

第10号

纖維研究所研究報告

2006

財団法人 衣笠会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

目次

報 文

- ケナフ、玄米含有人工飼料によるタイ原蚕の飼育と繭糸特性
烏袋順二・平田真弓・大槻良樹・古澤壽治 1
- セリシン部タンパク質のカイコ品種間差異に関する研究Ⅱ
一田昌利・三浦芳子・亀井加恵子・原 三郎 9
- キトサン処理繊維の機能性に関する研究
－金属錯塩染料によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色堅ろう度－
加古 武 21
- セリシン蚕Ndのセリシンに関する研究
－大造および錦秋×鐘和のセリシンとの比較－
亀井加恵子・遠藤 太・一田昌利・山崎 隆・三好 明 29
- メタクリルアミドによる絹のグラフト加工（2）
前川輝彦 47
- RNA結合タンパク質を過剰発現する昆虫細胞の作出と新たな表現形の解析
小谷英治・武藤清佳・松本忠実・田辺徹・森 肇・林 幸之 53

資 料

- 凍結桑葉による絹の緑色染めと型染めへの応用
平田真弓・中川里紗・有松祐治・烏袋順二・古澤壽治 59

解 説

- 家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼ：
精製と性質、cDNAクローニングとヌクレオチド配列の決定、大腸菌発現組換え
酵素の性質、同一遺伝子産物による器官特異的機能発現
角田素行 67

- 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況 81

ケナフ、玄米含有人工飼料による タイ原蚕の飼育と繭糸特性

島袋順二*・平田真弓*・大槻良樹**・古澤壽治*

Properties of Cocoon Filament of a Thai-originated Race, Nang-Lai and Nan-Noi, Reared on an Artificial Diet containing the Powders of Kenaf and Unpolished Rice

Junji SHIMABUKURO*, Mayumi HIRATA*, Yoshiki OHTSUKI**
and Toshiharu FURUSAWA*

*Center for Bioresource Field Science, Kyoto Institute of Technology,
Ipponki-cho, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan

**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,
29 Kitano Shimo-Hakubai-cho, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

Thai-originated races, Nang-Lai, were reared on an artificial diet containing the powder of Kenaf and unpolished rice. The quality and size of cocoon thread of Nang-Lai were almost the same among these reared on artificial diets containing the different materials, such as unpolished rice powder, unhulled rice, rice hull and Kenaf stem pith, but the curves of size and length of the cocoon filament were different among these artificial diets. The experiments were undertaken to examine whether the other Thai-originated race, Nan-Noi, which were reared on the above same artificial diets, produced cocoons on fresh mulberry leaves or only on a commercial artificial diet. The curves of size and length of the cocoon filament of the Nan-Noi was lower than those of Nang-Lai. The addition of citric acid to the commercial artificial diet improved the cocoon quality of Nan-Noi race.

Key Words : *Bombyx mori*, tropical race, cocoon quality, thread size, artificial diet

1. まえがき

タイ東北部では、米は一毛作で生産され、乾期になると稲収穫後の水田に牛が放牧され、特に目立った作物は栽培されていない。この間、養蚕農家は黄繭を作る多化性品種 (Nang-LaiやNan-Noi) を飼育し、繭から生繰りで糸を採り、この地方独自の方法で精練、染色して伝統的な文様を持つマットミー (緋) を織っている。この織物は農家の人たちが自ら着用する衣服として用いてきた[1]が、

最近では織物の特性や多種多様な文様を生かすことによって洋風の衣服として利用されている。

著者らは、Nang-LaiやNan-Noiのうち前者の品種について、繭糸、生糸ならびに織物特性を調べたところ、Nang-Laiの繭糸は繊度が細く、繊度開差も小さく、また伸張度が大きいことを明らかにした[2]。これらの性質に加え農家で繭糸から生糸への工程で2回の撚りを掛けるといったこの地方独自の方法がマットミーの特徴を生み出しているものと考えている。

* 連絡先：京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、Email: kbspace@kit.ac.jp、TEL 075-861-0735

Table 1. Composition of artificial diet which contained various materials such as unpolished rice and unhulled rice instead of the defatted soybean, and rice hull and Kenaf stem pith as cellulose.

Materials (%)	A : Standard I ¹⁾	B : Standard II ²⁾	C : Unpolished Rice Powder	D : Unhulled Rice	E : Rice hull	F : Kenaf Stem Pith	G : Defatted Soybean
Mulberry Leaf Powder	40 ¹⁾	40 ²⁾	50 ²⁾	50 ²⁾	40 ²⁾	40 ²⁾	50 ²⁾
Unpolished rice Powder			22				
Kenaf Stem Pith Powder						10	
Rice hull					10		
Unhulled rice				22			
Defatted Soybean	40.8	40.8			40.8	40.8	22
Cellulose	10	10	21.5	21.5			21.5
Choline chloride	0.4	0.4			0.4	0.4	
Crotonic acid	0.4	0.4			0.4	0.4	
Sterol	0.4	0.4			0.4	0.4	
Ascorbic acid	1.5	1.5			1.5	1.5	
Citric acid	2	2	2	2	2	2	2
Vitamin Mixture	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Wells's minerals	3	3	3	3	3	3	3
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100

1) The fresh mulberry leaves were dried and then crushed into the powder in a short minutes, which was contained in the Standard I.

2) The fresh mulberry leaves were sun-dried, and then crushed into the powder. The powder was contained in the Standard II and other artificial diet.

これらの品種は、現地では養蚕農家が栽培する桑で飼育されているが、著者らは1齢から3齢期を人工飼料で飼育した後、4齢から桑で飼育して得られた繭の性質や生糸特性を調べてところ桑育したものとはほとんど差がないことを報告した[2,3]。この他、タイの多化性蚕の繭糸質[4]や織物評価[5]についても報告されている。

今回、著者らはNang-Laiを安価でしかも簡単な組成で調製した人工飼料、例えばデンプンとして玄米、セルロースとしてケナフの髓粉砕物を人工飼料に加えて飼育し得られたNang-Laiの繭糸の織度曲線等を調べた。さらに、Nang-LaiとNang-Noiを同じ組成の人工飼料で飼育するとNang-Noiの人工飼料摂食性は、Nang-Laiに比べて非常に劣るが、人工飼料にクエン酸を添加することにより、Nang-Laiの摂食性が改善され、桑葉飼育した場合

と同程度の繭重、繭層重及び繭層歩合の繭が得られ、人工飼料へのクエン酸添加がNang-Noiの摂食性向上に有効なことが示唆されたのでその成果についても報告する。

2. 材料および方法

2. 1 供試材料、人工飼料の調製及び飼育方法

桑粉末は天日乾燥し、粉碎機（不二パウダル株式会社製 SAMPLE-MILL KII-1）で粉末にし、70メッシュに調製した。また、ケナフの髓粉末は、天日乾燥したものを桑粉末と同様に調製し、さらに玄米粉末も市販の玄米を桑粉末同様に調製した。

本報告で用いた人工飼料をTable 1に示した。標準飼料I（A）では桑粉末として、収穫直後の

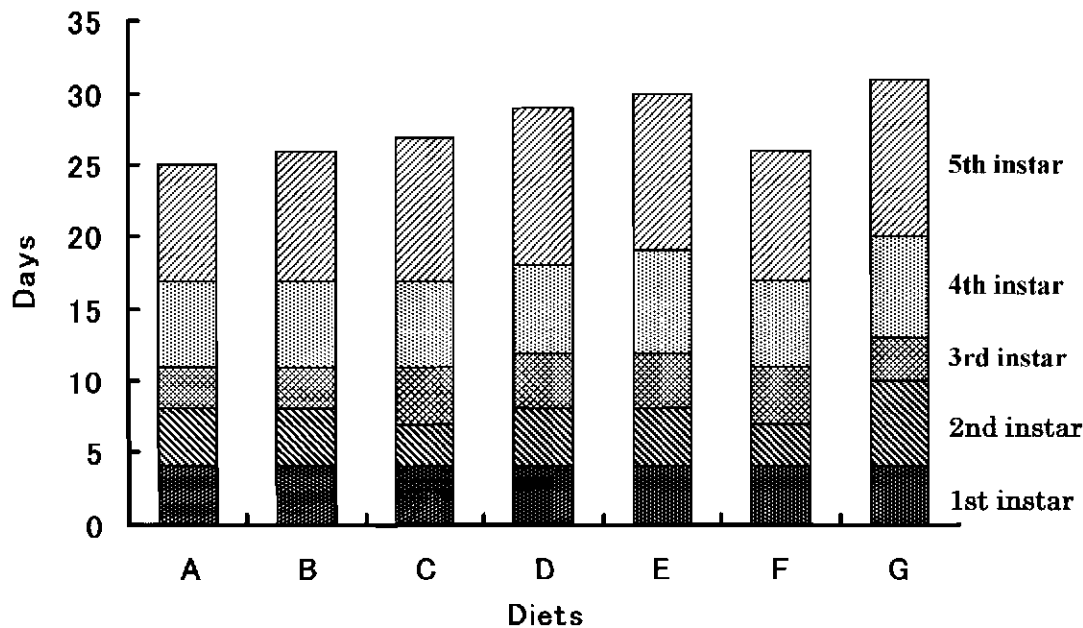


Fig. 1. The days of each larval period (1st through 5th instar) on Nang-Lai which reared on various kinds of artificial diets. A : Standard I, B : Standard II, C : unpolished rice powder, D : unhulled rice, E : rice hull, F : Kenaf stem pith, G : lower amount of defatted soybean powder and larger amount of cellulose than those in Standard I or Standard II, respectively.

桑を3分間で乾燥、粉末化したものを用いた。そしてB～Gの飼料には、天日の下で乾燥し粉末化したものを用いた。また、脱脂大豆の代わりに玄米(C)やモミ(D)、セルロースの代わりにモミ殻(E)、ケナフ(F)を加えた人工飼料、さらに脱脂大豆を減らして桑粉末を増量した人工飼料(G)を調製した。

Nang-LaiおよびNan-Noiを飼育する人工飼料は、センターで調製した各種飼料および市販の飼料を用い、粉体重量の2.2倍量の水を加えて練合わせ、115℃、40分間オートクレーブで加熱滅菌することによって調製した。掃き立てに当たっては、卵をエタノール、ホルマリンで消毒し、25℃で催青、孵化させた。

両品種の飼育は、全齢を人工飼料で25℃のインキュベータ内で飼育した。1齢から4齢まで22cm×16cmのプラスチックケースで飼育し、5齢期間で2回目の給餌をする全齢2回給仕法を用い、吐糸まで34cm×23.5cmのプラスチックケースで飼育した。熟蚕は新聞紙で作った筒に入れこの中で営繭させた。

2. 2 繭調査

飼育で得た繭は雌雄に分け、雌雄ごとに全繭重、繭層重、繭層歩合を測定し、雌雄の平均を各人工飼料試験区の値とした。

2. 3 織度の測定

各飼料で飼育したNang-LaiおよびNan-Noiの繭を無作為に選び、55℃に90秒間、沸騰水に90秒間浸漬した。再び55℃に戻して90秒、沸騰水に90秒浸漬した後、55℃のウォーターバスに移して保温した。

繭糸は1粒毎に沸周40cmの四角型木枠に手動で100回転(40m)毎に巻き取り、乾燥後、室内温度28℃、湿度58%の下で秤量し、織度を求めた。

3. 実験結果と考察

3. 1 玄米、モミ、モミガラ、ケナフ髓粉末を含む人工飼料で飼育したNang-Laiの飼育日数、蚕体重および繭質

Fig. 1は各人工飼料を用いて25℃で飼育した時の各齢の日数を示している。掃立てから上簇までの飼

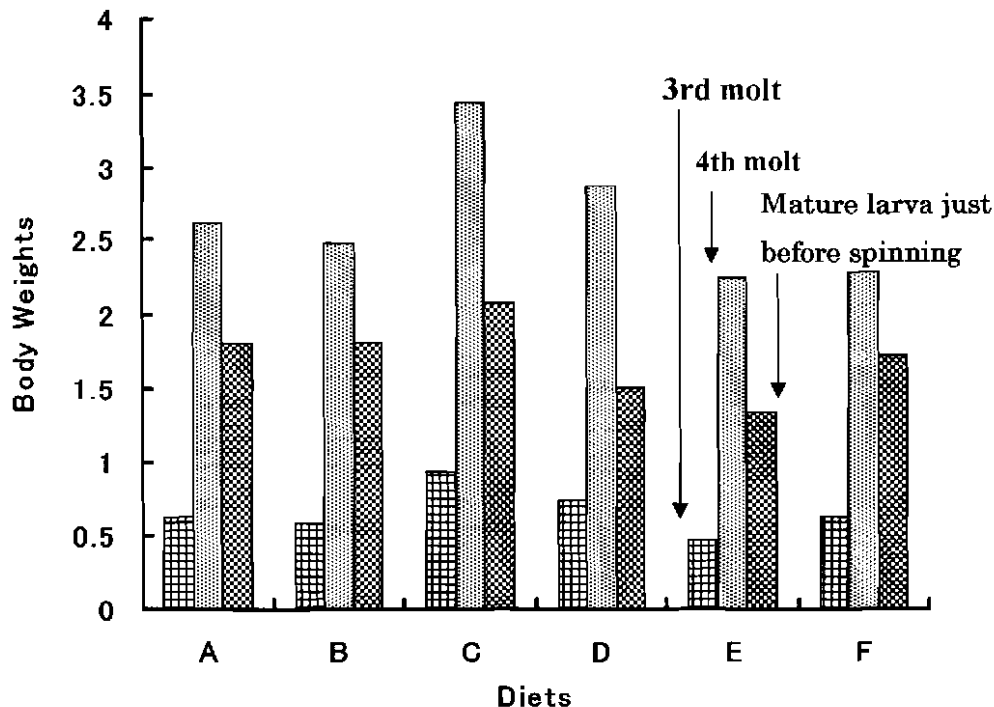


Fig. 2. The body weight of the larva (Nang-Lai) at the 3rd, 4th molt and just before spinning.
 A : Standard I, B : Standard II, C : unpolished rice powder, D : unhulled rice, E : rice hull,
 F : Kenaf stem pith

育日数は、フレッシュマルベリー粉末を含む人工飼料区 (A) では25日、天日乾燥桑粉末区 (B) とケナフ区 (F) が26日、玄米区 (C) 27日、モミ (D) とモミガラ区 (E) はそれぞれ29日、30日と飼育日数は長くなった。特に、モミ、モミガラ区は5齢期間が長かった。また、玄米区 (C) では塩化コリン、クロトン酸、ステロール、アスコルビン酸を含んでいないも関わらず、これらを含む天日乾燥桑粉末区 (B) とほとんど経過日数は大差なかった。また、セルロースの代わりにケナフ髓粉末を用いた区 (F) では、最も経過日数が短く、ケナフ繊維が摂食量を高めた結果と考えた。

Fig. 2は3眠と4眠の眠蚕体重と熟蚕体重を示している。玄米区では塩化コリン、クロトン酸、リケステロール、アスコルビン酸が含まれていないも関わらず、どの調査時期においても体重が最も大きかった。これに反し、これらの微量元素が含まれないモミガラ区では最も軽い体重となった。

さらに掃立て時には100頭の孵化幼虫を飼育した

が、営繭までの減蚕数は、モミガラ区が最も多く (76頭)、次いでフレッシュマルベリーを含む人工飼料区 (A) で55頭、天日乾燥桑を含む人工飼料で50頭となったが、玄米区では80頭が営繭した。Nang-Laiを飼育したこれらの飼料 (A、BおよびC) (Table 1) の組成をみると、脱脂大豆粉末を約40%含んでいるが、玄米区 (C) では、脱脂大豆を含まず、その代用として玄米を22%加え、セルロースを10%増量した結果、減蚕数は少なくなった。従って、タイ原産のNang-Laiを飼育するに当たっては、脱脂大豆の代わりに玄米を加えた人工飼料が適しているのかもしれない。

さらに、繭調査 (Table 2) に示す通り、全繭重ではフレッシュマルベリーを用いたStandard I 飼料 (A) に次いで天日乾燥桑粉末を含むStandard II 飼料 (B) で重く、次いでケナフ区 (F) や玄米区 (C) で、最も軽かったのはモミ区であった。繭層重ではStandard I とIIが10cg以上でこれとほぼ同じ値を示したのがケナフ区であった。体重や成長・発育が優れた玄米区では繭層重は他の飼料区に比べて低下した。そして、繭層歩合ではケナ

Table 2. Cocoon weight, cocoon shell weight and shell weight percentage of the silkworm which was reared on artificial diets showed in Table 1.

Investigated items	A : Standard I (n=10)		B : Standard II (n=10)		C : Unpolished rice powder (n=10)		D : Unhulled rice (n=10)		E : Rice hull (n=10)		F : Kenaf stem pith (n=10)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Cocoon weight (g)	0.83 ±0.12	1.17 ±0.12	0.75 ±0.06	1.11 ±0.16	0.64 ±0.19	0.84 ±0.11	0.75 ±0.06	0.54 ±0.08	0.72 ±0.14	0.89 ±0.02	0.64 ±0.06	1.03 ±0.09
Cocoon shell weight (cg)	11.4 ±1.90	12.8 ±1.65	9.5 ±1.60	12.2 ±2.64	6.5 ±1.54	7.7 ±1.39	9.5 ±1.60	4.7 ±0.99	8.9 ±1.73	9.5 ±1.13	9.5 ±1.13	13.2 ±1.28
Shell weight percentage (%)	13.7 ±1.20	11.0 ±0.90	12.8 ±2.50	11.0 ±1.36	10.7 ±0.69	9.2 ±0.74	12.8 ±2.50	8.7 ±0.82	12.4 ±0.92	10.7 ±1.47	14.8 ±0.76	12.9 ±0.88

Table 3. Cocoon weight, cocoon shell weight and shell weight percentage of the silkworm reared on fresh mulberry leaves, commercial artificial diet, and standard II (B) containing unpolished rice powder (C) or Kenaf stem pith (F) instead of defatted soybean and cellulose, respectively.

Item	Fresh Mulberry (n=20)		Commercial I (n=20)		Commercial II (n=18)		B : Standard II (n=10)		C : Unpolished rice powder (♂n=9, ♀n=10)		F : Kenaf stem pith (n=10)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Cocoon weight (g)	0.74 ±0.09	1.05 ±0.12	0.74 ±0.06	0.99 ±0.11	0.72 ±0.14	0.93 ±0.08	0.75 ±0.06	1.11 ±0.16	0.64 ±0.19	0.84 ±0.11	0.64 ±0.06	1.03 ±0.09
Cocoon shell Weight (cg)	10.2 ±1.59	11.8 ±1.69	10.8 ±1.43	12.3 ±1.73	9.1 ±2.81	10.7 ±1.47	9.5 ±1.60	12.2 ±2.64	6.5 ±1.54	7.7 ±1.39	9.5 ±1.13	13.2 ±1.28
Cocoon shell percentage (%)	13.8 ±0.86	11.2 ±0.75	14.7 ±1.07	12.4 ±1.07	12.7 ±3.26	11.5 ±1.41	12.8 ±2.5	11.0 ±1.36	10.7 ±0.69	9.2 ±0.74	14.8 ±0.76	12.9 ±0.88

n : 調査した繭数

フ区 (K) が Standard I と II とほぼ同等の値を示した。

従って、蚕体重からみると玄米区が最も成長が良いが、繭の性質からみるとケナフ区が対照区 (Standards I と II) とほぼ同じ繭を得られることがわかった。

そこで、玄米 (C) あるいはケナフ (F) 含有人工飼料で飼育した Nang-Lai の繭と桑生葉で飼育した Nang-Lai の繭、二種の市販飼料 (Commercial I と II)、および大日乾燥桑粉末を含む Standard II (B) で飼育した Nang-Lai の繭の性質を比較した (Table 3)。その結果、玄米を含む飼料を用い

て飼育した繭を除いて、いずれの人工飼料区においても雌雄ともに全繭重、繭層、繭層歩合にはほとんど差はみられなかった。また、玄米を含む飼料区では雄での全繭重、繭層、繭層歩合は他の飼料区とは差がなかったが、雌では差がみられた。

3. 2 各種の飼料で飼育した Nang-Lai の繭糸織度

各種の飼料で飼育した Nang-Lai の繭糸 40m ごとの織度を Fig. 3 に示した。市販飼料 I (Commercial I) では外層の織度は 3.8 d 太く、内層に行くに伴い急激に細くなり、約 1 d となり織度開差が 2.5 d

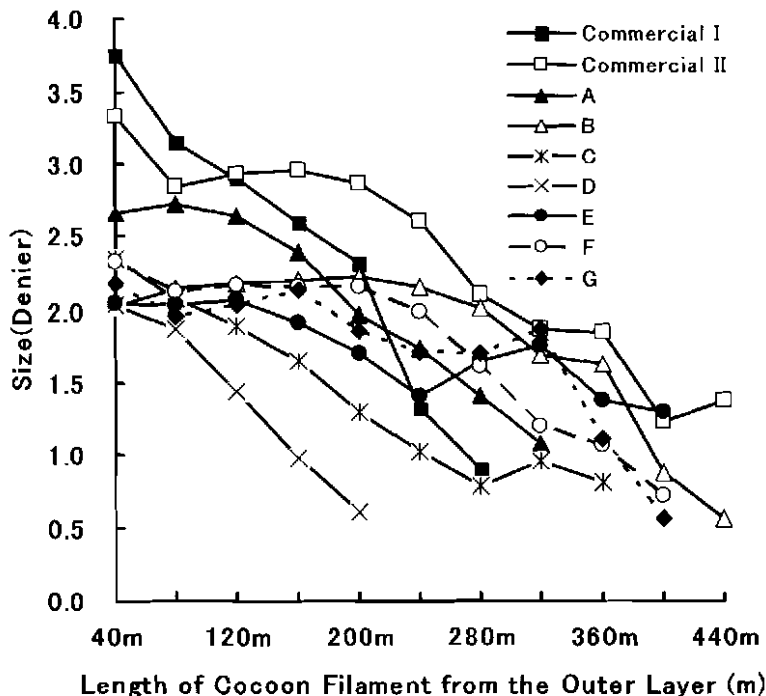


Fig. 3. Curves of the size and length of the cocoon filaments of the Thai-originated race, Nang Lai, which reared on the following artificial diets, A : Standard I, B : Standard II, C : unpolished rice powder, D : unhulled rice, E : rice hull, F : Kenaf stem pith, G : lower amount of defatted soybean powder and larger amount of cellulose than those in Standard I or Standard II, respectively.

であった。市販飼料Ⅱ (CommercialⅡ) では外層の繊度は3.4 d と太く、内層の約440mでは1.5 d と細くなり、開差は約2 d であった。これに反し、モミ区 (D) は繭糸長が短く、しかも繭糸繊度は細かった。

上記以外の飼料区 (A、B、C、E、FとG) では、フレッシュマルベリーを含む飼料 (A) では繭糸長は300mと短く、外層の繊度は2.6 d で、内層の約320mでは1.5 d と細くなり、開差は約2 d であった。天日乾燥粉末を含む飼料 (B) では外層から280mまでは約2 d とほぼ均一な繊度を保ったが、それ以上の内層では急激に繊度は小さくなった。この傾向はケナフ区 (F) でも同様であった。玄米を用いた飼料 (C) では外層の繊度は2 d と細く、内層の約360mでは1 d とさらに細くなり、開差は約1 d であった。

以上のように飼料組成の違いによって繭糸長は異なることはもとより繊度および繊度開差が大きく異なることが分かった。特に、眠蚕体重が軽く、

繭質も他の飼料に比べて良くなかったが、この場合の最外層の繊度は2 d で、300mまでこの繊度は保たれ、400mでの繊度は1.5 d で終わり、開差は0.5 d と最も小さかった。従って、モミガラを蚕幼虫が食べやすいような粉末に調製するなどの工夫をすると、ケナフを用いるよりも良好な繭質ならびに繭糸を得ることが可能と考えられる。

3. 3 Nang-Noiの人工飼料育と繭質

以上の結果ではTable 1に示す人工飼料を用いてNang-Laiを飼育した結果であるが、これと同時にタイ東北部の養蚕農家で飼育されているNang-NoiをTable 1の各飼料で飼育を試みた。しかし、天日乾燥した桑粉末を含む飼料では飼育が困難であった。すなわち、Nan-Noiは各種の人工飼料に対して摂食性を示さない特性をもち、生桑葉と市販飼料Ⅱを用いた場合のみ飼育することができた。

そこで、生桑葉と市販飼料Ⅱで飼育して得た繭の性質を調査した結果をTable 4に示した。桑葉育

Table 4. Cocoon weight, cocoon shell weight and shell weight percentage of Thai -originated silkworm, Nan-Noi, reared on fresh mulberry leaves and commercial artificial diet

Investigated items	Fresh mulberry leaves (n=20)		Commercial I (n=10)		Commercial I + Citric acid (♂n=10, ♀n=7)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Cocoon weight (g)	0.64 ±0.04	0.91 ±0.06	0.50 ±0.03	0.59 ±0.09	0.7 ±0.03	0.88 ±0.10
Cocoon shell weight (cg)	7.0 ±0.86	8.1 ±0.84	5.9 ±0.52	4.3 ±0.64	8.1 ±0.72	8.0 ±1.21
Shell weight percentage (%)	11.0 ±0.88	8.9 ±0.68	11.6 ±0.67	7.3 ±0.72	11.5 ±0.84	9.1 ±0.46

n : 調査した繭数

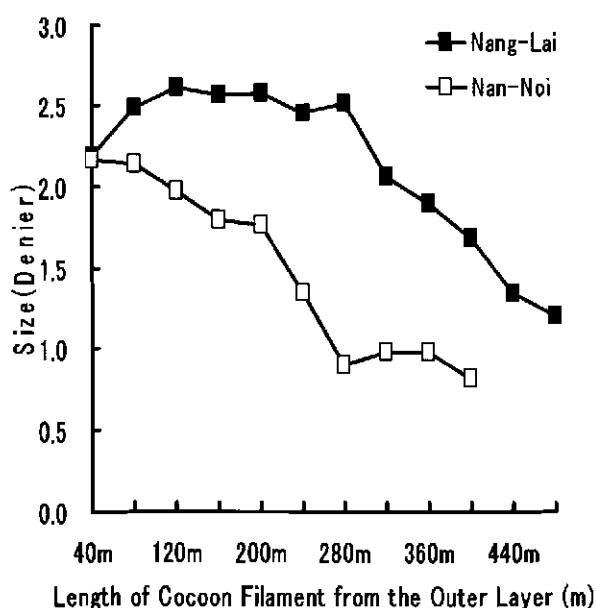


Fig. 4. Comparison of curves of the size and length of the cocoon filaments of the Thai-originated races between Nang-Lai and Nan-noi which were reared on fresh mulberry leaves.

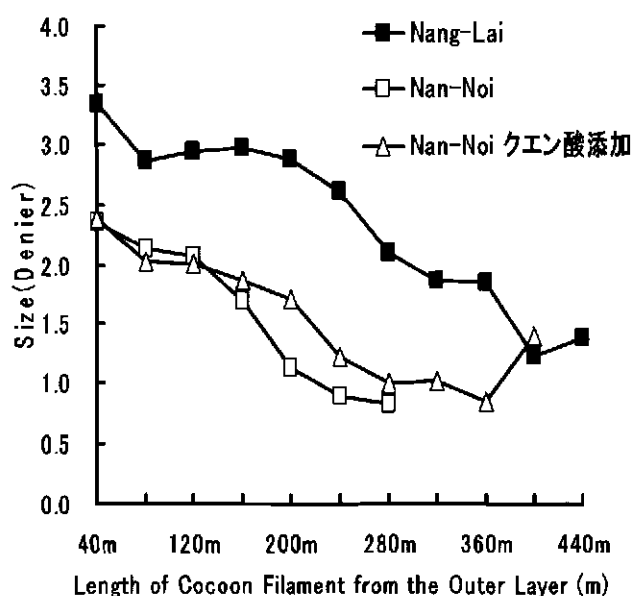


Fig. 5. Comparison of curves of the size and length of the cocoon filaments of the Thai-originated races between Nang-Lai and Nan-noi which were reared on commercial artificial diet I, and effect of citric acid added to the commercial diet on the curve of size and length of Nan-Noi cocoon filament.

と市販飼料Ⅱを用いた飼育で得られた繭の性質をみると、雄の繭層歩合を除いて、後者は前者よりも低い値を示した。そして、市販飼料Ⅱにクエン酸を加えると雌雄ともに全繭重、繭層、繭層歩合は桑葉飼育のそれらとほぼ同じ値となった。このことは、Nan-Noiは市販飼料Ⅱを酸性にすることにより摂食が良くなると考えられる。また、Nang-LaiとNan-Noiの人工飼料に対する摂食性が大きく異なることが分かった (Table 4)。

3. 4 桑葉飼育および人工飼料育したNan-NoiとNang-Laiの繭糸織度の比較

Fig. 4は桑葉飼育したNan-Noiの繭糸織度を40m毎に示した。いずれも繭糸長は400~480mであるが、Nan-Noiの織度は1~2 dと、Nang-Laiの1~2.5 dに比べてやや細い傾向にあった。

さらに、Nang-NoiとNang-Laiを市販のシルクメイトで飼育したところ、Nang-Laiの繭糸長は400m以上を示し、外層で3.3 dで内層では1.4 dと開

差は約2dとなった。一方、Nang-Noiでは繭糸長はNang-Laiに比べて短く約280mであり、外層の織度は2.4dで、内層では0.9dと開差は1.5dとなり、Nang-Laiに比べて細い糸であった。前述のごとく市販飼料Ⅱにクエン酸を加えた飼料では、雌雄ともに全繭重、繭層、繭層歩合は桑葉飼育のそれらとほぼ同じ値となった（Table 4）ことから、この繭の織度を調べたところ、クエン酸を加えなかった飼料で飼育した場合の繭糸織度とほとんど変わらなかったが、繭糸長は長くなった。このことは、市販飼料Ⅱにクエン酸を加えたことによる全繭重、繭層重の増加を反映しているであろう。

以上の結果からもNang-NoiとNang-Laiの人工飼料に用いる素材の違いによって織度は大きく変わることが明らかになった。

引用文献

- [1] Conway, S. (2001) : Thai Textiles pp.135-181
- [2] 島袋順夫, 中川里紗, 大槻良樹, 古澤壽治 (2005) : 人工飼料育したタイ原蚕種Nang-Laiの繭糸の性質. 衣笠織研報 No9, 25-30
- [3] 古澤壽治 (2005) : 熱帯性蚕Nang-Laiの繭糸の特徴. 野蚕 No.54, 7-9
- [4] 坪内絃三, 赤羽恒子, Chuaboonmee, A (1999) : 多化性蚕の繭糸質. 製糸絹研究会誌 8, 88-89
- [5] 赤羽恒子, 坪内絃三 (2000) : 多化性蚕繭による織物の評価. 製糸絹研究会誌 9, 112-113

セリシン部タンパク質の カイコ品種間差異に関する研究Ⅱ

一田昌利*・三浦芳子*・亀井加恵子**・原 三郎**

Difference in Sericin Protein Among the Silkworm Strains and Varieties II

Masatoshi ICHIDA*, Yoshiko MIURA*, Kaeko KAMEI** and Saburo HARA**

*Center for Biorcsource Field Science, Kyoto Institute of Technology,
Ippongi-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

**Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan

Abstract

In the analysis by SDS-PAGE of the cocoon shell proteins from each silkworm varieties and strains, different patterns were obtained except for a common band of 23 kDa. In comparison with the cocoon shell proteins from mulberry wild silkworm, *Bombyx mandarina*, and silkworm, *Bombyx mori*, no common band was detected in SDS-PAGE analysis. In the comparison of 4 strains of the "Koishimaru", the cocoon proteins of the "Koishimaru (Miyazaki)" and the "Koishimaru (Watari)" were similar in SDS-PAGE pattern and those of the "Koishimaru (Shiga)" and the "Koishimaru (KIT)" were also similar. But these patterns were different in the detail. In the cases of the "Aojuku" strains, the "Daizo" strains and the "Nd" strains of gene mutated race, different electrophoretic patterns were observed. The cocoon shell proteins from the identical varieties exhibited different SDS-PAGE patterns when bred with different diets, the natural mulberry and the artificial diet. Different electrophoretic patterns were also observed in cocoon shell proteins of parent silkworm and the mating F₁ silkworm.

