短 報

カイコの卵巣発育に及ぼす幼若ホルモンの影響

古沢久仁彦¹⁾・山下興亜・斎藤哲夫
名古屋大学農学部

Effects of Juvenils Hormone on Ovarian Development of the Silkworm, *Bombyx mori* L. Kunihiko FURUSAWA, Okitsugu YAMASHITA and Tetsuo SAITO (Faculty of Agriculture, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **23**: 257—259 (1979)

幼若ホルモン (JH) は昆虫の脱皮, 変態, 休眠等の発育分化の過程のみならず, 生殖機能の発達にも重要な役割を果たしている (WIGGLESWORTH, 1970)。JH による生殖腺刺激作用については, 特に最近になって多くの知見が報告され (ENGELMANN, 1970; GILBERT, 1970), 脂肪組織に作用し, 卵黄前駆タンパク質 (vitellogenin) の生合成能を活性化することによって卵成熟を促進していると理解されるようになった。しかし, JH の vitellogenin の合成刺激作用は, 卵巣発育が成虫分化後に周期的にみられる昆虫種で顕著であり, セクロピア蚕 *Hy-*

lophora cecropia L., カイコ *Bombyx mori* L. のように蛹期に卵巣発育がほぼ完了する昆虫種においては認められていない (ENGELMANN, 1970)。すなわち, セクロピア蚕での実験結果は, vitellogenin の生合成は JH の有無にかかわらず起こっており, また, 卵巣発育もアラタ体の摘出によってほとんど影響されない (PAN, 1977), さらに, タバコスズメガ *Manduca sexta* L. においても JH は vitellogenin の生合成には関与していないが, 卵母細胞 (栄養細胞および卵細胞を含む) の分化過程を支配し, 成熟卵数の増加にあずかっている (NIJHOUT and RIDDIFORD, 1974)。成熟卵数に及ぼすアラタ体の影響についてはすでに, カイコ (山下ら, 1961) およびハチミツガ *Galleria mellonella* L. (RÖLLER, 1962) で示されており, いずれも終令幼虫期にアラタ体を摘出すると成熟卵数が減少するとされている。

これらの結果は JH が卵黄形成以外の過程で卵成熟系に関与していることを示すものである。したがって本研究においては, 幼若ホルモン物質の投与によってカイコの卵成熟が修飾されるか否かについて検討を加えた。その結果 JH および類縁体が卵数を減少させる結果を得たので, その概要を報告する。

本文に先立ち, 本研究を行うに当たり, 御援助いただいた本学部農薬化学研究室 宗像 桂教授, 加藤夏樹助手, 京都大学農学部 巖 俊一教授, 当害虫学研究室 宮田 正助手, 中筋房夫助手, 並びに本多八郎技官に感謝の意を表する。

材 料 と 方 法

実験に供したカイコは, 交雑種 (春嶺×鐘月および錦秋×鐘

Fig. 1. Method of extraction of JH from silkworm hemolymph.

¹⁾ 現在 住友化学工業株式会社 農薬事業部 研究部
日本応用動物昆虫学会誌 (応動昆) 第 23 巻 第 4 号: 257—259 (1979)
1979 年 3 月 29 日 受領

和)で、幼虫は桑葉で飼育した。

幼若ホルモン物質としては、合成 JH-I (methyl-10-epoxy 7-ethyl 3-11 dimethyl 2-6 tridecadienoate) およびその類縁体 (JHA) である methoprene を用いた。さらにカイコ由来の JH 活性物質を DE LOOF *et al.* (1976) の方法を参考にして以下の方法によって調整した (Fig. 1)。

5 齢 2—3 日目のカイコより血液を採集し、ただちにメタノールを用いて 4°C で、24 時間抽出した。この粗抽出物をエチルエーテルで再抽出したのち、エチルエーテル層に同量のメタノールを加え、生じた沈殿を除き、上清を減圧濃縮した。濃縮物をエチルエーテルに溶解し、これに 2 倍量のアセトン を 攪拌しながら加え、再び沈殿を作り、上清をろ別、減圧濃縮した。さらに、濃縮物の 5 倍重の n-ヘキサンを加え 4°C に一晩静置し、上清を分離濃縮し、粗試料とした。この試料を薄層クロマトグラフィー (シリカゲル Merk FR-60, 展開溶媒, クロロホルム-メタノール-酢酸エチル 7:7:1 v/v) によって分離し、Rf 0.6—0.95 の部分をかき取り、エチルエーテルで抽出し、これを試料 I とした。次にこの試料 I を高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。用いたカラムは、Merk SI-100, φ 4mm×50 cm であり、溶出溶媒は 5% エチルエーテル/n-ヘキサンとし、2ml/分、圧力 55kg/cm² の条件で展開し、検出には UV 215 nm を用いた。試料は、保持時間 0—13 分および 13—21 分の分画を分取し、後者を試料 II とした。おな、JH の活性は OH-TAKI *et al.* (1972) の方法によって検討した。

