繊維研究所研究報告

2010

財団法人 衣 笠 会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

目 次

3. 学術講演会の開催

学術報告	
NADPH オキシダーゼ阻害物質および抗酸化物質のスクリーニング系の構築	-3
亀井加恵子・西谷真依子・NGUYEN Thi Tu Anh・山口政光	1
エビガラスズメ緑色幼虫の真皮細胞に存在するタンパク質凝集成分Xについて	
白井孝治・福島壽斗・烏田拓郎・木口憲爾	9
カイコガ前立腺に存在する endopeptidase である精子活性化因子	
'initiatorin' の精製と部分アミノ酸配列の決定	
長岡純治・加藤久美子・高田祐希	16
家蚕繭の紫外線遮蔽効果 高濱(一田)昌利・高野奈津子・伊田波啓輔	25
学術解説	
	32
技術ノート	
冬季における蚕の簡易人工飼料飼育法	
今村利勝・高濱(一田)昌利・古澤壽治	42
活動報告ノート	
「宇宙帰り蚕」を利用した青少年教育事業報告	61
全国中学校理科教育研究会 (京都大会) での展示発表の報告	68
平成22年度 (財)衣笠会繊維研究所活動状況一覧	70
1. 学術論文の発表、各種学会での口頭発表など 2. 講演活動	

NADPH オキシダーゼ阻害物質および抗酸化物質の スクリーニング系の構築

亀井加恵子・西谷真依子・NGUYEN Thi Tu Anh・山口政光

Establishment of the Screening System of Bioavailable NADPH Oxidase Inhibitors and Antioxidants

Kaeko KAMEI*, Maiko NISHITANI, NGUYEN Thi Tu Anh and Masamitsu YAMAGUCHI

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

Abstract

NADPH oxidase is the major source of non-mitochondrial cellular reactive oxygen species, and also is reported to be a major cause of various diseases including atherosclerosis and hypertension. In order to screen a new curative reagent that can suppress NADPH oxidase activity, we developed a *Drosophila melanogaster* fly that would overexpress human Dual oxidase 2 (hDuox2), a member of the NADPH oxidase family, as a screening model. These flics (GMR-GAL4/UAS-hDuox2) had a high generation of reactive oxygen species in the posterior region of the eye discs along with an easily recognizable rough-eye phenotype, which is an ideal and convenient marker for further screening steps. Moreover, the hDuox2-induced rough-eye phenotype can be rescued by feeding with a culture medium containing mulberry leaves, which reportedly have an anti-metabolic effect. Some commercially available antioxidants such as quercetin-3-O-D-glucoside or quercetin-3-O-glucose-6"-acetate, or the naringin contained in mulberry leaves and other herbs, also have shown a similar suppressing effect on the rough-eye phenotype. Our results suggest that flavonoid glycoside is absorbed from the intestine and functions in the body of *Drosophila melanogaster* as it does in mammalian models such as rats. Thus, the GMR-GAL4/UAS-hDuox2 fly line is a promising model for the screening of novel drugs such as NADPH oxidase inhibitors and/or anti-oxidants.

Key Words: Anti-metabolic disorder, NADPH oxidase, ROS. Mulberry leaf. Drosophila

1. まえがき

メタボリックシンドロームは、「死の四重奏」 「インスリン抵抗性症候群」あるいは「内臓脂肪症 候群」とも呼ばれる複合生活習慣病である。内臓 脂肪型肥満が原因となってインスリン抵抗性が惹 起され、高血糖、高脂血症、高血圧、さらに動脈 硬化へと進行する。日本におけるメタボリックシ ンドローム患者(予備軍を含む)は、40~74歳で みると、男性の2人に1人、女性の5人に1人と 推定されている。これらの疾患にかかる医療費は 莫大であり、現代社会においてメタボリックシン ドロームは経済的にも影響を与える深刻な問題と なっている。

桑葉は蚤の餌であるが、漢方薬としても知られ ている。日本でも関東地方を中心に古来より桑葉

*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、IIL 075-724-7553

茶として利用されている。桑葉には、抗酸化やフ リーラジカルスカベンジャーとしての作用が知ら れているフラボノイド類やモラシン類を始めとす る様々な生理活性物質が含まれている。我々は、 **桑葉を肥満病態モデルマウスに経口投与するとメ** タボリックシンドロームが抑制されることを見出 した[14]。また、桑葉によるメタボリックシンド ローム抑制機構として、抗糖尿病性の善玉アディ ポサイトカインであるアディポネクチンの発現向 上、各種炎症性サイトカインの発現低下、NADPH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) オキシダーゼの発現抑制による活性酸素種 (ROS) 産生の減少などを明らかにした。これらの因子は、 メタボリックシンドロームを抑制する治療薬や機 能性食品開発する上で重要な標的であると考えら れる。

NADPH オキシダーゼは ROS を発生させる主要 原因酵素であり、哺乳類、ショウジョウバエ、植 物、カビなど広く保存されている[9]。食細胞にお いて ROS を産生し、体内に侵入したバクテリア を殺す生体防御が本来の機能と考えられてきた。 しかし、我々の体の全ての細胞が NADPH オキシ ダーゼのホモログを持っており、増殖因子やサイ トカインの刺激に応じてROSを産生することが明 らかとなった。産生された ROS は、細胞内のセカ ンドメッセンジャーとして機能し、シグナル伝達 経路や転写因子の活性化を制御している[1]。一 方、過剰な ROS 産生は酸化ストレスを引き起こす ため、NADPH オキシダーゼはメタボリックシン ドロームを含む種々の疾病に関与している。メタ ボリックシンドロームから2型糖尿病への進行に 伴って NADPH オキシダーゼの発現が上昇し、産 生される ROS によって肝臓や膵臓β細胞が傷害を 受けることが報告されている[6]。一方、先述のよ うに我々は桑葉がメタボリックシンドロームを抑 制し、その機構の一つとして NADPH オキシダー ぜの発現抑制とROSの消去によることを明らかに している[14]。したがって、NADPHオキシダー ぜの活性阻害やその発現抑制は抗メタボリックシ ンドローム薬や機能性食品を開発する上で重要な 標的の一つである。

木研究では、NADPHオキシダーゼ阳害物質のス クリーニング系を構築することを目的として、ヒ ト dual oxidase 2 (hDuox2) を取り扱う。hDuox2 はNADPH オキシダーゼの1種であり、甲状腺、 気管、脳、筋肉、胎盤、精巣など多くの組織で発 現している。hDuox2の本来の機能は、甲状腺ホル モン生産過程での酸化反応に必要な過酸化水素の 産生であり、hDuox2は甲状腺機能低下症の原因遺 伝子である[12]。hDuox2は感染に対する防御およ び細胞外マトリックスの修飾にも必須であること が知られている[4.5.7]。近年、ショウジョウバエ NADPH オキシダーゼをノックダウンしたショウ ジョウバエに hDuox2遺伝子を導入すると、腸で の抗菌作用が回復することが報告された[7]。これ は、hDuox2がショウジョウバエでも有効に機能し 得ることを示している。

桑葉にはROSを消去する抗酸化物質あるいはNADPHオキシダーゼ阻害物質が含まれると考えられるが、それら生物学的利用可能な有効物質の簡便なスクリーニング系の構築のため、ショウジョウバエを利用した。ショウジョウバエは栄養摂取や貯蔵、代謝を制御する器官がヒトのそれと類似している[2]。ショウジョウバエは全ゲノム配列が解析され、ヒト遺伝子を含む任意の遺伝子を発生時期かつ組織特異的に発現、あるいはノックダウンさせる方法が確立されている。我々は、ショウジョウバエでの部位特異的発現のためにGAL4-UAS 発現システムを用いた。GAL4は酵母由来の転写因子で、その結合配列であるUAS 配列下流に位置する任意の遺伝子発現を人工的に誘導することができる[3.13]。

本研究において、GMR (glass multiple reporter) -GAL4遺伝子をX染色体上に持つ組換えショウジョウバエを、UAS-hDuox2遺伝子を第2染色体に持つショウジョウバエと交配した。GMR は複眼原基の posterior 側から morphogenetic furrow 側の細胞に GAL4タンパク質を高発現するため、同領域で hDuox2タンパク質を過剰発現させることが可能である。本系は、複眼の観察という極めて簡便な方法で hDuox2の活性を評価できるといった利点が期待できる。さらに、樹立した組換えショウ

ジョウバエを用いて、生物学的利用可能なNADPH オキシダーゼ阻害物質あるいは抗酸化物質のスク リーニング系としての有用性を検証した。

2. 材料および方法

2. 1 複眼特異的 hDuox2過剰発現系統の作製

ショウジョウバエ UAS 遺伝子を含むプラスミ ドの UAS の下流に hDuox2遺伝子を挿入した組 換えプラスミドを作製した。組換えプラスミドを ショウジョウバエ受精卵にマイクロインジェク ションし、hDuox2遺伝子導入ショウジョウバエ 系統を作出した。その際、組換えプラスミドはw 遺伝子(赤色色素作製に関与)をマーカーとして 持っており、白色複眼が赤色となることを指標に 組換えショウジョウバエを選別した。得られた組 換えショウジョウバエの中で UAS-hDuox2遺伝子 を第2染色体に持つ系統と GMR プロモーターの 下流に挿入された GAL4遺伝子を X 染色体に持つ GMR-GAL4系統を交配することによって、GMR-GALAとUAS-hDuox2遺伝子を2コピーずつ保有す るショウジョウバエ GMR-GAL1; UAS-hDuox2を 樹立した。得られたショウジョウバエは、GAL4-UAS 標的発現システムを利用して hDuox2を複眼 で過剰発現できる。

2. 2 免疫染色

3齢幼虫の複眼原基をパラホルムアルデヒドで固定した。 1% 牛血清アルブミンでブロッキングした後、ウサギ抗 hDuox2抗体(Abcam)を 4 $\mathbb C$ 、16時間反応させた。 2 次抗体には Alexa Flour 488標識抗ウサギ $\mathbb I$ \mathbb

2. 3 ROS 産生の確認

幼虫の頭部を10 μM CM-H₂DCFDA と 5 分間反応させ、1 %バラホルムアルデヒドで20分間固定した。洗浄後、蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX50)で観察した。

2. 4 スクリーニング系としての評価

instant drosophila medium (Carolina Biological

Supply Company)に桑葉乾燥粉末を10%、20%、30%(w/w)の割合で混合し、hDuox2過剰発現系統の幼虫に与えた。成虫となった後、走査電子顕微鏡(KEYENCE VE-7800)で複眼を観察した。桑葉は本学フィールド科学教育研究センター農場で栽培された品種新一ノ瀬で、熱風(180℃、7秒)で乾燥させたものを用いた。

桑葉に含まれていることが報告されているフラボノイド類 Rutin(Wako)、Quercetin(ナカライテスク)、Kaempherol(フナコシ)、Naringin(Wako)、Quercetin-3-O-glucose-6"-acetate(フナコシ)、Quercetin-3-O-D-glucoside(シグマ)、Epigallocatechin gallate(Wako)をinstant drosophila medium に 3%(w/w)の割合で混ぜ、hDuox2過剰発現系統の幼虫に与えた。成虫となった後、走査電子顕微鏡(KEYENCE VE-7800)で複眼を観察した。

3. 実験結果

hDuox2を複眼特異的に過剰発現する系統(GMR-GAL4; UAS-hDuox2)を樹立した。GMR-GAL4遺伝子のみを挿入されたショウジョウバエと、GMR-GAL4とUAS-hDuox2の両遺伝子を持つショウジョウバエの成虫の複眼を走査電子顕微鏡で観察した。Fig. 1に示すように GMR-GAL4遺伝子のみを持つショウジョウバエと比較し、GMR-GAL4と UAS-hDuox2の両遺伝子を持つショウジョウバエでは形態異常(ラファイ表現型)が強くなっていた。また、挿入遺伝子の数が多い方が、より強い表現型異常が認められた。

幼虫複眼原基でのhDuox2の発現を抗hDuox2抗体によって検出した。その結果、Fig. 2に示すようにコントロールに比べてhDuox2過剰発現系統は複眼 posteria 側においてhDuox2のシグナルが強く認められ、hDuox2の発現を確認した。

幼虫複眼原基での ROS 産生を蛍光色素で検出した。Fig. 3に示すように hDuox2過剰発現系統はコントロールに比べて ROS の産生が強く認められ、hDuox2がショウジョウバエ細胞でも機能することが分かった。これらの結果より、hDuox2を複

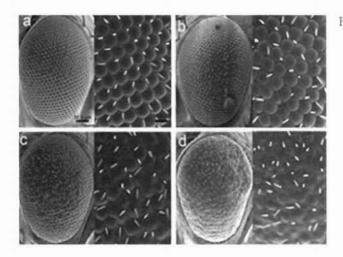


Fig. 1. Adult compound eyes observed by scanning electron microscopy. a, the eyes of flies carrying a single copy of GMR-GAL4 (GMR-GAL4/Y; +) appeared as normal a phenotype; b, flies carrying a single copy of both GMR-GAL4 and hDuox2 (GMR-GAL4/Y; UAS-hDuox2/+) showed a mild rough-eye phenotype; c. flies carrying two copies of GMR-GAL4 (GMR-GAL4; +) had many fused ommatidia; d, flies carrying two copies of both GMR-GAL4 and hDuox2 (GMR-GAL4; UAS-hDuox2) showed a more severe rough-eyes phenotype. Magnification is 200× for left panels and 700× for right panels. Flies were reared at 25°C.

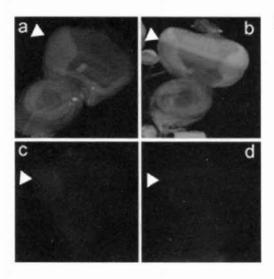


Fig. 2. Immunostaining of eye imaginal discs with anti-hDuox2 antibody. Eye imaginal discs were reacted with rabbit anti-hDuox2 antibody followed by anti-rabbit IgG Alexa Flour[™] 488 antibody (a, b). a. Immunostaining of eye discs of GMR-GAL4; + showed no detectable signal; b. notably, in GMR-GAL4; UAS-hDuox2, an ectopic hDuox2 signal from the posterior region to the morphogenetic furrow in eye discs was detected. Immunostaining of eye imaginal discs of both GMR-GAL4; + (c) and GMR-GAL4; UAS-hDuox2 (d) with only the anti-rabbit IgG Alexa Flour[™] 488 antibody showed no detectable signal. Flies were reared at 28°C. The arrowheads indicate morphogenetic furrows in the eye discs.

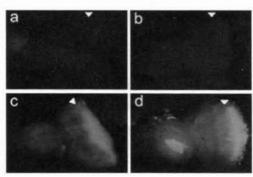


Fig. 3. Detection of ROS in eye imaginal discs of third instar larvae. Without substrate CM-H2DCFDA, there were no detectable signals in either GMR-GAL4; + (a) or GMR-GAL4; UAS-hDuox2 flies (b). However, by incubation with substrate CM-H2DCFDA, a weak fluorescent signal in control flies (GMR-GAL4; +, c) was detected. Remarkably, a strong fluorescent signal was detected in hDuox2-overexpressing flies (GMR-GAL4; UAS-hDuox2, d). Flies were reared at 25°C. The posterior of the discs are on the right. The arrowheads indicate morphogenetic furrows in the eye discs.

眼特異的に過剰発現する組換えショウジョウバエ GMR-GAL4; UAS-hDuox2の樹立に成功したことを 確認した。

hDuox2過剰発現系統のNADPHオキシダーゼ活性阻害物質スクリーニング系としての有用性を評価するために、病態モデルマウスによって抗メタボリックシンドローム活性が明らかとなっている桑葉を用いた。hDuox2過剰発現系統の幼虫に桑

葉を経口投与して飼育し、成虫となった後、その 複眼を走査電子微鏡によって観察した。Fig. 4 fh に示すように、桑葉の含有量が増えるにしたがっ て複眼の形態異常(ラフアイ表現型)が改善され ていた。改善効果の定量化は困難であるが、図中 白点線で囲んだラフアイ表現型を示す領域の面積 を解析することによって、おおまかな定量化はで きると考えられる。

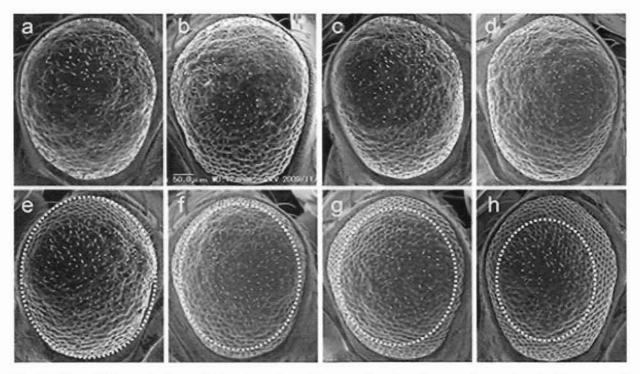


Fig. 4. Effect of MLs on the hDuox2-induced rough-eye phenotype. Scanning electron micrographs of adult compound eyes at 200× magnification of GMR-GAL4; UAS-DREF (a-d) and GMR-GAL4; UAS-hDuox2 (e-h). GMR-GAL4; UAS-DREF flies fed culture mediums containing 10% (b), 20% (c), or 30% (d) MLs showed no effect on the rough eye phenotype as compared to flies not fed MLs (a). However, compared to flies not fed MLs (e), the rough eye phenotype of hDuox2-overexpressing flies was suppressed when fed culture mediums containing 10% (f), 20% (g), or 30% (h) MLs. The suppressive effects can be realized by comparing rough areas of the eyes marked by dot circles. Flies were reared at 25°C.

続いて、桑葉の複眼形態改善効果がGAL4-UAS発現システム自体への影響によるものではないことを検証した。hDuox2過剰発現系統と同様の方法を用いて、他の遺伝子(ショウジョウバエ転写調節因子DREF)を過剰発現させた系統(GMR-GAL4:UAS-DREF)に桑葉粉末を経口投与した結果、Fig. 4 b-dに示すように複眼の形態異常(ラファイ表現型)は改善されなかった。したがって、桑葉による複眼形態改善効果はGAL4-UAS発現システムへの効果ではないことが明らかとなった。すなわち、hDuox2過剰発現系統に特異的な効果であり、hDuox2の活性阻害あるいはROS消去によるものであることが確認できた。

桑葉の抗メタボリックシンドローム効果は桑葉に含まれるフラボノイド類の抗酸化力によるものである可能性が高い。そこで、桑葉含有フラボノイド類からいくつかを選択し、3%(w/w)となる

ように餌に混合し、hDuox2過剰発現系統に投与した。この結果をFig.5に示す。Quercetin、Rutin、Kaempherol、Epigallocatechin gallate (Fig. 5 b-e) には複眼形態の改善効果が見られなかったのに対し、Quercetin-3-O-glucoside、Quercetin-3-O-glucose-6"-acetate および Naringin (Fig. 5 f-h) を投与したショウジョウバエでは異常な複眼形態の改善が顕著に認められた。

4. 考察

本研究において複眼特異的に hDuox2を過剰発現するショウジョウバエを樹立した。免疫染色によって hDuox2の過剰発現を確認するとともに、ROS が過剰に産生されていることを確認した。これは、hDuox2がショウジョウバエ細胞内においても機能していることを示している。樹立した

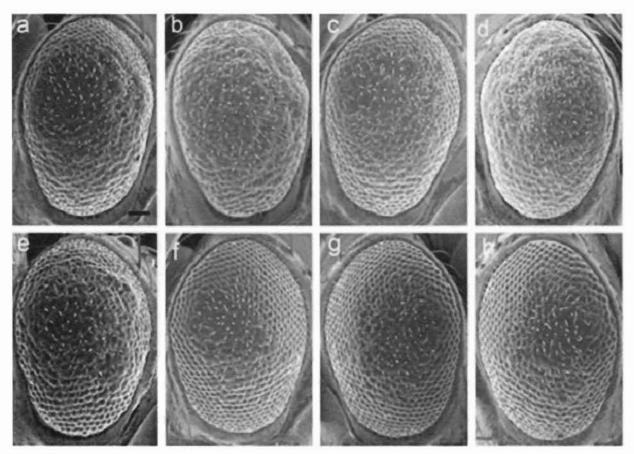


Fig. 5. Effect of flavonoids on the hDuox2-induced rough eye phenotype. Scanning electron micrographs of adult compound eyes at 200× magnification of GMR-GAL4; UAS-hDuox2. Untreated GMR-GAL4; UAS-hDuox2 flies showed a severe rough-eye phenotype (a). Treatment with 3% (w/w) quercetin (b), rutin (c), kaempherol (d), and epigallocatechin gallate (e) showed no detectable changes in compound eyes. However, treatment with 3% (w/w) quercetin-3-O-D-glucoside (f), quercetin-3-O-glucose-6"-acetate (g), and naringin (h) strongly suppressed the hDuox2-induced a rough-eye phenotype. Flies were reared at 25°C. bar; 50 μm.

hDuox2過剰発現ショウジョウバエは GMR-GAL4 と比較して、複眼おいて顕著な異常形態(ライフ表現型)を示した。これは、生物学的利用可能な Duox2の活性阻害物質あるいは ROS を消去する抗酸化物質のスクリーニングが、複眼の観察によって簡便に評価できることを示唆している。

hDuox2過剰発現ショウジョウバエ幼虫への桑葉の経口投与の結果、桑葉によって複眼の形態異常が抑制されることを見出した。これは、NADPHオキシダーゼを標的とする抗メタボリックシンドローム薬のスクリーニング系として、hDuox2過剰発現ショウジョウバエが有用であることを示している。

さらに、フラボノイド類を用いて検討した結果、 Quercetin、Rutin、Kaempherol、Epigallocatechin gallate (Fig. 5 b-e) には複眼形態の改善効果が見られなかったのに対し、配糖体である Quercetin-3-O-D-glucoside、Quercetin-3-O-glucose-6"-acetate、Naringin (Fig. 5 f-h) に顕著な複眼形態改善効果が認められた。これは、水への溶解度や構造の相違に起因する、フラボノイドとその配糖体の腸からの吸収や生物学的利用度の相違によるものと考えられる。これはヒトやラットにおける報告と一致している[8.10,11]。すなわち、少なくともフラボノイド類に関して、ショウジョウバエと哺乳類では腸からの吸収を含めた生物学的利用度が似ていることを示唆している。本研究では、スクリーニング系としての有用性を評価するために、抗酸化力を持ち ROS スカベンジャーであるフラボノイドを用いたが、NADPH オキシダーゼの活性阻

害剤も本システムを用いてスクリーニングできる と考えられる。hDuox2過剰発現ショウジョウバエ では、ラジカルスカベンジャーと NADPII オキシ ダーゼ活性阻害剤との区別はできない。両者を区別 するためには、NADPH オキシダーゼによる ROS 産生を試験管レベルで評価、あるいはキネティク スを解析することが必要である。しかし、ショウ ジョウバエはラットやマウスと比べると安価で飼 育可能、世代交代が短い、子孫の数が多いなどの 利点がある。また、基本的な代謝が脊椎動物と類 似しており、臓器も似ている。したがって、我々 が樹立したhDuox2過剰発現ショウジョウバエは生 物学的利用可能な薬剤の一次スクリーニングに有 用である。今後、桑葉のメタボリックシンドロー ム抑制機構の解明、活性物質の同定に本スクリー ニング系を利用したいと考えている。

引用文献

- [1] 赤池孝章(2009):活性酸素のシグナル伝達機能 -その生理機能の再発見と酸化ストレス研究の新展開 実験医学(増刊) 27, 22-29
- [2] Baker, KD. and Thummel. CS. (2007): Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. Cell Metab., 6, 257-266
- [3] Brand, AH. and Perrimon, N.(1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-415
- [4] Edens, WA., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, JM., Lee, T., Edens, HA., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, DB., Benian, GM. and Lambeth, JD. (2001): Tyrosine crosslinking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. J. Cell Biol., 154, 879-891
- [5] Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K. and Leto, TL. (2003): Dual oxidases represent

- novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.*, 17, 1502-1504
- [6] Guichard, C., Moreau, R., Pessayre, D., Epperson, TK. and Krause, KH. (2008): NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem. Soc. Trans.*, 36 (Pt 5), 920-929
- [7] Ha, EM., Oh, CT., Bae, YS. and Lee, WJ. (2005): A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. Science. 310, 847-850
- [8] Hollman, PC. Bijsman, MN., van Gameren. Y. Cnossen, EP., de Vries, JH. and Katan, MB. (1999): The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radic. Res., 31, 569-573
- [9] Kawahara, T., Quinn, MT. and Lambeth, JD.(2007): Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/ Duox) family of enzymes. BMC Evol. Biol., 7, 109
- [10] Makino, T., Shimizu, R., Kanemaru, M., Suzuki, Y., Moriwaki, M. and Mizukami, H. (2009): Enzymatically modified isoquercitrin, alpha-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 2034-2040
- [11] Murota, K. and Terao, J.(2003): Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. Arch. Biochem. Biophys., 417, 12-17
- [12] Pfarr, N., Korsch, E., Kaspers, S., Herbst, A., Stach, A., Zimmer, C. and Pohlenz, J. (2006): Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. Clin. Endocrinol. (Oxf), 65, 810-815

衣笠繊研報

- [13] Phelps, CB. and Brand, AH. (1998) : Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*, 14, 367-379
- [14] Sugimoto, M., Arai, H., Tamura, Y., Murayama, T., Khaengkhan, P., Nishio, T., Ono, K., Ariyasu, H., Akamizu, T., Ueda, Y.

