

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19310142

研究課題名 (和文) 昆虫－植物間共進化過程の分子化学生態学的解析

研究課題名 (英文) Molecular chemical ecology on the coevolutionary process between insects and plants

研究代表者

西田 律夫 (NISHIDA RITSUO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：30135545

研究成果の概要 (和文)：昆虫と植物間の相互作用に関わる情報化学因子について共進化的観点から考察した。1) 競走的共進化の解析—チョウ類数種の寄主植物に含まれる特有の産卵刺激因子 (成虫) および摂食刺激因子 (幼虫) を明らかにし、味覚感覚子における神経興奮電位計測比較解析などにより、化学感覚受容と寄主選択/種分化の関連性を考察した。2) 協調的共進化の解析—花香成分を介した *Bactrocera* ミバエと *Bulbophyllum* 属ランの送粉共生系について化学生態学・進化的観点から解析した。数種のミバエランには花香成分を異にする系統があり、送粉者種相に呼応した種分化様式が判明した。一方、ミバエ近縁種間の雄直腸腺成分の系統的解析から、花香シノモンを原料とした性フェロモンの多様性が生殖隔離/種分化プロセスに重要な要素となっている可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Ecological adaptation mechanisms were examined in the following two coevolutionary aspects, focusing on semiochemical factors associated with interactions between insects and plants. 1) Antagonistic coevolution – Swallowtail butterflies recognize host plants with a complex mixture of specific plant metabolites both in oviposition and larval feeding processes. Relationships between taste perception and host adaptation mechanisms were examined using an electrophysiological technique. 2) Mutualistic coevolution – Fruit fly orchids in the genus *Bulbophyllum* attract *Bactrocera* fruit fly species for pollination using specific phenylpropanoid volatiles. An adaptation mechanism was proposed in the process of speciation via floral synomones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：化学生態学

1. 研究開始当初の背景

アルカロイド・フェノーリックスに代表される植物二次代謝物質の多くは、昆虫をはじ

めとする草食者の攻撃から身を守るために植物が発達させてきた化学障壁と考えられている。昆虫はこれに拮抗し、独特の代謝機

構を発達させ、幾多の植物化学障壁を乗り越え適応してきた。このような「競争的共進化」プロセスを化学生態学・生化学・分子生物学的手法により解析する。一方、高等植物の多くは、受粉のために昆虫をはじめとする送粉者を惹きつけるために、花蜜（一次代謝物質）のほか、色素や花香など多様な「化学情報」としての二次代謝物質を発達させてきた。ここにも、送粉者とのかけ引きが相互の遺伝子への選択圧となって作用し「協調的共進化」が促された。しかし、これらの共進化の鍵となる情報化学因子本体やその生合成系をコードする遺伝子的な背景はほとんどわかっていない。本研究は、この相反する共進化現象に注目し、両者の接点に関わる植物化学因子を (1) 植物側が被食圧に対抗してどのように生合成系を発達させてきたのか、(2) 昆虫側が植物成分にどのように応答（認識・輸送・解毒）していったのか、「昆虫」vs「植物」相互の種分化のモチーフとなる化学的要因を体系的に調べてゆくことを目指している。

2. 研究の目的

(1) 競争的共進化の解析—アゲハチョウ類の食性進化と植物二次代謝物質

ほとんどの昆虫は、特定の植物群を寄主として利用している（狭食性）。族（tribe）ごとに食草選好性が決まっているアゲハチョウ科に着目し、寄主植物に特異的に含まれる産卵刺激物質（成虫）・摂食刺激物質（幼虫）、非寄主植物に含まれる産卵・摂食阻害成分を系統的に明らかにすることを第一の目標とする。原始的な族はケシ科あるいはウマノスズクサ科を食草とし、モクレン科→クスノキ科→ミカン科→セリ科へと食性を進化させていったと考えられている。寄主転換プロセスの中に含まれる共進化的要素に注目しながら、解析する。ある種のアゲハチョウ類は、本来昆虫の忌避/阻害/致死因子として作用するアルカロイドやポリフェノール類などを生理的に克服し、積極的に寄主認識物質（産卵・摂食刺激物質）として利用しながら適応している。それら植物毒を体内に選択蓄積し自らの天敵から身を守る種も存在する。草食性昆虫の多くは、このようにして、適応的に寄主植物範囲を拡大し、植物に対して新たな選択圧をかけていったと考えられている。アゲハチョウ類の母チョウは前脚の化学感覚器により寄主・非寄主の「味覚」情報を正確に識別している。より原始的な種、あるいは、より進化した類縁種間における産卵刺激因子と産卵阻害因子の関連に注目し、前脚附節感覚子によ

