

家蚕幼虫体液の熱凝集タンパク質

倉掛麻衣子¹⁾・Hossain MD. Tofazzal¹⁾・西 愛子²⁾・手柴智史¹⁾・
伴野 豊²⁾・山本幸治²⁾・麻生陽一²⁾.*

¹⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ²⁾九州大学大学院農学研究院

(2009年12月3日受付; 2010年1月14日受理)

Thermally aggregating protein from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*

MAIKO KURAKAKE, MD. TOFAZZAL HOSSAIN, AIKO NISHI, SATOSHI TESHIBA, YUTAKA BANNO, KOHJI YAMAMOTO and YOICHI ASO

Extract of larval hemolymph from the silkworm, *Bombyx mori* was searched for target proteins of silkworm small heat shock protein overproduced by *Escherichia coli* cells. Assaying temperature-induced aggregation followed by precipitation, a protein was purified using size-exclusion chromatography and hydrophobic-interaction chromatography in this order. This protein was exclusively precipitated at high temperature and identified to be the SP1 female-specific storage protein by N-terminal amino acid sequence analysis. Thermal aggregation of SP1 was clearly dependent on temperature and its protein amount. A sHSP20.8 silkworm small heat shock protein suppressed the thermal aggregation of SP1 with 1:32 (sHSP20.8:SP1) molar ratio at least.

Key words : *Bombyx mori*, Small heat shock protein, Hemolymph, Storage protein, Larva

結 言

生物は発生から死に至るまで大小様々なストレスを受けている。そこで、生物は一定範囲のストレスを日常的に処理することにより恒常性を保っている。各種ストレスに対応する生化学的メカニズムを明らかにすることは、生命活動の仕組みを解明する上で大きな課題である。熱ショックはストレスの1種であり、環境温度の急激な上昇に対応してスモール熱ショックタンパク質 (small heat shock protein: sHSP と略記) 遺伝子の翻訳量が增大する。一般に sHSP は熱変性タンパク質の不溶化を防ぐものと考えられている。一方、sHSP は1種類ではなく、その数は生物によって異なる。また、sHSP は熱を含む広範囲な生命現象に関わっていることも報告されている (NAKAMOTO and VIGH, 2007)。

家蚕には少なくとも6種の sHSP がある (SAKANO et al., 2006)。このうち、sHSP20.8 及び sHSP19.9 については大腸菌による大量生産系が構築され、これらの性質が比較された (Aso et al., 2007)。しかし、これら sHSP が生体内で対象にしているタンパク質は不明である。また、家蚕タンパク質の熱変性に際して、どのように作用するかも不明である。著者らは最近、家蚕幼虫の体液タンパク質をゲル排除クロマトグラフィー (SEC) で分画し、特異的に熱凝集する画分を見出した。この熱凝集は sHSP20.8 を添加することにより、ほぼ完全に抑制された。これら予備実験の結果に基づいて、本研究では、第1に体液中の熱凝集物質を精製・同定すること、第2に、その性質、特に sHSP の熱凝集に及ぼす効果を調べることを目的とした。

材料と方法

特に断らない限り、緩衝液には 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.7) を用いた。家蚕 (*Bombyx mori*) 幼虫は九州大学遺伝子資源開発研究センター保存のいくつかの系統を桑葉で飼育したものを用いた。幼虫 (5 齢 4 日) の下肢を針で傷つけ、ごく少量の体液を液体窒素で冷却したガラス容器に直接採取・凍結乾燥した。得られた凍結乾燥試料を精製直前まで -30 °C で保存した。sHSP19.9 及び sHSP20.8 は遺伝子を組み込んだ大腸菌で大量生産したものをを用いた (Aso et al., 2007)。

SEC にはセファクリル S-300 (GE Healthcare) カラム (2.3×74 cm) を用い、分画容量は 2 ml とした。疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) は TSKgel Ether-5PW カラム (TOSOH) を装着した ÄKTA システム (GE Healthcare) を用い、分画容量は 1 ml とした。熱凝集は 60 °C における散乱光の変化を簡便法で測定した。すなわち、同温度でインキュベートした試料溶液を、励起波長 360 nm に設定した蛍光光度計 (Shimadzu RF-5000 spectrofluorometer) にて、360 nm の散乱光を連続的に測定した。SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は 10% 分離ゲルを用い、LAEMMLI (1970) の方法に従って行った。N 末端アミノ酸配列は PPSQ-31A プロテインシーケンサー (Shimadzu) で分析した。熱凝集タンパク質の単離・アミノ酸配列分析、及び SDS-PAGE 分析には、HIC で得られたフラクション番号 19 の画分を用いた。

熱凝集タンパク質は次の方法で精製した。凍結乾燥した体液を緩衝液に再懸濁し、固形硫酸を加

* 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel: 092-621-4991, Fax: 092-624-1011
E-mail: yaso@agr.kyushu-u.ac.jp

