

テントウムシ類の足跡物質と体表リピッドの化学的特徴

小崎 晶子・山岡 亮平

京都工芸繊維大学応用生物学科

Chemical Composition of Footprints and Cuticula Lipids of Three Species of Lady Beetles. Akiko KOSAKI and Ryohci YAMAOKA (Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matugasaki-hashinouchi, Sakyo-ku, Kyoto, P606, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **40**: 47-53 (1996)

Lady beetle can walk on a vertically smooth surface such as a glass plate in the same manner as on a horizontal one. It was reported that the insect probably released a non-volatile lipid secretion from the spatulate ends of the tenent hairs and this secretion was essential to the adhesion process on smooth surfaces against the force of gravity. We have studied footprint chemicals which were secreted from the tenent hairs of the three species of lady beetles *Epilachna vigintioctopunctata*, *Epilachna vigintioctopunctata* and *Coccinella septempunctata*. The component of footprints was species specific and consisted of hydrocarbons and true waxes. The footprint chemicals were just identical with those of the cuticular waxes. The waxes of footprints were secreted larger amount from the tarsus than that from cuticular surface.

Key words: footprint chemicals, lady beetle, species specific, cuticular wax

緒 言

昆虫の中には、重力に逆らって窓や天井に止まったり、その面を自由に歩きまわったりすることのできるものがある。昆虫が平滑面に止まったり、歩いたりできる機構については、STORK (1980) が鞘翅目ハムシ科の *Chrysolina polita* を、WALKER ら (1985) がオオクロバエ *Calliphora vomitoria* を用いて、付着器官である毛から分泌される液が付着に重要な役割を果たしていると報告している。ISHII (1987)、石井 (1988) も鞘翅目テントウムシ科のオオニジュウヤホシテントウ *Epilachna vigintioctopunctata* が歩いたガラス面には、微細な油滴が千鳥格子に並んで残されており、その油滴はテントウムシの脚の第1フ節と第2フ節に密生する tenent hair の先から分泌されている。そして、その物質は、炭化水素やモノエステル、トリグリセリドなどの脂質を多く含みこれらと平滑面との凝集力によりテントウムシがガラス面に付着できると報告している。

本研究では、オオニジュウヤホシテントウ、ニジュウヤホシテントウ *Epilachna vigintioctopunctata*、ナナホシテントウ *Coccinella septempunctata* の3種のテントウムシについて、この付着に関係している足跡物質の主要粘着物質の化学的特徴について検討を加え、新たな知見を得たのでここに報告する。

本文に先立ち、研究にご助言いただくとともに本稿を校閲して下さい元京都大学農学部の石井象二郎先生に深くお礼申し上げます。

材料および方法

① 足跡物質の回収方法

オオニジュウヤホシテントウ (*E.v.m.*)、ニジュウヤホシテントウ (*E.v.p.*)、ナナホシテントウ (*C.s.*) をそれぞれ直径 9 cm のシャーレに1枚あたり 20~30 匹ずつ入れ、自由に歩きまわらせる。数時間後、その内壁に付着した油分をエチルエーテル約 2~3 ml で洗い集めた。この方法で、*E.v.m.* と *C.s.* はのべ 2 か月間、*E.v.p.* はのべ 3 か月間足跡物質の回収を行なった。回収した液体は、ロータリーエバポレーターを用い減圧乾固した後、冷凍室 (-20°C) で保存した。

② 足跡物質の同定方法

(a) カラムクロマトグラフィー

それぞれの足跡物質をシリカゲル薄層プレートを用い、TLC 分析を行なった。展開液としては、5% 酢酸エチル/ヘキサンを用いた。さらに、比較標品としては、炭化水素、ステロールエステル、脂肪酸メチルエステル、トリグリセリド、脂肪酸、ステロール混合液を用いた。展開後、50% 硫酸を噴霧し、加熱してスポットの検出を行ない、標品と R_f 値の比較を行なった。

