

# 家蚕踊の卵巣培養系における培養液組成と<sup>14</sup>Cロイシンとりこみ量との関係

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	491
掲載ページ	p. 32-38
発行年月	1980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



## 家蚕蛹の卵巢培養系における培養液組成と $^{14}\text{C}$ -ロイシンとりこみ量との関係

宮台俊明・山下興亜

名古屋市千種区・名古屋大学農学部 (〒 464)  
(1979年 8月16日受理)

家蚕の卵巢細胞を用いた細胞培養は TRAGER (1935) に始まり, WYATT (1956) による準合成培養液を用いた方法によってほぼ完成された。さらに細胞の継代培養は WYATT の培養液にビタミン等を添加した GRACE (1962, 1967) の研究によって初めて成功し, 細胞株が確立された。この成果は卵巢全体を対象とした器官培養にも適用され, たんぱく質 (ONO ら, 1975) とか, グリコーゲン (YAMASHITA・HASEGAWA, 1976) のような高分子物質の合成活性の検討に引き継がれている。

一方, 家蚕の卵巢発育も他の昆虫種におけると同様に内分泌的制御下にあり, 特にエクダイソンが卵成熟に必要なことが示された (SAKURAI・HASEGAWA, 1969; ONO ら, 1975; CHATANI・OHNISHI, 1976) また休眠ホルモンに関する一連の研究から, このホルモンの標的器官は卵巢であり (HASEGAWA・YAMASHITA, 1965) その作用の1つは卵巢トレハラーゼ活性の調節にあることが明らかにされた (YAMASHITA ら, 1972) このように卵巢の発育過程には栄養物質の十分な供給のみでなく, ホルモンなどの生理活性物質が関与していると考えられる。

ところが家蚕卵巢の器官培養条件, なかなく培養液の化学的組成に関しては十分な検討は行われておらず, 卵巢発育を保障する培養条件がはたして細胞培養のための条件で十分であるか否かは不明である。そこで本研究においては, 組成の異なる培養液中で短時間培養した卵巢でのたんぱく質合成能を比較し, 培養条件が卵巢の代謝活性に及ぼす影響について検討した。

本研究にあたり御指導いただいた川瀬茂実教授に感謝の意を表す。なお本研究の一部は文部省科学研究費 (総合研究 A, 236031) によった。

### 材料と方法

実験材料: 供試蚕品種は二化性の錦秋×鐘和ならびに春嶺×鐘月であり, 高温明催青によって休眠卵産生とした。幼虫は生葉または人工飼料 (武田薬品工業株式会社製) を用い常法に従って飼育した。蛹期は主として 25°C で保護したが, 実験の都合上卵巢発育の遅延を図るため一部は 15°C に保護した。

卵巢培養法: 種々の発育時期の雌蛹をまず 70% エタノール中に約 30 秒, 次に 0.1% 昇汞水に約 5 分間浸漬して消毒した。これを滅菌水でよく洗った後, 滅菌生理的食塩水 (0.75% 食塩水) 中で蛹を解剖し卵巢を摘出した。

培養はすでに報告した方法 (YAMASHITA・HASEGAWA, 1976; SHIMADA・YAMASHITA, 1976) に準じて行った。すなわち WYATT (1956) の培養液を基本とし, その組成の一部を以下のように変えて調製した培養液を用いた。すなわちグルコースをトレハロースに, チロシンをフェニールアラニンに置き換えたものを標準培養液とした。そのほかの組成および濃度は結果の項で述べるように実験目的に応じて変えた。なお一部の実験においては, 雌蛹の血液から抽出したリポたんぱく質およびピテロジェニンを添加した (結果の項参照)。調製した培養液はミリポアフィルター (孔径 0.45 $\mu\text{m}$ ) によって除菌し, 無菌的に保存した。

培養は, 培養液 0.5ml または 0.25ml を含む培

養管に卵巣標品を入れることによって開始し、25°Cで主として回転培養(14回転/分)によって行った。たんぱく質の合成能は培養液に<sup>14</sup>C(U)-ロイシン(比活性 300mCi/mole)を0.1または0.2 $\mu$ Ci/mlを加えて一定時間インキュベーションしたのち、たんぱく質画分への放射能のとりこみ量から判定した。なお一部の実験においては培養系でのとりこみ活性と比較検討するために、<sup>14</sup>C-ロイシンを各发育時期の雌蛹に注射し(0.2 $\mu$ Ci/頭)、2時間標識したのち卵巣を摘出し、たんぱく質画分を調製した。

