

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 5月31日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22780047

研究課題名（和文） アゲハチョウ成虫の配偶行動に作用するインフォケミカルに関する研究

研究課題名（英文） Study of infochemicals involved in mating behavior of papilionid butterfly adults

研究代表者

大村 尚（OMURA HISASHI）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：60335635

研究成果の概要（和文）：日本産アゲハチョウ 12 種類のうち、6 種の成虫は体表脂質組成において雌雄同型であるのに対し、6 種は明瞭な性的二型を示すことがわかった。シロオビアゲハ、ナミアゲハの雄成虫は、前脚で交尾相手を触診した後に交尾を試みることがわかった。電気生理学的試験において、雄成虫の前脚にある毛状感覚子は成虫より抽出した体表脂質に味覚応答を示した。これらの結果から、アゲハチョウは交尾相手の体表面にある脂溶性物質を配偶行動の手がかりに用いている可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Of the 12 papilionid butterflies inhabiting in Japan, 6 species were sexually dimorphic but 6 species were sexually monomorphic in the chemical composition of cuticular lipid of adults. Prior to copulation, male adults of *Papilio xuthus* and *Papilio polytes* are found to show palpation behavior to mating partners using their forelegs. Electrophysiological measurements revealed that sensilla trichodea of the foreleg tarsi show gustatory responses to the cuticular lipid extracts from conspecific and heterospecific adults. These results strongly suggest that adults of papilionid butterflies use the cuticular lipid substances of mating partners for chemical cues of mate recognition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

 キーワード：アゲハチョウ、体表脂質、香気成分、配偶行動、種間識別
 異性認知、味覚感覚子、化学分析

1. 研究開始当初の背景

チョウ目昆虫の配偶行動に関する研究の多くは、これまでガを対象に行われている。ガの雌成虫は尾端から匂いを放出し、同種雄を遠隔的に誘引して交尾を行うことが知られている。この匂いには、ガに嗅覚刺激として作用する種特異的なインフォケミカル

性フェロモンが含まれている。1959年のカイコガにおけるボンビコールの発見以来、600種以上のガから性フェロモンの構造決定が行われている。一方、同じチョウ目昆虫に分類されるチョウでは、視覚情報（交尾相手の翅の斑紋や色彩パターンなど）を配偶行動の主要な手がかりに利用すると考えられて

おり、配偶行動に作用するインフォケミカルに関する研究はガに比べて非常に少ない。しかし、マダラチョウやシロチョウなど一部の種において、雄成虫の匂いが雌の交尾行動を制御することが明らかにされ、嗅覚に作用するインフォケミカルを手がかりとした配偶行動システムはチョウにおいても普遍的に存在する可能性が指摘されてきた。

申請者はこれまで、数種のチョウについて成虫香気の化学組成を明らかにしてきた。その研究の一つ、アゲハチョウ科シロオビアゲハ成虫の香気成分を調べる過程で、雌雄の体表脂質（炭化水素）組成が顕著な性的二型を示すことに気づいた。そこで他のアゲハチョウについて予備的に調べたところ、成虫の体表脂質は種特異的な化学組成を示すこと、特定種の雄成虫は特徴的な香気（揮発性）成分をもつこと、が確認された。さらに、野外網室でシロオビアゲハの配偶行動を観察したところ、求愛行動を行う雄成虫は交尾相手に接触（触診）してから交尾を行う、ことが確認された。これらの事実から、アゲハチョウ成虫の香気や体表脂質は、配偶行動における異性認知や異種識別のための化学的指標として機能する可能性や、雄成虫が行う触診行動は交尾相手の体表脂質を接触化学刺激として味覚受容している可能性が予測される。特に後者について、チョウ目昆虫において体表脂質のインフォケミカルとしての機能はほとんど解明されていないことから、彼らの配偶行動や生殖隔離の制御要因として新規な視点を提案できると考えた。

2. 研究の目的

(1) 成虫体表脂質および香気の化学分析

GC および GC-MS を用いて、雌雄成虫の体表脂質および香気の化学分析を行い、組成プロフィールの種毎の特徴ならびに雌雄差を明らかにする。

(2) 配偶行動における成虫由来の化学的形質の機能解析

半自然条件下で自由飛翔する雄成虫を材料に、同種または異種成虫由来の体表脂質または香気成分で処理したモデルを提示し、これらの化学的刺激の有無による配偶行動への影響を精査する。

(3) 成虫前脚味覚受容器の体表脂質に対する応答特性

成虫の前脚附節に位置する味覚感覚子の応答特性を電気生理学的方法で調べ、触診を行う雄成虫は交尾相手の体表脂質をインフォケミカルとして味覚受容していることを立証する。

