

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19254

研究課題名(和文)青色殺虫光の作用部位の解明

研究課題名(英文)Site of action of blue light in lethal effect on insects

研究代表者

堀 雅敏(Hori, Masatoshi)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70372307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：青色光(400-500 nmの可視光)は昆虫に対して致死効果があるが、青色光が虫体のどの部位から入り、効果を発揮するのかわかっていなかった。本研究では、キイロショウジョウバエをモデルに青色光の入力(作用)部位について調査した。その結果、成虫においては、青色光の殺虫効果は視覚系やクリプトクロムなどの光受容体を介して発揮されるのではなく、表皮を透過した青色光が細胞に傷害を与えることにより生じることが明らかになった。また、卵に対しては、卵殻を透過した青色光が細胞に傷害を与えることで殺卵効果を発揮すると推測された。蛹においては、蛹化後すぐに作用部位は成虫と同じになることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

殺虫効果を生じるための青色光の入力部位は、これまでまったく分かっていなかったが、本研究により体表全体からの青色光の入力が殺虫には重要であることが明らかになった。研究代表者による青色光殺虫の発見後、海外でもメカニズムの解明に向けた研究がされているが、本成果により表皮の光透過性の重要性が世界で初めて明らかになり、学術的意義は非常に大きい。また、本成果は昆虫、さらには動物の光耐性に関して新たな学術的知見を与えるとともに、効果的な青色光殺虫技術の確立という実用的な面においても大きな知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that blue light has lethal effects on various insects. The effective wavelength of blue light is species-specific and is not always associated with the amount of photon energy delivered. However, the mechanism responsible for the lethal effects is not known. Therefore, contributions of photoreceptors and photopigments to lethal effects of blue light were investigated using *Drosophila melanogaster*. As the results, it was revealed that photoreceptors and photopigments such as compound eyes and cryptochrome do not contribute to the toxicity of blue light in the adults. On the other hand, the blue-light transmittance of the integument was very important for toxicity. That is, it was thought that blue light transmitted through the integument injures the insect tissues. Also in the eggs, it was thought that blue light transmitted through eggshell injures egg cells. In the pupae, it was suggested that active sites of blue light are same as those in the adults.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：昆虫 青色光 殺虫 青色LED ショウジョウバエ 作用部位 害虫防除 光防除

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 安全性や環境への負荷などの問題から、殺虫剤に代わる防除技術の開発が求められている。その一つに物理的防除があり、特に光による防除はLEDの普及もあり、注目されている。

(2) 光による害虫防除は古くから行われているが、いずれも害虫の行動制御によるものであった。光のエネルギーによる直接的な殺虫は、UVCやUVBでは研究され、効果が認められていたが、UVAより波長の長い可視光に、昆虫を含む複雑な動物に対する殺虫効果があるとは、考えられていなかった。研究代表者らは従来の定説を覆し、青色光(400~500 nmの可視光)の殺虫効果を世界で初めて発見した。この発見は世界で大きな注目を集めるとともに、ケミカルフリーでまったく新しい殺虫技術の開発への期待から、多くの企業や自治体の実用化に大きな関心を示した。

(3) 青色光の殺虫効果は昆虫種により効果的波長や有効光強度が異なることも明らかになってきたことから、特定の波長の光を吸収する種特異的な光感受性物質や発色団が虫体あるいは虫体内の組織に存在し、それらが殺虫効果の作用部位となっていると考えられた。そこで、作用部位が明らかになれば、未解明である殺虫メカニズムの解明にも大きく近づくと考えた。

