

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08099

研究課題名(和文) 交尾によって変化するモンシロチョウの寄主探索行動と嗅受容機構の解明

研究課題名(英文) Post-mating changes in host finding behavior and olfactory reception of *Pieris rapae* females

研究代表者

大村 尚 (Omura, Hisashi)

広島大学・統合生命科学研究科・准教授

研究者番号：60335635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：モンシロチョウの嗅覚を利用した寄主探索や交尾後の行動・嗅受容の変化について調べた。交尾雌は処女雌より匂いに対する反応性が高く、植物模型にキャベツ葉の匂いを賦香すると着陸頻度が増加した。雌の触角嗅覚感受性は交尾前後でほとんど変化しなかったため、交尾雌での行動の鋭敏化は、嗅受容に関する中枢神経系での変化に起因すると推定された。寄主探索をおこなう雌は幼虫糞の匂いを弱く忌避する傾向があり、交尾雌よりも処女雌において忌避反応は顕著であったが、活性物質の特定には至らなかった。雌成虫の遺伝子発現を調べ、触角での発現量は極めて少ないこと、胸部・卵では十数種の遺伝子が交尾後に過剰発現することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昼行性のチョウは視覚の手がかりを利用して遠隔的な寄主探索をおこなうと考えられてきた。本研究では、母チョウが視覚のみならず嗅覚も利用することを実験的に証明し、寄主探索の手がかりとなる植物由来のカイロモンを同定するとともに、幼虫糞の匂いが弱いながらも雌を忌避することを見いだした。これらの知見は、アブラナ科の重要害虫であるモンシロチョウの行動を匂い物質で制御するための基礎情報であり、新規防除法開発のシーズになりうる。また、雌成虫の行動は交尾後ダイナミックに変化しており、行動生理学的な視点においても、交尾前の雌の防除および交尾の攪乱がより重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study addressed the olfactory-guided host finding of *Pieris rapae* females and the post-mating changes in its behavior and olfactory reception. Mated females were more responsive to host plant volatiles than virgin females, in which the treatment of plant models with synthetic blends of cabbage leaf increased the number of landing on plant models by mated females. Since antennal responsiveness to host plant volatiles was similar between mated and virgin females, such behavioral enhancement of mated females might be attributed to post-mating changes in central nervous system involved in olfactory reception. Host-finding females showed weak repellency against larval frass odor although actual repellents could not be identified, in which virgin females were more sensitive than mated females. Quantitative RNA analyses revealed that female antennae possessed extremely low amounts of RNA and that 11 and 18 RNA genes overexpressed in female thorax and eggs, respectively, after mating.

研究分野：化学生態学

キーワード：植食性昆虫 モンシロチョウ 寄主選択 植物揮発性成分 幼虫糞 触角感受性 交尾 嗅覚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 99%のチョウ目昆虫は、幼虫期に限られた種類の植物を食べて成長する。幼虫の生存・発育において、母チョウが幼虫の食餌植物(寄主植物)を正確に識別して産卵することは極めて重要である<sup>1)</sup>。母チョウは視覚・嗅覚・味覚など複数の感覚器を駆使して寄主植物を探索し、産卵を行う(寄主選択)。寄主選択は、遠方から寄主植物を探し出し定位・着陸する過程と、着陸した植物に産卵する過程に二分される。後者の過程において、母チョウは植物中の化学成分を味覚受容して産卵の最終決定を行う。これまでアゲハチョウ科やシロチョウ科において、産卵を制御する植物化学成分の体系的な研究が行われている。前者の過程において、母チョウは主に視覚的な手がかりを利用して遠隔的な寄主探索を行うとされる。植物の匂いがチョウの寄主探索におよぼす影響を調べた研究は極めて少ない。

(2) モンシロチョウはアブラナ科野菜を加害する重要害虫である。本種は主に畑地で発生するが、寄主植物となるアブラナ科野菜の栽培状況に応じて、畑地周辺でのアブラナ科野生種の探索や遠距離の畑地間移動を行う<sup>2)</sup>。Ikeuraらは、モンシロチョウ雌成虫が、交尾後、匂いを利用した寄主探索行動を開始することを報告した<sup>3)</sup>。しかし、雌成虫はどのようなキャベツ由来の匂い成分を利用するのかこれまで検討されていない。また、ある種の植食性昆虫は交尾雌が同種幼虫の糞の匂いを忌避して産卵場所を選択することで種内競争を回避することが知られている<sup>4)</sup>。同様の種内コミュニケーションシステムがモンシロチョウにおいても存在するのかわかるとは不明である。

(3) 昆虫の雌成虫は、交尾後、速やかに生理状態を変化させ、産卵行動を開始する。雌の行動様式の変化は感覚器の応答特性の変化と密接にリンクしており、数種のガの雌成虫は、交尾後、寄主選択の手がかりとなる化学物質に対して感受性を大きく変化させる<sup>5)</sup>。一方、モンシロチョウでは、交尾後に寄主探索行動が変化することの生理学的基盤は検討されておらず、雌成虫の嗅覚受容やこれに続く神経系での交尾にともなう変化を詳しく調べる必要がある。

## 2. 研究の目的

### (1) キャベツの匂いに含まれるモンシロチョウ寄主探索因子(植物への誘引物質)の探索

モンシロチョウが寄主探索に利用する匂い成分および交尾後の応答変化を明らかにするため、申請者が先行研究で同定した15のキャベツ新鮮葉匂い成分の標品をもちいて、行動および感覚器応答を試験した。ガスクロマトグラフ-触角電図(GC-EAD)法により個々の化合物に対するモンシロチョウの嗅覚応答を調べ、羽化後同日齢の処女雌と交尾雌で応答性を比較した。

また、これらの標品を塗布した人工葉またはオルファクトメーターを用いて生物試験を行い、処女雌・交尾雌にとって寄主探索の手がかりとなる匂い物質を特定した。さらに、雌の交尾に伴う、化合物の生物(誘引)活性やチョウの嗅覚感受性の変化を検証した。

### (2) 幼虫の糞の匂いに含まれるモンシロチョウ忌避物質の探索

モンシロチョウの交尾雌が同種幼虫の糞の匂いを利用して寄主探索を行い、キャベツへの産み分けを行うのか確かめるため、糞の匂いに対する嗅覚反応を試験した。まず、糞の匂いを化学分析して主要成分を同定した後、GC-EAD法によりチョウが高い嗅覚感受性を示す成分をスクリーニングした。また、実際の糞や同定した主要成分の標品を用いて生物試験を行い、チョウの寄主探索行動におよぼす糞の匂いの影響を評価した。

### (3) 交尾後の嗅覚応答の変化に関する候補遺伝子の探索

匂いを利用した寄主探索行動が交尾雌において顕在化することの分子生理学的基盤を明らかにするため、交尾後に雌成虫で過剰発現する遺伝子から候補遺伝子を探索した。雌雄成虫の触角・頭部・胸部・腹部・翅および雌成虫の産下卵からRNAを抽出した。量的に十分なトータルRNAが抽出できたサンプルについて大規模シーケンズ解析をおこない、遺伝子ライブラリーを作成、交尾後の雌成虫で過剰発現している遺伝子を特定した。特定した遺伝子について同源性検索をおこない、化学受容に関連する候補遺伝子の絞り込みを行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 生物試料

広島県東広島市で野外採集したモンシロチョウ交尾雌から採卵し、卵より孵化した幼虫にキャベツを与え25℃、16L:8Dの条件で室内飼育した。蛹より羽化した成虫は雌雄を区別してナンバリングし、プラスチック容器で一個体ずつ飼育した。晴天下の網室内に羽化後2日齢以降の成虫10-20個体を同時に放飼し、自由に交尾させて交尾雌個体を得た。各試験には、羽化後2~7日齢の処女雌、交尾雌、未交尾雄をもちいた。

### (2) 人工葉をもちいた生物試験

キャベツ葉から揮発する15成分の標品を表1の組成で混合した4種類の人工香を調製した。

プラスチック製人工葉(図1A)にこれらの試料0.1 μL または1 μL を塗布して匂い付けした処理葉、等量の溶媒を塗布した対照葉を1つずつ室内試験区(図1B)に配置した。試験区に処女雌または交尾雌1~4個体を30分間放蝶し、処理葉または対照葉への着陸数を個体毎に記録した。20個体以上がどちらかの人工葉に着陸するまで繰り返し試験を行った。

化合物名	相対量			
	15成分mix	9成分mix	6成分mix	3成分mix
3-Heptanone	100			
Limonene	40			
γ-Terpinene	20			
3-Octanone	30	30		
p-Cymene	30	30		
Octanal	20	20	20	
6-Methyl-5-hepten-2-one	100	100	100	
1-Hexanol	10			
Nonanal	50	50	50	50
(E)-2-Hexen-1-ol	40			
Decanal	40	40	40	40
β-Caryophyllene	4			
Linalool	10	10		
Menthol	30	30	30	30
Acetophenone	30	30	30	

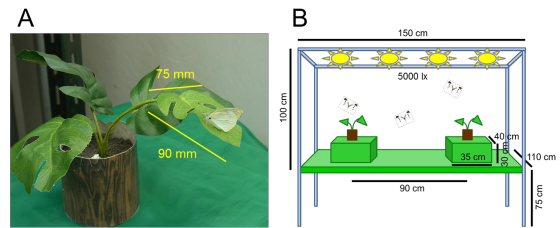


図1 人工葉(A)および生物試験区(B)

### (3) キャベツ株をもちいた生物試験

人工葉に代わり、図1Bの生物試験区にポット植えキャベツの“健全株”、モンシロチョウ幼虫の食害を受けた“被害株(幼虫糞あり)”、健全株の根元に幼虫糞3-6gを散布した“糞処理株”のいずれかを配置した。処女雌または交尾雌を30分間放蝶し、二種類の株への着陸数を個体毎に記録した。

### (4) オルファクト-メーターをもちいた生物試験

透明アクリル製オルファクトメーター(図2)を実験室に設置し、中央室にチョウを1個体入れ、中を自由飛翔させた。2つの翼室から異なる香気を中央室に向かって流し、10分以内にチョウがどちらの翼室に移動するか記録した。各試験は、25個体以上をもちいて繰り返した。

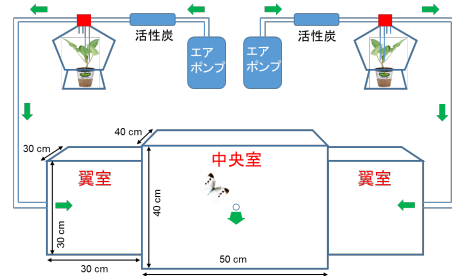


図2 オルファクトメーター模式図

### (5) GC-EADによる触角の嗅覚応答測定

触角を成虫頭部から切除し、導電性ゲルをもちいてEAD電極間に固定した。分析試料はHP5890ガスクロマトグラムに230で注入し、30mのDB-Waxカラム、昇温条件60/220/6/minで成分を分離した後、流出物を二分してFIDおよびEADで検出した。

### (6) 幼虫糞の匂いの化学分析

幼虫糞2-7gを100mLピーカーに入れてパラフィルムで密閉し、容器内に揮発する糞の匂いを固相マイクロ抽出(SPME)ファイバーで2-4時間捕集した。匂いを吸着させたファイバーは、GC-17Aガスクロマトグラムに230で注入し、30mのHP-5MSカラム、昇温条件40/280/5/minで成分を分離した後、流出物をQP5000質量分析計に導入して、成分分析を行った。

### (7) mRNAの抽出および遺伝子解析

広島県産飼育個体の処女雌・交尾雌・未交尾雄の触角それぞれ25本(2016年)、触角を含む約200雌の頭部(2017年)、処女雌23・交尾雌25の頭部・胸部・腹部・翅(2018年)、東京都産野生個体雌雄の触角80本・脚部30本(2017年)、処女雌・交尾雌の産下卵約100(2018年)を採取し、RNA保存剤に封入後、ホモジュナイズした。サンプル中のDNA量、RNA量を測定したのち、トータルRNAが定量的に得られたサンプルについて大規模シーケンス解析を行い、交尾後に発現量が3倍以上変化している遺伝子を検出し、相同性検索を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) キャベツの匂いに含まれるモンシロチョウ寄主探索因子(植物への誘引物質)の探索

#### 触角での嗅覚応答

キャベツ葉人工香15成分mixの1nL相当量をGCに注入したところ、雌雄の触角ともdecanal, nonanal, mentholに強く反応し、acetophenone, 6-methyl-5-hepten-2-oneに中程度の反応を3-octanone, octanal, linaloolに弱い反応を示した。同一成分に対して雄より雌の方が強い触角応答を示した。羽化後0, 1, 2, 4日齢の処女雌および羽化日に交尾させた1, 2, 4日齢の交尾雌をもちいて上記9成分に対する応答をしらべたが、交尾経験の有無や加齢にともなう顕著な変化はみられなかった。以上の結果から、モンシロチョウは寄主植物の匂いを受容できること、雄よりも雌において嗅覚感受性が高いこと、触角の嗅覚応答は交尾や加齢の影響をほとんど受けないことがわかった。

#### 匂いが雌の寄主探索に及ぼす影響

人工葉にキャベツ人工香15mixを塗布した処理葉と溶媒を塗布した対照葉をもちいた生物試

験の結果、30分間で観察された1個体あたりの着陸数は未交尾雄 < 処女雌 < 交尾雌の順に増加した。4種類の人工香をもちいて処理葉と対照葉の選択に匂いおよび影響を及ぼすところ(図3) 処女雌では匂い付けによる影響はみられなかった。一方、交尾雌は匂い付けした処理葉を好んで選択する傾向を示したが、人工香の構成成分が少なくなるにつれて匂いによる効果は低下した。以上のことから、交尾後、雌は寄主探索に匂いを利用するようになること、匂いの構成成分が多いほど交尾雌が頻りに着陸することがわかった。

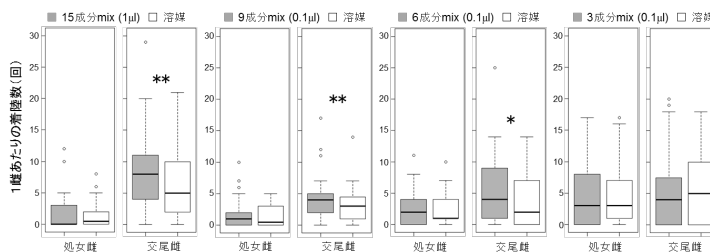


図3 人工香への着陸にキャベツ人工香の匂いが及ぼす影響

## (2) 幼虫の糞の匂いに含まれるモンシロチョウ忌避物質の探索

糞の匂いの化学分析および触角での嗅覚応答

SPME で捕集した糞の匂いからジメチルジスルフィド(DMDS)を主要成分として同定した。標品をもちいて同様の分析をおこない、糞 1g からの DMDS 揮発量は約 2 ng/h と推定された。DMDS の他に、ジメチルトリスルフィド(DMTS)やアリルチオニトリルなどの含硫黄化合物、nonanal, decanal, geranylacetone などを微量成分として検出した。

DMDS と DMTS 標品を 1:1 で混合したミネラルオイル溶液を SPME で捕集して、雌雄成虫の触角応答を GC-EAD で調べたが明瞭な反応はみられなかった。触角がこれらスルフィド化合物に反応しなかったことから、口吻や下唇髯などがその嗅受容を担っていると推察された。

糞の匂いが雌の寄主探索に及ぼす影響

ポット植えの健全株 vs 糞処理株、健全株 vs 被害株で着陸選択を比較したところ、処女雌・交尾雌とも健全株に有意に多く着陸し、処女雌において有意水準がより高かった(図4)。オルファクトメーターをもちいた処女雌・交尾雌による匂いの二選択試験において、健全株 vs 被害株(糞無) 健全株 vs DMDS を塗布した健全株で有意差はみられなかったが、健全株 vs 被害株(糞有)では処女雌のみが健全株を有意に選択した(図5)。これらの結果より、幼虫糞にはモンシロチョウの雌成虫に対する弱い忌避作用があること、忌避作用は交尾雌よりも処女雌で強いこと、糞の匂いの主要成分である DMDS は忌避作用の本体でないことがわかった。

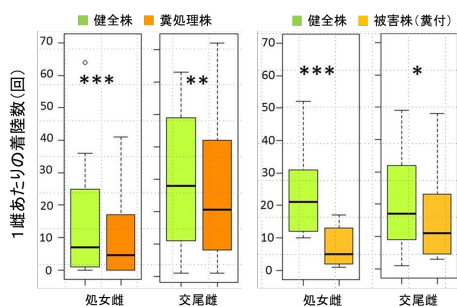


図4 キャベツ株への着陸に幼虫糞が及ぼす影響

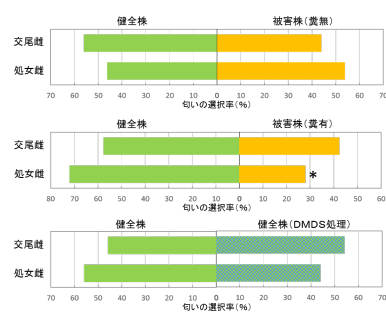


図5 オルファクトメーターによる匂いの二選択試験

## (3) 交尾後の嗅覚応答の変化に関する候補遺伝子の探索

2016年の触角サンプルからDNAの存在を確認したが、RNAの存在量は極めて低く、明瞭なバンドが確認できなかった。2017年に調製した100個体単位の頭部サンプル2本、80個体分の触角サンプル1本においてもRNAはほとんど抽出されなかった。一方、2017年の脚部サンプルからはトータルRNAが抽出できた。この大規模シーケンス解析を行い、RNAライブラリーを作成、double sex, Actin, Tubulin, NADPHの配列情報を明らかにした。以上の結果より生体試料からのRNA抽出方法に問題はなく、交尾の経験や雌雄の違いに関わらず、モンシロチョウの触角においてRNAの発現は極めて少ないと結論した。

触角でのRNA発現量が少なかったため、他の部位において交尾に伴う遺伝子発現の可能性を検討した。2018年に頭部・胸部・腹部・翅・卵のサンプルを処女雌・交尾雌で調製した。このうち、トータルRNAが取得できた胸部、卵のサンプルについてシーケンス解析を行い、交尾前後で発現量が3倍以上変化している遺伝子(DEG)を胸部で11種、卵で18種見いだした。これらDEGのうち、胸部で見つかった1374bpの遺伝子は、相同性検索からchemosensory proteinであることが判明し、交尾後の雌の寄主探索行動の亢進に関わっている可能性が示唆された。

( 引用文献 )

- 1) 本田計一. 2005. チョウの生物学 ( 本田計一・加藤義臣編 ), 東京大学出版会, pp. 253-301.
- 2) Molnár, B.P. et al. 2017. J. Pestic. Sci. 90, 873-885.
- 3) Ikeura, K. et al. 2010. Biochem. Syst. Ecol. 38, 1199-1203.
- 4) Myers, J.H. 1985. J. Anim. Ecol. 54, 193-204.
- 5) Saveer, A.M. et al. 2012. Proc. R Soc. B 279, 2314-2322.

5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Yuki Itoh, Yukiko Okumura, Takeshi Fujii, Yukio Ishikawa, Hisashi Ômura, Effects of mating on host selection by female small white butterflies *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), Journal of Comparative Physiology A, 査読有, 204 巻, 2018, pp. 245-255

DOI:10.1007/s00359-017-1237-x

藤井 毅、大村 尚、交尾により母となったモンシロチョウの行動変化、アグリバイオ、査読無、Vol.2、No.6、2018、pp. 572-576

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Yukiko Okumura, Souta Tamai, Takeshi Fujii, Yukio Ishikawa, Hisashi Ômura, Effect of dimethyl disulfide, present in larval frass odors, on host selection by female adults of *Pieris rapae*, the 34th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, 2018

Yukiko Okumura, Takeshi Fujii, Yukio Ishikawa, Hisashi Ômura, Involvement of larval frass volatiles in host selection by female adults of *Pieris rapae*, The joint meeting of the 33rd annual meeting of the ISCE and the 9th meeting of the APACE, 2017

奥村裕紀子、藤井 毅、石川幸男、大村 尚、モンシロチョウ雌成虫の寄主探索における幼虫糞由来香気の関与、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017

伊藤優希、奥村裕紀子、藤井 毅、石川幸男、大村 尚、モンシロチョウ雌成虫の寄主探索行動と触角嗅覚応答の交尾後の変動、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017

大村 尚、伊藤優希、奥村裕紀子、藤井 毅、石川幸男、交尾によって変化するモンシロチョウ雌成虫の寄主探索行動、平成 28 年度日本応用動物昆虫学会中国支部・日本昆虫学会中国支部合同例会、2016

[ その他 ]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/~homura/LCE/feature.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤井 毅

ローマ字氏名：( FUJII, Takeshi )

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科 ( 農学部 )

職名：特任助教

研究者番号 ( 8 桁 ) : 30730626

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：石川 幸男

ローマ字氏名：( ISHIKAWA, Yukio )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。