

# カイコ消化液アミラーゼ活性の強弱とアイソザイムの多型性 について

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	536
掲載ページ	p. 496-500
発行年月	1984年12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



## カイコ消化液アミラーゼ活性の強弱と アイソザイムの多型性について

原 和二郎・藤井 博・坂口文吾

福岡市東区箱崎・九州大学農学部 (〒 812)

(1984年5月25日 受領)

WAJIRO HARA, HIROSHI FUJII and BUNGO SAKAGUCHI: Activity and polymorphism of digestive juice amylase in various strains of *Bombyx mori*.

The relationship between amylase activity and electrophoretic patterns of digestive juice was analyzed on the basis of experimental results of accurate measurements of enzyme activity and electrophoresis.

When the amylase activity of digestive juice was measured by the Somogyi-Nelson method at the 4th day in the 5th instar larvae, the activities in + strains (p60, p50) were hundreds or thousands times stronger than that in *ae* strain (p61).

Two kinds of amylase isozymes were detected in the digestive juice by thin layer polyacrylamide gel electrophoresis: 1) cathodal isozymes showing a strong activity and 2) anodal isozymes showing a weak activity. Strains, p50 and p60 had 4 (4 type) and 5 (5 type) cathodal bands, respectively, but p61 had no cathodal bands (0 type).

Using 361 strains kept at the Institute of Silkworm Genetics of Kyushu University, amylase activity and cathodal isozyme types were analyzed. Only three types of cathodal isozymes, 4 type, 5 type, and 0 type were found among the strains. The cathodal isozymes were detected in the larvae of + strains but not in the larvae of *ae* strains. In some cases, two of the three types (4 type, 5 type, 0 type) were observed in a single strain. (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812)

カイコ消化液アミラーゼ活性と遺伝子との関係を明らかにする目的で、各種系統を用いSomogyi-Nelson法による活性の測定並びに水平平板ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるアイソザイムの分析を行った。

アミラーゼ活性強(+型)の系統は弱(*ae*)型の系統の約600倍ないし2,000倍の強さを示し、この値は系統によって異なっていた。また+型系統中には*ae*型個体の混在が認められたが、*ae*型系統では+型個体の混在は認められなかった。電気泳動法でアイソザイムを分析した結果、+型では陰極側に4本(4型)或いは5本(5型)検出されたが、*ae*型では全く検出されなかった(0型)。しかし陽極側へ移動したアミラーゼは+型と*ae*型両系統に活性帯が認められた。九大家蚕遺伝子実験施設保存の361系統において、陰極側アイソザイムを調べた結果、4型、5型、0型の3種のみで、他の型は検出されなかった。ある系統にはこれらの型の混在が認められた。

カイコの消化液のアミラーゼについて、松村(1933, 1934, 1951)は系統によって活性のあるものと活性のないものとを認め、これら両形質は対立形質であり、活性のない形質は*ae*遺伝子によって支配

カイコ消化液アミラーゼアイソザイムの生化遺伝学的研究 第1報

されることを明らかにした。この活性のない形質(以下*ae*型と略記)について、松村はアミラーゼのデンプン分解速度を測る方法によってアミラーゼ活性が殆んどないとしたが、伊藤(1953)はヨード・デンプン反応後の試料中の糖を測り微弱ではあるがアミラーゼ活性の存在を認めている。また*ae*型

について平田・蒲生 (1969 a, b), 平田 (1971, 1974), 平田・佐藤 (1972), 金勝 (1972) らもヨード・デンプン反応により, アミラーゼ活性を認めている。

河原ら (1973) は, アミラーゼ活性の強弱の差は酵素蛋白質の質的な差異によるのではないかと考え, ディスク電気泳動法を用いて, 消化液アミラーゼアイソザイムを調べたが, アイソザイムパターンと活性の強弱との関連性は認められないと報告した。

我々はアミラーゼ活性の強弱を萩原 (1969) に準じ Somogyi-Nelson 法により厳密に測定し, さらにこの酵素をアイソザイムのレベルで解析する為の電気泳動法を確立し, これに基づいてカイコ消化液アミラーゼにおける多型性について追求した。

この研究を開始する機会を与えて頂いた筑紫春生九州大学名誉教授, 材料の提供と御指導を頂いた九州大学農学部附属家蚕遺伝子実験施設の土井良宏助教授, また便宜を頂いた同施設職員の方々に感謝の意を表す。

