

倍数体カイコの体液タンパク質に関する研究

小原隆三*・河合 孝**

昭和53年8月31日受付

Studies on Haemolymph Proteins of Polyploid in the Silkworm, *Bombyx mori*

Ryūzō KOBARA*, Takashi KAWAI**

Differences in the quantitative or qualitative change of haemolymph proteins with the larval or pupal development were investigated to compare the polyploid with the diploid in the silkworm, *Bombyx mori*.

The haemolymph proteins were determined quantitatively or qualitatively by the method of Lowry *et al.* or acrylamide gel disc-electrophoresis.

The results were as follows.

There was little difference in the change of body weight with the larval or pupal development between the diploid and polyploid of silkworms.

The differences in the quantity of haemolymph proteins, especially female specific protein, and the ovarian development were recognized between the diploid and polyploid in the post-pupal stage. Namely, the concentration of haemolymph proteins in the polyploid was high as compared with that of the diploid but conversely, the ovaries were better developed in the diploid than the polyploid. Then, there were negative correlations between the quantity of female specific protein and the ovarian development (number of eggs) in those silkworm races.

From the fact that the female specific protein in the body-fluid of the polyploid was very high in concentration, we inferred that the female specific protein ought to be essentially incorporated into the ovary was forced to stay in the body-fluid by the inhibition of ovarian development produced by the polyploidy.

緒 言

昆虫の体液タンパク質は発育や変態あるいは栄養条件、疾病などによって量的ならびに質的に著しく変動することが明らかになっている。^{1,8,9,22)} また、体液タンパク質には雌雄差のあることが知られており、この雌に特異的に現れるタンパク質は雌特異的タンパク質あるいは vitellogenin と呼ばれている。^{1,7,20)} そして、これらは卵巣発育

または卵黄タンパク質との関連において研究されている。⁶⁾

しかし、雌特異的タンパク質の発現に関しては、2, 3の昆虫について研究が行われているが、カイコにおいてはこれらの発現の要因についてほとんど明らかにされていない。⁴⁾

本実験は倍数性カイコを用いて、体液タンパク質とくに雌特異的タンパク質の発現と倍数性との関連について研究した。その結果の概要について報告する。

* 鳥取大学農学部附属農場

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

材料及び方法

本研究に用いたカイコは $re\ 9$ と Tw_1 の交雑種の F_2 を対照として、これらの F_1 から産下卵冷却法で誘起した4倍体を用いて、原種あるいは F_1 との交雑による3倍体、4倍体相互交雑による4倍体など4系統である。¹⁷⁾ これらのカイコはいずれも北海道大学農学部玉沢享博士より恵与されたものである。それらの交配組合せは次の通りである。

rs 型 : $re\ 9 \times Tw_1$

A : $2N (2N \times 2N : rs \times rs)$

B : $3N (2N \times 4N : Tw_1 \times rs)$

C : $3N (4N \times 2N : rs \times rs)$

D : $4N (4N \times 4N : rs \times rs)$

カイコは約25°Cで桑葉育を行った。なお、倍数体カイコでは飼育中発育の著しく悪い個体は除外した。また、実験には主に雌を供した。

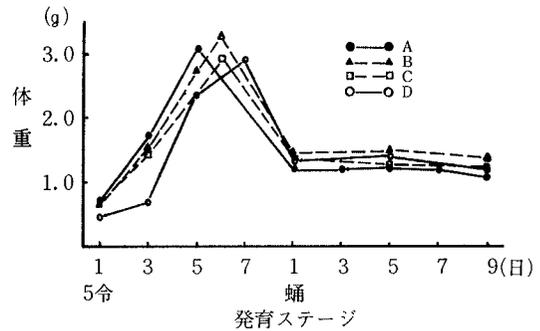
幼虫ならびに蛹の体重は5令起蚕より10ヶ体づ、1日おきに測定した。実験の進行に伴って10ヶ体を取り出せない時は測定可能な個体を測定してこの値とした。体液は5令起蚕より個体別に1日おきに採取した。ただし、別の電気泳動実験から幼虫期ならびに蛹3日までは系統内での個体変異がほとんどみられなかったので数ヶ体一括して供した。採取した体液は冷却したサンプル管に集め、少量のフェニールチオウレアを加えた後実験に供するまで-20°Cに凍結保存した。

