

家蚕 3 齡期の脱皮のタイミングに対する
光条件及び栄養条件の影響*

小林 淳・竹田 敏・柳川弘明

茨城県つくば市・農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 (〒305)

(1988年10月14日 受領)

JUN KOBAYASHI, SATOSHI TAKEDA and HIRO-AKI YANAGAWA: Effects of light and nutritional conditions on the timing of ecdysis in the 3rd instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

日本蚕糸学雑誌

第58巻 第1号 (平成元年2月) 別刷

Reprinted from

THE JOURNAL OF SERICULTURAL SCIENCE OF JAPAN

Volume 58, Number 1, (February 1989)

家蚕 3 齡期の脱皮のタイミングに対する 光条件及び栄養条件の影響*

小林 淳・竹田 敏・柳川弘明

茨城県つくば市・農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 (〒305)
(1988年10月14日 受領)

JUN KOBAYASHI, SATOSHI TAKEDA and HIRO-AKI YANAGAWA: Effects of light and nutritional conditions on the timing of ecdysis in the 3rd instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

Studies were carried out to elucidate the effects of light-pulse and both protein and β -sitosterol contents in the artificial diet lacking mulberry leaf powder on the morphogenetic events of the silkworm larvae in the 3rd instar. Changes in the body weight, hemolymph ecdysteroid titer and protein concentration were also analyzed throughout the instar. The peaks of the ecdysteroid titer and the body weight levels occurred at 68-72 hrs after the 2nd ecdysis under the continuous dark conditions. Eight hrs later apolysis occurred and hemolymph protein concentration became maximum. Finally ecdysis occurred 20-24 hrs after the apolysis. By the application of light-pulses at 12, 36 and 60 hrs after the 2nd ecdysis the occurrence of both apolysis and ecdysis was advanced by about 4 hrs, whereas by the application of light-pulses at 24 and 48 hrs it was delayed by about 4 hrs. Although the duration of the 3rd instar was prolonged when the content of either proteins or β -sitosterol in the diet decreased, ecdysteroid secretion responsible for ecdysis was not affected by these nutritional conditions. (National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, 305)

桑葉粉末を含まない準合成飼料で飼育した家蚕 3 齡幼虫の就眠・脱皮のタイミングに対する光パルス照射及び飼料中のタンパク質量と β -シトステロール量の影響を検討した。同時に、血液中のタンパク質量とエクジステロイド量の変動及び体重の変化も検討した。全暗条件下では、3 齡飼食後 68~72 時間目に血液中のエクジステロイド量と体重が、その約 8 時間後に就眠個体数と血液中のタンパク質量が、さらに、その 20~24 時間後に脱皮個体数がそれぞれピークに達した。一方、3 齡飼食後 12, 36 及び 60 時間目に与えた光パルスにより、就眠・脱皮のピーク時期がそれぞれ 4 時間程度早まり、3 齡飼食後 24 及び 48 時間目の光パルスにより 4 時間程度遅れた。一方、飼料中のタンパク質量と β -シトステロール量の添加量を減らすと、3 齡経過が遅延したが、エクジステロイド分泌から脱皮に至るまでの生理的過程の進行には、ほとんど影響が認められなかった。

* 本研究は、昭和 62 年度科学技術振興調整費重点基礎研究「蚕における飼料及び飼育環境条件とホルモン分泌リズムに関する研究」の課題の中で行った。

昆虫の脱皮のタイミング決定に対し、光や温度などの環境条件 (Truman, 1972) や栄養条件 (Clarke and Langley, 1963; Steele, 1978) が重要な役割を果たしている。

