

機関番号：16401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780048

研究課題名 (和文) 日本産アゲハチョウと寄主植物との共進化の化学的解明：アオスジアゲハの産卵刺激物質

研究課題名 (英文) Chemical study on the co-evolution between the Papilionidae butterflies and their host plants in Japan: oviposition stimulants for *Graphium sarpedon nipponum*.

研究代表者

手林 慎一 (TEBAYASHI SHINICHI)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授

研究者番号：70325405

研究成果の概要 (和文)：本研究ではアオスジアゲハの産卵刺激物質を単離・同定し、日本産アゲハチョウ亜科のチョウと寄主植物の共進化における化学物質の役割の体系的な研究を完成させることを目的とした。その結果、産卵行動を刺激するには Chlorogenic acid、3-O-Glu-Quercetin が必要であることを解明し、ジャコウアゲハ族の産卵刺激物質より真正アゲハ族のそれらに近いことを解明することで、アゲハチョウの食草進化に植物に含まれる化学物質が深く関与していることを証明した。

研究成果の概要 (英文)：It was revealed that chlorogenic acid and quercetin-3-O-glucoside, which are identified as parts of feeding stimulants for larva of *Graphium sarpedon nipponum*, displayed oviposition stimulant for adult female butterflies. Results proved that the chemical contained in the host plants deeply took part in co-evolution between swallowtail butterflies and their host plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用昆虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：寄主選択、食草進化、産卵刺激、摂食刺激、誘引、アオスジアゲハ、Chlorogenic acid、Quercetin-3-O-glucoside

1. 研究開始当初の背景

地球上には多種多様な生物が存在し、その食餌行動もまた様々である。そのような中、特定の昆虫グループとその寄主植物との関係を調べると、お互いに影響しながら進化してきた共進化の結果を見ることができる。特にアゲハチョウ科に属するチョウの族ごとの食草は、アゲハチョウ科のチョウの進化に

とよく一致しており、さらに寄主植物の範囲が比較的狭いことから昆虫と寄主植物との共進化を考察する上で極めて良好なモデルケースとなっていた (図1)。

昆虫の寄主植物は成虫の産卵行動と幼虫の摂食行動の両方により決定されるが、アゲハチョウのように幼虫の移動範囲が限られる場合には、特に成虫の産卵行動が重要な

る（図2）。

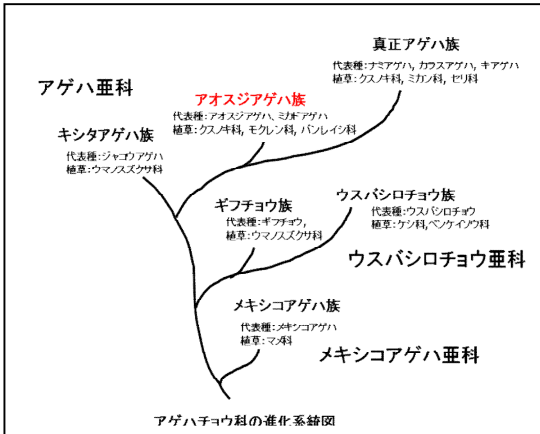


図1. アゲハチョウの進化系統図と食草

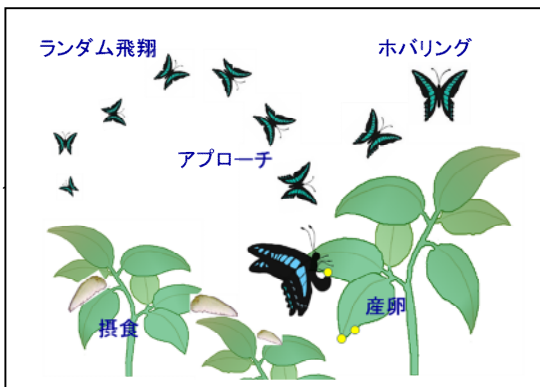


図2. アゲハチョウの寄主選択プロセス

またアゲハチョウの産卵行動は寄主植物に含まれる化学物質に制御されることが知られており世界的に研究が行われている。現在チョウ類の寄主選択に関する研究は日本が世界をリードしており、特に京都大学のグループと広島大学のグループにより日本産アゲハチョウの産卵刺激物質に関する研究が精力的に進められていた（図3）。

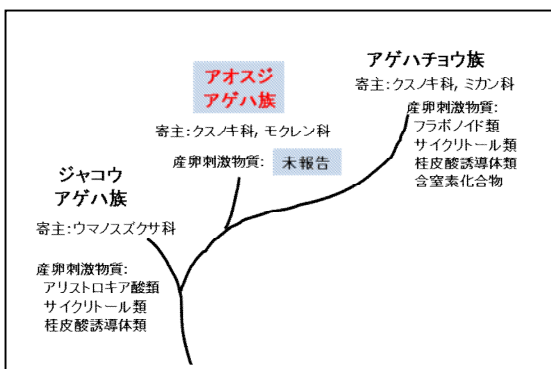


図3. アゲハチョウ亜科の代表的寄主植物と既同定の産卵刺激物質

これまでの研究を概略すると以下のようになる。

- I ジャコウアゲハ族はウマノスズクサ科を寄主とし、アリストロキア酸類、サイクリトール類、桂皮酸誘導体類を産卵刺激物質としている。
- II アゲハチョウ族はクスノキ科やミカン科を寄主とし、フラボノイド類、サイクリトール類、桂皮酸誘導体類、含窒素化合物類を産卵刺激物質としている。
- III ジャコウアゲハ族とアゲハチョウ族ではサイクリトール類、桂皮酸誘導体類を共通に利用しているが、フラボノイドや含窒素化合物など異なる化合物群も存在する。

これらの知見を見出し、産卵刺激物質がアゲハチョウと寄主植物の共進化において道しるべの役割を果たしてきた可能性を呈示した日本の研究成果には、世界から高い評価が与えられていたが、2族の中間に位置するアオスジアゲハ族の産卵刺激物質に関する研究は行われておらず、世界中からその解明が待ち望まれていた。このような研究背景のもとアオスジアゲハの産卵刺激物質の解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

日本には二種のアオスジアゲハ族、即ちアオスジアゲハとミカドアゲハが生息しているが、ミカドアゲハは希少種であることから研究の遂行が困難であり、産卵刺激物質の中間報告はなされているものの最終報告は未だに無い。アオスジアゲハは普通種であるものの、交尾・産卵に極めて大きな空間が必要であり、通常は人工的に産卵を促すことは不可能であった。しかし、高知大学農学部のキャンパス内外にはクスノキが約250本植林されており、キャンパス内は極めてアオスジアゲハの生息密度の高い地帯となっている。申請者はこの地の利を生かし高知大学に赴任以来アオスジアゲハの寄主選択に関する研究を行ってきた。その結果、現在までに以下の事象が判明した。

1. 産卵対象について

- ・濾紙および造花などに対してはドラミングおよび産卵行動を行わない。
- ・クスノキの新梢に対してはドラミングおよび産卵行動を行う。

2. 供試アオスジアゲハについて

- ・室内で人工飼育し羽化した個体はハンドペアリング後もクスノキに産卵しない。
- ・野外で移動中、吸蜜のために訪花中の個体はクスノキに産卵しない。
- ・ホバリングしながらクスノキに産卵中の個体は網室内でもクスノキに産卵する。
- ・ホバリングを一旦、妨害すると二度と網室内では産卵しない。

以上の知見に基づき、次の方法でアオスジア

ゲハにクスノキ葉抽出物に対して産卵させることに成功した。

すなわち野外で捕獲したアオスジアゲハを用いて産卵行動を実験室的に再現する生物試験方法を開発し、アオスジアゲハにクスノキ葉抽出物を塗布した擬似植物に産卵させることに成功している。そこで本研究ではこの生物試験系を指標としてクスノキ葉に含まれるアオスジアゲハの産卵刺激物質を精製・単離し、その構造を分子レベルで解明することを最重要課題とする。さらにその産卵刺激物質のクスノキ近縁種における分布を調査し、アオスジアゲハの寄主植物と産卵刺激物質の相関関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

3-1: 生物試験方法

高知大学物部キャンパス内に設置した網室から徒歩2分以内の範囲内で以下の条件に合致するようにアオスジアゲハ雌成虫を捕獲し生物試験に供した。

- A. クスノキに接近し、クスノキ上でホバリング状態のアオスジアゲハを捕獲する。
- B. ホバリングを継続させたままアオスジアゲハを移送し速やかに網室内に放飼しホバリングの継続を確認する。
- C. 網室内の高さ 1.8m の地点にクスノキ新鞘を設置し、アオスジアゲハによる産卵行動を確認する。

