様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ８ 月 ２７ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2017
課題番号：２６４５０４６６

研究課題名（和文）果実害虫ミバエ類における誘引物質の化学受容および代謝機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of chemoreception and biosynthesis of bioactive substances in several fruit fly species

研究代表者
小野　肇（Ono, Hajime）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：７０４５２２８２

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）：Bactrocera属の果実害虫ミバエ3種について、化学感覚受容体をコードする遺伝子配列を同定した。そのうちミカンコミバエの10種類の嗅覚受容体について、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、ミバエ類の生活環に関わる化合物への応答を解析した。その結果、２種類の受容体が植物に含まれる揮発成分に応答することを明らかにした。嗅覚受容体に応答する4種類の化合物について、室内行動試験を行った。その結果、交尾後の雌成虫が1-octen-3-ol、geranyl acetate、farneseneに有意に誘引された。

研究成果の概要（英文）：The fruit fly species in the genus Bactrocera and Zeugodacus are highly destructive pests of various fruits. The reproductive and host-finding behaviors of this species are affected by several plant semiochemicals that are perceived through chemosensory receptors. However, the chemosensory mechanisms by which this perception occurs have not been fully elucidated. We identified the genes coding for chemosensory receptors of three fruit fly species, and succeeded to characterized olfactory receptors in the Oriental fruit fly Bactrocera dorsalis that respond to plant volatiles in a heterologous expression system comprising Xenopus oocytes. We further assessed the attraction of both female and male flies to four volatiles recognized as ligands for the two ORs, and found that when used in combination with visual cues, certain plant volatiles had a significant effect on the landing behavior of mated females.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：果実害虫ミバエ類　ミカンコミバエ　誘引物質　植物揮発成分　嗅覚受容体

１．研究開始当初の背景

ミバエ類は世界的に果実や野菜に甚大な被害をもたらす重要害虫である。そのうち、*Bactrocera* 属や *Zeugodacus* 属のミバエの生活環において植物に含まれる情報化学物質が重要な役割を果たしていることが知られている。その一つの例が、雄の誘引物質である。例えば、ミカンコミバエ (*B. dorsalis*) の雄成虫は、ミバエランの花香成分であるメチルオイゲノールに強く誘引される。誘引された雄成虫は、メチルオイゲノールを摂取して、体内で性フェロモンへと変換し、雌を誘引することが明らかにされている。このような誘引物質はミカンコミバエの防除に利用され、実際に、沖縄に侵入したミカンバエがメチルオイゲノールを利用した誘引により根絶されている。また、ミバエ類の寄主となる果実に含まれる揮発性物質も産卵場所を探している雌成虫の行動に重要な役割を果たしている。これまでに、行動実験と電気生理による触角での匂い応答解析により、ミカンコミバエやウリミバエ (*Z. cucurbitae*) 雌成虫の寄主探索に影響を及ぼす化合物が幾つか同定されている。

このように、ミバエ類に対して植物に含まれる情報化学物質が重要な役割を果たすにもかかわらず、化学受容機構についてはほとんど明らかにされていない。最近、次世代シーケンサーによる大規模な遺伝子解析が可能となった。ミバエ類についても、化学感覚受容体をはじめとする、様々な遺伝子配列の網羅的な同定が進められている。しかし、化学受容に関与する生体分子の機能の解明はほとんど進んでいない。

２．研究の目的

本研究では、ミバエ類が植物に含まれる情報化学物質をどのような機構で受容しているかを解明することを主目的とした。そのために、化学感覚受容体を同定し、その機能の解析を行った。

３．研究の方法

３種類の *Bactrocera* 属ミバエ（ミカンコミバエ、ウリミバエ、ナスミバエ）の化学受容器官である触角と唇弁から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーで解析するためのシーケンスライブラリを調製した。調製したライブラリを Miseq 2000 へ供し、シーケンシングを行った。取得したリードを Trinity によって *de novo* アセンブルした。得られたコンティグ配列を既に報告されているショウジョウバエの受容体配列と、blast によって相同性を比較し、化学受容器官で発現している受容体遺伝子配列を網羅的に取得した。嗅覚受容体 (OR)、味覚受容体 (GR)、イオノトロピック受容体 (IR) を同定した。

