

家バエ前蛹中に存在するLatent Phenoloxidase Complexのタンパク化学的性質および生理的意義

船津, 勝
九州大学農学部

林, 勝哉
九州大学農学部

稲葉, 喬
佐賀大学農学部生物化学研究室

石黒, 正恒
九州大学農学部

他

<https://doi.org/10.15017/23067>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 26 (1/4), pp.85-104, 1972-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



家バエ前蛹中に存在する Latent Phenoloxidase Complex のタンパク化学的性質および生理的意義

船津 勝・林 勝哉・稲葉 喬*
石黒 正恒・波平 元辰・刈屋 雅雄
山浦 泉・塚本 卓治・陶山 公太

Nature of latent phenoloxidase complex in the prepupae of housefly and its physiological significance

Masaru Funatsu, Katsuya Hayashi, Takashi Inaba,
Masatsune Ishiguro, Genshin Namihira, Masao Kariya,
Izumi Yamaura, Takuji Tsukamoto
and Kimita Suyama

昆虫の Phenoloxidase は変態過程における脱皮、表皮の硬化、着色においてチロシンの代謝経路に関係し、オルソキノンを生成する酵素として、変態過程に含まれる生化学反応を究明する上で重要である。とくに変態ホルモン Ecdyson の作用機構に含まれる酵素と考えられており (Karlson, 1961, 1963), 変態過程におけるこの酵素の動態を明らかにすることは、Ecdyson の作用を分子レベルで解明するための基盤として重要であると考えられる。

1958年船津および稲葉は魚の飼料として市販されている蛹の水抽出液が放置するとほとんどすべて赤褐色に着色するのに、わずかながらまったく着色しない場合があることを見出し、着色は Phenoloxidase (Tyrosinase) の存在によるメラニンの生成に起因するものと考えられるので、無色の場合は Phenoloxidase が不活性な Proenzyme の形で存在するためではないかと考え本研究をはじめることになった。

昆虫の Prophenoloxidase (Protyrosinase) については、これよりさき Bodine ら (Bodine and Boell, 1935; Bodine et al. 1937) によってすでに研究されていた。すなわちバッタ (*Melanoplus differentialis*) の卵に Protyrosinase が存在することを認め、同時に脂溶性の活性化因子の存在を明らかにした (Bodine and Allen, 1938)。また *in vitro* でこの Protyrosinase は有機溶媒、界面活性剤などにより、さらに 60°C, 10 分間の加熱、激しい振盪などに

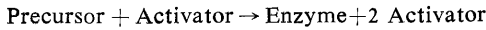
よつても活性化されることを見出し、活性化は Protyrosinase タンパク質の軽度の変性による立体構造の変化によつて起こるものと考えた (Allen and Bodine, 1940, 1941; Allen et al., 1943; Bodine and Carlson, 1941)。

これについて大西 (Ohnishi, 1953, 1954) はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*) の幼虫から蛹への変態過程における Tyrosinase 活性の変動を調べ、幼虫では蛹化直前、それまで表面的には非常に低いレベルにあつたものが急激に上昇し、蛹化開始後ふたたび急激に低下することを認めた。さらに Protyrosinase は体液中に存在し、高分子のタンパク質である活性化因子が組織中に存在することを明らかにし、活性化因子は NaCl, KCl によつて阻害されることを見出した。家バエについても同じ知見をえた (Ohnishi, 1958, 1959)。大西は Bodine らの場合と活性化因子の性質が異なることから、昆虫には少なくとも2種の Prophenoloxidase が存在し、一方は Bodine らのリピド性活性化因子によつて活性化されるもの、他はタンパク性活性化因子によつて活性化されるものと考えた (Ohnishi, 1958)。

これと同じころ、Horowitz と Fling (1955) はショウジョウバエの羽化6時間後の成虫の生理的食塩水による抽出液は、はじめフェノーラーゼ活性を示さないが、0°C に放置すると自触的な活性化を起こすことを見出し、さらに十分活性化した後遠心分離によつて、

* 現在 佐賀大学農学部生物化学研究室。

凝集した Phenoloxidase を除いた上清を新鮮な抽出液に加えると不活性な Phenoloxidase の活性化が促進されることを認め、上清中に活性化因子が含まれ、その濃度は活性化の過程で増大すると考え、つぎのような活性化の形式を推定した。



これについて Karlson (1958) も Ecdyson の作用機構に関連してクロバエ (blowfly, *Calliphora erythrocephala*) 幼虫の Phenoloxidase について報告し、幼虫の抽出液は、はじめ Phenoloxidase 活性を示さないが放置すると活性化が起こり、15~20 分で完了し、抽出液調製の条件によつて活性化曲線が異なることを認めた。その結果、生体内の活性化系は Prophenoloxidase と活性化因子というような簡単なものではなく、なお他に数種の因子が関与する非常に複雑なもので、さらに Ecdyson がこの活性化系に関与しているという仮説をはじめて提出した。その後 Karlson および Schweiger (1961) はアオバエ幼虫および蛹における Prophenoloxidase の変動を調べ、Prophenoloxidase が白い前蛹において最大量になること、また活性化因子活性が Ecdyson 分泌と時を同じくして増大することから、Ecdyson は染色体の特定の遺伝子に作用してパフ (Puff) の形成を促進し、活性化因子の生合成に必要な m-RNA の生成を促すものと推定した。ある種のチョウ類についてもこれと同じ現象が認められている (Karlson and Schmid, 1955; Karlson and Bückmann, 1956)。

昆虫の Prophenoloxidase については上述のハエの他にゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*) の幼虫にも不活性な Latent Phenoloxidase が存在し、*in vitro* でオレイン酸ソーダによつて活性化されることが知られている (Aerts and Vercauteren, 1964; Heyneman and Vercauteren, 1964)。

Karlson および Lieben (1961) はクロバエ幼虫のアセトン末から Phenoloxidase を結晶として単離し、基質特異性を検討した結果、この酵素は o-Diphenoloxidase [O_2 -oxidoreductase (EC No. 1, 10, 3, 1)] であることを明らかにした。さらに Prophenoloxidase の活性化を細胞顆粒、たとえばミトコンドリアが共存する環境で行なうと、活性化された酵素はミトコンドリアと結合し、元来の Diphenol-oxidase 活性の他に Monophenoloxidase 活性をも示すことを明らかにした。なお Jenny ら (1961), Horowitz および Fling (1955) により、Phenoloxidase は粗抽出液の遠心分離でマイクロゾーム区分に沈降すること

が報告されているが、Karlson および Schmid (1955) は Phenoloxidase が凝集しやすく、遠心分離ではマイクロゾーム区分に含まれると述べている。一方ゴミムシダマシ幼虫の Latent Phenoloxidase から活性化されたものは Mono- および Diphenoloxidase 両方の活性を示すと報告されている (Aerts and Vercauteren, 1964)。このように試料としたハエの違い、調製法の違いにより異なる結果がえられており、この問題は今後さらに検討する必要があるが、この報告では以下単に Phenoloxidase と呼ぶことにする。

われわれは家バエ前蛹中に Prophenoloxidase が存在することを見出し、その活性化の機序を調べ (稲葉喬, 1964)、さらにこの不活性酵素は 3 つのタンパク質によつて形成された潜在酵素系 (Latent Phenoloxidase System) であることを明らかにした (波平元辰, 1968)。その後、この潜在系を構成する 3 つのタンパク質は会合して Latent Phenoloxidase Complex を形成していることを明らかにした。また潜在酵素の活性化にはタンパク質の解離会合現象が関与している可能性も推察された。一方成熟蛹中に存在する活性化因子についても高度の精製を行ない、そのタンパク化学的性質を明らかにした (刈屋雅雄, 1969)。以上の結果をまとめてここに報告する。

I. 生物試料および Phenoloxidase と活性化因子の活性測定法

1. 生物試料

本研究を通じ家バエとして *Musca domestica vicina* Macquart 高槻系を用いた。

成虫の飼育は 26~30°C でスキムミルクおよび砂糖を各 5% になるよう水に溶解したものを飼料として行なつた。産卵はフスマと粉末酵母 (2:1 の割合に混合) を適当量の水と混和したものに行なわせ、そのまま孵化させた。幼虫も上記と同じフスマと粉末酵母を飼料とし、乾燥しないように注意しながら 25°C 附近で飼育した。孵化後蛹化までにはほぼ 6 日を要したが、蛹化の時期を厳密にそろえることは困難であつた。したがって多量の試料を処理する場合前蛹 (Pre-pupae, 白い蛹 White Pupae) はつぎのようにして選別した。すなわち水洗した蛹を水道水 (必要な場合適当量の食塩を添加し比重を調節) に投入すると前蛹は沈み、成熟蛹は浮上するので、沈降した前蛹を集め、さらに着色度合に応じ精選して白い蛹を選び前蛹試料とした。

2. Phenoloxidase 活性測定法

(1) 検圧法

ワールブルグ検圧装置を用い、 $6.4 \times 10^{-2} \text{ M}$ のカテコール（メルク製、特級品）を基質とし、 $\text{pH } 6.8$ の $\text{M}/15$ リン酸緩衝液（ 0.9% NaCl 含有）中で 25°C において反応を行ない、常法により、経時的に酸素消費量を求め、酵素溶液の $280 \text{ m}\mu$ における吸光度 (OD_{280}) あたりの酸素吸収量 (μl) をもって活性を表わした。

(2) 比色法

Horowitz および Fling (1955) にならい $2.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ DL-ジヒドロフェニルアラニン (DOPA) (N. B. C 製、特級品) を基質とし、酸化によって 10 分間に生成する DOPA-chrome の赤色を日立製作所製 EPO-B 型光电比色計により $470 \text{ m}\mu$ のフィルターを用い測定した。酵素溶液の $280 \text{ m}\mu$ における吸光度 (OD_{280}) あたりの OD_{470} をもって活性を表わした。反応は $\text{pH } 6$ あるいは 6.8 の $\text{M}/15$ リン酸緩衝液中で 25°C において行ない、 0.2 N KCN を添加して反応を停止した。

3. 活性化因子の活性測定法

一定量の Latent Phenoloxidase 溶液（前蛹を $\text{pH } 6.0$ の 0.2 M リン酸緩衝液で抽出し、 7000 rpm , 30 分間遠心分離した上清から硫酸飽和によって粗 Latent Phenoloxidase を沈澱させ、ふたたび上記の緩衝液に透析して溶解し、 7000 rpm , 30 分間の遠心分離によってえられる上清。使用に際してはその OD_{280} を 20 に調整した）に種々濃度の活性化因子（ $\text{pH } 6.0$ の溶液）を加え、適当に希釈して 25°C において 30 分間活性化を行なった。生成する活性を上記比色法により測定し、 OD_{470} を活性化因子の濃度 (OD_{280}) に対してプロットし、 OD_{470} を 0.2 とする活性化因子溶液の OD_{280} を求め、その逆数をもつて比活性を表わした。また活性単位としては OD_{280} が 1 ($E_{280\text{m}\mu}^{1\text{cm}} = 1$) であるときの活性化因子の量を 1 単位とした。

II. 家バエの変態過程における Phenoloxidase 活性の変動と潜在性 Phenoloxidase およびその活性化因子の存在

家バエの幼虫から蛹に至る過程において Phenoloxidase 活性は Fig. 1 に示すように顕著な変動を示す。すなわち幼虫末期高い活性を示したものが、蛹化直後の蛹（前蛹）では完全に消失し、蛹の成熟につれてふたたび活性を現わしてくる。しかし前蛹は Phe-

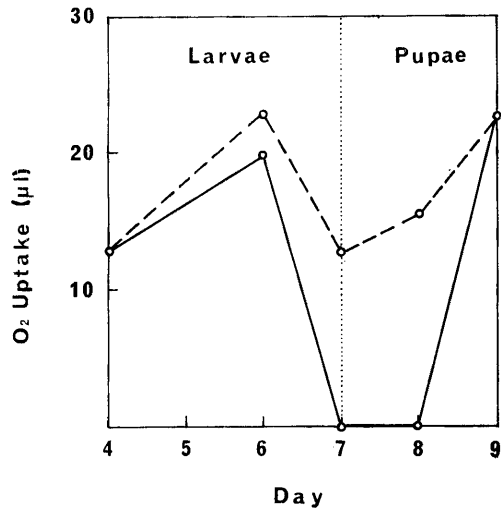


Fig. 1. Fluctuation of phenoloxidase activity in the process of metamorphosis from larvae to pupae.

