

蚕体液のclottingの機序について

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	582
掲載ページ	p. 112-118
発行年月	1989年4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



蚕体液の clotting の機序について

寺崎朝子¹⁾・川合秀樹¹⁾・下郡洋一郎¹⁾・姫野道夫²⁾

1) 船橋市・日本農産工業株式会社 中央研究所 (〒 273)

2) 堺市・大阪府立大学農学部 (〒 591)

(1988年11月16日 受領)

ASAKO TERASAKI, HIDEKI KAWAI, YOICHIRO SHIMOGORI and MICHIO HIMENO :
Hemolymph clotting in *Bombyx mori*

Clotting mechanism of heat-pretreated hemolymph from the silkworm (*B. mori*) was studied. The hemolymph from 5th instar larvae was incubated under various conditions to analyze the effect of hemocytes, EDTA and other factors on clotting. The gel forming substances in clotted hemolymph were also examined. Heat-pretreatment of hemolymph (e. g. for 20 min at 60°C) induced clotting and the clotting activity increased in the 5th instar. Hemolymph was divided into two fractions after centrifugation and the bottom fraction (hemocyte rich fraction) clotted faster than the top one (hemocyte poor fraction). The clotting was promoted by shaking but inhibited by addition of EDTA. Blackening slightly affected the clotting. A few proteins were found in the precipitate of centrifuged gel, and the precipitate highly promoted the hemolymph clotting. (¹⁾*Nihon Nosan Kogyo, Funabashi 273*; ²⁾*College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai 591*)

蚕幼虫の体液を加熱前処理した遠心上清は時によって凝固 (clotting) を起こし、ゲルを形成する。Clotting の機序を明らかにするために、加熱前処理条件、黒化、振とう、血球成分および EDTA が clotting に及ぼす影響を検討した。またゲルを構築する体液成分についても若干の検討を加えた。Clotting は限られた加熱前処理条件によって引き起こされ、5 齢期の clotting 活性は熟蚕期に近づく程上昇した。また、clotting は振とうや血球成分の添加によって促進され、EDTA の添加によって阻害されたが、黒化は大きな影響を示さなかった。Clotting 反応によって形成されたゲルを PBS で繰り返し洗浄すると、分子量約 3 万の蛋白質を主体とする沈澱が得られ、またこの沈澱は clotting を著しく促進した。

無脊椎動物の体液凝固 (clotting) はいくつかの動物について報告されており、その一部については生体防御との関連が示唆されている (宮田・岩永, 1986)。蚕幼虫においては採取した体液そのままでは明らかな clotting 反応は見られないが、体液を加熱前処理したものの遠心上清は clotting を起こし、ゲルを形成することがある。この現象は蛋白濃度の高い熟蚕の体液に多く認められるので、蛋白質の熱変性反応と考えられ、殆ど研究が行われていない。著者らはこの clotting の反応機序を明らかにするために、熟蚕の体液を用いて clotting に影響を及ぼす種々の要因や物質について検討し、更に5齢期の clotting 活性の変動を調べた。また、この clotting には蚕体液中の特定の物質が関与していることを示した。

本文に入るに先立ち、本研究の実施並びに本論文の作成にあたり、多大な御助言を頂いた、千葉大学理学部講師・大橋一世博士に厚く感謝の意を表する。

材料と方法

1. 供試品種及び材料の採取

供試蚕品種は錦秋×鐘和を使用した。供試蚕は市販の人工飼料 (日本農産工業製; シルクメイト) を用い1~3齢は30°C, 4~5齢は25°Cで飼育した。供試材料は5齢熟蚕の腹足を切断し、冷 PBS (75 mM リン酸水素二ナトリウム/リン酸水素一カリウム, pH 7.2, 75 mM 塩化ナトリウム, 1% チオ硫酸ナトリウム, 断りの無い限り PBS は全て1% チオ硫酸ナトリウムを含む) 中に PBS が全体の1/5量になるように採取し、以下これを採取体液として用いた。採取体液は実験に使用するまで-20°Cで凍結保存した。なお、体液の保存方法によって実験結果に差は見られなかった。5齢期における clotting 活性の変化を見るために、5齢起蚕時より24時間ごとに8日目 (吐糸開始) まで雌雄別々に上記の方法で体液を採取、保存した。