る特異的な植物化学因子認識の化学基盤を探り、複合系受容機構を追究することが第二の目標である。第三の目標は、幼虫による植物二次代謝物の特異的輸送・代謝・選択的蓄積に関わる分子メカニズムの解析である。これら植物側の二次代謝系の変遷を、生化学的に辿ることにより、昆虫側に寄主転換（host shift）をもたらした要素と植物側に化学障壁を築かせた要素を進化生物学的に解析する計画である。

(2) 協調的共進化の解析—ミバエ・ミバエランの共生と植物二次代謝物質

植物は昆虫による花粉媒介を通して多様に進化し、また、昆虫側もこれに呼応して共進化してきた。ミバエ類の送粉共生系に注目し、両者の間に働く花香シノモン（synomone: 相利的な関係を促す情報化学物質）を体系的に明らかにすることを第一の目的とする。具体的には東南アジアおよびオセアニア熱帯雨林に自生するラン科植物と *Bactrocera* 属ミバエを材料として、以下の項目について重点的に究明する。(1) 自然生態系においてミバエ類を誘引する *Bulbophyllum* 属ラン各種の花香成分の系統的化学解析、(2) 花香分析による新規ミバエ誘引剤の開発、(3) ミバエ類の配偶行動に関与するラン花香由来フェロモン成分の化学・行動生理学的解明、(4) *Bulbophyllum* 属ランにおける花香フェニルプロパノイド生合成ルートの解明、(5) ミバエによるフェニルプロパノイドの特異的認識・フェロモンとしての摂取・生化学変換に関わる因子の分子生物学的解明を中心に相互の適応的な共進化過程を解析する。

3. 研究の方法

(1) アゲハチョウ科の寄主認識機構の解析

① 神経生理学のアプローチ：アゲハチョウは柑橘類などミカン科植物を寄主としている。母チョウは前脚附節の雌特有の味覚感覚子でミカン葉に含まれる特有成分に的確に応答して産卵する。このような複合系味覚受容のメカニズムについて、電気生理学的手法を駆使し、ティップレコーディングによる神経電位応答を計測波形解析することにより、各成分間の干渉作用を明らかにする。アゲハチョウ科の進化系統樹の下位にある原始的なギフチョウ族などでも産卵刺激物質の追究と並行して、これら異系統間の寄主認識システムの基盤を神経生理額手法から体系的に調べる。

② 産卵刺激受容と摂食刺激受容の相関：アゲハチョウ科各種において、成虫の産卵刺激物質と幼虫の摂食刺激物質の関連を明らか

にする。特に後者に関しては活性因子がほとんど不明であり、相互の共通/特異的の化学基盤を明らかにする。(1)の電気生理実験における波形解析から、感覚生理的基盤について考察する。

③ 寄主認識基盤の分子生物学的解析：アゲハチョウ類における寄主転換は、産卵刺激レセプターの進化を物語っているものと考えられ、その起源を分子レベルで探る。雌成虫ふ節感覚子に特異的に発現するタンパク質を明らかにし、リガンドとの相互作用を調べる。アゲハチョウ類の産卵応答における複数物質の同時受容には、この種のタンパク質との複合的な包接作用が関与している可能性が考えられ、(1)の電気生理実験と連動して追跡する。原始的な種や進化の頂点に位置する真正アゲハ族など未知のアゲハチョウ類の産卵刺激物質の探索とあわせて追究する。

(2) ミバエとランの共進化解析

① ミバエランに含まれるミバエ誘引物質の探索：「ミバエラン」と仮称する *Bulbophyllum* 属のラン科植物の花は、熱帯果実の重要害虫であるミカンコミバエやウリミバエなどの雄成虫を誘引物質を産生し、特殊化したトラップ型花唇構造を発達させて特定のミバエ種を受粉のために誘い込む。一方、送粉者の *Bactrocera* 属ミバエは東南アジアを中心に著しく分化している。種々のミバエを誘引するミバエランの花香フェニルプロパノイドを明らかにし、生合成系に関与する酵素群の遺伝的背景を調べる。

