

学 位 論 文 題 名

Studies on a serine protease zymogen  
of the prophenoloxidase activating system  
of the silkworm, *Bombyx mori*

（家蚕幼虫のフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成する  
新規な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

カビや細菌の感染に対する昆虫の自然免疫作用として、血球細胞による食食や被嚢形成、メラニン合成、抗菌ペプチドの産生などが知られている。メラニン合成は、昆虫の体内に侵入したカビ、バクテリア、寄生虫などの周囲が黒色色素（メラニン）で覆われる現象として観察されている。このメラニン合成を触媒する key enzyme がフェノール酸化酵素（PO）で、昆虫では PO は不活性な前駆体（proPO）として存在し、カビや細菌の感染で引き金がひかれるプロテアーゼカスケード（proPO 活性化系または proPO カスケード）の働きにより活性化される。自然免疫においてカビや細菌を異物として認識するのに重要な役割を担っている分子は、パターン認識タンパクと呼ばれている。パターン認識タンパクは感染微生物に共通に存在する特有の分子構造を認識すると考えられている。昆虫の proPO カスケードの全体像はまだ明らかにされていないが、出発点にパターン認識タンパクが位置している。そのため、proPO カスケードがメラニン合成以外の他の自然免疫作用の発動においても異物認識機構の役割を担っている可能性が指摘されている。家蚕幼虫では  $\beta$ -1,3-グルカン認識タンパクとペプチドグリカン認識タンパクが、それぞれカビと細菌の細胞壁成分である  $\beta$ -1,3-グルカンとペプチドグリカンに特異的に結合する。その結合によってカスケードの引き金がひかれ、まだ明らかにされていない数段階のプロテアーゼ反応を経て、proPO 活性化酵素前駆体（proPPAE）が活性化され、さらに proPO が活性化されると、血液中に存在するチロシンやドーパなどのフェノール性物質を酸化し、生じたキノン類が重合してメラニンとなる。また、proPO の活性化には関わらないプロテアーゼ前駆体 proBAEEase も活性化されるが、生体内での基質や機能は不明である。しかし、活性型のプロテアーゼ BAEEase は、ショウジョウバエの抗菌ペプチドの産生に関わるプロシュベツツルを限定加水分解して活性型のシュベツツルとすることが確認されており、proBAEEase が家蚕で抗菌ペプチドの産生に関わっている可能性が高いと考えられている。昆虫の自然免疫における異物認識の仕組みや自然免疫作用の相互関連を知るために proPO カスケードの全貌を解明することは重要である。本研究では、家蚕幼虫血液から proPO カスケードを構成する新規の因子（factor S）を単離し、cDNA クローニングを行い、この因子のカスケード中での役割について検討した。

家蚕幼虫血液から proPO カスケードが動き出していない状態の血漿画分（以下、プラズマと略称）を得た。このプラズマを陽イオン交換（SP）、Heparin の連結カラムに吸着させ、それぞれのカラムから得られた溶出液（それぞれ SP、Heparin 画分と呼ぶ）と proBAEEase、カルシウムを混合すると、エリシターの存在下でのみ BAEEase 活性が現

れる。そこで、BAEEase 活性の出現に必要な SP 画分の因子 (factor S) の精製を試みた。120 ml のプラズマを硫酸分画後、3 回のクロマトグラフィー操作により約 60  $\mu$ g の精製標品が得られた。精製 factor S 標品は非還元条件下の SDS-PAGE で 42 kDa 付近に 2 本のバンドを与えたので、さらに逆相 HPLC カラムで展開したところ、2 つのピークに分かれた。それぞれのピークを分取して還元条件下の SDS-PAGE で分析した結果、一方のピークからは 29 kDa と 24 kDa に 2 本、もう一方のピークからは 51 kDa に 1 本のバンドが確認された。これらの断片のアミノ酸配列分析の結果、24 kDa と 51 kDa の断片の N 末端からの配列は同じであった。cDNA 塩基配列より推定された factor S の一次構造から判断すると、2 つのピークは同じタンパクに由来し、一方は 51 kDa のタンパクが切断されて 24 kDa と 29 kDa の断片が生じ、2 つの断片がジスルフィド結合で連結しているものと同定された。

