第12号

繊維研究所研究報告

2008

財団法人 衣 笠 会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

目　次

報　文

身近な植物で染めを楽しむ　泉　由美子・根岸明子　1

桑葉の動脈硬化抑制効果　－病態モデルマウスを用いた検討－
亀井加恵子・原馬明子・一田昌利・荒井秀典・村山敏典・横出正之　11

カイコ体液中のβ-ラクタマーゼの検索について　加藤靖夫　21

重粒子線に対する蚕胚の感受性と胚期の遺伝子発現
古澤壽治・野島久美恵・長岡俊治・有松祐治・鈴木英子・
一田昌利・長岡純治・杉村順夫・藤井　博・鈴木ひろみ・
嶋津　徹・大森克徳・石岡憲昭　27

Analysis of the Gene of BmTRN-1, an RNA-binding Protein Homologous to Mammalian TIA-1 from the Silkworm, *Bombyx mori*, it's Overexpression and Sub-cellular Distribution during the Baculovirus Infection Process
Sayaka MUTO, Emi MATSUMOTO, Tohru TANABE,
Hajime MORI, Yoshiyuki HAYASHI and Eiji KOTANI　39

総　説

中国蚕糸業の展開とその産地移動　顧　国達　55

技術資料

年表「近代化蚕糸業技術の変遷」　2　大正・昭和初期の蚕糸政策と科学・技術
松本継男　61

解　説

カイコの環境情報受容応答（その２）　角田素行　67

財団法人　衣笠会繊維研究所活動状況

1．平成20年度　各種学会口頭発表および各種学会投稿論文　75
2．平成20年度　講演活動報告　77
3．平成20年度　財団法人 衣笠会「繊維学術賞」報告　81
4．寄稿：「シルク・サミット2008 in ふくしま」に参加して　高橋重三　87
5．International Workshop on Sericulture and Weaving Silk 2006　古澤壽治　90

衣笠繊研報（2008）№12, 1～10
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

身近な植物で染めを楽しむ

泉　由美子*・根岸明子**

To enjoy easy dyeing with common plants

Yumiko IZUMI* and Akiko NEGISHI**

*Department of Human Life Studies, Kacho college,
3-456 Rinkacho, Higashiyama-ku, Kyoto 605-0062, Japan
**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,
29 Kitano Shimo-Hakubai-cho Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

Natural dyes are very popular in handicrafts, though most of them are not used in industry today. This paper introduces the way to enjoy dyeing safely at home with common plants such as weeds, herbs, vegetables, tea leaves, beans and so on. For safety, edible plants are mainly used. Starch can be used in marbling print to float dyes. On the whole, silk cloth dyes well.

For reference, the pictures of silk cloths and cotton cloths that are dyed with 13 kinds of plant extracts are added as color samples. Those colors are specified according to their three attributes (*HV/C*) by matching with JIS standard color chips.

Key Words：natural dyes, plants, handicrafts

1．はじめに

重要な天然染料の成分であるインジゴやアリザリンなどが合成によって工業生産され、さらに安価で鮮美な合成染料が数多く作られるようになって、今日天然染料はログウッドなど、ごく一部を除いて工業的にはほとんど使用されなくなっている。しかし、天然染料は数千年にわたる歴史を持ち、その間優れたものが数多く見出されてきた。またその複雑な色合いや染色工程がむしろ好まれる場合もあり、工芸染色などの分野では今も根強い人気がある。

ここでは身の回りの雑草や、食品、漢方薬など安全な植物材料を用いて、だれもが手軽に染色を楽しめる方法をいくつかの試作品とともに紹介する。

また参考のため、これらの身近な植物および一部の市販染料など合計13種類の植物を用いて染色した絹布および綿布の写真を色見本として提示する。さらにそれらの色の三属性（*HV/C*）をJIS標準色票によって求め、付記した。

2．材料および方法

2．1　供試材料

被染物として手漉き和紙、並太毛糸（毛100%、前処理済み市販品）、絹縮緬着尺地（絹100%、前処理済み市販品）を供試した。

染料植物として、スオウ、クロマメ、アズキ、クチナシ、ウーロン茶、ツルムラサキ、タマネギ、を供試した。

連絡先：*　**財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、
E-mail：zai-kinugasakai@nifty.ne.jp、TEL　075-461-5949

2．2　染色方法・工程

2．2．1　被染物（布・糸）の前処理

一般に被染物には予め精錬や糊抜きなどの前処理を行うが、我々が試作品の素材として用いた並太毛糸および絹縮緬着尺地は前処理済みの市販品（染色材料専門店で購入）であり、そのまま染色に供した。また、手漉き和紙もそのまま供した。

2．2．2　染色液の調製

利用する植物によって色素成分抽出の最適条件は異なり一様ではない。しかし、本報は手軽に染色を楽しむことを主目的としたので、いずれの材料植物の場合も色素成分の抽出に際しては水（イオン交換水を使用）を用いた。

①スオウ、クチナシ

乾燥したスオウ（樹幹、市販染料）、クチナシ（実）の量に対して12～15倍量の水（イオン交換水）を加えて昇温し、90℃以上で30分加熱後ろ過、ろ液を染色液の原液とした。

②クロマメ、アズキ

クロマメ（実）、アズキ（実）の量に対して12～15倍量の水（イオン交換水）を加えて昇温し、60分間煮沸後、ろ過、ろ液を染色液の原液とした。

③ウーロン茶

ウーロン茶（茶葉）の量にたいして30倍量の水（イオン交換水）を加えて昇温、30分間煮沸後ろ過し、ろ液を染色液の原液とした。

④ツルムラサキ

濃紫色に熟したツルムラサキの実を絞った果汁を染色液の原液とした。

⑤タマネギ

タマネギの外皮の量に対して30倍量の水（イオン交換水）を加えて昇温、30分間煮沸後ろ過、ろ液を染色液の原液とした。

2．2．3　媒染液の調製

試作品では媒染剤として酢酸アルミニウムおよび木酢酸鉄を用いた。以下の濃度の水溶液を媒染液として用いた。

酢酸アルミニウム　2.5g／ℓ

木酢酸鉄（液）　10g／ℓ

2．2．4　染色工程

植物を用いた染色では通常、以下の①または②いずれかの工程で行われる。

①先に被染物に媒染処理を行った後染色する【先媒染】

②被染物を染色した後、媒染処理をする【後媒染】

①または②のいずれが適しているかは染料あるいは被染物の繊維の種類により異なる。本報では予備的実験の結果により②を選択し染色を進めた。なお、被染物は予め湿した。

2．2．5　染色技法

試作品の地色の染色は、浸漬して着色（浸染）あるいは刷毛で着色（刷毛染め）のいずれかによって行った。また、手軽に出来る絞り染めやマーブリング（流し染め）も行った。なお、糸を染めた場合の応用例として手製の織り機（※1）による織物、および棒針による編み物を試作した結果を紹介する。

（※1）宮津　濃、山中泰子、「子どもと作るシリーズ13－織機をつくる－」、p14-20、大月書店

3．試作品の紹介

3．1　浸染

前記2．2の方法で調製した染料液および媒染液を用いて絹縮緬地および並太毛糸を浸染した。染色は加熱して行ったが、媒染は常温で行った。

3．1．1　絞り染め

絹縮緬地に乾燥大豆およびガラスビーズを芯に、あるいは適当に布をつまんで輪ゴムを巻いて絞りを施した。タマネギの染色液で染め、酢酸アルミニウムで後媒染を行った（写真1ａ）。

ガラスビーズを芯に、20番綿カタン糸で絞り、ウーロン茶染色液を用いて染めた。媒染は酢酸アルミで布全体を媒染し、少し時間をおいて布の一部を木酢酸鉄で媒染した（写真1ｂ）。

(a)

(b)

写真1　タマネギ（a）およびウーロン茶（b）染色液による絹縮緬地の絞り染め

(a)

(b)

写真2　ウーロン茶染めした毛糸を用いての編み試作（a）、タマネギ、クロマメ、アズキ、ウーロン茶で染色した毛糸をよこ糸とする織り、たて糸：タコ糸、織機：手作り（b）

3．1．2　糸染め

前処理済みの並太毛糸をかせにし、繰りながら染色・媒染を行った。染色した毛糸を用いて①棒針編みおよび②手織りで試作した。

①並太毛糸のかせを30倍量のウーロン茶染色液で染色し、かせ全体を酢酸アルミニウムで、さらに一部を木酢酸鉄で媒染し二色に染め分けた。この染め糸を棒針で編み試作した（写真2ａ）。

②並太毛糸をタマネギ、クロマメ、アズキ、ウーロン茶で染色し、それぞれ酢酸アルミニウムあるいは木酢酸鉄で媒染し多くの色糸を用意した。手作りの簡易織り機にタコ糸をたて糸として2本取りで張り、よこ糸は適当な段数ごとに染め糸を変えて織った（写真2ｂ）。

3．2　刷毛染め

手漉き和紙をスオウ、クロマメ、クチナシ、ツルムラサキの各染色液でそれぞれ刷毛染めし、半乾きになったところで酢酸アルミニウムあるいは木酢酸鉄の各媒染液を刷毛で塗布した。充分水洗、乾燥した（写真3ａ）。

さらに、1枚の和紙をスオウ、クチナシ、ツルムラサキの染色液で刷毛染めした。半乾燥の後、酢酸アルミニウムあるいは木酢酸鉄の媒染液を刷毛で塗布して媒染し、充分水洗、乾燥した。これらの染色した和紙を市販のうちわの台に貼った（写

(a)

(b)

写真３　スオウ、クロマメ、クチナシ、ツルムラサキ染色液による手漉き和紙の刷毛染め（ａ）、スオウ、クチナシ、ツルムラサキの染色液による和紙の刷毛染めと、これらの和紙を用いて試作した「うちわ」（ｂ）

(a)

(b)

写真４　スオウ、クチナシ、ツルムラサキ染色液による絹縮緬のマーブリング
（ａ）酢酸アルミニウム媒染、（ｂ）木酢酸鉄媒染

真３ｂ）。

３．３　マーブリング（流し染め）

マーブリング糊として食用の片栗粉を利用した。片栗糊をバット（被染物より大きいもの）に流し入れ、糊表面に染色液を滴下し、竹串等で染料を動かす。気に入った模様ができたところで、糊表面に布や紙などの被染物を置き模様を写し取る。水洗して被染物表面の余分な糊を落とした後、媒染・充分水洗・乾燥する。試作品には絹縮緬を供した。

①染料としてスオウ、クチナシ、ツルムラサキの染色液を用い、媒染は酢酸アルミニウム溶液で行った（写真４ａ）。

②染料としてスオウ、クチナシ、ツルムラサキの染色液を用い、媒染は木酢酸鉄溶液で行った（写真４ｂ）。

４．おわりに

天然染料特に植物染料については研究者、染色家等によって数多くの書籍が出版されている。われわれの目的は新規の染料植物や染色法の開発ではなく、だれもが身近な材料で染色を楽しめる方法を提案することである。

試作に際しては媒染剤に酢酸アルミニウムおよ

び木酢酸鉄を用いたが、家庭で行う場合、酢酸アルミニウムの代わりにミョウバンを、木酢酸鉄の代わりに鉄釘と食酢で作った鉄媒染液を利用することができよう。使用水も通常は水道水でさしつかえない。とくに家庭で染色する場合には食品添加物として認められているミョウバンによる媒染を勧める。染色に利用できる身近な植物はここで取り上げたもの以外にも数多くあるので、媒染剤がミョウバンだけでも多くの色を得ることが出来るからである。また手織りをする場合も、市販の織り機だけでなく、ベニヤ板やダンボール紙などを利用した手作りの織り機でも楽しむことができる。

天然染料によって染めた色は一般的に日光や洗濯などに対する堅ろう性が悪いが、用途を選べば利用価値が大きい。

謝辞

本報告の作成にあたっては、華頂短期大学・山中隆教授に多大なるご協力をいただきました。ここに深く感謝いたします。

参考資料（染色見本）

染色方法

1．材料

染料：スオウ（樹幹）、ログウッド（樹幹）、ヤマモモ（樹皮）、チャ（ウーロン茶葉）、クロマメ（実）、アズキ（実）、ヨモギ（葉）、キハダ（樹皮）、クチナシ（実）、タマネギ（皮）、カリヤス（葉、茎）、セイタカアワダチソウ（葉、茎）（以上乾燥状態）　ツルムラサキ（実）

被染布：綿（ブロード、金巾）、絹（縮緬）

使用水：イオン交換水

2．方法

1）被染布前処理

綿：マルセル石鹸（3g/ℓ）、浴比1：40にて、70℃で30分間加熱.

絹：結晶炭酸ナトリウム（2%owf）、浴比1：50にて、50℃で15分間加熱。

＊owf：対繊維重量百分比

2）染料液の調製

ツルムラサキ以外の染料液：

1回目抽出：乾燥染料の15倍の水で．30分煮沸後ろ過。

2回目抽出：1回目抽出の残渣に、乾燥時の10倍の水で30分煮沸後ろ過。

1、2回のろ液を混合して染料液とする。

ツルムラサキの染料液：

濃紫色に熟した生のツルムラサキの実を絞り、10倍の水で希釈する。

3）媒染液の調製

アルミニウム媒染液

：酢酸アルミニウム2.5g/ℓ 水溶液

銅媒染液：酢酸銅2.5g/ℓ 水溶液

鉄媒染液：木酢酸鉄（液体）10g/ℓ 希釈液

4）染色工程

先媒染染色：媒染→軽く水洗→半乾燥→染色→水洗

後媒染染色：染色→軽く水洗→半乾燥→媒染→水洗

媒染：浴比1：40の媒染液に、室温で20分間浸漬

染色：浴比1：40の染料液に室温から浸漬し、約10分間で90℃まで昇温、さらに90℃で20分間染色

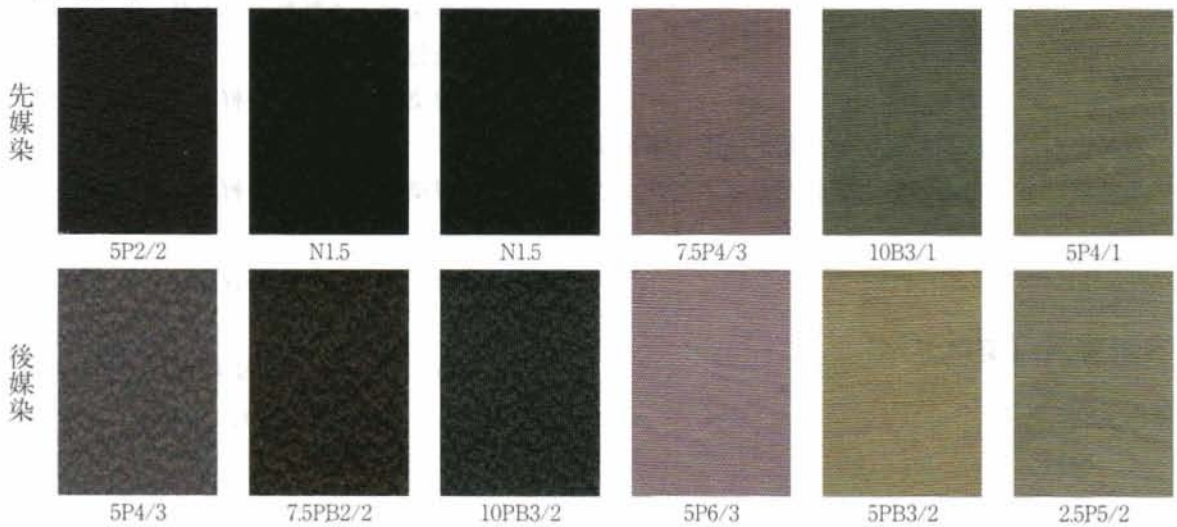
図に関して

1）図中のアルミ、銅、鉄はそれぞれ酢酸アルミニウム、酢酸銅、木酢酸鉄の水溶液で媒染したことを示す。

2）染色布の色の三属性（*HV/C*）はJIS標準色票（光沢）から求めた。

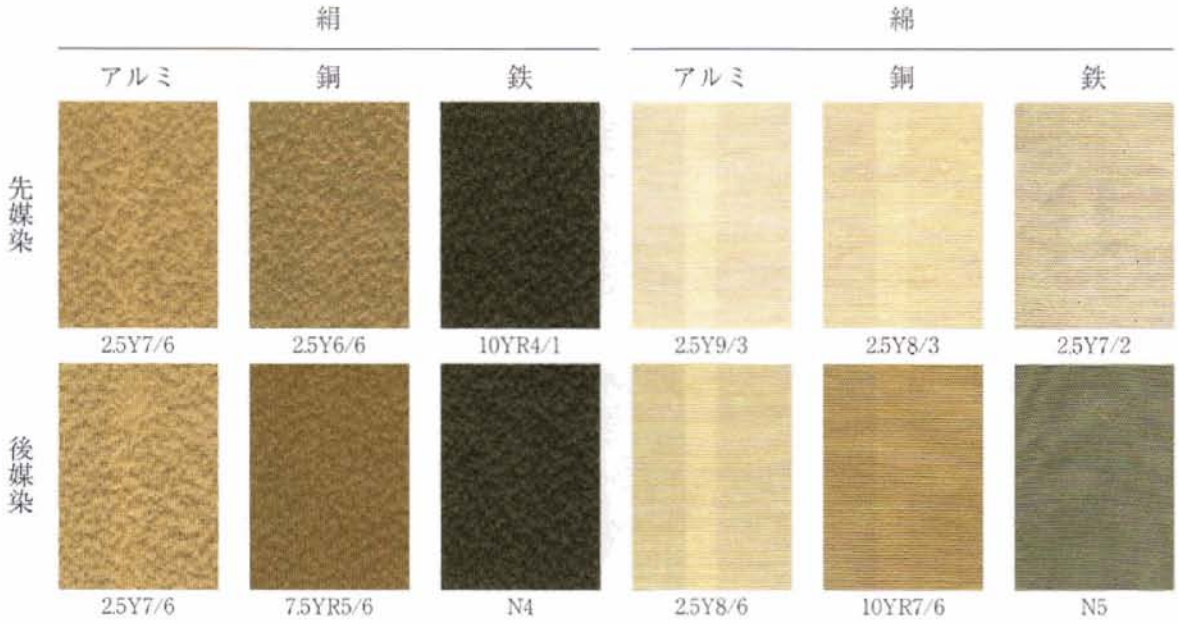
1．染料植物：スオウ

2．染料植物：ログウッド



3．染料植物：ヤマモモ

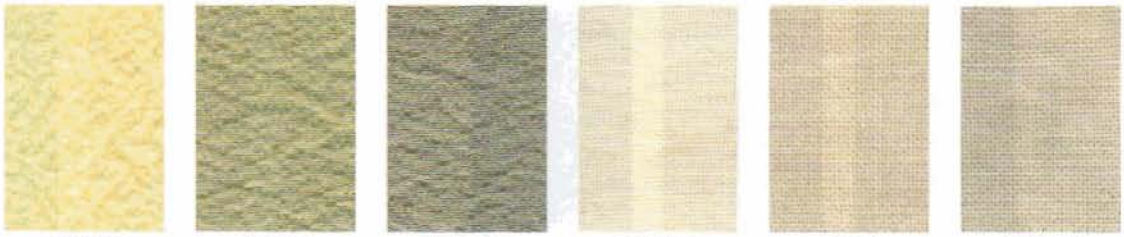
4．染料植物：ウーロン茶



5．染料植物：クロマメ

6．染料植物：アズキ

7．染料植物：ヨモギ

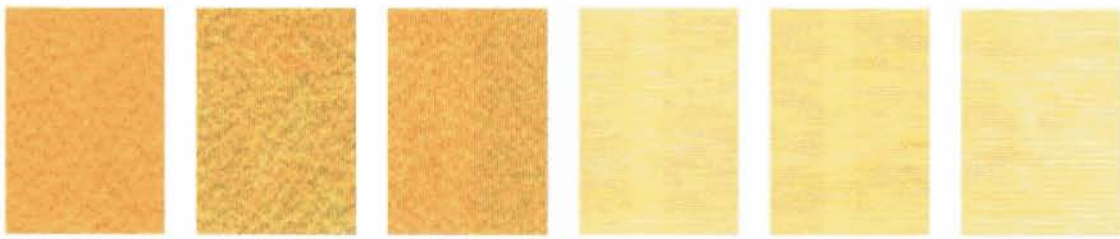


	絹			綿		
	アルミ	銅	鉄	アルミ	銅	鉄
先媒染	10Y9/6	10Y6/6	2.5GY6/3	7.5Y9/3	5Y7/4	10Y8/2
後媒染	7.5Y9/4	10Y7/4	2.5GY5/3	7.5Y9/3	2.5Y8/2	10Y7/2

8．染料植物：キハダ

先媒染	5Y8/12	7.5Y7/8	10Y7/8	5Y9/4	7.5Y9/4	10Y9/4
後媒染	5Y8/12	10Y7/10	10Y6/6	5Y9/3	10Y9/3	7.5Y8/3

9．染料植物：クチナシ



先媒染	10YR8/12	2.5Y7/12	2.5Y7/12	2.5Y8/14	2.5Y8/8	2.5Y8/10
後媒染	10YR8/12	2.5Y7/10	5Y6/8	2.5Y8/12	2.5Y8/8	5Y8/10

10. 染料植物：タマネギ

	絹			綿		
	アルミ	銅	鉄	アルミ	銅	鉄
先媒染	7.5YR5/8	7.5YR5/8	7.5YR3/4	10YR7/8	10YR6/10	10YR6/4
後媒染	10YR6/10	7.5YR4/6	2.5Y3/4	2.5Y7/12	10YR5/6	5Y4/4

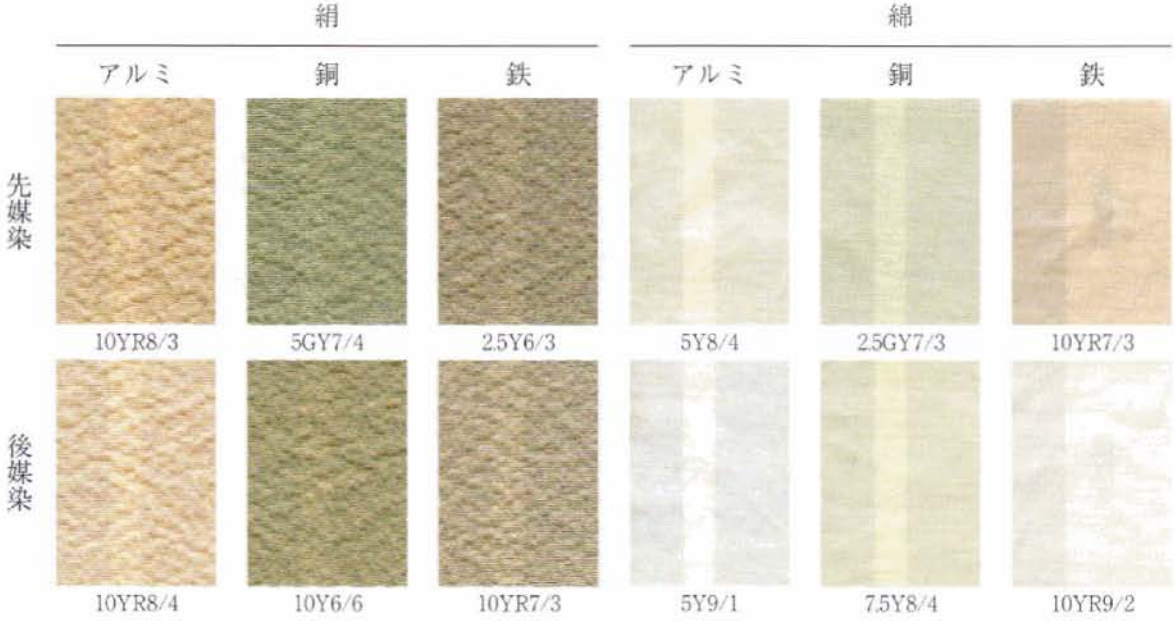
11. 染料植物：カリヤス

先媒染	5Y7/10	7.5Y6/8	7.5Y3/3	5Y9/3	5Y8/6	5Y6/3
後媒染	5Y7/10	5Y6/8	5Y3/3	5Y8/6	5Y7/10	5Y5/3

12. 染料植物：セイタカアワダチソウ

先媒染	7.5Y9/4	7.5Y7/4	2.5GY6/3	5Y9/2	2.5Y8/3	10Y7/2
後媒染	5Y9/4	7.5Y7/4	2.5GY4/2	5Y9/2	2.5Y7/3	7.5Y6/3

13. 染料植物：ツルムラサキ



使用した染料植物の例

衣笠繊研報（2008）No12, 11～19
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

桑葉の動脈硬化抑制効果
－病態モデルマウスを用いた検討－

亀井加恵子*・原馬明子*・一田昌利**・荒井秀典***・
村山敏典****・横出正之****

Suppression of Atherosclerosis by Mulberry Leaf
－ Analysis using Disease Model Mouse －

Kaeko KAMEI*, Akiko HARAUMA*, Masatoshi ICHIDA**, Hidenori ARAI***,
Toshinori MURAYAMA**** and Masayuki YOKODE****

*Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology,
Matsugasaki, Sakyo-ku,Kyoto 606-8585, Japan
**Bioresource Field Science Center, Kyoto Institute of Technology,
Ippongi-chou, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan
***Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University,
54 Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
****Department of Clinical Innovative Medicine, Translational Research Center, Kyoto University
Hospital, 54 Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Abstract

We examined whether a dietary intake of mulberry leaf could affect atherogenesis *in vivo*. Apolipoprotein E-deficient mice were fed either normal chow (control group) or a diet containing 1% mulberry leaf powder (mulberry group) from 6 weeks of age. The mice were sacrificed after 12 weeks. The susceptibility of plasma lipoprotein to oxidation was assessed using diene formation. A significant increase in the lag time of lipoprotein oxidation was detected in the mulberry group compared with the control group. The mulberry group showed a 40% reduction in atherosclerotic lesion size in the aortae compared with the control. Furthermore, immunohistochemical analyses were also performed for analyzing cell composition in the atherogenetic lesion site.

Key Words：Mulberry leaves, Atherosclerosis, Apolipoprotein E-deficient mice

＊連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門、
606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、E-mail：kame@kit.ac.jp、TEL 075-724-7553
＊＊連絡先：京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町１、E-mail：ichida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0714
＊＊＊連絡先：京都大学大学院医学研究科、606-8507 京都市左京区聖護院川原町54、
E-mail：harai@kuhp.kyoto-u.ac.jp、TEL 075-751-4260
＊＊＊＊連絡先：京都大学医学部付属病院 探索医療臨床部、606-8507 京都市左京区聖護院川原町54、
E-mail：murayama@kuhp.kyoto-u.ac.jp, yokode@kuhp.kyoto-u.ac.jp、TEL 075-751-4743

1．まえがき

動脈疾患は、血漿低比重リポタンパク質（LDL）レベルおよびコレステロールレベル、酸化や凝集といったLDLの修飾など様々な危険因子によって起こる。酸化型LDL（Ox-LDL）は動脈硬化症の進行に関与していることが報告されている[1-3]。Ox-LDLは単球の接着亢進[4]、より強い細胞毒性[5]、泡沫細胞の形成促進[6,7]およびサイトカインや細胞増殖因子の発現の変化誘導[8,9]などの活性を持っており、これらの生理活性によって動脈硬化病変部位の形成が促進される。Ox-LDLの生成は酸化ストレスによって加速されるため、抗酸化物質は動脈硬化症を抑制することが示唆されている。これまでに、高脂血症ウサギやサルにおいて抗酸化剤プロブコールによって動脈硬化症の進行が抑制されることが報告されている[10,11]。しかし、ビタミンE、s-カロテン、ビタミンCやポリフェノールなど食餌に含まれる抗酸化物質が、LDLの酸化に対する感受性や動脈硬化症に与える影響についてはまだ不明な点が多い[12]。これらのビタミンなどに加えて、いくつかのハーブ類がLDLの酸化を抑制することが報告されている[13,14]。

桑葉は、カイコの餌であるとともに、中国や日本で漢方薬として用いられている。また、桑葉は抗酸化物質を多く含むことが報告されている[15]。本研究では、桑葉をアポリポタンパク質Eノックアウトマウス（*apoE*$^{-/-}$）に経口投与し、リポタンパク質の酸化に与える影響や動脈硬化症に与える影響を調べた。

2．材料および方法

2．1　マウス

apoE$^{-/-}$ 129ola × C57BL/6ハイブリッドマウスはEdward M. Rubin博士（University of Callifornia at Berkely, USA）より提供された[16]。そのハイブリッドマウスをC57BL/6マウスと交配し、F1ハイブリッドを作製した。F1 *apoE*$^{+/-}$は5世代間C57BL/6マウスとバッククロスした。さらに、*apoE*－ノックアウトマウスは兄弟間で交配し、遺伝的に均一なマウスを作製した後、オスを実験に用いた[17,18]。

マウスは明（14時間）－暗（10時間）の光周期で、温度制御した施設内で自由に食餌と水を摂取できる条件で飼育した。4週齢で離乳後、実験を開始する6週齢までの期間、通常の食餌（8.7%脂肪と0.063%コレステロールを含むCMF、オリエンタル酵母）を与えた。マウスは一晩、絶食させた後に尾部静脈より採血し、エチレンジアミン四酢酸（EDTA、10mM/L）を含むチューブに入れ、血漿を調製した。研究の終了時に頚椎骨折によって全てのマウスを屠殺し、心臓を以後の実験に用いた。なお、本研究は京都大学の実験動物委員会の承認を受けて、京都大学の実験施設で実施したものである。

2．2　投与試料

桑葉は8秒間、180℃の温風（ドライマイスター、ホソカワミクロン社）により乾燥・粉砕した。6週齢のマウスをランダムにコントロール群（7匹）および桑葉投与群（7匹）の2群に分け、試験試料を与えた。コントロール群には粉砕したCMF、桑葉投与群には1％（w/w）桑葉粉末を含むCMFを6週齢から18週齢までの12週間投与した。

2．3　血漿コレステロールレベル

6、10、14、18週齢において、マウスを一晩絶食させ、血漿を採取した。血漿コレステロールレベルは分光法（Cholescolor Liquid Kit、東洋紡）によって測定した。

2．4　マウス非HDL-リポタンパク質の単離

EDTA（25mM）存在下で採取した新鮮血を低速遠心（3000rpm、4℃、10分）し、血清を得た。密度勾配遠心によってマウス血漿より非HDL-リポタンパク質（比重<1.063g/mL）を単離した。具体的には、700μLの血漿が入ったチューブに、最終比重が1.063g/mLとなるようにKBrを加えた。チューブを4℃で100,000rpm、24時間遠心（TC-

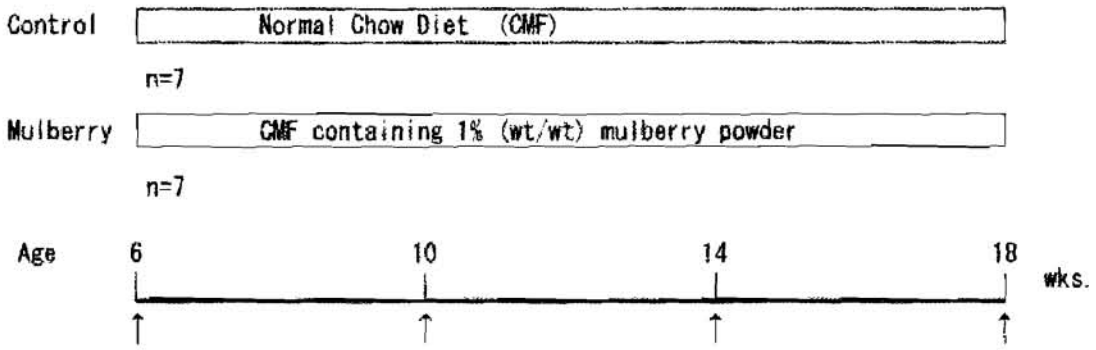


Fig. 1. Experimental protocols. At 6 weeks of age, mice were randomly divided into 2 groups (control and mulberry leaf groups). The mice were fasted overnight before collection of blood from the tail at 6, 10 and 14 weeks of age, and from the heart at 18 weeks of age. The mice were sacrificed at the end of study (18 weeks of age) under anesthesia with ether and hearts were obtained for subsequent analyses.

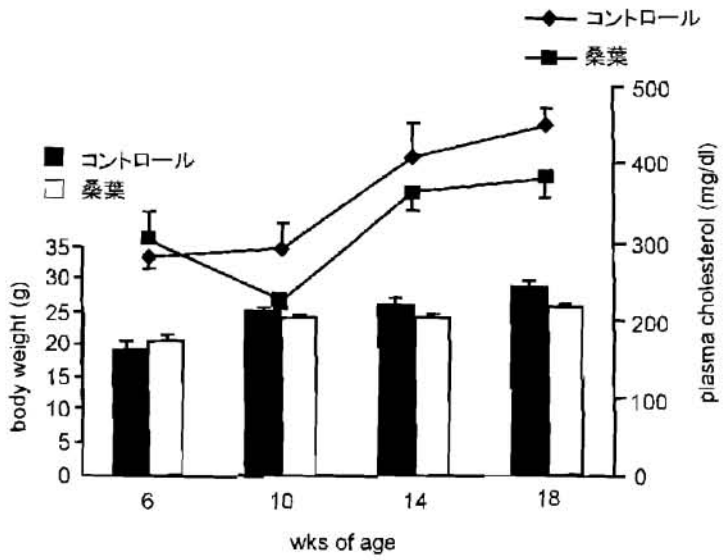


Fig. 2. Body weight and plasm cholesterol levels in the control and mulberry groups of *apoE*$^{-/-}$ mice.

