

体液キモトリプシンインヒビターCI-8の熟蚕中腸への結合におけるp29及びp60の役割

上野由宣*・伴野 豊・麻生陽一

九州大学大学院農学研究院

(2009年12月22日受付; 2010年2月2日受理)

Role of p29 and p60 in binding of a hemolymph chymotrypsin inhibitor, CI-8 on membrane of matured larva midgut during metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*

YOSHINORI UENO, YUTAKA BANNO and YOICHI ASO

Upon metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*, CI-8 a chymotrypsin inhibitor is taken into midgut. p29 and p60 in the midgut membrane are involved in the uptake as interacting factors with CI-8. Structure of p29 is highly similar to that of 19G1 protein. Two interacting factors interact with CI-8 independently. In the present study, the relative binding activity of CI-8 on the midgut membrane was further measured by Far Western assay to investigate involvement of p29 and p60. When membrane protein is large amount, binding is partially neutralized even with high dose of anti-19G1 antibody. On the other hand, when small amount of the proteins was used, the relative binding activities with and without the antibody was almost similar, indicating that no effect of the antibody was obvious. This data suggested that binding to p29 and p60 with CI-8 was dose-dependent and in the small amount of membrane proteins, p60 was a major interacting factor.

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

結 言

カイコは完全変態昆虫であり、幼虫から成虫への変化、すなわち変態は蛹期に行われる。この期間、幼虫期に役割を果たす絹糸腺は消失し (TERASHIMA et al., 2000)、消化器官は幼虫型から成虫型へ再編される (WAKU and SUMIMOTO, 1971)。また、成虫期のみ機能する組織は原基として幼虫期に存在し、変態期に増殖分化すると考えられている。これらの組織の消失、再編及び新生は、内分泌系や栄養の観点から精密に制御されると予想されるが、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。

また、変態期には体液の量や質が大きく変化する。詳細な解明は未だ行われていないが、これは体液が変態に何らかの影響を与え、また与えられていることを示している (BANNO et al., 1993)。

この時期のカイコの体液には種々のプロテアーゼインヒビターが存在している (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役割については、まだ十分な情報が蓄積されていない。しかし、低分子のインヒビターであるクニツツ型のインヒビターには、生体防御に関係していると考えられているものがある (Aso et al., 1994; HE et al., 2004)。高分子型のインヒビターで特によく調べられているものとして、キモトリプシンインヒビターCI-8がある。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活性を示す (SHIRAI et al., 1997; 2000)。

さらに変態期にCI-8は体液で減少後、中腸及び脂肪体で急速に増加する。また、免疫組織染色の結果、脂肪体を用いた取込み実験から、CI-8は変態期に体液から中腸及び脂肪体に取り込まれると考えられている (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末端ペプチド解析等一連のタンパク質解析の結果、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)。

中腸細胞膜は直接ファーウエスタン法で分析するとCI-8結合活性を示す。抗19G1抗体をこの分析に含めると結合活性が減少する。これは、抗体がp29と結合するために、p29にCI-8が結合できないためと考えられる。また、ある細胞膜量では抗体量が多くなり結合量が減少すると予想されても、全結合量の40~50%が減少しない。CI-8の細胞膜への結合にはp60も関与することから、この結合はp60の結合によるものと考えられる。さらに、この細胞膜量では結合量が抗19G1抗体の存在量に関わらず一定である。これは、最小濃度の抗体によりすべてのp29がCI-8と結合できなくなる一方、p60のみが結合に関わっていることを示している。このことは本来、CI-8はp29とp60に別個すなわち独立に結合することを示唆している

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

(UENO et al., 2006)。しかしながら、細胞膜量をより多くし、また少なくして、細胞膜への CI-8 の結合を調べることを未だ詳細に検討していない。

本研究では、熟蚕中腸の膜画分の結合量を直接ファウエスタン法でさらに分析し、p29 と p60 と CI-8 の相互作用を調べ、これらのタンパク質の CI-8 の変態期中腸への取り込みへの寄与を考察した。

材料と方法

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用いた。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)。CI-8 のファウエスタン法は既報の方法で行った (UENO et al., 2006)。細胞膜画分 (タンパク濃度: 60 mg/ml) 15, 7.5, 3.8 μ g をニトロセルロース膜に滴下し、風乾させ、これをファウエスタン法に用いた。まず TBSC-T 緩衝液 (20 mM Tris-Cl, pH7.6, 137 mM NaCl, 8 mM CaCl₂, 0.1% Tween 20) に室温で 1 時間浸漬した。その後ファウエスタン法を行い、X 線フィルムに CI-8 結合活性を検出した。以上の検出を抗体非添加区とした。

p29 と抗 19G1 抗体との反応は、膜タンパク質のニトロセルロース膜への滴下、風乾、TBSC-T 緩衝液に浸漬後行った。余剰の抗体は TBSC-T 緩衝液で洗浄除去した。抗体の希釈率は、10,000, 2,000, 1,000 倍とした。この処理区を抗体区とした。後の検出は抗体非添加区と同様とした。