Solid line shows apparent activity of the extract and broken line activity after treatment of the extract with sodium oleate.

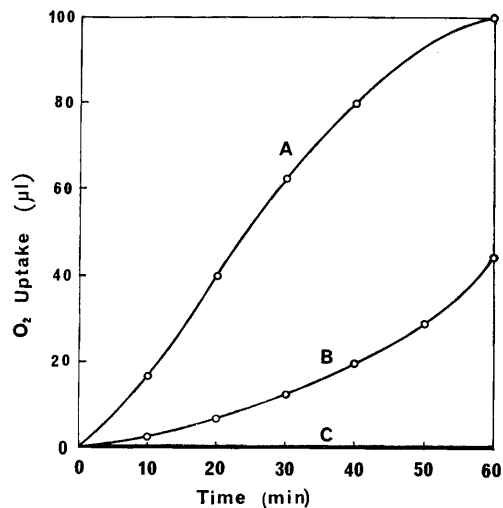


Fig. 2. Activation of latent phenoloxidase in prepupae by the extract of aged pupae.

Curve A: extract of prepupae + extract of aged pupae.

Curve B: extract of aged pupae.

Curve C: extract of prepupae.

noloxidase をまったく含まないのではなく、その抽出液にオレイン酸ソーダあるいはドデシル硫酸ソーダ (SDS) を加えると強い活性が出現した。したがって前蛹は陰イオン界面活性剤で活性化される不活性な状

蛹の Phenoloxidase を含んでいることが明らかになり、前蛹を上記の方法で選別して Latent Phenoloxidase の試料とした。

前蛹の抽出液はそのまま pH 6.8 で 25°C に 1 時間放置してもなんら Phenoloxidase 活性を示さないが、これに成熟蛹の抽出液を加えると、Fig. 2 に示すように、上記の界面活性剤の場合と同様に強い活性が出現した。したがって、成熟蛹は Latent Phenoloxidase の活性化因子を含有していることになり、成熟蛹を活性化因子調製の試料とした (Funatsu and Inaba, 1962)。

III. Latent Phenoloxidase の活性化

前蛹の Latent Phenoloxidase は *in vitro* において陰イオン界面活性剤、成熟蛹の活性化因子によって活性化されることをすでに述べたが、さらに前蛹抽出液を水に対して透析し、塩濃度を低下させても活性化が起こることが明らかになった。生体内においては活性化因子によって活性化されるものと考えられるが、*in vitro* においては上記 3 つの様式によって活性化を行なうことができる。

1. Latent Phenoloxidase 溶液の調製

前蛹に 0.9% NaCl を含む pH 6.8 の M/15 リン酸緩衝液 3~7 倍量を加えてホモジネートとし、ガーゼで濾過したのち、0~2°C、10,000 rpm で 30 分間遠心分離すると 3 層に分離する。黄色透明な中層をとり硫酸逆透析によってタンパク質を沈澱させ、沈澱を冷所において上記リン酸緩衝液に透析、溶解し、不溶物を除去したものを粗 Latent Phenoloxidase 溶液として用いた。

2. 陰イオン界面活性剤による活性化

Bodine ら (Allen and Bodine, 1941) によつてバッタの卵の不活性 Phenoloxidase (Protyrosinase と呼ばれた) の活性化剤と認められた陰イオン界面活性剤はハエの Prophenoloxidase の活性化には有効でないことが報告されているが (Ohnishi, 1958), これに反しすでに述べたように家バエ前蛹の Latent Phenoloxidase はオレイン酸ソーダによつて活性化されることが明らかになった。そこで界面活性剤による活性化を詳細に検討した (Inaba et al. 1963)。

まず各種の界面活性剤による活性化を調べたところ Table 1 に示すように陰イオン界面活性剤によつてのみ活性化が起こることが明らかになり、Bodine らの結果と一致した。

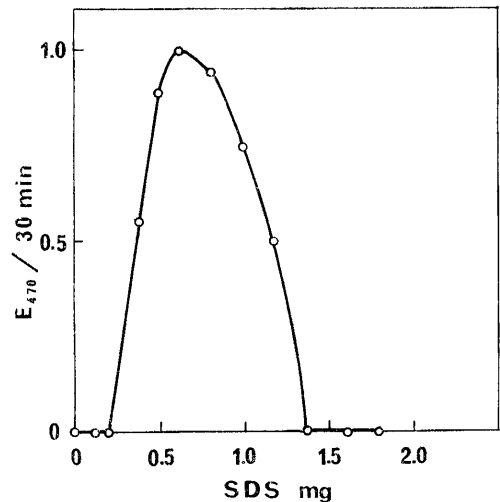


Fig. 3. Effect of concentration of SDS on activation of latent phenoloxidase.

Activity was measured colorimetrically.

Table 1. Activation of latent phenoloxidase with various detergents.

Detergents		O ₂ -Uptake, μ l/10min.
Anionic	S D S	38
	Alkylsulfate	35
	Alkylarylsulfonate	10
	Rote oil	48
	Polyoxyethylene castor oil	25
Cationic	Alkyldimethylbetaine	0
	Dimethylbenzylalkylammonium chloride	2
Non-ionic	Polyoxyethylenealkylester	0
	Polyoxyethylenealkylphenoether	0
	Polyoxyethylenealkylether	0

Manometric method; 0.2ml of crude extract of prepupae and 0.1ml of various detergents (0.5 mg) and M/15 phosphate buffer, pH 6.8, after incubation for 30 min at 25°C, 12.8 μ M catechol, in a total volume 1.2 ml. Center well, 0.1 ml of 20% KOH.

陰イオン界面活性剤のうち SDS についてさらに詳細に調べた。その結果 Fig. 3 および 4 に示すように SDS による活性化は SDS の限定された濃度においてのみ起こり、活性化に適した一定の SDS/Latent Phenoloxidase 量比が存在した。またこの活性化の pH 依存性は Fig. 5 に示すとおりで、Latent Phenoloxidase の安定 pH 領域内の pH 7~8 に至適 pH があつた。活性化に及ぼす温度の影響については Fig. 5 に示すように 10~20°C の低温に至適温度があつた。

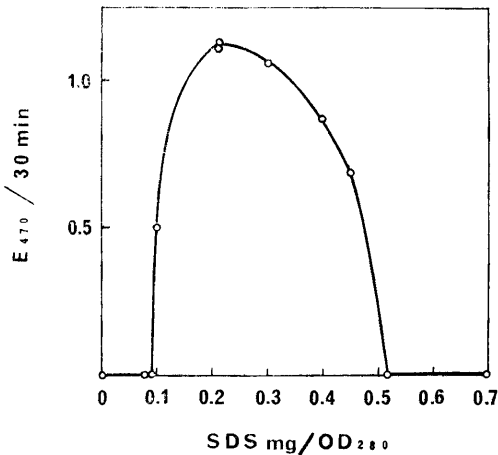


Fig. 4. The ratio of amounts of SDS and latent phenoloxidase in its activation.

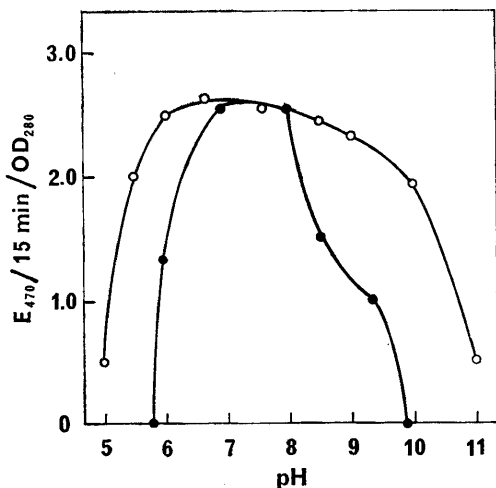


Fig. 5. The pH-stability of latent phenoloxidase and pH-dependence of its activation by SDS.

(○): pH-stability, (●): pH-dependence.

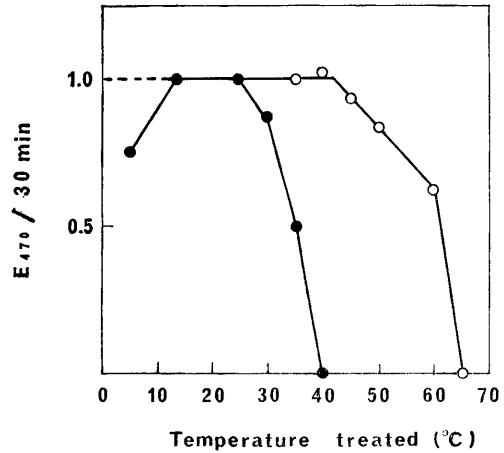


Fig. 6. Thermal stability of latent phenoloxidase and temperature dependence of its activation by SDS.

(○): Thermal stability.

(●): temperature dependence.

