

家蚕血液中のプロテアーゼインヒビター

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者名	江口,正治 羽田,一郎 巖本,章予
発行元	日本蠶絲學會
巻/号	48巻2号
掲載ページ	p. 89-95
発行年月	1979年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



家蚕血液中のプロテアーゼインヒビター：家蚕 消化液および中腸のプロテアーゼに対する作用

江口正治・羽田一郎・巖本章子

京都市左京区松ヶ崎・京都工芸繊維大学繊維学部 (〒 606)
(1978年9月4日受理)

動植物の組織中には蛋白分解酵素の活性を阻害する物質が広く分布していることが知られている。KUNITZ・NORTHROP (1936) がはじめてウシ膵臓から、また KUNITZ (1946) がダイズからトリプシンインヒビターを結晶状にとり、それらが蛋白質であることを示して以来、インヒビターについての研究が盛んに行なわれている。

カイコの血液中にプロテアーゼインヒビターが存在することは森田・吉川 (1961) によってはじめて学会発表されたが、詳細な報告は出されていない。その後、江口らによって家蚕蛹の中腸のプロテアーゼ活性が幼虫あるいは蛹の血液添加によって抑えられることが報告された(江口・古川, 1970; EGUCHIら, 1972; EGUCHI・IWAMOTO, 1975)。また、梅津・志村 (1972, 1976) は家蚕血液中のトリプシンインヒビターを精製し、2, 3の性質を検討した。一方、血液中のキモトリプシンインヒビターについても研究が進められている(佐々木, 1976, 1977)。

これまでのカイコにおけるプロテアーゼインヒビター研究の問題点の一つは、プロテアーゼとして市販のトリプシンやキモトリプシンが用いられていることが多いことであろう。酵素のインヒビターが体内での代謝調節に一役かっているとすれば、材料の酵素は体内に実際存在するものを用いることが、生理的意義を知るためには重要ではないかと考えられる。このような観点から、我々は家蚕消化液および中腸組織のプロテアーゼに対する作用に重点をおいてインヒビターの研究を進めているが、これまでにわかった概要について報告する。

材料と方法

供試蚕品種としては日115号、支108号および青熟を用いた。材料に用いた血液は主として5齢盛食期のカイコの腹脚を切って、氷冷した試験管にとり、凍結保存あるいは凍結乾燥したものを使用した。なお血液の保存法によって実験結果には余り大きな差はみられなかった。カラムを用いる実験においては、溶出中に添加した血液の変化によるカラムの目詰りが生じるので、添加前に血液を室温で約30分間攪拌後遠心分離し、上清を使用した。

プロテアーゼの材料としては、5齢盛食期のカイコを解剖して中腸組織をとり出し、洗浄後凍結保存したものを用いた。テフロン製ホモジナイザーで0.25M蔗糖液とともに磨砕後、10,000×g, 20分間遠心分離後その上清を使用した。また消化液は1日絶食後、電気ショック法により吐出する液を氷冷試験管中に採取した。トリプシンおよびキモトリプシンはともにウシの膵臓由来のもので、2~3回結晶化したシグマー社製品を用いた。

プロテアーゼ活性の測定法についてはすでに述べた(EGUCHI・IWAMOTO, 1976)ので、細かい点は省略する。基質にはカゼイン(メルク, ハマステン)を用い、分解生成物をFOLIN呈色法によって定量し、単位時間に生成するチロシン量で活性を表した。また蛋白質の定量はLOWRY法によった。

インヒビター活性の定量のための反応液は1%カゼイン0.5ml, 酵素液0.5ml, 0.1Mホウ酸-NaOH緩衝液2.5ml および血液0.5ml という組成で、血液は凍結乾燥粉末を0.25M蔗糖液で希釈して用いた。また、緩衝液は消化液および中腸の場合にはpH11.3, トリプシンとキモトリプシンについてはpH8.0のものを使用した。これに対し、対照実験用

