家蚕性フェロモンに関する研究 I

雌蛹体液中にみられる性フェロモン活性

林屋慶三・北尾元一・山崎敦子・熊澤誠人・岡田裕伸・西田 順

京都工芸繊維大学繊維学部

Studies on the Sex Pheromone of the Silkworm, *Bombyx mori* L. Sex Pheromone Activity Found in Hemolymph of the Female Pupae. Keizo HAYASHIYA, Motoichi KITAO, Atsuko YAMAZAKI, Masato KUMAZAWA, Yasunobu OKADA and Jun NISHIDA (Faculty of Textile Science, Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibres, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **23**: 28—32 (1979)

A strong sex pheromone activity was demonstrated in the ethereal extract of KOH-treated hemolymph of silkworm female pupae. No activity, however, was demonstrated in the untreated hemolymph extract. Such findings suggest that Bombykol or its precursor is accumulated in an inactive form bound to protein in the pupal hemolymph. Changes in the pheromonal activity during the female pupal period were observed both in the hemolymph and in the pheromone-producing organ, the alluring gland. The activity in the hemolymph which appeared 4 days before the emergence of adult reached maximum value after 2 days, but the activity in the alluring gland began to increase on the day before emergence. It was concluded that Bombykol or its precursor which was present in an inactive form bound to a protein in the hemolymph was transported to and accumulated in the alluring organ at the end of the pupal period.

緒 言

カイコの性誘引物質は BUTENANDT *et al.* (1959) により雌蛾の側胞体より精製単離され、またその構造は、*trans*-10, *cis*-12-hexadecadiene-1-ol と決定され、一般に“ボンビコール”と呼ばれている (BUTENANDT *et al.*, 1961)。 10^{-12} ~ 10^{-13} $\mu\text{g/ml}$ の微量でよく雄蛾に性行動をおこさせる生理活性物質である。ボンビコールの分泌機構については STEINBRECHT (1964), WAKU and SUMIMOTO (1969) らが雌蛾および蛹の側胞体の光学および電子顕微鏡による形態学的研究を行い、ボンビコール分泌の模様について考察した。一方、井上・浜村 (1972) はボンビコールの生合成について報告した。これによれば、ボンビコールがパルミチン酸を経て生成することをアイソトープを用いて明らかにし、さらにパルミチン酸が還元されてセチルアルコールになり、その炭素鎖の 10, 12 位の結合が不飽和化されてボンビコールとなると推定した。しかし、セチルアルコールのリン酸エステルと、化蛾直前の雌蛹側胞体の磨砕液との *in vit*-

ro の反応でボンビコールが生成すると報告した。

筆者らも上記 *in vitro* 生合成系を用いて、ボンビコールの生成機構について検討を加えてきたが、その過程で以下のような新しい知見が得られたので報告する。すなわち、雌蛹体液を KOH で処理してのちエーテル抽出をおこなうと、抽出液に強い性フェロモン活性が認められることが、生物検定によって明らかとなった。雌蛹体液をそのままエーテル抽出した場合には活性が殆んど認められず、KOH 処理することによってはじめて活性が現われてくることから、体液中に存在する物質はボンビコールの前駆体か、あるいはボンビコールと他の物質とが結合している、“結合ボンビコール”とでもいうべきものか、であろうと考えた。そこで化蛾前の雌蛹体液および側胞体の性フェロモン活性の強さの経時的变化を全蛹期について生物検定法を用いて定量した。またボンビコールと結合していると思われる物質についても検討を加え、これがタンパク質様の高分子物質であることを明らかにした。なお、この研究ではボンビコールそのものを分離確認していないが、いままでに明らかにされたカイ

コの性フェロモンはボンピコールであるので、KOH 処理によってはじめてエーテルに溶出してくる活性物質をボンピコールと考えることにして、記述を進めることにし、遊離型、結合型ボンピコールという言葉を使用した。

実験材料と方法

1. 材料

桑葉育または人工飼料育した家蚕交雑種の蛹を材料として用いた。雄蛹は化蛹 7～8 日後に 5°C に冷蔵保存し、適宜 25°C の下に出して羽化せしめ生物検定に使用した。雌蛹は通常 25°C、場合によっては 20°C で飼育し、適宜試料を採取した。

