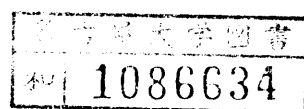


カイコの卵黄たんぱく質ビテリンの分解に  
関与するプロテアーゼの性状、一次構造  
および生合成機構に関する研究



1991年2月

池田素子

# 目次

	頁
第 1 章 緒論 -----	1
第 2 章 ビテリン分解に関与するプロテアーゼの精製と性質 -----	6
材料と方法 -----	7
結果 -----	11
1. 胚発生にともなうプロテアーゼ活性の変動 -----	11
2. プロテアーゼの精製 -----	11
3. 酵素の性質 -----	15
4. カイコ卵黄たんぱく質に対する作用 -----	20
考察 -----	26
摘要 -----	28
第 3 章 ビテリンプロテアーゼの発育時期および組織特異的発現 -----	29
材料と方法 -----	30
結果 -----	33
1. ビテリンプロテアーゼの免疫学的特異性 -----	33
2. ビテリンプロテアーゼの胚発生および後胚子発育にともなう変動 -----	33
3. 胚発生卵におけるビテリンプロテアーゼの局在性 -----	39
考察 -----	42
摘要 -----	45
第 4 章 ビテリンプロテアーゼの cDNA クローニング、塩基配列の決定 および遺伝子発現 -----	46
材料と方法 -----	47
結果 -----	51
1. cDNA のクローニングと塩基配列の決定 -----	51
2. ビテリンプロテアーゼ遺伝子の発現 -----	51

	頁
3. 翻訳活性の発育に伴う変化	54
考察	57
摘要	60
第 5 章 総合考察	61
謝辞	65
引用文献	66

## 第 1 章 緒論

現在、地球上に 200 万種以上の動物が生息している。哺乳動物は約 5,000 種であり、残りの動物種はすべて卵生動物である (Pearse *et al.*, 1987)。卵生動物は予め卵中に貯蔵された栄養物質のみを利用して自活できる体制になるまで卵内で発育する。卵は 1 個の細胞からなるが、通常の細胞に比較して非常に大きい。これは多量の卵黄物質を蓄積しているからである。卵黄は卵内での胚の成長、発育に要求される全ての栄養物質を含んでいる。量的にはたんぱく質と脂質が圧倒的に多く、ニワトリの卵 (浅野・石原、1985) でも、カイコの卵でも (Yamashita and Irie, 1980)、各々生体重当り約 12 % を占めている。

昆虫の卵黄たんぱく質に関する研究は、1953 年にセクロピア蚕での雌特異たんぱく質 (female specific protein) の発見によって始まった (Telfer, 1954; Telfer and Williams, 1953)。1969 年 (Pan *et al.*, 1969) にこのたんぱく質が精製され、分子組成や組織分布が明らかにされた。このたんぱく質は卵黄形成 (vitellogenesis) に与る主要なたんぱく質であることから、ピテロジェニン (卵内に蓄積されたものはピテリンと呼ぶ) と命名された。ピテロジェニンは一般名であり、昆虫のみでなく全ての動物種における主要な卵黄たんぱく質に対して与えられた。1970 年代以後、多くの昆虫種でピテロジェニンおよびピテリンの同定、生合成、合成の内分泌調節機構が盛んに研究された (Bownes, 1986; Engelmann, 1979; Kunkel and Nordin, 1985; Pan and Wyatt, 1976)。現在では、20 種以上の昆虫種でピテリンは同定され、その一次構造や遺伝子構造も明かにされつつある (Wyatt, 1988)。チャバネゴキブリ *Blattella germanica* (Kunkel and Pan, 1976)、サバクワタリバッタ *Locusta migratoria* (Chinzei *et al.*, 1981)、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (Bownes and Hames, 1977) 等では、ピテリンが卵黄たんぱく質の 80 % 以上を占めている (Hernishu and White, 1982; Kunkel and Nordin, 1985)。

一方、数種の鱗翅目昆虫の卵ではピテリンの含量は 50 から 60 % であり、ピテリン以外のたんぱく質も卵黄の形成に与っている。例えばセクロピア蚕の卵黄たんぱく質は、ピテリン以外にリポホリン、マイクロピテロジェニンおよびパラピテロジェニンと呼ばれる、各々分子的性状の異なったたんぱく質から構成されている (Telfer *et al.*, 1980)。ピテリン、リポホリン、マイクロピテロジェニンはいずれも脂肪体で合成され、血中に放出された後に、発育中の卵巣に取り込まれるたんぱく質である。パラピテロジェニンは卵巣、厳密には濾胞細胞で合成され、卵母細胞に蓄積されるたんぱく質である。このような複数の

たんぱく質組成はカイコ卵においてもみられる。カイコの卵黄たんぱく質は約 40 % がビテリン、35 % が 30 kDa たんぱく質、そして 25 % が卵特異たんぱく質で構成されている (Zhu *et al.*, 1986)。ビテリンは分子量 178 kDa のポリペプチド (重鎖) 2 分子と、分子量 42 kDa のポリペプチド (軽鎖) 2 分子からなる分子量 420 kDa のアポたんぱく質に、脂質、糖、りん酸の結合した複合たんぱく質である (Izumi *et al.*, 1980; Zhu *et al.*, 1986)。30 kDa たんぱく質は、分子量約 30 kDa の血清たんぱく質に対して与えられた名称であり、複数の異なったたんぱく質が含まれている (Chen and Yamashita, 1990; Izumi *et al.*, 1981)。30 kDa たんぱく質も脂肪体で合成され、血液を介して卵巣に取り込まれ、卵黄として蓄積される。分子の性状はマイクロビテロジェニンに極めてよく似ている。カイコにおいても濾胞細胞が合成するたんぱく質が卵黄たんぱく質の一部を構成している。このたんぱく質は卵特異たんぱく質 (Egg-specific protein, ESP) と呼ばれる (Irie and Yamashita, 1983; Ono *et al.*, 1975)、パラビテロジェニンに相当するものである。ESP に関しては、すでに分子の性状、生合成過程、一次構造、遺伝子構造も解析されている (Inagaki and Yamashita, 1987; Irie and Yamashita, 1983; Kobayashi and Inagaki, 1989; Sato and Yamashita, 1989, 1991; Zhu *et al.*, 1986)。

パラビテロジェニンや ESP に相当する卵黄たんぱく質は他の鱗翅目昆虫類の卵でも同定されている。マドラメイガ *Plodia interpunctella* や類縁の昆虫では *yolk polypeptide* (YP-2, YP-4) と呼ばれる (Shirk *et al.*, 1984)、タバコスズメガ *Manduca sexta* では *follicle specific protein* と呼ばれている (Tsuchida *et al.*, 私信)。これらの卵黄たんぱく質は精製されたところであり、まだ生合成系などについては解明が進んでいない。鱗翅目昆虫の卵黄たんぱく質のみ複数種のたんぱく質から構成されているのは、これらの昆虫が摂食によって直接卵形成のための素材を得ているのではなく、すでに蛹体内に貯蔵している物質を利用することによって卵形成を行っていることに関係していると考えられている (Shirk *et al.*, 1984)。

卵黄物質は、卵細胞内に均一に分布しているのではなく、特異的な構造を作って存在している。昆虫の卵にはニワトリ卵でみられる卵黄、卵白の区分はないが、卵黄顆粒として蓄積されている。卵黄顆粒は胚発生の初期に形成される卵黄細胞に包含される。卵黄細胞は卵黄の一時的な貯蔵場所として機能していると考えられる。胚発生の進行にともなって卵黄細胞は消失する。したがって、卵黄細胞の退化は胚への栄養源の供給過程と考えることができる (安藤、1988)。

卵黄たんぱく質は受精後の胚発生や幼虫体の形成のための代謝エネルギー、あるいは細胞構築のための素材となる貯蔵たんぱく質である。胚発生期における卵黄たんぱく質の消長についてはすでに数種の昆虫で検討されている。いずれの場合においても卵黄たんぱく質が急激に利用されるのは胚発生の中後期であり、幼虫系組織が分化し発育している時期である。ビテリンについてはサバクワタリバッタ (McGregor and Loughton, 1974)、チャバネゴキブリ (Purcell *et al.*, 1988a; Storella and Kunkel, 1979)、ワモンゴキブリ *Periplanata americana* (Storella *et al.*, 1985)、クロバエ *Calliphora erythrocephala* (Mendes and Raccand, 1986)、オオサシガメ *Rhodonius prolixus* (Oliveira *et al.*, 1989)、ナナフシ *Carausis morosus* (Masetti and Giorgi, 1989)、キイロショウジョウバエ (Bownes and Hames, 1977) で調査されている。その結果、ビテリンは限定分解を受けて分解中間体となり、さらに低分子化することによって最終的に消失すること、さらにこの分解過程は胚の発生によく対応して進行していることが共通の現象として示された (Nordin *et al.*, 1990; Yamashita and Indrasith, 1988)。カイコにおいては ESP の胚発生期における分解系がよく研究されている (Indrasith *et al.*, 1987, 1988a, 1988b)。ESP はビテリンよりも早くから減少し始める。ESP の分解も限定分解で開始される。まず 2 回の分解反応によって 4 種の分子になる。生じた分解中間産物はさらに加水分解を受けて最終的にはアミノ酸に遊離する。この一連の反応は反転期以降急速に進行し、幼虫孵化時には ESP は残存していない。これらの事実は卵黄たんぱく質の分解、利用が実によく調節された状態で進行していることを示している。

卵黄たんぱく質の限定分解は限られたプロテアーゼによって触媒されていると考えられる。これまでに卵黄たんぱく質の分解に与るプロテアーゼは、鳥類、甲殻類、昆虫類で断片的に研究されている。これまでの報告をまとめてみると、卵黄たんぱく質の分解に関与するプロテアーゼは 2 つに分けられる。1 つは不活性の状態に卵細胞に蓄積され、胚発生の特異的な時期に活性化されるものである。キイロショウジョウバエ、カイコ、エビ類をはじめ多くの動物では、予め卵内に蓄積されていたカテプシン様あるいはトリプシン様プロテアーゼが活性化され、卵黄たんぱく質の分解に関与していることが報告されている (Fagotto, 1990; Kageyama and Takahashi, 1990; Medina *et al.*, 1988; Perona *et al.*, 1988)。ハウネンエビモドキ *Artemia salina* では、リソゾームとたんぱく性卵黄球が接合することにより、カテプシン様プロテアーゼが活性化され、卵黄たんぱく質の分解が起きることを示している (Perona *et al.*, 1988)。また同じエビで、卵形成期にトリプ

シン様プロテアーゼがビテリンと結合して、不活性状態で蓄積され、何等かの原因でビテリンが酵素からはずれると、プロテアーゼは活性型となり、ビテリンを分解するようになることも示されている (Ezquieta and Vallejo, 1985)。つまりこの場合はビテリンがプロテアーゼの阻害剤として働いていると考えられる (Ezquieta and Vallejo, 1985)。トリプシンインヒビターが卵黄たんぱく質の分解を阻害していることは、ニワトリ卵でもよく知られている。オボムコイドやオボインヒビターはトリプシンインヒビターの代表的なものであり、これらがビテリンのみならず卵白アルブミンなどの分解を調節していると考えられている (Sugimoto *et al.*, 1984; Sugimoto and Yamada, 1986)。キイロショウジョウバエでは不活性型のカテプシン B 様プロテアーゼがトリプシン様プロテアーゼによって活性化され、その結果卵黄たんぱく質の分解が進行することが報告されている (Medina *et al.*, 1988)。

他の 1 つは、胚発生期間中に新たに生合成されて活性を発現するタイプのプロテアーゼである。カイコの ESP を特異的に分解するトリプシン様プロテアーゼ (ESPプロテアーゼ; Indrasith *et al.*, 1988b) がこのタイプに分類される。このタイプに属する卵黄たんぱく質分解プロテアーゼについての報告は他にはなく、現在の時点ではまだ例外的な存在である。このプロテアーゼの生合成を調節する機構は胚発生の過程の中に組み込まれていると考えられ、卵黄たんぱく質の胚発生にともなった計画的な分解、利用の機構を解明する上で極めて興味深いものである。

一方、卵黄たんぱく質は糖や脂質やりん酸を結合した複合たんぱく質であるので、このたんぱく質の代謝分解にはプロテアーゼのみでなく、炭水化物分解酵素、リパーゼ、ホスファターゼも重要な役割を果たしていると考えられる。チャバネゴキブリの胚発生の初期にはある種の炭水化物分解酵素やホスファターゼの活性が高くなることが報告されている (Purcell *et al.*, 1988b)。

カイコ卵ではすでに述べたように卵黄たんぱく質の同定も進み、また ESPプロテアーゼの研究から示されたように、この分野の研究を進める上で多くの実験結果が蓄積されている。そこで本研究においてはカイコ卵の卵黄たんぱく質の胚発生に伴う分解機構を明らかにするために、ビテリンの分解に注目し、この分解に関与するプロテアーゼについて研究した。第 2 章では胚発生に伴うプロテアーゼの活性変動を調査することによって、ビテリンの分解に関与すると思われる 2 種類のプロテアーゼ (ビテリンプロテアーゼと呼ぶ) を同定し、精製してその性状を明らかにした。第 3 章ではビテリンプロテアーゼに対する抗体

を作製し、これを用いてビテリンプロテアーゼの発育に伴う変動および組織特異性について免疫組織化学的方法も併せて調査した。その結果、本プロテアーゼはビテリンの特異的な分解に与るプロテアーゼであることが支持された。さらにプロテアーゼ活性の調節はプロテアーゼを新たに生合成することによって行われていると考えられた。プロテアーゼの生合成およびその調節機構を解明するためには、まずプロテアーゼたんぱく質の一次構造や遺伝子構造についての知見を得ることが必要である。そのために第 4 章では本プロテアーゼの cDNA を作製し、塩基配列を決定して、アミノ酸配列を推定した。また cDNA を用いて、遺伝子の転写活性や翻訳活性の発育時期特異性を明らかにした。これらの実験結果にもとずいて、ビテリン-ビテリンプロテアーゼの卵黄たんぱく質利用系における生物学的意味などについて第 5 章で考察した。



## 第2章 ビテリン分解に関与するプロテアーゼの精製と性質

カイコにおいて Kageyama *et al.* (1981) は、胚発生に伴うプロテアーゼ活性の変動を調査し、胚発生期間を通して一定の活性を持つ酸性プロテアーゼと胚発生の後半、特に孵化直前に活性が増大する中性およびアルカリ性プロテアーゼの存在を示した。特に孵化直前に現れるアルカリおよび中性プロテアーゼが卵黄たんぱく質の著しい分解に関与していることを示唆した。一方、Indrasith *et al.* (1988b) は、ESP の分解に着目し、ESP に特異的に作用するトリプシン様セリンプロテアーゼ (ESPプロテアーゼ) を同定し、胚発生に伴う ESP の分解は ESPプロテアーゼの活性変動に依存していることを示唆した。しかしながら、このプロテアーゼは ESP 以外の卵黄たんぱく質の分解にはほとんど関与していない。すなわち、カイコ卵にはビテリンや 30 kDa たんぱく質の分解を触媒する ESPプロテアーゼ以外のプロテアーゼが存在することを示唆している。

そこでこの章ではビテリンや 30 kDa たんぱく質の分解に関与するプロテアーゼについて検討を行った。まず胚発生に伴うプロテアーゼ活性の変動およびプロテアーゼの種類について調査し、2 種類のプロテアーゼが胚発生の後半に活性を発現していることが明らかとなった。これらのプロテアーゼは ESPプロテアーゼとは異なるものであり、胚発生中の卵で卵黄たんぱく質の分解に関与するものであると考えられた。そこでこの 2 種類のプロテアーゼを精製し、その性質を明かにした。さらに 2 種類のプロテアーゼの卵黄たんぱく質に対する分解特性について検討し、本酵素は胚発生中の卵でビテリンの分解に関与していると結論した。

## 材料と方法

### 供試材料

供試蚕品種は、交雑種（春嶺 x 鐘月）である。産卵時間を 3 時間とし、採集した卵を温度 25 °C、湿度 75 % の条件下で保護した。産下約 20 時間後に卵を塩酸処理（比重 1.075；46 °C、5 分間浸漬）し、休眠化を阻害した（Yamashita, 1984）。浸酸処理後の卵も上記条件下で保護し胚発生を進行させた。この保護条件では 7 日令が点青開始期、8 日令が催青期、そして 10 日令で幼虫孵化が起こった。8 日令の卵を -70 °C に保護し、酵素の精製に用いた。また、酵素活性の発育変動を調査するため、胚期間を通じて 12 時間毎に卵を採集した。

### 供試試薬

カラム担体としては、DEAE-セルロース（DE 23, Whatman International）、Sephadex G-75（Pharmacia LKB Biotechnology）、ODS 120T column（東洋曹達）を用いた。Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide（Bz-DLArg-pNA）、benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide（Bz-LArg-pNA）、benzoylglycyl-L-arginine（Bz-Gly-Arg）、benzoyl-L-tyrosine-p-nitroanilide（Bz-LTyr-pNA）、L-alanine-p-nitroanilide（LAla-pNA）、L-leucine-p-nitroanilide（LLeu-pNA）、carbobenzyloxycarbonyl-L-phenylalanine（Z-Gly-Phe）、leupeptin、chymostatin は、ペプチド研究所から購入した。glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide（Glt-Phe-pNA）、phenylmethylsulfonyl fluoride（PMSF）、tosyl-L-lysine chloromethylketone（TLCK）、tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone（TPCK）は、Sigma 社製を用いた。diisopropyl fluorophosphate（DFP）は、Fluka 社製を用いた。sodium casein は、和光純薬社製を用いた。ピテリン、ESP、30 kDa たんぱく質は、Zhu et al. (1986) に従い、カイコ完成卵から精製した。

### 酵素標品の調製

卵に 10 倍容の 400 mM NaCl を含む 50 mM りん酸緩衝液、pH 7.2、を加えて氷中で磨砕し、磨砕液を綿で濾過して得られた濾液を酵素標品とした。この濾液を 12,000 g、4 °C で 20 分間遠心して得られた上清を酵素粗抽出液として用いた。

## 酵素の精製

### 1. 硫酸分画

酵素の精製操作は 4 °C あるいは 0 °C (水中) で行った。10 g の卵から調製した酵素粗抽出液から、20 % 飽和の硫酸で沈澱する分画を除去した後、60 % 飽和の硫酸に沈澱する分画を集めた。この沈澱物を少量の 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、で溶解した後、同じ緩衝液に対して透析した。

### 2. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

透析したサンプルを、予め 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.5 x 25 cm) に添加した。同じ緩衝液でカラムを洗浄し、未吸着分画を取り除いた。カラムに吸着したたんぱく質を 0-0.5 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。流速は 50 ml/hr であり、10 ml ずつを分画した。各フラクションのたんぱく質量とプロテアーゼ活性 (後述) を測定した。活性の回収されたフラクションを集め、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥機で減圧濃縮した。

