

カイコ 5 令幼虫期から蛹期における ^{14}C -メチオニンの 各組織へのとり込み

小 原 隆 三・河 合 孝

(鳥取大学農学部応用昆虫学研究室)

Incorporation of ^{14}C -methionine into Some Tissues from the Fifth
Instar Larva to the Pupal Stage in the Silkworm, *Bombyx mori* L.

Ryūzō KOBARA and Takashi KAWAI

(Department of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, Tottori University)

A study on the protein metabolism during the metamorphosis from the last stage of the fifth instar larva to the pupal stage in the silkworm (*Bombyx mori* L.) was carried out by injecting carbon-14 labelled amino acid into the silkworm at various stages. Incorporation of ^{14}C -methionine into some tissues was detected by means of agarose gel electrophoresis and autoradiography. The results were as follows:

^{14}C incorporated into the haemolymph, and fat body proteins dwindled gradually with the development from the last stage of the fifth instar larva to three days after pupation. In the larval female, a large quantity of ^{14}C was incorporated into the protein band IV relevant to the female sex. In the ovary, the ^{14}C incorporation became slighter with the increase of protein concentration from the last stage of the larva to three days after pupation. In the larval stage, ^{14}C was greatly incorporated into the protein band IV, and also into the bands moving comparatively rapidly in the pupal stage. This suggests that in last stage of the larva ^{14}C -methionine incorporated into the haemolymph proteins of larval female, especially into the protein band IV, moves from the haemolymph to the fat bodies and further on to the ovary as metamorphosis proceeds.

緒 言

多くの昆虫で体液蛋白質は発育と変態に伴って変動し、また雌雄で差異のあることが明らかとなっている。体液蛋白質のあるものは脂肪組織で合成され、卵巣あるいは成虫組織へ直接とり込まれることが知られている^{1,5,10,11,17,18})。また、著者らは各種放射性アミノ酸の体液蛋白質へのとり込み実験から、 ^{14}C -メチオニンが雄よりも雌の体液蛋白質によくとり込まれ、しかも雌性に関連をもつ泳動帯の蛋白質(雌特異的蛋白質)に顕著にとり込まれることを明らかにした¹²)。しかし、体液蛋白質の各泳動帯の代謝やその機能について他組織との関連

において調べられた研究は少ない。

本実験においてはカイコの5令幼虫期から蛹期の変態期における ^{14}C -メチオニンの各組織へのとり込みについて調査した。本論文はこれらの結果をまとめたものである。

材料および方法

供試したカイコは普通飼育した大造である。蛋白質のアガロース・ゲル電気泳動法はすでに述べた方法と同様であるのでこゝでは省略する²³)。

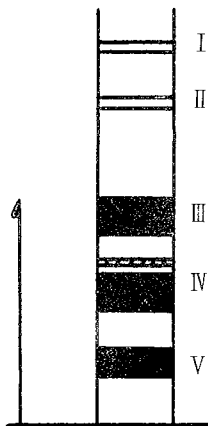
^{14}C -メチオニンの蛋白質泳動帯へのとり込みは電気泳

動像のオートラジオグラムによって調べた。オートラジオグラム作成の手順は次の如くである。¹⁴C-メチオニン(比放射能 56.8ci/mM, 0.01 N HCl 溶液, 放射能濃度 0.1mci/ml)を幼虫末期, 吐糸終了期ならびに蛹化3日目にそれぞれ1個体当たり 10 μ l 注射した。その後5から 140時間の間適当な時間に体液, 脂肪組織ならびに生殖巣をとり, 体液はそのまま, 脂肪組織と卵巣は少量の蒸留水を加えて磨砕後, 蛋白質を抽出しその上清を, 適当な長さに切った木綿糸に吸収させ電気泳動を行なった。泳動板はアミドブラック10Bで染色, 乾燥後X線フィルム(富士ノンスクリーン型No. 200)と密着させ, 2週間の露出後所定の現象を行なった。

実 験 結 果

本実験は大造を用いて幼虫期から 蛹期 への変態期に¹⁴C-メチオニンを注射しそのとり込みから, 体液, 脂肪組織および生殖巣における種々の時期の合成能の差異を知るために行なった。

各組織蛋白質のアガロース・ゲル電気泳動の結果, 陽極側へ移動する 6~10本の泳動帯が識別された。それらのうち濃染され量的にみて主要な泳動帯と考えられるものを移動度の高い方から記号をつけ模式的に示したのが第1図である。