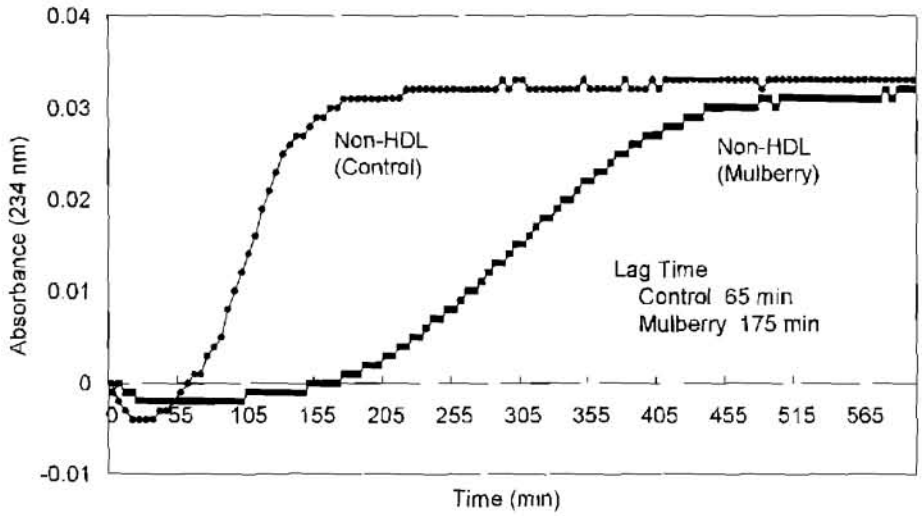


Fig. 3. Oxidation of non-HDL from *apoE*$^{-/-}$ mice in the control (●) and mulberry (■) groups. Conjugated-diene formation during the incubation of lipoprotein and $CuSO_4$ was measured at 234nm.

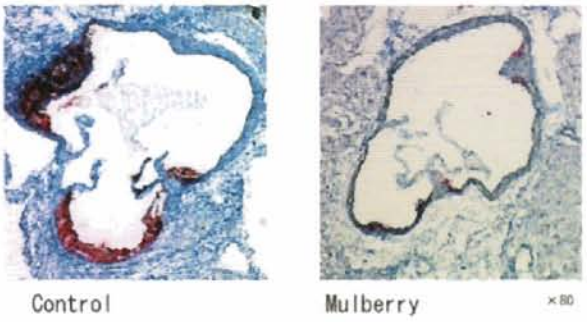


Fig. 4. Representative photomicrographs of the aortic sinus from *apoE*$^{-/-}$ mice. The animals in the control (left) and mulberry (right) groups were sacrificed at 18 weeks of age, and the aortic roots were stained with oil red-O and hematoxylin.

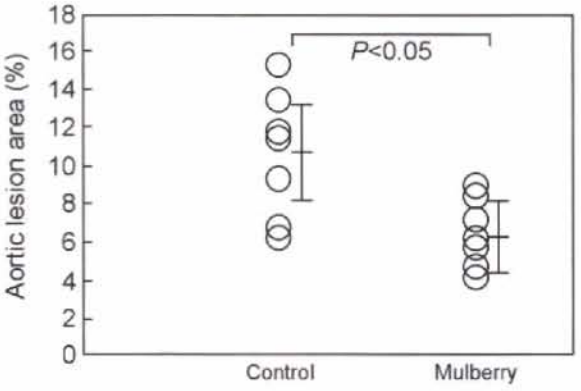


Fig. 5. Quantification of atherosclerotic lesion area stained by oil red-O. The atherosclerotic lesion was quantified as the fraction area of control and mulberry groups. The mulberry group showed 61% less atherosclerosis compared with the control group.

65分のコントロール群に比べて顕著に長かった。これは桑葉の経口投与によって、桑葉の抗酸化物質が*apoE*$^{-/-}$マウスの血中に取り込まれ、その結果、血中リポタンパク質の酸化が抑制されたことを示している。

3．3　動脈硬化に対する桑葉の影響

続いて動脈硬化病変部位を解析した。これまでに、通常食を投与した*apoE*$^{-/-}$マウスは18週齢までに線維増殖性病変部位を発症することが明らかにされている[25,27]。本研究においても、コントロール群の大動脈基始部でオイルレッドOで染色される粥状動脈硬化病変部位が認められた（図4左）。一方、桑葉投与群では病変部位が顕著に小さいことが分かった（図4右）。定量解析の結果、桑葉投与群では動脈硬化病変部位の面積はコントロール群に比べて約61％（P=0.014、図5）に減少していることが明らかとなった。

3．4　動脈硬化病変部位の免疫組織学的解析

動脈硬化病変部位における血管平滑筋細胞およびマクロファージの分布を解析した。α-アクチンに対する抗体を用いて平滑筋細胞を染色した結果、コントロール群では平滑筋細胞が血管内膜で凝集し、オイルレッドOで染色される部位で血管内皮下の空間を覆う繊維性皮膜構造を形成していることが分かった（図6A）。一方、桑葉投与群では繊維性皮膜構造は認められなかった（図6B）。続いて、マクロファージ特異的抗体を用いてマクロファージを染色した結果、コントロール群では血管内皮下にマクロファージが検出されたが（図6C）、桑葉投与群では検出されなかった（図6D）。

以上の結果より、コントロール群のオイルレッドOで染色された部位は動脈硬化病変部位であり、一方、桑葉投与群では動脈硬化症の進行が抑制されたことが確認された。

4．考察

apoE$^{-/-}$マウスに6週齢～18週齢の期間、1％桑葉（w/w）を含む食餌を経口投与した結果、動脈硬化症が抑制されることが示された。しかし、体重および血清コレステロール濃度は通常食投与群と有意な差は認められなかった。また、桑葉投与群のマウスから得たリポタンパク質は酸化に対する抵抗性が増加していた。

酸化ストレスが動脈硬化に関係していることは広く認められている。これまでに、ビタミンEがLDLの酸化を抑制することが報告されている[28-30]。しかし、ビタミンEが高脂血症の動物における動脈硬化病変部位の進展を遅らせるという報告

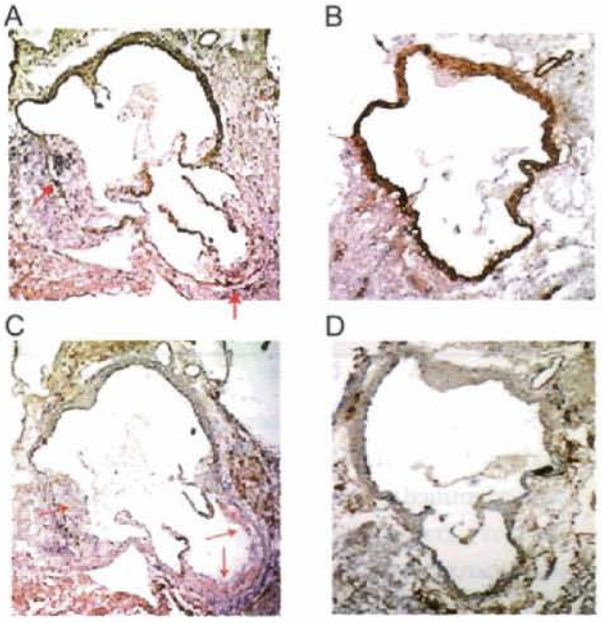


Fig. 6. Immunohistochemistry of aortic sinus from 18-weeks age *apoE*$^{-/-}$ mice. Sections were stained with anti-α-actin antibody for detecting smooth muscle cells (A and B), or with BM8 monoclonal antibody for detecting mouse macrophage (C and D). A and C, control group ; B and D, mulberry group.

がある一方で、ビタミンEは抗動脈硬化活性を示さないという報告もある[31-34]。

代表的なポリフェノールであるフラボノイドは2つのフェニルベンゼン（クロマノール）環がピラン環を通じて結合した一群の化合物である[35]。種々の異なる構造を持つフラボノイドが様々な果物、野菜、茶やワインを含む飲料に含まれている。桑葉にもケルセチンやケンフェロールなどのフラボノイドが含まれていることが知られている。フラボノイドは、動脈硬化症発症の重要な鍵を握っていると考えられるLDLの酸化を抑制することによって冠状動脈の疾病を防ぐと考えられる[36-45]。本研究でも、桑葉投与群マウスの血中リポタンパク質は酸化に対する抵抗性が増加していたことから、桑葉の経口投与による動脈硬化抑制効果の少なくとも一部は血中に取り込まれた抗酸化物質によるLDLの酸化抑制によるものと考えられる。

引用文献

[1] Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verhaeghe, R., Collen, D., Muls, E. and Van de Werf, F.(2001) :Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 844-848

[2] Holvoet, P., Kritchevsky, S.B., Tracy, R.P., Mertens, A., Rubin, S.M., Butler, J., Goodpaster, B. and Harris, T.B. (2004) : The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in wellfunctioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 53, 1068-1073

[3] Mertens, A., Verhamme, P., Bielicki, J.K., Phillips, M.C., Quarck, R., Verreth, W., Stengel, D., Ninio, E., Navab, M., Mackness, B., Mackness, M. and Holvoet, P. (2003) : Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice : LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation* 107, 1640-1646

[4] Mine, S., Tabata, T., Wada, Y., Fujisaki, T., Iida, T., Noguchi, N., Niki, E., Kodama, T. and Tanaka, Y. (2002) : Oxidized low

density lipoproteininduced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* **160**, 281-288

[5] Colles, S.M., Maxson, J.M., Carlson, S.G. and Chisolm, G.M. (2001) : Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc. Med.* 11, 131-138

[6] Yokode, M., Kita, T., Arai, H., Kawai, C., Narumiya, S. and Fujiwara, M. (1988) : Cholesteryl ester accumulation in macrophages incubated with low density lipoprotein pretreated with cigarette smoke extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2344-2348

[7] Chisolm, G.M. and Steinberg, D. (2000) : The oxidative modification hypothesis of atherogenesis : an overview. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1815-1826

[8] Chisolm 3rd, G.M. and Chai, Y. (2000) : Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1697-1707

[9] Fei, G.Z., Huang, Y.H., Swedenborg, J. and Frostegard, J. (2003) : Oxidised LDL modulates immune-activation by an IL-12 dependent mechanism. *Atherosclerosis* **169**, 77-85

[10] Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishii, K., Kume, N., Ooshima, A., Yoshida, H. and Kawai, C. (1987) : Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5928-5931

[11] Carew, T.E., Schwenke, D.C. and Steinberg, D. (1987) : Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect : evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7725-7729

[12] Munteanu, A., Zingg, J.M. and Azzi, A. (2004) : Anti-atherosclerotic effects of vitamin E – myth or reality? *J. Cell Mol. Med.* **8**, 59-76

[13] Gugliucci, A. and Menini, T. (2002) : Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb Achyrocline saturcoides. *Life Sci.* 71, 693-705

[14] Heber, D. (2001) : Herbs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **3**, 93-96

[15] Doi, K., Kojima, T. and Fujimoto, Y. (2000) : Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 1066-1071

[16] Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setala, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M. and Breslow, J.L. (1992) : Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**, 343-353

[17] Murayama, T., Yokode, M., Horiuchi, H., Yoshida, H., Sano, H. and Kita, T. (2000) : Overexpression of low density lipoprotein receptor eliminates apolipoprotein B100-containing lipoproteins from circulation and markedly prevents early atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **153**, 295-302

[18] Sano, H., Sudo, T., Yokode, M., Murayama, T., Kataoka, H., Takakura, N., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I. and Kita, T. (2001) : Functional blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta but not of receptor-alpha prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice.

vitamin E in coronary artery disease : is it time to reconsider the low-density lipoprotein oxidation hypothesis? *Curr. Atheroscler. Rep.* 5, 83-87.

[34] Upston, J.M., Witting, P.K., Brown, A.J., Stocker, R. and Keaney Jr., J.F. (2001) : Effect of vitamin E on aortic lipid oxidation and intimal proliferation after arterial injury in cholesterol-fed rabbits. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1245-1253

[35] Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. (1994) : Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of Morus Bombycis. *Carbohydr. Res.*, **253**, 235-245

[36] Aviram, M. and Fuhrman, B. (1998) : Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis* 137 (Suppl), S45-S50

[37] Fuhrman, B. and Aviram, M. (2001) : Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 41-48

[38] Belinky, P.A., Aviram, M., Fuhrman, B., Rosenblat, M. and Vaya, J. (1998) : The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis* **137**, 49-61

[39] Demrow, H.S., Slane, P.R. and Folts, J.D. (1995) : Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* **91**, 1182-1188

[40] Formica, J.V. and Regelson, W. (1995) : Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061-1080

[41] Goker, H., Tuncbilek, M., Leoncini, G., Buzzi, E., Mazzei, M., Rolland, Y. and Ertan, R. (1995) : Synthesis and inhibitory activities on platelet aggregation of some flavonoid analogues. *Arzneimittelforschung* **45**, 150-155

[42] Lanningham-Foster, L., Chen, C., Chance, D.S. and Loo, G. (1995) : Grape extract inhibits lipid peroxidation of human low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1347-1351

[43] Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y. and Tomita, I. (1995) : Effects of various natural antioxidants on the Cu(2+)-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1-4

[44] Sinatra, S.T. and DeMarco, J. (1995) : Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart : antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn. Med.* **59**, 579-588

[45] Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M. and Yamane, Y. (2005) : Mulberry (Morus alba L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* **135**, 729-734

衣笠繊研報（2008）No.12, 21～26
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

カイコ体液中のβ-ラクタマーゼの検索について

加藤靖夫*

β-Lactamase in the Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*

Yasuo KATO*

*Faculty of Contemporary Human Life Science, Tezukayama University, 3-1-3 Gakuen-minami, Nara 631-8585, Japan

Abstract

The activity of β-lactamase in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, was estimated by using the method of Sargent (1968), and of Sawai and Takahashi (1978). On basis of the methods, β-lactamase was fractionated from the hemolymph of 10th day of the 5th instar larvae by means of gel filtration and Mono Q ion-exchange chromatography. The activity was at trace level on day 3 and 6 of 5th instar, and increase to a high level on day 8 (matured larva) and day 10 (spinning larva), but decrease to a low level at pupal stage, suggesting that β-lactamase might be contribute to the larval-pupal metamorphosis.

Key Words：β-lactamase, Hemolymph, Silkworm, *Bombyx mori*

1．まえがき

これまでに、カイコ幼虫体液中のレクチン関連タンパク質の検討の過程において、２次元電気泳動（１次元目：アガロースゲル等電点電気泳動、２次元目；SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）によって得られた２つのスポットをゲルから切除して、ゲルトリプシン消化後、マトリックス添加レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）で分析し、スイスインターナショナルエアラインズ-タンパク質データベース検索に供した。その結果、２次元電気泳動によって得られたスポットのうちの１つがβ-ラクタマーゼ（EC3.5.2.6）であると推定された[1,2]。このことは、一般にβ-ラクタマーゼがペニシリンのようなβ-ラクタム剤のβ-ラクタム環を開裂することにより抗菌性を失わせる加水分解酵素として知られていることからも[3,4,7]、カイコの生体防御を考える上で非常に興味深い結果を得ることができたものと考えられる。

本報告では、カイコ体液中におけるβ-ラクタマーゼの存在の確認とゲル濾過法や Mono Q イオン交換クロマトグラフィーによる体液からのβ-ラクタマーゼの分別について検討した。

本文に入るに先立ち、本研究を遂行するに当たって御指導を賜った藤井　博九州大学名誉教授に心より御礼申し上げます。

2．材料および方法

2．1　供試試料

供試蚕品種としては、春嶺×秋月を用い、桑葉で飼育した。５齢幼虫の体液を2,260×g で15分間遠心分離し、その上清を凍結乾燥した。

＊連絡先：帝塚山大学現代生活学部
631-8585 奈良市学園南３丁目１－３、E-mail：katou@tezukayama-u.ac.jp、TEL & FAX　0742-41-4793

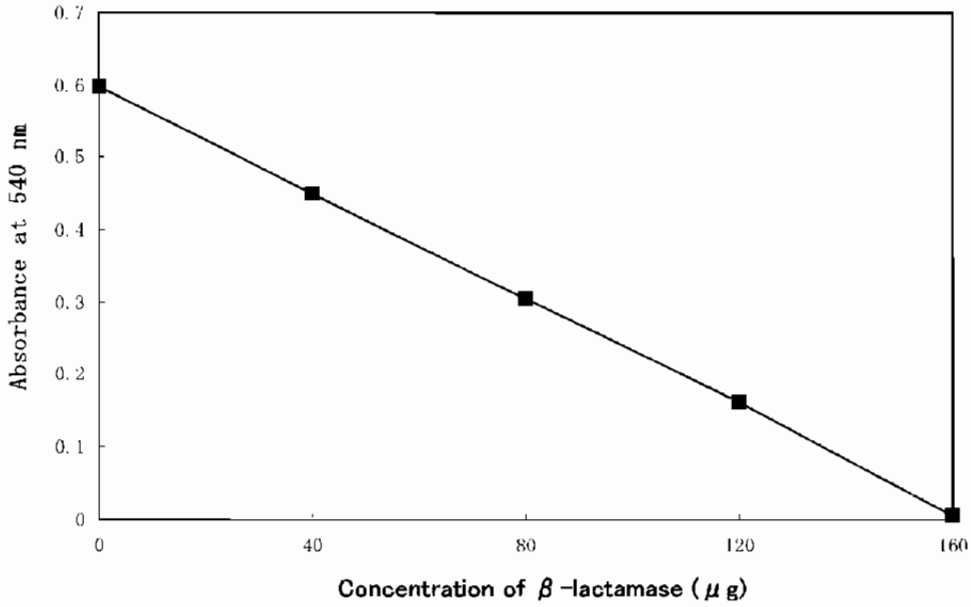


Fig. 1. Standard curve of β-lactamase activity.

2．2　β-ラクタマーゼ活性の測定

β-ラクタマーゼの活性はSargent[6] および澤井・高橋[5] の方法に準じて測定した。即ち、カイコ体液凍結乾燥物を0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解し、β-ラクタマーゼの基質であるペニシリンGカリウム塩を加え、30℃で10分間インキュベートした後、ヨウ素試薬を加えて反応を停止した（ヨウ素試薬は、5mℓのヨウ素保存液を95mℓの酢酸緩衝液（pH4.0）に加えることによって作成した。また、ヨウ素保存液は、20.3gのヨウ素と100gのヨウ化カリウムを500mℓの蒸留水に溶解して調製した。）。反応を停止してさらに10分間室温で放置後、反応液中に残存するヨウ素量を知るために540nmにおける吸光度を島津分光光度計UV-1200で測定した。なお、標品にはセレウス菌569/H9由来のβ-ラクタマーゼ（Nakalai Tesque, Inc.）を用いた。

2．3　ゲル濾過

Superdex 200カラム（2.6×60cm, Amershan Pharmacia Biotech Ltd.）を用いてゲル濾過を実施した。タンパク質の溶出は、0.1Mトリス－塩酸緩衝液（0.1M NaCl）を用いて、流速150mℓ/hで溶出した。溶出液を5mℓずつ分取し、280nmにおける吸光度を測定した。

2．4　イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーは、0.05Mトリス－塩酸緩衝液（pH8.0）であらかじめ平衡化したMono Q HR 5/50 GLカラム（5×50mm、Amershan Pharmacia Biotech Ltd.）を使用した。タンパク質の溶出は、0.05Mトリス－塩酸緩衝液（pH8.0）の0M～0.5Mの直線的濃度勾配法により行い、流速1mℓ/minで溶出した。溶出液を1mℓずつ分取し、280nmにおける吸光度を測定した。

3．結果および考察

3．1　β-ラクタマーゼ活性の標準曲線

図1にβ-ラクタマーゼ活性の標準曲線を示す。図1の横軸は、0.1Mリン酸緩衝液2.5mℓに含まれているセレウス菌569/H9由来のβ-ラクタマーゼのμg量を示す。リン酸緩衝液中のβ-ラクタマーゼ濃度が0μgの場合は、ヨウ素は全く消費されないので反応液の540nmにおける吸光度は高い値を示した。一方、リン酸緩衝液中のβ-ラクタマーゼ濃度が100μgの場合は、反応液の吸光度は非常に低い値を示した。即ち、澤井・高橋[5] が述べているように、基質であるペニシリン（ペニシリンGカリウム塩）のβ-ラクタム環がβ-ラクタマーゼ

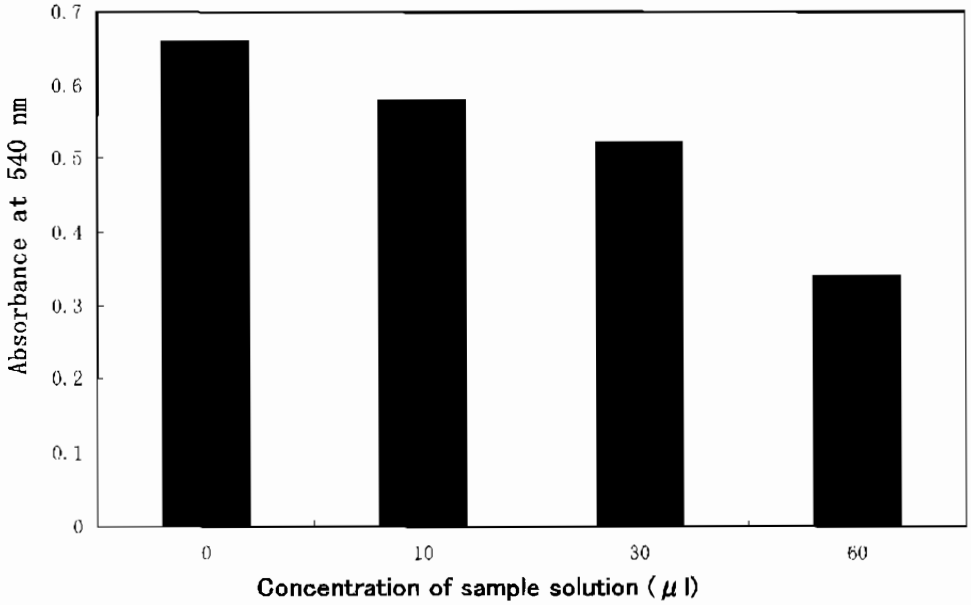


Fig. 2. The relationship between the concentration of the hemolymph of the silkworm in place of β-lactamase and absorbance.

の作用で切断されてできた反応生成物がヨウ素を消費していることが観察された。また、その際にβ-ラクタマーゼの濃度と反応液の吸光度とは反比例の関係にあることが確認された（図１）。このことは反応液の吸光度からβ-ラクタマーゼ活性値を推測することが可能であることを示している。

３．２　カイコ体液中のβ-ラクタマーゼ活性の変化

まず、標品のβ-ラクタマーゼの代わりに用いたカイコ体液の濃度と反応液の吸光度との関係を調べた。カイコ５齢幼虫10日目の体液凍結乾燥物（10mg）を100μℓの0.1Mリン酸緩衝液に溶解し、そのうちの10μℓ、30μℓ、60μℓを測定用の溶液とした。それぞれの基質（ペニシリンGカリウム塩）に反応させた場合のそれぞれの反応液の540nmにおける吸光度を図２に示した。即ち、体液の濃度が増加すれば反応液の吸光度が低下した。このことは、カイコ体液中にβ-ラクタマーゼの存在する可能性を示した。そこで、次にカイコ体液中のβ-ラクタマーゼの生理的な意味を解明するために、カイコ５齢幼虫体液中のβ-ラクタマーゼ活性の経時的変化に関する調査を行った。その結果を表１に示す。表１では、体液で処理されなかった反応混合物を「コントロール」として用いた。カイコ幼虫５齢期における体液中のβ-ラクタマーゼ活性を経時的に測定した結果、３日目および６日目ではその活性がほとんど認められなかったが、８日目（熟蚕期）、10日目（吐糸期）、13日目（蛹化期）において高い活性を示した。しかし、17日目（蛹期）には再び活性が低くなった。即ち、変態の進行している一時期において比較的高い活性を示した。これらの結果は、カイコの生体内にβ-ラクタマーゼが実際に存在することを示し、また、

Table 1. Change of β-lactamase activity in the hemolymph of the silkworm with development and growth of fifth instar larvae.

Days after 4th ecdysis	Absorbance at 540 nm
Control *	0.541
3rd	0.517
6th	0.505
8th	0.459
10th	0.46
13th	0.446
17th	0.493

* Non treated reaction mixture with hemolymph was used as "control".

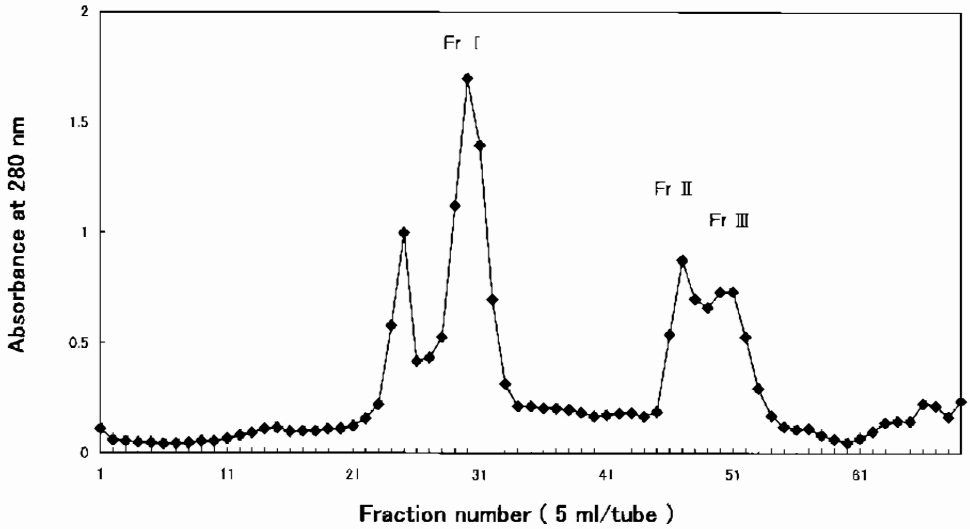


Fig. 3. Fractionation of the larval hemolymph of the silkworm on day 10 in the fifth instar by gel filtration through Superdex 200. Fr-I (tubes 20-32), Fr-II (tubes 47-49) and Fr-III (tubes 51-53) were separately pooled, dialyzed and lyophilized.

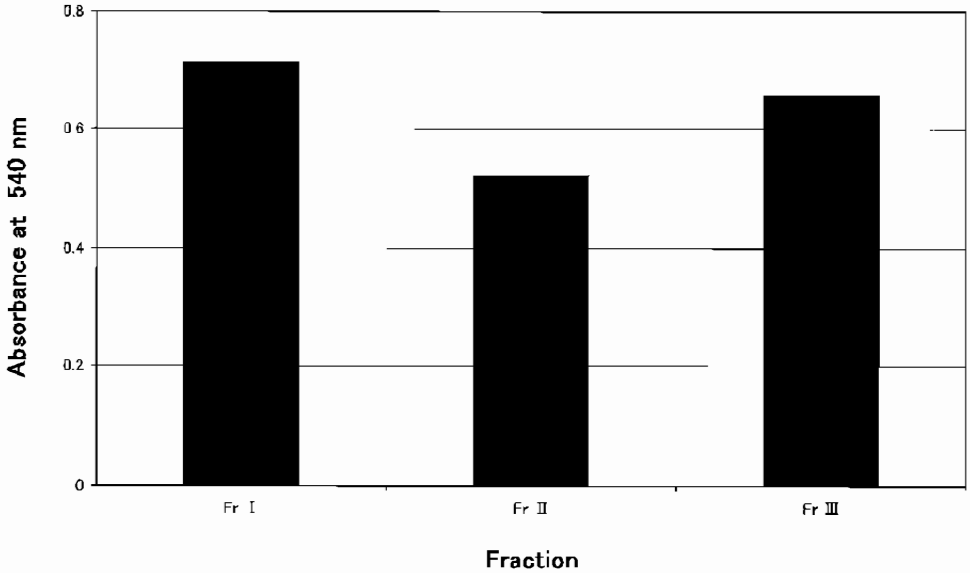


Fig. 4. Activity of β-lactamase in the fractions obtained by gel filtration from the hemolymph on day 10 as shown in Fig. 3. The activity of each fraction (10 mg of lyophilizate) was assayed with Penicillin G Potassium Salt as the substrate, by using to the procedure described in "MATERIALS and METHODS".

β-ラクタマーゼはカイコが変態の進行する一時期にカイコの生体にとって必要なものであることを示唆するものと考えられる。

3．3　ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーによる分別

表2において、比較的高いβ-ラクタマーゼ活性を示したカイコ5齢幼虫10日目の体液についてSuperdex 200カラムによるゲル濾過を行った。その結果、図3に示すように素通り画分（Blue dextranの溶出位置と重なる画分（tubes 24-25））を除いて、順に画分-Ⅰ、画分-Ⅱ、画分-Ⅲの3つの画分が得られた[2]。これらの画分を分取し、透析後、凍結乾燥した。図4は、カイコ5齢幼虫10日目の体液をゲル濾過して得た画分のβ-ラクタマーゼ活性についての調査結果を示す。各画分（凍結乾燥物

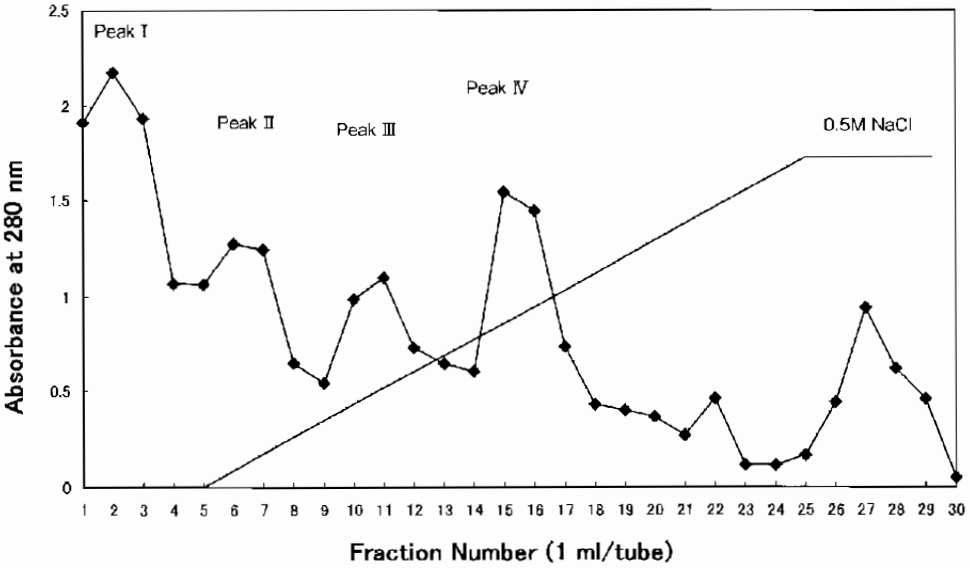


Fig. 5. Mono Q ion exchange chromatography of the larval hemolymph of the silkworm on day 10 in the fifth instar. Peak I (tubes 2-3), Peak II (tubes 6-7), Peak III (tubes 10-11) and Peak IV (tubes 15-16) were separately pooled.

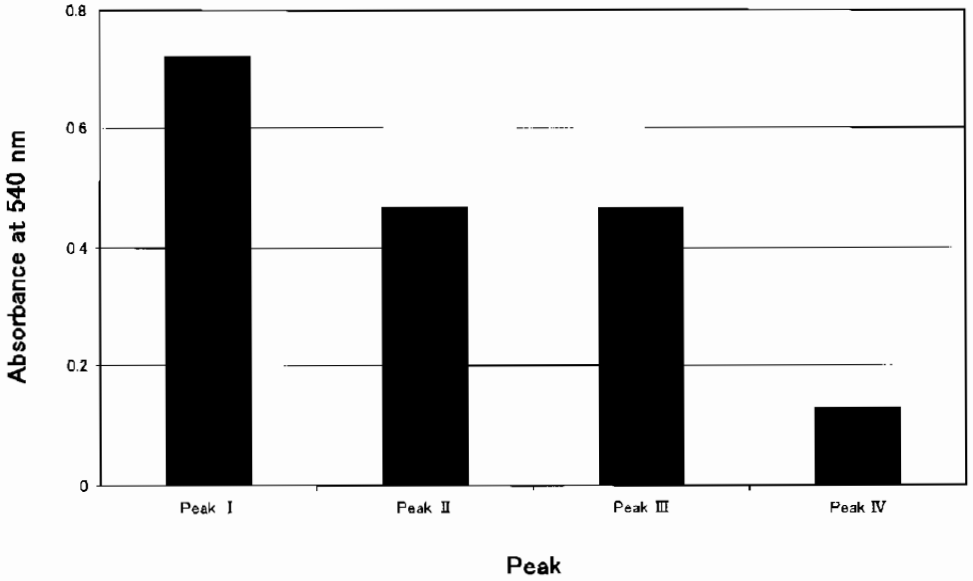


Fig. 6. Activity of β-lactamase in the peaks obtained by Mono Q ion exchange chromatography from the hemolymph on day 10 as shown in Fig. 5. The activity of each peak (0.5 mℓ of solution) was assayed with Penicillin G Potassium Salt as the substrate.