としては血液の代わりに緩衝液0.5mlを加えてプロテアーゼ活性を測定した。阻害率は次式から算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{ただし, } A \text{ はプロテアーゼのみの場合, } B \text{ は血液を作用させたプロテアーゼ活性})$$

熱安定性の実験については、10mg/mlの濃度に溶解した凍結乾燥血液を、各温度に15分間放置後阻害活性を測定した。血液の分画には2.2×70cmカラムを用い、セファデックス G-75によるゲル濾過によって分離した。血液の添加量は10mlで、0.9%NaClを含む0.01M ほう酸-NaOH 緩衝液、pH8.0で溶出し、6.5mlずつ分取した。

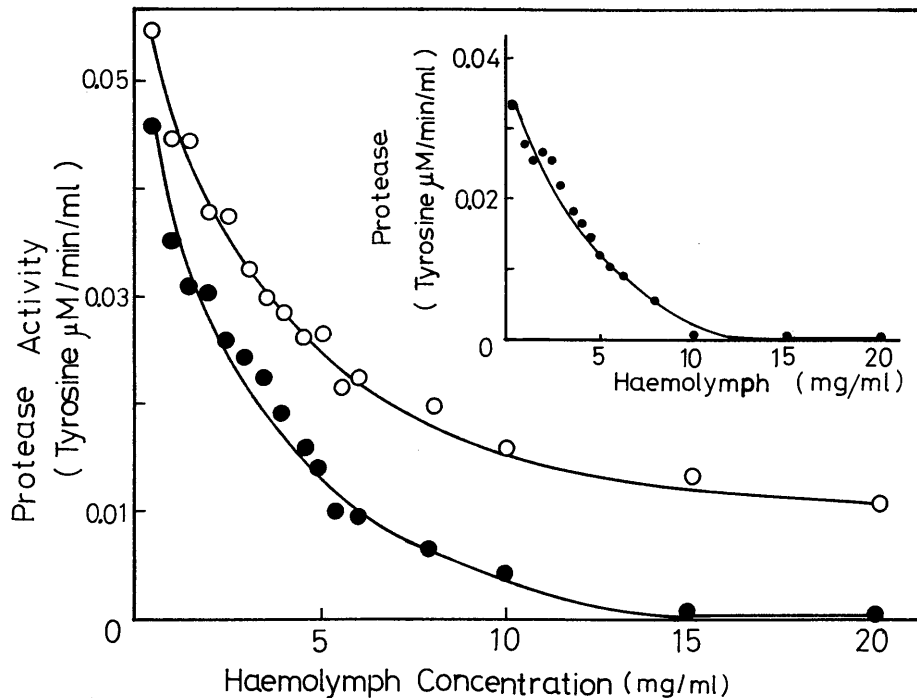
結 果

まず、カイコの消化液および中腸組織のプロテアーゼとトリプシンの活性に及ぼすカイコの血液濃度の影響について第1図に示した。この図にみられるように、カイコのプロテアーゼ活性は血液の添加に

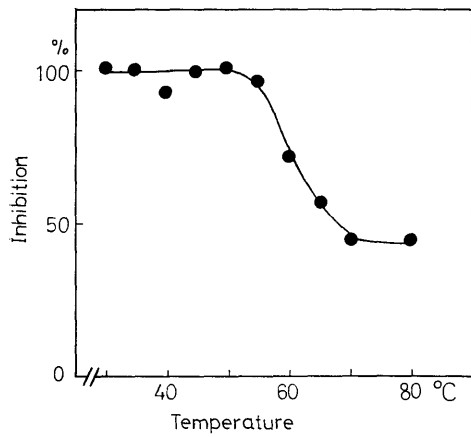
よって強く抑えられるが、血液中のインヒビターの影響は中腸よりも消化液のプロテアーゼに対する方が大きい。また、トリプシンの場合の活性-血液濃度曲線は消化液プロテアーゼを用いた場合の曲線に似ていることがわかる。