抗体非添加区、抗体区ともに同時に X 線フィルムに CI-8 結合活性を検出した。検出量はデンシトメトリーで測定した。結合活性は細胞膜タンパク量 7.5 μ g の抗体非添加区の結合量を 100、X 線フィルムに何も検出していない部分を 0 とし、相対的に表した。

結 果

熟蚕中腸細胞膜タンパク質量が 7.5 μ g の時の膜の CI-8 結合活性を 100 とし、15 と 3.8 μ g の膜タンパク質量の CI-8 結合活性を相対的に測定した。7.5 μ g の時の CI-8 結合活性は、UENO et al. (2006) に示しているように、抗体非添加区の活性を 100 とすると、抗体区はいずれの希釈率でも同様の値 (40~50) を示した。15 μ g の膜タンパク質量の場合、抗体非添加区と希釈率 10,000 の抗体区の結合は 120 の結合量を示した。抗体量が多くなると結合活性が 100 から 70 へ減少した (Fig. 1)。3.8 μ g の膜タンパク質量の場合、結合活性は抗体非添加区及び抗体区で 30 の値を示し、抗体の影響は大きく減少した。

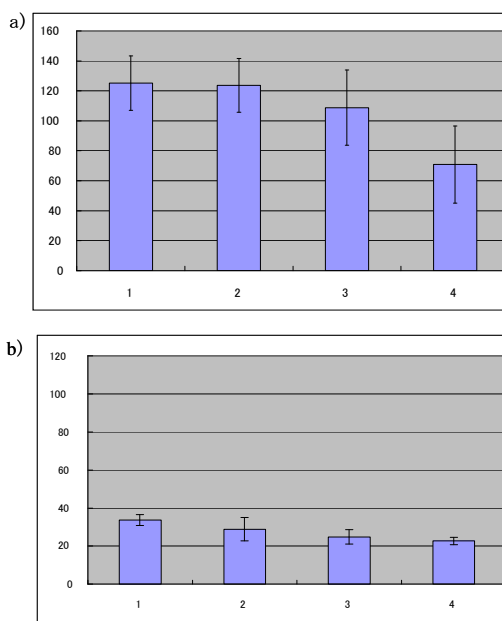


Fig. 1. Relative binding activity of CI-8 to the different dose midgut membrane.

Protein amount : a) 15 μ g, b) 3.8 μ g
 1: Without antibody
 2: Antibody addition (dilution power is 10,000)
 3: Antibody addition (dilution power is 2,000)
 4: Antibody addition (dilution power is 1,000)

考 察

リガンドとなる液性の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)。CI-8 とこの 2 つのタンパク質の相互作用を分析したところ、ある一定の濃度の p29 および p60 が存在すると、CI-8 と共に 3 者複合体を形成することが示唆された (UENO et al., 2006)。しかし、他の濃度での三者の関係は明らかではない。そこで、他の濃度における三者の関係を調べた。

15 μ g ぐらいの豊富な細胞膜タンパク質が存在すると、細胞膜は十分な CI-8 結合活性を認め、また抗 19G1 抗体の存在量に応じて結合が減少した。これは、CI-8 が膜上の 19G1 と相互作用していることを示している。

3.8 μ g の細胞膜タンパク質量になると、細胞膜の CI-8 結合活性は抗体非添加区と抗体区との差が見られなくなり、抗体の効果が無くなった。これは、この細胞膜量において抗体が妨害することができる p29 と CI-8 の結合が大幅に消失していることを示している。したがって、この量の細胞膜タンパ

ク質量では, CI-8 とレセプターの結合において p60 が重要になることを示唆している。

細胞膜量の相違による p29, p60 及び CI-8 との関係の生理学的意味を考えてみる。CI-8 は 5 齢期の塾蚕期にかけて体液中の存在量が増す (SHIRAI et al., 2000)。まず, 体液中の CI-8 が少量の場合, p60 が主要なレセプターとして中腸細胞膜に CI-8 を捕捉すると考えられる。さらに CI-8 量が増すと p29 と共に三者複合体を形成し, 中腸細胞膜に CI-8 を安定的に捕捉し, 細胞内への取り込みに備えるものと推察される。今後は一定の細胞膜量に CI-8 量を変化させる結合実験等を行い, これらのタンパク質の関係をさらに明らかにする必要がある。

摘 要

異なる量の塾蚕中腸膜画分の CI-8 結合活性を測定した。その結果, 細胞膜量に応じて抗 19G1 抗体に対する反応性が異なることが分かった。このことから, CI-8 のレセプターと考えられる p29 および p60 の役割を考察した。

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.
- BANNO, Y., TOCHIHARA, S., KAWAGUCHI, Y. and DOIRA, H. (1993) Homolymph proteins during larval development of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **62**, 187-194.
- 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.
- 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.
- TERASHIMA, J., YASHUHARA, N., IWAI, M. and SAKURAI, S. (2000) Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Genes. Evol.*, **210**, 545-558.
- 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.
- WAKU, Y. and SUMIMOTO, K. (1971) Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium deposits in the cytoplasm. I. Light microscopy. *Tissue Cell*, **3**, 127-136.