学会賞受賞論文

(業績賞)

昆虫の表皮形成およびキチン合成に関する
生理・生化学的研究

満 井 喬

理化学研究所

The Physiological and Biochemical Studies on Insect Cuticle
Formation and Chitin Synthesis

Takashi MITSUI

The Institute of Physical and Chemical Research,
Hirosawa, Wako 351-01, Japan

The tanned pupal cuticle was formed *in vitro* when the wandering stage larval epidermis of *Manduca sexta* was cultured in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ of β -ecdysone for 4 days. Since metamorphosis occurs in response to two releases of ecdysone, epidermis was explanted from feeding final-instar larvae (day 3, weighing 6.5–7.0 g) before the first release of ecdysone and was cultured in Grace's medium. During the first 24 hr of exposure to 1 $\mu\text{g/ml}$ of β -ecdysone *in vitro*, the epidermis changed its cellular commitment to that for pupal cuticle formation. Juvenile hormone inhibited the change of the cellular commitment and the tissue subsequently formed larval cuticle in the presence of JH. The epidermis of the last instar larvae was found to convert JH I into JH-acid. This esterase activity increased as a function of larval age and was considered to be involved in elimination of intracellular JH from the target tissues in preparation for metamorphosis. The nuclei were isolated and assayed for specific JH binding using the competitive nuclear exchange assay. Specific binding was found only for epidermal nuclei from larvae before the change in commitment of the cells. Diflubenzuron was found to inhibit both endocuticle deposition and β -ecdysone-initiated pupal cuticle synthesis by using the *in vitro* culture technique. Both effects were due to its inhibition of chitin synthesis. When larvae were injected with ^{14}C -glucosamine after treatment of diflubenzuron (DFB), ^{14}C -UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-AGA) was found to accumulate *in vivo*. However, chitin synthetase was not inhibited by DFB. Peritrophic membrane in the midgut of *Mamestra brassicae* final instar larvae was used as a target to study the mode of inhibition of chitin synthesis by DFB. Chitin synthesis was not inhibited only when DFB and UDP-AGA were applied inside the midguts. When ^{14}C -AGA was applied outside the midguts, the amount of the radio-labeled compounds transported across the microvilli membrane was about 1/4 as much in the DFB-treated tissues as in the control tissues. The results lead the conclusion that DFB seems to be an inhibitor of UDP-AGA transport across the microvilli membranes.

は じ め に

昆虫の脱皮ホルモン (ecdysone) や幼若ホルモン (juvenile hormone, JH) の化学構造が決定されて以来, これらのホルモンやホルモン作用物質を昆虫成長制御物質として利用することを目的として, 昆虫ホルモンの研究,

とくに化学, 生化学的研究が, 盛んに行なわれるようになった^{1,2)}. 著者らは, おもに農作害虫を対象にして, JH 作用物質の生物検定法の確立に着手した³⁾. JH 作用物質は幼虫から蛹, 蛹から成虫への変態時に, 部分的に幼虫(蛹)の形質を残すような不完全な変態を起こさせることによって昆虫の成長を攪乱する. この変態阻止作用は

微量の JH 作用物質で有効であるが、終齢幼虫(蛹)の日齢によって感受性が大きく変動する。

本研究は、感受性の変動が何に起因するかという疑問を解明するために、変態のメカニズムとそれに及ぼす JH 作用物質の影響について昆虫の真皮をターゲットとして進めてきたものである。そして変態に必要な要因として、JH esterase の出現、JH 核リセプターの消失、JH 作用物質の作用機構として、JH 核リセプター消失のリズムの攪乱であると結論した。さらに、表皮の主成

分であるキチンの合成に関する研究に転じ、その阻害剤である diflubenzuron (DFB) の作用機構は、キチンの前駆物質である UDP-N-acetylglucosamine の膜透過阻害であろうことを示した。以下にその概略を示した。

昆虫の変態と幼若ホルモン (JH)

1. 昆虫真皮の器官培養

JH 研究の標的器官として成虫原基がよく用いられているが、JH の成虫原基に及ぼす影響はたんに発育阻止

Fig. 1 Cross section of stages in pupal cuticle formation after exposure of epidermis to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of β -ecdysone for 4 days, then to hormone-free Grace's medium.

