



ニクバエ(Sarcophaga
ruficornis)の脱皮ホルモンに関する研究：
(II)発育に伴う量的変化とその役割

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山川, 隆, 桜井, 宏紀, 武田, 享 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5578

ニクバエ (*Sarcophaga ruficornis*) の
脱皮ホルモンに関する研究

II. 発育に伴う量的変化とその役割*

山川 隆¹⁾・桜井宏紀・武田 享

生物生産制御学講座
(1989年8月1日受理)

Studies on Molting Hormone in the Fleshfly,

Sarcophaga ruficornis

II. Changes of Molting Hormone Titres during
Development and its Roles

Takashi YAMAKAWA, Hironori SAKURAI and Susumu TAKEDA

Department of Controlled Plant Production
(Received August 1, 1989)

SUMMARY

The relationship between the quantitative changes in the molting hormone (ecdysteroid) during development and its roles in the fleshfly, *Sarcophaga ruficornis* Fabricius, was studied. α -Ecdysone was not detected at all during development, while β -ecdysone was detected. During the larva-pupal development, β -ecdysone titres increased remarkably from 3 day (wandering stage) to 4 day (puparium formation) and 8 day (pharate adult) after larviposition, demonstrating two peaks. Determination radio-immunoassay (RIA) showed much lower value than that by HPLC, exhibiting two peaks.

During the adult development, male β -ecdysone titres was extremely low, but in females HPLC showed high titres. Subsequently, in both sexes it was low. On the seventh day it increased in males. These results indicate that the molting hormone is involved in induction of wandering behavior, puparium formation and pupal development to the pharate adult. We suggest that, in adult stage, the vitellogenin synthesis and egg development are controlled by juvenile hormone rather molting hormone.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (54) : 99—104, 1989.

摘 要

ニクバエ (*Sarcophaga ruficornis* Fabricius) について、発育に伴う脱皮ホルモン (エクジステロイド) の量的変化とその役割を検討した。すべての発育ステージで α -エクダイソンは検出できず、 β -エクダイソンが確認された。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による幼虫—蛹期での β -エクダイソンの変化

* 岐阜大学農学部昆虫学教室業績 No.121

1) 岐阜県立岐南工業高等学校

は、這い出し期の 3 日齢、囲蛹形成期の 4 日齢及びファレート成虫期の 8 日齢に著しく増加し、2 つのピークが観察された。同時に行なったラジオイムノアッセイでは、HPLC より非常に低い測定値を示し、8 日齢をピークにした変化が見られた。成虫期での HPLC による脱皮ホルモン定量の結果では、 β -エクダイソンは羽化当日に雄でごく微量であったのに対し雌では多量に存在し、その後は雌雄とも微量であったが、雄のみ 7 日後に増加した。このことより、脱皮ホルモンの役割は這い出し行動の誘発、囲蛹形成及びファレート成虫の誘導に関係するものと考えられる。一方、成虫期における卵黄前駆物質（ビテロジェニン）の合成と卵巣発育の制御は、脱皮ホルモンより幼若ホルモンの作用化にある可能性が高いことが示唆された。

諸 言

衛生、農業害虫として重要であるニクバエ (*Sarcophaga ruficornis* Fabricius) の発育に伴う脱皮ホルモン量の変化とその役割を解明することは、生理活性物質の利用による害虫防除を図る上で重要である。クロバエ (*Calliphora erythrocephala* Meigen) では脱皮ホルモン (ecdysteroid; エクジステロイド) 活性は、囲蛹形成時とその 3~5 日後にピークがみられ¹⁾、同様のパターンはセンチニクバエ (*Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy) でもみられる²⁾。このように、エクジステロイドは昆虫の蛹化及び成虫化の制御に関係している。一方、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti* L.) では卵巣がエクジステロイド生産に関係しており、卵巣でつくられた α -エクダイソンは体内で β -エクダイソンに変換され、脂肪体に作用してビテロジェニンの合成を刺激するという³⁾。ニクバエ (*S. bullata* Parker) の成虫では雌の方が雄よりもエクジステロイド含量が高いが、エクジステロイドを注射すると雄もビテロジェニンを合成する⁴⁾。しかし、イエバエでは卵巣発育は幼若ホルモンの作用化にある⁵⁾。このように双翅目昆虫の卵巣発育のホルモン支配については種々な見解が示されている。本研究ではニクバエの発育に伴うエクジステロイド量の変化を調べ、発育におけるその役割を検討した。

材料及び方法

供試昆虫：ニクバエ (*Sarcophaga ruficornis* Fabricius) は、岐阜大学農学部昆虫学教室で 1981 年より累代飼育しているものである。飼育は全ステージを 25℃ の恒温条件で行なった。各日齢ごとに虫体を集め、個体数と体重を測定した後、液体窒素で凍結した。

抽出：約 10 g のニクバエをアセトニトリルで抽出し⁶⁾、n-ヘキサンで脂質を除去後、ロータリーエバポレーターで (40℃, 減圧下) 乾固した。乾固物はメタノールに溶解し、さらに n-ヘキサンで脂質を取り除き、ロータリーエバポレーターで (40℃, 減圧下) 濃縮した。

精製：クロロホルム：エタノール = 4 : 1 を展開液として、シリカゲルの薄層クロマトグラフィーで展開し⁷⁾、該当部分をかきとりメタノールで溶解し、100 μ l に濃縮した。

HPLC による定量：機器として HITACHI HPLC MODEL 635 を使用し、ステロイド化合物の検出は 254 nm で行なった⁸⁾。カラムはガスクロ社の C₁₈系 Inertsil ODS を、移動相としてメタノール：水：アセトニトリル (50 : 45 : 5) を使用し、定量はチャートのピークの高さと予め求めた標準曲線より求めた。

RIA による定量：試料を湯せん (50℃) で乾固し、乾固物は測定範囲 (0.01~0.1 ng/30 μ l) に入るようにリン酸緩衝液で希釈して 30 μ l にした。検体 30 μ l と ³H β -エクダイソン 30 μ l を攪拌し、これに β -エクダイソン抗体 30 μ l を加え 12 時間反応させた。これに飽和硫酸アンモニウム水溶液 90 μ l を加え沈殿させた後、遠心分離 (3,500 rpm 30 分間) し、上澄液を除去した。さらに沈殿物に 50% 硫酸アンモニウム水溶液 180 μ l を加え遠心分離し、上澄液を除去した。沈殿物に水 180 μ l を加え溶解後、シンチレーター (Aquasol-II®: New England Nuclear) を加え、シンチレーションカウンターで比放射活性を測定した。一方、予め標準 β -エクダイソンを検体として、同様な手順で比放射活性を測定し標準曲線を求め、これより試料中の β -エクダイソン量を換算し定量した。