3条件をクリアしたアオスジアゲハ個体に対して以下の処理を行った擬似産卵基質提示しアオスジアゲハの産卵行動を観察した。すなわち予め透明接着剤で表面を完全にコーティングしたクスノキ新鞘を、試料物質を溶解させた5%寒天ゲルでさらにコーティングし試料とした。

擬似産卵基質の下にろ紙(90度扇形、半径5.5cm)を挿入したサンプル瓶(1mL)をつるした。ろ紙にはあらかじめ試料を塗布することで誘因試験をおこなった。

3-2: 触角電図試験 (EAG)

野外で捕獲したアオスジアゲハ成虫の触角を頂部より約2.0cmの部位で剃刀を用いて切断しプローブ部に接続した。プローブとして Syntech 社製(Hilversum, The Netherlands)プローブ (Type PRG-2)を用い、専用ジェル(Spectra 360 electrode gel, Parker, Orange, NJ, USA)により触角断片を固定した。プローブは IDAC-4 に接続し電位を計測した。試料は CS-01 stimulus air controller を用いて定法により触角断片に導入し得られたシグナルは PC にて記録した。

3-3: 揮発性成分の捕集と分析

大型デシケータ (20 L) にクスノキ新梢 (約 40 g) をいれ Orbo™100 tube (350/175 mg

carbotrap, 7 mm i. d., 110 mm length; Supelco Inc., USA) を接続し、水流アスピレーターを用いて空気を吸引することでクスノキ由来の揮発性成分を Orbo™100 tube に吸着させた。新梢は1日ごとに交換し、吸着された成分はジエチルエーテルで溶出した。得られた試料は EAG および GC, GCMS 分析に供した。

3-4: クスノキ葉抽出と精製

高知大学物部キャンパス内で採取したクスノキ新梢をメタノールに浸漬し、得られた抽出液を試料とした。粗抽出液は濃縮後 ODS カラムクロマトで精製し水画分、20%MeOH 画分、40%MeOH 画分、100%MeOH 画分に分画した。

3-5: 使用機器

核磁気共鳴スペクトルは Jeol JNM-AL400 (日本電子) を用いて内部標準としてテトラメチルシラン (TMS) を利用した。ガスクロマトグラフィーは HEWLETT PACKARD HP6890 series GC System に HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane: 30m×0.32mm×0.25μm Film Thickness) を設備し、キャリアガスとして He を用い、水素炎検出器にて化合物を検出した。質量分析は JEOL JMS-600W (日本電子) に HEWLETT PACKARD HP6890 を接続し化合物を導入し、電子衝撃法 (70eV) で分析した。高速液体クロマトグラフィーは Shimadzu LC-10AD システムに InertsilODS (4.6mmΦ×50mm) を設備し分取を行った。

4. 研究成果

4-1 揮発性産卵刺激物質の解明

アオスジアゲハの雌雄の触角はクスノキ新梢から得られた揮発性成分に対して EAG 応答を示した。そこで個々の試料を濃縮し GC-EAD で分析すると、二つのピーク (Rt=15.65, 19.89 min) に対して EAG 応答を示した (図4)。

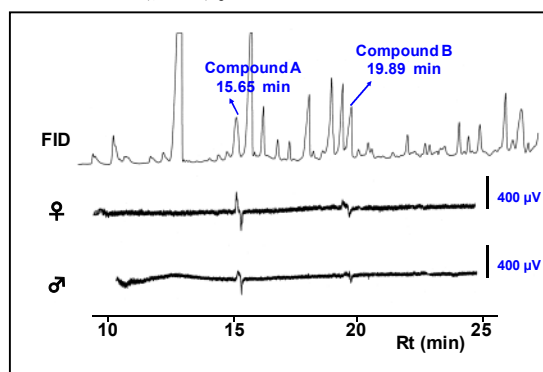


図4. アオスジアゲハ雌雄の触角によるクスノキ香気成分の GC-EAG クロマトグラム

次にこれらを GC-MS で分析すると図5に示すスペクトルが得られ、分子イオンピークは観察されなかったものの、脱 H₂O、脱カルボニル、McLafferty 開裂による m/z = 124, 114,

98 および $m/z = 138, 128, 112$ が観測されたことから 2 化合物が脂肪族アルデヒドであることが示唆された。最終的に標準物質を用いた co-chromatography により活性物質を nonanal と decanal の 2 化合物と同定した。

