

KK-42投与による3眠蚕の誘発と卵形成

河口, 豊
九州大学農学部蚕学教室

赤木, 俊介
九州大学農学部蚕学教室

古賀, 克己
九州大学農学部蚕学教室

藤井, 博
九州大学農学部遺伝資源研究センター

他

<https://doi.org/10.15017/23424>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 47 (1/2), pp.1-6, 1993-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

KK-42 投与による3眠蚕の誘発と卵形成

河 口 豊・赤 木 俊 介・古 賀 克 己
藤 井 博¹⁾・桑 野 栄 一²⁾

九州大学農学部蚕学教室
(1992年1月9日 受理)

Egg Formation in KK-42 Induced Trimolter of *Bombyx mori*

Yutaka KAWAGUCHI, Syunsuke AKAGI,
Katsumi KOGA, Hiroshi FUJII¹⁾
and Eiichi KUWANO²⁾

Laboratory of sericultural science, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

緒 言

カイコの卵形成を卵巣の発育状況からみると3期に大別される。第1は卵母細胞の数が増す増殖期、第2は卵黄物質の合成、分泌、蓄積と卵殻の構築を行う成長期、そして第3は第一成熟分裂に入る成熟期である(大槻, 1970)。これら3期の中で実質的な造卵の時期は卵黄形成と卵殻構築を行う「成長期」であり、蛹期の卵巣がこれにあたる。蛹期はガス交換を除けば閉鎖系であり、外部からの栄養物質の供給は無い。したがって、蛹期に行われる卵黄と卵殻の形成は幼虫期に桑葉から摂取し、体内に蓄積した種々の栄養物質にその全てを依存することとなる。

著者らは正常4眠蚕に早熟化を誘起するテルペノイドイミダゾール系化合物、KK-42 (Asano *et al.*, 1984; 桑野, 1987)を経皮投与することによって人為的に3眠蚕を誘発し、3眠化ならびに幼虫期に投与したKK-42が卵形成におよぼす影響を造卵能力、卵形態、卵黄タンパク質の面から調査・分析した。その結果、卵数の減少ならびに卵形が矮小化することを認めたので報告することにした。

本文に入るに先立ち、本研究を行う上で種々の有益な助言をいただき、また実験材料の吟味、育成について多大の協力をいただいた九州大学農学部遺伝子資源

研究センターの土井良 宏教授、供試材料蚕の飼育全般にわたり多大の援助を与えられた同センターの木原始氏にお礼申し上げる。

本研究の一部は文部省科学研究費、一般研究費 (B) No.03454060 によって行った。

材 料 と 方 法

1. 供試材料

九州大学農学部保存の正常4眠蚕で、正常卵を産下する実験雑種系 T011 を用いた。この系統には限性虎蚕遺伝子 T(W;3)Ze が導入されており、優性の斑紋遺伝子 Ze を含む第3染色体の断片が安定的に転座付着した W 染色体を有する。したがって本交雑系では雌においてのみ体表皮に虎蚕斑が発現されるので幼虫の初期からの雌雄の区別が容易であるという利点を持つ。

2. KK-42 の投与

テルペノイドイミダゾール系化合物 KK-42 はアセトンに溶解した。KK-42 溶液はマイクロシリンジを用いて4齢起蚕の背面表皮に1頭当たり0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100 および 300 μ g/50 μ l ずつ1回塗布投与した。アセトン溶液のみを塗布したものを対照区とした。各区とも雄20頭、雌20頭を供試した。

3. 卵形、卵重および卵数の調査

成虫化後直ちに解剖して卵管から取り出した完成卵を実体顕微鏡下で写真撮影し、長径と短径、側面積とを測定し拡大倍率により補正して実長と実面積とを求めた。また、雌成虫を解剖して1個体当りの造卵数を

1) 九州大学農学部遺伝子資源研究センター
2) 九州大学農学部農業化学教室

求めると共に、卵管から取り出した卵を蒸留水で数回洗浄し、風乾後の卵重を測定した。

4. 卵黄タンパク質の調製と定量

乳鉢中で卵を脱イオン水で軽く磨砕し、ガーゼで濾過して卵殻を除去した。濾液に等量の10%冷トリクロロ酢酸(TCA)溶液を加え、遠心分離後沈殿を得た。沈殿に5%冷TCA溶液を加え、数回洗浄を繰り返して酸不溶性画分とし、エタノール:エーテル(1:1)混液により脂質を除いて得られた沈殿に0.1N NaOHを加えて溶解した。この上清画分についてLowryの方法に準じ、牛血清アルブミンを標準タンパク質として定量した(林, 1983)。