家蚕では、幼虫脱皮が明から暗への切り替えによって誘導されること (小河原・小沢, 1978, 1980; 鷲田, 1981a, b; 竹田, 1988), さらに、脱皮誘導における光刺激と内分泌現象との関係 (Sakurai, 1983; Takeda, 1988) が明らかにされている。また、光刺激が脱皮誘導に対して有効に作用するには、それぞれの齢期における発育時期が重要であるとされている (鷲田, 1981a; 竹田, 1988)。特に人工飼料育した3齢幼虫への光パルス照射が血液中のエクジステロイド量及び就眠・脱皮のタイミングに与える影響は、Takeda (1988) が桑葉粉末を22%含むM22飼料において明らかにしている。

一方、家蚕の発育に対する栄養条件の影響は、人工飼料の開発に伴い詳細に研究されてきた (伊藤, 1983) が、脱皮のタイミング及び内分泌系との関連においては不明な点が多い。

本論文では、栄養素の影響をできるだけ正確に把握するために、桑葉粉末を含まない準合成飼料を供試し、家蚕3齢幼虫の就眠、脱皮のタイミング、血液中のタンパク質量とエクジステロイド量の変動及び体重の変化に対する光パルス照射の影響などについて検討した。さらに、飼料中のタンパク質量と β -シトステロール量の影響についても検討した。

材料と方法

実験には、日02号×中02号の3齢幼虫を供試した。温度条件は、1～2齢幼虫期を28～29°C、3齢幼虫期を25～26°Cとした。日長条件は、1～2齢幼虫期を8L:16D、3齢幼虫期を全暗あるいは12L:12Dとした。なお、3齢幼虫は、8L:16Dの最終明期開始後3時間以内に脱皮した個体を用いた。光源には黄色蛍光灯を用い、照度は100 lxを目標とした。また、3齢幼虫期での一部の実験区では、1000 lx、15分間の光パルスによる暗中断を行った。人工飼料は、桑葉粉末を全く含まないM0飼料 (伊藤ら, 1974) の脱脂大豆粉末をソルビー 600 (日清製油株式会社製) に代替したものをを用いた (以下、標準飼料と呼ぶ)。また、一部の実験区では飼料中

のソルビー 600 あるいは β -シトステロールの添加量を変化させた。

3齢幼虫の血液は、尾角をハサミで切断して、各個体から5 μ l または10 μ l 採取した。血液中のエクジステロイドの定量は、竹田ら (1986) の方法に従ってラジオイムノアッセイ法で行い、エクジステロイド量は20-OH-ecdysone 当量で表示した。一方、血液タンパク質量は、血液のメタノール沈澱分画をLowry *et al.* (1951) の方法で定量した。なお、暗期における給餌、体重の秤量および就眠・脱皮個体数の調査は、赤色のセロハンで覆った懐中電灯または60Wの暗室用赤色電球の光の下で行った。

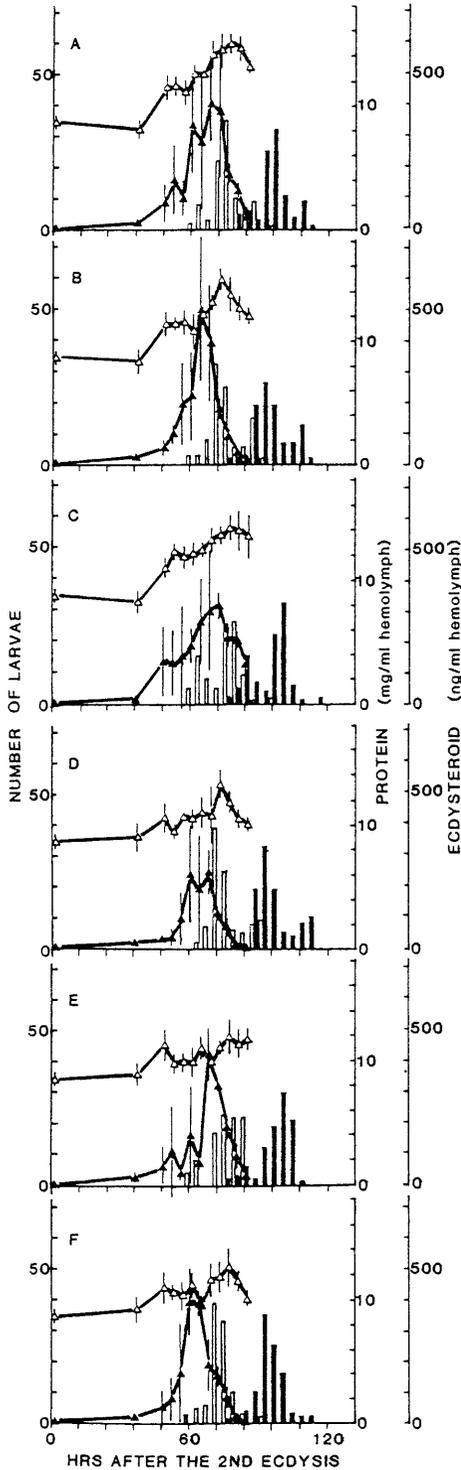
結 果

1. 光パルス照射時期が3齢幼虫の発育生理に及ぼす影響

本項では、M0飼料においてTakeda (1988) の結果を追試することを主な目的として、3齢幼虫への光パルス照射を、3齢飼食後12, 24, 36, 48及び60時間目を実施し、血液中のタンパク質量とエクジステロイド量の変動ならびに就眠・脱皮のタイミングへの影響を検討した。飼料はすべて標準飼料を用いた。

その結果をFig. 1. に示した。図から明らかなように、3齢期の発育に伴う血液タンパク質量の変動パターンに対し、明瞭な光パルスの影響は認められなかった。一方、エクジステロイド量の変動パターンについては、比較的顕著な影響が認められた。すなわち、全暗区では3齢飼食後48時間目頃からエクジステロイドの増加が認められ、68～72時間目にピークに達し、84時間目にはほとんど消失するというパターンを示したが、光パルスを12, 36及び60時間目に照射した実験区では、エクジステロイドのピーク及び消失の時期がそれぞれ60～68時間目と80時間目というように早まった。これに対して、24及び48時間目の照射区では、全暗区と類似した変動パターンを示した。ただし、24時間目の照射区では、84時間目でもエクジステロイドは消失しなかった。

さらに、就眠・脱皮のタイミングには光パルスの影響が最も顕著に現れた。すなわち、全暗区では就眠及び脱皮個体の出現ピークがそれぞれ76時間目及び96時間目で、概ね単峰型の分布を示したのに対し、



12, 36及び60時間目の照射区では、エクジステロイドの場合と同様に、就眠と脱皮のピークがそれぞれ全暗区より4時間程度早まった。特に、12及び36時間目の照射区では、就眠と脱皮の小さなピークがそれぞれ88~92時間目と108~112時間目に現れ、双峰型の分布を示した。また、24及び48時間目の照射区では、エクジステロイドに関して全暗区と大きな差異が認められなかったにもかかわらず、就眠は64時間目の小ピークと76~80時間目の主ピークに、脱皮も84時間目の小ピークと100時間目の主ピークに分かれ、就眠・脱皮とも主ピークと比較すると全暗区より4時間程度遅れた。

また、いずれの実験区においても、各調査項目におけるピークを時系列的に並べてみると、まず、エクジステロイドがピークに達し、その約8時間後に就眠とタンパク質のピークが現れ、さらにその20~24時間後に脱皮のピークが出現するという関係が成立していた。

2. 飼料中のタンパク質量が3齢幼虫の発育生理に及ぼす影響

標準飼料は、粗タンパク質量として約20%となるようにソルビー600を30%添加したが、さらに粗タンパク質量が約10%と5%になるようにソルビー600をそれぞれ15%と7.5%添加した飼料を調製した。そして、これら3種類の飼料で3齢幼虫を飼育し、体重の変化、血液中のタンパク質量とエクジステロイド量の変動及び就眠・脱皮のタイミングを調査した。なお、3齢幼虫は全暗条件で飼育した。また、発育に伴う蚕体重の変化を、上田ら(1969)に従い、ロジスティック曲線で近似して図示した。

Fig. 1. Effects of light-pulse on changes in hemolymph ecdysteroid titer (▲) and protein concentration (△) and the timing of apolysis (white bars) and ecdysis (black bars) in the 3rd instar. Each point of ecdysteroid titer and protein concentration represents the mean (\pm SD) of 5 individual measurements. The 3rd instar larvae were reared in continuous dark (A), or were subjected to the light-pulse at 12 (B), 24 (C), 36 (D), 48 (E) and 60 (F) hrs after the 2nd ecdysis.

結果を Fig. 2. に示した。各飼料における3齢幼虫の体重の変化はロジスティック曲線によく一致しており、飼料中のタンパク質量が少なくなるほど、体重の増加は鈍く、最大体重への到達時期が遅れた。そして、タンパク質20%飼料と10%飼料における最大体重は、ともに 0.24 g であったが、5%飼料では 0.19 g にとどまっていた。また、20%及び10%飼料ではほとんどの個体が4齢になったのに対し、5%飼料では30%程度の個体が就眠することなく3齢のまま死亡した。血液タンパク質量も体重同様、飼料中のタンパク質量が少なくなるほど、ピークへの到達時期が遅れた。ただし、飼料中のタンパク質量の違いにもかかわらず、ピーク時における血液タンパク質量は、各飼料とも 10~11 mg/ml 血液の範

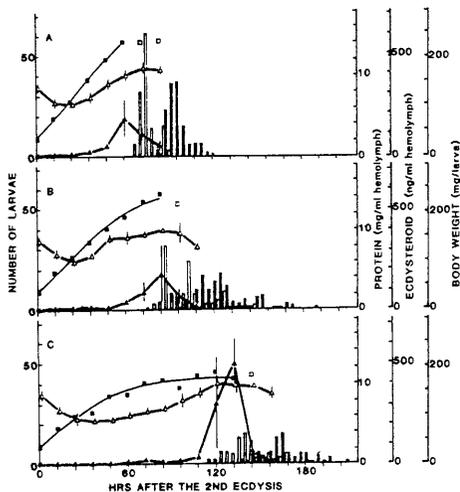


Fig. 2. Effects of protein content in the diet on changes in the body weight (before apolysis: ■, after apolysis: □), hemolymph ecdysteroid titer (▲) and protein concentration (△) and the timing of apolysis (white bars) and ecdysis (black bars) in the 3rd instar. Each point of ecdysteroid titer and protein concentration represents the mean (\pm SD) of 5 individual measurements and each point of body weight is an average of 20 larvae. The 3rd instar larvae were reared on the diet contained 20% (A), 10% (B) and 5% (C) protein, respectively.

囲にあった。エクジステロイド量の立ち上がりとピークの出現時期は、タンパク質20%飼料に対し10%飼料で約12時間、5%飼料で約60時間程度遅れた。なお、20%と10%飼料におけるエクジステロイドのピークが、5%飼料に比べて低くなった理由としては、調査を12時間間隔で行ったため、发育の速い20%と10%飼料では、エクジステロイドの真のピークをとらえそこなことが考えられる。また、就眠・脱皮個体のピークも、20%飼料に対し10%飼料で12~16時間、5%飼料で64~68時間遅れた。そして、飼料中のタンパク質量が減るほど就眠と脱皮が不齊一になった。しかも、10%飼料では、就眠と脱皮個体の最初のピークの12~16時間後に明瞭な第2のピークが認められた。

タンパク質20%の標準飼料では、体重を除く各調査項目のピークの時系列的関係は、前項と全く同様であり、体重はエクジステロイドのピークとほぼ同時期に最大値に達した。そして、この関係は、3齢幼虫期間が変化したにもかかわらず10%と5%飼料のいずれにおいても概ね成立した。

