

カイコ5齡幼虫期の絶食処理が卵形成におよぼす影響

河口, 豊
九州大学農学部蚕学教室

伴野, 豊
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子資源研究センター

<https://doi.org/10.15017/23355>

出版情報：九州大学農学部學藝雑誌. 45 (3/4), pp.145-151, 1991-02. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



カイコ 5 齡幼虫期の絶食処理が卵形成 におよぼす影響

河 口 豊⁽¹⁾・伴 野 豊⁽¹⁾
古 賀 克 己⁽¹⁾・藤 井 博⁽²⁾

(1) 九州大学農学部蚕学教室

(2) 九州大学農学部遺伝子資源研究センター

(1990年9月20日受理)

Effects of Starvation Stress at the Fifth Larval Instar on the Egg Formation of *Bombyx mori*

YUTAKA KAWAGUCHI⁽¹⁾, YUTAKA BANNO⁽¹⁾, KATSUMI KOGA⁽¹⁾ and HIROSHI FUJII⁽²⁾

(1) Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

(2) Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-15, Fukuoka 812

カイコの卵形成過程を卵巢の発育状況からみると3期に大別される。第1は卵原細胞が分裂し、その数を増す増殖期、第2は卵殻と卵内容物を合成、分泌、蓄積する成長期、そして第一次成熟分裂を完了する成熟期である(大概, 1970)。この3つの発育過程の中で実質的な卵形成とは、卵黄と卵殻の形成を行う「成長期」であり、蛹期の卵巢がこれにあたる。一方、蛹期はガス交換を除けば外界からの栄養補給のない閉鎖系である。したがって蛹期における生殖巣の発達に伴う成長と分化はもとより、成虫器官の形成には幼虫期間、特に5齡期の食桑によって摂取した栄養物質にそのすべてが依存することとなる。カイコ幼虫は一定期間食桑して成熟期(熟蚕)に達し、吐糸・営繭の後蛹化し、さらに羽化するのであるが、この過程を進行させるためには、5齡期の1/2以上の期間食桑することが必要であることを前報(河口ら, 1990)で指摘した。

本報では引き続き、5齡幼虫期における食桑期間の中で蛹化ならびに羽化可能な種々の期間絶食処理を行い、絶食期間の長短が卵形成に及ぼす影響を卵数、卵形ならびに卵黄タンパク質の面から分析した。

本研究を行うにあたり、種々の有益な助言をいただき、又実験材料の吟味、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、並びに蚕の飼育に際し協力をいただいた木原始氏に対し、お礼申し上げます。

材 料 と 方 法

供試材料および絶食処理条件は前報(河口ら, 1990)と同じである。すなわち5齡起蚕から絶食を開始したA区:起蚕から24時間(以下hrと略記)食桑後絶食のB区:48hr食桑後絶食のC区:72hr食桑後絶食のD区:96hr食桑後絶食のE区:120hr食桑後絶食のF区および5齡期間食桑(144hr食桑)させた対照区(CONT)を設定した。

卵黄タンパク質の調製と定量:成虫卵管より取り出した卵を0.75%冷NaCl溶液中で磨砕し、900×g, 2分間遠心して上清を得た。上清に等量の10%冷TCAを加えて沈殿を集め、5%冷TCAにて数回洗浄後、エタノール:エーテル混液(1:1)で脂質を除去し、0.1N NaOHで溶解し可溶性タンパク質画分とした。牛血清アルブミンを標準にLowryの方法に準じて定量した(林, 1983)。

電気泳動法と濃度測定:6.5%アクリルアミドゲルを支持体にpH8.6, トリス-グリシンを泳動用緩衝液として用い、卵黄タンパク質のディスク電気泳動を行った。泳動終了後0.1% CBB-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を染色し、さらに7%酢酸で過剰の色素を除いた後、デンストメーター(ベックマン社製DU-8)によりゲル中のタンパク質成分の濃度を測定した。