Kita, T., Harada, S., Kamei, K. and Yokode, M. (2009): Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice. *Atherosclerosis*, 204, 388-394

エビガラスズメ緑色幼虫の真皮細胞に存在する タンパク質凝集成分Xについて

白井孝治・福島壽斗・島田拓郎・木口憲爾

Aggregation Properties of the Factor X from the Epidermal Cells of Agrius Green Larva

Koji SHIRAI*, Hisato FUKUSHIMA, Takuro SIIIMADA and Kenji KIGUCHI

Bioresource and Environmental Science Course, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda Nagano 386-8567, Japan

Abstract

To clarify the molecular mechanisms of accumulation of insecticyanin (AcINS) in the epidermal cells of *Agrius* green larva, secretory granules containing AcINS were purified. The purified secretory granules were quite large (about $1 \mu m \phi$) and have relatively high density. The granules contained AcINS, epidermal carotenoid-binding proteins (eCBP) and many membrane-binding proteins. The soluble fraction of the granules had an ability to aggregate AcINS under mildly alkaline condition plus relatively high Ca²⁺ concentration. This ability could be the key of the sorting mechanisms for AcINS from *trans* Golgi network to the secretory glanules.

Key Words: Agrius convolvuli, epidermal cells, secretory vesicle, insecticyanin

1. まえがき

スズメガの一種、エビガラスズメ(Agrius convolvuli)はカイコと近縁の大型の鱗翅目昆虫である[1]。幼虫の基本体色は緑色であるが、特に5齢期において顕著な体色多形性が認められる。筆者らはエビガラスズメ幼虫の体色多形性の発現機構について研究を続けている。

幼虫体色の緑色は主にビリベルジンを結合したインセクトシアニン(AcINS)[2] とルテインを結合した真皮細胞カロチノイド結合タンパク質(eCBP)(白井、未発表)が真皮細胞中に蓄積するためである。しかしながら、これら色素結合タンパク質は共に小胞体輸送シグナルを持つ分泌タンパク質であるため、通常、生合成後すぐに細胞外

へ分泌される。したがって、細胞内に蓄積される ためには特別な機構が必要となる。

真核生物の分泌タンパク質はその合成途中から 和面小胞体内部へ移行し、以後は常に小胞輸送の 形で細胞内を移動し、最終的にエキソサイトーシ スにより細胞外へ分泌される。ゴルジ体の最も外 側に位置するトランス・ゴルジ・ネットワーク (TGN) はリソソームタンパク質と細胞外へ分泌 されるタンパク質などを選別する場である。ここ で選別されたリソソーム移行シグナルを持たない タンパク質は速やかに細胞膜へと輸送され分泌さ れると考えられる(構成性分泌経路)。一方、神経 分泌細胞など一部の細胞には調節性分泌経路と呼 ばれる特別な分泌経路を有する。この経路におい てもペプチドホルモンなどが TGN で特異的に選

*連絡先:信州大学繊維学部 生物資源·環境科学課程、

386-8567 長野県上田市常田 3 - 15 - 1、E-mail: kshirai@shinshu-u.ac.jp、TL 0268-21-5334

別され、一度細胞内に蓄積される。その後、細胞外のシグナルに応じて分泌される。すなわち TGN では構成性分泌経路と調節性分泌経路のタンパク質の選別も行われている。しかしながら、そのメカニズムは十分には解明されていない。

これまでの研究からエビガラスズメ緑色幼虫の 真皮細胞において色素結合タンパク質が分泌制御 を受けることが示唆されている。すなわち真皮細 胞に調節性分泌経路が存在することを示唆してい る。哺乳類のインスリンのように分泌制御を受け るタンパク質(またはペプチド)はTGNにおいて 選別され、極めて巨大な輸送小胞(分泌顆粒)に 貯留される。この分泌顆粒は通常の構成性分泌経 路の輸送小胞が直径50-100 nm であるのに対し、 約1-3µmと極めて巨大で、内部には特異的か つ高度に濃縮された調節性の分泌タンパク質(ま たはペプチド)を含んでいる。実際、緑色幼虫の 真皮細胞にも黒色幼虫の真皮細胞に観察されない 極めて大型の顆粒が認められている(白井ら、未 発表)。またこの分泌顆粒には調節性分泌のメカニ ズム解明の重要なヒントが隠されているはずであ 200

現在、調節性分泌経路において TGN でのタンパク質の選別に中心的役割を果たすと考えられているのは、Chromogranin A (CgA) を中心としたグラニンファミリーのタンパク質である。この CgA は弱酸性で高 Ca²+濃度条件下において自己 凝集を起こし、この凝集に巻き込まれることでホルモンなどの調節性分泌タンパク質は選別されると考えられている[3]。しかし、本来、構成性分泌タンパク質の一部も実験条件下では CgA の凝集に巻き込まれる等の報告もあり[4]、グラニン凝集説のみでは選別機構を完全に説明出来ていない。また、カイコなど鱗翅目昆虫はもとよりキイロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) を含む無脊椎動物では CgA のホモログは発見されていない。

そこで本研究では、まずエビガラスズメ緑色幼虫の真皮細胞中からの分泌顆粒の単離を試みた。 次に真皮細胞中で色素結合タンパク質の特異的選 別に関与すると思われる CgA ホモログ X の存在 の有無を調査した。

2. 材料および方法

2 1 供試昆虫

エピガラスズメは当研究室において人工飼料で継代飼育している個体群を用いた。幼虫は温度25℃、光条件16L-8Dで飼育した。人工飼料は広食性蚕用人工飼料 L4(M) にサツマイモ葉乾燥粉末を添加し調製した。

2. 2 緑色幼虫真皮細胞からの分泌顆粒の精製

生理食塩水 (7.5% NaCl) 中でエビガラスズメ 5齢 day 3緑色幼虫を解剖し、真皮細胞を採取し た。その後、湿重量を測定し、10倍量(w/v)の 50 mM 塩化マグネシウムを含む0.3 M リン酸ナト リウム・カリウム緩衝液中で組織を十分に磨砕し た。磨砕液を遠心処理(1.500×g、15分間)し、 沈澱を得た。得られた沈澱を再度緩衝液に懸濁 し、4重に重ねたチーズクロスで濾過した。得ら れたろ過液を0-1.8 M のショ糖連続密度勾配遠 心(23,000×g、20分間)に用いた。遠心により得 られた緑色のバンドを回収し、緩衝液に溶解後、 再度密度勾配遠心を行った。得られた緑色バンド を回収し、リン酸緩衝液に再度懸濁したのち遠心 処理し、得られた沈澱を回収した。この操作を再 度行い最終的に得られた沈澱を緑色幼虫真皮細胞 中の分泌顆粒標品として以後の実験に用いた。

2.3 顆粒成分の分画

単離した分泌顆粒に蒸留水を加え、超音波処理により顆粒を破壊した後、遠心処理(4℃、1,300×g、30分間)を行った。遠心後得られた上清を可溶画分、沈澱を不溶性画分をして以下の実験に用いた。

4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Leammli [5] の方法に準じて行った。分子量マーカーには LMW Marker kit (GE ヘルスケア・バイオサイエンス) を用いた。

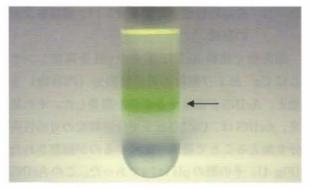


Fig. 1. Purification of secretory granules from the epidermal cells of Agrius green larvae. An arrow indicates seretrory granules.

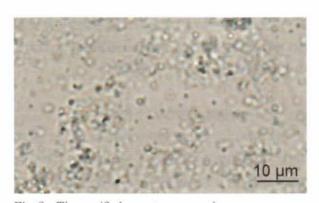


Fig. 2. The purified secretory granules.

2. 5 顆粒可溶性画分による AcINS 凝集沈澱

分泌顆粒可溶性画分中の凝集性成分Xの検討を AcINS の凝集性を指標に、pH、カルシウムイオン (Ca^{2+}) の有無に着目し調査した。すなわち目 的の濃度、pH に調整した INS 溶液に Ca^{2+} および 分泌顆粒可溶性画分を加え、凝集するか否か調査 した。

緩衝液のpHはpH5.5、6.5、7.4の3点である。 具体的にはpH5.5の緩衝液にはMESおよび酢酸ナトリウム緩衝液を用い、pH6.5の緩衝液としてリン酸ナトリウムおよびbis-Tris緩衝液を作成した。 最後にpH7.4の緩衝液にはHEPESおよびMOPS 緩衝液を用いた。なお、全ての緩衝液は凝集実験下における終濃度が50 mMになるように調整した。また塩化カルシウムは終濃度が実験条件下の終濃度が10 mMになるように調整した。

分泌顆粒の可溶性画分は各実験区の最終容量の 1/6 (v/v) になるように加えた。分泌顆粒の不溶 性画分を用いた実験には、不溶性画分5.6 mg に対 し150 μl の精製水を加えて懸濁したものを利用し た。これは可溶性画分の希釈率とほぼ同じである。 内容物画分と同様に全体の1/6 (v/v) になるよう に加えた。

精製 AcINS は終濃度が $200 \,\mu g/m\ell$ 、eCBP は終濃度が $50 \,\mu g/m\ell$ になるように調製した。

混和した各溶液は、4℃で30分間静置し反応させた。処理後、遠心処理(4℃,13,000×g,30分)により沈殿物と上清に分離した。各実験区の

沈澱および凝集、各画分を SDS-PAGE により成分 を分離し、AcINS が不溶性画分に含まれるか否か を調査した。

最後に形成された凝集沈澱に0.25 M EDTA 溶液 を等量加え、凝集が再溶解するか確認した。

3. 実験結果

3. 1 分泌顆粒の単離

5 齢 day 3 の緑色幼虫の真皮細胞から色素結合 タンパク質含有分泌顆粒の単離を試みた。粗ろ過 および低速遠心処理で細胞の残骸や核を除去した 後、真皮細胞の磨砕液をショ糖密度勾配遠心法で分離した。その結果、緑色のバンドが得られた (Fig. 1)。バンドを回収し、再度、連続密度勾配遠心処理を行い、分泌顆粒の精製をさらに進めた。回収した緑色バンド画分を光学顕微鏡を用いて観察すると、青緑色を呈する直径が約 1 μm の顆粒が多数認められた (Fig. 2)。他の不純物はほとんど観察されなかった。よってこの画分を精製分泌顆粒とした。得られた分泌顆粒の層の比重を計測したところ1.183 g/mℓ であった。

次に、分泌顆粒の波長350 nm から800 nm の範囲における吸収スペクトルを測定した。その結果、まず、緑色幼虫の真皮細胞摩砕液における吸収スペクトルとほぼ同じ吸収スペクトルを示し、AcINSに由来する670 nm 付近のピークと eCBP 由来の400 nm - 500 nm の間に存在する3つの吸収

ピークが認められた。よって、緑色幼虫の真皮細胞の持つ緑色色素成分が精製分泌顆粒に含まれる ことが確認された (データ省略)。

3. 2 分泌顆粒のタンパク質成分

分泌顆粒に含まれる成分を分析するため、分泌 顆粒を超音波処理で破壊後、遠心処理により分泌 顆粒の内容物(可溶性画分)と膜成分(不溶性画 分)に分離した。その後、SDS-PAGEで分泌顆粒 のタンパク質成分を分析した(Fig. 3)。その結果、 可溶性画分には AcINS と eCBP のみが主要成分と して認められた。特に AcINS は eCBP と比較して 極めて多量に存在していた。一方、不溶性画分か らは主要な9成分を含む多数のバンドが検出され た。また、分泌顆粒の不溶性画分には可溶画分よ り多くの eCBP タンパク質が認められた。

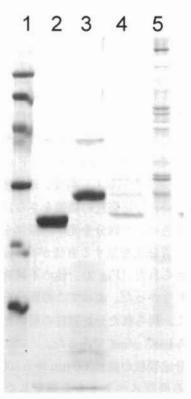


Fig. 3. SDS-PAGE of the soluble and membrane-binding fraction of the secretory granules.

Lane 1: marker, Lane 2: AcINS, Lane 3: eCBP, Lane 4: soluble fraction, Lane 5: membrene-binding fraction (insoluble fraction)

3.3 分泌顆粒成分によるタンパク質凝集沈澱 の形成

緩衝液で精製 AcINS 溶液の pH を調整し、そこに Ca^{2+} および顆粒の可溶性画分(内容物)を加え、AcINS が凝集するか否か調査した。その結果、AcINS は、 Ca^{2+} 存在下で分泌顆粒の可溶性画分を加えることで凝集・沈澱するのが観察された(Fig. 4)。その際の pH は7.4であった。この AcINS の凝集は瞬時に認められた。また哺乳類の CgA で報告されている弱酸性の環境下では凝集は認められなかった。

AcINSを凝集させるのが分泌顆粒の可溶性画分か、僅かに混入している可能性のある不溶性画分によるものかどちらかを明らかにするため、可溶性画分と不溶性画分をそれぞれにおける AcINS 凝集実験を行った。その結果、可溶性画分を加えた実験区では遠心後の上清(Fig. 5, Lane 2)以外に沈殿にも AcINS が検出されている(Fig. 5, Lane 3)。すなわち AcINS の凝集沈殿が認められる。一方、不溶性画分(膜画分)を加えた実験区では上清(Fig. 5, Lane 4)のみ AcINS が認められ、沈殿には検出されていない(Fig. 5, Lane 5)。すなわち AcINS を凝集させる因子は分泌顆粒の可溶性画分、すなわち顆粒内容物に存在することが明らかになった。

次に使用する緩衝液の影響を調査するため、同じpHで異なる緩衝液を用意しAcINSの凝集を調査した。その結果、MOPS緩衝液(pH7.4)を用いてもHEPES緩衝液と同様に凝集が観察された(データ省略)。またTris-HCI緩衝液(pH7.4)においても凝集が確認された(データ省略)。しかし、緩衝液のpHを変化させる凝集は観察されなくなった。すなわち凝集形成には緩衝液の成分ではなく、pH条件が重要であることが示された。

最後に凝集し沈澱した AcINS に EDTA を加えた場合の影響を調査した。その結果、凝集・沈澱した AcINS は EDTA 溶液 $(0.25 \text{ M}, 1.5 \text{ m}\ell)$ に速やかに溶解した(データ省略)。また蒸留水により 希釈した場合も AcINS の沈澱は溶解した(データ省略)。

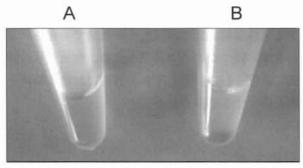


Fig. 4. The precipitate of aggregate of the purified AcINS

A:no addition of soluble fraction (control), B:addition of soluble fraction

4. 考察

本研究で追究した AcINS はN末端に小胞体輸送 シグナル配列を持つ分泌タンパク質で、通常は粗 面小胞体において合成後、速やかに細胞外へ分泌 されるはずである。よって、AcINS が蓄積する緑 色幼虫の真皮細胞には何らかの特殊な機構が存在 すると予想される。

そこで本研究では、まず緑色幼虫の真皮細胞より分泌顆粒の単離を試みた。タバコスズメガにおいて INS 含有顆粒の単離がメトリズアミドを利用してすでに発表されている[6]。また、脂肪体のタンパク質顆粒単離のためのショ糖不連続密度勾配超遠心法も報告されている[7.8]。本研究においても、当初、これらの方法を参考に顆粒の精製を試みた。しかし分泌顆粒の精製度およびコストを鑑みた結果、両方法は日常的に行う分泌顆粒の単離法として適さないと判断した(データ省略)。そこで新たにショ糖連続密度勾配遠心処理による精製条件を検討した。試行錯誤の結果、最終的に分泌顆粒の精製に成功した。

得られた分泌顆粒を観察すると、緑色の直径約 1 μm の大型の顆粒が多数占め、その他の成分は ほとんど観察されなかった。顆粒の吸収スペクトルには AcINS および eCBP の特徴的な吸収ピークが認められた。このピークは緑色幼虫の真皮細胞抽出液と同じで、緑色幼虫の体色が主に分泌顆

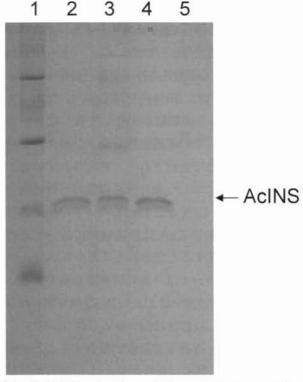


Fig. 5. Soluble fraction of the secretory granules required for aggregating of AcINS.

Lane 1: marker, Lane 2: soluble fraction (sup), Lane 3: soluble fraction (ppt), Lane 4: membrane-binding fraction (sup), Lane 5: membrane-binding fraction (ppt)

粒中の色素結合タンパク質によることが確認された。また得られた分泌顆粒の比重が比較的高い (1.183 g/mℓ) ことから、色素結合タンパク質は顆粒内に濃縮され蓄積されていると思われる。これは電子顕微鏡で電子密度の高い顆粒として検出されたこれまでの研究結果と矛盾しない。また、これは調節性分泌顆粒の特徴でもある。

次に分泌顆粒の内容物画分と膜画分のタンパク質成分を分析した。その結果、可溶画分からは主要成分としてAcINSおよびeCBPが検出された。よって、高純度に分泌顆粒を単離できていると判断される。一方、不溶画分には予想より多数の成分が認められた。主要成分は9種類存在した。これらの中にAcINSおよびeCBPの特異的選別や分泌制御に関与する成分が含まれると考えられるが、現時点では不明である。

次に、AcINS を用いて調節性分泌経路への選別 機構についての研究を進めた。現在、選別機構と して広く受け入れられているものの一つにグラニン凝集説がある[9]。CgAは酸性の可溶性タンパク質で、分子量約20,000-80,000、Ca²+ (1-10 mM程度)の存在する弱酸性条件下で自己凝集するという性質を持つ[10]。細胞内ではCgAはTGN(またはTGNから分泌顆粒が出芽した後)において凝集を開始し、その際調節性分泌タンパク質が巻き込まれることで選別されると考えられている。しかし、結果に示した様に分泌顆粒の可溶性画分(内容物)にはCgAと思われるバンドは検出されていない。一般にCgAは分泌顆粒において比較的高濃度で存在すると思われることから、CgAの存在の有無については今後の研究が必要である。

次に顆粒可溶性画分によるAcINS凝集実験を行った。その結果、AcINSは弱アルカリ性(pH 7.4)、Ca³⁺(10 mM)存在下で急激に凝集することが明らかになった。当初は条件が整えば AcINS 単独でも凝集するのではと考えたが、実験の結果、このような速やかな凝集は認められなかった(データ省略)。すなわちこの凝集は分泌顆粒の可溶性分画に含まれる因子 X が引き起こし、Ca²⁺を要求し、弱アルカリ条件下で起こることが明らかになった。これらの実験結果は哺乳類のグラニン凝集説と類似するものの、さきに述べたようにまず CgA が可溶性画分で検出されなかったことや反応が弱アルカリ条件下でおこること等幾つかの違いがある。今後、さらに研究を続けることでこれらの違いの原因を明らかにする予定である。

5. 要約

エビガラスズメ緑色幼虫の体色発現機構を追究するため、緑色幼虫の真皮細胞から色素結合タンパク質を含む分泌顆粒をショ糖密度勾配遠心法により単離した。単離した顆粒中のタンパク質成分を調査すると可溶性画分にはAcINSおよびeCBPの2種の色素結合タンパク質以外に主な成分は検出されなかったが、不溶性画分(膜画分)には多数のタンパク質が認められた。また可溶性画分にはCa²+の存在下でAcINSを凝集・沈殿させる何らかの成分Xが認められた。積み荷タンパク質を

凝集・沈殿させることで他のタンパク質から選別 する方法は哺乳類の調節性分泌機構で研究されて いるが、幾つかの点で異なるため、今後さらに詳 細に研究を行い、それぞれの機構における異同を 明らかにする必要がある。

引用文献

- Pittaway, A.R. (1993): The hawkmoths of the weatern palaerctic. Harley Books (England)
- [2] Saito, H. and Shimoda, M. (1997): Insecticyanin of Agrius convolvuli: purification and characterization of the biliverdin-binding protein from the larval hemolymph. Zool. Sci., 14, 777-783
- [3] Tooze, S., Martens, G.J. and Huttner, W.B. (2001): Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.*, 11, 116-122
- [4] Dannies, P.S. (1999): Protein hormone storage in secretory granules: mechanisms for concentration and sorting. *Endocr. Rev.*, 20, 3-21
- [5] Laemmli, U.K. (1970): Cleavage structural of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685
- [6] Shinoda, T., Iliruma, K., Charles, J.-P. and Riddiford, L.M. (1997): Hormonal regulation of JP29 in the epidermis during larval development and metamorphosis in the tobacco hornworm. *Manduca sexta*, Archiv. Insect Biochem. Physiol., 34, 409-428
- [7] Tojo, S., Nagata, M. and Kobayashi, M. (1980) : Storage proteins in the silkworm, Bombyx mari, Insect Biochem., 10, 289-303
- [8] Shirai, K., Fujii, H., Doira, H. and Iwamoto, H. (2000): Synthesis and resorption of a humoral chymotrypsin inhibitor, CI-8, by the fat body of the silkworm, *Bombyx mori. Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30, 363-368
- [9] Taupenpt, L., Harper, K.L. and O'Connor,

D.T. (2003): The chromogranin-secretogranin family. N. Engl J. Med., 348, 1134-1149

[10] Yoo, S.H. (1996): pH and Ca²⁺ dependent aggregation property of secretory vesicle

matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. *J. Biol. Chem.*, 271, 1558-1565

ることで有核精子東は解離し、緩慢な運動能を獲得するようになる[7]。このように変化した精子を未交尾メスの交尾囊に注入すると、受精卵を産ませることが出来る。このような in vivo での精子の変化は、in vitro でも再現することが出来る。すなわち、貯精嚢中の精子を分泌物とともに in vitro に取り出し、これに前立腺(glandula prostatica)の磨砕物、もしくはカイコガには存在しない trypsinを適当な濃度で混合することで、無核精子は活発な運動能を獲得し、有核精子東は解離する。さらにこれを未交尾のメス交尾囊に注入すると、受精卵を産ませることが出来る[6.8-12]。

前述の実験は、貯精嚢に貯蔵された精子を活性 化する因子は、前立腺にのみ存在することを表す が、この因子の活性は、①熱処理により失活す る[13]、② antipain、leupeptin といったセリンプ ロテアーゼ阻害剤との同時添加によって阻止され る[13]、③ trypsin の他にカイコガには存在しない タンパク質で、C末端側のアルギニン残基を特異 的に切断するマウス顎下腺由来の endoproteinase Arg-C といった市販エンドペプチダーゼによっ ても代用できるが、それ以外の chymotrypsin、 papain, collagenase, lipase, hyaluronidase & いった酵素では代用できない[12,13] 等の分子的 特徴を持つことが報告された。さらに、trypsinや endopeptidase Arg-Cなどのserine型endopeptidase は、ともに合成基質 Nα-benzoyl-L-arginine cthyl ester (BAEE) に対する estrase (BAEEase) 活性 を有するが、前立腺には、部位特異的にBAEEase 活性が存在している[14]。これらの知見から、前 立腺特異的な精子活性化因子は、C末端側のアル ギニン残基を切断する機能を持った、trypsin 様の serine 型 endopeptidase であると予想された。そ して、精子活性化イニシエーターという意味から 「initiatorin」と名付けられた[10]。

本研究では、精子活性化メカニズム in vitro における精子活性化活性を指標に、前立腺からのinitiatorin 精製方法の検討をおこなった。その結果、精子活性化活性と BAEEase 活性を同時に有するタンパク質を高度に精製することが出来るようになった。そして、この高度に精製されたタン

パク質についてN末端一次構造を明らかにすると 同時に、endopeptidase としての性質を調査した。

2. 材料と方法

2. 1 供試昆虫

実験には交雑種、錦秋×鐘和(上田蚕種)を用い、人工飼料による完全無菌状態で飼育をした[15]。

2. 2 器官の摘出

成虫オス生殖器官[2] は、成虫腹部を切断、背部を縦に切開の後、実体顕微鏡下、水冷カイコ用リンガー液[16] 中で摘出した。脂肪体を取り除いた後、部位別に切り分け、濾紙で過剰な水分を除去してエッペン型サンプルチューブに入れて、-60℃で保存した。

2. 3 in vitro での精子活性化検定

精子活性化の検定は、in vitro における精子運動 能獲得状態の観察によりおこなった。すなわち、 貯精嚢中の運動性を欠く無核精子および256本が東 となった有核精子束をスライドグラス上に取り出 し、これに検定溶液を添加することにより生じる 変化をもって検定した[13.17]。

貯精嚢、前立腺は、第2.2項と同様にして、氷冷カイコガ用リンガー液中で収り出した。

摘出した貯精嚢は、1器官あたり $50\mu\ell$ の氷冷カイコガ用リンガー液に移し、この中で器官を切開し、こぼれてくる精液との混合液を精子懸濁液として使用した。得られた精子懸濁液 $10\mu\ell$ に対して、各精製両分 $1\mu\ell$ を加え、スライドグラス上でよく混合した。これにカバーグラスをかけた時点を反応開始時間として、以降、透過型顕微鏡下で経時的に観察し、反応開始後10分における精子の状態をもって精子活性化活性の強さを判断した。

なお、この実験に用いた精子懸濁液は、作製後 20分以内のものを使用し、検定の都度、無核精子 に運動性がないこと、有核精子束が解離していな いことをあらかじめ確認してからおこなった。

2. 4 タンパク質定量

タンパク質の定量は、ビシンコニン酸を用いた 定量法[18] を Protein Assay Bicinchoninate kit (Nacalai tesque) を用い、牛血清アルブミンによ り作製した標準曲線をもとに比較算出した。

2. 5 BAEEase 活性の測定

酵素活性の測定は、Walsh and Wilcox (1970) の方法を参考にした[19]。すなわち、1.0 mM BAEE, (Peptide institute)を含む50 mM Tris-HCl(pH9.0)、1 mℓを反応液とし、これに10−100 μℓ の酵素液を加えて反応を開始した。反応は、25℃に保持された光路長10 mm のキュベット中で行い、分光光度計(Shimadzu、UV-1600)を使用して、253 nmにおける吸光度の上昇により活性値を求めた。BAEE の分子吸光係数は1150 M⁻¹ cm⁻¹であり、1分間に1 μmol の BAEE が分解された時の酵素活性を1 Unit とした。

2. 6 蛍光人工基質を用いた活性の測定

酵素の活性は、蛍光人工基質として Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Boc-Leu-Thr-Arg-MCA、Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA、Boc-Gly- Arg-Arg-MCA、Boc-Lys-Arg-MCA(Peptide institute)を用いて測定した[20-22]。

0.5 mℓの反応液 [50 mM Tris-HCI (pH8.0), 10 mM CaCl₂, 40 μM 基質] に、酵素溶液を適当に希釈し、これを10 μℓ 添加して、30℃で30分間反応させた。その後、1.5 mℓ の0.1 M CH₃COOH-CH₃COONa (pH 4.3) を加え、よく混合して反応を停止させた。酵素活性は、生成される7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の量を分光蛍光光度計(Hitachi, F-2000) を用いて、励起波長370 nm、測定波長460 nm で測定し、反応後に生成されるAMC 1 mol を 1 Unit として算出した。

また、Peptide instituteより購入した antipain、leupeptin、Sigmaより購入した Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)、Na-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)、Nakalai tesqueより購入したphenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を使用し、酵素活性に対する阻

害効果を求めた。なお、TPCK および PMSF は ethanol に、その他の試薬は水に溶解して使用した。

2. 7 Initiatorin タンパク質の精製

前立腺 5 本に対し、0.1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.8) 1 m ℓ を加え、氷冷下で磨砕した。この磨砕液を、15,000×g、10分間、4℃で遠心後、上清を回収した。

クロマトグラフィーの全過程は、initiatorinの分解を抑制するために4℃下で AKTA prime (GE Healthcare) システムを利用しておこなった。 500 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.4)で平衡化した Hi Trap Benzamidine FF (GE Healthcare)充填カラム (1 mℓ)に前述の粗酵素液を投与し、吸着、洗浄し、50 mM Glycine-HCl (pH 3.0)により溶出した。この溶出画分を Amicon Ultra-15 (Millipore)により濃縮した。この濃縮画分の一部は、第2.8項のアミノ酸解析に用いた。

次に、150 mM NaClを含む20 mM Sodium phosphate (pH 7.0) により平衡化したHi Trap Desalting (GE Healthcare) (5 mℓ) を用いて、プログラムに従い、前述の濃縮サンプルのバッファー交換をおこなった。これを第2.3項による精子活性化検定に供した。

SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質液にサンプル緩衝液 [4% sodium lauryl sulfate (SDS), 5% mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 125 mM Tris-IICl (pH 6.8)] を加え、十分に混合し、100℃で 5分間処理した。泳動は Laemmi (1970) の方法に準じて行った[23]。泳動後のたんぱく質の検出は、銀染色法をシルベストステインワン (Nakalai tesque) を用い、添付されている説明書に準じておこなった。

2.9 N末端アミノ酸配列解析

第2.7項で得られたサンプルを第2.8項に従

い、電気泳動を行った。ただし、陰極側の電極液には 1 mM thioglycolic acid を加えた。

SDS-PAGE によって分離したタンパク質は、電気的に polyvinilden difluoride (PVDF) 膜 (Fluorotrance, Pall) に転写した。分離ゲルの大きさに合わせて切断した濾紙 (ADVANTEC No. 590)を転写用緩衝液 A液 [30 mM tris, 20% methanol, 0.02% SDS]、B液 [25 mM tris, 20% methanol, 0.02% SDS]、C液 [25 mM tris, 20% methanol, 0.02% SDS. 40 mM 6-amino-n-caproic acid] にそれぞれ 2 枚ずつ15分間浸漬した。PVDF 膜の活性化は、methanol に 5 秒間浸し、水で軽くすすいだ後、C液に浸した。

セミドライ型ブロット装置 (Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) を用い、陽極側の電極上に、A液に浸した濾紙、PVDF 膜、泳動後のゲル、C液に浸した濾紙の順にセットし、パワーサプライに接続して、400 mA 定電流、常温で2時間ブロッティングをおこなった。

転写後の PVDF 膜は、0.1%(w/v)coomassie brilliant blue R-250を含むmethanol-acetic acid-H₂O (9:1:10) 溶液に 5 分間浸漬、振とうした。その後、methanol-acetic acid H₂O 混合液で15分間脱色し、さらに90% methanol で40秒間脱色を行い、膜を乾燥させた。

膜に転写されたタンパク質は、ハサミで切り 出した後、アミノ酸シーケンサー(PPSQ-21A、 Shimadzu)にて解析を行った。

3. 結果

1 前立腺からの initiatorin タンパク質の精製

0.1%CTABを含む50 mM Tris-HCl (pH7.8) で磨砕し、調製した前立腺和抽出物を500 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl (pH7.4) で平衡化した Hi Trap Benzamidine FF カラムに添加し、吸着・洗浄させたのち、50 mM Glycine-HCl (pH3.0) 緩衝液で酸性条件に切り換えることによって溶出されてきた画分のうち、12、13番にのみに BAEE ase活性は認められた (Fig. 1A)。さらにこの2画分

を混合・濃縮し、Hi Trap Desalting カラムに添加し、150 mM NaCl を含む20 mM NaH $_{0}$ PO $_{4}$ ・2 H_{2} O (pH7.0) で溶媒交換をおこない、「材料および方法」第2.3項に従い精子活性化活性を調べたところ、無核精子の活発な運動と有核精子束の解離が観察できた。12、13番の画分の精製率は、粗抽出物に比べわずか1.2倍であった(Table 1)、SDS-PAGE により分子量29、26 kDa のタンパク質のみが検出された(Fig. 1B)。

3. 2 N末端アミノ酸配列解析

前項で得られた溶出画分をPVDF 膜に転写後、切り出し、N末端アミノ酸配列解析をおこなった。 29.26 kDa タンパク質ともにN末端アミノ酸配列を明らかにすることができた。明らかになった配列は、両者ともに同一な IVGGRRAVPHSFPXTVAを有しており(ただし、X は解読できなかった)、この配列は、Aigaki et al. (1994)が報告した精包に存在するBAEEase タンパク質のN末端アミノ酸配列 IVGGRRAVPHSFPWTVAILK と合致した。

3. 3 酵素学的性質

Initiatorinによる精子活性化活性は、trypsinやendopeptidase Arg-Cに代用することできことから、C末端に arginine をもつ6種類の蛍光人工基質に対する酵素学的性質の調査を行った。そして、トリプシン同様、initiatorinはC末端にアルギニン残基を持つ基質すべてを切断できる endopeptidaseであることが確認できた。しかし、基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA に対する活性を100とし、他の基質に対する活性を相対活性で評価すると、trypsinについてはきわだった基質特異性が見出せなかったのに対し、前立腺精製タンパク質は基質 Boc-Gly-Lys-Arg-MCA と Boc-Gly-Arg-Arg-MCA への相対活性がそれぞれ915.7、67572.3と極めて特異的であった(Table 2)。

基質 Boc-Gly-Arg-Arg-MCA を用いて、至適 pII、CaCl₂の影響および阻害剤の影響について検 討したところ、至適 pH は9.0付近であり、Ca²⁻非 依存性であった。阻害剤の影響については、調査 した serine protease 阻害剤の中でも特に antipain,

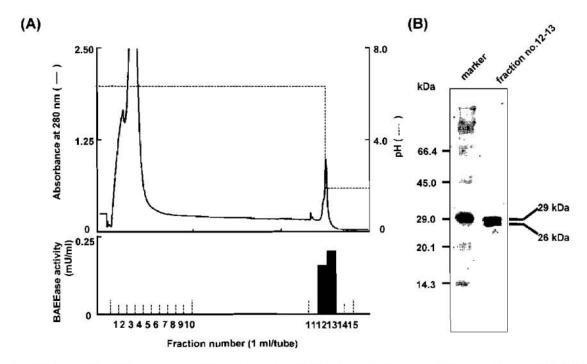


Fig. 1. Elution profile of B. mori g. prostatica extract on affinity chromatography with benzamidine and SDS-PAGE analyses.

(A), The crude extract obtained in the presence of 0.1% CTAB was applied to a column equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl. The column was eluted with 50 mM glycine-HCl buffer, pH 3.0, at a flow rate of 1.0 mℓ/min. Fractions of 1.0 mℓ were collected, and 100 μℓ of each was determined for BAEEase activity. Pooled fractions (fractions 12 and 13) were concentrated and applied to gel permeation chromatography equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.6, containing 150 mM NaCl. (B), A sample from gel permeation chromatography was subjected to SDS-PAGE with 12.5% gel, which was silver-stained.

Table 1. Purification of initiatorin from the g. prostatica of B. mori.

To and the second	Total activity (mU)	Total Protein (mg)	Vol. (mℓ)	Specific activity (mU/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Crude extract °	1085.7	848.7	1.5	1.28	1.0	100
Hi Trap Benzamidine FF *	450.0	300.6	2.0	1.50	1.2	41

[&]quot; Crude extract was prepared with Tris-HCl buffer (p117.6) containing 0.1% CTAB.

^b BAEEase activity and protein concentration were determined after performing gel permeation chromatography as described in the text.

leupeptinによる活性阻害が顕著であり、これは trypsin と類似した傾向であった(Table 3)。

4. 考察

前立腺の分泌物に存在するイニシャトリンは精液の移行先である精包内にも存在するという仮定のもと、精包内に含まれるBAEEase タンパク質の精製が行われ、結果、分子量26,29 kDaのタンパク質が精製され、29 kDa タンパク質についてはN 末端アミノ酸配列(IVGGRRAVPHSFPWTVAILK)が決定された[24]。しかし、このタンパク質には、精子活性化活性を認めることが出来ず、initiatorin

の精製に成功したと結論することが出来なかった。今回、前立腺から initiatorin を精子活性化活性を指標にして精製したところ、Aigaki et al. (1994) 同様にBAEEase 活性を有し、分子量は26, 29 kDaであり、しかも決定されたN末端アミノ酸配列 (IVGGRRAVPHSFPXTVA) は同一であるという結果を得た。この矛盾の原因として以下のようなことを考える。第一に、Aigaki et al. (1994) は、精包の粗抽出物からの精製を、硫安分画処理後、3回の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 処理によりおこなっているが、この方法では、多くの時間を要する。つまり、initiatorin がBAEEase 活性を有している状態であっても、精製過程での多く

Table 2. Relative rates of hydrolytic activity against various peptidyl-MCA substrate by trypsin and initiatorin.

Substrate	Relative activity (%)			
Substrate	trypsin	initiatolin		
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	100.0	100.0		
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	45.6 ± 0.3	46.7 ± 0.6		
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	37.5 ± 0.2	128.1 ± 0.2		
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	18.8 ± 0.4	54.7 ± 0.8		
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	36.1 ± 0.4	67572.3 ± 294.2		
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	19.1 ± 0.2	915.7 ± 10.4		

The enzyme activity toward BOC-Phe-Ser-Arg-MCA was taken as 100%. Data are expressed as the mean ± S.E., where n>3.

Table 3. Effects of various serine protease inhibitors on the initiatorin activity.

Inhibitor	Relative ac	etivity (%)
Inuition	trypsin	initiatolin
Control: water	100.0	100.0
Antipain	4.2 ± 0.2	29.9 ± 0.9
Leupeptin	1.1 ± 0.1	50.7 ± 1.4
TLCK	28.8 ± 1.0	65.1 ± 2.5
Control: EtOH	100.0	100.0
TPCK	100.0 ± 0.4	76.2 ± 0.9
PMSF	94.8 ± 0.2	82.9 ± 2.7

The enzyme activity toward BOC-Gly-Arg-Arg-MCA in absence of inhibitor was taken as 100%. Data are expressed as the mean \pm S.E., where n>3.

の緩衝液交換などによる煩雑さや時間が影響し、 何らかの原因で精子活性化活性が欠損してしまっ たと考えられる。第二に、精製標品の精子活性化 活性検定法に問題があったことが考えられる。本 研究でも用いた in vitro の精子活性化活性検定法で は、加える標品の溶媒 pH は、カイコガリンガー 液が緩衝性を持たないため、リンガー液と同様な 中性付近に限られ、さらに tris といった Aigaki et al. (1994) が精製中に用いた試薬は、最終濃度数 μM オーダーで精子に著しい毒性を示す(長岡未 発表データ)。アフィニティ精製は、カラムに固定 されたリガンドとタンパク質との特異性を利用し て、目的タンパク質を効率よく分離できるという 点で大変選択性に優れている。Benzamidine は、 factorXa や thrombin などの serine protease の阻 害剤であるため、これを採用することにより、粗 抽出液調製後、1回のカラムワークで精製がおこ なえるようになった。加えて、精製したタンパク 質を in vitro の精子活性化活性検定に供するのに、 時間のかかる透析法ではなく、ゲル濾過クロマト グラフィー (Hi Trap Desalting カラム)を用いて 素早く精子に対して毒性が低いと判断できたリン 酸緩衝液(500 mM NaCl を含む20 mM NaH。PO4・ 2H₂O、pII7.0) に置換できたことにより、精子活 性化活性が確実に検出できたものと考える。

カイコガの精子は精包において、initiatorin の 作用を受け、運動能を獲得し、さらに受精可能 な状態へと変化する。この一連の反応を「sperm maturation」と呼ぶが、精包には精子成熟と深い関 わりを持つ特異的な arginine 生成反応が存在する と考えられており、これは「arginine degradation cascade」と呼ばれている[10]。そして、この反応 系における initiatorin の作用点は、①タンパク質 の arginine 残基を認識し、そのC末端側を切断す ることにより C末端に arginine を有すペプチドを 生成すること、②生じたペプチド断片の C 末端側 の arginine 残基を遊離させる exopeptidase の前駆 体を活性化することが考えられている。前者にお ける initiatorin 基質タンパク質は、一般的なタン パク質と比較して、効率のよい arginine 生成を支 えるために、多くの arginine を含み、自ずと2個 以上の arginine の繰り返し配列を多く含むタンパ ク質であると予想される。よって、本研究で見出 された initiatorin の Arg-Arg 配列に対する基質特 異性は、想定される基質タンパク質の効率良いペ プチド断片生成に適していると考えられる。前立 腺と貯精囊、および前立腺と乳白腺の分泌物を試 験管内で反応させると、特異的に arginine が遊離 されてくることから、arginine carboxylpeptidase が、前立腺と/または貯精嚢および乳白腺に存在 しているものと子想された[25]。そして、arginine carboxylpeptidase 活性が精包内で存在し、同時 に、乳白腺、貯精嚢、前立腺分泌物に含まれるこ とが明らかとなった[26]。加えて、乳白腺や貯 精嚢に存在する arginine carboxylpeptidase 活性 は、当該生殖腺から調製した粗酵素液に適当な trypsinを添加することにより初めて活性が見出 された。このことは、哺乳動物の腸内に存在する carboxylpeptidase Bが、trypsinによる限定分解 により活性化されることと類似している[27]。以 上を総合し、カイコガ生殖腺に存在する arginine carboxylpeptidase の活性化は、trypsin に類似し た endopeptidase、すなわち、initiatorin による ものであると想定された。前立腺で特異的に発現 している arginine carboxylpeptidase 候補遺伝子 (GenBank: AB485777) から予測されるアミノ酸 配列を、他の生物に存在する carboxylpeptidase と 比較し、その相同性から trypsin などにより切断 される pro-mature 領域の切断部位(活性化切断部 位)を予想すると、3つの arginine の繰り返し配 列 (Arg-Arg-Arg 配列) が見出される(長岡未発 表データ)。この結果は、initiatorinの Arg-Arg 配 列に対する高い基質特異性により不活性型arginine carboxylpeptidase を選択的に基質とし、活性化し ている可能性を強く支持しているものと言える。 そして、以上に基づいた研究は initiatorin の基質 タンパク質探索にとって有効であり、精子活性化 の分子メカニズム解明に役に立つと予想される。

摘要

カイコガオス生殖輸管内前立腺に存在する精子

に運動性を付与する活性因子 "initiatorin" を精製した。前立腺粗抽出液の精製により得たタンパク質は、BAEEase 活性を有し、そのN末端アミノ酸配列は、すでに報告されていた精包から精製された BAEEase のそれと一致した。

endopeptidase としての基質特異性の調査によると、この酵素は serine 型 endopeptidase の一種である trypsin 同様ペプチドの Arg-C 末端を分解するが、特に2つの Arg が連続して存在する基質に特異的に反応するという性質を有していた。

謝辞

アミノ酸配列解析に際し、機械の使用を快諾して下さいました京都工芸繊維大学 亀井 加恵子准教授に対して深く感謝中し上げます。

引用文献

- [1] Werner, M. and Simmons, L. W. (2008): Insect sperm motility. *Biol. Rev.*, 83, 191-208
- [2] Nagaoka, S., Takata, Y. and Kato, K. (2011): Identification of two arginases generated by alternative splicing in the silkworm. *Bombyx* mori. Arch. Insect Biochem. Physiol., 76, 97-113
- [3] 入来重盛(1941): 蚕の二型精子とその作用 について. 動物学雑誌, 53, 123
- [4] Katsuno, S. (1977a): Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae).
 IV. The behaviour of the spermatozoa in the internal reproductive organs of female adults. Appl. Ent. Zool., 12, 352-359
- [5] Katsuno, S. (1977b): Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae). V. The factor related to the shrinkage of apyrene spermatozoa. Appl. Ent. Zool., 12, 370-371
- [6] Sado, T. (1961): Spermatogenesis of the

- silkworm and its bearing on the radiation induced sterility. I. J. Fac. Agric Kyushu. Univ., 12, 359-386
- [7] Osanai, M., Aigaki, T. and Kasuga, H.(1987): Physiological role of apyrene spermatozoa of Bombyx mori. Experientia, 43, 593-596
- [8] Katsuno, S. (1978): Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae). VI. The factor related to the shrinkage of apyrene spermatozoa. Appl. Ent. Zool., 13, 47-48
- [9] Omura. S.(1938): Studies on the reproductive system of the male of *Bombyx mori*. II. Posttesticular organs and post-testicular behavior of the spermatozoa. J. Frac. Agric. Hokkaido Imp. Univ., 40, 129-170
- [10] Osanai, M., Aigaki, T. and Kasuga, H.(1987): Arginine degradation cascade as an energyyielding system for sperm maturation in the spermatophore of the silkworm, Bombyx mori. In: New Horizons in Sperm Cell Research. (Edited by Mohri, II.). Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 185-195
- [11] Osanai, M., Kasuga, H. and Aigaki, T.(1991): Motility-related ultrastructural changes in the flagellar membrane of apyrene spermatozoa of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by Arg-C endopeptidases. *Inver. Repro. Dev.*, 19, 193-201
- [12] Takemura, Y., Kanda, T. and Horie, Y. (1999): Artificial insemination using trypsin-treated sperm in the silkworm. *Bombyx mori. J. Insect. Physiol.*, 45, 471-477.
- [13] Osanai, M., Kasuga, H. and Aigaki, T. (1989a): Induction of motility of apyrene spermamotzoa and dissociation of eupyrene sperm bundles of the silkmoth, *Bombyx mori*, by initiatorin and trypsin. *Invert. Repro. Develop.*, 15, 97-103
- [14] Aigaki, T., Kasuga, H. and Osanai, M.(1987):

- A specific endopeptidase, BAEE esterase, in the g. prostatica of the male reproductive system of silkworm, *Bombyx mori. Insect Biochem.*, 17, 323-328
- [15] 松原藤好、桑 前、杉森秀昭、石河正久、角 田素行、松本継男(1988):全齢2回人工飼 料給餌によるカイコの飼育. 日蚕雑, 57, 118-122
- [16] Narahashi, T. (1963): Dependence of resting and action potentials on internal potassium in perfused squid giant axons. Adv. Insect physiol., 1, 175-256
- [17] Osanai, M., Kasuga, H. and Aigaki, T. (1989b): Isolations of eupyrene sperm bundles and apyrene spermatozoa from seminal fluid of the silkmoth, *Bombyx mori.* J. Insect Physiol., 35, 401-408
- [18] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.*, 150, 76-85
- [19] Walsh, K.A. and Wilcox, P.E. (1970): Serine protease. In *Methods in Enzymology* 19 (Edited by Perlmann G.E.). Academic Press, New York, 31-36
- [20] Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S. and Toyoda, Y.(1994): Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. J. Biol. Chem., 269, 31845-31849
- [21] Hatsuzawa, K., Hosaka, M., Nakagawa, T., Nagase, M., Shoda, A. Murakami, K. and

- Nakayama, K. (1990): Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 22075-22078
- [22] Honda, A., Yamagata, K., Sugiura. S., Watanabe, K. and Baba, T. (2002): A mouse serine protease TESP5 is selectively included into lipid rafts of sperm membrane presumably as a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. J. Biol. Chem., 277, 16976-16984
- [23] Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685
- [24] Aigaki, T., Kasuga, H., Ngaoka, S. and Osanai, M. (1994): Purification and partial amino acid sequence of initiatorin, a prostatic endopeptidase of the silkworm, *Bombyx mori. Insect Biochem.*, 24, 969-975
- [25] Kasuga, H., Aigaki, T. and Osanai, M.(1987): System for supply of free arginine in the spermatophore of *Bombyx mori*: arginineliberating activities of contents of male reproductive glands. *Insect Biochem.*, 17, 317-322
- [26] Aigaki, T., Osanai, M. and Kasuga, H.(1988): Arginine carboxypeptidase activity in the male reproductive glands of the silkworm. Bombyx mori. Insect Biochem., 18, 295-298
- [27] Folk. J.E. and Gladner, J.A. (1958): Carboxypeptidase B. I. Purification of the zymogen and specificity of the enzyme. J. Biol. Chem., 231, 379-391

家蚕繭の紫外線遮蔽効果

高濱(一田)昌利・高野奈津子・伊田波啓輔

Shielding Efficiency from Ultraviolet Rays by Cocoon Extracts of Bombyx mori L.

Masatoshi TAKAHAMA (ICHIDA)*, Natsuko TAKANO and Keisuke ITABA

Center for Bioresource Field Science, Kyoto Institute of Technology, Ipponki-chou, Ukyou-ku, 616-8354 Kyoto

Abstract

In order to clarify whether or not fluorescent cocoons of the silkworm, *Bombyx mori*, contain shield chemicals from ultraviolet (UV) rays, UV shielding efficiency was assayed using agarose films containing cocoon extracts with ethanol and boiling-water. Among cocoons from 9 races, the higher shielding efficiency was obtained in boiling-water extract of LYS race cocoon, and conditions for extraction temperature and time were not greatly influential in the efficiency. The ethanol extracts from LYS race also showed to have higher efficiency, but lower efficiency was recorded in extracts with 90% and 100% ethanol. Compared between ethanol and boiling-water extracts, the UV shielding effect was higher in the ethanol extract. From these results, it was indicated that fluorescent chemicals responsible for shielding from UV rays are present in cocoons, which are not sericin protein and its hydrolysates.

Key Words: UV shield effect, ultraviolet ray, fluorescent cocoon. Bombyx mori L.

1. まえがき

南層中のセリシン部には抗酸化作用やチロシナーゼ活性阻害があることが亀井ら (2005) によって明らかにされている。Kurioka と Yamazaki (2002) は笹繭 (緑繭) 繭層の水溶性画分に含まれる 7種類のフラボノール及びフラボノール配糖体を同定し、笹繭における強い抗酸化作用の要因としている。またこれらの物質がカイコの食餌植物である桑葉中に含まれるフラボノール類と構造的に異なることから、これら 7種のフラボノール類がカイコの体内で合成されたものであることを示している。これらフラボノール類の一部は、繭糸の紫外線蛍光に関わっている(藤本・林屋、1960:一田ら、2010)。繭糸中の紫外線蛍光に関し、井上 (1933)

は繭の蛍光色として濃黄色、黄色、淡紫色、紫色の4色を挙げ、品種による違いを認め、蛍光と解じょとの関係や雌雄における差も調査しており、蛍光と雌雄の差は品種によって異なっているとしている。坂手ら(1952)は様々な系統の蛍光物質から極めて類似の紫外線吸収スペクトルを得たと報告をしている。また、味沢(1968)は黄色蛍光繭の繭層内には紫色蛍光が存在せず、黄色蛍光物質はフィブロインに存在しないとしている。

ところで、絹に紫外線防御効果があることもかなり以前から知られている。赤井(2003)は野蚕を含めた繭糸の紫外線防御効果には繭糸の構造が関わっているとしている。家蚕では、絹たんぱくに含まれるチロシンやトリプトファンが光酸化反応によって着色物質に変わり、黄褐変する(間、

*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、EL 075-861-0741 1990)ことで紫外線防御機能があると考えられている。一方、繭糸が紫外線蛍光を示すということは紫外線エネルギーを蛍光エネルギーに変換していることを意味し、紫外線蛍光繭には紫外線防御効果を持つことが推察される。そこで、蛍光繭と紫外線防御能の関係を明らかにするため、アガロースを用いた測定法について検討した。また、色・蛍光特性の異なる繭の抽出液を用いて紫外線防御能の測定を行い、繭の色・蛍光特性と紫外線防御能の関係について検討し、さらにそれらの抽出方法を変化させ、これらと紫外線防御能の関係についても検討した。

2. 材料および方法

2. 1 供試材料

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育 センターで継代飼育されている繭色および紫外線 蛍光の異なるカイコガ (Bombyx mori L.) 9系統 を試供材料として用いた (図1)。

黄繭黄色強蛍光系統 (CY-LYS:熱帯種由来の 黄繭種。5年間にわたって紫外線黄色強蛍光繭の みを選抜した系統。非休眠)。黄繭黄色弱蛍光系 統(CY-LYW:日本種金色に由来する黄繭種。紫 外線に対し黄色弱蛍光繭のみを選抜した系統)。 黄繭無蛍光系統(CY-NL:日本種金色に由来する 黄繭種。紫外線に対しほとんど蛍光を示さない系 統)。黃緑繭黃色強蛍光系統(CG-LYS:大造松村 に山来する黄緑色繭種。5年間にわたって紫外線 黄色強蛍光繭のみを選抜した系統)。 白繭黄色強蛍 光系統(CW-LYS:中国種 C-2に由来する白繭種。 紫外線黄色強蛍光繭のみを選抜している系統)。白 繭黄色蛍光系統(CW-LY:支124に由来する白繭 種。紫外線黄色蛍光繭のみを選抜している系統)。 白繭白色蛍光系統(CW-LW:CO4に由来する白 繭種。紫外線白色蛍光を示す系統)。白繭紫色蛍光 系統 (CW-LV: 小石丸亘理。白繭種)、および白 繭青色蛍光系統 (CW-LB: 滋賀県で採取した小石 九。白繭種)の繭を用いた。

2.2 繭層抽出液の作製

カイコの繭から毛羽を除去した後、約6mm 四 方に裁断した。これを0.1g秤量し、10mℓの溶媒 を加えて10種類の条件で抽出を行い、濾過によっ て繭層部分を取り除いた。これを以下の実験の試 料とした。

熱水抽出は、抽出温度および時間を変化させ、 2種類の方法で抽出を行った。溶媒として蒸留水 を加え、それぞれオートクレーブを用い、100℃で 20分、120℃で20分加熱し、抽出液を作製した。

エタノール抽出は、40%エタノール、50%エタ ノール、60%エタノール、70%エタノール、80% エタノール、90%エタノール、および100%エタ ノールを溶媒として25℃で48時間抽出した。これ らエタノール抽出液については、抽出液を60℃で 湯煎し、それぞれエタノールを除去した。これに エタノール除去前の量になるようにそれぞれ蒸留 水を加え、これを抽出液とした。

2.3 抽出率の測定

上述した2.2項において抽出した繭層の抽出残渣を蒸留水で洗浄し、乾燥器で乾燥後、抽出残渣の重量を測定した。これを抽出前の繭層の乾燥重量から差し引き、抽出率を算出した。

2. 4 膜の作成

アガロース0.6 g に対して蒸留水 $20 \, \text{ml}$ を加えて $3 \, \%$ アガロース溶液を作製した。このアガロース溶液 $300 \, \mu l$ に $2.2 \, \bar{q}$ で抽出した繭層抽出液を $600 \, \mu l$ 加えた。これを約 $10 \, \text{cm}$ 四方のポリプロピレン製のフィルム上に $500 \, \mu l$ 滴下した。これに再度フィルムをかぶせ、ガラス板で挟んでアガロース膜を作製した。膜の厚さはスペーサーにより厚さが一定になるようにした。

2. 5 紫外線強度計を用いた紫外線防御能の 測定

紫外線強度計 (UVP: ULTRA-VIOLET PRODUCTS)を用い、310 nm (UV-B) 及び360 nm (UV-A) の検知器を使用し、上述した2.4項で作製した膜で検知器を覆い、紫外線強度計の数値

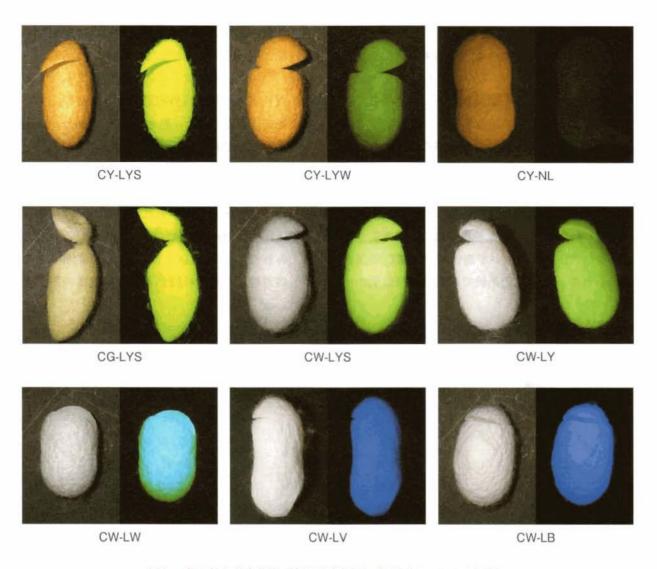


図1 繭の色と蛍光状況(左が蛍光灯下、右がブラックライト下)

を記録し、紫外線防御能を測定した。また、検知器に膜を覆う前後での紫外線強度計の数値より遮蔽率を次式を用いて算出した。

(進蔽率)%=|1-(進蔽時の紫外線強度)

/(光源の紫外線強度)|×100

使用した光源はブラックライト(主波長:352nm,310nm)である。また、抽出液の代わりに蒸留水で作製した膜で覆ったときの紫外線強度をpositive controlとした。

3. 結果および考察

3. 1 セリシン部の抽出率

それぞれの抽出方法による抽出率を表 1-1 およ

び表1-2に示した。熱水抽出では、抽出温度の上昇に伴って抽出率も上昇した。一方エタノール抽出では、系統により抽出率や最も抽出されるエタノール濃度が異なった。多くの系統でエタノール濃度40%と100%における抽出率は低かった。CG-LYS系統以外の系統では60%~90%エタノール濃度で抽出されたが、CG-LYS系統では50%~100%でほぼ同じ抽出率を示し、40%での抽出量は極めて少なかった。

3. 2 繭層の抽出条件と紫外線遮蔽率

紫外線遮蔽効果の測定方法の検討において、予 備試験で6穴プレートに抽出液を流し込み紫外線 遮蔽率を測定する方法を試みたが、6穴プレート の紫外線遮蔽率が高く適さなかった。ラップやフィルムはほとんど紫外線遮蔽効果を持たなかったが、ラップやフィルムだけでは抽出液を一定の厚さに保っておくことが出来なかった。そこで繭層抽出液にアガロース溶液を加え、膜状にすることとした。さらに、紫外線遮蔽率の測定のしやすさと取り扱いの良さから、3%アガロース溶液を繭層抽出液の半量加えることにした。

抽出方法ごとに、紫外線遮蔽率のグラフを図2-1 ~図2-9に示した。熱水抽出では、CY-LYS、CG-LYS の LYS 系統において高い紫外線遮蔽効果が 認められた。その他の系統では遮蔽効果は低かっ た。また、LYS系統では抽出温度を高くしても、 紫外線遮蔽率はほとんど変化しなかった。CY-LYS 系統、CG-LYS系統はともに黄色強蛍光系統であ り、黄色蛍光物質が紫外線遮蔽効果に寄与してい ると推察される。また、熱水(100℃、20分)抽出 よりも熱水(120℃、20分)抽出の抽出率が上昇し たことより、温度上昇に伴ってセリシン部タンパ ク質などがより多く溶出されるが、紫外線遮蔽効 果の違いはほとんど認められず、紫外線遮蔽効果 物質は100℃、20分抽出で容易に抽出されるものと 考えられた。また、100℃から120℃の範囲であれ ば、紫外線遮蔽効果に関わる物質は温度の影響を

表 1-1 熱水抽出による繭層抽出率

(14 5.4 ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ± ±	抽出來	< (%)	
供試繭	100℃、20分	120℃、20分	
CY-LYS	12.64	25.65	
CY-LYW	24.3	27.63	
CY-NL	12.62	26.02	
CG-LYS	9.36	28.59	
CW-LYS	11.68	31.33	
CW-LY	13.98	30.26	
CW-LW	14.18	31.10	
CW-LV	9.64	32.15	
CW-LB	9.7	28.42	

表1-2 濃度の異なるエタノール抽出による繭層抽出率

				抽出率(%)	1		
供試繭			I	タノール濃	度	90	
	40	50	60	70	80		100
CY-LYS	0.82	3.65	6.80	4.67	2.05	2.99	3.34
CY-LYW	0.61	0.11	0.00	1.11	3.14	1.80	0.86
CY-NL	0.12	0.52	0.52	7.44	4.47	3.72	3.37
CG-LYS	1.87	7.03	6.26	5.50	5.35	4.93	5.25
CW-LYS	1.32	2.63	3.01	5.29	5.67	6.61	4.38
CW-LY	0.21	2.01	2.24	2.13	3.82	4.54	1.48
CW-LW	0.41	0.45	0.93	5.03	6.33	3.87	0.84
CW-LV	1.48	1.40	2.26	1.32	5.78	0.92	0.54
CW-LB	1.02	1.14	1.80	2.16	3.67	3.03	1.49

ほとんど受けないと考えられた。

40%、50%、60%、70%、80%エタノール抽出で、CY-LYS、CG-LYSのLYS系統は高い遮蔽効果が認められたが、90%、100%エタノール抽出では紫外線遮蔽効果が低下した。他の系統ではほとんど紫外線遮蔽効果が認められなかった。

なお、CY-LYS 系統では60%エタノール抽出で 最も紫外線遮蔽率が高く、CG-LYS 系統では70% エタノール抽出で最も紫外線遮蔽率が高くなった。 また、熱水(120℃、20分)抽出における紫外線 遮蔽率が15%前後であるのに対し、40%~80%エ タノール抽出では、20%前後となり、エタノール 抽出の方が高い紫外線遮蔽率を示した。このことからLYS系統の紫外線遮蔽物質は、40%~80%エタノールで容易に抽出されるが、90%以上の高濃度では遮蔽効果に関わる物質が溶出されにくくなるあるいは変性を受け遮蔽効果の低下につながると考えられた。

それぞれの抽出方法における抽出率と紫外線遮 蔽率との関係をみると、熱水抽出ではどの系統に おいても、温度依存的に抽出率が上昇したが、紫 外線遮蔽率の上昇はほとんど認められなかった。 このことから、100℃20分の熱水抽出で紫外線遮蔽 効果に寄与する物質は、そのほとんどが抽出され

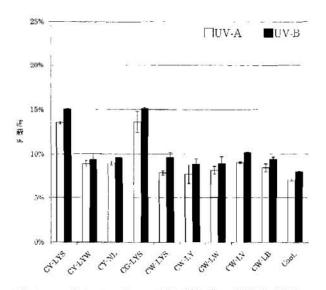


図2-1 熱水 (100℃、20分) 抽出液の紫外線遮蔽率

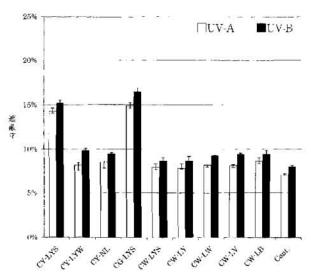
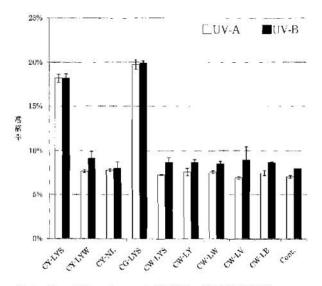


図 2-2 熱水 (120℃、20分) 抽出液の紫外線遮蔽率



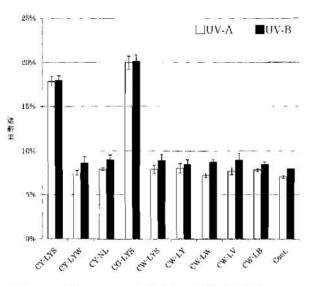


図2-4 50%エタノール抽出液の紫外線遮蔽率

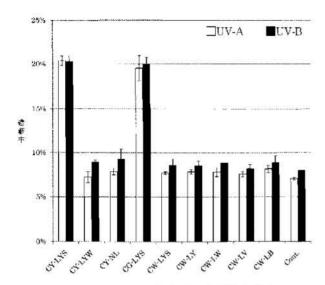


図2-5 60%エタノール抽出液の紫外線遮蔽率

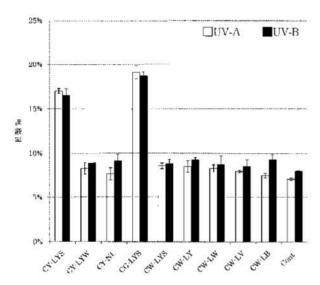


図2-7 80%エタノール抽出液の紫外線遮蔽率

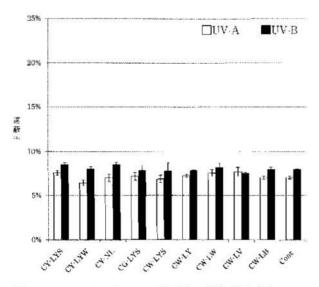


図2-9 100%エタノール抽出液の紫外線遮蔽率

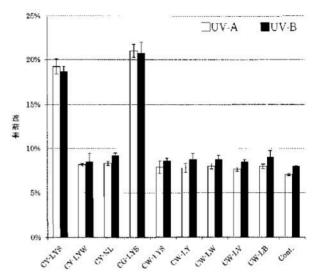


図2-6 70%エタノール抽出液の紫外線遮蔽率

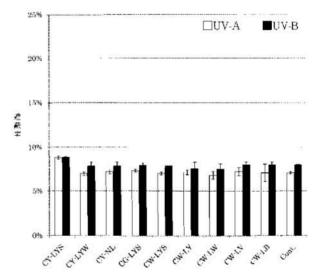


図2-8 90%エタノール抽出液の紫外線遮蔽率

ていると推察される。また、エタノール抽出においても抽出率の上昇と紫外線遮蔽率上昇の間に相関は認められず、CG-LYS系統では50%~100%エタノール抽出でほぼ同様の抽出率を示しているにも関わらず、50%~80%エタノール抽出における紫外線遮蔽率が90~100%エタノール抽出における紫外線遮蔽率の約3倍になった。

以上の結果からアガロース膜作成法は、紫外線 防御効果測定法として充分利用可能であることが 明らかとなった。また、繭糸の紫外線蛍光の違い は紫外線防御効果に大きな違いとして現れること が明らかとなった。今後は、紫外線防御に関わる 物質の特定を行いたいと考えている。

引用文献

- [1] 亀井加恵子、田中慶利、一田昌利、山崎 隆、三好 明(2005):家蚕及び野蚕の機能 研究、衣笠繊維研報、7,13-20
- [2] Kurioka, A. and Yamazaki, M. (2002): Purification and Identification Flavonoids from the YellowGreenCocoon Shell (Sasamayu) of the Silkworm, Bombyx mori. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66(6), 1396-1399
- [3] 藤本直正、林屋慶三(1960): 繭の色素に関する研究(VII) 白繭の蛍光性物質。日蚕雑。 29,495-500
- [4]一田(髙濱)昌利,昌原美和,伴野 豊

- (2010): 繭の紫外線蛍光と色彩値に関する研究. 衣笠繊維研報, 13, 45-50
- [5] 井上柳梧 (1933): 絹絲學. 76-89. 興文社, 東京
- [6] 坂手 栄、川口和夫、佐藤清夫 (1952): 家 蚕繭の蛍光性物質について (予報). 日蚕雑, 21,237-239
- [7] 味沢昭義 (1968): 繭解舒に関する理化学的研究 (IV) 蛍光色の繭層セリシンにおける分布、日蚕雑、38、210-214
- [8] 赤井 弘(2003): 多孔性シルクの形成と特性、衣笠繊維研報、6.65-69
- [9] 間 和夫(1990): わかりやすい絹の科学、 1-119, 文化出版局, 東京

カイコ体液中のβ-ラクタマーゼに関する研究

加藤靖夫

A Study on 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

A fraction obtained by gel filtration of Bombyx hemolymph was further separated as two protein spots by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE). Each spot was excised from the gel, and then subjected to in-gel tryptic digestion, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis and a SWISS-PROT protein database search. The results showed that the one spot obtained by 2-D PAGE was GDP-mannose 4,6-dehydratase (EC4.2.1.47), and the other obtained by 2-D PAGE was β -lactamase (EC3.5.2.6). I was able to obtain these very interesting results taking into consideration the organism defense mechanism of $Bombyx\ mori$. However, the reason why these enzymes exist in the silkworm's hemolymph is still unknown. Accordingly, I studied the method of the estimation of β -lactamase activity in detail. To examine the physiological roll of β -lactamase in the silkworm, the enzyme activity in the hemolymph was monitored during the fifth instar of the larvae, resulting that the increasing activity was detected up to spinning stage and then decreased toward pupation stage.

In addition, separation of β -lactamase in the hemolymph from B. mori was carried out by gel filtration and Mono Q ion exchange chromatography. The pattern of gel filtration showed to be three fractions with β -lactamase activity (Fr I, Fr II and Fr III), among which Fraction II had the highest activity. Using Mono Q ion exchange chromatography, β -lactamase with higher activity was eluted by 0.25 M NaCl. These results indicate that Bombyx β -lactamase could be separated from the hemolymph by gel filtration and Mono Q ion exchange chromatography which has been applied to microbial β -lactamase separation. However, the chromatographical pattern of β -lactamase was different between the Bombyx mori and Bacillus cereus.

Key Words: β -lactamase, hemolymph, silkworm, Bombyx mori

1. はじめに

二次元電気泳動法および質量分析(MALDI-TOF/MS) 法によるカイコレクチン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カイコ体液中のβ-ラクタマーゼの実態と性状について、これまで明らかになったことがらの解説を試みた。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. β-ラクタマーゼの同定

まず、カイコ幼虫5齢10日目の体液を採取

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 I - 3、E-mail: katou@tezukayama-u.ac.jp、ILL 0742-41-4793

し Superdex 200カラム (2.6×60 cm, Amershan Pharmacia Biotech Ltd.) によるゲルろ過を実施した。その結果、図1に示すように素通り画分 (Blue dextranの溶出位置と重なる画分 (Fraction No. 24-25)) を除いて、順にFraction I、Fraction II、Fraction IIの3つの画分が得られた[8]。そのうち、Fraction II(Fraction No. 47-49)は、これまでカイコレクチンの活性発現に関わる因子を含むことで着目してきており、このFraction IIについて二次元電気泳動 (2-D PAGE) による

細分画を試みた[1]。図2の写真は、カイコ幼虫体液のゲルろ過画分(Fr. II)を二次元電気泳動(一次元目:アガロースゲル等電点電気泳動、二次元目;SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分離した結果を示す。図2に示すように等電点pH $6.5\sim6.8$ 、分子量3万~4万の比較的似かよった位置に、鮮明な2つの主要なタンパク質スポット(スポット1、スポット2)が得られた。このCoomasie Brilliant Blueで染色された2-D PAGEゲルを2枚のぬれたセロファンシートの間に挿入し

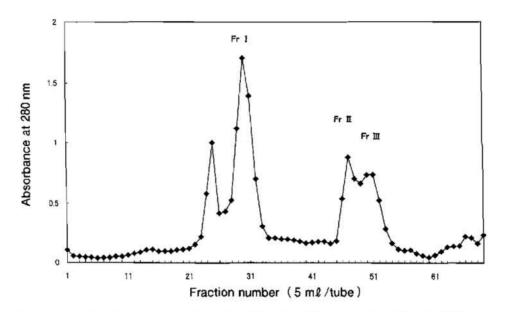


Fig. 1. Fractionation of the larval hemolymph of the silkworm on day 10 in the fifth instar by gel filtration through Superdex 200. Fr I (Fraction No. 20-32), Fr II (Fraction No. 47-49) and Fr III (Fraction No. 51-53) were separately pooled, dialyzed and lyophilized.

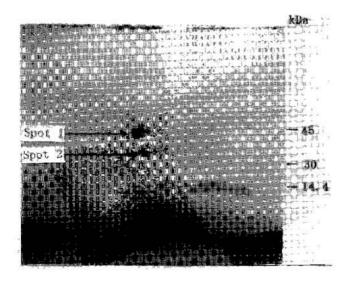


Fig. 2. 2-D PAGE pattern of Fraction II obtained from hemolymph by gel filtration. Arrows (Spot 1 and 2) indicate protein spots used for further mass spectrometric analysis.

て Rapid Dry Mini タイプ AE-3711 (アトー社)を 用いて、真空状態で80℃、2時間乾燥させた。そ の後、これらのタンパク質スポットをゲルから切 り取り、トリプシンでインゲル消化を行った後、 Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS:マ トリックスアシステッドレーザー励起イオン化飛 行時間型質量分析計)を用いてペプチドマスフィ ンガーブリント分析を行った[2,9]。2-D PAGE に よって得られたスポット2の質量分析(MALDI-TOF/MS)は、図3のようなスペクトルを示し た。縦軸は1058.33 m/zのピークを基準ピークと設 定し、そのシグナル強度を100とした時の相対強度 を示す。図のように1058.33、1090.53、1184.35、1332.70、1457.69、1535.68、1596.13、1722.92、1815.18、2138.26、2214.28、2264.99 m/z の位置に非常に明瞭な12個のピークを示した。MALDITOF/MS分析によるこの結果についてタンパク質分析のためのスイス-PROT タンパク質データベースで検索した(表 1)。そのデータベース検索の結果から、スポット 2 のタンパク質を等電点6.5、分子量31,402の β -ラクタマーゼと同定した。 β -ラクタマーゼ (EC3.5.2.6) は、一般にベニシリンのような 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であり、現在、 β -ラクタマーゼは多くの種類のバクテリア

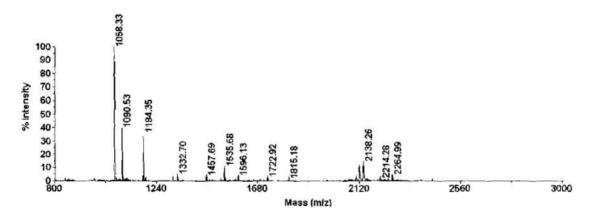


Fig. 3. MALDI-TOF/MS spectrum of spot 2 that was obtained after tryptic digestion.

Table 1. Result of sequence analysis of spot 2 by database search. Database search identified the protein as β -lactamase (EC3.5.2.6).

m/z Submitted	MH+ Matched	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
1090, 5287	1090. 3793		3	13	0	(R) IVGSSMLAALK (R)
1184. 3528	1184, 1953	1PO4	197	205	0	(R) NLYENVHSK (1)
1310. 3516	1310, 4342		223	233	0	(K) GQMESSVWEEK (R)
1332. 7039	1332, 615		249	259	0	(K) IMENLNLPYPK (K)
1457, 6939	1457, 7456	1PO4	1	13	1	(-)MRIVGSSMLAALK(R)
1596. 1348	1595, 8263		170	183	0	(K) DQGCVFTGDTLLIR (G)
1596. 1348	1595, 8479		70	84	0	(K) NGQAVIIDPVLEQAK (R)
1722, 9219	1722. 7999	2PO4	118	133	1	(R) KLTGCQSVIAAASGAK (A)
2120. 6992	2120, 3223	1Cys-am 1PO4	170	187	1	(K)DQGCVFTGDTLLIRGCGR(T)
2214. 2768	2214. 3292	2Cys-am 2PO4	170	187	1	(K)DQGCVFTGDTLLIRGCGR(T)

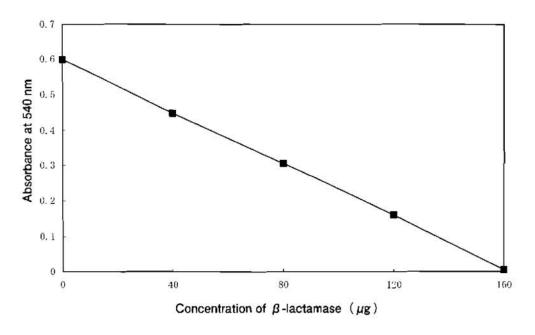


Fig. 4. The relationship between the concentration of β -lactamase and absorbance.

(細菌)によって生産されていることが知られている[10,11,15,16]。カイコの体液中にそのような酵素が存在する可能性が認められたことは、カイコの生体防御を考える上で興味ある結果が得られたものと考え、この酵素がカイコの体液中に存在する意義について解明していくことにした。なお、2-D PAGEによって得られたスポット1のタンパク質はMALDI-TOF/MSによる相同性を利用して同定を行った結果、GDP-mannose 4,6 dehydratase (GDP-D-mannose dehydratase) と推定した。

3. β-ラクタマーゼの存在確認

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、カイコ体液中の活性測定によりその存在を確認した。 β -ラクタマーゼの活性はSargent[13] および澤井・高橋[14] の方法に準じて測定した。即ち、カイコ体液凍結乾燥物を $0.1\,\mathrm{M}$ リン酸緩衝液($\mathrm{pH}7.0$)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、 $5\,\mathrm{m}\ell$ のヨウ素保存液を $95\,\mathrm{m}\ell$ の酢酸緩衝液($\mathrm{pH}4.0$)に

加えることによって作成した。また、ヨウ素保存液は、20.3 gのヨウ素と100 gのヨウ化カリウムを $500 m\ell$ 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540 nm 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 (Nacalai tesque, Inc.) を用いた。

図4の横軸は、0.1 Mリン酸緩衝液2.5 ml に含ま れているセレウス菌569/H9川来の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 Oμg の場合は、ヨウ素は全く消費されな いので、反応液の540 nm 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160 µg の場合は、反応液の吸光度は非常 に低い値を示した。即ち、澤井と高橋[14]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。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。次に、

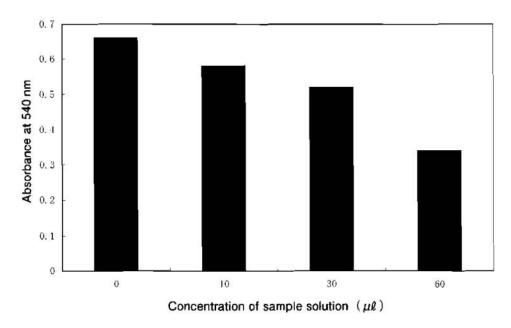


Fig. 5. The relationship between the concentration of the Bombyx hemolymph and absorbance.

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(10 mg)を100 μ ℓ の0.1 M リン酸緩衝液に溶解し、そのうちの10 μ ℓ、30 μ ℓ、60 μ ℓ 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540 nm における吸光度を図 5 に示す。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[3,5]。

さらに、 β -ラクタマーゼ活性測定法について詳細に再検討した。図6は、セレウス菌569/H9由来の β -ラクタマーゼ標品の濃度とヨウ素試薬消費量との関係を示す。図中の横軸は、0.1 M リン酸緩衝液2.5 m ℓ に含まれる β -ラクタマーゼの μ g 量を示している。ヨウ素試薬の消費量は、ヨウ素試薬の濃度と540 nm における吸光度が比例関係にあることおよび β -ラクタマーゼの濃度と反応液の吸光度とが反比例の関係にあることから得られた。図6に示すようにヨウ素試薬の消費量と β -ラクタマーゼ濃度は比例関係にあることが確認できた。このことは 0gawara and 0Umezawa[12] が述べているように β -ラクタマーゼ活性値を反応液のヨウ素

試薬消費量から推測することが可能であることを 示している。

4. β-ラクタマーゼの存在意義

カイコ体液中のβ-ラクタマーゼの生理的な意義 を解明するために、カイコ5齢幼虫体液中のB-ラ クタマーゼ活性の経時的変化に関する調査を行っ た。その結果を図7に示す。図7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(そ の際、血液中のβ-ラクタマーゼ活性はヨウ素試薬 消費量で表示した)、3日日および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日日 (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、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。また、カイコ5齢幼虫脂肪体中の

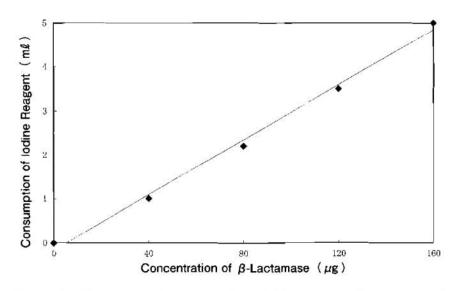


Fig. 6. Relationship between the concentration of β-lactamase and the consumption of iodine reagent.

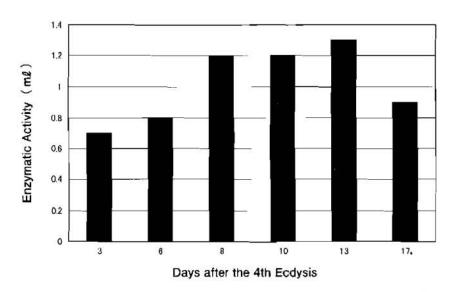


Fig. 7. The time-dependent change of β -lactamase activity during the fifth instar of Bombyx mori. The enzymatic activity is expressed as the consumption of iodine solution.

 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。その結果は、3 日日、6 日目、8 日日 (熟蚕期)、10 日日(吐糸期)ではその活性がほとんど認められなかったが、13 日日(蛹化期)、17 日日(蛹期)においてその活性が認められた。このことからも β -ラクタマーゼがカイコの変態の進行する時期にカイコの生体にとって必要なものであると考えられる。

β-ラクタマーゼの分画

カイコ体液と脂肪体についてゲル濾過法およびイオン交換クロマトグラフィーによる分別を試み、ゲル濾過画分および Mono Q イオン交換クロマトグラフィー画分における β -ラクタマーゼの挙動について検討を行った[4]。図8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

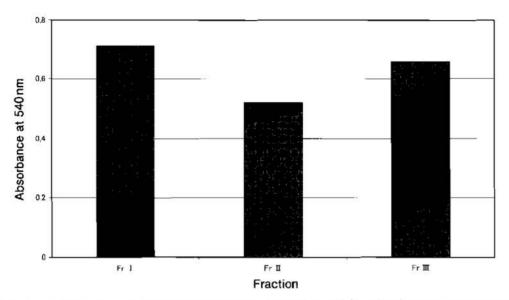


Fig. 8. Activity of β-lactamase in the fractions obtained by gel filtration from the hemolymph.

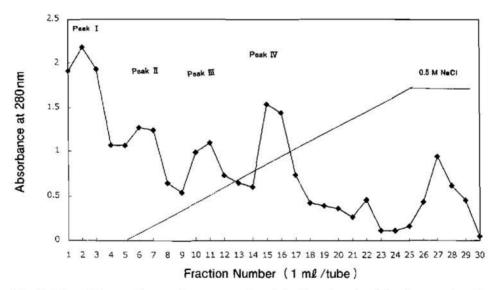


Fig. 9. Mono Q ion exchange chromatography of the hemolymph of *Bombyx mori* on day 10 in the fifth instar. Peak I (fraction No. 2-3), Peak II (fraction No. 6-7), Peak II (fraction No. 10-11) and Peak IV (fraction No. 15-16) were separately pooled.

(凍結乾燥物10 mg) の活性は、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ので[3]、 β -ラクタマーゼ活性が高ければ高いほど反応液の540 nm における吸光度はより低くなっている。そのため、ゲル濾過によって得られた画分中では画分 \mathbb{H} 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。一方、カイコ脂肪体についてもゲル濾過を実施したが、

得られた各画分からは明瞭な β -ラクタマーゼ活性の相違が認められなかった。

図9に5齢10日日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10 mg)をあらかじめ0.05 M トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 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 (Pcak I、Pcak II、Peak III、Peak IV) を示し

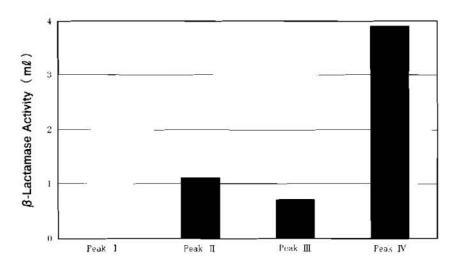


Fig. 10. β -Lactamase activity in the peaks obtained from Mono Q ion exchange chromatography of the hemolymph of *Bombyx mori*. The enzymatic activity is expressed as the consumption of iodine reagent.

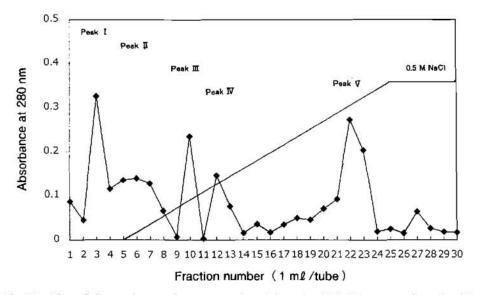


Fig. 11. Mono Q ion exchange chromatography of the microbial β-lactamase from Bacillus cereus 569/H9.

た。図10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($0.5\,\mathrm{m}\ell$ 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 9 に示すクロマトグラムにおいて $0.25\,\mathrm{M}$ NaCl濃度で溶出される Peak IVが比較的高い β -ラクタマーゼ活性を示した。一方、カイコ脂肪体についても Mono Q イオン交換クロマトグラフィーを実施し、様々な食塩濃度で溶出される $4\,\mathrm{co}$ のピークを得たが、

得られた各画分からは明瞭な β -ラクタマーゼ活性が認められなかった。

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。

微生物由来のβ-ラクタマーゼとの 比較検討

セレウス菌569/H9由来の β -ラクタマーゼ標品の Mono Qイオン交換クロマトグラフィーの結果を図11に示す。クロマトグラムは、様々な食塩濃度で溶出される5つのピークを示した。しかし、クロマトグラムにおいて0.25 M NaCl 濃度で溶出されるピークは検出されなかった。即ち、カイコ由来の β -ラクタマーゼと微生物由来の β -ラクタマーゼは性状を異にしていることが判明した。さらに、各ピークの β -ラクタマーゼ活性の測定結果は、すべてのピークで高い活性が認められた[6,7]。

7. まとめ

カイコ体液の二次元電気泳動法により得られた 2つの主要なタンパク質スポット (スポット1、 スポット2)を質量分析法により解析し、スポッ ト1のタンパク質はGDP-mannose 4.6 dehydratase (GDP-D-mannose dehydratase) であると推定し、 スポット2のタンパク質はβ-ラクタマーゼとして 同定した。この新たに同定された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、B-ラクタ マーゼがカイコの変態の過程において必要なもの であることを明らかにした。また、β-ラクタマー ぜの酵素活性値の表示方法について再検討し、カ イコ体液中のβ-ラクタマーゼの存在をより明確に した。次に、カイコ体液についてゲル濾過法およ びイオン交換クロマトグラフィーによる分別を試 み、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こ とを認め、Mono Qイオン交換クロマトグラフィー で得た0.25 M NaCl 濃度で溶出される Peak IV が 比較的高いB-ラクタマーゼ活性を示すことを認め た。さらに、カイコ由来のβ-ラクタマーゼと微生

物由来の β -ラクタマーゼとのクロマトグラム的挙動を比較し、両者に相異のあることを明らかにした。

引用文献

- [1] Kato, Y. (2006): An approach for proteomic analysis of Bombyx humoral lectin related proteins using two-dimensional gel electrophoresis. J. Contemporary Human Life Science, Tezukayama University, 2, 1-9
- [2] Kato, Y. (2007): Mass spectrometric analysis of Bombyx mori humoral lectin related proteins. J. Contemporary Human Life Science, Tezukayama University, 3, 1-10
- [3] Kato, Y. (2008): A Study on β -lactamase in hemolymph of Bombyx mori.
 J. Contemporary Human Life Science.
 Tezukayama University, 4, 1-10
- [4] Kato, Y.(2009) Fractionation of β-lactamase from Bombyx mori. J. Contemporary Human Life Science, Tezukayama University, 5, 13-22
- [5] 加藤靖夫(2008):カイコ体液中のβ-ラクタ マーゼの検索について、衣笠繊研報, 12, 21-26
- [6] Kato, Y. (2010): Enzymatic properties of β-lactamase involved in hemolymph of Bombyx mori, J. Contemporary Human Life Science, Tezukayama University, 6, 1-8
- [7] 加藤靖夫 (2009): カイコ体液中のβ-ラクタ マーゼの特性について、衣笠繊研報、13, 39-43
- [8] 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
- [9] 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,p36
- [10] Lee M.Z.P. (1987): Preparation and

- characterization of immobilized β-lactamase for destruction of penicillin in milk. J. Dairy Sci., 70, 2032-2039
- [11] 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
- [12] Ogawara, H. and Umezawa, H. (1975): Reaction with N-bromosuccinimide and the properties of the product, *Biochim, Biophys.* Acta., 391, 435-447
- [13] Sargent, M.G. (1968): Rapid fixes-time assay

- for penicillinase. J. Bacteriol., 95, 1493-1494
- [14] 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
- [15] 澤井哲夫、山岸三郎(1975): β-ラクタマーゼ ベニシリン/セファロスポリン加水 分解酵素-、蛋白質・核酸・酵素, 20, 1202-1212
- [16] 澤井哲夫、額賀路嘉、春田 仲(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

冬季における蚕の簡易人工飼料飼育法

今村利勝*・高濱(一田) 昌利**・古澤壽治***

Easy Rearing System of the Silkworm on an Artificial Diet in Non-aseptic Room during Winter Season

Toshikatsu IMAMURA*, Masatoshi TAKAHAMA (ICHIDA)**
and Toshiharu FURUSAWA***

*Aseptic Sericulture System Laboratory, 250 Chikuyama-cho, kuze, Minami-ku, Kyoto 601-8203, Japan
**Bioresource Field Science Center, Kyoto Institute of Technology,

Ipponngi-chou, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

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

Abstract

To assist the biology education, the newly-hatched larvae from the eggs which had been loaded into the International Space Station were provided to applicants in schools, and used for understanding the effects of cosmic environments on the development and growth. For this purpose, an easy rearing system on an artificial diet was developed. The larvae were reared on the diet in a plastic container $(155\times220\times40~\text{mm})$. Removal of feces and exchange of the diet were carried out inside the polyprophylene bag $(6450\times800\times0.03~\text{mm})$ where semi-aseptic conditions were kept. The temperature for rearing was maintained by a commercially-available pocket warmer. Even in winter, this method lead to successful rearing during larval stage, and produced cocoons, pupae and adults, meaning that the silkworms through all stages can be used as an experimental material for teaching biology in schools.

1. はじめに

カイコの人工飼料育は、稚蚕共同飼育所に導入 されることによって養蚕現場における稚蚕期の病 原からの隔離に寄与してきた。最近では、その技 術は、養蚕業の衰退に伴い稚蚕から壮蚕までの全 齢期間を無菌的に、しかも工業的な繭生産へ応用 されている。

このような養蚕現場のための技術開発とは別に、 分子生物学な急速な展開と相まって、人工飼料育 は蚕の生理学や病理学的な基礎研究にも飛躍的な 展開に寄与してきた。すなわち蚕の病原体である バキュロウイルスの遺伝子 DNA が環状であることから、このウイルスに有用な異種遺伝子、例えばインターロン遺伝子や蛋白性ホルモン遺伝子を挿入し、これを蚕に接種して異種遺伝子由来の蛋白質を蚕体内で生産する方法が確立された。その後、先の蚕の無菌的人工飼料による工業的飼育において有用タンパク質の生産が行われ、養蚕分野で開発されてきた飼育技術は、予想外な展開をみせている。

一方、蚕の人工飼料育は桑の無い冬季でも飼育 できる特徴があり、教育現場においては生物学の 教育に導入されている学校もある。しかし、人工

^{*}連絡先:無菌養蚕システム研究所、601-8203 京都市南区久世築山町250、E-mail:tvimamu@m15.alpha-net.jp

^{**}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、E-mail: ichida@kit.ac.jp、TL 075-861-0714

^{***}連絡先:財団法人衣笠会、603-8326 京都市北区北野下自梅町29、E-mail:zai-kinugasakai@nifty.com

飼料育は無菌的な方法で蚕を飼育するとなると、 クリーンベンチなどの設備を必要とし、その導入 には躊躇される場合が多い。筆者らは、蚕卵を国 際宇宙ステーションに搭載し、宇宙放射線や微小 重力が生物に及ぼす影響を調査する事業に係わっ たが、その一部の卵を教育現場に生かすため、全 国の学校に配布することになった。このため、冬 季に簡単な方法で蚕を人工飼料育する方法を開発 した。例えば、ビニール製のごみ袋の中で無菌的に飼料交換を行い、保温には懐炉を利用して、蚕幼虫を飼育する方法を各学校に提示した。各学校での飼育方法の結果は(http://homepage3.nifty.com/cosmos-silk/)で紹介している通りで、この方法はかなり有効であることが分かったので、ここにその飼育方法を資料として以下に掲載する。

2. お送りするカイコの発育・成長について

1) 搭載卵の経歴

カイコの卵の大きさは、幅 1 mm、長さ1.3 mm、厚さ0.5 mm 位の平たい楕円形で、外側は堅い卵殻で包まれています。産卵後2日位は黄色ですが、そのうち、卵は藤紫色になり、卵内の胚は一時発育を停止し、休眠します。しかし、休眠しない卵では産まれた時の黄色の状態が続き、産卵後10~12日後にふ化します。

皆さんにお配りするカイコは、以下の経歴を経ています。すなわち、黒縞系統のカイコで、卵で体眠するものです。産卵後、この卵を約1カ月間25℃に保護し、その後体眠から醒ますため、5℃に約1カ月保護した後、スペースシャトルに搭載して、国際宇宙ステーションまで運びました。ステーション内では2℃下に置かれ、体眠が歴めた頃に、胚を発育させました。その理由は、この時期にもっとも放射線に感受性の時期があり、また遺伝子発現が盛んであるためです。

この卵は、休眠期間も含め宇宙ステーション内に約3カ月滞在した後、11月27日にケネディー宇宙センターに帰還しました。その後、日本まで輸送する時には、卵からふ化しないように約4 $^{\circ}$ に保護され日本に移送、12月1日に京都工芸繊維大学附属生物資源フィールド科学教育研究センターに到着しました。

2) ふ化後の予想経過日数

日本に卵が到着後、卵は京都工芸繊維大学附属生物資源フィールド科学教育研究センターと無菌養蚕システム研究所(京都)に移され、それぞれ1日間、中間温度(15℃)に保護した後、25℃で培養しました。全齢飼育を希望された皆さんには、ふ化した幼虫を人工飼料の上にのせ、飼育ケースに入れてお送りしました。その後の飼育経過は以下の通りですが、保温温度によって発育に若干のずれが生じます。

1~3齢期間を28℃~30℃で飼育すると、11日~13日後に4齢起蚕(4齢に脱皮した蚕)になり、さらに約25℃で飼育すると、約6日で5齢起蚕になります。そして、5齢期間は6日~7日で、全期間の内、最も摂食量が多く、幼虫も日増しに肥大してゆきます。そして、糸を吐く前には徐々に餌を食べる量が少なくなり、この頃には体表の色が光沢を帯び、透明感を増してきます。また、この頃の幼虫を成熟幼虫あるいは「熟蚕(じゅくさん)」と呼び、頭部を持ち上げる特徴があります。このまま放置しておくと、飼育ケースの隅に移動して、4隅の内側角で糸を吐き始めます。この状態で置いておくと、飼育ケース内の収拾がつきませんので、熟蚕は別に用意した繭作り用の箱に移してやります。

以下に飼育する上で重要な点について記載しました。

3. 飼育中の注意

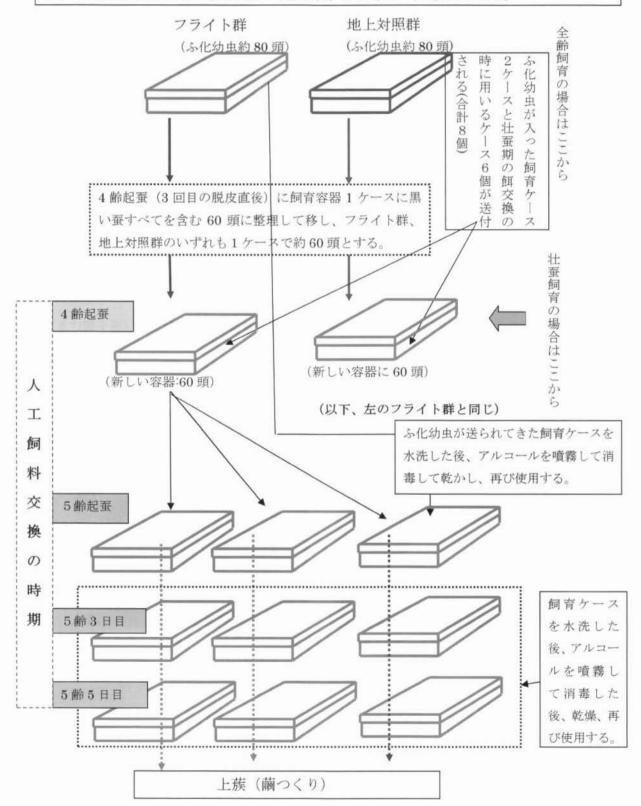
- 1) 飼育ケースの蓋は飼育中、餌を交換する時以外は開かないで下さい。
- 2) 餌を交換する時は、埃が立たない、また風の流れが無いところで行ってください。例えば、ファン ヒーターや空調機の前では絶対行わないこと。その理由は、埃が人工飼料の上に付着すると、そこか ら微生物(細菌や糸状菌など)が繁殖して、そこから人工飼料が腐敗するからです。
- 3) 気流が無いところ(人通りや換気扇などによる空気の流れが無いところ)で、平らな机の上などに、できれば段ボールの箱を利用したり、あるいは塩ビバイプなどで枠組みしてビニールなどで覆いをした囲いを作ります。そして、その内側を、消毒用アルコール(量販の薬局、スーパーマーケット、コンビニなどで入手)をきれいなタオルに浸みこませ丁寧に拭いて、そこで飼料の交換を行う工夫をして下さい。

筆者は透明のごみ袋を利用して「餌換え」を行っています。その方法については、写真入りで、後で詳しく説明します(51頁以降参照)。

- 4) カビが生えた場合には限に見えますので、消毒したスプーンなどでカビの部分を取り去り、消毒用アルコールを周りに噴霧します。同時に餌の交換を頻繁に行う(2日に1回位)。細菌汚染の場合には匂いや、カイコの様子からしか判らないので、細菌汚染と考えられる場合は、飼料交換を頻繁に(2日に1回位)するか、または、他に移らないように廃棄する。
- 5) お送りした飼育ケースの中には、下から平板状の人工飼料、その上に網が置かれています。ふ化幼虫は、お送りした時点では小さく、しかも人工飼料の色の影響で肉眼では大変見にくいです。しかし、2~3日経過すると肉眼でも見えるようになります。この点についても、写真入りで、後で詳しく説明します。
- 6) 人工飼料は、桑粉末、デンプン、タンパク質、蔗糖、無機塩混合物、ビタミン混合物などを混合し、水を加えて練合した後、PP フィルムの袋に入れて、平板状に成型して蒸煮滅菌しています。使用するまで冷蔵庫に保管して下さい
- 7) お送りした飼育ケースの使用の流れ図、および人工飼料の交換の時期を次頁の図にまとめましたので、飼育の流れの全体を把握して下さい。
- 8) フライト群、地上対照群、それぞれ約80頭のふ化幼虫が入った飼育ケースと飼料交換時に使う飼育ケース6個、人工飼料(11枚×2群)と予備5枚、計27枚を一括送付されます。予備の5枚の飼料は、5齢期に餌不足が生じた際に、餌を塊としてできるだけカイコとカイコの間に置いて、補給して下さい。
- 9) 緊急に質問がある場合には、e-mail:rad_silk.furu@mbn.nifty.com にお願いします。
- 10) ホームページ「宇宙とカイコ」http://homepagc3.nifty.com/cosmos-silk/ 「博士とピカル」: http://kibo.jaxa.jp/experiment/theme/first/radsilk/ も参考にして下さい

人工飼料交換の時期と飼育ケースの使用の流れ

フライト群、地上対照群、それぞれ約 80 頭のふ化幼虫が入った飼育ケースと飼料交換時に使う飼育ケース 6 個、人工飼料(11 枚 x 2 群)と予備 5 枚、計 27 枚が一括送付されます。



4. 送付するカイコについて

全齢飼育、壮蚕飼育を希望された場合のいずれもフライト群(約80頭)と地上対照群(約80頭)の両 方が宅急便(天地無用)で送られます。

試験的にふ化幼虫を飼育ケースに入れて宅急便で送り(写真1)、梱包された箱から飼育容器を取り出したところ、餌が容器内の横端に移動していました。また、餌の上に置いた網が餌から離れ上に浮き上がった状態になっていた(写真2)。

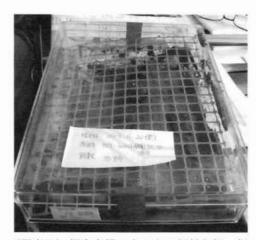
このため、次のような手順で、横に偏った餌を平らにし、 網が餌上面に付くようにしました。

- 1) 両手を消毒用ティッシュで拭いた後、餌を移動させる ための箸を消毒用ティッシュで拭き、これらに埃や微生 物が付着しないようにするため、透明の真新しいごみ袋 (クリーンベンチの代用) に入れます (54頁以降を読んで から行ってください)。
- 2) 飼育容器の外面を消毒用ティッシュで拭き、ごみ袋に 入れます。

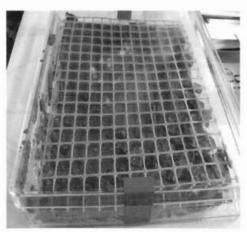


(写真1) ふ化幼虫入の飼育容器が段ボール箱 に入れて、宅急便(天地無用)で送られ てきた。

- 3) ごみ袋中に両手を入れ、箸で餌が移動できる程度に、飼育容器の蓋を開けます (蓋を開けきらないようにします)。
- 4) 餌を平らに整地し、網ができるだけ餌に付くようにします(写真3)。



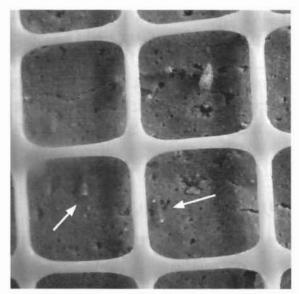
(写真2) 飼育容器の中の人工飼料と網、飼料が右に偏って移動した状態



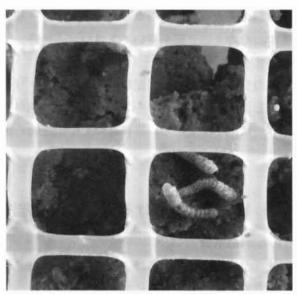
(写真3) 飼料を平らに整形し、網を飼料に できるだけ密着する

1)全齡飼育用

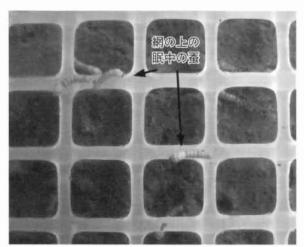
飼育容器には、人工飼料とその上に網を置いています。蚕の幼虫はふ化して間もないので、皆さんの手元に届いた時にはまだ肉眼で見にくいですが、 $2 \sim 3$ 日すると、褐色をした幼虫を見ることが可能です(写真 4 や写真 5)。飼育ケースの蓋を開けないで、20 $\mathbb{C} \sim 25$ \mathbb{C} の温度の下で約10 $\mathbb{H} \sim 12$ 日間保温して下さい。 $4 \sim 5$ 日すると幼虫は網の上に乗り、体を網に固定させ(写真 6 $\mathbb{E} \sim 7$)、脱皮の準備を始めます。



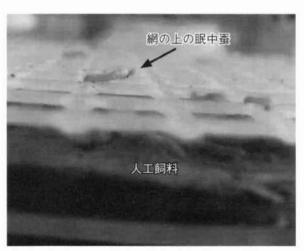
(写真4) ふ化幼虫を飼料の上に置いてから2日目 (矢印は幼虫を指している。格子は、飼料の上に のせた網の一部で幅は約9mmであるから、幼 虫の大きさは推定できるだろう)



(写真5) 飼育開始3日目 (格子は、飼料の上にのせた網の一部でその幅は 約7mm であるから、幼虫の大きさは推定でき るだろう)



(写真6) 網の上の眠中の幼虫、餌を食べずに静止して いる(上から撮影)



(写真7)網の上の眠中の幼虫 (側面から撮影)

1日程経過すると外皮を脱ぎ、黒い皮膚をした幼虫が現れますが、そのまま放置して下さい。

蚕は自ら網の下にある餌を食べて、4日程すると再び網の上に上り、先に説明したと同様の行動をとります。そして、2回目の脱皮をして3齢幼虫になります。3齢になってもそのまま置いておいて下さい。糞が沢山たまってきますが、心配いりません。3回目の脱皮をするまで、そのままにして置いて下さい。

3回目に脱皮すると4齢に入りますが、その前に新しい飼育容器を準備する必要があります。

新しいプラスチックケースを、エタノールを含んだ消毒用ティッシュで拭いた後、新しい人工飼料を飼育箱に置き、消毒したカッターで餌の上下端、両端を切り、上面のフィルムをピンセットで取り除きます。その上に、網を置いて下さい。この時、できるだけ蓋を開けないで、埃が入らないように作業を行います。

餌の交換方法は、次に記載するように、クリーンベンチを使う方法とビニール製の家庭用「ごみ袋」 利用し、この中に飼育ケースなどを入れて飼料を交換する方法があります。特に後者については筆者も 試験的に試みましたが、餌にはカビや微生物の繁殖もなく順調に蚕は育ちました。

(1) 壮蚕時期における飼料の交換方法 (クリーンベンチを用いる方法)

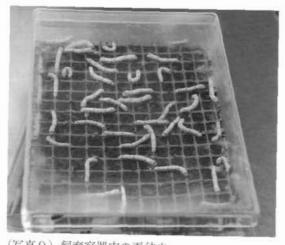
① 飼料の準備

壮蚕が送られる場合には、写真8に示す飼料と右端にある網、さらに飼育容器(プラスティック製)に入った壮蚕が送られる。

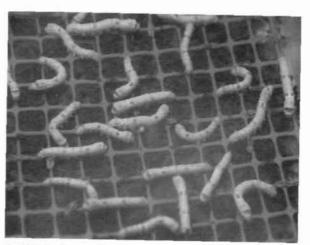
写真9~10は、飼育容器内の蚕幼虫を示す。



(写真8) 人工飼料 (左2つ) と餌の上に乗せる網



(写真9) 飼育容器内の蚕幼虫



(写真10) 左の写真の拡大

② 飼料交換の方法

飼育ケース内で蚕幼虫を飼育していると、カイコの身体が大きくなるに伴って、容器内の面積が狭くなるとともに、飼料の量が少なくなり、さら容器内に糞がたまってきます。



(写真11) 飼料交換前のクリーンペンチ内での 準備

このため、新しい餌や、消毒用アルコールで消毒した 飼育容器を準備する必要があります。

写真11はクリーンベンチ内に新しい飼料や滅菌済みの網(緑色の網)、飼育容器を準備した状態です。これらの資材は外面をアルコールで十分に拭いてから持ち込むことが必要です。写真では、両手に滅菌手袋がはめられているが、消毒用ティッシュで拭いても結構です。

クリーンベンチがない場合には、後で説明しますが、ビニール製の家庭用ごみ袋(透明のものが良い)を用いて、この中に飼料、飼育容器、ピンセットあるいは箸を消毒用アルコールで拭いてごみ袋内にすべて入れ込み、その後、両腕の衣類を上まであげ、両手、両腕を消毒用アルコールで拭いて、作業を行います。

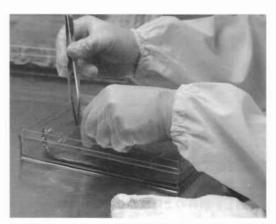
以下に飼料交換の方法を写真番号12~19の順に記載します。



(写真12) 新しい飼育容器に、新しい飼料をビニールで包まれたまま移します。



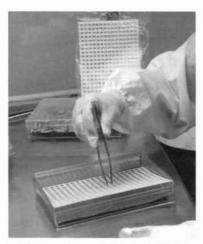
(写真13) 消毒済みのカッターで飼料の四隅両端を 切ります。



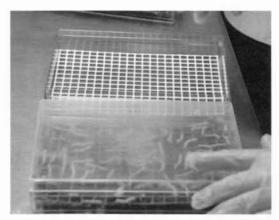
(写真14) フィルムの端をつまみ上に持ち上げます。



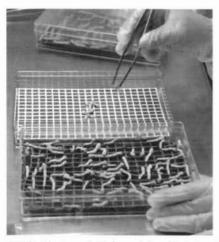
(写真15) フィルムをピンセットで持ち上げ除去します。



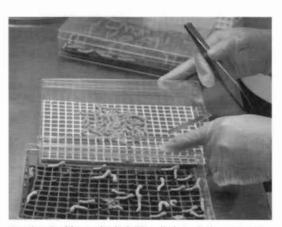
(写真16) 新しい網を、新しい飼育容器内の飼料の 上にセットします。



(写真17) 過密になりつつある飼育容器を、新しい 容器の横に置きます。



(写真18) 旧い容器内の蚕を二等分するため半分の 幼虫を、ピンセットを用いて先に準備した飼 育容器に移します。



(写真19)新しい飼育容器に蓋をします。ここで、 旧い飼育容器内には残り半分の蚕が残ります。

③ 飼育容器に残った幼虫の取り扱い方



(写真20) 飼育容器の蓋を裏返し、その上に、残った網上の幼虫を一旦置く。容器内に残った餌と糞を取り除き、箱内を消毒用ティッシュで 拭いて、新しい飼料を置く。



(写真21)新しい飼料の上に、幼虫が乗っている網 を新しい飼料の上に置く。



(写真22) 蓋を閉めて、飼育を続けます。

(2) 飼料交換の方法 (ごみ袋を使って行う方法)

① 市販の消毒用アルコール、噴霧器、アルコールを含んだウエットティッシュ、皿立て、透明のごみ袋、ピンセット、箸、新しい人工飼料、網、新しい飼育ケース、カイコが入っている飼育ケースなど準備します(写真23)。



(写真23) 飼育交換に必要な器具類

② 人工飼料交換に必要な資材を消毒して透明のビニール製ごみ袋に入れて、以下写真③~①の順で飼料を交換に必要な器具類を準備する。



②消毒液を噴霧器に移す。



⑤消毒用ウエットティッシュで手、腕を消毒する。



©皿立てに消毒液を噴霧して、ごみ袋の奥にいれ、立体的な空間を作る。



③カッターを消毒用ティッシュで拭き、ごみ袋に 入れる。



⑥人工飼料を入れた袋の外側を消毒用ティッシュ で拭く。



①網を入れた袋の外側を消毒用ティッシュで拭く。



®蚕を挟むピンセットや竹箸なども消毒用ティッシュで 拭き、ビニール袋の中に入れる。この他、新しい飼育ケース、カイコが入っている飼育ケースもティッ シュで拭いてごみ袋の中に入れます。

③ ごみ袋の中で、新しい人工飼料を以下@~©の手順で新しい飼育ケース内に置きます。





②ごみ袋の中の人工飼料を、新しい飼育ケース内に置いて、人工飼料の上下左右の端をカッターナイフで切ります。

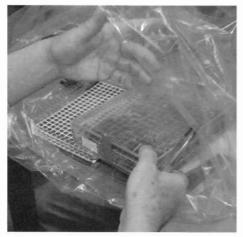


⑤飼料上面のフィルムをピンセットで取り除きます。



©餌の上に新しい網を置きます。

④ 新しい餌の上に以下②~©の手順で蚕幼虫を移します。



②蚕が入った飼育ケースを、新しい餌が入った ケースの横に置く。



⑤蚕をピンセット、あるいは竹箸でつまんで新しい人工飼料の上に移します。



ⓒ蚕を新しい餌に移した様子



2) 壮蚕飼育用

4齢から、あるいは5齢から幼虫を飼育することを希望された方には、飼育容器に人工飼料とその上に網を置き、フライト群と地上群を50頭ずつ入れて送ります。宅配便で送りますのです、幼虫と糞が混ざったり、あるいは幼虫が偏ったりしていることもあるかと思いますが、静置させて下さい。

4齢の期間は約4~6日で、徐々に餌を食べなくなり、幼虫は網目に上り、腹脚を自ら吐く絹糸(蛋白質)で固定します。この状態が約1日から1日半続いた後、脱皮を始めます(次頁「5. 脱皮の観察」を参照してください)。

脱皮を見たら、新しい飼育容器を準備して下さい。準備の方法は前述と同じ方法です。飼育容器の数は、4齢で1個用いていた場合には、5齢では2個を準備して下さい。

5齢になると餌を盛んに食べますので、摂食の状態や蚕の移動の仕方が良く分かります。横からみると黒くリング状をした気門(呼吸する器官)も良く観察できます。4~5日すると親指程にまで太ります。そして、蚕を1頭ずつ黒い皮膚に斑点(突然変異)がないかどうか、身体全体を、眼を凝らして観察して下さい。フライト群と地上対照群、それぞれについて白斑を持つ蚕と持たない蚕の二つに分けます。これらを元の飼育容器に戻し、飼育を続けて下さい。

飼育中の保温について、インキュベーターに入れ、温度を20~25℃に保って下さい。インキュベーターがない場合には、右の写真に示すように、懐炉(1枚22円位)をタオルで包み、飼育ケースの上に置き、さらに毛布で包めば、15~20℃に保つことができます。寒いところに飼育ケースを出すと結露しますが、懐炉を蓋上面に均等に置くと結露はとれます(写真24)。

しかし、この方法は常に温度をチェックする必要があり、 激しく発熱しないように注意することが必要です。

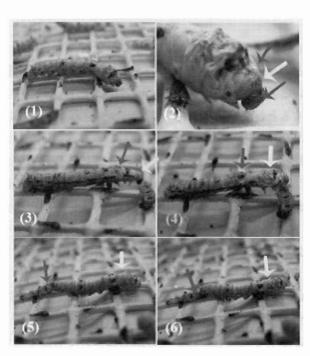
なお、糸を吐く前は幼虫の体内から水分を蒸発させますので、蓋の裏面が曇ってきたら飼育箱の蓋と身の間に、少し隙間を開けて下さい



(写真24) 懐炉による保温の方法

5. 脱皮の観察

幼虫の脱皮は、写真25に示すように、(1) 脱皮の開始;網に固定した腹脚4対を支えとして、頭部と胸部背面を境として皮膚が破れます。(2) 頭胸部の拡大した写真です。黒の矢印は旧い皮膚と頭盾で、白の矢印は次の齢の新しい頭部を示しています。(3) と(4) は新しい頭部(白矢印)を前方に進め、旧い皮膚(黒矢印)から抜け出ます。(5) は。ほぼ新しい幼虫が旧い皮膚(黒矢印)を残して抜け出る。(6) は脱皮完了。開始から4~5分で終了します。



(写真25) 脱皮の過程

6. 体細胞突然変異の観察の仕方

1) 体細胞突然変異検出の原理

放射線が卵に当たると、5齢幼虫の皮膚に白い斑点が出ます。その理由を以下の写真26を用いて説明しましょう。

国際宇宙ステーションに搭載された卵は、黒縞系統(♀)(写真 a)と小石丸(a)(写真 b)を両親として産まれたものです。黒縞系統の幼虫の皮膚は全体が黒く、 p^s という優性遺伝子によって皮膚に黒色の色素を作ります。また小石丸は乳白色の皮膚で、劣性のp遺伝子に支配され、黒い色素は作りません。

