

学 位 論 文 題 名

Studies on prophenoloxidase
in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*.

（家蚕幼虫外皮に存在するフェノール酸化酵素前駆体についての研究）

学位論文内容の要旨

昆虫の外骨格（クチクル）は、タンパク質、糖、脂質から成る非細胞性のマトリクスである。クチクルを構成するタンパク質の多くはクチクルを裏打ちする表皮細胞により合成されるが、なかには脂肪体や血球などで合成されるものもある。非表皮細胞由来のタンパク質は血液中に放出された後、表皮細胞層を通過しクチクルに達すると考えられている。しかしながら、血液からクチクルへのタンパク質の移行に関する報告は少なく、また、移行の仕組みについては何も分かっていない。一方、哺乳動物に於いてイムノグロブリン A、トランスフェリンなど、上皮及び内皮細胞層を通過するタンパク質の輸送の仕組みについては、詳しく調べられている。脊椎動物の上皮細胞層にはタイト・ジャンクション（TJ）が存在して、細胞間隙に於ける物質の行き来を制限している。哺乳類に関しては、細胞内をタンパク質が直接通過する輸送機構（トランスサイトosis）が、上皮及び内皮細胞層をタンパク質が通過する際に重要であることが示されている。受容体を介したエンドサイトosisにより細胞内に取り込まれたタンパク質は、目的部位に運ばれた後にエクソサイトosisで放出される。昆虫を始めとする無脊椎動物の上皮にはセプタイト・ジャンクション（SJ）が存在しており、TJ と同様の機能を有しているが局在する部位や構造などが異なる。このような昆虫上皮において上皮細胞層を隔てたタンパク質輸送がどのように行われているのかは興味深い問題である。本研究の実験対象である家蚕フェノール酸化酵素前駆体（proPO）は、フェノール酸化酵素（PO）の前駆体であり昆虫の生体防御で重要な働きをしているタンパク質である。これまでにノーザン解析などにより、クチクルの proPO は血球細胞で合成された後にクチクルへ移行したものであることが示唆されている。この proPO を用いて、これまでに直接的な証明のなかったタンパク質の移行を明確に示すことが本研究の目的である。

家蚕 proPO はヘテロダイマーであり、両サブユニットとも鋏角類ヘモシアニンに相同な銅タンパク質である。当研究室で用いている系統の家蚕の proPO には Native-PAGE 上で移動度の異なる二つのアイソフォームが存在する。移動度の大きい順に F-type (faster migrating)、S-type (slower migrating) と名付けられている。また、同系統には、F-type, S-type を両方持つ個体（FS-larva）と F-type 片方のみを持つ個体（F-larva）の 2 タイプの個体が存在している。F-larva の血体腔に S-type の proPO を注入して、それが血液からクチクルに移行するのであれば、S-type を注入された個体のクチクルには移行した S-type proPO が検出されるはずである。まず、血液からとれた F-type, S-type proPO の混合物を Mono-Q カラムで展開することにより、それぞれのアイソフォームを分離した。比活性や基質特異性には、ほとんど差が見られなかったが、両アイソフォーム間で 5 つのアミノ酸置換が存在

していた。S-type の proPO は F-larva の血体腔に注入され、2 日後にそのクチクル抽出物を Native-PAGE で調べたところ S-type の proPO が検出された。この結果は血液中の S-type がクチクルに移行したことを示す直接的な証拠といえる。次に、組織化学的手法を用い、proPO がクチクルを裏打ちする表皮細胞層のどの部分を通過しているのかを調べた。抗 proPO 抗体で 5 齢幼虫の切片を染色したところ表皮細胞内でシグナルが検出された。また、*in situ* hybridization で proPO の mRNA が検出されなかったことにより、表皮細胞中の proPO は表皮細胞で合成されたものではなく、おそらく、proPO が移行の際、直接細胞内を通過している途中のものだと考えられる。また、大腸菌で発現したショウジョウバエ proPO を抗原にして作成した抗体では、ショウジョウバエ幼虫のクチクルにシグナルが観察された。ショウジョウバエに於いても proPO が血液からクチクルに移行している可能性が考えられる。