結 果

1. 蛹期における生体重の変化

5 齢幼虫期の絶食処理が蛹期の生体重におよぼす影響をみるために、化蛹初期 (蛹 1 日), 中期 (蛹 5 日) および後期 (蛹 9 日) における蛹生体重を調べた. (Fig. 1). 対照区 (144hr 食桑) についてみると, 生体重は発育経過に伴ってわずかづつ減少するもののその減少量は極めて小さく, 雌体重は 1 頭当たり 1.8~1.6g, 雄体重は 1.4~1.2g の範囲の値を維持した. 雌の体重は雄よりも常に大であった. 一方, 120hr 食桑, 24hr 絶食した F 区の体重は雌が 1.7~1.5g, 雄は 1.4~1.2g となり, 食桑期間が短く, 絶食期間が長くなる E 区 (96hr 食桑後絶食) は雌 1.4~1.2g, 雄 1.1~1.0g, D 区 (72hr 食桑後絶食) では 1.1~1.0g, 雄 0.8~0.7g となり, 5 齢期の食桑期間の短縮と絶食期間の延長に伴って蛹体重は著しく減少した. なお, C 区の個体は羽化不能であった.

2. 造卵数, 卵形および卵重

5 齢期の絶食処理が, 造卵能力におよぼす影響を造卵数, 卵形および卵重について分析調査した. まず, 造卵数をみると (Fig. 2), 1 頭当たり対照区 (144hr 食

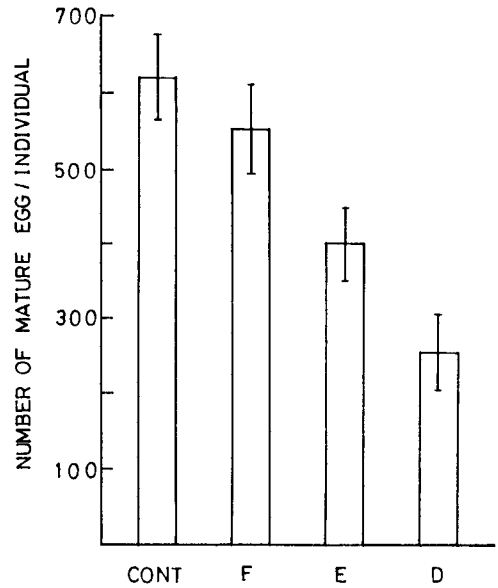


Fig. 2. Effects of starvation stress on the number of mature eggs.

Eggs were taken out from the oviducts of emerged females.

Cont: control; D, E and F are the same as in Fig. 1.

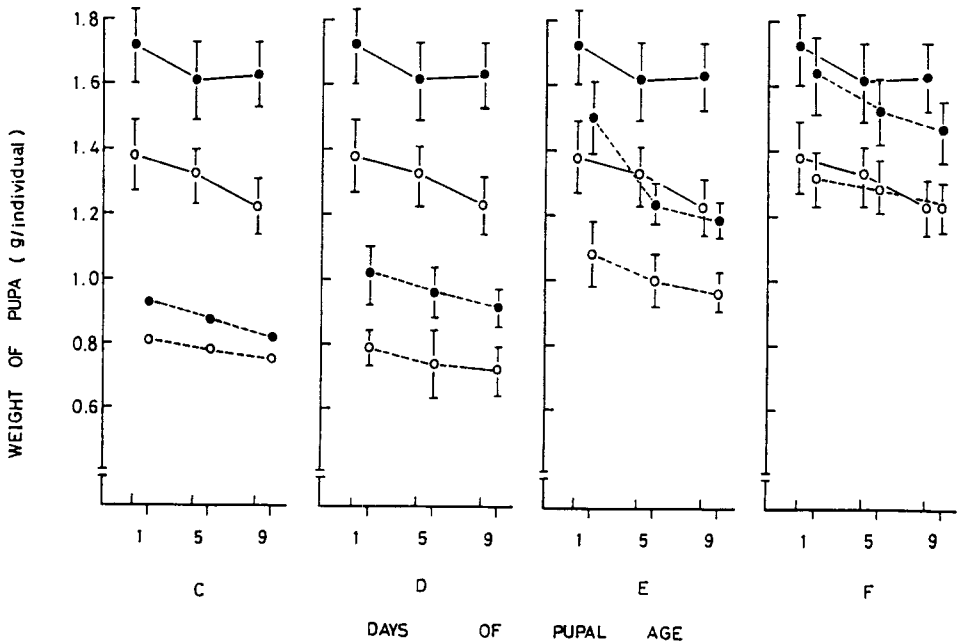


Fig. 1. Effects of starvation stress on the body weight of pupa.

Fifth instar larvae were made to abstain from foods after feeding for C: 2 days, D: 3 days, E: 4 days, F: 5 days. Closed circle: female, open circle: male, solid line: control, dotted line: starvation treatment, vertical bar: standard deviation.

桑) 618 ± 53 粒に対し, 120hr 食桑後絶食の F区は約560粒, 96hr 食桑の E区は約400粒と減少し, さらに72hr 食桑の D区では約260粒となり, 食桑期間が短く絶食期間が長くなるに伴い造卵数は急速に低下した. A区(完全絶食)およびB区(24hr 食桑)は孵化不能となり, C区(48hr 食桑)は羽化不能のため卵数調査が出来なかった.

次に各区の造成卵について (Fig. 3), 卵の長径と短径をみると (Fig. 4), 対照区の長径は 1.37 ± 0.04 mm, 短径は 1.14 ± 0.04 mm であった. F区においては長径 1.38mm, 短径 1.12mm であまり大きな差異はみられなかったが, E区になると 1.31mm, 1.09mm, D区では 1.19mm, 1.01mm と絶食期間が長くなると長径と短径の短縮化に伴って卵側面部の面積も, 対照区が

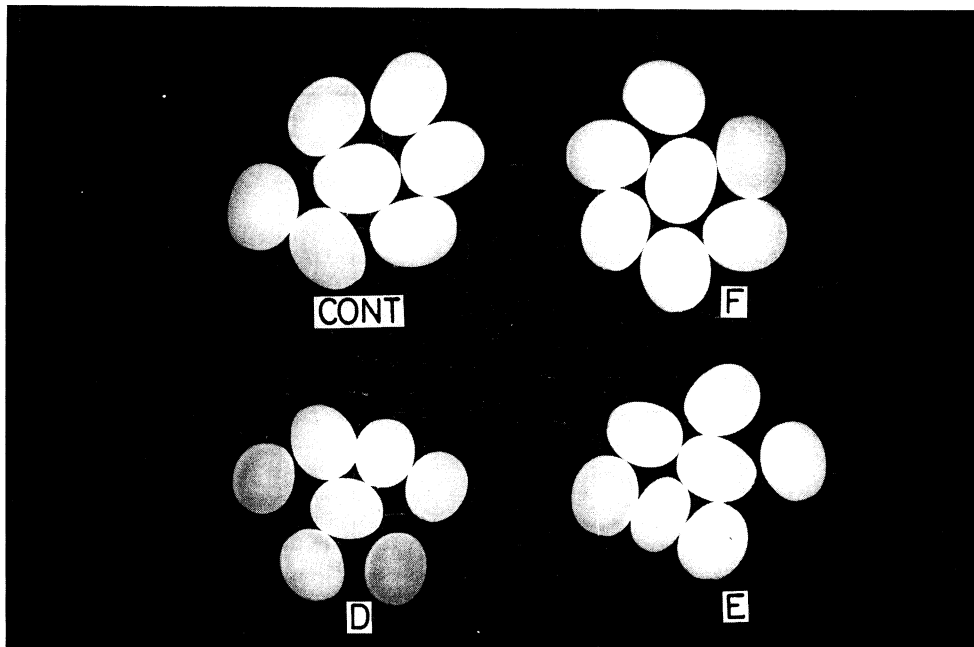


Fig. 3. Photograph of eggs of the control and starved females. Symbols are the same as in Fig. 2.

