

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06074

研究課題名(和文) 植物の乾燥ストレスにともなう植食性昆虫の産卵選好性の変化

研究課題名(英文) The change in oviposition preference of phytophagous insect by plant drought stress

研究代表者

大村 尚 (OMURA, Hisashi)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・准教授

研究者番号：60335635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キタキチョウは植物の代謝中間体や生理調節物質を利用して産卵を行う。既知の2成分に加え、本研究では新たにトレオン酸・エリスロン酸を産卵刺激物質として同定した。活性物質の一つピニトールは植物の乾燥ストレス応答によって増加し、ピニトール濃度の高い寄主植物に対してチョウは低い産卵選好性を示した。本種が産卵しない植物には4種類の活性物質のいずれかが含まれており、本種の産卵は主に阻害物質によって規定されると考えられた。実際、非寄主植物であるシロツメクサから4つの産卵刺激物質と産卵を阻害する青酸配糖体を同定した。本種の味覚受容体遺伝子を探索したところ、産卵に関わる4つの候補遺伝子を発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の乾燥ストレス応答は植食性昆虫の成長・発育を高める効果がある。これに対して本研究では、乾燥ストレス応答によって植食性昆虫の産卵が抑制されることを見だし、成虫と幼虫で環境に応じた餌資源の利用戦略が異なることを明らかにした。この知見は、地球温暖化・干ばつの増加にともなう害虫発生パターンの変化を予測するのに役立つ。また、灌水量を減らして栽培することで作物を害虫に産卵されにくくする新規防除方法の開発に応用できる。狭食性昆虫の産卵は、行動抑制因子の役割がより重要である。よって今後の化学受容と行動発現に関する研究は、刺激因子よりも抑制因子に焦点をおいて進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：The common grass yellow butterfly *Eurema mandarina* uses plant metabolic intermediates and physiological regulators for their oviposition. In addition to the two active compounds reported previously, erythronic and threonic acids have been newly identified as the oviposition stimulants. The concentration of pinitol, one of the active compounds, in host plants increased with host plant phenology and drought stress, and drought stress on host plants reduced oviposition preference of *E. mandarina*. Interestingly, non-host plants also contained any active compound, indicating that the oviposition availability of *E. mandarina* is primarily determined by oviposition inhibitors. In fact, one of the non-host plant, white clover, had four oviposition stimulants and a cyanogenic glycoside as an oviposition inhibitor. Genetical analyses on taste receptors revealed four candidate genes involved in oviposition.

研究分野：化学生態学

キーワード：乾燥ストレス マメ科植物 チョウ 産卵 植物二次代謝産物 味覚受容体 寄主選択 植物昆虫間相互作用

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物が乾燥ストレスを受けると体内での物質生産を大きく変化させる。これは植食性昆虫にとって餌資源の変化を意味し、彼らの生活史は大きな影響を受ける。現在、干ばつの多発化・激甚化が世界各地で起きており、これに附随した害虫の異常発生も多発している。作物の安定供給や環境保全のためには、植物の乾燥ストレス応答にともない植物 - 植食者間相互作用がどのように変化するのかわかる必要がある。これまでの研究では主に植物を摂食・吸汁する昆虫を用いて彼らの摂食選好性や成長パフォーマンスの変化が調べられてきた。その結果、乾燥ストレスは植物中での遊離アミノ酸を増加させ、植食者に対する防御毒を減少させる、この変化は昆虫の成長にプラスの効果となり、次世代の個体が大量発生することで植物の被害(食害)が甚大化することが明らかにされた。彼らの植物利用戦略として「植物ストレス仮説¹⁾」や「最適防御仮説²⁾」などいくつかの仮説が提唱されている。これに対して、植物の乾燥ストレスが成虫の産卵に与える影響を調べた研究は極めて少ない。成虫期の昆虫は繁殖(子孫の繁栄)をより重視しており、植物のストレス応答に対してこれまでの知見とは異なる反応を示す可能性がある。

