引用文献

- DAVIS, B. J. (1964) *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
 江原昭三 (1957) 植物防疫 **11**: 469-472.
 EHARA, S. (1966) *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. 6, Zool.* **16**: 1-22.
 江原昭三 (1973) 植物防疫 **27**: 293-298.
 江原昭三 (編) (1993) 日本原色植物ダニ図鑑. 東京: 全国農村教育協会, 298 p.
 江原昭三・真梶徳純 (1975) 農業ダニ学. 東京: 全国農村教育協会, 328 p.
 EHARA, S. and M. MASAKI (1989) *Acta Arachnol.* **38**: 49-54.
 ELIZABETH, E. G.-C., J. A. EASH and J. GRANETT (1988) *J. Econ.*

- Entomol.* **81**: 770-775.
 GOKA, K. and A. TAKAFUJI (1992) *Appl. Entomol. Zool.* **27**: 141-150.
 GOMI, K. and T. GOTOH (1996) *Appl. Entomol. Zool.* **31**: 417-425.
 GOTOH, T. and K. TAKAYAMA (1992) *J. Acarol. Soc. Jpn.* **1**: 45-60.
 JEPSON, L. R., H. H. KEIFER and E. W. BAKER (1975) *Mite Injurious to Economic Plants*. Berkley, Los Angeles and London: Univ. Calif. Press, pp. 219-230.
 小林義明 (1978) 第 22 回応動昆虫大会講演要旨 p. 103. [講要]
 WARD, P. S., I. A. BOUSSY and D. E. SWINGER (1982) *Ann. Entomol. Soc. Am.* **75**: 595-598.

数種昆虫の神経筋シナプスにおける興奮性シナプス後電位に対するグルタミン酸の作用

白井 トア子

理化学研究所昆虫生態制御研究室

Effects of L-Glutamic Acid on Excitatory Post-Synaptic Potentials at Neuromuscular Junction of Several Insect Species. Toako USUI (Insect Toxicology and Physiology Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research, Hirosawa 2-1, Wako, Saitama 351-01, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **40**: 315-318 (1996)

Abstract: Excitatory post-synaptic potentials at the neuromuscular junction of the larvae of several insects were suppressed by glutamate: IC_{50} (concentrations for 50% suppression of EPSP amplitude) were 9.6×10^{-5} M, 1.5×10^{-4} M, 1.7×10^{-4} M, 1.9×10^{-4} M, 2.4×10^{-4} M, 5.0×10^{-4} M and 5.0×10^{-4} M for *Tenebrio molitor* (2-cm body length), *T. molitor* (1.5 cm), *Spodoptera litura*, *Crocidolomia binotalis*, *Leucania separata*, *Mamestra brassicae*, *Epilachana vigintioctopunctata*, respectively. The depolarization pattern of the post-synaptic membrane was similar in all the insect samples. These results strongly suggest that glutamate acts as the excitatory transmitter at the insect neuromuscular junction.

Key words: glutamate, insect, excitatory post-synaptic potential

昆虫の神経筋シナプスにおける興奮性神経伝達物質はグルタミン酸であると推定されている。直翅目のバクダ *Schistocerca gregaria* (USHERWOOD and MACHILI, 1968; USHERWOOD et al., 1968; CULL-CANDY, 1983), ゴキブリ *Periplaneta americana* (SEPULVEDA and SATEELE, 1991), 双翅目のハエ *Sarcophaga bullata* (VYSKOCIL et al., 1984), 鞘翅目のチャイロコメノゴミムシ *Tenebrio molitor* (YAMAMOTO and WASIO, 1979, 1980; USUI and FUKAMI, 1984) についてすでに報告がある。チャイロコメノゴミムシダマシの腹部

縦走筋における神経筋シナプスの興奮性シナプス後電位 (以下 EPSP と表す) に対し, グルタミン酸とグルタミン酸アゴニストは膜の脱分極や EPSP の抑制を示し, 興奮性伝達物質がグルタミン酸である可能性を薬理学的に示唆している (USUI and FUKAMI, 1984)。しかし, まだ多くの昆虫種で確認されていない。本報ではチャイロコメノゴミムシ *Tenebrio molitor* LINNE のほか, 報告例の少ない鱗翅目を中心に数種の昆虫ヨトウガ *Mamestra brassicae* LINNE, アワヨトウ *Leucania separata* WALKER, ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* FABRICIUS, ケバカノメイガ *Crocidolomia binotalis* ZELLER, ニジユウヤホシテントウ *Epilachana vigintioctopunctata* FABRICIUS を用いて, 興奮性神経伝達物質の候補としてグルタミン酸の可能性を検討した。

実験に用いた昆虫を提供いただいた阿津沢新二, 内海恭一, 栗原政明, 信沢智恵子の各氏に感謝します。

材料と実験方法

1. 供試昆虫

チャイロコメノゴミムシダマシ幼虫は体長 2 cm と 1 cm, ヨトウガ, アワヨトウ, ハスモンヨトウは 5 齢幼虫 2, 3 日目で約 2 cm, ケバカノメイガは終齢 1 日目で約 1.1 cm, ニジユウヤホシテントウは終齢 1 日目で 0.6 cm を用いた。飼育条件は昆虫飼育室で $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L-8D とした。チャイロコメノゴミムシダマシはフスマで, ヨトウガは人工飼料 (服部・阿津沢, 1980) で, ケバカノメイガも人工飼料 (KURIHARA et al., 1987) で, アワヨトウ, ハスモンヨトウは市販の人工飼料 (日本農産工業株式会社 insecta LF) で, ニジユウヤホシテントウはトマトでそれぞれ飼育したものを用いた。すべての昆虫の体長は標本チャンプの大きさの関係で 2.0 cm 以内の範囲のものを用いた。

Table 1. Resting potentials, EPSP amplitudes, concentrations of glutamate for 50% suppression of EPSP amplitude (IC_{50}) and depolarization of muscle membrane for several insects

Insect (cm)	Resting potential (mV)	EPSP Amplitude (mV)	IC_{50} (M)	Depolarization of muscle (mV) ^a
<i>T. molitor</i> (2)	-40~-60	15~20	9.6×10^{-5}	30
<i>T. molitor</i> (1.5)	-35~-40	7~10	1.5×10^{-4}	14
<i>S. litura</i> (2)	-40~-50	10~15	1.7×10^{-4}	35
<i>C. binotalis</i> (1.1)	-35~-50	7~13	1.9×10^{-4}	15
<i>L. separata</i> (2)	-40~-50	15~20	2.4×10^{-4}	21
<i>M. brassicae</i> (2)	-35~-60	12~18	5.0×10^{-4}	26
<i>E. vigintioctopunctata</i> (0.6)	-20	1~4	5.0×10^{-4}	8

^a with 10^{-3} M glutamate.

Fig. 1. Pen-oscillographic recording of EPSP and depolarization by 10^{-3} M glutamate in ventral longitudinal muscles. A: *T. molitor*, B: *M. brassicae*, C: *S. litura*, D, E: *C. binotalis*, F: *L. separata*, G: *E. vigintioctopunctata*. Glutamate perfusion was started at the upward arrows and was washed at the downward arrows. Calibration, 10 mV (A-C, F), 5 mV (D, E, G); 24 s.

2. 化学物質

グルタミン酸 Na 塩は和光純薬から購入した特級試薬を用い、下記塩類溶液に溶かした。

3. 電気生理実験

EPSP の測定は細胞内微小電極法を用いた。下記塩類溶液中で、昆虫の標本は背側からメスで切り開き腸管を取り除いたのち、神経と腹部縦走筋を露出し、興奮性神経に支配されている神経筋シナプス後膜近傍に 2 M のクエン酸カリウムをつめたガ

