九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

カイコ体液プロフェノールオキシダーゼに関する研 究

山本, 幸治 九州大学農学研究科遺伝子資源工学専攻

https://doi.org/10.11501/3150654

出版情報:九州大学, 1998, 博士(農学), 課程博士 バージョン: 権利関係: 第五章 プロフェノールオキシダーゼの発現系の構築

第一節 緒言

前章では、PPO1およびPPO2のcDNAをクローニングし、その塩基配列に ついて述べた。これまでに、カイコ(錦秋×鐘和系統)、タバコスズメガ、 ショウジョウバエそしてザリガニよりPPOがクローニングされその塩基配列 が決定されている¹⁻⁴⁾。しかし、PPOの発現系の構築はまだなされていな い。本章では、PPO1およびPPO2の大腸菌内での発現を試みた。

第二節 実験材料

第一項 オリゴヌクレオチド

PCR反応に用いるオリゴヌクレオチドプライマーの作製は、サワデイーテクノロジー株式会社に依頼した。PCR反応には以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

Primer 1, 5'-GTGCCAAGCTTCATATGTCTGACGCCAAGA-3'; Primer 2, 5'-CCGGATCCCTACCCCTGCTGGCCGCGCGCGG-3'; Primer 3, 5'-GTGCCAAGCTTCATATGGCTGACGTTTTTG-3'; Primer 4, 5'-CCGGATCCTTAAACAGACATGGGAGGGTTC-3'

第二項 プラスミド

PCR産物のクローニングには、宝酒造社製のpUC18を用いた。また、発現ベクターpET-11bには、Novagen社製を用いた。

第三項 菌体

大腸菌は、JM109とHMS174 (DE3) (recA1 hsdR rif¹) を使用した。

第四項 酵素

制限酵素NdelおよびBamHIは、ニッポンジーン社製を用いた。Taq DNA

polymeraseは、プロメガ社製を用いた。

第三節 実験方法

第一項 PCR法

pUCPPO1およびpUCPPO2をそれぞれ鋳型とし、本章第二節第一項のプライマーを用いて前章第三節第三項に従いPCRを行った。

第二項 PCR産物のクローニング

PCR反応後、前章第三節第三項に従い増幅遺伝子をpUC18プラスミドに ライゲーションし、大腸菌JM109に形質転換した。LB寒天培地(Amp⁺、 IPTG、X-gal)に菌をまき、培養後、白色のコロニーを採取しプラスミドを 抽出した。プラスミドを*Hin*dIIIおよび*Bam*HIで消化し、挿入DNAの有無を 確認した。目的の大きさのDNA断片が検出されたものについては塩基配列 を決定して確認した。

第三項 発現ベクターへのライゲーション

前項で得られ、塩基配列を確認したプラスミドを制限酵素Ndelおよび BamHIで消化した。アガロース電気泳動後、DNAを精製し、あらかじめ NdelおよびBamHIで消化した発現ベクターpET-11bにライゲーションし、 大腸菌JM109に形質転換した。LB寒天培地に大腸菌をまき、培養後、任意 のコロニーからプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを制限酵素で消 化し、挿入DNAの有無を確認した。

第四項 PPOの発現

前項で構築した発現プラスミドを大腸菌HMS174に形質転換した。プラス ミド保持菌のシングルコロニーを50 mlのLB培地に接種し、OD₆₀₀が0.4-1.0になるまで37°Cで培養した。さらに、1 mMになるようにIPTGを添加し 3時間培養した。3,000 rpmで15分間遠心分離して菌体を集め、STE緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)/0.1 M NaCl/1 mM EDTA)で洗浄後、
-80°Cで保存した。また、PPOの発現の確認は、IPTG誘導前、誘導後の
SDS-PAGEにより判断した。

第五項 ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE後、ゲルを室温で15分間、転写用緩衝液(25 mM Tris-192 mM グリシン pH 8.3:メタノール=8:2)に浸して平衡化した。また、 ゲルと同じ大きさに切ったニトロセルロース膜についても同様に平衡化し た。次に同緩衝液に浸しておいた電極用濾紙(Whattmann 3MM)を2枚重 ね、この上にニトロセルロース膜を重ね、さらにその上にゲルを重ねた。そ の上に、気泡を入れないように電極用濾紙を2枚重ね、上部電極板(陰極) をその上にのせた。転写装置に少量の転写用緩衝液を入れ170 mAで1時間 通電した。転写後、ニトロセルローセ膜をブロッキング溶液(2% BSA in PBS(10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)/0.15 M 塩化カリウム)) で室温で1時間振とうした。PBSで5分間2回、TPBS(PBS/0.1% TritonX-100)で5分間3回そしてPBSで5分間2回洗浄した後、PBSで8,000倍希釈し た抗PPO抗血清溶液に浸し、室温で2時間反応させた。TPBSで5分間3回洗 浄した後、TPBSで4,000倍希釈した抗マウスIgG抗体-ペルオキシダーゼコ ンジュゲート(Cappel社製)と室温、2時間反応させた。TPBSで10分間4 回、PBSで10分間2回洗浄した後、直前に調製したペルオキシダーゼ溶液

(PBS/0.5 mg/ml ジアミノベンジジン四塩酸塩/0.03% 過酸化水素水)を 加え、適度なバンドが認められたとき、蒸留水で洗浄し反応を停止した。

第六項 粗組み換えタンパク質の調製

第四項で得た大腸菌をSTE緩衝液で洗浄後、4 mg/mlのリゾチームと1 mM PMSFを含む同緩衝液で懸濁し、37°Cで1時間保温した。その後、氷上 でout put 7の10秒間隔で2分間超音波処理、5分間静置のサイクルを10回繰 り返すことにより菌体を破砕した。超音波処理終了後、8,000 rpmで15分間

