

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770075
 研究課題名（和文）アゲハチョウ科昆虫における食草認識の多様性を支える分子基盤解明
 研究課題名（英文）Study on molecular bases of diversity in host plant recognition system in Papilionidae insects.
 研究代表者
 中 秀司 (NAKA HIDESHI)
 鳥取大学農学部・助教
 研究者番号：00443846

研究成果の概要：植食性昆虫が食草を認識するメカニズムを理解するため、食草認識に関与する化学物質の知見が豊富なアゲハチョウ科昆虫を対象として、食草認識の分子基盤を解明することを目的とした。キアゲハ・クロアゲハ・モンキアゲハの3種から、ナミアゲハより発見された産卵刺激物質受容体(尾崎私信)と相同と考えられる遺伝子の一部を同定することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：化学生態学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：昆虫、分子認識、多様性、生理活性

1. 研究開始当初の背景

生物は生きる上で、視覚・嗅覚・味覚・触覚など様々な感覚を通じて外界を認識し行動している。昆虫類の多くは、これら外界からの情報のうち、化学物質を介した情報(嗅覚・味覚)に重きを置き、配偶行動や寄主選択などに利用している。配偶行動や寄主選択の変化は、同所的種分化のきっかけとなる可能性が指摘されており、事実、ミバエなど複数の狭食性の植食性昆虫において、化学物質の受容機構に生じた変化が基と考えられる種分化が起こった証拠がある。

鱗翅目昆虫の大部分は狭食性で、限られた

分類群の植物のみを寄主としている。多くの蝶や蛾で、母親は寄主植物を探し出しその上に卵を産下するが、その探索・認識には植物由来の化学物質が深く関わっている。とりわけ、産卵選好性と化学物質の関わりはアゲハチョウ科の蝶でよく研究され、雌前脚ふ節にある化学感覚毛で食草に含まれる化学物質を認識し、産卵するか否かを決定することが明らかとなっている。ナミアゲハ(*Papilio xuthus*)においては、ウンシュウミカンの葉から産卵刺激物質として10種類の化合物が同定されており、ウンシュウミカンの葉から10種類の産卵刺激物質が同定されている。そ

れらは、主としてフラボノイド、アミン類、糖の誘導体に分類される。他にも数種の *Papilio* 属の種で産卵刺激物質が明らかにされている。これらはナミアゲハと同一の物質であったり、あるいは類似した構造を持つ物質がほとんどである。近縁種間で同一あるいは類似の物質群を産卵刺激に用いることは、植物に含まれている化合物の類似性が寄主転換に重要であることを示すと共に、化学物質の受容機構に生じる変化が寄主転換に重要な役割を果たすことを示唆している。このように、産卵行動やそれを刺激する化合物についてはよく理解されているが、産卵刺激物質を認識する分子機構については全く未解明であった。これまでに知られている産卵刺激物質の多くは不揮発性であり、昆虫では味覚刺激として認識されると考えられる。

しかしながら、産卵刺激物質の認識に関わる分子基盤は今まで明らかとなっていない。産卵刺激物質として同定されている物質のほとんどは水溶性であることから、これらの物質は味覚刺激として受容されると考えられる。

味覚及び嗅覚受容の分子基盤は、哺乳類における研究が先行している。哺乳類の例では、味覚・嗅覚はともに神経細胞の膜上にある 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型レセプター (7TM-GPCR) によって受容されることが明らかになっている。昆虫における味覚受容の研究は遅れていたが、21 世紀になってショウジョウバエから味覚受容型 7TM-GPCR の存在が報告され、大きな枠組みで哺乳類と同様の味覚受容機構を持つことが明らかとなった。

2. 研究の目的

前述のような知見を基に、ナミアゲハにおいて産卵刺激物質受容機構に関わる遺伝子群がクローニングされた(尾崎私信)。この遺伝子群の一つがコードするタンパク質(以下ナミアゲハ受容体)は、昆虫の味覚受容型 GPCR と考えられる構造をしており、アゲハチョウ科の産卵刺激に重要な役割を果たす化合物に特異的な応答を示すことが明らかとなった(尾崎私信)。

このことは、ナミアゲハ受容体及びそのホモログが *Papilio* 属昆虫において産卵刺激物質の受容に深く関わっていることのみならず、味覚受容体遺伝子の配列変化が、*Papilio* 属における寄主転換に深く関わっている証拠となりうる。

ショウジョウバエにおいて、Gr5a の個体差がトレハロースの受容活性に大きく影響している例がある。ナミアゲハにおいても同様に、個体ごとあるいは個体群間でナミアゲハ受容体の変異に起因した化合物への応答の差異が生じている可能性がある。

ナミアゲハ受容体及びそのホモログについて、その種内及び種間変異を解析することで、進化の過程で寄主選択にどのような変化が生じたかを、分子生物学的視点から議論することが可能となる。ひいては、寄主選択が種分化や個体群の形成にどのような役割を演じたかを議論することも可能であろう。また、食植生害虫には多食性のものを多く含むが、これらの近縁種は概して狭食性である。狭食性昆虫から多食性昆虫が進化するプロセスは未だ明らかになっていないが、本研究により食性転換の分子基盤が解明されることによって、大きく研究が進むものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 人工飼料による安定した累代飼育を行うため、最適な飼育条件を検討した。ナミアゲハにおいて、市販の人工飼料用基材(インセクタ F-II)に食草の乾燥粉末を添加することで累代飼育が可能である(尾崎私信)ため、同様の方法で近縁他種の飼育が可能かを検討した。基材に混ぜる食草として、野外で容易に大量調達が可能であるカラスザンショウ(ミカン科食 *Papilio*)・シシウド(キアゲハ)・ミカン(ナガサキアゲハ)を用いた。これらはシリカゲルにて急速乾燥させた後、ボールミルで粉碎した。飼育条件を検討するにあたり、基材と食草粉末の混合割合・添加する防腐剤の含量の 2 点を中心に、様々な条件で飼育を行った。

