カイコ卵黄タンパク質とその分解調節機構

山 本 芳 実・高 橋 進*

1. はじめに

胚発生の際に、胚に養分を供給する仕方に2つ考えられている。1) “Catering” strategy: 胚が成熟するまで母体内にとどまって、養分を母体が供給する型。哺乳動物がこの型を利用する。2) “Box-lunch” strategy: 母親が卵に栄養物を詰め込む型。いわゆる卵生生物にみられるもので無脊椎動物および哺乳動物以外の脊椎動物がこの型を利用する。従って、地球上に存在するほとんどの種が、後者を採用していることになる。約2億年前に哺乳類が誕生する時、この2)→1)への進化は極めて大きかったと思われる。卵黄物質の解析は、この際の飛躍的進化機構の解明に手掛かりを与えるかも知れない。多くの場合、これら栄養物質は卵黄顆粒(yolk granule)または卵黄胞(yolk sphere)の中に貯蔵され、その主なものは卵黄タンパクである¹⁾⁻⁵⁾。卵黄タンパクは、その主な用途として、発生中の胚へアミノ酸源を供することにあると考えられるが⁶⁾、最近、形態形成を始め、特殊な発生現象への関与も示唆されるようになった⁷⁾。いずれにしても、そのアミノ酸への分解は、必ずしも非特異的、一律に行なわれるわけではなく、いくつかの規則正しい限定分解を経て行なわれる。このように、その分解過程は、厳密な発生プログラムの調節下におかれていると思われる⁸⁾。このような観点で、最近、ウニ、昆虫を始め、いくつかの生物で、卵黄タンパクの分解調節機構の研究が盛んになりつつある⁹⁾⁻¹³⁾。卵黄タンパクの分解に於ては、タンパク分解酵素(プロテアーゼ)が中心的な役割を果たしているが、ここでは、カイコ卵(*Bombyx mori*)のプロテアーゼを中心に、その胚発生における活性調節機構について、最近の我々の成果を含めて述べてみたい。

2. カイコ卵における卵黄タンパク質

カイコ卵の抽出物をSDS-PAGEで分析すると、3種類の主要な卵黄タンパクが認められる(図3参照)。すなわち、Vn, ESP, 30K-プロテインである^{14), 15)}。これらタンパク質のホルモンによる生合成の調節、分泌、卵細胞への取り込みのメカニズム、翻訳後の修飾、卵黄顆粒へのパッケージング機構など、いずれも極めて興味深い主題であるが、本稿の主題ではないので、他誌を参照されたい。

1) Vn(Vitellin) カイコVnは、雌蛹の脂肪体中でVg(vitellogenin)として合成された後、発生中の卵細胞に取り込まれ、最終的には、卵黄顆粒(yolk granule)または卵黄胞(yolk sphere)に組み込まれる。この過程、あるいは取り込まれた後、その物理化学的な性質(溶解度、等電点)が多少変化して、Vn(vitellin)と呼ばれるようになる。両タンパクはいずれも分子量440Kであり、SDS-PAGEでは、180Kの重鎖(H chain)と42Kの軽鎖(L chain)の2つのバンドが検出される。その構造は、H₂L₂の4量体で、7%の脂質、マンノースを含む糖鎖をもつリボ糖タンパク質である。最近、矢野らにより、VgのcDNAがクローニングされ、その塩基配列と推定アミノ酸一次配列が報告された。これによると、分子量220K以上の一次翻訳産物からH、Lの両鎖が生成されることが推定されているが、ホルモンによる遺伝子発現調節に関しては、不明な点が多い。Vgは雌脂肪体中で合成された後、糖鎖の付加、脂質の結合、リン酸化による修飾等を受けた後、体液中に放出され、卵巣に取り込まれる¹⁶⁾。この過程の詳細は未だよく解明されていない。とりわけVg-受容体に関する報告は極めて限定されている。この点で興味ある突然変異体が報告されている。Sm突然変異(small egg mutant)と呼ばれる突然変異体がそれで、この変異体では、Vgは合成されている

*Yoshimi Yamamoto & Susumu Y. Takahashi, 山口大学教養部生物学教室(〒753 山口市大字吉田1677-1)

が卵巣に取り込まれない。Vg の受容体への取り込み機構を解析するには有効な系であろう。卵細胞に取り込まれた Vn は、胚発生の始まりと共に、初めに部分分解を受けて断片化され、最終的に、ほぼ完全に分解されていく。この過程に関与するタンパク分解酵素に関してこの稿で後に詳しく述べるが、同時に、特筆すべきこととして、Vn は胚発生が始まるとすぐに、リン酸化による化学修飾を再度受けることをあげておきたい¹⁶⁾。