## 材料と方法

材料は九州大学農学部附属家蚕遺伝子実験施設に保存されている 361 系統を用いた。これらの系統の幼虫から電気ショックにより吐液させ消化液を採取した。調査系統中には 3 眠, 4 眠, 5 眠のカイコが含まれている。そこで 3 眠蚕の系統からは 3 齢 2 日目に混合試料, 4 齢 3 日目に個別別試料を, 4 眠蚕, 5 眠蚕の系統からはそれぞれ 4 齢 2 日目に混合試料, 5 齢 4 日目に個別別試料を各々 10 頭分採取した。

これら消化液のアミラーゼ活性は分解産物である還元糖量を Somogyi-Nelson 法により測定した。すなわち,  $1/20$ M ホウ酸一水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.4) に溶解した 1% 可溶性デンプン (Connaught 社製: Starch hydrolyzed) 0.5ml と  $1/20$ M ホウ酸緩衝液で希釈した消化液 0.5ml とを混合し,  $37^{\circ}\text{C}$  で 5~60 分間保温した。次いでこの混合液に Somogyi 試薬を 1 ml 加え 25 分間煮沸し, 室温に冷却後 Nelson 試薬を 0.5ml 加え, 30 分間放置後  $\text{H}_2\text{O}$  5 ml を加え 500nm における吸光度を測定した。対照には基質溶液と酵素溶液を混合し, ただちに煮沸し Somogyi-Nelson 反応を行ったものを用いた。

マルトースを用いて作成した標準曲線により試験区と対照区との吸光度差から還元糖量を求め, 1 分間に産生される還元糖量をマルトース量 ( $1\mu\text{g}$ ) に換算し, これをアミラーゼ活性 1 ユニットとして表示した。

電気泳動法によるアミラーゼ活性帯の検出は Ornstein and Davis (1962) の方法に準じたディスク電気泳動, 或いは Poulik (1957) の方法に準じた水平平板電気泳動を行った後, ゲルを  $1/20$ M ホウ酸一水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.4) に溶解した 1~2% 可溶性デンプン液中で, 1~2 時間  $37^{\circ}\text{C}$  に保温し, ゲルを取り出し  $1/40$ N ヨード・ヨードカリ溶液に浸漬した。

アミラーゼ活性を示さない部域はヨード・デンプン反応により紫色に染色されるのに対し, 活性を示す部域は透明となる。

消化液の濃縮試料は, pH 9.4 に調整した硫酸の 70% 溶液の沈澱画分を  $1/20$ M ホウ酸一水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.4) に対し透析後, 更に試料をコロジオンバッグを用いて濃縮して調製した。

## 結果

### 1. 消化液アミラーゼ活性

消化液アミラーゼ活性が強いとされている p 50 (大造), p 60 系統の消化液の  $1/500$  希釈試料を用いてアミラーゼ活性を測定した。その結果, p 50 の活性は 23,900 ユニット/ml, p 60 は 6,300 ユニット/ml であった。

アミラーゼ活性が弱いとされている p 61 系統の

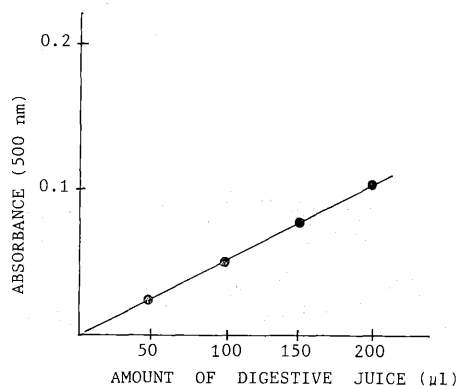


Fig. 1 Relationship between reaction intensity and amount of digestive juice in strain p 61(ce).

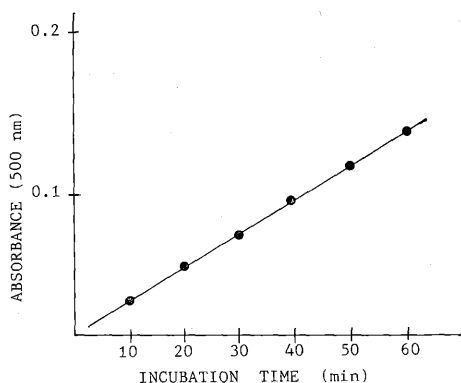


Fig. 2 Time course of reaction in digestive juice of strain p 61 (*ae*).

