

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580236

研究課題名(和文)キノコバエの特殊な性フェロモンの誘引性における菌体信号物質の役割

研究課題名(英文) Influence of fungus volatile components on attraction of the fungus gnat (Neoempheria sp.) unique sex pheromones.

研究代表者

所 雅彦 (TOKORO, MASAHIKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・室長

研究者番号：70343796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナガマドキノコバエの特殊な性フェロモンの誘引性における菌体信号物質の役割を解明するため、シイタケ菌床の揮発性成分捕集と、ガスクロマトグラフ質量分析計、昆虫の触角等を用いた電気生理学的手法、ガスクロマトグラフ触角電位検出法を用いて分析し、電気生理学的に活性のあった主成分リモネンをはじめ数成分を決定し、Y字管を用いた室内行動選択試験と粘着フィルムトラップを用いた栽培舎での誘引試験、および、ナガマドキノコバエの触角を用いた触角電図測定法で評価した。菌体揮発性主要成分及び二酸化炭素は性フェロモンに対して、室内行動試験、触角電図法のいずれの試験においても相乗的な誘引力増強効果は及ぼさないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Neoempheria fungus gnat uses a unique set of sex pheromone components. Influence of mushroom volatile components the pheromone attractant to reveal. Volatile components of shiitake mushroom were analyzed by gas chromatography mass spectrometry. Furthermore, the components analyzed using GC-EAD apparatus. Attractant activity of the antennal active components was evaluated in laboratory behavior choice test using a Y-shaped tube. Select capture test using adhesive film trap were made in cultivation Hall. Mushroom odor components did not synergistic compelling enhancement for pheromone in this study.

研究分野：化学生態学

キーワード：ナガマドキノコバエ 揮発性成分

1. 研究開始当初の背景

菌床シイタケの害虫であるナガマドキノコバエにおいて、雌性フェロモンがペンタエン炭化水素であると同定した。風洞をもちいた実験室条件下では、フェロモン単独で雄成虫が誘引されるが、シイタケ栽培施設では誘引力がほとんど見られなくなる。

近年、数種のチョウ目昆虫、カメムシ目昆虫では、性フェロモンの作用が寄主植物の匂いが存在する条件下で強くなる、共力作用が発見されてきている。

このような、寄主との相互作用がナガマドキノコバエにも存在するであろうか。キノコバエ類ではチョウ目昆虫に比べて性フェロモンの同定、応用研究が遅れており、寄主であるシイタケ菌体の匂いの共力作用抑制作用が検討された例はない。

2. 研究の目的

キノコバエにおいて、性フェロモンを用いた誘引トラップが栽培舎でほとんど効力を示さない場合がある。このためキノコバエ防除において性フェロモンが配偶行動にどのように作用しているか、どのような発動機構が関係しているかを突き止める必要がある。そこで本研究において性フェロモンの誘引力を強くする菌体揮発性成分の探索を行う。

このため、菌床シイタケを餌とするナガマドキノコバエを用いて、

(1)シイタケ菌体の有無が性フェロモンの誘引力を強くするか、(2)菌体の揮発性成分が関与するか、(3)寄主の呼吸に伴う二酸化炭素が関与するか、を検証する。

3. 研究の方法

(1) ナガマドキノコバエを群馬県富岡市、徳島県小松島市、にあるシイタケ栽培舎で捕獲し、研究室にてシイタケ菌床により大量飼育し試験に供試した。ナガマドキノコバエの特殊な性フェロモン・炭化水素ペンタエンは合成品を用いた。シイタケ菌床に特異的な菌体揮発性成分はテナックス(GLサイエンス社製)吸着剤、ORBOチューブ100(スペルコ社製)等の吸着剤を用いて、ハンディーポンプ(柴田社製Σ30)で100ml/分で24時間タイゴンチューブを介して吸引して捕集した。捕集した揮発性成分は吸着剤からペンタン及びエーテルで抽出した。また比較検証のため、固相マイクロ抽出法(SPM E:スペルコ社製)の2種類の吸着剤(PDMS100μm/Carboxen/PDMS85μm)を用いて揮発性成分を捕集した。捕集した抽出物各構成成分をガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS:アジレン

ト社製6890NGC/5973NMSD)で分析し、その化学構造決定した。また構造決定した各成分は、ナガマドキノコバエに特異的な信号化学物質であるかどうかを特定するため、ナガマドキノコバエの触角を用いた電気生理学的手法、ガスクロマトグラフ触角電位検出器(GC-EAD:アジレント社製5890GC+シンテック社製IDAC232)を用いて分析し、信号物質候補化合物を特定した。

(2) ナガマドキノコバエの触角応答のあった成分に対しては、成虫を用いた風洞(75×75×130cm)及びY字管(Φ10×50cm)による行動選択実験を行い、各活性成分、及び合成フェロモン、二酸化炭素との混合による、誘引性忌避性の協力作用、相加効果、相乗効果、抑制効果について評価した。さらに、シイタケ栽培舎においても粘着板トラップを作成して設置し、性フェロモンと菌体揮発性成分との誘引性、協力作用、抑制作用の評価を試みた。

(3) ナガマドキノコバエの触角応答のあった成分に対しては、行動選択試験による明確な反応が見られなかった場合、さらに触角電図(EAG)法を用いて、その混合による協力作用に相乗反応や抑制反応が認められるかを検証した。EAG測定装置はオランダシンテック社製IDAC232装置をもちい、グレースの細胞培養液を用いてガラス電極で測定した。供試化合物は4×10mmに切ったろ紙片に一定施容量有機溶媒と共に滴下し、溶媒を揮散させてからパスツールピペットの中に挿入してEAG装置に装着し、ガラス電極に設置したナガマドキノコバエの触角に供試した。

4. 研究成果

(1) シイタケ菌床の揮発性成分捕集においては、いずれも炭化水素、テルペノイド化合物、アルコール化合物、ケトン化合物、アルデヒド化合物、芳香族化合物等、30種以上の成分ピークが確認できた。吸着剤にテナックスを用いた吸着管が芳香族化合物も含めた最も安定して多くの成分を捕集することができた。各成分のGC-MS分析結果と、ナガマドキノコバエの触角を用いたGC-EAD分析の結果10成分以上で弱い触角応答が見られた。触角応答見られたシイタケ菌床成分の主成分はリモネンであった(図1)。その他にも、ヘキサノール、ヘキサノン、1-オクテン-3-オールやムウロール等を確認できた。

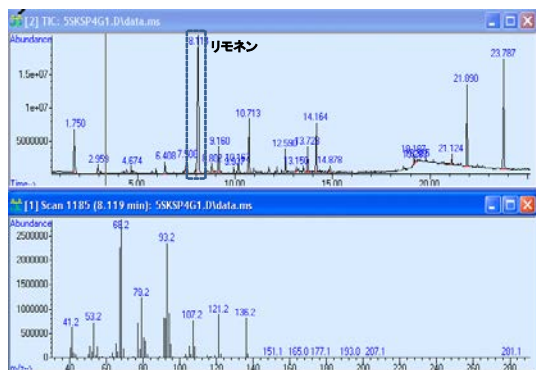


図1. シイタケ菌体揮発性成分のGC-MS分析の結果

(2) まず、大型風洞による誘引試験を行った。従来の風洞による誘引試験法を改良し、揮発性の低い本種フェロモンを適度に揮散させ、また偶然のメス個体の捕獲による誘引源の攪乱を防ぐことのできる新たな生物検定装置を開発した。処女雌と合成フェロモンが10mg施用の試験区においてはフェロモン100μg以下の施用区に対して有意にナガマドキノコバエ雄成虫を誘引した(表1)。

表1. ナガマドキノコバエ成虫に対する室内誘引試験(風洞)

誘引源	平均誘引率	誘殺♂数/放虫♂数		
		1回目	2回目	3回目
処女雌×5	33.40%	5/18	3/18	10/18
ヘキサシ	0%	0/18	0/18	0/18
Mix 10μg	0%	0/18	0/18	0/18
Mix 100μg	0%	0/18	0/18	—
Mix 10mg	20.40%	6/18	3/18	2/18

