

家蚕幼虫消化器官の局所的機能差に関する研究

Ⅲ 中腸被膜のグリコーゲン分解酵素作用と冷蔵障害の影響

山口 定次郎*

Sadajirō YAMAGUCHI : [Studies on the Functional Localization of Digestive System in the Larva, *Bombyx mori* L.

Ⅲ. On the Glycolytic Enzyme in the Enteric Epithelium and the Influence of Cold Injury upon the Enzyme Activity

(1957年9月20日受理)

家蚕中腸の酵素の中で消化液及被膜組織内の酵素作用の局所差については、amylase 及び saccharase は松村(1942)及び山口(1955)により、又 protease は山口(1955)により研究されたが、之等の酵素は局所的に活性度に差異があり、形態的に明かな区別が見られるように一般に、何れも中腸後部の膜皺部に特に強いことが見出された。その後山口(1956)は中腸被膜組織内に含まれる多糖類特にグリコーゲンを組織化学的に研究し、中腸後部には、中部や前部に比し著しく多くのグリコーゲンが作られ、特に眠直前の頃に最も多く蓄積すること、又起蚕では之が消費されて、減少することを知った。之に続いて堀江、田中(1957)は生化学的に山口と同様な事実を認めた。又別に山口、宮崎、清水(1956a)は中腸被膜のグリコーゲン其の他の貯蔵物質の重量消長を調べ、中腸後部は前部や中部に比し食桑と共に速かに増加し、又絶食により急激に重量が減少する事実を報告した。然し乍ら貯蔵物質の中、グリコーゲン以外のものについてははつきりしていないので、本研究においては先づ一般的にグリコーゲンを基質とし之を分解し還元糖を生ずる酵素(amylase)について、主に局所差、発育との関係を調べ、起蚕冷蔵、モリブテン酸アンモン添食等の蚕につきその影響をも観察したのでその結果を報告する。

材料及び実験方法

材料：供試蚕品種は支115号、支110号、日124号等を用いた。正常蚕の他、起蚕を5°Cに24時間冷蔵したものを飼育したもの及び0.5%モリブデン酸アンモン溶液

を添食させた蚕について夫々酵素作用を測定した。

酵素の定量：各条件の材料蚕をそのまま生理的食塩水中で解剖し、気管、マルピギー氏管等をなるべくていねいに取除いてから中腸を縦に切開し、胃腔膜と共に中腸内容物(桑片)をとり出し、被膜組織のみとし濾紙上で水の余滴をとり、秤量し、従来のように前、中及び後部に三区分して切りとり、この材料1gに対し緩衝液でpH7にした生理的食塩水10ccを加え、石英砂でよく磨砕し、遠心分離して上清をとり之を材料酵素液とした。尚このものに適量のトルオールを加え使用途は0°~3°C位に貯蔵しておいた。

酵素反応：酵素反応液は次の割合で行った。

グリコーゲン1%水溶液	2cc
燐酸緩衝液(M/10)pH.7.0	4cc
中腸酵素液	1cc

反応液は試験管中に入れトルオールを加え27°Cで反応させ、24時間、及び48時間目に定量を行った。

酵素活性度：酵素の定量には反応により生じた還元糖をSCHAFER-SOMOGYの定量法により測定した。すなわち試験管に試薬A液5cc、反応液2cc、蒸溜水3ccを混じ、湯煎で15分間煮沸し直ちに冷水で30分間冷却する。次に2N-H₂SO₄を2cc加え、三角瓶に移し、2分間放置し、その後、試薬B液をもつて滴定を行った。又同時に白試験には1)反応液のグリコーゲン及酵素液の代りに蒸溜水を用いたもの、2)反応液のグリコーゲン液を蒸溜水に代えたもの、及び3)反応液の酵素液の代りに蒸溜水を用いたものの三者から夫々2ccをとり各々滴定を行い、白試験と反応試験の滴定値の差を表示し之を

* 信州大学繊維学部 蚕種学研究室

もつて酵素活性度とした。

実験結果

1. 酵素反応の時間と分解能

酵素反応の時間とグリコーゲン分解能力については、3時間、24時間、48時間目に測定したものの一例を示せば次の如くで48時間目にはかなり大きい値を示しているが、全体として中腸の部位による局所差がせまいものがしばしばあつたので、24時間目の値をもつて表示することにした。