両品種を飼育して成虫になった黒縞成虫(♀)と小石丸(♂)を交尾させますと、両親からの遺伝子を受け継いだ p^{S}/p の遺伝子構成の卵が産み落とされます。このようにして作られた卵が宇宙ステーションに搭載されました。

国際宇宙ステーションへ搭載する卵の準備と

(写真26) 体細胞突然変異検出の方法

宇宙での放射線は太陽フレアや銀河系から飛来し、エネルギーが高い重粒子線(炭素、鉄、ネオンなどの原子核)が含まれています。このような放射線を千葉市にある放射線医学総合研究所に設置されている重粒子線照射装置で p^S/p を持つ卵に照射します。そして、ふ化してきた幼虫を桑や人工飼料で飼育すると、黒い皮膚に白い斑点が現れ(写真 c と d に示す矢印)、この発生頻度は、重粒子線の照射線量とエネルギーが大きくなると高くなることが分かりました。これは、放射線によって優性遺伝子(p^S)に変異が現れ、黒い色素が皮膚の一部に作られないからです。

このような理由から、 p^S/p の遺伝子構成を持つ卵をステーションに搭載しておけば、卵に宇宙放射線が当たると、この卵からふ化した幼虫に突然変異が現れることが予想できます。

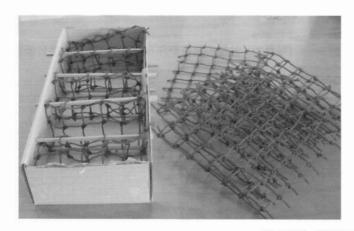
2) 突然変異の検出の仕方

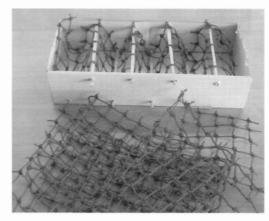
5齢に脱皮してから5~6日頃(糸を吐き始める前)に1頭ずつ胸部から腹部の皮膚を観察して下さい。黒地の皮膚に白い斑点が現れている幼虫を選び出して下さい。白い斑点の拡大写真を示しておきますので、これを参考にして下さい。宇宙ステーションに搭載した卵からの幼虫だけでなく、対照区となる地上で保護した卵からの幼虫についても観察して下さい。

7. 繭を作らせるための箱の作製法

写真27に示した箱は以下のようにして作りました。

- 1) 防虫ネットをホームセンターで購入(網目の大きさは、1.5~2cm、余り小さいと幼虫が網目の間をくぐれない)。
- 2) 菓子箱を準備し、防虫ネットを菓子箱の幅に合わせて切る。
- 3) 菓子箱の側面に穴を上下に開け、割りばしが通せるようにする。
- 4) 防虫ネットを、割りばしを支えとして上下させ、波型に張る。波の山と山の間隔は5cm 程度(厳密でなくとも良い)。



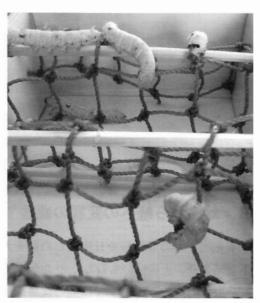


(写真27) 営繭用の網

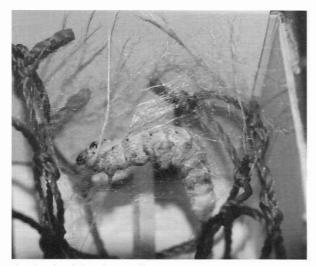
カイコ幼虫が4回目の脱皮をしてから6~7日 後に餌を食べるのを止め、飼育箱の中を徘徊し始 め、頭部を上に持ち上げ、左右に振ります(写真 28)。

このような蚕を先に作った箱に入れると、最初はあちらこちらと動き回りますが、適当な場所を見つけると糸を吐き始めます(写真29)。頭を左右に振りますが、糸を吐く場所を定めると頭を8の字、あるいはSの字状に左右に振りますので、よく観察して下さい。

半日ほどすると、幼虫の身体の周りにはふわふわした糸が見られ、その中で幼虫が糸を吐いています(写真30,31)。1日~1.5日経過すると網の谷に楕円形の繭を作っていますが、その中ではカイコは未だ糸を吐き続けています。掃き始めてからほぼ4日経過すると糸を吐くのを止めます。



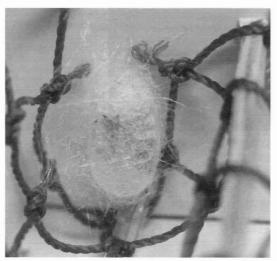
(写真28) 熟蚕を箱の中に入れると、営繭場所 を探すため、徘徊します。







(写真30) 外層の繭糸が作られる (吐糸開始半日後)

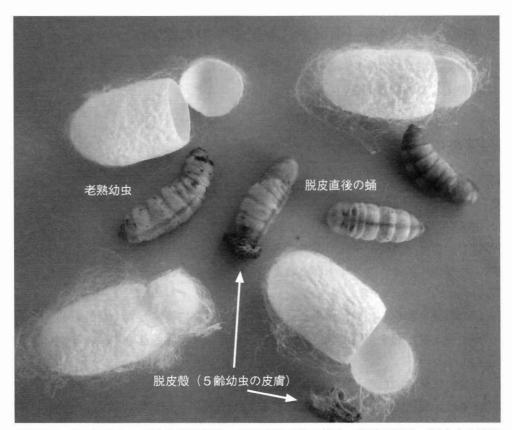


(写真31) 繭の外形が作られ、うっすらと繭の中で 熟蚕が糸を吐く様子をみることができます。

8. 幼虫から蛹への変態の観察

糸を吐き始めてから4日経過した繭をカッターで切開すると、繭の中にはまだ幼虫がいます。身体全体が縮まり、正に"いもむし"のようになっています(写真32、左端)。この老熟幼虫を出し、観察すると幼虫の皮膚の下にはすでに蛹の皮膚が形成されています。

その後、背側の頭部と胸部の間に裂け目が入り、蛹は身体全体を動かしますが、動くたびに皮膚が避け、淡い黄色の体色をした蛹が現れます。時間の経過とともにこの体色は濃い褐色に変わります。



(写真32) 繭を切開し、中から老熟幼虫、脱皮直後の蛹の様子。右端の蛹は、脱皮から時間 下経過したので褐色に変わっていきます。

9. 蛹の観察の仕方

蛹は餌を食べません。飼育ケースに柔らかい紙を敷いてその上に置き、20~25℃で保温して下さい。 特に脱皮直後の皮膚は黄色く、皮膚が破れやすいので丁寧に扱って下さい。頭部や胸部を観察すると、 触角、翅などが観察でき、すでに成虫の器官などが備わっています。

成虫になった時に雄と雌の交尾、また産卵の様子を観察する場合には、雌雄を別々に保護しておくと 良いでしょう。

10. 蛾の観察

蛹になってから、7日から10日経過すると、蛹の身体全体が黒い褐色になります。やはり頭部近辺の 皮膚に裂け目が入り、脱皮を始めます。脱皮直後は翅や触角には張りが観られませんが、しばらくする と翅の支脈に血液が充満して、ピーンと翅を広げます。

交尾をさせる場合には、新聞紙あるいはティッシュを敷いたプラスチックケースに雄と雌を入れると、 雄が雌を求めて動き回ります。5分もすると交尾し、雄は静かになります。この状態で約2時間放置し た後、雌雄を離し、メスを厚紙あるいは画用紙の上に置いておくと卵を産み始めます。

注意: 交尾の際には雄が動き回るので翅や胴部の鱗毛が飛び立ちますので、マスクをすること。また、 交尾後、メスは放尿しますので注意して下さい。

「宇宙帰り蚕」を利用した青少年教育事業報告

1. 背景

平成21年8月29日午後12時59分、蚕卵(黒縞系統卵)を搭載したスペースシャトルが、地球約400km上空を周回している国際宇宙ステーションの日本実験棟「きぼう」に向かって打ち上げられた。蚕卵搭載の目的は、ステーションに卵を約3カリの長期にわたって滞在させることによって、宇宙放射線による生物学的影響を調査することにある。具体的には、11月末に卵が地上に帰還した後、RadSilk研究グループ(注1参照)によってふ化幼虫を人工飼料で飼育し、宇宙放射線の影響を個体レベルから遺伝子レベルでみるとともに、微小重力環境での胚の発生状況について調査することにある(詳しくは、ホームページhttp://homepage3.nifty.com/cosmos-silk/をご覧ください)。

この実験では余剰の卵が出るため、その利用について宇宙航空研究開発機構内の宇宙環境利用研究委員会で検討され、余剰の卵は財団法人 衣笠会に委譲されることとなった。これを受け、衣笠会理事連絡会ではこの卵の有効利用について議論した結果、青少年に対する「繊維教育」の一環として「宇宙カイコを通しての青少年教育事業」を本年度の緊急課題として了承された。

このため、全国の小学校から高等学校の教育機関や博物館に対しホームページ、新聞報道などを通じて、「宇宙カイコ」を利用した実験テーマの公募を行った。その結果、全国から数多くの応募があり、教育機関からの提案は下記の三つに整理でき、注2に記載の学校および博物館等が参画した。

提案1:宇宙放射線や微小重力が生物に与える 影響を、「宇宙帰り蚕」を飼育観察する ことによって知る。

提案2:「宇宙帰り蚕」を人工飼料で飼育することによって、脱皮・変態の特異現象や

繭糸が産生される様子を生徒に観察させる。さらに京都での繊維産業とカイコとの関連などについても生徒と一緒に調べ、社会科教育にも役立てる。

提案3:宇宙で約3カ月滞在した卵からのふ化 幼虫と、地上で保護された卵からのふ 化幼虫を飼育し、絹糸腺でのタンパク 合成系の比較実験を生徒と共に行う。

さらに、博物館関係者からは次の提案があった。 人工飼料による冬季の蚕幼虫飼育の展示と併せ、 カイコ幼虫そのものを自由に観察できる工夫をす ること、このことによって、カイコと人間、繊維 との関わり、さらに宇宙に対しても入館者に認識 を広めてもらうことなどである。

財団では、応募者の提案が実現できるよう、人工飼料による盃の飼育方法に関するテキストや、ホームページを通して飼育方法に関する情報を提供した。また、専門外の人にも人工飼料で飼育できる準備を整えた。そして、「宇宙帰り蚕」を全国に配布することによって、より多くの青少年が天然繊維である「絹」や、それに加えて「宇宙」にも興味を持つよう計画を立てた。

以下に、青少年教育事業実施に伴う活動記録を まとめた。

1) 国際宇宙ステーション利用生物実験(RadSilk 研究グループ)宇宙打合せ会議

平成21年7月1日午後1時30分~4時まで衣 笠会館2階会議室において、蚕卵を国際宇宙ス テーション (ISS) に8月打上げる件に関し、宇 宙航空研究開発機構、日本宇宙フォーラム、京 都工芸繊維大学および財団法人衣笠会所属の関 係研究者が出席して具体的な実験計画を打ち合 わせた。

ISS 搭載カイコ卵の理科教育利用について
 上記1)の会議において RadSilk 研究グルー

プが研究に用いる卵に、余剰卵が生じることから、これを青少年教育に利用することが検討された。さらに、本件に関し、宇宙環境利用研究委員会でも審議され、余剰卵を財団法人衣笠会に移譲する旨の打診があった(平成21年7月下旬)。

3) ISS 搭載卵の青少年教育への利用および理科 教育に関する共同研究

上記2)に関し衣笠会定例理事連絡会(毎月1回開催)において定款を基に審議された結果、繊維科学とその関連科学、および宇宙科学、生命科学に関する青少年教育に貢献できると結論づけられた。これを踏まえ、京都工芸繊維大学に共同研究を申しこむとともに「宇宙カイコ飼育観察を通しての青少年教育」プロジェクトを立ち上げあげた(平成21年8月)。

(平成21年8月29日に国際宇宙ステーションにカイコ卵を搭載)

4) 宇宙帰りカイコを用いた教育プロジェクトに 関する報道機関への公開

「宇宙とカイコ」と題したホームページを全国に公開(平成21年9月15日)するとともに、京都府教育庁の協力の下に、各新聞社などを通し、本教育プロジェクトへの教育機関からの参加を募った(平成21年10月5日)。

5)教育プロジェクト「宇宙カイコ飼育観察を通 しての青少年教育」応募状況

全国から小学校1、中学校5、高等学校15、 昆虫愛好グループ4、研究所5、博物館5 合 計35件の応募があった(平成21年10月19日)。

6)「宇宙帰り蚕」飼育観察プロジェクト実行委員 会

上記5)に記載の応募機関、団体が、12月帰還予定の蚕を人工飼料で飼育することにより、青少年教育に反映され、かつ一般市民啓蒙に貢献するかについて下記の実行委員によって審議された。その結果、応募機関団体を本事業への参加者として採択した。

宇宙航空研究開発機構:石岡憲昭、大森克徳、 京都工芸繊維大学;杉村順夫、一田昌利、無菌 養蚕システム研究所(京都):今村利勝、財団法 人衣笠会(事業主体); 林 幸之、増井博之、古 澤壽治

7)「宇宙帰り蚕」の配布と飼育指導(平成22年1 月)

参加団体には、冬季の蚕飼育のため具体的な人工飼料飼育方法をホームページに掲載することによって飼育を徹底した。宇宙から帰還した卵からのふ化幼虫と人工飼料は、京都工芸繊維大学から5件、無菌養蚕システム研究所(京都)から30件が配送された。

8) 「宇宙帰り蚕」飼育観察プロジェクト報告書編 集(平成22年3月末より)

各教育機関、博物館、研究所による活動状況、宇宙蚕飼育観察、宇宙カイコの繭を通しての繊維教育、生徒による宇宙の絵画的表現、宇宙帰り蚕の成長・発育の観察図などをまとめた電子図書を編集し、参加校ならびに関係者に配布するとともにホームページ(http://silkwormcosmos.travel.coocan.jp/)にアップロードした。

- 注1: RadSilk グループ: 古澤壽治(研究代表者、 財団法人 衣笠会)、杉村順夫、一田昌利、 長岡純治(京都工芸繊維大学)、藤井 博 (九州大学)、野鳥久美恵(放射線医学総合 研究所)、石岡憲昭、大森克徳(宇宙航空研 究開発機構)、嶋津 徹、鈴木ひろみ(日本 宇宙フォーラム)
- 注2:大阪府立住吉高等学校、千葉県立東葛飾高 等学校、京都精華女子中学校・高等学校、佐 野日本大学高等学校、ノートルダム女学院 高等学校(科学クラブ)、京都府立洛北高 等学校サイエンス部、京都市立西京高等学 校附属中学校、京都市立藤森中学校、市川 学園生物部、西東京市立上向台小学校、京 の館中学校・高等学校、日本女子大学付属 豊明小学校、京都市立大枝中学校、京都府 立北嵯峨高等学校、京都西山高等学校、名古屋市立向陽高等学校、京都市立太 秦中学校(理科クラブ)、兵庫県立三田祥 雲館高等学校、京都市立桂中学校、足立西 高等学校、愛媛県立小松高等学校未来科学

プロジェクト、宮園生物学研究所、Space Children、高槻の昆虫愛好グループ、群馬県立日本絹の里、姫路科学館-アトムの館-、日本科学未来館、財団法人進化生物研究所、堺自然ふれあいの森、亀岡市文化資料館友の会、(財)伊丹市公園緑地協会伊丹昆虫館、NPO法人綾部ベンチャーものづくりの会、宇宙航空研究開発機構(ISS科学プロジェクト室)、日本宇宙フォーラム。

2. 宇宙帰りカイコの飼育と観察

平成21年8月29日に打ち上げられた蚕卵は、約3カ月搭載された後、11月27日にケネディー宇宙センターに帰還した。しかし、教育プロジェクト用として予定していた卵からのふ化した幼虫は、全国から応募された教育機関に配布するには顕数として不足した。そこで、京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育センターと無菌養蚕システム研究所(京都)との共同で第二世代の卵を採取し、これらのふ化幼虫を平成22年2月初旬に人工飼料と一緒に全国に配送することにした。

しかし、参加者にとっては冬季に人工飼料で蚕を 飼育することは初めての経験であるため、無菌養 蚕システム研究所で無菌的飼育の技術状況を写真 で撮り、さらにクリーンベンチや保温装置を持た ない機関でも人工飼料育ができる方法を考案し、 これらを取りまとめテキスト(本研究報告43頁10 行目~60頁最終行まで)として電子メールで参加 機関に配信した。これに加えて、配送後の各教育 機関での実際の飼育上に問題点や疑問点が生じた 場合にはメールで質問を受け、また京都市内の学 校には現場まで出向いて指導を行い、飼育面にお ける指導を徹底した。

さらに、蚕の成長、発育に関する特異な現象、 予め知らせていた体細胞突然変異を見つけた場合 には衣笠会に報告することをお願いしたところ、 体細胞突然変異個体の確認が数件あった。また、 参加教育機関、博物館などから飼育経過の報告、 宇宙帰り蚕を利用した青少年教育活動に関する報 告が衣笠会に寄せられた。飼育経過については、 「地上対照群」と「フライト群(国際宇宙ステーション搭載群)」について各学校で工夫されて観察され、また突然変異の発生については、デジカメによる玄人とも思える写真が送られてきた。これらの報告は、RadSilk研究グループによる研究結果とも併せて宇宙放射線影響について検討された。

また、青少年教育に関しては、宇宙帰り蚕の飼育を通して宇宙への想いを絵画で表現したり、蚕の成長発育、特に脱皮、変態過程のスケッチ、営繭行動から繭形成、糸繰りの一連に興味を持たせるなど、多彩な教育活動が行われたことが覗うことができた。

さらに、博物館では宇宙帰り蚕の飼育展示や糸 繰りの実演など、一般市民はもとより小学生から 高校生まで多数の参加者が訪れたとのことである。

3. 各校による宇宙カイコの飼育結果の まとめ

各校における飼育の実際についてはホームページ に掲載し、その際に「飼育の手引き」を配布し、 これに基づき飼育した、そのまとめを第1表に示 した。要約すると以下の通りである。

冬季における人工飼料によるカイコの飼育であるので、クリーンベンチを持たない学校ではテキストに準じ、ビニール袋内で餌交換を行った。この方法を採用した学校では飼料の交換が簡単に行うことができ、また餌にカビなどが生えず、全齢を順調に飼育できた。

アンケートの回答には昆虫飼育の経験がない人には、テキストの理解は無理とのコメントがあったが、ほとんどの学校では表に記載の通り、飼育の際には大いに役だったようである。一方、テキストについて改善すべき点では、例えば、生徒用テキストの作成を希望する学校、形態的な解説を望む学校もあった。また、桑育、人工飼料育のいずれにも飼育経験が無い学校でも成虫まで生育させた。

ほとんどの学校では飼育に際して、保温器を用いたが、保温器の無い学校では、20 W の電球を段ボールに入れたり、あるいは懐炉を用いるなど工

夫をしていた。また、クラブ活動として飼育をした学校では、蚕を自宅に持ち帰って、発育経過の 観察をしたようで、それぞれにおいて工夫をしな がら飼育された様子を覗うことができる。

白斑を持つ体細胞突然変異を見出した学校もあり、RadSilk 代表者にデジカメ写真を送ってこられ、放射線影響をみることもできた。この観察にもすべての参加校は力を入れていた。

理科の実験に蚕を導入する点については、飼育 期間が長く、毎日観察する必要がある点など、ま た生徒人数が多い場合には導入しにくいので、ク ラブ活動として取り入れるとする学校が多い。ま た、脱皮などの観察には、授業時間との関係で、 観察は昼休み時間しかできないので、脱皮の観察 は難しいとする学校が多い。これに対し、クラブ 活動として飼育導入した学校では、生徒に持ち帰 らせ、脱皮や営繭の様子を観察させていた。

営繭の観察については、営繭の状態をこま撮りするなど、営繭行動にはかなり興味を示したが、繭を切開して蛹を取り出し、蛹から蛾までの行動や形態の観察に使用したため、ほとんどの学校では糸を繰っていない。しかし、糸を繰って、絹の強

度などの物理的性質を調べたいとする学校もあっ た。

以上のように、宇宙放射線の影響のみならず、 繭糸に対する興味、特に営繭の様子を観察し、糸 に対する興味を持たせることができた。また、こ れまで学会等でも蚤を用いた生物実験を考えてこ られたが、桑葉の入手などが明確でなかったため か、生物実験には用いられていないようである。 今回、人工飼料育によって宇宙帰り蚕を飼育して もらったが、営繭させる方法をテキストで紹介し たところ、学校によっては、卵プラスチックケー スを用いたり、菓子箱に大小の区切り、紙で筒を 作り、また筒や山形を作ったりして、立体構造と 営繭との関係を試みる学校もあった。

今後は、人工飼料の供給体制や飼育技術に関しての細かな情報提供や繭糸を採る器械等を紹介すれば、教育面に蚕が生かされるであろう。この点については、22年度に滋賀大学教育学部附属農場での公開講座で実践したところ、その効果に手ごたえを感じることができた。

(報告者:古澤壽治)

