

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06723

研究課題名(和文) チョウ類の表現型可塑性の生理・生態学的機能の解析

研究課題名(英文) Physiological and ecological functions of phenotypic plasticity in butterflies

研究代表者

山中 明 (Yamanaka, Akira)

山口大学・大学院創成科学研究科 教授

研究者番号：20274152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：各種チョウ類の成虫の翅の表現型可塑性に関する生理学的な解析を行った。成虫の鱗粉形状および季節型発現機構は、脳由来の神経内分泌因子によって調節されていた。成虫の毛状鱗粉形成は、種特異的なもので、変化しない種もあることが示唆された。季節型がないとされたムラサキシジミ成虫には、腹側後翅の色彩パターンに変化が見られ、秋型と夏型があることが判明した。各種チョウ類の幼虫や蛹の表現型可塑性の検討を行い、環境要因によって幼虫および蛹の体色が変化し、一部の種において神経内分泌因子がその調節に関与す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

チョウ類の成虫の翅の表現型可塑性として、鱗粉構造や色彩パターンを種特異的に季節に応じて変化させ、その制御に神経内分泌因子が関与していることが示唆された。予期せず、ムラサキシジミ成虫の翅には季節型があることも判明した。幼虫および蛹体色発現についても種特異的に異なる環境要因によって体色変化を誘導しており、種の多様性を知る上で学術的な意義がある。「なぜ、野外の季節・環境変化の違いにより、色彩や他の形質を変化させる必要があるのか？」との、誰もが不思議に思う問いに対する生理学的な仕組みの一部が解き明かされたことは社会的意義がある。本研究は、各種チョウ類の生存戦略・進化多様性の解明への手掛かりとなる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the physiology of adult wing phenotypic plasticity in various butterflies. Adult scale shape and seasonal phenotypic expression mechanisms were modulated by brain-derived neuroendocrine factors. Scale formation of an adult was species-specific, suggesting that some species do not change. Adults of *N. japonica*, which had been assumed to have no seasonal type, showed a change in the color pattern of the ventral hindwing, indicating the presence of an autumnal and a summer type. Phenotypic plasticity of larvae and pupae of various butterfly species was examined, suggesting that environmental factors alter larval and pupal body coloration and that neuroendocrine factors are involved in its regulation in some species.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：表現型可塑性 チョウ類 季節型 幼虫体色 蛹体色 鱗粉 環境要因 神経内分泌因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、チョウ類の表現型可塑性の生理生態学的意義の解明を目的とする。ある種のチョウ類の幼虫・蛹・成虫は、季節あるいは生息環境に応じて色彩や形態を変化させる表現型可塑性をもつ。翅の色彩変化はチョウ類の代表的な表現型可塑性の例であり、季節型と呼ばれる。この翅の季節型変化は、蛹期に脳から夏型ホルモンが分泌されるか否かで決定される。申請者は、最近、季節型の有無に関わらず、ある種では、体の各部に生じるうろこ状の鱗粉を毛状の鱗粉(毛状鱗粉)に変化させ、その数をも変化させていること、黒色タイプのジャコウアゲハでは、鱗粉を毛状にするのではなく、鱗粉細胞の構造そのものを季節に合わせて変化させたり、ムラサキシジミでは、季節によって複眼の色彩を変化させていることを見出してきた。本研究では、これらの形質変化が、なぜ必要なのか?ということ、内分泌学的・生態学的な側面から解明することを目指す。

### 2. 研究の目的

研究の目的は、「なぜ、チョウ類は、野外の季節・環境変化の違いにより、色彩や他の形質を変化させる必要があるのか?」、つまり、幼虫・蛹・成虫の表現型可塑性の生理学的な仕組みと生態学的な知見とを統合することで、それぞれの種に特有な生活環における詳細な季節・環境適応機構を内分泌学的・生態学的に解明することとチョウの進化多様性を見出すことにある。

