

エリサン羽化ホルモンの部分精製

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
巻/号	344
掲載ページ	p. 289-295
発行年月	1990年11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



エリサン羽化ホルモンの部分精製

齊藤 準・普後 一

東京農工大学農学部

Partial Purification of Eclosion Hormone from the Saturniid Silkmoth, *Samia cynthia ricini* DONOVAN (Lepidoptera: Saturniidae). Hitoshi SAITO and Hajime FUGO (Department of Sericulture, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **34**: 289–295 (1990)

Eclosion hormone was purified from 800 pharate-adult heads or 3,000 adult heads of the saturniid silkmoth, *Samia cynthia ricini*. Eclosion hormone of *Samia* was able to induce the precocious eclosion of the pharate-adult of *Bombyx mori*. The molecular weight of *Samia* eclosion hormone from pharate adult or adult heads was estimated to be $8,500 \pm 1,000$ daltons by gel-filtration on Sephadex G-50 (superfine). It was concluded that eclosion hormone is not species-specific, at least in two lepidopteran species investigated.

緒 言

羽化ホルモン (eclosion hormone: EH) は、成虫の羽化を誘導するホルモンとして数種鱗翅目混虫でその存在が知られている (TRUMAN, 1985; REYNOLDS, 1986)。また、このホルモンは成虫羽化のみならず、孵化 (FUGO et al., 1985; 齊藤ら, 1987; SAITO et al., 1990)、幼虫脱皮 (COPENHAVER and TRUMAN, 1982)、化蛹脱皮 (TRUMAN et al., 1980, TAGHERT et al., 1980) にも関与していることが報告されている。最近、羽化ホルモンの精製、単離が進み、カイコガ、*Bombyx mori* およびタバコスズメガ、*Manduca sexta* で羽化ホルモンのアミノ酸配列構造が明らかにされた (KONO et al., 1987; KATAOKA et al., 1987; MARTI et al., 1987)。これらの結果によれば、カイコガとタバコスズメガの羽化ホルモンのアミノ酸配列は約 80% の相同性があることが明らかにされている。また、両種間でのホルモン作用については、互いに生理活性作用を示すことが報告されている (普後, 1986; 齊藤・普後, 1990)。

エリサン、*Samia cynthia ricini* の成虫頭部にカイコガの羽化を誘導する羽化ホルモン様生理活性物質が存在することは既に報告されている (FUGO et al., 1983) が、その化学的性状についての報告はない。そこで、エリサン潜成虫および成虫頭部から羽化ホルモンを抽出、部分精製し、その化学的性状について検討した。

材料と方法

1. 供試昆虫

カイコガ、*B. mori* は、大造種を用いた。孵化後幼虫は 1 日 2 回桑葉で、飼育温度を $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とし、自然日長下で飼育した。エリサン、*S. cynthia ricini* 幼虫は、1 日 2 回ヒマ葉あるいはシンジュ葉を与え、カイコガの飼育条件と同一条件下で飼育した。化蛹後、蛹は、 25°C 、16 時間明 - 8 時間暗 (16L-8D) の光周条件下の恒温器で羽化まで保った。潜成虫は羽化 1 日前の個体を用いた。成虫は羽化後 3 日以内の個体を用いた。今回の実験では、特に雌雄の区別や交尾、未交尾の区別はしなかった。抽出材料の潜成虫および成虫は、それぞれカミソリで頭部のみを採取し、 -20°C で凍結保存した。

2. 羽化ホルモンの調製

エリサン潜成虫および成虫頭部からの羽化ホルモンは、カイコガ成虫頭部からの羽化ホルモン抽出・部分精製法 (NAGASAWA et al., 1983) に従って行った。すなわち、1) エリサン潜成虫 (800 頭)、成虫 (3,000 頭) それぞれの頭部を冷アセトン (-20°C) と少量の石英砂とともに乳鉢内で磨砕し、磨砕液を Toyo 濾紙 No. 2 で濾過した後、減圧下でアセトン粉末を得た。2) アセトン粉末を 80% エタノールで洗浄した。3) 残渣に、2% NaCl を加えて 30 分間放置して、羽化ホルモンの抽出を行った。この過程を 3 回行って上清を集め粗抽出液とした。