場合は、p 50 或いは p 60 と同様の条件で活性の測定を試みても、活性が極めて弱く定量することができなかったため消化液量を多くして測定した。まず、37°C、20分間の反応で、消化液量 50 $\mu$ l から 200 $\mu$ l までの範囲において還元糖量は直線的に増加した (Fig. 1)。次に消化液 100 $\mu$ l を用い、反応時間に伴う還元糖量の変化をみると、60分までは直線的に増加し (Fig. 2)、p 61 系統のアミラーゼ活性は 10 ユニット/ml であった。

## 2. 消化液アミラーゼアインザイムの多型性

消化液アミラーゼ活性について強・弱両系統では、単位消化液量当りの活性に極めて大きな差が認められた。そこでこの差異をもたらす原因について、電気泳動法により検討した。

活性強の p 60 系統と活性弱の p 61 系統の消化液を等量用いて、ディスク電気泳動を行ったところ、p 60、p 61 共に分離ゲル中にアミラーゼ活性帯が検出された。しかし活性が弱い系統にもかかわらず

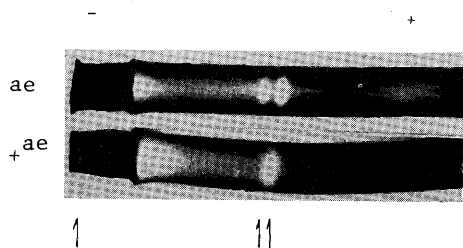


Fig. 3 Disc electrophoretic profile of amylase in digestive juice of strains p 60(+) and p 61(*ae*).

p 61 では 2 本に対し、それが強い系統の p 60 では 1 本であった (Fig. 3)。

電気泳動後のゲルを詳細にみると濃縮ゲル中に、p 61 では認められない活性帯が p 60 の方では認められた。この活性帯はここで用いた電気泳動の条件ではゲル中に入らないアミラーゼ蛋白質が存在する可能性があることを意味している。そこで電気泳動の条件を種々検討し、ディスク電気泳動法で検出できなかったアミラーゼ活性帯の分離を試みることにした。

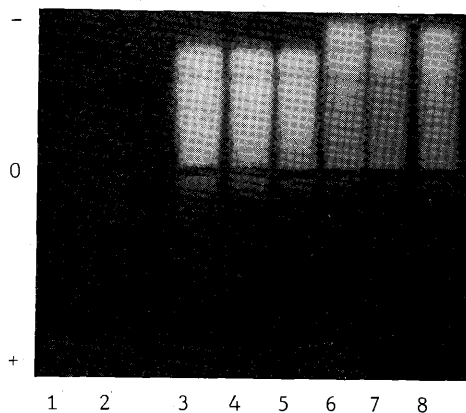


Fig. 4 Horizontal electrophoretic profile of amylase in digestive juice of *ae* and + strains.  
1, 2: p 61(*ae*); 3, 4, 5: p 50(+); 6, 7, 8: p 60(+).

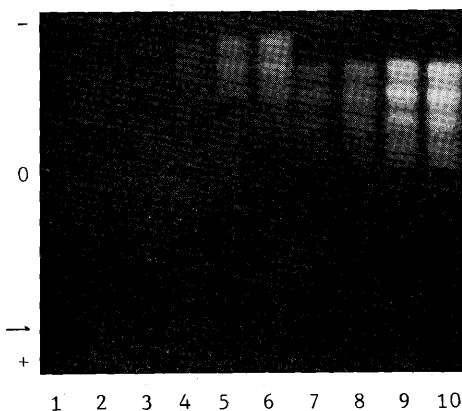


Fig. 5 Comparison of amylase isozymes between diluted digestive juice (DJ) of + strains and concentrated DJ of *ae* strain.  
1, 2: crude,  $\times 20$  concentrated DJ of p 61(*ae*); 3, 4, 5, 6: 1/50, 1/20, 1/10 diluted, crude DJ of p 60(+); 7, 8, 9, 10: 1/100, 1/50, 1/10 diluted, crude DJ of p 50(+).

Table 1 Classification of amylase activity and cathodal amylase isozyme types between strains.

Amylase activity	Isozyme pattern	Number of strains
<i>ae</i>	0	205
+	4	138
+	5	20
+	4 & 5	2

+ : showing more than 100 units/ml digestive juice; *ae* : showing less than 100 units/ml digestive juice; 4 : having 4 cathodal amylase bands; 5 : having 5 cathodal amylase bands; 0 : having no cathodal amylase bands.