### 3. 研究の方法

#### (1) チョウ類の成虫の毛状鱗粉あるいは鱗粉形状の解析

サカハチチョウ成虫の春型および夏型成虫を用い、実体顕微鏡下で翅および脚における毛状鱗粉の違いがあるかを調査した。ジャコウアゲハにおける休眠性の異なる長日休眠蛹から羽化した成虫と春型および夏型成虫の上層鱗の指状突起の数の比較を行った。さらに、走査型電子顕微鏡を用いて本種の鱗粉の微細構造を観察した。鱗粉の微細構造の変化が神経内分泌因子が関与するかを調べるため、脳抽出液を休眠蛹に投与し、羽化した成虫の鱗粉構造をSEM観察した。モンキアゲハ雌成虫を用い、非休眠蛹および休眠蛹から羽化した夏型および春型雌成虫の右前翅第7室に存在する黄色鱗粉に着目し、その鱗粉の指状突起数の違いを指標として、夏型と春型間での黄色鱗粉構成を比較した。

#### (2) 成虫の季節型に及ぼす環境要因あるいは神経内分泌因子の影響

ムラサキシジミ、ウラギンシジミ、ルリタテハおよびゴマダラチョウを材料に、幼虫期を長日条件で飼育して得られた成虫と、幼虫期を短日条件で飼育し得られた成虫の翅を比較した。成虫の翅の色彩パターン、翅の形状、腹部の色彩パターンの形態観察により、季節型の違いを指標化し、日長・温度条件の違いにより、各表現形質の指標から季節型の判定を行った。各種チョウ類の蛹から摘出した脳より調製した2% NaCl 画分を短日蛹に投与し、投与された蛹から羽化した成虫の翅の変化を調べた。

#### (3) 幼虫あるいは蛹体色の発現調節機構の解析

ウラギンシジミ幼虫は、LD25 および SD18 条件下でフジ類の花・若葉を与えて飼育し、2 齢、3 齢および 4 齢期の幼虫の体色を記録するため、3 齢 day0 に達する前日または 2 日前の 2 齢幼

虫、4 齢 day0 に達する前日または 2 日前の 3 齢幼虫、および前蛹期に達する前日または 2 日前の 4 齢幼虫の背側の体色は、デジタルカメラで撮影し、画像から幼虫の体色の分類を行った。

ウラギンシジミ、ナガサキアゲハ、シロオビアゲハ、モンキアゲハおよびクロアゲハの老熟幼虫を異なる蛹化面にて蛹化させ、その時の環境要因が蛹化後の蛹体色発現にどのような影響を及ぼしているかを調査した。蛹体色の発現に神経内聞発因子が関与しているかを調べるため、幼虫の Br-SG-TG<sub>1</sub> 連合体および TG<sub>2,3</sub>-AG<sub>1-7</sub> 連合体より調製した 2% NaCl 画分を結紮前蛹腹部に投与し、結紮腹部体色の変化の応答性を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 成虫の毛状鱗粉あるいは鱗粉形状の解析

サカハチチョウ成虫の春型および夏型成虫を材料に、実体顕微鏡下で翅および脚における毛状鱗粉の違いがあるかを調査した結果、季節型の違いに依る翅および脚における毛状鱗粉の差が認められなかった。

ジャコウアゲハの翅の中央の鱗粉では鱗粉表面の横梁という構造が夏型の方が春型に比べ、少なかった。一方、翅室の中央や縁に存在する黒色鱗粉ではその差は見られなかった。ジャコウアゲハの季節型の違いによる指状突起の数や微細構造の変化について、Br-SG 複合体に含まれる内分泌調節因子が分泌されることによってもたらされている可能性が、脳粗抽出液投与実験の結果より示唆された。

モンキアゲハ雌成虫に翅の表現型可塑性に関する詳細な報告はなく、夏型と春型間での黄色鱗粉構成を比較した。その結果、右前翅第 7 室に生じた黄色鱗粉の総数は夏型と春型間で有意差はみられなかったが、各指状突起数をもつ黄色鱗粉の割合が異なっていた。つまり、モンキアゲハ雌成虫の前翅の黄色鱗粉の形成過程には、休眠性の違いに依存する生理的な調節機構が関与していることが示唆された。

##### (2) 成虫の季節型発現解析

ムラサキシジミの成虫は、季節的な変化に応じた翅の色彩パターンの変化、いわゆる季節型がない種であると考えられてきた。今回、幼虫期を長日条件で飼育して得られた成虫と、幼虫期を短日条件で飼育して得られた成虫の翅を比較した結果、下翅腹側の色彩に違いがみられたため、その違いから夏型様成虫と秋型様成虫に区別することができた。季節型発現の調節に、脳由来の内分泌因子が関与しているかを除脳実験により検討した結果、ムラサキシジミ長日蛹は蛹化 0 日目の除脳では翅の色彩を変化させないが、蛹化 1 日目の除脳によってその成虫が秋型化した。一方で、夏型ホルモンがほとんど分泌されないはずの短日蛹の蛹化 0 日目の除脳によってその成虫が夏型化した。これら結果から、ムラサキシジミの季節型発現に脳由来の内分泌調節因子が関与しているが、従来のような夏型ホルモンの分泌調節とは異なり、秋型化を促す因子が分泌されている可能性が示唆された。

野外で採集したウラギンシジミ幼虫を、短日 18°C (SD18)、20°C (SD20) および 25°C (SD25) 条件下で飼育し、蛹化後も同一条件で維持した。羽化した成虫の前翅の形状により季節型を分類した。その結果、SD18 由来の成虫および SD20 由来の成虫は秋型に分類された。一方、SD25 由来の成虫は夏型および中間型に分類された。このことから、短日条件下であっても、幼虫-蛹期に経験した温度条件に応じて、成虫の翅の形状に影響が生じる特性を持っていることが示唆された。

ルリタテハ成虫の翅の色彩には夏型と秋型と呼ばれる季節型が存在する。今回、その季節型発

現調節に神経内分泌因子が関与するかを調査した。その結果、脳粗抽出液の投与個体より羽化した成虫の翅の白状紋の面積は、対照群よりも大きくなり、夏型化した。さらに、成虫の各部位を詳細に検討した結果、中脚と後脚の跗節における鱗粉の色彩は、脳粗抽出液投与群において黄褐色に変化し、夏型化した。以上より、ルリタテハの脳内には成虫の夏型化を促す夏型ホルモン様が存在し、翅だけでなく脚の色彩変化をもコントロールしていることが明らかとなった。

ゴマダラチョウの成虫は、翅の色彩パターンとして春型および夏型の季節型2型を示す。しかし、本種は幼虫で越冬するため、成虫の季節型発現調節に関する研究報告はない。今回、翅の季節型を決定する環境条件の検討、翅以外の部位において春型と夏型を明瞭に区別しうる表現形質を探索した。その結果、幼虫を長日 25℃条件下で飼育した時、すべての羽化成虫の翅は夏型となった。短日 18℃条件下において、ほとんどの幼虫は4齢脱皮後の14~40日目の間に越冬態に変化した。一部の幼虫は越冬態に変化することなく蛹化した。その一部は成虫となり、それらの翅はすべて春型となった。各条件下の羽化成虫を比較した結果、翅以外に腹部体色の黒色度合に顕著な差が認められた。越冬態幼虫を30日間の低温処理(5℃・暗所)をした後、長日 25℃条件下で起眠させた。起眠幼虫を長日 25℃及び 18℃条件下で飼育し、成虫を得た。その結果、長日 25℃飼育個体群の成虫の翅は夏型であったが、腹部は春型の表現形質が現れた。一方、長日 18℃飼育個体群では翅、腹部ともに春型の表現形質が現れた。春型形質の発現には、若齢期の短日の経験と5齢期以降の低温が必要であることが分かった。また、5齢期に達した起眠幼虫を25℃から18℃条件下に入れ替えた場合のみ、羽化成虫の翅と腹部は春型となった。長日 25℃飼育個体の除脳実験の結果、羽化成虫は腹部の形質のみが春型に変化した。つまり、本種成虫の表現形質の発現には、複数の内分泌因子が関与している可能性が示唆された。

モンキアゲハ雌成虫に翅の表現型可塑性に関する詳細な報告はないため、今回、非休眠蛹および休眠蛹から羽化した夏型および春型雌成虫の右前翅第7室に存在する黄色鱗粉に着目し、その鱗粉の指状突起数(0、2、3、4)の違いを指標として、夏型と春型間での黄色鱗粉構成を比較した。その結果、右前翅第7室に生じた黄色鱗粉の総数は夏型と春型間で有意差はみられなかったが、各指状突起数をもつ黄色鱗粉の割合が異なっていた。つまり、モンキアゲハ雌成虫の前翅の黄色鱗粉の形成過程には、休眠性の違いに依存する生理的な調節機構が関与していることが示唆された。

### (3) 幼虫あるいは蛹の体色発現の解析

ウラギンシジミにおいて、孵化後の1齢幼虫の体色は、幼虫の飼育条件の違いおよび餌の種類に関わらず、すべて緑色型に分類された。食草であるフジの可食部位が赤褐色あるいは赤紫色を呈していると、幼虫の体色は赤紫色型に誘導されやすいと示唆された。さらに、ノダフジの赤色および黄色をわずかに呈した白色の花、ヤマフジの黄色をわずかに呈した白色の花、およびナツフジの淡黄白色の花を与えて飼育された幼虫の体色は、中間色型および白色型といった体色の薄い赤紫色型幼虫が出現する可能性があるとして示唆された。また、幼虫期の環境温が低いと、幼虫の体色は赤紫色型に誘導されやすいと示唆された。

ウラギンシジミの蛹の体色には色彩多型が存在し、今回、本種の蛹体色多型を生じさせる環境要因の検討を行った。その結果、LD25蛹の体色は、SD18蛹の体色よりも淡緑色化した個体が多く生じた。次に、蛹化場所の背景色の違いが蛹体色に与える影響を検討した。LD25およびSD18老熟幼虫を全明および全暗とした黒色および白色背景条件下で蛹化させた。その結果、光および温度条件に依らず黒色背景条件下において、多くの蛹体色は濃緑色型に分類された。全明の白色背景条件下において、LD25蛹の多くは淡緑色型に分類された。続いて、ワンダリング

期以降の透過光を黄色光かつ背景色も黄色として、LD25 老熟幼虫を LD25、全明 25 および全暗 25 条件下で、SD18 老熟幼虫を SD18、全明 18 および全暗 18 条件下で蛹化させた。その結果、蛹化するまで LD25 全暗、SD18 および SD18 全暗条件下にあった個体の一部において濃緑色型に分類される蛹が生じた。この結果から、前蛹期において黄色背景色および透過光を感受できる時期が、SD18 個体では、前蛹初期（ワンダリング期）の間における暗期開始前後に存在する可能性が示唆された。

ナガサキアゲハの蛹の体色は、LD25 個体では、光の有無に関わらず直径の小さい円柱面および滑らかな平面上では緑色型になった。しかし、直径の大きい円柱面および粗い平面上で蛹化した LD25 個体は褐色型となった。全暗条件下の LD25 個体は、全明条件下の個体よりも粗らさ（粒度）の違いをより敏感に認識していることも示唆された。全明条件下において、SD18 個体は蛹化面の直径が小さいと緑色型に、一方、蛹化面の性状によらず直径が大きいと褐色型となることがわかった。蛹体色変化を誘導する神経内分泌因子の関与を検討した結果、ナガサキアゲハ幼虫の脳神経節連合体に、蛹体色を褐色化させる因子が存在していることが明らかとなった。

南方系のシロオビアゲハの蛹体色に影響する環境要因を調べた結果、幼虫期の短日低温経験もしくは蛹化時の低温によって褐色型の誘導が促進される可能性が示唆され、本種の蛹体色の決定には、光の有無や幼虫期からの温度および日長が複合して影響を与えることが示唆された。さらに、蛹体色の褐色化を誘導する内分泌因子がシロオビアゲハ 5 齢幼虫の脳神経節に存在するかを検討した結果、結紮腹部の褐色化を促進する活性が各種脳神経節から調製された 2% NaCl 水溶液画分および、TG<sub>2,3</sub>-AG<sub>1-7</sub> 連合体から調製された 80% エタノール画分において認められた。

モンキアゲハの非休眠蛹の体色は緑色型と褐色型が存在し、基本型は緑色型である。蛹の脳抽出液を結紮前蛹腹部に投与した結果、Br-SG-TG<sub>1</sub> 連合体由来の画分を投与した短日結紮前蛹腹部は、濃度依存的に褐色化度が高くなり、TG<sub>2,3</sub>-AG<sub>1-7</sub> 連合体由来の画分を投与した個体では、25 頭相当量以上の濃度で褐色化が高くなったことから、神経内分泌因子が蛹表皮を褐色化させていることが示唆された。

クロアゲハの短日飼育個体における蛹体色の環境応答性を調べた。老熟幼虫を、4 種の粗滑面（プラスチック板、キッチンペーパー、サンドペーパー #40 および段ボール）で蛹化させた結果、短日飼育個体が滑面であるプラスチック板上で蛹化した場合、蛹の体色は緑色型となり、その他の粗面条件下で蛹化した蛹の体色は褐色型となった。本種の短日飼育個体は、蛹化面が粗くなるほどより褐色化度の高い蛹体色になることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内 惇生, 大野 瑠璃, 北沢 千里, 山中 明
2. 発表標題 ウラギンシジミの蛹体色と環境要因の関係性について
3. 学会等名 2023年度 生物系三学会 中国四国地区合同大会（徳島大会）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 仲村 実紅乃, 山内 惇生, 北沢 千里, 山中 明
2. 発表標題 山口市内に生息するウラギンシジミ成虫の季節型発現に及ぼす日長と温度の影響
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 山内 惇生, 大野 瑠璃, 北沢 千里, 山中 明
2. 発表標題 ウラギンシジミの蛹体色発現に及ぼす環境要因の影響
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 田中宏明, 北沢 千里, 山中 明
2. 発表標題 ルリタテハ成虫の季節型発現調節機構について
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会（例会）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 田中星丞, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ゴマダラチョウの季節型発現における環境要因の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会(例会)
4. 発表年 2023年~2024年

1. 発表者名 仲村実紅乃, 大野瑠璃, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ウラギンシジミ成虫の越冬能と季節型の関係
3. 学会等名 2022年度中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内惇生, 大野瑠璃, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ウラギンシジミにおける幼虫体色と環境要因の関係性について
3. 学会等名 2022年度中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野翔也, 小島渉, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ナガサキアゲハにおける蛹体色発現調節機構について
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山城友孝, 仲村実紅乃, 上野翔也, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 シロオビアゲハの短日飼育個体における蛹体色発現について
3. 学会等名 生物系3学会中国四国地区合同大会 第73回(社)日本動物学会中国四国支部島根大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尼崎響子, 馬場彩樺, 高橋洋平, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 モンキアゲハにおける蛹体色発現に及ぼす環境要因の影響
3. 学会等名 生物系三学会 中国四国地区 合同大会 2021年度 香川大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野翔也, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ナガサキアゲハの蛹体色発現に及ぼす環境要因の影響
3. 学会等名 生物系三学会 中国四国地区 合同大会 2021年度 香川大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野翔也, 吉松友祈野, 北沢千里, 山中明
2. 発表標題 ルリタテハ成虫における季節型発現調節について
3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野翔也, 吉松友祈野, 尼崎響子, 馬場彩樺, 大野瑠璃, 前田瑞生, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ルリタテハ成虫の脚にみられる色彩2型の調節機構
3. 学会等名 2021年度 中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野翔也, 山城友孝, 小島 渉, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ナガサキアゲハの蛹体色調節機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第61回講演会(例会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田瑞生, 大野瑠璃, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 ムラサキシジミ成虫の季節型発現の調節機構について
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会 2020(オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清永晋平, 馬場彩樺, 前田瑞生, 北沢千里, 山中 明
2. 発表標題 休眠性の異なる蛹から羽化したジャコウアゲハ成虫の鱗粉形状の比較解析
3. 学会等名 令和2年度西日本応用動物昆虫研究会・中国地方昆虫学会合同例会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------