

キボシカミキリの各種アイソザイムの系統間ならびに雌雄間差異

澤村信生*・網代健一郎**・小原隆三*・甲斐英則***・東 政明***

平成7年6月23日受付

Differences between the Strains or Sexes in Various Isozymes of the Yellow-Spotted Longicorn Beetle, *Psacotha hilaris* (PASCOE) (Coleoptera:Cerambycidae)

Nobuo SAWAMURA*, Kenichiro AJIRO**, Ryuzo KOBARA*,
Hidenori KAI*** and Masaaki AZUMA***

Various isozymes of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* were identified and characterized by using an agarose gel electrophoresis. Among 19 enzymes tested, 6 enzymes could be detected clearly; i. e. general esterase, acid phosphatase, malate dehydrogenase, glucokinase, aspartate aminotransferase, malic enzyme (B). In particular, general esterase showed not only several activity bands, but also a certain geographical variants of them. The most slow-migrating band (esterase A) was specific to the eastern-type of this insect species but was not found in the western-type. This esterase A was more clearly shown in the gut of the adult beetle from the eastern-type. The most fast-migrating band (esterase G) was only detected in the female adult of both geographical types. This esterase isozyme may be originated from developing ovaries in their mother and was also seen in laid eggs.

緒 言

キボシカミキリ (*Psacotha hilaris* PASCOE) はクワやイチジクの穿孔性害虫で、全国的に大きな被害を与えている。そして、それには発生生態や前胸背縦条斑紋の違

いから西日本型と東日本型に分けられること、また幼虫の休眠性においても両型で異なることが報告されている^{8,10,16,20,22}。このような種内の系統間差異、生態種の分化、種間の関係、種内の遺伝的変異ならびに農業に対する抵抗性の検出などを目的として電気泳動法が応用されてい

* 鳥取大学農学部農林総合科学科生物生産学講座
Department of Agrobiolgy, Faculty of Agriculture Tottori University

** 京都市役所
Kyoto City Office

*** 鳥取大学農学部農林総合科学科生物資源科学講座
Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tottori University

る^{1,4-7,11-15,17-19,23})。キボシカミキリにおいては、卵のエステラーゼイモグラムが西日本型と東日本型で異なることが報告されているのみで、より詳細な生理、生化学的研究はまだ少ない²²⁾。

著者らはキボシカミキリの両型間の関係を究明するために種々の酵素について検出を試みた。その結果、エステラーゼイモグラムにおいて両型間と雌雄間に、また酸性ホスファターゼにおいて雌雄間に差異を認めた。このエステラーゼイモグラムにおける差異の発育・変態に伴う変化、組織特異性の発現消長について報告する。

材料および方法

供試虫は西日本型として、愛媛(愛媛県大洲市 愛媛県蚕業試験場)、東日本型として福島(福島県伊達郡梁川町 福島県蚕業試験場)より採集した成虫、ならびにそれら成虫を研究室において継代飼育しているものを用いた(以後それぞれ愛媛系統、福島系統と呼ぶ)。卵は各系統別に雌雄成虫一対ずつをプラスチック製の昆虫飼育箱に入れ、試験管に桑葉と濾紙を重ね巻き付けて作った人工枝に産卵させ、人工枝を毎日取り替え採取した。成虫用の餌としてはシャーレに水を入れそれに桑葉を指して与えた。卵はシャーレに濾紙をしき適度な水分を与えて25°C全暗下に保護した。孵化した幼虫は稚蚕用人工飼料(片倉工業)を一部改変したものを用いて飼育した²¹⁾。成虫はシャーレ(9cm)内で桑葉を与えて飼育した。幼虫ならびに成虫の飼育は、すべて25°C, 14時間明:10時間暗の条件で行った。

