

ヤママユガ科・カイコガ科のアリルフォリンの免疫拡散法による比較¹⁾

嶋田 透*・小林 淳*²⁾・宮田 保**

永田昌男*・小林正彦*

* 東京大学農学部

** 旭丘高等学校

Comparison of Arylphorins among Species belonging to Saturniidae and Bombycidae (Lepidoptera) by Immunodiffusion Analyses. Toru SHIMADA, Jun KOBAYASHI²⁾ (Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan), Tamotsu MIYATA (Asahigaoka High School, Jonai, Odawara, Kanagawa 250, Japan), Masao NAGATA and Masahiko KOBAYASHI (Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **36**: 119–126 (1992)

Arylphorins are major serum proteins in larvae of holometabolous insects. We studied cross-reaction of arylphorins from 11 silkworm species with anti-*Samia cynthia ricini* and anti-*Bombyx mori* arylphorin sera by Oudin's single immunodiffusion and Ouchterlony's double immunodiffusion analyses. Species used were 1. *S. c. ricini*, 2. *S. c. pryeri*, 3. *Antheraea yamamai*, 4. *Antheraea pernyi*, 5. *Dictyoploca japonica*, 6. *Actias selene*, 7. *B. mori*, 8. *B. mandarina*, 9. *Prismosticta hyalinata*, 10. *Pseudantheraea gracilis*, and 11. *Oberthueria falcigera*. Species 1–6 belong to Saturniidae, and 7–11 to Bombycidae. Intensity of cross-reaction with anti-*S. c. ricini* serum was arranged in the order as follows: 1=2>3=4=5=6=9≥10=11>7=8. That with anti-*B. mori* was as follows: 7=8>1=2=3=4=5=6=9=10=11. These results indicate that similarity of arylphorins is highest between 1 and 2 and between 7 and 8, and that arylphorins of 3, 4, 5, 6, 9, 10 and 11 are more similar to the arylphorin of 1 than that of 7. We discussed the phylogenetic relationship among these species, based on the results.

Key words: immunodiffusion, arylphorin, phylogenetic tree, Bombycidae, Saturniidae

緒 言

ヤママユガ科とカイコガ科は、いずれも鱗翅目のカイコガ上科に含まれる近縁の科である(黒子, 1972)。ヤママユガ科は世界各地に分布する 1,000 以上の種を擁し、わが国には 12 種が生息する(井上, 1982)。またカイコガ科はアジアを中心に数 10 種が報告されており、そのうち日本には 5 種が分布する(宮田, 1970; 井上, 1982)。両科に所属する種は、すべて繭を作り、あるものは糸を

とる目的で利用されている。しかし、経済的に重要なグループであるにもかかわらず、両科に関する分類学的、系統学的研究は必ずしも多くない。MICHENER (1952) がヤママユガ科に関して、また宮田 (1970) がカイコガ科に関して、それぞれ比較形態学的研究を行っている。

一方、比較的最近になって生化学的手法によって昆虫の系統関係を分析する試みがいくつか行われ、とくに免疫拡散法を用いた研究がゴキブリ (KUNKEL and LAWLER, 1974) やカイガラムシ (MILLER and Kosz-

1) 本研究の一部は文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) No. 63790336 の援助を受けた。本研究の結果の概略は国際分子昆虫学シンポジウム (International Symposium on Molecular Insect Science, Tucson, Arizona, USA., 1989) にて発表した。また、本研究の結果の一部は東京大学農学部生物環境制御システムセンター (CERES, 現農学部 6 号館) の環境調節設備を利用して得られた。

2) 現在 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所遺伝育種部

3) Present address: Department of Insect Genetics and Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1991 年 9 月 10 日受領 (Received September 10, 1991)

1991 年 11 月 12 日登載決定 (Accepted November 12, 1991)

TARAB, 1979; ROTANDO and TREMBLAY, 1980) などで行われ、成功をおさめている。カイコ、ヤマユガ、サクサンなど絹糸昆虫類では絹糸タンパク質、卵殻タンパク質、体液タンパク質などに関する解析が進んでおり、比較生化学的な研究に適した材料と考えられる。すでに著者らは、完全変態昆虫の主要な体液タンパク質であるアリルフォリンに関してヤマユガ科のエリサンとカイコガ科のカイコとの間で比較している (SHIMADA et al., 1987)。アリルフォリンは、変態にともなって必要とされるアミノ酸を貯蔵するいわゆる貯蔵タンパク質の一種であり、とくにチロシンとフェニルアラニンの両残基を多く含む (TELFER et al., 1983)。筆者らは、アリルフォリンの構造を他の種の間でも比較できると考えた。

