



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	勝見, 洋一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第3714号
Issue Date	1995-09-29
DOI	https://doi.org/10.11501/3106737
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51285
Type	doctoral thesis
File Information	000000291384.pdf



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

勝見 洋一

①

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

勝見 洋一

目次

緒言	p 1
略号表	p 3
第一章 「セリンプロテアーゼ前駆体、proBAEEase の家蚕幼虫 血漿中からの精製とその活性型 BAEEase の精製。」	p 4
実験方法	p 7
結果	p 17
考察	p 34
第二章 「ProBAEEase の活性化機構と、他の蛋白との相同性」	p 41
実験方法	p 42
結果	p 44
考察	p 57
総合考察	p 62
参考文献	p 64
謝辞	p 73

緒言

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

プロテアーゼの活性制御にはまず最初に遺伝子の転写、翻訳の段階での制御があり、次に蛋白の段階で制御がある (1)。蛋白の段階での重要な活性制御の方法として、前駆体の合成と各種蛋白成分での活性調節が挙げられる。すなわち、大部分のプロテアーゼが不活性型前駆体 (zymogen) として合成され、必要に応じて限定加水分解により不可逆的に活性化をうける。さらに特異的インヒビター、あるいは蛋白性コファクターなどにより活性の調節を受ける (2)。高等生物において生理的刺激を拡大、増幅し、刺激に応答するため複数のプロテアーゼ前駆体が順次活性化をうけるカスケード (cascade) を構成する場合がある。例えば哺乳類やカブトガニの血液凝固系 (3, 4)、哺乳類の補体系 (5) などで、これらのプロテアーゼ前駆体はほとんどすべてがセリンプロテアーゼの前駆体である。特に哺乳類の血液凝固系はセリンプロテアーゼの前駆体、それらの活性型に対する特異的インヒビター、蛋白性コファクターから構成されるカスケードである。その構成要素、活性化経路は非常に複雑で巧みな活性制御を受けている。

カスケードによるプロテアーゼの活性制御は、あらゆる生物にとって重要であるはずだが、脊椎動物以外の動物ではカブトガニの血液凝固系カスケードが詳細に研究されているのみで他の動物群での研究にみるべきものはない。昆虫もその例外ではなく、現在までに昆虫血液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前駆体カスケード (prophenoloxidase

activting cascade: proP0 カスケード) の存在が知られているが、その全容は未だ解明されていない。ProP0 カスケードは昆虫の異物認識や生体防御に深く関わっている事が知られるようになり (6)、このカスケードに対する関心は高まっている。ProP0 カスケードの構成要素の単離、精製、カスケードの再構成は proP0 カスケードの生理的意義を解明する上で重要である。また血液凝固系やフィブリン溶解系のセリンプロテアーゼ前駆体は共通の起源から進化してきたと考えられているが (7)、proP0 カスケードと他の動物群にみられるセリンプロテアーゼ前駆体を含むカスケードの間にどのような関係があるか興味深い。本論文ではフェノール酸化酵素前駆体カスケードの構成要素であり、昆虫血漿中において細菌の細胞壁成分によって活性化をうけるセリンプロテアーゼ前駆体、proBAEEase についての研究結果を報告する。

略号表

フェノール酸化酵素 (phenol oxidase), monophenol,
dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase (EC 1.14.18.1);
proPO, フェノール酸化酵素前駆体;
PPAE, proPO 活性化酵素 (proPO activating enzyme);
proPPAE, PPAE の前駆体; BzArgEt, N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester;
BAEEase, 家蚕血漿画分において発見された BzArgEt を加水分解する酵素 (8);
proBAEEase, BAEEase の前駆体; -NH-Mec, 4-methylcoumaryl-7-amide;
Boc, tert-butoxycarbonyl; Z, benzyloxycarbonyl; Bzl, benzyl;
Glt, glutaryl; Suc, succinyl; Glp, pyroglutamyl;
PhMeSO₂F, phenylmethanesulfonyl fluoride;
H₂N(NH)CPhMeSO₂F, (p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride;
NpGdnBzOH, p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate;
DFP, diisopropylfluorophosphate;
TosLysCH₂Cl, N-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone;
TosProCH₂Cl, N-tosyl-phenylalanyl-chloromethyl ketone;
PheProArgCH₂Cl, D-phenylalanyl-prolyl-arginyl chloromethyl ketone;
AcCN, acetonitrile; DMF, dimethylformamide;
PBAS, proBAEEase activating system; ddw, deionized distilled water;
ODS-カラム, C₁₈-カラム.

第 1 章 セリンプロテアーゼ前駆体、proBAEEase の家蚕幼虫血漿中からの精製とその活性型、BAEEase の精製。

フェノール酸化酵素前駆体カスケードの概要。

昆虫体腔内に侵入したカビの孢子などがメラニン層などによって覆われているのがしばしば観察されている。メラニンは昆虫体液（血液）内に大量に存在するフェノール性物質であるチロシン、ドーパなどがフェノール酸化酵素（phenoloxidase; P0）により酸化されて生成する。通常、昆虫体液内ではフェノール酸化酵素は不活性型前駆体（prophenoloxidase; proP0）として存在するが、昆虫体内にカビやバクテリアなどが侵入した場合活性化を受ける。これらの事実はメラニン生成が昆虫の生体防御や異物認識に深くかかわっていることを示している。家蚕幼虫血漿を使つての研究の結果、proP0 活性化反応は細菌の細胞壁構成成分によって引き金を引かれるカスケード反応であることが明らかにされている（6）。このカスケードはフェノール酸化酵素前駆体カスケード（proP0 カスケード）と呼ばれている。ProP0カスケードは家蚕以外にもゴキブリ（*Blaberus craniifer*）、バッタ（*Locusta migratoria*）などの血球破碎液上清（9,10）、そしてタバコスズメガ（*Manduca sexta*）、センチクバエ（*Sarcophaga bullata*）などの血漿画分（11,12）にもその存在が知られている。

家蚕幼虫血漿の proP0 カスケードについては他の昆虫の proP0 カスケードより研究が進んでいる（6）。現在までに判明している、家蚕幼虫血漿の proP0 カスケードの模式図を図 1 に示した。家蚕幼虫体内にカビやバクテリアが侵入した場合、最初にその細胞壁構成成分である β -1,3-glucan や peptidoglycan がそれぞれの認識蛋白（recognition protein）に認識されることによりカスケ

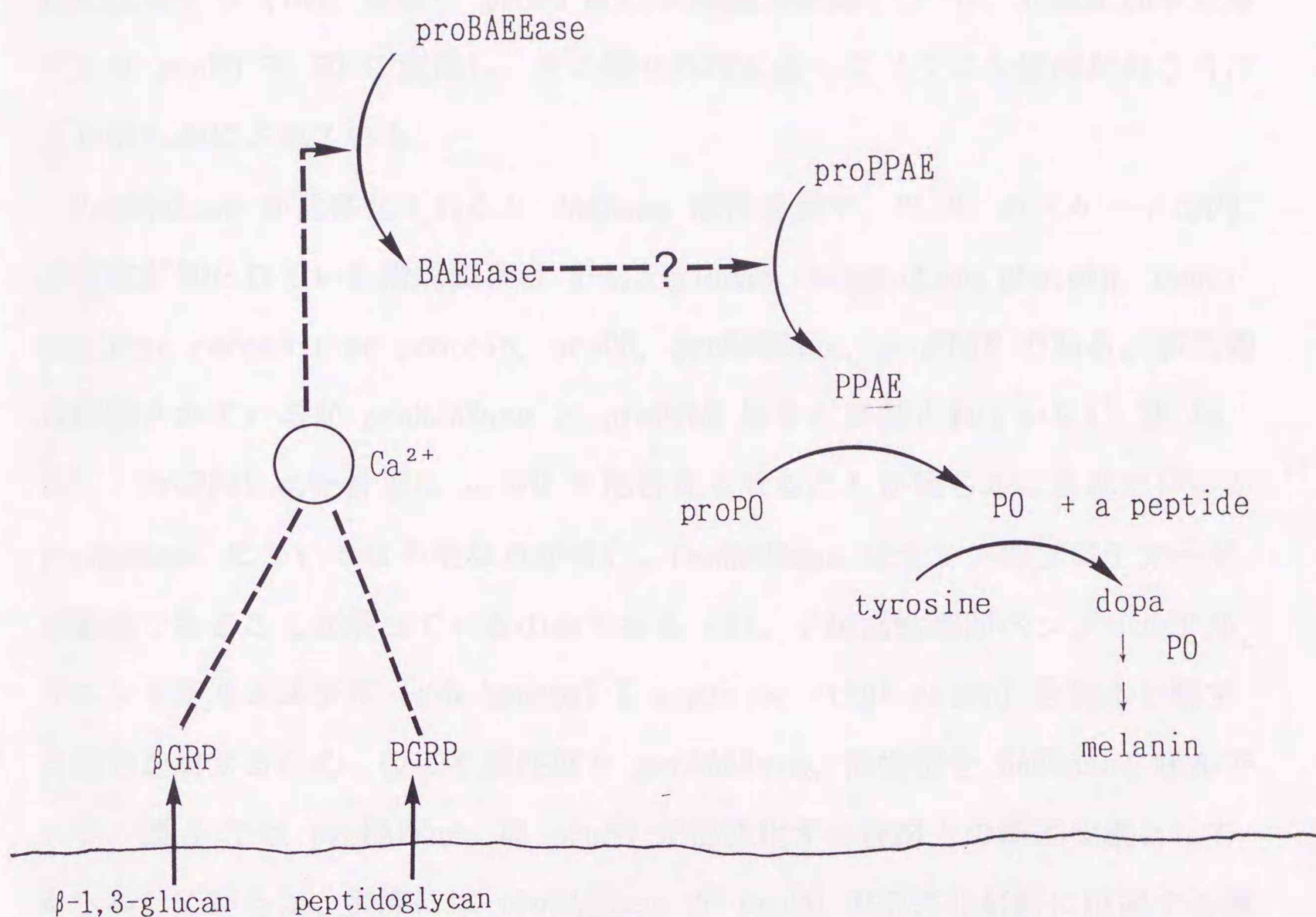


図 1) 家蚕幼虫血漿におけるフェノール酸化酵素前駆体カスケード (proPO カスケード) の概略。

図の点線部分は構成要素等、未解決の経路を示す。

Abbreviations:

βGRP: β-1,3-glucan recognition protein, PGRP: peptidoglycan recognition protein

BAEEase: α-N-benzoyl-arginine ethyl ester を加水分解する酵素として発見された酵素

proBAEEase: BAEEase の前駆体、PPAE: proPO 活性化酵素 (proPO activating enzyme)、

proPPAE: PPAE の前駆体、PO:フェノール酸化酵素 (phenoloxidase)、

proPO: PO の前駆体

ードの引き金が引かれる。その後 Ca^{2+} -dependent な経路を経て 2 種のセリンプロテアーゼ前駆体、proBAEEase と proPPAE が順次活性化される。活性化した proBAEEase すなわち BAEEase は血漿中に存在するインヒビターによって急速に失活する (13)。最後に proP0 activating enzyme (PPAE) が限定加水分解により proP0 を P0 に変換し、その酸化作用によってメラニン生成がおこることが明らかにされている。

ProBAEEase が活性化されると BAEEase 活性を示す。ProP0 カスケードの内存在が知られている構成要素は β -1,3-glucan recognition protein, peptidoglycan recognition protein, proP0, proBAEEase, proPPAE である。前三者は精製されているが proBAEEase と proPPAE はまだ精製されていない (6, 14, 15)。ProPPAE の活性型は proP0 を活性化させることが明らかにされているが proBAEEase については不明な点が多い。ProBAEEase はセリン型プロテアーゼ前駆体であることが解っているのみである (8)。その活性型がベンゾイルアルギニンエチルエステル (α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester) を加水分解する能力を有するため、仮に不活性型を proBAEEase、活性型を BAEEase と呼んでいる。図 1 では proBAEEase は proP0 を活性化する経路上の構成要素としてあらわしているが、実際には proBAEEase が proP0 の活性化経路に位置する構成要素であるということを支持する確実な証拠は得られていない。さらに proBAEEase の活性化の機構、BAEEase の実際の基質、proBAEEase (あるいは BAEEase) の生理機能など proBAEEase に関するほとんどが未解決の問題として残されている。これらの諸点を解明するため本章ではセリンプロテアーゼ前駆体 proBAEEase の家蚕幼虫血漿中からの精製と、その活性型 BAEEase の精製について研究したのでその成果を報告する。

実験方法

実験動物。

家蚕（錦秋×鐘和）は日本農産工業の人工飼料、シルクメイトを餌として与え 25 ℃、光周期（昼 14 時間、夜 10 時間）で飼育した。

試薬。

ザイモサン (zymosan)、p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate (NpGdnBzOH) 大豆トリプシンインヒビター、N-tosyl-phenylalanyl-chloromethyl ketone (TosPheCH₂Cl), N-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone (TosLysCH₂Cl), aprotinine はシグマ から、SDS-PAGE 用分子量マーカー、Econo-Pac HTP cartridge はバイオラッドから、ウルトラフリー (UFCLGL00) はミリポアから pH 4.0-6.5 のアンフォライン、セファデックス G-150 (Sephadex G-150) Q-セファロース (Q-Sepharose)、プレバックカラム (Mono Q column HR 5/5, Superose 12 column HR 10/30) はファルマシア から、フェニルトヨパール (Phenyl-Toyopearl 650 M)、ヘパリントヨパール (Heparin-Toyopearl 650 M) は東ソーから、マイクロ BCA 蛋白定量試薬 (Micro BCA protein assay reagent) はピラス (Pierce) から、7-amino-4-methylcoumarin, 各種 peptidyl-7-amino-4-methylcoumarin, アンチパイン (antipain), ロイペプチン (leupeptin), ペプスタチン (pepstatin), E-64 はペプチド研究所からゲル濾過分子量スタンダード、アンチスロンビン III はベーリンガーマンハイムから、phenylmethanesulfonyl fluoride (PhMeSO₂F), p-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride [H₂N(NH)CPhMeSO₂F], benzamidine, diisopropylfluoro-

phosphate (DFP), リジルエンドペプチダーゼは和光純薬から、トリチウムラベルの DFP ($[^3\text{H}]$ -DFP) (370 GBq/m mole)、Enlightning は DuPont/NEN Research Products から、 ^{14}C -ラベルの分子量マーカー ($[^{14}\text{C}]$ -carboxyl-methylated molecular weight marker) はアマシヤムから D-phenylalanyl-prolyl-arginyl-chloromethyl ketone (PheProArgCH₂Cl) はカルビオケムから、それぞれ購入した。他の試薬は特級を用いた。

ザイモサン (β -1,3-glucan を主成分に含む、酵母の細胞壁成分) 溶液の調製。

ザイモサン溶液は吉田ら (8) の方法に従い調製した。

家蚕血漿画分の調製。

血漿は 5 令熟蚕から芦田 (16) の方法に従い調製し、超遠心 (156,200 g, 2.5 時間, 2 ℃) 後使用した。

血漿 0-50 画分の調製。

血漿画分に対し等容量の飽和硫酸アンモニウム溶液 (pH 6.5) を加え、沈殿を血漿画分の 10 分の 1 容量の 10 mM Tris-maleate buffer, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 6.5 に溶かし、同じバッファー、2 l に対して透析した。その後超遠心 (156,200 g, 2 時間, 2 ℃) し、その上清に等容量の 10 mM Tris-maleate buffer, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, pH 6.5 を加えた。こうして得られた 0-50 画分はおよそ血漿画分の 5 分の 1 容量となった。0-50 画分には proBAEEase 活性化までのカスケードの構成要素がすべて含まれるが、BAEEase のインヒビ

ターは除かれる (13)。

BAEEase 活性の測定法。

BAEEase は最初、家蚕血漿を Ca^{2+} 存在下でザイモサンやペプチドグリカンと反応させたときに現れるエステラーゼ活性として吉田らによって発見されたが(8)、この活性出現のタイムコースは BzArgEt の代わりに合成基質 Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec を用いても同様になった。本報告における BAEEase 活性は Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec を基質として測定したものである。実際の測定は以下のようにおこなった。10 μl の酵素標品を 480 μl の 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.2 と 10 μl の 1 mM Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec と 30 $^{\circ}\text{C}$, 30 分間反応させ 500 μl の 50 % (V/V) 酢酸を加え反応を停止する。この反応液中に生成した 7-amino-4-methylcoumarin を Kojima ら (17) の方法に従い、蛍光分光光度計により励起波長 460 nm、蛍光波長 360 nm で定量した。この条件下で 1 分間に 1 nmol の 7-amino-4-methylcoumarin を遊離させる酵素量を 1 unit とした。

ProBAEEase の定量法。

直接 proBAEEase を活性で定量する方法はまだみつかっていないので、活性型に変換し BAEEase 活性で定量した。ProBAEEase は血漿 0-50 画分によって活性化させた。前述したように血漿 0-50 画分には proBAEEase が含まれているが、定量する試料を Ca^{2+} 存在下、0-50 画分、ザイモサンと反応させると 0-50 画分中と試料中の proBAEEase は活性化される。コントロール(試料の代わりに 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5 を加えた反応混液)と試料を加えた反応混液の BAEEase 活性の差を測定する事によって試料中の proBAEEase を定量した。実際の定量は以下のようにおこなった。25 μl の試料

を 1.5 μ l の 250 mM CaCl_2 , 5.0 μ l のザイモサン溶液 (0.1 mg/ml), 5.0 μ l の血漿 0-50 画分と 25 $^{\circ}\text{C}$, 100 分間反応させた。反応後、コントロールと試料各反応混液の BAEase 活性を測定した。尚、1 unit の proBAEase は活性化後、1 unit の BAEase 活性を与える proBAEase の量と定義した。