成虫の雌雄は触角の長さと同体の割合、腹部末端の環節の幅などから判別した。なお、蛹、幼虫では雌雄の判別は外観上困難であった。

試料の調製:卵は産卵後1日目から5日目までは1~3個を、6日目以降および孵化幼虫では1個体を、小型乳鉢にとり脱イオン水を1滴加えガラス棒で磨砕した。組織別調査のための幼虫は体重0.6g以上の個体を用いた。体液は幼虫に針を刺して採取し、極少量のフェニルチオウレア粉末を加えた。次いで、幼虫を解剖して脂肪体と消化管、消化管は前腸と中腸に分けて内容物を取り出し生理的食塩水で十分洗浄した。これら組織を小型乳鉢に適量とり脱イオン水を1~2滴加えてガラス棒にて磨砕した。これら磨砕液と体液はヘマトクリット毛細管に取り片方を封じた後10,000gで10分間遠心しその上清を試料とした。2齢以降の幼虫、蛹および成虫は1個体当たり脱イオン水を体重比1:1.5の割合で加え、氷冷しながらホモジナイザーで3,400回転で磨砕し、4°C, 15,

000gで10分間遠心し、その上清を試料とした。試料は電気泳動するまで-20°Cで凍結保存した。

アガロースゲルフィルム:アガロース2.0g,ポリビニールピロリドン(分子量90万)4.0gにリン酸緩衝液(pH6.8,イオン強度0.025)200mlを加え十分溶解した後、試験管に一定量分注し使用するまで室温に保存した。ゲルフィルムの作成はガラス板上に水を2,3滴落とし、アガフィックス(10mm×13mm)を載せて平に伸ばして密着させ、次に再溶解したゲルをアガフィックスの下側の方に流し、テンプレートで静かに押さえて0.5mm厚のゲルプレートとする。固まったらテンプレートをゆっくりはずして出来上がりとした。

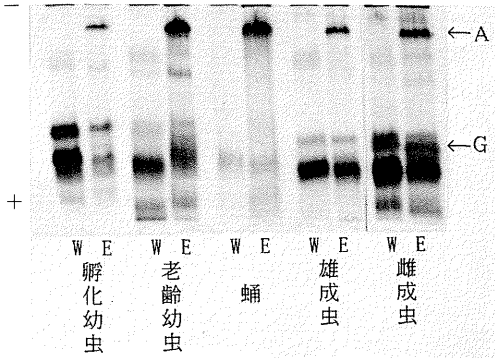
電気泳動:一定の長さに切ったレース糸に試料を吸わせた後、ゲルの上に乗せ軽く押さえて埋め込ませ電気泳動を行った。電気泳動はペロナル緩衝液(pH8.6,イオン強度0.05)を用いて、5°Cに保った冷蔵庫内にて、120V定電圧で50分間行った。

調査した酵素種:次の19種の酵素について調査した。エステラーゼ(以下EST),酸性ホスファターゼ(ACP),アルコール脱水素酵素(ADH),ジアホラーゼ(DIA),グルタミン酸脱水素酵素(GDH),グリセリン酸脱水素酵素(G2DH),グルコキナーゼ(GK),アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT),グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD),ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP),リンゴ酸脱水素酵素(MDH),リンゴ酸酵素(B)(ME(B)),メナジオンレダクターゼ(MNR),6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGD),ホスホグルコースイソメラーゼ(PGI),ホスホグルコムターゼ(PGM),シキミ酸脱水素酵素(ShDH),ソルビトール脱水素酵素(SoDH),テトラゾリウム酸化酵素(TZO)。

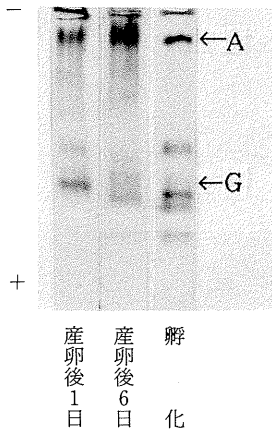
酵素活性の検出:ESTは α -および β -ナフチールアセテートを少量のアセトンで解かし、リン酸緩衝液(pH6.8)を加えて調製した2%混液を基質として、ゲル板上に均一にかけ、一定時間インキュベートした後、1%ファーストブルーB水溶液をかけ発色させ、バンドの検出を確認した後、水に浸しそれを取り替え洗浄した。ゲル板は乾燥して保存した。その他の酵素活性の検出は津村ら²⁴⁾のアイソザイム実験法に従って行った。