### 3. Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-75 カラム (0.9 x 90 cm) は、予め 0.5 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、で平衡化した。濃縮後のサンプル液をカラムに添加し、同上の緩衝液で溶出した。流速は 20 ml/hr であり、2 ml ずつを分画した。各フラクションのたんぱく質量と酵素活性を測定し、酵素活性を含むフラクションを回収した。この分画を再び蒸留水に対して透析し、減圧濃縮した。

### 4. Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE)

濃縮後のサンプルを sample buffer (Davis, 1964) と 2:1 の割合で混合後、10 % native-ポリアクリルアミドゲルに添加し、20 mA で 3 時間電気泳動した。泳動後のゲルから 2 レーンを切り取り、酵素たんぱく質の同定に用いた。残りのゲルは 4 °C に保存した。切り取ったゲルを各々たんぱく質と酵素活性の検出に用いた。たんぱく質の染色は Coomassie brilliant blue R-250 により後述の方法で行った。酵素活性は、ゲルを上端から 2 mm 間隔で切断し、各ゲル片を 200 mM 炭酸緩衝液、pH 9.0、に浸し、さらに基質を加えて測定した。4 °C に保存しておいた残りのゲルから酵素活性と一致する部分を切り出した。切り出したゲルを剃刀で細かく切断し、10 倍量の蒸留水を加えてガラスホモゲナイザーで磨砕した。磨砕液は 4 °C で 2 時間激しく振盪した後、12,000 g で 5 分間遠心し、上清に酵素たんぱく質を回収した。

## プロテアーゼ活性の測定法

### 1. BApNA に対する分解活性

Eguchi and Kuriyama (1983) の方法に従い測定した。反応液の組成は、0.1 ml の酵素液、0.1 ml の 4 mM BApNA (40 mM BApNA, dimethyl sulfoxide 溶液を保存液とし、蒸留水で 10 倍希釈して使用)、0.2 ml の 200 mM 炭酸緩衝液、pH 9.0、であった。反応は基質を添加することにより開始し、30 °C で 30 分間行った。0.1 ml の 20 % 過塩素酸溶液を加えて反応を停止した。生成した p-nitroanilin (pNA) 量は、以下の方法によって定量した。まず反応液に 0.5 ml の 0.1 % 亜硝酸ナトリウム溶液を加え、室温で 5 分間静置後、さらに 0.5 ml の 0.5 % スルファミン酸アンモニウム溶液を加え室温で 5 分間静置した。最後に 1 ml の 0.05 % N-1-naphtylethylene-diamine-diHCl のエタノール溶液を加え、30 °C で 10 分間静置した。反応液の吸光度を波長 546 nm で測定した。酵素活性は反応時間に対して 2 時間の範囲で一定であり、また酵素たんぱく質の増大に対しても、試験管当たり 0 から 1 mg の範囲内で比例的に増加した。酵素活性は反応 1 分間当りに生成する pNA 量 (pNA  $\mu$  moles/min) で示し、1 分間当りに 1  $\mu$  mol の pNA を生成する酵素の量を 1 単位 (U) とした。

### 2. その他の合成基質に対する分解活性

Bz-LArg-pNA、Bz-LTyr-pNA、LAla-pNA、LLeu-pNA、Glt-Phe-pNA を基質に用いた場合は、酵素反応の結果生成する pNA 量を上述の方法で定量した。Z-Gly-Phe と Bz-Gly-Alg の場合は各々 Neurath *et al.* (1947) と Folk *et al.* (1960) の方法に従って活性を測定した。

### 3. カゼイン、ビテリン、ESP、30 kDa たんぱく質に対する分解活性

0.3  $\mu$ g の精製酵素たんぱく質、27  $\mu$ g の精製基質たんぱく質および 100mM glycine-NaOH、pH 8.0、を混合し、30 °C で 0、5、30、60、120、600 分間反応した。反応液に等量の SDS-sample buffer (Laemmli, 1970) を加え、90 °C で 10 分間加熱処理し反応を停止した。この反応液を 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後 Coomassie brilliant blue R-250 で染色し反応産物を検出した (後述)。

## たんぱく質の定量

Lowry *et al.* (1951) の方法あるいは Bradford (1976) の方法に従った。標準曲線の作成には牛血清アルブミンを用いた。また、酵素の精製の指標としてのたんぱく質は波長

280 nm または 220 nm での吸光から推定した。

#### ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

native-PAGE は 10 % スラブゲルを用い、Davis (1964) に従って行った。SDS-PAGE は 10 % あるいは 12.5 % スラブゲルを用い、Laemmli (1970) の方法に従って行った。泳動後のゲルは 0.5 % Coomassie brilliant blue R-250 溶液 (50 % エタノール、10 % 酢酸溶液に溶解) で染色した後、25 % エタノール、7 % 酢酸の混合液で脱色した。

#### カゼイン SDS-PAGE 系によるプロテアーゼ活性の検出

Roche *et al.* (1983) に従い以下の方法で行った。まず最終濃度が 0.2 % になるようにカゼインを加えた 10 % ポリアクリルアミドゲルを作製した。酵素試料は 2-mercapto-ethanol を除いた SDS-sample buffer と 2:1 の割合で混合し、加熱処理は行わずゲルに添加した。20 mA、4 °C で 4 時間電気泳動を行った。泳動後のゲルは 250 ml の 2.5 % Triton X-100 溶液に浸し 1 時間振盪した後、蒸留水で洗浄した。酵素反応を行うために、洗浄後のゲルを 100 ml の 50 mM 炭酸緩衝液、pH 9.0、に浸し、室温で一晩振盪した。酵素活性はゲルを Coomassie brilliant blue R-250 で染色することにより判定した。活性バンドは、分解を受けなかったゲル中の基質が青く染色されるのに対し、白いゾーンとして検出された。

#### NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列

精製酵素溶液に混入している アクリルアミドを、Toso ODS-120T を用いた高速液体クロマトグラフィーによって取り除いた。つまり、各精製酵素溶液をカラムに添加し、95 % アセトニトリルを含む 0.1 % TFA 水溶液でカラムを洗浄した後、吸着たんぱく質を 9.5 % から 77 % までのアセトニトリルの直線濃度勾配により溶出した。たんぱく質は波長 220 nm での吸光により検出した。たんぱく質のピークを回収し、減圧濃縮した。NH<sub>2</sub>-末端のアミノ酸配列は PTH-Analyzer (model 120A, Applied Biosystems) を連動した Protein sequencer (model 477A, Applied Biosystems) によって決定した。

## 結果

### 1. 胚発生にともなうプロテアーゼ活性の変動

カイコの胚発生に伴う BApNA 分解活性の変動パターンを Fig. 1 に示した。pH 9.0 の反応条件では、BApNA 分解活性は産下当日から 7 日令まではほとんど検出されなかった。7.5 日令から活性が出現しはじめ、8.5 日令に向かって増加した。9 日令で活性は一端減少したが、幼虫孵化に向けて再び増加した。すなわち、BApNA の分解活性は 2 つの発生時期、8 日令と 10 日令でピークを示した。さらに、カゼイン-SDS-PAGE 系を用いてプロテアーゼの種類の変化を胚の発生を追って調査した (Fig. 2)。産下直後から 7 日令までは活性バンドはほとんど検出されなかった。7.5 日令から 2 本の活性バンドが検出されはじめ、これらは 8.5 日令まで強い活性を示したが、9.5 日令ではほとんど検出されなくなった。一方 9.5 日令からは先の 2 本のバンドより易動度の小さい 5 本の活性バンドが出現し、これらの活性は幼虫孵化に向かって増加した。この 5 本の活性バンドは 5 日令幼虫の消化液を試料として用いた場合にも検出されたことから、消化液中のプロテアーゼに相当すると考えられる。一方、8 日令を中心に検出された 2 本の活性バンドは幼虫期間には全く検出されず、胚発生期に特異的に発現しているプロテアーゼであることが示唆された。さらにこの 2 本の活性バンドの発現する時期と卵黄たんぱく質の著しい分解が起こる時期とが一致していることから、これらプロテアーゼが卵黄たんぱく質の分解に関与していることが示唆された。そこでプロテアーゼの性質を詳細に検討するため、8 日令の卵から酵素の精製を行った。

### 2. プロテアーゼの精製

プロテアーゼの精製過程の概要と結果を Table 1 に示した。10 g の 8 日令の卵から精製を開始した。まず卵の粗抽出液を硫酸分画したところ、酵素活性は 20 から 60 % 飽和硫酸分画中に回収された。そこで回収した活性分画を透析した後、DEAE-セルロースカラムにより精製した。酵素活性は、0.36 M の NaCl 濃度に単一のピークとして回収された。ピークの活性に対し 1/2 以上の活性を示すフラクションを集めた。回収した酵素溶液を濃縮後、Sephadex G-75 カラムにより分画した。酵素活性は単一のピークとして回収された。ここで回収された酵素標品を native-PAGE により分析したところ、酵素活性は 2 本のバンドに分離された。そこでこの分画から 2 種類の酵素を分離するために native-PAGE を

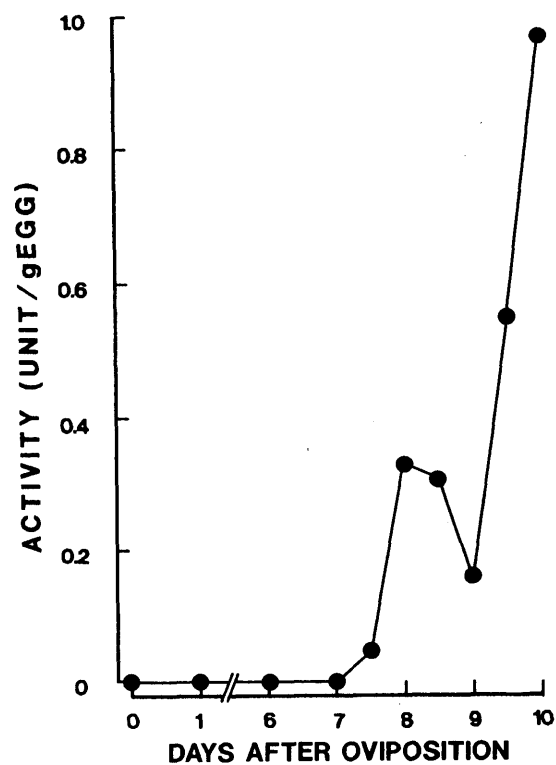


Fig. 1. Changes in benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilid-lytic activity during embryogenesis. Eggs were collected at the interval of one day or half day from oviposition to larval hatching. BApNA-lytic activity was measured at pH 9.0 for 30 min. Each point represents mean values from three different experiments. S.D. was within 10 % of mean values.

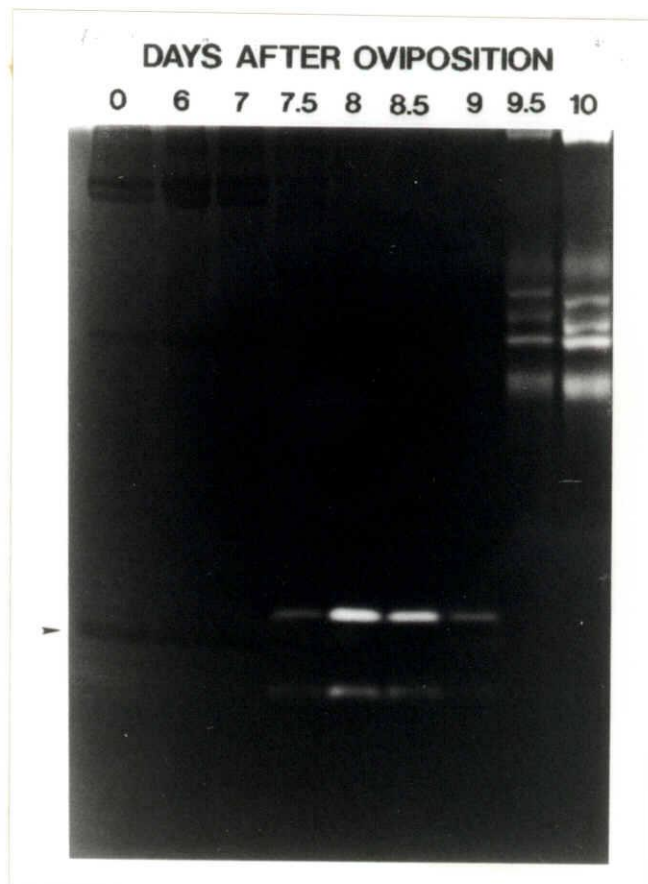


Fig. 2. Changes in banding patterns of proteases during embryogenesis. Crude extracts used in Fig. 1 were electrophoresed in the SDS-polyacrylamide gels containing 0.2 % casein. The activity bands were visualized by staining with <sup>0</sup>Comassie brilliant blue R-250 after incubation of the gel overnight. An arrowhead indicates the position where silkworm 30 kDa protein-2 (M.W.=31,000, Zhu *et al.*, 1986) migrated.



Table 1. Purification of proteases from day 8 eggs

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units x 10 <sup>3</sup> )	Specific activity (units x 10 <sup>3</sup> /mg protein)	Purity (-fold)	Yield (%)
Crude extracts	825.4	2673	3.24	1	100
Ammonium sulfate precipitaion (20 to 60 % saturation)	559.2	1907	3.41	1	71.3
DEAE-cellulose column chromatography	40.2	631	15.70	5	23.6
Sephadex G-75 column chromatography	0.93	472	507.53	157	17.7
Native-PAGE					
30k-protease	0.032	60	1875.00	579	2.2
24k-protease	0.080	74	925.00	285	2.8

10 g of eggs were used as the starting materials. Protease activity was assayed at pH 9.0 using BApNA as a substrate.

行い、バンドを切り出すことによって最終的に 2 種類の精製酵素を得ることができた。各精製酵素は native-PAGE と SDS-PAGE において各々単一のたんぱく質バンドを与えた (Fig. 3)。

### 3. 酵素の性質

#### (1) 分子量

各酵素たんぱく質の native の分子量は Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーの溶出位置から 30,000 と算定された (Table 2)。また SDS-PAGE によってポリペプチドの分子量は各々 30,000 および 24,000 と算定された (Table 2)。そこで前者を 30k-プロテアーゼ、後者を 24k-プロテアーゼと便宜的に呼ぶことにした。

#### (2) NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列

30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼたんぱく質の NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列を決定した (Fig. 4)。30k-プロテアーゼでは 30 個、また 24k-プロテアーゼでは 28 個のアミノ酸配列が明かになった。配列は互いに完全に異なっていた。30k-プロテアーゼの NH<sub>2</sub>-末端に存在するアミノ酸配列、Ile-Val-Gly-Gly、はほとんどのトリプシン様プロテアーゼに保存されているが、24k-プロテアーゼにはこの配列は存在しなかった。

#### (3) pH の影響

2 種の酵素の BApNA 分解活性を pH に対してプロットすると釣鐘型の曲線を示し、両酵素の活性は pH 8.0 で最大を示した (Table 2)。しかし曲線の形は 24k-プロテアーゼの方が 30k-プロテアーゼに比べて鋭く、すなわち 24k-プロテアーゼは 30k-プロテアーゼよりも pH に対する依存性が高いことが示唆された。

#### (4) 基質濃度

種々の BApNA 濃度に対する酵素活性を Hanes の方法に従ってプロットした結果、30k-プロテアーゼのみかけの Km 値は  $5.3 \times 10^{-5}$  M、24k-プロテアーゼのみかけの Km 値は  $5.0 \times 10^{-5}$  M と算定された (Table 2)。

#### (5) 温度の影響

種々の反応温度に対する 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの BApNA 分解活性を調査した (Fig. 5)。30k-プロテアーゼの活性は温度の上昇に伴って高くなり、50 °C で最大活性を示したが、これより高い温度では急激に低くなった。一方、24k-プロテアーゼは 40 °C で最大活性を示し、50 °C ではすでに失活した。アレニウス・プロットにより各酵

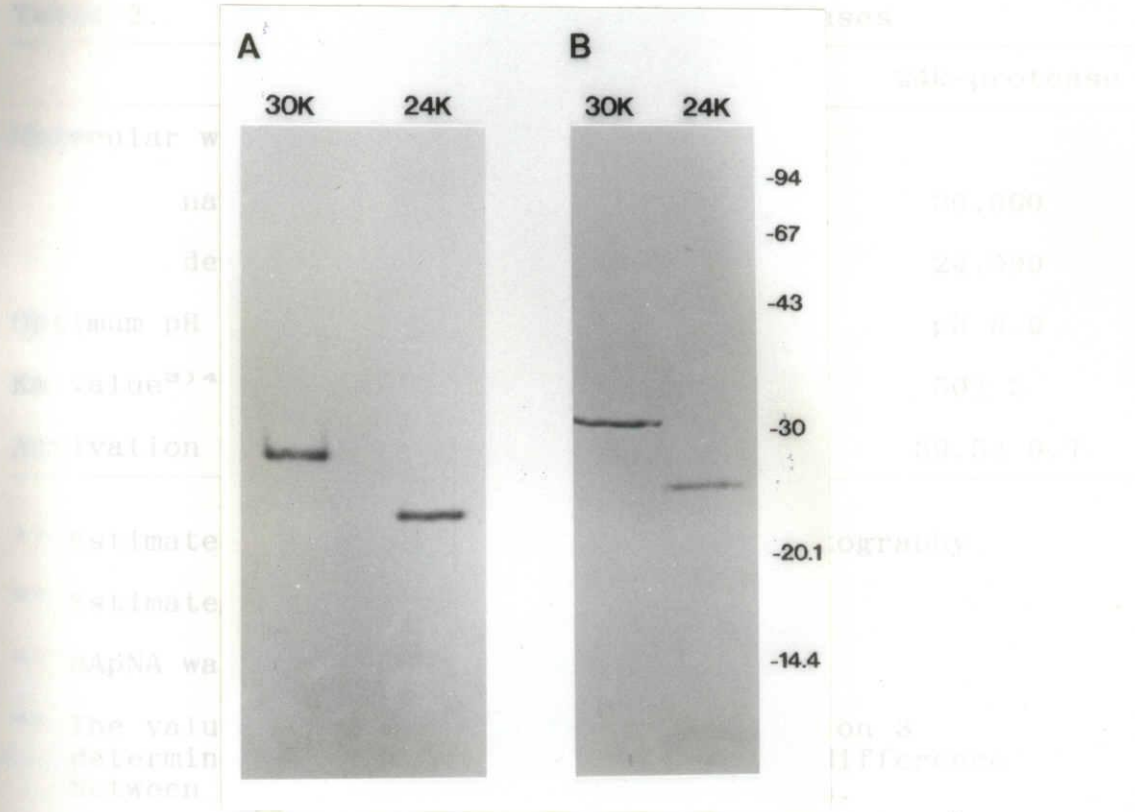


Fig. 3. Native- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified proteases from day 8 eggs. The purified proteases (3  $\mu$ g) were subjected to 10 % native-PAGE (A) and 15 % SDS-PAGE (B). The positions of the molecular mass markers are given in kDa at the right side. 30k, 30k-protease; 24k, 24k-protease.

