

v. 研究セクター 研究活動報告

1. アゲハチョウの食草選択と進化

尾崎克久（研究員）、吉澤靖貴（奨励研究員）
廣寄由利恵（研究補助員）

メス成虫は生得的に幼虫の食草を見分けることができる

昆虫は地球上で最も多様化した生物群で、種の数では現時点で学名が付けられている全生物の過半数を占める。昆虫の中で2番目に大きなグループとされる鱗翅目昆虫(チョウとガのこと。近年は「チョウ目」と呼ばれるようになりつつあるが、本報告書では「鱗翅目」とする。)は、被子植物の誕生後に多様化した新しいグループであると考えられている。鱗翅目昆虫の大部分(99%以上)は植食性で、多くは幼虫に限られた植物だけを食べる。翅を持ち移動能力が高い成虫に対し、幼虫は移動能力が低いため自力で広範囲を探し回って餌植物を見つけ出すのは困難であり、幼虫はメス成虫が選んで産卵した植物を食べることになる。植物は昆虫など動物たちから身を守るために被食防御物質を生産しており、それを克服した幼虫しか食べることはできないので、メス成虫による植物種識別の正確性は、次世代の生存率に強く影響する。そのため、**食草選択は本能（学習に影響されない生得的な行動）として厳密にプログラムされゲノムに刻まれており、親から子へ正確に受け継がれている。**

メス成虫は葉の味見をして産卵場所を決める

成虫が産卵場所として植物を選択する際に、最も重要な情報として利用しているのが化学感覚(味覚と嗅覚)である。陸棲動物においては、水溶性・脂溶性の不揮発性化合物を感覚器官が接触して認識するものを味覚、揮発性化合物を非接触的に認識するものを嗅覚と呼ぶ。化学感覚は生物の生存にとって不可欠な機能であり、寄主選択・配偶行動・集団生活の維持・社会性の構築など、生存上の様々な役割に関与している。アゲハチョウのメス成虫は、産卵の直前に前脚二本で葉の表面を叩く「ドラミング」と呼ばれる行動をとる。前脚先端部のふ節には、味を感じるための感覚器官である「毛状感覚子(化学感覚毛)」が多数存在しており(図1)、**ドラミング行動を通じて葉の味見をしているのである。**成虫は花の蜜を飲むので、葉を食べることはないにもかかわらず、前脚で葉の味を感じることができるのだ。

数種のアゲハチョウについては、食草を選択する時に感じている化合物ブレンド(産卵刺激物質)が解明されている¹⁻³。これら化合物の構造を比較すると、構造的な類似性が認められることから、植物の系統的類縁性とは無関係に植物に含まれている化合物の類似性が寄主転換の可能性を支え、食性の進化を可能にしたのではないかと考えられている⁴。これまでに報告され

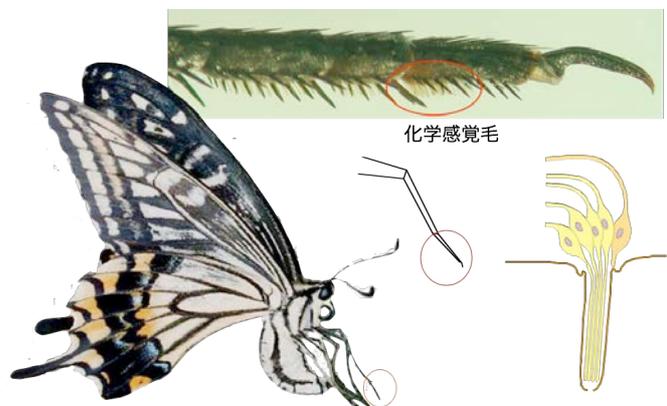


図1 メス成虫前脚ふ節の化学感覚毛
前脚先端部のふ節には、トゲの間に味を感じるための毛状感覚子(化学感覚毛)がある。

ている産卵刺激物質は全て不揮発性で、前脚ふ節で接触して感じていることから、アゲハチョウは産卵刺激物質を「味」として認識していると考えられている。産卵刺激物質を全て混合してメス成虫に触れさせると、生の葉と同等の頻度で産卵行動を示すが、興味深いことに単独の化合物では全く卵を産まないことが知られている。メス成虫に卵を産ませるためには、最低でも2種類の産卵刺激物質を混合する必要がある。

産卵刺激物質を認識する仕組みはブラックボックス

チョウの幼虫が決まった植物だけを食べることや、成虫が正確に植物を見分けて産卵していることは、古くはダーウィンやファーブルの時代から知られているが、どのような仕組みで植物種を認識しているのかは100年以上にわたって未解明であった。味覚受容体遺伝子の極度に少ない発現量や機能解析の困難さから、ブラックボックスとされ続けてきたのである(図2)。「チョウが食草を見分けるしくみを探るラボ」の取り組みにより、ナミアゲハの産卵刺激物質のひとつである「シネフリン」を特異的に認識する受容体を発見し、分子・細胞・行動の全ての階層から機能を解明した⁵。

昆虫の化学感覚に関わる遺伝子群を解明する取り組みは困難の多い研究分野であったが、近年の次世代型シーケンサーの急速な発展はめざましく、ある組織で発現している遺伝子群を網羅的に解析することが難しいことではなくなった。長年にわたりブラックボックスとされてきた、食草選択という本能の本体とも言える「産卵刺激物質認識システム」の全容解明に取り組むことができると考えた。

本研究では、アゲハチョウの仲間を研究材料として、植物種を正確に見分けて適切な産卵場所として選択するという本能のメカニズムを、分子の証拠を用いて理解することを目指す。遺伝子の情報のみならず、感覚神経の働きや個体の行動、群衆生態学的な解析といった様々な視点から総合的に「生きる」ということを考えるのが本研究の特徴である。

厳密な本能と食性進化のパラドックス

メス成虫が植物の選択を間違え、食草とは異なる植物に産卵した場合には、幼虫の生存率が著しく低下する。このため、食草選択の仕組みは本能として厳密にプログラムされ正確に受け継がれている反面、食性が変化したことが出発点となってアゲハチョウ科の種分化(進化)が起きたというパラドックスがある⁶(図3)。食性転換が成立するためには、(1)成虫の産卵場所としての植物の選択が変わる他に、(2)幼虫がその植物を食べることができるか、(3)食性が変わった雌雄が選択的に交尾できるか、といった様々な条件が整う必要がある。これ

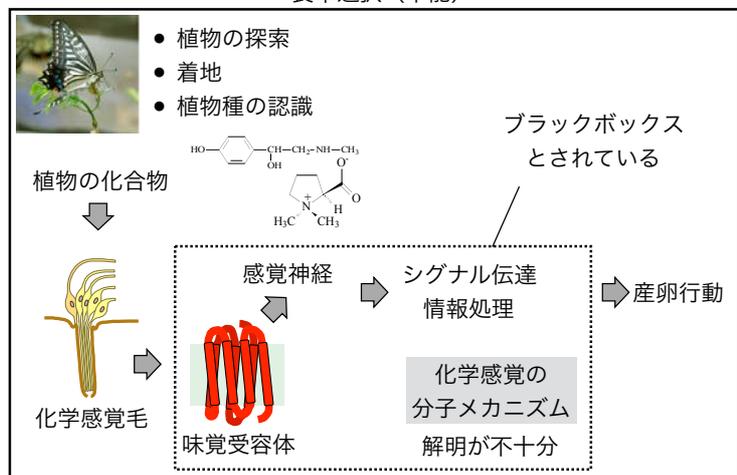


図2 食草選択と化学感覚システムの概略図。

チョウが植物の化合物をどのようにして認識し、産卵行動につながるのかは長年にわたり未解明である。

ら全てに関わる遺伝子群が同時多発的に好都合な突然変異を起こすことを仮定するのは難しい。この様に、食性転換による種分化を考えた場合にも、ブラックボックスが存在しているのである。

本研究の取り組みにより、複数種のアゲハチョウの産卵刺激物質認識システムに関する遺伝子やゲノム領域が明らかになれば、それらを比較することで「食性転換による進化」という現象の原動力となった変化を解明できるだろう。

結果と考察

これまでの経緯： ナミアゲハの場合、ミカン

(*Citrus unshiu*) の葉に含まれる10種類の化合物が産卵刺激物質として知られている¹。これら10種の化合物を適切に混合すると、生の葉と同等の頻度で産卵行動を誘導することができる。我々の取り組みにより、産卵刺激物質のひとつであるシネフリンに特異的に応答する味覚受容体を発見し、RNAiによって機能を阻害すると産卵の頻度が低下することを確認している⁵ (図4a)。また、各感覚毛に含まれる4種類の味覚神経細胞のうち、3種類が同時に発火することで産卵行動を誘導することを発見しており、「化合物の刺激」を「ミカンの葉の味」という情報に変換する独特の神経プロファイルがあることを確認している⁷ (図4b)。ナミアゲハの他には、クロアゲハとシロオビアゲハで主要な食草から産卵刺激物質が同定されており、それぞれ6種類と5種類の化合物を認識していることが知られている^{2,3}。

これら既知の産卵刺激物質を認識する味覚受容体の全容を解明するため、次世代型シーケンサーMiSeqを用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) に取り組んできた。メーカーのプロトコールに従った作業では、味覚受容体の遺伝子を探索するという目的を達することができなかったため、ライブラリー作成方法の改良 (2014年度報告) とアセンブル・解析方法の改善 (2015年度報告) に取り組み、効率的かつ高精度に遺伝子を検出できるようになった。これにより、アゲハチョウ科の味覚受容体遺伝子の一部には独特な選択的スプライシングがあり、何らかの役割を有する可能性が示唆された (2015年度報告)。

今年度の取り組み

1. 主要な7種のアゲハチョウから味覚受容体遺伝子の候補を発見 (活動計画番号: 1)

現在、国内には18種のアゲハチョウが生息していると言われている。その中で、進化的に古いとされるグループから新しいとされるグループを含む7種を代表として、トランスクリプトーム解析による味覚受容体遺伝子の探索を行った。これら7種については、外部の協力を得てゲノムを解読または解読に着手している。

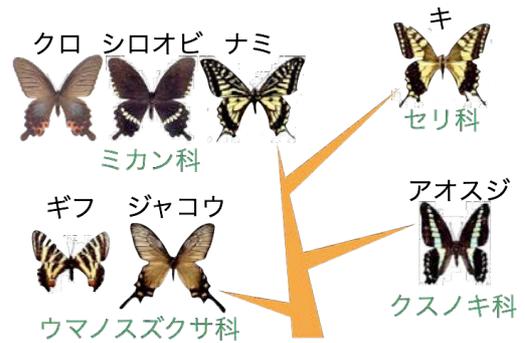


図3 アゲハチョウ科の系統関係
食草が変わることが進化の出発点となったと考えられている。

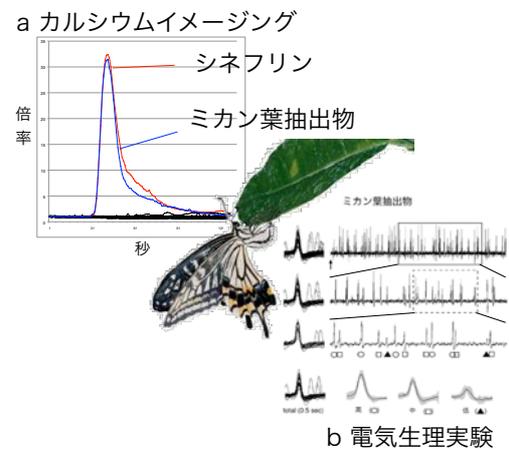


図4 成果の概要

a: シネフリンに特異的に応答する受容体の発見。b: 3種類の味覚神経の同時発火が産卵を誘導する。

昆虫の化学感覚受容体遺伝子は塩基配列・アミノ酸配列の多様性が極めて高く、最も多く用いられている相同性検索による遺伝子探索は不正確かつ困難である。そのため、生命情報学の手法を用いてアミノ酸コード領域を予測し、完全長と思われるものを抜き出し、膜貫通領域とループのトポロジーで定義される昆虫味覚受容体のドメイン構造を持つ配列を探索し、受容体の候補として検出した。これにより、7種のアゲハチョウからそれぞれ複数の味覚受容体候補遺伝子が見つかった

(図5)。前脚ふ節で発現量が高いものについても、見つかった遺伝子総数についても種間のばらつきがあるが、遺伝子数についてはシークエンスのデータ量やアセンブル精度の影響を受けている可能性があるため、今後さらに詳細な解析を行う必要がある。まだ不明瞭な部分が残されているが、食草選択に関与する遺伝子群の全容解明に近づきつつある。