ラス微小電極を刺入した。電極抵抗は 5~10 M Ω の範囲内とした。一方、その筋細胞を支配している興奮性神経に 2 本の銀線を当てて刺激装置 (SEN-7103, 日本光電) により、短い電気パルスで刺激した。矩形波は持続時間が 90 μ sec で電圧は 5~7 V で設定した。0.5 Hz のパルスで神経刺激して EPSP を導出し、連続観察した。記録電位は AVM-10 増幅器 (日本光電) と Model 8500 電子測定機 (Dagan) で増幅出力して日本光電の VC10 オシロスコープと RECTIHORZ-8 の感熱式記録計 (三栄測器) で記録した。塩類溶液イオン組成は 70 mM NaCl, 30 mM KCl, 0.8 mM CaCl₂, 14.2 mM MgCl₂, 445 mM グルコース, 5 mM HEPES (695 osm) (USUI and FUKAMI, 1984) を用いた。pH は NaOH で調整し pH 7.2 とした。標本チャンバーの容量は約 2 ml とし、塩類溶液を用いて灌流した。グルタミン酸投与時は灌流を一時停止してピペットでグルタミン酸溶液 0.2 ml をチャンバー中に注入し、EPSP 抑制が一定になったところで塩類溶液の灌流で洗浄した。すべての実験は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で行った。実験値は 3~6 回の実験の平均値と標準誤差を求めた。Dose-Response Curve はプロットに沿ってほぼシグモイド型にフリーハンドで描いた。

結果および考察

それぞれの昆虫の腹部縦走筋の神経筋シナプスにおける静止膜電位はチャイロコメノゴミムシダマシ、ヨトウガ、ハスモンヨトウ、アワヨトウ、ケバコノメイガは -35~-60 mV の範囲内であったが、ニジュウヤホシテントウは -20 mV であった (Table 1)。静止膜電位は細胞内と細胞外のイオンの濃度差によって生ずる電位差を示す。ここでの実験では細胞外液として同じ塩類溶液を用いて比較したが、この結果は各々の昆虫の膜の性質あるいは細胞内液イオン組成の他に個々の昆虫体液 (外液) による浸透圧の違いを反映しているだろう。

神経刺激によって発生する EPSP の振幅は、チャイロコメノゴミムシダマシ (2 cm) では 15~20 mV、チャイロコメノゴミムシダマシ (1.5 cm) では 7~10 mV、アワヨトウでは 15~20 mV、ヨトウガでは 12~18 mV、ハスモンヨトウでは 10~15 mV、ケバコノメイガでは 7~13 mV であった。ニジュウヤホ

Fig. 2A, B. Dose-response curve for glutamate-induced inhibition of neurally-evoked EPSP. Data points with error bars represent mean $\pm$ SE of 3–5 experiments. A; a: *T. molitor* (2 cm), b: *T. molitor* (1.5 cm), c: *C. binotalis*, d: *M. brassicae*, B; e: *S. litura*, f: *L. separata*, g: *E. vigintioctopunctata*.

シテントウでは標本があまりに小さ過ぎ神経刺激の操作ができなかったが、自発性 EPSP で 1–4 mV であった (Table 1, Fig. 1)。

それぞれの昆虫の腹部縦走筋の神経筋シナプスの EPSP に対して 10^{-3} M のグルタミン酸を作用させると、チャイロコメノゴミムシダマシは 30 mV 以上の膜の脱分極が見られ、EPSP は 100% 抑制された。ハスモンヨトウ、ケブカノメイガはそれぞれ 35 mV, 15 mV の膜の脱分極を示し、90% 以上の EPSP の抑制が見られた。アワヨトウ、ヨトウガはそれぞれ 21 mV, 26 mV の膜の脱分極で EPSP が 80% 抑制された。ニジュウヤホシテントウは 8 mV の膜の脱分極で自発性 EPSP が 80% 抑制された (Fig. 1, 2A, B)。

チャイロコメノゴミムシダマシで生育ステージの違う体長が 2.0 と 1.5 cm について比較すると、大きい方が、小さい方に比べて静止膜電位もやや深く (Table 1), グルタミン酸反応も低い

濃度で効果が大きかった (Fig. 2A ab)。また、塩類組成液中のカルシウム濃度が 0.7 mM の場合はグルタミン酸による IC_{50} は 4.2×10^{-5} M であるが (USUI and FUKAMI, 1984), 今回の 0.8 mM カルシウム濃度の場合は 9.6×10^{-5} M となったので、カルシウム濃度が低いほどグルタミン酸の効果が大きい傾向が見られる。その他に外液を冷やすとグルタミン酸反応が効きにくくなり、温度の影響が見られた。

EPSP 振幅の 50% 抑制制度を示すグルタミン酸濃度の IC_{50} で比較すると、チャイロコメノゴミムシダマシ、ハスモンヨトウ、ケブカノメイガ、アワヨトウ、ヨトウガ、ニジュウヤホシテントウはそれぞれ、 9.6×10^{-5} M, 1.7×10^{-4} M, 1.9×10^{-4} M, 2.4×10^{-4} M, 5.0×10^{-4} M, 5.0×10^{-4} M であった。チャイロコメノゴミムシダマシ (2 cm) > チャイロコメノゴミムシダマシ (1.5 cm), ハスモンヨトウ、ケブカノメイガ、アワヨトウ > ヨトウガ、ニジュウヤホシテントウの順になった (Fig. 2A, B, Table 1)。

ケブカノメイガは自発性 EPSP を発生するものが多かった。他の昆虫にも塩類溶液の灌流速度が遅い場合時々同じような現象が観察され、EPSP の発生頻度が多いと膜の脱分極まで生ずることがあるが、灌流速度を速くすることによってこの現象は消滅した。ケブカノメイガの場合は自発性の EPSP はやや EPSP 発生頻度が少ないためか、膜の脱分極も見られず長時間続いた。そして、神経刺激によって生ずる EPSP に対するグルタミン酸反応と全く同じグルタミン酸反応を示した。チャイロコメノゴミムシダマシの場合も自発性の EPSP が見られることがあり、中枢を潰すかあるいは神経を切ることによって消滅したことから、この現象は神経節における中枢で興奮状態にあるためと考えられる。中枢の興奮状態と外液の灌流速度のメカニズムの関連について次のことなどが考えられる。灌流速度が遅い場合、神経筋近傍において神経筋伝達に伴う伝達物質の蓄積あるいは塩類イオン濃度の変化などの要因が感覚神経に刺激を与え中枢に伝達し興奮状態を起こさせ、灌流速度を速くすることによってこれらのことが除去されるのであろうと考えられる。ケブカノメイガの場合も同様であろう。

同じ節足動物であるザリガニでは昆虫のグルタミン酸反応と違いが見られる。昆虫の場合は、グルタミン酸によって膜が脱分極し洗浄によって初めて静止膜電位に戻るが、ザリガニの場合は、グルタミン酸によって膜が脱分極するが洗浄しなくても静止膜電位に戻る (SHINOZAKI and SHIBUYA, 1974; USUI, 未発表)。このことは昆虫腹部縦走筋とザリガニ歩脚においてグルタミン酸リセプターの構造が異なる、あるいはリセプターのサブタイプが異なっているため、カインेटクスが異なっている可能性が考えられる。

以上の実験結果から、昆虫は種類によって、また生育ステージによって神経伝達反応の程度が変化したり、電気生理学的、薬理的に少しずつ差があるが、チャイロコメノゴミムシダマシ、ハスモンヨトウ、ケブカノメイガ、アワヨトウ、ヨトウ

ガ、ニジウヤホシテントウは EPSP 抑制に対するグルタミン酸濃度の IC_{50} が $9.6 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} M$ であり、昆虫間でそれほど大きな差は見られず、これらの種において同じようにグルタミン酸が神経伝達物質として働いていると考えられ、昆虫一般では神経筋シナプスにおける興奮性神経伝達物質がグルタミン酸である可能性をさらに裏付けるものとなる。

グルタミン酸リセプターのサブタイプには NMDA 型とキスカル酸型とカイニン酸型の 3 種類のタイプが知られており、昆虫の場合はキスカル酸型と言われている(篠崎, 1990)。筆者の報告(USUI and FUKAMI, 1984)でも IC_{50} がキスカル酸は $2.3 \times 10^{-5} M$ 、アスパラギン酸は $1.2 \times 10^{-3} M$ 、カイニン酸(未発表)は $3.5 \times 10^{-3} M$ で、キスカル酸が最も低濃度で膜の脱分極と EPSP の抑制効果がみられた。他の昆虫についてもキスカル酸タイプである可能性が高いことが考えられるので検討する必要がある。

引用文献

CULL-CANDY, S.G. (1983) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **48**: 269-278.

服部 誠・阿津沢新二 (1980) 応動昆 **24**: 36-38.

KURIHARA, M., S. TATSUKI, S. SUTRISNO and J. FUKAMI (1987) *Appl. Entomol. Zool.* **22**: 232-234.

SEPULVEDA, M.I. and D.B. SATEELE (1991) *Neurochem. Int.* **18**: 341-346.

SHINOZAKI, H. and I. SHIBUYA (1974) *Neuropharmacology* **13**: 665-672.

篠崎温彦 (1990) 日本農業学会誌 **15**: 605-611.

USHERWOOD, P.N.R. and P. MACHILI (1968) *J. Exp. Biol.* **49**: 341-361.

USHERWOOD, P.N.R., P. MACHILI and G. LEAF (1968) *Nature* **219**: 1169-1172.

USUI, T. and J. FUKAMI (1984) *Appl. Entomol. Zool.* **19**: 151-158.

VYSKOCIL, F., L. VYKLYCKY, V. VLACHOVA and E. UJEC (1984) *Mol. Physiol.* **74**: 143-154.

YAMAMOTO, D. and H. WASIO (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* **63C**: 75-80.

YAMAMOTO, D. and H. WASIO (1980) *J. Insect Physiol.* **26**: 253-256.

数種昆虫病原糸状菌のチャバネアオカメムシに対する病原性¹⁾

津田勝男*・吉岡哲也*²⁾・堤 隆文*

山中正博*³⁾・河原畑勇**

* 福岡県農業総合試験場

** 九州大学農学部

Pathogenicity of Some Entomogenous Fungi to Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). Katsuo TSUDA, Tetsuya YOSHIOKA,⁴⁾ Takafumi TSUTSUMI, Masahiro YAMANAKA⁵⁾ (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818, Japan) and Takeshi KAWARABATA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **40**: 318-321 (1996)

Abstract: The pathogenicity of 25 isolates of entomogenous fungi to the Brown-Winged Green bug, *Plautia stali*, was investigated. Eight isolates of *Beauveria bassiana* obtained from *P. stali* and 5 isolates of *B. bassiana* obtained from other insects showed pathogenicity. However,

another 5 isolates of *B. bassiana* obtained from other insects showed no pathogenicity. Two isolates of *Paecilomyces farinosus* also showed two type of pathogenicity. No isolates of *Beauveria brongniartii* and *Nomuraea rileyi* showed pathogenicity.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Plautia stali*

チャバネアオカメムシは、果樹園外のヒノキヤスギ等で繁殖し、そこから果樹園に飛来し、商品となる果実を直接加害する。このため、発生の予測および防除が非常に困難で、発生が多い場合には薬剤による防除だけでは被害を完全には防止できない。そこで著者らは、チャバネアオカメムシを生物的に防除する素材として昆虫病原糸状菌の探索を行ってきた。チャバネアオカメムシからは *Cordyceps nutans* (青木, 1957) および *Beauveria bassiana* (堤, 未発表) が分離された例があるが、防除素材としての検討はされていない。他のカメムシにおいては、森本 (1952) がイネクロカメムシから *Metarhizium anisopliae* および *Paecilomyces lilacinus* を分離した後、しばらく報告がなく、RAMOSKA (1984) に

1) 本研究の一部は第 37 回日本応用動物昆虫学会大会 (1992 年 10 月, 青森県弘前市) で発表した。

2) 現在 福岡県八女地域農業改良普及センター

3) 現在 農林水産省果樹試験場

4) Present address: Yame Farm Agent Office, Yame, Fukuoka 834, Japan.

5) Present address: National Institute of Fruit Tree Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

日本応用動物昆虫学会誌 (応動昆) 第 40 巻 第 4 号: 318-321 (1996)

1996 年 5 月 9 日受領 (Received 9 May 1996)

1996 年 6 月 5 日登載決定 (Accepted 5 June 1996)