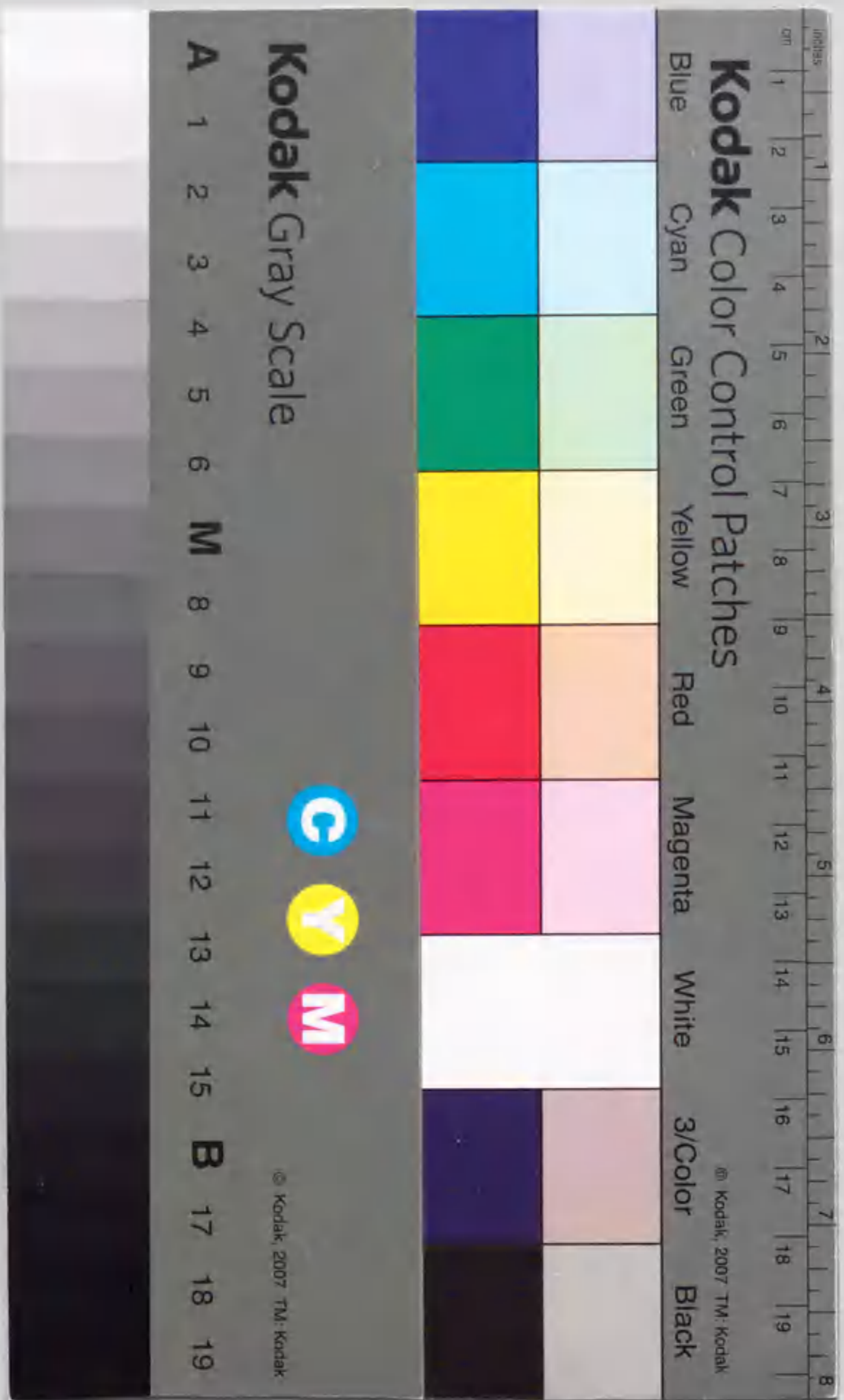


カイト脳ホルモン、ポンピキシンの  
分泌動態に関する研究

平成<sub>5</sub>年<sub>8</sub>月

三枝弘尚



報告番号 甲第 2832 号

主論文

①

カイコ脳ホルモン、ボンビキシンの分泌動態に関する研究

名古屋大学理学部  
生物学教室  
三枝弘尚

## 目次

1. 要約	4
2. 序論	6
3. 材料と方法	
3-1. 実験動物	8
3-2. カイコ血液の採取法および前処理	8
3-3. ボンビキシンの生物検定法	9
3-4. ホルモン	9
3-5. 抗体	
3-5-1. ボンビキシンIIに対する抗体	10
3-5-2. 合成Cペプチドフラグメントに対する抗体	10
3-6. 免疫沈降	11
3-7. イムノブロットティング	11
3-8. ボンビキシンのボンビキシンII抗体への結合	12
3-9. ボンビキシンIIのヨウ素標識	13
3-10. ボンビキシンのRIA	14
3-11. PVDF膜からの8K-IRMの抽出	14
3-12. リシルエンドペプチダーゼによる8K-IRMの消化	15
4. 結果	
4-1. ボンビキシンII抗体の性質の吟味	
4-1-1. カイコ脳抽出物のイムノブロットティング	16
4-1-2. Cペプチド抗体反応性物質のボンビキシンII抗体による認識	16
4-1-3. ボンビキシンII抗体はインタクトなボンビキシンを認識する	16
4-2. ボンビキシンRIAの開発	17

4-3.	カイコの発生に伴う血中ボンピキシン様免疫反応性物質の濃度の変動	18
4-4.	R I A と生物検定の比較	19
4-5.	カイコ血中に存在するボンピキシン II 抗体反応性物質のイムノプロットイングによる検出	19
4-6.	8K-IRM の性質の吟味	20
5.	考察	
5-1.	カイコ脳内に存在するボンピキシン II 抗体の認識する成分	22
5-2.	発生に伴うボンピキシンの分泌動態	24
5-3.	カイコ血中に存在する8K-IRMの性質	25
5-4.	ボンピキシンおよび8K-IRMの機能	27
6.	謝辞	31
7.	引用文献	32
8.	図の説明	39
9.	図	42
10.	表	50

## 1. 要約

ボンピキシンは、カイコ *Bombyx mori* の脳で産生される神経ペプチドで、別種の蛾エリサン *Samia cynthia ricini* の除脳蛹に対し、前胸腺を刺激して成虫化を誘導する活性をもつ。しかし、カイコ自身の前胸腺に対して、そのような活性を示さず、カイコにおける生理的機能は未知である。本研究では、ボンピキシンのカイコにおける機能を明らかにする手がかりを得る目的で、カイコの発生に伴うボンピキシンの分泌動態を調べた。

まず、すでに作製されていた、ボンピキシンIIに対するモノクローナル抗体（ボンピキシンII抗体）の性質を詳細に調べた。その結果、この抗体は、部分精製ボンピキシン標品の活性の3/4と結合することが明らかとなった。また、すでに得られていた、ボンピキシン前駆体のCペプチド部分のN末端8アミノ酸残基相当合成ペプチドに対するモノクローナル抗体（Cペプチド抗体）を利用した解析の結果、ボンピキシンII抗体はボンピキシンだけでなく、プロボンピキシンをも認識することを示した。

次に、このボンピキシンII抗体を用いて、ボンピキシンのラジオイムノアッセイ（RIA）系を開発した。このRIAにより、カイコ4齢0日目から成虫に到るまでの、血中のボンピキシン様免疫反応性物質の濃度の変動を調査した。4齢幼虫期から、5齢幼虫期前半においては、ボンピキシン様免疫反応性物質の濃度は低く、大きな変動はみられないが、5齢期後半にその濃度は上昇し始めた。雄においては、蛹期前期から中期にかけて高濃度が維持され、蛹期後期に濃度は低下し、羽化後再び上昇した。雌においては、蛹期中期において非常に高いピーク値をとり、蛹期後期に低下した後、羽化後上昇する傾向がみられた。また、蛹期から成虫期にかけては、雌の血中ボンピキシン様免疫反応性物質の濃度は雄のその2～3倍になるという事が明らかとなった。

次に、蛹-成虫発生におけるカイコ血中のボンピキシン様免疫反応性物質をイムノブロッティングにより検出し、その分子量を詳細に検討した。その結果、上述のRIAにより調べたボンピキシン様免疫反応性物

質の濃度の変動のパターンは、主として、分子量約8,000の物質（8K-IRMと略）の変動パターンを表すことが明らかとなった。ただし、羽化当日の雄成虫においては、ボンビキシン（分子量約5,000）の方が主要な成分であった。また、雄成虫羽化の時期についてさらに細かくサンプリングを行なったところ、ボンビキシンは、雄成虫の羽化直後から3～4時間の間に分泌されることが示唆された。



## 2. 序論

昆虫の脱皮、変態は、3種類のホルモンすなわち前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic Hormone, PTTHと略)、エクジソン、幼若ホルモンにより制御されている。PTTHは脳の神経分泌細胞で合成され、血中に分泌されて前胸腺を刺激し、エクジソンの合成、分泌を促進する。従ってPTTHは脱皮、変態を制御する上記3ホルモンのうちで最も上位に位置するホルモンである(2)。筆者の所属する研究グループ、および東京大学農学部鈴木昭憲研究室の共同研究により、カイコ蛾頭部からPTTHが精製され、構造が決定されたが、ボンビキシンと名づけられた、カイコ本来のPTTHとは別のペプチドもこの過程において精製されてきた。

ボンビキシンは、別種の蛾エリサンの除脳蛹に対する前胸腺刺激活性を指標に精製単離された神経ペプチドである(8,10,23)。しかし、4齢から5齢への幼虫脱皮を指標とした検定系(32)、および、蛹から成虫への発生を指標とした検定系(9)において調べられた限りでは、カイコ前胸腺に対する刺激活性はみられず、ボンビキシンのカイコにおける生理的役割は未だ明らかではない。

構造解析の結果、ボンビキシンには、アミノ酸配列がわずかに異なる多くの分子種が存在することが明らかとなった。そのうちボンビキシンII、IVは全アミノ酸配列が、ボンビキシンI、III、Vは部分アミノ酸配列が明らかとなっており、これらの一次構造はいずれもインスリンと高い相同性を示す(13,16,23,24,25)。

また、すでにボンビキシンのcDNAや遺伝子の構造も明らかにされており、ボンビキシンの生合成過程も推定されている(1,12,14)。すなわち、ボンビキシンはまずシグナルペプチド、B鎖、Cペプチド、A鎖より成るプレプロボンビキシンとして合成される。シグナルペプチドが切断されてプロボンビキシンとなり、さらに、Cペプチドの切断除去、A鎖B鎖間およびA鎖内のS-S結合形成、B鎖N末端グルタミンのピログルタミン酸への変換を経て、成熟ボンビキシン分子が形成されると考えられる。

ボンピキシンの生理学的研究において、抗体の利用は有効である。すでに、ボンピキシンの一次構造の情報を基に合成オリゴペプチドが作製され、それを抗原としてボンピキシンのマウスモノクローナル抗体が得られている（ボンピキシンのI(1-10)抗体）（文献19）。そして、この抗体を用いた免疫組織化学的研究によって、カイコ脳内のボンピキシンの産生細胞及びその分泌部位が推定されている。すなわち、ボンピキシンのカイコ脳背側中央部に位置する4対の神経分泌細胞で合成され、軸索を通過してアラタ体まで運搬され、アラタ体辺縁部にある神経終末から血中に放出されると考えられている（19）。また、このボンピキシンのI(1-10)抗体を用いたイムノブロットイングにより、カイコの発生に伴う脳内ボンピキシンの含量の変動についても調べられている（20）。このように、ボンピキシンの合成フラグメントに対する抗体は、免疫組織化学やイムノブロットイングへの利用には有用であったが、インタクトなボンピキシンの分子を認識できなかったため、RIA等の免疫学的測定法に利用することはできなかった。

Mizoguchi (1990)はカイコ頭部から精製された微量のボンピキシンのIIを抗原として用いることで、インタクトなボンピキシンのモノクローナル抗体を作製した（18）。筆者は、この抗体（ボンピキシンのII抗体と略す）の性質を詳細に吟味し、ボンピキシンのII抗体を用いたRIAを開発し、カイコ4齢幼虫から成虫に至るまでの、血中のボンピキシンのII抗体反応性物質の濃度を測定した。さらに、血中の免疫反応性物質をイムノブロットイングにより検出し、その性質についても調べた。結果の主要部分はすでに発表した（29）。

### 3. 材料と方法

#### 3-1. 実験動物

実験に用いたカイコは、実用交雑品種の錦秋×鐘和（カネボウシルクエレガンス）であり、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12時間明12時間暗の照明サイクルの下で、人工飼料（シルクメイト、日本農産工業）を与えて飼育した。多くの5齢幼虫は脱皮後7日目（少数は6日目）にワンダリングを開始した（7日目のもののみ実験に使用）。蛹化はワンダリング開始後、5日目に起こった。多くの雄は蛹化後11日目（少数は10日目および12日目）に羽化し、雌は12日目（少数は11日目および13日目）に羽化した（それぞれ、11日目、12日目羽化の個体のみを実験に使用）。

#### 3-2. カイコ血液の採取および前処理

3-30匹のカイコから500-1,000 $\mu\text{l}$ の血液を集め、1サンプルとした。4齢及び5齢幼虫については、第一腹脚の基部にハサミで傷をつけ、そこから滴下する血液を、氷冷した1.5 mlサンプリングチューブに集めた。それ以後のステージのカイコについては、背脈管に傷をつけ、そこから血液を集めた。なお、サンプリングチューブには、予め、sodium N,N'-diethyldithiocarbamate（フェノールオキシダーゼの阻害剤）を終濃度約5 mMとなるように入れておいた。また、血液には、タンパク質分解酵素阻害剤であるphenylmethanesulfonyl fluorideを終濃度約1 mMとなるように加えた。このようにして得た血液を遠心して（10,000 $\times g$ , 10分,  $4^\circ\text{C}$ ）、血球や組織片などを除いた後、 $-80^\circ\text{C}$ で使用時まで保存した。

RIAでボンピキシン様免疫反応性物質濃度を測定するのに先立って、血液の前処理を行なった。融かした血液に2N HClを滴下してpHを3にあわせた後、遠心して沈殿を除去し、上清をAmrep C2カラム（Amersham）に

通した。カラムを10 mlの0.1% trifluoroacetic acid (TFA)で洗った後、2.5 mlの60% acetonitrile/0.1% TFAでボンビキシンを溶出した。これを遠心エバポレーターで乾燥させ、適当量の希釈用バッファー(50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5% bovine serum albumin (BSA))に溶かして、RIA用のサンプルとした。

また、血液中のボンビキシン活性を生物検定する場合には、C2カラムの溶出物を透析チューブ(Spectra Por 6, Spectrum)を用いて水に対して透析し、凍結乾燥し、適当量の生物検定用バッファー(50 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, 0.04% BSA)に溶かした。

### 3-3. ボンビキシンの生物検定法

Ishizaki and Ichikawa (1967)の方法(8)に従い、エリサン除脳蛹を用いて検定した。但し、成虫化の指標として、翅のアポリシスが起きているかどうかを採用した。サンプルの希釈には、生物検定用バッファーを用いた。また、検定蛹の半数以上の成虫化を誘導する最小量のボンビキシン活性を1 *Samia* unitとした。

### 3-4. ホルモン

ボンビキシンの部分精製標品、あるいは単離されたボンビキシンIIを用いた。部分精製ボンビキシンは、全精製工程のうち12段階まで精製された標品で(22)、1 $\mu$ gのタンパク質当り、170 *Samia* unitsのボンビキシンを含む。この標品のボンビキシンの純度は約2%であり、また、すべてのボンビキシン分子種を含む。単離されたボンビキシンIIは、全精製工程の最終15段階まで精製された標品であり、高速液体クロマトグラフィーで単一のピークを与える(23)。なお、これらのホルモン標品は共同研究グループである鈴木昭憲研究室(東大・農・農化)から分与

されたものである。

### 3-5. 抗体

#### 3-5-1. ボンビキシンIIに対する抗体

カイコ頭部から精製されたボンビキシンIIとBSAとを1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC, Sigma)により結合させ、それを抗原としてBALB/cマウスを免疫した。そのマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞(NS-1)とをポリエチレングリコールを用いて融合させ、ハイブリドーマを得た。ハイブリドーマ上清のスクリーニングは、まず、ドットイムノバインディングアッセイにより行った。すなわち、ニトロセルロース膜上にドットしてあるボンビキシンIIに対し反応するものを選択した。次にカイコ脳抽出物をsodium dodecyl sulfate(SDS)を用いない非変性条件下でポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)により展開した後、イムノプロットングを行ない、目的の位置にバンドが検出されるハイブリドーマを選択した。ハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングした。約 $10^7$ 個の抗体産生細胞を、予めプリスタン0.5 mlを腹腔内注射されたBALB/cマウスに注射し、生じた腹水液から、プロテインA結合アフィニティーカラムを用いて抗体を精製した。抗体は、1 mg/ml 50 mM PBS (pH 7.4)となるように調製した。なお、この抗体の作製は溝口ら(文献18)によって行なわれた。

#### 3-5-2. 合成Cペプチドフラグメントに対する抗体

ボンビキシン遺伝子A1(文献12)から推定されるボンビキシン前駆体のCペプチドN末端8アミノ酸に、Cysを付加した9個のアミノ酸からなるオリゴペプチド(H-Ser-Gly-Ala-Gln-Phe-Ala-Ser-Tyr-Cys-OH)を化学合成し(この合成ペプチドは鈴木昭憲研究室(東大・農)で作製さ

れた)、N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてBSAとの結合物を作製し(Cペプチド(1-8)-Cys-BSAと略)、免疫原とした。このCペプチド(1-8)-Cys-BSAで免疫されたBALB/cマウスの脾細胞とNS-1細胞とを融合させ、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニングは次のような2段階の方法を用いた。まず、Cペプチド(1-8)-Cysと卵白アルブミンとの結合物との反応性をドットイムノバインディングアッセイで調べた。次に、カイコ幼虫脳連続切片を用いて免疫組織化学的染色を行い、すでに同定されている中央部4対のボンピキシン産生細胞(19)を特異的に染めるものを選択した。2段階のスクリーニングを経たハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、増殖させ、マウス腹腔内に注射し、腹水を得た。IgGをプロテインAアフィニティーカラムを用いて精製し、1 mg/ml 50 mM PBS (pH 7.4)となるように調製した。なお、この抗体の作製は、北洞、溝口らによって行なわれた(発表は文献29)。

### 3-6. 免疫沈降

サンプルを希釈用バッファー(50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5% BSA)に溶かし、1%正常マウス血清で1:50に希釈したボンピキシンII抗体100 $\mu$ lを加え、4 $^{\circ}$ C、24時間インキュベートし、希釈用バッファーで1:50に希釈した抗マウスIgG抗体(Cappel)100 $\mu$ lを加えてさらに4 $^{\circ}$ C、24時間インキュベートした。これを10,000 $\times$ g、20分遠心し、沈澱を20 mM PBS (pH7.4)で洗い、電気泳動用サンプルとした。

### 3-7. イムノブロットイング

サンプルに20 $\mu$ lのサンプルバッファー(4% SDS, 12% glycerol, 0.01% Coomassie brilliant blue G in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8)を加

え、90℃以上で3分間熱処理し、Tricine-SDS-PAGE (30)で展開した。Tricine-SDS-PAGEを用いたのは、低分子量ペプチドに対する分離能がすぐれているからである。ゲルは80×70×1 mmのものを使用し、16.5% T, 3% Cの分離ゲルの上に、10% T, 3% Cのスペーサーゲルを重層し、さらにその上に、4% T, 3% Cのスタッキングゲルを重層した。なお、分離ゲルには、後のイムノプロットティングでの検出の際の悪影響をさけるため、グリセロールを添加しなかった。電気泳動終了後、ゲルをトランスファーバッファー(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% methanol)中に1時間浸漬し、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (GVHP filter, Millipore)に、分離したタンパク質を転写した。プロットティング装置はMini Trans-Blot (Bio-Rad)を用い、100 V, 1時間転写した。転写後、PVDF膜を風乾し、105℃、30分の熱処理を行った。5%スキムミルクで一晩ブロッキングした後、TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20)で1:1000に希釈したボンピキシンII抗体と2時間室温でインキュベートし、次いで、ビオチン標識ヒツジ抗マウスIgG抗体 (Amersham) (1:1000に希釈、室温で2時間)、ストレプトアビジン-ビオチニル化西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 複合体 (Amersham) (1:1000に希釈、室温で1時間)と順次インキュベートした。HRPの活性の検出には、断わらない限りECLシステム (Amersham)を使用した。

### 3-8. ボンピキシンのボンピキシンII抗体への結合

2 mgのボンピキシンII抗体を40 mgのポリアクリルアミドビーズ (Immunobead Matrix, Bio-Rad)に、EDACを用いて共有結合的に固定した。対照実験用として、正常マウスIgG (Zymed Laboratories Inc)を同様にビーズに固定した。固定の方法はBio-Radのプロトコルに従った。

400 *Samia* unitsの部分精製ボンピキシンを100 $\mu$ lの生物検定用バッファーに溶かし、ボンピキシンII抗体あるいは、マウスIgG結合ビーズ (1 mg)を加え、4℃で24時間インキュベートした。その後、10,000 $\times$ gで

10分遠心し、ビーズを沈降させた。ビーズを50 $\mu$ lの生物検定用バッファで3回洗い、最初の上清と3回分の洗い液を合わせて、Sup-1とした。Sup-1の一部は、エリサン除脳蛹生物検定により、ボンピキシン活性を測定した。2/5量のSup-1にさらに1 mgのボンピキシン II 抗体結合ビーズを加え、上記と全く同様の操作をした。そして、上清と洗い液を合わせて (Sup-2と呼ぶ)、ボンピキシン活性を測定した。

沈降させたビーズからボンピキシンを回収するために、ビーズを3.5 M KSCN を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 6.6) 100 $\mu$ lに懸濁し、1時間氷冷下においた。ビーズを遠心して沈降させ、上清を回収した。沈降したビーズをKSCN溶液で3回洗い、先の上清と3回分の洗い液とを合わせた。これを水に対し透析し、凍結乾燥後、適当量の生物検定用バッファに溶かし、ボンピキシン活性を測定した。

### 3-9. ボンピキシン II のヨウ素標識

Miyachi *et al.* (1971) のラクトペルオキシダーゼ法 (17) を少し改変して、ボンピキシン II のヨウ素標識を行なった。

10 $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oに溶かした2.5 $\mu$ gのボンピキシン II と25 $\mu$ lの0.4 M acetate buffer (pH 5.6), 10 $\mu$ lの0.1 M acetate buffer (pH 5.6)に溶かした 100 ng ラクトペルオキシダーゼ (Boehringer Mannheim)、10 $\mu$ lの希水酸化ナトリウムに溶かした37 MBq のNa<sup>125</sup>I (Amersham)、5 $\mu$ lの0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とを混ぜ、室温で10分間インキュベートした。反応終了後、未反応の<sup>125</sup>Iと標識ホルモンとを分離するため、上記混合液をセファデックス G-50 (fine) カラム (1 $\times$ 25 cm) にかけた (図1)。溶出には50 mM PBS (pH 7.4)を用い、0.5 mlずつ分画した。 [<sup>125</sup>I]ボンピキシン II が吸着により失われるのを防ぐため、溶出液を受けるフラクションチューブには、予め、BSAを最終濃度約0.5%になるように加えておいた。フラクション15を、それぞれ約10<sup>6</sup>cpmの [<sup>125</sup>I]ボンピキシン II を含むように分注し、使用時まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。



### 3-10. ボンビキシンのRIA

50  $\mu$ lの標準ボンビキシンあるいは未知試料、100  $\mu$ lの希釈用バッファーに溶かした約 $10^4$ cpmの $[^{125}\text{I}]$ ボンビキシンII、1%正常マウス血清（希釈用バッファーで希釈）で希釈したボンビキシンII抗体100  $\mu$ lをよく混和し、4°Cで72時間インキュベートした。ボンビキシンII抗体濃度は、コンペティターとしての非標識ボンビキシンが存在しない条件下で $[^{125}\text{I}]$ ボンビキシンIIの約40%が抗体に結合するように決定した。

次に、1:40に希釈した抗マウスIgGヤギ抗血清（Cappel）100  $\mu$ lをそれぞれのチューブに加え、4°Cで24時間インキュベートした。インキュベーション終了後、遠心し（3,000 rpm、4°C、20分）沈殿の放射能をウェルタイプガンマカウンター（Aloka）で測定した。

ボンビキシンの標準試料としては、部分精製ボンビキシンを用いた。各濃度の標準ホルモンについて、抗体に結合した放射能の最大結合放射能に対する比（B/B<sub>0</sub>）を計算し、標準ホルモンの量の対数に対してプロットした。未知試料中のボンビキシン様免疫反応性物質を定量する場合は、標準曲線をlogit-logプロットにより直線化して用いた。測定結果は、RIA unitであらわした。1 RIA unitとは、カイコ成虫頭部1個相当の部分精製ボンビキシン（4 *Samia* unitsの活性を含む）に含まれる免疫反応性と定義する。

各発生段階について、1サンプル当たり50-250  $\mu$ lの血液を用い、独立した3個のサンプルについて測定した。未知試料の測定には、一つの未知試料から同じ量の二つのアリコットを作り、それらを測定して得られた値の平均値をその試料の測定値とした。標準試料はそれを三つのアリコットで行なった。

### 3-11. PVDF膜からの8K-IRMの抽出

PVDF膜からの8K-IRMの抽出はHarrington (1990)の方法(5)に従った。

蛹化後5日目の雌カイコの血液中のボンピキシンII抗体反応性物質を上述の免疫沈降反応により沈殿させた(血液1 ml相当由来の沈降物を同時に5個作った)。これらの免疫沈降物をTricine-SDS-PAGEで同時に展開し、PVDF膜に転写した。この膜を直ちに、0.1% Ponceau Sを含む1% acetic acidで30秒程染色し、数秒間DWで脱色した。分子量マーカー(ミオグロビンのCNBr分解フラグメント、Pharmacia)を参照しつつ、約8 kD付近を切り出した。そのPVDF膜を適当な大きさに切り、500  $\mu$ lの溶出液(30% TFA, 40% Acetonitrile, 5  $\mu$ g BSA)に漬けて室温で1時間振とうした。BSAは8K-IRMが吸着により失なわれるのを防ぐために加えた。遠心して液体を回収した後に、250  $\mu$ lの同溶出液で膜を洗い、遠心して液体を回収し、先の溶出液と合わせた。これを遠心エバポレータで乾燥させた。

### 3-12. リシルエンドペプチダーゼによる8K-IRMの消化

上述のように抽出した8K-IRM(血液2 mlに由来)を0.1% SDSを含む25 mM Tris-HCl (pH 8.3) 200  $\mu$ lに溶かし、10  $\mu$ lの10  $\mu$ g/mlリシルエンドペプチダーゼ(和光)を加えて、30°Cで16-20時間インキュベートした。反応終了後、凍結乾燥し、Tricine-SDS-PAGEとそれに続くボンピキシンII抗体によるイムノブロッティングで解析した。

## 4 . 結果

### 4-1. ボンビキシン II 抗体の性質の吟味

#### 4-1-1. カイコ脳抽出物のイムノブロッティング

5 齢 0 日のカイコ幼虫の脳抽出物を Tricine-SDS-PAGE で展開し、ボンビキシン II 抗体によりイムノブロッティングを行なったところ、見かけの分子量約 8.0kD と 6.5kD の 2 種類の成分が検出された (図 2 A、レーン 1)。完全精製されたボンビキシン II は、6.5kD のバンドとして検出された (図 2 A、レーン 2)。

#### 4-1-2. C ペプチド抗体反応性物質のボンビキシン II 抗体による認識

5 齢 0 日のカイコ幼虫の脳抽出物を、ボンビキシン II 抗体あるいは C ペプチド抗体とインキュベートして、それぞれの抗体が認識する成分を二次抗体により沈殿させた。これらの免疫沈降物を Tricine-SDS-PAGE で展開し、ボンビキシン II 抗体をプローブとしてイムノブロッティングを行なった。ボンビキシン II 抗体により得られた免疫沈降物中には、8.0 kD と 6.5kD の二種類の、ボンビキシン II 抗体反応性の成分が存在した (図 2 B、レーン 1)。一方、C ペプチド抗体により得られた免疫沈降物中には、8.0kD の成分のみが存在した (図 2 B、レーン 2)。C ペプチド抗体での免疫沈降物中の 8.0kD の成分のバンドの強さは、ボンビキシン II 抗体での免疫沈降物中のそれよりも弱かった。

#### 4-1-3. ボンビキシン II 抗体はインタクトなボンビキシンを認識する

以前作製された部分合成ボンビキシンに対するモノクローナル抗体は、

変性したボンピキシンは認識したが、生物活性をもった未変性ボンピキシンを認識することはできなかつた(19)。ボンピキシンII抗体はインタクトなボンピキシンを認識できるかどうかを調べるために、ボンピキシンII抗体を結合したイムノビーズマトリクス(Bio-Rad)でボンピキシン溶液を処理し、溶液中のボンピキシン活性が減少するかどうかを調べた。部分精製ボンピキシンの溶液にボンピキシンII抗体結合ビーズを加えてインキュベートした後、遠心して落とした。ビーズをKSCNで処理して、結合したボンピキシンを遊離させた。ボンピキシン活性は、非結合画分(洗い液と上清の混合物)および、結合画分(沈殿させたビーズをKSCN処理して遊離させた分画)の両方について調べた。

表1に示すように、非結合画分(Sup-1)のボンピキシン活性は、当初の400 *Samia* unitsから、100 *Samia* unitsに減少した。このことは、全活性の約3/4が、ビーズに結合したことを意味している。また、ビーズをKSCN溶液で処理して、遊離するボンピキシン量を調べたところ、25 *Samia* unitsの活性が検出された。このことは、ボンピキシンが実際にボンピキシンII抗体に結合していたことを示している。

ボンピキシン活性がSup-1に残ったことの原因が、加えた抗体の量の不十分さにあるかどうか調べるために、このSup-1を再びボンピキシンII抗体結合ビーズで処理した。その結果、Sup-2にはSup-1と同じ活性が残り、また、ビーズからボンピキシン活性は回収されなかつた。よって、Sup-1に存在していたボンピキシン活性は、ボンピキシンII抗体に認識されないボンピキシン分子種によるものであると考えられる。なお、対照実験として、ボンピキシンII抗体の代わりに正常マウスIgGを結合させたビーズを用いて部分精製ボンピキシンを処理した場合には、ボンピキシン活性はビーズに吸着されなかつた。

#### 4-2. ボンピキシンRIAの開発

図3にボンピキシンRIAの典型的な標準曲線(logit-log plotによ

り、直線化してある)を示す。加えた部分精製ボンピキシンは、 $[^{125}\text{I}]$ ボンピキシンIIのボンピキシンII抗体への結合を用量依存的に阻害した。この阻害効果は、0.2 Samia unit から8 Samia unitsの範囲で起こった。このように、ボンピキシンRIAの検出限界は、0.2 Samia unit の部分精製ボンピキシンに含まれるボンピキシン量ということになる。アッセイ内変動係数およびアッセイ間変動係数は、それぞれ9.7%、18.3%であった。

#### 4-3. カイコの発生に伴う血中ボンピキシン様免疫反応性物質の濃度の変動

上記のRIAにより、カイコの発生に伴う血中のボンピキシン様免疫反応性物質の濃度の変動を調べた。4齢幼虫から、成虫に至るまで1日毎に、血液を採取し、その中に含まれるボンピキシンをAmprep C2カラムにより粗精製し、RIAにより測定した。この粗精製法におけるボンピキシンの回収率は、既知量の $[^{125}\text{I}]$ ボンピキシンIIを加えた血液から、何%の $[^{125}\text{I}]$ ボンピキシンIIが回収されたかにより調べた。5齢0日目、5齢3日目、ワンダリング中の5齢幼虫、蛹0日目、蛹5日目、成虫0日目の血液を用いて、ボンピキシンの回収率を調べたところ、ほとんど変動はなかった(54-62%)。それゆえ、回収率は全発生段階においてほぼ一定であると推定した。

カイコ血中のボンピキシン様免疫反応性物質の濃度(RIA units/mlで示す)の発生に伴う変動を図4に示す。数値は、ボンピキシンの回収率による補正をしていない。調べたすべての発生段階においてボンピキシン様免疫反応性物質は血中に存在していた。4齢幼虫と5齢幼虫の摂食期にはその濃度は低くほとんど一定であった。但し、4齢から5齢への脱皮の時(雌)あるいは直前(雄)、また、ワンダリングの前にボンピキシン様免疫反応性物質の濃度の小さな上昇がみられた。ワンダリングの後に濃度は上がる傾向を見せ始め、雄ではワンダリング開始後3日目、

雌では4日目に急に上昇した。蛹化後1日目には雌雄ともに再び急上昇した。その後の濃度の変動の様子は雌雄で非常に異なる。雄では、高濃度(約5 RIA units/ml)が蛹化後6日目まで維持され、その後急に低下した。以後3日間低い値を保ち、成虫の羽化当日に再び上昇した。雌では、蛹化後のボンピキシン様免疫反応性物質の濃度は雄のその2~3倍高い値であった。濃度の変動のパターンは本質的には雄と同じであるが、蛹化後の濃度の上昇は、二段階的に起こっているように見える。

#### 4-4. RIAと生物検定の比較

同一の血液サンプルについて、RIAにより測定したボンピキシン様免疫反応性物質の量と、エリサン除脳蛹を用いた生物検定により調べたボンピキシンの生物学的活性量とを比較した。カイコのいくつかの発生段階について比較した結果を表2に示す。

5齢脱皮直後とワンダリング中の5齢幼虫については、RIAによる測定値は得られたが、ボンピキシンの活性は検出されなかった(雄についてのみ調べた。検出限界 2 *Samia* units/ml)。以後の発生段階については、ボンピキシンの生物学的活性と免疫反応性ともに検出可能であった。そして、免疫反応性物質の量の多少と、生物学的活性の量の多少は、おおむね平行関係を示した。しかし、二つのアッセイ法で得られた結果の比(RIA units/*Samia* units)をとってみると、サンプル毎に異なっていた。特に、雌蛹化後5日目、雌成虫においては、他のサンプルに比べその比の値は低かった。これは、生物学的活性はもつが、この抗体には反応しない物質の存在を示唆していると考えられる。

#### 4-5. カイコ血中に存在するボンピキシンII抗体反応性物質のイムノブロットングによる検出

上述のように、ボンピキシンII抗体が認識する成分はボンピキシンだけではないので、RIAにより測定した血中の免疫反応性物質の濃度の変動が本当にボンピキシンの濃度変動を反映しているかどうかについては疑問が残る。そこで、血液中の免疫反応性物質をイムノブロッティングにより検出、吟味することを試みた。

Amprep C2カラムを通した血液サンプルは直接電気泳動で展開するにはタンパク量が多すぎたので、免疫反応性物質を免疫沈降により濃縮し、これを電気泳動により展開することとした。

蛹化当日から成虫羽化当日まで1日毎に血液を集め、C2カラムで処理した後、ボンピキシンII抗体を用いた免疫沈降物を作製した。これをTricine-SDS-PAGEで展開し、ボンピキシンII抗体を用いてイムノブロッティングを行なった(図5)。雄では、すべての発生段階において見かけの分子量8.0kDの成分が検出されたが、蛹化当日、蛹化後1日目、成虫羽化当日においては、6.5kD(ボンピキシンと考えられる)と8.0kDの二つの成分が検出された。特に、羽化当日の成虫については、6.5kDの成分の方が主要な成分であった。雌では、調べたすべての発生段階において、8.0kDの成分しか検出されなかった。

雄成虫羽化当日の血液中にみられた6.5kDの成分がいつ頃から血中に出現するようになるのかを調べるために、より細かいサンプリングを行なった(図6)。羽化前日、羽化直前(1時間以内と思われる)、羽化直後(20分以内)、羽化後3~4時間という4点をとって調べたところ、羽化直後より前には、6.5kDの成分は検出されなかったが、羽化後3~4時間になると検出されるようになった。このことから、この6.5kDの成分の分泌時期は羽化直後から3~4時間の間であると考えられる。

#### 4-6. 8K-IRMの性質の吟味

上述のように、蛹期から成虫期にかけてカイコ血中に存在する主要な免疫反応性物質は8.0kDの成分であった。この8.0kDの成分がプロボンピ

キシシではないかということは容易に予測されることである。そこで、その濃度が最も高くなる蛹化後5日目の雌カイコの血液を用いて、Cペプチド抗体を用いた免疫沈降と、それに続くボンビキシシII抗体によるイムノプロットティングを行なった(図7)。5齢幼虫脳抽出物については、Cペプチド抗体による免疫沈降物中に8.0kDの成分が検出されているにも関わらず(レーン2)、血液サンプルについては、これに相当する8.0kDの成分は検出されなかった(レーン4)。

また、この8K-IRMがもしプロボンビキシシであるならば、Cペプチド部分の両側にリジン残基をもっていると考えられる。そこで、リジン残基のC末端側でペプチド結合を特異的に切断するリシルエンドペプチダーゼによりこの8K-IRMを消化することにより、バンドの位置がボンビキシシの電気泳動上の位置である約6.5kDにシフトするかどうかを調べた。8K-IRMをPVDF膜から抽出し、リシルエンドペプチダーゼによる消化の後、Tricine-SDS-PAGEにより展開し、ボンビキシシII抗体によるイムノプロットティングを行なった(図8)。その結果リシルエンドペプチダーゼで処理すると8K-IRMのバンドが消失することが明らかとなった(レーン2)。しかし、6.5kD付近には、バンドは検出されなかった。



## 5. 考察

### 5-1 カイコ脳内に存在するボンピキシンII抗体の認識する成分

ボンピキシンII抗体結合ビーズにより部分精製ボンピキシン標品を処理すると、その上清中のボンピキシン活性が低下すること、また、そのビーズから実際にボンピキシン活性が回収されることから、ボンピキシンII抗体は生物活性を持ったボンピキシンを認識することが明らかとなった。本研究の主要部分であるボンピキシンRIAの開発、およびそれを利用した血中ボンピキシン免疫反応性物質濃度の測定は、この抗体のこの重要な性質により可能となった。しかし、カイコ脳抽出物を用いたイムノブロットイングの結果、カイコ脳内にはボンピキシンII抗体によって認識される二種類の成分が存在することが明らかとなった(図2)。一つは見かけの分子量約6.5kDの成分であり、これは精製ボンピキシンIIと全く同じ位置に泳動されることから、成熟ボンピキシン分子であると考えられる。もう一つは、見かけの分子量約8.0kDの成分である。ボンピキシンは、cDNA、遺伝子の構造解析の結果から、前駆体であるプロボンピキシンがプロセッシングを受けて生ずると考えられており(1,12,14)、プロボンピキシンの分子量が約8kDであることを考慮すると、この8.0kDの成分はプロボンピキシンではないかと推測された。そこでこの8.0kDの成分がCペプチド抗体(材料と方法参照)と反応するかどうかを調べた。Cペプチド抗体をプローブとしてカイコ脳抽出物のイムノブロットイングを行なったところ、8.0kDの成分は検出されなかったが(データ示さず)、Cペプチド抗体とカイコ脳抽出物とをインキュベートして得られた免疫沈降物をTricine-SDS-PAGEで展開した後ボンピキシンII抗体によりイムノブロットイングを行なうと、8.0kDの成分が検出された。すなわち、8.0kDの成分はCペプチド抗体に認識されるエピトープをもっていることが明らかとなり、この分子は予想通りプロボンピキシンであると結論された。

こうして検出された8.0kD(プロボンピキシン)のバンドのシグナル強

度は、等量の脳由来抽出物をポンピキシン II 抗体とインキュベートして得られた免疫沈降物由来のそれと比較して弱かった (図 2 B)。このことは、C ペプチド抗体のプロポンピキシンに対するアフィニティーがポンピキシン II 抗体のそれよりも弱いという可能性、あるいは C ペプチド抗体が、多数の分子種が存在すると考えられるプロポンピキシンのうちの一部だけしか認識しないという可能性を示唆している。多数のポンピキシン遺伝子を比較した場合、C ペプチド部分の塩基配列保存性さらにその推測アミノ酸配列の保存性は、A 鎖、B 鎖に比べて低いこと (11, 14) から、後者の可能性が高いと考えられる。

さらに、ポンピキシン II 抗体の認識特異性に関して考慮しなければならない点は、ポンピキシンには多くの分子種が存在するという点である。精製ポンピキシンの構造解析、及び、cDNA、遺伝子の構造解析により、ポンピキシンにはアミノ酸配列がわずかに異なる分子種が多数存在することが明らかとなっている (1, 12, 13, 14, 16, 23, 24, および近藤ら、未発表データ)。それゆえ、ポンピキシン II 抗体が認識するのは、ポンピキシン II という一分子種だけではなく、この抗体のポンピキシン II 分子上の認識部位と類似の構造をもった一群のポンピキシン分子種であろうと推測される。このことは、逆にいえば、ポンピキシン分子種群のうち、ポンピキシン II 抗体の認識部位に相当する部分の構造が大きく異なるポンピキシン分子種は、この抗体により認識されないということになる。実際、部分精製ポンピキシンをポンピキシン II 抗体結合ビーズで処理しても、1/4 の活性が吸収されず (表 1)、ポンピキシン II 抗体がポンピキシン分子種のうちの一部しか認識しないことを示している。

また、同一の血液サンプルについて R I A により測定した免疫学的活性とエリサン除脳蝨生物検定により調べたポンピキシン生物活性との比を調べた結果、発生段階による変動がみられた。このことは、ポンピキシン II 抗体の認識するポンピキシン分子内のエピトープが、ポンピキシン受容体認識部位とは異なっている可能性を示唆している。

しかし、特定のポンピキシン抗体が分子種をどのように認識するかを厳密に特定するには、すべてのポンピキシン分子種を化学的にあるいは

大腸菌等を用いて合成し、それらについてその抗体との反応性を調べなければならない。しかしながら、カイコゲノム中にはボンピキシン遺伝子が30コピー以上も存在するという事（10、および近藤ら、未発表データ）を考慮するとそのアプローチは非現実的である。結局、現時点でボンピキシンII抗体の特異性に関して言及できることは、ボンピキシンII抗体はボンピキシン、及び、プロボンピキシンの両方を認識することであり、それらのうちどの分子種を認識するかということまでは結論できない。

#### 5-2 発生に伴うボンピキシンの分泌動態

血中のボンピキシン濃度を測定しようとする場合、ボンピキシンに対し特異的な抗体を作製し、それを用いた免疫測定法を開発すればよいと考えられる。しかし、成熟ボンピキシン分子とプロボンピキシンは立体構造が非常によく似ていることが予想され、ボンピキシンだけを認識するような特異性の高い抗体を得ることは非常に困難であると思われる。事実、化学合成ボンピキシンIIを抗原とし最近作製された9種類の抗ボンピキシンモノクローナル抗体がいずれも、カイコ脳抽出物のイムノブロットイングにおいて、ボンピキシンとプロボンピキシンに対応する2本のバンドを染色するという結果が得られている（小田、三部ら、未発表データ）。このような状況においては、RIAによる定量だけでは不十分であり、イムノブロットイングによって免疫反応性物質中のボンピキシンとプロボンピキシンを分別することが要求される。ただし、イムノブロットイング検出系は、RIAよりも検出感度が低く、目的の成分を濃縮する必要があり、簡便に血中ホルモン濃度を測定できる系とは言い難い。しかし、これら二つの検出系により得られた結果を総合することで、真の意味でのボンピキシンの分泌動態が明らかにされると考えられる。

そこで、まずはボンピキシンの分泌動態を調べる第一段階として、ボ

ンピキシン II 抗体を用いた R I A を開発し、それによって、カイコの発生をおって血中のボンピキシン免疫反応性物質の濃度を測定することにした。部分精製ボンピキシンを標準ホルモンとして用いて標準曲線を描いたところ、0.2 から 8 *Samia* units/tube の範囲で、logit B/B<sub>0</sub> との間には直線関係が得られた (図 3)。このように、エリサン除脳蛹生物検定よりも検出感度が高く、より簡便な R I A 系が確立できた。この R I A を用いて、カイコの 4 齢幼虫から成虫に至るまでの血中の免疫反応性物質の濃度を測定した (図 4)。その結果、発生段階や雌雄の違いによってボンピキシン免疫反応性物質の濃度は大きく変動することが明らかになった。

次に、各発生段階での血中に存在する主要な免疫反応性物質を検出するために、イムノブロットィングを試みた (図 5)。本研究においては、イムノブロットィングによるボンピキシン様免疫反応性物質の検出を蛹期から成虫期にかけてしか行なっていない。これは、5 齢 0 日、5 齢 3 日、ワンダリング中の幼虫について予備的に調べたところ、血中の免疫反応性物質の濃度が低く、1 ml 相当の血液サンプルからは検出できなかったためである。幼虫期の血中に存在する免疫反応性物質が本当にボンピキシンであるかどうかは今後明らかにされるべきであると思われる。蛹期から成虫期にかけては、雌雄ともに 8.0 kD の成分が主要な免疫反応性物質であり、雄蛹 0 日、1 日と成虫 0 日においてのみ、ボンピキシンと思われる成分も検出された。特に雄成虫 0 日では、ボンピキシンと思われる成分の方が、8.0 kD の成分よりも多く、主要な成分であった。また、この雄成虫でみられたボンピキシンがいつ頃から血中に存在しているかをさらに細かい時間間隔でのサンプリングを行なって調べたところ、羽化直後から羽化後 3 ~ 4 時間の間に血中に分泌されるものと推測された。

### 5 - 3 カイコ血中に存在する 8K-IRM の性質

血中 8K-IRM の濃度が最も高くなるのは、蛹化後 5 日目の雌においてで

あったので、この時期の血液を用いて8K-IRMの性質について調べることにした。そして、8K-IRMはプロボンピキシンであるという仮説のもとに、Cペプチド抗体、リシルエンドペプチダーゼを用いた実験を行なった。

上述したカイコ脳内の8.0kDの成分について調べたときと同様に、Cペプチド抗体による免疫沈降とそれに続くボンピキシンII抗体によるイムノプロットングを行なったところ、血液サンプルについては、8.0kDのバンドが検出されなかった(図7)。従って、血中の8K-IRMは脳から回収される8.0kDの成分とは異なり、Cペプチド抗体と反応しないか、あるいは仮に反応するにしても、そのアフィニティーがかなり低いものと考えられる。

次に、8K-IRMをリシルエンドペプチダーゼで消化する実験を行なった。現在までに明らかにされているボンピキシン遺伝子の塩基配列(1,12,14、および近藤ら、未発表データ)から考えて、もし8K-IRMがプロボンピキシンであるならば、Cペプチド部分の両側にリジン残基が存在すると考えられる。そこでこのペプチドをリジン残基のC末端側のペプチド結合を特異的に切断するリシルエンドペプチダーゼで処理すれば、Cペプチドは除かれ、B鎖については、そのC末端にリジン残基が付け加わった形となり、A鎖については、分子種により、そのN末端にアルギニン残基が付け加わるか、あるいは本来のA鎖のままかのいずれかとなるはずである。いずれにしても、分子量はボンピキシンのそれに近づくはずである。

さて、実際に8K-IRMをリシルエンドペプチダーゼで処理し、ボンピキシンII抗体でイムノプロットングを行なったところ、8.0kDのバンドは消失したが、ボンピキシンの位置にバンドは検出されなかった(図8、レーン2)。ボンピキシンに相当する位置にバンドがみられなかったことの原因は特定できないが、8K-IRMはプロボンピキシンとは全く別のものであるという可能性の他に、B鎖、A鎖に余分に付加したアミノ酸残基の影響で抗体に認識されなくなったという可能性も考えられる。この実験からは8K-IRM分子内にはリジン残基が存在することしか結論できない。ただし、ボンピキシンC2遺伝子から予測されるボンピキシンを除い

ては、ボンピキシンのA鎖、B鎖にはリジン残基が存在しないので(1, 12, 14, および近藤ら、未発表データ)、8K-IRMがボンピキシンC2遺伝子由来のものである可能性は残るとしても、8K-IRMがプロボンピキシンである可能性はきわめて低いものと考えられる。強いていえば、8K-IRMがA、B鎖間のS-S架橋の行なわれていないプロボンピキシンであると仮定すれば、リシルエンドペプチダーゼ処理後のイムノブロットングで全くバンドが検出されなくなってしまう事実を理解することはできる。しかし、この仮定は、インスリンの生合成過程の現在の知見からは妥当性の低いものといわねばなるまい。

いずれにしても上記の実験は、血中8K-IRMがプロボンピキシンであるという可能性に対して否定的な結果を与えたが、その性質を特定することはできなかった。しかし、たまたま分子量はほぼ同じ値をもつものの、血中8K-IRMは、脳内8kD成分とは性質の異なる分子であることは明らかである。カイコ脳から回収されるボンピキシン分子はすべて約5kDの分子量をもつ(21)。そもそもボンピキシンはエリサンの前胸腺刺激活性を指標にして捕えられたものであり、その生物活性は欠くがボンピキシン抗体とは反応性をもつ8kDの新しいボンピキシファミリー分子がここに捕えられているのかもしれない。この8K-IRMのカイコの発生に伴う血中出現様式は非常に興味深く、将来その正体の解明が待たれるところである。

#### 5-4 ボンピキシン及び8K-IRMの機能

幼虫期の血中に存在するボンピキシン様免疫反応性物質については、その主要な成分がボンピキシンと8K-IRMのいずれであるのか明らかではないが、いずれにしても、4齢幼虫期の間はその血中濃度に顕著なピークは見られなかった。一方、カイコ血中エクダイソンの変動パターンは4齢から5齢への脱皮の時に鋭いピークが報告されており(3)、ボンピキシン様免疫反応性物質の変動の様子とは大きく異なっている。また、ワンダリング以後の前蛹期においても、ボンピキシン様免疫反応性物質

の濃度の上昇には、エクダイソンにおける鋭いピーク(3)に相当する変動は見出せない。このようにボンピキシン様免疫反応性物質の濃度の変動の様子と、エクダイソンの濃度の変動の様子との間には直接の相関関係は見られない。従って、ボンピキシンおよび8K-IRMはカイコにおいて前胸腺刺激ホルモンとして機能しているとは考え難い。実際、ボンピキシンについては、カイコにおいて前胸腺刺激活性がみられないということがすでに示されている(9,32)。また、Kiriishi *et al.*(1992)も、*in vitro*ではボンピキシンはカイコの前胸腺を刺激しエクダイソンの合成、分泌をわずかに増加させるものの、ボンピキシンはカイコの前胸腺刺激ホルモンとはみなせないと結論している(15)。しかし、8K-IRMがカイコにおいて前胸腺刺激活性をもつかどうかは今後確かめられねばならない問題であろう。

R I Aによる定量では、ボンピキシン様免疫反応性物質の濃度が高くなるのは、蛹-成虫発生期においてであった。また、イムノブロッティングの結果では、この時期の血中に存在する主要なボンピキシン様免疫反応性物質はボンピキシンではなくて8K-IRMであり、しかも、その濃度は雌において雄におけるよりも高かった。以前の報告によると、高濃度の脳ホルモン(エリサン除脳蛹において前胸腺刺激活性を示す)が蛹-成虫発生過程にある雌カイコや羽化したての雌カイコの胸腹部において検出されている(7,26)。ボンピキシンII抗体に認識されないボンピキシン分子種がこの時期血中に増えてくるという可能性が示唆されているが(表2)、8K-IRMが上記の報告にある脳ホルモン活性の少なくとも一部に寄与している可能性も考えられる。今後、8K-IRMを精製して、そのことを確かめなければならないと思われる。また、Fugo *et al.*(1987)が報告した羽化1日前のカイコの卵巣や産下された直後の卵中のボンピキシン活性(4)が、本当にボンピキシンであるのか、8K-IRMであるのかも今後確かめるべきであると思われる。筆者の予備的な実験の結果では、蛹化後5-6日のカイコの卵巣抽出物中にボンピキシンII抗体に反応する8.0kDの成分が検出されている。このことを考えると、Fugoらの報告した卵巣中のボンピキシン活性が8K-IRMによるものである可能性も考えら

れる。今後、ボンビキシン及び8K-IRMが卵巣の発達などに関与している可能性も検討すべきであると思われる。

卵巣にインスリン様ペプチドが含まれるという例はバッタ *Locusta migratoria*でも報告されている(31)。このインスリン様ペプチドの機能は明らかではないが、系統的に遠く離れたこれら2種の昆虫の間にインスリン様あるいはボンビキシン様ペプチドが卵巣に存在するという共通点がみられるということは、卵巣機能の調節においてインスリンファミリーペプチドが重要な働きをしている可能性を示すものと思われる。また脊椎動物(ラット)においては、インスリンファミリーに属するインスリン様成長因子が、卵巣において発現していることが知られており(例えば文献27)、生殖腺刺激ホルモンの作用を局所的に増強する働きがあることが示唆されている(6)。インスリン様あるいはボンビキシン様ペプチドと卵巣との間に何らかの関係があるということは、動物界に広くみられることであるかも知れない。比較内分泌学的に興味深いことと思われる。

ボンビキシンが雄成虫において血中に分泌されていることが示唆された。その標的器官の候補としてまず考えられるのは精巣ならびに生殖輸管系である。カイコの精子の成熟は、交尾後、精包内で起こるが、この際精子の運動のためのエネルギーを供給する系として、細胞外解糖系およびアルギニン分解カスケードが働くことが知られている(28)。これらの酵素反応は、精巣および生殖輸管系の各組織から分泌された酵素と基質が射精時にはじめて混合され、精包の中で進行するものである。これらの反応のうち細胞外解糖系反応には、グリコーゲンが必要である。実際に生殖輸管系のうちの乳白腺や貯精嚢にグリコーゲンが存在することが知られている(28)。ボンビキシンとインスリンの一次構造上の類似性から機能の類似性を仮定することが許されるならば、ボンビキシンはこの乳白腺や貯精嚢の細胞でのグリコーゲンの合成を調節している可能性が考えられる。

以上のようにボンビキシンや8K-IRMの機能についての研究は、緒に就いたばかりであり、今後の研究が待たれる。本研究で明らかになったボ



ンピキシンの分泌動態のデータを基に、ボンピキシンが実際に分泌されている時期のカイコにボンピキシンに対する抗体を注射してその影響を見る実験や、ボンピキシンの受容体及び標的器官を明らかにする研究を進めていくことが重要であると思われる。

## 6 . 謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始ご指導いただいた溝口明助教授、石崎宏矩教授に感謝致します。カイコの飼育において多大なる御助力をいただいた相馬甲子男元技官、公保郁子技官に御礼申し上げます。共同研究グループの、東京大学農学部農芸化学科鈴木昭憲教授、長澤寛道博士（現、東京大学海洋研究所）、片岡宏誌博士、他同生物有機化学研究室の皆様には、ホルモン標品を分与して頂き、また、有意義な議論を頂き、感謝致します。有益な議論をいただいた動物学第二講座の皆様にも感謝致します。

## 7 . 引用文献

1. Adachi, T., S. Takiya, Y. Suzuki, M. Iwami, A. Kawakami, S.Y. Takahashi, H. Ishizaki, H. Nagasawa and A. Suzuki (1989) cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. J. Biol. Chem., **264**, 7681-7685.
2. Bollenbacher, W. E. and N. A. Granger (1984) Endocrinology of the prothoracicotropic hormone. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 7 (Eds. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), pp. 109-151, Pergamon, Oxford.
3. Calvez, B., M. Hirn and M. De Reggi (1976) Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development. FEBS Lett., **71**, 57-61.
4. Fugo, H., J.H. Chen, M. Nakajima, H. Nagasawa and A. Suzuki (1987) Neurohormones in developing embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: the presence and characteristics of prothoracicotropic hormone-S. J. Insect Physiol., **33**, 243-248.

5. Harrington, M.G. (1990) Elution of protein from gels. *Methods in Enzymol.*, **182**, 488-495.

6. Hsueh, A. J. W., T. A. Bicsak, X. C. Jia, K. D. Dahl, B. C. J. M. Fauser, A. B. Galway, N. Czekala, S. N. Pavlou, H. Papkoff, J. Keene, and I. Boime (1989) Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **45**, 209-277.

7. Ishizaki, H. (1969) Changes in titer of the brain hormone during development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.*, **11**, 1-7.

8. Ishizaki, H. and M. Ichikawa (1967) Purification of the brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biol. Bull.*, **133**, 355-368.

9. Ishizaki, H., A. Mizoguchi, M. Fujishita, A. Suzuki, I. Moriya, H. O'oka, H. Kataoka, A. Isogai, H. Nagasawa, S. Tamura and A. Suzuki (1983) Species specificity of the insect prothoracicotropic hormone (PTTH): the presence of *Bombyx*- and *Samia*-specific PTTHs in the brain of *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.*, **25**, 593-600.

10. Ishizaki, H. and A. Suzuki (1992) Brain secretory peptides of the silkworm *Bombyx mori*: prothoracicotropic hormone and bombyxin. *In Progress in Brain Research*, Vol. 92 (Eds. J. Joose, R.M. Buijs, and F.J.H. Tilders), pp. 1-14. Elsevier

Sci. Publ. B.V., Amsterdam.

11. Iwami, M. (1990) The genes encoding bombyxin, a brain secretory peptide of *Bombyx mori*: structure and expression. In *Molting and Metamorphosis* (Eds. E. Ohnishi and H. Ishizaki), pp. 49-66. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin.

12. Iwami, M., A. Kawakami, H. Ishizaki, S.Y. Takahashi, T. Adachi, Y. Suzuki, H. Nagasawa and A. Suzuki (1989) Cloning of a gene encoding bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori* with prothoracicotropic activity. *Develop. Growth & Differ.*, **31**, 31-37.

13. Jhoti, H., A.N. McLeod, T.L. Blundell, H. Ishizaki, H. Nagasawa and A. Suzuki (1987) Prothoracicotropic hormone has an insulin-like tertiary structure. *FEBS Lett.*, **219**, 419-425.

14. Kawakami, A., M. Iwami, H. Nagasawa, A. Suzuki and H. Ishizaki (1989) Structure and organization of four clustered genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6843-6847.

15. Kiriishi, S., H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Suzuki and S. Sakurai (1992) Comparison of the *in vivo* and *in vitro* effects of bombyxin and prothoracicotropic

hormone on prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. Zool. Sci., 9, 149-155.

16. Maruyama, K., H. Hietter, H. Nagasawa, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki and H. Ishizaki (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.

17. Miyachi, Y., J.L. Vaitukaitis, E. Nieschlag and M.B. Lipsett (1971) Enzymatic radioiodination of gonadotropins. J. Clin. Endocr. Metab., 34, 23-28.

18. Mizoguchi, A. (1990) Immunological approach to synthesis, release, and titre fluctuation of bombyxin and prothoracicotrophic hormone of *Bombyx mori*. In *Molting and Metamorphosis* (Eds. E. Ohnishi and H. Ishizaki), pp. 17-32, Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, and Springer-Verlag, Berlin.

19. Mizoguchi, A., H. Ishizaki, H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, M. Fujino and C. Kitada (1987) A monoclonal antibody against a synthetic fragment of bombyxin (4K-prothoracicotrophic hormone) from the silkworm, *Bombyx mori*: characterization and immunohistochemistry. Mol. Cell. Endocr., 51, 227-235.

20. Mizoguchi A., M. Hatta, S. Satoh, H. Nagasawa, A. Suzuki, and H. Ishizaki

(1990) Developmental change of bombyxin content in the brain of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **36**, 655-664.

21. Nagasawa, H., A. Isogai, A. Suzuki, S. Tamura, and H. Ishizaki (1979) Purification and properties of the prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.*, **21**, 29-38.

22. Nagasawa, H. H. Kataoka, Y. Hori, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, F. Guo, X. Zhong, A. Mizoguchi, M. Fujishita, S.Y. Takahasi, E. Ohnishi and H. Ishizaki (1984) Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocr.*, **53**, 143-152.

23. Nagasawa, H., H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, H. Ishizaki, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara and A. Suzuki (1984) Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: homology with insulin. *Science*, **226**, 1344-1345.

24. Nagasawa, H., H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara, A. Suzuki, S.Y. Takahashi and H. Ishizaki (1986) Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5840-5843.

25. Nagasawa, H., K. Maruyama, B. Sato, H. Hietter, H. Kataoka, A. Isogai,

S. Tamura, H. Ishizaki, T. Semba and A. Suzuki (1988) Structure and synthesis of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. In Peptide Chemistry 1987 (Eds. T. Shiba and S. Sakakibara), pp. 123-126, Protein Research Foundation, Osaka.

26. Nishiitsutsuji-Uwo, J. and M. S. Nishimura (1975) Brain hormone contained in the silkworm body of *Bombyx mori*. *Experientia*, **31**, 1105-1107.

27. Oliver, J. E., T. J. Aitman, J. F. Powell, C. A. Wilson, and N. Clayton (1989) Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology*, **124**, 2671-2679.

28. Osanai, M., T. Aigaki, and H. Kasuga (1987) Arginine degradation cascade as an energy-yielding system for sperm maturation in the spermatophore of the silkworm, *Bombyx mori*. In *New Horizons in Sperm Cell Research* (Ed. H. Mohri), pp. 185-195, Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo/ Gordon and Breach Sci. Publ., New York.

29. Saegusa, H., A. Mizoguchi, H. Kitahora, H. Nagasawa, A. Suzuki, and H. Ishizaki (1992) 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.

30. Schägger, H. and G. von Jagow (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from



1 to 100 kDa. Anal. Biochem., 166, 368-379.

31. Sevala, V. M. and B. G. Loughton (1992) Insulin-like peptides during oogenesis and embryogenesis in *Locusta migratoria*. Invert. Reprod. Devel., 21, 187-191.

32. Suzuki, C. and H. Ishizaki (1986) Prothoracicotropic hormone bioassay: *Bombyx* larva assay. Int. J. Invert. Reprod. Devel., 10, 259-274.

## 8. 図の説明

### 図 1. ボンビキシン II のヨウ素標識

ラクトペルオキシダーゼ法によりヨウ素化反応を行なった後、 $[^{125}\text{I}]$ ボンビキシン II と  $\text{Na}^{125}\text{I}$  とを分離するために、セファデックス G-50 によるゲル濾過を行なった。各フラクションの相対的放射能をプロットしてある。フラクション 14、15 に現れるピークが  $[^{125}\text{I}]$ ボンビキシン II のピーク。

### 図 2. ボンビキシンのイムノブロッティング

(A) カイコ脳抽出物及びボンビキシン II を Tricine-SDS-PAGE により展開し、ボンビキシン II 抗体を用いてイムノブロッティングを行なった。レーン 1 : 5 齢 0 日の幼虫の脳 20 個相当の抽出物。レーン 2 : 20 ng のボンビキシン II。

(B) カイコ脳抽出物をボンビキシン II 抗体あるいは C ペプチド抗体で免疫沈降した後、ボンビキシン II 抗体でイムノブロッティングを行なった。5 齢 0 日の幼虫の脳の抽出物をボンビキシン II 抗体と (レーン 1) あるいは、C ペプチド抗体と (レーン 2) インキュベートし、それぞれに対する免疫反応性物質を二次抗体を用いて沈殿させ、Tricine-SDS-PAGE で展開した。その後両方のレーンともボンビキシン II 抗体でイムノブロッティングを行なった。分子量約 14kD 以上のシグナルは、免疫沈降に用いた抗体に由来するものである。

### 図 3. logit-log plot により直線化したボンビキシン R I A の標準曲線

標準ホルモンとして、段階希釈した部分精製ボンビキシンを用いた。標準ホルモンの量は Samia unit で表してある。B/B<sub>0</sub> : 最大結合に対する抗体に結合した放射能の比率。logit B/B<sub>0</sub> =  $\ln B/B_0 / (1-B/B_0)$

図4. カイコの発生に伴うボンピキシン様免疫反応性物質の血中濃度の変動

横軸は4齢脱皮、5齢脱皮、及び、蛹脱皮からの日数。各点は、3回の測定の平均±標準誤差を示してある。値は、血中ボンピキシンの粗精製法による回収率で補正していない。●と○はそれぞれ雄と雌を表す。E<sub>3/4</sub>:3齢から4齢への脱皮。E<sub>4/5</sub>:4齢から5齢への脱皮。W:ワンダリング。E<sub>L/P</sub>:蛹脱皮。Fは雌を、Mは雄をそれぞれ表す。

図5. カイコの蛹-成虫発生における血中ボンピキシン様免疫反応性物質のイムノプロットティングによる検出

血液サンプル1 mlから、ボンピキシンII抗体により免疫沈降した免疫反応性物質を、Tricine-SDS-PAGEにより展開し、ボンピキシンII抗体でイムノプロットティングを行なった。P0は蛹化後0日を、A0は羽化後0日の成虫を、その他の数字は蛹化後の日数を示す。Bのレーンには、2 head相当(8 *Samia* units)の部分精製ボンピキシンを同様に処理した免疫沈降物を流してある。雌の蛹化後2日目及び3日目のレーンでは、免疫沈降の際生じた非特異的沈殿のため、8.0kDのバンドの強さが実際以上に強くなっている。

図6. 羽化1日前から羽化直後の雄カイコ血中に存在するボンピキシン様免疫反応性物質の検出

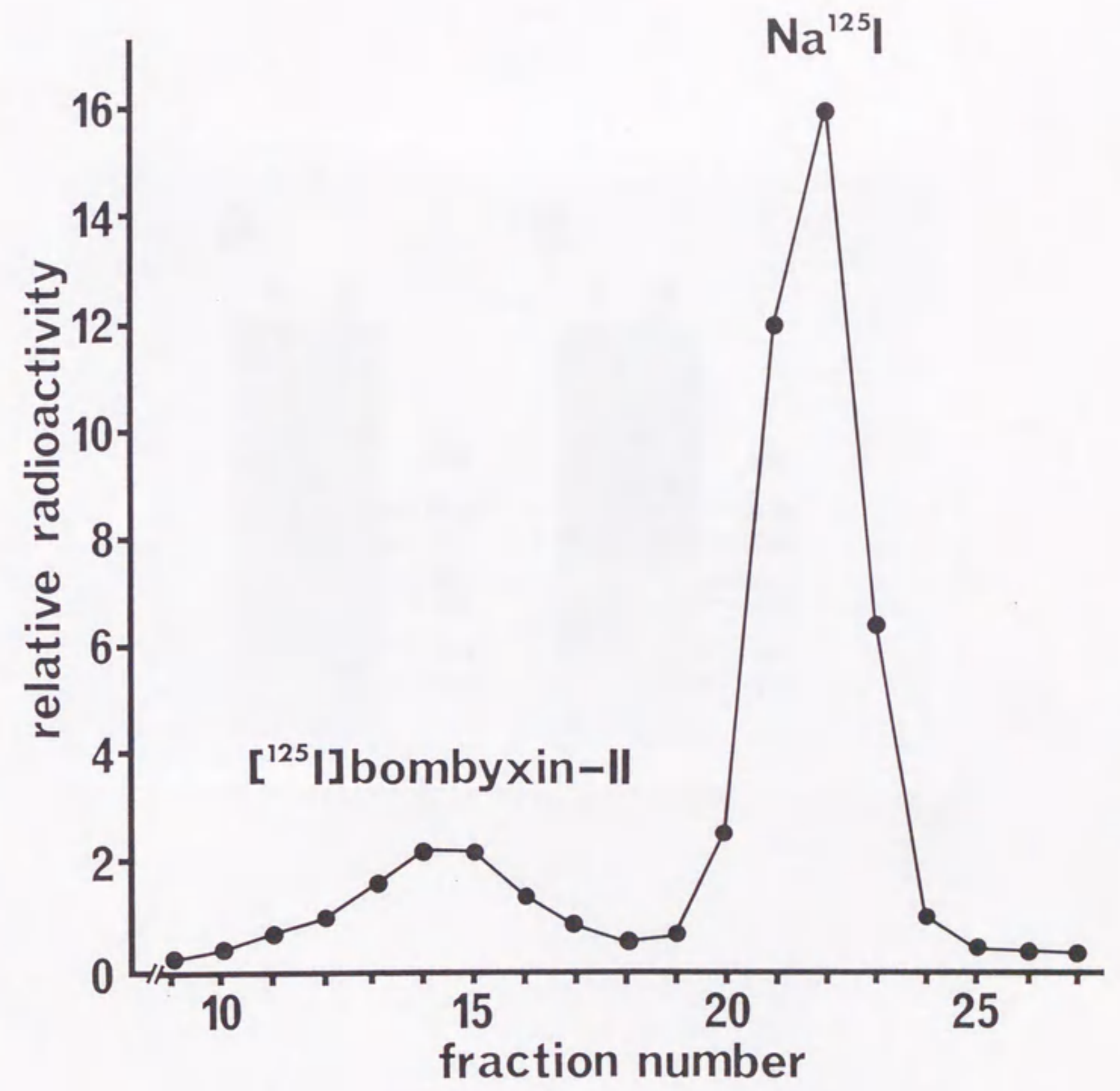
各ステージの雄カイコから集めた血液(レーン当たり1 ml相当)を図4と同様に処理し、ボンピキシンII抗体によりイムノプロットティングを行なった。レーン1:2 head相当の部分精製ボンピキシン。レーン2:羽化1日前。レーン3:羽化直前。レーン4:羽化直後。レーン5:羽化後3~4時間。

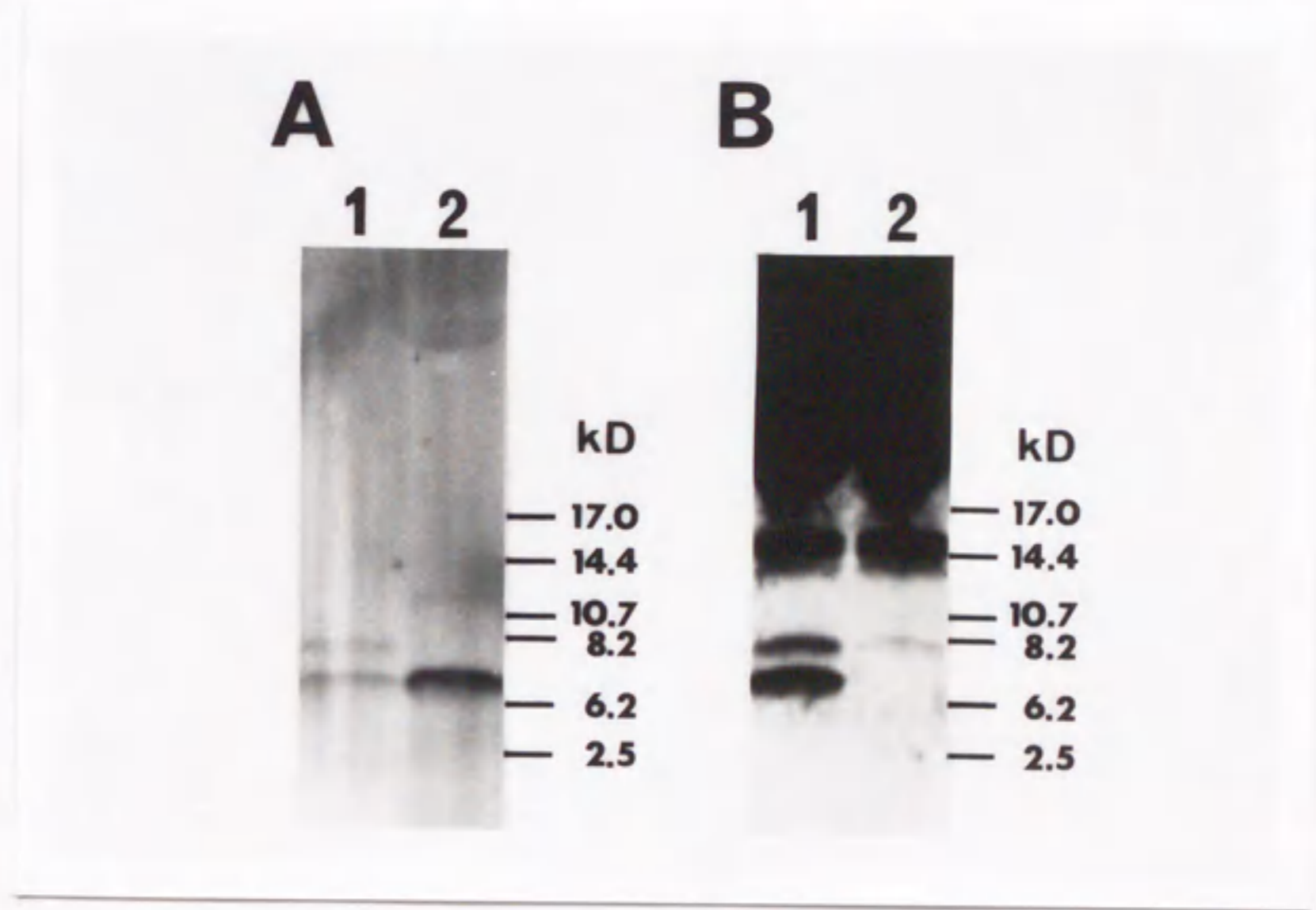
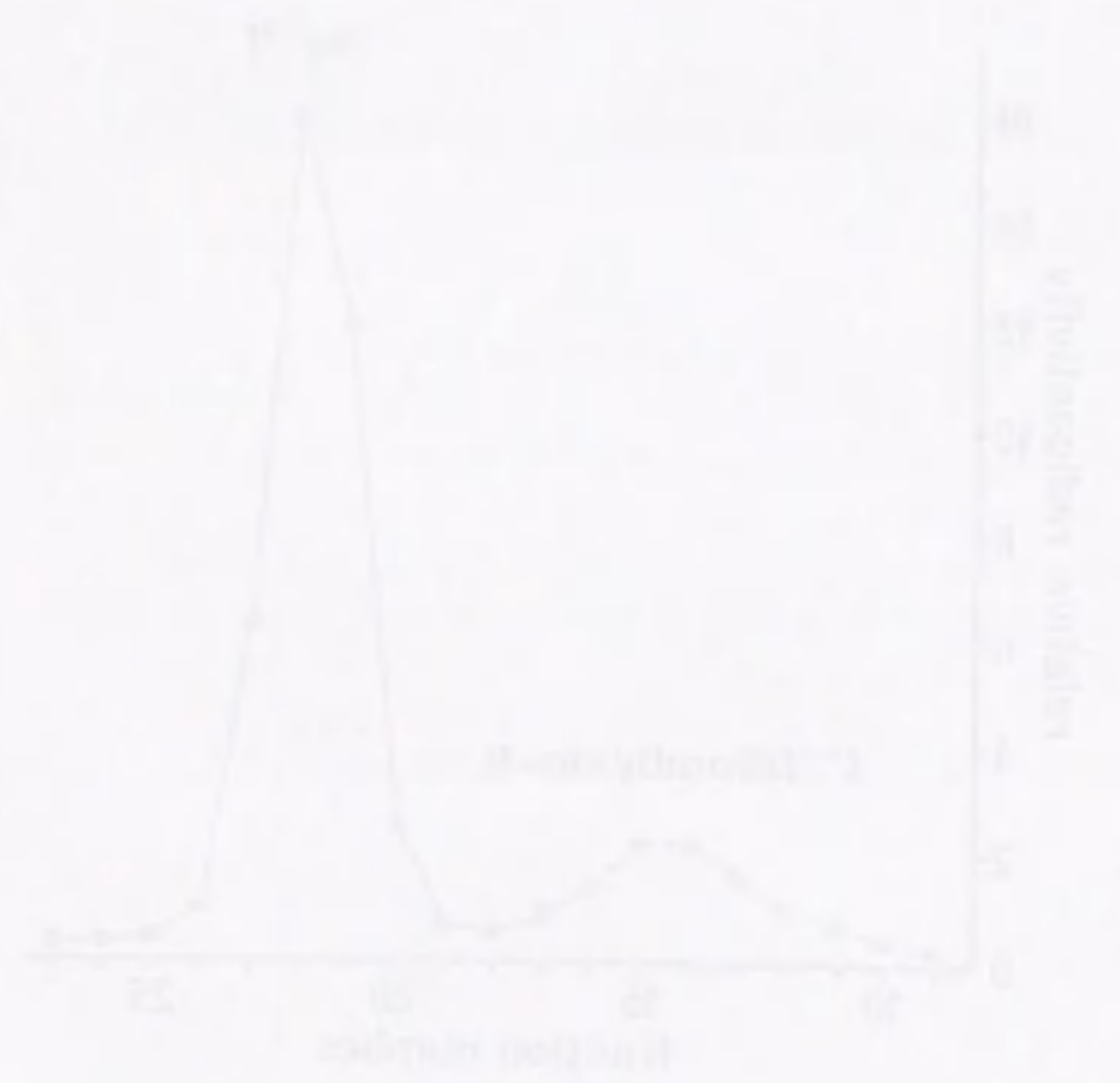
図7. 蛹化後5日目の雌カイコ血中に存在する8K-IRMのCペプチド抗体との反応性

カイコ脳抽出物（5齢0日の幼虫の脳20個相当）あるいは血液サンプル（蛹化後5日目の雌カイコの血液2 ml相当）をボンビキシンII抗体あるいはCペプチド抗体とインキュベートし、各抗体に反応する物質を沈殿させ、Tricine-SDS-PAGEで展開した後、ボンビキシンII抗体でイムノプロットングを行なった。シグナルの検出の際、HRPの発色基質として3,3'-diaminobenzidineを用いた。レーン1、3：それぞれ脳抽出物、血液サンプルをボンビキシンII抗体とインキュベートして生じた免疫沈降物。レーン2、4：それぞれ脳抽出物、血液サンプルをCペプチド抗体とインキュベートして生じた免疫沈降物。

図8. 8K-IRMのリシルエンドペプチダーゼによる消化実験

蛹化後5日目の雌カイコの血液から8K-IRMを精製し、リシルエンドペプチダーゼで処理するか（レーン2）、あるいは未処理のまま（レーン1）Tricine-SDS-PAGEで展開し、ボンビキシンII抗体でイムノプロットングを行なった。レーン1における分子量が17kDよりも大きいいくつかのバンドは、8K-IRMが吸着により失なわれるのを防ぐために加えたBSAに由来するバンドである。





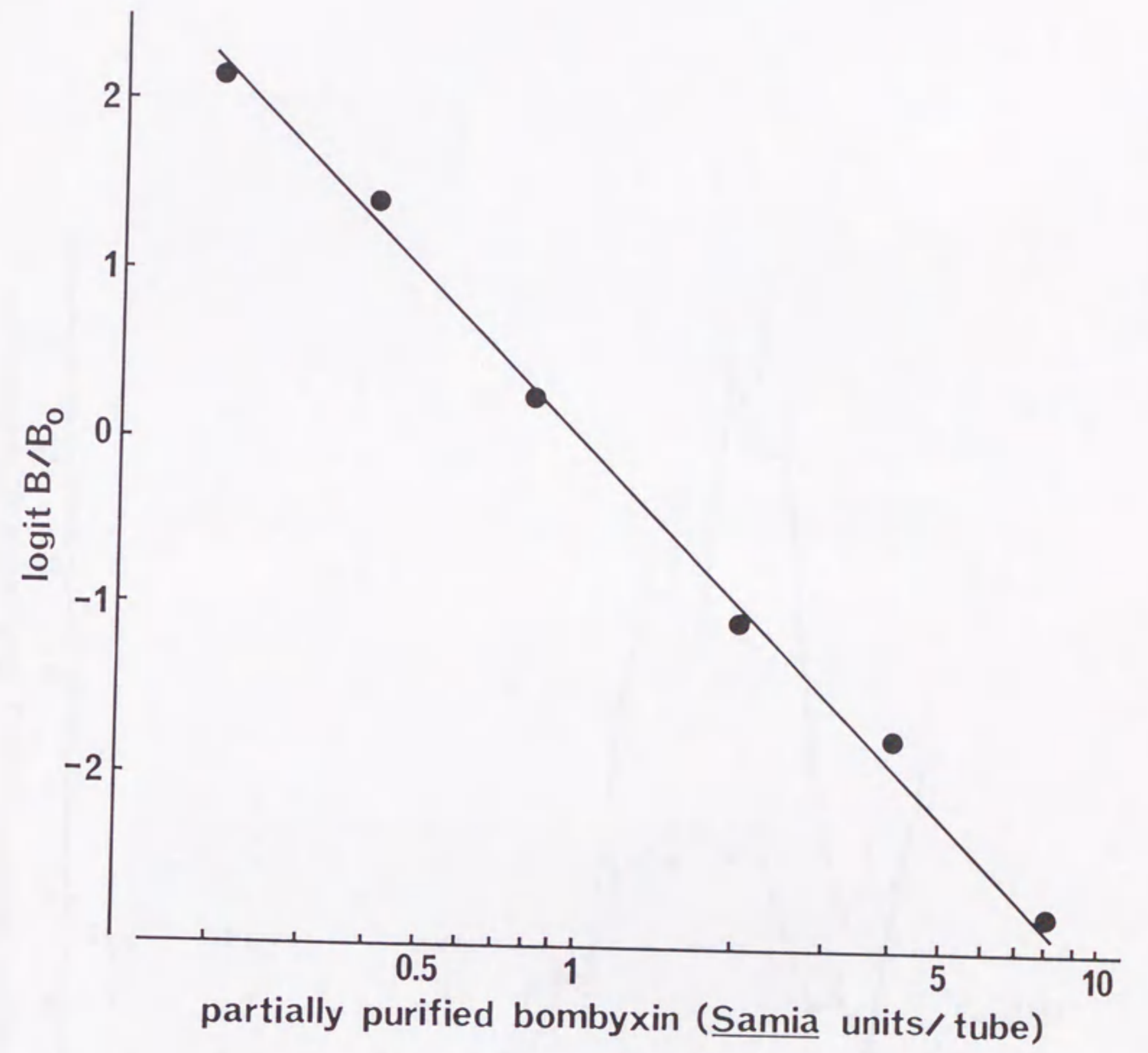
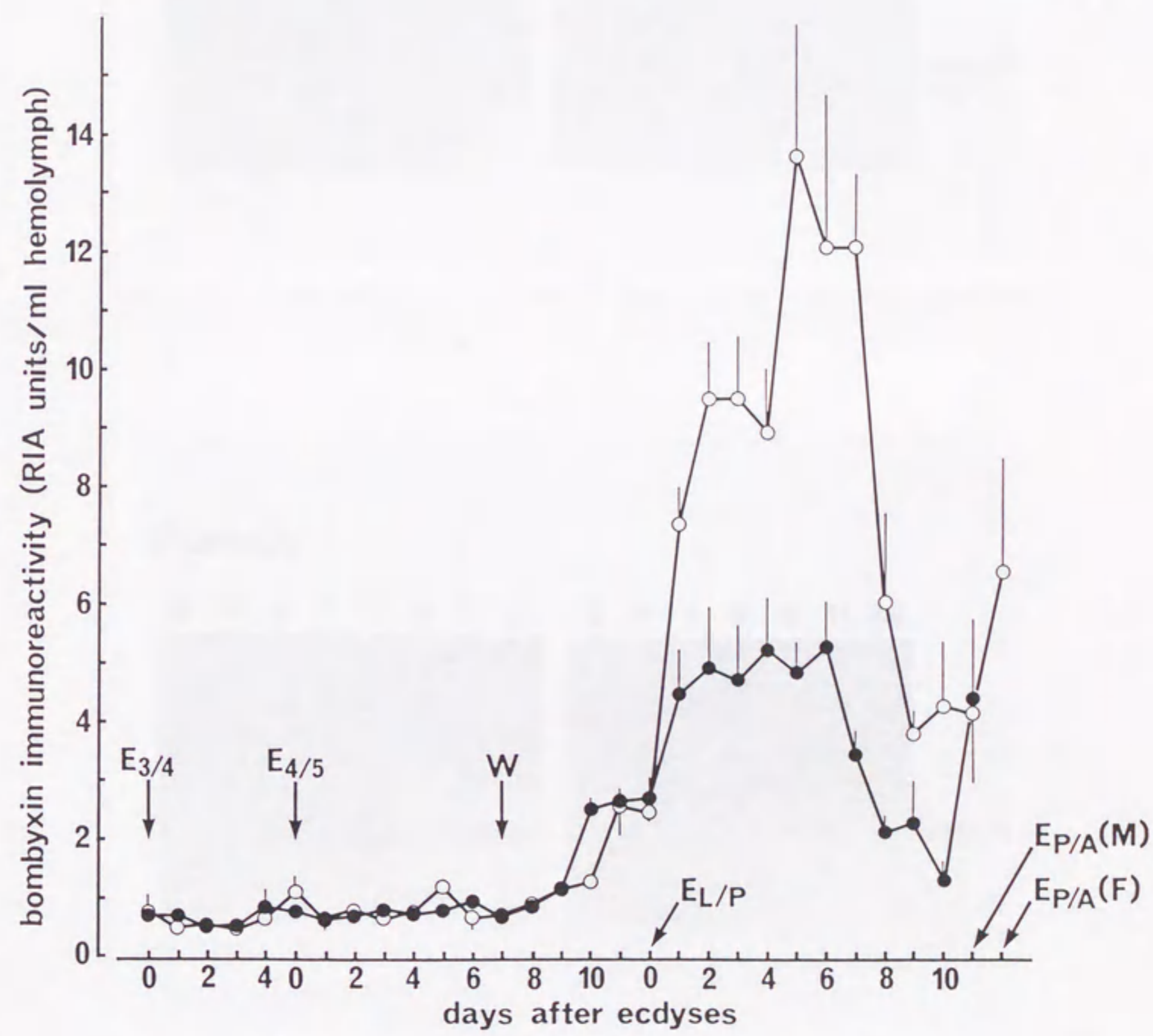
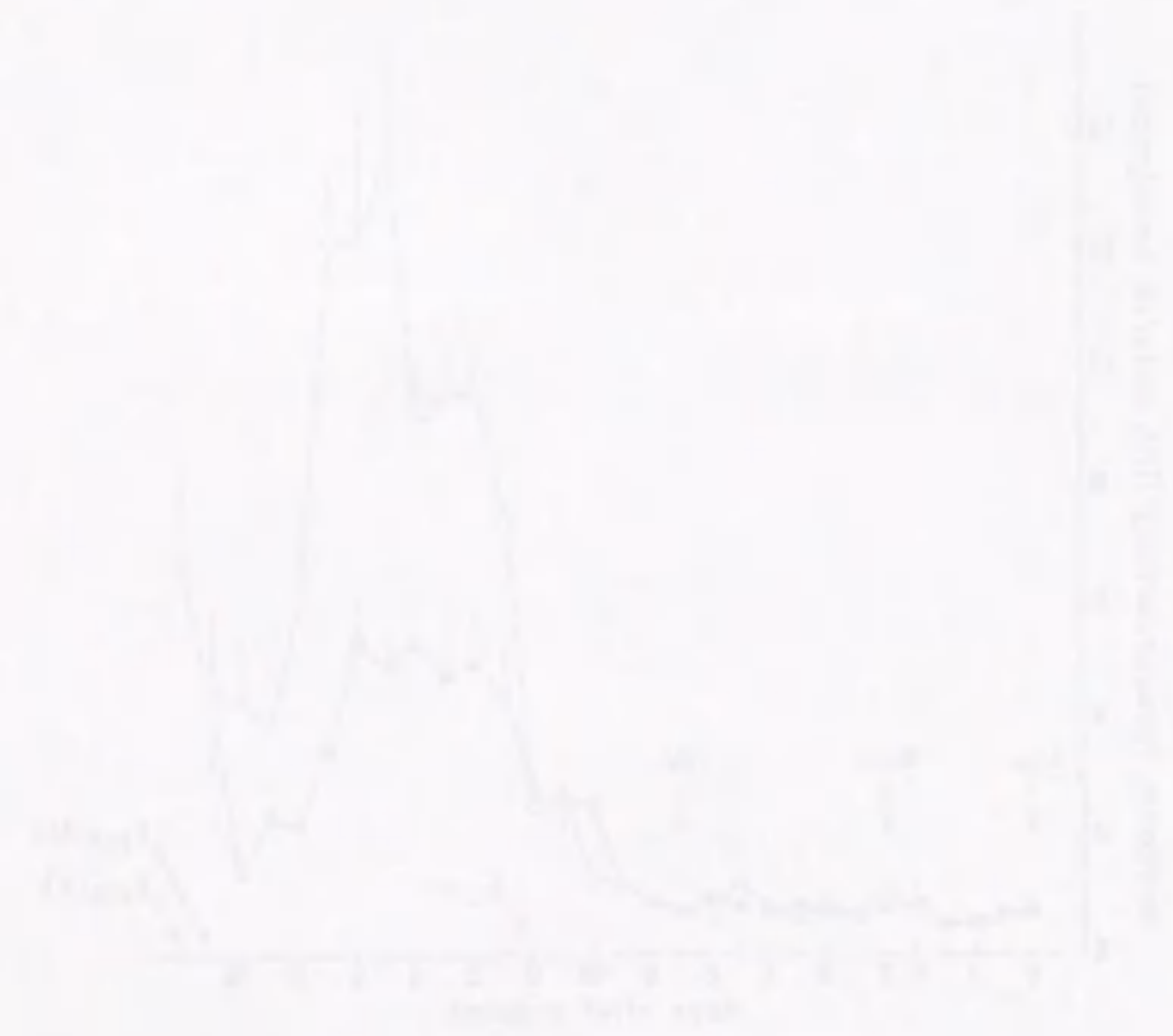


