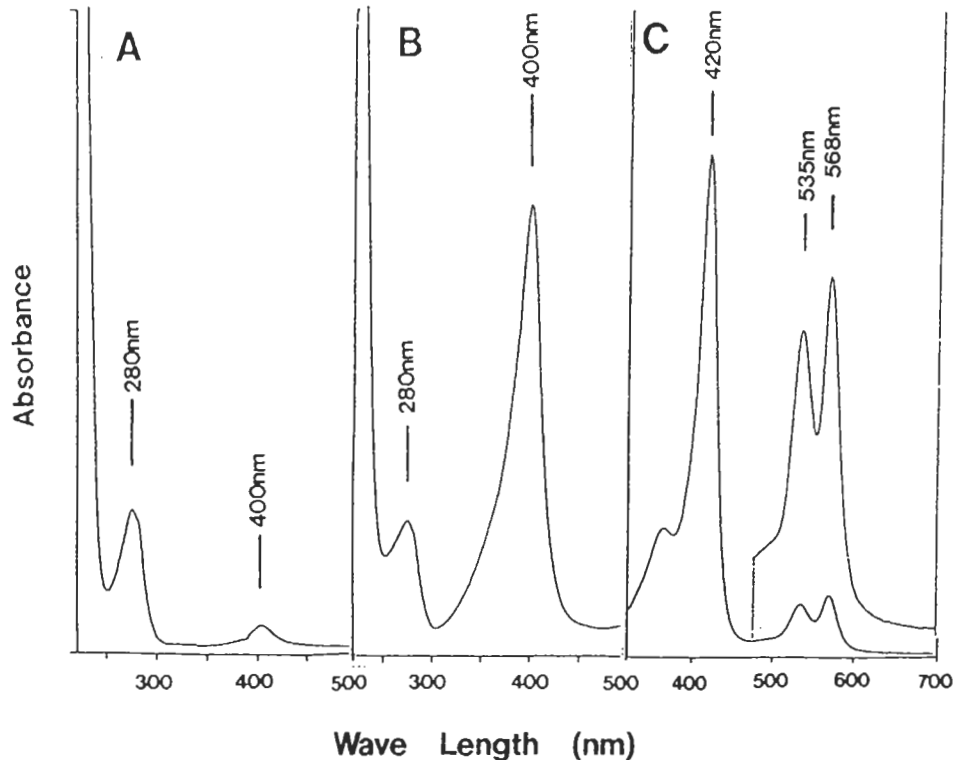


Fig. 5. Absorption spectra of reconstituted rProlixin-S. A, rProlixin-S isolated from the culture medium of Tn5 cells infected with recombinant baculovirus; B, rProlixin-S incubated with hemine (heme b); C, heme associated rProlixin-S charged with nitric oxide gas (NO).

4) Prolixin-S cDNA クローニングとタンパク構造の解析およびその発現

Prolixin-S の Xase 阻害活性の検討や構造解析その他性状を解析するためには十分なタンパク量が必要となる。そのために遺伝子工学的な手法により発現することを目指し、まず cDNA クローニングを行なった。オオサンガメの唾液腺から RNA を抽出し、reverse transcriptase によって cDNA を合成し、発現ベクター λ gt11 に組み込んで cDNA ライブラリーを作製した。精製した Prolixin-S に対する抗血清を用いて、cDNA をスクリーニングして、Prolixin-S cDNA のクローニングに成功した。Prolixin-S cDNA の塩基配列を決め、全アミノ酸配列を明らかにした。精製した Prolixin-S の N 末端のアミノ酸配列とこの cDNA の一部のアミノ酸配列とが完全に一致し、Prolixin-S の cDNA であることが確認できた。Open Reading Frame (ORF) は 203 アミノ酸で、23 アミノ酸のシグナルペプチドをもち、成熟タンパクとしての Prolixin-S は 179 アミノ酸で、分子量 19,921 であることが分かった (Sun *et al.*, 1996)。

Prolixin-S cDNA を用いバキュロウイルス発現系により組み替え体 Prolixin-S を発現した。AcNPV の核多角体遺伝子のプロモーターの下流に signal peptide