Time after onset of culture: A, 6 days; B, 8 days; C, 10 days; D, 13 days; E and F, 20 days. The extremely dark portion of the cuticle immediately under the epicuticle in C-F is tanned pupal cuticle (arrow). Bar=40 μm .⁴⁾

Fig. 2 The production and tanning of pupal cuticle by epidermis *in vitro* after exposure of epidermis to 5 μ g/ml of β -ecdysone for varying lengths of time.

The percentage of cuticle (○) and tanned cuticle (●) formed are plotted.⁴⁾

である。これに対し、真皮を用いれば、JH の効果は幼虫表皮あるいは蛹表皮として現われるので、ターゲットとしてはすぐれている。タバコスズメガ (the tobacco hornworm, *Manduca sexta*) の終齢5日齢幼虫 (wandering stage 幼虫) を表面殺菌し、腹部第5節を切り出し、これを 4×4 mm の小片として、0~10 μ g/ml の β -ecdysone を含む Grace 培養液で培養した⁴⁾。0.1 μ g/ml 以上の β -ecdysone 存在下では真皮細胞は古い表皮から離れ 1 μ g/ml 以上で新しい表皮が形成され、5 μ g/ml 以上でほぼ完全な蛹の表皮が形成された (Fig. 1)。5 μ g/ml の β -ecdysone に expose する期間は Fig. 2 に示すように 4 日間で十分で、それ以上の exposure では逆にタンニング率が低下することが観察された。本法で得られた表皮はその表面構造 (Fig. 3) から容易に幼虫表皮と蛹表皮と識別することができる。ここに用いられた wandering stage では、この系に JH 作用物質を加えても得られる表皮はすべて蛹表皮で、JH に対する感受性はまったく失われていることが明らかとなった。

2. Commitment の転換と JH の影響

Manduca 終齢幼虫のホルモンタイターは Fig. 4 に示すように、3 日目 (体重 6.5~7.0 g) に JH は完全に消失し、4 日目に ecdysone の第1ピーク、続いて 7~8 日目に第2の大きなピークが見られる^{5,6)}。JH に対する感受性は終齢3日目に最も高い⁷⁾ので、3 日齢幼虫の真皮を

Fig. 3 The surface structures of cuticle formed by epidermis *in vitro*.

A: larval, B: pupal.⁴⁾

供試して以下の実験を行なった。真皮小片を 3 μ g/ml の JH 作用物質, epoxygeranylsesamol (EGS) と 5 μ g/ml の β -ecdysone の存在下で培養すると得られた表皮はすべて幼虫であった。そこで問題は、幼虫から蛹への転換 (これを幼虫から蛹への commitment の転換という) はどのようにして起こるかということである。Fig. 4 に示す ecdysone の第1ピークに着目し、真皮小片を 0.1 または 1 μ g/ml の β -ecdysone 存在下で 24 時間培養し、次の 24 時間はホルモンを含まない培地に、さらに 96 時間 5 μ g/ml の β -ecdysone、以後はまたホルモンを含まない培地とホルモンタイターに準じてホルモン環境を変えると Table 1 に示すように、0.1 μ g/ml の β -ecdysone では幼虫と蛹のモザイク、1 μ g/ml で蛹の表皮を生じた。次に最初の 24 時間は 1 μ g/ml の β -ecdysone とともに JH または EGS を加えておくと、3 μ g/ml の JH または EGS ではほぼ完全に commitment の転換は抑えられ、得られた表皮は大部分が幼虫であった。また、真皮小片をホルモンを含まない培地で 0~4 日間培養し、これに表皮形成開始に必要な β -ecdysone (5 μ g/ml, 96 時間) を加えると、Fig. 5 に示すように、ホルモンを含まない培地に長時間放置することによって、徐々に commitment

Fig. 4 Timing of endocrine events during the last larval stage and the larval-pupal transformation of *Manduca sexta* in 12L : 12D photoperiod at 25°C.
JH titer: dashed curve, ecdysone titer: solid curve.⁵⁻⁷⁾

Table 1 The change in commitment of epidermis from 5th instar *Manduca* larvae weighing 6.5 to 7.0 g as assayed *in vitro*.