P0 活性の測定法。

P0 活性は吉田ら (8) の方法に従って測定した。

ProBAEase の精製法。

全ての操作は 0-4 $^{\circ}\text{C}$ で行なった。但し FPLC system は室温 (15-25 $^{\circ}\text{C}$) で使用した。また特にことわらない限り、遠心は 10,000 g, 10 分間、透析は一晩カラムクロマトグラフィーの流速は 1.0 ml/min でおこなった。家蚕血漿画分 260 ml を出発材料とし、等容量の飽和硫酸アンモニウム溶液 (pH 6.5) をそれに加え一晩攪拌した。沈殿を遠心 (10,000 g, 20 分間) によって集め、26 ml の 10 mM Tris-maleate buffer, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 6.5 に溶かし、0.31 ml の 100 mM DFP を加え 2 l の 10 mM Tris-maleate buffer, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 6.5 に透析し超遠心 (156,000 g, 2 時間) した。この上清 (31 ml) を硫酸画分 (ammonium sulfate fraction) とする。硫酸画分を 10 mM Tris-maleate buffer, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, pH 6.5 で平衡化しておいた Sephadex G-150 カラム (5.0 $\times$ 85 cm) にアプライした。溶出は平衡化に用いたのと同じバッファーを用い、流速 1.02 ml/min で行なった。溶出液は 10.2 ml ずつ分画した。ProBAEase を高濃度に含む画分 (Sephadex G-150 fraction) (図 3A) を 5 l の 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0, 20 % 飽和硫酸アンモニウムに透析し、同じバッファーに平衡化しておいた Phenyl-Toyopearl

カラム (2.0 × 28 cm) にアプライした。同じバッファーで洗浄後、吸着した蛋白を 300 ml の 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0 中、20 % から 0 % 飽和硫酸アンモニウムのグラジエントにより溶出させ 10 ml ずつ分画した。

ProBAEEase を高濃度に含む画分 (Phenyl-Toyopearl fraction) (図 3B) を 2 l の 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0 に透析し、同じバッファーで平衡化しておいた Heparin-Toyopearl カラム (1.2 × 9.0 cm) にアプライした。ProBAEEase を含む画分はカラムを素通りした。素通り画分 (Heparin-Toyopearl fraction) を 2 l の 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 に透析し、同じバッファーで平衡化しておいた Q-Sepharose カラム (1.8 × 11.8 cm) にアプライした。同じバッファーで洗浄後、吸着した蛋白は 150 ml の 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 中、0~0.3 M NaCl のグラジエントによって溶出させ、10 ml ずつ分画した。ProBAEEase を高濃度に含む画分 (Q-Sepharose fraction) (図 3C) を 2 l の 5 mM K-Pi buffer, pH 6.0 に透析し、同じバッファーで平衡化しておいた Econo-Pac HTP Cartridge (プレパックのハイドロキシルアパタイトカラム) にアプライした。同じバッファーで洗浄後、吸着した蛋白を 50 ml のグラジエント (5 mM から 200 mM の K-Pi pH 6.0)、で溶出させ 5 ml ずつ分画した。

ProBAEEase を高濃度に含む画分 (hydroxylapatite fraction) (図 3D) を 2 l の 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 に透析し、同バッファーに平衡化しておいた MonoQ カラムにアプライした。同じバッファーで洗浄後、吸着した蛋白を 25 ml の 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 中、0.1~0.2 M NaCl のグラジエントによって溶出させ 1.5 ml ずつ分画した。ProBAEEase を高濃度に含む画分 (1st. Mono Q fraction) (図 3E) を 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 によって 5 倍に薄め、MonoQ カラム にもう一度アプライし、一度目と同じ条件で溶出させた。こうして得られた proBAEEase を含む画分 (fraction Nos. 17

~19, 図 3F) を proBAEEase 精製標品とした。

ゲル濾過法による proBAEEase の分子量の決定。

ProBAEEase 精製標品 (20 μ g/200 μ l of 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) を 10 mM Bistris-propane buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5 に平衡化しておいた Superose 12 カラム (HR 10/30) に流速 0.5 ml/min でアプライした。標準蛋白として BSA (68 kDa), chicken ovalbumin (45 kDa), chymotrypsinogen A (25kDa) をそれぞれ 2 mg/ml の濃度で 10 mM Bistris-propane buffer, 0.15 M, NaCl pH 6.5 に溶かし、うち 200 μ l ずつ同じ条件でアプライした。

ProBAEEase 精製標品、標準蛋白、それぞれの溶出ボリュームから proBAEEase の分子量を決定した。

ProBAEEase 活性化画分 (proBAEEase activating system: PBAS) の調製法。

ProBAEEase の精製途中で Ca^{2+} 存在下、ザイモサンを加えることにより proBAEEase を活性化する画分が得られた。これを proBAEEase 活性化画分 (proBAEEase activating system: PBAS) と呼ぶ。PBAS は proBAEEase を含まない。PBAS は以下のように調製した。血漿画分から proBAEEase を調製する途中、Phenyl-Toyopearl カラムに吸着した画分を 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0 で一度に溶出させ、2 l の 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0 に透析した。その後 Heparin-Toyopearl カラムにアプライし、その吸着した画分を 10 mM K-Pi buffer, 1 M NaCl, pH 7.0 で溶出させ、1 l の 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5 に対し透析した。こうして得られた画分、PBASの蛋白濃度は 1.91 mg/ml であった。

PBAS を使った proBAEEase 活性化と BAEEase の精製。

精製した proBAEEase (141 μ g protein / 2.9 ml of 20 mM Tris-HCl buffer 0.15 M NaCl, pH 7.5) を 0.25 ml の PBAS, 0.192 ml の 250 mM CaCl_2 , 0.639 ml の 0.1 mg/ml ザイモサンと 25 $^{\circ}\text{C}$, 3.5 時間反応させた後、0.5 l の 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0 に対し透析を 5.5 時間おこなった。透析後、遠心 (10,000 g、10 分間) し不溶性のものを除き、上清を 10 mM K-Pi buffer, pH 7.0 に対して平衡化しておいた Heparin-Toyopearl カラム (0.5 $\times$ 10 cm) にアプライした。素通り画分 (7.0 ml) を 1 l の 5 mM K-Pi buffer, pH 6.0 に対し透析し遠心 (10,000 g、10 分間) 後上清を 5 mM K-Pi buffer, pH 6.0 で平衡化しておいた Koken HCA-GEL C-4603 (プレパックのハイドロキシルアパタイトカラム) にアプライした。同じバッファーで洗浄後、吸着した蛋白を 10 ml の K-Pi buffer, pH 6.0, 5 mM~200 mM のグラジエントにより流速 0.5 ml/min で溶出させた。およそ 84 mM リン酸濃度のところに蛋白のピークがみられ BAEEase 活性のピークと一致した (図 8)。この活性画分を BAEEase 精製標品とした。

BAEEase の [^3H]-DFP による標識と標識された BAEEase のフルオログラフィー

1.06 μ l の 5.73 M DFP を、精製した proBAEEase (19.6 μ g protein / 0.4 ml of 20 mM Tris-HCl buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.5)、89 μ l の PBAS と 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間反応させた。反応後 1 l の 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl pH 6.5 に 12 時間透析して未反応の DFP を除いた。その後反応混液にザイモサン溶液と CaCl_2 を最終濃度がそれぞれ 0.016 mg/ml, 11.1 mM となるように加え 25 $^{\circ}\text{C}$, 2 時間反応させた後、[^3H]-DFP (最終濃度 39.7 μM) と更に氷温で 12 時間反応させた。反応後、0.5 l の 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M

NaCl, pH 6.5 に対し 12 時間透析し、更にウルトラフリーによってその容量がおよそ 60 μ l になるまで濃縮した。この濃縮された反応混液は [3 H]-DFP によって標識された BAEaseを含む。コントロールとして proBAEease の代わりに 20 mM Tris-HCl buffer, 0.15 M NaCl pH 7.5 を含む反応混液を同様に処理した。2 つの反応混液を Laemli (18) の方法に従って還元条件下、2 mm 厚の 12 % アクリルアミドゲルを用いて SDS-電気泳動した。泳動後のゲルは 10 % のトリクロロ酢酸で蛋白を固定化し、さらに ddw で洗浄後、0.3 l の Enlightning:ddw:EtOH (5:3:2, v/v/v) で 1 時間処理し、その後乾燥させた。乾燥後のゲルは X 線フィルムに $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 週間感光させ、その後フィルムを現像した。

精製 BAEase 標品の基質特異性。

精製した BAEase (24.3 μ g/ml of 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl pH 6.5) を 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5 で 10 倍に希釈し、更に BAEase 活性を安定させるため BSA を最終濃度 0.22 mg/ml になるように加え、これを希釈 BAEase 酵素溶液とした。Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec を用いた BAEase 活性測定と同様に、各基質は濃度 20 μ M で $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 分間、pH 8.2 の条件で希釈 BAEase 酵素溶液と反応させた。加水分解によって生じる 7-amino-4-methylcoumarin の濃度を測定した。各基質に対する活性は Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec に対する活性を 100 % としたときの相対活性で示した。Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec を基質とした場合、およそ 10 % の基質がこの実験条件下において加水分解された。

精製 BAEase 標品に対する各種プロテアーゼインヒビターの阻害効果。

希釈 BAEase 酵素溶液を各種プロテアーゼインヒビターと表 3 に示した各濃度で 25 ℃, 30 分間反応させ、その後 BAEase 活性を測定した。各インヒビターの阻害効果はコントロール（インヒビターを加えない場合）を 0 % としたときの相対値で示した。

ProBAEase に対する (p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride, [H₂N(NH)-CPhMeSO₂F] の影響。

10 μl の 10 mM H₂N(NH)CPhMeSO₂F を 90 μl の proBAEase (28.9 μg/ml of 20 mM Tris-HCl buffer 0.15 M NaCl pH 8.2) と 25 ℃, 1 時間反応させて 0.5 l の 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5 に一晩透析した。この反応混液の内 31.0 μl を PBAS 6.0 μl, 250 mM CaCl₂ 1.85 μl, 0.1 mg/ml ザイモサン溶液 6.15 μl と 25 ℃ で反応させ、BAEase 活性を測定した。また H₂N(NH)CPhMeSO₂F の代わりに H₂N(NH)CPhMeSO₂F が溶けている溶媒である AcCN:DMF (3:1, v/v) を proBAEase と反応させ、同様に処理したものをコントロールとした。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (IEF-PAGE)。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は 1 mm の厚さのゲルを用い Laemliの方法 (18) に従って行なった。等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (IEF-PAGE) は Vesterberg の方法 (19) に従って行なった。泳動後、ゲルはそれぞれ Coomassie Brilliant Blue R-250 で蛋白染色した。

蛋白濃度の測定。

蛋白濃度の測定は Smith らの方法 (20) に従って行なった。

結果

ProBAEEase の定量。

実験方法に示したように、proBAEEase は血漿 0-50 % 画分によって活性化しその BAEEase 活性によって定量した。本研究で用いた測定系では、測定に供した proBAEEase の量と観察された BAEEase 活性の間には図 2 に示した様に proBAEEase の量が 400 ng まで直線性が示された。BAEEase の測定はこの範囲内で行なった。

ProBAEEase の精製。

実験方法に示した様に proBAEEase は家蚕血漿画分から硫安分画、Sephadex G-150 カラム、Phenyl-Toyopearl カラム、Heparin-Toyopearl カラム、Q-Sepharose カラム、hydroxylapatite カラム、Mono Q カラム による各種カラムクロマトグラフィーにより精製された (図 3A~F, 表 1)。2 回目の Mono Q カラムの活性画分 (図 3F, fraction Nos.17~19) を proBAEEase 精製標品とした。Phenyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィー (図 3B) で活性の小さいピークが後半に現れたが、この画分についてはこれ以上精製をすすめなかった。表 1 に示した様に 260 ml の家蚕血漿画分から収率 12 %、比活性 3,450 倍の上昇で、およそ 89 μ g の proBAEEase 標品が得られた。精製された proBAEEase 標品は SDS-PAGE において 39 kDa. (還元条件下)、IEF-PAGE において pI 4.55 の位置にそれぞれ一本のバンドを与えた (図 4)。また Superose 12 カラムを用いたゲル濾過では proBAEEase 精製標品は分子量 39 K に相当する位置に溶出された (図 5)。

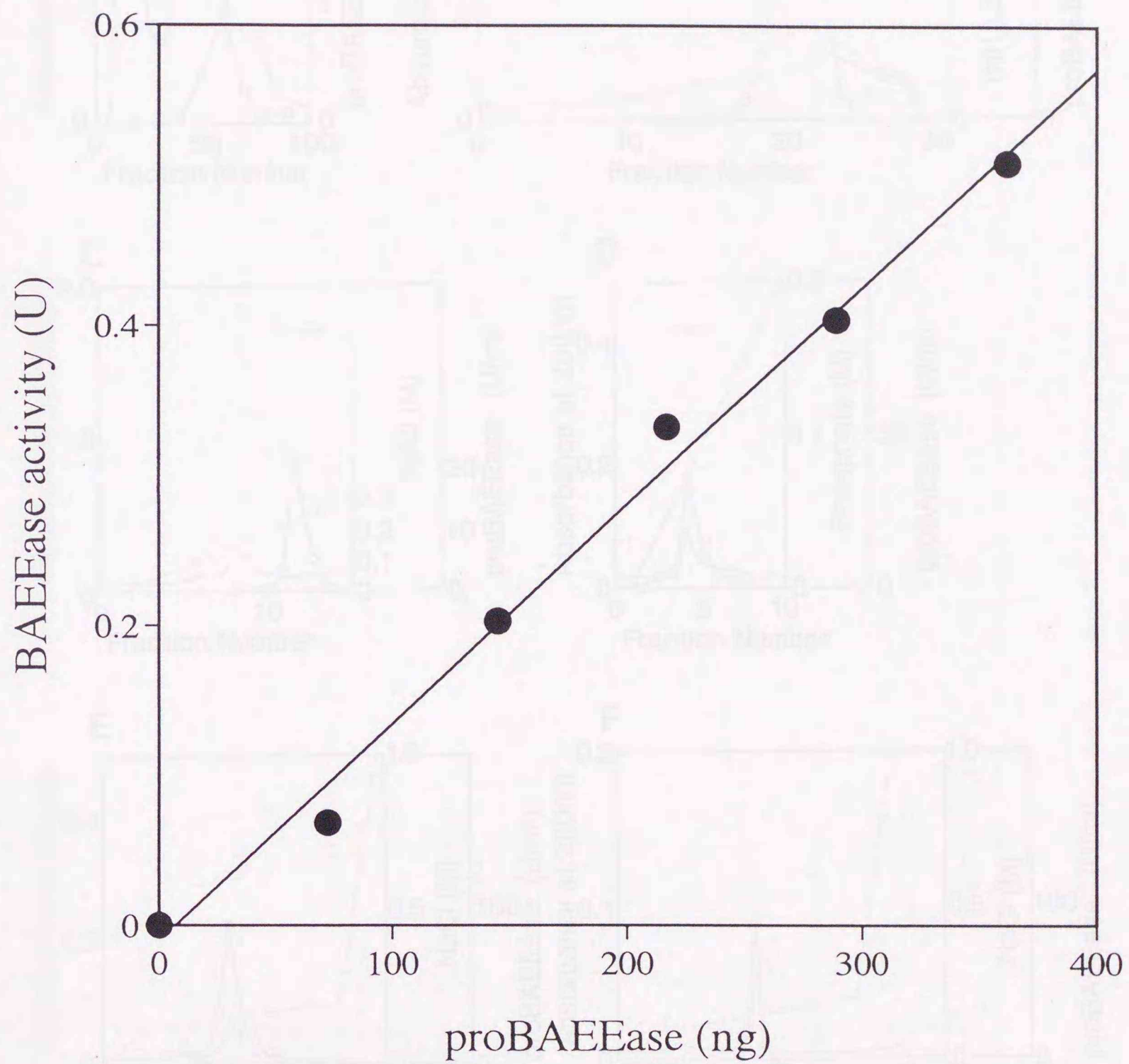


図 2) ProBAEEase の量と BAEEase 活性の関係。

ProBAEEase 精製標品を用い、実験方法に示したように proBAEEase を定量した。
測定に供した proBAEEase の量に対する、観察された BAEEase 活性をプロットした。

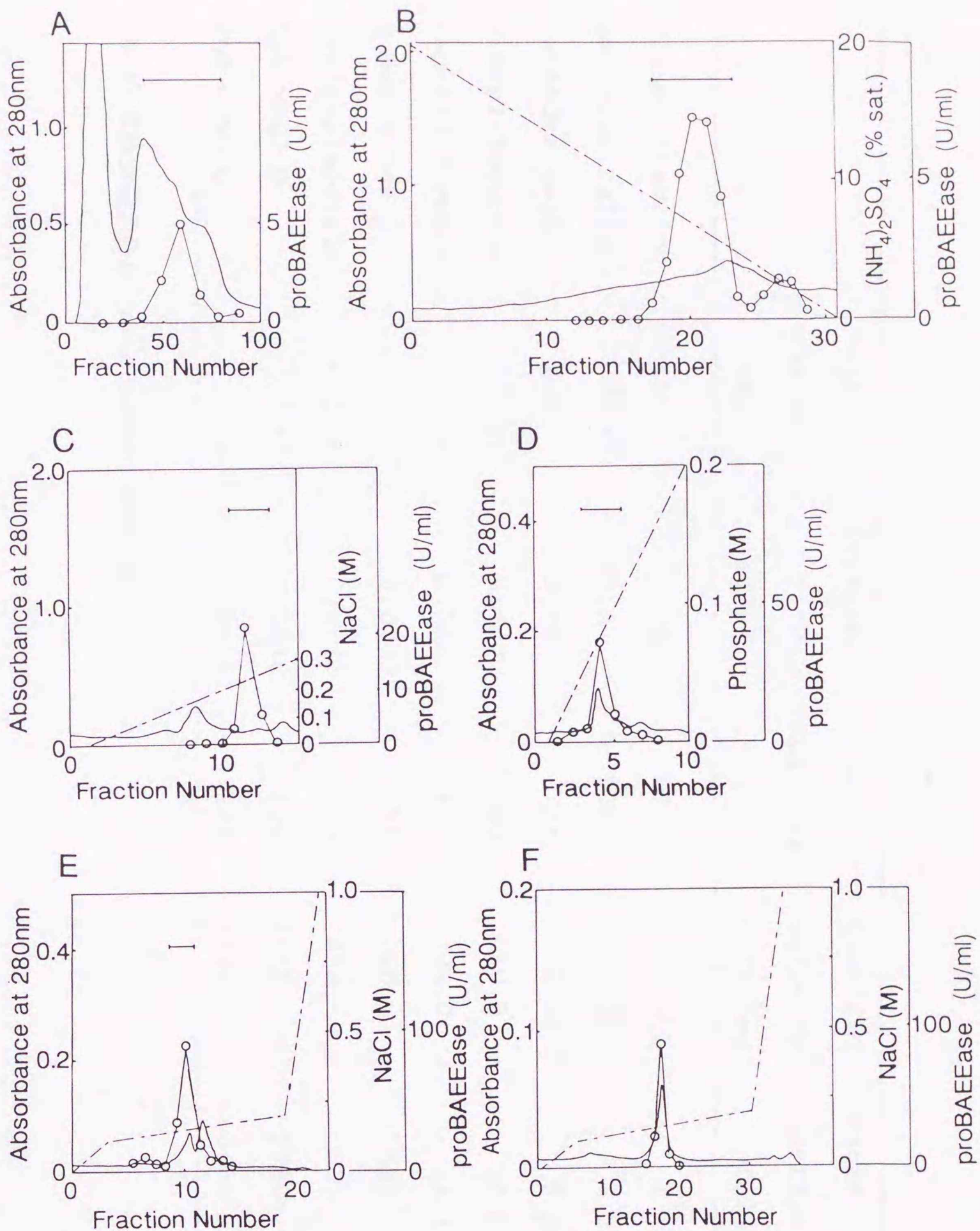


図 3) 家蚕幼虫血漿、硫酸画分からのセリンプロテアーゼ前駆体、proBAEEase の精製。

A, 硫酸画分 (ammonium sulfate fraction) の Sephadex G-150 カラムにおける溶出パターン。B, Sephadex G-150 fractionの Phenyl-Toyopearl カラムにおける溶出パターン。C, Heparin-Toyopearl fraction の Q-Sepharose カラムにおける溶出パターン。D, Q-Sepharose fraction の hydroxylapatite カラムにおける溶出パターン。E, hydroxylapatite fraction の Mono Q カラムにおける溶出パターン。F, Mono Q fraction の 2 回目の Mono Q カラムにおける溶出パターン。A)~E) の図の横棒で示した画分を集め、次のカラムにアプライした。Sephadex G-150 カラム以外のカラムは FPLC system (ファルマシア) を用いてクロマトグラフィーをおこなった。図の白丸、実線、破線はそれぞれ proBAEEase の濃度 280 nm における吸収、溶出液の濃度を示す。他の実験条件は「実験方法」に示した通りである。