2) 30K-タンパク質(30K-protein) 5 令幼虫および蛹の体液の SDS-PAGE を行なうと、分子量 30K の前後に、一群のタンパク質群が検出される。このタンパクは雄にも存在し、発生卵中においてその減少があまり顕著でないことなどから、必ずしも、卵黄タンパク質と言えるかどうか、疑問であるが、卵巣中に多量に蓄積されている。このタンパクの生理機能は未だ不明であるが、主要な 4 種の成分に関しては、幼虫の体液から精製されており、それぞれ、よく似たアミノ酸組成を示すことが解かっている。いずれもアスパラギン酸/アスパラギン、グルタミン酸/グルタミンに富み、システインとメチオニンは少ない。このタンパク質の正確な種類数は不明であるが、2 次元電気泳動によれば、15 種類前後のタンパクバンドが検出される。5 令幼虫の中期に雌雄ともに合成を開始し、蛹期の前期にその体液中で最大量に到達する。その後、雌においては、卵巣に取り込まれる。その生合成は幼若ホルモン(JH)、脱皮ホルモン(エクジソン)双方による複雑な調節を受けている¹⁴⁾。

3) ESP(Egg specific protein) Vn とは異なり、濾胞細胞(follicle cell)で合成され、卵巣中に蓄積される卵黄タンパク質が、ある種の鱗翅類昆虫に見いだされている。これらはそれぞれ、Paravitellogenin¹⁷⁾(*Hyalophora cecropia*), Yolk polypeptides^{18), 19)}(*Plodia interpunctella*), ESP²⁰⁾(*Bombyx mori*)と命名されている。カイコにおいては、山下等により²⁰⁾⁻²²⁾, ESP(Egg Specific Protein)と命名されたタンパク質が精製され、その性質がよく調べられている。それによると、本タンパクは、分子量 225K のリン酸化糖リポタンパク質(phosphoglycolipoprotein)で、SDS-PAGE 上、分子量 72K を示すサブユニット 2 つと、分子量 64K のサブユニット 1 つからなる 3 量体である。ESP を含む 3 つの卵黄タンパク質の卵中における存在比は、モル比で Vn : 30K : ESP = 1 : 1 : 1 である

ことが解かっている。最近、ESP 遺伝子の全構造が明らかにされた。それによると、このタンパク質が、哺乳動物のリパーゼ(Human gastrin lipase, Rat lingual lipase)に類似性をもつことが示された。とりわけ、哺乳動物のリパーゼファミリーにおいて高い保存性を示す脂質結合部位に高い相同性をもっていることが解かった。この中のセリン残基は、脂質分解活性に関与するよりもむしろ、基質との結合に関与すると考えられている。これらの点から考えて、ESP は、脂質の運搬体(lipid carrier)としての機能を果たしているのではないかと考えられているが²³⁾、現在までのところ、はっきりした証拠はない。同様なことはショウジョウバエのいくつかの卵黄タンパク質においてもみられ、これらも哺乳動物リパーゼの脂質結合部位に高い相同性を示し、脂質運搬体の役割が提唱されている^{24), 25)}。ESP も Vn 同様、糖鎖の付加、リン酸化による修飾を受ける^{22), 26), 27)}。

以上、カイコの卵黄タンパク質に関して、おおまかな説明を試みてきたが、これらのタンパク質の性質、その遺伝子構造など極めて詳しく調べられている。また、これらのタンパク質が、発生のプログラムに従って、正確かつ厳密な分解調節を受けていることも明らかである^{24), 28), 29)}。この過程に細胞内タンパク分解酵素が主要な役割を果たしていることはもちろんであるが、この点で重要な指摘を一つしてみたい。これまで多くのタンパク分解酵素が精製され、酵素学的知見も極めて多い。しかしながら、多くの場合、生体内での実際の基質が特定されていないか、又は、その解析が困難である場合が多い。この点で、カイコを始め、昆虫の胚発生のシステムは、その基質である卵黄タンパクの解析がすすんでいることから、非常によいシステムと考えられる。すなわち、発生のプログラムの解析という問題と共に、*in vivo* におけるタンパク分解酵素の調節機構についての解析に極めてよいモデルを提供していると思われる。

3. 卵黄タンパク質の分解に関与するタンパク分解酵素

プロテアーゼはその活性基から 4 種に分類される。すなわち、1) セリンプロテアーゼ(serine protease); 2) システインプロテアーゼ(cysteine protease); 3) アスパラギン酸プロテアーゼ(aspartate protease); 4) メタロプロテアーゼ(metallo protease)である。現在までに、カイコ

表1 PROTEASES IN ARTHROPOD EGGS

Kuk-Meiri <i>et al.</i>	1966	Cathepsin-like	<i>Locusta</i>
MacGregor, D.A. & Loughton, B.G.	1977	-	<i>Locusta</i>
Bownes, M. & Hames, B.G.	1977	-	<i>Drosophila</i>
Garesse, R. <i>et al.</i>	1980	Trypsin-like	<i>Artemia</i>
Kageyama, T. <i>et al.</i>	1981	Cathepsin-like	<i>Bombyx</i>
Perona, R. & Vallejo, C.G.	1982	Cathepsin-like	<i>Artemia</i>
Storella, J.R. <i>et al.</i>	1985	-	<i>Periplaneta</i>
Ezquita, B. & Vallejo, C.G.	1985	Trypsin-like	<i>Artemia</i>
Warner, A.H. & Shridher, V.	1985	Cathepsin-like	<i>Artemia</i>
Indrasith, L.S. <i>et al.</i>	1988	Trypsin-like	<i>Bombyx</i>
Medina, M. <i>et al.</i>	1988	Cathepsin-like	<i>Drosophila</i>
Indrasith, L.S. <i>et al.</i>	1988	Trypsin-like	<i>Bombyx</i>
Masetti, M. & Giorgi, F.	1989	-	<i>Carausius</i>
Ikeda, M. <i>et al.</i>	1990	Trypsin-like	<i>Bombyx</i>
Kageyama, T. & Takahashi, S.Y.	1990	Cathepsin-like	<i>Bombyx</i>
Fagotto, F.	1990	Cathepsin-like	<i>Ornithodoros</i>
Ikeda, M. <i>et al.</i>	1991	Trypsin-like	<i>Bombyx</i>
Cho, W.-L. <i>et al.</i>	1991	Carboxypeptidase	<i>Aedes</i>
Takahashi, S.Y. <i>et al.</i>	1992	Cathepsin-like	<i>Bombyx</i>

を初め昆虫類や甲殻類において、精製、性質の記載のあるものの多くは、この中で、セリンとシステインプロテアーゼであり、以下、これらの酵素に関して述べてみたい。トリプシンやキモトリプシンを代表とするセリンプロテアーゼ群は、活性中心にセリン、ヒスチジンをもち特徴とし、その活性機構に関しては、既に、詳細な報告がなされている。一方、活性中心にシステイン、ヒスチジンをもちことにより分類されるシステインプロテアーゼ群に関しても、最近、その研究は急速に進歩した。代表的なリソゾーム性プロテアーゼであるカテプシン類(B, H, L)はいずれもこの群に分類される。リソゾームは、細胞内消化器官とされ、これらリソゾーム性プロテアーゼは細胞内タンパク質の分解に主要な役割を果たしていると考えられている。近年、これらプロテアーゼが、いわゆる消化酵素としての役割だけでなく、種々の生理機能、すなわち、翻訳後プロセッシング、受精と発生、変態、各種プロテアーゼ依存性病態異常等に関与していることは、ますます明らかになりつつある^{30), 31)}。

表1は、卵黄タンパク質の分解に関与するタンパク分解酵素のうち、節足動物において、現在までに発表されたものをまとめたものである³²⁾。このうち、

カイコ卵に関しては、4種類(1種類のシステインプロテアーゼと3種類のセリンプロテアーゼ)が報告されている。

1) システインプロテアーゼ³²⁾⁻³⁸⁾ この酵素は、初期発生における卵黄タンパク質の分解過程において、主要なタンパク分解酵素として関与していると考えられる。我々のグループは、最近、カイコ蛹の成熟卵から、本酵素を均一な標品にまで精製することに成功した。表2に、その精製標品のいくつかの性質をまとめた³²⁾。成熟卵100gから、5段階の精製ステップにより、2-3mgの精製標品を得ることが出来る。このことは、本酵素が卵巣内に比較的多量に存在することを予想するものであるが、後に示すように、その量は、最大1卵巣あたり、30μgに達する。精製酵素はSDS-ゲル電気泳動で47Kの単一バンドを示し、ゲル通過での分子量が350Kであることから、分子量47Kのタンパク質をサブユニットとするホモポリマーであると思われる。この精製酵素は不活性化型であり、その活性化機構に関しては、後に述べる。本酵素はヘモグロビン、カゼインをはじめ、各種タンパク質に対して、分解活性をもつが、同時に、カイコ卵の卵黄タンパク質、特に、VnとESPに対して非常に強い基質特異性をもつ。これ


```

          1                               25
          |                               |
Papain    IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGSCGSCWAFSAVVTTIEGIIKIRTGNLNEY-
          ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Egg CP    LPEQVDWRKHGAVTDIKDQGKCGSCWSFSTTGALLEGQHFRQSGYL-VSL
          * ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Cathepsin L IPKTVDWREKGCVTPVKNQGQCGSCWAFSASGCLEGQMFLKTGKL-ISL

50                               75                               100
|                               |                               |
SEQELLDCDRRSY--GCNGGYPWSALQLV-AQYGIHYRNTYPYEGVQRYCRSREGPYAAKT-D
*** * ** * ***** * ** * ** * ** * ** * ** *
SEQNLIDCSEQYGNNGCNGGLMDNAFKYIKDNGGIDTEQAYPYEGVDDKCRYNPKNTGAEDVG
***** ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
SEQNLVDCSHDQGNQGCNGGLMDFAFQYIKENGGLDSEESYPYEAADGSCKYRAEYAVANDTG

          125                               150                               175
          |                               |                               |
GVRQV--QPYNEGALLYSIAN-QPVSVVLEAAGKDFQLYRGGIFVG-P-CG--NKVDHAVAAG
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
FVD-IP--EGDEQKLMEAVATVGPVSVAIDASHTHFQLYSSGVYN-EEEC-SSTDLDHGVLV
*** ** * ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** *
FVD-IP-Q--QEKALMKPVATVGPISVAMDASHPSLQFYSSGIYY-EPNC-SSKDLDHGVLV

GYGPN
***
GYGTDEQ
***
GYGYE-GT