本研究は、絹糸昆虫類すなわちヤマユガ科とカイコガ科の系統分類的關係を再検討するための一助とするために、アリルフォリンの性状を免疫拡散法を用いて比較検討したものである。

本文に入るに先立ち、終始ご指導いただいた故吉武成美名誉教授に深謝の意を表したい。また、材料昆虫を提供していただき、有益な助言を賜った東京農工大学農学部 (現北里大学衛生学部)・齊藤 準博士に御礼申し上げる。

材料および方法

1. 材料昆虫

エリサン *Samia cynthia ricini* (DONOVAN) とシンジュサン *Samia cynthia pryeri* (BUTLER) は東京農工大学農学部より分譲を受け、以後東京大学農学部にて累代飼育している系統を用いた。エリサンは台湾原産、シンジュサンは東京都内由来である。両種はそれぞれヒマとカラスザンショウの生葉を与えて飼育した。ヤマユガ *Antheraea yamamai* (GUÉRIN-MÉNEVILLE) とサクサン *Antheraea pernyi* (GUÉRIN-MÉNEVILLE) はいずれも長野県蚕業試験場天柞蚕試験地より分譲を受け、幼虫は 25°C、8L-16D の光周期に設定したコイトロン (小糸工業) の中でアベマキの生葉を用いて飼育した。クスサン *Dictyoploca japonica* (MOORE) は、千葉県にて採集され以後東京大学農学部にて累代飼育されている系統を用い、幼虫は 25°C の蚕室内でイチョウの葉を与えて飼育した。オナガミズアオ *Actias selene* (HÜBNER) は東京大学で維持されている台湾原産の系統を用い、約 25°C の蚕室でヤマザクラの葉を与えて飼育した。カイコ *Bombyx mori* (LINNAEUS) は実用品種支 166 号を使用し、クワコ *Bombyx mandarina* (MOORE) は東京大学農学部にて累代飼育されている

埼玉県坂戸市由来の系統を用いた。カイコとクワコは 25°C の蚕室で桑葉にて飼育した。スカシサン *Prismosticta hyalinata* BUTLER, カギバモドキ *Pseudantrax gracilis* (BUTLER), オオクワコモドキ *Oberthueria falcigera* (BUTLER) は、いずれも神奈川県下で幼虫を採集し、約 25°C の蚕室で飼育した。スカシサンはタンナサワフタギ、カギバモドキはヒメジャラ、オオクワコモドキはヤマモミジの樹上で発見されたため、同種の植物の葉を給餌した。いずれの幼虫もプラスチック製の密閉式または半密閉式の箱型容器の中で飼育し、1日1回ずつ給餌した。

2. 体液試料と抗アリルフォリン血清

いずれの種についても、最終齢 (クスサンのみ 7 齢、他は 5 齢) の幼虫が吐糸を目前に摂食を停止した時点で、腹脚に針を刺して体液を得た後、少量の 1-phenyl-2-thiourea を添加してから 3,000×g、10 分間 4°C にて遠心し、上清を -80°C にて保存した。なお、アリルフォリンの濃度は雌雄で差があることが知られている (Tojo et al., 1980; SHIMADA et al., 1987) ので、実験系を簡単にするために、外部形態または生殖巣の形態 (ISHIWATA, 1928) によって雌雄鑑別を行い、雌のみを用いた。エリサンのアリルフォリンに対する抗血清は電気泳動的に純化したアリルフォリンをウサギに免疫して得た血清であり (SHIMADA et al., 1987)、カイコ (品種は錦秋×鐘和) のアリルフォリンに対する抗血清も同様である (NAGATA and KOBAYASHI, 1990)。いずれの血清も、二重免疫拡散法ならびに単純免疫拡散法で免疫沈降物を検出できるだけの抗体価を有することが確かめられている。以後、エリサン・アリルフォリンとカイコ・アリルフォリンに対する抗体 (抗血清) を、それぞれ抗エリサン抗体 (血清)、抗カイコ抗体 (血清) と略称する。

3. 単純免疫拡散法

OUDIN (1949), HAYDEN and BECKER (1968) ならびに KUNKEL and LAWLER (1974) の方法に準じた。VBS 液 (3.12 mM 5, 5-diethylbarbiturate, 1.82 mM sodium 5, 5-diethylbarbiturate, pH 7.5, 145 mM sodium chloride, 0.1% sodium azide) を用いて 1.5% アガロースを加熱溶解し、VBS で希釈した抗血清を加えたのち、内径 2.7 mm, 外径 4.3 mm, 長さ 40 mm のガラス管に注いでゲル化させた。体液を等量の VBS と混合し、その 8 μl をゲルの上端に重層したのち、25°C の恒温器内に 70 時間放置し、抗原抗体反応を行った。結果は、ゲルを写真撮影し、そのネガフィルムをデンストメトリーして記録した。すなわち、沈降線観察装置 (TOYO, AE-2) の上

