

カイコの胚子における雌始原生殖細胞の γ -線誘発突然変異

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	481
掲載ページ	p. 59-64
発行年月	1979年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



カイコの胚子における雌始原生殖細胞の

γ -線誘発突然変異

三木六男・村上昭雄¹⁾

熊谷市石原, 埼玉県蚕業試験場 (〒 360)

¹⁾三島市谷田, 国立遺伝学研究所 (〒 411)

(1978年 8月 4日受理)

カイコの全生活環にわたる生殖細胞の突然変異を指標とした放射線感受性については既に詳細な研究がある。発生初期の生殖細胞における放射線感受性については卵母細胞の第2成熟分裂期および精・卵核合体前後から胚子発生の極く初期にいたる間の突然変異率が活発な核分裂に依存して極端に高まることが報告されている(村上, 1966; MURAKAMI, 1967, 1971 a, b; MURAKAMI・TAZIMA, 1965)。また, 胚子後期から孵化間もない幼虫に至る時期については, 始原生殖細胞の分裂による卵(精)原細胞の増殖時期に相当し突然変異率が多少高まるといふ報告(TAZIMA ら, 1961)があるに過ぎない。従って卵割期の分裂核, その一部が将来生殖細胞(器官)となる分化期, さらにそれらの細胞が発育して始原生殖細胞になる時期の放射線誘発突然変異反応についての情報は断片的である。本実験では胚子の器官(特に生殖腺)形成期前後から孵化2日前に至る雌生殖細胞に及ぼす電離放射線誘発突然変異反応の調査を行った。その結果2・3の知見を得たので報告する。

材料と方法

実験材料: 実験材料は放射線遺伝生物学の分野において従来から用いられてきた支108号系統を使用した。産卵時間を30分間に限定し, 産下20時間目に塩酸による即時浸酸を行ない, 処理20時間後から以後10日間5℃に冷蔵した。冷蔵後25℃で保護し, 出庫4時間目の卵を産下44時間卵とし, 以下12または24時間間隔で孵化2日前の212時間卵まで所定の時間に γ -線を照射した。

照射線源: γ -線照射は¹³⁷Csを線源としていずれの照射区も単一の線量1.0KRを線量率300R/minの条件で行った。

突然変異頻度の測定: 突然変異事象は卵色の特定座位法によって検出した。孵化幼虫が生育・化蛾後, 卵色の遺伝子 *pe* と *re* に関して二重劣性因子を有する標識系雄と交配して産卵させ, この産下卵における突然変異体を検出し, そこに誘発された座位毎の変異頻度 ($\cdot 10^{-5}$) 並びにその95%信頼限界値を FISHER・YATES(1953)の統計表から求めた。なお一雌蛾当たり少なくとも100個以上の産卵蛾区のみを計算の対象とした。

胚子の生育並びに生殖細胞の組織学的観察: 照射時の胚子の発育状態を知る目的で, それぞれの実験区の一部を照射開始と同時に温湯で固定し, 温湯法による解剖並びに透明標本作成法(高見・北沢, 1960)によって胚子の観察を行った。なお, 胚子の発育段階およびその呼称は高見・北沢(1960)の発育段階表に準拠した。また, 生殖細胞の数と発育状態を調査する目的で各実験区の卵の一部をカルノア液で固定し, 卵殻を除去して胚子を取り出しパラフィン法により厚さ8 μ の組織切片を作成し, デラフィールドのヘマトキシリン・エオシンおよびマロリーの三重染色法により染色して顕微鏡観察を行った。なお, 生殖細胞の観察は生殖腺の形成に参加する胚子の第6~8環節の細胞(宮, 1952)に主眼をおいて行った。

実験結果

1. 胚子(生殖腺)の発育に伴う突然変異頻度の

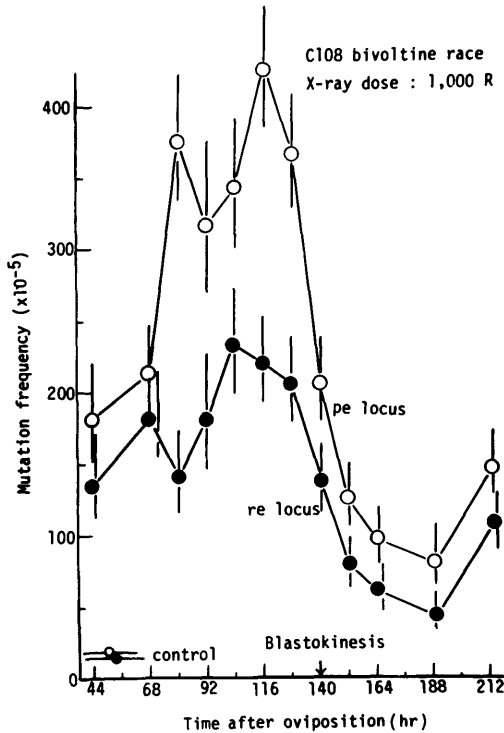


Figure 1. Frequencies of egg-color mutations in primordial germ-cells after γ -irradiation (1,000 R) of silkworm female embryos.

変動

産下44~212時間目に至る胚子期の雌始原生殖細胞における従来の計算法により求めた γ -線(1.0KR)誘発卵色の特定座位突然変異頻度を第1図に要約した。第1図にみられるように遺伝子座位によって突然変異頻度は異なる。先ず pe 座位についてみると、産下44~38時間目の突然変異頻度はゆるやかに上昇するが、産下72時間目には極端な上昇を示した。産下92時間目の突然変異頻度は多少低下するが、産下116時間目のそれは最大値を示し、以後産下152時間目まで急激な低下を示した。その後変異頻度は産下188時間目までゆるやかに低下し、その値は産下68時間目卵とはほぼ同一の値となった。産下212時間目の変異頻度は再び上昇した。次に re 座位の突然変異頻度についてみると、産下72時間目に一時低下し最も高い値は産下104時間目にみられ、産下140~152時間目に急激な低下がみられる。この卵齢以後 re 座位の放射線感受性の変動はほとんど pe 座位と差

異がなかった。いづれにせよ、突然変異頻度は両座位とも産下104~116時間目に最も高い値を示し、胚子(生殖腺)の発育に伴う感受性の変動は両座位とも同一傾向を示した。

ところで標的となる生殖細胞が増殖前でしかも細胞数が少ない場合、その中の一つの細胞に突然変異が生ずるとその細胞の増殖に伴って倍加に倍加を加え、最終的には突然変異体が群をなして出現する一群効果(cluster effect)一が知られている。そこで一蛾当りの突然変異体数の分布を第1表に要約した。

第1表から明らかのように産下80時間目の pe 座位における85個体、 re 座位における産下68時間目の39個体および産下104時間目の30個体など極端な例がみられる。一蛾当り0から5個体の突然変異体を有する蛾数の分布は大略ポアソン分布に一致するが、6以上の突然変異体を含む場合の分布はポアソン分布から逸脱する。かかる事情を考慮して一蛾当り5個体以内の突然変異体を有する蛾区のみを計算の対象として胚子の発育にともなう突然変異頻度($\cdot 10^{-5}$)の変動を求めた結果を第2図に示した。

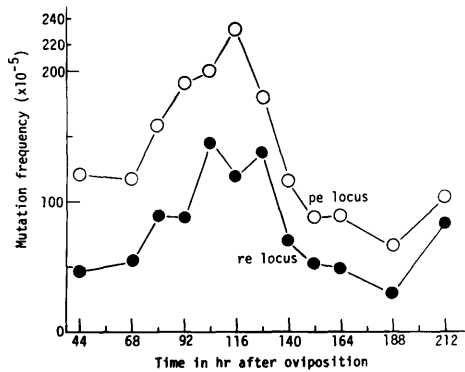


Figure 2. Frequencies of egg-color mutation in primordial germ-cells after γ -irradiation of silkworm female embryos excepting moths which laid six or more mutant eggs per batches.

さらに一蛾当り突然変異体を少なくとも1個以上を有する蛾数の総調査蛾数に対する頻度(%)を第3図に示した。第3図からみられるように座位による差はあるが、生殖細胞の発育に伴う突然変異体を有する雌蛾の頻度(%)は産下44時間から68時間目はほとんど変動なく、それ以後の産下80時間目からゆるやかに上昇し、産下116時間目に最高に達した(pe 座位に関して約50、 re 座位に関して約40%)が変

Table 1. Number of induced mutant eggs per batch in primordial germ-cells after γ -irradiation (1,000 R) of female embryos in the silkworm.

Age treated (hr)	Total no. of eggs of batches observed	Av. no. of eggs per batch	Total no. of eggs observed	Number of mutants per batch																												
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	23	28							
Control	243	518	125,874	234	3	2	1	2	1																							
				236	2	1	3	1																								
44	125	495	61,875	82	20	8	8	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				100	16	3	2	2	1	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2							
68	160	509	81,440	105	23	9	7	6	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				126	17	7	2	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
80	159	468	74,412	95	24	9	6	8	5	5	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				118	18	8	7	4	2	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
92	100	457	45,700	57	13	11	3	8	1	2	1	1	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				70	17	5	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
104	139	480	66,720	66	31	11	7	8	3	4	4	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2								
				85	24	13	8	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
116	197	486	95,742	83	30	32	13	8	6	5	6	4	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				118	37	18	5	5	2	2	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
128	200	468	93,600	101	36	19	14	5	3	3	5	6	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				126	37	14	4	8	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
140	189	522	98,658	127	28	8	7	5	5	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				145	25	8	3	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
152	198	513	101,574	143	27	12	6	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				159	26	7	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
164	193	520	100,360	141	30	11	5	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				162	20	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
188	204	522	103,488	157	31	7	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
				179	20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
212	220	532	117,040	153	33	14	3	6	5	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2								
				168	26	8	8	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2								

pe locus
re locus

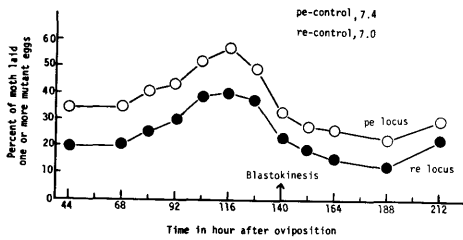


Figure 3. Percent of moths which laid one or more mutant eggs in primordial germ-cells after treatment of silkworm female embryos with γ -rays (1,000 R).

異体を有していた)。産下116時間目から突然変異頻度は低下し、産下140時間目（反転期）には産下44時間とほぼ同一の頻度となった。反転期以後変異頻度は非常にゆるやかに低下し、産下88時間目には最低に達し、孵化前後に再び変異率の上昇が認められた。この傾向は従来の方法で計算した突然変異頻度の動向と、および第2図に示した一蛾当り5個体以内の突然変異体を有する蛾区を計算の対象とした場合の感受性の変動の傾向と全く同一であった。

2. 胚子（生殖線）の発育に伴う始原生殖細胞数の変動

胚子の生殖細胞は産下68時間目（胸肢突起発現期 Stage 17）より明瞭に識別され、第6～8環節の左右でそれぞれ独立に分裂し、胚子の発育に伴ってそれぞれの場所で生殖隆起を形成した。産下116時間目の胚子では各環節のそれぞれの側の生殖隆起が索状体で連絡するとともに小型の細胞が出現し、産下128時間目（反転期直前、Stage 20～21）の胚子に至って初めて各生殖隆起は第8環節に集合して合体が完了して生殖腺を形成した。なお、本実験に供試した産下140時間目は反転期中頃（Stage 21）で212時間卵は催青Ⅰ期（Stage 28、孵化2日前）であった。胚子の発育に伴う生殖細胞数の変動についてはすでに支108号を用いて、孵化2日前から孵化10日後までの詳細な観察結果が報告されている（KOBAYASHI, 1961）ので、著者らは γ -線誘発突然変異頻度の高まる産下68時間から最高変異頻度を示す128時間に至る胚子期の生殖細胞数を12時間々隔で測定した。なお、実験に供試した支108号系統はW染色体に標識されていないので、雌雄の区別なく生殖細胞数の測定を行った。測定結果は第2表に示したよ

Table 2. Changes of the number of primordial germ-cells in embryonic stages of the silkworm.

Hours after oviposition	No. of embryos tested	No. of germ-cells per embryo		
		Average	Min.	Max.
68	16	9.0	6	12
80	18	12.3	8	17
92	19	19.6	15	27
116	14	25.0	19	34
128	10	39.6	33	53

Strain used in this experiment: C108 bivoltine race.

うに、産下68時間目の胚子の生殖細胞数は9.0個前後で、生殖腺形成時の産下128時間目には39.6個と胚子の発育に伴ってほぼ4倍に増加し、1細胞分裂に要する時間は30時間前後であった。

考 察

カイコにおける生殖腺形成期を中心とする産下68時間目から孵化2日前に至る間の、生殖細胞における γ -線誘発卵色の突然変異を指標とした感受性は産下80時間目から急激に上昇し、産下116時間目（反転期開始24時間前）に最高値に達し、それ以後反転完了後（産下140時間目）まで急激に低下する。しかし、反転完了後（殆どどの器官形成は完了する）から孵化3日前（産下188時間目）に至る間の感受性は全く変化なく低い水準を保つが、その24時間後に多少の変異頻度の増加が認められた。

組織学的に生殖細胞が明確に識別できる産下68時間目（胸肢突起発現期）から感受性が最高に達する産下116時間目に至る48時間に生殖細胞数は約3倍に増加した。特に産下80時間目以後の胚子において生殖細胞数の増加が顕著に認められた。なお、生殖隆起の形成は産下92時間目、そして反転期直前に各生殖隆起の合体がみられ生殖腺の形成が完了する。これらの組織学的な観察結果は宮(1959, 1975)の観察結果と良く一致する。感受性の最も高い産下116時間前後は索状体による各環節の生殖隆起の連絡する時期に相当し、生殖腺の形成の直前である。これらの観点から産下116時間目の突然変異頻度の上昇は、始原生殖細胞の分裂増殖に依存することが明らかである。参考までにこの胚子期は種々の器官形成

期(外山, 1909. 布目, 1937. 宮, 1951, 1975. 高見・北沢, 1960)にも相当する。宮(1952)は胚原基分化直後の産下16時間目に各環節に生殖細胞が出現し, 生理学的分化は胚盤期に行われるものと推論している。また生殖腺の形成は第6~9環節の細胞が参加するもので, 生殖細胞の増殖は主に生殖腺形成後に行われるが, 一部はすでにstage18前後から行われる(川口・宮, 1943. 宮, 1951, 1952, 1959, 1975)。吾々の胚子の組織学的観察結果から, Stage 17以後にすでに生殖細胞の増加が認められると同時に突然変異頻度の上昇期にも対応することが認められた。この点, ショウジョウバエ(SONNENBLICK, 1950)における極細胞(pole cell)の増殖は, 生殖腺へのとり込みが完了し, それに続いて開始されるとされている知見と, カイコにおける生殖細胞の増殖様式と大差がないようである。

さて, 本実験に用いた支103号系統において孵化2日前の1個体当りの生殖細胞数(47.5)は反転開始期の生殖細胞数との差が3日間でわずか8個程度と少なく, それ以前の器官形成期の増殖率と比較して非常に低い(KOBAYASHI, 1951)。この事実はカイコ胚子の生殖細胞が器官形成期に幼虫期の精原細胞(NAKANISHI ら, 1935)同様に分裂増殖するのに反し, 生殖腺形成完了後一時分裂停止し, 孵化2日前頃から精(卵)原細胞の分裂(KOBAYASHI, 1951)が再び開始されるものと考えられる。本実験の産下212時間目における突然変異頻度の上昇はちょうどこの卵原細胞の分裂増殖期に相当し, しかもTAZIMA ら(1931)の γ -線誘発突然変異頻度(率)とよく一致する。いづれにせよ, 生殖腺形成期の生殖細胞の放射線感受性は幼虫期の生殖細胞とほぼ同様に, しかも細胞分裂の所要時間も幼虫期の精原細胞の場合と同様に30時間であった。結論として胚子期の生殖細胞と言え, その生物学的様相は他の発育時期の生殖細胞のそれと比較して何ら差異のないことが推察された。

摘 要

カイコ胚子期の雌生殖腺・細胞の発育と放射線感受性の関係を分析する目的で, 支108号の産下44時間目より212時間目までの胚子を12または24時間々隔で ^{137}Cs γ -線(線量率300R/min)を1KR照射し, 孵化幼虫を飼育し, 化蛾後標識系統(pe・re)雄と

交配し, その産下したF₁卵について突然変異頻度を測定し, 以下の結果を得た。

1. 突然変異頻度は産下80時間目から急激に増加し, 産下116時間目に最高値に達し, それ以後低下するが, 反転完了後から産下188時間目までほとんど変化せず, 産下212時間目(孵化2日前)に再び上昇した。

2. 生殖細胞は産下68時間目(Stage 17)から産下116時間目(Stage 21)に至る48時間の間に, 一世代30時間のサイクルで細胞の増加がみられた。また, 生殖腺の形成は支108号系統において産下116時間目に完了することが観察された。しかし産下116時間以後約95時間は生殖細胞数の増加は非常に少なく分裂増殖がほとんど認められず, 孵化2日前に再度増殖が開始された。

3. 突然変異頻度を指標とした生殖腺形成期における放射線感受性の変動は, 幼虫期の生殖原細胞の場合と同様に生殖細胞の分裂増殖に強く依存することが認められた。

文 献

- 川口栄作・宮 慶一郎(1943): 遺伝雑 19, 133—134(要旨)
 KOBAYASHI, T. (1961): Ann. Rept. Natl. Inst. Genet., (Japan) 12, 91—92.
 宮 慶一郎(1951): 日蚕雑 20, 221—225.
 宮 慶一郎(1952): 遺伝雑 27, 48—55.
 MIYA, K. (1959): J. Fac. Agr., Iwate Univ., 4, 126—151.
 MIYA, K. (1975): J. Fac. Agr., Iwate Univ., 12, 329—363.
 村上 昭雄(1966): 放射線生物研究, 1, 29—42.
 MURAKAMI, A. (1967): Ann. Rept. Natl. Inst. Genet., (Japan) 17, 102—103.
 MURAKAMI, A. (1971a): Genetics, 67, 109—120.
 MURAKAMI, A. (1971b): Proc. Japan Acad., 47, 631—634.
 MURAKAMI, A. and Y. TAZIMA (1965): Ann. Rept. Natl. Inst. Genet., (Japan) 15, 121—123.
 NAKANISHI, T. H., T. IWASAKI and H. KATO (1965): Japan. Jour. Genetics, 40 (Suppl.), 49—67.
 布目順郎(1937): 応動雑 9, 68—92.
 SONNENBLICK, B. P. (1950): Biology of Drosophila (Ed. by M. Demerec), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 62—167.
 高見丈夫・北沢敏男(1960): 蚕試彙報 75, 1—31.

TAZIMA, Y., S. KONDO and T. SADO (1961): Genetics, 46: 1335—1345. 外山亀太郎 (1909): 蚕種論, 丸山舎, 東京.

Summary

γ -ray-induced mutations of female primordial germ-cells during organogenesis in the silkworm (*Bombyx mori* L.)

by

Mutsuo MIKI and Akio MURAKAMI¹⁾

Developing silkworm embryos from 44 up 212 hr after oviposition were irradiated with a constant single dose of 1000 R of ¹³⁷Cs gamma rays (dose-rate at 300 R per min) and the change of the female primordial germ-cells in the sensitivity to mutation induction during the organogenesis. Egg-color specific locus method was used for the detection of the mutational incidences. The results obtained were summarized as follows:

The mutation frequency increased gradually with the development of gonad in embryos from 68 to 116 hr after oviposition and there decreased until 188 hr when the mutation frequency was as low as in the 44 hr old embryo. The frequency increased slightly at 212 hr. The number of germ-cells increased at a rate of 30 hr/generation during the gonad formation in embryos from 68 to 128 hr after oviposition. Gonads were completed in 116 hr-old embryos. The multiplication of primordial germ-cells ceased temporarily after blastokinesis until the onset of gonial divisions in aged embryos 2 days before hatching. The change of primordial germ-cells in radiosensitivity appeared to depend on whether the germ-cells were in the process of multiplication.

(*Saitama-ken Sericultural Experimental Station, Kumagaya*, 〒 360
and *National Institute of Genetics, Misima*,¹⁾ 〒 411)