

家蚕幼虫におけるアンモニア窒素の代謝・利用
に関する生理・生化学的研究

平山 力

目次

緒言	1
第1章 アンモニア窒素の窒素栄養源としての有効性	7
材料と方法	8
結果	17
考察	29
摘要	32
第2章 終齢幼虫におけるアンモニア同化経路	34
材料と方法	36
結果	40
考察	50
摘要	54
第3章 グルタミン酸合成酵素の精製と性質	56
材料と方法	57
結果	61
考察	77
摘要	80
第4章 飼料に依存した尿素の利用・代謝特性	81
材料と方法	82

結果	85
考察	91
摘要	94

第5章 カイコの尿素代謝に関わるウレアーゼの起源とその生

化学的・酵素学的性質	96
材料と方法	97
結果	103
考察	123
摘要	127

総合考察	128
------	-----

総括	137
----	-----

文献	144
----	-----

緒言

近年、我が国の養蚕業は、従事者の高齢化、後継者不足等により繭生産の著しい減少が続き、その結果、養蚕業のみならず製糸業の衰退をももたらしている。このような現状を打開するためには、繭生産性の飛躍的な向上と規模拡大により農家の競争力を高める必要がある。しかしながら、現行の桑を利用した養蚕技術体系には限界があり、人工飼料を活用した全く新しい技術システムを構築することが必要になっている。そのような中で、高価な桑葉粉末を全く含まず、畜産用飼料素材を主原料とする低コスト人工飼料が開発され、さらにこれを忌避せずに摂取して成長する広食性蚕品種が育成されたことから全齢人工飼料育技術の実用化の機運が高まってきている (Shinbo and Yanagawa, 1994)。しかし一方で、全齢人工飼料育は従来の桑葉飼育に比べ、繭層生産性が劣ることが桑葉粉末を含む人工飼料を用いて飼育試験が行われていた頃から指摘されており (水沢ら, 1977)、繭層生産効率が高い人工飼料の開発が課題となっている。繭層生産効率の高い人工飼料を設計・開発するためにはまず、蚕の栄養生理に関する基礎的な研究、特に繭層生産性に関連する各種栄養素の要求について質的・量的な解明が必要とされている。とりわけカイコは飼料から吸収したアミノ酸の約 70%を絹糸タンパク質の合成へ利用していることから、飼料中に添加するタンパク質・アミノ酸に対する栄養要求や代謝機構の解明が非常に重要な課題として認識されている (伊藤, 1983)。

アミノ酸の栄養要求に関する研究は、他の栄養素の場合と同じく合成飼料を用いて行われている。アミノ酸混合物の入った合成飼料から、1

種類ずつアミノ酸を欠如させ、カイコが成長できずに死亡すれば、そのアミノ酸は必須であるとみなされる。絹糸タンパク質のような特定のタンパク質を極めて多量に合成していることから、カイコのアミノ酸要求性は他の昆虫と違うのではないかと以前考えられたこともあったが、基本的には他の昆虫と変わらないことが分かっている（伊藤,1983）。すなわち、必須アミノ酸としてはアルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリンの 10 種類であった。これに準必須アミノ酸としてプロリンが加わる。また、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）のうちどちらか 1 種類は必要とされている。

一方で、絹糸タンパク質の合成は、ほぼ 5 齢期間中に限って特異的に起きているため、カイコに特徴的なアミノ酸の栄養・代謝に関する生理・生化学的な研究は主に 5 齢幼虫を用いて進められてきた。その結果、アミノ酸の栄養に関してカイコ独自と思われる栄養要求性がみられることが明らかにされている。5 齢期のカイコに対してアミノ酸混合物の配合比を変えた飼料を与え、繭を作らせた場合、酸性アミノ酸や非必須アミノ酸の添加量を増加させると標準の飼料に比べ繭層生産が良好になったが、10 種の必須アミノ酸混合物を増加するとかえって繭層生産量は低下した（伊藤ら, 1967）。同じようにアミノ酸飼料で 5 齢のカイコを飼育した場合、飼料の EA/TA 比（必須アミノ酸/全アミノ酸比）が低い方が絹糸腺の成長が良好となる一方で、中腸などの組織の成長は、EA/TA 比が高い方が優れていることが報告されている（渡辺・堀江, 1979）。非必須アミノ酸（酸性アミノ酸を含む）の要求性が絹糸腺で高いのは、絹糸タンパク質のアミノ酸組成が通常のタンパク質の組成と大きく異なる

ることに起因すると思われる。すなわち、絹糸タンパク質フィブロインはグリシン、アラニン、セリン、チロシンの4種の非必須アミノ酸で約90%が構成されており、このことが実際のカイコのアミノ酸代謝にも大きく反映される。5 齢期間においては、飼料に由来する必須アミノ酸の多くは非必須アミノ酸へ転換され、最終的には主に繭層のグリシン、アラニン、セリンの合成に利用されることが知られている（堀江ら, 1978）。例えば繭層のグリシンは、その80%以上が5 齢期間中に他のアミノ酸から生合成されたものである。また、5 齢期間の絹糸腺、脂肪体、中腸でアミノ基転移酵素（アミノトランスフェラーゼ）の活性・代謝が強く（小出ら, 1955, 1956; Fukuda and Hayashi, 1958）、アラニンやグリシンの活発な合成を保証している。絹糸腺における絹糸タンパク質合成の活性化に伴って、5 齢期の非必須アミノ酸の合成量（要求量）が非常に高くなっている点は、他の動物には見られないカイコの窒素代謝における特徴であると言えよう。

ところで、ヒト、ブタ、ラット、ニワトリ等の単胃性（monogastric）動物において、アンモニウム塩や尿素のような非タンパク性窒素化合物が、飼料中の非必須アミノ酸の代用になることが知られている（Liu et al. 1955; Richards, 1972; Yoshizawa et al., 1973; Okumura et al., 1979; 唐沢, 1986）。アンモニウム塩や尿素のように腸管内のバクテリア等により容易にアンモニアに分解される非タンパク性窒素化合物は、主にアンモニアの形で吸収・代謝される。本来アンモニアは生体にとって有毒であり、これらの動物では発生したアンモニアの大部分を尿素あるいは尿酸の形で解毒・排泄している。しかし、飼料に添加した非タンパク性窒素の一部は、アンモニアの形で腸管から吸収された後、動物組織中のグルタミ

ン酸脱水素酵素によってグルタミン酸のアミノ基に取り込まれ、その後アミノ転移反応により各種の非必須アミノ酸の合成に利用されるものと考えられている。非タンパク性窒素化合物の動物組織タンパク質への取込量について詳細に解析された結果、特にタンパク質が不足するような低栄養条件下でこの非タンパク性窒素の利用が活発であることが判明している (Niiyama et al, 1978; 田中, 1988)。

カイコにおいてはこのような栄養学・飼料学的な試みはほとんど行われてこなかった。しかし、先に記述したように 5 齢のカイコでは非必須アミノ酸の要求量が高く、また飼料への非必須アミノ酸の添加量の増加により絹糸タンパク質の合成が促進されることから、もし安価なアンモニウム塩や尿素が高価な非必須アミノ酸混合物の代替物になりうるならば、実用的な飼料添加剤として繭層生産性の改善に効果を発揮する可能性がある。

また、カイコ生体内におけるアンモニアの発生やその解毒の機構に関する基礎的な代謝生理学についてもこれまでほとんど研究がなされていない。カイコ生体内におけるアンモニアの発生について実際に観察されたのは比較的最近になってからである。カイコを桑葉で飼育した場合には吐糸期になると体液中にウレアーゼ活性が検出されるようになり、体液中の尿素がアンモニアへ分解される (山田ら, 1984)。一方で、カイコを人工飼料で飼育した場合には、ウレアーゼ活性が存在しないために体液中に多量の尿素が蓄積してしまうことが知られている (山田ら, 1983b)。カイコの尿素代謝の解明が進めば、人工飼料育が桑葉育に比べ繭層生産性が低下するという育蚕上の問題点の解決にも通じる可能性があるが、尿素代謝の実態についてはこれまでほとんど検討されず、不明

な点が多い。

このように、アミノ酸代謝を中心とするカイコの栄養生理学の発展にはめざましいものがあるものの、アミノ酸以外の非タンパク性窒素化合物の代謝や利用に関してはほとんど解明されていないのが現状である。本論文では、以上のような背景に基づき、カイコの終齢幼虫におけるアンモニア窒素の代謝・利用について、生理・生化学的手法を用いて解析を行うことにした。

まず、第 1 章において、飼料に添加されたアンモニウム塩の窒素栄養源としての有効性について検討するとともに、経口あるいは直接体内に投与されたアンモニア窒素の各組織への取り込みについて調査した。その結果、特に 5 齢後半期において、アンモニア窒素の多くが絹糸タンパク質へ取り込まれ利用されることが判明した。そこで、第 2 章において、アンモニアの同化代謝に関与する酵素系の存在とその役割について検討した。第 3 章では、第 2 章においてアンモニア同化への関与が示唆されたグルタミン酸合成酵素を精製し、その性質について調べるとともに、同酵素活性とアンモニア同化活性の関係について追求した。第 4 章では、尿素の利用・代謝におよぼす飼料の影響について詳細に検討し、尿素の代謝・利用に関与するウレアーゼ活性の重要性について明らかにした。さらに第 5 章において、このウレアーゼの起源と性質について生化学的・免疫学的手法を用いて解析を行った。

以上の結果、カイコにおいてこれまで動物で知られていなかったアンモニア窒素再利用システムの存在が明らかにされ、このアンモニア同化機構の生理的な機能および繭生産における実用上の意義・重要性について考察を行った。

本論文の取りまとめにあたり、懇切なご指導とご教示を賜った東京大学大学院農学生命科学研究科小林正彦教授に深甚の謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、種々のご教示と激励を頂いた農林水産省蚕糸昆虫農業技術研究所人工飼料研究室前室長新保博博士（現農林水産技術会議事務局）、同現室長中村匡利博士、同元主任研究官渡辺喜二郎氏に厚く御礼申し上げます。さらに、タンパク質解析の手法を丁寧にご教授頂いた当研究所齊藤準博士、種々の実験にご協力頂いた同人工飼料研究室杉村雅広博士、非常勤職員櫛山まゆみさん、有益なご助言を頂いた同人工飼料研究室今野浩太郎氏に厚く感謝いたします。

第 1 章

アンモニア窒素の窒素栄養源としての有効性

昆虫ではアンモニア窒素の利用に関する研究は比較的少ないものの、いくつか興味深い報告がなされている。ゾウムシの一種 *Caryedes brasiliensis* は、その寄主植物 *Dioclea megacarpa* に大量に含まれるアミノ酸、カナバニンを吸収・代謝する過程で発生するアンモニアをアミノ酸の合成に利用していることが知られている (Rosenthal *et al.*, 1983, 1985)。さらに、ゴキブリやアブラムシが細胞内共生微生物の代謝系により、体内で発生するアンモニアの再利用を行っていることが明らかになってきている (石川, 1994)。また、必須アミノ酸のみを窒素源とする飼料でハマキガ *Agryrotaenia velutinana* やネッタイシマカ *Aedes aegypti* を飼育した場合に、アンモニウム塩を飼料へ添加することで成長や卵形成が促進されることが報告されており (Rock and King, 1967; Dimond *et al.*, 1956)、窒素栄養が不良な環境下ではアンモニア窒素が利用可能であることが示唆されている。しかし、どのくらいのアンモニア窒素が体内に取り込まれ、あるいは体内で発生し、そのうちどの程度が利用可能なのか、また、アンモニア窒素は主にどのような器官やタンパク質に取り込まれ利用されるのかといった詳細な解析は行われていない。

緒言で述べたように、非必須アミノ酸と同じようにアンモニア窒素に絹糸タンパク質の窒素源としての有効性が認められるか否かは実用的な面からも興味深い点である。そこで、本章においては、窒素源として必

須アミノ酸のみを含む合成飼料（以下、「基本飼料」と称する）にアンモニウム塩を加えた場合に、おもに絹糸腺の成長に関してグルタミン酸と同様な成長促進効果がみられるか比較検討した。また、その場合の体液中のタンパク質やアミノ酸に現れる影響についても調査した。さらに、飼料に添加したアンモニア窒素のアミノ窒素への変換について、アミノ窒素の収支を測定することにより検討し、最後に、 $[^{15}\text{N}]$ 標識アンモニウム塩を用いて、実際にカイコ体内に取り込まれたアンモニア窒素の代謝運命について量的に解析した。

材料と方法

供試蚕品種

用いた蚕品種は広食性品種の日 601・602×中 602・603（通称：しんあさざり）である。1-4 齢を市販の人工飼料（シルクメイト、日本農産工業）で飼育した後、5 齢脱皮直後（以後「5 齢起蚕」と称する）の雄だけを用いて、以下に述べる試験用飼料で飼育実験を行った。飼育温度は 25℃とした。

飼育試験 1

必須アミノ酸のみを窒素源として含む基本飼料（Basic diet）あるいはこれにアンモニウム塩を添加したもので 5 齢起蚕から飼育を行った。Table 1 は用いた飼料の必須アミノ酸混合物及び各種アンモニウム塩の

添加量を示したものであり、Table 2 はこれらの飼料の Pre-mixture の組成を示した。試験飼料で 5 齢起蚕から 5 齢 5 日齢までの 5 日間飼育し、体重を測定後に解剖を行った。各試料区 10 頭ずつ用いた。絹糸腺とそれ以外の体組織に分けそれぞれ、0.85% KCl 溶液でよく洗浄し、濾紙で水分をよく吸い取ってから秤量した。

飼育試験 2

Table 3 の飼料を飼育試験に用いた。5 齢起蚕時に各飼料区 100 頭ずつを供試して、熟蚕当日（全体の 50% 以上が吐糸を開始する日とした）まで飼育を行った。その間毎日、各区 5 頭を無作為に選んで、体重を測定し、体液を氷冷したマイクロチューブに採取した後、解剖して絹糸腺を採取しその重量を測定した。採取した体液は、10,000g で 5 分間遠心し、血球を取り除いた後、アミノ酸、タンパク質の定量に供した。また、5 齢 5 日齢のカイコから採取した体液についてはアミノ酸の組成分析も行った。

体液成分の分析

タンパク質の定量は標準タンパクとして牛血清アルブミンを用いて、BCA タンパク質定量キット(Pierce, Co)を使用して行った。全遊離アミノ酸の定量は、標準アミノ酸としてロイシンを用いて、ニンヒドリン反応によって行った（蒲生，1980）。アミノ酸組成の分析はアミノ酸自動分析装置（日立 L-8500 型）を用いて、リチウム緩衝液による生体液分析モードによって行った。採取した体液に 4 倍量の 4% スルフォサリチル酸を加え、タンパク質を遠心分離により取り除いた後、上清を 0.02N

Table 1. Composition of diets (1)

Substances	%of dry diet					
	Diet					
	Base	Ammonium Citrate	Ammonium Acetate	Ammonium Phosphate	Ammonium Sulfate	Ammonium Chloride
Pre-mixture	43.96	43.96	43.96	43.96	43.96	43.96
Essential amino acid mixture	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Ammonium citrate dibasic	0	6.8	0	0	0	0
Ammonium acetate	0	0	4.6	0	0	0
Ammonium dihydrogen phosphate	0	0	0	6.9	0	0
Ammonium sulfate	0	0	0	0	4.0	0
Ammonium chloride	0	0	0	0	0	3.2
Cellulose powder	47.54	40.74	42.94	40.64	43.54	44.34
(Total)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
Vitamin B mixture	Added	Added	Added	Added	Added	Added
Antiseptic	Added	Added	Added	Added	Added	Added
Distilled water	2,5ml/g	2,5ml/g	2,5ml/g	2,5ml/g	2,5ml/g	2,5ml/g

Table 2. Composition of pre-mixture

Substances	Amount (g)
Potato starch	100
Sucrose	100
Soybean oil	30
Salt mixture*	41.6
β -Sitosterol	3
Ascorbic acid	20
Citric acid	40
Agar	100
Chrologenic acid	3
Sorbic acid	2
Total	439.6

*Amount of salts added to mixture: K_2HPO_4 , 22.5g; $CaCO_3$, 10g; KCl, 5g; $MgSO_4$, 3g; $FePO_4 \cdot 4H_2O$, 1g; $ZnCl_2$, 0.1g

Table 3. Composition of diets (2)

Substances	% of dry diet		
	Base	Diet +Glu	+NH ₃
Pre-mixture	43.96	43.96	43.96
Essential amino acid mixture	8.5	8.5	8.5
Potassium glutamate	0	11.1	0
Diammonium citrate dibasic	0	0	6.8
Cellulose powder	47.54	36.44	40.74
(Total)	(100)	(100)	(100)
Vitamin B mixture	Added	Added	Added
Antiseptic	Added	Added	Added
Distilled water	2.5ml/g diet	2.5ml/g diet	2.5ml/g diet

塩酸で希釈し、分析に供した。

アミノ窒素の量的収支の測定

試験は堀江ら(1978)の方法に準じて行った。試験には 3 種類の飼料 (Table 3) を用い、各飼料につき 1 区 10 頭の 3 連で 30 頭を供試した。5 齢起蚕から 5 日間飼育し、起蚕、5 日齢幼虫及び飼育期間中毎日回収した残餌、糞を凍結乾燥し、乾物量を測定した後、粉末にした。アミノ酸分析を行うため、調製した乾燥粉末試料の一定量に 5ml の 6N 塩酸を加えて、減圧下で 110°C、22 時間加水分解を行った。分解終了後、50°C に加温したエバポレーターにより塩酸を除去し、蒸発乾固した。蒸発乾固した試料を 0.02N の塩酸で溶解・希釈後、アミノ酸自動分析装置 (日立 L-8500 型) を用いて、ナトリウム緩衝液による加水分解分析モードによりアミノ酸の分析・定量を行った。各飼料のアミノ酸含有量をその乾物量に乗じて、試料中の総含量を求めた。最終的には、各試料中の各アミノ酸の総含量を幼虫 1 頭あたりの窒素 mg 当量に換算し、アミノ酸窒素の収支について検討した。

¹⁵N 標識アンモニウム塩を用いたトレーサー実験 1

用いた標識化合物は [¹⁵N]酢酸アンモニウム (日本酸素製) である。この試験では、[¹⁵N]酢酸アンモニウムをアンモニウム塩として添加した飼料 (Table 1 を参照) を用いて飼育試験を行った。5 齢起蚕から 10 頭を供試して 5 日間飼育を行ったが、この間の排糞量と食下量を測定するため、糞と残餌を回収し、凍結乾燥した。試験最終日に、6 時間の絶食を行って、消化管中の栄養分がほぼ吸収されるまで待ってから解剖を

行い、体液、絹糸腺、消化管、及びそれ以外の体組織を回収した。その際、幼虫の皮膚や足を傷つけてほぼ全体液を出血させ、出血前後の体重差を測定することにより 1 頭あたりの体液量を推定した。回収した組織（体液以外）は凍結乾燥後、粉末にして保存した。一定量の試料に 5% トリクロロ酢酸（TCA）を加え、ホモジナイザーでよく粉砕した後、4℃で一晩静置し生じた沈殿を 5% TCA で 2 回洗浄した。各試料の上清分画と沈殿分画のそれぞれについてその窒素含有量をマイクロケルダール法により測定した。さらに、各試料中に存在する全窒素を加水分解により硫酸アンモニウムに変換した後、これに含まれる ^{15}N を定量した（昭光通商（株）に分析を依頼）。 ^{15}N の分析は質量分析法により行った。 ^{15}N 定量後、その含有量を各試料の全重量に乗じて、試料中の ^{15}N 総含量を求めた。各試料に取り込まれた ^{15}N の総含量を幼虫一頭あたりの窒素 μg 当量に換算し、 ^{15}N の利用・分配について検討した。

^{15}N 標識アンモニウム塩を用いたトレーサー実験 2

用いた標識化合物は [^{15}N]酢酸アンモニウム（日本酸素製）であり、蒸留水で $10\ \mu\text{mol}/20\ \mu\text{l}$ になるように溶解・希釈し、幼虫に注射する投与液とした。5 齢起蚕から熟蚕（5 齢 6 日齢）まで Table 4 の人工飼料で飼育を行い、その後吐糸・営繭をさせるために簇に移して保護した。この間 2 日齢、5 日齢および 8 日齢（吐糸中）の各幼虫（各区、5-10 頭）を冷水中に浸漬することにより麻酔し、マイクロシリンジを用いて、[^{15}N]酢酸アンモニウムを血体腔に体重 1g あたり $2\ \mu\text{mol}$ 注射した。投与後、プラスチック製の容器中で 25℃、12 時間静置した後に解剖し、体液、絹糸腺（吐糸中の繭糸を含む）、それ以外の組織（皮膚、脂肪体、

Table 4. Composition of diet (3)

Substances	% of dry diet
Mulberry leaf powder	25.0
Soy bean meal, defatted	24.0
Potato starch	10.0
Sucrose	10.0
Soybean oil	3.0
Salt mixture*	4.16
β -Sitosterol	0.3
Ascorbic acid	2.0
Citric acid	4.0
Agar	10.0
Cellulose powder	7.34
Sorbic acid	0.2
(Total)	(100.0)
Vitamin B mixture	Added
Antiseptic	Added
Distilled water	2.5ml/g diet

*Amount of salts added to mixture: K_2HPO_4 , 22.5g; $CaCO_3$, 10g; KCl, 5g; $MgSO_4$, 3g; $FePO_4 \cdot 4H_2O$, 1g; $ZnCl_2$, 0.1g

筋肉、消化管など)に分別した。各組織は 0.85% KCl でよく洗浄して、付着した体液を取り除いてから、サンプルチューブ中に採取した。また、 $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムを注射してから解剖するまでの間に排泄された糞を集めた(2日齢と5日齢の幼虫のみ)。この試験の場合、各試料は前述の試験のように凍結乾燥せず、凍結後そのまま 5% TCA を加え氷温下で磨砕した。また、以後の処理も若干改良した。すなわち、試料を磨砕後、磨砕液の一部を全窒素分析に供し、残りを遠心分離により沈殿させた後、沈殿を 5% TCA で 3 回洗浄し、さらにエタノール、エタノール・エーテル (3:1)、エーテルで順々に洗浄し、脂肪分を取り除いた。次に沈殿に 5% 過塩素酸 (PCA) を加え攪拌し、70°C、30 分加熱した後、遠心分離を行って上清を棄てた。さらに、70°C に加熱した 5% PCA で沈殿を 2 回洗浄し、核酸を除去した。体液、絹糸腺の場合、この時点で残っている沈殿をタンパク質分画として扱った。その他の組織の場合には、この沈殿にさらに 2.5N NaOH を加えて溶解させ、不溶性のキチンなどを除いた抽出液をタンパク質分画とした。試料中の ^{15}N の定量は先述した通り質量分析法により行った。非タンパク質成分中の ^{15}N 量は、試料中の全 ^{15}N 量からタンパク質分画中の ^{15}N 量を差し引いて求めた。

結果

基本飼料(必須アミノ酸飼料)へのアンモニウム塩添加がカイコの成長・体液成分におよぼす影響

10種類の必須アミノ酸のみを窒素源として含む飼料では、孵化幼虫はほとんど育たないことが知られている(伊藤・荒井, 1965)。今回の実験では、5齢起蚕からこれと同様な試験を行った。その結果、この基本飼料で飼育した場合に、途中で死ぬような個体は見られなかったが、体重等の各指標から判断して、通常の成長に比べ発育はかなり遅れているものと判断された。一方、この基本飼料に各種アンモニウム塩を窒素源として添加した場合には、一部のアンモニウム塩に明らかに成長促進効果がみられた(Table 5)。クエン酸アンモニウムと酢酸アンモニウムは顕著な効果を示し、5齢5日齢の時点で基本飼料に比べ絹糸腺は約2.5倍の成長をみせた。しかし、塩化アンモニウムや硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムはクエン酸アンモニウムや酢酸アンモニウムに比べるとほとんど成長促進効果はなかった。鳥類においても、アンモニウム塩の種類によって窒素源としての有効性に違いがあることが報告されている(唐沢、1986)。

以上の予備的な試験の結果、ある種のアンモニウム塩は窒素栄養源として有効であることが示唆された。アンモニウム塩の成長効果をグルタミン酸の場合と比較するために、基本飼料にクエン酸アンモニウムあるいはグルタミン酸カリウムを添加し、カイコの成長に及ぼす影響を比較・検討した。Fig.1Aは、試験飼料(Table 3)で飼育した場合の、5齢起蚕から熟蚕に至るまでの体重の変化を示している。必須アミノ酸だけ

Table 5. Effects of ammonium salts on the growth of the 5th-Instar larvae

Diet	Body weight (g/larva)	Integument (g/larva)	Silk glands (g/larva)
Base	2.48±0.16	0.63±0.03	0.22±0.02
Ammonium citrate	2.90±0.03	0.73±0.05	0.55±0.02
Ammonium acetate	2.83±0.26	0.71±0.06	0.55±0.08
Ammonium phosphate	1.99±0.12	0.55±0.01	0.24±0.02
Ammonium sulfate	2.24±0.12	0.56±0.02	0.33±0.05
Ammonium chloride	1.50±0.17	0.38±0.01	0.15±0.02

Each value represents the mean±S. D. of ten replications.

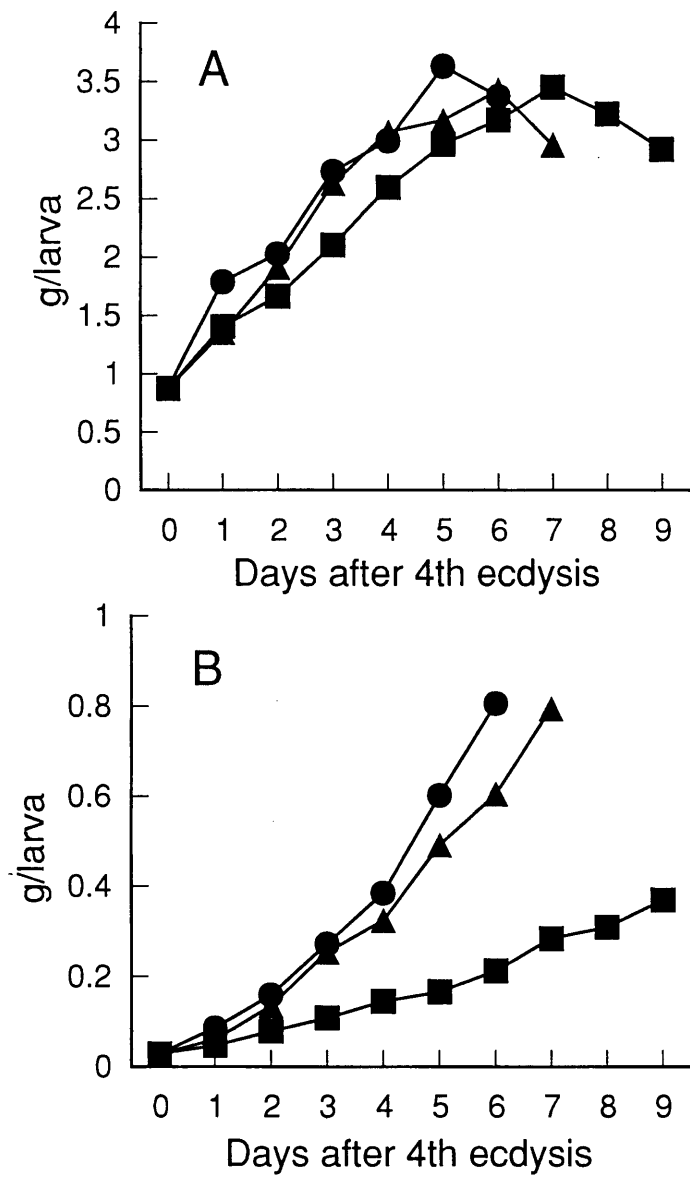


Fig. 1 . Effects of nitrogen sources in the diets on the weights of body (A) and silk glands (B)

Diet; —■— Base —●— +Glu —▲— +NH₃

Larvae just after 4th ecdysis were fed with base diet supplemented with glutamate or ammonium citrate.

を窒素源として含む基本飼料では、熟蚕になるまで9日間を要した。一方、基本飼料にクエン酸アンモニウムを添加した場合には7日で吐糸を開始した。グルタミン酸カリウムを加えた場合にはさらに成長が早まり、6日で熟蚕になった。いずれの場合も、熟蚕1、2日前に最高体重を記録したが、その値に飼料間で差は見られなかった。

絹糸腺重の変化は体重の変化に比べ、飼料間で著しい差が見られた (Fig. 1B)。いずれの飼料区でも、熟蚕当日に絹糸腺重の最大値を記録したが、その値は基本飼料ではわずか0.3gほどであったのに対し、クエン酸アンモニウムあるいはグルタミン酸カリウムを加えた場合には最大約0.8gまで成長した。

また、血液のタンパク質濃度の変化について調べた結果も、絹糸腺重の変化と同じような傾向が見られた (Fig. 2A)。すなわち、血液タンパク質の濃度は熟蚕になるまで次第に増加する傾向にあるが、基本飼料に比べるとクエン酸アンモニウムやグルタミン酸カリウムを加えた飼料区においてより顕著な増加をみせた。一方、血液遊離アミノ酸濃度変化にははっきりした傾向が見られず、飼料間で濃度差はなかった (Fig. 2B)。

しかしながら、5齢5日齢における血液遊離アミノ酸組成を調べた結果、飼料間で顕著な違いが見られた (Fig. 3)。10種類の必須アミノ酸だけを含む合成飼料で5齢幼虫を飼育すると、血液遊離アミノ酸組成が異常になることが報告されている (Ito and Inokuchi, 1992)。今回の試験においても、同じように基本飼料で飼育した場合、血液中の非必須アミノ酸が必須アミノ酸に比べ極端に少なくなった。ところが、基本飼料にクエン酸アンモニウムあるいはグルタミン酸カリウムを添加すると、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシンやフェニルアラニン等の

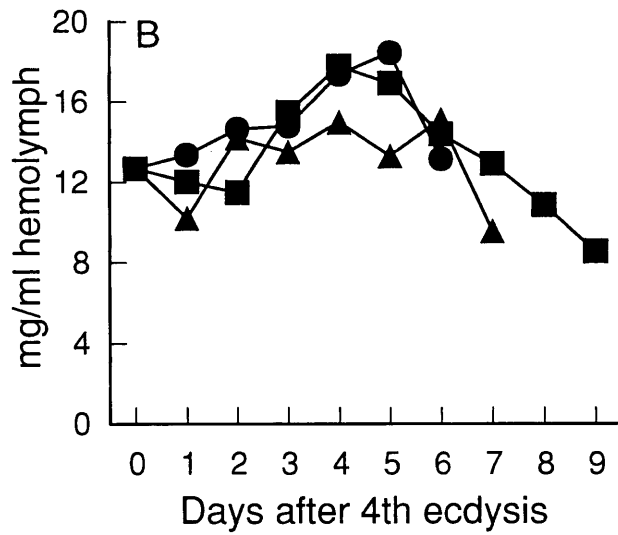
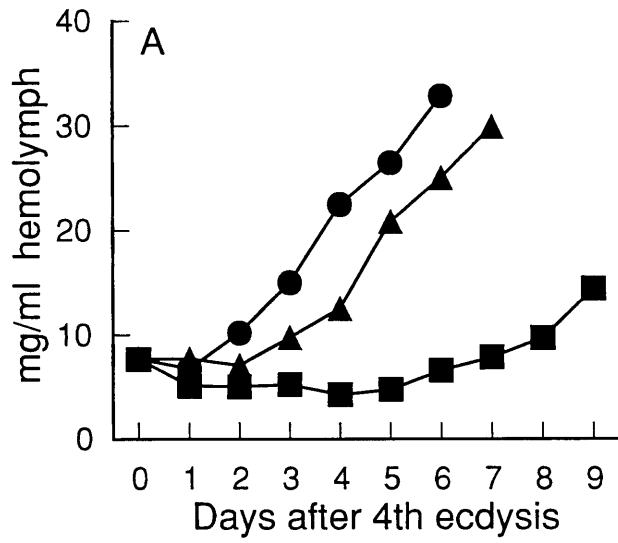


Fig. 2 Effects of nitrogen sources in the diets on the contents of protein (A) and free amino acids (B) in the hemolymph

Diet; —■— Base —●— +Glu —▲— +NH₃

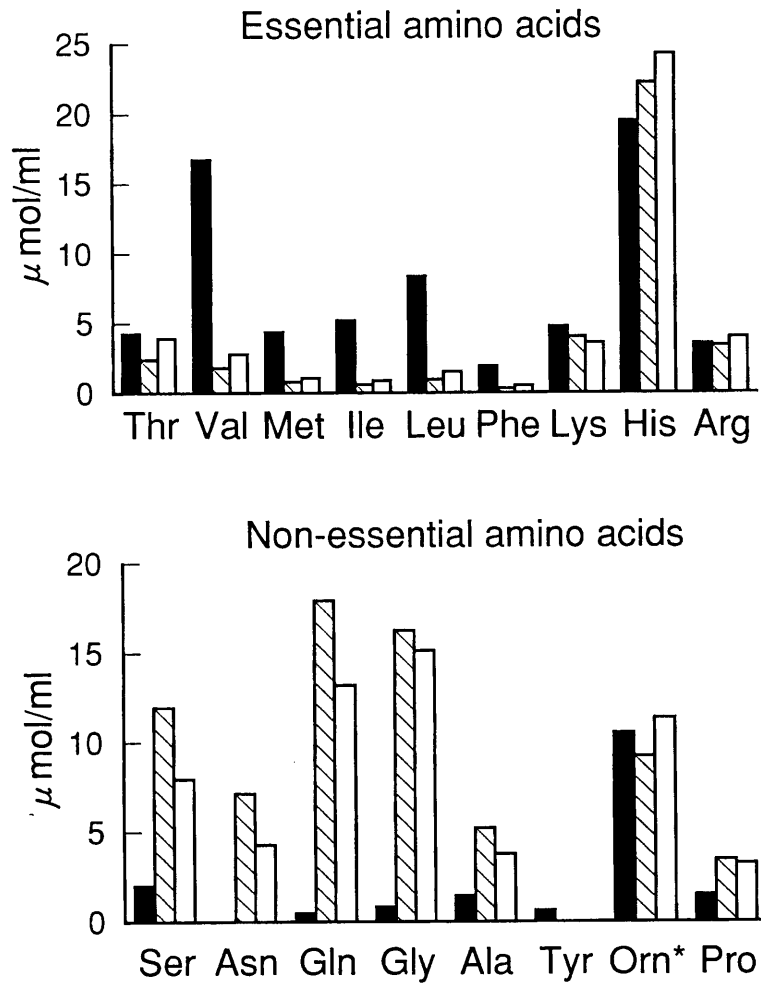


Fig. 3. The composition of free amino acids in the hemolymph of the silkworm fed diets containing different nitrogen sources (on day 5 of the 5th instar)

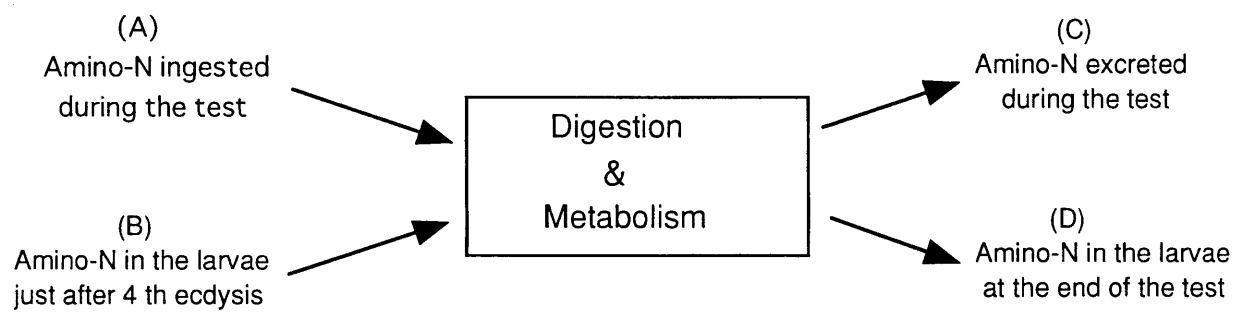
Diet; Base +Glu +NH₃
 * ; ornitine

必須アミノ酸が減って、セリン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、アラニンやプロリンなどの非必須アミノ酸が顕著に増加することが判明した。

アミノ窒素の量的収支

カイコによって摂取されたアミノ窒素は、一部はそのまま排泄されるが、多くは蚕体を構成するタンパク質中に同化される。しかし摂取された個々のアミノ酸の代謝運命は一様でなく、ある種のアミノ酸は吸収後の代謝の結果、他のアミノ酸へ変換されるため著しく減少することが知られている。その結果、逆に一部のアミノ酸は摂取した量よりも蚕体に存在する量が増えることが知られている（堀江ら，1978）。各アミノ酸の増減について、量的収支の計算式（ $C + D - A - B$, Fig. 4）より求め、個々のアミノ酸およびアミノ窒素全体の量的収支について示した（Table 6）。

この試験の結果、いずれの飼料で飼育した場合においても、いわゆる必須アミノ酸がヒスチジンをのぞいて減少し、代わって多くの非必須アミノ酸が増加した。この傾向は桑葉育のカイコについて報告された結果（堀江ら，1978）とよく似ている。すなわち、多くの必須アミノ酸は吸収後の代謝の結果、非必須アミノ酸へ変換されることを意味している。グルタミン酸カリウムを添加した場合は、必須アミノ酸からの非必須アミノ酸合成以外に、グルタミン酸からの非必須アミノ酸合成がかなりあることが推測される。本試験でもっとも注目すべき結果は、クエン酸アンモニウムを添加した場合に、アミノ窒素全体の量的収支が増加していることである。これはアンモニア窒素から、アミノ窒素への変換が起こ



$$\text{Amino-N balance} = (C) + (D) - (A) - (B)$$

Fig. 4. Calculation of Amino-N balance

Table 6. Amino-N balance of the silkworm larvae fed the diets containing different nitrogen sources

Amino acids	Balance of amino-N (mg/ larva)*		
	Base	Diet +Glu	+NH ₃
Thr	▲**0.95±0.00	▲1.56±0.01	▲1.16±0.06
Val	▲0.71±0.02	▲1.68±0.01	▲1.10±0.07
Met	▲0.13±0.01	▲0.29±0.10	▲0.14±0.02
Ile	▲0.72±0.01	▲1.50±0.01	▲1.02±0.05
Leu	▲1.27±0.00	▲2.72±0.02	▲1.84±0.09
Phe	▲0.59±0.02	▲1.07±0.01	▲0.78±0.05
Lys	▲0.81±0.01	▲1.39±0.05	▲0.95±0.06
Arg	▲3.79±0.03	▲7.01±0.16	▲4.92±0.23
His	0.04±0.02	0.07±0.07	0.20±0.06
Asp	0.69±0.01	2.10±0.02	1.49±0.02
Glu	0.82±0.02	▲12.26±0.23	1.70±0.07
Ser	0.74±0.01	2.85±0.16	2.16±0.03
Gly	1.65±0.05	6.38±0.56	4.71±0.47
Ala	1.22±0.03	3.92±0.33	3.09±0.32
Cys	0.14±0.01	0.28±0.06	0.27±0.03
Tyr	0.39±0.00	1.12±0.02	0.89±0.06
Pro	0.47±0.03	1.01±0.07	0.78±0.01
Total	▲2.81±0.19	▲11.74±0.80	3.37±0.98

*; Balance of each amino-N was calculated according to the formula shown in the fig. 4.

**; ▲means that the value was negative.

Values are expressed as mean±S.D. of three replications consisting 10 larvae each.

っていることを強く示唆する。この場合、非必須アミノ酸の増加が全体のアミノ窒素の増加につながっており、アンモニア窒素はグリシンやアラニンのような非必須アミノ酸の合成に利用されるものと推定された。他の2つの飼料の場合、アミノ窒素の収支が負になっており、アミノ酸から他の窒素化合物への転換があったことを示している。

飼料に添加したアンモニア窒素の利用・分配

5 齢起蚕から 5 日間にわたって飼料から経口摂取した ^{15}N 酢酸アンモニウムの利用・分配について調べた。各組織の TCA 沈殿および上清分画に存在する ^{15}N を測定し、その値を経口摂取した ^{15}N 量に対するパーセントで示した (Fig. 5)。経口摂取した ^{15}N 量の 97.3% がいずれかの試料中に回収された。このうち、約 50% が排泄された糞中に、残りは蚕体に留存していた。 ^{15}N の多くは各組織の沈殿分画に取り込まれていたが、その分布量は組織によって大きく違っていた。最大の取り込みは絹糸腺にみられ、ついで体組織（皮膚、脂肪体、筋肉を含む）であった。特に絹糸腺の TCA 沈殿分画に取り込まれたものは、ほとんどが絹糸タンパク質を構成するアミノ窒素として存在しているものと考えられる。一方、血液や消化管に存在する ^{15}N は少なかった。

5 齢の発育時期によるアンモニア窒素の利用・分配

5 齢 2 日齢、5 日齢、8 日齢の各時期にそれぞれ ^{15}N 酢酸アンモニウムを注射し、12 時間後に各組織のタンパク質および非タンパク質分画に存在する ^{15}N 量を測定し、その値を投与量に対するパーセントで示した (Fig. 6)。5 齢のいずれの時期においても、投与した ^{15}N のほとんど

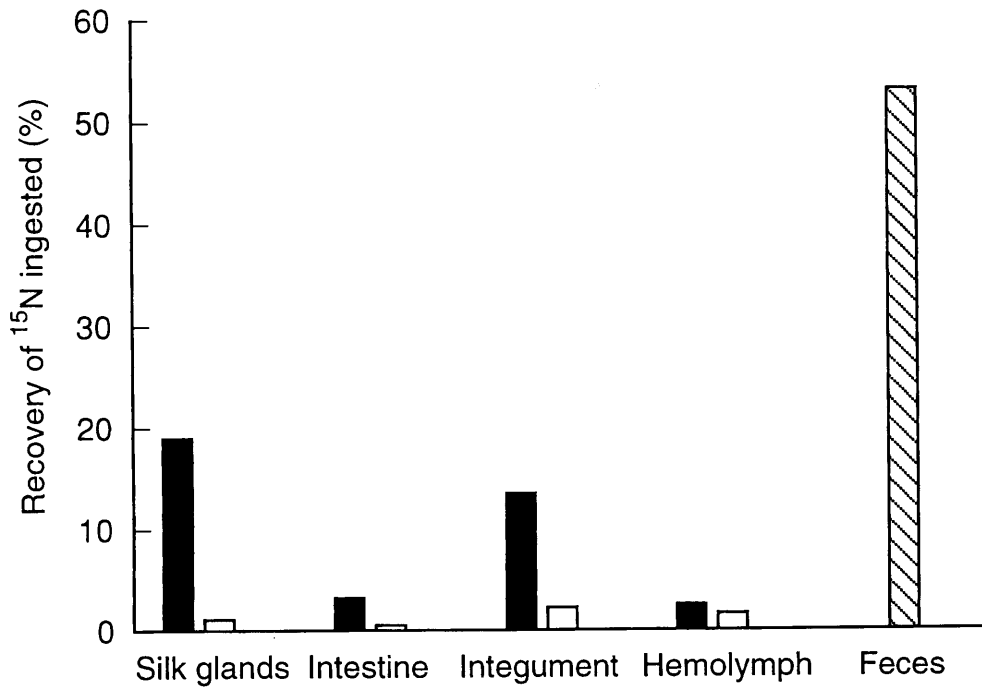


Fig. 5. Distribution of ^{15}N in the silkworm larvae fed the diet containing ^{15}N -ammonium acetate.

Protein*
 Non-protein**
 Feces

* ; precipitate by treatment with 5% TCA

** ; supernatant by treatment with 5% TCA

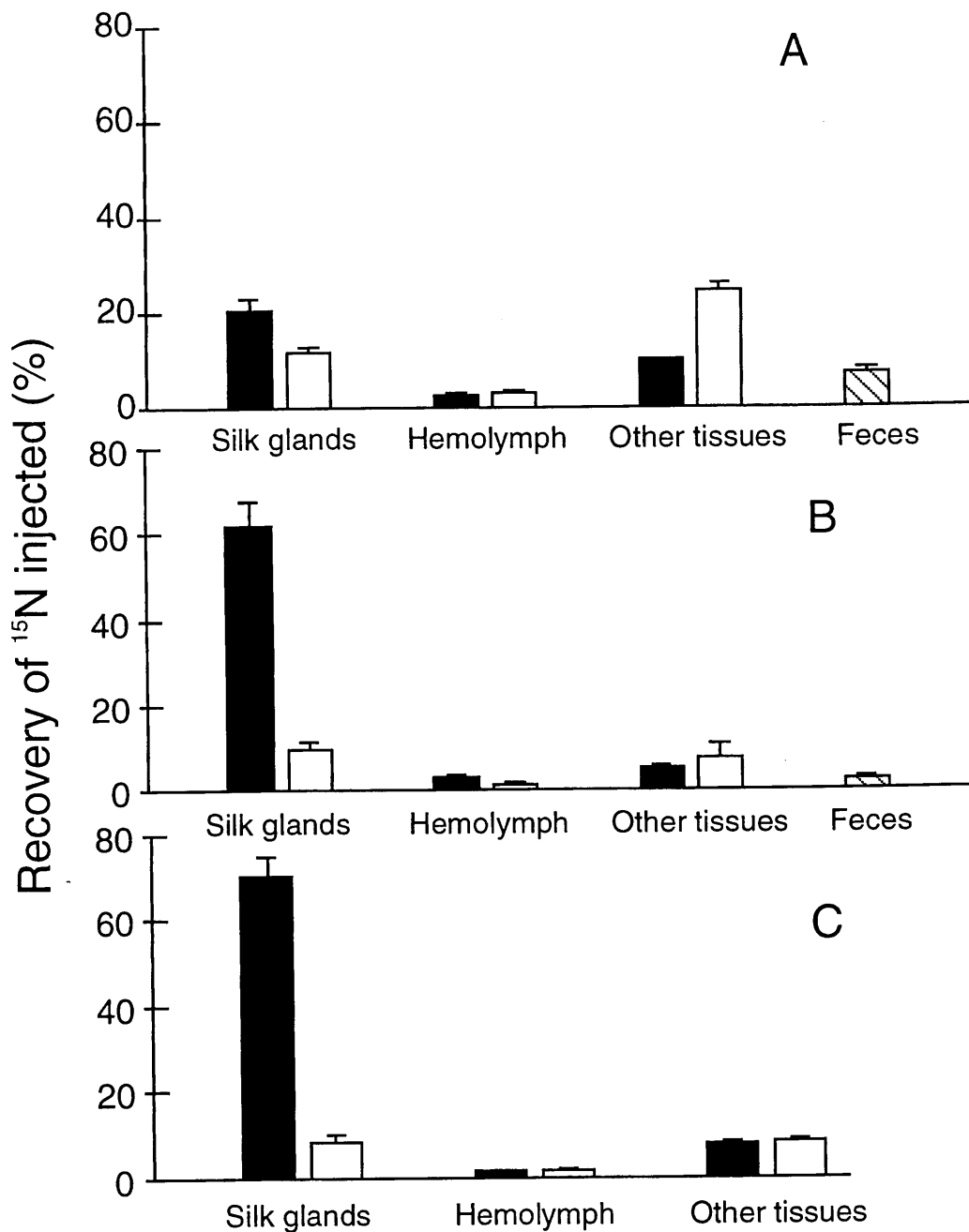


Fig. 6. Distribution of ^{15}N in the silkworm larvae 12hr after injection with ^{15}N - ammonium acetate at 2 days (A), 5 days (B), and 8 days (C) after 4th ecdysis.

Values are expressed as percentage of recovery of initial injected dose and represent the mean \pm S. D. (n=3).

■ Protein □ Non-protein ▨ Feces

がカイコ組織中に回収された。糞中への排泄が可能な 5 齢 2 日齢、5 日齢の時期でも糞中の ^{15}N 量は全 ^{15}N の 10% に満たなかった。 ^{15}N の各組織への取り込み様相は幼虫の発育時期によって異なっていた。5 齢 2 日齢の時期では、 ^{15}N のタンパク質分画への取り込みは 5 日齢、8 日齢の時期に比べはるかに少なく、絹糸腺や体液以外の「その他の組織中」の非タンパク質成分として存在しているものが最も多かった。5 日齢及び 8 日齢の時点では、絹糸腺のタンパク質分画中に存在する ^{15}N が最も多く、それぞれ全体の 60% 及び 70% 以上を占めていた。いずれの時期においても、体液中に存在する ^{15}N は極めて少なかった。

考察

栄養価の低いアミノ酸混合飼料あるいはタンパク質飼料に、制限要因となっているアミノ酸を添加するとカイコの成長が促進されることが報告されている（伊藤・荒井, 1965; Ito and Inokuchi, 1992）。同じように、栄養価が完全ではない必須アミノ酸飼料にアンモニウム塩を添加した場合に、カイコの成長が促進されるか否かで、添加したアンモニウム塩の有効性の評価が可能であろうと考えた。本章の栄養試験の結果、クエン酸アンモニウムはグルタミン酸カリウムに匹敵するほどの栄養効果があることが推測された。アンモニウム塩の添加は、最初に期待したとおり、絹糸腺の成長に対して顕著な効果を示した（Fig. 1B）。飼料中の非必須

アミノ酸の混合物を多くすると絹糸腺の成長が促進されることが報告されている（渡辺・堀江，1979）。今回の場合、飼料中のアンモニア窒素を利用して、グリシン、アラニンやセリン等の絹糸タンパク質の原料となる非必須アミノ酸の合成が行われ、絹糸タンパク質の合成が促進された結果、絹糸腺が増大したものと解釈できる。また、アンモニウム塩の添加により、絹糸腺の成長に加え、体液タンパク質の合成も著しく促進されており（Fig. 2A）、体液タンパク質合成にもアンモニア窒素が利用されたことを示唆している。カイコにおいては、飼料の栄養状態が体液アミノ酸組成に大きく影響することが知られている（井口，1970; Horie and Watanabe, 1983; Ito and Inokuchi, 1992）。今回、アンモニウム塩やグルタミン酸カリウムを必須アミノ酸飼料に添加すると、体液アミノ酸の組成が顕著に改善されたが（Fig. 3）、この結果はグルタミン酸やアンモニウム塩を利用して、非必須アミノ酸の合成が起こっていることを強く示唆する。また、アミノ窒素の収支測定試験の結果もアンモニア窒素の非必須アミノ酸への変換を強く示唆した（Table 6）。

以上の実験結果はカイコにおけるアンモニア窒素の利用を示唆しているが、この結果からはアンモニア窒素が実際の窒素源としてどの組織にどれだけ取り込まれるかといった量的な評価をすることはできない。そこで、 $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムをトレーサーに用いた実験により、アンモニア窒素の代謝運命について検討を行った。非常に高濃度のアンモニウム塩を飼料に添加し、経口から摂取させたにもかかわらず、飼料に含まれていたアンモニア窒素の約 50% が吸収され、その多くが蚕体の窒素源として利用されていた（Fig. 5）。カイコ幼虫の消化管内は強アルカリ性になっているので（守山ら，1984）、摂取されたアンモニウム塩は

毒性の強い遊離のアンモニアの状態が存在するものと推定される。したがって、カイコにはこの毒性のアンモニアを吸収後、速やかに解毒・固定する機構があるものと考えられる。また、経口ではなく直接血液中に ^{15}N 酢酸アンモニウムを投与した場合には、さらに ^{15}N の利用率が高く、特に5齢後半において絹糸形成に著しく利用されることが判明した (Fig 6)。同じように、放射性グリシンを用いた実験において、主に5齢期の後半に投与したグリシンが絹糸形成に利用されることが報告されている (稲垣・山下, 1983)。以上の結果は、カイコの5齢の後期に、絹糸タンパクの合成が特に活発である事実をよく反映している。一方、5齢前半に ^{15}N 酢酸アンモニウムを投与した場合には、 ^{15}N は蚕体の非タンパク成分にかなり存在していたが (Fig 6A)、実際にどのような物質に利用されているか今後検討する必要がある。

経口投与した場合と同様、血液中に投与されたアンモニアについても、これを速やかに解毒し、同化する機構がカイコに備わっているはずであるが、今の時点ではその機構については不明である。グルタミン合成酵素 (GS) がカイコの組織中に見いだされること (Seshachlam *et al.* 1992)、体液中に多量のグルタミンが存在すること (Gamo *et al.* 1978; Ito and Inokuchi, 1992) から、カイコにおけるアンモニア窒素同化の最初のステップは GS によるグルタミン合成である可能性が考えられる。このルートがアンモニアの解毒の重要な手段のひとつであることは多くの生物においても知られている (唐沢, 1986; 森, 1991)。実際、今回の試験において、飼料へのアンモニウム塩添加が体液グルタミンの増加をもたらした (Fig. 3)。しかし、動物においてはグルタミンのアミド位に取り込まれたアンモニア窒素をさらに、別のアミノ酸に変換する機構は知

られていない。一方で哺乳動物等でみられるように、アンモニア窒素がグルタミン酸脱水素酵素により、直接グルタミン酸へ代謝されている可能性もある (Richards, 1972; 唐沢, 1986; 森, 1991)。そこで、次章においては、カイコにおけるアンモニア同化経路について検討することにした。

摘要

必須アミノ酸のみを窒素源とする人工飼料 (基本飼料) に各種アンモニウム塩を添加した試験飼料で 5 齢幼虫を飼育し、基本飼料と栄養価を比較した。栄養価の指標として体重、絹糸腺、その他組織の重量および生存率を調べた。アンモニウム塩の中ではクエン酸アンモニウムおよび酢酸アンモニウムに成長促進効果があった。クエン酸アンモニウムの添加はグルタミン酸とほぼ同等の有効性を示した。体液のアミノ酸組成を調べた結果、クエン酸アンモニウムの添加により、必須アミノ酸が減少し、非必須アミノ酸が大幅に増加することから、アンモニア窒素から非必須アミノ酸への転換が示唆された。カイコが摂取したアミノ態窒素と体内に新たに増加したアミノ態窒素の収支について化学量論的に調べたところ、アンモニウム塩を添加した飼料で飼育した場合、摂取した量よりもカイコ体内に蓄積した量の方が明らかに多くなっており、アンモニア窒素からアミノ酸の合成がカイコ体内で起きていることが判明した。さらに、 ^{15}N で標識された酢酸アンモニウムを添加した人工飼料を与え

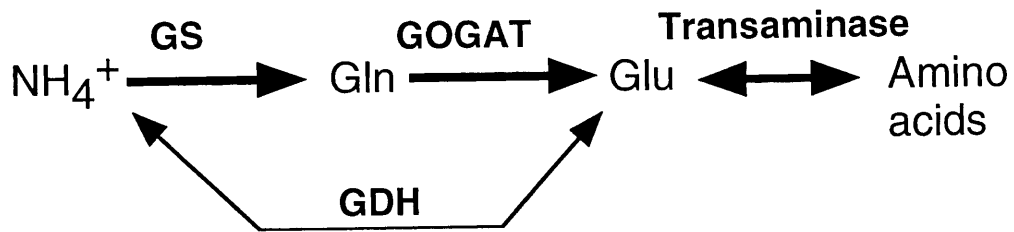
ると約 50% の ^{15}N が体内に取り込まれ、そのうちの 40% が絹糸タンパク質合成に利用されることが判った。また通常の人工飼料で飼育した 5 齢 2、5、8 日齢のカイコの体液中に [^{15}N] 酢酸アンモニウムを注射し、12 時間後の各組織への分布を調べたところ、注射した ^{15}N のうち 5 齢 2 日目では約 20% が、5 齢 5 日および 8 日目では 60-70% が絹糸タンパク質へ取り込まれ、5 齢の中・後期のほうがアンモニア窒素を効率的に絹糸タンパク質の合成に利用していることが判った。

第 2 章

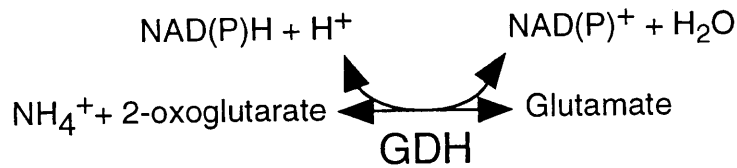
終齡幼虫におけるアンモニア同化経路

第 1 章において、経口投与された、あるいは直接血液中に投与されたアンモニア窒素を、カイコ 5 齢幼虫がタンパク質合成のための窒素源として利用していることを明らかにしたが、アンモニア窒素の同化経路については不明のままであった。マウス、ヒト等においても、タンパク質不足の条件下では飼料に添加したアンモニウム塩や生体内で発生したアンモニアをアミノ酸合成に利用できるようになるが、その代謝経路はまずグルタミン酸脱水素酵素(GDH)によるアンモニアからのグルタミン酸の合成にあると考えられている(森, 1991)。しかしながら、アミノ酸を十分に含む通常の飼料で飼育されたカイコであっても体液中に投与されたアンモニア窒素を極めて効率よくタンパク合成の窒素源として利用することから(第 1 章)、カイコは哺乳動物等とは異なるアンモニア同化経路を有する可能性もあると考えられる。高等植物や酵母、バクテリアの多くにおいては、GDH に加え、グルタミン合成酵素(GS)とグルタミン酸合成酵素(GOGAT)からなる GS/GOGAT 経路がアンモニア同化に関与していることが知られている(Brown *et al.*, 1974; Tyler, 1978; Mifflin and Lea, 1980; Oaks and Hirel, 1985. Fig.7 参照)。動物組織にも GS は普遍的に存在するが、GOGAT についての報告はこれまでなかった。

以上のような背景に基づいて、本章においては、GOGAT を含むアンモニア同化関連酵素の活性測定を行い、カイコにおけるアンモニア同化



1) GDH pathway



2) GS/GOGAT pathway

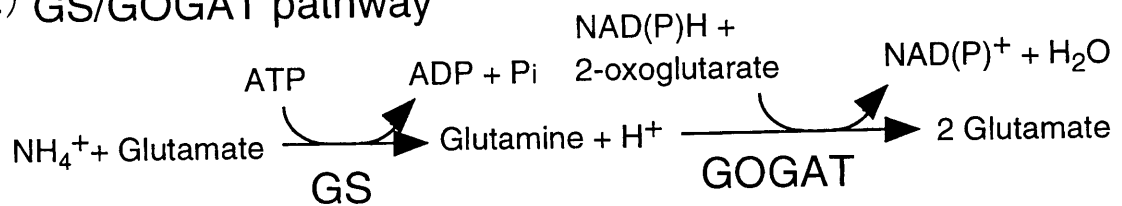


Fig. 7 Pathway of ammonia assimilation in micro organisms and plants

GS; glutamine synthase, GOGAT; glutamate synthase,
GDH; glutamate dehydrogenase

経路について検討した。その結果、カイコにおいても GDH および GS/GOGAT 経路の存在を示す結果が得られたので、さらに、このうち実際に生体内で機能している代謝経路がいずれであるかを明らかにするために、GS の特異的な阻害剤メチオニンスルフォキシミン(MS)を用いて、アンモニア代謝におよぼす *in vitro* および *in vivo* における影響について解析を行った。

材料と方法

供試蚕品種

用いた蚕品種は第 1 章で用いた日 601・602×中 602・603 である。1-4 齢を市販の人工飼料（シルクメイト、日本農産工業）で飼育した後、5 齢起蚕から雄だけを用いて、Table 4 に示した人工飼料で飼育した。この場合、5 齢 6 日齢で熟蚕となり吐糸を開始した。

アンモニア代謝関連酵素の組織からの抽出

5 齢 7 日齢のカイコを解剖し、脂肪体、中腸、後部絹糸腺を取り出し、0.85% KCl でよく洗浄した。濾紙で組織についた水分を吸い取り、ただちにドライアイス-アセトンにより凍結し、分析に用いるまで-80℃に保存した。各組織にその 3~10 倍量の 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.2) を加え、磨砕した。磨砕液は 4℃で 10,000g、15 分間遠心し、得られた上清を酵素測定液とした。各酵素の測定法は以下に記す。いずれの酵素反応も 30℃で行った。

グルタミン酸脱水素酵素(GDH)

基質の NADH の NAD⁺ への変換量を分光学的に測定した (Yamaya et al. 1984)。反応液は、0.2M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)、260mM NH₄Cl、5mM 2-オキソグルタル酸、0.16mM NADH、10mM CaCl₂ を含んでいる。反応は酵素液を加えて開始し、NADH の酸化量を 340nm の吸収の減少から求めた。酵素活性 1U は上記反応条件で、1 分間に 1 μmol の NADH を酸化する酵素量と定義した。

グルタミン合成酵素(GS)

本来 GS は *in vivo* では NH₄⁺ を基質とするが、一般的に組織の粗抽出液の活性を測定をする場合には、NH₄⁺ の代わりに NH₂OH を用いて、生成する γ-グルタミルヒドロキサム酸 (γ-GHA) を比色定量することが多い (Meister, 1985)。本実験においても、この方法を採用した。反応液は、50mM イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH7.2)、20mM MgCl₂、25mM 2-メルカプトエタノール、50mM L-グルタミン酸、100mM NH₂OH、10mM ATP を含んでいる。酵素液を加えて反応させた後、反応液にその 1.5 倍量の塩化鉄溶液 (0.37M FeCl₃、0.67N 塩酸、0.2M TCA) を加えて、反応を停止させた。遠心して除タンパク後、上清を用いて、生成した γ-GHA を 540nm で比色定量した。酵素活性 1U は上記反応条件で、1 分間に 1 μmol の γ-GHA を生成する酵素量と定義した。

グルタミン酸合成酵素(GOGAT)

GOGAT の活性はグルタミンからのグルタミン酸発生量を測定する

方法で行った。反応液は、100mM 燐酸緩衝液 (pH7.5)、2mM 2-オキソグルタル酸、10mM NADH、10mM グルタミンを含んでいる。酵素液を加えて反応を開始させ、4% スルフォサリチル酸を添加して反応を停止させた。遠心により除タンパク後、上清を 0.45 μ m のフィルターで濾過した。濾液の一部を用いてアミノ酸自動分析装置 (日立 L-8500A) により、グルタミン酸を定量した。酵素 1U は 1 分間にグルタミン酸 1 μ mol を合成する酵素量と定義した。

タンパク質測定法

組織中のタンパク質の定量は、Coomassie Plus タンパク質定量キット (Pierce, Co) を使用した。標準曲線は牛血清アルブミンを標準タンパクとして用いて作製した。

メチオニンスルフォキシミン (MS) 投与実験

MS は投与直前に蒸留水で 400mg/20 μ l になるように溶解、希釈した。MS の投与には主に 5 齢 8 日齢のカイコを用いたが、2 日齢や 5 日齢のカイコも一部使用した。氷水中で麻酔したカイコに、マイクロシリンジを用いて 1 頭あたり 400mg の MS を注射した。等量の蒸留水を投与したものを対照とした。投与から 2 時間後に解剖を行い、脂肪体、中腸、後部絹糸腺の各組織を取り出し、アンモニア代謝関連酵素の活性測定に供した。さらに、MS の投与後、0、2、4、6 および 12 時間後のそれぞれの時間に体液を採取し、グルタミンおよびアンモニアの濃度の測定に供した。採取した体液にはメラニン化を防ぐために、ただちに等量の 0.5% のアスコルビン酸溶液を加えた。また、5 齢 2 日齢および 5 日

齢のカイコに MS を投与した場合には、投与か 6 時間の間に排泄された糞を回収した。糞中のアンモニアがガス化して失われないように、採取後直ちに 2N 硫酸液を加えて、磨砕した。磨砕液を遠心し、得られた上清をアンモニア測定に供した。

さらに、5 齢 8 日齢の幼虫に、様々な濃度の MS (1 頭当たりそれぞれ 0, 5, 25, 100, 400, 1200mg) を投与し、投与後 6 時間後の体液中のグルタミンおよびアンモニアの濃度を測定した。また、その後の幼虫の発育経過を観察し、投与した MS 量と蛹化、成虫化の成否の関係について調査した。

アンモニア測定法

アンモニアの測定は市販のアンモニア測定試薬 (171-C、シグマ) を用いた。この試薬における測定原理は、NADPH および 2-オキソグルタル酸の入った試料中にグルタミン酸脱水素酵素を添加することにより、その試料中に存在するアンモニアをグルタミン酸へ変換させ、アンモニアの減少に比例して NADPH が酸化されることを利用している。NADPH の酸化量の測定は 340nm の吸光度の減少をモニターすることにより行った。

グルタミン測定法

グルタミンの測定はアミノ酸自動分析装置を用いて第 1 章の血液遊離アミノ酸組成の分析方法に準じて行った。

MS 存在下における ^{15}N 化合物の代謝の解析

用いた標識化合物は [^{15}N]酢酸アンモニウムおよび [^{15}N アミド]グルタミン（日本酸素製）である。 [^{15}N]酢酸アンモニウムおよび [^{15}N アミド]グルタミンをそれぞれ MS 水溶液（1200mg/20 μl ）で 10 μmol /20 μl および 5 μmol /20 μl 、になるように溶解・希釈し、幼虫に注射する投与液とした。また、対照として、MS を含まない ^{15}N 化合物の水溶液を投与液とした。

氷水麻醉した 5 齢 8 日齢の幼虫に、マイクロシリンジを用いて、 [^{15}N]酢酸アンモニウムおよび [^{15}N アミド]グルタミンをそれぞれ 10 μmol および 5 μmol 注射した。注射後 6 時間後に解剖し、体液、絹糸腺（吐糸中の繭糸を含む）、それ以外の組織（脂肪体、筋肉、消化管など）を採取した。第 1 章に述べた方法で各組織のタンパク質分画に存在する ^{15}N 量の測定を行った。

結果

アンモニア代謝関連酵素の存在

各組織における GDH、GS および GOGAT を Table 7 に示す。GDH はいずれの組織中にもかなり強い活性が認められた。GS は、後部絹糸腺にはほとんど活性が認められなかったが、中腸、脂肪体にはかなりの活性が存在していた。また、GOGAT については、いずれの組織にも活性が存在していたが、特に後部絹糸腺に非常に強い活性があり、組織の重量当たりの活性、総活性ともに他の組織に比べて極めて高かった。以上

Table 7. Distribution of enzymes involved in ammonia assimilation

Enzyme activities (U/g fresh wt.)			
Tissue	Enzyme		
	GDH	GS	GOGAT
Fat body	0.302±0.051	0.634±0.069	0.267±0.034
Midgut	4.391±1.212	1.018±0.107	0.381±0.102
Posterior silk glands	2.170±0.485	0.018±0.007	1.397±0.331

Enzyme activities (U/animal)			
Tissue	Enzyme		
	GDH	GS	GOGAT
Fat body	0.128±0.023	0.269±0.042	0.114±0.022
Midgut	0.627±0.241	0.143±0.021	0.052±0.014
Posterior silk glands	0.618±0.180	0.005±0.002	0.393±0.097

Values are expressed as mean±SD of five replications

の結果、カイコには GDH によるアンモニア同化経路に加え、高等植物や酵母、バクテリアと同じように GS/GOGAT 経路が存在することが推定された。しかし、アンモニア代謝に関連する酵素活性の分布は一様でなく、各組織ごとに代謝の役割分担があるように思われた。

アンモニア代謝に及ぼすメチオニンスルフォキシミン (MS) の影響

カイコが GS/GOGAT 経路によりアンモニアの同化を行っている可能性があるが、実際にこの代謝経路が生体内で機能しているか否かは、酵素活性だけでは判定することができない。そこで、グルタミン合成酵素の特異的な阻害剤メチオニンスルフォキシミン (MS) を投与することにより GS/GOGAT 経路を人為的に遮断させ、アンモニア代謝への影響を解析すれば、GS/GOGAT 経路が生体内において実際に機能しているか否か、またその重要性が評価できると考え、以下の実験を行った。

まず、5 齢 8 日齢のカイコに MS を注射し、組織中の GS が実際に阻害されることを *in vitro* における活性測定により確認した (Table 8)。いずれの組織においても GDH、GOGAT は MS の投与の影響をほとんど受けなかったが、中腸、脂肪体の各組織における GS は、MS 投与により対照の 1 割以下にまで活性が減少した。

次に、MS 投与の *in vivo* における影響を解析するため、5 齢 8 日齢の幼虫に MS 投与し、体液中のアンモニアおよびグルタミンの濃度変化を時間を追って調べた (Fig. 8)。MS 投与後、アンモニアは時間の経過とともに急激に増加し、12 時間後にはもとの 30 倍以上の値を示した。一方、グルタミンの方は時間とともに徐々に減少し、12 時間後にはもとの値の 1 割以下になった。5 齢 2 日齢あるいは 5 日齢に MS を投与した

Table 8. Effect of methionine sulfoximine (MS) on the activities of enzymes related to ammonia metabolism

GDH (U/g fresh wt.)		
Tissue	Control	+MS
Fat body	0.341±0.056	0.415±0.023 (122%)*
Midgut	5.804±0.271	5.490±0.946 (95%)
Posterior silk glands	1.609±0.625	2.350±0.328 (146%)

GS (U/g fresh wt.)		
Tissue	Control	+MS
Fat body	0.746±0.074	0.074±0.048 (10%)
Midgut	1.392±0.126	0.040±0.023 (3%)
Posterior silk glands	—	—

GOGAT (U/g fresh wt.)		
Tissue	Control	+MS
Fat body	0.314±0.073	0.400±0.082 (127%)
Midgut	0.227±0.032	0.224±0.065 (99%)
Posterior silk glands	1.413±0.210	1.414±0.136 (100%)

Values are expressed as mean±SD of five replications

*; Relative activities compared to the control are shown in parentheses.

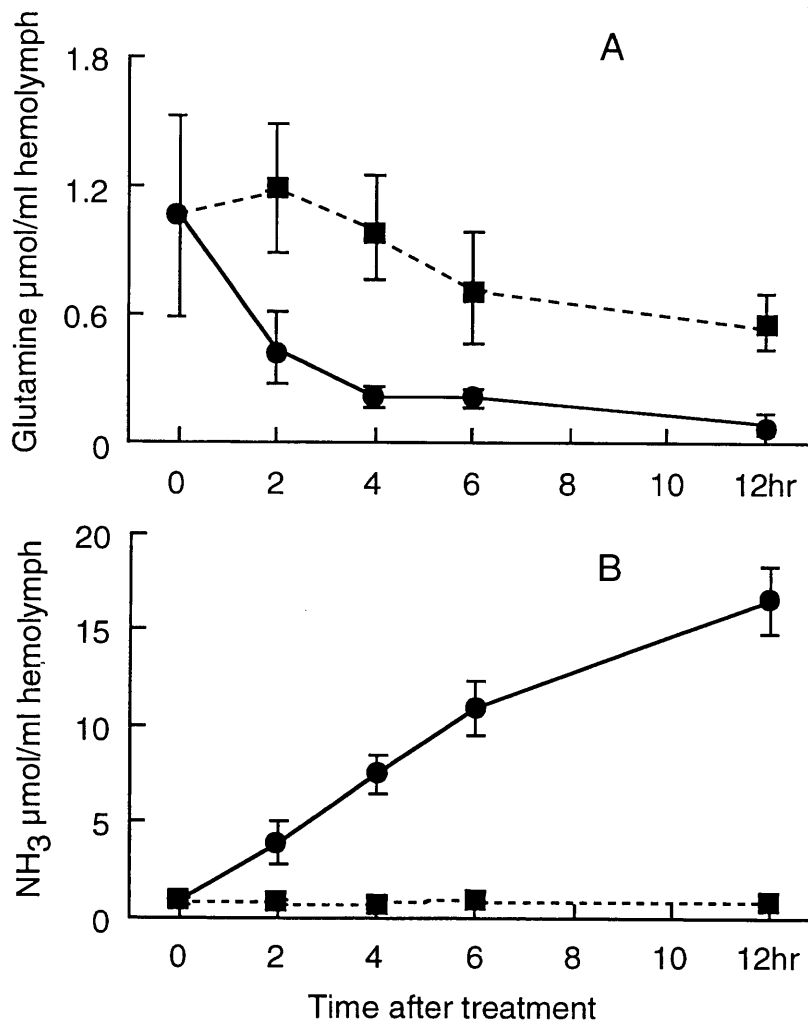


Fig 8. Time course changes of glutamine (A) and ammonia (B) concentrations in the hemolymph after injection of MS into silkworm larvae.

(●) :larvae injected with MS. (■): control larvae injected with distilled water.

Each point represents the mean \pm SD (n=5).

場合も、8日齢の場合と同様の影響が見られた（結果省略）。また、2日齢や5日齢にMSを投与した場合には糞中のアンモニアが急激に増加しており、発生したアンモニアを代謝・利用できずに、そのまま排泄してしまっていることがわかった（Fig. 9）。以上の結果は、5日齢期間のいずれの時期においても、カイコの体内において相当量のアンモニアが発生しており、それをまずグルタミンの形で解毒していることを示している。

さらに、様々な濃度のMS溶液を5日齢8日齢のカイコに注射し、投与後6時間後の血中アンモニアおよびグルタミンの濃度を比較した（Fig. 10）。1頭あたり25mg以上の投与でアンモニア濃度の増加が観察され、さらに投与量が増加するほど、アンモニア濃度の増加の程度は大きくなった。グルタミンの方は逆に、投与量が増えるほど濃度が減少した。また、MS投与量に依存して幼虫の変態が阻害され、100mg以上の投与ではすべての個体が営繭することなく、アンモニアによる中毒により死亡した（Table 9）。

さらに、MS存在下あるいは非存在下における ^{15}N 化合物（ ^{15}N 酢酸アンモニウムおよび ^{15}N アミドグルタミン）の代謝について比較調査した。各組織のタンパク質分画に存在する ^{15}N 量を測定し、その値を ^{15}N 投与量に対する割合で示した（Fig. 11）。MS非存在下では、 ^{15}N 酢酸アンモニウムに由来する ^{15}N の約60%が絹糸タンパク質中に取り込まれたが、MSの存在下では投与した ^{15}N のうち15%程度が絹糸タンパク質に存在したに過ぎなかった。また、体液や他組織中のタンパク質への取り込みもMSの存在下で半減した。一方、 ^{15}N アミドグルタミンの代謝に関しては、MS非存在下に比べMS存在下で幾分 ^{15}N の絹糸タンパク質への取り込みが減少してはいたが、 ^{15}N 酢酸アンモニウムの場合

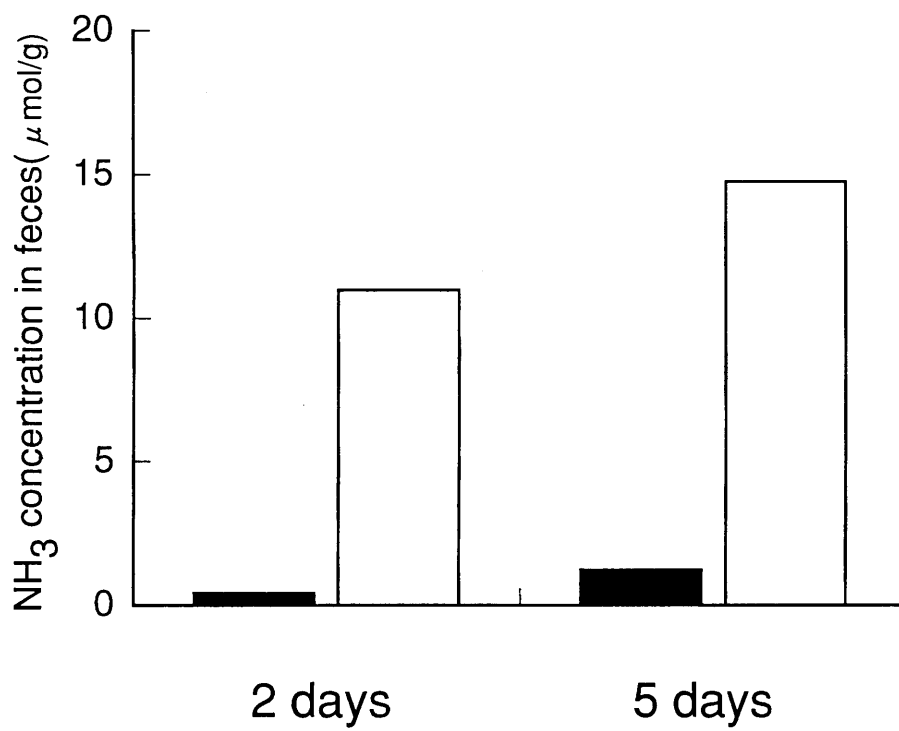


Fig 9. Effect of MS on ammonia concentration in the feces at 2 days and 5 days after the 4th ecdysis.

Solid bar: control larvae. Open bar: larvae injected with MS.

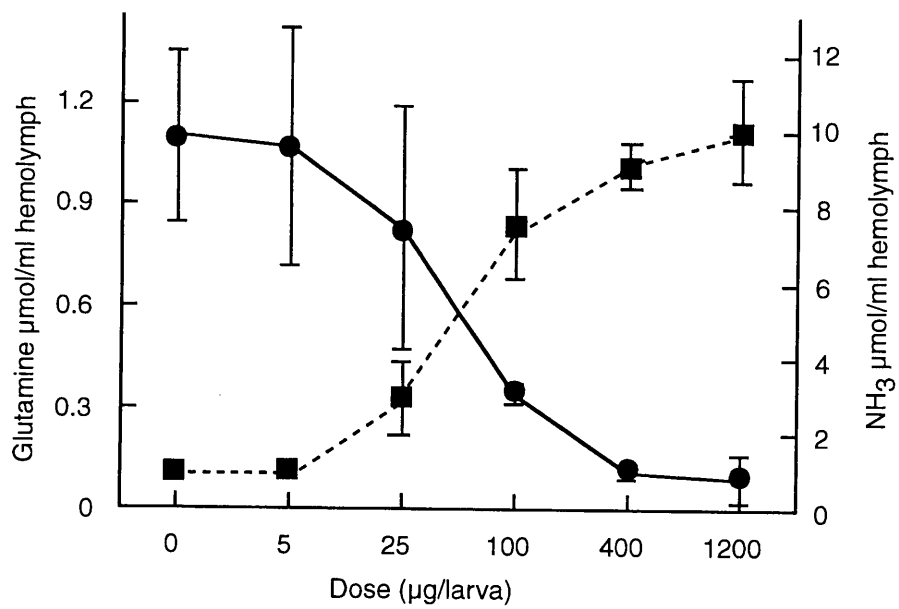


Fig 10. Effect of varying doses of MS on glutamine (●) and ammonia (■) concentrations in the hemolymph 4hr after injection into the silkworm larvae.

Each point represents the mean \pm SD (n=5).

Table 9. Effect of MS on cocooning and development of the silkworm

MS dose ($\mu\text{g}/\text{larva}$)	No. of larvae	Cocoons	Pupae	Adults
0	21	21	21	20
5	20	19	19	18
25	21	20	15	15
100	20	0	0	0
400	21	0	0	0

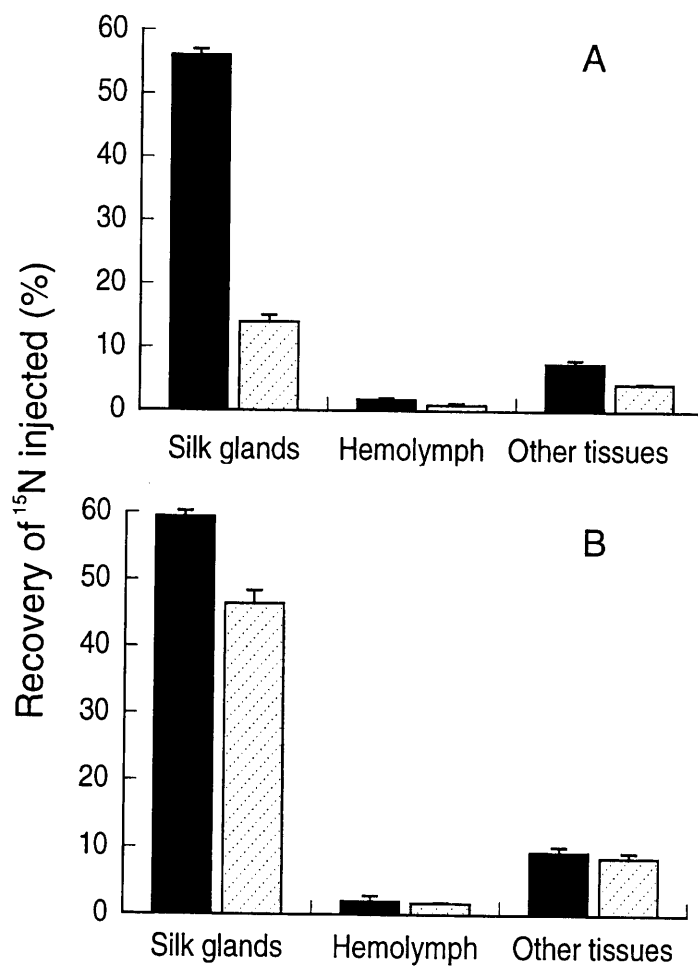


Fig. 11. Incorporation of ^{15}N - ammonium acetate (A) and ^{15}N -amide glutamine (B) into proteins in each tissue of the silkworm larvae 6hr after injection in the absence (solid bars) or presence (hatched bars) of MS.

Values are expressed as percentage of recovery of initial injected dose and represent the mean \pm SD (n=3).

に比べ、明らかに影響が少なかった。また、体液タンパク質や他組織中のタンパク質への取り込みについては全く影響を受けなかった。

考察

カイコにおけるアンモニア同化経路を明らかにするために、窒素代謝で中心的な役割を担っていると考えられる各組織中のアンモニア代謝関連酵素の活性測定を行った。その結果、酵母、多くの細菌類、一般高等植物でその存在と機能が明らかにされているグルタミン酸合成酵素 (GOGAT)の活性が検出された。これまで報告されている GOGAT は基質である電子供与体に対する特異性の違いから 3 種に分類されている (Suzuki and Gadall, 1984)。すなわち電子供与体として NADH を利用する酵素 (酵素番号 EC 1.4.1.14)、NADPH を利用する酵素 (酵素番号 EC 1.4.1.13) およびフェレドキシン (Fd) を利用する酵素 (酵素番号 EC 1.4.7.1) である。NADH-GOGAT は植物や酵母など主に真核生物に存在し、NADPH-GOGAT はバクテリアに広く分布している。Fd-GOGAT は光合成を行う生物に特有の酵素である。カイコ各組織に存在する GOGAT 活性を予備的に調べた際には、この 3 種類の酵素のうち、ほとんど NADH-GOGAT 活性のみが検出された (結果省略)。そこでカイコには NADH 依存型 GOGAT だけが存在すると判断し、本研究では NADH を用いて活性を測定し、その値を示している。

酵母や細菌、高等植物一般において、GOGAT はグルタミン合成酵素 (GS)とともに GS/GOGAT 経路を構成しており、この経路がアンモニア同化の主要な経路であることが明らかになっている (Brown *et al.*, 1974;

Tyler, 1978; Mifflin and Lea, 1980; Oaks and Hirel, 1985)。カイコに存在する GS/GOGAT 経路の機能を証明するため、GS に対する阻害剤メチオニンスルフォキシミン(MS)を投与してその影響を解析しようと試みた。MS は高等植物や微生物のアンモニア代謝の研究で広く利用されており、GS に対して極めて特異性が高いことが実証されている (Arima and Kumazawa, 1977; Lewis and Probyn, 1978; Fentem *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1983)。MS は GS タンパク質に強く結合し、非可逆的に不活性化してしまうが (Ronzio *et al.*, 1969)、もう一方のアンモニア同化経路であるグルタミン酸脱水素酵素(GDH)には全く影響がないことが知られている (Brenchley, 1973; Lewis and Probyn, 1978; Lewis *et al.*, 1983)。したがって、GS/GOGAT 経路が機能しない条件下で、GDH 単独の働きを見ることが出来る。

本研究においても、*in vitro* の実験から MS がカイコ GS を特異的に阻害することが確認された。次いで、MS の投与により体液中のグルタミンの減少と、同時にアンモニアの急激な増加がもたらされることが観察された (Fig. 8)。このことは GDH 単独の働きでは発生するアンモニアを解毒・代謝することはできないことを示しており、GS がアンモニアの同化の初期過程において非常に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

GS によって合成されたグルタミンは一般の動物においてはアンモニアの一時的な解毒中間体・運搬体であることが知られている。ほ乳類においてはグルタミンは肝臓グルタミナーゼにより速やかにアンモニアに再分解され、発生したアンモニアは最終的に尿素の形で排泄されてしまう (森, 1991)。一方、カイコにおいては、グルタミナーゼの活性はい

ずれの組織においても非常に微弱であった（結果省略）。また、 $[^{15}\text{N}]$ アンモニアの同化が MS の存在下では著しく阻害されるにもかかわらず、 $[^{15}\text{N}]$ アミド]グルタミンの同化はほとんど影響を受けなかった(Fig 11)。このことは、グルタミンのアミド位の窒素は、グルタミナーゼによる脱アミド反応と GDH によるアミノ化反応の組み合わせによってアミノ酸へ同化されるものではないことを示している。以上の結果を総合すると、アンモニアはグルタミンのアミド位に取り込まれた後は、GOGAT によりグルタミン酸に変換されるものと考えられ、カイコにおける主要なアンモニア同化経路は GS/GOGAT 経路であると結論付けた。

ところが、MS の投与は $[^{15}\text{N}]$ アンモニアの同化を完全に抑えることはできなかった。このことは、GS/GOGAT 経路に加えて GDH もある程度は機能している可能性も示唆する。カイコにおける GS、GDH の性質は明らかではないが、他の昆虫の GS や GDH の性質は一般の動物のものとよく似ていることが明らかにされている。すなわち、GDH のアンモニアに対する K_m 値は 10~600mM であり (Bursell, 1975; Male and storey, 1982; Prezioso *et al.*, 1985, Teller, 1988)、GS の K_m 値は 0.4mM 以下であって (Levenbook and Kuhn, 1962; Dowton and Kennedy, 1985)、GS の方が GDH に比べるとはるかにアンモニアに対する親和性が高いことが判明している。カイコの GS や GDH も他の昆虫と同様の性質であると仮定すると、通常のカイコ組織中のアンモニア濃度は非常に低いので、GDH は機能しうる状態にはないと推定される。GS は ATP を消費するため、GDH に比べエネルギー的には不利な面もあるが、低濃度のアンモニアを確実に解毒・同化するには有利であろう。一方、MS の投与や飼料への高濃度のアンモニアの添加などによって、組織のアンモニア濃

度が高くなるような非常事態には、GDH によりアンモニアの同化が可能になるものと考えられ、カイコはおかれた条件により、アンモニアの処理方法を切り替えて対処しているのではないかと考えられる。また、GDH はグルタミン酸をアンモニアと 2-オキソグルタル酸に分解する逆反応も触媒する両方向性の酵素であるので、アミノ酸が過剰な場合には逆にアミノ酸をアンモニアに分解する方向(脱アミノ化)に機能している可能性がある。

ところで、カイコ終齢幼虫の生体内ではその発育時期に関わらず、かなりのアンモニアが常に発生していることが明らかになった。先述したようにカイコの 5 齢体内では飼料に由来するアミノ酸（特に必須アミノ酸）の多くは最終的に絹糸タンパク質のもとになるグリシン、アラニン等の非必須アミノ酸へ変換される。この場合、アミノ酸の中にはアミノ基転移反応により直接他のアミノ酸へ変換されるものもあるが、アミノ酸酸化酵素などの作用によりアンモニアに分解後、代謝されるものも多いと思われる（森ら, 1997 参照）。したがって、5 齢 2 日および 5 日齢の摂食が盛んな時期において発生するアンモニアは、おもに飼料から摂取したアミノ酸に由来するものと推測される。一方、既に摂食を停止し、外から栄養を取り入れることができない 5 齢 8 日齢の時期にも、アンモニアの発生が極めて活発であった(Fig. 8)。カイコは摂食を停止した後も絹糸タンパク質を合成するが、この場合の絹糸タンパク質の窒素源は、蛹化に伴い不要となる組織から移行してくるものと考えられている（福田, 1951; Noguchi et al., 1974）。不要となった窒素化合物の中には一旦アンモニアにまで分解され、その後に絹糸タンパク質の合成に利用されるものがあるのではないかと推察される。

いずれの場合も、発生したアンモニアは一旦無毒のグルタミンの形に変換されて、体液を介して目的地まで運搬され、そこで再びアミノ酸や他の窒素化合物に変換されるものと考えられる。絹糸タンパク質の合成の活発な 5 齢後半時において、中腸や脂肪体で GS の活性が強かったが、後部絹糸腺にはほとんど GS 活性が存在していないことが明らかになった (Table 7)。逆に、アンモニア窒素を最終的に利用する後部絹糸腺において最も GOGAT の活性が強かった。このことは発生するアンモニアの再利用を行うため各組織の役割が分化し、合理的に機能していることを示すものであろう。

摘要

脂肪体、絹糸腺、中腸において植物や微生物のアンモニア同化に関わるグルタミン合成酵素(GS)、グルタミン酸合成酵素(GOGAT)およびグルタミン酸脱水素酵素(GDH)の活性が検出された。このことからカイコ体内におけるアンモニアの代謝経路としては、微生物や植物で知られる GS/GOGAT 経路および GDH 経路の 2 通りが考えられた。カイコにおける主要なアンモニア代謝経路を知るため、5 齢 7 日目のカイコ体液中に GS の特異的な阻害剤 (メチオニンスルフォキシミン; MS) を注射し、GS/GOGAT 経路を人為的に遮断することで GDH 経路だけが働きうる状態を作った。この結果、各組織の GS の活性が阻害されるため、体液中のグルタミンの減少が引き起こされたが、これに伴い体液中のアンモニアが顕著に増加した。このことは、脱アミノ反応により生じるアンモニ

アを GS によってグルタミンに変換していることを示すとともに、GDH によるアンモニアからのグルタミン酸への変換の系が弱いことを示唆している。注射する MS の量を増やすと、蓄積するアンモニアも増大し、その毒性により死亡する個体が現れた。5 齢 2 日および 5 日目に MS を投与した場合には糞中のアンモニアが著しく増大しており、発生したアンモニアを代謝せずにそのまま排泄していることがわかった。さらに、 ^{15}N 化合物を用いたトレーサー実験により MS のアンモニア代謝に及ぼす影響を調べた。MS を [^{15}N]酢酸アンモニウムと一緒に注射すると、 ^{15}N の絹糸タンパク質への取り込みは著しく阻害されたが、 [^{15}N]酢酸アンモニウムの代わりに [^{15}N アミド]グルタミンを投与した場合には、 ^{15}N の絹糸タンパク質への取り込みは MS による影響をほとんど受けなかった。以上の結果は、発生するアンモニアの主要な代謝経路が GS/GOGAT 経路であることを支持するものである。

第 3 章

グルタミン酸合成酵素の精製と性質

アンモニアが高濃度になる条件下ではグルタミン酸脱水素酵素(GDH)が機能している可能性は否定できないが、通常カイコ体内で発生するアンモニアの同化経路はグルタミン合成酵素(GS)とグルタミン酸合成酵素(GOGAT)からなる GS/GOGAT 経路であることが、第 2 章において強く示唆された。GS/GOGAT 経路を構成する酵素のうち、GS は一般生物に広く分布しているものの、GOGAT の動物組織における存在についてはこれまで不明であった。一方、植物や微生物のアンモニア代謝における GOGAT の重要性についてはよく知られており、既に多くの生物種から GOGAT が分離・精製され、その生化学・酵素学および分子生物学的性質が明らかになってきている (Curti *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1996; Vanoni and Curti, 1999)。

第 2 章において述べたように、絹糸タンパク質合成が活発な 5 齢後半時の後部絹糸腺に非常に強い NADH 依存型 GOGAT (NADH-GOGAT)活性の存在を認めた。アンモニア窒素を絹糸タンパク質の窒素源として有効に再利用する上で、本酵素の働きは非常に重要であると思われる。カイコにおける GOGAT の機能・役割についてより詳細に知るために、本酵素を分離・精製し、その性質について明らかにすることは極めて有効な手段である。また同時に、カイコ GOGAT と既知の GOGAT とを比較することにより、カイコ GOGAT の進化的な起源について考察できる可

能性がある。そこで、本章においては、最も活性の強い後部絹糸腺と、次に活性が強い脂肪体から GOGAT を精製し、その性質について検討した。さらに、5 齢期間中の各組織中の GOGAT 活性の変動について調査し、アンモニア代謝における GOGAT の役割について論じた。

材料と方法

供試蚕品種

用いた蚕品種は日 601・602×中 602・603 である。GOGAT の精製には、全齢を通じて市販人工飼料（シルクメイト、日本農産工業）で飼育した幼虫を用いた。また、GOGAT 活性の発育変動を調べる実験には、1～3 齢を市販人工飼料（シルクメイト、日本農産工業）で飼育した後、4 齢起蚕から Table 4 に示した人工飼料で飼育し雄幼虫を供試した。

GOGAT 活性の測定

酵素精製過程においては、基質 NADH の NAD^+ への変換量を分光学的に測定する方法を用いた。反応液は、100mM 燐酸緩衝液 (pH7.5)、2mM 2-オキソグルタル酸、2mM NADH、10mM グルタミンおよび酵素を含んでいる。反応は 30℃で行い、NADH の酸化量を 340nm の吸収の減少から求めた。酵素活性 1U は上記反応条件で、1 分間に 1 μmol の NADH を酸化する酵素量と定義した。Km 値や至適 pH を調べる際には、上記の反応液組成において 2-オキソグルタル酸、NADH、グルタミンの濃度

あるいは緩衝液の種類を変えた。

基質の 1 つである電子供与体の特異性を調べるために、一部の実験においては、第 2 章に述べた方法により GOGAT 活性を測定した。NADH の代わりに NADPH、フェレドキシン (Fd) を用いた。Fd は 12mM ジチオナイト、13.5mM 炭酸水素ナトリウム混合液により還元して使用した。

タンパク質濃度の測定

第 2 章で用いた方法に準じて測定した。

GOGAT の精製

5 齢 5、6 日齢のカイコから脂肪体および後部絹糸腺を集め、精製に用いるまで -80°C に保存した。酵素の精製は特に断らない限り、すべて 5°C 以下で行った。

1) 後部絹糸腺からの精製

約 50g の凍結した後部絹糸腺に 2 倍量の 50mM 磷酸緩衝液 (pH7.5) [0.1% 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA、2mM 2-オキソグルタル酸、10%グリセロール、200mM KCl、0.2mM PMSF を含む]を加え、磨砕した。磨砕後 22,000g、20 分間の遠心分離により、生じた沈殿を除去した。得られた上清をガーゼで濾過し、浮遊する脂肪分を除いて酵素粗抽出液とした。

この粗抽出液に、固形硫酸アンモニウムを添加し、33%飽和とした。 $22,000\text{g}$ 、20 分間の遠心分離を行って、生じた沈殿を除去した。上清に

さらに硫酸を加え 60%飽和とし、同様に遠心分離を行った。上清を廃棄した後、沈殿を緩衝液 A [50mM 磷酸緩衝液 (pH7.5)、0.1% 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA、2mM 2-オキシグルタル酸、10%グリセロール]に溶解した後、同じ緩衝液に対し透析し、硫酸を除去した。透析中に生じた不溶成分は遠心により除いた。

緩衝液 A で前もって平衡化しておいた Q-Sepharose HP カラム (ファルマシア、1.6×10cm) に上記の硫酸分画を添加した。タンパク質の溶出は流速 2ml/min で行い、280nm の吸光をモニターしながら 3ml ずつ分取した。カラムを緩衝液 A で十分に洗浄後、KCl の濃度を 0 から 0.5M まで直線的に上昇させることにより、GOGAT を溶出させた。酵素活性を含む画分を集め、緩衝液 A に対し一昼夜透析を行って KCl を除去した。

この透析液を、緩衝液 A で平衡化しておいた Blue-Sepharose FF カラム (ファルマシア、1.6×10cm) に添加した。カラムを緩衝液 A でよく洗浄後、吸着した酵素を 2mM NADH を含んだ同緩衝液により溶出させた (流速 1ml/min)。酵素活性のある画分を集め、ウルトラフリー-15 (ミリポア) を用いて限外濾過を行い濃縮した。

さらに Superdex 200HR カラム (ファルマシア、1.0×30cm) を HPLC (バイオ LC システム、トーソー) に接続し、室温でゲル濾過を行った。150mM KCl を含む緩衝液 A で平衡化した Superdex 200HR カラムに、上述の濃縮酵素液を添加した。流速 0.5ml/min で溶出を行い、0.5ml ずつ分取した。分取した酵素液は失活を防ぐため、直ちに氷水で冷やした。

2) 脂肪体からの精製

約 50g の脂肪体を出発材料にして、後部絹糸腺の場合と同様の手法により精製を行った。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびサブユニット分子量の推定

Laemmli (1970) の方法に準じて、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。ゲル濃度は 10% で、SDS を 0.1% 添加した。200V 定電圧で泳動を行った後、ゲル上のタンパク質を 0.25% のクマジーブリリアントブルー R250 (7% 酢酸、20% メタノールに溶解) で染色した。酵素を構成するサブユニットの分子量は、分子量マーカー (ファルマシア、高分子キャリブレーションキット) (ミオシン、212,000; α_2 -マクログロブリン、170,000; β -ガラクトシダーゼ、116,000; トランスフェリン、76,000; グルタミン酸脱水素酵素、53,000) を用いて推定した。

酵素分子量の測定

精製に用いた Superdex 200HR カラム (ファルマシア、1.0×30cm) からの溶出体積を分子量マーカー (フェリチン、440,000; γ -グロブリン、160,000; 牛血清アルブミン、67,000; 卵白アルブミン、45,000; ミオグロビン、18,000) を用いて校正し、GOGAT の分子量の推定を行った。

N 末端アミノ酸配列の分析

精製酵素標品を限外濾過により濃縮し SDS-PAGE に供した後、タンパク質を電氣的に PVDF 膜に転写した。クマジーブリリアントブルー R250 により染色された分子量 195,000 のバンドを膜から切り出し、気

相シークンサー（LF-3000、ベックマン）によりN末端アミノ酸の配列を決定した。

結果

後部絹糸腺 GOGAT の精製

後部絹糸腺の磨砕液を硫酸処理後、Q-Sepharose HP カラムに添加したところ、多くのタンパク質はカラムに吸着せずそのまま溶出してしまった。一方、後部絹糸腺 GOGAT はこのカラムによく吸着し、およそ 0.15M の KCl 濃度で溶出された (Fig. 12)。この陰イオン交換クロマトグラフィーにおいては、ほとんど活性の消失を受けずに GOGAT が回収され、非常に有効であった。Q-Sepharose HP カラムから溶出された GOGAT はさらに Blue-Sepharose FF カラムで精製を行った。Blue-Sepharose FF カラムは NADH を補酵素とする酵素の精製に有効であることが知られており、これまでいくつかの NADH-GOGAT の精製に使用されている (Matoh *et al.*, 1980; Chen and Cullimore, 1988; Hayakawa *et al.*, 1992)。この Blue-Sepharose FF カラムによる精製過程では、GOGAT 以外のタンパク質はほとんどこのカラムに吸着しないので非常に効率よく精製倍率を上げることが可能であった。しかし、この段階でも若干他のタンパク質の混在があったのでさらに Superdex 200 HR カラムを用いてゲル濾過による精製を行った。このカラムクロマトグラフィーでは左右対照形のきれいな溶出ピークが得られ、このタンパク質のピークと GOGAT 活性が

よく一致した (Fig. 13)。さらに、精製の各段階の分画中に存在するタンパク質を SDS-PAGE により視覚化したところ (Fig. 14)、ゲル濾過後の分画には1つのタンパク質バンドしかみられなかった。以上の結果から、この段階で GOGAT を単一成分にまで精製したものと判断した。精製の概要を Table 10 にまとめた。最終的には後部絹糸腺 50 g から、0.6mg の精製標品が得られ、精製倍率は 265 倍、収率は 14% であった。GOGAT は室温では不安定であるので、精製後濃縮して 50% グリセロール添加した 50mM 燐酸緩衝液 (pH7.5) 中で -80°C で保存した。

後部絹糸腺 GOGAT の性質

精製された酵素標品を用いて生化学・酵素学的な諸性質を調べた。

まず、SDS-PAGE の結果から絹糸腺 GOGAT のサブユニットの分子量が 195,000 であることが判明した (Fig. 14)。一方、本酵素が自然状態で存在する場合、その分子量は Superdex 200HR カラムからの溶出パターンから 190,000 であることが推定された (Fig. 15)。したがって、本酵素は単一のサブユニットからなる単量体であると結論された。

次に酵素学的な諸性質について検討した。反応液の pH を変化させて酵素活性に及ぼす pH の影響について調べたところ、絹糸腺 GOGAT の至適 pH は 7.0-7.8 付近であると判明した (Fig. 16)。次いで、電子供与体、アミノ基供与体、アミノ基受容体の各基質に対する特異性について調べた (Table 11)。既に、前章で述べたように、カイコの各組織に存在する GOGAT は NADH 依存型であろうと推測されていたが、精製された酵素を用いて調べた結果でも、NADH の代わりに NADPH やフェレドキシンを電子供与体として利用することはできないことが再確認された。

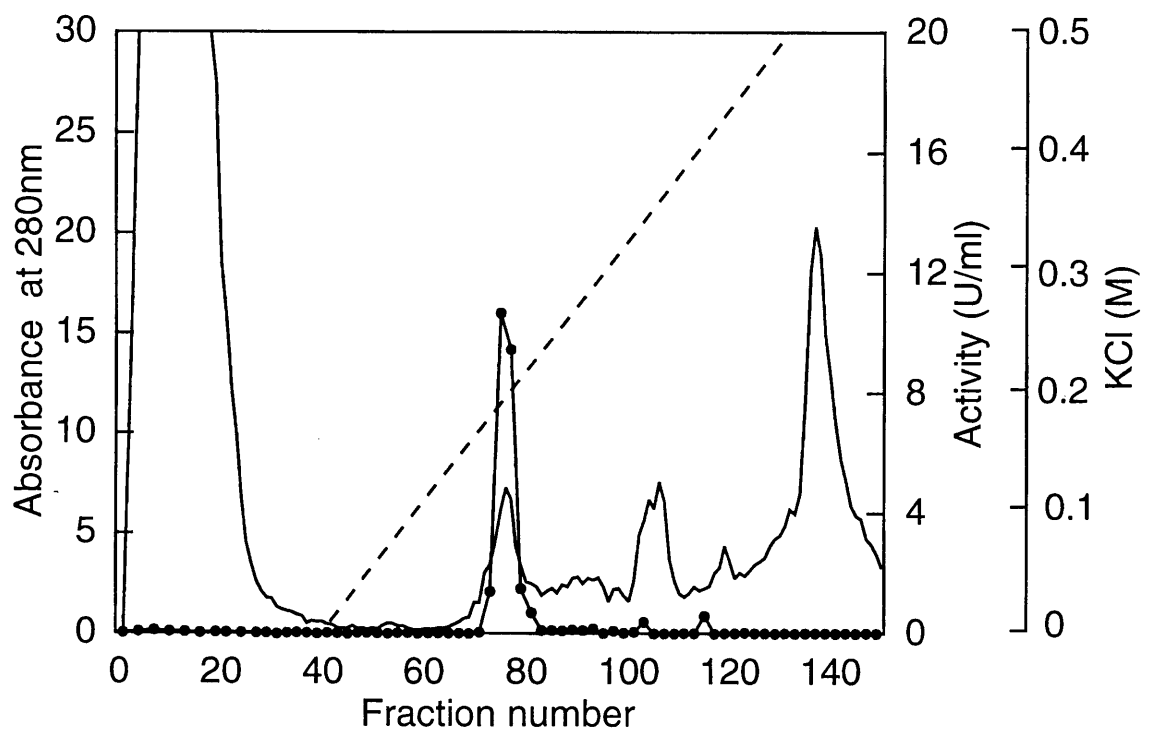


Fig 12. Elution profile of GOGAT activity on a Q-Sepharose HP15/10 ion-exchange column.

— : Absorbance at 280nm
 —●— : Enzyme activity
 - - - : KCl concentration

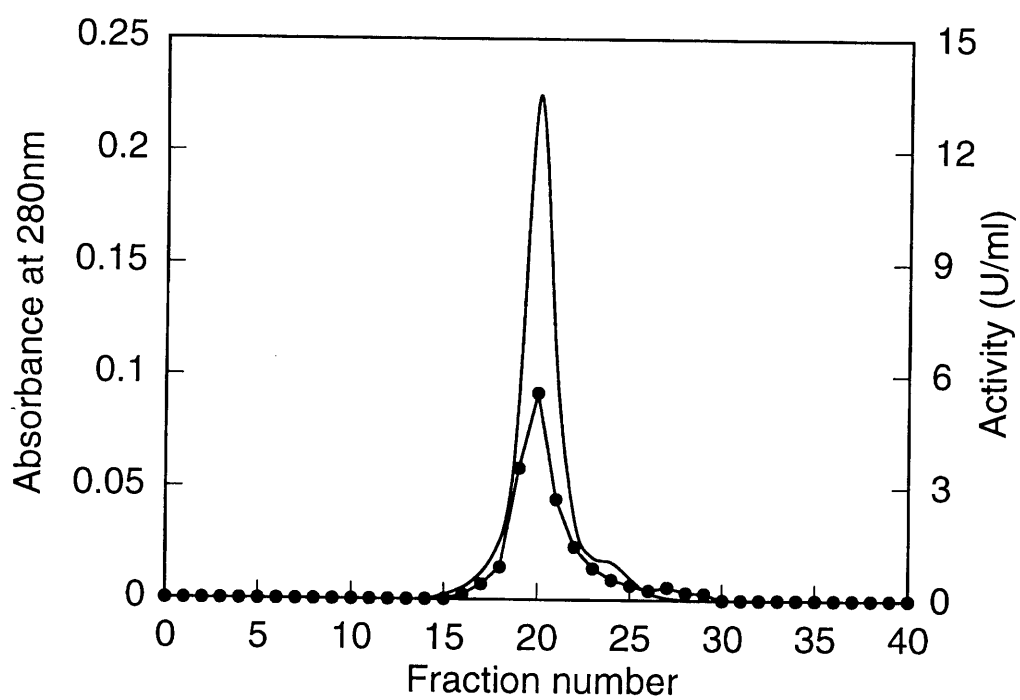


Fig 13. Elution profile of GOGAT activity on a Superdex 200HR gel filtration column.

— : Absorbance at 280nm

● : Enzyme activity

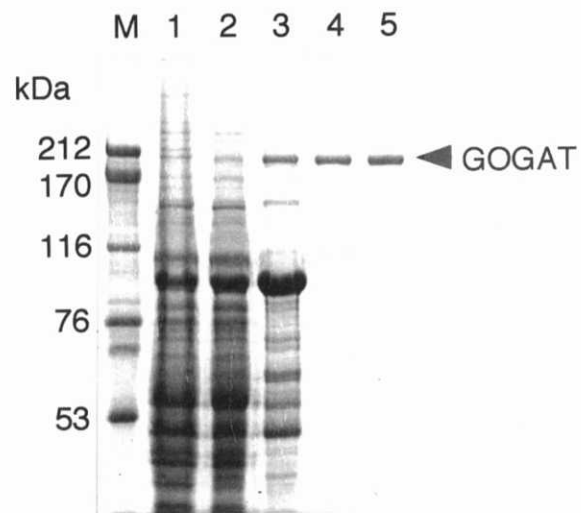


Fig. 14. SDS-PAGE of proteins at different steps in the purification of GOGAT from the posterior silk glands.

Lane M; molecular markers, lane 1; crude extract, lane 2; ammonium sulfate fraction, lane 3; Q-Sepharose HP fraction, lane 4; Blue-Sepharose FF fraction, lane 5; Superdex 200HR fraction

Table 10. Purification of GOGAT from the posterior silk glands

Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity * (units)	Specific Activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	1118	93.5	0.084	100	1
Ammonium sulfate	754	87.0	0.115	93	1.4
Q-Sepharose HP	56	73.4	1.31	78	15.7
Blue Sepharose FF	1.57	30.5	19.4	33	232
Superdex 200 HR	0.60	13.4	22.3	14	265

* A unit of enzyme is defined as the amount of the enzyme which consumes 1 μ mol NADH per min at 30 °C.

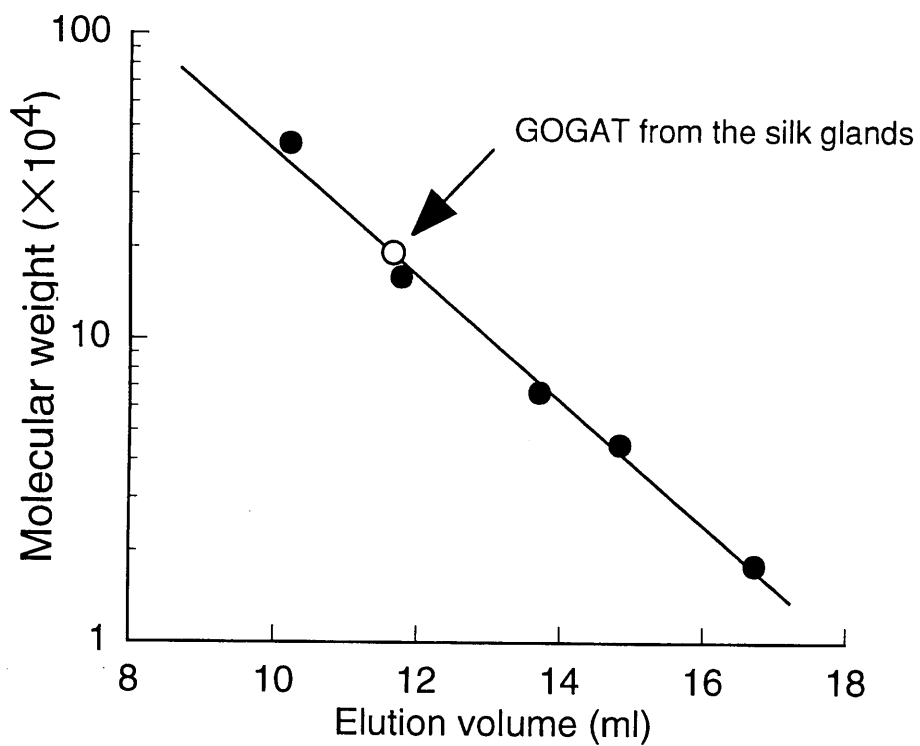


Fig. 15 Determination of the molecular weight of the native GOGAT from the silk glands

Standard proteins used were ferritin, 440,000;
 γ -globulin, 160,000; bovine serum albumin, 67,000;
 ovalbumin; 45,000; myoglobin, 18,000.

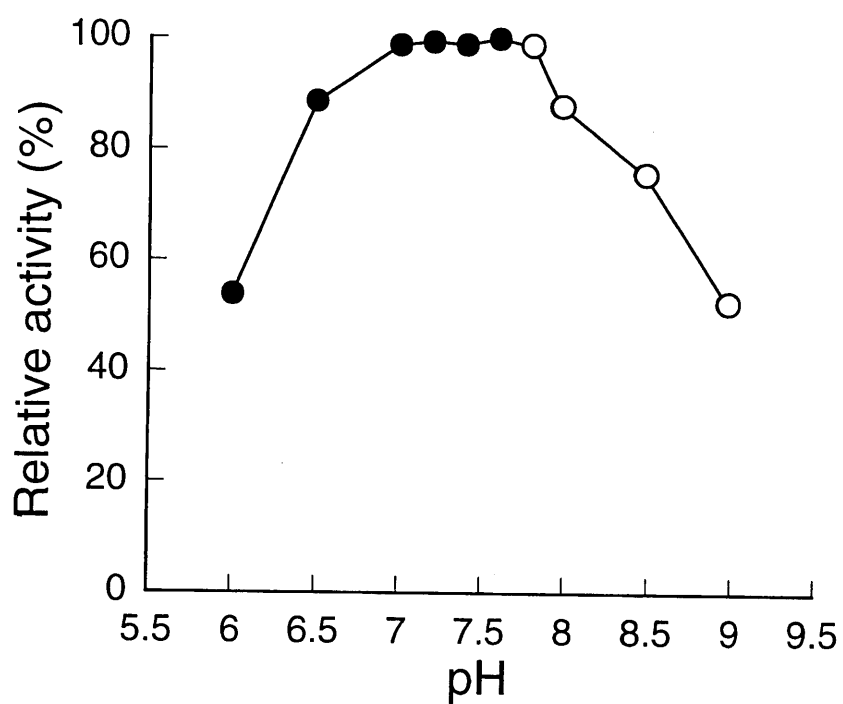


Fig. 16. Effect of pH on the activity of GOGAT from the silk glands

Buffers used were 0.1M phosphate (●), 0.1M Tris-HCl (○).

Table 11. Substrate specificity of GOGAT from the silk glands

Assay Conditions	Activity (%)
Complete assay	100
– NADH	0
– NADH + 2 mM NADPH	0
– NADH + 0.02 mM ferredoxin	0
– Glutamine	0
– Glutamine + 10 mM asparagine	0
– Glutamine + 100 mM NH ₄ Cl	0
– 2-Oxoglutarate	0
– 2-Oxoglutarate + 2 mM pyruvate	0
– 2-Oxoglutarate + 2 mM oxaloacetate	0

また、グルタミンの代わりにアンモニアやアスパラギンをアミノ基供与体として利用することはなかった。さらに、ピルビン酸やオキサロ酢酸を 2-オキソグルタル酸の代わりにアミノ基受容体として機能させることもできなかった。以上の結果は、本酵素は基質に関して非常に特異性が高いことを示している。NADH、グルタミン、2-オキソグルタル酸の各基質の濃度を変化させて酵素活性を測定し、基質濃度と酵素活性の関係について検討した。基質濃度と酵素活性のそれぞれについて逆数プロットをとると、Fig. 17 に示すように直線関係が得られた。したがって、各基質との反応が Michaelis-Menten の式にあてはめられるので、NADH、グルタミンおよび 2-オキソグルタル酸に対する K_m 値はそれぞれ 5.3、230 および $14 \mu\text{M}$ であると計算された。

脂肪体 GOGAT の精製と性質

後部絹糸腺 GOGAT と同様に、脂肪体からも GOGAT を単一成分として精製することができた（詳細は省略）。精製の概要を Table 12 に示したが、脂肪体 50g から 0.29mg の精製酵素が得られ、精製倍率 766 倍、収率 25%であった。

この、精製標品を用いて生化学的な諸性質を調べ、後部絹糸腺 GOGAT と比較を行った結果を Table 13 にまとめた。分子量、サブユニット構成、基質特異性、至適 pH、基質親和性のいずれの性質についても、両酵素はほぼ完全に同一であると結論された。

さらに、両酵素の N 末端の最初の 20 残基のアミノ酸について明らかにし、結果を既知の主な GOGAT のアミノ酸配列とともに示した (Fig. 18)。今回用いた方法では、本来メチオニン(C)を同定することは困難で

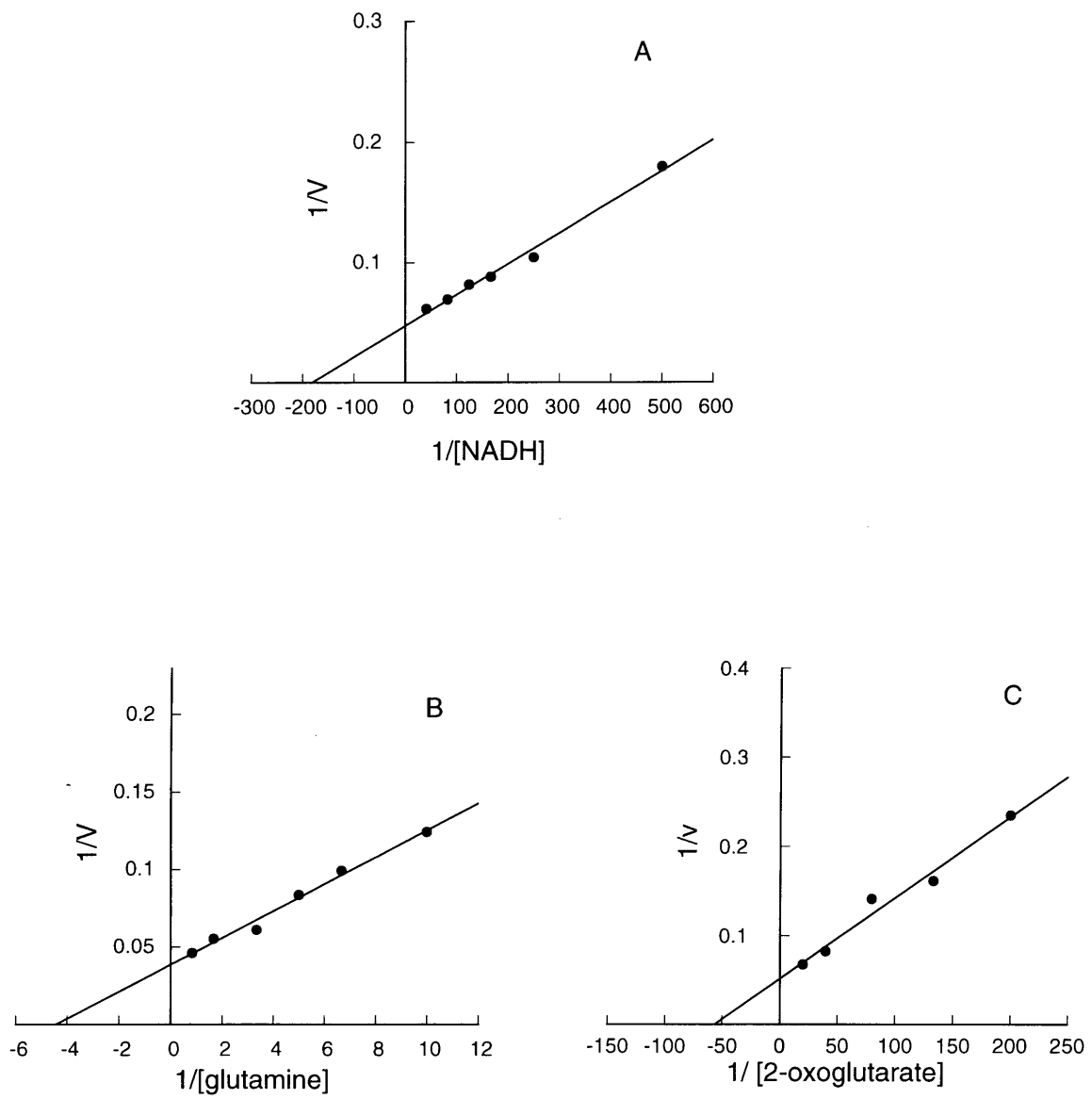


Fig 17. Lineweaver-Burk plots of GOGAT from the silk glands for NADH (A), glutamine (B), 2-oxoglutarate (C).

Table 12. Purification of GOGAT from the fat body

Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity * (units)	Specific Activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	900	16.2	0.018	100	1
Ammonium sulfate	636	15.6	0.025	96	1.4
Q-Sepharose HP	37	14.4	0.39	89	21.8
Blue Sepharose FF	0.48	6.3	13.0	39	721
Superdex 200 HR	0.29	4.0	13.8	25	766

A unit of enzyme is defined as the amount of the enzyme which consumes 1 μ mol NADH per min at 30 °C.

Table 13. Comparison of properties between GOGAT from the fat body and GOGAT from the silk glands

	Enzyme source	
	Fat body	Silk glands
Native molecular weight	190,000	190,000
Subunit molecular weight	195,000	195,000
Subunit composition	Monomer	Monomer
Electron donor	NADH	NADH
pH optimum	7.0~7.8	7.0~7.8
Km for NADH (μM)	5.7	5.3
Km for glutamine (μM)	220	230
Km for 2-oxoglutarate (μM)	17	14

	1	5	10	15	20															
Silkworm fat body	C	G	V	G	F	V	A	A	I	D	G	K	R	S	H	K	I	V	R	D
Silkworm silk glands	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Yeast (NADH-GOGAT)	*	*	*	*	*	*	N	K	H	*	E	Q	*	*	*	*	*	T	*	
Alfalfa(NADH-GOGAT)	*	*	*	*	*	*	E	L	N	*	Q	S	*	R	*	T	*	T	*	
Rice(NADH-GOGAT)	*	*	*	*	*	*	E	L	S	*	D	Y	K	R	A	T	*	N	*	
* <i>A. Brasilense</i> (NADPH-GOGAT)	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	P	R	R	S	V	*	E	K
<i>E. coli</i> (NADPH-GOGAT)	*	*	F	*	L	I	*	H	*	E	*	E	P	*	*	*	V	*	*	T
Maize (Fd-GOGAT)	*	*	*	*	*	*	N	L	K	N	M	S	*	F	D	*	*	*	*	

* bacteria

Fig. 18. N-terminal amino acid sequence of GOGATs from the silkworm compared with several known GOGATs.

Asterisks represent identical amino acid residues to those of GOGAT from the silkworm fat body.

あるが、これまで調べられたすべての GOGAT において、N末端の最初のアミノ酸が C であることからカイコにおいても同様であろうと推定した。その結果、絹糸腺 GOGAT および脂肪体 GOGAT N末端アミノ酸の配列はともに CGVGFVAAIDGKRSHKIVRD であると推定された。一方、このカイコ GOGAT の N末端アミノ酸配列を既知の GOGAT のものと比べた場合、50 から 70%の相同性を示した。

GOGAT 活性の変動

5 齢起蚕から化蛹当日までの 5 齢期間における脂肪体、後部絹糸腺及び中腸の GOGAT 活性の変動を追跡した (Fig. 19)。活性の変動は特に後部絹糸腺において著しく、組織タンパク質あたりの活性 (比活性) の最小値と最大値を比べた場合、30 倍以上の著しい変化であった。後部絹糸腺における GOGAT 活性は、比活性でみた場合も、組織全体の活性でみた場合も、5 齢起蚕時には他の組織に比べると、無視できるほど弱かった。しかし、5 齢 3 日齢以降に急激に活性が上昇し、熟蚕前後においては他の組織に比べ、極めて活性が強かった。5 齢 6 日齢 (熟蚕当日) に最大活性を示すが、その後活性は徐々に減少し、化蛹当日には 5 齢起蚕時と同じレベルにまで落ち込んだ。後部絹糸腺の活性と同様、脂肪体における活性も 5 齢中・後期に強まる傾向がみられたが、中腸における活性は 5 齢 5 日齢までは、あまり大きな変化は見られなかった。また、4 齢期間の後部絹糸腺における GOGAT 活性の変動について調べたところ、5 齢期間で見られたような活性変化は全くなく、4 齢期間を通じて活性は低いままであった (結果省略)。

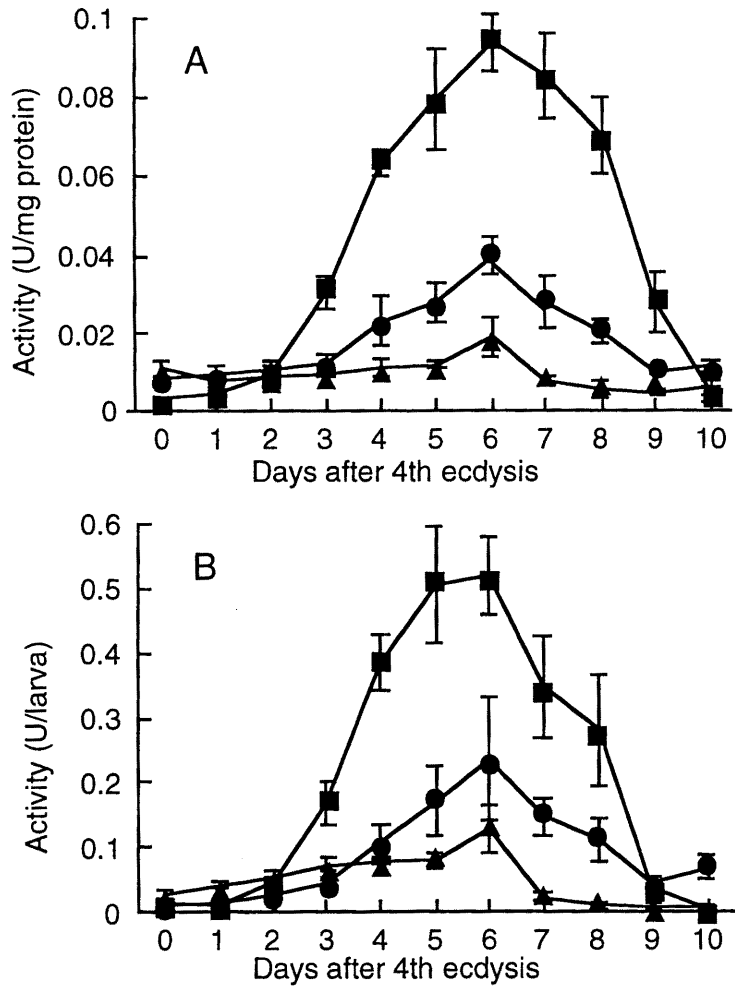


Fig. 19. Change of GOGAT activities in the posterior silk glands (■), fat body (●), midgut (▲) during the 5th instar.

A: Enzyme activity expressed in U/mg protein

B: Enzyme activity expressed in U/larva

Each point represents the mean \pm SD (n=5).

