

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05620

研究課題名(和文)カメムシ触角における嗅覚のオン・オフ制御を司る情報化学物質の不活性化の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis for the inactivation of semiochemicals in the stink bug antennae

研究代表者

野下 浩二 (Noge, Koji)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40423008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カメムシはじめ昆虫は、外界から特定の匂い物質(情報化学物質)を受け取り、それに応答することで好適な餌や配偶相手を探す。昆虫の行動を制御する情報化学物質が数多く発見され、その受容機構の詳細が明らかになってきている一方、役目を終えた情報化学物質がどのように不活性化され、次に来るであろう新しい情報化学物質に備えるか、その仕組みに関する知見は限られる。本研究では、主に、マツヘリカメムシを材料に、警報フェロモンの酸化物がカメムシに対してフェロモン活性を持たないことを行動解析から明らかにした。また、その不活性化に関わると考えられる酸化酵素をカメムシ触角内から見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

情報化学物質の役割を明らかにすることは、自然界での同種の昆虫どうし、あるいは昆虫と植物のように異種間での生物相互作用を理解する上で役立つ。情報化学物質がどのように作られ、昆虫にどのように受容され、作用するかは、その役割を理解する上で欠かすことができない。一方、本研究で着目した情報化学物質の不活性化は目立たないものの、如何に昆虫が外界からの情報を処理しているかという点で新たな知見を与えうる。昆虫の行動変化を引き起こす情報化学物質の中で、フェロモンのように害虫防除にも利用される例もある。まだまだ十分とは言えないものの、情報の不活性化も情報処理の攪乱という点で害虫対策に貢献できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Insects including heteropterans adopt to the external environment by responding to exogenous odorous substances (semiochemicals). Many semiochemicals have been identified and the mechanisms of their reception are becoming clear; however, information about inactivation of semiochemicals after perception in insects is limited. This mechanism is for the next new semiochemicals that will be received by the insects. In this study, behavioral assays revealed that oxidation of the alarm pheromone of the coreid bug led to the loss of pheromone activity. An oxidase has been found in the antennae of the bug, which is considered to be involved in inactivation of its alarm pheromone.

研究分野：化学生態学

キーワード：フェロモン分解 オドラント分解 酵素 ヘリカメムシ クサギカメムシ

## 1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫は、外界から情報として特定の匂い物質 (情報化学物質) を受容し、それに応答することで好適な餌や配偶者を探し出す。このような情報化学物質の探索し、その役割を明らかにすることは、同種の昆虫どうしや、昆虫と植物といった異種間の生物間相互作用を理解する上で役立つ。中でも同種他個体とのコミュニケーションに関わるフェロモンは、害虫防除にも利用されており、その構造・機能解析が国内外で盛んに研究されてきた。昆虫が外界から適切に情報を得るためには、情報化学物質の受容に加え、いったん受容した情報をリセットし、次に来る新しい情報に備える必要がある。ところが、役目を終えたフェロモンが不活性化される仕組みはあまり研究されているわけでもない。ある種の蛾やコガネムシでは、情報を感知する触角にエステラーゼが存在し、フェロモンであるエステルやラク톤を分解し不活性化することが知られているものの、昆虫フェロモンがエステルやラク톤に限られるわけではなく、幅広い分子種において検討する価値があると考えられる。

研究代表者は、これまで、カメムシの行動を制御する情報化学物質の研究を進めてきた。オオツマキヘリカメムシの警報フェロモンをヘキサナールと同定する過程で、同じく分泌腺に含まれる 1-ヘキサノールやヘキサン酸に本カメムシが反応しないことを報告している (Noge et al., *J. Chem. Ecol.*, 2015)。アルデヒドがアルコールやカルボン酸へと変化するとフェロモン活性が失われる。一方、ダイズや果樹など広範な植物種の害虫として知られるクサギカメムシは、餌となる植物由来のヘキサナールに誘引されることを報告している (Noge, *J. Pestic. Sci.*, 2019)。さらに、クサギカメムシの触角に、ヘキサナールをヘキサン酸へと酸化するアルデヒド酸化酵素が存在することを見出していた (未発表)。クサギカメムシがヘキサン酸にどのような反応を示すか定かでないが、オオツマキヘリカメムシのヘキサナールやその類縁体への反応性を参考にすると、餌探索シグナルであるヘキサナールがクサギカメムシ触角内で酸化されることにより情報の不活性化が起こると推察した。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもと、オオツマキヘリカメムシにおいては、警報フェロモンの不活性化として、触角内にヘキサナールを酸化する酵素活性が認められれば、フェロモン不活性化のメカニズム解明に繋がると思った。一方、クサギカメムシにおいては、ヘキサン酸への反応を調べることで、触角内に存在する酸化酵素活性と情報の不活性化を関連付けることができると考えた。行動学的な解析と生化学的な解析を組み合わせ、カメムシにおける情報化学物質の不活性の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料

当初は研究代表者らのグループでフェロモン同定したオオツマキヘリカメムシを研究材料とする予定であったが、研究開始時に野外採集した本カメムシがそれなりの頻度で昆虫病原微生物 (*Beauveria bassiana*) に感染しており、材料として使いにくいことが判明した。そのため、同じくヘリカメムシ科に属し、かつすでに海外のグループがヘキサナールを警報フェロモンと報告しているマツヘリカメムシを代替材料とした。マツヘリカメムシも人為的に処理すると、*B. bassiana* に感染することが判明したものの、野外採集個体での感染は稀であった。野外採集したマツヘリカメムシを実験室内で繁殖させ、飼育系統を作ることも試みたが、実験室内での交尾・産卵がごく稀であったこと、また、ふ化するものの 1 齢若虫までしか人工的に育てられなかったため、飼育系統の確立は断念し、野外採集個体をしばらく実験室内で飼育し、馴化させて実験に用いた。なお、マツヘリカメムシのヘキサン酸への反応は未検討であったため、触角内の酵素活性の探索と合わせて実験を行うことにした。

クサギカメムシは、実験動物として市販されているものを使用した。

### (2) マツヘリカメムシのヘキサン酸に対する反応

オオツマキヘリカメムシの警報フェロモンを同定する際に、円状にしたプラスチックチューブ状にカメムシを置き、匂い源を近づけ、どの程度の時間で逃避行動を示すか、また逃避行動を示した場合、どの程度匂い源から遠ざかったかをフェロモン活性の指標とするアッセイ系を確立していた。同じ方法をマツヘリカメムシにも適用し、ヘキサナール並びにヘキサン酸に対する反応を調べた。オオツマキヘリカメムシは飛翔しないが、マツヘリカメムシは飛翔能力に富み、匂い源への反応として飛んで逃げることもあったため、逃避の際の飛翔の有無も活性評価の指標の一つに加えた。

### (3) マツヘリカメムシ触角におけるアルデヒド酸化酵素の探索

マツヘリカメムシ触角を切り出し、バッファー中で破碎し、粗酵素液を調製した。これを Native PAGE により分離し、泳動後のゲルをヘキサナールを用いて活性染色した。

触角内にアルデヒド酸化酵素が認められたため、粗酵素液とヘキサナールを反応させ、反応後の生成物を GC/MS で分析することでヘキサ酸の生成を確認した。また、ヘキサナールと同じ鎖状であるが、より炭素鎖が長いデカナールや、芳香環を有し、ヘキサナールとは構造が大きく異なるアニスアルデヒドなどいくつかのアルデヒドを同様に反応させ、触角内の酸化酵素の基質特異性を調べた。

#### (4) クサギカメムシのヘキサ酸に対する反応

クサギカメムシはヘキサナールを感知すると、あたかも餌があるかのように口吻を伸ばし、吸汁を試みる行動を示す。この口吻伸展を活性の指標として、ヘキサ酸に対するクサギカメムシの反応を調べた。クサギカメムシはヘキサナールに対して 100% 反応するわけではないため、ヘキサナールに反応する個体を選び、その個体に対するヘキサ酸の反応を調べることで、ヘキサナールへの反応とヘキサ酸への反応を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) マツヘリカメムシのヘキサ酸に対する反応

マツヘリカメムシにヘキサナールとヘキサ酸を与えた時の行動を比較した。ヘキサナールはすでに警報フェロモンであることが報告されているが、ヘキサナールには即座に反応し、匂い源に対して後ずさりをしたり、方向転換した後に歩いて遠ざかるだけでなく、飛翔してより遠くへ逃げる行動が観察された。その一方、ヘキサ酸に対しては反応する個体が明らかに少なく、また反応したとしても逃避行動を示すまでに要する時間がヘキサナールに比べ明らかに長かった。したがって、ヘキサ酸はマツヘリカメムシに対して警報フェロモン活性を示さないことがわかった。行動レベルでは、フェロモンであるヘキサナールの酸化が、フェロモン活性消失に繋がること示された。

#### (2) マツヘリカメムシ触角におけるアルデヒド酸化酵素の探索

電気泳動と活性染色の結果、マツヘリカメムシの触角にヘキサナールをヘキサ酸へと酸化する酵素活性が認められた。酸化活性を示すタンパク質は電気泳動で見える限り 1 本のバンドのみであり、1 種類のタンパク質であると考えられた。このバンドを切り出し、SDS-PAGE で解析したところ、約 75 kDa のタンパク質であった。このタンパク質の同定をペプチドマスフィンガープリンティング法により試み、現在、解析を続けている。

触角から調製した粗酵素液をヘキサナールと反応させ、生成物を調べたところ、ヘキサ酸が生成していることが確認でき、確かにヘキサナールをヘキサ酸へと酸化することが確かめられた。一方で、この酵素が触角内で分泌され、外から触角内へと侵入してきたヘキサナールと本当に出会うかまでは調べられておらず、今後の課題が残る形となった。一方、ヘキサナール以外に、炭素鎖の長いデカナールや芳香環を有するアニスアルデヒドと反応させてもそれぞれ対応する酸化物の生成が確認された。したがって、この酵素は基質特異性が低く、警報フェロモンに特化した酵素ではないことが示唆された。

アルデヒド酸化酵素については未解明の部分が残されており、かつマツヘリカメムシ触角内にヘキサ酸の受容機構がないという可能性を考慮する必要は残されるものの、上述の行動レベルでのヘキサナールとヘキサ酸との違いが、触角内でのアルデヒドの酸化と一定の相関があると考えられる。

#### (3) クサギカメムシのヘキサ酸に対する反応

ヘキサナールに反応するクサギカメムシを選抜し、ヘキサ酸への反応を調べた。ヘキサナールに対しては、口吻を何度も伸ばし、口吻を伸ばしている時間も長かった。それに対して、ヘキサ酸を与えた場合、口吻を伸展する個体はいなかった。ヘキサナールは餌の匂いと認識されているが、酸化されたヘキサ酸は餌とは認識されないと考えられた。ヘキサナールが触角内でヘキサ酸へと酸化されると、餌としての刺激は失われ、そうすることで、触角内での情報のセンシングをリセットし、次の情報に備えることができるようになっていくことが示唆された。

クサギカメムシの触角内に見られるアルデヒド酸化酵素も、マツヘリカメムシと同様に Native PAGE と活性染色の結果、1 本のバンドであり、その大きさも約 75 kDa とよく似ていた。構造解析が現在進行中であるものの、科の異なるカメムシ種で同じ働きを持つ似たような酵素の存在が示唆された。また、クサギカメムシの触角内で発現している遺伝子を網羅的に解析したところ、アルデヒド酸化酵素と類似の酵素の存在が示唆されたが、タンパク質レベルで見られたアルデヒド酸化酵素との関連は現在調査中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野下浩二
2. 発表標題 カメムシの餌探索行動を解発する植物化学成分
3. 学会等名 日本農薬学会第22回農薬バイオサイエンス研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野下浩二
2. 発表標題 マツヘリカメムシ触角におけるアルデヒド酸化活性とフェロモン不活性化
3. 学会等名 日本農薬学会第49回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Koji Noge
2. 発表標題 Hexanal-oxidizing activity in the antennae of <i>Leptoglossus occidentalis</i> (Hemiptera: Coreidae) correlates with inactivation of its alarm pheromone
3. 学会等名 XXVII International Congress of Entomology (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------