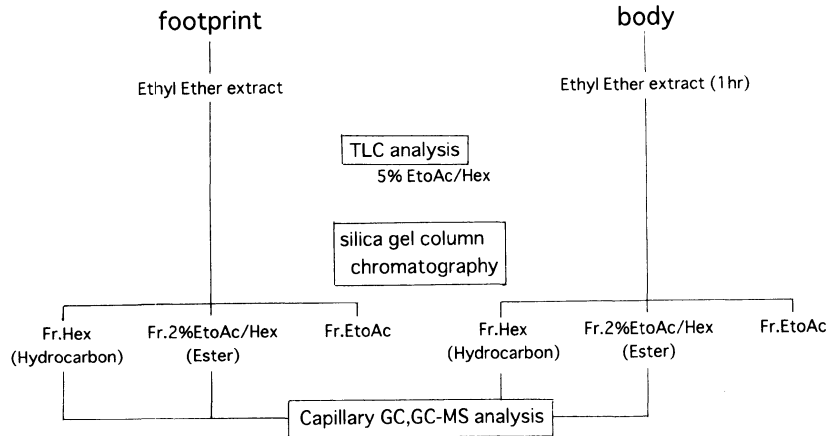


Fig. 1. Flow chart of extraction and chemical analysis of lipids isolated from three species of lady beetles.

次に、それぞれの足跡物質を Fig. 1 に示したようにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画した。シリカゲルカラムには、内径 6 mm、長さ 70 mm の小型バスツールピペットにシリカゲル (230~400 mesh, MERCK 社) を詰めたものを使用し、溶離液としては、ヘキサン、2% 酢酸エチル/ヘキサン、5% 酢酸エチル/ヘキサン、酢酸エチルを各 5 ml ずつ順に用いた。得られた画分をロータリーエバポレーターで減圧乾固した後、一定量のヘキサンに溶解させ、GC 及び GC-MS 分析に供した。

(b) 分析

分画したヘキサン溶出画分 (炭化水素) と 2% 酢酸エチル/ヘキサン溶出画分 (モノエステル類) の分析は、ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography; GC) 及びガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS) で行なった。

GC 分析の分析機器は、GC-14A (島津製作所) で、検出器として FID (水素炎イオン化検出器; Flame Ionization Detector) を使い、データ処理をクロマトパック CR-6A (島津製作所) で行なった。カラムは、CBP1-M25-025 (液相ケミカルボンテッドメチルシリコン、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm 、長さ 25 m) (島津製作所) を用いた。分析条件は、キャリアーガスとして He を線速度 40 cm/s で、スプリットレス注入法で注入した。気化室、検出器温度はそれぞれ、300°C、320°C として、カラム昇温条件は、1 分間 80°C で保持した後、毎分 16°C で昇温し、300°C で 20 分間保持した。

GC-MS 分析の分析機器は、GC 部に HP5970A (Hewlett Packard) MS 情報処理部に M80B (Hitachi) を用

い、カラムは、HP (液相クロスリンクメチルシリコン、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm 、長さ 12.5) を用いた。分析条件は、キャリアーガスとして He を入口圧 1.5 kg/cm² で、スプリットレス注入法で注入した。気化室、イオン源、インターフェイス温度はそれぞれ、300°C、250°C、300°C とした。イオン化エネルギーを 70 eV、カラム昇温条件は、1 分間 80°C で保持した後、毎分 20°C で昇温し、320°C で 20 分保持した。

(c) エステル交換

2% 酢酸エチル/ヘキサン溶出画分 (モノエステル類) に、5% 塩酸メタノール 1 ml を加え、90°C で 4 時間反応させた。その後、GC 分析に供した。

③ 体表成分の同定

(a) 抽出

それぞれのテントウムシを 15 匹ずつ三角フラスコに入れ、エチルエーテルで 1 時間抽出を行なった。

(b) カラムクロマトグラフィーと分析

足跡物質と同様の方法で、分画と分析を Fig. 1 で示したように行なった。

④ 足跡物質の分泌量

(a) 抽出

-20°C の冷凍庫にいれた *E.v.p.* を、片側 3 本の脚の第 1 フ節、第 2 フ節に速乾性接着剤を塗り、フ節部分を完全に被覆することによって足跡物質が抽出されないようにした後、かみそりを用いて虫体を縦に等分した。それぞれは別々に、エチルエーテルで 1 時間抽出を行なった。

(b) カラムクロマトグラフィー

得られた抽出物にそれぞれ内部標準物質として、C₂₂

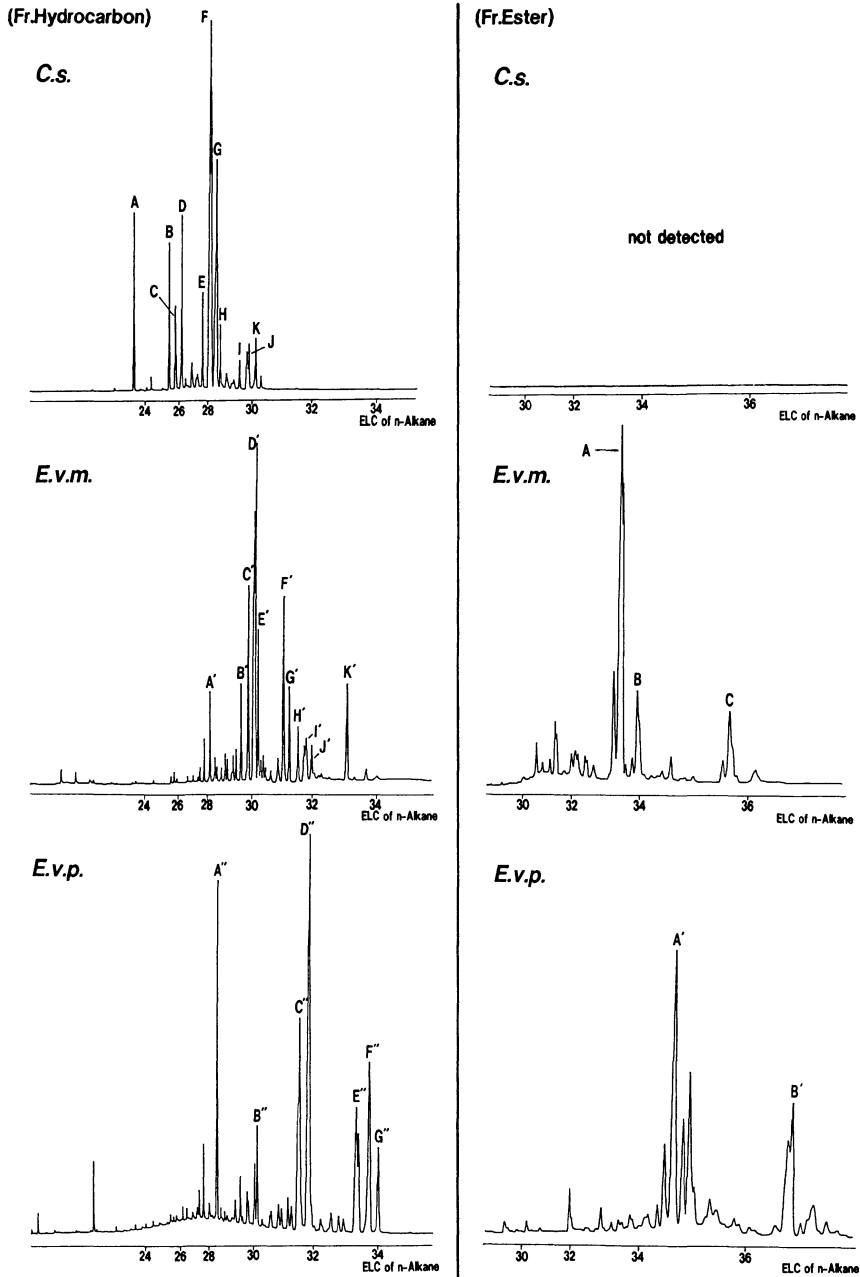


Fig. 2. Gas chromatograms of hydrocarbons and esters of three species of lady beetles.

