

学 位 論 文 題 名

昆虫のフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成する  
セリンプロテアーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

昆虫の体液を体外に取り出すと一般に黒化することが知られている。これは体液中のフェノール酸化酵素前駆体が活性化されて、体液内に存在するチロシンやドーパを酸化し、メラニンが形成されたためである。このフェノール酸化酵素前駆体の活性制御機構はフェノール酸化酵素前駆体活性化系と呼ばれており、体液の血漿部分に存在することが明らかになっている。フェノール酸化酵素前駆体活性化系は、カビの細胞壁成分である $\beta$ -1,3-グルカンやバクテリアの細胞壁成分であるペプチドグリカンが、数十～数百ピコグラム存在すると活性化カスケードの引き金が引かれることが明らかになっており、その際、少なくとも二種類のセリンプロテアーゼ前駆体が活性化することが知られている。一つはフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素で、この酵素はフェノール酸化酵素前駆体を限定分解によって切断し、活性化させる。そしてもう一つは、ベンゾイルアルギニンエチルエステルを良く加水分解することから、仮に BAEEase、その前駆体を proBAEEase と呼んでいる酵素である。ProBAEEase は昆虫血漿中に存在するセリンプロテアーゼ前駆体としては初めて家蚕血漿画分から精製された酵素で、これまでの研究からフェノール酸化酵素前駆体の活性化には直接関与せず、活性化カスケードの途中から枝分れした位置に存在していることが明らかになっている。しかし、proBAEEase の生体内での基質や機能は未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではこのセリンプロテアーゼの生体内における具体的な機能を明らかにすることを目的とする。

まず proBAEEase の一次構造からその機能を推定する目的で、cDNA のクローニングを行った。精製 proBAEEase をリジルエンドペプチダーゼで処理した後、逆相 HPLC で分離し、それぞれのペプチド断片のアミノ酸配列を決定した。この情報を基にオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、家蚕 5 齢幼虫の脂肪体の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、poly A 及び開始メチオニンを含む 2,102 bp のクローンを得ることができた。このクローンの全塩基配列のうちコーディングリージョンは 1,107 bp で、proBAEEase は 369 個のアミノ酸で構成されていることが明らかになった。さらに相同性検索と BAEEase のアミノ酸配列の情報から、24 残基のシグナルペプチド、活性化の際の切断部位を挟んでアミノ末端側に 88 残基の軽鎖、カルボキシル末端に 257 残基の重鎖の存在が示された。また、軽鎖においては 6 個のシステイン残基がそれぞれ 3 対のジスルフィド結合を構成するクリップドメインの配列が、重鎖ではセリンプロテアーゼの活性中心を構成するヒスチ

ジン、アスパラギン酸、セリン残基の存在がそれぞれ確認できた。クリップドメインはカプトガニの血液凝固系を構成するプロクロッティングエンザイムで初めて発見され、その後、節足動物のプロテアーゼにおいて数例報告されている。その機能については明らかになっていないが、クリップドメインをもつ酵素の大部分がある種のカスケード反応に関与していることから、カスケード反応の活性調節の機能が示唆されている。ProBAEEase のクリップドメインについては、抗クリップドメイン/IgG を用いたウェスタンブロット解析の結果、活性化の際に軽鎖の一部が重鎖から遊離され、クリップドメインが単独で存在することが示された。活性化の際にクリップドメインが遊離されるプロテアーゼの報告は proBAEEase が初めてである。更にノーザンブロット解析の結果、proBAEEase の mRNA は脂肪体で最も強く発現し、次いで血球と上皮細胞で発現しているのが観察された。この三つの組織で検出された転写産物は何れも同じ大きさであり、この長さは cDNA から予想される mRNA の長さとはほぼ一致した。これらのことから、proBAEEase は脂肪体、血球、上皮細胞で不活性な前駆体として合成されて血漿中に分泌された後、カビや細菌の細胞壁成分の存在下でフェノール酸化酵素前駆体活性化系を経て活性化し、その結果クリップドメインが遊離されることが明らかになった。

ProBAEEase のアミノ酸配列を基に相同性検索を行った結果、最も高い値を示したのはショウジョウバエの発生初期において胚の背腹軸決定に関与する *easter* で、シグナルペプチドを含む全アミノ酸配列で約 48%、活性中心を含む重鎖のみでは約 53% の相同性を示した。ショウジョウバエの背腹軸決定に関しては、主に遺伝学的な手法を用いた研究が活発に行われており、これまでに複数のプロテアーゼの関与するカスケードモデルが提唱されている。そのプロテアーゼカスケードの最終段階で pro-spätzle が *easter* によって限定分解を受けると、spätzle は細胞膜上に存在する Toll レセプターに結合し、関連遺伝子群を活性化することが示されている。同様にショウジョウバエでは spätzle と Toll が一連の抗菌ペプチドの発現調節にも関与していることが明らかにされている。更に、最近 Toll 様のレセプターが哺乳類からも発見され、自然免疫に関与していることも証明された。そこで、大腸菌及びバキュロウイルスの発現系を用いてショウジョウバエ pro-spätzle の組換えタンパク質を作成し、この組換え pro-spätzle と活性型の BAEEase を反応させた。その結果、pro-spätzle は BAEEase によって限定分解を受け、活性型の spätzle となることが明らかになった。更に、BAEEase によって限定分解を受けた spätzle のアミノ酸配列解析の結果、その切断部位は *easter* によるものと一致し、pro-spätzle が BAEEase の基質となり得る可能性が示された。しかしながら、家蚕においてショウジョウバエ spätzle 様のタンパク質や相同性の高い遺伝子は発見されていない。本研究でもその探索を試みたが、明らかにすることはできなかった。また、ショウジョウバエにおいて pro-spätzle を限定分解するプロテアーゼは *easter* 以外にも存在することが示唆されている。そこでショウジョウバエで proBAEEase 様のタンパク質が *easter* 以外にも存在するのかをウェスタンブロット解析で確認した。その結果、ショウジョウバエの幼虫と蛹において *easter* 以外にも proBAEEase 様のタンパク質が存在することが示された。これらのことから、フェノール酸化酵素前駆体活性化系はカビや細菌の細胞壁成分によって活性化カスケードの引き金が引かれると、一方ではメラニン形成、もう一方では抗菌ペプチドの発現調節に関与していることが強く

示唆された。今後は、家蚕からショウジョウバエの pro-spätzle 及び Toll のホモログを精製することにより、フェノール酸化酵素前駆体活性化系と抗菌ペプチドの発現調節機構の相互作用を、より詳細に解析できると期待される。

# 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

## 昆虫のフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成する セリンプロテアーゼに関する研究

昆虫に黴やバクテリアが侵入すると自らの体を守る防御反応、いわゆる生体防御反応が働きだすことが知られている。昆虫の生体防御反応は大別すると次の3つである。1) 侵入した微生物を血球細胞が取り囲む「被嚢形成」や血球細胞に取り込む「貪食」；侵入した微生物や傷口の周囲における血液凝固とメラニン形成；黴やバクテリアの増殖をおさえたり、殺したりする作用を持つペプチド (anti-microbial peptide) の合成。これらの防御反応は微生物など、昆虫にとっての異物が侵入した時に活性化される。従って、これらの反応が始まるためには、侵入した微生物などの異物に特異的な親和性を持つ分子（認識タンパク）が存在し、その分子が異物と結合したとき、防御反応が始まると考えられる。認識タンパクについての研究は、生物における自己と非自己の識別と言う生物学上きわめて大きな研究課題に直結する。この理由から、生物種の如何を問わず、認識タンパクにたいして強い関心がもたれている。昆虫における生体防御反応の開始に関与する認識タンパクとして確認されているものは、メラニン形成に働いている一種のプロテアーゼカスケード（フェノール酸化酵素前駆体活性化系、proPOカスケード）の構成要素として同定されているペプチドグリカン認識タンパク（PGRP）、ベーター1、3-グルカン認識タンパク（ $\beta$ GRP）それにいくつかのレクチンである。proPOカスケードは、調べられている限りのすべての昆虫に存在していて、黴やバクテリアが侵入するとただちに活性化される。3つに大別される昆虫の生体防御反応が、どのように相互に有機的に関連しているかは、現在の所、全く明らかにされていない。しかし、proPOカスケードの引き金がまず侵入微生物により引かれ、その結果、上に記した1や3の生体防御反応を始めるための信号が細胞に与えられるとの仮説が繰り返し主張されてきた。本研究では家蚕幼虫を用い、proPOカスケードの構成要素であるが、メラニン形成には関与せず、カスケードの途中で枝別れたところに位置しているプロテアーゼ前駆体（proBAEEase）とその活性型プロテアーゼ（BAEEase）について研究した。研究内容は、1) proBAEEase のcDNAクローニング、2) proBAEEaseとBAEEaseの精製法の改良、3) proBAEEaseの活性化反応の解析、4) BAEEaseの*in vivo*での基質の同定である。

主要な研究成果は以下のように纏められる。proBAEEaseのORFを含むcDNAが得ら

れ、推定一次構造が明らかにされた。この前駆体は286個のアミノ酸から構成され、N末端がわに3つのジスルフィド結合を持つクリップドメインの存在の可能性が示された。典型的なセリンプロテアーゼにおいて活性中心を構成するHis, Asp, Serの3つのアミノ酸の位置に相当するところに、proBAEEaseにおいてもこれらのアミノ酸 (His<sup>157</sup>, Asp<sup>219</sup>, Ser<sup>317</sup>) が同定された。推定一次構造から計算された分子量は31,516であった。proBAEEaseの精製標品はSDS-PAGEで移動度の異なる2種類のポリペプチドを含むことが示された。移動度の小さいポリペプチドは、前に勝見により家蚕幼虫より精製されたproBAEEaseと同じN末端アミノ酸配列を持ち、移動度の大きいポリペプチドの分子量はcDNAから推定されたものより1000大きかった。推定一次構造中にN-グリコシド結合型糖鎖が付着すると予想される配列が検出されたので、分子量1000の差は糖鎖の付着に起因する可能性が大きいと判断された。勝見がpro-BAEEaseとして精製したものをproBAEEase\*、今回新たに得られた前駆体をproBAEEaseとそれぞれ表記することにした。通常の生理条件下の体内において、proBAEEase\*は存在せず、proBAEEaseとして存在していることが証明された。proPOカスケードが血漿中で黴やバクテリアの細胞壁成分により引き金をひかれると、proBAEEase(Gln<sup>25</sup>-Gln<sup>369</sup>)が限定加水分解をうけて活性化される。proBAEEaseは、まずクリップドメインを失いproBAEEase\* (Ser<sup>84</sup>-Gln<sup>369</sup>) となり、次いで、Arg<sup>112</sup>とVal<sup>113</sup>の間のペプチド結合が切断されて活性型セリンプロテアーゼ (BAEEase) となることが証明された。Ser<sup>84</sup>-Arg<sup>112</sup>のポリペプチドはジスルフィド結合でキャタリティックドメイン (Ileu<sup>113</sup>-Gln<sup>369</sup>) につながっていることが示された。BAEEaseはN $\alpha$ -ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステルを加水分解する酵素として家蚕幼虫血漿から発見されたが、*in vivo*における基質は同定されていない。ホモロジー検索において、proBAEEaseはイースター (セリンプロテアーゼのひとつ) に最も高い相同性をしめした。イースターはショウジョウバエの初期発生過程においてペリビテリン間隙で働き、胚の背腹軸決定に重要な役割を演じている。イースターの基質はプロシュペツツル (pro-spz) と呼ばれるポリペプチドである。ショウジョウバエの幼虫や成虫が黴に感染するとドロソマイシンと呼ばれる抗カビペプチドの合成が誘導されることが知られている。プロシュペツツルがシュペツツル (spz) へ限定加水分解され、脂肪体細胞上にある受容体 (Toll) に結合することにより、この合成誘導が始まることを示す結果が報告されている。イースターを欠く突然変異体でも、黴が侵入するとドロソマイシンの合成は野生型と同様に誘導されることが観察されている。したがって、イースター以外に、pro-spz をspz へ限定加水分解するプロテアーゼが存在することが予想される。proBAEEaseは黴の細胞壁成分により引き金を引かれるプロテアーゼカスケードの作用で活性化され、一次構造がイースターによく似ているので、BAEEaseがspz 生成に関与しているかもしれないと考えられた。リコンビナントpro-spz を合成して、この可能性を検討した。ショウジョウバエのpro-spz からBAEEaseの作用でspz が生じることが証明された。また、ショウジョウバエにはイースターとは異なるが、proBAEEaseに対する特異抗体に交叉反応するポリペプチドの存在が証明された。

以上のとおり、著者は黴やバクテリアの細胞壁成分により引き金を引かれるプロテアーゼカスケード (フェノール酸化酵素前駆体活性化系) の構成要素であるセリンプロテアーゼ前駆体 (proBAEEase) の活性化機構を明らかにし、その生理機能の究明のために重要な実験を行った。著者はフェノール酸化酵素前駆体活性化系の生理機能について新知見を得たものであり、昆虫の生体防御機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

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。