

カイコのインスリン様ペプチド（ボンビキシン）  
の生理的機能に関する研究

（研究課題番号 04640655）

平成6年度科学研究費補助金（一般研究C）  
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 溝 口 明  
（名古屋大学理学部 助教授）

KAKEN  
04640655

## 図・本館

### 研究組織

研究代表者：溝口 明 (名古屋大学理学部 助教授)

### 研究経費

平成4年度	1, 100	千円
平成5年度	500	千円
平成6年度	500	千円
計	2, 100	千円

### 研究発表

#### 学会誌等

1. Saegusa, H., Mizoguchi, A., Kitahora, H., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H.: Changes in the titer of bombyxin-immunoreactive material in hemolymph during the postembryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. *Develop. Growth Differ.*, 34, 595-605 (1992)
2. Ishibashi, J., Kataoka, H., Isogai, A., Kawakami, A., Saegusa, H., Yagi, H., Mizoguchi, A., Ishizaki, H. and Suzuki, A.: Assignment of disulfide bond location in prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: a homodimeric peptide. *Biochemistry*, 33, 5912-5919 (1994)
3. Dai, J. -d., Mizoguchi, A. and Gilbert, L. I.: Immunoreactivity of neurosecretory granules in the brain-retrocerebral complex of *Manduca sexta* to heterologous antibodies against *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin. *Invert. Reprod. Develop.*, 26, 187-196 (1994)
4. Dai, J. -d., Mizoguchi, A., Satake, S. and Gilbert, L. I.: Developmental changes in the prothoracicotropic hormone content of the *Bombyx mori* brain-retrocerebral complex and hemolymph: analysis by immunogold electron microscopy-quantitative image analysis and time-resolved fluoroimmunoassay. (submitted)

名古屋大学図書	
和B	86211

## 口頭発表

1. 溝口明：Immunochemical studies of PTTH and bombyxin. Fourth MAFF Homeostasis Workshop, "Hormonal action and gene expression in insects", 1992年8月, 筑波
2. 三枝弘尚, 溝口明, 鈴木昭憲, 石崎宏矩：カイコの蛹-成虫発生に伴う抗ボンビキシンII 抗体反応性物質の血中濃度の変動. 日本動物学会第63回大会. 1992年10月, 仙台
3. 八木克将, 溝口明, 小嶋邦昭, 永田宏次, 鈴木昭憲, 石崎宏矩：エリサンボンビキシン様ペプチド産生細胞の免疫組織化学による同定. 同上
4. 溝口明, L. I. Gilbert：タバコスズメガの small PTTH はボンビキシン様ペプチドではない. 同上
5. 溝口明：Distribution and function of bombyxin. XII International Congress of Comparative Endocrinology, 1993年5月, トロント (カナダ)
6. 佐竹伸一郎, 溝口明, 永田宏次, 鈴木昭憲, 石崎宏矩：ボンビキシンの機能-カイコ *Bombyx mori* の糖代謝系への関与. 日本動物学会第64回大会, 1993年11月, 那覇
7. 八木克将, 溝口明, 小嶋邦昭, 永田宏次, 鈴木昭憲, 石崎宏矩：エリサンのボンビキシン様ペプチドおよびカイコPTTH様ペプチドの局在について. 同上
8. 溝口明, 岡忠則, 大橋康隆, 石崎宏矩, 小嶋邦昭, 鈴木昭憲：時間分解蛍光免疫アッセイによるカイコPTTHの測定. 同上
9. 溝口明, 大橋康隆, 佐竹伸一郎, 石橋純, 片岡宏誌, 鈴木昭憲：カイコ前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の血中濃度の変動. 日本動物学会第65回大会, 1994年10月, 名古屋
10. 佐竹伸一郎, 溝口明, 永田宏次, 片岡宏矩, 鈴木昭憲：ボンビキシンは脂肪体のグリコーゲン量の低下を引き起こす. 同上

## 出版物

1. 溝口明 (分担)：Distribution and function of bombyxin. In: (eds. Davey, K. G., Peter, R. E. and Tobe, S. S.) Perspectives in Comparative Endocrinology. pp. 215-219, National Research Council of Canada, Ottawa.
2. 溝口明・石崎宏矩 (分担)：カイコ脳ペプチドホルモンの生産・分泌・作用. In: (大西英爾・高橋進・園部治之 編) 昆虫の生化学・分子生物学, 名古屋大学出版会 (印刷中)

## 研究成果

### 1. はじめに

ボンビキシンは、カイコ蛾頭部から精製されたペプチドで、別種の蛾であるエリサンの前胸腺に働いて、脱皮ホルモン（エクジソン）の合成・分泌を促進する作用を持つ<sup>1)</sup>。カイコ前胸腺刺激ホルモン（PTTH）精製の副産物として単離されたこのペプチドは、1984年にその部分アミノ酸配列が決定された<sup>2)</sup>。その結果、ボンビキシンはインスリンと高い相同性をもつことが明らかとなり、昆虫ホルモン研究者のみならず、インスリンの研究者の注目を集めることとなった。ボンビキシンには、アミノ酸配列が少しずつ異なる多数の分子種がある。これまでに5種類が単離され、全アミノ酸配列（ボンビキシン-II、-IV）<sup>3) 4)</sup>、又は部分配列（ボンビキシン-I、-III、-V）<sup>2) 5)</sup>が明らかにされている。ボンビキシン分子は、インスリン同様に、A、B両鎖からなるヘテロ二量体で、サブユニット内及びサブユニット間にジスルフィド結合を持ち、分子量は約5000である。既にジスルフィド結合の架橋様式も明らかにされ、化学合成も成功している<sup>6) 7)</sup>。化学合成ボンビキシン-IIは天然のボンビキシンと同程度の生物活性（エリサン前胸腺刺激活性）をもつ<sup>7)</sup>。

一方、ボンビキシン遺伝子の構造解析も急速に進み、カイコゲノム中には少なくとも30種以上のボンビキシン遺伝子が存在することが明かにされた。ボンビキシン遺伝子はその塩基配列の類似性に基づいて4つのファミリーに分類されており、それらの染色体上での配列の様式も解析されている<sup>8)</sup>。

こうしたボンビキシンの化学・分子生物学的研究と並行して、ボンビキシンの生理機能に関する研究が始まった。ボンビキシンはインスリン類似のペプチドであり、インスリンが哺乳類の重要な代謝調節ホルモンであることを考えれば、ボンビキシンもまた、昆虫の重要なホルモンとして働いていることが期待される。しかし、ボンビキシンはカイコ前胸腺に対しては刺激活性をもたず、ボンビキシンの生理機能の研究は全く白紙の状態から出発することとなった。ボンビキシンがホルモンとして機能しているとすれば、血中に放出されている

はずである。これを確かめるためには、ボンビキシンの局在と分泌動態を調べなければならない。そこでまず、部分合成ボンビキシンを免疫原としてモノクローナル抗体が作製され、免疫組織化学により、ボンビキシンの局在が明らかにされた<sup>9)</sup>。ボンビキシンは、脳中央部の4対の神経分泌細胞とそこから伸びる軸索に局在しており、軸索はアラタ体の周縁部で分枝し終末を形成していた。また、in situ ハイブリダイゼーションにより、ボンビキシン mRNA は脳中央部の同じ神経分泌細胞に発現していることが示され<sup>8)</sup>、これらの結果から、ボンビキシンは脳中央部で生産された後、軸索を通してアラタ体に達し、血中に分泌されると結論された。次いで、新たなモノクローナル抗体を利用したボンビキシンのラジオイムノアッセイ (RIA) が開発され、カイコの発生に伴う血中ボンビキシン濃度の変動が調べられた<sup>10)</sup>。その結果、血中ボンビキシン濃度は幼虫期では低く、蛹期の前・中期に非常に高くなること、その後低下するが、羽化後に再び上昇することが判明した。また蛹期においては、メスではオスよりも2～3倍高いという特徴が見られた。

以上のように、ボンビキシンは血中に放出され、血中量は発生に伴って大きく変動することから、カイコの発育制御においてホルモンとして重要な機能を担っていることが強く示唆された。こうした背景のもとに、本研究では、ボンビキシンの生理機能と分泌制御機構の解明を目指した。また、ボンビキシンの分泌と機能の研究を進めるに当たっては、簡便なボンビキシンの超微量測定が必要であるため、RIAに代わる新たな超微量測定法を開発した。

## 2. ボンビキシンに対するマウスモノクローナル抗体の作製

ボンビキシンの微量測定法としては既にRIAを開発し、測定に成功しているが、RIAの利用に当たってはホルモンの放射標識をしばしば行なわなければならない。放射性廃棄物の管理も必要であることから、安全性や利便性に問題があった。また、測定感度も十分とはいえず、測定すべき血液サンプルは複数の個体から得る必要があった。そこで、より高感度でかつ安全で簡便な測定法の開発が強く望まれた。

我々は、ラジオアイソトープを使用せずに超高感度の測定が可能である時間分解蛍光免疫アッセイによるボンビキシンの測定系を開発することを目指して、まず必要となるモノクローナル抗体の作製を行なった。免疫原には化学合成ボンビキシニン-IIを使用した。ボンビキシニン-IIをカルボジイミドを使って牛血清アルブミン(BSA)と結合し、その12.5  $\mu$ g ボンビキシニン-II相当量をマウスの皮下に免疫注射した。注射は2週間毎に行ない、初回免疫には完全フロイントアジュバントを、追加免疫には不完全フロイントアジュバントを用いた。各注射の7-10日後に血液中の抗体価を調べた。抗体価の検定は、ボンビキシニン-IIを抗原としたドットELISAによった。3回の追加免疫の後、抗体価が十分に上昇したため、腹腔内に最終免疫を行ない、3日後に脾臓を摘出した。調整した脾細胞をNS-1ミエローマ細胞と混合し、ポリエチレングリコール4000下で細胞融合させた。細胞培養は37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下でHAT培地を用いて行なった。この培地は培養開始2週間後にHT培地に、さらに2週間後にはNS-1培地に変えた。抗体の一次スクリーニングはドットELISAによった。陽性の抗体は更に免疫組織化学法による二次スクリーニングにかけ、カイコ脳のボンビキシニン産生細胞を特異的に免疫染色する抗体を選択した。抗体産生ハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングした。細胞融合は2度行ない、その結果、合計11の抗ボンビキシニン-II抗体産生ハイブリドーマクローンが得られた。産生される抗体のクラスはすべてIgGであった。それぞれのクローンを大量培養し、回収した培地を限外濾過により濃縮し、さらにプロテインA結合カラムを用いてIgGをアフィニティー精製した。精製した抗体の特異性を更に調べるため、得られた抗体を用いてカイコ脳抽出物の免疫ブロッティングを行なったところ、いずれの抗体もボンビキシニンとプロボンビキシニンに相当する2本のバンドを染色した。一部のハイブリドーマについては、増殖させた後にマウス腹腔内に注射し、2-4週間後に腹水を得た。腹水から硫酸沈澱法により粗精製した抗体はプロテインAカラムを用いてアフィニティー精製した。

### 3. 時間分解蛍光免疫アッセイ (TR-FIA) の開発

### 3. 1. 最適な抗体の選択

TR-FIAには大きく分けて二つの方式があり、ひとつは競合法であり、今ひとつはサンドイッチ法である。我々は、より高感度の測定が可能であるサンドイッチ法に基づく測定系の開発をめざし、まず、得られた11種類のモノクローナル抗体の中から抗原抗体サンドイッチを形成しうる最適な2種類の抗体、すなわち、ボンビキシン分子上の十分に離れた相異なるエピトープを認識する2種の抗体を選択した。選択の方法は以下の通りである。まず、得られた11種類の抗体のそれぞれの一部をビオチン化キット（アマシヤム）を使ってビオチン化（ビオチン標識）しておく。20 mM 燐酸バッファー（pH 7.4）で $10^{-7}$ Mになるように希釈した非ビオチン化抗体を96穴EIAプレート（コスター 3590）の各ウエルに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置して吸着により固相化する。各ウエルを洗浄し、3%スキムミルクを含むTTBS（0.05% Tween-20, 0.9% NaCl を含む50mM トリス-塩酸バッファー, pH 7.4）によりブロッキングした後、希釈バッファー（2% BSAを含むTTBS）で段階希釈したボンビキシン-II（0～10 ng/ウエル）を入れ、 $4^{\circ}\text{C}$ で24時間インキュベートする。ウエルの洗浄後、希釈バッファーで希釈した50 ngのビオチン化抗体を入れ、 $4^{\circ}\text{C}$ で24時間インキュベートする。洗浄後、アッセイバッファー（ファルマシア）で希釈したユーロピウム（Eu）標識ストレプトアビジン（ファルマシア）を加え、室温で1時間インキュベートする。ストレプトアビジンはビオチンとの高い親和性をもつ。Euはランタノイドの一種でその特殊なキレートは長寿命の強い蛍光を発する。再度洗浄の後、Euのキレート剤を含む増強試薬（ファルマシア）を加え、Euキレートが発する蛍光を時間分解蛍光光度計により測定する。時間分解蛍光測定というのは、高周波（例えば1000 サイクル/秒）で励起光を照射し、各サイクル毎に非特異蛍光が消失した後に長寿命の特異蛍光を測定しこれを積算するという、低バックグラウンドの蛍光測定法であり、高い感度を得ることができる。この実験において、用いた2種の抗体がボンビキシン-IIとサンドイッチを形成すれば、固相化抗体-ボンビキシン-ビオチン化抗体-Eu標識ストレプトアビジン複合体が形成さ

れるため、蛍光が発生し、しかも蛍光の強さは加えたボンビキシン量に依存することが期待される。この検定を、様々な抗体の組合せについて行なった結果の一例を図1に示す。すべての組合せの中で、測定の感度が高く、バックグラウンドが低い抗体の組合せは、3 A 1 1と5 C 8，7 B 1 1と3 A 1，7 B 1 1と3 A 1 1であった。

### 3. 2. 測定系の最適化

固相化抗体には3 A 1抗体を、液相のビオチン化抗体には7 B 1 1抗体を使用することとし、T R - F I Aによるボンビキシン測定の最適条件を決定するために以下の点について検討した。

- 1) 使用する96穴プレートの種類（メーカー，タイプ）。
- 2) 抗体を固相化する時の抗体濃度と緩衝液。
- 3) その時のインキュベーション時間と温度。
- 4) ボンビキシンとビオチン化抗体の添加は1段階（同時添加）か2段階か。
- 5) ビオチン化抗体の濃度と希釈バッファの組成。
- 6) ボンビキシン及びビオチン化抗体とのインキュベーション時間・温度。
- 7) インキュベーション時における振とうの必要性と振とう法。
- 8) E u 標識ストレプトアビジンの濃度。
- 9) 各ステップ間での洗浄の条件。

その結果、表1に示した条件が最適であると結論した。また、測定の原理を図2に模式的に示した。図3にはボンビキシン測定の標準曲線を示す。確立したボンビキシンのT R - F I Aの測定限界は1～3ピコグラムである。この方法では、ボンビキシンの定量に必要な血液量が50～250 u lであり、個体毎の血中ボンビキシンの測定が可能となった。また蛍光測定に要する時間はプレート当たり僅か3分である。この測定法は、R I Aに比べ、感度・安全性・簡便性で勝るばかりでなく、アッセイに要する時間が半日～1.5日であり、時間短縮の利点も持つ。

### 3. 3. 血液の前処理

カイコ血液中にはTR-FIA測定系に干渉する成分が存在するため、無処理の血液を使って、血中ボンビキシン量を測定することはできない。そこで、血中の干渉物質を除去する目的で、逆相ミニカラムカートリッジ(Amprep C2 カラム, アマシヤム)を用いてボンビキシンの粗精製を行なった。精製の条件を検討した結果、以下の方法が最適であると結論した。すなわち、カイコ血液(標準 250  $\mu$ l)に3倍量の0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を加え、少量の2N塩酸でpHをおよそ3に合わせる。これをAmprep C2 カラムに通してボンビキシンを吸着させ、カラムを0.1% TFAを含む20%アセトニトリルで洗浄した後、0.1% TFAを含む60%アセトニトリルで溶出する。溶出液を凍結乾燥した後、希釈バッファーに溶解してTR-FIAで測定すると干渉作用はほぼ消失する。この時、血液からのボンビキシンの回収率は約50%であった。

## 4. 血中ボンビキシン濃度及び脳内ボンビキシン量の測定

### 4. 1. カイコの飼育および血液の採取

カイコの実用品種間雑種である錦秋x鐘和(カネボウシルクエレガンス)を恒温(25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)、明12時間:暗12時間の光周期の下で、人工飼料(シルクメイト, 日本農産工業)を与えて飼育した。以後の実験で使用したカイコもすべて同じ条件で飼育したものである。血液サンプルの採取は5令初期から羽化までの毎日、明期開始より約6時間後に行なった。幼虫の血液は腹脚に針で穴を空けて、蛹の血液は背脈管に傷をつけて採取し、直ちに氷冷した。この時、タンパク質分解酵素阻害剤であるp-アミジノフェニルメタンシルホニルフルオリド塩酸塩とフェノールオキシダーゼ阻害剤であるジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムをそれぞれ最終濃度がおよそ20  $\mu$ Mと10 mMになるように加えて、よく混和した。これを8000 xgで10分間遠心し、血球及び組織片を除去した。得られた上清の一定量を血液サンプルとし、測定に供するまで-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

#### 4. 2. 血中ボンビキシン濃度の発育に伴う変動

解凍した血液サンプルを上記の方法で前処理した後、TR-FIAにより血中ボンビキシン濃度を測定した。血中ボンビキシン濃度は幼虫期に低く、蛹期の前期から中期に上昇し、その後低下した。また、オスでは羽化後再び上昇した(図4)。カイコの発育に伴う血中ボンビキシンのこのような変動は、基本的にはRIAにより明かにされたものと同じであった。しかし、相違点も指摘できる。RIAの結果では、蛹期のメスの血中ボンビキシン濃度はオスに比べ2倍以上であったが、TR-FIAの結果ではむしろオスで高かった。この違いは何を意味するのか。一つの可能性は、メス蛹血液中には抗原抗体反応を阻害する物質が存在することである。競合法に基づくRIAでは、抗原抗体反応の阻害は間違った大きな測定値を与え、一方、サンドイッチ法に基づくTR-FIAでは間違った低い値を与えるからである。しかし、この可能性は低いと思われる。なぜならば、RIAと並行して行った生物検定において、メス蛹にはオスよりも遥かに高いボンビキシン活性(エリサンに対するPTTH様活性)があるとの結果を得ているからである。それでは、RIAで検出される、メスに多く存在する免疫反応物質は何か。それは、メス特異的に発現・機能するボンビキシンであるかもしれない。前記のように、ボンビキシンは単一分子種ではなく、多分子種から成るファミリーペプチドである。個々の分子種に機能分化があり、その一部はメス特異的に発現しているのかもしれない。RIAに用いた抗体とTR-FIAに用いた抗体は異なる。いずれもボンビキシン-IIを抗原として作製したモノクローナル抗体であるが、認識するエピトープの違いから、他のボンビキシン種との交差反応性は互いに異なるはずである。RIAで用いた抗体はメス特異的に発現するボンビキシンと交差反応するのかもしれない。ボンビキシンにはなぜ多数の分子種が存在するのかは不明であるが、もし分子種間に機能分化があるとすれば非常に興味深い。RIAで検出されたメス特異的な免疫反応性物質の正体の解明を急がねばならない。

さて、TR-FIAの結果によれば、性特異的なボンビキシン分泌が最も顕著に認められるのは羽化後においてである。オスでは羽化前日の血中ボンビキシン濃度は0.1 ng/mlであるのに対し、羽化数時間後には2 ng/mlに達する。

この間に血液量は数分の1に減少する（蛾尿として排出される）が、オスにおける血中ボンビキシン濃度の上昇が濃縮に起因する見かけ上の現象でないことは、メスとの比較において明らかである。メスにおいても水分の排出は同様に起こるにもかかわらず、その血中ボンビキシンは僅かしか増加しないからである。羽化後のオスはメスが放出するフェロモンを感知すると激しく翅をふるわせ、近くにメスがいれば直ちに交尾行動に移る。この時期にオス特異的に分泌されるボンビキシンの機能はオスの繁殖行動と関係がありそうである。

## 5. 脳内ボンビキシン量の変動

ボンビキシンの血中濃度が大きく変動することを示したが、脳内のボンビキシン量との関係はどうなっているのか。これを明らかにするため、ボンビキシンの血中量の測定と並行して脳内含量の測定を行なった。摘出した脳を2%食塩水中でホモジナイズし、2度凍結・融解した後遠心して上清を得た。これを沸騰水中で2分間加熱し、急冷後再び遠心して得た上清を凍結乾燥し、これを脳抽出物とした。脳抽出物中のボンビキシン量はTR-FIAにより定量した。その結果を図5に示す。ボンビキシンの脳内含量もまた、カイコの発育に応じて大きく変動した。5令脱皮直後に約1.5 ng/脳あったボンビキシンは翌日には急減し、摂食期を通じて低い値（約0.5 ng/脳）を保った。その後は、ワンダリングの開始後にやや上昇するが、蛹化時に低下し、以後、徐々に上昇した。蛹期後期には急上昇がみられ、最高値は3 ng/脳以上に達した。羽化後は、オスでのみ急減した。脳内ボンビキシン量を雌雄間で比較すると、ワンダリングの開始以後において常にメスの方が高い値を示した。

以上に示した脳内ボンビキシン量の変化を血中ボンビキシン量の変化と比較してみると次の点が指摘できる。1) 5令脱皮直後に脳内ボンビキシンは減少し、血中ボンビキシン値は増加する。2) 摂食期には、脳内・血中共にボンビキシン値は低い。3) ワンダリング後、血中ボンビキシンはやや減少し、この時、脳内ボンビキシンは逆にやや増加する。4) 蛹化後は、血中ボンビキシン、脳内ボンビキシン共に徐々に増加する。5) 蛹期後期において、血中ボンビキ

シンは減少し、一方、脳内ボンビキシンは急増する。6) オスの血中ボンビキシンは羽化後に急増し、この時、脳内ボンビキシンは急減する。7) 血中ボンビキシン値はオスで高く、脳内ボンビキシン値はメスで高い。

以上の結果より、脳のボンビキシンの合成・分泌活性の変動について次のように推定することができる。5令脱皮した幼虫は、脳内に蓄積していたボンビキシンを摂食開始とともに急速に分泌する。以後、ボンビキシンの合成と分泌の活性は5令幼虫期を通して共に比較的低いのが、蛹化後、共に高くなる。しかし、蛹期後期においは、分泌活性が低下するのに対し合成活性はしばらく維持され、その結果、脳内に大量のボンビキシンが蓄積する。ボンビキシン合成活性は以後低下して羽化を迎える。羽化直後にはオス特異的にボンビキシンの大量分泌が起こる。

このように、ボンビキシンの合成と分泌は、カイコの変態過程で大きく変動する。しかし、両者は必ずしも同調しているわけではない。ボンビキシンの血中への分泌量は、分泌と合成の2段階において調節を受けているようである。ノーザンブロット解析の結果によれば、ボンビキシンmRNAの発現量は5令脱皮後蛹化までほとんど変動がない<sup>11)</sup>。ボンビキシンの合成量の調節は、転写段階ではなく、翻訳又はそれ以後の段階でなされていると考えられる。

## 6. 幼虫期におけるボンビキシンの生理機能

### 6. 1. グルコースによるボンビキシンの分泌調節

ボンビキシンがカイコの前胸腺に対してPTTH様の活性をもたないことは既に述べた。少なくとも除脳蛹アッセイやin vitro前胸腺アッセイで調べる限りでは前胸腺に対する作用は認められない<sup>12)</sup>。それではボンビキシンの機能は何か。ボンビキシンのインスリンとの構造的類似性は機能面での類似性を期待させる。まして、昆虫のインスリン様ペプチドには血糖低下作用・脂質低下作用があるとの報告は多い<sup>13)</sup>。

そこでまず、ボンビキシンがインスリン同様に血糖による分泌調節を受けるかどうかを調べた。カイコ5令1日目の幼虫を餌から離して絶食させ、血中ボ

ンビキシン濃度の変化を調べ、継続して摂食した対照区と比較した。また、再摂食の効果も調べた。同時に、脳内のボンビキシン値の絶食・再摂食に伴う変動も調べた。ボンビキシンの定量はRIAによった。図6に示すように、絶食に伴って血中ボンビキシンは減少し、一方、脳内ボンビキシンは増加した。また、絶食させた幼虫を摂食させると、血中のボンビキシンは増加し、脳内ボンビキシンは減少した。この結果は、絶食によりボンビキシン分泌が抑制され、摂食により促進されることを示している。この時、同じ条件下で、絶食と再摂食に伴う血糖値の変化を調べると、グルコース値に大きな変動が見られ、血中ボンビキシン量の変化とよく対応する関係が認められた(図7)。すなわち、血中グルコース量は絶食により低下し、再摂食により急速に回復した。そこで、絶食中の幼虫にグルコースを注射し、ボンビキシン分泌に対する効果をみた。グルコース注射は、5令1日目の幼虫を6時間絶食させた後に氷水麻酔して行なった。図8に示すように、グルコース注射により脳内ボンビキシンは減少し、反応は濃度依存的であった。つまり、グルコースはボンビキシン分泌を誘導した。このように、ボンビキシンの分泌は脊椎動物におけるインスリン同様に、栄養情報による調節を受けることが判明した。いずれの場合にもグルコースが情報分子として使われている点は興味深い。インスリンとグルコースの結び付きの起源が非常に古いことを示すものである。

## 6. 2. ボンビキシンの血糖低下作用

ボンビキシンがインスリン同様に血糖による分泌調節を受けることは、ボンビキシンの機能が、インスリン同様に、糖代謝に関連する可能性を示唆する。そこで、ボンビキシンの糖代謝調節への関与を次に調べた。まず5令3日目の幼虫を頭胸間で結さつし、脳-側心体-アラタ体系から分泌されるホルモンの影響を排除しておく。そして、3時間後に、この幼虫腹部にボンビキシン-IIを注射して、その後の血中トレハロース濃度の経時的変化を調べた。トレハロースの定量は、トレハロースをトレハララーゼによりグルコースに分解し、生じたグルコースをヘキソキナーゼ法により測定し決定した。対照区にはボンビキシンの希釈に用いた0.5%BSAを注射した。結果を図9に示す。カイコの主