```

図1 カイコ卵システインプロテアーゼのアミノ酸配列—パパイン、カテプシンLとの比較

に従って、卵黄顆粒に蓄積されるが、本酵素も時期を相前後して、卵黄顆粒に蓄積されるものと思われる。次に問題になるのは、この酵素の合成部位である。本酵素は、卵巣の他に、血液中と脂肪体に見いだされ、酵素学的、免疫化学的に類似のものであると思われる。卵黄顆粒に蓄積するタンパク質の生合成に関して、主として、次の2つの可能性が考えられている。その1つは、Vnに関してよく調べられていることであるが、脂肪体で合成され、血液を介して卵細胞に取り込まれる方法である。他の1つは、ESPにおいてみられるように、卵細胞をとりまく濾胞細胞(follicle cell)において合成され、卵細胞に取り込まれるとされるものである。免疫組織化学により得られた像は、抗ESP抗体を用いて

同様な実験を行って得た像とよく似ている。一方、抗Vn抗体を用いた実験ははっきり異なる像を与えた。すなわち、抗Vn抗体では、濾胞細胞内に特異的染色は見られない一方、濾胞細胞間に、血液を介した取り込みを示唆する強い染色をみいだされた。これらの事実は、本酵素が、卵巣中で、特に、濾胞細胞中で、積極的に合成されていることを強く示唆するものである。事実我々は、翻訳活性のあるmRNAを成熟中の卵巣から得ている。また、最近、単離された濾胞細胞において、本酵素の合成を確認することが出来た。

精製標品を、この酵素の最適pHに近い酸性条件(pH3.5-5.0)におくと、数分後に、活性が上昇するのが観察される。このことは、この条件で活性化が

図2 カイコ卵システインプロテアーゼの局在性 A ; 3日目, B ; 6日目。fc ; 濾胞細胞, oc ; 卵細胞, nc ; ナース細胞, yg, 卵黄顆粒。

起こっていることを示唆するものであるが、SDS-ゲル電気泳動で、この過程を追うと、精製標品に存在していた分子量47Kの酵素型は、pH 3, 6の条件下で4分以内に消失し、新たに、分子量39Kの酵素型が現れることが分かった³⁸⁾。この過程は、システインプロテアーゼの特異的阻害剤であるE-64で完全に阻止されることから、いわゆる自己触媒的な活性化が起こるものと考えられる。このようにこの酵素は不活性型として成熟卵の卵黄顆粒に蓄積されているが、発生中の卵においても、卵黄タンパク質の分解開始と関連して、この様な活性化型への転換が起こっているのであろうか。特異抗体を用いて、発生中の卵における本酵素の分子型変化を調べてみると、休眠卵、未受精卵においては不活性型(47K)として存在し、2-3日目胚から活性化型(39K)が現

われ始め、6日目以降すべての酵素が活性型に転換していることが解かった。この時期は、VnやESPの分解開始時期と良く一致している。このように本酵素は、卵黄タンパクの分解開始の調節機構において、主要な役割を果たしているものと思われる。

