

# 環動昆

## 報 文

- 小山正仁・岩田隆太郎・山根明臣：牛糞と木材チップの混合物を餌とした2種コガネムシ科幼虫の成長量の比較（英文） ..... 1
- 板倉修司・田中裕美・榎 章郎：高等シロアリ*Nasutitermes walkeri* (Hill) ミトコンドリア内のピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 複合体の活性型-不活性型相互変換の阻害ならびに活性型PDH複合体活性の定量 ..... 9
- 松良俊明・足立明子・神先雅巳・田中嘉和・西川智裕・野々下徳之・松井茂洋・渡辺貢司：都市の人工水域に生息するトンボ目幼虫の生態学的研究：貯水池から羽化したトンボ類の種構成とその年次変動 ..... 19

## 短 報

- 内海与三郎・出口智也・西川 勝・亀井正治・林 晃史：ヒドラメチルノン含有バイト剤「シージ® ジェル」のクロゴキブリに対する殺虫効力 ..... 31

## 資 料

- 田中靖子・宮本 彰：武庫川水系河川敷における蝶類出現状況 ..... 37
- 辻 英明：クロゴキブリの自発飛翔 ..... 47

## 研究奨励賞受賞論文

- 北原正彦：富士山山麓のチョウ類群集の多様性に関する一連の研究 ..... 49

- 書 評 ..... 61
- 会 報 ..... 64
- 会 則 ..... 66
- 投稿規定 ..... 69

Vol. 14

1

日本環境動物昆虫学会

2003

## Comparison of Larval Growth of Two Scarabaeids Fed with Mixture of Cow Dung and Wood Chip<sup>1)</sup>

Masahito Koyama, Ryûtarô Iwata\* and Akiomi Yamane

College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa, 252-8510, Japan

(Received : August 13, 2002 ; Accepted : Decemer 24, 2002)

牛糞と木材チップの混合物を餌とした2種コガネムシ科幼虫の成長量の比較

小山正仁・岩田隆太郎・山根明臣（日本大学生物資源科学部森林資源科学科）

牛糞と木材チップ（2樹種：スギ，ミズナラ）を混ぜ合わせた混合物を餌として，その餌でのコガネムシ科幼虫の飼育の可能性，および最適餌条件を調べた．2種のコガネムシ科，ドウガネブイブイとシロテンハナムグリの幼虫を用い，混合物中の木材チップの種類と大きさを変えて飼育した．木材チップの条件は，2種幼虫の成長に有意に影響しなかった．

We assessed larval growth of the two scarabaeids, *Anomala cuprea* Hope and *Protaetia orientalis submarmorea* (Burmeister), fed with mixture of cow dung and wood chips (two wood species, *Cryptomeria japonica* and *Quercus mongolica*). We investigated the influence of the factors of wood chips, namely wood species and wood particle sizes, to know the feasibility of rearing grubs with the mixture and the best wood preparation for the rearing. The influence of the factors of wood chips was not significant in the growth of the two grub species.

**Key words :** *Anomala cuprea*, *Protaetia orientalis submarmorea*, Scarabaeidae, Wood chips, Cow dung

---

1) A part of this paper was presented at the 112th Annual Meeting of the Japanese Forestry Society (2001).

\* Corresponding author : iwata@brs.nihon-u.ac.jp

## Introduction

In Japan, cow dung is one of the causes of a public nuisance involving bad smell and water pollution in suburban environment. A problem has arisen that there comes to be too great an amount of cow dung to be disposed of as the scale of stockbreeding management becomes larger. The Japanese livestock industry is in want of sub-materials of composting, such as sawdust and rice straw, for the control of moisture content of cow dung. On the other hand, woody materials, such as pruned twigs, thinned trees and shrubs, have been mostly wasted as inutility, because of their nature of being hardly decomposed. Meanwhile, in composting cow dung, woody materials have been used into the mixture since it was known that woody materials is advantageous to control the moisture content of cow dung, and also woody materials may have deodorization effect. Also, woody materials, in itself, are easily decomposed when mixed with cow dung.

It is through actions of some soil organisms that both cow dung and wood chips are decomposed into produce compost (Niiijima and Hasegawa, 2000; Ueno *et al.*, 1992), among which soil animals including insects are important in the acceleration of decomposition. In compliance with these facts, we can carry out composting of the mixture of cow dung and wood chips through acceleration of decomposition by soil-inhabiting insects, among which we chose scarabaeid larvae as decomposing agents in due consideration of the following background. A good rearing result has been obtained with two non-dung-utilizing scarabaeids, *Oryctes nasicornis* (L.) and *Phyllognathus silenus* Fabricius (Dynastinae), using mammals' feces with or without wood chips (Hurpin and Fresneau, 1964). A good rearing result of soil-inhabiting *Anomala cuprea* Hope (Rutelinae) larvae has been

obtained using cow dung, once dried and then rewetted, as the food (Bhuiyan *et al.*, 1996). On the other hand, most of the larvae of three related subfamilies, Trichinae, Valginae and Cetoniinae, feed not only on rotten wood but also on animals' dung (Hoffman, 1939; Ritcher, 1945).

As we have reported preliminarily (Koyama *et al.*, 1999), we selected the larvae of *Anomala cuprea* Hope (Rutelinae) (AC) and *Protaetia orientalis submarmorea* (Burmeister) (Cetoniinae) (POS) as composting agents, which are easily obtainable and rearable in most part of Japan. We report a comparison of larval growth of the two scarabaeids fed with the mixture of cow dung and wood chips, in order to develop the technique of composting the mixture, and to know whether the mixture can be a food for scarabaeid larvae.

## Materials and Methods

### The best wood species and particle size for rearing the larvae in 1999 (Exp. I)

Larvae of AC and POS were offspring of the adults collected at Fujisawa, Kanagawa Prefecture, in July 1999. In a polyethylene cup, 12 cm in diameter and 6 cm deep, 2-4 newly hatched larvae of AC and POS were accommodated with leaf mold (Fujimi Engei Co., Shizuoka, Japan) according to the breeding method of Nishigaki (1991). Cow dung was collected at the cowshed in the College Experiment Farm of Nihon University, Fujisawa; it was used within 2 days after excretion. From *Cryptomeria japonica* (CJ) logs felled at Kawauchi, Fukushima Prefecture, in 1999 (month unknown), wood chips (about 40 × 30 × 5 mm; L, 10 × 10 × 2 mm or smaller; S) were prepared at our lab. From *Quercus mongolica* (QM) logs felled at Tateiwa, Fukushima Prefecture, in June 1999, wood chips were prepared in the same manner as those of CJ.

