

## 家蚕コクナーゼに関する研究

福森, 寿善

<https://hdl.handle.net/2324/1441293>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏 名 : 福森 寿善

論文題目 : 家蚕コクナーゼに関する研究

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

家蚕(*Bombyx mori*)の繭の主成分は球状タンパク質であるセリシンと繊維状タンパク質であるフィブロインである。繭の中で羽化した成虫は、口からコクナーゼ(CCN)を繭に吐き出し、セリシンを特異的に分解する。CCNが吐き出された繭の部位は局所的に薄くなり、成虫はその部位を押し広げて脱繭する。CCNに関する研究は、特に1970年代に数種の鱗翅目昆虫で行われた。家蚕CCNに関しては、断片的ではあるが、先駆的な研究成果が報告されている。これらの報告では、CCNはウシトリプシン(BTS)と類似した性質を有するセリンプロテアーゼとされている。CCNは、近年、温和な条件下、効率良く良質な生糸を得る手段やセリシン加工法等の観点からも興味を持たれている。

家蚕成虫の頭部を出発材料とし、ここから、硫酸分画(80%飽和上清)、疎水性相互作用及びサイズ排除クロマトグラフィーにより高純度のタンパク質標品を得る方法を確立した。N末端アミノ酸配列、分子サイズ、セリシン分解活性、及び繭分解活性を確認し、精製標品をCCNと同定した。合成基質Val-Pro-Arg(VPR)に対する加水分解活性を指標に、酵素活性の至適条件が塩基性pH領域にあることを明らかにした。また、45°C付近まで、及びpH4以上で活性が安定に保持されることも明らかにした。さらに、4M以下の尿素変性が可逆的なものであること、及び低濃度の尿素処理においては、酵素活性が処理前の値を越えて増大することを明らかにした。また、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、及びZn<sup>2+</sup>が顕著な阻害効果を示すが、Mn<sup>2+</sup>は影響を与えないことを発見した。

基質特異性と阻害に関してBTSとCCNとの差異を明らかにした。基質特異性ではP1位にArg残基を有する数種の合成基質の加水分解反応について、速度論的パラメータを比較した。その結果、CCNでは、Asp-Pro-Arg(DPR)が最も良い基質であり、Glu-Gly-Arg(EGR)、Phe-Ser-Arg(FSR)、及びVal-Pro-Arg(VPR)が比較的良好な基質であり、Gln-Arg-Arg(QRR)は最も貧弱な基質であることを明らかにした。一方、BTSでは、DPRが最も良い基質であり、次いでEGR、VPR、QRR、及びFSRが比較的良好な基質であった。しかしながら、CCNの触媒効率( $k_{cat}/K_M$ )は、いずれの基質でもBTSのその1/140以下であること、特にQRRにおいては1/3000であることを明らかにした。次いで、低分子化合物TLCK、ウシ膵臓トリプシンインヒビター(BPTI)、大豆トリプシンインヒビター(SBTI)、及び繭から抽出したインヒビター(CSE)による阻害効果の違いを明らかにした。TLCK、BPTI及びSBTIは、BTS同様、CCNをも阻害した。しかし、いずれの場合も、阻害効果はBTSに対するものよりもきわめて弱いことを明らかにした。さらに、繭のCSEはBTSを阻害するが、CCNは阻害しないことを見出した。繭中のインヒビターがCCNを阻害しないことは生理的に合目的と言える。これらの結果を総合して、CCNの触媒活性とBTSのそれには、従来報告されたよりも、はるかに大きな違いが有ることを明らかにした。さらに、これらの違いをアミノ酸配列のアラインメントの結果に基づいて、CCNにおけるアミノ酸残基の置換や挿入との関連を考察した。

最後に、家蚕成虫頭部におけるコクナーゼ活性は羽化前日から増大し、羽化直前に最大となること、組織的には表皮、触覚、及び神経において高いことを明らかにした。このようなCCN活性の時期的変動及び組織分布の調査から、CCNが口器にある小顎で生合成され、吸胃に蓄積され、羽化時に吐出され、成虫の脱繭を助けると推論した。