Table 2. Properties of the purified proteases

	30k-protease	24k-protease
Molecular weight		
native <sup>1)</sup>	30,000	30,000
denatured <sup>2)</sup>	30,000	24,000
Optimum pH	pH 8.0	pH 8.0
Km value <sup>3) 4)</sup> ( $\mu$ M)	53 $\pm$ 2	50 $\pm$ 3
Activation energy <sup>4)</sup> (kJ/mol)	38.7 $\pm$ 0.2	39.5 $\pm$ 0.7

<sup>1)</sup> Estimated by Sephadex G-75 column chromatography.

<sup>2)</sup> Estimated by SDS-PAGE.

<sup>3)</sup> BApNA was used as a substrate.

<sup>4)</sup> The value represents the mean $\pm$  SEM based on 3 determinations. A t-test indicates no difference between the 30k-protease and 24k-protease.

30k-protease	1	10	20	30																										
	I	V	G	G	X	D	I	V	I	T	X	A	P	T	Q	V	S	X	M	F	R	G	A	X	S	X	G	G	X	L
24k-protease	1	10	20	28																										
	D	G	M	L	T	D	V	G	D	L	A	X	X	P	D	F	N	F	A	S	M	X	N	X	I	A	I	L		

Fig. 4. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequences of 30k-protease and 24k-protease. X: unidentified.

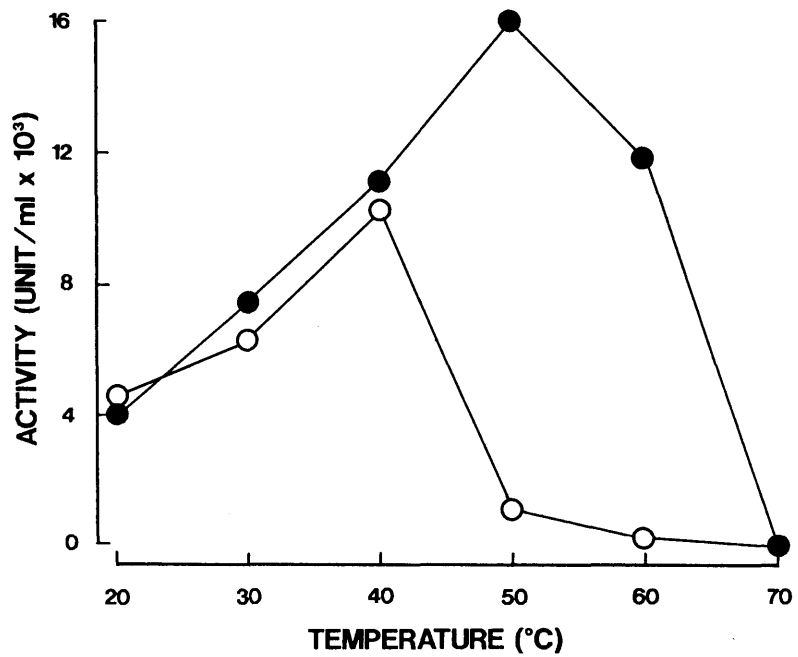


Fig. 5. Temperature dependency of protease activity. 30k-protease (●) and 24k-protease (○) were preincubated at indicated temperature for 5 min, and then incubated with BApNA at each temperature for 30 min. Each point represents mean values from three different tubes. S.E. was within 10 % of mean values.

素の活性化エネルギーを求めたところ、30k-プロテアーゼが 31.6 kJ/mol、24k-プロテアーゼが 38.9 kJ/mol であった。

#### (6) 阻害剤の影響

各種のプロテアーゼに対する特異的な阻害剤を用いて 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの活性に及ぼすこれらの影響を検討した (Table 3)。30k-プロテアーゼの活性は DFP、TLCK、leupeptin、antipain によって強く阻害されたが、TPCK、PMSF、chymostatin、IAA、EDTA、CaCl<sub>2</sub> ではほとんど阻害されなかった。24k-プロテアーゼについても同様の影響が認められた。DFP および TLCK はセリンプロテアーゼの阻害剤であることから、両酵素はセリンプロテアーゼに分類された。

#### (7) 合成基質に対する活性

両酵素は Bz-LArg-pNA を分解したが、その他の Bz-Gly-Arg、LAla-pNA、LLeu-pNA、Bz-LTyr-pNA、Z-Gly-Phe に対しては分解活性を示さなかった (Table 4)。Bz-LArg-pNA はトリプシン活性を検出する際に用いる合成基質であることから、両酵素はトリプシン様の活性を持つことが示唆された。

### 4. カイコ卵黄たんぱく質に対する作用

精製した 2 種のプロテアーゼがカイコ卵に存在する各卵黄たんぱく質の分解に関与しているか否か、また、分解に関与しているとすればどのような分解産物を与えるのかについて検討した。ビテリン、ESP、30 kDa たんぱく質を完成卵から別々に精製し、基質として用いた。すでに Fig. 2 に示したように本酵素はカゼインを分解することは明かであるので、カゼインの分解過程とも比較した。

#### (1) カゼイン

カゼインは各々の精製酵素によって小さなフラグメントへと分解された (Fig. 6A)。反応の進行とともにカゼイン量は減少し、分子量の小さなフラグメントが一次的に増加した。60 分間の反応後では、分解中間産物量も減少し、ここに用いたゲル濃度で推定すると分子量 10,000 以下のポリペプチドに分解された。

#### (2) ビテリン

ビテリンは 178 kDa の重鎖と 42 kDa の軽鎖からなる分子量 440 kDa の 4 量体である (Zhu *et al.*, 1986)。30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼはともにビテリンを限定分解した (Fig. 6B)。ここで注目されるべき点は、178 kDa の重鎖が選択的に分解を受け、

Table 3. Effects of various compounds on the purified protease activity

Inhibitors	Concentration	30k-protease (%)	24k-protease (%)
None		100	100
DFP	1 mM	5.5	8.5
TLCK	1 mM	13.7	8.1
TPCK	1 mM	102.5	94.3
PMSF	1 mM	104.1	95.3
Chymostatin	1 $\mu$ g/ml	78.1	95.9
Leupeptin	10 ng/ml	4.8	9.6
Antipain	1 $\mu$ g/ml	0.8	0
IAA	1 mM	99.7	97.6
EDTA	1 mM	97.6	97.6
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	99.7	103.6

Protease activity was assayed in the presence of inhibitors, using BApNA as a substrate for 30 min after a 10 min preincubation. The results were shown as percent activity to the control without added inhibitors. Each value represents means from five tubes. S.E. was within 10 % of mean values. A t-test indicates no difference in values between the 30k-protease and 24k-protease.



Table 4. Hydrolysis of synthetic substrates by the purified proteases

Substrate	30k-protease	24k-protease
Bz-Gly-Arg	-	-
LAla-pNA	-	-
LLeu-pNA	-	-
Bz-LTyr-pNA	-	-
Z-Gly-Phe	-	-
Bz-DLArg-pNA	+	+
Bz-LArg-pNA	++	++

Hydrolytic activity was represented by ++, + (++>+).  
 -, hydrolytic activity was not detected.

12 kDa) の軽鎖はほとんどともに分子量の小さなものになった。この 600 kDa のトリチンの電気泳動パターンは、卵内の現

(3) 卵特異たんぱく質 ESP は 2 つの 12 kDa (Zhu et al., 1986)。この 12 kDa のトリチンと切

り出した (Fig. 5C)。酵素は ESP プロテ

(4) 30 kDa たんぱく質 (30 kDa たんぱく質も作

らるれなかつた。そこで

を調べるため、卵の

の結果 120 分間反応させ

このことは、卵内の卵

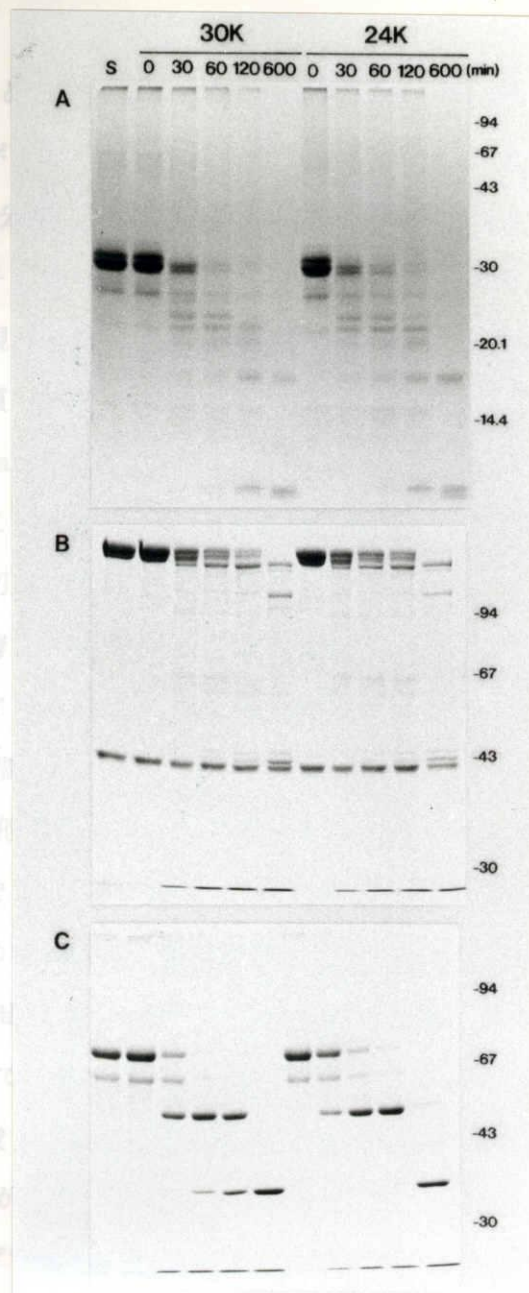
はないということを示唆

りも分解されることが

アアーゼが存在するはず

Da たんぱく質と反応させた (Fig. 7)。1 分間の反応により 30 kDa たんぱく質の 1 つ

バンドが消え、また 120 分間の反応によって完全ではないがその大部分が消失した。



の重鎖は反応時間一経過と以降ではほとんど認められ

ターンは、卵内の卵のビ

られた精製酵素によるトリ

ペプチドで構成されている

ることによって、まず 43

38 kDa のトリチンへと

らるれなかつた。この分解

一致していた。

らされたが異なる分解は認

分解する活性が存在するか

はイ質と反応させた。そ

られなかつた (Fig. 7)。30

0 kDa たんぱく質を基質と

く質も消化直前には卵

この分解に関与するプロ

を酵素溶液として 30

Fig. 6. Degradation kinetics of casein (A), vitellin (B) and egg-specific protein (C) by the purified proteases. The reaction mixture consisted of the purified enzymes (0.3  $\mu$ g) and each substrate (27  $\mu$ g) in 100 mM glycine buffer, pH 8.0, in a final volume of 400  $\mu$ l. The incubation was done at 30 °C for different period of times. At the indicated time, reaction was stopped by adding SDS-sample buffer and boiling for 10 min. The mixture was analyzed by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

42 kDa の軽鎖はほとんど変化しなかったことである。178 kDa の重鎖は反応時間の経過とともに分子量の小さなポリペプチドへと順次分解され、120 分以降ではほとんど認められなくなった。この 600 分間の反応による分解産物の電気泳動パターンは、8 日令の卵のビテリンの電気泳動パターンと一致していた。つまり、ここでみられた精製酵素によるビテリンの分解は、卵内の現象を反映していることを示唆している。

### (3) 卵特異たんぱく質 (ESP)

ESP は 2 つの 72 kDa ポリペプチドと 1 つの 64 kDa ポリペプチドで構成されている (Zhu *et al.*, 1986)。これらポリペプチドは精製酵素と反応することによって、まず 55 kDa ポリペプチドへと切断され、さらに反応時間の経過に従い 36 kDa ポリペプチドへと移行した (Fig. 6C)。酵素の違いによる分解パターンの差は認められなかった。この分解パターンは ESP プロテアーゼによる ESP の分解パターンとよく一致していた。

### (4) 30 kDa たんぱく質

30 kDa たんぱく質も他のたんぱく質と同様に各精製酵素と反応させたが顕著な分解は認められなかった。そこで 8 日令の卵中に 30 kDa たんぱく質を分解する活性が存在するかどうかを調べるため、卵の粗抽出液を酵素溶液として 30 kDa たんぱく質と反応させた。その結果 120 分間反応させても 30 kDa たんぱく質の分解は認められなかった (Fig. 7)。このことは 8 日令の卵で活性を発現しているプロテアーゼは 30 kDa たんぱく質を基質としないということを示唆している。しかしながら 30 kDa たんぱく質も孵化直前には約 50 % が分解されることが報告されており (Zhu *et al.*, 1986)、この分解に関与するプロテアーゼが存在するはずである。そこで孵化直前の卵の粗抽出液を酵素溶液として 30 kDa たんぱく質と反応させた (Fig. 7)。5 分間の反応により 30 kDa たんぱく質の 1 つのバンドが消失し、また 120 分間の反応によって完全ではないがその大部分が消失した。したがって、8 日令以降孵化直前にかけて発現するプロテアーゼ活性によって、30 kDa たんぱく質は分解されることが示唆された。

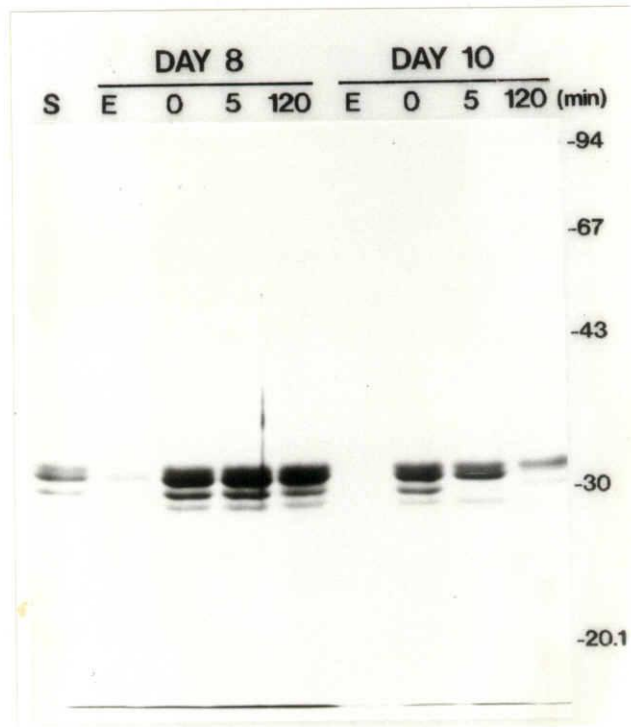


Fig. 7. Degradation kinetics of 30 kDa proteins by crude extracts from day 8 and day 10 eggs. The reaction mixture consisted of the crude extracts from day 8 eggs (1 mg) or day 10 eggs (140  $\mu$ g) and 30 kDa proteins (60  $\mu$ g) in 100 mM glycine buffer, pH 8.0, in a final volume 400  $\mu$ l. The incubation was done at 30 °C for different period times. At the indicated time, reaction was stopped by the addition SDS-sample buffer and boiling for 10 min. The mixture was analyzed SDS-PAGE followed by staining with Coomassie brilliant blue R-250. S, 30 kDa proteins used as the substrate; E, crude extracts used enzymes.

## 考察

カイコ卵中には胚発生期の後半に特異的に活性を発現する 2 種類のプロテアーゼが存在することが示唆された。これらプロテアーゼの活性は幼虫体からは検出されなかったことから、発育中の胚が卵黄たんぱく質の分解を目的として特異的に発現している可能性が示唆された。そこでプロテアーゼの性質を詳細に検討するため、プロテアーゼ活性が検出される 8 日令の卵から硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィー、native-PAGE によって最終的に 2 種類のプロテアーゼを精製した。1 つのプロテアーゼの分子量は 30,000 (30k-プロテアーゼ) であり、もう 1 つの分子量は 24,000 (24k-プロテアーゼ) であった。30k-プロテアーゼの 1 から 4 番目までの NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列、Ile-Val-Gly-Gly, はトリプシン様プロテアーゼの活性型の NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列として保存されている配列と一致していた。しかしながら、24k-プロテアーゼの NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列にはこの配列は存在せず、また配列全体を 30k-プロテアーゼのものと比較したところ、両者は完全に異なっていた。一方、各プロテアーゼの酵素学的性質は、非常によく似ており、さらにその性質から両酵素はトリプシン様セリンプロテアーゼに属することが示唆された。しかしながら至適反応温度および失活温度については両酵素間で異なっていた。したがって、両酵素は一次構造の上で異なることが推定されるにもかかわらず、酵素学的性質はよく似ていることが示された。

30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼのカゼインおよび各卵黄たんぱく質に対する分解活性を調査した結果、カゼイン、ビテリンおよび ESP を限定分解することが明らかとなった。したがって両酵素は ESPプロテアーゼのように ESP を特異的に分解するような基質特異性の高いプロテアーゼではないといえる。さらに *in vitro* での 30k-プロテアーゼあるいは 24k-プロテアーゼの反応によるビテリンの分解産物の SDS-PAGE パターンは *in vivo* でのビテリンの分解パターンと一致しており、また両酵素が発現する時期とビテリンの著しい分解が開始する時期とが一致していることから、胚発生中の卵での 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの主な機能はビテリンの分解であることが示唆された。

*in vitro* での 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼによるビテリンの分解産物を詳細に観察すると、ビテリンの 2 種類のサブユニットのうち分子量 178 kDa の重鎖が選択的に分解され、分子量 42 kDa の軽鎖は反応時間内では分解されず安定に残っていた。*in vivo* でも同様の傾向が認められた。このようなビテリンの各サブユニット、特に重鎖

の選択的な分解は、他の昆虫種やエビ類でも観察されている (Courcelles and Kondo, 1980; Masetti and Giolgi, 1989; Mendes and Raccand, 1986; Strella et al., 1985)。さらに、*in vivo* でビテリンの軽鎖が消失するのは幼虫孵化期 (10 日令) であり、この時期には 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの活性はすでに消失している。したがって、ビテリン軽鎖の分解は 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼ以外のプロテアーゼが関与している可能性が考えられる。

30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼは *in vitro* においてビテリンだけでなく ESP も限定分解し、その分解パターンは ESPプロテアーゼによる ESP の分解パターンおよび *in vivo* での ESP の分解パターンと一致していることから、*in vivo* において ESP の分解に関与している可能性も考えられる。しかしながら、胚発生中の卵では ESPプロテアーゼの活性は 5 日令から発現し、また同時に ESP の分解も開始される (Indrasith et al., 1988a, b)。したがって 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの活性が発現する 8 日令にはすでにほとんどの ESP が分解されてしまっていることから、ESP の分解は主に ESPプロテアーゼによって行われ、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼは残存している ESP の分解に関与するものと考えられる。