以上のように特定の条件においてのみ SDS による活性化が起こることは、活性化に Prophenoloxidase タンパク質の特異的な構造変化が関係しているものと考えた。

3. 成熟蛹中の活性化因子による活性化

水に投入したとき浮上する蛹として選別した成熟蛹から活性化因子を 0.9% の NaCl を含む M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) で抽出し、遠心分離によって組織片、リポドを除き、凍結融解を 2~3 回繰返すことによつて Phenoloxidase を不活性化して除去したのち、硫安 33% 飽和によつて沈澱させた。沈澱を水に透析しながら溶解し、凍結乾燥によつて部分的に精製された活性化因子標品を粉末状にえた。これを適当な溶媒に溶解して実験に供した (Inaba and Funatsu, 1964)。

一定量の Latent Phenoloxidase を種々濃度の活性化因子で活性化すると Fig. 7 に示すような S 字型の活性化曲線がえられた。また種々濃度の Latent Phenoloxidase を一定量の活性化因子で活性化すると Fig. 8 の活性化曲線がえられ、Latent Phenoloxidase 濃度を s 、活性化速度を v として Lineweaver-Burk のプロットを行なうと Fig. 9 に示すような直線がえられた。Hofstee のプロットでも同様に $[s]/V$ と $[s]$ との間に直線関係が認められた。以上の結果活性化因子による活性化は触媒反応であろうと推察された (Inaba and Funatsu, 1964)。

反応溶液の pH、反応温度が活性化速度に及ぼす影

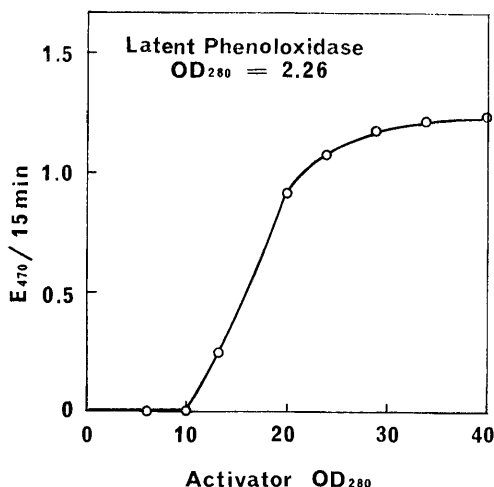


Fig. 7. Activation curve of latent phenoloxidase by activator.

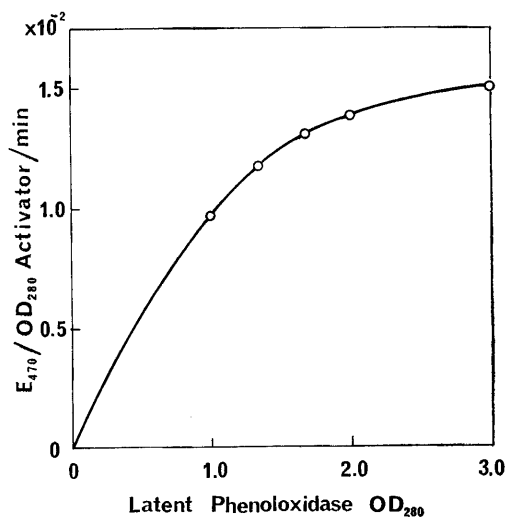


Fig. 8. Activation of varying amounts of latent phenoloxidase by a fixed concentration of activator.

響を Fig. 10 および 11 に示す。活性化の至適 pH は 6.5~7.5, 至適温度は 10~20°C で 3~10°C という低温でもかなり迅速に活性化が起こった。これに反し 20°C 以上では活性化速度が急激に低下し, 45°C では完全に活性化が停止した。活性化因子による活性化は Table 2 に示す試薬によって阻害された。表の第 1 列は活性化反応溶液に試薬を加えたとき, 第 2 列は Phenoloxidase 活性に対する影響, 第 3 列は Latent Phenoloxidase を, また第 4 列は活性化因子をそれぞれ, あらかじめ試薬で処理したときの影響

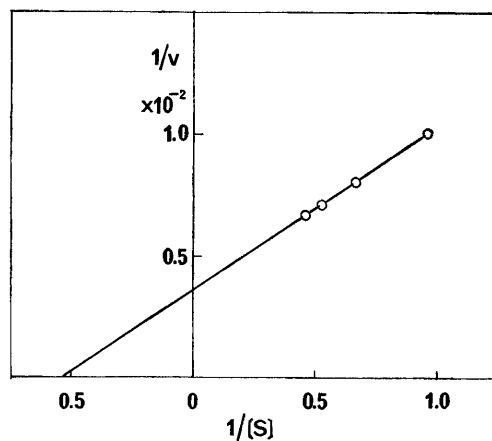


Fig. 9. Lineweaver-Burk's plot of activation of latent phenoloxidase by activator.

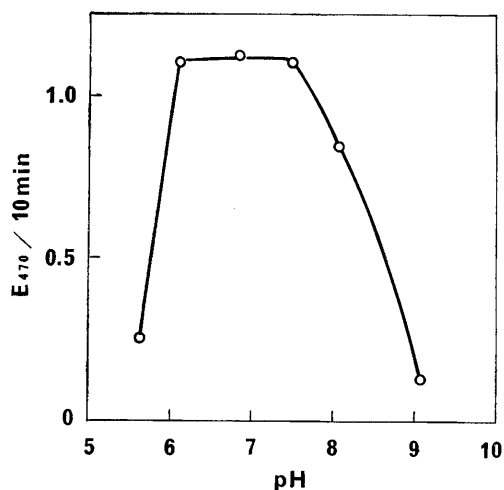


Fig. 10. The pH-dependence of activation of latent phenoloxidase by activator.

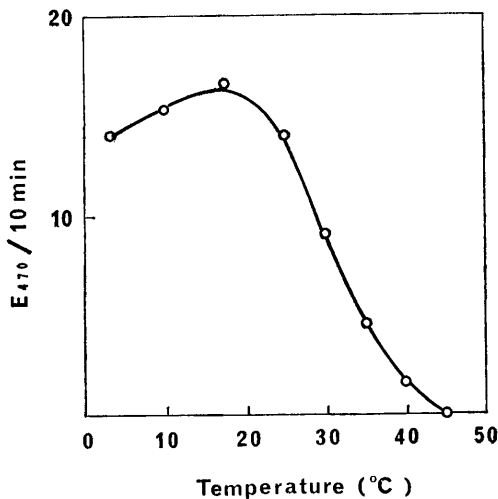
を示す。Na-picrylsulfate, NBS, ヨード, EDTA, は主として活性化因子を不活性化することによって活性化を阻害することがわかった (Inaba and Funatsu, 1964). EDTA はとくに顕著な活性化因子阻害剤であるが, これについては後述する。

4. Latent Phenoloxidase 溶液のイオン強度低下による活性化

Latent Phenoloxidase 溶液を pH 6~7 において水あるいは低濃度塩類溶液に対して透析すると活性化が起こることがわかった。たとえば pH 6.8 の 0.05 ~ 0.2 M リン酸緩衝液に対し 3°C で 24 時間透析し

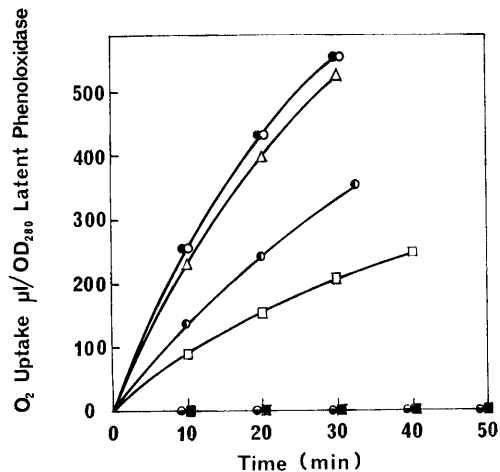
Table 2. Effect of chemical reagents on the activation of latent phenoloxidase by activator.

Reagents ($2 \times 10^{-3} M$)	Degree of inhibition			
	Activation	Phenoloxidase formed	Latent phenoloxidase	Activator
Na-picrylsulfate		0	0	
NBS		+	+	
Na-Azide				+
<i>o</i> -Chloroacetophenone		0	0	?
Iodine				
Thioglycolate		0	0	
Monoiodoacetate		+	+	
EDTA		0	0	

**Fig. 11.** Temperature dependence of activation of latent phenoloxidase by activator.

たとき出現する活性と、同じ Latent Phenoloxidase 溶液を成熟蛹の活性化因子で活性化したとき出現する活性とを Fig. 12 に示す。0.12 M 以上のリン酸緩衝液中では透析しても活性化は起こらず、Latent Phenoloxidase は安定な状態に保たれるが、0.1 M 以下の低濃度リン酸緩衝液中では水の場合と同様に活性化が起こった。しかもこの活性化は可逆的で、低濃度リン酸緩衝液中で活性化したもの、これをふたたび高濃度リン酸緩衝液に透析すると不活性化した。この不活性化はタンパク質の変性による失活ではなく元の Latent Phenoloxidase への復帰であることが、これをふたたび低濃度リン酸緩衝液または水に透析すると完全に活性化され、活性化、不活性化を反復しうることから明らかになった。

以上の現象はリン酸塩に特有な現象ではなく、0.05 M リン酸緩衝液に 0.1 M 以上の塩濃度になるよう

**Fig. 12.** Activation of latent phenoloxidase in phosphate buffer solution (pH 6.8) of low concentration.

(○), (△), (●), (□) represent activities exhibited with time by treatment with activator in 0.05, 0.08, 0.12 and 0.2 M phosphate buffers of pH 6.8, respectively. (●), (▲), (◐), (■) represent activities exhibited with time by dialysis of latent phenoloxidase against 0.05, 0.08, 0.12 and 0.2 M phosphate buffers of pH 6.8, respectively.

NaCl を加えた場合にも同様な現象が認められた。さらにリン酸緩衝液のかわりに酢酸緩衝液を用いてもまったく同じ現象が見られた。その結果塩の種類によらず 0.1 M 以上の濃度で Phenoloxidase は不活性な状態に保たれそれ以下の濃度で活性をもった状態に変わり、この変化は塩濃度の変化によって可逆的に起こることが明らかになった。

塩濃度の影響については、イオン強度の変動による影響および浸透圧の変動による影響の2つが考えられる。活性化の原因となるものがそのいずれであるかを

決定するため、まず滲透圧の変化を抑え、イオン強度のみを変化してその影響を検討した。すなわち 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に 0.05~1.0 M の蔗糖溶液を加え、これに対して透析を行ない、活性化を調べた。その結果 1.0 M の蔗糖を含む場合でも活性化を抑えることができなかった。したがって低濃度塩類溶液中における活性化は、溶液の滲透圧の低下にその原因があるのではなく、イオン強度の低下に原因があることが推察された。

もし滲透圧の低下に原因がある場合には、Latent Phenoloxidase の本体は Phenoloxidase が細胞の顆粒に結合し、表面的に活性を示さない結合型である可能性があり、この場合の活性化は顆粒の破壊による酵素の遊離であると考えられることができるわけであるが、蔗糖の影響についての実験結果からこの推論は妥当でないと思われる。したがって Latent Phenoloxidase は可溶性のタンパク質であると考えられることができる。

Latent Phenoloxidase の本態として結合型を考えることはイオン強度の変化に伴う活性の可逆的変動を説明するのに不適當である。また一般の Zymogen 活性化に見られるような限定水解も活性化機構の説明としては妥当でない。したがって、活性化因子を一種のタンパク質分解酵素と見做すこともこの意味で疑問がある。

