

家蚕の体液蛋白質に関する研究

阿久根了・福永隆生

Studies on the Proteins of Body of Silkworm

Satoru AKUNE and Takao FUKUNAGA

(Laboratory of Sericultural Chemistry)

家蚕の体液は幼虫の生理や絹糸腺の発達にも高等動物と同様に重要な働きを示している。さらに高等動物の血液とは著しく異つた生理作用を行うことは容易に推察される。しかしいかなる成分の差異を持つているか、又いかなる機能の差を示しているかはまだ十分に研究されていない。従来から体液の遊離アミノ酸や蛋白質の研究はいろいろ行なわれているがまだ根本的な解明は行なわれていない。そこで我々は Tiselius の電気泳動装置を用いて生長に伴う体液蛋白質の成分の変化を調べてみた。その結果アルブミンと思われている蛋白質は電泳的に馬、牛の血清アルブミンと比較した所、明らかに異なるものであることが確認された。それらの結果を報告する。

実験の部

(1) 実験材料及び方法

1957年晩秋蚕(秋花×銀嶺), 晩々秋蚕(日115×支108)及び1958年春蚕(秋花×銀嶺), (大平×長安)より雌雄別々に体液の採取を行つた。体液は常法に従い尾角より採血し少量のKCNを加えてTyrosinase作用を阻止し, 3,500 r.p.m. 10分間遠心分離を行つた後, セロファン膜に入れて約50倍量の緩衝液を用いて約5°Cで10時間透析を行い外液を更新して同一条件で12~15時間透析した。

透析後の蛋白質濃度は1957年には2~3%として用いたが, 1958年にはいずれも2%に調製し使用した。

緩衝液は炭酸緩衝液 pH 9.4, $\Gamma/2 = 0.07$ を用いた。電気泳動装置は日立製のHTD-1型 Tiselius 電気泳動装置を使用し, 泳動条件は5 mA で大体60分間行つた。温度は19~20°Cであつた。

又易動度算出に要する蛋白溶液の比電導度は KOHLRAUSH bridge を用いて測定した。

(2) 実験結果及び考察

従来の研究によれば主成分は3個が確認されている。^(1,2) 著者等の場合も5令期蚕児では3個の主成分が確認されたので, 泳動の最も早い分層から comp. I, II, III と名づけた。得られた結果から易動度の算出を行つた。その結果は第1表の如くである。

1957年の実験で絶対易動度は成長時期によつて相当の差が認められたので, 1958年春蚕期では次の様な実験を試みた。馬の血清から結晶アルブミンを精製し, これを家蚕の血液に添加して電泳を行つた。結晶アルブミンの易動度を100として comp. I, II, III. の相対易動度を求めた。この結果は第2表に示した。

これで解のごとくアルブミンを規準とした相対易動度を算出すると, 絶対易動度で示される成長に伴う変化はみられない。そこでこの comp. I の平均値 76.4 を規準として第1表(B)を相対易動度に換算したものを第3表に示した。

第1表における如く易動度の測定値丈では同一 component に於いてもその値が著しく異なり同一成分とは認め難い。換言すれば家蚕体液においては易動度の測定丈では同一 component か否かを認定することは困難である。然るに相対易動度を求めることによつて同一 component の値はほぼ同一値が得られる。この事実から易動度の変化は蛋白質の変化でなく体液自体の組成の相違に起因するものと考えらるべきである。家蚕体液の如き成長に伴つて相当変化するものに於いては上記の如く結晶アルブミンの如き既知単一蛋白質を添加して相対易動度を求めて検討すべきである。勿論蛋白質の種類によつては会離-会合を起し易いものがあるから、その点充分留意すべきは言を俟たない。

又この結果から判断すると稲神,⁽¹⁾ 小田⁽²⁾ 等が溶解性からアルブミン系と考へていた comp. I は電気泳動的には馬血清アルブミンとは著しく異なる点から、むしろグロブリン系と考へることが妥当である。

Table 1. Electrophoretic mobilities of each component (in the 5th instar and pupae).

