

報告番号 ※ 乙 1001 号

# 主論文の要旨

題名 CHEMICAL STUDIES ON THE SILKWORM DIAPAUSE HORMONE

(家蚕休眠ホルモンの化学的研究)

氏名 磯部 稔

# 主論文の要旨

報告番号 ※ 第 1001 号  
乙

氏名 磯部 稔

家蚕の休眠ホルモン (Diapause Hormone) は、カイコの卵休眠を支配する昆虫ホルモンの一種である。この休眠ホルモンは食道下神経節より血液中に分泌され 標的器管である卵巣に到達し、ある発育段階の非休眠性卵母細胞に作用して休眠卵に変える働きをする。このホルモンの作用を受けた卵はその後産下され、2~3日後にフジネズミ色に着色したまゝ胚発育を停止して越冬し、翌年の春再び発育を開始してカイコとなる。

上述の休眠ホルモンは休眠を誘導する以外に、炭水化物、蛋白質、あるいは卵色に関係する 3-hydroxykynurenine の代謝に関与することが報告されているが、いずれも休眠ホルモンの二次的な現象の説明にすぎない。このホルモンが直接どの様な機構で休眠を誘発するかという基本的な生命現象についての問題を解決するには、このホルモンを抽出・単離してその化学構造を明らかにすることが先決課題である。したがって本研究はこの目的に沿って休眠ホルモンの化学的な研究を行った。

## 第1章 休眠ホルモンの単離

抽出材料はホルモン含量が高く、しかも多量に集めることが可能でなければならぬ。これは蚕種製造会社より毎年100~200万頭の雄の蚕蛾 (通常は廃棄される) の頭部を入手することで解決した。

精製に併う生物検定法は 確実さを得るため 抽出物や精製標品を、非休眠卵を産むような品種の蚕のメスの蛹に直接注射し

実際に産下される卵のうち、休眠卵の発現割合を指標とした。しかし抽出の初段階では得られる粗抽出物を注射すると産卵が悪いか死亡する例が多く、活性の検定が困難であった。この困難は次の抽出法を案出して解決した。即ち最終的には約200万頭の蛾の頭部の粉碎物をアセトンで脱脂し、残渣をメタノール・クロホルム(1:1)で抽出し、次いで抽出物を濃縮後メタノール水分配し、メタノール層をよく水洗した後濃縮・乾固することにより、活性物質を得た。この固体は生物検定において産卵状況も良好で1957年長谷川が15,000頭の蛹から食道下神経節と脳の複合体を適出して得た収率に匹敵し、抽出規模の拡大化に成功した。

次いでこの抽出物(DHEと略)のカラムクロマトグラフによる精製を試みた。抽出操作が複合脂質のそれに酷似しまたシリカゲルTLCで大量のスフィンゴミエリン様の物質を認めためたので複合脂質分離に適する種々のクロマト剤を用いて分離・精製を行ったがいずれもホルモンが失活するか、あるいは低収量で実用にならなかった。セファデックス(G)によるゲル口過も種々試みたがホルモンは水溶液の中ではAggregatesを形成しこのため良好な結果は得られなかった。しかし、1968年使用可能となったセファデックスLH-20を用い有機溶媒系でDHEを展開すると、僅かに溶出物の比活性に優劣が付き活性も定量的に回収できた。この方法を改良し、一回のクロマトグラフで約10倍の比活

性を持つ画分を定量的に得ることができるようにし、さらにこの10倍活性物を約3mの長いカラムで精密に分離し、2つの活性物質、Fraction AとBを得た。

Fraction A, Bはさらにこの方法で精製を進めると、ほぼ完全に失活した。このことから休眠ホルモンは熱や光に対して純度が高くなると安定性を失うことを発見した。従って Fraction A, Bについては低温・暗所で精製せねばならないことになるが、セファテックス LH-20で高い精製能を持つ溶媒系(メタノール-メチレンクロリド-9:1)にこれらが溶けないこと、同じゲル透過による精製の繰返しに限界があることなどから別のクロマト剤を必要としていた。

1971年この要求を満足するクロマト剤、メルコゲル OR 6000(ポリビニルアセテート)が入手可能となり、そのうちOR-6000が低温暗所で好結果を与えたので、Fraction Aについてさらに精製を続行することができた。この方法で2度精製し、遂に活性と一致した1つのピークを示すクロマトグラムを得るに至った。このものを蚕の蛹(品種: N4)1頭当り、6 $\mu$ g注射すると平均産卵数250粒のうち100粒(40%)を休眠卵に誘導することができ、この活性を同じ蚕のホルモンである幼若ホルモン( $C_{19}$ -juvenile hormone)や脱皮ホルモン( $\alpha$ -ecdysone)のそれと比較した結果同程度の活性強度であることが判った。

休眠ホルモンの分子量は、セファテックス LH-20とメルコゲル OR 6000の限界分子量(4000)と分離性能、また DHEの主成分

であるジヒドロスフィンゴミエリン(分子量830)との比較から2000~4000と推定した。Fraction Bについては、単離にはまだ至っていないが、Aと同程度の分子量でAよりやや小さい分子量である。

## 第2章 休眠ホルモンの化学的性質

前章で得た休眠ホルモンの本体と構成成分を解明するため、種々の試薬・酵素を用いてホルモン活性との関連を指標に検討を加えた。

まず休眠ホルモンが純化されても弱酸性あるいは弱塩基性で失活しないことを確認し、この条件下で可能なアシル化、過ヨウ素酸酸化に対しても安定であることを見出した。次いで酵素による失活を検討したが、このホルモンは複合脂質の抽出操作によって得られたにもかかわらず、脂質や糖質分解酵素では失活せず、奇妙なことに蛋白分解酵素で完全に失活した。従って休眠ホルモンはその分子の中に活性に関与するペプチド結合を持つことになる。

この事実に基づいてクロマト精製過程に従って系統的にアミノ酸分析を行った結果、活性物質に由来すると考えられる14種のアミノ酸と2種のアミノ糖を検出することができた。先に得た休眠ホルモンを再度メルコゲルカラムクロマトグラフィーを行い、得られた単1ピークのクロマトグラム中のアミノ酸・アミノ糖の分布について分析した結果、ほぼ均一な組成比であった。

マイクロKBrディスクでの休眠ホルモンの赤外線吸収スペクトルもホルモン分子中に多くのペプチド結合が存在することを支持しているが、まだ見つけていない他の構成成分の存在も示唆している。これらについては得られたホルモンが微量のためまだ解明されていないが、今後微量分析法を開発して解明せねばならない大きな課題である。