2. 加熱前処理および clotting 反応の測定

採取体液は解凍し、恒温槽で加熱前処理 (後述) を行った後に、4°C, 9,000×g で20分間遠心分離し、その上清を0.5 ml ずつ試験管 (12×75 mm) に分注した。これを40°Cに放置し、clotting 反応

を24時間後まで経時的に観察した。clotting の判定は放置後の上清が全く粘性を示さないものを (-), 粘性を示し試験管壁に附着するものを (±), ゲルを形成したものを (+) とした (Fig. 1)。この際、液面のみが clotting している場合があるので、軽く振動を与えてから判定した。加熱前処理終了時より (+) と判定出来るまでの時間を clotting に要する時間とした。また、種々の要因および物質が clotting に及ぼす影響を数値化するために、上清の clotting 活性を以下に示す計算式に基づいて clotting 活性値として算出し、[平均値±standard error of mean (S. E. M.)] で表した。

Clotting 活性値=

$$\frac{[\text{対照区の試料が clotting に要した時間}]}{[\text{試験区の試料が clotting に要した時間}]}$$

3. ゲルの洗浄

60°C で20分間加熱前処理した体液の遠心上清が形成したゲルに、5倍量の PBS を加えてガラス棒で碎き、9,000×g で5分間遠心分離する操作を5回繰り返す。可溶性成分と沈澱を得た。また、1% SDS, 6 M 尿素に対するこの沈澱の溶解性を調べると共に、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて、蛋白質成分とその分子量について検討を行った。

4. Clotting に影響を及ぼす要因および物質の検討

加熱前処理条件、体液の黒化反応、振とうおよび血球成分が clotting に及ぼす影響を検討した。また、上清に EDTA またはゲルより得た沈澱を添加した時の clotting について検討した。

加熱前処理条件: 採取体液を 50, 60, 70, 80, 90°C の温度で、5, 15, 25 分と時間を変えて加熱した。その体液の遠心上清について clotting 反応を観察した。

黒化反応: 体液採取時にチオ硫酸ナトリウムを含まない PBS 中に滴下した体液を室温で約30分間放置した後、60°C で20分間加熱し、遠心して得た上清の clotting 活性を測定した。この時、通常の PBS 中に採取した体液を同様に処理した上清を対照区の試料とした。