5. 電気泳動分析

Davis (1964)とOrnstein (1964)の方法に準じ6.5%アクリルアミドゲルを支持体とする不変性試料を用いたディスク電気泳動である。泳動用試料は卵10粒をpH8.6, 20mM トリス-グリシン緩衝液100 μ l中で押し潰し、ガラス棒で充分攪拌して調製した。その溶液1カラム当り10 μ l(卵1粒/1カラム)を供した。泳動終了後、0.1%コマーディーブリリアントブルー R250溶液(エタノール:氷酢酸:水=4:1:5)でゲル中のタンパク質の固定と染色を行い、7%酢酸で脱色した。

結 果

1. 3眠化率と蛹体重

正常4眠蚕の4齢起蚕(3回目の幼虫脱皮直後の幼虫)にKK-42を1頭当り0.1, 0.5, 1.0, 5.0および10.0 μ gを体表皮に塗布投与した。その結果、それぞれの3眠化率は37.0, 44.8, 90.0, 100および100%となった。そこで以下の実験では、100%の3眠化率を得るためのKK-42の投与量として、1頭当り5 μ gを基準として、2, 10, 20および60倍量の投与区を設定した。誘発3眠化蚕(以下3眠蚕と称する)の蛹化1日における生体重をみると、対照区(アセトンのみ塗布した区で4眠蚕)が 1.87 ± 0.16 gであるのに対し10, 50, 100および300 μ g投与区ではそれぞれ 0.74 ± 0.08 , 0.70 ± 0.05 , 0.71 ± 0.06 および 0.65 ± 0.03 gとなり、いずれの投与区においても蛹体重はそれぞれ大きく減少したが(Fig. 1)、投与量の多少による蛹体重の変動はほとんど認められなかった。

2. 卵数、卵形および卵重

1頭当りの造卵数(調査個体数15頭)をみると対照区では 634 ± 31 粒に対し10, 50, 100および300 μ g投与区ではそれぞれ 250 ± 31 , 274 ± 41 , 257 ± 27 および 243 ± 15 粒となり、いずれの投与区においても対照区

に比べ大きく減少していた(Fig. 2)。しかしながら、その減少割合には投与量に対する依存性は認められなかった。

次に、それぞれの区の完成卵について卵形と大小を比較する簡便な方法として、任意に各区とも20~30個の卵を取り長径と短径および卵側面部の面積を測定した。その結果、対照区の長径は 1.41 ± 0.33 mm, 短径は 1.18 ± 0.04 mmであった。これに対し投与区ではKK-42の投与量に応じて長径は 1.33 ± 0.04 mm(10 μ g区)から 1.21 ± 0.04 mm(300 μ g区)まで、短径においては 1.11 ± 0.04 mm(10 μ g区)から 0.95 ± 0.04 mm(300 μ g区)まで長径、短径いずれにおいても対照区に比べて短くなっていた(Fig. 3)。長径および短径の短縮に伴って卵側面部の面積(測定個数50)においても、対照区が 1.49 ± 0.07 mm²であったのに対し投与区では 1.18 ± 0.06 mm²(10 μ g区), 1.10 ± 0.08 mm²(50 μ g区), 1.09 ± 0.06 mm²(100 μ g区)および 0.92 ± 0.05 mm²(300 μ g区)と減少し、長・短径における同様明瞭な容量依存性が認められた。(Fig. 4)。

一方、卵重(測定数15)をみると対照区では100粒あたり 64.9 ± 0.6 mgであったが、 52.9 ± 0.7 mg(10 μ g区), 48.5 ± 0.7 mg(50 μ g区), 47.3 ± 0.5 mg(100 μ g区)および 40.7 ± 0.7 mg(300 μ g区)と投与量が多くなるに伴って卵重は順次軽くなった(Fig. 5)。

3. 卵黄タンパク質の含量と組成

卵1粒当りの卵黄タンパク質の含量についてみると(Fig. 6)、対照区 61.1 ± 3.8 μ gに対し10 μ g投与区は 56.0 ± 4.7 μ g, 50 μ g投与区は 44.1 ± 1.8 μ g, 100 μ g投与区では 32.3 ± 2.3 μ gと逐次低下し、さらに300 μ g投与区になると 18.7 ± 1.3 μ gにまで大きな低下が認められた。