2. 体液および側胞体磨砕液の調製

雌蛹の腹部にハサミで切り口を入れ、滴下する体液を氷冷しつつ採取した。体液のチロシンナーゼによる黒化を防ぐため、採取した体液に 0.5% 溶液になるよう還元型グルタチオン(GSH)を加え、-20°C で保存し適宜使用した。なお GSH が活性に影響を与えないことを GSH 添加および無添加の体液について予め確認した。側胞体磨砕液は雌蛹より切りとった側胞体(側胞体がまだ形成されていない時期には尾部末端)を 0.75% 冷生理食塩水で洗浄後、pH 8.0 の 1/30 M リン酸緩衝液を加え乳鉢中で海砂とともにすりつぶし、これを 7,000 rpm で 30 分遠心しその上清を用いた。実験結果 1 および 3 で述べる体液は上記の方法で調製したが、2 で述べる定量実験ではこの方法では蛹 1 個体からとり出せる体液量が定まらないので、雌蛹の側胞体を切りとった残りの蛹体を軽くつぶし、遠心後の上清を体液とした。厳密に言えば 1 個の蛹について、側胞体とその残りの蛹体とに含まれるボンピコール活性を測定したことになる。

3. ボンピコールの抽出

体液および側胞体抽出液中に存在するボンピコールの抽出のため、まず試料に 1.5 倍量のメタノールを加え 60% 溶液とし、これに KOH を約 20% 溶液となるように加え、冷却しつつ溶解させた(井上・浜村, 1972)。この溶液を 25°C で 15～18 時間放置後、等量の水を加えて後エーテルでボンピコールを抽出した。エーテル層は水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。なお遊離のボンピコールの抽出は試料に直接エーテルを加えて抽出、水洗、乾燥した。

4. 生物検定

生物検定は BUTENANDT *et al.* (1961) の方法を一部変更して行なった。検定に用いた雄蛾は冷蔵保存してお

いた蛹を 25°C の下に戻し飼育し羽化 2 日後のものを使用した。検定は 25°C、湿度 75% の下で、1 日のうち 13:00 時～18:00 時の間に限って行なった。木製の箱(35×45 cm)に紙を敷き、その上に雄蛾 20 頭を載せ静止するまで 30 分以上環境に慣らした。次いで 1 cm 角のろ紙に 0.1 ml の供試溶液(体液および側胞体抽出液のエーテル抽出液を随意希釈した溶液)をつけエーテルを蒸発させた後、雄蛾の触角に静かに近づけ約 5 秒以内に雄蛾の約 50% が翅を小刻みに激しく振動させ、性行動をしめしたいわゆる BR₅₀ のときの供試溶液の希釈度を読みとった。通常は体液 1 ml に対しエーテル 5 ml で抽出した溶液を原液とした。実験結果 2 の項の定量では、側胞体および蛹体それぞれ 5 頭分をエーテル 5 ml で抽出した溶液を原液とした。図表に掲げた雄蛾誘引力の活性の数値は BR₅₀ を示したときの供試溶液の希釈度で全て表わした。なお検定は低濃度の溶液から高濃度へと順を追って行なった。

5. 雌蛹体液のゲルろ過

羽化 1～2 日前の雌蛹体液 15 ml をセファデックス G—150 カラム(2.5×100 cm)に通し、0.1 M 塩化ナトリウム—0.04 M リン酸緩衝液(pH 7.5)で展開した。流速は約 40～50 ml/hr で、5 ml ずつ分取した。展開後各々の分画を 280 nm の波長における吸光度を測定し、タンパク濃度とした。

実験結果

1. 雌蛹体液中に存在する結合型ボンピコール

著者らは井上・浜村(1972)が *in vitro* における生合成反応液よりボンピコールを抽出する際に用いた操作法を化蛾 2 日前の雌蛹の体液についておこない、以下の新知見をえた。すなわち実験方法 2 に記した体液調製法にしたがって、化蛾 2 日前の蛹体液 1.0 ml にメタノール 1.5 ml を加えた溶液に、0.5 g の KOH を低温下で加えて 25°C で一夜放置してのちエーテル抽出をおこなう区と、KOH を加えることなくエーテル抽出をおこなう区とを作った。両区のエーテル抽出液について生物検定をしたところ、前者には強い性フェロモン活性を認め、後者にはそれが殆んど認められないことを知った。KOH 処理によってはじめて性フェロモン活性があらわれることの説明としては、(1) 体液中にボンピコールの前駆体が存在し、KOH の作用でボンピコールとなる、(2) 体液の中ではボンピコールが他の体液成分と結合して不活性な形で存在しており、KOH 処理によってこれが遊離してくる、などが考えられる。

Table 1. Changes of sex pheromone activities in the hemolymph and the alluring gland during the pupal development of the female silkworm*
Alluring gland

Days before emergence	~8	7	6	5	4	3	2	1	0 (emergence)
Non treatment	0	0	0	0.25	0.5	0.8	1	20	2,500
KOH treatment	0	0.1	0.9	5	10	30	50	1,200	5,000

Hemolymph

Days before emergence	~8	7	6	5	4	3	2	1	0 (emergence)
Non treatment	0	0	0.1	1	5	7	15	20	1
KOH treatment	0	0	1	5	200	500	5,000	4,000	200

* Rearing temperature : 20°C.

Table 2. Sex pheromone activity of the fractions after treatment of the female pupal hemolymph with acetone

Fraction	Activity (dilution)
Supernatant	80
Precipitate	4,000

Table 3. Sex pheromone activity of the fractions after treatment of the female pupal hemolymph with ammonium sulfate

Fraction	Activity (dilution)
0 ~0.4 sat.	50
0.4~0.6 sat.	800
0.6~0.8 sat.	5,000
0.8~1.0 sat.	20
Supernatant	100

なお念のために雌蛹体液について同様の実験をおこなったが、いずれの場合にも活性は認められなかった。

2. 体液および側胞体中の結合型および遊離型ボンビコールの定量

上に述べたように雌蛹体液中に何らかの形でボンビコールが存在することがわかったので、これまでボンビコールの生合成の場であると考えられていた側胞体と体液中のボンビコールとの量的関係を明らかにするため、雌蛹の蛹期の各時期における側胞体と体液中のボンビコール活性を生物検定で測定した。この場合雌蛹は全蛹期を20°Cで飼育した。結果はTable 1に示した。体液、側胞体ともに化蛾6~5日前頃からKOH処理区において活性がではじめ、その量は体液では4~3日前、側胞体では1日前から急激に増加した。体液では化蛾2~1日前で最高となり、化蛾とともに急激に減少し、側胞体では羽化後も増加した。一方無処理区、すなわち遊離の性フェロモン活性は体液においては各時期ともわずかに存在する程度であるが、側胞体においては化蛾とともに急激に増加するという傾向がみられた。

3. 雌蛹体液のアセトン処理、硫酸塩析およびゲルろ過

体液中に存在するボンビコールは他の物質と結合していると考えられるので、その結合物質について検討し

た。化蛾2日前の雌蛹体液1mlに冷アセトンを加えて沈澱をつくり遠心分離をおこなった。沈澱は1/30Mリン酸緩衝液pH8.0で溶解し、また上清には少量の水を加え、それぞれKOH処理をしてのちエーテル抽出を行った。Table 2に示したように、性フェロモン活性は沈澱の方に強くみられた。次に体液2mlを用いTable 3に示した飽和度になるよう粉末硫酸を加えて塩析し、沈澱は遠心分離(10,000rpm, 30分)で分画した。それぞれの分画をKOH処理後、ボンビコールをエーテルで抽出した。結果は表のように硫酸0.6~0.8飽和で沈澱する分画に強い活性のあることがわかった。このことからボンビコールと結合している物質はタンパク性のものであろうと推定した。そこで、化蛾2日前の雌蛹体液15mlをセファデックスG—150によるゲルろ過にかけた。その結果をFig. 1に示す。

約3つのタンパクのピークが認められ、試験管番号29, 35, 40, 60, 100, 113, 140, 150の各分画について、KOH処理後エーテル抽出を行ない、ボンビコール活性を調べた。Fig. 1の如く、溶出量200mlのところ(試験管番号40)に強い性フェロモン活性が認められ、第1番目のタンパクのピークと一致した。他の分画にはほ

Fig. 1. Fractionation of proteins of the female pupal hemolymph on the Sephadex G-150 column (solid circle) and sex pheromone activity of each fraction (bar).

Column size, 2.5 cm×100 cm; flow rate, 40 ml~50 ml per hr.; and buffer, 0.04 M phosphate buffer containing 0.1 N NaCl (pH 7.5).

とんど活性が認められなかった。以上の結果より体液中のボンピコールはタンパク質と結合していることが明らかとなった。

考 察

ボンピコールは雌蛹末期の側胞体で生成され、化蛾とともに分泌されると考えられてきた。しかし本研究では雌蛹体液にすでにボンピコール活性を有する物質が存在することが明らかになった。しかもこの蛹の体液に存在する活性物質はタンパク質と結合しており、そのままでは雄蛾に対する活性がなく、KOH 処理することにより活性が現われた。それでこの活性物質を結合型ボンピコールと呼ぶことにした。体液に存在する結合型ボンピコールは化蛾6~5日前より出現しはじめ、漸次増加して化蛾2~1日前に最高となり、羽化後急速に減少してゆく。一方、側胞体中にも結合型ボンピコールが存在し、化蛾前日より急速に増加し羽化後も増加の傾向は続いた。また遊離型ボンピコールも同様の傾向を示し、とくに羽化後の増加が急激であった。以上の結果より化蛾2~1日前に雌蛹体液中に多量に存在する結合型ボンピコールは化蛾前日から羽化に際し側胞体に取り込まれることが示唆される。さらに側胞体に取り込まれた結合型ボンピコールは側胞体中のある種の加水分解酵素の働きに

