

ヤマユガ科幼虫の
青色色素結合タンパク質—— シンジュサン幼虫体液と皮膚組織における
ビリベルジン結合タンパク質の性質 ——

大学院工芸科学研究科 齊藤 準

1. 緒 言

チョウ目幼虫の多くは、寄主植物の葉を食べて成長する植食性であり、これらの幼虫体色は、緑色である場合が多く「アオムシ」と呼ばれている。アオムシの体色は植物の葉の色に似せた一種のカムフラージュとして働いており¹⁾、捕食性天敵から身を守るために有効であると考えられている²⁾。アオムシの緑色は、食物である植物の葉に由来するカロテノイド（黄色）と、体内で合成されるビリン系色素（青色）が混ざり合うことによるものである³⁾。

チョウ目昆虫の主要なビリン系色素はビリベルジン IX γ で、一部の種においてビリベルジン IX γ をもとにフォルカビリンやサーペドビリンが合成されると考えられている^{4),5)}。また、ビリン系色素は体内でタンパク質と結合して、ビリン結合タンパク質 (bilin binding protein) として体液や皮膚に存在している。ビリン結合タンパク質は、最初にタバコスズメガ *Manduca sexta* の幼虫体液から精製され、インセクトシアニン (insecticyanin: INS) と命名された⁶⁾。タバコスズメガ INS は、卵から成虫にいたるまでの全発育ステージに存在し、真皮細胞で合成・分泌され、体液や皮膚組織に蓄積する⁷⁾。INS タイプのビリン結合タンパク質は、180前後のアミノ酸残基からなる分子量20~25kDa のサブユニットをもつタンパク質として、オオモンシロチョウ *Pieris brassicae*^{8),9)} をはじめ、ヤマユガ科を中心に広くチョウ目昆虫に存在する^{10),11)}。

ヤマユガ科のエリサン *Samia cynthia ricini* では、ビリベルジン結合タンパク質 (biliverdin binding protein: BBP) が、幼虫体液や蛹化脱皮時の脱皮液に存在する^{12),13)}。特に幼虫体液には2種類のBBP (BBP-I, BBP-II) が存在し、BBP-II は表皮中のBBP と相同な分子であるのに対して、BBP-I は体液のみに存在する。このことは、BBP-I の生理的役割は体色形成以外にあることを示唆するものである。これまで、INS タイプのビリン結合タンパク質の生理機能は体色形成であり、植物の葉の色彩に似せたカムフラージュに効果的な役割を果たすものと考えられてきた。しかし、多くのチョウ目幼虫体液でみられるその存在は、必ずしも体色形成と直接結びつくものではなく、生理機能については未だに不明な点が多い。

本研究では、エリサンとは亜種関係にあり、日本国内に生息するシンジュサン *Samia cynthia pryeri* を実験材料に、体液や皮膚組織からのBBPの精製とその性質を明らかにし、生息環境の異なるシンジュサンとエリサンを比較研究することで、幼虫の体色形成メカニズムにおけるBBPの生理的役割について検討した。

2. 材料と方法

2. 1. 実験昆虫

ヤママユガ科 *Samia* 属に分類されるシンジュサン *Samia cynthia pryeri* は、ニガキ科シンジュ *Ailanthus altissima* を与え、孵化後、室温、自然日長条件下で飼育し、5 齢幼虫を実験材料とした (Fig.1)。エリサン *Samia cynthia ricini* (Blue 系統) は、人工飼料 (日本農業工業社製、シルクメイト L4M) を与え、孵化後25℃、明期16時間—暗期 8 時間の光周条件下で飼育した。

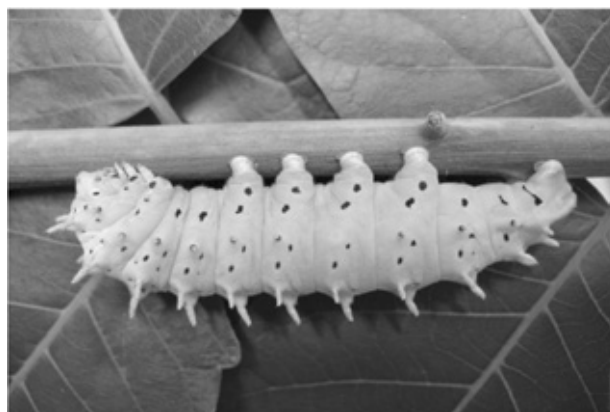


Fig.1 シンジュサン *Samia cynthia pryeri* 5 齢幼虫

2. 2. ビリベルジン結合タンパク質 (biliverdin binding protein: BBP) の精製

最初に 5 齢幼虫の第 2 腹脚基部を切開して体液を採取した後、腹面を尾部から頭部にかけて切開し、生理食塩水 (0.15M NaCl) で体液を十分に洗浄した。次に、中腸、気管、脂肪体、筋肉をピンセットで除去し、再び生理食塩水 (0.15M NaCl) で洗浄し、残りの皮膚を回収した。この際、皮膚からエピダーミスをミクロスパーテルでかき取り、エピダーミスとクチクラを分離して 1.5ml チューブに採取した。全てのサンプルは、使用時まで -25℃ で保存した。

体液及びクチクラからの BBP の部分精製は、体液 (5 齢 0 日目) は体液 2 ml に対して飽和硫酸アンモニウム (硫安) 溶液 8 ml を加えて 4℃ で 30 分間放置した後、遠心分離 (14,000r.p.m., 20min, 4℃) により沈殿を回収した。次に 40% 飽和硫安溶液 2 ml を加えて沈殿を溶解し、再び遠心分離 (14,000r.p.m., 20min, 4℃) を行い、上清を回収して 40% 飽和硫安分画とした。一方、クチクラ (5 齢 7 日目) は、0.246g のクチクラに対して、10 倍量の 20mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.15M NaCl, 1 mM PMSF 緩衝液を加えて磨砕した。4℃ で 30 分間放置した後、遠心分離 (14,000r.p.m., 20min, 4℃) を行い、上清を回収した。この行程を 2 回行い、全ての上清を合わせて抽出液とした。次に、80% 飽和となるように硫安を加えて溶解した後、4℃ で 30 分間放置した。遠心分離 (14,000r.p.m., 20min, 4℃) を行い、沈殿を回収した。さらに、40% 飽和硫安溶液を 2 ml 加えて沈殿を溶解し、再び遠心分離 (14,000r.p.m., 20min, 4℃) を行い、上清を回収して 40% 飽和硫安分画とした。

BBP の精製は、疎水カラムクロマトグラフィーとイオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (東ソー社製、バイオ LC システム) で行った。最初に HiTrap Phenyl HP カラム (1 ml : 0.7×2.5cm) (Amersham Biosciences 社製) に、40% 飽和硫安分画をアプライし、硫安濃度 40 から 0% の直線的濃度勾配で溶出した。溶出速度は 1 ml/分で行った。次に HiTrap Q HP カラム (1 ml : 0.7×2.5cm) (Amersham Biosciences 社製) に BBP 分画をアプライし、NaCl 濃度 0 から 0.4M の直線的濃度勾配で溶出した。溶出速度は 1 ml/分で行った。タンパク質の溶出は波長 280nm, ビリベルジンは 640 あるいは 667nm でモニターし、ビリベルジンの溶出位置をもとに BBP 分画を回収した。回収した BBP 分画は、遠心式限外濾過フィルター

(VIVASCIENCE, 5,000MWCO PES) を用いて, 1 ml 以下まで濃縮した。

2. 3. 分子量の測定

BBP 分子量の測定は, Superdex 200pg カラム (10mm×30cm) (Amersham Biosciences 社製) によるゲル濾過で行った。分子量マーカータンパク質としては, BSA, Ovalbumin, Soybean trypsin inhibitor (STI), Myoglobin を用いた。