3. 研究の方法

(1) 成虫体表脂質および香気の化学分析

日本産アゲハチョウ 14 種の成虫から体表脂質、香気成分を溶媒抽出し、その化学的形質を調べた。12 種のアゲハチョウは野外個体を起源に研究室で累代飼育を行い、羽化後 3 日齢の成虫（雄 10 個体、雌 10 個体）を抽出に供した。12 種のアゲハチョウの系統分類は下記の通りである。

[タイシアゲハ族] 1 種

ギフチョウ

[キシタアゲハ族] 2 種

ジャコウアゲハ、ベニモンアゲハ

[アゲハチョウ族] 9 種

ナミアゲハ、キアゲハ、クロアゲハ

シロオビアゲハ、オナガアゲハ

ナガサキアゲハ、モンキアゲハ

カラスアゲハ、ミヤマカラスアゲハ

アオスジアゲハ族に分類される 2 種—アオスジアゲハ、ミカドアゲハは野外採集した成虫数個体を抽出に供した。

各種成虫は -30°C で冷凍殺虫した後、精製ジクロロメタンに 3 分間浸漬した。抽出物は $100\mu\text{L}$ に濃縮し、Shimadzu GC-17A ガスクロマトグラフおよび Shimadzu QP5000 質量分析計を用いて成分分析を行った。

(2) 配偶行動における成虫由来の化学的形質の機能解析

研究室で累代飼育し、羽化後 1 週間以内のシロオビアゲハ、ナミアゲハを材料に、半自然条件下で交尾行動の操作実験を実施した。温室または野外網室に雄成虫 10~15 個体を自由飛翔させた。雌成虫、雌成虫の新鮮死体や乾燥標本、成虫 1 個体から抽出した体表脂質を塗布した乾燥標本をモデルとして雄成虫に所定時間提示した。モデルに対する雄成虫各個体の行動をデジタルビデオカメラで記録し、モデルへ接近した後の行動を以下の三段階の尺度で評価した。

1 : 前脚でモデルに接触（触診）

2 : モデルに降り立つ（着陸）

3 : 腹を曲げ交尾を試みる（交尾）

三段階の行動が生じる平均割合を算出することで、雄の交尾行動の強度を評価し、モデルの種類や化学的形質の違いが交尾行動に与える影響を調べた。

(3) 成虫前脚味覚受容器の体表脂質に対する応答特性

研究室で累代飼育し、羽化後 10 日以内のシロオビアゲハ、ナミアゲハを材料に用いてチップレコーディング法による電気生理学的試験を実施した。雄成虫から切除した前脚をステージ上に固定し、タングステン針を不

関電極として第1附節に挿入した。成虫1個体から抽出した体表脂質を Triton-X100 で可溶化し、所定濃度の水溶液としてガラス微小電極に充填した。これを記録電極に用い、倍率100倍程度の実体顕微鏡下で第5～3附節にある毛状感覚子先端に接触させ、味覚刺激を与えた。その際の電位変化を Cygnus ER-1 細胞外記録用アンプで記録した。電極接触後1秒間の応答パターンを各試料で比較し、体表脂質に対する応答特性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 成虫体表脂質および香気の化学分析

a. 体表脂質

アゲハチョウ成虫の体表脂質は、炭素数23～31の炭化水素、脂肪族ケトン、エポキシイド、炭素数16, 18の脂肪酸、コレステロール、スクアレンなどを主要な構成成分にもつことがわかった。

体表脂質の過半を占める炭化水素のプロファイルは、弱いながらもアゲハチョウの系統毎に違いが認められた。タイサアゲハ族のギフチョウ、アゲハチョウ族のナミアゲハ、キアゲハ、アオスジアゲハ族のアオスジアゲハ、ミカドアゲハは、炭化水素全体において分枝アルカンの占める割合が比較的高い傾向にあった。一方、キシタアゲハ族のジャコウアゲハ、ベニモンアゲハ、アゲハチョウ族の残る7種は炭化水素全体においてアルカンの占める割合が比較的高い傾向にあった。

それぞれの種の雌雄計20個体について、18種類の主要な体表脂質を変数に主成分分析を行ったところ、体表脂質の化学組成に明瞭な雌雄差のある種とない種に大別できることがわかった。ギフチョウ、ナミアゲハ、キアゲハ、オナガアゲハ、モンキアゲハ、ナガサキアゲハの体表脂質は雌雄同型(図1: オナガアゲハの例)であるのに対し、ジャコウアゲハ、ベニモンアゲハ、クロアゲハ、シロオビアゲハ、カラスアゲハ、ミヤマカラスアゲハでは雌雄二型(図2: シロオビアゲハの例)であった。アオスジアゲハ族二種は供試個体数が少なく雌雄差の検証は行っていない。