10mg）の活性は、「材料および方法」の項に述べたように基質としてペニシリンGカリウム塩を用いて測定した。この場合、反応液の吸光度がβ-ラクタマーゼの濃度と反比例の関係にある（図１）。すなわち、β-ラクタマーゼ活性が高ければ高いほど反応液の540nmにおける吸光度はより低くなっている。そのため、図３に示すゲル濾過によって得られた画分中では画分Ⅱが、β-ラクタマーゼを最も豊富に含む画分であると考えられる。

図５に５齢10日目のカイコ幼虫体液のMono Qイオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。体液試料（凍結乾燥物10mg）をあらかじめ0.05Mトリス－塩酸緩衝液（pH8.0）で平衡化したMono Q HR 5/50 GLカラムに添加した。クロマトグラムは、様々な食塩濃度で溶出される４つのピーク（ピークⅠ、ピークⅡ、ピークⅢ、ピークⅣ）を示

した。図６は、体液からMono Qイオン交換クロマトグラフィーで得た各ピークのβ-ラクタマーゼ活性の調査結果を示している。各ピーク（0.5mℓ溶液）のβ-ラクタマーゼ活性は、基質としてペニシリンGカリウム塩を用いて測定された。図５に示すクロマトグラムにおいて0.25M NaCl濃度で溶出されるピークⅣが比較的高いβ-ラクタマーゼ活性を示した。

上記の結果は、カイコ５齢幼虫体液からβ-ラクタマーゼをゲル濾過とMono Qイオン交換クロマトグラフィーにより分別することが可能であることを示している。したがって、将来的には分別されたβ-ラクタマーゼの様々な性質を検討すること、および既知の微生物由来のβ-ラクタマーゼとカイコのβ-ラクタマーゼとの比較研究を行うことなどができるものと考えられる。

４．摘　要

質量分析法によるカイコ関連タンパク質の解析の過程において、新たに同定されたβ-ラクタマーゼについて、カイコ５齢幼虫体液中のβ-ラクタマーゼ活性測定によりその存在を確認し、β-ラクタマーゼがカイコの変態の過程において必要な酵素であることを明らかにした。

引用文献

［１］加藤靖夫，張　平波，藤井　博（2006）：カイコ体液中のレクチン関連タンパク質の検討．日蚕関西講演集，36

［２］Kato, Y. and Takeuchi, T.（2006）：*In vitro* effect of two glycosidase activities on humoral lectin activity in *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 75, 153-159

［３］小河原　宏（1975）：ペニシリン不活化酵素，β-ラクタマーゼ．蛋白質　核酸　酵素，20，1214-1227

［４］Lee M. Z. P.（1987）：Preparation and characterization of immobilized β-lactamase for destruction of penicillin in milk. *J. Dairy Sci.* 70, 2032-2039

［５］澤井哲夫，高橋郁子（1978）：β-ラクタマーゼ活性測定法とその応用．蛋白質　核酸　酵素，23，391-400

［６］Sargent, M. G.（1968）：Rapid fixes-time assay for penicillinase. *J. Bacteriol.* 95, 1493-1494

［７］澤井哲夫・額賀路嘉・春田　伸（1995）：β-ラクタマーゼとその分子進化．蛋白質　核酸　酵素，40，1887-1899

衣笠繊研報（2008）№12, 27～37
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

重粒子線に対する蚕胚の感受性と胚期の遺伝子発現

古澤壽治[1]・野島久美恵[2]・長岡俊治[3]・有松祐治[4]・鈴木英子[4]・
一田昌利[4]・長岡純治[5]・杉村順夫[5]・藤井　博[6]・鈴木ひろみ[7,8]・
嶋津　徹[7]・大森克徳[9]・石岡憲昭[8,9]

Sensitivity of *Bombyx* Embryo to a Heavy Ion Beam, and its Effect on the Gene Expression during Embryogenesis

Toshiharu FURUSAWA[1], Kumie NOJIMA[2], Shunji NAGAOKA[3],
Yuji ARIMATSU[4], Eiko SUZUKI[4], Masatoshi ICHIDA[4],
Sumiharu NAGAOKA[5], Yukio SUGIMURA[5], Hiroshi FUJII[6],
Hiromi SUZUKI[7,8], Tohru SHIMAZU[7], Katsunori OHMORI[9]
and Noriaki ISHIOKA[8,9]

[1] *Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Shimo-Hakubai-cho, Kitano Kitaku Kyoto 603-8326*
[2] *National Institute of Radiological Science, Inage, Chiba 263-8555, Japan*
[3] *School of Health Science, Fujita Health University, Toyoake, Aichi 470-110, Japan*
[4] *Center for Bioresource Field Science, Kyoto Institute of Technology, Saga-Ipponki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 615-8354, Japan*
[5] *Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan.*
[6] *Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-0053, Japan*
[7] *Japan Space Forum, Shin-Otemachi Bldg.7F 2-2-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004, Japan*
[8] *Department of Space Environmental Medicine, Graduate School of Medical and Dental Science, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima, 890-8544, Japan*
[9] *Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen Tsukuba, Ibaraki 305-8505, Japan*

Abstract

Sensitivity of *Bombyx* eggs to a heavy ion beam was estimated from the frequency of somatic mutation which was shown by the white spot(s) on the black integument of the fifth instar larvae. The number of larvae with the white spot has been clarified as index of the incidence of somatic mutation. The highest sensitivity was observed on day 2 during resumption of embryogenesis after the termination of diapause, dependently on the dose of Ne, C and Fe ion beams. The sensitivity was higher in the Fe-irradiated eggs than in Ne-irradiated ones. On the basis of these data, the authors examined the sensitivity of embryonic developmental eggs to a low dose of Fe ion beams. The experiment was performed three times under the same irradiation condition. The somatic mutation was induced even by the irradiation of 2 mGy Fe ion beam to 2 day-old eggs after resumption of embryonic development. Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction showed that the irradiation of Fe ion on the day 2 eggs of the resumption of embryogenesis induced influences of gene expression, suggesting that the influence of cosmic rays on the gene(s) could be estimated using *Bombyx* eggs.

Key Words：Somatic mutation, *Bombyx* egg, Gene expression, Heavy ion beam, Cosmic ray

連絡先：1）財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29
E-mail：zai-kinugasakai@nifty.ne.jp、TEL 075-461-5949
2）放射線医学総合研究所、263-8555 千葉市稲毛区穴川4-19-1
3）藤田保健衛生大学、470-110 愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪1-98
4）京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町
5）京都工芸繊維大学工芸科学研究科応用生物学部門、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
6）九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発センター、812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
7）日本宇宙フォーラム、100-0004 東京都千代田区大手町2-2-1 新大手町ビル7階
8）鹿児島大学歯系大学院、890-8544 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1
9）宇宙航空研究開発機構、305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1

1．はじめに

1986年より地上約400kmを周回していたロシアの宇宙ステーション・ミールは老朽化のため2001年3月23日南太平洋上に落下、洋上廃棄された。この間、ミールは地球を86,321周したという。それまで、ミールには宇宙飛行士が滞在生活を送っていたため、ミールへの物資輸送とクルー交代のためアメリカのスペースシャトルが打ち上げられていた。同時に、シャトルには生物実験や材料実験が行えるスペースハブ（宇宙実験室）が備えられ、毛利宇宙飛行士や向井宇宙飛行士がシャトル内で数々の実験を行ってきた。例えば、メダカが無重力の環境で正常に交尾、産卵し、卵内での胚の発育も正常に進み、孵化することはよく知られている[1]。また、ショウジョウバエを用いた実験からは、突然変異が宇宙放射線と無重力との相乗効果によって引き起こされるとも云われている[2,3]。しかし、ヒトやネズミ、ハムスターの培養細胞をシャトルに搭載した実験では細胞分裂誘起物質によって活性化されるプロテインキナーゼやp53のようなストレス応答タンパク質の蓄積、核分裂の異常によって起こる小核化の頻度は、地上対照群とフライトサンプルでは有意な差は見られないことから先の相乗効果については否定的である[4]。

これらの実験に引き続き、1997年5月、私たちの研究グループの約7,000個の蚕卵がスペースシャトル・アトランティスに搭載され、打ち上げられた。シャトル飛行中に卵が受けた宇宙放射線量と、これらの卵から孵化した幼虫の奇形発生との関連をみるためである。この実験で明らかにされたことは、メダカの発生とは異なり、微小重力環境ではカイコの胚発生が正常に進行しにくいことである。また地上では見られない奇形が約0.4%発生したが、シャトルを利用した宇宙実験の期間は約9日間と短く、この間の放射線量は僅かで、奇形発生との関連は明確に認めることができなかった[5]。

しかし、国際宇宙ステーションでは宇宙飛行士は3～6カ月滞在する計画である。この間、宇宙では宇宙飛行士は1日に約1mSvの宇宙放射線を受け、ステーション滞在中に被曝する放射線の量は約200mSv（ミリシーベルト）と見積もられている[6,7]。しかし、250mSvの放射線を人人が1回全身照射を受けてもほとんど臨床的症状が起こらないと云われているが、3～6か月ロシアのミールに滞在した宇宙飛行士のリンパ球での染色体異常の発生頻度は、2～3週間のフライトで帰還した飛行士のものよりも高い[8]。また、宇宙では地上とは異なる放射線が太陽フレアや銀河から飛来している[9]ので、生物に対してどのような影響があるのか未解決な点が多い。このため、2006年に実際にカイコの卵を国際宇宙ステーションに2～3か月滞在させ、長期にわたる低線量被曝と突然変異との関連を調査する予定である。

これに先立ち、地上予備実験として放射線医学総合研究所や原子力研究機構との共同研究で、重粒子線による蚕の体細胞突然変異の発生頻度や遺伝子に対する変異について追跡してきたので、その概要を報告する。

2．材料および方法

2．1　照射卵

黒縞系統 (p^s/p^s) に小石丸を交配することによって得たヘテロ接合体 ($p^s/+^{p^s}$) [10] を、産卵後25℃に14～19日間保護することによって休眠させた。この卵を休眠から覚醒させるために５℃に100日以上、接触させた。そして、胚発育の再開を起こすため25℃に移してから２日後の卵に、放射線医学総合研究所の重粒子線がん治療装置（HIMAC）を用い、宇宙放射線と類似の性質をもった荷電加速炭素粒子；炭素（C）、ネオン（Ne）、鉄（Fe）の各重粒子線を0.02Gy～5.0Gy 照射した。詳細は以下の通りである。

（1）**炭素粒子線照射**：産卵後25℃に14日間保護した。そして、休眠から覚醒させるため５℃に108日間保護した後、再び25℃に移し、胚発育を再開させた。その２日後に重粒子線（C）を照射した。

（2）**ネオン粒子線照射**：産卵後25℃に14日間保護した。その後５℃に移し126日間保護した後、再び25℃に移し、胚の発育を再開させた。その２日後にネオン重粒子線を照射した。

（3）**鉄粒子線照射**：産卵後25℃に19日間保護した。その後５℃に134日間保護した後、再び25℃に移すことによって胚の発育を再開させた。そして再開２日後に Fe 重粒子線を照射した。

（4）**遺伝子解析用卵への照射**

放射線医学総合研究所のHIMACで１区につき、胚発育再開卵1.25g に Fe 重粒子線（LET：200keV/μm）を0.02Gy、0.2Gy、2.5Gy、5.0Gy の５区に分けて照射した。照射後、25℃で保護し、照射当日（０日）、２日後、４日後、６日後に卵を採取し、液体窒素中で凍結した。凍結後は－80℃に保存した。

2．2　体細胞突然変異の検出

上記の照射卵からの孵化幼虫を人工飼料あるいは桑で５齢まで飼育し、黒色の皮膚に白斑が現れた幼虫を突然変異蚕として変異率を求めた。

2．3　次世代への重粒子線照射の影響

前項１に記載したが、炭素、ネオンおよび鉄粒子線を照射した卵からの孵化幼虫の一部を成虫まで飼育し、別に飼育した卵色突然変異系統（*pe/re*）の成虫を交配させ、産んだ卵の中で赤色を呈した卵の割合を求めることによって次世代への重粒子線の影響について検討した。

2．4　RT-PCR-Differential display 法

凍結卵0.25g を用い、ISOGEN kit（ニッポンジーン社製）のプロトコールに従って RNA を抽出した。この RNA を用い、ThermoScript™ RT-PCR System（Invitongen 社製）のプロトコールに従って逆転写反応（RT 反応）を行なった。そして、得られた cDNA を用い、Fluorescence Differential Display Kit（タカラバイオ社製）附属の Rodamine 標識プライマー（励起波長：580nm、放射波長：605nm）を用いて、PCR １反応当り、10× PCR Buffer を２$\mu\ell$、25m M $MgCl_2$を１$\mu\ell$、10mM dNTP Mix を１$\mu\ell$、10μM 蛍光 Downstream primer を0.5$\mu\ell$、２μM Upstream primer を５$\mu\ell$、1st cDNA を２$\mu\ell$、D.W. を8.4$\mu\ell$、rTaq（recombinant Taq）polymerase（TOYOBO 社製）を0.1$\mu\ell$を混合した。PCR 条件は、94℃・２分間の熱処理後、94℃・30秒間、40℃・２分間、72℃・１分間を34サイクル、最後に72℃・５分間伸長後、５℃に急冷した。この PCR 反応液20$\mu\ell$に95％ホルムアミド－20mM EDTA を20$\mu\ell$加え、穏やかに撹拌し、97℃に３分間熱処理を行った。

PCR 反応生成物は７M 尿素変性６％ポリアクリルアミドゲルで泳動（15mA、約１時間）し、ゲル上のバンドをモレキュラーイメイジャーFXPro（日本バイオラッド）で解析、レーザー（532nm）で、励起波長580nm、放出波長605nm の Rodamine を付加した RT-PCR Differential Display 法によって生じた増幅 DNA 断片の検出を行なった。

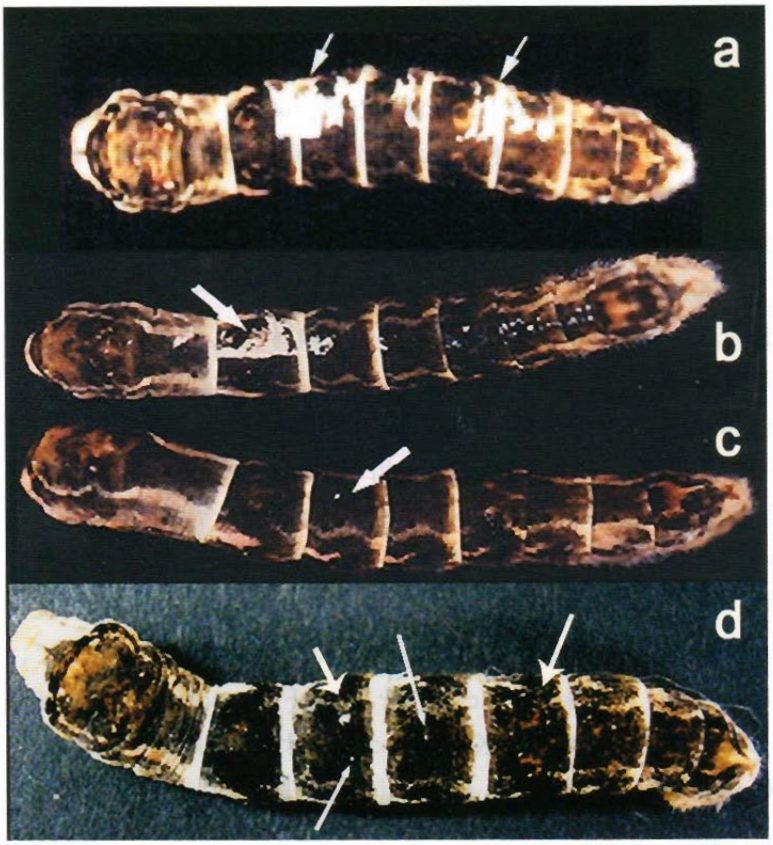


Fig. 1. Somatic mutation appears as white spot(arrows) on back integument of 5th instar larvae from heavy ion beam irradiated eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. The explanation about each photo is in the text.

3．実験結果

3．1　体細胞突然変異

カイコの体色を黒くする黒縞優性遺伝子（p^S）と白くする劣性遺伝子（$+^{p^S}$）を持つヘテロ接合体（$p^S/+^{p^S}$）の休眠卵に、炭素およびネオンの各重粒子線を照射すると、p^S 遺伝子が放射線によって損傷を受けるため、黒い皮膚をバックに白斑を持った体細胞変異が生じる。白斑を持つカイコの数は、照射線量および LET の増加に伴って増加した[10]。

この場合の白斑の現れ方は、照射する際に用いる卵が産卵後間もないものであれば、図１ａおよびｂに示すように体の左右いずれかの半分に大きな白斑が現れ、モザイクを示した。しかし、照射する際に用いる卵の卵齢が遅くなると白斑が１～２個の白斑を示した（図１ｃ）。一方、鉄重粒子線を照射すると、白斑が体全体に現れた（図１ｄ）。

3．2　卵期における重イオン粒子線感受性と次世代への影響

カイコの卵を用いて宇宙放射線被曝状況をみるのに、どの時期の胚が放射線に対して最も感受性が高いかが重要である。そこで、まず休眠卵と休眠覚醒卵の二つを用いてネオン重粒子線に対する感受性について比較検討した。すなわち、産卵後25℃で13日間保護した卵を５℃に冷蔵し、40日経過した卵（休眠卵）にネオン重粒子線を照射し、さらに43日間冷蔵（５℃冷蔵してから93日後）した。もう一つの実験区として冷蔵93日経過した休眠覚醒卵にネオン重粒子線を照射した。これら２つの実験区の卵を再び25℃に移して胚の発育を再開させ、孵化幼虫を飼育し、５齢幼虫での体細胞突然変異発生率について検討した（図２）。

その結果、休眠卵では照射線量が増加するに伴い発生頻度は増加するが、５Gy 照射では約22％であった。これに対し、休眠覚醒卵においても照射線量が増加するに伴い発生頻度は増加するが、２Gy 照射で約30％、５Gy 照射では80％といった高い頻度で発生した。このことから、休眠卵よりも

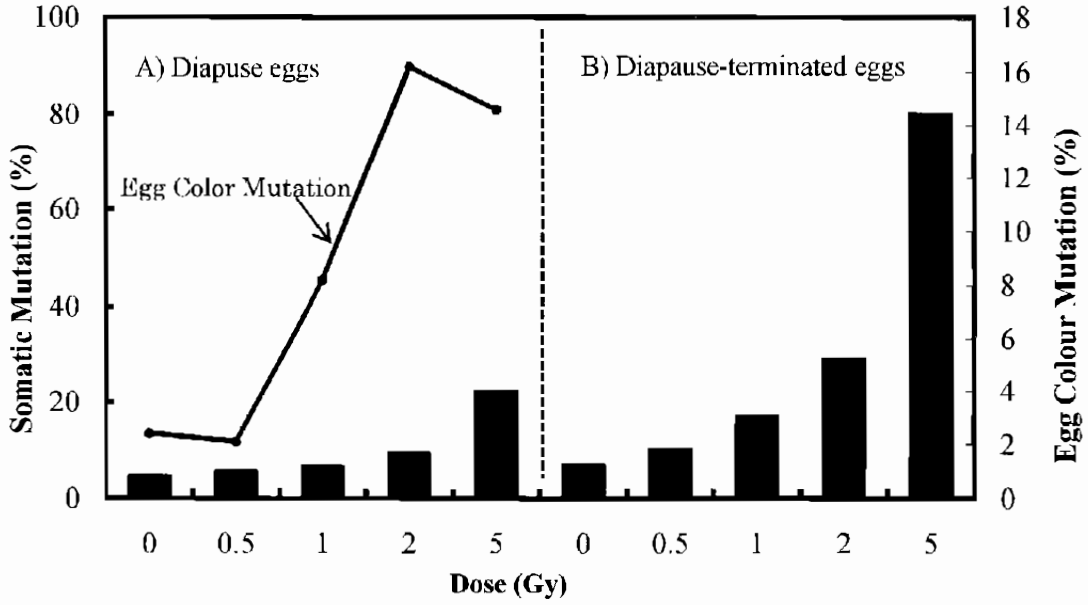


Fig. 2. Sensitivity of diapause eggs and diapause-terminated eggs to Ne-ion beam, and the frequency of somatic mutation in the second generation. A) The diapauses eggs were kept at 25℃ for first 13 days after oviposition, and then transferred to 5℃ to terminate diapause state. Fourty days after the beginning of 5℃ storage, Ne ion-beams were irradiated to the eggs. After the irradiation, these eggs were further kept at 5℃ for 43 days. B) The above diapause eggs (13 day-old eggs after oviposition) were kept at 5℃ for 93 days, and irradiated with Ne ion beams. Both the diapause (A) and the diapauses terminated (B) eggs were transferred to 25℃ to resume embryogenesis. The hatched larvae were reared, and the frequency of somatic mutation was investigated in 5th-instar larvae. The female larvae were grown up to adults to mate with the male adult of the *pe/re* strain (egg-color mutation) to examine the radiation effects in the second generation. The effects were monitored by oviposited egg-colour

休眠覚醒卵において放射線感受性が高いことがわかった。

また、休眠卵からの突然変異を現したカイコ成虫と卵色突然変異系統の *pe/re* の成虫と交配したところ、低率ではあるが、卵色突然変異を起こした卵が検出され、図２左に示した折れ線グラフの通り、卵色突然変異発生率は卵期における照射線量の増加に伴って増加した。

さらに、休眠覚醒後、25℃で保護することによって胚を発育させた際の放射線感受性について検討した。このため、黒縞系統と F^{Df}（過剰半月紋退化腹肢）の休眠覚醒後の卵を25℃に移した後、７日までの卵にネオン重粒子線を照射した。その結果、25℃に移してから２～３日後の卵に照射した場合突然変異発生頻度は高く、しかも約80％を示した。しかしその後の卵齢経過にともなって発生頻度は低下した（図３）。このことは、休眠覚醒後、胚発育を再開した２～３日後が最も放射線感受性が高いことを示している。

そこで、この時期の卵はどの程度、低線量の放射線を感知するかについて検討した（図４ａ）。胚発育再開２日後の卵に、0.02～5.0Gy の炭素、ネオン、鉄、それぞれの重粒子線を照射すると、炭素、ネオンでは0.02Gy では突然変異はほとんど認めることはできなかったが、鉄重粒子線では、炭素やネオンとは異なり、0.02Gy の低線量でも突然変異が発生した。

そして、炭素および鉄の各重粒子線照射によって現れた突然変異の蚕を成虫まで飼育し、*pe/re*（卵色突然変異系統）の成虫と掛け合わせ、これらが産んだ卵の内、赤色をもった卵を検出した（図４ｂ）。その結果、炭素粒子線照射では5.0Gy の照射線量で、約４％程度の発生率をみた。しかし、鉄粒子線を照射した場合には、照射線量増加に伴って赤色卵が現れる頻度が増加した。

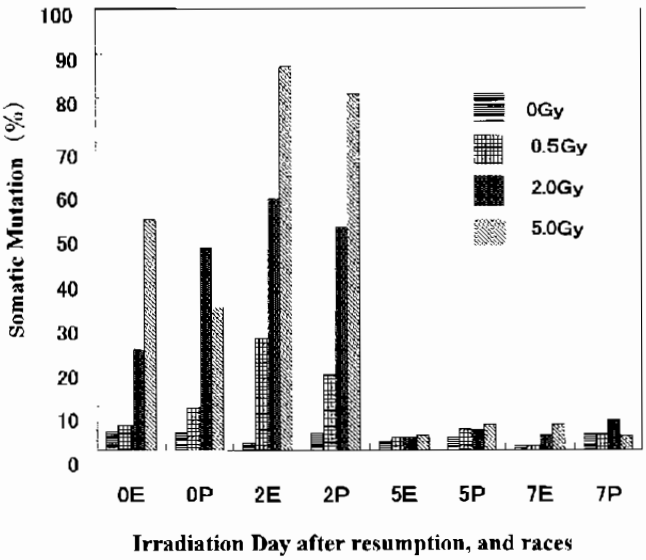


Fig. 3. Sensitivity of embryo after diapauses-termination against Ne ion-beams.
The heterozygote (eggs) of two hybrids (E : $p^S/+^{p^h}$, $+/E^{D\ell}$、P : p^S/p, $+/+$) were kept at 5℃ for first 14 days after oviposition. These eggs were transferred from 5℃ to 25℃ to resume embryogenesis 126 days after the beginning of the chilling. On the day 0, 2, 5 and 7days after the resume embryogenesis, Ne ion beams were irradiated to these eggs, and then incubated at 25℃. The newly hatched larvae were reared, and checked the frequency of the somatic mutation at 5th instar larvae.

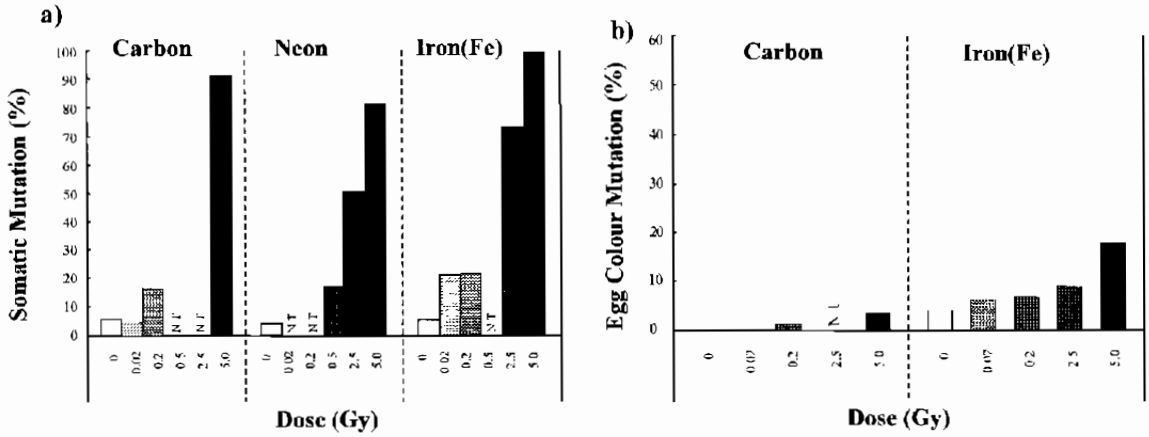


Fig. 4. Dose responsive of the 2-day old embryos after diapauses-termination against each doses of Carbon, Neon and Iron (Fe) ion beams.

a) Carbon beam : The diapause eggs were kept at 25℃ for first 14 days after oviposition, and then transferred to 5℃ to terminate diapause state. These eggs were transferred again to 25℃ to resume embryogenesis on 108 days after the beginning of the chilling. On day 2 after the beginning of the embryogenesis, carbon beams were irradiated to the eggs.

Neon beam : The diapause eggs were kept at 25℃ for first 14 days after oviposition, and then transferred to 5℃ to terminate diapause state. These eggs were transferred again to 25℃ to resume embryogenesis on 126 days after the beginning of the chilling. On day 2 after the beginning of the embryogenesis, Neon beams were irradiated to the eggs.

Iron (Fe) beam : The diapause eggs were kept at 25℃ for first 19 days after oviposition, and then transferred to 5℃ to terminate diapause state. These eggs were transferred again to 25℃ to resume embryogenesis on 134 days after the beginning of the chilling. On day 2 after the beginning of the embryogenesis, carbon beams were irradiated to the eggs.

b) The frequency of color mutation in the second generation was measured by the same method as shown in Fig. 2.

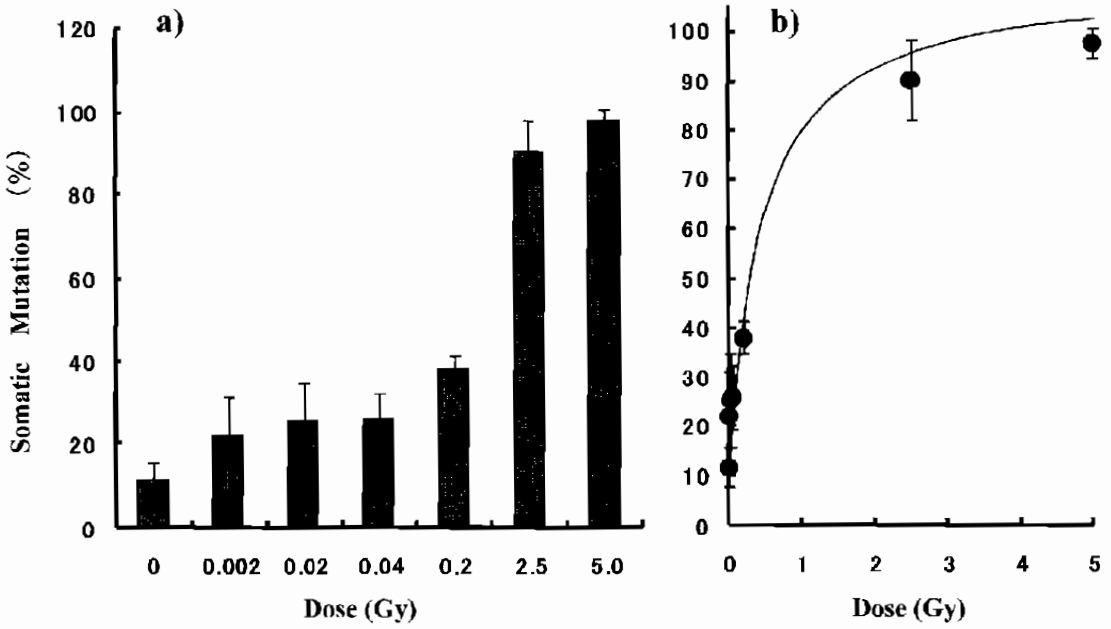


Fig. 5. Dose dependency of the 2-day old embryo after resumption of embryogenesis against a low dose of Iron (Fe) ion beams. The diapauses-terminated eggs were transferred from 5℃ to 25℃ to resume embryogenesis. On day 2 after the beginning of the embryogenesis, 0.002Gy～0.5Gy of Ferrous ion beams (500MeV/u. Mono. 10cm φ) were irradiated to the eggs. The experiments were repeated three times under the almost same conditions. Figure a was changed into the figure b which indicates the correlation between dose and frequency of somatic mutation.

3．3　休眠覚醒胚の線量依存性

さらに、低線量の鉄粒子線を照射することによって、休眠覚醒後の胚発育卵がどの程度の線量まで感知できるかについて検討した。図５ａに示すように0.002Gy（２mGy）から0.2Gy の間では増加がみられ、2.5Gy や5.0Gy といった線量では90％近くの頻度で変異が現れることが分かった。さらに、この結果をもとに照射線量と変異照射量との相関関係をみた（図５ｂ）。その結果、ほぼ１Gy までは直線的な発生頻度の増加をみたが、それ以上の照射線量ではプラトーに達した。

3．4　胚発育中の遺伝子発現に及ぼす重粒子線の影響

産卵後の卵を25℃に14日間保護した後、３ヶ月間５℃に冷蔵することによって休眠から覚醒させた。この卵を25℃に移し、胚の発育を再開させ、その２日後に Fe 重粒子線、5.0Gy（LET：200keV/μm）を照射した。そして、照射12時間後に RNA を抽出し、「材料および方法」に記載の通り、cDNA を増幅させることによって遺伝子発現と重粒子線照射との関連について検討した（図６）。なお、Rodamine 標識 primer は５種類用いた。その結果、P12プライマーを用いた場合、白い矢印で示したバンドが照射区においては発現量が減少していた。これに反し、P15およびP20プライマーとすると、新たなバンドが検出された（図６ａ）。

次いで、照射直後の胚発育２日目の胚（day 2）、照射２日後、４日後、６日後（day 4、day 6、day 8）の卵、それぞれから RNA を抽出して先と同様に cDNA を増幅させ、照射区と無照射区における泳動パターンの違いについて検討した（図６ｂ）。その結果、照射４日後（day 6）および６日後（day 8）の卵において新たな遺伝子発現（白い矢印）が起こることが分かった。

4．考察

黒縞系統の幼虫にγ線あるは中性子を照射すると黒色の皮膚に白斑が生じることが知られている

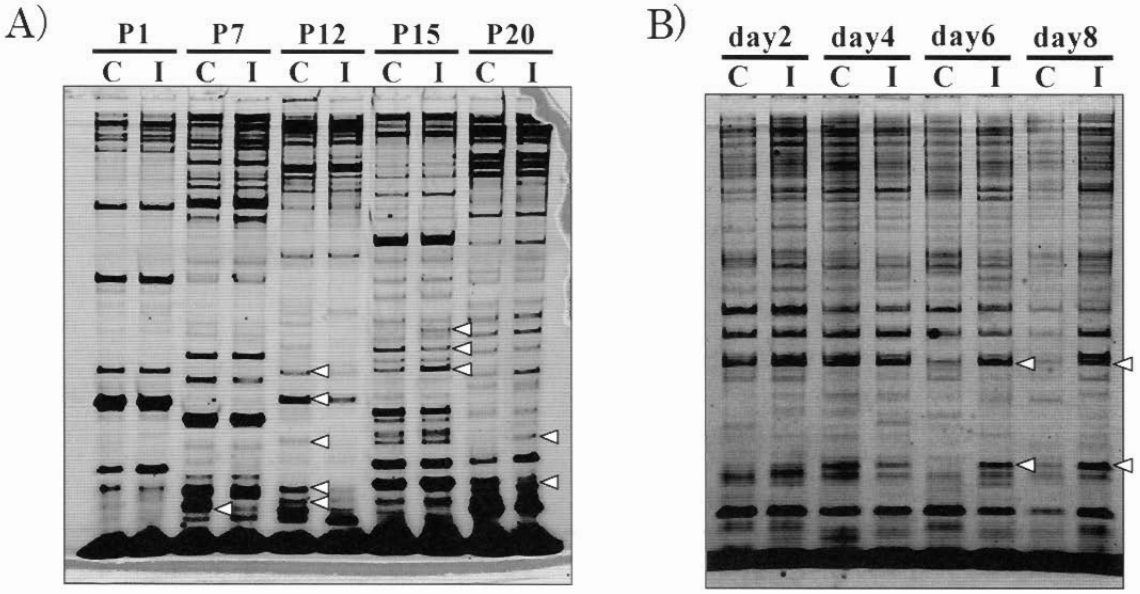


Fig. 6. Effect of Ferrous ion beams on the expression of genes during embryogenesis.

