

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17380038
 研究課題名（和文）社会性ハチ類の行動を統御する情報化学物質群の解明とその応用に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on elucidation of semiochemicals that regulate behaviors of social bees and wasps, and their application
 研究代表者
 小野 正人（ONO MASATO）
 玉川大学・農学部・教授
 研究者番号：70204253

研究成果の概要：真社会性昆虫を代表するグループであるマルハナバチ類、スズメバチ類、ミツバチ類が、個体間のコミュニケーション手段として利用している情報機能をもつ物質群にフォーカスを合わせ、その実態の解明を行った。各々のハチ類が、さまざまな揮発性の化学物質を防衛行動、配偶行動、採餌行動に利用していることが明らかとなり、物質の特定もなされた。さらに、それらの情報機能をもつ物質を応用面で活用する試みがなされた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	7,200,000	0	7,200,000
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	10,500,000	600,000	11,100,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫利用、社会性ハチ類、マルハナバチ、スズメバチ、ミツバチ、情報化学物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 真社会性昆虫を代表するグループであるマルハナバチ類、スズメバチ類、ミツバチ類は、さまざまな化学物質を発信・受信し、それらを防衛行動、配偶行動、採餌行動などの際に個体間のコミュニケーション手段として利用している。これらの情報機能をもつ物質群の解明は、昆虫類に進化した社会の複雑な統御機構を支える基盤を解き明かすという学術的な面から重要であるだけでなく、応用面からもきわめて意義あることと考

えられる。欧米諸国を中心に飼養化され、養蜂業を支えるセイヨウミツバチに関しては、女王物質や集合フェロモンが化学的に解明され (Slessor *et al.* 1988, Nature)、カナダのフェロテック社によりフェロモン製剤として商品化に至り、果樹の授粉や蜂群管理の効率化に利用されている。Slessor らの一連の研究の中で得られた重要な知見は、例えば英国の Butler *et al.* (1959, Nature) によって抽出・単離されたミツバチの女王物質が、実は大あご腺由来の少なくとも5種の化合物

からなる複数成分系のフェロモンであったことを明らかにし、その後もさらにその活性を相乗的に高める成分の存在を突き止めた点である(Keeling *et al.* 2003, PNAS)。これらの研究は、社会性ハチ類の行動制御の化学的メカニズムが大変複雑であることを示唆すると同時に、応用昆虫学の枠を越えた世界のトップジャーナルに論文が掲載され、大きな話題を呼んできた。

(2) 申請者は、その対象を、ミツバチだけではなく、「養蜂害虫」、「果樹害虫」そして時に人を死に至らしめる毒針をもつ「衛生害虫」として、大きな負のインパクトをもちながらも、その一方で膨大な害虫を捕食する「益虫」として重要な『スズメバチ類』や近年園芸作物の「授粉昆虫」として注目され、自然界でも植物との共生系の中で生物多様性を支える「キーストーン種」として機能している『マルハナバチ類』にまで広げた研究を展開している。その過程の中で、ニホンミツバチが天敵オオスズメバチの餌場マークフェロモンを傍受して発熱蜂球に封じ込めて熱殺する行動(Ono *et al.* 1995, Nature)、オオスズメバチの複数成分系の警報フェロモンの同定(Ono *et al.* 2003, Nature)などの成果を挙げてきた。

以上のように複雑な社会行動を制御する揮発性の情報化学物質群の存在が次々と指摘されながらも知見は限られており、その全貌の解明と、応用研究が大いに期待される状況にあった。

2. 研究の目的

(1) 真社会性昆虫を代表するグループであるマルハナバチ類、スズメバチ類、ミツバチ類は、様々な化学物質を発信・受信し、それらを防衛行動、配偶行動、採餌行動などの際に個体間のコミュニケーション手段として利用している。これらの情報機能をもつ物質群の解明は、昆虫類に進化した社会の複雑なコミュニケーションシステムを解き明かすという学術的な面から重要であるだけでなく、その機能利用という面からもきわめて意義あることと考えられる。

(2) 本研究では、主に社会行動を制御する揮発性の情報化学物質群にフォーカスを合わせその実態の解明及び得られた研究成果をハチ類の機能利用や刺害防止など応用面の活用に資することを目的として実施され

た。

3. 研究の方法

(1) 供試虫の確保

①マルハナバチ

クロマルハナバチ(*Bombus ignitus*)については、玉川大学農学部内の飼育施設で周年飼育されているコロニーから研究内容に応じたサンプルを得た。オオマルハナバチ(*B. hypocrita hypocrita*)、エゾオオマルハナバチ(*B. h. sapporoensis*)、ノサップマルハナバチ(*B. florilegus*)、コマルハナバチ(*B. ardens ardens*)、エゾコマルハナバチ(*B. a. sakagami*)、アカマルハナバチ(*B. hypnorum*)、トラマルハナバチ(*B. diversus diversus*)、エゾトラマルハナバチ(*B. d. tersatus*)などについては、2005~2008年の各々3~6月に東京都町田市、山梨県南都留郡、北海道勇払郡などにおいて野外で飛翔中の女王蜂を捕獲し、室内で造巣誘導を行なってコロニーを育て、それから得られたサンプルを使用した。さらに、セイヨウオオマルハナバチ(環境省から飼育許可取得:許可番号07013071)とクロマルハナバチについては、授粉用の商品として販売流通しているコロニーを適宜購入して研究に用いた。

飼育方法に関しては、基本的にOno *et al.* (1994, Appl. Ent. Zool.)に従った。ハチの入った巣箱を室温 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $70 \pm 20\%$ の条件下に設置し、完全に室内に閉じこめた閉鎖条件下で、ミツバチの花粉ダンゴと異性化糖溶液を必要に応じ与えて飼育した。

②スズメバチ

2005~2008年にかけて、東京都町田市、埼玉県春日部市、千葉県野田市、茨城県坂東市、長野県長野市、伊那市、新潟県新潟市などで発見されたオオスズメバチ(*Vespa mandarinia*)、ヒメスズメバチ(*V. ducalis*)、コガタスズメバチ(*V. analis*)、キイロスズメバチ(*V. simillima xanthoptera*)、モンズズメバチ(*V. crabro*)、チャイロスズメバチ(*V. dybowskii*)の巣を捕獲し、その巣から得られたサンプルを実験に用いた。また、生物検定などを行う場合には、必要に応じて巣を生け捕りにして観察用巣箱に移設し、継続的に飼育した。その際には、前述のマルハナバチのように閉鎖系ではなく、働き蜂が外役活動できるように巣門を屋外に開放した。

③ミツバチ

玉川大学構内の養蜂場にて飼育管理されている、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) とニホンミツバチ (*A. cerana japonica*) を使用した。

(2) 分析方法

① マルハナバチ雄蜂の下唇腺分泌成分

先行研究により、マルハナバチの雄蜂の下唇腺より、配偶者である新女王を誘引する作用をもつ揮発性成分の分泌が示唆されている。本研究では、揮発性の化合物だけを効率的に捕集し分析できる固相マイクロ抽出法 (Solid-Phase Micro-Extraction) を適用した。

実験室内で育てた各種マルハナバチの雄蜂を顕微鏡 (ハイスコープアドバンスド: KH-3000VD、ハイロックス) 下で解剖し、頭部にある下唇腺を外科的に摘出した。次にその分泌腺を、予め用意しておいた綺麗に洗浄されたガラスバイアル管に入れ、ガラス棒などを使用して構造を破壊し、アルミホイルで蓋をした。続いて SPME ファイバー (PDME100 μm 、スペルコ) をアルミホイルの蓋を貫通させるように差し込み、吸着面を露出させ、破壊された下唇腺から発散して管内のヘッドスペースに充満している揮発性化合物を捕集した。

捕集された成分の分析には、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS-QP5050A と GC/MS-QP2010A、島津製作所) を用いた。使用したキャピラリーカラムは、DB-5MS (J&W Scientific) で、長さ 60m、カラム内径 0.32mm である。インジェクション部位の温度を 250°C、インターフェース部は 260°C とし、昇温分析 (50~250°C) とした。昇温率は、毎分 5°C とし 250°C に達したところで 5 分間保持して分析を終了とした。以上の分析条件を基本としたが、サンプルの質・量などによって若干の変更を試みた。

② スズメバチの毒のう分泌成分

麻酔処理によって、採集されたスズメバチの巣から働き蜂を集め、超低温槽で冷凍し、前述のマルハナバチの下唇腺の処理方法と同様に、顕微鏡下で腹部から外科的に毒のうを取り出して、ガラスバイアル管内で破碎しヘッドスペースに揮発した成分を SPME ファイバーに吸着した。そして、同様の分析機器と条件で、吸着成分の分析を行った。

③ 蜂の体臭成分の分析

マルハナバチ、スズメバチ、ミツバチの体臭成分 (主に成虫) の分析に関しては、虫体

全体をサイズに合わせたガラスバイアル管に入れ、状況に応じてホットプレートで 70°C 程度の加熱をして体臭成分を揮発させ、同様に SPME ファイバーで捕集して分析した。巢仲間認識など難揮発性成分の分析の際にはサンプルの表面を直接有機溶媒で洗いとった洗浄液を分析に供した。

④ その他の分析

花香成分や試験的に行ったハチクマの羽の匂い成分の分析も、前述の SPME を用いて実施した。

4. 研究成果

研究開始当初には、存在は示唆されながらも実体の解明されていなかった社会性ハチ類の情報化学物質において、本研究により、特にヒトと大きな関わり合いのあるマルハナバチ、スズメバチ、ミツバチにおいて、様々な化学物質が係わっていることが具体的に証明されたことは大きな成果である。

(1) マルハナバチ

① 雄蜂の下唇腺からの揮発性化合物

クロマルハナバチは Dihydrofarnesol と Dyhydrofarnesal、オオマルハナバチは Ethyl decanoate, Methyl dodecanoate, Ethyl dodecanoate, エゾオオマルハナバチは Ethyl octanoate, Ethyl decanoate, Ethyl dodecanoate, コマルハナバチは Citronellal, Citronellol, Citronellyl acetate, トラマルハナバチは *E, E*-Farnesol, エゾトラマルハナバチは *E, E*-Farnesol と Farnesyl acetate を生産していることが、博士課程の久保良平氏との研究により明らかとなった。これらの内、同所的に生息している種間では、異なる成分を生産しており、それらの種特異的成分が、配偶者としての新女王を誘引する際に生殖隔離の機能をもっていることが強く示唆された。温室トマトなどの授粉用として輸入されている異所性のセイヨウオオマルハナバチでは、Dihydrofarnesol, Dyhydrofarnesal, Ethyl dodecanoate の生産が確認されており、前 2 成分が日本産のクロマルハナバチ、最後の成分はオオマルハナバチとエゾオオマルハナバチと同じ成分であり、異種間交尾が起きることが懸念された。事実、室内での交配実験で異種間交尾が確認され、さらには温室内から逃げ出したセイヨウオオマルハナバチの雄蜂と日本産のマルハナバチの交

尾が確認されている。セイヨウオオマルハナバチは「特定外来生物」に指定され、その使用には法的規制がかけられているが、野外への逸出は、わが国の生物多様性と生態系の保全という観点から防止しなければならないことがあらためて浮き彫りとなった。

本研究により、マルハナバチから検出された揮発性化合物は、花香成分とも構造的に近いものが多く植物と昆虫の共生系に係わるあらたな仕組みの解明につながるヒントが得られた。

②新女王の体臭成分

セイヨウオオマルハナバチ新女王の体臭成分に働き蜂にはないカースト特異的な成分が検出された。現時点で同定には至っていないものの、逃げ出した雄蜂を捕獲する誘引剤として活用することでリスク軽減策に応用できるのではないかと考えられた。

本研究で与えられた成果については、国立環境研究所の五箇公一博士らと共同でセイヨウオオマルハナバチを捕獲する有効なトラップの開発というテーマでも研究が展開した。さらに供試虫としてのマルハナバチ類の野外での採集と調査、その後の室内における飼育研究により、行動生態学的に興味あるデータも得られ、高橋純一博士らとの共同研究に発展した。

(2) スズメバチ

①毒のうに含まれる揮発性化合物

著者らは、オオスズメバチの毒のうで生産される毒液中に含まれる3種類の揮発性化合物のブレンドが警報フェロモンとして機能していることを明らかにした。本研究では、近年都市部で大発生し、その刺傷害が社会問題化しているキイロスズメバチとコガタスズメバチの毒のう内で生産される揮発性化合物の同定を行った。その結果、キイロスズメバチは2-Methyl-3-buten-2-ol, 2-Heptanone, Limonene, Acetophenone, Isoamyl isovalerate 他多数、コガタスズメバチは2-Pentanol, 1-Methylbutyl acetate, 2-Nonanone 他多数のようにアルコール、エステル、ケトンに属する多様な揮発性化合物が検出された。現在、精密な生物検定を行っているが、いずれの種もオオスズメバチと同様に複数の成分がブレンドになった時に、警報フェロモンとして高い活性を示すことが示された。今後、全貌が解明されれば、ヒトへ

の刺傷害の回避策の提言につながることで期待される。

②被食者-捕食者相互作用

オオスズメバチが集団攻撃をする際に餌場をマークするフェロモンを分泌するが、それを被食者のキイロスズメバチが傍受すると非血縁コロニー間であっても協力という現象を確認した。

ヒメスズメバチが被食者キアシナガバチに対して忌避作用を示す物質を分泌していることも実験的に示された。

育雛の時期にスズメバチの巣を襲いその幼虫や蛹を雛の餌にするハチクマから発散されていると考えられるスズメバチの忌避物質の解析に関しては、予備的な生物検定を行うにとどまったが、コガタスズメバチの行動に変化をもたらす可能性が示唆され、今後のさらなる探求に期待が寄せられた。

ニホンミツバチが捕食者のスズメバチを蜂球に封じ込めて熱殺する現象は知られていた。しかしながら、48℃にも達する蜂球から様々な揮発性成分が発散していることが明らかとなったが、その機能解明についてはさらなる解析が必要となった。

③巣仲間認識機構

社会寄生種チャイロスズメバチと宿主であるキイロスズメバチとモンズメバチの卵の表面にある化学物質の詳細な分析を英国の Martin 博士らのグループと詳細に行いパラサイトが宿主に見破られないようにする化学的な戦略の可能性が示された。

(3) ミツバチ

ミツバチの行動がフェロモンだけではなく、花香の干渉を受けているとの仮説を立てその検証を行った。花香成分の中には、ミツバチのフェロモン成分と構造が類似しているものも多く情報源としての機能にも興味をもたれたが、その香りが蜜や花粉といった報酬と結びつくことが定花性の形成につながるのではないかと考えられた。その検証実験として、ナスの花香成分の Geranylacetone を砂糖水に混ぜてセイヨウミツバチに与え、その成分と報酬を連合学習させるとナスへの訪花が促進されることが群馬県農業技術センターの宮本雅章氏らとの研究によって確かめられた。昨今、農業における授粉用ミツバチの不足が社会問題化しているが、情報化学物質の

利用によりハチの行動を統御することで、数少ない貴重なミツバチコロニーを効率的に働かせる新しい技術の開発にも大きく寄与するものとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Kubo, R. and M. Ono, Comparative analysis of volatile components from labial glands of male Japanese bumblebees (*Bombus* spp.), Entomological Science 査読有, 2010, (in press)
- ② Takahashi, J., S. J. Martin, M. Ono and I. Shimizu, Male production by non-natal workers in the bumblebee, *Bombus deuteronymus* (Hymenoptera: Apidae), Journal of Ethology, 査読有, 2009, 28巻, 61-66
- ③ 宮本雅章、久保良平、小野正人、佐々木正己、剣持伊佐男、ミツバチを利用した半促成ナスの着果促進技術体系の開発III. ナス花香成分と餌の報酬による条件付けが訪花に及ぼす影響、日本応用動物昆虫学会誌、査読有、53巻、2009、43 - 50
- ④ Takahashi, J., M. Itoh, I. Shimizu and M. Ono, Male parentage and queen mating frequency in the bumblebee *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Bombinae), Ecological Research, 査読有, 23巻, 2008, 937 - 942
- ⑤ Martin, J. S., J. Takahashi, M. Ono and F. P. Drijfhout, Is the social parasite *Vespa dybowskii* using chemical transparency to get her eggs accepted?, Journal of Insect Physiology, 査読有, 23巻, 2008,
- ⑥ Takahashi, J., T. Ayabe, M. Mitsuhashi, I. Shimizu and M. Ono, Diploid male production in a rare and locally distributed bumblebee, *Bombus florilegus* (Hymenoptera, Apidae), Insectes Sociux, 査読有, 55巻, 2008, 43-50
- ⑦ 小野正人、都市の環境に適応したスズメバチ、ペストコントロール、査読無、135号、

2006、5-13

[学会発表] (計18件)

- ① 久保良平、小野正人、マルハナバチ女王の造巣場所の選好性を利用したクマガイソウの受粉戦略、第54回日本応用動物昆虫学会大会、2010年3月28日、千葉大学
- ② 村本翔平、小野正人、キイロスズメバチのスーパーコロニーとその適応的意義、第54回日本応用動物昆虫学会大会、2010年3月28日、千葉大学
- ③ 宮本雅章、金井幸男、久保良平、佐々木正己、小野正人、ミツバチを利用した半促成ナスの着果技術の開発(第4報) 花香成分の学習と花の認識、第54回日本応用動物昆虫学会大会、2010年3月26日、千葉大学
- ④ 小島直樹、干場英弘、小野正人、セイヨウオオマルハナバチがもたらす新たな生態リスクー社会寄生ワーカーによるオス生産の可能性ー、第53回日本応用動物昆虫学会大会、2009年3月29日、北海道大学
- ⑤ 渡邊正子、小野正人、ヒメスズメバチの体臭成分に含まれるアシナガバチ類の忌避物質に関する研究(予報)、第53回日本応用動物昆虫学会大会、2009年3月29日、北海道大学
- ⑥ 久保良平、小野正人、マルハナバチ女王によるクマガイソウの授粉様式に関する研究、第53回日本応用動物昆虫学会大会、2009年3月28日、北海道大学
- ⑦ 古川洋平、小野正人、キイロスズメバチの社会行動を制御する情報化学物質、第52回日本応用動物昆虫学会大会、2008年3月28日、宇都宮大学
- ⑧ 青島亮太、干場英弘、佐々木哲彦、小野正人、クロマルハナバチとセイヨウオオマルハナバチの単数体と二倍体のDNA量測定、第52回日本応用動物昆虫学会大会、2008年3月28日、宇都宮大学
- ⑨ 佐藤智之、光畑雅宏、小野正人、セイヨウオオマルハナバチの誘引トラップ開発の試み、第52回日本応用動物昆虫学会大会、2008年3月28日、宇都宮大学
- ⑩ Ono, M., Chemical ecology of bumblebees (*Bombus* spp.), and ecological implications of introduced *Bombus terrestris* in Japan, The International

Meeting for Ecological Risk Assessment of Introduced Bumblebees, 2008年2月27日, NIES, Tsukuba

- ⑪久保良平、小野正人、ラン科植物の花香とマルハナバチの情報化学物質間に認められる類似性、第52回日本応用動物昆虫学会大会、2008年3月27日、宇都宮大学
- ⑫ Kubo, R. and M. Ono, Comparative chemical ecology of volatile components emitted from labial glands of male bumblebees (*Bombus* spp.), 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007年9月12日, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba
- ⑬田中勇史、小野正人、ニホンミツバチの蜂球による対オオスズメバチ防衛戦略ー捕食者を捕らえた発熱蜂球から立ち昇る揮発性物質とその機能解析、第51回日本応用動物昆虫学会大会、2007年3月29日、広島大学
- ⑭渡邊正子、小野正人、被食者アシナガバチは何をもってその専食者ヒメスズメバチを識別しているのか?、第51回日本応用動物昆虫学会大会、2007年3月29日、広島大学
- ⑮久保良平、小野正人、マルハナバチ雄蜂が頭部下唇腺で生産する揮発性成分比較分析、第51回日本応用動物昆虫学会大会、2007年3月28日、広島大学
- ⑯Ono, M., Defensive strategy of yellow hornet against predation by giant hornet, XV Congress IUSI Proceedings, 2006年8月3日, Washington DC
- ⑰小野正人、スーパーコロニー化してオオスズメバチの捕食圧に対抗するキイロスズメバチ、第50回日本応用動物昆虫学会大会、2006年3月29日、筑波大学
- ⑱久保良平、小野正人、マルハナバチと植物の情報化学物質を媒体とした相互作用、第50回日本応用動物昆虫学会大会、2006年3月29日、筑波大学

[図書] (計2件)

- ①小野正人、(株) エヌ・ティー・エス、昆虫ミメテックスー昆虫の設計に学ぶ、2008、934-940
- ②小野正人、裳華房、バイオディバシティー・シリーズ6 / 節足動物の多様性と系統、2008、94-98

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 所定の植物の花器の花香成分を利用してハナバチをその花器に誘導することを
含む植物の受粉を促進する方法

発明者: 佐々木正己、小野正人、宮本雅章

権利者: 学校法人玉川学園、群馬県

種類: 特許

番号: 特願2008-26254

出願年月日: 平成20年2月6日

国内外の別: 国内

[その他]

<http://www.kenkyu.tamagawa.ac.jp/Profiles/0002/0001969/pblcl.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 正人 (ONO MASATO)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号: 70204253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし