

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780036

研究課題名 (和文) 昆虫外骨格に存在するラッカーゼ前駆体の性状解析及び活性化因子の同定

研究課題名 (英文) Role of laccase in insect cuticle sclerotization

研究代表者

朝野維起 (ASANO TSUNAKI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：40347266

研究成果の概要 (和文)：昆虫の外骨格はキチン及びタンパク質から構成される、非細胞性のマトリクスである。外骨格形成時、外骨格タンパク質間に架橋が形成されることによって強度が増すが、この反応にラッカーゼと呼ばれる銅酵素が関与する事が明らかになってきた。家蚕の外骨格よりラッカーゼを精製し、そのアミノ酸配列等を明らかにするとともに、生化学的性状を解析した。その結果、家蚕外骨格ラッカーゼはこれまでにクローニングされていた昆虫ラッカーゼ 2 のオーソログであることが明らかとなった。家蚕ラッカーゼの合成は蛹脱皮前にほぼ完了し、前駆体の形で新しい外骨格中に蓄積する。ラッカーゼ前駆体は、その後蛹への脱皮後に活性化されることが明らかとなった、しかし、その分子機構の解明は今後の課題である。

研究成果の概要 (英文)： Insect cuticle is a non-cellular matrix composed of chitin fiber and proteins. In the process of cuticle formation, cuticular proteins are cross-linked to each other, which increases the mechanical strength of the cuticle. The importance of laccase in this process has become to be known in recent years. In this project, an inactive laccase precursor was purified from pupal cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*, and its biochemical properties were characterized. The laccase was found to be a product of *Bmlaccase2*, an ortholog of laccase2 genes of other insects. It was found that the laccase precursor is activated after pupation, but its molecular mechanisms remains to be studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学・昆虫生理

キーワード：昆虫外骨格、硬化、ラッカーゼ

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

昆虫外骨格形成時に構造タンパク質間に架橋が形成され、これによって外骨格は強度を得ていると考えられている。このプロセスに、植物等に見つかるラッカーゼと同様の活性を持ったタンパク質が関与しているとする説が以前から唱えられていた。一方、近年になって植物のラッカーゼに相同なタンパク質をコードする遺伝子が外骨格形成に働くことが示された。しかしながら、外骨格にラッカーゼ遺伝子の翻訳産物があるという事は未確認なままであった。

タンパク質レベルでラッカーゼ遺伝子の産物を同定し、その生化学的特性を明らかにするとともに、ラッカーゼ合成のホルモン依存性等について明らかにすることが、まず必要と考えられていた。また、家蚕のみで報告されていることではあるが、ラッカーゼ様タンパク質が不活性な前駆体として合成され、脱皮前の新しい外骨格に蓄積すること、及び、脱皮後に何らかの機構によって活性化することを示唆する結果が得られている。脱皮に伴うラッカーゼ活性のアクティブな変動が何を意味しているのかについて、全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

① 外骨格中に存在するラッカーゼ活性を有するタンパク質のアミノ酸配列や発現様式を明らかにし、さらに不活性な前駆体の性質や、その活性化に関わる分子メカニズムを調べる。最終的に、脱皮に伴うラッカーゼ活性制御機構の生物学的意義を明らかにするとともに、活性化メカニズムが昆虫進化のプロセスでどのように獲得されて来たのかなどについての知見も得る。

3. 研究の方法

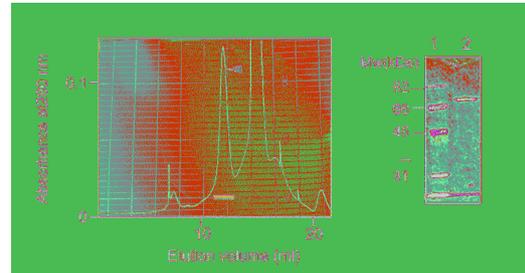
- ① 家蚕を用いて、蛹外骨格よりラッカーゼ活性を有するタンパク質を精製し、そのアミノ酸配列を調べるとともに、生化学的性状を解析する。
- ② 家蚕外骨格から不活性型のラッカーゼ（ラッカーゼ前駆体）を単離し、その性状を解析する。また、活性化因子を検出する方法を確立する。
- ③ ショウジョウバエを用いて、ラッカーゼ遺伝子の機能を解析する。

4. 研究成果

①家蚕蛹外骨格に存在するラッカーゼは、外骨格マトリクスに強固に結合しているため、ラッカーゼを抽出する為には、プロテアーゼ

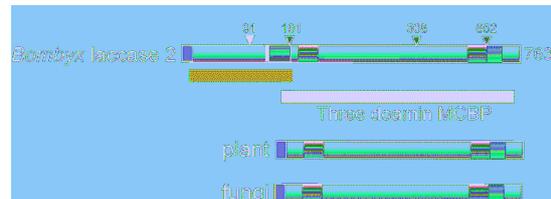
等で外骨格内のマトリクス構造を壊す必要がある。本研究では、脱皮直後の蛹外骨格からトリプシンを用いて活性型のラッカーゼを可溶性し、そこからラッカーゼ活性を有するタンパク質を精製した

(下図：左は最終精製のクロマトグラム、右は精製標品の電気泳動像)。

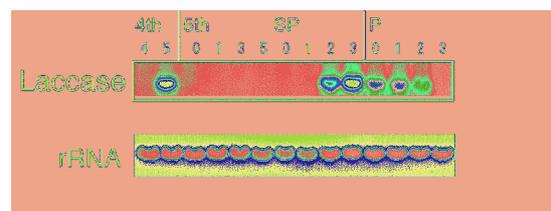


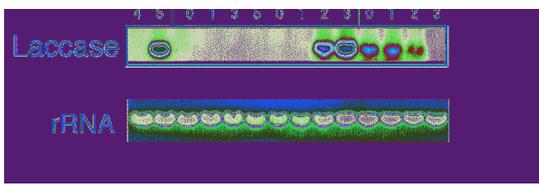
精製標品をマスマスペクトロメトリーによって解析した結果、家蚕外骨格のラッカーゼは今までに報告されていた昆虫ラッカーゼ遺伝子の一つであるラッカーゼ2 (laccase2) のオーツログであることが判明した。

下図は、昆虫ラッカーゼのドメイン構造であるが、植物・カビ等のラッカーゼとは異なり、アミノ末端に、機能未知の領域が存在する。



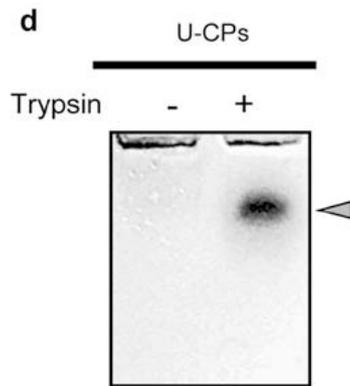
ノーザン解析を行った結果、家蚕ラッカーゼ2 (Bmlaccase2; Bmlac2) の発現は、蛹脱皮前にほぼ完了していることが判った。また、脱皮前の蛹外骨格には、相当量のラッカーゼ2タンパク質も存在していた。一方、ラッカーゼ活性は、脱皮前や脱皮直後の外骨格には無く脱皮後1時間すると活性が検出できた。この結果は、ラッカーゼが不活性な前駆体として新しい外骨格に蓄積し、脱皮後に何らかの機構によって活性化された後に、架橋反応を触媒する、と解釈できる。脱皮前には外骨格が柔らかく、これが脱皮のスムーズな進行を可能にするとともに、一旦脱皮した後に迅速に外骨格が硬くなる為のシステムだと推測できる。





②脱皮直後の家蚕蛹外骨格からラッカーゼを可溶化する際に、トリプシンではなくキモトリプシンを使用すると、ラッカーゼは不活性な前駆体として可溶化できる。これを精製し、その性状を調べた。精製したラッカーゼ前駆体は、改めてマスマスペクトル解析を行い、配列を確認した。トリプシンによる再処理によって、この前駆体は限定加水分解を受けるとともに、活性が生じた。しかしながら、生体内で同様のメカニズムが働いているとは限らない。ラッカーゼ前駆体は、変成作用を有する試薬を用いた処理によっても活性化されることから、活性化にプロテアーゼによる分解が必須でないことも考えられる。この前駆体を利用して、蛹外骨格中に存在すると思われる活性化因子を検出する為の系を確立している最中である。

また、キモトリプシンではなく、ウレアを利用した可溶化も試みた。蛹外骨格タンパク質を 8M ウレア中で抽出し、ラッカーゼの存在を確認した。この方法で得られるラッカーゼは、キモトリプシンを利用して可溶化した場合と同じく、活性を持たない前駆体であった。トリプシンによって、人工的に活性化することが可能であった(下図)。これらの結果から、キモトリプシンによって可溶化したラッカーゼの不活性化状態は、酵素処理によるアーティファクトではなく、外骨格中のラッカーゼ本来の性質が、保持された結果ということが言える。



③現在、ショウジョウバエを利用して変異体の表現型解析等を行っている。また、生化学的な解析も進めているが、家蚕ラッカーゼで得られた結果と同様の結果が得られている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件、査読あり)

1) Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification sequence analysis and presence of its inactive precursor in the cuticle. Jun Yatsu and Tsunaki Asano. *Insect Biochemistry and Molecular biology*. 2009. 39. 254-62.

2) Identification of the gene encoding pro-phenoloxidase A₃ in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. Tsunaki Asano and Kazushi Takebuchi. *Insect Molecular Biology*. 2009. 18. 223-232

3) A serine protease in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*: Protein sequencing, identification of cDNA, demonstration of its synthesis as zymogen form and activation during midgut remodeling. Kentaro Kaji, Shiro Tomino and Tsunaki Asano. *Insect Biochemistry and Molecular biology*. 2009. 39. 207-17.

4) Involvement of pro-phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. Hyuck-Jin Nam, In-Hwan Jang, Tsunaki Asano and Won-Jae Lee. *Molecular and Cells*. 2008. 26.606-610

[学会発表] (計 6 件)

1) Role of laccase in cuticle sclerotization. 昆虫ワークショップ '09年 10月 28~30日 福岡

2) 昆虫が発達させて来たラッカーゼ活性化系. 日本動物学会第 80 回大会. '09年 9月 17~20日 静岡

3) Role of laccase in insect cuticle sclerotization. In *Drosophila* meeting '09年 7月 6~8日 つまごい

4) Identification of the cuticle laccase in the silkworm, *Bombyx mori*. 昆虫ゲノム研究会. '09年 3月 11~12日 神戸

5) Characterization of cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*. UOS-TMU inter department meeting. '09年 2月 10~11日 Seoul.

6) 家蚕外骨格に存在するラッカーゼ活性の制御. 日本動物学会第 79 回大会. '09年 9月 5~7日 博多

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝野維起 (ASANO TSUNAKI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：40347266