

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580073

研究課題名(和文)チョウ目昆虫の蛹体色発現調節機構に関する研究

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms in pupal color development of some butterflies

研究代表者

山中 明(Yamanaka, Akira)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20274152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛹体色に影響を示すホルモン因子であるオレンジ色蛹誘導化因子の精製を試みた。C18-HPLCにより単一ピークの活性画分を得たが、極微量であったためアミノ酸配列解析に至らなかったが、精製ステップはほぼ確定できたと考えられる。他種チョウ類の蛹体色調節機構について、4種のチョウについて検討した。キアゲハ幼虫の脳神経系には蛹体色を変化させる因子が2種類存在することが示唆された。ジャコウアゲハの休眠蛹体色は、温度と湿度が重要な環境要因であり、キタテハの蛹体色は、温度が主要因であるが光周期も影響することが分かった。カラスアゲハの緑色型蛹は、主として食草の匂いと高湿度によって誘導されていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：OPIF-like activity was fractionated as one peak by C18-HPLC using ligated abdomens of *V. cardui* pharate pupae. Purification steps for OPIF may be decided although the primary structure of OPIF was not determined. To understand the regulatory mechanism underlying the control of pupal coloration in 4 butterflies, the effect of environmental cues on diapause and/or non-diapause pupal coloration is investigated. In *P. machaon*, at least two hormonal factors producing brown-white pupae are located in the larval central nervous system, with the secretion of these factors being regulated by the recognition of environmental cues in long-day larvae. In *B. alcinous*, temperature and humidity experienced after a gut purge are the main factors that affect the diapause pupal coloration. In *Po. c-aureum*, the pupal color polymorphism is co-regulated by mainly temperature and a small degree photoperiod. Green pupae of *P. bianor* were mainly produced by a larval food smell and highly relative humidity.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学・昆虫生理

キーワード：チョウ 蛹体色 オレンジ色蛹誘導化因子 キアゲハ ナミアゲハ ジャコウアゲハ ヒメアカタテハ
ホルモン

1. 研究開始当初の背景

チョウの蛹の体色調節機構に関する研究は19世紀後半あたりから興味もたれ、国内では1960年代に、ナミアゲハの非休眠蛹やモンシロチョウの蛹の体色調節に関する内分泌学的な研究がなされてきた。その後、1999年より研究代表者は、ナミアゲハの蛹体色調節因子として、蛹表皮褐色化ホルモン(PCMH)とオレンジ色蛹誘導因子(OPIF)が存在することを報告した。また、ヒメアカタテハには、蛹の色を薄くする淡色化因子が存在することを突き止めた。国外では、クジャクチョウの蛹黒色化抑制因子の存在かつ生理学的な研究が進み、1999年には、この抑制因子がククロキアゲハに対しては蛹体色の褐色化を促進するという報告がなされ、同一分子が種間に応じて2機能性を持つことが示唆された。しかしながら、いずれの蛹体色調節因子の一次構造も未だに決定されておらず、蛹体色調節因子の実態の究明が待たれている状況にある。

2. 研究の目的

チョウ目昆虫のある種のチョウの蛹体色は環境条件により変化する(表現型可塑性)。ナミアゲハ休眠蛹に特有なオレンジ色の体色は、OPIFの分泌により発現する。一方、非休眠蛹の体色には、2つの型(緑色・褐色型)があり、PCMHの分泌により褐色の体色が発現する。ヒメアカタテハでは淡色化因子が作用し、蛹の体色が淡色化する。本目的は、(1)幼虫の脳神経系からOPIF・PCMH・淡色化因子を単離精製し、N末端アミノ酸配列構造の決定後、DNA塩基配列決定を行う。また、(2)他種チョウの蛹体色調節因子の作用機作ならびに分子系統解析を行い、チョウ類の蛹体色の進化多様性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) OPIF・PCMH・淡色化因子の精製・部分アミノ酸配列決定。 ナミアゲハおよびヒメアカタテハ結紮前蛹腹部に粗抽出液を投与する生物検定方法を用いて、OPIF・PCMH・淡色化因子活性を検出し、各活性が検出された分画は、逆相HPLCで、順次、精製段階を進め単一ピークにする。その精製標品のN末端アミノ酸配列を決定する。

(2) 他種チョウの蛹体色調節因子の作用機作ならびに分子系統解析。

ジャコウアゲハの蛹体色調節機構を調べるため、ジャコウアゲハ幼虫を長日・短日条件下での蛹体色発現を詳細に検討した。ジャコウアゲハの蛹体色因子の生物検定方法を確立し、因子の特徴づけを行った。

キアゲハ休眠蛹の体色発現に関わる環境要因および内分泌因子について検討した。蛹化面の粗滑条件の異なる場合、どのような蛹

体色が発現するか、結紮実験によるPCMH様因子の分泌タイミング等を調べた。

キタテハの蛹体色と蛹化場所の環境要因にどのような関係があるかを検討するため、長日(16L-8D)および短日(8L-16D)日長条件下で飼育した終齢幼虫を様々な条件下で蛹化させ、その後の蛹体色を追跡した。

4. 研究成果

(1) ナミアゲハ幼虫の脳神経系から粗抽出したPCMHとOPIFの溶出時間の比較を行った。その結果、PCMHとOPIFの溶出時間が異なることが明らかとなった。従って、PCMHとOPIFはそれぞれ性質の異なる因子であることが示唆された。OPIFの精製を効率的に行えるように、ヒメアカタテハ前蛹結紮腹部を用いて、OPIF様の蛹体色調節因子(OPIF様因子)活性の検定が可能かどうかを検討した。その結果、OPIFを含む2% NaCl粗抽出液の投与濃度に応じて、ヒメアカタテハ結紮腹部は濃度依存的に体色を変化させたので、OPIF様因子の生物検定が可能となった。続いて、OPIF様因子の精製を試みた。ゲル濾過後、OPIF活性の認められた画分を、C8およびC18逆相HPLCに供したところ、OPIF様活性因子は、これまでのOPIFの部分精製過程においてナミアゲハ短日前蛹結紮腹部を用いた生物検定法でOPIF活性が認められた溶出画分と一致した。つまり、ヒメアカタテハの淡色化因子とOPIFは同じ分子である可能性が示唆された。さらに、C18カラムで単一ピークに活性が認められ、再クロマトにより精製標品が得られることができるところまで来た。

以上、本研究期間中、低温障害によりナミアゲハを安定的に供給することができなかった年もあり、ヒメアカタテハは、蛹体色調節因子の生物検定用の昆虫として適していることが判明した。OPIFの精製手順がほぼ確定したことから、出発材料のストックを増やし、精製を試みる必要がある。

(1) ヒメアカタテハの淡色化因子の特徴づけるため、本因子がペプチド性の調節因子であるかどうかを調べた。ヒメアカタテハの脳神経節から調製した2% NaCl粗抽出液画分をプロテアーゼKで処理した試料を、結紮腹部に投与した。その結果、プロテアーゼK処理した後の、Br-SG-TG₁連合体およびTG_{2,3}-AG_{1,7}連合体の粗抽出液画分に淡色化活性は認められず、ヒメアカタテハの淡色化因子はペプチドであることが明らかとなった。次に、ヒメアカタテハの淡色化因子が複数種存在するかどうかを確かめるため、ヒメアカタテハのBr-SG-TG₁連合体およびTG_{2,3}-AG_{1,7}連合体より調製した粗抽出液に含まれる淡色化因子の部分精製を行い、淡色化活性の溶出時間の比較を試みた。Superose12カラムゲル濾過クロマトグラフィーでは、各連合体由来の淡色化活性は同じ溶出時間に検出され

た。続く、C8 カラム逆相高速液体クロマトグラフィーでは、それぞれの連合体における淡色化活性が、異なる溶出時間に検出されたので、それぞれの連合体に淡色化因子が1種類ずつ存在する可能性が示唆された。さらに、C4 カラム逆相高速液体クロマトグラフィーにおいても、各連合体でそれぞれ異なる溶出時間に淡色化活性が検出されたので、淡色化因子は少なくとも2種類あることが明らかとなった。最後に、淡色化因子がタテハチョウ科のチョウに特異的な因子であるのか、他の科のチョウにも存在するのかどうかを検討するためタテハチョウ科のヒオドシチョウ、キタテハ、シロチョウ科のモンシロチョウ、アゲハチョウ科のナミアゲハおよびカイコガ科のカイコガ成虫の脳神経節連合体から調製した2%NaCl 粗抽出液をヒメアカタテハ結紮腹部に投与した。その結果、ヒオドシチョウおよびナミアゲハの Br-SG-TG₁ 連合体および TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体から淡色化活性が認められた。また、キタテハの Br およびモンシロチョウの TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体から淡色化活性が認められた。しかし、カイコガ成虫の Br-SG 複合体には、淡色化活性は認められなかった。このことから、淡色化因子はチョウ類の脳神経系に広く存在する可能性が示唆された。

(2) ジャコウアゲハ蛹の体色多型の有無およびその発現に関わる環境要因を調べるため、休眠蛹の野外調査および室内飼育蛹の体色分類を行った。その結果、野外休眠蛹の体色は全て褐色型であったが、室内休眠蛹において、褐色型、中間色型および黄色型の体色多型の存在が明らかとなった。さらに、休眠蛹の体色は、相対湿度 100% 下では黄色型の発現割合が高くなったが、10 下では、蛹化時の湿度条件に関わらず褐色型となり(図 1) 本来黄色型の非休眠蛹でも中間色型となった。以上のことから、蛹の体色発現に関わる環境要因は、温度および湿度であることが示唆された。



図 1 10 かつ湿度 60% (左) と 100% (右) 条件下で蛹化させたジャコウアゲハ短日蛹

次に、蛹体色を黄色化させる因子の分泌部位および時期、並びにその性質および局在性を調べるため、非休眠蛹予定の長日前蛹を用い、結紮および断頭実験並びに 5 齢幼虫の脳神経系から調製した粗抽出画分の投与実験を行った。それらの結果、蛹体色を黄色化させる因子は、前蛹期開始から 16 時間以降に頭部から分泌され、主に 5 齢短日幼虫の脳に局在していることが明らかとなり、その活性には最適濃度が存在することが確認された。さらに、ジャコウアゲハ、ナミアゲハおよびヒメアカタテハに存在する蛹体色調節因子の関連性を調べるため、3 種の前蛹に対する生物

検定を行った。その結果、ジャコウアゲハ 5 齢幼虫の Br-SG-TG₁ 連合体には PCMH 様因子および PMRF 様因子が、TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体には OPIF 様因子および PMRF 様因子が存在することが明らかとなり、PMRF 様因子の局在性の違いより、PMRF 様因子は、PCMH 様因子および OPIF 様因子とは異なる因子であることが示唆された。さらに、C8 カラム逆相高速液体クロマトグラフィーにより、ジャコウアゲハの蛹体色を黄色化させる因子および PCMH 様因子の保持時間が同じであったことから、それらは同様な性質を持つ因子であると考えられ、また、PCMH 様因子および OPIF 様因子は異なる因子であることが示唆された。

(2) キアゲハの蛹体色の決定に関わる環境要因を明らかにするために、長日老熟幼虫を蛹化面の粗滑、明暗、食草の匂いの有無あるいは背景色のそれぞれ異なる条件下で蛹化させたところ、滑面条件では緑色型が多く出現し、粗面条件では褐色型が多く出現した。続いて、短日老熟幼虫を粗滑あるいは背景色のそれぞれ異なる条件下で蛹化させたところ、ほとんどの蛹が褐色型の体色となった。よって、長日蛹体色は蛹化面の粗滑に大きく影響を受けて緑色型もしくは褐色型に、短日蛹体色は蛹化時の環境要因に左右されず褐色型になることが明らかとなった。さらに、前蛹の結紮実験により、褐色型の蛹体色を誘導する因子が、前蛹期後半に頭胸部から分泌されることが明らかとなった(図 2)

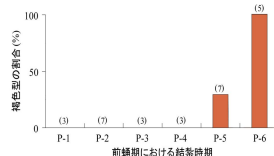


図 2 結紮時期の違いによる結紮腹部蛹体色の变化

続いて、キアゲハ 5 齢長日および短日幼虫の Br-SG-TG₁ 連合体および TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体から粗抽出液を調製し、キアゲハ短日前蛹の結紮腹部に投与した。その結果、2%NaCl 水溶液粗抽出液を投与した個体に蛹体色の褐色化を促進する活性が強く認められた。また、この粗抽出液の濃度を変えて投与したところ、濃度が高くなると蛹体色の褐色化を促進する活性が高くなった。このことから、褐色型の蛹体色を誘導する因子は、長日飼育・短日飼育に関わらず、5 齢幼虫 Br-SG-TG₁ 連合体および TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体に存在し、濃度依存的に活性が高くなることが明らかとなった。また、ナミアゲハ、モンキアゲハ、クロアゲハ、カラスアゲハ、カイコガ 5 齢幼虫の Br-SG-TG₁ 連合体および TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体、カイコガ成虫の Br-SG 複合体の 2%NaCl 水溶液粗抽出液をキアゲハ短日前蛹の結紮腹部に投与した。その結果、すべての粗抽出液で蛹体色の褐色化を促進する活性が認められ、キ

アゲハの褐色型の蛹体色を誘導する因子がこれらの種にも存在することが明らかとなった。さらに、キアゲハ 5 齢短日幼虫の Br-SG-TG₁ 連合体および TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体の 2%NaCl 水溶液粗抽出液をヒメアカタテハ前蛹の結紮腹部に投与した結果、TG_{2,3}-AG_{1,7} 連合体では結紮腹部の蛹体色の变化が認められたが、Br-SG-TG₁ 連合体では变化が認められなかった。このことから、キアゲハ 5 齢幼虫の脳神経系には蛹体色を変化させる因子が 2 種類存在することが示唆された。

(2) 蛹体色に関して知見の少ないキタテハの蛹体色ならびに蛹体色発現に影響を及ぼす環境要因について検討した。その結果、長日条件および短日条件下で得られた蛹の体色は、16 の低温では暗褐色型となり、32 の高温では鮮黄色型が多く生じることが分かった。つまり、本種の蛹体色は主に幼虫期の環境温度によって決定されることが明らかとなった。

以上の結果、アゲハチョウ科およびタテハチョウ科のチョウの蛹体色の多様性ならびに内分泌因子の種間作用について新たな知見が見出された。今後は、蛹体色発現に関わる情報伝達機構を検討する必要がある。

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 13 件)

Yamanaka A, Ito M, Moriyama C, Kitazawa C, Watanabe M. Developmental profiles and hormonal responsiveness of the painted lady butterfly, *Vanessa cardui*, reared on artificial diets containing *Artemisia indica*. *Information*, 査読有, Vol. 17, No.1, 2014, 295-304,
http://information-iii.org/abs_e2.html#No1-2014

Yamanaka A, Tsujimura Y, Oda Y, Uchiyama T, Kometani M, Yamamoto K, Kitazawa C. Regulatory mechanisms in phenotypic plasticity of diapause and non-diapause pupal colouration of the swallowtail butterfly *Papilio machaon*. *Physiological Entomology*, 査読有, Vol.38, No.2, 2013, 133-139, DOI: 10.1111/phen.12018

Yamanaka A, Tanaka A, Kitazawa C. Pupal color polyphenism regulated by temperature and photoperiod in the Asian comma butterfly, *Polygonia c-aureum* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Zoological Studies*, 査読有, Vol. 51, No.8, 2012, 1432-1437,
<http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/51.8/1432.pdf>

Yamamoto K, Tsujimura Y, Kometani M, Kitazawa C, Islam ATMF, Yamanaka A. Diapause pupal color diphenism induced by temperature and humidity condition in *Byasa alcinous* (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol.57, No.7, 930-934, 2011,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.002>

〔学会発表〕(計 19 件)

山中 明、チョウ類における蛹体色の調節機構、日本動物学会第 84 回大会シンポジウム、2013.9.26、岡山大学(岡山市) 吉岡遼子、安達美和、村上実菜子、中村冬馬、北沢千里、山中 明、カラスアゲハの蛹体色に及ぼす環境要因の影響、中国四国地区生物系三学合同大会徳島大会(日本動物学会中国四国支部大会第 66 回大会) 2013.5.11-12、徳島大学(徳島市)

Ito M, Kitazawa C, Yamanaka A, Developmental profiles of the painted lady butterfly, *Vanessa cardui*, reared on artificial diets containing *Artemisia indica*, The 6th International Conference on Information 2013, 2013.5.8-11, Tokyo, Japan, アルカディア市ヶ谷(千代田区) 伊藤正俊、北沢千里、山中 明、人工飼料飼育によるヒメアカタテハの発育および環境応答性について、日本応用動物昆虫学会中国支部・日本昆虫学会中国支

部平成 24 年度合同例会、2012.10.12、岡山大学（岡山市）

山中 明、藤島哲郎、山下佳恵、ATMF Islam、北沢千里、モンシロチョウの蛹体色発現に關与する 2 つの因子、日本動物学会第 83 回大会、2012.9.13-15、大阪大学（豊中市）

Yamanaka A., Pupal color polyphenism in *Papilio xuthus* and *P. machaon*、XXIV International Congress of Entomology、2012. 8.19-25、Deagu、Korea

高橋洋平、絹笠真弘、佐蔭 淳、日高亮子、北沢千里、山中 明、モンキアゲハの蛹体色に影響を及ぼす環境要因とホルモン因子、中国四国地区生物系三学合同大会島根大会（日本動物学会中国四国支部大会第 65 回大会）、2012.5.12-13、島根大学（松江市）

淵上惣一郎、日高亮子、北沢千里、山中 明、ヒメアカタテハ幼虫の脳神経系に存在する蛹体色調節因子について、第 56 回日本応用動物昆虫学会大会（H24 年度）、2012.3.27-29、近畿大学奈良キャンパス（奈良市）

林 絵里、Islam ATMF、林友萌子、北沢千里、山中 明、ヒメアカタテハの蛹体色発現に及ぼす前蛹期の温度入替えの影響、中国四国地区生物系三学合同大会香川大会（日本動物学会中国四国支部大会第 64 回大会）、2011.5.14-15、香川大学（高松市）

〔図書〕（計 1 件）

山中 明 他、少年写真新聞社、科教育
ニュース縮刷・活用版 理科実験大百科
第 12 集、2012、p.39,40 および 78.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 明（YAMANAKA Akira）

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20274152

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：