1960 年代にその存在が示唆されて以来、クチクルに存在する proPO が精製できたという報告はなかったが、本研究では、proPO をクチクルから精製することができた。精製標品のプロテアーゼ消化物を MALDI-TOF 質量分析計でマッピングすると、クチクル proPO には cDNA から予想される分子量よりも 16 Da 重いペプチド断片が観察された。ポスト・ソース・ディケイ法で、その断片をさらに解析した結果、メチオニン (Met) 残基がメチオニン・スルフォキシド (Met(O)) に酸化されていることが分かった。二つのサブユニットの内、片方は 5 ~ 6 個の Met が酸化され、もう片方では 1 個だけが酸化していることが分かった。Met(O)以外の修飾は見つかっていない。鉄角類ヘモシアニンの結晶構造解析のデータを用いて proPO の立体構造のモデルを導き出したが、モデルの表面に露出して存在する Met と、クチクル proPO にて Met(O)として同定された Met とがおおむね一致していた。特定の Met が酸化されているわけではなく、表面に露出しているものが押し並べて酸化を受けているようである。proPO がクチクルに移行する際に、どこかで酸化的环境を経ることが示唆される。現在、昆虫のクチクルに存在するタンパク質の中で Met(O)を含むタンパク質は proPO 以外に知られておらず、クチクル内のタンパク質に見られる Met 酸化の生理的意義は不明である。興味深いことに Met(O)を含むクチクル proPO は幼虫体腔内に注入されてもクチクルには移行しない。これは、Met(O)を含む proPO と含まない proPO を選別する機構の存在と、選別の際に Met 残基が何らかの働きをしている可能性の二つを示唆する。Met 残基の疎水性がタンパク質同士の相互作用に機能していることや、酸化による親水性の増加により結合が弱まることなどが報告されているが、もし、proPO に対する受容体が存在するならば、proPO 上の Met 残基が受容体との相互作用に働いているかも知れない。

本研究は、昆虫の表皮細胞層を隔てたタンパク質移行を明確に示した。また移行前後に於ける proPO の構造の違いも明らかにすることが出来た。昆虫におけるトランスサイトシスの仕組みは全く未開拓の分野だが、もしかすると TJ をもつ哺乳類とは異なる独自の機構を発達させてきたかもしれない。本研究は、昆虫以外にも SJ を持った多くの無脊椎動物のトランスサイトシス研究に於ける優れたモデルになり得る。ところで、無脊椎動物の代表的なモデル生物であるショウジョウバエや *C.elegans* が属する節足動物や線虫類は、共にクチクルを持ち、脱皮を重ねて成長するが、このような特徴を持った生物は「脱皮動物」という大きなグループを形成している。脊椎動物を含む後口動物に対比される前口動物に於ける主要なグループの一つである。しかし、ゲノムシーケンシングの完了しているこれらの動物種においてもクチクル形成・表皮の生理の研究は、まだ未開拓の分野である。節足動物や線虫類は種数においても、また生息環境や生活史についても、他の動物群には見られない際立った多様性を有しているが、このような繁栄をもたらした原因として、身体と環境の接点であるクチクルを如何様にも変えられることの持つ意味は大きい。今後、ショウジョウ

バエ、*C.elegans* 双方でこの分野の研究が進み、そして両者間でのクロストークが進んでいくことが期待される。本研究を含め「脱皮動物」が独自に発展させてきた上皮の性質についての理解が深まることを期待する。

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

Studies on prophenoloxidase in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*.

(家蚕幼虫外皮に存在するフェノール酸化酵素前駆体についての研究)

昆虫においてフェノール酸化酵素前駆体 (prophenoloxidase, proPO)は限定加水分解により活性化され、フェノール酸化酵素(phenoloxidase, PO)になる。proPO を限定加水分解する proPO活性化酵素 (proPO activating enzyme, PPAE)は 不活性なpro-PPAEとして存在する。proPO を活性化する仕組み全体は proPO カスケードと呼ばれ、ごく微量の黴やバクテリアの細胞壁成分で引き金が引かれることが分かっている。proPO と proPOを活性化する仕組みは昆虫の血液とクチクラに存在することが証明されている。POはチロシンやドーパなどのフェノール性化合物を酸素の存在下で酸化してメラニンを合成する。メラニンの合成途中に生成されるキノンは反応性に富み、細胞毒性が指摘されている。さらに、キノンは傷口や侵入した黴やバクテリアの周囲に形成される不溶性高分子を共有結合で結び、傷口を塞ぎ、黴やバクテリアを体内で物理的に閉じ込めるのに役立っていると考えられている。このように proPO 及びproPO カスケードは、クチクラと血液において、昆虫が自身の体を守る生体防御機構に重要な役割を果たしている。血液の proPOは約 30 年前に家蚕から精製され、その性質が調べられている。しかし、クチクラの proPOについては、その存在の可能性が 1960 年代半ばに指摘されたにもかかわらず、それ以後、誰ひとり単離、精製に成功せず現在に至っている。申請者の研究室でクチクラタンパクの新しい抽出法が数年前に考案され、家蚕クチクラからproPOを活性化せずに抽出することが可能になった。

本論文では、この新しい抽出法を用いてクチクラからproPOを抽出し、研究した。研究結果は 3 章に分けて報告されている。第 1 章では、クチクラからproPOを精製し,PPAEで活性化してえられたPOの酵素としての性質を調べた。クチクラのproPOと、血液のproPOのそれぞれを活性化して得られたPOの間には、酵素としての性質の差はほとんど認められなかった。さらに、血液のproPOは、表皮細胞層を横切ってクチクラに運ばれることが証明された。逆相液体クロマトグラフィーにおいて、血液のproPOとクチクラのproPOは異なる溶出パターンを与えることが観察された。この事実から、クチクラのproPOは血液のproPOが修飾されたものである可能性が指摘された。第 2 章では、血液のproPOがどのような修飾を受けるとクチクラのproPOになるのかが調べられている。proPOは 2 種のポリ

ペプチドから構成されるヘテロダイマーである。クチクラのproPOの1本のポリペプチドは5ないし6つのメチオニン残基がメチオニンサルホキシドへ酸化されており、他のポリペプチドではメチオニン残基1つがメチオニンサルホキシドへ酸化されていることが示されている。酸化されていたすべてのメチオニン残基が特定され、それらが分子の表面に位置している可能性が示された。クチクラから精製されたproPOを家蚕幼虫の血体腔へ注入しても、そのproPOのクチクラへの移行は認められなかった。しかし、血液から精製されたproPOを血体腔へ注入すると、そのproPOのクチクラへの移行が確認された。これらの結果から、血液のproPOがクチクラへ移行するか否かは、proPOのいくつかのメチオニン残基の酸化状態により決定されていることが明らかにされた。第3章では、血液のproPOが上皮細胞層を通過してクチクラへ移行する際、proPOが上皮細胞内部を横切るのか否かが、免疫組織化学的方法で調べられた。proPOは上皮細胞の液泡に取り込まれることが確認された。液泡への取込みや、液泡からクチクラへproPOが分泌される仕組みの解明は、今後の研究に待たなければならないが、これまでに記載されたことがない新しい仕組みが存在している可能性が指摘された。1章と2章の内容は、それぞれ単独の論文として、国際的に権威ある雑誌に投稿され、現在印刷中である。また、3章の内容は投稿準備中である。

脊椎動物において、上皮細胞あるいは内皮細胞を横切ってタンパクが移行する現象（トランスサイトーシス）はよく知られており、生理学上重要であることもよく分かっている。ほ乳動物ではイムノグロブリンAやトランスフェリンのトランスサイトーシスの仕組みがよく研究されている。昆虫などの無脊椎動物においても、トランスサイトーシスの重要性は脊椎動物におけると同様であると推測されていた。しかし、無脊椎動物のトランスサイトーシスの仕組みは、これまで全く手付かずの研究分野であった。本論文に報告されているproPOの血液からクチクラへの移行の証明が、昆虫におけるトランスサイトーシスの明確な証明の初めての例である。

本研究で報告されている、proPOの血液からクチクラへの移行に関する研究は、昆虫におけるトランスサイトーシスの仕組みを解明するための突破口になると期待される。

よって、著者は博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。