結 果

キボシカミキリの西日本型として野外より採集した愛媛系統、東日本型として福島系統の成虫を用いて、19種の酵素についてアガロースゲル電気泳動法によって調べ



第1図 発育に伴うエステラーゼザイモグラムの変動
W: 西日本型 E: 東日本型 各全個体



第2図 卵の発育に伴うエステラーゼザイモグラムの変動 (東日本型)

た。その結果、EST, ACP, DIA, GK, GOT, G6PD, MDH, ME(B), MNR, PGI, PGM, SoDH, LAPの13種の酵素で活性が認められた。なかでも、EST, ACP, GK, GOT, MDH, Me(B)の6種の酵素で鮮明なザイモグラムが得られた (結果省略)。

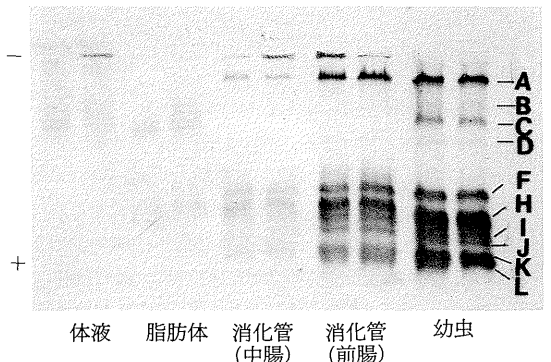
そして、ESTは他の酵素に比してバンド数も多く検出され、その数や活性などかなりの個体間の変異が見られた。なかでも、もっとも移動度の遅いバンドAは福島系統で52.5%の個体に発現し、愛媛系統では検出されなかった。また、バンドGの発現率はいずれの系統においても雌個体で96.5%と極めて高かった。このようにESTでは特定のバンドの発現で系統間ならびに雌雄間に差異が見られた (第1図)。

ESTザイモグラムにおいて、それらの差異がキボシシ

カミキリの発育と変態に伴ってどのように変動するかについて東日本系統の継代飼育個体を用いて調べた。まず、卵を25°Cにインキュベートし、胚子発育に伴うザイモグラムの変動について調べた(第2図)。検出されたバンドはすべて陽極側へ移動した。バンドは幼虫期の移動度を基準にして原点側よりA, B, ...とした。産卵後1日目頃の卵では原点近くにテーリングが見られることが多く、ほかに弱いバンドが見られ、特徴的なのは先に述べた雌特異的であったバンドGが見られることで、5日目頃まで検出され以後活性が弱くなり孵化前には見られなくなった。一方、6日目頃よりバンドAが発現し始め、その他移動度の大きいところいくつかのバンドが出現した。このバンドAの出現は、愛媛系統(西日本型)では認められなかった(結果省略)。

幼虫期、蛹期、成虫期の個体全体のザイモグラムについて調べたところ(第1図)、特徴的なことは、1) 孵化直前より発現の見られたバンドAが幼虫期~成虫期の全期間西日本型で検出されず、東日本型で認められたことである。2) 両系統で共通していたが卵期の初めに見られたバンドGが雌の成虫期、羽化後12日目頃より発現してきたことである。

その他のESTバンドについて、活性や発現において個体変異は見られたが、地理的特性との関係は見られなかった。幼虫期各齢について電気泳動した結果、孵化から2齢まではバンドの数も少なく活性も弱い傾向であったが、3齢以降バンドの発現やその活性も強くなった。以後、老齢期まで大きな変化は見られなかった。前蛹期になると活性が減少し始め、蛹化後はバンドAを除いて活性がほとんど見られなくなった。成虫期は羽化後2日目頃より多くのバンドが発現し始め、後食とともに活性が強くなりそのザイモグラムは幼虫期とほぼ同じであった。