2. 4. SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は, 15%ゲルを用いて, ゲル 1 枚当たり30mA 定電流で泳動を行った¹⁴⁾。分子量マーカータンパク質は, Phosphorylase b, BSA, Aldolase, Carbonic anhydrase, STI, Lysozyme (第一化学薬品(株)社製) を用いた。

2. 5. 吸収スペクトル, ビリベルジン量及びタンパク質量の測定

吸収スペクトルは, 波長200~700nm のレンジで測定した。ビリベルジン量は, ビリベルジンの吸収極大 (体液: 640nm, クチクラ: 667nm) における吸光度を用いて, 1 ml 当たりの吸光度0.1を 1 unit として算出した。タンパク質量の測定は, プロテインアッセイキット (BIO-RAD 社製) を用いて行った。

3. 結 果

3. 1. 体液及びクチクラからの BBP の精製

5 齢幼虫の体液及びクチクラから BBP の精製を行った。最初に40%飽和硫酸分画を HiTrap Phenyl HP カラムにアプライし, 硫酸濃度40から 0 %までの直線的濃度勾配溶出により, 疎水カラムクロマトグラフィーを行った。BBP 分画は, 体液及びクチクラでそれぞれ硫酸濃度約28%及び約26%にピークとして溶出された (Fig. 2A, B)。この分画を回収して Phenyl 分画とした。次に HiTrap Q HP カラムにアプライし, NaCl 濃度 0 から0.4M までの直線的濃度勾配溶出により, イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。BBP 分画は体液では0.1M と0.2M 付近に 2つのピークとして検出され, 溶出される順に BBP-I, BBP-II と命名した。(Fig. 2C)。一方, クチクラでは0.2M 付近にピークとして検出された (Fig. 2D)。

体液及びクチクラからの BBP 精製における各分画中の構成タンパク質を SDS-PAGE により解析した (Fig. 3)。体液からは BBP-I と BBP-II の 2つの BBP が単一バンドとして検出された (Fig. 3A, レーン 5, 6)。一方, クチクラでは 1つの BBP が単一バンドとして検出された (Fig. 3B, レーン 5)。

体液及びクチクラからの BBP 精製における各精製段階の精製度を Table 1と 2 に示した。体液 13.1mg のタンパク質から BBP-I が0.17mg, BBP-II が0.05mg 精製された。それぞれの回収率は14 %と 7 %であった。1 mg 当たりの BBP に含まれる色素量は, BBP-I で5.76unit, BBP-II で 9.80unit であった。一方, クチクラでは9.77mg のタンパク質から BBP が0.31mg 精製された。回収

