

## カイコ突然変異無翅における5齡期の翅の形態形成

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	川崎, 秀樹
巻/号	66巻1号
掲載ページ	p. 48-53
発行年月	1997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



## カイコ突然変異無翅における 5 齢期の翅の形態形成

川崎 秀樹

宇都宮大学農学部  
(1996 年 10 月 14 日 受領)

HIDEKI KAWASAKI: Wing disc morphogenesis of *fl* mutant (*flugellose*) of *Bombyx mori* during the fifth larval instar.

Size of wing discs of *fl* mutant compared with normal wing discs did not increase during the fifth larval instar. Fewer mitoses were observed in *fl* wing discs than in normal ones during the fifth larval instar. The structure of the wing porches and the tracheole migration were not clear. Each cell-organizing wing disc was cytologically normal. Evagination, flattening and elongation of the basal regions of the wing discs and the pupal cuticle deposition were the same as those observed in normal discs. Necrosis and destruction of cellular organelles were not observed. Some evaginated wing sticks had scales when observed after adult eclosion. Three synthesized peptides which were not synthesized in normal wing discs were detected by two-dimensional gel electrophoresis. It is suggested that *fl* mutant defects did not result from individual cell defects, but from defects in total tissue organization.

Key words: *Bombyx mori*, wing disc, wingless mutant, morphogenesis

近年ショウジョウバエで翅の突然変異に関わる遺伝子が発生の過程で様々な組織の形態形成に関わっていることが明らかにされている (COHEN *et al.*, 1992; KLINGENSMITH and NUSSE, 1994; WILLIAMS *et al.*, 1991)。カイコでも発生に関与する遺伝子のクローニングが行われてきており、翅原基は特にホルモンに感受性が高いことから遺伝子の発現系として好適な材料であると考えられる。川崎・岩下(1987b)はカイコの翅原基の形態形成について調べており、5 齢になると幼若ホルモンの消失によって翅原基で細胞分裂の促進が起こり、次いで吐糸期におけるエクジステロイドの分泌によって、細胞分裂の 2 度目の促進、クチクラの分泌、原基の外転などが引き起こされることを明らかにしている。本論文では翅原基の発達に関係する因子を考察するために、また羽化後正常の翅を有しない突然変異系統無翅 (*fl*) の翅原基の異常を明らかにするために、*fl* 系統の翅原基

の形態形成について正常と比較した。無翅は KATSUKI (1953) により調べられており、正常と無翅の半身モザイク個体を作成すると片側だけ翅の形成の異常な個体が得られることから、翅が発達しないことがホルモンなどの体液的要因の異常から誘引されるものではないことが明らかにされている。長田 (1962a) は無翅突然変異について顕微鏡レベルで観察を行い、また数種薬剤処理による翅の伸展の比較から (長田, 1961), 無翅では気管系の発達が十分でないこと、呼吸系、蛋白合成系に関連のある試薬の添加が無翅の翅の発達を多少促すことを見いだしている。本論文では光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて組織観察を行うとともに、細胞分裂数の変化を追跡し、さらに 2 次元電気泳動法を用いて、合成蛋白種の比較を行い、突然変異種無翅の翅原基の発達について調べた。

### 材料及び方法

材料蚕：無翅系統及び正常蚕として日 124 号×支 124 号を用いた。幼虫期は約 25°C で桑葉育を行い、

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya 321

上蔭後も 25°C に保護した。この条件で、無翅系統は最終齢期は 6 日間食桑を行い、7 日目に吐糸を開始し、9 日目に蛹化した。日 124 号×支 124 号は 7 日間食桑を行い、8 日目に吐糸を開始し、11 日目に蛹化した。

顕微鏡観察用試料の作成：電顕観察には、カイコから前翅の原基を取り出し、2.5% のグルタルアルデヒドで固定後、カコジル酸緩衝液で洗い、1% オスミウム固定液で後固定を行った。エタノール系列で脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作成した。切片は酢酸ウランと鉛染色液の 2 重染色を行った。一部の試料は光顕観察用に約 1  $\mu\text{m}$  の厚さに切り、脱エポキシ後 1% のトルイジンブルー染色液で染色を行った。

光顕観察においては、皮膚とともに原基をカルノア氏液で固定後 100% エタノールに置換し、パラフィン包埋を行い、10  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン、またはホイルゲン-アニリンブルー染色を行った。

