

家蚕の変態過程における中腸組織の機能的解析(II) ：変態に伴う中腸組織rRNA, tRNAの量並びに合成能の 変化

藤井, 博
九州大学農学部蚕学教室

<https://doi.org/10.15017/23277>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 33 (2/3), pp.135-145, 1979-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



家蚕の変態過程における中腸組織の機能的解析

II. 変態に伴う中腸組織 rRNA, tRNA の量並びに合成能の変化

藤 井 博

九州大学農学部蚕学教室

(1978年10月13日受理)

Studies on Functional and Structural Conversion of the Midgut during Larval-Pupal Transition in the Silkworm, *Bombyx mori*

II. RNA Content and its Synthesis in the Midgut during Larval-Pupal Transition

HIROSHI FUJII

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

緒 言

前報において、カイコの変態過程における中腸組織のタンパク質の量的、質的变化並びに核酸量の変動は組織重の変動と平行しており、さらに食桑活動と密接な関係にあることを明らかにした。そして幼虫から蛹への変態に際して中腸組織細胞では構造的、機能的変化が生じ、幼虫期にみられた消化吸收機能が失われてゆく反面、幼虫期とは異なつた機能を持つように変化してゆくことを示唆した。この中腸組織の構造及び機能の変化に伴つて、当然 RNA の質的变化が生じてくるものと思われる。

細胞が本来の生理機能を営むためには、タンパク質合成は第一義的な重要性をもつものであり、しかもこのタンパク質合成には RNA は欠くことのできない重要な成分である。そこで幼虫から蛹への変態過程における中腸組織の rRNA と tRNA の量的変化並びにその合成および RNA の安定性について調べた。

材料および方法

材料および中腸摘出の方法：前報 (I) と同じ方法である。

中腸組織からの RNA の抽出：Hosoda *et al.* (1963)

の方法に若干の変更を加えて行なつた。すなわち緩衝液から Mg^{2+} を除き、ドデシル硫酸ナトリウムを含まない 0.01 M Tris-HCl (pH 7.8) -0.14 M NaCl 緩衝液を、カミソリで細片した中腸組織に加えガラスホモジナイザーで摩砕した。摩砕液に90%フェノールを等量加え室温で60分間攪拌した。その後、10,000×g で30分遠心分離を行ない、水層 (I) とフェノールを含む間層とに分けた。フェノールを含む間層に同緩衝液を等量加え、室温で30分間攪拌し、その後10,000×g で30分間遠心分離を行なつて水層部分を取り、これを上記水層 (I) に加え、この混合液についてさらに同じ方法でフェノール抽出操作を3回行なつた。最後に得た水層に最終濃度2%になるように酢酸カリウムを加え、さらに冷エタノールを3倍量加え、 $-20^{\circ}C$ に一夜放置した。生じた沈殿を遠心分離によつて集め、冷75%エタノールで2回洗う。この操作によつて、オリゴヌクレオチドとみなされる低分子 RNA は除去される。この様に洗浄した RNA は、使用に際し、0.2 M buffered saline に溶かした。

^{32}P の RNA へのとりこみ：放射性リン酸 (^{32}P) は 0.01 N HCl に溶かし、重碳酸ナトリウムで中和した後、1 mCi/ml 溶液として用いた。1頭当たり 2 μCi の ^{32}P をマイクロシリンジを用いて幼虫に注射し

た。 ^{32}P の注射は5令起蚕に行ない、24時間(1日)、72時間(3日)、および168時間(7日)とこませて、発育に伴うRNA合成能の変化を調べた。

RNAにとりこまれた ^{32}P の放射能の測定:放射能測定にはAloka製ガスフローカウンターTDC-303型を用いた。メチル化アルブミンカラムでRNAを分画した場合には、各分画から0.1mlを試料皿にとり、乾燥した後、放射能を測定した。RNAをSTS法により分画した場合には、各分画をPCAで中和した後、一定量を試料皿に取り、乾燥後放射能を測定した。

メチル化アルブミン(MAK)カラムの作成法および各種RNAの分画:MAKカラムはMandel and Hershey(1960)の方法に基づき作成した。RNAの溶出は0.4Mから1.6MのNaClの直線的濃度勾配を用いて行なった。

溶出した各分画について、日立分光光度計EPU-2A型を用いて260nmでの吸光度を測定した。

MAKカラムを用いて分画したrRNA量とtRNA量の算出法:tRNAとrRNAの分画は一定量のRNAをMAKカラムに重層し、0.2M buffered salineで十分に洗い、次に0.4Mから1.6MのNaClの直線的濃度勾配法で溶出した。まずグリコーゲンやオリゴヌクレオチドなどを含むと思われる分画、ついでtRNA、rRNAの順で溶出された。

フェノール抽出したRNA中のrRNA量とtRNA量は次の算出法を用いて求めた。

組織重当りのtRNA量(mg/g)をAt、rRNA量(mg/g)をArとする。RNA 1mg/mlのO.D._{260nm} = 22.0とする(石英キュベットの吸収層の厚さ1cmの場合)と、AtとArとは次の式から求められる。 $At = \{(\text{カラムから溶出された tRNA 分画の全 O.D.}_{260\text{nm}} \text{ 値}) / (\text{カラムにかけた一定量の RNA の全 O.D.}_{260\text{nm}} \text{ 値})\} \times (\text{組織重当りの RNA の全 O.D.}_{260\text{nm}} \text{ の値}) \div 22$ 。同様に $Ar = \{(\text{カラムから溶出された rRNA 分画の全 O.D.}_{260\text{nm}} \text{ の値}) / (\text{カラムにかけた一定量の RNA の全 O.D.}_{260\text{nm}} \text{ の値})\} \times (\text{組織重当りの RNA の全 O.D.}_{260\text{nm}} \text{ の値}) \div 22$ 。