塩濃度の変化がタンパク質に及ぼす影響として、タンパク質分子のイオン状態の変化とこれに伴う構造変化および分子間の相互作用の変化による解離会合が考えられ、その両方あるいはいずれかが活性化の原因となる可能性が推察される。Grafius および Millar (1967) は Acetylcholine esterase がイオン強度の変化によつて解離会合を起こす現象を超遠心的に確かめており、Latent Phenoloxidase の場合にも後述するように解離会合が活性の変動に関係していることが推定された。

高イオン強度溶液中における Latent Phenoloxidase の安定性には溶液の pH が顕著な影響を及ぼした。Latent Phenoloxidase 溶液を Visking tube #18/32 に入れ、pH 5~8 の各種 pH の 0.2 M リン酸緩衝液に対し 24 時間冷所で透析し、活性発現の有無およびこれにさらに活性化因子を作用させたとき出現する活性を調べた。その結果 pH 5.5 以下の酸性では Latent Phenoloxidase は不可逆的な変性を起こし、イオン強度を低下しても、また活性化因子を加えてももはや活性化しない状態に変わる。一方 pH 7.0 以上

上では 0.2 M リン酸緩衝液中でも活性化を抑えることができず、透析中に活性化が起こり、この傾向は pH が高いほど強く現われた。

Latent Phenoloxidase のイオン強度低下による活性化は、活性化因子による活性化同様に EDTA によつて完全に抑制された。

Latent Phenoloxidase を 1.0×10^{-3} M の各キレート試薬を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して 3°C で 24 時間透析し、比色法によつて出現する Phenoloxidase 活性を測定したところ Table 3 に示す結果をえた。すなわち、グルタチオン、システインに弱い抑制作用が見られたが、EDTA は活性化を完全に阻害することがわかった。EDTA の阻害効果と濃度との関係を 1.0×10^{-5} ~ 1.0×10^{-2} M の濃度範囲で調べたところ EDTA 濃度 1.0×10^{-3} M 以上で完全な抑制が起こることが明らかになった。

Table 3. Effects of various chelating reagents on the activation of latent phenoloxidase by dialysis.

Reagents	Phenoloxidase activity ($OD_{470}/10\text{min}/OD_{280}$ of latent phenoloxidase)
none	0.031
Oxalic acid	0.030
Ethylene diamine-HCl	0.031
Histidine	0.030
Glutathione	0.020
Cysteine	0.013
EDTA	0

Latent phenoloxidase was dialyzed against 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.0×10^{-3} M reagent.

EDTA の作用については、さらにあらかじめ Latent Phenoloxidase 溶液に EDTA を加えるか、抽出に EDTA を含む緩衝液を用いれば、水あるいは低濃度塩類溶液に透析しても活性化が起こらないこと、また 1.0×10^{-3} M 以上の EDTA が溶液中に含まれていれば、pH 6.0 でのクロマトグラフィーにおいても Latent Phenoloxidase は安定に保たれることが明らかになった。

IV. Latent Phenoloxidase を構成するタンパク性因子

Latent Phenoloxidase の活性化に 3 つの形式があることを述べたが、活性化の経過は違ついても、最終的に生成する Phenoloxidase は同じものであるはずである。したがって上述の 3 つの活性化形式を矛盾

なく説明しうる機構を明らかにするためには Latent Phenoloxidase, Phenoloxidase, 活性化因子をそれぞれ純化し, 分子レベルで追究する必要が出た. そこでまず前蛹から Latent Phenoloxidase の精製を試みたところ, この潜在酵素は 3 つのタンパク性因子によって構成されている複雑な系であることが明らかになった (Funatsu et al., 1966, 1967 a, 1967 b).

1. Latent Phenoloxidase の部分的精製

Scheme 1 に示すように前蛹を 0.9% NaCl を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で抽出し, 抽出液を硫酸で飽和して Latent Phenoloxidase を沈澱させ, 粗標品として Latent Phenoloxidase N と呼ぶことにした. これを 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し同じ緩衝液に対して十分透析して硫酸を除いたのち, ふたたび硫酸を加えて 0.4 飽和にすると Latent Phenoloxidase に沈澱する. この粗標品を Latent Phenoloxidase A とした. A は N に比し遙かに不安定で活性化しやすく, 水に対して透析すると容易に活性化し Phenoloxidase を生じた.

Latent Phenoloxidase N 溶液を硫酸で 0.4 飽和にし A を沈澱させたときの上清に 1 つのタンパク質が含まれ, このタンパク質は Latent Phenoloxidase に関係をもつことがわかった. すなわちこのタンパク質を Latent Phenoloxidase N または A の活性化因

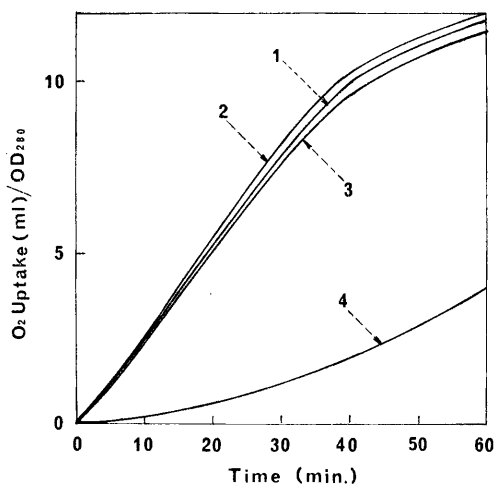
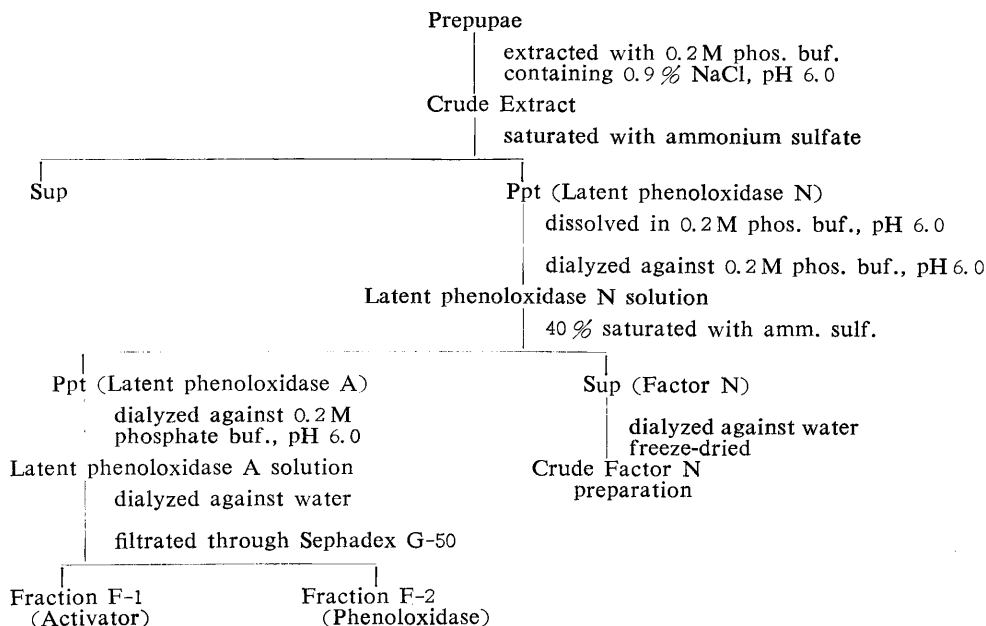


Fig. 13. Effect of fraction F-N on activation of latent phenoloxidase A by activator.

- 1: latent phenoloxidase+activator.
- 2: latent phenoloxidase+activator+F-N treated at 60°C.
- 3: latent phenoloxidase+activator+F-N treated at 70°C.
- 4: latent phenoloxidase+activator+F-N.

子による活性化系に加えると Fig. 13 に示すように活性化が顕著に抑制されることが明らかになった. このタンパク性抑制因子はあらかじめ 60°C 以上で 30

Scheme 1. Partial purification of latent phenoloxidase.



分間加熱すると作用を失った。また非透析性であった。このタンパク質は Factor N (F-N, Namihira factor) と呼ばれた。

F-N の作用様式についてはつぎの3つの可能性が考えられた。(1) Latent Phenoloxidase と結合し、これを安定化す一種の安定化因子 (Stabilizing factor), (2) 活性化因子の阻害因子, (3) 生成する Phenoloxidase の阻害因子である可能性である。これに対し、F-N とあらかじめインキュベートした活性化因子で活性化を行なっても活性化の速度は変わらないこと、また Phenoloxidase は F-N によって阻害されないことが確かめられ、(2) と (3) の可能性は否定され、(1) の可能性すなわち安定化因子としての可能性だけが残されている。Latent Phenoloxidase A が F-N の除去によって活性化されやすくなることはこの可能性を支持している。F-N の精製は目下進行中である。

Latent Phenoloxidase A は低温で 0.2 M リン酸緩衝液中では長期間不活性の状態に保たれるが、水に透析するか、活性化因子を作用させると容易に活性化す。水に透析し活性化したものを Sephadex G-50 によるゲル濾過にかけると Fig. 14 に示すように F-1 および F-2 の2つの画分に分かれ、Phenoloxidase は F-2 画分に含まれている。F-1 画分は Fig. 15 に示すように表面的な Phenoloxidase 活性をもたないが、わずかに未活性化の Latent Phenoloxidase を含み、これは活性化因子によって活性化される。

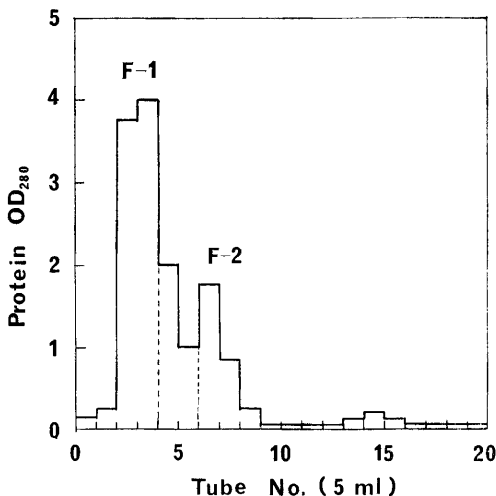


Fig. 14. Sephadex G-50 gelfiltration of latent phenoloxidase A previously dialyzed against water.

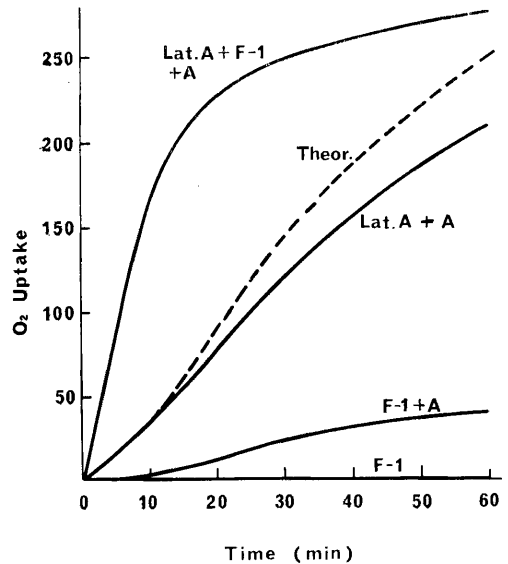


Fig. 15. Effect of fraction F-1 on activation of latent phenoloxidase A by activator.

Lat. A, A and F-1 mean latent phenoloxidase A, activator and fraction F-1, respectively. As to Theor., see text.

Latent Phenoloxidase A を活性化因子で活性化す系に F-1 を加えると、加えない場合に比し著しい活性化の促進が見られた。この活性化速度は、Latent Phenoloxidase と F-1 を活性化因子でそれぞれ活性化したときの速度から計算される値 (Fig. 15 Theor.) より遙かに大きかった。その結果 F-1 画分中に活性化因子が含まれている可能性が推察された。事実 Latent Phenoloxidase N または A に活性化因子のかわりに F-1 画分を加えても活性化が起こることが確かめられた (Fig. 16 参照)。

F-1 中の活性化因子は Latent Phenoloxidase A さらに N に由来するものであるから、これらの標品の中では不活性な状態が存在していたことになる。したがって、Latent Phenoloxidase 中の活性化因子を inert Activator と呼ぶことにした。

以上述べたことから明らかなように、これまで Latent Phenoloxidase として述べてきた前蛹中の Phenoloxidase の不活性体は、単一なタンパク質ではなく、Phenoloxidase の前駆体である Prophenoloxidase というタンパク質、これを安定化すると考えられる F-N というタンパク質および活性化因子の不活性形である inert Activator タンパク質の3つの構成成分によって形成された1つの潜在系であり、

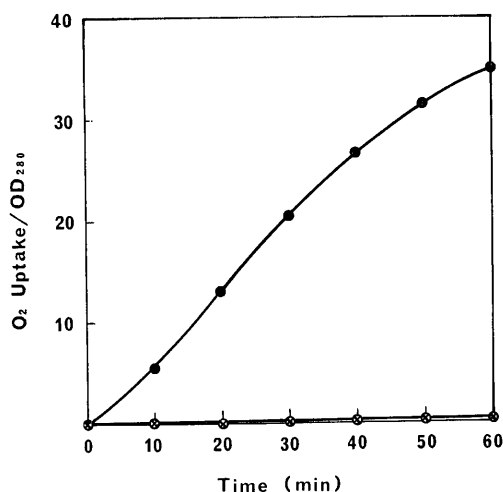


Fig. 16. Activation of latent phenoloxidase by fraction F-1.

(●): latent phenoloxidase + F-1.

(○): F-1.

(×): latent phenoloxidase.

Latent Phenoloxidase System と呼ぶのが妥当であると考えられる。

Latent Phenoloxidase A を水に透析したとき inert Activator が活性化された。このことからイオン強度低下による活性化においては inert Activator の活性化がまず起こり、これが Prophenoloxidase に働いてこれを活性化すものと考えられることができる。したがって活性化機構は活性化因子による活性化の場合とまったく同じになる。このことはさらに活性化が EDTA によって阻害される現象を解析することによって確かめられた。

2. EDTA による活性化の阻害

EDTA によって Prophenoloxidase の活性因子による活性化および溶液のイオン強度低下による活性化がともに完全に阻害されることを述べたが、この阻害の機構を推察するためつぎの実験を行なった。

すなわち各濃度の EDTA を含む水に対して Latent Phenoloxidase を透析し、出現する酵素活性を測定したのち、さらに活性因子を加えて活性化を行ない、ふたたび活性を測定した。一方 EDTA を含む水に透析したのち、水に透析して過剰の EDTA を除いたのち、活性化因子を加えて活性化を行ない活性を測定した。以上の結果を Table 4 に示す。

すなわち、EDTA 濃度 10^{-4}M 以下の場合、EDTA を含む水に透析することによって 50% 以上の活性化

Table 4. Effect of concentration of EDTA on the activation of latent phenoloxidase.

Final concentration of EDTA (M)	Relative phenoloxidase activity		
	Dialysis	Dialysis, Activator	Dialysis, Removal of excess EDTA by dialysis, Activator
0	63	100	100
1×10^{-5}	38	100	100
1×10^{-4}	35	100	100
1×10^{-3}	0	74	100
1×10^{-2}	0	0	100

が抑制されたが、これに活性化因子を加えると完全に活性化した。 10^{-3}M 以上の EDTA では透析による活性化は完全に抑えられた。しかしその後活性化因子を加えても 10^{-3}M の場合には約 25% が活性化されずに残り、 10^{-2}M の場合にはまったく活性化されなかった。この原因は過剰の EDTA が加えた活性化因子を阻害したことにあると考え、水に透析し過剰の EDTA を除き（この過程では Phenoloxidase は活性化しない）、これに活性化因子を加えたところ、いずれも 100% の活性化が見られた。

以上のことから EDTA は inert Activator の活性化および活性化因子の活性を阻害するが、Prophenoloxidase にはなんらの影響も与えないことがわかった。したがってイオン強度低下による活性化において、共存する inert Activator が活性化され、これが Prophenoloxidase を活性化するとすれば、inert Activator の活性化が EDTA によって阻害されれば活性化は起らないことになり、実験結果と一致した。このことは活性化因子による活性化とイオン強度低下による活性化が同じ機構によるという上述の推論を支持するものである。

EDTA による inert Activator の活性化阻害は硫酸 30~40% 飽和による沈澱と沈澱の水に対する透析によって除外される。硫酸 100% 飽和で沈澱させた場合には、これを水に対して透析しても活性化されない。このこともまた、イオン強度低下による Latent Phenoloxidase の活性化に inert Activator の活性化とその作用が関係していることを示している。

3. Latent Phenoloxidase Complex の存在

Latent Phenoloxidase System を構成する 3 つのタンパク性因子が単に混在するものか、あるいは会合して複合体を形成しているかを明らかにすることは、酵素の存在形態およびその生理的意義に関連して

Scheme 2. Flow sheet of purification of latent phenoloxidase complex.

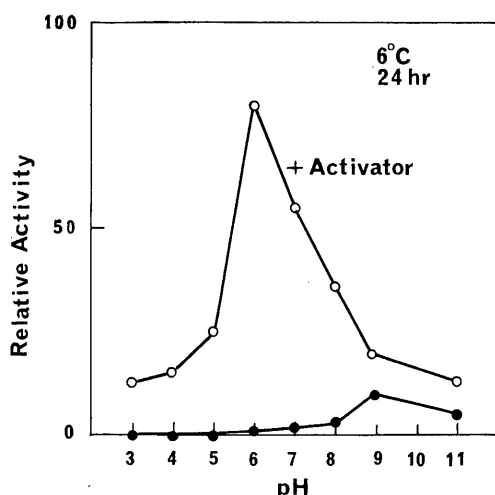
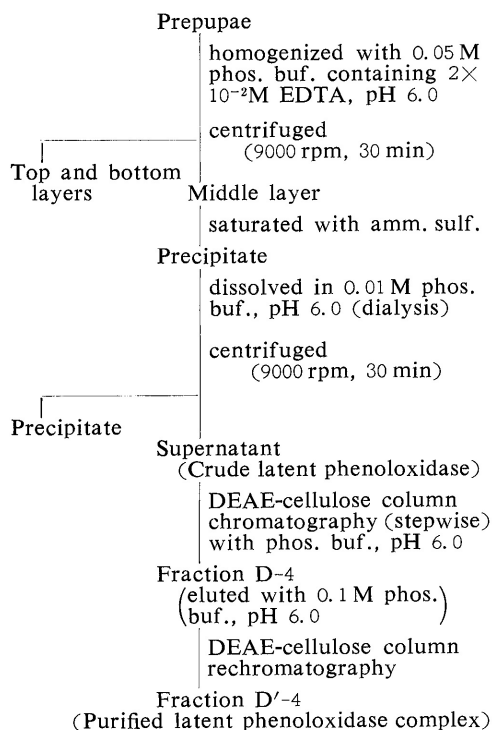


Fig. 18. The pH-stability of latent phenoloxidase complex.

The complex (D'-4) dissolved in buffer solution of different pH's (3-11) was kept at 6°C for 24hr. The measurement of phenoloxidase activity was performed after activation by activator.

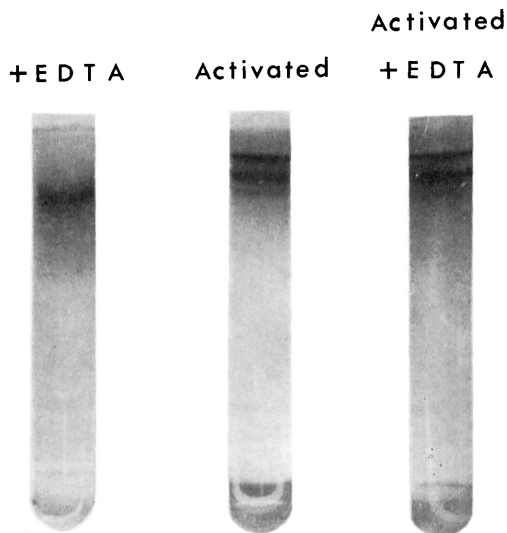


Fig. 17. Disc electrophoresis of latent phenoloxidase preparation, D'-4 Acrylamide gel: 7.5%, Tris-glycine buffer, pH 8.3.

+EDTA: electrophoresis of D'-4 in the presence of 1×10^{-3} M EDTA Activated: electrophoresis of D'-4 previously treated with ammonium sulfate followed by dialysis against water, in the absence of EDTA Activated, + EDTA: electrophoresis of D'-4 previously precipitated with ammonium sulfate followed by dialysis against water, in the presence of 1×10^{-3} M EDTA.

興味あることである。そこでこれを解明するため EDTA の存在下ふたたび Latent Phenoloxidase の精製を試みた。精製法の概要を Scheme 2 に示す。最終的にえられた画分 D'-4 は Fig. 17 に示すように EDTA 存在下のディスク電気泳動でただ 1 本のバンドを与えた。D'-4 は水に透析しても活性化しないが、EDTA の存在しない状態でディスク電気泳動を行なうと 3 本のバンドに分れた。一方 D'-4 の溶液に硫酸を 0.4 飽和になるように加え、生じた沈澱を水に対して透析して活性下したのち、ディスク電気泳動にかけたところ、EDTA 存在下においても 3 本のバンドが認められた。この 3 本のバンドは Latent Phenoloxidase System を構成するタンパク性因子を示すものと考えられ、D'-4 中でこれらの構成タンパク質は複合体を形成し Latent (Dormant) Phenoloxidase Complex として存在することが推定された。Latent Phenoloxidase Complex は Fig. 18 に示すように pH 6 附近のきわめて狭い pH 範囲でのみ安定であった。

Table 5. Recoveries of latent phenoloxidase complex in the process of purification.

Preparation (Fraction)	Recovery of protein	Recovery of activity*	Specific activity*
Middle layer	100	100	0.6
Fraction D-4	1.9	34.1	14.3
Fraction D'-4	0.2	14.0	64.5

* Activity was measured after activation of preparations with activator.

なお上記の精製過程における複合体の回収率，潜在活性の回収率，潜在比活性（活性化因子で活性化したのち測定した活性）を Table 5 に示す。

V. Latent Phenoloxidase の活性化

Latent Phenoloxidase Complex の形成および活性化の機構については未だ分子レベルの研究が終結せず結論はえられていないが，現在までにえられた知見から活性の変動には Phenoloxidase タンパク質の四次構造の変化および活性化因子の三次構造の変化が関係している可能性が推察される。

1. 幼虫の Phenoloxidase の電顕像

家バエ幼虫はその末期高い Phenoloxidase 活性を示すので蛹化 24 時間前の幼虫を集め，Scheme 3 に示す方法で精製を行ない，ディスク電気泳動で単一のバンドを与える精製標品をえた。

この標品について日本電子製 7A 型電子顕微鏡を用い negative staining により電顕像を撮影した結果 Fig. 19 に示す会合体の像をえた（山浦ら，1971）。そのサブユニット構造の詳細は不明であるが，大きな粒子量をもつことが推定された。

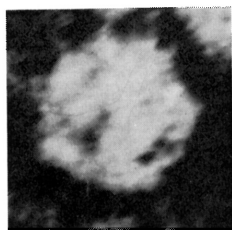


Fig. 19. Electron micrograph of phenoloxidase isolated from the larvae of housefly.

Karlson および Lieben (1961) はクロバエ幼虫のアセトン末から結晶として単離した Phenoloxidase の分子量を 530,000 (17S) と推定しており，上述の電顕像についてえた知見と一致している。

2. 成熟蛹の活性化因子

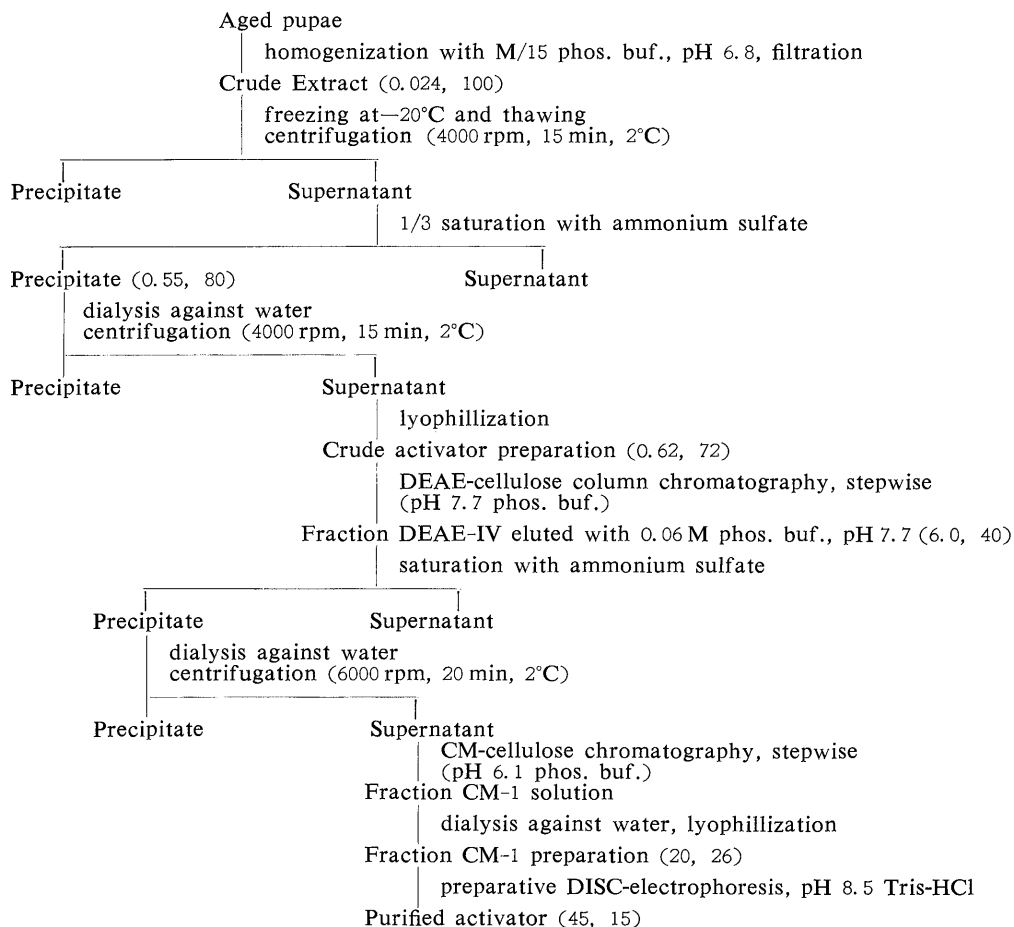
Scheme 3. Flow sheet of purification procedure of phenoloxidase from the larvae of housefly.

Larvae
homogenized with 0.01 M phos. buf. containing 0.9 % NaCl, pH 7.0
centrifuged (9000 rpm, 30 min)
Supernatant
saturated with ammonium sulfate
Precipitate
dialyzed against distilled water
centrifuged (9000 rpm, 30 min)
Precipitate
dialyzed against phos. buf. containing 0.9 % NaCl, pH 7.0
centrifuged (9000 rpm, 30 min)
Crude phenoloxidase
Hydroxylapatite chromatography; pH 7.0, phosphate buffer, gradient elution: 0.01-0.2 M
Partially purified phenoloxidase
Gelfiltration through Sephadex G-200; pH 7, 0.05 M phosphate buffer containing 0.1 M KCl
Purified phenoloxidase

さきに Inaba および Funatsu (1964) は家バエ成熟蛹中の活性化因子は非透析性の高分子のタンパク質で，その作用は触媒作用であろうと推定した。また Funatsu ら (1967) は前蛹の Latent Phenoloxidase Complex 中に活性化因子は不活性な inert Activator として存在することを明らかにした。その後刈屋 (1969) は成熟蛹を出発物として活性化因子の純化を試み，超遠心的ならびに電気泳動的にまったく均一なタンパク質として単離することに成功し，その物理化学的性質および生理的性質を検討した。

精製は Scheme 4 に示す方法により行なつた。カッコ内に比活性および活性の回収率を示す。精製標品の比活性は抽出液（比活性 0.024）の約 2,000 倍であつた。

精製活性化因子は沈降定数 2.06S で分子量約 16,000 と推定される酸性タンパク質で等電点 (Ampholine electrophoresis による) は 4.7 であつた。pH 6~10 に安定 pH 領域をもち，活性化の至適 pH は 6~7 であつた。また 45°C まで安定で，活性化の至適温度は 15~20°C であつた。アミノ酸組成は Table 6 に示すようにシスチン，システインとともにまったく含まず，アミノ酸残基数は 127 個で，これから計算した分子量は 15,232~15,762 であつた。分子

Scheme 4. Flow sheet of purification procedure of activator from the aged pupae of housefly.**Table 6.** Amino acid composition of activator.

Amino acid	Number of amino acid residue (M. W.=16,000)
Asp	14
Thr	8
Ser	10
Glu	16—18
Pro	6
Gly	14
Ala	10
1/2 Cys	0
Val	6—8
Met	2
Ile	6
Leu	10
Tyr	2
Phe	4
Lys	6
His	2
Arg	6
Trp	1

中にジスルフィド結合をもたないことから、このタンパク質は塩類によつて鋭敏に構造を変化する可能性が推定されたが、事実酢酸緩衝液では 0.5 M 以上の塩濃度において構造変化を起こし活性を失なつた。

成熟蛹からえられた活性化因子が、Latent Phenoloxidase Complex 中の inert Activator を活性化したときの活性化因子と同一物であるか否かの直接の証明はないが、EDTA に対する態度はまったく同じであつた。たとえば精製活性化因子を 1.2×10^{-4} M EDTA を含む pH 6.0 の 0.2 M 酢酸緩衝液に溶解し 19°C で 90 分間放置したのち、pH 8.0 の 0.1 M 酢酸ソーダ溶液に冷所で 36 時間透析し、過剰の EDTA を除去したものは活性を完全に失なつた。

EDTA 以外のキレート試薬として o-Phenanthroline, sodium azide についても検討を行なつたが、これら 2 つの試薬は活性化因子の活性になんらの影響

も与えなかつた。

一方 EDTA によって不活性化された活性化因子は inert Activator の場合と同じように、硫酸分別沈澱によつて賦活された。賦活はさらに二価の金属イオンの添加によつても起こつた。Table 7 に示すように Al^{+++} を除くすべての二価金属によつて賦活が起こり、特異性は認められなかつた。

Table 7. Reactivation of EDTA-treated activator with metal ion.

Final concentration (M)	Recovery of activity (%)					
	Cu	Mg	Zn	Ca	Co	Al
2×10^{-8}	11	10	14	10	10	10
2×10^{-7}	93	20	93	75	80	15
2×10^{-6}	ppt	90	92	82	110	30
2×10^{-5}	ppt	93	ppt	110	110	ppt
2×10^{-4}	ppt	86	ppt			

Activity of activator which was not treated with EDTA was assumed to be 100. The ppt means precipitation.

EDTA の阻害作用機構についてはまだ結論がえられていないが、金属によつて賦活されることから、一見活性化因子は金属タンパク質であるように見えるが、賦活金属に特異性がないこと、また限られた硫酸濃度による沈澱によつて賦活されるということは、金属タンパク質であるという考えを必ずしも支持しないように見える。EDTA は4つのカルボキシル基をもっている。カルボキシル基をもたない o-Phenanthroline や sodium azide が、不活性化作用をもたないことを考えると、EDTA のカルボキシル基が、脱金属以外の作用で重要な働きをしている可能性がある。活性化因子は S-S 結合をもたず、分子構造の安定化に塩結合が水素結合、疎水結合とともに重要な働きをしていることが考えられ、この塩結合の破壊に EDTA のカルボキシルが働き、活性化因子の高次構造を変化し、さらに塩濃度の変化による微細構造の変化を束縛することによつて活性化因子の活性発現を阻害する可能性が考えられる。カルボキシル基によつて活性化因子分子内に塩結合を作り結合した EDTA は高濃度の硫酸あるいは金属によつて除去されることができる。

活性化因子の酵素作用については Table 8 に示すように、プロテアーゼおよびエステラーゼ活性について種々の条件で検討したが、いずれの場合も活性を認めることができなかった。すでに述べたように活性化

Table 8. Enzymatic properties of activator.