1990 年 3 月 12 日受領 (Received March 12, 1990)

1990 年 7 月 21 日登載決定 (Accepted July 21, 1990)

4) 次に、この粗抽出液を沸騰水浴中で5分間熱処理を行い急冷後、遠心分離(5,000 r.p.m., 20分間)して上清を得た。5) この上清に80%飽和になるように硫酸アンモニウム(硫酸)を加え硫酸が完全に溶解した後、4°Cで一昼夜放置した。遠心分離(7,000 r.p.m., 20分間)して上清を除き、残渣を硫酸沈澱分画とした。6) この硫酸沈澱を冷蒸留水に溶解後、50%アセトン濃度になるように、冷アセトン(-20°C)を加えてよく攪拌した後、再び遠心分離(7,000 r.p.m., 20分間)した。その上清に同容量の冷アセトン(-20°C)を加えてよく攪拌後、遠心分離(7,000 r.p.m., 20分間)し、その沈澱を50~75%アセトン沈澱分画とした。7) このアセトン沈澱分画を冷蒸留水に溶解後、飽和ピクリン酸を最終濃度が90%となるように加え、ピクリン酸沈澱分画を得た。8) このピクリン酸沈澱分画を0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)に溶解し、さらに最終アセトン濃度が80%になるように冷アセトン(-20°C)を加えてよく攪拌後、遠心分離(7,000 r.p.m., 20分間)した。その残渣を1~2 mlの冷蒸留水に溶解し、これを“粗羽化ホルモン”(crude eclosion hormone)とした。

3. 羽化ホルモンの部分精製

上述の方法で得た“粗羽化ホルモン”を、あらかじめ0.02Mの酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.2)で平衡化させておいたDEAE-Sepharose CL-6B(27×360 mm)イオン交換クロマトグラフィーにのせた。続いて、0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4Mの酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.2)、最後に1.0M酢酸を順次流し段階溶出を行った。次に活性分画のpHを酢酸で3.8に落とし、あらかじめ0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 3.8)で平衡化させておいたSP-Sephadex(22×250 mm) C-25イオン交換クロマトグラフィーにのせた。続いて0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.2, 4.7, 7.0, 9.0)を順次流すことによって段階溶出を行った。次に、得られた活性分画を凍結乾燥した後蒸留水に溶解した。標品を0.2M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.2)で平衡化させておいたSephadex G-50(superfine)にのせ、0.2M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.2)で溶出を行いゲル濾過した。なお、各精製段階でのタンパク質量は、牛血清アルブミン(1 mg/ml)のOD値(280 nm)を基準として算出した。また、羽化ホルモンの抽出・部分精製の操作は、すべて4°Cの低温室内で行った。

4. 羽化ホルモンの生物検定法

羽化ホルモンの生物検定法は、カイコガ潜成虫を用いた方法(普後・岩田, 1983a)に従って行った。羽化ホル

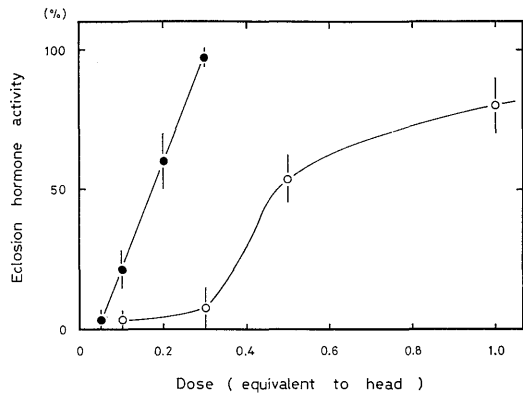


Fig. 1. Dose-response curves for the crude eclosion hormone obtained in the *Bombyx* eclosion hormone assay. Eclosion hormone activity in extract from pharate-adult heads (●) and one from adult heads (○). Mean (\pm S.E.) of three to five determinations is shown.