たんぱく質の調製・定量と放射能の測定：

培養の停止は、卵巣を水冷生理食塩水に移すか、または培養管に冷5%過塩素酸(PCA)を約1ml加えることによって行った。この卵巣標品を冷5%PCAでよく洗った後、冷5%PCA中でガラスホモゲナイザーを用いて磨砕した。遠心を3回繰り返すことによって冷酸可溶成分を除いた後、酸不溶画分をエタノール：エーテル(1:1)で洗い、この残渣に一定量の5%PCAを加え、沸騰水中で20分間加熱して熱酸可溶成分を除いた。熱酸不溶画分を再びエタノール：エーテル(1:1)で洗った後、一定量の0.5N NaOH溶液を加えて溶解し、遠心によって可溶物を得、これをたんぱく質画分とし

た。実験によっては培養停止以下の操作を5%トリクロロ酢酸を用いて行ったが、その場合には熱酸抽出は除いた。たんぱく質の定量はLOWRYら(1951)の方法に従い、仔牛血清アルブミンを標準物質として算定した。放射能は、たんぱく質画分の一部をトリトンX-100-トルエン系シンチレーター(1:2)とよく混合した後、液体シンチレーションカウンター(Packard Tricard 3320型)で測定した。ここで得られた計測効率率は約70%であった。

結果と考察

<sup>14</sup>C-ロイシンとりこみの性質：まず5日齢の蛹の卵巣を、<sup>14</sup>C-ロイシンを含む培養液中で10時間まで培養したところ(Fig.1)、とりこみ量は6時間まではほぼ直線的に増加したが、それ以後のとりこみの割合は減少した。そこで以後の実験ではとりこみ時間を2時間以内とした。

次に培養液中のロイシン濃度がとりこみ量に及ぼす影響について検討した(Fig.2)。ロイシン濃度1mMまではとりこみ速度は急激に増加したが、それ以上の濃度ではほぼ飽和状態に達した。この消長は酵素反応系におけるMICHAELIS-MENTEN型の飽和曲線に類似しているのので、LINEWEAVER-BURK

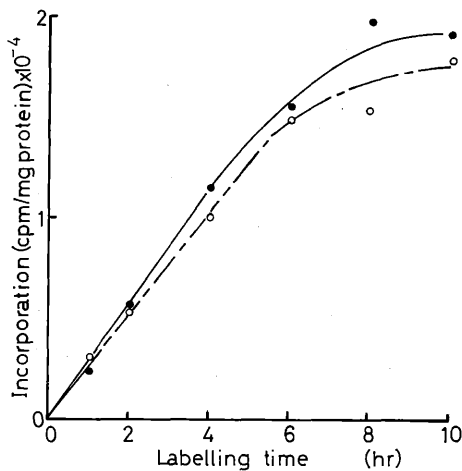


Fig. 1 Time course of the <sup>14</sup>C-leucine incorporation into the protein of the incubated ovary in the different medium. One ovariole was incubated in Wyatt's medius (●) and the medium containing 10 mg/ml of a mixture of vitellogenin and lipoprotein (○).

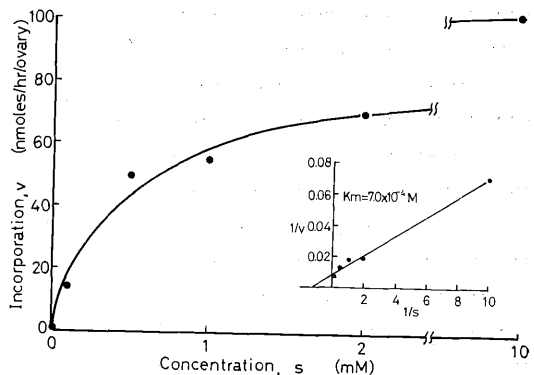


Fig. 2 Relationship between concentration of L-leucine in the medium and its incorporation into ovarian protein. Ovaries of about 150mg wet weight were incubated in the medium containing different concentration of L-leucine and a constant amount of <sup>14</sup>C-leucine (0.1 $\mu$ Ci) for 1hr and 40min. Amounts of leucine incorporated were calculated from the specific radioactivity set at the initiation of incubation. Inset shows reciprocal plots of the same data.

Table 1. *In vitro* incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine into the proteins of ovaries with different concentrations of  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  in the incubation medium.

Concentration			Incorporation	
$\text{K}^+$ (mM)	$\text{Na}^+$ (mM)	Ratio ( $\text{K}^+/\text{Na}^+$ )	(cpm/hr/ovary) $\times 10^{-4}$	Ratio
40	8	5.0*	0.86 $\pm$ 0.10	1
70	5	14.0	1.05 $\pm$ 0.10	1.22
65	10	6.5	0.83 $\pm$ 0.10	0.96
60	15	4.0	0.88 $\pm$ 0.08	1.02
40	35	1.14	1.08 $\pm$ 0.09	1.25
10	65	0.15	1.04 $\pm$ 0.13	1.21
0	75	0	1.01 $\pm$ 0.04	1.17

Ovaries of about 200mg wet weight were incubated in the medium containing  $^{14}\text{C}$ -leucine (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{tube}$ ) for 2hr. Each value represents the mean of 5 samples and standard deviation.

\* WYATT's medium.

法によってみかけの $K_m$ 値と最大とりこみ量( $V_{max}$ )を求めたところ、それぞれ0.70mM および 100n moles/時間/卵巣となった。ここで得られた $k_m$ 値は蛹期の血液中のロイシン濃度(約2mM, 井口:私信)より低いので、たんばく質合成活性が血液中のロイシン濃度によって左右されている可能性は少い。またロイシンの卵巣たんばく質に占める割合をほぼ5% (井口:私信)とし、しかも合成されたたんばく質がそのまま蓄積されると仮定すると、培養系で得られたロイシンの最大とりこみ量は、蛹齢5日から6日にかけての1日間の卵巣1対あたりのたんばく質の蓄積量として4.8mgを与えることになる。ところで蛹体内で发育している卵巣はこの期間に約10mg/日のたんばく質を蓄積している(Tojo, 1971)。卵巣のたんばく質中に占めるピテロジェニン量を約40% (入江・山下, 未発表)とすると、卵巣は1日に約6mgのたんばく質を合成蓄積していることになる。以上は1つの概算にすぎないが、この結果から今回用いた実験条件では培養卵巣のたんばく質合成能は生体内における能力の約80%を維持していると判断された。

無機イオンの影響: 培養組織の成長とか分化の過程に培養液中の無機イオン, 糖, アミノ酸組成が影響することは一般に知られている。また昆虫血液のイオン組成は哺乳動物に比較して $\text{K}^+$ イオンおよび $\text{Mg}^{2+}$ イオン濃度が高いことが特徴とされている(WYATT, 1961)。そこでまず培養液中の $\text{Na}^+$ イオ

ンおよび $\text{K}^+$ イオンの影響について調査したところ(Table. 1),  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 組成比を14から0に変えた場合、いずれの培養液においても、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンのとりこみ量はほぼ一定であり、これらのイオン濃度の影響は認められなかった。 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 比を変えた培養液中で70時間卵巣を培養した場合においても、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンのとりこみ量に有意な差異は認められなかった(結果省略)。したがって培養液中の $\text{K}^+$ イオンおよび $\text{Na}^+$ イオンは培養卵巣のたんばく質合成能に直接的な影響を及ぼしているとは考えられない。同様の結果はセクロピア蚕の脂肪体を培養した場合にも認められている(REDDY・WYATT, 1967)。しかしクロバエ科の一種 *Calliphora erythrocephara* の脂肪体を培養した場合には、 $\text{K}^+$ イオンや $\text{Na}^+$ イオンはむしろたんばく質合成能を阻害しており(PRICE, 1967),  $\text{K}^+$ および $\text{Na}^+$ イオンの作用を統一的に理解するには到っていない。