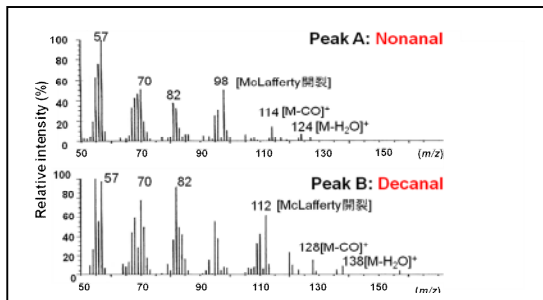


図 5. 2 化合物の MS スペクトル

さらに野外誘因試験を行うと nonanal と decanal の双方ともに雌雄に対して誘因活性を示し、雄に比べ雌への誘因効果が高かった。さらに 2 化合物を混合すると単独よりも高い誘因活性を示すことが判明した。

以上のことから nonanal と decanal をクスノキ由来のアオスジアゲハの誘因物質として同定した。さらに雄よりも雌に対して強い誘因活性を示すことから産卵行動を刺激する物質であると考えられた。

4-2 不揮発性産卵刺激物質の解明

クスノキ新梢のメタノール抽出物を濃縮後に、水とヘキサンを用いた液液分配分画により水層と有機層に分画し、両画分の産卵刺激活性を測定すると水層にのみ活性が確認された。そこで水層を ODS カラムにより精製し 4 画分 (100% H_2O 画分、20%MeOH- H_2O 画分、40%MeOH- H_2O 画分、100%MeOH 画分) に分画しそれぞれ単独での産卵刺激活性を測定したがいずれの画分にも活性は確認されなかった。そこで任意の 3 画分を混合し活性を測定すると 100% H_2O 画分および 20% MeOH- H_2O 画分、100%MeOH 画分の 3 画分の混合物に活性が確認された。これらの画分はアオスジアゲハ幼虫の摂食刺激物質が含まれる画分に一致していたことから、アオスジアゲハ幼虫の摂食刺激物質である Sucrose, Chlorogenic acid (GA) と 3-*O*-Glu-Quercetin (3GQ) (図 6) の産卵刺激活性を評価した。その結果 GA と 3GQ の 2 化合物混合試料および Sucrose, GA, 3GQ の 3 化合物混合試料の両方に産卵刺激活性が確認された。3 化合物混合画分の産卵刺激活性は 2 化合物混合の産卵刺激活性よりも強かったものの両試料間に有意差は確認されなかった。

以上のことから Chlorogenic acid と 3-*O*-Glu-Quercetin をアオスジアゲハ雌成虫のクスノキ由来の産卵刺激物質として同定した。

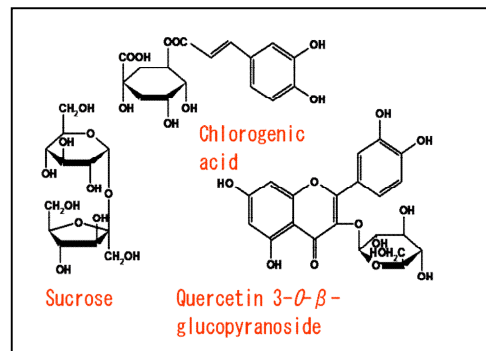


図 6. クスノキ葉に含まれるアオスジアゲハ幼虫の摂食刺激物質

4-3 食草進化における化学物質の役割

アオスジアゲハ雌成虫の産卵刺激物質として同定された Chlorogenic acid (GA) と 3-*O*-Glu-Quercetin (3GQ) のアオスジアゲハの寄主植物および真正アゲハ族チョウの食草植物、食草関係のない植物における分布を調査した。その結果含有量に差はあるものの 3GQ は調査したすべての植物で検出された一方、GA は寄主・非寄主を問わず一部の植物のみに含まれることが判明した (図 7)。

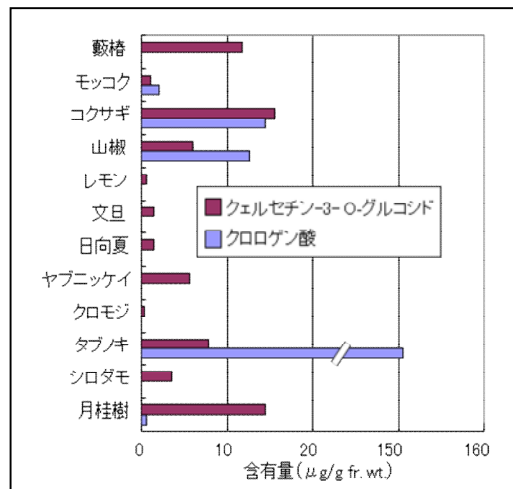


図 7. 寄主植物および非寄主植物の葉中の Chlorogenic acid と 3-*O*-Glu-Quercetin の含有量

この結果からアオスジアゲハの主要な寄主であるタブノキやクスノキには多量の GA が含まれる一方、ヤブニッケイやシロダモ、月桂樹にはごく少量の GA が含まれ寄主選択に一定の貢献しているものと考えられた。また寄主植物とされているクロモジから GA は検出されなかったがこれが品種や採集時期によるものと考えられ今後の追及が必要と考えられた。一方、非寄主であるコクサギや山椒には十分量の GA および 3GQ が含まれたがこれら 2 種の植物は芳香性の極

めて強い植物でありこれらの芳香成分あるいはその他の未知の成分が産卵活性を阻害しているものと推測された。またモッコクに見出された現象も同様の要因に起因するものと考えられた。このように産卵刺激物質や摂食刺激物質が含まれているにも関わらず寄主植物として利用されない植物が存在する事実は、カイコガにおける同様の研究と同じく、摂食あるいは産卵活性物質の活性を阻害する化学物質を含有しない植物に限られているためと推測される。

また、本研究により3GQに比べてGAは含有している植物に限られることが判明した。このことは食草選択においてGAの存在が食草選択の適否を決定づける要因になりやすいことを示す。さらにジャコウアゲハ族、真正アゲハ族の両族が産卵刺激物質として桂皮酸誘導体やサイクリトールを利用している事実と、両化合物群の縮合生成物であるクロロゲン酸をアオスジアゲハが産卵刺激物質として利用している事実とを総合的に考察すると、アゲハチョウ亜科のチョウは食草選択のカギとして桂皮酸誘導体およびサイクリトールを利用しながら進化してきたものと考察することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Li, J., Wakui, R., Horie, M., Nishimura, Y., Nishiyama, Y., Ikeno, Y., Tebayashi, S., Kim, C.-S. Feeding stimulant in *Cinnamomum camphora* for the common bluebottle, *Graphium sarpedon nipponum* (Lepidoptera: Papilionidae). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 査読有 65 C (9-10), pp. 571-576, 2010.
- ② Li, J., Wakui, R., Tebayashi, S.-I., Kim, C.-S. Volatile attractants for the common bluebottle, *graphium sarpedon nipponum*, from the host, *cinnamomum camphora*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 査読有 74 (10), pp. 1987-1990, 2010.

[学会発表] (計4件)

- ① Shinichi Tebayashi, Ryu Wakui, Masanori Horie, Yoshichika Nishimura, Yoshihide Nishiyama, Yasunori Ikeno, Chul-Sa Kim, Li Jing; Host selection of a Lauraceae-feeding swallowtail butterfly (*Graphium sarpedon* L.): feeding and oviposition stimulants from the camphor tree leaves (*Cinnamomum camphora* Sieb), PACIFICHEM2010:

The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, Dec. 15-20, 2010.

- ② Ryu Wakui, Masanori Horie, Yoshichika Nishimura, Yoshihide Nishiyama, Yasunori Ikeno, Shinichi Tebayashi Chul-Sa Kim ; Host selection of a Lauraceae feeding swallowtail butterfly (*Graphium sarpedon* L.): feeding and oviposition stimulants from the camphor tree leaves (*Cinnamomum camphora* Sieb). The 5th APACE (Asia Pacific Conference on Chemical Ecology) Conference 2009 Hawaii, Oct. 27-30, Honolulu, Hawaii, USA, 2009.
- ③ LI JING, RYU WAKUI, SHIN-ICHI TEBAYASHI, CHUL-SA KIM; Rsearch for Host-Plant Volatiles from the Leave of *Cinnamomum camphora* Attractive for Oriental the *Graphium sarpedon nipponum*, The 5th APACE (Asia Pacific Conference on Chemical Ecology) Conference 2009 Hawaii, Oct. 27-30, Honolulu, Hawaii, USA, 2009.
- ④ 手林慎一、涌井流、堀江督典、金哲史；アオスジアゲハの寄主選択, 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2009年度合同大会, 那覇 10月30-31日, 2009.

[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]

ホームページ等

高知大学農学部生理活性物質化学研究室 HP
http://www.geocities.jp/organicchemist_rykochi/20070416.html#

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手林 慎一 (TEBAYASHI SHINICHI)
高知大学・教育研究部自然科学系・准教授
研究者番号：70325405

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし