

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450064

研究課題名(和文) 果樹・林木を食害するヒメボクトウ幼虫の集合を引き起こすフェロモンの解明

研究課題名(英文) Pheromone eliciting an aggregation of the larvae of a cossid moth, *Cossus insularis*

研究代表者

中牟田 潔 (Nakamuta, Kiyoshi)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：70343788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメボクトウは日本に生息するボクトウガ科の昆虫で、幼虫がリンゴ、ナシ等の果樹に穿入し、材部を集団で摂食する。幼虫の集合性に化学成分が関与している可能性が示唆されており、本研究ではこの集合性に関する化学成分の特定を目的とした。幼虫由来の揮発性物質から粗試料の作成、粗試料の分画、生物検定、ガスクロマトグラフィー質量分析を行った結果、集合を引き起こす物質が極性物質である可能性が示唆された。また、この物質とは別に幼虫を集団に定着させる機能を持つ物質の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Larvae of cossid moth, *Cossus insularis*, bore into the fruit trees such as an apples or Japanese pears, form an aggregation and feed the woods. Because chemical(s) may be involved in the formation of a group, we tried to isolate active components releasing aggregation from the volatiles emitted from the larvae.

We collected volatiles from larvae on an absorbent by headspace sampling. Crude extracts were fractionated by column-chromatography and each fraction was behaviorally assayed and active fractions were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The results indicate that active components may be polar compounds that attract other individuals. There may be a different component other than the attractive component that arrests the larva to maintain an aggregation.

研究分野：化学生態学

キーワード：ヒメボクトウ 集合性 化学物質

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の集合性は、クイムシやカメムシ、ゴキブリなどでよく知られている。その生物学的意味については、天敵に対する防衛、餌資源の改変による成長の促進などが提案されている。また、集合のメカニズムとしては、集合を引き起こすフェロモンの存在がクイムシやカメムシなどで明らかになっており、その化学構造が決定されている種もある (Wyatt, 2003)。

ガの 1 種であるヒメボクトウ *Cossus inuslaris* (チョウ目:ボクトウガ科) は、幼虫がリンゴやナシ等の果樹、ヤナギやポプラなどの林木に穴を穿つてもぐり込み、集団で材部を食害する (中牟田ら、2007)。そのため、被害部より上の枝や幹は枯れてしまうことが多い。近年リンゴやナシにおける被害が関東地方から東北地方にかけて急激に増えており、生産地では対策に苦慮している (中牟田ら、2010)。孵化幼虫から蛹まで集団で生息するヒメボクトウのこの習性は、樹体内で材部を食う昆虫としては大変珍しく、同じ *Cossus* 属のガでもボクトウガ *Cossus jezoensis* はコナラなどの材内に単独で生息している (市川、2003)。また、カミキリムシの幼虫など樹木の材部を食う昆虫の多くは、音や振動などを介して個体同士が互いに避け合い、もし樹体内で出会うことがあると噛み合うことが知られている (Dajoz, 2000)。そこで、申請者は、なぜヒメボクトウは幼虫が生涯にわたって密な集合を形成するのか、その意義とメカニズムに興味を持った。

### 2. 研究の目的

樹木の樹皮下や樹体内に生息するガ類の幼虫は多くが単独で生息している。ところが、果樹や林木に幼虫が穿入するヒメボクトウは、孵化幼虫から蛹まで集団で生息する珍しい習性を持っている。申請者はヒメボクトウ幼虫のこの習性に興味を持ち、幼虫が集合することにより単独よりも成長が早くなること、また幼虫がその集合を引き起こす化学物質を有することをこれまでに明らかにしている。そこで、本研究では、樹木穿孔性害虫の新たな防除技術の開発を見据えて、ヒメボクトウ幼虫の集合を引き起こすフェロモンの化学構造を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒメボクトウ幼虫を誘引する揮発成分の捕集・精製

ヒメボクトウ幼虫 40 頭を放したセパラルプラスコ内のヘッドスペースを 48 時間捕集し、吸着材 (Porapak® Q) に吸着させた。吸着された物質を n-ヘキサンにて溶出し、粗抽出物を得た。得られた粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、複数の画分に分離した。粗抽出物とそれから得られた

複数の画分を用いてヒメボクトウ幼虫の反応を調べる生物検定を行い、誘引活性を示す画分を特定した。特定した画分を、さらにカラムクロマトグラフィーにより分画・精製し、活性画分の絞り込みを行った。

誘引活性を特定した画分について、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC: 7890A、MS 検出器: 5975C、いずれも Agilent Technologies 社製、USA) を用いて化学分析を行った。カラムは非極性の HP-1 (Agilent Technologies 社製、USA、内径 250  $\mu$ m  $\times$  長さ 30m、液相の膜厚 0.25  $\mu$ m) を用いた。注入口温度 300 $^{\circ}$ C、GC-MS インターフェース温度 280 $^{\circ}$ C、オープン温度は 60 $^{\circ}$ C:1 分-10 $^{\circ}$ C/分、280 $^{\circ}$ C:10 分とした。イオン源は EI で、EI 電圧は 70eV に設定した。

#### (2) ヒメボクトウ粗抽出物、および分画した画分のヒメボクトウ幼虫に対する活性を調べる生物検定

誘引活性および定着活性を以下の生物検定法により測定した。内径 11cm、高さ 12cm のガラス製保存瓶の底に直径 11cm のろ紙を敷き、ガラス棒 (直径 4mm、長さ 3cm) 2 本をろ紙の両端から 2cm のところにそれぞれホットボンドで固定した (図 1)。一方のガラス棒には粗抽出物あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分けた画分 (幼虫約 1.5 匹当量) を塗布し、他方のガラス棒にはヘキサン 20  $\mu$ l を塗布し、コントロール区とした。この容器の中央にガラス棒と平行に幼虫 (2~3 ヶ月齢) を導入し、その後の行動を 5 分間観察した。幼虫が最初に頭部から接触したガラス棒を幼虫が選択したと判定して、誘引性を記録した。併せて、各ガラス棒に対する幼虫の頭部からの接触時間を計測し定着時間として記録した。生物検定は 1 度に 20 反復行い、25 $^{\circ}$ C 暗黒条件下にて赤色照明のもとで行った。なお、ガラス棒に接触しなかった個体は未選択として記録した。



図 1 生物検定に用いたガラス容器。容器の底に固定した抽出物を塗布したガラス棒

と、放した幼虫の位置。

#### 4. 研究成果

粗抽出物に誘引活性があることを確認した後、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した。溶出溶媒は、ヘキサン：ジエチルエーテル系を用いた。エーテル0%、5%溶出画分がヒメボクトウ幼虫に対して有意な誘引性を示した。そこで、この2つの画分を合わせて、さらに複数回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画と生物検定を繰り返して、誘引活性を示す画分の絞り込みを行った。その結果、最終的に50%エーテル溶出画分に有意な誘引性が検出され(図2)、ヒメボクトウの集合に関与する物質が極性物質である可能性が示唆された。

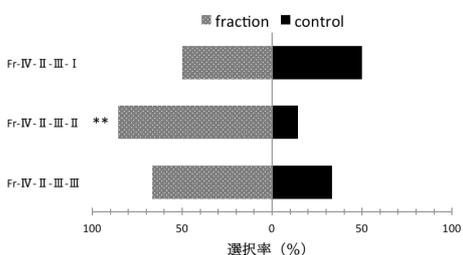


図2 シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した画分の誘引活性。Fr-IV-II-III-II がヒメボクトウ幼虫を有意に誘引した。

この画分についてGC-MSによる分析を行った結果、他の画分には見られず、この画分のみ特徴的な複数のピークが検出された。その中でもっとも大きなピークはマススペクトルの特性、およびマススペクトルライブラリとの比較により、アルデヒドの可能性が示唆されたが、最終的に単一の集合フェロモン活性を有する成分の構造解明にまでは至らなかった。

また、幼虫由来の揮発物質の中には誘引とともに幼虫を集団に定着させるフェロモンとしての機能を果たしている物質がある可能性も併せて示唆された。ただし、この定着活性は誘引活性とは異なる画分に現れたので、誘引活性を示すものとは異なる物質であると推察される。

#### <引用文献>

- ① Dajoz R (2000) *Insects and Forests*, pp. 668, Intercept.
- ② 市川俊英 (2003) 樹液に集まる虫たちとボクトウガ幼虫の関係、*昆虫と自然*, 38:37-41.

- ③ 中牟田潔、Xiong Chen、北島博、中西友章、吉松慎一 (2007) 日本産ボクトウガ *Cossus* 属3種の生態、*森林防疫*, 56: 5-9.
- ④ 中牟田潔、伊藤慎一、佐々木正剛、中西友章、南島誠 (2010) 新たな果樹害虫としてのヒメボクトウ、*植物防疫*, 64:779-781.
- ⑤ Wyatt TD (2003) *Pheromones and Animal Behavior*, pp. 391, Cambridge University Press.

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

植村直人、高橋元紀、中牟田潔 (2016) ヒメボクトウ幼虫の集合性に関与する化学成分について、第60回日本応用動物昆虫学会大会、2016. 3. 28、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)、p. 187.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
中牟田 潔 (NAKAMUTA Kiyoshi)  
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授  
研究者番号：70343788

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
植村 直人 (UEMURA Naoto)