を含む Prolixin-S cDNA を ligation し、wild type の AcNPV と昆虫の培養細胞 Tn5 に co-infection したあと、recombinant virus をスクリーニングした。この系で発現した recombinant Prolixin-S はほとんどが培養上清に分泌されており、培養液から HPLC によって、十分量の組み替え体 rProlixin-S を精製回収することができた (Yuda *et al.*, 1997)。

5) rProlixin-S を用いた凝固系阻害機構の解析

上で述べたように、サンガメ唾液腺の抗凝固活性は内因系凝固の Xase complex を阻害する。rProlixin-S が Xase を阻害する機構を解明する最初のステップとして、rProlixin-S と Xase を構成する因子 (IXa, VIIIa, リン脂質) さらには Xase 活性化に関わる因子 (XI 因子) 及び Xase の基質 (X 因子) との結合親和性を持つかどうかを調べた。これには ELISA や Pull down などの方法やタンパク質相互作用をリアルタイムで測定する装置 (Bia-Core) を用いて行った。その結果、rProlixin-S は XI 因子、VIIIa 因子、X 因子との結合は全くなく、IX 因子及び活性化された IXa 因子のみと結合することが判った (Isawa *et al.*, 2000) (Fig. 4 参照)。

また、この結合が Ca^{2+} 濃度依存的に起こることから、rProlixin-S は IX/IXa の Gla ドメインと結合する可能性が高い。そこで、Gla ドメインを持たない IX/

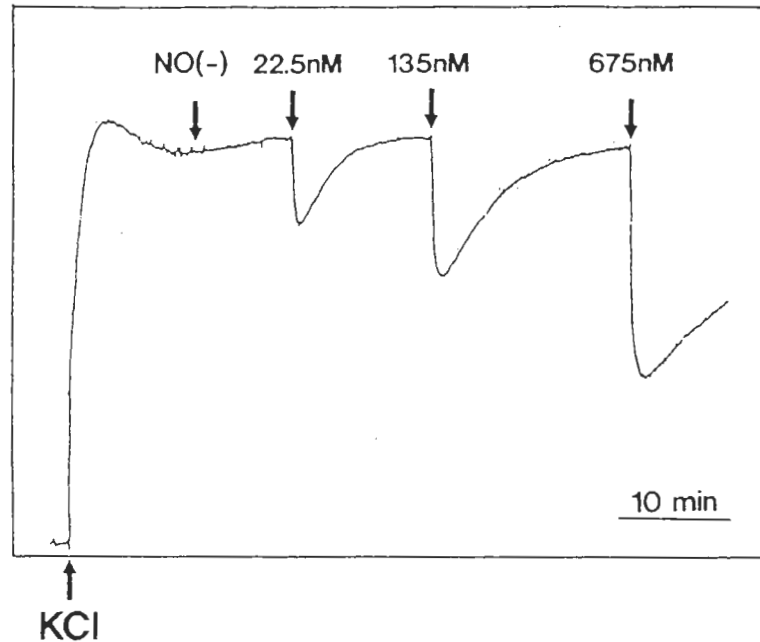


Fig. 6. Vasodilation activity of reconstituted rProlixin-S. rProlixin-S charged with NO were applied on the rabbit smooth muscle contracted with KCl in Ringer solution in different concentrations. NO(-): control, rProlixin-S without NO. Activities were detected with the Magnus apparatus.

IXa を作製して結合親和性を調べたところ、rProlixin-S との結合能がなくなっていることが判った。また、Xase は IXa や補酵素である VIII 因子がリン脂質（血管の内皮細胞表面）に結合して複合体を構成して活性を示すが、rProlixin-S は IXa 因子の Gla ドメインと結合することにより Xase 複合体形成を阻害することで Xase 活性を阻害することが明らかになった (Isawa *et al.*, 2000).

IX 因子は内因系の XIa 因子によって、また外因系の VIIa 因子及び組織因子 (TF: tissue factor) によっても活性化されることが判っている。rProlixin-S がこれらの活性化反応を阻害するかどうかを調べたところ、基質である IX に rProlixin-S が結合することで、これらの酵素（または酵素群）による IX の活性化も阻害することが判った (Isawa *et al.*, 2000).

酵素 (IX) の活性化と活性化された酵素 (IXa) の活性の両方を阻害していることが判ったわけである。以上の結果をまとめて示したものが、(Fig. 4) である。内因系外因系の交わる部分の key factor である IX 因子に結合することで、rProlixin-S は IX/IXa 因子の関わる全てのステップを阻害して、実に効果的に血液凝固をブロックしていることが判った訳である (Isawa *et al.*, 2000).

