

ナナホシテントウの夏眠に伴う血液タンパク
の変化とそのホルモン支配*

桜井宏紀・平野哲司**・武田 享

昆虫学研究室

(1985年7月31日受理)

Changes of Haemolymph Protein of *Coccinella septempunctata*
bruckii Mulsant during Aestivation and Its Hormonal Control

Hironori SAKURAI, Tetsushi HIRANO and Susumu TAKEDA

Laboratory of Entomology

(Received July 31, 1985)

SUMMARY

In order to clarify the physiological mechanism of aestivation in *Coccinella septempunctata*, changes in electrophoretic pattern of hemolymph protein were studied throughout aestivation. The electrophoretic pattern of haemolymph protein changed remarkably following aestivation and demonstrated bands peculiar to the diapause. These bands disappeared after awakening from the aestivation. By treatment of aestivating females with the juvenile hormone analogue, methoprene the bands peculiar to the diapause disappeared, while the low mobile band appeared. The latter band is specific to the haemolymph of sex matured females and corresponds to the main protein band of mature eggs. Results would indicate that the juvenile hormone is involved with hormonal control of aestivation in *Coccinella septempunctata* by regulating vitellogenin synthesis.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (50) : 41-45, 1985.

摘 要

ナナホシテントウの夏眠の生理機構を明らかにするため、夏眠に伴う血液タンパクの電気泳動像の変化と、それに及ぼす幼若ホルモンの作用を検討した。夏眠に伴い第1世代雌成虫の血液タンパクの泳動像は顕著に変化し、夏眠に特異的なバンドの出現と、夏眠覚醒に伴うそれらの消失が観察された。夏眠個体に幼若ホルモン類似体の methoprene を塗布したところ、夏眠に特異的なバンドが消失し、代って移動度の低いバンドが出現した。性成熟個体の血液タンパクの雌雄間差異および成熟卵抽出物の泳動像から、移動度の低いバンドは卵黄前駆物質である vitellogenin (Vg) と推測された。これらの結果から、幼若ホルモンは Vg の合成を制御することにより夏眠のホルモン支配に関与することが示唆された。

緒 言

捕食性テントウムシの生活史を明らかにすることは、野外での活動状況を知り、生物防除へのテントウムシの利用を図る上で重要である。ナナホシテントウは東海地方では通常2化性で、第1世代成虫は5月

* 岐阜大学農学部昆虫学教室業績 No.105

** 愛知県農業総合試験場, 山間技術実験農場

頃に出現して、6月下旬頃から雑草（主にススキ）の株元で夏眠に入った後、8月中旬頃より夏眠から覚醒する。一方、第2世代成虫は10月上旬頃から出現して、12月下旬頃には活動が低下し越冬に入り、3月上旬頃から活動を再開する。著者らはナナホシテントウの休眠生理をしらべ⁵⁾、越冬個体は呼吸量やアタラ体の内分泌活性が高く卵巣発育もやや進んだ状態にあるが、これらを25℃の適温下で飼育すると間もなく産卵を開始することから、本種の越冬が低温による単なる活動抑制であることを明らかにした。一方、夏眠個体では呼吸量やアタラ体の内分泌活性は著しく低下し、卵巣発育は完全に抑制され、消化機能も著しく低下する。これらに幼若ホルモン類似体を塗布処理すると、呼吸量は激増し、卵巣発育が誘起されることから、夏眠は真の休眠であることが示唆された。

本研究ではナナホシテントウの休眠の生理機構を知るため、夏眠に伴う血液タンパクの電気泳動像の変化と、それに及ぼす幼若ホルモンの作用について検討した結果を報告する。

材料および方法

供試昆虫：岐阜県各務原市の岐阜大学農学部附属農場の周辺の雑草上から、ナナホシテントウ成虫を採集した。成虫を蒸留水で洗滌後、後脚を切断し、5～10頭ずつを試験管に入れ、40%蔗糖中で泳がせることにより採血した。また成虫をアブラムシを与えて飼育し産卵させて、成熟卵を集めた。卵を40%蔗糖液中でガラスホモゲナイザーで磨砕し、2,000 rpm で10分間遠心分離した後、上清を更に13,000 rpm で10分間遠心分離し、得られた上清を電気泳動用の試料に供した。血液及び卵抽出物は-70℃で凍結保存し、実験に使用した。

電気泳動法：泳動はポリアクリルアミドゲル・ディスク電気泳動法により行った⁶⁾。5×70mmのガラス管を使用して、7.5%の分離用ゲルと3.75%の濃縮用ゲルを作製し、40%蔗糖液に溶かした試料をゲルの一番上に重層した。泳動は0.049M Tris—0.384M glycine 緩衝液 (pH 8.6) を用いて行い、ゲルカラム当り1.5mA の定電流を約2時間流した。またフロントルマーカーとして0.01% bromophenol blue を少量上部電極層の緩衝液の中に加えた。泳動後のゲルは0.05% amido black で1時間染色した後、7%酢酸で脱色した。脱色後ゲルの各バンドの相対濃度を、デンストメーター（東洋 DMU—33C）により620m μ で測定した。

幼若ホルモン類似体 (JHA) の処理：methoprene (ZR—515) をピーナッツ油で5 μ g/ μ l の濃度に稀釈し、その1 μ l をマイクロシリンジを用いて成虫の腹部背板に塗布した。

結果および考察

第1世代雌成虫の血液タンパクの電気泳動像と、各バンドの吸光度の季節的变化を第1, 2図にそれぞれ示す。5月下旬の新成虫 (Fig 1, 2:A) では主要なバンドが4本 (バンド2～5) みられ、その内バンド3と5の濃度が高かった。6月下旬 (Fig 1, 2:B) では5本の主要なバンド (3, 5, a, b, およびbのショルダー) がみられた。7月下旬 (Fig 1, 2:C) ではバンドbが消失して、代ってCが出現するようになり、バンドaと3の濃度は著しく高まった。8月下旬 (Fig 1, 2:D) では何れのバンドの濃度も著しく低下した。そしてバンドa, 3, bの各バンドは融合した状況であるのに対し、バンド5の濃度が激増した。9月下旬 (Fig 1, 2:E) ではバンド3と5が顕著となり、バンド1が出現する様になり、バンド2の濃度も増加した。

このように夏眠に伴い先ずバンドa, bが出現し、次いで夏眠の最深期の7月下旬にはバンドcが高濃度に存在するようになるが、夏眠覚醒に伴いこれらのバンドは消失した。このことからバンドa, b, cは夏眠に密接に関係したバンドであることが推測される。休眠中の血液タンパクの変化がコロラドハムシでしらべられており、夏に発生する新成虫を短日下で飼育すると越冬休眠に入り、それに伴い休眠に特異的なタンパク (diapause protein) が血液中に蓄積する^{7,8)}。本研究でもナナホシテントウの夏眠個体で同様な状況が観察された。

次にナナホシテントウの夏眠成虫の血液タンパクに対する幼若ホルモンの作用をみるため、夏眠中の雌成虫に JHA を塗布処理して血液タンパクの泳動像の変化をしらべた。夏眠個体 (Fig 3 A) では Fig 2

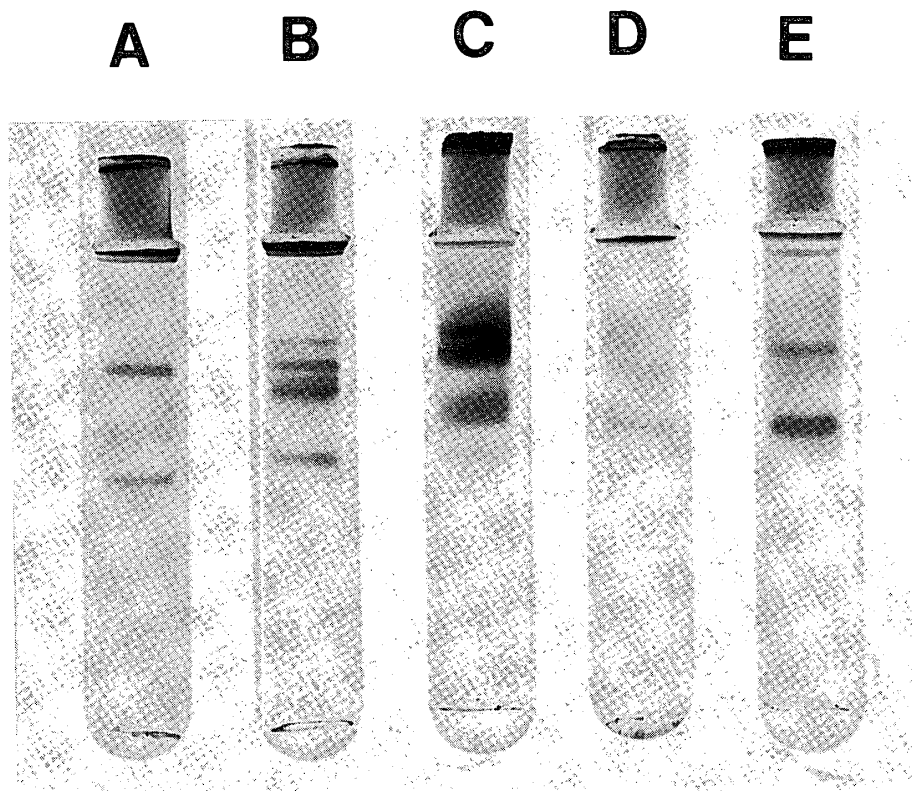


Fig. 1. Electrophoreogram of haemolymph protein of female adults during 1st-generation period. A, May 23 ; B, June 30 ; C, July 29 ; D, August 30 ; E, September 30.

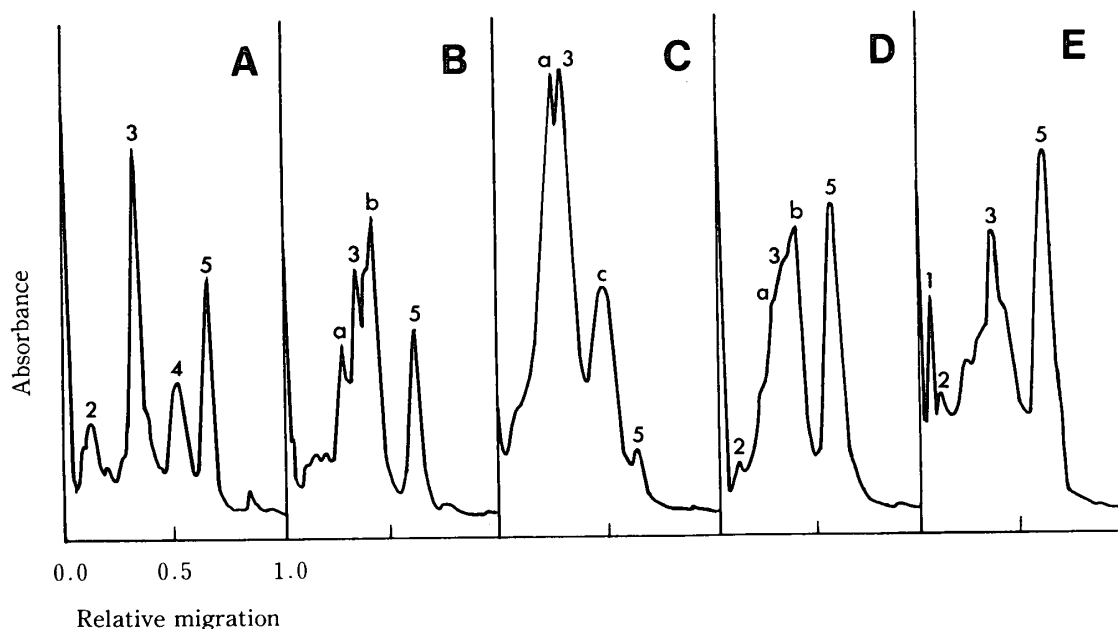


Fig. 2. Densitometric scans of electrophoreograms of haemolymph protein in female adults. A-E correspond to each electrophoreogram presented in Fig. 1.

Bと同様な泳動パターンを示すのに対し、JHA 処理して1週間経った個体ではバンド1の出現とバンド2の濃度の著しい増加がみられた (Fig 3 B)。処理2週間後にはバンドa, bは消失し、バンド5の濃度も

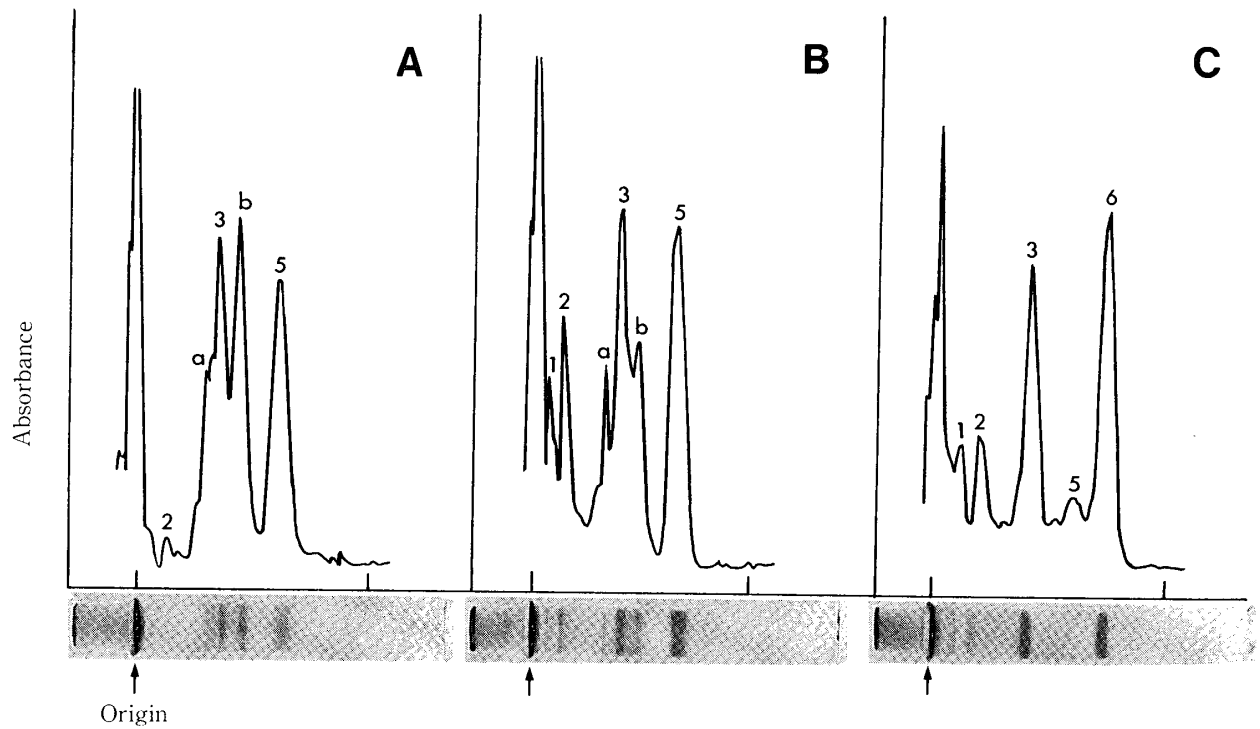


Fig. 3. Electrophoretic pattern of haemolymph protein in aestivating female adults treated with JHA (methoprene). A, aestivating (July 20); B, 1 week after JHA-treatment (July 20); C, 2 weeks after JHA-treatment (July 27).

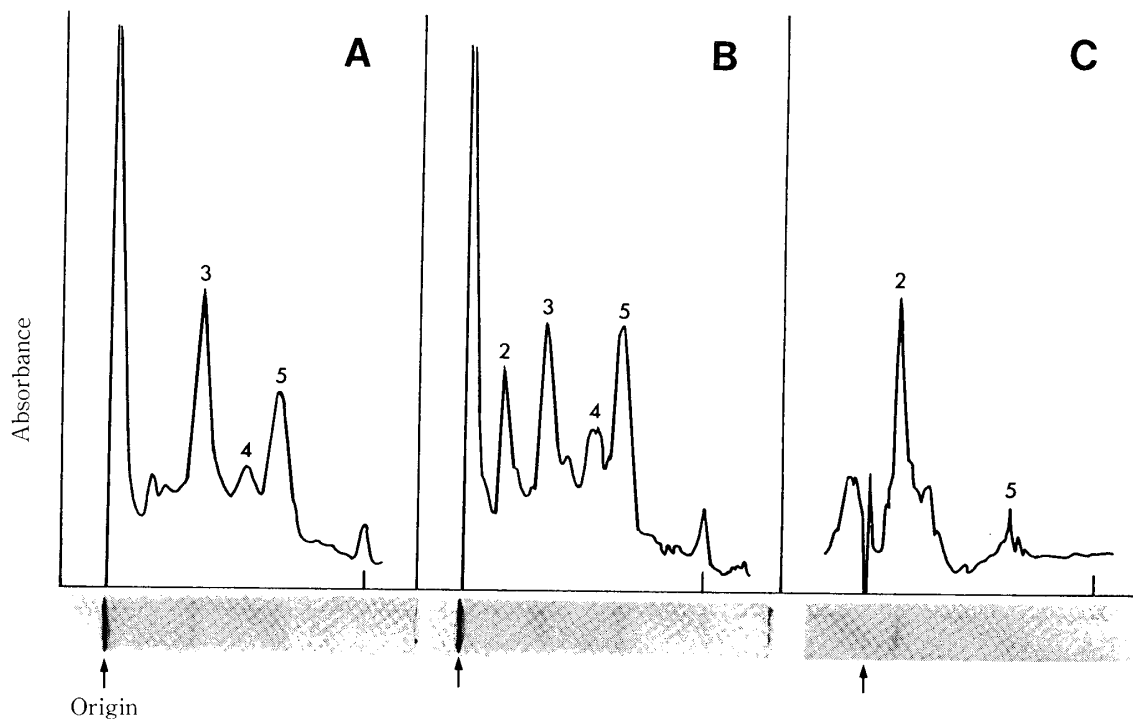


Fig. 4. Electrophoretic pattern of protein of haemolymph and egg. A, male haemolymph (April 15); B, female haemolymph (April 15); C, mature egg.