産卵刺激物質が解明されている3種(ナミアゲハ・クロアゲハ・シロオビアゲハ)の味覚受容体候補について、培養細胞を用いたカルシウムイメージング法、RNAiによる機能阻害と電気生理実験の組み合わせによる機能解析を進めている。どの化合物がどの受容体によって認識され、どのタイプの味覚神経を刺激し、どのような情報処理を経て産卵という行動に出力されているかという一連の仕組みは、「食草選択という本能」の本体であると考えられるため、これに関わる遺伝子の機能解明が最重要の課題である。



図5 味覚受容体遺伝子の数

数字はメス成虫前脚で高発現のもの。

カッコ内は候補遺伝子の総数。

2. 昆虫-植物-化合物の関係を理解するデータベース構築 (活動計画番号: 2, 4)

産卵刺激物質が未解明の4種についても、味覚受容体候補の機能を調べるためにリガンドとなる化合物の情報を把握する必要がある。しかし、産卵刺激物質を解明するには、従来の行動実験を主体とする研究方法では、1種あたり学位論文一人分に相当する労力が必要になる。この問題を解決するため、生命情報学の手法を取り入れることを考えた。

2-1. 昆虫の食性と化合物の相関関係

昆虫-植物の関係については、図鑑を始め様々な文献に分散して掲載されており、全体像を把握するのは困難である。まずは鱗翅目の中で小さなグループであるチョウに限定し、どの種がどの植物を食べるかという関係をデータベース化した。これに昆虫と植物の双方の分子系統樹を組み合わせマトリックス化することで、どの昆虫がどの植物と関係が深いのかを一覧できるようになった(図6)。これに植物化合物を網羅的に掲載するデータベースである KNApSAcK

(<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>) から化合物の情報を加え、化合物の類似性を指標にマトリックスを並べ替えると、昆虫がどの植物に依存するかと、植物に含有する化合物の類似性に相関が見られた(図7)。このことから、植物の進化の歴史や系統的な類縁性とは無関係に、化合物の類似性が食草選択に強く影響していることが明らかになった。

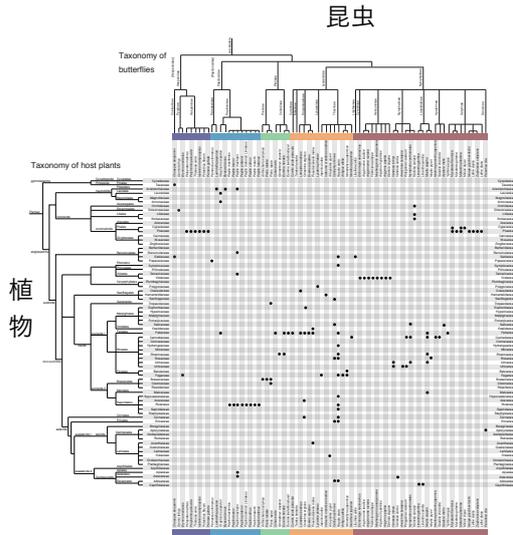


図6 昆虫-植物の分子系統と寄主マトリックス
 チョウが食草として利用している植物にプロットしている。プロットが横に並ぶものは、昆虫グループがその植物に強く依存することを示す。プロットが縦に並ぶものは、広い食性を持つことを示す

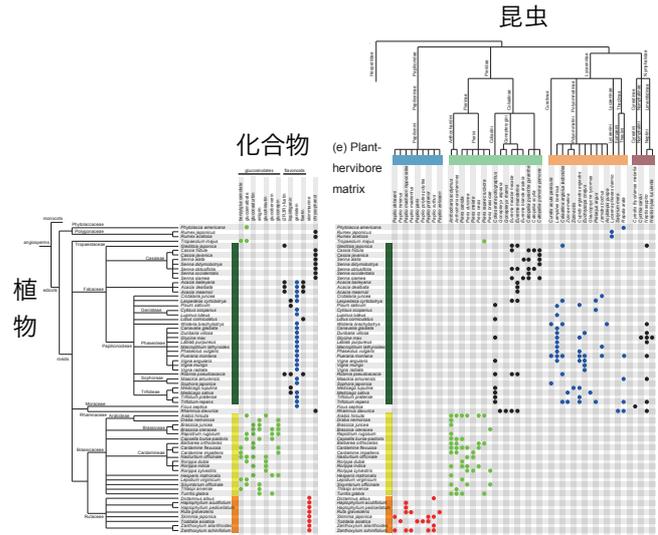


図7 化合物の類似性で並べかえた寄主マトリックス
 植物の分類群を無視して、含有する化合物の類似性で並べかえている。昆虫の植物への依存度は、化合物の類似性によって決まっていることを示す。

2-2. ネットワーク解析による食草への依存度解明

化合物の類似性を指標に、昆虫がどれくらいの強さで植物に依存しているかを解明するため、「Flavor network アルゴリズム⁸」によるネットワーク解析を行った（データ未掲載）。その結果を「Z-Score（サンプルサイズの異なる集団を比較できる偏差値のようなもの）」を用いて平均化すると、科という分類単位ごとのチョウがどの植物に依存しているかが示された（図8）。セセリチョウ科はイネ科植物に強く依存しており、スマレ科を中心に様々な植物を利用しているタテハチョウ科の一部とイネ科を共有している（図8a）。シロチョウ科はアブラナ科に強く依存しているが、様々な植物を利用しているシジミチョウ科とマメ科を共有している（図8b）。アゲハチョウ科には、ミカン科への強い依存関係が見られる（図8c）。

ここで注目したいのは、シロチョウ科とシジミチョウ科が一部の種でマメ科を共有する点である。シロチョウ科が主に

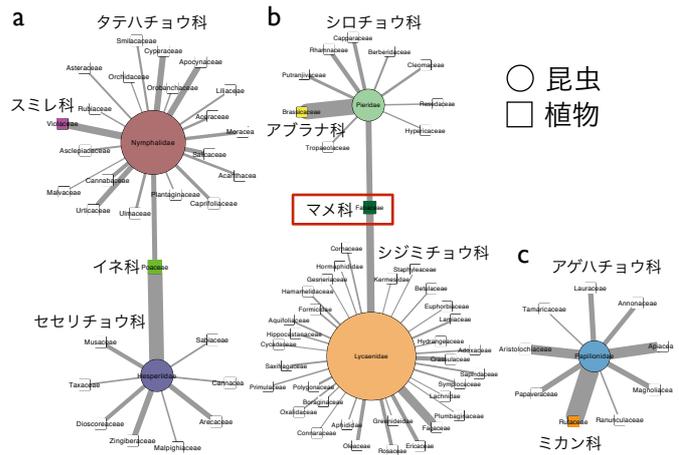


図8 昆虫の植物への依存度を示すネットワーク
 丸は昆虫の科、四角は植物の科によるグループングを表す。線の太さは、昆虫の植物への依存度の強さを示す。

利用するアブラナ科は、昆虫に対して毒性が強い防御物質としてカラシ油配糖体という化合物を持っていることが知られている。これに対し、マメ科植物の毒性は弱く、人為的に与えた場合には多くの鱗翅目昆虫が摂食可能であることが知られている。このことから、一部のチョウにおいては大きく異なる植物に寄主転換をする際に、一度マメ科のような安全な植物を間に挟み、その後に化合物レベルではかつての食草に近いものへと移るといった進化の歴史があるのではないかと示唆される。

そのような進化過程は、最初に食草を拒絶するという行動が獲得されることによって説明が可能である。本来の食草には卵を産まなくなった母チョウが様々な植物をドラミングし、渋々ではあるがマメ科に卵を産んだ場合には幼虫が生き残ることが可能である。しかしマメ科は多くの昆虫に利用され競争が激しいため、新たなニッチを探す必要がある。そして植物の分類群としては大きく異なっても、化合物レベルでは類似するものを新たな食草として選択する。その後、食性が変わったという事実に合わせてチューニングするかのように、関連する遺伝子群が変化していくのではないかと考えられる。

化学感覚毛には4種類ずつ味覚神経細胞が含まれており、そのうち3つが同時発火した場合に産卵行動が誘導される⁶。もし残りの一つが産卵忌避物質を認識する神経細胞である場合、産卵刺激物質受容体の一つが発現場所を忌避ニューロンに変更しただけで、かつての産卵刺激物質の一つが産卵忌避物質に変わることになる(図9)。

おわりに

昆虫化学感覚受容体遺伝子の探索は、一般的な相同性検索を用いた方法では困難であるため、実績のあるスマートな手法を使うことができず、地道な作業が必要になる。本研究の取り組みにより、国内の主要な7種については遺伝子の情報を蓄積しつつあり、食草選択の分子メカニズムの全容解明に着実に近づいていると言えるだろう。

受容体遺伝子を見つけることができたとしても、リガンドとなる化合物の情報がないと機能の解明が難しい。その問題について、生命情報学の手法を用いて解決に向かっている。その過程で得られた結果を詳細に考察することで、食性転換の進化過程に新たな理論を見出すことができた。現状では証拠となるデータが乏しい仮説ではあるが、大きな発見につながる可能性を秘めていると考えている。

今後は、これまでに構築したデータベースを主軸として、食草の成分分析や機械学習(人工知能の一種)を用いた予測法により、リガンド候補となる植物化合物を探索する予定である。

化学感覚毛に含まれる4種類の味覚神経細胞のうち、役割が不明であった一つが忌避行動のニューロンである可能性が示唆され、「食草選択という本能のしくみ」においても「食性転換を

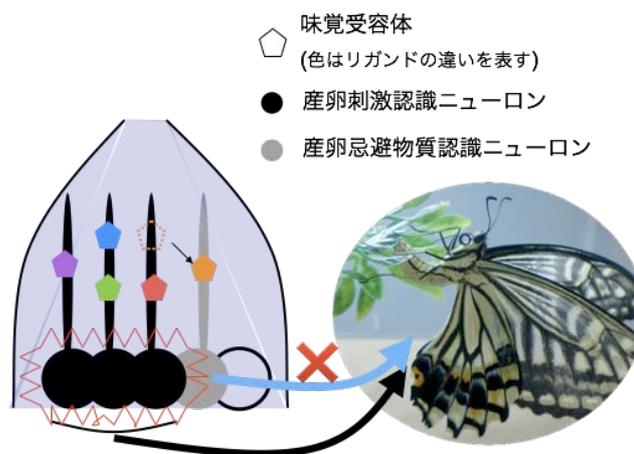


図9 味覚神経と行動の模式図

産卵刺激物質受容体を発現する味覚神経3種が同時発火することで産卵行動が誘導される。残りの味覚神経が産卵忌避ニューロンである場合、受容体の発現場所が変わることで、産卵刺激物質だった化合物が産卵忌避物質に変わる可能性がある。

出発点とする種分化」においても重要な意味を持つ可能性が浮上した。今後はこのニューロンの機能を慎重に解明する必要がある。

まだ荒削りな部分を多く残す結果ではあるが、今後の進展に向けて重要な布石を複数打つことができ、実りの多い一年であったと考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、吉川寛非常勤顧問 (BRH)、谷村禎一教授 (九大)、Frederic Marion-Poll 教授 (フランス INRA)、龍田勝輔助教 (佐賀大)、小寺正明講師 (東工大)、武藤愛助教 (奈良先端大)、澤田実氏 (北海道札幌市)、伊丹市昆虫館 (兵庫県伊丹市)、橿原市昆虫館 (奈良県橿原市) に多大な協力と助言を頂いた。

引用文献

1. Ohsugi, T., Nishida, R. & Fukami, H. Multi-component system of oviposition stimulants for a Rutaceae-feeding swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Applied Entomology and Zoology* **26**, 29-40 (1991).
2. Honda, K. Identification of host-plant chemicals stimulating oviposition by swallowtail butterfly, *Papilio protenor*. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 1127-1135 (1990).
3. Nakayama, T., Honda, K., Omura, H. & Hayashi, N. Oviposition stimulants for the tropical swallowtail butterfly, *Papilio polytes*, feeding on a rutaceous plant, *Toddalia asiatica*. *Journal of chemical ecology* **29**, 1621-1634 (2003).
4. Feeny, P., Rosenberg, L. & Carter, M. in *Herbivorous Insects: Host-seeking Behavior and Mechanisms*. *Academic Press* 27-76 (1983).
5. Ozaki, K. *et al.* A gustatory receptor involved in host-plant recognition for oviposition of the butterfly, *Papilio xuthus*. *Nature communications* **2:542**, (2011).
6. Thompson, J. N. Evolutionary genetics of oviposition preference in swallowtail butterflies. *Evolution* 1223-1234 (1988). doi:10.2307/2409006
7. Ryuda, M. *et al.* Gustatory sensing mechanism coding for multiple oviposition stimulants in the swallowtail butterfly, *papilio xuthus*. *J Neurosci* **33**, 914-24 (2013).
8. Ahn, Y.-Y., Ahnert, S. E., Bagrow, J. P. & Barabási, A.-L. Flavor network and the principles of food pairing. *Scientific reports* **1**, (2011).