(*n*-ドコサン：直鎖飽和炭化水素) 0.6 μg とステアリン酸
 パルミチルエステル (エステル) 3 μg を加え、Fig. 1 と
 同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画
 した。

(c) 分析

ヘキサン溶出画分と 2% 酢酸エチル/ヘキサン溶出画
 分について、GC 分析を行ない、それぞれ内部標準物質
 との比較を行なった。

Table 1-1. Hydrocarbons identified in footprint of *C.s.*

| Peak No. | Carbon No. | Hydrocarbon |
|----------|------------|--------------------------------------|
| A | 23 | trecosane |
| B | 25 | pentacosane |
| C | 26 | 9+11-methylpentacosane |
| D | 27 | 7,11-dimethylpentacosane |
| E | 27 | heptacosane |
| F | 28 | 7+9+11+13-methylheptacosane |
| G | 29 | 7,11+9,13+11,15-dimethylheptacosane |
| H | 30 | 7,11,15+9,13,17-trimethylheptacosane |
| I | 29 | nonacosane |
| J | 30 | 7+15-methylnonacosane |
| K | 31 | 7,11+7,15+dimethylnonacosane |

Table 1-2. Hydrocarbons identified in footprint of *E.v.m.*

| Peak No. | Carbon No. | Hydrocarbon |
|----------|------------|-----------------------------|
| A' | 28 | 13-methylheptacosane |
| B' | 29 | nonacosane |
| C' | 30 | 13-methylnonacosane |
| D' | 31 | 15-methyl-14+15-triacontene |
| | 31 | 13,17-dimethylnonacosane |
| E' | 30 | 3-methylnonacosane |
| F' | 31 | hentriacontene |
| G' | 32 | 12-methyl-12-hentriacontene |
| H' | 32 | 13+15-methylhentriacontane |
| I' | 32 | dotriacontene |
| | 33 | 11-methyl-10-dotriacontene |
| J' | 32 | 3-methyltriacontane |
| K' | 33 | tritiacontene |

Table 1-3. Hydrocarbons identified in footprint of *E.v.p.*

| Peak No. | Carbon No. | Hydrocarbon |
|----------|------------|-----------------------------|
| A'' | 28 | 3-methylheptacosane |
| B'' | 30 | 3-methylnonacosane |
| C'' | 32 | 9+13-methylhentriacontane |
| D'' | 33 | 9,13-dimethylhentriacontane |
| E'' | 34 | monomethyltritiacontene |
| F'' | 35 | dimethyltritiacontene |
| G'' | 35 | 9,13-dimethyltritiacontane |

結果および考察

① 足跡物質の回収

足跡物質の黄色油状液は、*E.v.m.* が 2 か月間で約 20.2 mg, *E.v.p.* が 3 か月間で約 30.8 mg, *C.s.* が 2 か月間で約 47.5 mg 得られた

② 足跡物質の構造と種間の比較

足跡物質の TLC 分析の結果より、近い種である *E.v.m.* と *E.v.p.* の足跡物質には、それぞれ炭化水素類とモノ

エステル類が存在し、分類的に離れた種である *C.s.* では、モノエステル類の存在は認められず、炭化水素類のみ存在した。

次に、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、それぞれの主成分である炭化水素類、モノエステル類を分画し、GC 分析した結果を Fig. 2 に示した。3 種のテントウムシの足跡物質には違いがみられ、*E.v.m.* と *E.v.p.* の足跡物質にはそれぞれ炭化水素類とモノエステル類の存在が認められ、*C.s.* ではモノエステル類の存在は認められず、炭化水素類のみで構成されていることが明らかとなった。*E.v.m.* と *E.v.p.*、*C.s.* の足跡物質の炭化水素画分にはそれぞれ質的に明らかな違いが認められ、さらに *E.v.m.* と *E.v.p.* の足跡物質のモノエステル画分にも質的な違いが認められた。

3 種のテントウムシの足跡物質の炭化水素画分の同定結果を Table 1 に示した。*C.s.* の炭化水素の主成分は、ピーク (F) のモノメチルヘプタコサンであり、マススペクトルから 7, 9, 11, 13 位にメチル側鎖を有する 4 種類のモノメチルヘプタコサンが存在し、9-メチルヘプタコサンが主成分であった。また、ピーク (E) のヘプタコサン、ピーク (F) のモノメチルヘプタコサン、ピーク (G) のジメチルヘプタコサン、ピーク (H) のトリメチルヘプタコサンと主鎖が炭素数 27 個からなる炭化水素類で全体の 70% 程度を占めた。

それに対して *E.v.m.* では、総炭素数が 30 以上の炭化水素が主として含まれ、モノメチルtriaconten と 13, 17-ジメチルノナコサン (ピーク (D')) が主成分として認められた。さらに、直鎖の不飽和炭化水素やメチル側鎖をもった不飽和炭化水素が多く存在した。