アクチノマイシンDの注射:アクチノマイシンDを蒸留水に溶かし、5°Cで遮光して保存したものを用いた。

アクチノマイシンDのRNA合成におよぼす影響を調べるために、5令3日目の幼虫にこの抗生物質(2μg/頭)と ^{32}P (2μCi/頭)を同時に注射し、一定時間後に中腸組織をとり出しSTS法によりRNA

を分画した。このRNA分画への ^{32}P の取り込み量、すなわちRNA合成量の測定はAloka製ガスフローカウンターTDC-303型を用いて行なった。またtRNAとrRNAそれぞれの合成に対するアクチノマイシンDの影響をみるためには、フェノール抽出したRNAをMAKカラムで分画し、各RNAへの ^{32}P のとりこみを前述のガスフローカウンターで測定した。

蔗糖密度勾配遠心分析法:フェノール抽出したRNAを0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶かし、同緩衝液に溶かした蔗糖の5~20%勾配上に重層し、Spinco Model 65L2型超遠心機、ローターSW25を用いて、25,000rpm、0°Cで8時間遠心分離した。遠心分離後チューブの底に針で穴をあけ、一定滴数ずつ試験管に集めて分画したのち、同緩衝液で希釈し、日立分光光度計EPU-2A型を用いて260nmで吸収値を測定した。

結 果

1. 中腸組織よりフェノール法で抽出したRNAの純度

前述のフェノール法で中腸組織から抽出したRNAの純度を次の諸点から調べた。

a. 紫外線吸収スペクトルの測定:中腸組織よりフェノール法で抽出したRNAを0.01M Tris-HCl(pH 7.6)-0.14M NaCl緩衝液に溶かし、分光光度計を用いて、紫外吸収スペクトルを測定した。その結

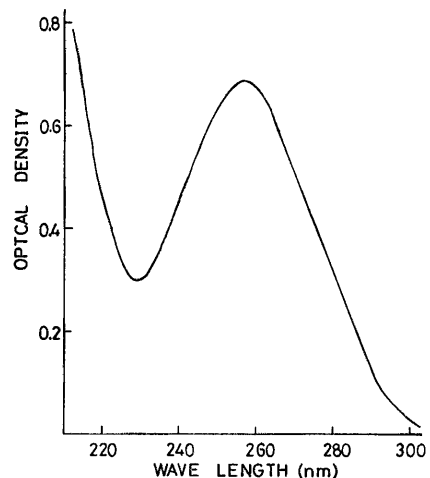


Fig. 1. Absorption spectrum of RNA extracted from the midgut of the 3-day-old fifth instar larvae.

果, Fig. 1 に示すように, 260 nm に吸収極大, 230 nm に吸収極小をもつ典型的な核酸の紫外吸収スペクトルが認められた。

b. 蔗糖密度勾配遠心分析: 一般に細胞の RNA の蔗糖密度勾配遠心分析では, 2種類の rRNA のピーク (バクテリアでは 23S と 16S の rRNA, 脊椎動物では 28S と 18S の rRNA) が認められ, さらに tRNA (5S rRNA や rRNA の分解物を含む) ピークが認められる。中腸組織の RNA の遠心分析の結果, Fig. 2 に示すように, 3つのピークが認められた。ピークの位置から前の2つは 28S と 18S (昆虫では 26S と 17S ともいう) の rRNA に相当し, 残りは tRNA に相当するものと認められる。この RNA 分析の結果から, 抽出操作中に大きな分解は生じておらず, また RNA 分子の解離会合なども起こっていないものと思われる。なおフェノール抽出した RNA に多くの場合, 混入してくる DNA の有無を Dische und Schwarz (1930) の方法により調べたところ, DNA はほとんど検出されなかった。

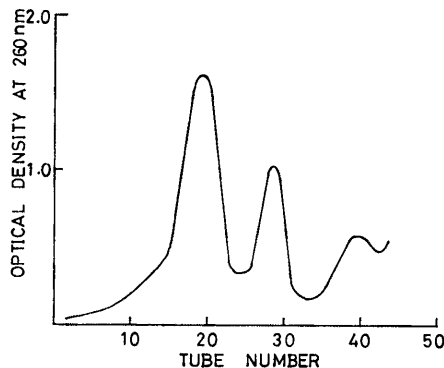


Fig. 2. Sucrose density gradient centrifugal pattern of RNA extracted from the midgut of the 3-day-old fifth instar larvae.

2. MAK カラムクロマトグラフによる DNA の分画

一般に RNA を MAK カラムを用い, NaCl の直線的濃度勾配で溶出すると, tRNA, DNA, rRNA の順で溶出分離される。

5令1日目の中腸組織の RNA を 0.2 M buffered saline に溶かし, MAK カラムに重層し, 同じ buffered saline で十分にまずグリコーゲンやオリゴヌクレオチドを洗い去る。その後 0.4 M から 1.6 M までの NaCl の直線的濃度勾配で溶出したところ, Fig. 3 に示すように2つのピークが検出された。第

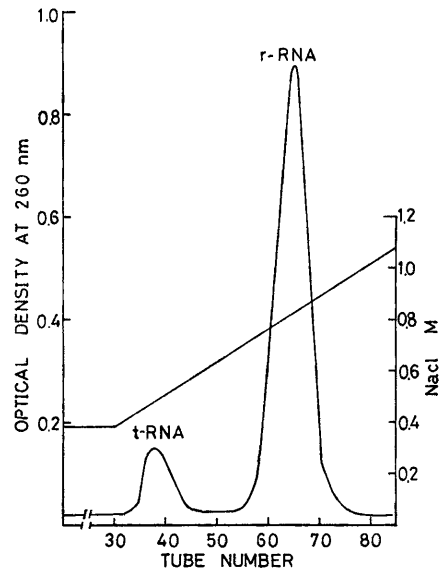


Fig. 3. Fractionation of RNA from the midgut of the 1-day old fifth instar larvae.

