

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02211

研究課題名(和文) カイコガをモデルとしたガ類の交尾行動解発因子の同定と受容・情報処理機構の解明

研究課題名(英文) Identification of initiation factors for copulation attempt and analysis of the reception and information processing mechanisms of the factors in Lepidoptera, using the silkworm *Bombyx mori*

研究代表者

櫻井 健志 (Sakurai, Takeshi)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：20506761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ガ類のモデル昆虫であるカイコガを用いて、オスが示すフェロモン源定位行動から交尾行動への行動スイッチングを解発する因子の同定とその受容、情報処理機構の解析を行った。高速度カメラを用いた詳細な行動解析から、オスの触角先端部と前脚ふ節に交尾行動の解発因子の受容部位があることを示した。また、脱脂したメスの鱗粉への接触により、通常の鱗粉と同様に交尾行動が解発されることから、鱗粉の化学物質の情報でなく鱗粉自体の構造に解発因子が存在することが示唆された。さらに受容部位のRNAseq解析から、解発因子の受容に関与する候補遺伝子を推定した。一方で、交尾行動発現の神経回路の同定にはいたらなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、カイコガの交尾行動を解発する因子とその受容機構に関する重要な手がかりを得ることができた。今後、本研究をベースとして行動スイッチング機構のより深い理解に向けた研究が可能となる。また、カイコガを含むガ類は多くの重要な農業害虫を含んでいる。本研究の成果をガ類の害虫種に拡張することで、交尾行動への移行を阻害する新しい害虫防除の方法論の開発につながるという点で社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the silkworm, a model insect in Lepidoptera, to identify the factors responsible for the behavioral switching from pheromone orientation behavior to copulation attempt, and to analyze the reception and processing mechanisms of the initiation factors for copulation attempt. Detailed behavioral analysis using a high-speed camera revealed that the antennal tips and foreleg tarsi of male moths serve as reception sites for the initiation factors. Additionally, contact with delipidated female scales triggered copulation attempts similar to the response to intact scales, suggesting that the structure of the scales themselves contains the initiation factors rather than chemical substances on the scales. Furthermore, RNAseq analysis of the reception organs identified candidate genes involved in the reception of the initiation factors. However, we were unable to identify the neural circuitry underlying initiation of copulation attempts in this study.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：昆虫 カイコガ 配偶行動 行動スイッチング 性フェロモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

配偶行動は定型的な行動パターンが、鍵刺激の入力によって順序だてて発現することで構成される。そのため、配偶行動における行動の切替え(スイッチング)は、環境中の変化に対して適応的な行動を選択する神経機構の解明に向けた格好のモデルである。多くのガ類昆虫では、オスが同種メスの放出する性フェロモンを利用して、メスのもとに定位することが良く知られているが、メスに定位したオスは、最終的にはメスとの接触から得られる情報により、定位行動から交尾行動へと行動を切り替えることが報告されている。ガ類のモデル昆虫であるカイコガ(*Bombyx mori*)では、オスはメスの放出する性フェロモンであるボンピコールの受容によりフェロモン源定位行動を発現しメスへと定位する。そして定位行動中にメスに接触するとオスは腹部を曲げてメスの外部生殖器を探り当て、交尾にいたる。

交尾行動の解発因子に関する研究はいくつかのガ種で報告されており、メス虫体の鱗粉との接触が交尾行動を解発する可能性が示唆されている⁽¹⁻⁴⁾。しかし、鱗粉の物理的構造を機械感覚として受容し交尾行動が発現するとした報告^(1,2)と、鱗粉中の化学物質を化学感覚受容器により受容し交尾行動が発現するとした報告⁽⁴⁾があり、解発因子の実体については不明な点が多い。カイコガにおいてもメスの腹部末端 3 節へのオスの接触が交尾行動の発現に重要であると報告されているが、解発因子の実体が鱗粉に含まれる化学物質か鱗粉そのものかは示されていない⁽³⁾。このように、ガ類の配偶行動において、定位行動中のオスがメスを認識し交尾行動へと行動をスイッチする仕組みは、交尾の達成に必須な要素であるが、解発因子の実体およびオスの解発因子の認識機構について明らかにされた例はない。