振とう: 60°C で20分間加熱後の遠心上清を1時間毎に軽く振とうし、clotting 活性を測定した。この

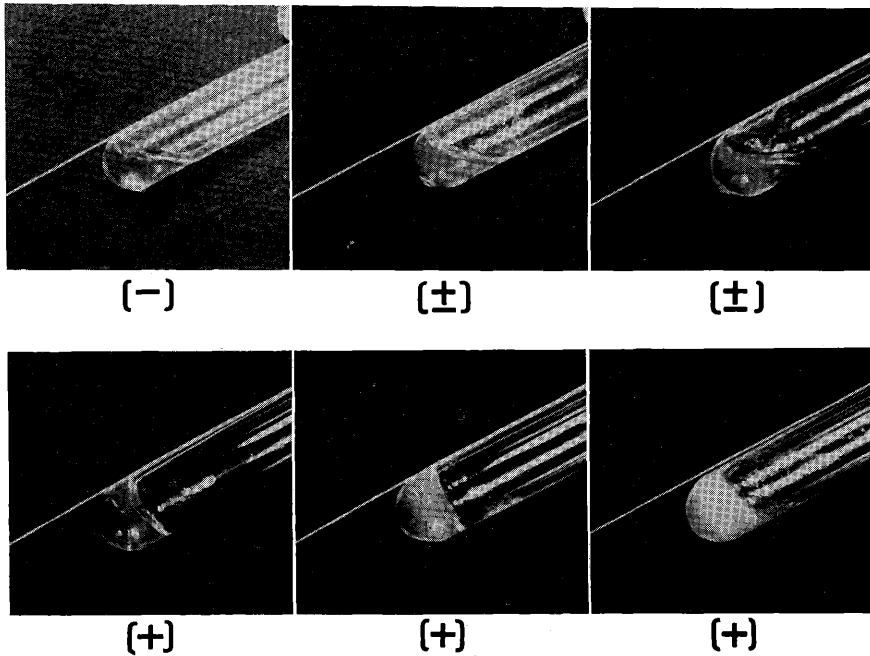


Fig. 1. Clotting of heat-pretreated hemolymph. Hemolymph was heat-treated for 20 min at 60°C and then centrifuged at 9000×g for 20 min at 4°C to remove precipitate. (-): non-clotting, (±): slight clotting, (+): complete clotting. Clotting started with increase of viscosity and finally hemolymph formed hard gel. After clotting, gel became milky-white color.

時振とうを加えない上清を対照区の試料とした。
血球成分：体液を採取後直ちに4°C、80×gで2分間遠心分離し、上半分を血球の少ない画分(画分A)、下半分を血球の多い画分(画分B)とした。画分Aと画分Bを60°Cで20分間加熱後、9,000×gで20分間遠心し、上清を得た。画分Bの上清のclotting活性について画分Aの上清を対照区の試料として測定した。

EDTA処理：60°Cで20分間加熱後の遠心上清0.4 mlにEDTAを5, 10, 50, 100, 250, 500 mM含むPBSを各々0.1 ml加え、総量を0.5 mlとしてclotting活性を測定した。この時EDTAを含まないPBSを0.1 ml加えた上清を対照区の試料とした。

ゲルより得られた沈殿：ゲルの洗浄によって得られた沈殿0.01 mlを、60°Cで20分間加熱前処理した体液の遠心上清0.49 mlにマイクロピペットで加え、総量を0.5 mlとしてclotting活性を測定した。また、異物としてイオン交換樹脂(DEAE Sepharose CL-6B)を0.01 ml加え総量を0.5 mlとした試験区も設定した。この時何も加えていない上清を対照区の試料とした。

5. 5齢期におけるclotting活性の経時変化

5齢起蚕を雌雄に分け、24時間おきに8日目(吐糸開始時)まで採取した体液を60°Cで20分間加熱前処理した遠心上清について、clotting活性を測定した。この時、対照区の試料として8日目雌の上清を用いた。

6. 蛋白濃度の測定

体液の蛋白濃度の測定はバイオラッド・プロテインアッセイキット（バイオラッド社）を用いてウシ血清アルブミンを標準として各採取体液ごとに行った。

7. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

加熱していない採取体液、60°Cで20分間加熱前処理した体液の遠心上清、およびゲルより得られた沈澱と可溶性成分について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動は濃縮ゲルに4%、分離ゲルに10%アクリルアミドゲルを用いて Laemmli (1970) に従って行った。ゲルは泳動後45%メタノール、7%酢酸で固定し、クーマジューブリリアントブルー R-250 で染色した。

結 果

1. 加熱前処理条件の影響

各加熱前処理条件が clotting に及ぼす影響を調べたところ、まれに60°Cで5分間または70°Cで5分間の加熱によって clotting が生じたが、60°Cで15分間または60°Cで25分間加熱した体液でのみ常時 clotting が観察された (Table 1)。Clotting は液面や試験管壁に近い部分で始まり、粘度の上昇と、透明度の僅かな減少が見られた。それらが時間の経過に伴って上清全体に広がり、最後に黄色透明なゲルを形成した。ゲルは強固で試験管を傾けても形状が変化せず、放置しておくとも白濁した (Fig. 1)。5齢熟蚕の体液が clotting に要する時間は40°Cに放置した場合、加熱前処理終了後30分から6時間程度と試料によって異なった。同一の試料では毎回一定の時間を要したが、40°Cより低温で放置した場合には clotting が遅れる傾向を示した。

2. ゲルの洗浄

ゲルを PBS で繰り返し洗浄すると、黄色透明の可溶性成分および最初のゲルの1/3量程度の白色糊状の沈澱が得られ、この沈澱は1% SDS 溶液あるいは6M尿素によって可溶化することが出来た。

3. 黒化反応の影響

チオ硫酸ナトリウムを含まない PBS 中に採取した体液は室温で速やかに黒化し、その加熱前処理した体液の遠心上清の clotting 活性値は、チオ硫酸ナトリウムを含む PBS 中に採取した黒化していない

Table 1. Effect of heat-pretreatment on clotting

Temperature (°C)	Time (min)		
	5	15	25
90	×	×	×
80	×	×	×
70	○	×	×
60	○	◎	◎
50	×	×	×

◎ : clotted in all of tested hemolymph (100%),

○ : clotted in a part of tested hemolymph (about 20%), × : clotting was not observed.

体液の上清を対照とした時に 0.83 ± 0.18 とやや低い値を示した。加熱前処理条件や EDTA の添加による影響も調べたところ、黒化反応を起こしていない体液と同様の傾向を示した。

4. 振とうの影響

1時間毎に振とうを加えた遠心上清の clotting 活性値は、振とうを加えない上清を対照とした時に 1.10 ± 0.02 であった。また、ゲルは早くから白濁する傾向が見られた。

5. 血球成分の影響

採取体液を低速遠心すると、下部には血球様の物質が沈澱し、上部に比べて濁りが多くなった。この体液を画分Aと画分Bに分け、加熱前処理した遠心上清について clotting 活性値を測定したところ、画分Aを対照とした時に画分Bは約 1.40 ± 0.12 であった。

6. EDTA の添加による影響

EDTA は clotting を著しく阻害し、数 mM よりその効果が現れた。EDTA は試料によっては 20 mM で完全なゲル化の阻害を示した (Fig. 2 sample No. 871124) が、別の試料では 100 mM の添加によっても clotting を完全に阻害出来なかった (Fig. 2 sample No. 880206)。

7. ゲルより得られた沈澱の影響

ゲルより得られた沈澱を60°Cで20分間加熱前処理した体液の遠心上清に加えた時の clotting 活性値は、 4.18 ± 0.75 と著しく高まった。これに対してイオン交換樹脂を加えた上清の clotting 活性値は、 1.09 ± 0.01 であった。PBS で洗浄する前のゲルも

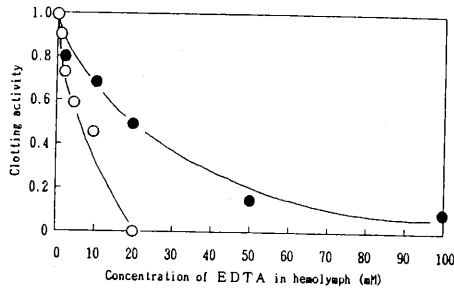


Fig. 2. Effect of EDTA on clotting.

The clotting activity was expressed as follows :

$$\frac{[\text{clotting time of control hemolymph}]}{[\text{clotting time of EDTA-added hemolymph}]}$$

○ : hemolymph of sample No. 871124,

● : hemolymph of sample No. 880206.

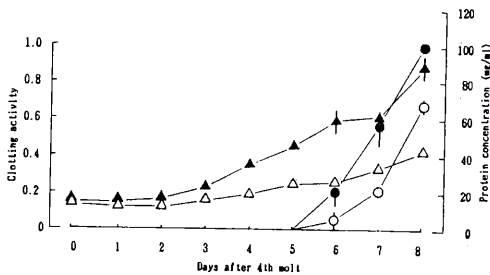


Fig. 3. Changes in protein concentration and the clotting activity of hemolymph from the 5th instar larvae.

Hemolymph was collected from larvae at intervals of 24hr from the day of the 4th molt until the day of spinning. The clotting activity was expressed as follows :

$$\frac{[\text{clotting time of control hemolymph}]}{[\text{clotting time of each hemolymph}]}$$

Control hemolymph was used the 5th instar day-8 female hemolymph. ○ : clotting activity of male hemolymph, ● : clotting activity of female hemolymph, △ : protein concentration of male hemolymph, ▲ : protein concentration of female hemolymph. The vertical lines indicates. S. E. M..

同様に添加したところ, clotting を促進する傾向が見られた。

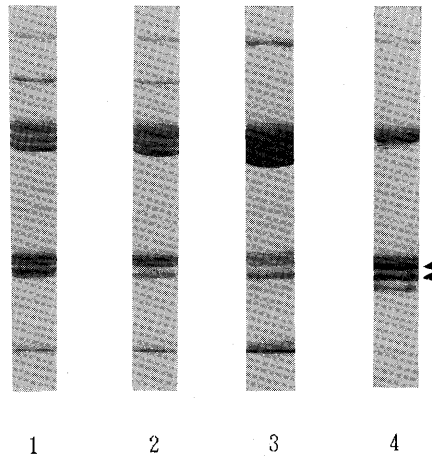


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of various hemolymph fractions.

1 : hemolymph of mature larvae, 2 : supernatant of heat-pretreated (for 20 min at 60°C) hemolymph, 3 : extracts isolated from clotting gel, 4 : residual precipitate isolated from clotting gel. Each sample was electrophoresed in the Laemmli's system using 10% acrylamide gel.

8. 5 齢期における clotting 活性の経時変化

5 齢起蚕時より 8 日目 (吐糸開始時) までの各体液を加熱前処理した遠心上清の clotting 活性値は, 8 日目の雌の上清を対照とした時に 5 日目までは雌雄共に 0.00 (clotting せず) であったが, その後活性は上昇し, 8 日目で最高の値 (雄 0.68 ± 0.05 , 雌 1.00) を示した。雄は雌よりやや低い活性を示した。蛋白濃度は性差や時期による変化が大きく, 従って蛋白濃度当たりの clotting 活性は比較することは出来なかった。しかし, 雌では 6 日目より 7 日目にかけて蛋白濃度の変化が少ないものの, clotting 活性は大きく上昇する傾向を示した (Fig. 3)。

9. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

加熱前処理していない体液の電気泳動パターン (Fig. 4-1) と, ゲルより得られた沈澱のそれ (Fig. 4-4) を比較すると, 数本のバンドの位置が一致したが, 特に加熱前処理した体液の遠心上清 (Fig. 4-2) との比較ではアクリルアミドゲルの下方に泳動される 2 本のバンド (Fig. 4-4 矢印) の量比が高い

傾向を示した。また、ゲルより得られた可溶性成分ではアクリルアミドゲルの先端付近が濃く染色された (Fig. 4-3)。

考 察

本実験で取り扱っている clotting は、60°C、20分の加熱前処理によって生じた沈澱物を遠心除去した上清に起こる現象であり、単なる蛋白質の熱変性反応による凝固ではない。また、この clotting は限られた加熱条件によって起きることが明らかとなった (Table 1)。

70°C 以上で加熱前処理した体液ではゲルを構築する物質が熱変性を起こし、活性を失ったと推察出来る。しかし、50°C 以下で加熱前処理した体液または加熱前処理していない体液で clotting が起こらない原因については、ゲルを構築する物質が60°C でなければ活性化されないのか、または clotting を阻害する物質が60°C で失活するのかなどの可能性が考えられる。

Clotting を起こすための加熱条件はポリフェノール オキシターゼ不活化のための条件に近いことから、フェノール オキシターゼによる黒化反応の停止が clotting を誘発することも考えられたが、黒化した体液を加熱処理すると clotting が起こることから、フェノール オキシターゼ活性と clotting との間には関連が低いと推測される。黒化した体液の clotting 活性がやや低いのは、ドーパキノンなど黒化反応の中間生成物が蛋白質の変性を引き起こしている可能性が考えられる (茅野・富野, 1984)。

5 齢後期の clotting 活性の上昇は体液蛋白質全体の増加によるものではなく、体液中のゲルを構築する物質の増加または質的变化によるものであることが推測される。また、clotting は性に無関係な現象と考えられる。

画分 A と画分 B の clotting 活性に差が認められたことから、血球中に clotting を促進する物質またはゲルを構築する物質そのものが含まれる可能性が考えられる。しかし血球の破壊なしに画分 A を得ることは出来ず、また遠心分離によって採血時に混入した細胞片、脂肪組織など血球以外の固形物も下方に移動することから、clotting を促進する体液中の成分が血球のみに由来するとは言い切れない。

昆虫の体液における clotting 反応に関しては、ゴキブリやバッタ (Chino *et al.*, 1987) などを用いて研究が進められている。ゴキブリの体液凝固には血球成分やカルシウムイオンが必要であることが明らかとなっている (Bohn *et al.*, 1981, 1984; Barwig, 1985)。本実験で示した加熱前処理による蚕体液の clotting 反応は血球成分や EDTA (Fig. 2) の影響を受ける点でゴキブリの体液凝固と類似している。このことから蚕体液にもゴキブリと同様、ゲルを構築する物質が存在している可能性が示唆される。

ゲルの洗浄によって得られた沈澱の蛋白質のうち、比較的量の多い2本のバンド (Fig. 4-4 矢印) は、ゲルを構築する物質の可能性が大きい。これらの蛋白質は全体液の泳動位置との比較から30K蛋白質に属するものと考えられる (Gamo, 1978; Izumi *et al.*, 1981) が、30K蛋白質には分子量と等電点が異なる15種以上の蛋白質が存在することが報告されている (Tomino, 1985) ので、現在著者らは2次元電気泳動を用いて詳細な検討を試みている。ゲルの洗浄によって得られた沈澱は clotting の重合核として働いたと考えられ、clotting が振とうの影響を受けることから、ゲルを構築する物質が互いに接触、重合することによってゲルが作られるものと推測できる。ゲルより得られた沈澱は SDS, 尿素によって可溶化出来ることから、重合は非共有結合によると結論出来、この点ではゲルを構築する物質が架橋を受けるゴキブリ体液のゲル構築機序 (Bohn *et al.*, 1984) とは異なると考えられる。

文 献

- BARWIG, B. (1985): *J. Comp. Physiol.*, **155**, 135-143.
- BOHN, H. and BARWIG, B. (1984): *J. Comp. Physiol.*, **154**, 457-467.
- BOHN, H., BARWIG, B. and BOHN, B. (1981): *J. Comp. Physiol.*, **143**, 169-184.
- CHINO, H., HIRAYAMA, Y., KIYOMOTO, Y., DOWNER, R. G. H. and TAKAHASHI, K. (1987): *Insect Biochem.*, **17**, 89-97.
- 茅野春男・富野士良 (1984): 家蚕生化学 (伊藤智夫編), pp. 119-123, 裳華房, 東京.
- GAMO, T. (1978): *Insect Biochem.*, **8**, 457-470.
- IZUMI, S., FUJIE, J., YAMADA, S. and TOMINO,

- S. (1981) : *Biochim. Biophys. Acta*, **670**, 222-229.
- LAEMMLI, U. K. (1970) : *Nature*, **227**, 680-685.
- 宮田敏行・岩永貞昭 (1986) : 蛋白質・核酸・酵素別冊, **29**, 30-43.
- TOMINO, S. (1985) : *Zool. Sci.*, **2**, 293-303.