にゲルの入ったガラス管を置き、カメラ OM-2 (オリンパス) にレンズ「ズイコー MC1 : 1 マクロ 80 mm F4」ならびにオートイクステンションチューブ 6.5-116 を装着し、絞り 5.6, 露光 1 秒, 倍率 1.2 倍で写真撮影した。フィルムはネオパン F (フジフィルム) を用いた。現像されたネガフィルムをクロマトスキャナー (島津製作所 CS-910) を用いてデンストメトリーした。スキャンニングの波長は 550 nm, スリット幅は高さ 1 mm, 幅 0.2 mm とし、速度は 2 cm/min とした。

4. 二重免疫拡散法

OUCHTERLONY (1968) の方法に準じた。VBS を用いて作った 1.5% アガロースゲルを、ガラス板の上に厚さ 1.5 mm となるように作成した。ゲル上には、1 辺が 6 mm の正三角形の各頂点ならびに中心に、直径 1.7 mm の円形の穴をあけた。抗原は VBS によって適当に希釈して 3~4.5 μ l ずつ、また抗血清は原液のまま 3~4.5 μ l ずつ、それぞれ試料穴に注入した。抗原抗体反応は 20°C で 24 時間行い、その後、ゲルは洗浄液 (0.14 M sodium chloride, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) に浸して液を交換しながら数日間洗浄した。ゲルは、さらに染色液 (0.1% thiazine red, 0.1% amido black, 0.1% light green SF, 0.1% mercury (II) chloride, 2% acetic acid) に 15 分間浸し、2% 酢酸の中で脱色した。

結 果

1. 単純免疫拡散法によるアリルフォリンの種間比較

最初に測定法の定量性を検討した。カイコ・アリルフォリンとその抗血清の系については、16 μ l 抗血清/200 μ l ゲル (1 本分) (相対濃度 1 と呼ぶ) から抗血清の濃度を半分ずつ減らして 1 μ l 抗血清 (200 μ l ゲル (相対濃度 1/16) まで 5 段階のゲルを作成し、抗原はカイコ体液の原液 8 μ l (相対濃度 1), 体液 4 μ l + VBS 4 μ l, 体液 2 μ l + VBS 6 μ l (相対濃度 1/4) の 3 段階を作成した。エリサンのアリルフォリンとその抗血清の系についても同様に、100 μ l 抗血清/200 μ l ゲル (相対濃度 1) から 6.25 μ l 抗血清/200 μ l ゲル (相対濃度 1/32) までの 5 段階のゲルを作成し、抗原もエリサン体液の原液 (相対濃度 1), 1/2 希釈液, 1/4 希釈液の 3 段階のそれぞれ 8 μ l を用いた。

おのおのの抗血清濃度と抗原濃度の組合せについて 3 回の反復実験を行い、平均値を求めた。Fig. 1 にデンストグラムのピーク面積と抗体濃度・抗原濃度との関係を図示した。エリサン・アリルフォリンとその抗体の系 (a) においてもカイコ・アリルフォリンとその抗体の系