(A) (Sept. 1957)

Strain	Component	♀		♂	
		6th day	Mature silkworm	6th day	Mature silkworm
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i>	Comp. I	2.8	4.9	2.8	4.8
	Comp. II	2.3	4.3	2.3	4.3
	Comp. III	1.8	3.6	1.9	3.5
		5th day	Mature silkworm	5th day	Mature silkworm
<i>Jap. No. 115</i> × <i>Chin. No. 108</i>	Comp. I	3.5	4.6	3.5	4.5
	Comp. II	3.1	3.8	3.1	3.8
	Comp. III	2.1	2.9	2.2	2.9

(B) (May. 1958)

Strain	Stage Com- ponent	2nd day	4th day	6th day	Mature silkworm	Pupae
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♀	Comp. I	3.3	4.0	4.6	5.8	—
	Comp. II	3.0	3.5	3.9	5.0	4.2
	Comp. III	2.3	2.6	3.1	4.1	3.7
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♂	Comp. I	2.8	2.0	4.1	5.0	—
	Comp. II	2.5	1.7	3.4	4.0	4.0
	Comp. III	1.9	1.3	2.7	3.3	3.4
<i>Taihei</i> × <i>Chōan</i> ♀	Comp. I	4.7	3.5	3.4	4.7	—
	Comp. II	4.2	3.0	2.8	4.0	4.1
	Comp. III	3.2	2.3	2.2	3.2	3.5
<i>Taihei</i> × <i>Chōan</i> ♂	Comp. I	3.5	—	4.4	4.6	—
	Comp. II	3.1	—	3.5	3.6	4.0
	Comp. III	2.4	—	2.9	3.0	3.2

入沢等⁽³⁾は下等動物の血液を炉紙電泳で分析し、バッタなどにはアルブミン系蛋白質は存在しない事を報告している。DEUTSH 等⁽⁴⁾も種々の下等動物の電泳を行い高等動物とは著しく相違することを報告している。それ故著者等は電泳の結果及び小田⁽⁵⁾の報告による分子量、等から総合して家蚕体液蛋白質の内容及び性質は哺乳動物の場合とは著しく相異なるものと考えている。高等動物の血液中に存在するアルブミンは滲透圧の維持、各種物質の運搬、保護膠質などの作用を持つとされているが、下等動物に於いてはグロブリン系蛋白質の一つがこれらの作用を代行するものではないかと考えられる。

家蚕の如き下等動物においては血管が存在せず体液中に各種機能が浸漬している状態である。特に消食管、絹糸腺の如き重要機能が体液中に存在するから易動度に対しては盛食期における桑葉中

Table 2. Electrophoretic and relative mobilities of each component (in the 5th instar and pupae).

Strain	Stage		4th day	6th day	Mature silkworm	Pupae	Average
	Component						
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♂	Absolute mobility	Albumin	5.6	5.9	6.7	6.5	
		Comp. I	4.3	4.5	5.1	—	
		Comp. II	3.7	3.7	4.0	4.1	
		Comp. III	2.6	2.9	3.2	3.3	
+ Albumin	Relative mobility	Albumin	100	100	100	100	
		Comp. I	76.8	76.2	76.1	—	76.4
		Comp. II	66.1	62.7	59.7	63.1	62.9
		Comp. III	46.4	49.1	47.8	50.8	

Table 3. Relative mobilities of each component (in the 5th instar).

Strain	Stage		2nd day	4th day	6th day	Mature silkworm	Pupae
	Component						
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♀		Comp. I	76.4	76.4	76.4	76.4	—
		Comp. II	69.5	66.9	64.8	65.9	62.9
		Comp. III	53.2	49.7	51.5	54.1	55.4
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♂		Comp. I	76.4	76.4	76.4	76.4	—
		Comp. II	68.2	64.9	63.4	61.1	62.9
		Comp. III	51.8	49.7	50.4	50.4	53.5
<i>Taihei</i> × <i>Chōan</i> ♀		Comp. I	76.4	76.4	76.4	76.4	—
		Comp. II	68.3	65.5	62.9	65.0	62.9
		Comp. III	52.0	50.2	49.4	52.0	52.5
<i>Taihei</i> × <i>Chōan</i> ♂		Comp. I	76.4	—	76.4	76.4	—
		Comp. II	67.7	—	60.8	59.8	62.9
		Comp. III	52.4	—	50.4	49.8	50.3

(1) The value of comp. I is the average of relative mobilities in Table 2.

(2) The value of comp. II in pupae is the average of relative mobilities in Table 2.

の成分即ち可消化成分による影響, 5 令の絹質造成期, 及び変態期の成分変化の影響も考慮せねばならない。

次に 5 令期に於ける各分層を量的に比較した。その結果は第 4 表の通りである。

この結果から雌では comp. I は成長に伴い減少しているのに反し, comp. II は漸増する傾向が見られる。comp. III は 5 令期を通じて雌雄ともほとんど大した変化が見られない。これらの結果は小林等⁽⁶⁾ の報告とも一致している。しかし雄の場合, comp. I, II については多少同一傾向が見られるが雌の如く明瞭ではない。また熟蚕に於ける各 component の分層を雌雄で比較してみると comp. I と III では何れも雄の方が大きく, comp. II では雌の方が大きい傾向が見られる。

Table 4. Percentage of each component (in the 5th instar and pupae).

Sept. in 1957		<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♀		<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♂	
Component	Stage	6th day	Mature silkworm	6th day	Mature silkworm
	Comp. I				
Comp. II		33.3	40.4	27.2	25.4
Comp. III		8.7	8.2	13.5	21.5

Oct. in 1957		<i>Jap. No. 115</i> × <i>Chin. No. 108</i> ♀		<i>Jap. No. 115</i> × <i>Chin. No. 108</i> ♂	
Component	stage	5th day	Mature silkworm	5th day	Mature silkworm
	Comp. I				
Comp. II		12.0	51.0	24.5	46.0
Comp. III		18.1	15.7	18.7	18.4

Strain	Component	Stage		6th day	Mature silkworm	Pupae
		2nd day	4th day			
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♀	Comp. I	59.9%	59.1%	43.8%	39.5%	—
	Comp. II	20.7	26.4	40.9	48.1	66.9%
	Comp. III	19.4	14.5	15.3	12.4	33.1
<i>Shūka</i> × <i>Ginrei</i> ♂	Comp. I	51.5	63.2	44.1	50.7	—
	Comp. II	22.5	18.4	43.1	29.5	75.9
	Comp. III	26.0	18.4	12.8	19.8	24.1
<i>Taihei</i> × <i>Chōan</i> ♀	Comp. I	56.9	60.6	50.2	35.0	—
	Comp. II	25.1	28.3	32.0	52.9	74.9
	Comp. III	18.0	11.1	17.8	12.1	25.1
<i>Taihei</i> × <i>Chōan</i> ♂	Comp. I	48.4	—	54.6	44.3	—
	Comp. II	32.8	—	29.3	34.8	75.8
	Comp. III	18.8	—	16.1	20.9	24.2

以上の結果からこれら3種の component は夫
夫量的に雌雄によつて異なるものと思考される。

なほ、化蛹後の血液についてみると DRILHON⁽⁷⁾
の報告の通り comp. I は雌雄に関係なく殆んど完
全に消失している。著者等は化蛹に際して comp.
II, III が如何に変化するかを知るために次の如き
算出を試みた。即ち熟蚕時の comp. I を除いた
他の comp. II, III の和を 100 として両成分の割
合を算出し第5表に示した。

第5表の結果によると雌では蛹の comp. II が
熟蚕の計算値よりも少く、comp. III は逆に多く
なつてゐる。これに反して雄では蛹の comp. II
は熟蚕の計算値よりも多く、comp. III は少くな
つてゐる。

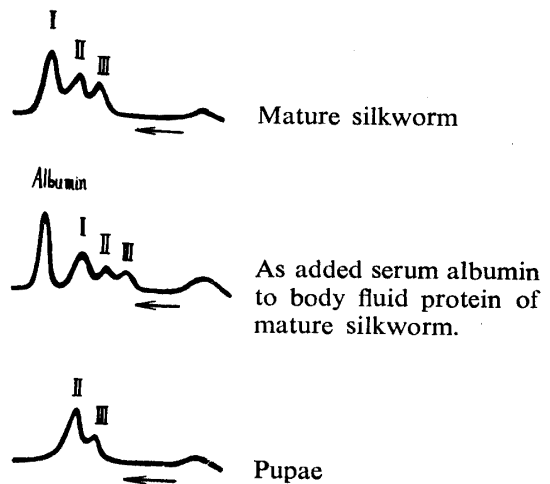


Fig. 1. Electrophoretic pattern (ascending) in body fluid protein.

Table 5. The calculated percentage of comp. II, III of mature silkworm.

	<i>Shūka × Ginrei</i> ♀			<i>Shūka × Ginrei</i> ♂		
	Mature silkworm	Calculated value *	Pupae	Mature silkworm	Calculated value *	Pupae
Comp. I	35.5%	—	—	50.7%	—	—
Comp. II	48.1	79.5%	66.9%	29.5	59.8%	75.9%
Comp. III	12.4	20.5	33.1	19.8	40.2	24.1

	<i>Taihei × Chōan</i> ♀			<i>Taihei × Chōan</i> ♂		
	Mature silkworm	Calculated value *	Pupae	Mature silkworm	Calculated value *	Pupae
Comp. I	35.0%	—	—	44.3%	—	—
Comp. II	52.9	83.0%	74.9%	34.8	62.5%	75.8%
Comp. III	12.1	17.0	25.1	20.9	37.5	24.2

* The values were calculated supposing that the comp. I had vanished in the mature silkworm.

この事柄は comp. II, III が熟蚕から蛹への変態過程において単なる残存結果でないことが推定される。又体内における血液の量が大きな増減がないとすれば comp. I が急速に消失することは滲透圧の平衡が破れることを意味する。

これらの事は comp. I から comp. II, III への転移が起るものと考えられる。しかし熟蚕から化蛹の時期に於いては絶食、排尿、吐糸等の後に起る変態であるからその内部変化の事実は容易に把握出来難い。熟蚕から化蛹の時代に於いて血液内の蛋白質の中1個の component が完全に消失する事実は確認し得たがその過程については種々疑問があるので今後の研究に俟たねばならない。

要 約

(1) 家蚕体液の蛋白質を電気泳動法により分割し5令蚕兒では3個の component, 蛹では2個の component がある事を確かめた。

(2) これら component は易動度において馬血清アルブミンとは著しく異なる点から電泳的にはアルブミンの存在は認め難くグロブリン系のみと考えられる。

(3) 5 令期蚕児の生長に伴い component の易動度が漸増することが認められたので馬血清アルブミンを対照として相対易動度を求めた。その結果はほぼ一定の値が得られ蛋白質自体の変化でないことを確認した。

(4) 5 令期蚕児の生長に伴う分層の量的変化では comp. I は漸減し、comp. II は漸増する。comp. III はほとんど変化はなかつた。

(5) 化蛹時には comp. I は消失する。comp. II, III の分層の量的関係は雌雄により逆の傾向を示した。即ち comp. II は雌で減少し、雄では増加する。comp. III は comp. II とは逆の関係が認められた。

文 献

- (1) 稲神 馨; 日蚕誌, **23**, 305 (1954).
- (3) 小田純子・林勝 哉・佐々木周郁; 農化誌, **30**, 342 (1956).
- (3) 入沢 宏; 電気泳動法(平井秀松・島尾和男共著) 共立出版, p. 156.
- (4) H. P. DEUTSH; *J. Biol. Chem.*, **180**, 219 (1949).
- (5) 小田純子; 農化誌, **30**, 345 (1956).
- (6) 小林茂三郎・小松一信; 生物物理化学, **3**, 28, (1956).
- (7) A. DRILHON; *Compt. rend.*, **238**, 2452 (1954).

Résumé

Body fluid proteins of the 5th instar and pupae of the silkworm were analysed with Tiselius electrophoretic method using the conditions of carbonate buffer (PH: 9.4, $I/2: 0.07$), 5 mA and 60 minutes.

The results are summarized as follows:

- (1) Three components (Comp. I, II, III) and two components (Comp. II, III) were obtained in the 5th instar and in pupae respectively.
- (2) It is found that there was not any protein of albumin system in the body fluid of silkworm, because the mobilities of these components are different from that of serum albumin (horse).
- (3) Being perceived that the mobilities of the components increased with the growing of the 5th instar, the relative mobilities of each components were determined by comparing with the mobility of the serum albumin.
- (4) In the qualitative changes of each component with the growing of the 5th instar, Comp. I decreased and Comp. II increased, and Comp. III varied little.
- (5) Comp. I vanished at pupation. At that time, Comp. II and III varied according to the sex (male and female). That is, Comp. II decreased in the female and increased in the male, and Comp. III would be varied reversely to Comp. II.