本研究ではフェロモン源定位行動から交尾行動へのスイッチングが容易に観察できるカイコガを対象として、交尾行動の解発因子を同定するとともに、解発因子の感覚受容機構を解明することを目的とした。そして、これらの情報をもとに交尾行動の発現を制御する神経回路を明らかにすることで、交尾行動の分子・神経基盤を解明できると考えた。さらに、交尾行動に関与する神経回路を、フェロモン源定位行動を生成する神経回路と比較分析することにより、フェロモン情報と交尾行動の解発因子の情報統合の仕組みが明らかになり、ガ類の配偶行動における行動スイッチングのメカニズムに迫れると考えた。

(1) 小野知洋 (1974) *防虫科学* 39: 93-95. (2) Ono T (1980) *Kontyu*, 48: 540-544. (3) 猪子英俊 (1982) *応動昆* 26: 10-14. (4) Grant GG et al. (1987) *J Chem Ecol* 13: 345-356.

2. 研究の目的

本研究では、カイコガをモデルとして、ガ類昆虫のオスの交尾行動の制御機構を交尾行動の解発因子 - 感覚系における受容機構 - 神経系における情報処理の観点から明らかにし、性フェロモンによる定位行動からメスへの交尾行動への行動スイッチングの基本機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

カイコガ蛹(錦秋×鐘和)は愛媛蚕種から購入し、羽化まで雌雄別に 25 で保管した。羽化後は実験に使用するまで 15 で飼育し、羽化後 1-6 日後のオスカイコガを以下の実験に使用した。

(2) 受容部位の同定実験

オスカイコガにメスを提示して自由行動下でオスの行動を高速カメラ(k8-USB、カトウ光研)で記録した。動画を解析し、交尾行動の指標となる腹曲げ行動の直前にメス虫体に接触している部位を同定した。

(3) 解発因子の同定

成虫の腹部鱗粉を雌雄別に採取した。ヘキサンで鱗粉に含まれる化学物質を抽出したのち、クロロホルム-メタノール(2:1)で鱗粉を洗浄することで脱脂した鱗粉を得た。鱗粉は風乾したのち、粘着性の綿棒の先端に接着させた。綿棒のみでは全く交尾試行が発現しないことを確認してから、鱗粉を付加した綿棒をフェロモン源定位行動を発現しているオスの触角先端に接触させ、腹曲げ行動の発現の有無を検証した。

(3) RNAseq による発現量比較

オス触角を先端部分を含む領域とそれ以外の領域に分けて、それぞれの組織から total RNA を精製した。またオスの前脚、中脚のふ節を単離し、それぞれの組織から total RNA を精製した。RNAseq 解析は Genewiz 社に委託した。

(4) 神経活動依存的な抗体染色

プラスチックカップにオスカイコガを一頭ずつ入れ、1 μ g のボンピコールをしみ込ませたる紙片のみ、または紙片に加えてメス成虫をカップに導入し、30 分間静置しフェロモン源定位行

動および交尾行動を誘発させた。刺激 3.5 時間後にそれぞれの条件のオスから脳を摘出し、BmHR38 抗体（金沢大学 木矢剛智先生より分譲）および synaptogagmin 抗体により染色を行った。BmHR38 抗体は Alexa488 標識二次抗体で、synaptogagmin 抗体は Alexa546 標識二次抗体で検出した。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡（LSM510, Zeiss）を用いて取得した。

4. 研究成果

(1) 解発因子の受容部位の同定

オスの交尾行動の解発因子の同定に向けて、まずオスが解発因子を受容する部位の同定を行った。高速度カメラを用いて、定位行動から交尾試行へ行動変化の詳細な解析を行った。その結果、交尾試行の指標となるオスの腹曲げ行動は、オスの前脚ふ節または触角先端部のいずれかがメス腹部に接触することによって起こることがわかった（図 1）。自由行動下での腹曲げ行動直前のオスの接触部位の頻度を比較したところ、大きな差異は見られなかったことから、いずれかの部位だけからの情報入力でも腹曲げ行動が解発されることが示唆された。そこで、前脚ふ節、触角のいずれか一方を切除したオス個体の行動を観察したところ、いずれの個体においても切除していない器官のメス腹部への接触後に腹曲げ行動を起こすことがわかった。これらの結果は、触角先端部と前脚ふ節に解発因子の受容機能があり、これら 2 つの組織からの入力は独立して腹曲げ行動を解発することを示している。