モン力価は、検体投与量と羽化誘導率との関係を表す濃度反応曲線から、50%の羽化誘導率を示す検体投与量を1羽化ホルモン単位(1 unit)と定めた。なお、エリサンの羽化ホルモンはエリサンの潜成虫に対して羽化誘導効果がある(齊藤ら, 1987; 齊藤・普後, 1990)が、ホルモン活性の検定時に多量の標品を消費するので、今回のホルモン活性は全てカイコガ羽化ホルモン生物検定法で検定した。

結 果

1. 潜成虫および成虫頭部の羽化ホルモン活性

エリサン潜成虫(800頭)、成虫(3,000頭)それぞれの頭部を出発材料として羽化ホルモンの抽出を行い、得られた“粗羽化ホルモン”の濃度反応曲線をFig. 1に示した。この濃度反応曲線から、潜成虫および成虫頭部それぞれ1個体当りの羽化ホルモン力価(unit/head)は、それぞれ5.8と2.1であった。

2. 羽化ホルモンの部分精製と化学的性状

潜成虫および成虫頭部由来の“粗羽化ホルモン”それぞれを、あらかじめ0.02Mの酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.2)で平衡化させておいたDEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィーに添加し、続いて酢酸アンモニウム緩衝液(0.02~0.4M; pH 7.2)および1.0M酢酸を順次流し段階溶出を行った。その結果、潜成虫および成虫頭部それぞれの羽化ホルモン活性は、ともに0.2M酢酸アンモニウム緩衝液での溶出分画に溶出され

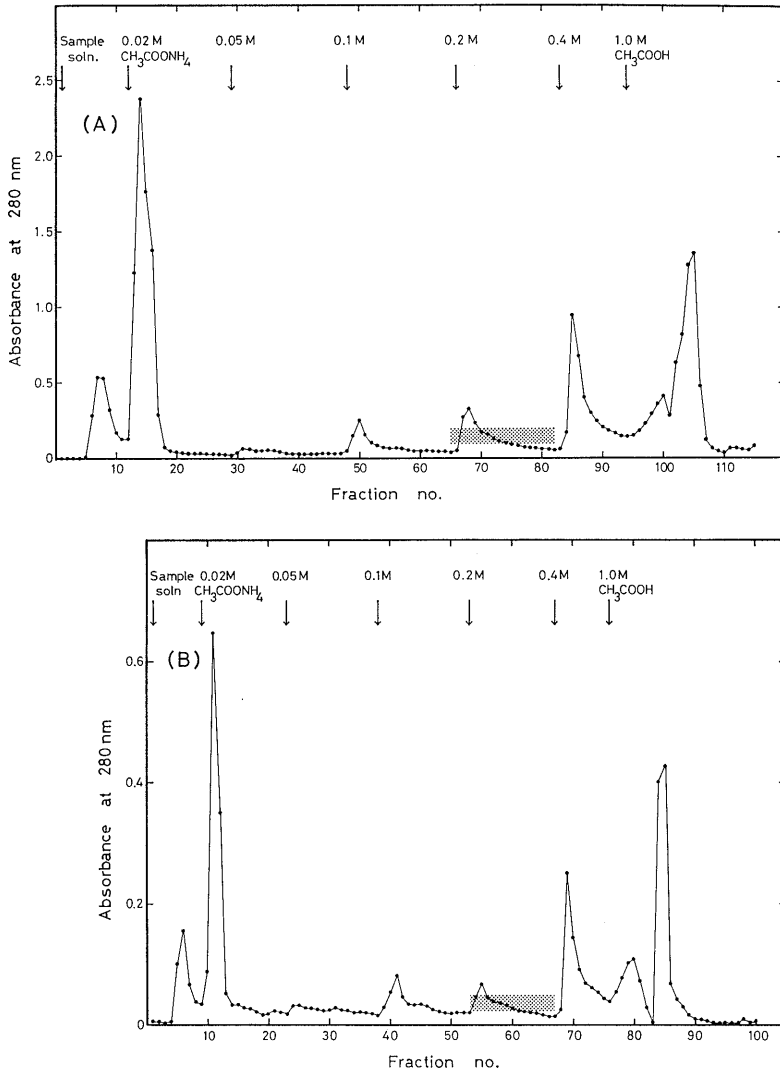


Fig. 2. Stepwise ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex CL-6B of the "crude extract having eclosion hormone activity". (A) Pharate-adult heads; (B) Adult heads. Shaded areas indicate eclosion hormone activity.