	Total volume ml	Protein mg/ml	Total activity U	Specific activity units/mg	Purifi -cation -fold	Recovery %
Plasma fraction	260	9.74	1020	0.403	1	100
Ammonium Sulfate	31.0	27.2	1090	1.29	3.21	107
Sephadex G-150	408	0.790	771	2.39	5.93	75.6
Phenyl-Toyopearl	54.0	0.440	260	10.9	26.8	25.5
Heparin-Toyopearl	56.0	0.268	315	21.0	52.1	30.9
Q-Sepharose	30.0	0.0490	321	218	541	31.5
hydroxylapatite	15.0	0.0676	255	252	625	25.0
1st MONO Q	3.00	0.0488	164	1120	2780	16.0
2nd MONO Q	3.00	0.0295	123	1390	3450	12.0

表 1) 家蚕血漿画分からの proBACEase 精製の概要。

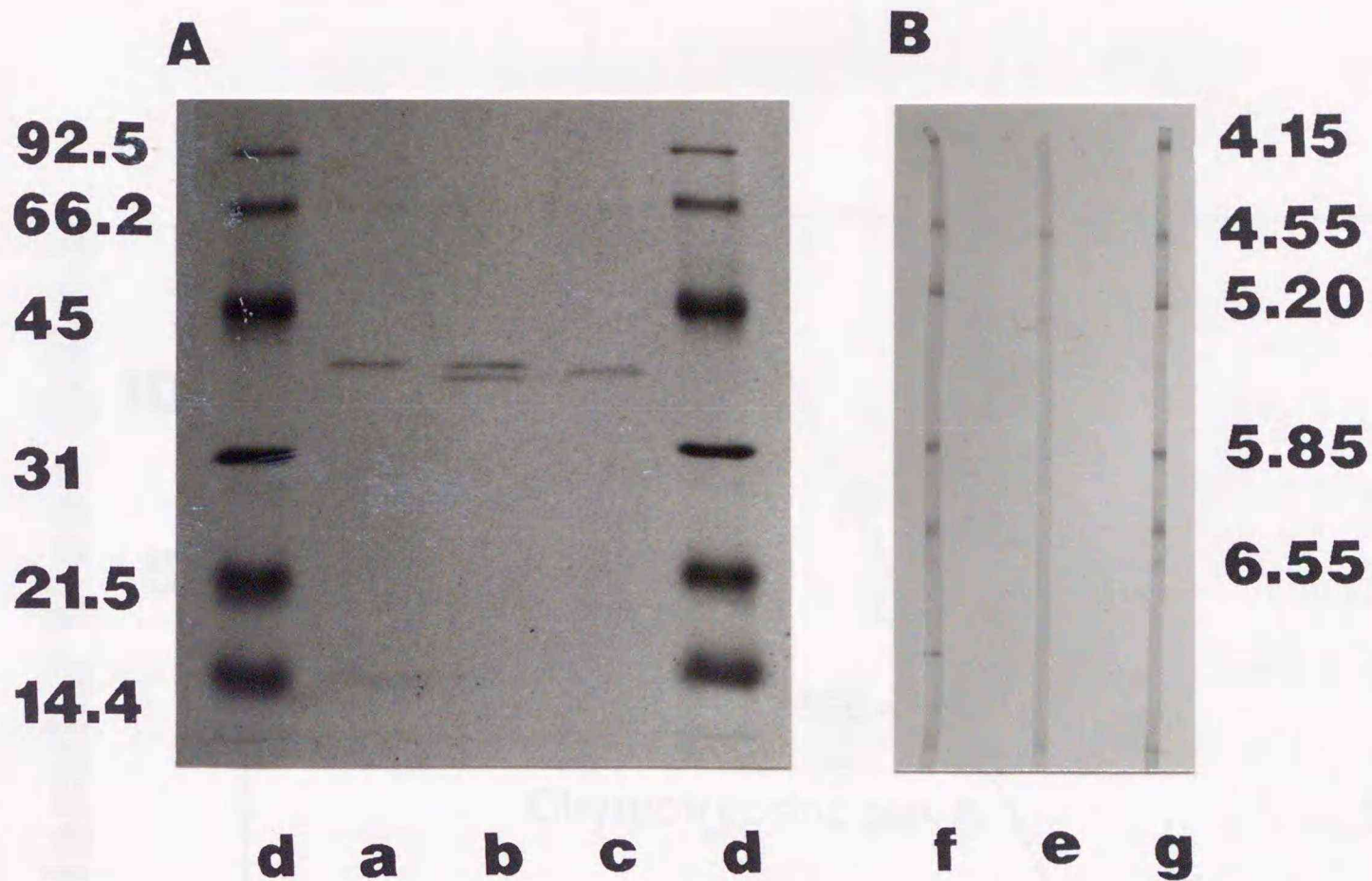


図 4) proBAEEase、BAEEase 精製標品の SDS-PAGE と proBAEEase 精製標品の IEF-PAGE。

A, SDS-PAGE: a, proBAEEase (0.2 μ g); b, proBAEEase (0.2 μ g) と BAEEase (0.2 μ g) を混合したもの; c, BAEEase (0.2 μ g); d, 分子量マーカー。分子量マーカーは phosphorylase b (92.5 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa) と lysozyme (14.4 kDa) で、マーカーの分子量は lane d の左に示した。

B, IEF-PAGE: e, proBAEEase (0.6 μ g); f, proBAEEase (0.6 μ g) と等電点マーカーを混合したもの; g, 等電点マーカー。等電点マーカーは glucose oxidase (pI 4.15), soybean trypsin inhibitor (pI 4.55), β -lactoglobulin A (pI 5.20), bovine carbonic anhydrase B (pI 5.85) と human carbonic B (6.55) で、マーカーの等電点は lane g の右に示した。Lane f において proBAEEase は soybean trypsin inhibitor と同じ位置に移動した。

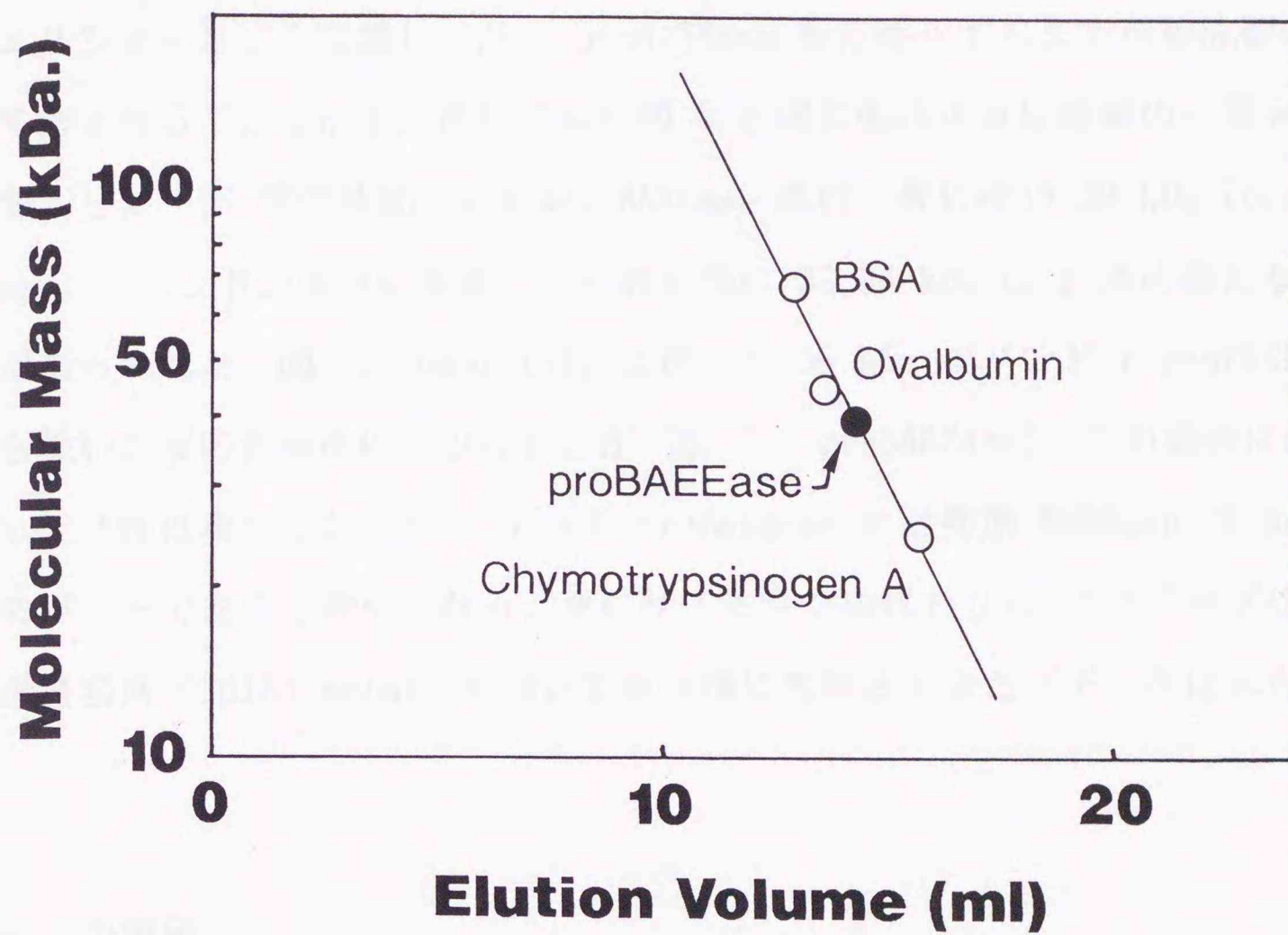


図 5) ゲル濾過カラム (Superose 12 カラム) による proBAEEase の分子量の決定。
各標準蛋白の分子量をそれぞれの溶出ボリュームに対し、対数スケールでプロットした。

ProBAEEase 活性化システム (PBAS) を使った proBAEEase の活性化。

Ca^{2+} 存在下、proBAEEase、PBAS、ザイモサンを反応させると BAEEase 活性が現れた。しかし proBAEEase、PBAS、ザイモサンの内のどれかひとつでも欠けると BAEEase 活性は現れなかった (図 6)。以上の結果は PBAS にはザイモサンをエリシターとして認識してから proBAEEase を活性化するまでの構成要素が全て含まれることを示す。次にこれら図 6 と同じ組成の反応混液の一部を反応時間ごとに SDS-電気泳動した結果、BAEEase 活性上昇に伴い 39 kDa (proBAEEase) のバンドが徐々に薄まり、それと共に 36, 38 kDa の 2 本の新たなバンドがあらわれた (図 7、complete)。このうち 36 kDa のバンドは proBAEEase を除いた反応混液中にもみられたが (図 7、-proBAEEase)、この場合には BAEEase 活性は現れなかった。よって proBAEEase の活性型 BAEEase は 38 kDa のバンドであると考えられる。更にザイモサンの代わりに ペプチドグリカン (最終濃度 0.0137 mg/ml) を用いても同様に再構成できた (データは示さず)。

BAEEase の精製。

実験方法に示したように proBAEEase を Ca^{2+} 存在下、PBAS、ザイモサンにより活性化し、その反応混液中から Heparin-Toyopearl カラム、hydroxylapatite カラムを用いたカラムクロマトグラフィーにより BAEEase を精製した。図 8 に hydroxylapatite カラムでの溶出パターンを示した。141 μg の proBAEEase から 49 μg の BAEEase が得られた。精製された BAEEase は SDS-PAGE において 38 kDa の単一なバンドを与えた (図 4A)。

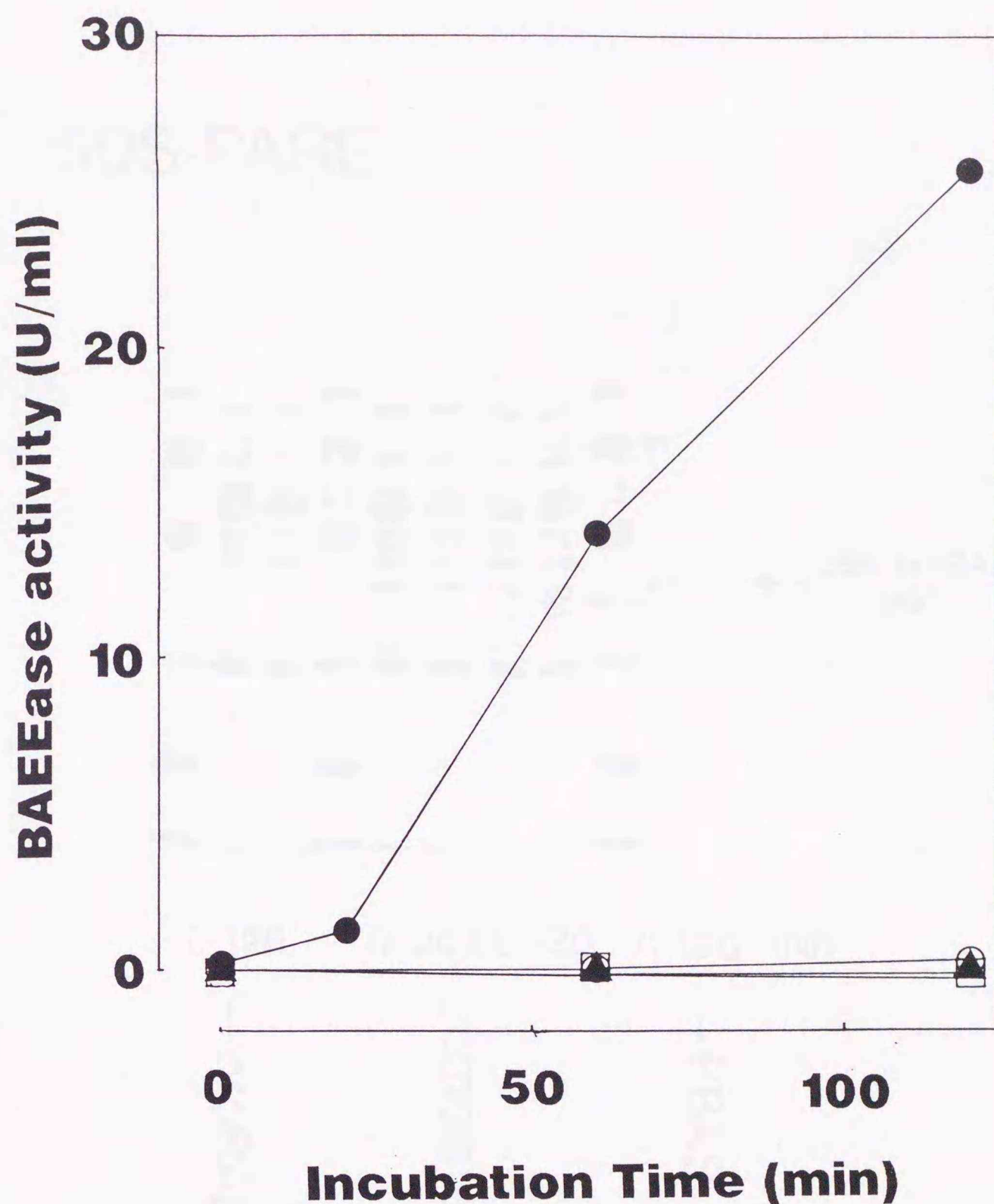


図 6) ProBAEEase activating system (PBAS) による proBAEEase の活性化。

以下に示した反応混液 a)~d) は 25 ℃ で反応させ、反応時間ごとに反応混液の一部をとり、BAEEase 活性を測定した。a) ●--●, 31.0 μ l の proBAEEase (82.8 μ g protein/ml of 10 mM Tris-maleate buffer 0.15 M NaCl pH 6.5), 6.0 μ l の PBAS, 1.85 μ l の 250 mM CaCl_2 , 6.15 μ l の 0.1 mg/ml ザイモサン溶液。b) ○--○, a) に同じ、但しザイモサン溶液を ddw に置き換えて反応させた。c) ▲--▲, a) に同じ、但し proBAEEase を 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5 に置き換えて反応させた。d) □--□, a) に同じ、但し PBAS を 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl pH 6.5 に置き換えて反応させた。