次に $\text{Mg}^{2+}$ イオンが $^{14}\text{C}$ -ロイシンのとりこみ量に及ぼす影響を調べたところ(Fig. 3),  $\text{Mg}^{2+}$ 無添加区においてもかなりのとりこみ量は認められたが、10mM以上の濃度において増加の傾向を示し、60mMでは無添加区に比し2倍以上のとりこみ量が得られた。この $\text{Mg}^{2+}$ イオン濃度依存性は、*C. erythrocephara*の培養脂肪体における $^{14}\text{C}$ -バリンのとりこみ実験の結果(PRICE, 1967)に類似していた。

ところで昆虫の各種無細胞系におけるたんばく質

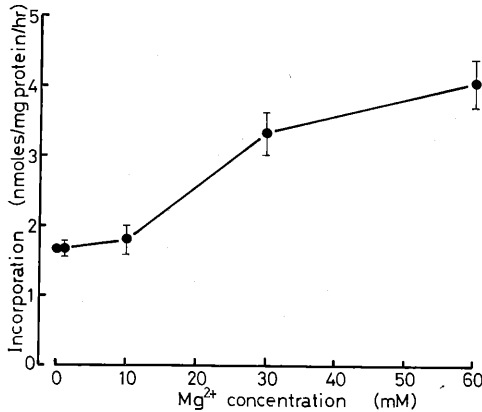


Fig. 3 Effect of  $Mg^{2+}$  concentrations on  $^{14}C$ -leucine incorporation into protein of incubated ovaries. Ovaries of about 150mg wet weight were incubated with  $0.04 \mu Ci$   $^{14}C$ -leucine for 1hr. Each point represents the mean value and standard deviation from 5 samples.

合成活性は反応液中の無機イオンの組成および濃度によって大きく影響されることが示されている。たとえばチャイロコメノゴミムシダマシ *Tenebrio molitor* では、高濃度の  $K^+$  イオン (120mM) が GTP ホスファターゼ活性を阻害することによって結果的にたんぱく質合成活性を高めている (ILAN, 1968)。またクロバエ科の一種 *Lucilia cuprina* から調製したミトコンドリアにおけるたんぱく質合成活性は  $K^+/Na^+$  比が高くなるにしたがって高くなること (WILLIAMS・BIRT, 1971) などが知られている。またチャイロコメノゴミムシダマシ (ILAN, 1958) とか *C. erythrocephara* (FRAGOULI-F.ら, 1978) についての研究から、 $Mg^{2+}$  イオンはポリゾームの構造維持に必須であることが推察されている。しかしここで要求される  $Mg^{2+}$  イオン濃度は非常に限られた範囲 (6mM, チャイロコメノゴミムシダマシ, ILAN, 1968; 3~4mM, *C. erythrocephara*, FRAGOULI-F.ら, 1978) にあり、培養系での結果 (Fig. 3) とは一致しない。

このようにたんぱく質合成系における各単位反応段階は特異的な無機イオンを要求しているが、この要求性は、卵巢培養系でみられたように組織器官をとりまく環境のイオンについては厳密に規定するものではないと考えられる。このことは、細胞内のイオン組成は細胞膜のイオン透過性の能力とか選択性によりかなり安定化していることを示唆している。

Table 2. Effects of sugars on the incorporation of  $^{14}C$ -leucine into protein of incubated ovaries of silkworms.

Sugar	Incubation time (hr)	
	2	12
cpm/hr/ $\mu g$ protein		
Glucose	$1.94 \pm 0.31$	$0.510 \pm 0.03$
Mannose	$2.23 \pm 0.43$	$0.623 \pm 0.03$
Galactose	$2.17 \pm 0.39$	$0.636 \pm 0.03$
Sucrose	$2.19 \pm 0.07$	$0.624 \pm 0.06$
Trehalose	$2.08 \pm 0.56$	$0.801 \pm 0.08$

Single ovariole from 6-day-old pharate adult was cultured *in vitro* in a modified Grace's medium containing various sugars at the concentration of 20mM for 2 and 12hr, but in the incubation of 12hr, the medium was renewed at 1hr.  $^{14}C$ -leucine ( $0.2 \mu Ci$ ) was pulsed for 1hr before stopping culture. Values are means  $\pm$  standard deviation of 4 samples provided from the same individuals.