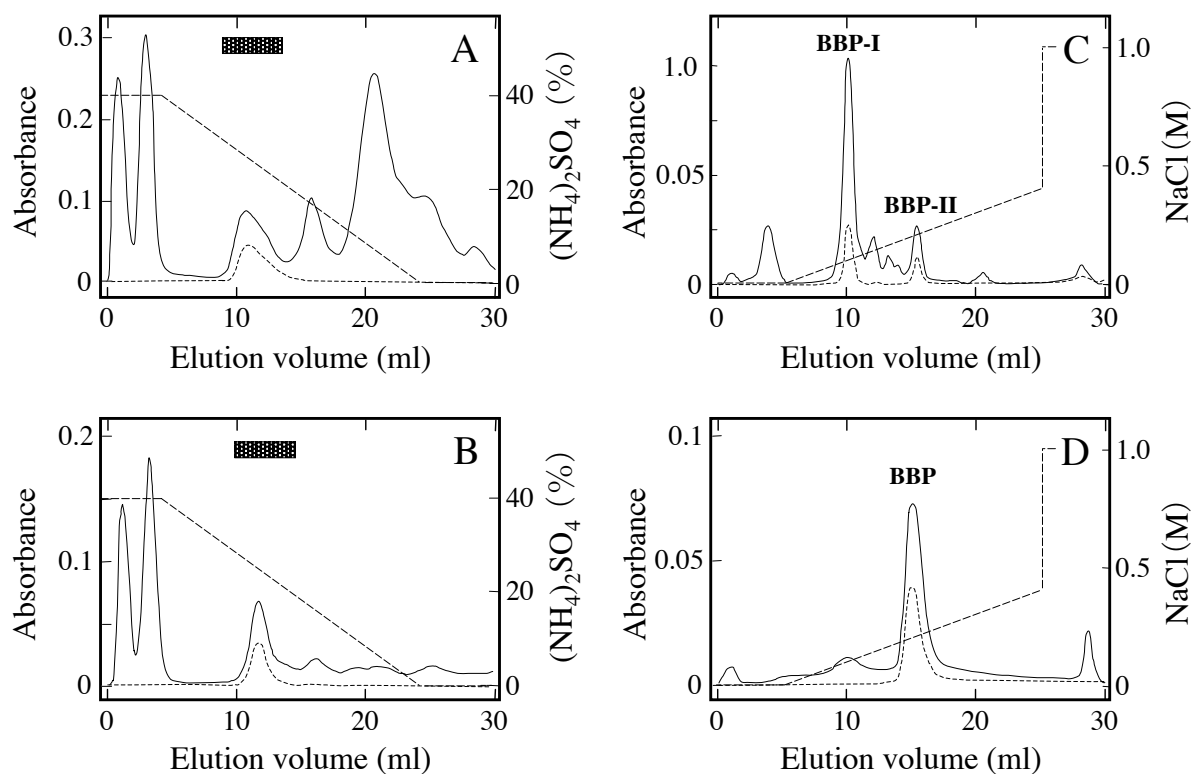


Fig. 2 シンジュサン 5 齢幼虫体液及びクチクラからの BBP 精製におけるカラム溶出パターン
 体液：疎水カラムクロマトグラフィー (A), イオン交換カラムクロマトグラフィー (C),
 クチクラ：疎水カラムクロマトグラフィー (B), イオン交換カラムクロマトグラフィー (D)
 ——：280nm, -----：640, 667nm,：(NH₄)₂SO₄ 濃度, -.-.-.：NaCl 濃度,
 ■■■■■：BBP 分画

Table 1. シンジュサン 5 齢幼虫体液からの BBP の精製

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total units*	units/mg	Yield (%)
1. 体液	2.00	13.1	7.00	0.53	100
2. 40%硫酸分画	2.12	8.31	5.04	0.61	72.0
3. Phenyl 分画	2.23	0.31	3.88	12.52	55.4
4. Q 分画					
BBP-I	0.72	0.17	0.98	5.76	14.0
BBP-II	0.72	0.05	0.49	9.80	7.0

*：640nm における溶液 1 ml 当たりの Absorbance 0.1 を 1 unit とする。

Table 2. シンジュサン 5 齢幼虫クチクラからの BBP の精製

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total units*	units/mg	Yield (%)
1. クチクラ	6.89	9.77	14.60	1.49	100
2. 40%硫酸分画	4.18	1.52	8.60	5.66	58.9
3. Phenyl 分画	3.09	0.40	1.78	4.45	12.2
4. Q 分画					
BBP	1.18	0.31	3.90	12.58	26.7