ビテリンと ESP に加えて 30 kDa たんぱく質はカイコ卵の主な卵黄たんぱく質の 1 つである。*in vitro* の実験では 30 kDa たんぱく質に対して 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼは分解活性を示さなかった (Fig. 7)。さらに *in vivo* においても 30 kDa たんぱく質は 30k-プロテアーゼと 24k-プロテアーゼが活性を示す期間中一定の状態 で存在し、酵素が活性を消失する幼虫孵化期以降に分解されている。したがって 30 kDa たんぱく質の分解は、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼ以外のプロテアーゼによっていると考えられる。

したがって、卵黄たんぱく質の分解に関与するプロテアーゼは 3 つのグループに分類される。第 1 のグループは ESPプロテアーゼであり、このプロテアーゼの活性の増加に依存して、ESP の特異的な分解が進行する。第 2 のグループは 30k-プロテアーゼと 24k-プロテアーゼで、両酵素活性の発現によりビテリンの重鎖の分解が進む。さらに孵化直前に第 3 のグループのプロテアーゼ活性が発現し、ビテリンの軽鎖、30 kDa たんぱく質を含む残存している全ての卵黄たんぱく質の分解が進行する。このように胚発生中の卵では 3 つの異なる機能を持つグループのプロテアーゼを差時的に発現することにより卵黄たんぱく質を選択的に分解していると考えられる。

## 摘要

1. ビテリンの著しい分解が起こる時期（8 日令）と一致して 2 種類のプロテアーゼ、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼ、が活性を発現していた。
2. 2 種類のプロテアーゼを 8 日令の卵から、硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィー、native-PAGE により各々単一なたんぱく質として精製した。
3. 1 つの酵素は分子量 30,000（30k-プロテアーゼ）であり、他の 1 つは 24,000（24k-プロテアーゼ）であった。NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列は、両酵素間で完全に異なっていた。
4. 両酵素は非常によく似た酵素学的性質を示した。その性質から両酵素はトリプシン様セリンプロテアーゼに属するとされた。一方、至適反応温度および失活温度については両酵素間で異なっていた。
5. 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼは、カゼイン、ビテリン、ESP を分解したが、30 kDa たんぱく質に対しては分解活性を示さなかった。また、*in vitro* でのビテリンの分解産物の SDS-PAGE のパターンは *in vivo* でのビテリンの分解パターンと一致していた。
6. 以上の結果から、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの胚発生中の卵における主な機能はビテリンの分解にあることが示唆された。

### 第3章 ビテリンプロテアーゼの発育時期および組織特異的発現

第2章では胚発生期の卵において、ビテリン分解に関与する2種類のプロテアーゼ、30k-プロテアーゼおよび24k-プロテアーゼ(ビテリンプロテアーゼ)が存在することを明らかにした。両プロテアーゼの活性は、胚発生の特定の時期に限定的に発現し、しかもこの時期にビテリンの顕著な分解が観察されることから、両プロテアーゼの主な機能はビテリンの分解であることを示唆した。ビテリンを含む卵黄たんぱく質の分解は、胚発生卵だけでなく卵形成の過程で出現する退化卵においても観察されている(長谷川、1947)。したがって、ビテリンプロテアーゼは退化卵でも発現している可能性が考えられる。一方、このビテリンプロテアーゼはカゼインおよびESPに対しても分解活性を示した。このことはビテリンプロテアーゼが生体内においてビテリンを含む卵黄たんぱく質以外のたんぱく質の分解に関与している可能性を示唆している。したがって、ビテリンプロテアーゼは胚発生期だけでなく後胚子発育期においても活性を発現している可能性が考えられることから、幼虫、蛹、成虫の各発育期で発現しているか否かを調査することはこの酵素の生体内における機能を明らかにする上で重要である。

一方、これまでは *in vitro* の系でビテリンプロテアーゼがビテリン分解活性を持つことを示してきた。しかしながら、実際卵内においてビテリンプロテアーゼがビテリンの分解に関与しているか否かは明かではない。少なくともビテリンプロテアーゼがビテリンを分解するためには、両者が同じ局在性を示す必要がある。ビテリンプロテアーゼの局在性は、ビテリンプロテアーゼに特異的な抗体を作製し、この抗体との反応物を検出することによって調査できる。そこでこの章では精製した各ビテリンプロテアーゼに対する抗体を作製し、この抗体を用いて各発育段階からビテリンプロテアーゼの検出を試みた。さらに、卵内での酵素の局在性を免疫組織化学的手法を用いて調査した。



## 材料と方法

### 供試材料

供試蚕品種は N<sub>4</sub> 種である。3 時間以内に産下された卵を採集し、温度 25 °C、湿度 75 % の条件で保護し、胚発生を進めた。この条件で、胚は産下後 7.5 日に点青期に入り、また 10.5 日で幼虫が孵化した。孵化した幼虫は桑葉で飼育した。幼虫期間は 30 日間で、蛹化後 8 日に成虫が羽化した。卵は胚発生期には 0.5 日毎に、また幼虫、蛹、成虫は 1 日毎に供試した。なお、1 から 4 令までは虫体全体を用い、5 令幼虫は解剖して血液、消化液、腸および残渣に分けた。5 令 6 日令の幼虫からは中腸も得た。蛹は中腸と残渣に分けた。さらに 8 日令の蛹からは中腸、吸胃および小腸を供試した。成虫は、口部から繭溶解酵素液を回収した後、中腸と残渣に分けて供試した。これらの試料は、SDS-PAGE 分析のための処理をした。卵の一部はカルノア固定し、免疫組織化学的な観察に用い、残りは SDS-PAGE 分析のための処理をした。なお、酵素の精製は 8.5 日令の卵を用いて第 2 章で述べた方法により行った。

### 供試試薬

Adjuvant Peptide およびパラフィン（ヒストプレップ 568 病理組織包埋用）は和光純薬社より購入した。ニトロセルロース膜（Membrane Filter）はアドバンテック東洋社より、Entellan は Merck 社より得た。パーオキシダーゼ標識付マウス IgG 抗体（ヤギ）は、Zymed Lab 社製を用い、コニカイムノステイン HRP IS-50B はコニカ社製を用いた。ヒストファイン SAB-PO キットおよびヒストファイン DAB 基質キットはニチレイ社から購入した。

### 抗体の作製

抗原としては、第 2 章で述べた方法で精製した 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼ標品をさらに SDS-PAGE によって分離したものをを用いた。すなわち、精製した 30k-プロテアーゼと 24k-プロテアーゼ標品を 12.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、泳動後ゲルを Coomassie brilliant blue R-250 で 10 分間染色し、脱色した。30k-プロテアーゼ標品からは、分子量 30 kDa のポリペプチドが主なたんぱく質バンドとして検出されたが、これより分子量の小さいポリペプチドも薄いバンドとして検出された。低分子

のポリペプチドは、保存中に自己消化によって生じたものであると考えられる。また 24k-プロテアーゼは、分子量 24 kDa のポリペプチドを主要なたんぱく質バンドとして与えた。この 30 kDa と 24 kDa のポリペプチドのバンドを各々のゲルから切り出し、140 mM の NaCl および 25 mM の KCl を含む 10 mM リン酸緩衝液、pH 7.5 (以下これを PBS と呼ぶ) に浸して、ゲル内の緩衝液を置換した。各ゲル片 (約 5  $\mu$ g のポリペプチド) は 300  $\mu$ l (約 3 倍容) の PBS を加えガラスホモゲナイザーで磨砕した後、100  $\mu$ l の Adjuvant Peptide (200  $\mu$ g/100  $\mu$ l PBS) と混合した。この混合液を 1 週間間隔で合計 8 回マウスの腹腔に注射した。最終の注射から 2 週間後に採血を行い、採集した血液を 12,000 g で 5 分間遠心し、得られた上清を抗体として用いた。

#### 試料の調製と SDS-PAGE

卵および 1 令から 4 令までの幼虫には、5 倍容の 200 mM NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、を加え、0  $^{\circ}$ C 中で磨砕した。磨砕液に等量の 2 x SDS-sample buffer を加え、90  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱処理した後、16,000 g で 5 分間遠心し、得られた上清を SDS-PAGE 用試料として用いた。5 令幼虫を消化液、血液、腸および残渣に腑分けした後、腸、脂肪体および残渣については同上の方法により SDS-PAGE 用試料とした。消化液と血液は 5 倍容の 200 mM NaCl を含むリン酸緩衝液、pH 7.2、と混合した後、等量の 2 x SDS-sample buffer を加え加熱処理した。蛹および成虫は中腸、吸胃と残渣に分け、磨砕後同上の方法で処理した。繭溶解酵素液は成虫から採集した後、等量の 2 x SDS-sample buffer を加え加熱処理した。

#### ウェスタンブロット法

電気泳動後 Towbin *et al.* (1979) の方法に従ってたんぱく質をニトロセルロース膜に電氣的にブロットした。たんぱく質をブロットした膜を 2 % スキムミルク溶液 (PBS に溶解) 中で 30 分間振盪した後、2,500 倍に希釈した 24k-プロテアーゼ抗体あるいは 30k-プロテアーゼ抗体を含む 2 % スキムミルク溶液中で、4  $^{\circ}$ C で一晩振盪した。2 % スキムミルク溶液中でよく洗浄した後、2,500 倍に希釈したパーオキシダーゼ標識付マウス IgG 抗体 (ヤギ) を含む 2 % スキムミルク溶液中で室温で 2 時間振盪した。再び 2 % スキムミルク溶液中で洗浄した。抗体と結合したたんぱく質バンドは、コニカイムノステイン HRP 1S-50B で染色し検出した。

## 免疫組織化学

### 1. 組織切片の作製

各発育時期の卵をカルノアの固定液（エタノール：クロロホルム：酢酸＝6：3：1）に浸漬し、室温で一晩静置した。試料を 95 %、90 %、80 % エタノールに順次移し換え、80 % エタノール内でピンセットを用いて卵殻除去を行った。卵殻除去した試料は 80 %、90 %、95 %、100 % エタノール（2 回）および 100 % n-ブタノール（2 回）に順次移し換えた後、n-ブタノール：パラフィン（1：1）に移し、62 °C で 3 時間静置した。続いてパラフィンに移し、62 °C で 2 時間静置した。パラフィンで包埋した後、マイクロームで厚さ 6 μm の切片を作製した。

### 2. 免疫反応

組織切片はスライドガラスに貼付し、キシレン（2 回）、キシレン：エタノール（1：1）、100 %、95 %、85 %、70 %、50 %、30 % エタノールに順次移し換え、流水中で洗浄後 PBS ですすいだ。さらに組織切片上に、3 % 過酸化水素水を滴下し、室温で 10 分間反応させ、反応後 PBS で洗浄した。次に 10 % ウサギ正常血清（PBS に溶解）を滴下し、室温で 10 分間静置した後 PBS で洗浄した。洗浄後 1,000 倍に希釈した 24k-プロテアーゼ抗体を含む 0.1 % ウサギ正常血清溶液を滴下し、37 °C で 3 時間反応させた。反応後 PBS でよく洗浄した。コントロールとして 1,000 倍に希釈したマウス非免疫血清を含む 0.1 % ウサギ正常血清溶液を用いた。抗体と反応した抗原は、ヒストファイン SAB-PO キットとヒストファイン DAB 基質キットを用いて染色することにより検出した。染色後、組織切片は 30 %、50 %、70 %、85 %、95 %、100 % エタノールに順次移し換え、キシレン：100 % エタノール（1：1）、キシレン（2 回）に移し、Entellan (Merck) を用いて封入した。組織像は、光学顕微鏡を用いて観察した。

## 結果

### 1. ビテリンプロテアーゼの免疫学的特異性

精製した 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼを抗原とし、マウスに注射することによって 30k-プロテアーゼ抗体および 24k-プロテアーゼ抗体を作製した。各抗体の精製たんぱく質に対する反応性をウェスタンブロット法で調査した (Fig. 8)。24k-プロテアーゼ抗体は、24k-プロテアーゼおよび 30k-プロテアーゼの双方に対し反応した。同様に 30k-プロテアーゼ抗体も両精製酵素に対して反応した。一方、24k-プロテアーゼ標品からは、24 kDa のポリペプチドとほぼ等しい染色度で 5.6 kDa のポリペプチドが検出された。また、8.5 日令の卵の粗抽出液に対し各抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、24k-プロテアーゼと 30k-プロテアーゼに相当するバンドのみが検出された (Fig. 8)。以上の結果は、今回作製した 2 種類の抗体が 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼに対し共通の免疫反応性を有していることを示している。ウェスタンブロット法での検出感度は 24k-プロテアーゼ抗体が 30k-プロテアーゼ抗体よりも高かったことから、以後の実験は主に 24k-プロテアーゼ抗体を用いることにした。

ビテリンプロテアーゼとこれまでにカイコで報告されている各種プロテアーゼとを比較するため産下直後の卵、5 令 6 日の幼虫の消化液、中腸、8 日令の蛹の中腸、吸胃、小顎および成虫が吐出する分泌液を試料として用い、各試料中に含まれているプロテアーゼと 24k-プロテアーゼ抗体との反応性をウェスタンブロット法で調査した (Fig. 9)。蛹の中腸からは分子量 30 kDa、24 kDa、22 kDa のポリペプチドが染色された。しかし、これ以外の試料はここで用いた反応条件では陽性反応を示さなかった。これらの結果は、幼虫の消化液プロテアーゼおよび中腸 (消化管) プロテアーゼ、蛹の吸胃、小顎中のプロテアーゼ、および繭溶解酵素 (cocoonaase) はビテリンプロテアーゼとは免疫学的に異なっていることを示している。

### 2. ビテリンプロテアーゼの胚発生および後胚子発育にともなう変動

ビテリンプロテアーゼの発育に伴う変動パターンをウェスタンブロット法により調査した (Figs 10, 11, 12)。

胚発生期：24k-プロテアーゼのバンドは産下後から 8 日まで検出されなかったが、8.5 日から検出されはじめ、9.5 日に向かって増加する傾向を示した (Fig. 10)。一方、10

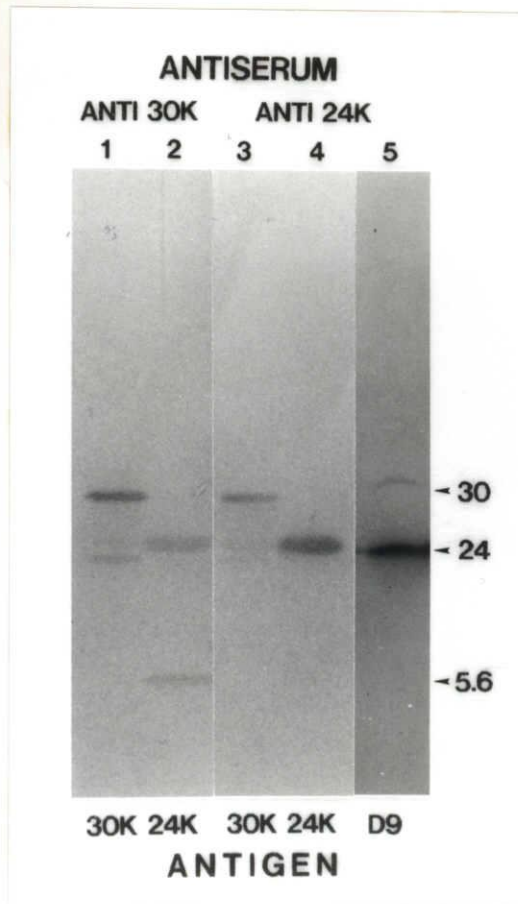


Fig. 8. Immunoreactivity of the anti-30k protease serum and the anti-24k protease serum. The purified 30k protease (30K) and 24k protease (24K) (each 1  $\mu\text{g}$ ) were used as antigen, and probed with each antiserum, anti-30k protease serum (ANTI 30K) or anti-24k protease serum (ANTI 24K). The probed band was visualized by incubating with the peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG serum and Konica immunostain HRP IS-50B. The same way was used in subsequent experiments. The crude extract (200  $\mu\text{g}$  protein) prepared from day 9 eggs (DAY 9) was probed with the anti-24k protease serum. The molecular mass (kDa) is given at the right side.

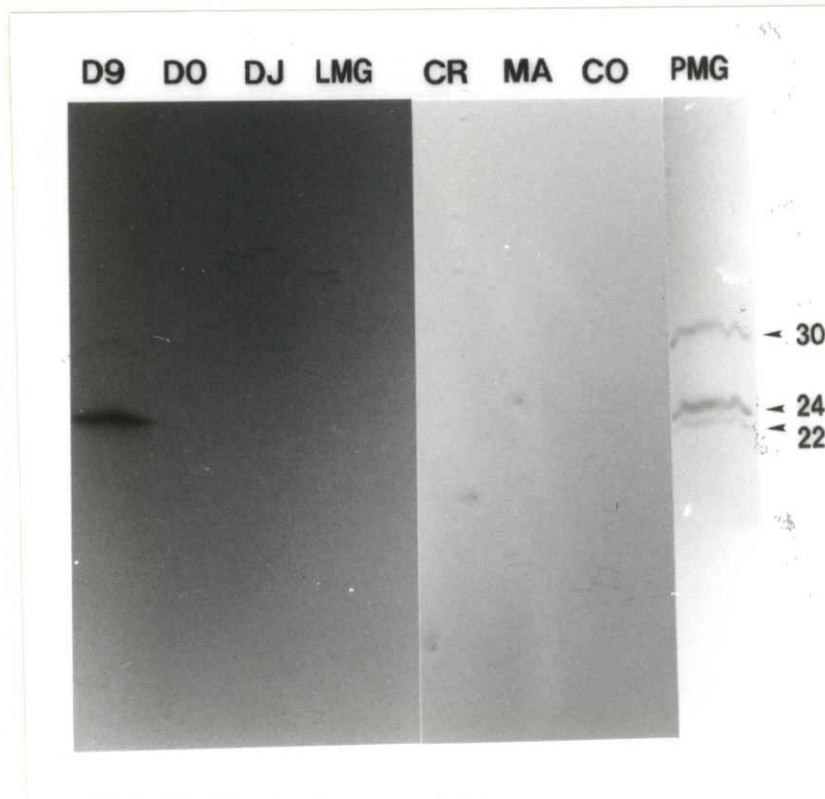


Fig. 9. Tissue distribution of antigens responsible for anti-24k protease serum. The crude extract from day 0 (D0) and day 9 (D9) eggs were used. Digestive juice (DJ) and midgut (LMG) were prepared from day 6 of 5th instar larvae. Midgut (PMG), crop (CR) and mandible (MA) were separately prepared from day 8 pharate adults. Cocoonase (CO) was collected from adults just after emergence. Samples (200  $\mu$ g protein or 1  $\mu$ g protein for cocoonase) were probed with the anti-24k protease serum. The molecular mass (kDa) is given at the right side.