た (Fig. 2)。次に、この 0.2 M 活性分画をあらかじめ 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.8) で平衡化させておいた SP-Sephadex C-25 イオン交換クロマトグラフィーにのせ、続いて 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.2, 4.7, 7.0, 9.0) を順次流し段階溶出を行った。その結果、それぞれの羽化ホルモン活性は両者とも pH 7.0 の分画に溶出された (Fig. 3)。そこで活性分画を凍結乾燥し、0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.2) で平衡化させておいた Sephadex G-50 (superfine) カラムでゲル濾過を

行った。その結果、羽化ホルモン活性は潜成虫由来のものでは分画番号 20~23 に溶出され、成虫頭部由来のものでは分画番号 18~19 に溶出された (Fig. 4)。Sephadex G-50 によるゲル濾過で推定された羽化ホルモンの分子量はともに $8,500 \pm 1,000$ であった。

潜成虫および成虫頭部それぞれの各精製段階における羽化ホルモンの精製度を Table 1, Table 2 にまとめた。DEAE-Sephadex CL-6B イオン交換クロマトグラフィーによって得られた活性分画の比活性 ($\mu\text{g}/\text{unit}$) は潜成

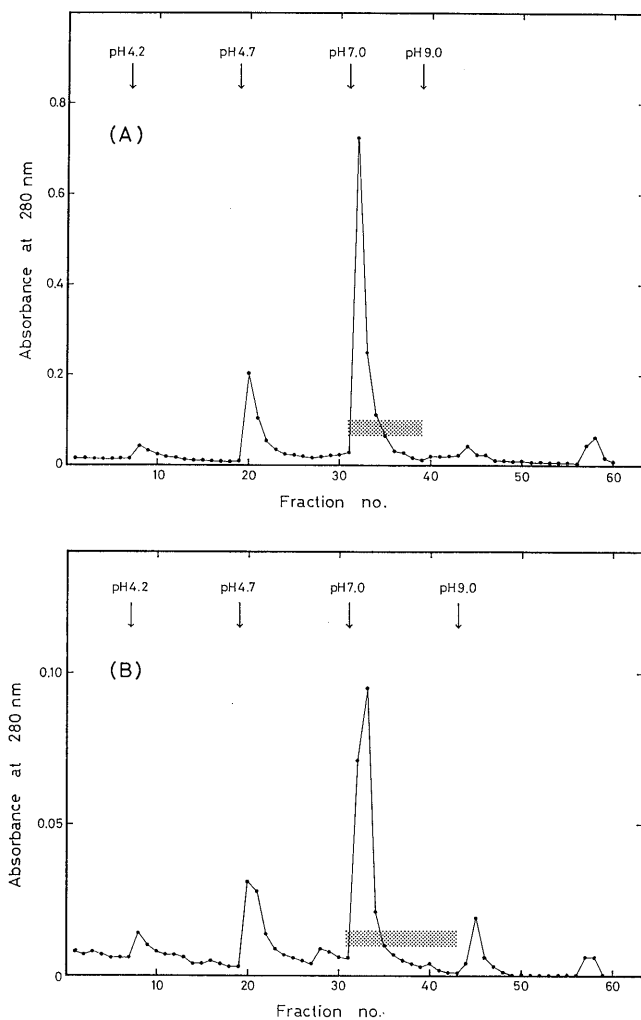


Fig. 3. Stepwise ion-exchange chromatography on SP-Sephadex C-25 of the DEAE active fractions. (A) Pharate-adult heads; (B) Adult heads. Shaded areas indicate eclosion hormone activity.