Key Words : Sericin protein, Silkworm, Strains, Varieties, SDS-PAGE

1. まえがき

家蚕糸は、細繊維度長繊維（フィラメント繊維）の天然繊維である[1]。その家蚕糸の主成分の1つであるセリシンは、繭層中に約25から30%含まれ[1,2]、精練により取り除かれる[2]絹タンパク質である。しかし、セリシンの研究は、その化学的構造の複雑さゆえに、確かな構造解析が遅れており、セリシンの挙動ははっきりしていない。

近年の報告では、絹糸の主成分であるセリシン

とフィブロインにとらわれず、繭層中のタンパク質の存在としてP25 (25kDa、29kDa、30kDa) [3-6]、トリプシンインヒビター (6kDa) [7]、トレハラーゼ[8]、シュークラーゼ (70kDa) [9,10]、未知の低分子タンパク質[11-13]などの存在が確認されている。

そこで、カイコ品種・系統間における繭層構成タンパク質の変異を調査するとともに、繭層に混在するタンパク質を同定することを目的とした。

*連絡先：京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨 一本木町1、E-mail: ichida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0741

**連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門、
606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、E-mail: kame@kit.ac.jp、TEL 075-724-7553

表1 供試カイコの品種系統一覧

日本種 15品種 19系統	青熟 小石丸 (KIT) 118 春早	青熟 (羽生田) 小石丸 (宮崎) 401	赤熟 青白 (山形) J1	金色 (前橋) 琉球多蚕繭 J2A	小石丸 (巨理) 110 限回	小石丸 (滋賀) 112 皓月
日中 固定種 2品種	綿蚕	大安橋				
中国種 22品種 23系統	漢口赫繭 雪花 107 春蕾	黒縞 大造 (長野) 115 鎮豊	湖北 大造 (松竹) 965 場B	支124 大巻上 4D 明珠	支21 天門 C15B 青松	新竜角 輪月 C5B
欧州種 3品種	アスコリ	黒蛾	ローザ			
熱帯種 1品種	アンナン					
遺伝子 突然変異 10系統	Ndb41 123	Nd ^H b40 131	P22P3 C 15	P3×P3 otm Pere b 84 淡黄繭 C 04 黄脚白繭	外層黄繭	d 90
祖先種 2系統	クワコ (日本)	クワコ (中国)				
交配種 1品種	アンナン×金色 (前橋)					
人工 試料育 2品種	金色 (前橋)	アンナン				
合計						46品種 54系統

2. 材料および方法

2. 1 供試品種・系統

供試品種・系統は、原種カイコである日本種15品種19系統、日中固定種2品種、中国種22品種23系統、欧州種3品種、熱帯種1品種、および遺伝子突然変異10系統、祖先種2系統、原種交配種1品種の桑飼育したカイコ系統品種の他に、全齢人工飼料飼育を行った日本種1品種、熱帯種1品種の合計46品種54系統である(表1)。なお、中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された日本種カイコ9品種は日本種、中国種11品種は中国種として扱った。

2. 2 繭層タンパク質抽出法の検討

SDS-PAGEを行うにあたり、繭層タンパク質の抽出bufferおよび抽出方法の検討を行った。セリシンの溶解を小松(1975)の方法[1] 0.2Mホウ酸buffer pH 9.0中で98℃ 2時間抽出後、遠心分離(18,000rpm 20min.)により精練条件と同様のアルカリ性条件下で行う[17]。〔2〕この抽出液をセントロコン(ULTRACENT-10 TOSOH)により脱塩濃縮後、SDS-PAGEを行う。〔3〕抽出bufferを2% SDSおよび8 M ureaを含む10 mM Tris-HCl pH 7.0に設定し、25℃ 48hの条件下で繭層タンパク質の抽出を行い、遠心分離(18,000rpm 20min.)し、可溶性画分をSDS-PAGEで分析。〔4〕2% SDS、5% 2-mercaptoethanolおよび8 M ureaを

含む10 mM Tris-HCl pH 7.0に設定し、25℃ 48hの条件下で菌層タンパク質の抽出を行い、遠心分離（18,000rpm 20min.）し、可溶性画分をSDS-PAGEで分析。

前報で報告したように、可溶性画分として菌層タンパク質は10から30%が得られたことから、菌層中のセリシン部（25～30%）が可溶化したと推測されたが、フィブロインも可溶化している恐れを考慮し、SDS-PAGEによりフィブロインと比較を行った。

これらの結果を基に、菌層タンパク質抽出bufferおよび抽出条件を確定し、SDS-PAGEによる菌層タンパク質の変異を調査した。

2. 3 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) による同定

2. 2の結果を基に、抽出bufferは2% SDS、5% 2-mercaptoethanol、8 M ureaを含む10mM Tris-HCl buffer pH 7.0とした。各品種系統から収菌した菌層の汚染部を取り除き、エッペンドルフチューブに菌層40mg、抽出buffer 1 mlを加え、25℃ 48h抽出した。遠心分離（18,000rpm 4℃ 20 min.）によって可溶部と沈殿部（繊維）に分離した（図1）。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動はLaemmli (1970) の方法に準じ行った[15]。14%ポリアクリルアミドゲル（6×9 cm）を使用し、電流12 mAで電気泳動し、泳動終了後、ゲルを固定し、クイックCBB（和光純薬工業株式会社）にて染色した。

なお、分子量マーカーとしてBovine Albumin (M.W.66,000)、Egg Albumin (M.W.45,000)、Carbonicanhydrase (M.W.29,000)、Lysozyme (M.W.14,300) を使用した。

3. 実験結果

3. 1 セリシン抽出法の検討結果

[1] セリシンの溶解を小松 (1975) の方法0.2 M ホウ酸buffer pH 9.0中で98℃ 2h抽出後、遠心分離（18,000rpm 20min.）により精練条件と同様のアルカリ性条件下で行い、可溶性画分をSDS-PAGEに

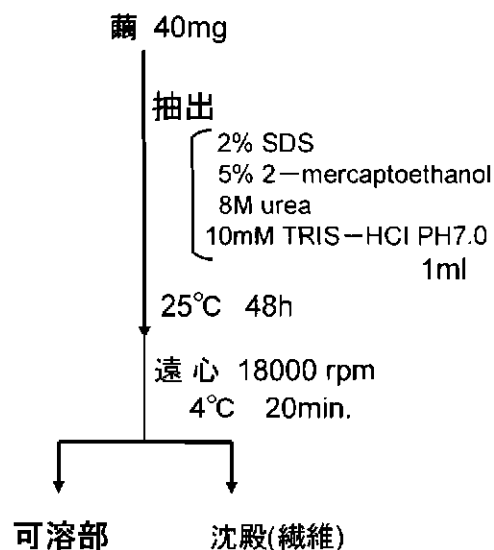


図1 菌層タンパク質の抽出方法

各品種・系統から集菌した菌層の汚染部を取り除き、エッペンドルフチューブに菌層40mg、抽出buffer 1 mlを加え、25℃ 48h抽出し、遠心分離（18,000rpm 4℃ 20min.）によって可溶部と沈殿部（繊維）に分離した

よりバンドの検出を試みたが良好なバンドが確認できず、鮮明な泳動像が得られなかった。

[2]この抽出液をセントリコン (ULTRACENT-10 TOSOH) により脱塩濃縮後、SDS-PAGEを行ったが、この方法でも明確なバンドが検出されなかった。

[3] 抽出bufferを2% SDSおよび8 M ureaを含む10mM Tris-HCl pH 7.0に設定し、25℃ 48hの条件下で菌層タンパク質の抽出を行い、遠心分離（18,000rpm 20min.）し、可溶性画分をSDS-PAGEで分析した結果でも明瞭なバンドは確認できなかった。

[4] 2% SDS、5% 2-mercaptoethanolおよび8 M ureaを含む10mM Tris-HCl pH 7.0に設定し、25℃ 48hの条件下で菌層タンパク質の抽出を行い、遠心分離（18,000rpm 20min.）し、可溶性画分をSDS-PAGEで分析した結果、多数の明瞭なバンドが検出された。

これらの結果から、抽出bufferを [4] に設定した。

3. 2 カイコ品種・系統タンパク質の検定

フィブロインも可溶化している恐れを考慮し、SDS-PAGEによりフィブロインと比較を行った。その結果、フィブロイン（H鎖：350 kDa、L鎖：25 kDa）はすべての試料で可溶化しているとは言えないことが確認できた（図2）。以上の検討結果により、SDS-PAGEによる繭層タンパク質の変異を調査した。

供試カイコ品種・系統間の繭層タンパク質のSDS-PAGEでは多数のバンドが確認された。電気泳動のパターンを比較すると、複数の品種・系統を供試した日本種、日中固定種、中国種、欧州種および遺伝子突然変異系統において、供試カイコ品種・系統間で同一および異なる多数のバンドの存在が認められた。実験例として、図3および4に供試した全日本種および中国種の電気泳動パターンを示した。

クワコ (*Bombyx mandarina*) では、カイコ (*Bombyx mori*) に見られる程の多数のバンドは確認できず、

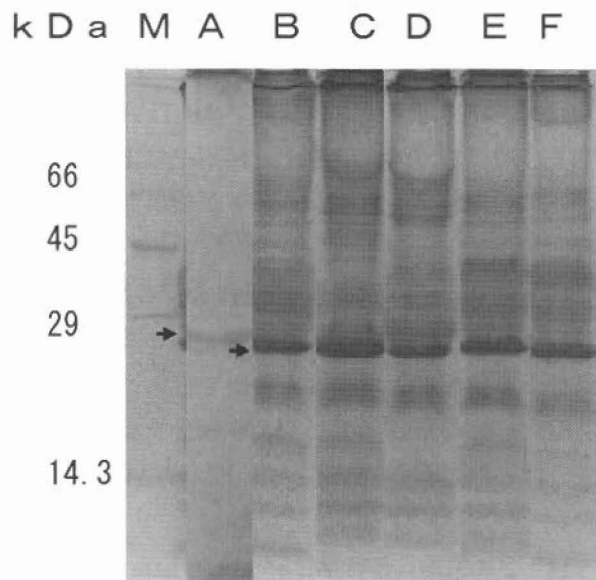


図2 フィブロインとの比較による繭層タンパク質のSDS-PAGE
 供試品種は、以下に示す品種系統を用い、SDS-PAGEによるフィブロインとの比較検討を行った。なお、Gel濃度は14%である。
 M：Molecular marker
 A：フィブロイン B：大造（長野）
 C：大造（松村） D：青熟（羽生田）
 E：湖北 F：雪花

系統間においても、クワコ（日本）とクワコ（中国）では泳動像が明らかに異なった（図5）。

日本古来の品種として知られる[16,17]小石丸の4系統においても系統間で相違している事が確認された（図6）。

青熟系統、大造系統および遺伝子突然変異種である裸蛹系統の繭層タンパク質においても細部で違いが認められた。

桑葉飼育と人工飼料飼育の繭層タンパク質の比較においては、供試したカイコ品種が同一品種であるにもかかわらず、飼料の相違によりバンドの違いが見られた（図7）。

原種カイコを交配させた繭層においても、交配した繭層タンパク質のバンドが異なっている事を確認した。

4. 考察

本報では、カイコ品種・系統間における繭層の可溶タンパク質の抽出を試み、繭層タンパク質の変異と同定を目的として、SDS-PAGEによる解析を行った。

SDS-PAGEを行うにあたり、繭層タンパク質の抽出bufferおよび抽出方法の検討を行った。結果で述べたようにセリシンの溶解を小松（1975）の方法 [1] 0.2Mホウ酸buffer pH 9.0中で98℃ 2h抽出後、遠心分離（18,000rpm 20min.）により精練条件と同様のアルカリ性条件下で行い[17]、検討した結果、可溶性画分をSDS-PAGEによりバンドの検出を試みたが良好なバンドが確認できず、鮮明な泳動像が得られなかった。さらに、[2] この抽出液をセントリコン（ULTRACENT-10 TOSOH）により脱塩濃縮後、SDS-PAGEを行ったが、この方法でも明確なバンドが検出されなかった。そこで抽出bufferを [3] 2% SDSおよび8 M ureaを含む10 mM Tris-HCl pH 7.0に設定し、25℃ 48hの条件下で繭層タンパク質の抽出を行い、遠心分離（18,000rpm 20min.）し、可溶性画分をSDS-PAGEで分析した。この方法でも明瞭なバンドは確認できず、[4] 2% SDS、5% 2-mercaptoethanolおよび8 M ureaを含む10 mM Tris-HCl pH 7.0に設定

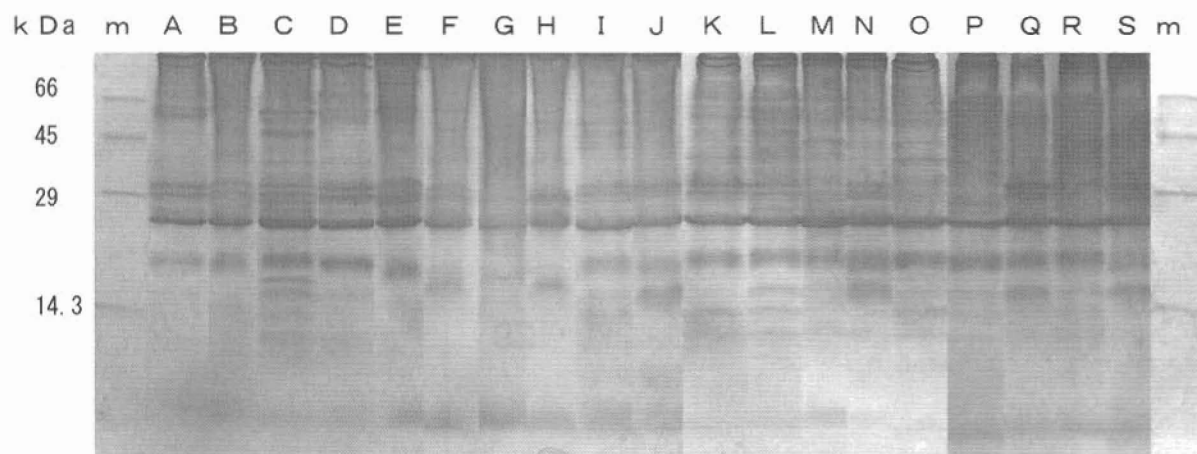


図3 日本種蔕層タンパク質のSDS-PAGE

m : Molecular marker、A : 青熟、B : 青熟 (羽生田)、C : 赤熟、D : 金色 (前橋)、E : 小石丸 (亘理)、F : 小石丸 (滋賀)、G : 小石丸 (KIT)、H : 小石丸 (宮崎)、I : 青白 (山形)、J : 琉球多萼蔕、K : 110、L : 112、M : 118、N : 401、O : J1、P : J2A、Q : 限回、R : 皓月、S : 春早

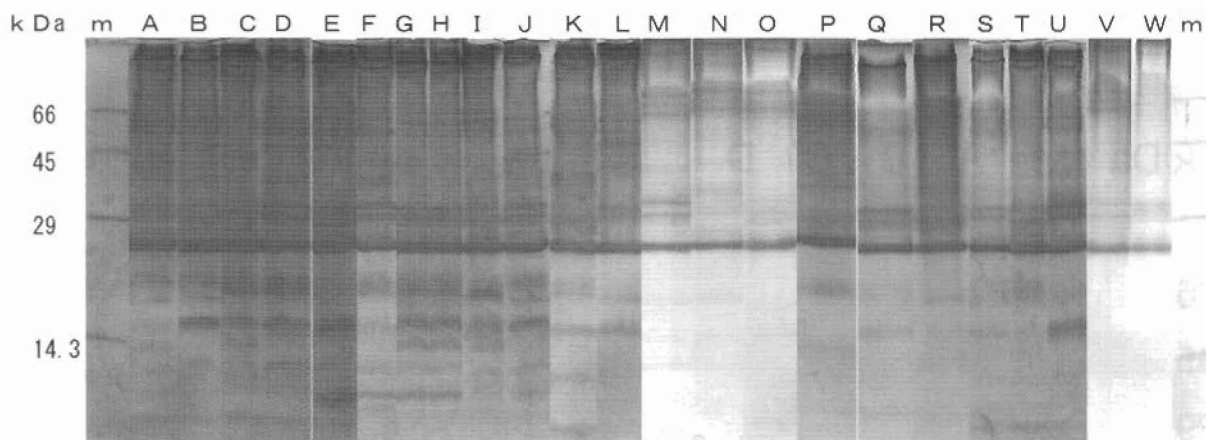


図4 中国種蔕層タンパク質のSDS-PAGE

m : Molecular marker、A : 漢口赫蔕、B : 黑蛾、C : 湖北、D : 支124、E : 支21、F : 新竜角、G : 雪花、H : 大造 (長野)、I : 大造 (松村)、J : 大巷上、K : 天門、L : 輪月、M : 107、N : 115、O : 965、P : 4D、Q : C15B、R : C5B、S : 春蕾、T : 鎮豊、U : 場B、V : 明珠、W : 菁松

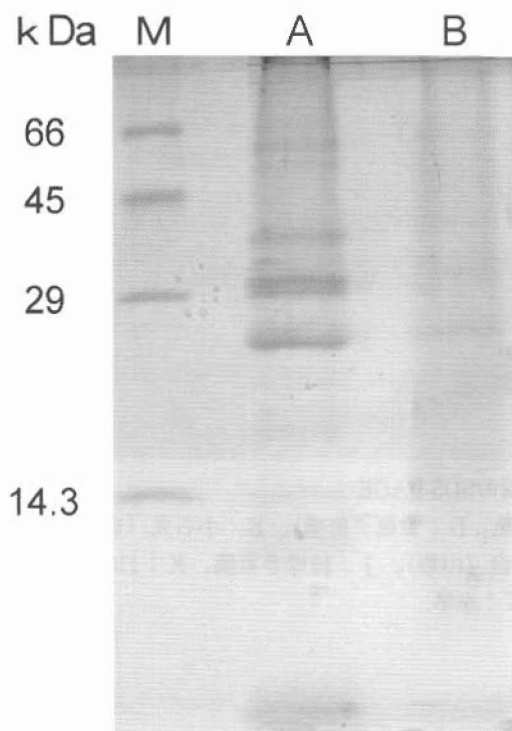


図5 祖先種繭層タンパク質のSDS-PAGE
M: Molecular marker
A: *Bombyx mandarina* (日本)
B: *Bombyx mandarina* (中国)

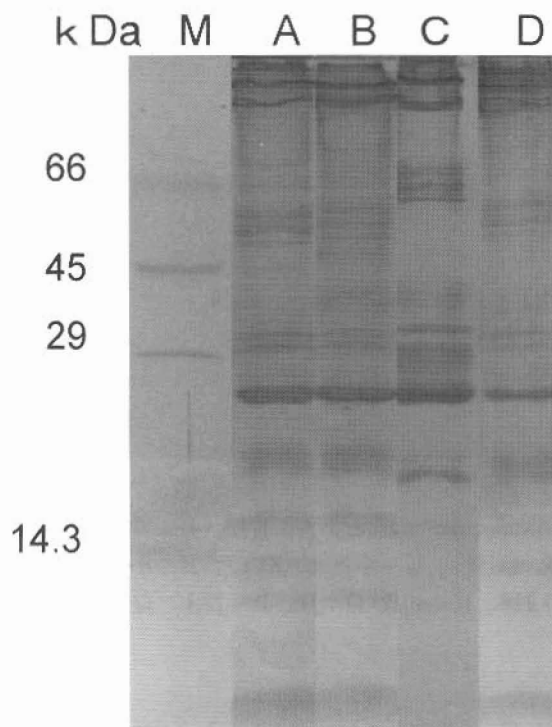


図7 人工飼料飼育および桑葉飼育蚕繭層タンパク質のSDS-PAGE
M: Molecular marker
A: 人工飼料飼育、アンナン
B: 桑葉飼育、アンナン
C: 人工飼料飼育、金色(前橋)
D: 桑葉飼育、金色(前橋)

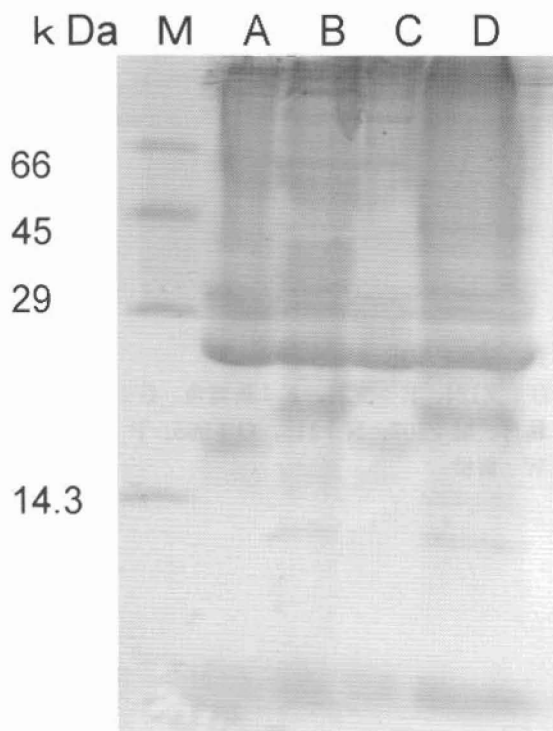


図6 小石丸4系統の繭層タンパク質のSDS-PAGE
M: Molecular marker
A: 小石丸(宮崎) B: 小石丸(滋賀)
C: 小石丸(亘理) D: 小石丸(KIT)

し、25℃ 48hの条件下で繭層タンパク質の抽出を行い、遠心分離(18,000rpm 20min.)し、可溶性画分をSDS-PAGEで分析した結果、多数の明瞭なバンドが検出された。可溶性画分として繭層タンパク質は10から30%が得られたことから、繭層中のセリシン部(25~30%)が可溶化したと推測されたが、フィブロインも可溶化している恐れを考慮し、SDS-PAGEによりフィブロインと比較を行った。その結果、フィブロイン(H鎖: 350 kDa、L鎖: 25 kDa)はすべての試料で可溶化しているとは言えないことが確認できた。以上の検討結果により、繭層タンパク質抽出bufferおよび抽出条件を確定し、SDS-PAGEによる繭層タンパク質の変異を調査した。

供試カイコ品種・系統間におけるSDS-PAGEの結果、多数のバンドが確認でき、供試したすべてのカイコに共通して見られるバンド(23 kDa)が

認められた。

カイコの祖先種と報告されている[19,20]クワコでは、カイコにあるような多数のバンドは検出されず、クワコとカイコの間には、繭層タンパク質の構成にかなりの差があると考えられた。しかし、細胞遺伝学的研究により単数染色体数は、カイコの起源が $n=28$ で、クワコの馴化が行われた中国のクワコと同じであることから、クワコがカイコの唯一の祖先型昆虫であると言われる[19]。また、持っている酵素型によってカイコとクワコの分化を説いた報告においても、カイコとクワコは極めて近縁であるとしている[20]。山田(1978)は、クワコ繭層セリシンのアミノ酸組成は野蚕とよりも家蚕セリシンに高い類似性があり、クワコ繭層セリシンには生物学的種族特異性があると推論している[21]。本研究では、野蚕の繭層タンパク質については検討しておらず、今後検討する必要がある。両者の泳動像の明らかな違いが、種の違いによるのかを検討しなければならないと考える。一方、日本で採取されたクワコ繭層と中国で採取されたクワコ繭層の泳動像も異なっていた。これはクワコの染色体数が、日本クワコは $n=27$ であるのに対し、中国クワコは $n=28$ であるという報告[19]から、両者が全く同一種ではなく、亜種の存在を示唆している。クワコは、個体の形態、染色体、タンパク質多型、アシルフォリン遺伝子の塩基配列による指標により地理的変異が認められる[19]ため、今後さらに検討する必要がある。

寛政(1790)の頃の育成とされる小石丸は、虫質強く繭素質良好なものとして明治時代にも賞用され、白繭種流行の波に乗り明治20年(1887)頃から全国に広く用いられたが、明治35年(1902)頃になり小石丸の小巢化が進み過ぎたためか、繭形は小さく且つ縊れ目が深く、解じょが悪く、節が多いという非難が高まり、改良が行われたが失敗に終わり、小石丸は実用から後退して行ったという経緯がある[18]。京都工芸繊維大学 繊維学部(旧 京都高等蚕糸学校)に保持されていた小石丸は、多くの系統に分離し、形質は雑ばく性と標準繭形の維持が困難であった事を示している[18、本学 附属農場 標本]。以上のことから、本

研究室で継代している小石丸4系統の比較をおこなった。その結果は系統間で泳動像に違いが生じており、小石丸の由来を詳細に検討する必要があると考えられた。今回供試した4系統の小石丸の由来については、以下に述べる通りである。小石丸(宮崎)、小石丸(KIT)は、1870年頃に育成者(所)不明で分離され、1969年に農林省蚕糸試験場で保存され、小石丸(宮崎)については、1988年から特殊用途用蚕品種として小石丸の飼育が始まり[22]、それ以降、宮崎県総合農業試験場で系統維持され、1994年頃に本研究室に分譲された系統、一方、小石丸(KIT)は、少なくとも1990年以前に農林省蚕糸試験場から本学に分譲された系統である。小石丸(滋賀)は、虫質強健、繭形はやや小さいが、良く締まり、解じょも良好であるということから宮中紅葉山御養蚕所で飼育されていた系統を約30年前に、当時の官房長官であった井出一太郎氏から滋賀県の松井 浄蓮氏に分譲され、その後、継代飼育されている系統である。また、小石丸(口理)は1790年頃に育成者(所)不明で分離され、1947年まで宮城県 亘理養蚕学校で保持され、1969年に農林省蚕糸試験場で小石丸(亘理)として系統保存している系統を1995年に農水省蚕糸昆虫農場試験場より分譲され、本研究室で飼育した系統である。これらの系統の祖先が同一であるかどうかは、記録に示されておらず明らかではないことから、各地域で系統保存された過程においてそれぞれが独自の変異を遂げた、あるいは地理的條件の差異が影響したなどの変異理由が挙げられる。さらに、他系統の混入も否定できない。この点については、今後詳細な検討が必要である。ところで、小石丸系統間における泳動像の差異は、メジャーバンドについてみると、小石丸(宮崎)と小石丸(亘理)、小石丸(滋賀)と小石丸(KIT)が良く似ていた。しかし、詳細なバンドには違いが認められ、先述の系統由来を踏まえ小石丸系統間における電気泳動の結果を考察すると、まず、小石丸(宮崎)と小石丸(亘理)については由来が異なり、特に小石丸(亘理)は、約100年間は宮城県で飼育され、農水省でも1品種系統として継代されており、両者はメジャーなバ

ンドが良く似ているが、細部で異なることから地理的差異が生じていると推察された。また、小石丸（滋賀）と小石丸（KIT）のメジャーバンドが良く似ている点については、小石丸（滋賀）の継代が途切れかけたところ、小石丸（KIT）の血を混入した可能性が考えられる。それを含めて考察すると、本研究の結果は納得することができる。以上を踏まえ、同系統といわれる小石丸においても、今後詳細な検討が必要である。

青熟系統の由来は、1852年頃、赤熟系統から体質強健で体表の青いカイコを選出し、織度の細太が適度で、繭糸質が良好とされ、1897年頃から賞用され、品種改良され、現在、農水省に系統保存されている[18]。青熟は、年代、成育者（所）は不明であるが蚕業試験場から農林省に集与され、1995年に本研究室に分譲され、飼育したものである。青熟（羽生田）は、福島県伊達郡富沢 井上传吉の選出により1893年に成育が完成し、この系統を長野県 羽生田源助が独自の改良を行い[18]、後に農林省に集与され、1997年に本研究室に分譲された。以上の由来に加えて、青熟はカイコの背側にある斑紋を持つ形蚕で、青熟（羽生田）は斑紋を持たない姫蚕というカイコの外形的差異からも系統間の差が生じたと考えられた。特に、青熟は昭和初期までに各蚕業試験場で独自の品種改良が行われている。これらから青熟系統においても地理的変異が生じていると考えられる。

この他、大造2系統、遺伝子突然変異によりセリシンを多く吐糸するNd系統でも泳動像の細部で差が存在した。これら各々を比較すると、同系統と言われているカイコにおいても、繭層中のタンパク質には何らかの違いがあることが明らかになった。また、アミノ酸組成もカイコ品種・系統間で有意差のみられるアミノ酸があることが報告され[21]、各品種・系統に固有の繭層構成タンパク質が存在していることが裏付けられた。

飼料の違いによる繭層タンパク質の相違を確認するために、桑飼育繭層と人工飼料飼育繭層とを比較した。その結果、桑飼育した繭層と人工飼料飼育した繭層にも相違が確認され、明らかに飼料が繭層タンパク質に影響していることが確認でき

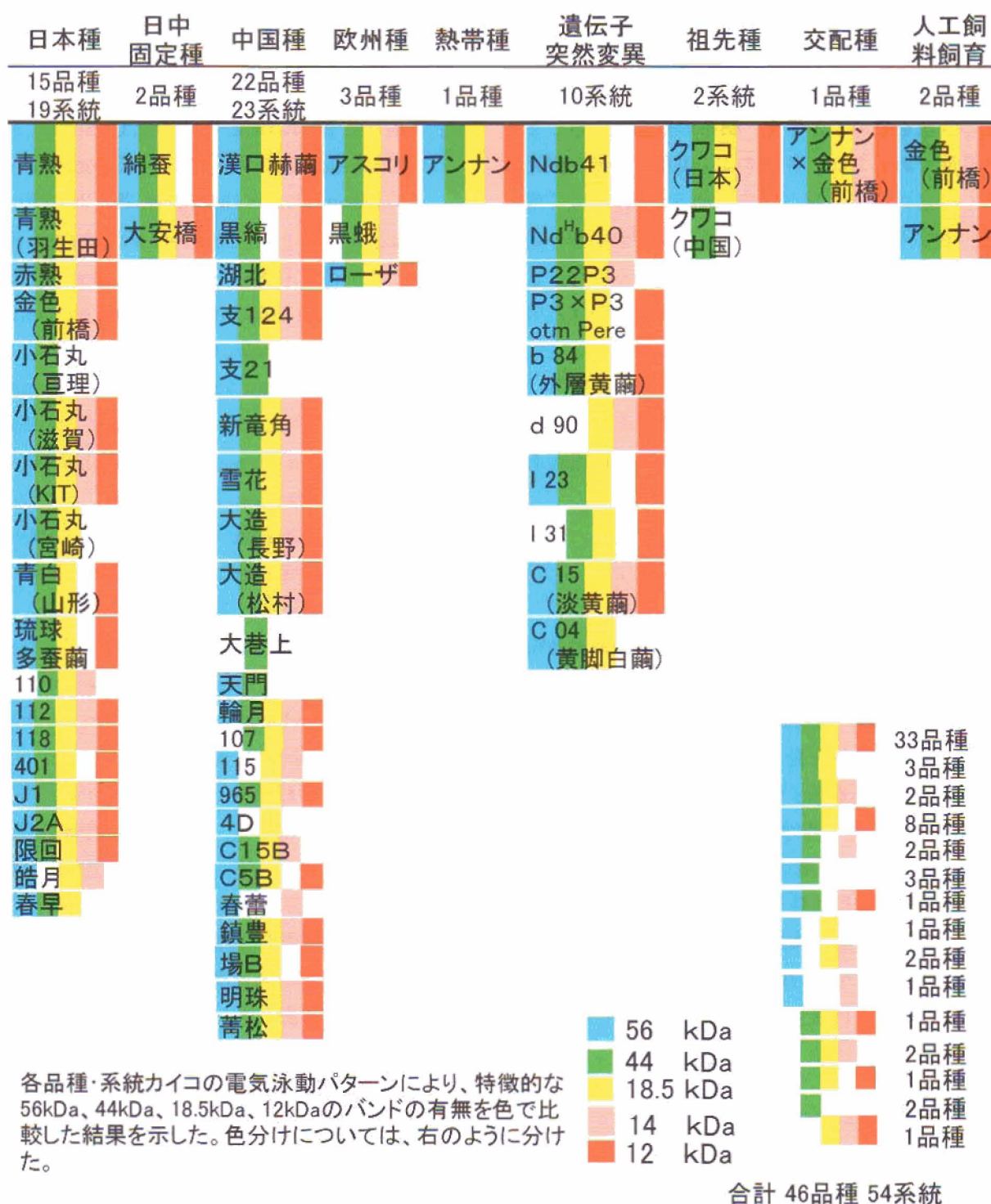
た。青木（1973）は桑飼育繭と人工飼料飼育繭の繭層セリシンの比較から、繭層中のセリシン含有率は人工飼料飼育繭の方が少ないと報告している[23]。しかし、陳（1994）は桑飼育繭より人工飼料飼育繭のセリシン含有量の方が多いと報告し[24]、本研究の繭層タンパク質回収率の結果と一致する。これまでの桑飼育繭と人工飼料飼育繭の比較報告は、フィブロイン、セリシンのアミノ酸組成に顕著な差が認められ[23-25]、人工飼料飼育を行った生糸の強度は若干弱い、伸度がやや大きい傾向[23]や絹フィブロインX線回折分析では違いがない[24,25]などの報告がある。このように両者の比較は、溶解性や物理性からの見解にすぎず、化学的・一次構造の面からの報告が乏しい。本研究では、電気泳動により繭層タンパク質に相違性が認められたが、その差は人工飼料組成成分に由来しており、今後さらに検討を要する。

原種カイコを交配して得られたカイコの繭層の電気泳動の結果では、親となるアンナンに欠落しているバンドが片親の金色（前橋）により保持され、交配F₁カイコの繭層タンパク質中に現れたと推定され、親の系統が遺伝的に影響しあっていると考えられた。

カイコ品種・系統間の繭層タンパク質を比較すると、固有の構成が認められた。志村（1984）は、日本種および中国種のフィブロインH鎖についてSDS-PAGE分析した結果、移動度の僅かに異なるバンドが存在し、同一のフィブロインタンパク質とは言えず、日本種と中国種の系統の違いとは関係なく、また、交配によっても親のH鎖の移動度に対応し、遺伝的変異が生じている[26]としている。これらの裏付けから、本研究での結果は、タンパク質の固有の構成が繭糸の性質に微妙な差を生じさせ、それが品種や系統で繭糸の品質が異なることに関与があり、生糸の性状を決める要因となると考えた。

以上の品種・系統間の比較により同系統内でも電気泳動像が相違していたことから、電気泳動パターンによって供試カイコ品種・系統を比較した。その結果、SDS-PAGEで特徴的に存在する5つのバンド（56 kDa、44 kDa、18.5 kDa、14 kDa、

表2 SDS-PAGEによる供試カイコの比較



12 kDa) が認められた。これらのバンドの有無によりカイコ品種・系統間を比較した結果、品種・系統間に関係なく15パターンに分けることができた(表2)。選び出した特徴的な5つのバンドを確認できたカイコ品種・系統は、供試カイコ中33品種系統であったことから、品種・系統間にかなり

の差異のあることが確認できた。

本研究における電気泳動の結果により、繭層中には多くのタンパク質が存在していることが確認でき、繭層中にはセリシンとフィブロイン以外に多くのタンパク質が存在していると考えられる。

現段階の研究ではSDS-PAGEによる泳動像の差

異で判断しているため、今後さらなる検討が必要である。しかし、①繭層タンパク質のカイコ系統間での明らかな違いがカイコ品種・系統間の変異指標になり得る可能性、②タンパク質の違いが繭糸の性状を決めると考え、繭糸の指標とすることも可能であること、さらには③現在、遺物の復元として古代絹の再現への取り組みが行われ、『魏志』「倭人伝」に邪馬台国の女王卑弥呼が魏帝へ謙譲したと記される倭錦が試織されている[27]。また、吉野ヶ里遺跡から出土した平絹や高松塚古墳出土の復元も行われている[28]。このような古代絹を探索する上で、生化学的な分析からの指標に生かせる可能性と、④カイコの祖先種と言われるクワコの地理的変異の指標になり得る可能性もあると考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言御指導を賜りました元京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学専攻 高野 良講師に心より感謝の意を表します。また、資料を提供していただきました九州大学農学部附属遺伝子資源開発センター家蚕遺伝子開発分野 藤井 博博士、伴野 豊博士、滋賀県山崎 隆氏、宮崎県総合農業試験場 宮沢 潤氏、農林水産省蚕糸昆虫農業技術研究所、中国 安徽省農業大学附属蚕場、株式会社協和 上井修治氏、丹下信株式会社、平尾 絹精錬工学研究所 平尾銀蔵氏に御礼申し上げます。

引用文献

- [1] シルクサイエンス研究会 (1994) : シルクの科学 (シルクサイエンス研究会編) pp.31.86-87, 朝倉書店, 東京
- [2] 皆川 基 (1981) : 絹の科学 pp.38-39,58, 関西衣生活研究会 (大阪)
- [3] Zurovec, M., Vaskova, M., Kodrik, D., Sehnal, F. and Kumaran, A.K. (1995) : Light-chain fibroin of *Galleria B. mellonella*, *Mol Gen Genet.* 247, 1-6
- [4] Zurovec, M., Yang, C., Kodrik, D. and Sehnal, F. (1998) : Identification of a Novel Type of silk protein and Regulation of Its Expression. *JBC.* 237, 25, pp15423-15428
- [5] Zurovec, M., Kodrik, D., Yang, C., Sehnal, F. and Scheller, K. (1998) : The P25 component of *Galleria silk*. *Mol Gen Genet.* 257, 264-270
- [6] Yang, C., Teng, X., Zurovec, M., Scheller, K. and Sehnal, F. (1998) : Characterization of P25 silk gene and associated insertion elements in *Galleria mellonella*. *Gene.* 209, 157-166
- [7] Kurioka, A., Yamazaki, M. and Hirano, H. (1999) : Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.* 259, 120-126
- [8] Shimada, S., Kamada, A. and Asano, S. (1980) : The cocoon trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10, 49-52
- [9] Shimada, S. and Hayashiya, K. (1975) : Isolation of a protein with saccharase activity from the liquid silk of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 5, 357-369
- [10] 古澤壽治, 杉村順夫, 竹 明美, 一田昌利, 小谷英治, 坂部 寛, 渡邊隆夫, 今溝真理, 東端 晃, 中野 完, 長岡敏治 (1999) : カイコ繭糸の性状に及ぼす重力変化の影響. 日本蚕糸学会関西支部関西蚕桑技術連絡会合同研究発表会講演要旨集 p.65, p.28
- [11] 栗岡 聡, 平野 久 (1996) : 家蚕繭層低分子量タンパク質のトリシン電気泳動法による分析. 日蚕雑 65(2), 125-127
- [12] 栗岡 聡, 平野 久, 小松一計 (1994) : 繭層11kDaタンパク質の精製とN末端一次構造分析. 日蚕雑 63(1), 72-78
- [13] 栗岡 聡 (1994) : 繭層低分子量タンパク質のN末端アミノ酸配列分析. 蚕研彙報 42, 19-25
- [14] 全国養蚕農業協同組合連合会 (1998) : 蚕糸の光 pp.26-29, 51(9), 全国養蚕農業協同組合連合会, 東京
- [15] Laemmli U.K. (1970) : Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- [16] 田島弥太郎 (1993) : 蚕の品種育成. p.21, サイエンスハウス (東京)
- [17] 小松一計 (1975) : セリシンの溶解性特性ならびに構造特性に関する研究. 蚕糸試験場報告書 26, 136-245
- [18] 平塚英吉 (1969) : 日本蚕品種実用系譜 pp.11, 26, 28, 54, 65, 財団法人日本蚕糸会蚕糸科学研究所 (東京)
- [19] 河原畑勇 (1998) : カイコとクワコ クワコからみたカイコと養蚕業の起源に関する一考察 (文部省科学研究費補助金基盤研究 (A) (2) 研究成果報告書 (別冊) pp.1-4, 43-54, 九州大学農学部 (福岡)
- [20] 森 精 (1968) : カイコによる新生物実験 生物科学の展開 pp.147-154, 三省堂, 東京
- [21] 山田政枝 (1978) : クワコ繭層セリシンのアミノ酸組成とその種族特異性. 日蚕雑 47(2), 108-112
- [22] 壹岐 透, 宮沢 潤 (1993) : 「小石丸」の人工飼料飼育適合性について. 九州蚕糸 24, 24
- [23] 青木一三 (1973) : セリシンに関する研究 第2報 人工飼料育蚕の繭層セリシンについて. 日蚕雑 42(1), 53-60
- [24] 陳 瑞英 (1994) : 全齡人工飼料無菌飼育による周年蚕糸生産に関する研究. 京都工芸繊維大学博士論文 pp.95.82-90
- [25] Ito, H., Muraoka, Y., Yamazaki, T., Imamura T., Mori, H., Ichida, M., Sumida, M. and Matsubara, F. (1995) : Structure and Chemical Composition of Silk Proteins in Relation to Silkworm Diet. *Textile Res. J.* 65(12), 755-759
- [26] 志村憲助 (1984) : 絹タンパク質の生合成. 家蚕生化学 (伊藤智夫編) pp.150-151, 裳華房, 東京
- [27] 布目順郎 (1988) : 絹の東伝 - 衣料の源流と変遷 - pp.82-86, 小学館 (東京)
- [28] 布目順郎 (1995) : 倭人の絹 弥生時代の織物文化 pp.83-100, 小学館 (東京)

キトサン処理繊維の機能性に関する研究 - 金属錯塩染料によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色堅ろう度 -

加古 武*

Functional Properties of Chitosan-treated Fibers - Color Fastness of Chitosan-treated Tussah Silk Fabrics Dyed with Metal-complex Dyes -

Takeshi KAKO*

*Faculty of Fashion and Design, Kobe University of Fashion and Design,
Meinan-cho 2-1-50, Akashi-shi, Hyogo 673-0001, Japan

Abstract

The color fastness of the chitosan-treated tussah silk fabrics treated with the 1:1 metal-complex dyes (1:1 dyes) or the 1:2 metal-complex dyes (1:2 dyes) was investigated.

In case of the 1:1 dyes used, the depth of the shade was evaluated from the K/S value on the chitosan-treated fabrics increased by 8.5~36.6%, compared with that of the untreated fabrics. Also, in case of the 1:2 dyes, the depth on the chitosan-treated fabrics increased by 15.0~31.1%. In both cases of the dyes, the lightness on the fabrics decreased due to chitosan-treatment. The color difference (ΔE^*ab) was relatively low and 2.8~4.8 for the usage of the 1:1 dyes and 2.7~4.4 for the 1:2 dyes. In both cases of the dyes, the color fastness to dry rubbing on the chitosan-treated fabrics was high. The fastness to wet rubbing was low, 2-3~4-5, but by soaping treatment, the fastness was improved to be 4~4-5. The chitosan-treated fabrics showed the high color fastness to water, washing and hot-pressing for staining and change in color. The color fastness to acidic perspiration was inclined to be slightly higher than that to alkaline perspiration. The color fastness to daylight for 15 hours of outdoor exposure was improved by the chitosan-treatment.