遠心分離した。沈殿を0.5%のTritonX-100と10 mM EDTAを含む溶菌緩衝 液に懸濁し、14,000 rpmで15分間遠心分離することにより封入体を得た。 封入体からのタンパク質の巻き戻しのためには、まず、封入体を8 M 尿素と 0.1 mM PMSFを含む溶菌緩衝液に懸濁し、その溶液を4 M 尿素を含む同緩 衝液に対して1晩透析した。その後、2 Mの尿素を含む同緩衝液に対して1晩 透析し、さらに、1 M 尿素を含む同緩衝液に対して1晩透析した。最後に、 溶菌緩衝液に対して1晩透析し、これを粗組み換えタンパク質標品とした。

第七項 粗組み換えタンパク質のDBMAとPPAEによる活性化 粗組み換えタンパク質のDBMAとPPAEによる活性化は、第三章に述べた 方法により行った。

第四節 実験結果

第一項 PCRによる制限酵素部位の導入とクローニング

PCR産物を1.2%アガロースゲル電気泳動に供与した結果をFig. 5-1に示 す。約2 kbpの2種の目的の遺伝子の増幅が確認されたので、これを精製した 後、pUC18プラスミドベクターヘライゲーションし、大腸菌JM109に形質 転換した。菌体から得たプラスミドを制限酵素*NdelとBam*HIで消化し、 Fig. 5-2に示すような結果を得た。この挿入DNAの塩基配列を調べ、変異が おこっていないことを確認した。このようにして得られた組み換えプラスミ ドをpmPPO1およびpmPPO2とした。

第二項 発現ベクターpET-11bへのライゲーション

得られたプラスミドをNdelとBamHIで消化後、発現ベクターpET-11bに ライゲーションした。大腸菌JM109に形質転換後、プラスミドを抽出し、 NdelとBamHIで消化した(Fig. 5-3)。このようにした構築した発現プラ スミドをpETPPO1およびpETPPO2とした。

第三項 PPO1およびPPO2の大腸菌内での発現

発現プラスミドpETPPO1およびpETPPO2を前節第四項に従ってT7 RNA polymeraseを持つ大腸菌HMS174 (DE3)に形質転換した。シングルコロ ニーを50 mlのLB液体培地 (Amp⁺)に添加し37°Cで培養した。3時間培養 後、終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加し、さらに3時間培養し菌体を回 収した。Fig. 5-4 (A)に示すように、IPTG誘導前と誘導後を比較すると、約 75 kDa付近のタンパク質の発現が確認された。抗PPO抗血清によってウエ スタンブロッティングを行ったところ発現タンパク質と同位置にあるバンド が抗血清と反応したことから、PPO1およびPPO2が発現していることが明 らかとなった (Fig. 5-4 (B))。菌体をリゾチームと超音波を用いて破砕 し、可溶性画分と不溶性画分 (封入体)をSDS-PAGEに供与し、ウエスタ ンブロットを行ったところ、発現タンパク質は大腸菌内で封入体として蓄積 することが明らかとなった (Fig. 5-5)。

第四項 組み換えタンパク質の活性化

8 M 尿素を含む緩衝液に封入体を溶解し、透析で尿素を除去し、発現タンパク質の巻き戻しを行った。得られた粗組み換えタンパク質をDBMAおよび PPAEを用いて活性化した(Fig. 5-6)。PPAEよりDBMAの方が効率よく PPOを活性化することが明らかとなった。

第五節 考察

本章において、PPOの発現系の構築に初めて成功した。これまでに、種々 の大腸菌組み換えタンパク質発現系ベクターが構築されているが、本研究で は、これらのうち最も強力な発現ベクターとして知られる、Studier等⁵⁾が 開発したpET-11bを用いた。この発現ベクターpET-11bでは、目的遺伝子 はT7ファージプロモーター下流に挿入され、宿主大腸菌:HMS174

(DE3)により供給される強力なT7RNAポリメラーゼにより転写される。 このT7RNAポリメラーゼ遺伝子は、宿主大腸菌の染色体に組み込まれてお り、lacUV5プロモーター下流にあるためIPTG添加による誘導で発現がコントロールされている。

この発現系により得られたタンパク質は、大腸菌内において封入体として 蓄積していることがウエスタンブロット分析により明らかとなった。封入体 は、不溶性である。そこで、8 M尿素溶液で可溶化し、透析で尿素を徐々に 除去した。このようにして調製しされたタンパク質は、DBMAおよびPPAE により活性化されることが明らかとなった。

第六節 小括

(1) PPO1およびPPO2のcDNA断片をPCR法により増幅して、これをpET-11bに組み込み、発現ベクターpETPPO1およびpETPPO2を構築した。

(2) SDS-PAGEと抗PPO抗血清を用いたウエスタンブロッティングにより 大腸菌内に組み換えタンパク質が発現していることが確認された。

(3)発現タンパク質は、大腸菌内において封入体として蓄積していることがウエスタンブロット分析により明らかとなった。

(4) 封入体を8 M尿素に可溶化し、透析法により尿素濃度を徐々に低下し タンパク質の巻き戻しを行った。この粗組み換えタンパク質は、DBMAおよ びPPAEで活性化されることが明らかとなった。

参考文献

1) T. Kawabata, Y. Yasuhara, M. Ochiai, S. Matsuura and M. Ashida, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7774–7778 (1995).

2) M. Hall, T. Scott, M. Sugumaran, K. Söderhäll and J. H. Law, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7764–7768 (1995).

3) K. Fujimoto, N. Okino, S. Kawabata, S. Iwanaga and E. Ohnishi, roc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7769–7773 (1995).

4) A. Aspán, T. Huang, L. Cerenius and K. Söderhäll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 939–943 (1995).

5) F. W. Studier and B. A. Moffatt, J. Mol. Biol., 189, 113-130 (1986).



Fig. 5-1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

Lane 1, Marker (λ /*Hin*dIII digests); Lane 2, PCR products using primers 1 and 2; Lane 3, PCR products using primers 3 and 4.



Fig. 5-2 Agarose gel electrophoresis of the *Nde*I and *Bam*HI digests of pmPPOs

Lane 1, Marker (λ /*Hin*dIII digests); Lane 2, pmPPO1/*Nde*I and *Bam*HI digests; Lane 3, pmPPO2/*Nde*I and *Bam*HI digests.



Fig. 5-3 Agarose gel electrophoresis of *Nde*I and *Bam*HI digests of pETPPOs

Lane 1, Marker (λ/*Hin*dIII digests); Lane 2, pETPPO1; Lane 3, pETPPO1/*Nde*I and *Bam*HI digests; Lane 4, pETPPO2; Lane 5, pETPPO2/*Nde*I and *Bam*HI digests.



Fig. 5-4 SDS-PAGE (A) and western blotting (B) of total proteins from *E. coli* carrying pETPPO1 or pETPPO2

Lanes 1 and 6, native PPO; Lanes 2 and 7, *E. coli* HMS174 cells carrying pETPPO1 and not treated with IPTG; Lanes 3 and 8, the same kind of cells treated with 1 mM IPTG for 3 h; Lanes 4 and 9, *E. coli* HMS174 carrying pETPPO2 and not treated with IPTG; Lanes 5 and 10, the same kind of cells treated with 1 mM IPTG for 3 h.



Fig. 5-5 Immunoblottings of soluble fraction and insoluble fraction (inclusion body)

Lane 1, purified PPO; Lane 2, rPPO1 (soluble fraction); Lane 3, rPPO1 (insoluble fraction); Lane 4, rPPO2 (soluble fraction); Lane 5, rPPO2 (insoluble fraction).





Fig. 5-6 Activation of recombinant proteins with DBMA (A) and PPAE (B)

Various amounts of the recombinant proteins were tested for their activation with DBMA and PPAE. Symbols: (), PPO1; •, PPO2.

第六章 カイコ変態過程におけるPPOの変動

第一節 緒言

本章では、カイコ変態過程におけるPO活性、PPO量およびPPO mRNAの 変動について検討を行った。PO活性は、第三章で述べたDBMAを用い、 PPO活性化後のPO活性として検出した。PPO量は、第五章で調製した抗 PPO抗体を用いてELISA法により行った。また、PPO mRNAの変動は、第 四章で単離したPPO cDNAをプローブとし、ノーザンハイブリダイゼーショ ン法を用いて行った。

第二節 実験材料

第一項 体液採取法

第二章第二節第一項に従い、体液を採取した。

第二項 血球採取法

第四章第二節第一項に従い、血球を採取した。

第三節 実験方法

第一項 体液中のプロフェノールオキシダーゼの検出

第二章第二節第一項に従って凍結乾燥したした体液5 mgを1 mlの0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し、そのうち50 µlを分取し第二章 第三節第一項に従って活性測定を行った。

第二項 ポリクローナル抗体の作製

抗PPO抗血清は以下のようにして作製した。架橋した1.0 mlのシリンジを 用いてPPOのPBS溶液(10 µg)と完全Freundアジュバント(Difco社製) を十分に混和してエマルジョンを調製し、DDYマウス(♀、5週令、セアッ ク吉富株式会社)の腹腔内に注射した。10日ごとに3回、PPOのPBS溶液と 不完全Fruendアジュバント(Difco社製)を同様に乳濁化し腹腔内に注射した。さらに10日後、採血を行い、室温に2時間静置し、その後4°Cに1時間静置した。3,000 rpmで10分間遠心分離し、上清の血清を抗血清とし使用時まで-80°Cで保存した。

第三項 ELISA

抗原タンパク質を50 mM 炭酸緩衝液(pH 9.6)で希釈した後、マイクロ タイタープレート(ファルコン社製)の各ウェルに100 µlずつ分注し、4°C で1晩静置し抗原を固定した。TPBSで3回洗浄し、さらに、1% BSAを含む PBSを100 µlずつ各ウェルにいれ、37°Cで2時間静置した。TPBSで3回洗浄 後、PBSで希釈した抗血清を各ウェルに50 µlずつ分注し、37°Cで2時間静置 した。その後、抗血清を除去し、TPBSで3回洗浄し、TPBSで希釈したペル オキシダーゼ標識抗マウスIgG溶液を100 µlずつ分注して37°Cで2時間反応 させた。ついで、TPBSで6回洗浄し、これに基質溶液(50 mMクエン酸-リ ン酸緩衝液(pH 5.0)、0.4 mg/ml o-フェニレンジアミン、0.006% 過酸 化水素水)50 µlを分注し、室温、遮光下で15分間反応させた。2 M硫酸を 100 µl加えることにより酵素反応を停止した後、イムノリーダーを用いて 490 nmにおける吸光度を測定した。

第四項 ノーザンハイブリダイゼーション

(1) トータルRNAの調製

トータルRNAの調製は、Isogen(ニッポンジーン社製)を用いて行っ た。すなわち、50-100 mgの血球に1 mlのIsogen溶液を添加し、テフロン ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。室温で5分間放置後、0.2 mlの クロロホルムを添加し、ボルテックスで15秒間撹拌し、室温に3分間放置し た。12,000 rpm、15分間、4°Cで遠心分離を行い、上清に0.5 mlのイソプロ パノールを添加し、室温で10分間放置した。12,000 rpm、10分間、4°Cで 遠心分離を行い沈殿を得た。この沈殿を75%のエタノール溶液で洗浄し、風 乾後、少量のTE緩衝液に溶解し、これをトータルRNAサンプルとした。

(2)変性アガロースゲル電気泳動

アガロースに10%の10×Goldberg溶液(0.4 M MOPS、50 mM クエン酸 ナトリウム、5 mM EDTA)を加えて加熱溶解し、スターラーで撹拌しなが ら室温に放置し、温度を60°Cまで下げた。最終量の16.7%のホルムアルデヒ ドを加え、充分混合し、泳動用プレートに流し込み完全に固化させた。この ゲルをミュービットII電気泳動装置に入れ、泳動緩衝液(10%10× Goldberg溶液、16.6% ホルムアルデヒド)を用いて50 Vで電気泳動した。 RNA溶液は、(1)で調製したトータルRNA8 µgとローディング 緩衝液 (45.5% ホルムアミド、9.1%10×Goldberg溶液、14.5% ホルマリン)を 10 µlになるよう混合し、65°Cで15分間保温した後、次中で5分間急冷し、

