

博 士 論 文

キボシカミキリ *Psacotha hilaris* における変態の制御に関する研究

長 峯 啓 佑

目次

第1章 序章	
1-1. 昆虫の変態	1
1-2. 昆虫の蛹化運命決定タイミング	2
1-3. キボシカミキリ	4
1-4. 研究の目的	6
第2章 キボシカミキリにおける Broad-Complex 遺伝子のクローニング, 系統解析, 発現解析	
2-1. 諸言	10
2-2. 材料と方法	11
2-3. 結果	22
2-4. 考察	30
第3章 キボシカミキリ 5 齢幼虫における蛹化運命決定タイミング	
3-1. 諸言	33
3-2. 材料と方法	35
3-3. 結果	41
3-4. 考察	69
第4章 総合考察	
4-1. 幼虫の発育	77
4-2. JH, エクダイソン分泌タイミングと <i>PhBR-C</i> 発現タイミング	79
4-3. 多様な蛹化運命決定タイミング	80
摘要	83
謝辞	89
引用文献	90

第1章 序章

1-1. 昆虫の変態

昆虫の幼虫は成長と共に脱皮を繰り返す。完全変態昆虫の終齢幼虫は蛹，成虫へと変態し，形態，食性，行動を劇的に変化させ，多様な環境に適応している。変態は生理学的，分子生物学的によく研究され，昆虫成長制御剤のターゲットとしても期待されている。完全変態昆虫の幼虫がホルモンの作用を介して脱皮に至る一連の過程は以下のようなになる（桜井，1981）。まず，脳の神経分泌細胞から前胸腺刺激ホルモン（prothoracicotropic hormone，以下，PTTH）が分泌される。次に，PTTHにより活性化された前胸腺で脱皮を誘導するホルモンであるエクダイソンが合成され血中に分泌される。このホルモンにより誘導される脱皮の性質はエクダイソンが分泌された時点での血中の幼若ホルモン（juvenile hormone，以下，JH）の有無で決まる。血中にJHがある状態では幼虫脱皮が起こる。一方，JHが無い状態では変態あるいは成虫の形態形成が起きる。このPTTH，エクダイソン，JHによる変態制御は，おそらく完全変態昆虫に共通している。完全変態昆虫の終齢では，エクダイソンのピークが大小2つ見られる（比留間，1983）。1つ目の小さなピークをコミットメントピークと呼び，これにより次回の脱皮の際に形成される表皮が幼虫型から蛹型に運命づけられるほか，ガットパーズ（蛹化の前に不用な未消化物などを腸から排出すること）やワンダリング（蛹化する場所を探して歩き回る）も引き起こす。一般に，コミットメントピークの出現，あるいはそれによる行動の変化が変態の開始と定義される。変態が開始した後，エクダイソンの2つ目の大きなピークにより，表皮から蛹クチクラが分泌されるなど，蛹の形態形成が進行し蛹化に至る。このように，変態の内分泌系による制御機構，各ホルモンの生合成や代謝，機能は今日までにかかなり詳細に解明されてきた（Nijhout et al., 2014; Jindra et al., 2013）。それに比べて，いつ何をきっかけに蛹化のタイミングが決定するのかに関する研究は遅

れており、しかも、それが明らかになった昆虫種は限られている。

1-2. 昆虫の蛹化運命決定タイミング

では、蛹化のタイミングを決定する瞬間（蛹化運命決定タイミング）はいつ訪れ、それは何がきっかけになっているのだろうか。鱗翅目のタバコスズメガ *Manduca sexta* の幼虫が最適な環境条件で成長する場合、蛹化するまでの生理学的なステップを以下に説明する (Nijhout and Williams, 1974a; Nijhout and Williams, 1974b; Nijhout, 1975)。最初のステップは幼虫が終齢を決定することである。頭幅が一定のサイズ以上になると、その齢が終齢であると決定される。タバコスズメガの終齢幼虫は餌を食べ成長し、まず蛹化のために必要最小限の体重 (minimum viable weight, 以下, MVW) に達する。MVW に達した幼虫は蛹化能力を持ち、絶食させても蛹化することができる。一方、MVW に満たない幼虫を絶食させると、蛹化能力を持たず死んでしまう。幼虫は MVW を越えて成長を続け、critical weight (以下, CW) に達する。CW に達した幼虫は蛹化の内分泌カスケードを開始する。アラタ体での JH 合成を止め、脂肪体から JH 分解酵素 (JH エステラーゼ) を血中に放出することで、血中 JH 濃度を下げる。血中から JH が排除されると、脳の神経分泌細胞から PTH が出され、PTH に刺激された前胸腺からエクダイソンが分泌される。エクダイソンが血中に分泌されると、幼虫は摂食を終了し、前蛹を経て蛹化に至る。蛹化の内分泌カスケードは不可逆的で、CW に達した幼虫は一定時間の後に蛹化することが運命づけられ、CW に達した後は、いつ絶食させても蛹化のタイミングは変化しない(図 1-1A)。CW を蛹化のきっかけとする蛹化運命決定機構を持つ昆虫は、鱗翅目と双翅目に見つかっている (Nijhout and Williams, 1974a; Jones et al., 1981; Stieper et al., 2008)。ただし、双翅目における CW は鱗翅目のそれとは仕組みが異なると考えられており、鱗翅目のそれと同等に扱うべきか疑いがある (Hattem et al., 2015)。本論文では双翅目の CW を鱗翅目のそれに含めない。

野外で生育する幼虫は餌不足に陥る、あるいは絶食状態にさらされることがある。エンマコガネ類の1種 *Onthophagus taurus* (鞘翅目：コガネムシ科，以下エンマコガネ) の幼虫は，メス親から与えられた糞玉を餌として成長する。糞玉を食べつくした幼虫は，それ以上の餌を自力で得ることはできず，絶食状態にさらされる (Shafiei et al., 2001)。セモンホソオオキノコムシ *Dacne picta* (鞘翅目：オオキノコムシ科，以下オオキノコムシ) の幼虫はシイタケの子実体を餌として成長するが，子実体の寿命は短く，幼虫が十分に成長するまでに子実体が枯れてしまうことがある。この場合，オオキノコムシの幼虫は絶食状態にさらされる (Sato and Suzuki, 2001)。マメハンミョウ *Epicauta gorhami* (鞘翅目：ツチハンミョウ科) の幼虫はバッタの卵を餌として成長するが，卵を食べつくした幼虫は絶食状態にさらされる (Terao et al., 2015)。絶食状態にさらされたこれらの幼虫は，鱗翅目とは異なり，次に述べるように絶食をきっかけとして蛹化へ進むことができる。

エンマコガネとオオキノコムシでは，終齢初期の数日間に絶食させると蛹化せず死んでしまう。つまり，MVW が存在すると考えられる。マメハンミョウは終齢脱皮直後から絶食させても蛹化するため，MVW は認められていない。MVW を越えたエンマコガネとオオキノコムシの終齢幼虫，及びマメハンミョウの終齢幼虫は絶食状態にさらされると，絶食タイミングにかかわらず絶食開始後一定時間の後に蛹化する (Shafiei et al., 2001; Sato and Suzuki, 2001; Terao et al., 2015)

(図 1-1B)。この，絶食から一定時間で蛹化する現象を，本論文では絶食誘起型の蛹化 starvation-induced pupation (以下，SIP) と呼ぶことにする。餌不足に陥った終齢幼虫にとって，SIP は危機回避の機能を果たすと考えられている (Nijhout et al., 2014 ; Hatem et al., 2015)。これら SIP を示す3種の昆虫はみな鞘翅目ではあるが3つの異なる科に属することから，この現象は鞘翅目昆虫に広く共有されている可能性がある。また，エンマコガネやオオキノコムシ終齢幼虫に継続的に給餌した場合には自発的に摂食終了し蛹化に至る (Shafiei et al., 2001; Sato

and Suzuki, 2001). このことから, SIP を示す昆虫は絶食に頼らない蛹化運命決定機構も持っていると考えられる.

1-3. キボシカミキリ

キボシカミキリ *Psacotheta hilaris* (鞘翅目: カミキリムシ科) はクワやイチジクの害虫であり, 幼虫は生枝に穿孔し, 成虫は生葉を食害する (草間・高桑, 1984). キボシカミキリの分布はもともと東アジアに限られていたが, 近年ヨーロッパに侵入し問題となっている (Jucker et al., 2006; Lupi et al., 2013).

キボシカミキリには多くの亜種の存在が認められており, 日本の本州, 四国, 九州に分布しているのは *P. hilaris hilaris* である. *P. hilaris hilaris* には成虫前胸背板の斑紋パターンが異なる 2 つの型がある. これら 2 型はその地理的分布から, 慣習的に「西日本型」, 「東日本型」と呼ばれている (伊庭, 1980; 榎原, 1986). 西日本型は, 九州, 四国, 本州西部に生息し, 前胸背板の縦斑は途切れている. 一方, 東日本型は, 本州東部に見られ, 前胸背板の縦斑に途切れはない (伊庭, 1980). 2 つの型は休眠性も異なっている (Shintani et al., 1996; Shintani and Ishikawa, 1997a). 25°C 条件で, 西日本型は顕著な長日性の光周反応を示し, 幼虫期に休眠に入るが, 東日本型は明瞭な光周反応を示さない (Shintani et al., 1996). この光周反応の違いは 2 型の生活環の違いをもたらしている. 西日本型は成熟した幼虫で越冬し, 初夏に羽化ピークを迎える. 一方, 東日本型の大部分は卵で越冬し, 秋に羽化ピークを迎える (伊庭, 1976; 伊庭ら, 1976). 2 型の境界地域では, どちらの型にも分類しがたい斑紋パターンを持つハイブリッドと考えられる個体が見つかった (伊庭, 1980). このハイブリッド様の個体は, かつて東日本型が占めていたと考えられる関東地方に広く見られ, これは西日本型が東へ侵出したことが原因と考えられている (Shintani and Ishikawa, 1999). ハイブリッド様個体の光周反応は, 長日反応と非反応の間である (Shintani and Ishikawa, 1999).

キボシカミキリの室内での飼育法は既に確立されている。幼虫、成虫ともに市販の人工飼料シルクメイト 2S, インセクタ LF (日本農産製) を併用した飼育が可能である。メス成虫にクワの生枝や生葉を餌として与えると産卵数が大きく増加する (筆者による観察)。性成熟した雌雄成虫はプラスチックカップ内で交尾させることができ、交尾済みのメス成虫にクワの生枝を与えるとその樹皮下に産卵する。25°C, 長日条件で西日本型に人工飼料を与えて飼育すると、5 齢を終齢とする場合、卵期間が約 7 日間, 1 齢は約 5 日間, 2 齢は約 4 日間, 3 齢は約 6 日間, 4 齢は約 12 日間, 5 齢は約 24 日間, 蛹期間は約 10 日間であり, 1 世代に約 68 日間が必要となる。共食いを避けるため, 幼虫は個体別に飼育しなければならない。

応用昆虫学研究室において, これまでにキボシカミキリに関する多数の研究が行われてきた。深谷緑博士らにより, 成虫の行動学的・化学生態学的研究が行われ, 配偶行動や, 性フェロモンが明らかにされた。新谷喜紀博士らにより, 幼虫休眠に関する研究が行われ, 温度や光周期との関係が調べられた。そして, Florence Njeri Munyiri 博士らにより, 幼虫の変態や休眠のホルモンによる制御機構が明らかにされた。

西日本型キボシカミキリ幼虫における光周反応は, 新谷博士らにより詳細に研究されている (Shintani et al., 1996; Shintani and Ishikawa, 1997a; Shintani and Ishikawa, 1997b; Shintani and Ishikawa, 1997c; Shintani and Ishikawa, 1998)。西日本型キボシカミキリの幼虫を 25°C, 15L:9D の長日条件で飼育すると, 一部の個体は 4 齢を終齢として蛹化するが (4 齢蛹化), 残りの個体は 5 齢を終齢として蛹化する (5 齢蛹化) (Shintani et al., 1996)。一方で, 25°C, 12L:12D の短日条件で飼育した場合, 5~9 齢まで成長した後に幼虫休眠し, 休眠覚醒後にその齢を終齢として蛹化する (Shintani et al., 1996; Shintani and Ishikawa, 1997a)。この場合, 4 齢蛹化は完全に抑制される。また, 5 齢の途中で短日から長日へ移すと, 5 齢または 6 齢を終齢とする個体が多くなる (Shintani and Ishikawa, 1998)。このよう

に、本種は環境が一定であっても終齢が一つの齢に固定しておらず、しかも、どの齢が終齢となるかは環境により変化する。

このようにキボシカミキリは飼育が比較的容易であり、かつ、体サイズが大きいため、非モデル昆虫としては内分泌系の解析や実験形態学的手法にも比較的適している。また、これまでに生態学的、生理学的知見が蓄積されているので変態に関する研究をする上で適した昆虫であると言える。

1-4. 本研究の目的

先に述べたように、西日本型キボシカミキリの幼虫を 25°C, 15L:9D の長日条件下で飼育すると、一部の個体は 4 齢を終齢として蛹化するが (4 齢蛹化)、残りの個体は 5 齢を終齢として蛹化する (5 齢蛹化) (Shintani et al., 1996)。長日で飼育されているキボシカミキリ 4 齢幼虫の各個体について、幼虫脱皮に向かうのか蛹化に向かうのかという発育運命を外見から脱皮前に判別することはできない。サンプリングした 4 齢幼虫が、幼虫脱皮と蛹化のどちらへ向かっているのか判別する手法を確立できれば、変態の機構解明のための実験の精度が向上するはずである。そこで、*Broad-Complex* 遺伝子 (*BR-C*) の発現を判断基準として利用することを考えた。*BR-C* はエクダイソンの一次応答遺伝子であり (Nishita and Takiya, 2006; Nishita and Takiya, 2009)、二次応答遺伝子の発現を制御する転写因子である (Karim et al., 1993; von Kalm et al., 1994; Hodgetts et al., 1995; Crossgrove et al., 1996)。タバコスズメガ終齢幼虫の表皮ではエクダイソンのコミットメントピークに誘導されて *BR-C* が発現すると考えられている (Zhou et al., 1998; Zhou and Riddiford, 2001)。*BR-C* は変態時に蛹の形質を発現するために必須であり、それゆえ pupal specifier と呼ばれる (Zhou and Riddiford, 2002)。変態の過程が進行していることを示す分子マーカーとして *BR-C* を用いた研究例に Truman et al. (2006) がある。第 2 章では *BR-C* をキボシカミキリ 4 齢幼虫における変態の進行を示す分子マーカーとして使用するための基礎的知見を得るこ

とを目的に、*BR-C* 遺伝子のクローニング，系統解析，発現解析を行った。

キボシカミキリの幼虫は隣接する寄主植物へ自力で移動できず，産卵された植物の中で幼虫発育を完了させなくてはならない。すでに衰弱が相当に進んだ木や，既に多数の幼虫が加害している木に産卵された場合には，幼虫が発育する過程で餌不足に陥ることも想定される。また，養蚕業における慣行として，クワの木の枝葉は秋に剪定されることが多く，その場合，剪定された枝の中に残された幼虫は餌の劣化にさらされる。キボシカミキリの成虫は剪定された放棄枝からも羽化する（横井，1989）。そこで，栄養状態の変化への対応が研究され，絶食状態に置かれた西日本型 5 齢幼虫は幼虫期間を早めに切り上げて蛹化し，小型の成虫に羽化することが分かった（Shintani et al., 2003）。すなわち，5 齢脱皮直後に短日条件から長日条件に移して自由摂食条件で飼育すると， 24.0 ± 2.8 日の 5 齢日数で蛹化した。これに対し，5 齢脱皮直後に短日条件から長日条件に移すと同時に絶食させると， 16.3 ± 1.9 日の 5 齢日数で蛹化した。また，5 齢脱皮直後に絶食させた 5 齢幼虫は自由摂食させた 5 齢幼虫に比べ，5 齢日数のばらつきが小さくなっていた。自由摂食条件ではばらばらだった蛹化の引き金が，絶食後にすべての個体で同時に引かれたと考えれば，5 齢日数のばらつきが小さくなることは説明がつく。これらのことから，キボシカミキリ 5 齢幼虫においても SIP が生じている可能性があると考えた。

エンマコガネ，オオキノコムシ，マメハンミョウの摂食期間中の終齢幼虫は，SIP が生じるため絶食タイミングにかかわらず絶食後一定時間で蛹化する。キボシカミキリ 5 齢幼虫では脱皮直後から絶食させた研究はあるが（Shintani et al., 2003），5 齢の他のタイミングで絶食させた研究はこれまでなく，キボシカミキリ 5 齢幼虫に SIP が生じるかは，これまでに明らかになっていない。そこで，本研究の第 3 章では，キボシカミキリ 5 齢幼虫に SIP が生じることを確認し，絶食により 5 齢終齢日数のばらつきが小さくなるしくみを考察しようとした（図 1-1, C）。しかし，キボシカミキリ 5 齢幼虫の絶食への応答は当初の予想よ

りも複雑で、エンマコガネ、オオキノコムシ、マメハンミョウの **SIP** とは異なっていた。そのため、第 3 章ではキボシカミキリ 5 齢幼虫に見られた絶食による蛹化運命決定タイミングを詳細に検討した。

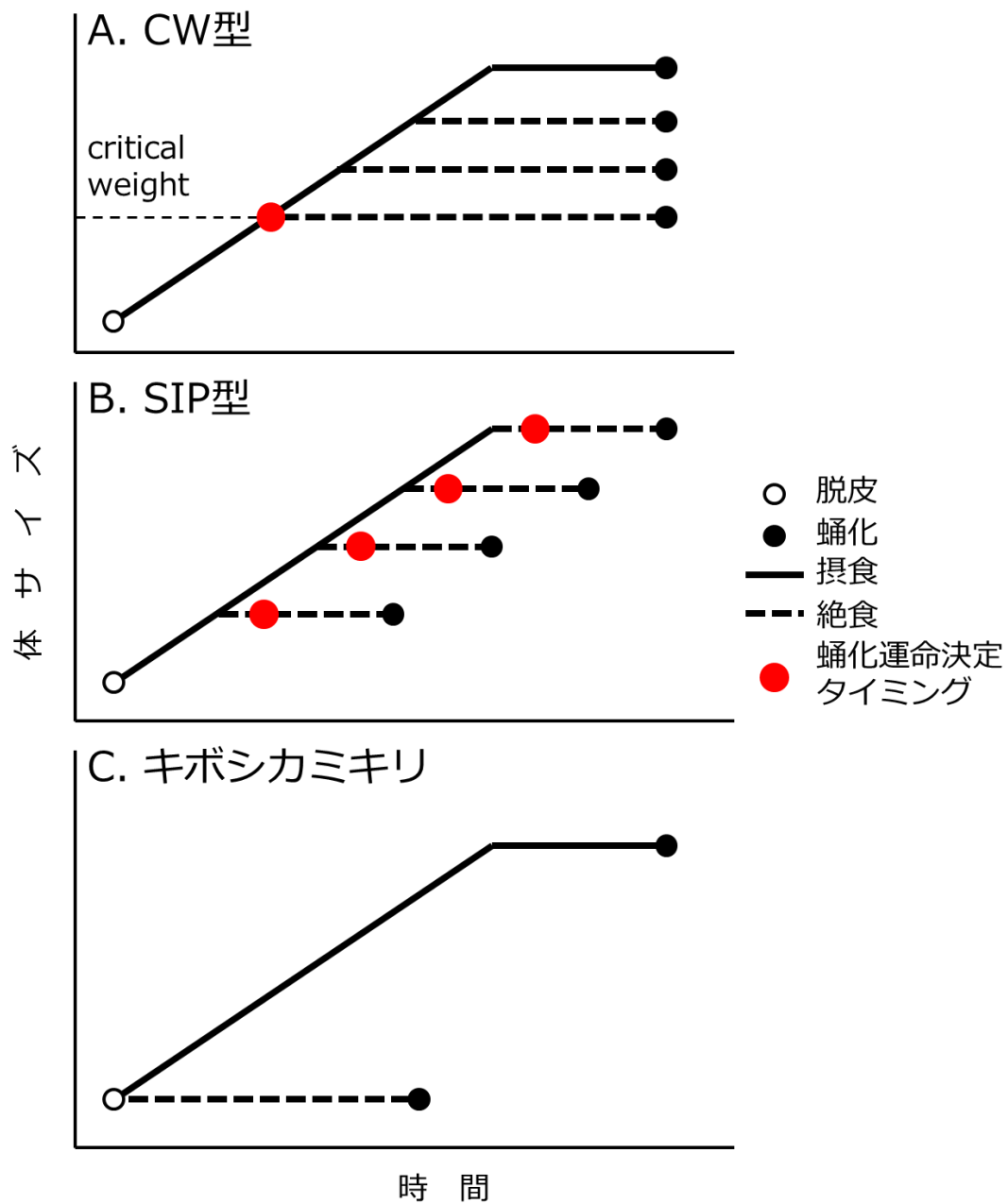


図 1-1. A. CW 型 (Nijhout, 2008 を改変), B. SIP 型 (Nijhout, 2008 を改変), C. キボシカミキリ (Shintani et al., 2003 より引用) における終齢幼虫の蛹化運命決定タイミングを表したモデル. 本研究ではキボシカミキリの蛹化運命決定タイミングを明らかにする.

第2章 キボシカミキリにおける Broad-Complex 遺伝子のクローニング, 系統解析, 発現解析

2-1. 諸言

キボシカミキリの幼虫発育では, 自由に摂食し続けられる条件 (自由摂食条件) 下で, 終齢が1つの齢に固定されない (Shintani et al., 1996; Watari et al., 2002). Shintani et al. (1996) によると, 長日条件, 25°Cで飼育された場合, 4 齢幼虫の約 50%は約 13 日目に 5 齢脱皮し, 続く 5 齢の約 18 日目に蛹化するが, 残りの 4 齢幼虫は 4 齢約 24 日目に蛹化する.

4 齢以降のキボシカミキリ幼虫は, 長日条件で餌の供給がなくなると幼虫生活を早期に切り上げて蛹化し, 小さな蛹を形成する (Munyiri et al., 2003; Shintani et al., 2003). 閾値体重 (180 mg) を超えた 4 齢幼虫を絶食させると早期に蛹化 (自由摂食条件より約 5 日早い) が誘導され, 閾値体重以下の 4 齢幼虫を絶食させると 5 齢脱皮も蛹化もせず死に至る (Munyiri et al., 2003). 絶食は JH 濃度の急激な低下を誘導し, これがキューとなってコミットメントピークが現れるものと示唆されている (Munyiri and Ishikawa, 2005b).

Broad-Complex 遺伝子 (*BR-C*) は, エクダイソンのシグナル伝達系における一次応答転写因子の一群 (*BR-C* アイソフォーム) をコードする (Nishita and Takiya, 2006; Nishita and Takiya, 2009). これらは完全変態昆虫において蛹化特異的に機能し (Suzuki et al., 2008; Konopova et al., 2011), 不完全変態昆虫においては胚発生, 翅芽や翅脈の形成に関与する (Erezyilmaz et al., 2006; Piulachs et al., 2010; Huang et al., 2013). *BR-C* アイソフォームはいずれも, 保存性の高い Broad-Tramtrack-Bric-a-brac (BTB) ドメインを N 末端に持ち, 変異の大きい C₂H₂ 型 zinc finger DNA 結合ドメインを C 末端に持つ (DiBello et al., 1991; Konopova and Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008; Piulachs et al., 2010). 昆虫にはこれまでに 6 タイプの zinc finger 配列 (Z1~Z6) が見つかっており (Spokony and Restifo, 2007;

Piulachs et al., 2010), どの zinc finger タイプを保有するかは種により異なる (DiBello et al., 1991; Bayer et al., 1996; Ijiro et al., 2004; Nishita and Takiya, 2004; Konopova and Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008; Minakuchi et al., 2011; Piulachs et al., 2010).

筆者はキボシカミキリにおいて変態の進行を示す分子マーカーとして *BR-C* を利用することを目指し, 摂食/絶食条件での *BR-C* の発現を調べることにした. 初めに, キボシカミキリで発現しているすべての *BR-C* zinc finger アイソフォームのクローニングを試みた. 結果として, 完全変態昆虫から初めて Z6 配列が得られ, zinc finger アミノ酸配列の系統解析を行い *BR-C* の進化を考察した. 次に, 絶食後の *PhBR-C* 発現プロファイルの変化を明らかにするために, 摂食/絶食条件で成長した幼虫において *BR-C* の転写産物を定量, 比較した.

2-2. 材料と方法

供試昆虫

2005 年に京都府福知山市で採集した西日本型キボシカミキリを 25°C, 湿度 30~60%, 日長 15L: 9D の条件で継代飼育した. 羽化後 2~3 週間たった雌雄成虫を 1 ペアずつプラスチックカップ (直径 12 cm, 高さ 10 cm) に入れ, 人工飼料インセクタ LF (日本農産工業, 横浜) を餌として, 長さ 5~7 cm に切ったクワの生枝 (直径 1~2 cm) を産卵材として与えた. 1 日後に, 樹皮の下に産みつけられた卵を回収した. 採卵日を記入したプラスチックシャーレ (直径 5.5 cm, 高さ 1.5 cm) に湿らせたろ紙を入れ, 卵をそのろ紙に置いて孵化をほぼ毎日点検した. 7 日間のうちに孵った幼虫を見つけ次第新たなプラスチックシャーレ (同上) に移し, 共食いを避けるため個体別飼育した. 3 齢幼虫までは人工飼料シルクメイト 2S (日本農産工業, 横浜) を, 4 齢以降は人工飼料インセクタ LF を, それぞれ 3 日ごとに 1~3 g 与えた.

核酸抽出

リン酸緩衝生理食塩水 (2.5 mM KCl, 141 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM

KH₂PO₄, pH 7.0, 以下, PBS) にキボシカミキリの幼虫を浸し, 後に挙げる研究対象組織を実体顕微鏡下で摘出し, PBS で洗浄した. 摘出した組織は, 液体窒素で凍らせた後に-80°Cで保存した. RNeasy Mini Kit (Qiagen, 東京) と RNase-free DNase I (Qiagen, 東京) を用いて組織から全 RNA を抽出した. 1 頭の幼虫から脂肪体を摘出し, Hight Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, 東京) を用いてゲノム DNA を抽出した.