1のピークは 0.5 M から 0.7 M NaCl で溶出され, これは tRNA に相当する。第2のピークは 0.75 M から 0.9 M NaCl で溶出され rRNA に相当する。

バクテリアの RNA を MAK カラムで分離すると, rRNA の構成成分である 23S と 16S の2つに分離するが, これは動物細胞, 例えば培養細胞 RNA (川出・深田, 1962) や肝細胞 RNA (木村ら, 1962) などでもみられている。しかし中腸組織 RNA では, この条件では2種の RNA 構成成分は分離できなかった。

3. 発育経過に伴う中腸組織の rRNA と tRNA の量的変化

Fig. 4 に示すように, 中腸組織 RNA を MAK カラムを用いて rRNA と tRNA に分離することができた。そこで各発育時期のカイコの中腸組織から RNA を抽出し, MAK カラムでそれぞれ2種の RNA に分画し, 前述した rRNA と tRNA の計算法により, rRNA と tRNA の量的変化を調べた。その結果 Fig. 4 に示すように, rRNA 量は食桑を始めた5令1日目から食桑しなくなった5日目の熟蚕までほとんど同じ値であったが, 吐糸を始めると急速に減少し, 前蛹期の7日目に至って盛食期幼虫の場合の約半分になった。他方 tRNA 量は Fig. 4 に示すように rRNA の量的変化とほぼ同じ傾向を辿った。

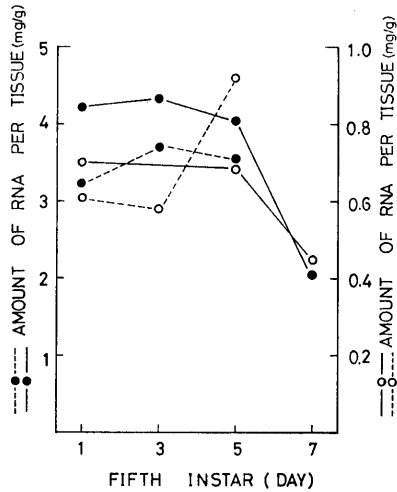


Fig. 4. Changes in the amounts of RNA and effects of actinomycin D on RNA contents at different stages of the fifth instar larvae. ●: rRNA, ○: tRNA,: Actinomycin D, —: Control.

4. 発育に伴う中腸組織の RNA の変化

発育経過に伴う中腸組織の RNA 合成能の変化を調べるために、5 令起蚕に ^{32}P を注射した後、1 日、3 日、7 日を経過したカイコの中腸組織から RNA をそれぞれ抽出し、MAK カラムで RNA を分離した。Fig. 5, 6, 7 に示すように各発育段階にお

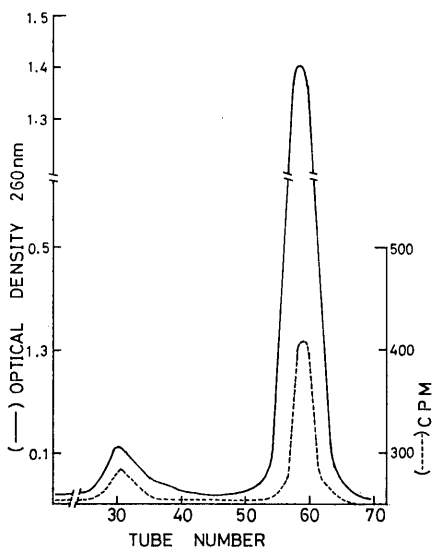


Fig. 5. Fractionation of RNA from the midgut of the 1-day-old fifth instar larvae after ^{32}P incorporation.

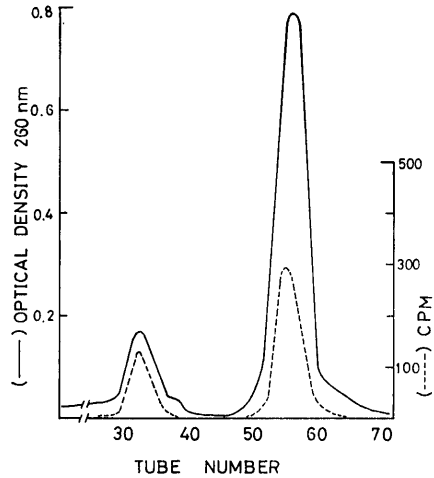


Fig. 6. Fractionation of RNA from the midgut of the 3-day-old fifth instar larvae after ^{32}P incorporation.

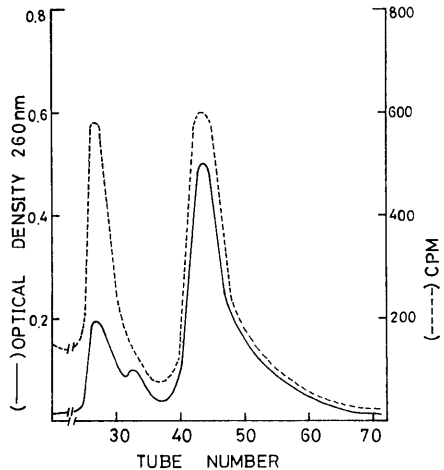


Fig. 7. Fractionation of RNA from the midgut of the 7-day-old fifth instar larvae after ^{32}P incorporation.