A) The diapause-terminated eggs were transferred to 5℃ to 25℃ to resume embryogenesis. The day 2- old embryo after the resumption was irradiated to Ferrous ion beam. Twelve hours later the RNA was extracted, and cDNAs were amplified from the template of the RNA using the following primers. C：non-irradiated, I：irradiated

Primers： P1：5'Rodamine-T*n*AA-3', 5'-GATCATAGCC-3' P7：5'Rodamine-T*n*AA-3', 5'-GATCATGGTC-3'
P12：5'Rodamine-T*n*AA-3', 5'-CTGATCCATG-3' P15：5'Rodamine-T*n*AA-3', 5'-GATCAATCGC-3'
P20：5'Rodamine-T*n*AA-3', 5'-GATC

B) The 2-day old embryo after the resumption was irradiated to Ferrous ion beam. Twelve hours later (day 2) the ferrous ion beam were irradiated to the eggs, and thereafter these eggs were incubated at 25℃. The RNA was extracted from day 2, day 4, day 6 and day 8- old eggs after the resumption, and cDNAs were amplified from the template of the RNA using the primers：5'Rhodamine-T*n*AC-3', 5'-GATCATAGCC-3').
C：non-irradiated, I：irradiated

[11,12]。これを指標として個体レベルでの宇宙放射線の影響を調べるには格好の生物材料である。しかし、スペースシャトルや国際宇宙ステーション内への搭載には、重量、空間の占有率、扱いが簡単であることなどかなりの制約があることから、幼虫をスペースシャトルに搭載することは不可能である。このため、黒縞の蚕卵を用いると個体数を数多く搭載でき、また卵期に休眠するので、長期にわたって国際宇宙ステーションに搭載することによって、宇宙線による長期被曝影響について検討することが可能となる。

国際宇宙ステーションが周回する約400km上空には太陽からのフレアや銀河からの重粒子線が飛来し、細胞内の遺伝子を切断するなどの影響を与える[13]。最近、宇宙飛行士が国際宇宙ステーションに長期にわたって滞在し宇宙開発に携わる面が多くなっている。しかし、人体に及ぼす宇宙放射線の生物影響については必ずしも明らかにされておらず、放射線防護の面からも早急に解決すべき問題である。

ところで、重粒子線と同質の重粒子線を発生させる装置（HIMAC）が放射線医学総合研究所に設置され、ガン治療のため利用されている。この装置は夜間には全国の研究者に解放され、宇宙放射線と同質のネオン、炭素、鉄などの重粒子線を発生させることができるので、これらのイオン粒子線を用いて地上で宇宙放射線の生物影響について検討ができる。このため、先に述べた黒縞の卵（ヘテロ接合体、$p^S/+^{p^S}$）に炭素やネオンの重粒子線を照射し、孵化幼虫を飼育したところ、5齢幼虫期に黒い皮膚をバックに白斑を持つカイコが生じた（図1）。この白斑は、第2染色体のテロメ

ア近傍、0.0に座位する黒縞優性遺伝子（p^S）が、放射線によって損傷を受け、色素[14]が形成されないため生じる。この体細胞突然変異を生じるカイコの数は、照射線量およびエネルギーに依存して増えた[10]。また、鉄重粒子線を照射した場合には、ネオンや炭素重粒子線とは異なり、小さな凸斑が体全体に現れた。これは、ネオンや炭素重粒子線とは異なり、鉄重粒子線のエネルギーが高く、黒縞優性遺伝子（p^S）に対する影響が異なることによるのかも知れない。

一方、宇宙ステーションでの１日の被曝量は約１mSvで低線量の域にある。従って、長期にわたる低線量被曝を想定することになるので、黒縞系統の卵に重粒子線を照射する場合には低線量を用いた場合の生物影響を調べる必要がある。このため、産卵から休眠、覚醒、覚醒後の胚発育再開から孵化に至る一連の過程で、どの時期が最も重粒子線に対して感受性であるかについて検討した。すなわち、予備的に休眠中の卵と休眠覚醒が終了した卵にネオン重粒子線を照射したところ（図２）、休眠覚醒卵の方が休眠卵に比べて突然変異発生頻度が高かった。このことは、休眠覚醒まもない時期、あるはその後の胚発育再開の卵で感受性が高いことを予想させた。さらに、休眠覚醒した卵を25℃に移すことによって、胚発育を再開させたところ、黒縞系統卵のみならずE^{p^e}系統の卵においても再開２～３日後までの変異発生頻度が高く、それ以後は感受性が低下することがわかった（図３）。休眠卵内の胚細胞はG_2期で分裂を停止している[15]ので、覚醒卵を25℃に移すことによってG_2期からM期へ移行する時期が最も放射線感受性が強いことを示すものである。

次いで、低線量被曝による発生頻度をみるため、炭素、ネオン、鉄の各重粒子線を胚発育２日後の卵に照射したところ、鉄重粒子線0.02Gyの照射によっても有意な発生頻度が検出された。さらに、これらの幼虫を成虫まで発育させ、卵色突然変異系統（*pe/re*）と交配させ、特定座位突然変異法(specific locus mutation)[16,17]を用い次世代までの放射線影響を調べたところ、産んだ卵に赤色卵を認めた。すなわち、卵期での放射線被曝が次世代まで持ち越されることが分かった。本方法がこの面での実験で有効であることは、ミールに搭載したカイコ休眠卵によって証明されている。すなわち、ミールに約40日間搭載した休眠卵での突然変異は*pe*（ピンク色）に関連するもののみで、*re*（赤色）に関する突然変異はみられなかった。そして、対照実験区における突然変異率は10^{-5}であったが、ミール搭載休眠卵では12.4×10^{-3}で対照区の約1,000倍の高率で検出された[18]。

宇宙放射線被曝を考える場合には、エネルギーが高い鉄重粒子線を重要視する必要がある。このため、鉄重粒子線を用いて、0.002Gy（２mGy）から５Gyを照射した。その結果、２mGyの照射によっても有意な頻度で突然変異が発生した（図５ａ）。そして、図５ｂに示すように１Gyまではほぼ直線的に発生頻度は増加したが、それ以上の線量照射ではプラトーに達する傾向にあった。このように、休眠覚醒卵を25℃に移すことによって胚発育させた後、３日後まで最も放射線に対して感受性が高いことが分かる。そして、この時期の卵が宇宙放射線に遭遇することで、これらの卵を地上に持ち帰り、孵化幼虫の５齢期における発生頻度から宇宙での被爆線量が推定できるだけでなく、次世代への影響も検討できよう。

以上の実験は、卵全体に対して重粒子線を照射、すなわち、胚と卵黄域の両方に照射したものである。卵黄領域をヒットした重粒子線がBystander効果によって突然変異が現れたのか、あるいは胚に直接ヒットしたことが原因で突然変異が現れたかについては不明である。これを確かめるため、卵中央部（卵黄域）、胚の頭・胸部および尾部に炭素イオンビームを局部照射したところ卵黄域に照射したものに比べ、胚の頭・胸部や尾部に照射した場合において突然変異率は高かかった[19]。このことは、突然変異発生はBystander効果によるものではなく、胚を直接ヒットした炭素イオン粒子線によって突然変異が生じたことを証明している。

さらに、上記の個体レベルでの突然変異の検出だけでなく、遺伝子レベルまでの影響についても検討した。すなわち、休眠覚醒した卵を25℃に移

すことによって胚を発育させ、放射線感受性が高い再開２日後に鉄イオン粒子線を照射し、その４日後、６日後の遺伝子の発現をDifferential Displayで検出したところ、新たな増幅バンドが２種類検出された（図６ｂ）。これらの遺伝子がどのように機能する遺伝子であるか、さらに遺伝子の種類、機能について検討する予定である。

これに加えて、カイコでの遺伝子発現に及ぼす宇宙放射線の影響に関する我々の結果が、他の生物材料を用いた宇宙生物実験結果と今後共通の議論ができるよう哺乳動物までの放射線影響まで広げることができるようにしたい。宇宙飛行をしたネズミの筋肉や皮膚でガン抑制遺伝子p53が蓄積した［20-22］ことから、孵化幼虫からガン抑制遺伝子であるp53様遺伝子を検出し、放射線と遺伝子発現との相関についての実験を行っている。

引用文献

［１］井尻憲一（2001）：宇宙メダカ実験.「宇宙の生物学」pp.70-85. 朝倉書店

［２］Bucher, H., Facius, R., Homeck, G., Reitz, G. Graul, E.H., Berger, H., Hoffken, H., Ruther, W., Heinrich, W. and Beaujean, R.（1986）：Embryogenesis and organogenesis of *Carausius morosus* under space environment. *Naturwissenschaften*, 73, 433-434

［３］Ikenaga, M., Yoshikawa, I., Kojoh, D., Kato, Y., Ayaki, T., Ryo, H., Ishizaki, K., Kato, T., Yamanaka, H. and Hara, R.(1997)：Mutations induced in *Drosohila* during space flight. *Biol. Sci. in Space*, 11, 346-350

［４］Ikenaga, M., Hirayama, J., Kato, T., Kitao, H., Han, Z.B., Ishizaki, K., Nishizawa, K., Suzuki, F., Cannon, T.F., Fukui, K., Shimazu, T., Kamigaichi, S., Ishioka, N. and Matsumiya, H.（2002）：Efffect of space flight on the frequency of micronuclei and expression of stress-responsive proteins in cultured mammalian cells. *J. RADIAT. Res.*, **43** *SUPPL.*, S141-S147

［５］Furusawa, T., Kotani, E., Ichida, M., Sugimura, Y., Yamanaka, H., Takahashi, S., Fukui, M., Kogure, K., Sakaguchi, B., Fujii, H., Ikenaga, M. and Watanabe, T.（1998）：Embryonic development in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, exposed to the space environment. *J. Jpn. Soc.Microgravity Appl.* 15. *Supplement* II 666-671

［６］Doke, T., Hayashi, T., Kikuchi, J., Hasebe, N., Nagaoka, S., Kato, M. and Badhwar, G.D.(1995)：Real time measurement of LET distribution in the IML-2 Space Lab (STS-65). *Nuc. Instr. Meth. Phys. Res.*, **A365**, 524

［７］Hayashi, T., Doke, T., Kikuchi, J., Sakaguchi, T., Takeuchi, R., Takashima, T., Kobayashi, M., Terasaka, K., Takajashi, K., Watatnabe, A., Kyan, A., Hasebe, N., Kashiwagi, T., Ogura, K., Nagaoaka, S., Kato, M., Nakano, T., Takahashi, S., Yamanaka, H., Yamaguchi, K. and Badhwar, G.D.（1996）：Measurement of LET distribution and dose equivalent onboard the space shuttle IML-2（STS-65）and S/MM-4（STS-79). *Biol. Sci. Space* 11, 355-364

［８］Testard, I., Ricoul, M., Hoffschir, F., Flury-Herard, A., Dutrillaux, B., Fedorenko, B., Gerasimenko, V. and Sabatier, L.（1996）：Radiation-induced chromosome damage in astronaut's lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 403-411

［９］Badwar, G.D.（1999）：Free space radiation environment, In *"Risk evaluation of cosmic-ray exposure in long-term manned space mission* (eds. Fujitaka, K., Majima, H., Ando, K. Yasuda, H. and Suzuki, M.)", pp.17-31

［10］Kotani, E., Furusawa, T., Nagaika, S., Nojima, K., Fujii, H., Sugimura, Y., Ichida, M., Suzuki, E., Nagamatsu, A., Todo, T. and Ikenagsa, M.(2002)：Somatic mutation in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by heavy ion irradiation to diapause eggs. *J. Radiat.*

Res., **43**, Suppl., S193-S-198

[11] Nakajima, M., Takimoto, T. and Miyakoda, T. (1972) : Radiation effects on silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to the changes in the frequencies of induced somatic mutations during different stages of larval development. *J. Sericult. Sci. Japan* **41** : 359-364

[12] Machida, I. (1975) : A comparison of mutagenic effects by 2 MeV neutrons and 200kVp X-rays in prophase I oocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan* **44**, 11-16

[13] Goodhead, D.T. (1994) : Initial events in the cellular effects of ionizing radiation; clustered damages in DNA. *Int. Radiat. Biol.*, **65**, 7-17

[14] Kawase, S. (1956) : Studies on the pigments found in the integument of *Bombyx mori* L. V. Histochemical studies on the tyrosinase and phenolic compounds concerning the melanin formation of a marking mutant "mottled striped". *Jap. J. Genet.*, **31**, 284-292

[15] Nakagaki, M., Takei, R., Nagashima, E. and Yaginuma, T. (1922) : Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **200**, 223-229

[16] Doira, H. (1978) : Genetic stocks of the silkworm. In : The silkworm : an important laboratory tool. Ed. Tazima, Y., pp.53-81, Kodansha (Tokyo)

[17] Tajima, Y. (1978) : Radiation mutagenesis of the silkworm. In "The silkworm : an important laboratory tool (ed. Tazima, Y.)", Kodansha (Tokyo) pp.213-245

[18] 森本弘一・堺　祐史 (1998) : スペースシャトルおよびミール利用「宇宙実験結果報告会」予稿集. pp.Ⅳ-105-Ⅳ-115

[19] Furusawa, T., Fukamoto, K., Sakashita, T., Suzuki, E., Kakizawa, T., Hamada, N., Funayama, T., Suzuki, H., Ishioka, N., Wada, S., Kobayashi, Y. and Nagaoka, S. (2009) : Targeted Heavy-Ion Microbeam Irradiation of the Embryo But Not Yolk in the Diapause Egg of the Silkworm, *Bombyx mori*, Induces the Somatic Mutation. (submitted).

[20] Ohnishi, T., Inoue, N., Matsumoto, H., Ohnishi, K., Fukuda, S. and Nagaoka, S. (1996) : Cellular content of p53 protein in rat skin after exposure to a space environment. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 183-185

[21] Ohnishi, T., Takahashi, A., Wang, X., Ohnishi, K., Ohhira, Y. and Nagaoka, S. (1999) : Accumulation of tumor suppressor p53 in rat muscle during a space flight. *Mutat. Res.*, **430**, 271-274

[22] Ohnishi, T., Wang, X., Fukuda, S., Takahashi, A., Ohnishi, K. and Nagaoka, S. (2000) : Accumulation of tumor suppressor p53 in rat muscle after a space flight. *Adv. Space Res.*, **25**, 2119-2122

衣等繊研報 (2008) No.12, 39～53
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

Analysis of the Gene of BmTRN-1, an RNA-binding Protein Homologous to Mammalian TIA-1 from the Silkworm, *Bombyx mori*, it's Overexpression and Sub-cellular Distribution during the Baculovirus Infection Process

Sayaka MUTO*, Emi MATSUMOTO*, Tohru TANABE*, Hajime MORI*, Yoshiyuki HAYASHI** and Eiji KOTANI*

*Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo, Kyoto 606-8585, Japan
**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Shimohakubai-cho, Kita-ku, kyoto 606-8326, Japan

Abstract

BmTRN-1, an RNA-binding protein homologous to mammalian TIA-1/TIAR, which possesses three RNA recognition motifs (RRMs) followed by a C-terminal auxiliary domain was shown to be involved in several mechanisms of RNA metabolism including the regulation of transcripts in the cells of the silkworm, *Bombyx mori*. The present gene analysis revealed that, in addition to previously reported mRNA, another isoform of mRNA with an alternatively spliced exon coding for an additional 14 amino acids in the auxiliary domain, was transcribed. Reporter protein production from the introduced plasmid was shown to be inhibited in the cultured cells by overexpressing both GFP-fused isoforms of BmTRN-1 with significant poly(U)-binding activity, but not by overexpressing the truncated mutant, such as RRM1-3 and the auxiliary domain. This indicates that the entire sequence of BmTRN-1 including both RRM1-3 and the auxiliary domain is necessary for the regulation of transcripts. Furthermore, analyses of the subcellular distribution of BmTRN-1 indicated that full-length BmTRN-1 is a shuttling protein present in both the nucleus and cytoplasm. However, BmTRN-1 was strongly distributed in the nucleus, especially when the cells were infected by the baculovirus, *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus (AcNPV). Production of the glycoprotein of AcNPV, in the cytoplasm of infected cells, was clearly inhibited by the strong presence of both the full-length BmTRN-1 isoforms. In addition, the domains of BmTRN-1 related to its nuclear export and nuclear accumulation during viral infection were found to be RRM2 and RRM3, respectively. Thus, these findings indicate that BmTRN-1 with the domain responsible for its nuclear accumulation caused by the viral infection, was possibly related to the cellular function of eliminating baculovirus transcripts in the nucleus.

1. Introduction

Several TIA-1-like molecules have also been found in certain insect species, which are considerably different from mammals in their evolution chronology. In *Drosophila*, expression of the gene Rox8, which shares 46% amino acid identity with TIA-1, has been shown to be up-regulated, especially during the egg formation process[1]. In the silkworm *Bombyx mori*, the Rox8 homologue, named BmTRN-1, was identified as a developmentally regulated RNA-binding

＊連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門、
606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、E-mail：Kotani@kit.ac.jp

protein[2]. The effective inhibition of BmTRN-1 protein synthesis in cultured *Bombyx* cells transfected with an oligonucleotide coding for the antisense of BmTRN-1 and then maintained under BmTRN-1-insufficient conditions until 48 hours after treatment, revealed a clear increase in the amount of several reporter proteins and transcripts expressed from co-transfected plasmids. This demonstrated that BmTRN-1 could act as a regulator, particularly for the mechanism of eliminating transcripts potentially targeting BmTRN-1 recognition in the authentic post-transcriptional process[2]. Also, another homologous RNA-binding protein, SfTRN-1 from cultured *Spodoptera* cells, was shown to exhibit similar characteristics, as its inhibition led to a similar increase in the reporter mRNA level[3].

BmTRN-1 and SfTRN-1 as well as the other TIA-1 family proteins contain three N-terminal RNA recognition motifs (RRM1-3) and a putative C-terminal auxiliary domain that are fundamentally less homologous to the mammalian TIA-1 family[2,3]. It was demonstrated through the use of artificial GFP-fused proteins and inhibitors of the nuclear importing or exporting mechanisms, that RRM RNA-binding activities were important for the subcellular localization of TIA-1/TIAR, which continuously shuttle between the cytoplasm and nucleus in cos-7 cells[4]. Under normal conditions in cos-7 cells, TIA-1/TIAR show a greater tendency to accumulate in the nucleus due to the specific role of RRM2 RNA-binding activity and the first half of the auxiliary domain. Since most similar proteins from various sources were shown to exhibit the properties of molecules shuttling between subcellular organelles, and to have localization specificities strongly linked to certain physiological conditions of cells, it is important to study the subcellular localization of TIA-1 family members in cells from several other sources including BmTRN-1 and SfTRN-1 in insects.

Also, the functions of TIA-1/TIAR were shown to be related to infections by specific viruses such as the flavivirus, whose minus-strand RNA genome with a 3' stem loop bound specifically to TIA-1/TIAR[5,6]. Both proteins co-localized with viral dsRNA in infected mammalian cells, and interact with the 3'-terminal stem loop structure of the viral minus-strand RNA for the facilitation of viral genomic RNA synthesis. In contrast, the multiplication of some other single-stranded RNA viruses, such as the sindbis virus, the vesicular stomatitis virus, and the double-stranded DNA virus HSV-1, were activated in infected mammalian cells in which TIA-1 expression was artificially inhibited[5]. From these results, it has been shown that TIA-1 family proteins either regulate viral infection processes, or specific viruses utilize the interaction between TIA-1 and RNA for their infection due to the ability of TIA-1 family members to recognize certain sequences of RNA. Many insect species have been studied using a double-stranded DNA virus referred to as baculovirus, including the *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus (AcNPV), which has a broad host range and causes varying disease symptoms among several of the investigated host insects. For example, AcNPV causes the full range of disease symptoms including the active production of daughter viruses, termination of all host protein production, and cell death in the typical host, *Spodoptera* cells. AcNPV was shown to cause a semi-productive infection in *Bombyx* cells, since viral genomic DNA replication and budding of the viral particles were detected to some extent, but this was with neither cell death nor the arrest of total protein production seen for other kinds of baculovirus in different hosts[7,8]. This semi-productive infection of AcNPV in *Bombyx* cells was due to putative cellular mechanisms including cellular protein

factors, which diminish viral protein production to inhibit viral reproduction cycles. However, less has been discovered regarding host-based intracellular regulation against NPV infection and therefore it seems very important to clarify whether there is a relationship between the function of the baculovirus and the potential biological significance of TRN-1, shown to be a regulator of transcripts in insect cells.

In the present study, overexpression of BmTRN-1 in BmN4 cells was investigated, and it was clearly shown that BmTRN-1 could inhibit aspects of AcNPV activity, such as envelope protein production. In addition, the observation of the subcellular distribution of GFP-fused BmTRN-1 or truncated mutants showed that the distribution pattern of BmTRN-1 changed, particularly in the AcNPV-infected cells. From these results, it can be ascertained that in the insect cells, BmTRN-1 could have the specific function of inhibiting the production of both AcNPV transcripts and proteins.

2. Materials and methods

2. 1 Cloning and sequencing of alternatively spliced BmTRN-1 mRNA and genomic DNA

By employing a PCR method for amplifying the gene of the full-length BmTRN-1 using primers, from the first strand of cDNA for the BmN4 mRNA as a template, and the enzyme KOD-plus version 2 (Toyobo Biochemical, Osaka, Japan), we cloned another gene fragment which encodes 402 amino acids with a calculated molecular mass of approximately 44 kDa. We also analyzed the BmTRN-1 gene in an isolated clone from the *Bombyx mori* BAC library described by Wu *et al.*[9]. The entire sequence of the BmTRN-1 gene and the open reading frame (ORF) of cDNA for the 44.1-kDa BmTRN-1 were deposited in the Genbank database under the accession numbers, AB461842 and AB461841, respectively.

2. 2 Overexpression of the BmTRN-1 protein and several truncated BmTRN-1-derived proteins

(i) Expression vector construction

For overexpression in BmN4 cells of the artificially designed proteins, N-terminal GFP plus C-terminal BmTRN-1-derived sequences, as shown in Fig. 3A, were inserted downstream of the *Orgyia psudotsugata* NPV IE2 promoter in the insect expression vector, pIZ/His-V5. The recombinant plasmids were constructed by inserting the full-length amino acid sequence of BmTRN-1[2] (44.1-kDa isoform, a.a.1-402; 42.5-kDa isoform, a.a.1-388), a truncated sequence such as the RRM1-3 region (a.a.1-281), or C-terminal auxiliary domain (auxiliary domain of the 44.1-kDa isoform, a.a.295-402; that of the 42.5-kDa isoform, a.a.295-388), into the restriction site between *Eco*RI and *Xba*I, and a full-length improved GFP into the *Eco*RI site from the start to the termination codon, as described by Crameri *et al.*[10]. Through application of the PCR methods, we constructed recombinant plasmids, including the designed sequence, encoding the GFP-fused full-length 42.5-kDa isoform lacking characteristic subdomains such as RRM1 at amino acid positions 8 through 84 (designated as ΔR1), RRM2 from 92 through 179 (ΔR2), RRM3 from 187 through 280 (ΔR3), the anterior half of the C-terminal auxiliary domain from 289 through 330 (ΔA1), and the posterior half of the auxiliary domain from 339 through 380 (ΔA2), respectively. All constructs were subsequently sequenced.

These plasmids were cloned in bacterial cells, then purified from their bacterial culture using the Genopure plasmid midi kit (Roche Diagnostics, Manheim, Germany), and transfected into BmN4 cells. This was done by mixing 3 μl

of the FuGENE™HD transfection kit (Roche Diagnostics, Manheim, Germany) with 2 μg of plasmid DNA dissolved in 100 μl of ESF921 after waiting 25 minutes for the process to complete. Next, 25 μl of the mixture was added to a medium that did not contain the serum in which the BmN4 cell monolayer (0.7 x 10^6 cells per 16-mm culture dish) was formed. The medium in each dish was then changed to a new one with the serum, and the cells were cultured in the dish.

(ii) Poly(U)-binding of the recombinant proteins

For investigating the poly(U)-binding of the recombinant BmTRN-1 or truncated BmTRN-1 proteins fused to N-terminal GFP expressed in BmN4 cells, lysed cell proteins in 50 μl of binding buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, and 0.1% SDS were mixed with a washed 5-μl suspension of Sepharose conjugated with poly(U) and poly(G) RNA (0.6 μg/μl of RNA). After being incubated for 1 hour at 4℃ and washed three times in the same buffer, proteins bound specifically to the RNAs were precipitated with the resin, heat denatured, and then detected with the Western blot analysis following 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, using the anti-GFP antibody. The detected recombinant proteins bound to poly(U) were confirmed to be the same as the immunoprecipitates from the same cell lysates prepared by specific binding to the GFP antibody on the protein G-sepharose resin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in the same binding buffer.

(iii) Effects of recombinant proteins on reporter protein production

To investigate the effect of overexpression of the full-length or truncated BmTRN-1 protein on the level of reporter protein production, 1 μg of plasmid DNA encoding the full-length or truncated BmTRN-1 fused to N-terminal GFP and GFP as a control were used to co-transfect BmN4 cells with 1 μg of a reporter gene containing pIEX-4, in which a chloramphenicol acetyl transferase gene plus SV5 epitope (CAT-SV5) were inserted downstream of the IE-1 promoter site under similar transfection conditions as described above. Western blot analyses of the cellular samples following the electrophoresis of proteins in a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and electroblotting of separated proteins onto the PVDF membrane were performed to investigate the expression of recombinant proteins in the BmN4 cells using 1 μg/μl of anti-GFP antibody or to investigate the production of reporter CAT-SV5 protein using an antibody specific for the SV5 antigen under the conditions previously described (first antibody/buffer=1:5,000) (Kotani *et al.*, 2003). The results obtained using an HRP-conjugated secondary antibody were visualized with an ECL-plus detection system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

2．3 Fluorescence microscopy

The subcellular distribution of the GFP-fused proteins was analyzed 48 hours after AcNPV infection. Cells on coverslips were washed three times for 5 min with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min at room temperature, washed three times with PBS for 5 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100, treated with ribonuclease A for the removal of RNA polymer in the cells, and then mounted with the VECTASHIELD medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and propidium iodide (1.0 ng/ml).

The AcNPV gp64 produced was analyzed through use of the same procedure, except that after fixation in 2% paraformaldehyde and rinsing in PBS, cells on the coverslips were permeabilized with 0.5% Triton X-100, washed three times in

PBS for 5 min, and blocked with 10% goat serum for 60 min at room temperature. The coverslips were then incubated with the primary antibody in 0.3% Triton X-100 overnight at 4℃ (anti-gp64/buffer=1:300). Then, the coverslips were washed three times for 5 min in 0.3% Triton X-100. For the detection of gp64 by the secondary antibody, the coverslips were blocked in 10% goat serum for 60 min at room temperature, incubated for 3 hours at 4℃ with the secondary antibody: Texas red-conjugated goat anti-mouse (antibody/buffer=1:500), then washed three times for 5 min in 0.3% Triton X-100, and mounted with the VECTASHIELD medium. Cells were then examined by confocal fluorescence microscopy (LSM510, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY, USA).

The quantification of the cytoplasmic and nuclear fluorescence of GFP was performed by integrating the signal in identical surface units taken in each subcellular compartment, assuming that the nuclear and cytoplasmic compartments of BmN4 cells have similar surfaces. This analysis was performed using at least 20 cells, and the average ratio of cytoplasmic and nuclear fluorescence was plotted as a percentage.

Also, the relative amount of the AcNPV gp64 protein detected using the anti-gp64 antibody and Texas red-conjugated secondary antibody was quantified 48 hours after the post AcNPV infection in the cytoplasm of the cells overexpressing GFP as a mock, and either the GFP-fused full-length BmTRN-1 42.5-kDa or 44.1-kDa isoform, and cells overexpressing both isoforms. These cells were infected by AcNPV (MOI of 10) 48 hours after the transfection. For the double transfection of the expression plasmid for both full-length isoforms, 1 μg of each plasmid DNA expressing the GFP-fused 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms was used, while 2 μg of plasmid DNA expressing the GFP-fused 42.5-kDa or 44.1-kDa isoforms was used for separate transfections.

3. Results

3. 1 Alternative splicing of the BmTRN-1 gene

Previously, we identified a complementary DNA with a 388-amino acid RNA-binding protein named *Bombyx mori* TRN-1 (BmTRN-1) with approximately a 42 kDa calculated mass, which is homologous to mammalian TIA-1/TIAR, from the midgut tissue and cultured cells of the silkworm, *Bombyx mori*. Since BmTRN-1 showed two isoforms detected in an SDS-PAGE gel, being 44.1-kDa and 42.5-kDa, and the molecular size of the 42.5-kDa isoform corresponded to that of the previous cDNA-encoded protein, we predicted that the larger isoform could be generated by the same gene through alternative splicing or by a modification of the translated protein such as phosphorylation or glycosylation. However, no conclusive evidence of this was found, though BmTRN-1 was demonstrated to have an important role eliminating possible target transcripts in post-transcriptional regulation[2]. In order to gain more insight into the biological significance of BmTRN-1 in silkworm cells, overexpression of the full-length or truncated BmTRN-1 in the BmN4 cell line was performed to evaluate its effect on the regulation of transcripts and protein synthesis.

During these experimental procedures, we obtained another cDNA encoding with a 402-amino acid sequence and an estimated molecular mass of approximately 44 kDa which corresponded to the larger 44.1-kDa BmTRN-1 isoform[2]. Figs. 1A and B show the exon-intron organization, and the additional nucleic acids and amino acid sequence of the alternatively spliced mRNA of the BmTRN-1 gene sequence encoded by an isolated BAC clone from the library described by

Wu *et al.* [9]. The 44.1-kDa BmTRN-1 is shown to be translated from the larger mRNA containing an additional exon lying inside the first intron region of the 42.5-kDa isoform mRNA. Since the first intron is located within the region coding for near the starting portion of the auxiliary domain, the additional 14 amino acids of the alternative exon caused the difference in the primary structure of the auxiliary domain between the 44.1-kDa and 42.5-kDa isoforms. All the intron-exon border sequences of the two isoform mRNAs fall into the generally conserved AG-GU rule (Fig. 1B), indicating that the two isoforms possessing different auxiliary domain structures are generated by alternative splicing.

3. 2 Effects of the overexpression of BmTRN-1 in the cultured cells on reporter protein production

To evaluate the effect of BmTRN-1's function on the synthesis of proteins, production of CAT-SV5 (see "MATERIALS AND METHODS") was investigated in BmN4 cells overexpressing recombinant proteins comprised of both an N-terminal GFP plus the full-length BmTRN-1 isoforms and truncated mutants such as RRM1-3, the 42.5-kDa isoform's auxiliary domain, and the 44.1-kDa isoform's auxiliary domain. Through the use of Western blotting, using a specific GFP antibody, it was possible to confirm that all of the recombinant proteins were substantially expressed (Fig. 2A). An assay for the poly(U) RNA-binding of all the recombinant fusion proteins was performed by mixing RNA-conjugated agarose resin and the recombinant protein samples in a test tube, followed by thorough washing and detection of the specific precipitates using the antibody against GFP. The results, shown in Fig. 2B, confirmed that there was no poly(G)-binding, but showed significant poly(U)-binding of the recombinant full-length protein and the truncated protein lacking the auxiliary domain, in which the RRM1-3 domain had no sequential deficit, meaning that there was no impeding influence of their fusion with GFP on the original RNA-binding activity of the RRM1-3 domain. This indicated that investigations using the recombinant proteins should be effective in studying the cellular function of BmTRN-1.

