カイコの大卵突然変異遺伝子による形質発現

2. 20-ハイドロキシエクダイソンの大量投与による 大型卵の人為的誘発

河口 豊・伴野 豊・土井良宏・藤井 博

九州大学農学部

Manifestation of Characteristics in the “Giant Egg” Mutant of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) 2. Artificial Induction of Large Eggs by Application of Large Amounts of 20-hydroxyecdysone. Yutaka KAWAGUCHI, Yutaka BANNO, Hiroshi DOIRA and Hiroshi FUJII (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **33**: 63–68 (1989)

Injection of large amounts of 20-hydroxyecdysone into normal female pupae of *Bombyx mori* altered egg production. Large eggs were produced in addition to normal eggs. 1) These eggs were as large and heavy as *Ge* mutant eggs. 2) Yolk protein contents in these large eggs had almost the same values as those of *Ge* eggs. However, there is no qualitative difference in the protein patterns of 20-hydroxyecdysone induced large eggs and normal eggs. 3) Large eggs were induced by injection of 20-hydroxyecdysone at doses of more than 50 μg . 4) Induction of large eggs was achieved at the expense of the total number of eggs, similarly to the case of *Ge* mutants. 5) Distribution of the enlarged eggs in a ovariole was not at random, but clustered in definite regions.

緒 言

著者らはカイコの卵形成過程における形質発現の遺伝子支配機構を究明する一環として、卵形が大きくなる突然変異体、大卵 (*Ge*; 有賀, 1943) に着目し、大卵形質発現の機構を調査中である。*Ge* 突然変異体における卵の大型化は内容積の拡大と卵重の増大を伴うものであるが、卵黄タンパク質に質的变化を生じることなく含量のみを増加させ、成熟完成卵数を減少させることにより個体としての卵造成量を一定に調節している (河口ら, 1987)。一方、雌蛹に多量の 20-ハイドロキシエクダイソンを投与すると、卵が大型化することが報告されている (HAMADA et al., 1983, 1984)。そこで著者らは *Ge* 遺伝子の形質発現機構を究明する一助として 20-ハイドロキシエクダイソン投与による大卵表形模写の人為的誘発を試みた。その結果、正常雌蛹に 20-ハイドロキシエクダイソンを大量投与することにより大卵の表形模写を作出しうることを確認し、その性状について調査した。

本文に入るに先立ち、材料蚕の飼育に援助を与えられ

た九州大学農学部遺伝子資源研究センターの木原 始氏に感謝する。

材 料 と 方 法

1. 供試材料

九州大学農学部遺伝子資源研究センター保存の d35 系統に限性虎蚕遺伝子 T (W; 3) *Ze* を導入し、幼虫斑紋により若齢期から雌雄を容易に識別することのできるようにした d351 系統を主材料とし、大卵 (*Ge*) の d202 と比較した。両系統とも化蛹後 25°C で保護した場合、10 日間で羽化する。

2. 20-ハイドロキシエクダイソンの投与

化蛹 1 日および化蛹 5 日の d351 雌蛹に 20-ハイドロキシエクダイソン (ロート製薬㈱; ED と略記する) を 1 個体当り、5 μg , 50 μg および 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ずつ注射した。対照区には同量の滅菌蒸留水を注射した。成虫化後解剖して卵を取り出し、卵殻が形成されたものについて造卵数ならびに卵重、卵形、卵黄タンパク質の含量と組成について分析した。さらに化蛹 1, 2, 3, 4, 5 および 8

日の雌蛹に ED を 1 個体当たり $50 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ずつ注射し、成虫化後解剖して卵管の卵基部から末端まで卵順位に卵形態を調査した。

卵形調査、卵黄タンパク質の調製と定量、電気泳動分析については前報(河口ら, 1987)に準じて行った。

結 果

1. ED 投与の卵造成に及ぼす影響

ED の投与が造卵能力に与える影響を調べるために d351 系統の化蛹 1 日および化蛹 5 日の雌蛹に 1 個体当たり $50 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ の ED を注射した。成虫化後解剖して卵管内にある卵を観察したところ、対照区と同程度の大きさの卵と大型の卵との 2 型が見られ (Fig. 1), Fig. 2 に

Fig. 1. Large eggs induced by 20-hydroxyecdysone injected into a day 5 female pupa. A: control, injected with $50 \mu\text{l}$ distilled water; B: large egg, injected with $50 \mu\text{g}$ of 20-hydroxyecdysone. Scale bar, 1 mm.

Fig. 2. Schematic illustration of an ovariole indicating orderly arrangement of enlarged eggs (black) induced by 20-hydroxyecdysone. A: day 1; B: day 5 injection; C: control (injected with distilled water). Dose of hormone, $50 \mu\text{g}$ per pupa. Egg-size increased abruptly. Single eggs located at each border position (arrow) were of intermediate size.

卵管内の位置と対応させて模式的に示した。対照区の卵は卵管基部付近でやや大きい、その他の部位では末端部まではほぼ斉一であるのに対し、化蛹 1 日に ED を投与した区では、卵管基部にある第 1 位から 12 位までは対照区に比べ卵形がきわめて大きくなっていった。第 14 位卵以下 34 位卵前後までは対照区とほぼ同様のサイズであったが、境界部の第 13 位卵 (矢印) は両群の間であった。35 位以下は小形で特に末端部付近には未熟卵が認められた。化蛹 5 日に ED を投与した場合には、第 1 位から 11 位卵までは普通で、第 12 位卵はやや大きく (矢印)、第 13 位から第 25 位卵までは非常に大きくなっていった。第 26 位卵は 25 位卵に比べやや小さく (矢印)、第 27 位卵以降約 10 粒が再び普通の大きさであった。それ以下の末端部にかけては非常に小さい卵と未熟な卵とが観察された。

ED 投与の影響を蛹期の発育時期別にみるため、化蛹 1, 2, 3, 4, 5 および 8 日の雌に $50 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ を投与し大型化する卵位を調査した (Fig. 3)。化蛹 1 日に ED を投与した区 (P-1) では第 1 位から 12 位卵 (11.8 ± 1.3) まで卵形が大きくなった。化蛹 2 日の投与区 (P-2) は第 1 位

Fig. 3. Changes in sequential arrangement of magnified eggs in an ovariole after injection of $50 \mu\text{g}$ 20-hydroxyecdysone into female pupae at different developmental stages. Mature eggs with enlarged or inherently normal sizes in an oviduct were counted after emergence. Emergence occurred on day 11. Vertical bar shows standard deviation.

から 14 位卵 ($1 \sim 13.9 \pm 1.4$), 化蛹 3 日の投与区 (P-3) は第 1 位から 16 位卵 ($1 \sim 15.9 \pm 1.1$) まで大型化していた。しかしながら化蛹 4 日の投与区 (P-4) では第 7 位から第 18 位卵 ($6.8 \pm 1.4 \sim 18.0 \pm 2.1$) までが大型化し, 化蛹 5 日の投与区 (P-5) においては Fig. 2 と同様に第 12 位から第 23 位卵 ($11.8 \pm 1.4 \sim 22.9 \pm 2.4$) が大きくなっていた。化蛹 8 日の投与区 (P-8) になると, 第 32 位卵から第 37 位卵 ($31.8 \pm 2.4 \sim 37.3 \pm 3.1$) が大型化していた。

次に ED 投与が造卵数におよぼす影響をみるために化蛹 5 日の雌蛹に 1 個体当たり $5 \mu\text{g}$, $50 \mu\text{g}$ および $100 \mu\text{g}$ (液量 $50 \mu\text{l}$) ずつ ED を注射し, 成虫化後に造卵数を調べた (Fig. 4)。 $5 \mu\text{g}$ 投与区では対照区と大差ないが, 50

Fig. 4. Relation between the dose of 20-hydroxyecdysone and egg production after hormone injection into day 5 female pupae. Shaded part in histogram indicates eggs of enlarged size. Vertical bar, standard deviation; Ge, Giant egg mutant.