2) ESP-プロテアーゼ⁴²⁾ 卵黄タンパクの中、ESPに非常に特異性の高いプロテアーゼが、カイコ卵から精製されている。この酵素は、人工基質のアルギニン又はリジン基のカルボニル末端を切断し、ジソプロピルフルオロリン酸(DFP)、フェニルメタンスルフォニルフルオライト、ロイペプチン等で阻害されることから、セリンプロテアーゼの一種、トリプシン様プロテアーゼとみなされている。精製酵素の分子量は30,500を示し、29,000のサブユニットからなっている。この酵素は、ESPが基質のとき、2ステップで3つのフラグメントに分解することが分かっている。このことは、ESPの分解において、この酵素がまず、2点でニックを入れることを示唆しており、その後の分解は、前述のシステインプロテアーゼの様な、より特異性の低い酵素により行なわれると思われる。この酵素の酵素活性は、胚発生の初期には非常に低く、4日目胚から徐々に現われ始め、8日目胚で最高値に達し、その後、孵化(10日目)を過ぎると、徐々に減少を始める。mRNAの研究から、この発生に伴う活性の増加は、酵素タンパク質の合成によるものであることが示されている。ESPの分解は、他の二つの卵黄タンパク質、Vn, 30Kプロテインの分解とは異なるパターンを示し、本酵素の活性出現の時期と、その分解開始の時期はよく一致している。これらの事実は、このユニークな酵素がESPの分解調節において、鍵となる役割を果たしていることを強く示唆している。

3) Vn特異的プロテアーゼ(Vn-プロテアーゼ)^{43), 44)} 2種類のVnを分解するプロテアーゼがカイコ卵より精製されている。分子量は、それぞれ、34,000と24,000を示し、それぞれ、アルファ、ベータ-Vn-プロテアーゼと命名された。阻害実験、基質特異性から、本酵素もまた、セリンプロテアーゼ群に属することが解かった。さらに、これらの酵素のcDNAが得られており、それから得られたアミノ酸一次配列から、いわゆるトリプシン様プロテアーゼであることが解かった。両酵素は、Km値、最適pH、免疫化学的性質において、区別がつかない。一方、ノーザンブロットでは、約1.3kbのmRNAバンドのみを示し、これは、翻訳システム

では、32K のポリペプチドを与えた。この一次翻訳産物は、上記 2 種類の成熟プロテアーゼにプロセスされることが解かっており、すなわち、両酵素とも、同一遺伝子の産物である。両酵素の機能的違いに関しては、未だ不明な部分も多いが、両酵素とも、Vn と ESP を小さなペプチドに効果的に限定分解する活性をもつ。30K プロテインはいずれの酵素に対しても、良い基質ではないらしい。両酵素活性とも、胚発生の初期には存在せず、7-8 日目胚に突然現われ、8-9 日目胚において最大値を示した後、孵化直前には、減少を始める。この出現の時期は Vn の最終的、また最大の分解の起こる時期と一致し、本酵素がこの分解過程に寄与していることを十分予想させる。さらに、この活性出現の直前に、この酵素の mRNA の合成が始まることも解かっている。このように、Vn プロテアーゼは、前述の ESP プロテアーゼと同様、転写レベルで調節を受けていると考えることができる。

4. プロテアーゼ活性の調節機構

胚発生における卵黄タンパクの分解は、時間的、空間的に厳密な制御下におかれていると考えられる。細胞内タンパク質分解の調節機構に関しては、現在まで、多くの報告がなされているが、ここでは、カイコ卵を中心に、卵黄タンパク質の分解調節機構に関して、現在までに報告されている、いくつかの例をあげてみたい。

1) プロテアーゼの新たな合成 ESP-プロテアーゼと 2 種の Vn-プロテアーゼがこの例である。これら特異的プロテアーゼは、それぞれ、胚発生の特定の、それが必要とされる時期に発現する。既に述べたように、これらはいずれもセリルトリプシン様プロテアーゼであり、特定な時期にその mRNA が発現し、酵素タンパク質の合成が引き起こされる。すなわち、調節は転写レベルでおこなわれていると考えられる。

2) プロテアーゼの活性化 酵素的に不活性な前駆体として存在し、選択的なタンパク分解を受けることにより、活性型に転換するプロテアーゼの例が多く知られている。また、多くの場合、この転換こそがその生理的調節機構の中心をなしているといえる。既に述べたように、カイコ卵システインプロテアーゼは、不活性な前駆体として存在し、胚発生の開始と共に活性型への転換を始める。重要なことは、*in vitro* では、この活性化は酸性条件(pH3.6-5.0)

で引き起こされるということである。それでは、胚発生の開始と共に、酵素は酸性条件にさらされるようになるのであろうか。この点に関して、ダニ卵において興味ある報告がなされている^{45), 46)}。ダニ卵においては、卵黄顆粒に存在するカテプシン L 様プロテアーゼが卵黄タンパクの分解に関与していると考えられるが、この酵素もまた不活性な前駆体として存在し、酸性条件で活性型へ転換する。彼らはまた、発生開始と共に卵黄顆粒が酸性化することを、特殊な色素をつかって示し、同時にこの顆粒中で、酵素の前駆体から活性型への転換が起こることを示唆している。興味深いことに、ウニ卵においても最近、電子顕微鏡レベルでこの卵黄顆粒の酸性化が確かめられ、さらに、プロトン勾配を乱す試薬として知られているクロロキニンが、卵黄タンパクの分解を阻害することも報告されている⁴⁷⁾。これは、卵黄顆粒の酸性化にリソゾームにみられるようなプロトンポンプの関与を示唆するものである。これらの結果の意味することは、卵黄顆粒の酸性化が、酵素の活性化の引き金になっているということである。酸性細胞内小器官として考えられるものは、リソゾームであるが、卵黄顆粒中に存在する酵素はいずれもリソゾーム性酵素であり、初期発生卵に於けるリソゾーム及び、卵黄顆粒とリソゾームの関係を考えるうえにも非常に興味深い。カイコ卵において、卵黄顆粒の pH 変化を測定することが待たれる。

3) 阻害因子(Inhibitor)と活性化因子(Activator) 細胞内プロテアーゼの活性調節に、内因性の阻害因子(Inhibitor)や活性化因子(Activator)が関与している場合がよく知られている。この場合、プロテアーゼそのものの動態よりも、これらの因子の濃度、動態が主要な調節因子になっていると考えることが出来る。近年、種々のペプチド性阻害因子が昆虫組織から発見されている⁴⁸⁾⁻⁵¹⁾。これらはいずれも、トリプシンやキモトリプシンを用いて、その阻害活性を指標にして精製されているが、生体内で実際に働いているプロテアーゼの活性調節という点では、未だにはっきりしたデータは乏しいと思われ、今後の研究が待たれる。現在までのところ、昆虫組織から、活性化因子を見いだしたという報告はない。昆虫ではないが、アルテミア胚のセリルトリプシン様プロテアーゼに関して、興味深い報告がなされている^{52), 53)}。この酵素は卵細胞中で合成され、卵黄顆粒内に蓄積されるが、この状態では、Vn の脂質複合体であるリポビテリンと結合することにより、不活

性な型で存在していると言われている。ノープリウス幼生の出現時に、突然高い酵素活性が検出されるのは、このリポビテリンからの分離が引き金になり、酵素の活性化と細胞質内への移動が起こると考えられている。このようにリポビテリンは酵素の活性部位を覆ってしまうわけで、その分離が酵素の活性化を引き起こしている訳である。

4) 酵素と基質の空間的局在性 プロテアーゼとその基質タンパク質が空間的に共存することが、酵素活性の発現に必要なことは言うまでもない。細胞内では、リソゾームの様な、特殊な細胞内小器官に局在しているプロテアーゼの存在は、良く知られている。例えば、カテプシンの様なプロテアーゼはこのリソゾームに局在し、その酵素活性の発現は、リソゾームに運び込まれた基質タンパク質にのみ働くと考えられている。これらの酵素は、リソゾームという特殊な環境条件(酸性条件等)に極めてよく適応しており、これはまた、細胞質中に漏れた酵素による細胞内タンパク質の非特異的分解を防ぐという意味からも、重要である。カイコ卵システインプロテアーゼにみられるように、卵黄顆粒内に酵素とその基質である卵黄タンパクが共存していることは、この点からも重要である。卵黄顆粒の不均一性を示唆する報告もあり、全ての卵黄顆粒は一樣なものなのか、又は、酵素と卵黄タンパクの分布に不均一性が存在するかどうか、極めて興味深い問題であり、今後の展開を待ちたい。

5) ビテリンのリン酸化による調節 カイコ卵、蛹に於ては、極めて高いレベルの環状グアニル酸(cGMP)依存性プロテインキナーゼ(G-キナーゼ)が存在することは良く知られたことであり⁵⁴⁾、我々は、その精製にも成功している。VnはこのG-キナーゼのよい基質であり、精製酵素により、モル当たり2モルのリン酸基が付加されることが解かっている。さらに、発生中の卵に、放射性のリン酸を微量注入することにより、発生開始後2時間以内に、Vnが極めて効率的にリン酸化されていることが解かった。この時間は、G-キナーゼの出現時期と良く一致し、発生の初期に於て、この酵素により、Vnのリン酸化をともなうプロセッシングが起こっていることが解かる。では、このVnのリン酸化は、いかなる生理的意義をもっているのだろうか。我々は、その糸口の一つを、システインプロテアーゼにみいだした⁵⁵⁾。既に述べたように、Vnはこのプロテアーゼのよい基質であるが、酸性条件(例えば

pH3.5)でないと、その分解はほとんど引き起こされない。試験管内では、pH3.5で本酵素の活性化が起こることを既に説明した。次に、我々は、リン酸化されたVnではどうか調べてみた。興味深いことに、一度リン酸化されたVnは、本酵素のよい基質になり、pH5.0(この条件では通常ほとんど分解がみられない)の条件で、積極的に分解されることが分かった。リン酸化が酵素そのものに影響を与えているとは考えにくく、事実、Vnに対するKm値を減少させていることが分かっている(1.25 μ Mから0.5 μ Mに)。このように、G-キナーゼによるVnのリン酸化がきっかけとなって、以後のタンパク分解の開始を引き起こしていることも十分考えられる。酵素の活性化とは独立に、基質レベルにおいても調節を受けているわけで、複雑な調節機構の存在を示唆している。