E.v.p. では、9-メチルヘントリアコンタンピーク (C'') や 9, 13-ジメチルヘントリアコンタンピーク (D'') が主成分として認められた。また、*E.v.m.* と同様にメチル側鎖をもった不飽和炭化水素であるヘントリtriaconten も存在した。

E.v.m. と *E.v.p.* のモノエステル画分の GC-MS 分析結果を Fig. 3 に示した。*E.v.m.* において、トータルイオンクロマトグラム上で最も大きいピーク (A) のマススペクトルから、低質量部の特異的イオン m/z 89 の存在よりこの化合物が高級アルコールの酪酸エステルであることが推定できた。高級アルコールのカルボン酸エステルのマススペクトルにおいては、構成カルボン酸+H イオンが固有イオンとして生成する (McLAFFERTY, 1973)。高質量部に存在する m/z 434 の偶数イオンは、分子イオンからマクラフアティー転移によって生じたイオンと考え

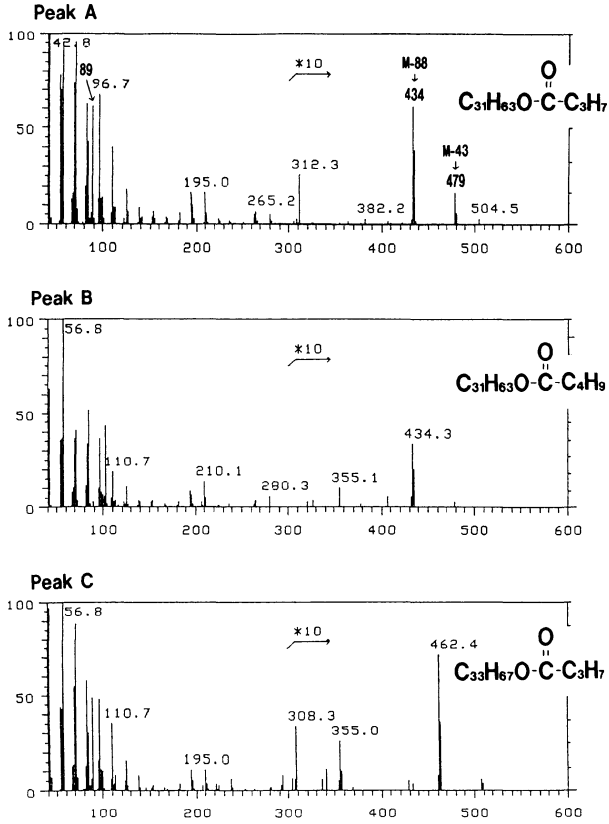


Fig. 3-1. Mass spectra of peak A, B and C on *E.v.m.*

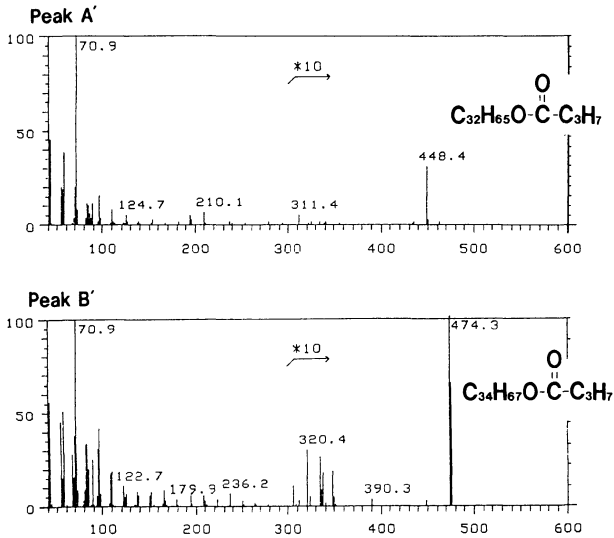


Fig. 3-2. Mass spectra of peak A' and B' on *E.v.p.*

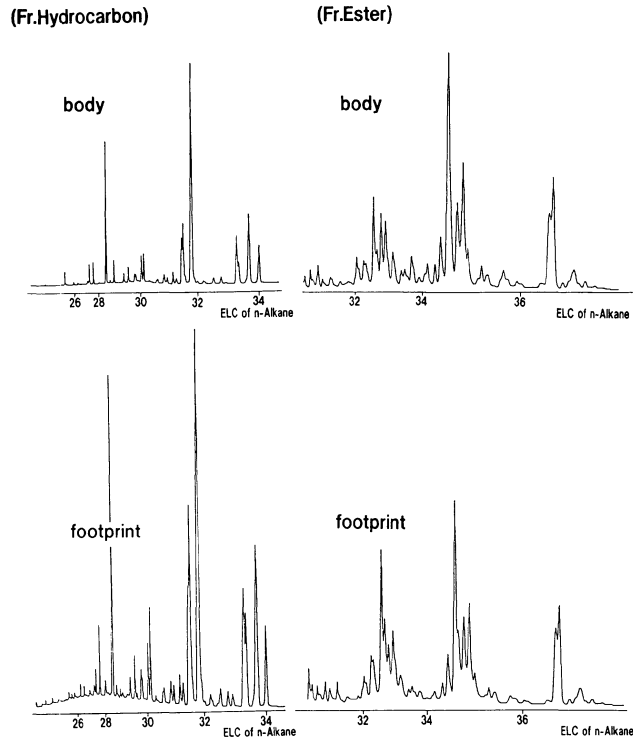


Fig. 4. Comparison of hydrocarbon and ester constituents isolated from footprint and whole body of *E.v.p.*

られる。またさらに、高質量部の m/z 479 イオンは分子イオンより C_9H_7 (43) の脱離したイオンとなり、酪酸エステルの固有イオンはすべて存在した (McLAFFERTY, 1973)。また、 m/z 195, 210, 265, 280 などのイオン群からアルコール側の炭素鎖部分にメチル側鎖を数多く持つことが明らかであり、そのうち少なくとも、13 位と 17 位などにメチル側鎖をもつと推定できた。ピーク (A) のエステル交換をして得たアルコールは、GC において溶出位置が炭素数 31 の直鎖のアルコールよりメチレン 2 個程度早く現われることより、メチル側鎖を 4 個程度もつと推定された。しかし、完全なメチル側鎖位置決定には、さらに詳細な検討が必要である。ピーク (B) と (C) についてもマススペクトルの解析を行なうと、ピーク (B) は総炭素数 31 のアルコールの吉草酸エステル、ピーク (C) は総炭素数 33 のアルコールの酪酸エステルと推定された。

また同様にして *E.v.p.* は、Fig. 3-2 から、総炭素数 32 および 34 で数個のメチル側鎖を持った高級アルコールの酪酸エステルを主成分としていた。

以上のことより、足跡物質成分の炭化水素類とモノエ

ステル類には、メチル側鎖やモノ不飽和結合が存在することが明らかとなった。通常、有機化合物は、炭素数が 30 近くになると固体として存在することが多いが足跡物質は液体として存在する。これは、メチル側鎖や不飽和結合が分子内に存在するため、融点が下がったと考えられる。従って、足跡物質は常温でも不揮発性の粘性を持った液体として長期間存在できると思われる。

③ 足跡物質と体表成分との関係

E.v.p. の体表成分と足跡物質の炭化水素画分とモノエステル画分の GC 分析結果を Fig. 4 に示した。足跡物質と体表ワックスには、質的に全く違いが認められないことが明らかとなった。さらに、*E.v.m.* と *C.s.* においても同様の結果が得られた。このことより、テントウムシは、足の裏からだけ特有の粘着成分を生合成して分泌しているわけではなく、体表ワックス自身が粘着性をもつことになる。

④ 体表ワックスと足に存在する粘着物質の分泌量の関係

Fig. 5 には、速乾性接着剤による被覆処理を行っていない虫体成分の脂質量を 100% とした場合の被覆処理

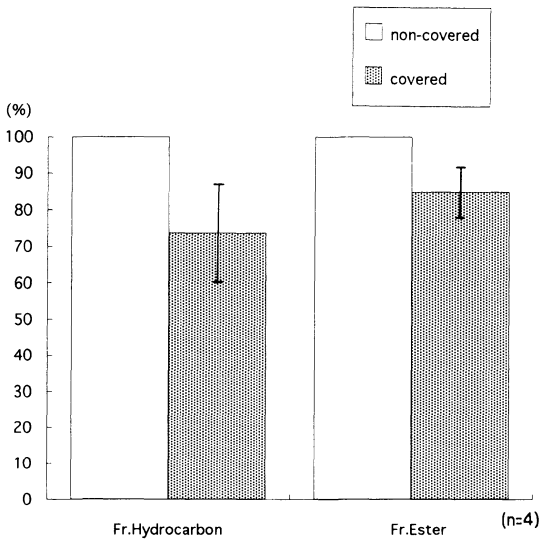


Fig. 5. Comparison of amount of lipids extracted from whole body and that from the same species of insect of which tarsi were covered with an adhesive.

を行なった虫体成分の脂質量を示した。その結果、処理区において、炭化水素画分で30%程度、モノエステル画分で20%程度の量的減少が認められた。このことより、脚の先端部の第1フ節、第2フ節の表面積と体表の表面積を考慮し、比較するとフ節部分における足跡物質の分泌量が、非常に多いことが明らかとなった。

一般に、昆虫の体表は、一番外側が皮脂線の分泌物でできたセメント層で、次にリビド層がある。リビドは真皮細胞で生産され、孔管を通して運ばれ蓄積される(高橋, 1987)。昆虫は体が小さく体表面が大きいので、水分の蒸散による乾燥の危機にさらされており、リビド層、セメント層は水分の蒸散を防ぎ、機械的損傷から虫体を保護している。その他に体表ワックスの機能は、微生物の感染に対する防御作用もある。近年、体表ワックスが昆虫間の同種、異種の認識のための信号物質として使われている可能性が示唆されており(Howard, 1993)、テントウムシでも足跡物質(体表脂質)に種特異性が存在したことは興味深いことである。もし、足の裏だけが別の粘着物質を生合成し、分泌するとすれば足の裏だけに他の部分とは異なる分泌細胞が多く必要となる。本研究で明らかとなったように、足の裏も体表もすべて同じ脂

質成分を用いて昆虫における本来の上記のような役割を果たせるなら、脂質の生合成において大変効率が良いと考えられる。そして、テントウムシのように重力に逆らって歩行できる昆虫は、付着、脱着がスムーズに行なえるよう足の裏に多くの毛を育成し、より多くの脂質成分を常に保持することを可能にしたため、自由に天井などを歩けるようになったと考えられる。

摘 要

本研究では、テントウムシの足跡物質の構成成分が種によって異なることが明らかとなった。オオニジュウヤホシテントウとニジュウヤホシテントウは近い種であり、炭化水素類とモノエステル類がその主成分であった。一方、ナナホシテントウは炭化水素類のみより成っていた。そして、足跡物質の炭化水素類とモノエステル類には、メチル側鎖や不飽和結合が存在した。

また、足跡物質は脚の第1フ節、第2フ節からのみ分泌されると考えられたが、虫体成分と足跡物質に違いは認められなかった。しかし、脚のフ節部分からは他の虫体部分と比較すると、多量の脂質成分が分泌されることが明らかとなった。

引用文献

MCLAFFERTY, F.W. (1973) [上野民夫訳, 1978] マススペクトルの解釈と演習. 京都: 化学同人, 282 p.
 HOWARD, R.W. (1993) Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. (D.W. STANLEY-SAMUELSON and D.R. NELSON, eds.), Lincoln and London, University of Nebraska Press, pp. 179-226.
 ISHII, S. (1987) Adhesion of a Leaf Feeding Ladybird *Epilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) on a Vertically Smooth Surface. *Appl. Entomol. Zool.* **22**: 222-228.
 石井象二郎 (1988) 昆虫がガラス窓に止まれるわけ. 日本接着協会誌 **24**: 444-450.
 STORK, N.E. (1980) Experimental analysis of adhesion of *Chrysolina polita* (Chrysomelidae: Coleoptera) on a variety of surfaces. *J. Exp. Biol.* **88**: 91-107.
 高橋正三 (1987) 昆虫の行動. 京都: 化学同人, 180 p.
 WALKER, G., A.B. YULE and J. RATCLIFFE (1985) The adhesive organ of the blowfly, *Calliphora vomitoria*: a functional approach (Diptera: Calliphoridae). *J. Zool., Lond. (A)* **205**: 297-307.