結 果

1. 幼虫一蛹期におけるエクジステロイド量の変化

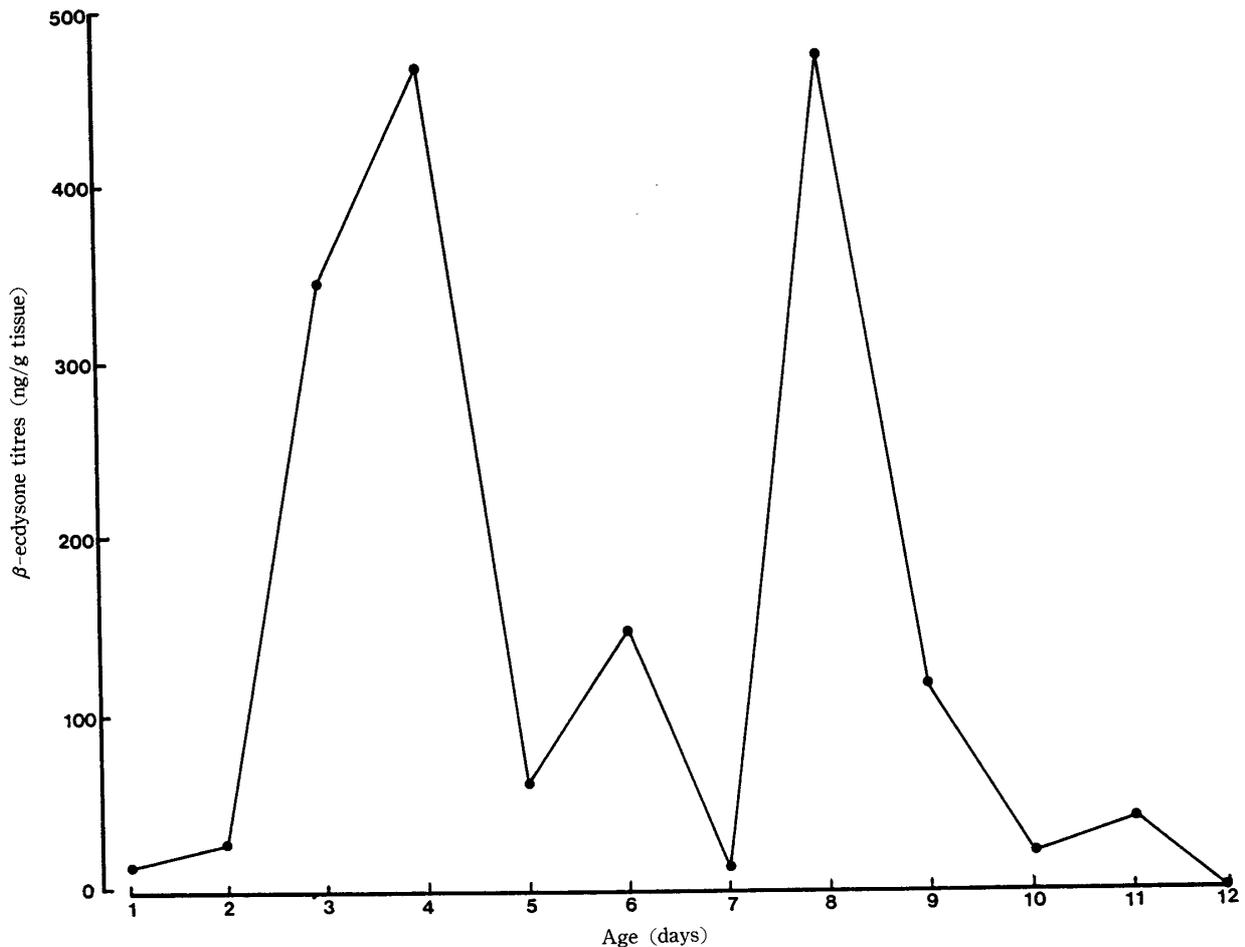


Fig. 1 Changes in β -ecdysone titres (ng/g tissue) determined by HPLC during larval-pupal development in fleshfly, *S. ruficornis*

(1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量：測定したすべてのステージで、 α -エクダイソンは検出できず、 β -エクダイソンのみが検出できた。産仔当日を0日としたときの β -エクダイソン量の変化をFig. 1に示す。1日齢で13ng/g (虫体1g当り)であった β -エクダイソンは、2日齢で27ng/gと少し増え、3日齢で346ng/gと急激に増加し、4日齢で469ng/gとさらに増え、5日齢で58ng/gと急減し、6日齢で148ng/gと増加し、7日齢で10ng/gと減少したが、8日齢で476ng/gと急増し、その後9日齢で113ng/g、10日齢で19ng/g、11日齢で39ng/gとなり、12日齢でほぼゼロになった。全体として3日齢の這い出し期から4日齢の囲蛹形成期と、8日齢のファレート成虫形成期 (成虫形成出現期) に2つのピークが観察された。

(2) ラジオイムノアッセイ (RIA) による定量： β -エクダイソン量は2日齢では1.0ng/gと微量であったが、日齢を増すに従い増加し、ファレート成虫形成期の8日齢では17.1ng/gと最高値に達した後、9日齢では3.5ng/gと急激に減少し、11日齢で9.8ng/gと増加した後、12日齢で1.3ng/gと再び減少した。全体として β -エクダイソン量は8日齢を中心としたピークを形成した。このようにRIAではHPLCで見られた8日齢のピークは一致したが、3、4日齢のピークは観察されなかった。また、RIAでの測定値はHPLCより非常に小さかった (Fig. 2)。