② 新規ミバエ誘引物質の探索：熱帯雨林に咲くミバエラン類の産生するフェニルプロパノイド系化合物の中には、まだ、誘引対象となるミバエ種が不明の化合物も含まれている。逆に、現在、日本への侵入害虫ナスミバエ *B. latifrons* の未知誘引物質の解明が急務となっている。原産地東南アジアでパートナーとして自生するミバエランを調査することによって、誘引物質を探り出す。

③ ミバエのフェロモン生合成系の解明：ミカンコミバエの雄成虫は、ラン花香のメチルオイゲノールを摂取してフェロモンに代謝変換する。ミカンコミバエ種群を中心に、フェロモンの多様性を明らかにし、その生合成系の違いから、ラン花香を介した種分化について検証する。

4. 研究成果

(1) 競争的共進化解析

① アゲハチョウ幼虫の摂食刺激成分

アゲハチョウ (*Papilio xuthus*) はミカン科

植物を寄主とし、幼虫は寄主を的確に識別し摂食する。幼虫の食草選択に関わる寄主特異的な化合物群を化学的に究明した。アゲハの代表的寄主であるウンシュウミカン (*Citrus unshiu*) の葉から、二次代謝物質として同定した isosinensetin 及び citrussin I (図1) は糖類との混合により活性を示した。摂食刺激活性の生物検定は、ウンシュウミカン葉のエタノール抽出物より得られた各クロマトグラフィ画面を塗布した紙片を用い、試験紙の摂食された面積により評価した。また、エーテル可溶画分から、糖と組み合わせることで高い摂食活性を示す成分として、モノアシルグリセロールである 1-linolenoylglycerol など5種類の脂質を摂食刺激物質として単離同定した。成虫の産卵刺激成分と異なり、栄養価の高い一次代謝成分をも味覚因子として寄主選択の手がかりにしていることが判明した。

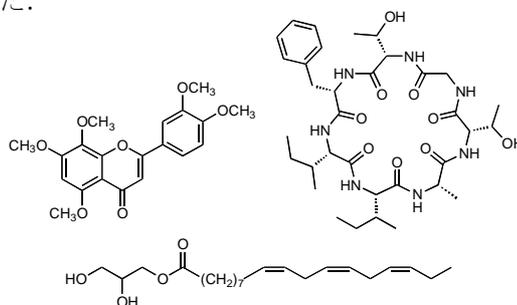


図1. アゲハチョウ幼虫摂食刺激物質 isosinensetin (左上), citrussin I (右上), 1-linolenoylglycerol (下)。

② アゲハチョウ類の寄主認識因子の電気生理学的解析

ホソオチヨウ *Sericinus montela* 幼虫の摂食刺激物質として、食草ウマノズグサに特有のアルカロイド誘導体である aristolochic acid I (AAI) のほか、グリセロ糖脂質 (MGDG), glucose, fructose, sucrose, sequoyitol の6化合物を同定した。ホソオチヨウ幼虫の口器上にある2種の味覚感覚子 (LS: lateral styloconic sensilla, MS: medial styloconic sensilla) における、摂食の際の神経活動を電気生理学的に調べた (図2)。LS は全刺激に対して応答を示した。一方、MS は sequoyitol 以外の刺激に対して応答を示したものの、AAI と MGDG に対してはほとんど応答を示さなかった。LS と MS は共に、各摂食刺激物質単独での刺激に対しては生葉抽出物への応答とは異なる応答を示し、全摂食刺激物質の混合物に対しては生葉抽出物への応答と類似する応答を示した。このことにより、両感覚子における摂食刺激

物質の複合受容がホソオチョウ幼虫の摂食行動の誘起に重要な役割を果たしていることが示唆された。同様の電気生理実験を、アゲハチョウに関して実施し、雌成虫前脚附節感覚子に対する産卵刺激物質、幼虫口器感覚子に対する摂食刺激成分の神経応答を計測・解析した。