SDS-PAGE

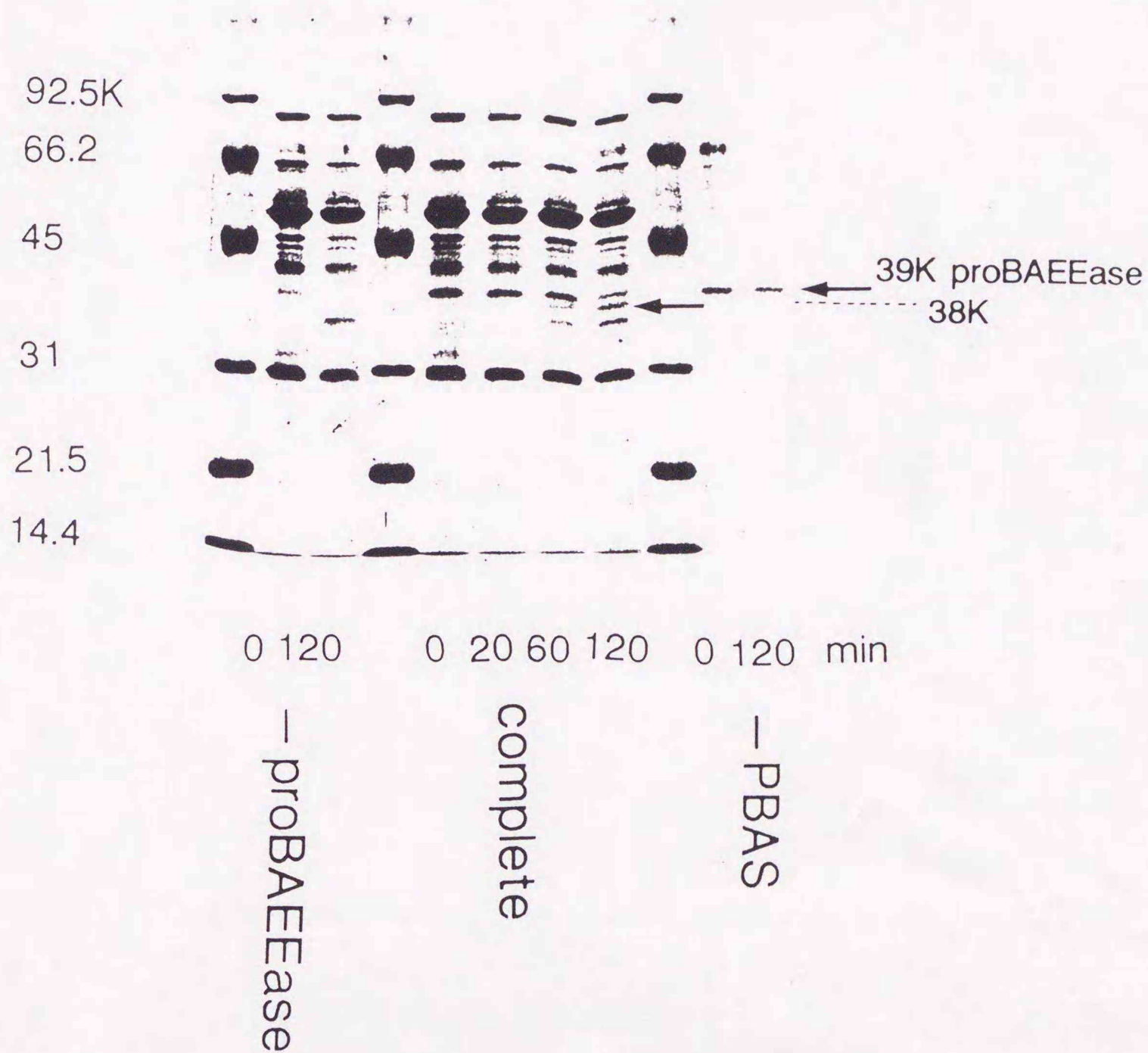


図 7) ProBAEEase 活性化の SDS-PAGE による解析。

図 6) の a), b), d) と同じ組成の反応混液、a) complete, c) -proBAEEase, d) -PBAS の一部を反応時間ごとに取り、還元条件下 SDS-PAGE をおこなった。左端の lane から分子量マーカー、c) の 0, 120 分後、分子量マーカー、a) の 0, 20, 60, 120 分後、分子量マーカー、d) の 0, 120 分後の反応混液をそれぞれ泳動したものである。

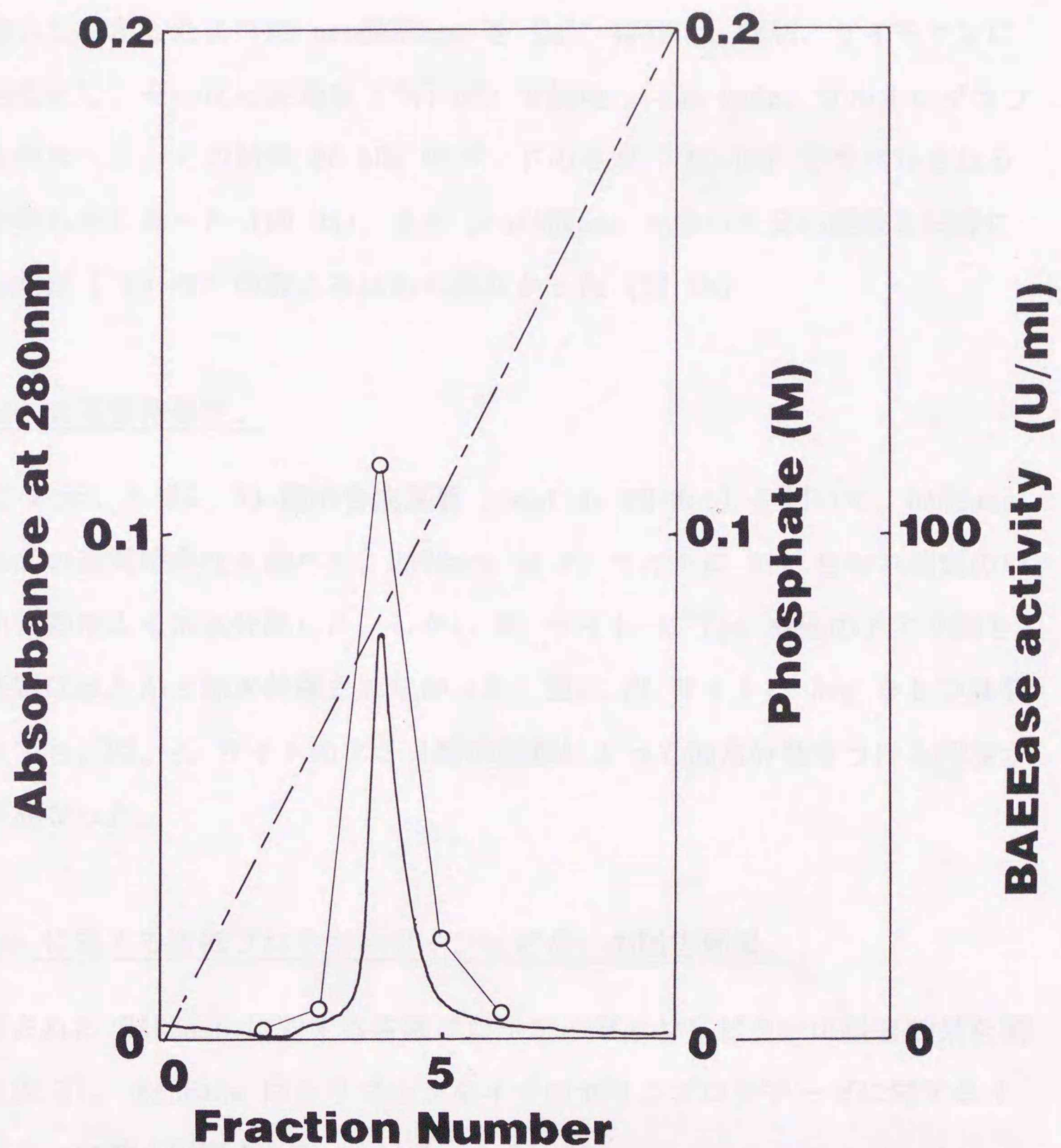


図 8) BAEase の hydroxylapatite カラムクロマトグラフィー。

「実験方法」に示したとおり、proBAEase を活性化させ Heparin-Toyopearl カラムに素通りさせた。その後、素通り画分を hydroxylapatite カラムにアプライした。図の白丸、実線、破線はそれぞれ BAEase 活性、280 nm における吸収、溶出液の濃度を示す。

[³H]-DFP でラベルされた BAEEase のフルオログラフィー。

実験方法に示したように proBAEEase を Ca^{2+} 存在下、PBAS、ザイモサンにより活性化し、その反応混液を [³H]-DFP で処理し SDS-PAGE、フルオログラフィーを行なった。その結果 38 kDa のバンドのみが [³H]-DFP でラベルされることが明らかになった (図 9a)。また proBAEEase を除いた反応混液を同様に処理したが [³H]-DFP の取込みはみられなかった (図 9b)。

BAEEase の基質特異性。

表 2 に示した様に 33 種の合成基質 (peptide-NH-Mec) を用いて、BAEEase 精製標品の基質特異性を調べた。BAEEase は P1 サイトに Arg をもつ基質のいくつかを効率よく加水分解した。しかし P1 サイトに Lys や他のアミノ酸をもつ基質はほとんど加水分解されなかった。更に P1 サイトに Arg をもつ基質であっても、P2、P3 サイトのアミノ酸の種類によって加水分解をうける程度がかなり異なった。

BAEEase に対する各種プロテアーゼインヒビターの阻害効果。

精製された BAEEase に対する各種プロテアーゼインヒビターの阻害効果を調べた (表 3)。BAEEase はトリプシンタイプ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された。しかし soybean trypsin inhibitor, TosLys-CH₂Cl, benzamidine には殆ど阻害効果はみられなかった。BAEEase は Tos-Lys-CH₂Cl, TosPheCH₂Cl にはあまり阻害されず、PheProArgCH₂Cl によって強く阻害を受けた。この結果は BAEEase の基質特異性を反映しているものと考えられる。

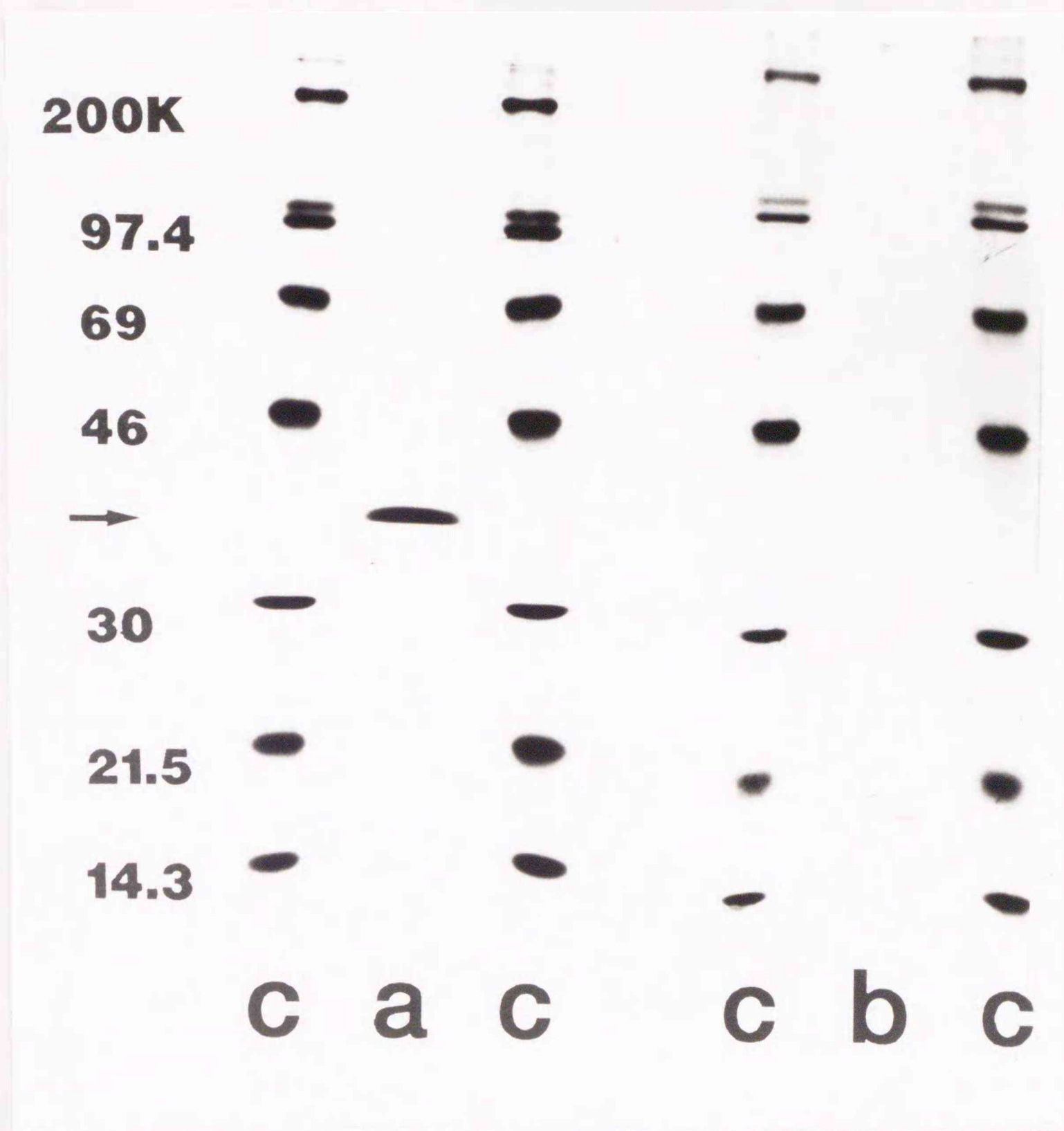


図 9) $[^3\text{H}]$ -DFP によってラベルされた BAEEase のフルオログラフィー。

a) ProBAEEase を Ca^{2+} 存在下、PBAS、ザイモサン によって活性化し、その反応混液を $[^3\text{H}]$ -DFP でラベルした。 b) a) に同じ、但し proBAEEase を 10 mM Tris-maleate buffer, 0.15 M NaCl pH 6.5 に置き換えて反応させた。 その後それぞれの反応混液を SDS-電気泳動しフルオログラフィーをおこなった。 c) $[^{14}\text{C}]$ -カルボキシルメチル化分子量マーカー、myosin (200 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (69 kDa), ovalbumin (46 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.3 kDa) で図の左に分子量を示してある。また矢印は 38 kDa の位置を示す。

基質

加水分解活性 (%)

Arg-NH-Mec	0
Bz-Arg-NH-Mec	4.6
Z-Arg-Arg-NH-Mec	1.1
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-NH-Mec	0
Boc-Gln-Arg-Arg-NH-Mec	120
Glp-Arg-Thr-Lys-Arg-NH-Mec	0
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-NH-Mec	1.4
Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-NH-Mec	28
Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec	100
Boc-Glu(OBzl)-Gly-Arg-NH-Mec	6.0
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-NH-Mec	3.8
Boc-Leu-Gly-Arg-NH-Mec	4.9
Glt-Gly-Arg-NH-Mec	0
Boc-Leu-Thr-Arg-NH-Mec	78
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-NH-Mec	13
Pro-Phe-Arg-NH-Mec	0.1
Z-Phe-Arg-NH-Mec	0.1
Boc-Glu-Lys-Lys-NH-Mec	4.4
Boc-Val-Leu-Lys-NH-Mec	4.8
Leu-NH-Mec	0.1
Glp-NH-Mec	0
Lys-Ala-NH-Mec	0.5
Suc-Ile-Ala-NH-Mec	0.1
Suc-Ala-Pro-Ala-NH-Mec	2.9
Gly-Pro-NH-Mec	0.2
Suc-Gly-Pro-NH-Mec	0.2
Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-NH-Mec	0
Glt-Ala-Ala-Phe-NH-Mec	0.3
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Mec	0
Suc-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-NH-Mec	0.4
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-NH-Mec	2.2
Suc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-NH-Mec	0.1
Z-Val-Lys-Met-NH-Mec	0

表 2) BAEEase の基質特異性。

BAEEase (2.43 $\mu\text{g/ml}$) を各基質 (濃度 20 μM) と 30 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応させた。反応混液は BAEEase 活性を測定する場合と同様の組成である。各基質に対する活性は Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec に対する活性を 100 % としたときの相対活性で示した。

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
None	---	0
PhMeSO ₂ F	1.0	27
H ₂ N(NH)CPhMeSO ₂ F	1.0	99
DFP	1.0	46
NpGdnBzOH	1.0	94
Leupeptin	1.0	88
Antipain	1.0	74
Pepstatin A	1.0	5.3
Soybean Trypsin Inhibitor	0.1	0.2
TosPheCH ₂ Cl	1.0	0.3
TosLysCH ₂ Cl	1.0	0
PheProArgCH ₂ Cl	1.0	94
Benzamidine	10	13
E-64	1.0	3.5
Aprotinin	0.1	12
Antithrombin III	0.015	65
EGTA	5.0	0.6

表 3) BAEEase に対する各種プロテアーゼインヒビターの阻害効果。

BAEEase (2.43 μg/ml) を各種プロテアーゼインヒビターと表に示した濃度で 25 ℃、30 分間反応させ、その後 BAEEase 活性を測定した。阻害効果は何も加えない場合の BAEEase 活性を 0 % としたときの相対値で示した。

ProBAEEase に対する $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ の影響。

BAEEase は $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ によって強く阻害されたが (表 3)、1 mM の $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ で処理された proBAEEase は PBAS、ザイモサンによってコントロールと同様に活性化された (図 10)。以上の結果とインヒビター実験の結果は proBAEEase は $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ 耐性であり、トリプシンタイプのセリンプロテアーゼの前駆体であることを示している。

ProBAEEase の活性化は proP0 (prophenoloxidase) の活性化を引き起こすか？

精製した BAEEase を 10 mM CaCl_2 存在下、血漿画分に加えた。加えた BAEEase の活性は血漿画分にザイモサンを加えたときに現れる BAEEase 活性の 1.3 倍に相当した。25 °C で反応させ、BAEEase 活性と P0 活性を調べた。