2. 成虫期におけるエクジステロイド量の変化

羽化当日を0日として、HPLCで定量した結果、幼虫一蛹期と同様に α -エクダイソンは存在せず、 β -エクダイソンのみ定量できた。羽化当日の β -エクダイソン量は、雄では45ng/g、雌では219ng/gと多量に観察され、2日後に雄ではゼロ、雌では15ng/gと共に減少し、4日及び6日後は両性ともゼロで、7日後に雄では105

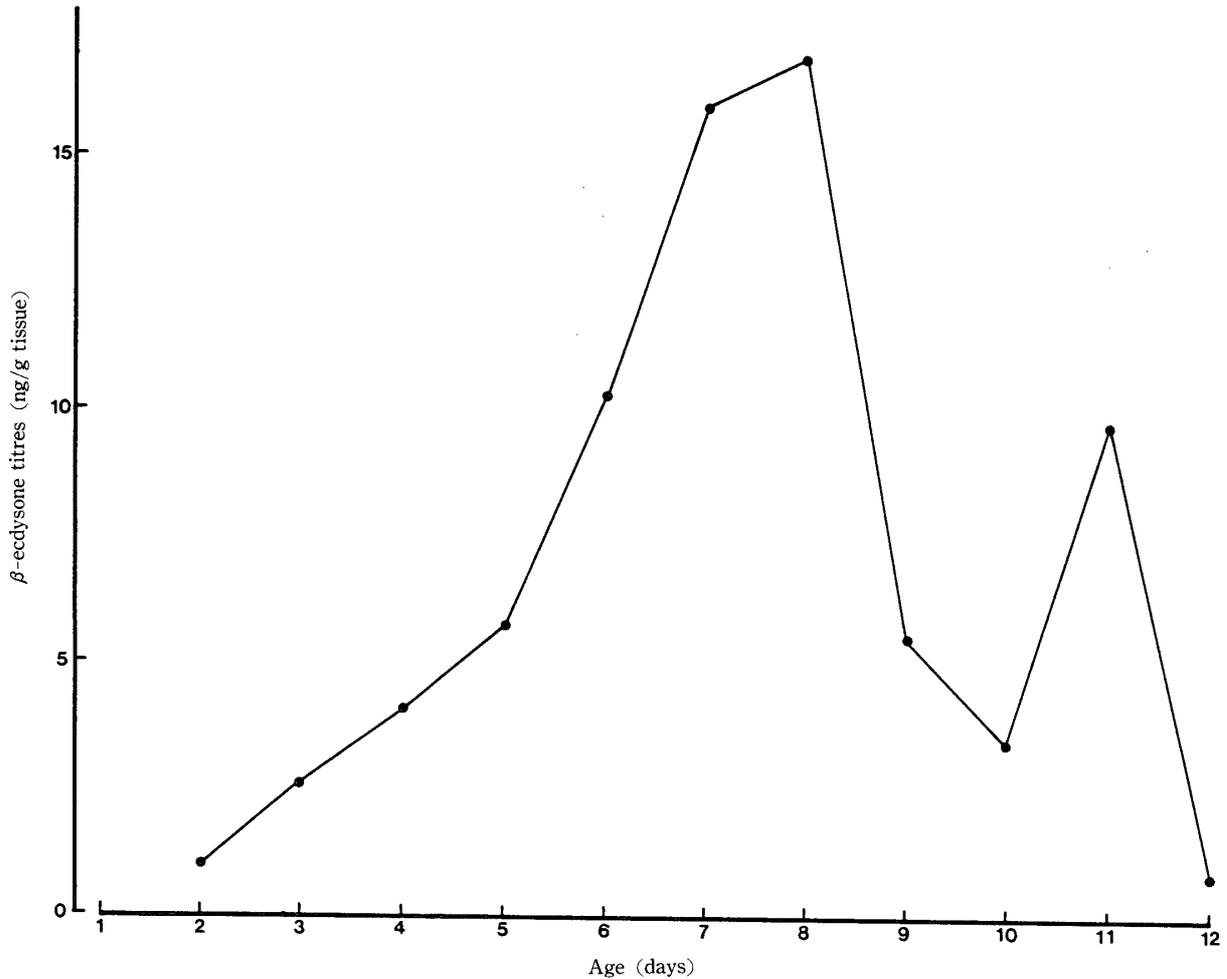


Fig. 2 Changes in β -ecdysone titres (ng/g tissue) determined by RIA during larval-pupal development in fleshfly, *S. ruficornis*

ng/g, 雌ではゼロ, 8日後に雄では14ng/gと減少するのに対し, 雌ではゼロのままであった (Fig.3).