細胞分裂数及び翅原基の面積の測定には、5 齢期に経時的に取り出した翅原基をカルノア氏液で 2 時間固定後、90% アルコールから順次アルコール濃度を下げて、水洗後シッフ氏液で染色を行った。染色後脱水して組織全体をスライドガラス上でバルサムに封入した後、顕微鏡下で分裂中の細胞数の計測を行った。

2 次元電気泳動法による合成蛋白質の検出：摘出した翅原基は金網台法 (川崎・岩下, 1987a) を用いて、25°C で 4 時間、Grace の昆虫培地 (Gibco) に  $^{35}\text{S}$ -メチオニン (最終濃度, 6 Mbq/ml) を添加し、取り込みを行わせた。取り込みの終わった組織は O'FERREL (1975) の方法に従って 2 次元電気泳動を行った。40 個の原基をリン酸緩衝生理食塩水で洗い、RNase 液 (0.01 M トリス塩酸, pH 7.4, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase) 20  $\mu\text{l}$  を加え 5 分間超音波処理を行った。DNase 1  $\mu\text{l}$  (0.01 M トリス塩酸, pH 7.4, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mg/ml DNase) を加えた後、尿素 10.8 mg, 細胞破壊バッファー (9.5 M 尿素, 2% NP-40, 2% アンホライン, 5% メルカプトエタノール) を 20  $\mu\text{l}$  加えて試料液とした。1 泳動試料あたり 40 万 dpm になるように調整した。1 次元目は等電点電気泳動, 2 次元目に SDS-PAGE を行った。泳動後ゲルを乾燥し、X 線フィルム (Amasham,  $\beta$ -max) に 72 時間露出した。

## 結 果

無翅突然変異のカイコでは、成虫の翅は痕跡程度にしか発達しないものの、5 齢初期には正常蚕より小さいが同様の形態を有する翅原基が存在した。正常翅を有するものでは幼若ホルモンの消失以後、すなわち 5 齢 5 日目以降翅原基の大きさに顕著な増加がみられ、特に 5 日目、7 日目さらに外転を終えた後の 11 日目に明瞭であった (Fig. 1)。無翅においては、Fig. 1 にみられるように徐々に面積の増大は認められるが、正常のそれに比べると顕著でなく、7 日目以降も増大はみられず、蛹化前の段階で正常の約 5 分の 1 程度であった。正常翅を有するものの翅原基では 川崎・岩下 (1987b) において、幼若ホル

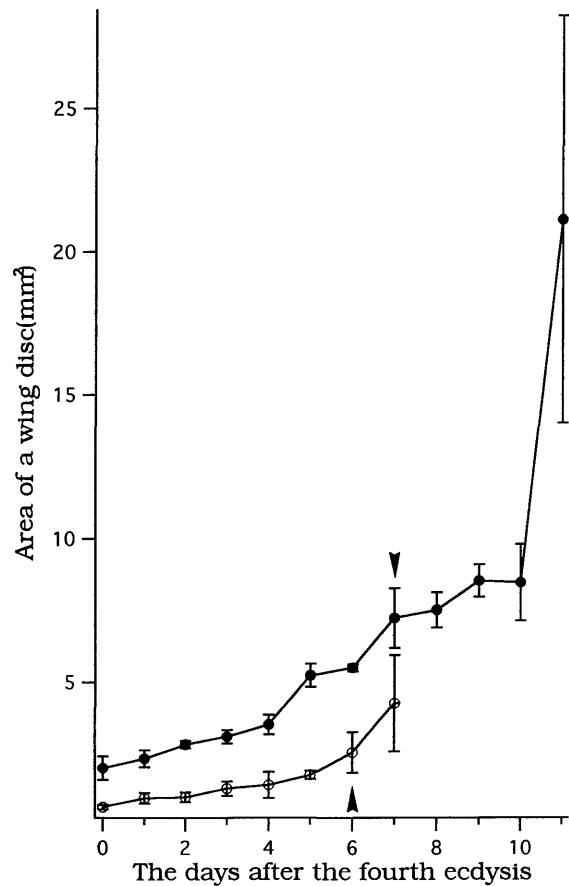


Fig. 1 Changes in wing disc size of N 124 × C 124 strain and *fl* mutant during the fifth larval instar. The area of whole mounted discs was measured. Data indicate means  $\pm$  S.D. of 6 discs. ●-●; N 124 × C 124 strain, ○-○; *fl*. Arrows indicate the beginning of spinning.