図 11 に示した様に BAEEase 活性は血漿中に存在するインヒビターにより 60 分後、約半分になったが、P0 活性は現れなかった。

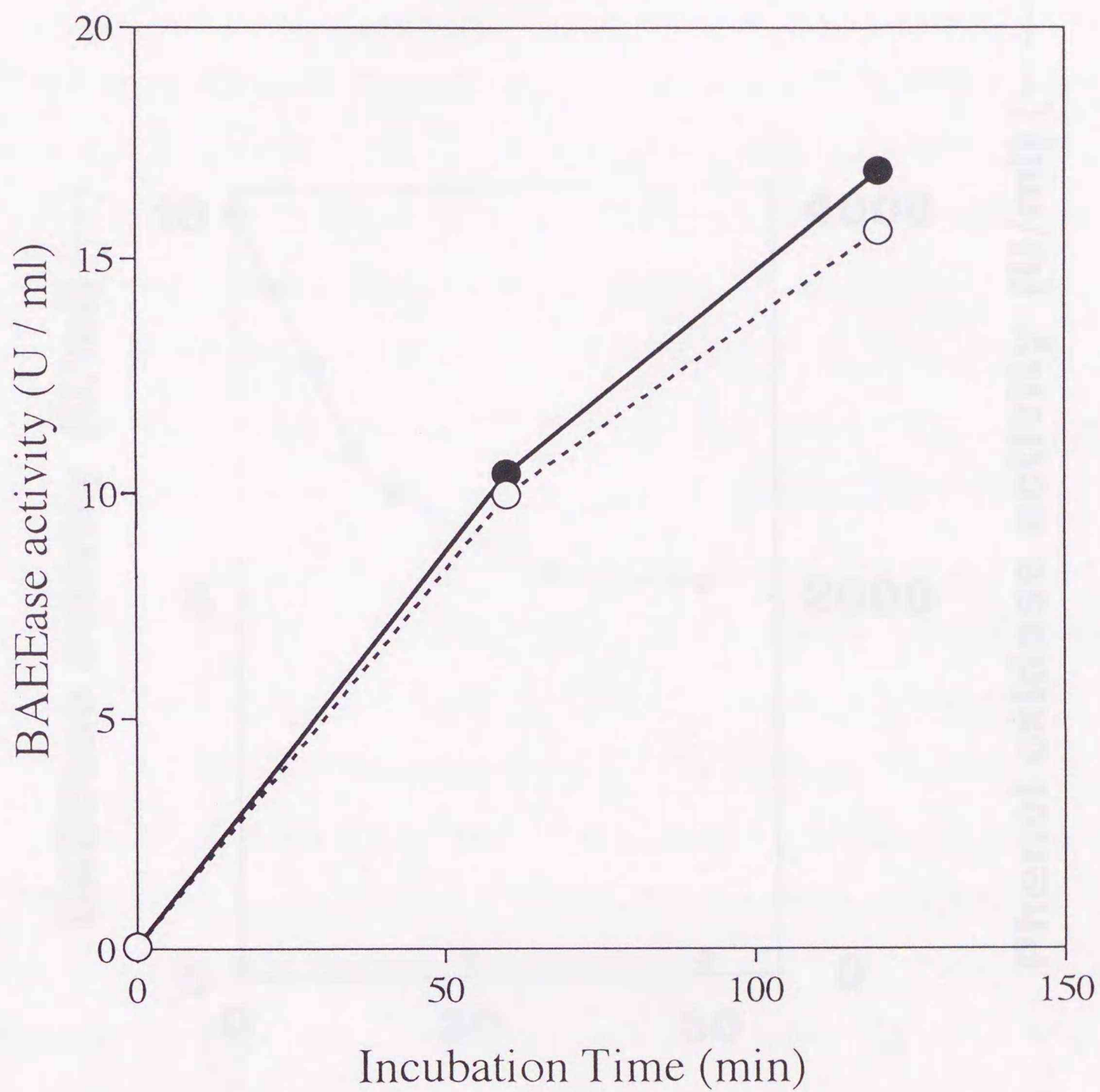


図 10) ProBAEEase に対する $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ の影響。

以下に示した反応混液 a), b) は 25 ℃ で反応させ、反応時間ごとに反応混液の一部をとり、BAEEase 活性を測定した。a) ●—●, proBAEEase を $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ で処理し Ca^{2+} 存在下、PBAS、ザイモサンと反応させた。b) ○--○, a) に同じ、但し $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ の代わりにその溶けている溶媒で proBAEEase を同様に処理した。

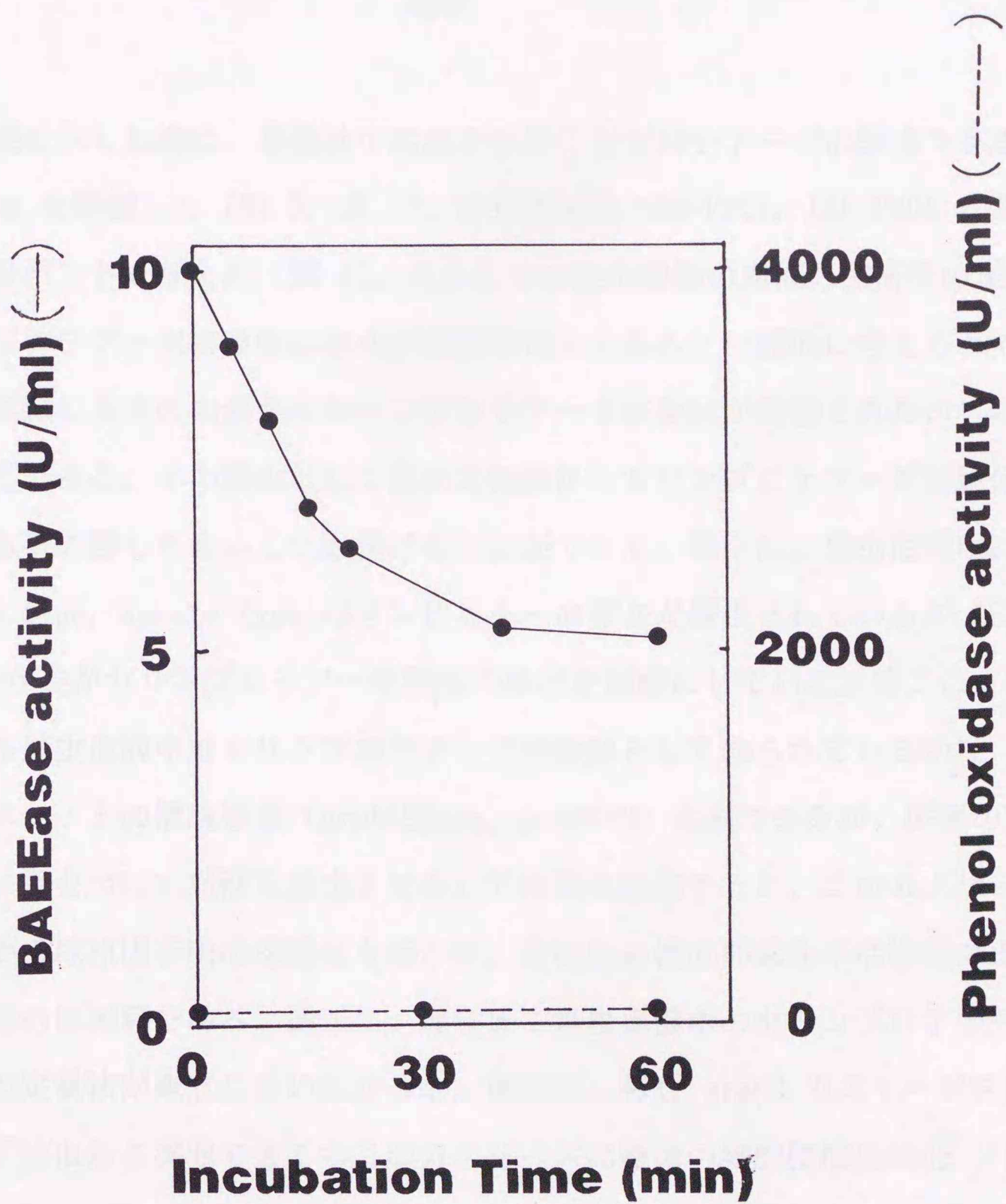


図 11) 血漿中 BAEEase の proPO カスケードへの影響。

60 μ l の血漿を 3.0 μ l の 250 mM CaCl_2 、10 μ l の BAEEase 精製標品 (24.3 μ g/ml) と 25 $^{\circ}\text{C}$ で反応させ反応時間ごとに反応混液の一部をとり、BAEEase 活性と PO 活性を測定した。実線と破線はそれぞれ、BAEEase 活性 と PO 活性を示す。

考察

実験結果に示した様に、家蚕幼虫血液からセリンプロテアーゼ前駆体である proBAEEase を精製した (図 3, 表 1)。精製標品は SDS-PAGE, IEF-PAGE において単一なバンドを与えた (図 4)。昆虫を含む後生動物の血液の恒常性の維持にセリンプロテアーゼ前駆体の存在が必要不可欠であると一般的に考えられているが、実際に昆虫の血液からセリンプロテアーゼ前駆体が精製されたのはこれが初めてである。その理由として昆虫の血液からセリンプロテアーゼ前駆体を精製する事の難しさをいくつか挙げる事ができる。第一に、昆虫血液中には serpin type, Kunitz type のインヒビターの存在が報告されているが (21, 22)、その存在がセリンプロテアーゼ活性の検出を困難にしている。第二に、現在のところ昆虫血液中でセリンプロテアーゼ前駆体として知られているのは proP0 カスケードの構成要素 (proBAEEase, proPPAE) のみであるが、従来の方法 (外皮に傷をつけて血液を放出させる) で血液を採取すると、このカスケードの構成要素は原因不明の活性化を起こす。そのため構成要素を不活性型のまま精製するのは困難である。第三に、現在まで昆虫血液中のセリンプロテアーゼ前駆体の定量法が確立していなかった。第四に、もし proP0 カスケードを活性化させずに血液を採取できてもこのカスケードは細菌の細胞壁構成成分 (β -1,3-glucan, peptidoglycan) によって活性化を受けるので試料の扱いの際には細菌の汚染に注意しなければならない。これらの困難を克服するため、家蚕幼虫血液は芦田の方法 (16) により proP0 カスケードを活性化させずに採取し、proBAEEase の精製の最初の段階で硫安分画によって BAEEase に対するインヒビターを除いた。さらに proBAEEase を定量する方法を開発し、それによって

proBAEEase の精製が可能になった。

家蚕幼虫血液を採取する際、血液は 5 ～6 倍程度薄まる (16) ことを考慮にいれ、表 1 の結果から計算すると家蚕幼虫血液中の proBAEEase の実際の濃度は 1.4 mg～1.7 mg/100 ml であると考えられる。この濃度は脊椎動物の血清中の補体系や、血液凝固系のいくつかの構成蛋白の濃度に相当する (23)。

精製された proBAEEase は SDS-PAGE とゲル濾過で分子量 39 K を示したことから単量体として存在していると考えられる (図 4, 5)。

活性型である BAEEase を精製するため、proBAEEase を Ca^{2+} 存在下で β -1,3-glucan あるいは peptidoglycan によって活性化する画分 (proBAEEase activating system; PBAS) を得た。この画分を使い proBAEEase を活性化し、そこから活性型 BAEEase を精製した (図 6, 8)。この PBAS を用いた proBAEEase 活性化反応を SDS-PAGE によって解析した結果から BAEEase は分子量 38 K であると推定されたが (図 7)、実際に精製された BAEEase も SDS-PAGE において還元条件下、38 kDa の移動度を示した (図 4a)。またフルオログラフイーの結果はこの 38 kDa 蛋白が DFP 反応性であることを示した (図 9a)。BAEEase の基質特異性、各種インヒビターの効果から BAEEase は trypsin-type のセリンプロテアーゼである事がわかった (表 2, 3)。SDS-PAGE をおこなったゲルのフルオログラフイー (図 9a) において、図のバンドの移動度が 38 kDa (BAEEase) を示すか、それとも 39 kDa (proBAEEase) を示すか、正確に判断するのは簡単ではない。しかし、この実験において proBAEEase は最初に大過剰の cold-DFP (12.3 mM) で処理してあるので、もし proBAEEase が DFP と反応性があったとしても [^3H]-DFP と反応させる以前に proBAEEase の反応部位は飽和しているはずである。また BAEEase は DFP や $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ といったセリンプロテアーゼの不可逆性インヒビターに強く阻害をうけるが、pro-

BAEEase は $\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{CPhMeSO}_2\text{F}$ 耐性である (表 3, 図 10)。これら 2 つの事実から、フルオログラフィー (図 9a) のバンドは BAEEase 由来のものであると考えられる。以上の実験結果から以下の事実が明らかになった。

- (a) ProBAEEase はセリンプロテアーゼの前駆体である。
- (b) ProBAEEase は proP0 カスケード中の他の構成要素によって活性化される。
- (c) ProBAEEase は血漿中に細菌の細胞壁構成成分 (β -1,3-glucan, peptidoglycan) を加えることにより活性化する。

33 種の peptidyl-7-amino-4-methylcoumarin を用いて BAEEase の基質特異性を調べた (表 2)。その結果、BAEEase は trypsin-type のセリンプロテアーゼであるが、トリプシンよりも基質特異性が高いことがあきらかになった (24)。実験に用いた peptidyl-7-amino-4-methylcoumarin 中、Boc-Gln-Arg-Arg-NH-Mec と Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec がよい基質となった。前者は *fur* 遺伝子産物として知られ分泌型蛋白質のプロセッシングをおこなうものであり、哺乳類とショウジョウバエにその存在が確認されている (25, 26)。後者はスロンビン (thrombin) のよい基質として知られている (27)。BAEEase のよい基質となっているものは全て P1 サイトが Arg であり、これは BAEEase は基質として P1 サイトに Lys ではなく、Arg を必要とすることを示唆する。しかし今回の実験では、上記の 2 つの合成基質に対する比較として Boc-Gln-Arg-Lys-NH-Mec と Boc-Val-Pro-Lys-NH-Mec を基質として実験できなかったため、P1 サイトが Arg であることが BAEEase の基質となるための絶対条件であると明確に証明することはできなかった。また P1 サイトのみならず、P2 サイトも基質の加水分解されやすさに影響を与えている。例えばこの実験条件では Boc-Leu-Gly-

Arg-NH-Mec は Boc-Leu-Thr-Arg-NH-Mec の 16 分の 1 しか加水分解を受けない。更に Boc-Arg-Val-Arg-Arg-NH-Mec と Boc-Gln-Arg-Arg-NH-Mec や、Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-NH-Mec と Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-NH-Mec と Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec などと比較すると基質の長さ、大きさ、P3 サイトも影響を与えていることが予想された。

図 1 に示したように家蚕幼虫血漿画分には proP0 カスケードの全構成要素が不活性型として含まれている。この血漿画分に BAEase を加えても proP0 の活性化を引き起こさなかった (図 11)。この結果から proBAEase と proP0 の活性化経路について 2 つの可能性が考えられる。第一に proP0 の活性化経路に proBAEase は存在しないという可能性。第二に proBAEase の活性化型にはいくつか種類があって、そのうちの 1 つが proP0 の活性化に関与するが、今回精製された BAEase は proP0 の活性化に関与しない型であるという可能性。第二の可能性を明確に否定することはできないが現時点で、実験結果を素直に解釈するならば第一の可能性、即ち図 12 に示した様に proP0 カスケードは 2 つに枝分かれしていて β -1,3-glucan、peptidoglycan によって活性化すると proBAEase と proP0 の活性化が並行しておこるという可能性がもっとも強いと言える。もしこの考えが正しければ、proBAEase と BAEase の生理的機能は不明ということになる。しかしながら BAEase の基質特異性が高いこと、細菌の細胞壁構成成分によって活性化すること、家蚕血液中には BAEase に対するインヒビターが存在し (13)、BAEase 活性の制御手段が存在することなどを考えると BAEase は何らかのかたちで昆虫の生体防御に関わっている事が予想される。現時点では *in vivo* での BAEase の基質となる物質は同定されていないが、ここでは昆虫血液中で観察される 2 つの現象と BAEase の関係

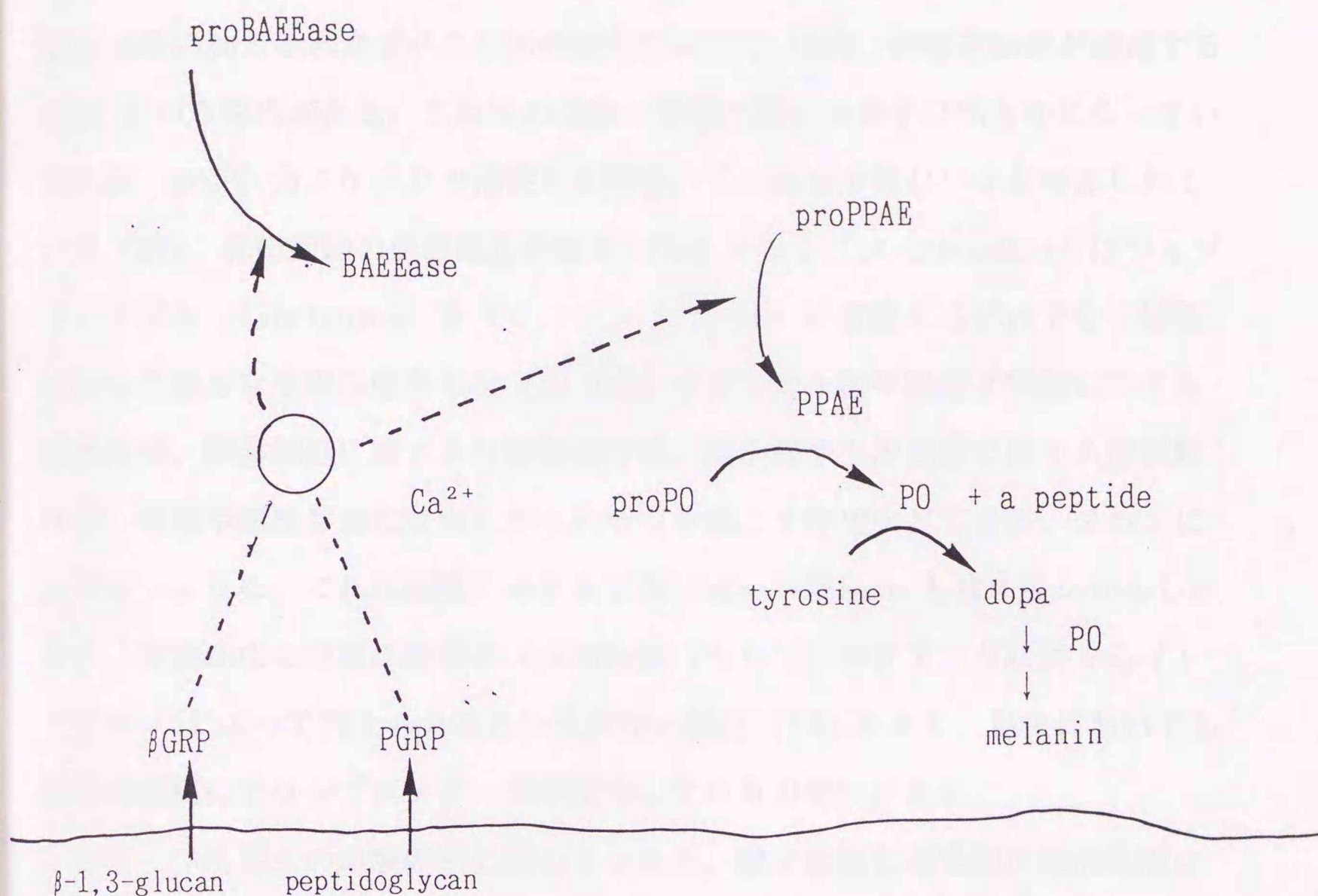


図 12) 図 11 に示した実験結果から予想される、枝分かれしたフェノール酸化酵素前駆体カスケードの概略。

図の点線部分は構成要素等、未解決の経路を示す。

Abbreviations:

βGRP: β-1,3-glucan recognition protein, PGRP: peptidoglycan recognition protein
 BAEEase: α-N-benzoyl-arginine ethyl ester を加水分解する酵素として発見された酵素
 proBAEEase: BAEEase の前駆体、PPAE: proPO 活性化酵素 (proPO activating enzyme)、
 proPPAE: PPAE の前駆体、PO: フェノール酸化酵素 (phenoloxidase)、
 proPO: PO の前駆体

について考察したい。

カビやグラム陰性菌の細胞壁構成成分である β -1,3-glucan や、リポ多糖を昆虫血液に加えるとオプソニン活性が発生したり (28)、血球運動能が増進する (29) という報告がある。これらの現象に実際に関わる分子は明らかになっていないが、proP0 カスケードの活性化が関係しているのではないかと考えられている (28)。脊椎動物の血液凝固系酵素であるスロンビン (thrombin) はフィブリノーゲン (fibrinogen) をフィブリン (fibrin) に変換するだけでなく細胞に対して様々な生理活性をもつ (30, 31)。つまり血小板や繊維芽細胞に対する凝集作用、脾臓細胞に対する分裂促進作用、血小板や上皮細胞に対する脱顆粒作用、単球や繊維芽細胞に対し走化性を引き起こす作用などである。スロンビンがもつような、これら細胞に対する生理活性を BAEase も有するのかもしれない。家蚕幼虫の血球の凝集が NpGdnBzOH (セリンプロテアーゼに対するインヒビター) によって抑えられるという芦田の報告 (16) もあり、昆虫においても血球の凝集にセリンプロテアーゼが関与している可能性がある。

もう一つは昆虫の血液凝固に関してである。節足動物と哺乳類の血液凝固においてセリンプロテアーゼが重要な役割を果たしている。カブトガニの血液凝固はごく微量の細菌細胞壁成分によって引き起こされる。同様の現象はザリガニにおいても観察される (32)。甲殻類においては細菌細胞壁成分によって proP0 の活性化が同時におこるが、この事実は proP0 カスケードと血液凝固カスケードが共通の因子で結ばれている可能性を示している。Bohn と Barwig はゴキブリの血液凝固がセリンプロテアーゼに対するインヒビターによって抑えられなかったと報告しているが (33)、彼らが血液凝固の緒過程の中で本当にセリンプロテアーゼが関与している過程を扱って、その結論を得たのかどうか明確ではない。昆虫の血液凝固にセリンプロテアーゼが関係するかどうか、研究の

進展がまたれる。既に述べたように血液凝固系酵素であるスロンビンのよい基質である Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec は BAEase に対してもよい基質であることは BAEase と血液凝固との関連で留意されるべき事実である。

第 2 章 ProBAEEase の活性化機構と、他の蛋白との相同性。

第 1 章に述べたように proBAEEase は proP0 cascade の他の構成要素によって活性化を受け BAEEase に変換する事がわかった。

第 2 章では proBAEEase の活性化様式を proBAEEase、BAEEase の部分的一次構造解析から検討した。更に一次構造に関する知見をもとに proBAEEase と他の既知の蛋白との相同性を検索したので、その結果についてもあわせて報告する。

実験方法

N-末アミノ酸シーケンス分析。

N-末アミノ酸シーケンス分析は島津プロテインシーケンサー PPSQ-10 を用い、エドマン分解法で行なった (34)。

ProBAEEase, BAEEase の還元ピリジルエチル化とリジルエンドペプチダーゼ消化。

ProBAEEase, BAEEase の還元ピリジルエチル化とリジルエンドペプチダーゼ消化は宮田の方法に従って行なった (35)。

逆相 ODS カラムによるポリペプチドの分離、精製。

逆相 ODS カラムによるポリペプチドの分離、精製は島津 HPLC system を用い、移動相 A: 0.1% TFA / ddw、B: 0.1 % TFA / AcCN、流速 1.0 ml/min で 5 % B → 60 % B (55 min)、60% B → 100 % B (20 min) のグラジエントでおこなった。また逆相 ODS カラムは YMC 社製、YMC-Pack ODS-AP とガードカラムとして YMC-Guardpack ODS-AP を用いた。

ProBAEEase のリジルエンドペプチダーゼ消化。

ProBAEEase (2.1 nmol) を還元ピリジルエチル化し ODS カラム により脱塩精製をおこなった。ProBAEEase のピークを分取しリジルエンドペプチダーゼ消化をおこない、その後逆相 ODS カラムによるポリペプチドの分離、精製をお

こなった。ODS カラムクロマトグラフィーの主なピークについてアミノ酸シーケンスを決定した。

BAEEase の heavy chain, light chain の分離と BAEEase (heavy chain) の リジルエンドペプチダーゼ消化。

BAEEase (0.70 nmol) を還元ピリジルエチル化し ODS カラムにより脱塩、更に light chain, heavy chain の分離をおこなった。コントロールとしてピリジルエチル化に使用した試薬のみを ODS カラムクロマトグラフィーに付し、還元ピリジルエチル化した BAEEase の溶出パターンと比較した。その比較により、light chain が溶出された位置を確認した。得られた light chain はそのままリジルエンドペプチダーゼ消化することなしにアミノ酸シーケンスを決定した。Heavy chain に対してはリジルエンドペプチダーゼ消化をおこない、その後逆相 ODS カラムによるポリペプチドの分離、精製をおこなった。図 15 の act-peak 3,7 についてはアミノ酸シーケンスを決定した。

アミノ酸シーケンスのホモロジー検索。

アミノ酸シーケンスのホモロジー検索は FASTA program によっておこなった (36)。

表 5 において、proBAEEase のリジルエンドペプチダーゼ消化、ODS カラムクロマトグラフィーによって得られたピーク(図 15) のアミノ酸シーケンスについて、ホモロジー検索を行なった。

表中における thrombin B chain (tokay) はトッケイヤモリの thrombin B chain を示す。

結果

ProBAEEase 活性化の際の切断位置の同定。

還元条件下において SDS-PAGE では proBAEEase と BAEEase の分子量はそれぞれ 39 K, 38 K であった (第一章、図 4A)。このことから proBAEEase が限定加水分解を受けること、また切断されるペプチド結合の位置は、N-末からアミノ酸 10 番目程度の場合、あるいは C-末からアミノ酸 10 番目程度の場合の 2 つの可能性が考えられた。そこで proBAEEase (1 nmol) を還元ピリジルエチル化し、アミノ酸シーケンス分析を行なった。その結果、N-末から 31 番目のアミノ酸まで決定する事ができた (図 13a)。また BAEEase (1 nmol) は還元ピリジルエチル化せずにアミノ酸シーケンス分析を行ない、N-末からアミノ酸 10 番目まで分析した (図 13b)。得られた結果を分析すると試料中には並行して 2 つのシーケンス (Ile-Phe-Gly-Gly- と続くシーケンスと、Ser-Ala-Phe-Ser- と続くシーケンスを与えるポリペプチドが存在していたことが示唆された。これらのシーケンスを比較した結果、proBAEEase と BAEEase の一次構造について下に示す a)~c) の事実が予想された。

- a) ProBAEEase は N-末から 29 番目の Arg と 30 番目の Ile の間が切断されることによって活性化する。
- b) ProBAEEase の N-末から 22 番目の Cys は、まだ同定できていない 30 番目以降の Cys と分子内 S-S 結合を形成する。
- c) BAEEase は Ser-1 から始まる light chain と Ile-30 から始まる heavy chain が S-S 結合した 2 本のポリペプチド鎖よりなる。

a) proBAEEase

Ser-Ala-Phe-Ser-Ser-Ala-Gly-Thr-Asn-Ser
¹¹
 -Asn-Pro-Thr-Ser-Ile-Leu-Pro-Asn-Pro-Lys
²¹
 -Val-Cys-Gly-Ile-Gln-Asn-Asn-Asp-Arg-Ile-Phe-

b) BAEEase

	1	2	3
cycle 1	Ile	Ser	Trp
2	Phe	Ala	Asn
3	Gly	Phe	Trp
4	Gly	Ser	Glu
5	Ile	Ser	Pro
6	Gln	Ala	Trp
7	Thr	Gly	Arg
8	Glu	Thr	Asp
9	Ile	Asn	Trp
10	Asp	Ser	Trp

図 13) ProBAEEase と BAEEase の N-末アミノ酸シーケンス。

a) ProBAEEase (1 nmol) を還元ピリジリエチル化し N-末アミノ酸シーケンスを調べた結果。 b) BAEEase (1 nmol) を還元ピリジリエチル化せずに N-末アミノ酸シーケンスを調べた結果。上から順に 1 サイクル目から 10 サイクル目までの結果を示す。各サイクル毎に、多く検出されたアミノ酸を左から順に 1~3 番目まで示した。

(“Ile-30” などのアミノ酸の番号は proBAEEase の N-末からの順番を示す。)

まず c) を証明するため BAEEase を還元ピリジリエチル化し、逆相 ODSカラムにより、予想される light chain と heavy chain の分離を試みた。コントロール (還元ピリジリエチル化に使用した試薬のみ) の溶出パターンと BAEEase の溶出パターンを比較した結果、34.8 % AcCN と 55.4 % AcCN の位置に新たなピークが現れた (図 14、下の図に bar で示してある)。55.4 % AcCN の位置のピークの一部をとり SDS-電気泳動すると 38 kDa の移動度を示した。また 34.8 % AcCN の位置のピークについてアミノ酸シーケンスを調べたところ図 13a に示した Ser-1 から始まって Arg-29 で終わる proBAEEase の N-末から 29 番目までのシーケンスが検出された。これらの結果と図 13b の結果から 34.8 % AcCN と 55.4 % AcCN の位置のピークはそれぞれ BAEEase の light chain と heavy chain であることが推定された。

次に a) を証明するため proBAEEase と BAEEase (heavy chain) の lysyl endopeptidase 消化によるペプチドマッピングをおこなった。ProBAEEase を還元ピリジリエチル化し lysyl endopeptidase 消化をおこない、生じたポリペプチドを ODSカラムによって分離し、主なピークについてアミノ酸シーケンスを調べた。Lysyl endopeptidase とは、Lys-X の間のペプチド結合を特異的に認識して切断する酵素である。図 14 の BAEEase (heavy chain) のピークも同様に lysyl endopeptidase 消化をおこない、生じたポリペプチドを ODS カラムによって分離し、いくつかのピークについてアミノ酸シーケンスを調べた (図 15、表 4)。a)~c)の予想が正しいとすると、proBAEEase と BAEEase

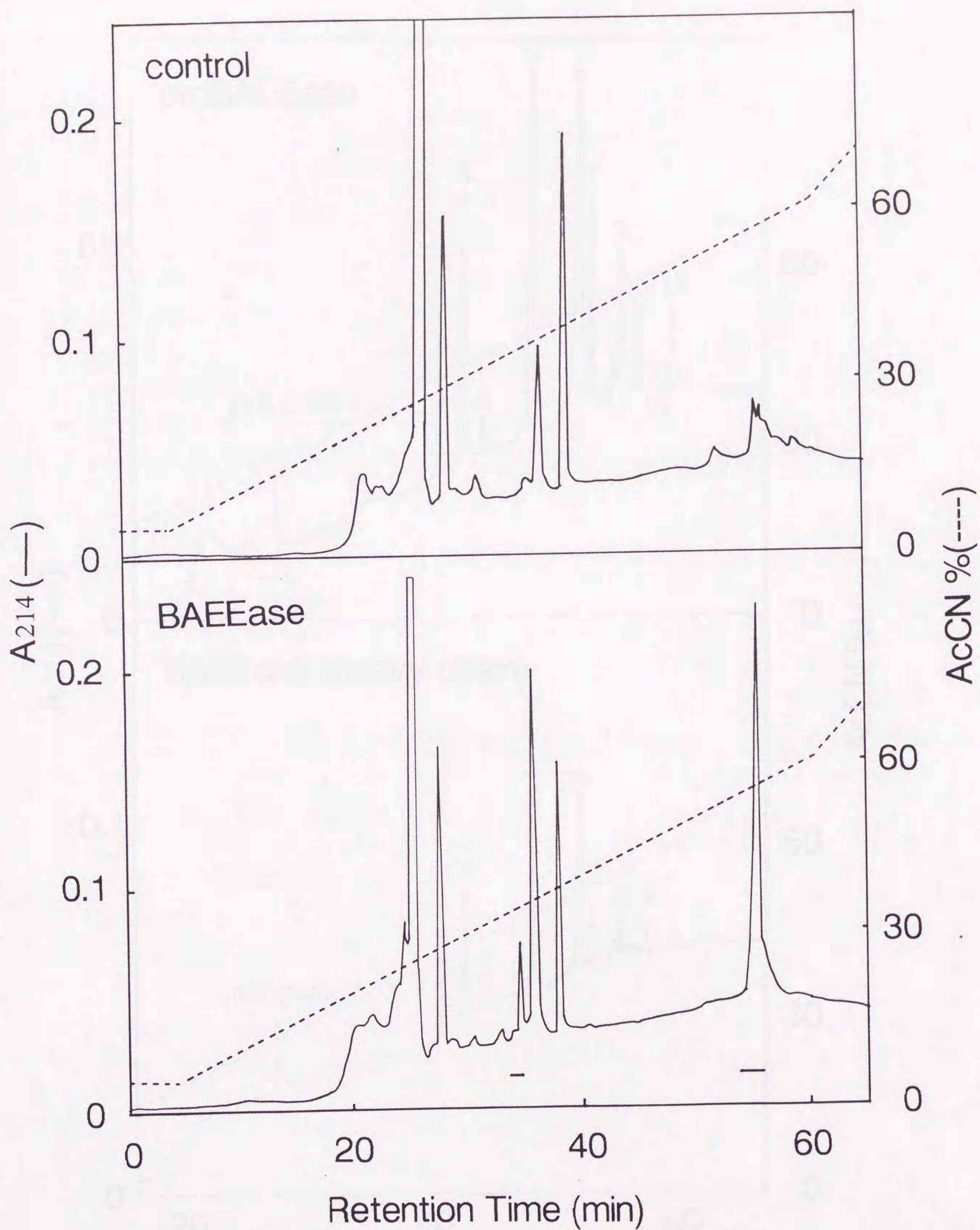


図 14) BAEase の heavy chain, light chain の分離。

BAEEase を還元ピリジリエチル化し ODS カラムにより、heavy chain, light chain の分離をおこなった。コントロールは還元ピリジリエチル化に使用した試薬のみを ODS カラムにアプライしたものである。図の実線、点線、bar、はそれぞれ 214 nm の吸収、AcCN の濃度、34.8 %, 55.4 % の位置のピークを示す。

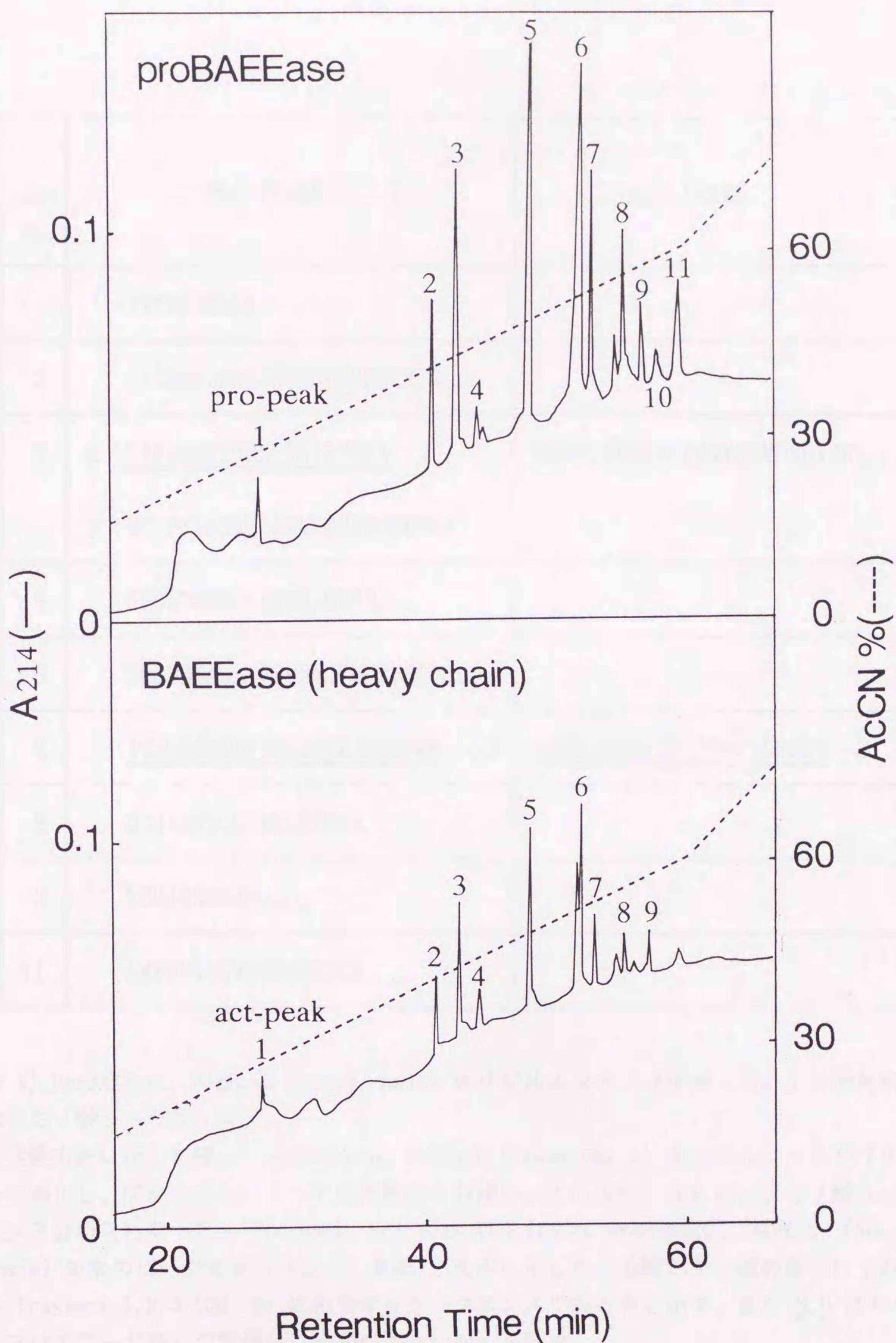


図 15) ProBAEEase, BAEEase (heavy chain) のリジルエンドペプチダーゼ消化で得られたポリペプチドの ODS-カラムクロマトグラフィー。