えて 70%飽和とした。遠心して得た沈殿を緩衝液で再溶解し、SEC によって分画した。熱凝集が検出された画分を集め、固形硫酸を加え、硫酸濃度 2 M として HIC に供した。溶出は、硫酸濃度を直線的グラジエントで 0 M に下げることで行った。

280 nm における分子吸光係数の値は、いずれもアミノ酸組成から計算で求めたものを用いた (PACE et al., 1995)。すなわち、SP1 の分子吸光係数は $104,260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、sHSP19.9 の分子吸光係数は $19,940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、及び sHSP20.8 の分子吸光係数は $22,585 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。

結 果

熱凝集タンパク質の精製

体液タンパク質を SEC で分離した (Fig. 1)。フラクション番号 110~125 付近に高い熱凝集が検出された。このフラクションは、280 nm における紫外吸収のピークとは大きく遅れた位置にあった。次に、フラクション番号 110~119 を集め、HIC でさらに精製した (Fig. 2)。その結果、フラクション

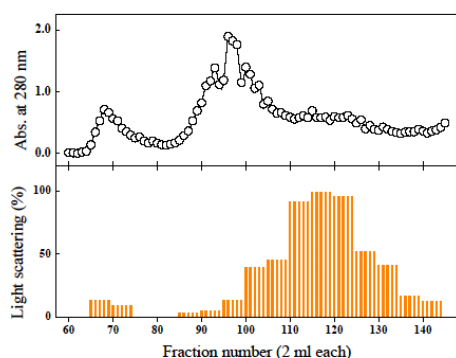


Fig. 1. Elution profile of SEC on Sephacryl S-300 column. Upper panel: absorbance at 280 nm. Lower panel: relative intensity of light scattering at 360 nm.

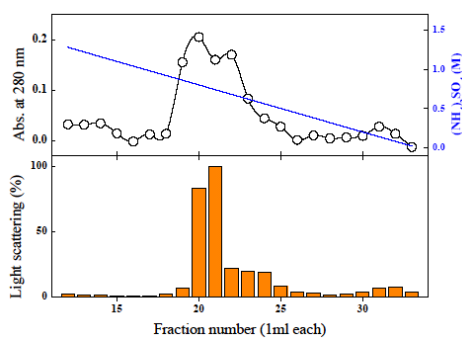


Fig. 2. Elution profile of HIC on TSKgel Ether-5PW column. Upper panel: absorbance at 280 nm. Lower panel: relative intensity of light scattering at 360 nm. The line in the upper panel indicates the linear concentration gradient of ammonium sulfate.

番号 20 及び 21 にほとんどの熱凝集活性が見られた。フラクション番号 21 の画分を熱凝集タンパク質の精製標品とした。幼虫 20 頭から 0.13 mg のタンパク質が得られた。精製標品の純度を SDS-PAGE で調べた結果、ほぼ単一のポリペプチドが含まれていることが分かった (Fig. 3)。

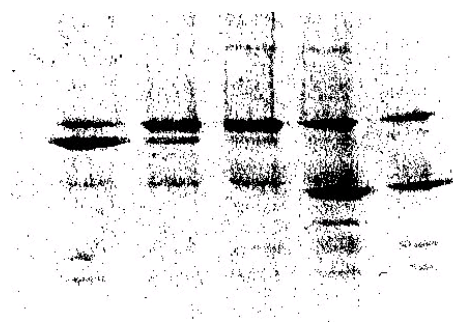


Fig. 3. SDS-PAGE profiles of proteins fractionated by HIC. Lanes from left to right correspond to the HIC fractions No. 19, 20, 21, 22, and 23, respectively.

熱凝集タンパク質の同定

HIC で得られた画分を 60°C でインキュベートし、沈殿と上澄みとを分離した。これらを SDS-PAGE で分析したところ、精製標品のポリペプチドのみが沈殿することが分かった (Fig. 4)。沈殿を 60°C の緩衝液で数回洗浄した後、酢酸で可溶化したものを N 末端アミノ酸配列分析に供した。その結果、N 末端 16 残基までの配列を決定することができた。この配列を NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で検索した結果、雌特異的貯蔵タンパク質 SP1 (GenBank: CAA31417.1) の配列と 100%一致した (Fig. 5)。

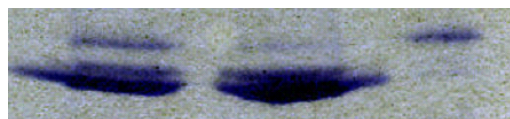


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of fractionated by HIC. Samples from the fraction No.19 of HIC were incubated at 60°C for 30 min and subjected to SDS-PAGE analysis. Lanes from right to left correspond to precipitate and supernatant after the incubation, and the HIC fraction without incubation, respectively.

1 5 6 10 11 15 16
SAISG GYGTM VFTKE P

Fig. 5. N-terminal amino acid sequence of thermally aggregating protein.