Key Words : Chitosan-treatment, Tussah silk, metal-complex dyes, color fastness

1. まえがき

一般に柞蚕絹は家蚕絹より染着性、発色性、染料のビルドアップ性などが低いといわれている。キトサン(カニ、エビなどの甲殻類のキチンから調製して得られる脱アセチル化物- β -1,4-ポリ-D-グルコサミン)は、繊維の染着性を向上させ[1]、遊離アミノ基が金属と結合し、また、酸と塩を形成して多くの金属を結合し、キレート化合物を形成するといわれている[2]。

前報[3]では、1:1型金属錯塩染料および1:2型金属錯塩染料によるキトサン処理柞蚕絹織物の染着性について検討したが、染色堅ろう度の報告はみあたらない。

そこで、一般に、色調が比較的鮮明で湿潤堅ろう度および日光堅ろう度がよく、染足が速く染着性が大きい、染むらになりやすいといわれる1:1型金属錯塩染料と色調が暗味で、湿潤堅ろう度が1:1型金属錯塩染料より良好で、耐光度がすぐれ、変色や脆化が少なく、染着力が非常に高い

*連絡先: 神戸ファッション造形大学、673-0001 兵庫県明石市明南町2丁目1番50号
TEL 078-927-0771, FAX 078-927-0774

が、溶解性が低く、不均染な1:2型金属錯塩染料を用いて、キトサン処理柞蚕絹織物の染色堅ろう度などを検討した。

2. 材料および方法

2. 1 試料

前報[4]と同様の柞蚕絹織物(ポンジー)を用いた。

2. 2 精練

前報[4]と同様の石けん・アルカリ法を用いた(以下、無処理織物とする)。

2. 3 キトサン処理

前報[4]と同様のpad-dry処理を行った(キトサン付着率0.75%、以下、キトサン処理織物とする)。

2. 4 染色

使用染料は、Neolan Orange G (C.I. Acid Orange 74)、Neolan Red GR、Neolan Blue 2G (C.I. Acid Blue 158) の3種の1:1型金属錯塩染料(Ciba SC製)およびIrgalan Brown 2GL (C.I. Acid Brown 44)、Irgalan Red 2GL (C.I. Acid Red 211)、Irgalan Blue BGLの3種の1:2型金属錯塩染料(Ciba SC製)を用いた[5]。前者は染料3%owf、 CH_3COOH 3%owf、 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10%owf、後者は染料3%owf、 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10%owf、 $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ 3%owfで、いずれも80℃、60分間(浴比1:100)処理をし、その後、水洗、自然乾燥した。なお、湿潤摩擦染色堅ろう度については、染色、水洗、乾燥後、1) 石けん5g/l、40℃、20分間(浴比1:100)、および2) 石けん5g/l、 Na_2CO_3 2g/l、80℃、20分間(浴比1:100)、それぞれ処理後、十分水洗し、自然乾燥した。

2. 5 染着濃度

前報[4]と同様に分光学的方法により測定し、Kubelka-Munkの式よりK/S値を算出した。

2. 6 色の三属性および色差

前報[4]と同様、分光学的方法により、色の三属性、色差(ΔE^*ab)を測色した。ただし、色の表示は、CIE表色系のL*a*b*系(1976)を用いた。

2. 7 染色堅ろう度試験

染色堅ろう度試験方法は、前報[4]と同様、JIS Lの摩擦(L-0849-2004)、乾燥、湿潤、摩擦試験機II形(学振形)、水(L-0846-2004)、洗濯(L-0844-2005、A-1法)、汗(L-0848-2004、酸性人工汗液、アルカリ性人工汗液)、ホットプレッシング(L-0850-1994、電気アイロン法B-3)、日光(L-0841-2004、125時間露光)に準じて行った(染色物の露光前後の色差 ΔE^*ab による)。

3. 結果および考察

3. 1 染着性

1:1型金属錯塩染料のNeolan Orange G、Neolan Red GR、Neolan Blue 2Gおよび1:2型金属錯塩染料のIrgalan Brown 2GL、Irgalan Red 2GL、Irgalan Blue BGLを用いて染色した無処理織物およびキトサン処理織物の染着性(K/S値)をTable 1に示した。

1:1型金属錯塩染料および1:2型金属錯塩染料によるキトサン処理織物のK/S値は、無処理織物より、前者は8.5~36.6%、後者は15.0~34.1%、いずれも増加した。

1:1型金属錯塩染料は、一般にpH1~3の強酸性領域の染浴が用いられる。柞蚕絹フィブロインの等電点はpH5.2~5.6で、キトサンはpH5.5以下では正に荷電を示すといわれている[6]。強酸性浴では、染料中のクロム原子は、正荷電となり、酸根のアニオンと結合するため、染料についたクロムイオンが柞蚕絹やキトサンとの接合がむづかしく、それらの基質の極性基との結合が起こりにくいものと思われる。一方、柞蚕絹フィブロイン繊維、またはキトサン中の正電荷のアミノ基と染料中の負電荷のスルホン酸基がイオン結合するものと考えられる。染浴のpHが3前後であるため、主としてNeolan染料分子(平面型)の負電荷

Table 1. Depth of shade and three attributes of color of untreated and chitosan-treated silk fabrics dyed with 1 : 1 type and 1 : 2 type metal-complex dyes

Dyes	Sample	K/S value	L*	a*	b*	ΔE^*ab
Neolan Orange G	U	9.5	53.01	39.24	42.28	0
	Ch	11.9	50.46	35.32	42.82	2.8
Neolan Red GR	U	9.4	48.51	39.72	22.07	0
	Ch	10.2	43.93	40.53	23.17	4.8
Neolan Blue 2G	U	8.2	36.87	-7.84	-14.13	0
	Ch	11.2	32.29	-7.15	-13.72	4.6
Irgalan Red 2GL	U	9.1	43.51	41.43	19.19	0
	Ch	12.2	39.51	41.05	20.85	4.4
Irgalan Brown 2GL	U	10.7	36.87	16.19	16.62	0
	Ch	12.3	34.61	17.56	15.92	2.7
Irgalan Blue BGL	U	5.7	41.36	-2.51	-23.56	0
	Ch	6.7	38.72	-2.58	-22.57	2.8

U : Untreated fabric Ch : Chitosan-treated fabric

のスルホン酸基（たとえば、Neolan Orange G、Neolan Blue 2G）とキトサン分子中の第1アミノ基とのイオン結合が、柞蚕絹フィブロイン分子のアミノ基より多く働いているものと考えられる。また、等電点よりも高い弱酸性～中性浴では、解離アミノ基の一部が水酸イオンと反応するため、基質全体の荷電量は、若干マイナスに帯電するといわれている。染色後水洗によって柞蚕絹分子、またはキトサン分子のアンモニウムイオンは遊離アミノ基になり、それが染料中のクロムイオンとの間に配位結合などが生じて、キトサン分子の方が柞蚕絹分子より多くの強固な染着が生じるためと考えられる。

1 : 2型金属錯塩染料については、一般に弱酸性～中性浴が用いられる。クロム錯塩は6配位数が最も安定な塩で、クロム原子（Ⅲ価クロムで、主原子価結合が4つある）を中心に2分子のモノアゾ化合物が互いに垂直に配置した特異な立体構造をもっている（たとえば、Irgalan Brown 2GL、モノアゾ金属錯塩）。この染料は、一般に、一部の1 : 2型スルホン型金属錯塩染料を除いて、スルホン酸基などのアニオン性の酸性基をもっていない場合が多いため、1 : 1型金属錯塩染料に比して水溶性の弱い結合基のスルホンアミド基、N

－アルキルスルホンアミド基などの非イオン性基の親水性基をもち、染料の極性は弱く、負電荷が分子全体に分布するためイオン性が小さい。染浴pHが5.5～7であるため、染料は錯体全体として負に荷電し、主として分子全体として負イオンのIrgalan染料分子（立体型）とキトサン分子の正イオンのアミノ基との間にイオン結合が働いているものと考えられる。

中性浴付近では、染浴のpHが柞蚕絹フィブロイン繊維、キトサンポリマーの等電点以上になり、水素結合、非極性ファンデルワールス力による結合が増加すること、また、染料の分子量や同一共面部分が増大すると柞蚕絹フィブロイン繊維、およびキトサンへの親和力が増し、非極性ファンデルワールス力による結合などの吸着が増加すること、キトサン処理柞蚕絹は、無処理柞蚕絹より疎水性であるため[2]、染料分子中の疎水部分との分配型の吸着が生じ、キトサン分子中の水酸基などの非極性ファンデルワールス力による結合、水素結合などの非イオンの結合が柞蚕絹フィブロイン分子より多く、働くことなどから染着性が増加したものと考えられる。

3. 2 色の三属性および色差

1 : 1 型金属錯塩染料のNeolan Orange G、Neolan Red GR、Neolan Blue 2Gおよび1 : 2 型金属錯塩染料のIrgalan Brown 2GL、Irgalan Red 2GL、Irgalan Blue BGLを用いて染色した無処理織物およびキトサン処理織物の色の三属性および色差 (ΔE^*ab) をTable 1に示した。

色相については、キトサン処理によって、両染料ともほとんど変化がみられなかった。明度は、キトサン処理によって、いずれの染料も低下した。これは、キトサン処理によって、染着濃度 (K/S 値) が増加したことに起因したものと考えられる。彩度は、キトサン処理によって、両染料ともに変化は小さく、一定の傾向がみられなかった。色差 (ΔE^*ab) は、キトサン処理によって1 : 1 型金属錯塩染料では2.8~4.8、1 : 2 型金属錯塩染料では2.7~4.4と変化した。これはキトサン処理によって色相、彩度の変化が小さいことから、主として明度によ

る影響、すなわち、染着濃度の増加による影響と考えられる。

3. 3 染色堅ろう度

1 : 1 型金属錯塩染料のNeolan Orange G、Neolan Red GR、Neolan Blue 2Gおよび1 : 2 型金属錯塩染料のIrgalan Brown 2GL、Irgalan Red 2GL、Irgalan Blue BGLを用いて染色した無処理織物およびキトサン処理織物の染色堅ろう度をTable 2、3、4および5に示した。

摩擦染色堅ろう度については、乾燥摩擦堅ろう度は高いが、湿潤摩擦堅ろう度は2-3~4-5級と比較的低い傾向がみられた。しかし、染色後ソーピングによって、石けん5g/l 処理 (40℃、20分間、浴比1 : 100) では3~4-5級、石けん5g/l、炭酸ナトリウム2g/l 処理 (80℃、20分間、浴比: 1 : 100) では4~4-5級とかなり向上した。これは柞蚕絹フィブロイン繊維、キトサンポリマーに表面付着した染料が除去され、染色

Table 2. Color fastness to rubbing of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with 1:1 type and 1:2 type metal-complex dyes

Dyes	Sample	Rubbing			
		Before soaping		After soaping*	
		Dry	Wet	Dry	Wet
Neolan Orange G	U	4.5	3.4	5	4.5
	Ch	4.5	3	5	4.5
Neolan Red GR	U	4.5	3	5	4.5
	Ch	4.5	3	5	4.5
Neolan Blue 2G	U	4.5	3	5	4
	Ch	4.5	2.3	5	4
Irgalan Red 2GL	U	4	3.4	5	4.5
	Ch	4	2.3	5	4.5
Irgalan Brown 2GL	U	4	3.4	5	4.5
	Ch	4	3.4	5	4.5
Irgalan Blue BGL	U	4.5	4.5	5	4.5
	Ch	4.5	4.5	5	4.5

U : Untreated fabric Ch : Chitosan-treated fabric

*Soaping: The dyed fabric was treated in a solution containing of 5g/l of marsellics soap and 2g/l of sodium carbonate of 80℃ for 20 minutes in a liquor ratio of 100 after dyeing and was washed with water.

Table 3. Color fastness to washing and water of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with 1 : 1 type and 1 : 2 type metal-complex dyes

Dyes	Sample	Washing			Water		
		Staining		Change in color	Staining		Change in color
		C	S		C	S	
Neolan Orange G	U	5	5	5	5	4	5
	Ch	5	5	5	5	4.5	5
Neolan Red GR	U	5	5	4.5	5	4.5	5
	Ch	5	5	4.5	5	5	5
Neolan Blue 2G	U	5	5	4.5	4	3	5
	Ch	5	5	5	4.5	4.5	5
Irgalan Red 2GL	U	5	5	5	5	5	4.5
	Ch	5	5	5	5	5	4.5
Irgalan Brown 2GL	U	5	5	4.5	5	5	4.5
	Ch	5	5	4.5	5	5	4.5
Irgalan Blue BGL	U	5	5	4.5	5	4	4.5
	Ch	5	5	5	5	4.5	5

U : Untreated fabric Ch : Chitosan-treated fabric C : Cotton, S : Silk

Table 4. Color fastness to Perspiration of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with 1:1 type and 1:2 type metal-complex dyes

Dyes	Sample	Perspiration					
		Acidic			Alkaline		
		Staining		Change in color	Staining		Change in color
		C	S		C	S	
Neolan Orange G	U	5	4.5	5	4.5	4	5
	Ch	5	4.5	5	4.5	4	5
Neolan Red GR	U	4.5	4	5	4	3.4	4.5
	Ch	4.5	4	5	4	4	5
Neolan Blue 2G	U	3.4	3.4	5	3.4	3.4	5
	Ch	4	4	5	4	4	5
Irgalan Red 2GL	U	5	4	5	5	4.5	5
	Ch	5	4	5	4.5	4	4.5
Irgalan Brown 2GL	U	5	5	5	5	5	5
	Ch	5	5	5	5	5	5
Irgalan Blue BGL	U	5	5	5	5	4	5
	Ch	5	5	5	5	4	5

U : Untreated fabric Ch : Chitosan-treated fabric C : Cotton, S : Silk

Table 5. Color fastness to daylight of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with 1 : 1 type and 1 : 2 type metal-complex dyes

Dyes	Sample	Daylight (ΔE^*ab)			
		Expousing time (hours)			
		Original	15	35	125
Neolan Orange G	U	0	2.8	4.7	7.8
	Ch	0	2.5	4.5	8.1
Neolan Red GR	U	0	1.2	1.7	3.1
	Ch	0	0.8	2.4	3.1
Neolan Blue 2G	U	0	2.9	3.4	9.2
	Ch	0	2.2	4.1	9.2
Irgalan Red 2GL	U	0	1.8	2.5	5.8
	Ch	0	1.6	2.6	4.8
Irgalan Brown 2GL	U	0	1.6	0.8	2.9
	Ch	0	0.2	0.5	5.3
Irgalan Blue BGL	U	0	3.3	5.5	11.3
	Ch	0	3.1	7.3	11.6

U : Untreated fabric Ch : Chitosan-treated fabric C : Cotton, S : Silk

堅ろう度を高めたためと思われる。洗濯、水およびホットプレッシング染色堅ろう度の汚染（綿、絹）および変退色は、いずれも高い傾向を示した（ホットプレッシング堅ろう度は、いずれも汚染5級、変退色4-5級を示した）。摩擦、洗濯、水およびホットプレッシング染色堅ろう度については、キトサン処理による染色堅ろう度への低下はみられず、洗濯および水堅ろう度は一部向上した。これは、1 : 1型金属錯塩染料では、クロムイオン染料に対し色素分子が1分子は配位し、さらに3分子の水（ H_2O ）が配位して、染色後水洗などによって、柞蚕絹フィブロイン分子、キトサン分子のアミノ基がクロム原子に配位結合し、いずれも、高い洗濯染色堅ろう度などが得られたものと考えられる。また、1 : 2型金属錯塩染料では、均染性につくられている1 : 1型金属錯塩染料に比べて染料の移動度が小さく、湿潤染色堅ろう性が高いといわれること、クロム原子などの6個の配位が染料との結合で飽和されているため、柞蚕絹分子やキトサン分子のアミノ基などとの結合も強くなり堅ろう度が高くなるものと考えられ

る。

汗染色堅ろう度は、一般にいずれの染料も酸性人工汗液では、アルカリ性人工汗液より高い傾向がみられた。酸性人工汗液、アルカリ性人工汗液では、汚染（綿、絹）、変退色ともに、1 : 2型金属錯塩染料の染色堅ろう度は、1 : 1型金属錯塩染料より若干高い傾向を示した。また、Neolan Blue 2Gでは、いずれの人工汗液の染色堅ろう度もキトサン処理によって向上した。

日光染色堅ろう度については、カーボンアーク灯光を20時間または40時間照射した場合、キトサン処理によって絹繊維の黄褐変度が少なくなり、耐光性があることが報告されている[7]。日光露光15時間では、キトサン処理によっていずれも染色織物の日光染色堅ろう度（染色物の露光前後の色差 ΔE^*ab が小さくなる）が高くなる傾向がみられるが、35時間、125時間と露光時間が長くなると、いずれの染料も明瞭な傾向が認められなかった。

4. 摘要

1 : 1 型金属錯塩染料および 1 : 2 型金属錯塩染料によるキトサン処理織物の染色堅ろう度などについて検討した。

1 : 1 型金属錯塩染料および 1 : 2 型金属錯塩染料によるキトサン処理織物の K/S 値は、無処理織物よりそれぞれ 8.5~36.6%、15.0~34.1% 増加した。色の三属性は、キトサン処理によって、明度は、1 : 1 型金属錯塩染料、1 : 2 型金属錯塩染料ともに低下した。色差 (ΔE^*ab) は 1 : 1 型金属錯塩染料 2.8~4.8、1 : 2 型金属錯塩染料 2.7~4.4 と比較的小さかった。

染色堅ろう度については、乾燥摩擦染色堅ろう度は高いが、湿潤摩擦染色堅ろう度は、2-3~4-5 級と低かった。しかし、石けん 5 g/l、炭酸ナトリウム 2 g/l (80°C、20 分間、浴比 1 : 100) のソーピングによって、4~4-5 級とかなり向上した。ホットプレッシング染色堅ろう度 (汚染、変退色) および洗濯染色堅ろう度の汚染は 5 級、変退色は 4~5 級でいずれも高かった。洗濯染色堅ろう度の変退色では、Neolan Blue 2G および Irgalan Blue BGL が、キトサン処理によって若干向上し、水染色堅ろう度では、Neolan Orange G、Neolan Blue 2G および Irgalan Blue BGL の無処理織物の汚染 (絹) は一部を除いて 4~5 級と高く、キトサン処理によって向上する傾向を示した。

汗染色堅ろう度については、酸性人工汗液の場合は、アルカリ性人工汗液より若干高い傾向がみられた。酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液

では、Neolan Blue 2G の汚染は、キトサン処理によって若干向上した。また、酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液は、汚染、変退色ともに、1 : 2 型金属錯塩染料の染色堅ろう度が 1 : 1 型金属錯塩染料より若干高い傾向がみられた。

日光染色堅ろう度は、15 時間露光の場合、1 : 1 型金属錯塩染料および 1 : 2 型金属錯塩染料、いずれもキトサン処理によって向上する傾向がみられた。

引用文献

- [1] 矢吹 稔 (1992) : キチン・キトサンのはなし. p.63, 技報堂出版 (東京)
- [2] 竹本喜一 (1981) : キチン・キトサンーその化学と応用ー. 現代化学 57-61
- [3] 加古 武 (2000) : 1 : 1 型金属錯塩染料および 1 : 2 型金属錯塩染料によるキトサン処理作蚕絹織物の染着性. 日蚕雑 69, 221-224
- [4] 加古 武, 片山 明 (1997) : キトサン付着柞蚕絹織物の色調および染色堅ろう度. 日蚕雑 66, 330-335
- [5] 皆木 弘 (2006) : 酸性染料、染色ノート、第 24 版. p.45, p.47, 色染社 (大阪)
- [6] 奥田拓道 (1995) : キチン・キトサンの活動分野、キチン・キトサンー基礎と薬理ー p.14, 薬局新聞社 (東京)
- [7] 和田哲夫 (1988) : 公開特許公報 (A), 昭和 63-159581

セリシン蚕Ndのセリシンに関する研究 — 大造および錦秋×鐘和のセリシンとの比較 —

亀井加恵子*・遠藤 太**・一田昌利**・山崎 隆***・三好 明****

Studies on Silk Sericin of Nd Strain in *Bombyx mori* Comparison with Silk Sericin of Daizo and Kinshu × Showa

Kaeko KAMEI*, Futoshi ENDO*, Masatoshi ICHIDA**,
Takashi YAMAZAKI*** and Akira MIYOSHI****

*Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan

**Center for Bioresource Field Science, Kyoto Institute of Technology,
Ippongi-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

***3-A-506 Mukaijima New Town, 151-30 Mukaijima-ninomaru-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8141, Japan

****Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,
29 Shimohakubai-cho, Kitano, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

Sericin protein of *Bombyx mori* have excellent functions such as anti-oxidative activity, tyrosinase inhibitory activity, absorption ability of UV light, and excellent biocompatibility. Since Nd strain in *Bombyx mori* produces low level of fibroin and extraction efficiency of sericin is expected to be high, Nd strain is one of ideal targets for developing practical use of sericin.

In this study, Nd sericin is separated into five fractions by continuous extraction with hot water of different temperatures, and its functions (anti-oxidative activity and effect on tyrosinase activity) were analyzed. Sericins of Daizo and Kinshu × Showa strains were also analyzed their functions for the comparative study. Fractions obtained by extraction at 95°C of Nd sericin showed anti-oxidative activity, may be due to uric acid or flavonoid, while Daizo sericin had weak anti-oxidative activity. Tyrosinase activity was enhanced by Nd and Daizo sericin, except that extract at 95°C of Daizo sericin slightly inhibited tyrosinase activity. Sericin protein might enhance tyrosinase activity, in contrast, flavonoid of Daizo inhibits tyrosinase activity.

Key Words : Sericin, silkworm, antioxidant, tyrosinase inhibition, UV absorption

1. まえがき

繭糸は主にフィブロインとセリシンの2種類のタンパク質から構成されており、その他にロウ質や炭水化物、色素、無機物なども含んでいる[1]。

これらのうち、フィブロインは蚕が吐き出した一本の繭糸中に一対2本存在し、1本のフィブロインは100本内外のフィブリルで構成されている。さらにフィブリルは太さが0.1 μmほどの極めて細かいマイクロフィブリルの集合体である[2]。このよう

*連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門、
606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、E-mail : kame@kit.ac.jp、TEL 075-724-7553

**連絡先：京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、
603-8326 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : ichida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0741

***連絡先：612-8141 京都市伏見区向島二ノ丸町151-30 向島ニュータウン3-A-506

****連絡先：財団法人衣笠織研研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、
E-mail : zai-kinugasakai@nifty.com、TEL 075-461-5949

に、極めて細い繊維状タンパク質の集合体であるフィブロインが絹繊維（シルク）として利用されてきた。一方、セリシンは β -構造をとり、水溶性でアルカリ溶液に極めて溶解しやすく、性状、特に熱水への溶解性の違いから4つの分画（セリシンI、II、III、IV）に分けられ、フィブロインを層状に取り巻くような形で存在している[3]。セリシンは蚕が繭を形成する際の繭糸の接着剤としての働きを持っているが、水溶性タンパク質であるため、これまでは製糸および精練の過程で除去され、廃棄されてきた[4,5]。このため、セリシンに関する研究はフィブロインに比べて分なされてきたとはいえない状態であった。しかし、近年になりセリシンが様々な機能性を有していることが明らかになり、独立行政法人 農業生物資源研究所の主催で「フィブロイン・セリシンの利用」研究会が開催されるまでになってきた。

セリシンの機能性として、保湿作用、紫外線吸収能、抗酸化力、メラニン合成に関与するチロシナーゼに対する阻害活性、細胞増殖促進能、抗がん効果などが知られている[6]。また、セリシンのアミノ酸組成が皮膚のアミノ酸組成とよく似ており、セリシンは生体適合性に優れているといわれている。そこで、これらのセリシンの特性を活かした化粧品や医薬品、食品などへの応用が試みられ、すでにいくつかの企業によってセリシンを配合した基礎化粧品、入浴液、石鹸などが販売されている。

ところで、これまでセリシンのアミノ酸組成に関し、小松[3]は野蚕セリシンのアミノ酸組成には蚕の生物学的種属による顕著な相違はなく、家蚕セリシンとの間にも大きな差はないとみてよいであろう。さらに、清水がテンサンの延伸セリシンの繊維X線図形は家蚕セリシンのそれと大きく相違しないと述べていることを考慮すると、家蚕、野蚕を通じてセリシンにはアミノ酸組成から見る限り、フィブロインに見られるような結晶形態に特異性をもたらすほど大きな化学構造の差はないとみるのが妥当であろう、と述べている。また、桐村[7]は系統の異なる蚕セリシンのアミノ酸組成がほとんど同じであることを報告しており、蚕品種

間でセリシンに大きな相違が認められないという見解が一般的であった。しかし、三浦[8]は、53系統の蚕のセリシン部タンパクを電気泳動によって調査し、様々なタンパクバンドが検出され、一つとして同じタンパクバンドパターンを示したものがないことを報告している。このことに関し、一出もその著書[9]の中で、三浦のデータを基に、セリシンには多種類のタンパク質が含まれており、これまでセリシンあるいはセリシンタンパクと呼んでいたものをセリシン部と呼ぶべきであると提唱している。一方、亀井ら[10]は、家蚕（春嶺×鐘月、輪月×漢川）および野蚕（サクサン、サクサンLY、エリサン）のセリシンの機能について検討し、種の違いあるいは同一種においては品種の違いによってセリシンの機能性が異なっていることを明らかにした。例えば、輪月×漢川セリシンは春嶺×鐘月セリシンと比較して、チロシナーゼの活性阻害が高く、逆にサクサンセリシンはチロシナーゼ活性を増強する。このように、種あるいは品種によってセリシンの性質が異なっており、それぞれのセリシンの機能性を明らかにすることが今後のセリシン利用において重要である。

著者らは裸蛹系統Ndに着目し、セリシンの機能性に関する研究を進めている。裸蛹系統Ndの繭は、フィブロインの含有率が非常に低く、大部分がセリシンで構成されている。そのため、Nd繭はセリシンの抽出効率が優れていると考えられ、セリシンを実用化するうえで優位性がある。これまでに、Nd繭および同じ白色繭である錦秋×鐘和の繭を121℃の熱水で1時間抽出して得たセリシンについて紫外線吸収能、アミノ酸組成、抗酸化力およびチロシナーゼ活性に与える影響を中心に検討した[11]。その結果、両セリシンの機能性には違いがあり、Ndセリシンは錦秋×鐘和セリシンに比べて強い抗酸化力と紫外線吸収能を持つことを明らかにした。一方、Ndセリシンはチロシナーゼ活性を増強したが、錦秋×鐘和セリシンはチロシナーゼ活性に影響を与えないことが分かった。

セリシンは熱水に対する溶解性の異なる複数分画からなり、各分画が層状に形成されていることが知られている[12]。本研究では、裸蛹系統Ndおよ

び錦秋×鐘和のセリシンを異なる温度の熱水で分画し、各セリシン画分の抗酸化力、チロシナーゼ活性に与える影響やアミノ酸組成などに関して追究した。同時に、高い抗酸化力が報告されている黄緑色繭の大造のセリシンについても検討した。

2. 材料および方法

2. 1 供試繭

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センターで飼育された家蚕裸蛹系統Ndと、家蚕 (*Bombyx mori* L.) 2品種 (錦秋×鐘和、大造) を用いた。Ndおよび錦秋×鐘和は白色繭であるのに対し、大造は黄緑色繭である。

2. 2 セリシンの調製

2. 2. 1 全セリシンの調製

繭の毛羽を除去した後、ハサミで約5×5mm四方の大きさにカットした。重量の20倍量の水を加え121℃で1時間加熱し、セリシンを抽出した。抽出液をろ紙でろ過した後、凍結乾燥し、全セリシンを得た。

2. 2. 2 熱水抽出によるセリシンの分画

繭の毛羽を除去した後、ハサミで繭層を切断し、薄く剥離し、さらにピンセットを用いて機械的に解きほぐし綿状とした。200mgの繭に重量の750倍 (150ml) の水を加え遠心分離 (7,000rpm、10分、室温) し、不純物を取り除いた。約95℃の熱水を試料に加え、ガラス棒でよく攪拌し、遠心分離した (7,000rpm、10分、室温)。得られた上清を画分1とした。沈殿として得られた繭に95℃で加湿した蒸留水150mlを加え、ウォーターバスを用いて95℃で30分間、次いでオートクレーブを用いて105℃で5分間、115℃で5分間、121℃で60分間の順序で加熱し、セリシンを抽出した。各温度での抽出ごとに遠心分離 (7,000rpm、10分、室温) し、得られた上清をそれぞれ順番に、画分2、画分3、画分4、画分5 (以後「画分セリシン」と呼ぶ) とした。得られた画分を凍結乾燥し、以後の実験に供した。

2. 2. 3 尿素によるセリシンの抽出

繭の毛羽を除去した後、ハサミで約5×5mm四方の大きさにカットした。マイクロチューブに繭40mgと抽出バッファー (2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、8M尿素を含む10mM Tris-HCl、pH7.0) 1mlを加え、25℃で24時間抽出した。遠心分離 (15,000rpm、4℃、20分) し、上清 (抽出液) を回収した。

2. 3 繭糸の形状

各温度でセリシンを抽出した後の繭糸の形状を、走査型電子顕微鏡 (SEM: TOPCON社製 SM-200) によって観察した。

2. 4 分子量

2. 4. 1 ゲルろ過クロマトグラフィー

セリシンの分子量をゲルろ過クロマトグラフィーによって測定した。適当量のセリシンに6M尿素および0.8M NaClを含む0.1M Tris-HCl pH 7.2を加えて、セリシンをほぼ完全に溶解した。遠心分離 (15,000rpm、5分、4℃) 後、フィルターろ過 (0.20μm) して不溶物を除去し、FPLC (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いてSuperdex 75カラム (1×30cm、GEヘルスケアバイオサイエンス社製) でゲルろ過した。流速は0.3ml/min、チャートスピードは5mm/min、セリシンの検出は280nmの吸収によって行った。標準タンパク質 (牛血清アルブミン: 分子量 66,000、卵オボアルブミン: 分子量 45,000、大豆Kunitzuトリプシンインヒビター: 分子量 24,000、ニワトリ卵白リゾチーム: 分子量 14,300、インシュリン: 分子量 5,938、還元型グルタチオン: 分子量 307) の溶出位置から作成した標準曲線を用いて分子量を算出した。

2. 4. 2 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) には14%ポリアクリルアミドゲルを使用し、電流12mAで電気泳動した。泳動終了後、クイックCBB (和光純薬工業) で染色した。分子量マーカーとして、Phosphorylase b (分子量97,400)、Serum albumin (分子量66,200)、

Ovalbumin (分子量45,000)、Carbonic anhydrase (分子量31,000)、Trypsin inhibitor (分子量21,500)、Lysozyme (分子量14,400) を使用した。

2. 5 アミノ酸組成分析

約0.2 mgのセリシンに50 μ l の0.2% 3-(2-アミノエチル) インドールを含む4 Nメタンスルホン酸 (和光純薬工業) を加え、真空封管した後、110°C で24時間加水分解し、アミノ酸分析計 (L-8500A、日立) で分析した。

2. 6 吸収スペクトル

0.1%セリシン水溶液の吸収スペクトルを分光光度計 (U-3300、日立) によって測定した。

2. 7 抗酸化力の測定

セリシンの抗酸化力をDPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) を用いて評価した。25mgのセリシンに800 μ l の水を加え、約95°C で約60分間加熱してセリシンを溶かした。遠心分離 (15,000 rpm、10分、4°C) によって不溶物を除去し、得られたセリシン溶液を蒸留水で段階希釈して使用した。

遮光した容器にDPPH溶液 (1 mg DPPH/6.25 ml エタノール) を作製し、サンプル100 μ l に対してエタノール100 μ l およびDPPH溶液50 μ l を加え、攪拌後、室温で30分間静置した。遠心分離 (15,000 rpm、5分、室温) し、析出した不溶物を除去した。混合溶液200 μ l を96穴マイクロプレート (Becton Dickinson Labware) に分注し、マイクロプレートリーダー (CORONA ELECTRIC MTP-120) を用いて、550nmの吸収を測定した。セリシン量は反応溶液中の重量 (μ g) で示した。DPPHは和光純薬工業社製を使用した。

2. 8 チロシナーゼ活性測定

マッシュルームチロシナーゼ45.1unit (Sigma, 終濃度9 unit) を含む1/15Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) 150 μ l に1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解したセリシン300 μ l を加え、25°C で5分間インキュベートした。インキュベート後、300 μ l の1.25 mM

L-DOPA (dihydroxyphenylalanine、ナカライテスク、終濃度0.5 mM) 溶液を加えて、分光光度計 (U-3300、日立) を用いて波長475 nmの吸収変化を測定した[6,13]。反応液中のセリシン終濃度は0.1% (w/v) になるように調製した。

3. 実験結果

3. 1 セリシンの熱水抽出

カットして、綿状にほぐしたNd繭、大造繭、錦秋×鐘和繭 (いずれも200 mg) を熱水によって抽出し、画分1~5に分画した。各画分セリシンの抽出量を凍結乾燥後の重量によって評価した。画分セリシンの乾燥重量 (mg)、抽出前の繭重量 (200 mg) に対する各画分の乾燥重量の割合 (%), および画分1~5の乾燥重量の総和に対する各画分の重量比率 (%) を表1に示す。大造、錦秋×鐘和に比べてNdはいずれの画分においても抽出されたセリシン量が多く、画分1~5の乾燥重量の総和と比較すると、Ndは大造に比べて約2.6倍、錦秋×鐘和に比べて約3.1倍であった。

3. 2 繭糸の形状

各画分セリシンを抽出した後の繭糸の形状を走査電顕によって観察した。図1はNd、図2は大造、図3は錦秋×鐘和を示す。なお、繭外層と内層が明瞭に区別できるものは外層を示したが、抽出操作によって両層が区別できなくなったものは繭として示した。Nd繭糸で特に顕著に観察されるセリシンが膜状に展開して癒合している状態が、抽出が進むにつれて減少した。画分1~5の全ての画分セリシンを抽出した繭糸ではセリシンがなくなり、いずれの繭糸も繊維同士がほぐれている様子が観察された。なお、画分5の抽出操作後のNd繭糸は、大造および錦秋×鐘和の繭糸に比べて細かった。

3. 3 分子量

大造の全セリシンの分子量をゲル濾過法によって測定した。ブロードな溶出パターンであったが、最初に溶出されるピークトップの溶出位置から算

表1. 各菌 (200 mg) から抽出した画分セリシンの乾燥重量、抽出率¹⁾、および各画分の重量比率²⁾

(A) Nd

	画分1	画分2	画分3	画分4	画分5	合計
乾燥重量 (mg)	10.0	12.9	17.0	20.2	57.8	117.9
抽出率 (%)	5.0	6.5	8.5	10.1	28.9	58.9
各画分の重量比率 (%)	8.5	11.0	14.4	17.1	49.1	100.0

(B) 大造

	画分1	画分2	画分3	画分4	画分5	合計
乾燥重量 (mg)	3.0	3.4	3.1	8.5	26.8	45.1
抽出率 (%)	1.5	1.7	1.7	4.3	13.4	22.5
各画分の重量比率 (%)	6.6	7.6	7.6	18.9	59.4	100.0

(C) 錦秋×鐘和

	画分1	画分2	画分3	画分4	画分5	合計
乾燥重量 (mg)	2.1	1.0	3.5	9.2	22.7	38.5
抽出率 (%)	1.1	0.5	1.8	4.6	11.4	19.2
各画分の重量比率 (%)	5.5	2.5	9.1	23.8	59.0	100.0

1) 抽出前菌の重量200 mgに対する画分セリシンの乾燥重量%

2) 画分セリシン乾燥重量の総和に対する各画分セリシンの重量%

出した大造全セリシンの分子量は61,300であった。

画分セリシンの分子量をゲルろ過によって分析した。画分1および2は2つ以上のピークが検出されたが、最初に溶出されるピークをセリシタンパク質と考え、分子量を求めた。結果を表2に示す。Ndセリシンについては画分1～3の分子量は11万前後であったが、画分4、5で分子量が低下した。大造セリシンは、画分1～4は分子量が10万前後であったが、画分5の分子量は半分程度に低下した。錦秋×鐘和セリシンは、画分1～4にかけて111,500から91,800まで徐々に分子量が低下し、画分5は62,300と大きく分子量が低下した。

続いて、セリシタンパク質の分子量をより詳細に解析するために、熱水分画したセリシンと尿素抽出セリシンの分子量をSDS-PAGEによって解析した。結果を図4に示す。いずれのセリシンも画分1～2は分子量10万以上の位置にバンドが検出されたが、画分3～5になるにしたがっては分子量10万以上のバンドが消失し、ゲル全体が染色さ

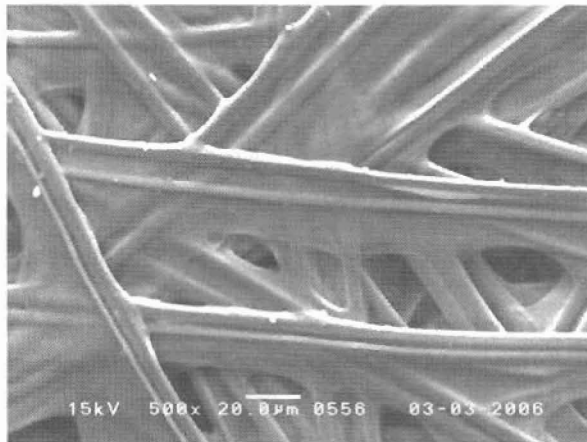
れた。画分1～2には低分子量域にもいくつかのバンドが検出された。全セリシン (図4. 熱水) は、いずれも画分5と同様な泳動パターンを示した。一方、尿素抽出セリシン (図4. 尿素) は10本以上の明瞭なバンドが検出された。

3. 4 アミノ酸組成

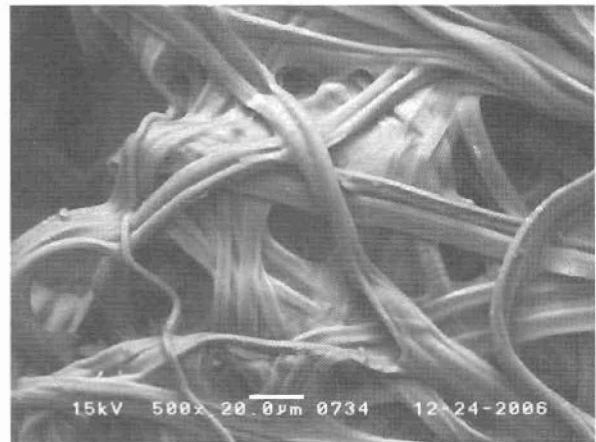
大造の全セリシンのアミノ酸組成分析の結果を、昨年度および一昨年度に報告したNd、錦秋×鐘和、春嶺×鐘月、輪月×漢川、サクサンおよびエリサンの全セリシンのアミノ酸組成と併せて表3に示す[10,11]。3種類の全セリシンを比較すると、Nd全セリシンはセリシンの含有量がやや大きく、錦秋×鐘和全セリシンはやや小さかったが、大きなアミノ酸組成の相違は認められなかった。

また、Nd、大造、錦秋×鐘和の画分セリシンのアミノ酸分析の結果を表4～6に示す。Ndの画分セリシンのアミノ酸組成を比較すると、セリシンが多く、次いでアスパラギン酸とグリシンが多いと

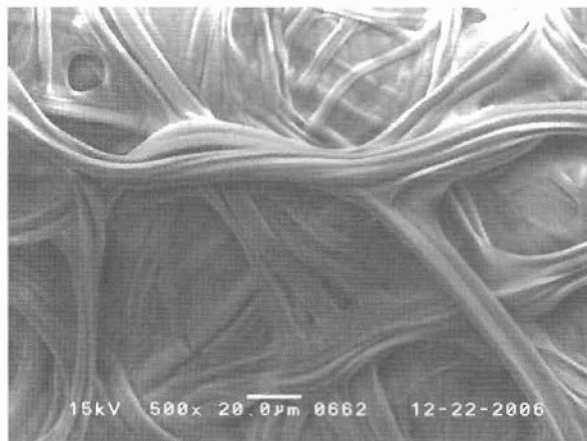
抽出前



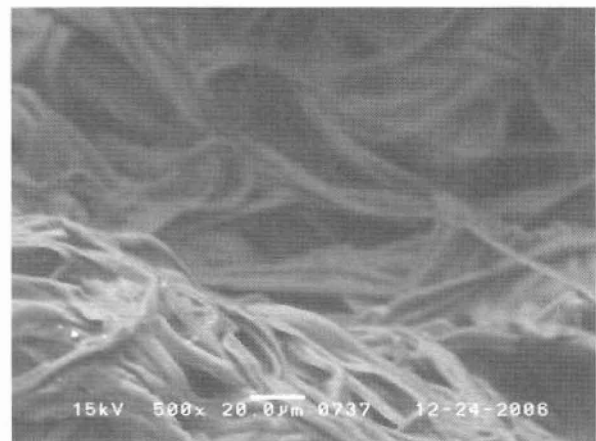
画分3抽出後



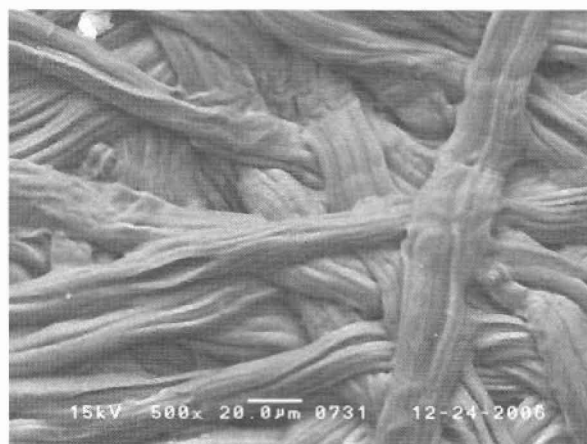
画分1抽出後



画分4抽出後



画分2抽出後



画分5抽出後

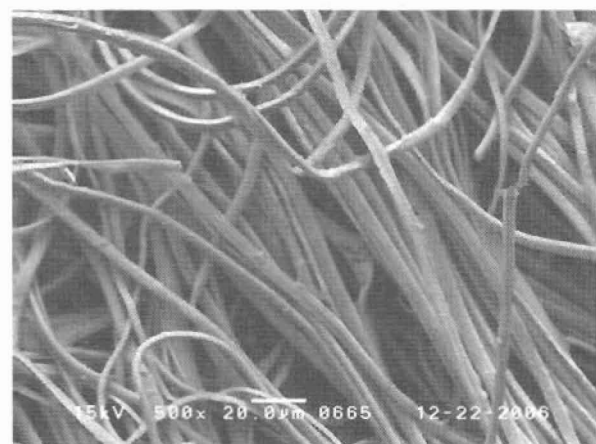
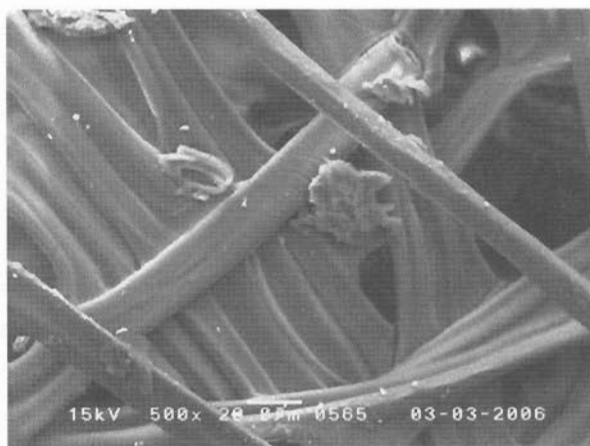
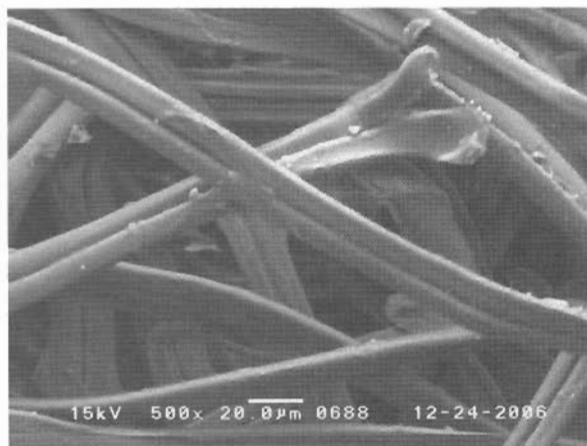


図1. Nd繭層からの抽出前と画分1～5抽出後の走査電子顕微鏡写真
抽出前繭層は内層を示す。抽出後繭層は外層および内層が区別できなかった。 ×500倍

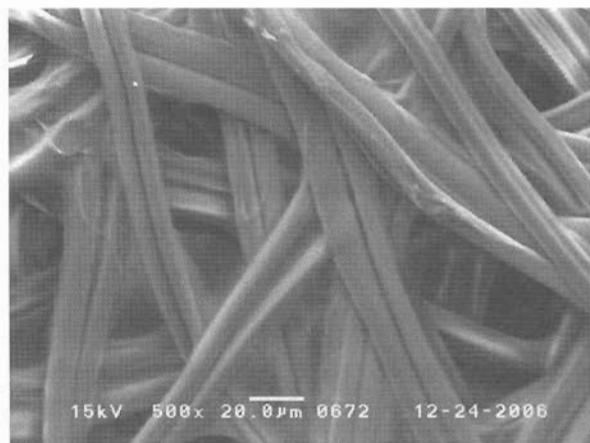
抽出前



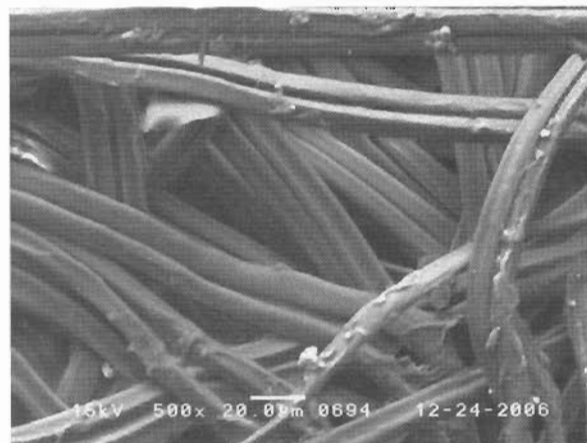
画分3 抽出後



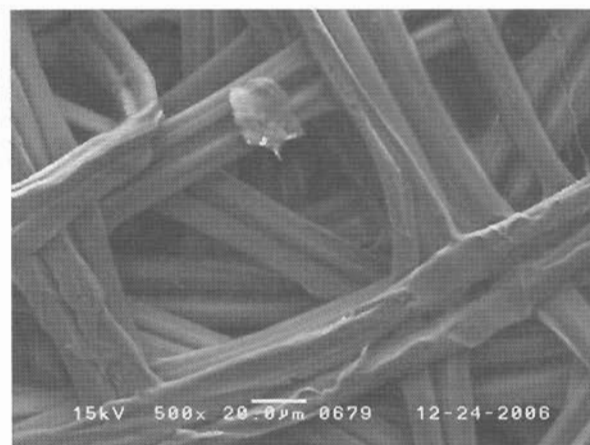
画分1 抽出後



画分4 抽出後



画分2 抽出後



画分5 抽出後

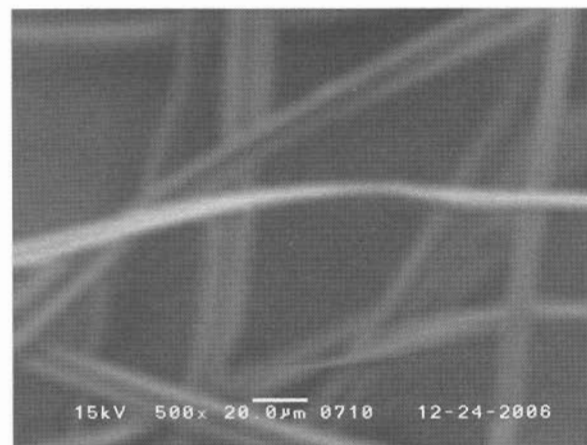
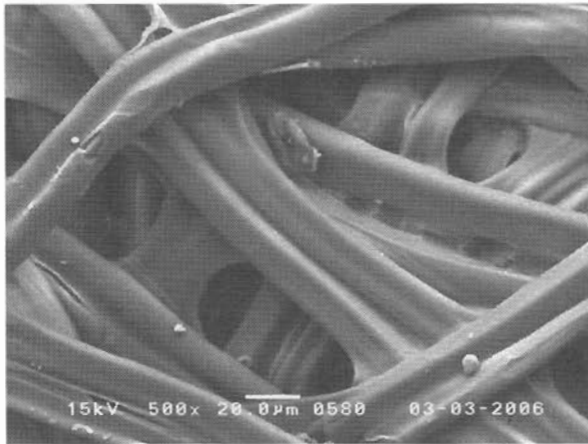
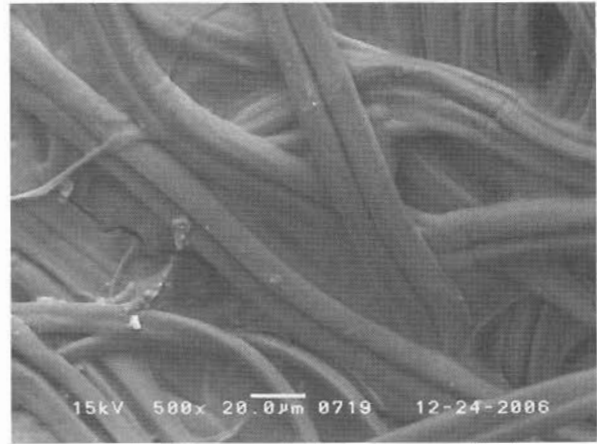


図2. 大造繭層からのセリシン抽出前と画分1～5抽出後の走査電子顕微鏡写真
抽出前繭層および画分1～4抽出後繭層は外層を示している。画分5抽出後の繭層は外層および内層が区別できなかった。 ×500倍

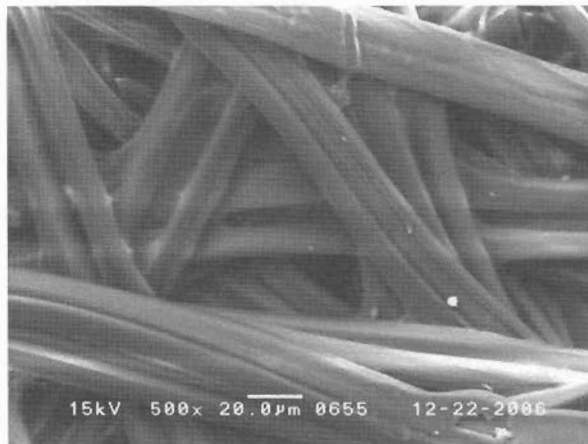
抽出前



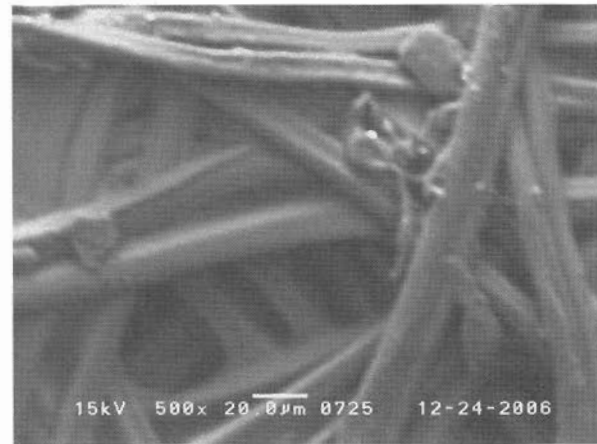
画分3 抽出後



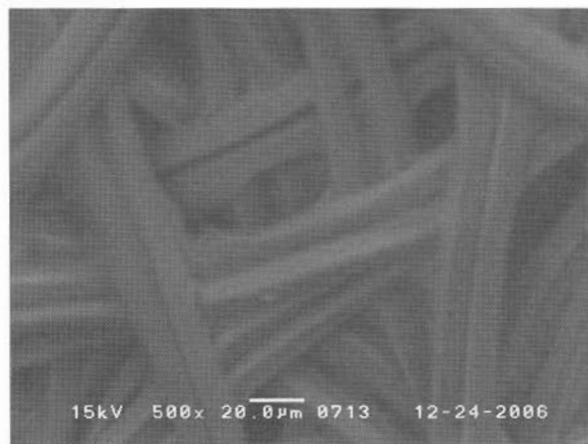
画分1 抽出後



画分4 抽出後



画分2 抽出後



画分5 抽出後

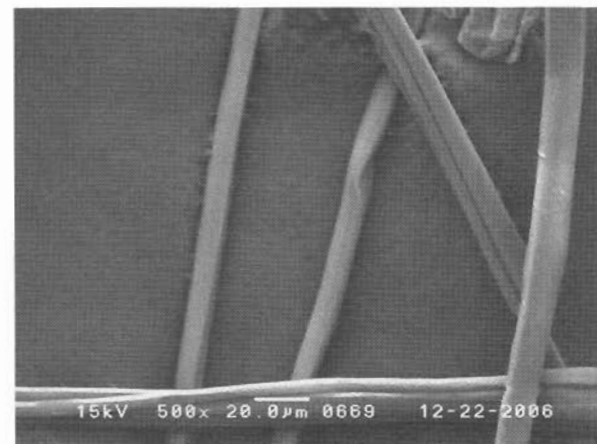


図3. 錦秋×鐘和繭層からのセリシン抽出前と画分1～5抽出後の走査電子顕微鏡写真
抽出前繭層および画分1～4抽出後繭層は外層を示している。画分5抽出後の繭層は外層および内層が区別できなかった。 ×500倍

表2. 各菌の画分セリシンの分子量

画分	Nd	大造	錦秋×鐘和
1	104,500	91,800	111,500
2	117,000	107,900	120,000
3	111,500	104,500	98,700
4	78,100	104,500	91,800
5	57,500	56,600	62,300

画分セリシンをゲルろ過し、最初に溶出したピークをセリシタンパク質として、標準曲線から分子量を求めた。

いうセリシタンパク質の特徴は一致していた。しかし、グルタミン酸とリジンは画分2が最も多く、抽出が進むにつれて減少した。大造の画分セリシンでは、画分5が最もセリンが多く、グルタミン酸とリジンは画分1が最も多く、抽出が進むにつれて減少した。錦秋×鐘和では、画分2が他の画分と比べて明らかにセリンが少なく、逆にグリシンが多かった。

3. 5 吸収スペクトル

大造の全セリシン水溶液 (0.1%) の吸収スペクトルを測定した。昨年度報告したNdおよびサクサン、輪月×漢川、錦秋×鐘和の全セリシンの吸収スペクトルを併せて図5に示した[11]。白色菌のNdは280nmに極大を持つ吸収スペクトルを示し、300nm付近に吸収のショルダーが見られた。同じ白色菌である錦秋×鐘和は、278nm付近に極大を示し、Ndと比較すると300nm付近のショルダーがほとんど見られなかった。黄緑菌の大造は、275nmに吸収極大を示し、300nm～380nm付近にも吸収が見られた。

Nd、大造、錦秋×鐘和の画分セリシンについて、画分ごとの吸収スペクトルを図6に示す。大造セリシンの画分1の吸収スペクトルは他の画分セリシンのものと大きく異なっており、270nm付近、320nm付近、370nm付近に極大を示した。画分2も300nmから340nmになだらかな吸収があり、340nmから480nmにかけての領域にも吸収が認められた。Ndセリシンの画分1は282nmに吸収

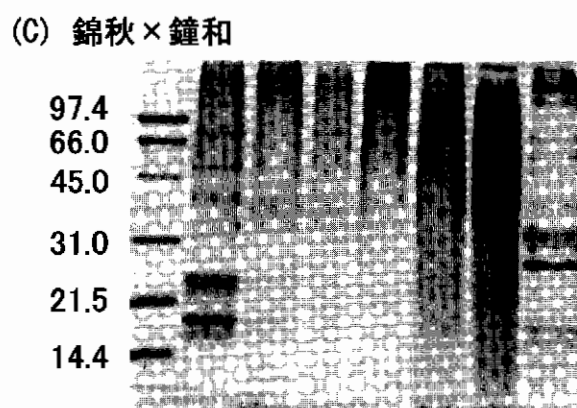
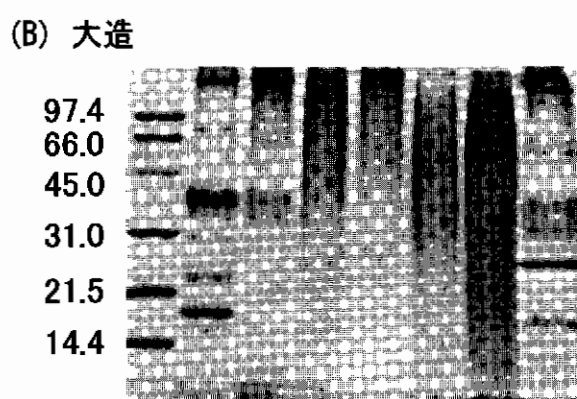
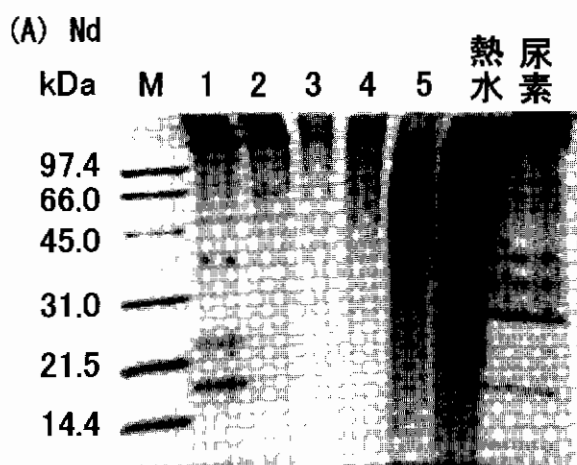


図4. 画分セリシンおよび尿素抽出セリシンのSDS-PAGE
M: 分子量マーカー、1～5: 熱水画分1～5、
熱水: 全セリシン、尿素: 尿素抽出セリシン

極大を示すスペクトルが得られたのに対し、画分2～5は275nm付近に極大を示し、280nm付近にショルダーを持つスペクトルが得られた。また、画分1および画分2は300nm付近にふくらみが見られた。錦秋×鐘和の画分セリシンはどの画分も273nm～275nm付近に極大を示した。さらに、画

表3. 家蚕および野蚕の熱水抽出した全セリシン画分のアミノ酸組成 (モル%)

	大造	Nd**	錦秋×鐘和**	春嶺×鐘月*	輪月×漢川*	サクサン*	エリサン*
Asp	15.17	14.78	15.21	15.60	15.05	15.44	14.19
Thr	8.51	7.92	8.30	8.31	7.51	13.85	6.49
Ser	34.22	35.23	33.45	33.23	34.03	23.38	31.91
Glu	4.39	5.28	4.85	5.01	5.98	6.33	8.62
Pro	0.62	0.68	0.62	0.70	0.60	1.18	1.78
Gly	15.17	15.02	15.2	15.61	14.34	19.47	12.13
Ala	4.73	4.75	4.76	5.06	4.73	3.40	4.51
1/2Cys	0.57	0.84	1.37	0.32	0.64	0.30	0.88
Val	3.16	2.70	2.97	3.01	2.98	1.04	1.44
Met	0.33	0.25	0.59	0.05	0.56	0.21	0.60
Ile	0.91	0.55	0.70	0.76	0.82	0.58	0.92
Leu	1.47	1.03	1.22	1.21	1.33	0.67	0.96
Tyr	3.15	3.36	3.53	3.52	3.29	5.23	4.41
Phe	0.65	0.34	0.35	0.40	0.37	0.35	0.76
Lys	2.45	2.79	2.62	2.69	3.29	2.23	5.10
His	1.22	1.27	1.18	1.22	1.20	2.58	3.07
Trp	0.14	n.d.	n.d.	0.13	0.10	0.08	n.d.
Arg	3.15	3.21	3.09	3.17	3.17	3.69	2.22
Total	100	100	100	100	100	100	100

*文献[10] **文献[11] n.d.: 未検出

表4. Ndの画分セリシンのアミノ酸組成 (モル%)

	画分1	画分2	画分3	画分4	画分5
Asp	14.85	14.73	14.88	15.09	14.88
Thr	6.07	4.68	8.47	7.84	9.49
Ser	35.39	35.22	34.41	38.67	36.50
Glu	7.47	10.04	5.31	5.27	4.11
Pro	0.89	0.59	0.40	0.38	0.56
Gly	15.15	15.09	12.87	14.92	13.19
Ala	5.49	5.47	3.77	4.19	3.95
1/2Cys	0.56	0.64	0.96	0.30	0.42
Val	2.22	1.58	3.15	2.49	3.08
Met	0.07	0.19	1.26	0.07	0.45
Ile	0.50	0.46	1.13	0.36	0.69
Lcu	0.89	0.86	1.54	0.64	1.22
Tyr	2.21	1.54	4.48	2.70	4.03
Phe	0.51	0.37	0.36	0.23	0.38
Lys	3.67	4.43	2.66	2.63	2.40
His	1.24	1.11	1.24	1.16	1.28
NH3	0.05	0.01	n.d.	0.05	n.d.
Arg	2.79	3.00	3.10	3.03	3.37
Total	100	100	100	100	100

n.d.: 未検出

表5. 大造の画分セリシンのアミノ酸組成 (モル%)

	画分1	画分2	画分3	画分4	画分5
Asp	14.82	16.32	16.01	17.25	16.31
Thr	3.78	4.94	7.38	3.50	4.17
Ser	30.55	30.81	34.10	34.16	37.80
Glu	11.28	8.81	5.88	5.77	4.10
Pro	1.20	0.59	0.49	0.56	0.49
Gly	15.77	17.91	15.23	14.89	14.91
Ala	6.48	5.93	5.11	3.78	4.39
1/2Cys	1.23	0.83	0.53	1.10	0.42
Val	1.71	1.93	2.71	3.61	3.44
Met	0.31	0.20	0.14	0.92	0.27
Ile	0.59	0.56	0.51	1.17	0.72
Leu	1.55	1.24	0.88	1.55	1.21
Tyr	1.22	1.95	3.21	4.18	4.20
Phc	0.87	0.34	0.29	0.43	0.32
Lys	5.23	3.90	3.06	2.80	2.34
His	1.07	0.90	1.13	1.12	1.37
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05
Arg	2.33	2.86	3.33	3.21	3.48
Total	100	100	100	100	100

n.d.: 未検出

表6. 錦秋×鐘和の画分セリシンのアミノ酸組成 (モル%)

	画分1	画分2	画分3	画分4	画分5
Asp	16.21	17.25	16.17	15.44	15.55
Thr	8.08	5.48	7.95	8.25	8.44
Ser	33.41	26.78	36.55	35.83	32.89
Glu	5.06	8.27	4.99	5.02	4.97
Pro	1.01	1.37	0.49	0.04	0.58
Gly	15.02	18.04	15.57	15.56	15.90
Ala	4.53	5.98	3.91	4.44	5.29
1/2Cys	0.67	0.55	0.39	0.47	0.51
Val	3.22	3.38	2.75	2.79	2.91
Met	0.33	0.12	0.23	0.37	0.22
Ile	0.69	0.84	0.45	0.57	0.76
Leu	1.07	2.42	0.80	0.94	1.27
Tyr	3.35	2.02	2.96	3.12	3.57
Phe	0.57	0.70	0.24	0.26	0.38
Lys	2.63	3.48	2.51	2.57	2.49
His	1.12	0.74	1.07	1.15	1.13
Trp	0.11	0.20	n.d.	0.15	0.05
Arg	2.94	2.39	2.97	3.04	3.08
Total	100	100	100	100	100

n.d.: 未検出

分1および2は300nmから480nm付近に吸収が認められた。

3. 6 抗酸化活性

大造菌全セリシンの抗酸化活性をDPPHフリーラジカル量の減少を測定することによって評価した。結果を図7に示す。比較のため昨年度報告したNd、錦秋×鐘和、輪月×漢川、サクサンの全セリシンの抗酸化力の測定結果を併せて示す[11]。セリシンを含まないコントロールの吸収の半値を与えるセリシン量、すなわちDPPHフリーラジカルを50%消去するのに必要なセリシン量を図7から計算した結果、Nd 140.1 μg 、大造200 μg 以上、錦秋×鐘和200 μg 以上、輪月×漢川136.6 μg 、サクサン15.7 μg であった。

Nd、大造、錦秋×鐘和について、画分1～5の抗酸化活性を測定し(図8)、DPPHフリーラジカルを50%消去するのに必要なセリシン量を求めた(表7)。その結果、Ndセリシンの画分1および2にはフリーラジカル消去活性が見られたが、その他の画分にはほとんど活性は見られなかった。また、大造セリシンの画分1に弱い抗酸化活性が検

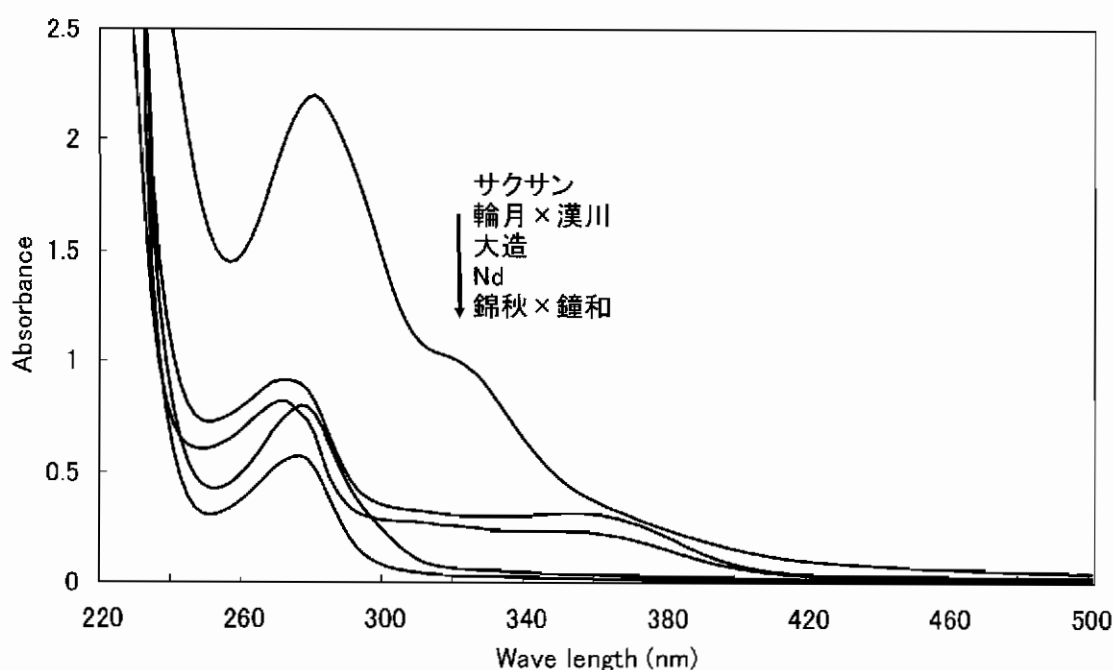


図5. 全セリシン (0.1%) の吸収スペクトル
↓は画分セリシンの吸収スペクトルの順番を示す。

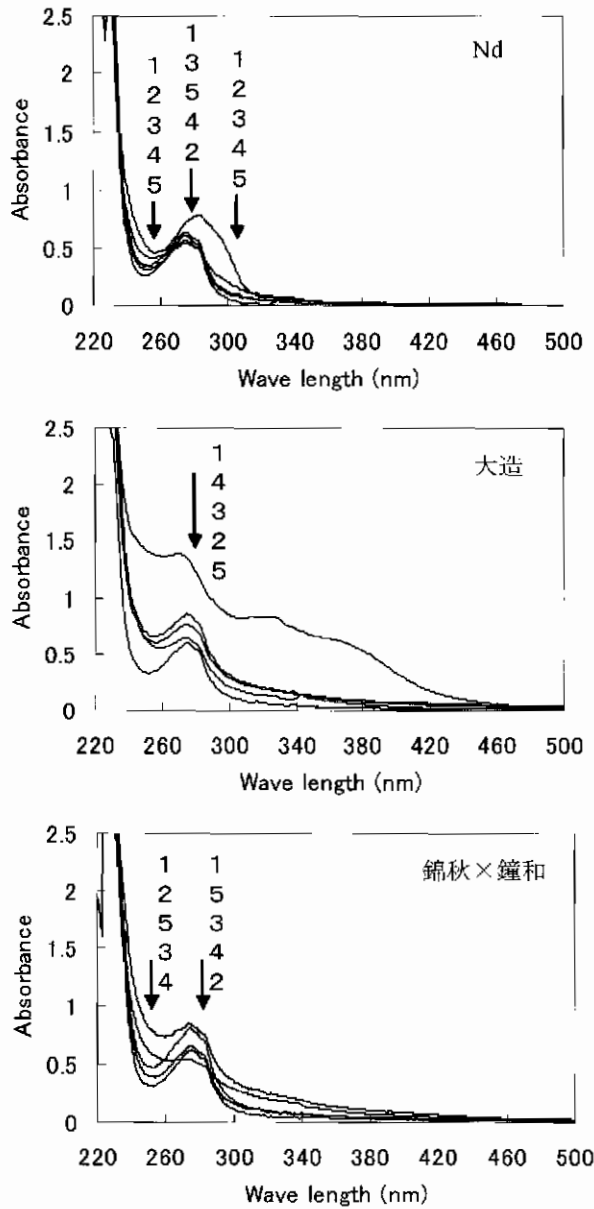


図6. 画分セリシン (0.1%) の吸収スペクトル
上からNd、大造、錦秋×鐘和の画分セリシン。↓は画分セリシンの吸収スペクトルの順番を示す。

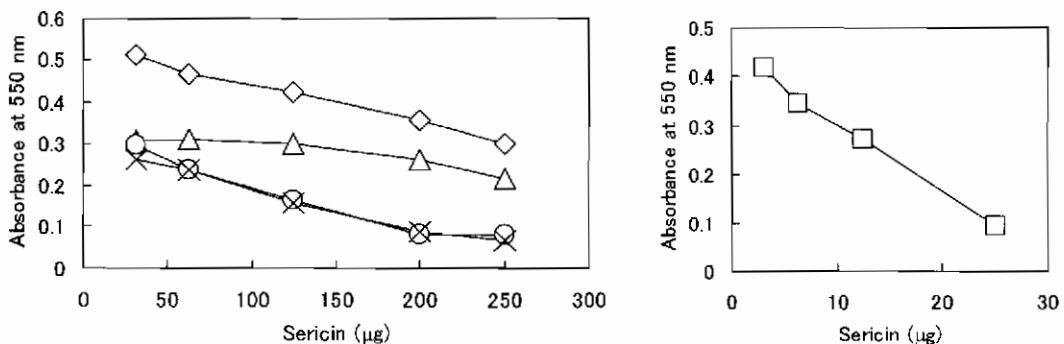


図7. 全セリシンの抗酸化活性

DPPHフリーラジカルを550 nmの吸収によって測定した。Nd (○)、錦秋×鐘和 (△)、大造 (◇)、輪月×漢川 (×)、サクサン (□)。

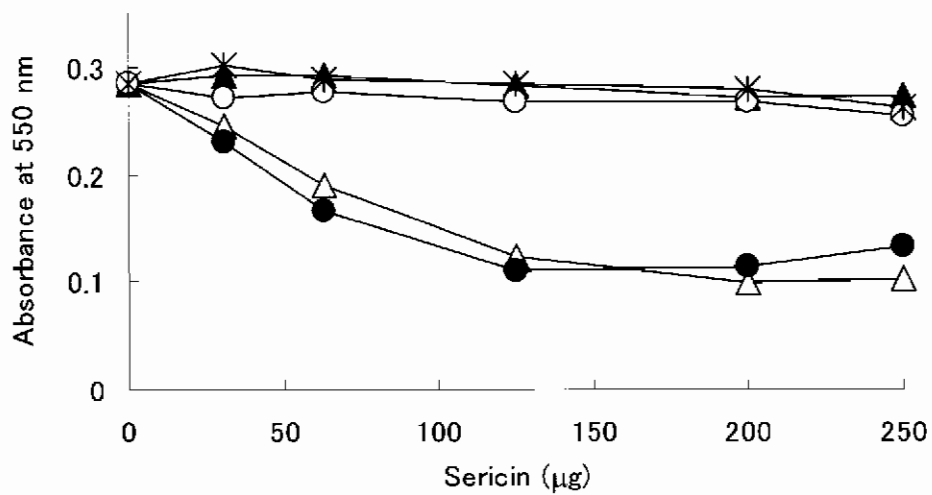
出された。錦秋×鐘和の画分セリシンに関してはいずれの画分も抗酸化活性はほとんど認められなかった。

3. 7 チロシナーゼに対する効果

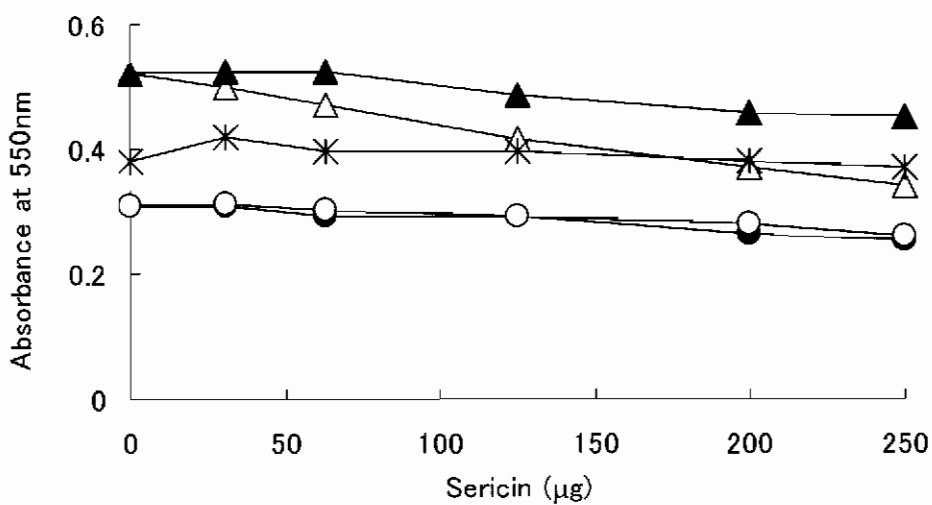
大造全セリシン共存下でのチロシナーゼ活性を図9および表8に示す。昨年に報告したNd、錦秋×鐘和、輪月×漢川、サクサンの全セリシンのチロシナーゼに対する効果を併せて示す[11]。セリシンを加えないコントロールのチロシナーゼ活性に対し、大造全セリシンおよびNd全セリシンを加えた場合、チロシナーゼ活性は増強された。錦秋×鐘和全セリシンを添加したチロシナーゼはほぼセリシン無添加のコントロールとほぼ同程度の活性を示し、輪月×漢川全セリシンのみがチロシナーゼ活性を阻害した。

Nd、大造および錦秋×鐘和セリシンの画分1～5を加えてチロシナーゼ活性を測定した。結果を表9に示す。Ndセリシンではいずれの画分を加えた場合でも、コントロールに対して115%～119%とチロシナーゼ活性が増強され、Nd全セリシンを加えた場合の結果と一致した。大造の画分セリシンでは、画分1のみがややチロシナーゼ活性を阻害し、画分2～5は増強した。錦秋×鐘和の画分セリシンの場合は、画分1および2がややチロシナーゼ活性を阻害し、画分3～5は増強した。

(A) Nd



(B) 大造



(C) 錦秋×錦和

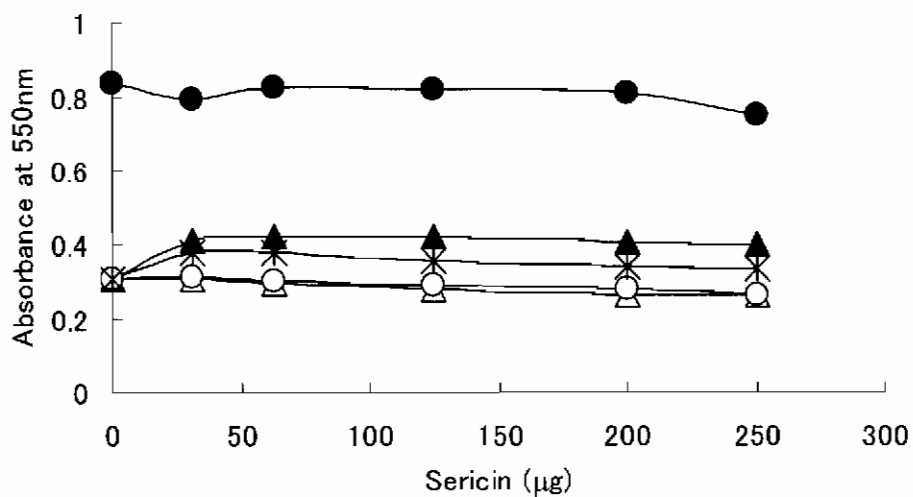


図8. 画分セリシンの抗酸化活性

DPPHフリーラジカルを550 nmの吸収によって測定した。画分1 (△)、画分2 (●)、画分3 (▲)、画分4 (○)、画分5 (*)。

表7. DPPHラジカル消去率50%を与える画分セリシンの量 (μg)

画分	1	2	3	4	5
Nd	102	81.5	>200	>200	>200
大造	>200	>200	>200	>200	>200
錦秋×鐘和	>200	>200	>200	>200	>200

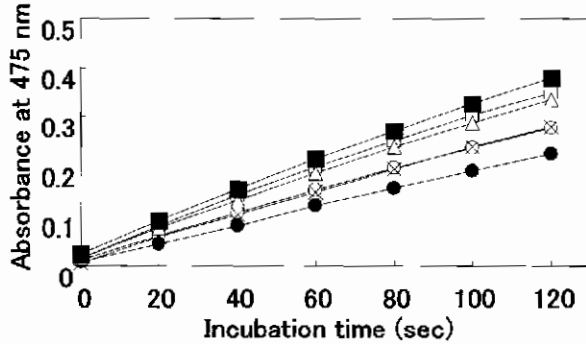


図9. 全セリシンのチロシナーゼに対する効果
マッシュルームチロシナーゼにセリシン(終濃度0.1%)を加えてインキュベート後、基質を添加し、475nmの吸収変化を測定した。コントロール(セリシン無し)(○)、Nd(△)、大造(■)、錦秋×鐘和(×)、輪月×漢川(●)、サクサン(□)。

4. 考察

裸蛹系統Nd系統は後部絹糸腺が退化あるいは機能しないため、ほとんどフィブロインを産生しない。そのため、繭のフィブロインの含有率が非常に低く、大部分がセリシンで構成されているため、セリシンを実用化するうえで優位性がある。異なる温度の熱水によってセリシンを分画した後、走査電子顕微鏡によって繭糸を観察した結果、抽出を進めるにしたがって繭糸の癒合は減少し、特に画分5の抽出によって1本ずつの繊維がほだけ、癒合が認められなくなった(図1~3)。このことから、画分5の抽出操作(121℃で1時間抽出)によってほぼ全てのセリシンが抽出できたと考えられる。

緒論に述べたように、セリシンは熱水への溶解性の違いから4つの分画(セリシンI、II、III、IV)に分けられ、フィブロインを層状に取り巻い

表8. 全セリシンのチロシナーゼ活性に与える効果

繭	チロシナーゼ活性 (%)
コントロール (セリシン無添加)	100.0
Nd	118.2
大造	136.4
錦秋×鐘和	104.5
輪月×漢川	81.8
サクサン	127.3

コントロール(セリシン無添加)のチロシナーゼ活性を100%とし、画分セリシンを加えたときのチロシナーゼ活性を示した。

表9. 画分セリシンのチロシナーゼ活性に与える効果

画分	チロシナーゼ活性 (%)				
	1	2	3	4	5
Nd	115.4	115.4	115.4	119.2	115.4
大造	92.3	111.5	119.2	123.1	119.2
錦秋×鐘和	96.2	96.2	146.2	123.1	123.1

コントロール(セリシン無添加)のチロシナーゼ活性を100%とし、画分セリシンを加えたときのチロシナーゼ活性を示した。

ているということが報告されている[3]。この報告では、セリシンを一定温度98±1℃で抽出し、抽出されてくるセリシンの量のグラフが変曲点を示すことからセリシンを分画している。しかし、本研究ではそのような変曲点が得られなかったために、95℃から121℃まで温度を変えることによってセリシンを分画した。したがって、本研究で得られたセリシン画分と小松らが報告しているセリシン画分が一致しているかどうかは分からない。

熱水抽出による分画の結果、Nd、大造、錦秋×鐘和いずれの繭も画分5に一番多くセリシンが抽出された(表1)。この結果は、走査電顕での観察結果と一致する。抽出前の繭の重量と画分1~5の乾燥重量の総和を比較すると、Ndは繭の58.9%、大造は22.5%、錦秋×鐘和は19.2%が抽出された。この結果より、Nd繭は同じ重さの大造繭の約2.6倍、錦秋×鐘和繭の約3.1倍のセリシンを含んでいると考えられ、Nd繭はセリシン抽出率の面から優

れた素材であるといえる。

昨年度報告したNdおよび錦秋×鐘和繭の0.5%炭酸ナトリウム中で湯煎した場合の練減率は78%および34%である[11]。したがって、Nd繭の全画分1～5の熱水抽出によって得られたセリシン量はアルカリ抽出の約76%、錦秋×鐘和の場合は56%である。アルカリ抽出ではほぼ全てのセリシンが抽出されると考えられているが、アルカリ抽出に比べて熱水抽出による画分の方がセリシンの回収率が低かった。この原因の一つとして、熱水分画ごとの遠心分離を含む一連の操作によって生じる繭の損失が考えられる。

セリシタンパク質は加熱によって分解する事が知られているので、実験に使用するセリシンの分子量を把握しておく必要がある。ゲルろ過の結果、大造の全セリシンの分子量は61,300であった。昨年報告した全セリシンの分子量は、Nd 69,700、錦秋×鐘和66,000、輪月×漢川61,300、サクサン59,500であり、いずれの全セリシンの分子量も6万から7万であることが分かった[11]。

熱水抽出した画分ごとのゲルろ過を行った結果、Ndセリシンは画分1から3まで、大造と錦秋×鐘和は画分4までは10万前後の分子量を保っていた。しかし、Ndでは画分4から分子量が減少し始め、大造および錦秋×鐘和では画分5で分子量が5.5万～6万程度まで減少した。SDS-PAGEにおいて、いずれの繭においても画分1～2は分子量97,000以上のセリシタンパク質と考えられるバンドが見られたが、画分3～5および全セリシンでは高分子量のバンドが消失し、ゲル全体が染色された(図4)。熱水分画したセリシンは、加熱によってセリシンがランダムに分解し種々の分子量のセリシンが生成したために、ゲル全体が染色されたものと考えられる。尿素抽出では加熱をしていないために、ペプチド結合の分解は起こらないはずである。一方、Kuriokaら[14]はセリシンにプロテアーゼインヒビターが含まれていることを報告している。したがって、尿素抽出セリシンで見られるいくつかのバンドには、セリシタンパク質以外のタンパク質が含まれていると考えられる。各繭の画分1に見られるバンドについても同

様のことがいえる。

セリシタンパク質に関する情報を得るため、アミノ酸組成を分析した。Nd、大造、錦秋×鐘和の全セリシンのアミノ酸組成はほとんど差がなく、いずれも典型的な家蚕セリシタンパク質の組成と一致する(表3)。また、画分セリシンのアミノ酸組成においても、いずれもセリンが多く、次いでアスパラギン酸とグリシンが多いというセリシタンパク質の特徴は一致している(表4～6)。錦秋×鐘和セリシン画分2においてセリンが少なく、グリシンが他の画分に比べて多かった。グリシンが多いことから、遠心分離によって除去しきれなかったフィブロインが混入したものと考えられる。大造の画分セリシンでは、画分5が最もセリンが多く、グルタミン酸とリジンは抽出が進むにつれて減少した。Ndおよび錦秋×鐘和では、画分2が最もグルタミン酸とリジンの含量が多く、抽出が進むにしたがって大造ほど顕著ではないが、両アミノ酸含量が低下した。この組成の違いは、小松ら[3,8,9]が報告しているフィブロインを取り巻く層状になったセリシンの構造による違いか、三浦や一田らが報告しているセリシンに含まれるセリシタンパク質以外のタンパク質によるものかは不明であり、今後検討を要する。

セリシンを化粧品に応用する場合、日焼け、皮膚ガン、しわなどの原因となる紫外線を吸収する能力は、非常に重要である。図5に示した吸収スペクトルから、大造および輪月×漢川の全セリシンは420nm付近までの領域に吸収を持つことから、紫外線吸収の面から見るとサクサンほどではないが両セリシンは優れた素材である。昨年報告[11]したように、同じ白色繭を比べるとNd全セリシンは錦秋×鐘和全セリシンよりもやや大きな紫外線吸収能を持つと言える。また、Nd全セリシンには300nm付近に錦秋×鐘和全セリシンにはほとんど見られない吸収があり、タンパク質以外の成分によると思われる紫外線吸収が認められた。熱水抽出によって得た画分セリシンの吸収スペクトルを比較すると、大造では300nmよりも長波長での吸収はほとんどが画分1に認められた(図6)。このことは、大造の早色成分はほとんどが画分1に分

画されたことを示している。同様に、白色繭のNdおよび錦秋×鐘和の画分セリシンでも300nm付近の吸収は画分1と2に回収されており、尿酸、フラボノールやその配糖体などのタンパク質以外の成分は95℃で容易に抽出されることが分かった。

大造セリシンの持つ抗酸化活性をDPPHフリーラジカル消去活性法によって測定した(図7)。昨年度、白色繭を作る家蚕の品種間では、Nd全セリシンは最も抗酸化力が大きく、黄色繭の輪月×漢川全セリシンに匹敵する事を報告した[11]。画分セリシンの抗酸化力を解析した結果、図8および表7よりNdの画分セリシンの抗酸化成分は画分1および2に含まれていることが分かった。セリシンの抗酸化力にはセリシンに含まれるフラボノイドおよび尿酸の寄与が大きいとの報告があり、これら品種間の抗酸化力の差異はフラボノイド色素の種類や量、尿酸の量の差異が反映しているものと考えられる[15]。尿酸は、pH7ではタンパク質の吸収よりやや長波長側の290nm付近に極大を持ち、320nm付近まで紫外吸収を示す。したがって、Ndセリシンの300nm付近の吸収は尿酸由来である可能性もあり、同じ白色繭錦秋×鐘和の画分セリシンに比べてNdセリシンが高い抗酸化力を示す原因が尿酸の含量の差である可能性が考えられる。Ndセリシンの抗酸化力が尿酸に起因するものかどうかを明らかにするためには、ウリカーゼPOD法など他の方法で尿酸量を測定することが必要である。一方、セリシタンパク質を構成するアミノ酸そのものも抗酸化力を持つ事が知られており、セリシタンパク質の抗酸化力への関与も存在すると考えられる[16]。しかし、錦秋×鐘和および大造のセリシンはNdセリシンと似通ったアミノ酸から構成されているにも関わらず弱い抗酸化力しか示さないことから、抗酸化力に対するタンパク質成分の寄与は非常に小さいものと考えられる。

笹繭系統大造セリシンは強い抗酸化力を持ち、その抗酸化力は7種類のフラボノールおよびフラボノール配糖体(ケルセチン、ケルセチン5-O-β-D-グルコシド、ケルセチン7-O-β-D-グルコシド、ケルセチン4'-O-β-D-グルコシド、ケンフェロール、

ケンフェロール5-O-β-D-グルコシド、ケンフェロール7-O-β-D-グルコシド)によるものであることが報告されている[17]。しかし、本研究で用いた大造全セリシンは抗酸化力が弱く、大造の系統によって抗酸化力が異なる可能性を示唆している。一方、図8に示すように大造の画分セリシンの画分1は弱いながらも抗酸化力が認められた。抗酸化力を示すと考えられるフラボノールおよびその配糖体は、吸収スペクトル(図6)から大造セリシンの画分1に含まれていると考えられ、大造セリシン画分1が抗酸化力を示すという結果と合致する。

セリシンは、メラニン合成酵素チロシナーゼを阻害することが報告されている。我々も、これまでに輪月×漢川全セリシンがチロシナーゼを阻害することを報告している[10]。一方、我々はチロシナーゼ活性に対する効果は蚕品種によって異なっていることも報告している[10]。本研究においても、錦秋×鐘和全セリシン(0.1%)はチロシナーゼ活性には影響を与えなかったが、Ndおよび大造の全セリシンはチロシナーゼ活性を増強した(図9、表8)。一方、大造および錦秋×鐘和の画分1~2の画分セリシンがチロシナーゼの活性を弱く阻害した(表9)。いくつかのフラボノイド類がチロシナーゼ阻害活性を有していることが報告されており[18]、画分1に抽出されるフラボノイド類がチロシナーゼ阻害活性に関与している可能性が考えられる。一方、その他の画分セリシンは全て活性を増強していることが分かった。このことから、全画分セリシンに共通して含まれるセリシタンパク質そのものがチロシナーゼ活性を増強する可能性が考えられ、今後、検討する必要がある。

本研究結果から、Ndは錦秋×鐘和と同様、白色繭を作る家蚕であるが、セリシンの機能性には違いが見られた。Nd全セリシンは、黄色繭の輪月×漢川全セリシンと同レベルの抗酸化力を持ち、白色繭の錦秋×鐘和に比べて高い紫外線吸収能を有していた。また、セリシンの抽出率に優れていることから、Nd繭はセリシンの機能利用を図る上で有用である。一方、大造セリシンの画分1は紫外

線吸収能とチロシナーゼ阻害活性において優れた材料である。

引用文献

- [1] 皆川 基 (1981): 絹の科学. pp.58-334, 関西衣生活研究会, 大阪
- [2] 間 和夫 (1990): わかりやすい絹の科学. p.6-11, 文化出版局, 東京
- [3] 北条舒正, 小松計一 (1980): 続絹糸の構造. p.379-413. 信州大学繊維学部, 上田市
- [4] 羽賀篤信, 筒井亮毅, 渡辺忠雄 (1980): 解じょ率の異なる蚕品種の絹糸腺セリシンの挙動, 九州蚕糸 11, 65
- [5] 北野 実 (1977): セリシンのモンモリロナイトへの吸着様式. 日蚕雑 46(4), 363-364
- [6] Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N. and Nomura, M. (1998): Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(1), 145-147
- [7] 桐村二郎 (1962): 微生物定量法による絹糸タンパク質のアミノ酸組成と化学構造に関する研究. 蚕糸試験場報告 17, 447-522
- [8] Miura, Y. (2000): The research on interspecies variation of the cocoon shell proteins. Kyoto Institute of Technology Master's degree paper pp.53-105
- [9] 佐藤昌憲監修, 一田昌利著 (1995): 絹文化財の世界. p.9-33, 角川書店, 東京
- [10] 亀井加恵子, 田中慶利, 一田昌利, 山崎隆, 三好 明 (2004): 家蚕及び野蚕のセリシンの機能研究. 繊維研究所研究報告 8, 13-20
- [11] 亀井加恵子, 中島怜美, 一田昌利, 山崎隆, 三好 明 (2005): 家蚕裸蛹系統Ndのセリシンに関する研究. 繊維研究所研究報告 9, 59-69
- [12] 小松計一 (1975): セリシンの溶解特性ならびに構造特性に関する研究. 蚕糸試験場報告 26, 146-163
- [13] Saboury, A.A., Karbassi, F., Haghbeen, K., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A.A. and Farzami, B. (2004): Stabiliby, structural and suicide inactibation changes of Mushroom tyrosinase after acetylation by N-acetylimidazol. Biol. Macromol. 34, 257-262
- [14] Kurioka, A., Yamazaki, M. and Hirano, H. (1999): Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. Eur J Biochem. 259(1-2), 120-126
- [15] 山崎昌良 (2002): セリシン抽出物の抗酸化作用について. No.10, pp.2-3, (財)大日本蚕糸会, シルクだより
- [16] Masuda, T., Nakano, S. and Kondo, M. (1973): Rate constants for the reactions of OH radicals with the enzyme proteins as determined by nitrosodimethylaniline method. J. Radiat. Res. 14, 339-345
- [17] Kurioka, A. and Yamazaki, M. (2002): Purification and Identification of Flavonoids from the Yellow Green Cocoon Shell (Sasamayu) of the Silkworm, *Bombyx mori*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1396-1399
- [18] Badria, F.A. and elGayar, M.A. (2001): A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. Boll. Chim. Farm 140(4), 267-271

メタクリルアミドによる絹のグラフト加工 (2)

前川輝彦*

Graft Polymerisation of Methacrylamide onto Silk Fibers (2)

Teruhiko MAEKAWA*

*Department of Clothing Science, Faculty of Liberal Arts, Osaka Shoin Women's University,
Hishiyanisi 4-2-26, Higasi-osaka city, Osaka 577-8550, Japan

Abstract

The graft polymerisation of methacrylamide onto silk fibers was conducted in aqueous media, using potassium peroxodisulfate as an initiator. The initial rate of the graft polymerisation (Rp-g) was larger than the initial rate of the homopolymerisation and nearly 1st-power dependence of Rp-g on monomer concentration was obtained. Also, dependence of Rp-g on initiator concentration was found to be about 0.5-power.

Apparent activation energy of the graft polymerisation was estimated to be 69.7 kJ/mol. Tensile strength, Young's modulus and elongation of silk fibers decreased with increasing of graft yield.

Key Words : Silk fibers, Methacrylamide, Graft polymerisation, Mechanism, Tensile properties

1. 緒言

メタクリルアミド (MAA) を用いる絹へのグラフト重合の反応挙動を調べた前報において、ホモポリマーの生成を認めた[1]。

本報ではグラフト重合速度と同時にホモ重合速度を調べた。また、グラフト加工絹糸の力学的性質の変化についても検討した。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料絹糸、MAA、開始剤 ペルオキシ二硫酸カリウム (KPS) の精製は前報の通りである[1]。

2. 2 グラフト重合反応

精評した絹糸 1g の存在下に KPS を開始剤として

MAA の重合をイオン交換水中で行なった。反応条件は、MAA 2~10wt%、KPS 0.1~1.0wt%、温度 60~80℃ の範囲で変え、浴比 1:20、pH 3.8 は一定とした。所定時間の反応後、加工絹糸と反応溶液を分離した。加工絹糸の洗浄は前報の通りである。反応溶液は 6 倍量のアセトンに投入し、24 時間室温で静置後、濾別しホモポリマーを回収した。これをアセトンで数回洗浄後室温で減圧乾燥した。

各種収率は次式により求めた。

グラフト重合率 (Graft polymer yield) (%)

$$= \frac{W_g - W}{\text{MAA 重量 (g)}} \times 100$$

ホモ重合率 (Homo polymer yield) (%)

$$= \frac{\text{ホモポリマー重量 (g)}}{\text{MAA 重量 (g)}} \times 100$$

* 連絡先 : 大阪樟蔭女子大学学芸学部被服学科、577-8550 東大阪市菱屋西 4-2-26、
E-mail : maekawa.teruhiko@osaka-shoin.ac.jp、TEL 06-6723-8181

Table 1. Effect of monomer concentration on graft polymer yields and homopolymer yields for the polymerisation of MAA

MAA concentration (wt%)	Reaction time (min)	Graft polymer yield (%)	Homopolymer yield (%)	Initial rate of polymerisation (%/min)	
				Graft polymn. Rp-g	Homopolymn. Rp-h
2.0	10	5.48	2.60	0.435	0.260
	30	9.63	10.4		
	60	10.8	27.8		
	120	15.5	33.8		
4.0	10	16.5	3.19	0.936	0.319
	30	18.1	12.8		
	60	31.6	34.7		
	120	37.4	40.6		
6.0	10	17.3	12.9	1.21	0.358
	30	20.4	17.6		
	60	35.2	34.7		
	120	38.3	41.9		
8.0	10	18.1	14.6	1.45	0.386
	30	33.7	18.8		
10.0	10	24.1	18.7	1.95	0.500
	30	45.1	24.4		

Silk fiber 1.0g, KPS 0.5wt%, liquor ratio 1 : 20, pH 3.8, 70°C.

グラフト率 (Graft yield) (%)

$$= \frac{W_g - W}{W} \times 100$$

W : 未処理絹糸の重量 (g)

W_g : グラフト絹糸の重量 (g)

2. 3 強伸度試験

絹糸の強伸度試験には万能引張試験機 (テンシロン、PTM-50、(株)オリエンテック社製) を用いた。

チャック間距離100mm、クロスヘッド速度50mm/minの条件で測定し、結果は20本の平均値で現した。

3. 結果および考察

3. 1 重合速度に及ぼすモノマー濃度の影響

MAA濃度を2から10wt%まで変化した場合の重合反応の結果をTable 1およびFig. 1に示す。グラフト重合率およびホモ重合率はともに反応時間の増加とともに増大する。反応初期 (約30分まで) にはグラフト重合率はホモ重合率より大きい。しかし、反応後期には逆転してホモ重合率の方が大きくなる。この結果はこのグラフト重合反応が不均一系で進行することを考慮すると、その特徴を示しているといえる。反応初期においてモノマーおよび開始剤の繊維への吸着と繊維内への拡散による加速効果が推定されるが、検証が必要である。Fig. 1はグラフト重合初期速度 (Rp-g) がMAA濃度のほぼ1次に比例することを表している。

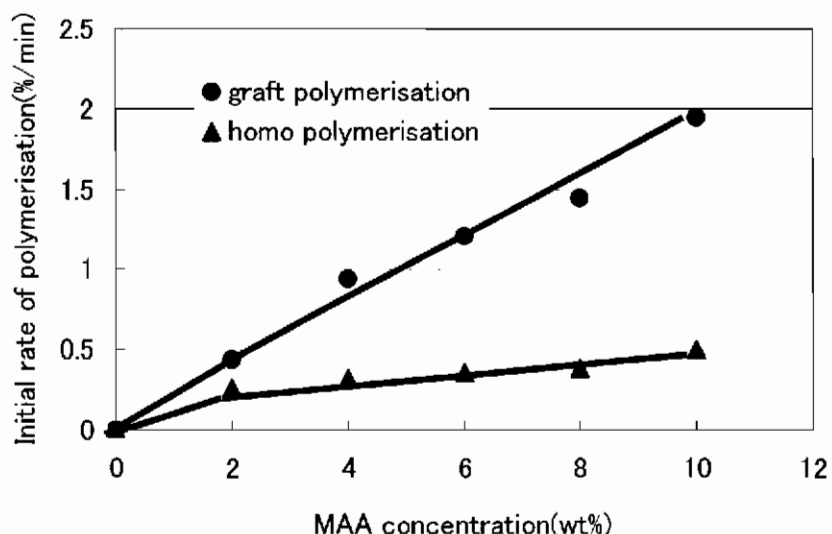


Fig. 1. Dependence of the rate of polymerisation on the monomer concentration.
Silk fiber 1.0g, KPS 0.5wt%, liquor ratio 1 : 20, pH 3.8, 70°C.

3. 2 重合連動に及ぼす開始剤濃度の影響

KPS濃度0.1から8.0wt%の範囲での重合結果をTable 2およびFig. 2に示す。開始剤濃度依存性は、グラフト重合初期速度については0.92次、ホモ重合初期速度では0.59次である。

繊維内（固相）でのグラフト重合ではほぼ1次依存性であり1分子停止の寄与が大きく、液相でのホモ重合では約0.5次依存性であり2分子停止が主として起っていると考えられる。グラフト重合では停止反応がモノマーや溶剤（水）への連鎖移動によることが示唆される。

3. 3 重合速度に及ぼす重合温度の影響

重合温度60、70、75、80°Cにおける重合結果をFig. 3に示す。図のアレニウスプロットから得られる見かけの全活性化エネルギー（ E_a ）はグラフト重合に対して $E_{a-g}=69.7\text{kJ/mol}$ 、ホモ重合に対して $E_{a-h}=56.1\text{kJ/mol}$ である。 E_{a-g} が E_{a-h} より大きいことの原因の一つとして幹ポリマーであるフィブリンへの連鎖移動反応の影響が考えられる。また、フィブリン中の還元性基とKPSとの関与も考えられる[2]。しかし、その反応機構の詳細はグラフト枝ポリマーの数と重合度の解析を待たねばならず、今後の課題である。

Table 2. Effect of initiator concentration on initial rate of polymerisation

KPS concn. (wt%)	Initial rate of graft polymn. Rp-g (%/min)	Initial rate of homo polymn. Rp-h (%/min)
0.1	0.282	0.146
0.3	0.751	0.271
0.5	1.40	0.388
0.7	1.41	0.513
1.0	2.05	0.500

Silk fiber 1.0g, MAA 8.0wt%, liquor ratio 1 : 20, pH 3.8, 70°C.

3. 4 グラフト加工絹糸の力学的性質

グラフト加工による絹糸の引張り力に対する力学的性質の変化をTable 3およびFig. 4に示す。グラフト率約40%以内において、グラフト率の増加とともに切断強度、ヤング率（初期引張り抵抗度）、切断伸度は減少する。グラフト率10~15%付近において減少率はやや小さくなる傾向がみられる。同様な結果はFreddiらによっても報告されている[3]。グラフト率に比例して絹糸の織度（ d ）は大きくなるが、切断荷重は本質的に大きくは変化しないことを考慮すると、グラフト率の増加にともなう強度の減少は十分説明される。また、繊維内非結晶領域に生成したグラフトポリマーがフィブ

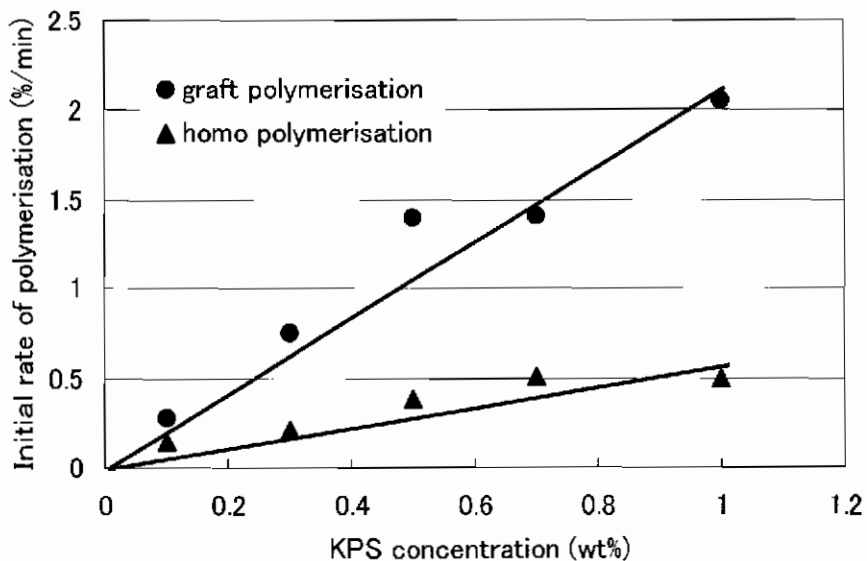


Fig. 2. Dependence of the rate of polymerisation on the initiator concentration. Silk fiber 1.0g, MAA 8.0wt%, liquor ratio 1 : 20, pII 3.8. 70°C.

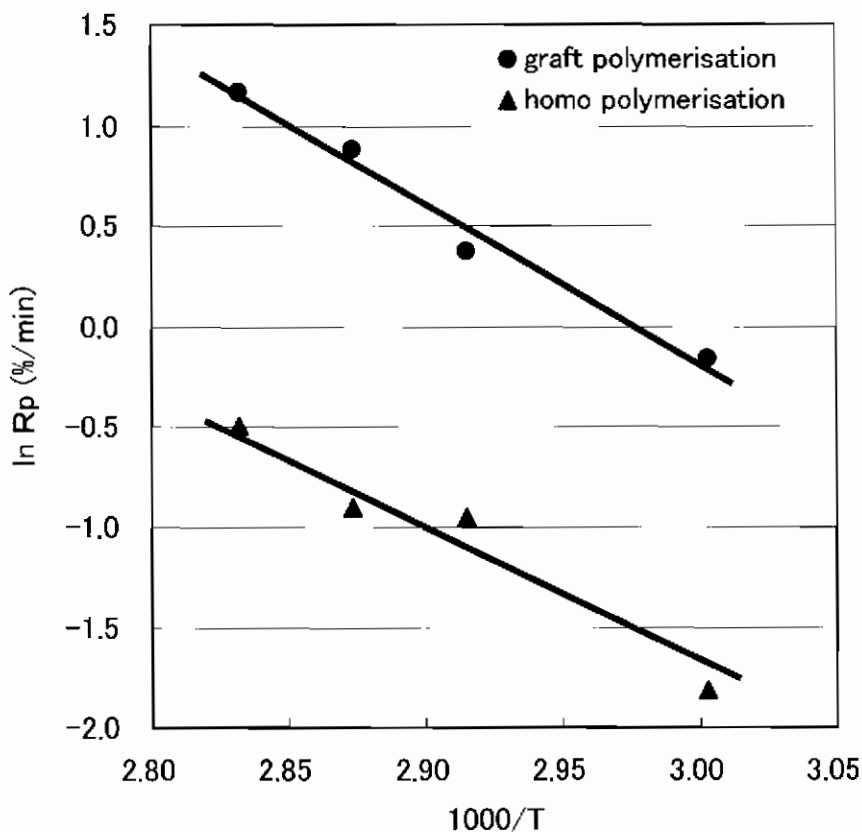


Fig. 3. Arrhenius plot of Rp for the polymerisation of MAA at silk fiber 1.0g. MAA 8.0wt%, KPS 0.5wt%, liquor ratio 1 : 20, pH 3.8.

Table 3. Tensile properties of MAA grafted silk fibers

Graft yield (%)	Tensile strength (gf/d)	Young's modulus (gf/d)	Elongation (%)
0	5.17	37.7	20.1
7.69	4.80	31.9	18.5
17.0	4.10	31.2	17.3
31.3	3.50	27.5	16.9
41.7	3.23	23.4	17.1

Silk fiber 1.0g, MAA 5.0wt%, KPS 0.5wt%,
liquor ratio 1 : 20, pH 3.8, 70°C.

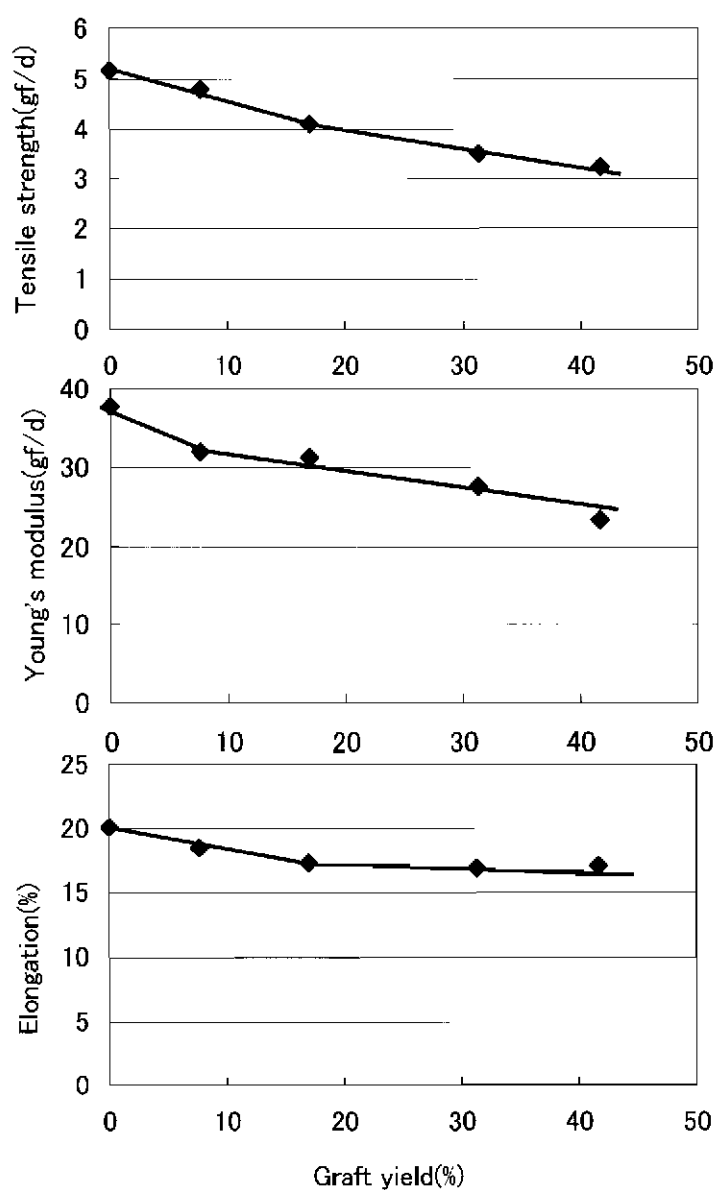


Fig. 4. Tensile properties of MAA grafted silk fibers.

Silk fiber 1.0g, MAA 5.0wt%, KPS 0.5wt%, liquor ratio 1 : 20, pH 3.8, 70°C.

ロイン分子鎖の配列に変化を与え、引張り力が働く際にその分子の動きを抑制することは容易に推測される。これが伸度減少をもたらすと考えられる。

4. 結言

水系でKPSを開始剤とするMAAの絹糸へのグラフト重合について検討し以下の結果を得た。

1. 重合初期においては繊維内でのグラフト重合収率は液相でのホモ重合収率より大きいが、後期ではこの関係は逆転する。
2. グラフト重合初期速度はMAA濃度について約1次であり、KPS濃度について約1次である。一方、ホモ重合初期速度はKPS濃度について約0.5次である。これは繊維内グラフト重合の1分子停止、液相でのホモ重合の2分子停止を示唆している。
3. グラフト重合の見かけの全活性化エネルギーは69.7kJ/molである。
4. グラフト率の増加とともに、グラフト加工絹糸の強度、ヤング率、伸度は減少する。

より詳細な機構の解明には、これらの結果をふまえて、さらに生成ポリマーの重合度に関する知見が必要である。特にグラフト枝ポリマーの分離とその重合度測定、グラフト効率を知ることが今後の課題である。

引用文献

- [1] 前川輝彦 (2005) : メタクリルアミドによる絹のグラフト加工—グラフト重合挙動—. 衣笠織研報 第9号, 9-14
- [2] 井手文雄 (1977) : グラフト重合とその応用. 高分子刊行会 75
- [3] Freddi, G., Massafra, M.R., Beretta, S., Shibata, S., Gotoh, Y., Yasui, H. and Tsukada, M. (1996) : Structure and properties of *Bombyx mori* silk fibers grafted with methacrylamide (MAA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). J. Appl. Polym. Sci. 60, 1867-1876

RNA結合タンパク質を過剰発現する 昆虫細胞の作出と新たな表現形の解析

小谷英治*・武藤清佳・松本恵実・田辺 徹・森 肇*・林 幸之**

Characterization of the *Bombyx mori* Cell Line Overexpressing an RNA-binding Protein, BmTRN-1.

Eiji KOTANI*, Sayaka MUTOH*, Emi MATSUMOTO*, Tohru TANABE*,
Hajime MORI* and Yoshiyuki HAYASHI**

*Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,
29 Kitano Shimo-Hakubai-cho, Kita-ku, Kyoto 606-8326, Japan.

Abstract

An RNA-binding protein, BmTRN-1 from the silkworm, *Bombyx mori* cells, has shown to be a regulator of transcripts. In the present study, the *B. mori* cultural cells (BmN4) expressing the full-length or truncated BmTRN-1 were generated by using the tentative protein expression vectors, in order to investigate whether the function of BmTRN-1 is involved in the innate immunity against viral multiplication process. Whereas overexpression of the truncated-sequences of BmTRN-1 coding RRM1 and C-terminal variable region, those which could be the dominant-negative mutants, led to increase of the foreign GFP protein production, extensive amounts of RRM1-2-3 region and full-length BmTRN-1 was shown to dampen the GFP expression, indicating that RRM1-2-3 region might be essential for the down-regulation of transcripts. It was also shown that overexpression of the full-length BmTRN-1 inhibited baculovirus multiplication process in the cells, but RRM1-2-3 region overexpression did not. It was demonstrated that BmTRN-1 might be an antiviral factor in the *Bombyx* innate immunity, and the full-length BmTRN-1 possessing both of RRM1-2-3 necessary for the regulation of transcripts and C-terminal variable region was important for its inner-cellular defense mechanism against virus.