要血糖であるトレハロースは結さつ後徐々に減少したが、ボンビキシンを注射すると、この減少率が大きくなった。10 ng と 100 ng のボンビキシンを注射した3時間後における血中ボンビキシンの減少量は、それぞれ対照区の1.4倍と2.3倍であった。また、図10はボンビキシンの効果が用量依存的であることを示す。これらの結果より、ボンビキシンには血糖低下作用があるといえる。血中には少量のグルコースも存在するが、グルコースに対するボンビキシン注射の効果は認められなかった(図11)。上記実験において、血中トレハロースを有意に減少させるのに必要なボンビキシンの量は比較的大量であった。そこで、血中におけるボンビキシンの分解速度を知るために、既知量のボンビキシン-IIをカイコ幼虫に注射し、その後の血中ボンビキシン濃度の変化を経時的に調べた。その結果、ボンビキシンの半減期は1~2時間であり、注射されたボンビキシンは急速に分解(または除去)されることがわかった(図12)。ボンビキシンがこのように短時間で分解されることを考慮すれば、ボンビキシン注射により血糖低下を引き起こすために生理的濃度の数倍から数十倍のボンビキシンが必要であることは不思議ではないと考えられる。

### 6. 3. ボンビキシンのトレハラーゼ活性化作用

ボンビキシンには血糖低下作用があることが明かとなったが、それではボンビキシンはどのようなしくみで血中トレハロースを減少させるのであろうか。トレハロースの代謝はよく調べられている。二糖類であるトレハロースの合成の場は脂肪体であり、トレハロースシンターゼの働きにより、UDPグルコースとD-グルコース-6-りん酸から合成される。一方、トレハロースは各組織に存在するトレハラーゼにより2分子のD-グルコースに分解される。血中のトレハロース量は基本的にはこの二つの酵素の活性により決定されると考えられる。

そこでまず、トレハラーゼに注目し、トレハラーゼ活性に対するボンビキシンの効果を中腸について調べた。中腸はトレハラーゼ活性が高いとされている組織である。図13に示すように、頭胸間で結さつした幼虫へのボンビキシン注射は、トレハラーゼ活性を約40%上昇させた。その他の組織についても調べた結果、表2に示すように、筋肉を含む外皮の酵素活性もボンビキシン注射

により有意に上昇することが明らかになった。脂肪体その他の組織においては酵素活性の上昇は認められなかった。これらの結果から、ポンピキシン作用の標的のひとつはトレハラーゼであり、その作用発現は組織特異的であると考えられる。

#### 6. 4. ポンピキシンのトレハロースシンターゼ活性に対する効果

さて、ポンピキシンはトレハロースの合成を阻害することによっても血中トレハロースを減少させる可能性がある。これを確かめるため、脂肪体におけるトレハラーゼシンターゼ活性に対するポンピキシンの作用を調べた。酵素活性の測定法は Yamashita ら<sup>15)</sup>の方法によった。その結果を図14に示すが、ポンピキシンのこの酵素に対する効果は認められなかった。

#### 6. 5. グリコーゲン蓄積に対するポンピキシンの効果

ポンピキシン注射はトレハラーゼ活性を上昇させ組織でのグルコースの生成を促進すると思われるが、生成したグルコースはどのように利用されるのであろうか。哺乳類では、インスリンはグルコースのグリコーゲンへの同化を促進ことが知られている。ポンピキシンによるグリコーゲン合成促進効果の有無を調べるため、頭胸間を結さつした幼虫にポンピキシンを注射し、組織内に蓄積するグリコーゲンの量を経時的に調べた。グリコーゲンの定量は Siegert<sup>16)</sup>の方法によった。図15aに示すように、中腸のグリコーゲン量はポンピキシン注射の影響を受けなかった。よって、中腸組織内に取り込まれたグルコースはグリコーゲンに同化されるとは考えにくい。エネルギー源として消費される可能性、表皮にあってはクチクラ形成に使われる可能性が考えられるが、今のところ不明である。

一方、脂肪体中のグリコーゲン蓄積に対するポンピキシン注射の効果を調べた結果が図15bである。結さつした幼虫の脂肪体のグリコーゲン量は対照区においても徐々に減少するが、ポンピキシン注射は明らかに減少量の増加を引き起こし、その効果は用量依存的であった。このように、ポンピキシンは、脂肪体においてはむしろグリコーゲンを減少させる効果を示し、インスリンの作

用とは際立った対比を見せる。ボンビキシンによるこの作用がグリコーゲンの合成阻害によるものか、逆に分解促進によるものかは今のところ不明であるが、ボンビキシンの作用が、同化促進ではない点は注目に値する。

以上のように、ボンビキシンは血中トレハロースや脂肪体中のグリコーゲンを減少させる。カイコ幼虫の血中トレハロースは $2 \sim 4 \text{ mg/ml}$ と高濃度に存在し、炭水化物の貯蔵の役を担っていると考えられている。脂肪体のグリコーゲンも又、貯蔵糖である。よって、カイコ幼虫におけるボンビキシンの機能は、貯蔵糖の利用促進にあると考えられる。このことは、インスリンが糖の同化促進機能を持つことと対照的であり、興味深い。ボンビキシンとインスリンは、共に糖代謝の調節作用を持ちながら、それぞれの機能は正反対のようにみえる。この違いは、餌が利用できる限られた期間にひたすら食べて成長し、短い一生を終えるカイコと、栄養の摂取・貯蔵・消費を繰返しつつ成長する哺乳類の、生活様式の違いの反映であろうか。

インスリンは糖代謝ばかりでなく脂質代謝・タンパク質代謝の調節にも深く関わっており、成長因子的側面も持っている。ボンビキシンがカイコにおいて同様な多面的機能を果たしているかどうかは不明であるが、グルコースにより分泌が刺激されること、糖代謝調節に関与することを考え合わせると、ボンビキシンが昆虫の重要な代謝調節ホルモンであることは疑いないところであろう。

## 7. 蛹期におけるボンビキシンの機能

### 7. 1. カイコ成虫化とボンビキシンの機能（仮説）

カイコ血中の糖・脂質・タンパク質の濃度は変態に伴って大きく変化する。このことは、発生の進行が代謝系の全身的な大きな変化に支えられていることを示唆する。ボンビキシンを代謝ホルモンと考えた場合、カイコの発生調節においてそれはどのような役割を担い得るであろうか。血中ボンビキシン量の変動に基づいて仮説を述べてみたい。血中ボンビキシン値は蛹期前・中期に高い。

この時期は、蛹という静的な外見とは裏腹に、内部においては成虫化に向けて劇的な組織の再構築が進行する時期である。幼虫に特異的な組織は破壊され、成虫原基が成長して成虫に特異的な組織・器官が作り上げられる。また生殖腺が発達し神経系も大きく変容する。当然タンパク質合成が盛んになり、大量のエネルギーが要求される。こうした時期に大量のボンビキシンが血中に現れることは、成虫化に必要なタンパク質代謝・エネルギー代謝とこのホルモンの関連を強く示唆する。成虫発生プログラムの進行はこの時期に大量に分泌されるエクジステロイドの支配下にあるとされるが、その進行を支える代謝的変化の調節機構についてはほとんど研究がなされていない。ボンビキシンの関与の可能性を追究する必要がある。

この時期の血中エクジステロイド<sup>16)</sup>とボンビキシンの量的変化パターンがよく似ていることも興味深い。前胸腺における大量のエクジソン合成には当然大量のエネルギーを必要とする。ボンビキシンがエリサンの前胸腺を刺激する事実は示唆的である。カイコの前胸腺の活性化にはP T T Hによる刺激が必要であるが、ボンビキシンは前胸腺の代謝レベル上げることにより大量かつ持続的なエクジソン合成に寄与しているのかもしれない。

## 7. 2. 変態期のボンビキシン分泌と血糖値の関連

ボンビキシンの血中濃度は蛹期の前・中期に上昇するが、この上昇は蛹期での糖代謝の変化と関係があるであろうか。図16は5令脱皮から蛹初期までの期間の血中トレハロース濃度の変化を調べた結果である。血中トレハロース値は摂食期の幼虫で高いが、摂食停止後急速に低下し、以後徐々に上昇する。この変化をボンビキシン血中濃度の変化と比較すると、際立った相関は認められない。幼虫の摂食停止以後、急激に血糖低下が起こる時にボンビキシンの分泌の増加はなく、この時の血糖低下は、ボンビキシンの血糖低下作用によるのではなく、摂食停止に伴う炭水化物供給の途絶によるものと考えられる。オスではワンダリング開始後血糖値が下がり続けるが、メスでは一旦上昇した後、下降するようである。この点については、メスの血中ボンビキシン値が、ワンダリング後、一時的に低下することと関連づけることができるかも知れない。関

連があるとすれば、ボンビキシンには血糖低下作用があると解釈できるが、これは実験による証明が必要である。蛹化直前から血中トレハロース値は増加に転じ、同時期に血中ボンビキシン値も上昇することから、この時期にはボンビキシンに血糖上昇作用があるようにもみえる。しかし、これも実験による証明はない。このように、この時期におけるボンビキシンの糖代謝調節機能については研究が進んでいない。

血糖値の増減とボンビキシンの血中濃度との関連を述べたが、そうした関連づけは無意味であるかも知れない。なぜならば、血糖値は血中への糖の供給と消費のバランスにより決定するものであり、糖を構成要素とするクチクラを含めた各組織の破壊・吸収・再構築が劇的に進行するこの時期においては、糖の血中への出入りは変態の進行に支配され、ボンビキシン作用の指標にはなりえない可能性があるからである。ボンビキシンの作用については、個々の組織、個々の酵素について、実験的に調べる必要があると考えられる。

## 8. 成虫におけるボンビキシンの生理機能

図4において、ボンビキシンはオスの成虫で大量に放出されることを見た。このボンビキシン分泌のタイミングを詳細に調べた結果が図17である。図に示されるように、羽化直後に低レベルであった血中ボンビキシンは1時間以内に上昇し始め、数時間のうちに非常に高いレベル（約3 ng/ml）に達する。こうした血中ボンビキシン値の上昇は、メスや羽化直後に頭胸間で結さつされたオスでは見られない。

こうしたオス特異的なボンビキシン分泌がオス特異的な代謝的变化と関係している可能性を調べるため、オス、メス、および羽化直後に頭胸間結さつしたオスとメスについて、血中のトレハロース濃度および脂質濃度の時間的変化を、羽化後数時間にわたって調べた。脂質の定量はりん酸バニリン法によった。その結果、トレハロース値については実験区間でほとんど差がなかったが、脂質に関しては大きな違いが認められた。すなわち、オスでは、羽化後、脂質濃度が少なくとも6時間にわたって大きく上昇したのに対し、メスや結さつしたオ

スでは上昇は僅かであった。この結果は、ボンビキシンがオス成虫の脂質代謝に関わっていることを示唆する。今後、結さつしたオスにボンビキシンを注射し、その効果を調べる必要がある。カイコ成虫の主要なエネルギー源は脂質であり、メスの探索行動に多大なエネルギーを必要とするオスにおいてのみボンビキシン分泌があることは、ボンビキシンがエネルギー代謝を促進する機能を担っていると仮定するとよく理解されるように思われる。

羽化後のボンビキシンの上昇はメスから隔離したオスでも起こることから、ボンビキシン分泌の誘因はメスのフェロモンでもなく、フェロモンに解発される激しく翅を震わせる行動(飛翔能力を失ったカイコの飛翔行動と見做しうる)でもない。ボンビキシン分泌の刺激は羽化行動そのものと深く関わっているものと推定される。

## 9. 終わりに

以上のように、超微量測定法の開発により、ボンビキシンの分泌動態が明らかになり、一方、化学合成ボンビキシンの利用により、ボンビキシンの作用の一端が明らかになってきた。ボンビキシンの構造決定を出発点としたボンビキシンの生理学的研究は、少しずつではあるが、確実に進展しつつある。

ボンビキシンの生理機能についてはまだほとんどが仮説の段階ではある。しかし、ボンビキシンがインスリン同様に代謝調節ホルモンであり、一方、昆虫の後胚発生が代謝的变化に大きく依存することを考えるとき、ボンビキシンは昆虫の発生と生理の統御機構の根幹に位置するきわめて重要なホルモンであることが予感される。ボンビキシンの生理機能の研究が今後幅広く展開していくことが大いに期待される。

## 引用文献

- 1) Ishizaki, H. and Ichikawa, M. (1967) Purification of the brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Biol. Bull. 133, 355-368.
- 2) Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y. and Suzuki, A. (1984) Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: homology with insulin. Science, 266: 1344-1345.
- 3) Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., Suzuki, A., Takahashi, S. Y. and Ishizaki, H. (1986) Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 5840-5843.
- 4) Maruyama, K., Hietter, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A. and Ishizaki, H. (1988) Isolation and primary structure of bombyxin-IV, a novel molecular species of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem., 52, 3035-3041.
- 5) Jhoti, H., Mcleod, A. N., Blundell, T. L., Ishizaki, H., Nagasawa, H. and Suzuki, A. (1987) Prothoracicotropic hormone has an insulin-like tertiary structure. FEBS Lett., 219, 419-425.
- 6) Nagasawa, H., Maruyama, K., Sato, B., Hietter, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Ishizaki, H., Semba, Y. and Suzuki, A. (1988) Structure and synthesis of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. In: Peptide Chemistry 1987 (eds. Shiba, T. and Sakakibara, S.). Protein Res. Found., Osaka, pp.123-126.
- 7) Nagata, K., Maruyama, K., Nagasawa, H., Tanaka, M. Isogai, A., Ishizaki, H. and Suzuki, A. (1992) Synthesis of bombyxin-IV, an insulin-like heterodimeric peptide of the silkworm *Bombyx mori*, by regiospecific disulfide bond formation. In: Peptide Chemistry 1991 (ed. Suzuki, A.) . Protein Res. Found., Osaka, pp. 1-6.
- 8) 石崎宏矩, 鈴木昭憲 (1990) カイコ脳ホルモン研究の展開 2 : ボンビキシ  
ン, 細胞工学, 9, 444-452.

- 9) Mizoguchi, A., Ishizaki, H., Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Fujino, M. and Kitada, C.(1987) A monoclonal antibody against a synthetic fragment of bombyxin (4K-prothoracicotropic hormone) from the silkworm, *Bombyx mori*: characterization and immunohistochemistry. *Mol. Cell. Endocr.*, 51, 227-235.
- 10) Saegusa, H., Mizoguchi, A., Kitahora, H., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H. (1992) Changes in the titer of bombyxin-immunoreactive material in hemolymph during the postembryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. *Devel. Growth Differ.*, 34, 595-605.
- 11) Adachi, T., Takiya, S., Suzuki, Y., Iwami, M., Kawakami, A., Takahashi, S. Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H. and Suzuki, A. (1989) cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 264, 7681-7685.
- 12) Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujishita, M., Suzuki, A., Moriya, I., O'oka, H., Kataoka, H., Isogai, A., Nagasawa, H., Tamura, S. and Suzuki, A. (1983) Species specificity of the insect prothoracicotropic hormone(PTTH): the presence of *Bombyx*- and *Samia*-specific PTTHs in the brain of *Bombyx mori*. *Devel. Growth Differ.*, 25, 593-600.
- 13) Kramer, K. J. (1985) Vertebrate hormones in insects. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 7. (eds: Kerkut, G. E. and Gilbert, L. I.), pp.511-536, Pergamon, New York.
- 14) Seigert, K. J. (1987) Carbohydrate metabolism in *Manduca sexta* during late larval development. *J. Insect Physiol*, 33, 421-427.
- 15) Yamashita, O., Sumida, M. and Hasegawa, K. (1974) Developmental changes in midgut trehalase activity and localization in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*, 20, 1079-1085.
- 16) Tsuchida, K., Nagata, M. and Suzuki, A. (1987) Hormonal control of ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5, 167-177.

表1. ボンビキシンTR-FIAの標準的条件

- 
1. 固相化抗体 (3A1) は, 0.1%アジ化ナトリウムを含む 0.1 M 燐酸バッファ (pH 7.4) で  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈し, 96穴EIAプレート (コスター 3590) の各ウエルに  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注する.  $37^\circ\text{C}$  で1~2時間, または  $4^\circ\text{C}$  で一夜インキュベートして抗体を固相化する.
  2. 3%スキムミルク, 0.9%NaCl, 0.1%アジ化ナトリウムを含む, 50 mM トリス-塩酸バッファ (pH7.4) を各ウエルに  $200 \mu\text{l}$  ずつ入れ,  $37^\circ\text{C}$  で1~2時間静置してブロッキングする.
  3. 希釈バッファで希釈した標準ボンビキシン又は未知試料 ( $50 \mu\text{l}$ ) とビオチン化抗体  $50 \text{ ng}$  ( $50 \mu\text{l}$ ) を同時にウエルに入れ, ロータリーシェーカーで振とうしながら,  $22^\circ\text{C}$  で24時間 (一夜でも可) インキュベートする. 希釈バッファは 0.5% BSA, 0.05% ウシ $\gamma$ -グロブリン, 0.9% NaCl, 0.1% アジ化ナトリウムを含む 50 mM トリス-塩酸バッファ, pH 7.4.
  4. アッセイバッファ (ファルマシア) で 500 倍に希釈した ユーロピウム 標識ストレプトアビジン (ファルマシア)  $100 \mu\text{l}$  をウエルに入れ, プレートシェーカーで振とうしながら, 室温で1時間インキュベートする.
  5. 増強試薬  $100 \mu\text{l}$  を入れ, 10分後に時間分解蛍光光度計で測定する.
  6. 抗体の固相化後は, 20 mM 燐酸バッファで6回洗浄する. 2~5の各ステップ間においては, 0.05% Tween-20, 0.9% NaCl を含むトリス-塩酸バッファ (pH 7.4) による洗浄を6回行なう. 洗浄にはプレートシェーカー (Wallac) を使用する.
-

表2. 各組織のトレハラーゼ活性に対するボンビキシンの効果.

組織	トレハラーゼ活性 ( nmol/min/mg protein)		
	生理的食塩水	ボンビキシシン-II	
脂肪体	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	N.S.
外皮 (筋肉を含む)	21.3 ± 2.3	35.2 ± 5.6	P<0.05
マルピーギ管	19.4 ± 1.6	20.6 ± 1.6	N.S.
中腸	45.3 ± 2.4	54.1 ± 2.8	P<0.05
絹糸腺	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.2	N.S.

5令脱皮後3日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし, 3時間後に, 生理的食塩水または 10 ngのボンビキシシン-IIを注射した. 表中の数値は, 注射後3時間における各組織のトレハラーゼ活性を標準誤差とともに示す.

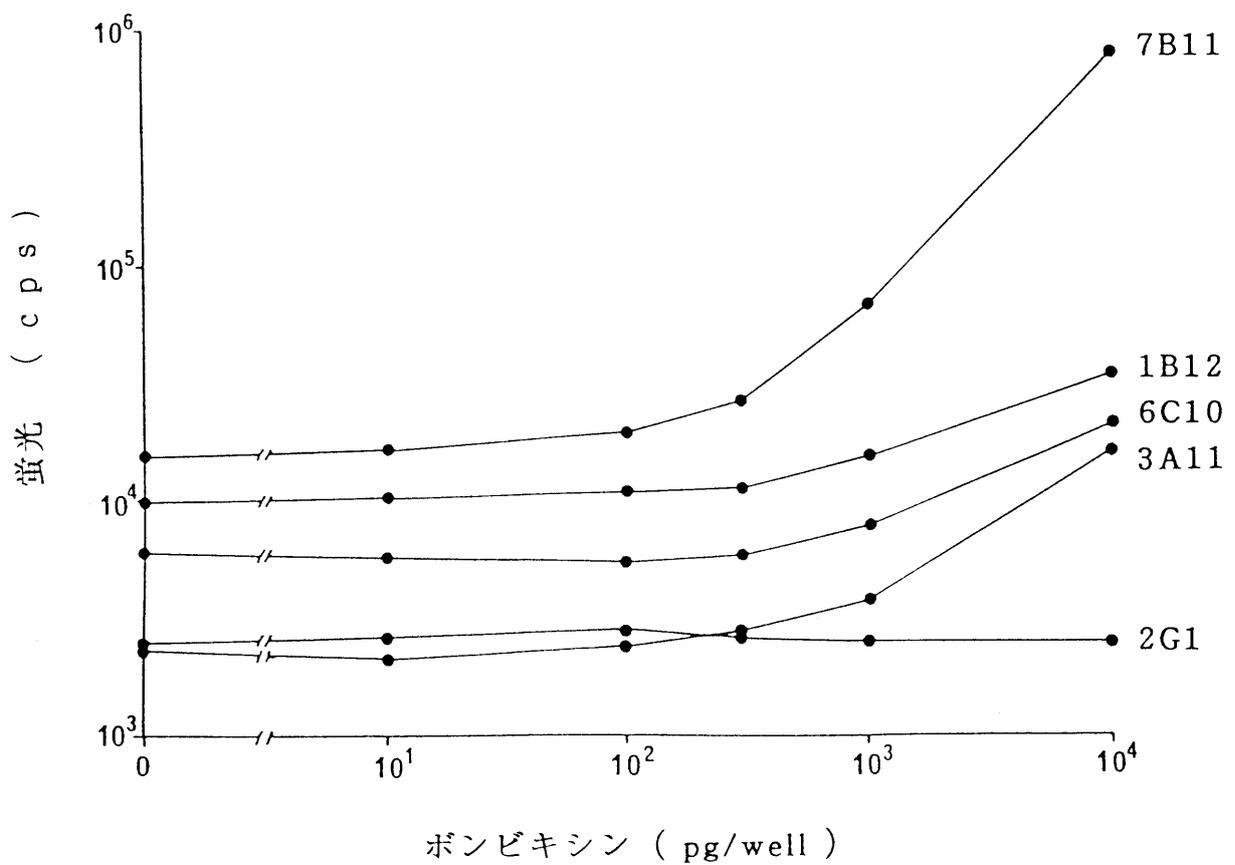
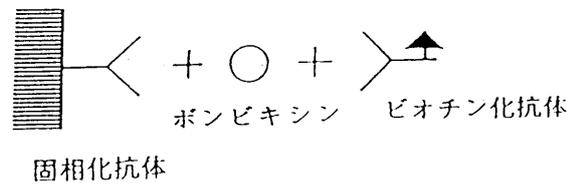


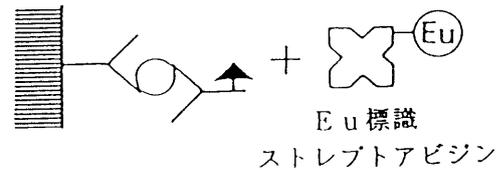
図1. 抗原抗体サンドイッチ形成能の検討.

ボンビキシンの時間分解蛍光イムノアッセイに必要な2種の抗体を選ぶため、様々な抗体を組合わせてアッセイを行なった。詳細は本文を参照。ビオチン化抗体として3A1抗体を用い、固相化抗体を様々に変えた時の結果を示す。固相化抗体の種類を図の右に示した。

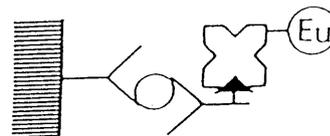
1. 第一抗体を固相化し、ボンビキシシ  
とビオチン化第二抗体を加えてイン  
キュベートする。



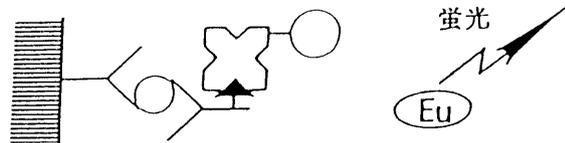
2. ボンビキシシと抗体がサンドイッチ  
を形成する。Eu 標識ストレプトア  
ビジンを加えてインキュベートする。



3. ストレプトアビジンはビオチンと結  
合し、その結果Euが固相に繋がれ  
る。



4. 増強試薬を加えるとEuが遊離し蛍  
光性のキレートを形成する。



5. 時間分解蛍光光度計により、蛍光を  
測定する。

図 2. 時間分解蛍光免疫アッセイによるボンビキシシ測定の実理。

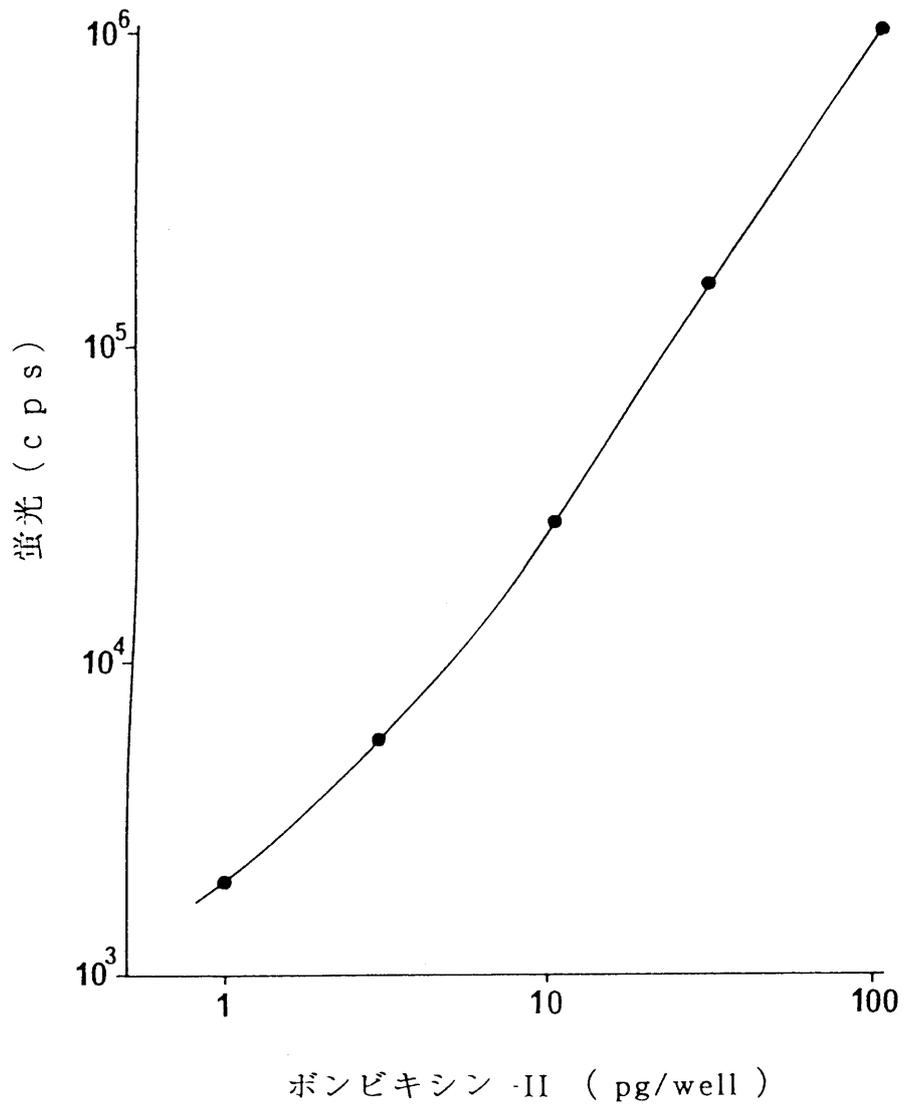


図3. ボンビキシンの時間分解蛍光イムノアッセイの標準曲線.