Furthermore, the function of these recombinant proteins in reporter protein production in cultured cells was investigated by co-transfection of the vector expressing the series of recombinant proteins and the reporter vector producing CAT-SV5, both of which were controlled by different promoters. As shown in Fig. 2C, a distinctive reduction of the CAT-SV5 protein was shown in the cells overexpressing both the GFP-fused full-length 42.5-kDa and 44.1-kDa BmTRN-1 proteins, whereas the other expressed recombinant proteins did not show any significant, detectable effect on reporter protein production. This indicates that both full-length BmTRN-1 isoforms can inhibit reporter protein production, which is consistent with previous results obtained using BmTRN-1 knock-down cells where the CAT-SV5 reporter protein increased (Kotani *et al.*, 2003). Authentic BmTRN-1 was previously shown to recognize and dampen the reporter CAT-SV5 transcript relatively weakly compared to other artificial reporter proteins because of a possible difference in sequence between the CAT-SV5 transcript and the other reporter transcripts. However, expression of the recombinant BmTRN-1 protein at a much higher level than the authentic protein in the cultured cells revealed a sufficiently significant reduction in CAT-SV5 production. From this, it can be assessed that CAT-SV5 is an appropriate reporter for investigating the recombinant BmTRN-1's function with understanding that the transcripts of other artificial reporters were so responsive

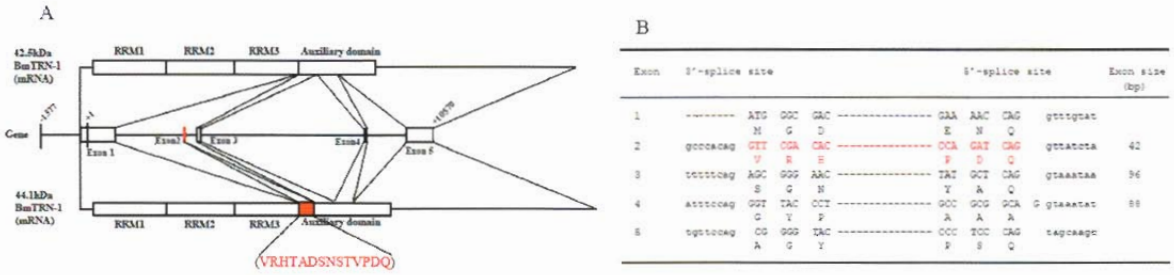


Fig. 1. *Bombyx mori* BmTRN-1 gene. (A) A schematic diagram of the BmTRN-1 genomic sequence with two BmTRN-1 mRNA isoforms encoding 42.5-kDa and 44.1-kDa proteins. Numbers indicate the nucleotide positions where the +1 position indicates the first nucleotide for the start codon, exons are represented by open boxes, and introns are indicated by horizontal bars. The red boxes indicate the alternative exon coding for the additional sequence, VRHTADSNSTVPDQ, in the auxiliary domain of the 44.1-kDa isoform. (B) Exon-intron junction sequences of the BmTRN-1 gene with the nucleotide sequences flanking the 3'- and 5'-splice sites shown. Exon sequences are indicated by capital letters and intron sequences by lower case letters. The amino acid residues encoded by the junction nucleotides of the exons are represented by single letter codes. The alternative exon coding for nucleotide and amino acid sequences is represented by red letters. The lengths of the exons are shown on the right.

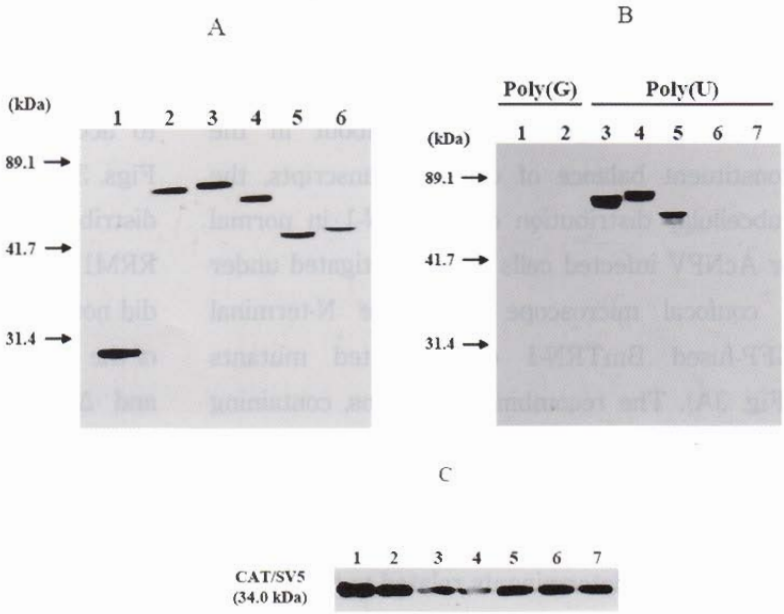


Fig. 2. Reporter protein production in B. mori cells overexpressing the GFP-fused BmTRN-1 or truncated mutants. (A) Expression of the recombinant proteins, such as GFP (lane 1), the N-terminal GFP-fused full-length 42.5-kDa isoform (approximately 78.0 kDa, lane 2), full-length 44.1-kDa isoform (79.5 kDa, lane 3), RRM1-3 domain (64.0 kDa, lane 4), C-terminal auxiliary domain of the-42.5 kDa isoform (43.0 kDa, lane 5), and auxiliary domain of the 44.1-kDa isoform (44.5 kDa, lane 6) were detected in the plasmid-transfected BmN4 cells. Ten micrograms of recombinant protein were separated through SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The GFP-fused protein bands on the membrane were specifically detected using the anti-GFP antibody as described in "MATERIALS AND METHODS", where a 31.4-kDa to 89.1-kDa protein ladder was used as a size standard. (B) Binding of the GFP-fused recombinant proteins to poly(U) (lanes 3-7) and poly(G) RNA-agarose (lanes 1,2). The GFP-fused full-length 42.5-kDa isoform (lanes 1, 3), 44.1-kDa isoform (lanes 2, 4), RRM1-3 (lane 5), auxiliary domain of the 42.5-kDa isoform (lane 6), and auxiliary domain of the 44.1-kDa isoform (lane 7) bound to RNA-conjugated agarose were prepared as described in "MATERIALS AND METHODS" and detected by Western blotting using anti-GFP. (C) Effects of overexpression of the GFP-fused full-length 42.5-kDa isoform (lane 3), 44.1-kDa isoform (lane 4), RRM1-3 (lane 5), auxiliary domain of the 42.5-kDa isoform (lane 6), and auxiliary domain of the 44.1-kDa isoform (lane 7) on the production of a reporter protein, chloramphenicol acetyl transferase plus SV5 epitope (CAT-SV5), from a co-transfected plasmid. As controls, cells were co-transfected with no plasmid (lane 1) or with the plasmid coding for GFP (lane 2). Ten micrograms of each protein sample were separated through SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Specific detection of the reporter CAT-SV5 protein by Western blotting was performed using the anti-SV5 antibody as described in "MATERIALS AND METHODS".

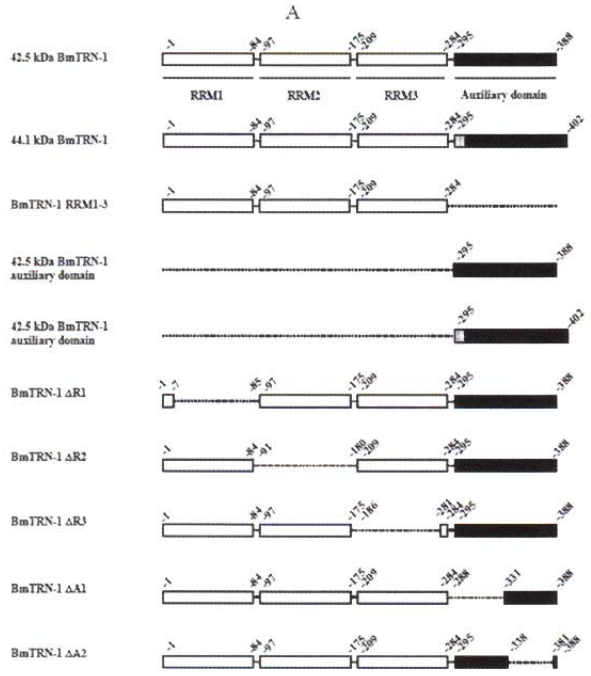
to minute quantities of the originally expressed authentic BmTRN-1 in the cells, that they were readily reduced, even without the additional recombinant BmTRN-1. Also, the RRM1-3 domain alone seemed unable to dampen the reporter transcript; both the function of RRM1-3 and the auxiliary domain of BmTRN-1 need to be intact in a molecule for the complete activity of BmTRN-1 to be achieved.

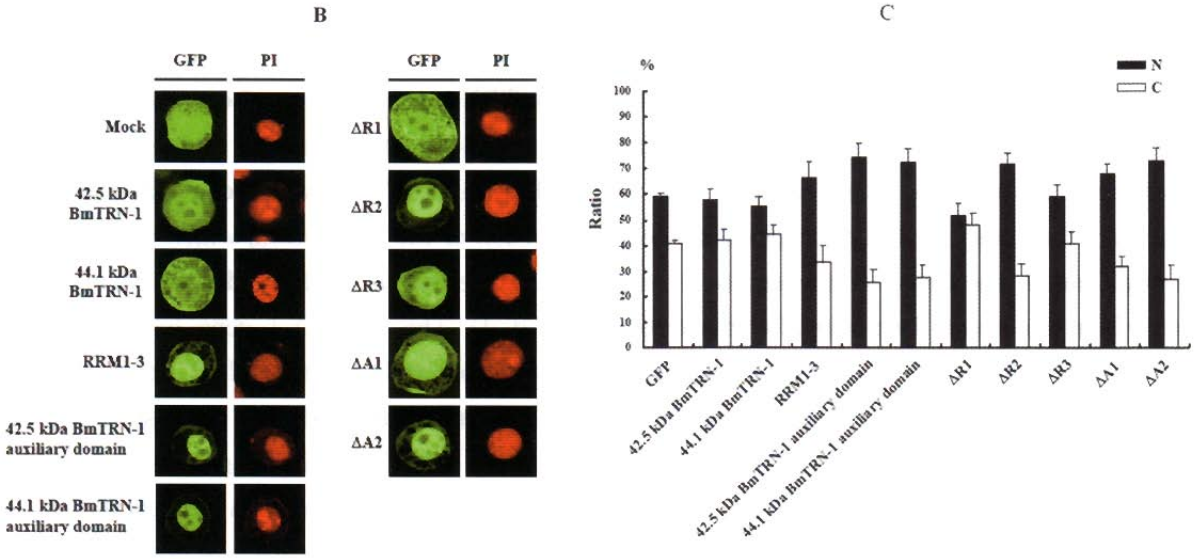
3. 3 Change in subcellular distribution of BmTRN-1 protein in cultured cells during AcNPV infection and the effects of BmTRN-1 overexpression on AcNPV protein production

To verify whether BmTRN-1 acts under emergent conditions on the transcription system, such as in the presence of a DNA virus, whereby a marked change is brought about in the constituent balance of cellular transcripts, the subcellular distribution of BmTRN-1 in normal or AcNPV infected cells was investigated under a confocal microscope using the N-terminal GFP-fused BmTRN-1 or truncated mutants (Fig. 3A). The recombinant proteins, containing the RRM1-3 domain, were confirmed to bind to RNA as explained above. Detailed analysis of the BmTRN-1 amino acid sequence did not reveal any sequence determinants related to the nuclear or cytoplasmic localization signals identified so far. In the observation of cells and a comparison of intensity between the nucleus and cytoplasm as shown in Figs. 3B and C, the mock GFP was always detected in the nuclei slightly more than in the cytoplasm, possibly due to its general properties as similar results were obtained using mammalian cos-7 cells (Zhang *et al.*, 2005). There have been reports that GFP-fused TIA-1 family members were distributed similarly to the authentic proteins in mammalian cells, and GFP-fusion recombinants were confirmed to be effective tools for the investigation of the subcellular distribution of the TIA-1 family[4,11].

As shown in Figs. 3B and C, the GFP-fused 42.5-kDa and 44.1-kDa BmTRN-1 were detected in both the nucleus and cytoplasm at a similar ratio to that of the mock GFP, indicating that both of the full-length BmTRN-1 isoforms were present in the nucleus and cytoplasm with no significant quantitative difference. However, truncated 42.5-kDa RRM1-3 domain and 42.5-kDa auxiliary domain were detected largely in the nucleus, indicating that the important domains of BmTRN-1, such as its RRM1-3 and auxiliary domain, mainly accumulated in the nucleus, and that the full-length BmTRN-1 could be distributed in both the nucleus and cytoplasm. The property of the 42.5-kDa full-length BmTRN-1 was changed by removing its RRM2 domain, leading to accumulation in the nucleus, as shown in Figs. 3B and C panel ΔR2, while the subcellular distributions of the truncated mutant lacking RRM1 and the truncated mutant lacking RRM3 did not show any significant difference from that of the 42.5-kDa full-length BmTRN-1 (panels ΔR1 and ΔR3). Since the truncated mutant lacking either RRM1-3 or the auxiliary domain was primarily distributed in the nucleus, the full-length BmTRN-1 was distributed in both the nucleus and cytoplasm, and the subdomain RRM2 was found to have roles related to nuclear export, it was suggested that BmTRN-1 newly synthesized in the cytoplasm is transported into the nucleus by its domain function, and then nearly half of the BmTRN-1 moves to the cytoplasm via the role of the RRM2. From these findings, it is also suggested that BmTRN-1 shuttles between the nucleus and cytoplasm, and its nuclear export depends on its RRM2 domain function. In addition, both truncated mutants, the 42.5-kDa BmTRN-1 lacking the anterior half of the auxiliary domain, and the protein lacking the posterior half of the

Fig. 3. Subcellular distribution of the GFP-fused BmTRN-1 recombinant proteins. (A) Schematic representation of the BmTRN-1 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms, and truncated mutants fused to the GFP protein. Each domain composing of both isoforms is indicated, and the dotted lines indicate the subdomains deleted in the mutant. () Subcellular distributions were analyzed by confocal fluorescence microscopy for the expressed GFP, GFP-fused full-length 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms, RRM1-3, and the auxiliary domain of the 42.5-kDa isoform and auxiliary domain of the 44.1-kDa isoform in cells grown on coverslips and fixed. The mutants of the 42.5-kDa isoform, the mutant lacking RRM1 (ΔR1), the mutant lacking RRM2 (ΔR2), the mutant lacking RRM3 (ΔR3), the mutant lacking the anterior half of the auxiliary domain (ΔA1), and the mutant lacking the posterior half of the auxiliary domain (ΔA2) were also analyzed as cell nuclei were stained with propidium iodide. (C) Ratios of cytoplasmic (C) and nuclear (N) fluorescence observed for GFP fused with BmTRN-1 or alone in relevant domains of BmTRN-1 as described in (A). These ratios are the means ± s.d. that were calculated as described in "MATERIALS AND METHODS".





auxiliary domain had a similar distribution to the RRM1-3 domain, accumulating in the nucleus (panels ΔA1 and ΔA2). From this result, it can be proposed that the auxiliary domain functions to promote the nuclear export of BmTRN-1 depending on the role of the RRM2.

While the tendency for both the RRM1-3 and auxiliary domain to accumulate in the nucleus was not changed by AcNPV, Figs. 4A and B clearly show that the full-length 42.5-kDa and 44.1-kDa BmTRN-1 accumulated in the nucleus during the infection process. The truncated mutant of the 42.5-kDa BmTRN-1 lacking RRM1, as well as the full-length versions of both isoforms, markedly accumulated in the nucleus in response to the viral infection. However, no significant change in the distribution of the truncated mutant of the 42.5-kDa BmTRN-1 lacking RRM3 was observed during the viral infection in comparison to that of normal healthy cells, suggesting a possible role of RRM3 in the nuclear accumulation caused by viral infections.

The effects of high levels of both recombinant full-length BmTRN-1 isoforms on AcNPV protein production were investigated by measuring an indicator protein, such as gp64, in the cells. AcNPV gp64 is a glycoprotein located on the envelope membrane of viral particles and is important for the entry of nucleocapsids into cells through membrane fusion of the envelope with the cellular endosome. Two days after these cells were infected by AcNPV, the gp64 protein signal was detected mostly in the cytoplasm, when the cells did not overexpress the recombinant BmTRN-1s. Then, the amount of gp64 protein stained *in situ* was measured by computer-aided confocal microscopic analysis using the gp64-specific antibody in transfected cells, and the intensity of the specific gp64 signal was compared in each transfected cell. As shown in Fig. 5, whereas a high percentage of the control cells such as non-transfected and GFP-producing vector-transfected cells exhibited strong signals, the transfected cells expressing either the full-length 42.5-kDa or 44.1-kDa isoforms, and the cells expressing both isoforms together in one culture had significantly weaker gp64 signals. However, Fig. 5 also shows that overexpression of the 42.5-kDa isoform was more effective at reducing AcNPV gp64 production than that of the 44.1-kDa isoform. These results reveal that the full-length BmTRN-1 also significantly inhibited the production of viral protein controlled by the late promoter which is activated by the normal production of other early phase viral proteins, suggesting that BmTRN-1 dampens transcription, not only for gp64, but also for a series of viral proteins possibly produced during the early and late phases. However it must be stated that each isoform exerted different effects.

4. Discussion

From the present study, it was shown that two alternatively spliced mRNAs, coding for 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms, were transcribed from the BmTRN-1 gene, and an alternative exon coding for an additional 14 amino acids specific for the 44.1-kDa BmTRN-1 was located in the internal portion of the first intron, which was present in the C-terminal auxiliary domain-coding region (Fig. 1). The BmTRN-1 gene has no intron in the region coding for RRM1-3, although TIA-1/TIAR in humans and mice have several introns in their RRM1-3-coding region, some of which have alternative intron-exon borders and possibly cause changes in the RRM sequence and RNA recognition (Kawakami *et al.*, 1994; Beck *et al.*, 1996). This suggests that additional intron-exon re-organization might have occurred during the evolution of vertebrate RRMs. SfTRN-1, a TIA-1 family protein from the *Spodoptera* insects,

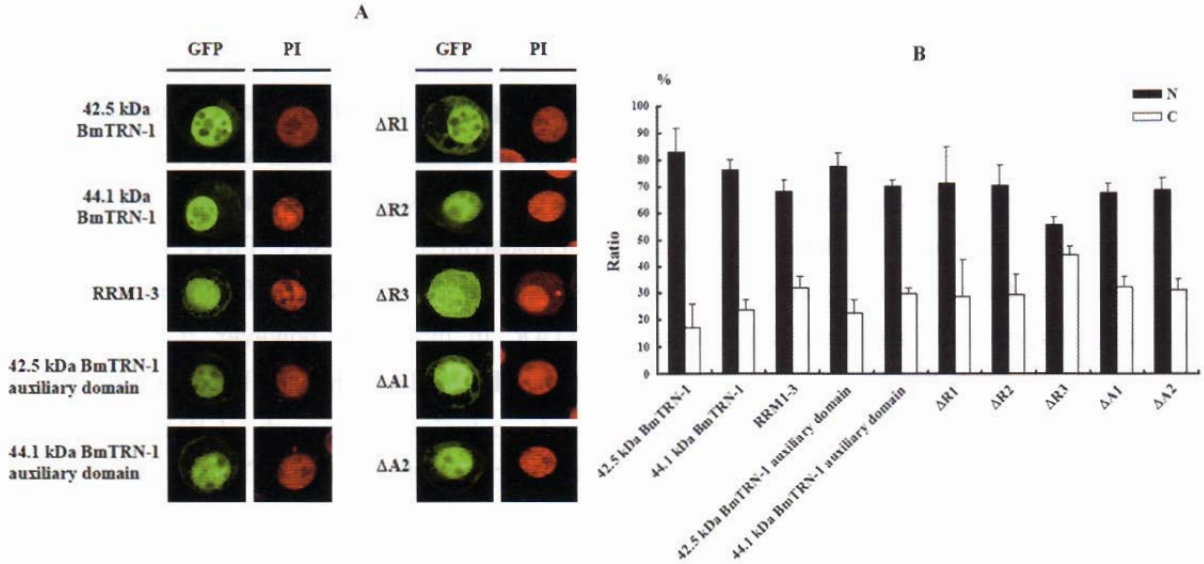


Fig. 4. Change in subcellular distribution of the recombinant BmTRN-1 in cells with AcNPV infections. (A) Subcellular distribution of the GFP-fused BmTRN-1 proteins and the truncated mutant of the 42.5-kDa isoform in BmN4 cells infected by *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus (AcNPV) (MOI of 10) 48 hours after infection. (B) Ratios of cytoplasmic and nuclear fluorescence observed for recombinant protein-expressing cells as represented in Figs. 3B and C during the AcNPV infection. These ratios are the means ± s.d. that were calculated as described in "MATERIALS AND METHODS".

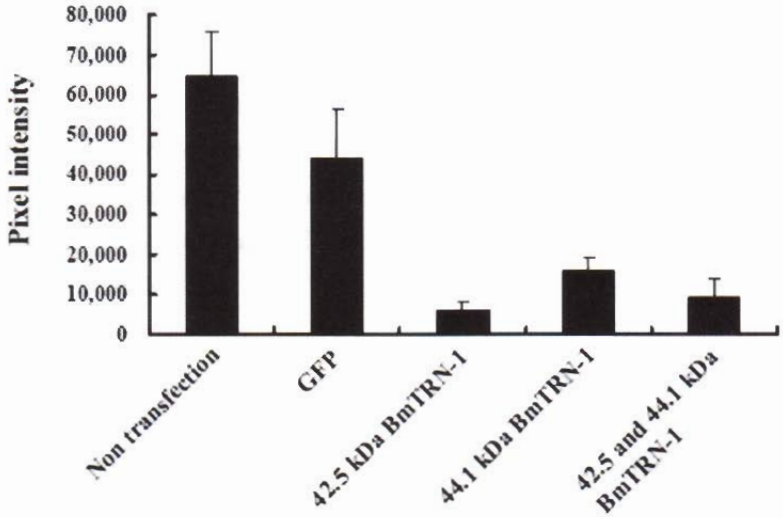


Fig. 5. Production of gp64 protein in AcNPV-infected BmN4 cells. BmN4 cells overexpressing GFP, either the GFP-fused BmTRN-1 42.5-kDa or 44.1-kDa isoforms, and both GFP-fused BmTRN-1 isoforms were infected with AcNPV (MOI of 10) at 48 hours after transfection. The cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-gp64. The quantification of the amount of gp64 in the cytoplasm of AcNPV-infected cells was performed 48 hours after infection. The relative pixel intensity in the cytoplasm of 20 cells after infection was measured, and the values were plotted. Error bars indicate the standard deviation from the mean.

was shown not to have isoforms generated by alternative splicing in cultured cells (Muto *et al.*, 2008) and in the midgut (Muto and Kotani, unpublished result), suggesting that the occurrence of alternative splicing in the auxiliary domain in insects is unique to silkworm tissues.

Since both isoforms were equally expressed in cultured *Bombyx* cells and tissue[2], it seems likely that the BmTRN-1 isoforms do not regulate each other's expression as TIA-1 was shown to down-regulate normal TIAR expression[11]. In addition, the subcellular distribution patterns of the BmTRN-1 isoforms do not differ (Fig. 3), suggesting that the isoforms function synchronously. There appeared to be no significant difference between the effects of the full-length 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms on the reporter protein; however, the overexpressed 42.5-kDa isoform was more effective at reducing the AcNPV gp64 production than the overexpressed 44.1-kDa isoform (Fig. 5). These results indicate that the 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms have slightly different functions in recognizing and dampening targets among the AcNPV transcripts.

The subcellular distribution of the full-length BmTRN-1 from the experimental group was found to differ from that found in normal cell states with no environmental stress present. BmTRN-1 is normally distributed in the nucleus and cytoplasm, but in the AcNPV-infected cells it clearly accumulated in the nucleus (Fig. 4). Further analysis revealed that the subdomain RRM2 is related to BmTRN-1's nuclear export under normal conditions and that RRM3 is related to the accumulation found in the nucleus during AcNPV infection (Figs. 3 and 4). Our results also indicated that in *Spodoptera* cells, SfTRN-1 was mainly present in the cytoplasm under normal conditions, whereas RRM2 showed characteristics important for nuclear export similar to BmTRN-1[3]. When both *Spodoptera* and *Bombyx* cells were exposed to oxidative stress caused by a β-meta-arsenite solution, many stress granule-like structures consisting of these TRN-1s in the cytoplasm were rapidly formed (Muto and Kotani, unpublished result). This demonstrates that insect TRN-1 could function similar to the cytoplasm of mammalian TIA-1/TIAR. In mammals, however, it was reported that TIA-1/TIAR shuttles between the nucleus and cytoplasm through CRM1-independent nuclear export and Ran-GTP-dependent nuclear import under normal conditions in the absent of a transcriptional inhibitor. RNA recognition of RRM3 is important for the nuclear export, and the recognition of RRM2 is related to the nuclear accumulation (Zhang *et al.*, 2005). The RRM2 and RRM3 domains of BmTRN-1 have distinctly opposite roles in the subcellular distribution, compared to those of TIA-1/TIAR, suggesting that lepidopterous insect cells have different nuclear transport systems or associated factors possessing different functions from those of mammalian cells, which are responsible for the relatively larger distribution of insect TRN-1 in the cytoplasm.

Furthermore, from the evidence of the altered subcellular distribution of BmTRN-1 in an AcNPV infection due to RRM3 (Fig. 4), RRM3 may have the ability to recognize and bind to specific transcripts during viral infections, possibly causing BmTRN-1's accumulation in the nucleus, and inhibiting viral protein production.

It remains unclear whether the BmTRN-1 subdomain responsible for RNA binding recognizes only viral transcripts or both cellular and viral transcripts, however as previously stated, the knock-down of BmTRN-1 had different effects on a variety of introduced foreign artificial transcripts which share common 5'- and 3'-untranslated regions except the ORFs, indicating that BmTRN-1 is related

was shown not to have isoforms generated by alternative splicing in cultured cells (Muto *et al.*, 2008) and in the midgut (Muto and Kotani, unpublished result), suggesting that the occurrence of alternative splicing in the auxiliary domain in insects is unique to silkworm tissues.

Since both isoforms were equally expressed in cultured *Bombyx* cells and tissue[2], it seems likely that the BmTRN-1 isoforms do not regulate each other's expression as TIA-1 was shown to down-regulate normal TIAR expression[11]. In addition, the subcellular distribution patterns of the BmTRN-1 isoforms do not differ (Fig. 3), suggesting that the isoforms function synchronously. There appeared to be no significant difference between the effects of the full-length 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms on the reporter protein; however, the overexpressed 42.5-kDa isoform was more effective at reducing the AcNPV gp64 production than the overexpressed 44.1-kDa isoform (Fig. 5). These results indicate that the 42.5-kDa and 44.1-kDa isoforms have slightly different functions in recognizing and dampening targets among the AcNPV transcripts.

The subcellular distribution of the full-length BmTRN-1 from the experimental group was found to differ from that found in normal cell states with no environmental stress present. BmTRN-1 is normally distributed in the nucleus and cytoplasm, but in the AcNPV-infected cells it clearly accumulated in the nucleus (Fig. 4). Further analysis revealed that the subdomain RRM2 is related to BmTRN-1's nuclear export under normal conditions and that RRM3 is related to the accumulation found in the nucleus during AcNPV infection (Figs. 3 and 4). Our results also indicated that in *Spodoptera* cells, SfTRN-1 was mainly present in the cytoplasm under normal conditions, whereas RRM2 showed characteristics important for nuclear export similar to BmTRN-1[3]. When both *Spodoptera* and *Bombyx* cells were exposed to oxidative stress caused by a β-meta-arsenite solution, many stress granule-like structures consisting of these TRN-1s in the cytoplasm were rapidly formed (Muto and Kotani, unpublished result). This demonstrates that insect TRN-1 could function similar to the cytoplasm of mammalian TIA-1/TIAR. In mammals, however, it was reported that TIA-1/TIAR shuttles between the nucleus and cytoplasm through CRM1-independent nuclear export and Ran-GTP-dependent nuclear import under normal conditions in the absent of a transcriptional inhibitor. RNA recognition of RRM3 is important for the nuclear export, and the recognition of RRM2 is related to the nuclear accumulation (Zhang *et al.*, 2005). The RRM2 and RRM3 domains of BmTRN-1 have distinctly opposite roles in the subcellular distribution, compared to those of TIA-1/TIAR, suggesting that lepidopterous insect cells have different nuclear transport systems or associated factors possessing different functions from those of mammalian cells, which are responsible for the relatively larger distribution of insect TRN-1 in the cytoplasm.

Furthermore, from the evidence of the altered subcellular distribution of BmTRN-1 in an AcNPV infection due to RRM3 (Fig. 4), RRM3 may have the ability to recognize and bind to specific transcripts during viral infections, possibly causing BmTRN-1's accumulation in the nucleus, and inhibiting viral protein production.

It remains unclear whether the BmTRN-1 subdomain responsible for RNA binding recognizes only viral transcripts or both cellular and viral transcripts, however as previously stated, the knock-down of BmTRN-1 had different effects on a variety of introduced foreign artificial transcripts which share common 5'- and 3'-untranslated regions except the ORFs, indicating that BmTRN-1 is related

to a cellular mechanism used to recognize the sequential difference inside ORFs[2]. Baculovirus transcripts, which have no intron to be excised by splicing in the nucleus and viral transcripts, could have quite a different structure from an insect's cellular transcripts, not only just after the initial pre-mRNAs are transcribed, but also after mature translation complexes consisting of mRNAs and key proteins are formed and pass through the nuclear membrane. Cellular transcripts, which form normal complexes and associate with the exon-junction complex only after their intron-exon excision is completed via a normal splicing process, can pass through the nuclear membrane check point of the mRNA surveillance system where aberrant transcripts fail to pass and are broken down[14]. The AcNPV transcripts are possibly recognized as aberrant since they have no intron sequences.

In addition, it was reported that TIA-1 family proteins can act as RNA-splicing regulators of a series of alternatively spliced mRNAs in the nucleus[15-17]. From this evidence, it was suggested that BmTRN-1 interacts with the transcripts in the nucleus, and that the BmTRN-1 adjusts the mechanism to characterize the AcNPV transcripts in the nucleus as aberrant. Since the functions of both RRM1-3 and the auxiliary domain need to be intact for the total activity of BmTRN-1 to be possible (Fig. 2), it was further predicted that not only the interaction of BmTRN-1 with transcripts via the RRMs, but also the putative cellular mechanism triggered by the function of the auxiliary domain to characterize target transcripts as aberrant, causes the removal of transcripts in the nucleus. Therefore, BmTRN-1 could accumulate in the nucleus and interact with AcNPV transcripts in association with the formation of aberrant translation complexes to be eliminated. With this understanding, it is likely that BmTRN-1 has specific sequences in the subdomain necessary for its subcellular distribution, such as RRM3, the function of which can be modified on receiving a signal occurring in response to a viral infection. However, it is possible that BmTRN-1 itself does not have the ability to distinguish between the transcripts derived from AcNPV and the cellular transcripts, but virus-triggered mechanisms may induce the nuclear accumulation of BmTRN-1 which is associated with a cellular function eliminating the AcNPV transcripts.

Thus, these ideas could lead to a new hypothesis, that BmTRN-1 is an RNA-binding protein related to a cellular antiviral mechanism able to recognize and eliminate foreign viral transcripts, similar to how the mammalian TIA-1 performs an antiviral role against the DNA virus, HSV-1[5]. To test this hypothesis, it is necessary to clarify how the overexpression of the BmTRN-1 affects the proportion of AcNPV-derived transcripts relative to host cell-derived transcripts. In addition, to prove the specificity of BmTRN-1 in the presence of foreign transcripts along with new traits, such as resistance to viral infections, that are now being investigated using a transgenic line of silkworm overexpressing BmTRN-1- derived sequences.

5. References

[1] Brand, S. and Bourbon, H.-M. (1993) : The developmentally-regulated *Drosophila* gene rox8 encodes an RRM-type RNA binding protein structurally related to human TIA-1-type nucleolysins. *Nucleic Acids Res.*. 21, 3699-3704.

[2] Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K.B., Storey, J.S., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y. and Furusawa, T. (2003) : De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from

the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene*, 320, 67-79.

[3] Muto, S., Tanabe, T., Matsumoto, E., Mori, H. and Kotani, E. (2009) : Molecular Characterization of a TIA-1 like RNA-binding protein in the cells derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 648-656.

[4] Zhang, T., Delestienne, N., Huez, G., Kruys, V. and Gueydan, C. (2005) : Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J. Cell Sci.*, 118, 5453-5363.

[5] Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K.M., Moreno, G.T. and Brinton, M.A. (2002) : Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.*, 76, 11989-2000.

[6] Emara, M.M. and Brinton, M.A. (2007): Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 9041-9046.

[7] Morris, T.D. and Miller, L.K. (1993) : Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. *Virology*, 197, 339-348.