1/5量のローディングダイと混合することにより作製し、電気泳動した。泳 動後、RNAは、ゲルを0.5 mg/mlエチジウムブロミド溶液に2時間浸した 後、滅菌水に1晩浸し、紫外線下により検出した。

(3) ブロッティング

ブロッティング台に300 mlの20×SSC溶液 (3 M NaCl, 0.3 M クエン酸 ナトリウム, pH 7.0) を入れ、適当な大きさに切った濾紙 (ワットマン3MM 濾紙) をブロッティング台の中央に置いた。ゲルを0.25 M 酢酸アンモニウ ム溶液 (pH 5.2) に20分間浸したものをその上に置き、ゲルと同じ大きさ に切ってあらかじめ超純水に浸しておいたHybond N +ナイロンメンブラン

(アマシャム社製)をその上に重ねた。同じ大きさに切った濾紙3枚をブ ロッテングバッファーで湿らせその上に重ね、さらにペーパータオルを適当 な大きさに切りゲル+濾紙の上に10 cm程度の厚さに積み重ねた。その上に 平らな板を置き1 cm²あたり5 g程度の重しを乗せ、均一に圧力をかけ、1晩 放置しトランスファーした。放置後、ペーパータオルと濾紙を注意深く外 し、0.05 N NaOHを含ませた濾紙2枚の上に、RNA吸着面を上にしてメンブ ランを置き5分間放置した。その後、2×SSC中で振盪しながら1分間洗浄 し、室温で乾燥させた。乾燥させたメンブランに5分間UV照射を行い、 RNAの固定を行った。UV照射後のメンブランは、使用時まで4°Cで保存し た。

(4) ジゴキシゲニン標識プローブの調製

第四章で単離したPPO cDNAにジゴキシゲニン(DIG)を標識することに よりプローブを作製した。DIG標識は、PCR DIG ラベリングミックス(ベ ーリンガーマンハイム社製)を用い、以下の組成で反応液100 µlを調製して PCR法により行った。

water	variable
10×PCR buffer	10.0 µl
25 mM MgCl ₂	6.0 µl
PCR DIG labelling mix	10.0 µl
primer (forward)	1.0 μl (0.5 μM)
primer (reverse)	$1.0 \ \mu l \ (0.5 \ \mu M)$
template DNA	variable
Taq DNA polymerase $(5U/\mu l)$	0.5 µl

ミネラルオイルを100 μl重層し、第四章第四節第三項に従い反応をさせた。 プローブを1本鎖とするため、アガロースゲル電気泳動によりプローブの合 成を確認後、100°Cで10分間熱変性を行い、氷中で10分間急冷した。その 後、ハイブリダイゼーション溶液に0.1%となるように添加した。

(5) ハイブリダイゼーション

(3) で得られたメンブランを超純水の上に浮かべ、水に馴染ませて3方を シールしたバッグに入れた。バッグにハイブリダイゼーション溶液(50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、50% ホルムアミド、0.1% *N*- laurylsarcosine、0.1% SDS、1% blocking reagent (ベーリンガーマン ハイム社製))を入れ、ポリシーラーでバッグの1辺を閉じ、50°Cで3時間保 温した。(4)で調製した変性プローブを0.1%となるようハイブリダイゼー ション溶液に混和し、上述のようにメンブランと共にバッグに入れ、50°Cで 1晩ハイブリダイゼーションを行った。

(6) DIG標識ハイブリダイズ体の検出

ハイブリダイゼーション後、メンブランを室温で5分間、1次洗浄液(2× SSC/0.1% SDS)を用いて洗浄した。この操作を3回繰り返した後、メンブ ランを2次洗浄液(0.1×SSC/0.1% SDS)で65°C、15分間洗浄した。この 操作を4回繰り返した後、3次洗浄液(マレイン酸緩衝液(100 mM マレイ ン酸、150 mM NaCl, pH 7.5) /0.3% Tween 20) で室温で10分間洗浄し た。洗浄後、メンブランをブロッキング溶液(マレイン酸緩衝液/1% blocking reagent) で30分間室温で振盪した。さらに、ブロッキング溶液 で10,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体(ベーリンガ ーマンハイム社製)溶液と30分間室温で振盪し反応させた後、室温で10分 間三次洗浄液で2回洗浄を行い、アッセイ溶液(100 mM ジエタノールアミ ン、1 mM塩化マグネシウム、0.02% アジ化ナトリウム)中にて室温で5分 間浸して平衡化した。その後、直前に調製したアルカリフォスファターゼ溶 液(アッセイ溶液/0.25 mM CSPD(ベーリンガーマンハイム社製))とメ ンブランを室温で5分間反応させ、室温で乾燥させた。バッグでメンブラン をシールし、暗所で30分間、Kodak scientific imaging filmに感光させ た。

第五項 PPO mRNA発現量の測定

ノーザンハイブリダイゼーション法により得られたDIG標識ハイブリダイ ズ体をスキャナー(シャープ社製)でMacintoshに取り込み、画像解析ソフ トNIH imageを用いてデンシトメーター分析を行った。

第四節 実験結果

第一項 変態過程におけるフェノールオキシダーゼ活性の変動 カイコ体液より調製した粗抽出液を用いて、カイコ幼虫5齢1日から蛹化4 日後までのPO活性変動を調べた。この期間において内因性のPO活性はほと んど検出されなかった(Fig. 6-1)。そこで、PPOをDBMA活性化後のPO 活性を測定することによりその変動を検討した。オスにおいては、5齢4日に わずかに増加が見られ吐糸日(6日)に最低値(1.39×10⁻³ unit/mg hemolymph)となった。その後、増加がみられ蛹化日に最大値(7.54× 10⁻³ unit/mg hemolymph)に達し減少した。メスにおいて、5齢1日から 徐々に減少し、吐糸日に最低値(2.41×10⁻³ unit/mg hemolymph)と なった。8日まで増加した後、蛹化2-3日後に最大値(9.80-9.74×10⁻³ unit/mg hemolymph)に達し、その後減少した。

第二項 変態過程におけるプロフェノールオキシダーゼ量の変動 ELISA法を用いて同発育期間のPPO量の変動について調べた(Fig. 6-2)。その結果、オスにおいては、5齢7日に最低値(0.048 µg/mg hemolymph)となり、その後増加が見られ蛹化2日後に最大値(0.433 µg/mg hemolymph)に達した。メスにおいて、吐糸日に最低値(0.062 µg/mg hemolymph)となり8日にわずかに増加し、蛹化3日後に最大値 (0.68 µg/mg hemolymph)となった。

第三項 変態過程におけるプロフェノールオキシダーゼmRNAの変動 PPO1およびPPO2のmRNAの変動をノーザンハイブリダイゼーション法 を用いて検討した(Fig. 6-3)。DIG標識したPPO2 cDNAを用いてハイブ リダイゼーションを行ったところ、2 kb付近に2本のRNAバンドが検出され た。オスにおいては、吐糸日に減少が見られその後増加し、最大(8日)と なり、その後減少した。メスにおいて、吐糸日付近(5-7日)に減少し、そ の後徐々に増加し蛹化1日後に最大に達した。オス、メスとも蛹化3および5 日後において検出されなかった。この発現パターンは、DBMAを用いたアッ セイ法およびELISA法を用いて測定した変動パターンより1-2日早く変動す ることがわかった(Fig. 6-4)。

第五節 考察

本章において、カイコ変態過程における体液中のPO活性、PPO量そして PPOmRNAの変動について検討した。カイコ幼虫5齢1日から蛹化4日後の期 間において、PO活性はほとんど検出されなかった。PO触媒反応の生成物で あるキノン化合物の反応性は極めて高く、POが常時活性な状態で存在する ことは、昆虫自体の生命を危うくする。そこで、昆虫には、PPOの活性化の 厳密な調節機構が存在するものと考えられる。また、1度活性化されたPPO を直接阻害する働きも必要であると考えられる。近年、Daquinagらは、PO 活性を直接阻害するPOインヒビターがイエバエに存在し、POの活性発現を 制御していると報告している¹⁾。

PPOの変動をDBMA活性化後のPO活性を測定することにより検討を行っ た。また、抗PPO抗血清を作製しELISA法を用いてPPO量の変動について調 べた。その結果、吐糸日付近で最低となり、徐々に増加し蛹化日付近で最大 値に達し、その後減少した。PPO mRNAの変動については、2 kb付近に2本 のRNAバンドが検出された。これは、PPO1およびPPO2 cDNAの大きさと 一致する。PPO mRNAの発現パターンは、DBMAを用いたアッセイ法およ びELISA法を用いて測定した変動パターン、すなわちPPOタンパク質量の変 動よりも1-2日早い。以上の結果より、PPOは、PPO mRNAの発現より若 干遅れて合成されることがわかり、転写レベルでその発現が制御されている ものと推察する。昆虫の変態は、ホルモン(エクジソンおよび幼若ホルモン (juvenile hormone, JH))により制御されている。PPOの転写制御がこれ らのホルモンにより制御されているか否か今後検討する必要がある。

カイコ変態過程におけるPPOの変動は、イエバエ由来のPOの変動とは、

異なる結果となった。イエバエの場合、ウエスタンブロットの結果、POタンパク質量にほとんど変化がなく¹⁾、POインヒビターがPOの活性発現を制御しているとされている。

PPOの生合成が蛹化日付近に促進されるということは、PPOが特にこの時 期に必要であると考えられる。この時期にはカイコ幼虫においては形態学的 および生化学的に劇的な変化が起こる。例えば、皮膚の色が白色から茶色に 変化し、皮膚の硬化がみられる。ほとんどの幼虫型組織は、崩壊し成虫型組 織が新たに作られる。また、芦田らは、POは、幼虫型の組織の除去に関与 していると報告していることもあり²⁾、この時期にPPOの発現量の増加は、 不要になった幼虫型組織を除去するためおよび幼虫から蛹の移行期という不 安定な時期に生体防御能を増加させるためと推定される。

第六節 小括

(1) カイコ幼虫5齢1日から蛹化4日後の期間において、PO活性はほとんど 検出されなかった。

(2) PPOをDBMA活性化後のPO活性を測定することによりその変動の検討 を行った。オスにおいては、吐糸日(6日)に最低値(1.39×10⁻³ unit/mg hemolymph)となり、その後増加がみられ蛹化日に最大値(7.54×10⁻³ unit/mg hemolymph)に達した。メスにおいても吐糸日に最低値(2.41× 10⁻³ unit/mg hemolymph)となり、蛹化2-3日後において最大値(9.80 -9.74×10⁻³ unit/mg hemolymph)に達した。

(3) ELISA法を用いて同期間のPPO量の変動について調べたところ、オス においては、5齢7日に最低値 (0.048 μ g/mg hemolymph) となり、蛹化2 日後に最大値 (0.433 μ g/mg hemolymph) に達した。メスにおいて、吐糸 日に最低値 (0.062 μ g/mg hemolymph) となり、蛹化3日後に最大値

 $(0.68 \mu g/mg hemolymph) となった。$

(4) ノーザンハイブリダイゼーション法を用いてPPO1およびPPO2の mRNAの変動を検討したところ、2本のRNAバンドが検出された。オスにお いて、吐糸日において減少が見られその後増加し、最大(8日)に達した。 メスにおいて、吐糸日付近(5-7日)に減少し、蛹1日目に最大値に達し た。オス、メスとも蛹化3および5日後において消失し、その後は検出されな かった。

(5) この発現パターンは、DBMAを用いたアッセイ法およびELISA法を用いて測定した変動パターンより1-2日早く変動することがわかった。

参考文献

1) A. C. Daquinag, S. Nakamura, T. Takao, Y. Shimonishi and T. Tsukamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2964–2968 (1995).

2) M. Ashida and Y. I. Yamazaki, In *Molting and Metamorphosis* (Edited by E. Ohnishi and H. Ishizaki), 239–265. Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1990).





Crude extract prepared from lyophilized hemolymph was incubated with assay solution in the presence of DBMA (\bigcirc) or in the absence of DBMA (\bigcirc), resulting PO activity was measured. Activity is expressed as the value per mg of lyophilized hemolymph. Measurements were started after day 1 of the fifth instar. S and P represent spinning and pupation, respectively. Bars indicate the standard deviation (*n*=3).





Changes in PPO content were determined in hemolymph at developmental stages from fifth larval instar to pupa employing ELISA. For abscissa, see the legend to Fig. 6-1.





Fig. 6-3 Developmental changes in PPO mRNA measured by northern hybridization

Total RNA (8 μ g) was loaded on each lane, separated, transferred to nylon membrane and hybridized with DIG-labelled PPO2 cDNA. Ethidium bromide staining of rRNA is shown as a control for equal loading.



Fig. 6-4 Developmental changes in PPO mRNA and PPO content

The amounts of hybridized label (\bigcirc) were assessed by scanning of the electrophoretogram of PPO mRNA in Fig. 6-3 by densitometry and replotted with PPO content (\bigcirc) in Fig. 6-2. S and P represent spinning and pupation, respectively.

第七章 総括および考察

本研究において、カイコ変態過程におけるプロフェノールオキシダーゼの 発現調節機構について、すなわちPO活性、PPO合成量そしてPPO mRNAの 変動について検討を行った。

フェノールオキシダーゼの発現調節機構を調べるにあたり、まず、PPOの 精製法および検出法の確立そしてPPO cDNAのクローニングを行った。芦田 は、カイコ体液からPPOを精製しているが、その報告は古い¹⁾。そこで、芦 田の方法よりも簡便かつ迅速なPPO精製法の確立を試みた。著者は、カイコ (a80系統)体液よりブチルトヨバール疎水カラムクロマトグラフィー、セ ファクリルS-200ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイ ト吸着カラムクロマトグラフィーそしてMono-Q陰イオン交換カラムクロマ トグラフィーを用いてPPOを電気泳動的に均一に精製した。この精製法によ り、芦田の精製法に用いられていた熱処理などの煩雑な操作を省略すること ができた。また、FPLCシステムを用いることにより迅速にPPOを精製する ことが可能となった。

次いでPPOの検出法について検討を行った。これまでにPPOの検出には、 活性化因子(PPAE)が用いられてきたが、(1)この活性化因子は、不安 定であり活性測定の標準化が困難であるため、繰り返し調製しなければなら ない。(2)活性化因子によるPPOの活性化反応が高い塩濃度により阻害さ れるため、例えばPPO精製時など活性測定前に多数のサンプルを脱塩をしな ければならない、等の問題点があった。そこでDBMAによる活性化を利用し て新規な活性測定法を開発した。この方法では、0.047 µgから2.8 µgまでの PPOが再現性よく検出可能であった。また、本研究で確立した検出法を用い ることにより、上述の問題点を解決することができた。 この検出法を用いてカイコa80系統体液中のPPO成分について調べたところ、3種のPPOイソフォームが存在することが明らかとなった。そこで、この3種のPPOイソフォームを分離し、その諸性質を調べた。その結果、等電点(pJ)、比活性そして触媒効率に差が見られた。その他の無脊椎動物由来のPPOのpIは、錦秋×鐘和系統のpIが、それぞれ4.95そして4.98であり²⁾、 ザリガニでは、5.4³、ショウジョウバエでは、5.8および6.7であり⁴⁾、いずれも酸性タンパク質であることが報告されている。L-ドーパ、ドーパミンそして*N*-アセチルドーパミンに対する*K*m値は、0.99~4.71 mMの範囲にあった。*V*maxは、いずれの基質に対してもQ3 > Q2 > Q1であった。また、触媒効率もQ3 > Q2 > Q1であった。タバコスズメガにおいては、体液のプロチロシナーゼのドーパに対する*K*m値は、それぞれ4.15そして8.4 mMであり、ドーパミンに対する両酵素の*K*m値は、0.71および0.91である⁵⁾。ドーパに対してはカイコPPOの方が親和性が高く、ドーバミンに対してはタバコスズメガPPOの方が親和性が高い。

次いでカイコ (a80系統) 血球よりPPO cDNAのクローニングを行った。 これまでにカイコ錦秋×鐘和系統⁶⁾、ザリガニ⁷⁾、タバコスズメガ⁸⁾そして ショウジョウバエ⁹⁾よりPPO cDNAが単離され、その塩基配列が決定されて いる。この4種の無脊椎動物のcDNA塩基配列を参考にしてブライマーを合 成した。このプライマーを用いてカイコa80系統血球より調製したcDNAを 鋳型としてRT-PCRを行ったところ、約2 kbの2種のクローン(PPO1 cDNAおよびPPO2 cDNA)が得られた。この増幅断片をpUC18プラスミド に連結し、塩基配列を決定した。PPO1は、2058 bpの塩基配列より成り、 686のアミノ酸配列をコードしていた。推定される分子サイズは、78,728 Daであった。PPO2は、2082 bpの塩基配列より成り、694のアミノ酸をコ ードしていた。推定される分子サイズは、79,990 Daであった。また、両

94

PPOは、アミノ酸レベルで50%の相同性を有していた。アミノ酸配列をカイ コ他系統(錦秋×鐘和)由来のPPOと比較したところ、PPO1が96.2%、 PPO2が99.3%の相同性を有していることが明らかとなった。安原らは、 PPAEによる限定加水分解は、PPO分子中のArg⁵¹-Phe⁵²間が切断されるこ とを報告している²⁾。本タンパク質においてもArg⁵¹-Phe⁵²は保存されてお り、PPAEによる活性化の際、この部位が切断されるものと推察する。

得られた2種のPPOクローンを発現ベクターに組み込み、大腸菌に形質転 換し、発現を試みた。まず、PPO1およびPPO2のcDNA断片をpET-11bに 組み込み、発現ベクターpETPPO1およびpETPPO2を構築した。この発現ベ クターをT7RNA polymerase遺伝子を持つ宿主大腸菌HMS174 (DE3) に 形質転換し、IPTGを用いてタンパク質の発現を誘導した。SDS-PAGEと抗 PPOポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより大腸菌内 に組換えタンパク質が発現していることが確認された。また、この発現タン パク質は、大腸菌内において封入体として蓄積していることが明らかとなっ た。封入体では、発現した組換えタンパク質は不溶性である。この問題を克 服するために、以下のように発現タンパク質を可溶化した。まず、大腸菌よ り封入体を精製し、8 M尿素と0.1 mM PMSFを含む溶液に溶解した。透析 法により尿素濃度を徐々に除去し、最終的に尿素を含まない緩衝液に対して 透析した。このようにして調製した粗組換えタンパク質は、DBMAおよび PPAEにより活性化され、タンパク質の巻き戻りが正確になされていること が明らかとなった。

そして、カイコ変態過程におけるPO活性、PPO量そしてPPO mRNAの変 動について検討した。カイコ幼虫5齢1日から蛹化4日後の期間において、PO 活性はほとんど検出されなかった。そこでPPOの変動をDBMA活性化後の PO活性を測定することにより検討した。その結果、吐糸日付近で最低とな

り、徐々に増加し蛹化日付近で最大値に達し、その後減少した。また、抗 PPOポリクローナル抗体を作製しELISA法を用いて同発育期間のPPO量の変 動について調べた場合も、その変動パターンは、ほぼ同じ傾向を示した。続 いて、PPO1およびPPO2のmRNAの変動を検討したところ、2本のRNAバン ドが検出された。これは、PPO1およびPPO2 cDNAのサイズと一致した。 その変動については、オスでは、吐糸日において減少が見られその後増加 し、最大(8日)に達した。メスにおいて、吐糸日付近(5-7日)に減少 し、蛹化1日後に最大に達し、その後減少した。オス、メスとも蛹化3および 5日後には検出されなかった。PPOは、PPOmRNAの発現より1-2日遅れて 合成されることがわかった。この結果、PPOの発現制御は、転写レベルで制 御されているものと推察される。昆虫の変態は、ホルモン(エクジソンおよ び幼若ホルモン(JH))により制御されている。1960年代カールソンらは、 クロバエ(Calliphora erythrocephala)のPPO活性化因子の活性がエクジ ソン分泌と時を同じくして増大することを明らかにした。この結果よりカー ルソンらはエクジソンが活性化因子の転写レベルで作用しするという仮説を 提唱した10)。この時期はステロイドホルモンの一種であるエストロゲンなど の作用機構が明らかにされる前で、ステロイドホルモンの作用機構に関する 説としては先駆的であった。しかし残念ながら、その後の研究から活性化因 子の調節にエクジソンが転写レベルで働いていることを示す明確な実験事実 は得られていない11)。

本研究では、カイコ体液中においては内因性のPO活性を検出することは できなかった。PO触媒反応の生成物であるキノン化合物の反応性は極めて 高く、POが常時活性な状態で存在することは、昆虫自体の生命を危うくす る。そこで、昆虫には、PPOの活性化の厳密な調節機構が存在するものと考 えられる。一方、活性化されたPPOを直接阻害する働きも必要であると考え られる。近年、Daquinagらは、PO活性を直接阻害するPOインヒビターが イエバエに存在し、POの活性発現を制御していると報告している¹²⁾。カイ コにおいては、同様の阻害因子を検出するには至らなかった。

PPOの生合成が蛹化日付近で促進されるということは、PPOが特にこの時 期に必要であると考えられる。この時期にはカイコ幼虫においてはに劇的な 変化が起こる。例えば、幼虫から蛹の脱皮に伴い皮膚の色が白色から茶色に 変化し、皮膚の硬化がみられる。さらに、ほとんどの幼虫型組織は、崩壊し 成虫型組織が新たに作られる。また、芦田らは、POは、幼虫型の組織の除 去に関与していると報告していることもあり¹³⁾、この時期のPPOの発現量 の増加は、不要になった幼虫型組織を除去するためおよび幼虫から蛹の移行 期という不安定な時期に生体防御能を増加させるためと推察している。

参考文献

1) M. Ashida, Arch. Biochem. Biophys., 144, 749-762 (1971).

2) Y, Yasuhara, Y. Koizumi, C. Katagiri and M. Ashida, Arch. Biochem. Biophys., 320, 14–23 (1995).

3) A. Aspán and K. Söderhäll, Insect. Biochem., 21, 363-373 (1991).

4) K. Fujimoto, K. Masuda, N. Asada and E. Ohnishi, J. Biochem., 113, 285–291(1993).

5) Y. Aso, K. J. Kramer, T. L. Hopkins and G. L. Lookhart, Insect Biochem., 15, 9–17 (1985).

6) T. Kawabata, Y. Yasuhara, M. Ochiai, S. Matsuura and M. Ashida, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7774–7778 (1995).

7) A. Aspán, T. Huang, L. Cerenius and K. Söderhäll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 939–943 (1995).

8) M. Hall, T. Scott, M. Sugumaran, K. Soderhall and J. H. Law, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7764–7768 (1995).

9) K. Fujimoto, N. Okino, S. Kawabata, S. Iwanaga and E. Ohnishi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7769–7773 (1995).

10) P. Karlson and A. Schweiger, *Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem.*, 323, 199–210 (1961).

11) E. Shaaya and P. Karlson, Gen. Comp. Endocr., 5, 35-39 (1965).

12) A. C. Daquinag, S. Nakamura, T. Takao, Y. Shimonishi and T. Tsukamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2964–2968 (1995).

13) M. Ashida and Y. I. Yamazaki, In *Molting andMetamorphosis*(Edited by E. Ohnishi and H. Ishizaki), 239–265. JapanScientific Societies Press, Tokyo (1990).

第八章 要約

(1) 凍結乾燥したカイコ(a80系統)体液よりブチルトヨバール疎水カラ ムクロマトグラフィー、セファクリルS-200ゲル濾過カラムクロマトグラフ ィー、ヒドロキシアバタイト吸着カラムクロマトグラフィーそしてMono-Q 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いてPPOを迅速かつ簡便に精製 する方法を確立した。

(2) DBMAを用いたPPOの活性測定法および活性染色法を開発した。この 活性測定法により0.047 µgから2.8 µgまでのPPOが検出可能であった。ま た、活性染色法によりカイコa80系統体液中には、3種のPPOイソフォーム が存在することが明らかとなった。

(3) カイコ (a80系統) 体液より3種のPPOイソフォーム、Q1、Q2および Q3を分離精製した。いずれのイソフォームもSDS-PAGEの結果、73 kDaお よび74 kDaのポリペプチドより構成されていた。等電点は、Q1が5.55、Q2 が5.63そしてQ3が5.58であった。いずれのイソフォームもpH 6-10の範囲 で安定であり、DBMAによる活性化の至適pHは、6.5であった。また、活性 化されたPPOの触媒反応における至適pHは、Q1およびQ2がpH 5.5-7.5そ してQ3がpH 5.5-6.5であった。L-ドーパ、ドーパミンおよびN-アセチルド ーパミンを用いてミカエリス定数 (K_m)、最大速度 (V_{max}) および触媒効 率 (V_{max}/K_m)を求めたところ、 K_m 値は0.99~4.71 mMの範囲にあった。 V_{max} は、いずれの基質に対してもQ3 > Q2 > Q1であり、触媒効率も、Q3 > Q2 > Q1であった。

(4) カイコ血球細胞より2種のPPOクローン(PPO1およびPPO2 cDNA)
 を単離し、その塩基配列を決定した。PPO1 cDNAは、2058 bpの塩基より
 構成され、686のアミノ酸配列をコードしていた。PPO2 cDNAは、2082

100

bpの塩基より構成され、694のアミノ酸をコードしていた。また、両者は、 50%の相同性を有していた。アミノ酸配列を錦秋×鐘和系統由来のPPOと比 較したところ、PPO1が96.2%、PPO2が99.3%の相同性を有していることが 明らかとなった。

(5) PPO1およびPPO2の大腸菌での発現系を構築した。発現タンパク質 は、大腸菌内において封入体として蓄積していることがウエスタンブロット 分析により明らかとなった。封入体を8 M尿素に可溶化し、透析法により尿 素濃度を徐々に低下しタンパク質の巻き戻しを行った。この粗組み換えタン パク質は、DBMAおよびPPAEで活性化されることが明らかとなった。

(6) カイコ生育時期におけるPO活性について調べた。カイコ幼虫5令1日目から蛹化4日目の期間において、PO活性はほとんど検出されなかった。そこで、PPOをDBMA活性化後のPO活性を測定することによりその変動の検討を行った。オスにおいては、吐糸日(6日)に最低値(1.39×10-3 unit/mg hemolymph)となり、その後増加がみられ蛹化日に最大値(7.54×10-3 unit/mg hemolymph)に達した。メスにおいても吐糸日に最低値(2.41×10-3 unit/mg hemolymph)となり、蛹化2-3日後において最大値(9.80-9.74×10-3 unit/mg hemolymph)に達した。

(7) 抗PPOポリクローナル抗体を作製し、ELISA法を用いて同期間のPPO 量の変動について調べた。オスにおいては、5齢7日に最低値 (0.048 μ g/mg hemolymph) となり、蛹化2日後に最大値 (0.433 μ g/mg hemolymph) に 達した。メスにおいて、吐糸日に最低値 (0.062 μ g/mg hemolymph) とな り、蛹化3日後に最大値 (0.68 μ g/mg hemolymph) となった。

(8) PPO1およびPPO2のmRNAの変動を検討したところ、2本のRNAバンドが検出された。その変動パターンは、オスにおいて、吐糸日において減少

が見られその後増加し、最大(8日)に達した。メスにおいて、吐糸日付近 (5-7日)に減少し、蛹化1日後に最大に達した。オス、メスとも蛹化3およ び5日後において検出されなかった。この発現パターンは、DBMAを用いた アッセイ法およびELISA法を用いて測定した変動パターンと同じ傾向を示し た。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧に御指導くださり、また本論文をま とめるにあたり、全構成にわたって御懇意なる御鞭撻を賜りました九州大学 農学研究科 石黒正恒教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、我儘を許し御指導くださり、また本論文をま とめるにあたり、御助言ならびに御鞭撻を賜りました九州大学農学研究科 麻生陽一助教授に心から感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、カイコの飼育ならびに実験を懇切丁寧に御指 導くださり、また本論文をまとめるにあたり、御鞭撻を賜りました九州大学 農学研究科 藤井 博教授に深い感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御助言をいただき、また本論文をま とめるにあたり、多大な御校閲を賜りました九州大学農学部 古賀克己教授 に謹んで感謝の意を表します。

本研究中、多くのカイコを恵与していただきました九州大学農学研究科 土井良 宏名誉教授に深い感謝の意を表します。

本研究中、遺伝子操作法について懇切丁寧に御指導いただきました九州大学農学研究科 焼山正敏氏に深く感謝致します。

本研究中、DNA塩基配列の決定ならびに大腸菌での発現系の構築につい て懇切丁寧に御指導いただきました九州大学農学部 日下部宜宏先生に深く 感謝致します。 本研究を行うにあたり、御協力いただきましたゴアテックス株式会社 杉 岡幹昌氏に厚く御礼申し上げます。

本研究中、カイコの飼育ならびにサンプル調製に御協力いただきました九 州大学農学研究科 目野浩二氏、島津製作所株式会社 中島暁寛氏、九州メ ディカルサイエンス 宮路由布子さんに厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり日々御激励いただきました蛋白質化学講座の緒氏および昆虫遺伝子資源学の皆様に厚く御礼申し上げます。