ところで無機イオンが血液の pH を決定する要因の 1つであると考えられるので、培養液の pH が  $^{14}C$ -ロイシンのとりこみ量に及ぼす影響を調査したところ、pH を 5.4 から 7.0 まで変化させた場合の  $^{14}C$ -ロイシンのとりこみ量は、これらの pH 領域においてはほぼ等しく (結果省略)、pH による顕著な差異は認められなかった。したがってすでに WYATT (1956) によって調整され、また家蚕の血液の pH (6.5~6.7, 永井, 1934; 高嶋, 1963) に近似した 6.35 を培養液の pH として設定することは妥当であると考えられた。

糖の影響：家蚕蛹の主要な血糖はトレハロースであり、卵巢が旺盛に発育している蛹齢中期の雌蛹ではその濃度は約 10mM である (山下・長谷川, 1965)。したがって本実験に用いた培養液はすべてトレハロース 10mM を含むように調製した。しかし培養系での卵巢のたんぱく質合成活性がトレハロースで完全に保障されているか否かについては疑問が残る。そこで 3 種の単糖類および 2 種の二糖類の影響を検討した (Table 2)。培養を開始してから 1 時間後あるいは 11 時間後に  $^{14}C$ -ロイシンを培養液に加え、それぞれ 1 時間とりこませたところ、培養開始時のとりこみ量は用いたすべての糖においてほぼ同レベルを示した。12 時間後のとりこみ量は培養時間が長くなったために低くなったが、培養液に加えた糖によ

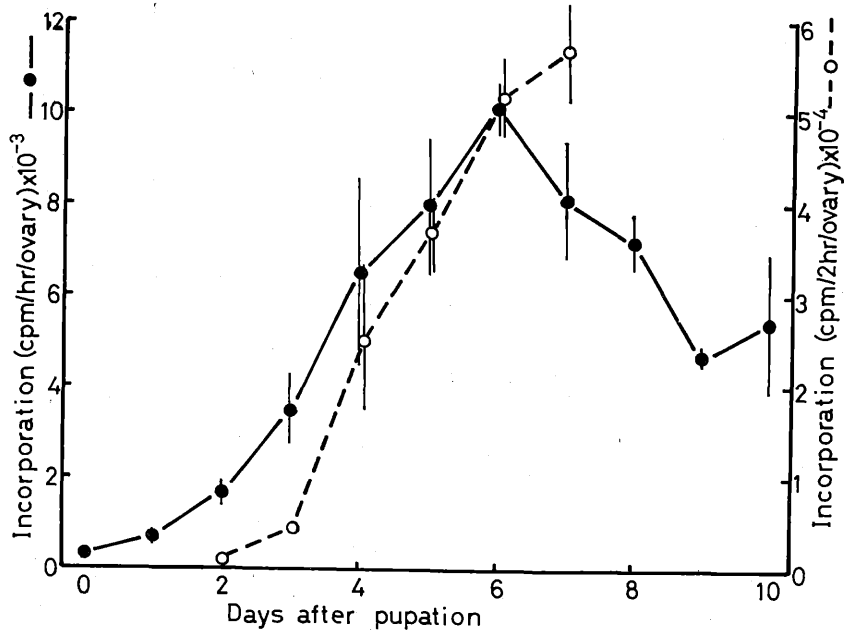


Fig. 4 Changes in the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine into protein of ovaries from different developmental stages. Ovaries prepared from 0- to 10-day-old pharate adults were incubated in the standard medium containing  $0.1\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -leucine for 1hr (●). On the other hand  $0.2\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -leucine was injected into the pharate adults of different stages and labelled for 2hr (○). Radioactivity of proteins extracted from the ovaries were determined as described in Materials and Methods. The data are expressed as mean and standard deviation from 5 samples.

る差はみられず、培養開始時と同様であった。この結果は培養系でのたんぱく質の合成活性は培養液中の糖組成によって大きく影響されないことを示している。

ビテロジェニンの影響：卵巣自身による高分子物質の生合成のみでなく、ビテロジェニンのように他組織で合成された物質の卵巣への供給もまた卵成熟にとっては重要な過程である (ONO ら, 1975; TELFER, 1960)。そこで家蚕蛹の血液から精製したビテロジェニンが $^{14}\text{C}$ -ロイシンのとりこみ量に及ぼす影響について調査した。ここで用いたビテロジェニン標品は CHINO(1969) のシンジュ蚕での結果を参考にし、硫酸塩析の代わりに透析を行い、低イオン強度(2mM リン酸緩衝液)による沈殿と 200mM リン酸緩衝液による溶解を繰り返した後、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって精製したものである。ここで得られたビテロジェニン標