同定した OR 遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、匂い物質に対する応答実験を試みた。全長配列を決定した 10 種類のミカンコミバエ OR 遺伝子と共受容体 ORCO 遺伝子から調製した cRNA を卵母細胞へインジェクションし嗅覚受容体複合体を発現させた。*Bactrocera* 属ミバエの性フェロモンや誘引物質、ミカンコミバエの寄主果実に含まれる揮発成分に対する電気生理的応答を計測した。

そのうち応答が認められた化合物について室内でのミカンコミバエ行動試験を行った。化合物を塗付した濾紙そのものにはミカンコミバエはほとんど誘引されなかったため、ケージ内に視覚的な手掛かりとして緑色あるいは白色の球体を設置した。50 匹の成虫を放ち、一定時間後に球体に着地したミバエを数え、揮発性化合物の有無と球体の色の影響を解析した。

４．研究成果

（１）*Bactrocera* 属ミバエの化学感覚受容体の同定

３種類の *Bactrocera* 属ミバエのいずれの種からも 50 種前後の OR や多数の GR、IR を同定した。そのうちミカンコミバエについて詳細な解析を進めた。多数の相同遺伝子を含む 60 種の嗅覚受容体 (OR)、17 種の味覚受容体、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 23 種を同定した。そのうち 15 種類の OR について全長 CDS 配列を決定した。OR の系統樹を作成したところ、ショウジョウバエの OR7a サブファミリーに属する OR が数多く含まれていた（図１）。そのため、これらの受容体は遺伝子重複によって生じ、ミカンコミバエ生活環において重要な役割を果たしていると考えられる。

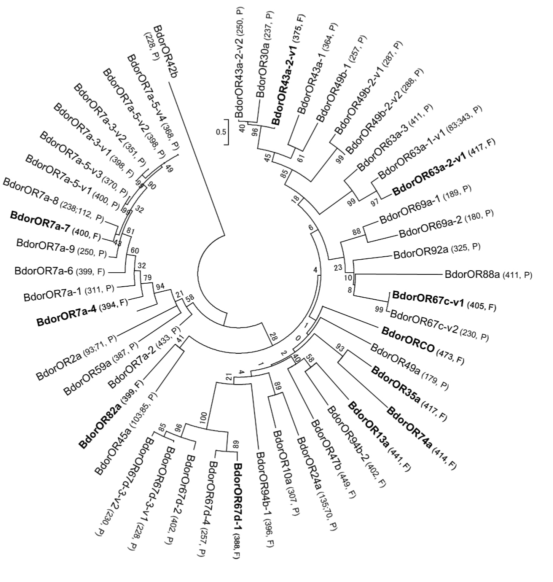

図1 ミカンコミバエ嗅覚受容体の系統樹
(カッコ内の数値は得られたアミノ酸の配列長を示す。F, P は得られたアミノ酸配列がそれぞれ部分配列あるいは全長配列を示す)

ミカンコミバエでは、雄のみが誘引物質に応答を示すことや、果実に含まれる特定の香りに雌成虫が応答を示すことが報告されている。性特異的な行動が示されるため、受容

体の発現レベルで性差が認められるかを解析した。全長配列が得られた１５種類の雌雄の触角での発現量を比較した結果、性特異的に発現する OR は認められなかった（図２）。

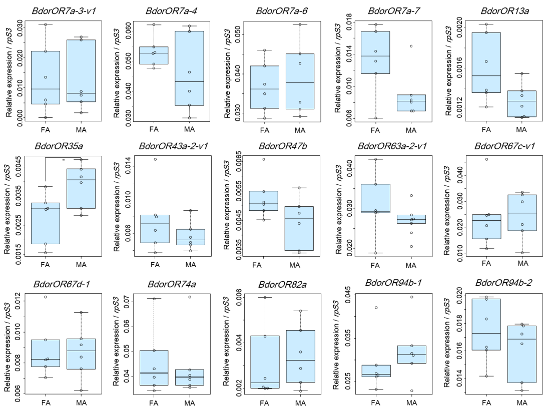

図2 ミカンコミバエ嗅覚受容体の雌雄触角での発現量の比較（* $p < 0.05$ で有意差あり）

この結果より、ミカンコミバエでは性特異的な行動は神経末梢の受容体の発現レベルの違いによって生じるのではなく、脳での情報処理の過程の違いによって生じることが示唆された。

（２）ミカンコミバエ嗅覚受容体の機能解析

ミカンコミバエから同定された１０種類の OR と共受容体 ORCO をアフリカツメガエル卵母細胞に共発現させて機能解析を行った。その結果、BdorOR13a および BdorOR82a が植物の揮発性成分として報告されている化合物に応答した。

BdorOR13a は 1-octen-3-ol に強い応答を示し、その応答強度は濃度依存的に増加した（図３）。

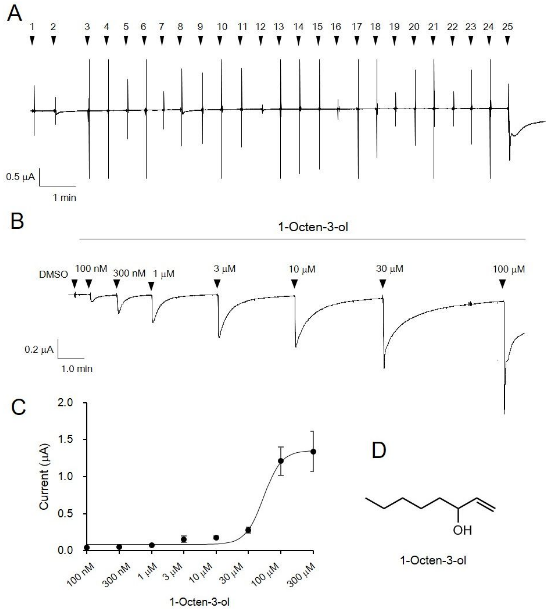

図3 BdorOR13の応答
(A) 投与した25種類の化合物への応答
25番目に投与した1-octen-3-olのみに応答
(B) 1-octen-3-ol の異なる濃度での応答 (C) 濃度応答曲線
(D) 1-octen-3-ol の構造

BdorOR82a は geranyl acetate に応答を示した。さらに、farnesenes と linalyl acetate に弱いながらも有意な応答を示した（図４）。Geranyl acetate について濃度別の応答を調べたが、非常に濃い濃度 (10 mM) を投与しても、応答は頭打ちにならなかった。なお、ショウジョウバエの OR82a は geranyl acetate へ顕著に応答することが示されている。その違いの原因として、geranyl acetate が疎水性であり、使用した緩衝液への溶解度が悪かったことが考えられる。あるいは、ミカンコミバエとショウジョウバエでは OR82a のアミノ酸配列の相同性が 43%であるため、配列の違いにより geranyl acetate への応答性の違いが生じている可能性も考えられる。なお、昆虫の OR82a が farnesenes や linalyl acetate に応答するという報告はなく、今回初めて明らかにされた。

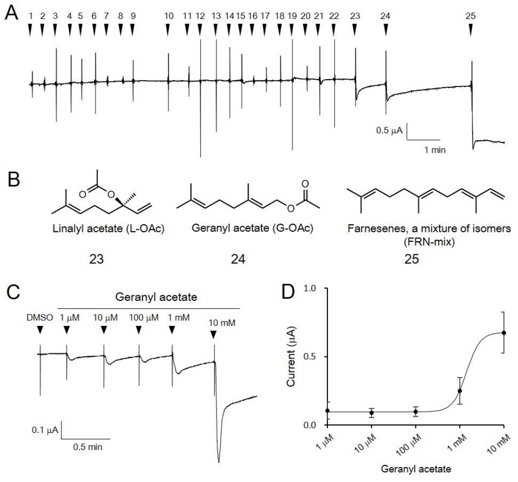

図4 BdorOR82aの応答
(A) 投与した25種類の化合物への応答、23-25番目に投与した化合物に応答
(B) 応答を示した化合物の構造
(C) 異なる濃度でのgeranyl acetate に対する応答 (D) 濃度応答曲線

（３）ミカンコミバエの寄主認識行動に影響を及ぼす化合物の同定

ミカンコミバエの嗅覚受容体のリガンドとして同定された４種類の揮発性成分、1-octen-3-ol, geranyl acetate, farnesenes, linalyl acetate について行動試験を行った。

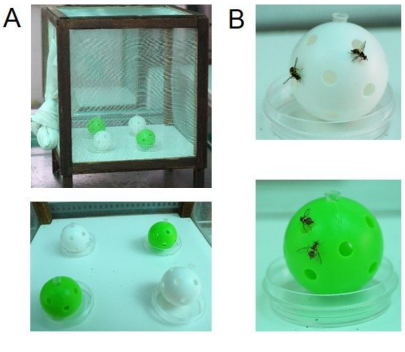

図5 行動試験
(A) ケージ内に設置された球体
(B) 揮発性成分を含むチューブを差した球体に誘引された成虫

行動試験の際に、試験する化合物を含むチューブを球体に差した。緑および白色の球体を視覚的な手掛かりとして２個ずつケージ内に置き、球体に着陸した成虫の数を計測した（図５）。成虫は未交尾あるいは交尾済みの成熟雄または成熟雌を試験に用いた。色と揮発性成分のどちらが球体に着陸したミバエの数に影響を及ぼしたかを GLM モデルによって解析した（図６）。

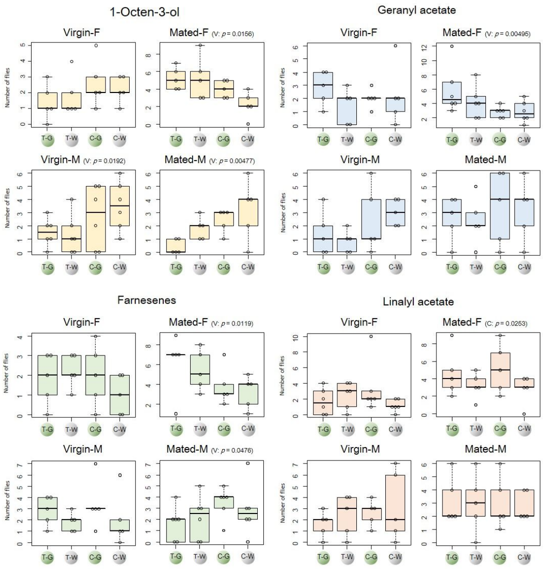

図6　行動試験の結果
T-G, T-W, C-G, C-W はそれぞれ、揮発性成分で処理した緑色の球体、揮発性成分で処理した白色の球体、無処理の緑色の球体、無処理の白色の球体を示す。
V, C はGLM解析によって揮発性成分での処理あるいは球体の色により有意な影響が示されたことを示す（p <0 .05)。

1-Octen-3-ol を処理した場合、球体の色はミバエの着陸数に影響しなかったが、化合物の有無は有意に影響を示した。1-Octen-3-ol の処理によって、交尾済みの雌成虫の誘引数はエタノールのみを処理したコントロールに比較して増加した。一方で、未交尾のメスと交尾済みの雄の球体への着陸数はコントロールに比較して減少した。Geranyl acetate あるいは farnesenes を処理した場合も、球体の色はミバエの着陸数に影響しなかったが、化合物の有無は有意に影響を示した。いずれの場合も、交尾済みの雌成虫の誘引数はエタノールの実を処理したコントロールに比較して増加した。Farnesenes を処理した場合、交尾済みの雄の球体への着陸数はコントロールに比較して減少した。Linalyl acetate を処理した場合は、化合物の有無はミバエの着陸数に影響しなかったが、球体の色は有意に影響を示した。以上より、試験した揮発性化合物に対する成虫の応答は雌雄によって異なることが明らかとなった。また、1-Octen-3-ol, geranyl acetate や farnesenes はミカンコミバエが寄主とする果実に含まれることが報告されている。そのため、これらの化合物を処理した場合、交尾済みの雌が球体に誘引される結果となった理由として、寄主果実の認識物質として機能していることが考えられる。以上より、ミカンコミバエ雌成虫では、寄主果実に含まれる揮発性化合物を、BdorOR13a, BdorOR82a といった嗅覚受容体を介して認識し、寄主果実の誘引に結びついている可能性が考えられる（図７）。本研究によって、受容体の機能解析によって同定された化合物の活性を調べることで、害虫ミバエの行動に影響を示す物質の同定に結びつくことが示された。ただし、本研究のデータからは、嗅覚受容体での揮発性化合物の受容が直接誘引行動に結びついていることは示されていない。今後、ゲノム編集技術により受容体遺伝子をノックアウトした成虫の行動を解析する必要がある。本研究により、ミバエ科昆虫で初めて嗅覚受容体の機能解析に成功したことから、今後、誘因剤の受容体の同定や受容機構の解明に結びつくことが期待される。

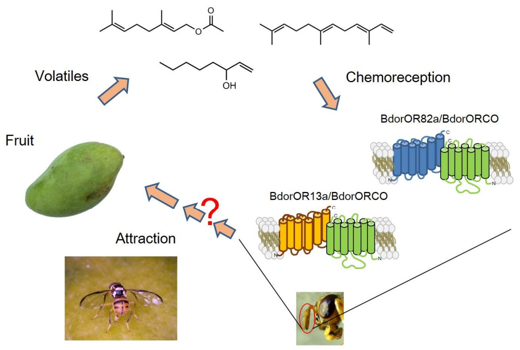

図7　嗅覚受容体を介した寄主果実の認識

（４）昆虫の発育調節機構の解析
ミバエ類の化学感覚受容体の解析と並行して、モデル生物のショウジョウバエを用いて昆虫の発育調節機構の解明を試みた。
昆虫ホルモンのエクダイソンの生合成における中間体を探索した。その際、エクダイソン欠損ショウジョウバエ幼虫を用いて候補中間体脱皮活性を評価した。これまでに、中間体候補物質として考えられてきた高度に共役したステロイド化合物は脱皮活性を示さなかった。その一方で、類似構造を持つ cholesta-4,7-dien-3-one が脱皮活性を示したことから、この化合物が中間体であることが示唆された。
ショウジョウバエは蛹化の際に壁に貼りつくために必要な糊タンパク質を分泌する。その一つの Salivary gland secretion 3（Sgs3）は 3 齢幼虫中期から脱皮ホルモン(20E) の分泌に応答して発現する。本研究では、時期特異的に 20E を不活性化する方法を確立して、幼虫の脱皮を阻害した。このような幼虫では、20E の投与により 1 齢期や 2 齢期においても Sgs3 が早期発現した。そのため、Sgs3 は本来発現するべき 3 齢期から逸脱して発現することが可能であることが示された。

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 Yuya Kaieda, Ryota Masuda, Ritsuo Nishida, MaryJane Shimell, Michael B. O’Connor, Hajime Ono
Glue protein production can be triggered by steroid hormone signaling independent of the developmental program in *Drosophila melanogaster*
Developmental Biology, 430: 166-176 (2017). 「査読有」
doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.002

② Junki Saito, Ryota Kimura, Yuya Kaieda, Ritsuo Nishida, Hajime Ono
Characterization of candidate intermediates in the Black Box of the ecdysone biosynthetic pathway in *Drosophila melanogaster*: evaluation of molting activities on ecdysteroid-defective larvae.
Journal of Insect Physiology, 93-94: 94-104. (2016)
「査読有」
DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.09.012

③ Luca Valzania[1], Hajime Ono[1], Marilena Ignestil, Valeria Cavaliere, Fabio Bernardi, Chiara Gamberi, Paul Lasko, Giuseppe Gargiulo
([1]These authors contributed equally to this work)
Drosophila 4EHP is essential for the larval-pupal transition and required in the prothoracic gland for ecdysone biosynthesis.
Developmental Biology, 410: 14-23. (2016)
「査読有」
doi: 10.1016/j.ydbio.2015.12.021

④ Alvin KW Hee, Suk-Ling Wee, Ritsuo Nishida, Hajime Ono, Jorge Hendrichs, David S Haymer, Keng-Hong Tan
Historical perspective on the synonymization of the four major pest species belonging to the Bactrocera dorsalis species complex (Diptera: Tephritidae)
Zookeys, 540: 323-338. (2015)
「査読有」
doi: 10.3897/zookeys.540.6028

〔学会発表〕（計１４件）
① 宮崎 仁美、大竹 潤、光野 秀文、尾崎 克久、Alvin Kah-Wei Hee、神崎 亮平、西田 律夫、小野 肇
ミカンコミバエ嗅覚受容体の機能解析：寄主果実に含まれる揮発成分への応答
第62回日本応用動物昆虫学会大会、(2018)

② 菅野　伸哉、小野　肇
ミカンバエの食害の有無によるウンシュウミカン成熟果の香気成分の比較
第62回日本応用動物昆虫学会大会、(2018)

③ Hitomi Miyazaki, Jun Otake, Hidefumi Mitsuno, Katsuhisa Ozaki, Ryohei Kanzaki, Alvin Kah-Wei Hee, Ritsuo Nishida, Hajime Ono
Functional characterization of olfactory receptors responding to plant volatiles in the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*
The joint meeting of the 33rd annual meeting of the ISCE and the 9th meeting of the APACE, (2017)

④ Yuya Kaieda, Ryota Masuda, Ritsuo Nishida, MaryJane Shimell, Michael B. O’Connor, Hajime Ono
Expression of a glue protein, Salivary gland secretion 3, is triggered by steroid hormone independently from developmental timeline in *Drosophila melanogaster*
The 3rd International Insect Hormone Workshop, (2017)

⑤ Yuya Kaieda, Ryota Masuda, Hajime Ono
Expression of a glue protein, Salivary gland secretion 3, can be triggered by steroid hormone signaling independent of the developmental program in *Drosophila melanogaster*
The 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference, (2017)

⑥ 小野肇、海江田祐也
ショウジョウバエにおける糊タンパク質が発現する時期と条件の解析
第61回日本応用動物昆虫学会大会、(2017)

⑦ 齊藤惇基、小野肇
Ecdysone生合成における3位の酸化還元の意義とCYP6T3の機能との関係
第61回日本応用動物昆虫学会大会、(2017)

⑧ 大竹 潤、東浦 祥光、大野 慧、吉永 直子、森 直樹、西田 律夫、小野 肇
ウンシュウミカン幼果由来のテルペン類を利用したミカンバエの誘引法の開発
日本農芸化学会2017年度大会、(2017)

⑨ 宮崎 仁実、大竹 潤、吉永 直子、森 直樹、西田 律夫、小野 肇
Bactrocera 属ミバエの化学感覚受容体の同定と発現組織の解析
日本農芸化学会2017年度大会、(2017)

⑩ 小野 肇、齊藤 惇基、吉永 直子、森 直樹
ショウジョウバエにおけるエクダイソン生合成過程での３位の還元反応の意義
日本農芸化学会 2017 年度大会、(2017)

⑪ 大竹潤、大野慧、Gail Lowe、Stefano De Faveri、西田律夫、小野肇
キュウリミバエの新規誘引物質の探索
昆虫学会第 76 回・応動昆第 60 回合同大会、(2016)

⑫ 小野肇
果実害虫 *Bactrocera* 属ミバエ類の誘引物質の開発と化学感覚受容体の探索
2015 年ケモビ研究会、(2015)

⑬ Yuya Kaieda, Ryota Masuda, Hajime Ono
Expression of a glue protein, Salivary gland secretion 3, is triggered by steroid hormone independently from developmental timeline in *Drosophila melanogaster*
The 2nd International Insect Hormone Workshop, (2015)

⑭ 宮崎仁実、西田律夫、小野肇
Bactrocera 属ミバエ類の化学感覚受容体の探索
第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、(2015)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp

６．研究組織
(1)研究代表者
小野　肇　　(ONO Hajime)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号： 70452282

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
光野　秀文　(MITSUNO Hidefumi)
東京大学・先端科学技術研究センター・助教
研究者番号： 60511855

(4)研究協力者
Alvin K. W. Hee
マレーシア・プトラ大学