ける RNA の 260 nm における吸収ピークと放射能とのピークとは溶出されてくるチューブ番号で一致した。つぎに rRNA ピークの 260 nm における吸収値からわかるように rRNA 量は発育が進行するにしたがつて次第に減少している。ところが tRNA のピークをみると、1 日目に比べて 3 日目と 7 日目はわずかに高くなっている。他方 rRNA への ^{32}P のとりこみをみると、1 日目と 3 日目はほぼ同じであるが、7 日目になると、前 2 者の約 2 倍量のとりこみがみられた。また tRNA への ^{32}P のとりこみは 1 日目よりは 3 日目の方が多く、3 日目よりは 7 日目ではさらに多

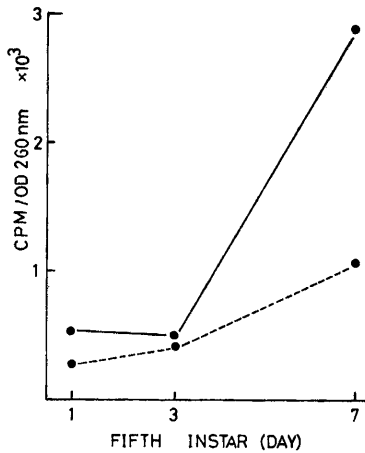


Fig. 8. Comparison of specific activities (cpm/O.D._{260nm}) of the rRNA and tRNA fractions from the midgut of the fifth instar larvae at different stages of the development. —●—: tRNA; ---●---: rRNA.

くなった。

發育経過に伴う中腸組織の RNA 合成能の変化を RNA 量当りの ^{32}P のとりこみ (cpm/O.D._{260nm}) でみると, Fig. 8 に示すように, tRNA では 5 令食桑中の比活性はほとんど同じであるが, 7 日目の閉鎖系に入り化蛹に向かっている時期には急激な増加がみられ, 1 日目や 3 日目の食桑期の 6 倍にも達した。他方 rRNA の比活性は發育が進行するにつれてゆるやかに, ほぼ直線的に増加し, 7 日目には 1 日目の比活性の 4 倍に達した。すなわち, 中腸組織における rRNA と tRNA の比活性は食桑している時期よりも, むしろ食桑をやめて閉鎖系に入つた時期の方が高かつた。この結果は ^3H -ウリジンをを用いた pulse レベルでの結果と同じであつた (未発表)。

5. 發育経過に伴う中腸組織の RNA 合成の特異性

アクチノマイシン D (AD) は DNA 依存 RNA 合成を特異的に阻害する試薬である (Reich *et al.*, 1961, 1962)。したがつて, AD をカイコに注射して経時的に RNA 量の変化を調べると, 組織中で生産された RNA の代謝回転を推測することができる。

RNA 合成におよぼすアクチノマイシン D (AD) の阻害作用時間を調べた結果を Fig. 9 に示す。グラフの各点は対照区の RNA 合成量に対する AD 処理による RNA 合成阻害率で表わされている。AD をカイコに注射すれば徐々に RNA 合成阻害作用が高

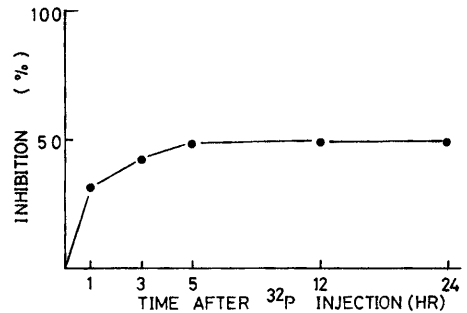


Fig. 9. Time course for the effect of actinomycin D on incorporation of ^{32}P into RNA.

まり, 約 5 時間後に最大の阻害度を示し, 少なくとも調べた範囲の 24 時間後まではこの作用は継続した。体液中の ^{32}P は少なくとも調べた一週間の間では同じ強さを保つていた。

RNA 合成におよぼすアクチノマイシン D (AD) 量の影響を調べた結果を Fig. 10 に示す。グラフの各点は対照区の RNA 合成量に対する AD 処理区の RNA 合成量の割合を求め, その値から求めた RNA 阻害率を示している。AD 2 μg をカイコに注射すると RNA 合成を約 50% 阻害した。さらに AD 量を増していくに伴い阻害率は高くなるが, 25 μg では注射数時間後にカイコは死んでしまった。

rRNA と tRNA 合成におよぼすアクチノマイシン D (AD) の作用を調べた。前述のように大量 (25 μg /頭) の AD をカイコに注射しても RNA 合成を完全に抑えることはできなかった。ところが Perry (1963) によると用いる AD 量により特異的に rRNA 合成のみが阻害されるといわれている。これらの点から各種の AD 濃度に対する rRNA と tRNA 合成阻害作用を別々に検討する必要がある。そこで 5 令 3 日

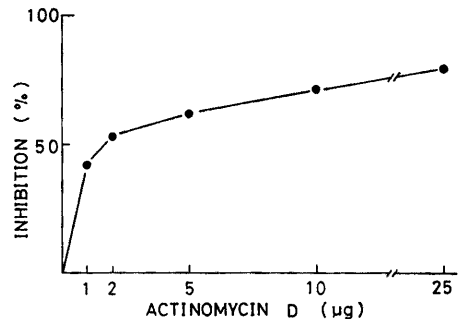


Fig. 10. Effect of concentration of actinomycin D on incorporation of ^{32}P into RNA.