品はポリアクリルアミドゲル電気泳動法によっては単一のバンドとして認められた(著者、未発表)。このビテロジェニン標品に、やはり DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって分離されたリポたんぱく質画分を加え、約  $10\text{mg/ml}$  の濃度になるように標準培養液に添加した。この培養液を用い、5日齢の蛹の卵巣における $^{14}\text{C}$ -ロイシンのたんぱく質画分へのとりこみ量を経時的に測定したところ (Fig. 1), とりこみ量は培養開始6時間まではほぼ直線的に増加したが、それ以後のとりこみ速度は若干減少した。このとりこみ量の消長はビテロジェニン無添加の対照区に類似しており、有意差は認められなかった。さらにビテロジェニン-リポたんぱく質濃度を  $30\text{mg/ml}$  となるように添加した場合にも有意な効果は現われなかった。

ビテロジェニンはそれ自身が卵黄たんぱく質の主要な構成成分であると同時に、包卵細胞で合成され

たんぱく質を卵母細胞内に運び込む機能をも合わせ持っていると推察されている (BAST・TELFER, 1976)。しかし本実験の結果は、ピテロジェニンは卵巣のたんぱく質合成に直接関与するものではないことを示唆している。

卵巣の発育にともなうたんぱく質合成能の変動：蛹化後卵黄形成期に入った卵巣は、急激にたんぱく質を蓄積して蛹齢の後期には成熟卵となる (長谷川, 1943; 小沢, 1959; SAKURAI・HASEGAWA, 1969)。この間、卵巣におけるたんぱく質合成能はその発育の進行に伴い大きく変動するものと考えられる。そこで、この変動を培養系において $^{14}\text{C}$ -ロイシンのとりこみ量から検討した (Fig. 4)。蛹化当日から羽化前日に到る蛹の卵巣を、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンを含む標準培養液中で1時間インキュベーションした後、たんぱく質画分へとりこまれた放射能を測定した。その結果とりこみ量は卵巣発育の進行に伴って増加し、化蛹6日時に最も高く、それ以後は低下した。

一方化蛹7日までの雌蛹に $^{14}\text{C}$ -ロイシン(0.2 $\mu\text{Ci}$ /頭)を注射し、2時間後に卵巣を摘出してたんぱく質画分へのとりこみ量を調査した結果 (Fig. 4) 培養卵巣の場合とほとんど同様のとりこみのパターンが見られた。このことから、少なくとも6時間以内の培養では、卵巣のたんぱく質合成活性は生体内の活性を反映していることが示唆された。

このように、蛹の卵巣の体外培養においては、WYATT (1956) によって開発された培養液を多少修正した培地を用いた短期間の培養であれば、卵巣組織の代謝活性は、培養条件によって大きく影響されないことが示された。したがって今回用いた培養条件は、短期間に終結する反応系についての検討に利用できると思われる。しかし長期間培養した場合には活性の低下が起こることから、培養液組成の改良を含めて培養法全体のみなおしが必要であり、現在検討中である。

### 摘 要

$^{14}\text{C}$ -ロイシンのたんぱく質画分へのとりこみ量を指標として家蚕卵巣の培養系の検討を行った。

1. 卵黄形成期にある卵巣をWYATTの培養液中でインキュベーションし、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンのたんぱく質画分へのとりこみの $K_m$ 値および $V_{max}$ を求めたところ、各々0.7mMおよび100n moles/時間/

卵巣であった。

2. 10mM以上の $\text{Mg}^{2+}$ イオンを含む培養液では、卵巣のたんぱく質合成活性の増加がみられた。しかし $\text{K}^+$ イオン(0~70mM)、 $\text{Na}^+$ イオン(5~75mM)、ピテロジェニン-リポたんぱく質(10, 30mg/ml)はその濃度のいかにかわらず影響を及ぼさなかった。また数種の糖類を添加した場合においても合成活性の変化は認められなかった。

3. 発育時期の異なる卵巣のたんぱく質合成活性を培養系において比較し、発育に伴う活性の変動を調べたところ、蛹体内での合成活性の変動とよく一致していた。

### 文 献

- BAST, R. E. and W. H. TELFER (1976) : *Develop. Biol.*, **52**, 83—97.
- CHATANI, F. and E. OHNISHI (1976) : *Develop. Growth. Differ.*, **18**, 481—484.
- CHINO, H., S. MURAKAMI, and K. HARASHIMA (1969) : *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 1—26.
- FRAGOULI-F., M.E., E.G. FRAGOULIS, and C. E. SEKERIS (1978) : *Insect Biochem.*, **8**, 435—441.
- GRACE, T. D. C. (1962) : *Nature*, **195**, 788—789.
- GRACE, T.D.C. (1967) : *Nature*, **216**, 613.
- 長谷川金作 (1943) : 蚕試報, **11**, 359—377.
- Hasegawa, K. and O. YAMASHITA (1965) : *J. Exp. Biol.*, **43**, 271—277.
- ILAN, J. (1968) : *J. Biol. Chem.*, **243**, 5859—5866.
- LOWRY, O. H., N. J. RESEBROUGH, A. L. FARR, and R.J. RANDALL (1951) : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
- 永井 寛 (1943) : 日蚕雑, **5**, 285—283.
- ONO, S., H. NAGAYAMA, and K. SHIMURA (1975) : *Insect Biochem.*, **5**, 313—329.
- 小沢民治 (1959) : 日蚕雑, **28**, 211—219.
- PRICE, G.M. (1967) : *J. Insect Physiol.*, **13**, 69—79.
- REDDY, S. R. and G. R. WYATT (1967) : *J. Insect Physiol.*, **13**, 981—994.
- SAKURAI, H. H. and K. HASEGAWA (1969) : *Appl. Entomol. Zool.*, **4**, 203—210.
- SHIMADA, S. and O. YAMASHITA (1979) : *J. Comp. Physiol.*, **131**, 333—339.
- 高嶋成之・高野幸治 (1963) : 蚕糸研究, (47), 59—63.
- TELFER, W. H. (1960) : *Biol. Bull., Woods Hole*, **118**, 338—351.

- TOJO, S. (1971) : *Insect Biochem.*, **1**, 249—263. 102.
- TRAGER, W. (1935) : *J. Exp. Med.*, **61**, 501—513. 山下興亜・長谷川金作(1965) : *日蚕雑*, **34**, 235—243.
- WILLIAMS, K. L. and L. M. BIRT (1971) : *Eur. J. Biochem.*, **22**, 87—95. YAMASHITA, O. and K. HASEGAWA, and M. SEKI (1972) : *Gen. Comp. Endocr.*, **18**, 515—523.
- WYATT, S. S. (1956) : *J. Gen. Physiol.*, **30**, 841—852. YAMASHITA, O. and K. HASEGAWA (1976) : *J. Insect Physiol.*, **22**, 409—414.
- WYATT, G. R. (1961) : *Ann. Rev. Entomol.*, **6**, 75—

### Summary

#### *In vitro* conditions for $^{14}\text{C}$ -leucine incorporation into the protein of cultured ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*.

Toshiaki MIYADAI and Okitsugu YAMASHITA

Vitellogenic ovaries of silkworm pupae were incubated *in vitro* in different media based on the Wyatt's medium to establish an adequate condition for culture of silkworm ovaries. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine into protein fraction was determined to assess the biochemical activity of the ovary.

When ovaries were incubated *in vitro* for a short time by 6 hr, a saturation kinetics of incorporation of the labelled leucine was shown. Sequential substitution of  $\text{K}^+$  ion to  $\text{Na}^+$  ion in the medium had no effect on the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine, but  $\text{Mg}^{2+}$  ion appeared to stimulate synthetic activity at more than 10 mM. The activity was not affected at pH range 5.0—7.2.

Neither different sugars, nor vitellogenin nor lipoprotein prepared from silkworm haemolymph affected the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine, when added into the medium. The synthesis of protein depended upon the developmental stages of the cultured ovaries and was most active in 6-day-old ovary. Ovaries developing in pupal body showed comparable changes in synthetic activity.

It is concluded that the chemical composition of the medium does not exert a strict effect on synthetic activity of protein in short-term cultures and the ovaries cultured *in vitro* maintain the activity comparable with those found in *in situ* condition.

(Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya. 〒464)