

カイコ非膠着卵変異体の粘液腺の発育に伴うタンパク質と核酸の変動

藤井, 博
九州大学農学部遺伝子資源研究センター

河口, 豊
九州大学農学部蚕学講座

<https://doi.org/10.15017/23532>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 49 (1/2), pp.61-66, 1994-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

カイコ非膠着卵変異体の粘液腺の発育に 伴うタンパク質と核酸の変動*

藤 井 博

九州大学農学部遺伝子資源研究センター

河 口 豊

九州大学農学部蚕学講座

(1994年8月8日受理)

Changes of Protein and Nucleic Acid Synthesis in the Developing Colleterial Glands of the Silkworm, *Bombyx mori*

Hiroshi FUJII

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812

Yutaka KAWAGUCHI

Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812

緒 言

樹木の幹・枝や葉に産下された昆虫の卵はそれらに付着した状態で存在し、雨や風により脱落することは無い。

カイコ卵においても例外ではなく、産下された卵は産卵台紙に付着し、脱落することはない。この付着は雌蛾体内の粘液腺から分泌されるタンパク性の膠着物質による。しかしながら、カイコには産下された卵が台紙に付着することなく脱落する。いわゆるバラ種を生じる非膠着卵突然変異 *Ng* が知られている(鈴木・平田, 1924)。*Ng* 突然変異体は組織学的な観察結果から卵膠着物質を産生していないと推察されている(鈴木・辻田, 1937)。卵の非膠着性は蚕種製造上きわめて都合のよい形質である、同時に卵膠着物質の主要成分について、ならびにそれらが糖質を含む数種のタンパク質からなる(笠井・平沢, 1993; Kamijo ら, 1978; 中村・井口, 1976) ことが明らかにされて以来、特定タンパク質に対する遺伝子発現機構を解明する上でも

好個の形質とみなされた(Kamijo ら, 1978; 有沢・普後, 1990)。また最近膠着タンパク質に関する研究が行われている(Weerawan ら, 1992; 姚ら, 1991)。

Kamijo ら(1978)は *Ng* 変異体における粘液腺組織タンパク質の合成能が低いのは発育中に rRNA 同様に mRNA が迅速に分解することによると推論しているが、膠着タンパク質の合成に関しては言及していない。そこで著者らは *Ng* 変異体の粘液腺において卵膠着物質が合成されているか否かを明らかにするために、粘液腺の発育経過に伴う粘液腺組織のタンパク質と核酸の合成変動ならびに卵膠着タンパク質の合成を調べた。

材料及び方法

供試材料: 実験に用いたカイコは九州大学農学部保存の非膠着卵 d90 の実験交雑系である。非膠着卵遺伝子 *Ng* は第12連関群に所属する優性の遺伝子であり、*Ng* 雌蛾の産下する卵は蚕卵台紙に付着しない。実験交雑系は第2連関群黄血遺伝子 *Y* の存在のもとに *Ng* と同一連関群に所属する優性の外層黃鹼遺伝子 *C* を標識遺伝子として導入したもので、遺伝子型 *Y; C Ng/+ +* の雌に *Y; + +/+ +* の雄を配し、次代の同

* 本研究の一部は文部省科学研究一般研究(B)No. 05454066 によって行った。

一蛾区内で分離する黄繭個体の（雌蛾の産下する卵は非膠着卵となる，*Ng* 個体と略記する）と白繭個体（膠着性卵を産下する，正常個体と略記する）とを用いた。蛹化直後を 0 日とし，24 時間後を蛹 1 日とした。この交雑系は蛹を 25°C に保護した場合，10 日後に羽化した。

Ng および正常個体の粘液腺を蛹 5 日，7 日，8 日，9 日および羽化産下後に 0.75% 冷食塩水中で解剖して取り出し，濾紙で水分を除いた後，直ちに一對の粘液腺重量（湿重量）を測定した。測定後組織を液体窒素で凍結して分析時まで -20°C に保存して使用に供した。

粘液腺組織のタンパク質，RNA および DNA の調製と定量：タンパク質，RNA および DNA の抽出は Schmidt-Thannhauser-Schneider の方法（STS 法）に若干の改変を加えて行った（藤井，1979）。凍結した粘液腺組織を剃刀で細片し 0.75% 冷食塩水を加え，ガラスホモジナイザーで磨砕した。磨砕液に等量の冷 10% トリクロロ酢酸（TCA）を加え，0°C に 1 時間放置した後，10,000×g，30 分間遠心分離し，沈澱部分を得た。この沈澱に 5% 冷 TCA を加え，懸濁し，遠心分離を行い沈澱を洗った。次にこの沈澱画分にエタノール-エーテル（1:1v/v）の混合液を加え 60°C に 5 分間加温し，その後遠心して脂質画分を除去した。ついで沈澱に 0.3N KOH を加え，37°C で 18 時間加水分解した後，過塩素酸（PCA）で中和し，遠心分離を行い上清を得た。これを RNA 画分とした。沈澱画分はさらに 5% PCA を加え 90°C で 15 分間加熱し DNA を抽出し，遠心分離を行い，上清を集め DNA 画分とした。その残余沈澱物をさらに 1N NaOH で 60°C，60 分間加水分解し，遠心分離をし，上清をタンパク質画分とした。

粘液タンパク質の合成は蛹 6，8 日の蛹に ³⁵S-メチオニン（10mCi/ml）を 1 頭当り 5μCi 注射し，3 時間取り込ませた後，粘液腺を取り出し，粘液物質を貯蔵部位より取り出し，一方粘液腺組織として粘液物質を取り出した残りの貯蔵部位と枝状部とを合わせたものを用いた。組織および粘液物質を試料調製液（8M 尿素と SDS を含む）中で磨砕し，尿素-SDS ゲル電気泳動（Swank and Munkres, 1971）を行い，オートラジオグラフをとり，その後 BAS1000（富士写真フィルム社製）で画像処理を行った。

タンパク質の定量は Lowry 法に基づき，牛血清アルブミンを標準に用いて行った。

RNA の定量はオルシンを用いた Davidson・Waymouth（1944）の方法にしたがって酵母の tRNA を標準に用いて行った。

DNA は Dische の方法（Dische・Schwarz, 1930）

により，仔牛胸腺 DNA を標準にしてジフェニルアミンで定量した。

粘液腺組織中への ¹⁴C-タンパク加水分解物の取り込み：蛹 5，7，8，9 日の蛹腹腔に ¹⁴C-タンパク加水分解物 0.1mCi/ml を蛹 1 頭当り 0.1μCi/2μl 注射した。0.5，1，2，3，6，12 時間取り込ませた後，前記調製法によりタンパク質画分を得た。画分中の放射活性はトルエン：トリトン X100：PPO の溶媒系を用いてベックマン社製シンチレーションスペクトロフオトメーター（Model LS-315T）で測定した。

粘液腺組織中への ³H-ウリジンの取り込み：蛹 5，7，8，9 日の蛹腹腔に ³H-ウリジン（25Ci/mM）を蛹 1 頭当り 2.0μCi/1μl 注射した。10，20，30，60 分間取り込ませた後，前記調製法によって RNA 画分を得た。画分中の放射活性の測定はタンパク質の場合と同様に行った。

結 果

1. 発育経過に伴う粘液腺組織重の変化

成虫の粘液腺の形態をみると枝状部と基部（膠着物質貯蔵部）との二つの部分からなっている。*Ng* 個体においても粘液腺は正常と同様に枝状部と貯蔵部の組織が形成されていた（Fig. 1）。そこで粘液腺原基の発達が起こる蛹中期以降の発育経過に伴う粘液腺組織の湿重量の変化をみると，正常個体の粘液腺組織の湿重量は蛹 5 日では一對当り 4.5mg で，発育の進行に伴い急速に増加し，蛹 9 日は 22.4mg と最高値に達した。その後羽化産卵に伴いその重量は激減し，蛹 5 日の重量とほぼ同じになった。一方 *Ng* 個体では蛹 5 日に 4.5mg で正常との間に差異が認められなかった，しかしその



Fig. 1. Photograph of the colleterial glands of normal and *Ng* mutant in the silkworm, *Bombyx mori*.

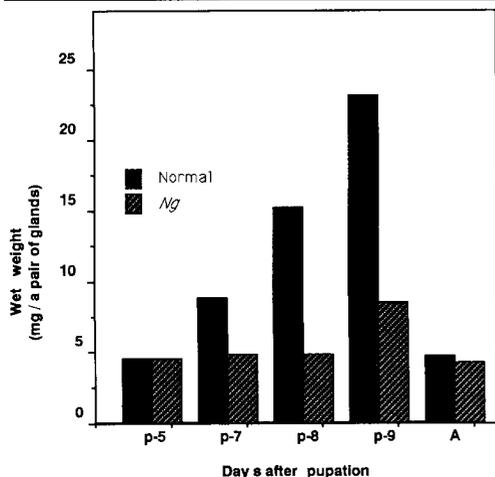


Fig. 2. Developmental changes of wet weight of a pair of colleterial glands of normal and Ng mutant.

後は正常でみられた急激な重量増加が認められなかった。ところが蛹9日にはやや増加したものの産卵後は蛹5日とほぼ同じレベルにまで減少した (Fig. 2)。

2. 発育に伴う粘液腺組織タンパク質含量の変化と放射性アミノ酸の取り込み

正常個体の粘液腺組織タンパク質含量は発育に伴って増加し、特に蛹8日から9日にかけて急速に増加して羽化直前に最高に達した。一方、Ng 個体におけるタンパク質含量はわずかな増加が認められるものの正常で認められた急速な増加は無く、終始低い値であった (Fig. 3)。

粘液腺組織における¹⁴C-アミノ酸の取り込みは、いずれの発育時期の粘液腺組織においても¹⁴C-アミノ酸の取り込みは投与直後から12時間までほぼ直線的に増加した (結果は省略)。したがって各時期における¹⁴C-アミノ酸の取り込みは3時間に限定して分析を行った。粘液腺一対当りの¹⁴C-アミノ酸の取り込み量を見ると、正常個体は蛹5日から9日にかけて直線的に上昇した。タンパク質含量 (mg) 当りの取り込み (比活性 S. A) で見ると、蛹5, 7, 8日においてほぼ一定の高い値を維持していたが、蛹9日になるとやや低下した。一方、Ng 個体における取り込み量は発育の進行に伴って低下し、さらにタンパク質含量 (mg) 当りの取り込みは蛹5日が高いものの、それ以降は低下し続け、取り込み値は正常のそれよりも常に低かった (Fig. 4)。

膠着タンパク質および粘液腺組織タンパク質への³⁵Sメチオニンの取り込みをゲル電気泳動で分離した

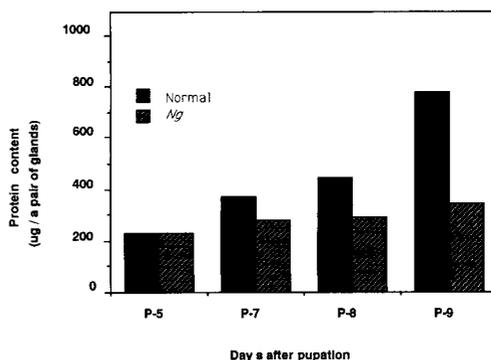


Fig. 3. Developmental changes of protein contents in a pair of colleterial glands of normal and Ng mutant.

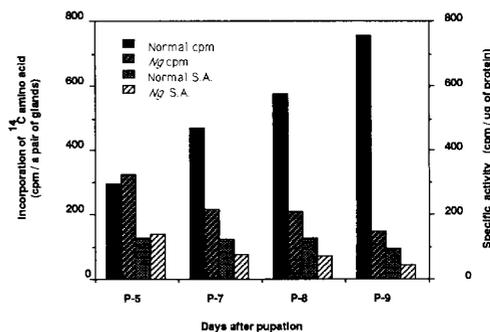


Fig. 4. Incorporation of ¹⁴C-amino acids into the protein of a pair of colleterial glands and its specific activity during pupal development. The ordinate at left showed incorporation of ¹⁴C-amino acid and at right showed specific activity (S. A).

後、オートラジオグラフをとり、BAS1000で画像処理を行った (Fig. 5)。蛹6日では正常個体ならびに Ng 個体の膠着タンパク質への取り込みはバンドとして認められなかったが、粘液腺組織をみると正常ならびに Ng 個体共に高分子量から低分子量までに取り込みがみられた。ところが、蛹8日になると正常個体では膠着タンパク質に主要な2本のバンド、これは分子量から推定して Weerawanら (1992) の GP-1 (240kDa) と GP-2 (190kDa) に相当するものである、とさらに分子量 70kDa とそれよりも分子量の小さい数本のバンドが認められた、しかしながら Ng 個体ではいかなるバンドも認められなかった。

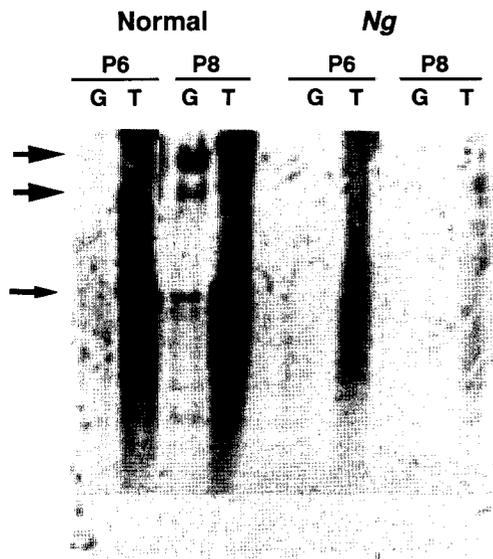


Fig. 5. Autoradiograph of proteins of a pair of colleterial glands and glutinous proteins at 6 day and 8 day on pupal stages in normal and *Ng* mutant.
G, glutinous protein; T, colleterial gland

3. 発育に伴う粘液腺組織のDNAとRNA含量の変化および ^3H -ウリジンの取り込み

粘液腺一对当りのDNA含量は*Ng*および正常個体共に蛹5日から9日までほぼ一定の値を維持し、両者間において大きな差異は認められなかった (Fig. 6). RNA含量をみると正常個体では蛹5日から7日にかけて一時増加しその後蛹9日にかけて減少していった。一方、*Ng*個体では蛹5日のそれは正常個体とほぼ同じ量であったが、その後は増加することなくむしろ発育の進行にともない緩やかに減少した (Fig. 6).

粘液腺組織中への ^3H -ウリジンの取り込みは投与後60分間までほぼ直線的な取り込みがみられたので、取り込みの時間を60分間に設定した (結果は省略)。

^3H -ウリジンの組織一对当りの取り込み量および単位RNA量 (μg) 当りの取り込みを見ると、*Ng*個体はどの時期においても正常個体の場合よりも低かった。しかしながら発育に伴う変化をみると正常個体ならびに*Ng*個体いずれの場合にも蛹5日が極めて高く、蛹7日になると共に激減し、その後発育の進行にともないさらに減少した (Fig. 7)。

考 察

卵膠着物質は粘液腺で合成され、分泌される。その

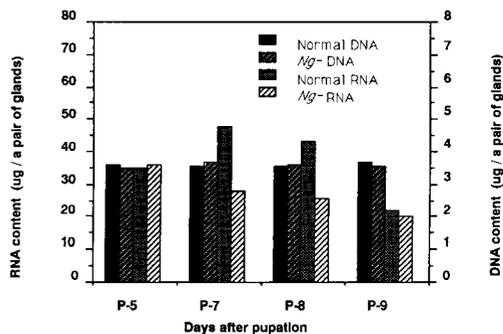


Fig. 6. Developmental changes of DNA and RNA contents of a pair of colleterial glands of normal and *Ng* mutant.

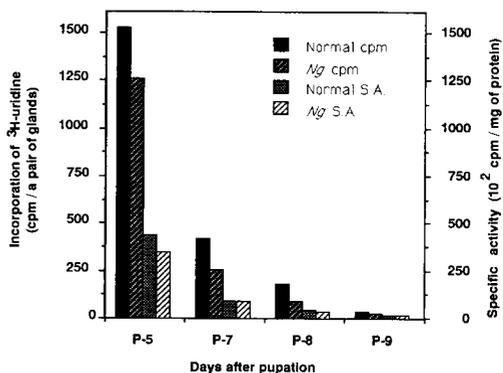


Fig. 7. Incorporation of ^3H -uridine into RNA of a pair of colleterial glands and its specific activity during pupal development. The ordinate at left presented incorporation of ^3H -uridine and it at right presented specific activity (S. A).

