

白井孝治・木口憲爾

目的別テーマ：バイオファイバー生合成機構の解明

研究テーマ

15-2-15：絹糸腺とその相同器官の遺伝子発現制御及び吐糸行動の内分泌制御機構に関する研究

ABSTRACT

While many members of lepidopteran insect produce fibrous materials (silk), only the silk produced by silkworm, particularly Bombyx mori, is commonly used in our daily lives. It is therefore important to investigate the properties and production of silk from other insects in order to source novel natural fibers (silks).

The tobacco hornworm, Agrius convolvuli is relatively large lepidopteran insect. The larva of A. convolvuli don't make cocoon, but produce tiny amounts of fibrous materials (Agrius silks). Agrius silk proteins are synthesized in the labial glands, homologous organ of the silk gland in the domesticated silkworm, Bombyx mori. Our previous researches showed the luminal contents in labial glands during larval stage were different from that of wandering stage or pupal chamber producing stage. These findings suggest A. convolvuli make different silk for adapting to the needs required at each developmental stage. These phenomena are not seen in silk glands of B. mori, unique in Agrius labial glands.

First of all, we investigated the influences of application of 20-hydroxyecdysone on the synthesis fibrous proteins in larval labial glands, and the transition of contents in the lumen. Then, the major component of larval and pupal silk of A. convolvuli were investigated

The studies about the synthesis of luminal proteins in labial glands revealed the luminal components reflected the newly synthesized proteins in labial glands. However, application of 20-hydroxyecdysone did not effect on the sort of proteins synthesized, and also on the member of luminal contents in the labial glands. These results indicate 20-hydroxyecdysone cannot control the synthesis of fibrous proteins in labial glands, directly.

70k and 180k proteins are the major components of larval or pupal silk protein, respectively. So, the synthesis and the properties of these proteins are examined. 70k protein was synthesized throughout 5th instar (probably from first instar to metamorphosis). On the other hand, 180k protein revealed only during late spinning stage. Analysis of the amino acid compositions of these proteins clearly show there is no relationship between 70k and 180k proteins; Glycine, asprtic acid, and lysine were abundant in 180k protein. In contrast, 70k protein contained Glycine, glutamic acid, alanine, and valine in profusion. These rates of amino acid compositions of 70k and 180k proteins were also different from that of fibroin and sericin of B. mori.

Finally, we tried to characterize and categorize the luminal proteins in labial glands at 5th instar larva. The major luminal contents were isolated and characterized some properties. These major luminal proteins had unique repeated amino acid sequences usually shown in fibrous protein, respectively. So they were considered to be the components of silk of Agrius larva (at fifth instar). Moreover, these proteins could classify into some group (at least three groups) by the size and sequence. Therefore, the larval silk would be made from several fibrous proteins.

From these studies, it revealed that labial gland of A. convolvuli was a good model organ as a reference for investigating the evolution of silk gland of B. mori.

研究目的

エビガラスズメはスズメガ科の昆虫でカイコ等の絹糸昆虫と異なり営繭しない。しかし、これまでに、著者らはエビガラスズメ下唇腺が、カイコのシルク合成器官である絹糸腺と形態学的に極めて類似していることを明らかにしてきた。また、エビガラスズメの蛹室内部に少量の繊維状物質を発見した。これらはエビガラスズメが少量ながらシルクを生産することを示す。ところが、エビガラスズメ下唇腺では幼虫期、ワンダリング期、および蛹室形成期（カイコでは繭形成期に相当）で異なるタンパク質が合成されるという特徴的な性質をもつことが判明した。すなわちエビガラスズメ幼虫は幼虫

期、ワンダリング期および蛹室形成期、それぞれのステージで目的にあった性質のシルクを合成すると思われる。

本研究はエビガラスズメのシルクの性質と合成・分泌制御機構を調査し、今後、さらに進展が期待される新生物繊維の作出に有用な知見を得るとともにカイコ絹糸腺の知見と比較することで、カイコの絹糸腺のシルク合成のメカニズムをこれまでとは異なる視点で考察することが目的である。

5 年間の研究内容と成果

最初に、それぞれの下唇腺の合成成分をステージごとに調査した。その結果、エビガラスズメが各ステージで合成するタンパク質成分を変化させることが確認された。特にワンダリング期から蛹室形成期までの極めて短期間にのみ合成・分泌される成分が存在することが初めて明らかになった。この成分はその後すぐに検出されなくなるため、合成制御機構とともに、その後の挙動も極めて興味深いと思われる。

