

第13号

# 纖維研究所研究報告

2009

財団法人 衣笠会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

# 目次

## 報 文

### 桑葉の抗アミロイド形成活性

亀井加恵子・KHAENGKHAN Parinda・一田昌利・新留徹広・杉本八郎 1

### カイコガの組織特異的に発現している2つのアルギナーゼ遺伝子は、 選択的スプライシングにより生じる

長岡純治・高田祐希・加藤久美子 13

### 微小重力下でのカイコの胚発育

古澤壽治・一田昌利・大森克徳・小谷英治・長岡純治・  
杉村順夫・藤井 博・鈴木ひろみ・嶋津 徹・石岡憲昭 21

### エビガラスズメド唇腺における *Hox* 遺伝子の発現解析

白井孝治・岡 誠・深本花菜・木口憲爾 31

### カイコ体液中の $\beta$ -ラクタマーゼの特性について

加藤靖夫 39

### 繭の紫外線蛍光と色彩値に関する研究

高濱（一田）昌利・昌原美和・伴野 豊 45

### ケナフ繊維の機械的特性－繊維採取の時期および部位による物性変動－

西村明紘・杉村順夫 51

## 解 説

### 色の見えのモード

根岸明子 57

## 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

1. 平成21年度 各種学会口頭発表および各種学会投稿論文 65
2. 平成21年度 講演活動報告 66
3. 平成21年度 財団法人 衣笠会「繊維学術賞」報告 71
4. 寄稿：シルク・サミット2009 in 須坂 に参加して 高橋重三 77

## 桑葉の抗アミロイド形成活性

亀井加恵子\*・KHAENGKHAN Parinda\*・一田昌利\*\*  
新留徹広\*\*\*・杉本八郎\*\*\*

### Antiamyloidogenic activity of mulberry leaf

Kaeko KAMEI\*, Parinda KHAENGKHAN\*, Masatoshi ICHIDA\*\*,  
Tetsuhiro NIIDOME\*\*\* and Hachiro SUGIMOTO\*\*\*

\*Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology,  
Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

\*\*Bioresource Field Science Center, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Ipponki-chou, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan

\*\*\*Department of Neuroscience for Drug Discovery, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Kyoto University, Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

#### Abstract

Mulberry leaf has been reported to possess medicinal properties, including hypoglycemic, hypotensive and diuretic effects. Little is known, however, about its medicinal properties for central nervous system disorders, including Alzheimer's disease. Accumulative evidence suggests that amyloid  $\beta$ -peptide(1-42) composed by 42 residues plays an important role in the etiology of Alzheimer's disease. Here we show that mulberry leaf extract inhibits the amyloid  $\beta$ -peptide(1-42) fibril formation and destabilizes amyloid  $\beta$ -peptide(1-42) fibril. Mulberry leaf extract protected hippocampal neurons against amyloid  $\beta$ -peptide(1-42)-induced cell death in a concentration-dependent manner. These results suggest that mulberry leaf extract provides a viable treatment for Alzheimer's disease through the inhibition of amyloid  $\beta$ -peptide(1-42) fibril formation and attenuation of amyloid  $\beta$ -peptide(1-42)-induced neurotoxicity. We identified anti-amyloidogenic substances, pheophorbide a, kaempferol-3-O-glucoside and kaempferol-3-O-(6-malonyl) glucoside, from methanol extract of mulberry leaf. We further compared the anti-amyloidogenic activity of pheophorbide a and other porphyrin-related compounds.

Key Words : Mulberry leaf, Anti-amyloidogenic, Amyloid beta-peptide fibril, Pheophorbide a, Kaempferol

### 1. まえがき

アルツハイマー病は高齢化とともに大きな社会問題となっており、その予防法や治療法の開発は重要な課題である。アルツハイマー病は臨床的には認識機能障害、組織学的には老人斑と神経原線

維変化を伴う神経変性疾患である[1]。老人斑はアミロイドペプチド(A $\beta$ )の蓄積、神経原線維変化はタウタンパク質の蓄積として捉えられている。老人斑は主に、A $\beta$ 前駆体タンパク質からプロテアーゼによって切り出される40残基あるいは42残基からなるA $\beta$ 40およびA $\beta$ 42によって形成され

\* 連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門、  
606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、E-mail: kame@kit.ac.jp、TEL 075-724-7553

\*\* 連絡先：京都工芸繊維大学附属生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail: ichida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0741

\*\*\* 連絡先：京都大学大学院薬学研究科、606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29、  
E-mail: hsugimot@pharm.kyoto-u.ac.jp、TEL 075-753-9270

る[2]。A $\beta$ 前駆体タンパク質は $\beta$ -セクレターゼによってその細胞外ドメインの部分が切断され、さらに $\gamma$ -セクレターゼによって細胞膜内で切断されることによって、A $\beta$ が産生される[3]。A $\beta$ は溶解度が低く、また、水溶液中で $\beta$ シートを形成するために非常に凝集しやすい。正常な状態では、A $\beta$ は合成後、凝集・蓄積する前に速やかに分解されるため、脳内のA $\beta$ 量は合成速度と分解速度のバランスによって決まる。アルツハイマー病の原因はよく分かっていないが、A $\beta$ の蓄積が関係していることが示されており、A $\beta$ の濃度と凝集が神経変性過程に関係していることが報告されている[4,5]。家族性アルツハイマー病原因遺伝子の中でA $\beta$ 前駆体タンパク質における変異は、 $\beta$ -セクレターゼ切断部位および $\gamma$ -セクレターゼ切断部位の近くに存在している。 $\beta$ -セクレターゼ切断部位付近の変異はA $\beta$ 40およびA $\beta$ 42の産生量を増加させ、 $\gamma$ -セクレターゼ切断部位付近の変異はA $\beta$ 42の産生量を選択的に増加させる[6]。その他の変異は、A $\beta$ の凝集を促進したり、分解を抑制することが知られている[7]。A $\beta$ は*in vitro*および*in vivo*において神経毒性を持つ[8,9]。一方、アルツハイマー病モデル動物への抗A $\beta$ 抗体の投与によって老人斑が減少し、認知能の低下も抑制される[10]。従って、アルツハイマー病を予防し、その進行を抑制することを目的とするA $\beta$ に基づく治療法の可能性を検討することが重要である[11]。

桑葉は漢方薬であり、血糖値降下や血圧降下などの効果が知られている[12]。我々も、桑葉の抗メタボリックシンドローム活性や抗動脈硬化活性について報告してきた[13-15]。一方、イチヨウ葉エキスがアルツハイマー病を含む認知能低下や痴呆の治療のための処方薬として商品化され、ヨーロッパを中心に利用されている[16]。しかし、桑葉のアルツハイマー病に対する予防・治療効果については未だ検討されていない。本研究では、桑葉メタノール抽出物の抗アミロイド形成活性とA $\beta$ の細胞毒性に対する細胞保護効果を検討するとともに、抗アミロイド形成物質を精製し、同定した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 桑葉の抽出

桑葉は京都工芸繊維大学附属生物資源フィールド科学教育研究センターにおいて標準的な方法で栽培されたものを使用した。桑葉は「みなみさかり」と「しんいちのせ」の2品種を1:2の比率で用い、収穫後、直ちに気流乾燥機（ドライマイスター、ホソカワミクロン社製）を用いて180℃のエアーフラッシュで7秒間乾燥させた。本研究で使用した乾燥粉末の粒径は平均20 $\mu$ mである。

桑葉粉末（50g）を750mlのメタノールで3時間、室温で2回抽出し、さらに55℃で抽出した。上清を遠心分離によって回収し、エバポレーターによって濃縮した。残渣をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、12,000rpmで10分間遠心分離した。回収した上清をフィルター（0.2 $\mu$ m）で濾過し、以後の実験に用いた。

### 2.2 抗A $\beta$ 42凝集活性の測定

抗A $\beta$ 42凝集活性は、A $\beta$ 42線維存在下で蛍光を発するチオフラビンT（ThT）を用いて測定した。試料をDMSOに溶解し、PBSで50倍に希釈した。試料15 $\mu$ l、A $\beta$ 42溶液（0.55mg/ml、15 $\mu$ l）を384穴マイクロプレート中で混合し、暗黒下で37℃、24時間インキュベートした。続いて、ThT溶液（3 $\mu$ M）30 $\mu$ lを添加し、混合後、Geniosマイクロプレートリーダー（Tecan, Crailsheim, ドイツ）によって蛍光強度を測定した。励起波長は410nm、蛍光波長は486nmを用いた。ネガティブコントロールとして桑葉試料の代わりにPBSを用いた。

### 2.3 A $\beta$ 42線維分解活性の測定

PBSに溶解したA $\beta$ 42（0.55mg/ml）を37℃、24時間インキュベートし、A $\beta$ 42線維を調製した。A $\beta$ 42線維の形成はThTアッセイによって確認した。事前に調製したA $\beta$ 42線維を桑葉試料とともに37℃、3時間インキュベートした。ThT溶液（3 $\mu$ M）を添加し、上記の方法で残存線維を定量した。



## 2. 4 原子間力顕微鏡による観察

試料20  $\mu\text{l}$  をマイカ上に置き、室温で一晩放置して乾燥した。原子間力顕微鏡チップを共振周波数288–300kHzで用い、線維を Nanoprobe III scanning probe ワークステーション (Digital Instruments, Santa Barbara, California, USA) でイメージングした。走査周波数1 Hz、タッピングモードで各画像を取得した。

## 2. 5 抗アミロイド形成物質の精製

桑葉メタノール抽出物を Inertsil ODS-3カラム (10 $\times$ 250mm, 5  $\mu\text{m}$ , GLサイエンス) を接続した高速液体クロマトグラフ (L-4200, 日立) を用いて分離した。抽出物は、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液から0.1%TFAを含むアセトニトリル溶液まで100分間の直線濃度勾配によって溶出した。流速は3 ml/minとし、260nmの吸収によって試料を検出した。

抗アミロイド形成活性を持つ画分をさらにInertsil ODS-3カラム (4.6 $\times$ 150mm, 5  $\mu\text{m}$ , GLサイエンス) を接続した高速液体クロマトグラフ (L-4200, 日立) によって分離した。溶出液は、A液:0.1%TFA–1%アセトニトリル溶液、B液:0.1%TFA–99%アセトニトリル溶液を用いた。100分間の直線濃度勾配によって50%A–50%Bから100%Bまで、流速1 ml/minで溶出した。260nmの吸収によって試料を検出した。

## 2. 6 NMR測定および質量分析

2 mgの試料を400  $\mu\text{l}$  のDMSO- $d_6$ に溶解し、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを27 $^{\circ}\text{C}$ でBruker ARX-500スペクトロメーター (Bruker Biospin K.K., 横浜) を用いて測定した。

質量分析は、Bruker micro TOF system (Bruker Biospin K.K., 横浜) を用いてネガティブイオン電子スプレーイオン化法によって測定した。

## 2. 7 神経細胞の培養

本研究で用いた実験動物は京都大学動物実験委員会の倫理規程および日本薬理学会のガイドラインに従って行った。海馬神経はICRマウス (日本

SLC, 静岡) の胎児 (16日) から既報に従って調製した[17]。海馬を切り出し、PBS (phosphate-buffered saline) 中で0.2%トリプシンを用いて分解した。細胞懸濁液を5 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mlとなるように調製し、ポリエチレンイミンでコーティングしたプラスチックディッシュに撒いた。培地には、2 mMグルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むNeurobasal/B27 (Invitrogen Corp., California, USA) を用いた。細胞は実験開始前6日間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub>で前培養した。培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼをCytotoxicity Detection LDH kit (極東製薬工業、東京) で定量することにより、細胞毒性を評価した。

## 3. 実験結果

### 3. 1 桑葉メタノール抽出物の抗アミロイド形成活性

桑葉メタノール抽出物の抗アミロイド凝集活性をThTアッセイによって測定した。A $\beta$ 42のみをインキュベートすると、インキュベート開始後10時間程度からThTの蛍光強度が増加した。これはA $\beta$ 42線維の形成を示している (図1 a)。一方、桑葉添加群では濃度依存的にA $\beta$ 42線維の形成が抑制された。インキュベート開始19時間後の蛍光強度 (図1 b) を比較すると、桑葉30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加群で有意にA $\beta$ 42線維の形成が抑制された。

桑葉メタノール抽出物の抗アミロイド凝集活性をさらに確認するために、インキュベート開始19時間後の試料を原子間力顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。A $\beta$ 42のみをインキュベートした場合、大きなA $\beta$ 42の凝集体が観察された (図2 a)。また、長さ20–250nmの直鎖状の線維 (図2 b) も観察されたが、これは典型的なアミロイド線維よりも短いことから、プロトフィブリルであると考えられる。A $\beta$ 42を桑葉抽出物 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と19時間インキュベートした場合、大きなA $\beta$ 42凝集体や線維は観察されず、直径50–100nmの粒状物質が観察された (図2 c)。この粒状物質は桑葉抽出物のみでも観察されたことから (図2

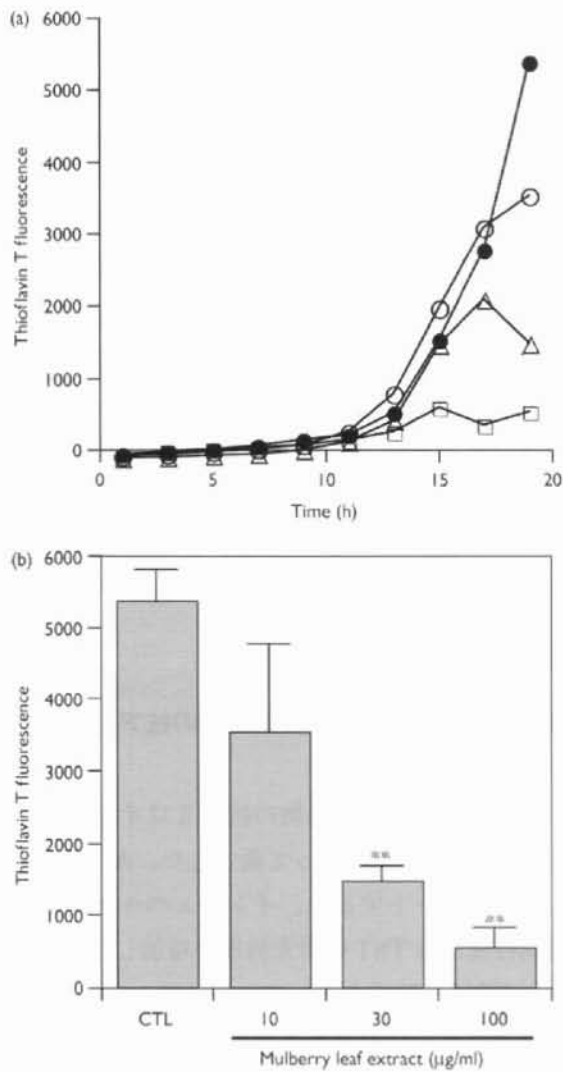


Fig. 1. Effects of mulberry leaf extract on  $A\beta 42$  fibril formation. (a) Time course of thioflavin T fluorescence.  $A\beta 42$  ( $10\ \mu\text{M}$ ) was incubated with 0 (closed circles), 10 (open circles), 30 (open triangles) or 100 (open squares)  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mulberry leaf extract at  $37^\circ\text{C}$  for the indicated times. Each point represents the mean value of three independent experiments. (b) Thioflavin T fluorescence at 19h in (a). Each value represents the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). \*\* $P < 0.01$  vs.  $A\beta 42$  alone (CTL) (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test). ANOVA, analysis of variance : CTL, control.

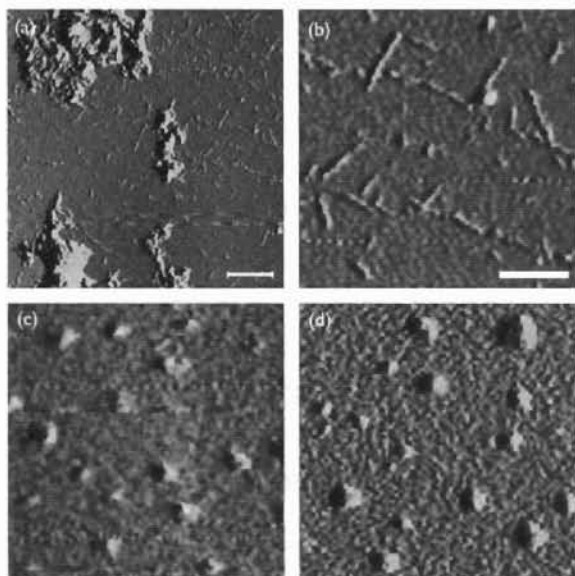


Fig. 2. Atomic force microscopy imaging of  $A\beta 42$  fibril formation.  $A\beta 42$  was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 19h in the absence (a, b) or presence (c) of  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  mulberry leaf extract. Mulberry leaf extract ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) alone was incubated under the same conditions (d). The images were obtained at saturation phase in tapping mode. The scan size is  $3 \times 3\ \mu\text{m}^2$  (a) or  $1 \times 1\ \mu\text{m}^2$  (b, c, d). The Z-scale is 20nm (a, b), 35nm (c) and 50nm (d). Scale bars : a, 500nm ; (in b) b-d, 250nm.

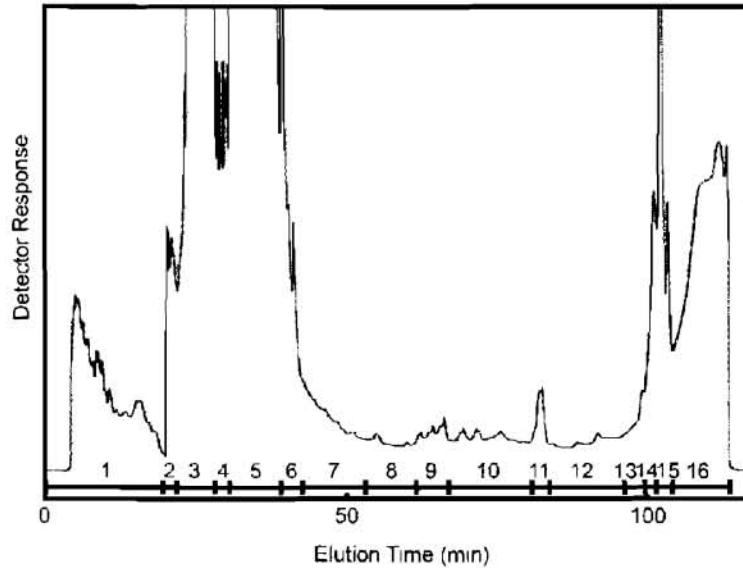


Fig. 3. Reversed-phase chromatography of methanol extract of mulberry leaves.

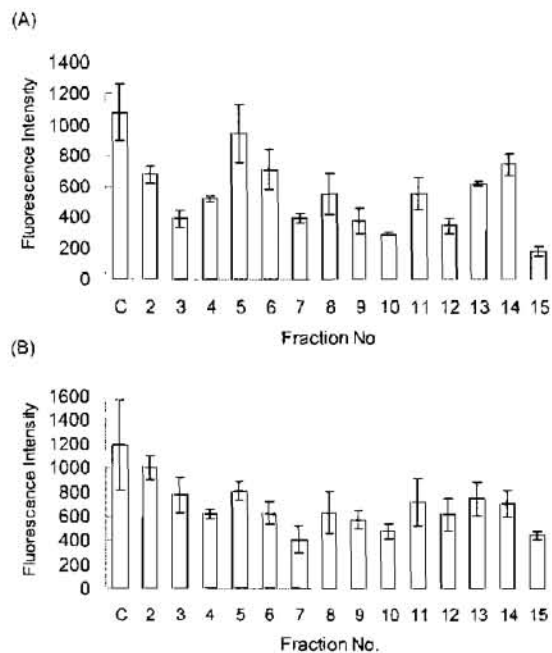


Fig. 4. Anti-amyloidogenic activities of mulberry leaf extract fractions. Anti-Aβ42 fibril aggregation activities (A) and Aβ42 fibril destabilizing activities (B) of mulberry leaf extract fractions obtained by reversed-phase chromatography of methanol extract of mulberry leaf. The concentration of sample in the mixture with Aβ42 was 10 μg/ml.

d)、桑葉由来であることが分かった。これらの結果より、桑葉抽出物は Aβ42 線維の形成を阻害することが示された。

### 3. 2 桑葉中の抗アミロイド形成物質の単離

桑葉メタノール抽出物から抗アミロイド形成物質の分離を試みた。桑葉メタノール抽出物を逆相クロマトグラフィーによって16画分に分離し

た(図3)。凍結乾燥後、抗 Aβ42 凝集活性および Aβ42 線維分解活性を測定した。その際、画分1は DMSO を含んでいたため、また画分16はクロマトグラフ上では大きなピークであったが非常に微量であったため、いずれも活性測定を行わなかった。抗 Aβ42 凝集活性は画分15が最も強く(図4A)、Aβ42 線維分解活性は画分7および15が強かった(図4B)。

### 3. 3 画分7の分離と同定

画分7をさらに分画し、2種類の抗アミロイド凝集物質を得た。NMR解析および質量分析の結果、ケンフェロール3-O-グルコシドおよびケンフェロール3-O-(6-マロニル)グルコシドと同定した(図5)。

### 3. 4 画分15の分離と同定

画分15から抗アミロイド凝集物質一種類を得た。質量分析の結果、 $m/z$ 値は591.3であり、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルはフェオホルビドaのスペクトルと一致していた。よって、画分15に含まれる活性物質をフェオホルビドaと同定した。構造を図6に示す。

### 3. 5 ポルフィリン化合物の抗アミロイド形成活性

桑葉より抽出したフェオホルビドaおよび市販のポルフィリン化合物(図6)の抗アミロイド凝

集活性およびアミロイド線維分解活性を比較した。結果を図7に示す。銅クロロフィリン、プロトポルフィリンIX、亜鉛プロトポルフィリンIX、ヘミンおよびヘマチンが強い抗アミロイド凝集活性(図7A)およびアミロイド線維分解活性(図7B)を示した。いずれの活性も濃度依存的であ

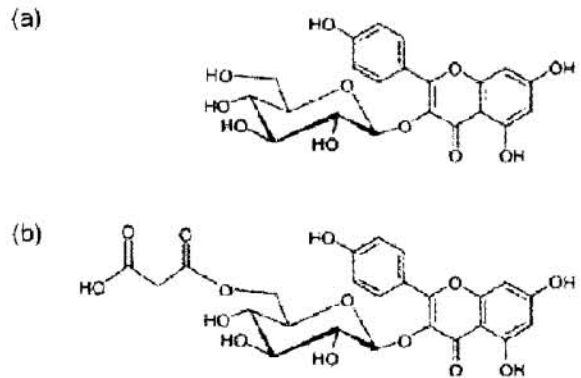


Fig. 5. Structures of kaempferol-3-O-glucoside (a) and kaempferol-3-O-(6-malonyl) glucoside (b) obtained from No.7 fraction in Fig.4.

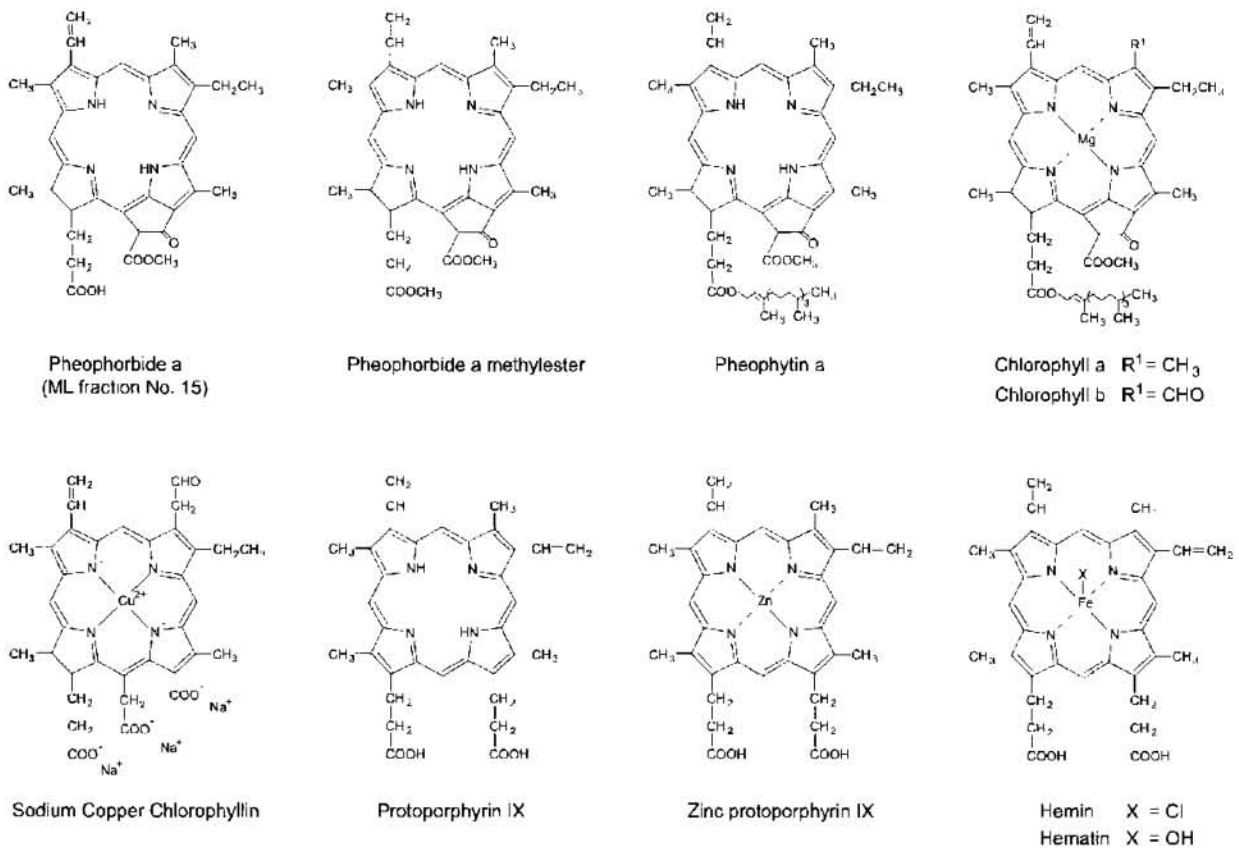


Fig. 6. Structures of anti-amyloidogenic substance (pheophorbide a) from fraction No.15 and porphyrin-related compounds used in this study.

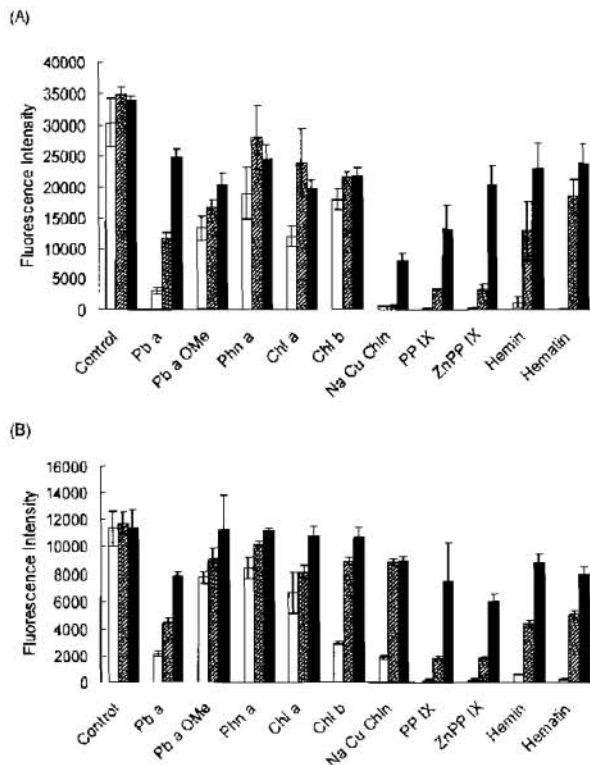


Fig. 7. Anti-amyloidogenic activities of pheophorbide a from ML and porphyrin-related compounds. Pb a, pheophorbide a purified from ML; Pb a OMe, pheophorbide a-O-methyl ester; Phn a, pheophytin a; Chl a, chlorophyll a; Chl b, chlorophyll b; Na Cu Chln, sodium copper chlorophyllin; PP IX, protoporphyrin IX; ZnPP IX, zinc protoporphyrin IX. white, 10 µg/ml; diagonal, 1 µg/ml; black, 0.1 µg/ml.

り、10 µg/ml ではほぼ完全にアミロイド凝集が阻害され (図7 A、白カラム)、アミロイド繊維は分解された (図7 B、白カラム)。一方、フェオホルピド a メチルエステル、フェオフィチン a、クロロフィル a およびクロロフィル b は弱い活性、フェオホルピド a は中程度の活性を有していた。

### 3. 6 Aβ42の毒性に対する細胞保護効果

Aβ42の毒性に対する桑葉抽出物およびフェオホルピド a の細胞保護効果を、マウス培養海馬神経細胞を用いて検討した。Aβ42 (1 µM) を培養海馬神経に添加して48時間インキュベーションすると (図8 a、CTL)、非添加群 (図8 a、Sham) と比較して有意に細胞死が増加したことから、Aβ42の細胞毒性が確認された。Aβ42に加えて桑葉メタノール抽出物を1、3および10 µg/ml の濃度で添加すると、Aβ42のみを添加した場合と比べて有意に細胞死が減少しており、それぞれ59.8 ± 11.0、43.7 ± 8.2、37.1 ± 5.4%となった。

続いて、Aβ42のみに48時間暴露した後に細胞を顕微鏡で観察すると (図8 c)、Aβ42非添加群 (図8 b) と比べて神経突起の変性と細胞数の減少

が観察された。一方、桑葉添加群 (10 µg/ml、図8 d) では神経突起変性と細胞数減少が抑制されていた。以上の結果より、桑葉抽出物の細胞保護効果が認められた。一方、フェオホルピド a の細胞保護効果を同様の条件で検討したが、細胞保護効果は認められなかった。

## 4. 考察

コリンエステラーゼ阻害剤 (タクリン、リバステイグミン、ガランタミン、塩酸ドネペジル) が軽度から中度のアルツハイマー型認知症を改善する薬剤として利用されている。加えて、イチヨウ葉エキス EGb761 (ドイツ・シュワーベ製薬が商品化) がドイツ、フランスを中心とするヨーロッパで、アルツハイマー病を含む認知能低下や痴呆の治療のための処方薬として使用されている [18]。EGb761のアルツハイマー病を改善する機構は不明であるが、EGb761は抗血小板凝集活性、抗酸化活性、抗Aβ凝集活性およびAβ細胞毒性に対する神経保護活性を含む種々の薬理活性を持つことが報告されている [19,20]。本研究では、桑葉のメ



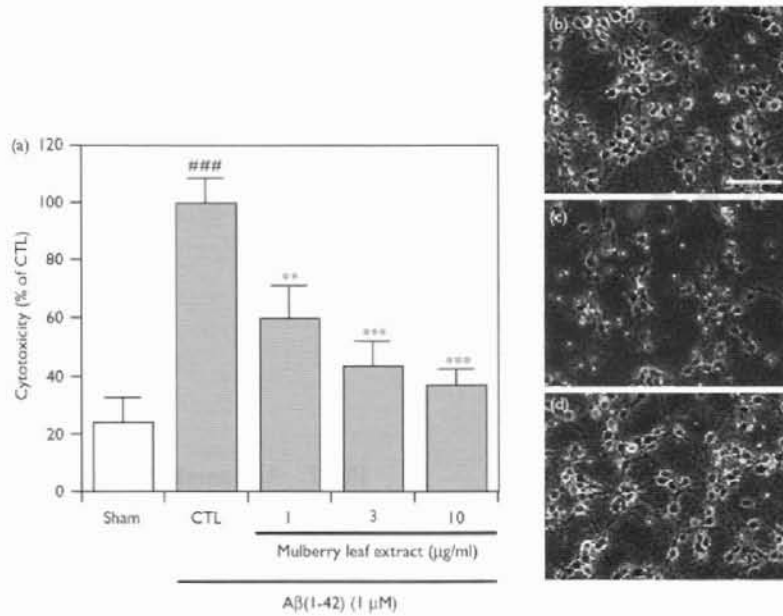


Fig. 8. Aβ42-induced cell toxicity in mouse cultured hippocampal neurons. (a) Cytotoxicity induced by Aβ42 (1 μM) for 48h. Mulberry leaf extract (1, 3, 10 μg/ml) was added to the culture medium 3h before the addition of Aβ42. The lactate dehydrogenase release assay was conducted after a 48-h exposure to Aβ42. The open column represents the cells to which Aβ42 was not added. Cytotoxicity was expressed as a percentage of the amount of lactate dehydrogenase in the culture medium of hippocampal neurons treated with 1 μM Aβ42 alone. Each value represents the mean ± SEM (n=5-6). \*\*\*P<0.01 vs. sham, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 vs. Aβ42 alone (CTL) (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test). Representative phase contrast photomicrographs showing hippocampal neurons exposed to vehicle (b), Aβ42 (c) or both Aβ42 and mulberry leaf extract (d). Cultured hippocampal neurons were incubated with Aβ42 (1 μM) for 48h. Mulberry leaf extract (10 μg/ml) was added to the culture medium 3h before the addition of Aβ42. Scale bar for all: 100 μm. Aβ42, amyloid beta-peptide; ANOVA, analysis of variance. CTL, control.

