

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18770052
 研究課題名（和文） チャバネゴキブリにおける性フェロモンの接触化学受容分子機構の解明
 研究課題名（英文） Behavioral and electrophysiological studies on contact sex-pheromone reception in the German cockroach

研究代表者
 勝又綾子（KATSUMATA AYAKO）
 京都大学・農学研究科・COE 研究員
 研究者番号：30423007

研究成果の概要：

チャバネゴキブリは雌雄それぞれが接触化学性フェロモンを分泌し、相手のフェロモンを化学受容・識別して配偶行動を示す。しかし化学受容を担う感覚器は特定されておらず、フェロモンがどのように情報処理されるかは不明であった。本研究では雌雄それぞれにおいて、接触化学性フェロモンの受容に関与する感覚器を、オスでは触角上、メスでは口器上で特定した。またフェロモンに対する感覚器の電気生理学的な応答を調べ、フェロモンの情報処理メカニズムを明らかにした。オスの化学感覚器においては、分子生物学的手法を用いて化学受容に関与するオス特異的な機能蛋白質を探索したが、これは発見には至らなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2600000	0	2600000
2007 年度	500000	0	500000
2008 年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	3700000	180000	3880000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：神経科学・昆虫・生理活性・蛋白質・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

チャバネゴキブリは世界的に最も重要な家屋害虫の一種である。本種は成虫と若虫が混在して集団をつくり、個体間や種間のコミュニケーションにおいて多様な情報化学物質を利用している。成熟した雌雄は群れの中で適切な配偶者を獲得するために、種特異的な性フェロモンを分泌し、またそれを受容するための特殊な化学物質受容感覚器（化学感覚器）を備えている。

一般に、昆虫の化学感覚器は触角や口器、足などに存在している。低分子アルコールやケトンなどの揮発性性フェロモンの受容機構については、カイコガ、タバコスズメガなどのガ類、ワモンゴキブリなどで研究が盛んに行われ、感覚器に含まれるキャリアタンパク質、感覚神経細胞上のレセプタータンパク質、中枢（脳）部位への感覚神経の走行、神経の応答特性などが、EAG(electro-antennogram)、ESG(electrosensillogram)、

EPG(electropalpogram)、SCR(single cell recording)、カルシウムイメージング法、GFP法などの手法を用いて明かされている。しかしながら一方、ハエ類、チャバネゴキブリ、カミキリムシ類に見られる長鎖炭化水素類や長鎖アルカノン類など、不揮発性フェロモンの受容機構の研究はほとんどされておらず、またその化学感覚器の同定すら行われていない。この研究の遅延は、不揮発性フェロモンが、多くの場合、昆虫の体表面に存在する多種類のクチクラワックス群に混入しており、その単離と同定が揮発性フェロモンに比べて困難であること、また、不揮発性フェロモンが別名で「接触化学感覚性フェロモン(コンタクトフェロモン)」と呼ばれる通り、化学感覚器が対象に直接「接触」することでしか受容されず、実験者が化学感覚の電気生理学的な検証の場面で、従来揮発性化合物に対して用いてきた「匂いづけした空気の吹きつけ実験」を適用できないことが原因であった。

2. 研究の目的

チャバネゴキブリの性フェロモンにおいては、オスの求愛行動を解発するメス由来の化合物として、2種類の長鎖アルカノン類(3, 11-dimethylnonacosan-2-one、29-hydroxy-3, 11-dimethylnonacosan-2-one)が明らかにされている(図)。これらは不揮発性でコンタクトフェロモンに分類され、いずれもオスの触角で受容されることが行動実験で示されている(文献 1)。また雌雄の触角上の感覚器の形態学的な比較において、メスに比べオスがより多く化学感覚器を有することから、化学感覚器の数がメスの性フェロモンの受容に重要であると推測されている(文献 2)。しかしながら通常、化学感覚器は、フェロモンを受容するタイプと、食物などに由来する一般的な化合物を受け取るタイプにそれぞれ機能的に特化しており、形態的な比較で性質の違いを確かめることはできない。チャバネゴキブリの触角上の化学感覚器は形態学的に少なくとも3種類に分けられ、雌雄差はその数とされているが、実際のところ、どの感覚器が性フェロモンを受容するのか、勿論その受容機構も不明のままである。

申請者は2002-5年にかけて、社会性昆虫のクロオオアリにおけるコンタクトフェロモンの一種、すなわち18種類の長鎖炭化水素化合物群で構成される巣仲間認識フェロモンの化学受容の研究を行った。巣仲間認識フェロモンはアリがコロニーと呼ばれる一まとまりの社会的集団を維持するために必要不可欠なフェロモンであり、体表クチクラワックス中に存在する。アリが他個体の体表を触角で触診し同巣個体へは攻撃せず異巣個体へ

攻撃行動を示すことは古くから知られていたが、攻撃行動の鍵となる化合物や接触化学受容機構は長らく謎であった。申請者はアリの体表からコンタクトフェロモン抽出して同定し、またアリの触角上にそれらを受容する化学感覚器を電気生理学的な手法(Tip-recording法)を駆使して発見した。驚くべきことにこの感覚器は従来知られてきた揮発性フェロモンを受容する感覚器とは異なり、コンタクトフェロモンを専門に受容する特殊なものであった。申請者は更に、特殊な化学感覚器内のリンパ液に大量に含まれ、外界から感覚器内の神経細胞膜上へフェロモン化合物を輸送するキャリアタンパク質の存在を分子生物学的な手法で明らかにし、その機能を電気生理学的な手法と化学分析の手法を組み合わせることで証明した(文献 3)。この報告は世界で初めて行われたもので、同時に、昆虫におけるコンタクトフェロモン受容機構の解明に最初に着手した例として、他種の昆虫に同様の仕組みが備わっているかどうかの検証が待たれている。

チャバネゴキブリは性フェロモンとして主に2種のコンタクトフェロモンを用いている。オスの求愛行動は2種のうち一種の化合物でも解発されるため、複雑な組成比を持つアリのコンタクトフェロモンに関する研究に比べて実験系の単純化と発展が期待される。申請者は本種のコンタクトフェロモンの受容機構について「化学感覚器の同定」「感覚神経の応答性の調査」「化学感覚器に含まれるキャリアタンパク質の調査」を形態・組織観察やTip-recording法を用いた電気生理学実験、分子生物学的な実験などを通して行い、その研究成果をアリにおける結果と比較したいと考えている。更にゴキブリ類は古くからその生態、生理、行動、神経組織学的な特性が研究され、非常に広いバックグラウンドを持つので、それらを参照しつつコンタクトフェロモン受容機構の基本的なモデルを、本種をもとに組み立てたいと考えた。

文献

- (1) Female sexpheromone of the German cockroach, *Blattella germanica*. Nishida, R., and Fukami, H. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. 122: 1-24. 1983.
- (2) Sensilla of antennae and the labial and maxillary palps of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Their Classification and distribution. Ramaswamy, S. B., and Gupta, A. P. J. Morphol. 168: 269-279. 1981.
- (3) Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nishimura, T., and Yamaoka, R. Science. 309: 311-314. 2005.

3. 研究の方法

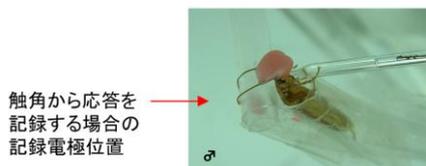
チャバネゴキブリのコンタクトフェロモン受容機構解明について、「化学感覚器の同定」「感覚神経の応答性の調査」「化学感覚器に含まれるキャリアタンパク質の調査」を以下の方法で行った。

- (1)電気生理学的なアプローチ
- (2)分子生物学的なアプローチ

(1)電気生理学的なアプローチ

①性フェロモン受容化学感覚器の特定： 電気生理実験と電子顕微鏡を用いた形態観察を併用し、オス触角上で、メス体表ワックスに含まれる性フェロモンを受容する化学感覚器を特定する。電気生理実験には Tip-recording 法を駆使し、性フェロモン受容化学感覚器の応答を多面的に記録した。本研究室で累代飼育しているゴキブリの中から成熟したメスを複数選び、性フェロモンを含む体表クチクラワックス（不揮発性化合物群）を抽出する。この抽出物を成熟したオスの触角に触れさせて求愛行動の発現を観察する。このことにより後の電気生理実験に用いる刺激として抽出物に性フェロモン効果があるかを確認できる。オスの触角上の化学感覚器の形態観察の結果を元に、各種電気生理実験手法で各化学感覚器を抽出物で刺激し、抽出物に対して応答する感覚器と応答しない感覚器を調べる。それぞれの感覚器を電子顕微鏡にて詳細に比較し、電気生理学的な性質を加味した感覚器の形態・分布の類型化を行った。