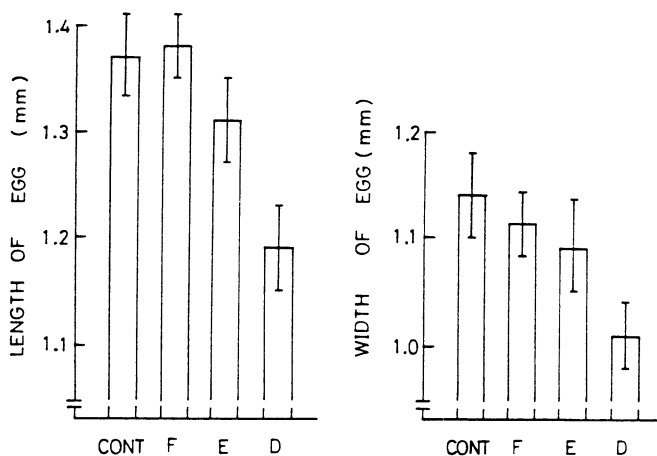


Fig. 4. Effects of starvation stress on the egg size. Symbols are the same as in Fig. 2.

1.25±0.08mm²であるのに対し、F区は1.23mm²、E区は1.15mm²、D区になると0.95mm²にまで減少した(Fig. 5)。長径と短径、卵側面部の面積の短縮と低下の程度は、F区、E区では比較的小さなものであったが、D区では短縮と低下が大きく卵形の小型化が顕著となった。

卵重をみると(Fig. 6)、対照区における100粒当たりの重さは62.6±0.8mgであった。それに対し、F区およびE区は62.0mgでやや低下するものの大差は認められなかった。しかしながらD区になると55.4mgと大きく低下した。

3. 卵黄タンパク質の含量と組成、および

ピテロジェニンと卵特異タンパク質の含量

対照区の卵黄タンパク質含量は、1粒当たり45.9mgであるのに対し、F区は40.2mg、E区は37.5mgとなり、D区においては33.1mgと絶食期間が長くなるに伴って低下した(Fig. 7)。

次に組成をみると、対照区では主要成分と微量成分の計15種類が検出された(Fig. 8, CONT)。一方、絶食処理を行ったD、E、F区はいずれも対照区と処理区の両者の間には成分的な差異は認められなかった(Fig. 8, D, E, F)。しかしながら、処理区において対照区の各タンパク質成分に対応するピテロジェニン以外の大部分の成分の染色性が低下し、濃度が低下する傾向が認められた。その傾向は、絶食期間が長い処理区ほど著しかった。そこで卵黄タンパク質組成のうち主要

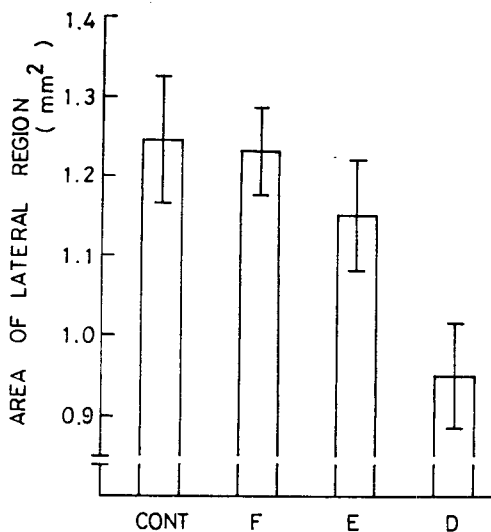


Fig. 5. Effects of starvation stress on the area of lateral region of eggs. Symbols are the same as in Fig. 2.

成分の1つであるピテロジェニンと卵特異タンパク質(ESP)とについてそれぞれの含量を比較した(Fig. 9)。対照区におけるピテロジェニン含量は、卵1粒当たり5.5μgであったのに対し、処理F区は6.5μg、E区では5.6μg、D区においては6.6μgといずれの場合も対照区のそれとほぼ同程度、あるいはそれよりも多い含量であった。一方、ESPをみると対照区が4.2μgに対

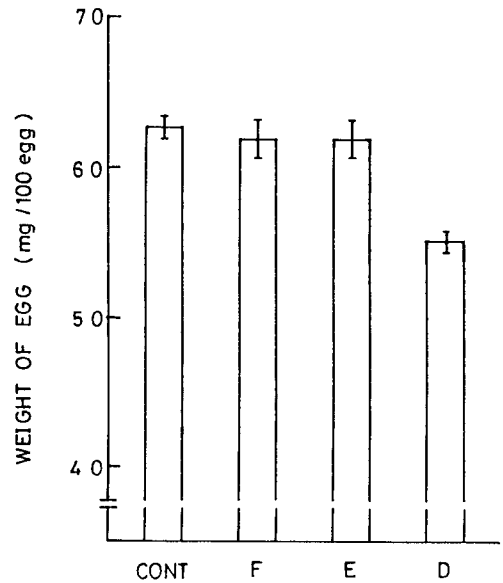


Fig. 6. Effects of starvation stress on the weight of eggs. Symbols are the same as in Fig. 2.

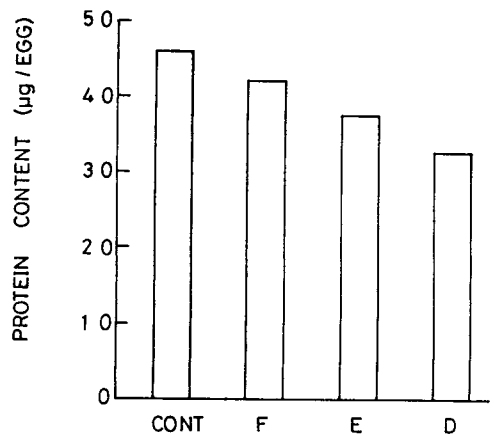


Fig. 7. Effects of starvation stress on the yolk protein contents of eggs. Symbols are the same as in Fig. 2.

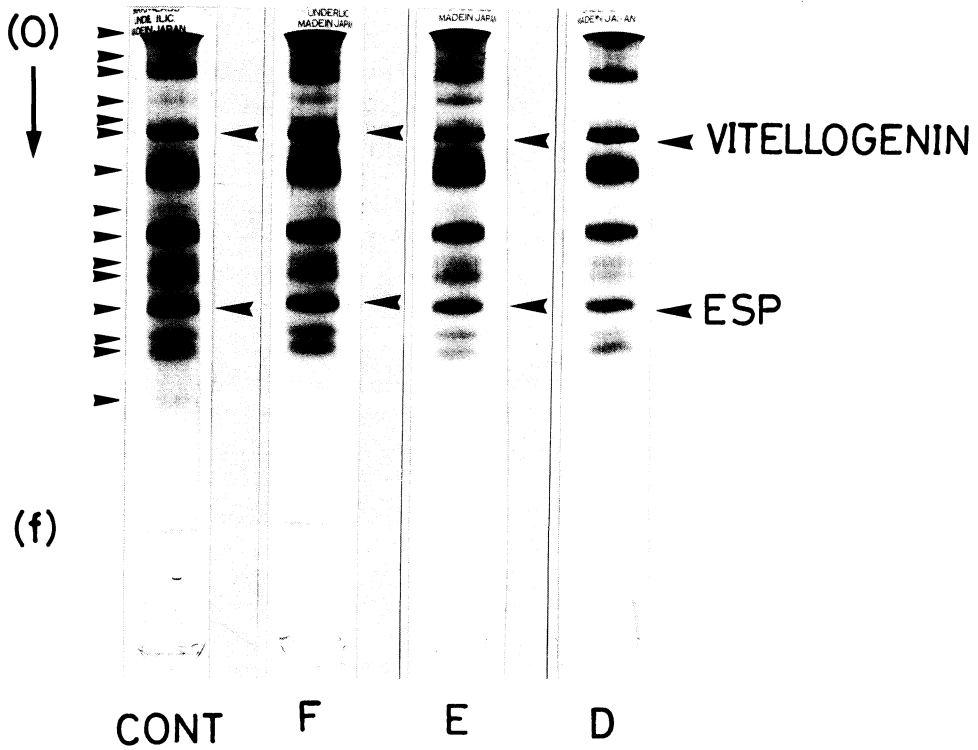


Fig. 8. Electrophoretic patterns of yolk protein in the eggs of the control and the starved females. Direction of the run was from the cathode (o) to the anode (f). ESP: egg specific protein. Symbols are the same as in Fig. :2.

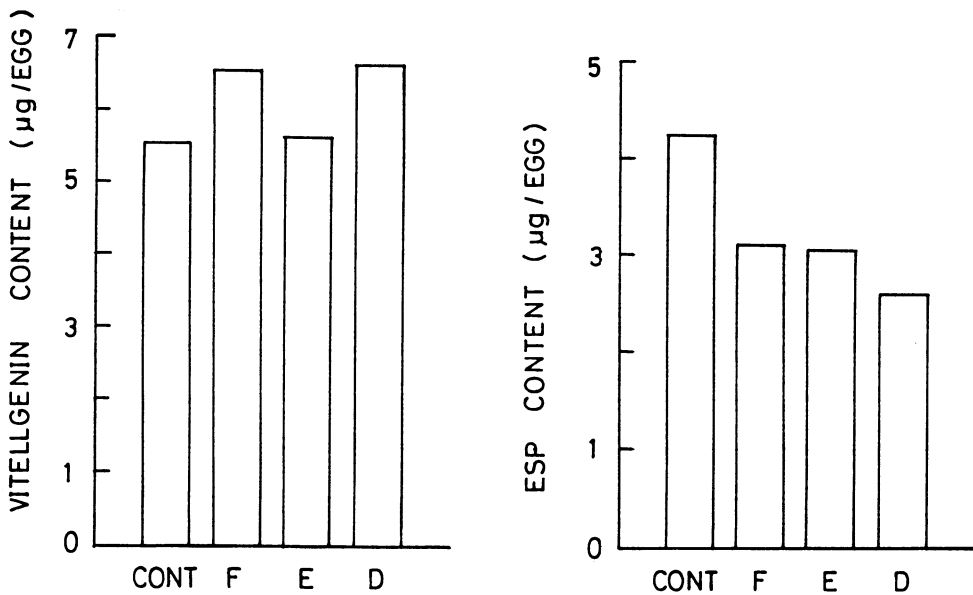


Fig. 9. Effects of starvation stress on the amounts of vitellogenin and egg specific protein in the eggs. Measurements from electropherograms shown in Fig. 8.

し、絶食処理を行ったF区は $3.1\mu\text{g}$ 、E区は $3.0\mu\text{g}$ 、D区では $2.6\mu\text{g}$ と含量が減少し、絶食期間が長い処理区ほど低下の程度が大となった。

考 察

幼虫期間の給餌制限やあるいは熟蚕期(5齢幼虫が充分発育して食桑を停止し、吐糸・営繭を開始する時期)前に食桑を中断して上簇(吐糸、営繭させること)させるいわゆる緑蚕上簇を行うと、繭重、繭層重、蛹体重、卵数、卵重などの計量形質に多大の影響をおよぼすことが知られている(松村, 1932; 長谷川, 1943; 堀内ら, 1962), この事は幼虫期における栄養摂取量の多少が、営繭ならびに蛹化以降の発育と成虫器官の形成に重要な要因となっていることを物語っている。