SP1の性質

精製した SP1 について、種々の温度で 30 分間インキュベートし、熱凝集を調べた (Table 1)。50 °C から 60 °C の間で凝集の度合いが大きくなった。次に、sHSP19.9 及び sHSP20.8 が熱凝集反応に及ぼす影響を、60 °C、30 分間のインキュベーション条件で調べた。sHSP19.9 は部分的に熱凝集を抑制した (データ未掲載)。sHSP20.8 はきわめて少量で熱凝集をほぼ抑制した (Table 2)。

Table 1. Aggregation of SP1 after incubation for 30 min at listed temperatures.

Temperature (°C)	Relative intensity of light scattering (%)
30	0.85
35	0.00
40	0.48
45	0.20
50	1.7
55	24
60	100

Table 2. Suppression of aggregation of SP1 at 60 °C by sHSP20.8.

Molar ratio (sHSP2.8)	Relative intensity of light scattering (%)
0.00	100
0.0625	20.1
0.125	19.1
0.250	15.8
0.500	6.25

考 察

家蚕幼虫体液から特異的に熱凝集するタンパク質を精製したところ、これが SP1 と同定された。SP1 は藤條らにより初めて報告された雌特異的な貯蔵タンパク質である (Tojo et al., 1978; Tojo et al., 1980)。SP1 は、他の昆虫にも広く存在する 6 量体のヘキサメリン・ファミリーに属する (BURMESTER, 1999)。藤條らは、SP1 と他の貯蔵タンパク質 SP2 との熱安定性の違いを調べ、これが両タンパク質の分別精製に利用できることを示した (Tojo et al., 1978)。我々は、10 mM HEPES (pH 7.7) という条件で SP1 は熱凝集することを見出した。また、温度依存性についても調べ、熱凝集が飛躍的に高まる温度が 60 °C であることを明らかにした。しかしながら、この熱凝集反応の詳細については、さらに調べる必要がある。60 °C は、幼虫の生育にとってきわめて不都合な温度と考えられるが、この凝集反応の生理的意義については、今のところ不明である。

sHSP は SP1 の熱凝集を抑制した。sHSP19.9 が部分的にしか熱凝集を抑制しない理由は、低イオン強度では sHSP19.9 が自己凝集するためだと考えら

れる (HOSSAIN et al., 2009)。sHSP20.8 は、SP1 の熱 1/32 のモル濃度で、その熱凝集を効果的に抑制した。このことは、sHSP20.8 の作用が化学量論的というよりは、むしろ、触媒的なものであることを示唆している。牛血清カタラーゼの熱凝集は、sHSP20.8 と可溶性の複合体を形成することで、すなわち化学量論的に抑制される (HOSSAIN et al., 2009)。この違いが、sHSP が自己と非自己とを識別しているためだとすれば、きわめて興味深い。

摘 要

家蚕幼虫体液より、特異的に熱凝集するタンパク質を SEC および HIC で精製した。N 末端アミノ酸配列分析の結果、このタンパク質は雌特異的な貯蔵タンパク質 SP1 と同定された。触媒量の家蚕 sHSP が SP1 の熱凝集を効率的に抑制した。

謝 辞

N 末端アミノ酸分析を行った九州大学大学院農学研究科生物化学研究室の木村 誠教授並びに中島 崇助教に感謝申し上げます。本研究の一部は日本応用酵素協会からの助成金によって行われた。家蚕試料の調製にあたってはナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) カイコの援助を受けた。

文 献

- ASO, Y., TESHIBA, S., SAKANO, D., and YUICHI, S. (2007) Comparison between assembly structures of sHSP20.8 and sHSP19.9 small heat shock proteins. *Entomotech*, **31**, 5-9.
- BURMESTER, T. (1999) Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur. J. Entomol.*, **96**, 213-225.
- HOSSAIN, MD. T., TESHIBA, S., SHIGEOKA, Y., UEDA, T., FUJISAWA, T., and ASO, Y. (2009) Silk worm small heat shock proteins: sHSP20.8 and sHSP19.9. Preceding of the 9th Annual Meeting of the Protein Society of Japan, Kumamoto, Japan.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- NAKAMOTO, H. and VIGH, L. (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 294-306.
- PACE, C. N., VAJDOS, F., FEE, L., GRIMSLEY, G., and GRAY, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, **4**, 2411-2423.
- SAKANO, D., LI, B., XIA, Q., YAMAMOTO, K., BANNO, Y., FUJII, H., and ASO, Y. (2006) Genes encoding small heat shock proteins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Biosci. Biotechnol. Biochem., **70**, 2443-2450.

TOJO, S., NAGATA, M. and KOBAYASHI, M. (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **10**, 289-303.

TOJO, S., BETCHAKU, T., ZICCARDI, V. J., and WYATT, G. R. (1978) Fat body granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J. Cell Biol.*, **78**, 823-838.