次に、factor S のプラズマ中での役割について検討した。抗 factor S 抗体を作り、プラズマに加えてインキュベーション後、遠心し、その上清を抗体処理後のプラズマとした。それにカルシウムと  $\beta$ -1,3-グルカンを加えて活性化反応を行い、PO 活性と BAEEase 活性を測定した結果、両者の活性は現れなかった。そこで、抗体処理後のプラズマに精製 factor S 標品を加えて活性化反応を行ったところ、PO 活性と BAEEase 活性が再び現れた。また、 $\beta$ -1,3-グルカンの代わりにペプチドグリカンを用いて同じ実験を行った場合にも、同様の結果が得られた。これらの事実は、factor S が proPO と proBAEEase の両方の活性化に必要な因子であること、かつ、 $\beta$ -1,3-グルカンとペプチドグリカンのいずれによってカスケードが動き出す場合にも必要な因子であることを示している。

一方、cDNA クローニングの結果より推定された一次構造から、factor S はシグナルペプチドが切断されて細胞外に分泌される 391 アミノ酸残基のセリンプロテアーゼ前駆体と推測され、活性化の際に限定加水分解を受ける部位に特徴的な配列も存在した。

そこで、factor S の活性型 (factor S\*と呼ぶ) の精製を行った。60 ml のプラズマから  $\beta$ -1,3-グルカンによる活性化反応を経て 4 回のクロマトグラフィー操作により、約 2  $\mu$ g の精製標品が得られた。精製 factor S\*標品は非還元条件下の SDS-PAGE で、38 kDa の 1 本のバンドを与えた。また、精製標品のアミノ酸配列分析の結果は、cDNA 塩基配列から推定された factor S の一次構造と一致し、この精製標品が確かに factor S が切断されたものであると同定された。

精製 factor S\*標品に、組み換え体の proBAEEase または proPPAE 産生のための培養上清を加えてインキュベーションし一定時間ごとにサンプリングして、BAEEase または PPAE の活性を測定したところ、factor S\*を加えた場合にのみ、培養上清からそれぞれの活性が検出された。同時に抗 proBAEEase 抗体または抗 proPPAE 抗体を用いたウェスタンブロット分析を行った結果、時間が経過するにつれて、proBAEEase と proPPAE のバンドが少なくなり、活性型の BAEEase と PPAE のバンドが現れた。これらの結果から、factor S\* は proBAEEase と proPPAE を直接、活性化していることが示された。proBAEEase は proPO の活性化には関わっていないので、factor S\* が proPO と proBAEEase の 2 つの活性化系の分岐点に位置することが示唆された。今後、factor S の活性化の機構や factor S\*活性の制御の仕組み、さらには proPO カスケードの全貌を明らかにすることが、proPO カスケードと他の自然免疫作用がどのような有機的なつながりをもって働いているのかについての理解を深めるために必要と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 田 正 憲  
副 査 教 授 木 村 正 人  
副 査 教 授 川 畑 俊一郎 (九州大学理学部)  
副 査 名誉教授 芦 田 正 明 (北海道大学)

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on a serine protease zymogen of the prophenoloxidase activating system of the silkworm, *Bombyx mori*