よってタンパク質との結合がはずれ、遊離されたボンピコールとして分泌されるのではないかと推定される。

このように疎水性のボンピコールがタンパク質と結合して親水性を獲得し、組織間を移動しているならば、このタンパク質は一種の carrier protein の機能を有するものと考えられる。これに関連あるものとしては、CHINO *et al.* (1969) はシンジュ蚕を用いて体液中に脂肪体からジグリセリドを特異的に取り出し運搬するタンパク質を見だし分離精製した例がある。また単離したリポタンパク質のひとつが卵の中に取り込まれ、卵黄タンパク中に蓄積されるヴィテロジェニンであることを明らかにした(茅野, 1977)。一方、藤條・鎮西 (1974) もセクロピア蚕の脂肪体に存在するタンパク顆粒から蛹期後半に体液中に放出され、成虫発育の過程で利用される2種類のタンパク質の存在およびその性質を明らかにした。筆者らの見出したボンピコールと結合しているタンパク質と、上述の知見との関連については目下検討中である。

さて、ボンピコールはどこで生合成されるのであろうか。体液に性フェロモン活性が明確に検出されるのは化蛾4日前頃であり、側胞体細胞が隣接の皮膚組織細胞とはっきりと区別がつくようになる時期は25°C飼育の場合化蛾4日前(WAKU and SUMIMOTO, 1969)といわれ

る。側胞体で作られたボンピコールがいったん体液中に放出されるのであろうか、あるいは他の組織でつくられたボンピコールが carrier protein に乗って側胞体に運ばれるのか、いまのところ即断できない。側胞体以外の組織も生合成の場として関与している可能性がでてきたのである。また緒言に述べたように性フェロモン活性は体液を KOH 処理することによって検出されたのであり、その間に単にタンパク質との解離反応ばかりでなく合成あるいは分解をとまらう化学反応がおこったとすれば、タンパク質と結合している物質はボンピコールの前駆体であるかも知れない。このように考えるとボンピコールの前駆体がタンパク質と結合したままボンピコールへと生合成されてゆくことも考えられ、またその場が側胞体である可能性もでてくる。井上・浜村 (1972) がセチルアルコールのリン酸エステルを基質とし、側胞体磨砕液を酵素液として *in vitro* で反応させ、ボンピコールを生合成させており、これとの関連についても同様に検討中である。

体液中でタンパク質と結合している物質の化学的固定、生成部位、結合しているタンパク質の性質の検討およびこれらを含めてボンピコール生合成の機構について今後研究を進めてゆきたい。

摘 要

1. カイコ雌蛹体液中に性フェロモン活性が見出された。この活性は体液をアルカリ処理してのち、エーテル抽出した場合にエーテル抽出液中に認められた。体液を直接エーテル抽出した場合には認められなかった。

2. この性フェロモン活性を示した物質は体液中ではタンパク質と結合し不活性な形で存在しているものと考えられる。

3. 生物検定法で全蛹期にわたってこの物質の消長を追求した結果、古くより性フェロモンの生産、分泌器官と考えられてきた側胞体にボンピコールが蓄積される以

前に、すでに体液中にこの物質が蓄積されている。したがって、体液中より化蛾直前に側胞体へ移行し、そこで活性なボンピコールとなると考えられる。

引用文献

- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, D. STAMM and E. HECKER (1959) Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. Z. Naturf. **14-b**: 283—284.
- BUTENANDT, A. and E. HECKER (1961) Synthese des Bombykols des Sexual-Lockstoffes des Seidenspinners und seiner geometrischen Isomeren. Angew. Chem. **73**: 349—353.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN and E. HECKER (1961) Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners. I. Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexuallockstoffes Bombykol. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **324**: 71—83.
- CHINO, H., S. MURAKAMI and K. HARASHIMA (1969) Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. Biochim. biophys. Acta **176**: 1—26.
- 茅野春雄 (1977) 昆虫に特異なタンパク質を捉える。自然 **32**: 46—55.
- 井上末広・浜村保次 (1972) カイコの性フェロモン “ボンピコール” の生合成について。農化 **46**: 645—649.
- STEINBRECHT, R. A. (1964) Feinstruktur und Histochemie der Sexualduftdrüse des Seidenspinners *Bombyx mori* L. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. **64**: 227—261.
- 藤条純夫・鎮西康雄 (1974) 昆虫の変態時におけるタンパク質、核酸の移行と貯蔵。化学と生物 **12**: 817—825.
- WAKU, Y. and K. SUMIMOTO (1969) Ultrastructure and secretory mechanism of the alluring gland cell in the silkworm, *Bombyx mori* L. Appl. Ent. Zool. **4**: 135—146.