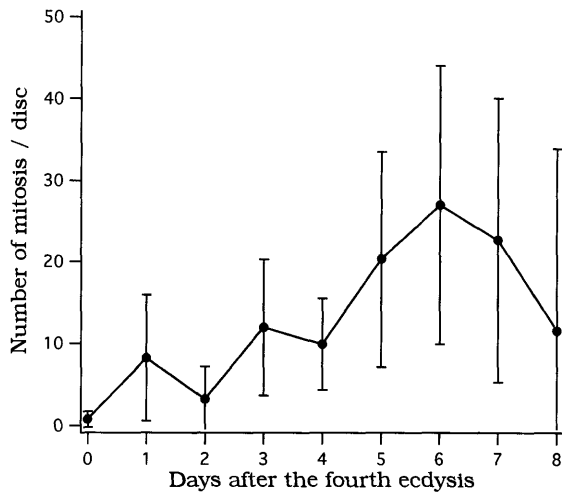


Fig. 2 The number of mitosis of *f*l wing discs during the fifth larval instar. Data indicate means  $\pm$  S.D. of 6 discs.

モンの消失に伴い、分裂のピークが3、4日目(約300/翅原基)に認められ、さらに吐糸開始後に2度目のピーク(約800/翅原基)がみられることを報告した。無翅では分裂数も少なく、Fig. 2にみられるように発育時期に伴う大きな変動も認められなかった。

5齢初期の無翅の翅原基の形態は正常のそれに近似し、組織レベルで翅部、翅のう部に異常は見られなかった。しかし、正常の翅原基では5日目から顕著に認められるようになる翅部の骨格がみられず、

正常では吐糸開始前後にみられる気管枝束の翅部への進入も顕著でなく、翅腔内の所々に気管枝が存在するだけであった。また、吐糸期には翅のう部が増大するにも関わらず翅部の増大が無く、膨らんだ翅のう内に翅部が萎縮した状態で観察された (Fig. 3A)。しかし、蛹化前には翅部は外転し (Fig. 3B)、翅部の扁平化、基底側細胞部分の伸長及び表皮側のクチクラ形成 (Fig. 3C) などの、正常蚕でみられる細胞レベルでの変化が認められた。

透過型電子顕微鏡を用いて細胞の微細構造を調べた結果、細胞レベルでの異常は見られなかった。吐糸2日目のもものでは翅部の頂端部のマイクロビルの先端に蛹のクチクラの分泌が正常の翅を有するもので観察されるのと同様に認められた (Fig. 4A)。また細胞内にはグリコーゲン顆粒、粗面小胞体など正常のものと同様の細胞内小器官あるいは含有物もみられた。さらに基底部には血球の入り込み、細胞端の伸長 (Fig. 4B) など、川崎・岩下 (1987b) が正常の翅を有するもので観察したのと同様の形態が認められた。このように光学、電子顕微鏡を用いて組織、細胞レベルでの形態変化を調べた結果、組織の壊死、細胞内器官の崩壊などは認められなかった。

蛹化後には、3日目以降にも無翅の翅原基にはほとんどりん毛形成は認められず、個体によってまれに観察される程度であった。しかし、成虫クチクラの合成は正常蚕と同様に行われた。羽化時に、無翅においては翅の部分には翅原基が外転した突起状であ

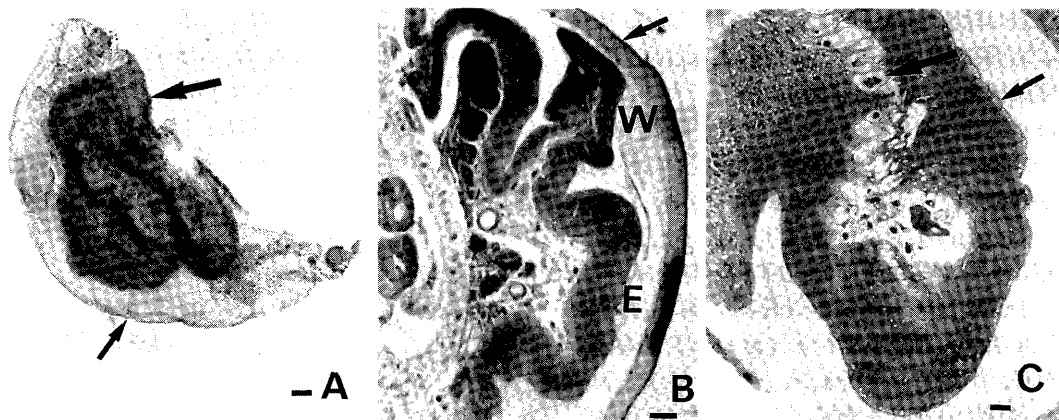


Fig. 3 Light micrographs of wing discs of *f*l. (A) Wing disc at the beginning of the spinning stage. Densely stained wing disc (large arrow) was detached from the wing sac. A small arrow indicates the wing sac. Whole mounted disc was stained with Feulgen reaction. (B) Wing disc(W) evaginating to outside of the larval epidermis(E) at day 1 of spinning stage. An arrow indicates the larval cuticle. The tissue was stained by hematoxylin and eosin. (C) Wing disc of the day 1 of spinning stage. Cuticle deposition (small arrow) and elongation of the cells in the basal region (large arrow) were observed. The tissue was stained with toluidine blue. Bars equal 50  $\mu$ m in (A) and (B), and 20  $\mu$ m in (C).

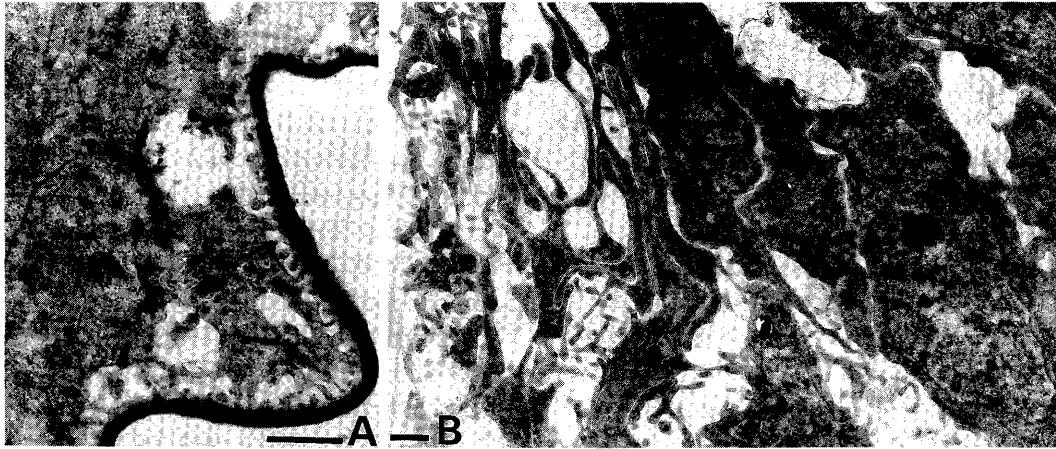


Fig. 4 Electron micrographs of wing discs of *fl* at day 1 of spinning stage. (A) Pupal cuticle was deposited outside of the microvilli as observed in normal wing discs of the same stage. (B) Fine structure of the basal region of the wing disc indicated in Fig. 3. (C) with large arrow. Elongation of the cells in the basal region was observed. Bars equal 1  $\mu$ m.

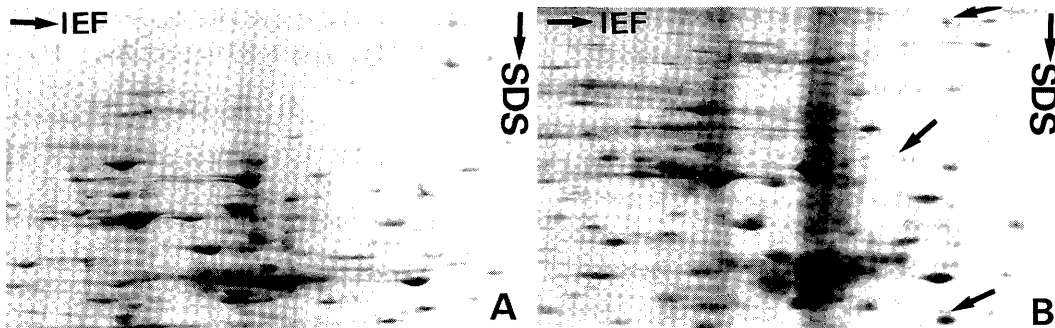


Fig. 5 Autoradiography of synthesized peptides separated by two dimensional gel electrophoresis of wing discs at the beginning of the spinning stage. (A) N 124 x C 124 strain . (B) *fl*.

り、突起の表面にはりん毛の形成は通常みられなかった。しかし稀に突起が長い個体が出現し、突起の表面にりん毛が形成されることが観察された。

無翅及び日 124 号 x 支 124 号の吐糸開始日に翅原基の合成蛋白質を 2 次元オートラジオグラフィーにより比較した結果、約 400 個のスポットが観察されたが、Fig. 5A, B にみられるように、無翅でのみ認められるスポットが 3 つ観察された。正常の翅を有するもので認められて無翅で合成されないスポットは検出される範囲では認められなかった。

#### 考 察

突然変異無翅の翅原基を観察した結果、無翅には正常蚕の翅原基構成組織で欠如するものはないが、翅原基の基部に存在する気管枝系の発達が悪いことが明らかとなった。また、5 齢期に周期的な細胞分裂は観察されないが、蛹クチクラ、成虫クチクラの

分泌を行うことが認められた。蛹化後に翅部でみられるりん毛形成は、細胞分裂が継続する結果行われると考えられ (KAWASAKI, 1995)、無翅の翅原基細胞の分裂の回数が多くなり組織の増大が生じた場合には稀にりん毛が形成されるものと考えられる。このように、個々の細胞はクチクラ形成や、りん毛形成を行う能力を有することから、無翅の発達異常は個々の細胞レベルの欠陥ではなく、組織全体として正常な発達ができないことが原因であると考えられる。量的に欠陥を起こす原因としては、気管系の発達不十分による酸素供給の不足とそれに伴う組織の発達不全が考えられる。エクジステロイドは酸素存在下で働くといわれており (RATNASIRI and FRAENKEL, 1974)、酸素供給の不足がエクジステロイドの働きを低下させていることも考えられる。正常蚕の有する翅原基では幼若ホルモンの消失及びエクジステロイドの分泌に伴って、細胞の分裂活性が盛んに

なるが、それらに並行して速やかに気管系の発達が見られる。翅原基が正常に発達するためには、ホルモン変動に敏感に反応し個々の細胞が同調することが必要であると考えられた。一方、正常蚕で見られる、気管枝束の進入前の翅原基の骨格形成が無翅では十分に行われぬ。従って、気管枝束を誘導するものが翅腔内になく、進入できない可能性もある。

SIN (1983) はショウジョウバエの痕跡翅では合成蛋白質が野生型と異なることを報告しているが、本実験でも2次元電気泳動の結果、無翅だけに検出されるペプチドが3種観察された。これらのポリペプチドは翅原基全体を磨砕しているため翅原基を構成している組織のどの部分から由来しているものか同定できない。無翅で認められたものが発達の阻害因子として働いているものか、発達不全のために結果的に出現するものかは明らかではない。しかし、殆どどのポリペプチドは正常の翅原基と同様に合成されていることは組織観察で細胞レベルでの異常が認められないことを反映している。また、正常でのみ認められるものがないことは、その発現量が少ないか、胚期などの早期に発現している可能性も考えられる。

FRISTROM (1969) はショウジョウバエで翅に異常のある突然変異種 vestigial, apterous, Beadex, cutららを形態学的に調べ、原基に部域特異的に細胞の変性が起こっているのを観察し、OBROCHTA and BRYANT (1983) はショウジョウバエの翅原基の翅部細胞が退化することを調べている。しかし、カイコの無翅では部域的な細胞の退化、変性などは観察されなかった。

ショウジョウバエの wingless は翅の発達だけでなく、体節の形成にも影響すると報告されており (KLINGENSMITH and NUSSE, 1994), apterous の遺伝子は胚発生の時に発現が認められ、2, 3 齢中の翅の発達にも必要であることや、脚、触覚にも影響することが知られている (COHEN ら, 1992)。長田 (1962b) は3 齢初期から無翅と正常翅の翅原基の大きさを比較しているが、3 齢初期にはすでに無翅の翅原基の大きさが小さいことを見だしており、3 齢期までにすでに影響を受けていることを確認している。本報告では5 齢期の発達から原因を推定したが、無翅遺伝子は幼虫の気管系の発達に関与している可能性や体節の決定などにも関連する可能性もある。エクジステロイドレセプターとの関連性を追求する報告もできており (藤原ら, 1996), 様々な方面での解析が期待される。

## 摘 要

無翅突然変異 (*fl*) の翅原基は正常のものに比べ、5 齢期の成長は顕著でなく、細胞分裂数も少なかった。また、翅部の骨格形成がみられず、気管枝束の翅部への進入も顕著でなく、吐糸期には翅のう部の増大はあるが翅部の増大が無く、膨らんだ翅のう内に萎縮した翅部が観察された。一方、細胞レベルの異常は見られず、蛹化前には翅部の外転、扁平化、基底側細胞部分の伸長及び表皮側のクチクラ形成などの正常と同様の変化がみられ、組織の壊死、細胞内器官の崩壊などは認められなかった。羽化時に、稀に翅部の突起が通常は無翅の個体より長い個体が出現する場合があります、これらの突起の表面にはりん毛が形成されることが観察された。吐糸期の翅原基の合成蛋白質に2次元電気泳動で無翅でのみ認められるスポットが3種観察された。これらの結果から無翅の発達異常は個々の細胞レベルの欠陥ではなく、組織全体の発達不全が原因であると考えられた。

## 引用文献

- COHEN, B., MCGUFFIN, M.E., PFEIFLE, C.S., EGAL, D. and COHEN, S.M. (1992): apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes & Dev.* **6**, 715-729.
- FRISTROM, D. (1969): Cellular degeneration in the production of some mutant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Gen. Genetics*, **103**, 363-379.
- 藤原晴彦・北条高史・神村学 (1996): 無翅突然変異体 (*fl*) の翅形態形成におけるエクダイソン受容体の発現. 日蚕第66回学術講演会講要, p 14.
- KATSUKI, K. (1953): Weitere versuche under erbliche Mosaikbildung und Gynandromorphismus bei *Bombyx mori* L.. *Biol. Zentralbl.*, **55**, 361-383.
- KAWASAKI, H. (1995): Ecdysteroid concentration inducing cell proliferation brings about the imaginal differentiation in the wing disc of *Bombyx mori in vitro*. *Develop. Growth Differ.* **37**, 575-580.
- 川崎秀樹・岩下嘉光 (1987a): カイコの5 齢期の翅原基の培養下での分化. 日蚕雑, **56**, 65-71.
- 川崎秀樹・岩下嘉光 (1987b): カイコの5 齢期における翅原基の発達. 日蚕雑, **56**, 89-98.
- KLINGENSMITH, J. and NUSSE, R. (1994): Signaling by wingless in *Drosophila*. *Develop. Biol.*, **166**,

- 396-414.
- 長田貞一 (1961)：カイコの突然変異種 Wingless の翅を発達させる物質について。京工織学報, **3**, 147-153.
- 長田貞一 (1962a)：カイコの正常型および突然変異種 Wingless の発生。京工織学報, **3**, 341-371.
- 長田貞一 (1962b)：カイコの突然変異種 Wingless の翅芽の成長。京工織学報, **3**, 372-379.
- O'BRONCH, D and BRYANT, P.J. (1983): Cell degeneration and elimination in the imaginal wing disc, caused by the mutations *vestigial* and *Ultravestigial* of *Drosophila melanogaster*. Roux Arch Devel. Biol. **192**, 285-294.
- O'FARRELL, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021.
- RATNASIRI, N.P. and FRAENKEL, G. (1974): The physiological basis of anterior inhibition of puparium formation in ligated fly larvae. J. Insect Physiol., **20**, 105-119.
- SIN, Y.T. (1983): *In vitro* differentiation and protein synthesis in imaginal wing discs of wild type and *vestigial Drosophila melanogaster*. Insect Biochem. **13**, 677-684.
- WILLIAMS, J.A., BELL, J.B. and CARROLL S.B. (1991): Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. Genes & Devel. **5**, 2481-2495.