考察

本章では、後部絹糸腺および脂肪体より GOGAT を電気泳動上で単一のタンパク成分にまで分離・精製することができた。今回精製された GOGAT は動物組織からは初めて精製され、性質が明らかになったものである。後部絹糸腺 GOGAT と脂肪体 GOGAT の性質を比較した限り、両者は全く同一の遺伝子から作られている同一の酵素であると考えられるので、以下カイコ GOGAT と称することにする。

これまで多くの GOGAT が植物や微生物から精製され、性質が詳細に調べられた結果、ビタミン B₂ を補酵素としていることがわかっている (Curti *et al.*, 1996)。今回精製されたカイコ GOGAT を UV-VIS スペクトル解析した結果、酵素分子中にビタミン B₂ 誘導体である FAD あるいは FMN を含むことが推定された (結果省略)。一方、カイコ GOGAT の N 末端アミノ酸配列の最初の 20 残基が明らかになり、既知の GOGAT の配列と比較した結果、いずれの酵素とも相同性がみられた。この結果は、カイコ GOGAT が既知の GOGAT 酵素グループの一員であることを示し、他の生物由来の GOGAT との共通の祖先型酵素から進化してきたことを示唆する。今回は、N 末端のわずかなアミノ酸配列しか知ることができなかったので、カイコ GOGAT と既知の GOGAT との近縁度について論じることはできない。しかし、本酵素の遺伝子がクローニングされ、遺伝子・アミノ酸配列の全容がわかれば、他生物の GOGAT との進化上の関係が明らかにできる可能性がある。ごく最近になって下等動物で

あるマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* や線虫 *Caenorhabditis elegans* にも、GOGAT 遺伝子によく似た遺伝子配列（遺伝子記号：Y17045 および Z49889）を有することがゲノム解析の過程でわかってきており（Vanoni and Curti, 1999）、その起源について非常に興味を持たれている。いまのところ、これらの動物において GOGAT 様遺伝子が実際に酵素として機能している証拠は得られていないが、これらの GOGAT 様遺伝子とカイコ GOGAT 遺伝子との関係が明らかになれば、動物における GOGAT 遺伝子の進化について議論できる可能性があり今後の解析が待たれる。

一方、すでに述べたように、既知の GOGAT は電子供与体に対する特異性の違いから NADH-GOGAT、NADPH-GOGAT、Fd-GOGAT のいずれかに分類されているが、精製されたカイコ GOGAT の電子供与体に対する特異性を調べた結果、本酵素は NADH-GOGAT に分類されることが判明した。これまで NADH-GOGAT はおもに植物から分離・精製されているが、非常に大きな単一サブユニットから構成されていることが特徴である。一方、原核生物に由来する NADPH-GOGAT のほとんどは大小 2 種類のサブユニットからなる多量体タンパク質であることが特徴である。カイコ GOGAT はサブユニットの分子量が 195,000 であった。これは、既知の NADH-GOGAT の分子量（196,000～235,000）とほとんど同じ数値であった（Boland and Benny, 1977; Match *et al.* 1980; Chen and Cullimore, 1988; Anderson *et al.* 1989; Hayakawa *et al.* 1992, Cogoni *et al.*, 1995）。また、至適 pH はカイコでは 7-7.8 であり、既知の NADH-GOGAT と同様に中性付近であった。さらに、基質に対する親和性について比較してみると、NADH、グルタミン、2-オキシグルタル酸に対するカイコ GOGAT

の K_m 値はそれぞれ $5.3-5.7 \mu\text{M}$ 、 $220-230 \mu\text{M}$ 、 $13-15 \mu\text{M}$ であり、これに対し多くの NADH-GOGAT の K_m 値はそれぞれ $1.3-14 \mu\text{M}$ 、 $240-811 \mu\text{M}$ 、 $22-104 \mu\text{M}$ の範囲にあった (Boland and Benny, 1977; Match *et al.* 1980; Chen and Cullimore, 1988; Anderson *et al.* 1989; Hayakawa *et al.* 1992, Cogoni *et al.*, 1995)。このようにカイコ GOGAT は進化的に非常に遠縁と思われる植物の NADH-GOGAT とかなり共通の生化学的・酵素学的性質を保持しており、その機能の重要性・共通性が強く示唆される。

ところで、既述したようにアンモニア窒素の代謝運命には 5 齢の発育時期によりかなりの違いがみられた。このことと、GOGAT 活性の間に何らかの関係があるものと考え、各組織の 5 齢期間中における GOGAT 活性の変動について調べた。その結果、いずれの組織においても、絹糸タンパク質合成が活発な 5 齢の中・後期に活性が強いことが判明した。特に後部絹糸腺における活性が圧倒的に強かったことは注目される。この時期カイコで発生したアンモニアはグルタミンに同化後、その多くは後部絹糸腺に移行し、GOGAT によりグルタミン酸へと変換されることを示唆するものである。一方、5 齢初期および化蛹直前の時期には、いずれの組織においても GOGAT 活性は極めて微弱であった。化蛹直前におけるアンモニア窒素の代謝運命については不明だが、この時期には既に絹糸タンパク質の合成も終了しており、5 齢の初期と同様にアンモニア窒素のタンパク質への取り込みは少ないものと推定される。化蛹から羽化にかけて、不要の窒素化合物は尿酸として体内に蓄積されることが報告されているが (藤條, 1971)、化蛹直前に体内で発生したアンモニアもすでに尿酸の形に変えられている可能性が高いように思われる。このように、カイコにおける GOGAT 活性の分布と変動は、生体内におけ

るアンモニア窒素の代謝を極めてよく反映しているものと解釈できる。しかし、当然アンモニア窒素の代謝動態は GOGAT 以外の窒素代謝関連諸酵素の分布や変動によっても規定されるものである。発育時期によるアンモニア窒素の動態・代謝運命の変化と窒素代謝関連諸酵素の活性変動との関係については今後の課題としてさらに解明を進める必要がある。

摘要

カイコが高等植物のように GS/GOGAT 経路を機能させ、アンモニア窒素をアミノ酸へ同化していることが推定された。これまで GOGAT については動物組織では存在が知られていなかったもので、その性質と機能を知る目的で、各種クロマトグラフィーにより後部絹糸腺および脂肪体から本酵素の精製を行った。分離・精製した酵素の分子量、N末端アミノ酸配列、至適 pH、基質特異性、基質親和性等を調べた結果、カイコ GOGAT は植物や酵母等の真核生物に存在する NADH 依存型 GOGAT と極めてよく似た性質を持っていることが判明した。また、その性質の比較から脂肪体と後部絹糸腺の酵素は全く同一の酵素と推定された。アンモニア窒素が絹糸タンパク質合成に効率よく利用される 5 齢中・後期の各組織、特に後部絹糸腺中の酵素活性が強く、この酵素の生理学的重要性を示唆した。

第4章

飼料に依存した尿素の利用・代謝特性

前章までの研究において、終齢のカイコ体内ではその発育時期によらず常にアンモニアの発生が起きていることを指摘し、発生したアンモニアがどのように代謝されるかについて論じてきた。しかし、生体においてアンモニアの発生源となる窒素化合物については本研究の中ではっきりと特定したわけではなかった。

カイコを桑葉で飼育した場合に、吐糸を開始した幼虫の体液中にウレアーゼ活性が出現し、体液中の尿素をアンモニアへ分解していることが報告されている（山田ら，1984）。一方、人工飼料で飼育した場合にはウレアーゼ活性は検出されず、熟蚕体液中に尿素が多量に蓄積する（山田ら，1983b）。これは人工飼料育蚕では尿素の分解が行われていないことを反映しているものと考えられている。以上のことが事実とすれば、桑葉で飼育した場合、熟蚕体液中の尿素はアンモニアに分解された後、窒素源として再利用されているものと推定される。

一方、5 齢の摂食期間中には尿素は糞中に排泄されており、体液中に尿素が過剰に蓄積することはないが、人工飼料で飼育した場合には桑葉飼育に比べて排泄される尿素が非常に多いことが知られている（Kobayashi *et al.*, 1980; 山田・井口, 1986）。このことから、人工飼料飼育蚕と桑葉飼育蚕では、摂食期においても尿素の代謝にかなりの違い

が存在するものと考えられるが、この時期の尿素代謝についてはほとんど検討されていない。

そこで、本章においては、5 齢の熟蚕および摂食期における尿素の利用・代謝について検討をおこない、人工飼料飼育と桑葉飼育における尿素の代謝特性の違いについて明らかにした。

材料と方法

供試蚕品種

用いた蚕品種、飼育法などは第 2 章に述べた通りである。実験の目的に応じて、一部のカイコは 5 齢起蚕あるいは 5 齢 3 日齢から桑葉に切り替えて飼育を行った。

[¹⁵N]化合物トレーサー実験

用いた標識化合物は [¹⁵N]酢酸アンモニウムおよび [¹⁵N]尿素（日本酸素製）である。蒸留水でそれぞれ 10 μmol/20 μl になるように溶解・希釈し、これを投与液とした。5 齢 7 日齢の吐糸を開始した幼虫を氷水中で麻酔し、マイクロシリンジを用いて体液中に注射した。一頭当たりの投与量は [¹⁵N]酢酸アンモニウムについては 10 μmol、[¹⁵N]尿素については 5 μmol とした。投与処理後は通常通り蔭中で吐糸させた。約 48 時間後には吐糸を終了したので、繭を切開して蛹を取り出し、繭層を回収した。繭層タンパク質中の ¹⁵N 量の測定は第 1 章に記した方法に準じて行った。

また、5 齢 3 日齢のカイコにも同じように $[^{15}\text{N}]$ 尿素の投与をおこなった。この場合、投与後 12 時間後に解剖を行って絹糸腺を取り出し、同様にタンパク質中の ^{15}N 量の測定を行った。

中腸内容物、組織の採取

5 齢 3 日齢の幼虫を液体窒素中で急速に凍結させた。凍結した幼虫をカッターを用いて体節ごとに輪切りにし、Fig. 20 に示した様に前方から各体節に 1 から 8 までの番号を付した。ピンセットを用いて、中腸組織が混入しないように細心の注意を払いながら個々の体節から凍ったままの中腸内容物を取り出し、分析に供するまで -80°C に保存した。生きたカイコからの各組織の採取は第 1 章に記した方法に準じて行った。

ウレアーゼ活性の測定

5 齢 3 日齢の幼虫から採取した各組織（中腸内容物、中腸、絹糸腺、脂肪体、マルピーギ管、体液）に数倍量の 0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.5) [5mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、0.5% アスコルビン酸] を加えて磨碎した後、20,000g、10 分間遠心を行って上清を得た。この上清を PD-10 脱塩カラム（ファルマシア）に通して、酵素活性を妨害するような低分子物質を除去したものを酵素液とした。反応液は、100mM 磷酸緩衝液 (pH7.5)、30mM 尿素を含んでいる。酵素液を加えて反応を開始させ、 30°C で反応後、1N 硫酸を加えて反応を停止させた。発生したアンモニアをマイクロ拡散法（日本土壤肥料学会監修、1990）により濃縮し、第 2 章に記した方法によりアンモニアの測定を行った。酵素 1U は 1 分間に尿素 $1\ \mu\text{mol}$ を加水分解する酵素量と定義した。

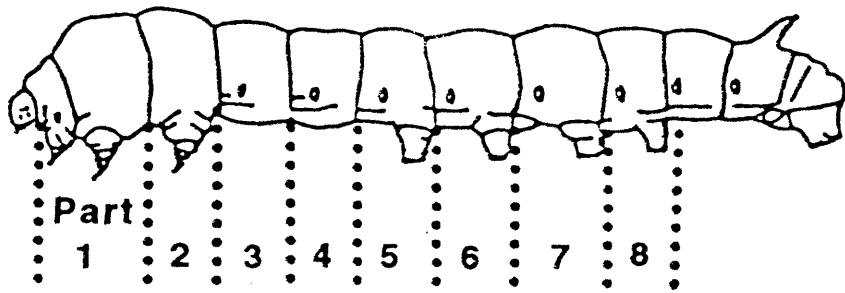


Fig. 20. Dissection and segment numbering of the silkworm larvae for preparation of midgut content.

The larvae were frozen in liquid nitrogen and the frozen larvae were cut crosswise at each segment, which was numbered from one through eight.

中腸内容物中の尿素、アンモニアの定量

中腸内容物に 3 倍量の 1N 硫酸を加え、試料中に含まれるウレアーゼを失活させた。遠心分離により沈殿を除去し、第 2 章に記した方法により上清中のアンモニアを定量した。さらに、試料に市販のナタマメウレアーゼ（和光純薬）を添加することにより、試料中の尿素をすべてアンモニアに変えた後、同様にアンモニアを定量した。試料中の尿素量はウレアーゼを添加したことによって増加したアンモニア量から計算した。

結果

飼料による尿素の代謝運命の違い

5 齢 7 日齢の幼虫に投与した $[^{15}\text{N}]$ 尿素あるいは $[^{15}\text{N}]$ アンモニアの代謝運命に及ぼす飼料の影響について調べた。繭層タンパク質に取り込まれた ^{15}N 量を測定し、その値を ^{15}N 投与量に対するパーセントで示した (Fig. 21)。人工飼料育した場合には、投与した $[^{15}\text{N}]$ アンモニアの多くが既述したように繭層タンパク質へ取り込まれた。しかし、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素を投与した場合、 ^{15}N は繭層タンパク質中には全く存在していなかった。一方、桑葉飼育した幼虫においては、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素も $[^{15}\text{N}]$ アンモニアと同じように利用されることが明らかになった。

同じように 5 齢 3 日齢の幼虫に $[^{15}\text{N}]$ 尿素を投与した場合に、絹糸タンパク質へ取り込まれる ^{15}N 量を測定した結果を Fig.22 に示した。熟蚕時に比べ、絹糸タンパク質へ取り込まれる ^{15}N 量は少ないものの、桑葉

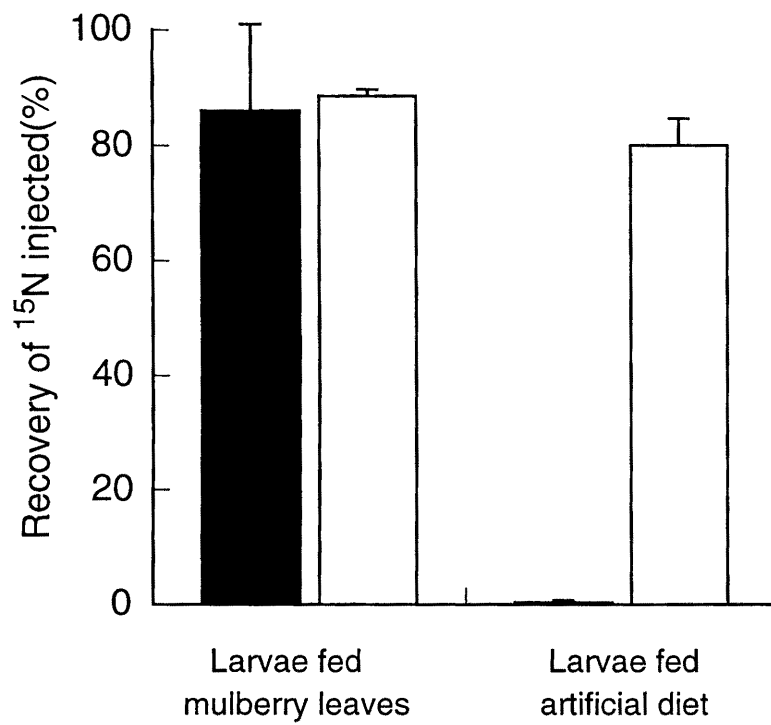


Fig. 21. Incorporation of ¹⁵N- urea (solid bars) or ¹⁵N- ammonium acetate (open bars) into silk protein at the spinning stage.

Values are expressed as percentage of recovery of initial injected dose and represent the mean \pm SD (n=3).

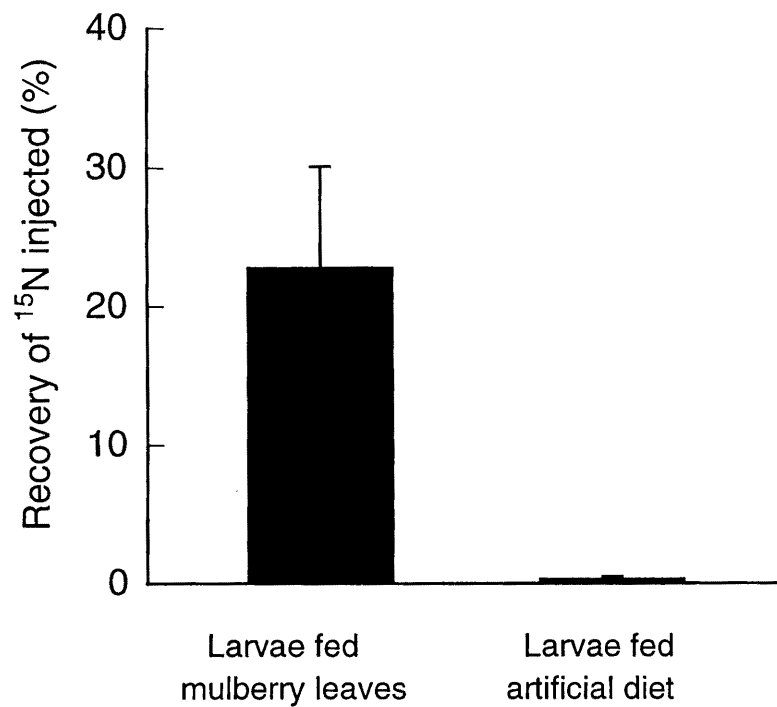


Fig. 22. Incorporation of ¹⁵N- urea into silk protein at the eating stage of 5th instar.

Values are expressed as percentage of recovery of initial injected dose and represent the mean \pm SD (n=4).

飼育した場合には、摂食期においてもかなりの $[^{15}\text{N}]$ 尿素が利用されることが判明した。一方、人工飼料で飼育した場合には ^{15}N の利用はほとんど認められなかった。

中腸内容物中のウレアーゼ活性

5 齢 3 日齢における各組織のウレアーゼ活性を測定した。その結果、人工飼料飼育した場合にはいずれの組織からもウレアーゼ活性は検出されなかった。桑葉飼育の場合には、体内の各組織にウレアーゼ活性は見出せなかったものの、唯一中腸の内容物中にウレアーゼ活性が認められた。中腸各部位の内容物におけるウレアーゼ活性について測定した結果を Fig. 23 に示した。人工飼料で飼育した幼虫の中腸内容物については、いずれの部位からもウレアーゼ活性は検出されなかった。一方、桑葉飼育した場合には、ウレアーゼ活性は中腸の最前部に対応する第 1 番目で最も強かった。以後 6 番目の部位に至るまで次第に活性が弱くなり、最後の部位で若干活性が上昇した。

中腸内容物中の尿素濃度

中腸の部位ごとに、その内容物中の尿素濃度を測定した結果を Fig. 24 に示した。人工飼料、桑葉のいずれの飼料で飼育した場合も、中腸のすべての部位から尿素が検出された。尿素濃度はどの部位でも、桑葉で飼育した方が人工飼料で飼育したよりも低かった。飼料中の尿素濃度は、人工飼料も桑葉中においても、無視できるくらい極微量であった ($0.1 \mu\text{g/g}$ 以下)。したがって、中腸内容物中に検出された尿素は、飼料に由来するものではなく、カイコ自身によって分泌されたものであると考

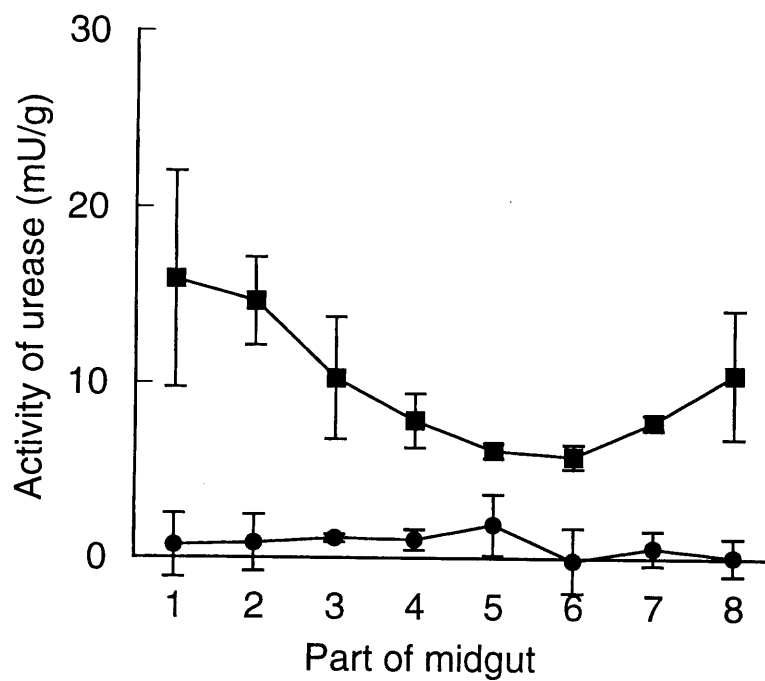


Fig.23. Urease activity in the content of each part of the midgut of the silkworm larvae

—■— Larvae fed mulberry leaves —●— Larvae fed artificial diet

Values represent the mean \pm SD (n=3).

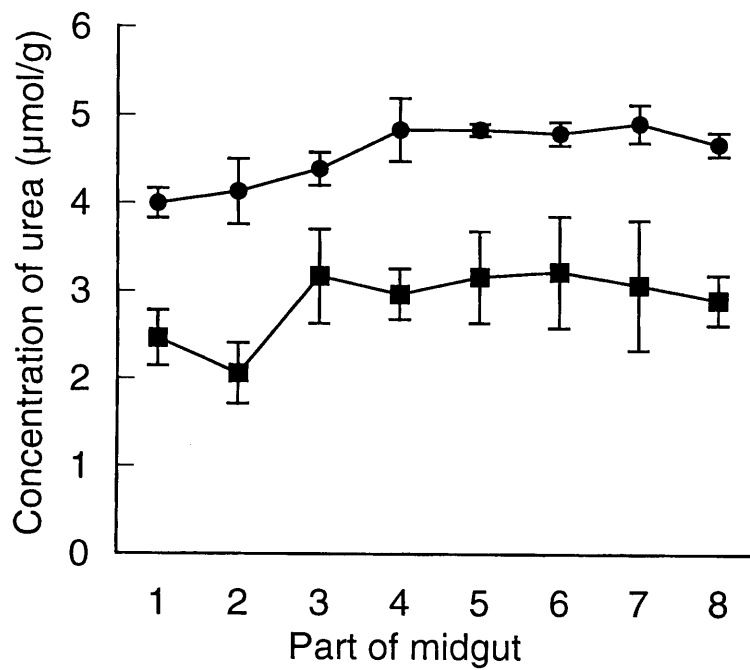


Fig.24. Urea concentration in the content of each part of the midgut of the silkworm larvae

—■— Larvae fed mulberry leaves —●— Larvae fed artificial diet

Values represent the mean \pm SD (n=3).

えられる。

人工飼料から桑葉への飼料切り替えによる中腸内アンモニア、尿素濃度の変動

5 齢 3 日齢まで人工飼料で飼育していたカイコに桑葉を与え、その後の中腸内容物（第 1 部位）中のアンモニアおよび尿素濃度の変動を調べた（Fig. 25）。飼料切り替え直前には中腸内容物中の尿素濃度はアンモニア濃度の約 2 倍であった。飼料を人工飼料から桑葉へ切り替えると、尿素濃度が減少し、逆にアンモニア濃度は増加し始めた。飼料切り替え後、わずか 4 時間で尿素とアンモニアの濃度はほぼ同じレベルに到達した。この現象は、中腸内容物中のウレアーゼにより尿素が分解し、実際にアンモニアが生じていることを示唆している。*in vitro* においてはウレアーゼは尿素 1 分子からアンモニア 2 分子を生じさせるが、この *in vivo* の実験においては、見かけ上アンモニアが増加する割合と尿素が減少する割合とはほぼ 1:1 であった。この結果は、発生したアンモニアの一部が中腸組織により再吸収されるため、見かけのアンモニア発生量が少なくなったものと解釈された。

考察

人工飼料で飼育した熟蚕に $[^{15}\text{N}]$ 尿素を投与しても、繭層タンパク質へ取り込まれることはなかった。人工飼料で飼育した場合には、熟蚕体液中に尿素が多量に蓄積するので（山田ら, 1983b）、おそらく投与され

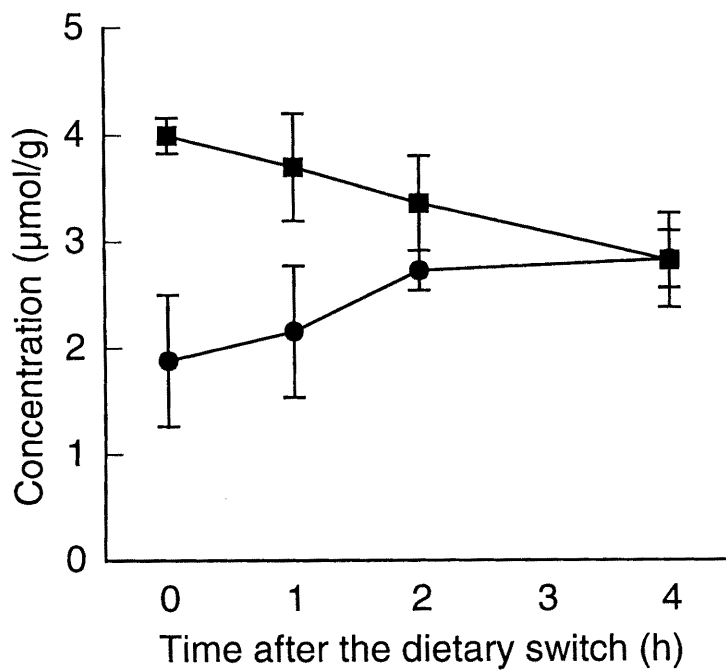


Fig 25. Time course change of urea and ammonia concentration in the midgut content after a dietary change from the artificial diet to fresh mulberry leaves.

—●— Ammonia —■— Urea

Values represent the mean \pm SD (n=3).

た ^{15}N 尿素は代謝されずにほとんどがそのまま体液中に留存するものと考えられる。また、人工飼料育蚕においては、尿素の一部は絹糸腺に取り込まれ、吐糸の際に繭糸とともに排泄されることが知られている(山田ら, 1983a) が、今回の分析においては繭層に含まれる尿素は分析の前処理で除去されてしまったので、人工飼料飼育蚕の繭層から ^{15}N は全く検出されなかったものと思われる。一方、桑葉で飼育した熟蚕に ^{15}N 尿素を投与した場合、 ^{15}N のほとんどが繭層タンパク質成分に取り込まれた。山田ら(1984)によって報告されているように、桑葉飼育した熟蚕の体液中にはウレアーゼ活性が見いだされることから、体液中に投与した ^{15}N 尿素はアンモニアに分解されてから、代謝・再利用されていることは間違いないことであろう。

一方、桑葉で飼育した5齢3日齢(摂食期)のカイコにおいても ^{15}N 尿素が窒素源として利用された。しかし、この時期の体液、各組織中にはウレアーゼ活性は認められず、尿素の分解はカイコの体内では起こることはありえないと考えられたので、上記の結果は意外なものであった。そこで、桑葉飼育蚕の中腸の内容物について調べたところ、十分なウレアーゼ活性が存在していることを突き止めた。また、かなり多量の尿素が桑葉飼育蚕の中腸内容物中には存在しており、しかも人工飼料育蚕に比べ明らかに少ないことから、中腸内容物中で尿素の分解が起こっているものと考えられた。以上の結果から、体液中に投与された ^{15}N 尿素は、一旦中腸内腔に分泌されるが、そこでウレアーゼによってアンモニアに分解された後、再吸収され窒素源として再利用されるものと解釈された。

ところで、多くの昆虫の体液中や排泄物中に尿素が検出されているが

(Bursell, 1967; Cochran, 1985)、これまで実際の尿素排泄機構についての記述はほとんどない。今回、カイコの消化管内最前部においても、相当の尿素が存在していたことから、マルピーギ管を經由して後腸へ排泄される尿酸とは異なり、尿素は中腸上皮から直接中腸管腔へ排出されるものと推定された。哺乳動物では、血中尿素は単純拡散により消化管細胞壁を通過して、管腔へ分泌されることが知られている(Haupt and Haupt, 1968; Cheng and Wallace, 1979)。おそらくカイコにおける尿素排泄も同様なメカニズムによる可能性が高いと思われる。

以上の結果、桑葉飼育蚕においては人工飼料飼育蚕には存在しない独自の尿素再利用機構を備えていることが明らかになった。この場合カイコの消化管や体液に見いだされるウレアーゼ活性は何に由来するのだろうか、ほ乳動物にみられるように、消化管中に棲息している微生物に起因するのだろうか、それとも摂取した桑葉に由来するのだろうか。または、カイコ自身がウレアーゼを合成しているのだろうか。この点については次章においてくわしく検討することとした。

摘要

人工飼料育蚕においては、吐糸期から蛹への変態期において体液中に尿素が蓄積するが、桑葉育では逆に減少することが知られている。もともとカイコには尿素をアンモニアに分解するウレアーゼという酵素が存在しないが、桑葉育のカイコは葉に由来するウレアーゼを熟蚕になる頃に体液中に取り込むので尿素の分解が起こるようになるという仮説が提

唱されている。そこで、実際に飼料に依存して尿素の運命に違いが見られるか否かを知るために、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素および $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムを5齢7日齢（熟蚕）のカイコ体液中に注射し、絹糸タンパク質中に取り込まれる ^{15}N を測定した。人工飼料育のカイコにおいては、 $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムを注射した場合にだけ ^{15}N が絹糸タンパク質中に取り込まれた。桑葉育のカイコにおいては、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素を注射した場合も $[^{15}\text{N}]$ アンモニウム塩を注射したときと全く同様に、投与した ^{15}N の約80%が絹糸タンパク質中に取り込まれた。さらに、桑葉育の5齢3日齢（摂食期）のカイコに ^{15}N 尿素を注射した場合でも、 ^{15}N の絹糸タンパク質への取り込みが観察された。5齢3日齢にはウレアーゼは体液中には存在せず、消化管内容物にのみ活性が認められた。そこで、消化管各部位における内容物中の尿素を定量したところ、消化管全体にわたってかなりの量の尿素が存在しており、中腸組織から尿素の分泌が起きているものと推定された。また、桑葉育の場合、人工飼料育蚕に比べ消化管中の尿素は少なかった。以上の結果、5齢の摂食期においては、桑葉を食べたカイコの消化管内で尿素の分解が起こっており、生じたアンモニアは消化管から再吸収・利用されるものと考えられた。

第5章

カイコの尿素代謝に関わるウレアーゼの起源とその生化学的・酵素学的性質

前章において、カイコ体内で発生する尿素の代謝運命が、摂取した飼料により大きく異なることを明らかにした。まず第一に、桑葉飼育した場合に限って、摂食期における中腸内容物中にウレアーゼ活性が見いだされ、これが中腸管内における尿素の分解・再吸収に関与していた。さらに、吐糸期においては体液中にウレアーゼ活性が出現するが（山田ら、1984）、これが体液尿素の再利用に関与していることが突き止められた。一方、人工飼料で飼育した場合には、摂食期・吐糸期のいずれの時期も、尿素は利用されることはなかった。おそらく尿素は、摂食期の場合そのまま糞中に排泄され、吐糸期においては代謝されずに体液中に蓄積してしまうものと思われる。

次に残された問題は、桑葉飼育した場合に検出されるウレアーゼ活性の起源が一体何に由来するかという点である。摂食期の中腸内容物に存在するウレアーゼの場合、最も考えられるのは飼料である桑葉中のウレアーゼがそのまま消化されずに中腸内で機能している可能性である。一方、熟蚕体液中に出現するウレアーゼについては、何らかのメカニズムにより桑葉ウレアーゼが体液中に取り込まれ機能していると推測されている（山田ら、1984）。しかし、それ以外の可能性も否定することは現時点ではできない。

本章においては、尿素の代謝機構についてその全貌を解明するため、

桑葉飼育のカイコに見いだされるウレアーゼ活性が桑葉自身のウレアーゼに由来するという仮説に基づき、桑葉および熟蚕体液からウレアーゼの精製を行い、その性質について比較・検討することにした。また、部分精製した桑葉ウレアーゼを経口投与し、体液中に出現するウレアーゼ活性を量的に解析した。さらに、以上の結果に基づいて、カイコにおけるウレアーゼの起源について議論した。

材料と方法

供試桑品種

供試桑品種としては「しんいちのせ」を用いた。圃場で通常栽培されている桑樹から新鮮葉を採取し、液体窒素で急速に凍結させ、精製に用いるまで-80℃に保存した。

供試蚕品種

用いた蚕品種、飼育法などは第2章に準じた。熟蚕体液からウレアーゼを精製する場合には雄雌混合で用いた。この場合、熟蚕直前の2日間（5齢4日齢と5日齢）は桑葉（しんいちのせ）による飼育を行った。

ウレアーゼ活性の測定

前章で記した方法をより簡略化して用いた。すなわち、活性測定前の脱塩処理と酵素反応で生じたアンモニアの分離・濃縮処理を行っていたが、桑葉およびカイコ体液に関してはウレアーゼ活性を阻害するような

因子がほとんどないのでこの両操作を省略した。また、前章では pH7.5 の緩衝液を用いていたが、標準的な反応液には磷酸緩衝液 (pH9.0) を用いた。km 値や至適 pH を調べる際には、反応液組成の尿素濃度あるいは緩衝液の種類を変えて反応を行った。

桑葉ウレアーゼの精製

特に断らない限りすべての操作は 4℃ 以下で行った。以下の遠心操作はすべて 28,000g で 20 分間行った。

凍結桑葉 500g に少量のポリビニルピロリドンを含む緩衝液 A[0.1M トリス-塩酸、5mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、pH7.5]を 1500ml 加えて、ヒスコトロンホモジナイザー（日本医科機械）で磨砕した。磨砕後、遠心を行い上清を粗抽出酵素液とした。さらにこの上清を 60℃ で約 20 分間加温した後、氷水中で急速に冷却し、生じた沈殿を遠心により除去した。得られた上清に固形硫酸をゆっくり添加し 20%飽和とした。沈殿を遠心により除去した後、さらに硫酸を加え 45%飽和とした。目的のウレアーゼはこの処理により沈殿するので、遠心により上清を廃棄した後、最少の量の緩衝液 A で沈殿を再溶解させた。再溶解した酵素液を同緩衝液に対し十分に透析を行い硫酸を除いた。不溶のタンパク質を遠心により除去後、上清に冷アセトンを最終濃度 20% (V/V) になるように加え、生じた沈殿を遠心により除去した。上清にさらに、60% (V/V) になるようにアセトンを添加し、ウレアーゼを沈殿させた。遠心により生じた沈殿を緩衝液 A に再溶解させ、同緩衝液に対し透析を行った。

透析処理後のアセトン分画を、緩衝液 A で平衡化しておいた Q-

Sepharose HP カラム（ファルマシア、 1.6×10 cm）に添加し、ウレアーゼを吸着させた。緩衝液 A で十分に洗浄した後、流速 2ml/min で、緩衝液 A 中の KCl 濃度を 0 から 1M まで直線的に上昇させ、ウレアーゼを溶出させた。

ウレアーゼの活性画分を集め、1MKCl を含む緩衝液 B [20mM トリス-塩酸、5mM EDTA、1mM 2-メルカプトエタノール、pH7.5]に対して十分に透析した。この透析液を、事前に同緩衝液で平衡化しておいた Phenyl-Sepharose HP カラム（ファルマシア、 1.6×10 cm）に流速 1ml/min で添加した。カラムを十分に同緩衝液で洗浄した後、KCl を含まない緩衝液 B で吸着したウレアーゼを溶出させた。溶出したウレアーゼを集め、限外濾過（ウルトラフリー-15、ミリポア）により濃縮した。

次に、HPLC（バイオ LC システム、トーソー）に Superdex 200 HR カラム（ファルマシア、 1×30 cm）を接続し、上記の濃縮液を用いてゲル濾過を行った。Superdex 200HR カラムは事前に 0.15MKCl を含む緩衝液 B で平衡化しておき、流速 0.5ml/min、室温で溶出を行った。失活を防ぐため、各溶出画分は直ちに氷水中で冷却した後、ウレアーゼ活性を測定した。

さらにウレアーゼ活性を含む画分を集め、上記 HPLC に Mono Q 5/5 カラム（ファルマシア）を接続し、イオン交換クロマトグラフィーを行った。Mono Q カラムは 0.15M KCl を含む緩衝液 B で事前に平衡化しておいた。この精製過程も流速は 0.5ml/min 室温で行った。カラムに吸着したウレアーゼは 0.15M-0.5M の KCl 濃度勾配により溶出した。精製されたウレアーゼは 4°C で保存した。

カイコ体液ウレアーゼの精製

5 齢 7 日、8 日齢の吐糸中のカイコを繭を切開して取りだし、体液を採取した。メラニン化を防ぐために体液の 1/3 量の 0.5% アスコルビン酸溶液を加え、精製に用いるまで -80℃ に保存した。

以下の操作は特に断らない限り、すべて 0-4℃ で行った。200ml の凍結体液に 20ml の 0.5M トリス-塩酸緩衝液、50mM EDTA、1% 2-メルカプトエタノールを添加した。体液を融解させた後、浮遊する成分を 22,000g、20 分間の遠心により沈殿除去した。緩衝液 C [0.1M トリス-塩酸、5mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、pH7.5] で平衡化しておいた Q-Sepharose FF カラム（ファルマシア、5.0×10cm）に得られた上清を添加し、ウレアーゼを吸着させた。カラムを緩衝液 C で十分に洗浄した後、さらに 0.2M KCl を含む同緩衝液で洗浄した。さらに 0.4M KCl を含む緩衝液 C をカラムによりウレアーゼを溶出した。溶出液に 50% 飽和になるように固形硫酸を添加した。ウレアーゼはこの処理により沈殿するので 22,000g、20 分間の遠心により回収し、0.15M KCl を含む最少量の緩衝液 C に再溶解させた。不溶成分を遠心により取り除いた後、0.15M KCl を含む緩衝液 C で平衡化しておいた Superdex 200HR カラム（ファルマシア、1.6×60cm）に添加し、流速 1ml/min で溶出を行った。ウレアーゼ活性のある画分を集め、限外濾過（ウルトラフリー-15、ミリポア）で濃縮した。さらに、HPLC（バイオ LC システム、トーソー）に接続した Mono Q5/5 カラム（ファルマシア）を用いて、室温で精製を行った。Mono Q カラムは 0.15M KCl を含む緩衝液 C で事前に平衡化しておいた。ウレアーゼをカラムに吸着させ、緩衝液 C で洗浄後、KCl 濃度を 0.15M から 0.5M まで直線的に上昇させて、ウレ

アーゼを溶出した。精製されたウレアーゼは 4℃で保存した。

タンパク質の定量、電気泳動、分子量の測定、N 末端アミノ酸配列の決定

いずれも第 3 章に記した方法に準じて行った。

ナタマメウレアーゼに対するモノクローナル抗体の作製

N 末端アミノ酸の分析の結果、ナタマメウレアーゼと桑葉ウレアーゼとの相同性が高かったため（結果参照）、ナタマメウレアーゼに対する抗体が桑葉ウレアーゼやカイコ体液ウレアーゼを認識する可能性が高いと判断し、市販ナタマメウレアーゼ（タイプ C-3、シグマ）を用いてモノクローナル抗体を作製することにした。実際のモノクローナル抗体の作製は、日本バイオテスト社に依頼したので、細かい操作手順の記述は省略する。結果として、抗ナタマメウレアーゼ抗体を安定して産生するハイブリドーマを 6 クローン得ることができた。得られたモノクローナル抗体をそれぞれ MabU3、MabU10、MabU13、MabU21、MabU23、MabU27、と名付けた。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE で分離したタンパク質を PVDF 膜に電氣的に転写させた後、TBS [500mM NaCl を含む 20mM トリス-塩酸緩衝液、pH7.5] で膜を洗浄した。次いで、膜をブロッキング緩衝液[1% BSA を含む TBS] に浸し、室温で 1 時間振とうしながらブロッキングを行った。次に TTBS[0.05% Tween20、500mM NaCl を含む 20mM トリス-塩酸緩衝液、pH7.5] で洗浄

後、1次抗体溶液[前述のマウスモノクローナル抗体および1% BSAを含むTTBS]と室温で1時間インキュベートさせた。さらに、TTBSで洗浄後、2次抗体溶液[アルカリフォスファターゼで標識したヤギ抗マウスIgG(バイオラッド)および1% BSAを含むTTBS]と室温で1時間反応させた。最後に、TTBSおよびTBSで十分に洗浄した後、BCIP/NBT(バイオラッド)を基質にして抗体と結合するタンパク質を発色させた。

ウレアーゼの消化実験

人工飼料で飼育した5齢3日齢の幼虫を解剖し、消化管から内容物を採取し、遠心上清を消化液とした。この時期の消化液のpHを測定したところ10付近であった。採取した消化液のpHが10に保たれるように、1Mグリシン-NaOH緩衝液(pH10.0)を1/10量加え、実験に使用した。桑葉から精製されたウレアーゼおよび市販ナタマメウレアーゼをそれぞれ50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で溶解・希釈して1mg/mlとし、各ウレアーゼ溶液と消化液を1:1の割合で混ぜ、30℃で一定時間反応させた。反応終了後直ちに反応液中に残存するウレアーゼ活性を測定した。同時に、反応液を100℃で5分間加熱してタンパク質分解反応を停止させ、SDS-PAGEサンプルブッファァを加えてから再び100℃で5分間加熱処理してSDS-PAGEを行った。

桑葉ウレアーゼ経口投与実験

実験には人工飼料(Table 4)で飼育した5齢3日および5日齢の雄幼虫を用いた。経口投与に用いる桑葉ウレアーゼを上述したように加熱処理、硫酸塩析、アセトン処理およびイオン交換クロマトグラフィー

(Q-Sepharose HP カラム) により部分精製した。部分精製されたウレアーゼを 0.2M 磷酸緩衝液(pH7.5)[5mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノールを含む]で様々な濃度に希釈してから、人工飼料の小片にそれぞれ 50 μ l ずつ浸透させた。各幼虫にこの飼料片を 6 時間に 1 個の割合で合計 4 個ずつ与えて食べ切らせた。最後の飼料片を与えてから 12 時間後に幼虫から体液を採取し、ウレアーゼの活性を測定した。また、第 1 章 ([¹⁵N]標識アンモニウム塩を用いたトレーサー実験 1) に記述した方法で 1 個体あたりの体液量の推定を行った。

結果

桑葉ウレアーゼの精製と性質

植物葉におけるウレアーゼの重要性についてはこれまでの報告 (Eskew *et al.* 1983; Krogmeier *et al.*, 1989; Stebbins *et al.* 1991) で明らかにされていたが、植物葉から単一成分として精製されたことはなく、その性質についても不明の点が多かった。この理由の 1 つとして、例えば大豆葉中のウレアーゼ活性は種子中の活性に比べて 1/1000 以下であると報告されているように (Polaco and Winkler, 1984)、葉中のウレアーゼの存在量が極めて少ないことが考えられる。

今回、桑葉ウレアーゼを精製した際には、粗抽出の段階から単一のタンパク質にまで精製するのに 5000 倍もの精製倍率を要し、500g の凍結葉から 30 μ g しか精製標品を得ることができなかった。桑葉ウレアーゼ

の精製の概要を Table14 にまとめた。精製の各段階におけるクロマトグラフィーの結果を Fig.26 に示したが、各クロマトグラフィーにおいて、ウレアーゼの活性はいつも単一のピーク成分として存在した。このことから、葉組織中のウレアーゼは単一種であり、アイソザイムは存在しないものと考えられた。

Mono Q カラムによるイオン交換クロマトグラフィー (Fig. 26D) の後、SDS-PAGE を行ったところ、ほぼ単一のタンパク質であることが確認された (Fig. 27)。また、その移動度を分子量マーカと比較した結果、本酵素は分子量 90,500 のサブユニットから構成されることが判明した。一方、自然状態で存在する場合、その分子量は Superdex 200HR カラムからの溶出パターンから 175,000 であると推定された (Fig. 28)。したがって、本酵素は単一のサブユニットからなる 2 量体で存在するものと推定された。

桑葉ウレアーゼを pH6-10 の緩衝液中に 30℃、2 時間放置しても、残存する活性にはほとんど変化はみられなかったが、pH4 以下では不可逆的に失活してしまった (結果省略)。また、酵素活性に及ぼす pH の影響について調べたところ、本酵素の至適 pH は 9.0 付近であることが判明した (Fig. 29)。さらに、基質である尿素の濃度を変化させて酵素活性を測定し、基質濃度と酵素活性のそれぞれについて逆数プロットをとると、Fig. 30 に示すように直線関係が得られた。この結果から、尿素に対する K_m 値は 0.16 mM であると計算された。

カイコ体液ウレアーゼの部分精製

桑葉飼育した熟蚕の体液中からウレアーゼの精製を試みた。Q-

Table 14. Purification of urease from the leaf of mulberry

Purification step	Total protein (mg)	Total activity * (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	5170	23.54	0.0046	100	1
Ammonium sulfate	240	16.07	0.067	68.3	14.5
Acetone	25	7.37	0.295	31.3	64.1
Q-Sepharose HP	3	5.54	1.85	23.5	402
Phenyl-Sepharose HP	0.48	5.30	11.0	22.5	2410
Superdex 200 HR	0.061	1.54	25.2	6.5	5480
Mono Q	0.033	0.86	26.1	3.6	5670

*One unit of enzyme is defined as the amount of the enzyme that hydrolyzes 1 μmol urea per min at 30 $^{\circ}\text{C}$.

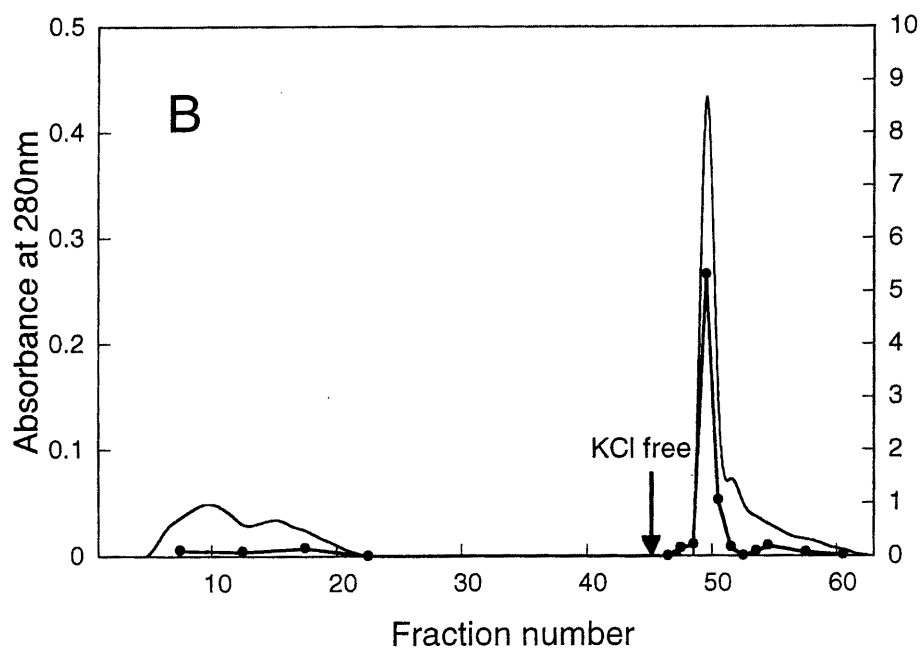
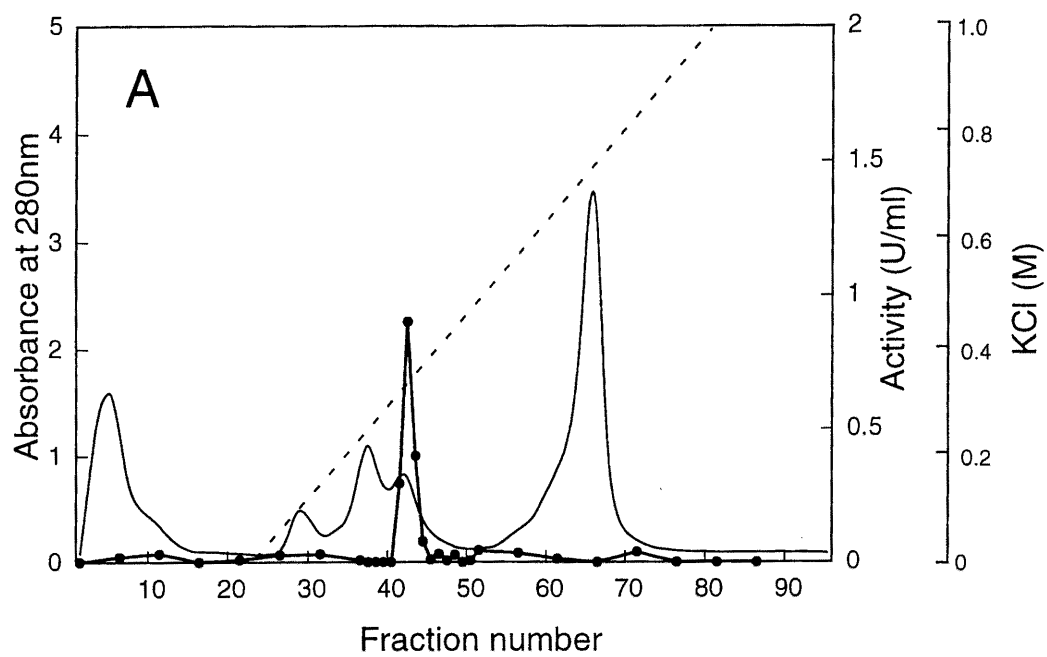


Fig.26 Elution profiles of mulberry leaf urease from the different chromatographic steps in the purification.

A: Q-Sepharose HP, B: Phenyl-Sepharose HP

- : Absorbance at 280nm
- : Enzyme activity
- - - : KCl concentration

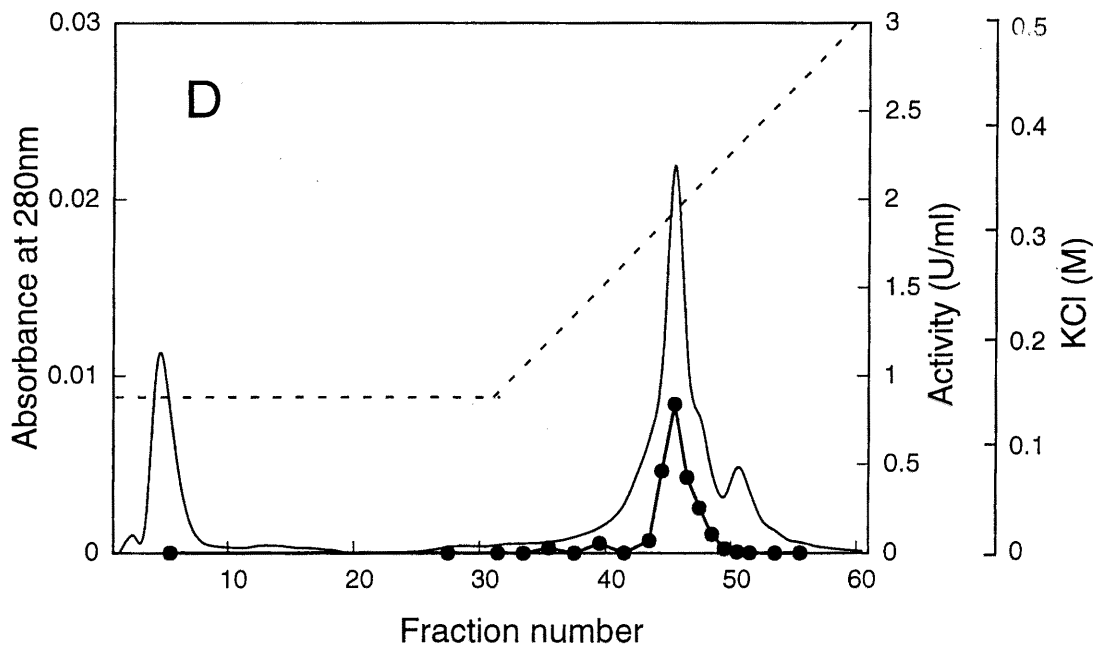
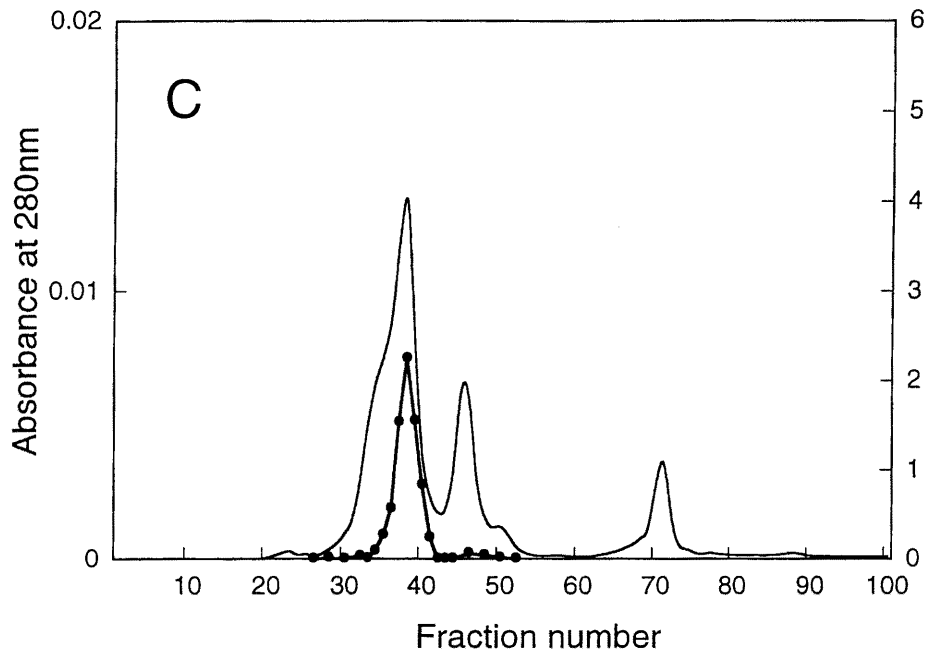


Fig.26. (continued)

C: Superdex 200HR, D: Mono Q.

— : Absorbance at 280nm

—●— : Enzyme activity

- - - : KCl concentration

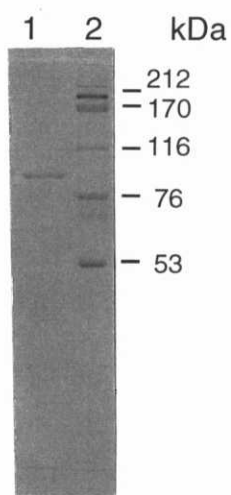


Fig. 27. SDS-PAGE analysis of urease purified from mulberry leaf

Lane 1: sample from Mono Q fraction

Lane 2: molecular markers

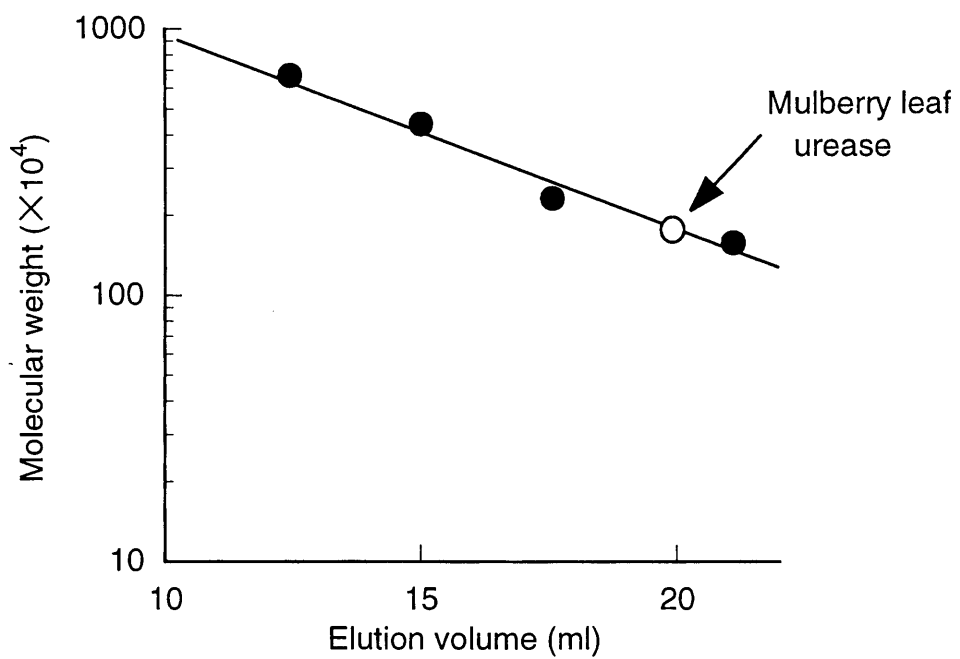


Fig. 28. Determination of the native molecular weight of mulberry leaf urease by gel filtration

Standard proteins used were thyroglobulin, 669,000;
ferritin, 440,000; catalase, 232,000; aldolase, 158,000

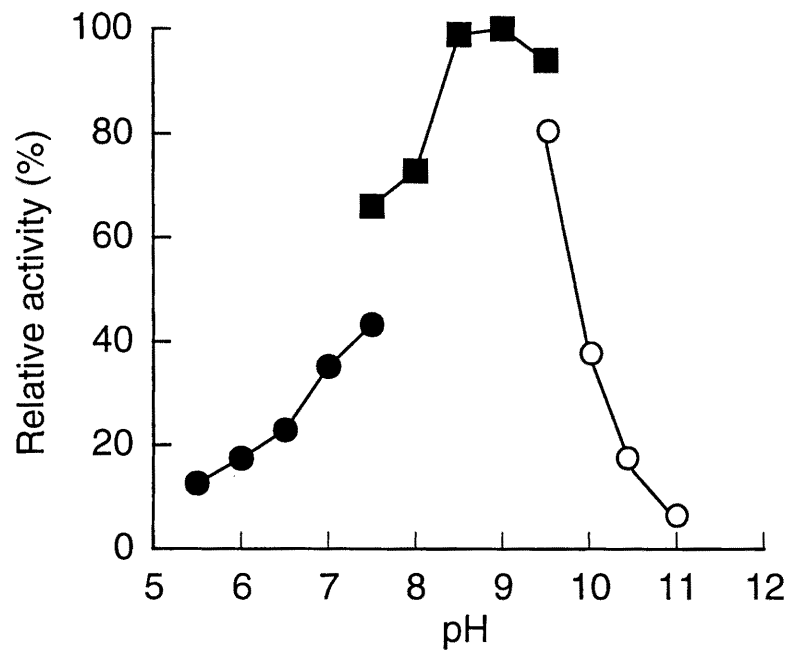


Fig. 29 Effect of pH on mulberry leaf urease activity.

Buffers used were 0.1M phosphate (●),
0.1 M Tris-HCl (■), 0.1M glycine-NaOH (○).

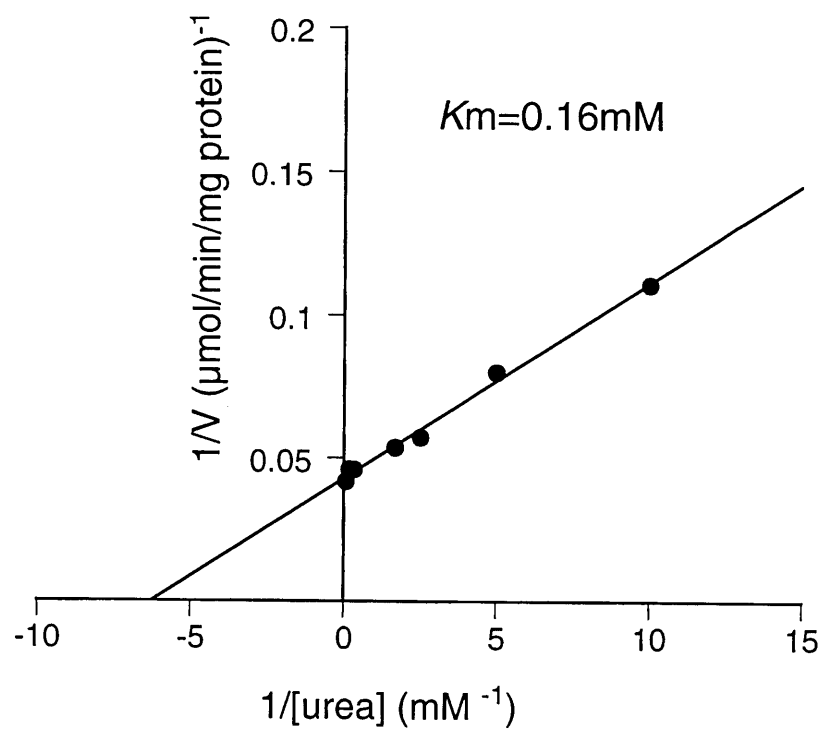


Fig. 30. Lineweaver-Burk plot of mulberry leaf urease for urea

Sepharose FF カラム、Superdex 200HR カラム、Mono Q カラムの 3 種の
カラムを用いて、クロマトグラフィーを行った。最後の Mono Q カラム
においても、タンパク質のピークと活性のピークは一致しておらず、ま
だかなりのタンパク質が混在していることを示していたが (Fig. 31A)、
酵素学的な性質を調べるには十分と判断し、精製をこの段階で終えた。
Mono Q カラムから溶出された 46 と 47 番目の画分を集め、本酵素の性
質を調べることにした。これに先立ち、ナタマメウレアーゼに対するマ
ウスモノクローナル抗体 (Mab23) を用いてウレアーゼ活性のあった各
フラクションについてウエスタンブロットングを行ったところ、活性の
強さにほぼ対応して検出される主要なタンパク質バンドの存在が確認さ
れた (Fig 31B)。このバンドの分子量は桑葉ウレアーゼのサブユニット
の分子量と同じ 90,500 であると推定された。このことから、このタン
パク質がカイコ体液ウレアーゼであろうと推測された。体液ウレアーゼ
の精製の概要は Table 15 にまとめた。

桑葉ウレアーゼとカイコ体液ウレアーゼの性質の比較

まず、ナタマメウレアーゼに対して作製した一連のモノクローナル抗
体 (MabU3、MabU10、MabU13、MabU21、MabU23、MabU27) を用い
て、桑葉およびカイコ体液由来のウレアーゼの抗原性について調査した
(Fig. 32)。6 クローンともナタマメウレアーゼ (レーン 1) とは反応し
たが、MabU3、MabU21、MabU23、MabU27 の 4 クローンは桑葉ウレ
アーゼ (レーン 2) とともにカイコの体液ウレアーゼ (レーン 3) も認識
した。この結果から、カイコ体液ウレアーゼと桑葉ウレアーゼの構成サ
ブユニットの分子量はともに 90,500 であり、ナタマメウレアーゼ

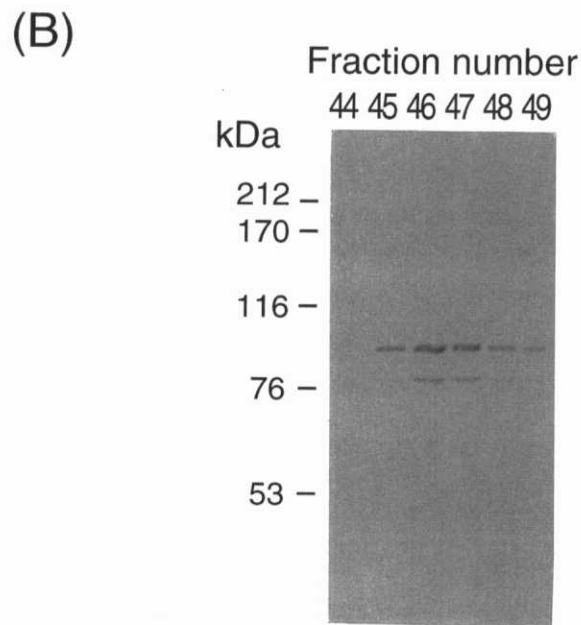
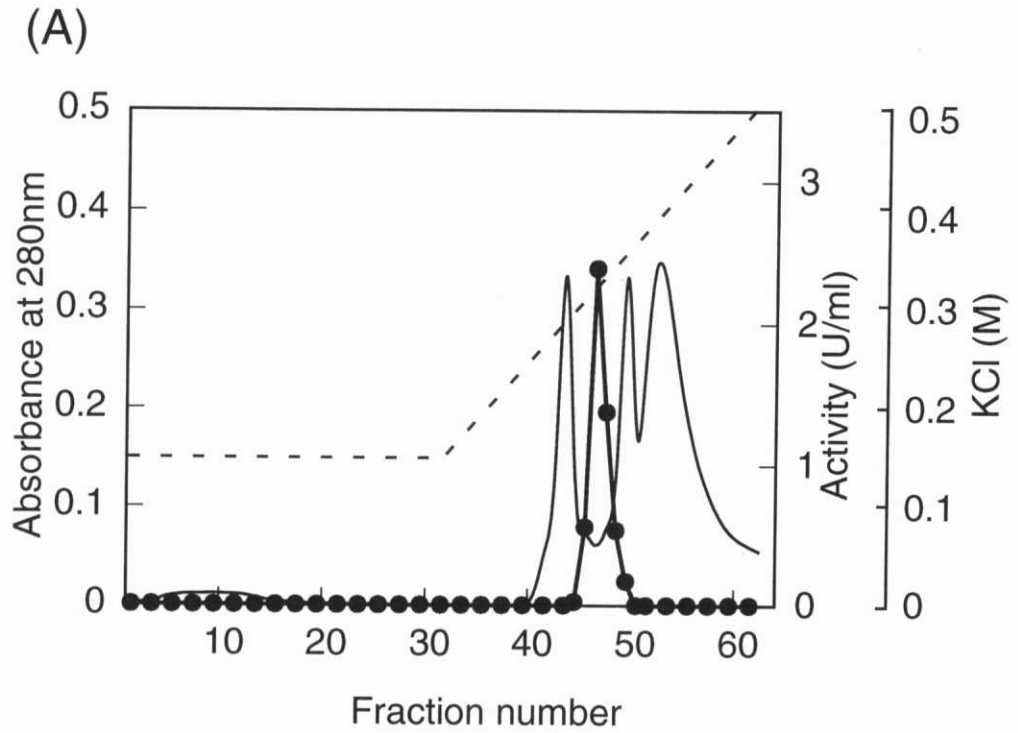


Fig. 31. Elution profile of silkworm hemolymph urease on a Mono Q column(A) and distribution of immuno reactive polypeptide (B).

For the western blot, 5 μ l of each fraction was subjected to SDS-PAGE and blotted onto PVDF membrane. The membrane was immunostained with a monoclonal antibody (Mab23) raised against jack bean urease .

Table 15. Purification of urease from the hemolymph of the spinning larvae

Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity * (units)	Specific Activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Hemolymph	8189	12.65	0.00154	100	1
Q-Sepharose FF	36.5	4.57	0.125	36.1	81.2
Superdex 200HR	4.82	2.16	0.448	17.1	291
Mono Q	0.22	1.89	8.59	14.9	5578

* A unit of enzyme is defined as the amount of the enzyme which hydrolyze 1 μmol urea per min at 30 °C.

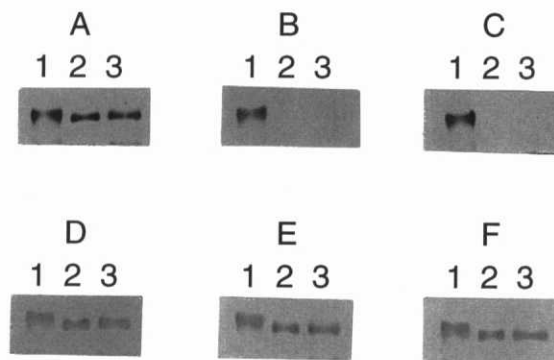


Fig. 32. Reactivity of a panel of monoclonal antibodies in Western blot analysis with different urease sources.

Used monoclonal antibodies were mAbU3 (A), mAbU10 (B), mAbU13 (C), mAbU21 (D), mAbU23 (E), and mAbU27 (F).
 lane 1; 0.1 μ g jackbean urease, lane 2; 0.1 μ g mulberry leaf urease, lane 3; 0.3 μ g partially purified urease from the silkworm hemolymph.

(93,000) より若干小さいことが再確認された。この実験においては、体液ウレアーゼ、桑葉ウレアーゼともに各レーンあたり 2.6mU を分析に供したが、いずれのモノクローナル抗体を用いた場合でも、PVDF 膜上の両酵素の染色性に差がみられなかった。以上の結果はカイコ体液ウレアーゼと桑葉ウレアーゼの抗原性が非常に似ていることを示している。

次に、桑葉ウレアーゼの精製標品およびカイコ体液ウレアーゼの部分精製標品を用いて N 末端アミノ酸の分析を行った結果、両酵素の N 末端の最初の 20 残基のアミノ酸について明らかにすることができた。その結果を既知のナタマメウレアーゼの配列とともに示した (Fig. 33)。桑葉ウレアーゼとカイコ体液ウレアーゼは 20 残基のアミノ酸が完全に一致したが、両酵素とナタマメウレアーゼとは 4 残基が異なっていた。他の生物由来のウレアーゼと比較した場合には、40-70%の相同性しかなかった (結果省略)。

さらに、カイコ体液ウレアーゼの基礎的な酵素学的性質 (至適 pH、尿素に対する親和性) について調査を行い、その結果を桑葉ウレアーゼ、ナタマメウレアーゼと比較した (Table 16)。桑葉ウレアーゼと体液ウレアーゼはほとんど同一の酵素学的性質を有しているが、一方でナタマメウレアーゼとはかなり性質を異にしていることが明らかとなった。

以上の結果を総合して判断すると、カイコ体液ウレアーゼは桑葉ウレアーゼと同一の酵素であり、食下された桑葉中の酵素が中腸組織を通過して体液中に取り込まれたものであると考えられた。

ウレアーゼに対するカイコ消化液の影響

カイコ消化液と桑葉ウレアーゼ、ナタマメウレアーゼとを反応させ、

	1	5	10	15	20
Silkworm (hemolymph)	M	K L T P R E	I E K L D L H N A G F L A		
Mulberry (leaf)	*	* * * * *	* * * * * * * * * * * * * * * *		
Jack bean (seed)	*	* * * S * * * V * * * G * * * * * Y * *			

Fig. 33. Sequence alignment of N-terminal amino acid sequence of urease from the silkworm hemolymph compared with those of mulberry leaf urease and jack bean seed urease. Asterisk represent identical amino acid residues to those of the silkworm urease.

Table. 16. Comparison of properties of ureases from different organisms

	Urease sources		
	Silkworm (hemolymph)	Mulberry (leaf)	Jack bean (seed)
Subunit size	90.5kDa	90.5kDa	93kDa
Optimum pH	9.0	9.0	7.0*
Km for urea	0.15mM	0.16mM	4.0mM*

* Data from Fishbein (1969).

残存する活性を経時的に測定した結果を Fig. 34 に示す。30℃で 6 時間消化液と反応させても桑葉ウレアーゼの場合には半分以上の活性が維持されていたが、ナタマメウレアーゼの場合には同じ処理を行うと活性は初めの約 1/5 になった。また、消化液による酵素タンパク質の分解過程を SDS-PAGE により経時的に調べた結果、桑葉ウレアーゼはナタマメウレアーゼに比べてカイコ消化液による分解を受けにくいことが示された (Fig. 35)。以上の結果から消化液中で桑葉ウレアーゼは比較的安定であり、その理由として消化液中のタンパク質分解酵素に対してある程度耐性を示すことが推測された。

桑葉ウレアーゼの経口投与と体液ウレアーゼ活性の出現

桑葉ウレアーゼがカイコの体液中に取り込まれる現象について量的に解析するため、5 齢 3 日齢あるいは 5 日齢のカイコに 24 時間にわたって、様々な濃度の桑葉ウレアーゼを経口から摂取させた。この処理によりカイコ体液中に現れたウレアーゼ活性を測定した結果を Table 17 に示した。5 齢 3 日齢の幼虫に投与した場合には、合計でウレアーゼ 1.8U (1 頭のカイコが 5 齢期間中に通常摂食するウレアーゼ活性の合計よりも多い) を摂食させても全く体液中にウレアーゼ活性は現れなかった。ウレアーゼを塗布した飼料の代わりに通常通り桑葉を食下させた場合でも同様であった。一方、5 齢 5 日齢の幼虫に摂取させた場合には、最小の投与量 (0.2U) でもかなりの活性が体液中に検出された。また、0.6U または 1.8U を経口から摂取しても、体液中に出現するウレアーゼ活性には両者に大きな違いは見られなかったが、このとき出現するウレアーゼ活性は桑葉を与えた場合に見られる活性値と非常に近かった。

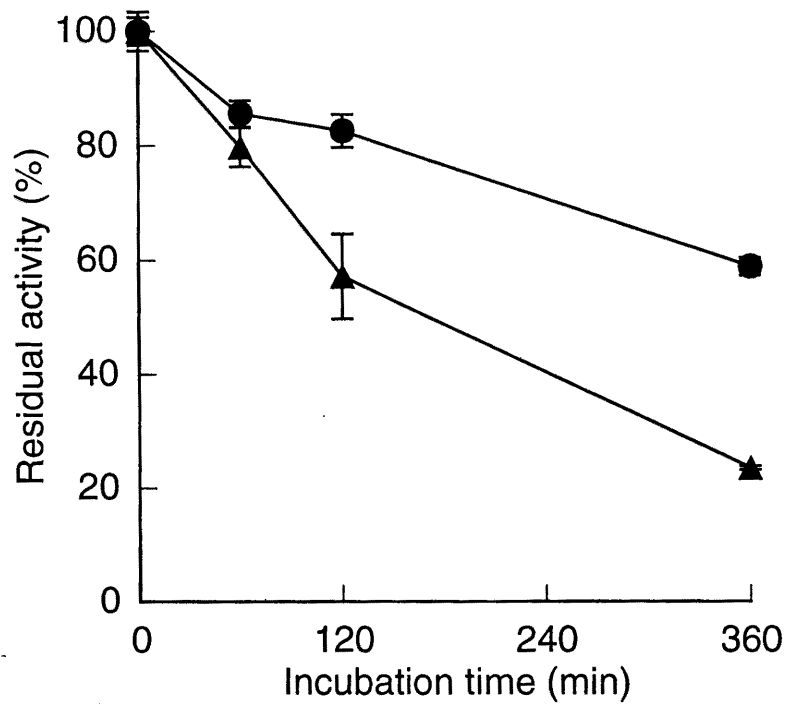


Fig. 34. Residual activities of ureases after the incubation with digestive juice of the silkworm.

▲ Jack bean seed urease ● Mulberry leaf urease

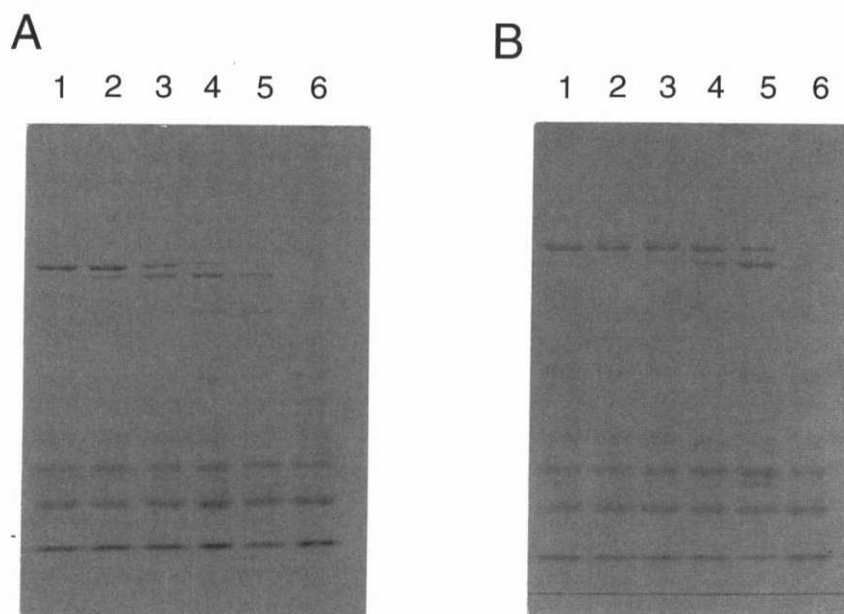


Fig. 35. SDS-PAGE of ureases incubated with the digestive juice of the silkworm.

A; jack bean urease, B; mulberry leaf urease

Each enzyme was incubated with the digestive juice for 0 min (lane1), 30 min (lane2), 2h (lane3), 6h (lane4) and 24h (lane5) respectively at 30°C.

Lane 6; proteins in the digestive juice.

Table 17. Urease activity in the hemolymph of the silkworm fed with mulberry leaf urease

Total amount of mulberry leaf urease administrated to the silkworm (U/larva)	Urease activity in the hemolymph (U/ml hemolymph)	
	4th day in 5th-instar	6th day in 5th-instar
0	Not detected	Not detected
0.2	Not detected	0.048 ± 0.015 (22.5 %)*
0.6	Not detected	0.090 ± 0.024 (13.4%)
1.8	Not detected	0.113 ± 0.033 (5.7%)
Mulberry leaves	Not detected	0.095 ± 0.026

* Efficiency of incorporation of mulberry leaf urease is expressed in parenthesis. Values are expressed as mean ± SD of five replications.

ところで、カイコ1頭あたりのおよその体液量を測定し、体液中に存在する全酵素活性値を推定することにより、ウレアーゼの取り込み効率 $\{(\text{体液中のウレアーゼ全活性}) \div (\text{摂取したウレアーゼ全活性}) \times 100$ (%) を計算した (Table 17)。ウレアーゼの取り込み率は、ウレアーゼの摂取量が多いほど低くなったものの、5.7%から22.5%とかなり高いことが判明した。

考察

桑葉ウレアーゼを精製してその性質についてまず明らかにした。原核生物のウレアーゼが2あるいは3種類のサブユニットから構成されているのに対し、真核生物のウレアーゼはこれまでの知見では、いずれも単一のサブユニットからなることが知られている (Mobley and Hausinger, 1989; Lubbers *et al.* 1996)。桑葉ウレアーゼも単一のサブユニットからなり、その分子量はナタマメおよび大豆種子から精製されたウレアーゼのサブユニットの大きさ (93,500) (Polacco and Havir, 1979) に非常に近かった。

桑葉ウレアーゼは至適 pH が9付近であった。これまで調べられたウレアーゼのほとんどは中性付近に至適 pH を持っており (Mobley and Hausinger, 1989)、桑葉ウレアーゼの至適 pH9 という値はもっとも高い部類に属する。カイコの消化管内の pH は前部と後部で8程度であり、消化管の中程にいくほど高くなっており、その値は10から11であると報告されている (守山ら, 1984)。また、本酵素の尿素に対する K_m 値は

0.16mM であった。カイコ中腸内容物中の尿素濃度は前章で明らかにされたようにおよそ 2-3 $\mu\text{mol/g}$ の範囲にあることから (Fig. 24)、中腸内では基質がほぼ飽和した状態で存在しているものと思われる。さらに、5 齢 3 日齢の幼虫から採取した消化液中において本酵素がかなり安定であることが示された (Fig. 34)。以上の結果から、桑葉を食下した幼虫の消化管内部において、本酵素は十分にその機能を発揮しうることが判明した。したがって、中腸内容物中に検出されたウレアーゼ活性は桑葉ウレアーゼに由来するものと判断された。

一方、熟蚕体液からもウレアーゼを部分精製し、その性質を桑葉ウレアーゼと比較することができた。抗原性、サブユニットの分子量、N 末端アミノ酸配列および酵素学的性質のいずれについても、桑葉ウレアーゼは熟蚕体液ウレアーゼと区別することはできなかった。一方、桑葉ウレアーゼとナタマメウレアーゼと比較した場合には、いずれの性質についても明確な違いがみられた。

昆虫のウレアーゼ活性についてはこれまでわずかではあるが報告されている (Robinson and Baker, 1939; Rosenthal *et al.*, 1977; Bleiler *et al.* 1988)。しかしながら、その性質についての記載はなく、ウレアーゼの実際の起源についても不明であった。今回カイコで明らかにされたように寄主植物のウレアーゼが消化管内、あるいは昆虫体内に取り込まれて機能している例が他の昆虫においてもあるかもしれない。

ところで、蚊やハエ等の吸血性の昆虫では、寄主動物の血液タンパク質成分を未消化のまま昆虫の体液中に取り込んでいる例がたくさん知られている。例えば、寄主動物の抗体 IgG が吸血昆虫の体液中に取り込まれ、抗体としての性質をかなりの間保持していると報告されている

(Hatfield, 1988; Lackie and Gavin, 1989; Vaugham *et al.* 1990; Allingham *et al.* 1992)。寄主動物の血液成分がこれらの昆虫の消化管を通過する現象は、ごく通常の生理現象として認められているが、その生理学的な意義やタンパク質のような巨大分子が消化管組織を通過する機構についてはよく分かっていない。しかし、吸血性の昆虫の消化管の細胞間隙にはかなり大きなすき間が存在していることから、消化管による巨大分子の取り込みは、このすき間を通した拡散現象によるものと推定されている (Billingsley and Lehane, 1996)。

吸血昆虫の体液中に取り込まれたタンパク質の濃度は、寄主の血液中の濃度に比べるとかなり低く、例えばハマダラカ *Anopheles stephensi* の体液 IgG 濃度は寄主血液中の 200 分の 1 程度であり (Vaugham *et al.* 1990)、ノサシバエ *Haematobia irritans exigua* の場合は 5000 分の 1 以下に過ぎなかった (Allingham *et al.* 1992)。これに対し、カイコによる桑葉ウレアーゼの取り込みはより効率的であり、酵素活性に基づいた計算では、経口摂取されたウレアーゼのうち 5 から 23% が消化管を通過して体液に取り込まれたものと推定された。

桑葉ウレアーゼの経口投与の実験から、この酵素が消化管から体液中へ取り込まれる現象は、おそらく摂食期の最終日に特異的であることが明らかにされた (Table 17)。この結果は体液中にウレアーゼ活性が出現するのが熟蚕期以降 (吐糸開始後) に特徴的であること (山田ら, 1984) と一致する。また、Sumida ら (1990) は 5 齢起蚕から 72 時間桑葉で飼育した場合でも、それ以後カイコを絶食させると、熟蚕期以降に尿素が体液中に蓄積してしまうことを見出した。これは熟蚕体液に出現するウレアーゼは熟蚕直前に摂取した桑葉に由来し、5 齢初・中期に摂

取された桑葉ウレアーゼは消化・吸収されてしまうか、糞中に排泄されてしまうことを示唆している。

摂食期には常に桑葉を摂取するので、ウレアーゼが消化管内に存在する状態がいつも保持されており、消化管中の尿素を分解・再利用する機構がうまく機能している。これに対し、熟蚕期以降はガットパーズにより消化管内容物が一掃されてしまうため、消化管への尿素排泄とリンクした尿素再利用機構は機能しなくなると考えられる。したがって、熟蚕期以後も尿素を再利用するためにはガットパーズ直前にウレアーゼを自身の体内へ取込み、保持しておく必要があるのであろう。

現在のところ、なぜウレアーゼの取り込みが時期特異的に起こるのか、その機構については不明である。しかし、カイコがウレアーゼと同じように他の高分子を非特異的に取り込むことは、生体防御の観点からみても考えにくいことであり、ウレアーゼはなんらかの特異的なメカニズムにより消化管から体液へ移行するものと考えられる。この場合、ウレアーゼの特異的な消化管通過は単純な拡散現象では説明不可能であり、エンドサイトシスによる能動的な吸収機構の存在が示唆される。似たような例として、ほ乳類の母乳中に存在する抗体が、新生児によって特異的に吸収される現象が知られている。この場合、抗体を特異的に認識するレセプターが新生児の消化管に特異的に発現することがわかっている (MacKenzie, 1984)。これと同様な機構が機能していると仮定すれば、桑葉ウレアーゼに特異的なレセプターがカイコの熟蚕時の消化管で特異的に発現していることになるが、この点に関しては今後の検討課題である。

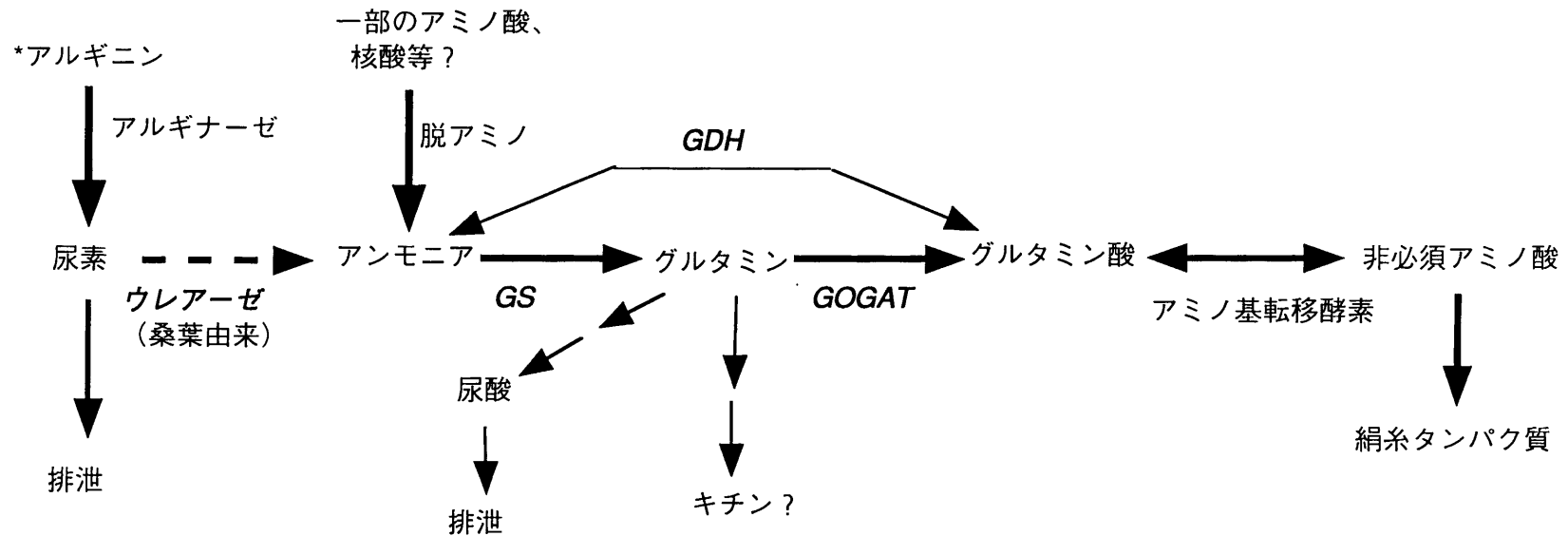
摘要

桑葉ウレアーゼのカイコ尿素代謝への関わりを実証し、その生理学的な機能について検討する目的で桑葉からウレアーゼの精製を行った。精製された酵素の分子量、N 末端アミノ酸配列、至適 pH、基質親和性等の酵素学的性質を検討するとともに、カイコ消化液に対する安定性を調べた。その結果、桑葉ウレアーゼの性質は、これまで精製された植物ウレアーゼとは性質が異なり、至適 pH がカイコ消化管内のようなアルカリ側にあることがわかった。また、カイコ消化液中でかなり安定であり、桑葉ウレアーゼが消化管内で十分に機能する性質を持っていることが判明した。さらに、桑葉飼育したカイコの吐糸期の体液からウレアーゼの部分精製を行い、サブユニットの分子量、基質親和性、至適 pH、N 末端アミノ酸配列、さらにナタマメウレアーゼを抗原として作成したモノクローナル抗体との反応性を調べた。この結果から、家蚕体液ウレアーゼは桑葉ウレアーゼの性質と全く同一であり、桑葉ウレアーゼが消化管から何らかの機構で取り込まれたものであることが示された。また、桑葉から部分精製されたウレアーゼを実験的に 5 齢 3 日齢と 5 齢 5 日齢の人工飼料で飼育したカイコに経口摂取させ、体液へのウレアーゼの出現について調べたところ、5 齢 5 日齢に摂取させた場合のみウレアーゼの取り込みが観察された。以上の結果、桑葉育蚕においては、桑葉ウレアーゼが摂食期には消化管内で作用し、熟蚕期以降は体液内に取り込まれ機能することにより尿素を窒素源として再利用することが可能になっていることが明らかになった。

総合考察

本研究において、飼料に添加したアンモニア塩および体内で窒素代謝の老廃物として生じるアンモニアのカイコの終齢幼虫による代謝・利用について生理・生化学的手法を用いて解析を行った。その結果、体内で生じるアンモニア窒素の多くが絹糸タンパク質の窒素源として再利用されていることを明らかにした（第 1 章）。体内で発生したアンモニアは一旦グルタミン合成酵素（GS）によりグルタミンへ代謝された後、これまで動物において存在が知られていなかったグルタミン酸合成酵素（GOGAT）によりグルタミン酸へ変換されることを突き止めた（第 2 章、3 章）。さらに、体内のアンモニア発生源の一つとして尿素が重要であることを確認し、カイコの食餌である桑葉に含まれるウレアーゼがその代謝・利用に関与していることを証明した（第 4 章、5 章）。今回明らかにされた窒素代謝機構について模式的に示すと Fig. 36 のようになる。

カイコはこのようにアンモニア窒素を絹糸タンパク質の合成に再利用する一方で、一般の昆虫と同様に不要になった窒素を尿酸の形にして排泄することも知られている。通常摂取した窒素のたかだか 2% 程度が尿酸として排泄されているに過ぎないが（小林ら, 1980; 堀江ら, 1978 の結果より計算）、絹糸タンパク質の合成が阻害されるような場合には、尿酸の排泄が著しく増加することから（小林ら, 1980）、カイコがもともと尿酸排泄性の昆虫であることは疑う余地はない。通常は発生するアンモニア窒素を主に「繭糸」の形にして再利用しているものの、この処理方法が機能しないような緊急事態においては、尿酸



--- ; 桑葉を摂取したカイコにのみ存在する代謝経路

Fig 36. カイコにおける窒素再利用経路の推定図

本論文で明らかとされた代謝経路はイタリックで示した。

*注:昆虫では尿素サイクルが無い。また、アラントイン酸を分解するアラントイカーゼを欠くので、尿素は食餌等に由来するアルギニンの分解でしか生じない。

(Cochran, 1985; Capman 1998 参照)

合成・排泄を活性化させる潜在的な能力が備わっていると考えられる。

昆虫の多くは不要な窒素を主に尿酸、あるいは尿酸の代謝物であるアラントインやアラントイン酸の形で排泄するが、窒素栄養が貧困なあるいは組成が極端にアンバランスな食餌環境下で日常的に生育する昆虫は窒素の排泄をできうるだけ抑制し、再利用を行っていると考えられている。シロアリやアブラムシ、ウンカ等はこのような栄養環境で生育する代表的な昆虫であるが、これらの昆虫の共通の特徴は消化管内あるいは組織内に共生微生物を保有している点である。現在では共生微生物の役目は、宿主の食餌に含まれるアンバランスな有機窒素分を、宿主自身には存在しない代謝系を用いてバランスのとれたものに変換し宿主へ供給することであると考えられている（石川, 1994）。

そのメカニズムについては、特にエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* で詳細に研究されている。抗生物質投与によってアブラムシから共生微生物を駆逐してしまうと、窒素栄養不良になりほとんど生育できない。この場合、摂取した飼料のアミノ酸組成によらず、アブラムシの排泄物中にグルタミンやアスパラギンが極めて多量に排泄されることから、グルタミンやアスパラギンが宿主本来の窒素代謝の終末生産物であると考えられた（Sasaki *et al.* 1990）。アブラムシ共生体には、本来排泄されるはずのこれらのアミド化合物を再利用するための代謝系が存在する。不要の窒素はグルタミン合成酵素（GS）によりグルタミンに変換後、共生体が生息する「菌細胞」と呼ばれる特殊な体細胞に取り込まれ、共生体によって吸収・代謝される（Sasaki and Ishikawa, 1995）。

カイコの窒素再利用系と比較した場合、不要な窒素が、宿主の代謝

系により一旦グルタミンに固定される点はカイコの代謝系と共通であり、グルタミンがアンモニア窒素の一時的な解毒体あるいは担体として重要であることを示すものであろう。カイコの場合、その組織中にこれまで動物には無いと思われていた GOGAT の存在が明らかにされ、グルタミンはこの酵素によってグルタミン酸へ変換されることは、すでに述べたとおりである。カイコには共生微生物が存在しないので(伊藤, 1983)、GOGAT が昆虫自身の遺伝子産物であることは疑う余地はなく、「微生物や植物だけが GS/GOGAT 経路によりアンモニアの同化を行っている」というこれまでの定説は修正されることになった。これに対しアブラムシでは、グルタミンは共生体によって吸収される際にグルタミナーゼによりアンモニアへ再分解されてから供給されており (Sasaki and Ishikawa, 1995)、昆虫自身は GOGAT を保有していないようである。アブラムシの窒素再利用代謝系ではアンモニアから非必須アミノ酸だけでなく必須アミノ酸が合成・供給される点がカイコの場合とは大きく異なり、極めて重要な特徴である (Sasaki and Ishikawa, 1995)。アブラムシの共生体において、必須アミノ酸合成に関わる酵素遺伝子が発現していることが確認されている (Nakabachi and Ishikawa, 1997)。

カイコやアブラムシ以外の昆虫の窒素再利用代謝系については、その実態についてほとんど解明されていない。今後の研究の進展により、窒素代謝系のどの酵素が普遍的に存在し、その一方でどのような酵素がそれぞれの種に特異的なものなのかが、徐々に明らかになるであろう。ごく最近になって、既知の GOGAT 遺伝子と非常に相同性の高い遺伝子がショウジョウバエにも存在することが判明した (遺伝子番号

CG9674, “FlyBase” ; <http://flybase.bio.indiana.edu/> 参照)。さらに、GOGAT様遺伝子は線虫でも見つかっていることから (Vanoni and Curti, 1999)、GOGAT は昆虫をはじめとする無脊椎動物に広く分布する可能性もある。動物における「窒素代謝の進化」を分子レベルで論ずるためにも、多くの生物種において GOGAT のような窒素代謝関連酵素の遺伝子解析が進むことが期待される。

ところで、本論文 (第 3 章) でカイコの GOGAT は 5 齢期中・後半に急激に活性が上昇し、中でも後部絹糸腺における GOGAT 活性が蚕体組織全体の活性のかなりの部分を占めることを明らかにした。この組織における GOGAT 活性がアンモニア窒素を効率よく絹糸タンパク質へ移行させる上で極めて重要な働きをしていることは間違いのないことと思われる。一方、絹糸タンパク質合成が低調な 4 齢期間においては、後部絹糸腺における GOGAT 活性はずっと低いままであったことから、GOGAT 活性と絹糸タンパク質合成活性とは何らかの共通する機構で制御されている可能性が考えられる。

後部絹糸腺における絹糸タンパク質フィブロインの合成は遺伝子の転写レベルで調節されており、カイコ終齢においてその合成が著しく促進される (鈴木, 1984)。同様に脂肪体における主要な体液タンパク質 (貯蔵タンパク質、30K タンパク質) の合成も終齢幼虫に特徴的な現象として知られており、これらの遺伝子の転写誘導が主に幼若ホルモンの消失に依存していることが示されている (富野, 1990)。GOGAT の活性調節機構についてはいまのところ全く不明であるが、遺伝子発現が幼若ホルモン等により内分泌的に制御されている可能性もあり、今後タンパク質・遺伝子レベルで発現制御機構の検討が必要

であろう。

本研究で明らかにされた成果の一つは、カイコの窒素老廃物の一つである尿素の代謝運命が、摂取する飼料に依存して様相を異にしており、その原因が飼料中のウレアーゼにあることを証明した点である(第4章、5章)。すなわち、カイコは5齢摂食期においては、餌として摂取した桑葉中のウレアーゼを消化管内で機能させることにより、体内から消化管へ分泌される尿素をアンモニアに分解し、窒素源として再吸収・再利用することが明らかとなった。さらに、桑葉ウレアーゼは、熟蚕期になるとカイコの体液中に取り込まれ、より効率的にその機能を発揮するようになる。しかし、加熱加工した人工飼料にはウレアーゼが含まれないので、尿素は利用されずにそのまま排泄されてしまうか、代謝されずに体液中に蓄積してしまう。この現象との関連で非常に興味深いのがカイコ消化管において赤色蛍光タンパク質(RFP)が生成される機構である。カイコによって桑葉が摂取されると、葉に含まれるクロロフィル-a とクロロフィラーゼが中腸内で反応し、クロロフィリド-a が生成し(林屋ら, 1976a)、さらにこれがカイコ自身のタンパク質と非酵素的反応により結合して RFP が合成されると報告されている(林屋ら, 1976a, 内田・林屋, 1981)。この RFP は核多角体病ウイルスに対して抗ウイルス作用を示し、カイコの生体防御に貢献することがわかっている(林屋ら, 1976b; 林屋, 1978)。一方、人工飼料で飼育した場合には飼料中にクロロフィラーゼ活性がないので、上記の様な反応は起こらず RFP の生成もない。このように、カイコは飼料として摂取した桑葉中の酵素(タンパク質)を単に栄養源として利用するだけでなく、自らの生理機能の一部を担わせるべく巧みに利

用しており、昆虫-植物間の相互作用の例としても極めて特異的であると思われる。

これまで、生体内で生じるアンモニアを効率よく再利用するために、カイコの終齢幼虫が巧妙なメカニズムを備えていることを述べてきた。しかし、その代謝系の生理的・生態的意味についてはこれまで議論してこなかった。前述したように、窒素（アンモニア）の再利用は、有機窒素栄養が貧困、あるいはこれらの組成が極端にアンバランスな環境で生育する昆虫にとっては極めて重要なことであるが、カイコの場合、その食餌である桑葉はアミノ酸（タンパク質）が豊富でかつその組成も非常にバランスが良いので、窒素の再利用自体がおそらく本来は不必要なものと思われる。カイコの場合、発生するアンモニア窒素のほとんどが繭層を構成する絹糸タンパク質へ取り込まれることが大きな特徴であるが、野蚕であるエリサン *Samia cynthia ricini* においてもアンモニア窒素が絹糸タンパク、フィブロインの非常に重要な窒素源であることが最近になって証明された (Osanai *et al*, 2000)。テンサン、サクサン等の野蚕においては、繭層が無防備な蛹期を安全に過ごすためのシェルターとして機能しているわけだが、おそらく繭層を構成する絹糸タンパク質はカイコと同じように不要なアンモニア窒素のリサイクルによって作られているものと推測される。野蚕や家蚕等の絹糸虫類の共通祖先種が体内で発生するアンモニア窒素を絹糸タンパク質の窒素源として再利用する能力を獲得した結果、外敵の多い環境でも生存できるようになり、その能力が現在の家畜化された家蚕にも引き継がれているのであろう。絹糸虫類の窒素リサイクルは、前述したアブラムシやウンカで見られる窒素リサイクルとは全く異なる生理

的・生態的機能であることは明らかである。

ところで、アンモニア窒素を行動制御物質として利用している昆虫がいくつか知られている。例えば、チャバネゴキブリ *Blattella germanica* は糞中のアンモニアおよびアミン類を集合フェロモンとして利用していることが知られている (Sakuma and Fukami, 1990)。また、シロイチモジマダラメイガ *Etiella zinckenella* のオス成虫の刷子器官 (brush-organ) には大量のアンモニアが存在しており、これを交尾の際に放出し、交尾行動制御物質として利用していると考えられている (Hattori, 1987)。本来老廃物に過ぎないアンモニアのような窒素化合物を単に排泄してしまわずに、別の生体機能のために再活用できれば、新たな物質を合成するための代謝系を構築しなくてすむので、生物にとって大変合理的であるといえるであろう。

さて、カイコの祖先種が進化の過程で合理的な窒素再利用システムを獲得し、さらにこの機能を育種によって人為的に強化したことによって、本来排泄されるべき不要な窒素化合物を我々人類は絹糸の形で手にすることが可能になったわけだが、カイコの体内でどれぐらいの量のアンモニアが発生し、有効利用されているのであろうか。このことは実用的な観点からも非常に興味深い問題である。当初、GS に特異的な阻害剤メチオニンスルフォキシミンを用いて GS/GOGAT 経路を遮断することにより、その繭生産への影響がみられるものと期待したが、カイコは蓄積するアンモニアの毒性で死亡してしまった。GOGAT を阻害した場合にはグルタミンが蓄積し、最終的には尿酸の形で排泄されるものと思われる。将来的には特異的な阻害剤あるいは分子生物学的手法を用いて GOGAT 活性を「ノックアウト」できれば、

GS/GOGAT 経路によって代謝される窒素量を推測できるであろう。一方、カイコを人工飼料で飼育すると、ウレアーゼを欠失した状態になるので、尿素に由来するアンモニア窒素の再利用を完全にストップさせることができる。カイコを人工飼料で飼育した場合、繭層歩合（繭層重/全繭重の比）が桑葉で飼育した時に比べて小さくなり、繭層生産性が劣るようになる（水沢ら, 1977）。この現象の原因の一つとしては、蚕体で発生する尿素が分解・代謝されずにそのまま糞に排泄されたり、体液中に蓄積してしまうので、再利用可能な窒素分が繭層へ移行しないためと解釈できるであろう。人工飼料育と桑葉育とを比較した場合、両者の尿素代謝の生理的な違いが「繭生産性」という経済的な側面にも差を生じさせている可能性を十分に認識しておく必要がある。

以上本研究は、カイコの体内で発生するアンモニアの代謝機構について明らかにし、昆虫の代謝生理学に新しい視点を提供したものである。また、本研究では通常的人工飼料にアンモニウム塩を添加した場合の飼料効率や増繭効果等、実用的な観点からのアンモニア窒素の利用についてはほとんど検討しなかったが、本研究の成果をもとに今後は繭生産を目的とする栄養管理技術の開発・研究の一層の飛躍も期待される。

総括

従来カイコは桑葉を唯一の飼料として飼育されていたが、カイコの栄養要求性の研究が進み、低コストな畜産用飼料素材を導入した人工飼料が線形計画法に基づいて開発されるようになると、全齢人工飼料育の実用化が検討されるようになった。特に最近になって、桑葉以外の植物葉や飼料素材をよく食べる広食性（polyphagous）の形質を有する蚕品種が育成されたことにより、広食性蚕品種と低コスト人工飼料を組み合わせた新しい繭生産システムの開発が一層期待されるようになった。しかしながら、人工飼料育は従来の桑葉飼育に比べ、繭層生産性が劣ることが指摘されており、人工飼料育に適合した蚕品種の育成と繭層生産効率の高い低コスト人工飼料の開発が急がれている。繭層生産性を高めるための一つの方策として、非必須アミノ酸混合物を多量に飼料中に添加することが有効であることが知られているが、コストの面から実用化が難しく非必須アミノ酸の代替物になりうる安価な飼料素材を導入することが必要である。家畜等において、飼料中に添加したアンモニウム塩の一部が腸管から吸収された後にアミノ酸に変換されることが報告されていることから、アンモニウム塩はカイコの人工飼料の素材としても有望であると思われるが、これまで全く検討されていなかった。

本研究では、アンモニウム塩をカイコの人工飼料の飼料素材として利用する観点から、終齢幼虫におけるアンモニア窒素の代謝・利用について生理・生化学的手法により解析を行った。また、カイコ体内におけるアンモニアの発生源の一つである尿素に着目し、飼料による代謝特性の差について生化学的側面から検討を行った。本研究で得られた知見の

概略は以下の通りである。

1. アンモニア窒素の窒素栄養源としての有効性

アンモニウム塩の飼料窒素源としての有効性を判定するために、まず、必須アミノ酸のみを窒素源とする人工飼料（基本飼料）に各種アンモニウム塩を添加した試験飼料で5齢幼虫を飼育し、基本飼料と栄養価を比較した。栄養価の指標として体重、絹糸腺、その他組織の重量および生存率を調べた結果、アンモニウム塩の中ではクエン酸アンモニウムおよび酢酸アンモニウムに成長促進効果があった。クエン酸アンモニウムの添加はグルタミン酸とほぼ同等の有効性を示した。また、添加した窒素源の有効性の指標として体液のアミノ酸組成を分析した結果、クエン酸アンモニウムの添加により、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシンやフェニルアラニン等の必須アミノ酸が減って、セリン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、アラニンやプロリンなどの非必須アミノ酸が顕著に増加しており、アンモニア窒素から非必須アミノ酸への転換が示唆された。次に、カイコが摂取したアミノ態窒素と体内に新たに増加したアミノ態窒素の収支について化学量論的に調べたところ、アンモニウム塩を添加した飼料で飼育した場合、摂取したアミノ態窒素量よりもカイコ体内に蓄積したアミノ態窒素量の方が明らかに多くなっており、アンモニア窒素からアミノ酸の合成がカイコ体内で起きていることが判明した。さらに、 ^{15}N で標識された酢酸アンモニウムを添加した人工飼料を与えると約50%の ^{15}N が体内に取り込まれ、そのうちの40%が絹糸タンパク質合成に利用された。また通常の人工飼料で飼育した5齢2、5、8日齢のカイコの

体液中に $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムを注射し、12 時間後の各組織への分布を調べたところ、注射した ^{15}N アンモニウムのうち 5 齢 2 日目では約 20%が、5 齢 5 日および 8 日目では 60-70%が絹糸タンパク質へ取り込まれ、5 齢の中・後期のほうがアンモニア窒素を効率的に絹糸タンパク質の合成に利用していることが判った。

2. 終齢幼虫におけるアンモニア同化経路

カイコの 5 齢幼虫におけるアンモニア同化経路を明らかにするため各組織の窒素代謝関連酵素の活性について検討を行った。その結果、脂肪体、絹糸腺、中腸において植物や微生物のアンモニア同化に関わるグルタミン合成酵素(GS)、グルタミン酸合成酵素(GOGAT)およびグルタミン酸脱水素酵素(GDH)の活性が検出された。このことからカイコ体内におけるアンモニアの代謝経路としては、微生物や植物で知られる GS/GOGAT 経路、および哺乳動物にも存在する GDH 経路の 2 通りが考えられた。カイコにおける主要なアンモニア代謝経路を知るため、5 齢 7 日目のカイコ体液中に GS の特異的な阻害剤（メチオニンスルフォキシミン；MS）を注射し、GS/GOGAT 経路を人為的に遮断することで GDH 経路だけが働きうる状態を作った。この結果、各組織の GS の活性が阻害され、体液中のグルタミンの減少が引き起こされたが、これに伴い体液中のアンモニアが顕著に増加した。このことは、脱アミノ反応により生じるアンモニアを GS によってグルタミンに変換していることを示すとともに、GDH によるアンモニアからのグルタミン酸への変換の系が弱いことを示唆している。注射する MS の量を増やすと、蓄積するアンモニアも増大し、その毒性により死亡

する個体が現れた。5 齢 2 日および 5 日目に MS を投与した場合には糞中のアンモニアが著しく増大しており、発生したアンモニアを代謝せずにそのまま排泄していることがわかった。さらに、 ^{15}N 化合物を用いたトレーサー実験により MS のアンモニア代謝に及ぼす影響を調べた。MS を [^{15}N]酢酸アンモニウムと一緒に注射すると、 ^{15}N の絹糸タンパク質への取り込みは著しく阻害されたが、 [^{15}N]酢酸アンモニウムの代わりに [^{15}N アミド]グルタミンを投与した場合には、 ^{15}N の絹糸タンパク質への取り込みは MS による影響をほとんど受けなかった。これらの結果から、カイコ体内で発生するアンモニアの主要な同化経路が GS/GOGAT 経路であると推定された。

3. グルタミン酸合成酵素の精製と性質

カイコが高等植物のように GS/GOGAT 経路を機能させ、アンモニア窒素をアミノ酸へ同化していることが明らかとなったが、これまで GOGAT については動物組織では存在が知られていなかったもので、その性質と機能を知る目的で、後部絹糸腺および脂肪体から本酵素の精製を行った。分離・精製した酵素の分子量、N 末端アミノ酸配列、至適 pH、基質特異性、基質親和性等を調べた結果、カイコ GOGAT は植物や酵母等の真核生物に存在する NADH 依存型 GOGAT と極めてよく似た性質を持っていることが判明した。また、その性質の比較から脂肪体と後部絹糸腺の酵素は全く同一の酵素と推定された。アンモニア窒素が絹糸タンパク質合成に効率よく利用される 5 齢中・後期の各組織、特に後部絹糸腺中の酵素活性が強く、この酵素が絹糸タンパク質の窒素源を供給する重要な役割を担っていることが推定された。

4. 飼料に依存した尿素の利用・代謝特性

カイコを桑葉で飼育した場合に限り、尿素をアンモニアに分解するウレアーゼ活性が吐糸期以降の体液中に出現し、これに伴って体液尿素濃度が急激に減少することが知られている。飼料に依存して尿素の運命に違いが見られるか否かを知るために、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素および $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムを5齢7日齢（熟蚕）のカイコ体液中に注射し、絹糸タンパク質中に取り込まれる ^{15}N 量を測定した。人工飼料育のカイコにおいては、 $[^{15}\text{N}]$ 酢酸アンモニウムを注射した場合にだけ $[^{15}\text{N}]$ が絹糸タンパク質中に取り込まれた。桑葉育のカイコにおいては、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素を注射した場合も $[^{15}\text{N}]$ アンモニウム塩を注射したときと全く同様に、投与した ^{15}N の約80%が絹糸タンパク質中に取り込まれた。次いで、摂食期においても飼料に依存した尿素の利用・代謝特性の違いが見られるか検討した。桑葉育の5齢3日齢（摂食期）のカイコに $[^{15}\text{N}]$ 尿素を注射した場合には、 $[^{15}\text{N}]$ の絹糸タンパク質への取り込みが観察されたが、人工飼料で飼育したカイコでは、 $[^{15}\text{N}]$ 尿素は全く利用されなかった。桑葉育5齢3日齢のカイコ体液中にはウレアーゼ活性は存在しなかったものの、消化管内容物中に活性が認められた。消化管各部位における内容物中の尿素を定量したところ、消化管全体にわたって多量の尿素が存在していたが、桑葉育の場合には、人工飼料育蚕に比べると少なかった。以上の結果から、5齢の摂食期には、消化管組織から消化管内腔へと尿素が分泌されるが、桑葉で飼育した場合に限ってカイコの消化管内腔でウレアーゼが働くので、尿素からアンモニアが発生し、その一部が消化管から再吸収・利用されるもの

と推定された。

5. カイコの尿素代謝に関わるウレアーゼの起源とその生化学的・酵素学的性質

桑葉ウレアーゼのカイコ尿素代謝への関わりを実証し、その生理学的な機能について検討する目的で桑葉からウレアーゼの精製を行った。精製された酵素の分子量、N末端アミノ酸配列、至適 pH、基質親和性等の酵素学的性質を検討するとともに、カイコ消化液に対する安定性を調べた。その結果、桑葉ウレアーゼの性質は、これまで精製された植物ウレアーゼとは性質が異なり、至適 pH がカイコ消化管内のようなアルカリ側にあることがわかった。また、カイコ消化液中でかなり安定であり、桑葉ウレアーゼが消化管内で十分に機能する性質を持っていることが判明した。さらに、桑葉飼育したカイコの吐糸期の体液からウレアーゼの部分精製を行い、サブユニットの分子量、基質親和性、至適 pH、N末端アミノ酸配列、さらにナタマメウレアーゼを抗原として作成したモノクローナル抗体との反応性を調べた。この結果から、家蚕体液ウレアーゼは桑葉ウレアーゼの性質と全く同一であり、桑葉ウレアーゼが消化管から何らかの機構で取り込まれたものであることが示された。また、桑葉から部分精製されたウレアーゼを実験的に5齢3日齢と5齢5日齢の人工飼料で飼育したカイコに経口摂取し、体液へのウレアーゼの出現について調べたところ、5齢5日齢に摂取させた場合のみウレアーゼの取り込みが観察された。以上の結果、桑葉育蚕においては、桑葉ウレアーゼが摂食期には消化管内で作用し、熟蚕期以降は体液内に取り込まれ機能することにより尿素を窒素源として再利用することを可能にしている

ことが明らかになった。

以上要するに、本研究において、カイコ終齢幼虫がアンモニア窒素を活発に絹糸タンパク質へ同化する能力があることを見出すとともに、動物においてこれまで知られていなかったアンモニアの同化経路の存在を立証し、その代謝経路を構成するグルタミン酸合成酵素の性質を明らかにした。さらに、カイコの生体内でのアンモニア発生源の一つである尿素の代謝・利用の様相が幼虫の摂取した飼料に依存して全く異なり、飼料中のウレアーゼの存否がこのことと密接に関わっていることが明らかとなった。今後、繭生産を目的とする栄養管理技術の開発・研究の発展に本研究の知見が役立つものと期待される。

文献

Allingham P. G., Kerlin R. L., Tellam R. L., Briscoe S. J. and Standfast H. A. (1992) Passage of host immunoglobulin across the mid-gut epithelium into the haemolymph of blood-fed buffalo flies *Haematobia iriitans exigua*. J. Insect Physiol. 38, 9-17.

Anderson M. P., Vance C. P., Heichel G. H. and Miller S. S. (1989) Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. Plant Physiol. 90, 351-358.

Arima Y. and Kumazawa K. (1977) Evidence of ammonia assimilation via the glutamine synthetase-glutamate synthase system in rice seedling roots. Plant Cell Physiol. 18, 1121-1129.

Billingsley P. F. and Lehane M. J. (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. Biology of the Insect Midgut. Chapman&Hall, London. pp3-30.

Bleiler J. A. and Rosenthal G. A. (1988) Biochemical ecology of canavanine-eating seed predators. Ecology 69, 427-433.

Boland M. J. and Benny A. G. (1977) Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-glutamate synthase

from lupin nodules. Eur. J. Biochem. 79, 355-362.

Brenchley J. E. (1973) The effect of methionine sulfoximine and methionine sulfon on glutamate synthesis in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. 114, 666-673.

Brown C. M., McDonald-Brown D. S. and Meers J. L. (1974) Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. Adv. Microbiol. Physiol. 11, 1-52.

Bursell E. (1967) The excretion of nitrogen in insects. Adv. Insect Physiol. 4, 33-67.

Bursell E. (1975) Glutamic dehydrogenase from sarcosomes of the tsetse fly (*Glossina morsitans*) and the blow fly (*Sarcophaga nodosa*). Insect Biochem. 5, 289-297.

Chapman R.F. (1998) Excretion and salt and water regulation. The Insects: Structure and Function, 4th edition. Cambridge University Press. pp478-508.

Chen, F. L. and Cullimore J. V. (1988) Two isozymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 88, 1411-1417.

Cheng K. J. and Wallace R. J. (1979) The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *British J. Nutr.* 42, 553-557.

Cochran D. G. (1985) Nitrogen excretion. *Comparative Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol.4. Pergamon Press, Oxford. pp. 467-506.

Cogoni C., Valenzuela L., Gonzalez-Halpen D., Olivra H., Macino G., Ballario P. and Gonzalez A. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 792-798.

Curti B., Vanoni M., Verzotti E. and Zanetti G. (1996) Glutamate synthase: a complex iron-sulfer flavoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 95-99.

Dimond J. B., Lea A. O., Hahnert W. F. and DeLong D. M. (1956) The amino acids required for egg production in *Aedes aegypti*. *Can. Ent.* 88, 57-62.

Dowton M. and Kennedy I. R. (1985) Purification and property of glutamine synthetase from freshfly flight muscle. *Insect Biochem.* 15, 763-770.

Eskew D. L., Welch R. M. and Cary E. E. (1983) Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science* 222, 621-623.

Fentem P. A., Lea P. J. and Stewart G. R. (1983) Action of inhibitors of ammonia assimilation on amino acid metabolism in *Hordeum vulgare* L. (cv. Golden promise). *Plant Physiol.* 71, 502-506.

福田紀文 (1951) 家蚕の蛹化と絹物質形成の關係に就いて. *蚕試報.* 13, 423-480.

Fukuda T. and Hayashi T. (1958) Biochemical studies on the formation of the silkprotein.. Conversion of glyoxilic acid to glycine in the silkworm larva. *J. Biochem.* 45, 469-474.

蒲生卓磨 (1980) アミノ酸分析法. *昆虫実験法 (研究編)* pp, 29-44. 学会出版センター, 東京

Gamo T., Kuroda S., Horie Y. and Watanabe K.(1978) Quantitative changes of asparagine and glutamine in hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, during larval and pupal development. *Appl. Ent. Zool.* 13, 223-226.

Hattori M. (1987) Evidence of ammonia presence in the brush-organs of the limabean pod borer, *Etiella zinckenella* Treitschke (Lepidoptera: Pyralidae) *Appl. Ent. Zool.* 22, 399-401.

Hatfield P. R. (1988) Detection and localization of antibody ingested with a mosquito bloodmeal. *Med. Vet. Ent.* 2, 339-345.

Hayakawa T., Yamaya T., Kamachi, K. and Ojima K (1992) Purification, Characterization, and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. *Plant Physiol.* 98, 1317-1322.

林屋慶三 (1978) 赤色けい光たんぱく質 (RFP) のウイルス不活化機構に関する研究 I RFP とウイルスとの間の沈降反応. *応動昆.* 22, 238-242.

林屋慶三・西田順・内田由子(1976a) カイコ幼虫消化液中の赤色けい光たんぱく質の生成機構 クロロフィリド a の生成. *応動昆.* 20, 37-43.

林屋慶三・内田由子・西田順 (1976b) 明および暗飼育したカイコの赤色けい光たんぱく質の生成とウイルス抵抗性. *応動昆.* 20, 139-143.

堀江保宏・井口民夫・渡辺喜二郎 (1978) 家蚕のライフサイクルにおける栄養物質の量的収支に関する研究. II. 窒素およびアミノ酸の摂取と利用. *蚕試報*, 27, 531-578.

Horie Y. and Watanabe K. (1983) Effect of various kinds of dietary protein and supplementation with limiting amino acids on growth, haemolymph components and uric acid excretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 29, 187-199.

Houpt T. R. and Houpt K. A. (1968) Transfer of urea across the rumen wall. *Am. J. Physiol.* 214, 1296-1303.

稲垣秀一郎・山下興亜 (1983) 家蚕の4, 5 齡期に投与した栄養物質の繭糸および完成卵への代謝分配. *日蚕雑*. 52, 215-220.

井口民夫 (1970) 家蚕のアミノ酸栄養に関する研究. III. 幼虫の血液の蛋白質濃度および遊離アミノ酸組成に及ぼす飼料中のアミノ酸の影響. *蚕試報*. 24, 389-408.

伊藤智夫 (1983) カイコの栄養と人工飼料. 日本蚕糸新聞社、東京

伊藤智夫・荒井成彦 (1965) 家蚕の栄養に関する研究. VIII. アミノ酸ならびに各種蛋白質の栄養効果. *蚕試報*, 19, 345-373.

伊藤智夫・荒井成彦・井口民夫 (1967) 家蚕の栄養に関する研究. XV II. 5 齡幼虫の成長および繭質に及ぼす飼料のアミノ酸含量の影響. *蚕試報*, 21, 385-400.

Ito T. and Inokuchi T. (1992) Nutritive effects of asparagine and glutamine on the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Ent. Zool.* 27, 575-586.

石川統 (1994) 昆虫を操るバクテリア. 共生の生態学 1. pp, 77-84. 平凡社. 東京

唐沢豊 (1986) ニワトリにおける食餌性アンモニアの代謝. 日畜会報, 57, 1-12.

小林睦夫・浜野国勝・向山文雄 (1980) 裸蛹 (Nd) 蚕の5齡期における窒素収支の特徴について. 日蚕雑. 49, 91-94.

Kobayashi M., Mukaiyama F. and Hamano K (1980) Studies on the nitrogenous compounds in urine of mature silkworm larvae, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Ent. Zool. 15, 60-65.

小出英興・長山英男・志村憲助 (1955) 蚕体組織の Transaminase について. 日農化. 29, 987-990.

小出英興・長山英男・志村憲助 (1956) 蚕体内に於けるアミノ転移反応による Glycine の生合成について. 日農化. 30, 283-287.

Krogmeier M. J., McCarty G. W. and Bremner J. M. (1989) Phytotoxicity of folia-applied urea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 819-

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lackie A. M and Gavin S. (1989) Uptake and persistence of ingested antibody in the mosquito *Anopheles stephensi*. Med. Vet. Ent. 3, 225-230.

Lam H. M., Coschigano K. T. , Oliveira I. C., Melo-Oliveira R. and Coruzzi G. M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47, 569-593.

Liu C. H., Hays V. W., Svec H. J., Catron D. V., Ashton G. C. and Speer V. C. (1955) The fate of urea in growing pigs. *J. Nutr.* 57, 241-247.

Levenbook L. and Kuhn J. (1962) Properties and distribution of glutamine synthetase in the southern armyworm *Prodenia eridania*. *Biochim. Biophys. Acta* 65, 219-232.

Lewis O. A. M. and Probyn T. A. (1978) ¹⁵N incorporation and glutamine synthetase inhibition studies of nitrogen assimilation in leaves of the nitrophile *Datura stramonium* L. *New Phytol.* 81, 519-526.

Lewis O. A. M., Chadwick S. and Withers J. (1983) The assimilation of ammonia by barley roots. *Planta* 159, 483-486.

Lubbers M. W., Rodriguez S. B., Honey N. K. and Thornton R. J. (1996) Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.* 42, 132-140.

MacKenzie N. (1984) F_c receptor-mediated transport of immunoglobulin across the intestinal epithelium of the neonatal rodent. *Immunol. Today* 5,

364-366.

Male K. B. and Storey K. B. (1982) Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the cold-hardy gall fly larva *Eurosta solidaginis*. *Insect Biochem.* 12, 507-514.

Match T., Ida S. and Takahashi E. (1980) *Plant Cell Physiol.* 21, 1461-1474.

Meister A. (1985) glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods in Enzymology* 113, 185-199.

Mifflin B. J. and Lea P. J. (1980) Ammonia assimilation. *The Biochemistry of Plants*, vol.5. pp. 169-202. Academic Press, New York.

水沢久成・笹原重雄・小野寺ナミ子 (1977) 原蚕の人工飼料育における繭及び卵の生産効率. *蚕糸研究.* 104, 55-62.

Mobley H. L. T. and Hausinger R. P. (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53, 85-108.

森正敬 (1991) 生体の窒素の旅. 共立出版

森正敬・石村巽・橘正道 (1997) アミノ酸代謝. 細胞機能と代謝マップ I. 細胞の代謝・物質の動態. 日本生化学会編. 東京化学同人

守山弘・榎本末男・加藤昭輔・岩波節夫 (1984) カイコの消化液の強塩基性とイオン組成の関係. 日蚕雑. 53, 506-512

Nakabachi A. and Ishikawa H. (1997) Differential display of mRNAs related to amino acid metabolism in the endosymbiotic system of aphids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 1057-1062.

Niiyama M, Kagota K, Iwase T and Namioka S. (1978) A ^{15}N study on dietary urea utility in young pigs fed with a low protein diet. *Jap. J. vet. Sci.* 40, 575-583.

日本土壤肥料学会監修 (1990) 植物栄養実験法. 博友社, 東京 pp. 276-278

Noguchi A., Takeshita H. and Shigematsu H. (1974) Interrelationship between the silk gland and other tissues in protein metabolism in the latest larval stage of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 20, 783-794.

Oaks A. and Hirel B. (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36, 345-365.

Okumura J, Tanaka H and Muramatsu T. (1979) Incorporation ^{15}N -Urea in chicks. *Japan Poult. Science.* 16, 45-48.

Osanai M., Okudaira M., Naito J., Demura M. and Asakura T. (2000) Biosynthesis of L-alanine, a major amino acid of fibroin in *Samia cynthia ricini*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 225-232.

Polacco J. C. and Havir E. A. (1979) Comparison of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *J. Biol. Chem.* 254, 1707-1715.

Polacco J. C. and Winkler R. G. (1984) Soybean leaf urease: a seed enzyme? *Plant Physiol.* 74, 800-803.

Prezioso G., Indiveri C. and Bonvino V. (1985) Kinetic characterization of L-glutamate dehydrogenase isolated from *Drosophila melanogaster* *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 1-4.

Richards P. (1972) Nutritional potential of nitrogen recycling in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 615-625.

Robinson W. and Baker F. C. (1939) The enzyme urease and the occurrence of ammonia in maggot-infected wounds. *J. Parasitol.* 25, 149-155.

Rock G. C. and King K. W. (1967) Qualitative amino acids requirements of the red-banded leaf roller, *Agryotaenia velutinana*. *J. Insect Physiol.* 13, 59-68.

Ronzio R. A., Rowe W. B. and Meister A. (1969) Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* 8, 1066-1075.

Rosenthal G. A., Janzen D. H. and Dahlman D. L. (1977) Degradation and detoxification of canavanine by a specialized seed predator. *Science* 196, 658-660.

Rosenthal G. A., Hughes C. and Janzen D. H. (1983) L-Canavanine, a dietary source for the seed predator *Caryedes brasiliensis* (Bruchidae). *Science* 217, 353-355.

Rosenthal G. A. and Janzen D. H. (1985) Ammonia utilization by the bruchid beetle *Caryedes brasiliensis* (Bruchidae). *J. Chem. Ecol.* 11, 539-544.

Sakuma M. and Fukami H. (1990) The aggregation pheromone of the German cockroach *Blattella germanica* L. Isolation and identification of the attractant components of the pheromone. *Appl. Ent. Zool.* 25, 353-368.

Sasaki T., Aoki T., Hayashi H. and Ishikawa H. (1990) Amino acid composition of the honeydew of symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 36, 35-40.

Sasaki T. and Ishikawa H. (1995) Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. J. Insect Physiol. 41, 41-46.

Seshachalam R. V., Subramanyam M. V. V. and Krishnamoorthy R. V. (1992) Glutamine synthetase activity during embryonic and larval development of the silkworm *Bombyx mori* and role of a JH analogue. Physiol. Entomol. 17, 277-280.

Shinbo H. and Yanagawa H. (1994) Low-cost artificial diets for polyphagous silkworms. JARQ. 28, 262-267.

Stebbins N., Holland M., Cianzio S. R. and Polacco J. C. (1991) Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. Plant Physiol. 97, 1004-1010.

Sumida M., Yamada Y., Tanaka Y., Shimabukuro J., Ohnishi M., Mori H. and Matsubara F. (1990) Changes in urea in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* in the fourth and the fifth larval instars and effect of starvation in the fifth instar on the level of urea in the pharate adults. Comp. Biochem Physiol. 97A, 373-379.

Suzuki A. and Gadal P. (1984) Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other

organisms. *Physiol. Veg.* 22, 471-486.

鈴木義昭 (1984) 絹糸腺におけるフィブロイン及びセリシン遺伝子の転写発現. *家蚕生化学*. 裳華房, 東京 pp. 170-212.

田中紀子. (1988) タンパク質欠乏ラットにおける経口投与した尿素 N のタンパク質への取込み. *栄食誌*, 41, 381-387.

渡辺喜二郎・堀江保宏 (1979) 飼料中のアミノ酸添加量が家蚕の成長、体液成分および尿酸量に及ぼす影響. *日蚕雑*, 48, 1-7.

Teller J. K. (1988) Kinetic properties of glutamate dehydrogenase purified from the mealworm fat body. The glutamate synthesizing direction. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B, 329-333

藤條純夫 (1971) カイコの蛹期における窒素異化代謝の研究. 第一報. 尿酸の分布・生成様相およびタンパク質量の変動. *応動昆*, 15, 144-152.

富野士良 (1990) カイコ主要体液タンパク質生合成系. *昆虫生理学-現象から分子へ*. 朝倉書店, 東京. pp. 125-146.

Tyler B. (1978) Regulation of the assimilation of the nitrogen compounds *Annu. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162.

内田由子・林屋慶三 (1981) カイコ幼虫消化液中の赤色けい光たんぱく質(RFP)の生成機構 クロロフィリド-a-中腸たんぱく質複合体の形成. 応動昆. 25, 94-100.

Vanoni M. A. and Curti B. (1999) Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. Cell. Mol. Life. Sci. 55, 617-638.

Vaughan J. A., Wirtz R. A., do Rosario V. E. and Azad A. F. (1990) Quantitation of antiparasite immunoglobulins in the hemolymph of *Anopheles stephensi* after blood feeding. (1990) Am. J. Trop. Med. Hyg. 42, 10-16.

山田政枝・中村晃三・井口民夫 (1983a) 家蚕の繭層中の遊離アミノ酸および尿素含量に及ぼす飼料の影響. 応動昆. 27, 46-51.

山田政枝・中村晃三・井口民夫 (1983b) 家蚕の5齢幼虫血液および絹糸腺の尿素含量に及ぼす飼料の影響. 応動昆. 27, 92-98.

山田政枝・中村晃三・井口民夫 (1984) 蚕体組織のウレアーゼ活性に及ぼす飼料の影響. 応動昆. 28, 49-56

山田政枝・井口民夫 (1986) 家蚕の排泄物中の尿素量とウレアーゼ活性に及ぼす飼料の影響. 日蚕雑. 55, 477-493.

Yamaya T., Oaks A. and Matumoto. H (1984) Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol.* 76, 1009-1013.

Yoshizawa M, Ishibashi T, Kametaka M and Kandatsu M. (1973) Utilization of diammonium citrate by adult rats. *Agr. Biol. Chem.* 37, 1057-1065.

論文受理日 平成14年12月2日