主要成分は糖を含むタンパク質 (結果は省略) からなり、絹タンパク質と同様に特定の細胞・組織器官における特異タンパク質に対する遺伝子発現の調節機構を解析するうえで好個の研究材料となることから、Kamijoら (1978) により研究が行われている。

カイコ粘液腺は膠着物質を産生する枝状部と膠着物質を貯蔵する基部の2部分よりなる。枝状部は腺細胞と支持細胞とからなりたっており、枝状部の腺細胞内では粘液顆粒 (粘液タンパク質) が多量に形成され、分泌顆粒となり、分泌顆粒は腺腔内に分泌される。他方非膠着卵を産む突然変異、*Ng*蚕の粘液腺組織においても正常個体と同様枝状部と基部とが形成される。しかしながら*Ng*蚕では枝状部は形成されるものの枝状部の腺細胞には粘液顆粒がほとんど観察されず、発

育の進行にともない腺細胞内には正常では認められない脂肪粒が多数出現し、ついには細胞の退化が起こる(鈴木・辻田, 1937)。したがって Ng 蚕の粘液腺組織においては膠着物質、主として膠着タンパク質の合成が欠如あるいは極めて低いと想像される。そこでこの点を明らかにするために粘液腺組織の発育に伴う組織のタンパク質および核酸含量の変化ならびにタンパク質と RNA のそれぞれの放射性前駆物質を用いた取り込み実験を行った。

産卵終了後の粘液腺組織重 (Fig. 2) は Weerawan ら (1992) の結果と比べると減少量が少ないが、蛹 5 日 (P-5) のそれとほぼ同じ値にまで減少した。このことは産卵により膠着物質が卵に付着して産卵されたために、組織中の膠着物質が消費されたために減少したものである。したがってもし産卵直後の腺組織に膠着物質が存在しないものと見なすならば、成虫の組織重が蛹 5 日の組織重と同じ重さになったということは、粘液腺は蛹 5 日に既に完成していることになる。この事は組織学的観察結果とよく一致している(鈴木・辻田, 1937)。

粘液腺におけるタンパク質含量およびタンパク質合成の経時的变化ならびにオートラジオグラフの結果、すなわち正常個体では、蛹 6 日および 8 日の粘液腺組織はタンパク質合成が行われているものの、6 日では膠着タンパク質合成は行われなかった。しかしながら 8 日では合成が行われていた。一方、Ng 個体では、蛹 6、8 日共に粘液腺組織ではタンパク質合成が正常と同じように行われているものの、膠着タンパク質合成が行われていなかった。これらの結果、蛹 5 日に認められるタンパク質含量は粘液腺組織を構成するタンパク質や組織細胞内の、いわゆる house keeping に必要なタンパク質であり、蛹 7 日、8 日、9 日における粘液腺組織の重量増加は粘液タンパク質を主とする膠着物質の蓄積によるものと判断される。

一方、Ng 個体をみると蛹 5 日の粘液腺の重量およびタンパク質含量、タンパク質合成の結果および 6 日におけるオートラジオグラフの結果が正常のものと同様であった。このことは Ng 個体の粘液腺はこの時期には正常の組織と同様に組織形成が行われていることを意味している。この事は鈴木・辻田 (1937) の組織観察の結果とも一致している。それ故に Ng 個体では粘液腺組織を構成するタンパク質と house keeping に関するタンパク質とは正常と同じように合成されていると判断される。しかしながら Ng 個体の粘液腺は Fig. 1 に見られるように、貯蔵部は細い管状

であり正常でみられる膨らみが認められないことから膠着タンパク質を主とする膠着物質の蓄積はほとんど無いと想像される。事実、放射性アミノ酸の取り込みからみたタンパク質の合成およびオートラジオグラフの結果をみると、Ng 個体では粘液腺の組織形成や house keeping に関するタンパク質合成は行われるものの、膠着タンパク質の合成は行われないものといえる。

放射性ウリジンの RNA 中への取り込みは、正常および Ng 個体ともに蛹 5 日が最も盛んであり、発育が進むにしたがい低下していった。しかし、取り込みは全蛹発育期間を通じて常に正常個体 > Ng 個体の関係が認められた。この取り込みにおける両者の差を生じる原因は、粘液タンパク質に対する mRNA を安定化させる機構の欠陥であると Kamijo ら (1978) により指摘されているが、今回の実験結果から膠着タンパク質の合成に関与する mRNA 合成が行われていない可能性が考えられる。この点に関しては現在膠着タンパク質に対する mRNA の存在を調べている。

以上の結果、非膠着卵を産む突然変異、Ng 蚕は粘液タンパク質の合成を行っていないものと結論した。

要 約

Ng 蚕における粘液腺の発育経過にともなうタンパク質と核酸 (RNA, DNA) 含量ならびに放射性前駆物質の取り込みの変動および膠着タンパク質合成をオートラジオグラフィ法で調べた。正常個体における粘液腺組織のタンパク質含量と組織タンパク質へのアミノ酸の取り込みは組織の発育にともない直線的に増加し、羽化直前に最高に達した。また蛹 8 日には膠着タンパク質の合成が確認された。一方、Ng 個体ではタンパク質含量は発育にともない僅かながら増加したものの、アミノ酸の取り込みは逆に減少していった。そして膠着タンパク質が合成されなかった。

正常個体における粘液腺の RNA 含量は蛹 7 日に高くなり以後減少した。それに対して Ng 個体では発育の初期に高いもののそれ以後は減少しつづけた。しかしながら RNA 中へのウリジンの取り込みをみると両者ともに蛹 5 日が高く以後減少した。しかし常に正常個体 > Ng 個体の関係が認められた。DNA 含量は両者に差異が認められなかった。

以上の結果、Ng 蚕の粘液腺は正常蚕のものと同じように組織形成を行うものの、膠着タンパク質の合成を行わないものである。

文 献

- Dische, Z. and K. Schwarz 1930 Mikromethode zur Bestimmung verscheidener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. *Mikrochemica. Acta.*, **2**: 12-19
- Davidson, J. N. and C. Waymouth 1944 Tissue nucleic acid: I. Ribonucleic acid and nucleotides in embryonic and adult tissue. *Biochem. J.*, **38**: 379-381
- 藤井 博 1979 家蚕の変態過程における中腸組織の機能的解析 1. 変態過程における中腸組織のタンパク質及び核酸の量的変動. *九大農芸誌*, **33**: 127-173
- Kamijo, S., Y. Kawaguchi, H. Fujii, B. Sakaguchi, H. Doira, S. Kuhara, Y. Aso, K. Koga, K. Hayashi and K. Shimotohno 1978 Instability of messenger and ribosomal RNA in a glue-protein mutant of *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, **20**: 283-289
- 笠井隆善, 平沢徳栄 1933 家蚕雌蛾膠着腺の分泌せる膠物質に関する研究. *蚕糸学報*, **15**: 595-615
- 中村晃三, 井口民夫 1978 家蚕の卵膠着物質のアミノ酸組成およびその合成について. *日蚕雑*, **46**: 120-124
- 鈴木簡一郎, 平田四郎右衛門 1924 蚕卵膠着性の遺伝子に関する研究. *蚕業試験場報告*, **6**: 301-318
- 鈴木簡一郎, 辻田光雄 1937 家蚕雌蛾に於ける粘液腺の細胞組織学的研究. *日蚕雑*, **8**: 89-105
- Swank, R. W. and K. D. Munkres 1971 Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecylsulfate. *Anal. Biochem.*, **39**: 464-477
- 姚 祥, 普後 一, 竹田 敏 1991 カイコガ膠着質腺トレハラーゼ活性に及ぼすバリドキシルアミンAの影響. *日蚕雑*, **60**: 296-301
- Weerawan, A., R. Noda and O. Yamashita 1992 Accumulation of glue proteins in the developing colleterial glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **61**: 123-130

Summary

Changes of protein and nucleic acid synthesis in the developing colleterial glands of the silkworm, *Bombyx mori*.

To elucidate no-production of glutinous substance in the colleterial glands of *Ng*-mutant, *Bombyx mori*. Changes of the contents of protein and nucleic acid (RNA and DNA) and the activities of protein and RNA synthesis in the colleterial glands during pupal development were investigated. In the colleterial glands of *Ng*-mutant, the protein content increased very slightly during pupal development, whereas in normal the content increased lineally. The activity of protein synthesis in *Ng*-mutant was the highest at 5 day of pupal stage, and then deminished gradually through pupal development. In contrary to *Ng*-mutant, the activity in normal was enhanced through pupal development. RNA content of *Ng*-mutant was the highest at 5 day on pupal stage and decreased for pupal development, while that of normal was the same content as that of *Ng*-mutant at 5 day, reached the maximam content at 7 day pupa and then decreased. The activity of RNA synthesis of *Ng*-mutant was the highest at 5 day pupa and diminished during pupal development, on the other hand, that of normal was the same tendency as that of *Ng*-mutant, but always the activities were higher than those of *Ng*-mutant.

We confirmed autoradiographically that *Ng*-mutant is not able to synthesize glutinous proteins. Therefore, this suggests that no mRNA synthesis for glutinous protein may occur to the *Ng*-mutant.