Proteolytic activity		
Hemoglobin	pH 4.2	negative
Casein	pH 7.0, 9.0	negative
Peptone	pH 4.2, 7.0, 9.0	negative
Esterase activity		
β -Naphthylacetate	pH 6.5	negative
Acetylcholine	pH 6.0, 6.9, 8.9	negative
Monophenylphosphate	pH 5.5, 6.0, 8.5	negative
Diphenylphosphate	pH 6.0, 7.3, 8.5	negative

因子を一種のプロテアーゼとするものもあり、本実験で検討した実験条件だけで活性化因子プロテアーゼ説を否定することはできないが、Latent Phenoloxidase 溶液のイオン強度低下による活性化の可逆性から見ても、プロテアーゼである公算は極めて少ない。

3. Latent Phenoloxidase Complex と Phenoloxidase の粒子量

(1) 蔗糖密度勾配沈降分析

部分的に精製した Latent Phenoloxidase Complex と Phenoloxidase を 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、Spinco L 2 型超遠心機を用い、5% から 20% の蔗糖濃度勾配によつて、3°C において 39,000 rpm で 240 分間遠心を行なつた。沈降図を Fig. 20 に示すが Phenoloxidase は Latent Phenoloxidase より大きな沈降を示した (波平, 1968)。

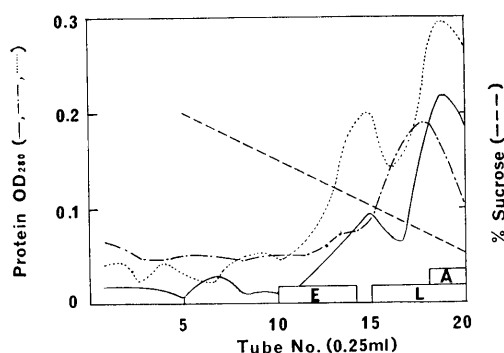


Fig. 20. Sucrose density gradient sedimentation analyses of crude phenoloxidase, latent phenoloxidase and activator preparations.

Spinco L 2, 39000 rpm, 240 min, 3°C.
Solid line: crude phenoloxidase.
Dotted line: crude latent phenoloxidase.
Broken line: crude activator.
E: phenoloxidase activity found.
L: latent activity of phenoloxidase found.
A: activator activity found.

(2) Sephadex G-200 によるゲル濾過

0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した Latent Phenoloxidase と Phenoloxidase について、同一条件で Sephadex G-200 によるゲル濾過を行なった結果、Fig. 21 に示すように Phenoloxidase は Latent Phenoloxidase より遙かに早く溶出され、より大きな分子量をもつことが推定された (山浦ら, 1971)。

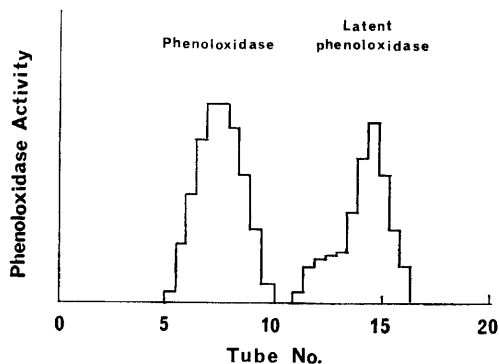


Fig. 21. Gelfiltration of latent phenoloxidase and phenoloxidase through Sephadex G-200.

4. 幼虫より蛹にいたる変態過程における Phenoloxidase のサブユニット構造の変化と活性との関係についての仮説

Phenoloxidase は大きな粒子量を持ち、またサブユニット構造をもっていることが、上記の蔗糖密度勾配沈降分析、ゲル濾過および電顕像から推定されたの

で、これを基にして、Fig. 22 に示すような Phenoloxidase のサブユニット構造と活性の変動の関係を推定した。すなわち幼虫の末期 Phenoloxidase は高分子の会合体として強い活性を示すが、蛹化時、なんらかの機構によつてサブユニットの解離が起こり Prophenoloxidase を生成する。同時に活性化因子もなんらかの機構によつて inert Activator に変わり、Factor N とともに活性をもたない Latent Phenoloxidase Complex を形成して前蛹中に持込まれる。この不活性体はふたたび解離し、活性化された活性化因子の作用によつてサブユニットが会合して Phenoloxidase を形成するものと考えられる。

VI Latent Phenoloxidase Complex の生理的意義

Latent Phenoloxidase Complex は蛹の初期における Phenoloxidase の唯一の供給源と考えられる。この複合体は inert Activator を含むので、局所的に高い濃度で Prophenoloxidase を活性化し、急激な Phenoloxidase 活性の要求に対応しうるものと考えられる。このような機構は酵素活性の1つの制御機構と考えることができる。すなわち、あらかじめ生合成した酵素を、サブユニット構造が関係する機構によつて可逆的に不活性化し、いわば休眠状態にある酵素として、その酵素活性を急激に要求する場所に持込み、これを活性化することによつて、その需要を満す機構であると考えられる。

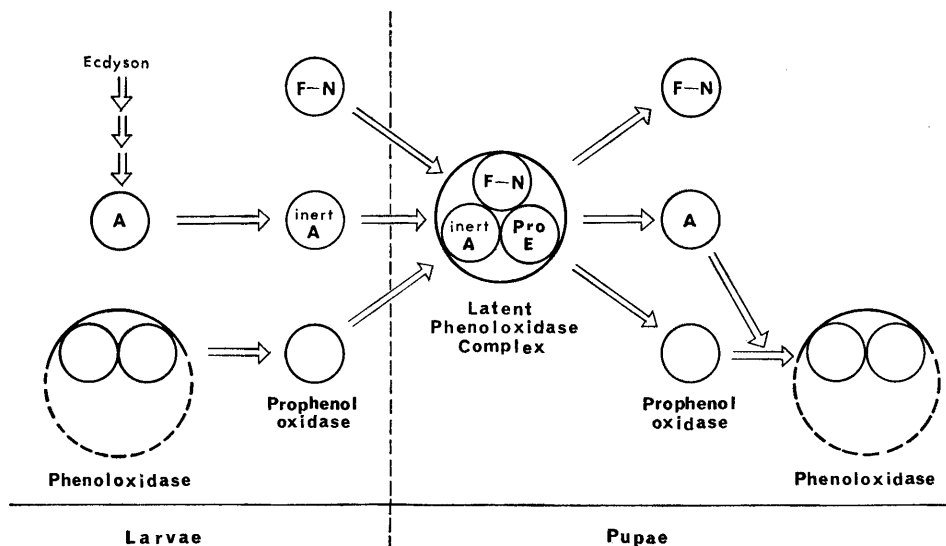


Fig. 22. A tentative scheme of the mode of activation and inactivation of phenoloxidase in the process of metamorphosis from larvae to pupae of housefly.

後記 この研究を行なうにあたり、家バエ試料を提供していただいた近藤化学株式会社、大串兎治博士に深甚の謝意を表します。また蔗糖密度勾配沈降分析の便宜を与えられた九州大学医学部遠藤英也教授および電子顕微鏡写真撮影の便宜を与えられた九州大学農学部日高醇教授ならびに長尾記明氏に深甚の謝意を表します。

文 献

- Aerts, F. E. and R. E. Vercauteren 1964 Specificity and mode of action of phenoloxidase from larvae of *Tenebrio molitor*. *Enzymol.*, 28, 1.
- Allen, T. H. and J. H. Bodine 1940 Enzymes in ontogenesis (Orthoptera). XIII Activation of protyrosinase and the oxidation of ascorbic acid. *J. Gen. Physiol.*, 24, 99.
- Allen, T. H. and J. H. Bodine 1941 Enzymes in ontogenesis. XVI Activation of protyrosinase by sodium alkyl sulfates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 27, 269.
- Allen, T. H., A. B. Otis and J. H. Bodine 1943 The pH stability of protyrosinase and tyrosinase. *J. Gen. physiol.*, 26, 151.
- Bodine, J. H. and E. J. Boell 1935 Enzymes in ontogenesis (Orthoptera) I. Tyrosinase. *J. Cellular Comp. Physiol.*, 6, 263.
- Bodine, J. H., T. H. Allen and E. J. Boell 1937 Enzymes in ontogenesis (Orthoptera) III. Activation of naturally occurring enzymes (tyrosinase). *Proc. soc. Exptl. Biol. Med.*, 37, 450.
- Bodine, J. H. and T. H. Allen 1938 Enzymes in ontogenesis (Orthoptera). V. Further studies on the activation of the enzyme, tyrosinase. *J. Cellular comp. Physiol.*, 12, 71.
- Bodine, J. H. and L. D. Carlson 1941 Enzymes in ontogenesis (Orthoptera) XIV. The action of proteins on certain activators of protyrosinase. *J. Gen. Physiol.*, 24, 423.
- Funatsu, M. and T. Inaba 1962 Studies on tyrosinase in the housefly. Part I. Prottyrosinase in the pupae of housefly and its activation. *Agr. Biol. Chem.*, 26, 536.
- 船津勝・林勝哉・稲葉喬・波平元辰・刈屋雅雄 1965 家蠅蛹の Prophenoloxidase とその活性化に関する研究, 第17回酵素化学シンポジウム予講集, p 218.
- Funatsu, M., T. Inaba, G. Namihira and M. Kariya 1966 Latent phenoloxidase system in the prepupae of housefly and its significance in metabolic control. Seminar on Metabolic Control under The Japan-United States Cooperative Science Program. p. 44.
- Funatsu, M., K. Hayashi, T. Inaba, G. Namihira and M. Kariya 1967a The nature of latent phenoloxidase in the prepupae of housefly. 7th Intern. Congr Biochem. Abst. Vol. V. p. 845.
- Funatsu, M., K. Hayashi and G. Namihira 1967b The protein components of a latent phenoloxidase system in the prepupae of housefly. *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1379.
- Grafius, M. A. and D. B. Millar 1967 Reversible aggregation of acetylcholinesterase. II. Interdependence of pH and ionic strength. *Biochem.*, 6, 1034.
- Heyneman, R. A. and R. E. Vercauteren 1964 Activation of the latent phenoloxidase of *Tenebrio molitor*. *Enzymol.* 28, 85.
- Horowitz, N. H. and M. Flin 1955 Autocatalytic production of tyrosinase in extracts of *Drosophila melanogaster*. Symposium on Amino Acid Metabolism (ed. W. D. Mc Elroy, B. Gloss) p. 207, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- Inaba, T., Y. Suetake and M. Funatsu 1963 Studies on tyrosinase in the housefly. Part II. Activation of protyrosinase by sodium dodecyl sulfate. *Agr. Biol. Chem.*, 27, 332.
- Inaba, T. and M. Funatsu 1964 Studies on tyrosinase in the housefly. Part III. Activation of protyrosinase by natural activator. *Agr. Biol. Chem.*, 28, 206.
- 稲葉 喬 1964 家蠅蛹の Prottyrosinase の活性化に関する研究, 九州大学農学部生物化学論文第4号
- Jenny, E., A. Hicklin and F. Leuthardt 1961 Microsomal tyrosinase from pupae of *Drosophila melanogaster*. *Helv. chim. Acta*, 44, 1395.
- 刈屋雅雄 1969 家蠅蛹 Prophenoloxidase の活性化因子に関する生物化学的研究, 九州大学農学部生物化学論文第13号.
- Karlson, P. and H. Schmid 1955 Über die Tyrosinase der *Calliphora* Larven. *Z. physiol. Chem.*, 300, 35.
- Karlson, P. and D. Bückmann 1956 Experimentelle Auslösung der Umfärbung bei *Cerura*-Raupen durch Prothorakaldrüsenhormon. *Naturwissenschaften*, 43, 44.
- Karlson, P. 1958 Zur Chemie und Wirkungswiese der Insektenhormone. IV International Congress of Biochemistry, Symp. XII. *Biochem. of Insect*, Pergamon Press, New York, p. 37.
- Karlson, P. and H. Lieben 1961 Reindarstellung, Kristallisation und Substrat-specificität der o-Diphenoloxydase aus *Calliphora erythrocephala*. *Z. physiol. Chem.*, 326, 135.