μg 投与区になると造卵数が低下し約 25% の減少となった。 $100 \mu\text{g}$ 投与区では造卵数はさらに低下し, 約 30% の減少となった。すなわち, 対照区比でみると, $5 \mu\text{g}$ 区: 97.5, $50 \mu\text{g}$ 区: 78.2, $100 \mu\text{g}$ 区: 69.9 である。なお, Ge 系統では $100 \mu\text{g}$ 投与区 (276 ± 33 粒) とほぼ同じ数の 271 ± 37 粒であった。一方, 造卵数の顕著な減少が認められた $50 \mu\text{g}$ および $100 \mu\text{g}$ 投与区の大型卵は, ED 投与量が高いほど数, 比率とも増加する傾向がみられた。

2. ED 投与による大型卵の形態と重量

ED 投与による卵の大型化は Fig. 1 に示したように形状に歪みを伴うことはない。そこで化蛹 5 日の雌蛹に ED を投与し, 成虫化後に第 13 位から第 25 位までの卵について長径と短径を測定した (Fig. 5)。 $5 \mu\text{g}$ 投与区では長径, 短径ともに対照区と比べ有意な差は認められなかった。しかしながら $50 \mu\text{g}$ 投与区では, 長径で 14.5%, 短径では 17.7% 長くなっていた。さらに $100 \mu\text{g}$ 投与区になると長径においても (16.8%), 短径においても (19.9%) 増大し, ED 投与量が多いほど長径, 短径ともに長くなる傾向が認められた。また, 大型化した卵の長径と短径の長さは Ge 卵のそれに匹敵するものであった。

次に卵重をみると, $5 \mu\text{g}$ 投与区では対照区と大差は認められなかったが, $50 \mu\text{g}$ 投与区になると対照区に比べ卵重が約 32% 増加し, さらに $100 \mu\text{g}$ 投与区においては約 44% の重量増加であった (Fig. 6)。すなわち卵重も卵形と並行的に ED 投与量が多いほど増加し, $100 \mu\text{g}$ 投与区では Ge 卵とほぼ同じ値をとった。

3. 卵黄タンパク質の含量と組成

次に卵黄タンパク質に対する ED の影響を調査した。

Fig. 5. Relation between the dose of 20-hydroxyecdysone and size of eggs after hormone injection into day 5 female pupae. Ge, egg of Ge mutant; vertical bar, standard deviation.

Fig. 6. Relation between the dose of 20-hydroxyecdysone and weight of eggs enlarged after injection of 50 μ g hormone into day 5 female pupae. Ge, egg of Ge mutant; vertical bar, standard deviation.

Fig. 7. Relation between the dose of 20-hydroxyecdysone and content of yolk protein in large eggs induced by injection of 50 μ g hormone into day 5 female pupae. Ge, egg of Ge mutant.

EDを投与した時期は化蛹5日で成虫化後卵管基部第13位から25位までの大型化した卵を採取して供試した。卵1粒当たりのタンパク質含量についてみると (Fig. 7), 5 μ g 投与区においては対照区 56.4 μ g に対して 61.4 μ g とやや増加し, 50 μ g 投与区では 84.2 μ g, 100 μ g 投与区では 85.9 μ g であった。これらを対照区比でみると, 5 μ g 区: 108.9, 50 μ g 区: 149.3, 100 μ g 区: 152.1 となる。Ge 卵の卵黄タンパク質量との比は 50 μ g 投与区 97.7%, 100 μ g 投与区 99.5% であった。

卵黄タンパク質の成分組成をみると, 対照区においては 13 種類の主要成分と数種類の微量成分とが検出された (Fig. 8A の a~l と V)。ED により大型化した卵の組

Fig. 8. Electrophoretic patterns of yolk proteins in large eggs induced by the injection of 50 μ g 20-hydroxyecdysone into day 5 female pupae. A: control; B: induced large egg.

Fig. 9. Amounts of yolk protein components separated by electrophoresis as shown in Fig. 8. □: control; ▨, induced large egg.

成は対照区のそれとほとんど差異はなく, 新たな成分あるいは消失する成分は認められなかった (Fig. 8 の B)。しかしながら, この大型卵にみられる各成分のバンドは程度の多少は認められるもののそれぞれ対照区におけるよりも濃くなっていた。そこで各成分の濃度測定を行った結果 ED で誘発した大型卵の各成分量は対照区に比べてすべて増加していた (Fig. 9)。なかでも a+b, 450%; d,