合成フェロモン10mgにシイタケ菌体抽出成分を加えた試験区においても平均誘引率は20%以上にはならなかった。

シイタケ菌体揮発性成分のEAD活性成分の、性フェロモンに対する協力効果を検証するための、Y字管を用いた室内行動選択試験の結果は、ばらつきが多く、フェロモン成分に対しても常に有意な選択行動を示さなかった。ナガマドキノコバエにおいては、Y字管を用いた狭い空間で風のある状態での行動誘引選択試験は、再現性ある行動評価には適さないと思われた。

またナガマドキノコバエ誘引候補化合物を用いた栽培舎での粘着フィルムトラップ誘引試験の結果、栽培舎においては、常時送風、霧吹き加湿と言う特殊な室内環境のため、ほとんど捕獲されず安定した試験結果が得られなかった。

(3) シイタケ菌体匂い成分の性フェロモンに対する協力効果を、行動選択試験で評価できないため、ナガマドキノコバエの触角を用

いた触角電図(EAG)測定法で検証した。合成フェロモンに対して、雄の触角応答は強く、雌の触角応答は弱かった(図2)。菌体揮発性成分に対する雌の触角応答は強く、雄の触角では雌の触角応答よりも弱かった。合成フェロモンに菌体揮発性成分を加えた場合、雄の触角ではフェロモン単独より応答が弱くなり、雌の触角応答では菌体成分単独より反応速度が速くなったが、閾値はほぼ同等であった。

主要な菌体揮発性成分に対する触角応答では主成分であった、リモネンにおいては雄では単独で応答がほとんど認められなかった。雌ではリモネン単独で弱い応答が見られたが、フェロモンとの混合によって比較的強い応答が見られた。触角レベルでは菌体成分とフェロモンによる付加効果が確認できたが、その閾値は相加的效果の範囲であった。

また二酸化炭素を同時に暴露した試験において、いずれの菌体成分の場合も触角応答が相乗的に変化することは認められなかった。ナガマドキノコバエにおいては二酸化炭素が、誘引選択行動に影響することはほとんどないと考えられた。

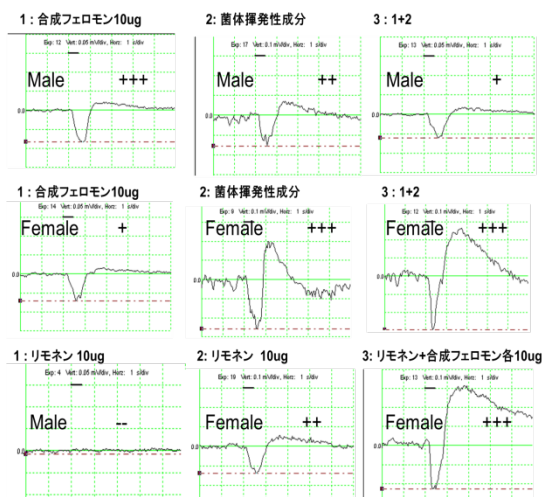


図2. ナガマドキノコバエの合成性フェロモンと菌体揮発性成分に対する触角電図

その他菌体揮発性成分である1オクテン3オール、ムウローロール、ヘキサノール、ヘキサノン等に対してもそれぞれに比較的弱い触角応答が見られたが、これら成分においても合成フェロモンとの混合で反応閾値を相乗的に向上させるものは認められなかった。本研究においてナガマドキノコバエは性フェロモンと菌体揮発性成分の関わりにおいて、室内行動試験、触角電図法のいずれの試験においても明確な相乗効果を示すような組み合わせは確認できず、明確な誘引力増強効果、忌避性、二酸化炭素誘引力増強効果は認められないことが判った。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

所雅彦、北島博、加藤厚 Influence of fungus volatile components on attraction of the fungus gnat (*Neoempheria* sp.) unique sex pheromones / ナガマドキノコバエ (*Neoempheria* sp.) のユニークな性フェロモンの誘引への菌類揮発性成分の影響、2014年11月18日、オレゴン州ポートランド、オレゴンコンベンションセンター (アメリカ合衆国) 第62回アメリカ昆虫学会2014年度年次大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

所 雅彦 (TOKORO MASAHIKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・室長

研究者番号：70343796

(2) 研究分担者

北島 博 (KITAJIMA HIROSHI)

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・チーム長

研究者番号：70353662