BTB ドメインのクローニング

Zollman et al. (1994) にならい, *BR-C* の BTB ドメインの一部をコードする DNA 領域を, 縮重プライマー (Br-f1/Br-R1 もしくは Br-f1/Br-R2 ; 表 2-1) を用いた PCR 反応 (PCR) で増幅した. PCR の反応液量を 20 μ l とし, 1 μ l のゲノム DNA 溶液を鋳型として用いた. 反応液は, TaKaRa Ex Taq 1.25 U, dNTP mixture 0.5 μ M, 1 \times Ex Taq buffer (Takara), 各プライマー 5 μ M から成る. 反応条件として, 95°C で 5 分間, 続いて 95°C で 1 分間, 40°C で 2 分間, 72°C で 2 分間を 3 サイクル, 95°C で 1 分間, 55°C で 2 分間, 72°C で 2 分間を 30 サイクル, 最後に 72°C で 5 分間保温した. pGEM-T Easy Vector System I (Promega, アメリカ合衆国, マディソン) を用いて PCR 産物をクローニングし, BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, アメリカ合衆国, フォスターシティ) を用いてインサート DNA の塩基配列を決定した.

3'-末端と 5'-末端の配列決定

4 頭の前蛹から脳-側心体-アラタ体連合を摘出し, そこから抽出した全 RNA を鋳型として CapFishing Full-length cDNA Premix Kit (Seegene, 韓国, ソウル) を用いて一本鎖 cDNA を合成した. プライマー Br-f1/Br-R1 もしくは Br-f1/Br-R2 を用いた PCR で獲得した *PhBR-C* 遺伝子断片の塩基配列を基に, プライマー (BR-FW1, BR-FW2, PW-FW1, PW-FW2, BR-RV1, BR-RV2) を設計した (表 2-1). それらのプライマーと CapFishing Full-length cDNA Premix Kit を用いた 3', 5'-RACE 法によって, *PhBR-C* の 3'-末端と 5'-末端の塩基配列決定を行った.

Z2, Z3, Z2/Z3, Z5 zinc finger ドメインの塩基配列決定

Z2, Z3 zinc finger ドメイン部分を PCR 増幅するため、リバーズ縮重プライマーである Z2-DG1 と Z3-DG1 を、それぞれ Z2, Z3 配列の中でも保存性の高い領域に設計した (表 2-1). フォワードプライマーには BR-FW2 を用いた. 前蛹の唾液腺から抽出した全 RNA から, oligo-dT adaptor プライマーと PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit (タカラバイオ, 草津) を用いて一本鎖 cDNA を合成した. PCR の反応サイクルとして, 94°C で 3 分間, 続いて 94°C で 30 秒間, 40°C で 30 秒間, 72°C で 1 分間から 40 サイクルを開始し, 1 サイクルごとにアニーリング温度を 0.5°C ずつ 30°C に達するまで下げ続け, 最後に 72°C で 3 分間保温した. PCR 産物をクローニングし, 塩基配列決定した.

Z5 zinc finger ドメイン部分を PCR 増幅するため, リバーズ縮重プライマーである Z5-DGRV1 と Z5-DGRV2 を, Z5 配列の中でもよく保存された領域に, それぞれ first PCR, nested PCR 用に設計した (表 2-1). フォワードプライマーには BR-FW2 を使った. First PCR の鋳型として, 脳から抽出した全 RNA から一本鎖 cDNA を合成した. First PCR の産物を 1000 倍希釈し, nested PCR の鋳型として用いた. First PCR と nested PCR は同じ反応条件に設定した. すなわち, 94°C で 3 分間に続き, 94°C で 30 秒間, 68°C で 5 分間を 5 サイクル; 94°C で 30 秒間, 68°C で 5 分間を 5 サイクル; 94°C で 30 秒間, 65°C で 30 秒間, 68°C で 5 分間を 5 サイクル; 94°C で 30 秒間, 62°C で 30 秒間, 68°C で 5 分間を 5 サイクル; 94°C で 30 秒間, 58°C で 30 秒間, 68°C で 5 分間を 5 サイクルで, 最後に 72°C で 3 分間保温した. PCR 産物をクローニングし, 塩基配列決定した. Z2, Z2/Z3, Z3, Z5/Z6 アイソフォームの 3'-末端配列を 3'-RACE 法で決定するため, プライマー Z2-FW1, Z2-FW2, Z2-FW3, Z3-FW1, Z3-FW2, Z5-PFW1, Z5-PFW2 を用いた (表 2-1).

ホモログの探索と系統解析

PhBR-C の塩基配列を query に, tblastx (www.ncbi.nlm.nih.gov/) を用いて相同性検索を行った. *PhBR-C* と相同性が高い 98 の zinc finger 塩基配列を公開データベースから取得し, その推定アミノ酸配列を Clustal W (Thompson et al. 1994) で予備的に整列させた. Accession No.NR_039480.1, region; 6-134 (セイヨウミツバチ *Apis mellifera* の Z5 配列) を除いて, gap を含むアミノ酸配列は後述の解析に用いなかった. *Drosophila* 属に関してはキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のアミノ酸配列を代表として用いた (表 2-2). 異なる種間に見られる同一のアミノ酸配列を MacClade ver.4 (Maddison and Maddison 2005) で探索・除去し, 最終的に 52 アミノ酸残基からなる 45 のアミノ酸配列を系統解析に用いた. MEGA5 (Tamura et al. 2011) により, ベイズ情報量規準に基づくアミノ酸置換の最適モデルとして, JTT + G モデルを選択した. MEGA5 を用いて最尤法により系統関係を推定し, 100 回抽出によるブーツストラップテストを行った.

餌処理

本論文では幼虫の摂食/絶食状態を次のように表す. ハイフンの前の数字をもって幼虫の齢を示す. ハイフンの後に, 摂食及び絶食をそれぞれ F, S をもって表す. また, F あるいは S の直前の数字はそれぞれ摂食あるいは絶食の日数を示す. 例えば, 4-4F8S は, 4 齢幼虫を脱皮後 4 日間摂食させ, その後 8 日間絶食させたことを表している. 図 2-1 に表したように, 幼虫を様々なタイミングで解剖し, 組織を摘出した. ガットパーズが終了した個体及び前蛹は, ハイフンの後に F あるいは S で摂食/絶食を表した後に, それぞれ GP 及び PP で表した. 6 時間ごとに脱皮の有無を確認した. 3-3F と 3-3S の幼虫 (図 2-1) のほとんどが 4 齢脱皮直前であり, サンプルング時にすでに 4 齢に脱皮していた個体は用いなかった. 摂食条件では一部の幼虫は 4 齢幼虫の 11 日目前後に 5 齢脱皮したので, 4-9F と 4-12F のサンプルには脱皮直前の幼虫と, 蛹化に向かう幼虫が混在していた可能性がある. 4 齢脱皮直後から絶食させた幼虫は 5 齢脱皮も蛹化もせず死に至った.

定量リアルタイム PCR (qPCR)

PhBR-C の転写量を，共通領域を対象として ABI PRISM 7700 genetic analyzer (Applied Biosystems, アメリカ合衆国, フォスターシティ) を用いた qPCR 法により定量した。20 頭の幼虫から脳を，5 頭の幼虫から唾液腺と表皮をそれぞれ摘出し，全 RNA を抽出し，PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) と random 6mers を用いて逆転写した。逆転写反応は 20 μ l 反応液量で行った。逆転写産物を 100 倍希釈したものを鋳型とし，BRcore-FW2 と BRcore-RV2 をプライマーとして増幅反応に用いた (表 2-1)。4-FPP 幼虫の唾液腺から得られた cDNA を 10~100,000 倍に希釈し，*PhBR-C* 発現量測定のための検量線作成に用いた。*18S rRNA* をリファレンスとして定量するため，各サンプルの一本鎖 cDNA を 1,000 倍希釈して鋳型とし，18S-FW1 と 18S-RV1 をプライマーとして PCR を行った (表 2-1)。5-FPP 幼虫の中腸由来の cDNA を 100~1,000,000 倍希釈し，*18S rRNA* 発現量測定のための検量線を作成した。PCR は 20 μ l 反応液量で，鋳型 cDNA, 1 \times SYBR Premix Ex Taq, 1 \times ROX Reference Dye (タカラバイオ), プライマー 0.2 μ M の構成とした。PCR サイクルは，95 $^{\circ}$ C で 10 秒に続き，95 $^{\circ}$ C で 5 秒，60 度で 30 秒を 40 サイクルとした。*PhBR-C* 量は *18S rRNA* 量で相対化した。定量は 3 反復を行った。

表 2-1. 本章で用いたプライマー

クローニングに用いた縮重プライマー

名前	塩基配列	出典
Br-f1	5'-TAGTCTAGAAGCTTTTTYTGYYTNMGNTGGAAYAA-3'	Zollman et al., 1994
Br-R1	5'-TGTCTGCACGAATTCRAARTANGGNGARCANGC-3'	Zollman et al., 1994
Br-R2	5'-TGTCTGCACGAATTCRAARTANGGRCTRCANGC-3'	Zollman et al., 1994
Z2-DG1	5'-CANCGR TAYTCYTCYTGN C-3'	本研究
Z3-DG1	5'-AGNGTRTCNGAYTG YTC-3'	本研究
Z5-DGRV1	5'-CAGRTGRCGYTGNAGNGACCA-3'	本研究
Z5-DGRV2	5'-GAYACNCA YTTYTAYACGCCGCA-3'	本研究

RACE 法に用いたプライマー

名前	塩基配列	出典
3'-RACE Primer	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-3'	CapFishing Full-length cDNA Premix Kit
BR-FW1	5'-TCACATCAGCTTTTCGAGAACCTCAGA-3'	本研究
BR-FW2	5'-CATTAGCGTGCGATGGAAAGAGC-3'	本研究
PW-FW1	5'-AACGAACATAAAAAGGGCCAGGTC-3'	本研究
PW-FW2	5'-CCGGCAGCTTTAACTTCAGTATGG-3'	本研究
Z2-FW1	5'-GTAAGGTGCTGTGCTCGAAAGC-3'	本研究
Z2-FW2	5'-CTACCGCACCAAGAACTCACTC-3'	本研究
Z2-FW3	5'-GCTTTCAGCTATGCAAGCACAC-3'	本研究
Z3-FW1	5'-ATCAACGAGCCACAGGAGTGC-3'	本研究
Z3-FW2	5'-AAGACCACGGCCATCAAGAG-3'	本研究
Z5-PWFW1	5'-GCCTGGTCTGAGTCCTCTCTAACG-3'	本研究
Z5-PWFW2	5'-ACTGTAAAATTTGCG-3'	本研究
5'-RACE Primer	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3'	CapFishing Full-length cDNA Premix Kit
BR-RV2	5'-TCTTCCATCGCACGCTAATGTCA-3'	本研究
BR-RV1	5'-TCTGAGGTTCTCGAAAGCTGATGTGA-3'	本研究

表 2-2. 系統解析に用いた塩基配列の一覧

種名 (和名)	Z1		Z2		Z3	
	Accession No.	領域	Accession No.	領域	Accession No.	領域
<i>Acheta domesticus</i> (ヨローロッパイエコオロギ)	DQ176003.1	1309-1464	-	-	-	-
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (エンドウヒゲナガアブラムシ)	-	-	XM_001942646.2	2554-2709	-	-
<i>Aedes aegypti</i> (ネッタイシマカ)	AY499537.1	1568-1723	AY499538.1	1492-1647	AY499539.1	1564-1719
<i>Anopheles gambiae</i> (ガンビエハマダラカ)	-	-	XM_308027.2	58-213	XM_308028.4	208-363
<i>Apis florea</i> (コムツバチ)	XM_003699020.1	39-194	XM_003695045.1	22-177	XM_003695045.1	483-328
<i>Apis mellifera</i> (セイヨウミツバチ)	AB208106.1	13-168	XM_003249278.1	117-272	AB208108.1	22-177
<i>Bactrocera dorsalis</i> (ミカンコミバエ)	-	-	-	-	JX069964.1	372-527
<i>Blattella germanica</i> (チャバネゴキブリ)	FN651774.1	1367-1522	FN651775.1	1364-1519	FN651776.1	1403-1558
<i>Bombus impatiens</i> (マルハナバチの一種)	-	-	XM_003494365.1	1251-1406	XM_003494366.1	85-240
<i>Bombus terrestris</i> (セイヨウオオマルハナバチ)	XM_003400277.1	67-222	XM_003403336.1	69-224	XM_003400164.1	85-240
<i>Bombyx mori</i> (カイコガ)	AB166725.1	1199-1354	AB181197.1	1331-1486	AB113089.1	8751-8906

表 2-2. 続き

種名 (和名)	Z1		Z2		Z3	
	Accession No.	領域	Accession No.	領域	Accession No.	領域
<i>Chrysopa pallens</i> (ヨツボシクサカゲロウ)	-	-	GAGF01032915.1	52-207	GAGF01032915.1	343-498
<i>Culex quinquefasciatus</i> (ネッタイエカ)	-	-	XM_001844944.1	157-312	XM_001844945.1	154-309
<i>Dendroctonus ponderosae</i> (アメリカマツノキクイムシ)	APGK01036020.1	10174-10019	APGK01036020.1	917-762	APGK01036019.1	23086-22931
<i>Drosophila melanogaster</i> (キイロシヨウジヨウバエ)	X54663.1	2106-2261	X54665.1	1707-1862	X54664.1	2151-2306
<i>Frankliniella occidentalis</i> (ミカンキイロアザミウマ)	-	-	AB572561.1	1743-1898	AB572562.1	1692-1847
<i>Manduca sexta</i> (タバコスズメ)	-	-	AF032674.1	19-174	AF032675.1	28-183
<i>Megachile rotundata</i> (アルファルフアハキリバチ)	-	-	-	-	XM_003704314.1	1066-1221
<i>Nasonia vitripennis</i> (キョウソクヤドリコバチ)	XM_001601980.2	1184-1339	XM_003426018.1	58-213	XM_001601297.2	130-285
<i>Pediculus humanus corporis</i> (コロモジラミ)	-	-	XM_002426486.1	1132-1287	XM_002426486.1	1354-1509
<i>Psacotha hilaris</i> (キボシカミキリ)	AB857715.1	1192-1347	AB857716.1	1201-1356	AB858991.1	1228-1383
<i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ)	EU200754.1	22-177	EU200755.1	28-183	EU200756.1	55-210

表 2-2. 続き

種名 (和名)	Z4		Z5		Z6	
	Accession No.	領域	Accession No.	領域	Accession No.	領域
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (エンドウヒゲナガアブラムシ)	XM_001942646.2	2136-2291	-	-	-	-
<i>Aedes aegypti</i> (ネッタイシマカ)	XM_001659167.1	1658-1813	-	-	-	-
<i>Anopheles gambiae</i> (ガンビエハマダラカ)	XM_565666.4	1567-1722	-	-	-	-
<i>Apis florea</i> (コミツバチ)	XR_142997.1	742-897	-	-	-	-
<i>Apis mellifera</i> (セイヨウミツバチ)	AB207270.1	1384-1539	NR_039480.1	6-134	-	-
<i>Blattella germanica</i> (チャバネゴキブリ)	FN651777.1	1409-1564	FN651778.1	1388-1543	FN651779.1	1424-1579
<i>Bombus terrestris</i> (マルハナバチの一種)	-	-	XM_003400278.1	2373-2528	-	-
<i>Bombyx mori</i> (カイコガ)	AB166727.1	1193-1348	-	-	-	-

表 2-2. 続き

種名 (和名)	Z4		Z5		Z6	
	Accession No.	領域	Accession No.	領域	Accession No.	領域
<i>Chrysopa pallens</i> (ヨツボシクサカゲロウ)	GAGF01019727.1	301-146	-	-	-	-
<i>Dendroctonus ponderosae</i> (アメリカマツノキクイムシ)	APGK01036020.1	6955-6800	-	-	-	-
<i>Drosophila melanogaster</i> (キイロシヨウジヨウバエ)	U51585.1	2689-2844	-	-	-	-
<i>Frankliniella occidentalis</i> (ミカンキイロアザミウマ)	-	-	AB572563.1	1689-1844	-	-
<i>Manduca sexta</i> (タバコスズメ)	AF032676.1	1663-1818	-	-	-	-
<i>Psacotheca hilaris</i> (キボシカミキリ)	AB858992.1	1219-1374	AB858993.1	2480-2635	AB858994.1	1219-1374
<i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ)	EU200757.1	46-201	NM_001111264.1	1504-1659	-	-

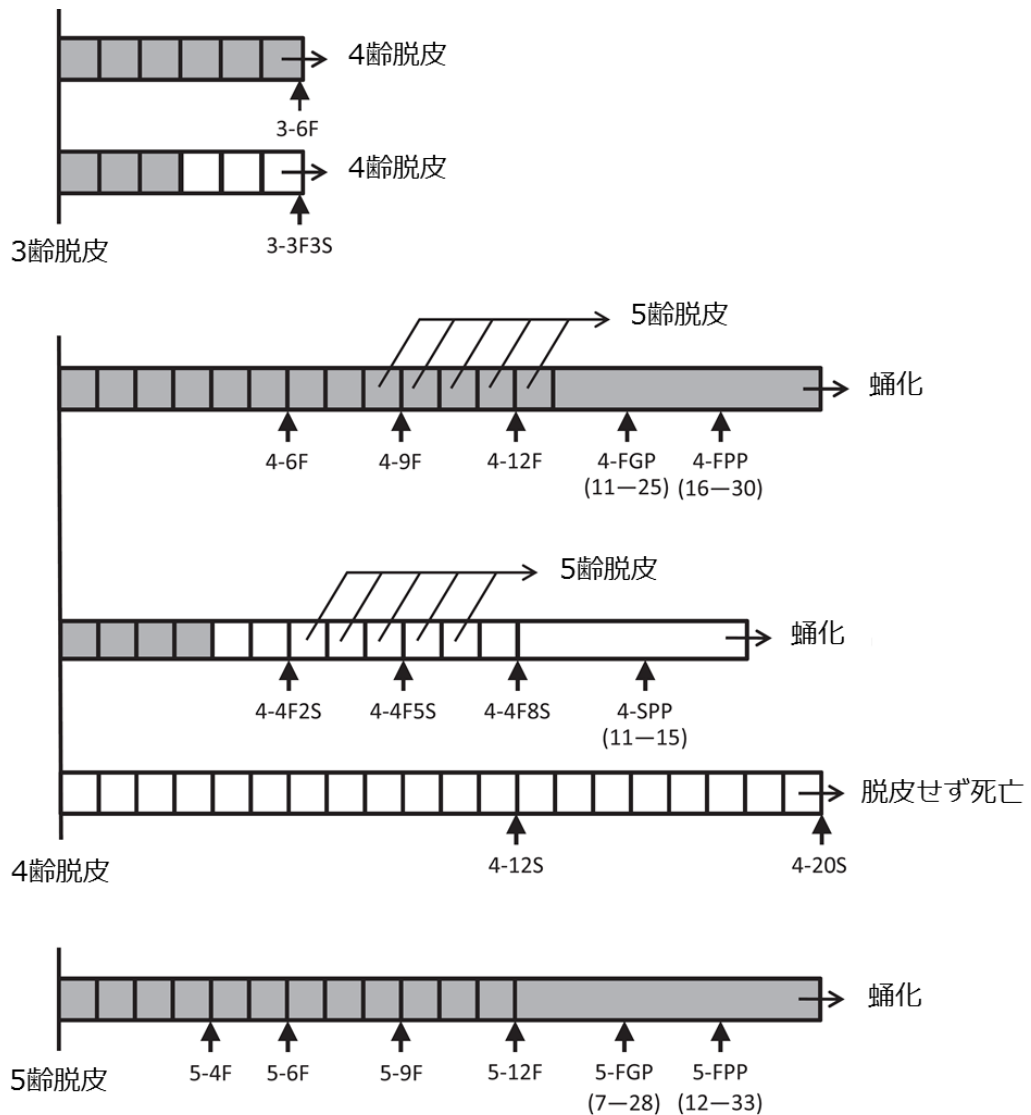


図 2-1. 給餌処理，絶食処理の略図

四角 1 つは 1 日を表す。四角のつながりは、右向きに日が経過することを表す。灰色の四角は給餌処理，白抜き四角は絶食処理をそれぞれ示す。上向きの矢印はサンプリングのタイミングを示す。ガットパージの完了 (4-FGP, 5-FGP) は腸の内容物がなくなったことを目視することで判断した。前蛹 (4-FPP, 4-SPP, 5-FPP) は表皮のアポリシスを確認すること，かつ，ピンセットによる刺激に反応しなくなることで判断した。ガットパージ完了 (4-FGP, 5-FGP) から約 10 日後，前蛹化 (4-FPP, 4-SPP, 5-FPP) から約 5 日後に蛹化が起こった。括弧内の数字は脱皮後の日数を示す。

2-3. 結果

PhBR-C cDNA

BR-C の BTB ドメイン中の約 100 bp のフラグメントを増幅するため、ゲノム DNA を鋳型として、縮重プライマーを用いた PCR を行った。予想通りのサイズのバンドが得られたため、ゲル抽出後プラスミドにクローニングし、大腸菌に形質転換させ、単一コロニーのプラスミドインサートを鋳型とした PCR 産物をダイレクトシーケンシングした。得られた 34 の塩基配列中 4 配列が同一であり、キイロショウジョウバエ、タバコスズメガ、カイコ *Bombyx mori*、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* の *BR-C* と高い相同性を示した。この塩基配列を含む、キボシカミキリの遺伝子を *PhBR-C* と呼ぶことにした。得られた 34 の塩基配列のうち、他の 30 配列は他の遺伝子をコードしていた。

キボシカミキリ幼虫の脳-側心体-アラタ体複合体から作成した cDNA を用いて、3'-, 5'-RACE 法を行い、3 タイプの *PhBR-C* 塩基配列を決定した。この 3 タイプは、zinc finger ドメインにおいて互いに異なっていたが、BTB ドメインを含む *PhBR-C* 共通配列については同じ塩基配列を持っていた。この 3 タイプの zinc finger 配列を blastx で相同性検索した結果、これらは昆虫の Z1, Z4, Z6 配列に該当することが示された (図 2-2, 2-3)。

前述の 3'-RACE 法では得られなかった Z2, Z3, Z5 タイプの塩基配列を含むアイソフォームを探すため、データベースから得られた Z2, Z3, Z5 アミノ酸配列を基にリバース縮重プライマーを設計し、先に決定した共通領域の塩基配列を基にフォワードプライマーを設計した。5-FPP 幼虫の唾液腺と脳の各々から用意した cDNA を鋳型として PCR を行い、その産物をクローニングして塩基配列決定した。その結果、Z2, Z3, Z5 配列の一部と見られる塩基配列を得ることができた。これらの塩基配列を用いて 3'-RACE 法を行い、ORF 全域と 3'UTR を明らかにし、最終的に 4 種類の *PhBR-C* 塩基配列を得た。これら 4 種の配列を、それぞれが保有する zinc finger 配列に基づき、Z2, Z3, Z2/Z3, Z5/Z6 アイソフォ

ームと呼ぶことにした (図 2-2, 2-3, 2-4).

BTB ドメイン, zinc finger ドメインの比較

BTB ドメインと zinc finger ドメインの各変異型 (Z1~Z6) の推定アミノ酸配列は完全変態, 不完全変態を問わず昆虫グループ間でよく保存されていた (図 2-3, 2-4B). とくに C₂H₂ 型の zinc finger に特徴的な Cys, His 残基は完全に保存されていた (図 2-3, 2-4B).

Z2/Z3, Z5/Z6 アイソフォームの構造

Z2/Z3 アイソフォームは, ORF に Z2 配列を持ち, 3'UTR には Z3 配列を持っていた (図 2-2). また, Z5/Z6 アイソフォームは, zinc finger ドメインの前に未成熟終止コドンを持ち, 3'UTR に Z5, Z6 配列を持っていた (図 2-2, 2-4A). この Z5/Z6 アイソフォーム mRNA からは zinc finger ドメインを欠くタンパク質が合成されると考えられる. Z5 配列を単独で持つ BR-C アイソフォームは発見されなかった.

zinc finger 変異型の系統関係

PhBR-C の Z1~Z6 の塩基配列を query に入力し, tblastx を用いて公開データベースを探索した. Z1~Z5 はそれぞれ, 完全変態と不完全変態を含む様々な昆虫種から見つかった. Z6 はチャバネゴキブリ *Blattella germanica* のみから見つかった. 様々な昆虫の Z1~Z6 アミノ酸配列を対象に最尤無根系統樹を推定した結果, Z1~Z6 はそれぞれ単系統群となった (図 2-5). Z1 と Z4 は一つのクレードを形成し, このクレードの存在はブーツストラップテストにより強く支持された. このように *PhBR-C* から見つかった zinc finger 配列 6 種が Z1~Z6 タイプへそれぞれ正しく分類されていることを確認した.