*：667nm における溶液 1 ml 当たりの Absorbance 0.1 を 1 unit とする。

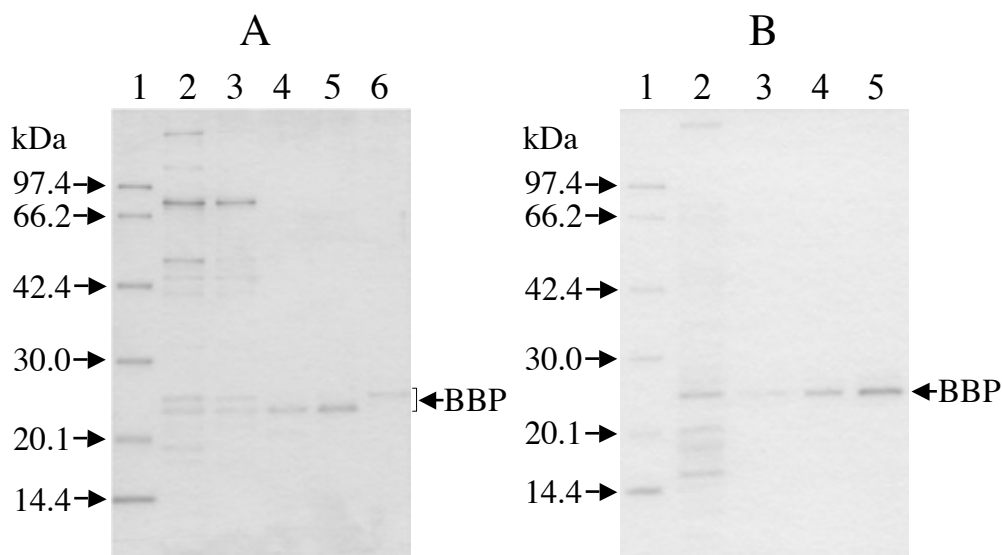


Fig. 3 シンジュサン 5 齢幼虫体液及びクチクラからの BBP 精製における各分画の SDS-PAGE
 A：分子量マーカー（レーン 1），体液（レーン 2），40%硫酸分画（レーン 3），Phenyl 分画（レーン 4），BBP-I（レーン 5），BBP-II（レーン 6），B：分子量マーカー（レーン 1），クチクラ（レーン 2），40%硫酸分画（レーン 3），Phenyl 分画（レーン 4），BBP（レーン 5）

率は26.7%であった。1 mg 当たりの BBP に含まれる色素量は、12.58unit であった。

3. 2. BBP の生化学的性質

精製 BBP の分子量は、SDS-PAGE の結果（Fig. 4）から、体液 BBP-I が22.3kDa、BBP-II が24.2kDa、クチクラ BBP は24.3kDa であった。さらに、ゲル濾過により、体液 BBP-I が21.4kDa、BBP-II が44.9kDa、クチクラ BBP は46.2kDa であった。以上の結果から、体液 BBP-I は単量体、体液 BBP-II とクチクラ BBP は 2 量体を形成することが推定された。各 BBP の吸収スペクトルを測定した結果、BBP-I は、278nm、379nm、638nm、BBP-II は276nm、385nm、667nm、クチクラ BBP は、278nm、383nm、667nm とそれぞれ 3 つの吸収極大を示した（Fig. 5）。これらの結果から、全ての BBP に結合している色素はビリベルジン IX γ であることが明らかになった。また、体液 BBP-II とクチクラ BBP は共通もしくは極めて類似した分子であると推察した。

3. 3. シンジュサンとエリサンの各組織の構成タンパク質の比較

シンジュサン（5 齢 7 日目、生体重5.361g）とエリサン（5 齢 3 日目、生体重5.308g）の体液及び皮膚組織（エピダーミス、クチクラ）の構成タンパク質を SDS-PAGE により比較した（Fig. 6）。

シンジュサンの体液と皮膚組織のエピダーミス及びクチクラにおいて、BBP-II は両種とも共通して含まれており、その量に大きな差はみられなかった。エリサンでも、体液では BBP-II の方が高濃度で存在した。皮膚組織の BBP-II は、エピダーミスよりクチクラでやや多く存在するものの、両種においてその存在様式に大きな違いはないことが明らかになった。両種で各組織の構成タンパク質には顕著な差はみられなかったが、存在量において若干の違いが確認できた。エピダーミスでは

46.9kDa のタンパク質がエリサンに比べてシンジュサンで多いのに対して、クチクラでは20kDa と 15.1kDa のタンパク質が、シンジュサンで少ないことが確認できた。

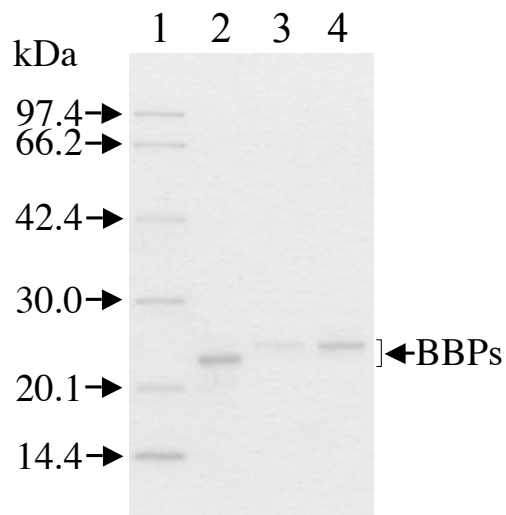


Fig. 4 シンジュサン 5 齢幼虫体液及びクチクラ BBP の SDS-PAGE 分子量マーカー (レーン 1), 体液 BBP-I (レーン 2), 体液 BBP-II (レーン 3), クチクラ BBP (レーン 4)

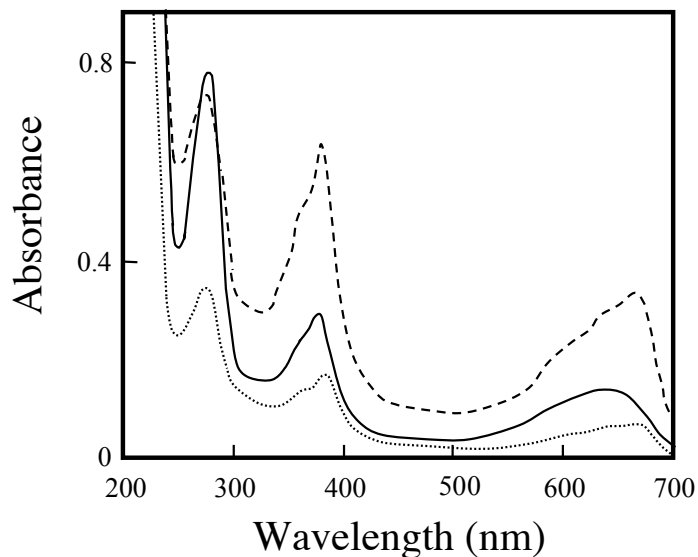


Fig. 5 精製 BBP の吸収スペクトルの比較
 —— : 体液 BBP-I, : 体液 BBP-II,
 - - - - : クチクラ BBP

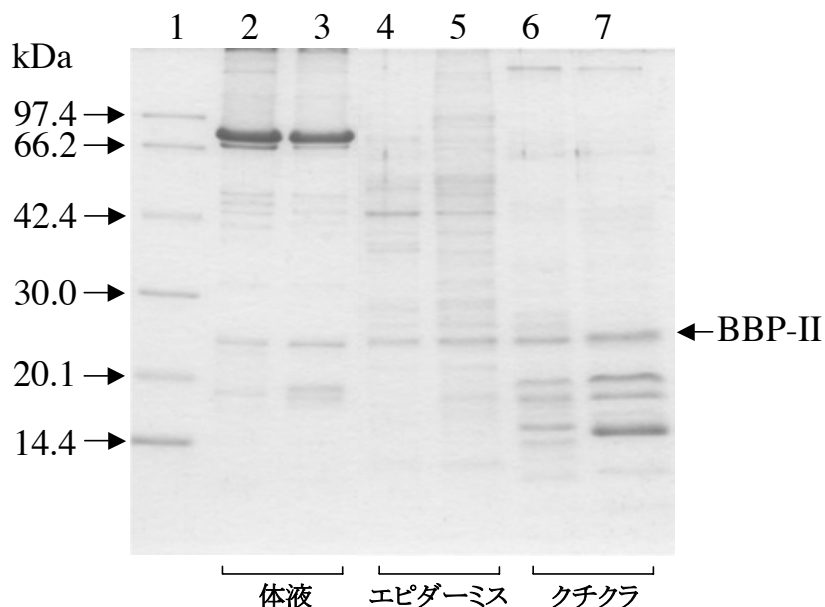


Fig. 6 シンジュサンとエリサンの 5 齢幼虫体液及び皮膚組織の構成タンパク質の SDS-PAGE による比較
 レーン 1 : 分子量マーカー, レーン 2, 4, 6 : シンジュサン (5 齢 7 日目),
 レーン 3, 5, 7 : エリサン Blue 系統 (5 齢 3 日目)

4. 考 察

最初にタバコスズメガの幼虫体液から精製された INS は、全てのステージに存在し⁷⁾、結合するビリル系色素はビリベルジン IX γ であることが明らかになった¹⁵⁾。その後、INS タイプのビリル結合タンパク質は、180前後のアミノ酸残基からなる分子量20~25kDa のサブユニットをもつタンパク質として多くのチョウ目昆虫からみつがっている。ヤマユガ科のエリサンでは、ビリベルジン IX γ が結合した BBP の存在が明らかになっており、4、5 齢幼虫の体色が青色である Blue 系統の脱皮液中から精製されている¹²⁾。その後、5 齢幼虫の体液中からも 2 種類の BBP (BBP-I, BBP-II) の存在が明らかにされた¹³⁾。体液中の BBP-I は分子量24kDa の単量体で、BBP-II は分子量49kDa で 24kDa のサブユニットからなる 2 量体のタンパク質であり、脱皮液由来の BBP と相同な分子であることが明らかになった。さらに、エリサンでは Blue 系統の他に幼虫体色が黄色い Yellow 系統があり^{16), 17)}、Yellow 系統の体液中には BBP-I, BBP-II に加えて BBP-0 の存在が報告されている¹⁷⁾。これらの結果は、両系統間における幼虫体色の違いに体液中の BBP が直接関与するものではないことを示唆している。

本研究では、野外に生息するシンジュサンの 5 齢幼虫を用いて体液とクチクラから BBP を精製した。その結果、体液からは 2 種類の BBP (BBP-I, BBP-II) が、クチクラからは 1 種類の BBP が精製された。体液 BBP-I は分子量22.3kDa の単量体、BBP-II は分子量44.9kDa で 24.2kDa のサブユニットからなる 2 量体、クチクラ BBP は分子量46.2kDa で 24.3kDa のサブユニットからなる 2 量体を形成することが示唆され、体液 BBP-II とクチクラ BBP は相同な分子であると推定された。また、各 BBP に結合する色素は、全てビリベルジン IX γ であると推定した。シンジュサン BBP はその生化学的性質から、エリサン BBP とほぼ相同な分子であることが明らかになった。

シンジュサンは日本国内の野外に生息しているのに対して、エリサンはインドでは家畜化され養蚕が行われている。両種は亜種関係にあるが、地理的にも隔離されており、最近では別種として扱うべきとの意見もある¹⁹⁾。両種には、産卵習性²⁰⁾ や休眠性²¹⁾ などに違いがみられる。シンジュサンとエリサンは、近縁種であるがその生息環境の違いから発育ステージの体液や皮膚組織において何らかの違いが存在するものと考えられる。特に幼虫体色は、種の特徴を規定するのみならず生息環境に対する適応的意味合いもある。従って、体色に関わる色素及びその結合タンパク質には量的質的特性が存在する可能性が高い。シンジュサンとエリサンの BBP 分子の生化学的性質やその存在様式は酷似しており、体液と皮膚において、BBP-II に相当する位置にバンドが検出された。5 齢最成長期の幼虫体液では、両種とも BBP-I に比べ BBP-II の方が高濃度に存在しているが、両種間で顕著な差はみられなかった。両種の 5 齢幼虫 (0 日目) における体液 1 ml 当たりに含まれる BBP-I と BBP-II 量を比較すると、シンジュサンではそれぞれ 87.0mg, 23.5mg であるのに対して、エリサンではそれぞれ 62.6mg, 16.3mg であった。シンジュサンで存在量が若干多いものの、BBP-I と BBP-II 量の比率には大きな違いはみられなかった。一方、エリサン Blue 系統では、エピダーミス及びクチクラに BBP-II が存在し、皮膚組織におけるクチクラへの蓄積が多く、シンジュサンにおいても同様の傾向がみられた。皮膚組織のクチクラ 1 g 中に含まれる BBP 量は、シンジュサンで 1.28mg, エリサンでは 0.78mg 存在することから、シンジュサンで幾分多く存在するようにもみえるが、両種の存在量に

明確な差はないものとする。以上のように、両種の BBP 間においては、量的にも質的にも異なる性質はみられなかった。エリサン幼虫の体液では、BBP-I は 5 齢初期に多く存在し、ステージが進むに従ってその量は減少する。一方、BBP-II は 5 齢 3 日目まで増加し、その後はワンダリングステージまでその量は維持される¹³⁾。このように体液中の BBP 量は発育ステージに伴って変動することが示されており、シンジュサンにおいても発育ステージ全体を通して BBP の量的変動について調べる必要がある。BBP の生理機能として、BBP-I は体液のみに存在することから体液中で働くものと考えられるが、BBP-II は体液及び皮膚組織に広く存在することから、複数の生理機能を有する可能性がある。その一つとして、皮膚組織に存在して体色形成に関与することは明らかである。しかしながら、体液中における 2 種類の BBP の生理機能については依然として不明であり、今後さらに検討したい。

5. 文 献

- 1) P. M. Tuskes, J. P. Tuttle and M. M. Collins, "The Wild Silk Moths of North America: A Natural History of the Saturniidae of the United States and Canada", eds. P. M. Tuskes, J. P. Tuttle and M. M. Collins, Cornell University Press, Ithaca/London, 9 (1996).
- 2) J. O. Schmidt, "Adaptive Coloration in Invertebrates", ed. M. Wicksten, Texas A&M University Press, Texas, 61 (1990).
- 3) H. Kayser, "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology", eds. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, vol.10, Pergamon Press, Oxford, 367 (1985).
- 4) M. Bois-Choussy and M. Barbier, *Experientia*, **33**, 1407 (1977).
- 5) M. Barbier, *Experientia*, **37**, 1060 (1981).
- 6) P. Cherbas, Biochemical Studies on Insecticyanin. Ph.D.thesis, Harvard University, (1973).
- 7) L. M. Riddiford, S. R. Palli, K. Hiruma, W.-C. Li, J. Green, R. H. Hice, W. J. Wolfgang and B. A. Webb, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **14**, 171 (1990).
- 8) R. Huber, M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt, J. Pflugrath and H. Kayser, *J. Molec. Biol.*, **195**, 423 (1987).
- 9) R. Huber, M. Schneider, I. Mayr, R. Muller, R. Deutzmann, F. Suter, H. Zuber, H. Falk and H. Kayser, *J. Molec. Biol.*, **198**, 499 (1987).
- 10) 齊藤 準, *野蚕*, **43**, 3 (2001).
- 11) 齊藤 準, *化学と生物*, **42**, 475 (2004).
- 12) H. Saito, *Comp. Biochem. Physiol.*, **105B**, 473 (1993).
- 13) H. Saito, *Biochim. Biophys. Acta*, **1380**, 141 (1998).
- 14) U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 15) W. G. Goodman, B. Adams and J. T. Trost, *Biochemistry*, **24**, 1168 (1985).
- 16) H. Saito, *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, **1**, 213 (1994).
- 17) 齊藤 準, 木内 信, *野蚕*, **39**, 5 (2000).

- 18) 齊藤 準, 早川春奈, 野蚕, **57**, 4 (2006).
- 19) R. S. Peigler and S. Naumann, University of the Incarnate Word, San Antonio, Texas, (2003).
- 20) 齊藤 準, 日本応用動物昆虫学会誌, **37**, 163 (1993).
- 21) H. Saito, Appl. Entomol. Zool., **29**, 296 (1994).

(応用生物学部門 准教授)