4. rProlixin-S の血管弛緩活性

1) rProlixin-S のヘムタンパク質への再構成

唾液腺から精製された native Prolixin-S はヘムタンパク質で赤い色をしているが、バキュロウイルスによって Tn5 細胞で発現され精製された rProlixin-S は無色であった。rProlixin-S の吸収スペクトルを Fig. 5 (A) に示した。280 nm にタンパクの吸収があり、400 nm に小さな吸収ピークがある。この結果は Tn5 によって発現分泌された rProlixin-S の大部分の分子はヘムを結合しておらず、ごく一部の分子が Tn5 細胞のもつヘムを結合してヘムタンパク質として分泌されたものであることを示している。native Prolixin-S のヘムの種類を分析したところ heme b (hemine) であることが分かった。そこで市販の hemine と rProlixin-S とを mix して incubation したところ、すべての分子がヘムを結合したヘムタンパク質に変換した (Fig. 5-B)。rProlixin-S とヘムとの結合モル比は 1:1 であることも分かった (Yuda *et al.*, 1997).

2) 一酸化窒素 NO 結合タンパク質としての Prolixin-S

一般にヘムタンパク質のヘムには酸素や炭酸ガス・一酸化炭素・一酸化窒素などのガスを結合することが知られている。Prolixin-S 精製の過程で 420 nm の吸収ピークが 400 nm にシフトすることを観察し、420 nm の吸収をもつものが一酸化窒素 NO の結合型であることを明らかにした。そこで組み換え体ヘムタンパクであ

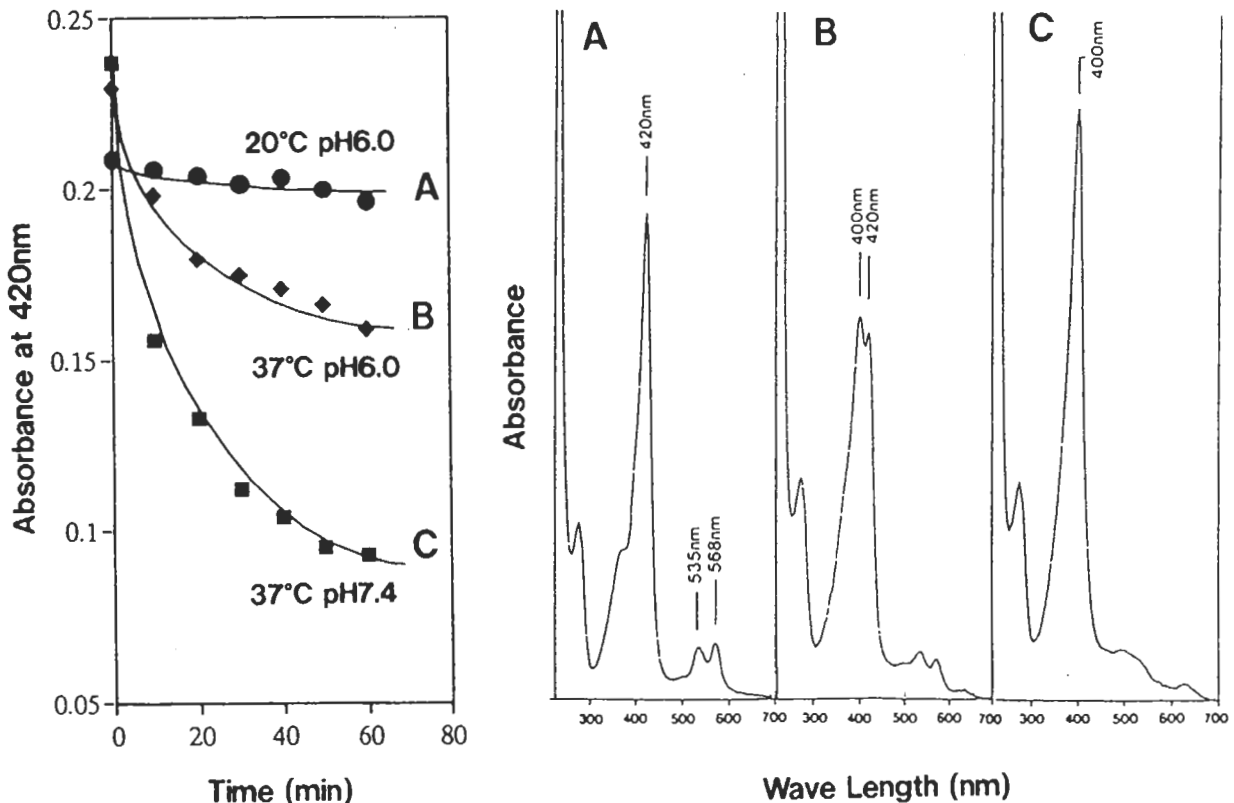


Fig. 7. Dissociation of NO from reconstituted rProlixin-S. Absorption at 420 nm were measured under different temp. and pH conditions.

る rProlixin-S に一酸化窒素の結合を行なった。Fig. 5 (C) は NO 結合後の吸収スペクトルを示す。420 nm にみごとなピークが現われ、NO の結合がうまくできていることを示している (Yuda *et al.*, 1997)。

3) NO 結合 rProlixin-S の血管弛緩活性

一酸化窒素 NO は生体内で多様な機能をもつことが指摘されているが、血管においては血管内皮細胞でつくられ、血管平滑筋に作用して弛緩させる作用のあることがわかっている。NO 結合 Prolixin-S が血管弛緩活性をもつかどうかをウサギの大動脈を使って調べた (Fig. 6)。その結果 NO をもたない Prolixin-S は全く活性を示さず、NO を結合した Prolixin-S は濃度依存的に平滑筋弛緩活性を示した。このことから Prolixin-S に結合した NO が放出されて平滑筋弛緩を誘導したことが明らかになった。いったん弛緩した筋肉は時間と共に再び緊張状態に回復した。これは遊離型 NO は酸化され易く、Prolixin-S から離れた NO が酸化されたため測定系から NO が無くなったことによると解釈された (Yuda *et al.*, 1997)。

4) rProlixin-S に結合した NO の解離

NO を結合した rProlixin-S からの NO の解離の速さを、温度・pH を変えて 420 nm の吸収の変化 (減少) によって調べた結果が、Fig. 7 に示してある。唾液腺

の中の条件に近い低い温度 (20°C)・低い pH (pH 6.0) では 420 nm の吸収がゆっくりと減少し、NO の解離がゆっくり進むことを示している (A)。一方、動物血管内条件に近い高い温度 (37°C)・高い pH (7.4) では 420 nm の吸収は急速に減少し、NO の解離が速いことを示している (C)。37°C・pH 6.0 の条件ではその中間的な速さで解離することがわかる (B) (Yuda *et al.*, 1997)。

唾液腺の中の Prolixin-S は NO を結合しており血管の中では NO を放出して、血管平滑筋を弛緩し血管を拡張して吸血していると考えられる。唾液腺の NO はどこからくるのか？ 合成されるのか？ 我々はこの点についても検討し、唾液腺には NO 合成酵素 (NOS: NO synthase) の活性のあることを示し、唾液腺自身が NO を合成していることを明らかにした。さらに NOS cDNA のクローニングにも成功し、構造を明らかにした (Yuda *et al.*, 1996b)。

5) Prolixin-S と NO の解離定数およびその特徴

Prolixin-S と NO ガスを混合し、stopped flow spectrophotometer によって、両者の会合反応を 400 nm の吸光の変化によって調べた。その結果 Prolixin-S と NO の反応は速い反応と遅い反応の 2 相から構成されることを明らかにした。それらの反応の解離会合の定数を異なる温度・pH で求めた。その結果から反応全体の解離

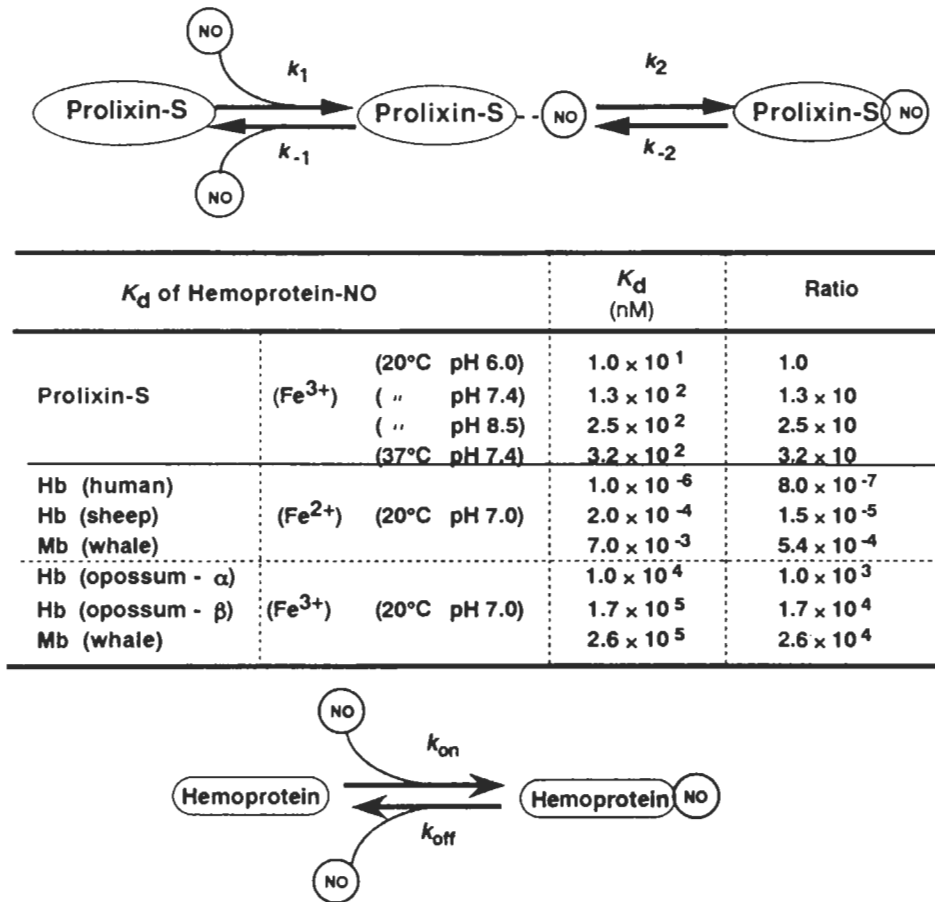


Fig. 8. Models of dissociation and association of heme protein and NO. Top and bottom figures indicate models of NO with Prolixin-S and regular heme protein, respectively. Hb, hemoglobin; Mb, myoglobin. Ratios indicate the comparisons with K_d of prolixin-S (20°C pH 6.0).

定数 K_d を計算してまとめたものが、Fig. 8 である。 K_d は低温・低 pH で小さく (1.0×10^1 nM), 高温・高 pH では高かった (3.2×10^2 nM). すでに報告されている他のヘム蛋白 (ヘモグロビン Hb・ミオグロビン Mb など) と NO との解離定数について文献からまとめてみると、20°C pH 7.0 の条件で、ヘムを構成する Fe が 2 価の場合は K_d が非常に小さく (human Hb: 1.0×10^{-6} nM), Fe が 3 価の場合 K_d は非常に大きい値 (whale Mb: 2.6×10^5 nM) をとることが示されている。即ち、ヘモグロビンやミオグロビンの場合、生理的条件下に近い条件下ではヘム蛋白質と NO との解離定数が極端に小さいか極端に大きいかのどちらかに偏っている。このことは、NO が結合したら離れないか、一方では結合できないかのどちらかであり、即ち通常のヘムタンパク質は生理的条件下で、NO の運搬者にはなれないことを意味している。一方、Prolixin-S は生理的条件下で少しの温度と pH の変化で可逆的に NO を結合したり、離したりできるので、NO の運搬者 carrier になれるという特異な性質を持っている (Kaneko *et al.*, 1999;

Kaneko *et al.*, 1999).

5. ま と め

以上のことをまとめて、模式的に示したものが Fig. 9 である。吸血前、唾液腺細胞は Prolixin-S を合成し、細胞内にあるヘム (このヘムは宿主のヘモグロビン由来と思われる) を結合し、さらに同じ唾液腺細胞内で NOS によって合成された NO をつけて腺腔に分泌されて、蓄えられる。温度は低く、腺腔の pH は低いので、Prolixin-S は NO を結合したまま貯蔵されている。

吸血の時、Prolixin-S は動物の体内に注入される。動物の体内は温度も高く、pH も高い。そのために、結合していた NO は離れ、付近の微小血管の平滑筋を弛緩させ、血管が拡張する。血管が大きくなれば血管を見つけ易くなり、口吻を挿入し易くなると思われる。口吻を血管に挿入し、更に唾液を分泌すれば、血管は益々拡張し、多くの血液を集めることができる。同時に Prolixin-S は抗凝固活性をもっているので、血液を固まらないようにして吸血を継続することができる。一酸化窒素 NO

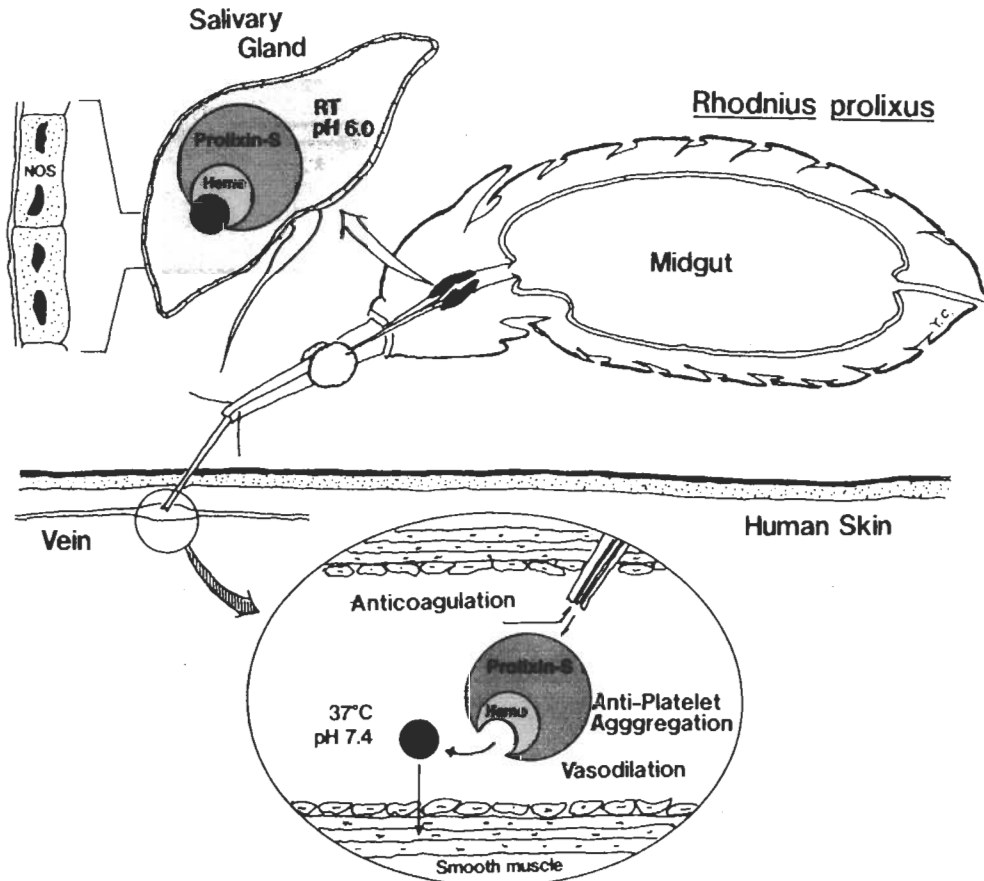


Fig. 9. A model of anticoagulation and vasodilation mechanisms in *Rhodnius prolixus*. *Rhodnius* salivary glands produce and keep anticoagulant hemeprotein Prolixin-S which is associated with nitric oxide NO in low temperature and pH conditions. Prolixin-S injected into host animal blood vessel inhibit coagulation reaction and release NO in higher temperature and pH conditions which induces smooth muscle vasodilation and inhibits platelet aggregation.

は血管平滑筋弛緩活性の他に、血小板凝集阻害活性ももっている。血液凝固・血栓の形成に血小板の凝集は重要なステップなので、NOは血液凝固も阻害することになる。

Prolixin-Sは抗凝固因子であると同時にNOの運び屋 carrierとしての機能をもつ極めてユニークなタンパク質といえる。オオサシガメはこのようにみごとに宿主動物の血管血液を含めた循環系に適応した特異な因子を唾液腺にもつことで、吸血を可能にしたと出ることが出来る。吸血昆虫の巧妙な戦略をここにみる事ができる。

最初に述べたように吸血昆虫やダニは唾液腺の中に多かれ少なかれオオサシガメの Prolixin-S に近い機能を持った分子を持っており、吸血を可能にしている。また、吸血昆虫の中腸は各種消化酵素の他抗凝固物質の存在が知られている。これらの解析はまだ十分進んでいない。現在我々の研究室ではオオサシガメ (Sun *et al.*, 1998) の他にもハマダラカ (Waidehet-Kouadio *et al.*,

1998) やカズキダニの唾液腺や中腸の活性物質について研究を進めている。世界的にも吸血昆虫の活性物質の研究は盛んになっている。近い将来、多くの活性物質とその機能が明らかにされ、吸血生理の全体像が理解できるであろう。

唾液腺や中腸にあるこれらの活性分子と病原体の媒介との関わりについては何も判っていない。病原体の昆虫細胞への感染・侵入や分裂増殖と関わり、それらを制御している可能性がある。これらの物質が、媒介を可能にし、ベクター足りうる条件の一つとなっている可能性もある。こうしたことが将来明らかにされれば、この活性物質の研究も幅と深みを持つことになる。

もう一つ、指摘しておきたいのは、これらの活性物質は動物の血液や血管の生理機能を制御する物質であることから、ヒトの循環系に関わる様々な疾病の予防や治療のための医薬の素材物質になりうるということである。作用点や作用機構の特異性から今までにない新規な活性を持ちより効果的で、副作用も少ない医薬品ができる可

能性を秘めている。これらの研究は医動物学を専門とする我々生物学者と薬学を専門とする科学者の共同研究によって成就される。またこれらの研究成果が何らかの形で病原体媒介を阻止する手段の開発に繋がるとすれば医動物学にとって大いに歓迎すべきことといわなければならない。

最後に、この研究は当医動物学教室の教官・学生・留学生・ポスドクの協力を得て行ったものであり、感謝したい。

引用文献

- Isawa, H., M. Yuda, K. Yoneda and Chinzei Y. (2000) The insect salivary protein, prolixin-S, inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway. *J. Biol. Chem.*, 275: 6636-6641.
- Kaneko, Y., H. Shojo, M. Yuda and Y. Chinzei (1999) Effects of recombinant nitrophorin-2 nitric oxide complex on vascular smooth muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63: 1488-1490.
- Kaneko, Y., M. Yuda, T. Iio, T. Murase and Y. Chinzei (1999) Kinetic analysis on nitric oxide binding of recombinant Prolixin-S, a nitric oxide transport protein from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1431: 492-499.
- Ribeiro, J. M. C. (1987) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 32: 463-478.
- Sun, J., M. Yamaguchi, M. Yuda and Y. Chinzei (1996) Purification, characterization and cDNA cloning of a novel anticoagulant of the intrinsic pathway, (prolixin-S), from salivary glands of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Thromb. Haemost.*, 75: 573-577.
- Sun, J., M. Yuda, K. Miura and Y. Chinzei (1998) Characterization and cDNA cloning of a hemoprotein in the salivary glands of a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 191-200.
- Yuda, M., K. Higuchi, J. Sun, Y. Kureishi, M. Ito and Y. Chinzei (1997) Expression, reconstitution and characterization of prolixin-S as a vasodilator: a salivary gland nitric-oxide-binding hemoprotein of *Rhodnius prolixus*. *Eur. J. Biochem.*, 249: 337-342.
- Yuda, M., M. Hirai, K. Miura, H. Matsumura and Y. Chinzei (1996 b) cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Eur. J. Biochem.*, 27: 807-812.
- Yuda, M., M. Sun, K. Yamaguchi, K. Ando and Y. Chinzei (1996 a) Identification and activities of anticoagulants in the salivary glands of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Med. Entomol. Zool.*, 47: 263-272.
- Waidhet-Kouadio, P., M. Yuda, K. Ando and Y. Chinzei (1998) Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarian vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1381: 227-233.