

家蚕の各種系統における消化液の抗 Streptococcus 活性 について

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	内海, 進 赤井, 厚喜 野村, 重雄
巻/号	56巻2号
掲載ページ	p. 109-115
発行年月	1987年4月

家蚕の各種系統における消化液の 抗 *Streptococcus* 活性について

内海 進¹⁾・赤井厚喜²⁾・野村重雄³⁾

- 1) 京都市左京区・京都工芸繊維大学繊維学部 (〒 606)
- 2) 京都府綾部市・綾部中学校 (〒 623)
- 3) 大阪市淀川区・日本シェーリング株式会社研究所 (〒 532)

(1986年8月4日 受領)

SUSUMU UTSUMI, ATSUKI AKAI and SHIGEO NOMURA: Anti-streptococcal activity of digestive juice in various stains of silkworm, *Bombyx mori*

In order to elucidate the genetic control of the anti-streptococcal activity (ASA) in the digestive juice (DJ) of the silkworm, *Bombyx mori*, the ASA was investigated on various strains and their hybrids which were reared on mulberry leaves until the 3rd day of the 5th instar. The DJ was fractionated by the stepwise addition of saturated ammonium sulfate at 10% intervals, and the ASA in terms of ASA₉₀, which indicates the dilution times to attain ED₉₀ in the inhibition on the growth of test bacterium, was assayed *in vitro* for each fraction. In each strain so far investigated ASA was detected between 20-80% saturation of ammonium sulfate and there were two peaks of ASA, i. e. in 30-40%, and 50-60% or 60-70% saturations. Total ASA₉₀ was distributed in the range between 300 and 600, and the value of the hybrids was higher than those in their parents, which seemed to indicate heterosis. When the protein fraction prepared by precipitation of DJ with ammonium sulfate at 80% saturation was applied to Sepharose 6B, ASA was eluted as three peaks, which were named as A, B and C. The elution profile indicated incomplete separation between A and B but the clear separation between A or B, and C. Strain H₄ had higher peaks in A and B compared with one of Kojiki and Daizo, both of which are considered to be more classical strains of the silkworms. The ASA of the hybrid, Kojiki × Daizo showed approximate value to the higher of their parents. These results suggest that the anti-streptococcal activity in the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori* might be controlled genetically.

¹⁾Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606; ²⁾Ayabe Middle School, Ayabe, Kyoto Prefecture 623; ³⁾Nippon Schering Co. Ltd. Laboratory, Yodogawa-ku, Osaka 532)

消化液 (DJ) から調製した硫酸飽和各画分における抗 *Streptococcus* 活性 (ASA) を *in vitro* で ED₉₀ 値を示す希釈倍数として検定した結果, 硫酸飽和濃度範囲 20~80% に ASA が認められ, 蚕の各系統とも 30~40% (A) と 50~60% または 60~70% (B) に ASA ピークをもち, 40~50% を谷とする 2 峰型 ASA 曲線を描いた。各系統の総 ASA₉₀ 値は 300~600 の範囲に分布した。一方, 交配種 (F₁) では両親の ASA 値を大きく上まわり, ヘテロシスのであった。

また硫酸塩析物のセファロース 6B カラムクロマトでは A, B および C の 3 画分に ASA がみられ, A, B の溶出は連続的であり, A, B それぞれ, あるいは (A+B) で系統差は著しいが, C 値の差は少なかった。改良系統 H₄ は乞食, 大造などの保存系統に比べ ASA 値は高く, また乞食 × 大造で両親の高い方に近い値であった。したがって蚕 DJ の ASA 発現は遺伝的支配の下にあることを示唆している。

家蚕においても強健性あるいは耐病性が遺伝的支配を受けている事実は広く認められ、育種上重要な選抜因子と考えられてきている。しかし実際、それらには各種の要因が錯そうし、濃核病などの一部のウィルス病を除いて、遺伝形質としての解析は十分なる進展をみるに至っていない(渡部・前田, 1978; 関, 1985)。

家蚕の細菌性消化病においても、耐病性を消化液における抗細菌性として位置づければ、少なくとも耐病性の一部は遺伝形質として解析が可能ではないかと予測される。消化液 (DJ) のアルカリ性は一般細菌に対して強力な抗細菌作用を示すこと、および抗アルカリ性細菌である *Streptococcus faecalis*, *S. faecium* およびそれらの類縁菌に対しては抗 *Streptococcus* 蛋白質 (ASP) の存在が明らかになっている (内海・西村, 1982)。DJ における ASP の活性低下は、それら抗アルカリ性乳酸菌の増殖を許容し DJ の pH 低下、一般細菌あるいは困食膜溶解性細菌の侵襲を誘導する。即ち、ASP の活性の

低下がそれらの増殖、ひいては細菌病発病に至ると考えられる。したがって ASP は消化管での細菌増殖防御の第一砦として重要である。

一方、ASP の産生が蚕の生育環境や栄養条件に大きく影響されることはすでに明らかにした (内海・西村, 1982; 内海, 1983)。本報では、ASP 産生における遺伝的支配の有無について追究するため、いくつかの蚕系統について消化液の ASP 活性を測定するとともに、それらの交配種 (F₁) についても一部検討した。その概要を報告する。

材料と方法

供試消化液：蚕糸試験場小淵沢研究室保存の日1号、角叉および乞食の日本種、大造 (中国種) および欧20号 (欧州種) の5系統と片倉工業 K. K. 育成中の H₄、また交配種としては、乞食を母体とした乞食×日1号、乞食×角叉、乞食×大造、および乞食×欧20号を春蚕期に桑葉育を行ない、5齢3日目に消化液を採取した。なお消化液 (DJ) の採取に

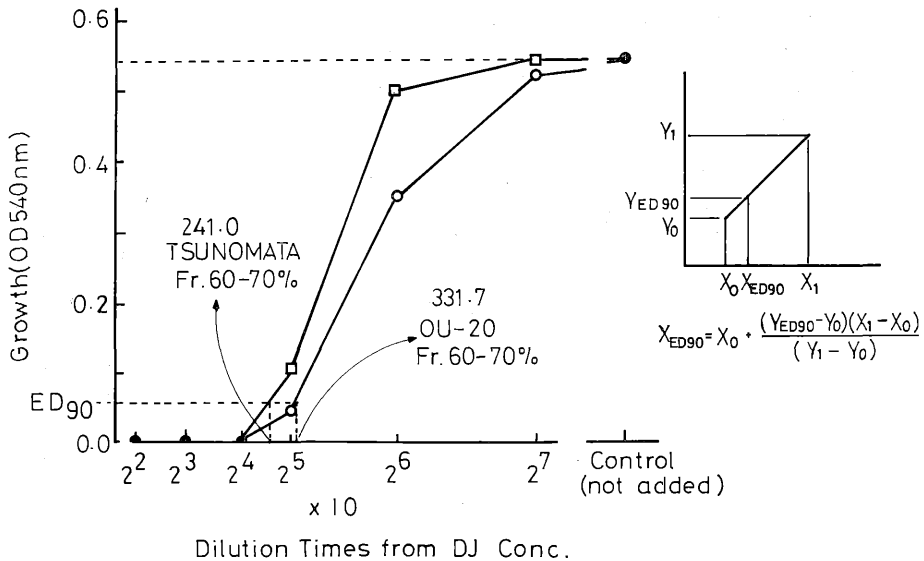


Fig. 1. Estimation process of the anti-storeptococcal activity, termed ASA₉₀. Fractions 60-70% of TSUNOMATA and OU-20 were some examples. Y_{ED90} value was decided to be 0.0542 (540nm value) which inhibited 90% on the growth of bacterium assayed, compared with the control growth value: 0.5420. X_{ED90} value was ASA₉₀ and calculated by the following formula:

$$X_{ED90} = X_0 + \frac{(Y_{ED90} - Y_0)(X_1 - X_0)}{(Y_1 - Y_0)} \dots\dots\dots(1)$$

and the examples were determined as follows: TSUNOMATA, 241.0; OU-20, 331.7.

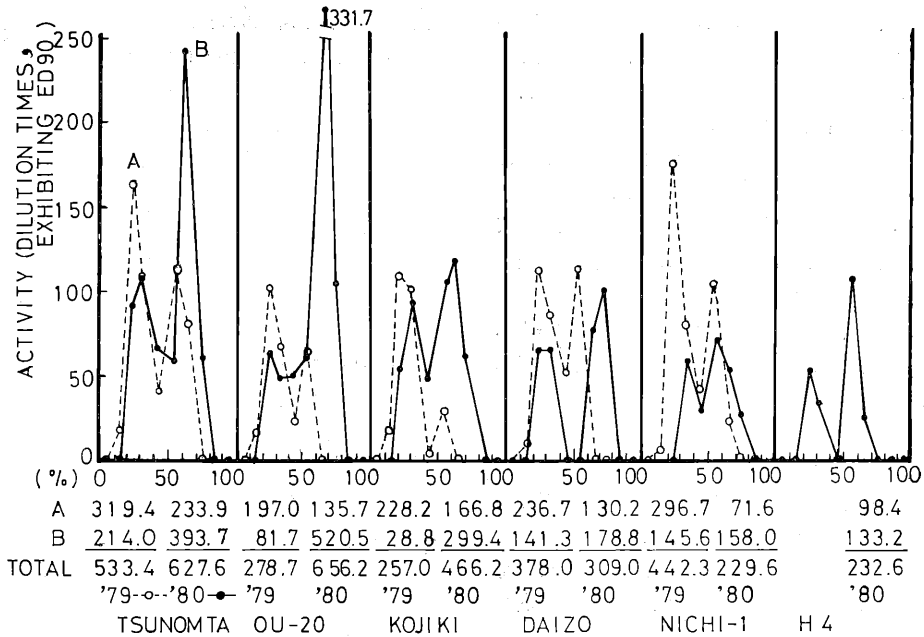


Fig. 2. Anti-streptococcal activity (ASA₉₀) in the fractions prepared from digestive juices by the stepwised additions of ammonium sulfate with 10% interval in various strains of silkworm larvae, reared on mulberry leaves until 3rd day of 5th instar, in spring 1979 (---○---) and 1980 (—○—). ASA₉₀ showed the dilution times from the concentration of digestive juice in each fraction which had a 90% inhibiting effect (ED₉₀) on the growth of test bacterium. ED₉₀ effect was determined by the 90% inhibition on the turbidity (OD 540nm) of liquid medium for growing test bacterium compared with cotrol (not added), as shown in Fig.1.

当っては、1日間絶食後、電気ショック法でDJを吐出させ、供試時まで-20°Cで凍結保存した。

硫酸飽和沈澱画分の調製：凍結保存DJを解凍後、0°Cで10,000×g、20分間の遠心処理で固形物を除去、上清部を用いた。上清部にまず10%飽和量の硫酸を加え、溶解後5°Cで約1時間放置後、遠心処理で沈澱部を分離し、その上清部に10%ないし20%飽和量の硫酸を加え溶解後、遠心処理を行い沈澱部を分離するという操作を100%量飽和まで10%間隔で硫酸塩析画分をそれぞれ調製した。

硫酸塩析画分における抗 *Streptococcus* 活性の検定：各画分の希釈には、0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を用い、DJ濃度から、2², 2³, 2⁴, …, 2ⁿ 倍希釈液を調製してろ過滅菌後、検定培地 YP (内海・西村, 1982) に1/10量あて添加して、検定細菌 *S. faecium* IFO 12368 を接種した。30°Cで

17時間静置培養した後の増殖度を540nmでの濁度(OD値)で計測した。活性の表示はFig.1に示した方法で検定細菌の増殖が90%抑制される増殖度(YED₉₀)を算出し、そのときのDJ濃度からの希釈倍数(XED₉₀)を求め、その値をASA₉₀として表示した。各画分のASA₉₀値を折線図示するとともに(Fig.2)、そのAピーク(20~50%)およびBピーク(50~80%)にそれぞれ纏め、一部の系統ではそれらの雑種1代についてもASA₉₀値を示した(Fig.3)。なおこの検定では、100%増殖抑制点は正確を期し難い傾向が認められたのでED₉₀値を採用し、ASA₉₀値とした。

ASA₁₀₀値の算出：一方、乞食、大造とそれらの交配種およびH₄については、DJ 10mlの0~80%硫酸飽和塩析画分をセファロース-6Bカラムマト(φ25×400mm)を用い蛋白質分画を行ない抗

Streptococcus 活性を検定した。この場合の検定は、溶出分画試験管 (5 ml) ごとに実施し、それらの 1/10 量を添加した検定培地 (5 ml) における検定細菌の増殖値で表示し、増殖値 0 の溶出分画試料ではさらに 5 倍希釈液について検定を実施した (Fig. 4, 5, 6, 7)。活性は蛋白質画分 A, B および C については, DJ ml 当りで増殖抑制値 (無添加区の増殖値 - 検定分画添加区の増殖値) の積算値として示し, 希釈検定したものについてはその積算に当り希釈倍数 5 を乗じた。また ASA₁₀₀ 値は, [A, B および C の積算値の合計/DJ ml] を検定培地 ml に対する完全抑制値 (OD 540nm, 0.12) で除して算出した (Table 1)。

結果と考察

1. 各種蚕系統の消化液における段階別硫酸塩析画分の抗 *Streptococcus* 活性

消化液 (DJ) の 0~60% 硫酸塩析画分の透析物をセファデクス G-75 カラムクロマトによって分画した結果, その高分子画分に抗 *Streptococcus* 活性 (ASA) が認められたことはすでに報告した (内海, 1983)。そこで DJ から 10% 刻みの硫酸塩析画分について各種の蚕系統の DJ における ASA を比較した (Fig. 2)。いずれの系統でも硫酸濃度 20~80% の広い範囲にわたって ASA が認められ, また 30~40% (A) と 50~60% または 60~70% (B) の 2 画分に ASA ピークが存在している。この結果は DJ には少なくとも 2 種以上の物理的性状を異にする活性物質の存在を示唆している。そして DJ の硫酸塩析物の DEAE-セルロースによる分画で, 2 ピークに活性を示した結果 (内海, 1983) と符合している。そこで A, B を頂点する画分に分けて, それぞれの ASA₉₀ を算出した。また乞食を母体とした交配種 (F₁) についても同様にまとめた (Fig. 3)。ASA₉₀ は, 方法の項で記述した通り *in vitro* で ED₉₀ 値を示す DJ からの希釈倍数値で表示しており, 角叉では 1979 年の (A+B) は, 533, 1980 年は 627 となっている。したがってこれらの DJ 濃度からの希釈倍数濃度培養液で検定細菌の増殖を比濁値 (OD 540nm) で 90% 抑制する強力な作用をもっている。弱い系統としては, H₄ の 232, 日 1 号の 229 (1980 年) あるいは乞食の 257 (1979 年) があげられる。そこで (A+B) 値を指標として系統差, 年

度差を分散分析法で検討した。系統と年度との間に高い交互作用が認められた。このことは各系統の ASA が年度により相反する値を示し, 年度差, 系統差はかなり大きくみえるが, 打消し合い有意な値とはならなかったと推論されよう。また各系統における A/B 比をみると, 1979 年はすべての系統が 1.0 以上を示し, A > B の傾向であったが, 1980 年は 1.0 以下で A < B の関係であった。この結果は A と B の活性比は固定的ではなく, いくつかの環境要

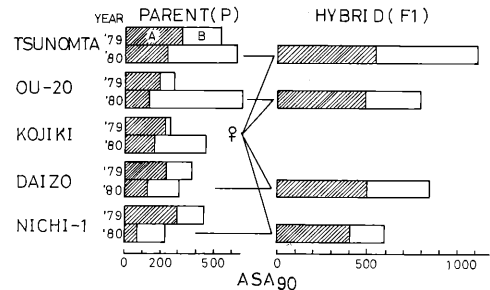


Fig. 3. Anti-streptococcal activity (ASA₉₀) of digestive juice in the various strains and their hybrids. ASAs in the parents were arranged A and B from the results shown in Fig. 2. A and B was assembled with Fr. 20-50% and Fr. 50-80%, respectively. ASAs in the hybrids were obtained by the same process as that of the parents.

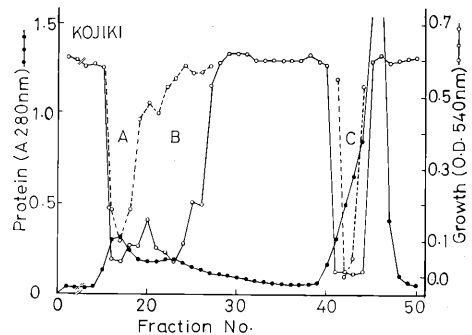


Fig. 4. Sepharose-6B column chromatography of 80% ammonium sulfate saturated fraction prepared from digestive juice and anti-streptococcal activity of the eluates. Test concentration of 10 times dilution: —○—○—○—, and of 50 times dilution: …○…○…○…○…○, Silkworm strain: Kojiki

因に左右されると考えられる。一方、(A+B)値で年度比('80/'79比)をみると、1.0以上は角叉、欧20および乞食、1.0以下は大造と日1号であった。このことは系統によりASAへの環境からの影響因子の働きが異なることを示唆しているが、詳細はさらに経年的検討、あるいは各種飼育条件との関連などの検討が必要であろう。

一方、乞食を母体とした交配種(F₁)4種を1980年春蚕期に飼育し、同様に採取したDJについての結果では、いずれの交配種でも両親に比べて虫体は肥大し、食欲も旺盛なことが観察され、DJのASA₉₀は(A+B)値でみると、いずれも両親(保存種)に比べて有意に高い値が認められた(Fig.2)。このことからDJのASA産生形質は明らかにヘテロース的であり、遺伝学的にはいくつかの遺伝子の関与が予測される。したがってFig.2で系統差が明確にできなかったことは、栄養・飼育温度湿度などの環境要因の影響が大きいこと(内海, 1983)、あるいは齢中の発育経過に伴うASA₉₀の変動もかなり大きいことから(内海, 未発表)、各系統とも5齢3日目に画一的な試料採取を実施したことも問題であり、さらに厳密な生理条件下での試料についての解析が必要であろう。しかし5齢3日目に絶食処理後に採取したDJが、弱い系統でも250倍~500倍以上の希釈でも、そしてF₁の乞食×角叉では1,000倍を越える希釈でも*in vitro*条件で検定細菌の増殖を90%抑制する活性を示した。これらの結果は蚕幼虫のDJが極めて強力なASAを保持してい

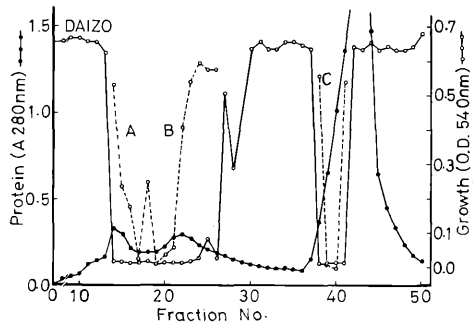


Fig. 5. Sephadex-6B column chromatography of 80% ammonium sulfate saturated fraction prepared from digestive juice and anti-streptococcal activity of the eluates. Test concentration; as shown in Fig.4. Silkworm strain: Daizo

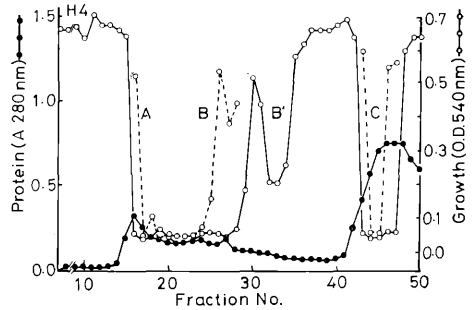


Fig. 6. Sephadex-6B column chromatography of 80% ammonium sulfate saturated fraction prepared from digestive juice and anti-streptococcal activity of eluates. Test concentration: as shown in Fig.4. Silkworm strain: H₄

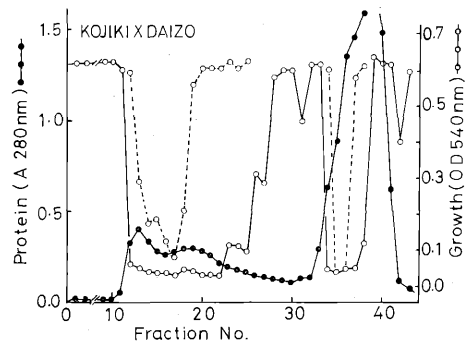


Fig. 7. Sephadex-6B column chromatography of 80% ammonium sulfate saturated fraction prepared from digestive juice and anti-streptococcal activity of eluates. Test concentration: as shown in Fig.4. Silkworm strain: Kojiki x Daizo

ることを物語っている。

2. セファロース6Bカラムクロマト画分における抗Streptococcus活性

Fig.2の結果からDJのASAは、20~80%の硫酸飽和画分に存在することが明らかである。そこでDJの0~80%硫酸飽和画分を試料としてセファロース6Bカラムクロマトで蛋白質分画を行ない、分画試験管ごとにASAを検定した。用いた系統は乞食、大造、H₄および乞食×大造である(Fig.4, 5, 6および7)。いずれの系統でも、蛋白質の溶出

Table 1. Anti-streptococcal activity in the fractions, A, B and C prepared with Sepharose-6B column chromatography of the ammonium sulfate precipitate in concentration of 80% from digestive juice

Strain	Activity* (OD 540nm/ml DJ)				ASA ₁₀₀
	A	B	C	Total**	
Kojiki	14.80	7.29	13.68	35.77	298
Daizo	14.49	27.49	14.41	56.39	469
H ₄	50.20	8.65	14.95	73.80	615
Kojiki × Daizo	28.85	9.34	14.56	52.75	439

* Activities were integrated the assay values in each fraction tube for the protein fraction A, B and C, respectively, from the results of Fig. 4, 5, 6 and 7 as follows;

$$\frac{\sum A_x D_x}{\text{DJ tested, ml}} = \frac{A_1 D_1 + A_2 D_2 + \dots + A_n D_n}{\text{DJ tested, ml}}$$

A : OD 540nm value (Control value - Fraction value)

D : Dilution times in each fraction assay.

ASA₁₀₀ showed the dilution times, exhibiting 100% inhibition on the growth of test bacterium, from DJ concentration; ASA₁₀₀ = Total activity**/0.1200, (0.1200 = 100% inhibition value/ml).

パターンはほぼ類似しており、溶出試験管 No. 16~17, 20~23, 28~30 および 40~47 のあたりにピークをもつ4画分に分離している。そして ASA のパターンは、蛋白質溶出の第1ピーク、第2ピークおよび第4ピークの前半部に認められる。それぞれを ASA の A, B および C と呼称することとする。ASA の A と B とは10倍希釈培地での検定では、各系統とも一連のものとなっているが、50倍希釈培地での検定では B がかなり弱い場合 (Fig. 4, 乞食) や中間にくびれが観察される場合 (Fig. 5, 大造) などから、ほぼ分離が認められる。しかしこれらの溶出範囲は広く、分子量的にみて多くの分子種の存在を示唆している。Fig. 2 に示した硫安飽和分画では、2つのピークであった ASA も、この場合の分画では少なくとも、A, B および C の3画分として溶出した。そして乞食を除く、大造, H₄ および乞食 × 大造で B の溶出域が広く、H₄, 乞食 × 大造では ASA 値としては小さいが、さらにもう1つのピークの存在が B ピークのあとに B' も認められる。そこで B + B' を B として、それぞれの系統の ASA を A, B および C 画分ごとに DJ ml 当りで算出した結果を Table 1 に示した。最も低分子域に溶出された C 画分の ASA は各系統とも 13~14 であり、A, B の活性値に比べて比較的一定した傾向が認められる。したがって系統間における ASA 差は、明

らかに A, B などの高分子画分に溶出される蛋白質量の差に基くものと考えられる。

一方、A と B 画分の区分けは前述のとおり、必ずしも正確とはいえないが、ピークの溶出位置からの分子量推定ではそれぞれ約40万ダルトン、と約20万ダルトンに相当している。また比較的改良が加えられた H₄, あるいは乞食 × 大造では A 画分の活性値が高くなっている。そして全活性値 (A + B + C) では 73.80 で、完全抑制を示す希釈倍数値 ASA₁₀₀ は 615 であり、他の系統に比べて高値である。また大造も 469 で Fig. 2 の結果に比べて高い活性値を示し、乞食 × 大造の ASA₁₀₀ は乞食のそれに比べて高いが、大造よりやや低い結果である。したがって Fig. 3 おいて F₁ の ASA はすべて両親のそれを上まわった結果とは検定方法の違いを考慮しても、相互関係は必ずしも一致をみていない。その詳細はさらに検討したいが、共存蛋白質が ASA 発現に著しい影響を示すこと、あるいは発育経過による変動も大きいこと (内海, 未発表) などの関連ではないかと考えられる。いずれにしても乞食と大造あるいは H₄ との間には著しい ASA 差が存在しており、その発現における系統差、ひいてはそれらに關与する遺伝的構成が反映しているものと考えられる。しかし ASA 発現を細菌病耐性形質として遺伝的解析を進めるには、以上の結果を踏えて、検定方法、検

定時期などについて、さらに詳細な検討が必要であ
ろう。

内海 進 (1983) : 日蚕雑, 52, 537-544.

内海 進・西村利典 (1982) : 日蚕雑, 51, 84-92.

渡部 仁・前田 進 (1978) : 日蚕雑, 47, 209-214.

文 献

関 宏夫 (1985) : 日蚕雑, 54, 445-448.