著者らは5齢幼虫期の絶食処理を通じて栄養摂取量を変化させ卵形成機能におよぼす影響を分析し、卵形成過程における調節機構の解明を試みた。

まず蛹体重をみると絶食期間が長い個体ほど軽くなり、体重低下の割合も大となった。すなわち、5齢幼虫期の栄養摂取量に応じて体形を矮小軽量化して、生体本来の機能維持を図るものと考えられる。この蛹の矮小化に伴い造卵数が極端に減少した。それに伴って卵形の微小化をも引き起こし、特に3日間絶食のD区において著しかった。一方、卵重をみると卵の微小化の程度が比較的小さいF区やE区では対照区に比べ大差は認められなかったが、微小化の著しいD区では約12%の減少となっていた。

絶食のストレスにより蛹体重の低下、造卵数の減少、卵の微小化の諸事象は、緑蚕上簇による調査(戸谷, 1984)とほぼ同様の結果となった。

卵数(造卵数)と卵の大きさ(卵形と卵重)に対する絶食の影響から卵形成をみると、まず第1に卵数を減少させることにより、成熟卵形成の調節を行い、さらに強く絶食のストレスが加わると、次に或る一定の卵数を維持しつつ卵の大きさ(容積)の低下を行いながら調節をするものと推察した。

次に卵黄タンパク質をみると、絶食期間の長さに応じてその含量は逐次減少した。しかしながら或る種のタンパク質成分の欠失や、新生タンパク質成分の出現は認められなかった。カイコの卵黄タンパク質は2つの方法により形成される。1つは体液中に存在するタンパク質成分が選択的に卵細胞内へ能動輸送によって移行し、蓄積されるものであり(Doira and Kawaguchi, 1972; Kawaguchi and Doira, 1974; 藤井・河口, 1983), いま1つは卵巣自身が合成し、卵細胞内に蓄積

する方法である(Ono *et al.*, 1975; Irie and Yamashita, 1983; Yamashita, 1986)。すなわち、卵黄中のタンパク質には形成の過程を異にする成分によって成り立ち、前者の代表がピテロジェニンであり、後者の代表が卵特異タンパク質ESPであると言える。そこで絶食の影響をそれぞれのタンパク種についてみると、ESPの含量は絶食期間の長さに応じて激減した。一方、ピテロジェニンの場合、含量の減少は全く無く、むしろ増加する処理区が認められた。この結果は、絶食のストレスは卵巣のタンパク質合成ならびに蓄積機能の低下を引き起こすことを明示するものである。しかしながら、体液タンパク質の選択的取り込み機能に対して低下させることなく、むしろストレスが強くなると合成と蓄積の機能低下に対する補償作用に影響をあたえ補償機能が作動して、体液に由来するピテロジェニン取り込み能が上昇し、その結果ピテロジェニン含量の増加が生じたものと推察した。

以上の結果を総合すると、絶食によるストレスは卵形成機能を低下させ、卵数、卵形、卵重、卵黄タンパク質に影響をあたえるが、その影響はまず卵数を減少させることにより完成成熟卵造成のための調節を行う。さらに強くストレスが加わると次には卵の容積を小さくすることにより一定の卵数を確保しようとする2段階の調節が働くものと推論することが出来る。しかしながら、カイコには卵形と卵黄の形成に関与する遺伝子が10数種知られている(Doira, 1983)。このことは卵形成が遺伝的に決定されていることを意味するものであり、絶食処理による卵の形成変化はあくまでも遺伝的決定の枠組内における変異であることに疑問の余地は無い。

要 約

5齢幼虫期の絶食処理が、卵形成におよぼす影響を分析した。

1. 造卵数が減少した。さらに絶食ストレスが強くと加わると、卵形の微小化および卵重の低下が認められた。

2. 卵黄タンパク質総含量は減少したが、成分の組成には変化は生じなかった。

3. 卵巣で合成される卵特異タンパク質の含量は低下した。しかしながら体液中のタンパク質に由来するピテロジェニンの含量は低下しなかった。

以上の結果より、カイコ卵形成過程において、①卵数の調節、②卵容積(卵形、卵重、卵内容物)の調節の機構が、環境の変化に呼応して作動しているものと推

察した。

文 献

- Doira, H. 1983 Linkage maps of *Bombyx mori* — Status quo in 1983. *Sericologia*, **23**, 245-269.
- Doira, H. and Y. Kawaguchi 1972 Changes in haemolymph and egg protein by the castration and implantation of the ovary in *Bombyx mori*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **17**, 117-125.
- 藤井 博・河口 豊 1983 カイコの体液タンパク質の発育過程に伴う変化, 特に主要タンパク質成分(MP5)の消長, 日蚕雑, **52**, 529-536.
- 長谷川金作 1943 家蚕卵細胞の発育に関する研究. I. 蛹期間に於ける卵巣の発育. 蚕試報, **11**, 359-377.
- 林 博司 1983 沬紙を用いた Folin 法の簡便化, 生化学, **55**, 257-258.
- 堀内彬明・波島千恵子・安江 昇 1962 家蚕の第5齢期における毎回減量給桑と緑蚕上簇との全繭重, 繭層重, 繭層歩合, 産卵数に及ぼす影響. 日蚕雑, **31**, 421-423.
- Irie, K. and O. Yamashita 1983 Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, localization and titre changes during oogenesis. *Insect Biochem.*, **13**, 71-80.
- Kawaguchi, Y. and H. Doira 1974 Incorporation and synthesis of protein by the ovaries of *Bombyx mori*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **18**, 139-147.
- 河口 豊・伴野 豊・古賀克己・藤井 博 1991 5齢期の絶食処理がカイコ幼虫の発育と体液タンパク質におよぼす影響. 九大農学芸誌, **45**, 135-143
- 松村季美 1932 原蚕飼育要約の差異が次代蚕に及ぼす影響. 長野蚕試報, (21), 1-69.
- 大槻良樹 1970 生殖と発生. カイコによる新生物学実験(森 精編). pp.104-120, 三省堂, 東京.
- Ono, S., H. Nagayama and K. Shimura 1975 The occurrence and synthesis of female and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **5**, 313-329.
- 戸谷和夫 1984 家蚕における退化卵発現に関する研究. 蚕試報, **29**, 285-369.
- Yamashita, O. 1986 Yolk protein synthesis in *Bombyx* eggs: Synthesis and degradation of egg-specific protein. *Adv. Invertebr. Reprod.* **4**, 79-84.

Summary

Silkworm larvae at the fifth instar were made to abstain from mulberry leaves after feeding for 0 to 5 days. Control larvae matured after feeding for 6 days, spun cocoons and went into metamorphosis. Larvae fed for only 0 to 2 days died mostly before pupation and some before emergence of moths. Effects of the starvation stress on the egg formation which takes place during pupal life were investigated.

1) The number of mature eggs was most severely affected to reduce by starvation stress as compared with size or weight. The longer the fasting, the more reduced the egg number. By fasting the last one day of the fifth instar, eggs became rather slender with no detectable changes in weight. The weight of an egg reduced only in those made by animals starved after feeding for the early three days in the fifth instar.

2) Contents of yolk protein tended to decrease with the shortening of feeding period. The amounts of the egg specific ESP protein, one of major components of yolk protein synthesized by the ovary, decreased significantly by starvation. While those of the vitellogenin, transferred from pupal haemolymph into the oocytes, were not reduced at all.

It may be inferred that there exist two different regulatory mechanisms in the oogenesis of silkworm. In response to unusual environment, a regulation process concerning the number of eggs to be matured comes into action at first, then against unsaturated shortages acts an egg size controlling mechanism.