

学 位 論 文 題 名

家蚕外皮のフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

昆虫の体内にカビや細菌などの異物が侵入すると、自分のからだを守ろうとする反応がおこる。これは生体防御反応と呼ばれ、二つに大別することができる。一つは被囊形成や貪食などの細胞性生体防御反応であり、もう一つは抗菌ペプチドの合成やフェノール酸化酵素前駆体活性化系（proPO活性化系）などの液性生体防御反応である。体内に侵入した異物を観察すると、その周囲がメラニンなどからつくられた黒色の層で包まれ、異物が物理的に隔離されていることが多い。このメラニンの生成に関わっているのがフェノール酸化酵素である。通常、フェノール酸化酵素は前駆体（proPO）として存在し、異物の侵入が引き金となって初めて活性化する。異物の侵入が認識され、proPOが活性化されるまでのしくみはフェノール酸化酵素前駆体活性化系（proPO活性化系）と呼ばれている。proPO活性化系は昆虫の血液と外皮に存在する。現在わかっているproPO活性化系の概略は次の通りである。昆虫の体内にカビや細菌が侵入すると、認識タンパク質がこれらの細胞壁成分（ペプチドグリカンや β -1,3-グルカン）を認識して結合する。この結合が引き金となって何段階かのカスケード反応が起こる。このカスケード反応については、いくつかのプロテアーゼ前駆体を含み、カルシウムイオンを必要とする反応段階があるという以外よくわかっていない。このカスケードのはたらきで活性化されたプロテアーゼによりproPOがフェノール酸化酵素に変換される。最近、proPO活性化系が昆虫のいくつかの生体防御反応を有機的に関連づける役割を担っている可能性や、初期発生時に背腹軸を決定するカスケード系とその構成要素の一部を共有している可能性が指摘されており、このカスケードに対して注目が集まっている。proPO活性化系のうち、認識タンパク質やproPOに関しては研究が進んでいるが、その間を支えるプロテアーゼ前駆体などについては、分子レベルでの研究はほとんど行われていない。proPO活性化系の役割を明らかにするためにはこれらのプロテアーゼ前駆体などの機能や構造を研究する必要がある。その研究の一環として、proPOを活性化するプロテアーゼであるフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素（PPAE）とPPAEの前駆体（proPPAE）について研究を行った。その報告が本論文であり、以下の4項目に要約できる。

1)家蚕の外皮を破碎し高塩濃度の緩衝液を用いてタンパク質を抽出した。その抽出物を塩析したのち5回のカラムクロマトグラフィーによりPPAEを精製した。さらに、家蚕の外皮から酸性の緩衝液を用いてタンパク質を抽出し、3回のカラムクロマトグラフィーによりproPPAEを精製した。SDS/ポリアクリルアミドゲル電気泳動のにおいて、PPAEは非還元状態で45.0kDaのタンパク質に相当する移動度を示し、還元状態ではそれぞれ38.5kDaと21.0kDaを与えた。一方、proPPAEは非還元状態・還元状態でいずれも一本のポリペプチド（それぞれ45.0kDaと54.0kDa）として泳動された。このことからproPPAEは少なくとも一カ所で限定加水分解を受けてPPAEになることがわかった。さらにproPPAEの精製標品を用いてproPPAEをPPAEに変換する因子を検出・定量することが可能であることを示した。

2)PPAEのcDNAクローニングを行った。得られたクローン（1447塩基対）の塩基配列を決定した。塩基配列から推定されるPPAEのアミノ酸配列と、PPAEの消化断片のアミ

ノ酸配列分析の結果が一致したことから、得られたクローンがPPAEのcDNAだということを確認した。さらに、PPAEのアミノ酸配列分析の結果と、得られたcDNAから推定されたPPAEの一次構造の比較から、以下のことが明らかになった。すなわち、a)PPAEが分泌型のタンパク質である、b)成熟型のタンパク質のN末端がピログルタミル化されている、c)proPPAEが173残基目のリジンのC末端側でのみ加水分解を受けてPPAEへと活性化される、という三点である。PPAEが合成される組織は、ノーザンブロット解析の結果から、主に外皮を裏打ちしている表皮細胞と血球であることがわかった。ホモロジー検索の結果から、PPAEの二本鎖のポリペプチドのうち長鎖（38.5kDa）がトリプシン型セリンプロテアーゼの構造をもっていることが判明した。短鎖も含めたPPAE全体のアミノ酸配列と他のプロテアーゼのアミノ酸配列との相同性を調べてみると、特に高かったのがカブトガニの血液凝固系ではたらく二つのプロテアーゼ、ショウジョウバエの発生初期で背腹軸の決定に関与するプロテアーゼの一つであるeaster、タバコスズメガと鞘翅目昆虫 *H. diompholia* でごく最近発見されたPPAEであった。PPAEも含めてこれらのプロテアーゼは、短鎖にclip-likeドメインという共通した構造をもつと推定される。現在のところ、プロテアーゼに存在するこのドメインの機能は不明である。抗菌活性をもつβ-ディフェンシンがclip-likeドメインをもつことから、PPAEが抗菌活性をもつかどうか調べたがその活性は検出できなかった。しかし、このドメインをもつプロテアーゼは無脊椎動物にのみ発見されていて、しかも、いずれもカスケードを構成するプロテアーゼであることは注目に値する。

3)proPO活性化系と背腹軸を決定するカスケード系に関する前述の可能性やPPAEがeasterと相同性があることから、卵におけるproPPAEの有無を、PPAEに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット解析を行って検討した。その結果、産卵直後の家蚕非休眠卵にもproPPAEが存在することがわかった。

4)PPAEが生体防御に関わっているならば、PPAE 遺伝子の発現は転写レベルで異物の侵入の影響を受けるかもしれないと考え、家蚕のゲノムライブラリーからPPAEのゲノムをスクリーニングしてプロモーター領域（約1.9キロ塩基対）の塩基配列を決定した。

PPAEのプロモーター領域には、哺乳類の免疫系のタンパク質や抗菌ペプチドのプロモーター領域によく見られるNF- κ B応答配列は存在しないことが明らかになった。しかし、背腹軸の決定の鍵となる転写因子dorsalの応答配列と大変よく似た配列が存在した。dorsalは背腹軸を決定する因子として発見されたが、最近ショウジョウバエの抗菌ペプチドの転写も制御することが明らかにされている。背腹軸を決定する因子がPPAEの転写制御に関わっている可能性が考えられる。

本研究はproPPAEの活性化機構を明らかにし、proPPAEをPPAEへ活性化する因子の精製に道を開いた。さらにPPAEのcDNAクローニングにより、背腹軸に関わっているプロテアーゼとproPO活性化系のプロテアーゼの異同を分子レベルで議論することを初めて可能にした。これらの成果は昆虫の主要な生体防御機構の一つと認識されるようになったproPO活性化系の今後の研究の進展に寄与することが大きいと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 芦 田 正 明

副 査 教 授 木 村 正 人

副 査 助 教 授 早 川 洋 一

学 位 論 文 題 名

家蚕外皮のフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素に関する研究

昆虫幼虫や成虫におけるカビやバクテリアなどに対する生体防御機構には貪食や被嚢形成、フェノール酸化酵素前駆体活性化系（フェノール酸化酵素前駆体カスケード）、それに抗菌タンパクの合成などが知られている。これらの生体防御機構が有機的に関連しあって有効な生体防御機構が構築されていると考えられているが、個々の生体防御機構がどのように相互に関連しているのかは明らかにされていない。昆虫の免疫（生体防御）研究の最近の成果の多くが、フェノール酸化酵素前駆体活性化系が昆虫の生体防御機構を相互に関連させる中心的な役割を担っている可能性を示すにいたり、この系にたいする昆虫の免疫（生体防御）研究者の関心がたかまっている。また、昆虫の初期発生における背腹軸決定にペリピテリン間隙で働くプロテアーゼカスケードが関与する事が知られているが、このカスケードの一部か、あるいはこのカスケードのプロテアーゼによく似た基質特異性を持つプロテアーゼがフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成している可能性が指摘されている。このため、昆虫の生体防御機構の一つとして発見され、研究されてきたフェノール酸化酵素前駆体活性化系が初期発生にも関わっているかもしれないと考えられるようになり、この面からもこの系にたいする関心が高まっている。