(家蚕幼虫のフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成する  
新規な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（自然免疫）についての研究が進展し、カビや細菌の侵入により合成誘導される抗菌・抗カビペプチドをコードする遺伝子の転写制御因子や、カビや細菌の侵入により生じたシグナルを受容する受容体に関して、昆虫で得られた知見が脊椎動物の自然免疫についての研究にも大きく貢献している。カビや細菌などの異物（非自己）に対する生体防御機構の発動には、異物を非自己として認識した後、認識したシグナルは増幅されて防御反応を実行する細胞へ伝えられなければならない。昆虫の自然免疫における、この認識、増幅に関して、まだ解明されるべき点が多く残されている。フェノール酸化酵素前駆体（prophenoloxidase, proPO）活性化系（proPOカスケード）は、ごく微量のカビやバクテリアの細胞壁成分で活性化される一種のプロテアーゼカスケードである。proPOカスケードの研究から、ペプチドグリカンや $\beta$ -1, 3-グルカン（pathogen に共通して存在する化学構造、いわゆる pathogen associated molecular patterns, PAMPs）と特異的に結合するペプチドグリカン認識タンパク（PGRP）や $\beta$ -1, 3-グルカン認識タンパク（ $\beta$ GRP）が発見された。その後、PGRPに相同な分子が脊椎動物にも発見され、脊椎動物における自然免疫においてもPGRPは重要な役割を担っていることが明らかにされた。proPOカスケードは昆虫において、カビやバクテリアを非自己として認識し、その認識シグナルを増幅する機構として働いている可能性が指摘され注目を集めている。

このような状況を踏まえ、申請者は、本学位論文において、proPOカスケードの生理機能を解明するためには、proPOカスケードを分子レベルでより深く理解することが必要と考え、家蚕proPOカスケードの未知の構成要素を単離精製し、その性質を調べた。さらに、その構成要素のproPOカスケード活性化における機能を明らかにした。まず、家蚕血液の血漿部分をproPOカスケードの引き金を引かず粗分画する方法を用い、家蚕proPOカスケードが再構成できることを示した。さらに、これまでに同定された家蚕proPOカスケードの構成要素が、どの粗分画々分に含まれ

ているかを検討し、*S fraction*と命名された粗分画々分に未同定の構成要素が、少なくとも一つ存在することを突き止めた。*S fraction*に含まれる未同定の構成要素を*factor S*と命名し、その半定量的検出法を考案した。*factor S*を精製し、cDNAクローニングを行なった。推定一次構造から*factor S*はクリップドメインをN末端側に、触媒ドメインをC末端側に持つトリプシン様基質特異性を示すことが期待されるセリンプロテアーゼ前駆体であることが示された。また、*factor S*の活性型、*factor S\**を精製し、*factor S*の活性化機構を明らかにした。*factor S\**の基質は、フェノール酸化酵素前駆体活性化酵素の前駆体と、*in vivo*における基質が明らかになっていないBAEEaseと命名されているセリンプロテアーゼの前駆体、*proBAEEase*であり、*factor S\**はそれらを活性化することが示された。家蚕*proPO*カスケードは、その経路の途中で、一つは*proPO*活性化経路へ、他方は*proBAEEase*活性化経路と分枝していることが知られている。*factor S*はこの分岐点に位置する構成要素であることが示された。ショウジョウバエでは、受容体*Toll*にリガンド（シュベッツレ）が結合して抗菌・抗カビペプチドの合成誘導シグナルが細胞に伝達されること、シュベッツレはプロテアーゼカスケードの作用でプロシュベッツレから生じることが示されている。ショウジョウバエでは限定加水分解によりプロシュベッツレからシュベッツレを生成する酵素がまだ同定されていないが、BAEEaseはプロシュベッツレに作用してシュベッツレを生成することが示されている。また、無脊椎動物のセリンプロテアーゼカスケードを構成するセリンプロテアーゼ前駆体にはクリップドメインを持つものが多く知られているが、クリップドメインの生理機能についてはほとんど何も明らかにされていない。*factor S*は活性化される際にクリップドメインが遊離されるめずらしいプロテアーゼ前駆体である。遊離されるクリップドメインについての研究から、その生理機能が明らかにされることが期待されている。

以上のように、申請者は、これまで昆虫の自然免疫において、異物認識、認識シグナルの増幅に働いているのではないかと関心を持たれているにも関わらず、その詳細が解明されていない*proPO*カスケードの新規な構成要素を同定し、その役割を明らかにした。この成果は、昆虫の自然免疫における異物認識、認識シグナルの増幅、いくつかの自然免疫反応の相互関連を究明する上で重要な研究成果である。審査委員一同は、本研究を高く評価し、また申請者は、研究者として誠実かつ熱心であり、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。