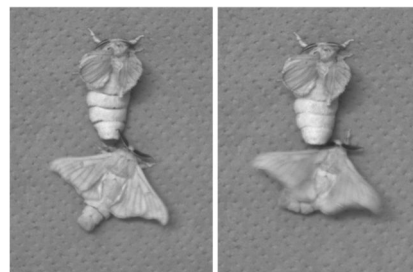


図 1 交尾行動（腹曲げ行動）の例
触角の先端が腹部に触れると（左）、その直後に腹曲げ行動が発現する（右）。

(2) 解発因子の同定

メスに含まれる交尾試行の解発因子を同定するために、フェロモンを提示しフェロモン源定位行動を発現させたオスに、メス虫体のヘキササン抽出物、ヘキササン抽出後のメス虫体、腹部の鱗粉を除去したメス虫体を提示し、前脚ふ節または触角先端部が抽出物もしくは虫体に接触したときの腹曲げ行動の発現を観察した。その結果、に対して最も高頻度で腹曲げ行動を起こすことが示された。一方で、については、腹曲げ行動の発現は著しく減少する傾向がみられた。これらの結果から、交尾行動の解発因子は、メスの鱗粉そのものである可能性が示唆された。そこで、メスのカイコガ腹部から鱗粉を採取し、ヘキササン処理により脱脂した鱗粉を用いて、実際に鱗粉自体に解発因子としての活性があることを検証した。フェロモン源定位行動を発現しているオス個体に、無処理および脱脂した鱗粉を作用部位である触角または前脚ふ節に接触させたところ、それぞれの鱗粉に対して、100% (20/20 個体) と 85% (17/20 個体) のオス個体が交尾試行の指標となる腹曲げ行動を起こした（図 2）。一方で、鱗粉のヘキササン抽出物を塗布した紙を定位行動中のオスに提示しても腹曲げ行動は起きなかった。これらの結果から、鱗粉に付着した化学物質ではなく、鱗粉自体の構造が交尾構造へのスイッチングに主要な役割を果たすことが示唆された。また、カイコガのオスは、フェロモン源定位行動中にオス個体への接触によっても、交尾試行を発現する。このことは鱗粉に性の認識に関わる特有の化学物質が存在しないことを示唆する。そこで、オスの脱脂した鱗粉を提示し、交尾試行を解発しうるか検討したところ、試行率は低下する傾向がみられたものの 65% (13/20 個体) のオス個体が交尾試行を示した。この結果から、オスの鱗粉にも交尾試行を解発する構造的特徴が存在することが示唆された。

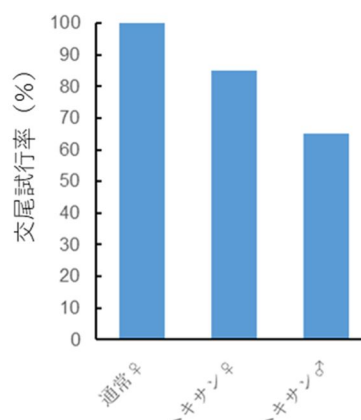


図 2 オスカイコガの鱗粉に対する交尾試行の発現率 (N=20)

(3) RNAseq による関連遺伝子の推定

(1)の結果から、オス触角先端部と前脚ふ節によるメスへの接触が交尾行動の指標となる腹曲げ行動を引き起こすことが示された。そこで、RNAseq 解析によりオスの触角先端部と前脚ふ節で優勢的に発現する遺伝子のリスト化を行った。具体的には、オスの触角先端部と触角のそれ以外の部位、オス前脚ふ節と中脚ふ節の間で遺伝子発現頻度の比較を行い、触角先端部と前脚ふ節で高頻度に発現する遺伝子を探索した。その結果、化学感覚を中心に湿度、温度、聴覚（機械感覚）など多様な感覚情報の受容に関与することが報告されているイオノトロピック受容体（IR）ファミリーに属する複数の遺伝子が触角先端部において優勢的に発現することが明らかになった（表 1）。一方で、前脚ふ節で優勢的に発現する遺伝子のリストには、触角先端で優勢的に発現していた IR 遺伝子を含めて感覚受容に関与することが示されている遺伝子は含まれて

いなかった。これらの結果から、両者で共通して解発因子の受容に関与する候補遺伝子の推定には至らなかった。今後、触角先端で優勢的に発現する IR のノックアウト体を作成し、交尾行動への影響を調べることで解発因子を受容する遺伝子の同定が可能であろう。

表 1 触角先端部で優勢的に発現していた IR 関連遺伝子

Gene No.	logFC	BLASTp best hit
1	3.81	antennal ionotropic receptor 41a-2 [Dendrolimus punctatus]
2	3.63	ionotropic receptor 75a [Bombyx mori]
3	3.54	ionotropic receptor 76b [Heortia vitessoides]
4	3.40	glutamate receptor ionotropic, delta-2-like isoform X1 [Trichoplusia ni]
5	3.30	ionotropic receptor 75a-like [Bombyx mori]
6	3.37	glutamate receptor ionotropic, kainate 2 [Bombyx mori]
7	2.80	ionotropic receptor 75a [Bombyx mori]
8	3.06	ionotropic receptor 75a-like, partial [Bombyx mandarina]
9	2.90	glutamate receptor ionotropic, kainate 2 isoform X2 [Bombyx mori]
10	2.65	ionotropic receptor 87a, partial [Peridroma saucia]

(4) 神経活動依存的マーカーを利用した回路同定の試み

フェロモン源定位行動から交尾行動へのスイッチングに関与する神経回路の同定を目的として、神経活動依存的に発現する BmHR38 の抗体を用いて神経細胞の標識を行った。ボンピコールのみ、ボンピコールに加えてメス個体との接触により腹曲げ行動(交尾試行)を高頻度で発現させたオスカイコガの脳内の BmHR38 発現パターンを比較した。しかし、両者の間で明確な差異は検出できず、期間内に神経回路の同定に関する手がかりを得るには至らなかった。触角と前脚ふ節という異なる器官からの入力が最終的に交尾行動という同一の行動を解発することから、それぞれの器官からの神経入力経路をバックフィル法などにより丹念に追っていくアプローチが有効かもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujii T, Kodama S, Ishikawa Y, Yamamoto M, Sakurai T, Fonagy A	4. 巻 142
2. 論文標題 Lipid droplets in the pheromone glands of bombycids: Effects of larval diet on their size and pheromone titer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinsphys.2022.104440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiota Y, Sakurai T, Ando N, Haupt SS, Mitsuno H, Daimon T, Kanzaki R	4. 巻 24
2. 論文標題 Pheromone binding protein is involved in temporal olfactory resolution in the silkworm.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yusuke Shiota, Takeshi Sakurai	4. 巻 642
2. 論文標題 Silencing of OBP genes; Generation of loss-of-function mutants of PBP by genome editing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 325-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2020.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤井毅、櫻井健志	4. 巻 5
2. 論文標題 カイコガの性フェロモン腺における微量成分を考える	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 34-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 清水伸泰, 藤井毅, 戎煜, 石川幸男, 櫻井健志, 光野秀文	4. 巻 57
2. 論文標題 脂肪酸に由来するフェロモンの生合成と受容機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 749-759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 櫻井健志	4. 巻 53
2. 論文標題 カ類の高選択的・高感度な性フェロモン受容の分子機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 13 - 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 櫻井健志
2. 発表標題 カ類の性フェロモン受容機構の分析と行動制御への応用
3. 学会等名 第71回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yusuke Shiota, Takeshi Sakurai	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 21
3. 書名 Pheromone detection and processing in the silkworm <i>Bombyx mori</i> in Insect Sex pheromone Research and Beyond: From Molecules to Robots	

1. 著者名 Takeshi Sakurai, Shigehiro Namiki, Hidefumi Mitsuno, Ryohei Kanzaki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier Science Publishing Co Inc.	5. 総ページ数 25
3. 書名 Pheromone detection and processing in the silkmoth Bombyx mori in Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology 2nd Edition	

〔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
研究分担者	中 秀司 (Naka Hideshi) (00443846)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究分担者	並木 重宏 (Namiki Shigehiro) (40567757)	東京大学・先端科学技術研究センター・准教授 (12601)	
研究分担者	藤井 毅 (Fujii Takeshi) (30730626)	摂南大学・農学部・講師 (34428)	

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
---------	---------