申請者は、マメ科植物に含まれキタキチョウの産卵を誘導する生理活性物質の探索を続けている。これまでに主要な寄主植物であるネムノキ・メドハギから二種類の産卵刺激物質 - 中性物質のピニトール(P)³⁾と塩基性物質のグリシンベタイン(GB)⁴⁾を同定した。これらは、乾燥ストレスを受けた植物が浸透圧調節のために産生する「オスモライト」であり、様々な植物種に存在することが知られている。これよりキタキチョウは幼虫が食べることでできない非寄主植物にも産卵できる可能性があり、その一例として申請者は本種がカタバミ科植物カタバミに産卵することを見つけている。また、他のチョウで見つかった産卵刺激物質に対する応答とは異なり、PやGBがある濃度を超えるとキタキチョウの産卵反応は低下する傾向を示した^{3),4)}。この事実は、母チョウがオスモライトをつかって植物の生理状態を調べ、過剰な乾燥ストレスをうけたり季節変化により劣化したりした植物への産卵を避けている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、キタキチョウと関連する植物を材料に用いることで、狭食性植食性昆虫のチョウにおいてオスモライトのような植物普遍的成分を産卵に利用することの進化学・生態学的意義を考察し、植食性昆虫の植物選択が日和見的なものではなく餌資源の将来利用価値を予測した適応的なものである可能性を検証する。植物化学成分に対する本種の産卵反応について、以下の3つの実験を行う。

(1)キタキチョウの産卵制御因子となる植物化学成分の探索

寄主植物のネムノキ・メドハギにおいて、高極性水溶性酸性画分に含まれる未知の産卵刺激物質を明らかにする。また、ネムノキ・メドハギと同じマメ科植物でありながら本種が産卵しないシロツメクサ・スズメノエンドウ・カラスノエンドウについて、産卵刺激物質の含有量を調べるとともに産卵阻害物質が含まれる可能性を検証する。さらに、本種が偶発的に産卵するカタバミ科植物のカタバミについても、産卵刺激物質・阻害物質の存在を明らかにする。

(2)植物のフェノロジー・乾燥ストレス応答にともなう産卵刺激物質の変動

ネムノキ野生株における産卵刺激物質の量的変動を調べ、本種産卵選好性の季節変化との関連性を考察する。さらに、ネムノキ栽培株に人為的乾燥ストレスを与えて産卵刺激物質の量的変化を調べるとともに、チョウの産卵選好性への影響を精査する。

(3)植物化学成分の味覚受容体解析

チョウの雌成虫は、前脚で植物化学成分を味覚受容して寄主植物であることを確認した後、産卵を行う。雌の前脚には産卵に関わる植物化学成分をリガンドとする味覚受容体が特異的に発現しており、その受容体タンパク質・遺伝子の解析を行う。

3. 研究の方法

(1)生物試料

キタキチョウ雌成虫は、広島県東広島市で野外採集または研究室で累代飼育した個体を用いた。植物試料は、本種の寄主植物としてマメ科のネムノキ・メドハギ、非寄主植物としてマメ科のシロツメクサ・スズメノエンドウ・カラスノエンドウ、カタバミ科のカタバミを用いた。生物試験および化学分析の一部に3年目のネムノキ栽培株を用いた以外、すべての植物試料は東広島市で野外採集した。

(2)植物化学成分の抽出・分析

植物新鮮葉を秤量したのち室温で MeOH 抽出した。この抽出物を液 - 液分配抽出、逆相カラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーで分画した。雌チョウの産卵を誘導または阻害する活性画分について、HPLC で分画を進めた後、TMS 誘導体化 GC-MS,HR-GC-MS,HR-ESI-MS,¹H/¹³C-NMR などの分析に供した。

(3)チョウの産卵反応試験

試験前に交尾雌の産卵反応が正常（ネムノキに産卵し、プラスチック人工葉には産卵しない）であることを確認した。所定濃度に調整した画分または試料溶液を人工葉に塗布して雌に提示し、産卵反応の有無を 3~5 回反復試験した。一試料について雌 10 個体以上で反復試験し、雌の平均産卵率から試料の産卵活性を評価した。

(4)チョウの産卵選好性試験

温室に設置した小型網室（75×105×90 cm）に、交尾雌 1 個体を放飼した。土壌水分率 20%（ストレス株）または 70%（健全株）の栽培ネムノキを 1 株ずつランダムな順番で網室にいれ、30 分間チョウに自由に産卵させた。試験は雌 31 個体で繰り返し試験され、各雌の処理株・対象株への産卵数を数えた後、産卵数を目的変数、株の土壌水分率・株を入れる順番を説明変数、雌をランダム高価とする一般化線形混合モデル(GLMM)で解析した。

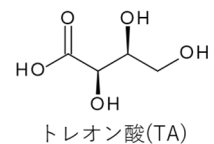
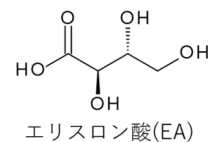
(5)mRNA の抽出および遺伝子解析

室内飼育した羽化後 2~4 日齢キタキチョウの未交尾雄 50 頭、未交尾雌 40 頭を、触角付き頭部、胸・胴部、前脚、中・後脚、前翅、後翅にわけ、RNA 保存剤に封入後、ホモジュナイズした。各サンプルの DNA, 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実施し、既存の昆虫味覚受容体遺伝子データとの相同性検索を実施した。

4. 研究成果

(1)新規産卵刺激物質の同定

ネムノキ・メドハギ抽出物の水溶性酸性画分より、エリスロン酸(EA)・トレオン酸(TA)を新規産卵刺激物質として同定した。EA は植物の新鮮重あたり約 0.01%、TA は約 0.1%含まれていた。雌の産卵はそれぞれの標品濃度 0.005%以上で誘導されたことから、植物中濃度で十分な産卵活性のあることがわかった。産卵反応の濃度応答曲線は EA と TA で異なり、EA が濃度 0.001%から 0.1%の範囲で右肩上がりになるのに対し、TA は濃度 0.01%で最大値となりそれ以上の濃度では活性が有意に低下した。この事実は、雌が EA・TA のわずかに 1 箇所の立体構造の違いを認識していることを意味している。植物中に存在する濃度で EA または TA を P と混合したところ雌の産卵反応は有意に亢進した。これより、先行研究において植物の水溶性中性画分と水溶性酸性画分との混合による産卵活性が協力的に亢進した現象³⁾を、主要成分の標品を混合することで同じように再現することができた。水溶性塩基性画分に含まれる GB⁴⁾とあわせて、ネムノキ・メドハギに含まれる本種の主要な産卵誘導因子をすべて明らかにすることができた。

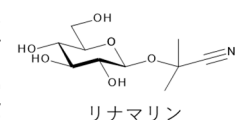


(2)植物における産卵刺激物質の普遍性

4 種類の非寄主植物の MeOH 抽出物を分画していくと高極性水溶性のサブ画分の中から雌に対して産卵活性を示すものが出現した。各植物の産卵活性画分で P,GB,EA,TA の存在・含有量を調べたところ、いずれかの成分が雌の産卵を誘導する閾値濃度以上で検出された。これより、キタキチョウの産卵反応は特定の植物群（たとえばマメ科寄主植物）に偏在する成分ではなく様々な植物群に普遍的に存在する成分によって誘導されることが明らかとなった。本種はあらゆる植物に産卵できる潜在能力を有しており、これにより寄主植物以外（たとえばカタバミ科植物）への誤産卵を比較的起こしやすいと考えられる。チョウはマメ科を利用する祖先種から種分化して狭食性を深化させたグループと考えられている。にもかかわらず、本種は植物の代謝・生理調節に深く関わる根源的な化学物質を産卵に利用している。この形質は、植食性昆虫の始祖的な形質の一つとして本種に引き継がれているのかもしれない。

(3)産卵阻害物質の同定

本種が産卵しないマメ科植物シロツメクサの中極性水溶性画分から、靑酸配糖体的一种リナマリンを産卵阻害物質として同定した。本化合物は植物新鮮葉中に約 1%含まれており、濃度 0.1%で他の産卵刺激物質の活性を強く抑制した。これまでの研究から、狭食性昆虫における寄主範囲の決定因子として植物特異的な産卵刺激物質の重要性が論じられてきたが、本研究では産卵阻害物質が主要な決定要因となることを明らかにした。



(4)産卵刺激物質の動態

キタキチョウの産卵刺激物質である P,GB は浸透圧調整物質(オスモライト) EA は植物の代謝中間体、TA はアスコルビン酸分解物として産生される。これより産卵刺激物質は環境条件によって植物での含有量が大きく変動すると考え、少量の植物試料からでも検出可能な P について、野生ネムノキ株での年間の季節変動および栽培ネムノキ株での乾燥ストレスによる変動をそれぞれ調べた。野生ネムノキでは、5月の展葉後、P 濃度が季節と共に増加した(図1)。栽培ネムノキ株に3段階の乾燥ストレス(大→土壌含水率15%、中→40%、小→60%)を与えたところ、有意ではないが、P 濃度は乾燥ストレスの強度に依存して増加する傾向を示した。本種の P に対する産卵反応は濃度0.5%で最大となり、それ以上の濃度では反応が徐々に低下していく³⁾。これより、植物のフェロロギーや乾燥ストレスによって P 濃度が極端に増加すると本種が産卵しにくくなることが予想された。

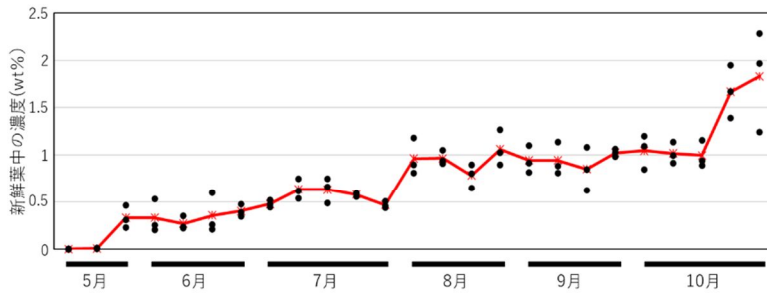


図1 2020年野生ネムノキ株でのピニトール濃度季節変化
(●:測定値 *:平均値)

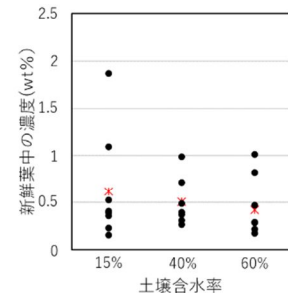


図2 乾燥ストレスによる栽培ネムノキ株でのピニトール濃度変化
(●:測定値 *:平均値)

(5)乾燥ストレスによる産卵選好性への影響

2種類の栽培ネムノキ株(土壌水分率20%のストレス株と70%の健常株)を順に1株ずつ雌に与え、それぞれに対する産卵を30分間記録した。雌の多くは、先に与えられた株へ有意に多く産卵した(図3左)。一方、与える順番にかかわらず雌はストレス株よりも健常株へ有意に多く産卵した。これより本種は乾燥ストレスを強く受けた植物への産卵を嫌う傾向があり、過剰に産生された P によって産卵反応が低下する先行研究や(4)の実験結果を実際の植物株でも再現することができた。

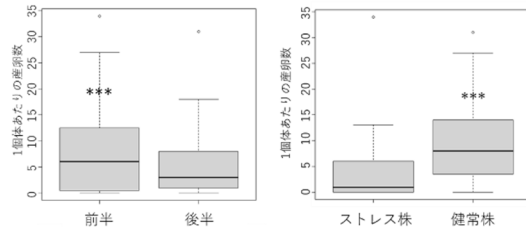


図3 栽培ネムノキ株に対するキタキチョウの30分間の産卵数

(6)雌の産卵に関与する味覚受容体の候補遺伝子

各サンプルの RNA-seq を行い、4つの味覚受容体候補遺伝子を発見した。その1つは雌雄の脚に特異的に発現しており、相同性検索の結果、カイコ味覚受容体遺伝子 BmGr10 に類似のアミノ酸配列をもち、糖受容に関わっていることが予想された。残る3つは、断片的なアミノ酸配列しか得られていないが、雌の脚でのみ発現しており、産卵を制御する植物化学成分受容に関与している可能性がある。

以上の結果から、キタキチョウは、植物の乾燥ストレスに応答して産卵を調節することがわかった。本研究では植物の(過度な)乾燥ストレスは昆虫の産卵選好性に負の影響を及ぼし、植食性昆虫の摂食選好性や成長パフォーマンスが亢進するとしたこれまでの知見とは対照的であった。この事実は、餌資源が環境ストレスによって質的に変化すると、植食性昆虫は成長ステージと繁殖ステージで異なる反応を示すことを物語っている。今後は、キタキチョウの P 以外の産卵刺激物質について乾燥ストレスにともなう変化と産卵選好性への影響を調べるとともに、本研究で対象としなかった植物揮発性成分や葉面ワックス成分の影響についても調べる必要がある。本研究の成果は、今後、人為的な乾燥ストレスを施して害虫に産卵されにくくする防除法の創出の基礎的知見として利用が期待される。

(引用文献)

- 1) White 1969. *Ecology* **50**:905-909.
- 2) Rhoades 1979. In: *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites* (Rosenthal GA & Janzen DH, Eds.). Academic Press: pp 3-54.
- 3) Mukae et al. 2016. *J. Chem. Ecol.* **42**:1122-1129.
- 4) Ohashi et al. 2019. *J. Chem. Ecol.* **45**:371-377.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohashi Toshiki, Ohta Shinji, Omura Hisashi	4. 巻 44
2. 論文標題 A cyanogenic glucoside of <i>Trifolium repens</i> deters oviposition by the common grass yellow <i>Eurema mandarina</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 222 ~ 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12296	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松永千知・金澤尚希・高塚裕太・藤井 毅・太田伸二・大村 尚
2. 発表標題 マメ科植物の糖酸化合物に対するキタキチョウの産卵反応
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永千知・金澤尚希・高塚裕太・太田伸二・大村 尚
2. 発表標題 キタキチョウの産卵を誘導する植物糖酸化合物
3. 学会等名 令和3年度西日本応用動物昆虫研究会・中国地方昆虫学会合同例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金澤尚希・松永千知・太田伸二・大村 尚
2. 発表標題 キタキチョウが非寄主植物に産卵を行う化学的要因
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永千知・金澤尚希・太田伸二・大村 尚
2. 発表標題 スズメノエンドウ・カラスノエンドウに対するキタキチョウの寄主適合性の検討
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiki Ohashi, Shinji Ohta, Hisashi Omura
2. 発表標題 A cyanogenic glucoside, linamarin, regulates differential oviposition on white clover by coliadine butterflies, <i>Colias erate</i> and <i>Eurema mandarina</i> l
3. 学会等名 The 10th Conference of Asia-Pacific Association of Chemical Ecologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大村 尚・大橋駿樹・太田伸二
2. 発表標題 シロツメクサに対するキタキチョウの寄主適合性
3. 学会等名 令和元年度西日本応用動物昆虫研究会・中国地方昆虫学会合同例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三本木 至宏、上田 晃弘、杉野 利久、鈴木 卓弥、富山 毅、船戸 耕一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 256
3. 書名 SDGsに向けた生物生産学入門	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果のアウトリーチ
夢ナビライブ2021講義動画「生き物たちが使う化学の言葉」<https://doug.yumenavi.info/Lecture/PublishDetail/2021000498?back=>

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