Table 1. Reaction time and glycolytic enzyme activity

Time in hour	3	24	48
Anterior midgut	0.4	0.6	1.5
Middle midgut	0.3	1.8	2.9
Posterior midgut	1.2	2.6	4.9

Material.....C.115

2. 発育に伴う酵素活性の局所差

5齢起蚕から食桑中及び上簇前までの蚕につき中腸被膜のグリコーゲン分解酵素の局所差を調べた所次の結果を得た。(Table 2)

Table 2. Localization of glycolytic enzyme in silkworm enteric epithelium

Day in V instar	Division of midgut		
	Anterior	Middle	Posterior
Just after moulting	1.7	2.6	4.2
1	1.8	3.2	3.9
2	1.5	2.8	4.6
3	3.1	3.0	5.7
4	2.6	2.6	5.3
5	3.2	3.5	6.0
7	2.8	3.9	6.3
Average	2.38	3.09	5.14

Figures show the difference of titration value (blank test value minus reaction test value), which is proportional to the quantity of reducing sugar yielded by the glycolytic enzyme. Material.....C115.

之によれば5令蚕に於ては発育の時期により酵素活性に多少の高低があり、5令初期に稍弱いが3日目頃から漸次高くなる傾向が見られる。各区分の局所差については、中腸後部に活性が最も高く、中部前部に次ぎ、中部と前部との差は比較的少なく、中部が前部より低い場合もみられる。この関係はTable 1.にもみられる。

3. 冷蔵障害と中腸被膜組織の酵素作用

5令起蚕を5°Cに24時間冷蔵した場合の冷蔵直後及び冷蔵後食桑発育させた場合について毎日の変化を調べた結果は次の通りであつた。(Table 3)

Table 3. Influence of cold injury upon the glycolytic enzyme activities of enteric epithelium

Day in V instar after refrigeration	Division of midgut		
	Anterior	Middle	Posterior
Just after refrigeration	1.8	1.3	3.0
1	1.8	2.3	2.6
2	2.5	3.0	3.9
3	2.0	2.9	5.2
4	2.4	2.6	3.1
5	2.4	1.6	2.7
7	1.8	1.3	2.3
Average	2.10	2.14	3.26

Figures show the value as described in Table 2. Compare with Table 2 as a contrast experiment. Material.....C115.

この場合の酵素作用は正常蚕(Table 2)に比して全体として値が低く1, 2日目も低く2, 3日目稍高くなるが以後再び低下していくのが見られ、正常蚕に比し中腸後部の低下が著しいようである。尚蚕の発育は全体として発育不良で上簇に際して約半数以上の病蚕を生じ、あるものは膿病蚕、あるものは外觀空頭蚕症状で解剖してみると中腸型多角体病であり、両者併発もあり又普通の軟化病症状のものも多少存在していた。

4. モリブデン酸アンモン添食と酵素活性

モリブデン酸アンモンを添食すれば多角体病を発生させることが塚田(1955)により知られているので著者は起蚕に0.5%のこの水溶液を3回添食させて2日目及び5日目に中腸のグリコーゲン分解酵素を測定した所、次表の如く添食2日目には正常よりも稍高くなつていたが

5日目には、ずつと低下していることを見た。すなわちモリブデン酸アンモンはグリコーゲン分解酵素を一時的に活性化させるがやがて減衰させるはたらきをもつていると思われる。(Table 4)

Table 4. Injury of ammonium molybdate on the glycolytic enzyme activities of enteric epithelium.

Day after molybdate feeding	Division of midgut			
	Anterior	Middle	Posterior	
Exp. 1.	2	3.5	5.2	6.4
	5	2.0	2.2	3.5
Exp. 2.	2	6.9	7.1	8.7
	5	2.2	2.8	3.7

Figures show the value as described in Table 2. Compare with Table 2. and 3. as contrast experiments. Material.....C115.

5. 蚕品種と酵素作用

日124号、支115号及び支110号を用いグリコーゲン分解酵素作用を調べた所次表の如く、蚕品種により酵素活性に強弱が認められ特に局所差の値に相当の開差のあることが見られた。(Table 5)

Table 5. Silkworm varieties and glycolytic enzyme activities of enteric epithelium.

Variety	Day in V instar	Division of midgut		
		Anterior	Middle	Posterior
N124	2	1.8	3.2	3.9
	5	2.6	2.6	5.3
C115	2	1.3	3.9	10.7
	5	1.5	4.8	15.9
C110	2	1.9	5.8	7.4
	5	2.3	5.1	11.7

Figures show the value as described in above tables.

考 察

中腸被膜組織のグリコーゲン分解酵素作用の局所差については中腸後部に活性度が高く、中部や前部は之に比して常に低い値を示しているが、之は先に山口(1956)が報告したグリコーゲンの組織化学的研究及び堀江・田中(1957)のグリコーゲンの生化学的定量に於て、中腸

後部に特に多く存在するという事実と関連しているものと考えられるし、又山口(1955)や松村(1942)が既に amylase, saccharase, protease 等について調べたが、之等酵素と同じ位置にグリコーゲン分解酵素も活性が強いという事実を見出した。更にこの部分が単に一般の消化酵素のみならずグリコーゲンの合成及び分解に与つていることがわかつたわけである。従つて先に WIGGLESWORTH (1942) が *Aedes* の実験に述べているように、蚕でも中腸の一部が炭水化物の中間代謝の場所として重要な役割を果しているように考えられる。グリコーゲンを分解して還元糖を生ぜしめる酵素は amylase であると思うが、もし高等動物における肝臓 amylase のようなものとすれば phosphorylase であるかもしれないが、之についての検出は行つていないので今後の研究を要する問題である。又先に平塚(1925)は蚕の中腸では糖はすべてグルコースとして吸収し、血糖調節は殆ど行われぬかの如く述べられているが、著者等(1956a)(1956b)の実験から見ると中腸では脂肪細胞で行われる血糖調節作用を補い血液内に過糖現象を起すときは腸から血液内に吸収される前に、この部に於てグルコースからグリコーゲンに合成され一時蓄積され後再びグリコーゲンからグルコースへの転換が行われ、茲でも血糖調節作用が行なわれていると考えてよいと思う。

次に5令中グリコーゲン分解酵素の消長については、発育が進むと共に除々に高くなる傾向がみられたが、一方中腸細胞内でのグリコーゲン蓄積の程度が5令には末期に至つても盛でないことは山口(1956)及堀江等(1957)も認めている。之は5令期には組織又は血液の糖消費が速かで過血糖の現象など起らず中腸細胞内にグリコーゲンとして貯えられる必要もいとまもなく、血液内に吸収されていくからであつて酵素活性が弱いからとはいえない。このことは5令蚕に糖を増給すれば、グリコーゲンは中腸中部と前部にはあまり変りがなく増さないが後部には著しく増加することがみられ、(山口1956)(山口・宮崎・清水 1956a)(堀江・田中1957)合成酵素の活性が高いこともうかがわれるし、又絶食すれば間もなく減少していくことを見ると分解酵素が特に弱くはないということからも肯定される。

次に本実験で、起蚕の冷蔵はグリコーゲン分解酵素作用を減衰させることが明かになつたが、一方起蚕の冷蔵又は絶食は膿病性、中腸型或はその併発症など多角体病の誘因となることが明かにされており、(有賀1956、塚

田1956) 著者も起蚕を冷蔵した場合及び冷蔵後10%の蔗糖増給を行つた場合に発病の状態を観た所、冷蔵は明かに、前記の病蚕を著しく多発し、又冷蔵した上に更に糖増給を行うと一層多くの病癩蚕を出すことを見た。平塚(1925)も早く糖増給の害について述べている。重松(1956)は脂肪組織にフォスフォリラーゼや、フォスホムターゼを認め、グリコーゲン合成も脂肪組織で行われているといっているが、著者はこの糖増給の害は、冷蔵により酵素作用が減衰したために脂肪細胞や中腸被膜組織中にグリコーゲンの合成も分解も行なわれず、のみならず血液は中腸から糖を多く吸収するため過血糖を起し細胞の物質代謝に異常を来した結果ではないかと考える。又尾藤・阿部(1955)による膿病蚕の血糖は正常蚕よりも含量が高いと記しているが之は血液と脂肪細胞の間の糖代謝(グルコースよりグリコーゲンへの)が円滑に行われない為であると思う。たゞ膿病の場合の過血糖現象はそれが発病の結果であるのか、それとも原因であるのかについてははつきりしていないが、冷蔵がグリコーゲン分解酵素作用を減弱させる事実を見ると合成酵素も減弱させられるであろうし、何れにしても糖代謝異常が発病と関連しているのではないかと思われる。

摘 要

家蚕中腸被膜組織のグリコーゲン分解酵素の活性度及び局所機能差の有無を知るために5令の蚕につき SCHAFFER-SOMOGY の方法をもつてグリコーゲンを基質として中腸被膜組織内の酵素によつて生じた還元糖の定量を行い、併せて、冷蔵障害を与え、又モリブデン酸アンモン添食を行い、酵素作用の消長を調べた。研究の結果は次の通りである。

1. 5令の蚕では中腸被膜組織のグリコーゲン分解酵素(多分 amylase)は何れの場合も、中腸後部に活性強く、中部及び前部は弱く局所機能差が明かに認められる。

2. 5令の發育に伴うグリコーゲン分解酵素の消長は全体として齡の進むと共に、酵素作用は強くなる傾向がある。局所差は齡の終りに次第にはつきりしてくる。

3. 起蚕を5°Cに24時間冷蔵しその後食桑し發育させる場合、中腸のグリコーゲン分解酵素作用は初期に稍高いが漸次低下して行くのが観られる。同時に膿病や中腸型多角体病が多発するのを見ると酵素の減衰と発病との間に密接な関係があるように思われる。

4. 起蚕にモリブデン酸アンモンを添食すると酵素作用は2日目に一時的にかなり高くなるが5日目にずつと低下し、多角体病が発生するのを見た。

5. 蚕品種の相違によりグリコーゲン分解酵素が特に後部に著しく高いものが見られた。

本研究を行うにあたり、有賀教授(東大)蒲生教授及び八木教授より終始懇切な御指導を賜つた。又実験は市川智子氏の助力にまつ所が多かつた。茲に併せて深甚なる謝意を表する次第である。

文 献

- 1 有賀久雄：日蚕関東シンポジウム., 54~65(1956)
- 2 尾藤省三・阿部弘：日蚕東海要旨., (3), (1955)
- 3 江上不二夫：多糖類化学(1930)
- 4 平塚英吉：蚕試報., 6 (10), 457~474 (1925)
- 5 堀江保宏・田中元三：日蚕誌., 26 (2), 40~45(1957)
- 6 松村季美：日蚕誌., 13 (4), 168~174 (1942)
- 7 重松孟：日蚕誌., 25, 115~121 (1956)
- 8 塚田修一：日蚕関東要旨., 7, (1955)
- 9 WIGGLESWORTH, V.B. : J. Exp. Biol., 19 (1), 56~77 (1942)
- 10 山口定次郎：信大織報., (5), 47~52 (1955)
- 11 ————：信大織報., (6), 45~50 (1956)
- 12 ————・宮崎久雄・清水猛：日蚕中部要旨., (12), (1956a)
- 13 ————・清水猛：日蚕中部要旨., (12), (1956b)

Summary

In the previous papers the author studied on the local difference of digestive enzymes (amylase, saccharase and protease) and of glycogen accumulation in the midgut enteric epithelium of the silkworm larva, *Bombyx mori* L. This time the author experimented to know the activity and localization of glycolytic enzyme (perhaps amylase) in the enteric epithelium of the same larva. The glycolytic enzyme activities, which produce the reducing sugar from glycogen as a substrate, are measured by means of the SCHAFFER-SOMOGY'S method. As materials the fifth instar larvae of three varieties of silkworms were used. The results thus obtained are as follows.

1) The obvious local difference of glycolytic enzyme activity in the enteric epithelium of silkworm larva appears clearly also in this experiment as it was seen in the glycogen accumulation. The glycolytic activity in the posterior portion of the enteric epithelium is always stronger than in the anterior and middle portion.

2) Generally the glycolytic activity seems to increase gradually in accordance with the larval development.

3) When the larvae were refrigerated just after the fourth moulting for 24 hours in 5°C, the glycolytic enzyme activity of the enteric epithelium is somewhat strong at first, but hereafter tends to weak gradually. This depression

of the enzyme activity seems to have some relation with pathogeny of silkworm larvae, because it has already been made cleared that the refrigeration of larva just after moulting frequently induce two kinds of polyhedral virus diseases, i.e. the grasserie and the midgut polyhedrosis.

4) When the larvae are given 0.5 per cent ammonium molybdate solution with mulberry leaves on the first day of the fifth instar, the glycolytic enzyme activity is pretty strong on the second day, but it becomes weak on the fifth day, the larva usually falling ill soon afterwards.

(Faculty of Textile and Sericulture, Shinshu University, Ueda, Japan.)