(4) 青色光殺虫の実用化への期待は大きいですが、害虫種により効果的波長や有効光強度が異なるため、実用化には各防除対象種についてこれらを調査する必要がある。しかし、調査には、対象種を用いた各波長光の殺虫試験と供試虫の累代飼育が必要となるため、多くの人と時間、実験スペースが必要となる。効果的波長の種特異性や有効光強度の種による違いの原因が解明されれば、対象となる害虫の効果的波長や有効光強度を分析的手法により推定できると考えた。すなわち、少サンプル、短期間でこれらを推定できるようになり、様々な害虫種において青色光殺虫の実用化を飛躍的に早めることが可能になると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 効果的波長の種特異性や有効光強度の種による違いの原因を作用部位から解明する。すなわち、活性酸素を発生させ、細胞や組織に傷害を与える青色光の入力(作用)部位を特定する。

(2) 作用部位を明らかにすることで、殺虫メカニズムの解明につなげる。

(3) 作用部位の光感受性物質や発色団の吸収スペクトルを解析して、対象害虫の効果的波長や有効光強度を短期間・少サンプルで推定する技術を開発するための知見を得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試虫

供試虫にはキイロショウジョウバエを用いた。卵、幼虫、蛹の試験では、野生型(住化テクノサービス)を用い、成虫の試験では、これに加えて、後述する複数の系統を用いた。

### (2) 光照射方法

光の照射は、光源として庫内天井部に150×150 mmのLEDパネル(ISL-150×150シリーズ)を設置したバイオマルチンキュベーター(25±1℃(細胞培養では27±1℃)、LH-30CCFL-8CT)内ですべて行った。光強度は高速分光ユニット(HSU-100S、受光角:23°)を用いて測定した。

### (3) 成虫における青色殺虫光の作用部位の解明

#### ① 突然変異系統間での殺虫効果の比較

視覚系突然変異系統の*white*(白色眼)、*sepia*(セピア色眼)、*Bar*(棒状眼)、*eye missing*(複眼欠損)、*norpA*(活動電位消失)および体色系突然変異系統の*ebony*(黒体色)、視覚系以外の光受容突然変異系統の*Cry<sup>b</sup>*(クリプトクロム欠損)の突然変異7系統と、比較としてCanton-S、住化テクノサービス系統(以下、住化)の野生型2系統について、成虫に対する各種青色波長光(405、420、435、450、470、490 nm)の殺虫効果を調査した。羽化後、約22時間以内の硬化後の成虫を雌雄5頭ずつ腰高シャーレ(直径60 mm、高さ90 mm)に入れ、各種波長の青色光を $10 \times 10^{18}$  photons $\cdot$ m<sup>-2</sup> $\cdot$ s<sup>-1</sup>の光強度で3日間、照射した。全暗区では、照射区と同様に成虫を腰高シャーレに入れ、全暗条件にしたバイオマルチンキュベーター内に3日間置いた。照射後各系統の死亡率を調査して、比較した。反復は各系統1シャーレを1反復として、10回行った。

#### ② 表皮の光透過性と殺虫効果の関係解明

上記①で供試した系統のうち*eye missing*を除く8系統の雌成虫について、表皮の透過スペクトルを調査した。羽化後24時間以内の硬化後の雌成虫の腹部から消化管や脂肪体などの内部組織を取り除き、蒸留水で洗浄した後、スライドガラス上に載せた。蒸留水をごく少量加えた後、カバーガラスを被せて、正立顕微鏡に設置し、腹部第4-5節の中央約4割部分の表皮の透過光による顕微鏡像をハイパースペクトルカメラ(エバ・ジャパン)で撮影し、400~500 nmにおける

透過スペクトルを解析した。反復は各系統 1 個体を 1 反復として、10 回行った。各波長について透過率と死亡率の相関を調査し、表皮の光透過性と殺虫効果の関係を解析した。

#### (4) 卵における青色殺虫光の作用部位の解明

① 効果的波長・有効光強度のショウジョウバエ胚由来培養細胞と卵との比較による解析  
ショウジョウバエ胚由来培養細胞（シュナイダー（S2）細胞）と卵との間で、効果的波長を比較した。卵に関してはこれまでの研究で波長が短いほど殺虫効果は高くなる傾向があることが明らかになっているので、S2 細胞に対する青色光の効果も調査して、両者で効果的波長を比較した。S2 細胞を 24 時間暗条件（ $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ）で培養後、各波長の光を  $5 \times 10^{18} \text{ photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  で 3 日間照射し、細胞増殖率を調査した。細胞増殖抑制効果と殺卵効果の関係を波長間で比較した。

