

センチニクバエ体液細胞プロテアーゼ
に関する研究

斎藤 清 美

①

学位論文

センチニクバエ体液細胞プロテアーゼ
に関する研究

東京大学大学院薬学系研究科生命薬学専攻
昭和63年度進学

斎藤 浩美

目次

略語	1
第1章 序論	2
第2章 体液細胞プロテアーゼの精製と性状解析	7
第1節 序	8
第2節 体液細胞プロテアーゼの精製	9
第3節 体液細胞プロテアーゼの構造	15
第4節 体液細胞プロテアーゼの性質	17
第5節 考察	20
図表	23
第3章 体液細胞プロテアーゼの生体防御過程への関与	36
第1節 序	37
第2節 体表傷害後の体液細胞プロテアーゼの経時変化	38
第3節 ヒツジ赤血球注入後の体液細胞プロテアーゼの経時変化	40
第4節 考察	47
図表	53
第4章 総括と展望	65
第5章 材料と方法	72
References	82
謝辞	84

略語

BSA	bovine serum albumin
EDTA	ethylene glycol tetraacetic acid
TCA	trichloroacetic acid
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
DPP	diisopropyl fluorophosphate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SRBC	sheep red blood cells
TPCK	tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone
Suc-	succinyl-
Z-	carbobenzoxy-
Boc-	tert-butoxycarbonyl-
MCA	methyl coumaryl amide
AMC	amino methyl coumarin
ND	not determined

第1章

序論

すべての生物は、外部環境の変化や外敵から自己を守り、自己の生命を維持するための防御機構をもっている。脊椎動物においては、高度に発達した免疫系がその中心的役割を担っている。すなわち、自己と非自己を識別し、非自己に対し特異的抗体を産生する体液性反応、およびリンパ球による細胞性反応により、体内に侵入した異物を選択的に排除している。また、このほかに、炎症、止血、血栓溶解や感染に対する抵抗性なども一種の生体防御反応ととらえることができる。一方、抗体産生能をもたない無脊椎動物もまた、生命を保ち、種を存続させるために独自の防御機構を備えている。例えば、単細胞生物である原生動物は、細胞自体が遊走・食食・消化を行う能力をもち、環形動物、海面動物においては、体腔内を遊走し、食食能をもつマクロファージ様細胞が生体防御を担っている。そして、前口動物の中で最も高度に進化した、節足動物に属する昆虫は全動物の中でおよそ80%を占めるともいわれるが、昆虫がこのような地球上に広く繁殖することができたのは、精巧な生体防御機構をもっているからにほかならない。

その1つとして、体内への異物の侵入に呼応して、抗

菌性物質や哺乳類の血球を凝集する活性をもつレクチンなどの液性因子を体液中に誘導して、異物処理を行うことが知られている(1-8)。これらの液性因子には、抗原と抗体の間にみられるような厳密な特異性はなく、ある異物に対して産生された因子が、別種の侵入異物に対しても効力を示す。このような非特異的因子の中には、精製、遺伝子単離が行われ、その構造や機能の解析が進んでいるものもある。

また、これとは別に、体液中に浮遊している体液細胞が昆虫の生体防御において重要な役割を果たしていると考えられる。昆虫の体液細胞は、形態的にみて数種に分類されるが、いずれもヒトの白血球に相当するものである。開放血管系である昆虫では、その体液細胞が異物と出会う機会も多く、相手に応じて、さまざまな異物処理の型をもっている。昆虫の体液細胞による細胞性防御反応は、Salt により、以下のように4つに分類されている。

(1) 微小な異物を取り込む食作用 (phagocytosis)、(2)

大きな異物に対して、体液細胞がカプセルを形成する包囲化作用 (encapsulation)、(3)すでに微小な異物を取り込んだ体液細胞が、細菌や他の微小な異物に集合し、そ

の分散を阻止する nodule 形成 (4) 毒性物質を除くときに生ずる隔絶作用 (segregation) の 4 つである (9-10)。しかしながら、これまでに得られたの知見は、形態学的な解析に基づくものがほとんどであり、その過程にどのような分子が関わっているのかは、あまり知られていない。体液細胞による細胞性の防御反応のメカニズムを明らかにする上で、分子レベルでの解析が必要と考えられる。

ところで、これまでにセンチニクバエを材料として、その生体防御についての解析がなされている。このハエの幼虫の体腔内に、異物蛋白としてカゼイン、自己の蛋白として体液蛋白を、それぞれ放射ヨード標識してうちこむと、異物蛋白が選択的に分解されることが示されている。このとき、体液中で分解された異物は、脂肪体という、高等動物の腎臓または肝臓に相当する器官に取り込まれる。さらに、このような蛋白を分解する活性を検索したところ、体液細胞にのみプロテアーゼ活性が認められた (11)。侵入してくる異物の大部分は蛋白性の成分を含むわけであるから、異物を排除する際に、プロテアーゼが必要になることは容易に想像できる。体液細胞

による異物処理において、体液細胞のもつプロテアーゼは、その key point となる分子の 1 つと考えられる。

そこで、私は、センチニクバエの体液細胞のプロテアーゼに注目し、その検索を行った。以下、第 2 章では体液細胞プロテアーゼの精製およびその性状解析、第 3 章では精製した体液細胞プロテアーゼの生体防御過程への関与について述べる。

体液細胞プロテアーゼの精製と性状解析

第2章

体液細胞プロテアーゼの精製と性状解析

第1節 序

昆虫の生体防御においてその体液細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。センチクバエ3令幼虫の体腔中に異物蛋白として放射ヨード標識したカゼインを注入すると、体液中で選択的に分解することが知られている。体液および幼虫各組織における ^{125}I -カゼイン水解活性を測定すると、体液細胞のみにこのようなプロテアーゼ活性が認められ(11)、体液細胞に存在するプロテアーゼが侵入した異物の処理に関与していることが予想された。そこで、私は体液細胞を介した生体防御を分子レベルで解析するための第一歩として、体液細胞プロテアーゼの精製を行った。まず、 ^{125}I -カゼイン水解活性を指標にプロテアーゼを検索した結果、体液細胞には複数種のプロテアーゼが存在することを見だし、さらに合成ペプチドを基質としたときの活性を指標として、このうちの1つを精製した。

第2節 体液細胞プロテアーゼの精製

1) DEAE-Sepharose イオン交換クロマトグラフィー
センチニクバエ3令幼虫の体液細胞抽出液を出発材料とし、精製の第1ステップとして DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーを行った。体液 約 100ml から回収した体液細胞(幼虫 約 10000 匹分)の抽出液をバッファーAで平衡化した DEAE-Sepharose カラム(直径 1.5×10 cm)に添加した。未吸着画分を回収し、イオン交換担体をバッファーAで十分に洗浄した後、バッファー中の NaCl 濃度を上昇させることにより吸着蛋白を回収した。分画は 2 ml ずつ行った。プロテアーゼ活性は ^{125}I -カゼインを基質とし、27 °C で 30 分反応させた後、酸可溶性画分への放射活性の回収により測定した。塩濃度 0-200 mM のグラジエント溶出(200 ml)により、活性は図 1 に示すように 100 mM 付近のピーク 1 (Fr.60-68)、150 mM 付近のピーク 2 (Fr.82-89) の 2 つの画分に分かれて回収された。その際の活性の回収は、ピーク 1 に 6 %、ピーク 2 に 11 % であった。未吸着画分に若干の活性が認められたが、さらに塩濃度を 1 M ま

で上げても活性は回収されなかった。

ピーク 1・ピーク 2 画分の活性を担うのは異なるプロテアーゼであるかどうかを調べるため、合成ペプチドを基質として用い、その水解活性を検討した。活性はいずれも pH 5 で測定した。表 1 に各々の基質に対する単位蛋白量あたりの活性を示したが、両者は異なる基質特異性を示しており、体液細胞には少なくとも 2 種類以上のプロテアーゼが存在していると考えられる。特に、一般にカテプシン B の基質として用いられる Z-Arg-Arg-MCA に対する活性はピーク 2 画分にはほとんど認められず、ピーク 1 画分特異的に検出された。そこで、この基質を水解する活性を指標としてピーク 1 画分からプロテアーゼの精製を行った。図 2 に合成ペプチド: Z-Arg-Arg-MCA に対する活性を指標としたときの DEAE-Sephrose カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを示した。これは、体液 約 500 ml から回収した体液細胞の抽出液を DEAE-Sephrose カラム (直径 2.5 × 7 cm) に添加し、NaCl 濃度 0-250 mM のグラジエント溶出を行い、4 ml ずつ分画した結果である。このように活性は主に単一の画分に回収され、その溶出塩濃度は図 1 のピーク 1 と

ほぼ一致した。その際、比活性は 11 倍上昇し、活性の回収は 85 % であった。

この活性画分は -20°C において少なくとも 1 ヶ月は安定であった。

2) FPLC Mono Q イオン交換クロマトグラフィー

次に、精製の第 2 ステップとして Mono Q カラムクロマトグラフィーを行った。前述の DEAE-Sepharose 画分を 3 等分して各々バッファー B で 5 倍希釈し、バッファー B で平衡化した FPLC Mono Q カラム (ファルマシア) に添加した。未吸着画分を回収し、イオン交換担体を十分に洗浄した後、バッファー中の NaCl 濃度を上昇させることにより吸着蛋白を溶出した。分画は 0.4 ml ずつ行った。

その結果、図 3 に示すように塩濃度 0-250 mM のグラジエント溶出で、70 % 以上の活性が単一の画分 (Fr.43-46) に回収された。このステップで比活性は約 4 倍上昇し、体液細胞抽出液からは 47 倍上昇した。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により Mono Q カラムクロマトグラフィー各画分に含まれる蛋白について解

析したところ、主要な成分である電気泳動上 26 kDa、29 kDa の 2 本のバンドが活性と挙動を共にしていた。この他のバンドは活性とは対応しなかった（データは示さず）。

3) FPLC Superose 12 ゲル濾過カラムクロマト

グラフィー

次に、回収した Mono Q 画分を濃縮した後、精製の第 3 ステップとして Superose 12 カラムクロマトグラフィーを行った。

まず、Mono Q 画分 (6 ml) をバッファー B で 5 倍希釈し、バッファー B で平衡化した FPLC Mono Q カラムに吸着させ、バッファー中の NaCl 濃度を 500mM まで急激に上げて溶出し、濃縮を行った。この操作により、ほぼ 100 % の活性が 0.5 ml 中に回収された。

この濃縮した試料をバッファー C で平衡化した FPLC Superose 12 カラム (ファルマシア) に添加し、0.4 ml ずつ 60 本の分画操作を行った結果、活性は図 4 に示すように、Fr.31 を頂点とする単一の画分 (Fr.30-33) に回収された。このステップでの非活性の上昇は 1.2 倍で

あり、活性の回収は 73 % であった。また、活性の溶出位置から、このプロテアーゼの本来の分子量は、68 kDa と算定された。

次に、Superose 12 カラムクロマトグラフィーの各画分に含まれる蛋白構成成分について解析した。活性の認められた画分について SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、CBB 染色により蛋白を検出した結果、図 5 に示すように電気泳動上 26 kDa、29kDa の 2 本のバンドが主要成分であり、これらが活性と挙動を共にしていた。両者はおおよそ 1:1 の比を保っていた。また、34 kDa のバンドを与える蛋白は 26 kDa、29 kDa より遅れて溶出され、このステップで活性画分から除かれた。

以上より、電気泳動上 26 kDa、29 kDa のバンドを与える蛋白がプロテアーゼ活性を担う実体であり、この 2 つが複合体を形成していることが示唆された。

4) FPLC Phenyl Superose 疎水カラムクロマト グラフィー

DEAE-Sepharose、Mono Q、Superose 12 カラムクロマトグラフィーの 3 ステップで電気泳動上 26 kDa、29kDa

の蛋白がプロテアーゼとして均一になっているかどうかを調べるため、精製標品 (Superose 12 画分) について Phenyl Superose 疎水カラムクロマトグラフィーを行った。Superose 12 画分 50 μ g に飽和硫酸を加え最終濃度 40 % とし、バッファー D で平衡化した FPLC Phenyl Superose カラム (ファルマシア) に添加した。未吸着画分を回収し、十分に洗浄した後、バッファー中の硫酸濃度を下げる (40-10 %) ことにより吸着蛋白を溶出した。この結果、活性は Fr.42 を頂点とする単一の画分として回収され、その回収率は 70 % であった。さらに、活性のある画分について SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により解析したところ、いずれも 26 kDa、29 kDa のバンドがほぼ 1:1 の比で検出され、デンストメーターで測定した 2 本のバンドの強度は活性とよく対応した (図 6)。従って、この 3 ステップにより体液細胞プロテアーゼが均一な成分にまで精製されたと判断した。

5) 精製のまとめ

この体液細胞プロテアーゼの精製の過程を表 2 にまとめた。1 ユニットは 10 分間に合成基質: Z-Arg-Arg-

MCA 1 μ M を水解する活性として表している。

センチニクバエ幼虫体液細胞抽出液を出発材料に、DEAE-Sephrose イオン交換クロマトグラフィー、Mono Q イオン交換クロマトグラフィー、さらに Superose 12 ゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、比活性の上昇は 55 倍、活性の回収は 34 % であり、体液細胞抽出液 62 mg の蛋白から 0.38 mg の体液細胞プロテアーゼが得られた。図 7 は精製の最終標品 1 μ g を電気泳動し、CBB 染色した結果であるが、26 kDa、29 kDa の 2 本のバンドを与える蛋白が主要成分であり、その純度は、ウシ血清アルブミンを基準として 91 % と算定された。この 2 本のバンドは精製の各ステップ、および Phenyl Superose カラムクロマトグラフィー上で活性と挙動を共にしており、ゲル濾過クロマトグラフィーで高分子画分に溶出されることから、体液細胞プロテアーゼは 26 kDa、29 kDa の 2 つのサブユニットから成ることが示された。

第 3 節 体液細胞プロテアーゼの構造

精製した体液細胞プロテアーゼは電気泳動上 26 kDa、

29 kDa の 2 つの蛋白によって構成されている。精製標品について非還元条件下で電気泳動を行ったときに、還元条件下のときとほぼ同じ移動度に 2 本のバンドが認められることから、両者の結合はジスルフィド結合によるものではないと考えられる（データは示さず）。

ところで、この 2 つは分子量が近いことから、一方がもう一方の修飾型である可能性もあると思われたので、26 kDa、29 kDa 蛋白が共通の一次構造をもつか否かを調べるため、Elder の方法に従い、ペプチドマッピングを行った（12）。まず、精製標品 2 μ g を用いて SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により 26 kDa、29 kDa 蛋白を分離し、各 1 μ g を放射ヨード標識した。それぞれをトリプシンで分解した後、1 次元目は電気泳動、2 次元目は薄層クロマトグラフィーにより分析し、オートラジオグラフィーを行った。この結果、26 kDa と 29 kDa のオートラジオグラム上のスポットは全く異なるパターンを示し、両者を合わせて 2 次元電気泳動を行うと、単独の場合のスポットをたし合わせた分のスポットが検出された（図 8）。従って、26 kDa と 29 kDa は一次構造の異なる蛋白であることが強く示唆された。

第4節 体液細胞プロテアーゼの性質

精製した体液細胞プロテアーゼの性質について検討した。

1) pH 依存性

まず最初に、体液細胞プロテアーゼの合成基質：Z-Arg-Arg-MCA に対する水解活性の pH 依存性を調べた。この際、バッファーが活性に及ぼす影響を除去するため、同じ pH で2種のバッファーを用いて活性を測定した。その結果、体液細胞プロテアーゼ pH 6 を至適としており、pH 4 以下および pH 7 以上では 50 % 以上の活性を失うことがわかった（図 9）。

2) 基質特異性

次に、このプロテアーゼの市販の合成基質に対する活性を調べた。用いた基質は、カテプシン B の基質である Z-Arg-Arg-MCA、カテプシン B およびカテプシン L の基質である Z-Phe-Arg-MCA、トリプシンの基質である Boc-

Phe-Ser-Arg-MCA、プラスミンの基質である Boc-Val-Leu-Lys-MCA、キモトリプシンの基質である Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA である。表 3 にそれぞれの基質に対する比活性を示した。

体液細胞プロテアーゼはカテプシン B の基質である Z-Arg-Arg-MCA に対して最大の比活性を示し、次いで Z-Phe-Arg-MCA をよく水解した。これに比べ、トリプシンやキモトリプシンの基質はほとんど水解されなかった。この結果は、体液細胞プロテアーゼがリソゾーム酵素であるカテプシン B に似た活性を有することを示している。同じリソゾーム酵素であるカテプシン L が Z-Phe-Arg-MCA のみ水解するのに対し、カテプシン B は Z-Arg-Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCA の両方に対して活性を示す (13)。

3) プロテアーゼインヒビターの効果

さらに、精製した体液細胞プロテアーゼの活性に対する各種プロテアーゼインヒビターの影響を調べた。基質として Z-Arg-Arg-MCA を用いた。ロイペプチン、アンチパイン、キモスタチン、ペプスタチンについてはインヒ

ビター存在下に活性を測定し、不可逆的インヒビターである E-64、PMSF、DFP についてはプロテアーゼを 27 °C 30 分インヒビターで前処理した後に活性を測定した。その結果を表 4 に、インヒビターを加えないときの活性を 100 としたときの相対値で示した。

体液細胞プロテアーゼの活性はシステインプロテアーゼ特異的インヒビターである E-64 で抑えられ、ロイペプチン、アンチパイン、キモスタチンによっても阻害された。一方、セリンプロテアーゼ特異的インヒビターである PMSF、DFP ではほとんど阻害されなかった。このことから、体液細胞プロテアーゼはシステインプロテアーゼであることがわかった。このプロテアーゼの活性は β -メルカプトエタノールにより増強され、この点でもシステインプロテアーゼの特徴に一致している。また、体液細胞プロテアーゼは EDTA により阻害されず、この活性には 2 価金属イオンは必要ないと考えられる（データは示さず）。

第 5 節 考察

センチニクバエ 3 令幼虫の体液細胞には少なくとも 2 種以上のプロテアーゼが存在している。このうちの 1 つを精製した結果、至適 pH を 6 とするシステインプロテアーゼであり、電気泳動上 26 kDa、29 kDa の 2 つの蛋白から構成されることが明らかになった。この 2 つの蛋白はカラムクロマトグラフィー上で常に活性と挙動を共にしており、ほぼ 1:1 の比である。ゲル濾過から算定された分子量と併せて考えると、この体液細胞プロテアーゼは 26 kDa 蛋白と 29 kDa 蛋白のヘテロダイマーであることが予想された。さて、どちらの分子が活性を担うかという点については、大きく分けて 2 通りの考え方ができる。1 つは 26 kDa、29 kDa 蛋白のいずれか一方が単独でプロテアーゼ活性をもつという可能性であり、もう 1 つは複合体となって初めて活性をもつという可能性である。ペプチドマッピングの結果から、26 kDa 蛋白と 29 kDa 蛋白とは一次構造の異なる分子であると推察されるので、おそらく、一方のみがシステインプロテアーゼの活性中心となる構造をもっていると考えられる。

もう一方は、活性を調節する因子であるか、または基質の結合部位として機能しているか、あるいは、他のプロテアーゼなどの攻撃から自らを守るために必要なものかもしれない。この点については、それぞれの一次構造を決定すれば、より明らかになるだろう。また、現時点では SDS-ポリアクリルアミド電気泳動以外に両者を分離する手段が見つかっていないが、より緩和な条件で分けられれば、さらに解析しやすくなるだろう。

ところで、この体液細胞プロテアーゼはシステインプロテアーゼであり、その基質特異性および至適 pH からみて、カテプシン B に似た活性をもつと思われる。カテプシン B は高等動物のリソゾームに存在するプロテアーゼ群の中で最も強い活性をもつプロテアーゼの 1 つであり、細胞内に取りこんだ蛋白を分解する際にはたらくと考えられている。すでにラットなどにおいてカテプシン B の全一次構造が決定されており、その成熟型酵素は分子量 29 kDa の単一なポリペプチド鎖であることが知られている (14)。今回精製したセンチニクバエの体液細胞プロテアーゼはこの点についてカテプシン B とは異なり、ユニークなプロテアーゼであるといえる。

また、センチニクバエの体液の pH は 6-6.5 であることが知られているが、この体液細胞プロテアーゼの至適 pH が 6 であるということは、体液中で作用することを示唆している。このプロテアーゼは比活性の上昇 55 倍で精製されることから、体液細胞内において比較的含有の高い蛋白と思われるが、これが体液細胞から体液に出て、体液中の不要な蛋白の分解・処理を行う際に、中心となつてはたらくことが考えられる。

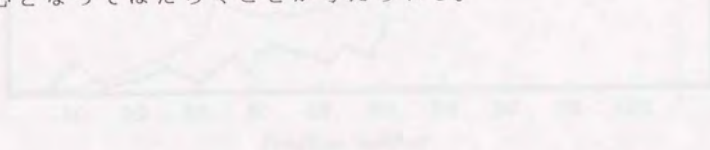


図 1. センチニクバエの体液細胞プロテアーゼの精製過程における相対活性の変化 (1974年発表)

体液細胞から抽出したプロテアーゼは、pH 6.5 で最も高い活性を示す。これは、体液の pH が 6-6.5 であることと一致する。また、この酵素は、55 倍の比活性で精製される。これは、体液細胞内において比較的豊富に存在する蛋白であることを示唆している。この酵素は、体液細胞から体液に出て、体液中の不要な蛋白の分解・処理を行う際に、中心となつてはたらくことが考えられる。

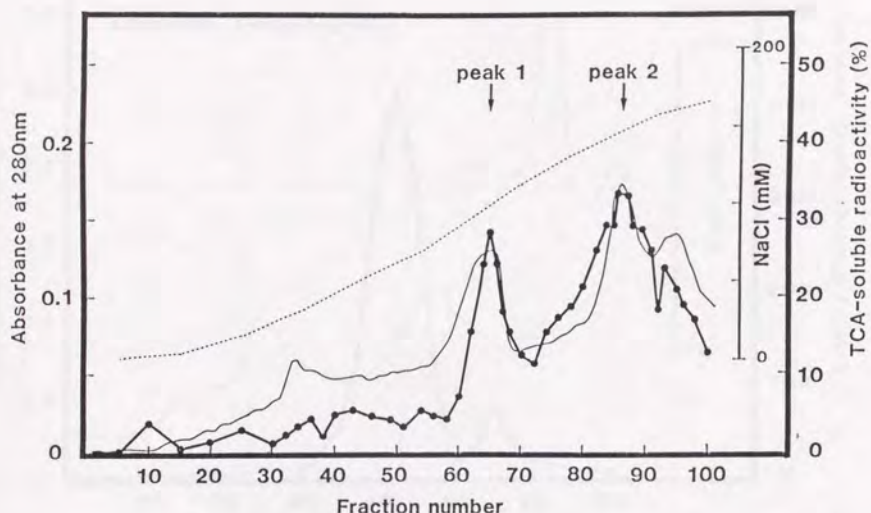


図 1 DEAE-Sephadex イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン (I)

精製の第 1 ステップとして、DEAE-Sephadex イオン交換クロマトグラフィーを行った。体液約 100 ml から回収した体液細胞の抽出液を DEAE-Sephadex カラム (直径 1.5×10 cm) に添加し、NaCl 濃度を上昇させることにより、吸着蛋白を溶出した。分画は 2 ml ずつ行った。プロテアーゼ活性は ^{125}I -カゼインの水解により測定した。横軸にはフラクションナンバーを示し、縦軸には、それぞれ、蛋白量を 280 nm の吸収で (—)、活性を酸可溶性画分への放射活性の回収 (●) で表示した。点線は溶出に用いたバッファー中の NaCl 濃度を示す。

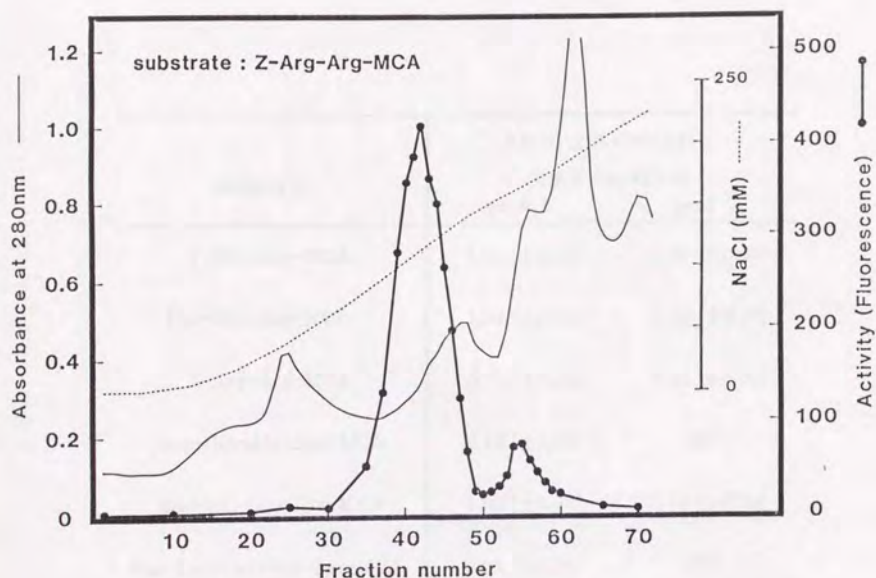


図 2 DEAE-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン (II)

体液約 500 ml から回収した体液細胞の抽出液を DEAE-Sepharose カラム (直径 2.5 × 7 cm) に添加し、4 ml ずつ分画を行った。プロテアーゼ活性は合成ペプチド: Z-Arg-Arg-MCA の水解により測定した。横軸にはフラクションナンバーを示し、縦軸には、それぞれ、蛋白量を 280nm の吸収で、活性を基質の水解産物である AMC の蛍光強度で示している。点線は溶出に用いたバッファー中の NaCl 濃度を示す。

substrate	Activity (units/mg)	
	DEAE-Sephadex peak 1	peak 2
Z-Phe-Arg-MCA	2.01 (± 0.13)	0.55 (± 0.00)
Pro-Phe-Arg-MCA	1.34 (± 0.05)	0.43 (± 0.02)
Z-Arg-Arg-MCA	0.77 (± 0.01)	0.04 (± 0.00)
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	0.16 (± 0.00)	ND
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	1.02 (± 0.02)	0.18 (± 0.00)
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0.03 (± 0.00)	ND

表 1 DEAE-Sephadex 活性画分の基質特異性

DEAE-Sephadex のピーク 1・ピーク 2 画分について、合成ペプチドに対するプロテアーゼ活性を測定し、その基質特異性を調べた。それぞれの基質に対する比活性を示している。

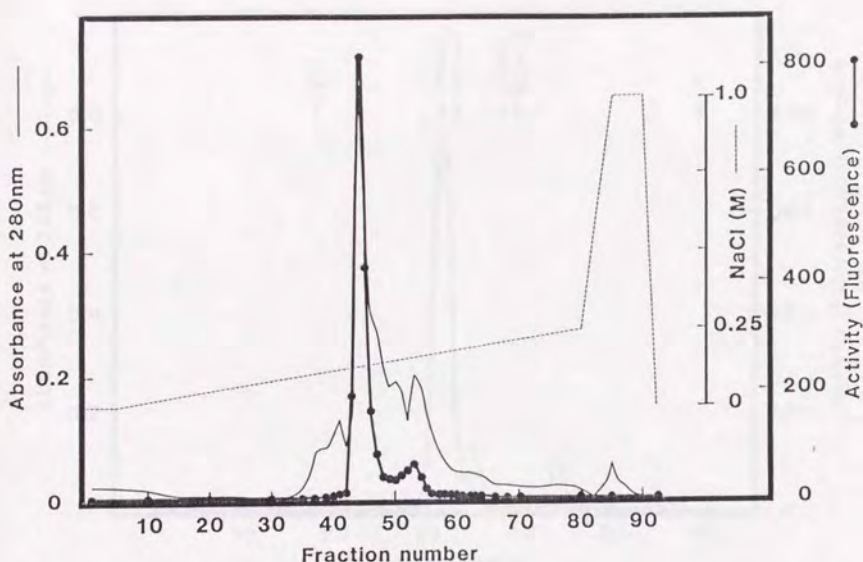


図 3 FPLC Mono Q イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン

精製の第2ステップとして FPLC Mono Q イオン交換クロマトグラフィーを行った。DEAE-Sepharose のピーク 1 画分を 3 等分し、各々バッファー B で 5 倍希釈して、FPLC MonoQ カラムに添加し、NaCl 濃度のリニアグラジエント溶出を行った。分画は 0.4 ml ずつ行った。横軸にはフラクションナンバーを示し、縦軸には、それぞれ、蛋白量を 280 nm の吸収で、活性を基質の水解産物である AMC の蛍光強度で示している。点線は溶出に用いたバッファー中の NaCl 濃度を示す。

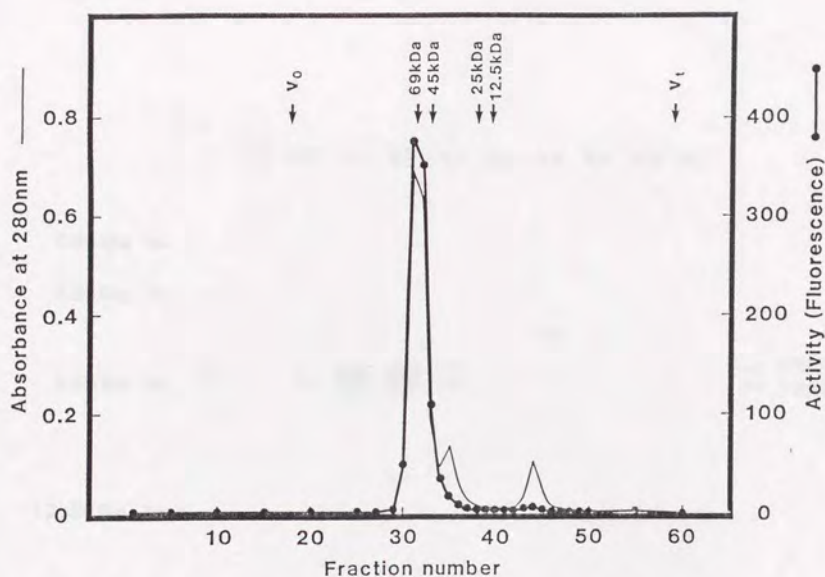


図 4 FPLC Superose 12 ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出パターン

精製の第3ステップとして FPLC Superose 12 ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。Mono Q の活性画分を濃縮した後、FPLC Superose 12 カラムに添加し、0.4 ml ずつ、60 本の分画操作を行った。横軸はフラクションナンバーを示し、縦軸は、それぞれ、蛋白量を 280 nm の吸収で、活性を基質の水解産物である AMC の蛍光強度で示している。

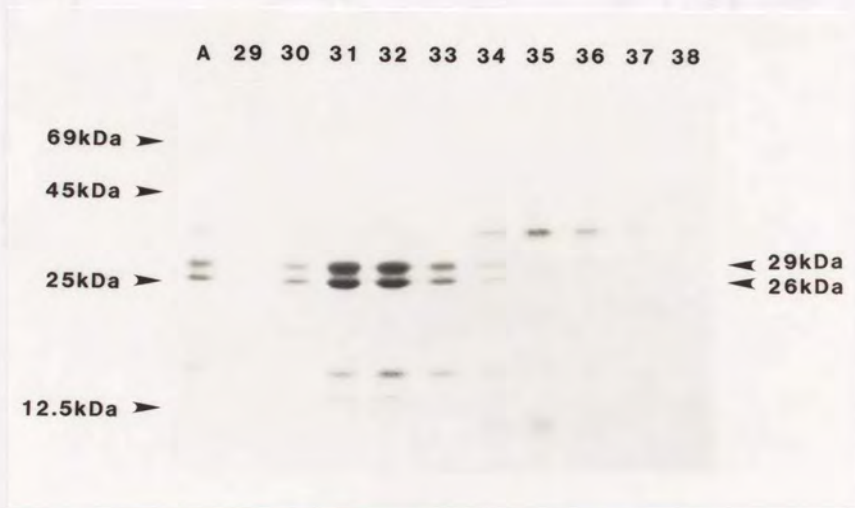


図 5 Superose 12 カラムクロマトグラフィーの各画分の
SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による解析

Superose 12 カラムクロマトグラフィーで活性の認められた画分について、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により解析し、CBB 染色を行った。各レーンの上の数字は、フラクションナンバーを示す。A は、Superose 12 カラムに添加したサンプルを表す。

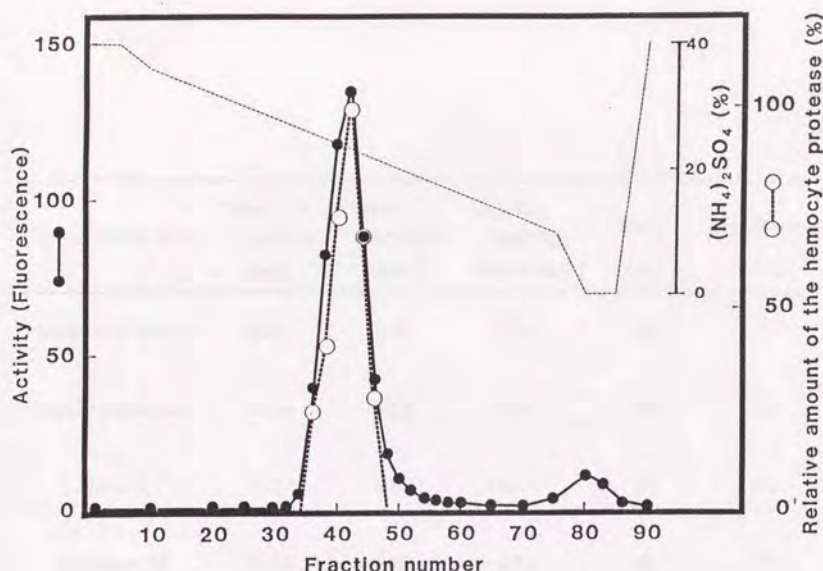


図 6 FPLC Phenyl Superose 疎水カラムクロマトグラフィーの溶出パターン

精製標品について FPLC Phenyl Superose 疎水カラムクロマトグラフィーを行った。Superose 12 画分 50 μ g に飽和硫酸を加えて、FPLC Phenyl Superose カラムに添加し、バッファー中の硫酸濃度を下げることにより、吸着蛋白を溶出した。分画は 0.4 ml ずつ行った。活性の認められた画分について、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により解析した。横軸はフラクションナンバーを示し、縦軸は、それぞれ、活性を基質の水解産物である AMC の蛍光強度 (●) で示し、26 kDa と 29 kDa 蛋白の量を、デンストメーターでスキャンした電気泳動上のバンドの強度の相対値 (○) で表している。点線は溶出に用いたバッファー中の硫酸の濃度を示す。

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Hemocyte lysate	61.9	5.57	0.09	100	1
DEAE-Sephadex	4.94	4.74	0.96	85	11
Mono Q	0.77	3.23	4.20	58	47
Superose 12	0.38	1.88	4.94	34	55

表 2 体液細胞プロテアーゼの精製のまとめ

幼虫体液細胞の抽出液を出発材料とし、DEAE-Sephadex、Mono Q、Superose 12 カラムクロマトグラフィーにより、体液細胞プロテアーゼを精製した。1 ユニットは、10 分間に合成基質：Z-Arg-Arg-MCA 1 μ M を水解する活性とした。

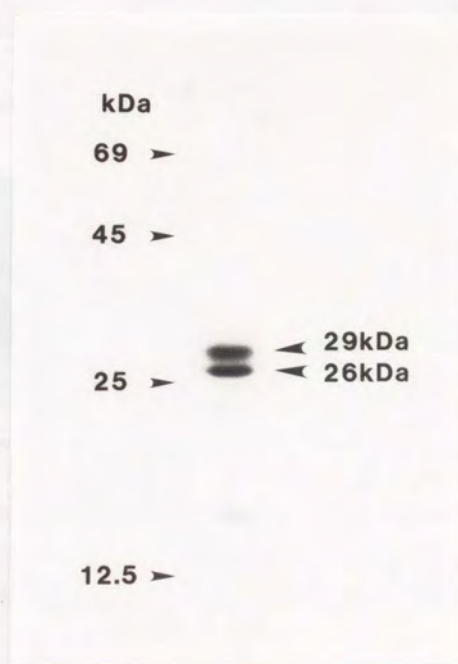


図 7 精製の最終標品の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による解析

精製標品 1 μg を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動し、CBB 染色を行った。

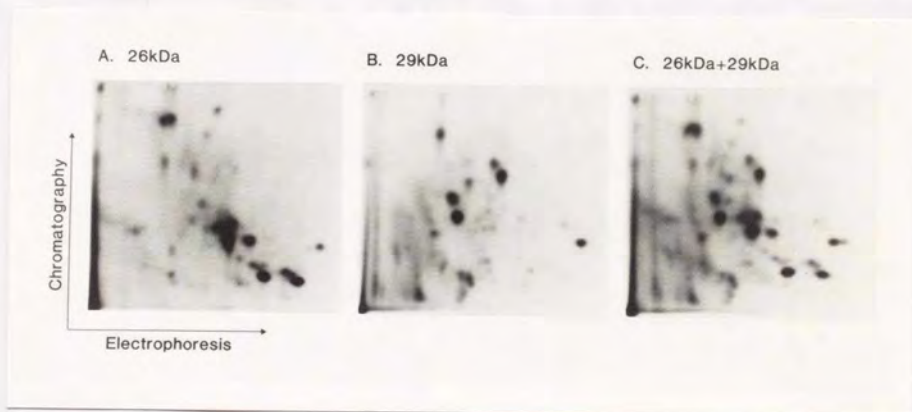


図 8 体液細胞プロテアーゼの 26 kDa・29 kDa 蛋白の
ペプチドマッピング

精製標品 2 μg を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動して、26 kDa と 29 kDa を分離し、Elder らの方法に従い、ペプチドマッピングを行った。A は 26 kDa、B は 29 kDa、C は両者の混合物を 2 次元電気泳動により解析した、オートラジオグラムである。

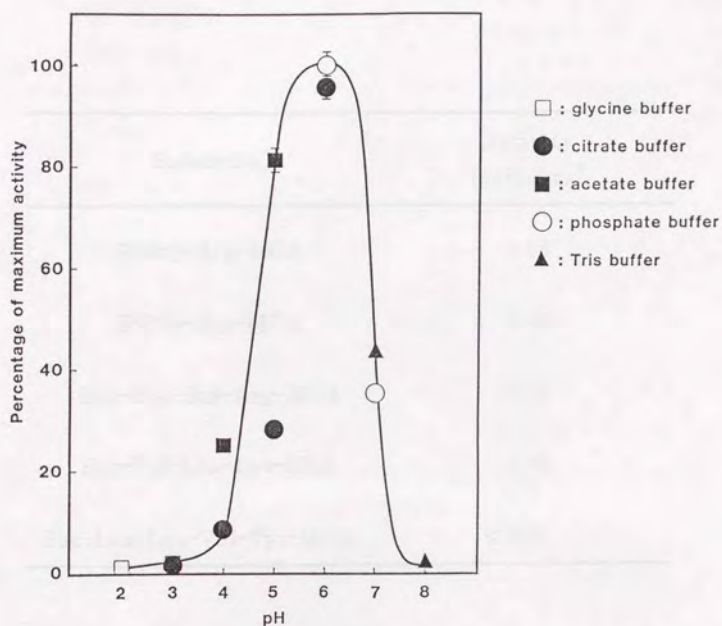


図 9 体液細胞プロテアーゼの pH 依存性

精製した体液細胞プロテアーゼの合成基質: Z-Arg-Arg-MCA 水解活性の pH 依存性を調べた。横軸はバッファの pH を示し、縦軸は活性を、検出された活性の最大値を 100 としたときの相対値で表している。アッセイに用いたバッファは、図中に示した。

Substrate	Activity (units/mg)
Z-Arg-Arg-MCA	4.13
Z-Phe-Arg-MCA	2.42
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	0.03
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	1.00
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	<0.01

表 3 体液細胞プロテアーゼの基質特異性

精製した体液細胞プロテアーゼの合成基質に対する活性を測定し、その基質特異性を調べた。それぞれの基質に対する、体液細胞プロテアーゼの比活性を示した。

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Leupeptin	2×10^{-2}	0.7 (± 0.0)
Antipain	2×10^{-2}	5.5 (± 1.9)
Chymostatin	2×10^{-2}	9.0 (± 0.1)
Pepstatin	2×10^{-2}	101.5 (± 0.2)
E-64	2×10^{-2}	15.1 (± 0.3)
PMSF	2	92.8 (± 0.4)
DFP	2	113.4 (± 3.1)
No addition		100

表 4 体液細胞プロテアーゼの活性に対するプロテアーゼ
インヒビターの影響

精製した体液細胞プロテアーゼの活性に対する各種プロテアーゼインヒビターの影響を調べた。基質は Z-Arg-Arg-MCA を用いた。各々のインヒビターを加えたときの活性を、インヒビター非存在下での活性を 100 とした相対値で表示した。

第3章

体液細胞プロテアーゼの 生体防御過程への関与

第 1 節 序

センチクバエ 3 令幼虫の体腔中に、ヒツジ赤血球 (SRBC) を注入すると、これが時間と共に溶血をおこし、体液中から排除されることが知られている (15)。第 2 章において述べたように、精製したセンチクバエ幼虫の体液細胞プロテアーゼは至適 pH を 6 としており、体液中で作用しうることから、このプロテアーゼが体液中に侵入した異物の分解・排除を行っている可能性が高いと考えられた。そこで、この体液細胞プロテアーゼの生体防御過程への関与を調べるため、幼虫に SRBC をうちこみ、体液細胞プロテアーゼの挙動を解析した。この結果、このプロテアーゼが SRBC 注入に依存して体液細胞から体液中に放出されることを見いだした。

第 2 節では体表傷害のみを与えたときの体液細胞プロテアーゼの変動、第 3 節では SRBC 注入後の体液細胞プロテアーゼの変動、さらに SRBC と共に数種の薬剤を注入したときの体液細胞プロテアーゼの放出への影響について述べる。

第2節 体表傷害後の体液細胞プロテアーゼの経時変化

センチクバエ幼虫の体表を傷つけると、抗菌性物質や *Sarcophaga* レクチンの体液中への誘導が起こる(2-8)。これは、傷害によりおこりやすくなった異物の侵入や菌による感染などに対処するための反応と考えられる。このような状況で、精製した体液細胞プロテアーゼがどのように変動するかをイムノブロッティングにより解析した。

まず、精製した体液細胞プロテアーゼ(純度 90 % 以上)を抗原としてウサギ(アルビノ種)に注射し、これに対する抗血清を調製した。抗体の特異性はイムノブロッティングにより確認した。体液細胞抽出液 10 μ g を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動した後、蛋白をフィルター上にトランスファーし、これを抗血清、続いて放射ヨード標識した2次抗体と反応させてオートラジオグラフィを行った。その結果、免疫前血清とは何も反応せず、免疫後血清特異的に、電気泳動上 26 kDa および 29 kDa のバンドが検出された(図 10)。精製標品を基準として、バンドの強度をデンスitomーターでスキャン

することにより定量すると、体液細胞抽出液 10 μ g あたりのプロテアーゼは約 180 ng であり、その含量は 1/55 であった。これは、精製の際の最終的な比活性の上昇とよく一致する。しかし、このとき 26 kDa のバンドの方が 29 kDa に比べかなり強かった（これについては第 4 節で考察する）。

次に、体表傷害後、経時的にサンプリングした体液細胞の抽出液を各 10 μ g 電気泳動し、この抗血清を用いたイムノブロッティングによりプロテアーゼを検出した。そのオートラジオグラムを図 11 に示したが、傷をつけた幼虫の体液細胞におけるプロテアーゼは、傷害後 22 時間以降、傷をつけない幼虫に比べ減少する傾向が認められた。オートラジオグラム上の 26 kDa、29 kDa のバンドの強度から体液細胞プロテアーゼを定量した結果が図 12 である。ここでは、傷をつけていない幼虫の体液細胞における量を 100 % としたときの相対値として体液細胞プロテアーゼの量を表示している。このように、傷害後 8 時間までは無処理の場合と変わらないが、その後減少し、32 時間以降は体液細胞におけるプロテアーゼの含量が無処理の幼虫の約 50 % まで低下することがわか

った。おそらく、体液細胞に多量に存在するプロテアーゼが体表傷害をうけることにより体液中に出ていくのではないかと思われる。この現象が傷の刺激によるものか、あるいは傷口から侵入した異物に対する反応であるかはよくわからない。

第3節 ヒツジ赤血球注入後の体液細胞プロテアーゼの経時変化

センチニクバエ幼虫に異物を注入すると、*Sarcophaga* レクチンをはじめとする体液性因子の誘導は体表傷害のみのときに比べ数倍に高まることが知られており(15)、第2節に述べた体液細胞プロテアーゼの変化も増幅されることが予想された。そこで、実際に異物をうちこんだときに、体液細胞プロテアーゼがどのように変動するかを解析するため、3令幼虫にSRBCを注入し、その後、経時的に体液および体液細胞を回収し、イムノブロッティングを行った。

1) 体液細胞におけるプロテアーゼの変動

体液細胞はホモジナイズ後の遠心上清を抽出液とし、各々細胞数を 5×10^4 にそろえて電気泳動し、前述の抗血清を用いたイムノブロッティングにより体液細胞プロテアーゼを検出した。図 13 はそのオートラジオグラム、図 14 は 26 kDa、29 kDa のバンドの強度から体液細胞プロテアーゼを定量した結果で、各時間の無処理の幼虫のプロテアーゼ量に対する比率で表示している。図 14 からわかるように、SRBC をうちこむと、体表傷害後よりもさらに顕著な、体液細胞プロテアーゼの減少が認められた。SRBC 注入後 6 時間では、まだ大きな変化はないが、このあと 18 時間までに急激に減少し、無処理の幼虫における体液細胞プロテアーゼ量の 20 % に低下した。そして、44 時間までこのレベルの状態が継続していた。SRBC 注入後 18 時間において減少したプロテアーゼ量は体液細胞 5×10^4 あたり約 32 ng、これを幼虫 1 匹あたりに換算すると 190 ng であった。

2) 体液における体液細胞プロテアーゼの変動

同時に回収した体液を蛋白量を各 50 μ g にそろえて

電気泳動し、イムノブロッティングにより体液細胞プロテアーゼを検出した。このとき、検出感度を上げるため、26 kDa、29 kDa 蛋白で抗血清をアフィニティー精製したものを1次抗体として用い、さらに、2次抗体は放射活性を2倍にして反応させた。これにより、1 ng の体液細胞プロテアーゼが検出可能となった。図 15 は、そのオートラジオグラムであり、矢印で示した位置のバンドが体液細胞プロテアーゼに相当する。これは、体液にインターナルマーカーとして精製標品を混ぜると、この部分のバンドのみが、加えた蛋白量の分だけ強くなることから確認された（データは示さず）。このほかに検出される、75 kDa 付近の丸く広がったシグナルは、体液中の蛋白の 90 % をしめる貯蔵蛋白が非特異的に反応したものと考えられ、nIgG を用いても認められる。また、40 kDa あたりのバンドは、nIgG とでもわずかに反応するが、体液細胞プロテアーゼに対する抗体とより強く反応することから、体液細胞プロテアーゼと部分的に類似する構造をもっていると思われる。しかし、その実体は不明である。

図 16 は、この 26 kDa、29 kDa バンドの強度から、

各時間の体液細胞プロテアーゼを定量し、検出されたプロテアーゼ量の最大値を 100 % としたときの相対値で表示したものである。このように、体液において、体液細胞プロテアーゼは SRBC 注入に依存して認められ、その変動パターンは体液細胞におけるプロテアーゼの変動と時間的によく対応していた。すなわち、SRBC をうちこんでから、6 時間後ではほとんど検出されなかったプロテアーゼが、18 時間までの間に急に増大した。この際、体液蛋白 50 μ g 中に、SRBC 注入に依存して検出された体液細胞プロテアーゼは約 1 ng であり、幼虫 1 匹あたりに換算すると 140 ng になる。これは、同じ時間において体液細胞から減少したプロテアーゼ量とほぼ一致していた。以上より、SRBC を注入することにより、体液細胞のもつプロテアーゼが体液中に放出されることが示された。細胞数あたりのプロテアーゼ量が減少していることから、異物侵入により体液細胞が自爆したとは考えにくいし、また、データは示していないが、間接蛍光抗体法による解析で幼虫のほとんど全ての体液細胞にこのプロテアーゼが認められたことから、体液細胞のポピュレーションの変化ではこれだけ大幅な体液細胞における減少

は説明できない。

3) α -アマニチンの体液細胞プロテアーゼ放出への影響

これまで述べたように、異物侵入後、体液細胞プロテアーゼの体液中への放出がおこるまでに 18 時間を要する。センチニクバエにおいては、体表に傷をつけたり異物を注入したとき、数時間のうちに *Sarcophaga* レクチンをはじめいくつかの抗菌性物質が転写レベルで誘導され、体液中に分泌される(16-18)。体液細胞からのプロテアーゼの放出は、異物侵入後、これらの反応よりも遅れて生じることから、このような液性因子の合成がプロテアーゼの放出過程に関与しているのではないかと考えた。そこで、RNA polymerase II のインヒビターである α -アマニチンを用い、新たな蛋白合成を抑えた状態で、SRBC 注入後の体液細胞および体液におけるプロテアーゼの挙動を解析した。

SRBC と共に 0.5 mg/ml の濃度で α -アマニチンを幼虫にうちこみ、18 時間後に体液と体液細胞を回収し、イムノブロットィングにより体液細胞プロテアーゼを定量

した。図 17 にそのオートラジオグラムを示し、表 5 に定量した結果をまとめた。このように、SRBC のみをうちこんだ場合、体液細胞におけるプロテアーゼは無処理の幼虫の 23 % まで低下するが、 α -アマニチンを加えてもこの減少は全く阻害されなかった。また、体液においては α -アマニチン存在下でも SRBC のみのときと同じように体液細胞プロテアーゼが増大した。

一方、 α -アマニチンが作用しているかどうかは、体液の血球凝集活性から判定した。表 5 の右端にその結果を示したが、幼虫に SRBC のみをうちこむと、このように、体液中に血球凝集活性が誘導される。この活性は Sarcophaga レクチンによるものであることが知られている(7)。ところが、 α -アマニチンを共存させると、この活性は無処理の場合と同じレベルまで抑えられたので、本来、異物侵入に依存しておこるべき新たな蛋白合成は止められていると判断した。従って、この体液細胞プロテアーゼの放出は、acute phase 蛋白の合成を介さずにひきおこされると考えられる。ただし、ここでは Sarcophaga レクチンを代表として、このハエの脂肪体における蛋白合成のみをみており、他の器官でつくられる

acute phase 蛋白の影響については疑問が残る。

4) 糖誘導体の体液細胞プロテアーゼ放出への影響
ところで、前述の α -アマニチンの実験と平行して、
体液細胞プロテアーゼの放出過程への Sarcophaga
レクチン影響を調べる目的で、代謝されないと考えられ
る糖の誘導体を用いて同様の解析を行った。この結果、
Sarcophaga レクチンの活性に対する作用と関係なく、こ
れらが体液細胞プロテアーゼの放出を阻害することを見
いだした。以下、これについて述べる。

ここで使用した糖誘導体は、1-thio- β -D-galactose、
1-thio- β -D-glucose、D-galactone- γ -lactone で、1-
thio- β -D-galactose のみが Sarcophaga レクチンによ
る血球凝集活性を阻害する。これらを 0.5 M の濃度で
SRBC と共にうちこみ、18 時間後に体液と体液細胞を回
収してイムノプロットングを行った。図 18 にそのオ
ートラジオグラム、表 6 に体液細胞プロテアーゼを定量
した結果を示した。SRBC のみを注入すると、体液細胞に
存在していたプロテアーゼは 23 % を残すのみで、あと
は体液中に放出される。ところが糖誘導体を加えると、

1-thio- β -D-galactose、1-thio- β -D-glucose では 60-70 %、D-galactone- γ -lactone では 50 % のプロテアーゼが体液細胞中に残り、その分だけ体液中に検出されるプロテアーゼが少なかった。このように、体液細胞プロテアーゼの放出に対しては、チオ糖がD-galactone- γ -lactone よりも強い阻害を示した。これら、糖誘導体が異物侵入から体液細胞プロテアーゼ放出にいたる過程のどのステップに作用しているかは、まだよくわからないが、このメカニズムを知る上で興味深い知見であると思われる。

なお、ガラクトース、グルコースそのものを SRBC と共に注入した場合は、体液細胞プロテアーゼの放出阻害は全く認められなかった。これは、18 時間までの間に糖が代謝され、その効果が消失したためであろう。

第 4 節 考察

体液細胞は、昆虫の生体防御において重要な役割を果たすと考えられている。そこで、精製した体液細胞プロテアーゼの生体防御過程への関与を調べるため、センチ

ニクバエ 3 令幼虫の体内に異物として SRBC を注入し、体液細胞、体液における体液細胞プロテアーゼの挙動についてイムノプロットイングにより解析した。この結果、SRBC を注入してから 18 時間のあいだに体液細胞においてプロテアーゼが減少し、同時に、これにみあう量の体液細胞プロテアーゼが体液中に検出された。このような時間的、量的相関が認められたことから、体液細胞プロテアーゼが、SRBC 注入に依存して体液中に放出されることが明らかになった。この体液細胞プロテアーゼは体液中で活性をもつと考えられるので、放出されたプロテアーゼが侵入した異物蛋白の分解、処理を行うことが推察された。

図 19 に、センチニクバエ体内でおこる生体防御反応についての模式図を示した。このハエでは、異物侵入後 2-3 時間で、脂肪体において *Sarcophaga* レクチンおよび数種の抗菌性物質が合成され始め、これが体液中に分泌されて、異物を攻撃する生体防御反応がよく知られている (2-8)。体液細胞プロテアーゼの放出は、 α -アamaniチン存在下、このような液性因子の誘導を抑えた状態で SRBC をうちこんでも認められることから、図 19 に

表したように、acute phase 蛋白の誘導とは異なる経路の生体防御システムに属するものと考えられる。

さて、異物の侵入から体液細胞プロテアーゼの放出が生じるまでに 18 時間を要するということが、この現象のユニークな点である。この体液細胞プロテアーゼは異物侵入後、どのような局面において必要なのだろうか。侵入した異物が最終的に処理されるまでには、いくつかのステップがあり、複数の因子が関与していると思われるが、プロテアーゼは、蛋白をバラバラに分解するという最終的な段階で作用すると考えられる。幼虫に SRBC を注入すると、数時間後から溶血をおこし始め、体液中から排除されるが、体液細胞プロテアーゼは溶血した後の SRBC の残骸を処理する際にはたらくと思われる。異物の侵入から、このプロテアーゼの放出に至るまでのメカニズムは、まだ不明であるが、おそらく、体液細胞が何らかの形で異物を認識し、これが引金となって、プロテアーゼを放出するものと考えられる。18 時間は、侵入した異物が体液中で徐々に変性し、体液細胞により認識されるまでに要する時間であり、プロテアーゼの放出は、異物処理の最終段階に達して初めておこるしくみになっ

ていると推測される。

第3節4)に述べた糖誘導体による体液細胞プロテアーゼ放出の阻害については、現段階では糖がどこに作用しているかよくわからないが、これが体液細胞と異物との相互作用に影響している可能性もあり、体液細胞による異物認識の機構を解析する上での手がかりとなると考えられる。

ところで、第2節に述べたように、体液細胞についてイムノブロッティングを行うと、26 kDa が圧倒的に多く、29 kDa はかすかに存在が確認できる程度である。体液中に検出されたプロテアーゼも、やはりこのような傾向が認められた。これに対し、精製標品の CBB 染色の像では 26 kDa のバンドがやや強いが、ほぼ 1:1 の比率である。この点については、大きく分けて2通りの解釈ができる。1つは、体液細胞および体液において、実際に 26 kDa 蛋白が多量に存在し、29 kDa 蛋白は少ないという考え方であり、もう1つは、体液細胞、体液において 26 kDa、29 kDa 蛋白は精製標品と同じ比率で存在しており、イムノブロッティングで違う比率になるのは、手法上のアーティファクトであるという考え方である。前者であると

すると、最終的に得られた精製標品中の 29 kDa 蛋白の量に比べ、体液細胞中に検出された 29 kDa 蛋白の量が少なすぎるという矛盾が生じる。一方、後者の場合、その主な原因として、蛋白をフィルター上にトランスファーする際の効率の違いが考えられる。実際に、精製標品についてイムノブロッティングを行うと、26 kDa と 29 kDa の比率は実験ごとにやや異なり、図 13 の左端のレーンのように 26 kDa の方が強くなることもある。また、無処理の幼虫の体液と精製標品を混ぜてイムノブロッティングを行うと、SRBC を注入したときの体液とよく似たパターンになる。現段階ではどちらとも断定しかねるが、26 kDa と 29 kDa の比は、少なくともイムノブロッティングの結果ほど極端ではないと思われる。

この問題は、第 2 章 5 節で述べた 26 kDa と 29 kDa のどちらがプロテアーゼ活性をもつかという点ともからんでくる。26 kDa、29 kDa 蛋白が複合体を形成したり、単独で存在したり、というように異なる存在状態をとることにより、プロテアーゼ活性を調節していることも十分考えられる。例えば、体液細胞内では不活化した状態で存在し、細胞内成分あるいはプロテアーゼ自身の分解を

抑制し、体液中に放出されるときに活性型になるとすれば、生体防御反応が効率よく進行すると考えられる。

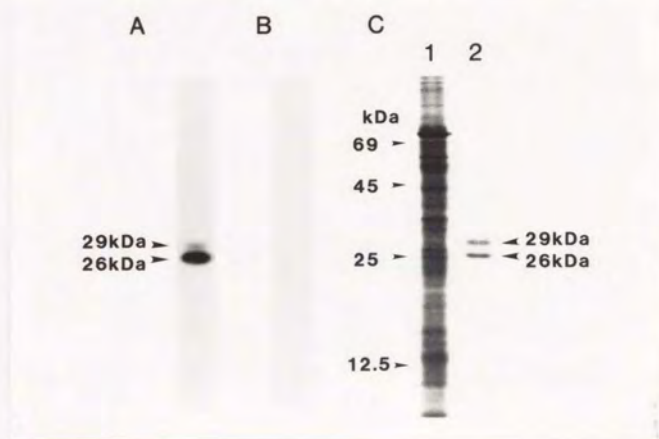


図 10 体液細胞抽出液のイムノブロッティングによる解析

体液細胞プロテアーゼに対して調製した抗体を用い、幼虫の体液細胞抽出液 10 μ g についてイムノブロッティングを行い、抗体の特異性を検討した。A、B はそのオートラジオグラムであり、C は体液細胞抽出液を電気泳動して CBB で染色した結果である。A では 1 次抗体として免疫後血清を、B では免疫前血清を用いている。また、C のレーン 1 は体液細胞抽出液、レーン 2 は精製標品である。

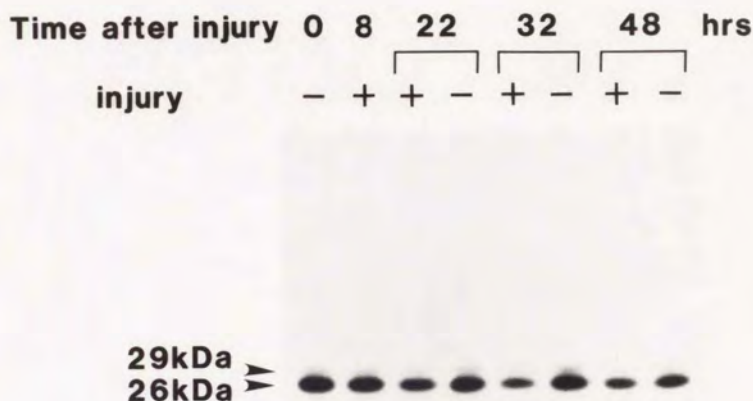


図 11 体表傷害後の体液細胞プロテアーゼの経時変化 (I)

幼虫の体表に傷をつけ、経時的に体液細胞を回収し、イムノブロッティングにより体液細胞プロテアーゼの挙動を解析した。これはそのオートラジオグラムである。上の数字は体表傷害後の時間を示し、+の記号は体表に傷をつけたことを、-の記号はこのような処理を行わないことを表す。

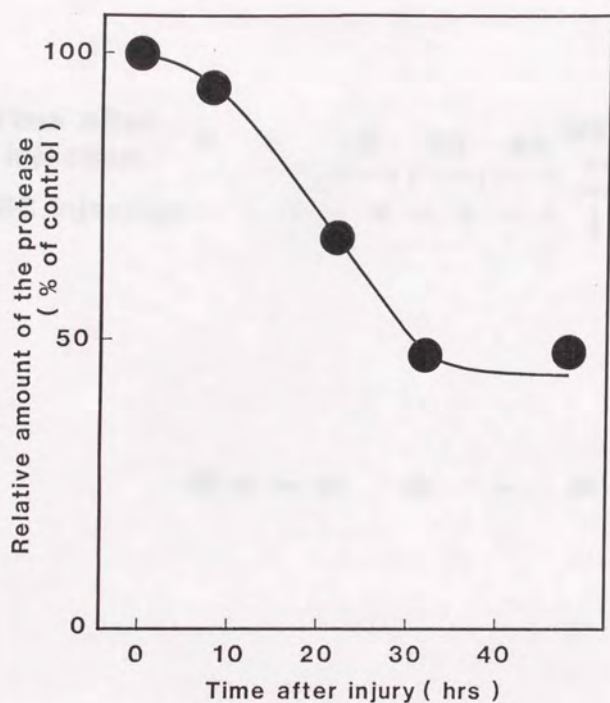


図 12 体表傷害後の体液細胞プロテアーゼの経時変化 (II)

図 11 の 26 kDa および 29 kDa のバンドの強度をデンシトメーターで測定することにより、体液細胞プロテアーゼを定量した結果を示す。横軸は体表傷害後の時間、縦軸はプロテアーゼの量を、無処理の幼虫の体液細胞における量を 100 としたときの相対値で示した。

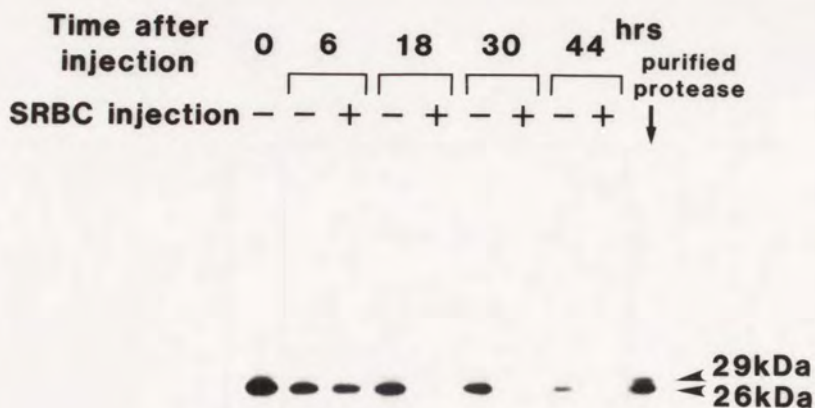


図 13 SRBC 注入後の体液細胞におけるプロテアーゼの経時変化 (I)

幼虫の体内に SRBC を注入した後、経時的に体液細胞を回収し、イムノブロットリングにより体液細胞プロテアーゼの挙動を解析した。これはそのオートラジオグラムである。上の数字は SRBC 注入後の時間を示し、+の記号は SRBC をうちこんだことを、-の記号はこのような処理を行わないことを表す。右端のレーンには精製標品 50 ng を電気泳動した。

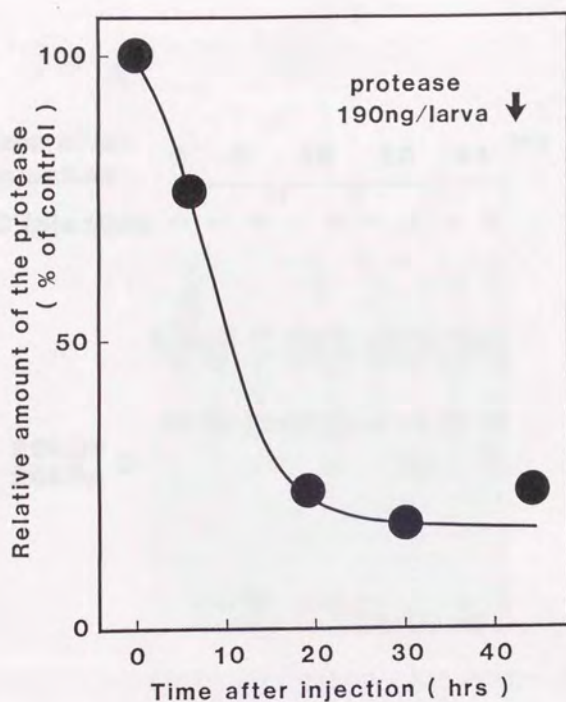


図 14 SRBC 注入後の体液細胞におけるプロテアーゼの経時変化 (II)

図 13 の 26 kDa および 29 kDa のバンドの強度をデンストメーターで測定することにより、体液細胞プロテアーゼを定量した結果を示す。横軸は SRBC 注入後の時間、縦軸はプロテアーゼの量を、各時間の無処理の幼虫の体液細胞における量に対する比率で示した。18 時間後には幼虫 1 匹あたり 190 ng のプロテアーゼが減少した。

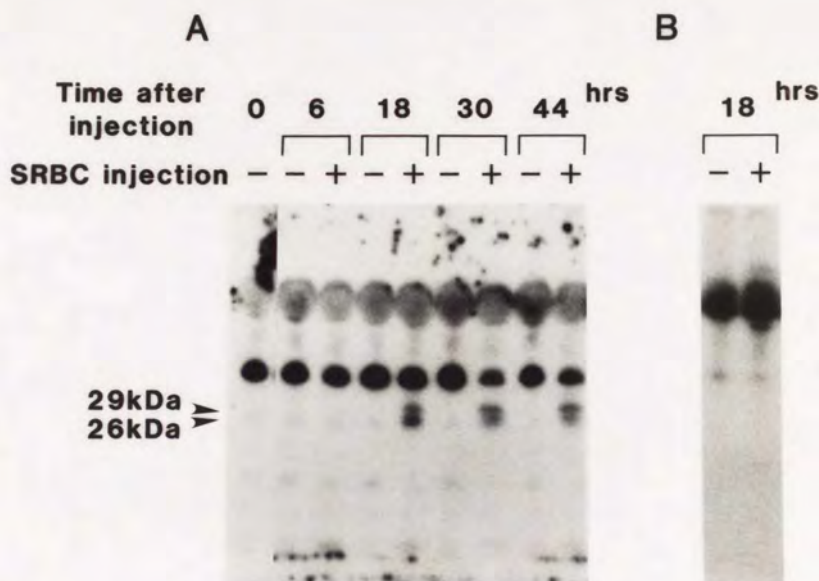


図 15 SRBC 注入後の体液におけるプロテアーゼの経時変化 (I)

幼虫の体内に SRBC を注入した後、経時的に体液を回収し、イムノブロッキングにより体液細胞プロテアーゼの挙動を解析した。これはそのオートラジオグラムである。A は 1 次抗体としてアフィニティー精製した体液細胞プロテアーゼの抗体を、B は nIgG を用いた結果である。上の数字は SRBC 注入後の時間を示し、+ の記号は SRBC をうちこんだことを、- の記号はこのような処理を行わないことを表す。オートラジオグラフィーの際の exposure は、A が -80°C で 2 日間、B が -80°C で 7 日間である。

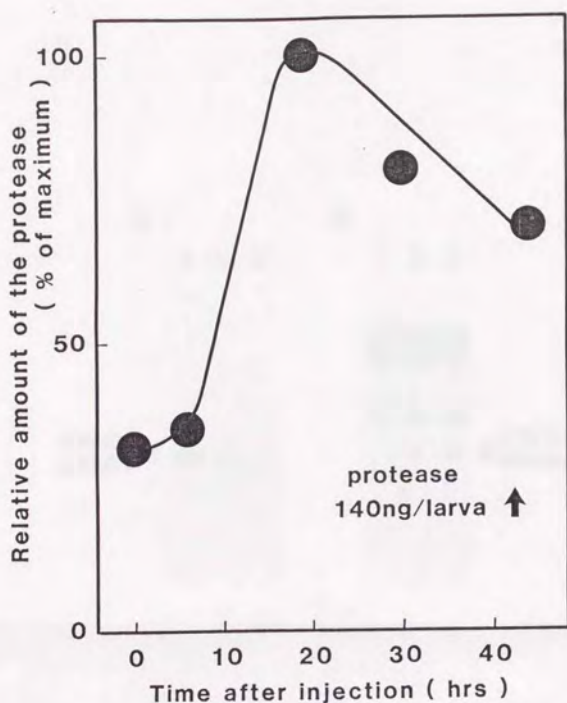


図 16 SRBC 注入後の体液におけるプロテアーゼの経時変化 (II)

図 15 の 26 kDa および 29 kDa のバンドの強度をデンストメーターで測定することにより、体液細胞プロテアーゼを定量した結果を示す。横軸は SRBC 注入後の時間、縦軸は体液細胞プロテアーゼの量を、体液中に検出されたプロテアーゼ量の最大値を 100 としたときの相対値で示した。18 時間後には幼虫 1 匹あたり 140 ng のプロテアーゼが増大した。

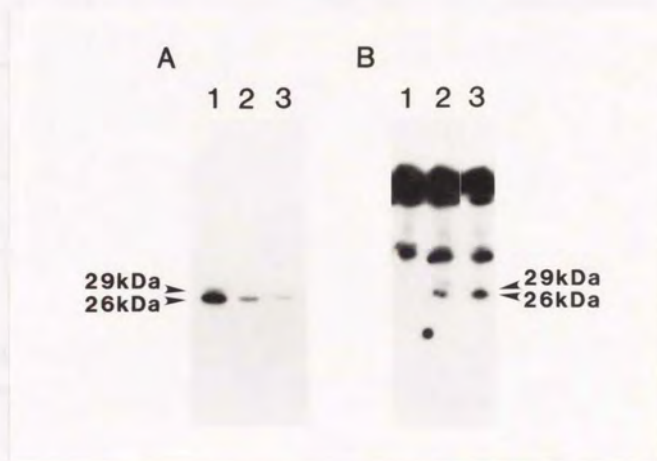


図 17 体液細胞プロテアーゼの放出に対する α -アマンニチンの影響 (I)

幼虫に、SRBC と共に α -アマンニチンをうちこみ、18 時間後に体液および体液細胞を回収し、イムノブロッティングを行った。この図はそのオートラジオグラムである。A は体液細胞、B は体液についての結果で、共に、レーン 1 は何もうちこんでいないもの、レーン 2 は SRBC のみをうちこんだもの、レーン 3 は α -アマンニチン存在下で SRBC をうちこんだものである

Injection	Relative amount of the protease (%)		Hemagglutinating activity (titer ⁻¹)
	Hemocytes	Hemolymph	
None	100	25	<1
SRBC	23	100	192
SRBC + α -Amanitin	9	141	<1

表 5 体液細胞プロテアーゼの放出に対する α -アマンニチンの影響 (II)

図 17 の 26 kDa および 29 kDa のバンドの強度をデンシトメーターで測定することにより、体液細胞および体液における体液細胞プロテアーゼを定量した結果を示す。体液細胞については、無処理の幼虫におけるプロテアーゼ量を 100 とし、体液については、SRBC のみをうちこんだときのプロテアーゼ量を 100 とした相対値で表示した。また、体液中の血球凝集活性は、体液 (insect saline で蛋白濃度 32 mg/ml に希釈したもの) の 2 倍希釈系列において活性を示す最大希釈倍数で表している。血球はヒツジ赤血球を用いた。

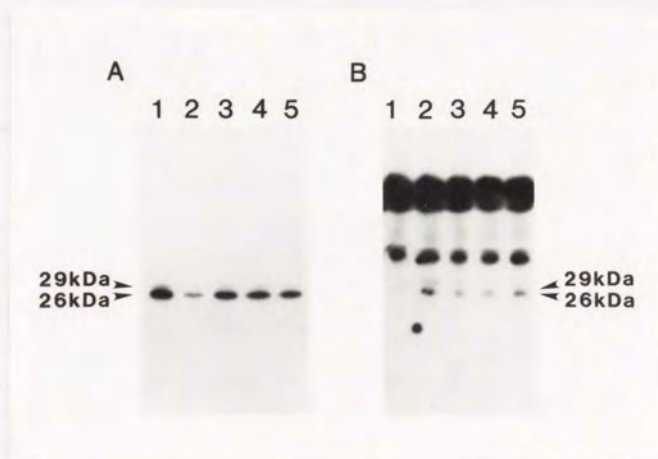


図 18 体液細胞プロテアーゼの放出に対する糖誘導体の影響 (I)

幼虫に、SRBC と共に糖誘導体をうちこみ、18 時間後に体液および体液細胞を回収し、イムノブロッティングを行った。この図はそのオートラジオグラムである。A は体液細胞、B は体液についての結果で、共に、レーン 1 は何もうちこんでいないもの、レーン 2 は SRBC のみをうちこんだもの、レーン 3 は 1-thio- β -D-galactose、レーン 4 は 1-thio- β -D-glucose、レーン 5 は D-galactone- γ -lactone 存在下で SRBC をうちこんだものである

Injection	Relative amount of the protease (%)	
	Hemocytes	Hemolymph
None	100	25
SRBC	23	100
SRBC + 1-Thio- β -D-galactose	68	45
SRBC + 1-Thio- β -D-glucose	63	43
SRBC + D-Galactone- γ -lactone	51	70

表 6 体液細胞プロテアーゼの放出に対する糖誘導体の影響 (II)

図 18 の 26 kDa および 29 kDa のバンドの強度をデンストメーターで測定することにより、体液細胞プロテアーゼを定量した結果を示す。体液細胞については、無処理の幼虫におけるプロテアーゼ量を 100 とし、体液については、SRBC のみをうちこんだときのプロテアーゼ量を 100 とした相対値で表示した。

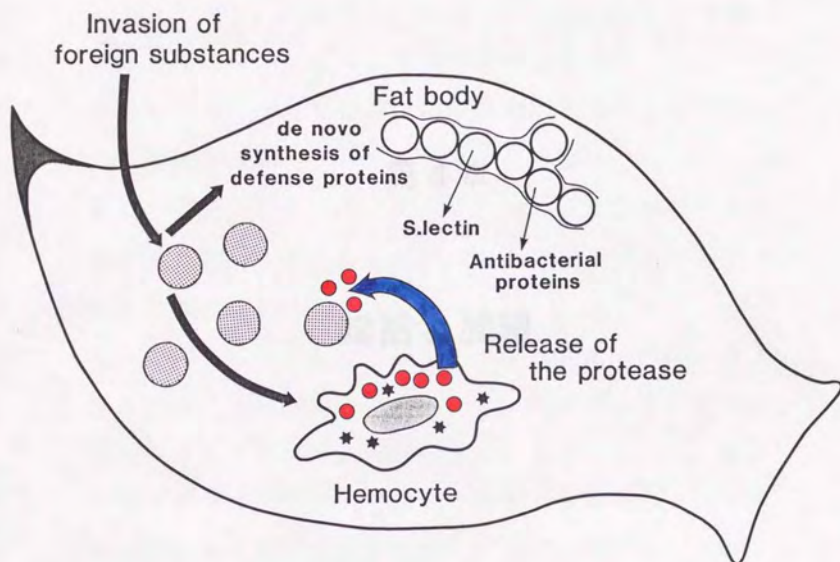


図 19 異物侵入時におこる生体防御反応の模式図

異物の侵入に応じて、体液細胞プロテアーゼが体液中に放出される。

第4章

総括と展望

すべての生物は自己の生命を維持するための防御機構をもっている。抗体産生能のない昆虫は、脊椎動物の免疫系とは異なる、独自の生体防御機構を備えている。その1つとして、異物の侵入に呼応してさまざまな液性因子を体液中に誘導することが知られている(1-8)。一方、昆虫の体液細胞は、その生体防御において重要な役割を果たしていると考えられるが、その分子レベルでの解析はほとんどなされていない。

センチニクバエにおいて、幼虫の体内に異物蛋白を注入すると、これが選択的に分解され、このような蛋白を分解する活性が体液細胞に局在することから(11)、体液細胞のもつプロテアーゼが異物処理に関与していると考え、これに注目して研究を行った。

まず、体液細胞中のプロテアーゼを検索し、少なくとも2種以上のプロテアーゼが存在することを見いだした。このうちの1つを実際に精製し、それがどのようなプロテアーゼであるかを解析した。第1章において述べたように、このプロテアーゼは体液細胞において高い含量を示す蛋白で、電気泳動上 26 kDa、29 kDa の2つの一次構造の異なる蛋白から構成され、その native な分子量

は 68 kDa である。この体液細胞プロテアーゼは至適 pH を 6 とするシステインプロテアーゼで、カテブシン B 様の活性をもつ。体液細胞プロテアーゼが精製されたことにより、次の分子レベルでの解析が可能となった。

体液細胞プロテアーゼの生体防御過程への関与について解析した結果を、第 2 章に示した。このプロテアーゼは SRBC 注入後 18 時間のあいだに、体液細胞から体液中に放出されることが明らかとなり、しかも、この反応は Sarcophaga レクチンをはじめとする液性因子の誘導とは異なる経路をとることがわかった。

体液細胞プロテアーゼの体液中への放出は、図 19 に示したような体液細胞による異物処理の 1 ステップと考えられる。体液細胞が侵入した異物の処理に関わるということは、これまでの形態学的解析からも指摘されていたが、本研究で、この過程における分子の動きが捉えられたことは大きな進歩である。これを起点として、体液細胞を介した昆虫の生体防御を解明するためのいくつかのアプローチを行うことができると思われる。

まず、第一に示さなければならないのは、このプロテアーゼが実際に異物をこわすということである。現段階

では、このプロテアーゼの至適 pH が 6 であり、体液中で作用するということから、異物を分解するだろうと考えているが、この点は実験的に証明する必要がある。

1 つの方法は、異物をなんらかの形で標識してその変化を追える系をつくり、これを異物分解の指標として体液細胞プロテアーゼの作用をみることである。次には、異物侵入から体液細胞プロテアーゼの放出に至る過程の解析が必要と考えられる。本研究で示したように、この過程には比較的長い時間を要することから、数段階の反応が含まれていると予想される。この中で特に興味深いのは、体液細胞による異物の認識である。プロテアーゼ自体は非自己である異物特異的に作用するのではなく、体液細胞がその識別を行っていると考えられる。センチニクバエでは、変態の過程で体液細胞が自己と非自己の認識の変換し、それまでは自己であったはずの幼虫組織を崩壊させることが示されている (19)。自己と非自己の識別は生体防御の核となる部分であり、これに狂いが生じると自己を守るための機構が、逆に破滅に導くことになってしまう。従って、異物の認識は、生体防御機構を理解する上で、最も重要な問題の 1 つといえる。異物

侵入に依存しておこる体液細胞プロテアーゼの放出を指標とし、これを阻害または促進する因子を検索することがその解析の方法の1つとなるかもしれない。第2章3節4)に述べた、糖誘導体による体液細胞プロテアーゼ放出の阻害は、1つの手がかりとなるかも知れない。ここに挙げたような解析には、異物に依存した体液細胞からのプロテアーゼの放出を *in vitro* で再現することが必要と思われる。図19に示したような一連の体液細胞を介した昆虫の生体防御反応が明らかになれば、高等動物における細胞性の生体防御反応を理解する上でも何らかの手がかりになると思われる。

ところで、この体液細胞プロテアーゼ自体は非特異的に作用するのであれば、これが異物以外の必要なもので攻撃することのないように、調節するしくみがあると考えられる。異物排除の過程では、体液細胞が異物を認識し、異物のごく近傍でプロテアーゼを放出することにより、その作用を限定することが可能と思われる。しかし、体液中に放出されたプロテアーゼが拡散すれば、異物以外の蛋白も標的となりうる。これを防ぐものとして、体液中のプロテアーゼインヒビターが挙げられる。セン

チニクバエ3令幼虫の体液には、体液細胞のプロテアーゼの活性を阻害するインヒビターが存在し、その1つは精製され、Sarcocystatin A と命名された(20)。このインヒビターは、哺乳類に広く存在するシスタチン(低分子蛋白性システインプロテアーゼインヒビター)と共通する構造をもっており、また、センチニクバエにおいて、胚発生時および変態の時期に特異的に発現するユニークな分子である(21-22)。今回精製した体液細胞プロテアーゼの活性は、Sarcocystatin A では阻害されなかったが、幼虫体液にはこの他にもインヒビターの存在が確認されており、この体液細胞プロテアーゼを標的とするインヒビターが含まれている可能性は十分考えられる。また、プロテアーゼ活性の調節を、体液細胞プロテアーゼ自身が行っていることも考えられる。この点については、考察の項で述べた。いずれにしても、プロテアーゼ活性の調節は、生体防御機構において不可欠と考えられ、このメカニズムを明らかにすることは重要である。

本研究で得られた知見として、もう一点、センチニクバエ幼虫の体液細胞には精製したもの以外にもプロテアーゼが存在しているということがある。また、このハエ

の蛹の体液細胞にはキモトリプシン様酵素が存在し、幼虫の脂肪体を崩壊する際にはたらくことが示されている(23)。このように体液細胞にはさまざまなプロテアーゼが存在し、機能を分担していると考えられる。インヒビターが発生過程に特異的に発現することから、発生過程に関与するプロテアーゼが存在することもあると考えられるし、また、生体防御に関与するプロテアーゼも1つだけではないだろう。今後、さらに体液細胞のプロテアーゼを同定し、その機能を解析することにより、多くの生命現象を解明する手がかりが得られるだろう。

第5章

材料と方法

(1) センチニクバエの飼育と取り扱い (24)

センチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) は 27 °C で飼育を行った。羽化後、10-12 日目の成虫に豚レバーを与え、1 令幼虫を産みつけさせる。幼虫は豚レバー中で飼育し、4 日後、最終令である 3 令幼虫を取り出す。よく洗浄した後、少量の水を入れたプラスチック容器に移し、24 時間おいてから実験に用いた。3 令幼虫は、この状態で少なくとも 5 日間は使用可能だが、体表傷害を与えたり、SRBC を注入したりする場合は、3 日以内の 3 令幼虫を用いた。このハエは囲蛹殻形成時に同調することができる (25)。

(2) 体液および体液細胞の採取

3 令幼虫の頭部を切断し、体液を氷冷した insect saline 中に回収した。遠心 (100 × g, 5 分, 4 °C) により得られた上清を体液とし、沈澱はさらに insect saline で 3 回洗浄し、これを体液細胞として用いた。体液、体液細胞は共に -80 °C に保存した。

(3) 体液細胞抽出液の調製

精製の出発材料とする場合、約 500 ml の体液から得た体液細胞を 30 ml の 0.1 % Triton X-100 を含む insect saline 中でホモジナイズして、さらに、超音波により粉碎し（氷上）、遠心（ $20,000 \times g$, 10分, 4°C ）を 2 回行った後の上清を用いた。この画分は -20°C に置いて、少なくとも 1 ヶ月は安定であった。

イムノブロッティングに使用する場合は、10-20 匹の幼虫から回収した体液細胞を、 2×10^6 細胞あたり $100 \mu\text{l}$ の 0.1 % Triton X-100、1 mM PMSF、 $100 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、5 mM EDTA を含む insect saline 中に懸濁し（氷上）、ボルトックスミキサーを用いて粉碎し、遠心（ $10,000 \times g$, 10 分, 4°C ）を 2 回行った後の上清を抽出液とした。

(4) ^{125}I -カゼインの水解によるプロテアーゼ活性の測定

アッセイは、Suzuki らの方法に従って行った (20)。
 ^{125}I -カゼイン 2 ng ($20,000 \text{ cpm}$, $1 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{g}$) を基質とし、reaction buffer A に試料を加えて $120 \mu\text{l}$

にし、27 °C、30 分のインキュベーションを行った。反応後、10 mg/ml BSA 80 μ l、10 % (w/v) TCA 200 μ l を加え、遠心 (10,000 \times g, 10 分, 4°C) した後、上清の放射活性を γ -カウンターで測定した。

カゼインの放射ヨード標識は、Hunter らの方法に従い、クロラミン T を用いて行った (26)。カゼインは 5 % TCA により沈澱した酸不溶性画分を回収し、これを 10 mM NaOH で再溶解した後、放射標識した。 125 I-カゼインは 1 mg/ml BSA 溶液中で、-80 °Cにおいて保存した。

(5) 合成基質を用いたプロテアーゼ活性の測定

50 μ M の基質を含む reaction buffer B を 27 °C、2 分ブレインキュベーションし、試料を加えて 200 μ l とする。27 °C、10 分インキュベーションした後、20 % 酢酸 200 μ l を加えて反応を止め、基質が水解されて生じた AMC による蛍光を測定した。excitation は 380nm、emission は 460 nm で行った。1 ユニットは、1 μ M の基質を 10 分間に水解する活性として定義した。

(6) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

電気泳動は、Laemmli の方法に従った (27)。分離ゲルは 12.5 % アクリルアミドとした。試料は sample buffer 中で 75 °C、20 分の熱処理により変性させて泳動した。電気泳動後のゲルは、Fairbanks らの方法に従い、染色を行った (28)。

(7) 蛋白定量

蛋白定量は、Lowry の方法に従い (29)、その 1/5 および 1/20 の系で行った。前者では 2-10 μg 、後者では 0.5-2.5 μg の蛋白を定量できる。定量の基準として BSA を用いた。

(8) ペプチドマッピング

Elderらの方法に従って行った (13)。精製標品 2 μg を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分離し、26 kDa と 29 kDa のバンドを切り出し、ゲルの中の蛋白をクロラミンTを用いて放射ヨード標識した。蛋白に取り込まれなかった放射ヨードを除去し、ゲルを粉碎した後、37 °C、20 時間、50 $\mu\text{g/ml}$ TPCK トリプシンと反応させ、トリプティックフラグメントを得た。これを TLC プレー

ト (20 × 20 cm, Merk 5716) にスポットし、1次元目は電気泳動、2次元目は薄層クロマトグラフィーにより分析し、オートラジオグラフィーを行った。

(9) 抗体の調製

体重約 3 kg のオスのウサギ (アルビノ種) に、精製した体液細胞プロテアーゼ (Superose 12 画分) を免疫した。第1次感作として、精製標品 20 μ g に complete Freund adjuvant を加えてエマルジョンを作製し、ウサギの背中の皮下に抗原を注射した。10 日後、さらに 17 日後、精製標品 20 μ g と incomplete Freund adjuvant によりエマルジョンを作製し、追加免疫を行った。最終免疫の 10 日後に採血し、血清成分を回収した。血清の力価は、イムノブロットティングにより判定した。

(10) イムノブロットティング

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分離した蛋白を、ゲルから Immobilon-P フィルター (Milipore) 上へ電氣的 (5 mA/cm², 1 時間) にトランスファーした (30)。この操作は、ゲルとフィルターを Whatman 3MM

Filter のあいだにはさみ、その外側に十分に transfer buffer を含ませたスポンジを置き、セミドライ用トランスファー装置を用いて行った。そのフィルターを、5 % スキムミルクを含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) で 1 時間ブロッキングした後、rinse buffer で洗浄し、1 次抗体と反応させた (4 °C, 12 時間)。よく洗浄した後、放射ヨード標識した 2 次抗体と反応させた (4 °C, 4 時間)。再びよく洗浄し、フィルターを風乾した後、Kodak XAR film を用いて、オートラジオグラフィーを行った。

体液細胞抽出液のイムノブロッティングでは、1 次抗体として、rinse buffer で 3,000 倍に希釈した抗血清を用い、2 次抗体の放射活性は 1.5×10^6 cpm とした。また、体液のイムノブロッティングでは、抗血清をアフィニティー精製して 1 次抗体として用い (0.4 μ g/ml)、2 次抗体は 3×10^6 cpm とした。

(11) 抗体のアフィニティー精製

精製した体液細胞プロテアーゼ 30 μ g を電気泳動し、蛋白をゲルからニトロセルロースフィルター (BA-85,

Schleicher and Schuell) にトランスファーし、そのフィルターのエンドをアミドブラックで染色して、26 kDa、29 kDa のバンドの位置を確認した。フィルターの 26 kDa、29 kDa 蛋白の部分を取り出し、抗血清と反応させた後、吸着した抗体液細胞プロテアーゼ抗体を 0.2 M glycine-HCl buffer (pH 2.8) により抽出し、1 M KOH で中和した。この抗体をフィルターにトランスファーし、放射ヨード標識したウサギ IgG に対する抗体と反応させて、精製した抗体中の IgG を検出し、nIgG を基準として定量した。

(12) 3 令幼虫への SRBC の注入

実体顕微鏡下で注射筒を固定し、幼虫の後部体節に SRBC を注入した。ディスポーザブルシリンジ (テルモ、1 ml) に、静脈用注射針をつけ、5 μ l のドラモントマイクログラビラリー内の SRBC 溶液 (10^7 cells) を顕微鏡下で吸い上げ、氷上で麻酔した幼虫に注射した。ペーパータオル上に約 10 分放置し、傷口を乾燥させた後、水を少量入れたプラスチック容器に移し、27 $^{\circ}$ C で飼育した。

(1 3) バッファーの組成

バッファー A	20 mM acetate buffer (pH 5.0) 1 mM EDTA
バッファー B	20 mM phosphate buffer (pH 6.0) 1 mM EDTA
バッファー C	20 mM phosphate buffer (pH 6.0) 130 mM NaCl, 1 mM EDTA
バッファー D	10 mM phosphate buffer (pH 6.0) 40 % sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
insect saline	130 mM NaCl, 5 mM KCl 1 mM CaCl_2
reaction buffer A	50 mM acetate buffer (pH 5.0) 100 mM NaCl, 1 mM EDTA 5 mM β -mercaptoethanol

reaction buffer B 50 mM phosphate buffer (pH 6.0)
100 mM NaCl, 1 mM EDTA,
5 mM β -mercaptoethanol

sample buffer 125 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9)
1 % SDS
2 % β -mercaptoethanol
20 % glycerol

transfer buffer 192 mM glycine,
25 mM Trizma base
20 % methanol, 0.02 % SDS

rinse buffer 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5),
150 mM NaCl, 1 mM EDTA,
0.1 % Triton X-100,
0.01 % sodium azide,
0.25 % skim milk (no fat, Difco)

References

1. Boman, H.G. and Hultmark, D. (1981) Trends Biochem. Sci. 6,
306-309
2. Okada, M. and Natori, S. (1983) Biochem. J. 211, 727-734.
3. Okada, M. and Natori, S. (1985) J. Biol. Chem. 260, 7174-7177.
4. Ando, K., Okada, M. and Natori, S. (1987) Biochemistry 26,
226-230.
5. Baba, K., Okada, M., Kawano, T., Komano, H. and Natori, S. (1987)
J. biochem. 102, 69-74.
6. Mstsuyama, K. and Natori, S. (1988) J. Biol. Chem. 263,
17112-17116.
7. Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S. (1980) J. Biol. Chem. 255,
2919-2924.
8. Natori, S. (1977) J. Insect. Physiol. 23, 1169-1171.
9. Ratcliffe, N.A. and Rowley, A.F. (1979) in Insect Hemocytes
(Gupta, A.P., ed.) pp.332-414, Cambridge univ press, Cambridge.
10. Salt, G. (1970) in The Cellular Defence Reactions of Insect,
pp.68-84, Cambridge univ press, Cambridge.
11. Suzuki, T. and Natori, S. (1985) Comp. Biochem. Physiol. 81A,
191-193.
12. Elder, J.H., Pickett, R.A.II, Hampton, J. and Lerner, R.A. (1977)
J. Biol. Chem. 183, 265-275.
13. Barret, A.J. and Kische, H. (1981) Meth. Enzymol. 80, 535-561
14. 勝沼信彦 (1987) 実験医学 5, 956-930
15. Komano, H. and Natori, S. (1985) Dev. comp. Immun. 9, 31-40.

16. Takahashi, H., Komano, H. and Natori, S. (1986)
J. Insect. Physiol. 32, 771-779.
17. Matsumoto, N., Okada, M., Takahashi, H., Qu, X.-M., Nakajima, Y.,
Nakanishi, Y., Komano, H. and Natori, S. (1986) Biochem. J. 239,
717-722.
18. Ando, K. and Natori, S. (1988) Biochemistry 27, 1715-1721.
19. Kurata, S., Komano, H. and natori, S. (1989) J. Insect. Physiol.
35, 559-565.
20. Suzuki, T. and Natori, S. (1985) J. Biol. Chem. 260, 5115-5120.
21. Suzuki, T. and Natori, S. (1986) Insect Biochem. 16, 589-595.
22. Saito, H., Suzuki, T., Ueno, K., Kubo, T. and Natori, S. (1989)
Biochemistry 28, 1749-1755.
23. Kurata, S., Saito, H. and Natori, S. (1990) Insect Biochem. 20,
461-465
24. 大滝哲也 (1980) 昆虫学実験法 材料・実習編 pp.10-13,
(学会出版センター)
25. Ohtaki, T. (1966) Jap. J. med. Sci. Biol. 19, 97-104.
26. Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. (1962) Nature, Lond. 194, 495-496
27. Laemli, U.K. (1970) Nature, Lond. 227, 680-685.
28. Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.L.H. (1971)
Biochemistry 10, 2606-2617.
29. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rsnall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
30. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.

謝 辞

本論文を終えるにあたり、この研究を行う機会を与えて下さり、常に暖かく励まし、御指導下さいました東京大学薬学部微生物薬品化学教室名取俊二教授に心から感謝致します。

本研究に対し、有益な、そして厳しい御指導、御批判を賜りました関水 和久助教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、終始暖かく、かつ厳しい御指導、御助言をして下さり、多くのことを教えて下さいました、駒野宏人助手、久保健雄助手に心から感謝します。

また、共に励ましあいながら研究を進め、本研究に関し有益な討論をして下さいました、中島由紀博士、倉田祥一朗博士をはじめ、東京大学微生物薬品化学教室の皆様心から感謝します。

斎藤 浩美