[8] Ikeda, M., Katou, Y., Yamada, Y., Chaeychomsri, S. and Kobayashi, M. (2001) : Characterization of *Autographa californica* nucleopolyhedrosisvirus infection in cell lines from Bombyx mori. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 70, 49-58.

[9] Wu, C., Asakawa, S., Shimizu, N., Kawasaki, S. and Yasukochi, Y. (1999) : Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Gen. Genet.*, 261, 698-706.

[10] Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P. (1996) : Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.*, 14, 315-319.

[11] Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M. and Anderson, P. (2004):Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell.*, 15, 5383-5398.

[12] Beck, A.R., Edley, Q.G., O'Brien, S., Anderson, P. and Streuli, M. (1996) : Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RNA binding proteins TIA-1 and TIAR. *Nucleic Acids Res.*, 24, 3829-3835.

[13] Kawakami, A., Tian, Q., Streuli, M., Poe, M., Edelhoff, S., Disteche, C.M. and Anderson, P. (1994) : Intron-exon organization and chromosomal localization of the human TIA-1 gene. *J. Immunol.*, 152, 4937-4945.

[14] Reed, R. and Hurt, E. (2002) : A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*, 108, 523-531.

[15] Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C.F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M.C., Stévenin, J. and Breathnach, R. (2000) : The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell Biol.*, 20, 6287-6299.

[16] Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P. and Valcarcel, J. (2000) : The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*, 6, 1089-1098.

[17] Zhu, H., Hasman, R. A., Young, K. M., Kedersha, N. L. and Lou, H. (2003) : U1 snRNP-dependent function of TIAR in the regulation of alternative RNA processing of the human calcitonin/CGRP pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 5959-5971.

衣笠繊研報（2008）№12, 55～59
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

中国蚕糸業の展開とその産地移動

顧　国達*

The Development and Production Area Shift of Sericulture Industry in China

Gu Guoda*

*College of Economics, Zhejiang University, China

Abstract

China is the world's *Big Silk Country*, whose cocoon and raw silk production and silk exports account for about 80% of the world. China's sericulture industry is closely related to the world demand, and also has an influential power on the supply-demand relationship and development of the world sericulture industry. Based on the related statistics, this paper presents an analysis of the China's sericulture industry status quo under the implementation of the "Western Shift of the Eastern Mulberry" policy, and its position in the world. Then we review the effectiveness of production area shift and give a summary with an outlook for the further development of sericulture industry in China.

Key Words：Production Area Shift, Development, Sericulture Industry, China

中国は世界の最も重要な蚕糸生産国とシルクの貿易国である。中国蚕糸業の展開は世界蚕糸業およびシルク貿易に対して大きな影響を及ぼしている。そこで、本稿は関連の統計をもとに、近年における中国蚕糸業の展開とその将来を概略的に論じる。

1．中国蚕糸業の展開

中国の蚕糸業は1995年頃、世界的シルクの供給過剰に影響され、繭買取価格は1994年全国平均の821.5元/50kgから1995年の596.4元/50kgへと暴落したことをきっかけに、調整の局面に入った。桑園面積は1994年の1867.2万ムから、1996年の1297.3万ム、1997年の957.7万ムへと縮小し、家蚕繭生産量も1994年の776941 tをピークに、1996年の470942 t、1997年の422976 t；生糸生産量も1994年の87767 tをピークに、1996年の66316 t、1997年の55117 tへと減少してきた。その厳しい状況を打開するために、中国政府は国家繭糸絹業協調管理事務室を設立し、全国的に繭糸絹業の構造調整を行った。特に、製糸業における総生産能力の制限、自動製糸機械導入と規模的生産を強力に推進した。2001年には「繭流通制度改革に関する意見」、2002年に「繭糸流通管理方法」を公表し、繭糸流通制度の改革による蚕糸業の活性化を促進して、養蚕農家と製糸業の利益調整を通じ、蚕糸業を振興した[1]。

この改革開放以降における伝統的蚕糸絹業の主産地である浙江省、江蘇省および広東省の経済急成長による労賃の高騰、民営と外資企業の快速的増加による労働力の不足における比較優位の低下、2001年12月に中国世界貿易機構（WTO）の加入による経済グローバル化の加速、21世紀に入って

＊連絡先：中国浙江大学経済学院、
310027 中国杭州市浙大路38号、E-mail：guguoda@zju.edu.cn、TEL　+86-571-87953273

表1　中国蚕糸業統計

	単位	2000	2003	2004	2005	2006	2007（年）
桑園面積	万ムー	948.7	1148.6	1171.7	1142.6	1283.5	1440.9
蚕種掃き立て	万箱	1405.3	1482.9	1562.9	1757.6	2006.8	2143.8
繭生産量	t	454614	481470	550121	621053	740076	779261
繭買取量	t	345937	384347	428059	526436	628924	697300
繭買取価格	元/50kg	838	669.4	797.2	977.7	1244.2	864.0
生糸生産量	t	51278	83763	80370	87761	93105	108420

出拠：『中国絲綢年鑑』各年版。

から国家西部大開発計画の実施など内外条件の変化をきっかけに、広西壮族自治区を代表的に蚕糸業の立地条件と労働力の比較優位を発揮した。また、全国的に蚕糸業の産地構造の再編成も急速に展開し、新しい蚕糸産地の寄与によって、中国の繭と生糸の生産は2001年から回復した。その結果（表1）、家蚕繭生産量は2001年の520558 t、2003年の再減少（481470 t）を経験し、2007年の779261 t；生糸生産量も2001年の62560 t、2007年の108420 tまで増加してきて、それぞれ歴史的新記録をつくった。

2．世界繭糸生産における中国の地位

世界繭糸生産量の変動も中国蚕糸業の展開に影響されて推移してきた。表2と表3で示すように、世界の家蚕繭生産量は1985年の561863 tから、1995年の968217 tへ増加してから、2000年の637920 tへ減少し、2006年は再び941160 tまで増加した。世界家蚕繭生産に占める中国の割合も1985年の59.8%から、1995年の78.5%へ上昇してから、2000年の71.3%へ低下し、2006年は再び78.6%まで上昇してきた。一方、中国自動製糸機械の全面的導入による製糸設備更新の寄与による生糸歩合の向上によって、世界の生糸生産量は1985年の59055 tから、1995年の102365 tへ増加してから、2000年の72011 tへ減少し、2006年は再び117074 tまで増加した。世界生糸生産に占める中国の割合も1985年の55.5%から、1995年の76.1%へ上昇してから、2000年の71.2%へ低下し、2006年は再び79.5%まで上昇してきた。

現在、中国の繭糸生産量が世界繭糸生産量の約八割を占めていること、また中国蚕糸業の展開は世界蚕糸絹業の展開とシルク市場の需給構造に大いに影響を与えていることに注目されている[2]。

3．中国蚕糸業の産地移動

最近の十年間には、中国蚕糸業産地構造の変動がみられる。中国の桑園面積は2000年の948.7万ム（1ムは666.7平方メートル）から、2005年の1142.6万ム、2007年の1428万ムと；蚕種掃き立て量は2000年の1405.3万箱から、2005年の1757.6万箱、2007年の2143.8万箱と；生繭生産量は2000年の454614 tから、2005年の621053 t、2007年の779261 tと増加してきた。地域別にみると、表4で示すように、浙江、江蘇、広東、山東および安徽を含む伝統的な養蚕主産地である東部地域は中国蚕糸業に占める地位が低下してきている。一方、広西、雲南、四川、重慶および陝西を含む西部地域は中国蚕糸業に占める地位が急速に上昇してきている。

主要省別の繭生産動向を見ると、表5で示すように、21世紀に入ってから、広東省、広西自治区、雲南省の生産量増大が目立っている。中でも西部内陸地域に位置する広西自治区の繭生産量は1990年に僅か7432 tで、2000年に26000 t台に達し、2005年に148460 t、2007年に205163 tと急速に増加してきました。そのほかに、雲南と広東の増加も注目される。

この養蚕産地移動の背景には、中国政府による東部地域の養蚕を西部地域へ移す農業政策「東桑西移」がある。中国政府は、2001年前後に「東桑

表2　世界家蚕繭生産に占める中国の割合　（単位：t、%）

年	世界家蚕繭生産量	中国	日本	インド	ブラジル	その他
1985	561863	59.8	8.4	13.7	2.0	16.1
1990	734431	65.4	3.4	15.9	2.2	13.1
1995	968217	78.5	0.6	12.0	1.7	7.2
2000	637920	71.3	0.2	19.5	1.6	7.4
2005	809991	76.7	−	15.6	1.0	6.7
2006	941160	78.6	−	14.4	0.9	6.1

出拠：1985年、1990と1995年のデータは顧国達著、「世界蚕糸業経済とシルク貿易」、中国農業科学技術出版社、2001年9月、p.271-272；2000年、2005年と2006年のデータはFAOと関連国の統計により整理したものである。

表3　世界生糸生産に占める中国の割合　（単位：t、%）

年	世界生糸生産量	中国	日本	インド	ブラジル	その他
1985	59055	55.5	16.2	11.9	2.6	13.8
1990	71654	60.0	8.0	16.0	2.4	13.6
1995	102365	76.1	3.2	12.6	2.4	5.7
2000	72011	71.2	0.8	20.0	1.9	6.1
2005	110291	79.6	0.1	14.0	1.2	5.1
2006	117074	79.5	0.1	14.1	1.2	5.1

出拠：1985年、1990と1995年のデータは顧国達著、「世界蚕糸業経済とシルク貿易」、中国農業科学技術出版社、2001年9月、p.271-272；2000年、2005年と2006年のデータはFAOと関連国の統計により整理したものである。

表4　"東桑西移"と養蚕地域構造の再編

項目	地域 / 年	東部地域 2000	東部地域 2006	中部地域 2000	中部地域 2006	西部地域 2000	西部地域 2006
桑園（万ム）	面　積	346	401	153	220	426	663
	%	37.4	31.2	16.6	17.1	46.0	51.7
蚕種（万箱）	掃立量	668	778	153	229	584	1000
	%	47.5	38.8	10.9	11.4	41.6	49.8
繭（万t）	生産量	24.3	31.1	5.4	8.9	15.7	34.1
	%	53.5	40.0	12.0	11.9	34.6	46.0

西移」のスローガンを打ち出し、その後国家プロジェクトとして、第11次5ヵ年計画実施期間中（2006～2010年）に、商務部が毎年50県（200万元／県）、1億元／年の助成を5年間行って、中西部地域に1万ムー以上の規模の桑園を有する養蚕基地を200箇所造成することが決められた。このプロジェクトの主目的は、著しい経済発展と都市化によって衰退傾向にある東部沿海地域における伝統的繭生産地域の養蚕業を西部内陸地域へシフトさせることによって、中国シルク産業の競争力を向上させるとともに、三農問題解決のための新社会主義農村計画を推進することにある。2000年以降の西部内陸地域の顕著な増産は、「東桑西移」プロジェクトの効果が現れ始めたからであると言えよ

表5　中国養蚕主産地の家蚕繭生産統計　（単位：t）

年 / 地域	1980	1990	2000	2005	2006	2007
	249850	480179	454614	621052	740076	779261
広西	1800	7432	26000	148460	185000	205163
江蘇	38200	120021	95600	100539	117800	104119
浙江	65000	117975	93500	74838	85122	83900
四川	91750	143448	73012	77500	77800	83700
広東	21650	25488	17500	34300	68750	81127
安徽	4800	18840	24315	33900	37596	38100
山東	10500	13725	36458	36845	39700	40500
雲南	700	2482	8510	20095	31477	36600
重慶	--	--	28270	31000	23828	24800
陝西	2850	9504	15500	20272	18498	24600
河南	900	1343	4700	8600	13390	13700
湖北	5700	7007	13000	13582	15706	15800
江西	200	2639	7100	10577	12110	12400
山西	1900	3323	4360	3912	5602	5800
湖南	2100	2422	876	3663	4100	4200
貴州	150	610	2150	1199	1254	2532
甘粛	–	143	421	537	613	500
寧夏	–	--	234	413	475	500
上海	100	311	555	407	–	
新疆	700	2534	3108	819	895	200

う[3]。

1990年代後半に製糸工場の生産能力削減政策により、全国の操糸機台数は1995年の21.3万台をピークに2000年には13万台へと急速に減少し、2004年には11万台まで削減された。一方、自動操糸機の台数は、1997年の2.8万台から2004年には6.9万台へと増加しており、このような製糸業の自動化による生産能率の向上によって生糸生産量は著しく増大した。このため、製糸主産地の移動は養蚕主産地の移動より遅れており、養蚕主産地である広西の製糸業は近年、快速的な展開が見られるが（表6）、従来製糸主産地である浙江、江蘇および四川の中国蚕糸生産における地位はむしろ固まってきた。

4．中国蚕糸業の将来

20世紀90年代後半には、世界的なシルク需要の低迷により、中国蚕糸業は縮小傾向にあったが、21世紀に入ってからシルク需要の回復とともに復活してきた。20世紀90年代後半における製糸工場の生産能力削減と自動製糸機械導入の推進政策、21世紀初頭から西部大開発の呼びかけに蚕糸業の「東桑西移」政策の実施は中国蚕糸業の構造調整に大きく影響を与えている。現在、「東部沿海地域＝原料繭需要地域」「西部内陸部地域＝原料繭供給地域」という原料繭の需給構図が明確化したが、数年後には「東部沿海地域＝蚕糸需要地域」「西部内陸部地域＝蚕糸供給地域」という蚕糸需給構図も十分考えられる。其の中に、広西自治区と雲南省蚕糸業の展開、浙江省、江蘇省と広東省など東部

表6　中国蚕糸生産統計　　(単位：t)

年 / 地域	1990	1995	2000	2005	2006
	56592	110461	74885	132535	141480
広西	635	3001	895	6153	8149
江蘇	13330	26161	13753	23273	26766
浙江	15266	34215	34365	53139	50810
四川	14572	21553	8279	19461	23331
広東	2361	2724	500	1098	6167
安徽	1771	5520	2118	3807	4082
山東	2434	5924	5422	6477	6637
雲南	216	590	617	1426	1335
重慶	−	−	2435	6116	6629
陝西	753	1221	1150	1775	1657
河南	222	1309	1075	5264	5530
湖北	558	1806	1323	619	536
江西	119	1074	345	1445	1676
山西	370	517	424	196	175
新疆	190	421	149	0	0

注：蚕糸は桑蚕生糸、柞蚕生糸と絹紡糸を含む。1990年と1995年四川の統計は重慶の分を含む。
出拠：『中国絲綢年鑑』各年版。

沿海地域製糸業の展開は中国蚕糸業の産地構造に大きな影響を及ぼしている。

中国蚕糸業の展開は、世界的なシルク需要に大きく依存してる。2008年９月急速に悪化してきたアメリカのサブプライム危機が本年から世界実体経済にも大きな影響を与えている。その影響で、中国蚕糸業もシルク輸出不振によって2008年秋から繭糸価格は急落し、他の産業とともに調整局面を迎えている。真綿布団など人気商品の内需拡大はシルク輸出不振をどのぐらい解消できるかは、世界経済危機による蚕糸業への影響を柔らかくする鍵である。いずれにしても、世界蚕糸生産量の八割近くを占めている「シルク大国」である中国蚕糸絹業の展開は世界蚕糸絹業の将来でもある。

引用文献

［１］顧国達（2005）：蚕業経済管理．浙江大学出版社，杭州

［２］顧国達（2001）：世界の蚕糸業経済とシルク貿易．中国農業科学技術出版社，北京

［３］浦出俊和，宇佐美好文，顧国達，宇山満（2008）：近年の中国養蚕業の発展とその要因－「東桑西移」政策の評価．（日）農林業問題研究，第44巻第３号．461-469

衣笠繊研報（2008）№12, 61～66
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

年表「近代化蚕糸業技術の変遷」
2　大正・昭和初期の蚕糸政策と科学・技術

松本継男*

The Chronicle of Scientific and Technological Supports to the Sericultural Industry in the Taisho to the early Showa Period

Tsuguo MATSUMOTO

*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,
29 Kitano Shiro-Hakubai-cho, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

はじめに

西洋列強国の近代化は、18世紀後半のイギリスの産業革命期に始まったが、我が国のそれは明治維新（1868）後でなかでも西南戦争（1877、明治10）以降であり、昭和初期にはその近代化の基盤はほぼ整った。わずか60～70年の間である。その近代化の推進や国力浮揚に、蚕糸・製糸業や綿糸紡績業などの繊維産業が果たした役割は多大であったが、我が国固有の産業で、しかも輸出貿易の太宗を担った蚕糸・製糸業の貢献は、絶大なものであった。先に明治期の蚕糸・製糸業とそれを支えた蚕糸科学・技術の一端を、歴史的事象に基づき年表として取り纏めた（松本、2007）が、ここでは引き続き「大正・昭和初期」の蚕糸・製糸業について年表化を試みた。

明治期の蚕糸・製糸業は、各地に多数存在する農耕未分離「養蚕（農業）＋製糸（工業）」で小規模、零細資本のもとで生産される「座繰生糸」を基本とする手工業的家内工業から、「器械生糸」へ、さらに日清戦争（1894、明治27）後の金本位制の確立や、日露戦争（1904、明治37）後の電動力や汽缶（ボイラー釜）の普及を背景にした「機械生糸」を主流とする営業的工場工業へと発展し、遂に1909（明治42）には世界一の蚕業国に至った。ここに西洋の資本主義経済国と比肩しうる日本的資本主義の礎が整備されが、これには最大の生糸輸入国であるアメリカの絹業保護政策による生糸輸入関税の改正や、絹の消費需要の拡大に恵まれたことが大きな要因の一つであるが、蚕業二法「蚕糸業組合準則（1885、明治18）、蚕種検査規則（1886、明治19）」により生糸の粗製濫造の弊害を除去したこと、さらに秩禄処分による士族授産の桑園開発や養蚕人口が増加したことなども、その背景を担っていたことを指摘しておく必要がある。

資本主義経済圏の一員として、位置付けられた我が国の蚕糸・製糸業の経営形態は、個人や合名、合資さらに産業組合などによる小資本による経営が主流で、他の近代化工業（鉱山、紡績、化学、電力、鉄鋼、造船など）の株式会社によるそれとは大きく異なっていた。このことは大正・昭和初期の資本主義社会が持つ労働争議や社会運動に翻弄される要因を孕んでいた。1912（大正元年）から1928（昭和３）にかけては、製糸会社の創設や合併、吸収、集中などが活発に繰り返されたが、昭和４・５年頃には大資本を中心とした企業（片倉や郡是、鐘紡など）への集中が図られた。巨大なアメリカマーケットに依存する我が国の生糸貿易は、日本経済全体の発展に大きく影響を及ぼしたが、繭生産農家の経済（繭価）にも影響を与え

＊連絡先：㈶衣笠会、603-8326　京都市北区北野下白梅町29、E-mail：tsu_5ma@wonder.ocn.ne.jp

た。大資本の工場制工業のもとで生産された生糸も、第一次大戦（1914、大正３）の勃発で糸価は暴落し、政府助成金による滞貨生糸の買収、その翌年には大戦景気の余波で糸価は空前の高騰を示したが、1920（大正９）にはその反動で再び大暴落した。この糸価の乱高下に製糸業界は度々集会を開催し対応を協議したが、危機脱出は極めて困難で政府援助を待たねばならなかった。関東大震災に伴う横浜生糸取引所の混乱や急遽神戸生絲取引所の復活（1923、大正12）は、生糸市況の混迷を表徴するものであった。経済恐慌（1920、大正９）や金融恐慌（1927、昭和２）が起こるや、糸価はついに泥沼状態化に陥り1932年（昭和７）には記録的な安値となった。操業短縮や帝国蚕糸倉庫（株）を設立して在庫の共同保管にあたるなど官民上げて対応したが糸価の安定には至らず、ついに政府は「糸価安定融資補償法（1930）」を発動して価格の補償を行った。糸価の下落は繭価にも当然連動したが、繭価の下落は皮肉にも繭を増産する現象となって現れた。このことは当時の農家総数の約４割近くにまで増加していた養蚕農家の不況を招来し、さらに賃金所得を失した製糸工女の帰村で、事態は深刻な社会問題化となった。糸価の崩落は、養蚕・製糸業のみでなく融資銀行も苦境に陥り、政府は改めて糸価安定の法令を制定し、滞貨生糸の一括買上げ措置を取った。

この期の糸価暴落の背景の一つに、人造絹糸の進出があげられる。生糸の最大の輸出国であるアメリカの需要が広幅織物の人造絹糸へと転換されるに伴い、生糸の需要が大幅に後退したことである。しかしやがて人造絹糸は天然繊維である生糸の特性にはほど遠いものであることが分かり、大型製糸会社業は、活動的なアメリカ婦人をターゲットにした「高級薄地絹靴下」にその活路を求めて、製糸工程の合理化、原料繭の契約取引する養蚕組合の結成、資金の融通、技術指導の向上など高品位生糸の確保に経営転換を図った。皮肉にも人造絹糸の進出は、かえって高級な生糸を生産するより高度な蚕糸業を発達させる誘因となり、再び生糸輸出の活況が日中戦争（1937、昭和12）まで増大することとなった。

大正期および昭和初期の蚕糸行政と科学･技術

年表「大正および昭和初期の蚕糸行政と科学・技術」

年	月	日	蚕糸行政策	蚕糸科学・技術等
1912（大正元）				
	3		原蚕種製造所設置（杉並・高円寺）	
	4	20	第１回中央種繭審査会開催	
			農商務省：桑育と条桑育との比較調査開始（静岡、愛知）	輸出生糸取扱高：内商＞外商
1913（大正２）				
				長野県生糸同業組合連合会：操業短縮決定（12/19より２時間/日・休業）
				農商務省蚕業講習所（東京、京都）を文部省に移管（現、東京農工大学および京都工芸繊維大学）
				向山忠次郎商店（八王子織物問屋）破綻
				田中義麿：蚕遺伝子の「連鎖」現象発見
1914（大正３）				
	2	18	農商務省：道府県原蚕製造規定公布	東京高等蚕糸学校、京都高等蚕業学校発足

6	17	蚕業試験場官制公布（農商務省原蚕種製造所廃止、蚕糸試験場設置）	石川県絹織物同業組合：操業短縮開始（3,31まで２時間/日）
12	19	政友会戸水寛人ら：蚕糸業救済法案提出	片倉組今井五介：一代交雑種配布計画発表
12	29	原種配布規定公布（一代雑種原蚕を地方に配布）	蚕ハイブリッド品種第１号誕生（秋蚕期実施） 皇后陛下：御蚕所（宮城内紅葉山）にて養蚕 横浜蚕糸貿易商同業組合：夏秋蚕繭買入金融通停止、操業短縮勧告 全国蚕糸同業者協議会開催（操短決議） 生糸相場暴落（明治33年以来の大暴落） 大日本一代交配蚕種普及団設立登記
1915（大正４）			
2	26	農商務省：蚕業諮問会開催	横浜蚕糸貿易商組：合繋急協議会開催
3	20	第一次帝国蚕糸（株）設立（糸価暴落対策買上機関；生糸買上開始）	（春挽製糸延期、信州一番格生糸の不売等決議）
6	5	農商務省：輸出真田取締規則公布	生糸相場急騰（取引所開設以来の上げ幅）
6	30	農商務省：輸出羽二重検査所・輸出絹織物検査所規程公布	皇后陛下：桑園開墾（六段歩） 外山亀太郎：「日１号×支４号」育成
9	30	蚕糸業法に基づき蚕糸業同業組合中央会設立	
1916（大正５）			全国絹織物業者大会開催 皇后陛下：東京蚕業講習所行啓 糸況好転（養蚕・製糸全国展開、専業農家増）
1917（大正６）			米：輸入生糸課税 生糸崩落（米独国交断続） 皇后陛下：掃立、製糸、奉告（紅葉山養蚕所） 製糸非売同盟会結成（信州） 蚕糸同業組合中央会：信州上一番格生糸売止、地方各組合操業短縮決議 全国蚕業者大会（糸価維持のため年内閉業繰上げ等決議） 全国製糸家大会（横浜、操業短縮決議）
1918（大正７）			
1	－	政府：蚕糸業の共同経営推奨	皇后陛下：農林省蚕業試験場（東京）行啓
2	6	関東州蚕業試験場規定制定	全国蚕糸業大会（操業短縮決議）
5	17	農商務省：桑園増殖奨励規則改正（桑園増殖から改良へと推奨）	糸価390円（開港以来最低価格） 甲信の製糸家：操業休止決議
1919（大正８）			福井市絹織物組合：休機決議 横浜蚕糸貿易同業組合：全国製糸業者に春挽操業延期警告 蚕糸業者（18名）：アメリカ絹業視察団出発 皇后陛下：京都高等蚕糸専門学校行啓

		皇太子；上田蚕糸専門学校、長野県立蚕業学校行啓 （社）帝国蚕糸組合創立
1920（大正9）		
4　20	日銀；救済資金特別融資決定	生糸相場高騰（横浜生糸取引所開設以来最高値、以後下落）
7　2	政府；臨時蚕業資金貸出決定（1,000万円）	片倉製糸紡績（株）設立
7　26	政府：蚕種輸入関税全廃	商品相場暴落（横浜生糸取引所休業（4/16～4/19）
9　25	第二次帝国蚕糸（株）設立 （滞貨生糸の買取、糸価維持のため）	第74銀行および茂木商店破綻 （横浜生糸市場混乱、休業5/25） 蚕糸業同業組合中央会政府に融資要求 横浜蚕糸貿易商組合；第2回全国蚕糸業者大会（全国一斉操業休止決議、11/30～78日間）
1921（大正10）		
3　4	政府；蚕糸業救済貸付金補償案議会に提出（3/25可決）	全国養蚕組合連合会設立（大正13、帝国養蚕組合に改称）
4　13	帝国蚕糸（株）への貸付に損失補償を契約（救済活動終了）	一部養蚕家の蚕糸業同業組合連合中央会離脱と全国養蚕組合連合会設立 糸価上昇 御法川直三郎：御法川式多条操糸機開発
1922（大正11）		
3　28	埼玉県；生繭正量取引奨励規程施行 道府県原蚕種製造所を蚕業試験場と改称	製糸連合会；操業短縮決議（5月以降） 生糸市場好転（値崩れ止る） 生糸輸出量、価格ともに最高
	埼玉県；蚕業試験場に製糸施設敷設し、製糸・繭検定開始（府県施設で最初）	帝国農会；地租軽減を決議 クワ立枯病初発生
1923（大正12）		
10　8	生糸共同荷受所設置（神戸；旧神戸生糸取引所復活）	生糸市況悪化（高値出現後漸落） 横浜生糸取引所；現物市場再開（定期取引1/11再開）
1924（大正13）		
1　24	神戸生糸検査所開設（横浜港の生糸輸出独占破壊）	全国製糸業者大会（糸価調節策決定、全国一斉休業（10日間））
5　19	焼失生糸（横浜港）の善後措置決定	蚕卵の化性と人工孵化法確立
1925（大正14）		
3　31	農商務省を廃し、農林・商工省設置	
7　1	生糸輸出同業組合設立認可申請→不許可	
1926（大正15、12/26昭和元）		
3　29	輸出生糸検査法公布（生糸検査法廃止、1927,7/1施行） 関税定率法改正公布（新興工業製品（人絹）や農産物の関税引上げ）	生糸・綿糸市況悪化（為替相場高騰による） 倉敷絹織（株）設立 株式・生糸・綿糸相場暴落（貿易不振、為替高）
4　2	帝国蚕糸倉庫（株）設立（糸価対策、後に帝蚕倉庫（株）と改称）	生糸相場暴落（全国製糸業者操業休止、12/31まで）
11　12	日銀：帝国蚕糸倉庫（株）に生糸救済資金融資（2,250万、横浜正金銀行経由で）	

11 13	蚕糸中央会：糸価維持のため生糸共同保管実施	
1927（昭和2）		
2 3	輸出生糸検査法施行規則公布	大日本生糸販売組合連合会設立
5 25	農林省に蚕糸局設置	鈴木商店破産
10 29	第二次帝国蚕糸（株）設立（糸価安定のため生糸買入、担保貸付）	山一林組（岡谷）同盟罷業（組合加盟の自由要求）
1928（昭和3）		
	第三次帝国蚕糸（株）・帝国蚕糸倉庫（株）；生糸の共同保管→糸価維持	片倉製糸紡績（株）大宮製糸所操業開始 農学諸学会連合大集会開催
1929（昭和4）		
3 28	糸価安定融資補償法公布（9/1施行）	全農第二回大会（農民戦線統一、養蚕農家救済運動方針決定）
7 3	稚蚕共同桑園設置奨励規則公布	
9 26	農林省；生糸検査所検査および鑑定規則・輸出生糸検査法施行規則改正同公布（生糸格付；10/1実施）	糸価崩落（米国株式市場暴落の影響） 恐慌→糸価下落 蚕糸業同業組合中央会総会（生糸共同保管、操業短縮、糸価安定融資補償法発動要請など決議） 全国製糸業者一斉休業（2週間）
1930（昭和5）		
3 8	政府；糸価安定融資補償法発動（業務は帝国蚕糸（株）担当）	日本農学会設立 製糸業：操業短縮・共同保管強制
6 7	稚蚕共同飼育所設置奨励規則公布	春繭相場暴落（前年度比47%減）
10 1	政府；糸価安定融資補償法の通用期間延長および補償金額の増額決定	生糸相場新安値（米の生糸消費激減）
11 1	失業救済農山漁村臨時対策として低利資金融資（養蚕応急資金；荒廃桑園の改良）	
1931（昭和6）		
3 30	蚕糸業組合法公布（7/15実施）	日本農民組合結成 全国製糸工場一斉休業（1ヶ月）
1932（昭和7）		
4 25	糸価委員会；滞貨生糸一括売却案決定（旭シルク（株））	日本中央蚕糸会設立（蚕糸関連諸団体の連合体）
6	糸価委員会；糸価下落で旭シルク（株）買渋り→政府買上	
7 1	糸価安定融資担保生糸買収法・糸価安融資損出善後処理法公布（滞貨生糸政府買上実施（約10万表））	
7 23	政府；生糸需要増進調査会設置	
9 7	蚕糸業法公布（製糸業の免許制；営業製糸、組合製糸）	
10 20	製糸業法施行	
11 20	臨時海外生糸市場調査事務所設置	
1933（昭和8）		
1934（昭和9）		
3 28	原蚕種管理法公布（原蚕種管理の国営化と品種統一）	輸出生糸30%出荷制限（9月まで、日本中央蚕糸会総会決議）
3	輸出生糸取引法公布（輸出生糸戸問屋の免許制）	帝国人絹（株）事件（株式買収疑獄事件）

11 1935（昭和10）	桑園整理改植助成（９万町分／３年）	全国乾繭販売購買組合連合会設立 養蚕実行組合組織率95.4％

典拠図書・引用文献

① 平凡社編（1997）：昭和・平成史年表．平凡社

② 岩波書店編（1991）：近代日本総合年表第三版．岩波書店

③ 児玉幸多編（2005）：標準日本史年表．吉川弘文館

④ 松本継男（2007）：衣笠繊研報．（11），35-41

⑤ 日本農業年鑑刊行会編（2000）：年表20世紀の日本農業．家の光協会

⑥ 農林水産技術情報協会監修（2000）：近代日本農業技術年表．農山魚村文化協会

⑦ 吉川弘文館編集部編（2007）：近代史必携．吉川弘文館

衣笠繊研報（2008）No.12, 67～74
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

カイコの環境情報受容応答（その２）

角田素行*

Environmental Signal Transduction in the Silkworm, *Bombyx mori* (No. 2)

Motoyuki SUMIDA*

*Center for Bioresources Field Science, Kyoto Institute of Technology, Ippongi-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

Abstract

In my No. 1 essay, the following discovery was introduced; dietary sucrose suppressed sucrase activity in the midgut of germfree, fifth instar silkworm larvae reared aseptically on an artificial diet after day 1 of the fifth instar onward until day 8. This phenomenon was interpreted as follows: sucrose introduced into the lumen of midgut functioned as an environmental signal to the midgut cells and as a response reaction of midgut cells sucrase was less produced. Mulberry leaves, a single natural diet for the silkworm larvae, contain about 3% sucrose by wet weight which is a product of photosynthesis. Photosynthesis is affected by environmental factors such as rain fall, carbon dioxide concentration, and solar irradiation. Thus amount of sucrose in mulberry leaves is an index of quality of environmental factors and represents environmental information.

An artificial diet supplemented with 6.9% sucrose suppressed midgut sucrase activity throughout the fifth larval instar to produce a low level of activity of midgut which was comparable to the activity of control larvae at day 1 of the fifth instar. A question was raised: does this low level of activity of midgut still produce enzymatic products from 6.9% sucrose, i.e., glucose and fructose? In other words, does the observed phenomenon of suppressed sucrase activity of midgut occur not by sucrose but by glucose or by fructose? Further studies disclosed that dietary 6.9% glucose or fructose suppressed sucrase activity of midgut to the similar extent as dietary 6.9% sucrose. The effect of dietary 6.9% glucose or fructose on midgut protein composition was different; suppression of protein synthesis by dietary glucose and both suppression and enhancement of protein synthesis by dietary fructose. It was concluded that dietary glucose or fructose suppresses midgut sucrase activity in the fifth instar silkworm larvae. Whether dietary sucrose affects midgut sucrase activity must be investigated by further studies.