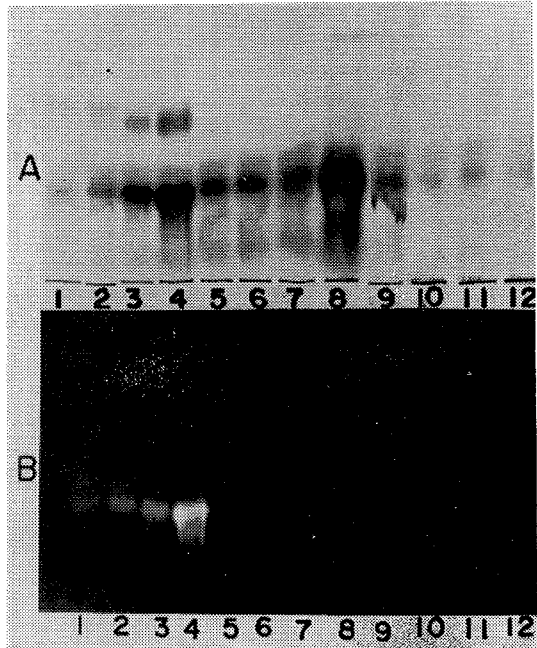


第1図 組織蛋白質のアガロース・ゲル電気泳動模式図

変態期において, 各組織間における蛋白質の関係についてみれば次のようである。体液では幼虫期に主な泳動帯Ⅲ, IVa, IVbならびにVが認められ, 吐糸終了前になると泳動帯Ⅲが消失する, そしてかわり泳動帯Ⅱがう

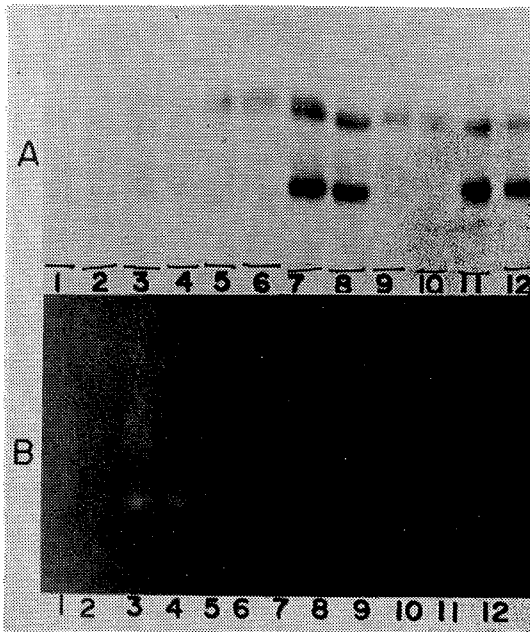
すくあらわれる。さらに蛹化3日頃にはやゝ体液蛋白質濃度がうすくなった。脂肪組織は幼虫期には非常に濃度がうすいが, 吐糸終了期には泳動帯ⅢとIVbが著しく濃くなる。しかし雄では泳動帯はあまり濃くあらわれない。蛹化3日でも吐糸終了期とほぼ同様な状態が認められた。精巣においては幼虫期, 吐糸終了期そして蛹化3日とも泳動帯Ⅰ, Ⅲ, IVa, IVbならびにVが認められ, 濃度において各期の間で大差がみられなかった。卵巣では泳動帯数は精巣とほぼ同様であった。しかし, 各泳動帯の濃度は幼虫期から蛹期へと進むにつれて濃くなった。また卵巣の泳動像では泳動帯ⅢとIVbが精巣の場合より濃くなり, 泳動帯Ⅰは逆に精巣より卵巣で若干淡くあらわれた。

发育段階の異なる大造に¹⁴C-メチオニンを注射し, 5時間後に体液, 脂肪組織ならびに生殖巣へのとり込みをオートラジオグラフィにより調べた。その結果は第2~4図に示すとおりである。



第2図 各发育段階における¹⁴C-メチオニンの体液へのとり込み

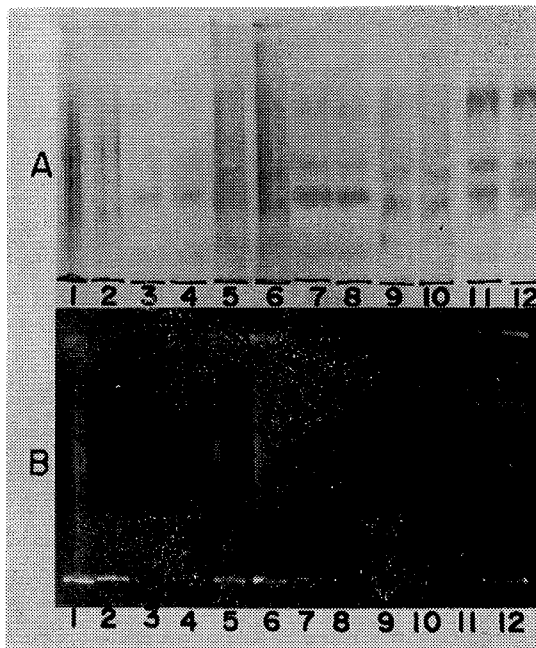
1,2: 熟蚕期♂, 5,6: 吐糸終了期♂, 9,10: 蛹化3日♂,
3,4: " ♀, 7,8: " ♀, 11,12: " ♀,
A: 蛋白質泳動像 B: オートラジオグラム, 注射後5時間



第3図 各発育段階における ^{14}C -メチオニンの脂肪組織へのとり込み

1,2: 熟蚕期♂, 5,6: 吐糸終了期♂, 9,10: 蛹化3日♂
3,4: " ♀, 7,8: " ♀, 11,12: " ♀

A: 蛋白質泳動像 B: オートラジオグラム, 注射後5時間

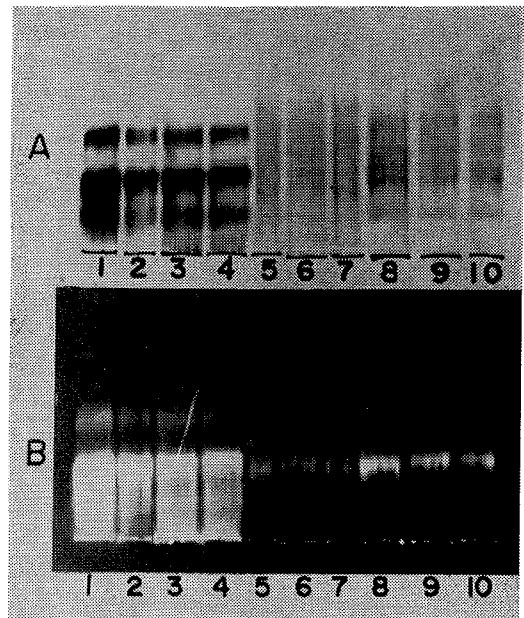


第4図 各発育段階における ^{14}C -メチオニンの生殖巣へのとり込み

1,2: 熟蚕期♂, 5,6: 吐糸終了期♂, 9,10: 蛹化3日♂
3,4: " ♀, 7,8: " ♀, 11,12: " ♀

A: 蛋白質泳動像 B: オートラジオグラム, 注射後5時間

体液では熟蚕期, 泳動帯IVb へのとり込みが最も多く, 他の泳動帯へのとり込みは少なかった。また雄よりも雌で多くとり込まれた。次いで吐糸終了期, 蛹化3日と発育段階の進むにつれてとり込みは減少した。脂肪組織では蛋白質量は熟蚕期に比して吐糸終了期, 蛹期の初めにおいて著しく多いが, ^{14}C -メチオニンのとり込みは体液と同様幼虫期に最も多く, 次いで吐糸終了期, 蛹期と徐々に少なくなった。またこの間雄より雌で多く, しかも泳動帯IVb へのとり込みが多い傾向がみられた。精巣では幼虫期, 吐糸終了期において各泳動帯への ^{14}C -メチオニンのとり込みがみられたが, 蛹化3日では若干それより少なくなった。卵巣では熟蚕期, 吐糸終了期ならびに蛹化3日と発育段階の進むにつれて蛋白質量の増加がみられ, それとともに ^{14}C -メチオニンのと



