氏　名	袁（エン）　錫麟（シャクリン）
学位(専攻分野)	博　士　（学　術）
学位記番号	博　甲　第　40　号
学位授与の日付	平成5年7月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科機能科学専攻
学位論文題目	無菌人工飼料育蚕における蔗糖の消化・吸収機構に関する研究 特に中腸組織の蔗糖分解酵素について
審査委員	（主査） 教授　松原藤好 教授　松本継男　　教授　小田耕平

論文内容の要旨

日本の養蚕業は1975年に人工飼料育技術を稚蚕共同飼育に導入し、稚蚕飼育の省力化と蚕作の安定化に大きな成果をあげてきており、1989年にはその普及率が40%に達している。今後生糸の生産量をさらに増大させるためには1～3齢の稚蚕人工飼料育を1～5齢の全齢人工飼料育へと飼育期間を拡大する必要がある。そのためには4～5齢幼虫用の新たな人工飼料の開発が必要となる。本研究は消化吸収効率の高い人工飼料を開発するための基礎データを得ることを目的として、家蚕の中腸組織の蔗糖の消化・吸収系をモデルシステムとしてとりあげ、蔗糖の消化吸収機構を中腸組織の蔗糖分解酵素に着目して検討したものである。

第1章では家蚕の中腸組織の蔗糖分解酵素の活性測定条件ならびに発育に伴う酵素活性を調査している。本酵素は5齢幼虫期と蛹期では至適pHならびに基質に対するKm値が若干異なっていること、また4齢幼虫期から5齢幼虫期、蛹期を経て蛾に至る発育時期の酵素活性の調査によって、5齢幼虫盛食期に活性の極大が認められること、5齢幼虫期と蛹期では可溶分画の酵素の電気泳動の活性パターンが異なることを明らかにした。

第2章では5齢幼虫中腸組織の酵素の細胞内局在性を検討している。可溶型酵素が中腸全体の活性の90%を占め、残りが膜結合型酵素の活性であること、これら二種類の酵素は反応動力学的性質の点でも若干異なっていること、5齢幼虫の始めから蛹中期に至る発育期間の二種類の酵素の活性の比は、調査した期間を通じて一定であることを明らかにした。二種類の酵素の反応動力学的性質から膜結合型酵素が蔗糖の分解に関与しているものと考察している。中腸組織の内腔に存在する囲腔膜の酵素の活性水準は中腸組織の活性の約500分の1であること、その反応動力学的性質は中腸組織の酵素の性質とは若干異なっていることを明らかにした。

第3章では数種類の蚕品種について5齢4日の中腸組織の酵素の活性を調査し、品種間の活性の差異が2倍程度認められること、また糸繭用の現行品種は高い活性を有していることを明らかにした。可溶型酵素をDEAE-セルロースイオン交換カラムクロマトグラフィーによって分離することによって酵素タンパク質について品種間差異のあることを明らかにした。

第4章では可溶型酵素を分離し、その反応動力学的性質を調査する目的で、40～80%の硫安飽和による分画、さらにDEAE-セルロースイオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、三つの酵素分画、Peak I、Peak II およびPeak III を得ている。至適pH、蔗糖に対するKm値、金属イオンによる酵素反応の阻害率、蔗糖分解酵素の特異的阻害剤による阻害率ならびに阻害の型の点で三つの酵素分画の性

質はそれぞれ異なっていることを明らかにした。

第5章では膜結合型ならびに可溶型酵素および囲腔膜の酵素の生理学的役割を明らかにする目的で、5齢幼虫の中腸組織から分離中腸を作り、その内腔に蔗糖液を入れ、内腔中での蔗糖の分解と分解産物の分離中腸外への移動を調査している。囲腔膜を残した分離中腸と囲腔膜を除いた分離中腸の比較では、分離中腸内腔中での蔗糖の分解速度は囲腔膜を除いた分離中腸の方が大きいこと、一方分離中腸外への蔗糖の分解産物の移動速度は囲腔膜を残した分離中腸の方が大きいことを明らかにした。なお内腔に金属イオンまたは糖輸送阻害剤を加えた系では、内腔中ならびに分離中腸外のいずれにおいても蔗糖の分解ならびに分解産物の移動が阻害されることを明らかにした。

第6章では可溶型の蔗糖分解酵素の精製方法を確立した。精製はイオン交換セルロース、ハイドロキシルアパタイトおよびセファクリルを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いている。精製酵素標品は電気泳動的にほぼ均一なタンパク質であり、その反応動力学的性質からβ-フラクトフラノシダーゼであることを明らかにした。昆虫の中腸組織からほぼ均一なタンパク質としてβ-フラクトフラノシダーゼが精製されたのは本論文が最初の例である。

第7章では膜結合型酵素を分離する目的で界面活性剤を用いて膜からの酵素の可溶化条件の検討、ならびに界面活性剤によって可溶化された酵素の精製方法の検討、また分離された酵素標品の反応動力学的性質の調査を行っている。膜結合型酵素は精製された可溶型のβ-フラクトフラノシダーゼの反応動力学的性質とは若干異なっていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は家蚕の中腸組織の蔗糖分解酵素について活性測定条件の検討からはじめて、発育に伴う活性の変動、酵素の細胞内局在性、可溶型と膜結合型酵素ならびに囲腔膜の酵素の反応動力学的性質を明らかにし、さらに酵素の品種間差異の存在、可溶型酵素の分離方法の検討を経てその精製方法の確立を行ったものである。また膜結合型酵素について生体内での蔗糖の分解への関与を分離中腸の実験系を利用して明らかにしている。さらに膜結合型酵素の単離のために膜からの酵素の可溶化方法を確立し、可溶化された酵素の分離法ならびに反応動力学的性質を検討している。

本論文は、以下の点で独創性が認められるので博士（学術）の学位を授与するに値する。

(1)5齢幼虫期と蛹期の中腸組織の蔗糖分解酵素の反応動力学的性質ならびに各発育時期の可溶分画の酵素について電気泳動での活性パターンが異なることを示したのは昆虫の蔗糖分解酵素について本論文が最初である。

(2)5齢幼虫中腸組織の可溶型と膜結合型の蔗糖分解酵素の反応動力学的性質が異なることを示したのは本論文が最初である。

(3)家蚕の可溶型の蔗糖分解酵素の精製方法の確立と精製酵素標品の性質の検討から家蚕の可溶型の蔗糖分解酵素がβ-フラクトフラノシダーゼであることを示したのは本論文が最初である。

(4)分離中腸の系を利用して膜結合型の蔗糖分解酵素が蔗糖分解に寄与していること、ならびに囲腔膜が蔗糖の分解産物の吸収過程に寄与していることを示したのは本論文が最初である。

(5)家蚕の膜結合型の蔗糖分解酵素の膜からの可溶化方法を確立したのは本論文が最初である。

以上の諸点は、酵素を発生生物学的観点から取扱うことの有効性を示したこと、酵素の生理学的意義の解析方法を案出したこと、酵素化学の発展に寄与できる酵素の精製方法を確立したことと言い替えることができる。

本論文の記載内容は査読制度のある学術雑誌に3つの報文として報告されている他、さらに2つの報文が投稿され受理されている。その内容は昆虫科学の発展に着実な寄与をしているものと判断した。