1. まえがき

RNA-recognition motif (RRM) を有するRNA結合タンパク質群は、特にタンパク質生合成に関する転写産物調節に重要な役割を担っている。RRM型RNA結合タンパク質は、N末端側に80-90個のアミノ酸からなるRRMドメインの繰り返し構造と、C末端側にRRMとは異なる独自の機能性配列(variable region)を持つという共通性が一般的に見られる[1,2]。この型のRNA結合タンパク

質群の一つのサブグループとしてのTIA-1およびTIARは、哺乳類細胞を用いた先駆研究において、アポトーシス関連タンパク質のスプライシング調節や翻訳サイレンシングおよびストレス下での不完全転写産物の選択的排除に役割を果たすことがわかってきた[3-8]。

昆虫種においても、TIA-1同属群のタンパク質が見つかってきた。カイコで同定されたTIA-1-related nucleolysin-1 (BmTRN-1) は、poly(A) およびpoly(U) RNA結合性の388アミノ酸配列か

*連絡先：京都工芸繊維大学工学科学部、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail: kotani@kit.ac.jp, TEL 075-724-7774, FAX 075-724-7760

らなり、アミノ末端側にはTIA-1と同様にRRM領域の3回繰り返し (RRM1-2-3) と、カルボキシル末端側にはvariable regionを有していることが示された[9]。C末端にはリソソーム移行に関連するとされる4つのペプチドがTIA-1/Rと同様BmTRN-1にも保存されていた[3,9]。BmTRN-1の人為的抑制下における培養細胞内外来タンパク質発現上昇も報告され、BmTRN-1は外来転写産物の排除機構に関連することが明らかとなった[9]。ヤガ科ハスモンヨトウの近縁種細胞においても、SlTRN-1タンパク質人為抑制によって外来タンパク質生産に影響が見られた (Mutohら、投稿準備中)。

チョウ目昆虫の細胞は、外来タンパク質発現の研究で頻繁に用いられ、プラスミドおよびウイルスベクターにより天然型に近い有用タンパク質生産が多方面で活用されてきた。チョウ目昆虫独特のタンパク質産生調節を解析することにより、今後の外来タンパク質発現系のさらなる改良がもたらされるはずである。TRN-1様RNA結合タンパク質のような性質を持つRNA結合タンパク質の働きを人為的に制御することが可能になれば、昆虫を用いた外来タンパク質発現系の改良に大きく役立つことも考えられる。このような観点から、各種昆虫TRN-1の外来転写産物に対する排除機構に関連した役割が持つ生体内での意義を明らかにすることが重要な課題となってきた。

外来転写産物の働きを制御するこのようなタンパク質の役割として、外来ウイルスの細胞内活動を抑制する可能性を考えることは難しくはない。なぜなら、近年DicerやAgoタンパク質などRNAi関連性の転写産物調節因子がウイルスに対する自然免疫の役割を担うことが示され始めているからである[10]。最も、通常細胞では抵抗性因子の存在量が自然状態で微量であり、ウイルスの増殖に対して細胞が寛容であるため、候補遺伝子の過剰発現系を用いなければ、ウイルスに対する抵抗性の存在自体を明確に示すことは難しい。したがって本研究では、BmTRN-1の機能とウイルスに対する防御系との関連を調べることを目的として、BmTRN-1過剰発現細胞を作出した。

2. 材料および方法

2. 1 昆虫細胞

カイコ卵巣由来BmN4細胞を農水省昆虫細胞バンクから供与を受けた。この細胞を12.5%仔牛胎児血清 (Gibco) が含まれるESF921液体培地 (Expression systems co.) 中で27°C単層培養した。

2. 2 昆虫細胞内におけるBmTRN-1配列およびtruncated-BmTRN-1過剰発現

カイコ細胞内でのBmTRN-1タンパク質過剰発現のため、発現ベクターpIZ-His (インビトロジェン製) を用いた。このベクター内のクローニングサイトに遺伝子を挿入すれば、opMNPV由来IE2プロモーターの働きでコードmRNAが発現する。本研究では、完全長BmTRN-1のC末にTagとしてパラミクソウイルスV5抗原を付加した融合配列、N末側RRM領域のC末にV5抗原を付加した融合配列、そしてvariable regionのC末にV5抗原を付加した融合配列をベクター内に組み込んで、これらを昆虫細胞内で発現させた (Fig. 1)。

FuGene⁶ (ロッシュ製) を用いて、400 μ l 無血清培地中の 0.2×10^6 個の単層細胞に0.2 μ gのプラスミドDNAをトランフェクトした。トランスフェクション処理後8時間後から血清を含む培地中で培養を続けた。トランスフェクション処理から2日後にウイルスを接種した。

2. 3 昆虫細胞内でのウイルス増殖の検討

ウイルスにはカイコ宿主のBmNPVとヤガ科昆虫宿主のAcNPVの双方のゲノムを混合した広宿主域型ハイブリッドウイルスを用いた[11]。このハイブリッドウイルスは、ポリヘドリンプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードしているため、BmN4細胞に感染した際、感染後期にルシフェラーゼ酵素を生産する。ウイルス液 (m.o.i. = 10PFU/cell) 10 μ l を接種し、接種から4日目の細胞を回収した。

細胞を1%のトライトンX-100、100mg/mlのBSAを含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で細胞を溶解させた。この細胞溶解液を同緩衝液で希釈し、

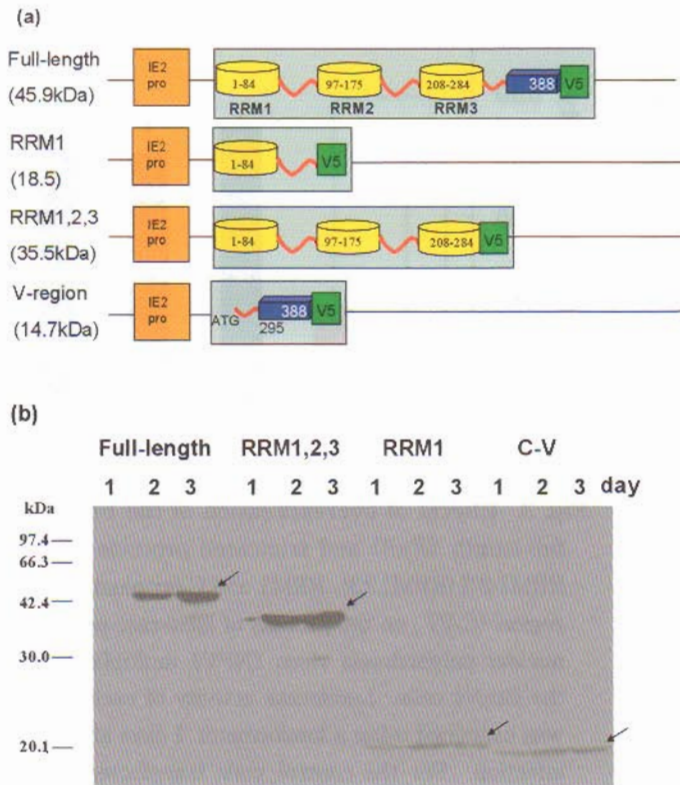


Fig. 1. Overexpression of the BmTRN-1.

(a) Schematic diagram of the vector construction for BmTRN-1 full-length protein or truncated mutants, RRM1, RRM1-2-3, and variable region (V-region), expressed under the control of the IE-2 promoter. In the case of V-region expression, artificial start codon, ATG was added to the no.295 amino acid of BmTRN-1. (b) Detection of expressed proteins by western blotting using the V5-tag specific antibody. Cells were transfected by the vectors and each protein sample was prepared after cultivation for the indicated day. Arrows show the protein bands specifically reacted with the antibody. Numbers at the left side indicate the molecular mass of the protein marker.

10 μ l 分を25℃に保温したピッカジーンキットの発光基質液50 μ l と混合した。発光はATTO社製 Luminescencer-JNR機を用いて、25℃下で測定した。

2. 4 細胞内でのタンパク質発現の検出

BmTRN-1配列もしくはtruncated-BmTRN-1配列を過剰発現している細胞における外来タンパク質生産 (GFP生産) について調べた。ベクターにはNovagen製pIEx-4を用い、AcNPVのhr5-IE1プロモーターの制御下でGFPを生産した。このGFP生産のために、0.2 μ gのGFP生産用ベクターを 0.2×10^6 細胞/400 μ l 無血清培地に0.2 μ gのBmTRN-1配列発現ベクターとともにトランスフェクトした。培養後の細胞抽出液における生産GFP量は特異抗体を用いたすでに述べた方法によるウエスタンブロットングで調べた[9]。

3. 結果および考察

3. 1 カイコ細胞におけるBmTRN-1配列の強制発現

カイコBmTRN-1は完全長の場合、細胞内で

42.5 kDaおよび44.1 kDaタンパク質として存在する。この内在性BmTRN-1は微量であり、本研究では完全長およびtruncated型BmTRN-1を強力なプロモーター制御下において、BmN4細胞内で強制発現させた。Fig. 1 (b) に示されるように、各種のBmTRN-1由来産物が、ウエスタンブロットング解析において抗体と特異的に反応した。量的にはauthenticなBmTRN-1に比べて、人為発現タンパク質が過剰量細胞内に存在していることが明らかとなった。こうしたBmTRN-1由来配列過剰発現細胞は、無処理細胞と比べて形態的にも増殖性の面でも大きな違いは見られなかった。

3. 2 BmTRN-1配列強制発現細胞におけるウイルス増殖

3. 2. 1 GFP生産への影響

BmTRN-1配列を発現するベクターを用いて処理してから3日間培養した細胞で、同時に発現しているGFPの存在量を調べた。Fig. 2に示されるように、C末端側variable regionを発現させた細胞では、対照区としてインサートを含まないベクターを取り込ませた細胞に比べて、GFP発現量は増大

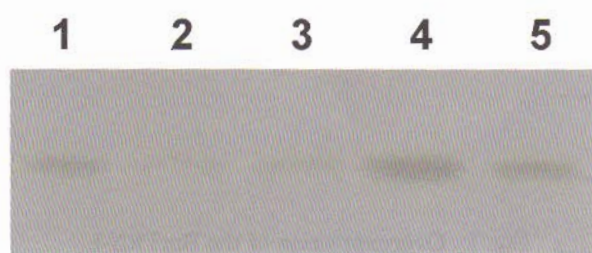


Fig. 2. Effects of overexpression of the BmTRN-1 full-length (lane 2) and truncated proteins such as RRM1-2-3 (lane 3), RRM1 (lane 4) and C-terminal variable region (lane 5), on the reporter protein production in the BmN4 cells. Cells were co-transfected with the plasmid producing GFP under the control of IE-1 promoter and the plasmid overexpressing the full-length protein and truncated mutants of BmTRN-1 under the control of IE-2 promoter. For the control, plasmid DNA which does not express any protein was transfected with the GFP-producing plasmid. Three days after the treatment, detection of GFP was performed by a western blotting using the GFP-specific antibody from the protein sample of each cell extract.

していた。すでにヒトTIA-1タンパク質のC末端側variable regionをCOS細胞にて発現させた場合に、同時に発現させたりポーター遺伝子産物の発現量変化において同様の結果が報告されている[5]。Kedershaら[5]によれば、この効果については明確な理由付けはできないまでも、variable regionがRNA結合能を持たないdominant negative mutantとして働き、正常型TIA-1のmRNA排除機能を阻害した結果であろうと推測されている。したがってやはりカイコにおいても同様にvariable regionのみを発現させることによって内在性のBmTRN-1に対して阻害的に働き、リポーターmRNAの存在量を増加させたと示唆される。また、RRM1領域のみをコードするtruncated-BmTRN-1の場合も、C末端variable regionを発現させた場合と同様、内在性BmTRN-1に対するdominant negative mutant様の働きを示しているらしく、対照区に比べてGFP生産量の増大が認められた。

Fig. 2に示されるように、BmTRN-1の完全長配列とRRM1-2-3領域配列を発現させた細胞では、明らかにGFP生産量が低下した。これまでに、内在

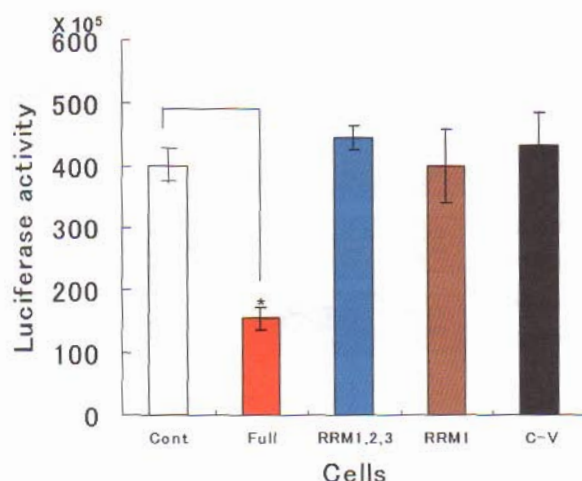


Fig. 3. Effects of overexpression of the BmTRN-1 full-length (Full) and truncated proteins such as RRM1-2-3 (RRM1,2,3), RRM1 and C-terminal variable region (C-V), on the process of luciferase-producing nuclear polyhedrosis virus (NPV) multiplication in the BmN4 cells. Luciferase activity of each sample was examined using a luminometer 4 days after virus infection. For the control, cells transfected with a vector producing no protein, were used. Combined data (means \pm standard error) from three separate experiments are shown. *, $p < 0.01$ for the effect of full-length BmTRN-1 overexpression.

性BmTRN-1のアンチセンス法による人為抑制によって、外来タンパク質生産量が増加することが示されており、BmTRN-1が外来タンパク質mRNAの排除に役割を果たすと考えられ、本研究で得られた結果はこの考えを強く支持するものとなった[9]。さらに外来のGFP mRNAを排除する上で、BmTRN-1のRRM1-2-3領域配列が重要な機能を持つことが考えられた。上述したRRM1のみの過剰発現とは反対の結果が得られたことから、完全な3つのRRM領域の繰り返し配列はmRNAを排除に導く特異的な生体反応を引き起こす最小単位ではないかと考えられる。

3. 2. 2 バキュロウイルスの生体機能への影響

BmTRN-1配列を過剰発現させた際のバキュロウイルスの活動に対する影響を調べた。用いた組換えウイルスはポリヘドリンプロモーター制御下

でルシフェラーゼを産生する。ポリヘドリンプロモーターはvery late期に働くため、very lateプロモーターが働き始めるまでのウイルス増殖過程の活発さを調べる指標となり得る。感染細胞のルシフェラーゼ活性を調べたところ、対照区であるインサートを含まないベクターを取り込ませた細胞と比較して、RRM1領域、RRM1-2-3領域、C末端variable regionのそれぞれの配列を発現させた細胞では、特に大きな変化は認められなかった (Fig. 3)。一方、完全長BmTRN-1を発現させた細胞において、ルシフェラーゼ活性の著しい低下が認められた (Fig. 3)。したがってBmTRN-1には、ウイルスの増殖の過程に対して細胞内抵抗性を付与する役割もあるものと示唆される。

しかし、タンパク質発現には抑制的に働くRRM1-2-3領域配列を発現させた細胞でのウイルスルシフェラーゼ活性には、対照区との間で大きな差は認められなかった。すなわちRRM1-2-3領域は、タンパク質発現抑制に機能するが、C末端variable regionが含まれないことによりウイルスの生体機能までは抑制できないことを意味している。哺乳類TIA-1のC末端variable regionには、この配列自体に凝集する性質があるため、砒素ストレスで機能不全化したmRNA翻訳複合体を細胞質で凝集させるTIA-1の役割に貢献しているドメインであると考えられている [12]。凝集したTIA-1はストレス顆粒を形成し、この顆粒内で機能不全化したmRNA翻訳複合体は閉じ込められ、処理される。本研究では砒素ストレスは与えないまでも、細胞内でウイルス感染が進行し非自己由来転写産物が大量に産生される危機的ストレスにカイコ細胞はさらされていたものと考えられる。このストレス状態から平常状態に戻すための自然免疫として、ウイルス転写産物の効率的な機能不全化と排除にBmTRN-1は重要な役割を果たしていると推察されるが、C末端variable regionには、効率的にウイルス転写産物を除去するための更なる生体機構を誘導する信号配列が存在するのかもしれない。特に、C末端のリソソーム移行ペプチド様配列の働きでリソソームに移行し、リソソームを活性化してウイルスの処理を助ける働きも考えられ

る [3,9]。variable regionの機能と配列の関係を調べる必要がある。

RNAi関連物質がウイルスに対する生体防御と関わりを持つことがすでにショウジョウバエで明らかにされつつある。この機構は、増殖の過程で二本鎖RNAゲノム中間体を形成するウイルスに対する抵抗性に限られる [10]。しかしFig. 3の結果では、二本鎖DNAウイルスに対する抵抗性とBmTRN-1機能との関係を示している。バキュロウイルスの感染過程では、通常の細胞転写産物と同様核内ウイルスゲノムから転写、スプライシングを経て生じたウイルス翻訳複合体からウイルスタンパク質が作られる。BmTRN-1のRNA認識特性あるいは局在性によって、ウイルスmRNAを認識し、細胞内のウイルス抵抗性機構を活性化していることも考えられる。RNAi関連物質と転写産物調節性RNA結合タンパク質の抗ウイルス特性との共通性と独自性を追求することが、昆虫の自然免疫をさらに深く理解する上で重要であろう。

現在アジア諸国で養蚕業が営まれ、各自の絹文化が伝承されているが、カイコ感染症の中でもウイルスによる疾病はこうした産業に大きな打撃を与える。BmTRN-1をはじめとするさまざまな抗ウイルス因子の機能解明と個体の染色体に対する遺伝子操作により、ウイルス耐性カイコが作出されれば、新たに効率的な分子養蚕業を生み出す契機にもなると期待される。現在、BmTRN-1配列を過剰発現するカイコの作出に関する研究を行っている。

引用文献

- [1] Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994): Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621
- [2] Kenan, D.J., Query, C.C. and Keene, J.D. (1991): RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220
- [3] Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S.F. and Anderson, P. (1991): A polyadenylate

- binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629-639
- [4] Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S.F. and Anderson, P. (1992) : Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8681-8685
- [5] Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E. and Anderson, P. (2001) : Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-1268
- [6] Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. and Anderson, P. (2000) : RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of cIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell. Biol.* 147, 1431-1442
- [7] Gatto-Konczak, F.D., Bourgeois, C., Guiner, C.L., Kister, L., Gesnel, M.C., Stevenin, J. and Breathnach, R. (2000) : The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6287-6299
- [8] Guiner, C.L., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J. and Gatto-Konczak, F.D. (2001) : TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 40638-40646
- [9] Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K.B., Storey, J.S., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y. and Furusawa, T. (2003) : De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene* 320, 67-79
- [10] Wang, X., Aliyari, R., Li, W., Li, H., Kim, K., Cathew, R., Atkinson, P. and Ding, S. (2006) : RNA interference directs innate immunity against in adult *Drosophila*. *Science* 312, 452-454
- [11] Mori, H., Nakazawa, H., Shirai, N., Shibata, N., Sumida, M. and Matsubara, F. (1992) : Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *J. Gen. Virol.* 73, 1877-1880
- [12] Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M. and Anderson, P. (2004) : Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell.* 15, 5358-5398

凍結桑葉による絹の緑色染めと型染めへの応用

平田真弓・中川里紗・有松祐治・島袋順二・古澤壽治

Vegetation Dyeing of Silk with Frozen-Mulberry Leaves and its Application to a Printing Called as "Kata-zome" in Japanese

Mayumi HIRATA, Risa NAKAGAWA, Yuji ARIMATSU,
Junji SHIMABUKURO and Toshiharu FURUSAWA

Center for Bioresource Field Science, Kyoto Institute of Technology, Ipponki-chou, Ukyou-ku, Kyoto

Abstract

It has been difficult to stain the cloth into green with the extract from various kinds of plants. For example, silk is usually dyed in light brown with the extract from mulberry leaves in boiling water. Recently, the silk is stained easily into light green with the extract from the young fresh mulberry leaves which were obtained at a definite time during spring. However, this method is restricted to be used only spring. The authors tried to establish a method to stain the silk green throughout a year using frozen-mulberry leaves as follows: The mulberry leaves in late autumn were frozen to be used throughout a year. The frozen leaves were boiled for short time, and crushed in 1% alkaline solution with a blender. The homogenate was filtrated through three-layers of gauzes, and the silk was dyed into green in neutral pH of extract and then with the mordanting of alum or copper sulfate. The precipitate, which is called as "Beni" in Japanese, from the homogenate of the frozen mulberry leaves in acidic pH was used as stain in printing called as "Kata-zome" in Japanese.

1. まえがき

1856年イギリスの科学者パーキンによって合成染料の一種である「モーブ」が初めて合成され、1859年フランスで合成染料「マゼンタ」が市場に出るまでは、動植物や鉱物を原料とした天然色素が使われていた。なかでも、植物の花、葉、材、樹皮、根などを原料としたものは種類も多い[1]。染色には合成染料によるものがほとんど占める現在でも、「草木染」は依然として素朴な色彩に魅惑され繊維染料として使われている。しかし、各種の植物抽出液によって緑色に染めることはむずかしい。

桑も葉、根、樹皮、材などの煎汁が染色に用いられていたが、現在ではほとんど用いられていない。その理由として染め上がりの色合いに特色が

なく、やや赤みの淡いみかん色となる。また、媒染を用いてもアルミ媒染では鮮やかな黄色、銅媒染で裏葉色、鉄媒染で鶯色に染まり[2]、緑色を出すのは困難である。さらに、著者らは、木村[3]が記載している「色素の抽出と染色の方法」を参考に、桑葉による「緑染め」を試みたが、満足する結果を得なかった。

最近、クズ、センダン、エンジュ、キハダ、ヨモギ、セイダカアワダチソウ、カラスノエンドウ等の若葉を用いることによって美しい緑色に染めることができるようになった。その具体的な染色方法が紹介されている[4]が、5~6月の若葉を用いるとされている。また、銅媒染で薄緑色に染めることができるが、採集する季節が遅れると綺麗な色にならないと言われている[5]。

著者らは染色用に用いる桑の季節に制約が加わ

ることなく、山崎[11]の方法を基にいつでも緑に染める方法を試みた。山崎の方法[4]で染めた色や色調が異なるかもしれないが、その方法を取りまとめた。さらに、桑の葉から“べに”を調製し、型染めに応用できるかについても検討した。

2. 染色に用いる桑葉の選定

10月末から11月初旬の桑樹から第4から5葉を採取し、約100gをサランラップで包み、-20度の冷蔵庫に保存した。

青みのある緑を出すために、実験した結果、桑の生えている場所によっても異なってくるようではあるが、枝上での葉の採取位置がポイントと思われる。成長しすぎた緑の濃い葉を使用して染めると、茶褐色が強くなる。新しい若い黄緑色の葉を使って染色を行うと、黄褐色となる。

したがって、青みのある鮮やかな緑を出すための葉を選ぶ基準は、視覚的には鮮やかな緑の葉で、手のひらサイズのもの、感触的には柔らかい葉で若葉の下に位置する桑葉がよい。

3. 桑葉染色液による絹、木綿および麻に対する染色性

3. 1 実験方法

若葉を採取し、0.1%炭酸カリウム溶液に入れて加熱し沸騰してから20分熱煎した後に、ガーゼで濾過して染色液を得た。再度、新しいアルカリ水の中に残液を入れて20分間熱し、ガーゼで濾過して最初の染色液と合わせた。この染色液に氷酢酸を加えてpH7に調整し、布を10分煮染して、染色液が冷めるまで放置した（媒染無・1回染め）。

次いで媒染液の0.2%硫酸カリウムアルミニウム（ミヨウバン） $(\text{Alk}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ 、0.1%硫酸鉄、 $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 、0.1%酢酸銅 $(\text{CH}_3\text{COOH})_2\text{Cu}$ を準備し、染色液の中の絹・綿・麻を20分媒染し、水洗いをした。さらに、染色液に氷酢酸を0.5ml加えて、pH6に調整し一回染めを行った布を入れて、15分煮染して水洗した。

3. 2 結果

染色の結果を写真1に示した。綿と麻に関して、1回染めは水洗いをするると全ての色が取れてしまい、染めあがりはもとの白生地同様となった。2回染め・媒染を行ったものに関しては、うっすらと緑色に染まったものの、大変染まり付きが悪い。絹に関しては非常に染まり付きがよかった。1回染めは全く緑が出ず、淡い茶色となった。2回染めでは、濃い黄色みを帯びた緑となった。ミヨウバンで媒染した絹は青みを帯びた緑となった。鉄媒染した絹は褐色の大変強い緑となった。酢酸銅で媒染した絹は少し褐色を帯びた緑となった。また、冷凍した桑を用いても同じ結果となった。このことから、絹を緑に染めるには媒染の際に“ミヨウバン”あるいは“酢酸銅”を用いると良いことが分かった。

4. 絹に対する染色条件の検討

4. 1 染液のpHと染色性（実験1）

4. 1. 1 実験方法

冷凍した桑葉 50gを熱湯に2分程度浸漬した後、0.1%炭酸カリウム液 1ℓの中で桑葉をミキサーで磨砕した。この磨砕液をガーゼで濾し、ろ液を染色液とし、pHを4、5、6、7、8およびpH9（原液）に調整した後、絹布（約10g）を10分煮染する。煮染後、0.1%酢酸銅水溶液で30分媒染して、水洗いをした。なお、染まった色は和色大辞典[6] (<http://www.colordic.org/>) に基づき、括弧番号で示した。

4. 1. 2 結果

写真2に示すように、全体的に濃い色みではないが、酸性になるにつれて変化がみられた。pH9では一番青みが強く出ている緑（日本の伝統色でもある、薄萌葱色 [#badcad]）となった。pH8と7についてはあまり違いがないものの、pH9に比べると黄色みがかかったものとなる。（裏柳色と呼ばれる色に近い [#c1d8ac]）pH6、5および4については明らかに違った色となり、若葉色 [#b9d08b] に黄色みから褐色が徐々に加わった

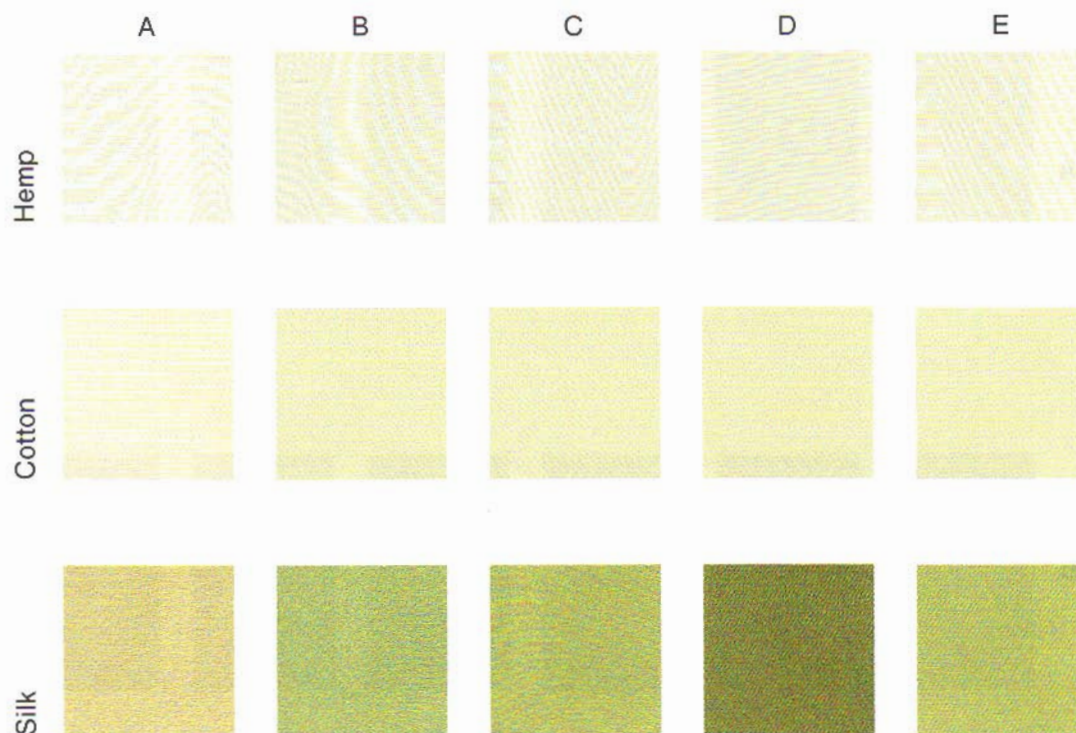


Photo. 1. Dyeing affinity of the extract from mulberry leaves to silk, hemp and cotton, and the effect of mordant on the the dyeing affinity. A : three clothes were soaked in the extract at pH 7.0, and then washed in top water. B : After the first dyeing, these clothes soaked again in the extract at pH 6.0. C~D : After the first dyeing, the clothes were soaked in mordant solution containing Aluminium potassium sulfate (C), Ferrous sulfate (D) and Copper acetate (E)

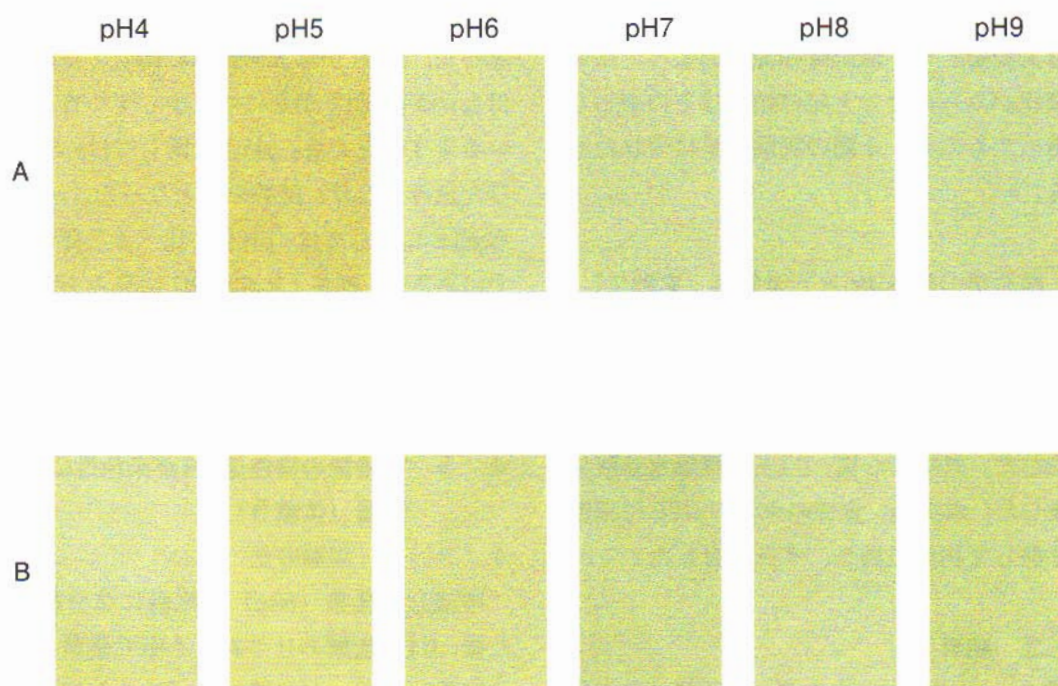


Photo. 2. Color changes on the silk cloth stained with different pH's of the extract of mulberry leaves. A and B were the same method as those in Photo.1.

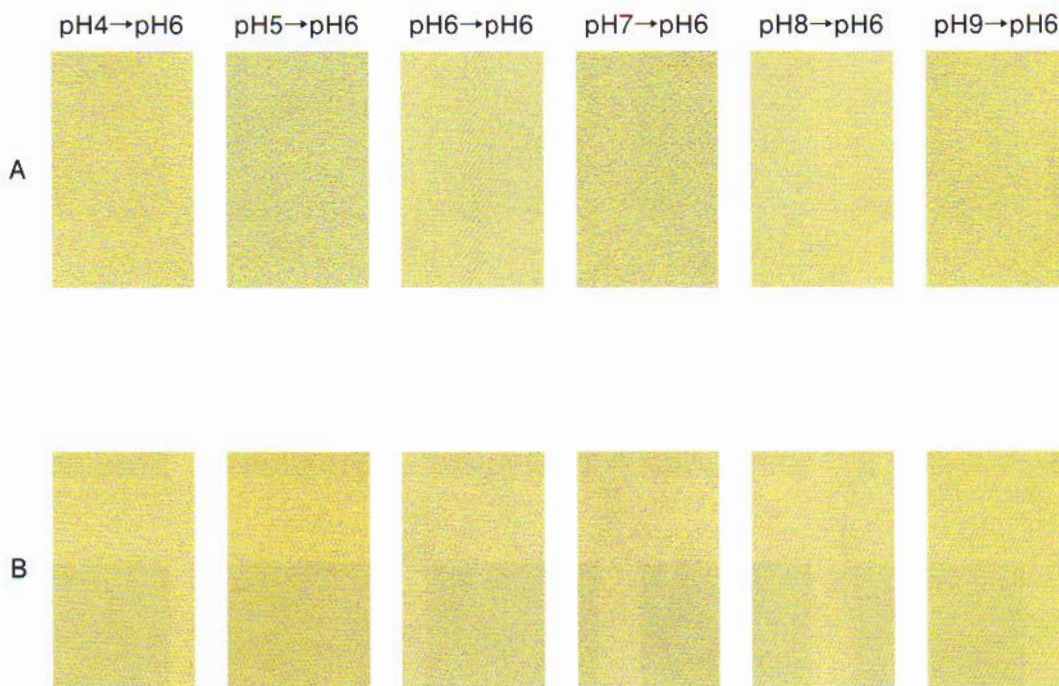


Photo. 3. The effect of pH's before mordanting on color which was derived from the extract of mulberry leaves. The first dyeing was undertaken in pH 4, 5, 6, 7, 8 and 9 of the extract of mulberry leaf homogenate, and the clothes were soaked in the mordant solution of Cu. After the washing of them in tap water, these clothes were soaked in pH 6.0 of the extract.

ものへと変化した。

しかしながら、植物染料のために、この実験は4回行ったもののしっかりと安定したデータをとるのは大変難しく、温湿度の変化によって微妙に色の変化がみられた。上記の結果はその微妙な変化はあったものの、4回の実験結果に現れたものである。

4. 2 媒染後の染色液pHと染色性 (実験2)

4. 2. 1 実験方法

実験1と同様に染液のpHを4、5、6、7、8およびpH9 (原液) に調整し、絹布 (約10g) を10分煮染した。煮染した後、0.1%酢酸銅水溶液で30分媒染した。水洗後、全ての染液をpH6に調整し染液を熱して10分煮染し、水洗いをした。

4. 2. 2 結果

pH調整をしたにもかかわらず、6種類の布の色はほぼ同じような色みとなった。全体的に、褐色がかかった色みとなった。その中でも、一番色みが

濃かったのはpH9であった。pH9は褐色が帯びてはいるものの、褐色よりも黄色みが強く出た。pH9の色みは濃いカーキ色 [#bdb76b] に近い色になった。pH8から5の色みに関しては、ほぼ変化はないがpHが下がるにつれ少しずつ青みを増しているように見える。pH4に関しては一番褐色を帯びた色みとなり、渋めの色となった。pH8以下からpH5に関しては、pH9に比べると薄い染まり付ではあるが、柳茶 [#ala46d] の色みを薄くした色となった。pH4に関しては、抹茶色 [#c5c56a] を薄くした色みとなった。

4. 3 媒染後の染色液pHが染色性に及ぼす影響 (実験3)

4. 3. 1 実験方法

冷凍した桑葉 (50g) を熱湯に2分程度浸漬した後、0.1%炭酸カリウム1ℓ中で桑葉をミキサーで磨砕し、ガーゼで濾した。このろ液を染液としてpH7に調整し、絹布10gを10分煮染した。その後、0.1%酢酸銅水溶液で30分媒染して、水洗いを

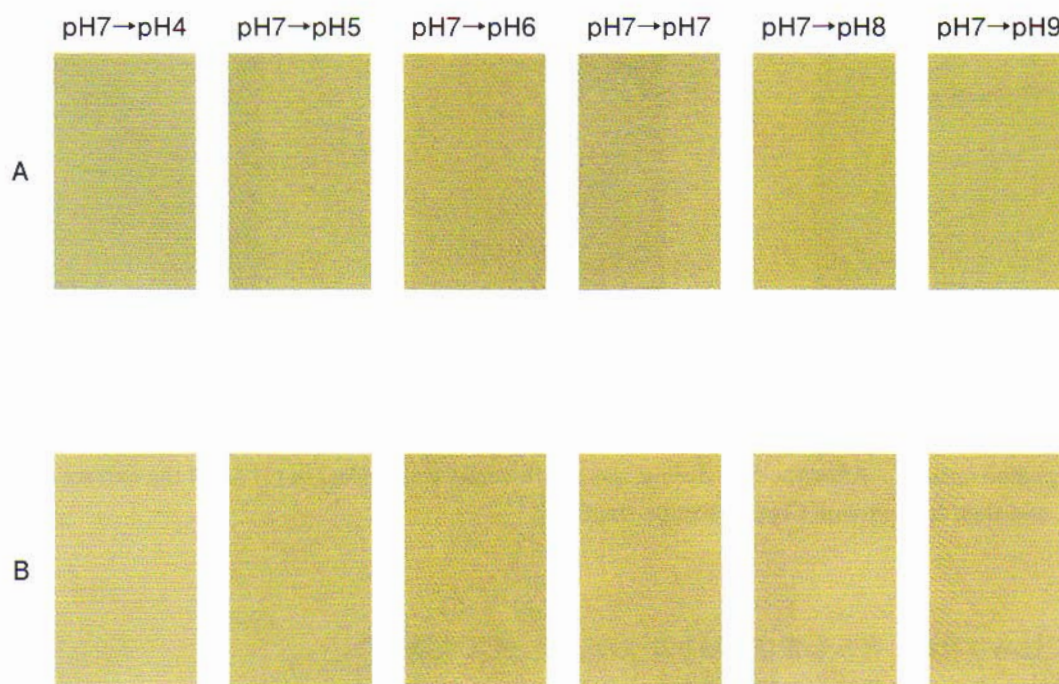


Photo. 4. The effect of pH's after mordanting on color which derived from the extract of mulberry leaves. The first dyeing was undertaken in pH 7 of the extract of mulberry leaf homogenate, and the clothes were soaked in the mordant solution of 0.1% Copper acetate. After the washing of them in tap water, these clothes were soaked in pH pH 4, 5, 6, 7, 8 and 9 of the extract.

