

## ナミテントウにおけるエステラーゼ アイソザイムの変異<sup>1</sup>

谷 本 智 昭

香川県高松高等学校生物教室

(1975 年 4 月 11 日受領)

テントウムシ科に属する種における 種内酵素多型および 種間特異性を 検討する目的で、翅鞘斑紋の多型に富むナミテントウについて、酵素系においても分子多型があらわれてくるかどうかを  $\beta$ -ナフチルアセテートを基質とする可溶性非特異的エステラーゼのアイソザイムを寒天ゲル電気泳動法を用いて分析し、あわせて他 2 種のテントウムシとの間に、酵素タンパクレベルで種間特異性があらわれてくるかどうかについても比較したところ若干の興味ある知見をえたので報告する。

なお、本研究についてご懇切な御助言とご激励をいただき、ナミテントウの人工飼料を分譲いただいた香川大学農学部岡本秀俊助教授に対し深く感謝の意を表します。また、電気泳動法についてご指導いただいた香川農試病虫部主任尾崎幸三郎博士に謝意を表します。

### 材料および方法

供試のナミテントウ (*Harmonia axyridis* PALLAS) およびナナホシテントウ (*Coccinella septempunctata bruckii* MULSANT) は、香川県高松市飯田町ならびに御所町の小麦畑で、またニジュウヤホシテントウ (*Epilachna sparsa orientalis* DIEKE) はジャガイモ畑でそれぞれ 1974 年 5 月 10 日から 5 月 22 日までの間で採集し、1 日間は消化管内容物が完全消化される必要があるため、スポンジに水を浸みこませて飼育したあと、個体のまま冷凍保存し材料は冷凍後 5 日以内に分析した。なお、実験材料はすべて成虫を使い、採集および飼育の際に交尾行動がみられたものについては雌雄を区分して保存した。また、泳動の際に翅鞘斑紋も記録した。

寒天ゲル電気泳動法の試料液としては、成体各 1 個体ずつ脱イオン水でよく洗い、各個体の 4 倍重の脱イオン水を加えて各個体ごとに体全体のホモジェネートを作成した。試料液は東洋ろ紙 No. 50 を  $1 \times 3$  mm の小片にしたものに添加し、電極槽液として pH 6.8 のリン酸緩衝液 (イオン強度 0.05) を使用した。また、寒天ゲルフィルムはリン酸緩衝液 (イオン強度 0.025) 100 ml に P・V・P (ポリビニルピロリドン) 2 g と寒天粉末 0.7 g とを加えて 30 分蒸し、ガラス板 (17×10 cm) 上に 0.9 mm の厚さのゲルフィルムを作成した。そして、上記の試料液を添加したろ紙をゲルフィルム内にうめこみ、冷所で 30 分

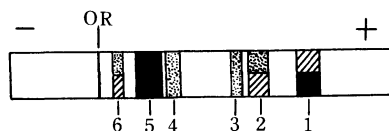
放置した後、ろ紙を取り除き電極槽にセットして定電圧 (250V-8 mA) を 90 分間流した。泳動後 2%  $\beta$ -ナフチルアセテートのアセトン液を基質として噴霧し、30 分間湿室定温器 (38°C) でインキュベートした。発色は 2% ナフタルニジアンゾブル B 水溶液によった。なお、アイソザイムの活性帯は移動度の大きい方から順次原点側の小さい方へ Est 1 から Est 6 として表示した。

### 結果ならびに考察

寒天ゲル電気泳動法によるナミテントウの非特異的エステラーゼアイソザイムは、同一種内においても個体間に移動度や活性帯の大きさなどに著しい変異がみられ、種内アイソザイムパターンを六つのタイプ (A~F) に類別することができた。また寒天ゲル電気泳動法で判別できる  $\beta$ -ナフチルアセテートを基質とするアイソザイムの数は Est 1 から Est 6 の 6 本が存在しそれぞれ活性帯として検出できた。

#### 1. 体全体のエステラーゼ泳動分離像の概要

香川県高松市の一つの地域集団で採集された検体 33 個体であるが、それらのアイソザイムパターンは第 1 図に示すように、総合すると陽極端部にみられる Est 1 はほとんどの個体にみられ高活性あるいはかなり高い活性を示した。次に泳動板中央部に Est 2 および Est 4 が検出されるが、前者はすべての個体に存在しかなり高活性の場合と低活性の場合とがみられた。また後者の Est 4 は殆んど個体に存在するがいずれも低活性である。ただ中央部に存在する Est 3 はごく少数の個体であられる活性帯である。また原点側に近い Est 6 および Est 5 は、前者がかなり多くの個体にみられる中活性あるいは低活性を示すのに対し、後者は非常に高活性で活性帯の幅も大きいごく少数の個体に存在するものである。