タンパク質の定量はLowryらの方法で発色させ、牛血清アルブミン量に換算して行った。¹⁶⁾ タンパク質の分離にはアクリルアミドゲルを支持体としたディスク電気泳動法を用いた。²¹⁾ ゲル濃度は6.5%とし、泳動に用いた体液量は原則としてゲル当たり10 μ lとした。ゲルのタンパク質は0.1%アミドブラック10Bを用いて染色し、過染された部分は7%醋酸液で脱色した。その後、デンストメーター(OZUMOR 82型)を用いて、波長500 m μ でゲルの各タンパク質バンドの吸光度を測定し積分値を求めた。その積分値から雌特異的タンパク質含量の割合を算出して、タンパク質定量結果にこの割合を乗じて雌特異的タンパク質量とした。

卵巣は蛹7日、9日、成虫期に腹部を切開して卵巣をとり出し、写真撮影を行った後、卵粒数を調査した。

実験結果

5令期ならびに蛹期における体重の変化は第1図に示した。2倍体カイコ(対照)において、体重は5令初期



第1図 体重の変化(雌)

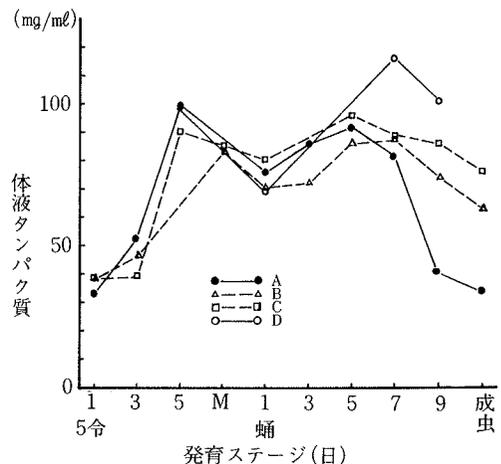
A $2N (2N \times 2N : rs \times rs)$

B $3N (2N \times 4N : Tw_1 \times rs)$

C $3N (4N \times 2N : rs \times rs)$

D $4N (4N \times 4N : rs \times rs)$

より急速に増加し始め熟蚕期前に最大に達して、その後蛹初期にかけて減少し、以後蛹期ではほとんど変化がみられなかった。倍数体カイコにおいてもその変化は2倍体カイコとほぼ同様なパターンを示した。しかし、4倍体カイコで5令初期にや、発育が遅れた。また、蛹期において2倍体カイコに比して倍数体カイコ、なかでも3N ($Tw_1 \times rs$) で蛹重が0.3gも多い結果が得られた。

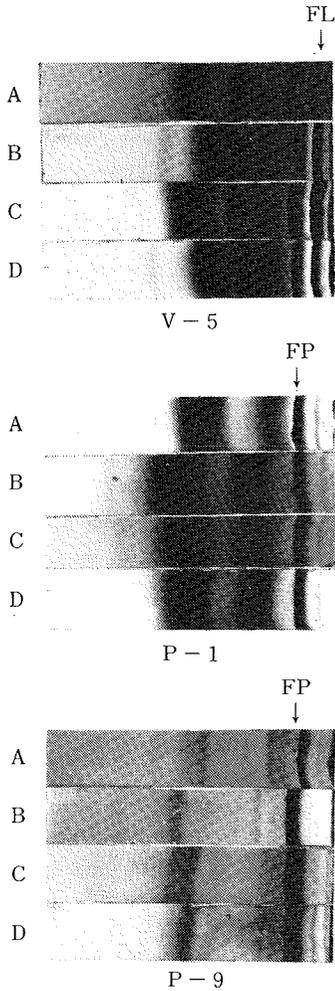


第2図 体液タンパク質量の変化(雌)

A $2N$ B $3N$ C $3N$ D $4N$

M 熟蚕

体液タンパク質量はLowryらの方法によって測定した。¹⁹⁾ その結果は第2図に示した。



第3図 体液タンパク質泳動像(雌)
 A 2N(2N×2N:rs×rs)
 B 3N(2N×4N:Tw₁×rs)
 C 3N(4N×2N:rs×rs)
 D 4N(4N×4N:rs×rs)
 V-5 5令5日
 P-1 蛹1日
 P-9 蛹9日
 FL 幼虫型雌特異的タンパク質
 FP 蛹型雌特異的タンパク質

