

家蚕の再出卵発現にともなう酸—アルコール可溶性 タンパク質量の変動

小原隆三*・佐野 泉**・甲斐英則**

昭和 56 年 8 月 1 日受付

Acid-Ethanol Soluble Protein in Relation to Unseasonal Termination of *Bombyx* Diapause

Ryuzo KOBARA,* Izumi SANO** and Hidenori KAI**

The relationship between unseasonal termination of *Bombyx* diapause and protein concentration in eggs was investigated in order to clarify a mechanism of diapause termination from a viewpoint of protein metabolism.

The unseasonal termination was obtained by keeping diapause eggs at 15°C, and not at the summer temperature of 25°C. Proteins in the eggs were fractionated into two fractions, a TCA insoluble fraction and an acid-ethanol soluble fraction, concentrations of which were determined colorimetrically. During 25°C incubation, both fractions did not change in concentration significantly, while the acid-ethanol soluble protein increased as the unseasonal termination ratio increased during the 15°C keeping of eggs.

These results would indicate that some physiological development proceeds to increase the particular protein before morphogenesis may be resumed.

緒 言

昆虫休眠の開始と終結には、遺伝子レベルの調節が関与している¹⁾。家蚕卵の休眠は、人為的に容易に制御できる発生形態であることから、真核生物の遺伝子発現調節に関する生化学的実験系の有効なモデルとも考えられており²⁾、休眠終結すなわち活性化は、蚕種保護など生産の場でも重要な問題となっている。

家蚕卵の休眠終結は、越冬すなわち低温接触の他、高濃度の塩酸に浸漬する浸酸法をはじめとして、種々の手段によって達成され得る。しかし、蚕種保護上最も問題となるのは、再出卵とよばれる一種の不時休眠終結卵で

ある。

家蚕の非休眠卵は、淡黄色で、産下後 2 週間以内には孵化する。一方、休眠卵は、黒種と称されるように、藤ねずみ色など黒く着色し、翌春にならないと孵化しない。ところが、再出卵は黒く着色し休眠卵とみられるにもかかわらず、以下に述べる洗落しなどの物理的刺戟により、不時に休眠が破れ孵化する。著者らは、家蚕卵の活性化機構を、この再出卵の観点から検討をすすめている。

再出卵発現機構については、既に、休眠卵の色素原物質(3-ヒドロキシキヌレンイン:3-OHK)の蓄積及び消費の面から検討されており、越年性物質(抑制質)の卵内移行の低下が基本的な機構であると考察されている^{11,12)}。

* 鳥取大学農学部附属農場

University Farm, Faculty of Agriculture, Tottori University

** 鳥取大学農学部農学科応用昆虫学研究室

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tottori University

抑制質と称されるこの仮説上の物質は、今日では、卵の中の休眠ホルモン(DH)と考えられており、ある種のタンパク質と結合して卵内に移行すると推察されている^{2,4)}。したがって再出卵についても、このDHの卵内移行の問題として検討を進める必要がある。そこで本研究では、まずDHと密接な関係にあるタンパク質、酸-アルコール可溶性タンパク質、について、再出卵発現にともなう卵内含量の変動を測定し、再出卵発現の機構について考察した。

材 料 と 方 法

1. 供試蚕品種及び卵の保護

供試蚕品種は、1年間に2回発生できる2化性品種の大造であり、25°Cで16時間以上の光条件下で孵化させ(高温明催青)て休眠卵産性蚕を得た。羽化産卵後、標本抽出誤差を小さくするために、産卵台紙を1/8蛾分ずつにわけ、それぞれ15°C及び25°Cに保護した。

2. 再出卵発現処理

再出卵発現率に最も大きな影響をおよぼす条件は、産下卵の保護温度及び水中にて台紙より卵をはなす操作(洗落し)の方法である。また、蛹の保護温度も影響がある。後者については、蚕品種により差があり⁸⁾、以下に述べる洗落し時期による差もある⁹⁾が、高温(30°C)でない方が再出卵発現率は高い。したがって本実験では、蛹の保護温度を25°Cとした。前者の卵保護温度及び洗落し方法については、河合の報告を参考にして次のように行った^{5-7,10)}。産下卵は25°C及び15°Cに保護し、産下10日後から10日毎に洗落した。洗落しは、約3蛾分の卵を2.5°C及び25°Cの水を用いて行い、室温にて風乾後、高温明催青し、洗落し15日後に孵化歩合を調査した。

3. タンパク質量の測定

タンパク質は、三塩化酢酸(TCA)不溶性分画及び酸-アルコール可溶性分画にわけて定量した。これら2分画の分離は、Kai and Hasegawaの方法によって行った³⁾。すなわち、卵の10%水磨砕物に等量の10% TCAを加え、生じた沈澱をまず95%エタノールで抽出し、この残渣を更に0.5% TCA含有90%エタノールで抽出した。この両抽出分画を合して酸-アルコール可溶性分画とした。また、上記の0.5% TCA含有90%エタノールによる抽出残渣を、更にエタノール・エーテル(3:1)及びエーテルで洗浄して得た沈澱をTCA不溶性分画とした。両分画ともにLowryらの方法¹⁴⁾で定量し、牛血清アルブミン(Fraction V)等量で表示した。なお、上記2分画の合計量を卵の全タンパク質量とし、結果はいずれも三連の平均値で表示

した。

測定は、産下直後(試料の変異を小さくするため、産卵開始から2時間以内の卵を集めた)、産卵2日後、及び各洗落し時期の5日前から1日おきに孵化するまでの卵のおの0.5gについて行った。

結 果 と 考 察

1. 再出卵発現歩合

卵3蛾分約600粒について、産下後の各時期に洗落しを行ったところ、第1図のような結果が得られた。

まず、25°C保護の卵についてみると、2.5°Cの水で洗落した場合、産下10日後処理で約15%の孵化がみられたのみで、20日以降はほとんど再出卵は発現しなかった。また、25°Cの水で洗落し区及び洗落しをせず25°Cで保護しつづけた区では、再出卵はほとんどみられなかった。産下10日後の洗落しによってわずかではあるが孵化のみられることは、高温明催青を行っても本供試蚕が休眠性のややあさい卵(いわゆる軟性卵)を10%強産下する傾向のあることを示唆する。しかし、上述のように25°Cで60日間保護しつづけても孵化はみられなかったことから、本実験に必要な休眠性は十分に獲得しているものと考えられる。

一方、この卵を15°Cで保護した場合は大きく異なっていた。すなわち、2.5°Cの水で洗落しを行った場合、産下10日後で40%弱の孵化がみられた。この孵化歩合は、産下後の時間とともに上昇し、産下60日後でほぼ100%が孵化した。しかし、25°Cの水による洗落し処理及び洗落しはせず15°Cから25°Cへ保護条件を変化させただけのものからは、より低い孵化歩合しか得られなかった。つまり、15°C保護、2.5°Cの水による洗落しは、効率の良い再出卵発現処理であることが判明した。なお、産下60日後になると、2.5°C水区、25°C水区及び無処理区いずれも高い孵化歩合を示した。これは、15°Cという比較的低い温度に2か月間接触すると、大造卵では休眠が破れはじめることを推察させる。したがって、いわゆる再出卵の発現から卵の活性化を考察するためには、15°C保護10~50日の卵について検討する必要がある。

2. 再出卵発現と卵タンパク質量の変動

まず、洗落し処理後のタンパク質量を経時的に測定した。第2図は、25°C保護卵を2.5°Cの水で洗落した場合の結果である。全タンパク質量は、産下20日後卵で約90 mg/g eggsであった。この卵を洗落したところ、黒印で示されるように、処理直後そのタンパク質量が上昇した。このような傾向は産下30日後及び40日後の卵についても