#### ② 卵の透過スペクトルと殺卵効果との関係解明

卵を純水で洗い、水分を除去した後、2 枚のスライドガラスに挟み込んで固定し、卵の透過スペクトルを紫外可視分光光度計（UV-2600）で測定した。スライドガラスには 10 卵を挟み込んだ。

#### (5) 幼虫における青色殺虫光の作用部位の解明

幼虫の吸収スペクトルと殺虫効果との関係を調査した。終齢幼虫を純水で洗い、水分を除去した後、2 枚のスライドガラスに挟み込んで固定し、卵の透過スペクトルを紫外可視分光光度計（UV-2600）で測定した。全身、頭部、消化管、表皮（頭部、尾部除去）のそれぞれについて調査した。全身と内臓のサンプルでは、幼虫を 24 時間絶食させ、消化管内の消化物をすべて排泄させてから供試した。スライドガラスには、全身の場合は 1 頭、頭部の場合は 3 頭分、消化管の場合は 1 頭分、表皮の場合は 1 頭分を挟み込んで測定した。

#### (6) 蛹における青色殺虫光の作用部位の解明

蛹は幼虫から成虫に変化していく過程であるので、初期は幼虫と、後期は成虫と作用部位が同じである可能性が高い。そこで、蛹の初期と後期における効果的波長および有効光強度の変化を調査し、すでに明らかになっている幼虫および成虫と比較した。キイロショウジョウバエの蛹は P1～P15 の 15 段階の成育ステージに分けられるので、P2-P4（前蛹）、P5（顕頭蛹の最初のステージ）、P7-P9（複眼が着色途中の段階）、P10-P11（複眼の着色が完了し、体表に剛毛が生えている途中の段階）の 4 段階について各波長で照射試験を行い、殺虫率を比較した。蛹 10 頭を湿ろ紙を敷いたガラスシャーレ（直径 60 mm、高さ 15 mm）に入れ、パラフィルムで密閉して  $10 \times 10^{18} \text{ photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  で 24 時間照射した。照射終了後は LED パネルを設置していない全暗条件の庫内に移動した。照射開始から 9 日目まで全暗条件に置き、羽化せずに死亡した個体数を計測した。羽化が始まっているが、蛹殻から完全に脱出できなかった個体は死亡個体とした。1 シャーレを 1 反復として、10 反復行った。高い殺虫効果が得られた P2-P4 と P5 では、 $8 \times 10^{18}$  および  $9 \times 10^{18} \text{ photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  での照射試験も行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 成虫における青色殺虫光の作用部位の解明

##### ① 突然変異系統間での殺虫効果の比較

405、420、435、450、470、490 nm の 6 波長の青色光の殺虫効果を 9 系統間で比較したところ、*ebony* が他の系統と比べて、明らかに高い青色光耐性を示した（図 1）。これに次いで *sepia*、*Cry<sup>b</sup>* の耐性が高かったが、*ebony* との差は大きかった。一方、*white*、*Bar*、*eye missing* は青色光耐性が低く、*norpa* の耐性もこれに次いで低かった。また、系統間で効果的な波長にやや違いがみられた。例えば、野生型でも Canton-S と住化では、最も効果的な波長が、前者は 420 nm、後者は 470 nm と異なっていた。*Bar* は棒状眼、*eye missing* は複眼欠損、*White* は白色眼といった複眼の異常系統であり、複眼からの青色光の入力は、他の系統に比べて少ないはずであるが、いずれも青色光耐性は他の系統よりも明らかに低かった。このことから、成虫において、複眼は青色光が殺虫効果を発揮するための作用部位として重要ではないと考えられた。また、*Cry<sup>b</sup>* の耐性も比較的高かったことから、クリプトクロムも青色光の殺虫効果には関与していないと考えられた。一方、黒体色の *ebony* が非常に高い青色光耐性を示したため、体表全体からの青色光の入力が殺虫には重要で、体表における青色光の透過率が青色光耐性に影響を与えると考えられた。

##### ② 表皮の光透過性と殺虫効果の関係解明

上記①の結果を受け、各系統の腹部表皮の透過スペクトルを調査したところ、*ebony* の青色光透過率は他の系統と比較して明らかに低く（図 2）、青色光耐性と透過率には大きな関係があると推測された。そこで、各波長について、系統の透過率と死亡率の関係を解析したところ、透過率と殺虫効果は正の相関をとることが明らかとなった（図 2）。殺虫効果が高い 420、435、470 nm は、特に高い相関関係を示した。①、②の結果から、青色光は視覚からの入力や視覚への作用、あるいはクリプトクロムを介して殺虫効果を発揮するのではなく、体表からの入力と、その後の細胞傷害により、効果を発揮することが示された。本結果は、殺虫効果を発揮するための青色光の入力部位についての初めての知見であり、青色光の殺虫メカニズムの解明に大きく貢献すると思われる。また、昆虫の光耐性においても大きな知見を与える成果と考える。

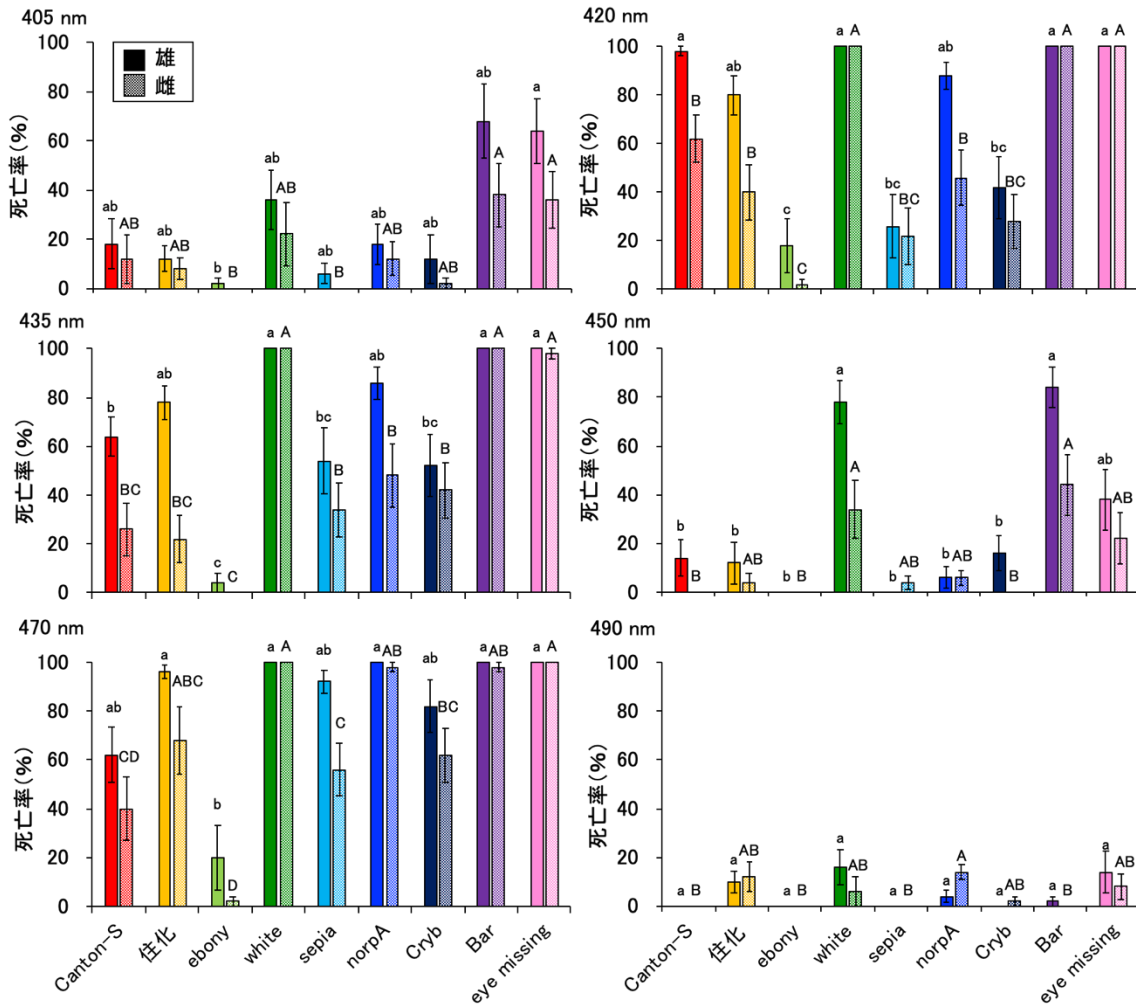


図1 成虫の各波長の青色光に対する耐性の系統間比較  
雌雄それぞれで、同じ英文字を付してある死亡率間に有意差なし ( $p > 0.05$ , Steel Dwass 検定)

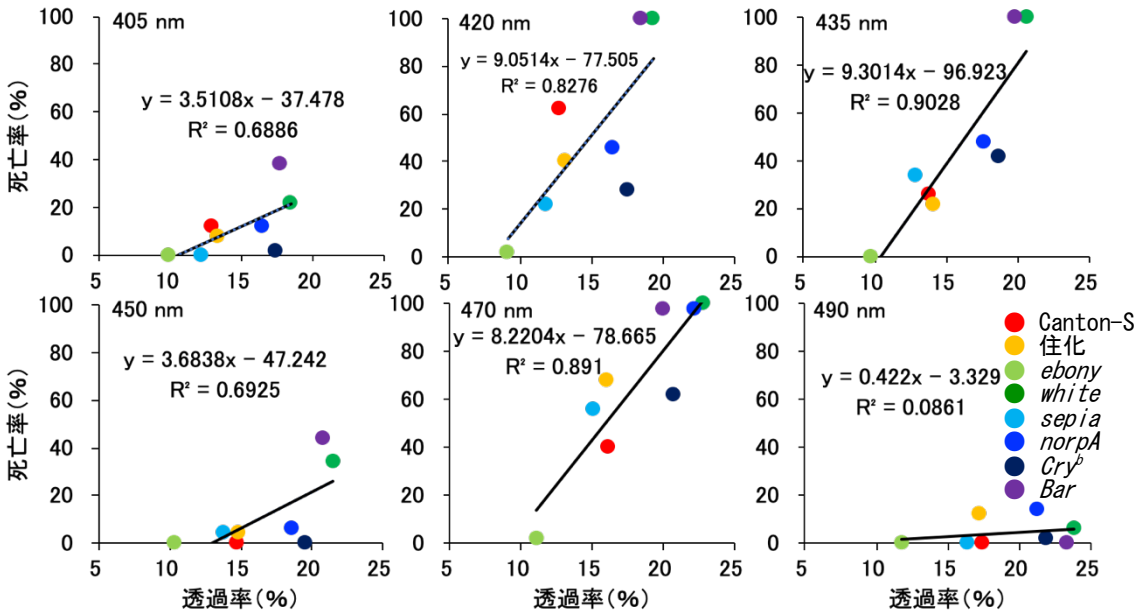


図2 各波長における腹部表皮透過率と殺虫効果の関係

(2) 卵における青色殺虫光の作用部位の解明

① 効果的波長・有効光強度のショウジョウバエ胚由来培養細胞と卵との比較による解析  
卵に対する殺虫効果は以前の研究で明らかになっており、435 nmが前後の波長に比べて効果がやや劣るものの、基本的には波長が短いほど殺虫効果が高い(図3左)。S2細胞に対する増殖抑制効果も、波長が短いほど高い傾向が示された(図3右)。このことから、卵においては、卵殻を透過した青色光が細胞に傷害を与えることで、殺卵効果を発揮すると考えられる。

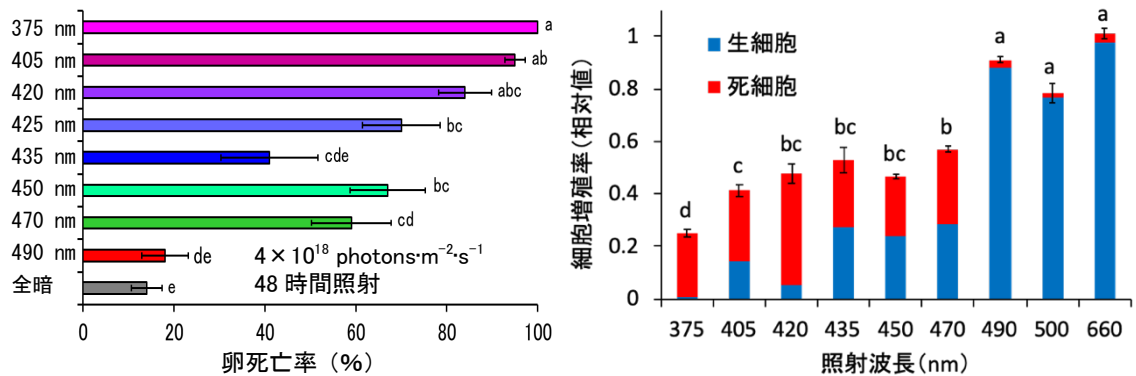


図3 各波長の青色光の卵に対する殺虫効果（左）と培養細胞増殖抑制効果（右）の比較  
 同じ英小文字を付してある死亡率間に有意差なし ( $p > 0.05$ , Steel Dwass 検定)

② 卵の吸収スペクトルと殺卵効果との関係解明

卵の透過スペクトルに特異的な吸収波長はみられなかった。卵に対しては、特異的な波長吸収は殺虫に重要ではなく、波長の卵殻透過率とエネルギーが重要と考えられる。

(3) 幼虫における青色殺虫光の作用部位の解明

全身、頭部、消化管、表皮の透過スペクトルを測定したが、全身と頭部でのみ特異的な吸収波長がみられた (図4)。全身と頭部はいずれも 420 nm に小さな吸収ピークがみられた。しかし、以前の研究で、幼虫に対しては、効果の高い特異的な青色光波長はないことがわかっている。したがって、この吸収は殺虫とはあまり関係ないと考えられる。

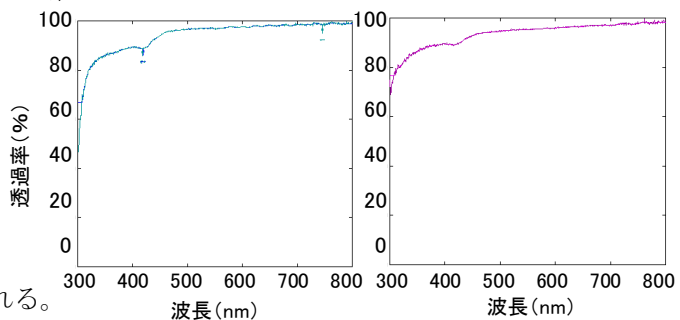


図4 幼虫の全身（左）と頭部の透過スペクトル

(4) 蛹における青色殺虫光の作用部位の解明

蛹の青色光耐性は P2-5 は同程度に低かったが (図5左)、P7以降は発育にともない、高くなった。効果的波長も、発育により変化した。幼虫では特に効果の高い波長がないことを明らかにしているが (図6左)、蛹では、P2-4 という蛹初期の段階で、すでに効果的波長がみられた (図5右)。470 nm が最も効果的で、420、435 nm がこれに続いた。効果的波長の特徴は成虫 (図6右) と類似していることから、蛹における青色光の作用部位は蛹化するとすぐに成虫と同じになると考えられる。

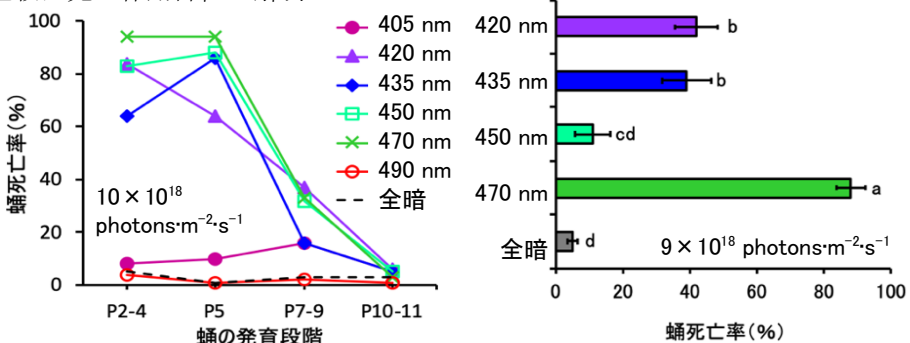


図5 蛹の発育にともなう殺虫効果の変化（左）と P2-4 での各波長の殺虫効果（右）  
 同じ英小文字を付してある死亡率間に有意差なし ( $p > 0.05$ , Steel Dwass 検定)

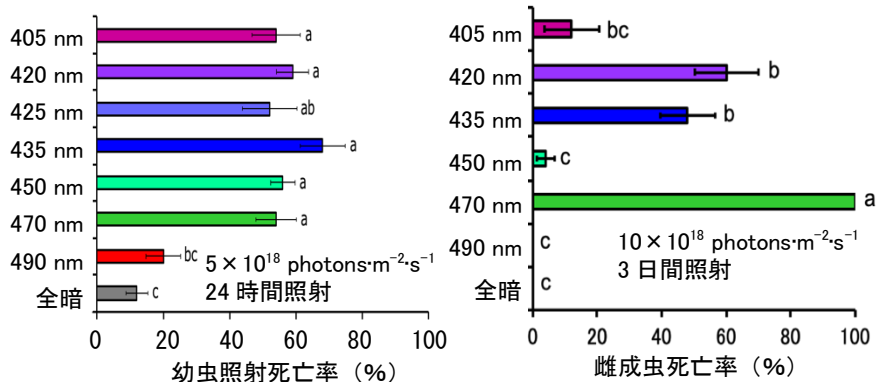


図6 幼虫（左）および成虫（右）に対する青色光の殺虫効果  
 同じ英小文字を付してある死亡率間に有意差なし ( $p > 0.05$ , Steel Dwass 検定)

本課題で、体の内部組織における特定波長の吸収部位までは特定できなかったが、少なくとも視覚系やクリプトクロムなどの光受容体が殺虫に関与しているのではなく、体表から透過した青色光が細胞に傷害を与えることで殺虫効果を発揮することを世界で初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 堀 雅敏	4. 巻 94
2. 論文標題 青色光の殺虫効果による害虫防除	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 農業および園芸	6. 最初と最後の頁 607 ~ 616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 堀 雅敏	4. 巻 43
2. 論文標題 青色光の殺虫効果と防除への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本農業学会誌	6. 最初と最後の頁 109 ~ 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.W18-32	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林敦樹・堀 雅敏
2. 発表標題 青色光はショウジョウバエの体表を透過して殺虫効果を発揮する！
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----