

# エリサン孵化期における羽化ホルモン様生理活性物質の変動

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	齊藤, 準 普後, 一 中島, 誠 向山, 文雄
巻/号	56巻4号
掲載ページ	p. 273-278
発行年月	1987年8月

## エリサン 孵化期における羽化ホルモン様 生理活性物質の変動

齊藤 準・普後 一・中島 誠・向山文雄

府中市幸町・東京農工大学農学部 (〒 183)

(1986年7月7日 受領)

HITOSHI SAITO, HAJIME FUGO, MAKOTO NAKAJIMA and FUMIO MUKAIYAMA:  
Fluctuations of the eclosion hormone activity during the hatching of the silkmoth,  
*Samia cynthia ricini*

Fluctuations of the eclosion hormone (EH) activity during hatching and the relationship between the EH activity and hatching behaviour of the silkmoth, *Samia cynthia ricini*, were investigated. The precocious adult eclosion of both pharate-adults of *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* was elicited by the administration of EH extracted from *Samia* embryos. It was clearly demonstrated that the extracts of the *Samia* embryos exhibited the EH activity. Hatching occurred at 9 days after oviposition and the time of hatching lasted about 2 to 3 hr after lights-on, when the embryos were maintained under a 16L-8D photoperiod regime at 25°C. EH titer of the newly hatched larvae was higher than that of the pharate-first instar larvae (1 day before hatching). To determine the localization of the EH activity in the embryos, EH was extracted from either a head segment or thoraco-abdominal segments during hatching and observed: the EH activity in the thoraco-abdominal segment abruptly increased by about 2.4-fold at 15 min after lights-on and decreased gradually, though the fluctuations of the EH titer in the head segment were limited. It is possible to consider that EH is involved in the induction of the hatching behaviour in the silkmoth, *Samia cynthia ricini*. (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183)

エリサンの孵化期における羽化ホルモン (Eclosion hormone: EH) 様生理活性物質の変動と、この生理活性物質の孵化行動発現への関与について検討した。エリサン 胚子からの抽出物には、カイコガおよびエリサンの潜成虫の羽化を誘導する生理活性物質が存在し、EH 力価は孵化1日前より孵化当日が高かった。

エリサン 胚子を頭部と胸腹部に分離して両部位の EH 活性を調べたところ、EH 活性はそれぞれの部位に存在しており、孵化直前の胚子頭部および胸腹部では EH 活性の変動がみられた。とくに胸腹部の EH 活性は、点灯後15分までに点灯時の値の約2.4倍に増加し、その後減少した。これらの結果から、胚子中の EH 様生理活性物質は、孵化に対して関与しているものと推察した。

昆虫の孵化に関する研究は、行動や生態面を中心として行われたものが主で、とくに周囲の環境の変化(光・温度など)に対する孵化のリズム性について調べている例が多い(Saunders, 1976)。田中(1966a-e)は、カイコガの孵化周期に関する生態学的研究を詳細に行い、孵化周期には概日性リズムがあることを示し、それは明→暗の刺激によって誘

発されることを明らかにした。さらに、カイコガ胚子が明暗の刺激に反応し始めるのは、反転完了期から剛毛発生期の間ごろで、この時期が胚子発育上、脳や食道下神経節が急速に分化発達する時期と一致することから、孵化周期発現にホルモン系が関与していることを推察した(田中, 1966b)。一方、Minis and Pittendrigh, (1968)は、ワタアカミムシの孵

化リズムの形成に、中枢神経系に存在すると考えられる振動体 (circadian oscillator) の分化が密接に関与していることを推察した。しかし、孵化行動発現やその周期性のメカニズムに関する生理・生化学的研究は、ほとんどなされていない。

Truman *et al.* (1981 a, b) は、昆虫でみられるすべての脱皮現象に羽化ホルモン (Eclosion hormone: EH) が関与していることを明らかにし、その中で彼らは、胚子発育期にみられる頭部での EH 活性の変動は、胚脱皮に関連して起こるものと考えている (Truman *et al.*, 1981 b)。また、タバコスズメガの孵化時の幼虫頭部および腹部神経球に、EH 活性が存在することについても明らかにしているが、孵化に対して EH が関与しているかについては言及していない (Truman *et al.*, 1981 a)。

