

ノシメマダラメイガのProteaseに及ぼす イネ種子糊粉層 Trypsin Inhibitor の影響

Effects of Rice Aleurone Trypsin Inhibitor on the Protease of *P.interpunctella*

伴 みずほ・美馬孝美*・仲佐輝子**・沖中 靖**

Ban Mizuho, Mima Takami, Nakasa Teruko, Okinaka Osamu

京都短期大学・*甲子園短期大学・**同志社女子大学

Kyoto Junior College, Koushien Junior College, Doushisha Woman's College

Abstract: Caseinolytic activities in homogenates from the indian-meal moth, *P.interpunctella*, were inhibited about 10% by trypsin inhibitor from rice aleurone, described earlier, which has a same dose of the ability to inhibit about 35% the activity of trypsin. Secondary, proteolytic activity in the extracts of the *P.interpunctella* decreased in the presence of commercially available protease inhibitors of each classes; decreased 90% by aspartic protease inhibitor and 10 to 30% in cysteine protease inhibitor, however, was not inhibited by metallo protease inhibitor. Furthermore, the optimum pH's of the protease of *P.interpunctella* were detected at pH 3,6 and 9.5. These results suggested that the digestive enzymes of the noxious insect may be consisted of a few classes of proteases. Casein or bovine serum albumin was digested by protease in four given pH, pH 3, 6, 8 and 9.5, respectively. Amino acid sequencis of the peptide fractions obtained from the digests by high-performance liquid chromatography, were analyzed. We considered that N-terminal amino acid of peptides fractionated were reactive sites of the midgut protease. From these results, it was confirmed that the cleaved sites were coincided with those of aspartic protease at pH 3 and 6 and with those of aspartic, cysteine and serine protease at pH 8 and 9.5. Consequently, the proportion of aspartic protease in the protease of *P.interpunctella* were high level, but metallo protease was not detected.

Key words: rice aleurone trypsin inhibitor, nexious insect, protease, *P.interpunctella*

序 論

ノシメマダラメイガ (the indian-meal moth, *Prodia interpunctella* Hübner) は、イネ科の貯穀害虫で、22日～45日間の幼虫期間を経て蛹化し、成虫となる昆虫である。大切な備蓄穀物を食害する害虫を防除する方法には、化学的方法が取り扱いやすく効果が確実なため最も普及したが、昆虫類は優れた生体機能を持つため、その薬剤に対する抵抗性を獲得する。薬剤の増量や、繰り返し使用することにより、人体への安全性、食品への残留毒性などが問題となっている。最近では昆虫の栄養摂取を妨害する物質が、植物中に存在することが明らかにされており研究が進められている。それらの主なものはprotease inhibitorや酸化酵素群である。こ

これらの存在意義は、植物の外敵（動物、昆虫、微生物など）に対する防御の役割を担っていると考えられている。

生育中のイネを食害するニカメイガ (*Chilo suppressalis* Walker) は、その寄生植物であるイネの水抽出物によって、幼虫の生育が阻害される¹⁾。しかし、イネに含まれている含量だけでは幼虫の成長は阻害されない。以前、我々はイネ種子由来の trypsin inhibitor を高濃度で与えた時、大豆を食害するホソヘリカメムシの幼虫の成長を阻害した報告をした²⁾。Chen³⁾らは、イネ種子由来の cysteine protease inhibitor⁴⁾ の cDNA を大量に発現させたものに、甲虫類害虫の増殖を抑制する効果があること、さらに害虫の腸内に含まれている protease のクラスは、種によってその割合が異なることを示した。

チョウやガの類では、消化管内の pH はアルカリ性 (pH 8 ~ 10) に傾き、消化酵素の大部分は trypsin 様酵素である⁵⁾。また Chen³⁾ からも、ノシメマダラメイガの腸内酵素は、cysteine protease よりも serine protease を多く含むと報告している。そこで我々は、イネ種子由来の trypsin inhibitor⁶⁾ が、ノシメマダラメイガの幼虫 protease に及ぼす影響を検討した。

実験方法

1. 試薬

Trypsin (from bovine pancreas, Type 1) は、SIGMA 社 (MO) 製のものを、Casein, acc. to Hammarsten は Merck 社 (NJ) 製のものをそれぞれナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。その他の試薬も全て特級または精密分析用を使用した。