著しく低下するのに対し、バンド6が新たに出現した (Fig 3 C)。このように JHA を夏眠個体に塗布処理した結果、休眠に特異的なバンド a, b が消失して、代ってバンド 1, 2 が出現し 9 月の夏眠覚醒個体

(Fig 2 E)と同様な変化がみられた。このことから、夏眠個体の血液タンパクの変化が幼若ホルモンの作用と密接な関係にあることが分かる。

成虫休眠のホルモン支配には、一般にアラタ体の機能が密接に関係する^{9,10}。休眠中のコロラドハムシに幼若ホルモン (JH) を塗布処理すると、血液中の diapause protein が消失して休眠から覚醒する^{7,8}。ナナホシテントウの夏眠個体でも JHA の処理により同様な変化が観察された。しかし JHA 処理により9月の夏眠覚醒個体でみられなかったバンド6が出現したことは、自然条件下における休眠覚醒と JHA 処理による強制的休眠覚醒との間での生理機構の違いを示すものと思われ興味深い。

更に血液タンパクの泳動バンドの機能を知るため、野外で摂食活動中の第2世代(越冬世代)の性成熟個体を4月中旬に採集し、血液タンパクの泳動パターンを雌雄間で比較した。雄 (Fig 4 A) ではバンド3と5が明瞭であるのに対し、雌 (Fig 4 B) では両バンドの他に移動度の低いバンド2が顕著にみられた。このことからバンド2が雌に特異的なタンパクであることが分かる。このバンド2は成熟卵抽出液中の主要成分であり (Fig 4 C), 卵黄タンパク (vitelline) に相当することから、雌の血液中のバンド2は卵黄タンパク前駆物質 (vitellogenin : Vg) であることが推測される。ナナホシテントウの Vg は、分子量が約40万の5量体であり、雌にのみ特異的に存在することが既に明らかにされている¹¹。本研究の結果から、幼若ホルモンはナナホシテントウの夏眠成虫に対し、Vgの合成を制御することにより、雌の生殖機能を支配しているものと考えられる。

謝 辞

本研究に際し色々とお便宜を賜った本学 西川浩三および渡部信義両先生に厚く御礼申し上げます。また methoprene を御供与下さった大塚製薬株式会社に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Sakurai, H. : Respiration and glycogen contents in the adult life of the *Coccinella septempunctata* Mulsant and *Epilachna vigintioctopunctata* Fabricius (Coleoptera : Coccinellidae). Appl. Ent. Zool. 4 : 55-57, 1969.
- 2) 桜井宏紀・森 靖・武田 享 : ナナホシテントウの休眠に関する研究, I. 夏眠および越冬に伴う生理的变化. 岐阜大農研報 (45) : 9-15, 1981.
- 3) 桜井宏紀・後藤研也・森 靖・武田 享 : ナナホシテントウの休眠に関する研究, II. 成虫休眠におけるアラタ体の役割. 岐阜大農研報 (45) : 17-23, 1981.
- 4) 桜井宏紀・奥田 隆・武田 享 : ナナホシテントウの休眠に関する研究, III. 休眠にともなう成虫の組織学的変化. 岐阜大農研報 (46) : 29-40, 1982.
- 5) Sakurai, H., Goto, K. & Takeda S. : Emergence of the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata bruckii* Mulsant in the field. Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (48) : 37-45, 1983.
- 6) Davis, B. J. : Disc electrophoresis —II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 406-427, 1964.
- 7) De Loof, A. & De Wilde, J. : The relationship between haemolymph proteins and vitellogenesis in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol. 16 : 157-169, 1970.
- 8) De Loof, A. & De Wilde, J. : Hormonal control of synthesis of vitellogenic female protein in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol. 16 : 1455-1466, 1970.
- 9) Wigglesworth, V. B. : The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. Adv. Insect Physiol. 2 : 248-336, 1964.
- 10) De Wilde, J. & De Loof, A. : Reproduction-endocrine control. The Physiology of Insecta (2nd ed. Ed. by Rockstein M.) 1 : 97-157. Academic Press, New York, 1973.
- 11) Zhai, Q, Postlethwait, J. H. & Bodley, J. W. : Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. Insect Biochem. 14 : 299-305, 1984.