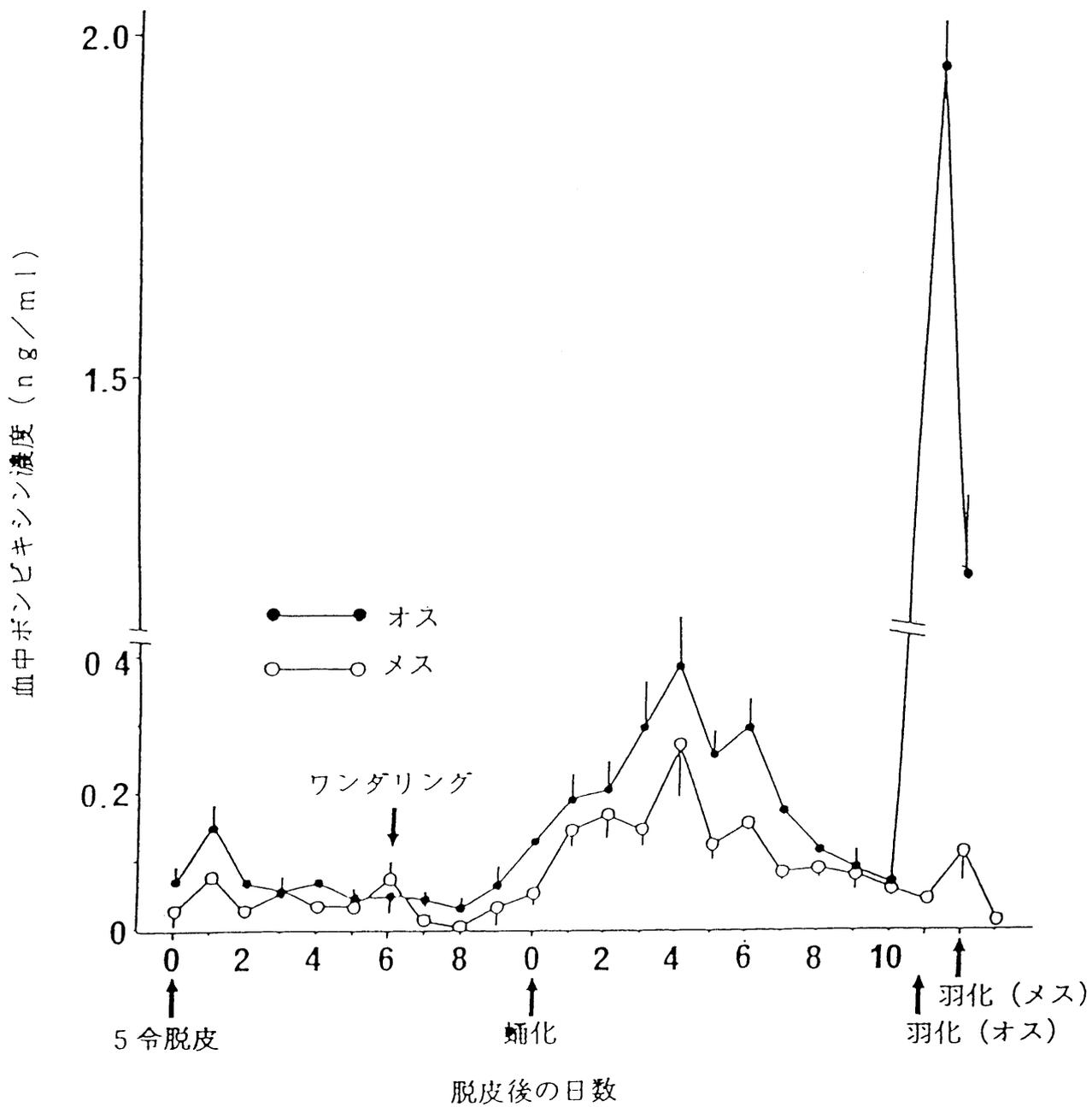


図4. ボンビキシンの血中濃度の変動。  
 ボンビキシンの定量はTR-FIAによる。  
 ボンビキシン濃度はボンビキシン-II相当量で表した。

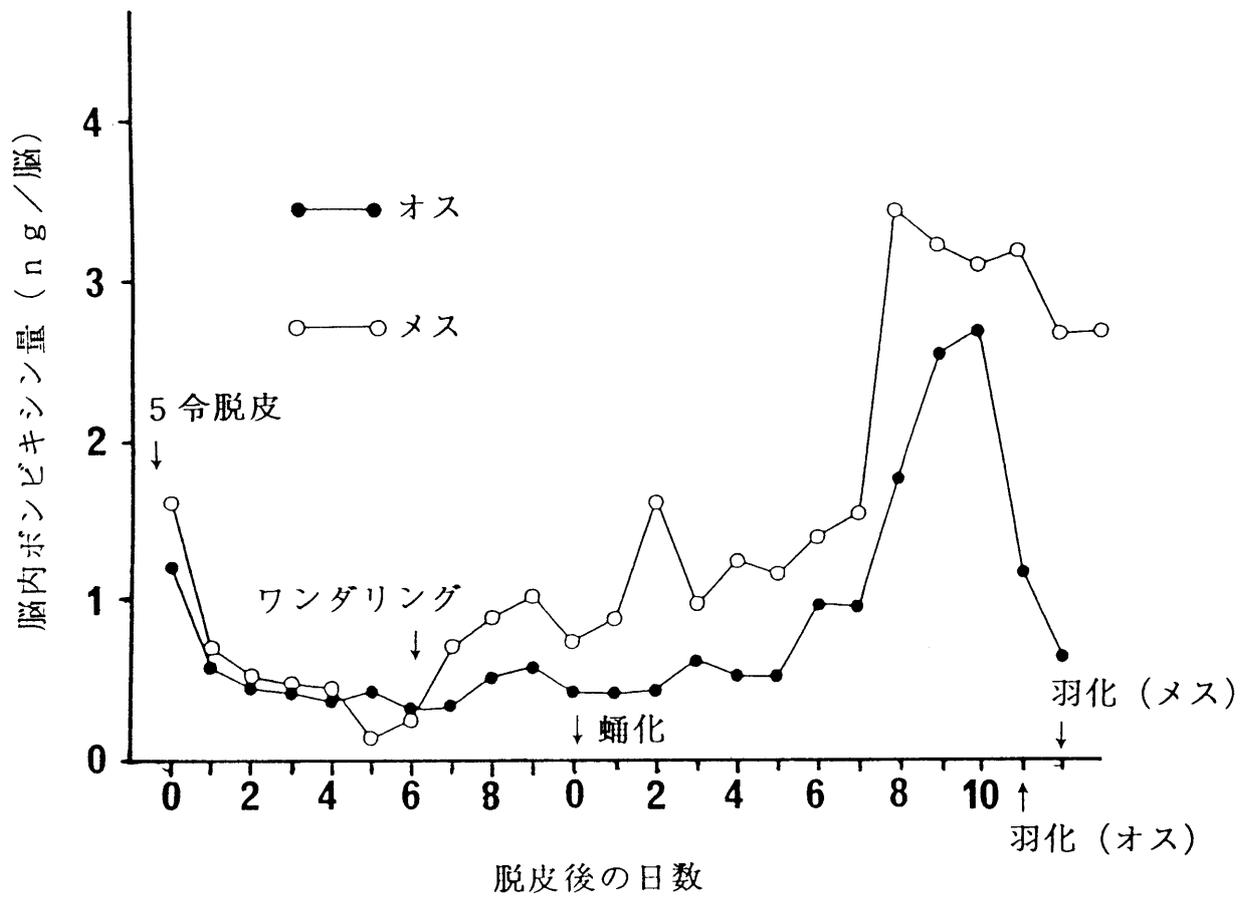


図5. ボンベキシンの脳内含量の変動.  
ボンベキシンの定量はTR-FIAによる.

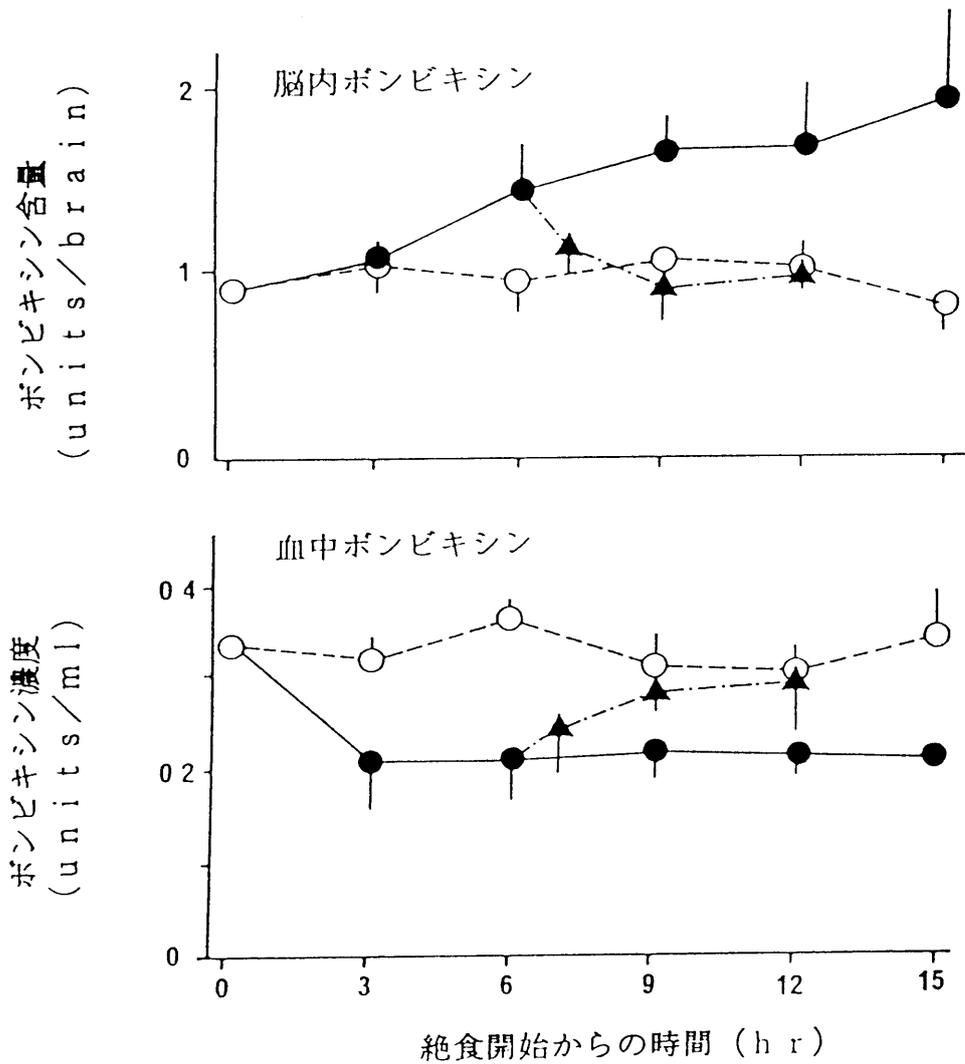


図6. 絶食と再摂食に伴う脳内ボンベキシンと血中ボンベキシンの量的変化. 5令脱皮後1日目のオスのカイコについて調べた. ボンベキシンの定量はRIAによる. ○摂食させた対照区, ●絶食させた実験区, ▲再摂食させた実験区.

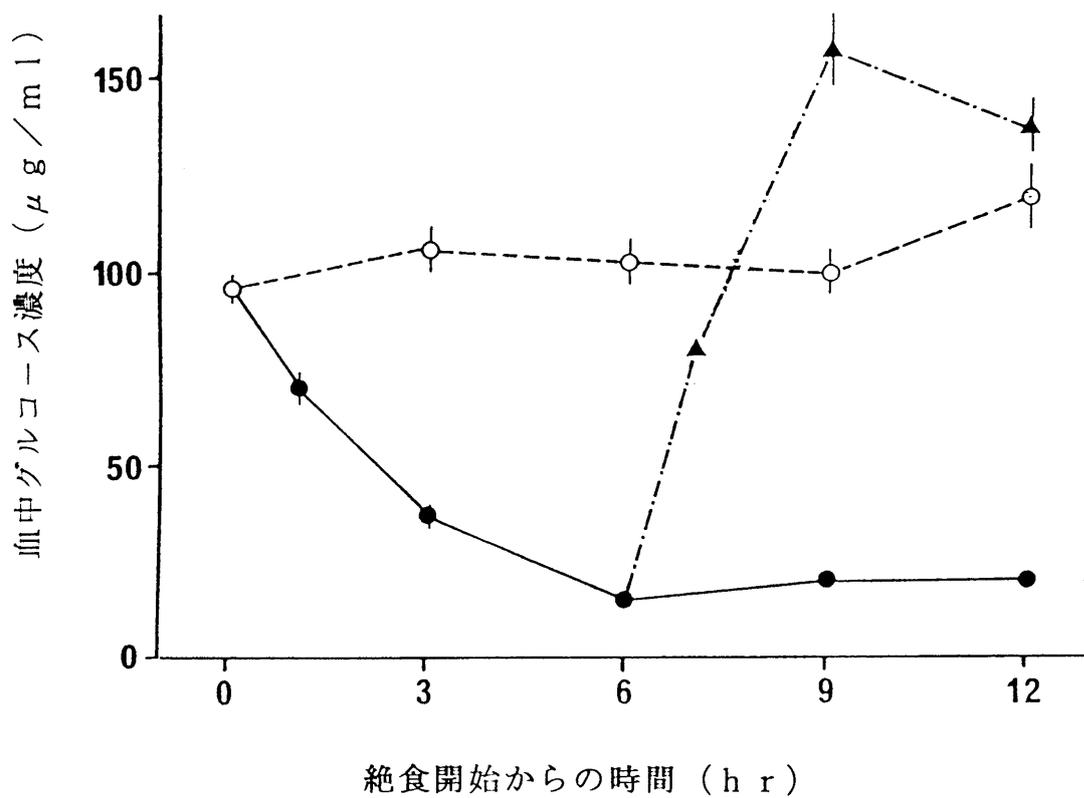


図7. 絶食と再摂食に伴う血中グルコースの量的変動。  
 5令脱皮後1日目のオスのカイコについて調べた。○摂食させた対照区,  
 ●絶食させた実験区, ▲再摂食させた実験区。

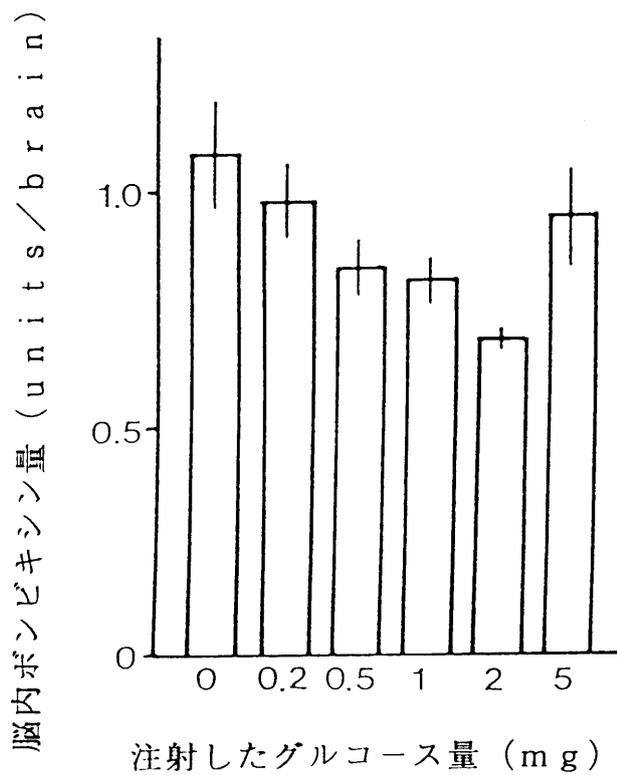


図8. グルコースによるボンベキシン分泌促進効果.  
 5令脱皮後1日目のオスのカイコを6時間絶食させた後、グルコースを注射し、  
 1時間後の脳内ボンベキシン量をRIAにより定量した。

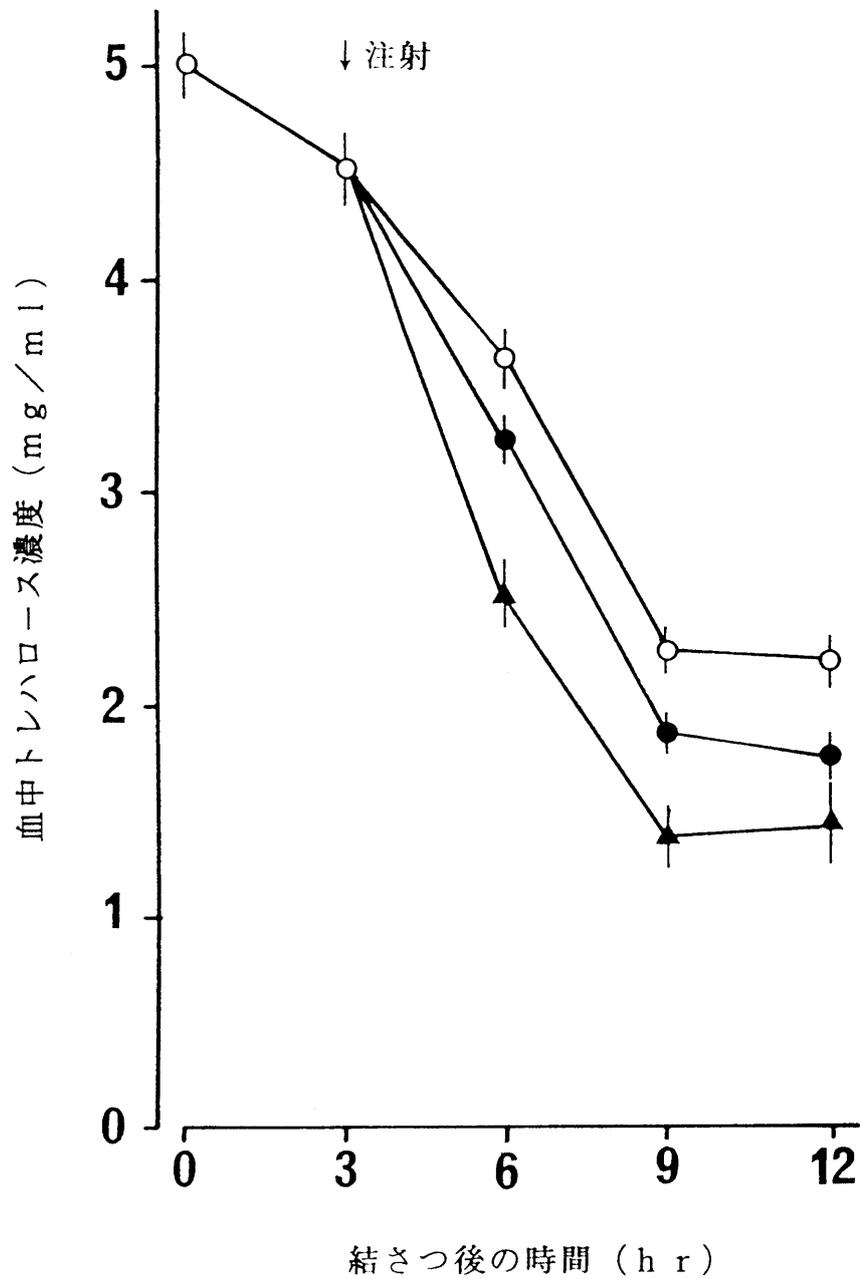


図9. 血中トレハロースに及ぼすボンビキシン注射の効果.

5令脱皮後3日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし, 3時間後にボンビキシン-IIを0 ng (○), 10 ng (●), 100 ng (▲) 注射した. 血中トレハロースの経時的変化を示す.

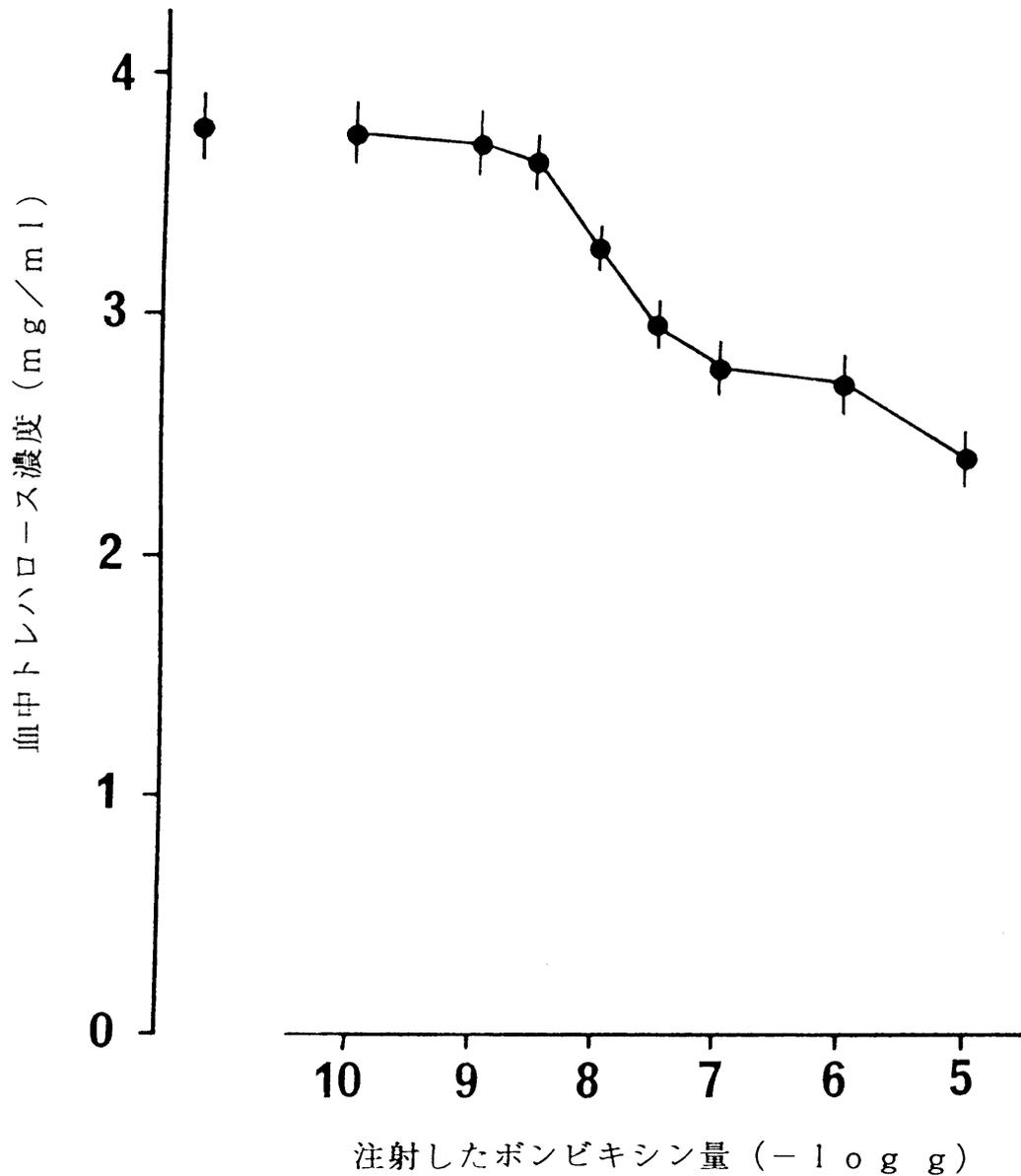


図10. ボンビキシンによる血中トレハロース低下作用の用量反応曲線。5令脱皮後3日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし、3時間後に段階希釈したボンビキシン-IIを注射した。注射後3時間の血中トレハロース値を示す。図中左隅は生理的食塩水を注射した対照区の血中トレハロース値。

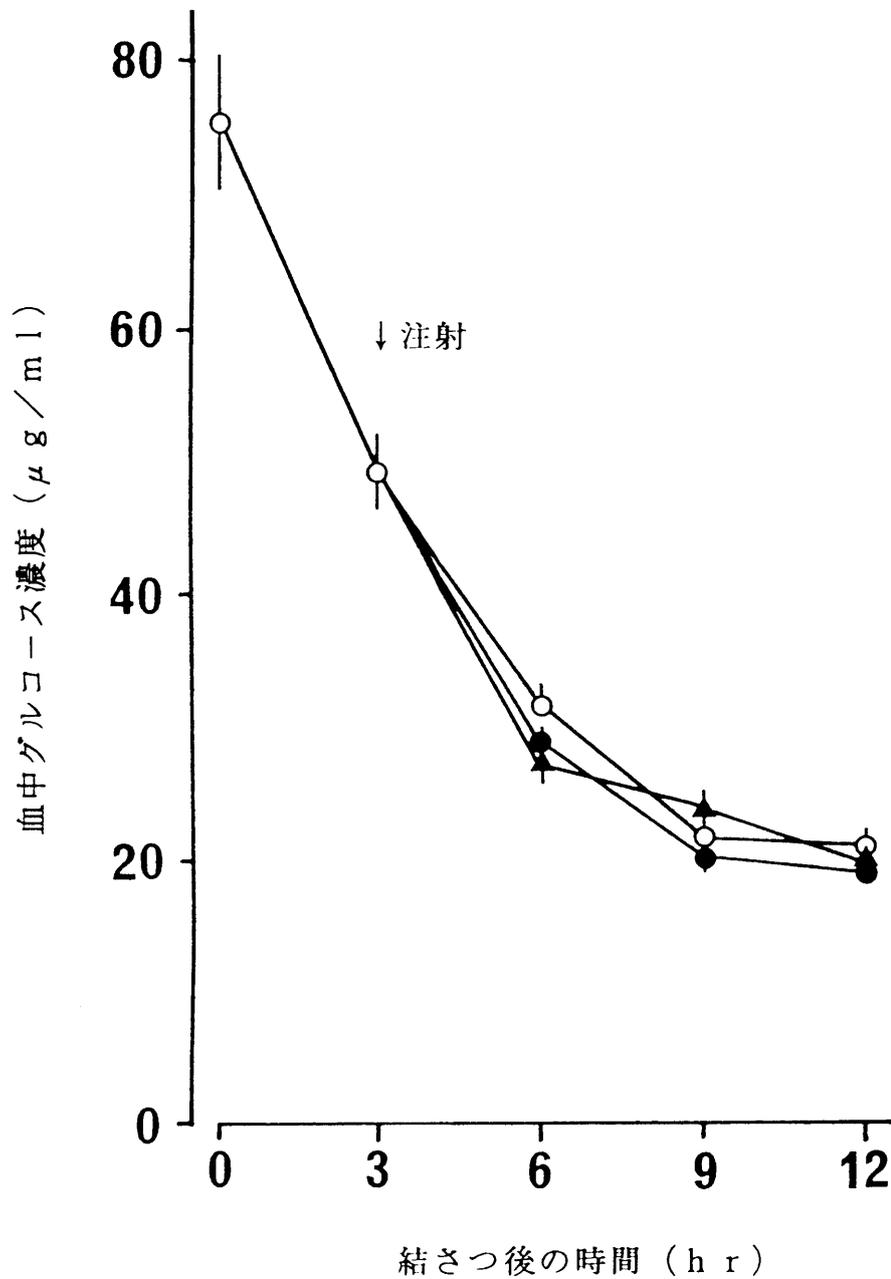


図 11. 血中グルコースに及ぼすボンビキシン注射の効果.

