ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 55, No. 2, pp. 137~139, 1981]

カイコ後部絹糸腺の器官培養
——ホルモン効果を検出できる
系の検討

小林 孝 雄

(北海道大学獣医学部放射線学教室,
現在: 秋田県立農業短期大学)

昭和 55 年 8 月 15 日 受理

Organ Culture of Posterior Silk Glands
of the Silkworm; Examination of
Culture System Detectable
for Hormonal Effects

Takao KOBAYASHI

Department of Experimental Radiobiology,
Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido University

Present address: Akita Prefectural College
of Agriculture, Ohgata-mura,
Minamiakita-gun, Akita 010-04

The effects of ecdysterone and nerolidol on the incorporation of ^{14}C -glycine into cultured posterior silk glands and cell-free system were examined.

The posterior silk glands at 3rd to 4th day of the fifth instar were cultured in three mediums and a cell-free system which contained the combination of a small amount (10, 0.1, 0.001 $\mu\text{g/ml}$) of ecdysterone and nerolidol. The enhancement of ^{14}C -glycine incorporation up to 2 or 3 folds was observed when the glands were cultured in Wyatt's medium without hemolymph. The enhancement became obscure when the glands were cultured in Wyatt's medium with hemolymph. In the medium of Nakanishi *et al.* rich in nutrient, these two hormones showed an inhibitory effect. The hormones added to the cell-free system slightly affected the protein synthetic activity of this system.

It seems likely that the enhancement of ^{14}C -glycine incorporation is reflective of the increase of fibroin biosynthesis in cultured silk glands by a small amount of ecdysterone and nerolidol.

(Received August 15, 1980)

絹フィブロインの合成は、カイコ幼虫期の終りの数日間に集中して行われる。したがって、フィブロイン合成をカイコの変態に関連した一過程、すなわちホルモンによる調節を受けて進行する一過程とみなすこともできる。

脱皮ホルモンおよび幼若ホルモンがカイコ後部絹糸腺のタンパク質合成に及ぼす影響をより明確な形で検討できる系を確立するために本研究を行った。すなわちカイコ後部絹糸腺の器官培養系に脱皮ホルモンおよび幼若ホルモンを組み合わせて添加し、 ^{14}C -グリシンの取込みの促進や抑制を検討した。また、比較のために、無細胞のタンパク質合成系に及ぼすホルモンの影響についても検討した。

器官培養の場合、人工飼料で飼育⁽¹⁾したカイコ交雑種(支 131×日 131)の5齢3日目ないし4日目の幼虫を70% エタノール中で約10秒間洗浄した後、エタノールを濾紙でふきとった。このカイコから摘出した後部絹糸腺を冷 1.15% KCl 溶液中で2回洗浄後、中西らの培養液⁽²⁾あるいは Wyatt の培養液⁽³⁾の中で保温した。Wyatt の培養液は原報どりのカイコ体液を加えたもののほかに、体液を加えないものも用いた。いずれの場合も30ml の三角フラスコに培養液全量で2mlを加え、この中で後部絹糸腺4本(湿重量約20mg)を培養した。三角フラスコにはアルミホイル2枚でふたをした。解剖や培養に使用する器具は乾熱により、KCl 溶液と蒸留水はオートクレーブにより、また培養液は滅菌濾過器によりいずれも滅菌した。

培養液に添加するホルモンとしては、エクジステロン⁽⁴⁾(東北大学薬学部竹本常松教授の恵による)および幼若ホルモン活性を有する⁽⁵⁾ネロリドール(Aldrich 社より購入)を供試した。二、三の昆虫における脱皮ホルモンや幼若ホルモンの生理的濃度⁽⁶⁻⁸⁾を考慮して、エクジステロンとネロリドールの終濃度は、それぞれ0.001, 0.1, および10 $\mu\text{g/ml}$ とし、これらをたがいに組み合わせた区を作った。エクジステロンは10% エタノールに、またネロリドールは70% エタノールに溶解し、全量で2ml の培養液中にそれぞれ0.02ml ずつ添加した。なお、ホルモン無添加区(対照区)にも70% エタノールと10% エタノールをそれぞれ0.02ml ずつ加えた。

各培養区には0.1 μCi の ^{14}C -グリシン(The Radiochemical Centre より購入)を加え、22°C で36時間保温した後、2ml の冷10% トリクロル酢酸(TCA)

を加えて絹糸腺を変性凝固させた。さらに、絹糸腺を5% TCA で2回洗浄後、メノウ乳鉢中で磨砕した。この磨砕液を5% TCA 中で90°C, 10分間処理してから、エタノール:エーテル(3:1), およびエーテルで洗浄した。各試料の1mg を分けとり、0.2ml のハイアミン-OH型メタノール溶液を加えて56°C, 1時間保温後、100% トルエン系シンチレータ 10ml を加えて放射活性の測定を行った。

無細胞系におけるタンパク質合成は前報⁽⁹⁾と同様に行い、この反応液中にエクジステロンとネロリドールを添加した。

以上の実験結果を Table I にまとめた。この Table においては、対照区の活性に対するホルモン添加区の活性の割合をパーセント(% control)で示した。対照区の活性は Table の最下段に示したが、実験区が異なり、発育経過にもわずかなずれがあるので、各対照区の specific activity の高低を比較することはできない。

まず、中西らの培養液を用いた系にエクジステロンとネロリドールを添加すると、¹⁴C-グリシンの取込みはいずれも抑制ないし阻害された。ホルモン添加区のタンパク質合成活性は、ホルモン濃度の組合せに関係なく、大部分が対照区の50~70%であった。