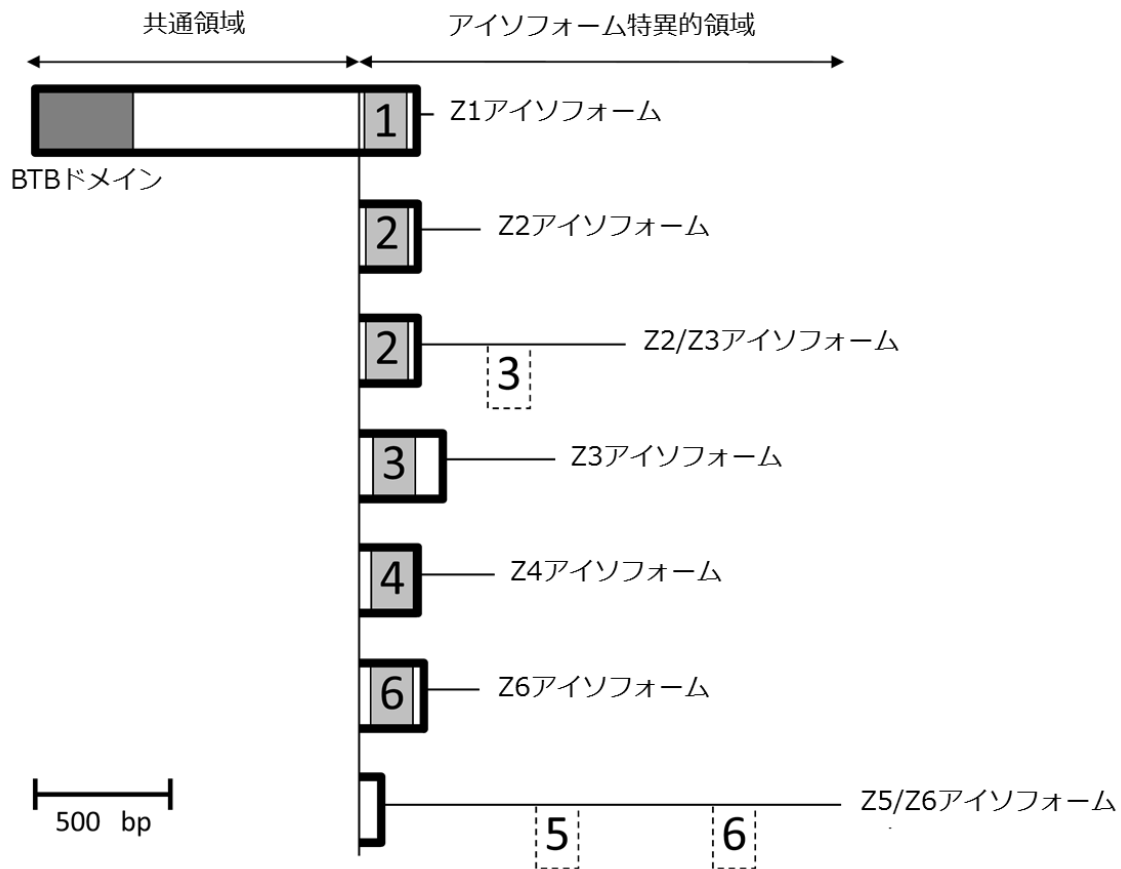


図 2-2. 本研究で見つかった *PhBR-C* 転写産物の構造

太線で囲われた領域は ORF を示す. 濃灰色の四角は BTB ドメイン, 薄灰色の四角は zinc finger 配列を, それぞれ示す. 細い横線は 3'UTR, 破線の四角は 3'UTR 内の zinc finger 配列をそれぞれ示す. 四角内の数字は zinc finger 配列のタイプを表す. 5'UTR のバリエーションは本研究では調査しなかった. Z1, Z2, Z2/Z3, Z3, Z4, Z6, Z5/Z6 転写産物の GenBank accession number は, それぞれ AB857715, AB857716, AB858990, AB858991, AB858992, AB858994, AB858993 である.

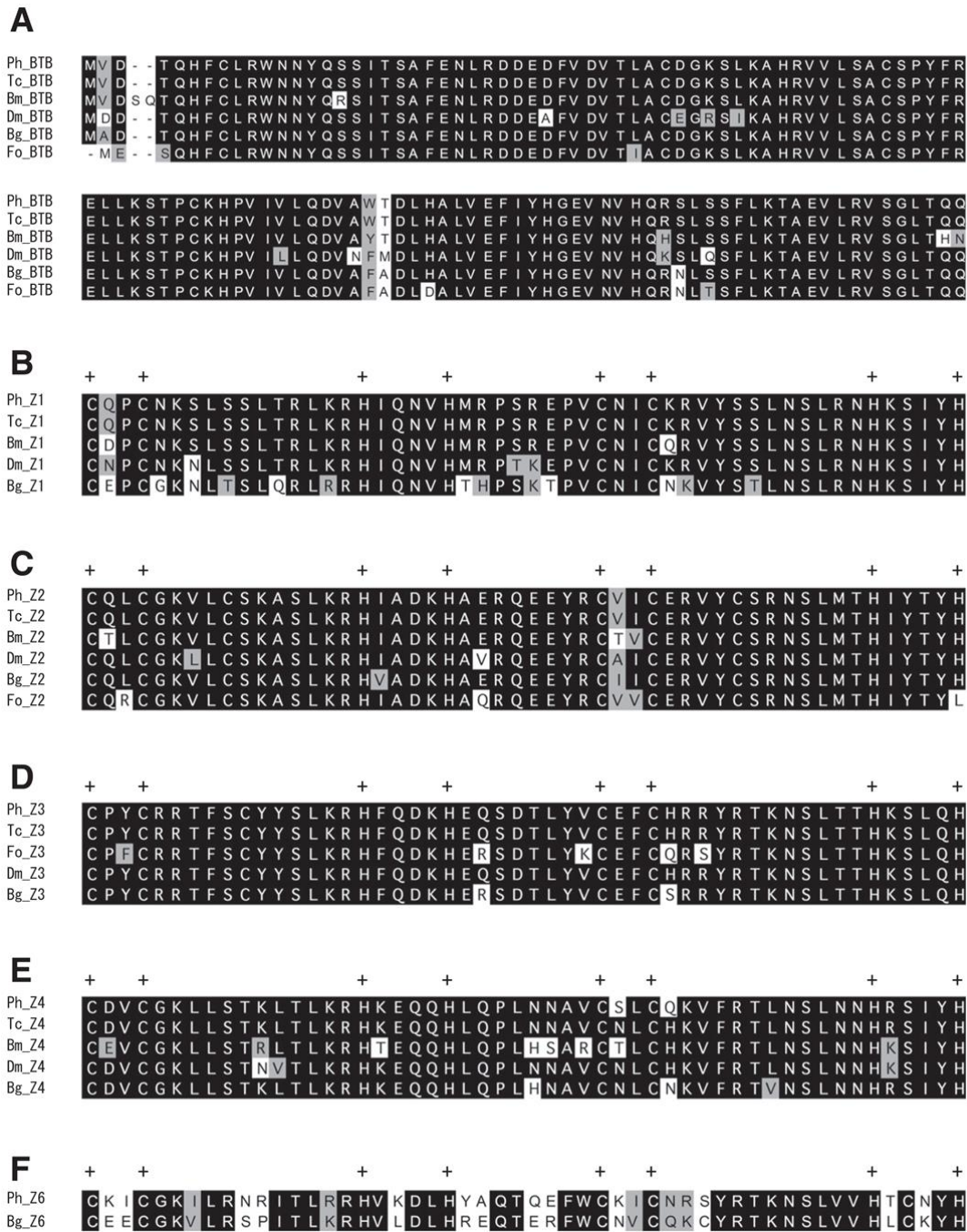


図 2-3. BR-C のアミノ酸配列の比較

Ph: *Psacotheta hiraris* (キボシカミキリ), Tc: *Tribolium castaneum* (コクヌストモドキ), Dm: *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ), Bm: *Bombyx mori* (カイコ), Bg: *Blattella germanica* (チャバネゴキブリ), Fo: *Frankliniella occidentalis* (ミカンキイロアザミウマ). BTB (A), Z1 (B), Z2 (C), Z3 (D), Z4 (E), Z6 (F) のアミノ酸配列を整列させた. プラス印 (+) は C₂H₂ タイプの zinc finger に保存された Cys, His 残基を示す. 黒塗は一致したアミノ酸残基, 灰色塗は類似したアミノ酸残基を示す.

A

```

1 ATGGTAGATACACAACATTTCTGTCTACGTTGGAACAATTATCAGAGCAGTATCAGATCAGCTTCGAGAACCTCAGAGATGATGAGGAC 90
1 M V D T Q H F C L R W N N Y Q S S I T S A F E N L R D D E D 30
91 TTGGTTGATGTGACATTAGCGTTCGATGGAAAGGCTTAAAGGCACCCGAGTGGTTTTGTCTGCTTGCAGCCATATTTTCGAGAGTTA 180
31 F V D V T L A C D G K S L K A H R V V L S A C S P Y F R E L 60
181 CTTAAGTCTACTCCCTGCAAAACCCCTGTGATAGTCTACAGATGTGCGGTGGACGGACCTCCATGCCCTGGTGGAGTTTATCTACCAC 270
61 L K S T P C K H P V I V L Q D V A W T D L H A L V E F I Y H 90
271 GGAAGTTAACGTCATCAGCGCTCCTATCGTGGTTCTCAAACCGCGAAGTTCTCAGAGTCAGCGACTCACACAACGACATGGC 360
91 G E V N V H O R S L S S F L K T A E V L R V S G L T Q Q H G 120
361 GATGGCCGTGACCGATTGGCTCAAGTACAAAGTATGGTTAGATCTCAGCAACAGCAGCAGCAACAGCAATCAACGCCCTTTGTCAAACCC 450
121 D G R D Q L A Q V Q S M V R S Q Q Q Q Q Q Q Q S T P L S N H 150
451 CACCCGATTTACCGAGAAGTTAGTAGAGGACGCCCTGTTACGTCGCGGTGCGCGCCGCGCAGCGCGCAGCGTCAACCCAGCTGTTG 540
151 H P S F T E K L V E D A L F T S P S S P P H G A T V N Q L L 180
541 AGGAGGGCGCCATGCAGTACAGGAGAGAGAGGAGATCCTCAGATCCGGATAACGAACATAAAAGGGCCAGGTGGAGCAGCATATA 630
181 R R A A M Q Y R R E R R I S S D P D N E H K R A R S E H I I 210
631 GGAATAATAACAATAACGAGTTGAACCTGTACACACGACGACCTCAGACGCAACGAGCGGACTTCTCAGCCAGGCCATGAAGAAT 720
211 G N N N N N E L N L S H T Q P P Q T Q P A D F S P S A M K N 240
721 AGTGACCTTAATCTTAACCTCAACCTCCACCAATGAAAAATGACGCGGAAGGTAAACGGCATCAGCAGTACGGAGCGAGAAAACTCCCCCTGT 810
241 S A L N L N L N S T M K N D A E G N G I S S T E R E N S P C 270
811 TCGGATCACCACGCTGCATTCTGGTGAACGAAACACGAGAACAACTGAAACGAAACCAATGGAGCTTATTGTAGTACAAC 900
271 S P S P T L H S R C N E N N E N N V K N E P M E L I C S T N 300
901 CCAGAAGAGAACAGTAAACGACTCCACGACGCGCAAAATGATAATGGCCATAACAATCTACCTCAGGGCCGCACTCGGGAGCTCGGGA 990
301 P E E N S N D S T D A T N D N G P N N L P Q G P H S G S S G 330
991 GGGAGCCAGGAGACCATGACAGCAGCATAGGACCCCTACCTAACGCCGTGGAGAGCAAACTGTTTGCACGGCCGCGCAGCTTTAAC 1080
331 G D H E D H D S T I G P Y L T P S E S K L F A T A A G S F N 360
1081 TTGAGTATGGCGGCTTTGGCAGCCGATCCGACAGGTCTAGGAGGTCTGAATCAATCTCTACAGGAAACGACAGCTTGCTGGTACGTC 1170
361 F S M A A L A A D P T G L G G L N Q S L Q G N D S L A G T S 390
1171 CAAGGTAAAGAACCTCCTTATTGAAGTACCCTAATACCCATGGTGTCTTAACTGAATGTTTTTATGTTGGCAGYTAAGGTG 1260
391 Q G K K P P Y L N V P L I P M V V L T E C F Y V V W Q X R * 419
1261 CTTTATGTTGGTAAATACCATCAGATCTCAGCCTCGCGCAAACTGACGGTATTTTGTCTAAAACCCGACTGTTTAAAAAAG 1350
1351 TTAGCATCTTTTCGAAACAAGTCCCCCTGTTGAAGAACTCCGAGGAATTTTCGGAATTTGCGACCGTTATCAGTTGTTATTCG 1440
1441 TGAAGTTTCTTYGAGTTTGTCCAATAGGTGTTTCGGAATGTGTTTAAACATGTGTTTCGTTTATTTTGTCCCTGGTGTGATTTGT 1530
1531 GTCTTTTATTTTTTATATACCTATTAATTTTGGGGAAGCCATCTAAACAAATGAGGAAACATAGCTTTTGTACACCATTTTT 1620
1621 AACCTGTATCATTTATCATTTAAGTCTGAACCTTTTAAACGCTTTTATGTAACCTTTTATAAGTAGTGGTGTAAATTTGTGAACGG 1710
1711 AATTTAAATGTAAGGTAGACATTTACGTAAGTGTTTTTAAGTAAACAGTAAATTTGGTGCCTTATGTTGTAATAATCCTCAAACCTGC 1800
1801 CTTATACAACGCTAACCTACTATAAGTGTGCGCGGTATCAAGCCTGGTCTGAGTCTCTCTAACGATTTGTTGCAGATCGTCAG 1890
1891 AGGGAGCAGACAGGCAATCGAGTTCAGCCGTTGCACCATATGCTAAGTCTCTCTCGGTTTGGTCTTACAACGCCACCTGT 1980
CTICYSKFSR FWSLQRHLADMHFYTPKDH DCDV CGRSYRSRNSLISHRSQYH
1981 CTGACATGCATTTTATACGCCAAGGACCCAGTTCGACGTTTGGGACGCTCATACGATCAGGGAATAGCTTGTATCAGTACCCGCA 2070
DMHFYTPKDH DCDV CGRSYRSRNSLISHRS
2071 GTCAATATCCGGAAGTAAATAGGTCCAACAGACCCCAAGAAATCGAGTGAATCGAACGACTAGGTTATTTAACGGGGTGTAGAACGTT 2160
QYH
2161 TCTTACAATCCGAGATCAGGAGTGGGATAATAGAATCAGAAGTGGGATAACTAGTATCAGGAGTGGGATTTTGTCAATTGATGTGCA 2250
2251 TTATTTTTTTTTTTACTGGGACTGTTTGGTATTGAAATTTTGGTTCCTCCCTACTGGCTTATAGAGAAAAATAATTTATTTAGTTG 2340
2341 ACTGTATTTCCAAAGAGCCTATTTATTTGGTTGTATGATTTCTGTGAGGAATGTGATACACAGTCAGCTAACGATTTATCTCTCTATA 2430
2431 TCCAGGTGGCGTTGCTTCAGGGGAGGAGTTTCCCGTTGTCCGCGAGGACTGTAATAATTCGCGGAAAAATTCGAGGAAACAGAAATACGTT 2520
CKJCGKJLRNRLTL
2521 AAGAAGGCACGTCAGAACCTGCATTACGCACAGCAGCAGGAGTCTGGTGCAAAATATGCAACCGATCTTACAGGACGAAAAACAGTT 2610
R R H V K D L H Y A Q J Q E F W C K I C N R S Y R T K N S L
2611 AGTCGTGCACACTTGTAACTACCACCAAAAAAAGCGAGGACAAAAAGGGCTTGGTTCTAGAATGATCCGAGATTGTTAGCGATGTGAA 2700
V V H C N Y H
2701 TAGTAAGTGGCCTTTAGCAGGGTTAATTTAGGCAAAATGAACTGTTTTCAGCCGACAAAAATTTCAAACTAGTCAAATTTTGAACCATTC 2790
2791 ATAGTTGATTAATGTCTTGGAGATAGTAAAAAGAAAATTTAGTTATTTTACAATAATTAATGTTTATTAATGTTAAAAACCGACTTA 2880
2881 TGAAGATGATCAGTAATGAAATGAAACGTTAACTATTAGAAAATGACTTTTTTATATTTTAGCCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2970

```

B

		+	+		+	+		+	+		+	+																																								
Ph_Z5	C	T	I	C	Y	K	S	F	S	R	F	W	S	L	Q	R	H	L	A	D	M	H	F	Y	T	P	K	D	H	D	C	D	V	C	G	R	S	Y	R	S	R	N	S	L	I	S	H	R	S	Q	Y	H
Bg_Z5	C	P	L	C	R	K	S	F	S	R	A	W	S	L	Q	R	H	M	A	D	T	H	F	Y	V	P	Q	S	F	E	C	D	V	C	G	R	S	Y	R	S	R	N	S	L	V	S	H	K	S	Q	Y	H
Fo_Z5	C	P	I	C	R	K	S	F	S	R	A	W	S	L	Q	R	H	M	S	D	T	H	F	Y	V	P	Q	S	F	E	C	E	V	C	G	R	M	Y	R	S	R	N	S	L	V	S	H	K	S	Q	Y	H
Bt_Z5	C	S	F	C	K	T	F	S	R	A	W	S	L	Q	R	H	L	A	D	T	H	F	Y	V	P	Q	S	L	S	C	D	C	C	G	R	S	Y	K	S	R	N	S	L	V	S	H	K	S	Q	Y	H	
Am_Z5	-	-	F	C	Q	K	T	F	S	R	A	W	S	L	Q	R	H	L	A	D	T	H	F	Y	V	P	Q	S	L	C	D	C	C	G	R	S	Y	K	S	R	N	S	L	V	S	-	-	-	-	-	-	

図 2-4. Z5/Z6 アイソフォーム

A. Z5/Z6 アイソフォームの塩基配列及び推定アミノ酸配列. BTB ドメインは破線の下線で示す. 1176 と 1177 の間の矢頭は共通領域の終点を示す. アスタリスクは終止コドン (TGA) を示す. 3'UTR 中の Z5, Z6 配列に相同な塩基配列はそれぞれ下線とダッシュの下線で示す. B. キボシカミキリ *Psacotha hilaris* (Ph) とチャバネゴキブリ *Blattella germanica* (Bg), ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* (Fo), セイヨウオオマルハナバチ *Bombus terrestris* (Bt), セイヨウミツバチ *Apis mellifera* (Am) の Z5 推定アミノ酸配列の比較. プラス印 (+) は C₂H₂ タイプの zinc finger に保存された Cys, His 残基を示す. 黒塗は一致したアミノ酸残基, 灰色塗は類似したアミノ酸残基を示す.

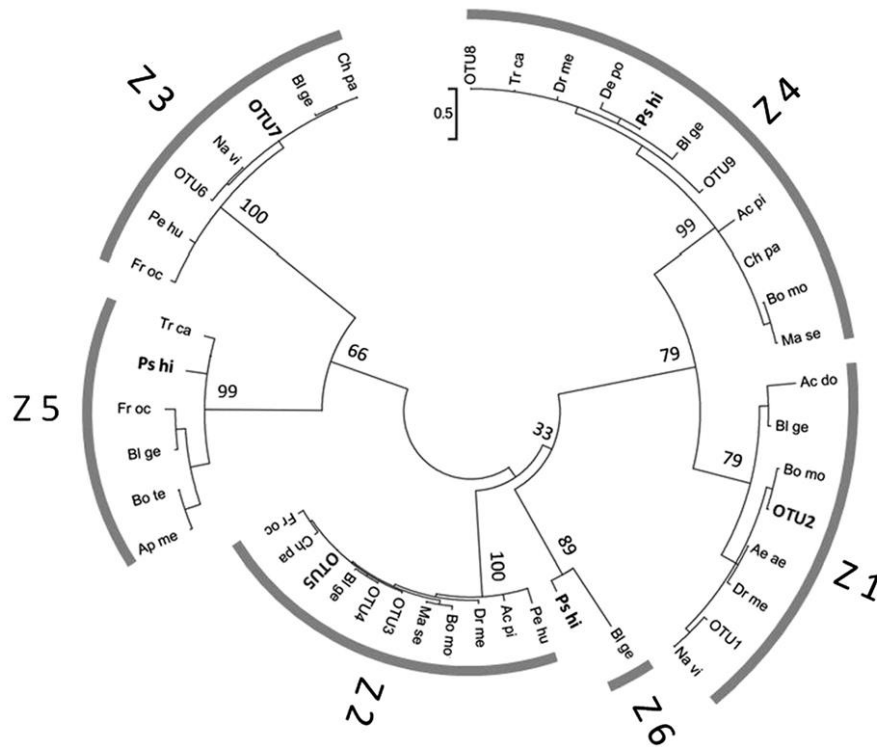


図 2-5. さまざまな昆虫の BR-C アミノ酸配列の最尤系統樹

ブーツストラップ指数を主要な枝上に表す. キボシカミキリ *Psacotha hilaris* を含む OTU は太字で示す. 種名の略号と各 OTU に含まれる種名を以下に記す.

Ac do: *Acheta domesticus*. Ac pi: *Acyrtosiphon pisum*. Ae ae: *Aedes aegypti*. Ap me: *Apis mellifera*. Bl ge: *Blattella germanica*. Bo mo: *Bombyx mori*. Bo te: *Bombus terrestris*. De po: *Dendroctonus ponderosae*. Fr oc: *Frankliniella occidentalis*. Ps hi: *Psacotha hilaris*. Tr ca: *Tribolium castaneum*. Na vi: *Nasonia vitripennis*. Dr me: *Drosophila melanogaster*. Ma se: *Manduca sexta*. Pe hu: *Pediculus humanus corporis*. Ch pa: *Chrysopa pallens*. OTU1: *Apis florea*, *A. mellifera*, *B. terrestris*. OTU2: *D. ponderosae*, *P. hilaris*, *T. castaneum*. OTU3: *A. aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*. OTU4: *A. florea*, *A. mellifera*, *Bombus impatiens*, *B. terrestris*, *N. vitripennis*. OTU5: *D. ponderosae*, *P. hilaris*, *T. castaneum*. OTU6: *A. florea*, *A. mellifera*, *B. impatiens*, *B. terrestris*, *Megachile rotundata*. OTU7: *A. aegypti*, *A. gambiae*, *Bactrocera dorsalis*, *B. mori*, *C. quinquefasciatus*, *D. ponderosae*, *D. melanogaster*, *P. hilaris*, *T. castaneum*. OTU8: *A. aegypti*, *A. gambiae*. OTU9: *A. florea*, *A. mellifera*. 系統推定に用いた配列の GenBank accession number は表 2-2 に記載する.

***PhBR-C* の転写量**

図 2-1 に示すように、異なる摂食/絶食条件でキボシカミキリの幼虫を飼育した。幼虫の脳、唾液腺、表皮における *PhBR-C* の転写量を、共通配列に特異的なプライマーを用いた qPCR 法により測定した (図 2-6)。自由摂食条件の幼虫の唾液腺と表皮では、ガットパージ後 (4-FGP, 5-FGP) に *PhBR-C* 発現量の上昇が見られ、さらなる上昇が前蛹期 (4-FPP, 5-FPP) に認められた。4 齢脱皮が間近い 3-6F 幼虫と 3-3F3S 幼虫では、*PhB-C* 発現量の上昇は認められなかった。4-12F 幼虫には 5 齢脱皮が間近い個体と更なる幼虫期間を経て後に 4 齢蛹化する個体が混在するが、4-12F 幼虫においても発現量の上昇は認められなかった。4 日間の摂食後に絶食させた 4 齢幼虫、すなわち、その後に早期の蛹化が誘導される 4 齢幼虫 (4-4F5S) では、表皮において *PhBR-C* 発現量の上昇が認められた。その一方で、4 齢脱皮直後から絶食させた 4 齢幼虫、すなわち、成長が停止し後に死に至る 4 齢幼虫 (4-12S, 4-20S) では、どの組織においても目立った発現量の変化は認められなかった。蛹化に先立つ発現量の上昇の他に、唾液腺と表皮とは異なり、脳では低い発現が恒常的に見られた。

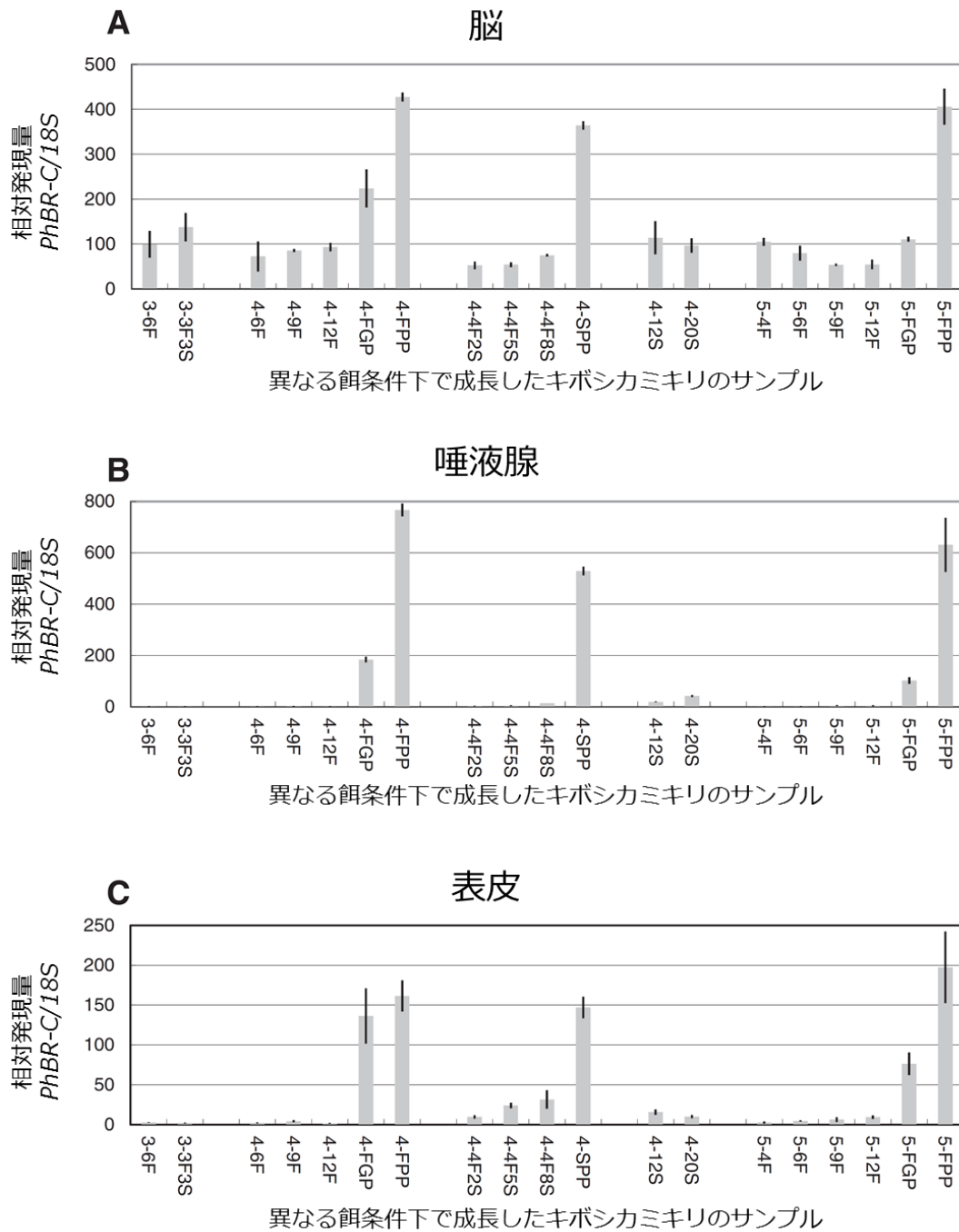


図 2-6. 脳 (A), 唾液腺 (B), 表皮 (C) における *PhBR-C* mRNA 発現量の qPCR 解析. *PhBR-C* mRNA 発現量 (共通領域) は *18S* リボソーム RNA の発現量で相対化した. 異なる摂食/絶食条件下で成長したキボシカミキリ幼虫を図 2-1 で示した特定のステージでサンプリングした. 4-12F は 5 齢へ脱皮する直前の個体と, さらに成長した後に蛹化する個体が含まれている. エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$).