3. 飼料中の β -シトステロール量が3齢幼虫の发育生理に及ぼす影響

標準飼料には、 β -シトステロールを0.3%添加したが、本試験ではその他に、 β -シトステロールをそれぞれ1.5%、0.15%、0.03%及び0%添加した飼料を調製した。そして、これら5種類の飼料で3齢幼虫を飼育し、前項と同様の試験を実施した。なお、3齢幼虫は12L:12Dの日長条件下で飼育した。

その結果は Fig. 3. のようになった。まず、体重の変化は前項同様ロジスティック曲線とよく一致しており、 β -シトステロール1.5%と0.3%飼料の間で体重の増加速度及び最大体重に明瞭な差異は認められなかった。0.15%飼料も最大体重の点では差異が認められなかったものの、増加速度は遅くなった。0.03%飼料では、最大体重が減少し、増加速度もさらに遅くなった。そして、0%飼料では、3齢飼食後24時間目に体重の増加が止まり、それ以後は、体重は徐々に減少した。また、1.5%、0.3%及び0.15%飼料では、すべての個体が4齢に達し、0.03%飼料では14%の個体が、0%飼料では全ての個体が死亡した。次に、血液タンパク質量は、1.5と0.3%飼料で3齢飼食後72時間目に、0.15%と0.03%飼料で

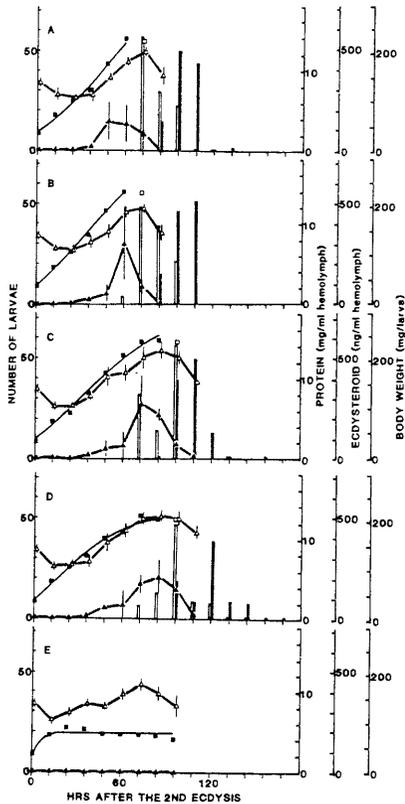


Fig. 3. Effects of β -sitosterol content in the diet on changes in the body weight (before apolysis: \blacksquare , after apolysis: \square), hemolymph ecdysteroid titer (\blacktriangle) and protein concentration (\triangle) and the timing of apolysis (white bars) and ecdysis (black bars) in the 3rd instar. Each point of ecdysteroid titer and protein concentration represents the mean (\pm SD) of 5 individual measurements and each point of body weight is an average of 20 larvae. The 3rd instar larvae were reared on the diet contained 1.5% (A), 0.3% (B), 0.15% (C), 0.03% (D) and 0% (E) β -sitosterol, respectively.

84時間目にピークを示した。ただし、ピーク時における血液タンパク質量は、1.5~0.03%飼料のいずれにおいても12~13 mg/ml血液の範囲にあり、あまり変化は認められなかった。また、0%飼料にお

いてもタンパク質量の変動が認められたが、100%死亡したことを考慮すると、単純に比較することはできない。一方、エクジステロイド量は、1.5~0.03%飼料まで立ち上がりの時期に差異が認められなかったものの、ピークの時期は、飼料中の β -シトステロール量が減るにつれて遅くなった。そして、0%飼料では、エクジステロイドの増加が全く認められなかった。さらに、就眠及び脱皮個体の出現時期も、1.5~0.03%飼料においては β -シトステロール量が減るにつれてピークの時期が遅れるか、あるいは、ピークへの集中の度合いが少なくなった。また、0.15%飼料において就眠のピークが二つ現れたのに対し脱皮のピークが一つになったのは、12時間という比較的長い時間間隔で調査を行ったことにより、就眠・脱皮個体数の微妙な変化を十分に捕えきれなかったためであると推察された。

前項の飼料中のタンパク質量を変化させた場合同様、 β -シトステロール量の増減により3齢幼虫期間は変化するが、0%飼料を除けば、各調査項目のピークの時系列的関係は標準飼料とほぼ同様であると考えられた。

考 察

昆虫の幼虫期における就眠・脱皮がいわゆる circadian clock (概日時計) によって制御されていることは、*Manduca sexta* (Truman, 1972) や *Samia cynthia ricini* (Fujishita and Ishizaki, 1981) などの種で明らかにされている。また、家蚕幼虫の就眠・脱皮のタイミングを調節する前胸腺刺激ホルモンの分泌も、概日時計の支配下にあることが証明されている (Sakurai, 1983)。今回得られた、3齢飼食後12、36及び60時間目の光パルスが就眠・脱皮個体出現時期のピークを約4時間早め、24及び48時間目の光パルスが約4時間遅らせるという結果は、家蚕の光パルスに対する感受性が24時間周期で変化していたことを示唆するものである。概日時計により支配されている生物のさまざまなリズム現象において、光パルスの効果は24時間に近い周期で変化することが普遍的に認められる (ヴェニング, 1973) ことを考慮すると、今回の結果は、家蚕の就眠・脱皮のタイミングが内分泌系を介して概日時計により決定されていることを反映したものであると考えられ

る。

鷲田 (1981a, b) は、明から暗への切り替え刺激に対する感受性から、刺激を感受しない齢初期、感受する齢中期及び刺激を必要としない齢後期の3段階に分類した。Takeda (1988) も、3齢幼虫の光パルスに対する感受性について、同様の結果を得ている。一方、今回の結果は、齢初期に相当する3齢飼食後12時間目と齢後期にあたる60時間目の光パルスも、就眠・脱皮のタイミングに影響を及ぼすことを示していた。この原因としては、鷲田 (1981a, b) と Takeda (1988) が、桑葉粉末を含む人工飼料を用いているのに対し、今回は桑葉粉末を含まない準合成飼料を用いており、このような桑葉粉末の有無等の栄養条件の違いが光感受性の発現に影響を及ぼしたという可能性が考えられる。また、鷲田 (1981a, b) と Takeda (1988) の実験は、齢中期における光感受性を主として検討していることから、齢初期と齢後期における光感受性は見逃されていたとも考えられる。

一方、栄養条件の違いにより発育経過が変化した場合でも、体重、血液中のタンパク質量とエクジステロイド量及び就眠・脱皮個体出現時期の各ピークの時系列的関係はほとんど不変であることが示された。そして、少なくともエクジステロイド分泌から脱皮に至るまでの一連の生理的過程が、栄養条件によらずほぼ一定速度で進行するのに対し、それ以前の発育生理の速度は栄養条件の影響を強く受けることが明らかにされた。このことは、ホルモン分泌を境にして、その前後の生理的過程はある程度独立であること、さらに、ホルモン分泌以降の生理的過程が精密にプログラムされたものであり、そのプログラムが一旦ホルモンにより解発されると、脱皮に至るまで時間的に秩序正しく進行する可能性を示唆している。Truman (1972) は、*Antheraea pernyi* 及び *Manduca sexta* の幼虫脱皮が前胸腺刺激ホルモン分泌の一定時間後に起こることを示すとともに、幼虫の齢と温度は、前胸腺刺激ホルモン分泌時期と脱皮時期との決められた時間間隔を変更する要因となっていることを明らかにした。今回の結果に関する限り、家蚕における栄養条件がこのような変更要因にならないことが判明した。

飼料中のタンパク質量 (堀江ら, 1971; 伊藤ら,

1972) 及び β -シトステロール量 (Ito and Horie, 1966) を減少させると、家蚕幼虫の発育経過が遅延するとともに不斉一になり、量的形質が劣化し、極端な場合には次の齢に進めずに死亡する。この点については、今回の結果も従来の知見に従うものであった。飼料中のタンパク質と β -シトステロールは、細胞を構成するタンパク質とコレステロールの原料として重要であり、これらの栄養素が不足すれば、当然、発育速度は遅くなるはずである。そして、発育速度の遅延とともに、摂食量や消化吸収効率などにおける個体差が増幅され、集団としての発育が不斉一になるものと考えられる。また、 β -シトステロールは、エクジステロイドの前駆体として必要であることから、エクジステロイドの不足が発育経過の遅延に関与している可能性も考えられる。実際、*Locusta migratoria* では、飼料中の利用可能なステロールを制限することによる発育経過の遅延と成虫化の阻止が、エクジステロイドの不足によるものであると推察されている (Charlet *et al.*, 1988)。

このように、基本的に栄養条件は、脱皮リズムに関与するホルモン分泌以前の発育生理に影響を及ぼすことによって、最終的にはホルモン分泌のタイミングにも影響を及ぼすものと思われる。今後、栄養条件と内分泌との関係を詳細に理解するためには、エクジステロイド以外のホルモンの変動も含めた内分泌学的研究が必要であろう。

文 献

- ビュニグ, E. (1973): 生理時計 (古谷雅樹・古谷妙子訳, 1977), p. 290, 東京大学出版会, 東京.
- CHARLET, M., ROUSSEL, J.-P., RINTERNECHT, E., BERCHTOLD, J.-P. and COSTET, M.-F. (1988): *J. Insect Physiol.*, **34**, 787-796.
- CLARKE, K. V. and LANGLEY, P. A. (1963): *J. Insect Physiol.*, **9**, 423-430.
- FUJISHITA, M. and ISHIZAKI, H. (1981): *J. Insect Physiol.*, **27**, 121-128.
- 堀江保宏・渡辺喜二郎・篠原栄子 (1971): 蚕糸研究, (78), 44-55.
- 伊藤智夫 (1983): 蚕の栄養と人工飼料, p. 298, 日本蚕糸新聞出版局, 東京.
- ITO, T. and HORIE, Y. (1966): *Annot. Zool. Jpn.*, **39**, 1-6.
- 伊藤智夫・堀江保宏・渡辺喜二郎 (1972): 蚕試報, **25**, 219-234.

- 伊藤智夫・堀江保宏・渡辺喜二郎・高宮邦夫・古山三夫・宮林満男・長島政喜 (1974): 農化誌, **48**, 403-407.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951): J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
- 小河原一憲・小沢民治 (1978): 茨城蚕試報, **32**, 1-7.
- 小河原一憲・小沢民治 (1980): 茨城蚕試報, **34**, 1-3.
- SAKURAI, S. (1983): J. Insect Physiol., **29**, 919-932.
- STEELE, C. G. H. (1978): In "Comparative Endocrinology" (Gaillard, P. J. and Boer, H. H., eds.), pp. 327-330, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- 竹田 敏 (1988): 蚕試報, **30**, 553-567.
- TAKEDA, S. (1988): J. Seric. Sci. Jpn., **57**, 415-424.
- 竹田 敏・木内 信・上田 悟 (1986): 蚕試報, **30**, 361-374.
- TRUMAN, J. W. (1972): J. Insect Physiol., **57**, 805-820.
- 上田 悟・木村良二・鈴木 清 (1969): 蚕試報, **23**, 255-293.
- 鷲田純彦 (1981a): 日蚕雑, **50**, 134-140.
- 鷲田純彦 (1981b): 日蚕雑, **50**, 506-512.