このように、酵素活性が血液中のインヒビターによって強く阻害されることが明らかになったので、つづいてこのプロテアーゼインヒビターの熱安定性を調べた(第2図)。30℃におけるインヒビター活性を100とすると、55℃付近まではほとんど活性は下らないが、それ以上の温度ではインヒビター活性の低下が著しく、70℃で55%の阻害率となった。しかし80℃においてもなお45%の残存活性が認められた。この結果は血液中には熱によって不活化されるインヒビターの外に、熱に安定な因子も含まれることを示唆している。

以上述べたように、血液全体を用いた場合のプロテアーゼ阻害作用についてはいくつかの点が明らかになった。血液に含まれるプロテアーゼインヒビタ



第1図 家蚕消化液と中腸組織のプロテアーゼおよびトリプシン(わく内)に対する家蚕血液中のプロテアーゼインヒビターの影響。
縦軸は用いた希釈酵素液当りの酵素活性、横軸は添加した凍結乾燥血液の濃度を示す。
消化液プロテアーゼ (●—●), 中腸プロテアーゼ (○—○)

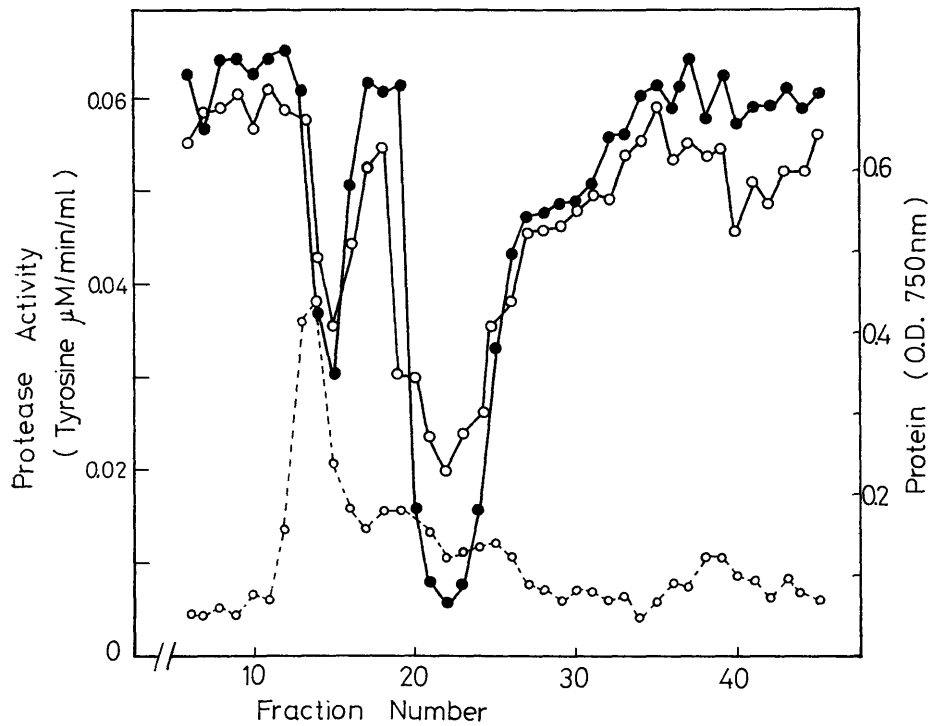


第2図 家蚕血液中のプロテアーゼインヒターの熱安定性。
縦軸は熱処理前の活性を100とした場合の各温度処理後の活性、横軸は処理温度を示す、プロテアーゼとしてはトリプシンを用いた。

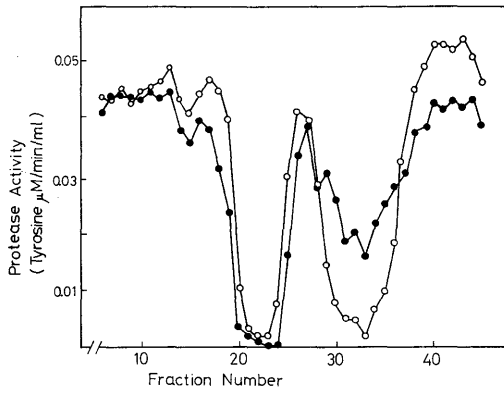
の組成と性質をさらに詳しく知るためには、インヒター成分を分離する必要があるので、セファデックス G-75 カラムによって血液成分を分画し、各フラクションを用いてプロテアーゼに対する作用を調べた。

第3図は縦軸にプロテアーゼ活性および蛋白濃度、横軸に血液の分画番号を示しているが、酵素として消化液あるいは中腸プロテアーゼを用いた場合、何れも試験管番号15と22に酵素活性の谷がみられ、この部分にインヒターが含まれていることを示している。また、谷の深さから消化液プロテアーゼに対する阻害の程度の方が大きいことが知られた。

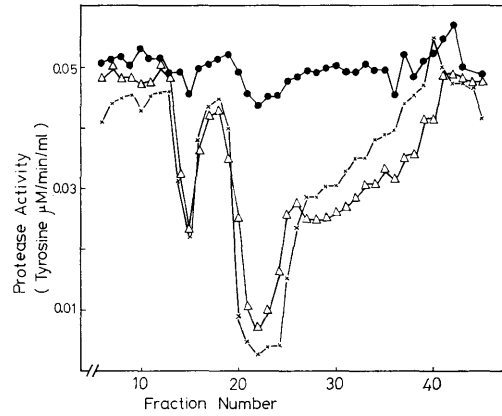
つづいて、比較のために市販のトリプシンおよびキモトリプシンに対する作用を調べた。第4図のグラフからみると、試験管番号15の最初の谷はわずかに認められるが、第3および5図のものに比べて著しく小さい。つぎに No. 22付近に深い谷部があり、



第3図 セファデックスG-75による血液中のインヒターの分画。
酵素として家蚕消化液および中腸組織のプロテアーゼを用いた。カラムサイズ、2.2×70cm；添加試料、血液10ml、溶出液、0.9%NaClを含む0.01M ホウ酸緩衝液、pH8.0、試験管1本当り6.5mlを分取消化液プロテアーゼ(●—●)、中腸プロテアーゼ(○—○)、血液中の蛋白濃度(○……○)



第4図 セファデックス G-75 による血液中のインヒビターの分画。
 プロテアーゼとしてトリプシンおよびキモトリプシンを用いた。カラムサイズその他は第3図に同じ。
 トリプシン (●—●), キモトリプシン (○—○)

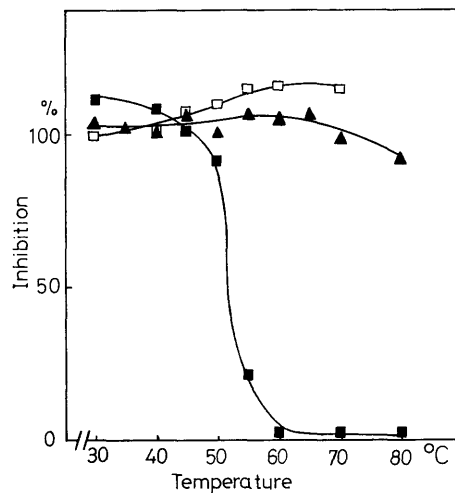


第5図 セファデックス G-75 による血液中のインヒビターの分画。
 酵素液として家蚕消化液プロテアーゼの3成分 (6B1~3) を用いた。
 プロテアーゼ 6B-1 (●—●), 6B-2 (△—△), 6B-3 (×—×)

この部分の血液成分によって両プロテアーゼがともに強く阻害されることがわかる。さらに、No.33を中心の前に認められなかった谷が存在し、この部分の阻害の程度はキモトリプシンを用いた場合の方が大きいという結果が得られた。このようにカイコのプロテアーゼを用いた場合と、トリプシンあるいはキモトリプシンの場合で阻害パターンに差が認められた。

