〔原 著〕

Euhadra 属卵白腺蛋白質合成に対する光照射の影響 (2次元電気泳動法による解析)

入村 信博*・井上 勤**

SUMMARY

The protein components of albumen gland from *Euhadra peliomphala* and *E. queasita* were analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and O'Farrell two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). The effect of light irradiation on the biosynthesis of protein in albumen gland of *E. peliomphala* and *E. queasita* were further analyzed by O'Farrell 2D-PAGE. The net weight of albumen gland of the light irradiated in *E. peliomphala* was 2.5-fold larger than that of on irradiation control. When calculated as weight ratio of albumen gland to the total body weight of irradiated was 1.7-fold larger than that of no irradiation control. Further, under the light irradiation, the three peptide group detected by O'Farrell 2D-PAGE were observed (Peptide map, address Nos. 8, 9 and 11). The biosynthesis of protein in three peptide group seemed to be induced by the light irradiation at one month. Once Usuda et al. reported that these peptide biosynthesis in albumen gland was induced with 17 β -estradiol in *E. peliomphala*. We suggest that 17 β -estradiol also participate in biosynthesis of protein in albumen gland by light irradiation, but the effect of the light irradiation was not observed in *E. queasita*.

Key words: land snail, albumen gland, O'Farrell 2D-PAGE, light irradiation.

緒 論

光照射が *Euhadra* 属の生殖腺の成熟にとって重要な要因であり、その刺激で視触角の眼腺が活性化することが知られている。眼腺ホルモンは生殖腺刺激ホルモンとして両性腺に作用するとともに、脳ホルモンの分泌を促す。脳ホルモンは生殖腺刺激ホルモンとして作用しエステラジオールの分泌を促す。これらの作用で雌性の付属

器官の発達が促進されるという報告もある¹⁾。一方臼田ら²⁾は、雌性付属器官の卵白腺の特定の蛋白質が雌性ホルモン 17 β -エステラジオールにより、生合成が促進されることを示した。そこで今回われわれは、Laemmli らの SDS ポリアクリルアミド電気泳動法³⁾、O'Farrell の 2次元電気泳動法⁴⁾を併用し、光照射が *Euhadra* 属の雌性生殖器官卵白腺蛋白質成分に対する影響を明らかにするために本実験を行った。

Effect of light irradiation on the albumen gland proteins of land snail, *Euhadra*, detected by two-dimensional gel electrophoresis.

* Nobuhiro Nyumura; 富里高校生物科

現在: 名古屋大学農学部生化学制御研究施設栄養制御部門

** Tsutomu Inoue; 東京学芸大学生物学

Correspondence address: Nobuhiro Nyumura, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.

(受付 1989年5月15日, 受理 1989年11月15日)

(8) 生物物理化学

材料と方法

1. 動物と飼育条件

本実験には *Euhadra* 属 2 種のマイマイ、ミスジマイマイ (*E. peliomphala*), ヒダリマキマイマイ (*E. queasita*) を用いた。ともに千葉県富里町で採集した。 *E. peliomphala*, *E. queasita* をおのおの 3 群に分け、1 群を 100 W 蛍光灯照射下 (照射群), 1 群を暗所下 (非照射群), 1 群を平常の明暗周期下 (対照群) で 1 カ月間飼育した。飼育条件は温度 23°C, 湿度 50% であった。

2. 分析試料

マイマイは一晚絶食させた後解剖し、中腸腺に包まれたうす黄色の船形の卵白腺を輸卵管のつけねから切り取り、0.15 M NaCl で洗浄し湿重量を秤量後、分析試料として実験に用いるまで -20°C で凍結保存した。

3. 電気泳動のための試料調製

卵白腺は湿重量の 10 倍量の 0.15 M NaCl を加えて 4°C でホモジナイズし 10,000 g で 30 分間遠心し、上清と沈殿とに分画した。これを上清試料および沈殿試料として電気泳動に使用した。

4. SDS 電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli 法³⁾に従って行った。ただし分離ゲルには 7.5~20% のポリアクリルアミド濃度勾配ゲルを用いた。

5. 2 次元電気泳動法 (2 D-PAGE)

2D-PAGE はほぼ O'Farrel 法に従って行った。蛋白質の定量は Lowry 法⁵⁾によって行った。また電気泳動後の蛋白質 (ポリペプチド) は Coomassie Brilliant Blue R-250 (C.I. No. 42 660) によって検出した。

結 果

1. 体重、卵白腺湿重量、卵白腺体重比、卵白腺蛋白質量に及ぼす影響

実験開始時と各条件で 1 カ月飼育後の各群の体重変化を Table 1 に示した。非照射群においては対照群にく

Table 1. Change of body weight from *E. peliomphala*.

	Initial	Final	Change
Irradiation group	3.8±0.5	4.5±0.6	+0.7
No irradiation group	3.6±0.3	3.0±0.3*	-0.6
Control group	3.9±0.6	4.7±0.5	+0.8

Values are means±standard error.

*Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 2. Comparison of albumen gland weight from *E. peliomphala*.

	Initial	Final	Change
Irradiation group		0.27±0.05*	+0.17
No irradiation group	0.10±0.06	0.07±0.04	-0.03
Control group		0.11±0.04	+0.01

Values are means±standard error.

*Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 3. Net weight ratio of albumen gland to body weight.

	Initial (%)	Final (%)
Irradiation group		4.3±0.6
No irradiation group	10.4±3.3	0.8±0.3
Control group		2.6±1.2

Values are means±standard error.

Table 4. Protein contents of albumen gland to tissue net weight (mg protein/g tissue).

	Initial	Final	Change
Irradiation group		110.6±0.2	+52.7
No irradiation group	57.9±0.7	117.7±0.5	+59.8
Control group		106.2±11.3	+48.3

Values are means±standard error.

らべ有意に減少した。

Table 2 には実験開始時と 1 カ月飼育後の卵白腺湿重量を示した。照射群は対照群の約 2.3 倍に有意に増加、非照射群は約 64% に減少した。また卵白腺湿重量と体重比をくらべてみると対照群 2.6±1.2%, 照射群 4.3±0.6%, 非照射群 0.8±0.3% であった (Table 3)。次に湿重量あたりの蛋白質含量を Table 4 に示した。3 群間において非照射群が照射群にくらべ有意に高かった。

2. 光照射が卵白腺蛋白質に及ぼす影響 (SDS-PAGE)

Fig. 1 に *E. peliomphala*, *E. queasita* の卵白腺蛋白質成分の SDS-PAGE パターンを示した。2 種ともに M.W. 90K, 82K, 68K, 43K, 33K, 18K および 13K の 7 本のバンド (▷) が共通に認められた。また *E. queasita* 特異的と報告されている⁶⁾ M.W. 32K, 30K の 2 本のバンド (►) も検出された。

Fig. 2 には 2 種のマイマイ卵白腺蛋白質成分の SDS パターンに対する光照射の効果を示した。レーン 1~5 は *E. peliomphala*, 6~8 は *E. queasita*, 1, 2, 6 は対照群, 3, 4, 7 は照射群, 5, 8 は非照射群の卵

Fig. 1. SDS-PAGE patterns of water-soluble proteins from *E. peliomphala* and *E. queasita* albumen gland.

1, 2: *E. queasita*. 3, 4, 5 and 6: *E. peliomphala*. Closed triangle indicates a specific polypeptide band in *E. queasita*. Open triangle indicates a major polypeptide band in two species.

白腺蛋白質成分の泳動パターンを示した。*E. peliomphala* において7本の主要なバンドの消失はなかったが、照射群において43K付近のバンド(→)の量的な増加がみられた。また非照射群において68K, 18Kのバンド(▲)の量的減少がみられた。

3. O'Farrell 法に基づく2次元電気泳動法による *E. queasita* の卵白腺蛋白質ペプチドマップ

O'Farrell の2次元電気泳動法によるペプチドマップを Fig. 3 に示した。ペプチドマップ中に検出される主要なスポット群にそれぞれ臼田らの方法²⁾に従い address をつけた。address は *E. peliomphala* を標準とし、pI と M.W. から合成して命名した。たとえば 9 (5, 90) は番号が9番でスポット中央の pI が5, M.W. が 90 Kであることを示すことにした。*E. queasita* (Fig. 3 の b) では1~14 のペプチド群中で11番のペプチド群(▲)が欠如していた。*E. queasita* にのみ認められるスポットとして図中に矢印(→)で示した pI 6.5, M.W. 30K が確認された。*E. queasita* において 8 (4, 100) のペプチド群(□)がアルカリ側に、9 (5, 95) のペプチド群(■)は酸性側にシフトしてきたため8番と9番のペプチド群がはっきり分離しなかった。今回の結果と臼田らの報告をまとめると、*E. queasita* は

Fig. 2. Effect of light irradiation on SDS-PAGE patterns of water-soluble proteins from *E. peliomphala* and *E. queasita* albumen gland.