2. 試料

ノシメマダラメイガ (*Plodia interpunctella* Hübner) の卵は、神戸大学院大学農学研究科昆虫学研究室の竹田真木生教授より御供与頂いた。ノシメマダラメイガの飼育⁶⁾は 15% のグリセリンを混ぜた糠を直径 9.5 cm、高さ 10 cm のガラス製ふた付シャーレを用いて行い、産卵後一日以内の卵をこれに入れて、30°C、16 時間照明下で飼育した。イネ種子由来 rice aleurone trypsin inhibitor (RATI)⁸⁾ は、米 (日本晴) の糠より精製したものをを用いた。RATI の活性は、trypsin と RATI を 37°C で 5 分間予温したのち 1% casein 溶液 0.5 ml を加え反応を開始させ、10 分間反応させた。これらに 25% TCA 溶液 0.5 ml を加えて反応を停止させ、その上清の 280 nm における吸光度を測定した。RATI を加えない吸光度を 100% とし、吸光度が減少した割合を阻害活性とした。

3. タンパク質の定量

試料溶液中のタンパク質濃度は、bovine serum albumin (BSA) を標準として、Lowry⁹⁾らの方法をHartree¹⁰⁾らが改良した方法によって測定した。

4. アミノ酸配列分析

CaseinおよびBSAを幼虫protease溶液で消化し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10~80% acetonitrileの直線的濃度勾配法によりCosmosil 5C18で分画したものを、アミノ酸配列自動分析機PPSQ-10 (Shimadzu) で分析した。

実験結果

1. ノシメマダラメイガ幼虫protease活性のRATIによる阻害

第5ステージの幼虫全体を、5 mM Na-phosphate buffer (pH7.0, 4℃) でホモジナイズした。この遠心分離上清を、同bufferに対して十分透析を行い、その透析液の上清を幼虫protease溶液とした。Protease溶液の活性を、trypsinの活性を約40%阻害する量のRATI存在下において測定した。その結果、protease溶液に対してRATIは10%前後の阻害を示した (Table 1)。

Table 1 Inhibition of proteases included in the extracts of *Pinterpunctella* by RATI*

pH	Inhibition by RATI	
	Trypsin activity	Protease activity in extract
6.0	25-30%	0%
8.0	27-50%	9-14%

* RATI: rice aleurone trypsin inhibitor

2. ノシメマダラメイガ幼虫proteaseの検索

1) 幼虫抽出液のprotease活性とpHとの関係

幼虫抽出液とcaseinとの反応を、各pHの0.2M buffer [Glycin-HCl (pH2.5-3.5), acetate (pH3.5-6.0), K-phosphate (pH6.0-8.0), Tris-HCl (pH8.5-10.0)] 中で、90分間行った。その結果、幼虫抽出液のprotease活性のピークは、pH3.0、pH6.0およびpH9.5の3ヶ所に検出された (Fig. 1)。

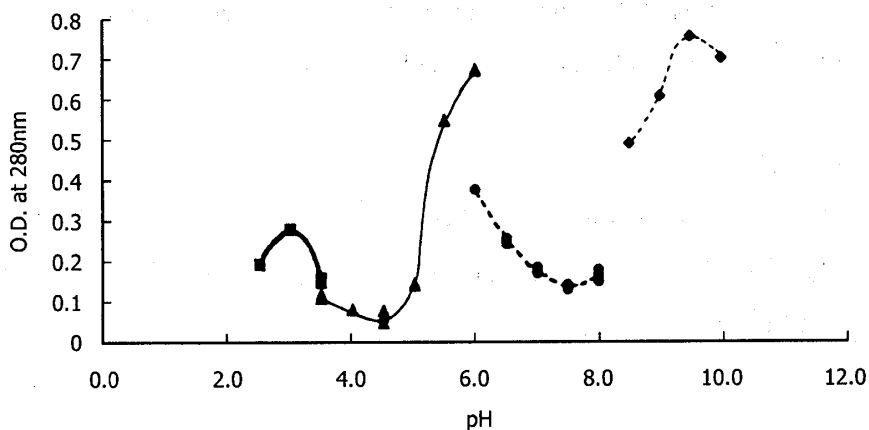


Fig.1 Activities of protease included in the extracts of *P.interpunctella* as the function of pH buffers were used.

—■— Gly-HCl, —▲— Acetate, -●- K-phosphate, and -◆- Tris-HCl

2) 幼虫抽出液のprotease活性に対する各種阻害剤の影響

各クラスの市販阻害剤を用いて、それらが同クラスのproteaseを約40%阻害するに要する濃度において、幼虫protease活性に対する影響を検討した。その結果、aspartic protease inhibitorであるpepstatinはpH 3におけるprotease活性を90%阻害したが、metallo protease inhibitorであるEDTAによる阻害は、pH 8において認められなかった。その他の阻害剤では、それぞれの最適pHにおいて10-30%の阻害が認められた (Table 2、3)。

Table 2 Commercially available proteases and protease inhibitors employed in this study

Protease			Inhibitor*	
Enzyme	pH	Concentration	Substance	Concentration
Trypsin	8.0	0.005%	STI	130 μ M
			PMSF	0.7 μ g/ml
Thermolysin	8.0	0.008%	EDTA	417 μ M
Ficin	6.0	0.008%	E-64	13 μ M
			NEM	400 μ M
			IAA	6 μ M
			PCMB	1 μ M
Pepsin	3.0	0.030%	Pepstatin	0.17 μ M

* STI; soybean trypsin inhibitor, PMSF; phenyl methyl sulfonyl fluoride, EDTA; ethylenediamine tetra acetic acid, E-64; L-trans-epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino) butane, NEM; N-ethylmaleimide, IAA; iodo acetamido, PCMB; p-chloromercuri benzoic acid.

Table 3 Inhibitory activities of various inhibitors against proteolytic activities in the extract of *Pinterpunctella*

Class of Inhibitor	Inhibitor	Inhibition (%)
(Trypsin inhibitor)	STI	10
	PMSF	14~17
(Thermolysin inhibitor)	EDTA	0
(Ficin inhibitor)	E-64	2~5
	NEM	30
	IAA	1~3
	PCMB	2
	Pepstatin	90
(Pepsin inhibitor)		

3) 幼虫proteaseによるcaseinおよびBSAの切断部位の推定

Casein、BSAおよび還元アルキル化¹¹⁾ BSAを、幼虫proteaseとともにpH3.0、pH6.0、pH8.0およびpH9.5のbuffer中で、37℃、一晩反応させた。それぞれの消化物の遠心分離上清をpore size 0.45 μmの膜でろ過後、HPLCにより分画し、高いピーク部分を分取した(図省略)。この各ピークのアミノ酸配列をシークエンスしたところ、caseinおよびBSAのアミノ酸配列(Fig. 2、3)の数字で表記したアミノ酸のN末端側を切断すると考えられた(Table 4)。多くのproteaseの基質特異性は厳密で、たとえばtrypsin proteaseは基質のアルギニンまたはリシン残基のカルボキシル基側のペプチド結合のみを切断する。以上の結果からメイガ幼虫proteaseによる推定切断部位は、各クラスのproteaseの特異的な反応部位と照らしあわせた結果、pH3.0、pH6.0ではaspartic proteaseの反応部位と、pH8.0、pH9.5ではserine protease、cysteine protease、aspartic proteaseの反応部位とよく一致した(Table 5)。

```

R E L E E L N V P G E I V E S L S S S E
E S I T R/4I N K K I E K F Q S E E Q Q Q
T E D E L Q D K I H P F A Q T Q S L V T
P F P G P I P N S L P Q N I P P L T Q T
P V V V P P F L Q P E V M G V S K V K E
A M/5A P K H K E M P F P K Y P V Q P F T
E S Q S L T L T Q V F N L H L P P L L L
Q S W M H Q P H Q P L P P T V M F P P Q
S V L S L S Q S K/2V L P V P E K/1A V P Y
P Q R D M P I Q A F L/3L Y Q Q P V L G P
V R G P F P I I V
    
```

Fig.2 Amino acid sequence of milk casein
 Each slash represented hydrolytic site when casein was digested at pH 8.

```

D T H K S E I A H R F K D L G E E H
F K G L V L I A/1F S Q Y L O O C P F
D E H V K L/11V N E L T E F/11A K T C V
A D E S H A G C E K S L H T L F G D
E L C K V A S L R E T Y G D M A D C
C E K E Q P E R N E C F L S H K-13D D
S P D L P K-14L K P D P N T L C D E F
K A D E K K F/8W G K Y L/7Y E/3I A R R V
H P Y F Y A P E L L Y A N K Y N G V
F Q E C-16Q A E D K G A C L L P K I
E T M R E K V L E T S S A R Q R L R C
A S I O K F F/17G E R A L K A W S V A R T
L S Q K F P K A E F V E V T K L V T
D L T K V H K E C C H G D L L E C A
D D R A D L A K Y I C B B Z B T I S
S K L K E C K D P C L L E K S H C I
A E/9V E K D A I P E D L P P L T A D
F A E D K D V C K N Y Q E A K D A F
L G S F/6L/5Y E Y S R R H P E Y A V-15S
V L L R L A K E Y E A T L E E C C A
K D D P H A C Y T S V F D K L K H L
V D E P Q N L I K Z B C B Z F E K L
G D E Y X X X L I V R Y T R/10K V P
Q V S T P T L V E V S R S L G K V G
T R C C T K P E S E R M P C T E D Y
L S L I L N R L C V L H E K T P V E
S K V T K C C T E S L V N R R P C F
S A L T P D E T Y V P K A F D E K L
F T F H A D I C T L P D T E K O I K
K Q T A L V E L/2L K H K P K A T E E
Q/12L K T V M E N F V A F V D K C C A
A D D K E A C F A V E G P K L V V S
T Q T A L A
    
```

Fig.3 Amino acid sequence of BSA
 Each slash represented hydrolytic site when BSA and alkylated BSA were digested at /; pH 3, ↓; pH 6, ↑; pH 8 -; pH 9.5, *; alkylated.

Table 4 N-terminal amino acid sequences of peptides fractionated from milk casein, BSA and alkylated BSA digested with the extract of *P.interpunctella*

Substrate	pH	Fraction No.	N-terminal amino acid sequence
Casein	8.0	1	Ala ⁽¹⁷⁷⁾ -Val-Pro-Tyr-----
		2	Val ⁽¹⁷⁰⁾ -Leu-Pro-Val-----
		3	Leu ⁽¹⁹²⁾ -Tyr-Gln-Gln-----
		4	Ile ⁽²⁶⁾ -Asn-Lys-Lys-----
		5	Ala ⁽¹⁰³⁾ -Pro-Lys-His-----
BSA*	3.0	1	Phe ⁽²⁷⁾ -Ser-Gln-Try-----
		2	Leu ⁽⁵³¹⁾ -Lys-His-Lys-----
		3	Ile ⁽¹⁴¹⁾ -Ala-Arg-Arg-----
		4	Tyr ⁽¹³⁹⁾ -Glu-Ile-Ala-----
		5	Tyr ⁽³³⁰⁾ -Glu-Tyr-Ser-----
		6	Leu ⁽³²⁹⁾ -Tyr-Glu-Tyr-----
	6.0	7	Trp ⁽¹³⁴⁾ -Gln-Lys-Tyr-----
	8.0	8	Val ⁽²⁹¹⁾ -Glu-Lys-Asp-----
		9	Lys ⁽⁴¹²⁾ -Val-Pro-Gln-----
	9.5	10	Val ⁽⁴³⁾ -Asn-Glu-Leu-----
		11	Leu ⁽⁵⁴²⁾ -Lys-Tyr-Val-----
		12	Asp ⁽¹⁰⁷⁾ -Asp-Ser-Pro-----
		13	Leu ⁽¹¹⁵⁾ -Lys-Pro-Asp-----
	Alkylated BSA	3.0	14
15			Gly ⁽²⁰⁵⁾ -Glu-Arg-Ala-----
16			Ala ⁽⁵⁰⁾ -Lys-Thr-Cys-----

* Bovine serum albumin

Table 5 Number of cleaved sites in milk casein, BSA and alkylated BSA by digestion with proteases included in the extracts of *P.interpunctella*

Substrate	pH	Aspartic protease	Both	Serine protease or Cystein protease
Casein	8.0	2	2	1
BSA	3.0	6	0	0
	6.0	1	0	0
	8.0	3	0	1
	9.5	0	1	1
Alkylated BSA	3.0	2	0	0

考 察

植物種子や根茎は、各種のPIを豊富に含んでいるが、そのPIの役割は、種子が成熟する過程で、あるいは種子が発芽できる条件が整うまで、細菌や害虫から自身を保護するためと考えられている。一方、発芽成長過程の植物組織において、PI自身が貯蔵タンパクであるとする考え方もできる。さらに成長後、微生物や害虫により葉が食害を受けた時に誘導されるPIが、防御反応（phytoalexin誘導）をひき起こすelicitorになるとも考えられ、その植物体上で昆虫の成育は栄養摂取阻害効果がみとめられている。

種子植物中にもともと存在する含量で、その植物の害虫の腸内protease活性を強力に阻害する場合と、あまり阻害活性を示さない場合がある。トウモロコシ由来のcysteine protease inhibitorは強力な阻害活性を示すが、イネ種子由来のcysteine protease inhibitorはイネ害虫の腸内cysteine proteaseに対しあまり阻害効果を示さない¹²⁾。今回はイネ種子由来trypsin inhibitor (RATI) を用いて、イネ科の貯穀害虫であるノシメマダラメイガの幼虫腸内proteaseに対する影響を検討した。RATIは幼虫proteaseに対して10~14%、その活性を阻害した。Irie¹²⁾らの報告のようにRATIも、阻害活性の低いPIであるとも考えられるが、幼虫の消化液を構成するproteaseのクラスが、それぞれ異なった比率で組み合わせられていると考えた場合、これらの害虫の腸内には、trypsin type proteaseの占める割合が相当低いのではないかと思われた。そこでノシメマダラメイガ幼虫の腸内酵素の構成を知るために、まず最も多く存在するproteaseのクラスの検討を行った。幼虫抽出液のprotease活性をpH2.5-10.0の各buffer中において検討した結果、pH3.0および9.5の3ヶ所に高いピークが認められ、どの群のproteaseかを特定することができなかった。しかし、その活性はEDTAの存在下では維持し、pepstatinによって90%阻害された。このことからメイガ幼虫腸内酵素の分布は、pepsin type proteaseで占められていると推察できる。さらに確認するために、ノシメマダラメイガ幼虫抽出液と、caseinまたはBSAとともにpH3.0、6.0、8.0および9.5のbuffer中で一晚反応させ、その消化された断片のN末端側をアミノ酸自動分析器で解読した。しかし、その推定切断部位は、pH3.0、6.0で得られたものが、最も多くaspartic proteaseの反応部位に一致し、メイガ幼虫腸内酵素の断定には至らなかった。

Proteaseの基質特異性は厳密であるものが多いが、Proteaseによっては、特異性の低いものも多く存在し、また、今回は試料として幼虫の全体を使用したため、腸内酵素以外の酵素の存在も否定できないため、以上の結果からは、メイガ幼虫腸内酵素には、aspartic proteaseが最も多く存在し、metallo proteaseは存在しないことのみが明らかになった。今後は、消化酵素のみを抽出し再検討したい。

要旨 イネ種子 (*Oryza sativa* L.cv. Nihonbare) 中のtrypsin inhibitor (TI) の貯穀害虫であるノシメダラメイガの腸内proteaseへの影響の検討を行った。試料には、5 齢の幼虫全体を用い、リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 でホモジナイズした上清を酵素液とした。イネ種子由来 TI がtrypsin を約 35 % 阻害するのと同じタンパク質量を酵素反応系に添加したところ、害虫酵素活性は TI によって約 10 % 阻害され、メイガの消化液は serine protease 単独ではないと考えられたため、幼虫酵素液の pH による影響を検討した。活性のピークは pH 3、6 および 9.5 の 3 ケ所に認められ、どの群の protease かを特定することができなかった。次に各クラスを代表する protease inhibitor 存在下での幼虫酵素活性への影響を検討したところ、aspartic protease inhibitor で 90 %、cysteine protease inhibitor で 10-30 % 活性が低下したが、metallo protease inhibitor では活性は維持されたままであった。また、Casein および BSA を基質に用い、pH 3、6、8 および 9.5 の buffer 中で一晚幼虫酵素液とともに反応させた。得られたペプチド断片を逆相 HPLC により分画し、それぞれの画分についてアミノ酸配列分析を行った結果と、既知の BSA アミノ酸配列から切断部位を推定した。切断部位のうち、pH 3、6 では aspartic protease の反応部位と、pH 8、9.5 では aspartic protease、cysteine protease、serine protease の反応部位と一致した。以上のことから、メイガ幼虫酵素液中には、aspartic protease が最も多く存在し、反対に metallo protease は存在しないと考えられた。

参考文献

- 1) 石井象二郎 "昆虫学への招待" 岩波新書 (1970)
- 2) 伴みずほ、仲佐輝子、沖中靖 (2001) 同志社女子大学生生活科学、35, 51-54.
- 3) Chen, M.S., Johson, B. Wen, L. Muthukrishman, S., et. al. (1992) Protein Expr. Purif. 3, 41-49.
- 4) Abe, K. and Arai, S. (1985) Agric. Biol. Chem. 49, 3349-3350.
- 5) 石川幸男 (1995) 化学と生物. 33, 11, 714-720.
- 6) Horiguchi, T. and Kitagishi, K. (1971) Plant Cell Physiol. 12, 907-915.
- 7) Naeemullah, M. and Takeda, M. (1998) Entomological Science. 1, 4, 503-510.
- 8) 伴みずほ、仲佐輝子、沖中靖 (2000) 同志社女子大学生生活科学、34, 1-11.
- 9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 10) Hartree, E.F. (1972) Anal. Biochem. 48, 422-427.
- 11) Minakuchi, K., Higaki, N., Sato, K., et. al. (1997) J. Biochem. 121, 842-848.
- 12) Irie, K., Hosoyama, H., Takeuchi, T., Iwabuchi, K., et. al. (1996) Plant Mol. Biol. 30, 149-157.