2-4. 考察

BR-C zinc finger 配列の進化

本研究により，Z1～Z6 配列のうち 1 つもしくは 2 つを含む *PhBR-C* 転写産物を 7 種類キボシカミキリから同定した．Z1～Z4 配列は昆虫種間でよく保存されている (Spokony and Restifo, 2007)．それに対して，Z5 配列は不完全変態昆虫の 2 種，チャバネゴキブリ (Piulachs et al., 2010) とミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* (Minakuchi et al., 2011)，そして完全変態昆虫の 1 種，コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* (Konopova and Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008) で見ついている．このことから，Piulachs et al. (2010) は，Z5 配列が完全変態昆虫の高等なグループで消失した可能性を指摘した．本研究の結果は Z5 配列消失仮説と符合するよう見える．また，キボシカミキリの Z5/Z6 アイソフォームには未成熟終止コドンが存在するため，Z5 配列を含む BR-C タンパク質は生産されないと予想される．Z6 配列は，不完全変態昆虫であるチャバネゴキブリのみから報告されている (Piulachs et al., 2010)．本研究におけるデータベース探索により，キイロショウジョウバエ，カイコ，コクヌストモドキといったゲノム解読済の昆虫は Z6 配列を持たないことが示された．Piulachs et al. (2010) は，Z6 配列の進化について 2 つのシナリオを考えた．1 つは，完全変態類と不完全変態類の分岐後に，ゴキブリの系譜で Z6 配列が誕生したというものであり，もう 1 つは，完全変態類と不完全変態類の分岐前に Z6 配列は存在しており，完全変態類で消失したというものである．完全変態昆虫であるキボシカミキリに Z6 配列が存在することは，後者のシナリオを支持する．さらに，Z6 配列がコクヌストモドキシのゲノム上に存在しないことは，鞘翅目の進化の過程で少なくとも 1 度は Z6 配列が消失したことを示唆している．この鞘翅目内での Z6 配列の消失はこれまでに指摘されたことがなく興味深い．以上をまとめると，本研究の結果は不完全変態昆虫が一旦 6 つの zinc finger (Z1～Z6) 配列を獲得したが，進化の過程で一特に完全変態昆虫でタンパク質として使われる zinc finger 配列の数が減ったというシナリオ (Piulachs et al., 2010) を支持した．今後，異なる目に属する様々な昆虫から BR-C zinc finger 配列を探索することが，昆虫にお

ける *BR-C* の進化史を明らかにするために必要である。

***PhBR-C* の発現プロファイル**

本研究により、キボシカミキリ 4 齢及び 5 齢幼虫において、ガットパージ後から前蛹期にかけて脳、唾液腺、表皮で *PhBR-C* 発現量が上昇することがわかった (図 2-6)。キイロショウジョウバエ、タバコスズメガ、カイコでは、様々な組織で *BR-C* の発現が 20-hydroxyecdysone (20E) により誘導され JH により抑制される (Zhou et al., 1998; Zhou and Riddiford, 2002; Reza et al., 2004)。しかし、これらのホルモン応答は唾液腺、絹糸腺、表皮、筋肉などの組織では高く、脳や脂肪体などの組織では低い。多くの組織で *BR-C* は蛹化前に特異的に発現するが、脳や脂肪体では少ない mRNA 量ながら恒常的にも発現している (Emery et al., 1994; Ijiro et al., 2004; Nishita and Takiya 2004)。キイロショウジョウバエの脳では *BR-C* アイソフォームが神経の分化に関与することが示唆された (Spokony and Restifo, 2009; Zhou et al., 2009; Dincer 2011)。脳や脂肪体での *BR-C* の役割は直接変態に関するとは限らない。キイロショウジョウバエとコクヌストモドキの *BR-C* 変異体は終齢後期までは正常に発育しているように見えることから、胚発生と幼虫発生における *BR-C* の機能は未だ不明である (Kiss et al., 1988; Konopova and Jindra, 2008)。キボシカミキリ 4 齢幼虫を 4 日間の摂食後に絶食させた場合 (4-4FS)，その後 24 時間で血中 JH 濃度は急激に減少し、元のレベルに戻ることはなく、6 日目に血中 20E 濃度の小さなピークが、続いて 11 日目に血中 20E 濃度の大きなピークがそれぞれあった (Munyiri and Ishikawa 2005a)。従って、本研究において、4-4F5S, 4-4F8S 幼虫の表皮で見られた *PhBR-C* 発現の上昇 (図 2-6) は、この JH が不在状態での 20E の小さなピークにより誘導されたのかもしれない。絶食させた幼虫の *PhBR-C* 発現量は、幼虫脱皮へ向かう状態 (3-3F3S) や、成長停止していずれは死に至る、4 齢脱皮直後から絶食した幼虫 (4-12S, 4-20S) では低かった。従って、絶食の *PhBR-C* 発現への影響は蛹化へ向かう終齢幼虫に限られる。

Z6, Z5 配列を含むアイソフォームの機能

PhBR-C をクローニングしたところ, Z1~Z4 配列だけでなく Z5, Z6 配列を含むアイソフォーム (Z5/Z6, Z6 アイソフォーム) が見つかった. チャバネゴキブリでは, Z6 アイソフォームは翅芽や翅脈の形成に関与することが RNAi 法による機能解析によって明らかになった (Erezyilmaz et al., 2006; Piulachs et al., 2010; Huang et al., 2013). キボシカミキリにおける Z6 配列を含むアイソフォームが, チャバネゴキブリの Z6 アイソフォームと似通った機能を持つのか, キボシカミキリ固有の機能をもつのかを明らかにするため, 今後 RNAi 法などを用いた機能解析を行う必要がある.

Z5 配列を含むアイソフォームの機能はいまだに不明である. チャバネゴキブリとコクヌストモドキにおいて RNAi 法による Z5 アイソフォームの機能解析が行われたが, 表現型に異常は認められなかった (Suzuki et al., 2008; Huang et al., 2013). セイヨウミツバチの Z5 配列は miRNA のソース配列である可能性がある. Chen et al. (2010) はセイヨウミツバチから多くの miRNA を発見したが, そのうちの Ame-mir-3782 は Z5 配列の一部と高い相同性を示す. この miRNA の機能は不明であり, また Z5 配列が Ame-mir-3782 のソースであることも証明されていない. キボシカミキリを用いた機能解析が, Z5 配列を含むアイソフォームの機能を特定するための足掛かりになるかもしれない.

第3章 キボシカミキリ5齢幼虫における蛹化運命決定タイミング

3-1. 諸言

完全変態昆虫における蛹化は、2種類のホルモン、すなわちアラタ体で合成される幼若ホルモン（JH）と前胸腺で合成されるエクダイソンにより制御される（桜井，1981）。若齢幼虫では，血中 JH の存在下でエクダイソンのピークが幼虫脱皮を誘導する。一方，終齢幼虫では，血中 JH 濃度が低下した状態におけるエクダイソンのピークが幼虫の成長を停止させ，蛹化を誘導する。完全変態昆虫の変態における JH とエクダイソンの生合成経路や信号伝達メカニズム，応答因子は分子レベルで近年盛んに研究され，多くの知見を集めつつある（Jindra et al., 2013; Nijhout et al., 2014）。その一方で，終齢幼虫がいつ，何をきっかけに変態を開始するのかという，蛹化運命決定のタイミングに関する研究は相対的にずっと少ない（Nijhout et al., 2014）。

適切な環境におかれた終齢幼虫は，時間の経過とともに体サイズを増加させる。経過時間と体サイズが発育に与える効果を分離する方法として，絶食処理がある。タバコスズメガ（鱗翅目）では，絶食実験により蛹化運命の決定において体サイズ（体重）が重要な要素となることが明らかになった（Nijhout and Williams, 1974a; Nijhout and Williams, 1974b; Callier and Nijhout, 2013; Nijhout et al., 2014）。すなわち，摂食期間中に体重が critical weight (CW) に達すると変態の内分泌カスケードが開始する。まず JH 合成が止まり，続いて JH エステラーゼによる JH 分解が始まり，その結果，血中の JH が減少していく。CW に達した約 1 日後には血中から JH がなくなり，脳から前胸腺刺激ホルモン (PTTH) が放出され，PTTH が前胸腺を刺激し，前胸腺からエクダイソンが分泌される。このエクダイソンのコミットメントピークが刺激となり幼虫は摂食を終了する。

その後、ワンダリングと前蛹を経て蛹化する。つまり、CW に達した時点で蛹化運命が決定する。従って、CW に達したあとは摂食期間内にいつ絶食しても蛹化のタイミングは変わらない。CW を蛹化のきっかけとする蛹化運命決定機構を持つ昆虫は鱗翅目に見つかっている (Nijhout and Williams, 1974a; Jones et al., 1981)。鱗翅目以外で終齢幼虫における蛹化運命決定のタイミングが調べられた昆虫は鞘翅目である。エンマコガネ (鞘翅目コガネムシ科) では絶食によって変態が誘起される (Shafiei et al., 2001)。すなわち、ある程度成長した終齢幼虫は、時間経過及び体サイズにかかわらず絶食開始から一定時間で蛹化する。このことは餌資源の枯渇が変態のキューになることを意味する。本研究では、この絶食開始から一定時間で蛹化する現象を絶食誘起型の蛹化 starvation-induced pupation (以下, SIP) と呼ぶことにする。

SIP は、オオキノコムシ (鞘翅目オオキノコムシ科) (Sato and Suzuki, 2001) やマメハンミョウ (鞘翅目ツチハンミョウ科) (Terao et al., 2015) にも存在する。オオキノコムシやマメハンミョウの終齢幼虫もエンマコガネと同様に摂食時間にかかわらず絶食開始から一定時間で蛹化する。餌不足への適応であろう SIP は「危機回避型」の蛹化運命決定機構と称されることがある (Nijhout et al., 2014)。オオキノコムシの終齢では、蛹化運命の決定は絶食開始直後ではなく数日間の絶食の後に起こることが、再給餌実験により示された (Sato and Suzuki, 2001)。マメハンミョウの終齢では、多くの個体が 1 日の絶食で蛹化運命を決定した (Terao et al., 2015)。

タバコスズメガの CW 型蛹化と鞘翅目に見られる SIP の研究では、終齢幼虫をさまざまなタイミングで絶食させる実験が体系的になされている。従って、今までに調べられた昆虫が CW 型蛹化と SIP の双方を保有しているとは考えにくい。

SIP が報告された 3 種は鞘翅目の異なる科に属する。そこで、鞘翅目昆虫では SIP が共有されているという仮説を考え、キボシカミキリの蛹化運命決定機構に着目した。なぜなら、キボシカミキリの 5 齢幼虫を用いた絶食実験が Shintani et al. (2003) によって既に行われ、その結果は SIP の存在と矛盾しないものであったからである。Shintani et al. (2003) は、5 齢脱皮直後から幼虫を絶食させると自由摂食条件に比べて早期に蛹化することを発見した。しかし、摂食時間にかかわらず絶食から蛹化までの時間が一定であるかどうかは確かめられていなかったため、この蛹化が SIP であるとは断定できない。また、5 齢 8 日目までを短日、自由摂食条件で飼育し、その後長日、絶食環境へ移す実験もなされた。その結果、5 齢脱皮直後から絶食した場合と 5 齢 8 日目から絶食した場合の 5 齢日数は近い値だった（それぞれ 16.3 ± 1.9 日、 15.4 ± 3.8 日）。しかし、この実験では 5 齢 8 日目で日長も変えたため、必ずしも絶食だけが蛹化運命決定に影響したかどうかは決定的ではなかった。

本章では、キボシカミキリ 5 齢において SIP が見られるか否かをさまざまなタイミングで絶食することにより調べた。その結果、5 齢後期においては絶食から一定日数での蛹化が観察された。一方で、5 齢前期においては絶食開始が遅れるにつれ絶食から蛹化までの所要日数は少なくなった。つづいて、5 齢幼虫において絶食による蛹化運命決定のために必要な絶食日数を調べた。これらの結果から、5 齢後期においては絶食により SIP が起こるが、5 齢前期においては SIP は抑制されることが明らかになった。

3-2. 材料と方法

実験昆虫の継代飼育

2011 年 7 月に京都府福知山で採集した約 50 頭の成虫を用いて、継代飼育を開

始した。飼育室の条件は $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ 、15L:9D とした。成虫を 1 ペアずつプラスチックカップ（直径 10cm × 高さ 6cm）に入れ、餌兼産卵木として、長さ 8 cm 程度に切断した直径 2 cm 程度のクワ生枝を与えた。産卵木を与えてから 2~4 日後に、樹皮下に生みつけられた卵をピンセットでつまみ、プラスチックシャーレ（直径 5 cm × 高さ 1.5 cm、以下、標準と表記）に張った水道水に浮かべて 25°C に置き、孵化をほぼ毎日点検した。孵化した幼虫をプラスチックシャーレ（標準）に入れ、個体別に飼育を開始した。1 齢から 3 齢までは人工飼料シルクメイト 2S（日本農産工業、横浜）を、4 齢以降は人工飼料インセクタ LF（日本農産工業、横浜）を、それぞれ餌交換時に 1~3 g 与えた。孵化幼虫については人工飼料片の一面にピンセットで溝をつけて、溝をつけた面を下にして、孵化幼虫が人工飼料片とプラスチックシャーレの間に挟まれて溝の中に入るように置いた。餌の腐敗や乾燥、不足を防ぐため、3~5 日間隔で餌を交換した。幼虫が蛹化したら、何も入れないプラスチックシャーレ（標準）に蛹を個体別に置き、羽化を待った。新成虫の性成熟を待つため、羽化後 14 日間以上プラスチックカップ（直径 10 cm × 高さ 6 cm）中で、長さ 8 cm 程度に切断した直径 2 cm 程度のクワの生枝を餌として個体別に飼育した。その後、1 ペアずつプラスチックカップ（直径 10 cm × 高さ 6 cm）に入れて交尾、産卵させた。これらの作業を毎世代繰り返して、継代飼育した。

絶食実験

継代飼育により得られた交尾済みメス成虫 10 頭から採卵し、幼虫を孵化させた。4 齢蛹化を抑制し、5 齢蛹化する割合を高くするために、1 齢から 4 齢までは $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、短日 (12L: 12D) 条件に、5 齢脱皮直後から $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、長日 (15L:9D) 条件にそれぞれ置いた (Shintani and Ishikawa, 1998)。プラスチックシャーレ（標

準) 中で幼虫を個体別に飼育した。1 齢から 3 齢までは人工飼料シルクメイト 2S を、4 齢幼虫から終齢幼虫までは人工飼料インセクタ LF を、それぞれ 1~3 g ずつ餌交換の度に与えた。1 齢と 2 齢では 5 日ごとに、3 齢から終齢までは 3 日ごとに、それぞれ餌を交換した。孵化幼虫については、継代飼育と同じ方法でプラスチックシャーレに配置した。5 齢幼虫を対象に絶食実験を次の要領で行った。5 齢脱皮を認めた直後に 12L: 12D 条件から 15L: 9D 条件に移し、0~18 日間の給餌の後に絶食させた。給餌期間には、幼虫が自由に摂食できるようにプラスチックシャーレ (標準) に人工飼料インセクタ LF を 1~3 g ずつ 3 日ごとに与えた。絶食期間にはプラスチックシャーレ (標準) に幼虫のみを入れ、水は与えなかった。処理の簡略表示として給餌を F、絶食を S と表すこととする。F の直後に給餌日数を数字で付す。例えば、F4-S は 4 日間の給餌の後に蛹化まで絶食させたという処理を表す。5 齢幼虫の自発的な摂食終了は 5 齢脱皮後平均 13.5 日、標準偏差 2.6 日 (著者による観察) であったので、本実験の給餌期間 (最大 18 日) 内に自発的に摂食終了する個体はかなり含まれてしまうと考えられた。そこで、給餌期間中に摂食を自発的に終えた個体を解析対象から除外するため、9 日間以上給餌する処理においては 1 日または 2 日ごとに体重測定し、絶食開始時点までに 2 日連続で急激に体重を減少させた個体を解析から除外した。

処理区、対照区の個体について、4 齢後期以降の 1~2 日ごとの体重、5 齢蛹化した個体について、5 齢脱皮日、絶食開始日 (処理区のみ)、最大体重日 (以下、PW 日 ; 対照区のみ)、前蛹化した日 (以下、PP 日)、蛹化日、羽化日、5 齢初期体重、絶食直前体重 (処理区のみ)、最大体重 (以下、PW ; 対照区のみ)、蛹重、成虫体サイズを個体ごとに以下のように定義し記録した。また、Days to pupation, 5 齢日数、蛹日数を以下のように定義し算出した。ただし、一部の個体については、1~2 日ごとの体重、PP 日、羽化日、5 齢初期体重、成虫体サイ

ズの記録のうち1～5項目が測定できなかった。6齢脱皮した個体については、6齢以降の発育を記録しなかった。

<5 齢脱皮日>

すべての実験用個体のすべての齢について、1～3日ごとに明期に、脱皮の有無を確認した。脱皮後に脱ぎ捨てられた頭殻を認めるか、頭殻が発見できなくても脱皮直後のため頭殻が硬化着色不十分である状態を認めたときに脱皮が起きたと判定した。毎日の観察中に5齢脱皮を認めた場合、脱皮を認めた当日を5齢脱皮日とした。2～3日おきの観察によって5齢脱皮を認めた場合、すでに摂食により胸部が肥大し胸部表皮に艶が出ている個体については脱皮に気づいた前日を、まだ胸部が肥大しておらず表皮がざらついている個体については脱皮に気づいた当日を、それぞれ5齢脱皮日とした。

<5 齢初期体重>

1～3日ごとに体重測定を行い、4齢最終日体重と5齢初日体重のうち、値が小さい方を5齢初期体重とした。ただし、4齢最終日体重を測らなかった個体については5齢初日の体重を、5齢初日の体重を測らなかった個体については4齢最終日体重を5齢初期体重として用いた。両方を測らなかった個体については、5齢初期体重を未測定とした。

<前蛹化，蛹化>

自発的に摂食を終了した幼虫、あるいは絶食させた幼虫の腹部末端をピンセットでつまんだとき自力で頭部を持ち上げなくなった観察日を、前蛹化した日（PP日）と定義した。毎日の観察により蛹化を認めた場合、蛹を発見した当日を蛹化日とした。2～3日おきの観察により蛹化を認めた場合、蛹発見時に触角

第 1 節が不透明になっている個体については蛹発見の前日を，蛹発見時に触角第 1 節がいまだ半透明である個体については蛹発見の当日を蛹化日とした。

<前蛹日数，羽化日>

PP 日から蛹化日までを前蛹日数とした。プラスチックシャーレ（標準）に蛹を 1 個体ずつ置き，水を与えずに羽化を待った。5 齢脱皮後 40 日以内に体が黒化した個体は死亡したとみなし，5 齢脱皮後 40 日経過しても脱皮しなかった個体は 6 齢脱皮も蛹化脱皮もしなかったと記録した。蛹化後 0～2 日に蛹重を測定した。毎日の観察によって羽化を認めた場合，成虫発見の当日を羽化日とした。2～3 日おきの観察によって羽化を認めた場合，発見時に新成虫の鞘翅の斑紋が薄い黄色になっている個体については成虫発見前日を，斑紋がいまだ白い個体については成虫発見当日を，それぞれ羽化日とした。

<体サイズ，ピークウェイト>

成虫の体サイズ指標として，最大体幅すなわち鞘翅 2 枚の最大幅をノギスで測定した。対照区は 5 齢脱皮を確認した直後に 12L:12D 条件から 15L:9D 条件に移し，餌を与え続けた。対照区の幼虫について，体重の測定値が最大（ピークウェイト，以下 PW）になった日を PW 日と定義した。対照区では，処理区で記録を取った項目に加えて PW と PW 日を記録した。ただし，一部の個体については，1～2 日ごとの体重，PW，PW 日，羽化日，5 齢初期体重のうち 1～5 項目が測定できなかった。

<Days to pupation>

処理区については絶食開始日から蛹化日までの日数を，対照区については PW 日から蛹化日までの日数を，いずれも Days to pupation（以下，DTP）と定義した。Shafiei et al. (2001)，Shintani et al. (2003) は DTP に相当するデータを示し

ている。また、Munyiri et al. (2003), Sato and Suzuki (2001) は DTP という指標を用いず、終齢脱皮から絶食開始までの日数と終齢日数を示している。本研究ではこの 2 つの研究を引用する場合、終齢日数から絶食開始までの日数を差し引いた期間を DTP とみなした。5 齢脱皮日から蛹化日までを 5 齢日数、蛹化日から羽化日までを蛹日数と定義した。蛹化不全、羽化不全となった個体については、蛹日数をデータ無しとした。

再給餌実験

採卵、幼虫の飼育、脱皮の観察、体重の測定は、絶食実験におけるそれらと同様に行った。5 齢脱皮直後から一旦給餌した後に絶食させ、その後再び餌を与える処理（再給餌実験）を行った。4 日間あるいは 10 日間の給餌の後に 1~6 日間の絶食を経て再給餌した。処理の簡略表示として、給餌日数を初めの F の後に、絶食日数を S の後に、再給餌を 2 番目の F として、それぞれ表すこととする。例えば、F10-S2-F は 10 日間の給餌の後に 2 日間の絶食を経て蛹化まで再給餌した処理を表す。摂食を自発的に終えた個体を実験対象から除外するため、絶食開始までに 2 日連続で急激に体重を減少させた個体を解析から除外した。また、3 日おきに体重測定した個体は実験に用いなかった。4 日間、10 日間の給餌後の絶食実験以外に、少数の個体については、8 日間、9 日間、11 日間、12 日間、15 日間の給餌の後に 1~4 日間の絶食を経て再給餌した。絶食実験における処理区と同様に 4 齢後期以降の 1~2 日ごとの体重、5 齢脱皮日、絶食開始日、PP 日、蛹化日、羽化日、5 齢初期体重、絶食直前体重、蛹重に加え、再給餌の当日及び翌日の体重を記録した。処理区については絶食開始日から蛹化日までの日数を DTP と定義した。5 齢脱皮日から蛹化日までを 5 齢日数、蛹化日から羽化日までを蛹日数と定義した。蛹化不全、羽化不全になった個体については、

蛹日数をデータ無しとした。

糖の投与実験

採卵，幼虫の飼育，脱皮の観察，体重の測定は，絶食実験におけるそれらと同様に行った。5 齢脱皮直後から 3 日間または 4 日間人工飼料インセクタ LF を 1~3 g 給餌した後に，8%グルコースを含む 2%アガロース片，8%トレハロースを含む 2%アガロース片のどちらかを，1~3 g ずつ給餌し，毎日新しいものに交換した。対照区は糖を含まない 2%アガロース片を 1~3 g ずつ毎日給餌した。処理区と対照区のそれぞれについて 4 齢後期以降の 1~2 日ごとの体重，5 齢脱皮日，処理開始日，蛹化日，羽化日，5 齢初期体重，処理開始前体重，蛹重をそれぞれ記録した。処理開始日から蛹化日までの日数を DTP と定義した。5 齢脱皮日から蛹化日までを 5 齢日数，蛹化日から羽化日までを蛹日数と定義した。蛹化不全，羽化不全になった個体については，蛹日数をデータ無しとした。

統計処理

すべての統計処理に，R (R Core Team, 2014) を用い，必要に応じて R コマンダー (Fox, 2005) を用いた。分散分析で 3 つ以上の群間に平均値の有意差が認められた場合，続いて Tukey test による多重比較を行った。相関の有無についてはピアソンの積率相関を求め，t 検定した。

3-3. 結果

絶食実験

給餌日数と DTP の関係を調べるため，0~18 日間の給餌の後に絶食させた (図 3-1)。給餌日数別の 5 齢蛹化率を図 3-2 に示す。この図では，6 齢脱皮した個体，

5 齢のまま死亡した個体，観察期間内に脱皮しなかった個体を「5 齢蛹化せず」としてまとめた．また，後述の理由により給餌日数が 6 日間以上の個体を L 群としてまとめた．給餌日数 0 日（図 3-2 では F0-S）以外の処理では 69%以上が 5 齢蛹化し，給餌日数 0 日の処理では 58%の個体が 5 齢蛹化した．従って，5 齢脱皮以降の成長が蛹化能力を変化させることはないと考えられた．

5 齢蛹化した個体について給餌日数と DTP の関係を図 3-3A に示した．データ点の分布は 2 つのグループから成るように見えた．すなわち，給餌日数の小さいグループでは給餌日数と DTP の間に負の相関があるように見え，給餌日数の大きいグループでは相関がないように見えた．そこで，R パッケージの segmented (Muggeo, 2003) を用いて，連結された 2 本の回帰直線という前提を置いて回帰分析を行った．回帰直線の変化点は 5.9 日目（95%信頼区間：4.9～6.8）であると推定された．まず，給餌日数が 0～5 日間のグループ（以下，E 群とする：early group）については有意な負の相関が認められた（adjusted $r^2 = 0.36$, $p < 0.001$, $n = 111$, $Y = -1.3X + 20$ ）．つまり E 群については，5 齢脱皮直後からまったく給餌しなければ期待値 20 日後に 5 齢蛹化し，5 齢 5 日目までは遅くに絶食を開始するほど DTP が短くなり，5 齢 5 日目に絶食を開始すると期待値 14 日後に 5 齢蛹化するというモデルが得られた．一方，給餌日数が 6～18 日間のグループ（以下，L 群とする：late group）については，有意な相関が認められなかった（adjusted $r^2 = 0.00056$, $p = 0.47$, $n = 85$, $Y = -0.043X + 13$ ）．つまり L 群では，給餌日数に関わらず，絶食させると期待値 13 日後に 5 齢蛹化するというモデルが得られた．また，対照区，つまり自由摂食条件のグループ（以下，F 群とする：fed group）では，DTP と PW 日までの 5 齢日数の間に有意な相関が認められなかった（adjusted $r^2 = 0.0078$, $p = 0.27$, $n = 33$, $Y = -0.14X + 14$ ）（図 3-3B）．

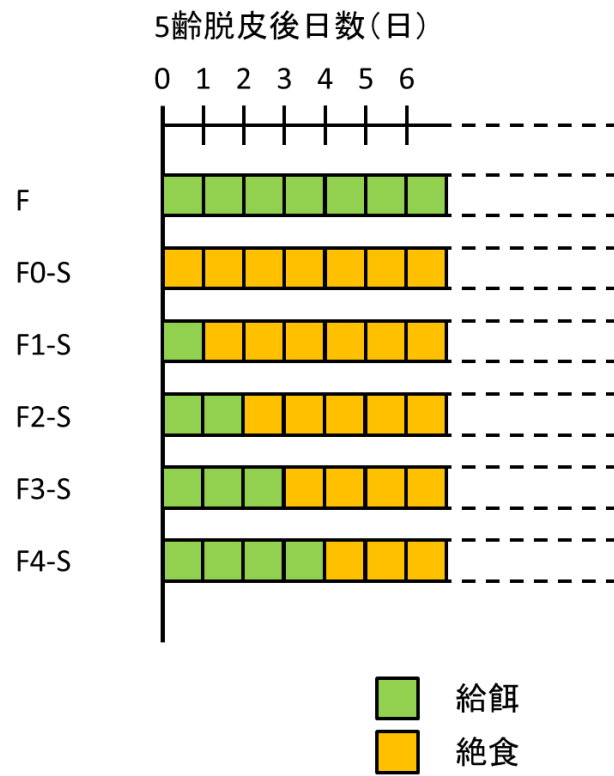


図 3-1. 絶食処理の模式図. 縦軸に餌条件の略称を, 横軸に 5 齡脱皮後日数を示す. 絶食実験では F0-S~F18-S まで用意した.

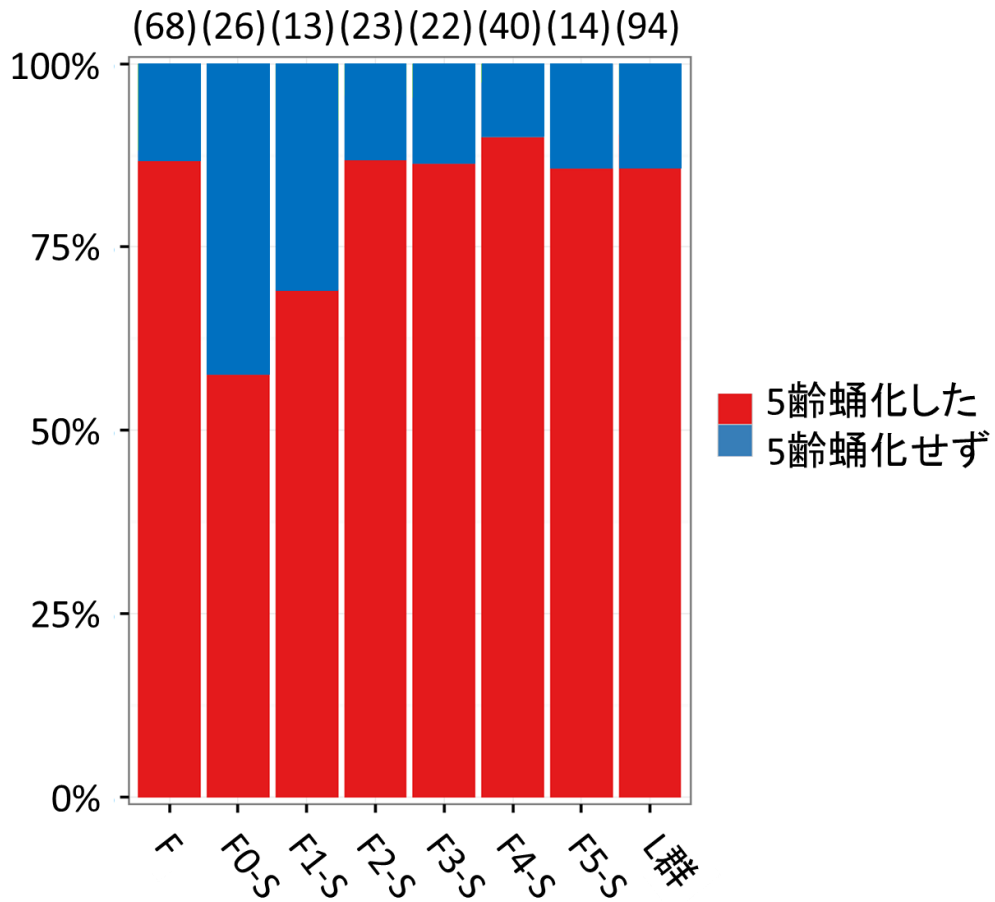


図 3-2. 絶食実験における 5 齢幼虫の発育運命. 5 齢幼虫の発育運命を 5 齢蛹化した個体としなかった個体の割合として示す. 「5 齢蛹化せず」には 6 齢脱皮した個体, 5 齢で死亡した個体, 観察期間内に脱皮しなかった個体が含まれる. 給餌日数が 6 日間以上の個体 (F6-S~F18-S) は L 群としてまとめてある. 括弧内の数字はサンプル数を示す.

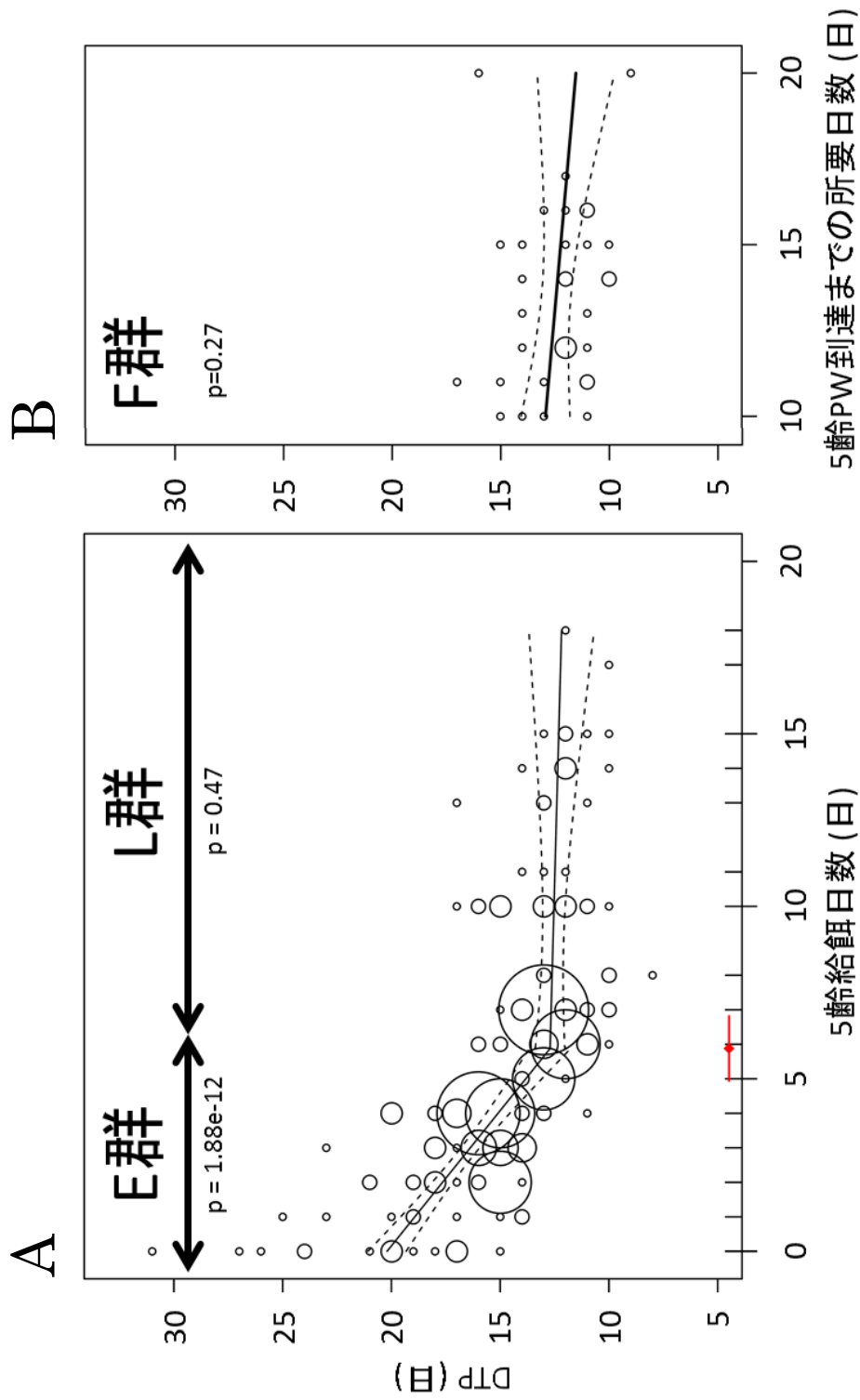


図 3-3. 5 齢給餌日数と DTP の関係. A. F0-S~F18-S 幼虫の DTP を示した. 回歸直線の変化点を境に, F0-S~F5-S を E 群, F6-S~F18-S を L 群と呼ぶ. 赤ひし形は回歸直線の変化点を, 赤線は変化点の 95%信頼区間を示す. B. 給餌し続けたグループ (F 群) の DTP を示した. 円のサイズはサンプルサイズを示す ($n = 1 \sim 13$). 直線は回歸直線を, 点線は 95%信頼区間の上限と下限を示す.

F 群, E 群, L 群の間で, 5 齢初期体重, 5 齢日数, 蛹重, 蛹日数を比較した (表 3-1). 5 齢初期体重に有意差は認められなかった (ANOVA, $F = 1.45$, $p > 0.05$). 5 齢日数は 3 つのグループの間に有意差が認められた (ANOVA, $F = 88.22$, $p < 0.05$). 5 齢日数の平均は, F 群が最も長く E 群が最も短かった (Tukey test, $p < 0.05$). 蛹重についても 3 つのグループの間に有意差が認められ (ANOVA, $F = 62.25$, $p < 0.05$), 5 齢日数の場合と同じく, F 群が最も重く E 群が最も軽かった (Tukey test, $p < 0.05$). 蛹日数に有意差は認められなかった (ANOVA, $F = 3.37$, $p > 0.05$).

F 群及び L 群と E 群との DTP の差が前蛹化の前後どちらの発育過程で生じているのかを検討するため, DTP を前蛹化日 (PP 日) の前後に分割し, 各期間に要した日数を求めた (表 3-2). PW 日もしくは絶食開始日から PP 日までの日数には, F 群と L 群との間に有意な差が認められなかった (ANOVA, $F = 39.48$, $p > 0.05$). 一方で, L 群と E 群, F 群と E 群の間では有意に異なっていた (Tukey test, $p < 0.05$). 前蛹日数については, F 群, E 群, L 群の間に有意な差が認められなかった (ANOVA, $F = 2.30$, $p > 0.05$). よって, F 群及び L 群のそれぞれと E 群との間に生じた DTP の差は, 主に絶食開始日から PP 日までの発育に由来していた.

E 群と L 群に見られた給餌日数と DTP のトレンドに体サイズが影響しているかどうかを調べるため, 図 3-3A に用いたデータを 5 齢初期体重により 50 mg ごとに 4 区画 (200 mg~399 mg) に分けて, 各区について E 群と L 群における給餌日数に対する DTP の回帰直線とその 95% 信頼区間をそれぞれ求めた. その結果, いずれの区においても, E 群では給餌日数が増加するにつれ DTP が減少し, L 群では給餌日数にかかわらず DTP が一定で, 図 3-3A と同様の傾向が見られた (図 3-4). 次に, 図 3-3A に用いたデータを絶食直前体重により 100 mg ずつ 6 区画 (200 mg~799 mg) に分けて, 各区について E 群と L 群における給餌日数

に対する DTP の回帰直線とその 95%信頼区間をそれぞれ求めた。その結果、いずれの区においても、E 群では給餌日数が増加するにつれ DTP が減少し、L 群では給餌日数にかかわらず DTP が一定で、図 3-3A と同様の傾向が見られた(図 3-5)。よって、E 群と L 群に見られた DTP トレンドに体サイズは影響しないと考えられる。

F 群、E 群、L 群及び野外で採集された成虫について、体幅値を指標として体サイズを比較した(図 3-6)。野外では体サイズの個体変異がとて大きく、F 群、E 群、L 群の体サイズ値の範囲はいずれも野外個体群の体サイズ値の範囲内にあった。体サイズの有意差は、E 群と野外採集個体群の間に認められた。F 群の中央値と野外採集個体群の中央値はとて近かった。これらの結果は、F 群が野外と比べて遜色ない成長をしたこと、E 群、L 群の体サイズは野外の小型成虫の体サイズに相当することを示している。

表 3 - 1. 絶食実験における 5 齢初期体重, 5 齢日数, 蛹重, 蛹日数の処理間比較

	5 齢初期体重 (mg)		5 齢日数 (日)		蛹重 (mg)		蛹日数 (日)	
	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n
F 群	333.7 ^a (69.2)	39	26.0 ^c (3.2)	59	427.7 ^c (114.8)	59	12.2 ^a (0.6)	26
E 群	330.8 ^a (67.7)	28	19.4 ^a (2.7)	111	257.1 ^a (80.8)	111	11.7 ^a (0.9)	23
L 群	305.0 ^a (94.3)	36	21.5 ^b (3.5)	85	306.9 ^b (97.5)	85	11.7 ^a (0.8)	26

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p > 0.05$) .

表 3-2. 絶食実験におけるピークウェイト日 (PW 日) もしくは絶食日から前蛹化日 (PP 日) までの日数と, 前蛹日数

	PW 日, 絶食日から PP 日までの日数 (日)		前蛹日数 (日)	
	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n
F 群	12.4 ^a (1.9)	33	4.4 ^a (0.9)	33
E 群	16.6 ^b (3.3)	111	4.8 ^a (0.9)	25
L 群	12.6 ^a (1.7)	85	4.4 ^a (0.8)	34

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p > 0.05$) .

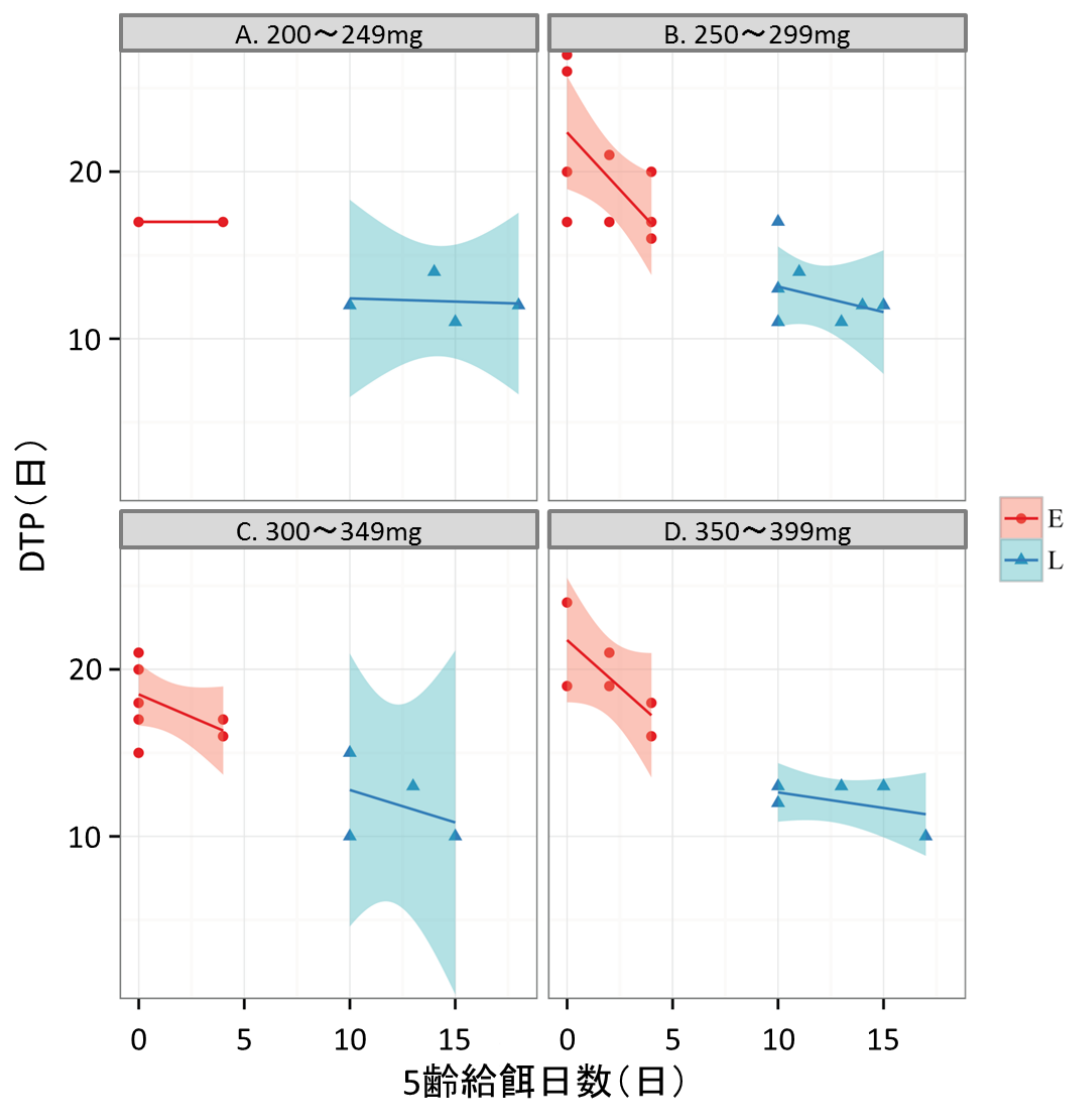


図 3-4. 5 齢初期体重別にみた給餌日数と DTP の関係. パネルの見出しには 5 齢初期体重グループを示す. A~D は 5 齢初期体重がそれぞれ 200~249 mg, 250~299 mg, 300~349 mg, 350~399 mg の幼虫を含む. 赤線, 赤部分はそれぞれ E 群の回帰直線と 95%信頼区間を, 青線, 青部分はそれぞれ L 群の回帰直線と 95%信頼区間を示す.

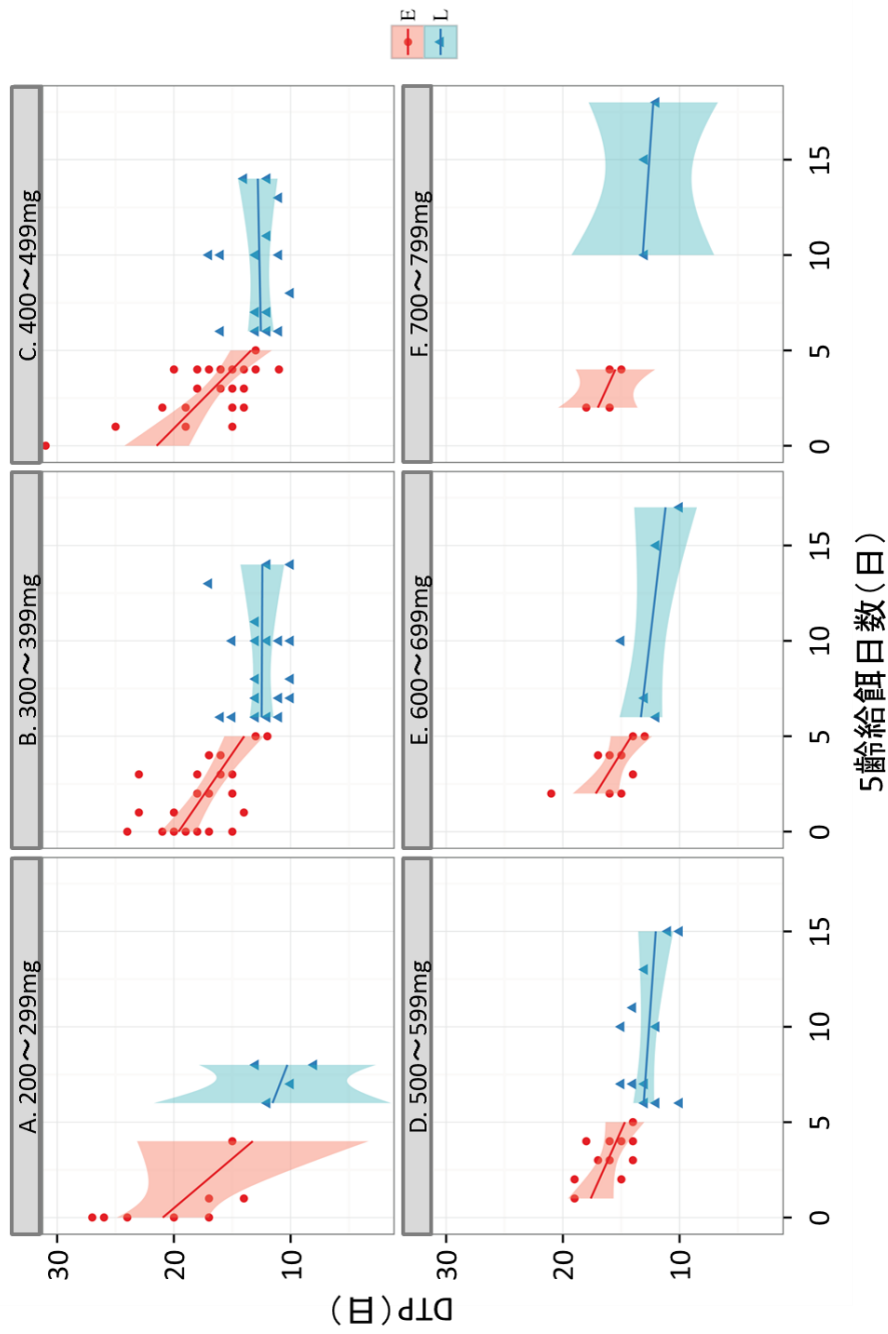


図3-5. 絶食直前体重別にみた5齢給餌日数とDTPの関係. パネルの見出しには絶食直前体重グループを示す. A~Fは絶食直前体重がそれぞれ200~299mg, 300~399mg, 400~499mg, 500~599mg, 600~699mg, 700~799mgの幼虫を含む. 赤線, 赤線, 赤部分はそれぞれE群の回帰直線と95%信頼区間を, 青線, 青部分はそれぞれL群の回帰直線と95%信頼区間を示す.

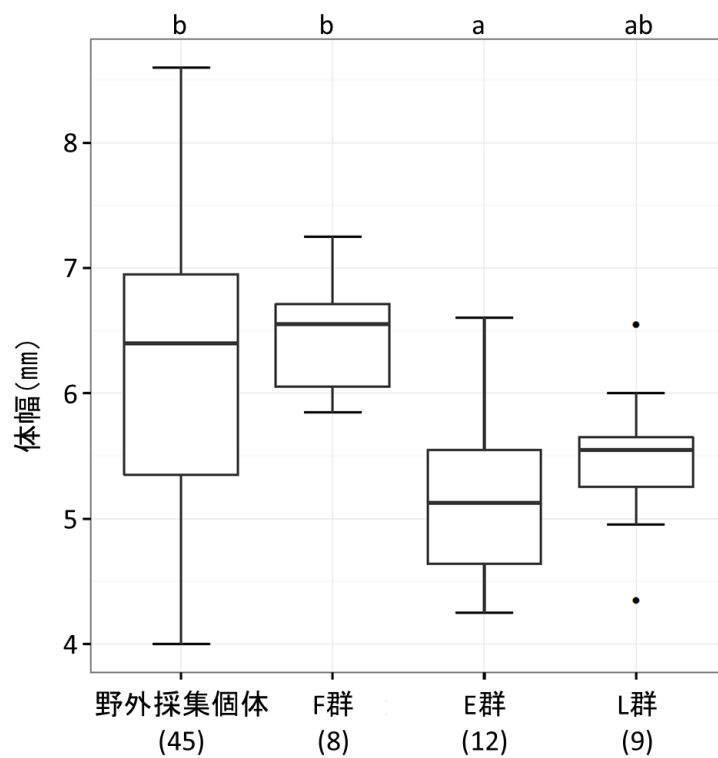


図 3-6. 飼育個体と野外採集個体における成虫体サイズ. 両鞘翅の最大幅を体幅とした. アルファベットが同じグループどうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p > 0.05$).

再給餌実験

<F10の再給餌実験>

絶食による蛹化運命の決定に必要な絶食日数を調べるために、5 齢脱皮後 10 日間給餌した幼虫 (F10) を 1~4 日間の絶食 (S1~S4) に置いた後に、再給餌した (図 3-7)。処理間で絶食直前体重に有意な差は認められなかった (表 3-3)。すべての処理で 5 齢蛹化率は 75%以上だった。

5 齢蛹化した個体のデータを用いて以下の解析を行った。5 齢初期体重に処理間で有意な差は認められなかった (表 3-4)。絶食により蛹化運命が決定された個体は、再び給餌されてももはや摂食しないと予想した。そこで、再給餌後に摂食した個体と摂食しなかった個体を区別するため、再給餌開始時に比べて再給餌翌日に体重が増加したグループ (以下、WI 群とする : weight increase group) と減少したグループ (以下、WD 群とする : weight decrease group) に分けた。絶食日数の差異を考慮しない場合、WI 群の DTP 平均値は WD 群のそれより有意に大きかった (WI 群 : mean = 18.7, SD = 2.7, n = 20 ; WD 群 : mean = 14.4, SD = 2.3, n = 25 : ANOVA, F = 33.78, p < 0.001) (図 3-8)。絶食 3 日間処理 (F10-S3-F) に限っても、WI 群と WD 群の DTP 平均値には有意差が認められた (図 3-8, WI 群 : mean = 19.0, SD = 1.6, n = 6 ; WD 群 : mean = 14.6, SD = 2.7, n = 14 : ANOVA, F = 13.55, p < 0.01)。WD 群の DTP 平均値は、絶食実験における F10-S の DTP 平均値とは有意に異なっていなかった (WD 群 : mean = 14.4, SD = 2.3, n = 25 ; F10-S : mean = 13.4, SD = 2.1, n = 15 ; ANOVA, F = 1.73, p = 0.196)。WD 群と F10-S の DTP 平均値が近かったことは、絶食によって蛹化運命が決定された個体は再び給餌されてももはや摂食はしないという予想を支持する。ゆえに以後 WD 群を絶食によって蛹化運命が決定されたものとみなすことにする。WD 群とは対照的に、WI 群と F10-S における DTP 平均には有意な差が見られた

(WI 群 : mean = 18.7, SD = 2.7, n = 20 ; F10-S : mean = 13.4, SD = 2.1, n = 15 ; ANOVA, $F = 39.34$, $p > 0.001$). よって WI 群では絶食によって蛹化運命がまだ決定していなかったと考えられる.