Poulik (1957) の方法に準じた水平平板ゲル電気泳動法による分離を試みたところ、陽極側へ移動する弱いアミラーゼ活性帯と、陰極側に広い範囲に強い活性を示す領域が検出された。しかも陰極側の活性領域は活性強の p60 には検出されるのに対し、活性弱の p61 には検出されなかった。

そこで陰極側のアミラーゼ活性領域の分離能を高める為、さらにこの電気泳動法を用いて種々の条件を検討した結果、ポリアクリルアミド 6%, ゲル内緩衝液<sup>1</sup>/<sub>60</sub>M トリス・クエン酸 (pH 9.1), 電極用緩衝液<sup>3</sup>/<sub>10</sub>M ホウ酸-水酸化ナトリウム (pH 7.5) を用い、試料をゲルの中央部に置き 2 mA/cm の定電流で 1.5 時間、4°C の低温室で泳動を行うという条件で、分解能の高い泳動像を得た。

この方法により消化液アミラーゼ活性強の p50 と p60 では陰極側へ移動するアミラーゼ活性帯は p50 では 4 本、p60 では 5 本が検出されたが、活性弱の p61 では陰極側に活性帯は全く検出されなかった。ところが陽極側には活性の強・弱いずれの系統でもアミラーゼ活性帯が検出されたが、その活性度は陰極側のものに比べて極めて弱いものであった (Fig. 4)。

次に活性弱の系統の消化液中の陰極側アミラーゼアイソザイムの存在について検討した。すなわち活性弱の p61 の消化液を可能な限り、濃縮し、電気泳動法で分析した。

p61 の消化液を 20 倍に濃縮した試料では陽極側に原液の場合より強くアミラーゼ活性帯が検出されたにもかかわらず、原液はもちろん、20 倍に濃縮した試料でも陰極側にはアミラーゼ活性帯を検出するこ

とができなかった (Fig. 5)。

このように陰極側のアミラーゼ活性帯が p50 では 4 本、p60 では 5 本、p61 ではなしという結果を得たが、消化液中にはこれ以外に例えば 3 本、2 本、1 本或いは 6 本という活性帯が存在することも考えられる。そこで九州大学農学部附属蚕遺伝子実験施設に保存されている 361 系統の消化液アミラーゼ活性と陰極側アミラーゼ活性帯を調べた (Table 1)。

まず各系統の混合試料を用いて、消化液アミラーゼ活性を調べた。活性の強弱の判定基準は 100 ユニット/ml とし、それ以上のものを + 型、それ以下のものを *ae* 型とした。活性が弱い系統では、混合試料において活性が弱ければすべての個体の活性は弱いといえる。混合試料で活性が強いものは + 型と *ae* 型とが混在している可能性があるため、個別に調べたところ、全個体が + 型の系統と、+ 型と *ae* 型とが混在している系統とがあった。

次に陰極側アミラーゼアイソザイムを調べたところ、各系統の混合試料において陰極側のアミラーゼ活性帯が検出されなかったもの (以後 0 型とする)、4 本の活性帯が認められたもの (4 型とする)、及び 5 本の活性帯が認められたもの (5 型とする) の 3 つのタイプのみが認められ、それ以外のタイプは検出されなかった。混合試料で 4 型を示した系統には総ての個体が 4 型であるものと、4 型と 0 型とが混合するものがあった。さらに混合試料で 5 型を示した系統には全個体が 5 型の系統と、5 型と 0 型とが混在する系統に加え、4 型と 5 型とが混在する系統とがあった。

調査した 361 系統中すべての系統及び個体において、活性の強弱と陰極側アミラーゼ活性帯の有無との間には密接な関係が認められた。すなわち *ae* 型においては陰極側にアミラーゼは認められず、+ 型においてはすべて 4 本或いは 5 本の陰極側アミラーゼ活性帯が必ずセットとして検出された。

## 考 察

これまでに報告されている活性の強い系統と弱い系統との間の単位消化液量当りの活性の差は、ヨード・デンプン反応で 4~5 倍 (平田・蒲生, 1969 a, b), また + 型を Somogyi-Nelson 法, *ae* 型をヨード・デンプン反応で 60 倍 (金勝, 1972) 程度の表示に止まっていた。

これらの結果と比較すると、著者らが用いた方法では、+型と *ae* 型との差は数百倍ないし数千倍という極めて大きなものであった。これはヨード・デンプン反応は基質の存在量を測定する方法であるのに対し、Somogyi-Nelson 法は分解産物である還元糖を測定する方法である為とも考えられる。

電気泳動後のゲルでの活性帯の検出はヨード・デンプン反応によるものであるが、この方法によっても+型と *ae* 型との差は大きいものであった。すなわち Somogyi-Nelson 法で同程度の単位液量当りの活性を示す+型系統の消化液希釈試料と *ae* 型系統の濃縮試料と比較すると、両者の活性は同程度であった (Fig. 5)。そこでヨード・デンプン反応においても、電気泳動後のゲル上の活性帯では、+型と *ae* 型との活性の差異は Somogyi-Nelson 法で測定したと同様な傾向を示していると判断する。

伊藤 (1953) は+型の消化液中には糊精化型の  $\alpha$  アミラーゼと糖化型の  $\beta$  アミラーゼの作用を持つ酵素が存在することを示唆した。本実験においても Fig. 4 に示したように+型と *ae* 型間に質的な差が存在した。すなわち水平平板ポリアクリルアミドゲル電気泳動法において、陽極側へ移動するアミラーゼは+型と *ae* 型共に存在するのに対し、陰極側へ移動するアミラーゼは+型では4本或いは5本存在するが、*ae* 型においてはこれらは全く認められなかった。しかし  $\alpha$  アミラーゼ、 $\beta$  アミラーゼとアイソザイムとの関連については本実験では確認を得るには至らなかった。

さらに九州大学農学部附属家蚕遺伝子実験施設の保存系統について、アミラーゼ活性の強弱と陰極側アイソザイムとの関係について調べた。調査した361系統のうち、全体の55.7%がアミラーゼ活性弱で、しかもそのすべてが陰極側にアミラーゼが認められない0型であり、残り44.3%がアミラーゼ活性強で陰極側アミラーゼアイソザイムが認められた。このアミラーゼ活性の強い+型系統においては+型個体と *ae* 型個体が混在するいわゆるヘテロ型と+型個体みのホモ型とがあった。混合試料でも個体別試料でも活性が強いものにはすべて陰極側に4本或いは5本の活性帯が認められ、この2種以外のものは認められなかった。すなわち4本或いは5本の活性帯があたかも1セットとして発現されているように見える。

以上のように著者らが確立した電気泳動条件下で陽極側と陰極側とにアミラーゼ活性帯を検出することが可能となり、さらに消化液アミラーゼ活性の強弱の差は、この陰極側アミラーゼアイソザイムの有無と密接な関係があることが明らかとなった。

河口ら (1973) は消化液アミラーゼアイソザイムの存在をディスク電気泳動法で調べ、+型と *ae* 型との間でアイソザイムパターンに違いを認めることはできないとした。本実験の結果より+型と *ae* 型とでは陰極側アミラーゼアイソザイムに違いのあることは明らかであるが、陽極側アミラーゼアイソザイムは+型或いは *ae* 型にかかわらず検出される。従って河口ら (1973) の分離したアミラーゼアイソザイムはこの陽極側アミラーゼアイソザイムに相当するものと思われる。

以上の結果、カイコの消化液アミラーゼには陰極側アイソザイムの4型、5型及び0型の多型性が認められ、活性の弱い *ae* 型はすべて0型であるから一応 *ae* 遺伝子の作用とみなせるようであるが、活性の強い+型には4型と5型とがあつてさらに遺伝子的な解析が必要である。また陽極側アイソザイムと *ae* 座の遺伝子との関係はさらに究明を要する。

## 文 献

- 萩原文二 (1969): 実験化学講座24, pp. 282 (日本化学会編), 丸善株式会社, 東京.
- 平田保夫 (1971): 日蚕雑, 40, 150-156.
- 平田保夫 (1974): 日蚕雑, 43, 384-390.
- 平田保夫・蒲生卓磨 (1969 a): 日蚕雑, 38, 395-400.
- 平田保夫・蒲生卓磨 (1969 b): 日蚕雑, 33, 401-405.
- 平田保夫・佐藤久喜 (1972): 蚕糸研究, 44, 56-61.
- 伊藤智夫 (1953): 遺雑, 28, 35-37.
- 金勝康介 (1972): 日蚕雑, 41, 445-451.
- 河口 豊・筑紫春生・土井良 宏 (1973): 九州蚕糸, 4, 77.
- 松村季美 (1933): 日蚕雑, 4, 168-170.
- 松村季美 (1934): 長野蚕試報, (28), 1-124.
- 松村季美 (1951): 蚕試報, 13, 513-519.
- ORNSTEIN, L. and DAVIS B. J. (1962): Disk electrophoresis (Printed by Distillation Products Industries, Eastman Kodak Co).
- POULIK, M. D. (1957): Nature, 180, 1477-1479.