

図・本館

報告番号 * 甲 第 2466 号

主論文の要旨

題名 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

氏名 池田 素子

主論文の要旨

報告番号	※甲第	号	氏名	池田素子
<p>卵は胚の成長、発育に要求される全ての栄養物質を含んでおり、卵黄たんぱく質はその主な構成要素である。多くの昆虫では、全卵黄たんぱく質の 80 % 以上がビテリンという単一のたんぱく質で構成されている。一方、鱗翅目昆虫では、ビテリンとビテリン以外の複数種のたんぱく質が卵内に蓄積されている。カイコの卵黄たんぱく質もビテリン (40 %)、30 kDa たんぱく質 (35 %) および卵特異たんぱく質 (ESP; 20 %) で構成されている。これらのたんぱく質は胚発生の進行に伴って分解、利用される。卵黄たんぱく質の分解過程で特徴的な現象は、たんぱく質ごとに限定分解されることである。カイコ卵においては、ESP は ESP に特異的に作用するプロテアーゼ (ESPプロテアーゼ) によって選択的に分解されることが示唆されている。したがって、このプロテアーゼは ESP 以外のたんぱく質、すなわちビテリンや 30 kDa たんぱく質の分解にはほとんど関与していない。そこで本研究においては、カイコ卵の卵黄たんぱく質の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。</p> <p>胚発生に伴うプロテアーゼ活性の変動を調査した結果、2 種類のプロテアーゼがビテリンの著しい分解が起こる時期と一致して活性を発現していた。そこで、これら酵素をさらに詳しく調査するため、活性を発現する 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-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、各々を単一なたんぱく質に精製した。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。また、NH₂-末端アミノ酸配列は両酵素間で完全に異なっていた。それにもかかわらず、両酵素は非常によく似た酵素学的性質を示した。またその性質から、両酵素はトリプシン様セリンプロテアーゼに分類された。両酵素は、ビテリン、ESP さ</p>				

らに卵黄たんぱく質以外のカゼインに対して分解活性を示したが、30 kDa たんぱく質に対しては分解活性を示さなかった。さらに、両酵素との反応の結果生じたビテリンの分解産物は、生体内でのビテリンの分解中間産物と電気泳動的に一致していた。以上の結果から、両酵素の胚発生中の卵における機能はビテリンの分解であることが示唆された（以下両酵素をビテリンプロテアーゼと呼ぶ）。

さらに、ビテリンプロテアーゼの生体内での機能を明かにするため、発現時期および組織特異性について免疫学的手法を用いて検討した。まず、精製した各酵素に対して抗体を作製した。得られた抗体は両酵素に対し共通の免疫反応性を示した。つまり、両酵素は共通の抗原決定部位をもっていることが示された。一方、これまでカイコで報告されているいくつかのプロテアーゼに対しては反応性を示さず、ビテリンプロテアーゼはこれらとは免疫学的に異なることが示された。また、全発育時期を通して、ビテリンプロテアーゼの変動をウェスタンブロット法によって調査した結果、胚発生の後半の一時期と羽化前の蛹の中腸で陽性反応が認められた。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-プロテアーゼであった。蛹中腸からは、3本の活性バンドが検出され、このうち2本は胚のものに相当していた。さらに免疫組織化学的な観察から、ビテリンプロテアーゼは、中腸上皮細胞の管腔側で発現していることが示された。この時期、ビテリンは胚の中腸に取り込まれていることが示されている。したがって、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。一方、蛹の中腸における本酵素の機能については、今後の問題として残された。

ウェスタンブロット法の結果から、両酵素は完成卵に予め存在していたものでなく、胚発生期間中、卵内で新たに生合成され、その結果活性を発現していることが示された。そこで、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、プロテアーゼの生合成機構について検討した。まず、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。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。化学的に決めた 30k-プロテアーゼの NH₂-末端アミノ酸配列は 28 から 57 番目までの配列と完全に一致し、また 24k-プロテアーゼの NH₂-末端アミノ酸配列は 90 から 117 番目までの配列と一致していた。したがって、24k-プロテアーゼは 30k-プロテアーゼ分子内の 89 と 90 番目の間のペプチド結合が切断された結果生じたものであるとした。

この 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の発現を調査した結果、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。さらに *in vitro* たんぱく質翻訳系によって、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、胚発生にともな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となった。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となった。

今回精製されたプロテアーゼは、主にビテリンの分解に関与していることが示された。さらに活性の発現はプロテアーゼをコードする遺伝子の発現の段階で調節されていることから、本酵素の発現は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いえた。ESPプロテアーゼも本酵素と同様に、胚期に遺伝子が発現するとされている。したがって、ESPプロテアーゼとビ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、胚に利用されていると結論した。