

家蚕蛹の中腸の蛋白質分解酵素 II

| | |
|-------|------------------|
| 誌名 | 日本蠶絲學雜誌 |
| ISSN | 00372455 |
| 著者 | 江口, 正治 巖本, 章子 |
| 巻/号 | 42巻2号 |
| 掲載ページ | p. 144-150 |
| 発行年月 | 1973年4月 |

家蚕蛹の中腸の蛋白質分解酵素 II. 可溶化した フィブロインおよび液状絹の分解

江口正治・巖本章子

京都市・京都工芸繊維大学繊維学部
(1972年9月1日受理)

Masaharu EGUCHI and Akiko IWAMOTO: Protease in the pupal midgut of the silkworm,
Bombyx mori L. II. Hydrolysis of the solubilized fibroin and native silk proteins

著者ら(江口・古川, 1970; EGUCHI *et al.*, 1972)はさきに, 家蚕中腸の蛋白質分解酵素作用は蛹の後期に増加し, 羽化前において最高値となり, 蛾になると激減することを示し, この酵素の性質を調べるとともに, 寒天ゲル電気泳動による分離結果などを報告した。またこの蛹の中腸に存在するプロテアーゼは羽化の時に吐出される吸胃液中の酵素や KAFATOS and WILLIAMS (1964), KAFATOS *et al.*, (1967 a, b) によって研究が進められているサク蚕の cocoonase と同一ではないが, いくつかの実験結果から蛾の吐出液に含まれる繭溶解酵素と密接な関係があり, 少なくとも一部は吐出液中の酵素の起源になっているのではないかと推論した。

前記の実験(江口・古川, 1970)においてはプロテアーゼの基質として常用されるカゼインを用いた。しかし, 上記のような推論を裏付け, この酵素の生理的意義を知るとともに, 蚕種製造上問題となっている不脱繭蚕との関係を知るためには, 絹糸蛋白に対する酵素作用を調べることは重要であると考えられる。そこで, この論文においては可溶化したフィブロインおよび液状絹の加水分解作用について報告する。

材料の一部を御恵与頂いた本学の小西孝助教授, 終始御激励頂いた藤本直正教授に深謝する。

材料と方法

供試品種には支124号, 黒縞, 大錦などを用いた。末期の蛹を解剖して中腸をとり出し, よく純水で洗った後, 新鮮物を用いるか, または凍結あるいは凍結乾燥保存のものを一定量として材料とした。

フィブロインは臭化リチウムあるいは銅-エチレンジアミンで可溶化した。前者の場合には細切した繭を炭酸ナトリウムで洗ってセリンを除いた後, フィブロイン10gに対して10.7Nの臭化リチウムを100mlの割合に加えて溶解し, それに50mlの純水を加え, 純水に対し3日間透析した。その透析内液にエタノールを加えてできた白色沈殿を遠心分離によって集め, 純水に溶かしたものを水溶性フィブロインとして用いた。後者の場合はフィブロイン1gに対して1.2Mの銅-エチレンジアミン25mlの割合に加えて溶解した後, 1Nの酢酸を加えて中和し, セロファンチューブに入れ, 銅-エチレンジアミンの色がなくなるまで純水に対して透析後, 沝過したものを使用した。

液状絹は5齢盛食期のカイコを解剖して絹糸腺をとり出し, 純水を加えて4°Cで一晩抽出後, 10,000g, 30分間遠心分離して沈殿物を除いたものを材料として使用した。

酵素活性の測定には, 酵素液として凍結乾燥試料1mgに1mlの割合になるように緩衝液を加えて磨砕後, 1500g, 20分遠心分離した上澄液を用いた。

酵素反応については, 可溶化したフィブロインを基質として用いる場合には基質溶液0.5ml, 緩衝液0.5mlに酵素1mlを加え, 30°Cの恒温槽中で1.5時間保温した。これにエタノール4mlを加えて反応を止めるとともに除蛋白を行なった。1時間放置後沝過し, 沝液0.5mlに純水1.5mlを加えて4倍希釈した後, これに0.55M炭酸ソーダ5mlとフェノール試薬1mlを加えて発色させ, 1時間放置