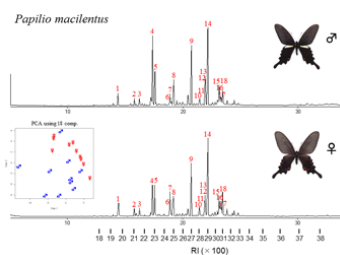


図1 オナガアゲハの体表脂質プロフィール

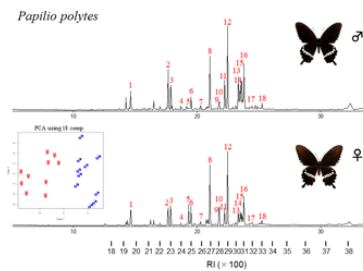


図2 シロオビアゲハの体表脂質プロフィール

b. 香気成分

キシタアゲハ族の二種、ジャコウアゲハとベニモンアゲハの雄成虫から複数のセスキテルペノイド化合物を多量に検出した。雄が強い匂いを有するという化学的特徴は他のアゲハチョウには認められず、本族のアゲハチョウに特異的な形質と考えられる。検出された匂い成分のうち、ジャコウアゲハの主要成分について、雄成虫27個体の抽出物から単離・同定を試み、その構造を γ -himachalene 骨格を有する酢酸エステルと決定した。本化合物は新規物質であり、ジャコウアゲハの雄特異的な匂い成分と考えられる。また、この化合物は主に雄の胸部に集中し、交尾によってその一部が雌の虫体に移行することを確認した。この事実から、同種の雄に対し雌が交尾済みであることを表す性フェロモンとしての潜在的な機能が示唆される。

アゲハチョウ族のクロアゲハ、特に雄成虫から量的には少ないながらも数種の香気成分を検出した。このうち linalool, 2,3-butanediol は雄特異的であり、heptanal, nonanal, methyl salicylateなどは雌雄共通成分であった。これらの化合物のいくつかは、近縁種シロオビアゲハ成虫の香気中に含まれており、linaloolはシロオビアゲハにおいても雄に特異的であった。

これらの事実から、特定のアゲハチョウには雄特異的な香気成分が存在することがわかった。

(2) 配偶行動における成虫由来の化学的形質の機能解析

a. 前脚処理を施した雄成虫の応答

シロオビアゲハ、ナミアゲハとも無処理の雄成虫は、雌に対する求愛の際、必ず触診を行ってから交尾に至る。そこで、雄の前脚を切除または全ての脚をマニキュア被覆した処理雄を準備し、無処理の対照雄と自由に飛翔させて交尾成功率を比較した。対照雄と比較して処理雄の交尾成功率は若干低下したが、処理によって交尾が阻害されることはなかった。また、前脚切除雄では中脚を使った触診が観察され、マニキュア被覆雄では触診→交尾までの行動に大きな変化は認められ

なかった。

b. 体表脂質を塗布することによる雄成虫の行動変化

シロオビアゲハの雄成虫は、雌成虫の(乾燥)標本に対しても積極的な求愛行動を行う。この性質を利用して、雌成虫の(乾燥)標本をモデルとし、これに体表脂質を塗布することによる雄の行動変化を三段階の尺度基準で評価した。結果を表1に表す。雄成虫の雌(乾燥)標本に対する交尾反応は、雌の新鮮死体に対する反応とほぼ同等であり、接近した雄の半数以上が腹曲げし、交尾を試みた。この標本に同種雌より抽出した体表脂質を塗布しても行動はさほど変化しないが、同種雄または異種(クロアゲハ)雌より抽出した体表脂質を塗布すると、交尾、着陸行動の割合は大きく低下し、多くの雄は触診行動のみにとどまった。この結果から、シロオビアゲハ雄成虫は交尾相手の体表脂質を配偶者選択に利用していることが裏付けられた。

表1 シロオビアゲハ雄成虫の雌モデルに対する配偶行動

	行動割合(%)		
	触診	着陸	交尾
雌新鮮死体	16.9	18.5	50.8
雌標本	16.8	13.9	63.9
雌標本+同種雌脂質	19.6	26.1	43.5
雌標本+同種雄脂質	48.0	18.0	8.0
雌標本+異種雌脂質	36.3	18.2	20.0

(3) 成虫前脚味覚受容器の体表脂質に対する応答特性

a. 附節毛状感覚子の形態観察

実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡観察により、シロオビアゲハ、ナミアゲハ雄成虫の前脚附節から2種類の毛状感覚子の所在を確認した(図3)。附節腹面中央部には太く大型の毛状感覚子が密に生えており、これを **Medial sensilla trichodea (MST)** と定義した。附節側面には細く小型の毛状感覚子が粗に生えており、これを **Lateral sensilla trichodea (LST)** と定義した。

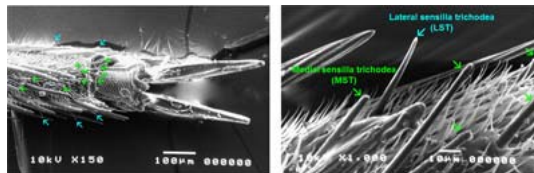


図3 シロオビアゲハ前脚附節 SEM 写真

この2種類の毛状感覚子を対象にして、同種・異種成虫から抽出した0.5個体当量の体表脂質試料に対する味覚応答をチップレコーディング法で調べた。

シロオビアゲハにおいて、MSTはほとんど

応答しなかったのに対し、LSTの約半数は体表脂質に対して味覚応答を示した(図4)。興味深いことに、同種雌のみならず同種雄や異種の体表脂質にも明瞭な応答が確認された。

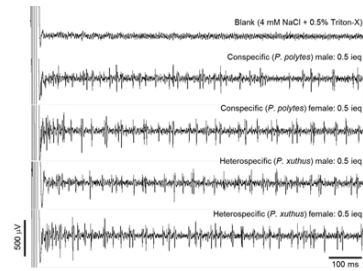


図4 シロオビアゲハ LST の味覚応答

ナミアゲハでは LST がほとんど応答しなかったのに対して、30%強の MST が体表脂質に対して味覚応答した。シロオビアゲハ同様、同種雌雄や異種の体表脂質にも応答を示した。

(4) 総合考察

アゲハチョウ成虫の体表脂質、香気成分は、種や性別を表す化学的特徴になりうる。特に体表脂質は、それぞれの種で特徴的な化学組成を示すことから、種間識別の手がかりとして利用できるポテンシャルをもつと考えられる。一方、体表脂質の性差や香気成分の種特異性は限定的であり、これらは特定の種が異性認知をする際の手がかりになっているのかもしれない。

行動実験によって、体表脂質が雄成虫の配偶行動に影響をあたえることが証明された。電気生理学的試験により、雄成虫の前脚には味覚受容器として機能する毛状感覚子があり、成虫より抽出した体表脂質に味覚応答することを明らかにした。これにより、雄は触診行動を通じて交尾相手の体表脂質を味覚的に受容し、交尾のインフォケミカルとして利用していることを初めて明らかにした。

接触化学刺激を利用した配偶システムはショウジョウバエやカミキリで知られているが、チョウ目昆虫ではほとんど検証されていない。本研究で得られた知見は、チョウの配偶システムに接触化学因子という新たな視点を加えた点において新規性を有する。一方、前脚処理を施した雄成虫において交尾率の顕著な低下が認められなかったことから、雄の触診で受容される接触化学因子は配偶行動において必須かつ決定的な制御因子として機能していない。考えられる背景として、体表脂質を利用した配偶システムは、同種の認識よりも異種の識別にその主目的をおいている可能性があり、今後はその仮説を証明する実験を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Omura Hisashi, Two lactones in the androconial scent of the lycaenid butterfly *Celastrina argilous ladonides*, *Naturwissenschaften*, 査読有, 100, 2013, pp373-377.
2. Omura Hisashi Sexual dimorphism in scent substances and cuticular lipids of adult *Papilio protenor* butterflies, *Z. Naturforsch.*, 査読有, 67c, 2012, pp331-341.
3. Omura Hisashi, Pungent odor of the adult skipper butterfly *Erynnis montanus* (Lepidoptera: Hesperiiidae), *Appl. Entomol. Zool.*, 査読有, 46, 2011, pp281-286.
4. Omura Hisashi, Allelochemicals in Plant-Insect Interactions, *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology* (eds. L. Mander and H.-W. Liu), Elsevier, 査読無, 2010, pp563-594.

[学会発表] (計6件)

1. 大村 尚, ジャコウアゲハ雄成虫の新規香気成分, 第57回日本応用動物昆虫学会大会, 2013年3月28日, 日本大学生物資源科学部(藤沢市)
2. 大村 尚, ナミアゲハの配偶行動における触診の意味: 体表脂質の味覚受容, 第57回日本応用動物昆虫学会大会, 2013年3月28日, 日本大学生物資源科学部(藤沢市)
3. 大村 尚, アゲハチョウ成虫の体表脂質は配偶行動の指標となるのか?, 平成24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, 2012年10月12日, 岡山大学(岡山市)
4. Omura Hisashi, Possible roles of cuticular lipids in mating behavior of *Papilio polytes* (Lepidoptera: Papilionidae), XXIV International Congress of Entomology, Aug 19-25 2012, Daegu Korea
5. 大村 尚, アゲハチョウ成虫の体表脂質にみられる種および性特異的な化学組成, 第55回日本応用動物昆虫学会大会, 2011年3月27日, 九州大学(福岡市)
6. Omura Hisashi, Chemical diversity in the cuticular lipids of adult papilionid butterflies, *International Society of Chemical Ecology*, 26th, Jul 31-Aug 4 2010, Tours, France

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 尚 (OMURA HISASHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号: 60335635

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし