



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	越冬期のツヤハナバチに含まれる多量の糖類
Author(s)	丹野, 皓三; TANNO, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 22, 51-57
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17680">https://hdl.handle.net/2115/17680</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p51-57.pdf



## 越冬期のツヤハナバチに含まれる多量の糖類

丹野 皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 39 年 7 月受理)

### I. 緒 言

凍害防止剤としてのグリセリンの効果が哺乳動物の血球等において発見されて以来<sup>1)</sup>, 越冬昆虫の体内に生ずるグリセリンとその耐凍性及び防凍性(過冷却能力)との関連についてしばしば論ぜられて来た<sup>2)-11)</sup>。しかし多くの報告は幼虫及び蛹の時期におけるもので, 成虫に関しては報告は少ない。今までの報告によれば, 成虫はたとえ越冬期にグリセリンを含有していても凍結しさえすれば致命的な害を例外なく受ける<sup>9), 12)</sup>。このように成虫越冬の昆虫に検出されるグリセリンは凍害に対して何ら防止効果を持たないが, 防凍性に対してはその過冷却能力を高める点において有効であるように思われる<sup>12)</sup>。

従来耐凍性に関連して越冬昆虫の体液に含まれる量的に比較的多い小分子の物質としてグリセリン及び他の多価アルコールがとりあげられていたが, これにくらべて量的に少ない糖類は問題にされていなかった。しかし昆虫で糖をもっているものはきわめて普通であり<sup>13)</sup> 稀にはポプラハナバチのように多価アルコールはほとんどなく, かわりに多量の糖を含んでいる耐凍性昆虫もある<sup>14)</sup>。一方植物においては秋から冬にかけて増大する糖類とその耐凍性との間に密接な関係があることが知られている<sup>15)</sup>。本文ではこのような越冬生物の体内に含まれる糖とその生物の耐凍性及び防凍性との関係を明らかにする立場から成虫で越冬しているツヤハナバチ類の 2 種にきわめて多量の糖類が含まれている事実と, これが越冬時に果す役割についてのべる。

### II. 材料と方法

'63 年 10 月初旬に北海道大学構内で採集したキオビヒメハナバチ *Ceratina flavipes* Smith と *C. japonica* Cockerell を用いて翌年春までの間に実験した。このツヤハナバチ類は 9 月下旬ころ 8 頭前後の群をつくり立枯れたオオハンゴンソウの髓等に入り成虫で越冬する。採集した虫をオオハンゴンソウの髓の中に入れてそのままデシケーターの中に入れて外気温とほぼ同じ室温の飼育室におき実験に使った。*C. flavipes* と *C. japonica* は形態学的, 生態学的に非常に近い種であり<sup>16)</sup>, 今回の報告ではこの二種を全く区別していない。

**凍結の方法及び凍結の判定:** 直径 15 cm の乾いたペトリ皿に入れた ♂ 20, ♀ 34 頭を  $-10 \pm 1^{\circ}\text{C}$  の恒温箱においた。24 時間後凍結したものをとりのぞき, 未だ凍結しないものを  $-15$

±1°Cの恒温箱に移しさらに24時間おいた。この温度でも凍結しなかったものを-23±2°Cに移しさらに24時間おきそれでも凍結しなかったものをさらに-30±1°Cにおいた。虫体の凍結は第1図に示したように凍結した個体が例外なく触角を硬直させる事実及びピンセットの先で腹部を押した場合硬くなっている事実とで容易に判定出来た。

**ペーパークロマトグラフィーによる糖類及び多価アルコールの定性定量：** 13~15個体(146~210 mg)を磨砕し、10 ml 80% エタノールで3回抽出し活性炭を加えて遠沈し上清液を蒸発させた。この残渣を0.5 ml ピリジンに溶解させた。このピリジン溶液の0.01 mlをワットマンろ紙につけn-ブタノール、氷酢酸、水(4:1:2)<sup>17)</sup>で室温で10回展開した。定性クロマトグラムを得るためにアルカリ性硝酸銀<sup>18)</sup>及びp-アニシジン<sup>19)</sup>を用いた。発色させたクロマトグラムに合わせて未発色のクロマトグラムを切り取り各々10 ml 蒸留水で抽出した。各抽出液中の糖はアンスロン法<sup>20)</sup>で定量した。アンスロン法によるフラクトースの発色率は標準糖液として用いたグルコース100に対して68であるから<sup>21)</sup>この点の補正を行なった。多価アルコールはクロモトローブ酸試薬の発色で定量した<sup>22)</sup>。

**全糖の定量：** 10 mg 前後の虫体を磨砕し10 ml の80% エタノールで抽出した。この上清液0.2 ml にアンスロン試薬を加え100°Cで10分間加熱した。これを急冷却させて620 m $\mu$ の吸光度を分光光度計で測定した。ペーパークロマトグラフィーの結果から620 m $\mu$ の吸光度の50%をフラクトースが占めているから(本文54ページ)この点の補正を各測定値について行なった。標準糖液として100  $\mu$ g/mlのグルコース液を用いた。

トレハロースの化学的定量及びグリコーゲンの定量は本文60ページと同様にして行なった。これらの成分の値は何れも生体重1 g 当りの重量(mg)で表わした。

### III. 結 果

#### 1. 凍 結

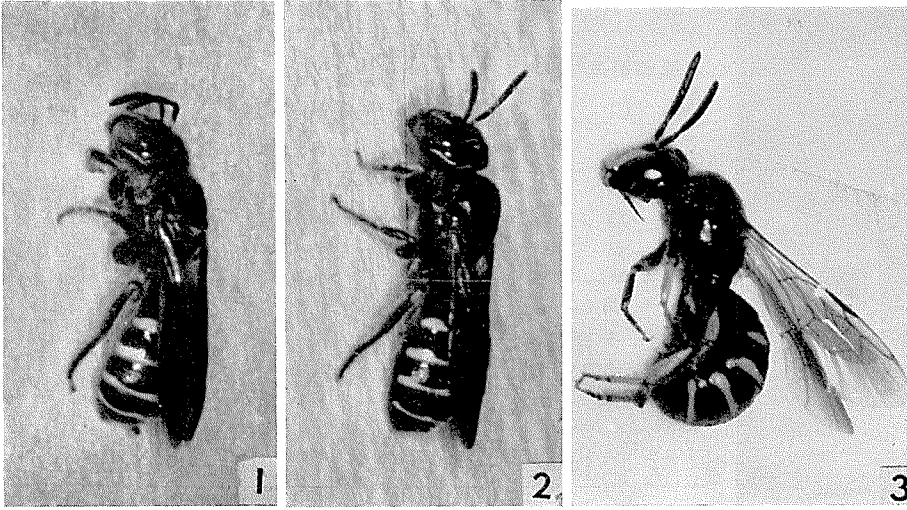
12月初旬行なった凍結実験の結果を第1表に示した。未凍結の個体は常に第1図に示したように触角を柄節と梗節の間で折り曲げているのに対して、凍結した個体は例外なく触角を硬直させ、室温にもどし融解させると数分で死後硬直を起した。-5°Cでは虫体をぬらしても用いた10個体のうち凍結したものはなく、10日後室温にもどすと正常に活動した。

#### 2. 糖含量と凍結温度

第1表に示したものと同一個体を融解後に用いて、その全糖含量をアンスロン法でしらべた。結果を第2表に示した。生体重1 g 当りの糖含量は雄の方が雌のそれより50%ほど多い。-10°Cで凍結した個体の糖含量は雌雄とも最低量であり、次に低い糖含量と比較しても統計的に有意な差があった。(雄の場合は-30°Cと比較してp<0.01, 雌では-15°Cのそれと比較してp<0.01) -15°C以下の温度では雌の場合糖含量が多いほどより低い温度で凍結する傾向を示したが、一方雄の場合は、はっきりした傾向を示さなかった。

#### 3. 糖の定性定量及び多価アルコール、グリコーゲンの定量

3月初旬の個体から得たクロマトグラム(アルカリ性硝酸銀で発色)を第2図に示した。



第 1 図 ツヤハナバチの凍結状態 × 8

1. 凍結前                      2. 凍結中                      3. 融解後

第 1 表 ツヤハナバチの凍結温度 XII, 3~7, 1963

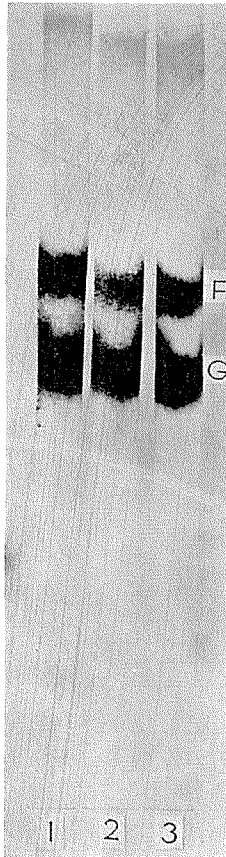
凍結温度* (°C)	凍結した個体数			
	♂		♀	
-10	6	30%	7	21%
-15	6	30	8	23
-23	3	15	10	30
-30	5	25	9	26
使用個体数計	20	100	34	100

\* ♂ 20 ♀ 34 個体を使用。凍結の方法は第 II 節参照

雌雄とも標準のフラクトース及びグルコースと同じ位置に明確な発色がみられる。また p-アニンジンで発色させると標準のフラクトース及びグルコースと同じく黄色及び褐色にそれぞれ発色した。これらの糖をクロマトグラムから分離し定量した結果を同一の資料について化学的方法で定量した全糖量、トレハロース、グリコーゲンと併記して第 3 表に示した。化学的方法でもとめた全糖量とクロマトグラムで定量した糖の総和とはよく一致している。糖類の大部分は雌雄ともフラクトース及びグルコースでありトレハロースが少量含まれていた。アルカリ性硝酸銀で発色させた場合トレハロースの附近にわずかに発色するスポットが 2 個みられたが、定量にかからぬほどであった。多価アルコール及びグリコーゲンも定量にかからぬほど微量であった。

#### IV. 考 察

今まで報告された最も多量の糖をもっている昆虫は独居性の花蜂で、その糖含量は体液 1 ml あたり 65.54 mg である<sup>13)</sup>。ところが今回実験に使った *Ceratina* はそれよりもはるかに多



第2図 ツヤハナバチに含まれる糖のペーパークロマトグラム  
1. ♂ 2. ♀ 3. 対称  
F: フラクトース  
G: グルコース

第2表 糖含量と凍結温度 XII, 3~7, 1963

凍結温度* (°C)	♂		♀	
	個体数	糖含量** (mg/g)	個体数	糖含量** (mg/g)
-10	6	104.0±13.1	7	92.9±0.7
-15	6	184.0±4.3	8	99.4±3.4
-23	3	176.9±0.1	10	104.1±16.2
-30	5	148.5±20.9	9	134.0±3.7

\* 第1表参照

\*\* ♂ 平均値 150.0±35.0 ♀ 平均値 108.0±16.8

全虫平均値 128.3±33.6

第3表 ツヤハナバチに含まれる糖, 多価アルコール, グリコーゲン III, 20, 1964

	♂ (13頭)		♀ (15頭)	
	含量 (mg/g)	(%)	含量 (mg/g)	(%)
ペーパークロマトグラムによる方法				
フラクトース	76.8	59.6	44.9	57.1
グルコース	48.2	37.8	29.5	37.5
トレハロース	3.6	2.8	4.2	5.4
糖類計	128.6	100.0	78.6	100.0
多価アルコール	0.0		0.0	
化学的方法				
全糖量	129.1	100.0	83.3	100.0
トレハロース	4.9	3.8	7.1	8.5
グリコーゲン	0.0		0.0	

い糖を含んでいる。この蜂はグリコーゲンをまったく持っていないから、この多量の糖は越冬中の貯蔵物質としての役割を果しているのであろう。12月の糖含量より3月の糖含量の方が少ない事実から考えて、越冬中の代謝に一部分使われたのでであろう。生体重あたりの糖含量において雌雄間にかなりの差があったが、雌は解剖してみると雄にくらべて脂肪体を多量に持っているから、体液あたりの糖含量は雌雄間に差がないのかもしれない。*C. flavipes* と *C. jayonica* とを区別することなく実験に使用したが、第2表において各糖含量の標準偏差がそれほど大きくない事から考えて、この二種類の蜂の糖含量間にはほとんど差がないものと思われる。

種々の無脊椎動物において知られているように<sup>23)</sup>昆虫においても含まれる糖類の大部分をトレハロースが占めている場合が普通である<sup>19)</sup>。しかしウマバエ *Gastrophilus intestinalis* の幼虫のように量的には少ないが糖類の大部分をフラクトース (体液 1ml あたり 0.28 mg) 及びグルコース (0.65 mg) が占めている場合もある<sup>24)</sup>。Czarnowskiによればミツバチの成虫は17~

37 mg/g の糖を含有し、その 20~43.5% がフラクトースであり、残りがグルコースである<sup>25)</sup>。フラクトース及びグルコースが糖類の大部分を占めている点は今回の実験に用いた *Ceratina* の場合に似ている。

ごく最近糖類を多量に含んでいて非常に耐凍性の高いポプラハバチ *Trichiocamps populi* の越冬前蛹が発見された<sup>14)</sup> が *Ceratina* の場合は多量の糖を持っていても凍結しさえすればかならず致命的な害を受けた。この事実は越冬昆虫の体内に含まれるグリセリンが凍害に対する防禦効果において有効な条件のひとつでありえても、必要且つ十分な条件ではないとする我々の見解<sup>10)</sup> を越冬昆虫の体内に含まれる多量の糖においても支持するものである。一方今回の実験の結果はこの多量の糖が虫体の過冷却能力を高めるのに役立っていることを示している。しかし  $-15^{\circ}\text{C}$  でもかなりの蜂が凍結することから考えて、野外ではおそらくこれより低い温度に長時間さらされることはなく過冷却状態で越冬しているのであろう。

### 摘 要

成虫で越冬するツヤハナバチ類のキオビメハナバチ *Ceratina flavipes* 及び *C. japonica* の体内に従来報告された昆虫のうちで最大量の糖類が含有されている事実を発見したので、この糖類の組成を明らかにし、この虫に含まれる糖とその耐凍性及び防凍性との関係を調べた。*C. flavipes* と *C. japonica* とを区別することなく実験に使ったが、測定した各糖含量の標準偏差がそれほど大きくない事から考えてこの二種間にそれほど差がないものと思われる。雄 (20頭の平均値) の糖含量は  $150 \pm 35$  mg/g 生体重、雌 (34頭の平均値) では  $108 \pm 17$  mg/g 生体重であった (63, XII, 3~7)。翌年の III, 20 に糖量を調べてみると、雄 (13頭の平均値) では 129 mg/g 生体重、雌 (15頭の平均値) では 83 mg/g 生体重であった。糖類の組成は雌雄間にほとんど差がなく、雄ではフラクトース 59.6%, グルコース 37.8%, トレハロース 3.6%, 雌ではそれぞれ 57.1%, 37.5%, 5.4%, であった。グリコーゲン及び多価アルコールは定量にかからぬほど微量であった。

この蜂は凍結しさえすれば例外なく致命的な害を受けた。このことは越冬昆虫の体内に含まれるグリセリンが凍害を防ぐために有効なひとつの条件でありえても、必要且つ十分な条件ではないとする我々の見解を、越冬昆虫の体内に含まれる多量の糖においても支持するものである。一方糖含量と昆虫の凍結する温度との間には明らかな関係がみとめられ、多量の糖の存在はこの昆虫の過冷却能力を高めるのに役立っていることがわかった。しかし  $-15^{\circ}\text{C}$  の温度でも 24 時間以内になんかの虫が凍結することから考えて、野外ではおそらく  $-15^{\circ}\text{C}$  以下の低温に長時間さらされることはなく過冷却状態で越冬しているのであろう。

最後に、この報告にあたり *Ceratina* について色々教えて頂いた本学理学部助教授坂上昭一氏並びに札幌東高等学校教諭塩川信氏に厚く御礼申し上げる。実験の指導並びに御校閲下さった朝比奈教授に感謝する。

## 文 献

- 1) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 2) Salt, R. W. 1957 Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Canad. Ent.*, **89**, 491-494.
- 3) Salt, R. W. 1959 Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). *Can. J. Zool.*, **37**, 59-69.
- 4) 竹原一郎・朝比奈英三 1959 越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて, 低温科学, 生物篇, **17**, 159-163.
- 5) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 昆虫の耐凍性とグリセリン. 低温科学, 生物篇, **18**, 57-65.
- 6) 竹原一郎・朝比奈英三 1961 イラガ越冬前蛹のグリセリン I. グリセリン生成, 休眠, 耐凍性に及ぼす環境温度の影響. 低温科学, 生物篇, **19**, 29-36.
- 7) Smith, A. U. 1961 *Biological Effects of Freezing and Super cooling*, Edward Arnold Ltd. London, 462 pp.
- 8) Aoki, K. 1962 Protective action of the polyols against freezing injury in the silkworm egg. *Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. IV (Biol.)* **28**, 29-36.
- 9) Sømme, L. 1963 Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.*, **42**, 87-101.
- 10) 丹野皓三 1963 アゲハ越冬蛹の耐凍性. 低温科学, 生物篇, **21**, 41-52.
- 11) Asahina, É. 1964 Freezing and frost-resistance in insect. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.) Academic Press, London 印刷中.
- 12) 丹野皓三 1962 ムネアカオオアリの耐凍性とグリセリンの関係. 低温科学, 生物篇, **20**, 25-34.
- 13) Wyatt, G. R. 1961 The biochemistry of insect hemolymph, *Ann. Rev. Ent.*, **6**, 75-102.
- 14) 丹野皓三・朝比奈英三 1964 ポプラハバチの耐凍性 I. 低温科学, 生物篇, **22**,
- 15) Sakai, A. 1962 Studies on the frost-hardiness of woody plants I. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B. 11**, 1-40.
- 16) Shiokawa, M. 1963 Redescriptions of *Ceratina flavipes* Smith and *C. japonica* Cokerell. *Contyû*, **31**, 276-280.
- 17) Partridge, S. M. 1948 Filter-paper partition chromatography of sugars I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.*, **42**, 238-248.
- 18) Trevelyan, W. E., Protector, D. P., and Harrison, J. S. 1950 Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 444.
- 19) Hough, L., Jones, J. K. N. and Wadman, W. H. 1950 Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. *J. Chem. Soc.*, 1702-1706.
- 20) Makrasch, L. C. 1954 Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **208**, 55-59.
- 21) 堀越弘毅 1958 糖類 (アンスロン法). 化学の領域増刊 **34**, 36-39.
- 22) Burton, R. M. 1957 The detection of glycerol and dihydroxyacetone, *In Method in Enzymology*, **3**, (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.) Acad. Press. Inc., Pub. N. Y., 246-248.
- 23) Donald, F. 1958 Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. *Can. J. Zool.*, **36**, 787-795.
- 24) Levenbook, L. 1950 The composition of horse bot fly (*Gastrophilus intestinalis*) larva blood. *Biochem. J.*, **47**, 336-346.
- 25) Czarnowski, C. V. 1954 Zur papierchromatographischen Blutzuckerbestimmung bei der Honigbiene. *Naturwissenschaften*, **41**, 577.

### Summary

Extremely high sugar levels were found in overwintering adults of the solitary bees *Ceratina flavipes* Smith and *C. japonica* Cockerell (Hymenoptera, Apidae). The relation between the sugar content, frost-resistance and super-cooling ability was investigated in these bees.

The bees were kept at out door temperatures for examination. There was no difference in sugar content in the two species. In December the average sugar content in 20 males and 34 females were  $150 \pm 35$  mg/g and  $108 \pm 17$  mg/g respectively, based on their fresh body weight. Either of these values are the highest reported for any insect. These levels decreased by approximately 20 per cent in both males and females by the following March.

These sugars were analysed by paper chromatography. In the male, 59.6 per cent of the sugar was fructose, 37.8 per cent was glucose, and the remainder was trehalose. The result in the female was nearly the same. They contained neither polyols nor glycogen.

The bees were unable to survive freezing even for short periods at high temperatures. This means that a large amount of sugar in an insect does not always protect it against frost injury.

By exposing bees to temperature gradually lowered from  $-10$  to  $-15$ ,  $-23$  and finally  $-30^{\circ}\text{C}$ , at one day intervals without ice seeding, the relation between the sugar content and the supercooling ability in the insect was observed. The sugar content in the bees which froze at  $-10^{\circ}\text{C}$  was always clearly lower than that of those which froze at any lower temperature. This suggests that a high sugar content is ecologically useful because it enhances their supercooling ability and therefore protects them from bodily freezing which is invariably fatal.