

学 位 論 文 題 名

昆虫血漿中で細菌細胞壁構成成分により活性化
されるセリンプロテアーゼ前駆体に関する研究

学位論文内容の要旨

生体内においてプロテアーゼは恒常性維持を始め、様々な生理反応に関与しており、各種プロテアーゼの活性制御は生物の生存にとって非常に重要である。高等生物において生理的刺激を拡大、増幅し、それに応答するため複数のプロテアーゼ前駆体がカスケードを構成する場合がある。昆虫血漿中においてプロテアーゼ前駆体を含むカスケードとしてフェノール酸化酵素カスケード（proPOカスケード）の存在が知られている。

ProPO カスケードはカビや細菌の細胞壁構成成分（ β -1,3-glucan, peptidoglycan）により活性化されるカスケードである。このカスケードの終末にはフェノール酸化酵素前駆体（prophenoloxidase: proPO）が位置しており、proPO が活性化されるとフェノール酸化酵素（phenol oxidase: PO）が生じる。PO は昆虫血漿内に大量に存在するチロシンやドーパといったフェノール性物質を酸化する酵素で、酵素作用の最終産物はメラニンである。昆虫体内に侵入したカビや細菌がメラニン層によって覆われる事は古くから知られた事実であるが、そのメラニン生成に proPO カスケードが関与している事が明らかになったのはこの十年程の間の研究の結果である。現在 proPO カスケードは昆虫の異物認識や生態防御に深く関わっていると考えられるようになり、活発な研究の対象となっている。家蚕幼虫血漿を Ca^{2+} 存在下、 β -1,3-glucan や peptidoglycan と反応させると、二種のセリンプロテアーゼ前駆体（proBAEEase と proPO 活性化酵素前駆体）が順次活性化される。ProPO 活性化酵素前駆体の活性型は proPO を活性化する事が知られているが、proBAEEase に関してはその活性型である BAEEase がベンゾイルアルギニンエチルエステルを加水分解する活性を有する事が知られているのみで、その性質、活性化機構、あるいは生理機能、特に proBAEEase が proPO の活性化経路上に位置するか、否かについては不明であった。これら proBAEEase についての未解決な点を解決するために、本研究では家蚕幼虫血漿からセリンプロテアーゼ前駆体、proBAEEase を精製した。更に proPO カスケードを部分的に再構成し、proBAEEase の活性型である BAEEase を精製した。精製の結果、proBAEEase と BAEEase は還元 SDS-PAGE においてそれぞれ分子量 39K、38K の移動度を示す分子であることが明らかになり、proBAEEase の活性化は限定加水分解（limited proteolysis）によって起こる事が示唆された。精製した BAEEase を家蚕幼虫血漿に加えても proPO の活性化は起こらなかった。この結果 proBAEEase は proPO の活性化経路上に位置しない事が明らかになった。精製した BAEEase

の基質特異性を 33 種の合成基質により調べた結果、*tert*-butoxycarbonyl-Val-Pro-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (thrombin に対する基質として知られている) と *tert*-butoxycarbonyl-Gln-Arg-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide が BAEase に対する良い基質となる事がわかった。また各種プロテアーゼインヒビターの阻害効果を調べた結果、BAEase は *p*-nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate や (*p*-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride といった trypsin-type のセリンプロテアーゼに対するインヒビターに強く阻害を受ける事が明らかになった。

次に proBAEase の活性化の際の切断位置を決定するため、proBAEase と BAEase の N-末アミノ酸シーケンス分析を行った。その結果 proBAEase は Ser-Ala-Phe-Ser- と続くシーケンスを持つポリペプチドであり、一方 BAEase は Ser-Ala-Phe-Ser- と続くシーケンスを持つポリペプチドと Ile-Phe-Gly-Gly- と続くシーケンスを持つポリペプチドの二本のポリペプチドから構成される事が示唆された。また BAEase の二本鎖を分離し、その一方 (heavy chain) と proBAEase のそれぞれについて lysyl endopeptidase 消化を行い、得られたポリペプチドのペプチドマッピングを行った。その結果 proBAEase は N-末から 29 番目の Arg と 30 番目の Ile の間で限定加水分解を受け BAEase に変換し、BAEase は二本のポリペプチドが S-S 結合した構造である事が明らかになった。

前述したように proBAEase は proPO の活性化経路上に位置しない事が明らかになったので、proBAEase, BAEase の生理機能は一体何なのかという新しい問題が提起された。しかし BAEase が高い気質特異性を示す事、thrombin に対する基質を良く加水分解する事、また家蚕血漿中には BAEase に対する特異的インヒビターが存在する事などを考慮すると proBAEase, BAEase は血液凝固などの昆虫の生体防御に関係している可能性が考えられる。また proBAEase のアミノ酸シーケンスは *Drosophila* の形態形成に関与するセリンプロテアーゼ前駆体、easter protein のアミノ酸シーケンスと部分的に高い相同性を示した。現在、昆虫において生体防御と発生の間に深い関連のある事が研究者の間の共通認識となりつつあるが、proBAEase は家蚕の発生過程にも関与する多機能セリンプロテアーゼ前駆体であるのかもしれない。今後 proBAEase の生理機能を知るためには生体防御と発生過程への関与という二つの側面から研究を進める必要があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 芦 田 正 明

副 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

学 位 論 文 題 名

昆虫血漿中で細菌細胞壁構成成分により活性化 されるセリンプロテアーゼ前駆体に関する研究

近年、昆虫の生体防御機構に関する研究が盛んに行われている。昆虫の生体防御機構としては、血球細胞による貪食や被嚢形成のような細胞性のものと抗菌タンパクやレクチンなどによる液性のものが知られている。これら以前からよく知られていた生体防御機構以外に昆虫体液の血漿部分に存在するフェノール酸化酵素前駆体活性化系（プロフェノールオキシダーゼカスケード、以下 proPO カスケードと略称）が最近注目を集めている。その理由は、 proPO カスケードがごく微量の細菌細胞壁成分（ペプチドグリカンや、 β -1,3-グルカン）によって引き金を引かれるカスケードで、細菌細胞壁成分を認識するタンパクやセリン型プロテアーゼ前駆体などから構成されているらしいことを示す事実が明らかになってきたからである。現在、 proPO カスケードはほ乳類の補体系に匹敵するような機能を昆虫の生体防御機構に於いて担っているかもしれないと推測されている。昆虫体液のセリン型プロテアーゼやその前駆体については、まだそれが単離・精製された例がない。したがって昆虫の生体防御機構についての理解を深めるために proPO カスケード構成要素のうち特にセリン型プロテアーゼ前駆体の単離・精製やその機能の解明が待たれている状況にある。

本論文は、昆虫の proPO カスケードを構成するセリン型プロテアーゼ前駆体（ proBAEEase ）について、カイコ幼虫体液の血漿から精製した標品を用いて、酵素化学的、タンパク化学的に研究したものである。 proBAEEase は昆虫体液から精製された初めてのセリン型プロテアーゼ前駆体で、限定加水分解により活性化されることが明らかにされた。活性化の結果生じる BAEEase はほ乳類血液凝固系のスロンビンにたいする基質をよく加水分解することから、 BAEEase が昆虫体液の凝固に関与している可能性が示唆された。昆虫の体液凝固の分子機構はまだ全く未開拓の分野で、本研究によりこの分野の急展開が期待できる。精製した BAEEase を用いた実験によって proPO カスケードが proBAEEase を活性化する経路と、フェノール酸化酵素前駆体を活性化する経路との2つに枝分かれしている事が初めて明らかにされた。この事実は、昆虫や甲殻類以外に存在の知られていない proPO カスケードの起源及び進化を探るうえで将来にわたって重要な意味を持つ知見であるとかんがえられる。一次構造解析の結果、 proBAEEase はショウジョウバエの初期発生過程で背腹軸の決

定に関与するeaster proteinに高い相同性を示すことが明らかになった。easter proteinもセリン型プロテアーゼ前駆体であることが確認されているので、同一のセリン型プロテアーゼが昆虫における生体防御と初期発生の双方で働いている可能性も想定される。本研究のproBAEEase一次構造解析の結果は、proBAEEase遺伝子の制御機構について、将来活発な研究の端緒になることが期待できる。

これを要するに、著者は、いままで記載例のなかった昆虫体液のセリン型プロテアーゼ前駆体について初めて、そのひとつを単離・精製する方法を開発し、酵素化学的・タンパク化学的新知見を得たものであり、昆虫の生体防御機構、ひいては昆虫体液の生理・生化学に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。