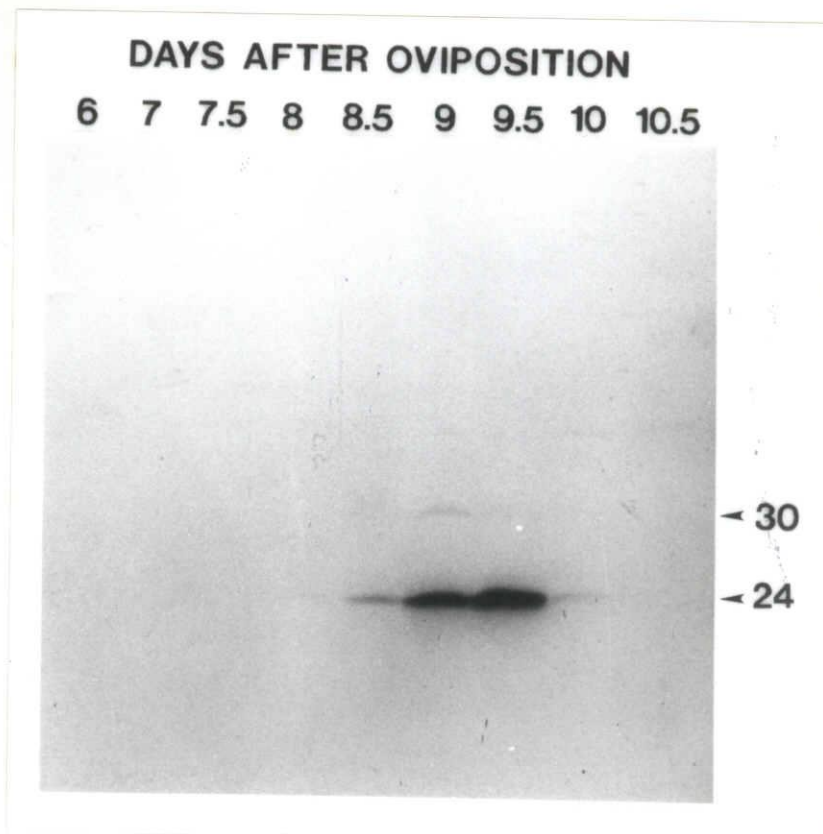


Fig. 10. Developmental changes of the vitellin protease antigens during embryogenesis. The crude extracts (200  $\mu\text{g}$  protein) prepared at the indicated stages were probed with the anti-24k protease serum. The molecular mass (kDa) is given at the right side.

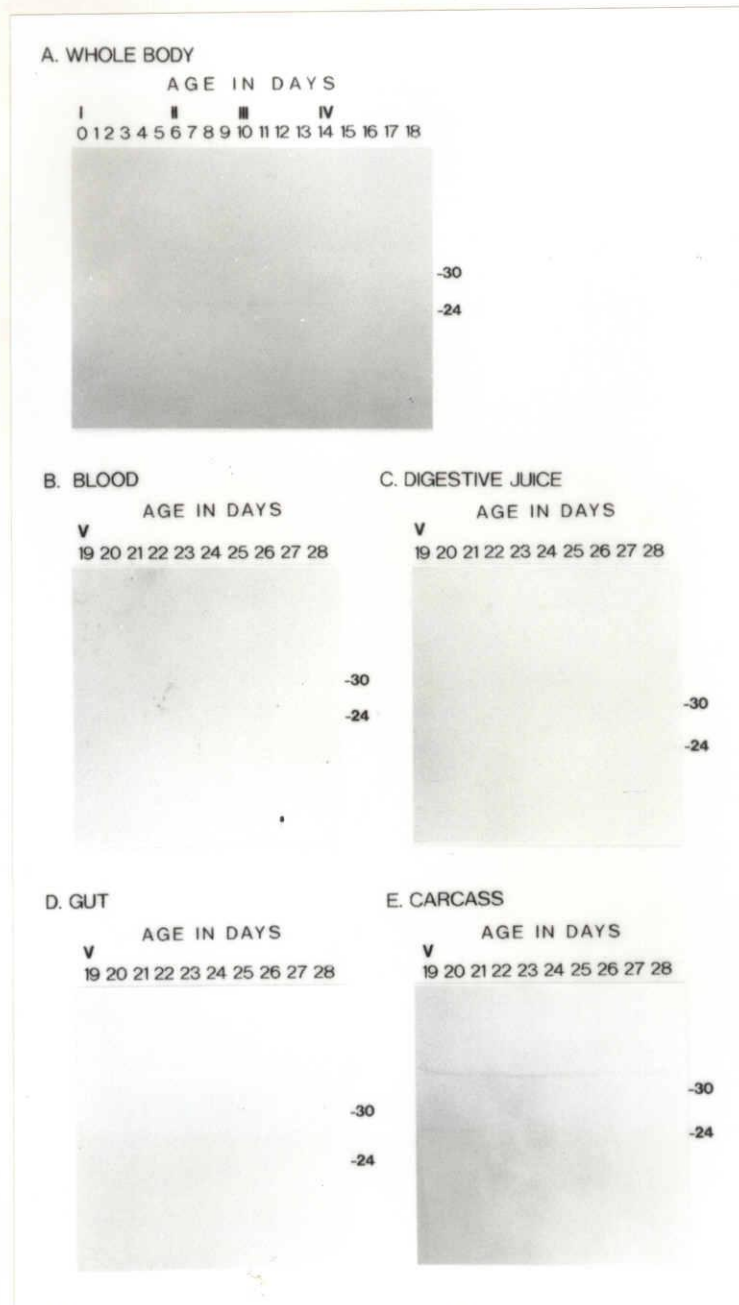


Fig. 11. Immunoblot analysis of the vitellin protease antigen during larval development. From the first instar (I) to the fourth instar (IV), whole body (A) was used to prepared the sample. Blood (B), digestive juice (C), gut (D) and carcass (E) were collected separately from the fifth instar larvae (V) at the indicated stages. Samples were probed with the anti-24k protease serum. The molecular mass (kDa) is given at the right side.



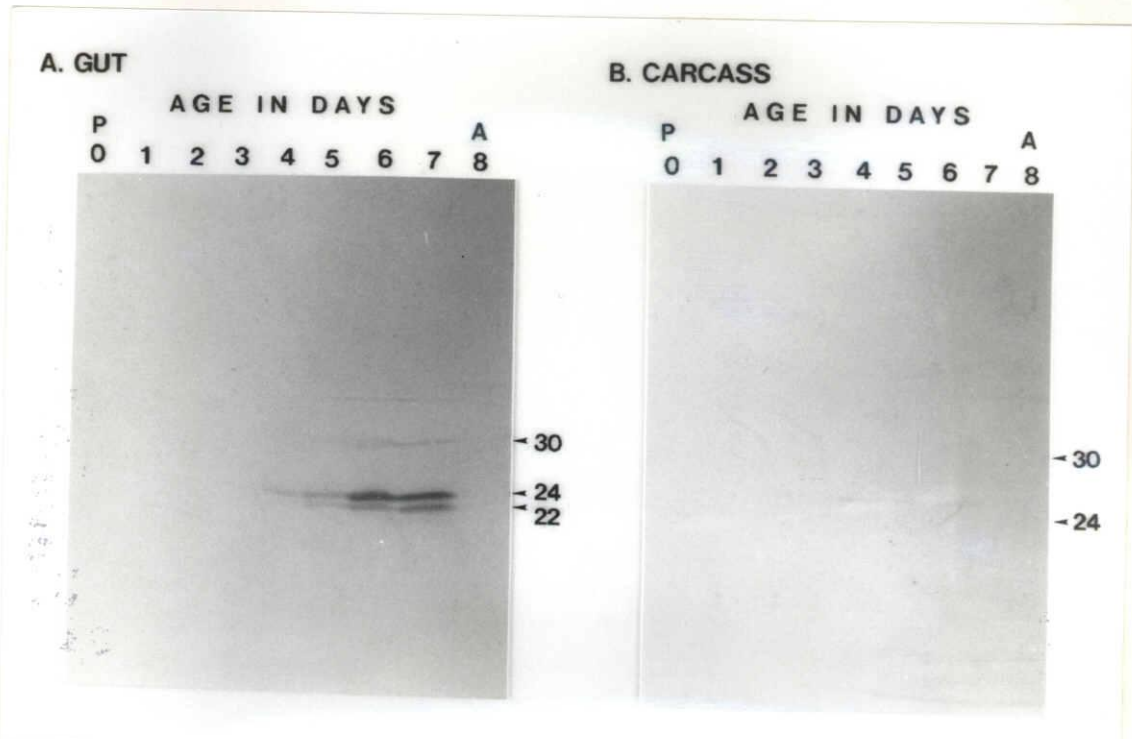


Fig. 12. Immunoblot analysis of the vitellin protease antigens after pupation. Gut (A) and carcass (B) were collected separately from the pupae (P) and adults (A) at indicated stages. Samples were probed with the anti-24k protease serum. The molecular mass (kDa) is given at the right side.

日以降は検出されなくなった。30k-プロテアーゼのバンドは 9 日令の卵に検出されたが 24k-プロテアーゼのバンドに比べると非常に薄かった (Fig. 10)。

幼虫期：調査に用いた全ての組織、全てのステージで抗体に対する反応物は検出されなかった (Fig. 11)。

蛹および成虫期：蛹の中腸では蛹化後 4 日まで反応物は検出されなかった。5 日から 30 kDa、24 kDa および 22 kDa の 3 種のポリペプチドが検出され、発育に伴い増加した (Fig. 12A)。30 kDa および 24 kDa のポリペプチドは、胚発生期から検出した 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼと同じ易動度を示した。一方、これらのポリペプチドは成虫の中腸からは検出されなかった。蛹および成虫の、卵巣を含むその他の組織中には反応物は検出されなかった (Fig. 12B)。

### 3. 胚発生卵におけるビテリンプロテアーゼの局在性

胚発生中の卵におけるビテリンプロテアーゼの局在性を調査するため、9 日令の胚のパラフィン切片を作製し、24k-プロテアーゼ抗体と反応させた後、抗原と結合した抗体をヒストファイン SAB-P0 キットおよびヒストファイン DAB 基質キットを用いて検出した。Fig. 13 に組織切片の光学顕微鏡写真を示した。中腸とその内容物が染色され、その他の組織、器官は染色されなかった (Fig. 13A)。非免疫血清を用いたコントロールでは組織は全く染色されなかった (Fig. 13B)。さらに各発育ステージの胚を用いて、ビテリンプロテアーゼの発育にともなう分布の変化を調査した (Fig. 14)。7 日令ではどの組織、器官も染色されなかった。9 日令になると中腸皮膜細胞の管腔側の先端および中腸内容物が強く染色された。一方、その他の組織、器官は染色されなかった。孵化幼虫では中腸を含む全ての組織、器官は染色されなかった。

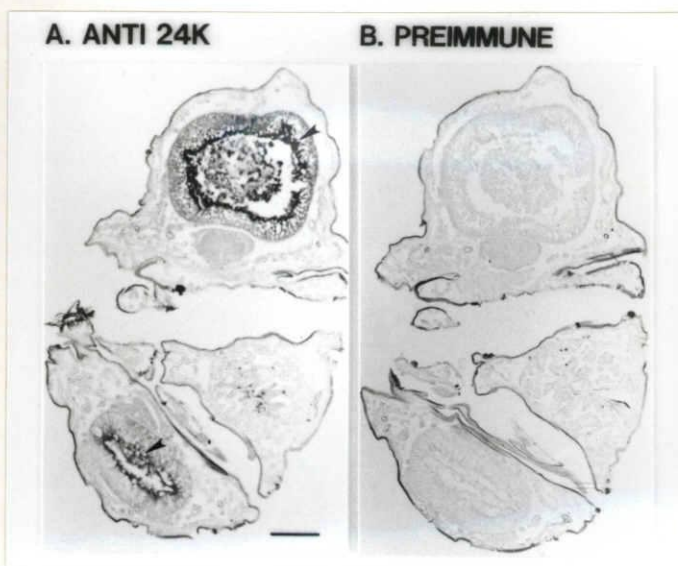


Fig. 13. Immunohistochemical localization of the vitellin protease antigens. Histological section from day 9 egg was probed with the anti-24k protease serum (A), or preimmune serum (B). Immunoreacted antibody was stained with Histofine SAB-PO Kit and Histofine DAB Substrate kit. The specific staining observed at midgut cell apical surface in (A) was indicated by arrows. Bar is 100  $\mu$ m.

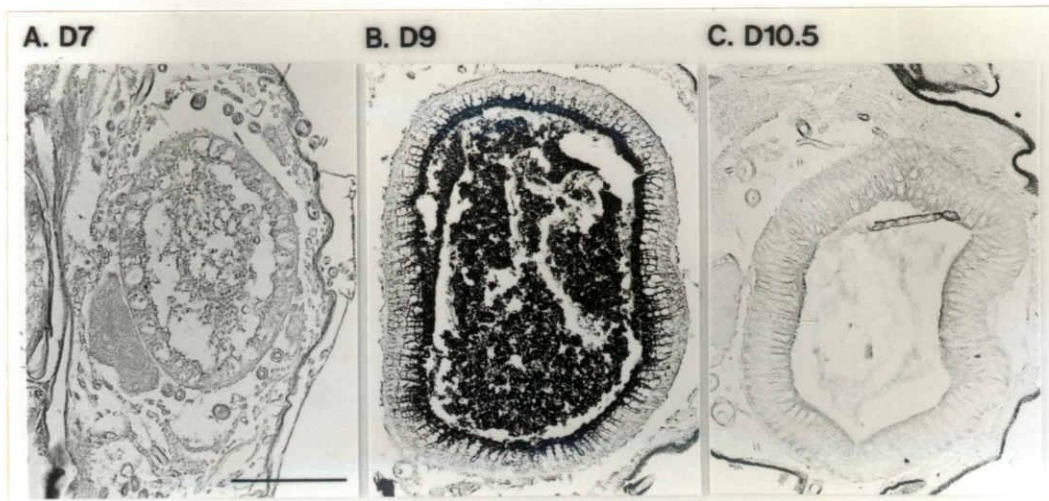


Fig. 14. Developmental changes in vitellin protease localization probed by anti-24k protease serum. Histological section was prepared from day 7 egg (A), day 9 egg (B) and newly hatched larva (C). Bar is 100  $\mu$ m.

## 考察

本実験で作製した 30k-プロテアーゼ抗体および 24k-プロテアーゼ抗体を用いて、ビテリンプロテアーゼの免疫学的特異性と発育に伴う変動について検討を行った。30k-プロテアーゼは 24k-プロテアーゼ抗体に対し、また 24k-プロテアーゼは 30k-プロテアーゼ抗体に対し反応性を示したことから、2 つのプロテアーゼは免疫学的に相同であることが明かとなった。30k-プロテアーゼ抗体を用いたウェスタンブロット法によって 24k-プロテアーゼ標品からは分子量 24 kDa のポリペプチドに加えて、分子量 5.6 kDa のポリペプチドが検出された。一方、24k-プロテアーゼ抗体はこの 5.6 kDa ポリペプチドに対して反応性を示さなかった。このことは、5.6 kDa のポリペプチドが 30k-プロテアーゼ抗体によって特異的に認識される抗原決定部位を保持していることを示唆している。この 5.6 kDa ポリペプチドはおそらく 30k-プロテアーゼに由来すると考えられるが、30k-プロテアーゼたんぱく質が分解されることによって生じたものであるか否かについてはさらに検討する必要がある。またこのポリペプチドが 24k-プロテアーゼ標品中に混入していた理由についても疑問点として残された。

一方、24k-プロテアーゼ抗体は種々のプロテアーゼ、すなわち完成卵に存在するカテプシン様プロテアーゼ (Kageyama and Takahashi, 1990)、幼虫消化液および中腸 (消化管) プロテアーゼ (Eguchi and Iwamoto, 1976; Sasaki and Suzuki, 1982)、蛹の中腸、吸胃、小腸に存在するプロテアーゼ (江口・巖本, 1975; Eguchi and Iwamoto, 1976) および成虫が吐出する繭溶解酵素 (cocoonase) (Kafatos *et al.*, 1967) に対して反応性を示さなかった。したがって、ビテリンプロテアーゼはこれまでにカイコで報告されている他のプロテアーゼとは免疫学的に異なることが明かとなった。しかしながら、蛹中腸に存在する 3 つのポリペプチドが 24k-プロテアーゼ抗体に対し反応性を示した。2 つのポリペプチドは分子量が各々 30 kDa および 24 kDa であり、これらは 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼの分子量と一致していることから 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼである可能性が考えられる。つまりビテリンプロテアーゼは胚期だけでなく蛹の中腸においても発現していることを示唆している。しかし、この点に付いては今後明かにされなければならない問題として残された。

全発育段階を通してビテリンプロテアーゼの変動を調査した結果、ビテリンプロテアーゼは胚発生期の後半と蛹末期の中腸のみで検出され、その他の発育時期には検出されな

った。このことは、本酵素が極めて限られた発育期に集中して活性を発現していることを示している。胚発生期においても 24k-プロテアーゼが産下後 8.5 日から 9.5 日にかけての 1 日間のみを検出された。30k-プロテアーゼは産下後 9 日に検出されたのみである。30k-プロテアーゼのバンドは 24k-プロテアーゼに比べて、その染色度が非常に薄かった。しかし、酵素活性の面からみると、すでに第 2 章でも述べたように両酵素間に大差はなく、比活性の違いでも 2 倍以内であった。したがって今回のウェスタンブロット分析の結果は、他のたんぱく質によってその反応性が阻害された結果によると考えられる。事実、8 から 9 日令の卵には分子量 30 kDa 付近のたんぱく質が多量に存在しており、30k-プロテアーゼとほぼ同じ位置に泳動されている。そこで分子量 30 kDa 付近のたんぱく質を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって除いた標品についてウェスタンブロット分析を行った（結果省略）。その結果、30k-プロテアーゼのバンドは 24k-プロテアーゼのバンドとほぼ等しい強さで検出された。したがって粗抽出物を用いたウェスタンブロット分析で 30k-プロテアーゼが検出されにくかったのは、共存たんぱく質の影響によるものであり、9 日令の卵には活性でみられたように 30k-プロテアーゼ抗原も存在しているといえた。

蛹期中腸での抗原の出現時期は成虫系中腸細胞の形成時期に対応している（辻田、1943）。したがって、この酵素は成虫型中腸に特異的なプロテアーゼとも考えられるが、成虫羽化してからは消失してしまうので、このプロテアーゼが成虫中腸で機能しているとは考えられない。また、この時期の中腸がビテリンの代謝に積極的に関与しているとの報告もない。一方この時期に、蛹化後ほとんど変化の認められなかった中腸内容物が著しく減少するのが観察された（結果省略）。したがって、蛹期のプロテアーゼはこのことに関与しているのかもしれない。また、この時期の蛹は卵形成の時期であり、卵形成の過程で未完成の卵胞は退化卵となる（長谷川、1947）。つまり、それまでに蓄積した全ての卵黄たんぱく質を分解して消失してしまう。しかしながら抗原が検出されたのは中腸のみで、卵巣を含むその他の組織からは検出されなかった。したがって、ビテリンプロテアーゼは退化卵での卵黄たんぱく質の分解には関与していないといえた。

免疫組織化学による観察から、ビテリンプロテアーゼは 9 日令の胚の中腸に局在していることを示した。Izuhara and Yamashita（未発表）は、ビテリン抗体を用いた免疫組織化学的な観察から、この時期の卵ではビテリンは中腸内に取り込まれていることを示している。このことは、ビテリンプロテアーゼが中腸で活性を発現し、中腸内に取り込まれたビテリンの限定分解に関与していることを示唆している。ビテリンプロテアーゼが発現して

いる時期の中腸組織は形態的にはほぼ完成している。Miya (1976) は、点青 I 期に臍孔閉鎖がおこることによって中腸が管状化し、この時期から催青期にかけて中腸組織の形態形成が完了することを示している。また竹内 (1955) は、催青期の中腸の管壁が中腸内に取り込んでいた養液を次第に吸収し肥厚することを観察している。したがって、この時期の胚は中腸内に取り込まれたビテリンをビテリンプロテアーゼによって分解し、生じた分解産物を小腸組織を通して吸収していると考えられる。

ビテリンの代謝利用は、胚発生の後半、特に各組織、器官の分化を終え幼虫体としてほぼ完成し、孵化後の自立した栄養摂取を行うようになる体制を整える時期に旺盛に起こっている。この利用に直接関わっているのがビテリンプロテアーゼであることが判明した。また蛹期の後半、羽化直前に成虫体としてほぼ完成した中腸でその内容物を代謝するという現象にもかかわっていることが示唆された。いずれの場合も新たな生活環境に適応した生理機能を発展させる発生の一つの段階といえ、この発生過程の機構を解明するために本プロテアーゼはかけがえのない指標たんぱく質となると考えられる。

## 摘要

1. 精製した 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼを抗原にして、マウスを用いて抗体を作製した。得られた抗体は共通の免疫反応を示した。つまり、両プロテアーゼは共通の抗原決定部位を持っていることが示された。

2. 全発育時期を通して、ビテリンプロテアーゼの変動を 24k-プロテアーゼ抗体を用いたウェスタンブロット法によって調査した結果、胚発生の後期の一時期と羽化前の蛹の中腸で陽性反応がみられた。胚から検出された陽性バンドは、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼのバンドであった。蛹中腸では、3本のバンドが検出され、このうちの 2本は胚のものに相当していた。

3. 免疫組織化学的な観察から、ビテリンプロテアーゼは胚の中腸上皮細胞の管腔側で発現していた。つまり、ビテリンプロテアーゼは胚発生の後半、胚の中腸で活性を発現し、中腸内に取り込まれたビテリンの分解に関与しているとされた。



## 第4章 ビテリンプロテアーゼの cDNA クローニング、塩基配列の決定および遺伝子 発現

カイコ卵において 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼは胚発生の特異的な時期、すなわちビテリンの著しい分解が起こる時期に活性を発現することを第2章で示した。両酵素は胚発生に伴ってよく似た活性の変動パターンを示すだけでなく、非常によく似た酵素学的性質を示した。さらに各精製たんぱく質に対して作製した抗体、30k-プロテアーゼ抗体および 24k-プロテアーゼ抗体に対する反応性から両酵素は免疫学的にもよく似ていることが明らかとなった。しかしながら NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列については全く相同性がみられず、両酵素たんぱく質は一次構造のレベルで異なることが予想された。したがって、両ビテリンプロテアーゼの一次構造を解析することは、両酵素を同定する上で重要と思われる。

一方、第3章において、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼは完成卵には存在せず、胚発生期に卵内で新たに生合成され、その結果プロテアーゼ活性を発現することが明かにされた。つまりプロテアーゼ活性の出現はもともと存在していた不活性型酵素の活性化によるものではないと考えられる。したがって、胚発生期におけるプロテアーゼ活性の調節機構を解明するためには、まずプロテアーゼの生合成過程を明らかにし、さらにその過程の内どの段階で調節を受けているのかを明らかにする必要がある。

そこで本章では、まず両ビテリンプロテアーゼの一次構造を明らかにすることを目的として、ビテリンプロテアーゼ cDNA のクローニングと塩基配列の決定を行った。さらに得られたビテリンプロテアーゼ cDNA をプローブとして、胚発生に伴うビテリンプロテアーゼ遺伝子発現の変化について調査した。ビテリンプロテアーゼをコードする mRNA はプロテアーゼ活性が検出される時期と一致して検出された。そこでさらにビテリンプロテアーゼの生合成過程について検討するため、ビテリンプロテアーゼ mRNA の翻訳活性および翻訳産物の同定を行った。これらの結果をもとにして、胚発生に伴うプロテアーゼ活性変動の調節機構について考察した。

## 材料と方法

### 供試材料

供試蚕品種は N<sub>4</sub> 種である。産卵時間を 3 時間とし、集めた卵を温度 25 °C、湿度 75 % の条件で保護した。この条件で胚は産下後 7.5 日に点青期に入り、また 10.5 日で幼虫孵化が起こった。卵は胚発生期を通して半日毎に集め、直ちに RNA の抽出に用いた。

### 供試試薬

Oligotex-dT30 (Hoffmann-La Roche)、M13mp18 (東洋紡)、Sequenase (United States Biochemical)、Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim)、ウサギ網状赤血球ライセート (和光純薬)、0.24-0.95 kb RNA Ladder (Bethesda Research Laboratories Life Technologies) を使用した。Lambda gt11 Cloning Kit および GigapackII Gold Packaging Extract は Stratagene 社製を用いた。ライゲーションキットおよび逆転写酵素 (RAV-2) は宝酒造社製を用いた。cDNA Synthesis Kit、Protein A-Sepharose CL-4B および Low-molecular-weight Calibration Kit は Pharmacia LKB Biotechnology 社製を用いた。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (比放射能 110 TBq/mmol)、 $^{125}\text{I}$ -sheep anti-mouse Ig serum (比放射能 111 TBq/mmol)、 $^{35}\text{S}$ methionine (比放射能 37 TBq/mmol) およびナイロン膜 (Hybond N+ nylon membrane) は Amersham から購入した。制限酵素は各々東洋紡社製 (EcoRI, PstI) およびニッポンジーン社製 (BamHI) を用いた。

### cDNA ライブラリーの作製

8.5 日令の卵から Kobayashi and Inagaki (1989) の方法に従いフェノール法によって全 RNA を抽出した。全 RNA から Oligotex-dT30 を用いて poly(A)<sup>+</sup>RNA を精製した。この poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型として二重鎖 cDNA を合成し、両末端に EcoRI アプターを連結した。これらの操作は cDNA Synthesis Kit を用いて行った。EcoRI 末端を持つ cDNA を  $\lambda$ gt11 ベクター (Lambda gt11 Cloning Kit) の EcoRI 切断部位にライゲーションキットを用いて連結し、 $\lambda$ gt11cDNA 組換え体を形成した。GigapackII Gold Packaging Extract を用い *in vitro* packaging によりこの組換え体 DNA をファージに組み入れ、生じたファージをスクリーニングに用いた。

## ビテリンプロテアーゼ cDNA のスクリーニング

組換え体入フェージを大腸菌 Y1090 に感染させプラークを形成させた。このプラークに予め 10 mM IPTG で処理しておいたニトロセルロース膜をあて、膜上にたんぱく質を吸着させた。この膜を 2 % スキムミルク溶液 (PBS に溶解) 中で室温で 30 分間振盪した後、2,000 倍に希釈した 24k-プロテアーゼ抗体を含む同様の溶液中で 4 °C、一晩振盪した。2 % スキムミルク溶液でニトロセルロース膜を洗浄し、続いて [<sup>125</sup>I] で標識したマウス IgG 抗体 (74 KBq/20 ml) (ヤギ) を含む同様の溶液中で室温で 2 時間振盪した。陽性のプラークから回収したフェージを再び大腸菌に感染させ、スクリーニングを繰り返した。この操作はすべてのプラークが陽性になるまで繰り返した。

## cDNA の塩基配列の決定

クローン化した組換え体入フェージを EcoRI で切断し、得られた cDNA インサートを M13mp18 ベクターのマルチクローニングサイト内にある EcoRI 切断部位にライゲーションキットを用いて連結した。M13mp18 cDNA 組換え体と JM103 のコンピテント細胞を混合し、形質転換した JM103 コンピテント細胞を得た。形質転換した細胞と JM103 とを同時に培養することにより、組換え体 M13 フェージのプラークを形成させた。組換え体 M13 フェージの RF (replicative form) DNA を調製し (Sambrook *et al.*, 1989)、PstI と BamHI で切断した。キョシーケンス用デレーションキットを用い、cDNA インサートのプライマーアニーリングサイト側の末端から順次欠損を起こしたミュータント cDNA を組み入れた M13mp18 フェージを作製した。種々の長さの cDNA インサートを含む M13mp18 フェージの 1 本鎖 DNA を調製し、これらをテンプレートとしてシーケンス反応に用いた。シーケンス反応は Sequenase を用い、ジデオキシ法 (Sanger *et al.*, 1977) により行った。塩基配列の解析は、自動 DNA シーケンサー (model ABI 370A, Applied Biosystems) により行った。また一次構造は、GENETYX (SDC Software Develop) により推定した。

## RNA の塩基配列の決定

### 1. オリゴヌクレオチドの調製

cDNA の 39 から 58 までの塩基配列と相補な 20 mer [5'GTGGGGGATGAGGCGGCTAA3'] のオリゴヌクレオチドを DNA シンセサイザー (model 391A, Applied Biosystems) により合

成した。合成 DNA は 27 % アンモニア水中、55 °Cで一晩インキュベートすることにより塩基の脱保護を行った。アンモニア水を蒸発乾固した後、蒸留水に溶かし、ブタノール抽出を 3 回繰り返す、最後にエーテル抽出を行った。エーテルを除いて適当量の蒸留水に溶かし、逆転写酵素のプライマーとして用いた。

## 2. シークエンス反応

8.5 日令の卵から抽出した poly(A)<sup>+</sup>RNA (0.5 pmol) を鋳型にしてプライマーとアニーリングさせた。シークエンス反応は 20 unit の逆転写酵素 (RAV-2) を用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (370 KBq) 存在下でジデオキシ法により行った。塩基配列はポリアクリルアミドゲル電気泳動後のオートラジオグラムから解析した。

## ノーザンブロット法

### 1. ホルムアルデヒドゲル電気泳動とナイロン膜への転移

各発育時期の卵から抽出した全 RNA (20  $\mu$ g) に、2.0  $\mu$ l の 5 x MOPS、3.5  $\mu$ l の formaldehyde、10.0  $\mu$ l の formaldehyde gel-loading buffer (50 % glycerol、1 mM EDTA、0.25 % BPB、0.25 % xylene cyanol FE) を加え、電気泳動用試料とした。2.2 M formaldehyde を含む 1.2 % アガロースゲルを作製し、電気泳動緩衝液 (1 x MOPS) に浸して 5 V/cm、5 分間プレランした後、試料を添加し、3-4 V/cm で電気泳動した。泳動後のゲルから RNA をナイロン膜 (Hybond N+ nylon membrane) に転移した。転移は 20 x SSPE をブロッティングバッファーとして用い、毛細管現象を利用する方法で行った。

### 2. プロブの作製

cDNA を鋳型にして、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (1.85 MBq) を用いランダムプライマー法により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] で標識したオリゴヌクレオチドを作製した。反応は Random Primed DNA Labeling Kit を用いて行った。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] で標識したオリゴヌクレオチドは、エタノール沈澱を 3 回繰り返す、沈澱を乾固した後、20  $\mu$ l の TE に溶解した。

### 3. ハイブリダイゼーション

RNA をブロットしたナイロン膜はプレハイブリダイゼーション溶液 (5 x SSPE、50 % formamide、5 x Denhardt's reagent、0.5 % SDS、10 mg/ml salmon sperm DNA) に浸し、42 °Cで 1 時間インキュベートした。プレハイブリダイゼーション溶液を取り除いた後、プレハイブリダイゼーション溶液に [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] で標識した DNA プロブ (2 x 10<sup>7</sup> cpm/4 ml) を加えたハイブリダイゼーション溶液にナイロン膜を浸し、42 °Cで

12 時間インキュベートした。インキュベート後ナイロン膜は洗浄するため 100 ml の 0.1 % SDS を含む 2 x SSPE 溶液に浸し、42 °C で 15 分間振盪した。この操作を 3 回繰り返した。さらに 200 ml の 0.1 % SDS を含む 0.1 % SSPE 溶液に浸し、65 °C で 15 分間振盪した。この操作は 2 回繰り返した。洗浄後ナイロン膜は室温でオートラジオグラフィを行い、反応物を検出した。

#### in vitro たんぱく質翻訳と翻訳産物の同定

各発育時期の卵から抽出した全 RNA を用いて、 $[^{35}\text{S}]$ methionine (18.5 MBq/ml) を含むウサギ網状赤血球ライセート中で in vitro たんぱく質翻訳させた。反応終了後、2 x SDS-sample buffer を加え、90 °C で 3 分間加熱処理し、SDS-PAGE 用試料とした。一定量を glass filter にスポットし、トリクロロ酢酸不溶性画分をカウントすることにより取り込まれたアイソトープ量を定量した。放射能は、液体シンチレーションカウンター (Beckmann) で測定した。

たんぱく質翻訳反応後、反応液に 10 % SDS 溶液を加えて混合し、続いて 20 % Triton X-100 溶液を加えよく混合した。この混合液に 24k-プロテアーゼ抗体 (あるいは 30k-プロテアーゼ抗体) を加え、37 °C で 1 時間振盪した。次にマウス Ig 抗体を加え、37 °C で 1 時間振盪した。さらに、Protein A-Sepharose CL-4B を加え、37 °C で 1 時間振盪した。この混合液をミニカラムに移し、5 ml Triton-saline 溶液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.0、0.1 % Triton X-100、140 mM NaCl、1 mM EDTA) で洗浄した後、さらに 3 ml の蒸留水で洗浄した。2 x SDS-sample buffer を加え室温で 1 時間インキュベートした後、遠心し、抗原-抗体反応物を Protein A-Sepharose CL-4B から溶出した。溶出液を 90 °C で 3 分間加熱処理し、SDS-PAGE 用試料として用いた (Kobayashi and Inagaki, 1989)。たんぱく質中のアイソトープ量は上述の方法に従い定量した。たんぱく質の分析は各 SDS-PAGE 用試料を SDS-PAGE で分離後、フルオログラフィー (Skinner and Grisgold, 1983) により行った。

## 結果

### 1. cDNA のクローニングと塩基配列の決定

8.5 日令の卵の poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型にして cDNA ライブラリーを作製した。2 x 10<sup>6</sup> 個以上の組換え体ファージに対してスクリーニングを行い、4 個の陽性クローン (λ cVP-1, -2, -3, -4) を得ることができた。各クローンは異なるサイズの cDNA を挿入していた。λ cVP-1 の挿入 cDNA が最長であり、アガロースゲル電気泳動の易動度から 0.9 kbp と算定された。この大きさは分子量 30 kDa のプロテアーゼをコードしうる大きさである。そこで cDNA の塩基配列を決定するため、λ cVP-1 の挿入 cDNA を EcoRI 消化によって切り出し、M13mp18 ベクターにサブクローンした。cDNA の制限酵素地図およびシーケンスストラテジーを Fig. 15 に示した。シーケンスの結果、cDNA の 5' 末端側が欠損していた。すなわち翻訳開始コドン [ATG] が検出されなかった。そこで cDNA の 5' 末端側の塩基配列は、cDNA の 39 から 58 までの塩基配列に相補な合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型にして逆転写酵素を作用させジデオキシ法により解析した。Fig. 16 に mRNA の塩基配列と推定されるアミノ酸配列を示した。mRNA は 871 塩基からなり、25 塩基の 5' 非翻訳領域、794 塩基の翻訳領域、45 塩基の 3' 非翻訳領域および 6 塩基の poly(A)<sup>+</sup>RNA で構成されていた。翻訳開始コドン [ATG] (+1) より上流の -4 から -1 塩基部位にキイロショウジョウバエで報告されている翻訳開始のための consensus 配列 [C/AAAC/A] が存在していた (Cavener, 1987)。また [TAA] (+793) より下流に poly(A) 付加のシグナル配列 [AATAAA] (Proudfoot and Brownlee, 1976) が 823 から 828 塩基部位に存在していた。

翻訳領域は 264 個のアミノ酸をコードしており、たんぱく質の分子量は 28,520 と算定された。エドマン分解で決定した 30k-プロテアーゼたんぱく質の NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列 (第 2 章) は 28 から 57 番目までのアミノ酸配列と一致していた。また 24k-プロテアーゼの NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列は 90 から 117 番目までのアミノ酸配列と一致していた。2 つの N 型糖鎖結合配列 (Marshall, 1972) が 161 から 163 番目と 251 から 253 番目に存在していた。

### 2. ビテリンプロテアーゼ遺伝子の発現

[α-<sup>32</sup>P] で標識した cDNA をプローブに用い、ノーザンブロット法によって ビテリン

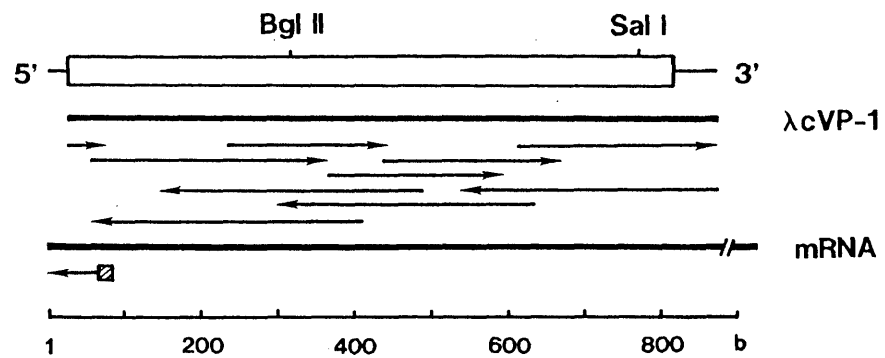


Fig. 15. The restriction map and sequence strategy of cDNA and mRNA for the vitellin protease. The open box represents the coding region. The mRNA and the  $\lambda$ cVP-1 insert DNA are represented by solid bars. The arrows indicate the extent and the direction of sequence determination. Hatched box represents the site used for the synthesis of the twenty base oligonucleotide as the primer for mRNA sequencing. BglII and SalI sites are shown.

```

-25                               -1+1
AGCCAGTACAGTTAGACTCCTCAACATGACAAATTCAC1TTTAAATA 21
                               M T N S L L I
                               1
TGCTTCACGATCTTAGGTTTAGCCGCCTCATCCCCACAAAACCCATCGGGGATATAAGG 81
C F T I L G L A A S S P T K P I G D I R
 10                               20
ATCGTGGGAGGTGAAGACATCGTCATCACAGAGGGCGCCGTACCAAGTATCAGTCATGTTTC 141
I V G G E D I V I T E A P Y Q V S V M F
30K PROTEASE
CGAGGAGCCCATTCTTGCGGTGGAACCTTAGTCGCTGCTGACATCGTTGTTACTGCCGCA 201
R G A H S C G G T L V A A D I V V T A A
 50                               60
CACTGTGTCATGAGTTTTGCTCCAGAAGACTACAGGATCAGAGTAGGATCTTCCTTCCAT 261
H C V M S F A P E D Y R I R V G S S F H
 70                               80
CAACGAGATGGAATGCTTTACGATGTAGGAGATCTAGCTTGGCACCCAGATTTCAATTTT 321
Q R D G M L Y D V G D L A W H P D F N F
24K PROTEASE
CGCTCAATGGATAATGATATCGCCATTTTATGGTTGCCAAAACAGTCATGTTTCGGGGAT 381
A S M D N D I A I L W L P K P V M F G D
110                               120
ACAGTGAAGCTATCGAGATGGTAGAACTAATTCCGAGATCCCCGATGGAGATATTACA 441
T V E A I E M V E T N S E I P D G D I T
130                               140
ATTGTAACTGGATGGGGCCATATGGAGGAAGGCGGTGGTAACCCTTCTGTCTTCAAAGA 501
I V T G W G H M E E G G G N P S V L Q R
150                               160
GTTATAGTCCCTAAAATCAACGAAGCTGCGTGCGCCGAGGCTTACTCACCGATTTACGCA 561
V I V P K I N E A A C A E A Y S P I Y A
170                               180
ATAACCCCCAGAATGCTATGCGCTGGAACGCCTGAAGGTGGCAAAGACGCGTGTCAAGGT 621
I T P R M L C A G T P E G G K D A C Q G
190                               200
GACAGTGGTGGTCCTTTGGTCCATAAAAAGAAATTGGCCGGCATCGTTTCTTGGGGGCTT 681
D S G G P L V H K K K L A G I V S W G L
210                               220
GGCTGTGCGAGACCAGAATACCCAGGGGTCTACACGAAGGTGTCCGCGCTAAGGGAATGG 741
G C A R P E Y P G V Y T K V S A L R E W
230                               240
GTTCGACGAAAACATAACCAATCTGAGACTGAAGCATATTTTAAGGAGATTTTAAACAAC2T 801
V D E N I T N L R L K H I L R R F *
250                               260
GTTCAGGGCAATTATTTGAAGAAATAAAATTATGAAATGTAAAAAA 848

```

Fig. 16. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the vitellin protease. The nucleotides are numbered in the 5' to 3' direction beginning with the first residue of the initiation codon. The amino acids are also numbered from the initiation methionine. The NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequences of the 30k protease and the 24k protease determined by Edman degradation are underlined. The proposed signal sequence cleavage site is marked by arrow. The presumed polyadenylation signal is double-lined. The N-linked glycosylation sites are boxed.



プロテアーゼ mRNA の検出を行った。8.5 日令の poly(A)<sup>+</sup>RNA を供試した結果、1.3 kb の mRNA が検出された。この大きさは mRNA の塩基配列から推定される大きさと一致していた。したがって検出された mRNA が ビテリンプロテアーゼ mRNA であると結論した。さらに各発育時期の卵から抽出した全 RNA を用いノーザンブロットを行った (Fig. 17)。産下後から 7 日令まで反応物は検出されなかった。8 日令から mRNA が検出されはじめ 9 日令に向かって増加する傾向を示したが、10 日令になると減少しほとんど検出されなかった。mRNA の易動度は発育時期を通して常に一定であった。このことは mRNA の発育に伴う量的変動は同一の遺伝子からの転写活性に依存していることを示唆している。

### 3. 翻訳活性の発育に伴う変化

各発育時期の卵から抽出した全 RNA を [<sup>35</sup>S]methionine 存在下で *in vitro* 翻訳させた。この系では複数のポリペプチドが合成された (結果省略)。翻訳産物は 24k-プロテアーゼ抗体と反応させ、免疫沈降物をフルオログラフィーにより分析した (Fig. 18)。分子量 32 kDa のポリペプチドが 8 日令から 9.5 日令にかけて検出された。同じ結果が 30k-プロテアーゼ抗体を用いて免疫沈降させた場合にも得られた。したがって 32 kDa ポリペプチドが、ビテリンプロテアーゼ mRNA の翻訳産物であることが示唆された。



Fig. 17. Northern blot analysis of expression of the vitellin protease gene during embryogenesis. Total RNAs extracted from eggs at indicated stages were hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNA as a probe. The size (1.3 kb) was estimated by referring the known sizes of mRNAs (0.24-9.5 kb RNA ladder).

本家では cDNA による 24k の塩基配列を決定することによってゼナリソブリンの一次構造の解析を行った。24k-プロテアーゼのアミノ酸配列を他のたんぱく質のアミノ酸配列と比較すると、最も高い相関性を示し、24k の相同性を示した (Davis 他、1987)。James 等 (1987) は、ほとんど全く同一であると報告している。Olson 等 (1987) は、Lys-Gly-Gly の配列を、膜透過に際して糖化ペプチドで置換した His 14 と Asp 90 の間が高い。しかし、まだが配列化がプロテアーゼがトリプシン

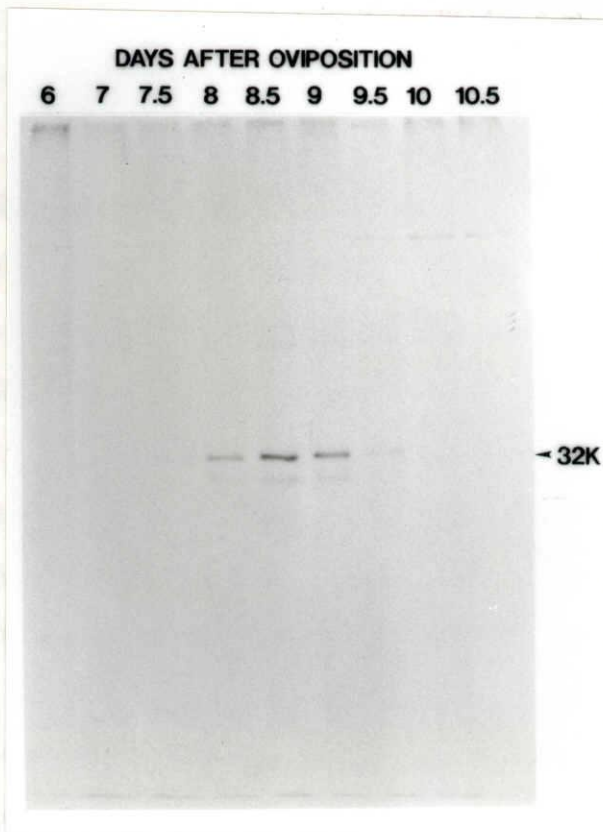


Fig. 18. Identification of a primary translation product and developmental changes of the translation activity. Total RNAs used in Fig. 17 were translated *in vitro* in a rabbit reticulocyte lysate. Total translation products were immunoprecipitated with the anti-24k vitellin protease serum, and analyzed on a 12.5 % SDS-PAGE followed by fluorography. The size (32K) was estimated by Low-molecular-weight Calibration Kit.

一方、ストロン分解により決定した 24k-プロテアーゼの NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列は、今回決定したアミノ酸配列の Asp 90 から His 14 までのアミノ酸配列と一致している。Asp 90 から Phe 264 までのアミノ酸配列からなるポリペプチドの分子量は 19,000 と算定される。さらにこの配列内には N-型糖結合部位が 2 箇所存在し、高マンノース型の糖合糖が両部位に結合すると仮定すると、このポリペプチドの分子量は約 24,000 になると推定される。この値は、SDS-PAGE により決定した 24k-プロテアーゼの分子量、24,000、とよく一致している。さらに 24k-プロテアーゼと 30k-プロテアーゼとは免疫学的に相同であり、また 24k-プロテアーゼによるペプチドマッピングの結果から、両プロテアーゼは共通のポリペプチドで構成されていることが示唆された (結果省略)。したがって、Asp 90 から Phe 264 までのアミノ酸配列からなるポリペプチドが、24k-プロテアーゼと 30k-プロテアーゼとを構成していることが示唆される。また、24k-プロテアーゼは 30k-プロテアーゼ分子内の Arg 89 と Asp 90 の間で切断がおり生じたものであると推測される。

## 考察

本章では cDNA および mRNA の塩基配列を決定することによってビテリンプロテアーゼの一次構造の解析を行った。30k-プロテアーゼのアミノ酸配列を他のたんぱく質のアミノ酸配列と比較すると、30k-プロテアーゼはトリプシン様プロテアーゼと高い相同性を示し、キイロショウジョウバエのトリプシン様プロテアーゼとは最も高い 39.6 % の相同性を示した (Davis *et al.*, 1985)。特に活性基となる 3 つのアミノ酸残基 His 68、Asp 113、Ser 209、および基質結合部位にあたる Asp 203 の周辺の配列は高い相同性を示した (James *et al.*, 1978)。28 番から 31 番目までのアミノ酸配列、Ile-Val-Gly-Gly、はほとんど全てのトリプシン様プロテアーゼの活性型の NH<sub>2</sub>-末端に保存されている配列である (Olson *et al.*, 1970)。したがって、多くのトリプシン様プロテアーゼと同様に Ile-Val-Gly-Gly よりさらに NH<sub>2</sub>-末端側、すなわち Met 1 から Arg 27 までのアミノ酸配列は、膜透過に関与するシグナルペプチドおよびプロテアーゼの前駆体の NH<sub>2</sub>-末端である活性化ペプチドで構成されていると考えられる。von Heijne (1986) の方法で分析すると、Ala 15 と Ala 16 の間のペプチド結合がシグナルペプチダーゼによって切断される可能性が高い。したがって、Met 1 から Ala 15 までがシグナルペプチド、Ala 16 から Arg 27 までが活性化ペプチドであると推定される。以上のような一次構造の相同性は 30k-プロテアーゼがトリプシンファミリーに属していることを示唆している。

一方、エドマン分解により決定した 24k-プロテアーゼの NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列は、今回決定したアミノ酸配列の Asp 90 から Lys 117 までのアミノ酸配列と一致していた。Asp 90 から Phe 264 までのアミノ酸配列からなるポリペプチドの分子量は 19,256 と算定される。さらにこの配列内には N 型糖鎖結合部位が 2 箇所存在し、高マンノース型の複合糖が両部位に結合すると仮定すると、このポリペプチドの分子量は約 24,000 になると推定される。この値は、SDS-PAGE により決定した 24k-プロテアーゼの分子量、24,000、とよく一致している。さらに 24k-プロテアーゼと 30k-プロテアーゼとは免疫学的に相同であり、また V8プロテアーゼによるペプチドマッピングの結果から、両プロテアーゼは共通のポリペプチドで構成されていることが示唆された (結果省略)。したがって、Asp 90 から Phe 264 までのアミノ酸配列からなるポリペプチドが 24k-プロテアーゼに相当すると考えられ、24k-プロテアーゼは 30k-プロテアーゼ分子内の Arg 89 と Asp 90 の間で切断がおこり生じたものであると推測される。

30k-プロテアーゼがその分子内で切断されることによって、24k-プロテアーゼが生成されるとすれば切断部位より NH<sub>2</sub>-末端側、すなわち Ile 28 から Arg 89 までのアミノ酸配列からなるポリペプチドが遊離してくることが予想される。実際、精製後の 24k-プロテアーゼ標品から 30k-プロテアーゼ抗体を用いたウェスタンブロット分析で、24 kDa のポリペプチドに加えて分子量 5.6 kDa のポリペプチドが検出された (第 3 章、Fig. 8)。この 5.6 kDa ポリペプチドは、24 kDa ポリペプチドに対して作製した 24k-プロテアーゼ抗体では検出されなかった。さらに精製した 30k-プロテアーゼを 30 °C で反応させ、反応産物を SDS-PAGE で分析した結果、30 kDa ポリペプチドの減少と同時に 24 kDa ポリペプチドと 5.6 kDa ポリペプチドが生じた。したがって、5.6 kDa ポリペプチドが 30k-プロテアーゼの NH<sub>2</sub>-末端側に相当する断片であり、さらにこの 5.6 kDa ポリペプチドは 24 kDa ポリペプチドと共に挙動していると考えられる。

一方、24k-プロテアーゼの native の分子量は Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーにより 30,000 と推定されている。この値は 2 つのポリペプチドの分子量を加えた値とほぼ一致する。すなわち、24k-プロテアーゼは分子量 24,000 と 5,600 の 2 つのサブユニットで構成されていることを示唆している。この 2 つのサブユニットの会合は、プロテアーゼとして機能する上で必須の条件であると考えられる。なぜなら、5.6 kDa のポリペプチドには活性基の 1 つ、His 68 および Ile-Val-Gly-Gly のアミノ酸配列が含まれており、これらはプロテアーゼ活性を発現する上で欠かすことができない。おそらく 24k-プロテアーゼは 2 つのサブユニットの会合によって 30k-プロテアーゼとよく似た立体構造を保持していると考えられる。これと同じ様な現象がウシのトリプシンで知られている。すなわち、 $\alpha$ -トリプシンは分子内で 1 箇所切断されているにも関わらず、切断されていない  $\beta$ -トリプシンと相同の三次構造を保持している (Higaki and Light, 1985; Kasche, 1976)。しかしながら、24k-プロテアーゼは第 2 章で示したように SDS-PAGE 後でさえ活性を示し、さらにウシトリプシンの場合のように 2 つのサブユニット、すなわち 5.6 kDa と 24 kDa のポリペプチドを結ぶ S-S 結合が存在しないと推定されることから、24k-プロテアーゼが 2 つのサブユニットによって構成されているか否かについてはさらに詳細な実験が必要である。

プロテアーゼ活性の検出される 8.5 日令の RNA に対してノーザンブロット分析を行った結果から、ビテリンプロテアーゼ遺伝子からの転写産物は単一の、1.3 kb の mRNA であることが明かとなった。さらに *in vitro* たんぱく質翻訳系によって、この mRNA は分子

量 32,000 の前駆体プロテアーゼとして翻訳されることが示唆された。一方、ウェスタンブロット分析の結果から、この前駆体プロテアーゼは合成後直ちに 2 つの活性型プロテアーゼ、すなわち 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼへと修飾されることが示唆された。したがって、一次構造の結果も併せて、両酵素は単一の遺伝子から生合成されたものであることが明かとなった。またピテリンプロテアーゼはその活性が胚発生期の卵でピテリンが著しく分解される時期に特異的に発現することから同定されたものである。このプロテアーゼ活性の検出される時期はピテリンプロテアーゼをコードする mRNA が検出される時期と一致しており、さらに翻訳および翻訳後の修飾もほぼ同時に起こることからピテリンプロテアーゼ活性の時期特異的発現は、遺伝子発現の段階で調節されていることが明かとなった。

## 摘要

1. ビテリンプロテアーゼをコードする cDNA をクローン化し、cDNA と mRNA の塩基配列を決定することによって、ビテリンプロテアーゼの一次構造を明らかにした。
2. 推定されたアミノ酸配列は、264 個のアミノ酸残基で構成されており、他の動物のトリプシン様プロテアーゼと高い相同性を示した。
3. cDNA をプローブに用いノーザンブロット法によって、ビテリンプロテアーゼ遺伝子はプロテアーゼ活性が検出される時期と一致して発現していることが明かとなった。
4. *in vitro* たんぱく質翻訳によって、ビテリンプロテアーゼ mRNA の翻訳産物は分子量 32,000 のポリペプチドであり、また胚発生に伴う翻訳活性の変化は転写活性の変化に一致していることが明かになった。さらに、翻訳活性の検出される時期は、第 3 章で示した 30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼが検出される時期と一致していた。
5. 以上の結果から、ビテリンプロテアーゼは単一の遺伝子から生合成されたものであり、翻訳後の修飾によって 2 つのプロテアーゼ、30k-プロテアーゼおよび 24k-プロテアーゼが生じることを示唆した。さらに、胚発生期におけるビテリンプロテアーゼ活性の変動は遺伝子発現の段階で調節されていることが明かになった。

## 第5章 総合考察

本論文は、ビテリンの分解に関与するプロテアーゼ（ビテリンプロテアーゼ）の同定とその生合成機構について検討したものである。今回精製されたプロテアーゼが主にビテリンの分解に関与しているということは次の事実から示された。つまり、(1) 本酵素活性の発現が生体内、つまり卵内でのビテリンの分解と発育時期的に一致していたこと、(2) 精製酵素は胚発生中の卵から検出されるビテリンの分解産物と電気泳動的に相同な分解産物を与えたこと、(3) 本酵素は発生中の胚の中腸管腔側に局在しており、しかも同じ場所にビテリンが蓄積されていたことである。しかし、ビテリン以外にも ESP やカゼインを加水分解したこと、および免疫化学的に同じ反応性を示すポリペプチドが蛹の中腸にも認められたことなどから、本酵素はビテリンの分解、利用のみならず、他のたんぱく質の分解にも関与している可能性は残されている。

ビテリンプロテアーゼはその酵素学的性質および一次構造において、多くの動物に存在しているトリプシン様プロテアーゼとよく似ており、トリプシン様セリンプロテアーゼファミリーに属すると結論された (Neurath, 1984)。多くの場合、トリプシンはたんぱく質の特定のアミノ酸配列、Arg および Lys のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解する。ビテリンプロテアーゼは 30 kDa たんぱく質やビテリンの軽鎖に対して反応性を示さなかったことから、多くのトリプシンとは異なってかなり高い基質特異性を保持しているといえる。本研究の範囲では、本酵素によるビテリン分子の切断点などについては解析されていないので、基質特異性について分子レベルで考察することはできない。しかし、ESP に対しては ESPプロテアーゼと同じ分解産物を与えているので、本酵素も ESPプロテアーゼと同様に Lys 132-Asn 133 および Arg 228-Asp 229 の間の結合のみを切断しているに違いない (Indrasith *et al.*, 1988b)。ビテリン軽鎖には Arg、Lys は各々 5.8、6.7 mol % 含まれており (Izumi *et al.*, 1980)、トリプシン様のプロテアーゼ活性によって低分子化されることが期待される。またビテリン軽鎖は糖、脂質やリン酸を含まない単純ポリペプチドであるから (Izumi *et al.*, 1980; Zhu *et al.*, 1986) これらがプロテアーゼの作用を保護しているとは考えられない。同様のことは 30 kDa たんぱく質についても言える (Izumi *et al.*, 1981)。おそらくプロテアーゼの反応性は基質となるたんぱく質の構造によって規定されていると考えられ、この点についての解明はプロテアーゼの基質選択性を理解する上で大切なことだと思われる。