(2) (1)の方法で飼育した、ミヤマカラスアゲハとオナガアゲハを除く *Papilio* 属アゲハチョウの各種からナミアゲハ受容体のホモログ探索を試みた。ナミアゲハ受容体のクローニングには、羽化前日の雌の蛹を用いた(尾崎私信)ため、同様に羽化前日の雌の蛹から前脚ふ節を摘出し、RNA を抽出した。RNA を逆転写して得られた cDNA から、ナミアゲハ受容体の配列情報をプローブにして作成した数種のプライマーを用い、ナミアゲハ受容体ホモログと考えられる遺伝子の部分配列を得た。得られた部分配列を基にして 3'-RACE 法、5'-RACE 法により全長配列の決定を試みた。

(3) 関西地方を中心とした全国からナミアゲハを収集し、ゲノム DNA を抽出した。ナミアゲハ

受容体の 5'-及び 3'-末端(尾崎私信)に設計したプライマーを用い、PCR 法によりイントロンを含むナミ受容体の全長を増幅した。計 12 個のプライマーを用いて、得られた増幅産物の配列を決定し個体変異の比較を試みた。

4. 研究成果

(1) *Papilio* 全種を対象とした飼育実験では、ミヤマカラスアゲハ・オナガアゲハを除いて人工飼料による累代飼育が可能であった。そのうち、生葉での飼育が困難であるキアゲハについては、様々な飼育条件下で飼育を行い、人工飼料を用いた最適飼育条件を検討した。乾燥粉末の原料としてシシウドを用い、ボールミルで粉砕して人工飼料に用いたところ、キアゲハ幼虫は良好に生育し、野外と同等の体サイズを持つ成虫が羽化した。ただし、飼育条件によっては長日条件にもかかわらず蛹で休眠するものが現れたため、休眠蛹としない飼育条件の検討が必要と考えられた。

(2) ナミ受容体の配列(尾崎私信)をプローブとして、同属のキアゲハ・クロアゲハ・モンキアゲハの 3 種から類似の遺伝子の一部を同定する事ができた。クロアゲハ及びモンキアゲハのナミ受容体相同配列は、GPCR としては非常に高い相同性を保っており、近縁な 2 種は産卵刺激物質の受容機構が非常に似通っていると考えられた。モンキアゲハの産卵刺激物質に関する知見はないが、クロアゲハ・モンキアゲハの 2 種はナミアゲハと同じ食草(ミカン・カラスザンショウ)を利用しており、クロアゲハについてはナミアゲハと産卵刺激物質が一部重複する事が分かっている。一方、3 種のうちキアゲハはナミと近縁であるが、セリ科植物を食草としており、産卵刺激物質は大きく異なる事が予想される。これら遺伝子間の相同性は、食草を異にするキアゲハのみで低い事が予想されるため、全長配列の決定によりキアゲハを含む近縁種間で相同性を比較することが望まれる。

(3) ナミ受容体の種内変異に関して、北海道から石垣島までの、関西地方を中心とする全国からサンプルを収集し配列の変異を解析したところ、種内変異の存在が認められた。しかしながら、配列変異に基づく機能の変異を発見するには至っていない。

(4) なお、本研究は JT 生命誌研究館・昆虫と植物の共進化ラボで現在進行中の研究から、未公開の研究成果を利用し、その一部として進めたものである。本研究の基となる研究成果は、現在成果公表に向け論文を投稿準備中

であり、また先進的かつ競争が激しい分野の研究成果となるため、学術論文として成果が公表されるまで、データの公表は控えたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① 中 秀司、宇戸口愛、山田 歩、吉川 寛、尾崎克久、人工飼料によるキアゲハの飼育条件検討、第 52 回日本応用動物昆虫学会講演要旨集 p174、2008 年 3 月 28 日、宇都宮大学

② Hideshi Naka, Ai Utoguchi, Ayumi Yamada, Hiroshi Yoshikawa, Katsuhisa Ozaki, Inter- and intraspecific variation in oviposition regulatory receptor among *Papilio* butterflies, The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007 年 9 月 12 日、つくば市国際会議場

③ Katsuhisa Ozaki, Hideshi Naka, Ai Utoguchi, Ayumi Yamada, Hiroshi Yoshikawa, Identification of genes involved in perception of oviposition regulating compounds of swallowtail butterflies, The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007 年 9 月 12 日、つくば市国際会議場

④ Ai Utoguchi, Ayumi Yamada, Hideshi Naka, Hiroshi Yoshikawa, Katsuhisa Ozaki, Expression analysis of genes involved in oviposition behavior of swallowtail butterflies, The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007 年 9 月 12 日、つくば市国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中 秀司 (NAKA HIDESHI)
鳥取大学農学部・助教

研究者番号：00443846