後、島津—ボッシュロム光电比色計を用いて波長 660 m μ で比色定量した。液状絹を基質として用いる場合にはトリクロル酢酸で反応を停止し、温浴中で2時間以上放置後濾過し、濾液に炭酸ソーダおよびフェノール試薬を加えた。酵素活性は1分間に加水分解によって生じたチロシンの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) で表した。蛋白質は Lowry 法によって定量した。

電気泳動は薄層寒天ゲルを用いる方法で行ない、基質溶液は泳動前に寒天中に加えた。電気泳動の詳細についてはすでに述べた (EGUCHI and YOSHITAKE, 1967; EGUCHI, 1968) ので省略する。

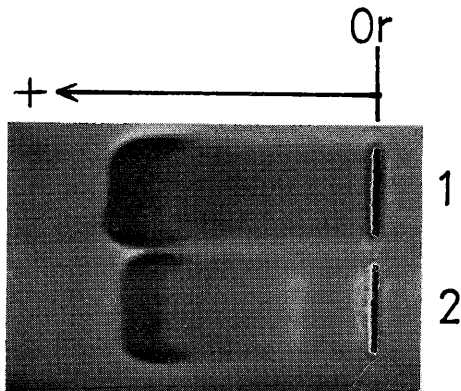
カラムクロマトグラフィーにはセファローズ 6 B カラムを使用した。0.1 M, pH 8.3 のペロナルソーダ緩衝液で抽出し、1500 g, 20分間遠心分離の上清をカラムに添加後、上記緩衝液で溶出を行なった。

結 果

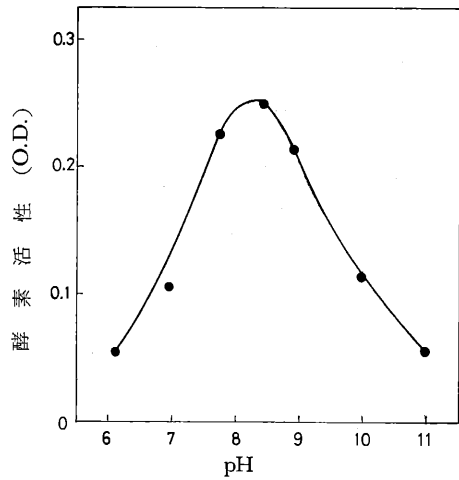
(1) 可溶化したフィブロインを基質にした場合

電気泳動の結果は第1図にみられるように、フィブロインを基質として蛋白質分解酵素を検出すると、陽極側に移動する明瞭な活性泳動帯が認められ、蛹の中腸に上記基質を加水分解する作用があることを示している。

ついで、この酵素の性質を調べるため定量的な研



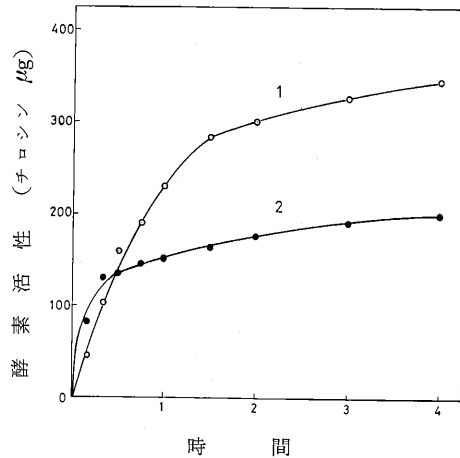
第1図 蛹中腸の蛋白分解酵素の電気泳動像
基質; 可溶化したフィブロイン, 1: 黒絹,
2: B7×新元油。
写真は陰画で表わされているので、黒色の
バンドがプロテアーゼ活性を示す。



第2図 酵素活性に対する pH の影響

究を行なった。第2図は酵素活性に対する pH の影響を表したものであるが、この図から酵素反応の最適 pH は 8.3 付近にあることがわかる。この pH—活性曲線は前報 (江口・古川, 1970) に示したカゼインを基質とした場合よりもシャープな曲線を描いている。

第3図には反応時間と酵素活性との関係が示されている。この図から基質濃度が高い場合(4倍希釈)には約1.5時間後から反応速度の低下が著しいが、10倍希釈のものでは約20分以後反応速度は急激に減

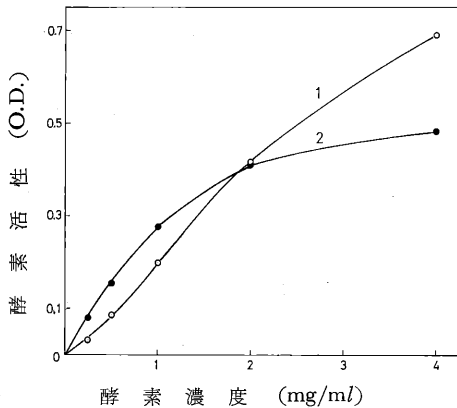


第3図 反応時間と酵素活性との関係

1: 基質 (3% フィブロイン) 4倍希釈
2: 基質10倍希釈

少していることがわかる。

酵素濃度と活性との関係(第4図)については、水溶性フィブリンを基質とした場合、曲線の形は酵素濃度 1 mg/ml までは大体直線に近いが、それ以上の濃度では活性増加の割合は低下している。対照に用いたカゼインを基質とした場合にはS字曲線が認められ、反応様式がかなり異なっているのではないかと推察される。



第4図 酵素濃度と活性との関係

1: 基質カゼイン, 2: フィブリン
酵素濃度は酵素液 1 ml 中に含まれる凍結乾燥した中腸の重量で表した。

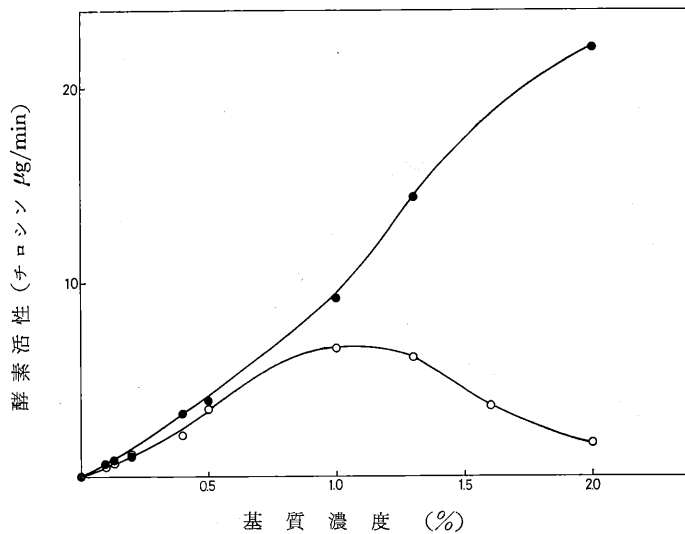
さらに、基質濃度と酵素活性との関係を第5図に示したが、この図から酵素濃度が低い場合、フィブリン濃度が1%以上になると酵素活性はかえって減少していることが明らかである。

ついでこの酵素をカラムクロマトグラフィーによって分離するため、セファローズ 6 B カラムに試料を添加後溶出を行なった。第6図はプロテアーゼは単一のピーク(試験管番号37)として認められるが、蛋白質濃度については2つの山があり、酵素のピークとは必ずしも一致していないことを示している。

第7図に蛹の中腸のプロテアーゼに対する血液の作用を図示してあるが、この実験において試料としては中腸、血液ともに凍結乾燥したものを使った。この図からプロテアーゼ活性は水溶性フィブリンを基質にした場合にも血液の添加によって強く抑えられ、その程度はカゼインを基質に用いた時(江口・古川, 1970)よりも著しいことがわかる。すなわち、体液中に蛋白質分解酵素の阻害物質が存在することがこの場合にも確かめられた。

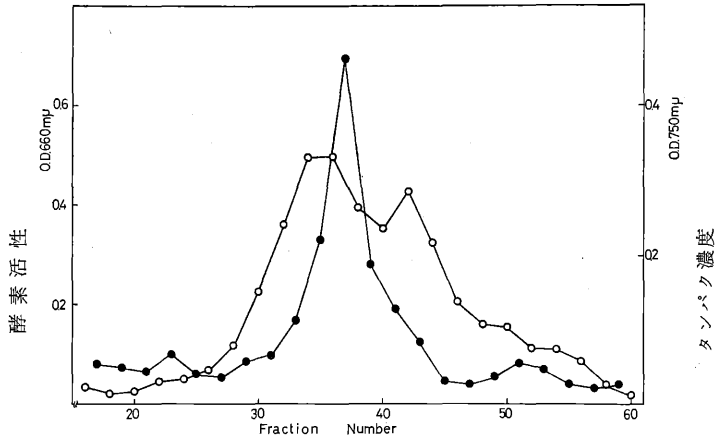
(2) 液状絹を基質に用いた場合

寒天ゲル電気泳動法によってプロテアーゼを分離検出した結果を第8図に示した。電気泳動像はカゼインあるいは可溶化したフィブリンを基質に用

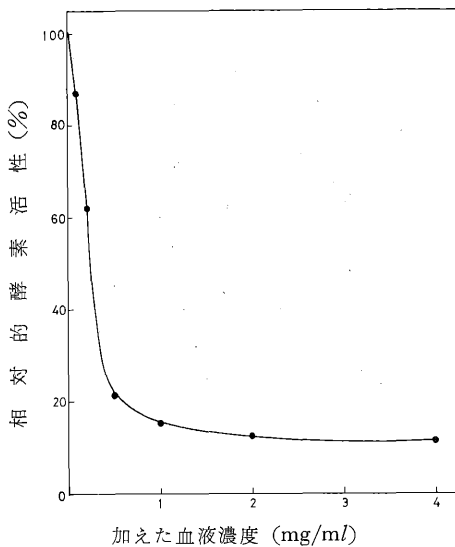


第5図 基質濃度と酵素活性との関係

黒丸: 酵素濃度 2 mg/ml, 白丸: 1 mg/ml



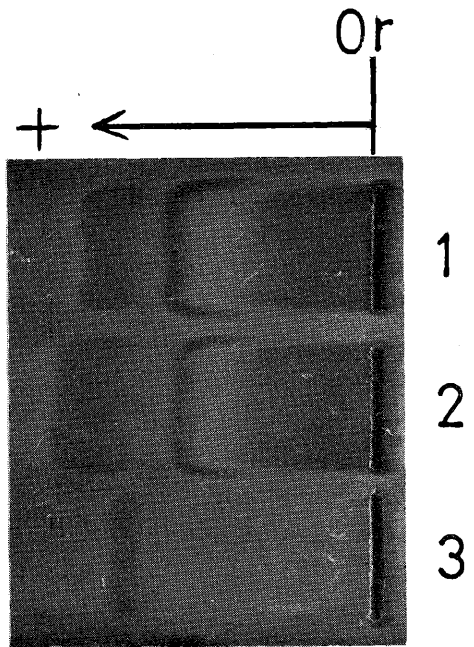
第6図 セファローズ6Bカラムによる蛹中腸の蛋白質分解酵素の溶出曲線 黒丸；酵素活性，白丸；蛋白質



第7図 蛹の中腸の蛋白質分解酵素に対する血液の影響

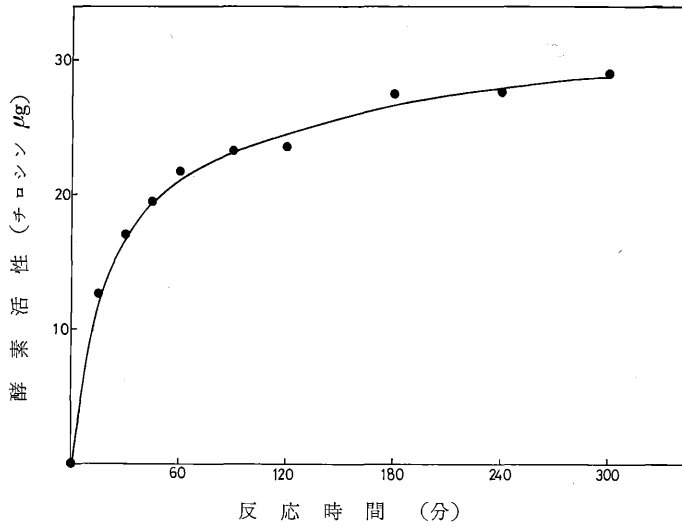
いた時よりも鮮明ではないが、陽極側に移動する1～数本の活性泳動帯が見られ、それらの数および易動度は品種によって異なっている。

このように電気泳動によってプロテアーゼ作用が確かめられたので、つづいてその性質を定量的に調べてみた。第9図は反応時間—活性曲線を表しているが、活性は保温60分頃までは急激に増加しており、それ以後反応速度の低下が著しい。

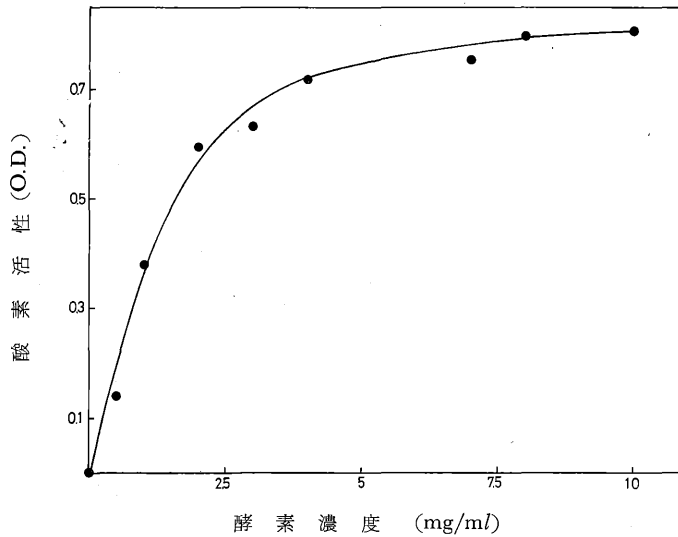


第8図 蛹中腸の蛋白質分解酵素の電気泳動像
基質：液状絹，1：万里×郡光，2：綿秋×鐘和，3：日115号

第10図は酵素濃度と活性との関係をまとめたものである。つづいて、基質濃度と酵素活性との関係を第11図に示した。この図から基質濃度が一定値以上になると酵素作用の低下がみられる現象は水溶性フ



第9図 反応時間と酵素活性との関係



第10図 酵素濃度と活性との関係

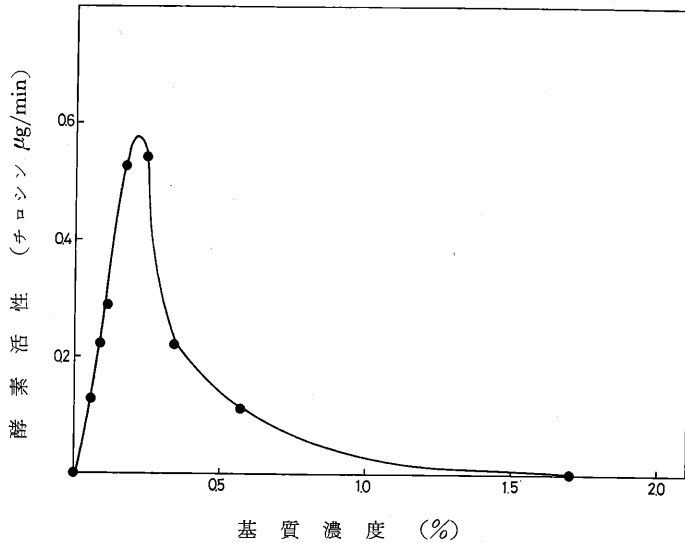
フィブリンを用いた場合よりもさらに著しいことがわかる。

考 察

すでにあげた結果から蛹の中腸のプロテアーゼは基質としてふつうに用いられるカゼインばかりでなく、可溶化したフィブリンや絹糸腺から得られた液状絹を加水分解する作用のあることが明らかで

ある。フィブリン可溶化のための臭化リチウムや銅エチレンジアミン処理はかなり激しい方法であると考えられるが、後者については徳武・奥山(1971)の報告があり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による可溶化したフィブリンの泳動像は液状絹のそれと大差ないと報告されている。

一方、フィブリンに対する市販のプロテアーゼの作用については DRUCKER ら (1953) の論文が



第11図 基質濃度と酵素活性との関係

あるが、カイコから得られた酵素によるフィブロインの分解作用についての報告はわれわれの知る限りでは見当たらない。サク蚕の小腸外葉から得られた cocoonase についての詳細な研究が KAFATOS・WILLIAMS (1964), KAFATOS *et al.*, (1967 a, b) によって進められているが、セリシンあるいはフィブロイン分解についての具体的なデータはあげられていない。