240%; e, 170%; j, 182% が大きく増加しており, 減少する成分はなかった。

考 察

カイコ卵の大きさは品種あるいは系統によって異なるが, 同じ品種内においても幼虫期の栄養条件 (渡辺, 1926; 堀内ら, 1960) や蛹期の保護温度 (木暮・山本, 1930) によっても影響を受ける。すなわち, 蛹化して卵殻分泌までの間におこる代謝活性が高く, かつ卵造成に用いる素材物質質量が多ければ卵は大型化するが, 正常品種では突然変異系統の大卵 (*Ge*) ほど大きくなることはない。ところが, 今回雌蛹に脱皮ホルモンの一種である, 20-ヒドロキシエクダイソンを多量に投与することによって, きわめて大型の卵が造成されることが明らかにされた。

50 μ g 以上の ED 投与によって大型化した卵は, 卵殻の長径, 短径ともに正常卵より長くなり, *Ge* 卵のそれにほぼ匹敵する大きさになっていた。また, 大型化した卵では卵重も増加していたが, この増加は主として卵黄タンパク質量の増加によるものであり, 新生のタンパク種の出現はみられなかった。この点でも, ED 誘発大型卵は *Ge* 卵 (河口ら, 1987) に類似しており *Ge* の表形模写とみることができる。

ED の投与による大型卵の出現は, *Ge* の場合, すべての卵が大卵になるのに対し, 特定の卵管部位に限定されており, 卵巣小管内に並んだ卵細胞-栄養細胞-包卵細胞複合体が卵巣小管内の順位によって发育状態が連続的に異なることを考えると, 特定の发育時期にある卵細胞-栄養細胞-包卵細胞複合体のみが, ED に対する大型化の作用を受けたことを示していた。

カイコにおける卵造成は包卵細胞と栄養細胞との働きにより, 卵細胞質内に卵黄を蓄積し (町田, 1940), その後包卵細胞の働きにより卵細胞の周辺に卵殻を構築する (松崎, 1968) ことによって完了する。したがって, 卵形的大型化には卵黄の大量蓄積を伴う卵細胞の生長量の増大とこれに伴う卵殻の大型化が必要となる。そのためには, 包卵細胞の増殖による細胞数の増加, あるいは肥大生長による包卵細胞の大型化, さらに栄養細胞の機能の活発化が起こっていなければならない。過剰量の ED の存在はこのような卵造成の過程を全体的に高めることにより, 二義的に卵の大型化を導いたものと考えられる。

ED 投与による大型卵の誘発は造卵数を減少させるが, 卵造成の行われる蛹期は外部からの栄養補給のない閉鎖系であることを考えると, 一定量の素材のもとで卵

形が大きく内容物の多い卵を造るには必然的に卵数を少なくして調節しなければならないのは当然と考えられる。この造卵数の減少についても *Ge* 卵の場合 (河口ら, 1987) に部分的に類似していると考えられる。

以上述べてきたように, 今回, 多量の ED の投与によって誘発された大型化卵は *Ge* の表形発現とみなされ, 今後, 大卵形質発現機構を解析する上で, 有用な材料になりうると思われる。しかしながら, カイコの蛹後期においては卵巣組織においても活発にエクジステロイドが合成・蓄積されることが知られており (HANAOKA and OHNISHI, 1974), 大量に投与した ED が卵巣組織に存在する oöecdysteroid (OHNISHI, 1986) あるいは前胸腺における ecdysone の分泌能とどのような関わりのもとに卵巣に働き, 卵の大型化をもたらすのかについては, 今後追求すべき問題である。

摘 要

正常卵産生性カイコ雌蛹に 20-ヒドロキシエクダイソンを投与すると大型卵が誘発されることを確認し, その性状を調べた。

- 1) 卵の大型化の程度は ED 投与量が 50 μ g 以上でみられ, 100 μ g 投与の場合で長径が 16.8%, 短径が 19.9% 増大した。卵の大型化は卵重の増大をもたらしたが, これはおもに卵黄タンパク質量の増加によるものであった。
- 2) 卵黄タンパク質の成分組成に変化はみられなかった。
- 3) 卵の大型化現象は特定の发育時期にある卵位のものに限られた。
- 4) 卵の大型化に伴って造卵数が減少した。
- 5) 誘発された大型卵の性状は, *Ge* 突然変異体に類似し, *Ge* の表形模写とみることができる。

引 用 文 献

- 有賀久雄 (1943) 家蚕に於ける伴性遺伝をなす一突然変異. 蚕試験報 11: 499—507.
- HAMADA, N., K. KOGA and K. HAYASHI (1983) Effects of a large dose of ecdysteroid on development of ovary in *Bombyx* pupae. J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 28: 23—30.
- HAMADA, N., O. NAKAMURA, K. KOGA and K. HAYASHI (1984) Effects of ecdysteroid on protein synthesis of *Bombyx* ovary. Agric. Biol. Chem. 48: 277—283.
- HANAOKA, K. and E. OHNISHI (1974) Changes in ecdysone titer during pupal—adult development in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 20: 2375—2384.

堀内彬明・波島千恵子・安江 昇 (1960) 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 29: 421—423。

河口 豊・紫藤光一・藤井 博・土井良宏 (1987) カイコの大卵突然変異遺伝子による形質発現。1. 大卵形質の特徴。応動昆 31: 344—349。

木暮植太・山本茂樹 (1930) 上簇以後の保護温度と蚕卵の大小との関係。日蚕雑 1: 23—47。

町田次郎 (1940) 家蚕卵の卵形成について、附、卵膜の形成。蚕試報 10: 26—76。

松崎守夫 (1968) 家蚕卵の卵殻形成に関する電子顕微鏡的研究。日蚕雑 37: 483—490。

OHNISHI, E. (1986) Ovarian ecdysteroids of *Bombyx mori*: Retrospect and prospect. Zool. Sci. 3: 401—407。

渡辺勘次 (1926) 蚕の大きさについて一特に蚕の雌雄との関係について。蚕業新報 34: 1359—1368。

新 刊 紹 介

立川哲三郎著作集 立川哲三郎教授退官記念事業会編 (1989) 同記念事業会、松山、1,111 pp.+xvi, 非売品

カイガラムシの重要天敵を含むトビコバチ科をはじめ各種寄生蜂の分類の研究を行ってきた愛媛大学農学部立川哲三郎教授の定年退官を記念して、40年余にわたる同氏の原著論文・総説・随筆など 231 編を収録した刊行物である。ここに収録されている論文中とくに注目されるのは、ルビーアカヤドリコバチについて最初に公表された論文 (YASUMATSU and TACHIKAWA, 1951) と日本産トビコバチ科の分類学的再検討に関する大著 (TACHIKAWA, 1963) である。いずれも大学の紀要に掲載されたため直接多くの人の目に触れる機会が少なかっただけに、他の多くの論著とともに今回一冊の刊行物として出版された意義は大きい。

ルビーアカヤドリコバチに関する上記の論文は、同氏の卒業論文に基づいて安松・立川両氏の共著論文としてまとめられたものであることが、本刊行物中に収録された最近の随筆によって明らかにされている。また本種の由来について、ツノロウアカヤドリコバチから突然変異によって生じたとする安松氏の仮説に対し、同氏は本種が中国または東南アジア原産であることを早くから示唆し、インドと中国の標本を精査し、さらに中国科学院動物研究所の所蔵標本を調べることによって、本種が第二次大戦中に偶然九州へ入ったとの推論に達した経過を、数編

の論著で示している。

トビコバチ科の分類に関しては、前記の論文で日本産 54 属 122 種の再検討を行い、亜科・族・属・種への検索表を作成したほか、世界中の主要な属について寄主との関係を調べた。同氏はその後も日本産トビコバチ科のファウナにいくつかの属と種を加え、また異名の整理を行った。それらの論文もすべて収録されているので、日本産既知種の同定を行うのにたいへん便利である。本科の属と寄主の関係については、その後の新知見を追加しながら 4 報にわたって改訂を行い、属と寄主との間には密接な関係があることを明らかにした。

そのほかトビコバチ科以外の寄生蜂の分類学的著作、学名・種名の混乱していた重要天敵の整理、コバチ上科・アリガタバチ上科の分類同定の手引きとなる解説なども含まれており、天敵の研究を行う上でたいへん役立つ刊行物となっている。

本刊行物はその性格上非売品となっているが、入手を希望される人は下記に問い合わせられるようおすすめする。

〒790 松山市樟味 3-5-7

愛媛大学農学部昆虫学研究室 立川記念事業会
(電話 0899-41-4171, 内線 366 友岡)

(九大農 村上陽三)