

膜翅目・広腰亜目では卵黄蛋白質は非常によく類似している

畠山 正統・高寺 憲司・大石 陸生

Masatsugu HATAKEYAMA¹⁾, Kenji TAKADERA²⁾ and Kugao OISHI¹⁾: Similarities in vitellin antigenicity and Vg mRNA nucleotide sequence among Symphyta (Hymenoptera)*

¹⁾ Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657, Japan

²⁾ Osaka Seiyaku Co. Ltd, 3-2-4 Takaida-hondori, Higashi-osaka, Osaka 577, Japan

昆虫の卵黄蛋白質は、一般に雌の脂肪体で合成されて体液中に分泌され (vitellogenin: Vg)、発育中の卵母細胞に取り込まれて蓄えられる (vitellin: Vn) ことが知られている (Wyatt, 1991; Raikhel and Dhadialla, 1992)。最近になって、カブラハバチ *Athalia rosae* を含むいくつかの昆虫で卵黄蛋白質 cDNA がクローニングされ、その構造が保存されていることがわかってきた (鞘翅目 *Anthonomus grandis*: Trewitt *et al.*, 1992, Heilmann *et al.*, 1993; 双翅目 *Aedes aegypti*: Chen *et al.*, 1994; 膜翅目 *Athalia rosae*: Kageyama *et al.*, 1994; 鱗翅目 *Bombyx mori*: Yano *et al.*, 1994)。しかしながら、これまで、昆虫の卵黄蛋白質の類似性を広く調べた研究は限られている (Shirk, 1987)。そこで、今回は膜翅目、広腰亜目内での卵黄蛋白質の類似性を調べた。

カブラハバチの卵黄蛋白質は、雌の脂肪体中で6.5 kb の mRNA から翻訳された1本の長いポリペプチドが二つに切断されて体液中に放出され (L-Vg=180 kDa, S-Vg=50 kDa)、それぞれ卵母細胞に蓄積される (L-Vn, S-Vn) (Hatakeyama *et al.*, 1990; Kageyama *et al.*, 1994)。野外で採集した広腰亜目の2科12属21種について、卵黄蛋白質の抗原共通性をカブラハバチ抗L-および抗S-Vn抗体を用いたウエスタンブロットング法で、また、卵黄蛋白質 mRNA の塩基配列の類似性については、カブラハバチ卵黄蛋白質 cDNA の5'末端付近 (プローブ a)、S-Vg-L-Vg境界部分 (プローブ b)、3'末端付近 (プローブ c) の三つの断片をプローブにしたノーザンブロットング法を用いて調べた (Fig. 1)。

Table 1にまとめたように、卵抽出物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の結果、調べたすべての種で、1本の180-200 kDaのポリペプチド (L) と1ないし数本の40-60 kDaのポリペプチド (S)

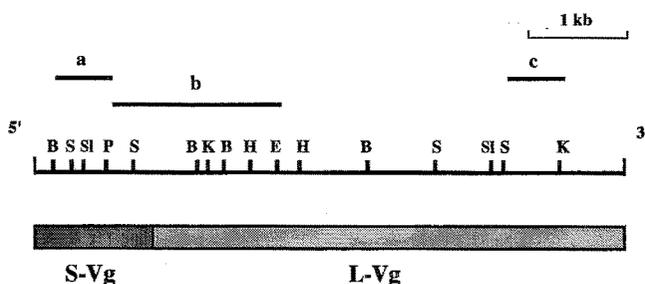


Fig. 1 Restriction map of the cloned *Athalia rosae* Vg cDNA (middle) and three fragments used as probes (top), with information on translated single long polypeptide to be processed to L-Vg and S-Vg in the female fat body cells (bottom). B: *Bam* HI, S: *Sac* I, Sl: *Sal* I, P: *Pst* I, K: *Kpn* I, H: *Hin* dIII, E: *Eco* RI

* Abstract of paper read at the 31st Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, June 1-2, 1995 (Higashi-izu, Shizuoka).

が検出され、Lポリペプチドは抗L-Vn抗体とのみ、Sポリペプチドは抗S-Vn抗体とのみ反応した。ミフシハバチ科の2種、*Arge nigrinodosa*と*Ar. nipponensis*はL、Sポリペプチドに加えて100–140 kDaの1本のMポリペプチドが検出され、これらはともに抗L-および抗S-Vn抗体の両方に反応した。ハバチ科の*Tenthredo hokkaidonis*ではL、Sポリペプチドに加えて100–140 kDaの2本のMポリペプチドが検出され、高分子量のもの(M1)は抗L-Vn抗体と、低分子量のもの(M2)は抗S-Vn抗体と反応した。

Table 1 Characteristics of yolk proteins and Vg mRNAs in 21 symphytan species (Hymenoptera).

Family	Genus	Species	Polypeptide detected on SDS-PAGE*	Western blot reaction to antisera		mRNA detected (kb)	Northern blot hybridization with probes			
				L-Vn	S-Vn		a	b	c	
Argidae	<i>Arge</i>	<i>nigrinodosa</i> **	L	+	–	6.5	+	+	–	
			M	+	+					
			S	–	+					
	<i>Arge</i>	<i>nipponensis</i>	L	+	–	6.5	ND	ND	ND	
			M	+	+					
			S	–	+					
	<i>Arge</i>	<i>similis</i>	L	+	–	6.5	ND	+	ND	
			S	–	+					
	<i>Arge</i>	<i>captiva</i>	L	+	–	6.5	ND	ND	ND	
			S	–	+					
	Tenthredinidae	<i>Aneugmenus</i>	<i>kiotonis</i>	L	+	–	6.5	ND	ND	ND
				S	–	+				
<i>Dolerus</i>		<i>similis</i>	L	+	–	6.5	+	+	ND	
			S	–	+					
<i>Dolerus</i>		<i>subfasciatus</i>	L	+	–	6.5	ND	ND	ND	
			S	–	+					
<i>Priophorus</i>		<i>nigricans</i>	L	+	–	6.5	ND	ND	ND	
			S	–	+					
<i>Athalia</i>		<i>rosae</i> **	L	+	–	6.5	+	+	+	
			S	–	+					
<i>Athalia</i>		<i>infumata</i> **	L	+	–	6.5	+	+	+	
			S	–	+					
<i>Athalia</i>		<i>japonica</i> **	L	+	–	6.5	+	+	+	
			S	–	+					
<i>Athalia</i>		<i>kashmirensis</i> **	L	+	–	6.5	+	+	+	
			S	–	+					
<i>Allantus</i>		<i>luctifer</i>	L	+	–	6.5	ND	ND	ND	
			S	–	+					
<i>Taxonus</i>		<i>minomensis</i>	L	+	–	6.5	+	+	ND	
			S	–	+					
<i>Aglaostigma</i>		<i>occipitosa</i> **	L	+	–	6.5	+	+	+	
			S	–	+					
<i>Rhogogaster</i>		<i>nigriventris</i>	L	+	–	6.5	+	+	ND	
			S	–	+					
<i>Tenthredo</i>		<i>hokkaidonis</i>	L	+	–	6.5	+	±	+	
			M1	+	–					
			M2	–	+					
<i>Macrophya</i>	<i>crassuliformis</i>	L	+	–	6.5	+	+	ND		
		S	–	+						
<i>Macrophya</i>	<i>ignava</i> **	L	+	–	6.5	+	ND	ND		
		S	–	+						
<i>Macrophya</i>	<i>malaisei</i>	L	+	–	6.5	+	+	ND		
		S	–	+						
<i>Pachyprotasis</i>	sp.	L	+	–	6.5	ND	ND	ND		
		S	–	+						

ND: not done.

*L: 180–200 kDa, M: 100–140 kDa, S: 40–60 kDa.

** Both female and male haemolymph samples were analyzed and Vgs were detected only in females.

これらのうち、2科4属7種で体液蛋白質をウエスタンブロッティング法で調べたところ (Table 1 中の**印)、卵抽出物で検出されたポリペプチドに対応するものは雌体液の中にのみ検出され、卵抽出物中のポリペプチドを Vn、体液中のポリペプチドを Vg と決定できた。

さらに、2科8属14種について雌脂肪体から抽出した全 RNA について調べたところ、非常に厳しい条件下で、カブラハバチ卵黄蛋白質 cDNA の三つのどのプローブとも反応する6.5 kb のバンドが検出され、これらは卵黄蛋白質 (Vg) の mRNA であると結論した。しかしながら、M-Vn をもつ2種のうち、*Arge nigrinodosa* の mRNA はプローブ c とは反応せず、また、*Tenthredo hokkaidonis* の mRNA はプローブ b との反応性がプローブ a、c との反応性に比べて非常に弱かった。

これらの結果から、膜翅目広腰亜目内では卵黄蛋白質に非常に高い抗原共通性があり、mRNA の一次構造もよく類似していることがわかった。広腰亜目ではカブラハバチの場合と同様に、雌の脂肪体中で6.5 kb の mRNA から翻訳された1本のポリペプチドが切断されて体液中に分泌され、発育中の卵母細胞に取り込まれるものと考えられる。また、M-Vn を持つ2種、*Arge nigrinodosa* と *Tenthredo hokkaidonis* では、抗体との反応性と用いたプローブ断片との反応性の違いから、L-Vn と S-Vn の切断部位とは異なる選択的切断部位が存在する可能性が示唆される (Fig. 2)。

卵黄蛋白質の特徴をもとに昆虫をグループ分けした場合、これまでのところ、複数のポリペプチドからなる卵黄蛋白質をもつ多くの昆虫 (今回の結果から広腰亜目も含まれる) と、分子量の大きな1本のポリペプチドからなる卵黄蛋白質をもつミツバチ *Apis mellifera* などの細腰亜目 (Wheeler and Kawooya, 1990; Oishi *et al.*, 1993) は、別々のグループとして扱われている (Harnish and White, 1982) が、同じ目内でも亜目の違いによって卵黄蛋白質の特徴が異なるのは何に起因するのか興味のもたれるところである。今後さらに、細腰亜目の卵黄蛋白質およびその mRNA を調べることにより、広腰亜目との違いについて検討する予定である。

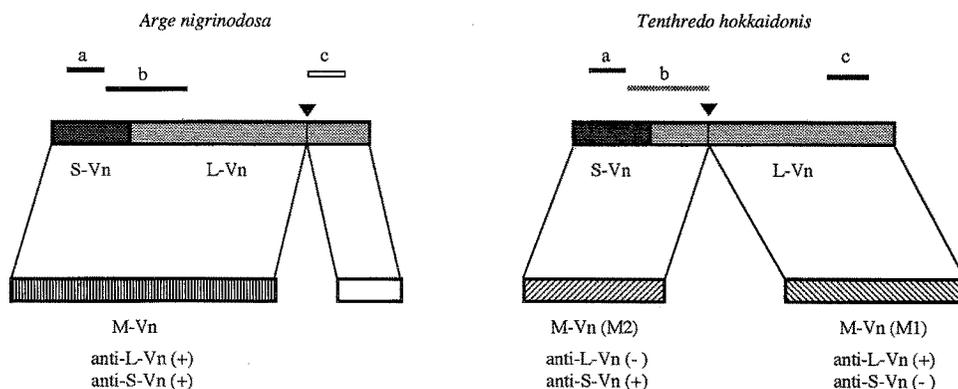


Fig. 2 Possible presence of alternative cleavage sites (arrowheads) in the two species, *Arge nigrinodosa* and *Tenthredo hokkaidonis* both having M-Vns in addition to L- and S-Vn. The probes hybridized well and only weakly with the Vg mRNAs are indicated by solid boxes and dotted boxes, respectively. The probe which did not hybridize is indicated by an open box.

引用文献

- Chen, J. S., W. L. Cho and A. S. Raikhel (1994) *J. Mol. Biol.*, **237**, 641—647.
 Harnish, D. G. and B. N. White (1982) *J. Mol. Evol.*, **18**, 405—413.
 Hatakeyama, M., M. Sawa and K. Oishi (1990) *Invert. Reprod. Dev.*, **17**, 237—245.
 Heilmann, L. J., P. M. Trewitt and A. K. Kumaran (1993) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **23**, 125—134.

- Kageyama, Y., T. Kinoshita, Y. Umesono, M. Hatakeyama and K. Oishi (1994) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 599–605.
- Oishi, K., M. Yamashita, Y. Kageyama, M. Hatakeyama and T. Naito (1993) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **(28)**, 27–29.
- Raikhel, A. S. and T. S. Dhadialla (1992) *Ann. Rev. Entomol.*, **37**, 217–251.
- Shirk, P. D. (1987) *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, **11**, 173–188.
- Trewitt, P. M., L. J. Heilmann, S. S. Degrugillier and A. K. Kumaran (1992) *J. Mol. Evol.*, **34**, 478–492.
- Wheeler, D. E and J. K. Kawooya (1990) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **14**, 253–267.
- Wyatt, G. R. (1991) *Invert. Reprod. Dev.*, **20**, 1–35.
- Yano, K., M. Toriyama-Sakurai, S. Watabe, S. Izumi and S. Tomino (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1218**, 1–10.