JH, JHA, JH 活性物質のカイコへの処理は、まずこれらの物質を一定のピーナツ油、あるいはアセトンに溶かして、種々の発育時期の蛹の胸部第 3 環節に ミクロシリンジを用いて 1 頭

あたり 1μl 注射、あるいは、背部に 5μl を塗布した。処理した蛹は 25°C、関係湿度 60%、16 時間明の恒温器に保存した。羽化時に 0.75% 生理食塩水中で腹部を切開して、卵巣を取り出し、卵数を調査した後、濾紙で余分の水分を取り除き完成卵を含めた卵巣重を秤量した。

結果および考察

まず、カイコの蛹期における卵発育に及ぼす JH, JHA の影響を調べるため、蛹化直後の蛹に 1μl の JH-I ならびに JHA を、対照区として 1μl のピーナツ油を注射した。その後、蛹を 25°C をに保ち、羽化にまで要する日数ならびに成虫体重、卵巣重および成熟卵数を調査し、その結果を Table 1 に示した。蛹期間は、JH および JHA 注射によって若干短くなる傾向にあった。また、成虫体重および卵巣重も JH 処理区で若干減少したが、有意差は認められなかった。一方、成熟卵数は、対照区が約 500 粒であったのに比較して、処理区では 30% 以上減少し、有意差が認められた。この結果は、JH, JHA 処理は、成熟卵数を減少させる作用があることを示唆した。

しかし、ここで用いた JH および JHA は、カイコ起源のものではないため、カイコより JH 活性分画を抽出して、JH 活性分画が上記で用いた JH および JHA と同様に成熟卵数の減少作用を持つか否かを検討した。

JH 抽出過程で得られた 2 つの分画、つまり、TLC 分画 (試料 I, Rf 0.6—0.95) と高速液体クロマトグラフィーによる分画 (試料 II; 保持時間 13—21 分) の一定量をアセトンに溶解して、蛹化直後の蛹に塗布し、蛹期間、成虫体重、卵巣重ならびに成熟卵数について調査した (Table 2)。試料 I, II は、いず

Table 1. Oostatic effect of JH and JHA in *Bombyx mori* L.

Treatment	No. of adults obtained ^a	Duration of pupal life (days)	Body weight of adult (mg)	Weight of ovaries (mg)	No. of mature eggs
Cont. ^b	5	10.4±0.55	913±120	405±25	498±25
JH-I (1μg)	4	9.7±0.50	787±38	342±23	372±15**c
JHA (1μg)	5	9.6±0.50	720±54	421±75	357±15**

^a Five newly ecdysed pupae were treated in each group.

^b Injected with peanut oil alone.

^c Indicates significant difference at p<0.01.

Table 2. Oostatic effect of JH active substance extracted from hemolymph in *Bombyx mori* L.

Treatment	No. of adults obtained ^a	Duration of pupal life (days)	Body weight of adult (mg)	Weight of ovaries (mg)	No. of mature eggs
Cont. ^b	8	10.3±0.46	1,200±134	567±92	542±47
Sample I (1μg)	6	10.6±0.81	1,283±114	523±84	459±78*c
Cont.	9	9.3±0.51	847±112	389±47	448±38
Sample II (0.5μg)	8	10.5±0.61	845±141	434±86	359±44**c

^a Ten newly ecdysed pupae were treated in each group.

^b Acetone treatment.

^c * and ** indicate respectively significant difference at p<0.05 and p<0.01.

Fig. 2. Change in oostatic effects of JHA during pupal-adult development.

れも, OHTAKI *et al.* (1972) の方法で JH 活性を示したものである。これらの分画の塗布は蛹期間, 成虫体重および卵巣重にはほとんど影響を及ぼさなかったが, 成熟卵数を明らかに減少させた。このことから, カイコより抽出した JH 活性分画も, JH-I および JHA と同じく卵数減少作用を持つことが明らかである。

次に, JH の成熟卵数減少作用が卵巣発育のどの時期にみられるかを調べた。つまり, 蛹化当日から4日齢まで毎日 JHA を $1\mu\text{g}$ /頭注射して, 羽化時の卵巣重および成熟卵数を調査した (Fig. 2)。蛹化当日に JHA 処理した場合には, 成熟卵数は明らかに減少しており, 対照区と比較して有意差が認められた。しかし, 蛹齢1日以降の処理では, 処理区, 対照区との間には, 有意な差は認められなかった。また, 成虫の卵巣重については, JHA 処理の影響は実験時期を通じて認められず, ほぼ一定であった。

このことから, JH はカイコの特定の発育時期に作用し, その成熟卵数の決定にあずかっていることが示唆された。カイコの場合, 卵母細胞の分化は5齢の初期から本格的に始まり, それ以後増加の一途をたどり, 蛹化当日ころまでに作られた卵母細胞がほぼ造卵数にあたとされている。しかし, 卵母細胞数は蛹期の前半期を通じて増加しつつあるが, これらは, それ以後の過程で退化し, いわゆる退化卵として消失すると考えられている。したがって, JH 処理の効果が蛹化当日にみられ (Fig. 2), しかも, その減少割合が30%前後であったこと (Table 1, 2, Fig. 2) は, この時期の卵母細胞数の増加率とよく一致しており (町田, 1922), JH は将来完成卵として成熟する卵母細胞の分化を阻害していると考えられる。

ところで, すでに述べた様にカイコにおいて, 幼虫期にアラタ体を摘出すると卵数が減少することが示されている (山下ら,

1961)。ここで, アラタ体の機能が JH によるものとすれば, 本実験で得られた結果とは異なるものである。この差異について詳細に検討することは, 本実験の範囲内では不十分ではあるが, 前者ではアラタ体の摘出が5齢3日目になされており, それ以後は JH 欠乏の状態では卵母細胞の分化, 卵巣発育が進められている。したがって, アラタ体の卵巣発育機能のみでなく, 他の機能, たとえば, 脳, 前胸腺に対する作用も欠乏し, それらの結果として, 長期間にわたり卵形成に影響したとも考えられる。一方, 本実験では, アラタ体を有している蛹に JH を投与したものであり, ここでみられる JH 活性は, いわゆる内分泌学的な濃度以上の, しかも限られた期間の影響であるとも考えられる。したがって, 両者の結果が JH の作用として全く矛盾していると簡単にはいえない。

ところで, 多くの昆虫での成虫芽の分化がエクダイソンによって促進され, JH によって阻害されている (OBELANDER and TONIBLIN, 1972)。カイコにおいてもエクダイソンが卵母細胞の分化を促進している (SAKURAI and HASEGAWA, 1969) ので, JH はこの過程で阻害的に作用することによって卵形成の内分泌支配系にあずかっているとも理解される。いずれにしても, JH が vitellogenin の生合成系でなく, 卵数の決定の過程にある作用を有していることは, カイコを含め, タバコスズメガ (NIJHOUT and RIDDIFORD, 1974) およびハチミツガ (RÖLLER, 1962) の場合も観察されており, これらの昆虫における JH の生殖生理の調整機能が, 1つの課題となるといえる。

引用文献

- DE LOOF, A., K. MADHAVAN and S. E. GIRARD (1976) *J. Insect Physiol.* **22**: 827—832.
- ENGELMANN, F. (1970) *The physiology of insect reproduction*. Oxford: Pergamon Press, 299p.
- GILBERT, L. I. (1976) *The juvenile hormone*. New York: Plenum Press, 527p.
- 町田次郎 (1922) 蚕試彙報 **16**: 1—14.
- NIJHOUT, M. M. and L. M. RIDDIFORD (1974) *Biol. Bull.* **146**: 377—392.
- OHTAKI, T., S. TAKEUCHI and K. MORI (1972) *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **24**: 251—255.
- OBELANDER, H. and C. TONIBLIN (1972) *Science* **177**: 441—442.
- PAN, M. L. (1977) *Biol. Bull.* **153**: 336—345.
- RÖLLER, H. (1962) *Naturewissenschaften* **49**: 524.
- SAKURAI, H. and K. HASEGAWA (1969) *Appl. Ent. Zool.* **4**: 59—65.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1970) *Insect hormones*. Edinburgh: Oliver & Boyd, 179p.
- 山下幸雄・谷喜代子・小林勝利 (1961) 蚕糸研究 **39**: 12—15.