②性フェロモン受容感覚神経の電気生理学的な応答性の解析： 各種の化合物で刺激した時の成熟したオスの性フェロモン受容感覚器の応答をチップレコーディング法（図）にて記録した。刺激に用いた化合物として、成熟したメスに由来する体表クチクラワックスの抽出物とオスの求愛行動を解発するメスの性フェロモンの合成品を用いた。

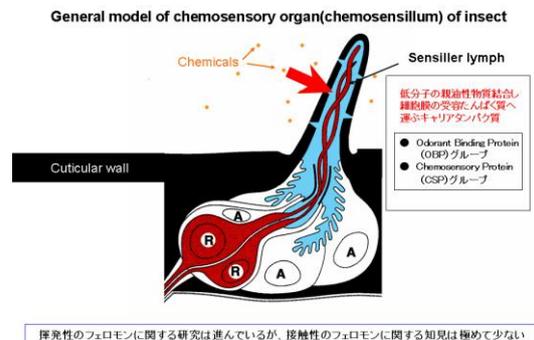


(2)分子生物学的なアプローチ

①化学感覚器に含まれる性フェロモンのキャリアタンパク質の究明： 昆虫の化学感覚器内には OBP(odorant binding protein)と CSP(chemosensory protein)の二種のキャリ

アタンパク質が存在する（図）。化学感覚器内の感覚神経はセンシラリンパと呼ばれるリンパ液中に存在し、外界の匂いやワックスなどといった難水溶性の化合物は OBP か CSP と結合しなければ親水環境のセンシラリンパを通過して感覚神経上のレセプターに到達できない。ゴキブリにおいては *Leucophaea maderae* のメスの触角にオス由来の揮発性性フェロモンを運搬するキャリアタンパク質 (LmaBP, OBP の仲間)が含まれるという報告が 2002-3 年になされ、タンパク質の立体構造解析と揮発性性フェロモンとの結合実験が済んでいる。一方、クロオオアリの触角に含まれ、コンタクトフェロモンを運搬するタンパク質は CSP である。しかしこれらの結果はチャバネゴキブリのオスの触角において性フェロモン（コンタクトフェロモングループ）をキャリアするタンパク質が OBP であるか CSP であるかを推定する助けにはならない。そこで本研究では、チャバネゴキブリのオスの触角に含まれ、性フェロモンを運搬するタンパク質を分子生物学的な手法で探索した。

方法は以下の手順とした。1) 成熟したオスの触角抽出物から、キャリアタンパク質などの水溶性タンパク質を含む画分を取り出し、これを二次元電気泳動によって展開した。2) 雌雄差のあるタンパク質のスポットを選定した。

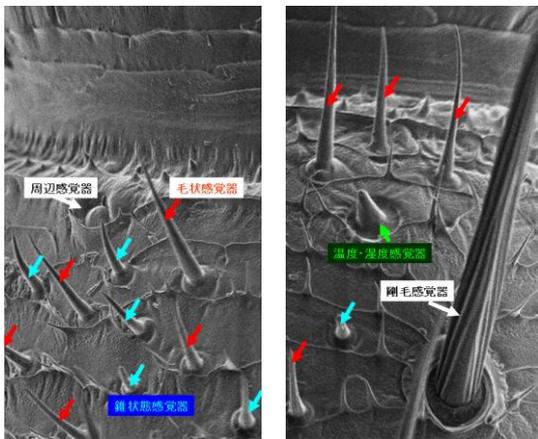
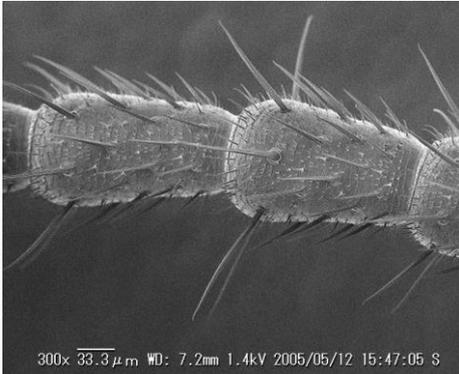


その他：チャバネゴキブリの配偶行動では、前述のように、オスがメスのコンタクトフェロモンを受容して求愛行動を示す。その一方で求愛を受けたメスはオスの背面腹部から分泌されるコンタクトフェロモンを受容し、オスの求愛に応じる。オスの触角におけるコンタクトフェロモンの化学受容のしくみ他に、メスの口器におけるコンタクトフェロモンの化学受容についても、チップレコーディング法を用いて電気生理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 化学感覚器の同定

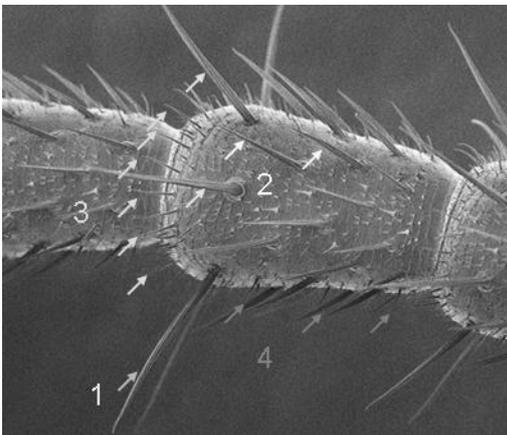
走査型電子顕微鏡 (SEM) にてチャバネゴキブリの雌雄の触角の形態観察を行った。その結果、触角上に存在する化学感覚器の種類には雌雄差がなく、これは過去の報告と一致しており、オスの方がメスよりも感覚子数が多いことがわかった。



オス触角の SEM : 低倍率 (上段)。高倍率 (下段)。オスの方がメスよりも→で示した触角感覚器の数が多し。

(2) 感覚神経の応答性の調査

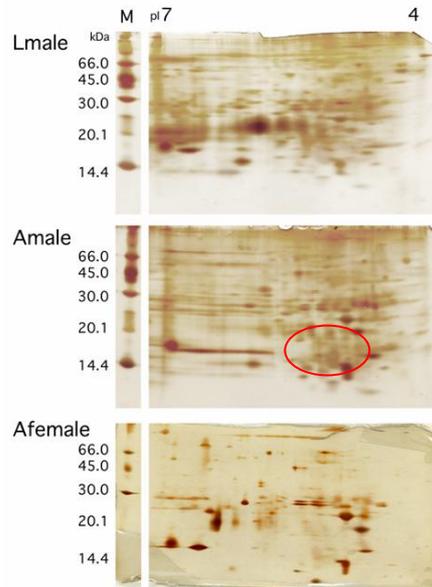
チップレコーディング法により、メスの体表抽出物に対して応答するオスの触角上の化学感覚器を探索したところ、4番 (グレーの矢印) の感覚器から応答を得た。



メスの体表抽出物に対して応答する感覚器とその応答

(3) 化学感覚器に含まれるキャリアタンパク質の調査

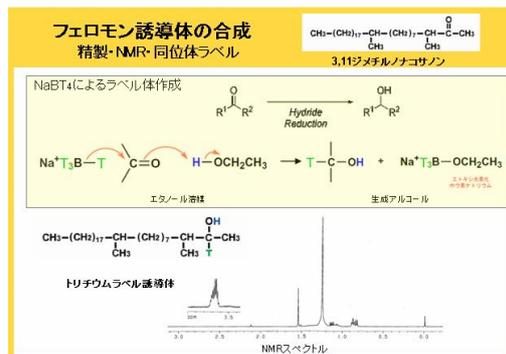
チャバネゴキブリのオス、メス、幼虫のボディと触角から抽出した水溶性たんぱく質の比較を行い、オス成虫の触角に特異的に発現しているタンパク質を探索した。その結果オス特異的に発現しているタンパク質は発見できず、オスに特異的に多量に発現している候補タンパク質が十数個あることがわかった。



触角の水溶性タンパク質等電点二次元電気泳動

Lmale, オス幼虫触角; Amale, オス成虫触角; Afemale, メス成虫触角

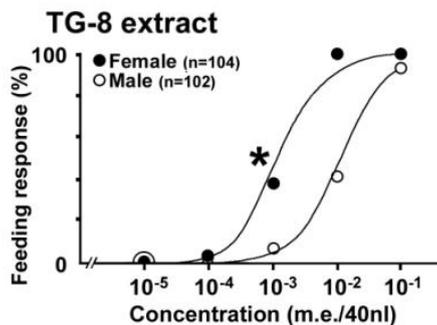
性フェロモンと結合するタンパク質を同定するために、メス成虫の合成フェロモンをトリチウムラベル化した。



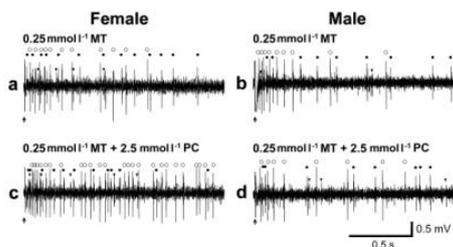
これとオスの触角抽出物を混合し、ラベル体と結合したタンパク質を電気泳動で調べたが、今回はラベル化したフェロモンと特異的に結合するオス触角中のタンパク質は発見できなかった。

(4) その他：メスの口器上の味覚感覚器におけるオスのコンタクトフェロモンに対する応答の調査

メスの口器に存在する味覚感覚器内の糖受容細胞は、オスのコンタクトフェロモンに対してよく応答し、メスによるオスの求愛の受け入れ行動を促進させることがわかった。



オスのコンタクトフェロモン (RG-8extract) に対する雌雄の摂食活性 (この場合、摂食行動は求愛に応じることと同義)：メスは薄い濃度でもオスのコンタクトフェロモンに対して活性を示す。



雌雄の味覚感覚器におけるオスのコンタクトフェロモン成分に対する電気生理学的応答：メスにおいて味覚感覚器内の糖受容細胞がオスよりもコンタクトフェロモンに対してよく応答する。糖受容細胞の強い応答が、メスの強い摂食行動 (求愛に応じる行動) を引き起こすと考えられる。

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 4 件)

① 尾崎まみこ, 勝又綾子, 化学受容にかか

わる親油性刺激物質の輸送蛋白質, 蛋白質・核酸・酵素, 53, 111-118, 2008, 無

② Masaru K. Hojo, Ayako Wada-Katsumata, Mamiko Ozaki, Susumu Yamaguchi, Ryohei Yamaoka, Gustatory synergism in ants mediates a species-specific symbiosis with lycaenid butterflies, Journal of Comparative Physiology A, 194, 1043-1052, 2008, 有

③ Masaru K. Hojo, Ayako Wada-Katsumata, Toshiharu Akino, Susumu Yamaguchi, Mamiko Ozaki, Ryohei Yamaoka, Chemical disguise as particular caste of host ants in the ant inquiline parasite Niphanda fusca (Lepidoptera: Lycaenidae), Proceedings of the Royal Society B: Biological Science, 276, 551-558, 2008, 有

④ Ayako Wada-Katsumata, Mamiko Ozaki, Fumio Yokohari, Michiko Nishikawa, Ritsuo Nishida, Behavioral and electrophysiological studies on the sexually biased synergism between oligosaccharides and phospholipids in gustatory perception of nuptial secretion by the German cockroach, Journal of Insect Physiology (accepted), 2009, 有

[学会発表] (計 6 件)

① 勝又綾子, チャバネゴキブリの雄の婚贈呈物質に対するメスの味覚応答, 第51回日本応用動物昆虫学会, 2007. 3. 27, 広島大学

② 勝又綾子, Female's specific gustatory perception of a nuptial gift in the German cockroach, Asia-Pacific Association of Chemical Ecologists, 2007. 9. 12, エポカルつくば

③ 勝又綾子, チャバネゴキブリの雄の婚贈呈物質はメスにとってどんな魅力があるのか?: 感覚生理の視点から, 生物間相互作用に基づく新規害虫管理モデルの構築, 2007. 10. 31, 京都大学

④ Ayako Wada-Katsumata, Chemical senses and behavior: Sense of taste in cockroaches and butterflies, An international symposium entitled "Construction of the Novel Model of Pest Management Based on Biological Interactions" as a part of the 21st COE program, 2008. 11. 12, Kyoto University

⑤ 尾崎まみこ 北條 賢 勝又綾子, アリーチョウ異種間共生関係を支える味覚相乗効果, 日本動物学会第 79 回大会, 2008. 9. 6, 福岡大学

- ⑥ 北條 賢 勝又綾子, クロシジミ幼虫は宿主アリの上位階級に化学擬態する, 日本動物学会第 79 回大会, 2008. 9. 6, 福岡大学

[図書] (計 3 件)

- ① 尾崎まみこ・勝又綾子, 株式会社エヌ・ティー・エス, 昆虫ミメティックス 第 2 編 (分担), 総ページ数 950, 2008
- ② 勝又綾子, 株式会社エヌ・ティー・エス, 昆虫ミメティックス 第 3 編 (分担), 総ページ数 950, 2008
- ③ 勝又綾子・西田律夫, 京都大学出版会, 昆虫が拓く未来科学 (分担), 総ページ数 580, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝又綾子 (KATSUMATA AYAKO)
京都大学・農学研究科・COE 研究員
研究者番号: 30423007