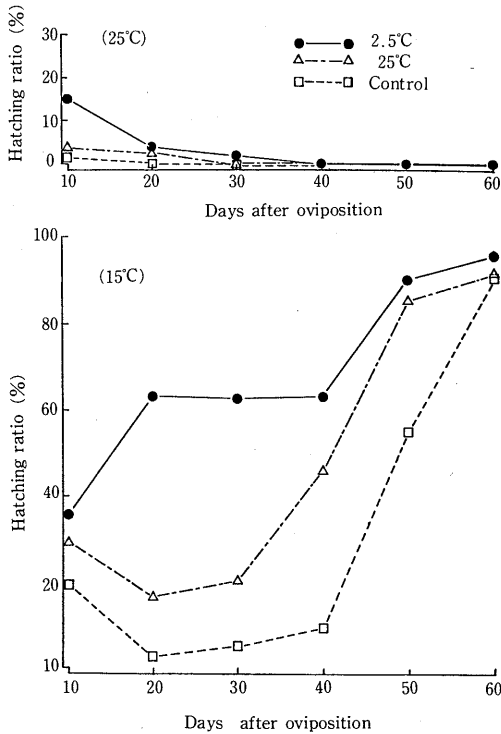


Fig. 1 Changes in hatching ratios after the treatment of egg loosening. Eggs were kept at 25°C (upper panel) or 15°C (lower panel), and after the treatment they were all incubated at 25°C. The treatments of egg loosening were carried out every 10 day by water of 2.5°C or 25°C. Controls mean no treatment in upper panel and transferring eggs from 15°C to 25°C incubation in lower panel. Hatching ratios were counted 15 days after the treatment and included died eggs after body pigmentation stage (the same applies to Fig. 5)

認められ、それぞれ処理直後タンパク質量が増加し、1～数日後減少に転じた。しかし、50～70日後洗落しでは、処理後直ちに減少する傾向がみられた。TCA不溶性分画量は産下20日後卵で約72mg/g eggsであり、洗落し後は各時期とも上記全タンパク質の場合とほぼ同じ変動を示した。一方、酸-アルコール可溶性タンパク質は、その卵内全量が少なく、洗落しを行った場合もTCA不溶性分画とは異なる動きを示した。

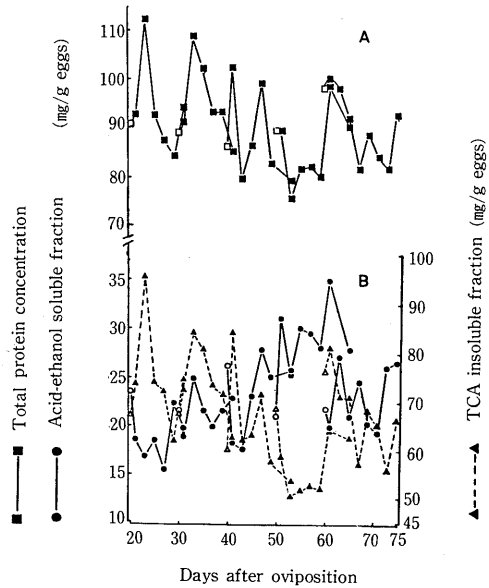


Fig. 2 Changes in protein concentrations of eggs incubated at 25°C after egg loosening by water of 2.5°C. Eggs were kept at 25°C except at the treatment. A, total protein ; B, trichloroacetic acid (TCA) insoluble and acid - ethanol soluble fraction (the same applies to the following Figures). Open symbols, values for just after the treatment (the same applies to Fig. 3).

第3図は、再出卵発現条件である15°C保護卵についての結果である。まず、全タンパク質量についてみると、変動幅がやや大きいこと、産下40日後処理でそのタンパク質量が低下すること、また産下60日後処理での上昇程度が大きいことなど、25°C保護卵の場合に比較して若干の差異が認められた。しかし、その他には再出卵発現率にみられるような顕著な差異はなかった。また、TCA不溶性分画、酸-アルコール可溶性分画についても、ともに、25°C保護卵との間に顕著な差異は認められなかった。

このようなタンパク質量変動の生理学的意義については、現在のところ不明である。しかし、15°C保護の洗落し卵と25°Cの卵との間に顕著な差異の認められなかったことは、再出卵発現後の代謝と卵の保護温度条件との関係はほとんどないことを推察させる。

次いで、洗落しをする前、すなわち15°C及び25°C保護中の卵のタンパク質量の変動について検討した。第4図

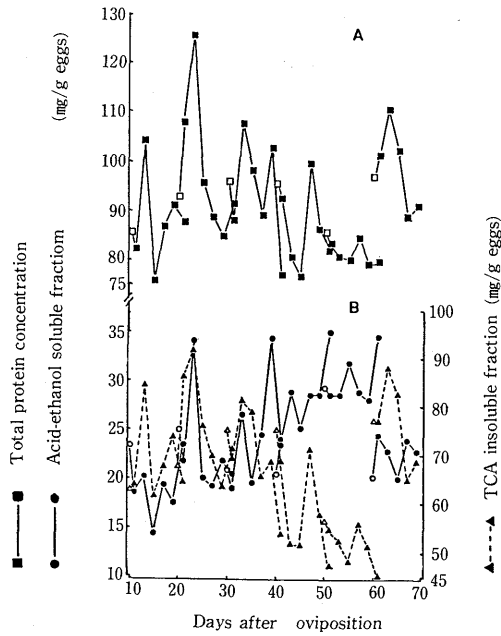


Fig. 3 Changes in protein concentrations of eggs kept at 15°C after the treatment of egg loosening by water of 2.5°C. Eggs were kept at 15°C before the treatment, and were transferred to 25°C after the treatment.