幼虫期において、体液タンパク質は2倍体カイコで5令3日頃から急速に増大し始めて熟蚕期に最大に達し、以後蛹初期に向って低下するという変動を示した。倍数

体カイコにおいてもほぼ同様な変動パターンを示し、量的にも大差が認められなかった。

蛹期において、2倍体カイコでは中期頃まで若干増加がみられたが、その後成虫期にかけて急速に減少した。これに対して、倍数体カイコでは中期まで2倍体カイコと同様なパターンで若干増加する。しかし、その後の減少は少なく蛹末期では2倍体カイコに比して著しい高い濃度を示し、なかでも4倍体カイコでは2倍体カイコとの差が蛹9日で約60mg/mlと著しくなった。

幼虫期と蛹期における体液タンパク質をアクリルアミドゲル電気泳動法によって分別した結果は第3図に示した。

カイコの体液タンパク質には雌雄差が認められており、幼虫期では5令3日頃より雌より雄より著しく増加が認められる幼虫型雌特異的タンパク質(以下FLという)があり、蛹期では幼虫期とは若干移動性の高い所に現れる蛹型雌特異的タンパク質(以下FPという)の存在することが明らかにされている^{1,7)}

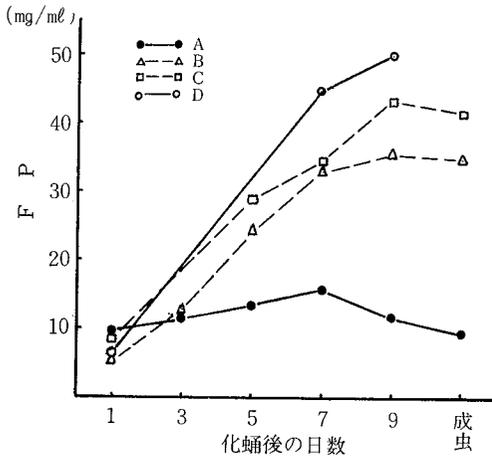
5令5日の泳動パターンについて見ると、FLバンドで2倍体カイコと倍数体カイコで大きな差異は見られない。その他のバンドにおいても若干の差異はみられるが倍数性によると思われる差異は認められなかった。

蛹1日では、幼虫期に高い濃度を示したFLは各系統ともほとんど消失して新たにFPバンドが雌に現れて来る。このFPバンドも倍数性による差異は認められず、その他のバンドにおいても濃度の差異は若干みられるがそのパターンにおいて差異は認められない。

化蛹後、泳動像は体液タンパク質濃度の変動と同様に若干各バンドの濃度の増加が認められるが5日頃より濃度が低下し始めて来る。しかし、倍数体カイコではFPの濃度が逆に増加して来た。図には蛹9日の泳動像を示した。これより2倍体カイコではFPバンドがわずかに見られる程度でその他のバンドはほとんど見られない状態である。これに対して倍数体カイコではFPバンドは著しく濃度が高く、その他のバンドも2倍体カイコに比してやゝ濃く現れた。

雌特異的タンパク質量は電気泳動像をデンストメーターにより測定し、吸光度の全積算に対する雌特異的タンパク質量の割合を算出し、その割合をタンパク質量値に乗じて求めたものである。その結果は第4図に示した。

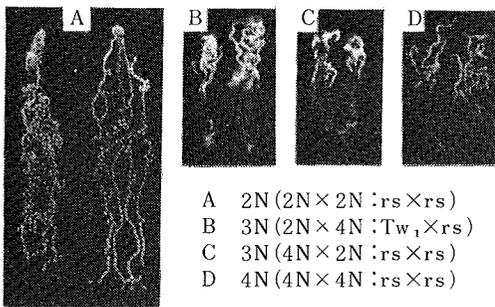
その結果、FP量は2倍体カイコで蛹中期までわずかに増加するが、その後急速に低下して行った。倍数体カイコでは蛹3日頃から2倍体カイコに比して著しく増加して行き、蛹9日頃最高に達した。そして、2倍体カイ



第4図 蛹期における雌特異的タンパク質量の変化
A 2N B 3N C 3N D 4N

コと4倍体カイコのFP量の差は最大35mg/mlとなった。その後、成虫期にはいずれの系統も若干濃度の低下がみられたが、FP量は倍数体カイコで2倍体カイコに比して著しい高い濃度を示した。