また、われわれはすでにセリシンを基質として電気泳動によって蛹の中腸のプロテアーゼを検出している (EGUCHI *et al.*, 1972)。これに続いて定量的な研究も進めているが、実験法に問題があると考えられるので、現在検討中である。

ところで、前報 (江口・古川, 1970) においても一部ふれたが、下記のような理由から蛹の中腸のプロテアーゼの少なくとも一部は蛾の吐出液中の菌溶解酵素の起源になっているのではないかと考えられる。すなわち、1) 中腸のプロテアーゼ活性は羽化前日最高値に達し、羽化後激減する (江口・古川, 1970)。2) 蛹の中腸のプロテアーゼ活性は大部分その内容物に認められ、中腸組織にはほとんど存在しない (江口・古川, 1970)。3) 蛾の吐出液と蛹の末期の吸胃から得られたプロテアーゼを寒天ゲル電気泳動法 (基質カゼイン) によって分離検出すると、それらの泳動像には差が認められない

(EGUCHI *et al.*, 1972)。

このような理由から、われわれは羽化に伴って中腸のプロテアーゼの一部は口部へ移動し、その過程で、とくに吸胃において吐出液に含まれる菌溶解酵素に変化するのではないかと想像している。

羽化前の蛹の中腸に存在するプロテアーゼが可溶性化したフィブロインや液状絹を分解するということは上の推論に対して一つの根拠を与えるように思われる。さらに、この酵素の比活性はフィブロインを基質に用いた場合の方がカゼインを用いた時よりも約3.8倍高いという結果が得られている (著者、未発表)。このことは菌糸蛋白質の分解作用に対する蛹の中腸の酵素の積極的な役割を示唆しているように考えられる。

実験結果の項で述べたように、基質濃度が一定値以上になると酵素活性が抑制されるというデータが得られたが、プロテアーゼの場合、このような現象は一部の例 (BIRK *et al.*, 1962) を除き稀であるように思われるので、今後この問題についても検討を進めていきたい。

摘 要

羽化前の蛹の中腸に含まれる蛋白質分解酵素は銅—エチレンジアミンあるいは臭化リチウムで可溶性化したフィブロインおよび液状絹を加水分解する作用

をもつことが明らかになった。

すなわち、上記の蛋白質を基質に用いると寒天ゲル電気泳動によって、蛹の中腸のプロテアーゼは陽極側に移動する1～数本の活性泳動帯として認められた。

さらに、酵素の性質を知るため最適 pH、反応時間—活性曲線、基質濃度あるいは酵素濃度と酵素活性との関係などを調べた。またカラムクロマトグラフィによって単一のプロテアーゼ活性のピークがみられた。

前報およびこの論文において示した結果は蛹中腸のプロテアーゼの少なくとも一部は蛾の吐出液中の菌溶解酵素の起源になるのではないかという推論に対して根拠を与えるように思われる。

文 献

- BIRK, Y., I. HARPAZ, I. ISHAAYA and A. BONDI (1962): *J. Insect Physiol.*, **8**, 417-429.
- EGUCHI, M. and Y. YOSHITAKE (1967): *Nature*, **214**, 843-844.
- EGUCHI, M. (1968): *Appl. Ent. Zool.*, **3**, 189-197.
- 江口正治・古川繁 (1970): *日蚕雑*, **39**, 387-392.
- EGUCHI, M., S. FURUKAWA and A. IWAMOTO (1972): *J. Insect Physiol.*, **18**, 2457-2467.
- DRUCKER, B., R. HAINSWORTH and S.G. SMITH (1953): *J. Text. Inst.*, **44**, 420-435.
- KAFATOS, F.C. and C.M. WILLIAMS (1964): *Science*, **146**, 538-540.
- KAFATOS, F.C., A.M. TARTAKOFF and J.H. LAW (1967 a): *J. Biol. Chem.*, **242**, 1477-1487.
- KAFATOS, F. C., J. H. LAW and A. M. TARTAKOFF (1967 b): *J. Biol. Chem.* **242**, 1488-1494.
- 徳武 哲・奥山典生 (1971): *生化学*, **43**, 576.