

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580054
 研究課題名（和文） 植物毒利用昆虫におけるアルカロイド摂取の進化起源—特に生殖能力増進作用の評価
 研究課題名（英文） Evolutionary origin of alkaloid acquisition in insects utilizing plant toxins
 研究代表者
 本田 計一（HONDA KEIICHI）
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
 研究者番号：00238809

研究成果の概要（和文）：

マダラチョウ3種のおスにおけるピロリジジンアルカロイド(PA)類の摂取と発香器官分泌物の生合成、配偶行動との関係、及びPA類に対する嗅・味覚受容やそれらの繁殖生理への影響などを調べ、(1)特定構造のPA類が重要な前駆体となり、分泌物成分は性フェロモン機能を持つこと、(2)主要な化学受容器は脚に存在すること、(3)特定PA類はオスの配偶行動活性化や受精・孵化率の維持に不可欠であること等を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We studied how the ingestion of various pyrrolizidine alkaloids (PAs) by male adults of three danaine species affects the biosynthesis of their androconial secretion components and male mating behavior, together with the investigations of olfactory and gustatory reception of PAs and the implication of PA uptake for reproductive physiology. The results showed (1) that PAs with specific chemical structures (lycopsamine type) are important precursors for the biosynthesis of the secretion components, which proved to serve as the sex pheromones, (2) that foretarsi are endowed with olfactory sensilla responsible for PA perception, while mid- and hind-legs possess gustatory receptors, and (3) that specific PAs are essential for enhancing male mating vigor (virility) and also for maintaining high egg fertility and hatchability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学生態学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：アルカロイド、生理活性、昆虫、配偶行動、性フェロモン、防御物質

1. 研究開始当初の背景

栄養物以外の特定の物質（植物二次代謝産物など）を摂取して利用する習性は「薬物食性」と称され、多くの昆虫種で知られている。特によく研究されているのは、ヒトリガ科の

ガ類に見られるピロリジジンアルカロイド(PA)類の摂取である。彼らは幼・成虫時代に取り込んだ多量のPAを体内に蓄えて、それを性フェロモンの生合成原料や防御物質として利用していることが知られている。ま

たヒトリガなどにおいては、PA摂取とその体内動態や性フェロモンの生合成機構についての詳細な研究が、独・米国を中心に行われているが、彼らの繁殖戦略におけるPA類の選好的・選択的摂取の合目的性を説明するに足るPA類の本質的な生理機能については、未だ全く明らかにされていない。一方、マダラチョウ類もPAと強いつながりを持っているが、これについての類似の研究は世界中を見ても乏しく、発香器官分泌物の成分分析が主体で、その機能まで調べられた例もまだ数例に過ぎず、生合成機構や実際の利用態様についても殆ど明らかにされていない。

マダラチョウ類の殆どの種（主に雄）は成虫になってからPA含有植物（キク科、ムラサキ科などの非寄主植物）を探索して、その枯れた部分や花蜜からこれを摂取して体内に蓄積する習性を持つが、一部の種はPA含有植物（キョウチクトウ科）を寄主としており、成虫時に特別にPAを摂取することはない。このような背景の中で私は過去10余年間、マダラチョウ類とPAとの関係について様々な視点から野外調査や実験を行い、PA摂取の実態、発香器官分泌物、寄主選択に関与する植物成分、植物成分〔PAおよびフェナンスロインドリジジンアルカロイド（PIAと略）〕の体内蓄積、PAの選好性と発香器官分泌物の起源、などについて明らかにする中で、PAが生殖生理に重要な役割を担う生理活性物質として、特定構造のPA類などがマダラチョウの繁殖を直接にコントロールしているという、予備実験での結果も得た。しかしチョウ目のみならず、このような昆虫の生殖生理へのPA類の関与を示唆する報告は国内・外を問わず全く無かった。

2. 研究の目的

本研究では、特異な植物成分（特に有毒物質）を選好的に摂取して体内に取り込む習性が顕著な昆虫類の代表例としてのマダラチョウ類を対象に、特にアルカロイド類の摂取に着目して、その生理的および生態学的意義を配偶行動や生殖生理を中心に採餌（摂食）行動、防衛戦術、寄主選択（産卵など）などの観点から多面的な解析を行うことにより、彼らの繁殖戦略全般に亘るアルカロイド摂取の意義の本質を明らかにする。また同時にそのような形質の進化学的起源の解明を試みる。具体的には、PA摂取による生殖生理への直接的影響を検証し（卵受精率、孵化率などへの影響やその生理作用機序）、さらにはPAを前駆体とする発香器官分泌物の機能と生合成機構、PA受容に関わる感覚器官（嗅覚、味覚）の特定と電気生理学実験、PA含有植物中のPA類の構造決定と定量、化学合成などを通して、マダラチョウ類におけるアルカロイド要求の真の生理的意義とそ

の進化起源を探る。

3. 研究の方法

(1) 生合成前駆体としてのPAの化学構造が発香器官分泌物の生成に及ぼす影響

アサギマダラ (*Parantica sita*) およびツマムラサキマダラ (*Euploea mulciber*) での結果を踏まえて、本研究項目では主にリュウキュウアサギマダラ (*Ideopsis similis*) を用いて実験を行った。

ツルモウリンカなどで飼育した幼虫より得た雄成虫に、Intermedine/Lycopsamine (4:1 混合物, I/L), Heliotrine (He), Retronecine (Re), Monocrotaline (Mo) のいずれかを7日齢から0.5mgずつ3日間経口投与し(計1.5mg)、14日齢以降に性標(SB)とヘアペンシル(HP)を切除して、分泌物の成分分析を行った。

分析はGC及びGC/MSにより行い、定量分析用の内標準物質にはベンジルアルコールを用いた。また標品の合成や確認にはNMRを用いた。

(2) ヘアペンシル(HP)におけるPA由来発香器官分泌物の産生機構

飼育により得たアサギマダラ雄成虫を用いて実験を行った。I/Lまたはダナイドン(D0; 本種の主要な発香器官分泌物成分)を投与した雄に、SB切除、SB-HPの隔離実験などを行ってHPでのD0生成量を調べ、産生メカニズムを解析した。

(3) 配偶行動における発香器官分泌物の機能

上記の3種について実験を行った。飼育により得た各雄成虫を同数ずつのPA(I/L)投与群[PA(+)]と非投与群[PA(-)]に分け、総雄数の約2/3~3/4の数の雌成虫を用いて競合交尾実験を行い、PA投与群と非投与群の交尾率や日齢を比較した。

(4) PAの嗅・味受容に関する行動学的、形態学および電気生理学的実験

① PA類に対する嗅覚的・味覚的選好性とそれらの性差

飼育により得たアサギマダラ成虫を用いた。嗅覚的選好性に関しては、I/L, He, Re, Moのいずれかを400nm/cm²塗布した造花を作成し、それにヨツバヒヨドリ花香を模擬した香料混合物を適量賦香して誘引実験を行った。

味覚的選好性に関しては、I/Lの2.5%, 1.0%, 0.5%の各濃度の水溶液を調製し、それに中・後脚を接触させて口吻伸展反射(PER)を起こして5秒以上継続摂食するかどうかを調べた。

② 嗅受容の同定と電気生理学応答

雄成虫が持つ可能なPA受容化学感覚器候補として触角、下唇鬚、前脚を選定し、それらの1~3器官を切除したアサギマダラ雄成虫を用いて実験を行った。I/Lの蒸気を含

む空気流を視覚刺激を隠蔽した装置より、成虫下部(腹面)から吹き付け、自発的に PER を起こすかを調べた。

主要な P A 嗅受容器官と判断された部分については、電子顕微鏡(SEM)による外部形態の観察も行い、感覚子の特定を行った。またチップレコーディング(TR)法により、感覚子の P A 類に対する応答性を調べた。

③味受容器の同定と電気生理学応答

3種のチョウ雄成虫について、中・後脚味覚感覚子の SEM 観察を行い、TR 法により P A 類に対する応答性を調べた。

(5) P A 摂取の繁殖生理への新規な効果

①アサギマダラ雄成虫における交尾行動活性化効果の評価

SB を切除して雄を I/L 摂取群と非摂取群に 2 分して競合交尾実験を行い(性フェロモン無し)、それぞれの交尾率と求愛行動の様子を記録した。

また別の実験として、Re を投与、匂い付け後に SB を切除して、雄を I/L 摂取群と非摂取群に 2 分して競合交尾実験を行い(性フェロモン有り)、それぞれの交尾率を記録した。

②リュウキュウアサギマダラにおける卵受精率と孵化率、及び有核・無核精子数に及ぼす P A 摂取の影響

野外採集雌(第 1 世代)から得た次世代個体群を I/L 投与群[PA(+)]と非投与群[PA(-)]に分け、4 世代目まで累代飼育を行い、世代毎の卵の受精率と孵化率を計測した。

一方これに関連して、雄生殖組織(精巣及び貯精囊)内の有核・無核精子数の日齢変化を比較した。

(6) クモ類に対する P A 及び P I A 類の化学防御効果

①アサギマダラ及びツمامラサキマダラにおける P A 類の効果

成虫(雌雄)に 1mg の各種 P A 類を経口投与して、翌日以降に、前者に対してはジョロウグモ、後者に対してはオオジョロウグモの捕食行動を数値化して防御効果を評価した。

②リュウキュウアサギマダラにおける P I A 類の効果

ツルモウリンカ飼育成虫(P I A を体内蓄積)及びイヨカズラ飼育成虫(P I A を蓄積せず)に 1mg の各種 P I A 類(塩酸塩)を経口投与して、3 日後にオオジョロウグモあるいはジョロウグモに提示し、捕食行動を数値化して防御効果を評価した。

(7) P A 含有植物中の P A 類の分析

ヨツバヒヨドリの花穂・新芽、スナビキソウ、モンパノキ、スイゼンジナの各花穂をメタノール抽出、分画し、これらに含まれる P A 類を NMR などにより調べた。

4. 研究成果

(1) 生合成前駆体としての P A の化学構造が

発香器官分泌物の生成に及ぼす影響

リュウキュウアサギマダラにおいては、過去の我々の研究で SB と HP は異なった物質を独立して産生し、SB ではダナイドン(DO)を HP ではヒドロキシダナイダール(HD)をそれぞれ分泌することを明らかにしているが、今回の研究で新たに、SB に(-)-viridiflorine β -lactone(VL)の存在することが分かった。本物質はツمامラサキマダラ雄が HP に産生する主要物質の一つであり、進化学的にも重要な発見である。一方、VL は I/L のみから生合成され、ネシン酸部分が前駆体となっていると考えられた。さらに HP での HD は I/L と Re から効率良く生産され、He は全く利用されないことから、ネシン塩基部の 7 位の立体配置が重要であることも判明した。尚、アサギマダラの産生する HD も本種と同様 R 体であることが、光学異性体分離カラムによる GC 分析で明らかとなり、前駆物質となるネシン塩基部の立体配置と完全に一致していることが証明された。

(2) ヘアペンシル(HP)における P A 由来発香器官分泌物の産生機構

アサギマダラにおいては SB と HP 分泌物の成分組成は同じであり、I/L 摂取により DO と HD が生産されるが、両器官を隔離すると HP にはいずれも産生されないことが分かった。様々な実験から、HP での産生には両器官の物理的接触(匂い付け行動)が不可欠であり、DO などはまず SB で生産され、匂い付けの際に SB から HP に移動することが判明した。また、DO は体液を通じて HP に移動することはない。

(3) 配偶行動における発香器官分泌物の機能

3種のマダラチョウのいずれにおいても、I/L 摂取雄の方が優先的に交尾したことから、雄の発香器官分泌物は性フェロモンとして機能することが明らかとなった。特にアサギマダラでは I/L 非摂取雄は殆ど交尾することができず、本種の交尾に P A の摂取は不可欠と考えられた。しかしながら他の 2 種では P A 非摂取雄も 30%程度交尾が可能であったことから、発香器官分泌物の性フェロモン機能は限定的と判断される。従って、分泌物成分は種認識という点からは狭義の性フェロモンとは考えにくく、別の機能が示唆される。

(4) P A の嗅・味受容に関する行動学的、形態学および電気生理学的実験

① P A 類に対する嗅覚的・味覚的選好性とそれらの性差

アサギマダラ雄成虫における I/L, He, Re, Mo に対する嗅覚的選好性に関しては、I/L のみ顕著な誘引性がみられたが、他の P A 類はいずれも忌避性を示した。これはこれまでの常識を覆す知見で、P A の構造と生理機能を明らかにする上で極めて重要である。一方、味覚的選好性に関しても I/L を最も好み Mo などを避けることが分かった。また雌は一般

的にPA類に誘引されないが、アサギマダラでこのことが実証された。しかしながら雌成虫も味覚的にはI/Lを比較的好んで摂取することが判明し、雄には劣るものかなりの味覚的感度を有していることも明らかとなった。この事実はPA摂取の進化起源を探る上で重要な手掛かりとなる。

②嗅受容器の同定と電気生理学応答

雄成虫によるPAの嗅受容に関して、触角、下唇鬚、前脚の中では、意外にも前脚が最も重要な役割を担っていることが判明した。次いで触角もある程度機能していたが、下唇鬚は殆ど役に立っていなかった。前脚附節のSEM観察を行ったところ、先端部約1mmの部位には3種のチョウから類似構造の錐状感覚子が見出された。これらはI/Lに対して顕著な電気生理学的応答を示したことから、嗅(味)受容器としてPAの探索に重要な役割を担っていると考えられる。前脚に嗅受容感覚器が存在することは、前例の無い新知見であり、これまで機能が不明であった雄の前脚の一つの役割が解明された。

③味受容器の同定と電気生理学応答

後脚附節にも味受容器の存在することが分かったが、PAに対する味覚感度は中脚の方が高かった。中脚附節には味受容を司る毛状感覚子が2種類(MST, VST)存在し、これらの外部形態や数およびPA類に対する電気生理学的応答を3種間で比較した。いずれもI/Lに最もよく応答したが、他のPA類への応答は不十分であった。しかし種間差が認められ、PA類に対する選好性を反映しているものと推察された。

(5) PA摂取の繁殖生理への新規な効果

①アサギマダラ雄成虫における交尾行動活性化効果の評価

性フェロモンを保持しない雄個体を用いた競合交尾実験では、I/L摂取群の雄のみが僅か2個体交尾したに過ぎなかったが、これらの雄の方が非摂取雄よりもはるかに活発な求愛行動を示し、統計的にも有意差が認められた($p < 0.01$)。一方、性フェロモンを保持した雄個体を用いた競合交尾実験では、I/L摂取群の雄のみが約60%弱の割合で交尾し(これは実験条件下での通常の交尾率)、非摂取雄では全く交尾は見られなかった。

これらの結果から、本種の雄の交尾において性フェロモンは極めて重要な役割を担うものの、単に性フェロモンを保持しているだけでは不十分で、正常な交尾を行うためにはPAの摂取が不可欠であることを示している。即ち、PA摂取により雄の求愛行動が活性化されると考えられる。このような事例はこれまで全く報告が無く、かれらの薬物食性の進化を考察する上で学術的に極めて重要な知見を提供している。

②リュウキュウアサギマダラにおける卵受

精率と孵化率、及び有核・無核精子数に及ぼすPA摂取の影響

世代毎の卵の受精率と孵化率を測定した結果、第2世代では両群とも同程度の低下が見られたが、PA摂取群では以降概ね一定の値に維持されたのに対して、PA非摂取群では世代を重ねる毎に減少した。またPA非摂取群の第4、5世代では性比以上が顕著であり、雌に著しく偏っていたが、雄生殖組織内の有核・無核精子数の日齢変化には両群間で大差は認められなかった。しかしPA摂取雄は射精後に短期間でより多くの有核精子を準備できることが分かり、PA摂取が雄の多回交尾を促進する可能性が示唆された。これらのことから、PA摂取は雄の繁殖成功に有利に働くと共に、本種はPAを摂取しないと個体群の維持は困難と考えられた。

このようにPAの欠如は本種の繁殖に致命的な累積的悪影響を与えることが判明し、このことも画期的な新知見である。以上のこと(①②)から、PAは性フェロモンの前駆体として利用されるというよりも、生殖に不可欠な物質として利用されるという、PAの新規且つ本質的な機能が明らかとなると同時に、PA摂取の進化起源の解明に大きな一歩を踏み出したと言える。

(6) クモ類に対するPA及びPIA類の化学防御効果

①アサギマダラ及びツマムラサキマダラにおけるPA類の効果

両種のクモは殆どのPA投与個体(雌雄共)に対して強い拒否反応を示し、PA類のクモに対する高い防御効果が証明された。ただ、Mo投与個体ではやや個体差が見られ、防御効果の劣る場合が有った。これは本PAの吸収・代謝に個体差が有ることを示唆している。

②リュウキュウアサギマダラにおけるPIA類の効果

PIA類の投与はPA類ほどではないものの明瞭な防御効果を示した。特にジョロウグモに対してはかなりの有効性が認められた。またクモは初回経験時よりも2度目に経験する場合にはより強い拒否反応を示し、学習経験に基づく防御効果の発現されることが判明した。PIAを含む*Tylophola*属植物を寄主とするマダラチョウの種類は多く、彼らはPAとPIAの2つのタイプの毒物によって防衛されている可能性が高い。

(7) PA含有植物中のPA類の分析

ヨツバヒヨドリの花穂・新芽、スナビキソウの花穂からはIntermedineとLycopsamineが検出され、それらの割合は部位、植物種によりやや異なっていた。しかしモンパノやスイゼンジナの各花穂からはPA類は見出されなかった。

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3件)

1. Hisashi Ômura, Keiichi Honda, Kiyoshi Asaoka, Takashi A. Inoue, Divergent behavioral and electrophysiological taste responses in the mid-legs of adult butterflies, *Vanessa indica* and *Argyreus hyperbius*, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, 57, 2011, 118-126.
2. Keiichi Honda, Hisashi Ômura, Masatoshi Hori, Yohichi Kainoh, Allelochemicals in plant-insect interactions, *Comprehensive Natural Products*, 査読有, II, 2010, 563-594.
3. Tsuyoshi Takeuchi, Keiichi Honda, Early comers become owners: Effect of residency experience on territorial contest dynamics in a lycaenid butterfly, *Ethology*, 査読有, 115, 2009, 767-773.

[学会発表] (計9件)

1. 向井健浩, 松本隼也, 本田計一, 大村尚, マダラチョウが摂取するアルカロイド類(PA, PIA)のクモに対する化学防御効果, 第55回日本応用動物昆虫学会大会, 2011年3月27日, 九州大学
2. 向井健浩, 本田計一, 大村尚, リュウキュウアサギマダラ (IS) におけるアルカロイドの生殖生理機能への影響, 第55回日本応用動物昆虫学会大会, 2011年3月27日, 九州大学
3. 松本隼也, 鶴田義明, 本田計一, 大村尚, アサギマダラ雄成虫のピロリジジンアルカロイド摂取による配偶行動活性化とヘアペンシル (HP) におけるダナイドン (DO) の生成機構, 第55回日本応用動物昆虫学会大会, 2011年3月27日, 九州大学
4. 吉岡弥生, 本田計一, 中田まり子, 大村尚, マダラチョウ雄成虫のピロリジジンアルカロイドに対する化学感覚器応答, 第55回日本応用動物昆虫学会大会, 2011年3月27日, 九州大学
5. 本田計一, 松本隼也, 大村尚, アサギマダラの配偶行動とアルカロイド, 第57回日本鱗翅学会大会, 2010年10月31日, 東京大学
6. 本田計一, 中田まり子, 吉岡弥生, 大村尚, アサギマダラ雄成虫のアルカロイド受容化学感覚器と電気生理応答, 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
7. Keiichi Honda, Mariko Nakata, Hisashi Ômura, Differential Chemosensory

Perception of Pyrrolizidine Alkaloids by the Male Danaine Butterfly, *Parantica sita*, 5th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 28 Oct 2009, Honolulu, USA

8. 本田計一, アサギマダラの化学生態学, 日本鱗翅学会アサギマダラシンポジウム, 2009年5月10日, 大阪市立自然史博物館

9. 中田まり子, 本田計一, 大村尚, アサギマダラ成虫のピロリジジンアルカロイド類に対する嗅覚応答, 第53回日本応用動物昆虫学会大会, 2009年3月30日, 北海道大学

[図書] (計1件)

1. Keiichi Honda, Nova Science Publishers, Inc., *Insect Physiology: New Research*, 2008, 73-118.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/honce/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 計一 (HONDA KEIICHI)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 00238809

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: