

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：94404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780052

研究課題名（和文） アゲハチョウ類の寄主認識に関する化学受容機構と食性進化の解明

研究課題名（英文） Identification of mechanism of chemoreception for host recognition and feeding habit evolution in a swallowtail butterflies

研究代表者

尾崎 克久 (OZAKI KATSUHISA)

株式会社生命誌研究館・研究員

研究者番号：60396223

研究成果の概要（和文）：アゲハチョウは前脚にある化学感覚毛で植物の“味見”を行い、産卵する植物を選択している。本研究では、この味見の際に働く味覚受容体の遺伝子を同定し、機能を解明した。RNAi という手法でこの遺伝子の発現を阻害すると、植物成分への感受性が低下し、産卵行動が抑制されることを観察した。この結果から、食草転換を原動力とする進化に、味覚受容体が深く関与していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Female of swallowtail butterflies select their host plant by tasting using chemo-sensory hair on their tarsi. I identified a mechanism of taste receptor for oviposition behavior. When expression of the receptor gene is interfered by RNAi method, butterflies show reduced sensitivity for the synephrine, one kind of 10 oviposition stimulants. This result suggests that this receptor gene affect to evolution driven by host-shift of phytophagous swallowtail butterflies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：アゲハチョウ、味覚受容体、化学感覚、生物間相互作用、食性進化、産卵行動

1. 研究開始当初の背景

(1) アゲハチョウの生態的特徴

植食性昆虫の大部分が、特定の植物のみを餌として利用していることが知られている。アゲハチョウの仲間は、産卵の直前に前脚で植物表面をたたき、先端部のふ節にある化学感覚毛で植物に含まれる化合物を認識し、植物種を正確に認識している。言わば“味見”をして、幼虫が食べられる植物であることを確認し、産卵しているのである。

(2) 産卵行動の誘発

ナミアゲハは、ミカン科シトラス属植物に含まれる 10 種類の化合物を認識し、産卵行動が誘発されることが知られており、これらが「産卵刺激物質」として報告されている。産卵刺激物質は、どれも単独では産卵活性がなく、最低でも 2 種類の混合によって産卵行動が引き起こされる。10 種類全て混合すると、生葉と同等の産卵活性となる。

(3) 産卵刺激物質の認識機構

植食性昆虫と植物の強固な絆は、ファーブルの時代から知られている謎であったが、そのメカニズムについては全く未解明であった。しかし、本課題の開始前の取り組みにより、ナミアゲハのメス成虫前脚ふ節で特異的に発現する7回膜貫通型受容体(7TMR)の候補遺伝子を発見しており、その機能解析に取り組む必要があった。

2. 研究の目的

味覚の一種と考えられる「産卵阻害物質の認識」について、仕組みを解明する。味覚受容体を中心とする認識システムが化学感覚毛内に存在し、正確に植物を見分けていると考えられるので、このシステムに関与する遺伝群を探索し、機能を解明する。

これにより、昆虫の食性が変化し、選択する植物が変わったことを切っ掛けとして起きたと考えられる、アゲハチョウ科昆虫の進化について、その原動力となった現象を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) カルシウムイメージング法によるリガンド解析

化学感覚受容体が特定の化合物と結合すると、感覚神経細胞内のカルシウム濃度が上昇する。この細胞内のカルシウム濃度の変化を検出する方法を「カルシウムイメージング法」と呼ぶ。本研究では、味覚とは無関係の培養昆虫細胞内でアゲハチョウの7TMRを強制的に発現させ、産卵刺激物質で刺激し応答を観察した。

(2) RNAiによる発現阻害

標的遺伝子と相補的な2重鎖RNAを細胞内に導入すると、mRNAが破壊され遺伝子発現が阻害される。この現象をRNAiと呼ぶ。ナミアゲハ7TMRのRNAiを行い、産卵刺激物質への感受性の変化を観察する。

① 電気生理実験による応答の観察

神経細胞が化合物を認識すると、その情報を脳に伝えるために微弱な電気が流れる。神経内を流れる微弱な電気の電圧変化を計測することで、化合物への応答を観察できる。

② 産卵実験

RNAiにより7TMR遺伝子の発現が阻害されたチョウを用い、産卵行動の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) ナミアゲハ7TMRのリガンド同定

カルシウムイメージング法により、10種類ある産卵刺激物質のうち、シネフリンに特異的に応答することを確認した。ミカンの葉から

抽出した化合物混合液で刺激を行っても、同じ応答が観察された。この結果から、ナミアゲハ7TMRは、ミカンの葉に含まれる多数の化合物の中から、シネフリンに特異的に応答する受容体であると考えられる(図1)。

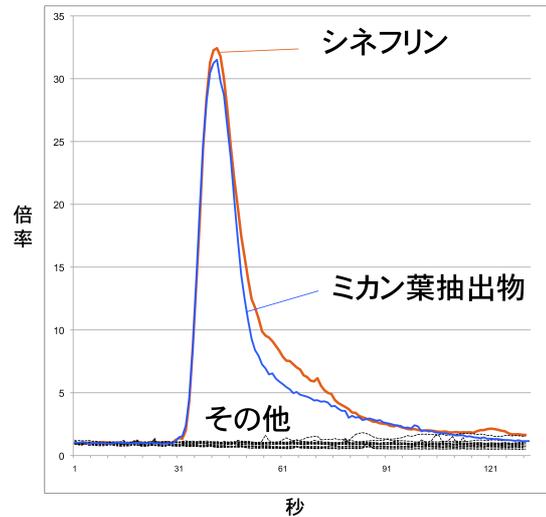


図1 カルシウムイメージング法による応答強度。横軸は時間、縦軸は非刺激時の発光強度を1とした場合の相対的発光強度を示す。赤線はシネフリンによる刺激への応答、青線はミカン葉抽出物による刺激への応答、黒点線はその他産卵刺激物質による刺激への応答を示す。

(2) 産卵刺激物質への感受性低下

① 鱗翅目昆虫は、RNAiの効果が出にくいと言われている。本研究では、ナミアゲハ7TMRの発現時期を詳細に解析し、羽化する前日の蛹で急激に発現量が増加することを確認した(図2)。このピークを抑えることができれば、発現量を低レベルに維持したのと同等の効果が得られると考えた。

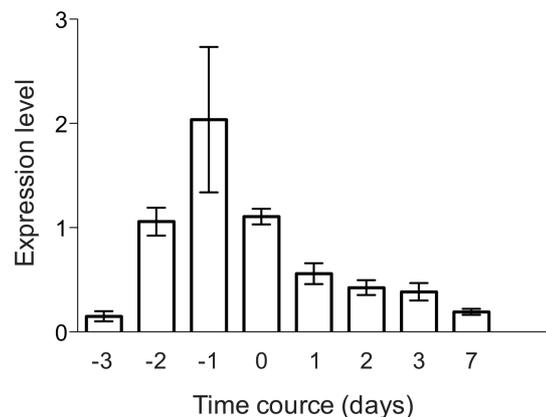


図2 7TMR遺伝子の発現量変化。横軸は羽化日を0として羽化前後の日数を示す。縦軸は、羽化日の発現量を1として相対的発現量を示す。

② ナミアゲハ 7TMR の 2 重鎖 RNA を合成し、蛹に注射で導入すると、蛹化後の早い時期に注射するほど発現抑制効果が強いことが観察された (図 3)。

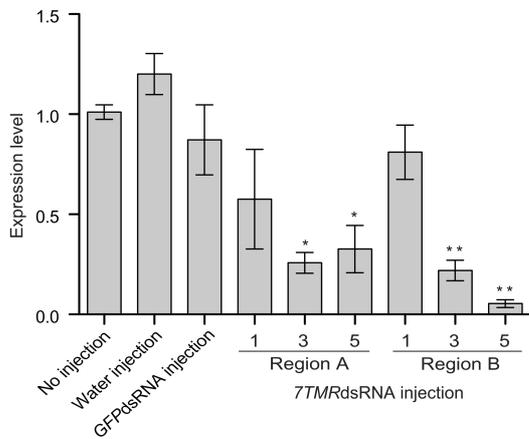


図 3 RNAi による 7TMR 遺伝子の発現阻害効果。Region A および B の数字は、羽化前の日数を示す。Region A と B は、7TMR 遺伝子の別の場所から設計した二重鎖 RNA を示す。

③ RNAi によって 7TMR の発現量が低下したナミアゲハ (RNAi チョウ) の前脚を用い、電気生理実験を行った結果、シネフリンにのみ感受性が低下していることを確認した (図 4)。

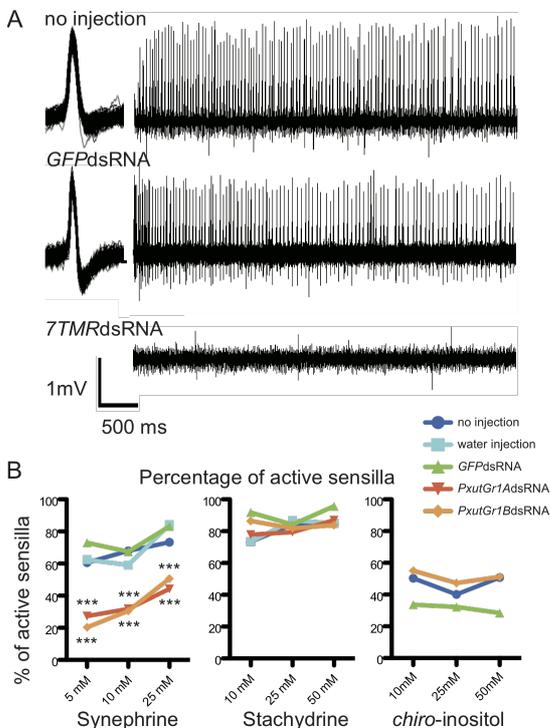


図 4 RNAi チョウふ節感覚子の電気生理応答。A 典型的なスパイクの例。B 応答する感覚子の割合の変化。

(3) 産卵活性の低下

産卵刺激物質は、10 種類全て混合すると生の葉と同等の産卵活性が観察されるが、シネフリンとカイロイノシトールの 2 種類を混合した場合には、10 種類に比べて約 70% の産卵活性となる。それぞれ一種類では産卵活性がないので、シネフリンへの感受性が低下している RNAi チョウは、シネフリンとカイロイノシトールの 2 種混合液に対して産卵活性を示さないはずである。

約 50 センチ四方の容器内で RNAi チョウを自由飛翔させ、2 種混合液を付着させた人工葉を提示し、産卵行動を観察した結果、RNAi チョウの産卵活性が有意に低下していることを確認した (表 1)。

表 1 自由飛翔による産卵活性

	未処理	RNAi チョウ
水	0	0
シネフリン	0	0
カイロイノシトール	0	0
2 種混合液	72.1	21.1
ミカン葉抽出物	100	100

以上の結果から、ナミアゲハ 7TMR は産卵刺激物質の一つであるシネフリンに特異的に応答し、産卵行動に関与する遺伝子であることが確認された。

この様な化学感覚受容体遺伝子に何らかの変化が生じ、食草の認識が変化した場合、それまでとは異なる植物を選択することになり、行動や生息環境の変化が種分化 (進化) の出発点となったのではないかと考えられる。

(4) 味覚関連遺伝子の探索

次世代型シーケンサー illumina MiSeq を用いて RNA-seq を行い、ナミアゲハから 37 種類の味覚受容体候補遺伝子、27 種類の chemosensory protein (CSP: 化合物を受容体に運搬する役割を持つと推定されている遺伝子ファミリー) の候補遺伝子、シロオビアゲハから 51 種類の味覚受容体候補遺伝子、28 種類の CSP 候補遺伝子を発見した。

この結果は、申請時の研究計画より大きく進展した内容である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Masasuke Ryuda, Delphine Calas-List, Ayumi Yamada, Frederic Marion-Poll, Hiroshi Yoshikawa, Teiichi Tanimura, and Katsuhisa Ozaki (2013) 査読有り

Gustatory sensing mechanism coding for multiple oviposition stimulants in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* Journal of Neuroscience 33 (3) 914-924. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1405-12.2013

(2) Katsuhisa Ozaki, Masasuke Ryuda, Ayumi Yamada, Ai Utoguchi, Hiroshi Ishimoto, Delphine Calas, Frederic Marion-Poll, Teiichi Tanimura & Hiroshi Yoshikawa (2011) 査読有り

A gustatory receptor involved in host plant recognition for oviposition of a swallowtail butterfly

Nature Communications. doi: 10.1038/ncomms1548

[学会発表] (計 15 件)

(1) Ozaki, Katsuhisa, Ryuda, Masasuke and Yoshikawa, Hiroshi

A gustatory receptor involved in host-plant recognition for oviposition of the butterfly, *Papilio xuthus*.

The 59th Annual Meeting of the Entomological Society of America. 2011.11.16. (アメリカ合衆国ネバダ州リノ市: シンポジウム招待講演)

(2) 尾崎克久・龍田勝輔・吉川寛

アゲハチョウの産卵行動のための食草認識に關与する味覚受容体

日本遺伝学会第 84 回大会 2012.9.24-26 (招待講演) (九州大学医学部: 福岡県福岡市)

(3) 尾崎克久・龍田勝輔・吉川寛

アゲハチョウが産卵のために食草を認識する仕組みに關与する味覚受容体

第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14 (ワークショップ・ポスター) (福岡国際会議場: 福岡県福岡市)

[図書] (計 5 件)

(1) 尾崎克久 化学受容の科学 第 6 章 昆虫ゲノムに見る化学感覚受容体遺伝子の多様化 東原和成編 化学同人 2012 年 2 月 15 日発行

(2) 尾崎克久・龍田勝輔・吉川寛 (2012)

アゲハチョウが植物を的確に見分けるしくみ. AROMA RESEARCH No.50 2012/5 月号 (vol.13/No.2)

[その他]

Web サイト

<http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/069/>

research_1.html

番組出演

(1) RKB 毎日放送ラジオ局 (福岡県)・中西一清スタミナラジオ (2011.12.2)

(2) NHK ニュース (関西地区)・おはよう関西 (2011.11.16)

取材協力 (来館)

(1) NHK (久保隆 記者)

(2) 読売新聞 (阿部健 記者)

(3) 毎日新聞 (須田桃子 記者)

取材協力 (電話)

(1) 日本経済新聞 (松田 記者)

(2) 共同通信 (中沢 記者): 写真等の資料を提供

(3) 朝日新聞 (東山 記者): 写真等の資料を提供

(4) 産経新聞 (秋山 記者)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 克久 (OZAKI Katsuhisa)

株式会社生命誌研究館・研究員

研究者番号: 60396223