タノール抽出物が Aβ42線維形成を阻害し、海馬ニューロンの Aβ42による細胞死を抑制する作用を持つ事を明らかにした。この効果はイチヨウ葉エキス EGb761と似ていることから、桑葉もアルツハイマー病への治療効果が期待できる。今後、動物実験等による桑葉の効果を確認する必要がある。

桑葉よりケンフェロール 3-O-グルコシド、ケンフェロール 3-O-(6-マロニル) グルコシドおよびフェオホルピド a を抗アミロイド形成物質として同定した。ケンフェロールおよびその配糖体が抗アミロイド凝集活性を持つ事はこれまでも報告されており[21]、本結果と一致する。また、桑葉にも含まれるケルセチンとその配糖体も抗アミロイド凝集活性を有すると報告されている[21]。本研究で用いた桑葉メタノール抽出物の分離条件に

おいて、ケルセチンとその配糖体は逆相クロマトグラフィーの画分6 (図3) に含まれていることを確かめている。しかし、画分6は夾雑物が多く重量あたりの抗アミロイド凝集活性は弱かったために、画分6に関しては検討を加えなかった。

クロロフィル a の分解産物であるフェロフォルピド a はポルフィリン環を持つことから、フェオホルピド a および市販のポルフィリン化合物の抗アミロイド凝集活性およびアミロイド線維分解活性を比較した。Howlettらは、抗体法によってヘミン、ヘマチン、亜鉛プロトポルフィリン IX、プロトポルフィリン IX の抗アミロイド凝集活性を測定し、その強度をヘミン>ヘマチン>亜鉛プロトポルフィリン IX>プロトポルフィリン IX と報告している[22]。しかし、本研究の結果では、プロトポルフィリン IX、亜鉛プロトポルフィリン IX>ヘミ

ン>ヘマチンの順(図7)となった。この結果の不一致の理由は不明であるが、測定方法(抗体法 vs. ThT法)やA $\beta$ ペプチド(A $\beta$ 40 vs. A $\beta$ 42)の違いによるものと考えられる。

本研究結果(図7)は、ポルフィリン化合物の抗アミロイド形成活性はポルフィリン環中の金属には関係なく、カルボキシル基の数に依存していることを示している。ポルフィリンIXやヘミンのように2個あるいは3個のカルボキシル基を持つポルフィリン化合物が強い抗アミロイド形成活性を持つのに対し、カルボキシル基を持たないものは活性が弱かった。A $\beta$ の16~20番目の疎水コアがA $\beta$ ペプチドの自己凝集に必要であることが報告されている[23,24]。疎水コアのアミノ酸配列と一致するペプタペプチドKLVFEはA $\beta$ の疎水コアと結合し、線維形成を阻害する。したがって、ポルフィリン化合物は、ポルフィリン環とA $\beta$ 疎水コア間の疎水結合によってA $\beta$ と結合するものと考えられる。ポルフィリン環に結合したカルボキシル基はA $\beta$ 42・ポルフィリン化合物複合体の溶解度を高める事によって、A $\beta$ 線維から可溶性A $\beta$ への平衡をシフトさせるものと考えられる。その結果、A $\beta$ 42の凝集は阻害され、かつA $\beta$ 42線維は分解される。ケンフェロール3-O-グルコシドおよびケンフェロール3-O-(6-マロニル)グルコシドも、フラボノイド骨格の疎水領域と親水性の水酸基によってポルフィリン化合物と同様の機構で作用すると考えられる。

A $\beta$ を神経細胞に添加してインキュベートすると、神経細胞は死滅する。一方、A $\beta$ 42とともに桑葉のメタノール抽出液を培養神経細胞に添加すると、神経細胞はA $\beta$ 42の毒性から保護されて細胞死が抑制された。また、ケンフェロール、ケンフェロール3-O-グルコシド、ケルセチン3-O-グルコシドがA $\beta$ からの神経細胞保護作用を持つことが報告されている[21]。ケンフェロールはフラボノイドの1種であり、抗酸化活性を持つ。A $\beta$ は脂質の過酸化によって活性酸素種を生じることが知られている[25]。我々は、本研究と同じ実験条件において抗酸化物質EUK-8がA $\beta$ 42によって誘導される海馬ニューロンの細胞死を防ぐことを確か

めている。一方、イチヨウ葉抽出物EGb761はA $\beta$ によって誘導される活性酸素種を除去できるにも関わらず、A $\beta$ の毒性に対するPC12細胞保護作用が認められないことも報告されている[26]。したがって、ケンフェロールおよびその配糖体を持つ抗酸化力の寄与については明確ではないが、桑葉はA $\beta$ 42線維形成を阻害、A $\beta$ 42線維を分解するだけでなく、さらにおそらくは抗酸化力による神経細胞保護作用を持つ可能性が十分に考えられる。

一方、フェオホルピドaはA $\beta$ 42の凝集を抑制するにも関わらず、A $\beta$ 42からの神経細胞保護作用を有していないことが明らかになった。したがって、桑葉抽出物による神経細胞保護作用はケンフェロールおよびその配糖体やケルセチンによるものと考えられる。ポルフィリン環を持つヘムは細胞膜に結合して細胞膜に傷害を与える事が知られている。したがって、フェオホルピドaも細胞膜に結合するためにA $\beta$ 42とは結合できず、A $\beta$ 42の毒性に対する神経細胞保護作用を持たないものと考えられる。

以上より、桑葉の抗アミロイド形成活性およびA $\beta$ 42に対する神経細胞保護作用を明らかにし、アルツハイマー病への治療効果の可能性を示した。また、抗アミロイド凝集薬を論理的に設計する為には、A $\beta$ と結合できる疎水性領域と、A $\beta$ 線維と可溶性A $\beta$ 間の平衡を可溶性A $\beta$ にシフトさせる親水性領域の両方が必要であることを示した。さらに、細胞に投与する場合に細胞膜との親和性が強すぎないことが必要であり、疎水性領域と親水性領域のバランスが重要であることを明らかにした。

## 5. 謝辞

本実験を遂行するにあたり、NMR測定および質量分析を行っていただいた京都工芸繊維大学金折賢二准教授、原子間力顕微鏡による観察に御協力いただいた京都工芸繊維大学田中直毅准教授に心より感謝の意を表します。

## 引用文献

- [ 1 ] Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R. and Sisodia, S.S. (1998) : Alzheimer's disease : genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 461-493
- [ 2 ] Selkoe, D.J. (2001) : Alzheimer's disease : genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.*, **81**, 741-766
- [ 3 ] Vassar, R. and Citron, M. (2000) : Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron.*, **27**, 419-22
- [ 4 ] Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. and Cotman, C.W. (1991) : In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.*, **563**, 311-314
- [ 5 ] Hardy, J. and Allsop, D. (1991) : Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 383-388
- [ 6 ] Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G. and Sisodia, S.S. (1996) : Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, **17**, 1005-1013
- [ 7 ] Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P. and Selkoe, D.J. (1997) : Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.*, **3**, 67-72
- [ 8 ] Kowall, N.W., Beal, M.F., Busciglio, J., Duffy, L.K. and Yankner, B.A. (1991) : An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 7247-7251
- [ 9 ] Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. and Cotman, C.W. (1991) : Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur. J. Pharmacol.*, **207**, 367-368
- [10] Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999) : Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, **400**, 173-177
- [11] Selkoe, D.J. and Schenk, D. (2003) : Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 545-584
- [12] Andallu, B., Suryakantham, V., Lakshmi Srikanthi, B. and Reddy, G.K. (2001) : Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clin. Chim. Acta*, **314**, 47-53
- [13] Harauma, A., Murayama, T., Ikeyama, K., Sano, H., Arai, H., Takano, R., Kita, T., Hara, S., Kamei, K. and Yokode, M. (2007) : Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 751-756
- [14] Sugimoto, M., Arai, H., Tamura, Y., Murayama, T., Khaengkhan, P., Nishio, T., Ono, K., Ariyasu, H., Akamizu, T., Ueda, Y., Kita, T., Harada, S., Kamei, K. and Yokode,

- M. (2009) : Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice. *Atherosclerosis*, **204**, 388-394
- [15] 亀井加恵子, 原馬明子, 一田昌利, 荒井秀典, 村山敏典, 横手正之 (2008) : 桑葉の動脈硬化抑制効果 - 病態モデルマウスを用いた検討 -. 繊維研究所研究報告, **12**, 11-19
- [16] Oken, B.S., Storzbach, D.M. and Kaye, J.A. (1998) : The efficacy of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, **55**, 1409-1415
- [17] Goto, Y., Niidome, T., Akaike, A., Kihara, T. and Sugimoto, H. (2006) : Amyloid  $\beta$ -peptide preconditioning reduces glutamate-induced neurotoxicity by promoting endocytosis of NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 259-265
- [18] McKenna, D.J., Jones, K. and Hughes, K. (2001) : Efficacy, safety, and use of *Ginkgo biloba* in clinical and preclinical applications. *Altern. Ther. Health Med.*, **7**, 70-90
- [19] Bastianetto, S., Ramassamy, C., Doré, S., Christen, Y., Poirier, J. and Quirion, R. (2000) : The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1882-1890
- [20] Luo, Y., Smith, J.V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K.J., Buford, J.P., Khan, I., Netzer, W.J., Xu, H. and Butko, P. (2002) : Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 12197-12202
- [21] Zhu, J.T., Choi, R.C., Chu, G.K., Cheung, A.W., Gao, Q.T., Li, J., Jiang, Z.Y., Dong, T.T. and Tsim, K.W. (2007) : Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: a comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing beta-amyloid-induced cell death. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2438-2445
- [22] Howlett, D., Cutler, P., Heales, S. and Camilleri, P. (1997) : Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation. *FEBS Lett.*, **417**, 249-251
- [23] Tjernberg, L.O., Näslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlström, A.R., Thyberg, J., Terenius, L. and Nordstedt, C. (1996) : Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8545-8548
- [24] Tjernberg, L.O., Lilliehöök, C., Callaway, D.J., Näslund, J., Hahne, S., Thyberg, J., Terenius, L. and Nordstedt, C. (1997) : Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2601-2605
- [25] Subramaniam, R., Koppal, T., Green, M., Yatin, S., Jordan, B., Drake, J. and Butterfield, D.A. (1998) : The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide (25-35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, **23**, 1403-1410
- [26] Yao, Z., Drieu, K. and Papadopoulos, V. (2001) : The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res.*, **889**, 181-190





# カイコガの組織特異的に発現している 2つのアルギナーゼ遺伝子は、 選択的スプライシングにより生じる

長岡純治・高田祐希・加藤久美子

## Identification of Two Tissue Specific Arginases Generated by Alternative Splicing in the Silkworm, *Bombyx mori*

Sumiharu NAGAOKA, Yuki TAKATA and Kumiko KATO

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology,  
Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8585, Japan

### Abstract

Arginase (EC 3.5.3.1) catalyzes the hydrolysis of arginine to ornithine and urea. Here we have cloned the two arginase cDNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. The analysis of exon/intron structures showed the two mRNAs named *bmarg-r* and *bmarg-f*, respectively, were generated from a single gene by alternative usage. In the glandula (g.) lacteola and vesicular (v.) seminalis of male reproductive system, *bmarg-r* was highly expressed whereas *bmarg-f* was active in the fat body and muscle. The *bmarg-r* and *bmarg-f* were predicted encoding almost same amino acid sequences, except 10 N-terminal residues. The preliminary characterization shown that the preparations from the v.seminalis resembled to the preparations from the larval fat bodies in the arginase activity, also similarly to *Escherichia coli*-expressed arginase corresponding to *bmarg-r*. The concomitant with the decline in the g. lacteola and v. seminalis of the mated male and the rise in the female bursa (b.) copulatrix on the arginase activity suggested that the silkworm arginase produced from *bmarg-r* gene was secreted to the seminal fluid and the transfer from the male to the female during copulation. Our results suggest that the generation of the two silkworm arginase isoforms may have a unique functional significance whether it secretes or it stay in the cytoplasm of each expressing cells.

**Key Words** : Arginase, Male reproductive system, Spermatophore, Alternative splicing, *Bombyx mori*

## 1. まえがき

アルギナーゼ (Arginase ; EC 3.5.3.1 ; L-arginine aminohydrolase) はアルギニンをオルニチンと尿素へと変換する反応を不可逆的に触媒する酵素である。

哺乳動物では、2種類のアイソザイム、すなわち、arginase I (A-I) と arginase II (A-II) が存在する。ヒトの A-I は、分子量約37 kDa をサ

ブユニットとし、ホモ3量体の105 kDa タンパク質であると報告されているが、近年、一部の研究者からは単量体であるという指摘もなされている [1]。A-I は活性中心にマンガンを有するので、酵素活性の発現にはマンガンを要求し、主に、肝臓や赤血球の細胞質に存在する。一方、A-II は、分子量約39 kDa のタンパク質であり、その遺伝子の発現は、肝臓では認められないかわりに腎臓、脳で高く、さらに、そこから作られるタンパク質

はミトコンドリアに特異的に存在する[2]。一般に、食餌として摂取したアミノ酸は、アミノトランスフェラーゼの作用によりさまざまなアミノ酸へと再変換され、体内で利用されるが、利用されることによりアンモニアが生じる。生じたアンモニアは、生体にとって極めて毒性が高いので速やかに処理される必要がある。そこで、アンモニアは、グルタミン、グルタミン酸などのアミノ酸に再変換されたり、尿素サイクル（オルニチンサイクル）により毒性の低い尿素へと変換され、体外に放出される。尿素サイクルは、完全なサイクリックな経路であり、カルボモイルリン酸に固定化されたアンモニアは、オルニチンからシトルリンを合成される際に使われ、アルギニノコハク酸を経てアルギニンとなり、A-Iの作用により、尿素とオルニチンが合成される。そのため、肝臓に存在するアルギナーゼ活性の98%を占めるA-Iが欠損すると、肝臓における尿素サイクルに依存したアンモニア、アルギニン、尿素代謝が異常となる[3-5]。このことから、哺乳類アルギナーゼ、特に、A-Iは、尿素サイクルにおけるキー酵素であるといえる。

カイコガを含む多くの昆虫の排泄物は、哺乳動物と異なり、尿素を多く含まず、尿酸やアンモニアである。これは、尿素サイクルを形成する反応のうち、オルニチンからシトルリンへの反応が存在しておらず、不完全であることにも起因すると考えられている[6-8]。一方、アルギナーゼ活性は、さまざまな昆虫から見出されており、アルギナーゼの作用により生じたオルニチンは、プロリンへと代謝される[9]。プロリンは細胞質からミトコンドリアに容易に移行でき、TCA回路と共役できることから、昆虫では重要なエネルギー生成物質となっている。すなわち、昆虫において、アルギナーゼはプロリン代謝を介したエネルギー調節に関わる酵素ということもできる[10]。カイコガでは、アルギナーゼ活性が、当初、幼虫の筋肉、マルピーギ氏管に存在することが報告された[11]。その後、カイコガの系統に関係なく、アルギナーゼ活性は、全発段階の脂肪体、幼虫筋肉に存在しているものの、マルピーギ氏管には見出されな

いことと、成虫全体の活性の雌雄差は、オス生殖腺に由来し、しかも全活性の96%が貯精嚢に特異的に存在することが報告された[12-14]。加えて、この活性は射精に伴い、メスの交尾嚢中に形成される精包に移行することを見出した[15]。

本研究では、組織特異的に発現する2種類のカイコガアルギナーゼ遺伝子を単離し、これらが、選択的スプライシングにより生じることを明らかにした。次に、これらの遺伝子から翻訳されるタンパク質の性質を検討するために、大腸菌のタンパク質発現系に導入し、得られた発現タンパク質のアルギナーゼ活性の性質を比較調査した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試昆虫

実験には交雑種、錦秋×鐘和（上田蚕種）を用い、人工飼料による完全無菌状態で飼育をした[16]。

### 2.2 器官の摘出

成虫オス生殖器官各腺は、実体顕微鏡下で摘出した[17]。

脂肪体およびオス生殖器官は、成虫腹部を切断、背部を縦に切開の後、氷冷カイコ用リンガー液[18]中で取り出した。オス生殖器官は、脂肪体を取り除いた後、精巣、輸精管、輸精管膨大部、及び雄生殖輸管、すなわち、透明腺、乳白腺、貯精嚢、精包腺、白腺、前立腺をそれぞれ別々に切り分けた。交尾開始後30分で割愛した雄個体（交尾完了個体）についても同様の操作を行い、各生殖器官を摘出した。各器官は、濾紙で過剰な水分を除去した後、エッペン型サンプルチューブに入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 2.3 酵素活性測定

エッペン型サンプルチューブ内の器官に対し5-10容の氷冷20 mM Tris-HCl (pH 7.8) 緩衝液を加え、氷冷下でポッター型マイクロホモジナイザーで磨砕し、 $15,000 \times g$ で10分間、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心した。その上清を回収し、これを粗酵素液とした。

アルギナーゼの活性は、アルギニンを基質とし

て、生成される尿素量を定量することによって求め、1分間に1  $\mu$ mol、合成される酵素活性を1 Unitとした[19]。

## 2. 4 RNA 調製と cDNA 合成

RNA の調整は、GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) を用いて行った。cDNA の合成は、それぞれの器官から調節した全 RNA を鋳型として、Superscript II (Invitrogen) と oligot dT primer で行った。

## 2. 5 遺伝子の単離

*Xenopus laevis* の arginase I (GenBank accession No. U08406) [20] のアミノ酸配列をもとに、tblastn によりカイコゲノムデータベース (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>) を検索したところ、さまざまなアルギナーゼに保存されているアミノ酸配列のうち、xx WVD AHxD に対応した推定アミノ酸配列 LIWVD AHAD を含む配列と、SFDxDxxDPxxxPATGTP VxGG に対応した推定アミノ酸配列 SFDIDSLAL EAPSTGTPVRGG を含む配列が contig 114650 に見出された。そこで、VDAHADINT に対応した AG#1 (5'-GTTGATGCTCATGCGGACATCAAT AC-3') と PIHVSFDID に対応した AG#2 (5'-CA ATGTC~~AA~~AGCTCACATGGATAGG-3') のオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCR を行い、増幅された DNA の塩基配列を決定した。さらに、この配列からプライマーを合成し、5', 3' RACE を行い、全長配列を決定した。その結果、オス生殖腺、脂肪体から単離された配列を *bmarg-r*、*bmarg-f* とそれぞれ名付け、DDBJ-GenBank に accession No. AB479104、AB479105 として登録した。

## 2. 6 発現解析

遺伝子の発現解析は、半定量的 RT-PCR (Reverse Transcribed-Polymerase Chain Reaction) により行った。

## 2. 7 発現タンパク質

組換えタンパク質は、大腸菌発現系を用いて発現させた。*bmarg-r* および *bmarg-f* のコーディング

配列に対して、5' 端に *Nde* I、3' 端に *Bam*H I 配列をそれぞれ付加した DNA を作成し、*Nde* I、*Bam*II I で処理した後、これを pET-11b vector (Novagen) の *Nde* I、*Bam*H I サイトにクローニングした。これを、大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS (Novagen) で形質転換した。形質転換した大腸菌は、Overnight Express Autoinduction System (Novagen) で 37°C、16 時間培養した。培養後、大腸菌体を集菌した後、Bug Baster (Novagen) で溶菌させたものの遠心上清を粗発現タンパク質として、それぞれを *rbmARG-r*、*rbmARG-f* と命名した。

## 3. 実験結果

### 3. 1 交尾前後におけるオス生殖腺各部位および精包の活性の変化

カイコガの幼虫、蛹、成虫の諸組織からアルギナーゼ活性を含む粗酵素液を調整する際に、抽出緩衝液として、1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を含む 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液により調整した粗酵素液を用いたオス生殖腺の部位別活性を測定したところ、相垣と小山内[14] が報告したように、貯精囊にのみアルギナーゼ活性が認められた。しかし、抽出緩衝液を 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) に変えると貯精囊の活性は、2 倍に上昇し、さらに、乳白線においても、強い活性が見出された。従って、以降の実験においては、20 mM Tris-HCl (pH 7.8) を用いて、粗酵素液の調整を行うこととした。

第 1 表に示すようにアルギナーゼ活性はオス生殖腺の全ての部位において見出すことができた。しかし、全オス生殖腺で見出された活性のうち 75.6% が乳白線に、23.1% が貯精囊に存在していた。また、輸精管膨大部でも比較的高い活性が認められた。さらに、射精に伴い、乳白線に存在していた活性は交尾・射精前の 12.2%、貯精囊では 37.4% へと減少した。しかし、輸精管膨大部では、射精に伴い若干、活性が減少しているものの、その他の部位の活性は大きな変化が認められなかった。一方、交尾前にまったく見出されなかったメス交尾

Table 1. Arginase activity of the male reproductive tissues and the female bursa copulatrix

Organ	Activity of arginase (mU/insect)		
	Before ejaculation (B)	After ejaculation (A)	B-A
testis	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.00	
d. deferens	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.00	
ampulla d. d.	0.43 ± 0.07	0.28 ± 0.00	
Male reproductive tract			
g. pellucida	0.27 ± 0.00	0.26 ± 0.00	0.01 ( 0.0%)
g. lacteola	3.94 ± 0.41	0.18 ± 0.01	3.46 (75.6%)
v. seminalis	1.71 ± 0.31	0.64 ± 0.01	1.06 (23.1%)
g. prostatica	0.28 ± 0.00	0.27 ± 0.00	0.01 ( 0.0%)
g. spermatophorae	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.00	0.01 ( 0.0%)
Total	6.50	1.92	4.58 (100%)
b. copulatrix	N.D.	3.02 ± 0.58	3.02 (65.9%)

Mean (±SE) enzyme activities in triplicate determinations are shown.

Differences of reproductive glands before (B) and after (A) the onset of copulation are represented as B-A.

In the B-A column, relative values of the respective glands to the sum of total glands (4.58 mU) are expressed as percentages in parentheses.

N.D. : not detected.

囊中のアルギナーゼ活性は、交尾後20分ですでに3.02 mUの活性が認められた。なお、射精に伴いメスに移行してメスの交尾嚢内に精包を形成するのに必要なオス生殖腺分泌物を分泌する乳白腺、貯精嚢に存在しているアルギナーゼ活性が射精に伴い減少した総活性量は、4.52 mUと算出された。

### 3. 2 遺伝子の単離

アルギナーゼ活性が見出されている貯精嚢および脂肪体[14]の全RNAを鋳型に、2種類のアルギナーゼ遺伝子をクローニングした。貯精嚢RNAに由来する単離された遺伝子 (*bmarg-r*)の全長は1,573 bpであり、233-235番目のATGが開始コドンであるとすると、そのアミノ酸配列の終始コドンは1,229-1,231番目のTAAであり、その推定分子量は36.3 kDaとなった。一方、脂肪体RNAに由来する単離された遺伝子 (*bmarg-f*)の全長は1,399 bpであり、93-95番目のATGが開始コドンであるとすると、そのアミノ酸配列の終始コドンは1,119-1,201番目のTAAであり、その推定分子量は37.3 kDaであった。後者の遺伝子から推定されるアミノ酸配列は前者のものより推定されるアミノ酸配列と比較すると、単にN末端10残基多

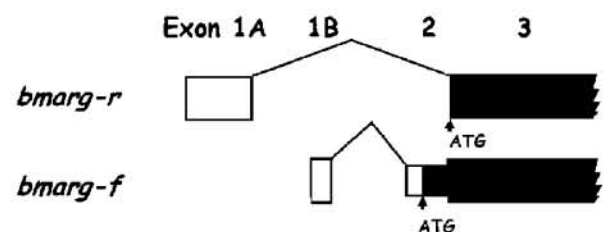


Fig. 1. Genomic sequence and the exon/intron boundaries of 5' region of the *bmarg* gene. Open boxes represent untranslated regions and black boxes show coding regions. The vertical arrow and ATG mark indicate the translation start codon.

いことが判明した。

### 3. 3 ゲノム構造

*bmarg-r*、*bmarg-f*の5'端の配列が異なる領域を含むゲノム構造(429 bp)を、カイコゲノムデータ(GenBank accession No.: BABH01002659.1, ΛADK01022568.1, BAAB01006548.1)を用いて解析した。結果、4つのExon(1A、1B、2、3と呼ぶ)が存在し、*bmarg-r*は、Exon 1A-3、*bmarg-f*は、Exon 1B-2-3から生じることが明らかとなった(第1図)。



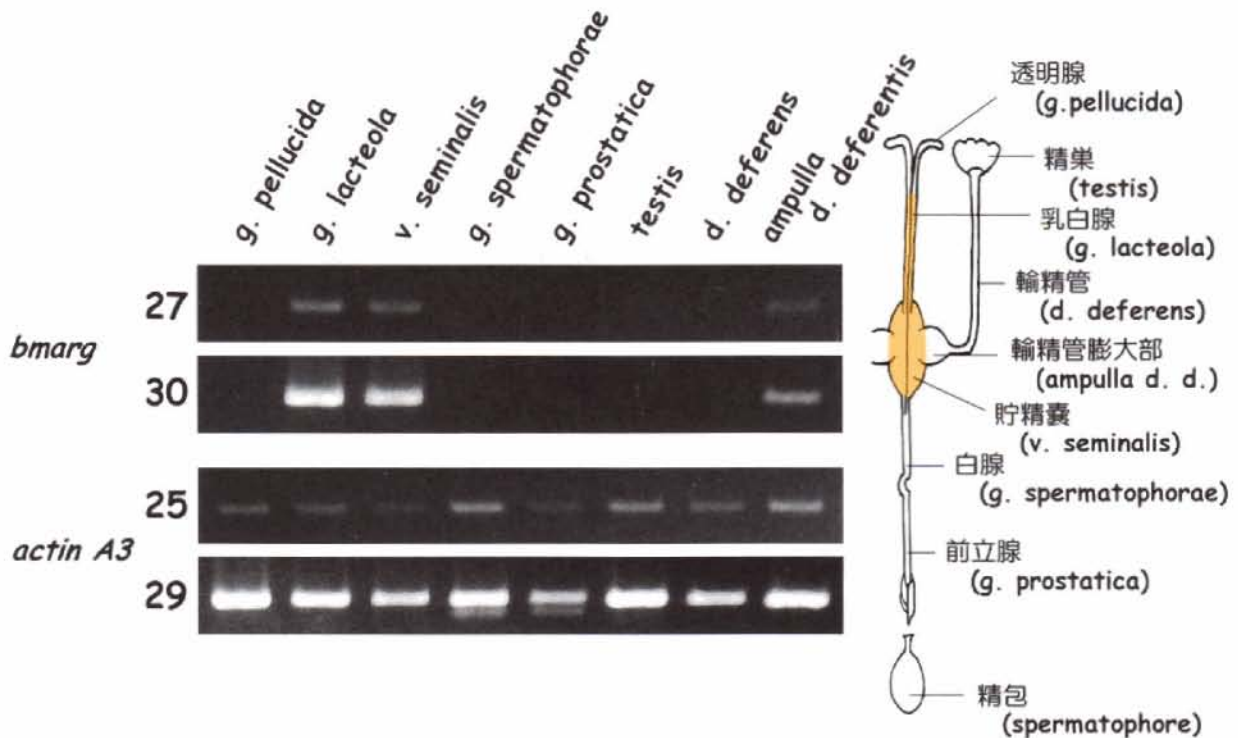


Fig. 2. Tissue-specific expression of *B. mori* arginase gene within the male reproductive system of adult. RT-PCR was carried out for arginase by a common primer pair for *bmarg-r* and *bmarg-f* (upper panels) with actin A3 specific primer pair as an internal control (lower panels).

### 3. 4 遺伝子発現

オス生殖腺では、*bmarg* は、乳白腺、貯精囊、輸精管で特異的に発現していた (第2図)。オス生殖腺、貯精囊および成虫脂肪体におけるカイコガアルギナーゼ遺伝子の発現量を同一にしたとき、*bmarg-r* は脂肪体では発現が認められず、貯精囊で強い発現が認められたのに対して、*bmarg-f* は脂肪体で強い発現が認められたが、貯精囊では発現が見出せなかった (第3図)。

### 3. 5 酵素学的性質

*bmarg-r* の強い発現が見出された貯精囊から調整された粗酵素液と *bmarg-f* の強い発現が見出された幼虫から調整された粗酵素液のそれぞれに含まれるアルギナーゼのアルギニンに対する  $K_m$  値、至適反応 pH ならびに至適反応温度には大きな差が認められなかった (第2表)。また、*bmarg-r*、*bmarg-f* から予想されるアミノ酸配列を持つタンパク質を発現させた大腸菌の抽出画分に含まれるアルギナーゼ活性にも大きな違いが認められなかった。

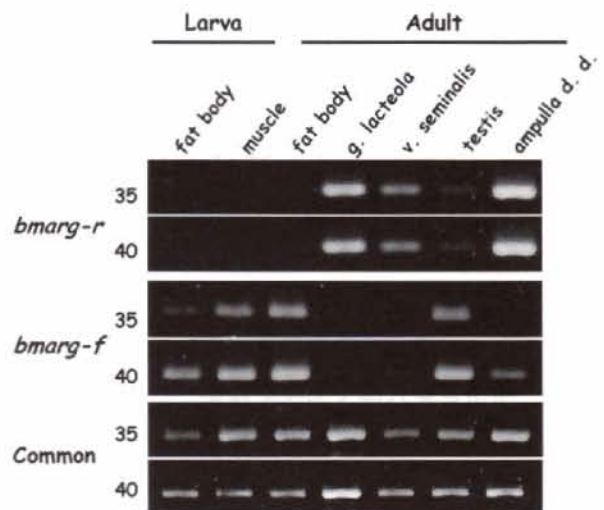


Fig. 3. Differential expression of *bmarg-r* and *bmarg-f* in larval and adult tissues. RT-PCR was carried out with *bmarg-r* specific primer pair (upper panels), *bmarg-f* specific primer pair (middle panels) and a common primer pair for the two *bmarg* isoforms (lower panels).



Table 2.  $K_m$  values, pH optimum and temperature optimum for arginase of *Bombyx mori*

	Crude extract		<i>E. coli</i> expression	
	v. seminalis	fat body	rbmARG-r	rbmARG-f
$K_m$ (mM)	34.8	17.3	28.9	5.76
Optimum pH	8.5	8.75	8.5-9.0	9.0 9.5
Optimum Temperature (°C)	30-40	30-40	30	40

#### 4. 考察

従来、カイコガの組織や器官からアルギナーゼを抽出するのに、0.1% CTAB を含む緩衝液を用いている [14]。本研究でもオス生殖腺各部位から同様の抽出法によりアルギナーゼを抽出し、活性を測定すると、貯精囊からのみその活性を見出した。しかし、0.1% CTAB を含まない緩衝液で抽出すると、①貯精囊以外のすべての生殖腺部位から活性が見出された。②貯精囊の活性は、CTAB を加えない方が高い活性を有していた。③乳白腺で見出された活性は貯精囊で見出される活性よりも高いという結果が得られた。大腸菌で発現したアルギナーゼ酵素液を希釈するのに、CTAB を含む緩衝液を用いると、活性は著しく阻害され、CTAB を含まない緩衝液ではそのような阻害は観察されなかった。このことから、CTAB はアルギナーゼ活性に対して阻害的に働くものと予想され、それが、相垣と小山内 [14] の結果と本研究の結果との矛盾を生じさせた原因と考えられる。単離されたアルギナーゼ遺伝子の発現は、貯精囊の他に、乳白腺、輸精管膨大部で発現が確認され、これは本研究で、強いアルギナーゼ活性が認められた部位と一致する。

乳白腺、貯精囊を含む透明腺、精包腺 + 白腺、および前立腺に含まれる分泌物は、射精に伴って、精子とともにメス精包内へと移行する [16]。カイコガの交尾中の精子成熟の場である精包は精子以外に細胞を含まないオス生殖腺に由来する物質のみからなる無細胞器官であり、さらには、メス体液との物質交流がない閉鎖系である。すなわち、射精中に変化がないならば、精包形成に関わる生殖腺各部位での射精前から射精後における変化は、

射精完了直後の精包の状態と等しいと考えられ、以降の精包内での変化は、なんらかの化学的な反応の結果生じたものであり、さらに、その反応は精子成熟に関連しているものと予想できる。乳白腺および貯精囊で見出されたアルギナーゼ活性は射精により多く減少し、この減少分を総合すると 4.58 mU となる。これに対して、射精完了直後、すなわち、交尾開始後 30 分の交尾囊 (精包) 内には、3.02 mU のアルギナーゼ活性が認められた。このことから、生殖腺に存在していたアルギナーゼは射精に伴い射精中に活性化もしくは著しい不活化の変化を受けずに、メスへと移動したといえる。

*bmarg-r* は成虫のオス生殖腺の一部である乳白腺、貯精囊と精管膨大部で、*bmarg-f* は、幼虫、成虫の脂肪体、幼虫筋肉、成虫精葉に特異的であった。すなわち、*bmarg-r* は、オス生殖腺特異的な遺伝子であるのに対して、*bmarg-f* は、雌雄に関係なく発現している遺伝子と考えられる。そして、両遺伝子は第 2 エクソンのユニークな選択的スプライシングによって生じる。ショウジョウバエの性決定遺伝子群に属する *transformer (tra)* があげられ、性決定遺伝子カスケードの *tra* の上流に位置する *Sex-lethal (Sxl)* が、第 2 エクソンの上流に結合することにより、オスでは第 1-2 エクソンの結合が起きるが、メスでは第 1 エクソンに第 2 エクソンの途中から結合する [21-24]。カイコガアルギナーゼ遺伝子の組織特異的なユニークなスプライシングは、オス生殖腺分化に関与した *tra* と同様なシステムにより制御されている可能性が考えられる。

貯精囊または脂肪体から調製された粗酵素液に含まれるアルギナーゼ活性ならびに 2 種類の

*bmarg* を発現させた大腸菌の粗抽出液に含まれるアルギナーゼ活性は、 $K_m$  値、至適反応 pH ならびに至適反応温度に大きな差が認められなかったことから *bmarg-r*、*bmarg-f* から作られる酵素タンパク質の酵素学的性質には違いはないものと考えられる。乳白線や貯精嚢に存在するアルギナーゼ活性の多くは射精に伴い、メスへと移行したことから、乳白線、貯精嚢の細胞で作られたアルギナーゼタンパク質は、生殖腺分泌物として、その内腔内に分泌されると考えられる。一方、幼虫の体液中には、アルギナーゼ活性は見出されないの、幼虫脂肪体や筋肉の細胞で合成されたアルギナーゼタンパク質は、細胞質内に留まって存在しているものと同様と予想される。よって、オス生殖腺にみられる分泌型アルギナーゼをコードする遺伝子が *bmarg-r* であり、その他の細胞質内に存在するアルギナーゼをコードする遺伝子が *bmarg-f* であると予想できる。通常、細胞外に分泌されるタンパク質の N 末端には、分泌時には取り除かれる疎水性アミノ酸に富んだシグナル配列が存在し、Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) のようなプロトコールによりコンピューターで予測ができる。しかし、2 種類の *bmarg* から予想されるアミノ酸配列中には、シグナル配列やその他の細胞内器官へ移動させるシグナル配列の候補は全く見出すことができなかつた。一方、*bmarg-f* から翻訳されるアルギナーゼタンパク質の予想一次構造は、*bmarg-r* のそれと比較して、N 末端が 10 アミノ酸残基のみ長いとした。よって、このアミノ酸残基の違いは、アルギナーゼの酵素学的性質には影響を及ぼさず、むしろ、細胞外への分泌性の有無に関与していると考えられる。しかし、この点については、*bmarg-f* および *bmarg-r* から生体内で翻訳されたタンパク質の N 末端解析による同定がされなければ、正しい推定とはいえない。

## 引用文献

- [1] Ikemoto, M., Tabata, M., Miyake, T., Kono, T., Mori, M., Totani, M. and Murachi, T. (1990): Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*. Purification and properties of the product. *Biochem. J.*, 270, 697-703
- [2] Gotoh, T., Sonoki, T., Nagasaki, A., Terada, K., Takiguchi, M. and Mori, M. (1996): Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Letters*, 395, 119-122
- [3] Cederbaum, S. D., Shaw, K. N. and Valente, M. (1977): Hyperargininemia. *J. Pediatr.*, 90, 69-73
- [4] Spector, E. B., Ricc, S. C. H. and Cederbaum, S.D. (1983): Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. *Pediatr. Res.*, 17, 941-944
- [5] Bernar, J., Hanson, R. A., Kern, R., Phoenix, B., Shaw, K. N. F. and Cederbaum, S. D. (1986): Arginase deficiency manifesting delayed clinical sequelae and induction of a kidney arginase isozyme. *J. Pediatr.*, 108, 432-435
- [6] Inokuchi, T., Horie, Y. and Ito, T. (1969): Urea cycle in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 783-787
- [7] Reddy, S. S. R. and Campbell, J. W. (1969): Arginine metabolism in insects. Role of arginase in proline formation during silkworm development. *Biochem. J.*, 115, 495-503
- [8] Pant R. and Kumar S. (1978): Is a urea cycle present in insects. *Biochem. J.*, 174, 341-344
- [9] Bursell, E. (1981): The role of proline in energy metabolism. In: Downer RGH (ed) Energy metabolism in insects. *Plenum Publishing Co.*, pp135-154
- [10] Sacktor, B and Childress, C. C. (1967): Metabolism of proline in insect flight muscle and its significance in stimulating the oxidation of pyruvate. *Arch Biochem*

- Biophys.*, 120, 583-588
- [11] 林 幸之 (1961) : 幼虫の組織磨砕液による尿素の生成について. 日蚕雑, 30, 13-16
- [12] Osanai, M. and Yonezawa, Y. (1984) : Age-related changes in amino acid pool sizes in the adult silkworm, *Bombyx mori*, reared at low and high temperature : A biochemical examination of the rate of living theory and urea accumulation when reared at high temperature. *Exp Gerontol.*, 19, 37-51
- [13] Osanai, M. and Aigaki, T. (1984) : Sex and strain differences in arginase activity of the adult silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 519-526
- [14] Aigaki, T. and Osanai, M. (1985) : Arginase activity in the silkworm, *Bombyx mori* : development profiles, tissue distribution and physiological role. *J. Comp. Physiol. B.*, 155, 653-657
- [15] Osanai, M., Aigaki, T., Kasuga, H. and Yonezawa, Y. (1986) : Role of arginase transferred from the vesicula seminalis during mating and changes in amino acid pools of the spermatophore after ejaculation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 16, 879-885
- [16] 松原藤好, 桑 前, 杉森秀昭, 石河正久, 角田素行, 松本継男 (1988) : 全齡2回人工飼料給餌によるカイコの飼育. 日蚕雑, 57, 118-122
- [17] Kasuga, H., Aigaki, T. and Osanai, M. (1987) : System for supply of free arginine in the spermatophore of *Bombyx mori* : arginine-liberating activities of contents of male reproductive glands. *Insect Biochem.*, 17, 317-322
- [18] Narahashi, T. (1963) : Dependence of resting and action potentials on internal potassium in perfused squid giant axons. *Adv. Insect physiol.*, 1, 175-256
- [19] Schimke, R. T. (1967) : Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.*, 237, 459-468
- [20] Patterson, D. and Shi, Y. B. (1994) : Thyroid hormone-dependent differential regulation of multiple arginase genes during amphibian metamorphosis. *J. Biol. Chem.*, 269, 25328-25334
- [21] Inoue, K., Hoshijima, K., Sakamoto, H. and Shimura, Y. (1990) : Binding of the *Drosophila* Sex-lethal gene product to the alternative splice site of transformer primary transcript. *Nature*, 344, 461-463
- [22] Hoshijima K., Inoue K., Higuchi I., Sakamoto H. and Shimura Y. (1991) : Control of doublesex alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. *Science*, 252, 833-836
- [23] Inoue, K., Hoshijima, K., Higuchi, I., Sakamoto, H. and Shimura Y. (1992) : Binding of the *Drosophila* transformer and transformer-2 proteins to the regulatory elements of doublesex primary transcript for sex-specific RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 8092-8096
- [24] Sakamoto, H., Inoue, K., Higuchi, I., Ono, Y. and Shimura, Y. (1992) : Control of *Drosophila* Sex-lethal pre-mRNA splicing by its own female-specific product. *Nucleic Acids Res.*, 20, 5533-5540

## 微小重力下でのカイコの胚発育

古澤壽治<sup>1)</sup>・一田昌利<sup>2)</sup>・大森克徳<sup>3)</sup>・小谷英治<sup>4)</sup>・長岡純治<sup>4)</sup>・  
杉村順夫<sup>4)</sup>・藤井 博<sup>5)</sup>・鈴木ひろみ<sup>6)</sup>・嶋津 徹<sup>6)</sup>・石岡憲昭<sup>3)</sup>

### Embryonic Development in Eggs of the Silkworm, *Bombyx mori*, under Microgravity

Toshiharu FURUSAWA<sup>1)</sup>, Masatoshi ICHIDA<sup>2)</sup>, Katsunori OHMORI<sup>3)</sup>,  
Eiji KOTANI<sup>4)</sup>, Sumiharu NAGAOKA<sup>4)</sup>, Yukio SUGIMURA<sup>4)</sup>, Hiroshi FUJII<sup>5)</sup>,  
Hiromi SUZUKI<sup>6)</sup>, Tohru SHIMAZU<sup>6)</sup> and Noriaki ISHIOKA<sup>3)</sup>

1) Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,  
29 Shimo-Hakubai-cho, Kitano Kitaku Kyoto 603-8326

2) Center for Bioresource Field Science, Kyoto Institute of Technology,  
Saga-Ipponki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 615-8354, Japan

3) Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen Tsukuba, Ibaraki 305-8505, Japan

4) Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan

5) Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-0053, Japan

6) Japan Space Forum, Shin-Otemachi Bldg.7F 2-2-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004, Japan

#### Abstract

The effects of gravity fluctuation and microgravity on the differentiation of embryo in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori* was examined using 2-dimensional (2D) clinostat and the International Space Station (ISS), respectively. The 24 hour-old eggs were rotated under 2D-clinostat. In the vertical rotation, the occurrence of the abnormal embryonic reversal rose with the increase of the rotation frequency. The percentage of the abnormality was the highest in the 24 hr-old eggs.

In order to load silkworm eggs into the International Space Station, the eggs were kept at 25°C for first 30 days after oviposition, and then at 5°C for 30 days. To examine the effect of microgravity on embryonic development, these eggs were exposed to the following conditions: The eggs were kept continuously at 2°C for about 3 months until recovery ( $\mu G \cdot 2^\circ C$ ). A part of these eggs were transferred two different conditions, One was incubated at 20°C for 6 days to resume embryonic development ( $\mu G \cdot 20^\circ C$ ), another one was set into a centrifuge in incubator to get similar condition of 1G to the earth, and kept at 20°C for 6 days to resume embryonic development (1G  $\cdot$  20°C). In addition, the Ground control and Shuttle Flight were set up as controls, namely, as the Ground Control, the eggs were transferred from Japan (Kyoto) to Kennedy Space Center, and back to Japan without going to the ISS. As the control in Shuttle Flight, the eggs were transferred once to the ISS by space shuttle, and then coming back to the earth without keeping in the ISS.

Under above five conditions, the embryos underwent development normally in the three experimental lots, Ground Control, Shuttle Flight and  $\mu G \cdot 2^\circ C$ , also about 50% of embryos in 1G  $\cdot$  20°C perform embryonic reversal. In contrast, any embryos did not carry out the embryonic development in  $\mu G \cdot 20^\circ C$ , suggesting that microgravity will affect the embryonic development in the silkworm egg.

From these data, the interrelation between microgravity and embryonic development in the clinostat and in the ISS is discussed.

Key Words: *Bombyx mori*, Embryonic reversal, Microgravity, International Space Station, Clinostat



- 連絡先： 1) 財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29  
E-mail: zai-kinugasakai@nifty.ne.jp, TEL 075-461-5949  
2) 京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、616-8354京都市右京区嵯峨一本木町  
3) 宇宙航空研究開発機構、305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1  
4) 京都工芸繊維大学工芸科学研究科応用生物学部門、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町  
5) 九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発センター、812-8581 福岡市東区祐崎6-10-1  
6) 日本宇宙フォーラム、100-0004 東京都千代田区大手町2-2-1 新大手町ビル7階

## 1. まえがき

国際宇宙ステーション (ISS) は地上から約400km 上空を周回している。そこでは、太陽フレアや銀河系からの宇宙放射線が飛来し、また微小重力の環境である。ISSに滞在する宇宙飛行士は常にこれらの環境に曝されているので、宇宙放射線の生物学的評価法を開発する目的で、宇宙環境に対する生物の応答についての試験が要求されている。このため、近年、数種の生物がスペースシャトルに搭載されることによって解析されている。しかし、これらの生物を搭載したスペースシャトルの飛行期間が短いため、被曝期間も短い。その生物材料の中にはショウジョウバエ幼虫[1] やナナフシの胚[2] が含まれ、これらに対する宇宙放射線と微小重力の影響が示されている。

これらの実験では地球上で維持された地上対照群に比べて飛行群で高い頻度で突然変異が発生することが報告され、高エネルギー重粒子によるヒットと微小重力との相乗効果を暗示した。同時に、昆虫に対する宇宙放射線の生物学的影響が微小重力の下では高められる。しかし、宇宙放射線と微小重力あるいはこれら両者の影響は、9日間のミッション中に培養されたヒト、マウスやハムスターの培養細胞の微小核では認められない[3]。

1997年、カイコの卵 (過剰半月紋退化腹肢  $E^{D^b}$ ) がテスト動物として9日間、アメリカのスペースシャトル・アトランティスに搭載された[4]。この品種は  $E$ -群疑似遺伝子 ( $E-1$  pseudo allelic gene) を持ち、その遺伝子は第6染色体 遺伝子座位 0.0 に座位するホメオオティック遺伝子[5] で、スペースシャトルへの搭載結果[4] から胚発生の初期段階で第4体節と第5体節の間で融合する形態的な異常がみられ、また星状斑紋や半月紋の異常な発

現と同様に体節融合も地上群よりもフライト群で有意な差で現れた。フライト群での異常発生頻度は、宇宙放射線の影響というよりも微小重力下における背面閉鎖の異常に因ると考えられる。これは、フライトサンプルから分化した異常胚と星状胚の間で宇宙放射線の吸収線量との間で差がないことや、反転が微小重力の下では進行しなかったことによる[4]。しかし、ロシアのミールに約40日間搭載した休眠卵では、第二世代における卵色突然変異の頻度が地上群では $10^{-5}$ であったのに対して $124 \times 10^{-3}$ であった[6]。これらの結果は蚕卵が、宇宙放射線と微小重力の影響をみるに恰好な生物材料であることを示している。

ところで、1998年に国際宇宙ステーションを利用した生物実験に関する国際公募があり、先のアトランティスでの実験結果や蚕卵の生理特性を利用した宇宙生物実験を踏まえた提案を行った。その実験の目的は既に Biological Science in Space [7] に紹介しているが、主なる大きな目的は、1) 宇宙放射線の長期被曝による体細胞突然変異 2) 微小重力による胚発生への影響 3) 宇宙放射線と微小重力の相乗による体細胞突然変異について検討することである。

国際公募に採択され、国際宇宙ステーションへの卵の打ち上げ準備が2007年11月より始まった。2009年3月に打上げと決まり、これを予想して2008年12月から人工飼料で黒縞系統と小石丸の二品種を飼育し、搭載用卵を採取し、休眠覚醒卵の準備を始めた。しかし、この6月打上げの計画が変更され、8月6日に延期となった。さらに、この8月6日打上げフライトも急きよ「食料打上げのために冷蔵庫がキャンセルされ」卵の打ち上げがとり止めになり、これまで準備した搭載用卵は5℃で約7カ月経過し、さらに宇宙ステーションで3カ



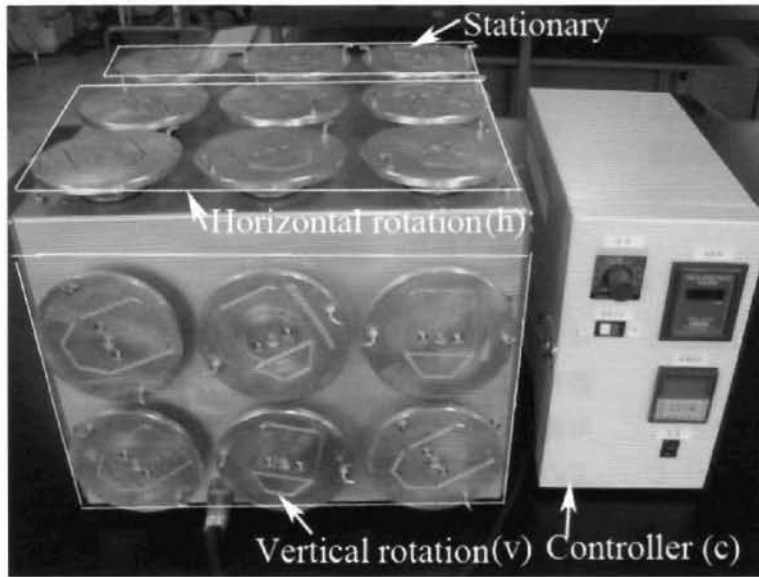


Fig. 1. Two-dimensional clinostat, which consists of 6 vertical rotation (v) and 6 horizontal rotation (h) turntables. The rotation numbers of these turntables are regulated by the controller (c). With contrast of these experiment turntables, three stationary turntables are equipped as control. The eggs were adhered on the paper, and then attached onto these turntables.

月滞在させるには困難な卵となった。この時点までの卵の打上げ延期は5回であった。幸い遅延用に5月から新たに黒縞系統と小石丸の二系統が飼育されていたので、以後の打上げに対応できるよう準備はされていた。その後、またもや2回の打上げ延期があり、3度めの2009年8月28日午後11時59分（日本時間29日午前12時59分）にケネディ宇宙センターから打ち上げられた。これまでに至る搭載延期は合計8回であった。

このような事情から、今回搭載したすべての卵の内、約30%しか休眠から覚醒していない点で、当初の目的を満足させるものではなかった。この間、関係各位の協力を得て、これまで微小重力による胚の発育影響についての実験が行われ、その結果を得たので、地上予備実験の結果も含め取りまとめたので報告する。

なお、宇宙放射線影響については、現在解析中であるので、別途報告する予定でいる。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試卵

クリノスタットを用いた重力変化の影響をみる実験では  $E^{D^2}$  系統の卵を用いた。国際宇宙ステーションに搭載する卵は、黒縞 ( $P^S/p$ ) に小石丸 ( $p/p$ ) を掛け合わせ、産まれた卵（休眠卵）を用

いた。

### 2.2 蚕卵への二次元クリノスタット回転処理

青熟系統の親蛾を直径3.5cmの円形台紙上に置き産卵させた。産卵後24時間、25℃に保温した後、46℃の塩酸（比重1.075）に5分間浸酸処理することによって胚が休眠に入るのを避けた。この直後から0、24、48、72時間後に得られた卵を二次元クリノスタット装置（川崎重工業）の静止、垂直および水平ターンテーブルに設置した（図1）。回転数30、42.5、55rpmの3区の条件下で、27℃でふ化2日前まで回転させた。

回転処理後の卵を温浴中（73℃、10分間）に浸すことにより内部の胚を固定し、摘出胚の発育ステージを Ohtsuki の発育表[7] に基づき判定した。

### 2.3 搭載卵の準備

#### 2.3.1 卵の採取

搭載卵採取のための準備を京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター（一田研究室）で行った。黒縞×小石丸を2007年12月より人工飼料によって飼育を開始するとともに、打上げ延期に備え、2009年4月下旬から5月上旬に人工飼料による飼育を開始した。

緒論にも述べたように、実際は予定の打上げ日より、延期されたので、2009年4月より飼育を

開始した蚕から卵を採取した。卵の採取は5月30日から6月15日の間に行い、7月17日までの約1カ月25℃で保護し、その後5℃に冷蔵し、打ち上げまでの間、約1カ月5℃に冷蔵した。日本時間8月29日12時59分に打ち上げられた。

### 2. 3. 2 搭載卵の卵容器への収納

112mm × 110mm × 15mm 容器1枚 (RadSilk Case) に約2,200粒の卵を貼り付けた。図2 a に示すように、1枚は、帰還後の遺伝子解析用とし、RadSilk Case を3枚1組 (RadSilk Case Triple) とし、各セットには、熱蛍光線量計 (TLD-MSO) と個体飛跡検出器 (CR-39) から成る受動積算型宇宙放射線計測器 (PADLES: Passive Dosimeter for Lifescience Experiments in Space) を貼り付け、放射線影響や微小重力の影響の検討用とした。搭載する際には、先の RadSilk Case 1枚 (遺伝子解析用) と RadSilk Case Triple とを1セット準備し、以下の実験区に合わせて5セット用意し、これらが GLACIER (General Laboratory Active Cytogenic ISS Experiments Refrigerator: 低温実験用冷蔵庫) に保管され、5℃に保たれスペースシャトルで国際宇宙ステーションまで移送された。

- ① セット1: シャトルフライト群 (対照群): 地上からスペースシャトルに搭載され、他の4セットが国際宇宙ステーションに移された後、1セットだけシャトル帰還の際に地上に戻り、以後2℃で保管された。

シャトルから宇宙ステーションに移された4セットは、2℃で約3カ月、MELFI (Minus Eighty Degree Celsius Laboratory Freezer for ISS: 冷凍・冷蔵庫) で保護された。この4セットは宇宙ステーション内で宇宙飛行上により次の処理が施された (図2 b)。

- ② セット2:  $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$  保護群: 1セットは帰還まで MELFI 内で2℃下に連続保護された。  
 ③ セット3:  $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$  培養群: 1セットは CBEF (Cell Biology Experiment Facility: 細胞培養装置) に移され20℃で6日間保護  
 ④ セット4:  $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$  培養群: 残りの2セッ

トは CBEF 内の1G 発生用遠心器に設置され20℃で6日間保護。この場合、遠心器のバランスをとるため2セット用いたが、1セットは研究用、他の1セットは教育用として帰還後、全国の教育機関、博物館に分譲された。

なお、卵の保護は、休眠から覚醒させるためには5℃が最適であるが、MELFIでの2℃保護は、器械の物理的制約のためこれ以外の温度設定は不可能であるため、止む無く2℃で保護した。CBEFでの培養期間は、当初の計画では25℃で8日間培養する予定であったが、CBEFが他の実験グループとの共用であったため、実験条件のすり合わせで上記のようになった。

帰還時には、 $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$  保護群、 $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$  培養群および  $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$  培養群の各セットから1枚の RadSilk Case がはずされ、マイナス95℃に冷凍された。これらは遺伝子解析用として用いられる。残りのサンプルは4℃で Double Cold Bag に保管され帰還した (図2 c)。

## 3. 実験結果

### 3. 1 重力変化が胚運動に及ぼす影響

#### 3. 1. 1 クリノスタット回転数と反転異常

$E^{10}$  系統の卵を休眠回避させるため産卵20時間後に人工ふ化 (即時浸酸) することによって胚を発育させた。この卵を回転数30、42.5および55rpmで垂直および水平方向で回転させた。図3に示す通り、水平回転区では、55rpmで2.7%、42.5rpmで1.3%の胚に反転異常が認められた。これに反し、垂直回転区では stage20 (頭胸分節期) および stage21 (反転期) で発育停止する異常胚がみられ、回転数30rpmで平均24%、42.5rpmで36.6%、55rpmで52%みられた。また、ターンテーブルに設置した卵の位置が回転中心より大きくなるに伴い、その出現率が上昇した。

#### 3. 1. 2 重力変化を与える時期と反転異常との関連

浸酸処理後、0、24、48、72時間の卵を30rpm

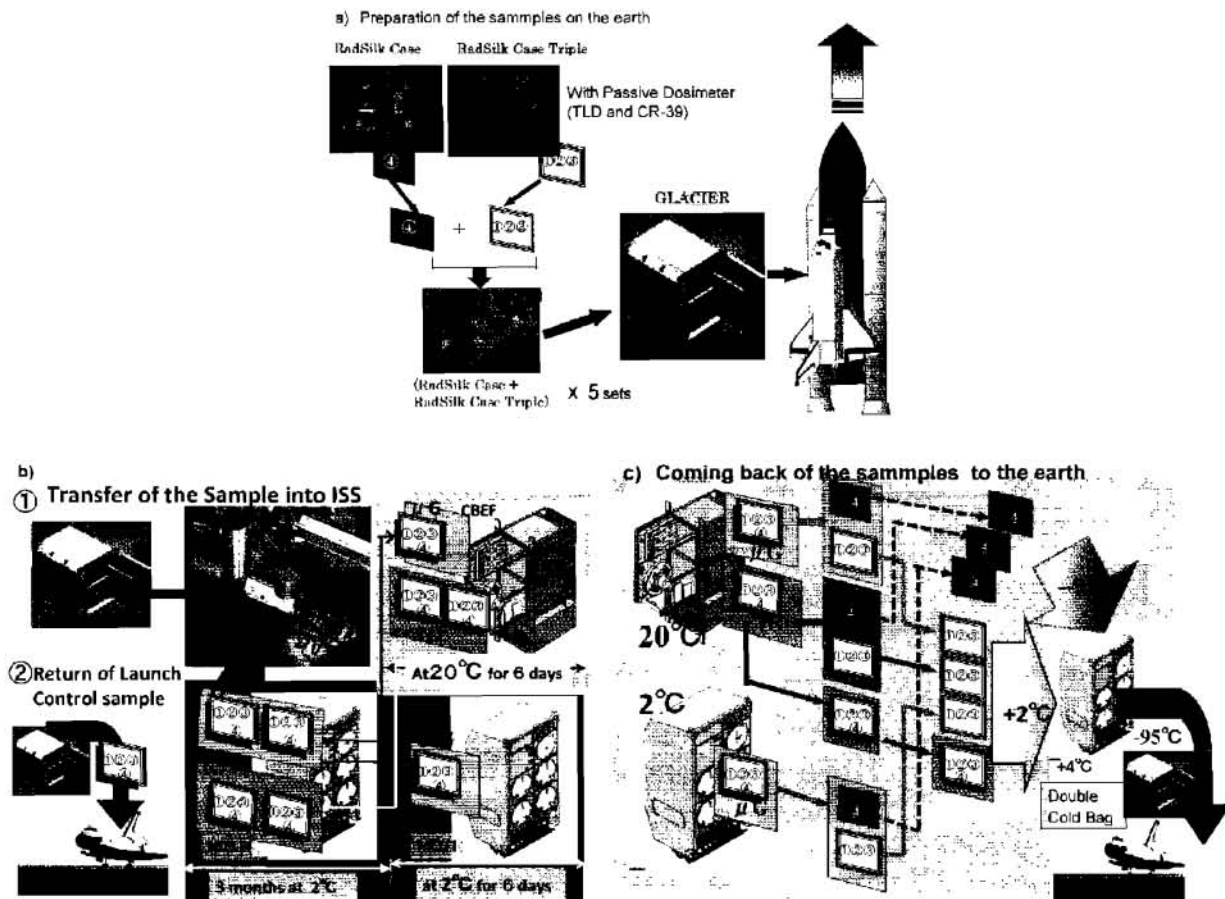


Fig. 2. Flows of RadSilk Cases, which contained the silkworm eggs, from the preparing the sample for the loading on the space shuttle(a), through the process of the incubation of the eggs in the International Space Station (ISS) (b), to the return of the sample to the earth(c).

- a) In order to deal with the egg samples smoothly in the complicated processes as you see later, the RadSilk Case (112mm × 160mm × 15mm) (designated as No.1), which contained about 2,200 eggs, was prepared as indicated at the upper-left side. As indicated at the right side, the "RadSilk Case Triple", which consisted of three RadSilk Case (No. 1, 2 and 3) equipped with Passive Dosimeter (TLD and CR-39) was prepared. The former No.1 is used for analysis of gene expression, and the latter No. 1, 2 and 3 for the detection of somatic mutation after hatching and of abnormal reversal. Before the loading the these sample onto space shuttle, the RadSilk Case (No.1) and RadSilk Case Triple were combined to make one set (RadSilk Case + RadSilk Case Triple), and then five sets were put into at 4°C in the GLACIER (General Laboratory Active Cytogenic ISS Experiment Refrigerator).
- b) The five sets in GLACIER were transferred to the ISS, the four sets were moved into ISS (red circle 1), the remainder one was left in the space shuttle, and then returned, use as "Flight Control" sample (red circle 2). The four sets were kept at 2°C in the MELFI (Minus Eighty Degree Celsius Laboratory Freezer for ISS) for about 3 months (designated as " $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ "). Thereafter, one set remained at 2°C in MELFI for 6 days, and the remainder three sets were transferred to 20°C in CBEF (Cell Biology Experiment Facility) to resume embryonic development, one set under microgravity (designated as " $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ "), and the other two sets under about 1G (designated as " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ ") which was generated by a centrifuge in CBEF.
- c) After the incubation, one RadSilk Case (No.4) was take out from each experiment lot of " $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ ", " $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ " and " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ ". These three RadSilk Case were frozen in minus 95°C to use as the analysis of gene expression, and RadSilk Case Triple (No.1 to 3) of " $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ ", " $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ " and " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ ", and the "RadSilk Case + RadSilk Case Triple" (No.1 to 4) of " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ " were kept at 2°C in Double Cold Bag. These samples were return to the earth by space shuttle.



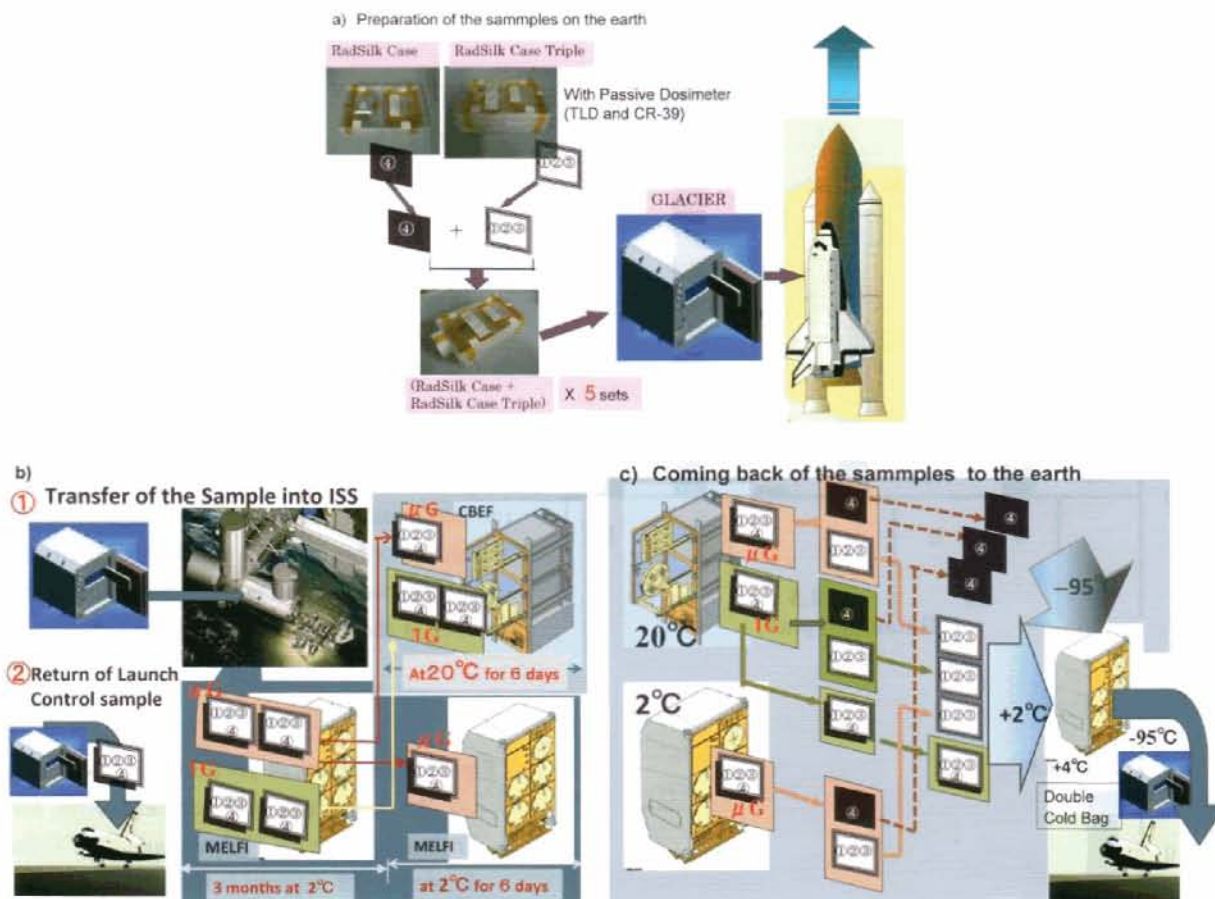


Fig. 2. Flows of RadSilk Cases, which contained the silkworm eggs, from the preparing the sample for the loading on the space shuttle(a), through the process of the incubation of the eggs in the International Space Station (ISS) (b), to the return of the sample to the earth (c).

a) In order to deal with the egg samples smoothly in the complicated processes as you see later, the RadSilk Case (112mm × 160mm × 15mm) (designated as No.4), which contained about 2,200 eggs, was prepared as indicated at the upper-left side. As indicated at the right side, the "RadSilk Case Triple", which consisted of three RadSilk Case (No. 1, 2 and 3) equipped with Passive Dosimeter (TLD and CR-39) was prepared. The former No.4 is used for analysis of gene expression, and the latter No. 1, 2 and 3 for the detection of somatic mutation after hatching and of abnormal reversal. Before the loading the these sample onto space shuttle, the RadSilk Case (No.4) and RadSilk Case Triple were combined to make one set (RadSilk Case + RadSilk Case Triple), and then five sets were put into at 4°C in the GLACIER (General Laboratory Active Cytogenic ISS Experiment Refrigerator).

b) The five sets in GLACIER were transferred to the ISS, the four sets were moved into ISS (red circle 1), the remainder one was left in the space shuttle, and then returned, use as "Flight Control" sample (red circle 2). The four sets were kept at 2°C in the MELFI (Minus Eighty Degree Celsius Laboratory Freezer for ISS) for about 3 months (designated as " $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ "). Thereafter, one set remained at 2°C in MELFI for 6 days, and the remainder three sets were transferred to 20°C in CBEF (Cell Biology Experiment Facility) to resume embryonic development, one set under microgravity (designated as " $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ "), and the other two sets under about 1G (designated as " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ ") which was generated by a centrifuge in CBEF.

c) After the incubation, one RadSilk Case (No.4) was take out from each experiment lot of " $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ ", " $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ " and " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ ". These three RadSilk Case were frozen in minus 95°C to use as the analysis of gene expression, and RadSilk Case Triple (No.1 to 3) of " $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ ", " $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ " and " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ ", and the "RadSilk Case + RadSilk Case Triple" (No.1 to 4) of " $1\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ " were kept at 2°C in Double Cold Bag. These samples were return to the earth by space shuttle.

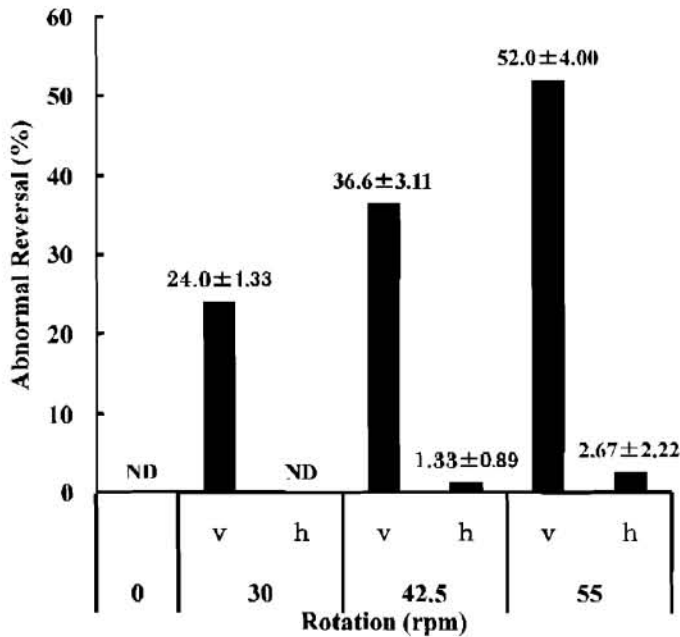


Fig. 3. The effects of turntable-rotation numbers on the embryonic development in the silkworm eggs. Twenty hours later after oviposition, the silkworm eggs were treated with 6N HCl solution at 46°C for 5 minutes not to enter into diapause state. The eggs were washed in tap water and air-dried. Then, they were adhered to the paper and then attached onto the vertical (V) and horizontal turntable (h). Both turntables were rotated at 30, 42.5 and 55 of rotation number in a minute for 8 days. In order to check whether embryo will develop normally, these eggs were dissected out, and counted the number of the abnormal reversal embryo.

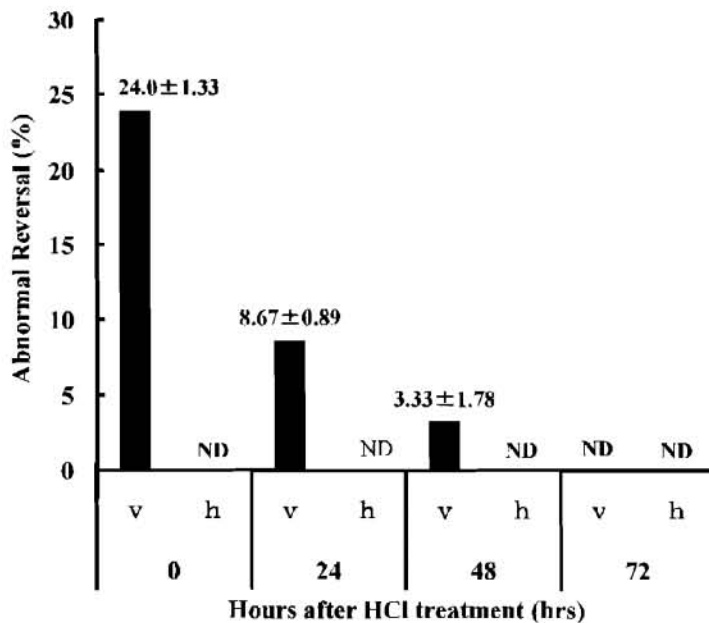


Fig. 4. The effects of gravitational fluctuation on the embryonic development after the treatment with 6N HCl solution at 46°C for 5 minutes for artificial hatching. Immediately after the treatment (0hr), 24hrs, 48hrs and 72hrs after the treatment, the eggs were adhered to the paper and attached onto the vertical (V) and horizontal turntable (h). Both turntables were rotated at 30 of rotation number in a minute until 2 days before hatching. In order to whether embryo will develop normally, these eggs were dissected out, and counted the number of the abnormal reversal embryo. ND: not detectable.

で垂直および水平回転させた。その結果、図4に示すように、浸酸処理直後から回転処理した場合に比較して、24時間後では8.7%、48時間では3.3%と反転異常胚出現率は低下し、72時間後ではすべての受精卵が正常に発育した。

### 3. 2 微小重力下における胚の発育

#### 3. 2. 1 宇宙ステーション内での卵の休眠覚醒と胚の発育

スペースシャトルで搭載用卵（5組）は2009年8月29日12時59分（日本時間）に打ち上げられ、

国際宇宙ステーションまで運ばれた。卵の一部（RadSilkCase + RadSilk Triple）はシャトル飛行中の宇宙放射線による影響をみるためシャトル帰還の際に地上に持ち帰り、筑波宇宙センターで2℃に保管された（Shuttle Flight 群）。残りの4組の卵保管容器はステーション内で2℃に約3カ月間保護された。これら4組の卵の休眠覚醒の進行程度を推定するため、地上で、2℃で連続保護した卵（Ground Control: ISSには運ばずに京都・つくば経由ケネディ宇宙センター間往復）を、25℃に移し、14日後のふ化率を調査した結果から、休



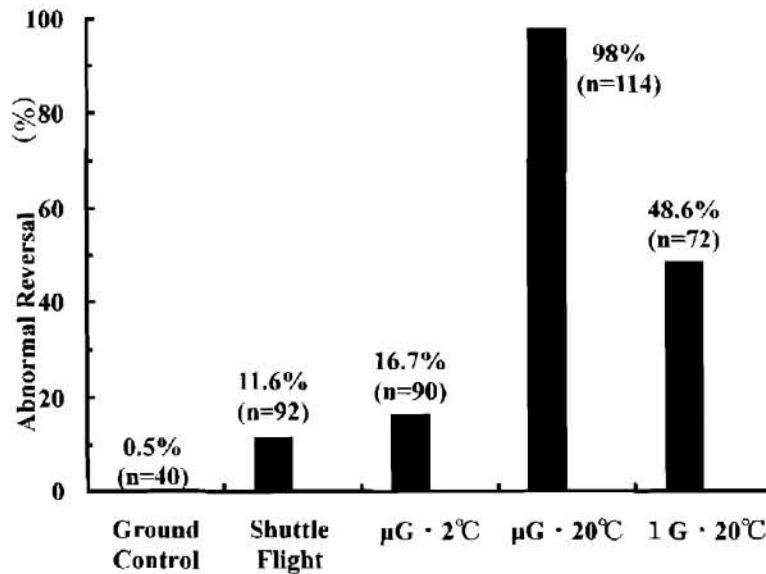


Fig. 5. Incidence of abnormal reversal in each experimental lot.

Ground Control : The eggs were transferred from Japan (Kyoto) to Kennedy Space Center, and back to Japan without going to the ISS.

Shuttle Flight : The eggs were transferred once to the ISS by space shuttle, and then coming back to the earth without keeping in the ISS.

$\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$  : The eggs were kept continuously at  $2^\circ\text{C}$  in the MELFI in the ISS just before recovery into Double Cold Bag as shown in Fig.2C.

$\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$  : The eggs were kept continuously at  $2^\circ\text{C}$  in the MELFI for 3 months, and then transferred to  $20^\circ\text{C}$  and incubated in CBEF for 6 days to resume embryonic development.

1G · 20°C : The eggs were kept continuously at  $2^\circ\text{C}$  in the MELFI for 3 months, and then set into a centrifuge in CBEF to get similar condition of 1G to the earth, and kept at  $20^\circ\text{C}$  for 6 days to resume embryonic development.

n : The number of embryos after the stage of blastokinesis which were selected to observe their morphology from dissected eggs.

眠覚醒した卵は約30%であった。その後、このふ化率は30%を上回ることはなかった。従って、ISS内で保護されている4組の卵の休眠覚醒の割合も30%と推定した。

このように休眠覚醒が不十分ではあるが、4組の内3組が11月17日20時33分(日本時間)にCBEFに移され、1組は微小重力下( $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ 群)で、他の2組は地上とほぼ同一の1Gの状態に保つようにCBEF内の遠心機に設置された(1G · 20°C群)。そして、これらの3組はCBEF内で、 $20^\circ\text{C}$ で6日間(11月23日18時55分培養終了)、培養された。なお、4組の内残りの1組はそのまま $2^\circ\text{C}$ でさらに6日間保護を続けた( $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ 群)。

そして、上記のCBEF内の $20^\circ\text{C}$ での培養群での胚の発育状況を推定するため、地上対照群(Ground Control)として $2^\circ\text{C}$ 保護していた卵を $20^\circ\text{C}$ に移

し、毎日卵を採取し、温湯固定した。そして、これらの卵を解剖することによって、ISSのCBEF内での培養期間中の胚の発育状況を推定した。

その結果、培養開始時の胚は、越冬期(Stage11~14)であったが、6日後には反転前期(Stage20)まで進んでいることが分かった。

### 3. 2. 2 ふ化しなかった卵の胚の発育状況

前節に記載した実験群(Ground Control, Shuttle Flight,  $\mu\text{G} \cdot 20^\circ\text{C}$ 群, 1G · 20°C群と $\mu\text{G} \cdot 2^\circ\text{C}$ 群)において、ふ化しなかった卵の胚の発育状態を調べた。その結果、反転期からふ化直前までの胚が反転しているか否かについて実体顕微鏡の下で観察し、反転していない胚の割合を図5に示した。

その結果、地上で $2^\circ\text{C}$ に連続保護し、 $20^\circ\text{C}$ に移すことによって発育した胚(地上対照区)では、

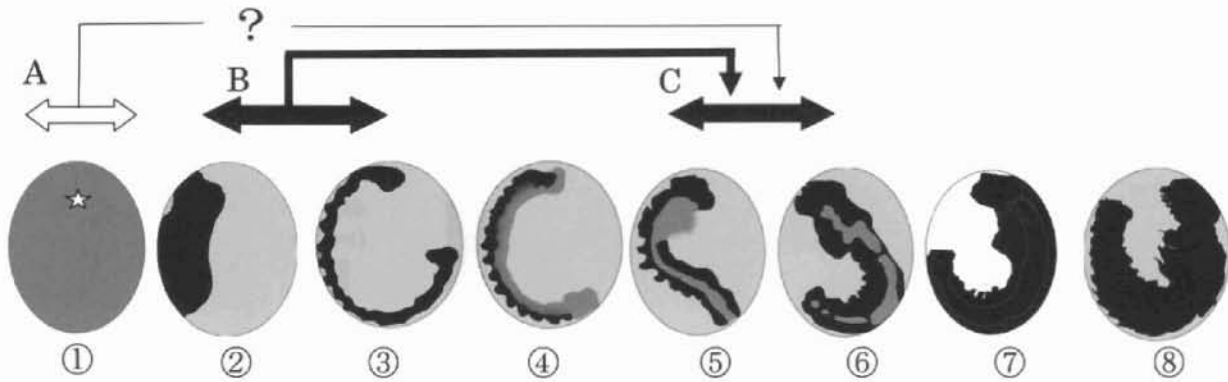


Fig. 6. Embryonic stages which is supposed to affect the embryonic reversal.

① The second maturation division and syngamy occur. Progress of synchronous cleavage mitosis is followed by uniform invasion of the periplasm. ② The germ band is formed. Suitable for acid treatment for artificial hatching. ③: Formation of stomodeum and proctodeum, 2 days after oviposition. ④: 3~3.5 days, Invagination of the trachea and the proctodeum proceeds and reaches the 16th segment. ⑤ and ⑥: Blastokinesis; embryonic reversal occurs from 4 through 5 days after oviposition. ⑦: 6 and 7 days after oviposition, taenidium in spiral band is formed in the tracheal tube. ⑧: 8 and 9 days after oviposition. Pigmentation begins at the head, and pigments formed seta and epithelium. A: Not decided experimentally whether this stage would be affect to the embryonic reversal (blasokinesis). B: The stages of ② and ③ will affect the embryonic reversal. C: Stages of embryonic reversal.

胚は完全な幼虫態を形成し、反転が終了していた。また、シャトルに搭載され宇宙ステーションには滞在せずに帰還し、その後地上で2℃に保護され、さらに25℃に移されることによって发育した胚（Shuttle Flight 群）においても、反転は終了し正常な胚发育が行われていた。また、ステーション内で地上とほぼ同じ1G重力下で发育させた胚（1G・20℃群）においても約50%の胚が、反転が終了していた。さらに、宇宙ステーション内の微小重力下で、2℃で連続保護され（ $\mu$ G・2℃群）、地上に帰還後、发育させた胚においても反転は終了し、正常に发育した胚が約83%観察された。これらに反し、微小重力下での2℃で保護された後、ステーション内で20℃に移す（ $\mu$ G・20℃群）ことによって发育させた場合ほとんどの胚は反転していなかった。

以上の結果から、 $\mu$ G20℃培養のみが全く反転せず、これに反し1G・20℃群では約50%の胚の反転が終了し、残りの実験区では反転が終了し脚が内側に向け正常に胚发育が進行した。このような結果は、1997年のシャトル実験での結果[4]と同じであることが分かった。

#### 4. 考察

地球上で生命が発生してから、38億年間、生物は重力に依存して進化してきた[8]。重力は生物にとってどのような意味を持っているのか？このことを知るためには、微小重力装置による重力変化やスペースシャトルや国際宇宙ステーション内の微小重力下での生物現象を観ることは、重力と生物現象との関わりを解明する糸口を与えるものである。重力と発生・分化との関係については、宇宙での微小重力下に生物を置く方法とクリノスタットによる重力変化の下に生物を置く二つの方法が用いられ、胚発生や細胞構造や細胞機能に及ぼす微小重力の影響が調べられ、細胞骨格形成に変化がみられるという[9]。サンショウウオの受精卵が宇宙ステーション・ミールに搭載したところ、分割、神経管形成、不規則な体節形成に影響がみられた[10]。さらに、微小重力はマウスのプロテインキナーゼをリン酸化することによって活性化し[11]、Zebrafishの心臓での遺伝子発現が微小重力下で増加している[12]。このように、微小重力あるいは重力変化が与える生体影響につい

て、発生における形態形成だけでなく、生化学的な酵素レベルや遺伝子レベルとの関連について研究されている。

ところで、カイコの胚発生と微小重力との関連については、休眠覚醒した卵をスペースシャトルに搭載したところ、地上対照群に比べフライト群において胚の反転が起こりにくいことが報告されている[4]。この結果を踏まえ、蚕の卵内での胚発生において、特に反転現象に注目し、これを指標に微小重力と反転現象との関係についてクリノスタットと宇宙ステーションに卵を搭載することによって検討した。

### 1) クリノスタット実験

クリノスタットを用いた重力変化の条件のもとでは、図3と4に示したように産卵20時間～72時間の卵を垂直回転させることにより重力変化をおこした下では、反転が起こらないことが分かった。実際に、反転が起こるのは産卵されてから4.5日～5日(25℃)であるが、この時期の卵をクリノスタットに設置し、重力変化を起こしても反転は正常に起こった。このような結果は、重力変化が反転運動(図6の⑤と⑥)に直接作用するのではなく、20時間～72時間の発生段階で重力が感知され(図6の②と③の发育段階)、その情報が、反転が起こる時期(図6の⑤から⑥の段階)まで持ち越されることを示しているのだろう。しかし、今回は休眠卵が休眠に入らないように塩酸処理することによって、胚の发育を続行させたため、産卵直後から産卵20時間までの卵については検討していない。この間に起こる卵内での出来事は、受精核の分裂と分裂核の卵周辺への移動、しょう液膜細胞の形成、胚帯の肥厚、胚域の形成など将来の形態形成の基盤がこの時期(図6の①)に完成されるため、より詳細に検討する必要がある。

### 2) ステーション内での実験

一方、宇宙ステーション内に卵を20℃で6日間胚を発生させ、卵を低温に保護して地上に持ち帰った。この6日間で胚はどの段階まで発生したか?地上ではステーション内とほぼ同じ温度条件下(2℃)で保護してきた卵を、同じく20℃に移し、卵内の胚の发育形態を観察することによって、

この間にステーション内での胚の发育状況を推定した。その結果、20℃、6日間での胚の发育は反転が終了する前の段階であり(図6の⑤)、反転は終了していなかった。それにも関わらず、卵解剖による胚の形態観察結果は(図5)、ステーションのCBEF内では、1G下では反転が正常に進行したのに対し、微小重力下では反転は正常に進行しなかったことを示した。すなわち、今回の実験結果は微小重力が胚運動に直接影響を与え、反転を起こさなかったことを示している。

STS84におけるスペースシャトルを利用した微小重力下での実験では休眠覚醒卵を用い、シャトル内で胚を发育させふ化直前まで微小重力に曝したので、微小重力そのものが反転運動に直接影響したことにあると考えていたので、今回の実験結果は予想に反した。

しかし、今回のクリノスタット実験、ステーション内でのCBEFを利用した実験では、反転以前の发育段階に反転運動を起こさせない要因が発生していることを推察させた(図6)。そして、産卵20時間後に浸酸することによる休眠回避後の胚发育と、休眠覚醒後の胚发育の開始時期とはほぼ同一であるのでクリノスタット実験による重力変化、およびステーションでの微小重力での実験結果から、反転運動に影響を与える時期は、本実験からは産卵20時間後から72時間にあることが考えられるが、さらに産卵直後から産卵20時間までの胚発生時期における重力変化や微小重力が反転運動に及ぼす影響については検討する必要がある。

## 文献

- [1] Inoguchi, M. and Ikenaga, M. (2000) : Cosmic irradiation. In : Inoguchi, H., Okada, M., Kuchitsu, K. and Kobayashi, S. (Eds.), Science for Space Utilization Research, Shokabo, Tokyo, pp.235-254.
- [2] Bucher, H., Facius, R., Horneck, G., Reitz, G., Graul, E., Berger, H., Hoffken, H., Ruther, W., Heirich, W., Beaujean, R. and Enge, W. (1986) : Embryogenesis and organogenesis

- of *Carausius morosus* under spaceflight conditions. *Adv. Space Res.*, **6**, 115-124
- [3] Ikenaga, M., Hirayama, J., Kato, T., Kitao, H., Han, Z., Ishizaki, K., Nishizawa, K., Suzuki, F., Cannon, T.F. and Matsumiya, H. (2002) : Effect of space flight on the frequency of micronuclei and expression of stress-responsive proteins in cultured mammalian cells. *J. Radiat. Res.*, **43 Suppl.**, S141-S147
- [4] Furusawa, T., Kotani, E., Ichida, M., Sugimura, Y., Yamanaka, H., Takahashi, S., Fukui, M., Kogure, K., Sakaguchi, B., Fujii, H., Ikenaga, M. and Watanabe, T. (1998) : Embryonic Development in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, exposed to the space environment. *J. Jpn. Soc. Microgravity Appl.*, **15, Suppl. 11**, 666-671
- [5] Doira, H. (1979) : Genetic stocks of the silkworm. In "The silkworm : an important laboratory tool. Ed. Tazima, Y." pp.53-81, Kodansha (Tokyo).
- [6] Morimoto, K. and Sakai, A. (1998) : Long-term effect of cosmic environment on the diapausing egg of the silkworm, *Bombyx mori*. Rept. on the Results of Space Experiments. NASDA., IV105-115.
- [7] Ohtsuki, Y. (1979) : Silkworm eggs. In "A general Textbook of Sericulture (ed., Japanese Society of Sericultural Science) pp.156-173.
- [8] Ronca, A.E. (2003) : Mammalian development in space. *Adv. Space Biol. Med.*, **9**, 17-51
- [9] Crawford-Young, S.J. (2006) : Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, **50**, 183-191
- [10] Glualandris-Parisot, L., Husson, D., Bautz, A., Durand, D., Kan, P., Arimar, C., Membre, H., Duprat, A.M. and Dournon, C. (1992) : Effects of space environment on embryonic growth up to hatching of salamander eggs fertilized and developed during orbital flights. *Biol. Sci. Space*, **16**, 3-11
- [11] Wang, Y., Xie, Y., Wyglc, D., Shen, H.H., Puscheck, E.E. and Rappolee, D.A. (2009) : A major effect of simulated microgravity on several stages of preimplantation mouse development is lethality associated with elevated phosphorylated SAPK/JNK. *Reprod. Sci.*, **16**, 947-959
- [12] Gillete-Ferguson, I., Ferguson, D.G., Poss, K.D. and Mooman, S.J. (2003) : Changes in gravitational force induce alterations in gene expression that can be monitored in the live, developing zebrafish heart. *Adv. Space Res.*, **32**, 1641-1646.
- 日本実験棟「きぼう」での卵の保護に用いられた器械、GLACIER、CBEF、MELFIの機能などは、<http://kibo.jaxa.jp/experiment/> を参照

# エビガラスズメ下唇腺における *Hox* 遺伝子の発現解析

白井孝治・岡 誠・深本花菜・木口憲爾

## Expression of *Hox* Genes in Labial Glands of the Sweet Potato Hornworm, *Agrius convolvuli*

Koji SHIRAI\*, Makoto OKA, Kana FUKAMOTO and Kenji KITAGUCHI

Division of Bioresource and Environmental Science, Faculty of Textile Science and Technology,  
Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

### Abstract

The sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli* is classified within the Bombycoidea superfamily. However, despite their close taxonomic affiliation, the silk production strategies between *A. convolvuli* and *Bombyx mori* are quite different. In this paper, we have examined the functional differences between region 2 (middle) and region 3 (posterior) of the labial glands of *A. convolvuli*. The same proteins are synthesized in the region 2 and region 3 of the gland during both the fifth and the wandering stages. However, during the wandering stage, the amount (or ability) of silk protein synthesis in the region 3 is quite higher than that of region 2. Macro autoradiography during the wandering stage shows the putative boundary of region 2 and region 3. The expression of *Antennapedia* (*Antp*) gene has only been detected in region 2. These results indicate that there are developmental and functional differences between region 2 and region 3 of the larval labial glands, although the same silk proteins are synthesized in both regions.

Key Words : *Agrius convolvuli*, Labial glands, Silk protein, *Hox* genes

## 1. まえがき

エビガラスズメ (*Agrius convolvuli*) はスズメガの一種で日本全土に生育する比較的大型の鱗翅目昆虫である。また、カイコガ上科に属し、分類学上はカイコ (家蚕) と比較的近縁種である [1]。エビガラスズメのカイコと異なる大きな特徴の一つとして、繭を作らず地中に蛹室と呼ばれる空間を作り、その中で蛹化することが挙げられる。しかしながら、繭を作らないエビガラスズメ幼虫も、カイコ絹糸腺の発生学的相同器官である下唇腺を有している。

著者らはこれまでにエビガラスズメ幼虫の下唇腺の形態がカイコ絹糸腺と極めてよく似ているこ

と、エビガラスズメ幼虫も少量ながらシルクを吐くことなどを明らかにしてきた [2]。エビガラスズメ下唇腺はカイコ絹糸腺と比較し、最も発達した状態でも直径が 1 mm 以下と極めて細いものの、長さは 180 mm 以上になる比較的大きな器官である。細胞を観察すると、核は樹枝状を呈し、発達した粗面小胞体と多数のゴルジ体が観察されるなど、カイコ絹糸腺にも認められる特徴を数多く備えている [2]。これらの特徴はエビガラスズメ幼虫も多量のシルクを吐く準備が整っている事を示している。しかしながら、幼虫はほとんどシルクを吐かない。著者らはシルクをほとんど吐かないエビガラスズメの下唇腺を詳細に調べ、カイコ絹糸腺と比較することで、カイコの優れたシルク合成

\*連絡先：信州大学繊維学部生物資源・環境科学課程、  
386-8567 長野県上山市 3-15-1、E-mail : kshirai@shinshu-u.ac.jp、TEL 0268-21-5334



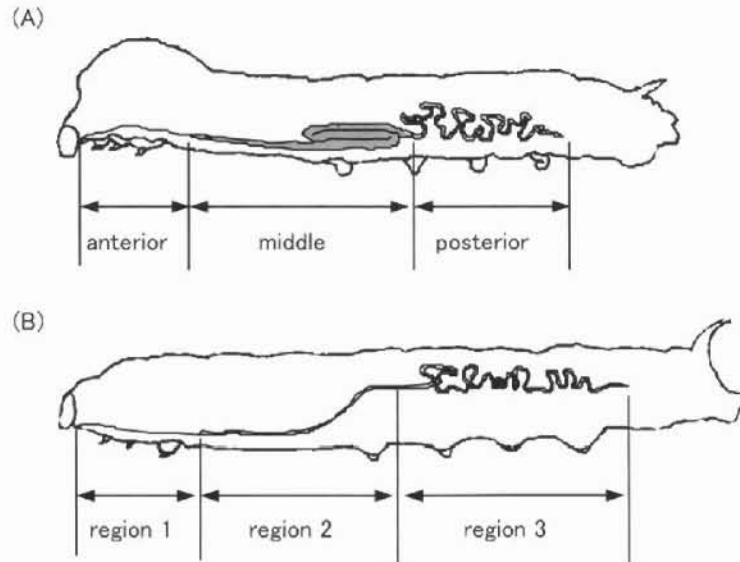


Fig. 1. The silk glands of *B. mori* (A) and the labial glands of *A. convulvuli* (B)

の機構を追究しようと考えている。その過程で、エビガラスズメ幼虫の吐くシルク成分が幼虫摂食期とワンダリング期で異なることを明らかにした [3]。この様なシルク成分の切り替えはカイコを始めとする他の絹糸昆虫では知られていない。さらにカイコの吐糸期に当たるワンダリング期のエビガラスズメ幼虫の下唇腺のルーメンタンパク質を調査したところ、これまで知られているシルク（または繭）のタンパク質組成と全く異なることが判明した。一方、カイコではフィブロイン、セリシン、p25などの成分が知られているが、エビガラスズメ下唇腺のルーメンタンパク質がどれに相当するか現在も不明である。また上述したように、幼虫期とワンダリング期で合成成分が変化する事実がエビガラスズメ幼虫成分の同定をより複雑にしている。

著者らはこれまでエビガラスズメ下唇腺をその外部形態とカイコ絹糸腺で得られた知見から大きく3つの部位に分かれると考えてきた。他の部位と比較して顕著に細い部位1、さらに部位1より管径が大きく直線的な部位2、気管が密に分布しコイル状に湾曲している部位3である (Fig. 1)。部位1はカイコの前部絹糸腺、部位2は中部絹糸腺、そして部位3は後部絹糸腺にそれぞれ相当すると考えられる。部位1は明確に他の部分と区別可能で、細胞の微細形態からもカイコの前部絹糸

腺と同様に導管として機能すると考えられる。一方、部位2と部位3は共にタンパク質の合成に適した微細形態をしており、事実多くの分泌顆粒が細胞内に認められる [2]。また部位間の境界も不明瞭である。

カイコでは中部絹糸腺でセリシン、後部絹糸腺でフィブロインと合成されるタンパク質が異なり器官内の機能分化が認められ、効率的なシルク合成を支えると考えられる。そこでエビガラスズメ幼虫下唇腺における器官内機能分化とタンパク質成分の合成部位を明らかにすることで、エビガラスズメ下唇腺のシルク合成についての理解が進む可能性がある。本研究ではエビガラスズメ下唇腺の部位2と部位3の合成する成分を調査し、また *Hox* 遺伝子の一つ *Antp* 遺伝子の発現を調査することで、下唇腺の機能分化についての研究を行った。

## 2. 材料および方法

### 2. 1 供試昆虫

エビガラスズメは当研究室で人工飼料により継代飼育している個体群を使用した。飼育は25℃、日長条件は16L-8Dとした。飼育に用いた人工飼料は日本農産工業社のシルクメイト L4 (M) にサツマイモ葉の乾燥粉末を1-4齢幼虫用試料には

10% (w/w)、5 齢幼虫用試料には 5% (w/w) となるように添加したものをを用いた。

## 2. 2 下唇腺内容物のサンプリングと調製

まずエビガラスズメ幼虫を解剖し下唇腺を採取した。次に採取した下唇腺からルーメン内容物を以下のように回収した。2本のピンセットを用い、片方で下唇腺をつまみ上げ、もう一方で内容物をしごき出すようにして回収した。回収した内容物は直ちに SDS-PAGE 用の試料調製液 (×2) と混合し、100℃で5分間処理し、以降の実験に用いた。

## 2. 3 SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (1970) の定法に従って行った[4]。

## 2. 4 下唇腺の *in vitro* 培養

下唇腺の部位毎の合成成分を調査するため、採取したエビガラスズメ幼虫の下唇腺 (5 齢 day 3 およびワンダリング day 1) を部位 II および部位 III にわけ別々に培養した。培養液には標識アミノ酸 (redivue Pro-mix L-<sup>35</sup>S) *in vitro* labeling mix, GEヘルスケア・バイオサイエンス株式会社) を加えた Gracc's Insect Culture Medium (Gibco BRL 社) を用いた。4時間または8時間の培養後、下唇腺を回収し内容物を採取した。その後、内容物は SDS-PAGE で分離した。その後、ゲルはタンパク質染色を行った後、濾紙上で乾燥させた。乾燥後、ゲル上の新規合成タンパク質をイメージングアナライザー (STOM, GEヘルスケア・バイオサイエンス株式会社) で検出した。

## 2. 5 下唇腺部位 2 および部位 3 におけるルーメン内成分合成量の測定

上記の標識アミノ酸を 5 齢 day 3 およびワンダリング day 1 幼虫の体腔に注射し、4時間および8時間後にルーメン内容物を回収した。その後、新規に合成されたタンパク質量を取り込まれた放射性アミノ酸量を液体シンチレーションカウンターで測定した。5mm 四方の濾紙に部位 2 および部

位 3 それぞれのサンプルを 1/5 個体分染みこませ、風乾した。次に 5% TCA 中に濾紙を沈め、5分間振とうしつつタンパク質の固定と遊離の標識アミノ酸の洗浄を行った。この操作を 3 回繰り返した。最後にバイアルに濾紙を移し液体シンチレーションカクテルを加え放射活性を測定した。

## 2. 6 マクロオートグラフィ

標識アミノ酸を 5 齢 day 3 およびワンダリング day 1 幼虫の体腔に注射し、4時間後解剖し下唇腺を採取した。次に Gracc's Insect Culture Medium (Gibco BRL 社) で引き続き培養することで細胞に取り込まれた遊離の標識アミノ酸の影響をできる限り除去した。培養後、生理食塩水中で下唇腺を洗浄した後、濾紙上で乾燥させた。最後に、この状態のまま、イメージングプレートに挟み込みマクロオートラジオグラムを撮影した。

## 2. 7 *Hox* 遺伝子の発現解析

5 齢 day 2 幼虫の下唇腺を採取し、部位 2 および部位 3 を分離した後、それぞれの部位から total RNA を抽出した。抽出には QuickPrep Total RNA Extraction kit (GEヘルスケア・バイオサイエンス株式会社) を用いた。抽出した Total RNA をテンプレートとして RT-PCR 法によりエビガラスズメ *Antp* 遺伝子の増幅を試みた。抽出した total RNA 0.5 μg をテンプレートし、RNA PCR kit ver. 3 (タカラバイオ株式会社) を用いて実験を行った。使用したプライマーは既報のカイコ *Antp* 遺伝子を参考に設計した[5]。

## 3. 実験結果

### 3. 1 下唇腺の *in vitro* 培養による合成タンパク質の確認

下唇腺の部位 1 と部位 3 を分け別々に培養し、新規に合成されたルーメンタンパク質を調査した。結果を Fig. 2 に示す。培養 4 時間後からすでに 5 齢 day 3 幼虫では幼虫期の下唇腺内容物である 116k、76k および 70k タンパク質が観察された。また新規に合成された内容成分が部位 2 と部位 3

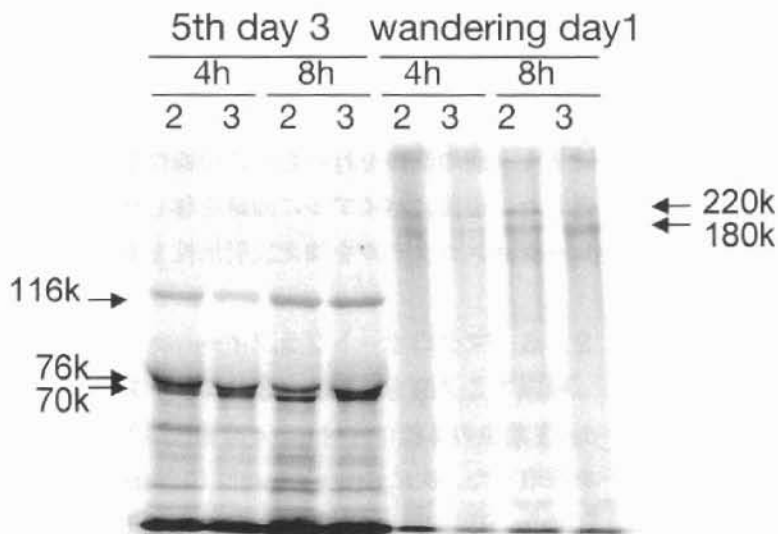


Fig. 2. Comparison of newly synthesized proteins in the labial glands between region 2 and region 3

The region 2 and region 3 of labial glands from fifth instar day 3 and the wandering stage day 1 larvae were cultured in the Grace's medium with radio-labeled amino acids. After 2 and 4 hours, the lumen proteins of the cultured labial glands were collected. Then the samples were separated by SDS-PAGE, respectively, and the newly synthesized proteins were detected by autoradiography.

で全く同じであることが明らかになった。この結果は培養8時間後においても同じであった。さらにワンダリング期 day 1 においても部位2と部位3の両方で主要ルーメンタンパク質である180kおよび220kタンパク質両方が合成されている事が明らかになった。以上の結果、下唇腺部位2と部位3では同じ成分を合成する事が明らかになった。

### 3. 2 部位による新規タンパク質合成能の違い

下唇腺部位2と部位3で新規に合成されたルーメンタンパク質量を標識アミノ酸の取り込み量 (cpm) を指標として比較した。その結果、5齢幼虫期は部位2と部位3で新しく合成されたタンパク質量に大きな違いは認められなかった (Fig. 3A)。ところが、ワンダリング期では明らかに部位3の方が多くのタンパク質を合成しており、その差は約10倍であった (Fig. 3B)。

### 3. 3 下唇腺部位2と部位3の境界領域のマクロオートラジオグラフィによる解析

ワンダリング期において、部位2と比較し部位3のタンパク質合成能が顕著に高いことから、タンパク質合成能を調査することで、不明瞭な部位2と部位3の境界を明らかにできる可能性がある。そこで、イメージングアナライザーを利用した下唇腺全体のマクロオートラジオグラムを撮影し調査した (Fig. 4)。得られた放射活性の相対値を疑

似カラーでも同時に表示し比較した。その結果、5齢期の下唇腺のオートラジオグラムではどの部位でもほぼ均一であった。しかしワンダリング期の下唇腺では、明らかに後部の方がタンパク質合成が盛んであった。さらに部位2と部位3の仮の境界部分、すなわち直線的な部分とコイル状の部分の境界付近に大きくタンパク質合成量の異なる部分が認められた。

### 3. 4 下唇腺における *Antp* 遺伝子の発現

下唇腺部位2および部位3から別々にRNAを調製し *Antp* 遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認した (Fig. 5)。その結果、目的とする大きさの遺伝子断片の増幅が部位2のみ認められた (Fig. 5, lane 2)。この増幅断片は逆転写反応 (RT-reaction) を行わない場合は増幅しなかったことから (Fig. 5, lane 3)、特異的増幅であることが証明された。

## 4. 考察

カイコ絹糸腺では後部絹糸腺でフィブロインおよび p25、中部絹糸腺ではセリシンと合成するタンパク質が異なり器官内に明確な機能分化が認められる。本研究ではエビガラスズメ下唇腺部位2と部位3の機能分化の有無と、それぞれの部位で合成されているタンパク質を明らかにする目的で研究を行った。

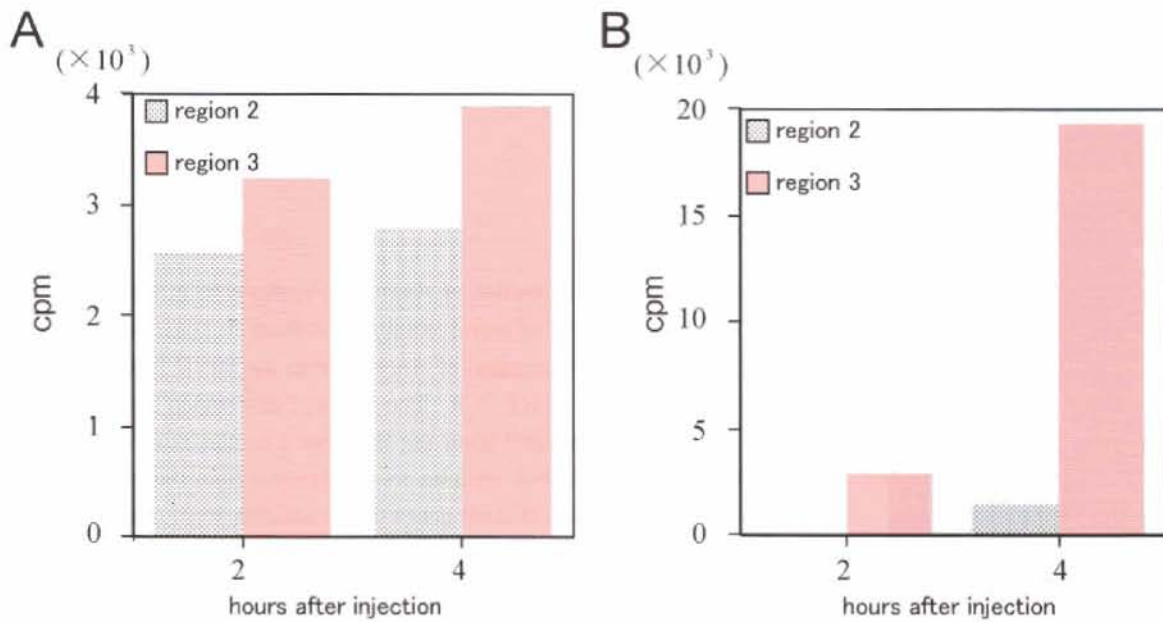


Fig. 3. Relative amounts of newly synthesized proteins at region 2 and region 3 of labial glands

Radio-labeled amino acids were injected into the hemocoel of the fifth day 3 (A) and wandering day 1 (B) larvae. After 4 and 8 hours, the lumen proteins were collected from the region 2 and region 3, respectively. Then the relative amounts (cpm) of radio-labeled amino acids in the synthesized proteins were counted by scintillation counter.

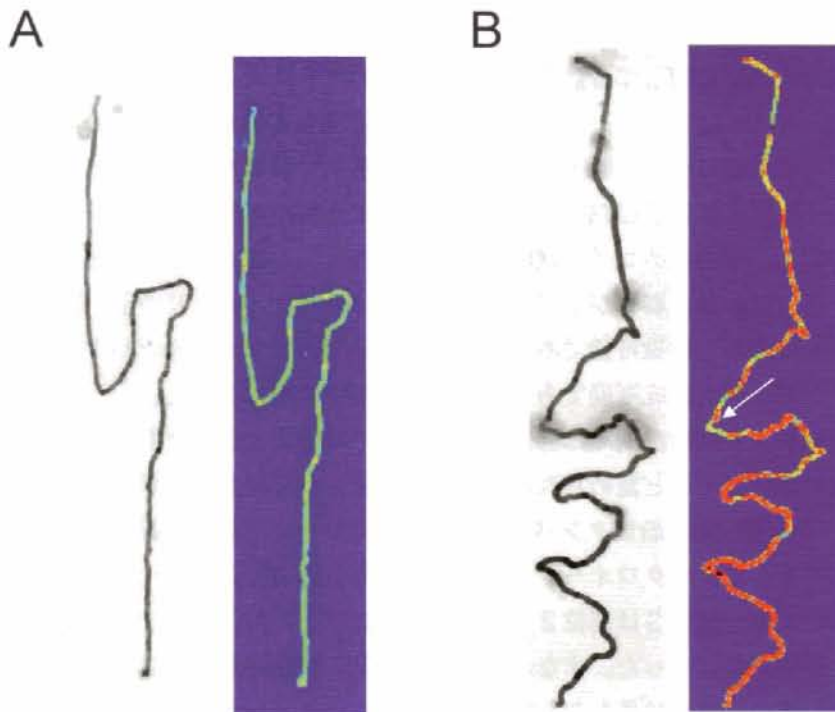


Fig. 4. Macro auto-radiograms of labial glands

Radio-labeled amino acids were injected into the hemocoel of the fifth day 3 (A) and the wandering day 1 (B) larvae. After 4 hours, the labial glands were collected, and the collected glands were dried on the filter papers, respectively. Then the samples were applied to the macro radio-autography for the detection of the boundary between region 2 and region 3. The left panel is an autoradiogram of the gland. The right panel shows the pseudo-color display of the same autoradiogram. An arrow indicates the putative boundary of the labial glands from the wandering larva.

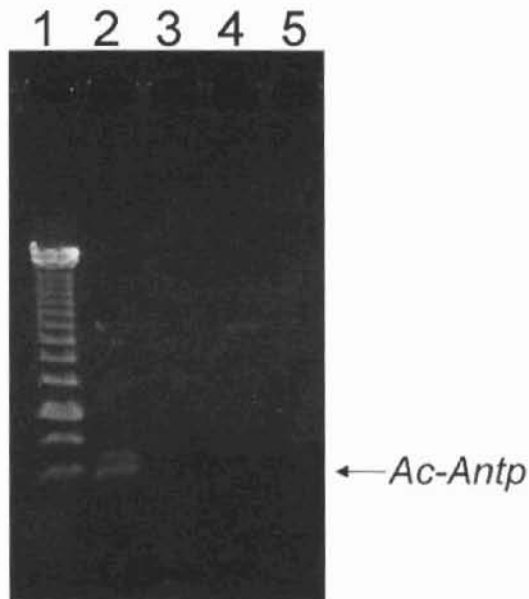


Fig. 5. Detection of *Antp* gene expression in the region 2 and region 3 of larval labial glands from *A. convolvuli*

The expression of *Antp* gene in the larval labial glands was studied by RT-PCR. The region 2 and region 3 of labial glands were obtained from the fifth day 2 larvae, respectively. Then the total RNA samples were extracted from the glands, then the expression of *Antp* genes in the samples were examined by RT-PCR. Lane 1 : marker, lane 2 : region 2, lane 3 : region 2 (- RT reaction), lane 4 : region 3, lane 5 : region 3 (- RT reaction).

まず最初に合成するタンパク質成分を調査した。その結果、部位2と部位3で全く同じ成分が合成されていることが明らかになった。上述のようにエビガラスズメはカイコなど絹糸昆虫とは比較的近縁種であるため、この結果は極めて興味深い。またルーメン内成分の同定に関しても謎を投げかける結果となった。

次にタンパク質の合成能について調査した。エビガラスズメ幼虫下唇腺の部位3は部位2と比較して器官が密に付着し、そのためコイル状に湾曲した形態をしている (Fig. 1)。器官が密に存在するということは多くの酸素を供給可能であることを示し、多くのタンパク質が合成可能であると思われる。調査した結果、5齢幼虫期では部位によるタンパク質合成に差はほとんど認められなかった。一方、ワンダリング期では、新規タンパク質合成量の比較においても、またマクロオートラジオグラムの結果においても、部位3は部位2と比較し顕著に高いことが明らかになった。すなわち、合成成分は同じでもその合成能は異なり、部位3 (すなわち後部) が極めて高い事が明らかになった。さらにワンダリング期ではタンパク質合成の異なる領域、すなわち部位2と部位3の境界領域が観察された。この境界はこれまで形態から定めた仮の境界とほぼ一致した。

そこで最後に *Hox* 遺伝子の一つである *Antp* 遺

伝子の部位2と部位3における発現を調査した。*Antp* 遺伝子はカイコでは中部絹糸腺の形成を支配することが明らかにされている [6]。実験の結果、エビガラスズメ下唇腺においても部位2のみに *Antp* 遺伝子の発現が観察された。この結果、エビガラスズメ下唇腺の部位2と部位3は発生学的に異なる事が明らかになった。なお、RT-PCRの結果で目的バンドの上に検出されたバンドについては現在追究中である。

以上、本研究によりエビガラスズメ幼虫下唇腺ではカイコと異なり中部 (部位2) と後部 (部位3) で同じシルクタンパク質を合成・分泌することが明らかになった。しかし、特にワンダリング期では合成タンパク質量は部位3で顕著に高く、部位2と部位3の境界も検出された。さらにカイコにおいて中部絹糸腺の発生を支配すると考えられる *Hox* 遺伝子の一つ、*Antp* 遺伝子の発現を調査したところ、部位2のみに発現が確認された。これらの結果からエビガラスズメ下唇腺は発生学的にはカイコと同じく部位2および部位3で異なる組織であるが、同じルーメンタンパク質を合成することが明らかになった。

## 引用文献

[1] Pittaway, A.R. (1993) : Classification. In



- The hawk moths of the western Palaearctic (A. R. Pittaway, (pp 59-66) Harley Books, England
- [ 2 ] Zha, X.-M., Shirai, K., Yoshikawa, K., Sato, S., Kanekatsu, R. and Kiguchi, K. (2009) : Larval labial glands of the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*: morphology and secreted proteins. *J. Insect Biothchnol. Sericol.*, **78**, 53-60
- [ 3 ] Shirai, K., Zha, X.-M., Oka, M., Kanekatsu, R. and Kiguchi, K. (2009) : Switchover of protein synthesis occurs during the wandering stage in the labial glands of the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*. *J. Insect Biothechnol. Sericol.*, **78**, 63-68
- [ 4 ] Laemmli, U.K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- [ 5 ] Dhawan, S. and Gopinathan, K.P. (2003) : Expression profiling of homeobox genes in silk gland development in the mulberry silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Genes. Evol.*, **213**, 523-533
- [ 6 ] Nagata, T., Suzuki, Y., Ueno K., Kokubo, H., Xu, X., Hui, C., Hara, W. and Fukuta M. (1996) : Developmental expression of the *Bombyx Antennapedia* homologue and homeotic changes in the *Nc* Mutant. *Genes Cell*, **1**, 555-568

# カイコ体液中の $\beta$ -ラクタマーゼの特性について

加藤靖夫

## Characterization of $\beta$ -Lactamase in the Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*

Yasuo KATO

Faculty of Contemporary Human Life Science, Tezukayama University,  
3-1-3 Gakuen-minami, Nara 631-8585, Japan

### Abstract

In previous reports,  $\beta$ -lactamase activity in the assay for the activity was in view of poor activity, so the assay was misleading for the comparison. Therefore, in this study, I tried to re-examine the enzymatic activity of  $\beta$ -lactamase and on how to view it. The result showed that  $\beta$ -lactamase activity was recognized in the hemolymph during the fifth instar of the silkworm, *Bombyx mori*. The activity was higher at one time during the metamorphosis period. These results suggested the possibility that  $\beta$ -lactamase might be present actually in the living body of *B. mori*. Moreover, I studied fractionating  $\beta$ -lactamase by means of Mono Q ion exchange chromatography. The result suggested that  $\beta$ -lactamase from the hemolymph of *B. mori* and the microbial-derived  $\beta$ -lactamase were able to have fractionation by means of Mono Q ion chromatography. However, it seems that their elution patterns were different.

Key Words :  $\beta$ -lactamase, Hemolymph, Silkworm, *Bombyx mori*

## 1. まえがき

2008年度繊維研究所報告では、質量分析法によるカイコ関連タンパク質の解析の過程において、新たに同定された $\beta$ -ラクタマーゼについて、カイコ体液中の活性測定からその存在を確認し、それがカイコの変態の過程において必要なものであることを明らかにした[1]。しかし、前報では、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定における活性値の表示について不十分なところがあり、そのため種々の条件における $\beta$ -ラクタマーゼ活性を比較する際に紛らわしいところがあった。

本報告では、カイコ体液中の $\beta$ -ラクタマーゼの存在をより明確にするために、 $\beta$ -ラクタマーゼ

の酵素活性値の表示方法について再検討した。また、カイコ由来の $\beta$ -ラクタマーゼと微生物由来の $\beta$ -ラクタマーゼとのクロマトグラムの性状を比較検討した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試試料

供試蚕品種としては、春嶺×秋月を用い、桑葉で飼育した。採取した5齢幼虫の体液を2.260×gで15分間遠心分離し、その上清を凍結乾燥した。なお、微生物由来の $\beta$ -ラクタマーゼ標品にはセレウス菌569/H9由来の $\beta$ -ラクタマーゼ (Nakalai Tesque, Inc.) を用いた。

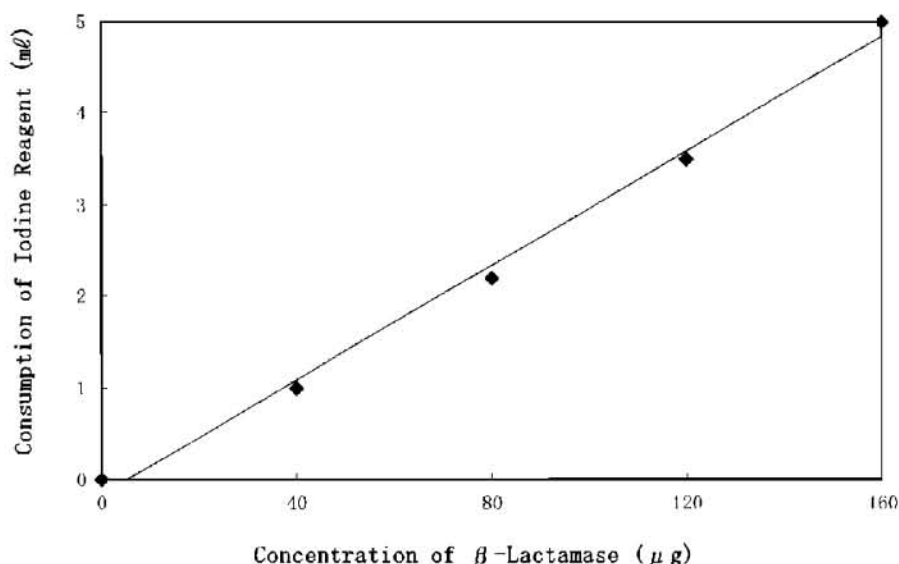


Fig. 1. Relationship between the concentration of  $\beta$ -lactamase and the consumption of iodine reagent.

## 2. 2 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定

$\beta$ -ラクタマーゼの活性はSargent (1968) および沢井・高橋 (1978) の方法に準じて測定した[2,3]。即ち、カイコ体液凍結乾燥物を0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、 $\beta$ -ラクタマーゼの基質であるペニシリンGカリウム塩を加え、30℃で10分間インキュベートした後、ヨウ素試薬を加えて反応を停止した (ヨウ素試薬は、5 ml のヨウ素保存液を95ml の酢酸緩衝液 (pH4.0) に加えることによって調製した)。また、ヨウ素保存液は、20.3g のヨウ素と100g のヨウ化カリウムを500ml の蒸留水に溶解して調製した)。さらに10分間室温で放置後、反応液中に残存するヨウ素量を知るために540nm における吸光度を島津分光光度計 UV-1200で測定した。

## 2. 3 イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーは、0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) であらかじめ平衡化した Mono Q HR 5/50 GL カラム (5×50mm, Amershan Pharmacia Biotech Ltd.) を使用した。タンパク質の溶出は、0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) の0M~0.5Mの直線的濃度勾配法により行い、流速1 ml/minで溶出した。溶出液を1 mlずつ分取し、280nm における吸光度を測定した。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定

$\beta$ -ラクタマーゼ活性測定法について詳細に再検討した。図1は、セレウス菌569/H9由来の $\beta$ -ラクタマーゼ標品の濃度とヨウ素試薬消費量との関係を示す。図中の横軸は、0.1M リン酸緩衝液2.5mlに含まれる $\beta$ -ラクタマーゼの $\mu\text{g}$ 量を示している。ヨウ素試薬の消費量は、ヨウ素試薬の濃度と540nmにおける吸光度が比例関係にあることおよび $\beta$ -ラクタマーゼの濃度と反応液の吸光度とが反比例の関係にあることから得られた。図1に示すようにヨウ素試薬の消費量と $\beta$ -ラクタマーゼ濃度は比例関係にあることが確認できた。このことはOgawara & Umezawa[4] が述べているように $\beta$ -ラクタマーゼ活性値を反応液のヨウ素試薬消費量から推測することが可能であることを示している。

次にカイコ体液中の $\beta$ -ラクタマーゼの生理的な意味を解明するために、カイコ5齢幼虫体液中の $\beta$ -ラクタマーゼ活性の経時的変化に関する再調査を行った。その結果を図2に示す。その際、血液中の $\beta$ -ラクタマーゼ活性はヨウ素試薬消費量で表示した。3日目および6日目ではその活性があまり認められなかったが、8日目 (熟蚕期)、10日目

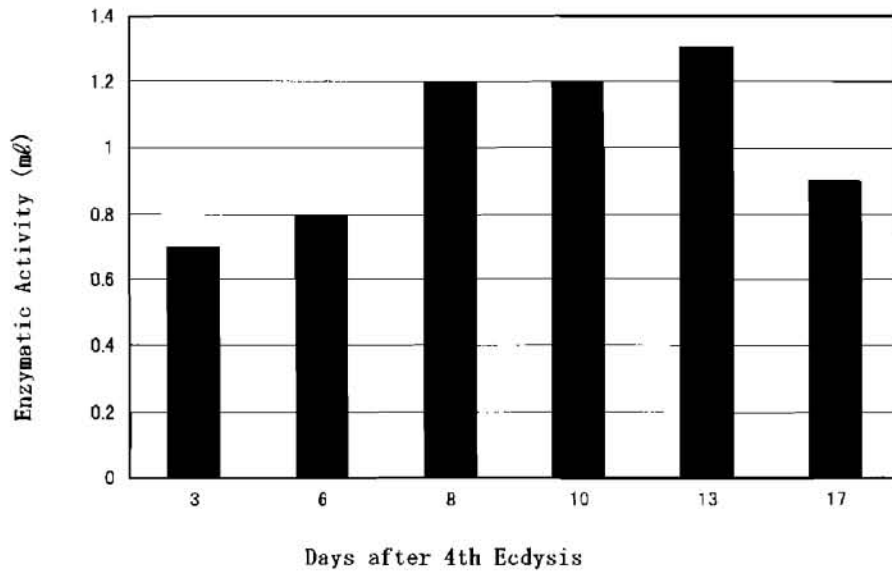


Fig. 2. The time-dependent change of  $\beta$ -lactamase activity during the fifth instar of *B. mori*. The enzymatic activity in the figure is expressed as the consumption of iodine reagent.

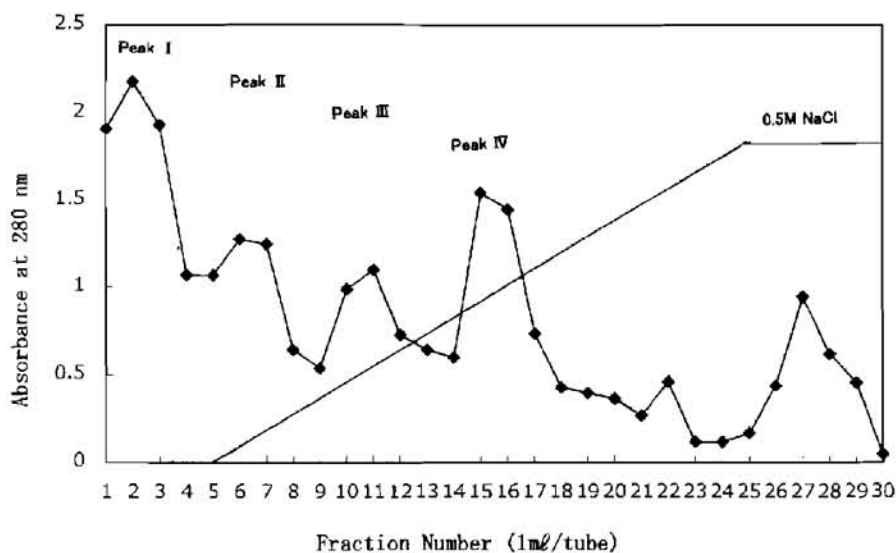


Fig. 3. Mono Q ion exchange chromatography of the hemolymph of *B. mori*. Peak I (tubes 2-3), Peak II (tubes 6-7), Peak III (tubes 10-11) and Peak IV (tubes 15-16) were separately pooled.

(吐糸期)、13日目（蛹化期）において高い活性を示した。しかし、17日目（蛹期）には再び活性が低くなった。即ち、変態の進行している一時期において比較的高い活性を示した。このことから前報[1]で述べたように $\beta$ -ラクタマーゼはカイコが変態の進行する一時期にカイコの生体にとって必要なものであることが再確認できた。

### 3. 2 カイコ由来の $\beta$ -ラクタマーゼと微生物由来の $\beta$ -ラクタマーゼとのクロマトグラムの性状の比較

図3に5齢10日目のカイコ幼虫体液のMono Qイオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。体液試料（凍結乾燥物10mg）をあらかじめ0.05M トリス-塩酸緩衝液（pH8.0）で平衡化したMono Q HR 5/50 GL カラムに添加した。クロマトグラ

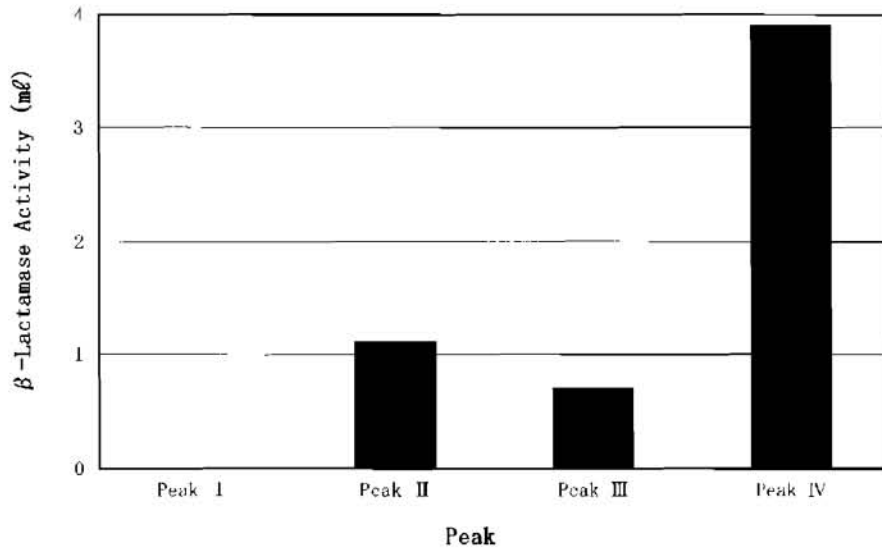


Fig. 4.  $\beta$ -Lactamase activity in the peaks obtained by Mono Q ion exchange chromatography from the hemolymph of *B. mori*. The enzymatic activity in the figure is expressed as the consumption of iodine reagent.

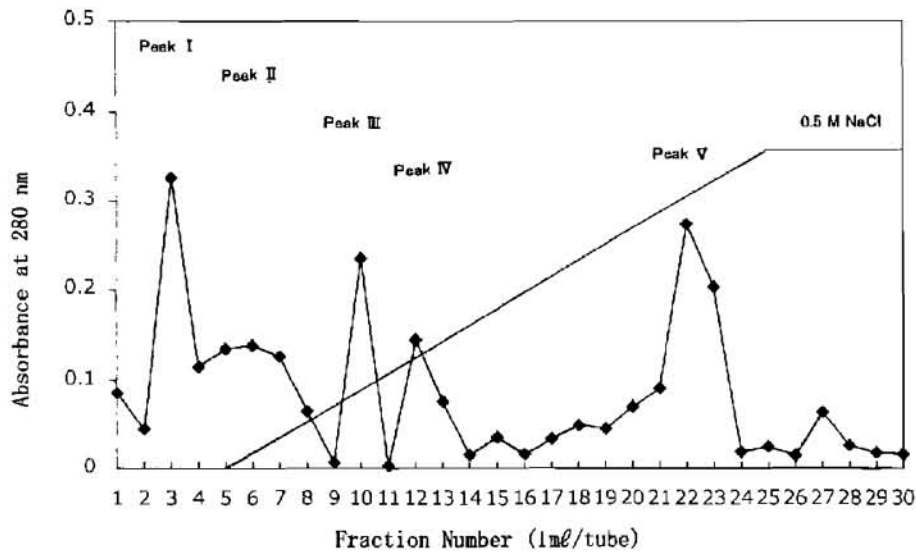


Fig. 5. Mono Q ion exchange chromatography of the microbial  $\beta$ -lactamase. Peak I (tube 3), Peak II (tubes 5-7), Peak III (tube 10), Peak IV (tubes 12-13) and Peak V (tubes 22-23) were separately pooled.

ムは、様々な食塩濃度で溶出される4つのピーク（ピーク I、ピーク II、ピーク III、ピーク IV）を示した。図4は、体液から Mono Q イオン交換クロマトグラフィーで得た各ピークの  $\beta$ -ラクタマーゼ活性の調査結果を示している。各ピーク（0.5mℓ 溶液）の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は、基質としてペニシリン G カリウム塩を用いて測定した。 $\beta$ -ラクタマーゼ活性はヨウ素試薬消費量で表示した。図4

に示すクロマトグラムにおいて0.25M NaCl濃度で溶出されるピーク IV が比較的高い  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を示した。

一方、セレウス菌569/II9由来の  $\beta$ -ラクタマーゼ標品（Nakalai Tesque Inc.）の Mono Q イオン交換クロマトグラフィーの結果を図5に示した。クロマトグラムは、様々な食塩濃度で溶出される5つのピーク（ピーク I、ピーク II、ピーク III、



ピークⅣ、ピークⅤ)を示した。しかし、クロマトグラムにおいて0.25M NaCl濃度で溶出されるピークは検出されなかった。即ち、カイコ由来のβ-ラクタマーゼと微生物由来のβ-ラクタマーゼからは異なった溶出パターンが得られた。従って、Mono Q イオン交換クロマトグラフィーにより得られた結果から、カイコ由来のβ-ラクタマーゼと微生物由来のβ-ラクタマーゼは性状を異にしていることが判明した。さらに、各ピークのβ-ラクタマーゼ活性の測定結果は、すべてのピークで高い活性が認められた。

#### 4. 摘要

β-ラクタマーゼの酵素活性値の表示方法について再検討し、カイコ体液中のβ-ラクタマーゼの存在をより明確にした。また、カイコ由来のβ-ラクタマーゼと微生物由来のβ-ラクタマーゼとのクロ

マトグラムの性状を比較し、両者に相異のあることを明らかにした。

#### 引用文献

- [1] 加藤靖夫 (2009) : カイコ体液中のβ-ラクタマーゼの検索について. 衣笠織研報 (2008), 12, 21-26
- [2] Sargent, M.G. (1968) : Rapid Fixes-Time Assay for Penicillinase. *J. Bacteriol.*, 95, 1493-1494
- [3] 澤井哲夫, 高橋郁子 (1978) : β-ラクタマーゼ活性測定法とその応用. 蛋白質 核酸 酵素, 23, 391-400
- [4] Ogawara, H. and Umezawa, H. (1975) : Reaction with *N*-bromosuccinimide and the properties of the product. *Biochim. Biophys. Acta*, 391, 435-447

# 繭の紫外線蛍光と色彩値に関する研究

高濱 (一田) 昌利\*・昌原美和\*・伴野 豊\*\*

## Study of the Ultraviolet Rays Fluorescence and a Color Value of Cocoon

Masatoshi TAKAHAMA (ICHIDA)\*, Miwa MASAHARA\*  
and Yutaka BANNO\*\*

\*Bioresource Field Science Center, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Ipponki-chou, Ukyou-ku, 616-8354 Kyoto

\*\*Department of Genetic Resources Technology Faculty of Agriculture Kyushu University,  
6-10-1 Hakozaki Higashi-ku Fukuoka 812-8581, Japan

### Abstract

The authors investigated the ultraviolet irradiation fluorescence for the cocoon of 455 silkworm strains stored in Kyushu University, and then measured viewing-colored color value. On the basis of the data, 2-dimensional figures which exhibit relations between a cocoon color and the ultraviolet rays fluorescent color, and a cocoon color and the color value were made.

Key Words : Ultraviolet irradiation fluorescence, Cocoon color, *Bombyx mori* L.,  $L^*a^*b^*$

## 1. まえがき

これまでカイコが績み出す繭糸は、良質な天然繊維素材として様々な布帛の生産に用いられてきた。そして、繭糸質に特徴のある蚕品種の育成が、品種改良の主目的であった。

繭の計量形質には様々な要素があり、明治以降、日本では繭糸質、特に繭層重と繭層歩合の向上を大きな目標に品種改良が続けられ、日本の養蚕農家で飼育されている実用蚕品種の生糸量歩合が18.5%を越えるのに対し、今なお生糸量歩合が世界平均で9.3%の現状を考えると、いかに日本における品種改良の進展がめざましかったかを実感できる。

それ以外にも、解じょ率の向上、同功繭歩合の減少、さらに、夏秋蚕期飼育対策としての虫健質

の向上など、品種改良の成果は現在日本の実用蚕品種の中に活かされている。

さらに、日本の養蚕業が衰退を始めた昭和50年代になって、絹の多用途化を図るため、織度の特性を生かした品種（あけほの、ありあけ等）の開発ならびに製品の開発も行われてきた。

一方、遺伝形質のひとつである繭色に関しては、明治以降輸出用生糸生産のための繭が白繭であることを求められたため、繭色に関する研究は遺伝学研究の中にのみ封じ込められ、実用形質の要素として組み込まれることはなかった。近年になって衣料用原料以外の面から色繭の需要が高まり、繭色が注目されるようになってきた。

しかしながら、これら繭糸の光沢や色彩については科学的データの蓄積がなされておらず、新たなニーズとして繭糸自体が持つ色彩や繭糸の明度を

\*連絡先：京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail: ichida@kit.ac.jp, TEL 075-861-0741  
\*\*連絡先：九州大学大学院農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター、  
812-8581 福岡市東区筲崎6丁目10番1号

第1表 供試繭

分類記号 (群)	分類内容	系統数	分類記号 (群)	分類内容	系統数
p	地域型品種	18	a	胚子・幼虫期致死	18
b	繭形・繭質	17	c	繭色	26
d	卵形・卵殻色	30	e	卵色	28
f	幼虫肢・斑紋	37	g	幼虫斑紋	16
i	幼虫眼紋・頭尾紋	13	k	幼虫体色	23
l	幼虫体色	28	m	モザイク・畸形	16
n	幼虫体形	26	o	油蚕	35
r	染色体異常・交叉率	15	t	発育・眠性	22
u	蛹・成虫	20	w	連関分析用合成系	27
x	分析未了の新突然変異	13	その他	その他	27

明らかにデータベース化することが重要になってきていると云える。

そこで、本研究では繭糸に特徴ある品種の育成のため、繭糸の紫外線蛍光、明度および繭糸の色彩に着目し、その評価法のひとつを確立することを目的として、九州大学農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターで継代保存されている450系統に及ぶ蚕繭の紫外線蛍光、明度および色彩値を調査した。

## 2. 材料および方法

供試材料として九州大学農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターで継代保存している455系統(456種類)の繭を実験材料として用いた。

供試材料となる蚕繭は系統によって、同一系統にも関わらず明らかに色が異なるものもあり、基本的に各系統ごとで5粒ずつ供試した。

### 2. 1 ブラックライト下における繭蛍光の判別

暗室内で、ブラックライトを供試材料の各系統繭表面に照射し、ブラックライト下における繭の表面の蛍光を目視により判別した。

それぞれ紫色蛍光、黄色蛍光、無蛍光に分け、特に黄色蛍光を持つ繭は蛍光強度(明度)によって3段階(強黄色蛍光:LYS、黄色蛍光:LY、弱黄色蛍光:LYW)に分別し、紫色蛍光を示す

ものをLV、蛍光を持たないもの、もしくは蛍光を持っているか持っていないか分別しづらい程蛍光の弱いものをNLとした。なお、供試した同一系統の繭すべてがブラックライト下で同じ蛍光を示すとは限らなかったため、蚕繭を九州大学農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターでの分類区分(第1表参照。家蚕遺伝子資源系統の特性情報:1998)に分け、さらに区分内で紫外線蛍光の種類ごとにまとめた。

### 2. 2 色相のグループ分け

供試材料の繭表面の色相を判別するため、財団法人日本色彩研究所監修の配色カード(日本色研事業株式会社製)を用いて、目視により色の分類を行い、色相ごとのグループに分けた。色相は白色、黄色、緑色、桃色に分け、さらに白色繭の中でも明るい白色を「白輝」、それと比べると濁った白色を「白濁」とした。黄色繭も同様に、白に近く薄い黄色(クリーム色)を「淡黄」、濃い黄色を「濃黄」、濃い黄色で橙色に近いものを「黄橙」とした。黄緑色の繭は、白色に近いものを「淡緑」、黄色に近い黄緑色を「黄緑」、黄緑色繭を「濃緑」とした。

### 2. 3 繭表面の明度および色彩値の測定

供試材料の各系統繭5個中から3個を選出し、測定しやすいよう各繭を切り開き平面状にした上

で、明度および色彩を測定した。なお、先ほどのブラックライト下における紫外線蛍光色と色彩値との関連も調べるため、この実験では特に繭の表面の色彩値について着目した。本実験では国際照明委員会 (CIE) で規格化され、JIS (JISZ8729) においても採用され、物体の色を表すのに、もっともポピュラーに使用されている  $L^*a^*b^*$  表色系を採用した。 $L^*$  は明度を表し、色相と彩度を  $a^*$ 、 $b^*$  で表している。 $a^*$ 、 $b^*$  は色の方向を示しており、 $a^*$  は赤方向、 $-a^*$  は緑方向、 $b^*$  は黄方向、 $-b^*$  は青方向を示す。色彩測定装置は、NF333 簡易型分光色差計 (日本電色工業株式会社製) を用いた。なお、測定結果を基に、供試材料の繭を前述した色相ごとのグループに分け、色彩測定した数値から、色相別の色彩分布図を作成した。併せて各色相の  $a^*$  値と  $b^*$  値の平均値から彩度  $c^*$  ( $=\sqrt{(a^*)^2+(b^*)^2}$ ) 値を算出し、 $L^*$  と  $c^*$  との関係を作図した。

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1 ブラックライト下における繭蛍光の判別と系統別の蛍光

供試繭の紫外線蛍光は、紫色蛍光 (LV)、強黄色蛍光 (LYS)、黄色蛍光 (LY)、弱黄色蛍光 (LYW)、無蛍光 (NL) の順に分けた。なお、群名はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) カイコ-Silkworm Base-系統情報・遺伝子情報ならびに家蚕遺伝子資源系統の特性情報 (1998) に基づいている。その結果、同一の系統であってもすべてが同じ紫外線蛍光を示すとは限らず、繭5粒 (一部粒数が異なる) を供試した場合、5粒とも同じ蛍光を示すものが360系統:78.9%、5粒のうちで異なる蛍光を示す系統が96系統:21.1%あった。それらのうち、同じ系統内で3種類の異なる紫外線蛍光を示す系統が8系統あった。

各群の紫外線蛍光色に着目すると、紫色蛍光繭は w 群 (連関分析用合成系) で明らかに多く、b 群 (繭形・繭質)、d 群 (卵形・卵殻色)、p 群 (地域型品種) においても多く見られた。黄色蛍光繭は蛍光が強いものから弱いものまで幅広いが、c 群

(繭色) やその他区分に分類出来る系統に特に多く見られた。蛍光が弱いもの、蛍光を確認できなかったものとして分類された無蛍光繭は c 群や、r 群 (染色体異常・交叉率) で多い。一方、b 群の繭では全く確認することが出来なかった。

繭色と紫外線蛍光色の関係についてみると、比較的白繭には紫色蛍光の繭が多く、黄色繭には黄色蛍光や無蛍光の繭が多いが、白繭であっても黄色蛍光を示すもの、黄色繭であっても紫色蛍光を示すものが存在した。さらに、桃色繭系統では系統内で蛍光色のばらつきが確認できなかった。これらのことから繭の表面的な色彩が蛍光色の判別につながるとはいえないことが明らかとなった。

#### 3. 2 色相のグループ分けおよび色彩の分類と図示

目視で分類した各色相ごとにグループ化し、繭表面の各色彩値  $L^*$  (明度)、 $a^*$ 、 $b^*$  の値を測定した。各系統の色彩値から  $a^*$  と  $b^*$ 、 $a^*$  と  $L^*$ 、 $b^*$  と  $L^*$  の関係を作図した (第1図~第3図)。さらに、各色相別に  $a^*$  値、 $b^*$  値および  $L^*$  値の平均値を算出し、彩度  $c^*$  値を算出し (第2表)、平均値としての  $a^*$  と  $b^*$ 、 $a^*$  と  $L^*$ 、 $b^*$  と  $L^*$ 、 $c^*$  と  $L^*$  の関係をプロットし (第4~7図)、検討した結果、各々の色相の平均値で比較すると、より美しい白として抽出した「白輝」のグループでは  $a^*$ 、 $b^*$  の値が0に近く、明度が高いのに比べ、「白濁」のグループは  $a^*$ 、 $b^*$  値がわずかに大きくなった。これは「白濁」の明度が「白輝」よりも少し低いからといえるが、その差はわずかであった。

黄色繭系統では、 $a^*$  値は小さいが、 $b^*$  値は黄色が濃くなるほどは大きくなった。これらのうちクリーム色に分類される「淡黄」のグループでは、黄色繭の中でも比較的  $b^*$  の値が小さく、より白に近い色であることを示している。黄色が濃い「濃黄」のグループでは  $b^*$  値が大きかった。また、黄色の中でも橙色に近いものを「黄橙」と分類したが、このグループは少数ながらもグラフによっては2つの群に分かれた。濃い橙色のグループ、薄い橙色のグループである。薄い橙色のグループは「淡黄」の色相に近いと考えられた。また、黄色繭

第2表 色相別の平均色彩値

色相	a*	b*	L*	c*
白輝	-2.3213	7.02607	93.623	7.02607
白濁	-3.10915	10.22985	93.24488	10.69189
桃色	11.35162	31.21611	84.51811	33.40333
淡黄	-3.26545	34.60242	89.97529	34.75616
濃黄	0.728246	69.9951	85.61317	69.99889
黄橙	3.438222	51.16133	84.81156	51.21673
淡緑	-7.03218	19.0095	92.48544	20.26851
黄緑	-11.041	34.14756	91.01066	35.88815
濃緑	-13.9768	48.2419	89.8239	50.22581

の色相にはb\*値が関係しており、b\*値が大きければより濃い橙黄色に分類されると考えられた。これらのことから、黄色繭の定義にはb\*の値が重要である。

緑色繭の特徴は、a\*が負の数値を示すことである。これは、緑色の要素を含んでいることを表しており、「淡緑」→「黄緑」→「濃緑」の順に緑の要素が高くなっている。b\*値は正の値を示しているが、これは要素として黄味を含む程度を示し、黄色に関しても「淡緑」→「黄緑」→「濃緑」の順に黄の要素が高くなっている。このため、第4図で示されているように、「淡緑」・「黄緑」・「濃緑」が直線状に配置されることが明らかとなった。

肉色系統繭は個体数が少ないが、a\*、b\*値が正の値で大きい。特にb\*値の大きいことが特徴である。

明度(L\*)と彩度(c\*)の関係(第7図)をみ

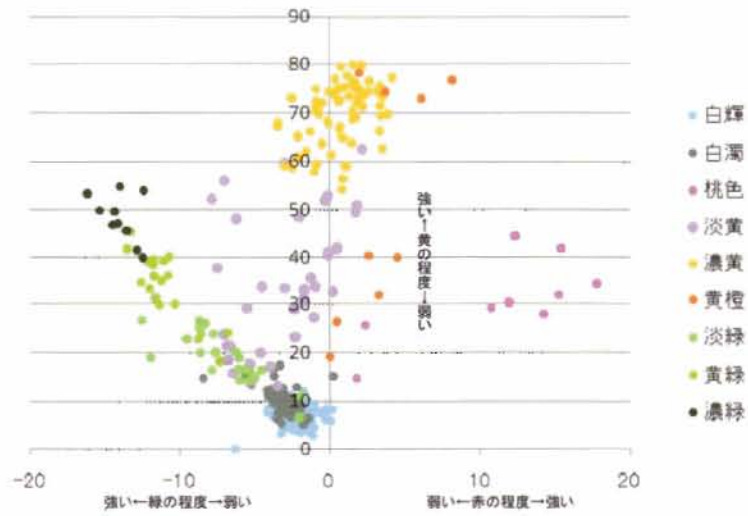
ると図上で「白輝」、「白濁」、「淡緑」、「黄緑」=「淡黄」、「濃緑」の順に直線状に並び、明るくごく薄い色から鮮やかな色への順列が推察できた。また、異なる並び方として「桃色(肉色)」、「黄橙」、「濃黄」が直線状に並んだ。これらの間には明度の大きな違いはないが、鮮やかさの違いが窺えた。

今後、繭の表裏両面においてそれぞれの繭色と色彩値の関係を明らかにした上で、その色繭の性質を細部にわたって明らかにする必要があると考えられた。

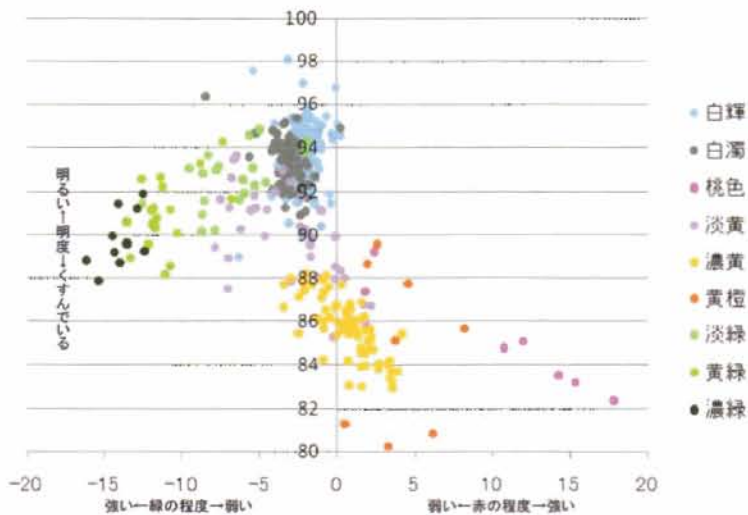
## 文献

藤井 博編 家蚕遺伝子資源系統の特性情報、1998、p1-54、九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター家蚕遺伝子開発分野

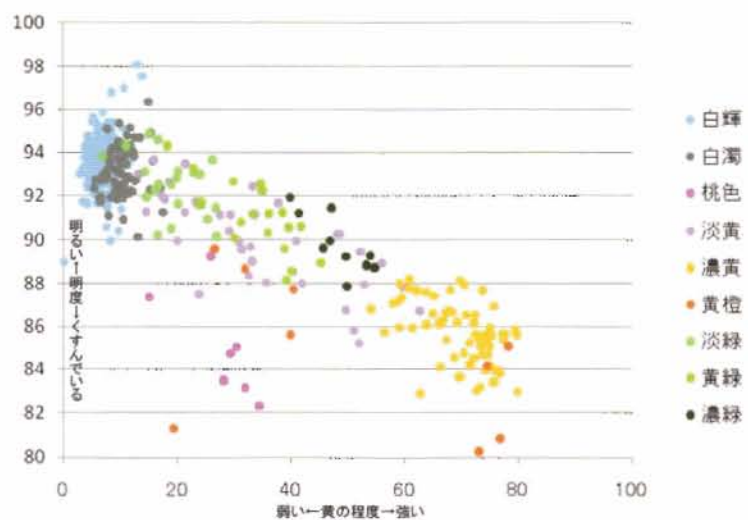




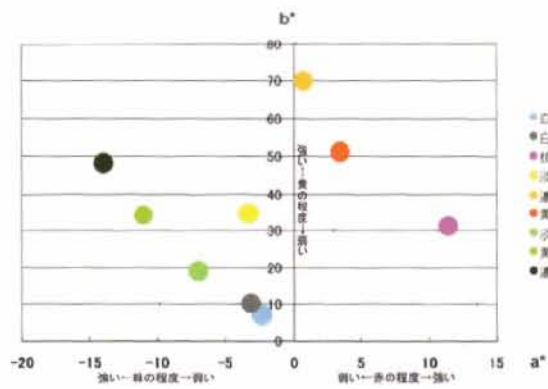
第1図 横軸 a\*・縦軸 b\* とした色彩分布図



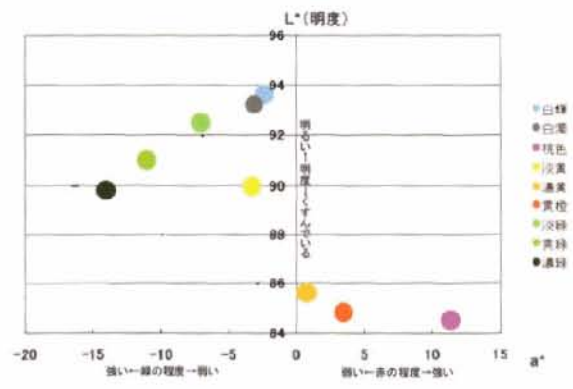
第2図 横軸 a\*・縦軸 L\* とした色彩分布図



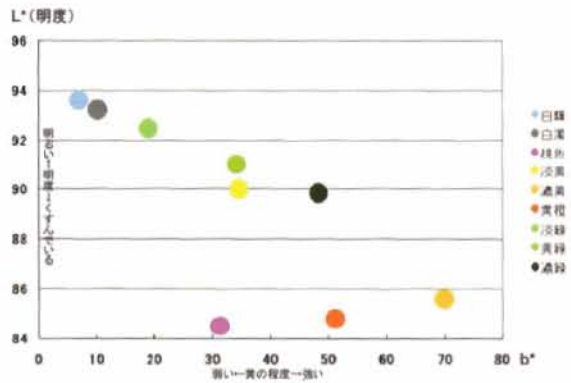
第3図 横軸 b\*・縦軸 L\* とした色彩分布図



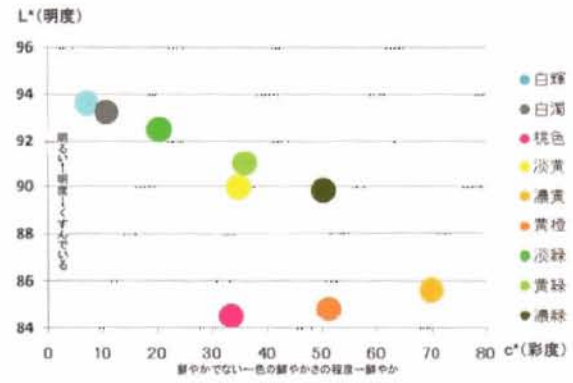
第4図 a\*・b\* 平均値の分布図



第5図 a\*・L\* 平均値の分布図



第6図 b\*・L\* 平均値の分布図  
黄の程度と明るさの関係



第7図 c\*・L\* 平均値の分布図-色の鮮やかさの程度-

# ケナフ繊維の機械的特性 － 繊維採取の時期および部位による物性変動 －

西村明紘・杉村順夫

## Mechanical Properties of Kenaf Fiber － Variation of Fiber Properties Induced by Harvesting Timing and Stem Parts －

Akihiro NISHIMURA and Yukio SUGIMURA

*Department of Applied Biology, Graduate School of Science and Technology,  
Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan*

### Abstract

Physical properties of kenaf blast fiber were changed by harvesting timing and stem parts. The denier values of the fibers increased along with cultivation period, which were closely associated with growth pattern. The fibers were isolated from different stem parts which were harvested in various cultivation periods and characterized to know the variation of physical properties. The fibers from the middle part of stems that were grown for 4-5 months showed higher scores in the breaking tensile strength and the initial tensile resistance. Lower scores were recorded in the fibers from the bottom and upper parts of stems.

**Key Words** : Kenaf fiber, Physical evaluation, Harvesting timing, Stem part

### 1. まえがき

ケナフ (*Hibiscus cannabinus* L.) の靱皮部から採取される繊維は、ロープ、南京袋や魚網などに利用する目的で、古くから熱帯地方で栽培されてきた。近年になり、製紙、衣料、生活用品の原料としての価値が見出され、種々の用途開発が進展している。特に、ケナフ繊維を充填・強化材として用いた繊維強化プラスチックの研究が進み、電子機器の容器や自動車内装に利用することが開発された。牛分解性樹脂、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂の強化材として利用したケナフ繊維強化複合材料が注目されており、なかでも、ケナフ繊維とポリ-L-乳酸などの硬質生分解性プラスチック

との複合材は、すべてが植物由来の複合材料であり、環境調和の“グリーンコンポジット (green composite)”として、産業用途への展開が期待されている[1-3]。

植物由来の天然物を工業用材料として利用する場合、常に問題視されるのは量的および質的変動である。天然物の生産量と品質は気象条件、栽培環境条件、栽培管理条件、栽培法、栽培品種、収穫物の後処理工程などに大きく左右される。ケナフ繊維の品質特性もこれらの因子により変動すると考えられるが、鈴木らは収穫する採取部位によって繊維強度が大きく異なるが、弾性率は部位に関係なくその変動は少ないと報告している[1,2]。また、繊維強度の品種間差異について報告されてい

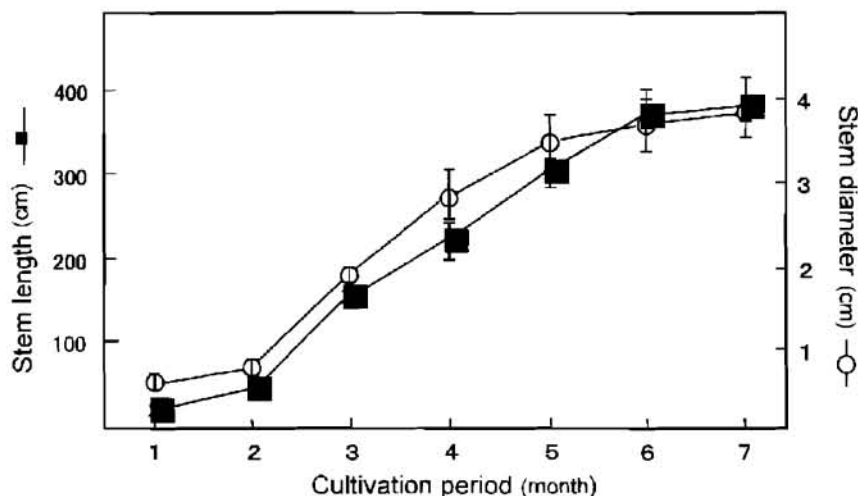


Fig. 1. Growth pattern of kenaf pant

るが[4]、ケナフ繊維の品質変動因子に関する研究情報の集積は極めて限られている。

本研究では、ケナフ生育に伴う靱皮繊維の力学特性の変化を茎の部位別に測定し、繊維強度に及ぼす影響を植物生理学の観点から考察した。

## 2. 材料および方法

### 2. 1 供試材料の調製

圃場で栽培したケナフ (*Hibiscus cannabinus* L. cv. 中雑紅305) を供試した。播種後1カ月目から6カ月目までの株を地際部から茎を切断して収穫した。その茎長を測定した後、茎頂部から全茎長に対して1割、5割、9割にある部位をそれぞれ上位部、中位部、下位部と名付け、その周辺部位から靱皮繊維を分離した。各部位の靱皮部を剥ぎ取り、できる限り細かく解離して、水に2週間浸漬した。さらに、得られた繊維束を1 N NaOHで50℃、10分間処理した。実態顕微鏡下で枝分かれや裂け目のない繊維を選択し、測定用試料とした。

### 2. 2 デニール値の測定

分離した単繊維を5cmに裁断し、20℃、65%相対湿度の恒温恒湿室に24時間放置したのち、オートパイロ式繊維測定器 (Denier computer DC-11、サーチ (株)) でデニール測定した。まず、単繊維の一端にスプリング荷重を取り付け、他端を

振動式繊維測定器の糸保持クリップに固定したのち、振動長を5.0cmにしてパイプレーターエッジおよび下部エッジに通した。スプリング荷重を試料に懸垂させたのち、可変低周波発振器の周波数を調節して試料の共振周波数を決定した。この値を基に、原理式からデニール値を算出した。

### 2. 3 強伸度の測定

デニール値を測定した単繊維について、強度および伸度をJIS-L-1015に準じて、オートグラフ (島津製作所製、DSS-500型) を用いて、20℃、65%相対湿度の測定室で、試料長10mm、引張速度30mm/分の条件で測定した。試験区当たり最低10本を測定し、得られた切断時荷重値をデニール値当たり (g/d) に換算した。また、同時に得られる伸長変化に対する荷重変化の最大点を求め、初期引張抵抗度 (g/d) を算出した。

## 3. 実験結果

ケナフの茎伸長および肥大化は、播種後2カ月目 (5月下旬) から5カ月目 (8月下旬) まで直線的に増加し、6カ月目 (9月下旬) 以降の成長はほぼ停止した (図1)。この期間における成長速度は83cm/月であり、茎直径の肥大速度は0.9cm/月であった。成育ステージの異なる茎から得られる繊維特性を調べるために、播種後1カ月目から

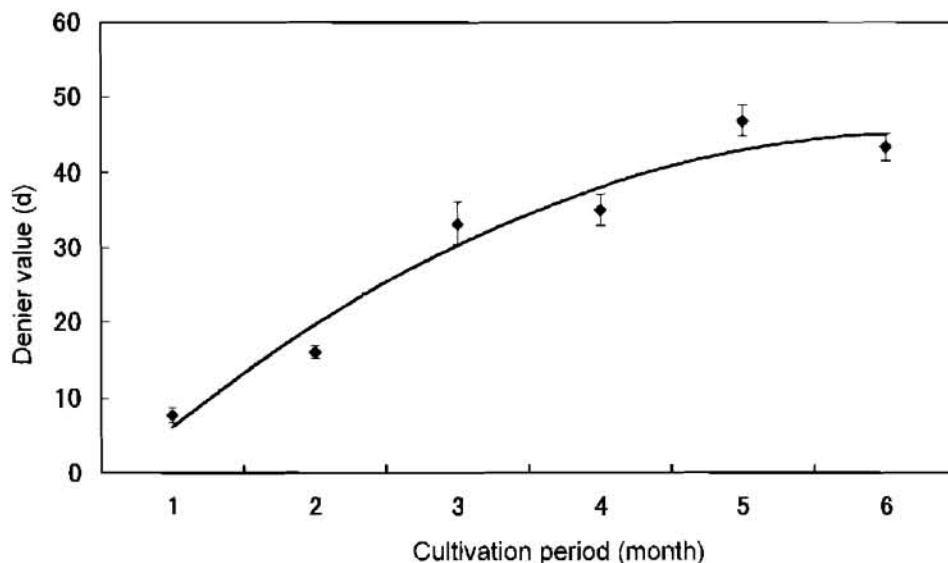


Fig. 2. Denier values of fibers separated from the lower stem part at different growth stages.  
Bars :  $Av \pm SE$ .

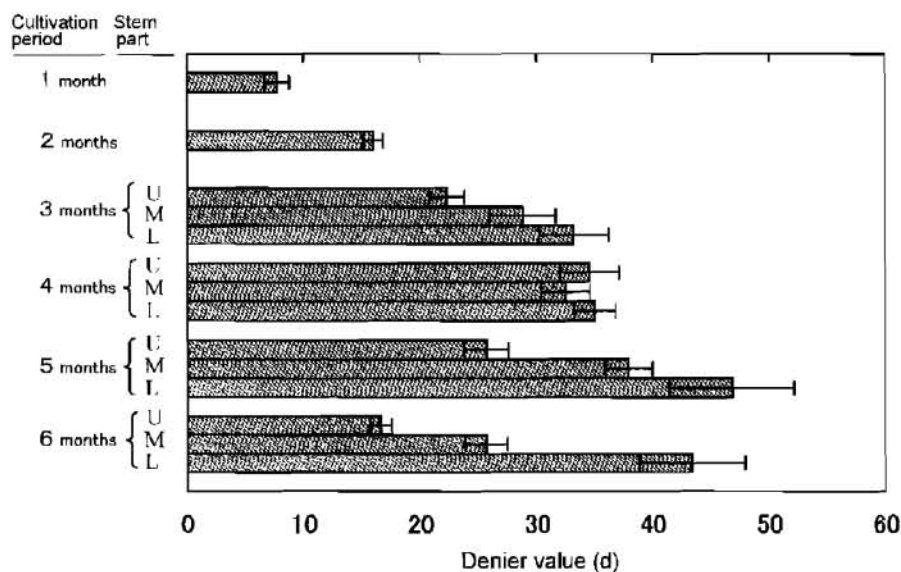


Fig. 3. Denier values of fibers separated from various stem parts at different growth stages.  
U : upper part, M : middle part, L : lower part. Bars :  $Av \pm SE$ .

毎月定期的に茎の地際部から繊維を分離して、それらのデニール値を比較した。その結果、茎の成長パターンと同様な増加変動が認められた(図2)。例えば、播種後1カ月目の繊維のデニール値は $7.75 \pm 1.03d$ であるのに対して、播種後5カ月目の繊維では $46.83 \pm 5.34d$ になり、成育に伴って著しく増加した。さらに、成育ステージ別に異なる茎部位でのデニール値の変動を調べた(図3)。4カ月目の試料では、上、中、下位部間でデニール

値に有意な差はなかったが、他の3、5、6カ月目の試料では、上位部<中位部<下位部の順にデニール値の増加傾向が認められ、5、6カ月目の下位部でのデニール値が最大値を示した。

成育ステージや茎の部位により繊維のデニール値が異なることから、それら繊維の力学的差異について調べた。切断強度および初期引張抵抗度は成育ステージや採取部位により変動し、切断強度は4~8 g/d、初期引張抵抗度は300~550 g/dの



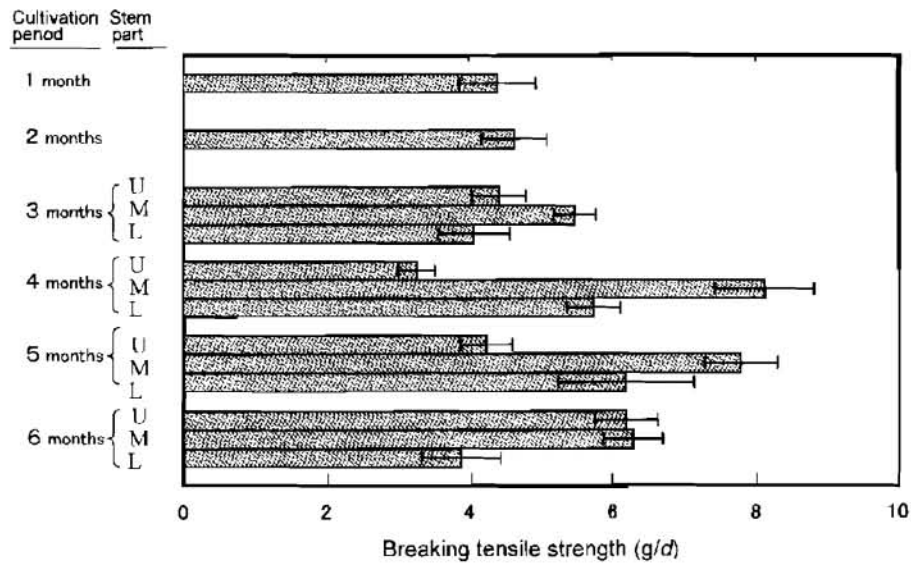


Fig. 4. Breaking tensile strengths of fibers separated from various stem parts at different growth stages.

U : upper part. M : middle part. L : lower part. Bars :  $\bar{A}_v \pm SE$ .

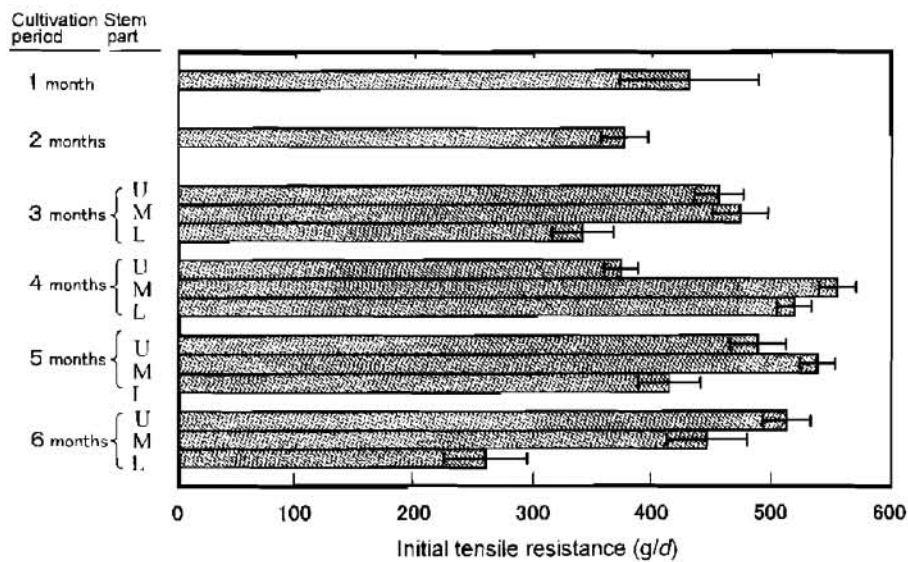


Fig.5. Initial tensile resistance values of fibers separated from various stem parts at different growth stages.

U : upper part. M : middle part. L : lower part. Bars :  $\bar{A}_v \pm SE$ .

“ばらつき”が認められた。これら力学的特性の“ばらつき”をステージ別と部位別に分けて調べてみると、播種後の栽培月数が4カ月、5カ月の中位部からの繊維において、切断強度および初期引張抵抗度が最大値を示した(図4、図5)。ちなみに、栽培月数が4カ月の中位部における繊維の切断強度は $8.12 \pm 0.69 \text{g/d}$ 、初期引張抵抗度は $554.6 \pm 14.7 \text{g/d}$ であった。また、3カ月目～6カ月の下位部では、中位部より低下していた。これらの結

果から、成育後期にある中位部から得られる繊維が、より強靱であることが明らかになった。

#### 4. 考察

ケナフ繊維の由来は師部繊維細胞の二次細胞壁である。従って、繊維品質は、繊維細胞の成熟度と直接的に関わっている。茎は先端部に近いほど若く、地際部に近づくに従って成熟度が増す。茎

の発達に伴って繊維細胞の数および細胞壁の質的変化が起こると考えられる。若株や茎の上位部では繊維細胞は発達過程に当たるため、茎の下位部のデニール値より低い値を示したと考えられる。一方、下位部の切断強度、初期引張抵抗度は中位部よりも低い傾向が認められた。特に、栽培日数が5カ月目、6カ月で著しかった。この低下は、下位部での繊維細胞の老化、特に細胞壁を構成する多糖類やリグニンの部分分解による細胞壁の変質に起因すると考えられる。より強靱で剛直な繊維を得るためには、成育後期に茎中位部から繊維を分離する必要がある。すなわち、茎を収穫適期（本研究の栽培条件では播種後の栽培期間が4～5カ月）に、部位別に収穫して繊維を調製することにより、より均一な繊維原料が得られることが明らかになった。

他の天然繊維である亜麻、綿、絹の切断強度および初期引張抵抗度と比較すると、これらの天然繊維よりも強度において優るが、弾性率が低い。ケナフ繊維細胞の二次細胞壁には、双子葉植物には見出されない(1→3, 1→4)β-D-グルカンが特異的に含まれており[5]、繊維強度に関わっている可能性がある。ケナフ繊維は強靱ではあるが、しなやかさに乏しい繊維であり、産業的に利用する際には、この物性特徴を考慮する必要がある。

## 5. 摘要

ケナフの靱皮繊維の力学的性質は収穫時期や収穫する茎の部位により異なる。繊維のデニール値は栽培期間に伴って増加し、成長パターンと関係していた。栽培期間の異なる株の異なる部位から

繊維を分離し、その物性のばらつきを調べた。4～5カ月間栽培した株の中位部にある茎から分離した繊維では、切断強度および初期引張抵抗度は高かったが、上位および下位部の茎からの繊維では低かった。

## 6. 謝辞

ケナフの物性評価についてご指導をいただいた京都市産業技術研究所繊維技術センターの八山誠治部長にお礼を申し上げます。

## 引用文献

- [1] 鈴木博治, 船見国男, 金原 勲, 景山和郎 (2003): 天然植物繊維の力学的特性のばらつきについて, 第32回 FRP シンポジウム講演論文集, pp.5-6
- [2] 鈴木博治, 金原 勲, 齊藤博嗣, 船見国男 (2005): ケナフ靱繊維皮繊維の横断面積および単繊維強度の試験測定データ, 日本材料学会誌, 54, 887-894
- [3] 木村照夫 (2005): ケナフ戦維と生分解樹脂の複合化, 植物資源と文明を考える集い「ケナフ15周年記念」予講集, pp.13-14
- [4] 大柿麻衣, 道満光生, 鳥袋順二, 古澤壽治, 杉村順夫 (2005): ケナフ繊維の品種間比較, 衣笠織研報, 9, 71-74
- [5] 杉村順夫 (2009): ケナフ繊維細胞の発達と細胞壁多糖の特徴-細胞壁工学の構築を目指して-, 繊維学会誌, 65, 121-124

# 色の見えのモード

根岸明子\*

## Mode of Color Appearance

Akiko NEGISHI\*

\*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,  
29 Kitano Shimo-Hakubai-cho Kita-ku Kyoto 603-8326, Japan

### Abstract

The modes of color appearance are simply the various kinds of context or setting in which color is perceived. There are many classifications of these modes because of the infinite variety of textures and settings with which colors are perceived in common visual experience. Katz was the first to describe modes of appearance in a systematic way in 1911. He thought the surface mode and the film (illuminant) mode were opposite and very important. In these two modes, color spaces are consistently divided into 11 basic color categories respectively.

For constant background luminance, the appearance of the illuminant mode increases linearly with increasing logarithmic stimulus luminance. The perception of the illuminant mode increases with increasing saturation, that is, a higher saturation leads to a stronger illuminant mode perception for equal luminance stimuli.

**Key Words** : Mode of color appearance, Surface mode, Illuminant mode, Luminance, Saturation, Color space

## 1. はじめに

色の見えのモードという概念は、1911年に心理学者 D.Katz によって述べられたのが最初である。そして今日色彩学では色の属性とされているが、一般に広く知られているとは言えない。以下に色の見えのモードという概念について述べる。

我々はあらゆる視覚対象に色を見る（知覚する）。そして色は視覚対象によって様々な現れ方（見え方）をする。例えば視覚対象が不透明な物体の場合、色はその物体表面に属しているように見えることが多い。また視覚対象が光源など自発光している場合は、色は光に属していて、その色光が直接目に入ってくるような見え方をすることが多い。このような種々の色の見え方を「色の見え

のモード」と呼ぶ。そして、個々のモードを表面色モード、光源色モードなどと表現する。通常の条件下では物体の表面の色は表面色モードに、光源の色は光源色モードに安定して見えている。しかし、モードは人間の感覚であるから、目に入る色光が実際に表面での反射光なのか自発光しているのかということとは本質的に無関係である。そのため、色を知覚する際の周囲の状況や、心理的な期待、解釈などによってもモードは変化する。例えば照明を暗くしたり明るくしたりすることでテレビ画像の色を光源色のようにも表面色のようにも認識することができる。したがって色の見えのモードの違いとは、目に入る色光が実際に自発光しているのか物体表面で反射しているのかではなく、それを自発光していると認識するか物体表

\*連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、  
E-mail: zai-kinugasakai@nifty.ne.jp、TEL 075-461-5949

面の反射光であると認識するかの違いである。

ふだん我々がものを見るとき必ずしも色の見えのモードを意識するわけではないが、色は必ず何らかのモードを伴って知覚され、色の属性のひとつと考えることができる。そして、形や大きさなどの情報と一緒に視覚対象が何であるかを素早く判断するのに非常に役立っている。視覚の対象は無限に存在し、またそれらを見る状況も様々なので、色の見えのモードも無数に考えることができる。

ところで、一般の物体などの「白い-黒い」という色の見え方が、光の色では「明るい-暗い」という見え方になる。このことから色の見えのモードが変わると同じ色光が異なる色に見えたり、明るさの知覚が変化したりすることが予測できる。これは表面色モードで見ている視覚対象物の前に小さな窓を開けた厚紙などをかざすことで簡単に体験できる。このときそれまで見ていた対象物に焦点が合わなくなって開口色モードと呼ばれる色の見えとなり、全く同じ対象物の色であるにもかかわらず異なって見える。しかし現在の表色系にモードは含まれていない。そのため測色値が同じであってもモードによって異なる色に見えるということが起こる。より正確に色を表すには色の見えのモードの特定が必要である。

Katzは細かな観察に基づく現象学的な分析を行い、色の見えのモードを整理分類した。モードは色彩学分野で重要視され、さらにその後のコンピュータの普及などで実用面からも関心が持たれるようになった。しかし名称や分類方法が統一されず、また測色学的に取り扱いにくいなどの理由から十分な研究はされていない。本稿ではKatz以降の分類、名称の変遷やこれまで行われてきた研究について紹介する。

## 2. 色の見えのモードの分類と名称の変遷

### 2. 1. Katzの分類

色の見えのモードという概念については、「Erscheinungsweisen (色発現の状態)」として1911年にKatzが系統的に述べたのが最初である[1]。

Katzは細かな観察に基づく現象学的な分析を行い、以下のように整理して説明した。

- ・ Flächenfarbe (film color, 面色)：視野いっぱい雲ひとつない青空を見たときのような見え方をする色。色の着いたfilmを通して見たような色でもあるので film color と訳される。種々の色の見えのモードを生じる手がかりを除いたときの純粋な色の見えである。色の存在する位置が不確定であり、視線はどこまでも突き通る。
- ・ Oberflächenfarbe (surface color, 表面色)：通常物体の表面で観察される色。その物体の材質感を伴う。色の位置が確定的で、視線はそこで行き止まる。
- ・ durchsichtige Flächenfarbe (transparent film color, 透明面色)：色ガラスや色フィルターなどをその全体の形が見えるような位置に置き、それらを通して向こう側を見ると、ガラスやフィルターの色は面的な様相を呈すると同時に透明感がある。このような見え方をする色。
- ・ durchsichtige Oberflächenfarbe (transparent surface color, 透明表面色)：両目である対象を凝視し、片方の視野を色紙のような不透明なものでさえぎると、その色紙を透かして対象を見ているような印象を受ける。このとき色紙はやはり表面的な様相を呈している。この色紙のような見え方をする色。
- ・ Raumfarbe (volume color, 空間色、容積色)：透明な容器に入った色水のように、三次元空間を満たしているように見える色。
- ・ gespiegelte Farbe (mirrored color, 鏡映色)：鏡映像が鏡面の後ろ側に、鏡面の固有の色を透かして見られる色。ガラスの裏面を黒く塗ったブラックミラーに映したときの色など。
- ・ Glanz (luster, 光沢)：物体表面に反射像がはっきりせず、表面の一部がその表面的特徴を失い、かつその部分の反射光が他の部分より明るいときの様相。
- ・ Leuchten (luminosity, 光輝)：ろうそくの炎のような色。同じ照明条件下で白よりも明るく感じる色。
- ・ Glühen (glow, 灼熱)：灼熱した鉄のように、

その表面だけが光輝ある色として感じるのではなく、その物体の内部を含めた全体が発光していると感じるような色。

Katzはこれらの色の見えのモードのうち、面色と表面色の二つが最も重要であり、かつ、この二つのモードは相反するものであると述べている。これらの項目の中には他のモードの属性または一面と考えられるものが含まれている。

## 2. 2 OSAの初期の分類

その後1943年に測色学的な立場から OSA (The Optical Society of America) の Committee on Colorimetry (アメリカ光学会測色委員会) によって次のように整理された[2]。ここでは色の見えのモードを、色の存在する位置が確定的であるかどうかを基本にして分類している。

### (1) located modes (定位モード)

illumination mode (照明モード)

illuminant mode (光源モード)

object modes (物体モード)

volume mode (容積モード)

surface mode (表面モード)

### (2) non-locate mode (非定位モード)

aperture mode (開口モード)

ここに見られる aperture mode というのは、目から少し離れた小さな開口部を通してある色を見たときの色の見えのことで、焦点が外れるために純粋な色の見えとなる。Katz の分類に見られる film color とほとんど同一のもので考えてよい。

## 2. 3 OSAの分類

OSA の同じ委員会が1953年に出版した書物の中では、物体 (object) と非物体 (non-object) とに分けるという分類方法を示した[3]。

### (1) non-object modes (非物体モード)

film mode (面色モード)

illumination mode (照明モード)

### (2) object modes (物体モード)

illuminant mode (光源モード)

surface mode (表面モード)

volume mode (容積モード)

ここでは1943年の報告の中で用いた aperture という名称は用いられていず、再び film という用語が使われており、同じ委員会でも10年の間に分類の方法や使用する用語が変化している。

## 2. 4 Huntの分類

1985年に R.W.G. Hunt がカラーオーダーシステムのために次のような色の分類方法を提案した。

### (1) unrelated color (無関係色)

luminous color (発光色)

nonluminous color (非発光色)

### (2) related color (関係色)

luminous color (発光色)

nonluminous color (非発光色)

無関係色というのは単独で見られる色、すなわち暗黒の中でひとつの色光を見た場合の見え力をする色のことである。それに対し関係色とは、他の色との関係において見る色のことである。通常我々がものを見る場合はほとんどこの関係色である。無関係色、関係色、発光色、非発光色のすべての説明に perceived ということが使われており、mode という用語は用いられていないが、色の見えのモードの概念を用いた分類方法である。

## 2. 5 現在の状況

現在も名称や分類方法は定まっていない。インターネットによる売買などが広まり、関心は持たれているが、色の見えのモードそのものに関する議論は十分に尽くされないまま今日に至っている。日本工業規格 (JIS) にも開口色などの用語やモードの概念の説明はあるが、規定されたものはない。現在も Katz が考えたと同様、面色モードと表面色モードが最も重要であると考えられている。面色ということばは現在ほとんど用いられず、同様の意味で開口色、光源色、輝面色などの用語が用いられている。特に最近では、反射光による色の見えである表面色モードに対し、白発光の色の見えとして光源色モードという用語が多く用いられるようになり、この二つのモードを対比させた種々の研究がなされている。



### 3. 色の見えのモードに関する研究

色の見えのモードは人間の感覚であるためその知覚には記憶などの内的な要因と、色光の性質や周囲の状況などの外的要因とが関わっている。ここでは外的要因に関する研究のみを取り上げる。

これまでになされてきた色の見えのモードに関する研究は、

- (1) 色の見えのモードそのものを対象とする研究
- (2) 種々の色の性質を異なるモード間で比較する研究

の2種類に大別される。それぞれの研究で得られている主な知見を紹介する。Katzは、面色と表面色が最も重要でかつ反対のモードであると述べたが、これらの研究もKatzと同様の考え方でこの二つのモードを対比させて行われている。面色モードという用語は現在ほとんど用いられず、代わって光源色モード、開口色モード、輝面色モードなどの用語が使われている。それらの意味するところは厳密には異なると思われるが、いずれも表面色モードに対立するモードとして用いられている。ここでは光源色モードという語を用いることとする。

ここにいう表面色モードとは、その色が視覚対象である物体などの表面に属し、日光や照明光のような他からの光をその表面で反射することによって見えているという色の見え方のことである。これに対し光源色モードとは、光源のように視覚対象そのものが自発光しているような色の見え方のことである。また、調べようとする色光のことをテスト刺激または単に刺激という。

#### 3. 1 色の見えのモードそのものに関する研究結果

##### 3. 1. 1 輝度に対する光源色モードと表面色モードの知覚特性

我々がある色光を見てそれが光源であると認識する場合、その色光は視野においていずれかの他の色光より明るいと感じられることが必要である。すなわち、光源色モードの見えを生じる要因として明るさの知覚が必須である。心理的な明るさに主として関連する心理物理量は輝度である。

- 1) 暗黒中に唯一存在する刺激は光源色モードとして知覚される。また一般に、周囲の光の輝度がテスト刺激の輝度より低ければ光源色モード、高ければ表面色モードになるが、これらのモードは単一に現れるのではなく、完全な光源色モードと完全な表面色モードとの間には両モードが混合した見えが生じる。
- 2) 周囲の輝度が一定の場合、それより高い輝度を有する刺激の光源色モードの見えは刺激の輝度の対数に対して直線的に増加する[4]。
- 3) 同一輝度比(テスト刺激と周辺光との輝度の比)における光源色モードの見えは輝度レベルに対して増加する。すなわち、同等の光源色モードの見えを得るために必要な輝度比は輝度レベルが高いほど小さくなる。これは、光源色モードを知覚するためには、周辺光との輝度コントラストだけでなく、刺激自体の絶対的な輝度もその要因であることを示す[4]。

##### 3. 1. 2 光源色モード知覚に対する彩度\*\*の影響

- 1) 光源色モードの知覚は、刺激の輝度が等しい場合、彩度が高くなるほど増加する。また刺激の彩度が高いほど、より低い輝度で等しい強さの光源色モードを知覚することができる。明るさの知覚では彩度が高くなると、より低い輝度で同じ明るさに見えるという現象が古

\*\*ここでは彩度という語を広義で使用している。彩度に関する概念は国際的に細分化されてきてCIEでは次の3段階を定義しているが日本語の用語はまだ明確に定められていない。(1) chromaticness (鮮やかさ、colorfulness)、(2) chroma (マンセルクロマに対応、物体色)、(3) saturation (飽和度、主に発光物体または照明光)

くから知られており (Helmholtz-Kohlrausch 効果)、光源色モード知覚は彩度に対して明るさ知覚と同様の特性を示す。

- 2) 彩度変化に対する光源色モードおよび明るさの知覚は同様の傾向を示すが、彩度から受ける影響は光源色モード知覚の方が明るさ知覚よりも大きい。等しい明るさに知覚された刺激の場合でも、彩度が高いほど光源色モード知覚が強くなる [5]。

光源色モード知覚と明るさ知覚に与える彩度の影響の強さには差がある。この理由のひとつとしてこれらの知覚の役割について次のように推測できる。光源色モード知覚はふつう光を発するものを見つけ出すのに役立つ知覚であるが、明るさ知覚は必ずしも明るいものを見つけ出すことがその役割ではない。我々にとって視覚対象が何であるかをすばやく判断することは生存のために非常に重要なことである。このため光源色モード知覚では彩度も含めた視覚情報をできるだけ有効に利用できるようになり、その結果、明るさ知覚の場合よりも彩度の影響が強くなるようになったのではないかと考えられる。

ところで、明るさ知覚と光源色モードに対する彩度の影響に差があることを利用することで、CRT 画像などの明るさと光源色モードを別々に変化させることができる。例えば輝度を上げ、彩度を下げることで、明るさは増加させるが光源色モードの見えは減少させる、あるいは逆に彩度を上げ、輝度を下げることで、明るさは減少させるが光源色モードの見えは増加させるということが出来る。これが実際に可能であることは確認されている。このことはコンピュータグラフィックスなどで利用できるのではないかとと思われる。

### 3. 1. 3 その他の研究

- 1) 光源色モード知覚に与える周辺光の色度の影響は、輝度や彩度の影響に比べ非常に小さく、周辺光がテスト刺激と同一の主波長の場合でも白色光の場合と同様の光源色モードが得られる [6]。

- 2) 無彩色のモンドリアン刺激中の光源を検出するためには、視野内での最高強度の光源、平均以上の光強度、絶対的な光強度、局所並びに広範囲の一定以上のコントラスト、グラデーションが重要な役割を果たす [7]。モンドリアン刺激とは、様々なサイズ、形の白、灰、黒の長方形を組み合わせた抽象画のような複雑な刺激である。

他に、白色光の光源色モードの知覚を、テスト刺激および背景の輝度の関数として定式化する試みもなされている [4,8]。

### 3. 2 種々の色の性質を異なるモード間で比較した研究

色の見え方については染色や塗装など色にかかわる業種に携わる人々の間では古くから重要な問題であった。ふつう色見本と仕上がりの色の比較は測色値ではなく目で見て行われるため、モードのような知覚的な色の見えが果たす役割が無視できないからである。このような実際問題に対して産業的な現場では、その業界だけの用語を使用したり、長年の熟練した技術や勘で補ってきた。しかしこうした個人的な技量に依存していくには限界がある。加えて1980年代以降のカラーディスプレイとコンピュータグラフィックスの技術進歩はめざましく、それらを用いた製品設計が広く行われるようになった。その際、コンピュータ画像と実物とで色合いが違って見えることが大きな問題として浮上した。一般に、製品の色は表面の反射光による色であり、コンピュータ画像の色は発光による色である。そのため色の見えのモードの違いがその原因のひとつと考えられた。そしてCIE (国際照明委員会) では、印刷物や写真などの物体色と自発光ディスプレイの表示色の比較、表示方法の研究調査のために1989年に技術委員会 (TC1-27) を設置した。さらにこの委員会は相互比較のできる実験データの集積を図るため1994年に実験のガイドラインを作成して国際的に標準的な実験方法を定めた。わが国でも照明学会において1991年~1995年の間「物体色と光源色の色の見え研究

調査会」のちに「特別研究委員会」を設置し、調査、検討を行なった。その結果1997年に京都で開催された国際色彩学会（AIC'97）では各国の研究者によって色の見えモデルについていくつもの報告がなされた。こうして、色の見えのモードに関しては、基礎的な研究が行われる前に実用的な側面が先行してきた。

以下に比較的基礎的な研究結果を紹介する。これらの実験では、光源色モードの色は暗黒中にテスト刺激のみを呈示するかまたは低輝度の周辺光とともに呈示するような方法で作成し、一方表面色モードの色は照明光で明るくしたボックス内に刺激を呈示したり、暗黒中では刺激より高輝度の周辺光を同時に呈示するなどの方法で作成している。このように周辺環境が異なる条件下で比較実験をする場合は十分な注意が必要である。

- 1) 表面色モードの色と光源色モードの色を等色させると、表面色モードでは測光値が同じ光源色モードよりも色度図上で彩度が高い色として知覚される。また、光源色モードに対応する表面色モードの色の輝度は光源色モードよりも高い[9]。言い換えれば、表面色モードの色は光源色モードの色より色みが強く感じられ、また、輝度が等しい場合、光源色モードの方が表面色モードの色より高輝度に知覚されることを示す。別の研究で、周辺光の輝度が高くなると中心の刺激に黒みが誘導されることが知られている。表面色モードは周辺輝度が光源色モードの場合よりも高いため、黒みの誘導を受けて色みが強く感じられるのではないかと推測される。
- 2) 表面色モードの色光の明るさ効率、物理的特性が同じ光源色モードの色光の明るさ効率に比べ大きい[10]。

よく用いられる明るさ効率 ( $B/L$ ) は次のように定義される。

$$B/L = (\text{参照白色光の輝度}) / (\text{参照白色光と等明るさのテスト色光の輝度})$$

$B/L$  はテスト色光の色みが明るさに寄与する度合いを反映する量と考えられており、 $B/L > 1$  ならば等輝度のテスト色光の方が白色光

よりも明るく見えることを示す。物理的特性が同じ場合に表面色モードの方が光源色モードの場合より色みが強く感じられることが関係しているのではないかと思われる。

- 3) 表面色モード、光源色モードいずれの場合も、色空間の全ての領域はそれぞれ特徴的に11個のカテゴリカル基本色名によって特徴的に安定して分割される[11]。ここで言う基本色名とは、赤、緑、黄、青、茶、オレンジ、紫、ピンク、白、黒、灰の11色である。これらは、人によらず、場合によらず一致して用いられ、その語義が他の単語に含まれないなどの条件を満たす色名として抽出された。
- 4) 低輝度の表面色モードの刺激の輝度を上げて光源色モードに近づけていくと色空間のカテゴリカル色名領域に主として次のような変化がみられる[12]。光源色モードではさらに輝度を上げてカテゴリカル色名領域はほとんど変化しない。

- ・無彩色領域は黒から灰、白へと変化する。
- ・緑は黄との境界から次第に黄に置き換わり、黄の領域が拡大する。黄との境界に近い緑の領域は低輝度においてもわずかに黄が含まれていると感じられる領域でカテゴリーとして緑から黄に変化する。
- ・茶と赤との境界からオレンジが出現し、次第に茶の領域がオレンジに置き換わる。オレンジが茶の領域に拡大して茶の領域は小さくなる。
- ・紫は領域が減少し一部がピンクに置き換わる。

#### 4. おわりに

我々はふだん色の見えのモードというものをほとんど意識していない。モードは視覚対象自身に備わる質感であるというようにとらえ、色と切り離して認識しがちである。にもかかわらず、メタリック、透明感などの言葉を色に対してふつうに使用する。これらは色の見えのモードを表わす言葉である。また電源の ON、OFF を知らせる小さ

なランプや自動車のブレーキランプなどは着色されている。そうすることで、それらが点灯状態にあることを見やすくしている。これは結果的に輝度だけでなく、色み（彩度）も光源色モード知覚を引き起こすことを利用している。このように日常の視覚活動に色の見えのモードは色の属性として深く関わっている。

色の見えのモードについての考え方が定まる以前から表色系は考案され、モードとは関係なくつくられてきた。現在の表色系はある一定のモード下で行われた色の観察をもとにして構築されている。しかし色の見えのモードが異なると色知覚に変化が生じる。今後さらに多彩な人工照明や表示メディアが発達していくにつれ、色の見えのモードを含む表色法が求められるようになるだろう。また過去の研究を調べたり、色の実験をする場合にも色の見えのモードの関わりについて留意することが必要である。

ところで第3章で紹介した研究で、輝度が高くなると光源色モードが知覚されるという結果が得られ、その一方で、光源色モードの色光は表面色モードの色光よりも輝度を高く感じるという結果が得られている。このことから、輝度が高く見えるのは白発光している場合であるという経験の記憶が、白発光しているように見える（光源色モード）場合は輝度が高いという判断を導く結果になったと推測できる。これは色の見えのモードの知覚が学習によって獲得されていることを示唆するもので非常に興味深い結果である。

## 参考文献

- [1] Katz, D. (1911) : Der Aufbau der Farbwelt. Zeitschrift für Psychologie, Ergänzungsband, 7, 8-36
- [2] Committee on colorimetry (1943) : The Concept of Color. *J. Opt. Soc. Am.*, 33-10, 544-553
- [3] Committee on colorimetry of OSA (1953) : The science of color. CROWELL, 145
- [4] 根岸明子, 西村 武 (1998) : CRT 画像の表面色モードと光源色モードの見えの特性とその定式化の試み. 照明学会誌, 82-8A, 515-522
- [5] 根岸明子, 西村 武 (1997) : CRT の光源色モード知覚および明るさ知覚に与える彩度の影響. 照明学会誌, 81-5, 407-414
- [6] 根岸明子, 西村 武 (1999) : CRT 画像の光源色モード知覚に対する周辺光の色の影響についての一考察. 照明学会誌, 83-2, 115-118
- [7] Ullman, S. (1976) : On visual detection of light sources. *Biol. Cybern.*, 21, 205-212
- [8] 岡嶋克典, 池田光男 (1989) : 白色光における輝面色モードと表面色モードの見えの定式化. 光学, 18, 558-564
- [9] 岡嶋克典, 池田光男 (1991) : 表面色モードと光源色モードにおける対応色の関係. 光学, 20-6, 363-368
- [10] 岡嶋克典, 阿山みよし, 内川恵二, 池田光男 (1988) : 光源色モードと表面色モードにおける明るさ効率の比較. 光学, 17-11, 582-592
- [11] 内川恵二, 栗木一郎, 篠田博之 (1993) : 開口色と表面色モードにおける色空間のカテゴリカル色名領域. 照明学会誌, 77-6, 346-354
- [12] 内川恵二, 栗木一郎, 篠田博之 (1994) : カテゴリー比率評価法による開口色と表面色モードの色の見えの表現. 照明学会誌, 78-2, 83-93

## 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

### 1. 平成21年度各種学会口頭発表および各種学会投稿論文（下線部は財団理事、評議員および著者）

#### 1) 原著論文

Yamamoto K, Nagaoka S, Banno Y, Aso Y. : Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 149 : 461-467 (2009)

Furusawa T, Nojima, K., Ichida M, Nagaoka S, Sugimura Y, Suzuki, E., Sumida, M., Suzuki, H., Shimazu, T., Omori, K., Ishioka, N., Fujii, H., and Nagaoka. S. : Introduction to the proposed space experiments aboard the ISS using the silkworm, *Bombyx mori*. Biological Science in Space 23, 61-69, 2009.

Furusawa, T., Fukamoto, K., Sakashita, T., Suzuki, E., Kakizawa, T., Hamada, N., Funayama, T., Suzuki, H., Ishioka, N., Wada, S., Kobayashi, y. and Nagaoka, S. : Targeted heavy-ion microbeam irradiation of the embryo but not yolk in the diapauses eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, induces the somatic mutation, J. Radiat. Res., 50, 371-375 (2009).

南 秀明・西内滋典・門野純一郎・杉村順夫・河原 豊 : 水熱処理によるケナフ韌皮繊維の中間ラメラへの影響. 繊維学会誌 65 : 338-343 (2009)

#### 2) 総 説

杉村順夫 : ケナフ繊維細胞の発達と細胞壁多糖の特徴 - 細胞壁工学の構築を目指して - . 繊維学会誌 65, 121-124 (2009)

#### 3) 書 籍

間宮寛之・杉村順夫 : クワ蛋白質を利用したカイコの生存戦略. pp10-13. 虫たちが語る生物学の未来. (財)衣笠会 (2009)

藤井 博 : 蚕の系統と生命解明への応用 pp.58-63. 虫たちが語る生物学の未来. (財)衣笠会 (2009)

長岡純治 : 精子が動き出す仕組み pp.114-119. 虫たちが語る生物学の未来. (財)衣笠会 (2009)

定金忠子・古澤壽治 : カイコの絹蛋白質合成器官 - 絹糸腺 - でのエネルギー代謝 pp.170-173. 虫たちが語る生物学の未来. (財)衣笠会 (2009)

松本継男 : 微生物叢による生体防御 pp.196-199. 虫たちが語る生物学の未来. (財)衣笠会 (2009)

加藤靖夫 : 昆虫の血液 (生体防御) pp.200-203. 虫たちが語る生物学の未来. (財)衣笠会 (2009)

#### 4) 口頭発表

長岡純治・谷尾博子・谷口博昭・伊東昌章 : 絹糸腺由来の無細胞翻訳系における Plautia stali intestine virus (PSIV) - IRES の機能解析. 日本蚕糸学会第79回大会講演要旨集 p.53 (2009)



## 平成21年度 講演活動報告

【演 題】 昆虫を利用した農芸化学分野の研究

講演者 長岡純治

日 時 2009年10月9日  
場 所 独立法人 国立高等専門学校機構 沖縄工業高等専門学校  
対 象 者 生物資源工学科、機械システム工学科3, 4, 5年生、専攻生  
講演内容 化学的な研究アプローチが生物学にとってどのようなインパクトを与えてきたか、カイコというキーワードをつかって解説した。そして、こういった知見が、我々の生活にどのように利用されているのか？されようとしているのかを、現在、農学、工学、さらにそれらの境界領域まで広げて解説した。

---

【演 題】 国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」を利用したカイコに関する宇宙生物実験

講演者 古澤壽治

日 時 2009年11月5日 午後2時より  
場 所 宇宙航空研究開発機構 (JAXA)  
丸の内東京事務所3階プレスルーム  
対 象 者 各報道機関 (新聞社、TV局など)  
講演内容 国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」にカイコ卵を3カ月搭載し、宇宙放射線被曝影響、微小重力の影響に関する実験を実施するため、2010年8月29日にカイコの休眠卵が打ち上げられた。本実験の目的、実施状況を報道機関に説明し、質疑応答を行った。毎日新聞社 (科学環境部)、科学新聞社 (編集局)、共同通信社 (編集局科学部)、NHK 報道局科学文化部、東京新聞・中日新聞 (編集局科学部)、日刊工業新聞 (編集局科学技術部)、朝日新聞社 (東京本社科学グループ) より活発な質問を受けた。

---

〔演 題〕 カイコを生物材料とした宇宙生物実験

講演者 古澤壽治

日 時 2009年8月31日 午後1時30分より  
場 所 日本宇宙フォーラム 第一会議室  
対 象 者 一般  
講演内容 カイコを生物材料とする生命科学研究の紹介から、カイコ卵を利用した宇宙放射線研究に関するホームページをJAXAが製作するため、その素材としてのインタビュー収録を行った。

---

〔演 題〕 ケナフ細胞の形態と特徴

講演者 杉村順夫

日 時 2009年9月4日  
場 所 京都工芸繊維大学  
対 象 者 繊維関連研究者および技術者、繊維植物の生産者  
講演内容 ケナフ等植物資源利用による地球環境保全協議会が主催する講演会で、ケナフ茎に存在する繊維細胞について最近の知見を紹介した。特に、著しく肥厚化した繊維細胞の二次細胞壁には、特異な細胞壁多糖が存在していることを組織免疫化学的に明らかにし、その合成プロセスと生理的意義について論述した。

---

〔演 題〕 蚕の人工飼料飼育

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年3月15日  
場 所 志津川福祉の園（宇治市）  
対 象 者 志津川福祉の園関係者（約100名）  
講演内容 志津川福祉の甲で取り組んでいる蚕の人工飼料飼育技術の説明および技術上の問題点等について講演した。

---

「演 題」 桑・蚕・絹の機能性

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年 3月30日  
場 所 玉川大学  
対 象 者 農学部教員および学生（10名）  
講演内容 近年注目されている桑・蚕・絹の機能性に関し、その歴史、機能性の解説を行うとともに、研究内容の講演を行った。

---

「演 題」 蚕に関するお話

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年 4月25日  
場 所 大阪市 城星学園  
対 象 者 城星学園生徒14名  
講演内容 日本学術振興会事業の一環として、城星学園中高校生に養蚕の歴史、特徴、シルクの特徴等を解説した。

---

「演 題」 絹に関するお話

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年 8月23日  
場 所 京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター  
対 象 者 着物学園生徒（1名）  
講演内容 染織工芸素材としての絹の特性と利用の歴史、絹に関わる蚕の話を行った。

---

【演 題】 昆虫とともに生きる

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年9月17日  
場 所 大阪府中央区大林組大阪支店  
対 象 者 大林組松柏会会員（約40名）  
講演内容 昆虫の分類、人と昆虫の関わり、特に昆虫利用、地球と昆虫の共生に意味について講演した。

---

【演 題】 人とムシの共生

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年12月2日  
場 所 京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター  
対 象 者 一般市民約30名  
講演内容 本センター主催の一般市民を対象とした「太根抜き事業」の一環として、人とムシとのかわりおよびその意義について講演した。

---

【演 題】 養蚕および絹について

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年11月12日  
場 所 京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター  
対 象 者 沖縄県立芸術大学学生（10名）  
講演内容 染織工芸材料としての絹および養蚕に関する情報について講演した。

---

【演 題】 シマグワって何？

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年12月25日  
場 所 鹿児島県大島郡知名町公民館  
対 象 者 知名町町民  
講演内容 基本的な桑の特徴および琉球弧に分布する特徴的な桑であるシマグワの分類上の特徴について講演した。

---

【演 題】 シマグワの栽培技術

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年12月25日  
場 所 鹿児島県大島郡知名町図書館  
対 象 者 NPO 法人あぐヘルシー会員  
講演内容 沖永良部島に分布するシマグワの特徴とその栽培方法の特徴および同島知名町内で分布地域の異なるシマグワの機能性の違いについての調査結果を講演した。

---

【演 題】 シマグワの分類と特徴ならびに栽培法

講演者 一田（高濱）昌利

日 時 平成21年12月26日  
場 所 鹿児島県大島郡和泊町  
対 象 者 和泊町自然の会員  
講演内容 沖永良部島に分布するシマグワの特徴とその栽培方法の特徴および同島和泊町内で分布地域の異なるシマグワの機能性の違いについての調査結果を講演した。



## 平成21年度 財団法人衣笠会「繊維学術賞」報告

平成21年度繊維学術賞の候補者が、「財団法人衣笠会 繊維学術賞実施要領」に基づき選考された。選考委員会では本賞に該当する候補者が挙げられ、衣笠会理事会に推薦され、平成22年2月27日開催の理事会で、平成21年度授賞課題として承認された。

なお、授賞式は平成22年3月29日(月)午後4時より、当財団理事、監事および京都工芸繊維大学教員出席のもと開催され、賞状柄並びに記念品が授与された。

### I. 受賞課題：「家蚕の温度ストレス適応性に関する研究」

1. 受賞者：博士(学術)坂野大介氏(熊本大学 医学研究所 博士研究員)

#### 2. 研究内容

##### 1) カイコ卵の低温適応に関する研究

カイコは胚発生の初期に発生を停止し休眠する昆虫である。この休眠開始に伴い卵内では貯蔵グリコーゲンが耐凍性物質であるソルビトールとグリセロールに変換され、休眠覚醒とともにグリコーゲンに再変換される。一方、非休眠卵では通常胚発生が停止することなく進行し約10Hで孵化する。しかし、非休眠卵を産卵2日後に10℃以下の温度に遭遇させると休眠卵と同様にソルビトールやグリセロールが蓄積する。低温保護された非休眠卵は約120日間孵化能力を維持している。このことは、非休眠卵が低温適応能をもち休眠卵と同じく低温保存により長期にわたり保存できることを示している。しかし、非休眠卵での胚発育期および低温下で卵内での炭水化物代謝を統合的に捉えた研究はほとんど見当たらず、その生理学的機構は不明なままであった。

そこで、カイコ系統のさらなる長期保存の効率化を目的とし、非休眠卵の胚発育や低温下での炭水化物の代謝変換について遊離糖およびリン酸糖の量的変動、そして糖代謝に関わる律速酵素の酵素学的性質から検討した。まず、非休眠卵での胚発育から孵化までの10日間における炭水化物代謝について解析した。産卵直後から5日後までは嫌氣的代謝に起因するソルビトールの一時的な蓄積とトレハロースの蓄積が起こることを明らかにした。胚発育開始5日から孵化までは、好氣的呼吸によりトレハロースが分解され、続いてグリコーゲンが急激に分解されると推察した。この代謝変換はホスホフルクトキナーゼ(PFK)とピルビン酸キナーゼ(PK)の活性上昇が関与していることがわかった。

さらに産卵1日後に非休眠卵を5℃に冷蔵すると、胚は約80日間孵化能を維持していることから、この冷蔵非休眠卵の炭水化物代謝を追跡した。その結果、冷蔵開始とともに、ソルビトール、グリセロールやトレハロース、ピルビン酸、および乳酸が蓄積し、PFK、PK活性、およびミトコンドリア活性の指標であるNAD-イソクエン酸脱水素酵素(NAD-IDIT)の活性が低いレベルであった。しかし、この冷蔵卵を25℃に移し、胚発育を再開させると蓄積されていたソルビトールは直ちに消費され、これに続いてトレハロースやグリコーゲンが消費された。このことによって、胚発育に伴って差時的に代謝変換が起こることを明らかにした。以上の結果は、カイコ卵の温度適応性の機構を理解するうえでPFKおよびPKの酵素活性の制御が極めて重要であることを示唆した。

さらに、これら2つの酵素の活性調節機構についても焦点を当て研究を進めた。PFKは48kDaのサブユニットからなる四量体として存在し、卵が保護される環境温度によって、サブユニットの解離・会合が起こり酵素活性が調節されていることがわかった。さらに胚発育初期(嫌氣的状

態)ではリン酸化状態にあり、発育中期(好气的状態)から脱リン酸化が起こることによって活性化されることも明らかにした。一方PKは56kDaのサブユニットからなる四量体として存在し、PFKと同様に胚発育中期から脱リン酸化によって活性が上昇することを明らかにした。

## 2) カイコの small heat shock protein に関する研究

カイコは幼虫を45°Cで30分保護しても死なないことから熱ストレス耐性が高い昆虫である。このような熱ストレス耐性機構を解明する目的で熱ストレス応答性タンパク質、とくに機能がよくわかっていないSmall heat shock protein (sHSP)に着目し研究を進めた。sHSPは分子量15-40kDaのタンパク質で生物種にかかわらず広く存在している。sHSPファミリーの特徴である $\alpha$ -crystallin domainの配列を指標にカイコゲノムを解析した。その結果、少なくとも14種のsHSP遺伝子が存在することを明らかにし、このうち6種のsHSP遺伝子(sHSP 19.9, sHSP 20.1, sHSP 20.4, sHSP 20.8, sHSP 21.4, sHSP 23.7)を単離した。これらの生体内での機能を明らかにするため6種のsHSP組み換えタンパク質を大腸菌内で発現させ解析を行った。するとsHSP19.9とsHSP20.8のタンパク質は不特定のタンパク質の変性による凝集を抑制する効果(シャペロン活性)を有した。そして、超遠心分析によりこれらの発現sHSPタンパク質がともに一般的なsHSPの特徴である多量体を形成することがわかった。これらの性質はヒトで研究が進んでいる分子シャペロンの一つであるHSP20に類似していた。すなわちカイコのsHSPタンパク質群の機能のひとつが熱ストレス耐性に関連することが示唆された。実際、これらの組み換えタンパク質を発現している大腸菌は発現していない大腸菌に比べ耐熱性が顕著に高かった。

一方、カイコsHSPはクローニングした6遺伝子すべてが恒常的に発現しており、ストレス応答タンパク質としての性質以外の機能をもつことが予想された。一般的に他の生物のsHSPの多量体は機能を持つタンパク質との会合体を形成することによって生体内で機能していることからカイコsHSPが親和性をもつカイコタンパク質の検索を行った。

産卵後1日の卵より抽出したタンパク質から組み換えsHSP 20.8タンパク質に結合するものを二次元電気泳動とその後のペプチドマスフィンガープリントにより解析した。すると、30kDaタンパク質6G1(30k6G1)(NCBI accession No. P09334)と一致した。30k6G1は分子量約30kDaのタンパク質ファミリーに属し血液中の主要タンパク質として知られている。最近の研究では、30k6G1タンパク質はアポトーシスの進行を阻害したり、細菌に対する生体防御に関わっていることも明らかにされている。これらの結果から、sHSPが恒常的に発現することで生体内のアポトーシス抑制に関与しているのではないかと考えている。

## 3. 研究業績

[原著論文]

- Sakano D, Kato A, Parikh N, McKnight K, Terry D, Stefanovic B and Kato Y. (2010) A novel repressor of Notch signaling regulates the patterning of left-right axis in *Xenopus* embryos. *Dev. Cell.* (in press)
- Sakano D, Zhang P, Miake F, Ujita M, Fujii H, Aso Y, Yamamoto K and Banno Y. (2007) The searching for the egg protein interacting with small heat shock protein of silkworm, *Bombyx mori*. *Entomotech*, 31, 11-12
- Aso Y, Teshiba S, Sakano D, Shigeoka Y. (2007) Comparison between Assembly Structures of sHSP20.8 and sHSP19.9 Small Heat Shock Proteins. *Entomotech* 31, 5-9.
- Sakano D, Li B, Xia Q, Yamamoto K, Fujii H and Aso Y. (2006) Genes encoding small heat shock proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70(10), 2443-2450.

- Zhang P, Yamamoto K, Aso Y, Banno Y, Sakano D, Wang Y, Fujii H. (2005) Proteomic studies of isoforms of the P25 component of Bombyx mori fibroin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69, 2086-93.
- Sakano D, Furusawa T, Sugimura Y, Storey J M and Storey K B. (2004) Metabolic shifts in carbohydrate metabolism during embryonic development of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Seric.* 73, 15-22.
- Furusawa T, Konishi A, Sakano D, Kotani E, Sugimura Y, Storey J M and Storey K B. (1999) Regulatory properties of phosphofructokinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 68, 181-194
- Furusawa T, Ueda N, Nakamura N, Sakano D, Kotani E and Sugimura Y. (1999) Prolongation of embryonic diapause by repeated injection of synthetic diapause hormone into pupae of non-diapause egg producer of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 68, 9-18.

## 〔国際学会ポスター発表〕

- Sakano D, Miki R, Iemura S, Natsume T, Shiraki N, Kume K and Kume S. (2009) The characterization of novel EPPK 1 associated proteins in mice. International Joint Symposium "Cell Fate Regulation Research: Stem cells and organogenesis" Kumamoto. p.21, Kumamoto, Japan
- Sakano D, Kato A, Parikh N, McKnight K, Terry D, Stefanovic B and Kato Y. (2008) A novel Notch repressor regulates the determination of left-right asymmetry. 12th International *Xenopus* conference. p.156, Leiwent/Treir/Mose, Germany.
- Sakano D, Li B, Xia Q, Yamamoto K, Fujii H and Aso Y. (2006) Silkworm sHSP20.8 and sHSP19.9 small heat shock proteins. The 20th symposium of the protein society. p.437 San Diego, USA

## 〔国内学会1日頭発表〕

- 坂野大介、李 斌、張 平波、麻生陽一、山本幸治、伴野 豊、藤井 博 (2004b) カイコにおける small heat shock protein に関する研究 (第三報) 日本蚕糸学会 第60回九州支部、第70回 関西支部合同研究発表会発表講演集 p.49、九州大学創立50周年記念講堂
- 坂野大介、李 斌、張 平波、麻生陽一、山本幸治、伴野 豊、藤井 博 (2004a) カイコにおける small heat shock protein に関する研究 (第二報) 日本蚕糸学会第74回大会 日本蚕糸学会 第74回学術講演会講演要旨集 p.72、岩手大学学生センター棟
- 坂野大介、李 斌、山本幸治、伴野 豊、藤井 博 (2003a) カイコにおける small heat shock protein に関する研究 日本蚕糸学会第69回関西支部・第59回九州支部 合同研究発表会講演要旨集 p.52、京都工芸繊維大学繊維学部
- 坂野大介、小西 綾、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治 (2003) カイコの胚発育期における炭水化物代謝変換とその調節機構 日本蚕糸学会第73回学術講演会講演要旨集 p.59、東京農工大学農学部
- 坂野大介、杉村順夫、小谷英治、古澤壽治 (2002b) カイコ胚発育期における pyruvate kinase の活性調節について 日本蚕糸学会第68回関西支部・平成14年度九州支部 合同研究発表会講演要旨集 p.46、京都府網野町 アミティ丹後
- 坂野大介、杉村順夫、小谷英治、古澤壽治 (2002a)、カイコ卵における Pyruvate kinase の発現量解析 日本蚕糸学会第72回学術講演会講演要旨集 p.76、九州大学
- 坂野大介、杉村順夫、小谷英治、古澤壽治 (2001b) カイコ Pyruvate kinase の活性調節機構一

特にPKの *de novo* 合成について 日本蚕糸学会関西支部 関西蚕桑技術連絡会、第67回 合同研究発表会講演要旨集 p.9、帝塚山大学学園前キャンパス

坂野大介、杉村順夫、小谷英治、古澤壽治 (2001a) カイコ胚からの Pyruvate kinase の精製について (第二報) 日本蚕糸学会第71回学術講演会講演要旨集 p.26、農林水産技術会議事務局筑波事務所

坂野大介、杉村順夫、小谷英治、古澤壽治 (2000)、カイコ胚からの Pyruvate kinase の精製について 日本蚕糸学会関西支部 関西蚕桑技術連絡会、第66回 合同研究発表会講演要旨集 p.13、神戸大学農学部学舎 神戸大学瀧川記念学術交流会館

坂野大介、松村玲子、杉村順夫、小谷英治、K.B.Storey、古澤壽治 (2000) 家蚕卵の胚発育に伴う Pyruvate kinase の活性変動と性状について (続報) 日本蚕糸学会第70回学術講演会講演要旨集 p.17、東京大学農学部

坂野大介、松村玲子、杉村順夫、小谷英治、K.B.Storey、古澤壽治 (1999) 家蚕卵の胚発育に伴う Pyruvate kinase の活性変動と性状について 日本蚕糸学会関西支部 関西蚕桑技術連絡会、第65回 合同研究発表会講演要旨集 p.6、徳島県徳島市 徳島県郷土文化会館

坂野大介、衣笠智子、小谷英治、杉村順夫、古澤壽治 (1999) 家蚕胚発育期に伴う炭水化物代謝系 日本蚕糸学会、日本蚕糸学会第69回学術講演会講演要旨集 p.23、信州大学繊維学部

[和文著書]

坂野大介、小西 綾 (2009a) カイコ卵のホスホフルクトキナーゼによる耐凍性物質の代謝調節、虫たちが語る生物学の世界、36-39 財団法人衣笠会

坂野大介、白木伸明、糸 昭苑 (2009b) iPS 細胞を用いた膵β細胞分化誘導の研究、日本内科学会雑誌 98,3148-3153 日本内科学会

## II. 受賞課題：「クワ葉に存在する巨細胞の微細構造とカルシウム蓄積能力に関する研究」

1. 受賞者：博士 (学術) 新出育郎 (濱田プレス工業株式会社)

2. 研究内容

植物界における Biomineralization (生体内での無機塩類の結晶化) 研究により、多くの植物種において、シュウ酸 Ca 結晶が細胞の液胞内で蓄積することは広く知られている。しかし、炭酸 Ca 結晶が蓄積する Biomineralization 研究は大きく立ち遅れており、未だその生物学的実態が解明されていない。本研究では、クワ葉における炭酸 Ca 蓄積の「場」の特定化、「場」形成の起源と発達過程、「場」における炭酸 Ca 蓄積能力について解明することを目的とした。

クワ葉の Ca 含量は極めて高いが、その Ca は表皮組織にある巨細胞に炭酸 Ca として蓄積している。巨細胞での炭酸 Ca 蓄積の「場」は、細胞壁の内膜が陥入して形成される嚢状構造体であり、新たに "cell wall sac" と命名した。この sac は "cap" と名づけた細胞壁部位から新たに発生し、原基発生期、形態分化期、肥大成長期、成熟期を経て構造形態が完成する。肥大成長・成熟期において、cap 部位から円柱状の柄を介して大きく肥大化した sac 部が形成され、その内部構造はセルロースラメラ由来の微繊維で満たされていた。また、陥入したセルロースラメラで構成された多層構造の compartment 群が出現した。cell wall sac 形成に伴う一連の構造変化には細胞壁分解酵素が関わり、細胞壁構造の緩み、細胞壁セルロースラメラの部分分解が生じていると示唆された。

cell wall sac 内での炭酸 Ca 結晶を観察するために、銀による細胞化学的検出法を新たに開発した。その結果、cell wall sac の周縁部では微細な炭酸 Ca 顆粒が観察され、sac 中心部では、繊維構造

に沿って粒子サイズの大きい炭酸Ca結晶が高密度に蓄積していた。この結晶形態から、amorphous炭酸Caと同定した。これらの結果は、cell wall sacに充満するセルロース微繊維が炭酸Caの核形成と結晶成長の「場」であることを示している。

一方、酵素的に分離した巨細胞を用いて、cell wall sacに蓄積する最大許容炭酸Ca量が測定された。その結果、cell wall sac当たり、120 ng炭酸Caが蓄積しており、極めて高い蓄積能力を具備していた。この高い炭酸Ca蓄積量を支えるためには、継続的なCaイオンの流入が必要となる。Ca捕捉蛍光試薬により、巨細胞周辺のイオン動態を調べた。その結果、高濃度のCaイオンがcell wall sacの周縁部に滞留し、その中心部ではイオン濃度が低下し、ケイ素を含む柄の先端部および結晶蓄積部ではその濃度は低かった。このcell wall sacにおけるイオン勾配パターンから、Caイオンはcell wall sac周縁部から供給されていると考えられる。すなわち、Caイオンはアポプラスト（細胞壁およびフリースペース）を經由してcell wall sac周縁部に供給されていることを明らかにした。これらの結果を基に、組織内に流入したイオンがcell wall sacへ到達する経路をモデル化し、炭酸Ca結晶の蓄積との関係について言及した。

炭酸Ca蓄積の植物生理学的役割として、葉組織におけるCaイオン濃度の調節に関わっていると考えられる。すなわち、導管を通じて根から取り込まれた過剰のCaイオンと気孔から取り込まれた二酸化炭素由来の炭酸イオンが結合することにより、葉体内に滞留する高濃度Caイオンを低下させることに寄与していると推定される。また、amorphous炭酸Ca結晶は水に溶け易く、蓄積された炭酸CaからCaイオンと炭酸イオンが解離すると想定される。葉体内のCaイオン濃度、炭酸イオン濃度に応じて、この可逆的反応が進行すると考えられる。従って、蓄積した炭酸Caはこれらイオンのregulatorと考えられる。また、炭酸イオンは重炭酸イオンになり、巨細胞を取り巻く葉肉細胞に転流した後、carbonic anhydraseにより二酸化炭素が生成される可能性があり、炭酸Caが二酸化炭素の補給源になると考察した。

これらの研究成果は、クワ栽培における肥培管理に関する基礎的知見を提供するものであり、世界の養蚕業、クワを用いた植物産業に貢献するものと期待される。

### 3. 研究業績

#### [原著論文]

Sugimura, Y. and Nitta, I. (2007) : Cytological changes during cell wall sac formation in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 231, 123-125.

Nitta, I., Kida, A., Fujibayashi, Y., Katayama, H. and Sugimura, Y. (2006) : Calcium carbonate deposition in a cell wall sac formed in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 228, 201-208.

Sugimura, Y., Mori, T., Nitta, I., Kotani, E., Furusawa, T., Tatsumi, M., Kusakari, S., Wada, M. and Morita, Y. (1999) : Calcium deposition in idioblasts of mulberry leaves. *Annals of Botany*, 83, 543-550.

Sugimura, Y., Nitta, I., Morita, Y., Ishikawa, S., Mori, T., Kotani, E. and Furusawa, T. (1998) : Microscopic detection of calcium deposited in idioblasts of mulberry leaves. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67, 445-451.

#### [研究発表]

新田育朗、森 智世、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫、森田洋二、石川純代 (1998) : クワ巨細胞に関する研究 (第3報) 組織化学的染色及び走査型X線顕微鏡によるカルシウム蓄積の検出、日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会第64回合同研究発表会講演要旨集 p.29.

新田育朗、森 智世、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫、森田洋二、石川純代 (1999) : クワ巨細胞



に関する研究（第5報）X線分析によるCa及びSiの細胞内局在性の検出、日本蚕糸学会第69回学術講演会講演要旨集 p.83.

新田育朗、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫（1999）：クワ巨細胞に関する研究（第8報）カルシウム蓄積に伴う細胞内微細構造変化、日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会第65回合同研究発表会講演要旨集 p.36.

新田育朗、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫（2000）：クワ巨細胞に関する研究（第11報）巨細胞の単離およびタンパク分析、日本蚕糸学会第70回学術講演会講演要旨集 p.6.

新田育朗、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫（2000）：クワ巨細胞に関する研究（第13報）カルシウム蓄積に伴う微細構造変化、日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会第66回合同研究発表会講演要旨集 p.25.

新田育朗、木川綾子、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫（2001）：クワ巨細胞に関する研究（第14報）カルシウム蓄積部位である‘球状体’の微細構造変化、日本蚕糸学会第71回学術講演会講演要旨集 p.77.

新田育朗、木川綾子、小谷英治、古澤壽治、杉村順夫（2001）：クワ巨細胞に関する研究（第15報）カルシウム蓄積部位における細胞壁多糖の細胞化学的検出、日本蚕糸学会関西支部・関西蚕桑技術連絡会第67回合同研究発表会講演要旨集 p.21.

## シルク・サミット2009 in 須坂 に参加して



高橋 重三  
(財)衣笠会研究員

### はじめに

平成21年10月29日(木)~30日(金)、長野県須坂市シルキーホールで開催された。

最初に「明治初期における須坂製糸業の発展とその要因」と題して、須坂市誌編さん室主任専門員青木広安氏の講演があった。また同じく編さん室の小林裕氏、井上光由氏の北信濃の製糸王 越寿三郎に関する話、製糸工女の労働と生活についての講演があった。明治初期からの製糸全盛時代の様子や、日本の貧しい時代の生活の様子を知る事が出来た。

慶応高校2年の河野氏は「絹の道が運んだもの」と題して信州から横浜への生糸の足取りを自分で歩いて調べ、若い人の感覚で感じたことを説明された。次に信州大学大学院生 庄司氏の「用水路と水車小屋との関係」の調査報告があった。翌日は市内の製糸場の跡を見学した。須坂の製糸業が盛大になった理由、またどの様に転換して来たかなどを考えながら見てきた。

### 須坂の昔と今

須坂市は、JR長野駅から長野電鉄に乗り換え、千曲川の鉄橋を渡って間もなく須坂駅に着く、電車で約20分の所にあり、千曲川の東側に位置し、長野盆地の河東地区に当たる。昔は駅を降りると「蛹の匂い」がし、町を上がって行くと「化粧の匂い」がすると言われたほどに、昔は物凄い活気あふれる町であったと思う。須坂駅前に「シルキーホール」があり、今もシルクを元に元気に活動し

ていることを感じ、須坂の皆さんの心いきが感じられた。

午後は市内を見学し、乾繭を貯蔵する3階建ての蔵や、豪華な門構えの家などを見学した。須坂は直線距離にして約600mの間に標高差約100mあるので、かなり急な坂道である。街道の両側に、かつて豪商だった旧製糸家の建物が残されている、その裏側に用水路がある。江戸初期に三つの用水路が整備されていたようである、取り水口は標高約460m付近にあり、水路幅は約1mとするとかなり急流であったと思われる。当時はこの用水を使って水車を回し、精米、製粉、油搾りなどが行われていた、須坂では手取り糸が主であったが明治7年に水車を製糸の動力として利用し、器械製糸が始まった。用水は須坂市発展の原動力となった。

明治の初めに洋式機械製糸機が導入され糸質が一段と向上した事に伴い、須坂では商才に長け先進性を持った人材が多くいて、「品質管理」をすることを呼びかけ、明治8年に日本で初めての製糸結社を作り、共同で揚げ返し場を作り、各種の規格を作るなどして、品質の揃った生糸をまとめて販売できる組織を作った。序々に須坂の生糸の良さが認められるようになった。明治9年に初めて蒸気釜が導入され以後煙突が林立するに至った。

須坂での生糸の生産量は、明治43年には6万7677貫であったものが、大正15年には最高で18万9485貫(1貫は3.75Kg)となったが昭和4年の大恐慌により10万貫台に減少した。戦後昭和20年代、30年代には自動繰糸機が導入され、再生のきざしが見えたが、ナイロンはじめ多くの合成繊維が作ら

れ、さらに中国から安い生糸が入ってきたりして、生糸の使用は激減し今に至っている。須坂では今は生糸の生産は殆ど行われていないと思う。

戦時中に企業が疎開して来て、その後定着し、昭和30年頃から電機機械工業が主流になり、生糸の町から電子工業の町へと変わった。昭和35年には、昭栄製糸が富士通の合併会社となり、昭和42年には昭栄電子工業（株）になり完全に電子工業に転換した。平成2年には機械工業従業員数は約1000名、電機関係従業員は約4000名となった。富士通は須坂市の電子部品工業の中核工場で、その下請け工場が多くあり、今では須坂は電子産業の町である。

立派な蔵が幾つか残っているが、どの様に利用されているか甚だ興味がある、蔵は断熱構造になっているので、容易に冷蔵庫、恒温室として利用すれば電力料は少なくすむと思われる。また用水を太陽光発電と同様に水力発電（自転車のライト

と同じ方式）に、利用することは出来ないか、など等考えながら見学した。

### 蚕糸・絹業提携事業

前回の福島県でのサミットでは基調講演において、大日本蚕糸会蚕業技術研究所所長、井上元氏の「蚕糸シルクイノベーション戦略と実践」という講演があり、今最も注目されている「蚕糸・絹業提携事業」の話であった。高品質の絹製品を純国産で作ることで、これまで政府は繭代を補填するという方法で支援してきたが、今回改めて、政府は35億円を用意し、3年間支援金を出し、その間に自立できるようにするという方法である。平成19年度から始まったので、本年は3年目になり、自立への目途はどの様になっているか、関係者には気になることである、今回は何一つ講演が無く、いささか物足りなさを感じた。



発行所

財団法人 衣笠会 繊維研究所  
〒603-8326  
京都市北区北野下白梅町29  
TEL 075-461-5949  
TEL/FAX 075-463-6679  
E-mail zai-kinugasakai@nifty.com  
<http://www.soc.nii.ac.jp/kinugasa/>

会長

林 幸之

印刷所

為国印刷株式会社  
〒604-8457  
京都府京都市中京区西ノ京馬代町6-16  
TEL 075-462-7889  
FAX 075-464-3923