考 察

1. 幼虫-蛹期における脱皮ホルモンの役割

HPLC 分析では, 幼虫-蛹期のすべてのステージで, α -エクダイソンは接近する不純物のすそにかかって正確に定量できなかった。しかし, α -エクダイソンの保持時間には該当するピークは見られなかったことから, α -エクダイソンはほとんど存在しないと判断される。これと同様な傾向は, カイコ (*Bombyx mori* L.)⁹⁾, ニクバエ (*S. bullata*)¹⁰⁾, イエバエ (*Musca domestica* L.)⁷⁾などで報告されている。このことは, α -エクダイソンが双翅目の環状腺で合成されるとただちに放出され, 周辺組織でステロイド環 C₂₀水酸化酵素により β -エクダイソンに変換されると考えられる¹⁰⁾。in vitroでの種々の実験で, 一般に α -エクダイソンより β -エクダイソンのほうが強い脱皮ホルモン活性を示すことから, α -エクダイソンはプレホルモンであり β -エクダイソンが真の脱皮ホルモンであると考えられている¹⁰⁾。

幼虫-蛹期間での HPLC 分析による β -エクダイソン量の変化は, 這い出し期の3日齢で346ng/g, 罍蛹形成期の4日齢で469ng/g, ファレート成虫期の8日齢で476ng/gに増加し, 2つのピークを形成した。この値を他の昆虫と比較すると, センチニクバエ (*S. peregrina*) の生物検定による罍蛹形成期に125ng/g, ファレート成虫期に105ng/g²⁾, ニクバエ (*S. bullata*) の RIA による定量では罍蛹形成期に208ng/g, ファレート成虫期に215ng/g¹²⁾である。また, イエバエでは罍蛹形成期に HPLC により360ng/g, また生物検定により180ng/gが検出されている⁷⁾。このように, 供試昆虫と定量方法に違いはあるものの,

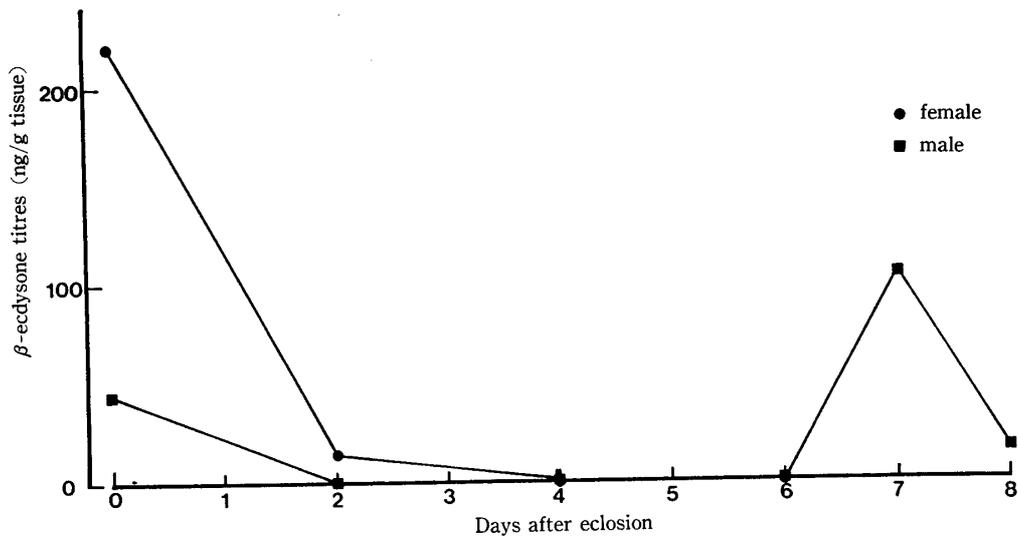


Fig. 3 Changes in β -ecdysone titres (ng/g tissue) determined by HPLC during adult period in fleshfly, *S. ruficornis*

ほぼ同様な値を示している。幼虫一蛹期間における β -エクダイソン量の変化から、脱皮ホルモンは前変態行動である這い出し行動の誘発と罌蛹形成に関係し、組織解離 (histolysis) を誘導した後、蛹中期には成虫芽に作用して成虫の組織形成を制御するものと考えられる。

一方、RIA による定量では脱皮ホルモン量は成長に伴い増加し、8日齢で最高値の17.1ng/gと増加し、11日齢で最高値の約半分になり、その後測定不能のレベルに減少した。このように、すべての日齢でRIAでの値はHPLCの値より非常に低かった。両者の測定値の間でエクジステロイド量に大きな差が生じた原因として、HPLCではタンパク質や糖と結合したエクジステロイドの結合型も遊離型も同時に定量できるのに対して、RIAでは遊離型しかエクジステロイド抗体と反応せず結合型が定量されないためと考えられる。エクジステロイドは血リンパでの輸送や代謝及び排泄と関係して、遊離型が結合型へと変化すると考えられる。本種で検出された β -エクダイソンはほとんどが結合型であったことは、代謝のひとつの過程を示すものと考えられる。しかし、エクジステロイドの結合型と遊離型の各ステージでの割合や相互の転換、活性化については不明の点が多く、今後の研究課題である。

2. 成虫及び卵における脱皮ホルモンの役割

成虫期においても α -エクダイソンは検出されず、 β -エクダイソンのみが検出されたことは、成虫でも幼虫と同様な理由が考えられる。雌雄間で β -エクダイソンの変化のパターンに違いがみられ、雄では羽化当日 (45ng/g) 及び7日後 (105ng/g) にかなり存在したのに対し、雌では羽化当日 (219ng/g) に多量に存在した後激減した。成虫の雌雄間でのエクジステロイド量の性差は、多くの昆虫について報告されている。クロバエの雌では、雄よりもエクジステロイド量は7倍高い¹²⁾。またニクバエ (*S. bullata*) に肝臓を摂食させた場合、雄ではエクジステロイド量は低いままであるのに対し、雌では増加する¹¹⁾。この成虫では一般に雌の方が雄よりもエクジステロイド量は高いが、エクジステロイドを注射すると雄もビテロジェンを合成するという⁴⁾。このように、ニクバエの雌ではエクジステロイドがビテロジェン合成の制御に関係することが推測される。ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) では卵巣がエクジステロイド生産器官であり、脂肪体に作用してビテロジェンを合成する³⁾。また、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster* Meigen) の雌も、エクジステロイドはビテロジェン合成に関係する¹³⁾。これらのことから、本研究で羽化当日に本種 (*S. ruficornis*) の雌だけに β -エクダイソンが多量に検出されたことから、 β -エクダイソンは卵巣発育の開始及びビテロジェン合成に関係すると考えられる。しかし、羽化2日以降の卵巣発育が活発な時期や、血中のビテロジェン量が高まる羽化7日後に¹⁴⁾ β -エクダイソンが検出できず、また、本種 (*S. ruficornis*) のアラタ体摘出個体に幼若ホルモン塗布処理すると卵巣発育が刺激された¹⁴⁾ことから、本種の卵巣発育にはエクジステロイドよりも幼若ホルモンがより密接に関係している可能性が示唆される。

本種の卵からエクジステロイドは検出できなかった。しかし、カイコ¹⁵⁾やその他多くの昆虫の卵からエクジステロイドが検出されている。ネッタイシマカでは卵巣がエクジステロイドを合成することが確認されているが³⁾、卵巣を摘出したサシガメ (*Oncopeltus fasciatus* Dallas) では雌ばかりでなく雄にもエクジステロイドの生合成がみられる¹⁶⁾。エノサイトが成虫でのエクジステロイドの分泌器官という説¹⁷⁾もあるが、一般に成虫のエクジステロイドの起源はよくわかっていない。本研究では羽化7日後の雄からかなり多くの β -エクダイソンが検出されたが、この起源と意義は不明であり、成虫ステージでのエクジステロイドの起源については今後の研究が待たれる。

謝 辞

ラジオイムノアッセイでの定量について御指導下さった名古屋大学農学部蚕糸学教室山下興亜助教授ならびに奥田敬子博士、高速液体クロマトグラフィーの使用について御指導下さった福井博一助教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Shaaya, E. & Karlson, P. : Der Ecdyson Titer während der insekten Entwicklung. II. Die postembryonale Entwicklung der Schmeissfliege *Calliphora erythrocephala* Meig. J. Insect. Physiol. **11** : 65-69, 1965.
- 2) Ohtaki, T. & Takahashi, M. : Induction and termination of pupal diapause in relation to the flesh fly, *Sarcophaga peregrina*. Japan. J. Med. Sci. Biol. **25** : 369-376, 1972.
- 3) Hagedorn, H. H. & Fallon, A. M. : Ovarian control vitellogenin synthesis by the fat body in *Aedes aegypti*. Nature. **244** : 103-105, 1974.
- 4) Huybrechts, R. & De Loof, A. : Introduction of vitellogenin synthesis in male *Sarcophaga bullata* by ecdysterone. J. Physiol. **23** : 1359-1362, 1977.
- 5) 桜井宏紀 : イエバエの卵発育に関する研究 III. 卵巣発育における幼若ホルモンの役割. 衛生動物 **27** : 355-359, 1976.
- 6) Pimprikar, G. D., Coign, M. J., Sakurai, H. & Heitz, J. R. : High-performance liquid chromatographic determination of ecdystroid titre in the housefly. J. Chromatography **317** : 413-419, 1984.
- 7) 桜井宏紀・Heitz, J. R. : イエバエに対するキサントン色素の発育制御及び殺虫作用について第25回日本応用動物昆虫大会講要 : **47**, 1981.
- 8) 山川 隆・桜井宏紀・武田 亨 : ニクバエ (*Sarcophaga ruficornis*) の脱皮ホルモンに関する研究 I. 高速クロマトグラフィー (HPLC) によるニクバエの脱皮ホルモンの定量方法. 岐阜大農研報 (54) : 91-97, 1989.
- 9) Chino, H., Sakurai, S., Ohtaki, T., Ikekawa, N., Miyazaki, H., Ishibashi, M. & Abuki, H. : Biosynthesis of α -ecdysone by prothoracic glands *in vitro*. Science **183** : 529-530, 1974.
- 10) Bollenbacher, W. E., Goodman, W., Vedeckis, W. V. & Gilbert, L. I. : The *in vitro* synthesis and secretion of α -ecdysone by the ring glands of the fly, *Sarcophaga bullata*. Steroids **27** : 309-317, 1976.
- 11) Briers, T. & De Loof, A. : The molting hormone activity in *Sarcophaga bullata* in relation to metamorphosis and reproduction. Int. J. Inveret. Reprod. **2** : 363-372, 1980.
- 12) Koolman, J., Scheller, K. & Bodenstern, D. : Ecdystroids in the adult male blowfly, *Calliphora vicina*. Experientia **35** : 134-135, 1979.
- 13) Hodgetts, R. B., Sage, B. & O'Connor, J. D. : Ecdysone titres during postembryonic development of *Drosophila meralogaster*. Dev. Biol. **60** : 310-317, 1977.
- 14) 桜井宏紀・武田 亨・Singh, S. V. : ニクバエ *Sarcophaga ruficornis* の卵巣発育の生理的特徴. 第28回日本応用動物昆虫大会講要 : **47**, 1984.
- 15) Ohnishi, E., Ohtaki, T. & Fukuda, S. : Ecdysone in the eggs of *Bombyx* silkwarm. Proc. Japan Acad. **47** : 413-415, 1971.
- 16) Dorn, A. : Ecdysone synthesis in castrated imagines *Oncopeltus fasciatus* Dallas. Gen. Comp. Endocr. **34** : 106, 1978.
- 17) Romer, F., Emmerich, H. & Nowock, J. : Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor in vitro*. J. Insect. Physiol. **20** : 1975-1987, 1974.