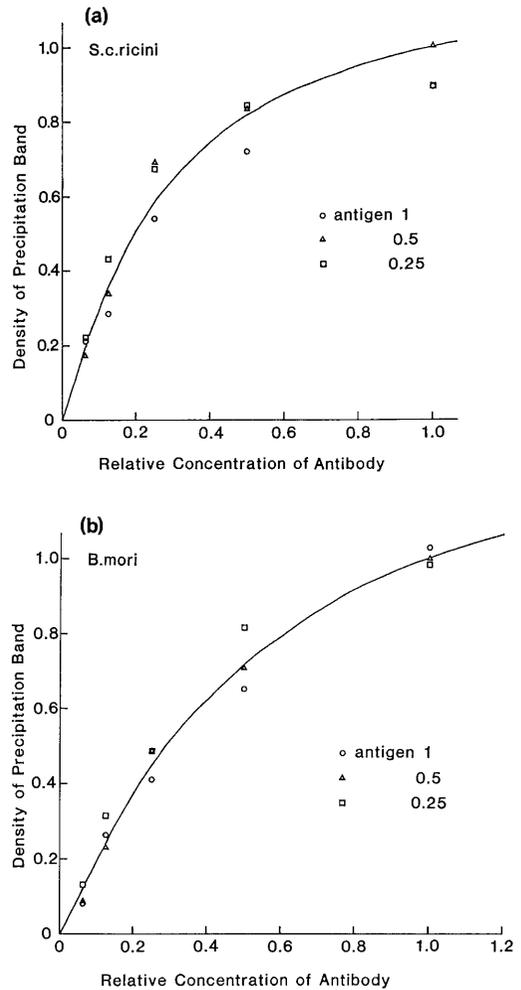


Fig. 1. Effects of antibody concentration and antigen concentration on the amount of immunoprecipitation in OUDIN's single immunodiffusion. The immunoprecipitation band was photographed and the density of the negative film was measured. Values were expressed at relative values (see text for details). (a) Reaction of *S. c. ricini* haemolymph with anti-*S. c. ricini* arylphorin serum. (b) Reaction of *B. mori* haemolymph with anti-*B. mori* arylphorin serum.

(b)においても、デンストグラムのピーク面積は抗体の濃度に依存しており、抗体の濃度が高いほどピーク面積は大きくなっていった。一方、抗原の濃度差によるピーク面積の変化はわずかであり、抗原濃度の影響はほとんど無視できることがわかった。つまり、ゲル写真のデンストグラムのピーク面積から抗体濃度が逆算できる。他昆虫のアリルフォリンを反応させれば共通抗原に対する抗

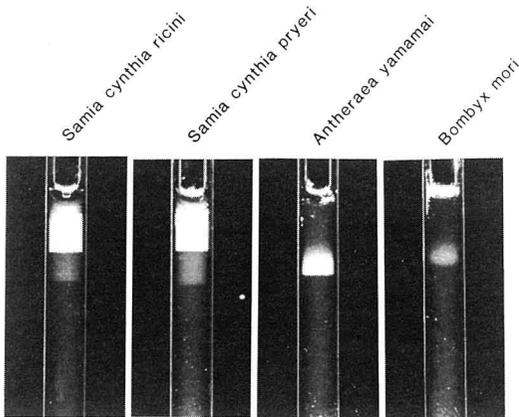


Fig. 2. OUDIN's single immunodiffusion. Each gel contains anti-*S. c. ricini* arylphorin serum. Antigens are haemolymph of several silkworm species.

Table 1. Cross-reactions of arylphorins in various silkworms with anti-*S. c. ricini* arylphorin and anti-*B. mori* arylphorin sera in OUDIN's immunodiffusion

	anti- <i>S. c. ricini</i>	anti- <i>B. mori</i>
<i>Samia cynthia ricini</i>	1.000±0.022	0.604±0.036
<i>Samia cynthia pryeri</i>	1.003±0.071	0.682±0.028
<i>Antheraea yamamai</i>	0.438±0.014	0.507±0.046
<i>Antheraea pernyi</i>	0.517±0.025	0.634±0.026
<i>Dictyoploca japonica</i>	0.599±0.021	0.496±0.040
<i>Actias selene</i>	0.597±0.005	0.529±0.024
<i>Bombyx mori</i>	0.161±0.022	1.000±0.075
<i>Bombyx mandarina</i>	0.180±0.032	1.121±0.057
<i>Prismosticta hyalinata</i>	0.376±0.005	0.521±0.006
<i>Pseudandracra gracilis</i>	0.405±0.000	0.546±0.020
<i>Oberthueria falcigera</i>	0.430±0.013	0.604±0.036

Values are expressed at relative values and indicate mean values±standard errors ($n=3$ to 6).

体だけが反応するはずであるから、ピーク面積を比較することにより抗原の共通性の多少を推定できることになる。

次に、抗エリサン抗体と、抗カイコ抗体それぞれに対する他昆虫の体液の反応を調べた。たとえば、Fig. 2 に一例を示すように、抗エリサン抗体に対しては、エリサンとシンジュサンの体液成分（つまりアシルフォリン）が同程度に強く反応し、ヤママユガの反応はそれよりも弱く、カイコの反応は最も弱かった。つまり、エリサンとシンジュサンのアシルフォリンはほとんど抗原性が同一であり、ヤママユガのアシルフォリンはエリサンと一部の抗原性が共通しており、カイコのアシルフォリンはエリサンと共通の抗原性が最も少ないことが示唆され

る。このような試験を 11 種類の昆虫についてすべて行い、抗カイコ抗体に対する反応も同時に調べた。その結果を Table 1 に示した。おのおのの抗体／抗原の組合せについて 3 ないし 6 個体の雌幼虫を用い、デンストメトリ後のピーク面積の平均と標準誤差を求めた。値は、同種の抗原／抗体の組合せを 1 とした場合の相対値で表した。