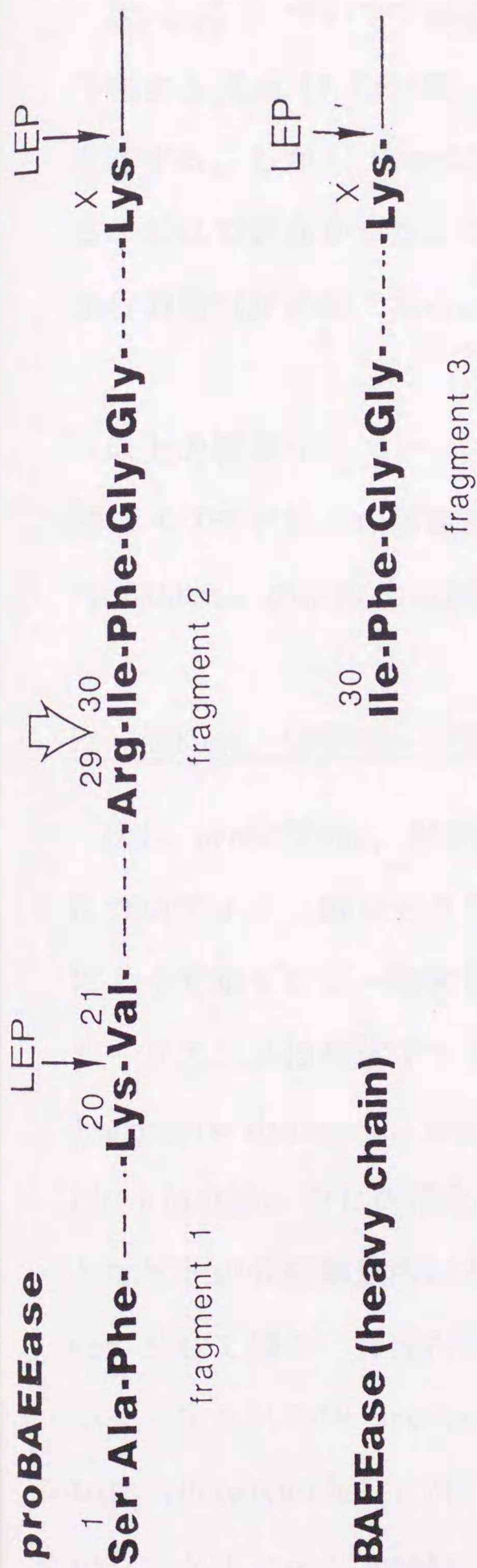
還元ピリジリエチル化した proBAEEase (2.1 nmol)、BAEEase (heavy chain, 0.7 nmol) に対しリジルエンドペプチダーゼ消化をおこない、その結果生じたポリペプチドを ODS カラムにより分離、精製した。図の実線、点線はそれぞれ 214 nm の吸収、AcCN の濃度を示す。

peak No.	PRO-PEAKS	ACT-PEAKS
1	TETRSESDVK	
2	QICAGGLAGRDSCRGD <u>S</u> GGALMGQ...	
3	a <u>SAFSSAGTNSNPTSILPNPK</u> 1 b VRVPIVNREECANVYSNVDRRVTNK	VRVPIVNREECANVYSNVDRRVTNK
5	GFDLPSSWQLWVSRLGVDD...	
6	DQQNDIALLRLSRNAQFNDFVSPICL..	
7	<u>VCGIQNNDRIFGGIQTEIDEHPWM</u> ... 2	<u>IFGGIQTEIDEHPWMALLRYDK</u> 3
8	QLGAGFYCGGVLIAEMYV...	
9	VCGIQNNDRI...	
11	ANNWYVFGVVSYGPSDCG...	

表 4) ProBAEEase, BAEEase (heavy chain) のリジルエンドペプチダーゼによる消化断片のアミノ酸シーケンス。

実験方法に示した様に、proBAEEase, BAEEase (heavy chain) をリジルエンドペプチダーゼ消化し、ODS カラムによって消化断片を分離し、その各ピークに対しアミノ酸シーケンス分析を行なった。Pro-peak, act-peak はそれぞれ proBAEEase, BAEEase (heavy chain) 由来のピークである (図 15 参照)。表中に示した二重線とその後の数字はそれぞれ fragment 1, 2, 3 (図 16) に相当するシーケンスである事を示す。また S, D はセリンプロテアーゼ特有の電荷リレー系の Ser, Asp を示す。

(heavy chain) それぞれの lysyl endopeptidase 消化物から得られるポリペプチドとそのアミノ酸シーケンスを比較すると図 16 に示したような fragment が得られることが予想された。つまり proBAEEase からは Ser-1 から Lys-20 までのアミノ酸 20 個からなるポリペプチド (fragment 1 とする) と Val-21 から Arg-29 をへて、まだみつかってない Lys-X までのアミノ酸からなるポリペプチド (fragment 2 とする) が得られる。また BAEEase (heavy chain) からは Ile-30 から Lys-X までのアミノ酸からなるポリペプチド (fragment 3 とする) が得られ、fragment 2, 3 からカルボキシル基側のポリペプチドに関しては proBAEEase と BAEEase (heavy chain) 消化物は互いに同じ種類のポリペプチドからなる事が予想された。図 15 の各ピークに対して proBAEEase 由来のピークを順に pro-peak 1, 2, 3, ... と、BAEEase 由来のピークを順に act-peak 1, 2, 3, ... と名付けた。表 4 で示したように proBAEEase 由来の主なピークについてアミノ酸シーケンスを調べた結果、図 15 の pro-peak 3 からは並行して 2 つのシーケンス、fragment 1 と一致するシーケンスと Val-Arg-Val- と続き -Asn-Lys で終わるシーケンスが得られた。また pro-peak 7 からは fragment 2 と一致するシーケンスが得られたが、24 番目の Met までしか検出できなかった。Pro-peak 3 と pro-peak 7 に対応する BAEEase (heavy chain) 由来のピーク、act-peak 3 と peak 7 についてアミノ酸シーケンスを調べた結果、act-peak 3 から Val-Arg-Val- と続き -Asn-Lys で終わるシーケンスのみが得られ、fragment 1 に相当するシーケンスは検出されなかった。Act-peak 7からは fragment 3 に相当するシーケンスが得られ、このポリペプチドは 22 番目 が Lys で終わるアミノ酸 22 個からなるポリペプチドであることが解った。よって 図 16 の Lys-X は Lys-51 ということになり、fragment 2 は Val-21 から Lys-51 までのポリペプチドで、fragment 3



fragment 1 SAFSAGTNSPTSILPNPK

2 VCGIQNDR-----K

3 IFGGIQTEID - - - - K

LEP; lysyl endopeptidase

☒ 16) ProBAEEase, BAEase (heavy chain) のリジルエンドペプチダーゼ消化物から予想されるペプチド。

ProBAEEase のリジルエンドペプチダーゼ消化物から図中に示した fragment 1, 2 が、そして BAEase (heavy chain) のリジルエンドペプチダーゼ消化物から fragment 3 にそれぞれ相当するシークエンスが検出されることが予想された。LEP と示した矢印はリジルエンドペプチダーゼによる切断位置を示し、また中抜きの矢印は proBAEEase が活性化を受ける際の切断部位を示す。アミノ酸の上に示した番号は proBAEEase の N-末から何番目のアミノ酸かということを示す。

は Ile-30 から Lys-51 までのポリペプチドであることがわかった。予想された fragment が得られた事によって a) は証明された。

次に b) についてであるが、proBAEEase において N-末から Arg-29 までに存在する Cys は Cys-22 のみであり、今までの結果は強く b) に述べた予想を支持する。しかし Cys-22 がどの Cys と S-S 結合しているのかははっきりさせることはできなかった。この disulfide 結合の位置を同定するにはさらにこれからの解析が必要である。

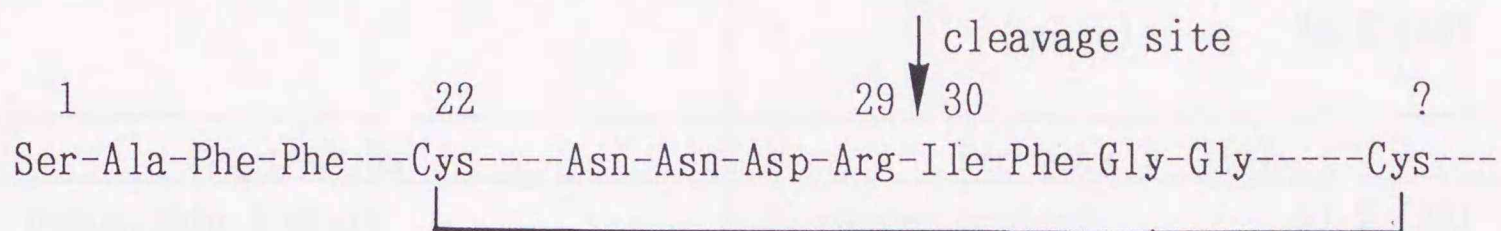
以上の結果から a)~c) に示した様に、proBAEEase は Arg-29 と Ile-30 の間のペプチド結合の限定加水分解により活性化することがわかった。

ProBAEEase の活性化の機構を図 17 に模式的に示した。

ProBAEEase, BAEEase の部分的一次配列によるホモロジー検索。

次に proBAEEase, BAEEase のリジルエンドペプチダーゼ消化物の主なピークについてアミノ酸シーケンスを調べた結果から (表 4)、FASTA program (36) によってホモロジー検索をおこなった (表 5)。表 5 に示した内のいくつかのシーケンスは補体系セリンプロテアーゼ、血液凝固系セリンプロテアーゼ、leukocyte elastase, medullasin などの細胞内セリンプロテアーゼ、pancreatic elastase などの消化系セリンプロテアーゼと相同性があった。Medullasin とはヒトの骨髄細胞内に存在するセリンプロテアーゼでリンパ球に対し mitogen として働き、炎症作用に関与する事が知られている (37)。表 5 に示したシーケンスの内 pro-peak 2, 6, 7, 11 のピークのシーケンスは easter protein (*Drosophila*) と高い相同性 (50~70 %) を示した。Pro-peak 2, 6, 7, 11 のシーケンスと easter protein の対応するシーケンスを実際に表 6 に示

proBAEEase



intra-molecular disulfide bond



LIMITED PROTEOLYSIS

BAEEase

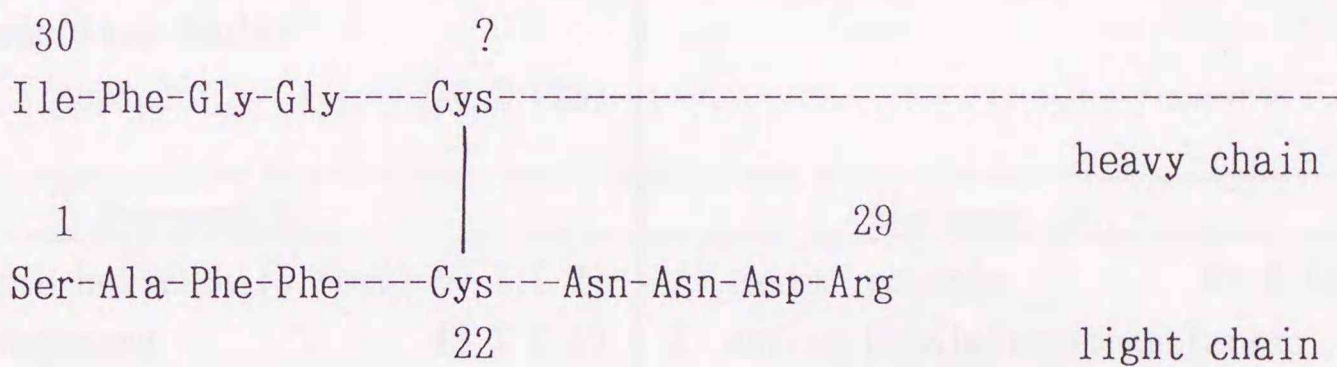


図 17) ProBAEEase の活性化機構。

図 に示した proBAEEase 中の Arg(29)-Ile(30) のペプチド結合が限定加水分解を受けBAEEase に活性化する。BAEEase は 2 本のポリペプチドがジスルフィド結合した構造である。

Pro-peak 2 (Ser)		Pro-peak 6 (Asp)	
1	easter protein 74 % (23)	1	easter protein 62 % (26)
2	complement C1s (human) 60 % (23)	2	thrombin B chain
3	pancreatic elastase 60 % (20)		(tokay) 50 % (24)
		3	(mouse) 46 % (24)
Pro-peak 3a		Pro-peak 7 (↓)	
1	hemoglobin β -chain	1	easter protein 57 % (23)
	(tree sparrow) 56 % (18)	2	factor D (mouse) 38 % (24)
2	(blackbird) 56 % (18)	3	factor D homologue 38 % (24)
3	(Eurasian tree sparrow) 56 % (18)		
Pro-peak 3b		Pro-peak 8	
1	29 K serine protease	1	lekocyte elastase
	(mouse) 33 % (23)		(human) 50 % (18)
2	fibrinogen β -chain	2	medullasin 50 % (18)
	(sea lamprey) 42 % (19)	3	granzyme D (mouse) 50 % (16)
3	Ra-reactive factor		
	(human) 30 % (23)		
Pro-peak 5		Pro-peak 11	
1	dynein heavy chain (rat) 57 % (7)	1	easter protein 64 % (14)
2	transposase 44 % (9)	2	serine C-palmitoyltransferase
3	flagellum-associated		57 % (7)
	protein 38 % (16)	3	dichloromethane dehalogenase
			38 % (16)

表 5) ProBAEEase の部分的一次構造のホモロジー検索の結果。

表 4 の主なシーケンスについてホモロジー検索を行い、各々、相同性が上位 (1~3 位) の蛋白を上から順に、その相同性 (%) と共に下の欄に示した。

相同性をあらわす “74 % (23)” 等の表記は例えばこの場合、アミノ酸 23 個のシーケンスの内、74 % の一致があったことを示す。また pro-peak 2,6 はそれぞれ電荷リレー系の Ser, Asp を、pro-peak 7 は活性化の際の切断部位を含むシーケンスである。

pro-peak 7	↓ VCGIQNNDRIFGGIQTEIDHPWM X:::X PGQCGNILSNRIYGGMKTIDEFPWMAL -10 0 10 ↑
pro-peak 6	DQQNDIALLRSLRNAQFNDFVSPICL .XX ASKNQVDIALLRLAQQVEYTDVFRPICLPLDV 110 120 130
pro-peak 2	QICAGGLAGRDSCRGD<u>SGG</u>ALMGQ X.....:X LEDTQMCAGGKEGVDSRGD<u>SGG</u>PLIGLDTNKN 200 210 220
pro-peak 11	ANNWYVFGVVSYPSPCG .. X.....X KVNTYYFLAGVVSFGPTPCGLA 230 240

表 6) ProBAEEase と easter protein の相同性。

ProBAEEase のアミノ酸シーケンスとそれに相同性の高い、easter protein の部分を実際に比較した。二列の配列の内、上の列が図 15 から得られた proBAEEase のシーケンスで、下の列が easter protein のシーケンスである。S, Dはそれぞれ、電荷リレー系の Ser, Aspを示す。Easter protein のシーケンスの下に数字は活性型 easter protein の N-末からの位置を示している。また各二列の配列の間の X とコロンはアミノ酸の一致を、ドットはアミノ酸の性質のあまり変わらない置換をそれぞれ示す (36)。Pro-peak 2,6 が電荷リレー系の Ser, Aspを含むシーケンスで、pro-peak 7 は活性化の際の切断部位 (矢印)を含むシーケンスである。

した。また pro-peak 2 は補体系の構成因子 C1s と高い相同性を示した。また他のいくつかのピークで血液凝固因子 (thrombin, fibrinogen) と相同性を示した。

Easter protein については trypsin (bovine), thrombin (bovine) との比較によりセリンプロテアーゼ特有の電荷リレー系を構成する His, Asp, Ser の位置が同定されている (38)。その結果 easter protein との比較により、pro-peak 2 の N-末から17番目の Ser、pro-peak 6 の N-末から 5 番目の Asp はそれぞれ電荷リレー系の Ser、Asp であると推定された (表 5,6)。しかし、電荷リレー系の His を含むシーケンスは今回はみつからなかった。

考察

諸言でも既に言及したが、セリンプロテアーゼ前駆体が血液凝固系 (3, 4)、補体系 (5) の様にカスケードを構成している場合、各構成要素は限定加水分解によって順次活性化をうける。哺乳類の血液凝固系の構成は非常に複雑であるが、内因系の構成要素でのセリンプロテアーゼ前駆体である factor XII, prekallikrein, factor XI, IX, prothrombin は分子内 S-S 結合をもち、活性化すると S-S 結合された 2 本のポリペプチド鎖となる事が知られている。今回精製された proBAEEase も限定加水分解 (limited proteolysis) によって活性化し、その結果 S-S 結合された 2 本のポリペプチド鎖となることがわかった (図 17)。

また活性化の際の切断部位を比較すると、proBAEEase は -Arg-Ile-Phe-Gly-Gly- における Arg-Ile のペプチド結合であり、factor XI, X, prekallikrein は -Arg-Ile-Val-Gly-Gly- における Arg-Ile のペプチド結合で、factor XII, IX は -Arg-Ile-Val-Val-Gly- における Arg-Ile のペプチド結合である (39)。このように活性化の際の切断部位に関しても proBAEEase と哺乳類の血液凝固系の構成要素は相同性がみられた。また表 5 において proBAEEase とかなりの相同性を示した easter protein の活性化の際の切断部位は *Drosophila* の突然変異体を用いた実験により、-Arg-Ile-Tyr-Gly-Gly- における Arg-Ile のペプチド結合であることが示されているが (40)、活性化の際の切断部位周辺の一次構造に関しても proBAEEase と easter protein は相同性が高い (表 6 の pro-peak 7)。ProBAEEase が Arg-29 と Ile-30 の間のペプチド結合の限定加水分解により活性化することは、家蚕幼虫血漿と細菌細胞壁構成成分を反応さ

せると血漿中に proBAEEase のこのペプチド結合を限定加水分解する活性が出現することを示唆している。しかもその活性を担うプロテアーゼは proBAEEase 同様、不活性型前駆体で存在し、細菌の細胞壁構成成分によって活性化を受けると考えられる。

還元条件下での SDS-PAGE の結果 (図 4A) から BAEEase を構成する 2 本のポリペプチド鎖の内、light chain は分子量 1,000 程度 (アミノ酸 10 個程度) であると推定されたが、実際にはアミノ酸 29 個 (およそ分子量 4,000) からなっていた。図 4A でこの断片がみえなかったのは CBB 染色の感度の問題であると考えられる。

ProBAEEase の lysyl endopeptidase 消化によって生じたポリペプチドのアミノ酸シーケンス分析により、proBAEEase の全一次配列の約半分に相当するおよそ 150 個のアミノ酸の配列と、活性化の際の切断部位を含む N-末から 51 番目までのアミノ酸の配列が判明した (図 16, 表 4)。ホモロジー検索の結果 (表 5)、proBAEEase はいくつかのセリンプロテアーゼと相同性を示したが、ここでは高い相同性を示した easter protein について説明し、proBAEEase の生理機能の可能性について推定してみる事にする。

ProBAEEase の lysyl endopeptidase 消化によって得られたポリペプチドの内、半分が easter protein と非常に高い相同性を示した (表 5, 6)。Easter protein とはショウジョウバエの形態形成において背腹軸決定に関係する遺伝子 easter の産物で、胞胚期の囲卵腔液 (perivitelline fluid) 中に分布するセリンプロテアーゼ前駆体である (38)。easter 遺伝子は卵を産む雌親の中で転写され、その mRNA かあるいはその翻訳産物が卵に貯えられると考えられている (38, 41)。胚発生の際、腹側の easter protein が活性化され、Toll 産

物のリガンドを産生する。Toll 遺伝子の産物は細胞表面のシグナル受容体であると考えられている。シグナル受容体の活性化により細胞質内の cactus・dorsal のヘテロ二量体から cactus が解離し dorsal が核内へ移行し、転写因子として働く (41, 42)。しかし背側の dorsal は細胞質にとどまる。このようにして背腹軸が決定される。Toll 産物の細胞外領域は血小板 thrombin receptor である glycoprotein 1b と共通部分を持つことから (43)、活性化した easter protein が直接 Toll 産物のリガンドとなる可能性も考えられる。また最近 nudel, pipe, windbeutel, gastrulation defective 各遺伝子の産物が snake 産物 (セリンプロテアーゼ前駆体) を活性化し、活性化された snake が easter protein を活性化するカスケード反応モデルが提起されている (44, 45)。

Drosophila において背腹軸の決定に easter 遺伝子が関与している事は家蚕などにも同じ様な機構が働いている事を暗示している。家蚕などの鱗翅目昆虫にも *Drosophila* における easter に相当する背腹軸を決定する遺伝子の存在を予測できるが、家蚕についてはそのような発生に関与した遺伝子の研究はなされていない。したがって鱗翅目昆虫における easter protein に相当する遺伝子産物と *Drosophila* の easter protein の相同性がどの程度かは全く不明である。ProBAEEase と *Drosophila* の easter protein のシーケンスを比較したときセリンプロテアーゼの活性中心以外でも、60 % 近くの相同性を示す部分がある事は注目に値する (表 5 の pro-peak 11)。Easter protein が雌親の遺伝子産物であること、雌親のどの組織で合成されるのか明確ではない事、proBAEEase は未だその合成場所が明らかにされていない事などを考慮すると次のような大胆な仮説をとる事ができるかもしれない。

「ProBAEEase は複数の機能をもったセリンプロテアーゼ前駆体で、血液内では細菌の侵入により活性化されて生体防御に関わる。また卵形成時には卵黄内に蓄積され、胞胚期には囲卵腔内に分泌され、形態形成に関与する。」

この仮説を検証するには鱗翅目昆虫（家蚕）における *easter* 遺伝子と相同な遺伝子の同定などの様々な研究の積み重ねが必要で、その道程の遠いことは明らかである。しかし、この仮説は本研究の結果があって初めて成立したものであり、今後 proBAEEase について研究を進める場合、無視できない側面であると思われる。近年、昆虫の生体防御と発生に関与する遺伝子の発現が相互に関連を持つ可能性が指摘されているが、その一例を紹介してみることにする。

哺乳類において抗体 (IgG-light chain) やインターロイキンなどの遺伝子の転写は転写調節因子である NF- κ B によって調節される (46)。NF- κ B によって認識される DNA 配列が昆虫においても発見され、しかも抗菌性蛋白 (cecropin, diptercin, attacin, lysozyme) をコードする DNA 配列の上流に存在し、その転写を調節していることが明らかになった (47)。昆虫ではこの配列に結合する蛋白として、Dif という転写調節因子が同定されている (48)。

また昆虫の初期発生の段階で胚の細胞が背側の細胞としての特徴を示すか、腹側の細胞としての特徴を示すかは細胞表面上の受容体 (Toll) にある種のリガンドが結合する事によって決まる (42)。ショウジョウバエの突然変異体で Toll をコードする遺伝子が恒常的に発現している固体では、幼虫の抗菌蛋白を合成する組織 (脂肪体) 細胞の核内に Dif が蓄積していることが観察されている (48)。このことはショウジョウバエで胚の背腹軸決定という発生の一つの過程を支配する機構と抗菌蛋白を合成するという生体防御機構が互いにその一部を共有して存在している可能性を示している。今後の研究の進展によらなけれ

ばはっきりした事はいえないが、現段階では昆虫の発生のある種の過程と生体防御機構は密接に関連している事が研究者での間での共通認識になっている。

ProBAEEase と easter protein の間で相同性が高いという事実は、昆虫の生体防御と発生という一見、関連がないと思われていた現象に関する最近の研究動向に照らして考えると今後の proBAEEase の研究にとって示唆に富むものである。今回 proBAEEase の約半分のアミノ酸の配列が判明した。今後その全配列を決定すると共に proBAEEase 遺伝子の構造を探る事が、proBAEEaseの機能を明らかにする上で必要であると思われる。

総合考察

本論文では、昆虫血漿中に存在し、細菌の細胞壁構成成分によって活性化を受けるセリンプロテアーゼ前駆体 (proBAEEase) について研究した結果を報告した。第一章でも述べたように、proBAEEase は昆虫の血漿中から精製されたセリンプロテアーゼ前駆体としては最初のものである。まだ proBAEEase について明らかでない点が数多く残されている。本研究で明らかになった事実とその事実から生じた今後の課題についてその概略を述べ、総合考察とする。

吉田らによって BAEEase 活性が 1986 年に昆虫血漿中に発見されて以来 (8)、proBAEEase の活性化機構、*in vivo* での基質、生理機能などはずっとわからないままであった。その理由の最たるものは proBAEEase が精製されていないことにあった。吉田の proBAEEase 発見以来、proBAEEase は proP0 を活性化するカスケードの構成要素として信じられてきた。しかし本研究において精製した BAEEase を用いた実験の結果、フェノール酸化酵素前駆体カスケードは枝分かれしていることが強く示唆された。ProBAEEase が proP0 を活性化する経路上にないという事実は、それでは proBAEEase あるいは BAEEase の生理機能は一体何なのかという新しい問いを提示することになった。本論文ではこの問いに答えることはできなかったが、今後その機能を明らかにすることは昆虫の生体防御機構の解明にも貢献すると思われる。

先に述べたように哺乳類の血液凝固系のセリンプロテアーゼ前駆体は互いに相同性が高い。フェノール酸化酵素前駆体カスケードのもう一つのセリンプロ

テアーゼ前駆体である proPPAE はまだ精製されていないが、proBAEEase との一次構造、活性化機構の比較は興味深い。

ProBAEEase が精製できたこと、また proBAEEase の活性化因子が得られた事により、proBAEEase がペプチド結合の限定加水分解により活性化されることを明らかにする事ができた。この事実は proBAEEase を活性化する因子もプロテアーゼであることを示している。この proBAEEase 活性化酵素の単離、精製が期待される。

細菌の細胞壁構成成分によって引き金を引かれる 2 つの経路、一方は proBAEEase を活性化し、また一方は proP0 を活性化する。この枝分かれしたカスケードの構成要素の間にいくつ共通の要素があるか明らかではない。これらの経路の関係、例えばどこの構成要素で枝分かれしているか、などという問題は今後、proP0 カスケードを解析する上であきらかにすべき重要な点だと思われる。

最後に、やはり BAEEase の *in vivo* での基質は何であるかという問題が重要である。これは BAEEase の機能に関係してくる。第 1 章では哺乳類の血液凝固系酵素であるスロンビンとの関係で BAEEase の機能について考察した。また第二章においてホモロジー検索の結果、proBAEEase が *Drosophila* の発生に関係する easter protein と非常に相同性が高い事が明らかになったが、これは今後の proBAEEase についての研究を進める上で考慮すべき側面である。

参考文献

- 1) 高橋健次 (1993) プロテアーゼの活性制御, 現代化学 増刊 22, pp 3-9. 東京化学同人
- 2) Neurath, H. and Walsh, K. A. (1976) Role of proteolytic enzymes in biological regulation (A review), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3825-3832.
- 3) Davie, E. W., Fujikawa, K., Kurachi, K. and Kisiel, W. (1979) The role of serine protease in the blood coagulation cascade, *Adv. Enzymol.*, 48, 277-318.
- 4) Iwanaga, S. (1993) Primitive coagulation system and their message to modern biology, *Thrombosis and Haemostasis*, 70, 48-55.
- 5) Reid, K. B. M. and Porter, R. R. (1981) The proteolytic activation systems of complement, *Ann. Rev. Biochem.* 50, 433-464.
- 6) Ashida, M. and Yamazaki, H. (1990) Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation, *Molting and Metamorphosis* (E. Ohnishi

and H. Ishizaki., eds.), 239-265. Springer-Verlag, Berlin.

- 7) Patthy, L. (1985) Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules, *Cell*, 41, 657-663.
- 8) Yoshida, H. and Ashida, M. (1988) Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, *Insect Biochem.*, 16, 539-545.
- 9) Leonard, C. Söderhäll, K. and Ratcliffe, N. A. (1985) Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* Haemocytes, *Insect Biochem.*, 15, 803-810.
- 10) Brehélin, M. Drif, L. Baud, L. and Boemare, N. (1989) Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*, *Insect Biochem.*, 19, 301-307.
- 11) Saul, S. J., Sugumaran, M. (1987) Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 5, 1-11.

- 12) Saul, S. J., Sugumaran, M. (1988) Prophenoloxidase activation in the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 7, 91-103.
- 13) Ashida, M. and Sasaki, T. (1994) A target protease activity of serpins in insect hemolymph, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24, 1037-1041.
- 14) Ochiai, M. and Ashida, M. (1988) Purification of a β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, *J. Biol. Chem.*, 263, 12056-12062.
- 15) Ashida, M. (1971) Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 749-762.
- 16) Ashida, M. (1981) A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, *Insect Biochem.*, 11, 57-65.
- 17) Kojima, K., Kinoshita, T., Kato, T., Takada, K. and Sakakibara, S. (1979) A new and highly sensitive fluorescence assay for collagenase-like peptidase activity,

Anal. Biochem., 100, 43-50.

18) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

19) Vesterberg, O. (1972) Isoelectric focusing of protein in polyacrylamide gels, *Biochim. Biophys. Acta.*, 257, 11-19.

20) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchonic acid, *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.

21) Ramesh, N., Sugmaran, M. and Mole, J. E. (1988) Purification and characterization of two trypsin inhibitors from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae, *J. Biol. Chem.*, 263, 11523-11527.

22) Eguchi, M. (1993) Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors (A review), *Comp. Biochem. Physiol.*, 105 B, 449-456.

23) Lorand, L. (1981) Proteolytic Enzymes, *Methods Enzymol.*,

80 C, pp 3-341, Academic Press, New York.

- 24) Kawabata, S., Miura, T., Morita, T., Kato, H., Fujikawa, K., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S. (1988) Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting protease and trypsin, *Eur. J. Biochem.*, 172, 17-25.
- 25) Roebroek, A. J. M., Pauli, I. G. L., Zhang, Y. and Van de Ven W. J. M. (1991) cDNA sequence of a *Drosophila melanogaster* gene *Dfur 1*, encoding a protein structurally related to the subtilisin-like proprotein processing enzyme furin, *FEBS Lett.*, 289, 133-137.
- 26) Roebroek, A. J. M., Creemers, J. W. M., Pauli, I. G. L., Kurzik-Dumke, U., Martin, R., Gateff, E. A. F., Leunissen, J. A. M. and Van de Ven W. J. M. (1992) Cloning and functional expression of *Dfurin 2*, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motive, *J. Biol. Chem.*, 267, 17208-17215.
- 27) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S. (1977) New fluorogenic substrates for

α -thrombin, factor Xa, kallikreins and urokinase,
J. Biochem., 82, 1495-1498.

- 28) Ratcliffe, N. A., Leonard, C. and Rowley, A. F. (1984)
Prophenoloxidase activation: nonself recognition and cell
cooperation in insect immunity, *Science*, 226, 557-559.
- 29) Takle, G. B. and Lackie, A. M. (1986) Chemokinetic behaviour
of insect haemocytes in vitro, *J. Cell Sci.*, 85, 85-94.
- 30) Shuman, M. A. (1986) Thrombin-cellular interactions,
Annals New York Academy of Sciences, 485, (Walz, D. A.,
Fenton, J. W. and Shuman, M. A., eds.) 229-239.
- 31) Dawes, K. E., Gray, A. J. and Laurent, G. J. (1993)
Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication,
Eur. J. Cell. Biol., 61, 126-130.
- 32) Söderhäll, K. (1981) Fungal cell wall β -1,3-glucans
induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign
surfaces of crayfish hemocyte lysate, *Dev. Comp. Immunol.*,
5, 565-573.
- 33) Bohn, H. and Barwig, B. (1984) Hemolymph clotting in the

- cockroach *Lecophaea manderiae* (Blattaria), *J. Comp. Physol.*,
B 154, 457-467.
- 34) Edman, P. and Begg, G. (1966) A protein sequenator,
Eur. J. Biochem., 1, 80-91.
- 35) 宮田敏行 (1990) タンパク質、ペプチドの高速液体クロマト
グラフィー (II), 化学増刊 117、化学同人、pp 153-160.
- 36) Lipman, D. and Pearson, W. (1985) Rapid and sensitive
protein similarity searches, *Science*, 227, 1435-1441.
- 37) Aoki, Y. and Hase, T. (1991) The primary structure and
elastinolytic activity of medullasin (A serine protease
of bone marrow), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178,
501-506.
- 38) Chasan, R., and Anderson, K. V. (1989). The role of easter,
an apparent serine protease, in organizing the dorsal
-ventral pattern of the *Drosophila* embryo, *Cell*, 56, 391-400.
- 39) 岩永貞昭、宮田敏行 (1983). プロテアーゼ反応と代謝調節,
pp 71-151. 学会出版センター

- 40) Jin, Y., Anderson, K. V. (1990) Dominant and recessive alleles of the *Drosophila* *easter* gene are point mutations at conserved sites in the serine protease catalytic domain, *Cell*, 60, 873-881.
- 41) Chasan, R., Jin, Y. and Anderson, K. V. (1992) Activation of the *easter* zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo, *Development*, 115, 607-616.
- 42) StJohnston, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo, *Cell*, 68, 201-219.
- 43) Keith, F. J. and Gay, N. J. (1990) The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion, *EMBO J.*, 9, 4299-4306.
- 44) DeLotto, R. and Spierer, P. (1986) A gene required for the specification of dorsal-ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease, *Nature*, 323, 688-692.
- 45) Smith, C. L. and DeLotto, R. (1994) Ventralizing signal determined by protease activation in *Drosophila*

embryogenesis, *Nature*, 368, 548-551.

- 46) Baeuerle, P. A. (1991) The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1072, 63-80.
- 47) Hultmark, D. (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity, *Trends in genetics*, 9, 178-183.
- 48) Ip, Y., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K., and Levine, M. (1993) Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*, *Cell*, 75, 753-763.

謝辞

フェノール酸化酵素前駆体カスケードのセリンプロテアーゼ前駆体の研究という興味深いテーマを私に与えてくださり、またこの研究に対し適切な御意見、励ましを頂きました北海道大学 低温科学研究所 生化学部門 芦田正明教授に深く感謝いたします。

また、この研究に対する助言を頂きました当研究室の落合正則助手、片桐千仞助手、早川洋一助教授、安原優子さん、小泉淑子さん、木原秀晃さん、木下邦則さん、平岡毅さん、長尾恵理子さん、竹内直人さん、芹澤領さん、後輩の方々、そして茅野春雄 北海道大学 名誉教授に深く感謝いたします。