した。次に、全ての染液をpH 4、5、6、7、8 および9に調整し染液を熱して10分煮染し、水洗いをした。

4. 3. 2 結果

色みとしては全体的に渋い色みとなった。全体的な大まかな変化としてみられた傾向は柳茶色 [#ala46d] から黄褐色が加わり、pH 5からは色みが大きく変化し、青みがかった色みへと変化した。pH 9の柳茶色 [#ala46d] の色みから、徐々に黄褐色が加わりpH 6では抹茶色 [#c5c56a] へと変化した。pH 5に関しては、夏虫色 [#cee4ae] よりも色みが少し濃い色となり、pH 4は柳鼠 [#c8d5bb] となった。

5. 凍結桑による絹ハンカチの染色方法

5. 1 染色方法

冷凍桑 (100g) を沸騰したお湯に約2分程度 (淡い緑色になる状態。熱湯には黄褐色の色が出る状

態) 浸けた。0.1%の炭酸カリウムの溶液 1ℓで、桑葉をミキサー磨砕し、磨砕液をガーゼ (3枚) で濾した。濾した溶液をpH 7に調整し、染色液とした。

染色に当たっては、染液を沸騰させ、ハンカチ (約40cm×40cm) を10分間煮染した後、0.1%の硫酸銅もしくは酢酸銅の水溶液に30分浸して媒染した。媒染後、水洗いをし、1回染め (写真5 A) とした。

さらに10分煮染したものを、染液が冷めるまで放置し、この液に前日より放置していた布を再度、媒染液に30分入れて、水洗いした (写真5 B)。

放置した布を取り出し、染液をpH 5にして、沸騰させてハンカチを入れて10分煮染し、媒染液に30分入れて水洗いをし (写真5 C)、それぞれの染色性を比較した。

5. 2 結果

染色の結果を写真5に示した。1回染めのハンカチ (写真A) は3枚のハンカチの中では一番薄

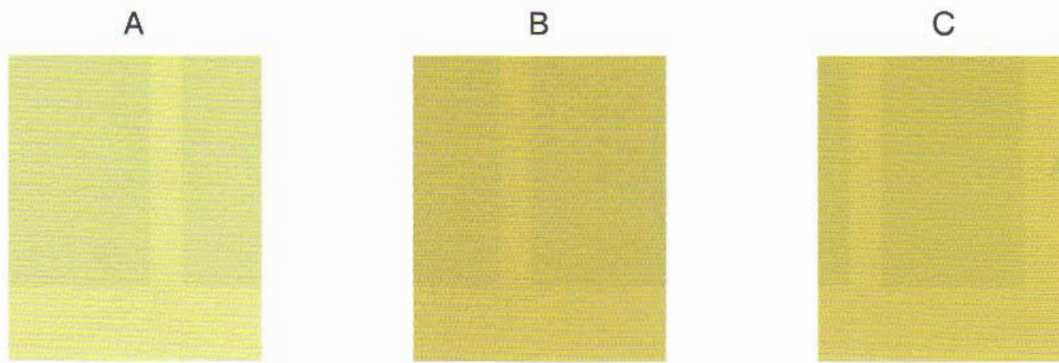


Photo. 5. Dyeing affinity of the extract from mulberry leaves. A : Silk handkerchief was soaked in the extract (pH 7.0) of mulberry leaves, and then mordant with Copper (the first dyeing). B: The same method of the first dyeing was repeated again. C : After the first dyeing, the handkerchief was soaked in pH 5.0 of the extract of mulberry leaves, and then treated with Copper acetate solution.

い色みではあったが、青みを帯びた緑となった。1回染めのハンカチを放置して媒染すると、ハンカチは黄色みを帯びた緑へと変化した。放置+1回染めは3枚の中では一番褐色を帯びた緑になった。

6. “べに”による染色条件

6. 1 凍結桑葉によるベニの作り方

凍結した桑葉を沸騰水に1分程度浸漬した後、0.1%炭酸カリウム液と共に桑葉をミキサーで磨砕しガーゼで濾した。濾した桑葉は再度、新しく作った0.1%炭酸カリウムに入れて20分程度熱して、ガーゼで濾した。この操作を3回繰り返した後に、煎汁に、酢酸を加えてpHを3.5に調製した。

これを一晩静止すると沈殿が生じるので、その上澄み液を捨てて、残った沈殿を細かい目の布でろ過した。布に残ったものを「べに」として用いた。

ベニの使用法は引染め、もしくは浸ぜん染めに使うことができるので、使用する場合にはベニを必要量の水に入れて、さらに炭酸カリウムを加えてpHを9.5に調製することによって溶解させた。

引染めの場合、べにが溶けたら酢酸を加えてpHを7に調整して、染液が冷めてから引染めを行った。なお、pH7という調整は文献によるものであって、どのpHがよい色が出るか、についても併

せて実験した。

6. 2 染色に用いる“べに”の量に関する検討 (実験4)

6. 2. 1 実験方法

“べに” 5g (A)、10g (B)、15g (C)、20g (D)、25g (E) および30g (F) を30mlの水に懸濁し、さらにpH 9.5に調整することによって“べに”を溶解した。さらに、pH 7に全ての染料を調整し、染液として用いた。染液を2回引いた後、1%酢酸銅水溶液で媒染した。さらに1から2回(実験では1回行った。)染液を引き染した後、もう1回媒染液を引き、最後に2%酢酸を引いて、十分に水洗いした。

6. 2. 2 結果

結果を写真6に示した。染めているときの感触から、写真EおよびFは濃厚な染液となったので、布を染めているとき刷毛ムラが気になった。したがって、引き染めをする場合には写真Aから写真Dで用いた量が最適であると判断した。

染め上がりの色は写真AからCの濃度の染料が綺麗な緑が出た。写真Aは夏虫色 [#cee4ae] に近い色みとなり、写真BとCは徐々に微量の褐色を帯びた。写真D [鶉茶 #8c8861] から写真Fまでは茶褐色が明らかに強くなり、濁った色となった。

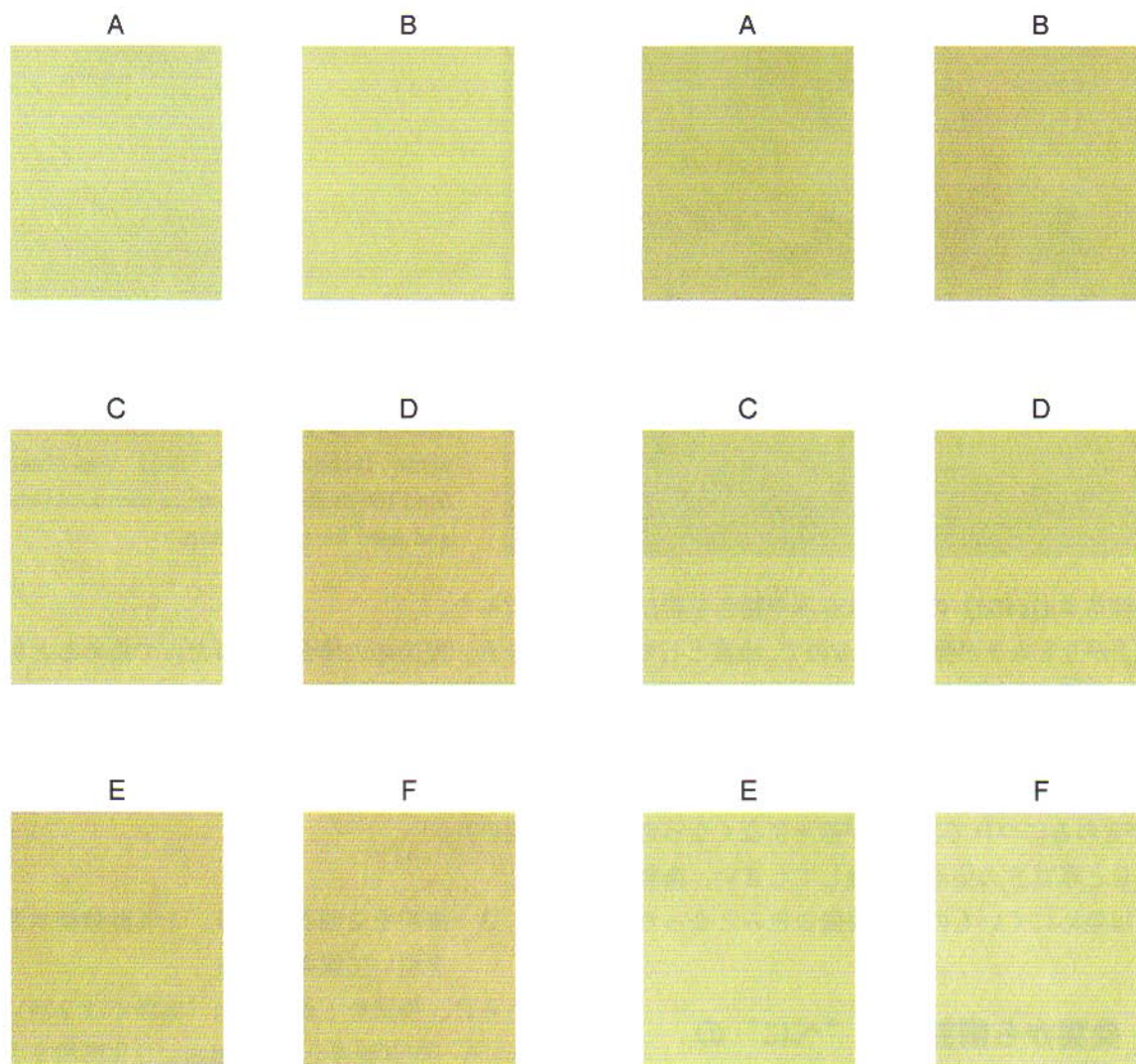


Photo. 6. Dyeing affinity of "Beni", which was precipitated in acidic pH from the homogenate of mulberry leaves, to silk cloth. The amount of Beni of 5g (A), 10g (B), 15g (C), 20g (D), 25g (E) and 30g (F) were dissolved in pH 9.5 of potassium carbonate solution, and then adjusted to pH 7 for dyeing.

Photo. 7. Dyeing affinity of coloring matter in "Beni" to silk cloth. Forty gram of "Beni" was dissolved in pH 9.5, and then dyeing solutions of pH 9 (A), pH 8 (B), pH 7 (C), pH 6 (D), pH 5 (E), pH 4 (F) were prepared. The solution was put twice on each cloth, following the mordant of 1% copper acetate solution.

6. 3 “べに”から調製した染色液のpHと染色性 (実験5)

6. 3. 1 実験方法

さきの実験から40gの“べに”を用いるのが最適であることが分かったので、これを30 mlに懸濁し、さらに染液を全てpH9.5に調整して、“べに”を溶解した。そして、pH9 (A)、pH8 (B)、pH7 (C)、pH6 (D)、pH5 (E)、pH4 (F)に調整し染色液を調製した。

これらの染液を2回引いた後、1%酢酸銅水溶

液で媒染を行った。さらに1回染液を引き染した後、最後に2%酢酸を引いて水洗した。

6. 3. 2 結果

pH6からpH4の染液に酢酸を入れてpH調整を行っている時、染液から発泡が起こる現象があった。特に、pH5あるいはpH4では発泡は激しく、染液の3倍ほどに嵩が膨らんだ。このため、染液として使用しやすいpHは4～6以外と判断した。

しかしながら、染め上がりを見ると写真Aと写真



Photo. 8. A handkerchief on which printed the silkworm larvae (white portion) with "Katazome" technique. The "Beni" was obtained from the mulberry leaves as mentioned above, and used for the printing.

B〔柳茶#ala46d〕の染液は赤みや褐色を帯び、染め上がりもムラが強く現れるので、染液としては適していなかった。写真C以降の色みは写真AとBに比べて、褐色がなく綺麗に染まりあがった。〔柳鼠#c8d5bb〕写真Cから写真Fに示すようにpHが変わるにつれて、褐色が徐々になくなった。写真Eと写真Fの染液は発泡してしまい、染料としては染めにくいものの、綺麗な色みとなった。

7. 桑葉から調製した“べに”の型染めへの応用（実験6）

前項からの実験から、染色に用いる“べに”の量と染色の際の染色液のpHが決まったので、この結果を使って、“べに”の利用方法として型染め技法に適用できるかについて検討した。その一つとして、以下の手順で“べに”を用い、型染め技法を使ってハンカチを染めることを試みた。

7. 1 ハンカチを染める

pH7の条件の染液で10分染め、0.1%酢酸銅で30分媒染した。

7. 2 ハンカチに型染めをする

好みの型紙を準備し（ここでは蚕幼虫をデザインした）、ハンカチの上に置いた型紙の上に糊を引いた。糊が乾いた後、染液を2回引くが、このときの染液は、“べに”の量20の割合を用い、pH5

で行った。

なお、型染めの場合、染料だけで染めると糊際がにじむ（「なく」という現象が起こる。）ので、なき止めを使用した。なき止めは水に混ぜたが、水：30ml、ふのり：15ml、べに：30gを混合して用いた。

7. 3 染料を2回引いた後、1%酢酸銅水溶液を引いて媒染をする

さらに、染液を1から2回（実験では1回）引き、もう一回媒染液を引き、最後に2%酢酸を引いて終わる。後は、豆汁を1回引いて一夜以上置いてから水洗いを十分に行い、完成作品とした（写真8）。

引用文献

- [1] 千曲会（1986）：桑の文化誌. pp.111-114, 郷土出版社
- [2] 山崎青樹（2004）：草木染 染料植物図鑑. pp.96-97, 美術出版社
- [3] 木村光雄（1997）：自然の色と染め. pp.93-100, 木魂社
- [4] 山崎青樹（1995）：若葉による緑色染展.（高崎市染料植物園開園1周年記念）パンフレット
- [5] 山崎青樹（2004）：続続 草木染 染料植物図鑑. pp.212-213, 美術出版社

家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼ：精製と性質、 cDNAクローニングとヌクレオチド配列の決定、 大腸菌発現組換え酵素の性質、 同一遺伝子産物による器官特異的機能発現

角田素行*

Fibroinase of Silk Gland in the Silkworm, *Bombyx mori*: Purification, Characterization, Cloning and Sequencing of cDNAs, Characterization of Recombinant Enzyme Expressed in *E. coli* and Implementation of Organ Specific Biological Function by an Identical Gene Product

Motoyuki SUMIDA*

*Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan

Abstract

Fibroinase of silk gland of *B. mori* is a cathepsin L-like cysteine proteinase and involved in two physiological functions : 1) digestion of fibroin and sericin in the luminal contents of silk gland at the molt periods in the larval development and at early pupa, and 2) at the feeding and spinning periods, digestion of proteins and organelles carried into lysosomes in silk gland cells. This article summarizes a study history of fibroinase of silk gland, now renamed as *Bombyx* cysteine proteinase of silk gland (BCPSG), from the first question, "Does the silk gland produce fibroin digestion enzyme?" to the recently established conclusion that BCPSG is a product of a gene which also encodes *Bombyx* cysteine proteinase (BCP) in *B. mori* ovary, which digests vitellin in developing eggs. This conclusion provides an interesting study subject that how is an identical gene product regulated in digestion of unique proteins in different insect organs. A study of BCPSG is extended to investigations of fibroinase of silk gland in wild silkmoths such as *Samia cynthia ricini* and *Antheraea pernyi*, which possess numerous pores in the fibroin fiber, not found in the domesticated silkworm, *B. mori*. The pores are postulated as secreted lysosomes into fibroin in the luminal contents of silk gland and presence of fibroinase of silk gland in the pores is suspected. Further studies of BCPSG and fibroinase of silk gland in wild silkmoths may elucidate evolutionary reason why silk spinning insects selected cysteine proteinase as digestion enzyme of fibroin and sericin.

Contents : Fibroinase, cathepsin L-like cysteine proteinase, silk gland, fibroin, sericin, digestion, purification, characterization, cDNA cloning, nucleotide sequence, recombinant enzyme, expression in *E. coli*, organ specific biological function

* 連絡先 : 京都工芸繊維大学応用生物学部門、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail : sumida@kit.ac.jp、TEL 075-724-7765

1. はじめに

2006年5月末に、家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼの研究の区切りをつけました[21]。ここに絹糸腺フィブロイナーゼの発見、研究成果、研究の意義、今後の展望について報告します。

1. 1 家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼはどんなタンパク質分解酵素（プロテイナーゼ）であるか？

家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼは、家蚕のフィブロイン分子中に豊富に存在する繰返し配列であるグリシン-アラニン[29]の間のペプチド結合を優先的に切断するプロテイナーゼです。酸性のpH 4で働きます。プロテイナーゼの種類はカテプシンL様のシステインプロテイナーゼです[8]。酵素の活性中心を構成する3つのアミノ酸残基のうちの一つがシステインです。液状フィブロインを分解しますのでフィブロイナーゼと名付けました。今ではフィブロインに加えて、もう一つのシルクタンパク質であるセリシンも分解することが明らかになっています[22]。そこでフィブロイナーゼを「カイコ絹糸腺システインプロテイナーゼ (BCPSG)」と命名し直しました[22]。したがってBCPSGと家蚕のフィブロイナーゼは同一の酵素タンパク質です。本報告ではフィブロイナーゼの研究の歴史を辿りますので、家蚕のフィブロイナーゼとBCPSGという二つの名称を両方とも使用します。

1. 2 フィブロイナーゼとコクナーゼ

家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼは、フィブロインとセリシンという二つのシルクタンパク質を酸性のpH 4で分解します。カテプシンLに似たシステインプロテイナーゼです。コクナーゼは、マユ溶解酵素として良く知られており、セリシンのみをアルカリ性のpH 8で分解します。プロテイナーゼの種類はセリンプロテイナーゼです。両者は全く別のプロテイナーゼです。

2. フィブロイナーゼの発見

2. 1 1988年4月から始めた「家蚕の絹糸腺はフィブロイン分解酵素をつくるか？」という研究の動機は4つ

1) 家蚕の酵素を指標にして発育生物学を展開したいという私の希望。2) 江口正治先生の研究室で家蚕の消化液プロテイナーゼを指標とした遺伝生化学の研究に従事し、プロテイナーゼという酵素の研究をすることの面白さを知ったこと。3) 林屋慶三先生からの「絹糸腺を研究しませんか」というお誘い。先生は「京都工芸繊維大学はカイコの学校であり、絹糸腺を研究する研究者が必要だと思います。あなた絹糸腺を研究しませんか」とお誘いいただきました。4) 1985年8月1日から1986年7月31日まで米国アリゾナ大学の生化学学部のJohn Law先生の研究室でタバコスズメガを使って昆虫の脂質代謝を研究する機会を与えられたこと。脂肪体におけるリポホリンの生合成の研究を行ないました。研究は大変面白かったのですが、それ以上に驚いたことがありました。家蚕と同じ鱗翅目昆虫であるタバコスズメガは何とマユをつくらずにサナギになるのでした。日本に帰ったらマユ関連の研究をしなければならぬと思いました。これら4つの動機をもとにしてつくった研究課題が「家蚕の絹糸腺はフィブロイン分解酵素をつくるか？」でした。

2. 2 酵素液、基質、活性測定

フィブロイナーゼの研究は私自身にとって新しい経験となりました。結果が出るか否か分からない研究課題に挑戦したのです。家蚕のサナギを毎日解剖して残存絹糸腺を観察しました。サナギ0日令から2日令まで観察可能でした。その後アポトーシスによって消失しました。サナギ0日令から1日令にかけて絹糸腺のうち中部絹糸腺がやせ細ることに気がつきました。中部絹糸腺内腔のフィブロインとセリシンが分解されたに違いないと思いました。フィブロイナーゼが関与しているはずであると信じました。そこでサナギ1日令の残存絹糸腺の磨砕液を酵素液として選びました。

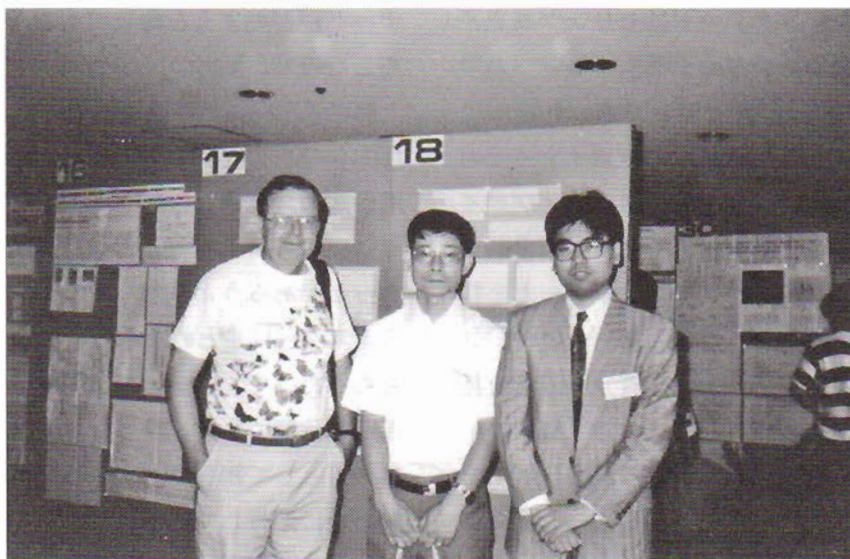


図1. 左からJohn Law先生、私、指導学生の一守博正君と18番の「フィブロイン分解酵素」のポスターの前で、1989年の国際無脊椎動物生殖学会 (Congress of International Society of Invertebrate Reproduction)、名古屋にて

酵素が働く相手の基質として液状フィブロインを用いました。東北大学農学部の志村憲助先生が固形フィブロインから液状フィブロインを調製する方法[6]、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) によってフィブロインのH鎖とL鎖を分離して検出する実験条件を作っておられました[6]。これらをそれぞれ基質調製とフィブロイナーゼの活性測定に利用しました。一般にプロテイナーゼ活性の測定にはカゼインを基質に用い、酵素反応後カゼインの分解産物を試薬と反応させた後に分光光学的に測定します。フィブロイナーゼの研究では酵素活性測定法として、フィブロイナーゼの作用によって出来たフィブロイン分解産物を目で見て確認する方法を採用しました[9,10,11,12,14,17,19,20,21]。すなわち、液状フィブロイン分解のタイムコースをとり、SDS-PAGEによってフィブロインのH鎖が分解されて出来たフィブロインペプチドが反応時間の経過とともに更に分解されてより低分子化したフィブロインペプチドが産生される様子を観察することによってフィブロイナーゼ活性を検出しました。このことは後になって重要であることが分かりました。一方、セリシンについては良い調製法ならびに検出法が1988年当時、見当たりませんでした。これが

液状フィブロインをフィブロイナーゼの基質に選んだ理由です。今ではマユからセリシンを調製するTakasu et al.の方法[13]があります。セリシンを生合成する中部絹糸腺の前区、中区、後区で合成される3つのセリシン画分の調製法であり、後にフィブロイナーゼのセリシン分解を検討する際に利用しました。

2. 3 フィブロイナーゼはアリゾナ大学のJohn Law先生が名付け親

1989年名古屋市で国際無脊椎動物生殖学会が開かれ、ポスター発表をしました。John Law先生も来日されました。ポスター中でフィブロイナーゼをフィブロイン加水分解酵素 (Fibroin hydrolyzing enzyme) と呼んでいました。John Law先生は「フィブロインを分解する酵素だからフィブロイナーゼと命名したら」と言ってくださいました。その時点でフィブロイナーゼがセリシンを分解するか否かは不明でした。先生の提案をいただいて、フィブロイナーゼと命名しました。野蚕で主として研究されたマユ溶解酵素のコクナーゼは生化学の教科書に記載されている有名なプロテイナーゼです。1960年代に米国ハーバード大学のKafatos先生が研究を主導され、John Law先生も主要な研

究者の一人でした。コクナーゼはセリンプロテイナーゼです。酵素の活性中心を構成する三つのアミノ酸残基のうちの一つがセリンです。至適pHはアルカリ性のpH8です。後にフィブロイナーゼの活性がpH4で検出できるようになり、フィブロイナーゼの活性を阻害するプロテイナーゼ阻害剤を調査したところ、システインプロテイナーゼを特異的に阻害する阻害剤が有効でした。その時、コクナーゼとは別のシルクタンパク質分解酵素を見つけたと思いました。John Law先生は「液状フィブロインを基質に用い、活性測定にSDS-PAGEを使用していたら私たちもフィブロイナーゼを見つけていたかもしれないね」と言ってくださいました。セリンを分解するコクナーゼを研究されたJohn Law先生が、同じくシルクタンパク質であるフィブロインを分解する酵素の名付け親となられたことは奇遇と言うしかありません。

2. 4 ようやく活性を検出できた

フィブロイナーゼの活性を検出するのに苦労しました。サナギ1日令の絹糸腺の磨砕液を酵素液に用いて酵素反応させた後、SDS-PAGEを行ない、タンパク質を染色すると、ゲル板が真っ青に染まりました。酵素反応によって出来たはずのフィブロインペプチドが検出出来ません。酵素液に混在しているフィブロイナーゼ以外のタンパク質が濃く染まったためでした。絹糸腺の磨砕液を遠心して上清画分と沈殿画分に分けてそれぞれを酵素液として用いてもだめでした。最後に沈殿画分を石けん的一种のTriton X-100で抽出した上清画分を酵素液に用いて、ようやく分解されたフィブロインペプチドをSDS-PAGEのゲル板上に見ることが出来ました。Triton X-100は膜結合酵素の抽出に用いられるので、これを使えば沈殿画分から酵素が可溶化できるかもしれないと思い、使用しました。抽出されたフィブロイナーゼは、今考えてみますと、絹糸腺のリソソーム中のフィブロイナーゼであったようです。今では絹糸腺の磨砕液の上清画分を酸沈殿処理して混在タンパク質を除去しています。曲がりなりにも活性が検出できるようになりましたので、次に進みました。フィブロイ

ナーゼがどのような酵素であるか予想出来ませんでしたので、反応のpHを酸性、中性、アルカリ性と酵素反応が進行する可能性のあるすべてのpHで反応させました。酸性のpHのみでフィブロイン分解が認められました。したがってフィブロイナーゼはプロテイナーゼとしてはシステインプロテイナーゼであろうと予想しました。ここまでの結果をポスターにまとめたものをJohn Law先生に見てもらったのです。フィブロイナーゼの実体が全く不明の状態でした。フィブロイナーゼが酵素タンパク質として精製されていない状態で、酵素反応が確かに進行していることを示すためにはフィブロイン分解のタイムコースの確実な結果を得ることが必須でした。つまり、反応時間の進行に比例して、フィブロインのH鎖が分解されて低分子化したフィブロインペプチドが生成され、さらに時間が経過すると低分子化したフィブロインペプチドが更に低分子化されるというパターンが認められればフィブロイナーゼが機能しているはずでした。実際にこのようなパターンが得られたのは1991年4月23日でした。pH4における酵素反応によってフィブロインのH鎖の下に何本ものフィブロインペプチドが階段状(ラダー状)に生成され、その集団の泳動位置が反応時間の進行とともにゲル板の下方へと移動しました。つまりフィブロインペプチドの低分子化が進行しました。コクナーゼとは違うシルク分解酵素であるフィブロイナーゼを見つけたと思いました。ただちにプロテイナーゼ阻害剤の実験を行ないました。確かにE-64やロイペプチンのような典型的なシステインプロテイナーゼ阻害剤によって有為に阻害がかけられました。得られた結果を1993年の2つの論文にまとめました[9,10]。鶴飼 睦、瀧本 聡との共同作業でした(以下、身内にあたります指導学生の敬称を略します)。

2. 5 フィブロイナーゼはカテプシンに似た酵素であるのでカテプシンの人工蛍光基質をフィブロイナーゼの活性測定に使用して良いか?

フィブロイナーゼが家蚕の絹糸腺において絹糸

腺内腔に分泌されていることを示す何らかの証拠があれば、カテプシンの活性測定用の人工蛍光基質を使用すると決心しました。その理由は以下のとおりです。フィブロイナーゼの活性測定には天然基質である液状フィブロンを使用するのが最良です。しかし反応終了後、SDS-PAGEの結果を得るのに2日かかりました。現在では2時間で結果が見られる改良法のSDS-PAGEを用いています。そこで、フィブロイナーゼがシステインプロテイナーゼのカテプシンLに性質が似ているので、カテプシンLの活性測定のための人工蛍光基質を使いたい。反応後、蛍光分光光度計で測定するだけであり、早いし、定量性も出る。しかし酵素の性質が似ているという理由だけで軽々しく人工蛍光基質を使ってよいだろうかと思いました。酵素タンパク質を単離してシステインプロテイナーゼであることを証明したわけでもない。ここにこだわりました。カテプシンLは細胞質中で生合成されたあと、小胞体に入り、続いてリソソームに運ばれ、通常はリソソーム中に留まり、そこで不要となったタンパク質や細胞内小器官を分解します。カテプシンLは細胞外に分泌されません。唯一の例外は骨粗鬆症に関連する破骨細胞のカテプシンLやKであり、細胞外に分泌されます。フィブロイナーゼは絹糸腺内腔に蓄積されたフィブロンとおそらくセリシンも分解するので、絹糸腺内腔、つまり細胞外に分泌される必要があります。そこでカテプシンLの人工蛍光基質を使用するにあたって、フィブロイナーゼが絹糸腺から何らかの形で絹糸腺内腔に分泌されているという証拠が得られたら使用することに決心したのです。そのために何か実験をしなければならぬと思いました。また文献を調べてみなければならぬと思いました。

2. 6 赤井 弘先生の1965年の論文

まず家蚕の絹糸腺に関する文献を調べてみました。1965年、赤井 弘先生がカイコの4令幼虫眠期の絹糸腺の内腔中に蓄積されていたフィブロンとセリシンが完全に分解される現象を報告されていました[1]。眠期の前期に絹糸腺細胞中に液胞

が発達し、その中味が内腔に分泌されている像を観察されていました。これだ、と思いました。最初は実験に使用することを想像もしていなかった4令幼虫眠期の絹糸腺を取り扱うことになりました。

2. 7 家蚕の4令幼虫眠期の絹糸腺は確かに高いフィブロイナーゼ活性を示す

4令幼虫眠期の絹糸腺の磨砕液の遠心上清画分は強いフィブロイナーゼ活性を示しました。サナギ1日令の高い活性に匹敵する高い活性でした。赤井 弘先生が観察された現象に関与する酵素をつかまえたと思いました。

3. 家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼの精製

3. 1 家蚕の4令幼虫眠期の絹糸腺からフィブロイナーゼを精製

フィブロイナーゼを最初に精製するための出発材料として4令幼虫眠期の絹糸腺を選びました。この絹糸腺は次の幼虫期である5令になる際に分解されずにそのまま5令幼虫の絹糸腺になります。これに対してサナギ1日令の絹糸腺はあと1日たつとアポトーシスによって分解され消失します。ですからサナギの絹糸腺はフィブロイナーゼ以外の多種多様のプロテイナーゼも発現しているであろうと思いました。フィブロイナーゼの精製の際に混入するかもしれないと思いました。1997年3月末に精製方法を確立出来ました。由良 敦との共同作業でした。絹糸腺の磨砕液の遠心上清画分を酸沈殿処理した上清を強陽イオン交換体のSP Sepharose FFにかけNaClの濃度勾配によって溶出すれば精製標品が得られました。二段階の精製法です。この方法を確立するまでにカラムの担体として、DEAE-cellulose、CM-cellulose、SP Sepharose FFと、陰イオン交換体から陽イオン交換体へと渡り歩き、用いる緩衝液のpHも5.0から4.0へと変化させました。フィブロイナーゼをカラムに完全に吸着させた後にカラムからNaClの濃度勾配によってフィブロイナーゼを溶出させたかったのです。

フィブロイナーゼをカラムに完全に吸着させる実験条件をつくることにこだわった理由は、絹糸腺磨砕液の遠心上清画分に回収されたフィブロイナーゼをすべて回収してその挙動をカラムからの溶出曲線という形で見てみたいからでした。精製酵素は典型的なシステインプロテイナーゼの性質を示しました。とりわけカテプシンLに良く似ていました。精製フィブロイナーゼによる液状フィブロインのペプチド結合の切断部位のアミノ酸の決定（山中雅弘との共同作業）、酸化インシュリン β 鎖の切断部位の決定（山中雅弘との共同作業）、性質の異なる解析（渡邊昌秀との共同作業）の結果を加えて2004年に論文にまとめました[14]。

3. 2 液状フィブロインを基質に用いる活性測定法の重要性

フィブロイナーゼの精製方法を確立する過程で活性測定にカテプシンLの活性測定に用いられる人工蛍光基質を用いました。予想通り、測定にかかる時間が短く、定量性も得られました。しかし新たな精製手段を試みる時には必ず液状フィブロインを基質に用いました。その理由は、人工蛍光基質の活性のみを信用して酵素の精製を進めた結果、フィブロイナーゼとは別のプロテイナーゼを手にするようになったという苦い経験があるからです。しかし液状フィブロインを基質に用いる活性測定法にも問題がありました。この測定法は定性的測定法であり、活性の有無しか判定できません。この思いが後に液状フィブロインを用いたフィブロイナーゼの絶対活性測定法を開発することにつながったと思います。

3. 3 家蚕のサナギ1日令の残存絹糸腺からフィブロイナーゼを精製、反応動力学的性質は4令眠期のフィブロイナーゼと異なる

サナギ1日令の絹糸腺のフィブロイナーゼは、4令幼虫眠期の絹糸腺のフィブロイナーゼの精製方法を用いることによって精製出来ました。アポトーシスに関連したプロテイナーゼの混在を心配しなくても良いという結果になりました。カテプシ

ンLに似たシステインプロテイナーゼが得られました[17]。しかし反応動力学的性質は4令眠期の酵素と異なりました。例えばpH-活性曲線が、4令眠期の酵素では酸性側に明瞭な肩が認められ、左右対称でないのに対して、1日令のサナギではそれほど顕著な非対称性は認められませんでした。反応動力学定数にも差異が認められました。プロテイナーゼ阻害剤のうちサナギ1日令の酵素だけにペプスタチンが有効でした。pH-安定性にも顕著な差異が認められました。したがって両時期の酵素は異なった遺伝子によってコードされているか、同一の遺伝子によってコードされていて翻訳後に修飾される、のいずれかの可能性が考えられました。

3. 4 液状フィブロインを基質に用いるフィブロイナーゼの絶対活性測定法

志村憲助先生のSDS-PAGEの実験条件ではゲル濃度は10%を用います。ある日、小寺 徹が「間違えて7%のゲル濃度でSDS-PAGEをしてしまいました」と言って結果を持ってきました。見ると、きれいなラダーバンドが多数観察されました。10%ゲルでは見たこともないほどの多数のバンドです。10%ゲルの上の部分を拡大したものが見えていたのです。7%のゲル濃度はフィブロイナーゼによるフィブロインの分解の初期段階を見るのに有効かもしれないと思いました。そこでタイムコースをとってみました。7%のゲル濃度では、反応時間の経過に比例してある時間まで、分子量100kDaに相当するフィブロインペプチドが蓄積し続け、その後分解が始まる現象が明瞭に観察されました。この現象をフィブロイナーゼの絶対活性測定のための指標に出来ると思いました。100kDaのフィブロインペプチドが産生されて蓄積し、その濃度が最大になる時間を3時間とするような酵素量を1酵素単位と定義することによってフィブロイナーゼの絶対活性測定法を作りました[11]。由良 敦との共同作業でした。

3. 5 フィブロインとセリシンを多量に含む絹糸腺を磨碎して絹糸腺細胞の磨碎液を調製する方法

2000年8月にブラジルで国際昆虫学会が開催され参加しました。留守番をしてくれた日沼久人に、フィブロインとセリシンを多量に含む家蚕の5令幼虫の絹糸腺の磨碎法を試みるように頼んで出発しました。絹糸腺はどろどろした粘っこい器官であり生化学実験で出来ることならば材料として扱いたくない器官です。それでも4令幼虫眠期やサナギ1日令の絹糸腺は小さく、フィブロインとセリシンもそれほど含んでいません。磨碎液を作成することは困難ではありませんでした。フィブロイナーゼも精製できたのです。しかし5令の幼虫の絹糸腺から磨碎液をつくることは出来ていませんでした。帰国後、出来ましたとの報告をもらいました。早速再現性を確かめました。不幸にして再現できません。私は一回出来たことは必ず再現できるはずと言って二人で実験段階を一つずつ検討しました。その結果、 -20°C で1日以上凍結した絹糸腺を融解せずにそのままホモゲナイザーで磨碎するとフィブロインとセリシンは応力によって固化するのに対して絹糸腺細胞は磨碎液となることが分かりました。固化したフィブロインとセリシン中に包み込まれた形で残存する絹糸腺細胞の磨碎物は、固化したフィブロインとセリシンを回収して、はさみを使って細切した後、再度緩衝液とともに磨碎して上清画分に回収しました[11,16]。

3. 6 家蚕の食桑期と5令幼虫の吐糸期の絹糸腺からフィブロイナーゼ活性を検出出来た、その生理学的意義は？

これまでのところ4令幼虫眠期とサナギ1日令というカイコの発育時期のうち2点しかフィブロイナーゼ活性が捉えられていませんでした。しかし、3. 4と3. 5の方法を組み合わせれば、家蚕がクワを食べている時期も5令幼虫になって糸を吐く時期も絹糸腺がフィブロイナーゼ活性を示すか否かを明らかに出来るはずで。ちょうどタイ王国からVallaya Sutthikhumが博士後期課程の

留学生として来日しました。研究課題として提案しました。これまでの知見を考慮すればフィブロイナーゼ活性を測定できるはずだけれど、5令幼虫期間にどのような活性パターンを示すかは全く分からない。この実験によって初めて分かることになるはずである。しかし万が一が一家蚕がクワを食べている時期も5令幼虫になって糸を吐く時期も活性が無かった場合は、別の研究課題を考えなければならない。このような事情だけれど、5令幼虫期の絹糸腺のフィブロイナーゼ活性の測定に挑戦しますかと尋ねました。答えはyesでした。実験の結果もaffirmativeでした。フィブロイナーゼ活性が検出出来たのです[11,16]。家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼ活性に関して点から線になった瞬間でした。ではその生理学的意義は何かということが問題となります。5令幼虫期の絹糸腺フィブロイナーゼは絹糸腺細胞内に局在しており、絹糸腺内腔に分泌されません[15]。絹糸腺細胞内での機能を考慮する必要があります。今では絹糸腺細胞のリソソーム内でのリソソーム酵素としての機能を果たしていると考えています。

3. 7 家蚕の4令幼虫眠期、5令幼虫吐糸期、サナギ1日令の3つの発育時期の絹糸腺フィブロイナーゼの性質はそれぞれ異なる

Vallaya Sutthikhumとの共同作業によって吐糸中の5令9日の幼虫の絹糸腺から吐糸期のフィブロイナーゼを精製しました。4令幼虫眠期の精製法を使用することが出来ました。もっともSP Sepharose FFカラムは若干長いものが必要でした[12]。絹糸腺細胞は発育時期によって含有タンパク質の質と量に変化していたのがその理由です。精製酵素の性質を調べてみると4令幼虫眠期、5令幼虫吐糸期、サナギ1日令の3つの発育時期の酵素の性質はそれぞれ互いに異なっていました。その原因は3. 3で推定したようにフィブロイナーゼに関して発育時期特異的遺伝子が存在するか、遺伝子は同一のものであり翻訳後の修飾により異なる酵素が生成されるかのいずれかの可能性が考えられました。

3. 8 フィブロインのアミノ酸配列を有する消光性人工蛍光基質をつくる

人工蛍光基質を用いてフィブロイナーゼのpH-活性曲線を作成すると至適pHは6付近という結果を得ます。これに対して液状フィブロインを基質に用いて得られる至適pHは3から4付近です。この至適pHの基質による違いはフィブロイナーゼが異なる基質に対して示す性質であり、それ以上の何者でもありません。しかし何とかして液状フィブロインの至適pHの3から4付近を再現できる人工蛍光基質をつくりたいと思いました。そこで家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼによる液状フィブロインの分解産物であるペプチドのアミノ酸配列を決めました。この情報を参考にして消光性人工蛍光基質を設計し、調製しました。その結果、至適pHは5付近にあるという結果が得られ、3とか4にはなりません。しかし、この基質を利用すれば、液状フィブロインを利用した絶対活性測定法では測定が不可能であった、1令幼虫の始めからサナギ1日令までの発育期間の絹糸腺フィブロイナーゼの絶対活性が測定できると思いました。液状フィブロインを基質に用いる絶対活性測定法では、かなりの量の酵素液が必要です。この必要量を調製することが1令幼虫から3令幼虫の絹糸腺の場合、容易ではありませんでした。消光性人工蛍光基質を用いてフィブロイナーゼ活性を測定しました[18]。フィブロイナーゼ活性は家蚕の発育に伴って指数関数的に上昇しました。絹糸腺の重量増加曲線とは比例せず、はるかに低い活性上昇割合でした。この結果は、家蚕の幼虫がクワを食べているときや糸を吐くときにはフィブロイナーゼは絹糸腺のリソソームのなかで古くなったタンパク質や細胞内小器官を分解するといったhouse-keeping機能に従事しており、直接、シルクタンパク質の生合成機構に関わっているのではないことを示唆しています。眠期の活性はクワを食べている次期に比べて若干上昇しました。4令幼虫眠期の活性も上昇しましたが、液状フィブロインを用いた絶対活性測定法による活性上昇[11]ほど増加しませんでした。後者の活性測定法は250kDaのフィブロインのH鎖が分解されて100kDaのフィ

ブロインペプチドが蓄積し最大濃度になるまでの時間が3時間になる酵素量を1酵素単位としています。これに対して消光性人工蛍光基質を用いる測定法は液状フィブロインの250kDaよりもはるかに低分子の基質を何回切断したかというものでした。活性測定の基本原理が異なります。両者の結果の差異はこれが原因と思われます。消光性人工蛍光基質を用いた活性測定によっても5令幼虫の絹糸腺のすべての部分、つまり後部糸腺、中部糸腺、前部糸腺においてフィブロイナーゼ活性が認められることが明らかになりました[18]。

4. 野蚕のフィブロイナーゼ

4. 1 家蚕のサナギ1日令の精製酵素の抗体を用いた研究

家蚕のサナギ1日令の精製フィブロイナーゼを抗原に用いて作成した抗体は、野蚕であるエリ蚕とサクサンの絹糸腺の切片標本と反応性を示すことが分かりました[15]。野蚕の絹糸腺中に家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼと類似した酵素が存在する可能性が示されました。また家蚕と野蚕の絹糸腺におけるフィブロイナーゼの局在性を調査した結果、眠期には抗体に反応する物質が絹糸腺内腔に認められることが分かりました[15]。フィブロイナーゼの腺腔内への分泌の証拠であると考えられました。

4. 2 エリ蚕の4令幼虫眠期の絹糸腺フィブロイナーゼの精製と性質

野蚕学会の会長の赤井 弘先生のお勧めにより、エリ蚕のフィブロイナーゼを研究することを決めました。2000年8月にブラジルのイグアスの滝で開催された国際昆虫学会に参加した折のことです。野蚕の一種、エリ蚕のフィブロインはグリシン-アラニンの繰返し配列の間にポリアラニン部分があることが知られています。家蚕のフィブロインの主要なアミノ酸配列はグリシン-アラニンの繰返し配列です。ポリアラニン部分はありません。そこでエリ蚕の絹糸腺フィブロイナーゼはカイコのフィブロイナーゼと異なっているの

ではないかと予想しました。エリ蚕のフィブロイナーゼの活性測定のための基質としてエリ蚕の液状フィブロインをエリ蚕の固形フィブロインから調製しようとしたのですが出来ませんでした。ヤマユガのフィブロイン溶液を調製する論文を参考にして、エリ蚕の液状フィブロインを作成しました。酵素反応を行い、反応産物をSDS-PAGEによって同定しようとしたのですが出来ませんでした。改善の策として家蚕の液状フィブロインをエリ蚕のフィブロイナーゼの基質として使用することにしました。エリ蚕の絹糸腺磨砕液の上清画分を酵素液に用いて酵素反応をさせると、家蚕と同様にSDS-PAGEによって液状フィブロインの分解産物の多数のラダーバンドが認められました。家蚕の4齢幼虫眠期の絹糸腺のフィブロイナーゼの精製法を用いてエリ蚕の4齢幼虫眠期の絹糸腺の精製フィブロイナーゼを得ることが出来ました[20]。カテプシンLに似たシステインプロテイナーゼでした。精製酵素のアミノ末端のアミノ酸配列は家蚕のものとは若干違いがありました。野蚕のフィブロイナーゼは家蚕のものとは異なる遺伝子によってコードされている可能性が明らかとなりました。1971年に赤井 弘先生はエリ蚕の4令眠期において家蚕の4令眠期と同様の現象、つまり絹糸腺内腔においてフィブロインとセリシンが分解される現象が見られることを報告されています[2]。

5. 家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼはセリシンを分解するか

長らく懸案となっていましたこの課題に挑戦しました。Takasu et alの方法[13]を用いて調製した3つのセリシン画分のすべてを、家蚕のサナギ1日令の絹糸腺から精製したフィブロイナーゼは分解しました。分解されたセリシンペプチドを逆相カラムで分画し、それぞれのピークに含まれるセリシンペプチドの分子量ならびにアミノ酸配列を調べました。アミノ酸配列を決定出来たセリシンペプチドとすでに報告されているセリシン遺伝子と関連づけたセリシンペプチド配列を比較した結果、いくつかのペプチドの由来をセリシン遺伝

子と関連づけることが出来ました。なかでも一つのセリシンペプチドはフィブロイナーゼによる切断を両端で受けていました。以上の結果よりフィブロイナーゼがセリシン分子のペプチド結合のうち、どのアミノ酸とどのアミノ酸の間を切断するかを推定することが出来ました[22]。サナギ初期の残存絹糸腺中のフィブロインとセリシンは単一の酵素であるフィブロイナーゼによって分解できることが分かりました。眠期の絹糸腺中のフィブロインとセリシンの分解についてもおそらく同様であると考えられます。長らくフィブロイナーゼと呼んできましたが、フィブロイナーゼはフィブロインに加えてセリシンも分解するので「カイコ絹糸腺システインプロテイナーゼ (BCPSG)」と命名し直しました[22]。

6. エリ蚕ふたたび

6. 1 エリ蚕の4令幼虫後期から5令幼虫期の終わりまでの発育期間の絹糸腺フィブロイナーゼの活性消長は家蚕のものとは異なる

エリ蚕のフィブロイナーゼは、吐糸終了時に最大活性を示すことが分かりました[19]。その活性値は家蚕が4令幼虫眠期あるいはサナギ1日令で示す最大活性値の38倍という高い活性でした。エリ蚕を含む野蚕のフィブロイン繊維中には多数の小さな穴があいていることが赤井 弘先生によって報告されています[3]。このフィブロインの中の多数の小さな穴は後部絹糸腺細胞から絹糸腺内腔のフィブロインに向けてリソソームの袋が分泌されたものであることが明らかにされています。この事実を踏まえると、エリ蚕の吐糸期に測定されたフィブロイナーゼの高い活性は絹糸腺細胞と絹糸腺内腔に局在するものを合計した活性であり、シルク繊維として吐糸されたフィブロイナーゼは測定していません。エリ蚕が実際に生合成して作ったフィブロイナーゼ分子は記録された活性から計算出来る数よりもはるかに多いと推定されます。

6. 2 エリ蚕の吐糸終了時の絹糸腺フィブロイナーゼの精製と性質、エリ蚕においても発育時期を異にすると酵素の性質が変わる

家蚕の発育時期を異にする3種類の絹糸腺フィブロイナーゼは性質が互いに異なります。エリ蚕においても発育時期が異なると性質が変化することが分かりました。エリ蚕の場合は、SP Sepharose FFカラムの溶出パターンがまず変化していました。カラムに吸着させたフィブロイナーゼをNaClの濃度勾配で溶出させると、通常大部分の活性が回収される0.1M画分のみに活性が回収されるのではなくて、0.2M、0.3M、1.0M溶出画分にもほぼ同等の活性が回収されました。また0.1M画分の溶出パターンは酵素の荷電が大きく、カラムからなかなか溶出されにくいことを示唆していました。いずれにしてもどの溶出画分を回収したらよいか、判断することが出来ず、精製酵素を得ることが出来ませんでした。最終的に新規の精製方法を採用して精製しました[20]。後に示します家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼのcDNAを大腸菌に発現させて作らせた組換えフィブロイナーゼを精製する方法を借りました。精製酵素はシステインプロテイナーゼの性質を示しました。反応動力的性質はエリ蚕の4令幼虫眠期の酵素と似ていました。おそらく糖鎖がより多くついているのがエリ蚕の吐糸終了時の酵素であると思われました。多量の精製酵素が得られましたので、アミノ末端のアミノ酸配列を決定することが出来ました。4令眠期の酵素のアミノ末端の最初のアミノ酸が未同定でしたが、今回は決定できました。その結果、2番日以降のアミノ酸の配列は両時期で同一であることが分かりました。

6. 3 エリ蚕のフィブロイナーゼを含むリソソームは後部絹糸腺細胞から絹糸腺内腔のフィブロインの中に分泌される

2003年4月に京都工芸繊維大学の附属農場で野蚕学会が開催されました。エリ蚕の研究成果を発表しました。赤井 弘先生は、天蚕のフィブロインに多数の小さな穴が開いている現象を発表され

ました[3]。天蚕の絹糸腺細胞がフィブロインを分泌する時、同時にリソソームを絹糸腺内腔に分泌するということでした。絹糸腺細胞が内腔に面している部分の内膜が、天蚕の場合発達しておらず、リソソームの袋がそのまま内腔に分泌されるということでした。内膜が発達していないテンサンのほうが、内膜が発達している家蚕よりも進化しているということでした。家蚕ではリソソームの分泌は認められません。懇親会で赤井 弘先生から、天蚕の他に野蚕で同様の現象が見られるのはサクサンであると教えていただきました。また、テンサンのリソソームの袋の中の酵素活性を測定してもらえませんかということでした。マユになったフィブロインのリソソーム中に活性が残っているか否かも知りたいということでした。これらは継続研究課題です。

7. フィブロイナーゼcDNAのクローニング

7. 1 家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼのcDNAクローニングとヌクレオチド配列の決定

家蚕のサナギ1日令の絹糸腺から得た精製フィブロイナーゼをトリプシン消化して逆相カラムでフィブロイナーゼペプチドを分離しました。そのうち5つのペプチドのアミノ酸配列を決定することが出来ました。この配列をデータベースで検索したところ、「家蚕卵のシステインプロテアーゼ(BCP)」の推定アミノ酸配列[26]中にすべてのペプチド配列が見いだされ、アミノ酸配列も完全に一致しました。そこでBCPのヌクレオチド配列を参考にしてPCRプライマーを作り、4令眠期の絹糸腺から得たcDNAをもとにしてフィブロイナーゼのcDNAをクローニングしました。得られたクローンのヌクレオチド配列を決定しました。BCPと完全に同一ではありませんでしたが、BCPの配列と類似性の極めて高い配列が得られました[21]。吐糸期とサナギ0日令の絹糸腺からも同様の方法を用いてフィブロイナーゼcDNAをクローニングし、ヌクレオチド配列を決定しました。3つの発育時期から得られたフィブロイナーゼcDNAのヌ

クレオチド配列はすべて一致しました[21]。以上の結果は発育時期を異にする家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼは同一の遺伝子によってコードされていることを示唆するものでした。

7. 2 大腸菌で発現させた組換えフィブロイナーゼの性質

発現ベクターにBCPSGのcDNAを組込んで、Yamamoto et al.が用いた大腸菌による遺伝子発現系[28]の変法を用いてBCPSGを発現させました。発現させたBCPSGの精製は従来の方法では不可能でした。そこで新規精製法を開発しました。精製組換えBCPSGは家蚕の3種類のBCPSGのすべての性質を持っていました[21]。サナギ1日令のBCPSGのみが阻害を受けるプロテイナーゼ阻害剤のペプスタチンによる活性阻害を受けました。pH-活性曲線は吐糸期のBCPSGのパターンに似ていました。pH-安定性のパターンは4令眠期とサナギ1日令のBCPSGのパターンの中間型を示しました。反応動力学的性質はおおむね吐糸期のBCPSGの性質に似ていました。つまり、組換えBCPSGは家蚕の発育時期によって異なる3種類のBCPSGに変化する前駆体の性質を備えていました。これまでのところBCPSGのcDNAが1種類しか得られていない事実を考慮すると、家蚕のBCPSG遺伝子は1種類であり、翻訳後の酵素の修飾によって3種類の酵素がつくられると考えられます。

7. 3 同一の遺伝子が異なる器官で発現し、生成されたプロテイナーゼが一方でシルクタンパク質分解、他方で卵黄分解という異なる生理学的機能を遂行する

BCPが卵巣の包卵皮膜細胞で不活性化酵素として合成された後、卵に取り込まれ、受精、産卵後、胚子発育の過程で卵黄細胞の卵黄分解に関与するプロテイナーゼとして機能することが明らかにされていました[23,24,25]。今、絹糸腺フィブロイナーゼ、BCPSG、が絹糸腺において眠期とサナギ初期に絹糸腺内腔に分泌され、内腔に蓄積されたフィブリンとセリシンを分解することが明らかにされました。食桑期と吐糸期にはリソソーム

酵素として機能すると考えられます。またBCPとBCPSGをコードするcDNAはほとんど同一のものであることも明らかとなりました。このことは、昆虫における同一遺伝子による器官特異的機能発現系が得られたことを意味します。新たな発育生物学を構築できる可能性を秘めた生物系が準備されたと考えられます。

7. 4 BCPを研究してこられた高橋 進先生の研究グループは、絹糸腺の調査結果を報告しておられない

BCPを研究してこられた高橋 進先生の研究グループはBCPの家蚕における組織分布を抗BCP抗体を用いて調査されました[27]。しかしなぜか絹糸腺の調査結果がありません。私は研究の当初から「家蚕の絹糸腺はフィブリン分解酵素をつくるか?」という課題を掲げていました。液状フィブリンを基質に用いて、フィブリン分解産物をSDS-PAGEによって追いかけてみました。そうして1965年の赤井 弘先生の4令幼虫眠期の絹糸腺の論文[1]に巡り会った時、家蚕の絹糸腺フィブロイナーゼの一つの生理学的意義が明らかになりました。精製フィブロイナーゼのトリプシン消化産物のフィブロイナーゼペプチドのアミノ酸配列がBCPのアミノ酸配列の中にすべて見いだされたとき、高橋 進先生の研究グループとの接点が見つかりました。今、研究の道筋を振り返ってみますと、私が採用した研究の進め方によって初めてBCPSGの生理学的意義が明らかになったと思います。

8. 昆虫のシステインプロテイナーゼの3つ目の生理学的役割

昆虫のシステインプロテイナーゼの生理学的役割についてこれまで2つ明らかにされてきました。1つはBCPに代表される発育中の卵における卵黄タンパク質の分解[4,23,25]です。2つ目は中腸における食物分解であり、*Tenebrio molitor*で詳細に検討されました[5]。今回新たに昆虫における3つ目のシステインプロテイナーゼの生理学的役割が明らかにされました。絹糸腺フィブロイナーゼ、

BCPSG、は絹糸腺において眠期にシルクタンパク質のフィブロインとセリシンを分解するという役割です。眠期以外では、リソソーム酵素として機能していると考えられます。私の研究は、昆虫におけるシステインプロテナーゼの3つ目の生理学的役割を明らかにしたところに意義があると思います。

9. 謝辞

本報告を纏めるようにお勧めくださいました財団法人衣笠会繊維研究所会長理事 林 幸之博士に感謝申し上げます。

1988年4月から始めた「カイコの絹糸腺はフィブロイン分解酵素をつくるか？」という研究は、区切りをつけるまでに多くの時間がかかりました。その間、「カイコはなぜクワしか食べないのか？」という京都高等蚕糸学校の浜村保次先生が1935年に提出された疑問をもとに始められた研究を思い出すことにしていました。先生は粘り強く研究を続けられ、1959年から1962年にかけてクワの葉の中に1) 誘引因子、2) 嘔みつき因子、3) 飲み込み因子を発見されました。この結果をもとにしてカイコの人工飼料を世界で初めて作られました。この人工飼料で2万頭のカイコを飼育したところ、人工飼料に生えたカビによりカイコは全滅しました。そこで1963年から家蚕の無菌人工飼料育システムの研究に着手され、無菌人工飼料育システムを完成されました。それまで誰も真面目に取り上げなかった研究課題で、答えが得られるか否か見通しのつかない困難な課題に挑戦され、輝かしい成果をあげられた先生の研究から励ましを得ました。無菌人工飼料育システム[7]により一年中いつでも生の絹糸腺が入手できたことも研究の進展に大きな助けとなりました。高橋 進先生の研究グループのBCPの研究成果からも多くを学びました。ここに記して感謝します。

引用文献

[1] Akai, H. (1965) : Studies on the ultrastructure

of the silk gland in the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Seric. Exp. Sta. 19, 375-484 (in Japanese with English summary.)

- [2] Akai, H. (1971) : An ultrastructural study of changes during molting in the silk gland of larvae of the Eri-silkworm, *Philosamia cynihia ricini* Boisduval (Lepidoptera : Saturniidae). Appl. Ent. Zool. 6, 27-39
- [3] Akai, H. (2005) : [Review] Porous cocoon filaments - Their characteristics and formation -. Int. J. Wild Silkworm & Silk 10, 57-74
- [4] Cho, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walter, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S. and Raikhel, A.S. (1999) : Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. J. Biol. Chem. 274, 13311-13321
- [5] Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F. and Terra, W.R. (2005) : The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae : Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 883-901
- [6] Katagata, Y., Kikuchi, A. and Shimura, K. (1984) : Characterization of the crystalline-region peptides prepared from the posterior silk gland fibroin. J. Seric. Sci. Jpn. 53, 165-174
- [7] Matsubara, F., Sang, Q., Sugimori, H., Ishiko, S., Sumida, M. and Matsumoto, T. (1988) : New method of silkworm rearing on an artificial diet (two feedings throughout the larval period). J. seric. Sci. Jpn. 57, 118-122 (in Japanese)
- [8] Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (1994) : Families of cysteine peptidases. Method Enzymol. 244, 461-486
- [9] Sumida, M., Takimoto, S., Ukai, M. and Matsubara, F. (1993a) : Occurrence of fibroinase in degenerating silk gland in the pharate adult of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 105B, 239-245

- [10] Sumida, M., Takimoto, S. and Matsubara, F. (1993b) : Fibroinase of silk gland in the fourth molt stage in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**, 247-251
- [11] Sutthikhum, V., Watanabe, M. and Sumida, M. (2004a) : Fibroinase activity in *Bombyx mori* silk gland in the larval-pupal development and its partial purification from spinning larva. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **73**, 71-79
- [12] Sutthikhum, V., Watanabe, M. and Sumida, M. (2004b) : Fibroinase, a cathepsin L-like cysteine proteinase, from the silk gland of spinning *Bombyx mori* larva, a counterpart in the silk gland of wild silkmoths, *Samia cynthia ricini* and *Antheraea pernyi* : Purification and characterization. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **9**, 21-38
- [13] Takasu, Y., Yamada, H. and Tsubouchi, K. (2002) : Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (12), 2715-2718
- [14] Watanabe, M., Yura, A., Yamanaka, M., Kamei, K., Hara, S. and Sumida, M. (2004a) : Purification and characterization of fibroinase, a cathepsin L-like cysteine proteinase, from the silk gland in the fourth instar *Bombyx mori* larva at the fourth molt period, stage D₂. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **73**, 61-70
- [15] Watanabe, M., Fujii, S., Miyata, S. and Sumida, M. (2004b) : Localization of fibroinase in the silk gland of domesticated silkworm, *Bombyx mori*, wild silkmoths, *Samia cynthia ricini* and *Antheraea pernyi* studied by confocal laser scanning microscopy. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **9**, 1-14
- [16] Watanabe, M., Fujii, S., Hinuma, H. and Sumida, M. (2004c) : Cathepsin activities in the silk gland of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, the wild silkmoths, *Samia cynthia ricini* and *Antheraea pernyi* during the fifth instar larval development. *Int. J. Wild Silkmoth, & Silk* **9**, 15-20
- [17] Watanabe, M., Kotera, T., Yura, A. and Sumida, M. (2006a) : Enzymatic properties of fibroinase of silk gland from day one pupa of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **75**, 39-46
- [18] Watanabe, M., Kamei, K. and Sumida, M. (2006b) : Fibroinase activity of silk gland in larval and early pupal development of the silkworm, *Bombyx mori* assayed with a fluorescent quenched peptide substrate. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **75**, 115-126
- [19] Watanabe, M., Fujii, S. and Sumida, M. (2006c) : Fibroinase of silk gland in eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* : Enzymatic properties at the fourth molt period, stage D₂, and changes in activity during the fifth instar. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **11**, 41-51
- [20] Watanabe, M. and Sumida, M. (2006d) : Enzymatic Properties of Purified Fibroinase of Silk Gland of Eri-Silkworm, *Samia cynthia ricini* at End of Spinning. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **11**, 60-72
- [21] Watanabe, M., Sutthikhum, V., Kotera, T., Okumura, M., Nagaoka, S., Kamei, K., Mori, H. and Sumida, M. (2006e) : *Bombyx* cysteine proteinase of silk gland (BCPSG) : Cloning of cDNA and characterization of recombinant enzyme expressed in *E. coli*. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **11**, 73-90
- [22] Watanabe, M., Kamei, K. and Sumida, M. (2007) : Sericin digestion by fibroinase, a cathepsin L-like cysteine proteinase, of *Bombyx mori* silk gland. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **76**, 9-15
- [23] Yamahama, Y., Uto, N., Tamotsu, S., Miyata, T., Yamamoto, Y., Watabe, S. and Takahashi, S.Y. (2003) : In vivo activation of pro-form *Bombyx* cysteine protease (BCP) in silkworm eggs : localization of yolk proteins and BCP,

- and acidification of yolk granules. *J. Insect Physiol.* **49**, 131-140
- [24] Yamamoto, Y. and Takahashi, S.Y. (1993) : Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: Role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**, 35-45
- [25] Yamamoto, Y., Zhao, X., Suzuki, A.C. and Takahashi, S.Y. (1994a) : Cysteine proteinase from the eggs of silkworm, *Bombyx mori* : Site of synthesis and a suggested role in yolk protein degradation. *J. Insect Physiol.* **40**, 447-454
- [26] Yamamoto, Y., Takimoto, K., Izumi, S., Toriyama-Sakurai, M., Kageyama, T. and Takahashi, S.Y. (1994b) : Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biochem. (Tokyo)*, **116**, 1330-1335
- [27] Yamamoto, Y., Watabe, S. and Takahashi, S.Y. (1995) : Chap. 12 *Bombyx* egg cysteine proteinase : Structure and function. In "Recent Advances in Insect Biochemistry and Molecular Biology" Ed. by Ohnishi, E., Sonobe, N. and Takahashi, S.Y. pp.259-279. Nagoya University Press, Nagoya. (in Japanese)
- [28] Yamamoto, Y., Watabe, S., Kageyama, T. and Takahashi, S.Y. (1999) : Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**, 167-178
- [29] Zhou, C.Z., Confalonieri, F., Medina, N., Zivanovic, Y., Esnault, C., Yang, T., Jacquet, M., Janin, J., Duguet, M., Pcrasso, R. and Li, Z.G. (2000) : Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2413-2419

財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

1. 平成18年度各種学会口頭発表 (下線部は財団理事, 評議員及び著者)

- 1) 加藤靖夫・張平波・藤井博: カイコ体液中のレクチン関連タンパク質の検討. 日本蚕糸学会第62回九州支部・第72回関西支部合同大会 昆虫機能・利用学術講演会発表講演集 p.36, 2006, 福岡
- 2) 武藤清佳・小谷英治・中田香奈・森 肇: ハスモンヨトウ類細胞におけるRNA結合タンパク質(SfTTRN-1)の機能解析. 平成18年度日本蚕糸学会第76回大会-蚕糸・昆虫機能学術講演会-講演要旨集 p.80, 京都
- 3) 小谷英治・中田香奈・森 肇: カイコRNA結合蛋白質BmTRN-1の選択的スプライシングについて. 平成18年度日本蚕糸学会第76回大会-蚕糸・昆虫機能学術講演会-講演要旨集 p.81, 2006, 京都
- 4) 武藤清佳・小谷英治・松本恵実・田辺徹・森 肇: ハスモンヨトウ類RNA結合蛋白質群(SfTRN-1およびSfTRN-2)の機能解析. 日本蚕糸学会第62回九州支部・第72回関西支部合同大会 昆虫機能・利用学術講演会発表要旨集 p.42, 2006, 福岡
- 5) 中村照子・落井克彌・野口亜友美・一田昌利: カイコ幼虫体内におけるDNJ蓄積量. 日本蚕糸学会第76回学術講演会要旨集 2006, 京都
- 6) 落井克彌・野口亜友美・昌原美和・平山珠美・岡 崇史・一田昌利: カイコ体内における蛍光物質の推移. 日本蚕糸学会第62回九州支部・第72回関西支部合同大会 昆虫機能・利用学術講演会発表講演集 p.33, 2006, 福岡
- 7) 古澤壽治・有松祐治・鈴木英子・長岡俊治・野島久美恵・嶋津 徹・鈴木ひろみ・永松愛子・石岡憲昭: カイコの生体反応による長期宇宙放射線の総合的評価「ワークショップ: 国際宇宙ステーション“JEM”搭載実験実現にむけて». 日本放射線影響学会第49回大会講演要旨集 p.88, 2006, 札幌
- 8) 渡邊昌秀・亀井加恵子・角田素行: カイコ絹糸腺フィブロイナーゼによるセリシン分解. 日本蚕糸学会第76回大会講演要旨集 p.66, 2006, 京都
- 9) 渡邊昌秀・角田素行: エリ蚕吐糸終了時の絹糸線フィブロイナーゼの精製と性質. 日本野蚕学会第12回大会講演要旨集 p.5, 2006, 東京
- 10) Huy T.N., A.Maeda, M. Sasai, T. Shiono, S. Harada, K. Kamei: n-Alcohols induce beta-hematin formation via dissociation of aggregated heme and reduction in interfacial tension of solution. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan “Life: Molecular Integration & Biological Diversity” Abstract p.204 (2006) Kyoto
- 11) 名村哲也・乾 善智・世良田聡・荻谷 豊・原田繁春・高野 良・亀井加恵子: 2-O, N-硫酸化ヘパロザンの調製と生理活性. 第26回日本糖質学会年会要旨集 p.174 (2006) 仙台
- 12) 山形 渉・佐藤 暖・野崎智義・亀井加恵子・原田繁春: 赤痢アメーバ*Entamoeba histolytica*由来メチオニンγ-リアーゼの結晶構造解析. 第6回日本蛋白質科学会年会要旨集 p.70 (2006) 京都
- 13) 前田篤志・Huy Nguyen・笹井基裕・Trang Dai・Uyen Dinh・老田達生・原田繁春・亀井加恵子: ホスホリパーゼによる活性化膜がマラリア色素形成を開始する. 第75回日本寄生虫学会大会抄録集 p.49 (2006) 弘前

2. 平成18年度各種学会誌投稿論文

- 1) Kato, Y. : An approach for proteomic analysis of *Bombyx* humoral lectin related proteins using two-dimensional gel electrophoresis. J. Contemporary Human Life Science, Tezukayama University 2, 1-9. (2006)
- 2) Kato, Y., and Takeuchi, T. : *In Vitro* effect of two glycosidase activities on humoral lectin activity in *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericol. 75. 153-159. (2006)
- 3) Arimatsu, Y., Furuno, T., Sugimura, Y., Togoh, M., Ichihara, Tokizane, M., Kotani, E., Iiyashi, Y., and Furusawa, T. : Purification and properties of double-stranded RNA-degrading nuclease, dsRNase, from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericol. 76(1), 57-62, (2007)
- 4) Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y., and Furusawa, T. : Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 176-183, (2007)
- 5) Kako, T. : Dyeing Properties of Chitosan-Treated Tussah Silk Fabrics Dyed with Lanaset Dyes. Kobe University of Fashion and Design, Kobe College of Liberal Arts, RESEARCHES No.30, 1-7 (2006)
- 6) Watanabe, M., Kotera, T., Yura, A., and Sumida, M. : Enzymatic properties of fibroinase of silk gland from day one pupa of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericol. 75, 39-46 (2006)
- 7) Watanabe, M., Kamei, K., and Sumida, M. : Fibroinase activity of silk gland in larval and early pupal development of the silkworm, *Bombyx mori* assayed with a fluorescent quenched peptide substrate. J. Insect Biotechnol. Sericol. 75, 115-126 (2006)
- 8) Watanabe, M., Fujii, S., and Sumida, M. : Fibroinase of silk gland in Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* : Enzymatic properties at the fourth molt period, stage D₂, and changes in activity during the fifth instar. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 11,41-51 (2006)
- 9) Watanabe, M., and Sumida, M. : Enzymatic properties of purified fibroinase of silk gland of Eri-silkworm, *Samia Cynthia ricini* at end of spinning. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 11, 60-72 (2006)
- 10) Watanabe, M., Sutthikhum, V., Kotera, T., Okumura, M., Nagaoka, S., Kamei, K., Mori, H., and Sumida, M. : *Bombyx* cysteine proteinase of silk gland (BCPSG) : Cloning of cDNA and characterization of recombinant enzyme expressed in *E. coli*. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 11, 73-90 (2006)
- 11) Y. Shibata, N. Kume, H. Arai, K. Hayashida, A., Inui-Hayashida, M. Minami, E. Mukai, M. Toyohara, A. Harauma T. Murayama, T. Kita, S. Hara, K. Kamei, and M. Yokode : Mulberry leaf aqueous fractions inhibit TNF- α -induced nuclear factor κ B (NF- κ B) activation and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* (2006) [Epub ahead of print]
- 12) D. Sato, W. Yamagata, K. Kamei, T. Nozaki and S. Harada : Expression, purification and crystallization of L-methionine γ -lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. Acta Cryst. F62, 1034-1036 (2006)
- 13) D.T.X. Trang, N.T. Huy, D.T. Uyen, M. Sasai, T. Shiono, S. Harada, and K. Kamei : Inhibition assay of β -hematin formation initiated by lecithin for screening new antimalarial drugs. *Anal. Biochem.* 349, 292-296 (2006)
- 14) N.T. Huy, D.T. Uyen, M. Sasai, D.T.X. Trang, T. Shiono, S. Harada, K. Kamei : A simple and rapid colorimetric method to measure hemozoin crystal growth *in vitro*. *Anal. Biochem.* 354(2), 305-307

(2006)

- 15) M. Taniguchi, P. Atiwetin, T. Hirai, M. Itoh, S. Harada, S. Hara, and K. Kamei: Interaction of subtilisin BPN' and recombinant fungal protease inhibitor F from silkworm with substituted P1 site residues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(5), 1262-1264 (2006)

(総説)

- 16) 古澤壽治: カイコの卵を用いた宇宙放射線影響の生物学的評価. *放射線生物研究* 42(1), 79-95 (2007)
- 17) 小谷英治: 昆虫においてタンパク質発現を調節しているRNA結合タンパク質. *蚕糸昆虫バイオテクノロジー* 1, 22-23 (2006)

平成18年度講演活動報告

『演 題』 宇宙でカイコは繭をつくるかー営繭行動と糸の性質

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター教授
本財団 理事

古澤壽治

日時・場所 平成18年3月16日

京都工芸繊維大学 京丹後キャンパス・地域連携センター 1階セミナー室

対 象 者 一般

講演要旨

カイコは糸を吐く前に重力に逆らって這い上がる性質があり、この状態を保って営繭する。このような性質を持つ蚕は、無重力の宇宙で繭を作るのだろうか。
地上での模擬微小重力装置を使ったカイコの営繭行動と糸の性質の解析結果、1997年にスペースシャトルにカイコの卵を滞在させた実験結果、2008年にカイコの卵を国際宇宙ステーションに6ヶ月滞在させるための地上予備実験の結果について解説した。

『演 題』 カイコのお話し

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター准教授
本財団 評議員

一田昌利

日時・場所 平成18年6月25日

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター

対 象 者 京都科学読み物の会 約100名

講演要旨

カイコの歴史、生活環などカイコと桑に関する基本的な説明をした。

『演 題』 フィブロインの分解酵素

京都工芸繊維大学応用生物学部門准教授 角田素行

日時・場所 平成18年7月22日 東京農業大学 グリーンアカデミー 3F

対 象 者 野蚕糸、野蚕織物の製造業者、販売業者、カイコ及び野蚕の研究者、東京農業大学教職員、大学院生、学生

講演要旨

「東京農業大学総合研究所研究会 第112回フォーラム新昆虫産業の最前線（第2回）ー絹タンパク研究を新ビジネスへー」の5つの講演の一つとして、カイコのフィブロイン分解酵素の発見の経緯、その特性、更にカイコと野蚕の酵素の特性と相違点、酵素製剤

としての可能性について述べた。

【演 題】 カイコ卵の休眠代謝と耐寒性

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター教授
本財団 理事

古澤壽治

日時・場所 平成18年8月29日 京都工芸繊維大学嵯峨キャンパス 学道会館大研修室
対 象 者 大学院学生 研究者 大学教員
講 演 要 旨 カイコの休眠卵と非休眠卵に蓄積するソルビトールは卵の過冷却点の降下と休眠継続に寄与するとともに、胚の発育にも影響を及ぼす。このソルビトールは、休眠卵ではphosphofructokinase (PFK) がリン酸化され不活性のため、生成される。そして、胚の発育の中期よりPFKが脱リン酸化されることによって活性化され、解糖系が作動する。また、卵が置かれる保護温度下では、PFKは2量体や6量体の状態になることによって活性が調節されると推察され、休眠及び非休眠卵のソルビトール蓄積とPFKの活性調節機構および耐寒性との関連を述べた。

【演 題】 トウモロコシ加害害虫 (*Anomala sp.*) の微生物的防除法の確立

京都工芸繊維大学名誉教授

本財団 評議員

松本継男

日時・場所 平成18年9月10日～平成18年9月15日
中国、河北省農科院植物保護研究所 (植保研)
対 象 者 植保研微生物防除研究室員 (8名 馮書亮教授) 及び河北農業大学大学院生 (Mc 3名 Dc 2名)
講 演 要 旨 河北省の主要作物の一つであるトウモロコシを加害する害虫 (甲虫類) の微生物的防除法の確立を図るプロジェクトに参画した。殺滅すべき害虫は、現地調査ですでにコガネムシ科の幼虫 (*Anomala sp.*) と同定されたもので、今年度は圃場より採取した当該害虫の斃死固体より、対象微生物としてウイルスおよび細菌の検索と分離・同定が主要課題であった。生物検定の結果、加害虫の殺滅に有効な数種の細菌株が得られた。

【演 題】 クワ・カイコ・シルクからの素敵な贈り物

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター准教授
本財団 評議員

一田昌利

日時・場所 平成18年10月17日 京都工芸繊維大学京丹後キャンパス地域連携センター
対 象 者 一般 30名
講演要旨 今、機能性が注目されるクワ・カイコ・シルクに関し、その可能性と将来性を説明した。

発行所 財団法人 衣笠会 繊維研究所
〒603-8326
京都市北区北野下白梅町29
TEL 075-461-5949
TEL/FAX 075-463-6679
E-mail zai-kinugasakai@nifty.com
http://www.soc.nii.ac.jp/kinugasa/

会 長 林 幸 之

印刷所 為国印刷株式会社
〒604-8457
京都府京都市中京区西ノ京馬代町6-16
TEL 075-462-7889
FAX 075-464-3923