抗エリサン抗体に対する反応は、エリサンとシンジュサンが、前述のように最も強く、続いてヤママユガ・サクサン・クスサン・オナガミズアオ・スカンサン・カギバモドキ・オオクワコモドキの 7 種がエリサンに対する相対値で 0.376~0.599 と、中程度の反応を示し、カイコとクワコはそれぞれ 0.161 と 0.181 という値の弱い反応をした。

抗カイコ抗体に対する反応は、カイコとクワコが最も強かった。他の 9 種の昆虫は、カイコに対する相対値で 0.507 ないし 0.682 の反応性であり、カイコやクワコよりは弱いものの、それら 9 種の間では大差がなかった。

2. 二重免疫拡散法によるアシルフォリンの種間比較

二重免疫拡散法における沈降線の形態を観察するために、抗エリサン血清と抗カイコ血清のおのおのに対して、最もよく均衡のとれる抗原／抗体反応の最適比率を調査した。11 種類の昆虫それぞれの体液について、1/2 ずつの希釈系列を作成し、抗血清原液と等しい体積どうしで反応させたときに、どの濃度の抗原が最もシャープな沈降線を作るかを調べた。その結果、抗エリサン血清に対しては、エリサン 1/32、シンジュサン 1/16、ヤママユガ 1/32、サクサン 1/16、クスサン 1/128、オナガミズアオ 1/64、カイコ 1/32、クワコ 1/64、スカンサン 1/128、カギバモドキ 1/32、オオクワコモドキ 1/128 の体液の希釈率が最適であった。また、抗カイコ血清に対してはエリサン 1/16、シンジュサン 1/16、ヤママユガ 1/32、サクサン 1/16、クスサン 1/64、オナガミズアオ 1/32、カイコ 1/16、クワコ 1/32、スカンサン 1/32、カギバモドキ 1/16、オオクワコモドキ 1/16 の希釈率が最適であった。抗原の種が異なると最適希釈率が変化する原因は、おもに抗原の濃度が種ごとに異なることにあると思われる。以下の実験はこの最適希釈の抗原を用いた。なお、沈降線のスパーの形成を観察する場合には、2, 3 回反復して実験を行い、結果が変わらないことを確かめた。

抗エリサン血清に対する反応は、エリサンとシンジュサンが強く、太い沈降線を形成した。他種昆虫の反応はそれらよりは弱く、なかでもカイコ・クワコ・カギバモドキの 3 種の反応がとくに弱かった。沈降線の交点にお

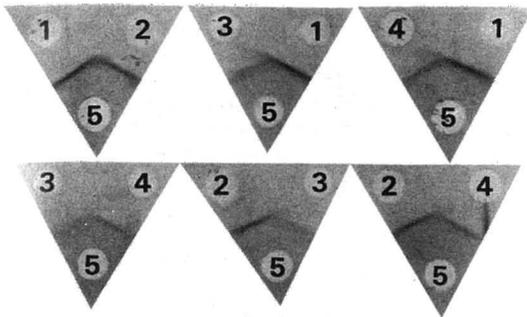


Fig. 3. OUCHTERLONY's double immunodiffusion. Spurs are seen in the combination of (1, 3), (1, 4), (2, 3) and (2, 4) but not seen in (1, 2) and (3, 4).

- 1: *Antheraea yamamai*, 2: *Prismosticta hyalinata*,
- 3: *Pseudandracra gracilis*, 5: *Oberthueria falcigera*,
- 4: *anti-S. c. ricini* A.

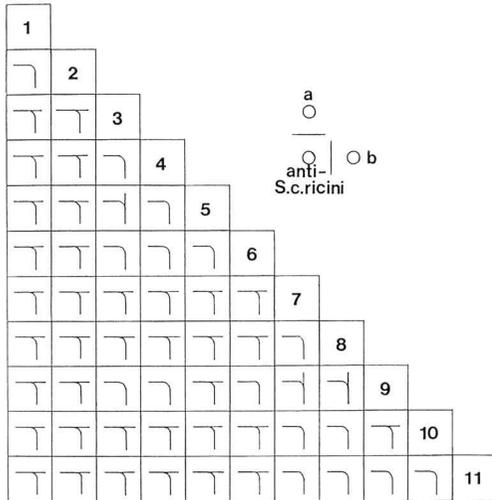


Fig. 4. Schematic representation of immunoprecipitation lines in OUCHTERLONY's double immunodiffusion. Reaction with anti-*S. c. ricini* arylphorin antiserum. Numbers indicate silkworm species: 1. *Samia cynthia ricini*, 2. *Samia cynthia pyneri*, 3. *Antheraea yamamai*, 4. *Antheraea pernyi*, 5. *Dictyoploca japonica*, 6. *Actias selene*, 7. *Bombyx mori*, 8. *Bombyx mandarina*, 9. *Prismosticta hyalinata*, 10. *Pseudandracra gracilis*, 11. *Oberthueria falcigera*. Letters "a" and "b" indicate positions of antigens in immunodiffusion gel.

ける形状は、隣合う抗原の組合せに依存していた。スパークが形成されない組合せは、カイコとクワコ、カイコとカギバモドキ、カイコとオオクワコモドキ、クワコとカギバモドキ、クワコとオオクワコモドキ、スカシサンとオオクワコモドキ、カギバモドキとオオクワコモドキ、

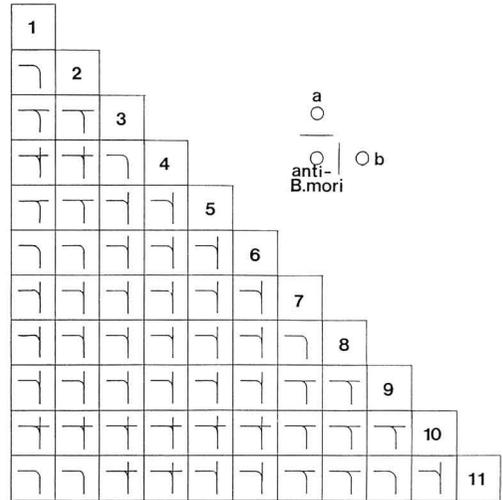


Fig. 5. Schematic representation of OUCHTERLONY's immunoprecipitation lines. Reaction with anti-*B. mori* arylphorin antiserum. See Fig. 2 for details.

スカシサンとヤママユガ、スカシサンとサクサン、エリサンとシンジュサン、ヤママユガとサクサン、ヤママユガとオナガミズアオ、サクサンとクスサン、サクサンとオナガミズアオ、クスサンとオナガミズアオの15通りの組合せであり、他の40通りの組合せでは大小のスパークを生じた。Fig. 3に実例を示すとともに、スパークの形成の有無とその方向性をFig. 4で模式的に表現した。同図において、スパークの大小は考慮していない。

次に、抗カイコ血清に対する各種昆虫の反応を調べたところ、カイコとクワコの反応がとくに強かった。沈降線の交点におけるスパークの形成は抗エリサン血清と同様に隣接する抗原の組合せ方に依存していた。スパークを形成しない組合せは、カイコとクワコ、スカシサンとオオクワコモドキ、オオクワコモドキとエリサン、オオクワコモドキとシンジュサン、エリサンとシンジュサン、ヤママユガとサクサン、エリサンとオナガミズアオ、シンジュサンとオナガミズアオの計8通りであり、残る47通りの組合せではスパークが形成された。そのうちの特殊な場合には、スパークが両方の抗原に向かって形成され、沈降線の形態がX字状を呈した。特殊な場合とは、エリサンとカギバモドキ、シンジュサンとカギバモドキ、ヤママユガとカギバモドキ、サクサンとカギバモドキ、クスサンとカギバモドキ、オナガミズアオとカギバモドキ、ヤママユガとオオクワコモドキ、サクサンとオオクワコモドキ、エリサンとサクサン、シンジュサンとサクサンの10通りであった。それ以外の37通りの組合せで

はスパーは一方方向のみに伸びていた。スパーの形態を Fig. 5 に模式的に示す。

考 察

アリルフォリンは、カイコ (Tojo et al., 1980) やエリサン (SHIMADA et al., 1987) 以外にも、タバコスズメガ (KRAMER et al., 1980)、セクロピアサン (TELFER et al., 1983)、ヤガ科の *Heliothis zea* (HAUNERLAND and BOWERS, 1986) などの鱗翅目昆虫から単離されており、分子量、サブユニット構成およびアミノ酸組成が互によく似ている。さらに、カイコ (Fuji et al., 1989) とタバコスズメガ (WILLOTT et al., 1989) では、アミノ酸配列の相同性が明らかにされている。本研究の結果も、ヤマムユガ科とカイコガ科におけるアリルフォリンの抗原性の共有、すなわち相同性の存在を示している。

Table 1 に示した抗エリサン血清に対する OUDIN の免疫拡散の結果から、エリサンのアリルフォリンとの相同性は、シンジュサンが最も高く、カイコとクワコが最低で、他 7 種はその中間であると思われる。一方、抗カイコ血清に対する試験の結果は、カイコとクワコの相同性が非常に高く、他 9 種とカイコとの間の相同性はそれよりも低いことを示している。また、これらを総合すると、ヤマムユガ・サクサン・クスサン・オナガミズアオ・スカシサン・カギバモドキの 6 種のアリルフォリンは、いずれもカイコよりもエリサンのアリルフォリンと相同性が高いことが示唆される。

Fig. 4 と Fig. 5 の OUCHTERLONY 法による結果から、OUDIN の方法で区別できなかった微量な抗原の差異を、種間で認めることができる。たとえば Fig. 3, Fig. 4 に示されているように、カギバモドキは、ヤマムユガ・サクサン・クスサン・オナガミズアオに対してエリサンに対するのと同様の一方方向のスパーを形成した。このことは、カギバモドキのアリルフォリンは、エリサンとの抗原の共有度がヤマムユガなどよりも低いことを示す。同様のことがオオクワコモドキについてもいえる。さらに他の種の間でもさまざまな抗原的な相違があることがわかるが、OUCHTERLONY 法の欠点である定量性のなさにために、これ以上の結論は得られない。

以上の議論により、アリルフォリンの相同性がある程度解明されたので、それをもとに今回用いた種間の進化的な系統関係を考察する。今回のデータから推定される系統関係は Fig. 6 に示すものである。11 種の中で最も古い時代に分岐したのがカイコ・クワコのグループであり、次に分岐したのがオオクワコモドキか、またはカ

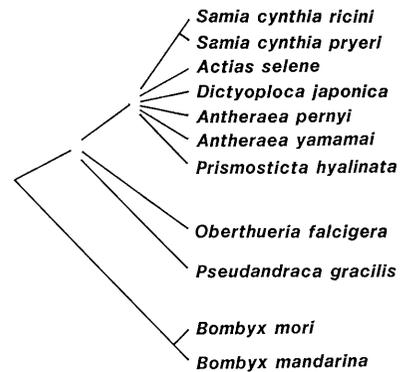


Fig. 6. Hypothetical phylogenetic relationship of the silkworm species, based on antigenic similarity of their arylphorins.

ギバモドキである。これらは別々に分岐したのではなく、その時点では同一の種であったかもしれない。分岐の順序が推定できない部分は Fig. 6 の系統樹で枝を結んでいない。その後、スカシサン・ヤマムユガ・サクサン・クスサン・オナガミズアオの 5 種がエリサン・シンジュサンのグループから分かれていった。これらについても分化の前後関係は不明である。そして、最も最近になって起こった分化が、シンジュサンとエリサンの分化、そしてカイコとクワコの分化であると思われる。

以上の推定は、ある部分では従来の分類学的ないし遺伝学的知見と符合する。たとえば、エリサンとシンジュサンは形態的・生態的には若干の差異があるものの、交配可能なほどに近縁であり、地理的に隔離された亜種であると考えられている (田中, 1943; 井上, 1982)。またカイコとクワコも交配可能である (KAWAGUCHI, 1928)。絹タンパク質であるフィブロインの遺伝子の一次構造を調べた最近の報告でも、ヤマムユガ (TAMURA et al., 1987; 田村, 1990) に比べてクワコ (KUSUDA et al., 1986) のほうがはるかにカイコとの相同性が高いことがわかっており、この両種の近縁性は疑いの余地がない。これらのことは今回のデータからも裏付けられている。

しかし、分類学上はカイコガ科に所属しているスカシサン・カギバモドキ・オオクワコモドキの 3 種は、カイコよりもむしろエリサンに似たアリルフォリンを持っていることが示された。これら 3 種は、幼虫が尾角をもつことなどからカイコガ科に含まれている (井上, 1982) が、形態的にも生態的にもかなり多様である (宮田, 1970)。本研究の結果は、カイコガ科の単系統性に疑問をもたせる結果を示した。しかし、結論を出すためにはさらにさまざまな形質に関する比較が必要である。アリ

ルフォリンについても、より詳細な検討、とくに一次構造を直接比較することが必要である。著者らは現在アリルフォリン遺伝子の構造の比較を始めている。

摘 要

アリルフォリンは完全変態昆虫の主要な体液タンパク質である。ヤママユガ科6種(1. エリサン, 2. シンジュサン, 3. ヤママユガ, 4. サクサン, 5. クスサン, 6. オナガミズアオ), カイコガ科5種(7. カイコ, 8. クワコ, 9. スカシサン, 10. カギバモドキ, 11. オオクワコモドキ)について、それらのアリルフォリンが、エリサンとカイコのアリルフォリンの抗血清に対してどの程度反応するかを、OUDINの単純免疫拡散法と OUCHTERLONYの二重免疫拡散法を用いて調べた。抗エリサン血清に対する反応は $1=2>3=4=5=6=9\geq 10=11>7=8$ の順であった。一方、抗カイコ血清に対する反応は $7=8>1=2=3=4=5=6=9=10=11$ の順であった。以上の結果はエリサンとシンジュサン、カイコとクワコのアリルフォリンがそれぞれ相同性が高く、それ以外の7種のそれはカイコよりもエリサンのアリルフォリンとの相同性が高いことを示す。

引 用 文 献

FUJII, T., H. SAKURAI, S. IZUMI and S. TOMINO (1989) Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein SP2 of *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. **264**: 11020—11025.

HAUNERLAND, N.H. and W.S. BOWERS (1986) Arylphorin from the corn earworm, *Heliothis zea*. Insect Biochem. **16**: 617—625.

HAYDEN, A.R. and E.L. BECKER (1968) Antigen antibody reaction in agar—V. Precipitate density studies using the Oudin technique. J. Immunol. **85**: 591—602.

井上 寛 (1982) カイコガ科, ヤママユガ科. 日本産蛾類大図鑑 (井上 寛 編), 東京: 講談社, 解説編 pp. 585—590.

ISHIWATA, S. (1928) Sexual differences in the larvae of the silk worms and other moths. In: Proceedings of the 3rd Pan-Pacific Science Congress, 2: 2171.

KAWAGUCHI, E. (1928) Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. **7**: 519—552 (in German).

KRAMER, S. J., E. C. MUNDALL and J.H. LAW (1980) Purification and properties of manducin, an amino acid storage protein of the haemolymph of larval *Manduca sexta*. Insect Biochem. **10**: 279—288.

KUNKEL, J.G. and D.M. LAWLER (1974) Larval-specific

serum protein in the order Dictyoptera—I. Immunologic characterization in larval *Blattella germanica* and cross-reaction throughout the order. Comp. Biochem. Physiol. **47B**: 697—710.

黒子 浩 (1972) 鱗翅類. 動物系統分類学 (内田 享 監修), 東京: 中山書店, 巻 7C (下), pp. 52—74.

KUSUDA, J., Y. TAZIMA, K. ONIMARU, O. NINAKI and Y. SUZUKI (1986) The sequence around 5' end of the fibroin gene from the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, and comparison with that of the domesticated species, *B. mori*. Mol. Gen. Genet. **203**: 359—364.

MICHENER, C.D. (1952) The Saturniidae (Lepidoptera) of the western hemisphere: morphology, phylogeny and classification. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. **98**: 333—501.

MILLER, D.R. and M. KOSZTARAB (1979) Recent advances in the study of scale insects. Annu. Rev. Entomol. **24**: 1—27.

宮田 保 (1970) 日本産カイコガ科の属の再検討. Tinea **8**: 190—199.

NAGATA, M. and M. KOBAYASHI (1990) Quantitative changes in storage proteins during larval development of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. **59**: 461—468.

OUCHTERLONY, O. (1968) Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science Publishers.

OUDIN, J. (1949) La diffusion d'un antigene dans une colonne de gel contenant les anticorpus precipitans homologues. Etude quantitative des trois principales variables. C.R. Acad. Sci., Paris **228**: 1890—1892 (in French).

ROTANDO, G. and E. TREMBLAY (1980) Serological studies on five species of Pseudococcidae (Homoptera). Syst. Entomol. **4**: 431—435.

SHIMADA, T., M. NAGATA and N. YOSHITAKE (1987) Characterization of arylphorin of the eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* (DONOVAN) (Lepidoptera: Saturniidae). Appl. Entomol. Zool. **22**: 543—552.

TAMURA, T., H. INOUE and Y. SUZUKI (1987) The fibroin genes of *Antheraea yamamai* and *Bombyx mori* are different in their core regions but reveal a striking sequence similarity in their 5' ends and 5' flanking regions. Mol. Gen. Genet. **207**: 189—195.

田村俊樹 (1990) フィブロイン遺伝子. 天蚕 (赤井 弘・栗林 茂治 編), 東京: 榊サイエンスハウス, pp. 58—69.

田中義麿 (1943) 野蚕論. 蚕学, 東京: 興文社, pp. 618—638.

TELFER, W.H., P.S. KEIM and J.H. LAW (1983) Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: Comparison with calliphorin and manducin. Insect Biochem. **13**: 601—613.

TOJO, S., M. NAGATA and M. KOBAYASHI (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **10**: 289—303.

WILLOT, E., X.-Y. WANG and M.A. WELLS (1989) cDNA and gene structure of *Manduca sexta* arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein. J. Biol. Chem. **264**: 19052—19059.