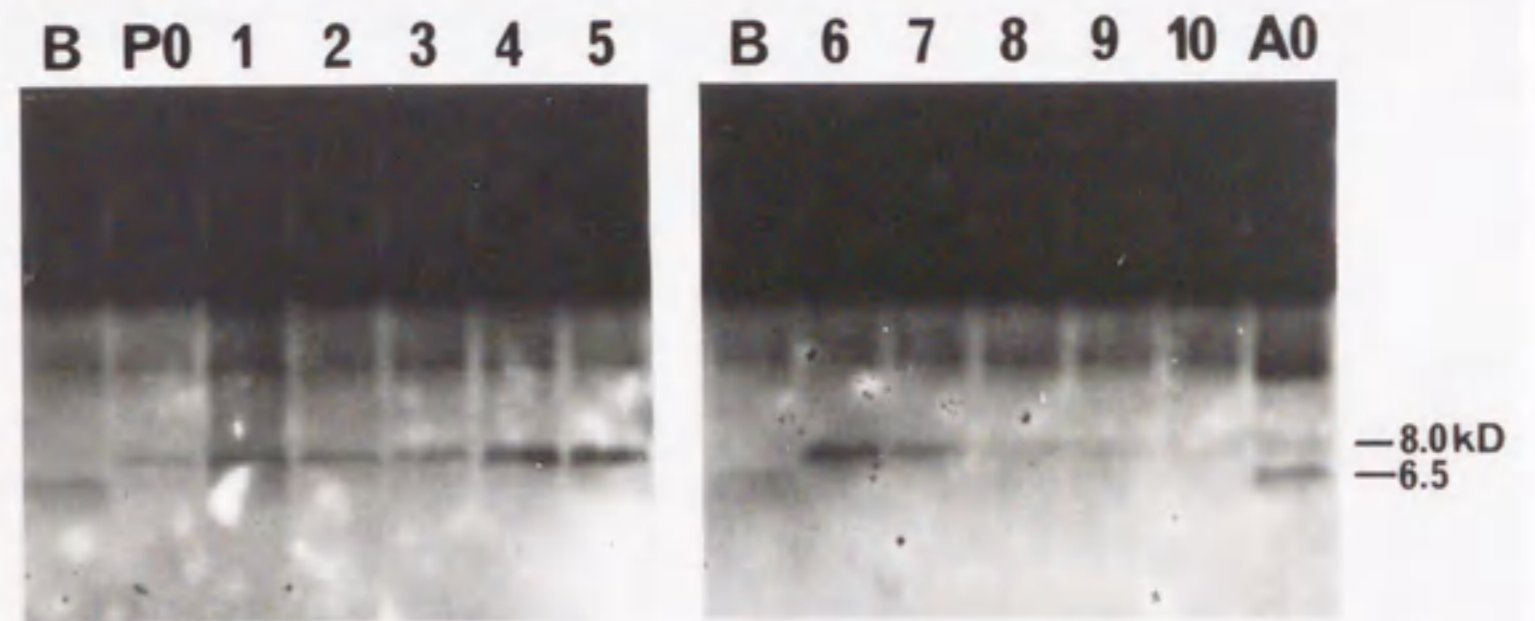
图 4







**Male**



**Female**

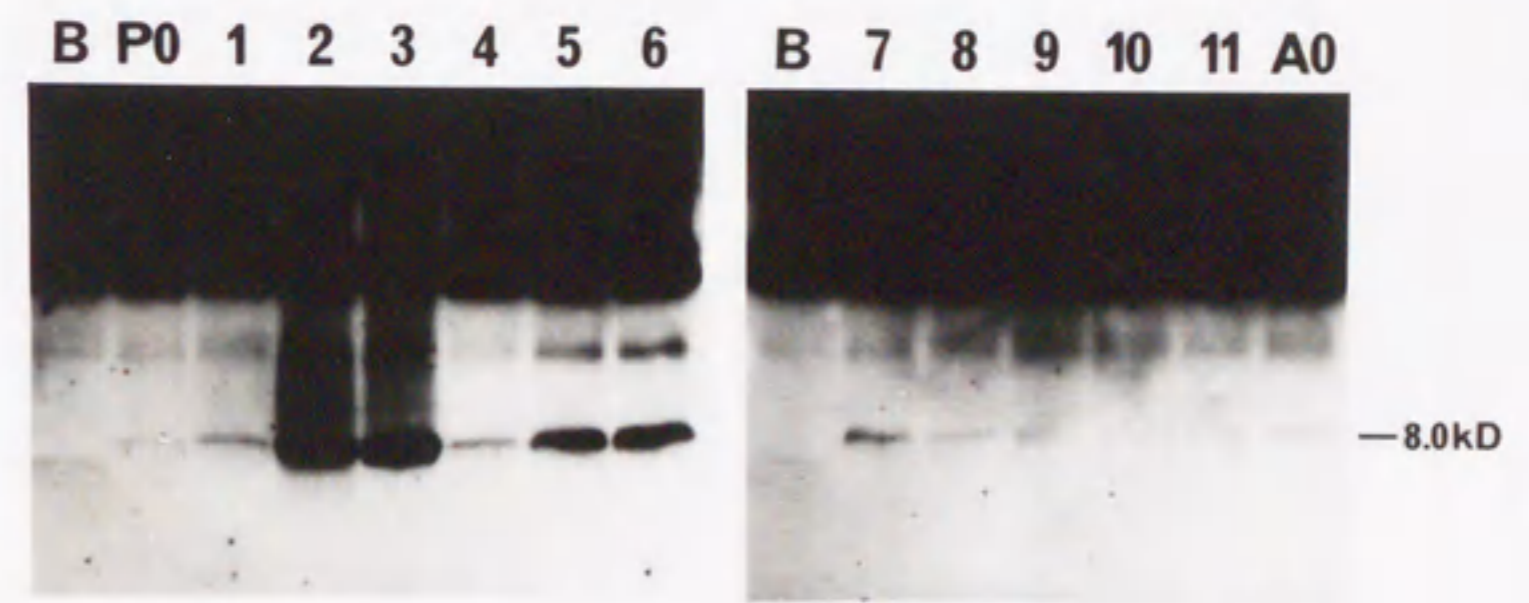


图 6

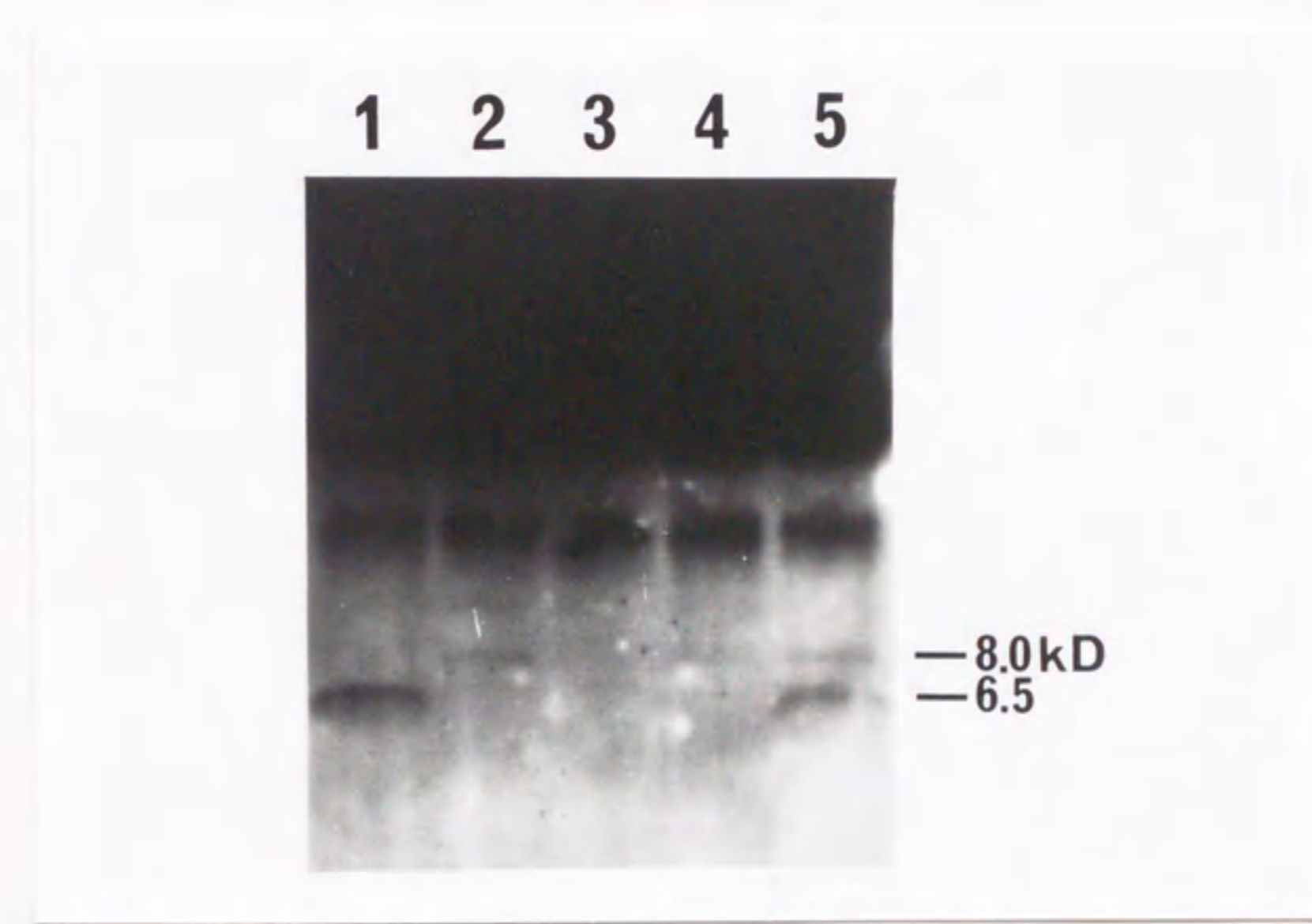


图 7

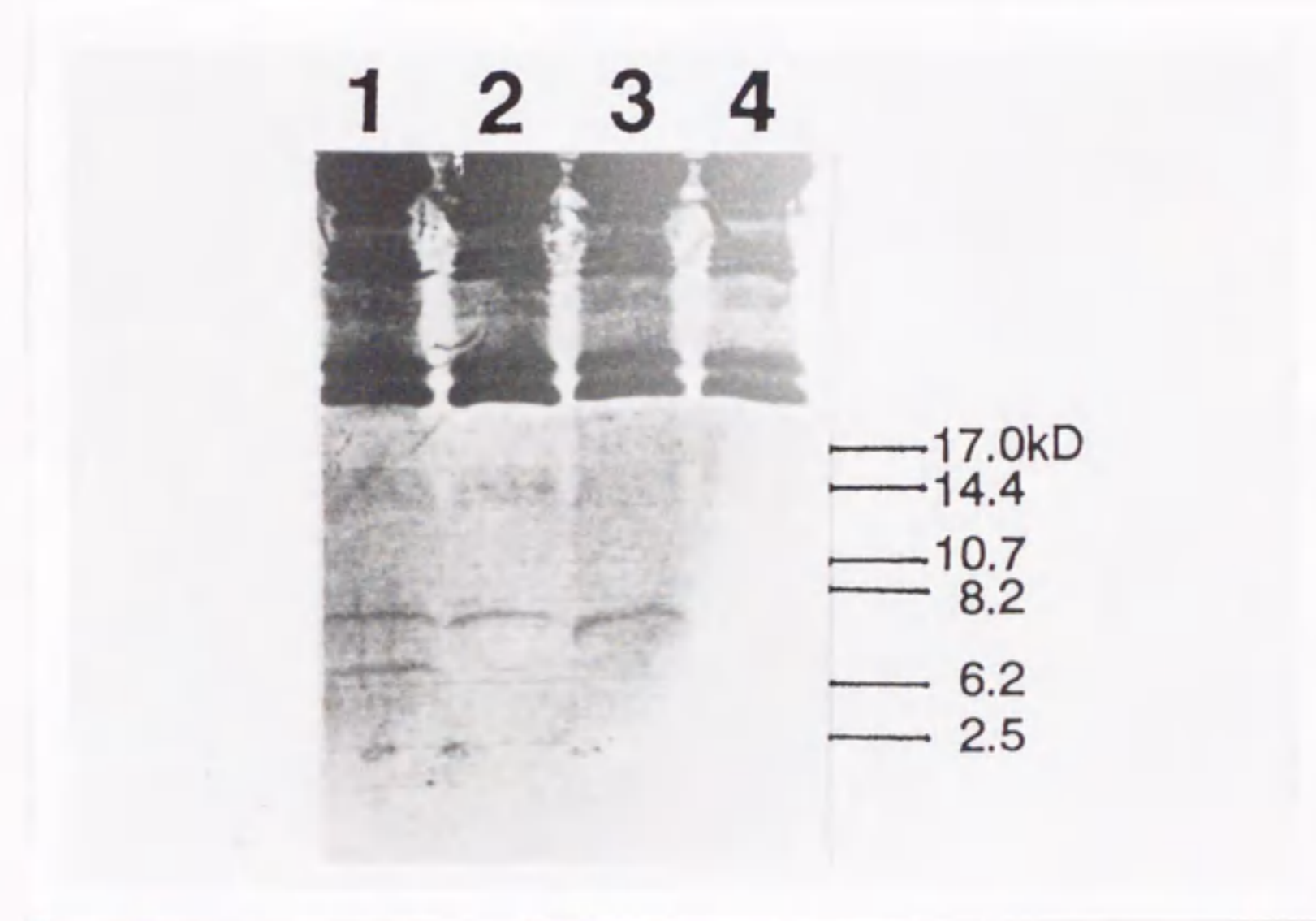




Table 1. Binding of bombyxin bioactivity to bombyxin-II antibody

Sample	Bombyxin titer in <i>Samia</i> units
Mother sample	400
Treated with bombyxin-II antibody	
Sup. (Sup-1)	100
Ppt.	25
Sup-1 + bombyxin-II antibody	
Sup. (Sup-2)	100
Ppt.	N.D.
Treated with mouse IgG	
Sup.	400
Ppt.	N.D.

Partially purified bombyxin with 400 *Samia* unit activity was treated with Immunobead Matrix (Bio-Rad) coupled with bombyxin-II antibody or mouse IgG. Bombyxin titer was determined by *Samia* pupal assay. Sup., supernatant. Ppt., supernatant obtained after treatment of the precipitated beads with KSCN. N.D., bombyxin activity was not detected.

Table 2. Bombyxin titers in the hemolymph from various developmental stages of *Bombyx mori* as determined by both RIA and *Samia* assay

Developmental Stage	Bombyxin titer / ml hemolymph		RIA units/ <i>Samia</i> units
	RIA unit	<i>Samia</i> unit	
Newly ecdysed fifth-instar larva (M)	0.26	N.D.	-
Wandering larva (M)	0.31	N.D.	-
Newly ecdysed pupa (M)	2.51	5	0.50
Newly ecdysed pupa (F)	4.02	10	0.40
Developing adult 5 days after pupal ecdysis (M)	4.11	10	0.41
Developing adult 5 days after pupal ecdysis (F)	10.6	80	0.13
Newly ecdysed adult (M)	3.47	10	0.35
Newly ecdysed adult (F)	13.8	80	0.17

N.D., Bombyxin activity was not detected. Limit of detection was 2 *Samia* units/ml. M, male. F, female.

副論文

1. 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. *Develop. Growth Differ.*, 34, 595-605.