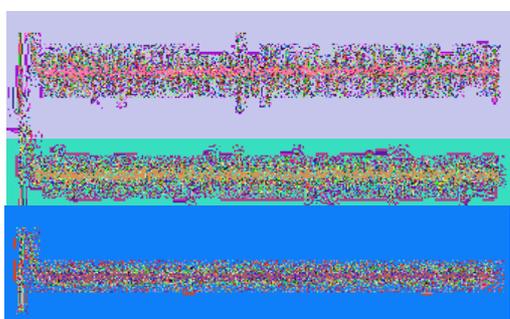
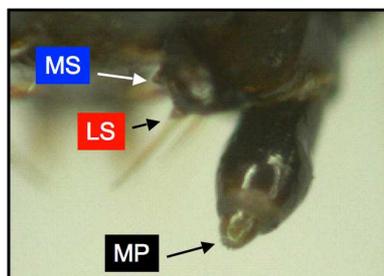


図2. ホソオチョウ幼虫の口器味覚感覚子（MPは小鰓鬚）およびLS感覚子に対する神経電位応答。上：ウマノスズクサ粗抽出物，中：Aristolochic acid I, 下：ブランク。

③アゲハチョウ類の寄主認識化学受容の分子機構解析

ジャコウアゲハ雌成虫前脚附節に特異的に発現するタンパク質とリガンドである aristolochic acid I (AAI) の蛍光標識体を作成し、両者の相互作用を分子モデリングにより解析した。

(2) 競争的共進化の解析

①ミバエ-ミバエラン送粉共生系に関するシノモン花香の化学的解析

東南アジア等の熱帯雨林に自生するミバエラン *Bulbophyllum macranthum* の花は独特な芳香でウリミバエ等の *Bactrocera* 属ミバエ雄成虫を誘引し、送粉者として利用している。各地域に自生する本種のミバエ雄誘引成分を分析し、地域変異を調べることを目的とした。マレーシア・タイおよびパプアニューギニアに自生する *Bu. macranthum* の花のエタノール抽出物をGC/MS等で分析し、各地域のミバエ雄誘引成分の比較を行った。タイおよびマレーシア産の *Bu. macranthum* からは

共に zingerone を主要成分として同定した。一方、パプアニューギニア自生種からは zingerone のみならずウリミバエ類を誘引する raspberry ketone を同定し、誘引成分の地域変異が認められた（図3）。また、マレーシア産の本種を訪花したパンノキミバエ *B. umbrosa* 雄成虫の直腸フェロモン腺から還元体である zingerol を検出したことから、ミバエとミバエランの密接な共生関係が示唆された。このほか、ミカンコミバエ種群を強く誘引する *Bu. elevatopunctatum* の花から、メチルオイゲノールをはじめとする複数のフェニルプロパノイド成分を同定した（図3）。この場合も花を舐めて誘引成分を摂取した雄ミバエは、同物質を体内で代謝変換し、雌を誘引する性フェロモンとして直腸腺に蓄積することを実証した。ミバエ-ミバエラン相互依存の繁殖戦略を化学生態学ならびに進化的観点から考察した。

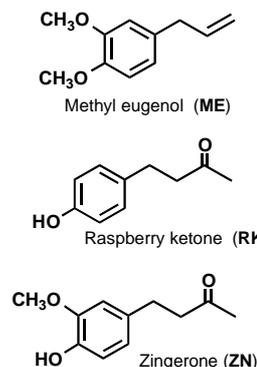


図3. *Bulbophyllum* 属ミバエランの産生するミバエ誘引物質。ZNはMEとRKのハイブリッド構造をもち、ミカンコミバエ種群とウリミバエ種群の両系統のミバエ雄を誘引する。

②ミバエ近縁種群の生殖隔離に関与するフェロモン腺成分の解明

ミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* は、東南アジア・熱帯オセアニアを中心に多数の近縁（亜）種群から成り立っている。これは、同地を中心に適応放散／種分化の途上にあることを示唆している。これら近縁種間の生殖隔離には性フェロモンが重要な役割を果たしていると考えられることから、現在、独立主として記載されている以下の3種（ミカンコミバエ *B. dorsalis*, モモミバエ *B. zonata*, セグロモモミバエ *B. correcta*）を中心に、フェロモン分泌器官である直腸腺成分を、フェロモン原料であるメチルオイゲノール摂取後分析した。その結果、ミバエ3種はいずれも2種の異なるフェロモン成分組成のME酸

化体を組み合わせて代謝蓄積していることが判明した (図4)。

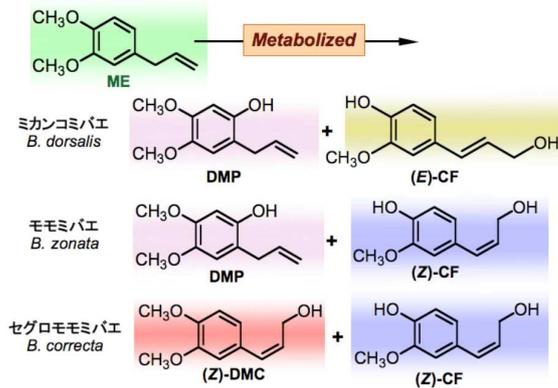


図4. ミカンコミバエ近縁種における直腸フェロモン腺分泌成分. いずれも2種の組み合わせから成り, 相互の生殖隔離に寄与していることが示唆された.

また, *B. correcta* 野生雄個体においては, β -caryophyllene, α -humulene, alloaromadendrene をはじめとするセスキテルペン炭化水素のフェロモン腺蓄積が判明し, 種分化の解析に新たな知見を与えた (図5). 各種セスキテルペンの1雄当たりの含有量はきわめて多量で, 合計 300 μ g に達する個体も認められた (図5). その獲得経路は不明であるが, 室内飼育個体からは検出されないことから, 成虫になってから何らかの植物源から得ていることが示唆された.

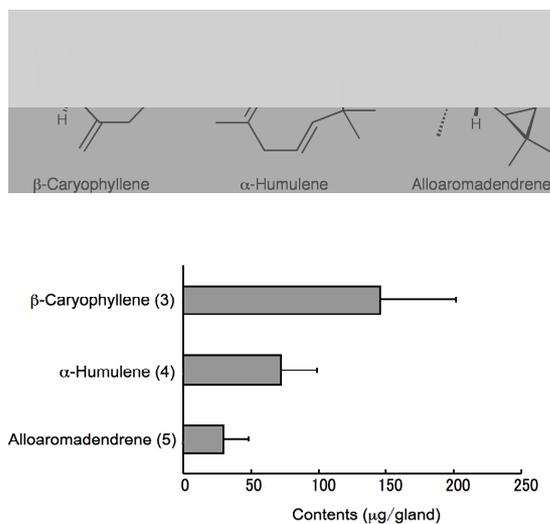


図5. タイ国バンコク市において採集した野生セグロモモバエ雄直腸フェロモン腺から検出されたセスキテルペン炭化水素および, その平均蓄積量 (μ g/直腸腺).

B. dorsalis とは別種として記載されている *B. invadens*, *B. philippinensis* などと併せたDNA配列によるミカンコミバエ種群の分子クローニング (mitochondrial cytochrome oxidase subunit, COI; 16S r RNA, rDNA 領域) により系統分析を実施, 近縁度に関する考察を行った. これらの解析結果を図6に示す.

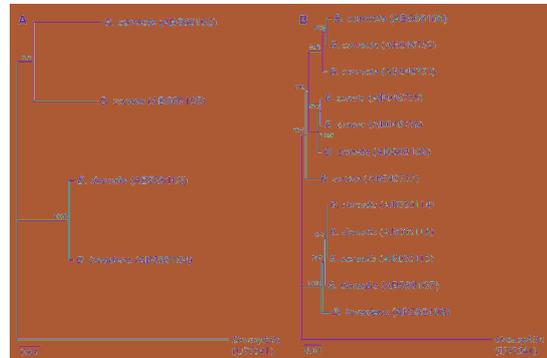
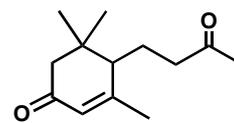


図6. ミカンコミバエ近縁種群における分子系統解析. A: COI; B: rDNA

③ミバエ類の新規誘引物質の解明

現在, 沖縄本島への侵入・定着が確認されているナスミバエ *Bactrocera latifrons* に対する有効な雄誘引剤は見出されていないが, 本研究により, 3-oxo-7,8-dihydro- α -ionone (図7) をはじめとする有望な誘引物質を開発することができた. 与那国島における野外トラップにて, 不妊虫放飼のモニタリングに供試している. また, 日本本土 (九州・中国地方) におけるミカン園で繁殖拡大が問題となっているミカンバエ *B. tsuneonis* についても誘引物質の検討を行っている.



3-Oxo-7,8-dihydro- α -ionone



図7. ナスミバエの新規誘引物質 3-oxo-7,8-dihydro- α -ionone およびスタイナー型トラップによる誘引試験 (下).

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 Tokushima, I., Orankanok, W., Tan, K. H., Ono, H., and Nishida, R. Accumulation of phenylpropanoid and sesquiterpenoid volatiles in male rectal pheromonal glands of the guava fruit fly, *Bactrocera correcta*. *J. Chem. Ecol.* 36: 2011, 1327-1334. 査読有
- ② Tan, K. H., Tokushima, I., Ono, H., and Nishida, R. Comparison of phenylpropanoid volatiles in male rectal pheromone gland after methyl eugenol consumption, and molecular phylogenetic relationship of four global pest fruit fly species - *Bactrocera invadens*, *B. dorsalis*, *B. correcta* and *B. zonata*. *Chemoecology* 21: 2011, 25-33. 査読有
- ③ Enomoto, H., Ishida, T., and Nishida, R., 3-Oxygenated α -ionone derivatives as potent male attractants for the solanaceous fruit fly, *Bactrocera latifrons* (Diptera), and sequestered metabolites in the rectal gland. *Appl. Entomol. Zool.* 45: 2010, 551-556. 査読有
- ④ Wada-Katsumata, A., Ozaki, M., Yokohari, F., Nishikawa, M. and Nishida, R. Behavioral and electrophysiological study on the sexually biased synergism between oligosaccharides and phospholipids in gustatory perception of nuptial secretion by the German cockroach. *J. Insect Physiol.* 55: 2009, 742-750. 査読有
- ⑤ Nishida, R., Enomoto, H., Shelly, T. E. and Ishida, T. Sequestration of 3-oxygenated α -ionone derivatives in the male rectal gland of the solanaceous fruit fly, *Bactrocera latifrons*. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 2009, 85-92. 査読有
- ⑥ Tsuchihara, K., Wazawa, T., Ishii, Y., Yanagida, T., Nishida, R. Zhen, X. G., Ishiguro, M., Yoshihara, K., Hisatomi, O. and Tokunaga, F. Characterization of chemoreceptive protein binding to an oviposition stimulant using a fluorescent micro-binding assay in a butterfly. *FEBS Letters* 583: 2008, 345-349. 査読有
- ⑦ Ishida, T., Enomoto, H. and Nishida, R. New attractants for males of the solanaceous fruit fly *Bactrocera latifrons*. *J. Chem. Ecol.* 34: 2008, 1532-1535. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nishida, R. Pheromonal communication systems in the oriental fruit moth and oriental

fruit fly. Chinese Association of Chemical Ecology, Shanghai, 2010.10.11 (invited).

- ② 西田律夫. 昆虫と植物をめぐる化学生態学-情報物質を介した進化の構図. 2010年度日本農芸化学会大会 2010. 3. 30, 東京大学 (招待講演).
- ③ Nishida, R. New attractants for the solanaceous fruit flies *Bactrocera latifrons* and their ecological significance. Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology. Hawaii, 2009.10.27 (invited).
- ④ Nishida, R. Fragrances to entice females: Ecological significance of male sex pheromones in insects. Entomological Society of America. Reno. 2008. 11. 18 (invited).

[図書] (計 3 件)

- ① 西田律夫 (分担執筆) 2009. 昆虫と植物の共存-花の香りを介した相互の適応戦略「昆虫科学が拓く未来」(藤崎憲治・西田律夫・佐久間正幸編), 査読なし, 京都大学学術出版会, 京都, pp. 191 -220.
- ② 勝又綾子・西田律夫 (分担執筆) 2009. 昆虫の化学センサー「昆虫科学が拓く未来」(藤崎憲治・西田律夫・佐久間正幸編), 査読なし, 京都大学学術出版会, 京都, pp. 321 -341.
- ③ 西田律夫 (分担執筆) 2007. 昆虫と植物-攻防と共存の歴史「生物資源から考える21世紀の農学(第3巻)植物を守る」(佐久間正幸編), 査読なし, 京都大学学術出版会, 京都, pp. 83 -122.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ミバエの誘引・摂食刺激剤及び誘引体

発明者: 西田律夫, 榎本弘, 石田龍顕

権利者: 国立大学法人京都大学

種類: 特願

番号: 2008-128415 号

出願年月日: 平成 20 年 5 月 15 日

国内外の別: 日本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 律夫 (NISHIDA RITSUO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 30135545

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 研究協力者

タン ケンホン (TAN KENG HONG)

元マレーシア理科大学・教授