一方、Fugo *et al.* (1985) は、カイコガの胚子発育中期に出現する EH 様生理活性物質が、孵化行動発現に関与している可能性を示唆した。すなわち、EH 様生理活性物質が孵化前後において顕著な変動をみせることから、孵化に対して EH 様生理活性物質が関与しているものと考えている。また、この EH 様生理活性物質の化学的性状が、カイコガの潜成虫および成虫頭部から抽出・精製された EH と非常に似ていることも報告している (Fugo *et al.*, 1985)。

そこで、著者らは孵化行動の発現と EH 様生理活性物質との関係を明らかにするため、エリサン卵を用いて EH 様生理活性物質の存在部位とそれの孵化期における変動について調べ、若干の知見が得られたので報告する。

## 材料と方法

実験材料としてエリサン卵を用いた。その理由は、卵がカイコガ卵に比べて大型であるため、実験形態学的手法を使うことが容易であること、しかも非休眠卵で多化性であることから通年飼育が可能であり、なおかつ孵化が斉一性を示すことなどエリサンが数々の利点を有しているからである。

エリサン幼虫は、孵化後  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  のキャリアー蚕室にて、全齢シンジュ葉あるいはヒマ葉で飼育した。化蛹後は  $25^\circ\text{C}$ 、16時間明 - 8時間暗 (16L-8D) の光周条件下で羽化まで保護した。採卵は 8~12 時間交尾させた雌蛾を必要頭数となるまで  $10^\circ\text{C}$  の冷

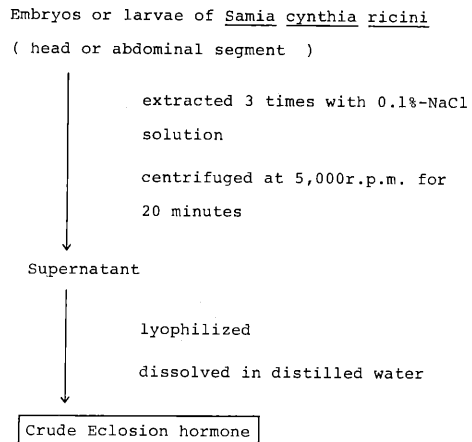


Fig. 1. Procedure for the extraction of eclosion hormone (EH) from embryos or newly hatched larvae of the silkworm, *Samia cynthia ricini*.

蔵庫に入れ、必要頭数が集まったところで  $25^\circ\text{C}$ 、16L-8D の光周条件の部屋に再び移して産卵させた。産下卵は、引き続き  $25^\circ\text{C}$ 、16L-8D の光周条件下で保護し、胚子発育を行わせた。

### 1. 羽化ホルモン様生理活性物質の調製

孵化 1 日前 (産下 8 日目) および孵化当日 (産下 9 日目) のエリサン卵それぞれ 20 g づつ (約 10,000 頭) を抽出材料とした。EH 様生理活性物質の抽出は、Nagasawa *et al.* (1983) の EH 抽出法に従って第 8 段階まで行った。一方、胚子頭部および胸腹部からの EH 様生理活性物質の抽出は、Fig. 1 に示した方法で行った。すなわち、胚子 (500~1,000 頭) 頭部および胸腹部のそれぞれを 2~3 ml の 0.1%-NaCl と共にガラスホモゲナイザーで磨碎し、30 分間放置後、遠心分離 (5,000 r.p.m., 20min) して上清を得た。この行程を 3 回繰り返して、得られた抽出液を  $-20^\circ\text{C}$  で凍結保存した。凍結乾燥後、蒸留水を最終塩濃度が 0.9% 以下になるように加えて溶解し、これを粗抽出 EH 様生理活性物質とした。

### 2. 胚子頭胸間分割法

孵化 1 日前、孵化当日、孵化 1 日後の各時期の点灯直後の胚子を材料とした。なお、孵化 1 日後の胚子は、孵化後摂食させずに 1 日経過した蟻蚕を用いた。各時期の胚子を氷冷スライドガラス上に移し、実体顕微鏡下でマイクロナイフを用いて頭部および胸腹部に分離し、抽出まで  $-20^\circ\text{C}$  に凍結保存した。

Table 1. Presence of eclosion hormone (EH) activity in embryos or newly hatched larvae of the silkmoth, *Samia cynthia ricini*

Developmental stage	Eclosion hormone activity	
	<i>Bombyx</i> EH unit/animal	<i>Samia</i> EH unit/animal
1 day before hatching	0.21 ± 0.05	0.09 ± 0.02
Newly hatched larvae	0.34 ± 0.06	0.13 ± 0.03

The values were expressed as the mean ( $\pm$ s.e.) of at least five assays.

### 3. 羽化ホルモン活性の生物検定法

カイコガ潜成虫（大造）を用いたEH活性の生物検定法は、普後・岩田（1983）の方法に従って行った。

一方、エリサン潜成虫を用いる生物検定は、つぎの方法で行った。化蛹したエリサン蛹を25°C、16L-8Dの光周条件下で成虫発育を行わせ、羽化当日（化蛹15～16日目）の点灯直後に検体を注射した。注射後3時間以内に早期羽化個体が誘導された場合、検体中にはEH活性が存在すると判断した。また、EH活性の力価は、検定潜成虫の50%以上を羽化させるのに必要な最低検体量を1EH単位とした。なお、注射量は1個体当たり20 $\mu$ lとし、最低10個体の潜成虫を各々の検定に用いた。

### 結果と考察

エリサン孵化期の胚子中にEH様生理活性物質が存在するか否かについて、カイコガおよびエリサンの生物検定法によって調べた。その結果、エリサン胚子中にはEH活性をもつ物質が存在することが判明した（Table 1）。すなわち、カイコガが潜成虫による生物検定法で求めたエリサン胚子中のEH力価は、孵化1日前で0.21 *Bombyx* EH unit/animal、孵化当日で0.34 *Bombyx* EH unit/animalであった。一方、エリサン潜成虫を用いた生物検定法で求めたEH力価は、孵化1日前で0.09 *Samia* EH unit/animal、孵化当日で0.13 *Samia* EH unit/animalであった。2つの生物検定法によって求めたエリサン胚子中のEH力価は、孵化当日の値が孵化1日前の値の約1.4～1.6倍であった。従って、エリサン胚子中に存在するEH様生理活性物質は、孵化1日前から孵化当日まで増加していることが明らかとなった。すでに数種鱗翅目昆虫の成虫頭部から得られたEHの生理活性作用には、種特異性がないことが報

告されている（Fugo *et al.*, 1983；普後，1986）。今回、エリサン胚子由来のEH様生理活性物質が、異種であるカイコガが潜成虫の羽化を誘導したことは、胚子由来のEH様生理活性物質が、種特異性をもたないことを示唆する。

カイコガ、エリサンそれぞれの潜成虫を用いた生物検定法について比較してみると、エリサン潜成虫を生物検定に用いた場合は、カイコガよりも多くの検体を必要とする。従って、以後の実験では、カイコガ潜成虫を用いる生物検定法によってエリサン胚子中のEH力価を測定した。

Truman *et al.* (1981 a, b) は、セクロピアサンやタバコスズメガの胚子頭部および胸腹部のそれぞれにEH活性が存在することを報告した。一方、Fugo *et al.* (1985) の報告では、カイコガ胚子中のどの部位にEH活性が存在するかについては明らかにされていない。カイコガ胚子を頭部および胸腹部に分け、各部位のEH活性を測定するには多くの胚子を必要とする。そこで、カイコガよりも大型のエリサン胚子中にもTable 1に示したようにEH様生理活性物質の存在が明らかとなったので、エリサン胚子を頭部および胸腹部に分割し、EH活性の存在部位と孵化前後での変動の有無について検討した。

孵化1日前から孵化1日後までのエリサン胚子頭部、胸腹部それぞれの部位におけるEH活性の変動の結果をFig. 2に示した。EH活性は頭部および胸腹部それぞれから検出され、頭部よりも胸腹部の方が常に高い値を示し、孵化1日前から孵化1日後まで両者ともに増加した。孵化前後でEH力価が増加することは、Table 1に示した結果と同様であった。さらに、頭部および胸腹部それぞれの生体重当たりのEH活性についてその変動を検討した（Fig. 3）。両部位の生体重当たりのEH活性は、ほぼ同じか

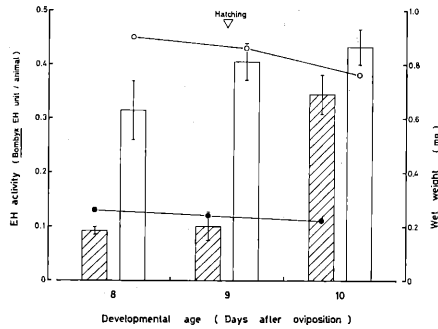


Fig. 2. Eclosion hormone (EH) activity in the head thoraco-abdominal segments during hatching of *Samia cynthia ricini*. Cross-hatched histograms show EH activity from extracts of the head segment. Open histograms show EH activity from extracts of the thoraco-abdominal segment. Each bar represents the mean values ( $\pm$ s.e.) of at least five assays. Daily changes of weight of the head and thorax-abdomen are represented as follows: ●, head; ○, thorax-abdomen. The larvae were not fed after hatching.

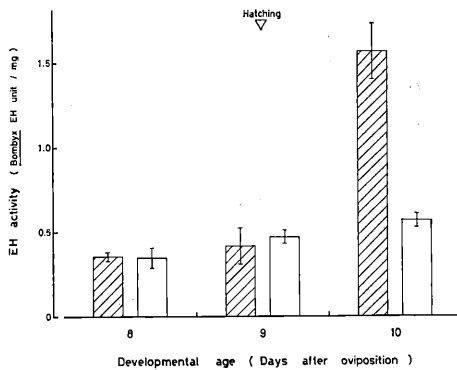


Fig. 3. Eclosion hormone (EH) activity (unit per mg) during hatching of *Samia cynthia ricini*. Cross-hatched histograms show EH activity from extracts of the head segment. Open histograms show EH activity from extracts of the thoraco-abdominal segment. Each bar represents the mean values ( $\pm$ s.e.) of at least five assays. The larvae were not fed after hatching.

頭部の方が胸腹部より高い値を示した。また、両部位とも孵化1日前から孵化1日後までEH力価が増

加する傾向は、先の2つの実験の結果と同じであった。

Truman *et al.* (1981 a, b) は、タバコスズメガの幼虫頭部、胸腹部それぞれの部位におけるEH活性が、頭部では脳一側心体由来、胸腹部では腹部神経球由来のEHによるものであると報告した。エリサン胚子頭部および胸腹部それぞれにみられたEH活性 (Fig. 2, 3) も、脳あるいは腹部神経球に由来する可能性が高いものと考えられる。また、両部位における生体重当りのEH力価の増加が、体内の特定の組織あるいは器官による生合成の結果を反映するのであるなら、頭部と胸腹部のいずれにおいてEH様生理活性物質の合成がさかんに行われているかを検討する必要がある。

タバコスズメガにおいては、孵化前後でのEH力価は頭部、胸腹部の何れも変動していないという (Truman *et al.*, 1981 a)。しかし、これまでの結果から、エリサンの孵化前後におけるEH活性の変動は、頭部、胸腹部ともにEH力価の増加がみられた。そこで、孵化直前の胚子頭部および胸腹部のそれぞれについてEH活性の経時的変動について検討した。

エリサン幼虫の孵化は25°C、16L—8Dの光周条件下では、産下後9日目の点灯後2~3時間以内に集中して起こった (Fig. 4)。そこで、点灯してから最初の孵化個体が出現する90分後まで、15分おきに胚子の一定量を採り、Fig. 1の方法に従って、頭部、胸腹部それぞれからEH様生理活性物質の抽出を行い、EH活性の経時的変動を調べた。両部位のEH活性は点灯時のEH活性を1とした相対値で示した (Fig. 4)。頭部におけるEH活性の経時的変動を見ると、点灯45分後までは約0.8~0.9とわずかに減少したが、60分後には約1.2まで増加した。しかし、その後は直線的に減少し、点灯90分後には約0.5となった。一方、胸腹部のEH活性は点灯15分後には約2.4まで急激に増加し、その後点灯60分後には点灯時の約0.5まで減少した。

これらの結果から、孵化直前の胚子頭部および胸腹部に存在するEH様生理活性物質は、それぞれの部位において経時的に変動することが明らかとなった。とくに点灯時のEH活性を1とした場合、胸腹部では15分後に2.4まで増加し、その後減少した。この変化はカイコガ成虫羽化時にみられた体液中の

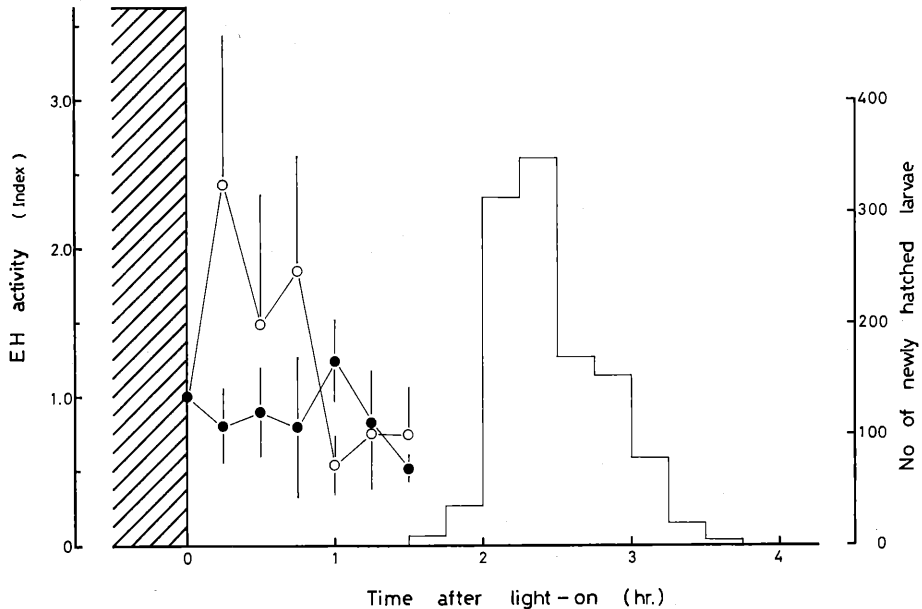


Fig. 4. Fluctuations of eclosion hormone (EH) activity in the head and thoraco-abdominal segments of *Samia cynthia ricini* embryos. The embryos had been maintained under a 16L-8D photoperiod regime. Samples were collected intermittently after lights-on. Levels of EH activity are expressed as relative values to that measured at "0" time. Symbols represent EH activity from extracts of : ●, head; ○, thorax-abdomen. Each point represents the mean values ( $\pm$ s.e.) of at 5-7 assays. Open histograms show the distribution of the newly hatched larvae. Cross-hatched area indicates the scotophase.

EH 活性の変動 (Fugo *et al.*, 1984) と似た傾向にある。カイコガ成虫羽化の場合、体液中に EH 活性が検出されるのは実際の羽化行動の約30~40分前であるという (Fugo *et al.*, 1984)。今回の実験は胸腹部全体を用いているため、体液中の EH 活性の経時的変動をみることはできなかった。しかし、胸腹部での EH 活性の変動は、体液中の変動をも含んでいるものと考えられる。EH は脱皮行動の引き金として幼虫脱皮、化蛹脱皮、成虫脱皮などすべての脱皮行動に関与していると考えられており、それぞれの脱皮行動が起こる約1~3時間前に EH 活性が体液中で検出されている (Reynolds and Truman, 1983, Truman, 1985)。

Fugo *et al.* (1985) は、カイコガの孵化直前の胚子中における EH 力価を1とすると、孵化3~4時間後には約半分まで EH 力価が低下することから、EH が孵化行動発現に関与しているのではないかと推察している。今回の実験において、実際の孵

化がみられる約1~1.5時間前に顕著な EH 活性の変動が胸腹部でみられたことは、EH が孵化行動に関与している可能性が高いことを暗示させる。また、エリサンの卵殻食い破り行動の開始は、孵化幼虫がみられる約45~60分前である (齊藤, 未発表) ことも、この考え方を支持するものと思われる。一方、胸腹部において短時間での EH 活性の急激な増加がみられたが、生体重当りの EH 力価は胸腹部と頭部との間に差がないかむしろ頭部の方が高い (Fig. 3) ので、この結果から胸腹部での EH の生合成が頭部よりも高いとは考えにくい。

以上のように今回の実験結果から、著者らが先に提唱した EH 様生理活性物質が、孵化行動に関与しているのではないかという仮説 (Fugo *et al.*, 1985) の一部について、支持される結果が得られた。しかし、孵化行動発現機構に EH が関与していることを証明するためには、今回の実験結果のみではまだ十分とはいえない。著者らは、卵殻内胚子に直接 EH

様生理活性物質を注射し、孵化行動が誘導されるか否かを検討する生物検定法 (Embryo bioassay) の開発を進めている。また、エリサン胚子由来の EH 様生理活性物質の抽出・部分精製を進めており、カイコが胚子由来の EH、潜成虫由来の EH などとの化学的性状についての比較を急いでいる。一方、エリサン胚子中に存在する EH 様生理活性物質の役割や測定機構との関係などには、多くの不明な点が残されており、今後さらに検討して行く必要がある。

### 文 献

- 普後 一 (1986) : 植物防疫, **40**, 230-233.
- 普後 一・岩田裕子 (1983) : 日蚕雑, **52**, 71-78.
- FUGO, H., IWATA, Y. and NAKAJIMA, M. (1984) : *J. Insect. Physiol.*, **30**, 471-475.
- FUGO, H., NAGASAWA, H. and SUZUKI, A. (1983) : *Appl. Ent. Zool.* **18**, 540-544.
- FUGO, H., SAITO, H., NAGASAWA, H. and SUZUKI, A. (1985) : *J. Insect. Physiol.*, **31**, 293-298.
- MINIS, D. H. and PITTENDRIGH, C. S. (1968) : *Science*, **159**, 534-536.
- NAGASAWA, H., FUGO, H., TAKAHASHI, S., KAMITO, T., ISOGAI, A. and SUZUKI, A. (1983) : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1901-1906.
- REYNOLDS, S. E. and TRUMAN, J. W. (1983) : In "Endocrinology of Insects" (DOWER, R. G. and LAUFER, H. eds), pp. 217-234, Alan R. Liss Inc., New York.
- SAUNDERS, D. S. (1976) : In "Insect Clock" pp. 280 Pergamon Press, Oxford, U. K.
- 田中 深 (1966 a) : 日蚕雑, **35**, 88-94.
- 田中 深 (1966 b) : 日蚕雑, **35**, 165-168.
- 田中 深 (1966 c) : 日蚕雑, **35**, 262-266.
- 田中 深 (1966 d) : 日蚕雑, **35**, 321-326.
- 田中 深 (1966 e) : 日蚕雑, **35**, 327-330.
- TRUMAN, J. W. (1985) : In "Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology" (KERKUT, G. A. and GILBERT, L. I. eds) Vol. 8. pp. 413-440, Pergamon Press, Oxford.
- TRUMAN, J. W., TAGHERT, P. H., COPENHAVER, P. F. and TUBLITZ, N. J. (1981 a) : In "Regulation of Insect Development and Behaviour" (SEHNAL, R., ZABZA, A., MENN, J. J. and CYMBOROWSKI, B. eds), pp. 1011-1020, Wroclaw Technical University Press, Wroclaw.
- TRUMAN, J. W., TAGHERT, P. H., COPENHAVER, P. F., TUBLITZ, N. J. and SCHWARTZ, L. M. (1981 b) : *Nature*, **291**, 70-71.