7. 結果
141
新に関するアン
人工飼料飼育。
H
第1表 冬季におけるカイコの簡易人

日連の名			3			··	:				!	
の名職のない。 動力が緩のか。 かい人には理解 ない。 ちました。保 や温度や関数 といった図の解説 をい も数立った。 も数立った。 も数う分かり いても非いて欲し 最かの課程の中に本体表 ストイスタール 作らせた も数立った。 も数う分かり いても非いて欲し 最がそと思う がんしかった。 動物のとの記録 が成しかった。 動物のとの記録 が成しかった。 動物のよりかり いても非いて欲し 最が建りなどでも維維的 かった かった かった かった かった もあり分かり いても非いてなる がのな反為他の がった。 あのな反為他の かった かった かった かった は可能 ものが必要した。 またられる かった かった かった は可能 ものが表してもなり を変したりがましてすが、選択機ち に関数したりを認確の かった は可能 ものが表してある。 を変したりがまないこと思う ないたもかった。 専門的な正述がある ものが確いてある ないかを ないかを ないかを かった は可能 ものが表してある を変したくりるこなうこと は可能 は可能 ないるを を変したくりるこなうこと は可能 ないるを ないるを ないるを をを可能だと思います。 またりに記述して、 を変の変化の様子 ないるを ないないと ないる ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないると ないるを ないると ない。 まいる ないる ないるを ないるを ないないる ないないないる ないる ないると ないると ないる ないると ないると ないるを ないるを ないないないない ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるに ないる ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないるを ないる。 ないる。 ないる ないる ないる ないる ないる ないる ないる ないないないないないないないないる ないないないないないないないないないないないないないないないないないないない	录音器 人工版 ビニール袋 験の有 解育器 内での餌な 左の方法を採用 超音中の 験の有 験を採用し しなかった場合 保温方式 無 たか。	スニーン数 囚かの耳炎 伍の方法を採用 様を採用: しなかった場合 たか。	左の方法を採用しなかった場合	総育中の 保護方法		テキストでの 問題点	以各点	理科の実験に用いること は可能か	どのような実験 に用いることが 円來るか	薬を作らせた	繭糸を採ったか	
(4ました。保 (本) (2) (2) (2) (2) (3) (4) (4) (4) (2) (3) (4) (4) (4) (4) (ある ある 採用	五 光	H + H	7777		尼虫の知識のない 人、飼育溶験の合 くない人には理解 できない		可能(作し学校関係では 飼育時期は夏から秋)		念として残	耐が薄くで繰れ なかった	
6.投近った。	ない ない	クリーンベンチ	ナンベンチ			役立ちました。保留器や証拠を創業の問題などの治癒に役立った	〇番四ガとこの位といったといった図りを記さいった図の解説が(次しかった。	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	スーパサイエンスハイスタールスハイスタール 治定校の学校設 記科日への尊入	作らむた	繰っていない	
8 あり分かり	ない ある 採用	茶田		- X - #	-1, 1, 1 mg 44/	たも役立った。 b イコの 年 い か 5、質の交換の時 間	掛になし	可能だと思う		段ポールの口で作らせた	批戦する予定	
がきえのなに も後なった も後なった かった かった かった かった もでた経験が 歯の繰り力のコッ とにっくりおこなうこと 大変(いった ことが発してもない。 は可能 で、観察の手 ました。 ました。 ました。 などろまで をとあるをいました。 ました。 などのが終でし かいたころまで あればいいと思い ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 ました。 をの可能だと思います。 をが糸を吐き始め をの可能だと思います。 をが糸を吐き始め をの可能だと思います。 ました。 ないををもらけること。 またた。 ました。 ました。 ないををもにはいたいがり ないををもにはいたががも で、 で質がでとももしました。 で、 で、 で、 で、 で、 で、 で で で で で で	ない ない クリーンベンチ	ケントント				写真もあり分かり やすかった	温度の休め方にし いてを書いて欲し かった	向付はとても谷易にでき、 扱いやすい教材であると 考えられる		作らせた	繰らなかった	
4年でた経験が 種の繰り方のコッ	ある ある クリーンベンチ 保証器	サンアン・ロッ		光田部		薬の質者えのほど とても役立った	<u> </u>	準しいて 思い		の手引きに書た方法で作ら	築うなやった	
・中間的な記述があ で、熱葉の手ました。 で、動葉の手ました。 になり役立ち、生徒用デキストが、業なら可能だと思います。 あればいいと思い ました。 あればいいと思い ました。 あればいいと思い ました。 が糸を吐き始め 気温の低い時間だったの がに記述して、る時期にさしかか 気温の低い時間だったの かに記述して、る際の変化の様子で、観察しにくい部分も かに記述して、などをおりに書い。 ができると思う。 が存むけること。 ができると思う。 が行成した網符 で、観察しにくい部分も かに記述して、 などをおりに書い。 が、着人できると思う。 かる。 が、着人できると思う。 かる。 が、着人できると思う。 かる。	大田 ない な出 大田	核油	路頭迷	金河			繭の繰り力のコッ などが奪いてある と良かった	進状理科などでも経続的 に観察したり実験をもっ とじっくりおこなうこと は可能		設ジーンにネットを張っ、その中心 を振っ、その中心 躍を信の立た	繰りました。 沢がされい。	
なが来を吐き始め いところまで、名時期におしかか。気温の低い時期だったの おに記述して、る際の変化の様子・で、觀察しにくい部分も おに記述して、そ気を付けること、あった。社承幼虫を整温 、大変助から、などをおりに書い。で顕音できる時期であれ で頂げるとなお切っぱ、着人できると思う	ない ない と投が- ル	20Wの飛	20Wの電歌となびボール	20Wの電珠 と段ポール		初めての容礙でしたので、観察の手がので、観察の手引きになり役立ちました。	専門的な記述があ り、生徒と読み合 わせが難しく思い ました。できれば、 生徒用テキストが あればいいと思い ました	普通授業に取り入れるの は難しいですが、選択授 業なら可能だと思います。			繰らなかった	
	幸 ・	北京 ゲンンベーニケ	采頭器		善性 は は は は は は は は は は は は は は は は は は は	いととろまで 的に記述して 、大変助かっ	数分米を円×品める時期におした今の時期におした今の際の変化の様子や対象でのでした。 を対象では10様子を対象でした かがまたけること などをおりに書い し同いるとなおは かめ	気温の低い時間だったので、観察しにくい部分もあった。社英幼虫を登温で回行できる時期であれば、 は、 地人できると思う。 は、 地人できると思う		飼育テキストを参考に作成した網箱 で作らせた	糸練りした。強 度等を比較する 予定	

	锤		毎口回話をしな ければならな かったこと。エ やの交換や清掃 時に無菌状態で 行わなければな らなかった		学校のクラブ活動として行ったため、観察に十ため、観察に十分な時間をさくしたができなっていたがったからかった。	
	廉糸を採ったか	等にしてらなら	業ってない	くらなからた。 耐水切って蛹の 臍敷に用いた。	繰らなかった	認識 業業 業 素 素 を 用いて 様 の た
	繭を作らせた	空き箱に割りばし で任切り、網を敷 いて作らせた	そのままで作らせた	作らせた	ネットを購入し、 設ポール箱の中に 張り、繭をつくら せた	ブラスチッケ容器 に、半紙を波型に したものと、当状 にしたものを発記 として作らせた
	どのような実験 に用いることが 出来るか			数材化に取り組みたい、日本のは消費を多くの、日本の自由を紹介したの。3年に乗りの、3年に乗りの実際、治生の文明、第年の大学のの実際、治生の大学の大学等		
	理科の実験に用いること は可能か	飼育期間が長く、経験が 必要なためなかなかなか離し い	現段階では考えていない が、数を増やすことができれば可能であると思わ れる	1) 仕徒が固首をするためには、集団の固ずはリスクが大きいかったように思う。2) 観察をするに思う。2) 観察をするに思う。2) 観察をするに関うれるだめ、脱皮や羽代を対象できるタイミンがなかなかあいませんでした。工夫をすれば、でした。工夫をすれば、遺伝やフェローンの実験に活用していくことは可能であると思うし、ぜひゃってみない。	すでに3年生で覆修する 生物Ⅱの実験として、毎 年行っています	4階幼虫、5階幼虫、蛹(菌)、羽化成虫、卵と炎態を観察するだけでも実物教育になる。本物を見ると云うことが素晴らしい実験だと思っている。
(第1表の続き)	改善点				特になし。	これで十分でいないからいなったっていりをいっていの説はなっかした際になったところはありませが、文書もの直があるとがあると前にたすまストがある前来
	テキストでの問題点	なにも飼育力法を 知らなかったの で、群し説明があ り分かりやすかっ た。	細かいところまで非常に分かりやすく書かれていて、初心者でも十分理解できた。特に良かったのは们業のかったのは作業の様子が写真で載っていたこと。	写真を参く扱った おんずなやく扱った さかからやすいも のでした。 ひ書の 知画の日女が示さ の現研や方面 からはなかがい からはおから がった からはあるして がった からはあるして がった かった がった がった かった がった がった がった からで から のでした。 のでした。 のでした。 のでした。 のでした。 のでした。 のでした。 のでした。 のでした。 のでは から のでいた。 のでいた。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 のででした。 がった。 がった。 がった。 がった。 がった。 がった。 がった。 がっ	人変役立ちました。回台のノウハ ウが丁寧に書かれている点が特に良かかした。	文章説明だけでな く写工資料や細か な指示があったこ とで事前予測がで き、人にに役立っ た。
	飼育中の 保温方法	保温器			保温器	天 道 器
	左の方法を採用 しなかった場合	クリーンベンチ	釣付用の部属に 入れたアコンで 近度遺跡			ケリーンベンチ
	ビニ・ル袋 内での飼交 換を採用し たか。				茶王	
!	人工飼 料育経 験の有 無	约季	1		48 16	40
		S	\$4 5	_	48 10	18 16
	学校名·団体名	RA 南等学校	IC 学園	RI 商等学校	KI高等学校	NI 古等学校

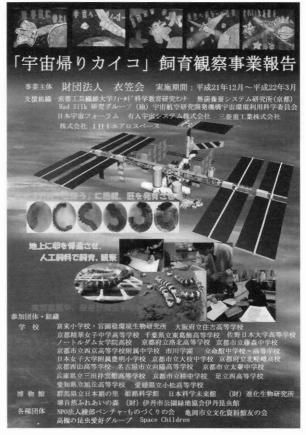
,	₩					
	選					
	歯糸を採ったか	業の存むらた	糸を繰るところ まで時間的に出 来なかった	薬のみなかった	織らなかった	賞多るでは
	繭を作らせた	クラフト田級に割り箸と図去田ネットを出い、別背テキストに習って作られた。	衛にネットを引っ 掛けて部屋を作り、一方で封衛を り、一方で封衛を 十分に切り、三角 形の空間を作り、 繭を作らせた	お菓子の箱を用いて繭を作らせた	等き箱を区分けし で作らせた	阿銀で四角い枠を 作ったり、卵やイ チゴのバックを利 HLで1個体ずつ 部壁を作り、そこで繭を作り、そこで繭を作り、そこ
	どのような実験 に用いることが 旧来るか					
(株1枚の続き)	理科の実験に用いること は可能か	国市については、少数の軍法のも年俸のケレーズを搭載する必要必めるとも関われます。解決動へにひか、た配行動の関係にしたが、交配行動の関係においることが考えられます。今回、私は、ガジスコップの中で着をつへるご様についてインターズの場面でピアを譲襲しま	- 機学級では人数が多い ので離しいかもしれませ ん。育成や進択の投業で は可能だと思います。今 回は理料部の生徒と・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	大体顕微鏡で観察したり、 スケッナ」なり影響の中 で活用した。宇宙と地球 の環境の違いがあたらす 生物への影響を超べると いうことで、生物からの れ方と地球環境という地 様分野からのアブローナ の両方の視点から年命を 観察できるこいきっかけ になった。	現行の高等学校の教科「生 物」においては、フュロ モンの実験が最も効果的 と思われる。この実験へ の導入は可能である。	可能だと思います。
	议卷点	鮮蜂の区別の仕方 など、形派的な解 説があればと感じ ました。	降にありません。	はにありません	全部と并秦の劉本テキストを別るにすると、より分かすると、より分かりやすくなったと問うので、分けて関うので、分けて関けると良いと思います。	各品種の特性と各 成長段階の写真が あれば、実変に気 がつきやすいと思 います。
	テキストでの問題点	蚕の飼育について 大変丁奪に説明が あり、助かりまし た。	大変役に立ちました。 た、タリーンペン チの代わりとして の、ビニ・ア級の 利用法が分かっや すかったです。	大変組やかに配合 の方法等を描かれ ていて、何育する 与にありません 上で大変役にたっ た。	人工資料で適合し たのは初めてだっ たので、大変参考 になった。	与点つきだったの でとても単解しや すかったです。
	飼育中の 保温方法	米山路	(名)		器開路	被
	左の方法を採用 しなかった場合			ナンスソーン		
	バニール袋 内での餌交 稼を採用し たか。	五	氏 张		田 珠	茶
	人工的 粋古経 願の右 無	ら で	. &	₹ %	\# *	₹6 '\3
	森 職 第 の 単 か の 単	<i>₩</i>	3	ğ	+€ ≻3	₹6 12
	学校名,团体名	KO 高等学校	UZ中学校	AD 自每学校	AS高等学表	KO 高等学校

全国中学校理科教育研究会(京都大会)での 展示発表の報告

第57回全国中学校理科教育研究会(京都大会)が 平成22年8月5日・6日に京都市勧業館(みやこめっせ)において開催された。「カイコを用いた生命連続性の体験学習」をテーマに(財)衣笠会、京都工芸繊維大学附属生物資源フィールド科学教育研究センター(一田昌利准教授)と無菌養蚕システム研究所(京都)(今村利勝所長)が共同して展示発表をした。発表は実物展示とポスター展示を組み合わせて行い、実物展示として、カイコの胚発育観察、人工飼料飼育法、5齢飼育から繭形成までの飼育キット、カイコや桑蚕の各種繭形 状、色繭などであり、ポスターとして、カイコの 生活史における特異な胚の反転、脱皮、変態現象 の図解写真を展示した。加えて、ビッグプロジェ クトとして衣笠会が事業主体として実施した「宇 宙帰り蚕の飼育観察事業」の結果もポスターとパ ソコンを用いた電子ブックで展示するとともに、 宇宙航空研究開発機構から国際宇宙ステーション にある日本実験棟「きぼう」の精密な模型が展示 され、宇宙カイコが搭載されたミニチュアの内部 設備が公開された。

いずれの展示物についても参加された現場の先





生達には好評であり、「初めてカイコを観て、触れ、知りました」とか「理科の実験に使えるなー」などのコメントが多数寄せられました。また、生徒・学生と共に「宇宙帰り蚕」を飼育・観察された先生達から、飼育の苦労話や発刊した電子ブック報告書を見て、「こんな立派な報告書にして頂けるのですかー」など、驚嘆の声をあげられていた。

生徒・学生がカイコの飼育観察、繭形成から糸繰 を体験することにより、生物としてのカイコの不 思議さや、織物原料としての繭糸生産に強い感心を引きつけることができる生物教育の環境が整うことを期待している。当財団がその一翼を担うための努力をしたいものである。この努力が次世代の人材育成や京都西陣、丹後の地場産業である繊維産業の新展開、普及にも繋がると信じたい。参加された中学校の先生達との会話を通じて、その手ごたえを感じるとともに、カイコを学校教材として取り扱うための現実的な問題点が発掘でき、今後の検討課題としたい。 (報告者:古澤壽治)



カイコを用いた生物実験の説明



「宇宙帰り蚕飼育観察結果」の電子ブック(左)と報告書(右)をみる先生達

平成22年度 (財) 衣笠会繊維研究所活動状況

- 1. 学術論文の発表、各種学会での口頭発表など(下線部は財団理事、評議員)
 - 1) 原著論文
 - 西村明紘・<u>杉村順夫</u>:ケナフ繊維の機械的特性 繊維採取の時期および部位による物性変化 . 衣 笠繊研報 13, 1-5 (2009)
 - 古澤壽治・一田昌利・大森克徳・小谷英治・長岡純治・杉村順夫・藤井 博・鈴木ひろみ・嶋津 徹・石岡憲昭: 微小重力下でのカイコの胚発育. 衣笠繊研報 13, 21-30 (2009)
 - 一田(高濱)昌利・野口亜友美・藤井佳美・諏訪裕美・河本愛美・三浦芳子:家蚕繭の紫外線蛍 光測定法と評価. 日本シルク学会誌 19,37-44 (2011)
 - Nagaoka, S., Katayama, H., Fujibayashi, Y., <u>Sugimura, Y.</u>: Calcium oxalate crystals in mulberry leaves: No negative effect on feeding the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericol. 79, 71-74 (2010)
 - Arimatsu, Y., Sugimura, Y., Furusawa, T.: In vitro processing of the dsRNase precursor isolated from silkworm midgut tissue, Bombyx mori. J. Insect Biotechnol. Sericol. 79, 125-127 (2010)
 - Moriwaki H., Kitajima S., <u>Shirai K.</u>, Kiguchi K. and Yamada O.: Application of the powder of porous titanium carbide ceramics to a reusable adsorbent for environmental pollutants. J. Hazardous Materials 185, 725-731 (2011)
 - 2) 書籍
 - 山本博規・白井孝治:バイオマスとその利用. pp 135-156. 応用生物学入門. オーム社 (2010).
 - 3) 口頭発表
 - 白井孝治・福島壽斗・片桐千・深本花菜・木口憲爾:エビガラスズメ緑色幼虫の体色発現機構: 色素顆粒中の INS 凝集成分 X について.日本蚕糸学会第80回大会 講演要旨集 p.30. 信州大学 (長野県).平成22年4月3日
 - 深本花菜・小林智史・土屋志織・舟山知夫・横田裕一郎・坂下哲哉・小林泰彦・木口憲爾・<u>白井</u> 孝治: 重イオン照射造血器官の崩壊・再生機構:血球前駆細胞の重イオンに対する応答. 日本蚕 糸学会第80回大会 講演要旨集 p.38. 信州大学(長野県). 平成22年4月3日
 - 長岡純治・片山寿人・藤林芳成・杉村順夫:シュウ酸カルシウムのカイコ摂食性に及ぼす影響. 日本蚕糸学会第80回大会 講演要旨集 p.67. 信州大学(長野県). 平成22年4月4日
 - 武智多与理・<u>杉村順夫</u>・前川善一郎:セリシン蛋白質のサラダドレッシングへの応用. 日本調理科学会平成22年度大会 講演要旨集 p.38. 中村学園大学(福岡県). 平成22年8月28日.
 - 古澤壽治・一田昌利・野島久美恵・今村利勝・長岡純治・<u>杉村順夫</u>・大森克徳・鈴木ひろみ・永 松愛子・嶋津 徹・山崎 丘・藤井 博・石岡憲昭:Symposium Ⅱ:宇宙放射線研究の新展開. 宇宙放射線によるカイコでの突然変異発現. 日本宇宙生物科学会第24回大会プログラム・予稿集 p.29. 東北大学 (宮城県). 平成22年10月17日.
 - 古澤壽治・一田昌利・野島久美恵・今村利勝・長岡純治・杉村順夫・大森克徳・鈴木ひろみ・永松愛子・嶋津 徹・山崎 丘・藤井 博・石岡憲昭:シンポジウム1:宇宙放射線研究 ISS 建設完成と宇宙実験報告と計画.「きぼう」での宇宙放射線研究 Rad Silk 報告:宇宙放射線によるカイコでの突然変異発現. 日本放射線影響学会第53回大会講演要旨集 p.51. 京都テルサ(京都). 平成22年10月20日.
 - 小谷英治・武藤清佳・福嶋真実・森 肇:カイコの TIA-1ホモローグ (BmTRN-1) と相互作用す

るタンパク質の探索. 日本蚕糸学会第65回東北支部・第66回中部支部・第62回東海支部・第76回 関西支部、第66回九州支部合同大会. 昆虫機能・利用学術講演会要旨集 p.19. 浦添てだこホール (沖縄). 平成22年11月15日.

4) ポスター展示発表

古澤壽治・一田昌利・今村利勝:カイコを用いた生命連続性の体験学習. 第57回 全国中学校理科教育研究会. 京都市勧業館(京都府). 平成22年8月5日・6日

小谷英治・武藤清佳・福嶋真実・森 肇:ウイルス感染に伴う TIA-1相同性タンパク質の細胞内 分布変化の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. ポスターNo. 3P-0768. 神戸ポートピアホール(兵庫). 平成22年12月9日.

5) 研究会、講演会等への出席

古澤壽治・杉村順夫・一田昌利:第1回 ISS・きぼう利用科学プロジェクト科学成果報告会. 航空会館(東京) 平成22年12月9日.

藤井直樹: 平成22年度京都府文化財所有者等連絡協議会総会. 平安会館(京都). 平成22年7月30日. 藤井直樹: 平成22年度京都府文化財所有者等連絡協議会研究会. 三宅八幡神社(京都). 平成22年12月17日.

<u>藤井直樹</u>: 平成22年度京都府文化財保護推進会議. 宗教法人醍醐寺三宝院(京都). 平成23年3月15日.

2. 講演活動

杉村順夫

演題:オイルパームの植物学的特性と栽培

主催:アブラヤシ研究会 日時:平成22年5月8日

場所及び対象者:同志社大学。植物生態学、植物生産学、油脂化学、農業経営学、農業政策学、熱帯農学などの研究者、技術者、大学院生など

講演内容:マレーシア、インドネシアで行われているオイルパームの大規模農業に関わる植物学的特長を 網羅的解説した。また、オイルパームの細胞・分子育種の展望、新規な工業的利用の展開について 言及すると共に、大規模栽培に伴って生じている生物多様性の問題、環境問題について取り上げた。

白井孝治

演題:昆虫に学ぶ生物学

日時: 平成22年9月2日、9月18日

場所及び対象者:長野県立野沢北高校、長野県立篠ノ井高校1、2年生

講演内容:エビガラスズメ緑色幼虫の体色多形性発現に関する研究の発端やその研究の実際を講演し、大 学における研究活動の実際を紹介した。

一田(髙濱)昌利

演題:食品養蚕学

日時: 平成22年6月10日

場所及び対象者:大阪市。日本食品機械研究会員

講演内容:日本食品機械研究会年次大会において、世界における食用昆虫の現状ならびに今後の可能性、 カイコと桑の食品としての価値を中心に食品養蚕学と題し、講演を行った。特に、食品として考え た場合の桑とカイコの持つ機能性に関し話題提供した。

衣笠繊研報

一田 (髙濱) 昌利

演題: クワとカイコ

日時: 平成22年10月1日

場所及び対象者:京都工芸繊維大学 CBFS 研修室。城星学園高校生

講演内容:城星学園高校の学外授業の一環として、養蚕の歴史、特徴、シルクの特徴、人との関わり等を 解説した。

一田 (髙濱) 昌利

演題:桑セミナー 桑栽培技術

日時:平成22年12月22日

場所及び対象者:京丹後市大宮町。一般市民

講演内容: 桑の栽培に取り組んでいるあるいはこれから取り組もうとしている企業、農家、農協関係者、 地方公共団体職員および興味をもたれた一般市民を対象とし、桑とは、桑の分類、桑品種、増殖 法、植え付け法、仕立て、収穫法、病害虫に関する講演を行った。

3. 学術講演会の開催

1) 春季講演会

中村 照子氏(帝塚山大学)

演題: 蚕血液のレオロジー特性-蚕の血液にも "さらさら" ってあるの?

日時:平成22年5月19日 17時~18時

場所:衣笠会館2F会議室

講演要旨:レオロジーとは、生体および生体を構成する物質の "流動と変形の科学"と定義され人間を含むすべての動物と植物、それらを構成する物質など多くの日常生活に関係したものが研究対象になる。哺乳動物の血液についてのレオロジー研究は多くなされているが、昆虫血液の流動下での粘度測定に基づいたレオロジー研究はほとんどなされていない。蚕血液は細胞浮遊液 (cell suspension) に特徴的な非ニュートン流動を示し、5齢前期の蚕血液は、見かけの粘度も非ニュートン性も5齢後期に比べて著しく低い。また、不吐糸蚕とよばれる繭を作らない蚕血液のレオロジー特性を示す物理量 (降伏値・粘度) は顕著に低いこと、さらに、各種人工飼料育蚕については、5齢前期・後期の成長過程にかかわらず、飼料組成の桑粉末の添加濃度含有量が高くなるほど粘度が低下していた。これらの知見はレオロジー特性研究が、蚕血液の成長過程における生理現象の把握に有効な指標となり得ることを示唆している。これに加え、ナチュラル SEM (日立製 S3500N) を用い、採取直後の "限りなく自然に近い状態" での蚕血液細胞の構造観察の結果や、蚕血液中のトレハロース、シアル酸、不飽和脂肪酸、デオキシノジリマイシン (DNJ) などが5齢前期血液中に多く含まれ、これらの成分により血液の流動性が高められることの論述があった。

2) 秋季講演会

馬場 まみ氏 (華頂短期大学教授)

演題:近代の文様

日時:平成22年11月4日 17時~18時

場所:衣笠会館2F会議室

講演要旨:京都における染織文様の近代化の流れをたどり、呉服商や百貨店、図案家や職人たちが近代デザインの展開にどのように取り組み、明治から昭和初期の京都でどのような染織品が創り出されたかなど、詳細な解説がなされた。

繊維研究所研究報告

2011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

古澤 壽治

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