

ニカメイガにおけるグリコーゲン 代謝系路について

積木久明・兼久勝夫・白神 孝

ニカメイガ幼虫は冬期休眠に入るに従って体内に多量のグリセロールを蓄積し (Tsumuki and Kanehisa 1978), 耐凍性を高めることにより越冬時の低温の害からよく保護されると推定した (積木・兼久 1974). 越冬休眠時のグリセロールは主に脂肪体のグリコーゲンに由来し, 休眠が破れると逆にグリセロールからグリコーゲンに再合成されることを明らかにした (Tsumuki and Kanehisa 1978, 1980 b). ところで, グリコーゲンからグリセロールへの転移を考える場合, グリコーゲンから三単糖リン酸への代謝系路は, 昆虫では主に解糖系とペントースリン酸回路である (Chefurka 1965, Kobayashi and Kimura 1967, Horie 1967). 蚕の休眠卵でソルビトールやグリセロールを生成する系で, ペントースリン酸回路が非常に重要な働きをしていることが報告され (Kageyama and Ohnishi 1971), さらに, ^{14}C -(6)-グルコースを用いて, 休眠中解糖系もグリコーゲン代謝に関与していることが明らかにされている (Kageyama 1976). 解糖系とペントースリン酸回路がどのような量的比率で炭水化物代謝に寄与しているかを求める方法として, 特定の炭素原子を ^{14}C で標識した炭水化物が代謝された際に呼出される炭酸ガスの放射能を測定して算出する方法が知られている (Wood *et al.* 1963).

本研究では ^{14}C -(1)-グルコースと ^{14}C -(6)-グルコースを用いて, 炭酸ガスに呼出される放射能を比較して, ニカメイガ越冬休眠時におけるグリコーゲンの代謝系路を推定した. また, 炭水化物がペントースリン酸回路を経て代謝されるためには, まず, グルコース-6-リン酸脱水素酵素の作用を受けなければならない. そこで, グルコース-6-リン酸脱水素酵素についても越冬中の活性消長を調査し, 越冬時のグリコーゲン代謝に果たすペントースリン酸回路の重要性を推定した.

材料および方法

供試昆虫

ニカメイガ越冬幼虫は必要に応じて圃場の稲わらより採集し, 供試した. 非休眠幼虫は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 長日条件 (16L, 8D) で飼育した (Tsumuki and Kanehisa 1978). なお, 実験にはすべて終齢幼虫を供試した.

試薬

^{14}C -(1)-グルコース (58.0 mCi/mM) と ^{14}C -(6)-グルコース (59.6 mCi/mM) は Radiochemical Centre から購入した. グルコース-6-リン酸 (G-6-P と略記), ニコチ

ンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP), 還元型 NADP (NADPH) は Sigma 社製である。その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。

¹⁴C-グルコースの注射と放射能の測定

ニカメイガ幼虫をエーテルで麻酔後, ¹⁴C-(1)-グルコースと ¹⁴C-(6)-グルコースをそれぞれ 1 μ l ずつ腹脚より体腔内に注射し, 呼出される炭酸ガスをエタノールアミンで捕集した (Tsumuki and Kanehisa 1980 b)。

エタノールアミンで捕集された炭酸ガス中の放射能は, トルエンシンチレーターを加えた後, 液体シンチレーションカウンターで測定した (Tsumuki and Kanehisa 1980 b)。注射 8 時間後, 幼虫体内に残存している放射能は全自動試料燃焼装置 (Aloka ASC-112) を用いて, 濾紙とともに虫体を燃焼し, 生じた炭酸ガスをエタノールアミンで捕集し, トルエンシンチレーターを加え同様に測定した。そして, 体内から回収された放射能より呼出された炭酸ガス中の放射能の割合を求めた。

G-6-P 脱水素酵素活性の測定

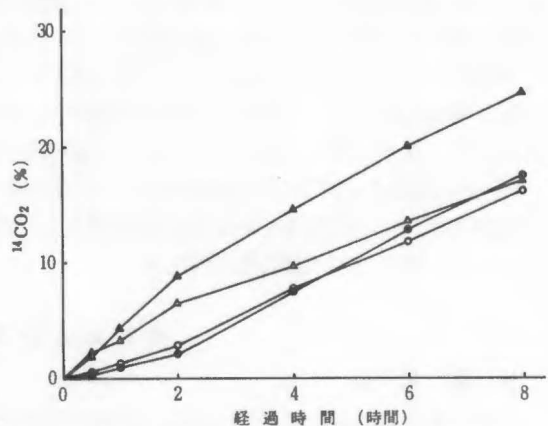
体重を秤量した後, 80 倍の蒸留水を加え氷で冷却しながらガラス製 ホモジナイザーで磨砕した。磨砕液を 10,000 g, 2°C で 15 分間遠心分離し, その上清を酵素液として用いた。反応組成は 0.1 ml の 0.1 M G-6-P と 0.1 ml の 0.1 M MgCl₂, 0.1 ml の 2×10^{-3} M NADP, 0.1 ml の酵素液, 2.6 ml の 0.1 M トリスアミノメタン-塩酸緩衝液 (pH 9.2) である。10 分間 25°C の室温に置いた後, 酵素液を添加することにより反応を開始させ, 340 nm で生成される NADPH 量を測定し, 酵素活性を求めた (Tsumuki and Kanehisa 1980 c)。また, 採血後解剖し, 脂肪体, 消化管, その他残り組織に分け, 全虫体と同様の方法により, 各組織における酵素活性を測定した。

酵素液のタンパク質量は Lowry *et al.* (1951) の方法によって測定した。

結 果

¹⁴C-グルコースの代謝割合

第 1 図は ¹⁴C-(1)-グルコースと ¹⁴C-(6)-グルコースを注射した後, 非休眠終齢幼虫と越冬休眠幼虫から呼出された炭酸ガスの放射能を比較したものである。非休眠終齢幼虫では注射 8 時間後, ¹⁴C-(1)-グルコース注射と ¹⁴C-(6)-グルコース注射で炭酸ガスへの代謝割合はほとんど変らなかった。一方, 越冬休眠幼虫では ¹⁴C-(1)-グルコースより呼出される炭酸ガスは ¹⁴C-(6)-グルコースに比べて多かった。すなわち,



第 1 図 ¹⁴C-(1)-グルコースと ¹⁴C-(6)-グルコースを注射された越冬休眠幼虫と非休眠終齢幼虫によって生成された ¹⁴CO₂ の割合

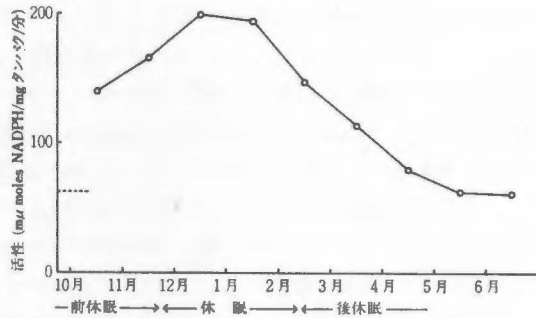
(▲) ¹⁴C-(1)-グルコースを注射された越冬休眠幼虫, (●) ¹⁴C-(6)-グルコースを注射された越冬休眠幼虫, (△) ¹⁴C-(1)-グルコースを注射された非休眠終齢幼虫, (○) ¹⁴C-(6)-グルコースを注射された非休眠終齢幼虫。

越冬休眠幼虫では解糖系以外にペントースリン酸回路を経てもかなり炭水化物が代謝されることが明らかとなった。

G-6-P 脱水素酵素の活性消長

グルコースがペントースリン酸回路を経て代謝されるためには、まず G-6-P 脱水素酵素の作用を受ける必要がある。第2図は越冬中の G-6-P 脱水素酵素の活性消長を示したものである。休眠に入るに従って G-6-P 脱水素酵素の活性化がみられ、休眠が破れるに従って活性の低下がおこった。非休眠終齢幼虫における G-6-P 脱水素酵素活性は越冬休眠幼虫に比べ低かった。

第1表は越冬休眠幼虫と非休眠終齢幼虫の各組織における G-6-P 脱水素酵素の活性を比較したものである。休眠幼虫、非休眠終齢幼虫とも脂肪体で G-6-P 脱水素酵素の活性が高く、消化管、その他残り組織では活性は低かった。体液には休眠幼虫、非休眠終



第2図 ニカメイガ幼虫の越冬中の G-6-P 脱水素酵素の活性消長

○—○ 越冬幼虫 非休眠終齢幼虫

第1表 ニカメイガ幼虫の各組織における G-6-P 脱水素酵素活性

		活性 (μmoles NADPH/mg タンパク/分)			
		体液	消化管	脂肪体	残り組織
休	眠	—	51.8	820.6	70.1
非	休 眠	—	41.5	254.9	44.5

齢幼虫ともに G-6-P 脱水素酵素活性はほとんど検出されなかった。なお、いずれの組織でも休眠幼虫の方が非休眠終齢幼虫に比べ G-6-P 脱水素酵素活性は高かった。

考 察

¹⁴C-(1)-グルコースと ¹⁴C-(6)-グルコースの炭酸ガスへの代謝割合を比較することにより、解糖系とペントースリン酸回路によるグルコースの分解割合を明らかにすることができる (Wood *et al.* 1963)。非休眠終齢幼虫では ¹⁴C-(1)-グルコース注射と ¹⁴C-(6)-グルコース注射で、8時間後炭酸ガスへ代謝される割合はわずかしかならなかつた。これは非休眠終齢幼虫では、グルコースの大部分が解糖系を経て代謝されたことを意味している。一方、越冬休眠幼虫では ¹⁴C-(1)-グルコースより呼出される炭酸ガスは ¹⁴C-(6)-グルコースに比べて多かった。すなわち、越冬休眠幼虫ではペントースリン酸回路を経ても、グルコースが代謝されることを意味している。Horie *et al.* (1968) は ¹⁴C-(1)-グルコースと ¹⁴C-(6)-グルコースを用いて、発育中の蚕で炭酸ガスへの代謝割合の違いから、グルコースの一部はペントースリン酸回路を経て代謝されることを報告している。一方、

ニカメイガ非休眠終齢幼虫においては、ペントースリン酸回路を経て代謝されるグルコースは少ないようにみえた。しかし、注射後短時間内では、呼出される炭酸ガス中の放射能に両グルコースでかなり差がみられたことから、ニカメイガ非休眠終齢幼虫においても、ペントースリン酸回路を経て代謝されるグルコースを無視することはできないものと考えられた。Chino (1960) は蚕の休眠卵でグリコーゲンが解糖系とペントースリン酸回路を経て糖アルコールへ代謝されるとした。一方、Kageyama and Ohnishi (1971) は蚕の休眠卵で G-6-P 脱水素酵素活性が高く、ホスホフラクトキナーゼ活性が検出されなかったことから、グリコーゲンはペントースリン酸回路を経由してのみ代謝されるとした。しかし、Suzuki and Miya (1975, 1977) はホスホフラクトキナーゼが蚕の休眠卵、非休眠卵とも存在することを認め、さらに、Kageyama (1976) も ^{14}C -(1)-グルコースと ^{14}C -(6)-グルコースを用い、蚕の休眠卵でグリコーゲンは解糖系を経ても代謝されることを確認した。また、Wood and Nordin (1980) も同様に ^{14}C -グルコースを用いて、グリセロールの生成がみられるクロバエの一種 *Protophormia terranovae* と、グリセロールの生成がみられないイエバエを比較して、グリセロールの生成時ペントースリン酸回路が活性化されることを報告しており、ニカメイガで得られた本結果と一致していた。なお、 ^{14}C -(6)-グルコースから呼出される炭酸ガスが休眠と非休眠終齢幼虫で差がみられなかったことから、解糖系は休眠、非休眠にかかわらずほぼ一定の活性を保っていることが明らかとなった。

^{14}C -グルコースを用いたこれらの結果は、G-6-P 脱水素酵素活性の越冬中の変化からも確認された。すなわち、休眠に入るに従って G-6-P 脱水素酵素活性が高くなり、ペントースリン酸回路が活性化されることが推定された。さらに、グリコーゲンの貯蔵組織である脂肪体 (Tsumuki and Kanehisa, 1978) で、G-6-P 脱水素酵素活性が非常に高いことから、脂肪体ではグリコーゲンは休眠中ペントースリン酸回路を経てより多く代謝されると考えられた。

ニカメイガにおいて、グリコーゲン代謝の律速酵素であるホスホリラーゼ (Tsumuki and Kanehisa 1979, 1980 a) により分解されたグリコーゲンは、解糖系とペントースリン酸回路を経て代謝され、生成された三単糖リン酸は、越冬休眠中活性化された α -グリセロリン酸脱水素酵素により α -グリセロリン酸に代謝され (Tsumuki and Kanehisa 1980 c), さらにホスファターゼの作用 (未発表) を受けてグリセロールが生成されるものと推定された。しかし、蚕 (Chino 1958, Yaginuma and Yamashita 1978) と異なって、ニカメイガではソルビトールの生成はみられず (Tsumuki and Kanehisa 1978), ペントースリン酸回路によって生成される NADPH はグリセロールの生成過程において補酵素とはなり得ない (Tsumuki and Kanehisa 1980 c) ことから、ニカメイガにおいて休眠中ペントースリン酸回路の活性化が、グリセロールの生成にどのような意味を持っているか不明である。

摘 要

ニカメイガ越冬休眠幼虫におけるグリコーゲンからグリセロールへの代謝系路について、 ^{14}C -(1)-グルコースと ^{14}C -(6)-グルコースを用いて調査した。また、越冬中の G-6-P 脱水素酵素の活性消長についても調査した。

越冬休眠幼虫では ^{14}C -(6)-グルコースに比べ、 ^{14}C -(1)-グルコースより呼出される炭酸ガス中の放射能は多かった。一方、非休眠終齢幼虫では両グルコースであまり差がみられなかった。すなわち、非休眠終齢幼虫ではグリコーゲンは大部分が解糖系を経て代謝され、越冬休眠幼虫では解糖系以外にペントースリン酸回路を経由しても代謝されることが推定された。 ^{14}C -(6)-グルコースより呼出される炭酸ガス中の放射能は、越冬休眠幼虫と非休眠終齢幼虫で変らなかったことから、休眠中でも解糖系によるグリコーゲン代謝活性は変らないものと推定された。

G-6-P 脱水素酵素活性は休眠に入るに従って活性化され、休眠が破れると活性は低下した。特に、休眠中グリコーゲンを貯蔵している脂肪体で G-6-P 脱水素酵素活性が高かった。すなわち、休眠に入るに従ってペントースリン酸回路が活性化され、この回路で代謝されるグリコーゲン量は増加するものと推定され、上記 ^{14}C -グルコースで得られた結果と一致していた。

しかしながら、グリコーゲンからグリセロールへの代謝系において、ペントースリン酸回路の活性化が、グリセロールの生成にどのような意味を持っているか不明である。

文 献

- Chefurka, W. 1965. Intermediary metabolism of carbohydrates in insects. In *The Physiology of Insecta*. II. (ed. by Rockstein, M.): 581-667. Acad. Press, New York.
- Chino, H. 1958. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*-II. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. *J. Insect Physiol.* 2: 1-12.
- Chino, H. 1960. Enzymatic pathways in the formation of sorbitol and glycerol in the diapausing egg of the silkworm, *Bombyx mori*-I. On the polyol dehydrogenases. *J. Insect Physiol.* 5: 1-15.
- Horie, Y. 1967. Dehydrogenase in carbohydrate metabolism in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.* 13: 1163-1175.
- Horie, Y., Nakasone, S. and Ito, T. 1968. The conversion of ^{14}C -carbohydrates into CO_2 and lipid by the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 14: 971-981.
- Kageyama, T. 1976. Pathways of carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 6: 507-511.
- Kageyama, T. and Ohnishi, E. 1971. Carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Absence of phosphofructokinase in the diapausing egg. *Dev. Growth Differ.* 13: 97-106.
- Kobayashi, M. and Kimura, S. 1967. Action of ecdysone on the conversion of ^{14}C -glucose in dauer pupa of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 13: 545-552.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Suzuki, K. and Miya, K. 1975. Studies on the carbohydrate metabolism in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, with special reference to phosphofructokinase

- activity. J. Sericult. Sci. Japan 44 : 88-97.
- Suzuki, K. and Miya, K. 1977. Studies on the carbohydrate metabolism of diapause eggs of *Bombyx mori*, with special reference to the detection of phosphofructokinase activity. J. Sericult. Sci. Japan 46 : 213-219.
- 積木久明, 兼久勝夫. 1974. ニカメイガ越冬幼虫の耐凍性. 応動昆中国支報 16 : 37-39.
- Tsumuki, H. and Kanehisa, K. 1978. Carbohydrate content and oxygen uptake in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ. 17 : 95-110.
- Tsumuki, H. and Kanehisa, K. 1979. Enzymes associated with glycogen metabolism in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker: Some properties and changes in activities during hibernation. Appl. Ent. Zool. 14 : 270-277.
- Tsumuki, H. and Kanehisa, K. 1980 a. Enzyme activities associated with glycogen metabolism in diapausing and developing larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ. 18 : 31-41.
- Tsumuki, H. and Kanehisa, K. 1980 b. Metabolism of ^{14}C -glucose and UDP- ^{14}C -G in hibernating larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ. 18 : 43-53.
- Tsumuki, H. and Kanehisa, K. 1980 c. Changes in enzyme activities related to glycerol synthesis in hibernating larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. Appl. Ent. Zool. 15 : 285-292.
- Wood, F. E. Jr. and Nordin, J. H. 1980. Activation of the hexose monophosphate shunt during cold-induced glycerol accumulation by *Protophormia terranovae*. Insect Biochem. 10 : 87-93.
- Wood, H. G., Katz, J. and Landau, B. R. 1963. Estimation of pathways of carbohydrate metabolism. Biochem. Z. 338 : 809-847.
- Yaginuma, T. and Yamashita, O. 1978. Polyol metabolism related to diapause in *Bombyx* eggs: Different behaviour of sorbitol from glycerol during diapause and post-diapause. J. Insect Physiol. 24 : 347-354.