Effect of dietary 6.9% glucose or fructose on sucrase activity in cells of anterior part of middle silk gland was studied using germfree fifth instar silkworm larvae. Dietary 6.9% glucose enhanced sucrase activity at early and late periods of the fifth instar. No effect of dietary 6.9% glucose was observed on the middle day of the fifth instar. Dietary 6.9% fructose gave no effect throughout the fifth instar. Dietary 6.9% glucose enhanced synthesis of some of the proteins in cells of anterior part of middle silk gland at early and late periods of the fifth instar.

Based on these results, studies were planned of signal transduction and its response reaction in cells of midgut and of an anterior part of middle silk gland using an organ culture system. However, which signal transduction model should be adopted was totally unknown. Incidentally, ChREBP, carbohydrate response element binding protein, was implicated to be involved in signal transduction in the silkworm, *Bombyx mori*, which may serve as a tentative paradigm for future studies.

Key Words：Dietary glucose or fructose, midgut, middle silk gland, sucrase activity, signal transduction, *Bombyx mori*

＊連絡先：京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町１、E-mail：sumida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0735

1.「その1」のまとめ

財団法人衣笠会繊維研究所研究報告第11号の解説「その1」[1]で、「カイコの幼虫が卵から孵化する前にクリーンベンチ中で4％ホルマリンに15分間、卵を浸漬し卵表面を滅菌した後、卵表面を充分乾燥し滅菌シャーレに入れてその中で孵化させて作出した無菌カイコの1令幼虫を、4令幼虫の終わりまで無菌人工飼料育し、5令幼虫の始めからショ糖を添加した無菌人工飼料を無菌環境下で食下させると、中腸のショ糖分解酵素活性は変化するか？」という課題を作り実験した。その結果、5令幼虫の異なる発育時期に異なる効果が観察された[2]。一つは5令幼虫になってから24時間以内の効果であり、3％ショ糖を連続して食下させると中腸のショ糖分解酵素活性は対照区に比べて有意に上昇した。もう一つは5令幼虫になってから24時間以降、5令8日の吐糸開始までの間の効果であり、1.5%から6.9%までのショ糖を連続して食下させると、中腸のショ糖分解酵素活性は対照区で認められる発育に伴う活性上昇を有意に抑制することが分かった。活性抑制の程度はショ糖濃度の上昇に比例して増大した。

無菌カイコの5令幼虫に食下させたショ糖が異なる発育時期に中腸のショ糖分解酵素活性に異なる効果を示す理由は、中腸の細胞がカイコの5令幼虫の発育に連動して分化することによるものと推察した。

この実験では無菌カイコの幼虫を使用したので、無菌カイコの幼虫が食下したショ糖は中腸細胞によって吸収されて代謝されたと考えられた。無菌カイコの幼虫の中腸の内腔に腸内細菌は生息しておらず食下されたショ糖が腸内細菌によって消費される心配はなかったからである。

そして当面の研究課題として、カイコが5令幼虫になってから24時間以降、5令8日までの間に無菌カイコの幼虫が食下したショ糖によって中腸のショ糖分解酵素活性が抑制される理由を追求することにした。これは5令24時間以降8日までの幼虫時期がカイコがクワの葉を大量に食下して絹糸腺でシルクタンパク質をさかんに生合成し、絹糸腺内腔に分泌して蓄積する時期に当たるためであり、この発育時期のショ糖の効果を追求することが重要であると考えたからである。

ショ糖はクワの葉中に湿重量にして約3％含まれている。無菌カイコの5令幼虫が食下したクワの葉中のショ糖は中腸細胞において吸収されて代謝されるのみならず、ショ糖自身が無菌カイコの幼虫に環境情報を伝達する信号物質として中腸細胞に働くのではないか。これに対する無菌カイコの幼虫の中腸細胞の応答反応としてショ糖分解酵素の生成量を変化させるのではないかと考えた。

クワの葉中のショ糖は、クワの葉が光合成をした結果産生した炭水化物である。光合成は、水、炭酸ガス、太陽光エネルギーをもちいて実現される化学反応であり、クワの葉中のショ糖含量は、降水量、炭酸ガス濃度、日照などクワの葉が置かれた環境情報を反映している。カイコはクワの葉を食下して中腸細胞においてクワの葉中のショ糖濃度を感知し、いわゆる sugar sensing を行い、間接的に降水量、炭酸ガス濃度、日照など食下したクワの葉が光合成をした時点の環境情報を受容していると考えられる。これに対するカイコの応答反応として中腸細胞のショ糖分解酵素の生成量を調節すると考えた。

2.「その1」の研究が提起した新たな研究課題

6.9%のショ糖を添加した人工飼料を全5令幼虫期間の8日間を通じて食下させつづけた無菌カイコの中腸のショ糖分解酵素活性は、5令1日の低い活性水準を維持して、5令8日の吐糸開始に至った。この5令1日のショ糖分解酵素活性の水準は、対照区の無菌カイコの活性水準とほぼ同じであった。つまり、6.9%のショ糖を添加した人工飼料を全5令幼虫期間の8日間を通じて食下させつづけた無菌カイコは、対照区の無菌カイコの5令1日の低い活性水準を5令幼虫期間を通じて維持し続けた。注目すべき点は、低い活性水準とはいえ、この0でない活性は、かなりの活性であった点である。いいかえれば、6.9%のショ糖を食下

させたカイコの中腸の内腔に入ったショ糖は中腸細胞に局在するショ糖分解酵素によって加水分解されてブドウ糖と果糖が産生されていたはずである。したがって6.9%のショ糖によって中腸のショ糖分解酵素活性が抑制されて低水準の活性が維持された現象は、本当にショ糖が引き起した現象であったかという疑問が出てくる。低いけれども活性が認められたショ糖分解酵素によって、食下されたショ糖が加水分解されて産生されたブドウ糖、あるいは果糖が引き起した現象ではないのか。

ここに、「その１」の研究を開始する時には想像もしなかった「無菌カイコの５令幼虫にブドウ糖又は果糖を食下させると中腸のショ糖分解酵素活性は対照区で認められる発育に伴う活性上昇を抑制するか？」という課題を設定し、その答えを得ることが必要となった。

３．ブドウ糖の効果

ブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中腸のショ糖分解酵素活性を調査した。「その１」で実施した実験設定のうち、ショ糖をブドウ糖に置き換えた。ブドウ糖の濃度は０％と6.9%の２区を設定した。それぞれ対照区と試験区である。結果の予想は全く出来なかった。カイコに尋ねてみるという気持ちで実験に臨んだ。その結果、驚いたことに6.9%のブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中腸のショ糖分解酵素活性は対照区で認められる発育に伴う活性上昇を有意に抑制した。これは、6.9%のショ糖と同様の抑制効果であった。抑制の程度も同様であった。抑制効果が５令１日から５令８日まで持続する点も同様であった。

４．果糖の効果

上で述べたようにブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中腸のショ糖分解酵素はショ糖を食下させた時と同様の効果、すなわちショ糖分解酵素の活性抑制効果を示した。いずれにしてもポジティブな結果が得られた。次に果糖の効果を調査するに当って気楽に実験を進めることができた。果糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中腸のショ糖分解酵素活性がどのような変化を示すか予想がつかなかった点はブドウ糖の実験を行った時と同様であった。再度カイコに尋ねてみた。

「その１」で実施した実験設定のうち、ショ糖を果糖に置き換えた。果糖の濃度は０％と6.9%の２区とした。それぞれ対照区と試験区である。その結果、またまた驚いたことに6.9%の果糖を無菌カイコの５令幼虫に食下させた時、中腸のショ糖分解酵素活性は、6.9%のショ糖とほぼ同様の効果、対照区で認められる発育に伴う活性上昇を抑制した。抑制の程度も同様であった。抑制効果が５令１日から５令８日まで持続する点も同様であった。

５．あらためて問う、ショ糖は中腸のショ糖分解酵素活性を抑制するか

ブドウ糖又は果糖の効果はいずれも無菌カイコの５令幼虫に食下させた時、中腸のショ糖分解酵素活性について対照区で認められる発育に伴う活性上昇を抑制した。抑制の程度も似ていた。抑制効果が５令１日から５令８日まで持続する点も似ていた。以上２つの実験からショ糖を食下させた時に観察された無菌カイコの５令幼虫の中腸のショ糖分解酵素の活性抑制現象は、ショ糖の分解産物であるブドウ糖と果糖によってもたらされたと結論づけた。その理由は食下させたショ糖は低いけれども活性を示す中腸のショ糖分解酵素によって加水分解されてブドウ糖と果糖が産生されていると考えられること、また実際にブドウ糖又は果糖は、それぞれ単独で中腸のショ糖分解酵素活性について対照区で認められる発育に伴う活性上昇を抑制したからである。では、ブドウ糖と果糖それぞれ一分子からなる二糖のショ糖はカイコの中腸のショ糖分解酵素の活性抑制をするであろうか。この答を得るためにはショ糖に類似した化合物であってカイコの中腸細胞のショ糖分解酵素が分解出来ない二糖類類縁化合物を使った新たな実験が必要である。

6．ブドウ糖又は果糖は中腸の構造タンパク質の生合成に対して似た効果を示すか

中腸のショ糖分解酵素活性を指標に用いてブドウ糖と果糖の効果を調べると似た効果が観察された。それでは、「中腸の構造タンパク質の生合成を指標に用いた場合、ブドウ糖と果糖は似た効果を示すか？」という課題を作った。日常的にカイコの中腸や絹糸腺の構造タンパク質の組成をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いて分析していたので、この課題の答を知りたくなったのである。

ブドウ糖又は果糖をそれぞれ添加した人工飼料を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中腸を磨砕して遠心し、遠心上清画分と沈殿画分のそれぞれについてSDS-PAGEによってタンパク質を分析した。その結果、ブドウ糖と果糖はカイコの中腸の構造タンパク質の生合成に異なる効果を示すことが分かった。

すべての構造タンパク質を分析した訳ではなく、７％ゲルを用いた一次元のSDS-PAGEによって同定出来たタンパク質に限って分析した。ブドウ糖は、数種類のタンパク質バンドの染色度を対照区に比べて有意に低下させた。つまり生合成を抑制したと考えられた。これに対して果糖は、数種類のタンパク質バンドの染色度を有意に低下させた。これに加えて別の数種類のタンパク質バンドの染色度を有意に上昇させた。つまり生合成を促進すると考えられた。ブドウ糖と果糖がそれぞれ生合成を抑制する中腸の構造タンパク質バンドのうち同じ移動度を持つタンパク質バンドは認められなかった。ここに至ってブドウ糖と果糖がカイコの中腸に及ぼす効果が異なる場合があることが分かった。

以上の結果からブドウ糖と果糖は中腸細胞の構造タンパク質の生合成に関して一般に異なる効果を示すと考えられた。種々の酵素タンパク質についても一般に異なる効果を示すと考えられる。しかし、中腸細胞で生合成される酵素タンパク質のうちショ糖分解酵素に着目した場合は、ブドウ糖と果糖はそれぞれ生合成を抑制する効果を示し、抑制の程度も似ていた。その結果、類似の活性抑制効果が観察されたと解釈された。

7．ショ糖分解酵素活性を示すカイコのもう一つの器官、中部絹糸腺

ショ糖分解酵素活性といえば、もう一つ活性を示す器官がカイコで知られていた。絹糸のもとになるシルクタンパク質を生合成する器官、絹糸腺である。絹糸腺は、後部絹糸腺、中部絹糸腺、前部絹糸腺の３つの部分からなる器官である。後部絹糸腺はシルクタンパク質の一つ、フィブロインを生合成し、絹糸腺内腔に分泌して蓄積する。中部絹糸腺は、もう一つのシルクタンパク質、セリシンを生合成し、絹糸腺内腔に分泌して蓄積する。中部絹糸腺はその形態からさらに、前区、中区、後区の３つの部分に区分される。前区、中区、後区ではそれぞれ*Ser2*、*Ser1*、*Ser1*遺伝子を発現し、中区と後区の*Ser1*遺伝子はそれぞれ選択的なスプライシングによって異なるmRNAを生合成する。その結果、３種類のセリシンタンパク質を生合成して絹糸腺内腔に分泌して蓄積する。そのうち中部絹糸腺前区に、生理学的意義は不明であるが、ショ糖分解酵素活性が認められていた。カイコを含めた昆虫の体液中の主要な血糖はブドウ糖２分子からなるトレハロースであり、ショ糖ではない。カイコの幼虫の体液中にショ糖が存在することは知られていない。カイコの幼虫の中部絹糸腺前区に局在するショ糖分解酵素は生理学的基質が明らかでない酵素であった。

これまでブドウ糖、果糖が中腸のショ糖分解酵素活性に及ぼす効果を調べてきた。そこで中部絹糸腺前区に活性を示すショ糖分解酵素が局在するのであれば、ブドウ糖又は果糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫において活性がどうなるかを知りたいというのは自然な発想である。

新たに研究室の修士の学生となった吉田恭子（ゆきこ）さんが、ブドウ糖又は果糖が中部絹糸腺前区のショ糖分解酵素活性に及ぼす効果を調べたいと言った時、私はこの課題を研究テーマとすべき

かどうか躊躇した。学生に与える研究テーマは、結果が何らかの形で出ることが予め指導教員に分かっていなければならない。そうでなければ学生は勿論のこと、指導教員にも実験結果の考察が出来ず、結局のところ研究を一区切りのところまで持って行くことが出来ないからである。私はこれまで予備実験によって何らかの形で結果が出ることを確かめたテーマのみを学生に渡してきた。中部絹糸腺前区のショ糖分解酵素については不幸にして、まだ予備実験をしていなかった。

振り返ってみれば私も一度は中部絹糸腺のショ糖分解酵素活性にブドウ糖又は果糖が効果を及ぼすかという課題を考えてみた。その結果、効果がないだろうと思った。無菌カイコの５令幼虫に食下させたブドウ糖又は果糖は、中腸の内腔に入る。そこで中腸細胞に吸収され中腸細胞中で代謝されて別の物質に変換されるであろう。ブドウ糖又は果糖のうち一部はそのまま体液中に運ばれるかもしれない。中腸細胞から体液中に運ばれた代謝産物やブドウ糖又は果糖は、中部絹糸腺前区の細胞の表面に到達するであろう。しかし中部絹糸腺前区の細胞にたいして、代謝産物やブドウ糖又は果糖は、そもそも信号として働くであろうか。体液中に運ばれた代謝産物あるいはブドウ糖又は果糖の濃度は信号として働くのに充分であろうか。もし変化が観察されたとして、観察される現象の再現性は充分あるであろうか。このような心配があった。

しかし、吉田さんのこの課題に対する興味と研究意欲は大きく、どうしても実験をしてみたいという。そこで実験をしてみてポジティブな結果が得られない時は、新たな研究テーマを設定して研究をやり直すという方針をつくり、中部絹糸腺の実験に臨んだ。

課題は、「無菌カイコの５令幼虫にブドウ糖又は果糖を食下させると中部絹糸腺前区の細胞のショ糖分解酵素活性は変化するか？」であった。

８．ブドウ糖又は果糖が無菌カイコの５令幼虫の中部絹糸腺前区の細胞のショ糖分解酵素活性に及ぼす効果

この実験では、５令幼虫の０日から８日まで毎日絹糸腺を採取して磨砕し、絹糸腺細胞の磨砕液を調製することが必要であった。５令幼虫期の初期では何も問題はない。しかし５令３日以降、後部絹糸腺では活発なフィブロインの生合成と絹糸腺内腔への分泌と蓄積が始まる。中部絹糸腺では活発なセリシンの生合成と絹糸腺内腔への分泌と蓄積が始まる。このようにして２種類のシルクタンパク質を大量に蓄積した絹糸腺は、磨砕して絹糸腺細胞の磨砕液を調製することは不可能となる。ホモゲナイザーを用いて絹糸腺全体を磨砕している途中で絹糸腺の腺腔にあった大量のシルクタンパク質のフィブロインとセリシンにホモゲナイザーのモーターの回転によって生ずる応力がペッスルを通じて加わり、フィブロインとセリシンはたちまち凝固して固形化し、それ以後ペッスルを上下動することが不可能になるからである。

この困難を回避するために私たちがここ20年間にわたって絹糸腺のシルクタンパク質分解酵素、フィブロイナーゼを研究してきた蓄積が役立った。フィブロイナーゼを研究する過程でフィブロインとセリシンを多量に腺腔に蓄積した絹糸腺全体を磨砕して絹糸腺細胞の磨砕液を調製する必要があった。試行錯誤の末に、磨砕法を一つ開発した。この磨砕法を使えば絹糸腺全体からはもちろんのこと、中部絹糸腺前区から絹糸腺細胞の磨砕液を調製することも何の問題もなかった。

最初の実験では、中腸と絹糸腺全体を試料として採取し、それぞれのショ糖分解酵素活性を測定した。こうすればブドウ糖又は果糖の効果が確かに中腸に及んでいる無菌カイコの個体を使って絹糸腺に対してどのような効果が及んでいるかを調査することが出来るからである。

6.9%のブドウ糖の効果を調査した結果、またもや驚くべき現象が見つかった。まずブドウ糖が中腸のショ糖分解酵素活性に及ぼす効果の再現性を確認した。つまりブドウ糖を食下させた無菌カイ

コの５令幼虫の中腸は５令１日のショ糖分解酵素の活性水準を維持して５令８日の吐糸開始に至った。では絹糸腺の活性はどうなるであろうか。ブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の絹糸腺全体のショ糖分解酵素活性は、５令前期の３日と後期の７日にそれぞれ一つずつの活性ピークを示し、この活性ピークの水準は明らかに対照区の活性水準よりも高かった。つまり、活性化効果を示した。５令中期の５日は試験区と対照区の活性水準が同じであり、活性化効果は認められなかった。ここに至って無菌カイコの５令幼虫のブドウ糖の食下が中部絹糸腺前区の細胞のショ糖分解酵素の活性化につながるという中腸では５令24時間以内の時期を除いては決して認められなかった変化の方向性を持った活性変化を観察することが出来た。また絹糸腺の酵素の活性の値について目立った特徴が認められた。ブドウ糖を食下させた実験区の無菌カイコの５令幼虫の絹糸腺のショ糖分解酵素活性は個体差が大きかった。５令幼虫期間を通じて大きなばらつきが認められた。これは同じ実験者が中腸のショ糖分解酵素活性を測定した場合、個体別の活性測定値は有意にある狭い範囲内にばらつきが収まったことと対照的な結果であった。以上の結果から、ブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫において体液中を運ばれて中部絹糸腺前区の絹糸腺細胞に到達する信号物質の濃度は個体ごとに大きな差異があるものと推察された。

二番目の実験では、試料の採取は中腸と中部絹糸腺とした。中部絹糸腺を試料に用いた場合にも絹糸腺全体を用いた場合と同様の結果が得られた。

以上の結果からブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中部絹糸腺前区の細胞のショ糖分解酵素は、５令幼虫前期と後期に活性の促進されることが明らかとなった。

では次に、果糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中部絹糸腺前区の細胞のショ糖分解酵素活性はどのような変化を示すであろうか。すでに述べたように、ブドウ糖又は果糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中腸の構造タンパク質の組成は異なっていた。この結果を踏まえると、中部絹糸腺前区の細胞のショ糖分解酵素活性は果糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫ではブドウ糖を食下させた場合とは異なる変化を示すかもしれない。予想通りというべきか、結果は果糖の場合は、ブドウ糖の場合とは異なった変化を示した。変化無しであった。

こうして、対象となる器官は中腸ではなく中部絹糸腺前区であり、ショ糖分解酵素活性を生物学的指標として用いると、明確に無菌カイコの５令幼虫に食下させたブドウ糖と果糖の間で異なる効果が見いだされる場合があることが分かった。

ではブドウ糖を食下させた無菌カイコの５令幼虫の中部絹糸腺前区の細胞の構造タンパク質の組成は何らかの変化を示すであろうか。実験の結果、ブドウ糖の食下は中部絹糸腺前区の細胞の数種類の構造タンパク質の生合成を促進することが示唆された。

９．無菌カイコの５令幼虫の中腸と絹糸腺という２つの器官の細胞に局在するショ糖分解酵素を生物学的指標として用いたブドウ糖、果糖による細胞内信号伝達経路の研究

無菌カイコの５令幼虫から得られる中腸と中部絹糸腺前区という２つの器官の細胞を利用することによって、sugar sensing とそれにもとづく細胞の応答反応の研究を行うための有望な実験系を構築出来る可能性が示された。これもまた「その１」で研究を始める前には予想もしていなかった新たな展開であった。Sugar sensing とその応答反応の起こるしくみの解明というまさにカレントな生物学上の研究課題に、古き良き生物であるカイコを使って挑戦することが出来る可能性がある。

10. 今後の実験計画

１）無菌カイコの５令幼虫から無菌的に絹糸腺を取出して、器官培養系に移して、培養液に添加したブドウ糖の効果を調べる。

２）無菌カイコの５令幼虫から無菌的に中腸を

取出して、器官培養系に移して、培養液に添加したブドウ糖又は果糖の効果を調べる。

3）中腸の形質を示す培養細胞系統を用いて、細胞培養系を使ってブドウ糖又は果糖の効果を調べる。

以上のような実験を計画して実験を始めた。

カイコを含めた昆虫の血管系は解放血管系であり体内諸器官は体液に浮遊した状態で機能している。これは昆虫を材料とする研究にとって、とりわけ器官培養系を利用して実験をすすめるとき、大変有利な状況となる。器官培養そのもの自体が昆虫が生きている状況を再現するからである。さらに器官培養に使用する昆虫の器官は、本研究のようにカイコの無菌人工飼料育システムによって作出された無菌カイコを使用する場合、クリーンベンチ中で採取した器官をただちに器官培養に持って行ける。しかし根本的な問題が残されていた。それは糖を感知してそれに応答するしくみを明らかにすると言っても、どのような信号伝達系をモデルとして想定し研究を進めていったらよいかということが私自身明確でなかったのである。

11. 思いがけないきっかけ

新たに「生命科学」という講義を行う機会を与えられて、教科書として採用すべき本を探した。その過程で「図解入門　メディカルサイエンスシリーズ　よくわかる細胞生物学の基本としくみ」秀和システム刊行の井出利憲さんの本に出会った。p. 364で「グルコース自身による遺伝子発現制御」という題目が目に入った。LXR（Liver X receptor）という人間の肝臓の細胞核中において翻訳促進因子として働くタンパク質の紹介であった。このタンパク質に食物として取り込まれたブドウ糖が結合して肝臓における脂質代謝系の酵素の遺伝子発現を促進するという。この話の元のnatureの論文[3] はすぐに見つかった。読んでみるとなかなか面白い研究であった。さらにこの論文の後に出た関連する研究論文を読んだ。すると、上記のnatureに発表された論文は、ブドウ糖に反応しにくいガン細胞を実験材料として使用したなどの点で実験計画が適切でなく、ブドウ糖に充分反応性を示す培養細胞系を用いた新たな実験系を使って実験した結果、注目すべきはLXRではなく、ChREBP（Carbohydrate response element binding protein）であるという論文[4] に行き着いた。ChREBPがラットの肝臓から世界で初めて単離された論文[5] に示された興奮も味わった。

つまりChREBPは細胞内に取り込まれた炭水化物を感知して炭水化物代謝と脂質代謝に関わる酵素のプロモーター部分の特定の塩基配列（Carbohydrate response element）を認識して結合するタンパク質で、上記２つの代謝系に関わる酵素の遺伝子発現を誘導する翻訳促進因子である。肥満やいま注目されているメタボリック症候群の症状を改善するために検討すべき重要な標的の一つと考えられている。このタンパク質は哺乳動物のみならず、鳥類やキイロショウジョウバエ、線虫でも見つかっており、カイコの中部絹糸腺前区の細胞に局在してショ糖分解酵素の遺伝子発現の促進に関与しているかもしれない。５令24時間以内の中腸細胞でもその機能を発揮しているかもしれない。しかし、５令24時間以降５令８日までの中腸のショ糖分解酵素活性に対するブドウ糖又は果糖の効果は、活性促進ではなく、活性抑制である。ChREBPは遺伝子発現を誘導する翻訳促進因子であり、活性抑制とはどのような関わりを持つのであろうか。又は活性抑制にはChREBPは関与しておらず、その他のこれまでに知られていない異なった信号伝達経路または機構が働くのであろうか。このように現時点では、ChREBPの関与を考慮すれば、カイコの中腸と中部絹糸腺前区の細胞におけるブドウ糖又は果糖による細胞内信号伝達経路とその応答反応が簡単に理解出来るというようなストーリーを描くことは出来そうもない。しかしまた、そうであるからこそ、無菌カイコの５令幼虫の中腸と中部絹糸腺前区におけるChREBPの関与の可能性を検討しつつ、新たな機構の解明を目指してもよいように思われる。

哺乳動物の肝臓における脂質代謝の調節に関わる因子がもう一つ知られている。インシュリンである。つまりブドウ糖または過剰の炭水化物の摂

取によって肝臓細胞のChREBPが脱リン酸化され、その結果ChREBPが細胞質から細胞核内に移動し、炭水化物代謝と脂質代謝に関わる酵素の遺伝子のプロモーター近傍のDNAに結合して遺伝子発現を誘導し肝臓における代謝を脂質代謝が旺盛な状態に持って行く。同時にインシュリンが肝臓細胞のSREBPというもう一つの翻訳調節因子を活性化して、脂質合成にかかわる酵素系の遺伝子発現を誘導し、肝臓における代謝を一層、脂質合成が旺盛な方向に動かす。哺乳動物における肝臓の代謝変化には、このようにブドウ糖とインシュリンによる２つの信号系が存在する。

カイコではインシュリン様物質であるボンビキシンの存在が知られている。カイコの幼虫が食物として取入れたブドウ糖と、ボンビキシンがChREBPをまきこんで、カイコの中腸と中部絹糸腺前区の細胞において炭水化物代謝と脂質代謝を調節しているのであろうか。

また果糖を信号として利用するカイコの５令幼虫の中腸細胞における細胞内信号伝達系がもう一つ研究すべき昆虫の信号系として残されていることを忘れてはならない。

昆虫の免疫機構では自然免疫だけが機能しており、獲得免疫はないと言われている。この特性を利用して昆虫の自然免疫の研究は、昆虫以外の他の生物の免疫の研究、とりわけ哺乳動物や植物における自然免疫の仕組みの解明に大きな貢献をしてきた。ブドウ糖又は果糖による細胞内信号伝達系の研究においてもカイコを含めた昆虫の研究が大きな貢献をする可能性がある。

引用文献

［１］角田素行（2007）：カイコの環境情報受容応答（その１）．財団法人衣笠会繊維研究所研究報告11，43-48

［２］Sumida, M. and Ueda, H. (2007)：Dietary sucrose suppresses midgut sucrase activity in germfree, fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 76(1), 31-37

［３］Mitro, M., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A. and Saez, E. (2007)：The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219-223

［４］Denechaud, P.-D., Bossard, P., Lobaccaro, J.-M. A., Millatt, L., Staels, B., Girard, J. and Postic, C. (2008)：ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* 118(3), 956-964

［５］Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D. and Uyeda, K. (2001)：A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *PNAS* 98(16), 9116-9121

財団法人　衣笠会繊維研究所活動状況

1．平成20年度各種学会口頭発表および各種学会投稿論文（下線部は財団理事、評議員および著者）

1）口頭発表

武藤清佳・小谷英治・松本忠実・田辺　徹・齋藤磨希・森　肇：ハスモンヨトウ類細胞におけるRNA結合タンパク質（SfTRN-1）の発現解析．日本蚕糸学会第78回大会講演要旨集 p.73（2008）

田辺　徹・小谷英治・武藤清佳・松本忠実・齋藤磨希・森　肇：カイコにおけるTIA-1ホモローグ遺伝子（BmTRN-1）の機能解析．日本蚕糸学会第78回大会講演要旨集 p.71（2008）

田辺　徹・小谷英治・武藤清佳・加藤拓也・森　肇：カイコ培養細胞におけるBmTRN-1の遺伝子抑制が及ぼすバキュロウイルスのタンパク質生産への影響．日本蚕糸学会第64回九州支部・第74回関西支部合同支部大会昆虫機能利用学術講演会講演要旨集 p.37（2008）

片山 寿人・杉村 順夫・高野 良：クワ表皮細胞に蓄積する粘性多糖の糖鎖構造と生理的役割．平成20年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会　日本蚕糸学会第78回大会　講演要旨集 p.57．名古屋大．３月21日

片山寿人・杉村順夫・草刈眞一・辰巳　眞：クワ葉の巨細胞におけるストロンチウムの蓄積．平成20年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会　日本蚕糸学会第78回大会　講演要旨集 p.57．名古屋大．３月21日

大西祐作・間宮寛之・長岡純治・杉村順夫：カイコ中腸組織からのウレアーゼ結合タンパク質の分離．平成20年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会　日本蚕糸学会第78回大会講演要旨集 p.78．名古屋大．３月21日

馬場奈央登・杉村順夫・草刈真一・辰巳　真：クワ巨細胞におけるCdおよびZnの局在性．日本蚕糸学会第64回九州支部・第74回関西支部合同大会　発表講演集 p.29．九州大．11月14日

大西祐作・間宮寛之・長岡純治・杉村順夫：カイコ幼虫体内へ取り込まれるクワ葉タンパク質の同定．日本蚕糸学会第64回九州支部・第74回関西支部合同大会発表講演集 p.30．九州大．11月14日

Matsumoto, M., Kotani, E., Mutoh, S., Tanabe, T., Saito, M., Mori, H.：Molecular characterization of the TIA-1-like RNA-binding protein, BmTRN-1 of the silkworm, *Bombyx mori*. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biochemistry 2008 Nagoya（p.72）

Sugimura, Y., Nitta, I., Katayama, H., Nagaoka, S.：Biomineralization function in mulberry leaves. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology 2008 Nagoya. Abs. O-09, p.37.（2008）

Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y., Furusawa, T.：Molecular characterization of a c-DNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology 2008 Nagoya. Abs. Poster No.16, p.59.（2008）

Furusawa, T.：Keynote address；Development Sericultural Science and Technology, and silk products in Japan. Int. Workshop on Sericulture and Weaving Silk 2008, Abs.p.1.

2）各種学会投稿論文

（1）原著論文

Kato, Y.：A study on β-lactamase in hemolymph of *Bombyx mori*. J. Contemporary Human Life Science, Tezukayama University 4, 1-9（2008）

M. Sugimoto, H. Arai, Y. Tamura, T. Murayama, P. Khaengkhan, T. Nishio, K. Ono, H. Ariyasu, T. Akamizu, Y. Ueda, T. Kita, S. Harada, K. Kamei, and M. Yokode：Mulberry leaf ameliorates the

expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice. Atherosclerosis, in press

Muto, S., Matsumoto, E., Tanabe, T., Mori, H., Kotani, E.：Functional analysis of the gene of BmTRN-1, an RNA-binding protein homologous to mammalian TIA-1 from the silkworm, *Bombyx mori*：a study of it's overexpression and sub-cellular distribution during the baculovirus infection process. J. Insect Biotech. Sericol. 78：39-51（2009）

Muto, S., Tanabe, T., Matsumoto, E., Mori, H., Kotani, E.：Molecular Characterization of a TIA-1 like RNA-binding protein in the cells derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*（Lepidoptera：Noctuidae）. Bioscience Biotechnology and Biochemistry（2009, in press）

Katayama, H., Takano, R., Sugimura, Y.：Localization of mucilaginous polysaccharides in mulberry leaves. Protoplasma 233：157-163.（2008）

Katayama, H., Fujibayashi, Y., Nagaoka, S. and Sugimura,Y.：Ultrastructural and immunochemical features of the cell wall sac formed in mulberry（*Morus alba*）idioblasts. J. Plant Res. 121：201-205.（2008）

Furusawa, T., Fukamoto, K., Sakashita, T., Suzuki, E., Kakizaki, T., Hamada, N., Funayama, T., Suzuki, H., Ishioka, N., Wada, S., Kobayashi, Y. and Nagaoka, S.：Targeted Heavy-Ion Microbeam Irradiation of the Embryo But Not Yolk in the Diapause Egg of the Silkworm, *Bombyx mori*, Induces The Somatic Mutation. J. Rad. Res.,（submitted）.

Kazuhisa Yatsunami, Masatoshi Ichida, Satoshi Onodera. 1-deoxynojirimycin vontent and α-glucosidase inhibitory activity in leaves of 276 mulberry cultivars（*Morus spp.*）in Kyoto, Japan J.Nat. Med 62, 63-66, 2008

島袋順二・古澤壽治・杉村順夫：３段階培養によるケナフ胚軸組織からの個体再生．衣笠繊研報11：1-7.（2007）

篠崎秀雄、油野崇志、佐野義孝、松本継男：斃死ヤマトシロアリ、*Reticulitermes speratus*、から分離した *Serratia marcescens* の性状．環境動物昆虫学会誌19(3), 105-114（2008）

篠崎秀雄、油野崇志、佐野義孝、松本継男：ヤマトシロアリ、*Reticulitermes speratus*、の簡易飼育法．環境動物昆虫学会誌19(3), 141-144（2008）

一田昌利、冬虫夏草の培養とトレハロース、第12回トレハロースシンポジウム記録集 12-16、2008

一田昌利、八並一寿、小野寺敏、徳之島に自生する「シマグワ」と島で持続可能な健康増進の試み、総合医学論文集、第４集、68-73、2008.

