

生育ステージの違いによるタマナギンウワバ
(鱗翅目: ヤガ科) のタンパク質変異

野村昌史・上原さとみ
(応用動物昆虫学研究室)

Electrophoretic Patterns of Proteins in Various Stages of
Autographa nigrisigna
(Lepidoptera: Noctuidae)

Masashi NOMURA and Satomi UEHARA
(Laboratory of Applied Entomology and Zoology)

ABSTRACT

Electrophoretic patterns of general proteins and esterases of *Autographa nigrisigna* as holometabola insect (Lepidoptera: Noctuidae) were examined in various developmental and adult stages using native polyacrylamide gel electrophoresis.

The patterns of major bands of general proteins and esterases were divided into three types characteristic to egg, larval and adult stages, respectively. There are few day-old-development changes in the pattern among individuals in larval and adult stages. On the other hand, the pattern of pupae shifted from the larval to adult types when time passed.

These results suggested that physiological conditions of *A. nigrisigna* were stage development and relatively stable during each stage except the pupa.

緒 言

生化学的形質と呼ばれる生体内の酵素のアイソザイムやアロザイム, さらに核およびオルガネラのDNAを用いての研究は, 近年益々盛んになってきており, 生化学的形質の変異を遺伝マーカーとして捉えることにより, 分類学をはじめとして生態学など多くの分野に応用されている^[1].

この手法を用いた系統発生的な研究に関しては, 最近ではDNAの塩基配列比較を用いた研究成果が蓄積されつつあるが, まだ十分とはいえない。今後の詳細な解析については遺伝子の塩基配列に移行すると考えられるが, 酵素のアロザイムを用いての研究はこれまでに多くの有用なデータを蓄積しており, 遺伝子を用いた研究よりは簡便でコストもかからないために, 今後も多くの成果を上げるとともに, 研究機関だけではなく, 圃場における種内および種間変異の検出など新たな展開も期待されている。

しかしながらアイソザイムやアロザイムを個体間で比較する場合は, それらの生育期間中における変異の有無が問題点として挙げられる。なかでも昆虫は脱皮や変態を行い, その発育期間において個体が劇的に変化するのでステージごとの試料の状態を把握しておくことは不可欠である。これまでに品種やステージや食物によるタンパク質の変異を調べた研究についてはみられるものの^[4,5,6,14,18,19], 世代の各ステージのタンパク質の泳動像を日齢を含めて追跡した研究例はほとんどない。

そこで本研究は発育に伴う個体の体内変化が顕著にみられる完全変態を行う昆虫で, キャベツ・ブロッコリーなどを食する^[8,9,16]害虫でもあるタマナギンウワバ (*Autographa nigrisigna*; 鱗翅目・ヤガ科・キンウワバ亜科) の卵, 幼虫各齢, 蛹, 成虫をそれぞれ供試し, タンパク質染色とエステラーゼの活性染色を行い, 比較を行ったので報告する。

本文に先立ち, 試料作成法において多くの有益なご助言をいただいた厚生省国立予衛衛生研究所昆虫医科学部平岡 毅博士に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試虫

タマナギンウワバは、1995年5月千葉県松戸市主水新田のキャベツ圃場に発生していた幼虫を採集した。これを実験室に持ち帰り、羽化させた後、遺伝的な影響を最小限に抑えるため、1雌由来の次世代を得られるよう円筒型容器（直径15×高さ18cm）に1雌1雄のペアにして交配させた。採卵は毎日行い、孵化後は餌の質および発育状態に差が出ないように川崎ら^[10]の開発したキンウワバ亜科に用いられている人工飼料を与えて飼育した。飼育は20×13×6cmの密閉型容器を用い、22±2°C・16L8Dの日長条件で恒温器内において行った。餌の交換や容器内の掃除は適宜行った。なお本種は特定の休眠ステージを有さない昆虫である^[8]。成虫の飼育や採卵についてはNOMURA and ICHINOSE^[14]に従った。

上述の飼育を行った1雌1雄由来の卵(1,2,3,4および5日齢)、1齢幼虫(孵化1日齢および眠期)、2齢幼虫(脱皮1日目および眠期)、3齢幼虫(2日齢)、4齢幼虫(2日齢)、5齢幼虫(1,2,3および4日齢)、蛹(1,2,3,4,5,6,7,8および9日齢)、成虫(1,2,3および4日齢)をそれぞれ飼育中に採集し、1.5mlのサンプルチューブに入れて実験に供するまで-80°Cの超低温槽に収納して保存した。

2. 試料の作成

1) 摩砕試料

電気泳動に供試する試料は、基本的にはNOMURA and ICHINOSE^[14]に準じて作成した。試料作成用緩衝液は、タンパク質分解酵素の影響をなるべく受けないように摩砕直前に1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニル=フルオリド)を加えた20mMリン酸緩衝液(pH=7.0, 150mM NaCl₂, 5mM EDTA, 0.5mM フェニルチオ尿素を含む)を用いた。

試料の摩砕に際しては、本実験では1.5mlのサンプルチューブのサスペンション用に販売されているペレットベッスル(コンテス社製)を用いてそのまま虫体の摩砕を行う方法を採用した。手順は、1.5mlのサンプルチューブに磨砕するタマナギンウワバの卵から成虫のいずれか1個体と試料作成用緩衝液を入れ、モーターで回転させたペレットベッスルにより氷冷下で摩砕した。その後、磨砕液の入ったサンプルチューブを4°C、10,000×gで20分間遠心分離し、上清を別のサンプルチューブに移して粗酵素液とした。なお卵から3齢幼虫までは供試個体が小さいので、摩擦熱を抑えるためにペレットベッスル

で手動により摩砕を行った。

2) 体液を用いた試料

4齢以降の幼虫および蛹では磨砕する前に体液を取り出してこれも試料とした。幼虫は腹脚にハサミで傷つけ漏出した体液を1.5mlサンプルチューブに入れた200 μ lの試料作成用緩衝液中に滴下した(約20~30 μ l)。蛹については解剖用のメスで腹側の翅の合わせ目部分に傷を付け、浸出した体液を同様に緩衝液内に滴下した。体液を含んだ試料作成用緩衝液は4°C、800×gで2分間遠心分離して血球を除去した後、電気泳動に供試した。

作成した試料はいずれも遠心分離後、原則として直ちに電気泳動を行った。卵から2齢幼虫については1個体で1回分の試料しか得られなかったが、3齢幼虫以降は1個体でタンパク質とエステラーゼの両方の解析を行った。また試料が残っており保存後再度泳動を行う場合は使用するまで-80°Cで保存した。

実験は卵から3齢幼虫については、5反復、4齢以降の幼虫、蛹、成虫に関しては2反復で行った。

ゲル上のバンドの濃淡については試料中のタンパク質濃度が関与している可能性もあるため、ゲルに加えるタンパク量のある程度揃える必要がある。そこでCBB法^[2]により試料のタンパク質量の定量を行った。試料数が少ないために信頼度は低いですが、卵で約30 μ g/ml、1齢幼虫は約40 μ g/ml、5齢幼虫：約5mg/ml、蛹：約9mg/ml、成虫頭部：約1.5mg/ml、胸部：約5mg/ml、腹部：約7mg/mlという結果となり、個体が大きくなればなるほどタンパク質量も多くなるということが確認された。しかしながら電気泳動に供試した試料中のタンパク質濃度については必ずしも一定ではないので、本実験では主に質的変動を中心に調査を行うことにした。

3. 電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、濃縮ゲルと分離ゲルの二層式でゲル中の緩衝液と泳動用緩衝液の組成が異なる非連続系^[3]で行った。方法は永井^[13]、藤條^[17]およびNOMURA and ICHINOSE^[14]に準じた。電気泳動装置には市販の垂直スラブ式のキットを用い(アトー社製AE-6200型)、ゲルの大きさは160mm×100mm×1mmでゲル中のアクリルアミドの濃度は7.5%とし、1枚のゲルで20検体を泳動した。

前述の方法で作成したサンプルを40%ショ糖溶液(通電マーカーであるプロモフェノールブルー試薬を含む)と3:2の割合で混合した後、試料溝に注入した。泳動は、約4°Cの冷蔵庫内において200Vの定電圧で行い、プロモフェノールブルーが約8cm移動した時点で終了した。

4. 染色および解析

泳動終了後のゲルは、直ちに染色を行った。1枚のゲルについてタンパク質染色もしくはエステラーゼの活性染色を行い、ステージごとの違いを調べた。タンパク質の染色は和光純薬工業（株）製のクイックCBBを用い、そのマニュアルに示されている手順に従って行った。エ

ステラーゼの活性染色は α -および β -ナフチルアセテートを基質としたNOMURA and ICHINOSE^[14]の方法で行った。

タンパク質またはエステラーゼの解析にあたっては、ゲル上に検出されたバンドについて、タマナギンウワバのステージに共通もしくは特異的なものを選び、それらの出現状況等を検討した。

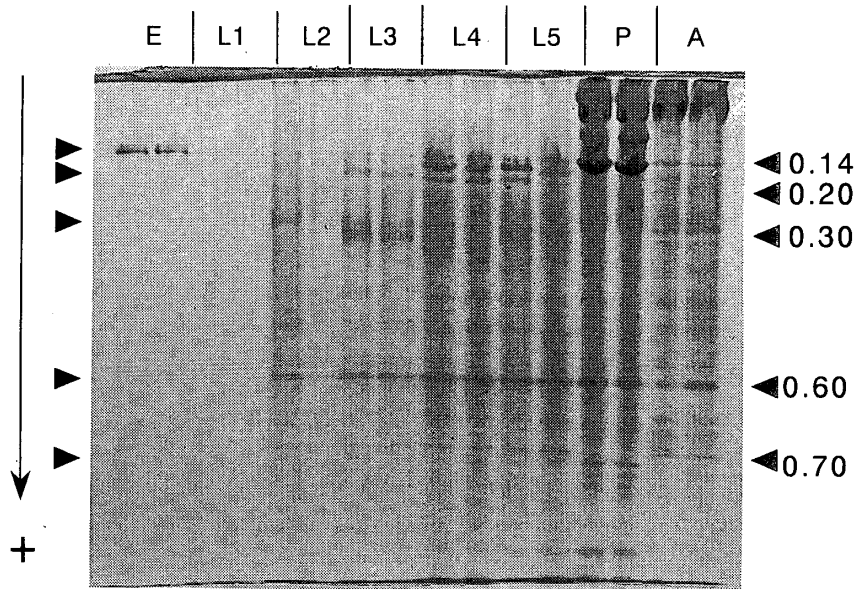


Fig. 1 General protein zymogram in whole stages of *Autographa nigrisigna*, E:egg, L1 to L5: 1st to 5th larval instar, P: pupa, A: adult. Arrows with relative electrophoretic mobility (Rm) values show the position of major bands.

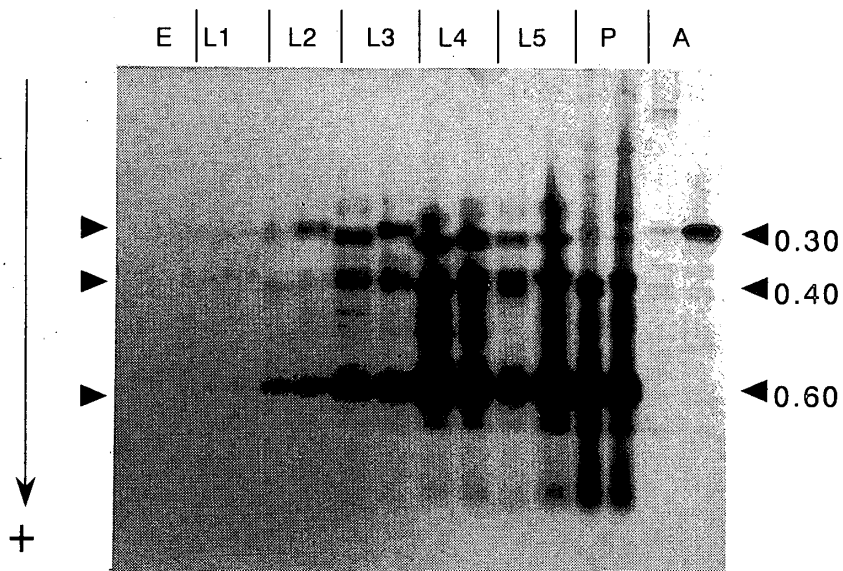


Fig. 2 Esterases zymogram in whole stages of *Autographa nigrisigna*, E:egg, L1 to L5: 1st to 5th larval instar, P: pupa, A: adult. Arrows with Rm values show the position of major bands.

結 果

Fig. 1 にはタマナギンウワバの卵から成虫の各ステージにおけるタンパク質のバンドの出現状況を, Fig. 2 には同じくエステラーゼの出現状況を示した。タンパク質およびエステラーゼのどちらもゲル全体に多くのバンドが出現しているのが確認されたが, ここでは比較的明瞭なバンドを選択してステージごとにその出現状況を把握した。なお, ゲル上のバンドの位置に関しては, SDS 処理をしていないために分子量マーカーは使わず, 泳動末端であるプロモフェノールブルーの移動度に対するバンドの移動度から算出した相対移動度 (Rm) で表した。各ステージの泳動パターンの特徴を以下に示す。

1. 卵

タンパク質では, $R_m=0.14$ 付近に濃いはっきりとしたバンドが出現したが, その他については明瞭なものはみられなかった (Fig. 1)。今回の実験では卵にはこのバンドのみが見られ, 22°C の飼育条件では 4 日目まで出現したが, 孵化直前の 5 日目の卵からは検出されなかった (Fig. 3)。

エステラーゼについては全体に活性が非常に弱かったが, $R_m=0.60$ 付近に認識可能な弱い活性帯が認められた。図には示さなかったが, 4 日目まで出現した。

2. 幼虫

卵の電気泳動像とは異なるパターンを示した。1 齢幼虫のタンパク質とエステラーゼはともに薄いバンドしか確認できなかったが, 2 齢以降の幼虫についてはバンド

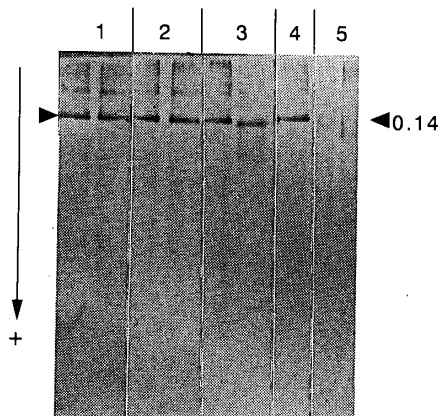


Fig. 3 General protein zymogram in 1 to 5 (1-5) days-old egg of *Autographa nigrisigna*, Arrow with Rm value shows the position of major band.

として認識できる活性帯がみられた (Fig. 1, 2)。幼虫の齢による比較では, タンパク質, エステラーゼともに若干の変異はみられるものの, タンパク質での $R_m=0.14, 0.20, 0.60, 0.70$ などにみられるバンドやエステラーゼでの $R_m=0.30, 0.40, 0.60$ 付近などにみられる活性帯は齢期による差は判然としなかった。また眠期に入った幼虫についても特有のバンドがみられるかどうかを調べたが, タンパク質, エステラーゼともに明瞭な変化はみられないようであった。

5 齢幼虫に関しては, 1~4 日齢ごとに試料を作成し, 電気泳動に供試した。その場合幼虫を磨碎する直前に体液を取り出して試料としたものの方が, 不純物に起因するバンドのテーリングが比較的弱く, タンパク質の場合

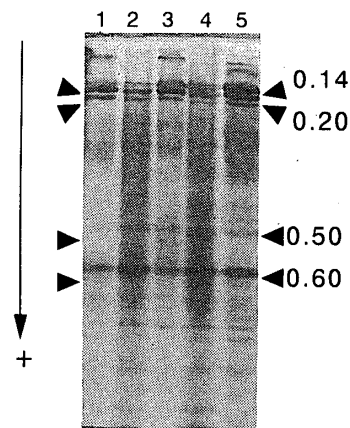


Fig. 4 General protein zymogram of haemolymph in 1 to 5 (1-5) days-old 5th instar larvae of *Autographa nigrisigna*, Arrow with Rm value shows the position of major band.

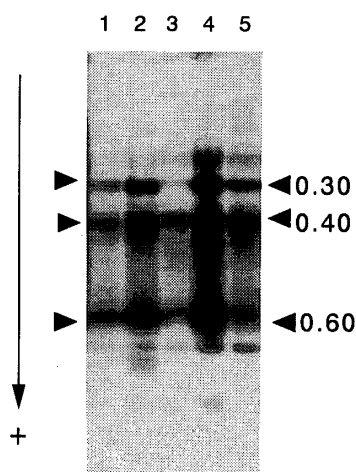


Fig. 5 Esterases zymogram of haemolymph in 1 to 5 (1-5) days-old 5th instar larvae of *Autographa nigrisigna*, Arrows with Rm values show the position of major bands.

は磨砕した試料と明確に現れたバンドがやや異なったが（ $R_m=0.50, 0.60$ が鮮明）そのパターンに差異はなかったので、Fig. 4, 5には体液を取り出した電気泳動像を示した。しかし、タンパク質、エステラーゼともに日齢による差はみられなかった。

3. 蛹

幼虫期と同様に蛹でも、体液を浸出させた試料を用いて日齢の差異を調べた（Fig. 6, 7 A）。22°Cの条件下で約9日の蛹期間があったが、成虫化が進んだと思われる6日目以降は体液の収量が極端に低下した。そのために活性帯が現れにくかったエステラーゼに関しては、同時に磨砕した場合の試料も加えてバンドの状況を比較した

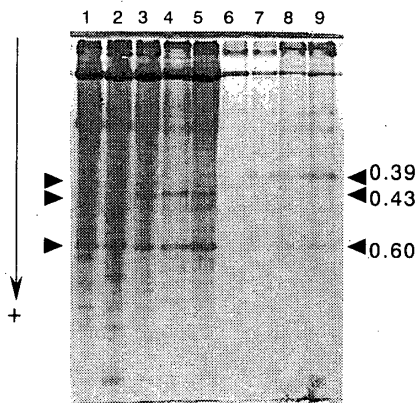


Fig. 6 General protein zymogram of haemolymph in 1 to 9 (1-9) days-old pupae of *Autographa nigrisigna*, Arrows with R_m values show the position of major bands.

(Fig. 7 B).

タンパク質は6日目を境にして、 $R_m=0.43$ および0.60付近のバンドが弱くなり、0.39付近のバンドが強くなるようになったが、その他については明瞭な違いがみられなかった。またエステラーゼについては $R_m=0.60$ 付近にみられた強い活性が6日目以降は急激に低下するという現象がみられた。また、3日目までは $R_m=0.84$ 付近に活性がみられたが、以降は消失した。その他は明瞭な差異はみられなかった。

4. 成虫

成虫のタンパク質の泳動パターンは他のステージのものと比較してバンドに大きな差異がみられなかったが、幼虫期に見られた $R_m=0.30$ 付近のバンドの一部が消失するなど若干の違いは見られた（Fig. 1）。これに対しエステラーゼに関しては幼虫期のものとは明らかに異なる活性帯がみられた（Fig. 2）。

成虫はそれ以前のステージに比べて頭部、胸部、腹部のそれぞれが明瞭に区別でき、クチクラ化が進んでいるので、各部を容易に分離することができる。アイソザイムは組織特異性がみられるという報告もあるので^[7]、成虫に関しては日齢の他に組織特異性も考慮して実験を行った。

タマナギンウワバは約3日で成熟することから^[10]、4日齢までのタンパク質およびエステラーゼを比較した。Fig. 8は頭部、胸部、腹部のそれぞれ1～4日齢までのタンパク質の違いをみたものである。胸部では他の部位に見られた $R_m=0.10$ 付近のバンドがはっきりせず、 $R_m=0.17$ 付近にバンドがみられ組織によりタンパク質

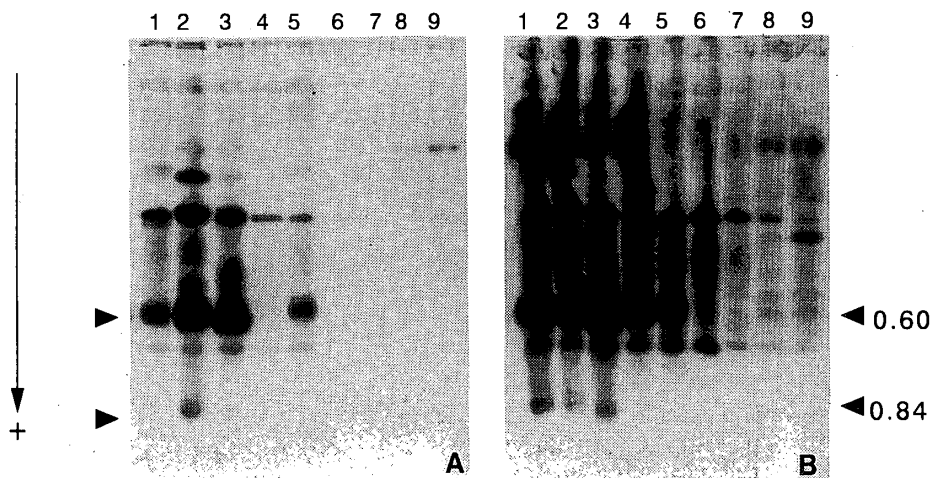


Fig. 7 Esterases zymogram of haemolymph (A) and homogenate (B) in 1 to 9 (1-9) days-old pupae of *Autographa nigrisigna*, Arrows with R_m values show the position of major bands.

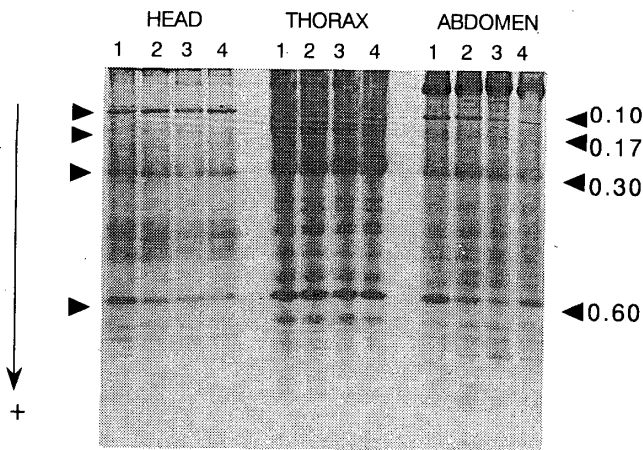


Fig. 8 General protein zymogram in 1 to 4 (1-4) days-old adult (head, thorax and abdomen) of *Autographa nigrisigna*; Arrows with Rm values show the position of major bands.

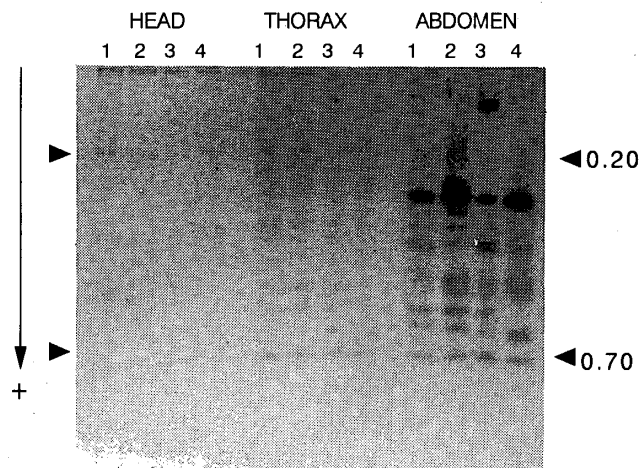


Fig. 9 Esterases zymogram in 1 to 4 (1-4) days-old adult (head, thorax and abdomen) of *Autographa nigrisigna*; Arrows with Rm values show the position of major bands.

のパターンに若干の差異があったが、各部位とも主要な Rm=0.30, 0.60 付近のバンドは日齢によっての変動は見られないようであった。Fig. 9 にはエステラーゼの電気泳動像を示した。頭部、胸部の活性については弱く比較しづらいが、腹部にも見られる Rm=0.20 および 0.70 付近のバンドを比較しても日齢による差は判然としなかった。腹部は明瞭なバンドがみられたが、ここでも日齢の差と判定できるものは検出できなかった。また、頭部や胸部に比べ、腹部には多数のアイソザイムが検出された。

考 察

個体の成長に伴うアイソザイムの変化でよく知られているものとしてはマウスの乳酸脱脂粗酵素があげられる^[12]。この酵素は 1~5 型という 5 つのタイプがあり、成長に伴ってそれぞれの型に移行していく。このように機能的には変わらないが個体発生に伴って変動する遺伝的に制御された酵素がいくつか明らかとなっている。

昆虫は様々な環境に適応できるような体の仕組みを変化させ、完全変態を行う仲間では幼虫期と成虫期の体の構造が大きく異なるために、蛹のステージを間に挿入してこの変化に対応している。そのために、生体内の生理的变化も大きいと考えられており、たとえばショウジョウバエの仲間 (*Drosophila immigrans* 他 8 種など) ではエステラーゼの電気泳動パターンが発育ステージに伴って変化するという報告^[15]がみられる。

また、アイソザイムには組織特異性がみられる^[7]という報告もあるために、タンパク質の組成は組織や日齢でかなり変異するのではないかと考えられている。従って個体間のそれらの変異を比較するためには同一個体でのその変動を把握する必要があると思われる。しかしながらこれを確かめた研究は少ない。

そこで本研究はタマナギンウワバを対象にしてその発育ステージごとにタンパク質およびエステラーゼの電気泳動パターンに差異があるか否かを検討した。その結果、卵から成虫までの電気泳動像は Rm=0.14, 0.2, 0.3, 0.6 付近に検出される比較的明瞭なタンパク質のバンド (Fig. 1) と、Rm=0.3, 0.4, 0.6 付近に認められるエステラーゼのバンドの出現パターン (Fig. 2) により、卵、幼虫、成虫の 3 つの型に分けられる傾向があった。蛹の時期については、Fig. 1, 2 からでははっきりしなかったが、蛹および成虫の日齢の電気泳動像 (Fig. 6~9) から判断すると、6 日目を境に泳動パターンに違いがみられ、内部に成虫の体が形成される発育後期 (ファレート成虫期) は成虫に類似したパターンを示し、蛹の時期は幼虫期から成虫期に移行する過程期であることが本実験からもうかがえた。ショウジョウバエのエステラーゼ活性を調べた PANTELOURIS and DOWNER^[15]によると、発育ステージに伴いその活性が変化することが述べられている。その結果はデンプンゲルの不鮮明さもあってはっきりしていないが、彼らの研究でも蛹の前期とファレート成虫期では活性に違いがみられているようであった。しかしながら本実験では、蛹を除く各ステージにおいて日齢の違いによる顕著な変化はみられなかった。また幼虫期の眠でも大きな変異は検出されなかった。カイコの発

育に伴うホスファターゼ^[4]や、エステラーゼでの活性変化を調べた研究^[5]では、幼虫期と蛹において酵素活性が異なることなどがあげられている。エステラーゼ以外の酵素についても調べる必要はあると思われるが、タマナギンウワバではこれらと変動様式がやや異なるのではないかと考えられる。

今回検出されたタンパク質やアイソザイムの中には生育ステージにより消失したものや、電気泳動像が明瞭になったものがいくつか存在したが、これらの変化については質的变化による影響の他に、個体のタンパク質の量的変動が泳動パターンに変化をもたらすことも考えられる。本実験では電気泳動に用いた試料中のタンパク質の量的変動よりも質的変動を重視したので、バンドパターンの変化が量的なものであるかについては分からなかった。特に卵から1齢幼虫にかけての個体が小さいときには、十分量のタンパク質が得られないために検出できなかったものもあると思われる。今後は量的な影響を考慮するために、感度の高い銀染色法を用いたり、試料中のタンパク質量を揃えて泳動を行うなど厳密な条件下で比較を行う必要がある。

タンパク質の変動を個体間あるいは個体群間で比較する場合は、生理的な状態が比較的安定したステージの個体を供試材料として用いる必要があると考えられるが、本実験結果から判断すると、幼虫期は日齢による変化がほとんど見られないので、齢期が揃っていれば比較を行うことは可能と思われる。成虫期については組織を分けて電気泳動を行えば、そのバンドのパターンは安定しており同じ組織による比較は有効であろう。しかし、蛹については日齢による差が大きいので注意した方がよいと結論できる。

摘 要

発育に伴う生物体の生理的变化を知るために、卵、幼虫、蛹、成虫と劇的な変化を経る完全変態昆虫のタマナギンウワバ（鱗翅目：ヤガ科）を用い、そのステージごとのタンパク質およびエステラーゼの泳動パターンの差異について、日齢ごとの変化も加味して検討した。

タンパク質、エステラーゼともに、卵、幼虫、成虫期の3つの泳動パターンがあるように思われた。幼虫および成虫期についてはともに日齢による変化は判然としなかったが、蛹では日齢が進むにつれて、その泳動パターンが幼虫型から成虫型に変化した。

本種の場合では発育によってそのタンパク質組成にも変動がみられるが、同一ステージの期間中は比較的安定していると推察され、カイコで行われた結果と若干異

なった。また蛹のステージは幼虫から成虫に変化する時期なので、電気泳動を行う場合には注意を要する事が考えられた。

引用文献

- [1] AVISE, J. C. (1994) : Molecular Markers, Natural History and Evolution, Chapman and Hall, New York, 511p.
- [2] BRADFORD, M.M (1976) : *Anal. Chem.* **29**, 944.
- [3] DAVIS, B.J. (1964) : Disc electrophoresis method and application to human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- [4] 江口正治(1964) : 家蚕の発育に伴うホスファターゼ型の変化, *日本蚕糸学雑誌*, **33**, 327-332.
- [5] 江口正治・杉本達芳(1964) : 家蚕の発育に伴うエステラーゼ型の変化, *日本蚕糸学雑誌*, **33**, 321-326.
- [6] EGUCHI, M., N. YOSHITAKE and H. KAI (1965) : Types and inheritance of blood esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L., *Japan J. Genet.*, **40**, 15-19.
- [7] FERKOVICH, S.M., F. VAN ESSEN and T.R. TAYLOR (1980) : Hydrolysis of sex pheromone by antennal esterases of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, *Chemical Ecology*, **5**, 33-46.
- [8] 一瀬太良・渋谷成美 (1959) : タマナギンウワバおよびその近似種(ヤガ科)の生態に関する研究II. タマナギンウワバの発育に及ぼす温度の影響, *応動昆*, **3**, 157-162.
- [9] 一瀬太良(1962) : 日本産キンウワバ亜科(ヤガ科)に関する研究. 東京農工大学農学部学術報告, **6**, 1-127.
- [10] 川崎建次郎・杉江 元(1990) : タマナギンウワバの交尾時刻と風洞内における性フェロモンの生物検定, *応動昆*, **34**, 319-320.
- [11] 川崎建次郎・池内まき子・日高輝展 (1987) : 飼料交換を要しないミツモンキンウワバの室内飼育法, *応動昆*, **31**, 78-80.
- [12] MARKERT, C.L. and H. URSPRUNG (1962) : *Dev. Biol.*, **5**, 363.
- [13] 永井 裕 (1965) : ディスク電気泳動法. 蛋白質 核酸 酵素 **11**, 746-749.
- [14] NOMURA, M. and T. ICHINOSE (1990) : Comparison of esterase zymograms among genera and species of Japanese Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl. Ent. Zool.*, **25**, 140-143.
- [15] PANTELOURIS and DOWNER (1969) : Phenotypic changes of the esterase pattern in insect metamorphosis, *J. Insect Physiol.*, **15**, 2357-2362.

- [16] 杉 繁朗 (1982): キンウワバ亜科. 日本産蛾類大図鑑 (井上寛ら編). 講談社, 東京, 1,827-838.
- [17] 藤條純夫 (1980): ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [吉武成美ら編. 昆虫実験法-材料・実習編, 東京: 学会出版センター, 187-193].
- [18] 吉武成美・秋山昌子(1965): カイコの幼虫血液における酸性ホスファターゼ型の品種間差異について, 日本蚕糸学雑誌, 34,99-103.
- [19] 吉武成美・秋山昌子(1965): カイコの卵のエステラーゼ活性に関する遺伝的考察, 日本蚕糸学雑誌, 34,327-332. LEGEND OF FIGURES