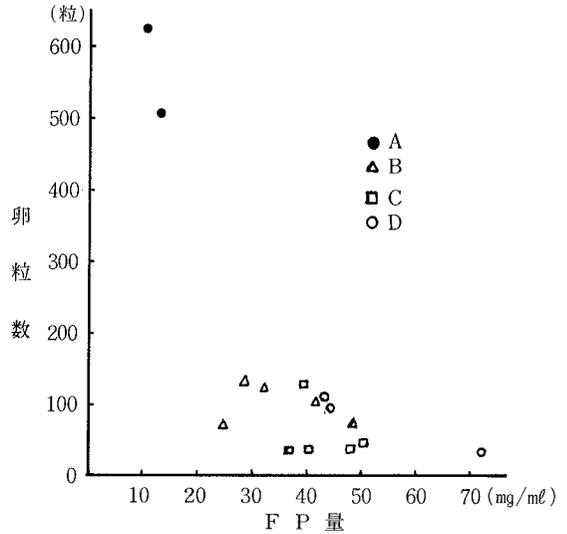
以上のように倍数体カイコにおいてはタンパク質特にFPで著しく高い濃度がみられた。その要因の一つとして卵巣発育との関係が考えられる。次に卵巣の発育状況



第5図 蛹9日における卵巣の発育状況

について調べた結果の一例を第5図に示した。蛹9日における卵巣の発育は2倍体カイコに比して倍数体カイコで著しく悪かった。そして、各系統内で卵巣発育には著しい個体差が見られた。即ち、蛹9日で4倍体では少ないもの35卵粒から多いもので107卵粒、3倍体(Tw₁×rs)では74~135卵粒などであった。

そこで、蛹9日に個体別の卵巣の発育状況(卵粒数)とFP量を調査した。その結果の相関は第6図に示すと



第6図 蛹9日における卵粒数とFP量の関係
A 2N B 3N C 3N D 4N

おりである。その相関係数は $r = -0.76^{**}$ で1%水準で有意な相関が認められた。即ち卵巣発育の悪い(卵粒数が少ない)個体は体液中のFP濃度が高いという関係が認められた。

考 察

倍数体カイコにおける体重の変化は2倍体カイコとほぼ同じ経過をたどり著しい差は認められなかった。しかし、幼虫体重においては倍数体カイコで2倍体カイコに比して成育もやゝ遅れ、個体変異も大きい傾向がみられた。また、蛹重では倍数体カイコで2倍体カイコよりやゝ重い傾向がみられた。このような結果から、本実験で倍数性と発育との関連について十分考察することは出来なかった。今後、さらに多くの事例について精査する必要がある。

体液タンパク質は脂肪体で合成されることが多くの研究者により明らかにされている。^{14,15)}そして雌特異的タンパク質も同じく脂肪体で合成される。¹³⁾たゞ、雌特異的タンパク質が雌のみで合成される原因については性染色体と関連して遺伝子そのものに雌雄差があるのか、より下

位の反応系に性差による調節があるのか不明な点が多い。しかし、Engelmann ら(1971)⁴⁾は雌特異的タンパク質の合成に関して、*Leucophaea maderae*, *Schistocerca vaga* と *Sarcophaga bullata* を用いて実験し、アラタ体を摘出した個体に JH を投与することによって雌特異的タンパク質の合成を報告している。カイコにおいてはこれらの要因について明らかにされていない。

本実験は体液タンパク質特に雌特異的タンパク質の発現と性染色体との関連をみるために倍数性カイコを用いて行った。カイコの場合、性染色体は2倍体雌で XY、雄で XX である。したがって、3倍体雌では XXY、4倍体雌の場合は XXYY あるいは XXXY であると考えられる。本実験で5令始めから蛹中期まで体液タンパク質ならびに雌特異的タンパク質の量的あるいは質的な変動パターンに倍数性による差異が認められなかった。このことは体液タンパク質の合成や脂肪体組織の崩壊など発育、変態に伴う生理活性が性染色体などの倍数化に影響されないものと考えられる。

カイコにおいて、卵巣は蛹3日頃より急速に発達し始め蛹期間中に完成する¹²⁾一方、蛹の脂肪体は除々に崩壊して行き、体液中にタンパク質などを遊離する。そして、それらのタンパク質は卵巣など各組織に再び直接、間接にとり込まれる。^{19,20)}

体液中の FP が卵巣にそのまま取り込まれることはアイソトープや免疫電気泳動などの実験から証明されている^{6,18)}また、卵巣の発育と体液タンパク質ならびに FP との関連を見るために、卵巣の摘出、移植実験、抗生物質などによる卵巣の発育阻害実験あるいは遺伝的に小形卵を作る系統 (sm) を使った実験などが行なわれており、これらの結果から卵巣を摘出した場合あるいはその発育を阻害した場合には蛹の後期から成虫期にかけて体液タンパク質特に FP は体液中に高い濃度で残留することが明らかにされている。^{2,3,5,10,11)}

本実験においても、卵巣発育が倍数体カイコで2倍体カイコに比して著しく悪かった。そして、蛹の中期から後期にかけて体液タンパク質の減少が2倍体カイコに比して倍数体カイコで少なかった。なかでも、FP は蛹後期においてや、多くなる傾向さえみられた。また、蛹9日の卵粒数と FP 量とは負の高い相関がみられた。この倍数体における卵巣の発育阻害は染色体の倍数化による不和合のためか、あるいはタンパク質など物質の取り込みが阻害されたためなのか、なお検討する必要がある。

以上、倍数体カイコで蛹後期に FP が高い濃度を示したことは卵巣の発育が悪くて、本来卵巣に取り込まれる

べき FP が卵巣に取り込まれずに体液中に残留したためと推察される。

摘 要

倍数体カイコを用いて、それらの発育と体液タンパク質の量的、質的な変化が倍数性とどのような関連があるかについて研究した。

体液タンパク質は Lowry らの方法及びアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて調査した。

その結果は次のようである。

発育に伴う体重の変化は2倍体カイコと倍数体カイコの間で大差がみられなかった。

体液タンパク質量、特に雌特異的タンパク質量及び卵巣の発達に関しては倍数性による差異が蛹後期において認められた。すなわち、2倍体カイコに比べて倍数体カイコにおいてはそれらのタンパク質濃度が高く、そして卵巣の発育が悪かった。また、雌特異的タンパク質量と卵巣発達との間には負の相関が認められた。

これらのことから、倍数体カイコにおける体液中の雌特異的タンパク質が高濃度を示したことは、本来卵巣へ取り込まれるべき雌特異的タンパク質が卵巣の発育抑制によって体液中に残留したためであろうと推察する。

本研究の一部は昭和52年～53年度の文部省科学研究費(課題番号256242)の援助により行った。最後に、本研究に当り心よく材料を恵贈いただいた北海道大学農学部玉沢享博士に対し深謝の意を表す。また、実験に当り援助をいただいた小松清明君、高崎雅明君ならびに原田禎治君らに謝意を表す。

文 献

- 1) 土井良宏：九大農芸雑誌，23 205 (1968)
- 2) Doira, H. and Kawaguchi, Y. : J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 17 119 (1972)
- 3) Doira, H. and Kawaguchi, Y. : J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 18 201 (1974)
- 4) Engelmann, F., Hill, L. and Wilkens, J. L. : J. Insect Physiol., 17 2179 (1971)
- 5) Kawaguchi, Y. and Doira, H. : J. Insect Physiol., 19 2083 (1973)
- 6) Kawaguchi, Y. and Doira, H. : J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 18 139 (1974)
- 7) 小原隆三：応動昆，11 71 (1967)
- 8) 小原隆三：応動昆，13 185 (1969)
- 9) 小原隆三・河合孝：鳥取農学報 21 18 (1969)

- 10) 小原隆三・河合孝：鳥大農研報, **23** 1 (1971)
- 11) 小原隆三・河合孝：鳥大農研報, **28** 124 (1976)
- 12) 小沢民治：日蚕雑, **28** 211 (1959)
- 13) Pan, M. L., Bell, W. L. and Telfer, W. H. :
Science, **165** 393 (1969)
- 14) Price, G. M. : J. Insect Physiol., **15** 931 (1969)
- 15) 重松 孟：蚕試報, **16** 141 (1960)
- 16) 副島正美・管原 潔：蛋白質の定量法, 東京大学出版会, 東京 (1971), pp.89~91
- 17) 玉沢 享・滝沢義郎：北大農邦文紀要, **10** 272 (1977)
- 18) Telfer, W. H. : Biol. Bull., **118** 338 (1960)
- 19) 藤條純夫：生物科学, **20** 102 (1968)
- 20) 藤條純夫・鎮西康雄：化学と生物, **12** 817 (1974)
- 21) Watanabe, H. : Appl. Ent. Zool., **3** 74 (1968)
- 22) 渡部 仁・小原隆三・保坂政子：日蚕雑, **37** 319 (1968)