5 令脱皮後 3 日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし, 3 時間後にボンビキシン-II を 0 ng (○), 10 ng (●), 100 ng (▲) 注射した. 血中グルコース濃度の経時的变化を示す.

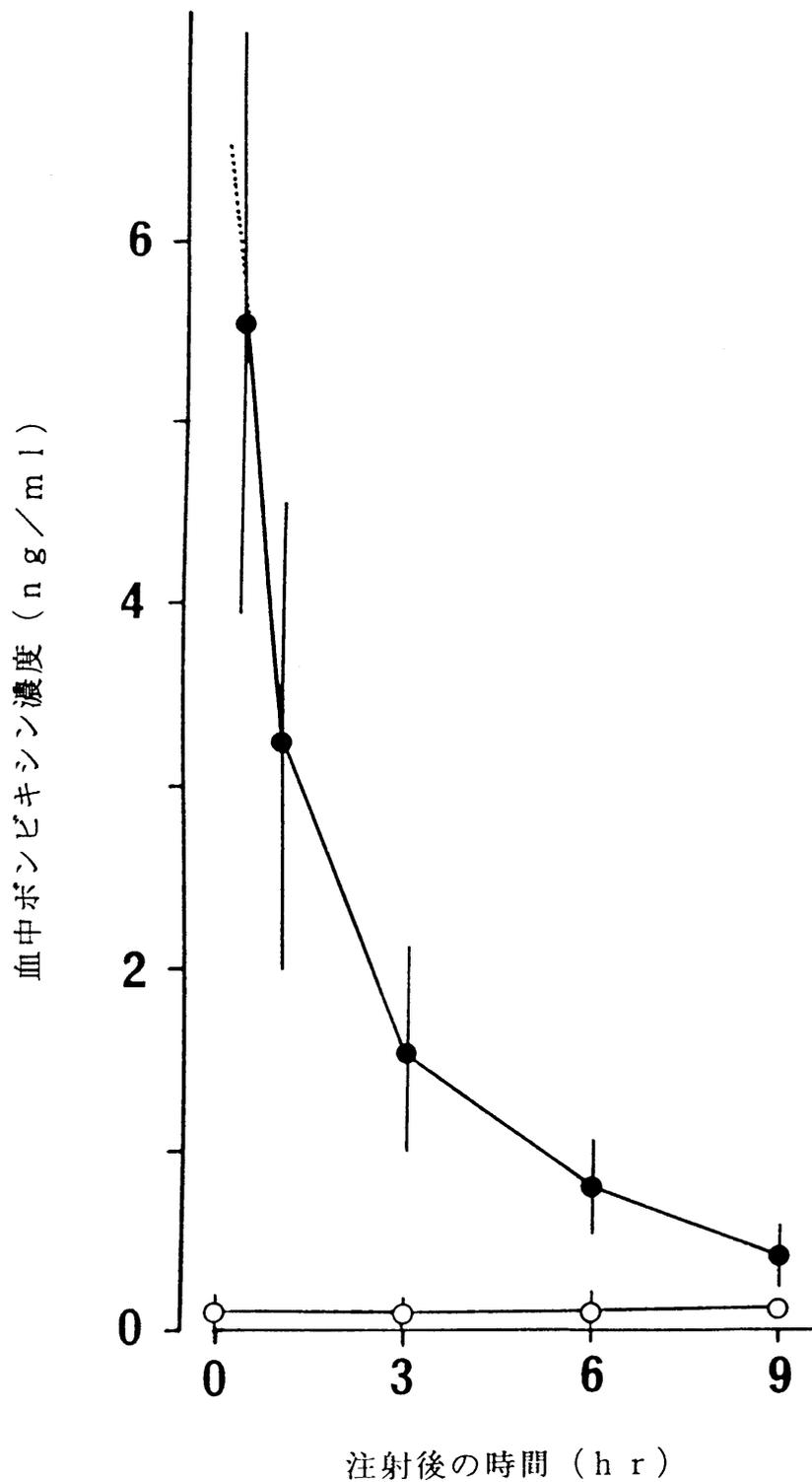


図12. ボンビキシンの血中における分解速度.

5令脱皮後3日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし, 3時間後に, 生理的食塩水 (○) 又はボンビキシ素-II 10 ng (●) を注射した. ボンビキシンの血中濃度の経時的变化を示す. ボンビキシンの定量はTR-FIAによる.

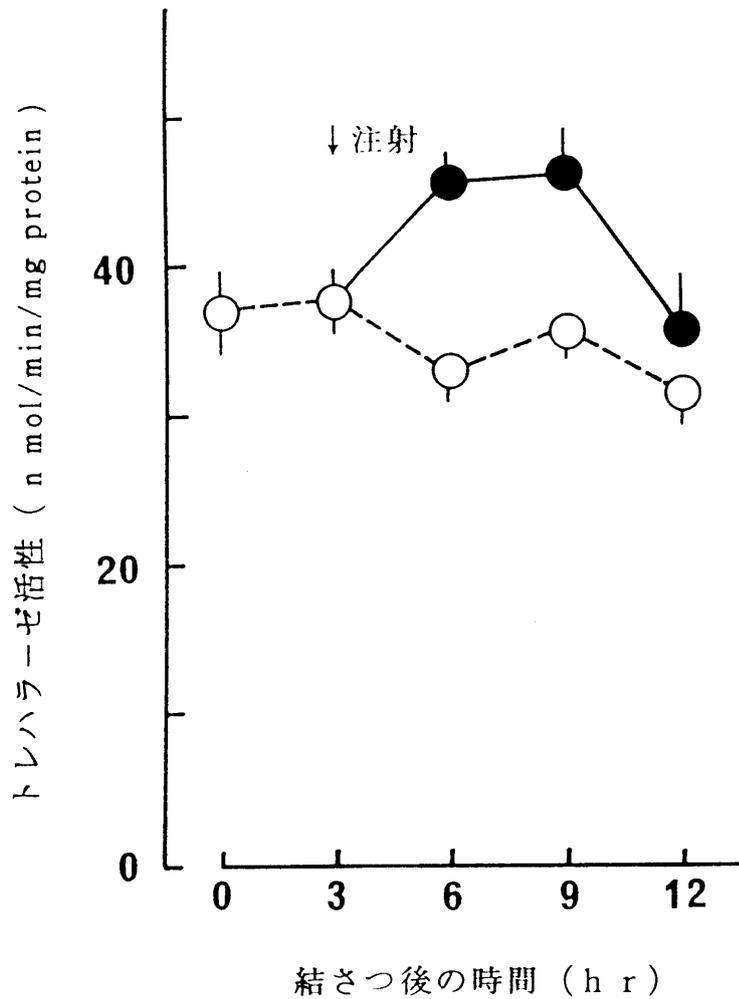


図 1 3 . 中腸のトレハラーゼ活性に対するボンビキシンの効果.

5 令脱皮後 3 日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし, 3 時間後に, 生理的食塩水 (○) 又はボンビキシン-II 10 ng (●) を注射した. 中腸のトレハラーゼ活性の経時的変化を示す.

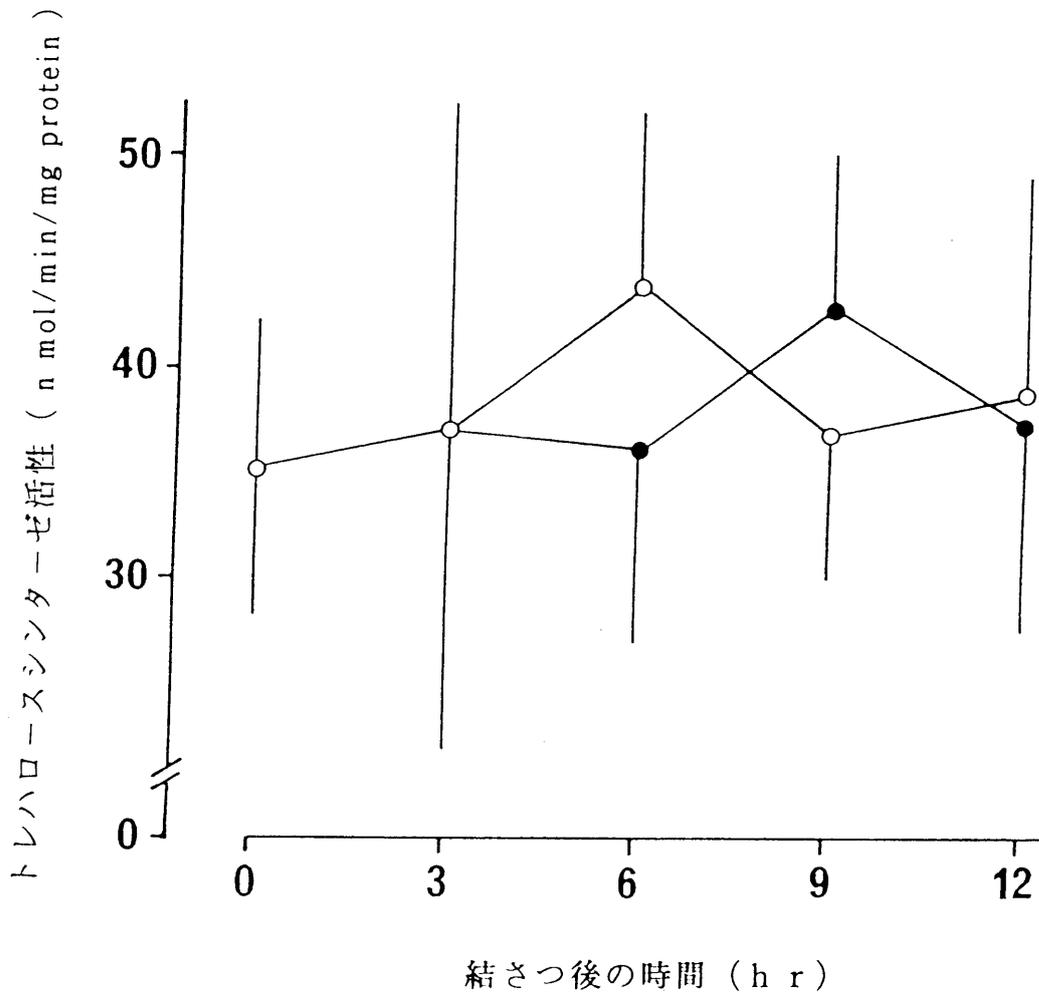


図14. 脂肪体のトレハロースシンターゼ活性に対するボンビキシンの効果. 5令脱皮後3日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし, 3時間後に, 生理的食塩水 (○) 又はボンビキシン-II 10 ng (●) を注射した. 脂肪体のトレハロースシンターゼ活性の経時的变化を示す.

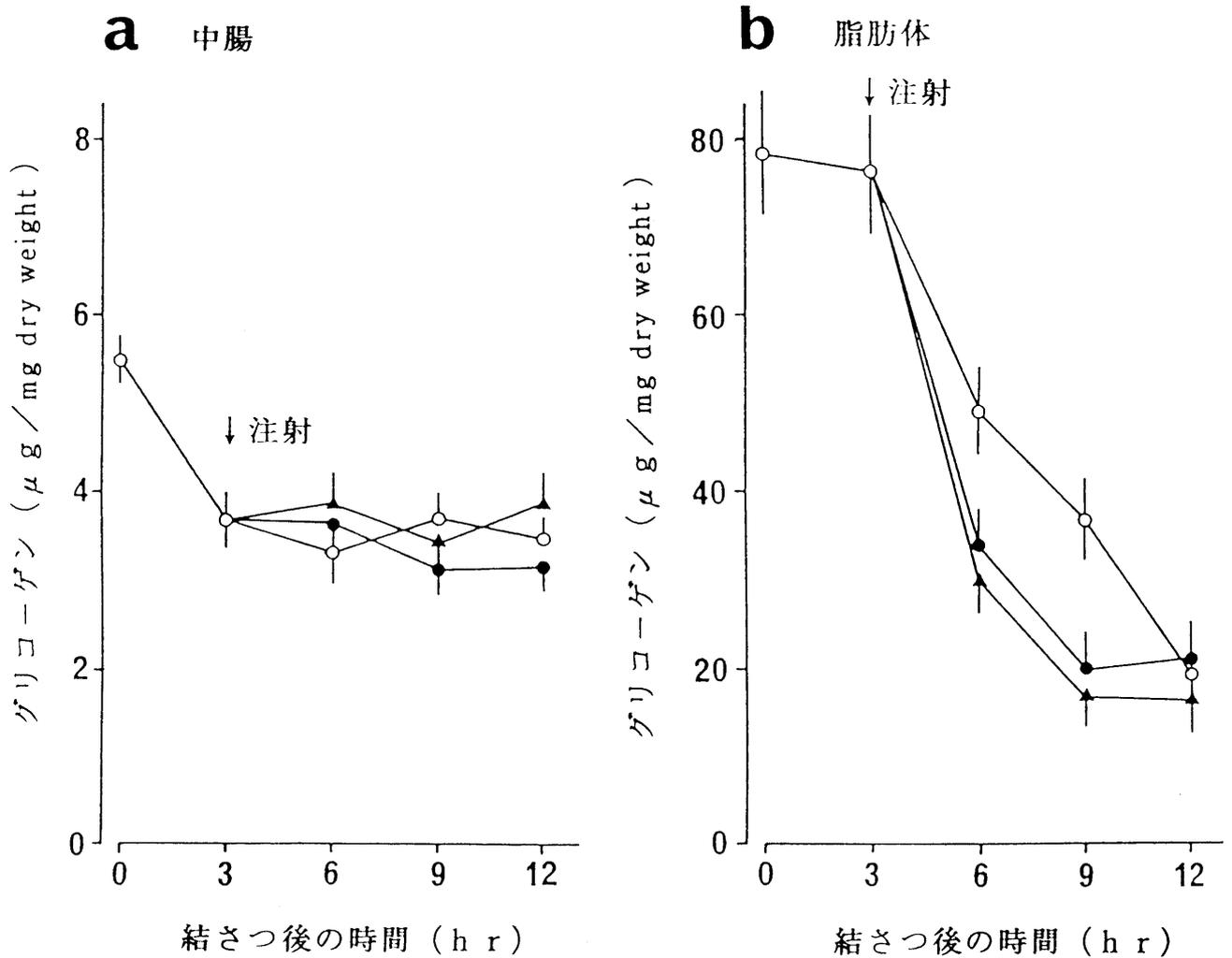


図 15. グリコーゲンの組織含量に及ぼすボンベキシンの効果。  
 5 令脱皮後 3 日目のメスのカイコを頭胸間で結さつし、3 時間後にボンベキシ  
 ン-II を 0 ng (○), 10 ng (●), 100 ng (▲) 注射した。  
 中腸 (a) と脂肪体 (b) のグリコーゲン量の経時的变化を示す。

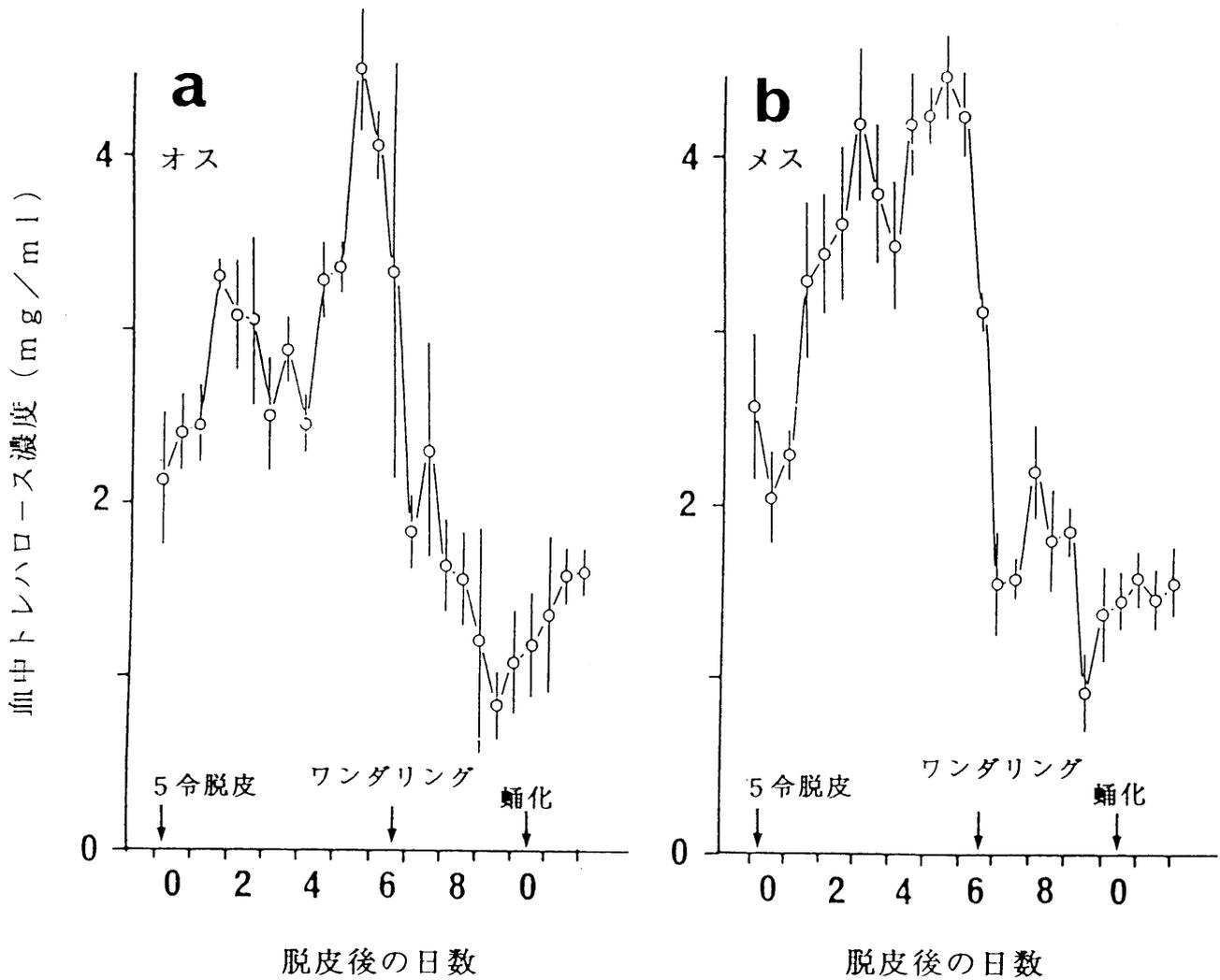


図16. 幼虫から蛹への発生に伴う血中トレハロース濃度の変化。  
オス (a) とメス (b) について示す。

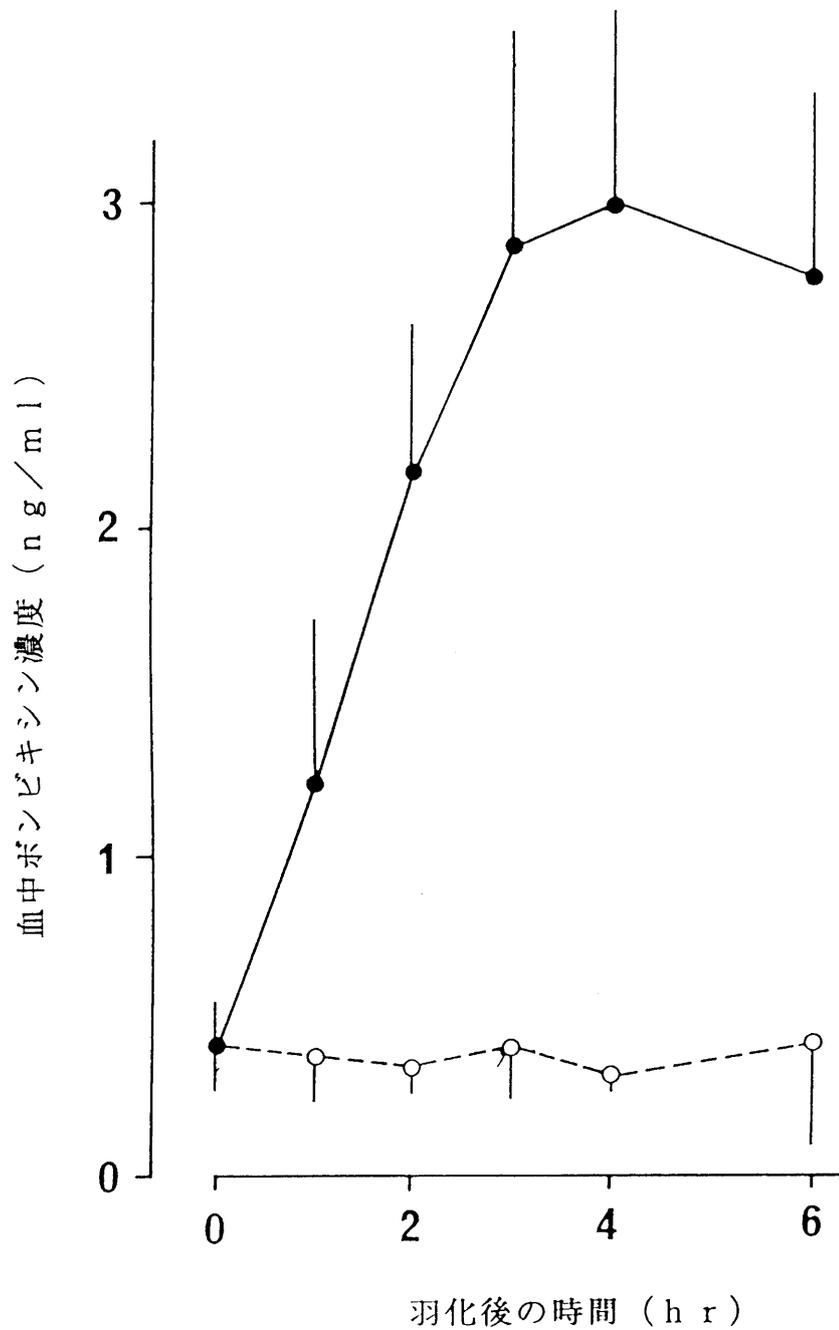


図 17. 羽化後の血中ボンビキシン濃度の変化.

羽化直後に頭胸間で結さつしたオス蛾 (○) と, しなかつたオス蛾 (●) の血中ボンビキシン濃度の経時的变化を示す. ボンビキシンの定量はTR-FIAによる.

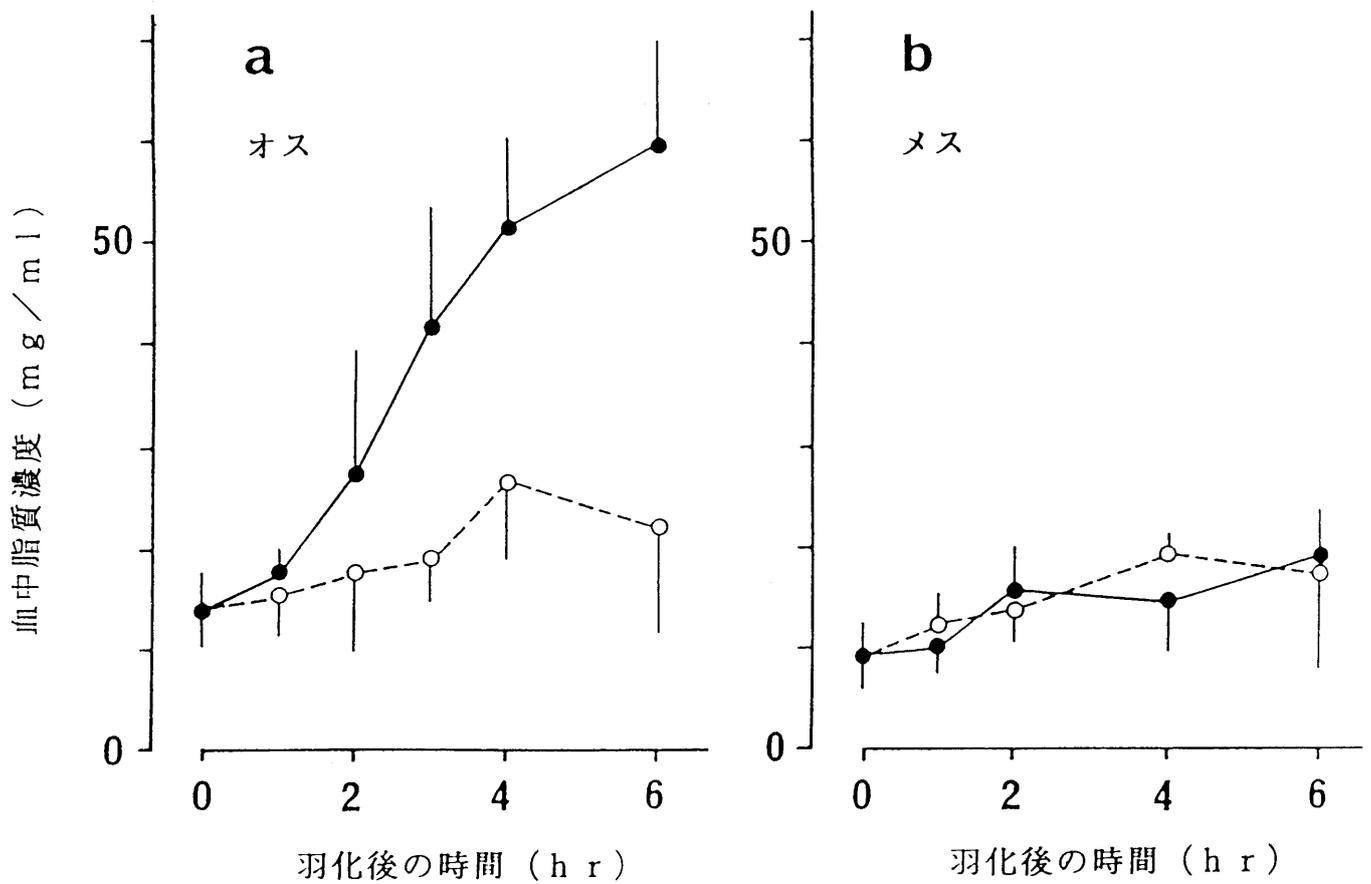


図 18. 羽化後の血中脂質濃度の変化.

羽化直後に頭胸間で結さつした蛾 (○) と、しなかつた蛾 (●) の血中脂質濃度の経時的变化を示す. a オス, b メス. 脂質濃度はリノレン酸相当量で表した.