次にタンパク質組成をみると、対照区においては13種類の主要成分(Fig. 7, A~M)と数種類の微量成分とが検出された。KK-42を投与したいずれの区においてもタンパク質組成には対照区のそれとほとんど差異はなく、新たに出現する成分あるいは消失する成分は認められなかった。しかしながら、各投与区におけるそれぞれの成分濃度を色素染色性からみると、KK-42の投与濃度が高くなるに伴い全ての成分(A~M)について濃度低下が認められた。なお卵黄タンパク質の成分組成中J成分がvitellin, C成分がegg-specific protein(ESP; Irie and Yamashita, 1983)に相当するものと考えられる。

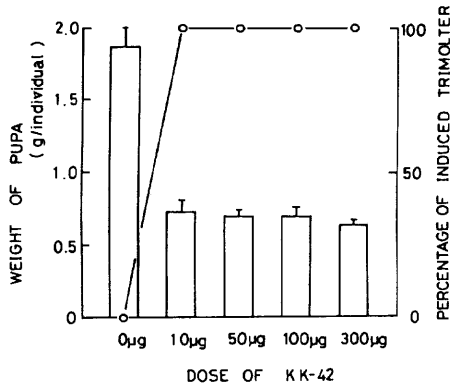


Fig. 1. Percentage of the trimolter individuals induced by application of KK-42 and the pupal weight. 0μg: Control, tetramolter (smeared with 50μl acetone). 10, 50, 100 and 300μg: smearing with 10, 50, 100 and 300μg KK-42, respectively in 50μl acetone. Boxes with vertical bars (standard deviation) indicate the average weight of a pupa and open circles stand for the percentages of trimolting animals. N=40.

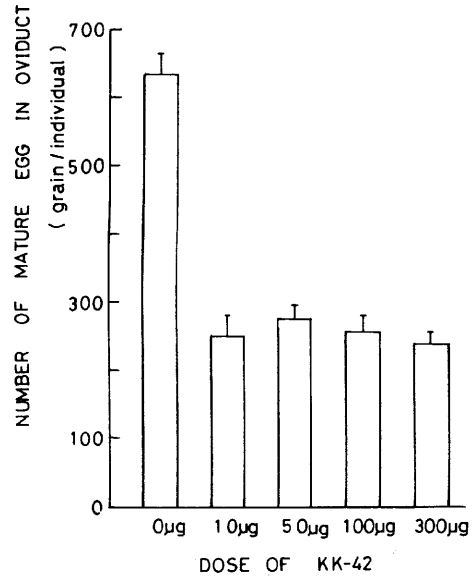


Fig. 2. Relation between the dose of KK-42 and the number of eggs produced in the trimolter pupae. Vertical bar, standard deviation. N=15. For abscissa, see the legend to Fig. 1.

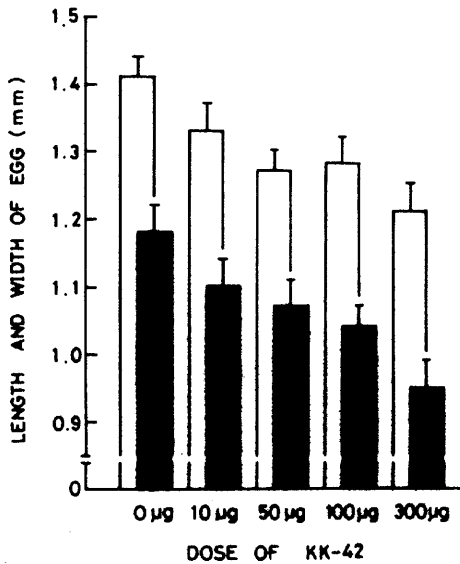


Fig. 3. Relation between the dose of KK-42 and the size of an egg produced. Open part and shadowed part in histogram indicate average length and width of an egg, respectively. N=20 to 30. Vertical bar, standard deviation. For abscissa, see the legend to Fig. 1.

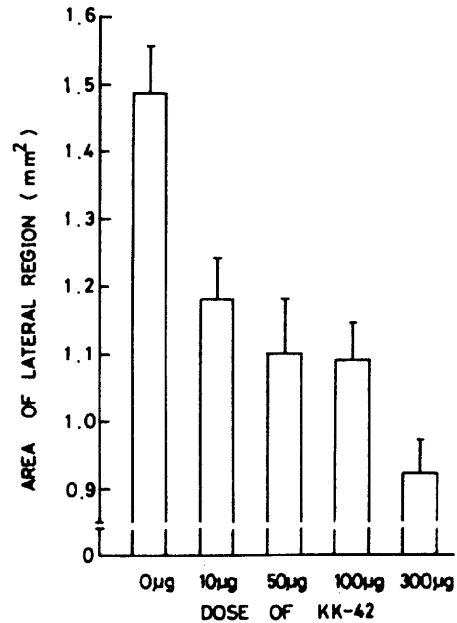


Fig. 4. Relation between the dose of KK-42 and the area of lateral region of an egg. Vertical bar, standard deviation. N=50. For abscissa, see the legend to Fig. 1.

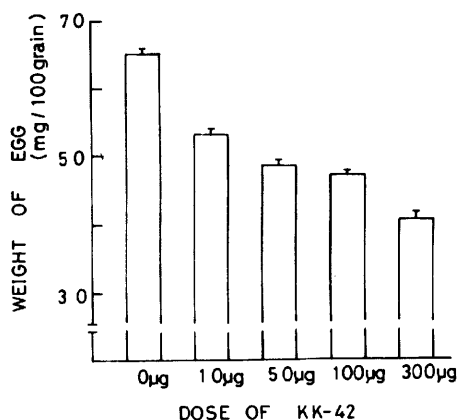


Fig. 5. Relation between the dose of KK-42 and the weight of an egg. Vertical bar, standard deviation. N=15. For abscissa, see the legend to Fig. 1.

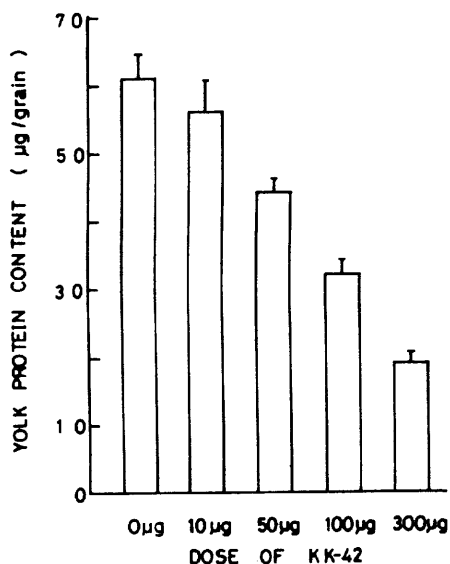
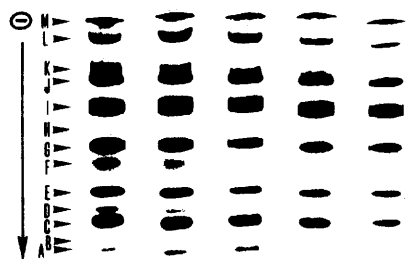


Fig. 6. Relation between the dose of KK-42 and the content of yolk proteins. Vertical bar, standard deviation. N=5. For abscissa, see the legend to Fig. 1.



⊙

0µg 10µg 50µg 100µg 300µg

Fig. 7. Electrophoretic patterns of yolk proteins. A~M: Major components of yolk proteins. For abscissa, see the legend to Fig. 1.

考 察

テルペノイドイミダゾール系化合物 KK-42 はエクジステロイドの分泌抑制物質 (Yamashita *et al.*, 1987; Kadono-Okuda *et al.*, 1987) であると共に抗幼若ホルモン活性をもつ物質 (Akai and Mauchamp, 1989) でもあり、投与されたカイコ幼虫は早熟変態が誘導されて蛹化することがすでに明らかにされている (山下, 1988)。そこで当該化合物をカイコの 4 齢起蚕に投与することによる人為的 3 眠化と幼虫期に投与した KK-

42 が卵形成におよぼす影響について調べた。

まず蛹化 1 日の体重をみると、投与量の相違による差異は認められなかったが、3 眠化することによって約 60~65% の体重の減少がみられた。蛹体重の減少は早熟化に伴う脱皮の省略によって体形矮小のまま成熟期に達したために生じたものである。

軽量矮小化した 3 眠蚕の卵形成について、まず卵数をみると正常に 4 眠したものに比べ、KK-42 の投与量には関係なく、3 眠化個体はいずれの区においても 60% 前後減少していた。一方、長・短径および側面部の面積からみた卵形態や卵重については、卵小形化に明瞭な用量依存性が認められる点に 1 つの大きな特徴がある。

次に、卵黄タンパク質についてまず含量をみると、卵重や卵形の軽量小形化に伴い減少すると共に、投与量が多くなればなるほどその減少割合はさらに著しくなっていた。しかしながら、各々の成分濃度は減少するものの、組成にはなんら変化すること無く、差異はみられなかった。いずれの投与区においても交尾後産下された小形化した卵は着色したことから受精能を持つことが明らかである。

人為的に 3 眠化を誘導すると、脱皮の省略により体容積増加の割合が低下し、食桑期間の短縮による栄養貯蔵物質の低減が生じる。その結果として幼虫期に絶

食ストレスを加えた場合(河口ら, 1991)にみられたのと同じように, 蛹体型が矮小軽量化するだけでなく, 成熟卵形成のための調節機構が作動し, 造卵数を減少させているものと考えられる。蛹体型の軽量化と卵数の減少は3眠化の現象によって誘起されるものと推察される。しかしながら, 卵形態(卵形)と卵容積(卵重, 卵黄タンパク質を含む卵内容物)は3眠化によって小形軽量化するが, その程度割合には明瞭な用量依存性が認められたことから, 3眠化を誘起するために必要な用量以上のKK-42の投与は卵形と卵内容物の含量に大きく影響をあたえているものと考えられる。卵形成におけるKK-42の作用については不明であるが, 包卵被膜細胞の増殖, 肥大さらにはその機能に作用するものと推察され今後追求すべき問題である。

以上の結果を総合すると, 卵数の減少はKK-42の投与による3眠化の二次的影響と考えられるが, 卵の形態と内容物の形成には3眠化の二次的影響のみならず, KK-42による影響をもうけている可能性がある。

摘 要

幼虫期に投与したKK-42による正常4眠蚕の3眠化と卵形成におよぼす影響を分析した。

1. 蛹体重の低下に伴い卵数は減少したが投与濃度による変異はみられなかった。
2. 卵形は小形化すると共に, 卵重も減少した。小形化と重さの減少には, 明瞭な用量依存性が認められた。
3. 卵黄タンパク質成分の組成変化は生じなかったが, 投与量依存的に各成分濃度の低下に伴い総含量が顕著に減少した。

文 献

Akai, H. and B. Mauchamp 1989 Suppressive

effects of an imidazole derivative, KK-42 on JH levels in hemolymph of *Bombyx larvae*. *J. Seric. sci. Jpn.*, **58**: 73-74

Asano, S., E. Kuwano and M. Eto 1984 Anti-juvenile hormone activity of 1-citoronesilly-5-phenylimidazole in the 3th instar Silkworm, *Bombyx mori* L. *Appl. Ent. Zool.*, **19**: 212-220

Davis, B.J. 1964 Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**(Art 2): 71-80

林 博司 1983 濾紙を用いたFolin法の簡便化, 生化学, **55**: 257-258

Irie and Yamashita 1983 Egg-specific protein in the silkworm *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titer changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.* **13**: 71-80

Kadono-Okuda, K., E. Kuwano, M. Eto and O. Yamasita 1987 Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Growth Differ.*, **29**: 527-533

河口 豊・伴野 豊・古賀克己・藤井 博 1991 カイコ5齢幼虫期の絶食処理が卵形成におよぼす影響. 九大農芸誌, **45**: 145-151

桑野栄一 1987 抗幼若ホルモン活性物質. 植物防疫, **41**: 392-397

大槻良樹 1970 生殖と発生, 森 精編: カイコによる新生物学実験. 三省堂, 東京, 104-120頁

Ornstein, L. 1964 Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**(Art 2): 321-349

Yamashita, O., Kadono-Okuda, K., Kuwano, E. and E. Eto 1987 An imidazole compound as a potent anti-ecdysteroid in an insect. *Agric. Biol. chem.*, **51**: 2295-2297

山下興亜 1988 昆虫ホルモンの構造と作用. 化学と生物, **26**: 355-363

Summary

Precocious metamorphosis was induced by topical application of a terpenoid imidazole compound, KK-42, immediately after the 3rd larval ecdysis of *Bombyx mori*. All the larvae received 5 to 300 μ g of compound become trimolting pupae. Dose effects of KK-42 upon the egg formation in the induced trimolting were investigated.

1. The number of matured eggs produced was ca. 40% that produced by the normal tetramolting control, although there observed no dependency on the dose of applied KK-42.
2. The size and the weight of eggs produced by the trimolting were significantly smaller and lighter than normal tetramolting's eggs. Higher dose gave smaller values.
3. The amount of yolk proteins decreased according to the increasing dose of KK-42.

However, there were no qualitative changes of the yolk proteins as analysed by gel electrophoresis.

4. It is inferred that a large amount of KK-42 affects oogenesis through the functional alteration of the ovarian follicular epithelial cells.