第 1 図 ナミテントウにおけるエステラーゼアイソザイムの泳動像。

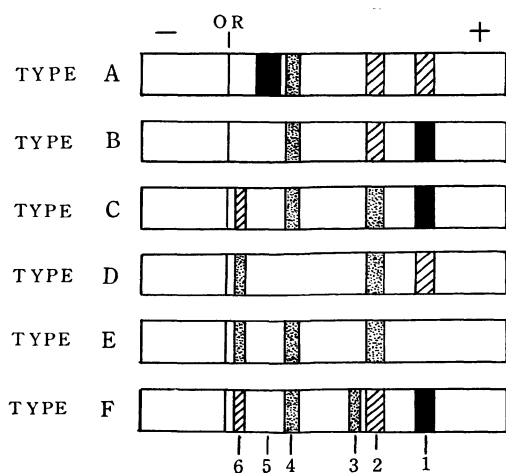
以上総合すると第 1 図のように、Est 1 から Est 6 の 6 本のエステラーゼアイソザイムが検出できた。そして個体間の変異はそれらのいずれかの欠除による多型であると判断できた。

#### 2. 種内アイソザイムパターンの類別と集団での出現ひん度

種内アイソザイムパターンを判別していくうちに、およそ六つのタイプ (A~F) に類別して扱うことができると考えた (第 2 図)。

非常に複雑なアイソザイムパターンであるが、各個体のパタ

1 Variations of esterase isozymes in *Harmonia axyridis* PALLAS. By Chiaki TANIMOTO (Takamatsu High School, Takamatsu-shi, Kagawa 760)



第2図 ナミテントウにみられるエステラーゼアイソザイムの泳動像タイプと種内酵素多型。

TYPE A : 4本のアイソザイムが存在し、特に Est 5 が非常に高活性、Est 1 および Est 3 が中活性、Est 4 が低活性のもの。

TYPE B : 3本のアイソザイムが検出され、Est 1 が高活性、Est 2 が中活性、Est 4 が低活性のもの。

TYPE C : 4本が存在し、Est 1 が高活性、Est 2 および Est 4 が低活性、さらに Est 6 が中活性のもの。

TYPE D : 3本が存在し、いずれも活性が低いが、Est 1 が中活性のもの。

TYPE E : 3本が検出され、すべて低活性であり、Est 1 および Est 5 が欠除している。

TYPE F : Est 5 を欠除するだけで他の5本が活性帯をなし、特に Est 1 は高活性、Est 2 および Est 6 は中活性、また Est 3 および Est 4 は低活性のもので、Est 3 は他のタイプにはない活性帯である。

第1表 エステラーゼ各タイプの出現ひん度\*

TYPE	A	B	C	D	E	F
%	18.2	18.2	33.3	9.1	6.1	15.1

\* 香川県高松市集団

ーンを六つのタイプにあてはめて自然集団における出現ひん度を第1表にまとめた。

この自然集団ではタイプCの出現率が33%程度と一番高く、次にタイプBおよびタイプAがそれぞれ約18%、タイプF、タイプDそしてタイプEと順次出現率が小さくなる結果を得た。

### 3. 斑紋型とエステラーゼアイソザイム・タイプ

ナミテントウの翅鞘斑紋を紅型、四紋型、二紋型、斑紋型と大きく四つに分けて、エステラーゼアイソザイムのタイプを比較したところ第2表のような結果が得られた。データのうち、紅型、四紋型、斑紋型はサンプル数が非常に少ないのではっきりした結果はでないが、二紋型に関するかぎりエステラーゼアイソザイムのタイプがAからFまですべてこの二紋型に存在することから斑紋型とエステラーゼタイプとの関連性はあまりみ

第2表 斑紋型とエステラーゼタイプとの関係

斑紋型 \ TYPE	A	B	C	D	E	F
二紋型	6	6	10	1	2	3
四紋型	0	0	1	1	0	2
斑紋型	0	0	0	0	0	1
紅型	0	0	0	1	0	0

数字は個体数を示す。

られないものと判定された。

### 4. 性差とエステラーゼアイソザイム・タイプ

野外での採集時ならびにベトリ皿で飼育している際、交尾行動がみられたものについてのみ雌雄を判別したため、今回の実験に供した個体数が少なく結論まではだせないが、第3表のような一応の結果を得た。

第3表 性差とエステラーゼ各タイプとの関係

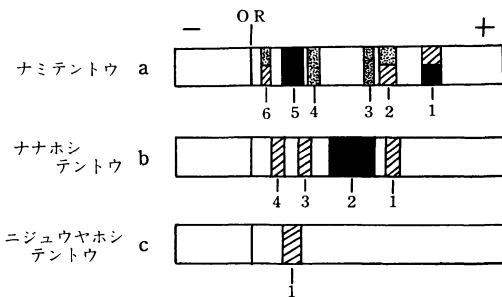
性 \ TYPE	A	B	C	D	E	F
♂	2	4	2	0	1	1
♀	0	1	3	2	2	1

数字は個体数を示す。

すなわち、雄にもエステラーゼアイソザイムのタイプがAからFまで殆んどすべて認められること、また雌にも同様な結果が認められることから、エステラーゼアイソザイムについては明らかな性差は認められないと判定された。ただ、サンプル数が少ないので今後個体数を増やして再度検討してみたい。

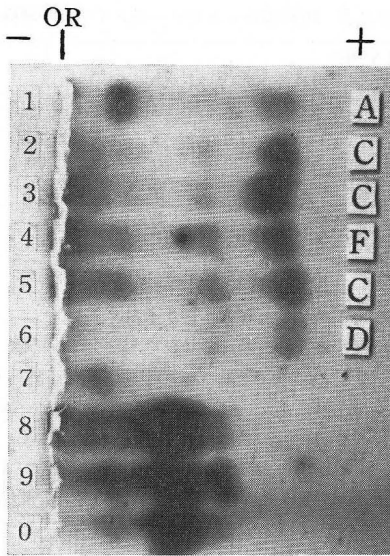
### 5. テントウムシ3種のエステラーゼアイソザイムパターンの差異

第3図および第4図に示したように、ナミテントウには6本のエステラーゼアイソザイムが検出され、パターンによって六つに類別できる種内酵素多型を示すのに対し、ナナホシテントウでは4本の活性帯がそれぞれアイソザイムをなし、特に Est 2 は非常に高活性でゾーンの幅も大きく調査された個体すべてに



第3図 テントウムシ3種のエステラーゼアイソザイム泳動像にみられる種間特異性。

a. ナミテントウ b. ナナホシテントウ  
c. ニジウヤホシテントウ



第4図 自然集団(高松)におけるエステラーゼアイソザイム・タイプの個体変異。  
No. 1~No. 6 ナミテントウ  
No. 7 ニジュウヤホシテントウ  
No. 8~No. 10 ナナホシテントウ

検出できた。Est 3 ならびに Est 4 とは種内でいずれかを欠除する程度の個体変異は認められたが、ナミテントウとは対照的であった。

また、ニジュウヤホシテントウには1本の活性帯しか検出できなかった。今回調査したテントウムシ3種にはエステラーゼアイソザイム・パターンにおいて種間特異性が明りょうであった。

近年になって種の分化、種の特異性などを研究する一手法として、電気泳動法を使ってタンパク質の差異あるいはアイソザイムをとりあげたもの、また免疫学的な手法によって分析する方法がとられている。

佐々治・大西(1973)は $\alpha$ -ナフチルアセテートを基質として1個体全体の可溶性エステラーゼのアイソザイムをディスク電気泳動法で分析した。その結果ナミテントウのアイソザイム

パターンには個体間に著しい変異があるが、総合すると中央部に3種と陽極部の端に1種の顕著なもの、やや不明確な6種、合計10種のアイソザイムが存在し、個体間の変異はそれらのいずれかを欠除するという。あわせてナナホシテントウについて同様な方法で分析すると、極めて安定したパターンを示すことで対照的であったと報告している。

著者の結果も、基質が $\beta$ -ナフチルアセテートであったこと、さらに寒天ゲル電気泳動法を用いたことで活性帯の数は少なくまた異なるが、ナナホシテントウおよびナミテントウとを比較した場合種内多型の有無については、ほぼ同様の結果が得られたものとする。ただ著者がナミテントウの種内をアイソザイムパターンによって、六つに類別できたことは今後各地集団における各タイプの出現ひん度を比較検討でき、集団的な立場で種の系統分化の問題などを分析する手がかりが得られたものと考えられる。

また、エステラーゼタイプ(A~F)と斑紋型および性差との関連性については、もう少しサンプル数を多くして論議すべきで今後の課題である。

なお、佐々治(1974)はオオニジュウヤホシテントウ群について、同様の方法でエステラーゼアイソザイムを検出したところ、いずれの型においても、同一個体群内にも顕著な酵素多型現象がみられ、そのパターンは異った種または型間で特異性が認められたと報告している。今回著者が扱ったニジュウヤホシテントウの場合はサンプル数が少なく、また、寒天ゲル電気泳動法によったこともあり、多型現象を明確には認められなかったが、今後さらに検討を要するものと考えられる。

#### 引用文献

- 青木幸一郎・中埜栄三(1969)電気泳動実験法(第4版)、広川書店、東京、185pp.  
電気泳動学会(1969)電気泳動実験法(第4版)、文光堂、東京、443pp.  
OGITA, Z. (1964) Med. J. Osaka Univ. **15**: 141~153.  
佐々治寛之・大西英嗣(1973)動雑 **82**: 340(講演要旨).  
佐々治寛之(1974)動雑 **83**: 442(講演要旨).  
湯嶋 健(1968)植物防疫 **22**: 71~74.