ESP の分解過程で顕著に認められたように、これらのプロテアーゼによって限定分解された分解産物は、アミノ酸配列の上からさらに分解されうる部位が存在するにもかかわらず、分解されることはなく分解中間産物として残された。この分解中間産物は、卵内においても一定期間は安定な状態で存在している。このことは、限定分解が単に卵黄たんぱく質の分解の効率化、つまりたんぱく質のもつ構造を壊すことによってプロテアーゼが反応しやすくするためや、大きなポリペプチドを小さなポリペプチドに切断し、多くの非特異的なペプチダーゼによって構成アミノ酸に分解するためにあるのではないことを示唆している。むしろ分解中間産物に分解前のたんぱく質にはなかった生理機能を発現させている可能性が考えられる。ピテリンプロテアーゼによってピテリンを分解し、その分解産物を高速液体カラムクロマトグラフィーによって分析したところ、1つの分画に分子量 42kDa の軽鎖のみからなるたんぱく質が得られた（結果省略）。また、ESPプロテアーゼによる ESP 分解産物からは 36 kDa ESP の 3 量体を得られた (Indrasith, *et al.*, 1988b)。これらのたんぱく質がいかなる生理作用を保持しているかは不明であるが、たんぱく質としては分解前のたんぱく質とは全く異なった構造を持っていることは確かである。ウニ卵では、ピテリンの限定分解産物である分子量 160、130、95、91、74、63 kDa のポリペプチドからなる 22S のたんぱく質が胚細胞の接着因子として機能している可能性が示されており (Cervello and Matranga, 1989)、カイコ卵においても限定分解産物の機能の検索は興味ある問題として残されている。

cDNA の塩基配列から一次構造を解析することによって、本酵素は分泌型の前駆体たんぱく質として生合成され、シグナルペプチドおよび活性化ペプチドの遊離によって活性型のたんぱく質として成熟することが推定された。また、免疫組織化学的に本酵素は中腸皮膜細胞の管腔側に局在していることから、このプロテアーゼは中腸皮膜細胞で合成され、管腔に分泌されるといえる。ところで、24k-プロテアーゼは、すでに第 4 章で考察したように、30k-プロテアーゼたんぱく質がさらに自己分解することによって分子内に切断（ニック）が入り生じたものと考えられた。このように分解を受けても生物活性は失われず、基質特異性や阻害剤に対する反応性も変化することはないので、分子内に切断が起こることが、プロテアーゼ合成過程の貴重な一段階にあるとは考えられない。しかし、各プロテアーゼを区別して検出する方法を用いて発育動態や組織局在性を検討すれば、各プロテアーゼに特異的な機能が判明するかもしれない。30k-プロテアーゼとしての成熟酵素がペプチドレベルでは分断されながら、引き続いて生理機能を持ち続けることは、たんぱく質の構

造と機能の関係を解明する上で 1 つのモデル系として役立つかもしれない。

本酵素は、卵形成期に卵黄たんぱく質とともに卵内に蓄積されるのではなく、胚発生期に新たに生合成され活性を発現することを示した。この生合成過程は遺伝子発現の段階で調節されていることが mRNA の翻訳活性を測定することによって判明した。ESPプロテアーゼも、本酵素と同様に胚期にその遺伝子が発現するとされている (Indrasith *et al.*, 1988b)。この 2 つのプロテアーゼの発現は、すでに緒論で述べた他の動物種にみられているプロテアーゼとは異なって、胚の発生のプログラムに組み込まれた発現現象であるところに特徴がある。つまり、ESPプロテアーゼとピテリンプロテアーゼをコードする遺伝子の差時的発現によって卵黄たんぱく質が選択的に分解され、その分解産物が胚に利用されているのである。これまでの分子発生学は、胚体そのものを形成する構造たんぱく質や機能たんぱく質を指標にして進められてきたが、ここに示したように卵黄たんぱく質の利用系もこの範疇に入れることができ、胚の発育と卵黄物質の利用を統一して理解する上で貴重な知見を与えたことになる。

本酵素が発現する時期には中腸皮膜細胞は形態的にはほぼ完成している。この時期はすでに中腸細胞の先端では微絨毛の伸長が起こっており、さらに孵化に向けて基底膜や筋原組織が形成され、器官全体の構築が完了ようになる (Miya, 1976)。しかし、幼虫の中腸で機能する消化液プロテアーゼはこの時期にはまだ合成されておらず、孵化直前になってはじめて合成される。したがって、中腸は孵化直前に機能的には完成し、孵化した幼虫が摂食した食物の消化、吸収に備えているといえる。一方プロテアーゼの面からみると、胚の中腸はまず卵黄たんぱく質を分解、吸収する機能を発現し、孵化にいたる最終段階の発育を完成する。これに続いて中腸細胞の一部、もしくは全細胞が新たな遺伝子群を発現し、全く異なったプロテアーゼ合成を開始する。このプロテアーゼは未分解のまま残されている卵黄たんぱく質を含めて、幼虫が摂食する全ての種類のたんぱく質を加水分解する。時間的には 1 日の間にこの変化が起こっているのであるが、幼虫体の完成においては欠かすことのできない機能の変換であると考えられる。この中腸細胞における機能分化は、胚発生と後胚子発育のつながりを解明する 1 つの契機を与えるものである。

同じ器官で機能する酵素が発生にともなって変化することは、鳥類やほ乳類でも報告されている。鳥類では、胚期の胃のペプシノーゲンと全く異なる分子種の成鳥ペプシノーゲンが孵化と同時に出現する (Yasugi and Mizuno, 1981)。また、新生仔牛の胃は新生児特有の牛乳分解酵素、レンニンを発現し、離乳期になると消失し、変わって成牛型の消化ペ

プシノーゲンが発現するようになる (Eckert, 1988)。このような酵素分子種の発生にともなう変化は、発生の遺伝子制御の問題として検討されている。

卵黄たんぱく質の分解に関与する各酵素の差時的発現がどのようにして調節されているのかを解明することが、今後の課題である。鳥類では、胚期のペプシノーゲンの遺伝子発現が消化管間充織との相互作用によって誘導されることを示している (Hayashi *et al.*, 1988)。またキイロショウジョウバエでは、中腸で機能する酵素の遺伝子発現がホメオティック遺伝子によって調節されていることが示唆されている (Immerglück, 1990)。これは、今後 ESPプロテアーゼおよびピテリンプロテアーゼの遺伝子発現の調節機構を解明する上で重要な手がかりになると考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、始終変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました山下興亜教授に厚くお礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたり、多くの御教示と御助言を頂戴致しました川瀬茂実名誉教授、小林迪弘助教授、柳沼利信博士、佐々木卓治博士、榊原清技官に深く感謝申し上げます。さらに、良き相談相手として協力していただいた研究室の皆様に心からお礼申し上げます。

## 引用文献

- 浅野 悠輔・石原 良三 (1985) 卵 - その化学と加工技術 pp.51-109. 老琳, 東京.
- 安藤 裕 (1988) 無脊椎動物発生学 E.昆虫類 pp.131-248. 培風館, 東京.
- Bownes, M. (1986) Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). *Ann. Rev. Entomol.* 31, 507-531.
- Bownes, M. and Hames, B.D. (1977) Accumulation and degradation of three major yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 220, 149-156.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cavener, D.R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 15, 1353-1361.
- Cervello, M. and Matranga, V. (1989) Evidence of a precursor-product relationship between vitellogenin and toposome, a glycoprotein complex mediating cell adhesion. *Cell Diff. Dev.* 26, 67-76.
- Chen, Y.L. and Yamashita, O. (1990) Nonselective uptake of different 30 kDa plasma proteins by developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci.* 59, 202-209.
- Chinzei, Y., Chino, H. and Wyatt, G.R. (1981) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 11, 1-7.
- Courcelles, D.C. and Kondo, M. (1980) Lipovitellin from the crustacean, *Artemia salina*: Biochemical analysis of lipovitellin complex from the yolk granules. *J. Biol. Chem.* 255, 6727-6733.
- Davis, B.J. (1964) Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 131, 404-427.
- Davis, C.A., Riddell, D.C., Higgins M.J., Holden J.J.A. and White, B.N. (1985)

- A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucleic Acids Res.* 13, 6605-6619.
- Eckert, R. (1988) "Animal physiology" pp.520-554. W.H. Freeman and Company, New York.
- 江口 正治・巖本 章子 (1975) 繭溶解酵素生成における家蚕の中腸、吸胃および小腸の役割. 日蚕雑. 44, 314-320.
- Eguchi, M. and Iwamoto, A. (1976) Alkaline proteases in the midgut tissue and digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 6, 491-496.
- Eguchi, M. and Kuriyama, K. (1983) Relationship between alkaline proteases from the midgut lumen and epithelia of the silkworm: Partial purification and comparison of properties of both proteases-6B3. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B, 29-34.
- Engelmann, F. (1979) Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.* 14, 49-108.
- Ezquieta, B. and Vallejo, C.G. (1985) The trypsin-like proteinase of *Artemia*: Yolk localization and developmental activation. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B, 731-736.
- Fagotto, F. (1990) Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14, 217-235.
- Folk, J.E., Piez, K.A., Carroll, W.R. and Glander, J.A. (1960) Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme. *J. Biol. Chem.* 235, 2272-2277.
- Harnish, D.G. and White, B.N. (1982) Insect vitellins: Identification, purification and characterization from eight orders. *J. Exp. Zool.* 220, 1-10.
- 長谷川 金作 (1947) 家蚕卵細胞の發育に関する研究. II. 退化卵に関する 2, 3 の觀察. 蚕試報. 12, 481-492.

- Hayashi, K., Yasugi, S. and Mizuno, T. (1988) Pepsinogen gene transcription induced in heterologous epithelial-mesenchymal recombinations of chicken endoderms and glandular stomach mesenchyme. *Development* 103, 725-731.
- Higaki, J.N. and Light, A. (1985) The identification of neotrypsinogens in samples of bovine trypsinogen. *Anal. Biochem.* 148, 111-120.
- Immerglück, K., Lawrence, P.A. and Bienz, M. (1990) Induction across germ layers in *Drosophila* mediated by a genetic cascade. *Cell* 62, 261-268.
- Inagaki, S. and Yamashita, O. (1989) Complete amino acid sequence of *Bombyx* egg-specific protein deduced from cDNA clone. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10, 131-139.
- Indrasith, L.S., Furusawa, T., Shikata, M. and Yamashita, O. (1987) Limited degradation of vitellin and egg-specific protein in *Bombyx* eggs during embryogenesis. *Insect Biochem.* 17, 539-545.
- Indrasith, L.S., Izuhara, M., Kobayashi, M. and Yamashita, O. (1988a) *In vitro* translation of the protease catalyzing *Bombyx mori* egg-specific protein and identification of a nascent peptide with biological activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 328-333.
- Indrasith, L.S., Sasaki, T. and Yamashita, O. (1988b) A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*: Purification, characterization and cleavage profile. *J. Biol. Chem.* 263, 1045-1051.
- Irie, K. and Yamashita, O. (1983) Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.* 13, 71-80.
- Izumi, S., Fujie, J., Yamada, S. and Tomino, S. (1981) Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 670, 222-229.
- Izumi, S., Tomino, S. and Chino, H. (1980) Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*

10, 199-208.

- James, M.N.G., Delbaere, L.T.J. and Brayer, G.D. (1978) Amino acid sequence alignment of bacterial and mammalian pancreatic serine proteases based on topological equivalences. *Can. J. Biochem.* **56**, 396-402.
- Kafatos, F.C., Tartakoff, A.M. and Law, J.H. (1967) Cocoonase. I. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silkmoths. *J. Biol. Chem.* **242**, 1477-1487.
- Kageyama, T. and Takahashi, S.Y. (1990) Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *Eur. J. Biochem.* **193**, 203-210.
- Kageyama, T., Takahashi, S.Y. and Takahashi, K. (1981) Occurrence of thiol proteinases in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biochem.* **90**, 665-671.
- Kasche, V. (1976) The kinetics of trypsinogen activation studied by analytical affinity chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**, 269-272.
- Kobayashi, M. and Inagaki, S. (1989) Translation and processing of egg-specific protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* **1009**, 129-136.
- Kunkel, J.G. and Nordin, J.H. (1985) Yolk protein. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. (Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. eds) vol.1, pp.83-111. Pergamon Press. Oxford.
- Kunkel, J.G. and Pan, M.L. (1976) Selectivity of yolk protein uptake: Comparison of vitellogenins of two insects. *J. Insect Physiol.* **22**, 809-818.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marshall, R.D. (1972) Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 673-702.



- Masetti, M. and Giorgi, F. (1989) Vitellin degradation in developing embryos of the stick insect, *Carausius morosus*. *J. Insect Physiol.* 35, 689-697.
- McGregor, D.A. and Loughton, B.G. (1974) Yolk-protein degradation during embryogenesis of the *African migratory* locust. *Can. J. Zool.* 52, 907-917.
- Medina, M., León, P. and Vallejo, C.G. (1988) *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: A suggested role in yolk degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 355-363.
- Mendes, H. and Raccand, J.S. (1986) Comparative study of the variations of the blowfly *Calliphora erythrocephala* (Diptera cyclorrhapha). *Compt. Rend. Acad. Sci. Ser. III*, 303, 391.
- Miya, K. (1976) Ultrastructural changes of embryonic cells during organogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*. II. The alimentary canal and the malpighian tubules. *J. Fac. Agric. Iwate Univ.* 13, 95-122.
- Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357.
- Neurath, H., Elkins, E. and Kaufman, S. (1947) The antipodal specificity and inhibition of crystalline carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 170, 221-226.
- Nordin, J.H., Beaudoin, E.L. and Liu, X. (1990) Proteolytic processing of *Blattella germanica* vitellin during early embryo development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15, 119-135.
- Oliveira, P.L., Petreski, M.D. and Masuda, H. (1989) Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 19, 489-498.
- Olson, M.O.J., Nagabhushan, N., Dzwinel, M. and smillie, L.B. (1970) Primary structure of  $\alpha$ -lytic protease: A bacterial homologue of the pancreatic serine proteases. *Nature* 228, 438-442.
- Ono, S., Nagayama, H. and Shimura, K. (1975) The occurrence and synthesis of

- female- and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 5, 313-329.
- Pan, M.L., Bell, W.J. and Telfer, W.H. (1969) Vitellogenic blood protein synthesis by insect-fat body. *Science* 165, 393-394.
- Pan, M.L. and Wyatt, G.R. (1976) Control of vitellogenin synthesis in the monarch butterfly by juvenile hormone. *Dev. Biol.* 54, 127-134.
- Pears, V., Pears, J., Buchsbaum, M. and Buchsbaum, R. (1987) Living invertebrates. pp.1-8. Boxwood Press, Pacific Grove.
- Perona, R., Bés, J.C. and Vallejo, C.G. (1988) Degradation of yolk in the brine shrimp *Artemia*. Biochemical and morphological studies on the involvement of the lysosomal system. *Biol. Cell* 63, 361-366.
- Proudfoot, N.J. and Brownlee, G.G. (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211.
- Purcell, J.P., Kunkel, J.G. and Nordin, J.H. (1988a) Yolk hydrolase activities associated with polypeptide and oligosaccharide processing of *Blattella germanica* vitellin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 8, 39-58.
- Purcell, J.P., Quinn, T.M., Kunkel J.G. and Nordin J.H.(1988b) Correlation of yolk phosphatase expression with the programmed proteolysis of vitellin in *Blattella germanica* during embryonic development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 9, 237-251.
- Roche, P.C., Campeau, J.D. and Shaw, Jr.S.T. (1983) Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein. *Biochim. Biophys. Acta* 745, 82-89.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells: Analysis of RNA. In *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. pp. 7.37-7.83. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with

- chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.
- Sasaki, T. and Suzuki, Y. (1982) Alkaline proteases in digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 703, 1-10.
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1989) Post-translational processing in the synthesis of egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 19, 293-300.
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1991) Structure and expression of a gene coding for egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 21, submit.
- Shirk, P.D., Bean, D., Millemann, A.M. and Brookes, V.J. (1984) Identification, synthesis and characterization of the yolk polypeptides of *Plodia interpunctella*. *J. Exp. Zool.* 232, 87-98.
- Skinner, M.K. and Grisgold, M.D. (1983) Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with 2,5-diphenyloxazole in acetic acid and its comparison with existing procedures. *Biochem. J.* 209, 281-284.
- Storella, J.R. and Kunkel J.G. (1979) Processing and utilization of vitellin in the cockroach egg. *Am. Zool.* 19, 999.
- Storella, J.R., Wojchowski, D.M. and Kunkel, J.G. (1985) Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 15, 259-275.
- Sugimoto, A., Hanada, S., Koga, K. and Sakaguchi, B. (1984) Egg-yolk trypsin inhibitor identical to albumen ovomucoid. *Biochim. Biophys. Acta* 788, 117-123.
- Sugimoto, Y. and Yamada, M. (1986) Changes in proteins from yolk and in the activity of benzoyl-L-tyrosine ethyl ester hydrolase from the yolk sac membrane during embryonic development of the chicken. *Poult. Sci.* 65, 789-794.

- 竹内 孝三 (1955) 孵化前後における家蚕食道管の内容について. 日蚕雑. 24, 259-263.
- Telfer, W.H. (1954) Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the *cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.* 37, 539-558.
- Telfer, W.H., Rubenstein, E. and Pan, M.L. (1980) How the ovary makes yolk in *Hyalophora*. In *Regulation of Insect Development and Behavior*. No.22, Conference 7 (Sehnal, F., Zabza, A., Menn, J.J. and Cymborowski, B. eds) No. 22, Conference 7, pp.638-653. Warsaw Technical Univ. Warsaw.
- Telfer, W.H. and Williams, C.M. (1953) Immunological studies of insect metamorphosis. I. Qualitative and quantitative description of the blood antigens of the *cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.* 36, 389-413.
- Towbin, H., Staehelin, R. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- 辻田 光雄 (1943) 家蚕中腸皮膜の組織学的並に細胞学的研究. 蚕試報. 11, 211-293.
- von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.
- Wyatt, G.R. (1988) Vitellogenin synthesis and the analysis of juvenile hormone action in locust fat body. *Can. J. Zool.* 66, 2600-2610.
- Yamashita, O. (1984) Control of embryogenesis and diapause in the silkworm, *Bombyx mori*; Roles of diapause hormone and egg-specific protein. *Adv. Invertebr. Rep.* 3, 251-258.
- Yamashita, O. and Indrasith, L.S. (1988) Metabolic fates of yolk proteins during embryogenesis in Arthropods. *Dev. Growth. Differ.* 30, 337-346.
- Yamashita, O. and Irie, K. (1980) Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm. *Nature* 283, 385-386.
- Yasugi, S. and Mizuno, T. (1981) Developmental changes in acid proteases of the avian proventriculus. *J. Exp. Zool.* 216, 331-335.

Zhu, J., Indrasith, L.S. and Yamashita, O. (1986) Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 882, 427-436.

## 報文目録

1. Ikeda, M., Sasaki, T. and Yamashita, O. (1990)  
Purification and characterization of proteases  
responsible for vitellin degradation of the silkworm,  
*Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **20**, 727-734.
  
2. Ikeda, M., Yaginuma, T., Kobayashi, M. and Yamashita, O.  
cDNA cloning, sequencing and temporal expression of  
the protease responsible for vitellin degradation in  
the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*  
(in press)
  
3. Ikeda, M., Yaginuma, T. and Yamashita, O.  
Developmental profile and tissue localization of the  
protease responsible for vitellin degradation in the  
silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*  
(submitted)

## 参考論文目録

1. Eguchi, M., Takahama, Y., Ikeda, M. and Horii, S. (1988)  
A novel variant of acid phosphatase isozyme from  
hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J.*  
*Genet.* **63**, 149-157.