は、25°C保護卵についての結果である。産下直後約65mg/g eggsであった全タンパク質量は急上昇し、25°C保護15日後には102mg/g eggsとなった。その後は±10mg程度の増減を繰り返しながら、約90mg/g eggsを中心とした値であった。また、TCA不溶性分画量も産下直後から上昇し、20日以降70mg/g eggs弱の値を中心として変動した。酸-アルコール可溶性タンパク質も、産下20日以降約25mg/g eggs弱を中心とする値を維持しつづけた。

これに対して、15°C保護区では異った結果が得られた。第5図にみられるように、全タンパク質量の産下15日後までの上昇は25°C保護の場合とほとんど同じであった。しかし、その後25°Cに比較してその増減の程度は小さくなり、またその値も時間とともにやや上昇する傾向にあった。そこで、2分画それぞれについて検討した。その結果、TCA不溶性タンパク質量の変動は25°C保護の場合とほとんど同じであったが、酸-アルコール可溶性分画の含量が25°C保護とは異なっていた。すなわち、その含量は産下後15~20日後にいったん低下したあと上昇に転

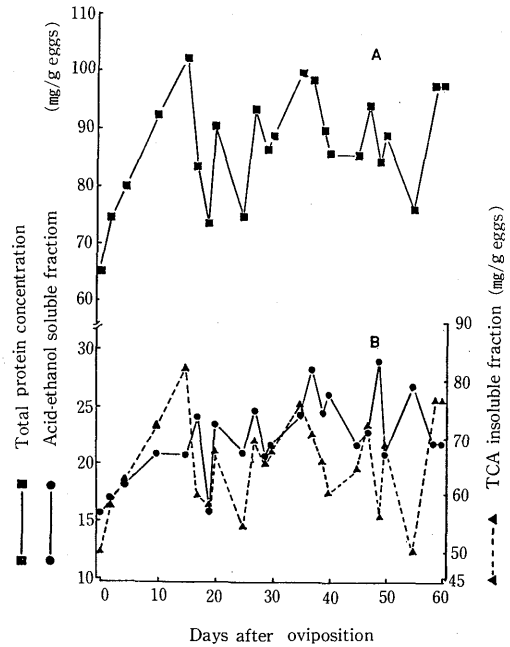


Fig. 4 Changes in protein concentration of eggs during 25°C incubation.

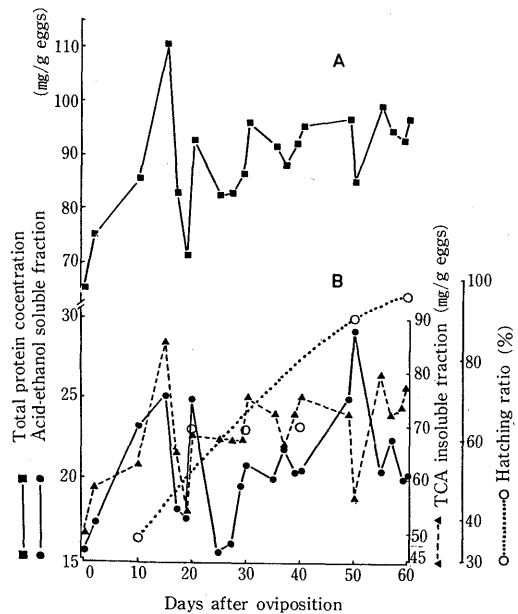


Fig. 5 Changes in protein concentrations of eggs during 15°C keeping and hatching ratios after egg loosening by water of 2.5°C.

じた。この上昇は産下50日後までつづき、25日後卵の約2倍の含量となった。したがって、この酸-アルコール可溶性分画量の上昇が全タンパク質量の上昇に反映されたものと考えられる。更に、この15°C保護中における酸-アルコール可溶性タンパク質量の上昇期は、再出卵発現率上昇期に一致していた。

なお、このタンパク質量の上昇は、供試卵中の軟性卵含有率が小さくなれば、更に顕著になるものと推察される。

酸-アルコール可溶性タンパク質は、胚発生における神経胚誘導能を有するタンパク質の一種であり、また牛の初乳や昆虫のウイルス病罹病による多角体形成時など、いわゆる発生、発育の急速な進行時に認められるタンパク質である³⁾。このタンパク質が、蚕休眠卵に多く休眠卵では少ない³⁾。しかし、上述のように再出卵の発現のための保護中に再び増加することは、休眠卵の活性化と酸-アルコール可溶性タンパク質との密接な関係を推察させ、このタンパク質と休眠ホルモンの卵への移行との関係や、3-OHKをはじめとする種々の休眠現象との関連性について、更に検討を進める必要性のあることを暗示する。

総 括

家蚕の再出卵発現とタンパク質代謝との関連を検討する目的で、卵タンパク質量の変動を、三塩化酢酸不溶性分画及び酸-アルコール可溶性分画とにわけて測定した。

大造休眠卵を15°Cと25°Cとに保護したところ、再出卵は15°C保護の場合にのみ産下20日頃から出現しはじめ、経過とともに徐々に増加した。タンパク質量についてみると、25°C保護の場合は2分画ともほとんど変化しなかった。しかし、15°C保護の場合は、再出卵発現率の上昇にともなって酸-アルコール可溶性分画の含量が増加した。

以上の結果から、胚発生時などにみられる酸-アルコール可溶性タンパク質と再出卵発現との密接な関係が推察された。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費（一般研究(B)548071) によった。

文 献

- 1) Grzelak, K., Szczesna, E. and Lassota, Z. : Polyadenylated RNA in diapausing and developing embryos of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **9** 125-128 (1979)
- 2) 甲斐英則：休眠ホルモンの家蚕蛾卵巣および完成卵中における存在。日蚕雑, **46** 239~245 (1977)
- 3) Kai, H. and Hasegawa, K. : Studies on the mode of action of the diapause hormone with special reference to the protein metabolism in the silkworm, *Bombyx mori* L. I. The diapause hormone and the protein soluble in ethanol containing trichloroacetic acid in mature eggs of adult ovaries. 日蚕雑, **40** 199~208 (1971)
- 4) Kai, H. and Kawai, T. : Diapause hormone in *Bombyx* eggs and adult ovaries. *J. Insect Physiol.*, **27** 623~627 (1981)
- 5) 河合 孝：再出卵に関する研究 (I) 洗落用水の温度と再出卵の発生との関係。日蚕雑, **21** 253~254 (1952)
- 6) 河合 孝：再出卵に関する研究 (II) 洗落用水の低温に就て。日蚕雑, **23** 147~150 (1954)
- 7) 河合 孝：再出卵に関する研究 (III) 洗落による再出卵発現の要因について。日蚕雑, **25** 111~114 (1956)
- 8) 河合 孝：再出卵に関する研究 (VI) 蛹, 卵 (産下後10日間) の保護温度並びに散種洗落時間及び水温の再出卵の発現に及ぼす影響。日蚕雑, **28** 358~361 (1959)
- 9) 河合 孝：再出卵に関する研究 (VII) 催青温度, 洗落用水温度並びに洗落時期の再出卵の発現に及ぼす影響。日蚕雑, **29** 345~348 (1960a)
- 10) 河合 孝：再出卵に関する研究 (VIII) 蛹の保護温度と洗落時期 (産下後4日間と産下後40~70日間) が散種における再出卵発現に及ぼす影響。日蚕雑, **29** 349~351 (1960b)
- 11) 河合 孝：再出卵に関する研究 (XI) 再出卵の発現と3-hydroxykynurenineの卵内移行量並びに卵着色のための消費量との関係。応動昆, **6** 24~27 (1962a)
- 12) 河合 孝：再出卵に関する研究 (XII) 再出卵の発現とその機構について。鳥大農研報, **14** 8~15 (1962b)
- 13) 古賀克己：昆虫休眠へのアプローチ—リボソームRNA遺伝子を指標として—。化学と生物, **17** 637~639 (1979)
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** 265-275 (1951)