- Karlson, P. 1961 Biochemische Wirkungsweise der Hormone. Dtsch. med. Wschr., 86, 668.
- Karlson, P. and A. Schweiger 1961 Das Phenoloxidase-System von *Calliphora* und seine Beeinflussung durch das hormon Ecdyson. Z. physiol. Chem., 323, 199.
- Karlson, P. 1963 Chemistry and biochemistry of insect hormone. Angew. Chem., intern. Ed., 2, 175.
- 波平元辰 1968 家蠅前蛹中に存在する Latent Phenoloxidase に関する研究, 九州大学農学部生物化学論文第12号.
- Ohnishi, E. 1953 Tyrosinase activity during puparium formation in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Zool., 11, 69.
- Ohnishi, E. 1954 Activation of tyrosinase in *Drosophila virilis*. Annot. Zool. Japan, 27, 188.
- Ohnishi, E. 1958 Tyrosinase activation in the pupae of the housefly. Jap. J. Zool., 12, 179.
- Ohnishi, E. 1959 Studies on the mechanism of tyrosinase activation in the housefly, *Musca vicina* Macq. J. Insect Physiol., 3, 219.
- 山浦泉・波平元辰・石黒正恒・林勝哉・船津勝 1971 家蠅幼虫フェノールオキシダーゼと前蛹プロフェノールオキシダーゼの粒子量について, 日本農芸化学会昭和46年度大会要旨集, p. 228.

Summary

In the process of metamorphosis of the housefly, *Musca domestica vicina* Macquart, phenoloxidase undergoes a sharp fluctuation as shown in Fig. 1. The high activity observed at the final stage of larval development disappears completely in the prepupae. However, a homogenate of prepupae, which exhibits no phenoloxidase activity, displays enzyme activity on the addition of either an anionic detergent or an extract of aged pupae as can be seen in Figs. 1 and 2. It was inferred from these facts that phenoloxidase survived as a latent enzyme in the prepupae and that its activator was contained in the aged pupae. Although there was a difficulty in the separation of the prepupae from the aged pupae, we were successful in this separation by putting them into water. The prepupae sank to the bottom, while the others floated on the surface of the water.

The mode of activation of latent phenoloxidase from prepupae by SDS was studied in detail. As shown in Figs. 3 and 4, there was a certain range of ratios between the concentration of SDS and that of latent phenoloxidase which is effective for the activation. It was observed that a narrow pH range between 7 and 8 was effective for the activation as seen in Fig. 5. The Fig. 6 shows the thermal stability of latent phenoloxidase and temperature dependence of the activation with SDS. Thus, effective activation evidently occurs only with the specific experimental conditions mentioned above.

An activator of protein nature was partially purified from the aged pupae. Effects of concentration of activator, pH, and temperature on the activation of latent phenoloxidase were studied. The results obtained are shown in Figs. 7-11. From these results it was presumed that the activation occurs catalytically. Inhibition of the activation by various chemical reagents were studied and the results were shown in Table 2.

The activation of the latent phenoloxidase was also brought about by dialyzing it against water or buffer solution of low salt concentration below 0.1 M at pH 6 to 7 as seen in Fig. 12. The decrease in salt concentration could affect either ionic strength or osmotic pressure of the solution. The lowering of osmotic pressure would cause the destruction of a granule to which phenoloxidase is bound, hence the liberation of the enzyme. Thus, dialysis of the latent phenoloxidase solution was carried out against 0.01 M phosphate buffer of pH 6.0 containing 0.5 to 1.0 M sugar. Despite of maintaining the osmotic pressure of the solution, activation was brought about in all cases. From this it was inferred that the activation occurred independently on the osmotic pressure and dependently upon the ionic strength of the solution. It was also presumed that the latent form of phenoloxidase is not a bound form but an inactive form of soluble protein.

Depending upon the salt concentration of the solution, phenoloxidase fluctuated reversibly from active to inactive form. At a high concentration of 0.2 M phenoloxidase became inactive again. It seems reasonable to conclude that the limited proteolysis which plays an important role in zymogen activation can be excluded from the mechanism of the activation of latent phenoloxidase. The decrease in ionic strength of solution would lead to a conformational change of latent phenoloxidase protein or affect the interaction between protein molecules.

As to the effects of various chelating reagents on the activation of latent phenoloxidase by dialysis, EDTA was found to inhibit the activation completely as seen in Table 3.

In order to elucidate the common mechanism involved in three different processes mentioned above, attempts were made of the purification of latent phenoloxidase. Scheme 1 shows the partial purification procedure of latent phenoloxidase from prepupae. By 0.4 saturation of the latent phenoloxidase N solution with ammonium sulfate, a rather labile latent phenoloxidase A was precipitated leaving a factor in the supernatant, which can inhibit the activation of latent phenoloxidase by its activator, presumably by stabilizing it. The inhibitory effect of this factor, which was tentatively referred to as factor N, was lost on heating above 60°C as can be seen in Fig. 13. Factor N was non-dialyzable and assumed to be a protein. Although latent phenoloxidase A was fairly unstable, it was in an inactive state in 0.2 M phosphate buffer at pH 6.0 unless any activating agent was present. This means that latent phenoloxidase A solution does not contain free activator. In addition, the latent phenoloxidase A exhibited only a single peak in its gel filtration pattern on Sephadex G-50. However, two peaks were observed after dialysis against water as shown in Fig. 14. Phenoloxidase produced was found in F-2, while F-1 exhibited no apparent phenoloxidase activity but was found to accelerate the rate of activation of latent phenoloxidase A by activator remarkably as can be seen in Fig. 15. In addition, it was found as shown in Fig. 16 that the activation was fulfilled by F-1. Thus, it is believed that an activator exists in the latent phenoloxidase system but in an inactive form. This inactive form of activator was designated as an inert activator. Consequently, it appears that three types of protein; prophenoloxidase, a precursor of phenoloxidase, inert activator, and factor N, participate in the organization of latent (dormant) phenoloxidase system in the prepupae of housefly. As for the activation of latent phenoloxidase by dialysis against water, it is possible to conclude that the inert activator is activated by dialysis, hence the mechanism of activation by dialysis is the same as that by activator.

As can be seen in Table 4, the activation of inert activator was inhibited by EDTA, whereas prophenoloxidase was not affected. This suggests the important role of the activator which was produced from its inert form by dialysis. The inhibitory action of EDTA, however, was excluded by precipitation with 30-40 % saturation of ammonium sulfate, followed by dialysis against water. The precipitation with 100 % saturation, however, was not effective in excluding the inhibitory action of EDTA.

In order to clarify whether three types of proteins which participate in the organization of the latent phenoloxidase system exist in a form of complex or not, attempts were made to purify the latent phenoloxidase system in the presence of EDTA by the procedure shown in Scheme 2. A fraction D'-4 obtained was not activated by dialysis and moved as a single band in disc electrophoresis performed in the presence of EDTA as seen in Fig. 17. However, the sample moved as three bands in disc electrophoresis either in the presence or absence of EDTA after the treatment with ammonium sulfate, followed by dialysis as mentioned above. Consequently, it was presumed that three protein components exist as a complex in the prepupae. The complex was referred to

as latent or dormant phenoloxidase complex. This complex was stable only in a limited pH-range near pH 6 as shown in Fig. 18.

The mechanism of activation of latent phenoloxidase complex is now still obscure in connection with protein structure. However, there was a possibility that the formation of a certain quaternary structure or subunit structure might be involved in the process of activation. Phenoloxidase was purified from the larvae of housefly by the procedure described in Scheme 3 as an electrophoretically homogeneous protein. Fig. 19 is an electron micrograph of the purified phenoloxidase. Evidently, phenoloxidase has a subunit structure and a large molecular weight.

In sucrose density gradient sedimentation analyses of crude preparations of latent phenoloxidase and phenoloxidase, the latter was sedimented faster than the former as can be seen in Fig. 20. Gel filtrations of partially purified latent phenoloxidase and phenoloxidase preparations through Sephadex G-200 were carried out resulting in an assumption that the molecular weight of the latter was greater than that of the former judging from Fig. 21.

The activator was purified from the aged pupae by the method described in Scheme 4 and obtained as an electrophoretically and ultracentrifugally homogeneous protein. The specific activity of the preparation was 2,000 times as high as that of the crude extract. The molecular weight was assumed to be about 16,000 from the sedimentation coefficient of 2.06 S. The isoelectric point of this protein was determined to be 4.7. The amino acid composition of the activator is shown in Table 6. Neither sulfhydryl group nor disulfide linkage was contained in this protein. In this connection, the conformation of activator was highly sensitive to the salt concentration in solution and actually it became inactive at concentrations higher than 0.5 M of acetate buffer. The activator lost its activity completely by EDTA. The reactivation was accomplished by either precipitation with 40 % saturation of ammonium sulfate and subsequent dialysis against water or the addition of metal ion of two valence cited in Table 6. From these facts it was inferred that the activator is not regarded as a metal protein and that negatively charged carboxyl groups of EDTA interact with positively charged groups inside the activator molecule resulting in the conformational change or the restriction of conformational change.

Notwithstanding the examination in various experimental conditions shown in Table 7, neither proteolytic nor esterase activities of the activator was detected.

From the evidence mentioned above, a hypothesis on the mode of activation and inactivation of phenoloxidase in the process of metamorphosis from larvae to pupae was presented as shown in Fig. 22. In this hypothesis it was postulated that changes in subunit structure cause the fluctuation of the activity of phenoloxidase.

It is already known that a metamorphosis hormone, ecdyson, is secreted increasingly at the final stage of larval development, resulting in the acceleration of the synthesis of an activator of prophenoloxidase. From this fact, and those reported here, it is possible to postulate that the activator formed changes in an inactive form at the end of the larval stage and combine with prophenoloxidase forming an enzymatically inactive complex which is stabilized by binding to factor N. Such a latent phenoloxidase complex might be passed along to prepupae and stored as a source of phenoloxidase at the initial step of the metamorphosis of the insect. If this is correct, the possibility exists that such a latent enzyme complex can participate in the regulation of the enzyme activity of living organisms.