Concentration of JH I or EGS (μg/ml)		Concentration of β-ecdysone (μg/ml)			Type of cuticle formed (%)		
Day 1		Day 1	Day 2	Day 3-6	Larval	Larval+Pupal	Pupal
JH I	0	0.1	0	5	8	67	25
	0	1	0	5	0	8	92
	3	1	0	5	100	0	0
	0.3	1	0	5	63	25	12
	0.03	1	0	5	21	43	36
EGS	3	1	0	5	89	11	0

EGS: epoxygeranylsesamol.

は転換し、幼虫型から蛹型へと移行するが、この系に JH 作用物質を添加すると幼虫表皮を形成する。すなわち、真皮をホルモンを含まない状態に長時間おいて、endogenous JH を分解によってとり除いただけでは commitment は完全に転換しない。以上のように、commitment の転換には第 1 ピークの β-ecdysone が重要な役割を持っている。JH 作用物質はこの β-ecdysone による commitment の転換を阻害することによって、正常な変態を阻害するものと結論された⁹⁾。

3. JH のメタボリズム

終齢 2, 3, 4 日齢幼虫の真皮を ³H-JH I を含む培地中で incubate し、培養液中の JH I およびその分解生成物を TLC で分離定量すると⁹⁾、分解生成物の 95% は

JH-acid¹⁰⁾であった。JH I の分解速度は 4, 3, 2 日齢の順に速く¹¹⁾、半減に要する時間はそれぞれ 7, 21, 45 分であった (Fig. 6a)。この系に JH 結合たんぱく¹¹⁻¹⁴⁾を加えると、2 日齢では分解速度は大きく減じ、4 日齢ではそれほど変わらず、3 日齢ではその中間であった (Fig. 6b)。

次に、各日齢の真皮細胞のホモジネートを用いて *in vitro* で JH I の分解を調べると Fig. 7 のように、carboxylesterase 活性は 2, 3, 4 日齢の順に高まる。この系にこの酵素の阻害剤である diisopropylphosphorofluoridate (DFP) を加えると 2 日齢では JH I の分解は 1/4 に抑えられ、3, 4 日齢では 20~30% が抑えられるに過ぎなかった。以上の実験から JH はアラタ体から放出

Fig. 5 The type of cuticle formed by epidermis from *Manduca* last instar larvae weighing 6.5–6.8 g (day 3) after exposure to 5 µg/ml of β-ecdysone for 4 days following exposure to hormone-free medium for varying lengths of time.

Open bars indicate those forming >80% larval cuticle; solid bars those forming >80% pupal cuticle; and diagonal bars, those forming 100% larval cuticle when exposure to β-ecdysone was in the presence of 3 µg/ml of EGS. Numbers above the bars indicate number of explants tested.⁸⁾

Fig. 6 Time course of JH I metabolism by larval integument at different times during the last instar.

a: JH I in the plain medium, b: JH I in the presence of 5×10^{-8} M JH binding protein, ●: day 2, 4.0–4.5 g larva, ▲: day 3, 6.5–7.0 g larva, ■: day 4, 9.5–10.5 g larva.¹¹⁾

Fig. 7 Esterase activity of epidermal homogenates as a function of larval age.

Day 2, 3.5–4.5 g; Day 3, 6.5–7.5 g; Day 4, 10.0–11.0 g; □, epidermis only; ■, epidermis + 0.2 mM DFP. The number at the bottom of the bars indicates the number of determinations.¹¹⁾

されると、体液中の結合たんぱくと結合し、ターゲットに運搬されるが、この結合たんぱくによって carboxyl-esterase の攻撃から保護されていることがわかる。しかし、3日齢から DFP-insensitive な JH esterase^{15–17)} が体液中出现し、結合たんぱくと結合している JH も容易に分解する。その結果、体内の JH を完全に消失させ、commitment の転換を容易ならしめるものと結論された。

4. JH の核リセプター

前述のように、JH esterase の出現によって、3日齢で体内の JH は完全に消失する。しかし、Fig. 5 に示すように、*in vitro* で真皮を hormone-free の状態で保つと、3~4日を経ても commitment は完全に転換せず、第1ピークの β -ecdysone を培養液に加えることによって始めて commitment は完全に転換する。第1ピークの β -ecdysone は commitment の転換にいかにかかわっているのであろうか。そこで、この β -ecdysone と JH の核へのとり込みについて検討した¹⁸⁾。終齢3日および4日齢幼虫の真皮細胞より核を分離し、これを2分し、一方には ^3H -JH I を、他方には ^3H -JH I に100倍量の JH I を混合して incubate し、核分画にとり込まれた ^3H -JH I の総量を測定した。この場合、後者は non-specific に核分画へ吸着した ^3H -JH I と考えられるので、前者から後者を差し引いたものが、核へとり込まれた ^3H -JH I となる。その結果、Fig. 8 に示すように、3日齢幼虫では ^3H -JH I は核へとり込まれ、その Kd 値は $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ¹⁹⁾ であった。それに対し、4日齢幼虫では、両者のとり込みにまったく差が認められず、 ^3H -JH I は核へとり込まれないことが明らかとなった。このことから、第1ピークの β -ecdysone の出現によって、真皮細胞の JH 核リセプターが消失し、JH に対する感受性が失われるものと結論した。

昆虫の表皮、囲食膜におけるキチン合成

1. 表皮形成に及ぼす DFB の影響

Manduca およびヨトウガ (the cabbage armyworm,

Fig. 8 Binding of ^3H -JH I to epidermal nuclei from day 3 (6.5–7.0 g) larvae.

●: ^3H -JH I, ○: ^3H -JH I + $\times 100$ excess unlabeled JH I, ---: specific ^3H -JH I binding (upper curve-lower curve).

Table 2 Pupal cuticle formation *in vitro* by epidermis from wandering larvae of *Manduca* after exposure to 5 $\mu\text{g/ml}$ ecdysterone in the presence of diflubenzuron.

Concentration of diflubenzuron ($\mu\text{g/ml}$)	Number cultured	Type of cuticle formed (%)				Average score
		0	1	2	3	
0	20	0	5	35	60	2.6
0.25	16	6	82	12	0	1.1
2.5	20	60	30	10	0	0.5

Scoring system; 0: no cuticle formed, 1: incomplete, 2: partially complete, 3: complete.

Fig. 9 Incorporation of ^{14}C -GA into chitinous cuticle *in vivo* in *Mamestra* last instar larvae.

The numbers on the abscissa show the time in days when the animals were sacrificed to analyze the incorporation of radioactivity: ^{14}C -GA was injected 1 day before the day shown in abscissa. Open circle: control ($n=5$), closed circle: the larvae fed on the diet containing 1 ppm DFB ($n=5$). W: wandering stage, P: pupation.²²⁾

Mamestra brassicae) 幼虫に DFB を投与すると、表皮が破れ出血し、場合によっては中腸が突出するものが観察された。しかし、多くの個体では次齢の表皮が形成されず脱皮不能となって死ぬ。そこで、表皮形成に及ぼす DFB の影響を真皮の器官培養法によって検討した。*Manduca* 終齢 wandering stage の幼虫から真皮を切り出し、前述の方法により、蛹表皮を *in vitro* で形成させた。この系に 0.25 および 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の DFB を加えると、Table 2 に示すように完全な蛹表皮はまったく形成されなかった²⁰⁾。この表皮形成阻害がキチン合成阻害に基づくものかどうかを調べるため ^{14}C -glucosamine (GA) を前駆物質として投与し、キチンへの ^{14}C のとり込みをみた結果、Fig. 9 に示すように DFB 処理幼虫では、 ^{14}C

Table 3 Accumulation of ^{14}C -UDP-AGA in final instar *Mamestra brassicae* larvae after topical application of diflubenzuron.^{a)}

Dose ($\mu\text{g/larva}$)	^{14}C -GA injected (nmol)	^{14}C -UDP-AGA formed (pmol)
0	3.27	13.5 ± 1.0
5	3.27	19.2 ± 0.6
0	6.5	13.1 ± 1.9
5	6.5	20.3 ± 0.4

^{a)} Diflubenzuron in 1 μl DMSO was topically applied to freshly ecdysed final instar larvae. Twenty four hr later ^{14}C -GA was injected and the ^{14}C -UDP-AGA accumulated in 3 hr was determined.

のキチンへのとり込みはまったく見られなかった^{21,22)}。

2. DFB のキチン合成阻害機構

1) UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-AGA) の蓄積

Mamestra 終齢脱皮直後の幼虫に DFB を局所施用し、24時間後に ^{14}C -glucosamine を注射し、さらに3時間後に ^{14}C -UDP-AGA を分析した結果、Table 3 のように、処理幼虫では、無処理幼虫に比べて約 1.6 倍量の UDP-AGA が蓄積することが認められた^{21,22)}。この結果は *Oncopeltus fasciatus*²³⁾、*Musca domestica*²⁴⁾ の結果とよく一致する。

2) Chitin synthetase に及ぼす DFB の影響

Mamestra 終齢脱皮直後の幼虫から中腸をとり出し、磨砕後速心によって 78,000 $\times g$ の沈澱を集めて酵素液とした。この酵素に及ぼす DFB および polyoxin D の影響は Fig. 10 に示すように、polyoxin D はこの酵素を強く阻害するが、DFB では阻害が見られなかった²²⁾。この結果は、他の多くの昆虫での結果²⁵⁻²⁸⁾ とよく一致している。しかし、brine shrimp (*Artemia salina*)²⁹⁾ や Diptera の 2, 3 の幼虫³⁰⁾ から得た chitin synthetase は DFB によって阻害されることが報告されている。したがって、この酵素に関しては結論を出すに至っていない

Fig. 10 The inhibitory effects of DFB and polyoxin D on chitin synthetase activity in cell-free extracts of the final instar larvae of *Mamestra* *in vitro*.

○: polyoxin D, ●: DFB.

Table 4 Inhibition of chitin synthesis by DFB and polyoxin D in the peritrophic membrane of the midguts from *Mamestra brassicae* larvae *in vitro*, by the application methods shown in Fig. 11.

Inhibitor (μg/ml)	Inhibition (%)				
	Inside		Outside		Inside-outside
	AGA	UDP-AGA	AGA	UDP-AGA	AGA
DFB (1 μg/ml)	78	0	87	71	82
Polyoxin D (5 μg/ml)	80	74	83	—	74

Fig. 11 Application methods of the inhibitors and the precursors to the ligated midguts.

a: inside, b: outside, c: inside-outside, ○: ^{14}C -precursor, ●: inhibitor.³¹⁾

が、供試された酵素が crude なもので、chitin synthetase 以外の何かキチン合成に關与する重要なファクターが存在する可能性が考えられている。

3) 中腸囲食膜でのキチン合成と阻害剤

中腸の上皮細胞は管腔側は microvilli として露出して

おり、この上をキチンからなる囲食膜が覆っている。したがって、体液側から acetylglucosamine (AGA) を投与して、細胞内で UDP-AGA を生成させることも、UDP-AGA を直接 microvilli の外膜へ投与することも可能であるので、DFB の作用機構解明の材料として適している。

無菌飼育によって得た *Mamestra* 終齢脱皮直後の幼虫から中腸をとり出し、Fig. 11 に示すような 3 通りの方法で阻害剤 (DFB と polyoxin D) およびキチンの前駆物質 (^{14}C -AGA および ^{14}C -UDP-AGA) を投与し、囲食膜のキチンにとり込まれる ^{14}C を測定した³¹⁾。その結果、Table 4 に示すように、阻害剤、 ^{14}C -AGA は中腸の内側、外側どちらから投与してもキチン合成は阻害される。 ^{14}C -UDP-AGA は外側から投与すると、キチンへの ^{14}C のとり込み量は ^{14}C -AGA を投与した時の 1/20 に過ぎない。おそらく UDP-AGA は体液側から基底膜を通して

Fig. 12 Summary of the roles of DFB in the epithelial cells.

●: AGA, □: UDP, CS: chitin synthetase, I: inside the midgut, O: outside the midgut, EC: epithelial cell, M: biomembrane.³¹⁾

Table 5 Analysis of ¹⁴C-chitin and ¹⁴C-UDP-AGA in the medium and the midgut tissues after application of ¹⁴C-AGA to the turned-out midguts.

Inhibitor (μg/ml)	UDP-AGA in medium (pmol) (a)	Chitin (pmol eq.) (b)	Total (a + b)	UDP-AGA in tissue (pmol)
Control	50.5	52.8	103.3	52.7
Polyoxin D (10)	53.5	11.5	65.0	62.1
DFB (2.5)	18.0	8.2	26.2	85.7
Polyoxin D (10) + DFB (2.5)	24.2	8.2	32.4	85.7

細胞内へはとり込まれないで、分解により生じた AGA が細胞内にとり込まれるものと考えられる。¹⁴C-UDP-AGA を阻害剤とともに中腸の内側に注入すると, polyoxin D はキチン合成を抑えるが, DFB はまったく影響しない。以上の結果を模式的に Fig. 12 に示した。これから, DFB のキチン合成阻害機構として 3 つの可能性が考えられた。

(1) ¹⁴C-AGA から ¹⁴C-UDP-AGA 合成の阻害: 前述のように, 真皮では UDP-AGA の蓄積が認められているが²²⁾, 中腸上皮細胞においても, DFB 処理では無処理に比して約 1.7 倍の UDP-AGA の蓄積が見られた³⁴⁾。

(2) Phospholipids の生合成阻害: IBP など有機りん殺菌剤は生体膜の主成分である phosphatidyl choline の生合成を阻害することが知られている^{32,33)}。¹⁴C-酢酸を前駆物質として中腸に *in vitro* で投与し, phospholipids を分析した結果, 量的, 質的とも, DFB 処理, 無処理で差が見られなかった。また, 組織学的にも差は観察されなかった。

(3) UDP-AGA の microvilli 膜透過阻害: UDP-AGA は上皮細胞内で合成され, キチンは膜外に存在する。UDP-AGA で膜を通過するのか, 細胞内でキチン

が合成された後, 膜を通過するのかはまだ分かっていない。イースト菌では chitosome^{35,36)}と呼ばれる小顆粒の中でキチンが合成され, これが生体膜を通過するといわれている。しかし, 昆虫や他の動物では chitosome は観察されていない。

中腸を裏返し, 裏返した中腸の内側 (体液側) に ¹⁴C-AGA を注入して両端を結紮する。これを 2 時間培養液中で incubate して, 培養液中および組織中の ¹⁴C-UDP-AGA と生成されるキチンを別々に定量した。その結果 Table 5 に示すように, 培養液中の ¹⁴C-UDP-AGA は DFB 処理では無処理あるいは polyoxin D 処理の約 1/3 であった。また, キチンへとり込まれた ¹⁴C との和を比較すると, DFB 処理は無処理の 1/4 が膜を通過するに過ぎなかった。なお, 組織中には, ¹⁴C-UDP-AGA の蓄積が認められた³⁴⁾。

以上の結果から, DFB のキチン合成阻害機構はキチンの前駆物質である UDP-AGA の microvilli 膜透過の阻害であろうと考えられる。

あ と が き

JH esterase がどのようなメカニズムで終齢幼虫に現われるかまだ明らかでないが, JH esterase を阻害する

物質は、JH 作用物質となりうる事が前述の実験から示唆された。事実、ある種の有機りん剤やカーバメイト剤が JH esterase 阻害剤として見いだされ、これらは JH 作用を有していることが報告されている^{37,38)}。さらに、JH esterase の誘導についても報告があり³⁹⁾、若齢幼虫でこれを誘導できれば、anti-JH としての可能性も考えられる。今後 JH esterase をめぐる諸研究が発展するのを期待するものである。

生体膜を通しての物質の移動に関する研究は近年盛んに行なわれ、次々に新しい事実が解明されているが、昆虫の分野ではまったく未開の分野である。また、細胞内への物質のとり込みについては多くの報告があるが、細胞内から外への移動についてはいまだ一例もない。Mamestra 中腸の microvilli membrane に UDP-AGA transporter が存在するか否かはいまだ明らかでないが、存在が証明されるならば、非常に興味深いものとする。

本研究遂行にあたり、ご指導、ご助言をいただいた米国ワシントン大学 Lynn M. Riddiford 教授、James W. Truman 教授に心からの謝意を表します。DFB の作用機構の研究を通して終始ご助言と結果のご討論をいただいた茨城大学農学部教授赤塚尹巳博士、三菱化成工業株式会社総合研究所若林攻博士、岩手大学農学部助教授柿木和雄博士、理化学研究所主任研究員山口勇博士、理化学研究所米山勝美博士に衷心よりお礼申し上げます。また、供試薬剤の提供をいただいた日産化学工業株式会社、科研製薬株式会社に対して厚くお礼申し上げます。

最後に本研究を行なうにあたり、終始ご指導、ご協力をいただいた理化学研究所前主任研究員福永一夫博士、昆虫薬理研究室主任研究員深見順一博士、共同研究者としてご協力いただいた信澤智恵子さんをはじめ研究室の皆様は心から感謝をするとともに、栄誉を分かち合いたいと思います。

引用文献

- 1) H. A. Schneiderman: "Insect Juvenile Hormones—Chemistry and Action—," ed. by J. J. Menn & M. Beroza, Academic Press, New York and London, 1972
- 2) K. Sláma: "Insect Hormones and Bioanalogs," ed. by K. Sláma, M. Romaňuk & F. Šorm, Springer-Verlag, Wien and New York, 1974
- 3) T. Mitsui, C. Nobusawa, J. Fukami, K. Mori & K. Fukunaga: *Appl. Entomol. Zool.* **8**, 27 (1973)
- 4) T. Mitsui & L. M. Riddiford: *Dev. Biol.* **54**, 172 (1976)
- 5) M. J. Fain & L. M. Riddiford: *Biol. Bull.* **149**, 506 (1975)
- 6) E. Bollenbacher, W. V. Vedeckis, L. I. Gilbert & J. D. O'Connor: *Dev. Biol.* **44**, 33 (1975)
- 7) J. W. Truman: *J. Exp. Biol.* **57**, 805 (1972)
- 8) T. Mitsui & L. M. Riddiford: *Dev. Biol.* **62**, 193 (1978)
- 9) A. M. Ajami & L. M. Riddiford: *J. Insect Physiol.* **19**, 635 (1973)
- 10) L. I. Gilbert, W. Goodman & J. Nowock: "Actualities Sur les Hormones D'Invertebrates," Colloque int. du C.N.R.S. No. 251, Paris, pp. 413-434, 1976
- 11) T. Mitsui, L. M. Riddiford & G. Bellamy: *Insect Biochem.* **9**, 637 (1979)
- 12) K. J. Kramer, P. E. Dunn, R. C. Peterson, H. L. Seballos, L. L. Sanburg & J. H. Law: *J. Biol. Chem.* **251**, 4979 (1976)
- 13) J. Nowock, W. Goodman, W. E. Bollenbacher & L. I. Gilbert: *Gen. Comp. Endocrinol.* **27**, 230 (1975)
- 14) B. Hammock, J. Nowock, W. Goodman, V. Stamoudis & L. I. Gilbert: *Mol. Cell. Endocrinol.* **3**, 167 (1975)
- 15) L. L. Sanburg, K. J. Kramer, F. J. Kezdy, J. H. Law & H. Oberlander: *Nature* **253**, 266 (1975)
- 16) L. L. Sanburg, K. J. Kramer, F. J. Kezdy & J. H. Law: *J. Insect Physiol.* **21**, 873 (1975)
- 17) R. K. Vince & L. I. Gilbert: *Insect Biochem.* **7**, 115 (1977)
- 18) E. R. Mulvihill & R. D. Palmiter: *J. Biol. Chem.* **252**, 2060 (1977)
- 19) L. M. Riddiford & T. Mitsui: "Comparative Endocrinology," ed. by P. J. Gaillard & H. H. Boer, Elsevier/North Holland, Amsterdam, p. 519, 1979
- 20) T. Mitsui, C. Nobusawa, J. Fukami, J. Colins & L. M. Riddiford: *J. Pesticide Sci.* **5**, 335 (1980)
- 21) T. Mitsui, J. Fukami & L. M. Riddiford: "Regulation of Insect Development and Behaviour," ed. by F. Sehnal, A. Zabza, J. J. Menn & B. Cymborowsky, No. 22 Conferences No. 7, Scientific Papers of the Institute of Organic and Physical Chemistry of Wroclaw Technical University, Poland, p. 1131, 1981
- 22) T. Mitsui, C. Nobusawa & J. Fukami: *J. Pesticide Sci.* **6**, 155 (1981)
- 23) N. P. Hajjar & J. E. Casida: *Science* **200**, 1499 (1978)
- 24) W. H. vanEck: *Insect Biochem.* **9**, 295 (1979)
- 25) E. Cohen & J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **13**, 129 (1980)
- 26) R. T. Mayer, A. C. Chen & J. R. DeLoach: *Insect Biochem.* **10**, 549 (1980)
- 27) R. T. Mayer, A. C. Chen & J. R. DeLoach: *Ex-*

- perientia* **37**, 337 (1981)
- 28) E. Cohen & J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, 301 (1982)
- 29) M. N. Horst: *J. Biol. Chem.* **256**, 1412 (1981)
- 30) I. F. Turnbull & A. J. Howells: *Aust. J. Biol. Sci.* **36**, 251 (1983)
- 31) T. Mitsui, C. Nobusawa & J. Fukami: *J. Pesticide Sci.* **9**, 19 (1984)
- 32) O. Kodama, K. Yamashita & T. Akatsuka: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1719 (1979)
- 33) O. Kodama, K. Yamashita & T. Akatsuka: *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1015 (1980)
- 34) T. Mitsui, M. Tada, C. Nobusawa & I. Yamaguchi: *J. Pesticide Sci.* **10**, 55 (1985)
- 35) C. E. Bracker, J. Ruiz-Herrera & S. Bartuicki-Garcia: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 4570 (1976)
- 36) J. Ruiz-Herrera, E. Lopez-Romero & S. Bartuicki-Garcia: *J. Biol. Chem.* **252**, 3338 (1977)
- 37) B. D. Hammock, T. C. Spark & S. M. Mumby: *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 517 (1977)
- 38) T. C. Spark & B. D. Hammock: *Pestic. Biochem. Physiol.* **14**, 290 (1980)
- 39) K. D. Wing, T. C. Spark, U. M. Lovell, S. O. Levinson & B. D. Hammock: *Insect Biochem.* **11**, 473 (1981)