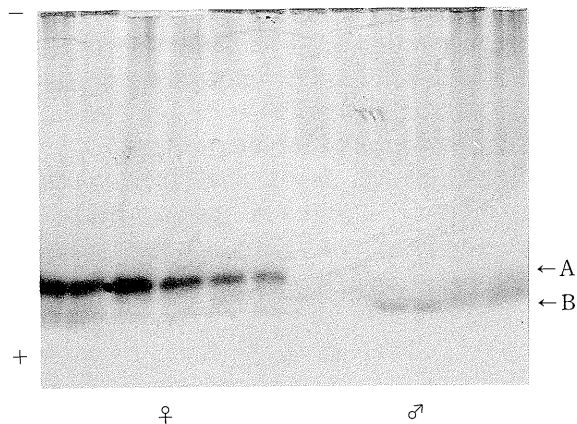


第3図 幼虫組織のエステラーゼザイモグラム (東日本型) 幼虫は全個体

ESTバンドの各組織間の関連について、東日本型幼虫を用いて調べた(第3図)。幼虫全体では、バンドはすべて陽極側へ移動し11本発現した。そのバンドには原点側よりA, B, …Lまで記号を付けた。しかし、産卵直後の卵に存在するバンドG(第2図)は幼虫では見られなかった。また、バンドEは活性が弱く発現のみられる個体は少なかった。体液では陰極側に一本のバンドが発現した。これは幼虫全個体のザイモグラムでは認められなかった。原因としては個体全体から見れば相対的に活性が非常に弱いために発現しなかったのではないかと推定される。バンドAは消化管の前腸でもっとも活性が強く、中腸で弱くなり他の組織では見られなかった。バンドB, C, D, は体液、脂肪体が主で、消化管では弱く発現する。体液ではバンドは一本の場合が多く、脂肪体、消化管では1~3本のバンドが発現し、その活性にも変異が見られた。また、体液ではバンドの活性は東日本型で弱く、西日本型で強い傾向であった。バンドF~Lの活性は消化管前腸で最も強くこの活性が個体全体を反映しており、次いで消化管中腸で、脂肪体では弱く見られ、体液では見られなかった。

野外より採集した成虫で鮮明に発現した主要な酵素の泳動結果は以下のとおりであった。

ACPザイモグラム(第4図)

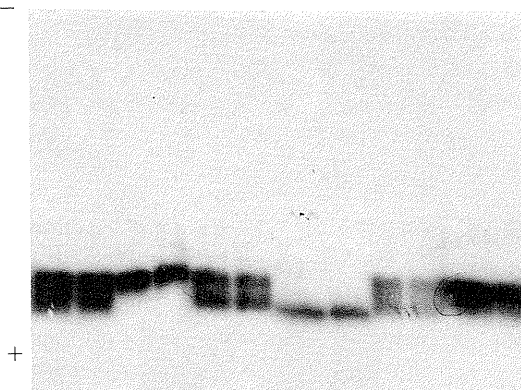


第4図 酸性ホスファターゼザイモグラム
成虫全個体

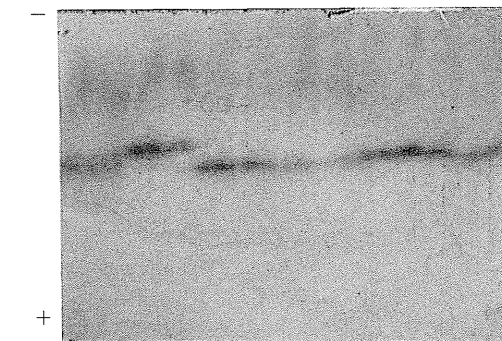
すべて陽極側へ移動する2本のバンドが認められ、それらを原点に近い方からA, Bとした。バンドBはその活性に個体変異が見られたがすべての個体に発現し、バンドAは調査した雌134個体中131個体に発現して、その発現率は97.8%であった。このように、バンドAの発現

が雌個体のすべてに見られなかったことは野外採集であったためと推察される。以上の結果から、雄は一本のバンドB, 雌は2本のバンドA, Bが発現し、雌雄差が認められた。

GKならびにGOTザイモグラム(第5, 第6図)



第5図 グルコキナーゼザイモグラム
成虫全個体



第6図 アスパラギン酸アミノ転移酵素ザイモグラム
成虫全個体

すべて陽極側へ移動する2本のバンドが見られ、移動度の早いものと遅いもの、そして両方発現するものの3種類見られた。

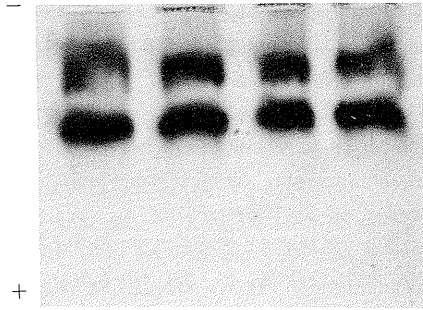
MDHザイモグラム(第7図)

すべて陽極側へ移動する2本のバンドが見られ、個体変異はほとんど見られなかった。

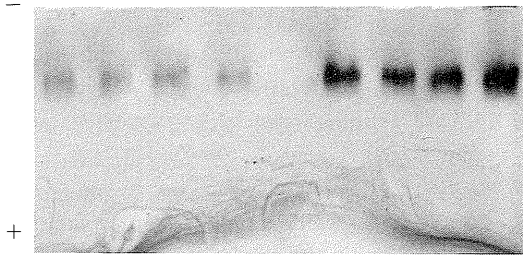
ME(B)ザイモグラム(第8図)

陽極側へ移動する1本のバンドが見られ、個体変異はほとんど見られなかった。

以上、ACPに雌雄差が認められたほか、他の酵素では



第7図 リンゴ酸脱水素酵素ザイモグラム
成虫全個体



第8図 リンゴ酸酵素(B)ザイモグラム
成虫全個体

系統間ならびに雌雄間に差異は認められなかった。

考 察

キボシカミキリは極めて地域差に富む種であり、台湾から九州にかけての島々で分化が進んでおり、国内では10亜種が知られている。本研究に用いた原名亜種 (*ssp. hilaris*) には西日本型と東日本型のあることが知られている^{8,10,16,22}。そこで、本研究では種あるいは系統間の識別法に従来の形態的観察に加えて電気泳動法を用いて地理的変異の詳細な検討を行った。

カイガラムシ類、アザミウマ類、およびアブラムシ類など多くの昆虫やダニ類で種間差ならびに種内変異と各種アイソザイムとの関係について研究が行われ、その識別に 응용が可能であることが報告されている^{1,4-6,11-14,18,19,23}。このように種の識別に各種のアイソザイムが利用されている例が多く、本研究の結果からキボシカミキリでESTアイソザイムが兩型間判別の指標として有用であると考えられた。

本研究では東日本型と西日本型の差異の指標となりうる酵素を見い出すために19種の酵素についてアガロースゲル電気泳動法を用いて調べた。その結果、ESTにおいて最も変異が認められ、兩型間で差異の指標となるEST

バンドAの発現することが明らかとなった。このバンドAは東日本型の福島系統の個体で多く発現したが西日本型の愛媛系統の個体では発現しなかった。さらに、このバンドAの発現について発育と変態に伴う変動について調べた結果、孵化直前頃より現われ、幼虫期、蛹期、成虫期のすべての時期に強く現われた。そして、それは幼虫組織の消化管に主として由来することが明らかとなった。

新谷ら²²はキボシカミキリの初期発生卵のESTについてポリアクリルアミドゲル電気泳動法により調べた。その結果、EST-A、EST-Bの二つの主要なバンド群が観察され、バンドAはすべての卵から検出されたが、バンドBに関して地理的変異が見られた。関東周辺個体群の卵のほとんどがバンドBを持つのにに対し、中部地方以西の個体群の卵の多くはバンドBを欠く傾向にあったと報告している。

本実験においては、アガロースゲル電気泳動法を用いてESTについて調べた。新谷らとは実験方法ならびに調査時期も幼虫期～成虫期と違い、したがって泳動像も異なった。今回本実験のESTバンドAが新谷らのどのバンドに対応するか検証していないが、結果は東日本型にESTバンドAが発現するのに対して西日本型で発現しないという地理的変異のあることが認められた。

野外採集の成虫において、雄にはなく雌に発現するESTバンドGとACPバンドAで雌雄差のあることが分かった。そこで、継代飼育中の卵から成虫を用いてESTについて調べたところ、バンドGは成虫の羽化後12日頃より発現し、一方卵では産下置床後5日ごろまで見られた(第2図)。キボシカミキリは後食開始後6～7日で成熟卵が形成されるという。室内飼育の場合、後食開始は羽化後3～4日から羽化後10日頃に成熟卵が認められた。このことは、ESTバンドGが卵に由来するアイソザイムであることを示唆している。ただ、野外採集成虫個体でESTバンドGが雌個体で100%発現しなかった。このことはステージの違いか、そのほか何らかの要因があったものと考えられるがその原因は不明である。

キボシカミキリの発育と変態に伴うESTの変動について、バンドA、Gを除くその他のバンドは孵化前の卵ではほぼ幼虫期のバンドを発現し、幼虫期となれば齢が進むにつれてバンドの数の増加や活性が強くなり、3齢期以後は大きく変わらず、蛹化前より弱くなりはじめ、蛹期では活性が弱く、成虫となり再び強くなり、後食とともにバンド数の増加や活性が強くなる傾向が見られた。

発育に伴うザイモグラムの変動については、カイコの

アミラーゼアイソザイム,そしてカイコやカイガラムシ類のESTアイソザイムにおいて,発育に伴ってバンド数の増加ならびに活性の強くなることなど変動することが報告されている^{2,3,13)}。このことは発育過程で酵素の合成が行われているか。あるいは,発育と変態に伴う組織の崩壊や形成などに関連があるものと考えられる。

幼虫各組織におけるESTザイモグラムについて比較したところ,各バンドに組織特異性が認められた。特に,地理的変異の見られるバンドAが消化管に由来し孵化幼虫から成虫期まで強い活性を示すということが明らかとなった。江口ら³⁾は家蚕各組織のEST活性について調べ,活性型は組織,器官により特異的であり,また成長に伴って徐々に変化し,特に5齢後期から化蛹の時期に大きく変化が見られたという。本研究では幼虫後期の一時期の調査であるが,各組織の関連は発育に伴う変化から見ても推察されるところである。この様に組織特異性が認められたことは各組織でそれぞれ酵素の役割が異なっているためと考えられる。

総 括

キボシカミキリは成虫の発生生態や前胸背縦条斑紋の違いから東日本型と西日本型に分けられている。東日本型として福島,西日本型として愛媛から採集した成虫ならびに継代飼育虫を用いて両型のアイソザイムについてアガロースゲル電気泳動法によって研究した。

野外採集の成虫を用いて,19種の酵素活性について調べた。その結果,13種の酵素で活性を認め,なかでも6つの酵素で鮮明なバンドが得られた。そのうち,エステラーゼにおいてバンド数は最も多く検出され,その変異も見られた。そして,エステラーゼバンドAが東日本型に多く発現するのに対して西日本型には発現しないという両型間に差異が見られた。このバンドAは孵化直前から成虫期までどのステージでも検出され,それは組織の消化管に由来していることが明らかとなった。

一方,エステラーゼバンドGが羽化後12日以降の成虫雌において発現し,雄には発現しないという雌雄差が認められた。また,このバンドは卵の初期においても発現した。さらに,成虫の酸性フォスファターゼにおいて雄ではバンドBのみ発現し,雌ではバンドAとBの2本発現するという雌雄差が認められた。

引 用 文 献

1) ABID, H. S., KINDLER, S. D., JENSEN, S. G., THOMAS-COMPTON, M. A. and SPOMER, S. M. : Isozyme char-

acterization of sorghum aphid species and greenbug biotypes (Homoptera: Aphididae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82 303-306 (1989)

2) BANNO, Y., KAWAGUCHI, Y. and DOIRA, H. : Sexual dimorphism and developmental changes in hemolymph amylase of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53 335-339 (1984)

3) 江口正治・杉本達芳 : 家蚕の発育に伴うエステラーゼ型の変化。日蚕雑, 33 321-325 (1964)

4) GOKA, K. and TAKAFUJI, A. : Enzyme variations among Japanese populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Appl. Entomol. Zool.*, 27 141-150 (1992)

5) GOTOH, T. and ISHIKAWA, Y. : Separation of *Panonychus ulmi*, *P. thelytokus* and *P. bambusicola* (Acari: Tetranychidae) by esterase zymograms. *Appl. Entomol. Zool.*, 27 598-601 (1992)

6) GOTOH, T., ISHIKAWA, Y., TAKAYAMA, K. and SUZUKI, M. : Differences in esterase zymograms between non-diapausing and diapausing individuals of the hawthorn spider mite, *Tetranychus viennensis* ZACHER (Acari: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 26 153-155 (1991)

7) HSIAO, T. H. : Estimation of genetic variability amongst coleoptera. In *Electrophoretic Studies on Agricultural Pests*. Edited LOXDALE, H. D. and HOLLANDER, J. D. Clarendon press, Oxford, (1989) pp.143-180

8) 伊庭正樹 : キボシカミキリの生態学的研究 4. 成虫の前胸背斑紋にみられる地理的差異。日蚕雑, 49 429-433 (1980)

9) 伊庭正樹 : キボシカミキリの後食活動と性成熟および産卵との関係。日蚕雑, 51 223-227 (1982)

10) 伊庭正樹・井上昭司・菊地実 : キボシカミキリの生態学的研究。1. 成虫の発生長に見られる地方的差異。日蚕雑, 45 156-160 (1976)

11) 伊沢宏毅・刑部正博・守屋成一 : アイソザイム分析によるクリタマバチの輸入天敵チュウゴクオナゴバチと土着天敵クリマモリオナゴバチの判別法。応動昆, 36 58-60 (1992)

12) 河合孝・小原隆三・榎原保 : クワコナカイガラムシとミカンヒメコナカイガラムシの生理および形態的差異について。鳥大農研報, 24 6-12 (1972)

13) KAWAI, T., KOBARA, R., YAMANE, I. and MATUNAGA,

- M.: Studies on esterase of scale insects and mealybugs. J. Fac. Agric., Tottori Univ., 7 13-21 (1972)
- 14) 小原隆三・河合孝・前田進・久保信夫: クワシロカイガラムシとウメシロカイガラムシの差異について. 応動昆虫中国支会報, 21 24-28 (1979)
- 15) KUWAHARA, M., MIYATA, T., SAITO, T. and ETO M.: Relationship between high esterase activity and *in vitro* degradation of ¹⁴C-malathion by organophosphate-resistant and susceptible strains of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acarina: Tetranychidae), and their inhibition with specific synergists. Appl. Entomol. Zool., 16 297-305 (1981)
- 16) 草間慶一・高桑正敏: 日本産カミキリ大図鑑, 日本鞘翅目学会, 講談社, 東京 (1984) pp. 445-447
- 17) McDONALD, I. C., KRYSAN, J. L. and JOHNSON O. A.: Studies of electrophoretic variation in *Diabrotica* as influenced by the age, sex, or diet of adult beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 83 1192-1202 (1990)
- 18) 村井保: アザミウマ類のアイソザイムによる識別法. 植物防疫, 44 229-232 (1990)
- 19) 刑部正博: ハダニ類の変異—タンパク分析によるアプローチ. 植物防疫, 43 362-366 (1989)
- 20) SAKAKIBARA, M. and KAWAKAMI, K.: Larval diapause inheritance mode in two ecotypes of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (PASCOE) (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool., 27 47-56 (1992)
- 21) 島根孝典・河上清: 人工飼料によるキボシカミキリの大量累代飼育法. 蚕糸昆虫研報, 2 65-112 (1991)
- 22) SHINTANI, Y., ISHIKAWA, Y. and HONDA, H.: Geographic variation in esterase isozymes of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (PASCOE) (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool., 27 57-64 (1992)
- 23) 高田肇・田村光章: モモアカアブラムシの“タバコ型”は存在するか. 昆虫, 55 573-586 (1987)
- 24) 津村義彦・戸丸信宏・陶山佳久・モハマド=ナイム・大場喜八郎: アイソザイム実験法, 筑大演報, 6 63-95 (1990)