次に下唇腺のタンパク質合成・分泌とルーメン内からの成分の除去に対する 20-ヒドロキシエクダイソンの影響を調査した。20-ヒドロキシエクダイソンは昆虫の脱皮・変態を支配する主要ホルモンである。終齢盛食期 (day1-2) の幼虫およびワンダリング期 (day0-1) を用い 20-ヒドロキシエクダイソンを投与し、その後の下唇腺のタンパク合成とルーメン内成分の変化を調査した。しかし、対照区と比較して、合成されたタンパク質成分は 20-ヒドロキシエクダイソン投与個体でも違いは認められなかった。また投与後のルーメン内部の成分にも大きな変化は観察されなかった。そこで、投与するホルモンの量を変化させて、再度実験したが、最終的に 20-ヒドロキシエクダイソン投与の影響を確認することは出来なかった。これらの結果は、少なくとも下唇腺のタンパク質合成、(除去を含む) 内容成分の切り替えに 20-ヒドロキシエクダイソンのみでは影響しないことを示唆する。

蛹室形成期のエビガラスズメ幼虫のシルクは主に比較的高分子の 2 種のタンパク質 (フィブロイン) で構成される。これら 2 種のタンパク質の性質を調査したところ、互いに極めてよく似ており、同じ祖先型タンパク質から派生したと思われる。そこで次に蛹室形成期のエビガラスズメの合成するシルクの主要タンパク質である 180k タンパク質と終齢期の主要成分である 70k タンパク質のアミノ酸組成を調査した。その結果、エビガラスズメの 180k タンパク質のアミノ酸組成は 70k タンパク質のそれとは大きく異なることが明らかになった。また、これらはカイコのフィブロインやセリシンの組成とも異なっていた。他の鱗翅目昆虫の合成・分泌するフィブロインはカイコのフィブロインと同じある共通の祖先遺伝子から変化したと考えられている。しかし、本研究の結果はエビガラスズメのフィブロインが独自に進化したことを示唆する。一般にカイコ等は乾燥した場所で営繭する。一方、エビガラスズメは蛹室を土中に作り、さらに、口および肛門から液体を吐出し土を塗り固める。このような蛹室形成期の多湿な環境が影響しているのかもしれない。

エビガラスズメは幼虫盛食期と蛹室形成期では異なるタンパク質を合成する。この切り替えのタイミングを調査すると 5 齢期、ワンダリング期、蛹室形成期と 3 段階に変化する。孵化直後の幼虫も吐糸することから幼虫期の成分も繊維状物質であると思われる。そこで 5 齢幼虫期の成分についても詳細に調査した。まず 5 齢幼虫期の下唇腺内タンパク質の経時的変化を明らかにした。5 齢脱皮後から蛹室形成期まで、24 時間毎に下唇腺内容を回収し、発育に伴う成分変化を分析した。その結果、5 齢幼虫期を通してルーメン内成分の変化がほとんど無いことが分かった。なお、一部の個体にのみ認められる特有の成分も存在した。これら特異的成分の分析は今後の課題としたい。次に主要成分をより詳細に分析するため、2 次元電気泳動を行い、より詳細に分離した。その結果、これまで報告してきた主要成分 76k および 70k タンパク質と分子量の近いタンパク質を少なくとも 2 種類認めた。このうち、76k と新たに検出された 74k の N 末端アミノ酸配列を決定し、両者が極めて類似していることを突き止めた。これら 2 種のタンパク質はペプチドマップも極めて類似しており、これらの遺伝子は重複により生じたと考えられる。比較的高分子の主要成分である 116k タンパク質も単離し、N 末端アミノ酸配列等を分析したが、76k タンパク質を含む他のグループのタンパク質とは様々な点で異なっていた。さらに本研究で新たに着目した比較的低分子のルーメン内成分 (約 30kDa) についても同様の分析を行ったところ、Gly-X の繰り返し配列を持つ特徴的なタンパク質であることが示唆された。これら成分の中で 31k と 33k タンパク質は、様々な性質が類似しており、76k および 70k タンパク質の関係と同様に祖先型遺伝子の重複により生じたと思われる。以上の結果から、幼虫期のシルクも幾つかのグループに分離可能な複数の成分からなることが明らかになった。

エビガラスズメは進化学的には比較的カイコに近いと考えられている。作るシルクも類似していると考えられてきた。しかし、研究を続けると上述のように多くの点で異なる事が明らかになった。これらの結果は現在、盛んに研究されている昆虫の生物繊維の研究に大きな知見をもたらすと期待している。