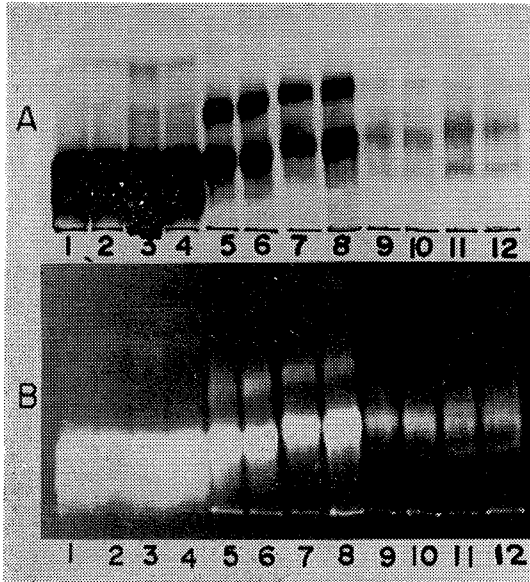
第5図 熟蚕期における ^{14}C -メチオニンのとり込み (大造, 雌)

1~4: 体液, 5~7: 脂肪組織, 8~10: 卵巣

A: 蛋白質泳動像 B: オートラジオグラム, 注射後20時間

り込みも若干増加した。幼虫期には体液, 脂肪組織と同様泳動帯IVb へのとり込みが多く, 蛹期には移動性の高い泳動帯IおよびIIIへのとり込みが他の泳動帯に比して多い傾向がみられた。

次に大造雌を用いて, 熟蚕期に ^{14}C -メチオニンを注射し, その後時間の経過とともに放射能がどのよう



第6図 吐糸終了期における ^{14}C -メチオニンのとり込み(大造, 雌)

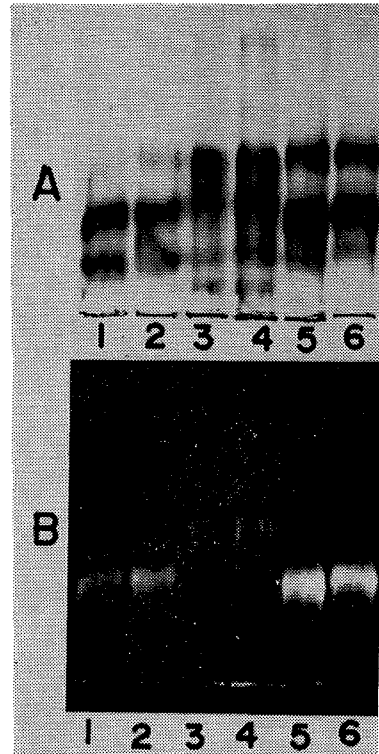
1~4: 体液, 5~8: 脂肪組織, 9~12: 卵巣,

A: 蛋白質泳動像 B: オートラジオグラム, 注射後68時間

な組織の蛋白質成分に移動するかを調べた結果は第5~7図に示すとおりである。

図からわかるように ^{14}C -メチオニンのとり込みは熟蚕期は体液で最も多く、次いで卵巣、脂肪組織である。しかも泳動帯IVbへのとり込みが最も多かった。熟蚕期に体液蛋白質にとり込まれた ^{14}C -メチオニンはその後、吐糸終了期、脂肪組織の蛋白質濃度の増加とともに脂肪組織にかなり転移し、特に泳動帯IVbに著しく多くみいだされた。蛹化4日(注射後140時間)においては体液、脂肪組織に比して卵巣での蛋白質濃度が高くなり、特に卵巣内での泳動帯IVbで ^{14}C -メチオニンをとり込んだ蛋白質が著しく多くみられた。

以上のように ^{14}C -メチオニンの組織蛋白質へのとり込みは各組織あるいは发育段階により異なり、また熟蚕期体液蛋白質中、とくに泳動帯IVbへとり込まれたものは幼虫期から蛹期への変態期に脂肪組織から卵巣へと転移するものと考えられる。



第7図 蛹化4日における ^{14}C -メチオニンのとり込み(大造, 雌)

1~2: 体液, 3~4: 脂肪組織, 5~6: 卵巣,

A: 蛋白質泳動像 B: オートラジオグラム, 注射後140時間

考 察

さきに ^{14}C -メチオニンは体液蛋白質の雌性に関連ある泳動帯に多くとり込まれることを明らかにした¹²⁾。さらにこの点を究明するために、カイコの幼虫期から蛹期の変態期に ^{14}C -メチオニンを注射して各組織蛋白質へのとり込みについて調べた。その結果、 ^{14}C -メチオニンのとり込みは各組織あるいは发育段階により異なり、また熟蚕期体液蛋白質中にとり込まれたものは変態期に脂肪組織から卵巣へと転移するものと考えられる。

TOBE and LOUGHTON²²⁾は*Locusta*の5令幼虫で ^3H -ロイシンの体液蛋白質へのとり込みについて調べ、令の初めと終りでは少なく、体液蛋白質の増加の著しい時に最高のとり込みを示すことを報告している。

重松²⁰⁾はカイコの4眠期から蛹期間の发育過程に伴う脂肪組織の蛋白質合成能の変化を調べ、合成能の変化が組織呼吸活性の変化と極めてよく一致し、さらに5令中期と吐糸中期に蛋白質合成反応に2つの重要な時期

が存在することを明らかにした。STEVENS ON and WYATT²¹⁾はセクロピア蚕の脂肪組織を¹⁴C-ロイシンにインキュベートし全蛋白質へのとり込みを調べた。その結果、成熟幼虫の脂肪組織へのとり込みが多く、休眠蛹では幼虫の0.3%、成虫期には幼虫期の約10%に上ることを報告している。PRICE¹⁶⁾も *Phormia regina* の幼虫脂肪組織へのU-¹⁴C-パリンのとり込みを *in vitro* で研究し、4日目まで最高とり込みを示し、令が進むにつれて徐々に減少することを示している。このように体液ならびに脂肪組織における放射性アミノ酸のとり込みは発育の段階により異なるものと考えられる。

本実験においても体液ならびに脂肪組織への¹⁴C-メチオニンのとり込みは主として泳動帯IVbにみられ、そして幼虫期から蛹期にかけて減少していった。しかも雄に比べて雌に多い傾向がみられた。また、卵巣では発育に伴って若干増加することが明らかとなった。

つぎに、吐糸終了期においては脂肪組織への¹⁴C-メチオニンのとり込みが少なにかかわらず、脂肪組織蛋白質の濃度の増加がみられた。一方、熟蚕期に¹⁴C-メチオニンを注射した個体では多くの放射能が脂肪組織蛋白質の泳動帯IVbに見出された。このことは幼虫期に体液蛋白質、主として泳動帯IVbにとり込まれた¹⁴C-メチオニンが変態期、脂肪組織へ転移し多く貯蔵されたためと考えられる。

重松・竹下¹⁹⁾はカイコの変態に伴う脂肪組織の主要成分の変化について調べた。なかでも蛋白質は特徴的な変化を示し、5令中期まで増加した蛋白質量は以後熟蚕までほぼ一定に保たれ、吐糸期に急速に増量して2倍強となることを示している。また、KILBY⁹⁾は幼虫で脂肪組織が脂質、炭水化物、蛋白質の貯蔵センターとして作用し、そして中間代謝の中心的場所であることを示している。さらにCHIPPENDALE and BECK²⁾はアワノメイガで、CHIPPENDALE and KILBY³⁾は *Pieris* で、HUDSON⁷⁾は *Protoparce quinque maculata* で、そしてCOLLINS and DOWNE¹⁾は *Galleria* で脂肪組織が体液蛋白質を貯蔵することを示した。

一方、細胞組織学的にも研究が行なわれている。LOCKE and COLLINS^{13,14,15)}は *Calpodex* の脂肪組織が終令幼虫に multivesicular bodies と貯蔵顆粒の型に体液蛋白質を蓄積することを示した。これは電顕による組織学的研究ならびに脂肪組織による放射性アミノ酸のとり込み割合の減少と脂肪組織が蛋白質顆粒を形成する時に体液蛋白質濃度の減少すること、さらにある他の蛋白質を体液に注射すると顆粒に現われることなどから証

明したものである。このように体液蛋白質が変態期、脂肪組織に貯蔵されることは明らかである。

卵巣は発育に伴ってその蛋白質質量を増加する、それに伴って¹⁴C-メチオニンのとり込みも若干増加した。そして、そのとり込みは幼虫末期から吐糸終了期には泳動帯IVbで多く、蛹化3日では移動性の高い泳動帯I、IIIに多い傾向がみられた。熟蚕期¹⁴C-メチオニンを注射した個体では発育の経過に伴って卵巣蛋白質、特に泳動帯IVbで高い放射能がみられるようになった。このことは幼虫末期に¹⁴C-メチオニンをとり込んだ体液蛋白質、特に泳動帯IVbの一部分が変態期に体液→脂肪組織→卵巣へと転移したためと考えられる。

管家ら⁸⁾はカイコの雌蛹の卵形成期に³⁵S-メチオニンを注射すると、それが卵殻へ多量にとり込まれることを認めている。これらの結果と本実験において、雌に特異的な泳動帯IVb(雌特異的蛋白質)に¹⁴C-メチオニンの顕著なとり込みが認められたことから、いわゆる雌特異的蛋白質はメチオニンあるいはメチオニンから転換したシスチンを多量に含んでおり、さらにその蛋白質は卵、特に卵殻形成に重要な関連をもっているのではないかと考えられる。

総 括

カイコの幼虫期から蛹期の変態期における蛋白質代謝を調べるために¹⁴C-メチオニンをういて研究した。

変態期の種々の発育段階に¹⁴C-メチオニンを注射して各組織蛋白質へのとり込みをアガロース・ゲル電気泳動像とそのオートラジオグラムから調べた。その結果、体液ならびに脂肪組織へのとり込みは幼虫末期から蛹化3日へと順次少なくなった。そして幼虫期、雌では雌性に関連ある泳動帯IVbへのとり込みが多かった。卵巣では幼虫末期から蛹化3日へと順次蛋白質濃度の増加とともにとり込みも若干増加した。そして幼虫期は泳動帯IVbへのとり込みが多く、蛹期は比較的移動性の大きい泳動帯へのとり込みが多かった。

幼虫末期、雌の体液蛋白質(特に泳動帯IVb)へとり込まれた¹⁴C-メチオニンは変態に伴って体液から脂肪組織、そして卵巣へと転移して行くものと考えられた。

最後に、実験について種々ご助言をいただいた東京大学農学部教授吉武成美博士ならびに渡部仁博士、さらに研究の便宜を与えられた東京大学農学部教授有賀久雄博士(現在東京農工大学農学部教授)に対し深謝の意を表す。また、本研究の一部は文部省科学研究費によって

行なわれた。ここに謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) CHEN P. S. and LEVENBOOK L. : *J. Insect Physiol.*, **12**, 1611 (1966)
- 2) CHIPPENDALE G. M. and BECK S. D. : *J. Insect Physiol.*, **13**, 955 (1967)
- 3) CHIPPENDALE G. M. and KILBY B. A. : *J. Insect Physiol.*, **15**, 905 (1969)
- 4) COLLINS J. V. and DOWNE A. E. R. : *J. Insect Physiol.*, **16**, 1697 (1970)
- 5) 土井良宏：九大農学芸雑，**23**，205 (1968)
- 6) 江口正治・政山亨・西村允子：日蚕雑，**35**，435 (1966)
- 7) HUDSON A. : *Can. J. Zool.*, **44**, 541 (1966)
- 8) 管家英治・吉武成美・関潔：日蚕雑，**39**，125 (1970)
- 9) KILBY B. A. : *Adv. Insect Physiol.*, **1**, 111 (1963)
- 10) 小原隆三：応動昆，**11**，71 (1967)
- 11) 小原隆三・河合孝：鳥取大農学会報，**21**，18 (1969)
- 12) 小原隆三・渡部仁：日蚕雑，**38**，386 (1969)
- 13) LOCKE M. and COLLINS J. V. : *Nature*, **120**, 552 (1966)
- 14) LOCKE M. and COLLINS J. V. : *Science*, **155**, 467 (1967)
- 15) LOCKE M. and COLLINS J. V. : *J. Cell Biol.*, **36**, 453 (1968)
- 16) PRICE G. M. : *J. Insect Physiol.*, **12**, 731 (1966)
- 17) SCHEURER R. : *J. Insect Physiol.*, **15**, 1673 (1969)
- 18) SHIGEMATSU H. : *Nature*, **182**, 880 (1958)
- 19) 重松孟・竹下弘夫：応動昆，**3**，123 (1959)
- 20) 重松孟：蚕試報，**16**，141 (1960)
- 21) STEVENSON E, and WYATT G. R. : *Arch. Biochem. and Biophys.*, **99**, 65 (1962)
- 22) TOBE S. S. and LOUGHTON B. S. : *J. Insect Physiol.*, **15**, 1659 (1969)
- 23) 渡部仁・小原隆三・保坂政子：日蚕雑，**37**，319 (1968)