虫で 20.83 成虫頭部で 4.34 であり、この段階で羽化ホルモンは前段階 (step 8) よりそれぞれ約 8.2 倍と約 6.1 倍精製され、それぞれの回収率は 55.3% と 50.0% であった。SP-Sephadex C-25 イオン交換クロマトグラフィーでの比活性は、潜成虫で 14.71 となり step 8 より約 11.6 倍精製され、その回収率は 40.4% であった。一方、成虫頭部の比活性は、3.65 で step 8 より約 7.3 倍精製され、回収率は 24.7% であった。さらに、Sephadex G-50 (superfine) によるゲル濾過の結果、潜成虫の比活性は、0.52~1.14 で step 8 より約 150~330 倍精製され、この時の羽化ホルモンの回収率は 2~5% であった。成虫頭部の比活性は、0.07~0.15 で step 8 より約

180~360 倍精製されており、また回収率は 4.5% であった。

考 察

羽化ホルモンは脳で合成され側心体-アラタ体に蓄積された後、羽化直前に体液中に放出され羽化行動を誘導することが知られている (TRUMAN, 1985)。タバコスズメガでは側心体の羽化ホルモン活性は、羽化後約 70% 減少することが報告されている (TRUMAN et al., 1981)。カイコガでも羽化ホルモン活性は、羽化後アラタ体で約 70%、脳で約 20~40% の低下がみられている (普後・岩田, 1983b)。このような脳-側心体-アラタ体系での羽

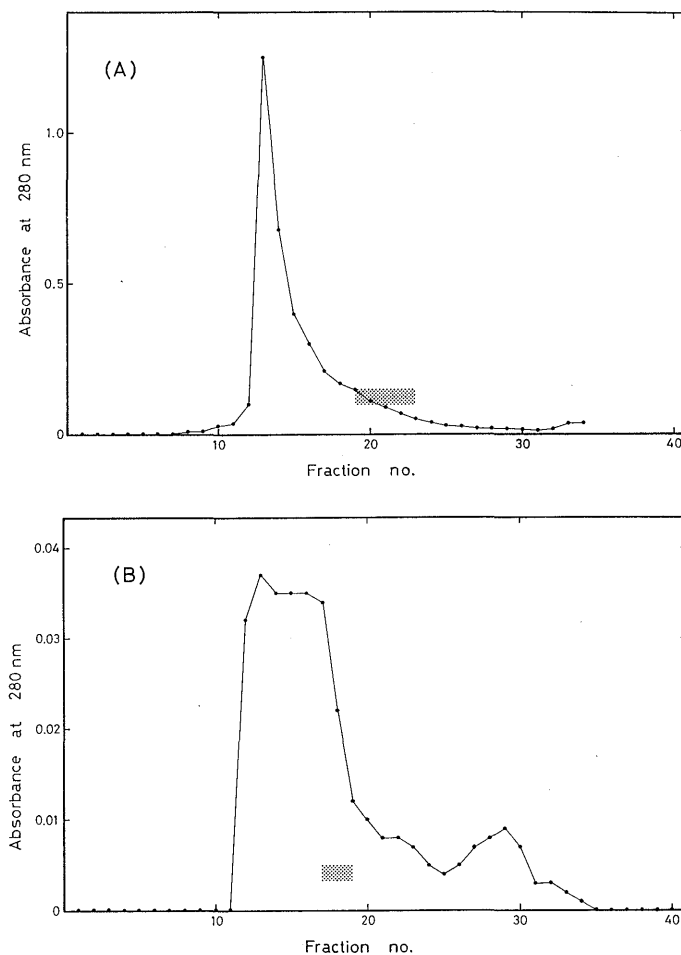


Fig. 4. Gel-filtration on Sephadex G-50 (superfine) of the SP active fractions. (A) Pharate-adult heads: column size, 12 × 1,150 mm; (B) Adult heads: column size, 12 × 985 mm. Shaded areas indicate eclosion hormone activity.

Table 1. Purification of eclosion hormone from 800 *Samia* pharate-adult heads

Purification step ^a	Weight (mg)	Total activity ^b (units)	Specific activity (μg/unit)
8. "Crude eclosion hormone"	793.09	4,640	170.92
9. DEAE-Sepharose CL-6B	53.47	2,567	20.83
10. SP-Sephadex C-25	27.58	1,875	14.71
11. Sephadex G-50 (superfine)			
Fraction No. 20	0.20	175	1.14
21	0.16	233	0.69
22	0.12	233	0.52
23	0.09	90	1.00

^a Procedure for partial purification of *Samia* eclosion hormone (EH) was the same as that for *Bombyx* eclosion hormone (NAGASAWA et al., 1983).

