

熟蚕中腸膜画分における p29 を含むタンパク質複合体の変化

上野由宣¹⁾・岡田太郎²⁾・伴野 豊¹⁾・山本幸治¹⁾・麻生陽一¹⁾

¹⁾九州大学大学院農学研究院, ²⁾フェニックスバイオ

(2008年12月3日受付; 2009年3月5日受理)

Changes in p29-containing protein complexes in midgut-membrane fraction of mature larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

YOSHINORI UENO, TARO OKADA, YUTAKA BANNO, KOHJI YAMAMOTO and YOICHI ASO

Upon metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*, CI-8 chymotrypsin inhibitor is taken into midgut. CI-8 interacts with p29 protein in midgut membrane; structure of p29 is highly similar to that of 19G1 protein. In the present study, proteins interacting with each other in midgut membrane fraction from mature larvae were trapped by chemical crosslink reaction using glutaraldehyde and detected by western blotting using anti-19G1 antibody. The addition of CI-8 to the fraction was suggested to facilitate the complex formation of p29 with a variety of other proteins including CI-8. Besides such complexes, the addition of hemolymph to the fraction was newly found to yield the complex having a molecular size of about 240 kDa.

Key words : *Bombyx mori*, CI-8, Hemolymph, Midgut membrane, Chemical cross-linking

緒 言

カイコは完全変態昆虫であり、幼虫から蛹を経て成虫となる。この蛹を中心とする変態期に幼虫組織は成虫組織へと再編される。すなわち、幼虫に存在しない組織は新たに作られ、成虫型となるべき組織は改造され、成虫には不要な組織は消化される。この再編に必要な素材は外界から遮断された体内で調達される。そこで、変態期には生体物質の分解と合成が精緻な制御下に同時に進行する必要がある。変態期における反応とその制御は、古くから生命活動のメカニズムを解き明かす格好のモデル系と認識され、多くの報告がなされて来た。しかしながら、対象とする系が複雑であり、比較的短時間に変化するので、その詳細については未だに不明な点が多く残されている。

カイコの体液には種々のプロテアーゼインヒビターがある (SHINOHARA et al., 1993; FUJII et al., 1996)。これらプロテアーゼインヒビターの生理的意義については、まだ、十分な情報が蓄積されていないが、それぞれが異なった役割を果たしているものと考えられている (Aso et al., 1994; He et al., 2004)。それらの1つがキモトリプシンインヒビターCI-8である。CI-8は分子サイズ42 kDaで、糖鎖を含むポリペプチドから成り、プロテアーゼに対してセルピン型の阻害様式を示す (SHIRAI et al., 2000)。CI-8は変態期中腸や脂肪体へ取り込まれる (SHIRAI, 1997; SHIRAI et al., 1997; SHIRAI et al., 2000)。この時期、中腸の細胞膜にはCI-8と結合し得る2つのタンパク質 p29 (分子サイズ29 kDa) 及び p60 (分子サイズ60 kDa) が存在し、これらがCI-8のレセプターであることが示唆された (UENO et al., 2006)。また、N-末端アミノ酸配列分析、ペプチドマス

フィンガープリンティング分析、および免疫化学的分析の結果から、p29は19G1-30Kタンパク質と構造的にきわめて類似していることが示された (UENO et al., 2006)。さらに、熟蚕中腸のミクロソーム中には p29 のパラログと見られるタンパク質 p27 が存在することも分かった (未発表)。これらの結果に基づいて、我々は、CI-8 と他のタンパク質との相互作用が単純ではなく、複数のタンパク質と複雑な相互作用をしているものと推測した。そこで、この点を明らかにするために、本研究では熟蚕中腸の膜画分にCI-8を添加し、その際に生じるタンパク質複合体を化学架橋で固定化し、抗19G1抗体を用いて網羅的に調べた。

材料と方法

リン酸緩衝液は0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.5) を用いた。トリス緩衝液は1.0 M トリス塩酸塩 (pH 8.0) を用いた。SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は、還元剤非存在下、LAEMMLI (1970) の方法で行った。カイコ (*Bombyx mori*) は九州大学遺伝子資源開発研究センターの c60 系統を桑葉で飼育したものをを用いた。ウエスタンブロッティングは既報の方法で行った (UENO et al., 2006)。抗19G1抗体、CI-8、体液タンパク質、および熟蚕中腸の細胞膜画分は既報の方法で調製した (UENO et al., 2006)。細胞膜画分 (タンパク濃度: 60 mg/ml) をリン酸緩衝液にけん濁したものを対照区とし、新たに、CI区: 膜画分+CI-8 (40 ng)、および体液区: 膜画分+体液タンパク質 (30 µg) を作製した。各区 (8 µl) に等容の0.002% グルタルアルデヒド溶液を加え、37 °C で10分間インキュベートした。トリス緩衝液を加え反応を止めた後、SDS-PAGE

¹⁾ 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
TEL: 092-621-4991, FAX: 092-624-1011
連絡先: yaso@agr.kyushu-u.ac.jp

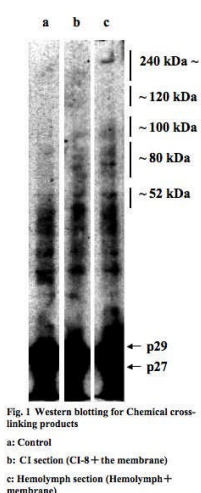
に供し、抗 19G1 抗体を用いたウェスタンブロット法で分析した。検出時間は1時間とした。

