

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

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、家蚕が成虫脱皮後に繭から脱出する際に重要な役割を果たしているコクナーゼの生理学的特性の解明を目的に、家蚕体内から効率的にコクナーゼを精製し、その酵素化学的特性、組織分布、活性の時間的変動を解析したものである。

まず家蚕成虫の頭部から、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た。N 末端アミノ酸配列、分子サイズ、セリシン分解活性特性、及び繭分解活性を調べ、精製標品を家蚕コクナーゼ (CCN) と同定した。次いで、合成基質 Val-Pro-Arg (VPR) を用い、加水分解活性を指標に、酵素活性の諸特性を調べ、至適条件が塩基性 pH 領域にあること、熱安定性に関しては 45°C 付近までは高い活性が維持されること、pH 4 以上では活性が安定に保持されることを明らかにした。さらに、4 M 以下の尿素変性が可逆的なものであること、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、2 価金属の影響に関しては、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、及び Zn^{2+} が顕著な阻害効果を示すが、 Mn^{2+} は影響が無いことを明らかにした。

先行研究等から CCN はトリプシンに構造的、機能的特徴に類似することが知られていたため、ウシ由来のトリプシン (BTS) との差異を明らかにする目的で基質特異性について両者を比較した。先ず、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、速度パラメータを解析した。その結果、BTS の触媒活性は、Asp-Pro-Arg (DPR) で最も高いが、Glu-Gly-Arg (EGR)、Phe-Ser-Arg (FSR)、Val-Pro-Arg (VPR)、Gln-Arg-Arg (QRR) に対しても比較的効率良く触媒することを認めた。一方、CCN では DPR が最も高く、EGR、FSR、VPR でも比較的効率良く働く点は同じであるが、QRR は効率が低い基質であることを明らかにした。また、CCN の触媒効率 (k_{cat}/K_M) は、いずれの基質に対しても BTS 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、合成トリプシン阻害剤 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)、及びトリプシン阻害活性を持つとされる繭抽出液 (CSE) を用いて、CCN と BTS の活性に対する阻害効果を追究し、TLCK、BPTI 及び SBTI が、CCN、BTS の両者を阻害することを明らかにした。しかし、いずれの場合も、CCN への阻害効果は BTS に対するものよりも極めて弱いことを明らかにした。加えて、繭の CSE は BTS を阻害するが、CCN に対しては阻害しないという大きな違いのあることを発見した。これらの結果を総合して、トリプシンに類似する作用を持つとされて来た CCN はトリプシンとは大きな違いが有ることを明示した。

さらに、CCN 活性の家蚕体内における組織分布と頭部における活性変動を経時的に調べ、CCN 活性は蛾の羽化前日から増大し、羽化直前に最大となること、またその存在量は吸胃で高く、従来から生成分泌組織とされていた小顎では低いことを明らかにした。以上のような結果から、CCN は口器にある小顎で生合成され、吸胃に蓄積され、羽化時に吐出されていることが示唆された。

以上要するに、本論文は、繭内から羽化した家蚕成虫 (蛾) に必須な酵素であるコクナーゼの酵素化学的な諸特性、組織分布を明らかにしたもので、昆虫生理学ならびに蚕糸学の進歩に功績する価値ある論文と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。