^b Eclosion hormone activity was determined with *Bombyx* bioassay.

Table 2. Purification of eclosion hormone from 3,000 *Samia* adult heads

Purification step ^a	Weight (mg)	Total activity ^b (units)	Specific activity ($\mu\text{g}/\text{unit}$)
8. "Crude eclosion hormone"	159.79	6,000	26.63
9. DEAE-Sepharose CL-6B	13.03	3,000	4.34
10. SP-Sephadex C-25	5.41	1,483	3.65
11. Sephadex G-50 (superfine)			
Fraction No. 18	0.04	270	0.15
19	0.02	270	0.07

^a Procedure for partial purification of *Samia* eclosion hormone (EH) was the same as that for *Bombyx* eclosion hormone (NAGASAWA et al., 1983).

^b Eclosion hormone activity was determined with *Bombyx* bioassay.

化ホルモン活性の減少は、潜成虫頭部で合成された羽化ホルモンが、羽化に伴い体液中に放出されるために起こるものと考えられる (FUGO et al., 1984)。事実、*in vitro* 条件下で脳-側心体-アラタ体の羽化ホルモン力価の測定が行われており (SAKAKIBARA and FUGO, 1990)、それによれば生体内での減少とほぼ同様のことが *in vitro* 条件下で再現されている。エリサン潜成虫、成虫頭部それぞれから得られた“粗羽化ホルモン”の力価を比較すると、潜成虫頭部の方が成虫頭部よりも約 2.8 倍高いことがわかった (Fig. 1)。エリサン羽化ホルモンの分泌経路は不明であるが、頭部の羽化ホルモン活性が約 64% 減少していることはこのホルモンがエリサンの羽化に関与していることを強く示唆する。

エリサン羽化ホルモンと他の鱗翅目昆虫羽化ホルモンとを化学的性状の面から比較するために、エリサン羽化ホルモンの部分精製を行った。カイコガから単離された羽化ホルモンの分子量は 6,648 前後 (KONO et al., 1987)、タバコスズメガでは 6,813 (MARTI et al., 1987) であることが報告されている。カイコガの場合、Sephadex G-50 のゲル濾過により推定分子量は $8,400 \pm 1,000$ (NAGASAWA et al., 1983) で、単離された羽化ホルモンはその約 80% の分子量であった (KONO et al., 1987)。一方、エリサン潜成虫および成虫頭部より精製された羽化ホルモンの推定分子量は $8,500 \pm 1,000$ であり (Fig. 4)、カイコガ羽化ホルモンの分子量に近似している。また、熱安定性、各種イオン交換クロマトグラフィーによる活性分画の溶出パターン (Fig. 2, 3) などの化学的性状においてもカイコガ羽化ホルモンと類似点がみられた。FUGO et al. (1983) は、エリサン成虫頭部にカイコガの羽化を誘導する羽化ホルモン活性が存在することを報告している。また、カイコガ成虫頭部にはエリサンの羽化を誘導する羽化ホルモンが存在することも報告されている (FUGO et al., 1983; 齊藤・普後, 1990)。前述のように、

分子量やイオン交換クロマトグラフィーでの溶出挙動などから判断して、エリサンとカイコガの羽化ホルモンは生理学的にも化学的にもほぼ共通した分子種であるものと推察される。

一方、エリサン胚子にも羽化ホルモンの存在が報告され (齊藤ら, 1987; SAITO et al., 1990)、そのホルモンの推定分子量は $8,500 \pm 1,000$ であり化学的性状等も近似していることから、胚子由来の羽化ホルモンと潜成虫および成虫由来の羽化ホルモンは、同一の物質である可能性がきわめて高いと考えられる。

摘 要

エリサン潜成虫および成虫頭部には、カイコガ潜成虫の羽化を誘導する羽化ホルモン活性が存在し、それぞれの羽化ホルモン力価は潜成虫で 5.8 unit/head, 成虫頭部で 2.1 unit/head であった。また、エリサン潜成虫および成虫頭部の羽化ホルモンについて部分精製を行い化学的性状を調べた結果、それぞれの羽化ホルモンは熱に安定な分子量 $8,500 \pm 1,000$ のペプチドであることが判明した。これらの結果から、羽化ホルモンはその生理作用において、両種間で種特異的でないものと判断された。

引用文献

- COPENHAVER, P.F. and J.W. TRUMAN (1982) The role of eclosion hormone in the larval ecdyses of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 28: 695-701.
- 普後 一 (1986) 昆虫羽化ホルモンの作用機作. *植物防疫* 40: 24-27.
- 普後 一・岩田裕子 (1983 a) 家蚕脳ホルモン粗抽出物中の羽化ホルモン活性と検定法. *日蚕雑* 52: 71-78.
- 普後 一・岩田裕子 (1983 b) 家蚕の蛹-成虫発育期間における羽化ホルモン活性の変動. *日蚕雑* 52: 79-84.
- FUGO, H., Y. IWATA and M. NAKAJIMA (1984) Eclosion

- hormone activity in haemolymph of eclosing silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **30**: 471—475.
- FUGO, H., H. NAGASAWA and A. SUZUKI (1983) Induction of precocious adult eclosion by the eclosion hormone extracted from the heads of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) and *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *Appl. Ent. Zool.* **18**: 540—544.
- FUGO, H., H. SAITO, H. NAGASAWA and A. SUZUKI (1985) Eclosion hormone activity in developing embryos of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **31**: 293—298.
- KATAOKA, H., R.G. TROETSCHLER, S.J. KRAMER, B.J. CESARIN and D.A. SCHOOLEY (1987) Isolation and primary structure of the eclosion hormone of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 746—750.
- KONO, T., H. NAGASAWA, A. ISOGAI, H. FUGO and A. SUZUKI (1987) Amino acid sequence of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2307—2308.
- MARTI, T., K. TAKIO, K.A. WALSH, G. TERZI and J.W. TRUMAN (1987) Microanalysis of amino acid sequence of the eclosion hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* **219**: 415—418.
- NAGASAWA, H., H. FUGO, S. TAKAHASHI, T. KAMITO, A. ISOGAI and A. SUZUKI (1983) Purification and properties of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1901—1906.
- REYNOLDS, S.E. (1986) Endocrine timing signals that direct ecdysial physiology and behavior. *In: Insect Neurochemistry and Neurophysiology.* (A.B. BORKOVEC and D.B. GELMAN eds.), USDA, Beltsville, Maryland: Humana, pp. 53—77.
- 齊藤 準・普後 一 (1990) 数種鱗翅目昆虫における羽化ホルモン. *応動昆* **34**: 257—259.
- 齊藤 準・普後 一・中島 誠・向山文雄 (1987) エリサン孵化期における羽化ホルモン様生理活性物質の変動. *日蚕雑* **56**: 273—278.
- SAITO, H., H. FUGO, M. NAKAJIMA and F. MUKAIYAMA (1990) Eclosion hormone activity during the embryonic development of the saturniid silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Appl. Ent. Zool.* **25**: 85—93.
- SAKAKIBARA, M. and H. FUGO (1990) *In vitro* eclosion hormone synthesis and secretion in the brain-retrocerebral complexes of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 489—493.
- TAGHERT, P.H., J.W. TRUMAN and S.E. REYNOLDS (1980) Physiology of pupal ecdysis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. II. Chemistry, distribution and release of eclosion hormone at pupal ecdysis. *J. Exp. Biol.* **88**: 339—349.
- TRUMAN, J.W. (1985) Hormonal control of ecdysis. *In: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology.* (G.A. KERKUT and L.I. GILBERT eds.), Oxford: Pergamon Press, Vol. 8, pp. 413—440.
- TRUMAN, J.W., P.H. TAGHERT and S.E. REYNOLDS (1980) Physiology of pupal ecdysis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. I. Evidence for control by eclosion hormone. *J. Exp. Biol.* **114**: 381—395.
- TRUMAN, J.W., P.H. TAGHERT, P.F. COPENHAVER, N.J. TUBLITZ and L.M. SCHWARTZ (1981) Eclosion hormone may control all ecdyses in insects. *Nature* **291**: 70—71.