一田昌利・岡 崇史・亀井加恵子、セリシン部タンパク質の解析－クマシーブリリアントブルー染色と銀染色法によるセリシンタンパク質の検出の相違－、衣笠繊維研究所報告、11、27-34、2008

八並一寿、一田昌利、小野寺敏、沖永良部島に自生する有望な桑資源と薬草・島の特産品について、Food Style Vol.12 No.2 77-82、2008

３）著書

Sugimura, Y., Nagaoka, S. Plant-herbivore interaction, with special reference to mulberry leaves and the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Physiology：New Research.(ed. R.P. Maes). Nova Science Publishers Inc., New York（2008）

衣笠繊研報（2008）No.12, 77～80
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

平成20年度 講演活動報告

「演　題」　ケナフ繊維細胞の発達と細胞壁多糖の特徴

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科教授
当財団　評議員　　杉村順夫

日時・場所　2008年９月３日　霞ヶ関ナレッジポータルスタジオ
対　象　者　繊維関連研究者および技術者
講演要旨　ケナフ茎に存在する繊維細胞の発達過程、微細構造、細胞壁多糖類の特徴を解説した。繊維細胞の集合体が師部組織部に形成され、規則性を持って発達する。繊維細胞は著しく肥厚化した２次細胞壁を持っており、その構成多糖の種類についても言及し、繊維品質が二次細胞壁の多糖成分と構造に依存することを示唆した。

『演　題』　ミニシンポジウム「植物・動物を対象とした無菌生物学の応用」
２．養蚕学における無菌生物学

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター　教授　角田素行

日時・場所　2009年１月24日　大阪市　住友クラブ
対　象　者　日本無菌生物ノートバイオロジー学会 会員
講演要旨　カイコの無菌人工飼料育法は、蚕糸試験場と京都工芸繊維大学繊維学部及び農場で独自に開発された。前者は、カイコの栄養要求、後者は「カイコはなぜクワしか食べないのか？」という浜村保次名誉教授の疑問の解明をめざした。後者では、クワの葉中に、誘引、かみつき、飲み込み因子を発見し、「人工飼料」をつくり、カイコを飼育した。しかし、カイコはカビの病気で全滅した。これが無菌人工飼料育法が開発される動機となった。

『演　題』　カイコの人工飼料飼育

財団法人　衣笠会　理事　古澤壽治

日時・場所　2008年10月26日～11月１日　中国・安徽農業大学
対　象　者　農学生命科学院教職員、学生６名
講演内容　カイコの人工飼料開発の歴史と昆虫工場でのカイコの大量飼育について話すとともに飼料調製、具体的な飼育方法に関する技術的指導を行った。

『演　題』　搭乗員訓練サイエンスブリーフィング（1）

財団法人　衣笠会　理事　古澤壽治

日時・場所　2009年1月14日　宇宙航空研究開発機構　筑波宇宙センター
対象者　NASA 宇宙飛行士4名（男性）　他5名
講演内容　カイコを用いた宇宙放射線被曝の総合的評価研究に関する研究目的を説明した。これに伴って、平成21年6月13日（予定）に打ち上げの蚕卵の取り扱い、国際宇宙ステーションでの卵の保護方法について具体的取扱いを訓練した。

『演　題』　搭乗員訓練サイエンスブリーフィング（2）

財団法人　衣笠会　理事　古澤壽治

日時・場所　2009年3月24日　宇宙航空研究開発機構　筑波宇宙センター
対象者　NASA 宇宙飛行士2名（女性）　他5名
講演内容　カイコを用いた宇宙放射線被曝の総合的評価研究に関する研究目的を説明した。これに伴って、平成21年6月13日（予定）に打ち上げの蚕卵の取り扱い、国際宇宙ステーションでの卵の保護方法について具体的取扱いを訓練した。

『演　題』　カイコの生体反応による長期宇宙放射線暴露の総合的評価
（平成20年度 ISS 科学プロジェクト年次評価）

財団法人　衣笠会　理事　古澤壽治

日時・場所　2009年3月26日　宇宙航空研究開発機構　宇宙開発研究本部（相模原）
対象者　評価委員20名　オブザーバー15名
講演内容　標記「演題」に関する2008年度の成果を発表した。1）2009年6月13日に打ち上げ予定のスペースシャトルへの卵の搭載、国際宇宙ステーションでの卵の保護、帰還の際の卵の保護、ケネディー宇宙センターから京都までの輸送に関するシミュレーション実験結果、宇宙放射線が遺伝子に及ぼす影響に関する予備的実験結果などについて発表し評価を受けた。特にカイコ孵化幼虫からガン抑制遺伝子 p53を検出し、これを宇宙放射線影響の指標に用いることを新たに実験項目に設定したことに対し、本プロジェクトのレベルアップを図っていると評価された。

『演　題』　Integrated Assesment of Long-term Cosmic Radiation through Biological Responses of the silkworm, *Bombyx mori*, in Space
(Inc 19 & 20 サイエンスシンポジウム)

財団法人　衣笠会　理事　古澤壽治

日時・場所　2009年３月５日　宇宙航空研究開発機構　筑波宇宙センター
対　象　者　全世界宇宙実験関係者
講演内容　NASAをシンポジウム本部として、これを介してインターネットで講演内容が伝達された。講演内容は2009年６月13日に国際宇宙ステーションにカイコの卵を搭載するが、そこで実施される実験内容を説明、公開した。内容は、宇宙放射線被曝と突然変異、微小重力下での蚕胚の発生（特に反転運動）、胚発生中の遺伝子発現に及ぼす宇宙放射線の影響、これらの実験結果を踏まえ、宇宙開発に携わるヒトの宇宙放射線防護に役立てることをアピールした。

『演　題』　クワとカイコのお話し

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター准教授
財団法人　衣笠会　評議員　一田（髙濱）昌利

日時・場所　平成20年６月13日　京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター
対　象　者　京都市立室町小学校３年生
講演内容　小学校の総合学習の一環として、クワとカイコの歴史、特徴、利用などの話しを行うとともに、クワやカイコの機能性、シルクの機能性などについて講演した。

『演　題』　クワとカイコのお話し

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター准教授
財団法人　衣笠会　評議員　一田（髙濱）昌利

日時・場所　平成20年６月20日　京都市立東山小学校
対　象　者　京都市立東山小学校３年生及びその保護者
講演内容　小学校の総合学習の一環として、カイコの飼育に取り組み、その結果を基にクワとカイコの歴史、特徴、利用などの話しを行うとともに、クワやカイコの機能性、シルクの機能性などについて講演した。

『演　題』　クワの特徴と徳之島に自生するシマグワ

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター准教授
財団法人　衣笠会　評議員　一田（高濱）昌利

日時・場所　平成20年８月25日　徳之島町役場
対　象　者　徳之島町役場職員、徳之島町民
講演内容　徳之島にはシマグワが数多く分布しているが、一般的なクワの特徴を解説するとともに、クワが持つ機能性を解説した。併せて、徳之島に分布するシマグワの特徴についても講演した。

『演　題』　クワの特徴と沖永良部島に自生するシマグワ

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター准教授
財団法人　衣笠会　評議員　一田（高濱）昌利

日時・場所　平成20年８月25日
対　象　者　知名町役場
講演内容　沖永良部島にはシマグワが数多く分布しているが、一般的なクワの特徴を解説するとともに、クワが持つ機能性クワ乾燥粉末作成法を解説した。併せて、知名町に分布するシマグワの特徴についても講演した。

衣笠繊研報（2008）№12. 81～86
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

平成20年度　財団法人 衣笠会「繊維学術賞」報告

平成20年度繊維学術賞の候補者が、「財団法人 衣笠会 繊維学術賞実施要領」に基づき選考された。選考委員会では本賞に該当する候補３件挙げられ、そのうち２件が衣笠会理事会に推薦され、３月25日開催の理事会で、平成20年度受賞課題として承認された。

なお、授賞式は３月25日午後３時より、当財団理事、監事、および京都工芸繊維大学教員出席のもと開催され、賞状楯ならびに記念品が授与された。

Ⅰ．受賞課題：カイコ二本鎖 RNA 分解酵素の分子特性と遺伝子発現に関する研究

１．受賞者：博士（学術）有松祐治氏　（日東紡メディカル開発センター・
バイオメディカル研究所研究員）

２．研究内容

カイコの消化液には細胞質多角体病ウィルスのゲノムである二本鎖 RNA（CPV-dsRNA）や合成核酸基質である Poly(I)・Poly(C) を分解する酵素が存在する（Furusawa *et al.*, 1993）ので、本研究ではカイコ消化液二本鎖 RNA 分解酵素（Bm-dsRNase）の１）酵素学的性質、２）Bm-dsRNase の遺伝子解析とプロセッシング、３）５齢幼虫期における消化管での生成・局在性とプロセッシングを明らかにした。

１）Bm-dsRNase の酵素学的性質

カイコ消化液二本鎖 RNA 分解酵素（Bm-dsRNase）を Poly(I)・Poly(C) に対する分解活性を指標にイオン交換（CM-Sepharose）、ゲルろ過（Superdex 75）、アフィニティー（Poly(I)・Poly(C)-Agarose）の各種クロマトグラフィーを用いることによって精製した。本酵素は41 kDa の単量体タンパク質で、Mg^{2+} イオン存在下において活性化され、pH 8.0から pH 11.0まで上昇を続けた。また、Bm-dsRNase は天然核酸基質である CPV-dsRNA に対して最も高い親和性を示し、次いでウシ胸腺 DNA、カイコ中腸 RNA、Poly(I)・Poly(C) の順であった。

２）Bm-dsRNase の遺伝子

Bm-dsRNase 遺伝子は1350の塩基対より成り、その ORF には449個のアミノ酸がコードされていた。Bm-dsRNase はアミノ酸配列の持つ特徴的な性質や、精製タンパク質のＮ末端アミノ酸配列の結果と合わせて考察すると、Signal peptide、N-terminal propeptide、Mature region の３つの領域に分類することができた。このことは Bm-dsRNase が前駆体タンパク質として合成され、翻訳後プロセッシングにより、Signal peptide と N-terminal peptide が内生的 Serine protease によって特異的に切断され、活性型 dsRNase へと変換されると推察した。

また、Bm-dsRNase のアミノ酸配列を既知のタンパク質と比較すると、*Serratia* dsRNase の活性部位と高い相同性を示す配列が存在することが明らかになった。さらに、Bm-dsRNase は *Serratia* dsRNase と比較すると塩基性アミノ酸である Arg 残基が高い割合で含まれており、高い等電点（pI. 10）をもっていることから、アルカリ条件下では構造的に安定であることが推察された。

３）Bm-dsRNase の５齢幼虫期における発現パターンとプロセッシング

Bm-dsRNase の mRNA、およびタンパク質合成の幼虫体内における発現パターンについて解析した。その結果、Bm-dsRNase はカイコ幼虫の中腸組織の中部および後部において局所的に合成されていることが明らかになった。そして、幼虫期の５齢１日目から開始され、３日目にピークに達し、吐糸期開始時期には終了していた。

一方、中腸組織中部における Bm-dsRNase タンパク質は45 kDa と41 kDa の２種類が検出された。このことから Bm-dsRNase は前駆体タンパク質（45 kDa）として合成され、翻訳後プロセッシングにより活性型の Bm-dsRNase（41 kDa）へと変換すると推測した。

さらに、このことの確証を得るために Bm-dsRNase の N-terminal propeptide と Mature region の間の Arg-Ser サイトを標的に分解するトリプシンをプロセッシングプロテアーゼとして用い、部分的に精製した45 kDa タンパク質を処理した。その結果、45 kDa タンパク質が41 kDa タンパク質へと変換すると共に dsRNase 活性の上昇が認められた。これらの結果から、中腸組織で特異的に合成された Bm-dsRNase は、中腸皮膜内腔側でプロセッシングを受けることによって活性化され、さらに活性化された41 kDa タンパク質は消化液へと分泌され、消化管内腔での核酸分解に関わるものと推察した。

［発表論文］

Arimatsu, Y., Furuno, T., Sugimura, Y., Togoh, M., Ishihara, R., Tokizane, M., Kotani, E., Hayashi, Y. and Furusawa, T. (2007)：Purification and properties of double-stranded RNA-degrading nuclease, dsRNase, from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericol., 76, 57-62.

Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y. and Furusawa, T. (2007)：Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. Mol. Biol., 37, 176-183.

Huang, J., Arimatsu, Y., Sadakane, K., Endo, Y. and Furusawa, T. (2005)：Gene expression and localization of trehalase during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. Int. J. Wild Silkmoth and Silk, 10, 17-26

［研究発表］

有松祐治、古野哲生、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：カイコ消化液に含まれる dsRNase の特性．日本蚕糸学会第70回学術講演会、東京大学農学部、講演要旨集 p.28、2000年４月４日～５日

有松祐治、古野哲生、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：カイコ消化液に含まれる二本鎖 RNA 分解酵素の cDNA クローニング．第66回日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会、合同研究発表会、神戸大学農学部学舎神戸大学瀧川記念学術交流会館、講演要旨集 p.8、2000年11月11日～12日

有松祐治、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：カイコ消化液ヌクレアーゼの一次構造解析．日本蚕糸学会第71回学術講演会、農林水産技術会議事務局筑波事務所、講演要旨集 p.26、2001年３月22日～23日

有松祐治、古野哲生、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：カイコ消化液ヌクレアーゼの酵素学的性質について．第67回日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会、合同研究発表会、帝塚山大学学園前キャンパス、講演要旨集 p.17、2001年11月10日～11日

有松祐治、古野哲生、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：カイコ消化液ヌクレアーゼの天然基質に対する親和性．日本蚕糸学会第72回学術講演会、九州大学、講演要旨集 p.84、2002年４月３日～４日

有松祐治、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：カイコ消化液アルカリ性 RNase の大腸菌での発現について．日本蚕糸学会第68回関西支部・平成14年度九州支部、合同研究発表会、京都府網野

町アミティ丹後、講演要旨集 p.47、2002年10月26日～27日

有松祐治、小谷英治、杉村順夫、宮田清司、古澤壽治：カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて．日本蚕糸学会第74回学術講演会、岩手大学学生センター棟、講演要旨集 p.49、2004年３月29日～30日

有松祐治、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：「カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて．日本蚕糸学会第69回関西支部・第59回九州支部、合同研究発表会、京都工芸繊維大学繊維学部、講演要旨集 p.14、2003年10月24～日25日

有松祐治、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：「カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて（第３報）．日本蚕糸学会第70回関西支部・第60回九州支部、合同研究発表会、九州大学創立50周年記念講堂、講演要旨集 p.29、2004年11月25日～26日

有松祐治、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：「カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて（第４報）．日本蚕糸学会第75回学術講演会、東京大学農学部、講演要旨集 p.62、2005年４月３日～４日

有松祐治、古澤壽治、鈴木英子、野島久美恵、長岡俊治、永松愛子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭：カイコ胚発育期の遺伝子発現に及ぼす重粒子線の影響．日本宇宙生物科学会第19回大会、東京大学・駒場キャンパス・数理科学研究科大講堂室、プログラム・予稿集 p.43、2005年９月29日～30日

古澤壽治、有松祐治、鈴木英子、長岡俊治、野島久美恵、永松愛子、石岡憲昭：カイコ個体での形質および遺伝子発現による重粒子線影響解析．日本放射線影響学会第48回大会・第１回アジア放射線研究会議、広島国際会議場、講演要旨集 p.139、2005年11月16日～17日

有松祐治、古野哲生、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治：「カイコ消化液に含まれる dsRNase の精製法の改善．第65回日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会、合同研究発表会、徳島県徳島市徳島県郷土文化会館、講演要旨集 p.9、1999年11月24日～25日

Ⅱ．受賞課題：A Comparative Study of Thai Matmii and Japanese Kasuri
（タイのマットミーと日本の絣の比較研究）

１．受賞者：Ph.D.（Culture Science）行松啓子氏

（タイ王立マハサラカム大学・東北タイ文化芸術研究所、
International Relations Office 職員）

２．研究内容（英文に続いて、日本語要約を掲載した）

The technique used in making Japanese silk Kasuri, a silk textile woven with dyed yarn, is similar to the technique used in making the Thai-Lao equivalent "Matmii". Both techniques produce a style of silk cloth called pongee in English or *Tumugi* in Japanese. The style involves weaving with rough fibers dyed specifically to create patterns and images in the textile. Local weavers with knowledge of community customs and traditions use this technique to create the various patterns in a repetitive process that has developed over centuries. This study explores and compares the significant social and cultural differences between the Japanese and Thai weavers, and how these differences are reflected in their textiles. The textiles studied are the Thai-Lao silk Matmii from Maha Sarakham Province in northeastern Thailand and the silk *Tumugi* Kasuri called Ushikubi *Tumugi* from Ishikawa Prefecture in Japan. This study examines the social and cultural indigenous

knowledge of Thai Matmii and Japanese Kasuri society and determines how such knowledge is transferred to the new generation that is imbued with its own set of cultural and social standards.

The objectives of the research were to study the cultural and historical background of Thai Matmii and Japanese Kasuri ; undertake a comparative study of Thai Matmii and Japanese Kasuri in six aspects : patterns or designs, materials, local wisdom, cultural values, process of producing and beliefs ; and study the added values of each textile.

This research results were derived from three research questions :

1) What is the cultural and historical background of Thai Matmii and Japanese Kasuri? The cultural and historical background of both textiles influences their individual identities and development. 2) What are their similarities and differences between Thai Matmii and Japanese Kasuri? Both textiles were originally created as "clothing" for local people, and both possessed the local wisdom and local identity common to their production area. Though they may have shared similar weaving techniques, the process of their development, the customs of each country, and their unique environments contributed the differences found in the final product. 3) What are their added values? Added value is measured according to 6 categories : commercial value, social value, cultural value, aesthetic value, inspirations value, and environmental value. The added value is created from the functions of each textile ; they have an impact on society and produce the image of the textile. Both textiles are rooted in local society as traditional crafts. As such, the added value is affected by local living and local identity, and the benefits from the added values are returned to the local society.

Though both textiles are recognized as traditional textiles and serve important functions to local society, both have positive and negative effects. A significant positive effect is that both textiles contribute revenue to the local economy by generating income for the local weavers and improving the lifestyle of the local society. Negatively, local weavers are losing some of the traditional identity that is an important part of the historical and cultural value of the textile. For example, in Thailand today Matmii has become a synonym for Thai silk, a product that has proudly earned an international reputation for beauty and quality. In Japan, on the other hand, Ushikubi *Tumugi* is a local specialty and traditional handy craft that attracts tourists. It is no longer produced using traditional methods. Both cultures give a prominent role to the connection between nature and man and as such, both Thai Matmii and Japanese Kasuri have developed under the influences of time and local culture. Today, both techniques represent high-grade textiles. These modern textiles, like their predecessors, serve in numerous functions, i.e., use as clothing, religious symbols and celebrations. Through the introduction of new techniques and knowledge, new functions are added. The new functions benefit the local society in that added value is produced. The added value in turn improves the well-being of the local people.

In conclusion, this comparative study explored the essence of local traditional textiles and the cultural changes in those textiles. The study demonstrates that both textiles, as traditional crafts, reflect the identity, heritage, and dignity of the local weavers and local people. The weavers and the local people proudly view their craft as their legacy to future generations. The legacy represents a visible historical record of changes in the society and that society's adjustment to new environments. Thai Matmii and Japanese Kasuri so express the many facets of local society they are often referred

to as the "symbol" of that society.

(日本語での要約)

タイ東北部で多く織られている絹マットミーと日本の紬・絹紬は、その技法が同じである。カイコの飼育から始まり、座繰り技法により絹紬糸を生み出し、先染め技法で「括る」「染める」を繰り返すことによって独特の模様を生み出し織物とする。この研究は、タイ東北部マハサラカム県に居住するタイーラオ族の村で伝統的に織られている絹マットミーと日本の石川県白峰村に伝わる紬・絹紬織物を事例とし、これら二つの絹織物に関る６つの観点すなわち模様、素材、地域特性、文化的価値、創造過程、地域信仰に焦点をあて、両絹紬織物を取り巻く文化的および歴史的背景、かつ付加価値について比較検討した。

それぞれの絹紬織物はその時代や文化・社会的背景の影響を受けながら発展し、技術を同じくしているにも関らず、その用途や環境の違いなどから異質の織物として存在している。一般的に絹織物は高級品として特別な衣装として用いられる事が多いが、養蚕農家で手前用として生み出されたこれら二つの絹織物は、共にその地域の生活必需品の１つに過ぎず、常に織手やその周辺の人々の生活や地域社会に密着している。また地域で生産されたカイコの繭特性が織物特性となり、その織物に地域の養蚕技術が反映されている。

その発展の過程で、養蚕や織物の新技術や知識の導入が繰り返されているが、それらはその織物に付加価値を与え、地域社会に文化的発展や経済効果をもたらしている。両紬絹織物は、その容を変えることがあってもその文化的意味を変えることはなく、伝統文化に支えられ、常に地域社会において「シンボル的」に存在し続けている。

１）発表論文

Yukimatsu, K., Chantachon, S., Pothisane, S., Kobsiriphat, W. (2008) : Comparing Local Silk Textiles : The Thai-Lao Matmii and the Japanese *Tumugi* Kasuri. SOJOURN : Journal of Social Issues in Southeast Asia Vol. 23, No. 2, pp. 234–251

Yukimatsu, K. (2008) : The Added Value of Thai-Lao Matmii and Japanese *Tumugi* Kasuri International Meeting on "Local Information Network : Local Wisdom as Power to Social and Economic Development", Seminar Papers

２）研究発表

行松啓子：全齢人工飼料無菌飼育による紬生産とその物性試験．日本服飾文化学会　(口頭発表) 2000年10月

行松啓子：色づいた繭．日本繊維機械学会、染織文化研究会　(口頭発表) 2002年５月

行松啓子、Wanchai De-Eknamkul、岡崎正樹、原三郎、古澤壽治：タイ産・黄繭種 (Nang-Lai) の生糸特性．蚕糸学会　関西・九州支部合同発表会 (口頭発表) 2003年10月

行松啓子、Wanchai De-Eknamkul、岡崎正樹、原三郎、古澤壽治：東北タイ・イサン地方における生糸作りとその特性．日本シルク学会　第51回研究発表会　(口頭発表) 2003年12月

行松啓子：タイ産黄繭種・Nang-Lai のシルク特性について－マットミーの生産を中心に－．日本繊維機械学会　生物資源繊維研究会　研究発表会　(口頭発表)　2004年４月

行松啓子：The Quality of Raw Silk for *Madmii* in Isan. マハサラカム大学　リサーチクション研究発表会 (ポスター発表) 2005年９月

行松啓子：The Technology Transfer of New Textile to The Weaving Women's Group in Ban Khowyai, Mahasarakham. マハサラカム大学　シルクイノベーションセンター主催　養蚕研究会　（ポスター発表）2006年８月

行松啓子：The significance of local traditional silk weaving textiles in the local society -The case of the Thai-Lao silk Matmii in MahaSarakham-. International Workshop on Sericulture and Weaving Silk*（口頭発表）2008年８月

* 所属先のマハサラカム大学シルクイノベーションセンター主催で、プロジェクトリーダーとして、ユネスコ・タイ、ジムトンプソンファンデーション、ジャパンファンデーションより助成を受ける。

行松啓子：The Added Value of Thai-Lao Matmii and Japanese *Tumugi* Kasuri. International Meeting on "Local Information Network：Local Wisdom as Power to Social and Economic Development"（口頭発表）2008年９月

衣笠繊研報（2008）№12，87～89
Bull. Kinugasa Text. Res. Inst.

「シルク・サミット2008 in ふくしま」に参加して

高橋　重三
（財）衣笠会研究員

1．はじめに

2008年10月23、24日表記の会が、福島県農業総合センター（郡山市）で開催された。本会の主催は（独）農業生物資源研究所・岡谷市立蚕糸博物館で、共催として福島県、協賛として製糸技術研究会で運営されている。本会の目的は「カイコ・シルクに関心がある人があつまり、意見交換、情報交流、技術交流を進め、シルクの用途拡大およびシルク文化の創造などに寄与すること」で、学会とは異なり産官学の広い分野の方々の集まりで、至極気楽な会である。私はこれまで９回開催されたうち６回参加している。

2．基調講演

大日本蚕糸会蚕業技術研究所所長、井上元氏の「蚕糸・シルクイノベーション戦略と実践」という表題で、今最も注目されている「蚕糸・絹業提携事業」の話が主であった。概要は、新しい蚕糸・絹業政策とはどんなものか、目的は高品質の絹製品を純国産で作ることで、具体的方法として養蚕農家、製糸業者、織物業者、問屋、小売店が１つのグループを作り、特色ある製品を開発する事である。これまで政府は繭代を補填するという方法で支援して来たが、今回改めて、政府は35億円（平成19年度補正予算）を用意し、３年間支援金を出す、その間に自立できるようにするという方法である。また、支援システムとして（財）大日本蚕糸会内に「蚕糸・絹業提携支援センター」を設け、グループの選定やコーディネーターによる支援などにあたる。平成19年度と20年度において６グループが承認され、活動を始めている。詳細は省略する。

上記政策を支援する技術開発研究も行われている。（財）大日本蚕糸会内に、支援組織を立ち上げ、「空気を含む」をキーワードに、繭および絹の生産技術の研究開発が行われている。生糸・生糸のハイブリッドとか、家蚕糸と野蚕糸のハイブリッド、個性のある繭素材に適する煮繭方法や精練方法などの研究、太繊度低張力糸の商品化などの研究開発が行われている。

最後に森英恵氏の言葉を引用し、デザイナーの意見も聞き連携して、国際的にもアピールできる良い物作りを期待したいと結んでいる。

3．講演（学術）

（独）農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域長竹田敏氏の「蚕糸・昆虫・シルク機能利用研究の展開－新たなシルク利用研究の現状－」と題した講演があった。概要は次の様である。新たなシルク利用への取り組みとして、衣料中心からの研究に加え、シルクをタンパク質として捉え、工学・医療分野への用途開発、具体的には、シルク水溶液からの展開（粉末、フィルム、ブロック等）とか、シルク微粉末の利用、フィブロインの化学的加工による新たな機能性の付与、蚕以外の昆虫のシルクの研究等がある。

遺伝子組み換えによる新しいシルクの生成は、かなり具体的な成果が発表されている。例えば、フィブロイン遺伝子に緑色蛍光を発するクラゲの

連絡先：〒616-8175 京都市右京区太秦一町芝町１－13

蛍光タンパク質遺伝子を導入すると、精練後の絹糸においても蛍光を保持した新たな絹となり、用途が拡大する。また、色々な機能を持ったタンパク質をフィブロインに導入する事によって、衣料の他にも利用が考えられるので、今後も期待されていると結んでいた。

4．活動事例の報告

りょうぜん天蚕の会からは、天蚕（やま繭）を飼育し、繭から独特な輝きを持った工芸品を創ったり、紬糸、家蚕・天蚕のハイブリッド糸等を作り、特産品の開発・商品化を進め、シルク文化の再興に取り組んでいる事、その間の苦労話など、また、会場ロビーで展示・実演を行っていた。

「アトリエ・トレビ」からは、インドのタサール蚕、ムガ蚕、エリ蚕などの野蚕シルクの生地を現場で織り、日本で洋服、ストール等を作り販売しているとのこと。販売員にシルクについての知識をどのように教えるかが課題である、とのことを話された。

その他、桑の健康食品としての意義や、シルクをアートの材料として作品を作っている話などがあった。

5．見学（オプションツアー）

10月24日朝、郡山駅前を出発し、かって盛んに行われていた蚕種製造所を、車窓から見ながら川俣（伊達郡川俣町）へと進んだ。

川俣では「かわまたシルクピア」（写真）を見学した。この地域では、絹織物のうち薄物（軽目羽二重）の生産が盛んであった所で、多くの展示品を見る事が出来た。からりこ館では手織りも行われていた。川俣名物シャモの昼食を終え、伊達市保原へ進んだ。

保原では、保原歴史文化博物館を見学した。明治30年頃に亀岡正元氏が建築し平成７年に現在の所に移築された物である。同氏は蚕種製造を行っていた。外観はモダンな洋風で内部は純和風の書院作りで驚いた、内部には、江戸時代の珍しい蚕種・繭の標本はじめ、伊達政宗の書状なども見る事が出来た。また、建築材料にも見るべきものが多くあるとのこと、現在福島県の指定文化財である。次に伊達郡桑折町へ向かった。

旧伊達郡役所を見学した。明治16年に保原町から桑折町に移築され、郡役所として約43年間郡行政の中心として使われてきたが、大正15年郡役所としての役目を終え、今は国の重要文化財として保存されている。堂々たる建築物で、明治洋式建築物の代表とも言える建物である。隣接する桑折町種徳美術館を見学した。富豪角田林兵衛氏が家伝の貴重な美術品と建物を町に寄付して出来たものである。主として江戸時代～明治初期の重要美術品が納められていた。JR福島駅前で解散して終了した。

絹産業と文化および、それより得た資財に基づいて多くの文化が創出され、今日まで保存されている事を痛感した。私は温故知新を「正しい歴史認識に基いて未来を考えること」と考えている、今回のツアーは極めて有意義であった。

6．おわりに

基調講演にあった「空気を含む」の話しについて、有本先生の「昔の絹、今の絹」（繊消誌 Vol.24 No.3（1983））と題した論文を思い出した。同先生は昭和30年代に始まった自動繰糸機による時代を境として、その前後の生糸の糸質を比較している。結論として、自動繰糸機法では強度は上がったが、伸度の小さい針金糸を作ったのであると結んでいる。私は約50年にわたり化合繊特に親水性繊維の取り扱いに関わって来た、最近10年程は、繭糸繊度約4d 以上の太繊度糸を生成する蚕「ありあけ」を飼育し、繰糸、撚糸、製織など行い、色々考察している。蚕が作った繭糸は優れた性質を持ち、特に人間の体を覆う材料としては極めて優れていると思う。繭以後人間の都合により改悪していると思う。タンパク質の熱変性について配慮せず殺蛹と能率の為に高温で乾繭している事、煮繭も同じ事が言える。自動繰糸法では９％前後の延伸を掛けたまま乾燥固定しているので、伸度

が小さいものと思われる。

2009年１月22日の朝日新聞に、有織文化研究所仙石宗久氏が「平安装束、糸を窮める」と題して次の様に述べている。十二単を作るのに現在の糸では15Kg前後になり、身動きがしにくいが、昔のような細くて軽い糸を使えば10Kg以下になり、優美に振り舞えるはずだと考えた、と言う記事である。この様に、もう一度自動繰糸機による能率と、繊度の均一性の長所を生かし、「空気を着る織物」を得る方法も、この度の「蚕糸・絹業提携事業」における一つのテーマと思う。

なお、2008年８月13日の朝日新聞の社説でも「蚕糸・絹業提携事業」を取り上げ、見直しが遅すぎて事態を深刻にしてしまった事が悔やまれる。新制度のもとで支援期間中に経営体質を強め、その後も消費者に評価される製品を作り続けてもらいたい。絹は日本人の衣生活や文化と深く結びついている。関連する事業者は、この機会を逃さず、世界最高の養蚕技術と生きた産業文化を守ってほしい。と書いており、強く印象に残っている。

かわまたシルクピア

物に紋をプリントする方法に関しての講演（イタリア人デザイナー)、マハサラカム大学・東北タイ文化芸術研究所の行松啓子氏は東南アジアのマットミーにはThai-Lao、Phu-ThaiとKhmerの３タイプがあり、これらはそれぞれの地域での生活様式のシンボルとして発展してきた。講演ではマハサラカム地方でのThai-Laoタイプのマットミーの変遷について講演された。

また、会期中、会場ロビーでは絹織物、絹タンパク入りの化粧品、桑茶などの展示販売も行われていた。また、第１日目の夜にはホテル会場で、Welcome Party（？）というより、ファッションショウーが催され、顔なじみの男性、女性が地元のデザイナーによる衣装をまとって舞台をモデル気取りで登場、絹衣裳をアピールしていた。

全体的な印象としては、マハサラカム地方の養蚕農家、蚕糸業者、大学研究者、染織デザイナーが一堂に会したワークショップであったといえよう。ただ、マハサラカム大学・Silk Innovation Centerの現状をみれば、地域の蚕糸業を発展させるためには、地域タイシルク伝統文化の継承に蚕糸科学の発展の重要性を認識する研究者やプロパーを養成することが急務である。この意味でも、基調講演でそのことを訴えた。

（古澤壽治　記）

繊維研究所研究報告　2009年３月31日刊

発行所　財団法人　衣笠会　繊維研究所
〒603－8326
京都市北区北野下白梅町29
TEL　075－461－5949
TEL/FAX　075－463－6679
E-mail　zai-kinugasakai@nifty.com
http：//wwwsoc.nii.ac.jp/kinugasa/

会　長　林　　幸　之

印刷所　為国印刷株式会社
〒604－8457
京都府京都市中京区西ノ京馬代町６－16
TEL　075－462－7889
FAX　075－464－3923