図 3-8 のデータについて, F10 に続く絶食 1~4 日処理 (F10-S1-F~F10-S4-F) における WI 群と WD 群の割合を図 3-9 に示した. 1 日間の絶食では WD 群は認められなかった. 2 日間の絶食では 17%, 3 日間の絶食では 70%の個体がそれぞれ WD 群に含まれた. 4 日間の絶食ではすべての個体が WD 群に含まれた. これらのことから, 絶食によって 50%の個体について蛹化運命が決定されるための絶食日数は約 2.8 日であると推測される. 絶食日数 (1~4 日) による蛹日数に有意な差は認められなかった (表 3-4). F10-S1-F, F10-S2-F では再摂食する個体が多かったので, 蛹重は F 群と同等のサイズまで達した (表 3-4). F10-S3-F, F10-S4-F は再摂食しない個体が多かったので, 蛹重は F 群より小さかった (表 3-4).

供試した個体数は少なかったが, 10F 以外の L 群として 5 齢脱皮後から 8, 9, 11, 12, 15 日間給餌した幼虫に再給餌処理を施した (図 3-10). 給餌日数にかかわらず 2 日間の絶食では 1 個体中 0 個体, 3 日間の絶食では 5 個体中 2 個体がそれぞれ WD 群に, 4 日間の絶食で 3 個体すべてが WD 群に含まれた. これらの結果から, 50%及び 100%の個体が WD 群になるために必要な絶食日数は, それぞれ約 2.8 日, 4 日と考えられ, F10 の再給餌実験の結果と一致した.

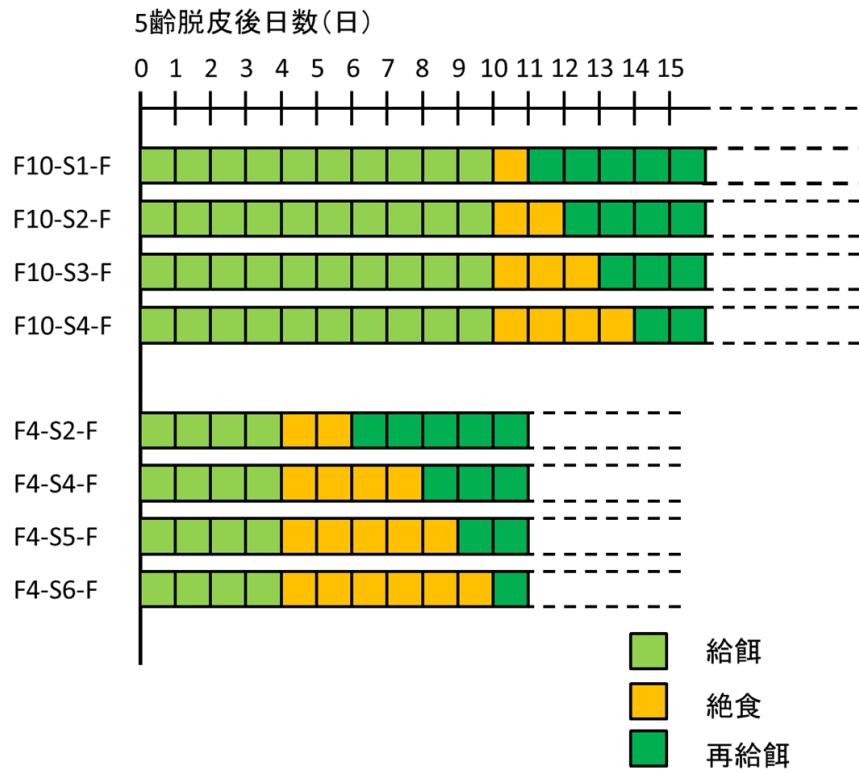


図 3-7. 再給餌処理の模式図. 縦軸に餌操作の略称を, 横軸に 5 齡脱皮後日数と餌操作を示す.

表 3-3. F10 再給餌処理個体の絶食直前日の体重と 5 齢蛹化率

処理	F10 絶食直前体重 (mg)		5 齢蛹化率	
	平均 (標準偏差)	n	%	n
F10-S1-F	530.2 ^a (164.4)	9	81.8	11
F10-S2-F	568.0 ^a (160.3)	6	75	8
F10-S3-F	472.1 ^a (125.3)	20	100	20
F10-S4-F	610.8 ^a (135.8)	10	100	10

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p > 0.05$) .

表 3 - 4. F10 再給餌処理個体の 5 齢初期体重, 蛹重, 蛹日数の処理間比較

処理	5 齢初期体重 (mg)		WI 群蛹重 (mg)		WD 群蛹重 (mg)		蛹日数 (日)	
	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n
F10-S1-F	322.1 ^a (80.3)	11	411.3 ^a (122.5)	9	- (-)	0	11.7 ^a (0.7)	9
F10-S2-F	320.8 ^a (97.0)	8	512.4 ^a (114.4)	5	249.0 ^a (-)	1	11.3 ^a (1.2)	6
F10-S3-F	305.1 ^a (76.0)	19	364.2 ^a (120.5)	6	292.7 ^a (95.3)	14	11.7 ^a (0.9)	20
F10-S4-F	356.4 ^a (111.0)	10	- (-)	0	387.9 ^a (102.7)	10	12.2 ^a (0.8)	10

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, p>0.05) .

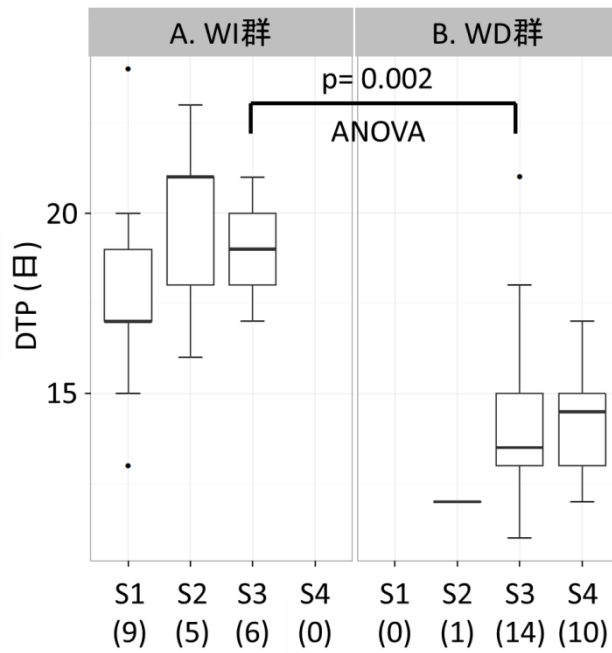


図 3-8. F10 再給餌処理における絶食日数が DTP に与える影響. S1, S2, S3, S4 は絶食処理, 括弧内の数字はサンプル数を示す. WI 群 (A), WD 群 (B) はそれぞれ再給餌翌日に体重が増えたグループ, 減ったグループを示す. S3 について, WI 群と WD 群の DTP には有意差が認められた.

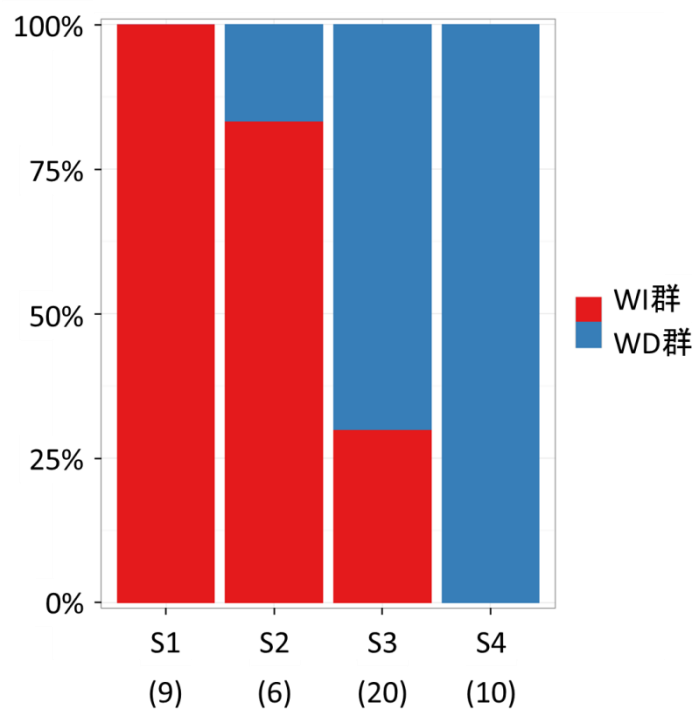


図 3-9. F10 再給餌処理における絶食日数が WI 群と WD 群の割合に与える影響。S1, S2, S3, S4 は絶食処理を，括弧内の数字はサンプル数を，それぞれ示す。WI 群，WD 群はそれぞれ再給餌翌日に体重が増えたグループ，減ったグループを示す。

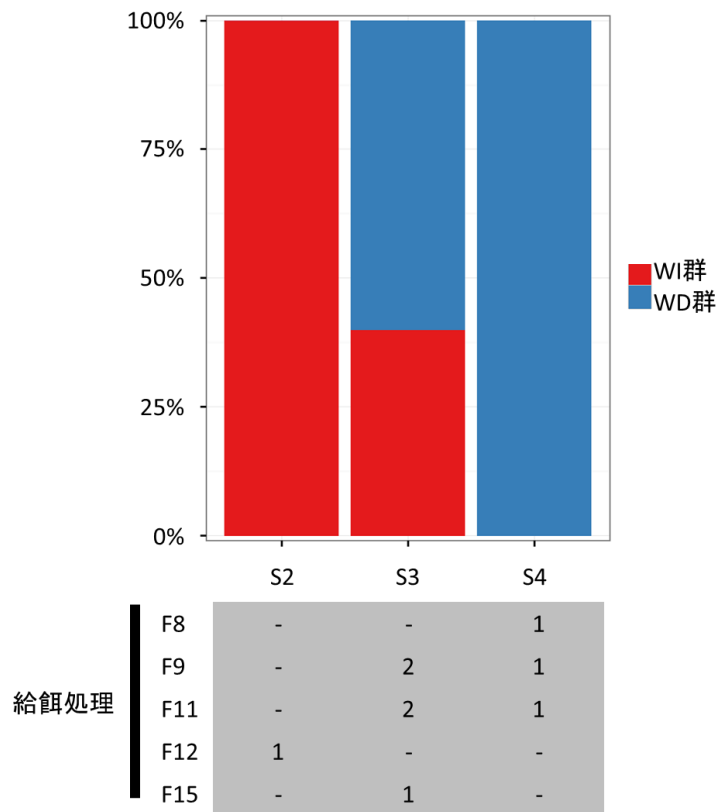


図3-10. L群再給餌処理における絶食日数がWI群とWD群の割合に与える影響. WI群, WD群はそれぞれ再給餌後に体重が増えたグループ, 減ったグループを示す. サンプル数を灰色部分に示した. 縦軸は給餌処理, S2, S3, S4は絶食処理を示す.

<F4 の再給餌実験>

E 群における蛹化運命の決定に必要な絶食日数を調べるため、5 齢脱皮後から 4 日間給餌した幼虫 (F4) を 2, 4, 5, 6 日間絶食 (S2, S4, S5, S6) させ、その後、再給餌した (図 3-7)。絶食開始直前体重に処理間に有意な差は認められず (表 3-5)、すべての観察個体が 5 齢蛹化した (表 3-5)。観察個体を WI 群と WD 群に分けた。絶食日数の違いを考慮せずに比較すると、WI 群の DTP 平均値が WD 群のそれより有意に長かった (WI 群 : mean = 22.4, SD = 3.5, n = 13 ; WD 群 : mean = 16.1, SD = 0.8, n = 8 ; ANOVA, F = 24.59, p < 0.001) (図 3-11)。WD 群と再給餌しない F4-S の DTP 平均値には有意差が認められなかった (WD 群 : mean = 16.1, SD = 0.8, n = 8 ; F4-S : mean = 15.9, SD = 1.9, n = 36 ; ANOVA, F = 0.153, p = 0.698)。このことは、WD 群が F4-S と同じタイミングで蛹化運命を決定したことを示唆する。

図 3-11 のデータについて、F4 に続く絶食日数 2, 4, 5, 6 日の処理 (F4-S2-F, F4-S4-F, F4-S5-F, F4-S6-F) における WI 群と WD 群の割合を図 3-12 に示した。2 日間、4 日間の絶食日数では WD 群の個体は認められなかった。5 日間絶食すると、3 個体中 1 個体が WD 群に含まれ、6 日間絶食すると 7 個体すべてが WD 群に含まれた。つまり、100%の個体が WD 群になるための絶食日数は 6 日間であり、F10 の再給餌実験と比べて 2 日長かった。また、50%の個体が WD 群になるための絶食日数は約 5.3 日と推測され、F10 の再給餌実験と比べて約 3 日長かった。処理間で 5 齢初期体重、蛹日数と蛹重に有意な差が認められなかった (表 3-6)。

表 3 - 5. F4 再給餌処理個体の絶食直前体重と 5 齢蛹化率

処理	F4 絶食直前体重 (mg)		5 齢蛹化率	
	平均 (標準偏差)	n	%	n
F4-S2-F	477.4 ^a (132.0)	10	100	10
F4-S4-F	450.0 ^a (-)	1	100	1
F4-S5-F	464.7 ^a (104.4)	3	100	3
F4-S6-F	496.6 ^a (75.9)	7	100	7

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p > 0.05$) .

表3-6. F4 再給餌処理個体の初期体重, 蛹重, 蛹日数の処理間比較

処理	5 齢初期体重 (mg)		WI 群蛹重 (mg)		WD 群蛹重 (mg)		蛹日数 (日)	
	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n	平均 (標準偏差)	n
F4-S2-F	351.8 ^a (102.0)	10	389.3 ^a (147.9)	10	- (-)	0	11.7 ^a (0.8)	10
F4-S4-F	358.0 ^a (-)	1	454.0 ^a (-)	1	- (-)	0	13.0 ^a (-)	1
F4-S5-F	306.5 ^a (29.0)	2	374.0 ^a (91.9)	2	201.0 ^a (-)	1	11.3 ^a (1.2)	3
F4-S6-F	373.1 ^a (56.7)	7	- (-)	0	303.0 ^a (53.0)	7	11.4 ^a (0.5)	7

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, p>0.05) .

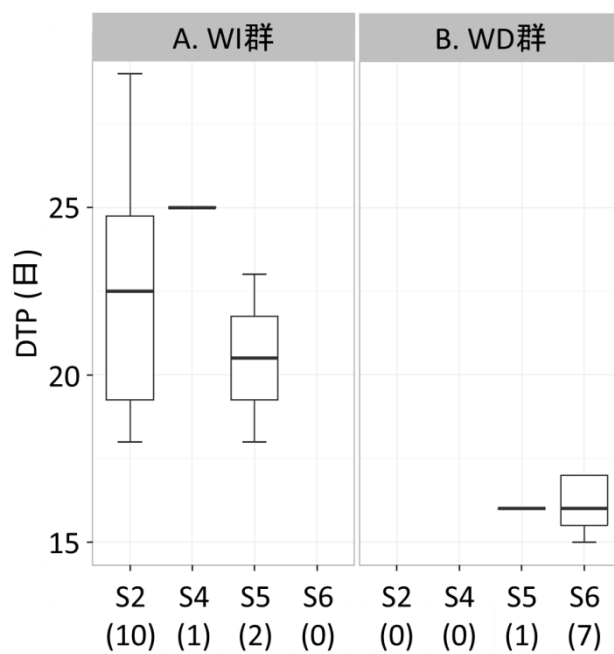


図 3-11. F4 再給餌処理における絶食日数と DTP の関係. WI 群 (A), WD (B) 群はそれぞれ再給餌翌日に体重が増えたグループ, 減ったグループを示す. S1, S2, S3, S4 は絶食処理, 括弧内の数字はサンプル数を示す.

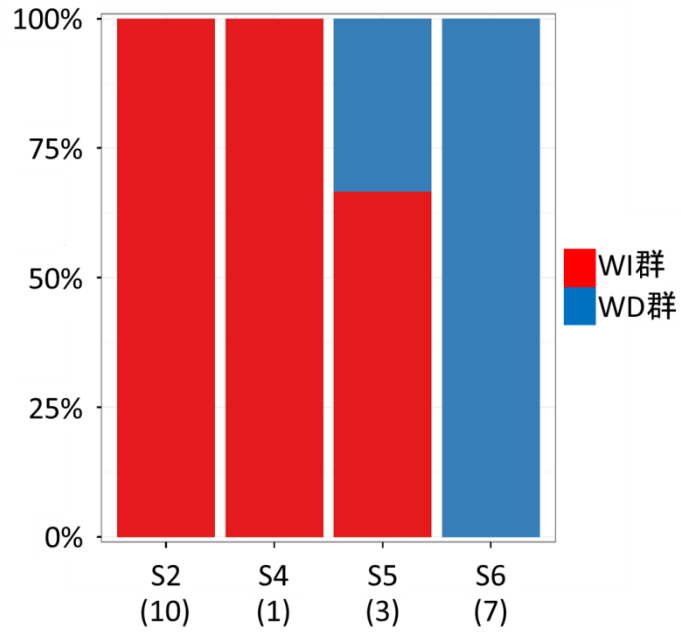


図 3-12. F4 再給餌処理における絶食日数が WI 群, WD 群の割合に与える影響. WI 群, WD 群はそれぞれ再給餌翌日に体重が増えたグループ, 減ったグループを示す. S1, S2, S3, S4 は絶食処理, 括弧内の数字はサンプル数を示す.

糖の投与実験

トレハロースとグルコースの摂取が絶食による蛹化運命の決定タイミングに与える影響を検討するために、5 齢脱皮後 3 日間または 4 日間給餌した後に、アガロース片（対照区）、8%グルコースを含むアガロース片、8%トレハロースを含むアガロース片のいずれかを給餌した。処理開始前体重には処理間で有意な差は認められなかった（表 3-7）。対照区、グルコース処理区、トレハロース処理区のいずれについても、与えられた餌を幼虫が摂食していることを目視により確かめた。すべての区で 5 齢蛹化の割合は 100%だった。本実験では糖を与えてから蛹化するまでの日数を DTP とした。対照区の DTP 平均値（16.0）はグルコース処理区とトレハロース処理区のそれぞれの DTP 平均値（20.3 と 21.2）よりも有意に短かった（図 3-13）（Tukey test, $p < 0.05$ ）。対照区の DTP 平均値は再給餌しなかった F4-S の DTP 平均値（15.9）と有意な差が認められなかった（ANOVA, $F = 0.045$, $p = 0.834$ ）。このことから、対照区では F4-S と同じタイミングで絶食による蛹化運命の決定がなされたと考えられる。以上をまとめると、糖を含まない対照区では絶食処理した場合と同じタイミングで蛹化運命が決定された一方で、グルコース処理区及びトレハロース処理区のそれぞれでは絶食による蛹化運命が起こらなかったと言える。処理間で蛹重と蛹日数に有意な差は認められなかった（表 2-7）。

表3-7. 糖処理実験における処理開始前体重, 蛹重, 蛹期間の処理間比較

処理	処理開始前体重 (mg)		蛹重 (mg)		蛹日数 (日)	
	平均(標準偏差)	n	平均(標準偏差)	n	平均(標準偏差)	n
対照区	492.5 ^a (106.6)	11	290.8 ^a (67.5)	11	11.5 ^a (1.6)	11
グルコース	509.0 ^a (146.5)	12	364.8 ^a (97.7)	12	11.8 ^a (1.0)	6
トレハロース	447.6 ^a (155.9)	13	307.4 ^a (104.4)	13	13.1 ^a (1.3)	9

同一カラム内で上付きアルファベットが同じ数値どうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p>0.05$) .

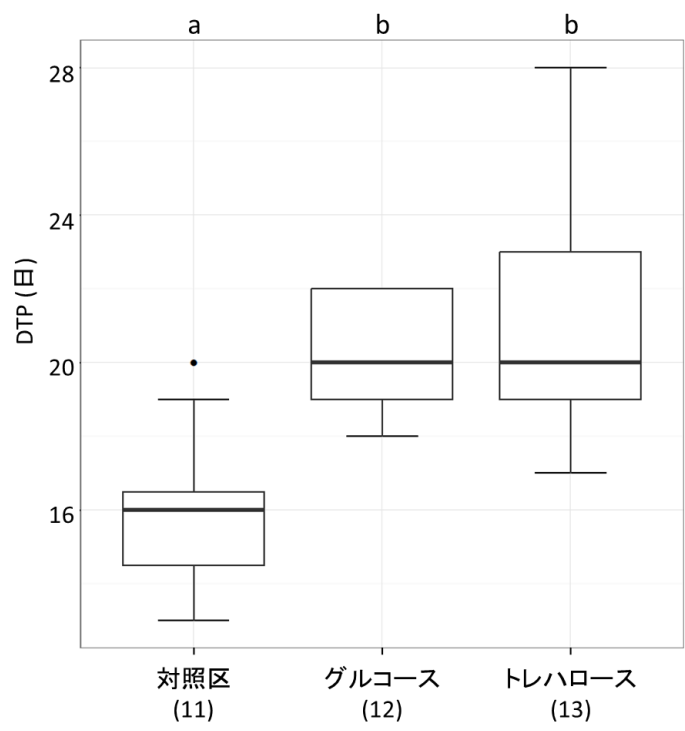


図 3-13. 糖の摂取が DTP に及ぼす影響. 括弧内の数字はサンプル数を示す. アルファベットが同じグループどうしには有意な差が認められなかった (Tukey test, $p > 0.05$).

3-4. 考察

SIP は、終齢幼虫を絶食させると体サイズや絶食開始タイミングにかかわらず一定時間後に蛹化が起きるという実験結果によって特徴づけられ、エンマコガネ、オオキノコムシ、マメハンミョウにおいて知られている (Shafiei et al., 2001; Sato and Suzuki, 2001; Terao et al., 2015). Shintani et al. (2003) は、キボシカミキリ幼虫を 5 齢脱皮直後から絶食すると自由摂食条件下におけるよりも早く蛹化することを報告した。しかし、本種の 5 齢幼虫をさまざまなタイミングで絶食させても DTP が一定であるかどうかは確かめられておらず、キボシカミキリの終齢幼虫で観察された絶食による早期蛹化が SIP であることは確かめられていなかった。また、絶食が蛹化を引き起こす点では同じであるが、エンマコガネとオオキノコムシは終齢に脱皮して日が浅いうちに絶食させると蛹化できず死ぬ (Shafiei et al., 2001; Sato and Suzuki, 2001) のに対し、マメハンミョウでは終齢脱皮直後から絶食させても SIP が起きる (Terao et al., 2015)。もし、キボシカミキリの 5 齢幼虫に SIP があるとすれば、5 齢脱皮後の摂食を全くせずに絶食しても蛹化できる (Shintani et al., 2003) という点でマメハンミョウの SIP に似ていると本研究の開始時点で予想できた。本研究開始時点で想定された最も単純な結果は、キボシカミキリ 5 齢においても、マメハンミョウと同様、絶食タイミングに一切関わらず DTP が一定になるというものであった。しかし、本研究の結果はそのように単純ではなかった。以下、キボシカミキリ 5 齢幼虫の蛹化の制御に関する本研究の結果を他種昆虫と照らして考察し、その後にキボシカミキリに関する先行研究の知見と本研究で得られた結果を比較して議論することにする。

2つのフェーズと SIP

5 齢脱皮後 0~5 日目 (以下, early フェーズと呼ぶ) の幼虫については、早く絶食開始させるほど DTP は長かった。5 齢脱皮後 6 日目以降 (以下, late フェー

ズと呼ぶ)の幼虫については、給餌日数にかかわらず DTP は一定だった。このように、キボシカミキリの 5 齢終齢の摂食フェーズは、幼虫の絶食応答により 2 つのフェーズに分けられる。early フェーズに絶食開始した場合と late フェーズに絶食開始した場合を比べると、前蛹日数には有意差は認められなかったが、絶食開始日から PP 日までの日数には有意差が認められた。従って、early フェーズと late フェーズの DTP の差は絶食から PP 日までの期間に由来する。以下、early フェーズと late フェーズにおける蛹化運命の決定タイミングをそれぞれ考察する (図 3-14)。

late フェーズでは、絶食タイミングにかかわらず DTP が一定になった。これは late フェーズのキボシカミキリでは SIP が生じることを示している。late フェーズにおける再給餌実験の結果、SIP 運命の決定には 2.8 日間の絶食が必要であると考えられた。late フェーズに入った幼虫は、すでに変態の準備が一定段階まで完了しており、2.8 日間の絶食がキューとなって SIP の引き金が引かれると考えられる。

一方、early フェーズでは絶食開始が遅いほど DTP が短くなり、5 齢脱皮直後と比べて 6 日間で DTP は約 7 日短くなった。つまり、DTP が 1 日あたり約 1 日短くなり、6 日目に late フェーズに入ったことになる。このことから、early フェーズが終わるまで、すなわち絶食開始日から 5 齢脱皮後 6 日目 (DTP 期待値の変化点) までは SIP 運命決定が可能となるまでの「待ち時間」であると考えられる。

5 齢脱皮後 6 日目以降に SIP 運命決定が可能になるとする前提を置けば、E 群に対する再給餌実験の結果を次のように説明できる。5 齢脱皮から 4 日間給餌して絶食する場合 (4F-S)、変化点までの 2 日間が「待ち時間」と想定される。4 日間の給餌後に絶食させた実験では SIP 運命決定に必要な絶食日数の期待値は 5.3 日間だった。この日数は late フェーズについて求めた SIP 運命決定に必要な絶食日数 (2.8 日間) と先の想定待ち時間 (2 日間) を足した 4.8 日間に近い。つまり、late フェーズで絶食させられた幼虫は 2.8 日間の絶食で SIP 運命を決定

するのに対して、early フェーズで絶食させられた幼虫では、late フェーズに移行してから 2.8 日後に SIP 運命を決定したと解釈することができる。キボシカミキリにおいても、他の 3 種（エンマコガネ、オオキノコムシ、マメハンミョウ）より複雑ではあるものの、当初の予想通り SIP が見つかった。これで、SIP は鞘翅目の異なる 4 科に属する 4 種の昆虫で見つかった。SIP は鞘翅目昆虫で共通に見られる蛹化運命決定機構なのかもしれない。

キボシカミキリ 5 齢幼虫における絶食応答には、エンマコガネ、オオキノコムシ、マメハンミョウと比べて興味深い点が 2 つある。第 1 に、終齢に SIP の誘導が抑制される early フェーズが存在したことである。この点は、これまで他の昆虫において知られていないと思われる。第 2 に、マメハンミョウ終齢幼虫と同じく (Terao et al., 2015)、キボシカミキリは 5 齢初期から絶食させても蛹化能力が高いことである。脱皮後、摂食を全くしていない 5 齢幼虫でさえも小さい蛹を形成し成虫に羽化する能力を持つ (本研究)。このことは、キボシカミキリ 5 齢において体の成長は変態能の獲得ではなく、成虫の体サイズ増大に貢献することを示している。これに対し、エンマコガネとオオキノコムシの終齢では、SIP が生じるためには脱皮後にある程度の成長が必要となる (Shafiei et al., 2001; Sato and Suzuki, 2001)。このように、鞘翅目の 4 種に SIP がみられることは共通しているが、SIP の細部には種による違いが見られる。

本研究では 5 齢 0 日から絶食した場合の DTP 平均値は 21.1 日だったのに対し、Shintani et al. (2003) の研究では平均 16.3 日だった。この DTP の違いは、与えた餌の違い (インセクタ LF (本研究) と日本クロレラ (Shintani et al., 2003))、もしくは系統の違い (京都府福知山 (本研究) と高知県伊野 (Shintani et al., 2003)) に由来するものかもしれない。

本研究では、F 群、E 群、L 群のキボシカミキリ成虫サイズの分布は、野外の成虫サイズの範囲に収まっていた。中でも、絶食により得られた最も小さな E 群の成虫であっても、その体サイズは野外の小型成虫に相当した。ゆえに、自

然状態でもキボシカミキリの蛹化が絶食によって引き起こされている可能性がある。エンマコガネのメス成虫は、子の餌である糞玉を作成して産卵する。幼虫 1 頭が利用できる餌の量は有限であり、野外でも餌不足に陥ることがあり、ゆえに絶食が変態のキューになりえると考えられる (Shafiei et al., 2001)。Munyiri et al. (2003) が既に述べている通り、キボシカミキリの幼虫は卵を産みつけられた寄主植物から他の植物へ移動できないため、餌資源の枯渇に際して終齢幼虫期間を早期に切り上げて蛹化することは、幼虫期間を延長して更なる餌を探すよりも適応的であると考えられる。野外のキボシカミキリ幼虫において、どのような状況において SIP が生じそうであるか、2つの可能性を考えた。第1に、寄主植物が枯れたり、強風により枝が折れてしまった場合である。キボシカミキリは伐採放置株からも羽化することが知られており (横井, 1989)、この場合 SIP が生じているかもしれない。第2に、競合する同種他個体の接近によって行動が妨げられて絶食に至る可能性が考えられる。

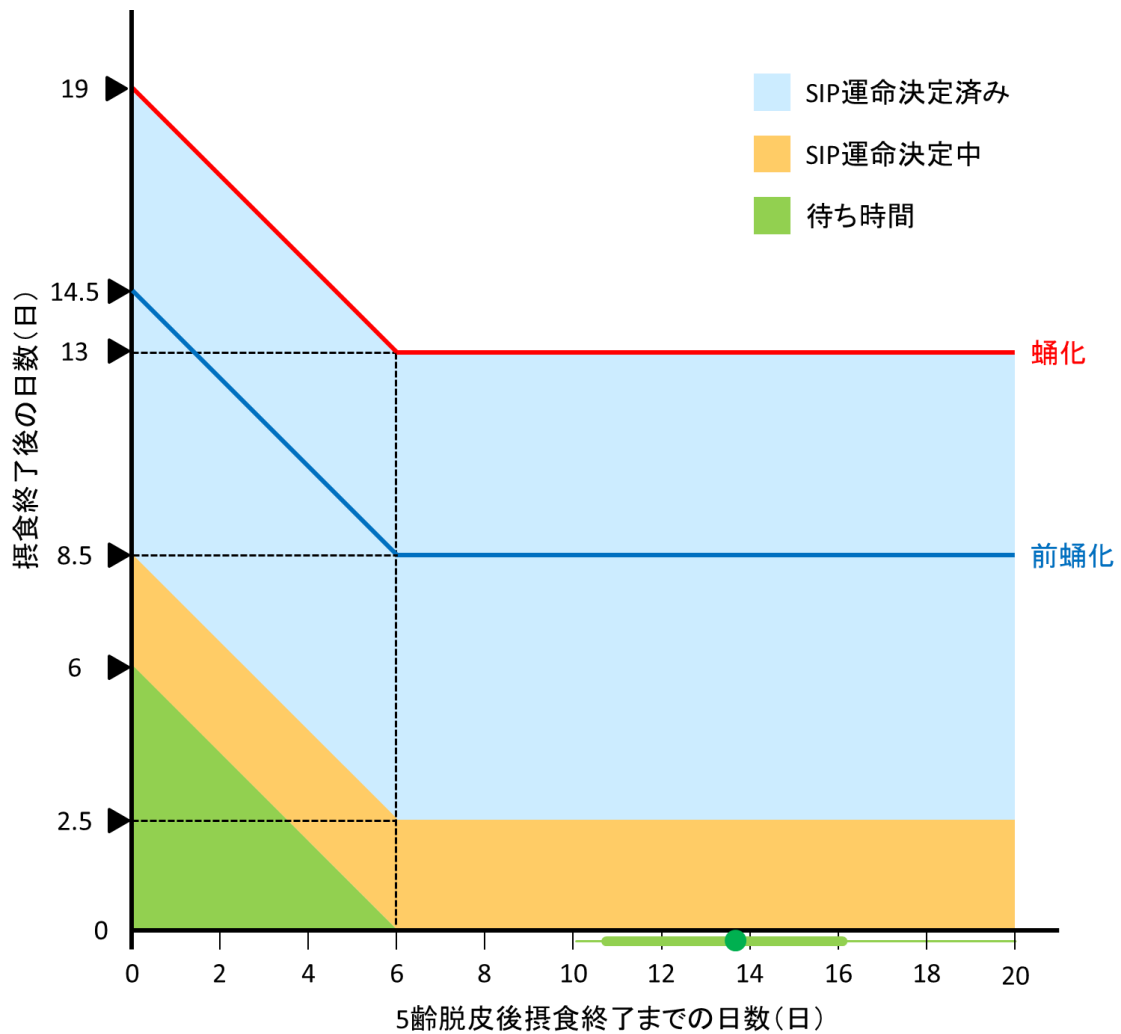


図 3-14. 5 齢における摂食終了後の発生イベント模式図. 緑の部分は SIP 運命決定の待ち時間と想定される状態を, オレンジの部分は SIP 運命決定中の状態をそれぞれ表し, どちらの状態でも再摂食により SIP 運命の決定を延期することができる. 青の部分は SIP 運命がすでに決定した状態を表し, 再給餌しても摂食はせず, 蛹化が延期されることはない. 青線と赤線はそれぞれ前蛹化と蛹化を示す. 給餌し続けた個体がピークウェイトに達した日数の平均を緑の点, 標準偏差を緑の太線, 範囲を緑の細線でそれぞれ示す.

終齢幼虫における JH の働き

タバコスズメガの終齢幼虫において、CW は JH 存在下で機能する。JH 合成組織であるアラタ体を除去した (CAX) 終齢幼虫では CW は機能せず、体サイズにかかわらず摂食開始から 4 日後に変態を開始する。この 4 日間で体サイズが CW に満たない CAX 終齢幼虫も変態を開始するが、完全な蛹を形成することはできず、最終的には死に至る。CW に達した CAX 終齢幼虫は蛹を形成する。このことから、CW は変態の完遂に必要な体サイズを獲得するための機構であり、JH は CW を機能させる働きを持つと考えられる (Suzuki et al., 2013)。一方、本研究ではキボシカミキリ 5 齢幼虫の変態には CW のような体サイズに依存した仕組みは見つからなかった。CW が見られないキボシカミキリにおける JH の役割を、次に示す 2 つの仮説を立てて考察する。第 1 は、5 齢初期に存在する血中 JH が、体サイズではなく経過時間をモニターするという仮説である。キボシカミキリ 5 齢脱皮後 6 日目まで SIP が抑制されるのは、血中 JH により変態に必要な成熟期間を確保するためであると考えられる。第 2 は、キボシカミキリ終齢幼虫では、すでに血中 JH が存在していないという仮説である。この仮説では、JH が存在していないために CW が機能しないと考える。これらの仮説の検証には、血中 JH の定量、JH アナログの投与、CAX 処理などの実験が必要である。すなわち、5 齢初期幼虫の血中 JH 濃度が活性閾値より高く、5 齢初期の CAX 処理幼虫で SIP 抑制期間が短縮し、不正常的な蛹化が起これば第 1 の仮説が支持される。5 齢初期幼虫の血中 JH 濃度が活性閾値より低く、5 齢初期幼虫に JH アナログを投与することで CW が認められれば第 2 の仮説が支持される。

自由摂食条件での蛹化運命決定機構

キボシカミキリ 5 齢幼虫は自由摂食条件におかれると自発的に摂食を終え、蛹化運命を決定する (Shintani et al., 2003; 本研究)。本研究では、自由摂食の F 群は平均 13.5 日 (範囲 10~20 日) の摂食で PW 日に達した (図 3-3B)。つまり、F 群は late フェーズのうちに自発的に摂食を終了した。F 群と L 群の DTP 平均

値に有意な差は認められなかった。加えて、DTP を前蛹化前後の日数に分けても、それぞれ F 群と L 群の間で有意差は認められなかった (表 3-2)。つまり、自発的に摂食を終えた 5 齢幼虫と、絶食後の L 群幼虫には、蛹化までの時間経過に違いが認められなかった。これらと late フェーズでの SIP 運命決定タイミングを合わせて考えると、late フェーズにおける強制的絶食と同じように、自由摂食条件においては自発的摂食終了がキューとなって SIP 運命が決定するという仮説が得られる。この説では、SIP は外的要因によって餌が得られなくなったときの危機回避のための蛹化運命決定機構という役割だけでなく、自由摂食条件における自発的な摂食終了による蛹化運命決定における役割も持ち合わせると考える。この仮説はキボシカミキリだけでなく、エンマコガネにも当てはまるかもしれない。エンマコガネの終齢幼虫に餌を過剰に与えても自発的に摂食終了する (Shafiei et al., 2001)。そして、強制的に絶食した個体と自発的に摂食終了した個体の DTP 平均値には有意差が認められず、摂食終了後の行動は似通っていた (Shafiei et al., 2001)。しかし、この仮説には、自由摂食条件でキボシカミキリの 5 齢幼虫がなぜ自発的に摂食終了するのかという説明が含まれていない。今後、この仮説を裏づけるための解決策を模索していきたい。

絶食の認識は、摂食行動の終了ではなく糖の摂取終了によるかもしれない

糖の投与実験の対照区と再給餌をしない F4-S の DTP 平均値はほぼ同じであった (それぞれ、16.0, 15.9)。よって、アガロース片を与えても SIP が生じたことになる。対照区では、幼虫はアガロース片を食べ、糞にはアガロース片が含まれていることも確認した。これに対して、糖の投与実験において、グルコース処理とトレハロース処理の DTP 平均値 (それぞれ、20.3, 21.2) は、対照区の DTP 平均値 (16.0) と有意に乖離していた。これは、グルコース処理とトレハロース処理では SIP が生じなかったことを示している。これらの結果から、5 齢幼虫が絶食を認識し SIP を起こしたのは、何も食下しなくなったことによるので

はなく、糖を摂取しなくなったことによる可能性がある。すると、もし 5 齢幼虫が餌を自由に摂取できる状態でその餌にグルコースかトレハロースが含まれているならば、糖の摂取が摂食期間中に変態の開始を抑制すると予想できる。また、キボシカミキリの腸からはセルラーゼが分泌され、cello-oligosaccharides を分解してわずかながらグルコースを生産することができる (Sugimura et al., 2003)。この点に注目すると、グルコースを含まない餌を食べていても、腸内でグルコースを生産できることが予想される。また、この腸内でのセルラーゼ分泌を中止することが、変態の開始に繋がるかもしれない。糖に対する 5 齢幼虫の応答については、セルラーゼ遺伝子に着目し、この遺伝子の発現解析やノックダウンなど、更なる研究を行いたい。

4 齢幼虫については、グルコース投与によって絶食による蛹化誘導が回避されることが分かっている (Munyiri and Ishikawa, 2005a)。4 齢幼虫におけるグルコース処理個体の血中グルコース濃度及び血中トレハロース濃度がそれぞれ測定された。これらの血糖値には、絶食による蛹化誘導との関連が見られず、グルコース投与による蛹化誘導の抑制は血糖を介さない作用であると考察されている。本研究で明らかになった、5 齢幼虫におけるグルコースやトレハロースの SIP 抑制効果も、血糖を介さない作用であるかもしれない。

第4章 総合考察

本章では、第2章と第3章の結果に基づいて本研究の生理学的意義を考察する。

4-1. 幼虫の発育

一般に、自由摂食条件では幼虫の体サイズは時間経過とともに増大する。そのため、自由摂食条件での観察だけでは、蛹化運命の決定が時間経過に依存するのか、それとも体サイズに依存するのかを判別するのは困難である。この2つの要因の影響を分離するため、終齢幼虫の絶食処理が行われてきた。摂食幼虫が時間とともに大きくなるのに対して、絶食幼虫の体サイズの増大は抑制され、時間だけが進行する。鱗翅目では CW に達した時点で蛹化運命が決定するため、その後のいずれのタイミングで絶食させても蛹化タイミングは変わらない(図 4-1A)。つまり、体サイズの指標である CW が蛹化運命の決定要因であり、CW に達した後は体サイズではなく、時間経過に依存したメカニズムにより蛹化に至る。一方、鞘翅目では MVW を越えた幼虫は、いずれのタイミングで絶食させても SIP が誘導されるため、絶食から蛹化までの時間は一定である(図 4-1B)。つまり、MVW を越えた幼虫を絶食させた場合、成長量にも終齢脱皮からの時間経過にも依存せず、飢餓に依存して蛹化運命を決定する。キボシカミキリ 5 齢幼虫においては、late フェーズで SIP が明瞭に観察された。一方、early フェーズ幼虫を絶食させると、いずれのタイミングで絶食しても蛹化タイミングは変わらなかった。再給餌処理の結果から、early フェーズで絶食させた幼虫の SIP 運命が決定するのは late フェーズに入ってからであり、5 齢脱皮後 6 日目までは SIP の誘導がかからないと考えた(図 4-1C)。これらのことから、キボシカミキリ 5 齢幼虫は脱皮後 6 日目までは時間経過に依存したメカニズムで蛹化運命決定が抑制され、それ以降は絶食に依存したメカニズムにより蛹化運命が決定すると示された。

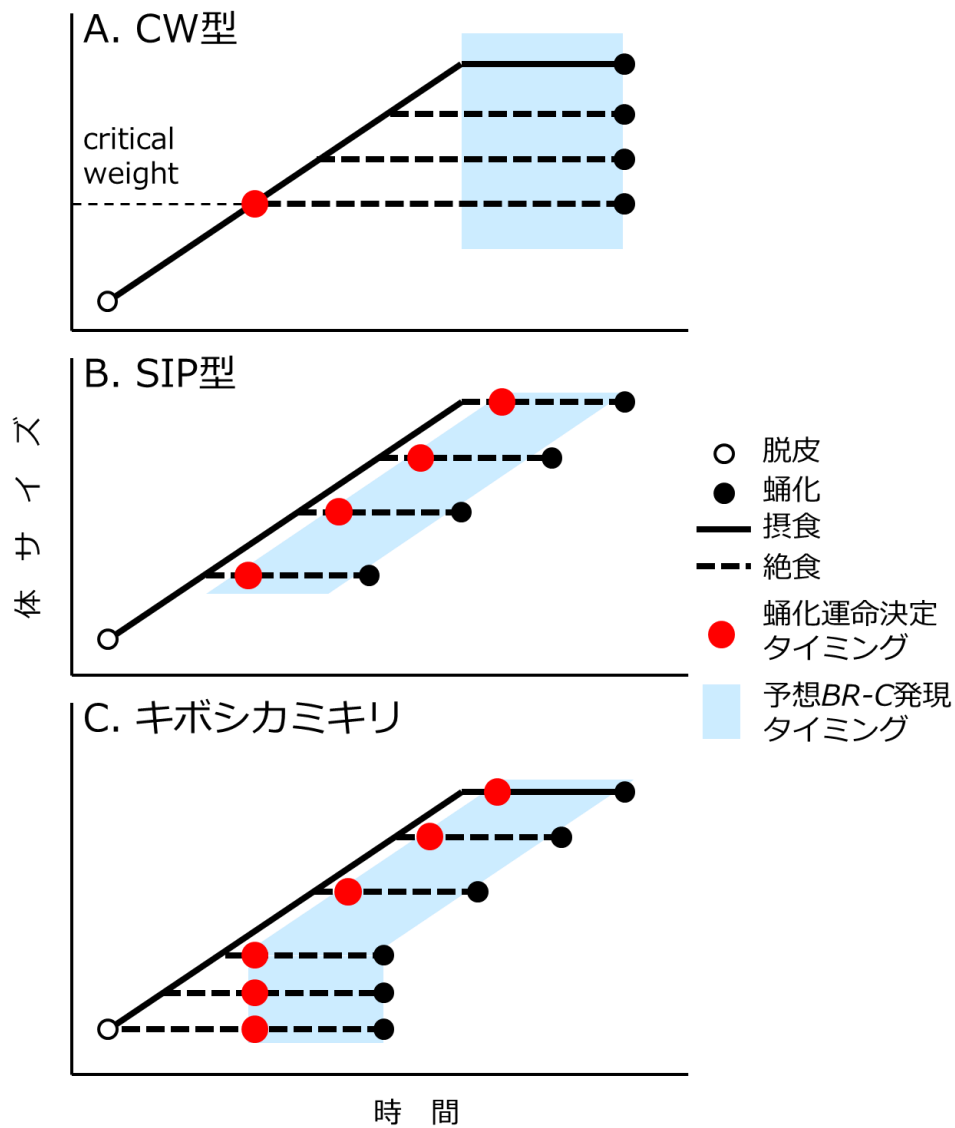


図 4-1. A. CW 型 (Nijhout, 2008 を改変), B. SIP 型 (Nijhout, 2008 を改変), C. キボシカミキリ (本研究) における終齢幼虫の蛹化運命決定タイミングを表したモデル. 本研究ではキボシカミキリ 5 齢における蛹化運命決定タイミングを明らかにし, 5 齢の *BR-C* 発現タイミングを予想した.

4-2. JH, エクダイソン分泌タイミングと *PhBR-C* 発現タイミング

第2章では福知山産キボシカミキリ 4 齢の *PhBR-C* 発現タイミングを測定し、第3章では福知山産キボシカミキリ 5 齢の蛹化運命決定タイミングを調べた。Munyiri et al. (2003) は伊野産キボシカミキリ 4 齢の蛹化運命決定タイミングを一部条件で調べている。また、伊野産キボシカミキリでは、自由摂食 4 齢 (Munyiri and Ishikawa, 2005b)、絶食 4 齢 (Munyiri and Ishikawa, 2005b)、自由摂食 5 齢 (Munyiri and Ishikawa, 2004) の血中 JH 濃度、血中エクダイソン濃度が測定されている。これらの結果から、4 齢終齢と 5 齢終齢、福知山産と伊野産の発育が均質であることを前提としてではあるが、福知山産キボシカミキリ 5 齢の JH、エクダイソンの分泌 (コミットメントピーク) タイミング、*PhBR-C* 発現タイミングを考えてみる。

キボシカミキリ 5 齢幼虫は、late フェーズに入るまで絶食による SIP の誘導が抑制される。変態開始に関して抑制に働くホルモンとして JH が挙げられる。Munyiri and Ishikawa (2004) はキボシカミキリ 5 齢幼虫の血中 JH 濃度を測定し、5 齢初期には血中 JH が高濃度で存在することを報告している。これらのことから、5 齢初期の SIP 抑制は JH によるものと推測できる。Munyiri and Ishikawa (2005b) らは絶食により 4 齢幼虫の血中 JH 濃度がただちに減少し、次いでエクダイソンのコミットメントピークが出現することを報告している。このことから、late フェーズでは絶食が血中 JH 濃度を低下させ、活性閾値以下になることでコミットメントピークを誘導したと考えられる (図 4-2D)。一方、early フェーズでは、絶食させても late フェーズに入るまで血中 JH 濃度が下がらない可能性がある (図 4-2C)。5 齢初期の JH に対してクリアリング能力を持つのが脱皮後 6 日目なのかもしれない。また、自由摂食条件では、何らかの要因により自発的に摂食終了し、摂食終了が血中 JH 濃度を低下させ、コミットメントピークを誘導すると考える (図 4-2B)。第3章で、L 群と F 群の DTP に有意差が認められなかったことも (図 3-3) この仮説を支持している。コミットメントピー

クにより変態を開始した幼虫は、給餌しても摂食せず蛹化への運命は変えられない。つまり、SIP 運命決定とはコミットメントピークの出現であると考え、SIP 運命決定前に再給餌すると SIP が誘導されないのは (図 3-8, 図 3-11), 再給餌により JH が再分泌されたためかもしれない。

第 2 章で明らかにした, 4 齢表皮における *PhBR-C* の発現タイミングも, この仮説で説明できる。タバコスズメガでは *BR-C* はコミットメントピークにより誘導される (Zhou et al., 1998; Zhou and Riddiford, 2001) (図 4-1A)。本研究の結果から, 脱皮後 4 日間の摂食後に絶食した幼虫は, 4 齢でも脱皮後 9.5 日目に蛹化運命が決定すると考えられる。つまり脱皮後 9.5 日目 (6 日目から 2.8 日間の絶食) にコミットメントピークが出現すると期待される。この餌条件の幼虫における *PhBR-C* 発現量測定の結果, *PhBR-C* は脱皮後 9 日目から上昇が認められた (図 2-6C)。よって, 蛹化運命決定タイミングと *PhBR-C* 発現タイミングは合致し, そのタイミングにコミットメントピークが出現している可能性が高い。

この仮説では, CW 型の蛹化決定と SIP に見られる蛹化運命決定は内分泌学的に異なる機構に裏づけられる。CW 型蛹化では CW に達した時点で血中 JH 濃度の低下が始まり, その後の蛹化プロセスは不可逆的で, CW 到達が蛹化運命決定タイミングである。一方, SIP では絶食後に再給餌すると, 蛹化運命決定が回避されることから, 再摂食により血中 JH 濃度の低下が可逆的に変化する可能性がある。SIP では血中 JH 濃度の変化開始ではなく, その後のコミットメントピークが蛹化運命決定タイミングになっていると考える。また, CW 型蛹化ではコミットメントピークにより摂食が終了する (Dominick and Truman, 1985; Nijhout et al., 2014)。一方, 自由摂食条件に見られる SIP では, エクダイソン分泌は摂食終了よりも後になるので, これまでに論じられていない摂食終了因子の存在が示唆される。

4-3. 多様な蛹化運命決定タイミング

本研究において、これまでに報告されている CW 型蛹化, SIP とは異なる蛹化運命決定タイミングをキボシカミキリから発見した。キボシカミキリの蛹化運命決定タイミングは他の鞘翅目昆虫に見られる SIP のバリエーションだった(図 4-1)。蛹化運命決定タイミングが調べられた昆虫種は限られている。今後、より多くの昆虫種で蛹化運命決定タイミングが調べられれば、そのバリエーションはさらに増えるかもしれない。

蛹化運命決定タイミングの多様性は JH とエクダイソンの分泌制御の違いによると考察した。しかし、SIP が見られる昆虫で、JH, エクダイソンと蛹化運命決定タイミングの関係を示した研究は未だない。一方で、JH とエクダイソンの機能は昆虫種で共通していると考えられる。本研究を内分泌学的レベルに掘り下げることが、機能の保存された内分泌物質をどのように使い分け、変態を多様化させてきたのかを明らかにする足掛かりとなるだろう。

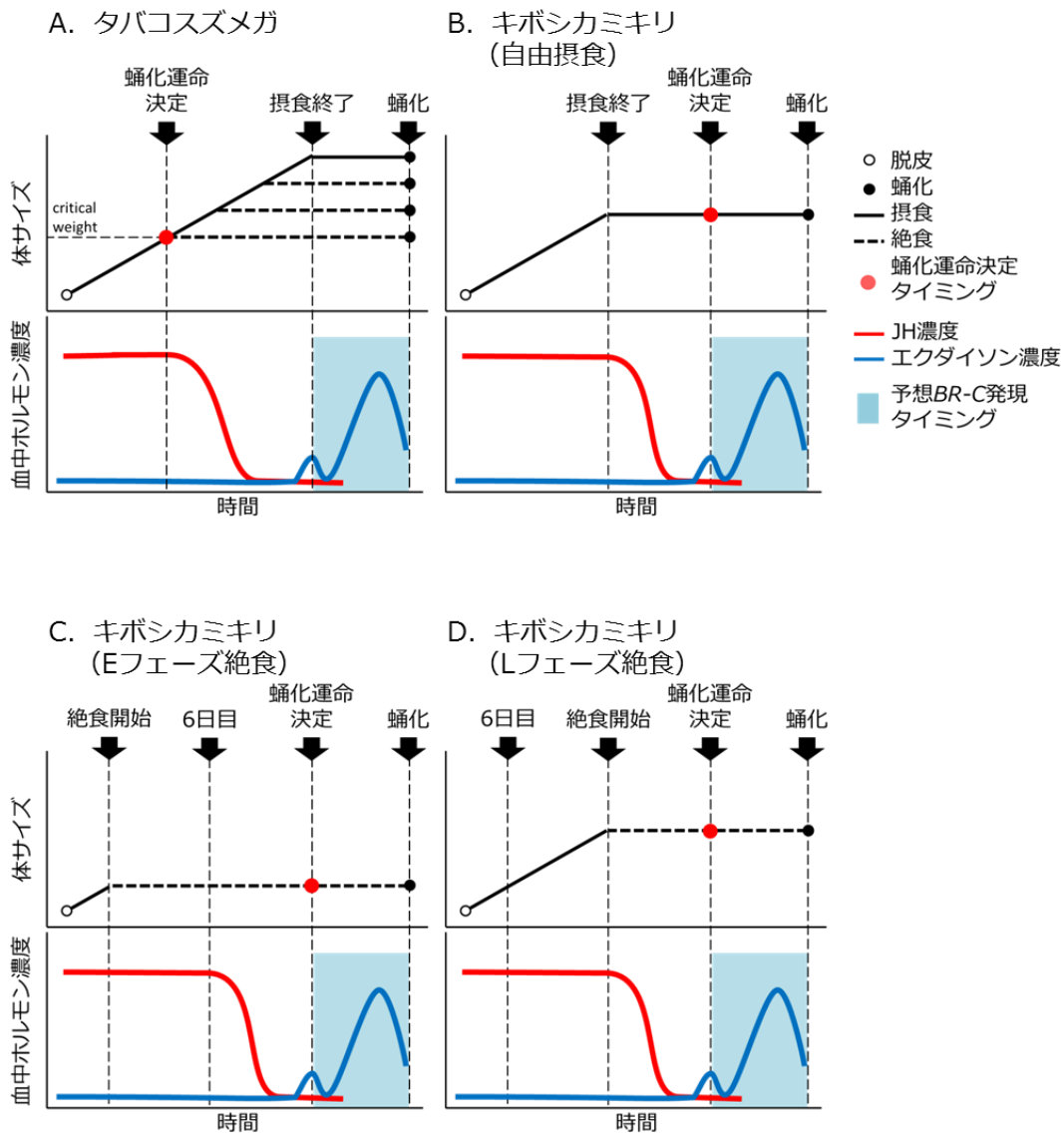


図 4-2. 蛹化運命決定タイミングと血中ホルモン濃度, *BR-C* 発現タイミングの関係を表した模式図. A. 自由摂食させたタバコスズメガ. B, C, D. それぞれ, 自由摂食, E フェーズ絶食, L フェーズ絶食させたキボシカミキリ.

摘要

完全変態昆虫の終齢幼虫は、蛹、成虫と変態し、その過程で形態、食性、行動を劇的に変化させることにより、その生活史を多様化させている。終齢幼虫の変態は、血中の幼若ホルモン（JH）の濃度低下とそれに続くエクダイソンの分泌により誘導される。エクダイソンは *Broad-Complex* 遺伝子（*BR-C*）をはじめとする一次応答遺伝子群を誘導し、*BR-C* が蛹形質の発現に必要な二次応答遺伝子群を誘導する。JH、エクダイソン、*BR-C* の働きは完全変態昆虫に共通すると考えられている。一般に、終齢におけるエクダイソンの少量の分泌（コミットメントピーク）をもって変態の開始とされることが多いが、コミットメントピークよりも前に蛹化へのプロセス、つまり血中 JH の減少は始まっている。鱗翅目のタバコスズメガ *Manduca sexta* では血中 JH の減少以降のプロセスは不可逆的で、血中 JH が減り始めた時点で蛹化の時期が決まる（蛹化運命決定）。タバコスズメガの終齢幼虫が最適な環境条件下で成長する場合、体重が **critical weight** と呼ばれる値に達すると血中 JH の減少、すなわち蛹化のプロセスが始まる。critical weight に達した後は摂食してもしなくても、蛹化タイミングは変わらない。つまり、critical weight に達した時点で蛹化運命が決定したことになる。一方、エンマコガネ類の 1 種 *Onthophagus taurus* などの鞘翅目の終齢幼虫では、絶食により蛹化運命が決定する現象、starvation-induced pupation（SIP）が知られている。SIP では、終齢幼虫は絶食タイミングにかかわらず、絶食から一定時間後に蛹化する。以上、蛹化の開始が体重によって決まる昆虫と、絶食をキューとして蛹化へのプロセスが開始される昆虫を挙げたが、このように蛹化のプロセスの開始要因が明らかになっている昆虫種はきわめて限られている。また、ホルモンによる変態の制御機構、変態に関わるホルモンの生合成、代謝、シグナル伝達は今日までに盛んに研究されてきた一方で、いつ何をきっかけに蛹化

運命が決定するのかに焦点を当てた研究は多くない。

キボシカミキリ *Psacotheta hilaris* (鞘翅目：カミキリムシ科) はクワとイチジクの害虫であり、幼虫は幹や枝を、成虫は葉を食害する。本州、四国、九州に分布するキボシカミキリについては、その前胸背斑紋の形状の違いから、西日本型と東日本型に分けられている。キボシカミキリの蛹化、変態に及ぼす温度、日長、そして餌条件の影響は西日本型を用いて詳細に調べられており、鞘翅目昆虫における変態の制御に関する研究のモデルとして有利な条件を備えている。本研究は、西日本型のキボシカミキリにおける変態の制御機構を明らかにしようとしたものであり、まず、蛹化運命決定済の指標となりうる *Broad-Complex* 遺伝子について、そのクローニング、系統解析、発現解析を行った。これに続いて、キボシカミキリの終齢 (5 齢) 幼虫における蛹化運命決定タイミングを、絶食実験を駆使して詳細な解析を行った。

第 2 章. キボシカミキリにおける *Broad-Complex* 遺伝子のクローニング, 系統解析, 発現解析

西日本型キボシカミキリの幼虫を 25°C, 長日条件で飼育すると、一部の個体は 4 齢を終齢として蛹化するが、残りの個体は 5 齢を終齢として蛹化する。このように、環境が一定であっても終齢は一つの齢には固定していない。長日飼育下のキボシカミキリ 4 齢幼虫について、観察個体の発育運命—幼虫脱皮に向かうのか蛹化に向かうのか—を外見から判断することは、蛹化に向かう幼虫がガットパーズしない限りできない。観察個体の発育運命を判別する手法を確立できれば、変態の研究において実験の精度が向上すると期待できる。そこで、蛹化に必須の働きを持つ *BR-C* の発現レベルを判別基準として利用することを考えた。鞘翅目昆虫における *BR-C* の研究例はコクヌストモドキ *Tribolium*

castaneum しかなく, カミキリムシ科の昆虫では *BR-C* に関する知見がまだない. *BR-C* が持つ zinc finger ドメインの変異型は昆虫種間で多様であるため, コクヌストモドキの知見をキボシカミキリに適用することはできない. そこでまず, キボシカミキリの *BR-C* をクローニングし, 構造解析, 系統解析を行った. つづいて, キボシカミキリ 4 齢幼虫における変態の進行を示す分子マーカーとして, *BR-C* 発現を利用するための基礎的知見を得ることを目的に発現解析を行った.

キボシカミキリから *Broad-Complex* 遺伝子 (*PhBR-C*) の 7 つの mRNA アイソフォームをクローニングした. それぞれのアイソフォームは異なる zinc finger ドメイン (Z1, Z2, Z3, Z2/Z3, Z4, Z5/Z6, Z6) を持っていた. Z5/Z6 アイソフォームには zinc finger ドメインの直前に未成熟終止コドンが存在していた. 公開データベースに登録されている昆虫の *BR-C* について解析したところ, Z1~Z4 のアミノ酸配列は本種を含め, 昆虫種間で高く保存されていた. Z5 はこれまでに, チャバネゴキブリ *Blattella germanica* やミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis*, コクヌストモドキなどから発見されている. Z6 はこれまでに, 不完全変態昆虫であるチャバネゴキブリからしか発見されていない. Z6 がキボシカミキリに存在し, 全ゲノムが解読されているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* やカイコ *Bombyx mori* に存在しないことから, 完全変態昆虫が進化する過程でゲノムから消失したことが示唆された. また, Z6 がキボシカミキリに存在し, 全ゲノムが解読されているコクヌストモドキに存在しないことから, Z6 は鞘翅目が分岐した後にも, ゲノムから消失したことが示唆された.

異なる給餌条件で飼育した幼虫の脳, 唾液腺, 表皮において *PhBR-C* の発現量を測定したところ, *PhBR-C* はそれぞれの組織においてガットパージ後に発現のレベルが上昇し, 前蛹期に高発現していた. これとは対照的に, 脳においては恒

常的な低い発現がみられた。キボシカミキリ 4 齢の蛹化が早期に誘導される給餌条件（4 齢脱皮後 4 日間摂食させた後に絶食）では、表皮において早期の発現上昇がみられた一方、全く脱皮せずに死んでしまう条件（4 齢脱皮直後から絶食）では、どの組織においても発現レベルの目立った変化は見られなかった。

第 3 章. キボシカミキリ 5 齢幼虫における蛹化運命決定タイミング

キボシカミキリの 5 齢幼虫は、脱皮直後に絶食させると餌を与え続けた場合より早期に蛹化する。これは、絶食させたキボシカミキリで SIP が惹起された可能性を示している。SIP は鞘翅目の昆虫 3 種で報告されているが、カミキリムシ科の昆虫では蛹化運命決定タイミングは研究されていなかった。そこで、キボシカミキリ 5 齢幼虫の蛹化運命決定タイミングを特定し、この種でも SIP が惹起されるのかを調べた。

キボシカミキリ 5 齢幼虫を様々なタイミングで絶食させ、絶食開始から蛹化までにかかる日数（days to pupation : DTP）を調べた。DTP は絶食開始タイミングに対して一定ではなく、その関係は 5 齢 6 日目を境に 2 群に分けられた。6 日目以後では、絶食開始タイミングに関わらず DTP は一定であり、ゆえに SIP が惹起されたと考えられた。一方、6 日目前に絶食開始した場合、絶食開始が遅くなるほど DTP が短くなり、これは既知の SIP とは異なっていた。次に、6 日目以後と以前で蛹化運命を決定するのに必要な絶食時間を調べ、比較した。6 日目以後は、いずれのタイミングで絶食開始させても一定の絶食時間後に蛹化運命を決定した。6 日目以前に絶食を開始した場合の蛹化運命決定に必要な絶食時間は、6 日目以後のそれに比べて長かった。これらの結果から、6 日目以前に絶食を開始した場合には 6 日目までは SIP が抑制され、6 日目から一定時間の絶食により SIP が惹起されたと結論づけた。これで、SIP は 4 種の鞘翅目昆虫、すなわ

ちエンマコガネ類の一種（コガネムシ科），セモンホソオオキノコムシ *Dacne picta*（オオキノコムシ科），マメハンミョウ *Epicauta gorhami*（ツチハンミョウ科），キボシカミキリ（カミキリムシ科）で見つかった．SIPは鞘翅目昆虫で共通に見られる蛹化運命決定機構なのかもしれない．その一方で，キボシカミキリ5齢幼虫ではSIPの抑制期間がある点が他の鞘翅目昆虫のSIPとは異なっており，SIPにも多様性があることが示された．

キボシカミキリの5齢幼虫を自由に摂食させ続けると，自発的に摂食を終了し蛹化する．自発的な摂食の終了から蛹化までの日数と，6日目以後に絶食させた個体のDTPを比較すると有意差は認められなかった．この結果から，自発的な摂食終了であっても強制的な絶食であっても，摂食を終了することが蛹化運命決定のキューとなっている可能性が強く示された．自発的な摂食終了と強制的な絶食から蛹化までのプロセスが同じであるとすれば，絶食から蛹化までを研究対象とすることで，過不足なく蛹化のプロセスを研究できると期待できる．

以上，本研究は，第2章でキボシカミキリにおけるBR-Cの構造，系統進化，発現タイミングを明らかにしたものであり，PhBR-Cのzinc fingerドメインの変異型は他の鞘翅目昆虫と比較しても多様であることが示された．また，表皮におけるPhBR-Cの発現を変態の進行を判別するための分子マーカーとして利用できる可能性を示した．第3章で，キボシカミキリにおいては5齢6日目以前にはSIPは生じず，6日目以後に限ってSIPが生じることを明らかにした．SIPが見られる昆虫において，終齢にSIPが生じない期間が存在する例は他に見つかっていない．すなわち，本研究では新しいタイプのSIPを発見した．昆虫の変態制御に関与するホルモンや転写因子はおそらく完全変態昆虫で共通しているが，その利用方法は種により多様である．変態のしくみを統合的に解釈し，変態の進化史を説明するためには，より多くの昆虫種について解析する必要がある

ある.

謝辞

本研究を行うにあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜った東京大学応用昆虫学研究室 石川幸男教授に深く謝意を表す．分子生物学実験全般を指導していただいた農業生物資源研究所 粥川琢巳博士（当時 東京大学応用昆虫学研究室所属），分子生物学実験を進めるにあたり様々な便宜を図っていただいた農業生物資源研究所 篠田徹郎博士に厚く謝意を表す．東京大学応用昆虫学研究室 松尾隆嗣准教授には，*BR-C*に関する文献についての討論を通して数々のご指摘をいただいた．蛹化運命決定タイミングの測定に関し，研究プランの構築，データ解析を東京大学応用昆虫学研究室 星崎杉彦助教に指導していただいた．粥川琢巳博士，農業・食品産業技術総合研究機構 中野亮博士（当時 東京大学応用昆虫学研究室所属），富山大学 杉本貴史博士（当時 東京大学応用昆虫学研究室所属），星崎杉彦助教，東京大学応用昆虫学研究室 工藤愛弓氏，サミット株式会社 瀬戸口栞氏（当時 東京大学応用昆虫学研究室所属）に供試虫の採集を協力していただいた．

博士課程を休学した際には石川幸男教授，松尾隆嗣准教授，星崎杉彦助教，玉川大学 坂本洋典博士（当時 東京大学応用昆虫学研究室所属），粥川琢巳博士，中野亮博士，杉本貴史博士に心の面，学業の面で忍耐強く支えていただき，東京大学応用昆虫学研究室の学生たちに温かく迎えられ復学することができた．多くの方々のご助力に支えられ，本研究を完遂することができた．言葉では表せないほどの謝意を，深く，深くここに表す．

引用文献

Bayer, C. A., Holley, B., & Fristrom, J. W. (1996). A Switch in *Broad-Complex* Zinc-Finger Isoform Expression Is Regulated Posttranscriptionally during the Metamorphosis of *Drosophila* Imaginal Discs. *Developmental biology*, *177*(1), 1-14.

Callier, V., & Nijhout, H. F. (2013). Body size determination in insects: a review and synthesis of size- and brain- dependent and independent mechanisms. *Biological Reviews*, *88*(4), 944-954.

Chen, X., Yu, X., Cai, Y., Zheng, H., Yu, D., Liu, G., Zhou, Q., Hu, S., & Hu, F. (2010). Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, *19*(6), 799-805.

Crossgrove, K., Bayer, C. A., Fristrom, J. W., & Guild, G. M. (1996). The *Drosophila Broad-Complex* Early Gene Directly Regulates Late Gene Transcription during the Ecdysone-Induced Puffing Cascade. *Developmental biology*, *180*(2), 745-758.

DiBello, P. R., Withers, D. A., Bayer, C. A., Fristrom, J. W., & Guild, G. M. (1991). The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics*, *129*(2), 385-397.

Dominick, O. S., & Truman, J. W. (1985). The physiology of wandering behaviour in *Manduca sexta*. II. The endocrine control of wandering behaviour. *Journal of Experimental Biology*, *117*(1), 45-68.

Emery, I. F., Bedian, V., & Guild, G. M. (1994). Differential expression of *Broad-Complex* transcription factors may forecast tissue-specific developmental fates during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, *120*(11), 3275-3287.

Erezyilmaz, D. F., Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (2006). The pupal specifier *broad* directs progressive morphogenesis in a direct-developing insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(18), 6925-6930.

Fox, J. (2005). Getting started with the R commander: a basic-statistics graphical user interface to R. *Journal of statistical software*, *14*(9), 1-42.

Hatem, N. E., Wang, Z., Nave, K. B., Koyama, T., & Suzuki, Y. (2015). The role of juvenile hormone and insulin/TOR signaling in the growth of *Manduca sexta*. *BMC biology*, 13(1), 44.

比留間 潔 (1983). 「幼若ホルモンによる前胸腺の制御と昆虫の発育」. 『化学と生物 日本農芸化学会』, 19 (2), 70-79.

Hodgetts, R. B., Clark, W. C., O'Keefe, S. L., Schouls, M., Crossgrove, K., Guild, G. M., & von Kalm, L. (1995). Hormonal induction of Dopa decarboxylase in the epidermis of *Drosophila* is mediated by the *Broad-Complex*. *Development*, 121(11), 3913-3922.

Huang, J. H., Lozano, J., & Belles, X. (2013). Broad-complex functions in postembryonic development of the cockroach *Blattella germanica* shed new light on the evolution of insect metamorphosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(1), 2178-2187.

伊庭 正樹, 井上 昭司, 菊地 実 (1976). 「キボシカミキリの生態学的研究 I. 成虫の発生消長にみられる地方的差異」『日本蚕糸学雑誌』, 45 (2), 156-60.

伊庭 正樹 (1976). 「キボシカミキリの生態学的研究 II. 産卵時期による周年経過の相違」『日本蚕糸学雑誌』, 45 (5), 443-447.

伊庭 正樹 (1980). 「キボシカミキリの生態学的研究 IV. 成虫の前胸背斑紋: にみられる地理的差異」『日本蚕糸学雑誌』, 49 (5), 429-433.

Ijiro, T., Urakawa, H., Yasukochi, Y., Takeda, M., & Fujiwara, Y. (2004). cDNA cloning, gene structure, and expression of Broad-Complex (BR-C) genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(9), 963-969.

Jindra, M., Palli, S. R., & Riddiford, L. M. (2013). The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual review of entomology*, 58, 181-204.

Jones, D., Jones, G., & Hammock, B. D. (1981). Growth parameters associated with endocrine events in larval *Trichoplusia ni* (Hübner) and timing of these events with developmental markers. *Journal of Insect Physiology*, 27(11), 779-788.

Jucker, C., Tantardini, A., & Colombo, M. (2006). First record of *Psacotha hilaris* (Pascoe) in Europe (Coleoptera Cerambycidae Lamiinae Lamiini). *Boll Zool Agrar Bachic Ser II*, 38, 187-191.

Karim, F. D., Guild, G. M., & Thummel, C. S. (1993). The *Drosophila Broad-Complex* plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development*, 118(3), 977-988.

Kiss, I., Beaton, A. H., Tardiff, J., Fristrom, D., & Fristrom, J. W. (1988). Interactions and developmental effects of mutations in the *Broad-Complex* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 118(2), 247-259.

Konopova, B., & Jindra, M. (2008). Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolous metamorphosis. *Development*, 135(3), 559-568.

Konopova, B., Smykal, V., & Jindra, M. (2011). Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. *PLoS One*, 6(12), e28728.

草間 慶一, 高桑 正敏 (1984). 『日本産カミキリ大図鑑 (日本鞘翅目学会編)』講談社, 東京, 374-493.

Lupi, D., Jucker, C., & Colombo, M. (2013). Distribution and biology of the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotha hilaris hilaris* (Pascoe) in Italy. *EPPO Bulletin*, 43(2), 316-322.

Maddison, W. P., Maddison, D. R. (2005). MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution. Version 4. *Sinauer Associates*, Massachusetts.

槇原 寛 (1986). 『カミキリムシ-分布拡大と地理的変異. 日本の昆虫-侵略と攪乱の生態学 (桐谷 圭治編)』, 東海大学出版会, 東京, 96-106.

Minakuchi, C., Tanaka, M., Miura, K., & Tanaka, T. (2011). Developmental profile and hormonal regulation of the transcription factors *broad* and *Krüppel homolog 1* in

hemimetabolous thrips. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(2), 125-134.

Muggeo, V. M. (2003). Estimating regression models with unknown break-points. *Statistics in medicine*, 22(19), 3055-3071.

Munyiri, F. N., Asano, W., Shintani, Y., & Ishikawa, Y. (2003). Threshold weight for starvation-triggered metamorphosis in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied entomology and zoology*, 38(4), 509-515.

Munyiri, F. N., & Ishikawa, Y. (2004). Endocrine changes associated with metamorphosis and diapause induction in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *Journal of insect physiology*, 50(11), 1075-1081.

Munyiri, F. N., & Ishikawa, Y. (2005a). Feeding glucose or sucrose, but not trehalose, suppresses the starvation-induced premature pupation in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *Journal of insect physiology*, 51(9), 1005-1012.

Munyiri, F. N., & Ishikawa, Y. (2005b). Endocrine changes associated with the starvation-induced premature metamorphosis in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *General and comparative endocrinology*, 144(2), 150-155.

Nijhout, H. F. (1975). A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Biological bulletin*, 214-225.

Nijhout, H. F. (2008). Size matters (but so does time), and it's OK to be different. *Developmental cell*, 15(4), 491-492.

Nijhout, H. F., Riddiford, L. M., Mirth, C., Shingleton, A. W., Suzuki, Y., & Callier, V. (2014). The developmental control of size in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(1), 113-134.

Nijhout, H. F., & Williams, C. M. (1974a). Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): growth of the last-instar larva and the decision to pupate. *Journal of Experimental Biology*, 61(2), 481-491.

Nijhout, H. F., & Williams, C. M. (1974b). Control of moulting and metamorphosis in

the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *Journal of Experimental Biology*, 61(2), 493-501.

Nishita, Y., & Takiya, S. (2004). Structure and expression of the gene encoding a *Broad-Complex* homolog in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 339, 161-172.

Nishita, Y., & Takiya, S. (2006). Differential usage of two promoters of the *Broad-Complex* gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(10), 779-788.

Nishita, Y., & Takiya, S. (2009). Differential responsiveness of *BmBR-C* promoters to ecdysone signals. *Journal of insect biotechnology and sericulture*, 78(3), 127-138.

Piulachs, M. D., Pagone, V., & Bellés, X. (2010). Key roles of the *Broad-Complex* gene in insect embryogenesis. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(6), 468-475.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Reza, A. M. S., Kanamori, Y., Shinoda, T., Shimura, S., Mita, K., Nakahara, Y., Kiuchi, M., & Kamimura, M. (2004). Hormonal control of a metamorphosis-specific transcriptional factor *Broad-Complex* in silkworm. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(4), 753-761.

桜井 勝 (1981). 「昆虫ホルモンの制御機構: エクダイソン分泌の調節を中心に」. 『化学と生物 日本農芸化学会』, 19 (2), 70-79.

Sato, T., & Suzuki, A. (2001). Effect of starvation and feeding of larvae during 4th stadia on pupation and adult size in *Dacne picta* (Coleoptera: Erotylidae). *Applied Entomology and Zoology*, 36(2), 189-197.

Shafiei, M., Moczek, A. P., & Nijhout, H. F. (2001). Food availability controls the onset of metamorphosis in the dung beetle *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Physiological Entomology*, 26(2), 173-180.

Shintani, Y., & Ishikawa, Y. (1997a). Temperature dependency of photoperiodic

response and its geographic variation in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied entomology and zoology*, 32(2), 347-354.

Shintani, Y., & Ishikawa, Y. (1997b). Effects of photoperiod and low temperature on diapause termination in the yellow-spotted longicorn beetle (*Psacotha hilaris*). *Physiological Entomology*, 22(2), 170-174.

Shintani, Y., & Ishikawa, Y. (1997c). Diapause avoidance induced by low temperature in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 85(1), 11-15.

Shintani, Y., & Ishikawa, Y. (1998). Photoperiodic control of larval diapause in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*: analysis by photoperiod manipulation. *Entomologia experimentalis et applicata*, 86(1), 41-48.

Shintani, Y., & Ishikawa, Y. (1999). Transition of diapause attributes in the hybrid zone of the two morphological types of *Psacotha hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environmental entomology*, 28(4), 690-695.

Shintani, Y., Ishikawa, Y., & Tatsuki, S. (1996). Larval diapause in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied entomology and zoology*, 31(4), 489-494.

Shintani, Y., Munyiri, F. N., & Ishikawa, Y. (2003). Change in significance of feeding during larval development in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *Journal of insect physiology*, 49(10), 975-981.

Spokony, R. F., & Restifo, L. L. (2007). Anciently duplicated *Broad Complex* exons have distinct temporal functions during tissue morphogenesis. *Development genes and evolution*, 217(7), 499-513.

Spokony, R. F., & Restifo, L. L. (2009). Broad Complex isoforms have unique distributions during central nervous system metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, 517(1), 15-36.

Stieper, B. C., Kupershtok, M., Driscoll, M. V., & Shingleton, A. W. (2008). Imaginal discs regulate developmental timing in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 321(1), 18-26.

Sugimura, M., Watanabe, H., Lo, N., & Saito, H. (2003). Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris*. *European Journal of Biochemistry*, 270(16), 3455-3460.

Suzuki, Y., Koyama, T., Hiruma, K., Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (2013). A molt timer is involved in the metamorphic molt in *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), 12518-12525.

Suzuki, Y., Truman, J. W., & Riddiford, L. M. (2008). The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development*, 135(3), 569-577.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

Terao, M., Hirose, Y., & Shintani, Y. (2015). Food-availability dependent premature metamorphosis in the bean blister beetle *Epicauta gorhami* (Coleoptera: Meloidae), a hypermetamorphic insect that feeds on grasshopper eggs in the larval stage. *Entomological Science*, 18(1), 85-93.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.

Truman, J. W., Hiruma, K., Allee, J. P., MacWhinnie, S. G. B., Champlin, D. T., & Riddiford, L. M. (2006). Juvenile hormone is required to couple imaginal disc formation with nutrition in insects. *Science*, 312(5778), 1385-1388.

von Kalm, L., Crossgrove, K., Von Seggern, D., Guild, G. M., & Beckendorf, S. K. (1994). The *Broad-Complex* directly controls a tissue-specific response to the steroid hormone ecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *The EMBO journal*, *13*(15), 3505.

Watari, Y., Yamanaka, T., Asano, W., & Ishikawa, Y. (2002). Prediction of the life cycle of the west Japan type yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) by numerical simulations. *Applied entomology and zoology*, *37*(4), 559-569.

横井 直人. (1989). 「キボシカミキリの桑における羽化率について」『日本蚕糸学雑誌』, *58*(1), 47-52.

Zhou, B., Hiruma, K., Shinoda, T., & Riddiford, L. M. (1998). Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental biology*, *203*(2), 233-244.

Zhou, B., & Riddiford, L. M. (2001). Hormonal regulation and patterning of the broad-complex in the epidermis and wing discs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental biology*, *231*(1), 125-137.

Zhou, B., Williams, D. W., Altman, J., Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (2009). Temporal patterns of *broad* isoform expression during the development of neuronal lineages in *Drosophila*. *Neural Development*, *4*, 39.

Zhou, X., & Riddiford, L. M. (2002). Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development*, *129*(9), 2259-2269.

Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L., & Laski, F. A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(22), 10717-10721.