When the wood chips and cow dung were mixed,

we set up 2 parameters, namely (i) wood species (either CJ or QM) and (ii) wood particle sizes (either L or S), to know the best condition for 2nd (a) or 3rd (b) instar larvae. The moisture contents of 4 types of wood chips (CJ-L, CJ-S, QM-L, QM-S) were 14.9%, 14.1%, 17.4%, and 16.8% in (a), and 12.6%, 12.2%, 11.9%, and 11.1% in (b), respectively, and the moisture contents of cow dung was 84.8% in (a) and 84.5% in (b).

The moisture contents were controlled to 40%, using the following formula (1):

$$M = (h_1W + h_2x) / (W + x) \dots\dots\dots (1)$$

where  $W$  is the weight of wood chips (g),  $x$  is the weight of cow dung (g),  $h_1$  and  $h_2$  are the moisture contents of wood chips and cow dung (%), respectively, and  $M$  is the moisture content of the mixture (%). We calculated the value  $x$  and prepared food mixture of wood chips and cow dung by the following formula (2), as is induced from Formula (1):

$$x = W(M - h_1) / (h_2 - M) \dots\dots\dots (2)$$

We settled  $W$  to be 20g, which led to that  $x = 11.2$  g, 11.6 g, 10.4 g and 11.2 g in (a) and  $x = 12.3$  g, 12.5 g, 12.6 g and 13.0 g in (b) for CJ-L, CJ-S, QM-L and QM-S, respectively. The mixture was kept in a polyethylene cup, 9.8 cm in diameter and 5.5 cm deep, which was covered with a lid on which ten or more holes were bored. One larva of either AC or POS species was kept in them.

Seven larvae of either AC or POS were supplied for each condition. The experiment was carried out from September 29 to October 13, 1999 in (a), and from October 21 to November 18, 1999 in (b) in a field cage with a roof cover to avoid direct exposure to precipitation, installed at the Shonan campus, Nihon University, Fujisawa. During the course of experiment of about two or four weeks, larval weights were measured at the interval of about one week, from which we calculated "growth value", i. e. 1 mg weight increase per 1 g of body weight per

one week (mg/g/week) of each larva. The temperature during the experiment was 11.0-23.3°C (Average 17.6°C) in (a), and 3.9-20.7°C (Average 11.4°C) in (b).

**The best wood species and particle size for rearing the larvae in 2000 (Exp. II).**

Larvae of AC and POS were offspring of the adults collected at Fujisawa, Kanagawa prefecture, in August 2000. The polyethylene cup size, larval food, and rearing procedure of AC and POS, measurement and data processing methods were the same with those in Exp. I.

Cow dung was collected at the same place as in Exp. I. From CJ and QM logs felled at the same place and time as in Exp. I, wood chips (about 40 × 30 × 5 mm; Size I, 10 × 10 × 2 mm; Size II, 2 × 2 × 1 mm; Size III, and <0.5 × 0.5 × 0.5 mm; Size IV) were prepared at our lab. When the wood chips and cow dung were mixed, we set up 2 parameters, namely (i) wood species (either CJ or QM), (ii) four wood particle sizes (Size I, Size II, Size III, and Size IV), to know the best wood condition for larvae. The mixture was kept in a polyethylene in the same manner as in Exp. I. The moisture contents of 8 types wood chips (CJ-Size I, CJ-Size II, CJ-Size III, CJ-Size IV, QM-Size I, QM-Size II, QM-Size III, and QM-Size IV) were 13.2%, 13.0%, 12.4%, 12.4%, 12.2%, 12.0%, 11.2% and 11.2%, respectively, and the moisture contents of cow dung was 84.6%. The moisture contents were controlled to 40%, using the formula (1). Twenty grams of wood chips were supplied for all the rearing cups, and the quantities of cow dung to be mixed with CJ-Size I, CJ-Size II, CJ-Size III, CJ-Size IV, QM-Size I, QM-Size II, QM-Size III, and QM-Size IV were 12.0 g, 12.1 g, 12.4 g, 12.4 g, 12.5 g, 12.6 g, 12.9 g and 12.9 g, respectively.

Five 2nd instar larvae of either AC or POS were supplied for each condition. The experiment was

carried out from September 13 to October 10, 2000 in the same field cage as in Exp. I. During the experimental period of about four weeks, larval weights were measured at the interval of about one week, from which we calculated "growth value". The temperature during this experiment was 8.9–22.5 °C (Average 17.1 °C).

## Results

### The best wood species and particle size for rearing the larvae in 1999 (Exp. I)

The result of this experiment using the 2nd instar larvae was shown in Fig. 1 a. The particle sizes of the wood chips did not influence the growth of both grub species with both wood species (Wilcoxon's test;  $p > 0.05$ ). Also, wood species (CJ, QM) did not influence the growth of both grub species with all of the wood particle sizes (Wilcoxon's test;  $p > 0.05$ ), except for POS with S (Wilcoxon's test;  $p < 0.01$ ). Mortalities were 0% in all conditions.

The result of this experiment using the 3rd instar larvae was shown in Fig. 1 b. In this experiment, the result after the 2nd week was discarded, because POS larvae markedly lost their weight in the 3rd week as they had eaten up most of the cow dung. The growth of the 3rd instar larvae of AC was not observed, while the growth of the 3rd instar larvae of POS was observed to much lesser extent than the 2nd instar larvae. The particle sizes of the wood chips did not influence the growth of both grub species with both wood species (Wilcoxon's test;  $p > 0.05$ ). The wood species (either CJ or QM) significantly influenced in the growth of AC larvae with S and in the growth of POS larvae with L (Wilcoxon's test;  $p < 0.05$ ), whereas it did not influence significantly in the other cases (Wilcoxon's test;  $p > 0.05$ ). Mortalities were 0% in all conditions.

### The best wood species and particle size for rearing the larvae in 2000 (Exp. II)

The result was shown in Fig. 2. With CJ, the larval growth of AC was comparatively good in Size II and Size IV, and bad in Size I, while the growth of POS was comparatively good in Size I and Size II, and bad in Size IV. With QM, little difference was detected in the larval growth of AC, while the growth of POS was best in Size I and worst in Size III. However, there was no significant difference among the above four wood chip sizes in the larval growth of both grub species with both wood species (Kruskal-Wallis test:  $p > 0.05$ ). Also, the wood species (either CJ or QM) did not influence the growth of both grub species with all wood particle sizes (Kruskal-Wallis test:  $p > 0.05$ ). Mortalities were 0% in all conditions except in POS-Size III, where one individual was killed by a predator.

## Discussion

The family Scarabaeidae comprises coprophagous subfamilies and saprophagous subfamilies in terms of larval food habit. In general, mammals' feces are mostly utilized by the former group, and decomposed plant materials, such as humus or rotten wood, are mostly utilized by the latter group. However, feces consist of undigested and/or partially digested fiber substances, and this suggests that the foods of the above two groups of Scarabaeidae are not of different nature from the viewpoint of nutritional physiology. As stated in Introduction, non-coprophagous scarabaeids have been reared with dried or rewetted animal feces, but there have been no works unequivocally describing rearings of non-coprophagous scarabaeid larvae exclusively with fresh, non-processed animal feces. The present investigation of ours was successful in rearing larvae of AC and POS, both being non-coprophagous, with little mortality and in a short period, by mixing the cow dung and the wood chips. The wood chips absorbed considerable amount of

Comparison of Larval Growth of Two Scarabaeids

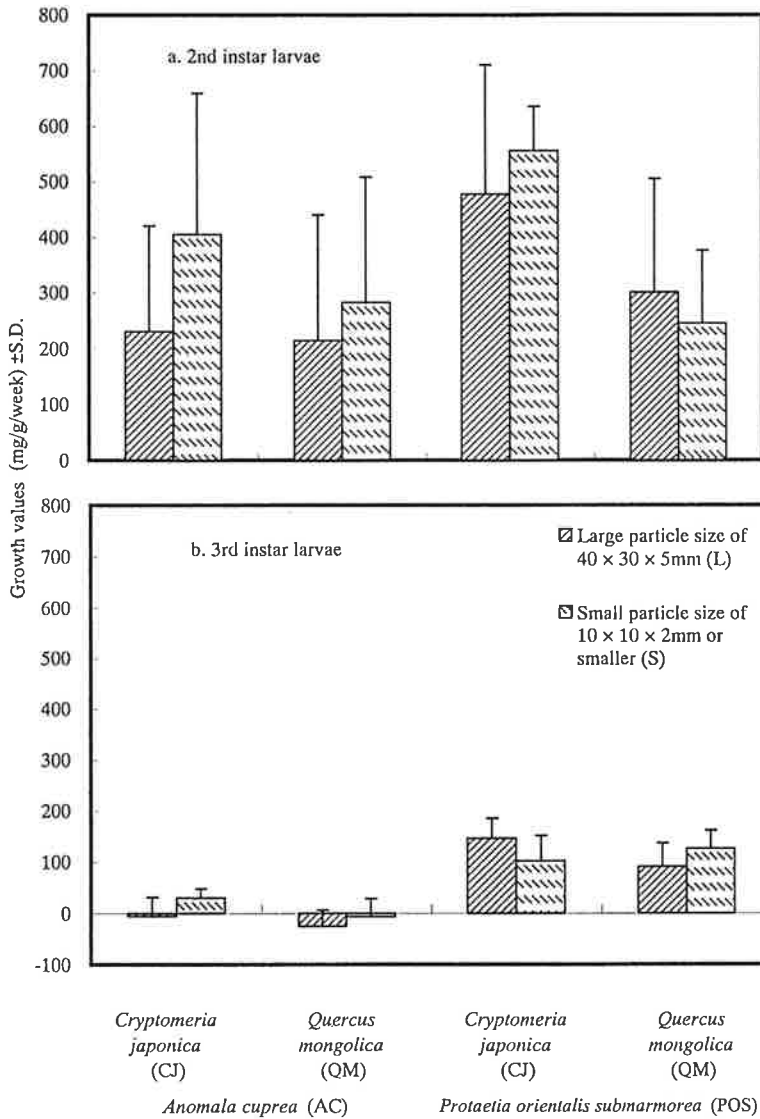


Fig. 1 The growth values of *Anomala cuprea* (AC) and *Protaetia orientalis submarmorea* (POS) 2nd instar larvae (a) and 3rd instar larvae (b) in Exp. I, where they were fed with mixture of cow dung and wood chips of two species, *Cryptomeria japonica* (CJ) and *Quercus mongolica* (QM), with different particle sizes (L and S). Mean and S. D. are given ( $n = 7$ ).

moisture from the cow dung, which alone is almost in semi-liquid state and is too moist for the survival of these larvae. We have confirmed that larvae of AC and POS showed low survival rate and little growth when fed with the cow dung alone, as well

as with leaf mold of the similarly high moisture condition (Koyama *et al.*, unpublished data). Such an unfavorable condition turned out to be easily overcome by adding wood chips. The present investigation has also shown that wood conditions, such

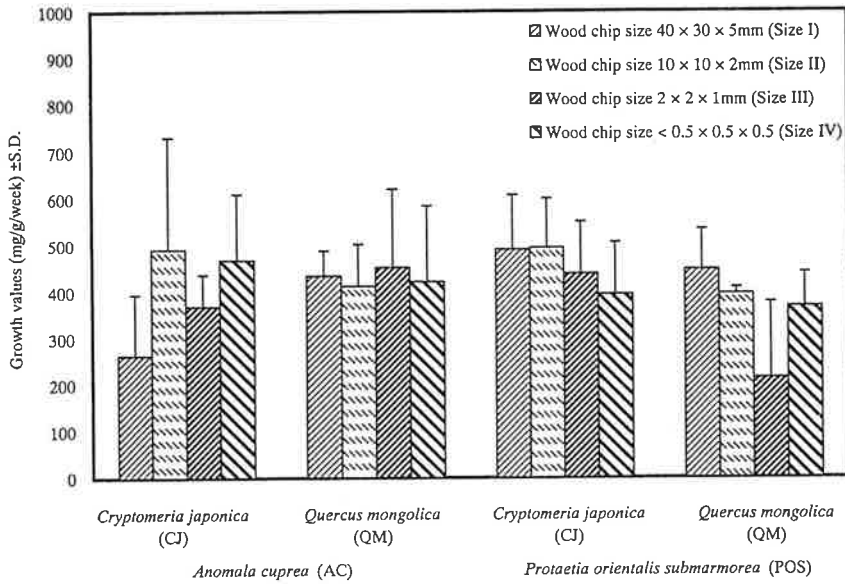


Fig. 2 The growth values of *Anomala cuprea* (AC) and *Protaetia orientalis submarmorea* (POS) larvae in Exp. II, where they were fed with mixture of cow dung and wood chips of two species, *Cryptomeria japonica* (CJ) and *Quercus mongolica* (QM), with different particle sizes (Sizes I-IV). Mean and S. D. are given ( $n = 5$ ).

as wood species and wood particle size, exert rather little influence on larval growth in the present two scarabaeid species. This fact will be advantageous to the industrial composting using the present mixture, and also contribute to laboratory rearing technique of some species.

In the Exp. I, the growth of the grubs of both species was much worse in the 3rd instar larvae in late autumn than in the 2nd instar larvae in early autumn. Bhuiyan and Nishigaki (1995) reared 1st and 2nd instar larvae of AC on cow dung under various temperature conditions (22, 25, 28, 30 and 32°C), and concluded that 30°C was the best among these. When the Exp. I with the 3rd instar larvae was carried out, the temperature was 20°C or lower (Average 11.4°C), which is much lower than the lowest temperatures of Bhuiyan and Nishigaki's. This suggests an influence of temperature on their growth although instar of the larvae employed may

also influence the growth rate. Larvae, when in later stage of the 3rd instar, may exhibit a limited growth toward the "yellow stage" in AC (Fujiyama and Takahashi, 1973) or toward "cocoon stage" in POS (Koyama, unpublished observation).

#### Acknowledgements

We thank Dr. Keiko Nijjima (Tama Forest Science Garden, Forestry and Forest Products Research Institute, Hachiôji) for her valuable advise throughout this study, Messrs. Hiroataka Kobayashi and Tadahiro Okamoto (Forest Zoology Laboratory, Nihon University) for their kindly providing us with the wood chips, and College Experiment Farm of Nihon University for providing us with cow dung.

#### References

Bhuiyan, M. K. R. and J. Nishigaki (1995) Effect

- of different temperatures on the rearing of 1st and 2nd instar larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea* (Hope) (Coleoptera: Scarabaeidae) in decomposed cow-dung under laboratory conditions. *Appl. Entomol. Zool.* 30:401-406.
- Bhuiyan, M. K. R., M. Hatsukade, and J. Nishigaki (1996) Rearing of larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae) on different artificial diets under laboratory conditions. *J. Jpn. Soc. Turfgrass Sci.* 25:22-27.
- Fujiyama, S. and F. Takahashi (1973) Studies on the self-regulation of life cycle in *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae). 1. The effects of constant temperature on the developmental stages. *Memoirs Coll. Agric., Kyoto Univ.* 104:23-30.
- Hoffman, C. H. (1939) The biology and taxonomy of the nearctic species of *Osmoderma* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 32:510-525.
- Hurpin, B. and M. Fresneau (1964) Élevage de deux Dynastides, *Oryctes nasicornis* (L.), *Phyllognathus silenus* F. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Rev. Pathol. Vég. Entomol. Agr. Fr.* 43:75-96.
- Koyama, M., A. Yamane, and R. Iwata (1999) Comparison of the growths of *Anomala cuprea* Hope and *Protaetia orientalis* (Gory et Perchelon) larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) when fed with various wood chips mixed with cow dung (preliminary report). *Trans. 50th Annu. Mtg. Kanto Branch, Jpn. Forestry Soc.* :99-102 (in Japanese with English title).
- Niijima, K. and M. Hasegawa (2000) The development of promotive technique for composting livestock excrement using soil animals. In "Kenkyû Seika Senshû, 1999 (fiscal)", pp. 36-37, Forestry and Forest Products Research Institute, Kukizaki (in Japanese).
- Nishigaki, J. (1991) *Anomala cuprea*, In "Rearing Methods of Insects" (Yushima, K., S. Kamano and Y. Tamaki, eds.), pp. 224-227, Japanese Society of Plant Protection, Tokyo (in Japanese).
- Ritcher, P. O. (1945) North American Cetoniinae with descriptions of larvae and key to genera and species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Bull. Kentucky Agr. Exp. Sta., Univ. Kentucky* 476:1-39.
- Ueno, M., N. Kusakabe, K. Kumagai, M. Togashi, and N. Tanaka (1992) Utilization technique of wood chip materials, such as shrubs, in large-scale agricultural land development. *Agriculture and Horticulture* 67:1094-1098 (in Japanese).



# 高等シロアリ *Nasutitermes walkeri* (Hill) ミトコンドリア内の ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 複合体の活性型-不活性 型相互変換の阻害ならびに活性型PDH複合体活性の定量<sup>1)</sup>

板倉修司・田中裕美・榎 章郎

近畿大学農学部

(受領: 2002年11月3日; 受理: 2003年1月9日)

**Inhibition of Interconversion of the Pyruvate Dehydrogenase (PDH) Complex between Active Form and Inactive Form in Mitochondria of the Higher Termite *Nasutitermes walkeri* (Hill) and Determination of the Active PDH Complex Activity.** Shuji Itakura, Hiromi Tanaka and Akio Enoki (Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan) *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* **14**: 9-17 (2003)

We set out to assay the activity of the active form of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex in mitochondria of the higher termite *Nasutitermes walkeri* because of our interest in the symbiosis between the termite and the bacteria in the gut. So that the assay results would reflect activity of the mitochondria *in vivo* as closely as possible, mitochondria were isolated in the presence of a mixture of 2,2-dichloroacetophenone, which inhibited PDH kinase, and fluphenazine, which inhibited PDH phosphatase (final concentrations of both, 0.1 mM). When the isolated mitochondria were treated with the uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, which allows complete conversion of inactive PDH complex to the active form by endogenous PDH phosphatase, the complexes were assumed to regain maximum activity. The mean total activity of the PDH complex was 72.87 nmol/termite/h, of which 43.68 nmol/termite/h was in the active form. The PDH complex in this termite is normally maintained at 60% of maximum activity.

**Key words** : Pyruvate dehydrogenase complex, PDH phosphatase, PDH kinase,  
Mitochondria, Termite, *Nasutitermes walkeri*

1) 本研究の一部は、第13回日本環境動物昆虫学会年次大会(2001年11月, 堺)において発表した。

シロアリ組織ミトコンドリアに存在するピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 複合体のリン酸化と脱リン酸化を触媒するPDHキナーゼならびにPDHフォスファターゼの阻害剤として0.1 mM 2,2-dichloroacetophenoneと0.1 mM fluphenazineが有効であることを見出した。これらの阻害剤の存在下で高等シロアリ *Nasutitermes walkeri* のシロアリ組織からミトコンドリアを調製し、活性型PDH複合体活性を定量した。また、ATP合成の脱共役剤であるcarbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazoneを用いてミトコンドリア内のPDH複合体を活性型へ変換して全PDH複合体活性を定量した。この活性型PDH複合体の活性は $43.68 \pm 4.14$  nmol/termite/hであり、また全PDH複合体活性は $72.87 \pm 8.98$  nmol/termite/hであった。シロアリ組織ミトコンドリアのPDH複合体は約60%が活性型PDH複合体として存在していた。

## 緒 言

食料性シロアリは木材の主要な構成成分であるセルロースを消化するために内在性セルラーゼを生成する (Watanabe *et al.*, 1998; Watanabe and Tokuda, 2001)。また、完全に機能する解糖系と五単糖リン酸経路の諸酵素がシロアリ組織ホモジネートに存在することが明らかにされている (O'Brien and Breznak, 1984; Slaytor *et al.*, 1997)。従って、シロアリのセルラーゼの作用でセルロースから生成したグルコースは、シロアリ組織中の解糖系によりピルビン酸塩まで酸化される。ピルビン酸塩の二酸化炭素への完全酸化は、ピルビン酸塩をアセチル-CoAへ変換するピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 複合体 (EC 1.2.4.1) の活性に依存する。このPDH複合体はリン酸化と脱リン酸化によりその活性が制御される。PDHキナーゼにより触媒されるリン酸化はPDH複合体を不活性化し、一方PDHフォスファターゼにより触媒される脱リン酸化はPDH複合体を活性化させる。PDH複合体の存在量は短期間では変化しないので、PDH複合体活性はPDHキナーゼとPDHフォスファターゼの相対的な活性の強さにより決定される (Denyer *et al.*, 1991)。

シロアリ組織ではPDH複合体活性が弱い (Itakura *et al.*, 1999) あるいは全く検出されない (O'Brien and Breznak, 1984; Slaytor *et al.*, 1997) ため、ミトコンドリア内のピルビン酸塩が

トリカルボン酸回路により二酸化炭素まで直接酸化されることはないと言われてきた。他にもPDH複合体活性が弱い例が、反芻動物の脂肪組織やラットなど哺乳類の肝臓で報告されている。例えば反芻動物では、消化管内の食物から生じたグルコースに共生細菌が最初に遭遇しグルコースを消費してしまうため、反芻動物は消化管からグルコースをほとんど吸収できず、必要とされる90%以上のグルコースは糖新生により獲得される。このような反芻動物では、PDH複合体活性が低く保たれることで、トリカルボン酸回路を経て二酸化炭素へ不可逆的に酸化されるピルビン酸塩を減らし、糖新生の前駆体として利用されるピルビン酸塩を増やしていると考えられている (Robertson *et al.*, 1980)。また、血糖濃度を一定に保つ機能をもつ肝臓のPDH複合体活性は、心臓のようなグルコースを消費する器官のPDH複合体活性よりも低いことが示されている (Wieland, 1983; Chicco *et al.*, 1986; Caterson *et al.*, 1987; Denyer *et al.*, 1991)。これらの器官では、二酸化炭素まで酸化されるピルビン酸塩の量を減らすため、PDH複合体の存在量自体が少ない (Robertson *et al.*, 1980)、あるいはPDH複合体が存在していても不活性型の割合が高く保たれている (Wieland, 1983; Chicco *et al.*, 1986; Caterson *et al.*, 1987; Holness and Sugden, 1990; Denyer *et al.*, 1991)。

PDH複合体活性が低いあるいは全く検出され

ないシロアリの場合、PDH複合体は存在しているが不活性型に保たれている、あるいはPDH複合体の存在量そのものが少ないという2通りのケースが考えられる。本研究では、シロアリ組織中で機能している活性型PDH複合体の量および全PDH複合体活性に対する存在比を明らかにするために、先ずシロアリのPDHキナーゼとPDHフォスファターゼに効率的に作用する阻害剤を検討し、次にこれらの阻害剤の存在下でシロアリ組織ミトコンドリアを分離して活性型PDH複合体と全PDH複合体の活性を測定した。

## 材料および方法

### 1. シロアリ

成熟した屋外の巣 (Greenwich, New South Wales, Australia) から *Nasutitermes walkeri* (Hill) を採集した。樹上につくられた巣へ続く蟻道からシロアリを採集し、採集後3時間以内に解剖した。実験には職蟻を用いた。

### 2. ミトコンドリアの調製

全ての操作を0-4°Cで行った。氷の上で動かなくした職蟻100頭の頭部を切断しピンセットで腸全体を引き抜いた。腸を引き抜いた胸・腹部と頭部 (以下ではシロアリ組織と称する) を抽出用緩衝液 (IB: 1 mM EGTA, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM MOPS, 300 mM sucrose および 0.1% BSA, pH 7.4) 10 ml に浸漬し、外骨格を取り除くため Potter-Elvehjem ホモジナイザー 中でホモジナイズした。ホモジナイザーを 5 ml の IB で洗浄した後、抽出液を Sorvall RC-5C 遠心分離機 (Kendro Laboratory Products, Sydney) を用いて 10,000×g で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿物を 10 ml の IB に再懸濁し Ten-Broeck ホモジナイザー で再びホモジナイズした。このシロアリ組織ホモジネートを 800×g で 10 分間遠心分離した。この 2 回目の遠心分離で得られた上澄み液をさらに 10,000×g で 10 分間遠心分離し、沈殿物としてミトコンドリアを得た。ミトコンドリアの濃度が約 2 mg/ml になるように IB を加え、穏やかに攪拌しミトコン

ドリアを懸濁した。シロアリ組織ホモジネートとミトコンドリア懸濁液のクエン酸シンターゼ活性を測定し、毎回のミトコンドリア回収率を求めた。

### 3. 酵素抽出液の調製

シロアリ組織ホモジネートとミトコンドリアを上述した方法に従って調製した。液体窒素中での冷凍と 30°C の湯浴中での融解を交互に 3 回繰り返すことで IB に懸濁したミトコンドリアを破碎し、ミトコンドリアから酵素を抽出した。

### 4. PDH複合体活性およびクエン酸シンターゼ活性の測定

全ての活性測定は 30°C で行った。ピルビン酸塩と CoA から生成するアセチル-CoA を定量し、ミトコンドリア抽出液とシロアリ組織ホモジネートの PDH 複合体 (EC 1.2.4.1) 活性を測定した (Denyer *et al.*, 1991)。シロアリ組織ホモジネートとミトコンドリア抽出液のクエン酸シンターゼ活性の値を用いて、ミトコンドリア抽出液で検出された PDH 複合体活性をシロアリ 1 頭あたりの PDH 複合体活性に換算した。オキサロ酢酸とアセチル-CoA から生成する CoA-SH を 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) を用いて定量し、ミトコンドリア抽出液とシロアリ組織ホモジネートのクエン酸シンターゼ (EC 4.1.3.7) 活性を測定した (Srere, 1969)。

### 5. 活性型PDH複合体の定量

活性型PDH複合体活性の測定では、PDHキナーゼとPDHフォスファターゼを阻害するため 0.1 mM 2,2-dichloroacetophenone (DCAP) および 0.1 mM fluphenazine を添加した IB を用いてミトコンドリアを調製した。また、これらの阻害剤の代わりに dichloroacetate (DCA, 10 mM) と sodium fluoride (NaF, 50 mM) を加えた IB でもミトコンドリアを調製した。DCAP と fluphenazine を添加して調製したミトコンドリア懸濁液ならびに DCA と NaF を添加して調製したミトコンドリア懸濁液をそれぞれ 3 画分へ分割した。この中の 1 画分は、解剖した時点での PDH 複合体活性 (活性型 PDH 複合体活性, PDH<sub>active</sub>) の測定に用い

た。残りの2つのミトコンドリア画分を、阻害剤を含まないIB (10 ml) で希釈しさらに遠心分離 (10,000×g, 10分間) を2回繰り返すことで洗浄した。これらの洗浄済みミトコンドリアを、最大のPDH複合体活性 (PDHtotal) を測定するために10 μM carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (*m*CCCP) を添加したKCl培養液 (2 mM EDTA, 120 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) あるいは最小のPDH複合体活性 (PDHminimum) を測定するために5 mM succinate を添加したKCl培養液に各々懸濁し30°C で15分間インキュベートした。

#### 6. PDH複合体の再活性化

PDHキナーゼとPDHフォスファターゼの阻害剤を含まないIBで調製したミトコンドリアを0.5 mM L-malateと5 mM 2-oxoglutarateを含むKCl培養液中で30°C, 10分間インキュベートしPDH複合体の初期活性を低下させた。10 μM *m*CCCPの添加により内在性PDHフォスファターゼによるPDH複合体の敏速な活性化を開始した。一定時間ごとに分取したサンプル (0.6 ml) を4°C, 16,000×gで30秒間遠心分離 (Biofuge Fresco centrifuge) し、沈殿したミトコンドリアを液体窒素で冷凍した。上述した方法に従って、凍結したミトコンドリアから酵素液を抽出しPDH複合体活性を測定した。*m*CCCPによるPDH複合体の活性化を開始する前に、0.1 mM DCAPと0.1 mM fluphenazineを添加したミトコンドリア懸濁液をコントロールとした。

#### 7. PDH複合体の不活性化

PDH複合体の初期活性を上昇させるため、ミトコンドリアをKCl培養液中で30°C, 10分間インキュベートした。シロアリ組織ミトコンドリアを0.5 mM L-malateと5 mM 2-oxoglutarateを含むKCl培養液 (3.0 ml) 中でインキュベートしミトコンドリア内のATP濃度を上昇させることで、内在性PDHキナーゼによるPDH複合体の敏速なリン酸化を行った (Kerbey *et al.*, 1976)。上述のPDH複合体の再活性化と同様な方法で、不活

性化におけるPDH複合体の活性を測定した。L-Malateと2-oxoglutarateを含むKCl培養液中でミトコンドリアをインキュベートし始める前に、0.1 mM DCAPと0.1 mM fluphenazineをKCl培養液に添加したミトコンドリア懸濁液をコントロールとした。

#### 8. タンパク質の定量

BSAを含まないIBに懸濁したミトコンドリアを液体窒素と30°Cの湯浴に交互に浸漬した。凍結と融解を繰り返すことでミトコンドリアを破碎し、ミトコンドリア抽出液を得た。この抽出液中のタンパク質量を、Bradford dye binding methodに基づいたBio-Rad protein assay kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて定量した。

### 結果および考察

#### 1. PDH複合体の活性型—不活性型相互変換の阻害

##### 1) PDH複合体活性

全PDH複合体活性 (PDHtotal) は72.87 ± 8.98 nmol/termite/h (*n* = 6) であり (Table 1), この値はこれまでに報告されたPDH複合体活性7.06 ± 0.96 nmol/termite/h (Itakura *et al.*, 1999) の約10倍に相当する。ミトコンドリア抽出液からはこの様に高いPDH複合体活性が検出されたものの、シロアリ組織ホモジネートからはPDH複合体活性が全く検出されなかった。

シロアリ組織ホモジネートの中には、ミトコンドリアの調製過程で破碎したミトコンドリアが含まれている。このことはミトコンドリア内膜結合タンパク質であるPDH複合体が、破碎したミトコンドリア膜とともに、シロアリ組織ホモジネート中に存在することを示している。しかしPDH複合体が存在しているのにも関わらず、シロアリ組織ホモジネートからはPDH複合体活性が全く検出されなかった。このことより、*in vivo*でのシロアリ組織ミトコンドリア内では、PDH複合体が不活性型として存在しているものと推測された。これらの結果から、約2時間を要するミトコ

**Table 1** Activities of PDH complex and citrate synthase in termite tissue mitochondria<sup>1)</sup> of *N. walkeri*

	PDH complex activity <sup>2)</sup>				Citrate synthase activity <sup>3)</sup>
	(nmol/termite/h)	(mU/mg mitochondrial protein)	(mU/g wet weight)	(mU/U citrate synthase)	(U/mg mitochondrial protein)
PDH <sub>active</sub> (5)	43.68 ± 4.14	15.84 ± 1.24	140.01 ± 13.26	5.46 ± 0.77	3.04 ± 0.27
PDH <sub>total</sub> (6)	72.87 ± 8.98	23.68 ± 2.36	233.57 ± 28.78	10.44 ± 2.20	2.72 ± 0.42
PDH <sub>minimum</sub> (3)	25.90 ± 1.75	8.43 ± 0.84	83.00 ± 5.61	2.90 ± 0.66	3.14 ± 0.35

1) Mitochondria were prepared from termite tissue in the presence of inhibitors of PDH complex interconversion. After isolation, the mitochondria were divided into three portions. One portion was frozen at the time of sacrifice and later assayed to determine the amount of active PDH complex. The two other mitochondrial portions were washed free of interconversion inhibitors. One portion was incubated in the presence of 10 μM *m*CCCP and then assayed for total PDH complex activity. The second portion was incubated in the presence of 5mM succinate and then assayed for minimum PDH complex activity. Citrate synthase activity was determined in all the mitochondrial extracts used for estimation of active, total, and minimum PDH complex activity. Results are expressed as means ± SEM. Values in parentheses indicate the number of replicates.

2) One unit of PDH complex activity is defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of acetyl-CoA per minute.

3) One unit of citrate synthase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of citrate per minute.

ミトコンドリア調製の際にミトコンドリア内に存在していた基質が枯渇する（ミトコンドリア内のATPが消費される）ことでPDH複合体が活性化された可能性が示唆された。このため活性型PDH複合体と不活性型PDH複合体間の相互変換を触媒するPDHキナーゼとPDHフォスファターゼの阻害剤を検討することで、ミトコンドリア調製の間PDH複合体活性を一定に保ち、本来シロアリ体内で活性型として存在しているPDH複合体の活性（PDH<sub>active</sub>）を測定することが必要となった。この他にもミトコンドリア抽出液でPDH複合体活性が検出されたのにシロアリ組織ホモジネートからは活性が検出されなかった原因として、シロアリ組織ホモジネート中にPDH複合体に対して阻害剤的にはたらく物質が含まれている可能性が考えられる。しかしながら、シロアリ組織ホモジネートにはそのような阻害剤として作用する物質は含まれていないということが、ワモンゴキブリ *Periplaneta americana* と大腸菌 *Escherichia coli* のPDH複合体の活性がシロアリ *N. walkeri*, *Reticulitermes flavipes* あるいは *Coptotermes lacteus* から得た抽出液を添加しても影響を受けないことを示した実験により、既に明らかにされている

(O'Brien and Breznak, 1984).

## 2) DCAとNaFによる相互変換の阻害

これまでPDHキナーゼおよびPDHフォスファターゼの阻害剤として使われてきたDCAとNaF (Whitehouse *et al.*, 1974; Kerbey *et al.*, 1976) による、シロアリ組織ミトコンドリア内のPDH複合体の活性型/不活性型相互変換に対する阻害効果を検討した。ブタの心臓から抽出したPDHキナーゼは10mM DCAにより阻害され (Whitehouse *et al.*, 1974), また同じくブタの心臓から抽出したPDHフォスファターゼは50mM NaFにより阻害された (Siess and Wieland, 1972). この様な阻害剤はシロアリのPDHキナーゼやPDHフォスファターゼに対しても阻害作用を示すものと予測された。シロアリ組織ミトコンドリア中で起こるPDH複合体の相互変換に対するこれら阻害剤の効果を、PDH複合体の敏速なリン酸化と脱リン酸化が起こる実験条件下で検討した。

予め高濃度の基質存在下 (0.5mM L-malate + 5mM 2-oxoglutarate あるいは 5mM succinate) でインキュベートしPDH複合体を不活性化したシロアリ組織ミトコンドリアに、ATP合成の脱共役剤である *m*CCCP を添加しミトコンドリア内

のエネルギーを枯渇させることでPDH複合体を再活性化した。ミトコンドリアをmCCCPとともにインキュベートするとミトコンドリア内のATP濃度が減少するため、内在性のPDHフォスファターゼの作用で不活性型のPDH複合体が活性型へ完全に変換される (Denyer *et al.*, 1991)。この様な条件下で起こるシロアリ組織ミトコンドリア内のPDH複合体の脱リン酸化による活性化をNaF (50 mM)は効率的に阻害できなかった (阻害率38.8%) (Table 2)。

一方、基質の存在しない条件で予めインキュベートしミトコンドリア内のエネルギーを枯渇させることでPDH複合体を活性型へ変換したシロアリ組織ミトコンドリアに、高濃度の基質 (5 mM succinate) を加えることでPDH複合体を不活性型へ変換した。この条件下では、基質の酸化によりミトコンドリア内のATP濃度が増加するため

内在性PDHキナーゼの作用により活性型PDH複合体が不活性型へ敏速に変換される。このPDHキナーゼによるPDH複合体の不活性型への変換に対するDCA (10 mM)による阻害効率もあまり高くなかった (阻害率37.7%) (Table 2)。

### 3) DCAPとfluphenazineによる相互変換の阻害

上述の結果により、哺乳類のPDHキナーゼとPDHフォスファターゼの阻害剤として用いられるDCAとNaFがシロアリ組織ミトコンドリアでは有効に機能しないことが示された。このため、より効果的なPDHキナーゼの阻害剤であるDCA P (Mann *et al.*, 2000)とPDHフォスファターゼの阻害剤であるfluphenazine (Bak *et al.*, 1999)を用いた新たなプロトコルの開発が必要となった。Fluphenazineは0.1 mMでPDHフォスファターゼによるPDH複合体の活性化を強く阻害した (阻害率98.4%) (Table 2)。Fluphenazineをさらに高

Table 2 Efficacy of inhibitors at preventing interconversion of PDH complex in termite tissue mitochondria<sup>1)</sup> of *N. walkeri*

Inhibitors		Efficacy of inhibition (%)
Inhibitors of PDH phosphatase		
NaF	(50mM)	38.8
Fluphenazine	(0.1 mM)	98.4
	(1 mM)	94.2
	(10 mM)	ND <sup>2)</sup>
Inhibitors of PDH kinase		
DCA	(10 mM)	37.7
DCAP	(0.01 mM)	53.5
	(0.1 mM)	84.6
	(1 mM)	29.6
	(10 mM)	4.1

1) Mitochondria were prepared from termite tissue in the absence of inhibitors of PDH complex interconversion. After isolation, the mitochondria were divided into three portions. For the assay of PDH phosphatase inhibitors, one portion was incubated in the presence of 10  $\mu$ M mCCCP without inhibitors, the other two portions were incubated in the presence of 10  $\mu$ M mCCCP with the addition of NaF or fluphenazine. For the assay of PDH kinase inhibitors, one portion was incubated in the presence of 5 mM succinate or 0.5 mM L-malate / 5 mM 2-oxoglutarate without inhibitors, the other two portions were incubated in the presence of succinate or L-malate / 2-oxoglutarate with the addition of DCA or DCAP. PDH complex activity was determined in all the mitochondrial extracts used for estimation of efficacy of inhibitors at preventing the interconversion.

2) Efficacy at preventing dephosphorylation was not determined because of decrease in PDH complex activity occurred with the addition of 10 mM fluphenazine.

濃度の 1 mM で用いても阻害効果の増加は認められず、10 mM では PDH 複合体の活性を阻害した。一方、DCAP は 0.01 mM では PDH キナーゼによる PDH 複合体の不活性化の阻害に対して部分的にしかならずでなかったが (阻害率 53.5%), 0.1 mM にすると PDH キナーゼを効果的に阻害することに成功した (阻害率 84.6%) (Table 2)。さ

らに高濃度の 1 mM あるいは 10 mM では PDH 複合体自体の活性を阻害してしまい、例えば 10 mM では PDH 複合体の活性が DCAP を添加しない試料の活性の 10% まで低下した (Table 2)。これらの結果をもとに行った 0.1 mM DCAP と 0.1 mM fluphenazine を同時に添加した場合の PDH 複合体の再活性化 (Fig. 1a) と不活性化 (Fig. 1b) 実

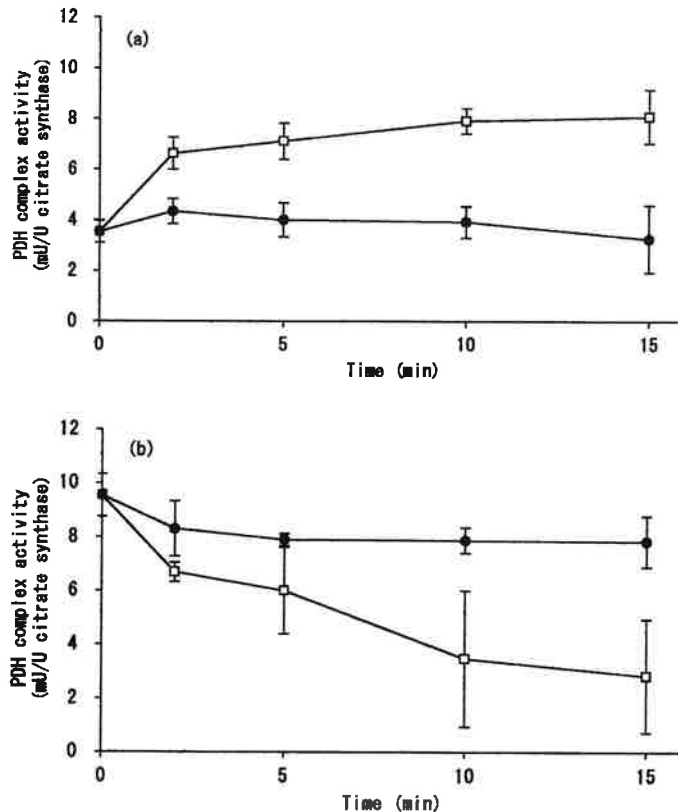


Fig. 1 Efficacy of DCAP and fluphenazine at preventing interconversion of PDH complex in termite tissue mitochondria of *N. walkeri*. Termite tissue mitochondria were incubated in KCl medium at 30 °C in the presence of 10  $\mu$ M *m*CCCP (a) or 0.5 mM L-malate / 5 mM 2-oxoglutarate (b). Mitochondria in (a) were incubated in KCl medium containing malate / 2-oxoglutarate at 30 °C for 10 min before addition of *m*CCCP to obtain PDH complex with a low initial activity. Mitochondria in (b) were incubated in KCl medium at 30 °C for 10 min before addition of malate / 2-oxoglutarate to obtain PDH complex with a high initial activity. Incubations were performed either in the absence of 0.1 mM DCAP / 0.1 mM fluphenazine (□) or with these inhibitors present initially (●). Results are from three separate mitochondrial preparations.

験において、これらの阻害剤が存在するとPDH複合体の活性化と不活性化が効率的に阻害されPDH複合体の活性は実験中ほぼ一定に保たれることが確かめられた。PDH複合体の活性化と不活性化の経時変化を調べた結果 (Fig. 1) により、これらの阻害剤の有効性が確かめられ、シロアリ組織ミトコンドリアに存在する活性型のPDH複合体活性 (PDH<sub>active</sub>) の定量が可能なことが明らかとなった (Table 1)。さらに、調製したミトコンドリアを活性化条件あるいは不活性化条件におくことで、最大のPDH複合体活性 (PDH<sub>total</sub>) ならびに最小のPDH複合体活性 (PDH<sub>minimum</sub>) を測定することが可能となった (Table 1)。

## 2. シロアリ組織ミトコンドリア内のPDH複合体活性

この様にして定量したシロアリ組織ミトコンドリアの活性型PDH複合体活性の全PDH複合体活性に対する割合は約60%であった (43.68 ± 4.14 nmol/termite/h) (Table 1)。この60%という値は、ラット (Wieland, 1983) の心筋 (70%)、脳 (68%) および腎臓 (65%) などピルビン酸塩を酸化する器官での活性型PDH複合体の存在率に近く、肝臓 (17%) や脂肪組織 (20%) のようなピルビン酸塩の酸化を抑制し糖新生や脂質合成の基質として利用する器官や組織での存在率とは異なる値であった。このことから、シロアリ組織ミトコンドリア内のPDH複合体は心臓などピルビン酸塩酸化型の器官に存在するPDH複合体に近い機能を担っているものと推測される。

シロアリ組織ミトコンドリアの活性型PDH複合体活性 (Table 1) を、ミトコンドリアのタンパク質量 (mU/mg mitochondrial protein) あるいはシロアリの湿質量 (mU/g wet weight) を基準にして他の動物と比較すると、子牛の腎臓および心臓では170, 500 mU/mg mitochondrial protein (Pettit and Reed, 1982)、ラットの心臓および横隔膜ではそれぞれ 52.8, 33.0 mU/mg mitochondrial protein (Denyer *et al.*, 1989)、ラットの肝臓では360 mU/g wet weight (Chicco *et*

*al.*, 1986)、脂肪組織では671 mU/g wet weight (Holness and Sugden, 1990)と報告されており、シロアリで検出されたPDH複合体活性の方が相当低い値であった。これらの結果はシロアリ組織ミトコンドリアではピルビン酸塩が利用されるものの他の生物と比べてその利用効率が低いことを示しており、高等シロアリでは解糖により生じたピルビン酸塩がシロアリの後腸内へ運搬され共生細菌のエネルギー源として利用されるという説 (Slaytor, 2000) と矛盾しない。

シロアリ組織ホモジネートのクエン酸シンターゼ活性は7759 ± 260 nmol/termite/h ( $n = 54$ )であり、シロアリ組織の全PDH複合体の活性 (72.87 ± 8.98 nmol/termite/h) と比べると約100倍も高い値であった。ラットでは同じく全PDH複合体活性に対するクエン酸シンターゼ活性の割合は約10倍 (Denyer *et al.*, 1989; Holness and Sugden, 1990)と報告されており、シロアリ組織ミトコンドリアが高い酸化能力を備えていることが示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行にあたり直接ご指導頂きましたSydney大学 Michael Slaytor 教授、Douglas J. Chappell 講師、また1年間にわたるSydney大学での研究を許可頂いた近畿大学に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Bak, C., J. Huh, S. Hong and B. Song (1999) Noncompetitive, Ca<sup>2+</sup>-independent inhibition of pyruvate dehydrogenase phosphatase by fluphenazine. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47: 1029-1037.
- Caterson, I. D., L. D. Astbury, P. F. Williams, M. A. Vanner, G. J. Cooney and J. R. Turtle (1987) The activity of the pyruvate dehydrogenase complex in heart and liver from mice during the development of obesity and insulin