

2種の鱗翅目昆虫の環境および季節適応に関わる神経内分泌学的研究

山中 明

山口大学理学部自然情報科学科生物科学講座

Neuroendocrine studies of the environmental and seasonal adaptation in two lepidopteran species

Akira YAMANAKA

*Department of Physics, Biology and Informatics, Faculty of Science, Yamaguchi University,
Yamaguchi 753-8512, Japan*

要 旨

第1章 序 論

生物は、地球上の環境に適応するため様々な多様性を進化の過程で獲得してきた。特に、動物界で種・個体数ともに圧倒的な数を占める昆虫の繁栄は、そのずば抜けた適応能力の多様性に他ならない。昆虫は変態や休眠という機構を持つ一方で、個々の形態や色彩をその環境や季節に適合させる機構を持つことにより、種多様性を保っていると考えられる。後者の発現調節機構も神経内分泌系が関与していると考えられているが、実体の明らかになったものは非常に少なく、分子機構などについてはまだ不明な点が多い。本研究では、最初にナミアゲハの環境適応機構（蛹および幼虫体色に関わる内分泌調節機構）および季節適応機構（成虫の季節型に関わる内分泌調節機構）について、続いて、カイコガ（大造）の季節適応機構についての解析を行った。

第2章 ナミアゲハの蛹表皮褐色化ホルモンの抽出とその部分的な特徴づけ

ナミアゲハ非休眠蛹には、緑色および褐色の蛹体色が存在する。このような蛹体色の発現には、環境条件として、匂い、光、湿度のほか、蛹化する場所の性質（粗滑）が関係している。一方、神経内分泌学的研究により、褐色の蛹となるためには、脳で生産され前蛹期の後期に前胸神経節から分泌される褐色化ホルモンが関与していることが示唆されている。今回、ナミアゲハ前蛹個体の結紮腹部を用い、蛹表皮褐色化ホルモン（Pupal-cuticle-melanizing-hormone ; PCMH）活性を定量化する生物検定方法の確立、ナミアゲハ緑色蛹の脳-食道下神経節-前胸神経節（Br-SG-PG）連合体からのPCMH抽出方法の検討を行い、更に、PCMHの諸性質を検討した。また、カイコガ成虫のBr-SG連合体からのPCMH活性物質の抽出も試みた。

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第27巻（2001）

*広島大学審査学位論文

口頭発表日：2001年1月26日、学位取得日：2001年3月5日

その結果、前蛹個体の結紮腹部を用いる生物検定方法により、PCMH活性を定量化することができた。この生物検定方法を用い、Br-SG (-PG) 連合体を破碎し、5種類の粗抽出液画分を調製したところ、PCMHおよびPCMH活性物質は2%NaCl粗抽出液画分に抽出された。更に、諸性質を検討した結果、ゲル濾過クロマトグラフィーによりPCMH活性物質の分子量はおよそ3,000-4,000Daであり、陽イオン交換体に吸着すること、C18逆相カラム樹脂に吸着し、26-34%アセトニトリル画分に溶出されることが分かった。

第3章 ナミアゲハの蛹体色に及ぼすホルモン因子の影響

前章より抽出が可能となったナミアゲハPCMHあるいはカイコガPCMH活性物質以外に、ナミアゲハ蛹体色の褐色化に作用する物質が存在するかどうかを調べるため、他の既知の昆虫生理活性物質が関与しているかどうかの検討を行った。実験に使用した昆虫生理活性物質は、幼若ホルモン、エクダイソン、フェロモン生合成活性化ペプチド (PBAN)、カイコガ夏型ホルモン活性物質および幼若ホルモン様物質 (メソプレン) であった。

前章の生物検定方法を用い、蛹表皮褐色化の促進効果の影響を調べた。使用した昆虫生理活性物質は、ナミアゲハ前蛹の結紮腹部を褐色にする作用は認められず、カイコガPCMH活性物質のみが、蛹表皮の褐色化の促進をした。また、褐色蛹条件下のナミアゲハ前蛹腹部 (無結紮個体) にこれらの昆虫生理活性物質を投与し、蛹表皮褐色化の阻害効果の影響を調べたところ、これらの昆虫生理活性物質は、蛹表皮褐色化を阻害する効果も認められなかった。以上より、ナミアゲハにおいて蛹表皮の褐色化の引き金となる物質は、PCMHであることが示唆された。

第4章 ナミアゲハ幼虫体液からのピリベルジン結合蛋白質の精製とその特徴づけ

ナミアゲハ非休眠蛹体色には、緑色と褐色があり、また、幼虫期の体色は4齢までは黒色で5齢では緑色となる。これらの体色変化は、生育環境条件への適応であると考えられている。両生育段階における緑色の体色発現には、青色色素 (ピリベルジン) が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、この色素を体内にとどめる働きをするピリベルジン結合蛋白質が、蛹期および幼虫期の体色発現においてどのような挙動をしているのかを捉える目的のため、ピリベルジン結合蛋白質 (BP) の精製を試みた。

5齢幼虫体液から、BPを、飽和硫酸分画、ゲルろ過クロマトグラフィー、陽陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。精製されたBPの分子量は、SDS-PAGEで21kDa、ゲルろ過で24kDaと算出され、単量体であった。本精製蛋白質は、吸収スペクトルからピリベルジンIXを結合していることが示唆された。本蛋白質のN末端から19個のアミノ酸配列を決定したところ、オオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) のピリベルジン結合蛋白質のN末端アミノ酸配列と42%の相同性を示した。これらの結果から、本精製BPは、insecticyanin型蛋白質であることが示唆された。

第5章 ナミアゲハの夏型ホルモン存在の証拠

ナミアゲハは、幼虫期の光周温度条件により2つの季節型 (夏型と春型) が生ずる。夏型は、脳から分泌される体液性因子によって決定されと考えられている。

本章では、ナミアゲハ休眠覚醒蛹を用いて、ナミアゲハ夏型ホルモン (Summer-morph-produce-

ing hormone; SMPH) 活性の生物検定方法の確立を目指し、更に、ナミアゲハ非休眠蛹の Br-SG 連合体からナミアゲハ SMPH の抽出とその性質について検討した。

その結果、この生物検定方法と棄却楕円によるナミアゲハ季節型の分類方法との組み合わせにより、ナミアゲハ SMPH 活性の定量化及び季節型の分類が可能となった。20脳相当量の投与が、休眠覚醒蛹から夏型成虫を生じさせる効果をもつことがわかった。また、非休眠蛹を低温処理すると、蛹化当日と1日目において中間型の成虫が生じた。休眠覚醒蛹は、覚醒当日と1日目にのみナミアゲハ SMPH 活性を示すことから、ナミアゲハ SMPH の分泌時期あるいは感受期が蛹期初期に存在することを示唆した。また、カイコガ成虫の脳からもナミアゲハ SMPH 活性物質を検出・抽出することができた。この研究により、初めて、蛹休眠をするチョウでの夏型ホルモンの存在を明らかにした。

第6章 二化性カイコガの季節型発現と休眠卵産卵性における光周温度条件の影響

カイコガ(大造)において、胚期と幼虫期の光周温度条件と関連して、成虫の翅の紋様に違いが生ずることを見出した。この違いが、成虫の季節型(夏型と秋型)の違いであるかどうかを休眠卵産卵性と合わせて検討した。

胚および幼虫を飼育する光周温度条件を変える実験により、胚期と幼虫期の両光周条件が季節型発現の決定に関与していることが明かとなった。長日条件下では翅に明瞭な黒褐色帯を持つ秋型(休眠卵産卵)成虫が、短日条件下では明瞭な帯を持たない夏型(非休眠卵産卵)成虫が発現した。雄成虫の季節型は、翅の黒褐色鱗粉数をもとに、信頼楕円法により分類が可能となった。光周条件が季節型の発現に及ぼす効果は休眠卵産卵性の決定の場合と同様に、胚期より幼虫期のほうが、より強い効果を持った。また、胚期の短日低温条件の季節型発現に対する効果は、成虫の休眠卵産卵性に対する効果と逆の関係にあると推察された。

第7章 二化性のカイコガ(大造)の季節型発現の内分泌調節

前章の結果を踏まえ、カイコガ(大造)の季節型発現の内分泌調節機構の検討を行った。幼虫を短日および長日条件下で飼育し、蛹の脳-食道下神経節に手術を加え、脳-食道下神経節系の季節型発現への関与を調べた。更に、脳の抽出液、休眠ホルモン(DH)、PBANの投与実験等を行った。翅のパターンへの効果より、カイコガの季節型は、脳で生産される夏型ホルモン活性物質ではなく、食道下神経節で生産され、雌成虫に休眠卵の産下を促すDHが関与している可能性を示唆したが、蛹を抗-DH抗体で処理しても効果が認められなかった。

第8章 総合考察

これらの一連の研究により、これまで個体レベルでの解析しかされていなかったナミアゲハの環境適応及び季節適応機構を、初めて、物質(分子)レベルで解析することを可能にした。前者においては、蛹表皮褐色化ホルモンおよびピリベルジン結合蛋白質の生化学的な諸性質を、後者については、夏型ホルモンの存在を明らかにすることができた。

続いて、カイコガ(大造)の季節適応機構の解析結果は、カイコガにも季節型が存在し、その内分泌調節機構にはDHが関与している可能性を示唆し、DHの雄成虫における初めての生理的機能を示すことができた。従って、この研究結果は、鱗翅目昆虫の環境適応や季節適応に関わる内分泌学機構

の解明に対して重要な成果を示すことができたと考えられる。

今後は、これら生理活性物質の構造解析および作用機作について詳細に調べる必要がある。