結 果

対照区, CI 区及び体液区のグルタルアルデヒドとの反応液をウェスタンブロット法により分析し, その結果を Fig. 1 に示した。

対照区では, p27 および p29 に相当するサイズから 52 kDa までのサイズのポリペプチドが抗 19G1 抗体で検出された。CI 区においては, 対照区と同様のポリペプチドのみならず, より分子サイズが大きい, 80~120 kDa のポリペプチドが検出された。体液区では, CI 区と同様のポリペプチドが検出されたが, 加えて約 240 kDa のポリペプチドも検出された。

CI 区および体液区, いずれも, 52 kDa のポリペプチドは対照区のそれよりも濃いバンドとして検出された。



考 察

一般に, タンパク質は膜上のレセプターによって認識され, 組織内へ取り込まれる (BURMESTER and SCHELLER, 1996, 1999)。熟蚕中腸の膜画分にある p29 および p60 は, CI-8 のレセプターであることが示唆されている (UENO et al., 2006)。しかしながら, CI-8 はこれらに結合するのみならず, p27 を含めて他のタンパク質とも結合する (未発表)。

対照区で得られた結果は, 中腸膜画分中で 19G1 (p29) と接近した位置にあるタンパク質, すなわち 19G1 と相互作用しているタンパク質が複数存在することを示唆している。CI-8 と p29 との分子サイズの和は, 71 kDa である。そこで, CI-8 の添加により, 新たに 80~120 kDa のポリペプチドが検

出されたことは, CI-8 と 19G1 と他のタンパク質との 3 者以上の規模の複合体が形成される可能性, および, CI-8 が 19G1 と他のタンパク質とのより大規模な複合体形成を促進している可能性が考えられる。本研究では CI-8 を直接検出していないので, どちらの可能性が高いかを判断できない。なお, 免疫的に抗原決定部位を同じくする複数の異なるタンパク質の存在も否定できない。

以前, 我々は, CI-8 が p29 と p60 とに, それぞれ独立に会合すること明らかにした (UENO et al., 2006)。これは CI-8 を含む 3 者複合体が形成し得ることを示している。この複合体の分子サイズは約 130 kDa であり, 架橋産物にはこの分子サイズに近い 120 kDa ポリペプチドが検出されている。このことは, CI-8 添加がこの 3 者複合体形成を熟蚕中腸膜画分で引き起こしている可能性を示している。

タンパク質複合体の形成は体液区でも検出された。これは CI-8 が体液に含まれているためと考えられる。体液区において特徴的なことは, 分子サイズ約 240 kDa のポリペプチドが新たに検出されたことである。生体内において中腸細胞膜に作用するのは精製された単独の CI-8 ではなく, 体液であると考えるので, この体液添加によって生じるタンパク質複合体の構造と生理的役割には大きな興味を持たれる。今後, 複合体の構造及び生理的役割を解明するために, 検出された架橋産物を構成するポリペプチドの分析が必要である。

摘 要

熟蚕中腸膜画分において, 互いに相互作用しているタンパク質を抗 19G1 抗体で検出した。その結果, CI-8 添加が 19G1 を含むタンパク質複合体の形成を誘導することが分かった。また, 体液添加のみによって検出される新たな複合体を見出した。

文 献

- ASO, Y., YAMASHITA, T., MENO, K., and MURAKAMI, M. (1994) Inhibition of prophenoloxidase-activating enzyme from *Bombyx mori* by endogenous chymotrypsin inhibitors. *J. Mol. Biol. Int.*, **33**, 751-758.
- BURMESTER, T. and SCHELLER, K. (1996) Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J. Mol. Evol.*, **42**, 713-728.
- BURMESTER, T. and SCHELLER, K. (1999) Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften*, **86**, 468-474.
- FUJII, H., ARATAKE, H., DOIRA, H., and KOGA, K. (1996) Genetic analysis of chymotrypsin inhibitors in the hemolymph of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**, 334-341.
- HE, N., ASO, Y., FUJII, H., BANNO, Y., and YAMAMOTO, K.

- (2004) *In vivo* and *in vitro* interactions of the *Bombyx mori* chymotrypsin inhibitor b1 with *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 835-840.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- SHIRAI, K. (1997) Doctoral thesis of Kyushu University.
- SHIRAI, K., FUJII, H., DOIRA, H. and IWAMOTO, H. (2000) Synthesis and resorption of a humoral chymotrypsin inhibitor, CI-8, by fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **30**, 363-368.
- SHIRAI, K., FUJII, H. and DOIRA, H. (1997) Purification and characterization of chymotrypsin inhibitor with an oligosaccharide chain from the hemolymph of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **66**, 253-260.
- SHINOHARA, T., ASO, Y., SHIRAI, K., FUJII, H., and FUNATSU, G. (1993) Purification of chymotrypsin inhibitors from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1067-1071.
- UENO, Y., HE, N., UJITA, M., YAMAMOTO, K., BANNO, Y., FUJII, H., and ASO, Y. (2006) Silkworm midgut proteins interacting with a hemolymph protease inhibitor, CI-8. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1557- 1563.