つぎに、Wyatt の培養液(カイコ体液添加)を用いた結果についてみると、0.1 µg/ml のネロリドールに各濃度のエクジステロンが組み合わされた場合に他の区よりわずかながら高い活性が認められた。しかし、全体としてみると、ホルモン添加区の活性は対照区の近傍にあり、傾向は明確ではなかった。

Wyatt の培養液に体液を加えない場合には、ホルモンの添加によるタンパク質合成活性の促進が明確となった。活性の促進はネロリドール単独でも、またエクジステロン単独でも観察された。とくに微量(0.001 µg/ml)のネロリドール添加による促進効果は、ホルモン無添加区の約3倍と著しく、この傾向は0.001 µg/ml のネロ

Table I. Effects of Ecdysterone and Nerolidol on the Incorporation of ¹⁴C-Glycine into Cultured Posterior Silk Glands and Cell-free System

Ecdysterone ($\mu\text{g/ml}$)	Nerolidol ($\mu\text{g/ml}$)	% control of ^{14}C -glycine incorporation			
		Nakanishi <i>et al.</i> ^a	Culture medium		Cell-free system
			Wyatt (with hemolymph) ^b	Wyatt (without hemolymph) ^c	
0	0	100	100	100	100
0	0.001	66		358	
0	0.1	60		151	
0	10	51		137	
0.001	0	70		227	
0.001	0.001	73	124	254	77
0.001	0.1	70	147	195	103
0.001	10	89	96	103	99
0.1	0	64		261	
0.1	0.001	48	102	334	48
0.1	0.1	60	124	271	85
0.1	10	52	89	94	84
10	0	71		204	
10	0.001	52	69	264	81
10	0.1	55	133	113	81
10	10	82	70	148	81
^{14}C -Glycine incorporation of control (cpm/mg protein)		1009	115	339	640

Composition of culture medium

^a Hanks balanced salt solution 1 liter, Yeast extract 1.0g, Lactoalbumin hydrolysate 5.0g, Glucose 4.5g, Streptomycin 100mg, Penicillin 100,000 unit, NaHCO₃ 0.8g, Phenol red 0.02g, Inactivated bovine serum 200ml.

^b (mg/100ml) NaH₂PO₄ 110, MgCl₂·6H₂O 304, MgSO₄·7H₂O 370, KCl 298, CaCl₂ 81, Glucose 70, Fructose 40, Sucrose 40, Malic acid 67, α-Ketoglutaric acid 37, Succinic acid 6, Fumaric acid 5.5, 22 amino acids 2.5~250, Heat-treated hemolymph 10%.

^c Medium b minus heat-treated hemolymph.

リドールに各濃度のエクジステロンが組み合わされた場合も変わらなかった。

これらの結果から、栄養分の豊富な中西らの培養液に添加されたホルモンは、後部絹糸腺におけるタンパク質合成の促進を示さず、むしろ阻害的に作用すること、および Wyatt の組成のうちカイコ体液を加えない“合成的”な培養液に添加されたホルモンは、活性の促進をもたらすことが示唆された。

5 齢 4 日目のカイコ幼虫の後部絹糸腺から分画したリボソームと、酵素および tRNA を用いた無細胞のタンパク質合成系にホルモンを添加した場合、 ^{14}C -グリシンの取込み活性は、大部分が対照区の 80 から 100% の間にあった。無細胞のタンパク質合成系がホルモンの添加によってほとんど影響を受けなかったのは、ホルモン作用が現われるためには細胞膜の完全さが必要である⁽¹⁰⁾ことを示すものと思われる。

この研究で培養のためにカイコ幼虫から後部絹糸腺を摘出した 5 齢 3 日目ないし 4 日目という時期は、生体内でフィブロイン合成がまさに活発になりつつある時期である。また、フィブロインの構成アミノ酸の中でグリシンは 44%⁽¹¹⁾を占める。これらの点を考慮すると、この研究で観察された ^{14}C -グリシンの取込み促進は、微量の

エクジステロンとネオリドールによるフィブロイン合成の促進を反映しているとみなすことができるであろう。

終りに、エクジステロンを恵与いただきました東北大学薬学部竹本常松教授（現在徳島文理大学）に感謝いたします。

- (1) 飯塚敏彦, 滝沢義郎: 日蚕雑, **38**, 95 (1969).
- (2) Y. H. Nakanishi, H. Kato, T. Iwasaki and T. Okigaki: *Proc. Jpn. Acad.*, **39**, 236 (1963).
- (3) S. Wyatt: *J. Gen. Physiol.*, **39**, 841 (1956).
- (4) 竹本常松, 小川俊太郎, 西本喜重: 薬誌, **87**, 325 (1967).
- (5) S. W. Bowers and M. J. Thompson: *Science*, **142**, 1469 (1963).
- (6) M. F. Ruh, T. S. Ruh, W. DeWert and V. Duenas: *J. Insect Physiol.*, **20**, 1729 (1974).
- (7) M. Metzler, K. H. Dahm, D. Meyer and H. Röller: *Z. Naturforsch.*, **26 b**, 1270 (1971).
- (8) S. Yagi and T. Fukushima: *Appl. Ent. Zool.*, **10**, 77 (1975).
- (9) T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 545 (1980).
- (10) E. Cohen and L. I. Gilbert: *J. Insect. Physiol.*, **19**, 1857 (1973).
- (11) F. Lucas, J. T. B. Shaw and S. G. Smith: *Adv. Protein Chem.*, **13**, 107 (1958).