目幼虫にADを1頭当り 0 μ g, 2 μ g, 5 μ g とそれぞれ 2 μ Ci の 32 P とを同時に注射した。注射5時間後に中腸組織を取り出し、フェノール法で RNA を抽出し、MAK カラムで rRNA と tRNA とに分画し、各々への 32 P のとりこみを調べた。その結果を Fig. 11 に示す。rRNA はAD量が 0 μ g のときの合成量を 100 とすると、2 μ g のときの合成率は 70 % となり、5 μ g のときには 25 % となった。他方 tRNA の合成をみると、2 μ g のとき 77 %, 5 μ g のときに 70 % となり、rRNA の場合のように AD 5 μ g で顕著な合成の低下は起こらなかった。すなわち tRNA に対する合成阻害作用と rRNA に対するそれとは注射したAD量によって阻害程度が異なっており、AD の阻害効果は rRNA 合成に対してとくに著しかった。

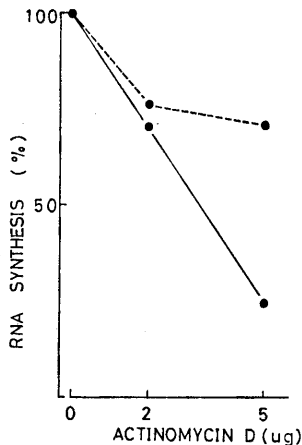


Fig. 11. Differential sensitivities of the syntheses of rRNA and tRNA to actinomycin D. —●—: rRNA; ---●---: tRNA.

アクチノマイシンD (AD) 処理後の rRNA と tRNA 量の経時的変化を調べた。AD を5令起蚕に1頭当り 2 μ g 注射し、その後 rRNA と tRNA 量を経時的に調べた結果、rRNA は対照区のものに比し各時期とも 80 % の値を示し、対照区の変化とはほぼ平行して変化していった (Fig. 4)。他方 tRNA をみると5令1日目および3日目におけるAD注射区では、rRNA の場合と同様に対照区の約 80 % の値を示しているが、5日目では rRNA の場合と異なり、tRNA は対照区よりもむしろ 30 % 多かつた。ここでAD注射量を1頭当り 2 μ g としたのは、このAD量で RNA 合成が 50 % 抑えられること (Fig. 10)、およびこの量よりも多量に注射するとカイコが非常に衰弱

し、比較的早く斃死する個体が多くなることによる。

考 察

昆虫の変態過程における RNA の量的変動に関する従来の研究では全 RNA 量の変化として捉えられているために、RNA 中の個々の分子種の変動に関する情報はほとんど得られていない。ただ変態時における脂肪組織中の RNA 種の変化をみた結果、発育に伴って tRNA/DNA 比は一定であるが、rRNA/DNA 比は徐々に減少していくことが明らかにされている (Takahashi, 1966)。また全虫体を材料として全 RNA の塩基組成を分析した結果から、変態中に rRNA と tRNA の比が変化している可能性が推論されている (Sissakian, 1959)。

5令食桑開始から盛食期をへて熟蚕、すなわち食桑しなくなつて栄養的閉鎖系に入り蛹化に向かいつつある時期までの中腸組織における全 RNA 量は発育経過に伴い徐々に減少している (前報)。しかしながら rRNA と tRNA についてみれば、Fig. 4 に示すように、5令1日目から5日目までの食桑を行なっている期間中では、rRNA と tRNA 含量は多量でかつ一定の値を保っている。すなわちフェノール抽出した RNA を MAK カラムで分離した場合、オリゴヌクレオチドなどの低分子 RNA が除かれるために、MAK カラムによって得た tRNA と rRNA とを含む量は全 RNA 量に比べて少なくなる。しかしながらこれらの tRNA と rRNA 量の変化は細胞内で機能している tRNA と rRNA との変化を真に反映しているものと考えることができる。したがって、5令1日目から5日目までの期間中、rRNA と tRNA とが多量でかつ一定であることは中腸組織が盛んな消化吸収機能を営んでいることと関係があるといえる。また、幼虫が食桑しなくなり閉鎖系に入つた7日目に tRNA と rRNA 含量が減少していることは、この期間に消化吸収機能が低下していることを示唆している。

赤井 (1970) は中腸組織における微細構造の電顕観察で、食桑中、円筒細胞と盞状細胞の細胞質には粗面小胞体が良く発達していることを認めたことから、細胞内でタンパク質合成が盛んに行なわれていることを推測し、また熟蚕になると、これらの細胞において粗面小胞体は少なくなり、リソゾームが出現し始めることを観察し、これを細胞の退化の徴候であると考えた。このことは著者の実験結果と傾向としてはよく一致している。すなわち、中腸組織は食桑期間には、盛

んな消化吸收活動を行ない、それに伴ってタンパク質合成を活発に行なっているが、熟蚕になるとこの機能が弱まると共にタンパク質合成も低下していくものといえる。

中腸組織の RNA の比活性は、Fig. 8 に示すように 1 日目と 3 日目の RNA 合成能に比し、7 日目の前蛹期の方がむしろ高くなっている。このことは中腸に関する組織学的観察結果およびそれらから推論される消化吸收機能の低下と矛盾しているかのように見える。幼虫の 5 令後期から熟蚕期、前蛹期へと中腸の生理機能は低下し、細胞構造は崩壊しつつあるとするならば、5 令 7 日目の前蛹期中腸組織における RNA の比活性の高まりは何を意味しているのだろうか。このことは中腸組織が化蛹に向かって機能的変化を起こしつつあることを示唆しているのではないかと思われる。その理由は辻田 (1943)、赤井 (1970)、Waku and Sumimoto (1971) らによる中腸組織の組織学的観察において、幼虫期間中分泌と吸収の機能を司っていた円筒細胞や盂状細胞は熟蚕期から化蛹に向かうにつれて崩壊してゆく反面、新生細胞は盛んに分裂増殖していることが明らかにされているからである。すなわち、この 7 日目にみられる RNA 合成能の高まりは新生細胞の活動を反映しているものであり、前蛹期にみられる RNA 合成能の高まりは化蛹に備えて、新生細胞が分裂増殖して幼虫中腸組織の再編成をしつつあること、それに伴って幼虫期とは別の生理機能が生じつつあることを意味しているものと推察される。

中腸組織は皮膚組織と異なり脱皮ごとに盛んな分泌活動や、細胞分裂、核酸合成、タンパク質合成などを行なうような組織ではなく、またセクロビアにおける休眠蛹の脂肪体や成虫芽のように成虫化に伴って急速な RNA 合成を開始する (Wyatt, 1965, 1968) という組織でもない。中腸組織ではそれを構成する細胞が分裂増殖して、円筒細胞や盂状細胞に分化し発育成長に伴って細胞数を増加せしめてゆき、令の進行につれてこれらの細胞が肥大生長して大きくなり、中腸の長さも伸びてゆく (辻田, 1943; 赤井, 1970; Waku and Sumimoto, 1971)。山口 (1962) によると中腸の長さは体長の伸長に相応して生長するのであるが、4 令期までと比較した場合、5 令 1 日目からの中腸の生長率は急に大きくなり、その長さは体長の 90% に達し、3 日目から 4 日目には引き伸ばすと体長よりも長くなるといつている。これらの事実からすると、4 令期に造られた rRNA や tRNA は 4 眠期中から脱皮期にかけて一旦分解をうけ、その後再合成さ

れるというのではなく、むしろ 4 眠中からそのまま安定な状態で細胞質中に継続して保存されると考えられる。

そこで RNA が 5 令期、全食桑期間を通じて細胞に保存されているという可能性について検討することにした。すなわち、DNA 依存 RNA 合成を特異的に阻害するアクチノマイシン D (AD) を用いて細胞における RNA 合成に関して一時的な生理的脱核状態をつくり、核での RNA 合成を阻害させると、その細胞には AD を与えられる以前に合成された RNA のみが存在することになる。この様な状態にして RNA 量の経時的変化を調べたところ、Fig. 4 に示すように対照区における rRNA と tRNA との量は 5 令 1 日目に多量に存在し、5 日目まではほぼ一定の高い値で保持されている。他方 AD 処理区においても tRNA の 5 日目を除いて、rRNA は対照区の RNA 量よりも 20% 少ないレベルで対照区と平行的な変化を示し経時的に一定の値を示している。もし RNA 合成のみが行なわれ、RNA の分解が起こっていないならば、RNA は一定の値とならず、増加の傾向を示すと思われる。逆に RNA 合成が行なわれず、分解のみが起こっているならば RNA 量はむしろ減少の傾向を示すことになるはずである。また合成も分解も起こらない場合には一定値をとると考えられるが、 ^{32}P のとりこみ実験から RNA 合成が行なわれていることは明らかであり、したがって RNA 量が一定の値を示すということは、RNA 合成量と分解量とが均衡を保っているものと解せざるを得ない。すなわち生体内における RNA の合成量と分解量との関係は対照区および AD 処理区について、次のようであると推定される。

RNA の合成量を a 、分解量を b とし、合成量と分解量とが等しいとすれば ($a = b$)、5 令起蚕時における RNA 量 (A) は、対照区では 1 日目に RNA 量が A_1 ($\rightleftharpoons A$) となる。1 日目から 3 日目まで合成と分解が起こって、 A_1 量から分解量 b が減少し、新たに合成量 a が加わるので 3 日目の RNA (A_3) は $A_1 = (A_1 - b) + a$ となるが、 $a = b$ とする時は $A_3 = A_1$ となる。また、5 日目の RNA 量 (A_5) は、 $A_5 = [(A_1 - b) + a] - b + a$ となるが、この場合も $a = b$ の条件下では、 $A_5 = A_1$ となる。結局 1 日目から 5 日目まで RNA 量は一定となつて見かけ上変化がないことになる。

他方 AD 処理区では、AD 量の 1 頭当たり $2 \mu\text{g}$ は RNA 合成を 50% 阻害するので、5 令起蚕時の RNA

量 A は分解をうけて1日目のRNA量は A_1' となる。1日目から3日目までに分解量 b が減少し、新たに合成量 $1/2a$ (ADによる合成阻害は50%)が加わるので、3日目のRNA量 A_3' は、 $A_3'=(A_1'-b)+1/2a$ であるが、 $a=b$ なる条件の下では、 $A_3'=A_1'-1/2a$ となる。また5日目のRNA量(A_5')は同様に $A_5'=[\{(A_1'-b)+1/2a\}-b]+1/2a=A_1'-1/2a \times 2$ となり、結局発育経過に伴い A_1' から $1/2a$ づつ減少してゆく。従つてグラフは一定の値をとる直線とならず下降を示す曲線になると思われる。それにもかかわらず実際にはFig. 4に示すようにグラフは一定に近い値を示すものであつた。それ故にこれには見かけ上一定の値を示すように働く何らかの原因が伏在することが考えられる。その原因として、1つにはADのRNA合成阻害作用が、時間の経過につれて漸次弱くなつていくに伴い、RNA合成量が50%より多くなる、その阻害作用が弱くなるために合成量が増加する分を α とすれば、合成量は $a/2, a/2+\alpha, a/2+2\alpha, a/2+3\alpha, \dots$ といった具合に発育経過につれて推移する。結局、分解速度は一定であつても合成量は α ずつ増してゆくことになるので一定に近い値を示すグラフが得られるものと思われる。

またADの作用がRNA合成を抑えると同時に細胞内のRNA分解をも抑え、両者が量的にほぼ等しいとすれば、それは見かけ上一定の値をとることに働く原因の1つに考えられるであろう。

本実験結果における5日目でのAD処理区のtRNA量が対照区よりも多くなっていることは(Fig. 4)、ADのRNA合成阻害作用が次第に弱くなつていったことを端的に示していると思われる。5令期にはrRNA量とtRNA量とはほぼ一定であるが、厳密にはこれらのRNA合成と分解とが起こつており、RNAは代謝回転してたえず変化しているのであろう。それ故に4令期に造られたrRNAとtRNAとが5令食桑期を通じて安定な状態で存在しているということを正確に言うためには、なお検討すべき点が残されているけれども、*Antheraea pernyi*の脂肪組織において、RNAが合成されているが、合成を停止した後においても、既存のRNAは一週間にわたり安定して維持されていること(Barth *et al.*, 1964)、rRNAは他のRNA種に比して安定であること(石本ら, 1970)、ADは低濃度で全RNAの80%を占めるrRNA合成を特に大きく阻害すること(Perry, 1963)などを併せて考えると、少なくとも5令初期に多量に存在するRNAは4令期に造られたRNAの

持ちこみであり、それが5令食桑期を通じて存在するという可能性が高い。

以上の事柄をさらに詳細に検討するためにrRNAとtRNA合成におよぼすADの影響を調べた。Fig. 11に示すようにrRNA合成はAD量が増すにつれて阻害の程度が増加していった。一方tRNAはAD量の如何にかかわらず約30%の合成阻害を受けるにすぎなかつた。このことはKadowaki *et al.* (1965, 1966)によると一定条件下ではADの合成阻害作用がrRNAとtRNAとで異なるという結果や、ADは低濃度ではrRNA合成を特異的に阻害するというHeLa細胞のPerry (1962, 1963)による結果とも一致している。

このADによるrRNAとtRNA合成阻害のちがいは、ADの作用機構として、染色体DNA鎖のグアニン塩基とかなり安定な状態で結合し、RNA合成を阻害することが明らかにされている(Hamilton *et al.*, 1963)ことから、ADによるrRNAとtRNA合成阻害の差異は両DNA分子中のGC含量のちがによるものと思われるが、カイコのrRNA分子のGC含量は50%であり、tRNA分子のGC含量は52%であること(Suzuki and Brown, 1972)からすると、ADのtRNAとrRNA合成阻害をGC含量のちがいで説明することはできない。1つの考え方としては*Xenopus*や*Drosophila*などでrRNA遺伝子の染色体上におけるその存在様式がredundancyの高い遺伝子であること、例えば*Xenopus laevis*では450~800個(Wallace and Birnstiel, 1965)、*Drosophila melanogaster*では130個(Ritossa and Spiegelman, 1965)、が明らかにされているが、もしカイコのrRNA遺伝子が*Xenopus*や*Drosophila*などと同様にredundancyが高いものと仮定するならば、ADがtRNA遺伝子よりもrRNA遺伝子とより結合しやすくなり、そのためにrRNA合成がtRNA合成よりも強く阻害されたのではないかと考えられる。

以上の結果、中腸組織のrRNAとtRNAが5令摂食期間中多量に存在し、閉鎖系に入ると減少してゆくということは、中腸の消化吸收機能の変化と充分に対応的である。しかしながら閉鎖系にはいと摂食期に比べ、RNA合成能が高くなるのは、組織学的変化を考慮すると熟蚕期中腸組織は幼虫期のものとは異なつた別の機能が生じつつあることを示唆しており、しかもこの機能は新生細胞による新しい中腸皮膜形成と関係しているものと思われる。

摘 要

変態過程における中腸組織の rRNA と tRNA との变化をみると、rRNA は 5 令摂食期間を通じて高い値を示し、吐糸を開始すると急速に減少していった。また tRNA は rRNA と同じ傾向で変化していった。摂食期間中 rRNA と tRNA とが多量に存在することは、この期間中タンパク質合成が盛んに行われていることを示唆している。

しかしながら RNA 合成能をみると、tRNA の合成能は摂食期間中はほとんど一定であるが、閉鎖系に入ると急激に高くなった。rRNA の合成能は発育経過に伴ってほぼ直線的に増加していった。すなわち、中腸組織における rRNA と tRNA との合成能は摂食中よりも、閉鎖系に入った方が高かった。

中腸組織の RNA 合成におよぼすアクチノマイシン D (AD) の影響をみると、AD をカイコに注射した 1 時間後に RNA 合成阻害効果が現われ、24 時間まで阻害がみられた。注射する AD 量を増してゆくと RNA 合成阻害効果は増大する。しかしながら 5~6 時間後に致死させる量である 1 頭当たり 25 μ g を注射しても阻害度は 80 % にとまった。

rRNA と tRNA 合成への AD の影響をみると注射する AD 量により rRNA 合成と tRNA 合成阻害に違いがみられるが、AD は rRNA 合成をより強く阻害した。

5 令起蚕に AD を注射し、RNA 合成を阻害したのち rRNA と tRNA 量の経時の変化を調べたところ、ともに摂食期間中対照の 80 % と高い値を示したが、tRNA は 5 日目に対照よりも高い値を示した。すなわち 5 令初期に多量に存在する RNA は 4 令期に作られた RNA が持ちこまれ、そして 5 令摂食期間を通じて安定な状態で存在するものと思われる。

以上の結果、5 令摂食期間中には、中腸組織の rRNA と tRNA が多量に存在し、閉鎖系に入つて減少していった。中腸の消化吸收機能の変化と充分対応的である。閉鎖系に入ると RNA 合成能が高くなるのは、組織学的変化を考慮すると、幼虫期とは異なった別の生理機能が生じつつあるものと思われ、しかもこの機能は新生細胞による新しい中腸皮膜組織の形成に関係していると思われる。

文 献

1. 中腸皮膜組織の微細構造. 蚕糸報, 24: 303-344
- Barth, B. H., P. D. Bunyard and T. H. Hamilton 1964 RNA metabolism in pupae of the oak silkworm, *Antheraea pernyi*; the effects of diapause development and injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 52: 1572-1580
- Dische, Z. und K. Schwarz 1930 Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. *Mikrochemika Acta*, 2: 12-19
- Hamilton, L. D., W. Fuller and E. Reich 1963 X-ray diffraction and molecular model building studies of the interaction of actinomycin with nucleic acids. *Nature*, 193: 538-540
- Hosoda, J., H. Shigematsu, H. Takeshita, S. Mizuno, H. Takahashi and B. Maruo 1963 Ribonucleic acid metabolism in the posterior silk gland of silkworm, *Bombyx mori*, during the fifth instar. *Biochem. Biophys. Acta*, 72: 544-554
- 石本 真・木村孝一・入江伸吉・上杉いづみ・小池達郎訳 1970 スピーリン: リボゾーム. 広川書店, 東京
- Kadowaki, K., J. Hosoda and B. Maruo 1956 Effects of actinomycin D and 5-fluorouracil on the formation of enzymes in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Acta*, 103: 311-318
- Kadowaki, K. and B. Maruo 1966 Pulse-labeled RNA formed in the presence of actinomycin D. *Biochem. Biophys. Acta*, 119: 480-485
- 川出由己・深田哲夫 1962 動物細胞にみいだされる 50S RNA について. 生化学 (講演要旨), 34: 409
- 木村孝一・友田順子・柴谷篤弘 1962 肝細胞 RNA のクロマトグラフ分析. 生化学 (講演要旨), 34: 409
- Mandel, J. D. and A. D. Hershey 1960 A fractionating column for analysis of nucleic acids. *Anal. Biochem.*, 1: 66-77
- Perry, R. P. 1962 The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48: 2179-2186
- Perry R. P. 1963 Selective effects of actinomycin on the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue cultures. *Exptl. Cell Res.*, 29: 400-406
- Reich, E., R. M. Franklin, A. J. Shatkin and E. L. Tatum 1961 Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis. *Science*, 134: 556-557
- Reich, E., R. M. Franklin, A. J. Shatkin and E. L. Tatum 1962 Action of actinomycin D on animal cells and virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48: 1238-1245
- Ritossa, F. M. and S. Spiegelman 1965 Localization of DNA complementary to ribosomal

- RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 53: 737-745
- Sissakian, N. M. 1959 Discussion. *Proc. 4th Int. Cong. Biochemistry*, 12: 180-183
- Suzuki, Y. and D. D. Brown 1972 Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 63: 409-429
- Takahashi, S. 1966 Studies on ribonucleic acid in the fat body of *Philosamia cynthia ricini donovan* (Lepidoptera) during development. *J. Insect Physiol.*, 12: 798-801
- 辻田光雄 1946 家蚕腸皮膜の組織学的並びに細胞学的研究. 蚕試報, 11: 211-293
- Waku, Y. and K. Sumimoto 1971 Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm, *Bombyx mori*, with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. I. Lightmicroscopy. *Tissue and Cell*, 3: 127-136
- Wallace, H. and M. L. Birnstiel 1965 Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochem. Biophys. Acta*, 114: 296-310
- Wyatt, G. R. and B. Linzen 1965 The metabolism of ribonucleic acid in *Cecropia* silkworm pupae in diapause during development and after injury. *Biochem. Biophys. Acta*, 103: 588-600
- Wyatt, G. R. 1968 Biochemistry of insect metamorphosis. In "Metamorphosis" (eds. W. Etkin and L. I. Gilbert): 144-184. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- 山口定次郎 1962 家蚕幼虫消化管の局所的機能差に関する研究. VII. 中腸皮膜の成長特にひだの数および長さの変化. 日蚕雑, 26: 299-305

Summary

Developmental changes in RNA content and its synthesis in the midgut during metamorphosis and the effect of actinomycin D on RNA synthesis in the midgut was studied.

The large amount of rRNA and tRNA per gram of tissue through the period of feeding at the fifth instar were contained in the midgut at high constant value of approximately 4 mg and 0.7 mg, respectively, and then decreased rapidly at the beginning of the larval maturation. The result implies that the midgut at gluteous stage, unlike that at stage of larval maturation, has a high rate of protein biosynthesis.

The rate of tRNA synthesis continued to increase gradually during the period of feeding and then enhanced greatly at larval maturation at which larva ceased to feed. On the other hand, the rate of rRNA synthesis continued to increase linearly accompanying larval development, that is, the rates of both RNA in the midgut at larval maturation were higher than that at the feeding stage.

The higher concentration of actinomycin D was injected, the stronger RNA synthesis was inhibited. Inhibition of RNA synthesis appeared within 1 hour after administration with actinomycin D, reached maximum by 5 hour and then continued for 24 hours. Although the larva treated with high concentration of actinomycin D, such as 25 μ g, was died within 5 to 6 hours after injection, even the administration of larva with 25 μ g of actinomycin D did not inhibit completely RNA synthesis, but inhibited 80 per cent of the control. The differential sensitivity of rRNA and tRNA syntheses to actinomycin D was noted. Actinomycin D inhibited rRNA synthesis stronger than tRNA synthesis.

Inhibition of both RNA syntheses was dependent on the actinomycin D dosage with which larvae were injected. After the 50 per cent blockage of further RNA syntheses by the treatment of the 1-day-old fifth instar larva with actinomycin D, developmental changes of both RNA contents were examined through stage of the fifth instar larva. Ribosomal RNA and tRNA contents during the period of feeding were at constant value of about 3.2 mg and 0.6 mg, respectively, each

value was about 75 per cent of the control, except for at the 5th day of the fifth instar, tRNA content was higher than the control. The results indicated that RNA synthesized during the fourth moulting and/or the fourth instar occurs relatively stable during the period of feeding at the fifth instar.