1-5: *E. peliomphala*. 6-8: *E. queasita*. 1, 2 and 6: Control group, 3, 4 and 7: Irradiation group, 5 and 8: No irradiation group. Markers of molecular weight (M.W.) were phosphorylase b (97 K), bovine serum albumen (66 K), ovalbumin (43 K), carbonic anhydrase (31 K), soybean trypsin inhibitor (22 K), and lysozyme (14 K).

E. peliomphala や *E. simodae* より *E. subnimbosa* のパターンに類似することがあきらかになった。

4. 光照射が2種のマイマイ卵白腺蛋白質成分に及ぼす影響 (2D-PAGE)

SDS-PAGE でははっきりしない卵白腺蛋白質合成に対する光照射の影響を調べるために、3群間のマイマイの卵白腺蛋白質成分の2Dパターンを比較した。Fig. 4 は *E. peliomphala*, Fig. 5 は *E. queasita* である。

E. peliomphala において、照射群の 8 (4, 100), 9 (5, 95), 11 (5, 50) のペプチド群(→)が、対照群にくらべ増加した。SDS-PAGE の照射群で増加した 43 K のバンドは 11 のペプチド群に相当すると考えられる。また非照射群で 8 (4, 100), 9 (5, 95) のペプチド群(→)が幾分減少した。

E. queasita においては照射群、非照射群に主要なペプチドの量的な変化は認められなかった。データには示さなかったが、*E. queasita* においては体重、卵白腺湿重量、卵白腺体重比が照射群、非照射群において対照群との間に有意な差は認められなかった。これらのこととあわせて Fig. 2 のレーン 6~8, Fig. 5 の3群間で大きな違いが認められなかったことは妥当であると考えられる。

(10) 生物物理化学

Fig. 3. Two-dimensional electrophoretic patterns of albumen gland proteins and address of major peptides group.

A: Peptide map of *E. peliomphala*. a: Schematic drawing of peptide map of A, B and b: *E. queasita*. C: Address of major peptide group.

考 察

今回われわれは光照射が *Euhadra* 属 2 種の卵白腺蛋白質に及ぼす影響を量的な面と、質的な面から調べた。量的な面は卵白腺湿重量、卵白腺体重比、卵白腺の湿重量あたりの蛋白質量を検討した。質的な面は Laemmli らの SDS ポリアクリルアミド電気泳動法、O'Farrell の 2 次元電気泳動法を併用し、卵白腺蛋白質成分の検討を行った。

E. peliomphala の各条件 1 カ月飼育により、卵白腺湿重量は照射群で対照群にくらべ約 2.5 倍へと有意に増

加、非照射群では 64% へと減少した。しかし食餌量の違いによる成長の違いなどの問題も考えられ、卵白腺湿重量を単純比較することはできない。そこで次に卵白腺と体重比を比較してみた (Table 3)。すると対照群 2.6 ± 1.2% に対し、照射群で約 1.7 倍の 4.3 ± 0.6% に、非照射群では約 31% の 0.8 ± 0.3% まで低下した。また照射群は非照射群の約 5.4 倍であった。この結果により卵白腺蛋白質の合成は光照射により促進されることが明らかになった。

しかし *E. queasita* について同様な実験を行ったところ、体重、卵白腺湿重量、卵白腺体重比について 3 群間

Fig. 4. Effect of light irradiation on two-dimensional (2D) PAGE patterns of water-soluble proteins from *E. peliomphala* albumen gland.

(a) Control group, (b) Light irradiation group, (c) No light irradiation group.

で全く有意な差が認められなかった。このことから光照射による卵白腺蛋白質合成促進作用は種により異なり、*E. peliomphala* のほうが *E. queasita* より、より光照射に対して敏感であると考えられる。また、*E. peliomphala* の3群間において湿重量あたりの蛋白質量には有意な差が認められなかった。3群間の蛋白質合成の量的な相違は光照射の他に、温度、湿度、食餌成分、食餌摂取量、個体密度などの違いも考えられる。3群間で食

Fig. 5. Effect of light irradiation on 2D-PAGE patterns of water-soluble protein from *E. queasita* albumen gland.

(a) Control group, (b) Light irradiation group, (c) No light irradiation group.

餌成分、個体密度については全く同じに、温度、湿度においても同じ部屋内で飼育したため、大きな差はないと考えられる。光照射による食餌摂取量の変動はあると考えられ、その摂取変動による蛋白質合成の応答反応は十分考えられ、今後の改良が必要である。

次に光照射の卵白腺蛋白質成分に与える影響を調べた。*E. queasita* の卵白腺について、SDS-PAGE によ

(12) 生物物理化学

り調べたところ、浅賀⁶⁾が報告した *E. queasita* に特異的な 32K, 30K のバンドが検出された。さらに詳細を知るため 2D-PAGE を行くと、*E. peliomphala* には認められないペプチドスポットが存在することが明らかになった。また最も特徴的に認められた M. W. 68K のポリペプチドスポット (address 8, 9) が *E. queasita* においては、*pI* の異なる二つのポリペプチドには分離されず一つのポリペプチドスポットとして検出された。このように *E. peliomphala* と *E. queasita* の卵白腺蛋白質は主要なスポットにおいては、ほぼ類似していることが明らかになった。

次に光照射が 2 種のマイマイ卵白腺蛋白質成分の SDS-PAGE, 2D-PAGE パターンに及ぼす影響を検討した。*E. peliomphala* については SDS-PAGE により照射群における 43K バンドの量的増加、非照射群の 68K, 18K バンドの減少が認められたので、詳細な検討を行うため 2D-PAGE を行った。その結果照射群において 8 (4, 100), 9 (5, 95), 11 (5, 50) のペプチド群が増加した。またこのうち address 8, 9 のペプチド群は非照射群において減少の傾向を示した。また address 8, 9, 11 のスポットは雌性ホルモン 17 β -エストラジオールの体腔内注射によって誘導されると報告されたペプチド群である。このことから光照射により合成が促進される卵白腺蛋白質の合成機構に雌性ホルモンが関係している可能性が考えられる。また *E. peliomphala*, *E. queasita* において、address 8, 9 のペプチド群は最近井上⁷⁾によって免疫生化学的に卵白腺から卵へ移行することが証明された。このことから光照射によって合成促進された蛋白質が卵へ移行し卵成熟をはやめる可能性も考えられる。今回形態的にも照射群で卵白腺の成熟、非照射群での萎縮がみられたが、これとともに両性腺の形態的变化を調べる必要があると考える。

一方、*E. queasita* の卵白腺蛋白質成分においては SDS-PAGE, 2D-PAGE の主要なスポットに変化は認められなかった。卵白腺湿重量、卵白腺体重比も光照射により変化しなかった事実とも考え合わせ、*E. queasita* は光照射の影響を *E. peliomphala* にくらべ受けにくいと考えられる。これは、活動期前に照射を続けたという照射の時期の不適さ、自然状態では高山性であること、などとも関係あるのかもしれない。

本研究において光照射の実験として条件設定が完全に

統一されていないという問題がある。今後光照射時間、照度、光照射間隔などを厳密に設定し、多くの種について同様の実験を行いたい。また光照射による脳分泌ペプチドホルモン、生殖腺ホルモン量の変動、両性腺その他の生殖器官系の形態的变化を調べていく必要があると考える。

謝 辞

本研究を行うにあたり実験動物採集において協力をいただいた千葉県立富里高校生徒諸君、田村真弓氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 武田直邦：遺伝, 36: 31, 1982.
- 2) 臼田浩一, 井上 勤：生物物理化学, 30: 31, 1986.
- 3) Laemmli, U. K.: Nature, 227: 680, 1970.
- 4) O'Farrell, P. H.: J. Biol. Chem., 250: 4007, 1975.
- 5) Lowry, O. H. et al.: J. Biol. Chem., 193: 265 1951.
- 6) 浅賀宏昭, 他：生物物理化学, 31: 251, 1987.
- 7) 井上 勤, 他：生物物理化学, 32: 135, 1988.

要 旨

光照射が *E. peliomphala* と *E. queasita* の卵白腺蛋白質に及ぼす影響を量的な面と、質的な面から解析した。量的な面は卵白腺湿重量、卵白腺体重比、卵白腺の湿重量あたりの蛋白質量を検討した。質的な面は Laemmli らの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、O'Farrell の 2 次元電気泳動法を併用し、卵白腺蛋白質成分の検討を行った。*E. peliomphala* において、1 カ月の光照射により対照群にくらべ、卵白腺湿重量は 2.5 倍に、卵白腺体重比は 1.7 倍へと増加した。質的には address 8, 9, 11 のペプチド群の合成が光照射により促進された。これらのペプチド群はエストラジオールによっても合成促進されたという報告もあり、光照射による卵白腺蛋白質合成促進において、雌性ホルモンの関与が示唆された。また、*E. queasita* においては、同様な効果は認められなかった。光照射の効果には種差があり、*E. peliomphala* は光照射に対し、*E. queasita* より、より敏感であると予想される。