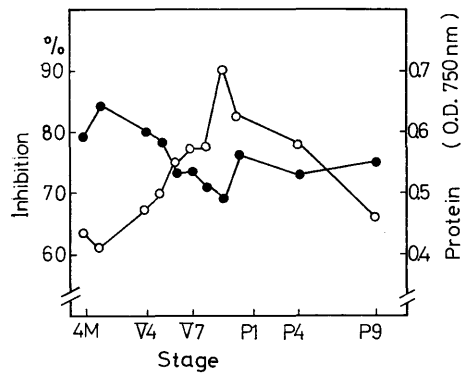
消化液プロテアーゼをセファローズ 6B カラムによって3成分 (6B-1~3) に分離し、部分精製後それらの性質を比較すると、いくつかの相違点と類似点が認められることについては既に報告した。(巖本・江口, 1978 a, b) が、第5図はそれらのプロテアーゼを用いた場合の結果を示している。それによると、消化液プロテアーゼ 6B-2 および 3 については、試験管番号15および22のフラクションを底とする大きな活性の谷がこの場合にも認められる。しかし、6B-1 についてはわずかに小さな谷がみられるだけで、No.45まで酵素活性の大きな低下は認められず、このプロテアーゼが血液中のインヒビターによって非常に阻害されにくいことを示している。

血液全体を用いた場合の熱安定性の実験結果についてはすでに第2図に示したが、第3~5図と同じように、セファデックス G-75 カラムによって分画した血液成分について、第2図の場合と同じ実験条



第6図 セファデックス G-75 で分離した血液の各フラクションを用いた場合の熱安定性の比較。
 第1画分 (□—□), 第2画分 (■—■), 第3画分 (▲—▲)

件で、3種のインヒビターに対する温度の影響を調べた。第6図にみられるように、第2の谷の部分のインヒビターは50°C以上で活性の減少がみられ、60°C、15分間の処理で完全に失活した。しかし、第1および第3のフラクションのインヒビターは熱に対し非常に安定で、とくに第1のフラクションのものは70°Cにおいても全く失活がみられなかった。なお



第7図 カイコの発育に伴うインヒター活性の変化。
縦軸は阻害率(%), 横軸は発育時期を示す。4M; 4
眠; V4, 5令4日目; P4, 化蛹4日目
阻害率 (●—●), 血液蛋白濃度 (○—○)

この場合、70℃以上では用いた血液成分が沈殿し、それ以上の温度での実験は困難であった。

これまで5齢盛食蚕の血液に含まれるインヒターの性質について述べたが、カイコの発育変態に伴うインヒター活性の変化を知ることは種々の点からみて重要であるように思われる。第7図に発育に伴う阻害率の変化を示した。この図から5齢期では蛋白濃度は前蛹期まで上昇するが、阻害率の方は次第に減少し、化蛹前に一時増加が認められるが、蛹期にはあまり大きな変化がないことがわかる。今後このような量的変化だけでなく、インヒターの質的な変化も検討したいと考えている。

考 察

これまでのカイコにおけるプロテアーゼインヒターの研究は、プロテアーゼあるいはインヒターのどちらかに他の生物起源のものが用いられている。すなわち、梅津・志村(1972, 1976)は市販のトリプシン、佐々木(1976, 1977)はキモトリプシンに対する家蚕血液中のインヒターの作用を調べ、反対に ITO (1977), HIXSON・LASKOWSKI(1970)はそれぞれ家蚕消化液あるいは野蚕のコクナーゼに対するダイズトリプシンインヒターの影響について報告している。生体内で酵素のインヒターは生体制御という面で重要な役割を果していると考えられるので、このような観点からも筆者らの研究のように、酵素もインヒターも共にその生体に存在するものを用いる方が適当ではないかと思われる。

実験の結果から家蚕血液中には、家蚕の消化液および中腸組織のプロテアーゼをかなり強く阻害する物質が存在することが明らかになった。我々は野蚕の血液中のインヒターについても研究を進めているので、別報で報告する予定である。

血液成分をセファデックスG-75カラムで分画し、インヒターの存在するフラクションを数種のプロテアーゼに対する作用から検索すると、3つの画分が認められ、プロテアーゼによって阻害パターンが異なることが明らかになった。すなわち家蚕消化液および中腸のプロテアーゼは酵素の活性に関与する部分として、トリプシンやキモトリプシンと異なるものも含んでいることが示唆された。

さらに、熱安定性についての実験結果から、血液中には熱に安定なものと、不安定なインヒターが存在することがわかった。この問題に関連して梅津・志村(1972)は55℃、10分間の加熱でほとんど失活するので、家蚕のトリプシンインヒターは熱に対して比較的失活しやすいと述べているが、これはおそらく透析によって熱に安定な成分が除かれたためではないかと想像される。

プロテアーゼインヒターについての化学的研究は非常に多い(MARTIN, 1961; DIBELLA・LIENER, 1969; BURCK, 1970; MOROI・YAMASAKI, 1974; SAKLATVALA ら, 1976; DUBIN, 1977; 小谷・池中, 1977)が、生理的意義という点ではヒトの場合を除き、知られない面が多いように思われる。

昆虫においては、吸血性昆虫の消化管に存在するトリプシンが脊椎動物の血清中のインヒターによって阻害されることが知られている(HUANG, 1971 a, b)が、これらの研究は昆虫自体の生理という面からは見方が異なっているように考えられる。ショウジョウバエ(KIKKAWA, 1968)や蚊(SPIRO-KERN・CHEN, 1977)で、これらの体内のプロテアーゼに作用するインヒターの存在が報告されているが、それらの役割についてはわかっていない。カイコにおいてもインヒターの研究は化学的な面からの追究が主としてなされている(梅津・志村, 1972, 1976; 佐々木, 1976, 1977)。

筆者らはカイコ血液中のインヒターの存在意義として、次の3つが重要ではないかと想像している。その1つは血液中的プロテアーゼの抑制、制御ということであろう。我々の実験によると、界面活

性剤処理によって無処理のものには認められない血液プロテアーゼ活性が現れる。このことは血液中のプロテアーゼとそのインヒビターの結合が上記処理によって解離したと考えられるので、現在検討を進めている。

次に消化液と中腸組織とくに前者には非常に活性の強いプロテアーゼが含まれるが、もしこれらのプロテアーゼが血液中に流入すれば、カイコにとって致命的な影響を与えることは明らかである。例えば病原体の侵入によってこのような現象が起るものと思われる。これらの流入プロテアーゼの作用を抑えることは、プロテアーゼインヒビターの重要な役割であろう。第3に皮膚から侵入した外来の、例えば糸状菌のプロテアーゼに対する阻害作用も血液中のインヒビターの役目の1つであると考えられる。このようなインヒビターの生理的意義を知るとともに、その利用の道を開くため、今後我々は種々の方向から実験を重ねて行くつもりである。

摘 要

主として5齢盛食期のカイコを用い、消化液および中腸組織のプロテアーゼに対する血液中のインヒビターの影響を調べ、併せてトリプシンおよびキモトリプシンに対する作用と比較した。

カイコのプロテアーゼは血液の添加によって活性が強く抑えられたが、酵素活性—血液濃度曲線の型は消化液プロテアーゼの方が中腸のものよりもトリプシンの場合に似ていた。

カイコの血液をセファデックス G-75 カラムで分離すると、分子量の異なる3つのインヒビターが認められた。すなわち、最初のフラクションはカイコの消化液と中腸のプロテアーゼに有効であり、第3番目のものはトリプシンとキモトリプシンにのみ阻害作用を示したが、2番目のものは上記4種類のプロテアーゼをすべて阻害した。すなわちカイコのプロテアーゼと市販のプロテアーゼとの阻害パターンに差がみられた。

つづいてインヒビターの熱安定性を調べた結果、熱に安定な2成分(第1および第3画分)と不安定な1成分(第2画分)が存在することがわかった。

またカイコの発育時期を追ってインヒビター活性を測定すると、5齢期では発育とともに活性が減少したが、前蛹期に一時上昇し、蛹期には大きな変化

は認められなかった。

このような実験結果から、カイコにおける血液中のプロテアーゼインヒビターの存在意義について考察した。

文 献

- BURCK, P. J. (1970): In "Methods in Enzymology" (G. E. PERLMANN and L. LORAND ed.) vol. 19, pp. 906—914, Academic Press, New York.
- DiBELLA, F. P. and I. E. LIENER (1969): J. Biol. Chem., **244**, 2824—2829.
- DUBIN, A. (1977): Eur. J. Biochem., **73**, 429—435.
- 江口正治・吉川繁(1970): 日蚕雑., **39**, 387—392.
- EGUCHI, M., S. FURUKAWA and A. IWAMOTO (1972): J. Insect Physiol., **18**, 2457—2467.
- EGUCHI, M. and A. IWAMOTO (1975): J. Insect Physiol., **21**, 577—588.
- EGUCHI, M. and A. IWAMOTO (1976): Insect Biochem., **6**, 491—496.
- HIXSON, H.F. and M. LASKOWSKI (1970): Biochem., **9**, 166—170.
- HUANG, C. T. (1971 a): Insect Biochem., **1**, 27—38.
- HUANG, C. T. (1971 b): Insect Biochem., **1**, 207—227.
- ITO, T. (1977) J. Sericult. Sci. Japan, **46**, 171—172.
- 巖本章子・江口正治(1978): 日蚕雑., **47**, 285—291.
- 巖本章子・江口正治(1979): 日蚕雑., **48**, 31—36.
- KIKKAWA, H. (1968): Japan. J. Genetics, **43**, 137—148.
- KUNITZ, M. and J. H. NORTHROP (1936): J. Gen. Physiol., **19**, 991—1007.
- KUNITZ, M. (1946): J. Gen. Physiol., **29**, 149—154.
- MARTIN, C. J. (1961): J. Biol. Chem., **236**, 2672—2676.
- 森田敏照・吉川秀男(1961): 動雑., **70**, 53—54. (講要).
- MOROI, M. and M. YAMASAKI (1974): Biochim. Biophys. Acta, **359**, 130—141.
- 小谷昌司・池中徳治(1977): 生化学., **49**, 1—18.
- SAKLATVALA, J., G.C. WOOD and D.D. WHITE (1976): Biochem. J., **157**, 339—351.
- 佐々木卓治 (1976): 生化学., **48**, 544 (講要).
- 佐々木卓治 (1977): 生化学., **49**, 763 (講要).
- SPIRO-KERN, A. and P. S. CHEN (1977): Insect Biochem., **7**, 453—457.
- 梅津良逸・志村憲助 (1972): 農化., **46**, 385—391.
- 梅津良逸・志村憲助 (1976): 農化講演要旨集., **51**, 87.

Summary**Protease inhibitors in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*: their effect on the proteases from the digestive fluid and the midgut of the silkworm**

By

Masaharu EGUCHI, Ichiro HANEDA and Akiko IWAMOTO

The effect of inhibitors in the haemolymph of the silkworm on the proteases from the digestive fluid and midgut of the silkworm was studied and compared with their effect on trypsin and chymotrypsin.

Protease activity of the midgut and the digestive fluid was inhibited by the addition of haemolymph. The enzyme activity-haemolymph concentration curve of digestive fluid protease was similar to that of trypsin, but curve of midgut protease was somewhat different from the above proteases.

Three inhibitors were demonstrated by the gel filtration of haemolymph on Sephadex G-75; the first fraction inhibited the digestive fluid and midgut proteases, the third one was effective to trypsin and chymotrypsin and the second one inhibited all the four proteases. The first and third fractions were heat stable but the second one was heat labile.

The inhibitory effect decreased during the fifth instar, increased just before pupation and there was no great change in the pupal stage.

(*Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibers, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 〒 606*)