5. おわりに

この10年来、昆虫をはじめ、多くの節足動物の卵におけるプロテアーゼに関する理解が急速に進んだ。種々のプロテアーゼが、様々な調節機構で、卵黄タンパクの分解に関与していることが解明されてきた。この稿では、主として、カイコ卵を中心にこの問題を論じてきた。カイコ卵においては、3種のセリルトリプシン様プロテアーゼと1種のシステインプロテアーゼに関して述べてきたが、これらの酵素と卵黄タンパクの分解過程とのかかわりを図3にまとめてみた³²⁾。未受精卵、休眠卵に存在する卵黄タンパクが、胚発生の開始と共に、それぞれ異なるプロセスで、分解されることが示されている。セリンプロテアーゼはその必要とされる時期に合成され、出現してくること、また、それとは独立に、卵黄顆粒中に蓄積されていたシステインプロテアーゼの活性化が起こっていることが解る。発生卵中では、この様に基本的に異なる2種類の酵素系が協調して働くことにより、よくプログラムされた卵黄タンパクの分解が起こっているものと考えられる。両酵素系の相互作用に関しては、未だ未解明といえるが、システインプロテアーゼは卵黄顆粒に局在していること、トリプシン様プロテアーゼはいずれも、細胞質性酵素であること(これらの酵素に関しては細胞内局在性に関する証拠は乏しい)は、今後の展開を考えるうえで、重要な示唆を与えるものと思われる。卵黄タンパクの分解の研究はいままさに端緒についたばかりであり、今後、急速な進展が見込まれている。

図3 カイコ卵における卵黄タンパク質の発生に伴う分解とタンパク分解酵素

同時にこれは、プロテアーゼの生理的機能の研究に新たな視点を与えるものと期待されている。

文 献

- 1) Engelmann F.: Adv. Insect Physiol., 14, 49-108 (1979)
- 2) Hagedorn H.H. & Kunkel J.G.: Annu. Rev. Entomol., 24, 475-505 (1979)
- 3) Kunkel J.G. & Nordin J.H.: Comprehensive Insect Physiol. Biochem. & Pharmacol. vol. 1, p 88-111, Pergamon Press (1985)
- 4) Postlethwait J.H. & Giorgi F.: Developmental Biology, Vol.1, p 85-126, Plenum Press (1985)
- 5) Byrne B.M., Gruber M. & AB G.: Prog. Biophys. molec. Biol., 53, 33-69 (1989)
- 6) McGregor D.A. & Loughton B.G.: Roux's Arch. Dev. Biol., 181, 113-122 (1977)
- 7) Gratwohl E.K.M., Kellenberger E., Lorand L. & Noll H.: Mech. Dev., 33, 127-138 (1991)
- 8) Yamashita O. & Indrasith L.S.: Develop. Growth & Differ., 30, 337-346 (1988)
- 9) Kuk-Meiri S., Lichtenstein N., Schulov A. & Pener M.P.: Comp. Biochem. Physiol., 18, 783-795 (1966)
- 10) Perona R. & Vallejo C.G.: Eur. J. Biochem., 124, 357-362 (1982)
- 11) Warner A.H. & Schlidhar V.: J. Biol. Chem., 260, 7008-7014 (1985)
- 12) Medina M., Leon P. & Vallejo C.G.: Arch Biochem. Biophys., 263, 355-363 (1988)
- 13) Sugimoto Y., Saito A., Kosegawa E., Koga K. & Fujii H.: Comp. Biochem. Physiol., 96B, 253-256 (1990)
- 14) Tomino S.: Zool. Sci., 2, 293-303 (1985)
- 15) Zhu J., Indrasith L.S. & Yamashita O.:

- Biochim. Biophys. Acta 882, 427-436 (1986)
- 16) Takahashi S.Y.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 255-266 (1987b)
 - 17) Telfer W.H., Rubenstein E. & Pan M.L.: *Regulation of Insect Development and Behaviour*, p 637-654, Wroclaw Technical University (1980)
 - 18) Shirk P.D., Bean D., Millemann A.M. & Brooks V.: *J. Exp. Zool.*, 232, 87-98 (1984)
 - 19) Bean D.W., Shirk P.D. & Brooks V.J.: *Insect Biochem.*, 18, 199-210 (1988)
 - 20) Irie K. & Yamashita O.: *Insect Biochem.*, 13, 71-80 (1983)
 - 21) Inagaki S. & Yamashita O.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 10, 131-139 (1989)
 - 22) Sato Y. & Yamashita O.: *Insect Biochem.*, 21, 233-238 (1991)
 - 23) Miya K. & Kurihara M.: *J. Fac. Agrc.*, Iwate Univ., 8, 1-13 (1966)
 - 24) Bownes M. Hames B.D.: *J. Exp. Zool.*, 220, 149-156 (1977)
 - 25) Persson B., Bengtsson-Oliverona G., Eneback S., Olivecrona T. & Jornvall H.: *Eur. J. Biochem.*, 179, 39-45 (1989)
 - 26) Takahashi S.Y.: *Insect Biochem.*, 17, 141-152 (1987a)
 - 27) Kobayashi M. & Inagaki S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1009, 129-136 (1989)
 - 28) Storella J.R., Wejchowski D.M. & Kunkel J.G.: *Insect Biochem.*, 15, 65-76 (1985)
 - 29) Masetti M. & Giorgi F.: *J. Insect Physiol.*, 35, 689-697 (1989)
 - 30) Holzer H. & Heinrich P.C.: *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 63-91 (1980)
 - 31) Bond J.S. & Butler P.E.: *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 334-364 (1987)
 - 32) Yamamoto Y. & Takahashi S.Y.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 印刷中 (1993)
 - 33) Kageyama T., Takahashi S.Y. & Takahashi K.: *J. Biochem. (Tokyo)* 90, 665-671 (1981)
 - 34) Kageyama T. & Takahashi S.Y.: *Eur. J. Biochem.*, 193, 203-210 (1990)
 - 35) Zhao X., Kageyama T., Yamamoto Y. & Takahashi S.Y.: *Zool. Sci.*, 8, 1139 (1991)
 - 36) Takahashi S.Y., Zhao X., Kageyama T. & Yamamoto Y.: *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22, 369-377 (1992)
 - 37) Takahashi S.Y. and Yamamoto Y.: *Zool. Sci.*, 9, 1139 (1992)
 - 38) Takahashi S.Y., Yamamoto Y., Shionoya Y. & Kageyama T.: *J. Biochem. (Tokyo)* 投稿中 (1993)
 - 39) Yamamoto Y., Zhao X., Suzuki A.C. & Takahashi S.Y.: *J. Insect Physiol.*, 投稿中 (1993)
 - 40) Takio K., Towatari T., Katsunuma N., Telfer D.C. & Titani K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3666-3670 (1983)
 - 41) Ishido K., Towatari T., Imajo., Kawasaki H., Kiminami E., Katsunuma N. & Suzuki K.: *FEBS Lett.*, 223, 69-73 (1987)
 - 42) Indrasith L.S., Sasaki T. & Yamashita O.: *J. Biol. Chem.*, 263, 1045-1051 (1988)
 - 43) Ikeda M., Sasaki T. & Yamashita O.: *Insect Biochem.*, 20, 725-734 (1990)
 - 44) Ikeda M., Yaginuma T., Kobayashi M. & Yamashita O.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B, 405-411 (1991)
 - 45) Fagotto F.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 14, 217-235 (1990)
 - 46) Fagotto F.: *Develop. Growth & Differ.*, 33, 57-66 (1991)
 - 47) Mallya S.K., Partin J.S., Valdizan M.C. & Lennarz W.J.: *J. Cell Biol.*, 117, 1211-1221 (1992)
 - 48) Nagainis P.A. & Warner A.H.: *Develop. Biol.*, 68, 259-270 (1979)
 - 49) Kang S-H. & Fuchs M.S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 611, 379-383 (1980)
 - 50) Kucera M. & Turner R.B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 611, 379-383 (1981)
 - 51) Aratake H., Deng L-R., Fujii H., Kawaguchi Y. & Koga K.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 97A, 205-209 (1990)
 - 52) Garesse R.R., Perona R., Marco R. & Vallejo C.G.: *Eur. J. Biochem.*, 106, 225-231 (1980)
 - 53) Ezquieta B. & Vallejo C.G.: *Copm. Biochem. Physiol.*, 82B, 731-736 (1985)

54) Takahashi S.Y.: J. Comp. Physiol., 155B,
693-701 (1985)

55) Takahashi S.Y., Fujiwara M., Ohoka T.

& Yamamoto Y.: Comp. Biochem. Physiol.,
103B, 71-79 (1992)