フェノール酸化酵素前駆体活性化系はカビやバクテリアの細胞壁成分と特異的に結合する認識タンパク、プロテアーゼの前駆体、フェノール酸化酵素前駆体から構成されることが今までの研究により判明している。プロテアーゼの前駆体に関しては、家蚕から2つのプロテアーゼ（フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素と役割不明の酵素、BAEEaseと命名されているもの）が精製されているが、詳細な性質の究明や前駆体の活性化機構、ペリピテリン間隙で働くプロテアーゼカスケードの構成要素との関係などは研究されずに残されていた。本研究はフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成するプロテアーゼの一つ、フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素についての研究である。

論文のResultsは4章からなっている。第一章はフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素を家蚕幼虫クチクラから精製し、その酵素学的・物理化学的性質を明らかにしている。フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素についての研究は、四半世紀まえに、やはり家蚕幼虫クチクラから精製された標品についての報告があるのみで、その後、研究は全く進展していなかった。その理由は微量しか酵素が存在せず、性質の究明に十分な量の標品を得ることが困難であったためである。本論文では抽出法を工夫し、今までの方法に比して20倍近くの収率でしかも比活性の高い抽出液を得ることに成功している。さらに、精製にアフィニティークロマトグラフィーの手法を導入するなどの工夫を加え、高度に精製されたフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素を大量に得る方法が述べられている。

第二章では、フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素の不活性型（proPPAE）の精製と不活性型を活性型にかえる因子（proPPAE活性化因子）の調整法について述べ

ている。proPPAE活性化因子は家蚕クチクラの抽出液から調製した。第一章で明らかにされたようにフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素はコンカナバリンAと結合するが、proPPAE活性化因子は結合しないという事実がこの因子の調製に利用された。このproPPAE活性化因子と精製されたproPPAEが調製出来たことにより、フェノール酸化酵素前駆体活性化系の研究がさらに上流部へ進むことが可能になった。

第三章ではフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素のcDNAクローニングを取り上げている。cDNAの塩基配列から推定された一次構造から a) 触媒部位が典型的なセリンプロテアーゼの構造を示すこと、b) 分泌型のタンパクとして合成されること、c) 活性化の際に触媒部位から切断されるプロペプチドは連続する二つのシステインノットドメインを持っていること、d) proPPAEは152番目のリジンと153番目のイソロイシンの間のペプチド結合がただ一カ所加水分解を受けて活性化されること、e) フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素は、ショウジョウバエの背腹軸決定にペリビテリン間隙で働くプロテアーゼの一つ（イースター、easter）と相同性が高いことなどが明らかにされた。さらに、フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素遺伝子はゲノム中に1コピーしか存在しないらしいこと、この遺伝子は表皮細胞、血球細胞、唾液腺細胞で発現していることなどが証明されている。

第4章ではフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素遺伝子の翻訳開始点より約2 kb上流部分までの塩基配列を解析したことが述べられている。インターロイキン応答配列（II型）、インターフェロン応答配列、リボポリサッカライド応答配列、ショウジョウバエで発見されているdorsal 応答配列に似た配列などが見出されたことが報告されている。これらのシス因子が実際にフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素遺伝子の転写制御にどのように関わっているかは本論分では明らかにされていない。しかし、フェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成する他のプロテアーゼの遺伝子や、背腹軸決定に関与する遺伝子のプロモーター領域を含めた塩基配列がいずれ明らかにされられると思われる。それらの知見と、本研究で明らかにされたプロモーター領域の塩基配列は、昆虫のプロテアーゼカスケード構成要素の遺伝子発現がどのように制御されているかを明らかにする上で、貴重な資料になることが期待される。

本研究で得られた以上の成果は、昆虫のフェノール酸化酵素前駆体活性化系の構成要素の一つであるフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素、その前駆体、前駆体を活性型にかえる酵素などに関する我々の理解を飛躍的に前進させたとして評価に値する。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者が研究者として誠実勝つ熱心であり、大学院における研鑽や取得単位数なども併せ、博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資格を有すると判定した。