

1. アゲハチョウの食草選択と進化

尾崎 克久（研究員）、宇賀神 篤（奨励研究員）
廣寄 由利恵（研究補助員）

アゲハチョウが食草を選択するしくみ

完全変態の昆虫は、幼虫と成虫では形状も餌も大きく異なる。アゲハチョウの仲間の幼虫は食草・食樹の葉を食べるが、成虫は花の蜜を吸う。幼虫が食べる植物は種ごとに決まっており、食草ではない植物を与えた場合、餓死してでも食べないのである。しかし、幼虫の移動能力は低く、特に初令幼虫が自力で広大な環境から餌を探し出すのは困難である。そこで、成虫が葉を食べないにも関わらず、幼虫が食べる植物を見つけ出し産卵するのである。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。

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味覚である。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「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。

成虫の食草の探索から産卵に至るまでの一連の行動は、だれかに教わったり練習を積んでうまくなるようなものではなく、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。

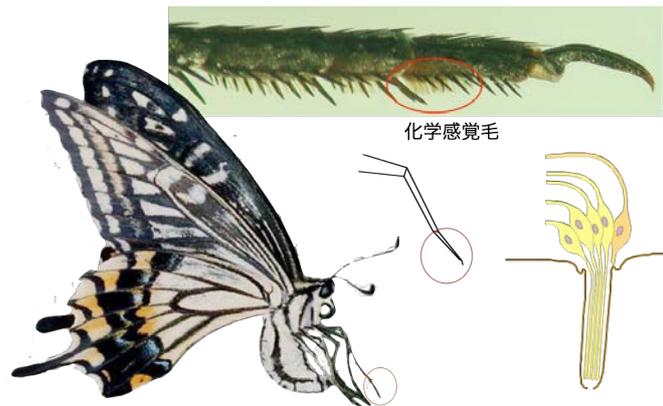


図1 メス成虫前脚ふ節の化学感覚毛

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。

本能のメカニズム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、味覚受容体遺伝子が食草選択に関与していることを明らかにした¹。

産卵刺激物質の情報は、3つのステップを経て産卵に至る行動を構築していると考えられることができる。

情報の入り口：味として感知する

産卵するか否かの判断：神経活動によって情報が処理される

情報の出口：卵を植物に産み付けるという行動

第3ステップの行動に関しては、生態学的な研究によって多くの知見が蓄積されている。第1ステップの感知に関しては、本研究の取り組みにより理解が深まりつつある。しかし、第2ステップの情報処理に関しては、これまでほとんど未解明であった。昆虫が感覚器官で感じた化合物の刺激を、どのような神経活動によって産卵場所であるとの「判断」を行っているのかについて、分子生物学的に説明することは困難なことである。それどころか、化学感覚毛の味覚神経が脳に投射しているのかさえも未解明であった。

食性転換のパラドックス

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²というパラドックスがある（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配できるか、といった様々な条件が整う必要がある。これ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した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と、種分化が起きる最初の変化を、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。

結果と考察

今年度の取り組み

本能行動の分子メカニズム

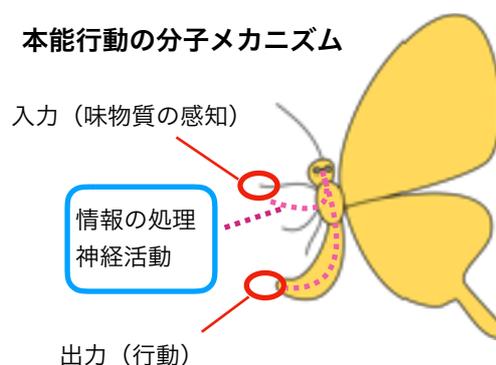


図2 食草認識における情報処理の概略図
味覚の情報がどのように伝わり、産卵行動が誘導されるのかについては謎のままである。



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。

1. 産卵刺激物質認識時に活動する脳領域

食草認識から選択的産卵に至る過程のうち、入り口となる食草認識機構については本研究により理解が進みつつある^{1,4}。しかし、前脚の味覚感覚子で受容された食草の化合物情報が「どこでどのように処理されて産卵へと繋がるのか」は依然として完全なるブラックボックスのままである。脳で化合物情報を元に食草であるとの「判断」が行われている可能性と同時に、脳には化合物情報が届かずに、昆虫の様々な運動を制御している胸部神経節の働きで反射的に腹部を曲げている可能性も考えられる。

産卵刺激物質に対するナミアゲハ前脚ふ節の味覚感覚子の応答自体は、羽化直後から常に観察される。一方で、産卵行動は、光条件や飛翔量、交尾経験といった複数の要因が整ったうえで産卵刺激物質を提示して初めて観察される。また、ミカンの葉上で一連の産卵行動に没頭中の個体を断頭すると、まだ生きている（脚や翅を動かすことができる）にも関わらず、以降はミカン葉に触れても一切産卵しなくなってしまう。これらの観察事実から、食草認識—産卵行動において、脳での複数情報の統合が重要な役割を果たしている可能性が浮上した。より高次の情報処理機構へと視点を広げた研究を展開すべく、本年度はそのための予備的な検討を実施した。

1-1. 前脚ふ節味覚神経の投射先

食草情報の伝達先を明らかにするには、前脚ふ節の味覚神経細胞の一次投射先の解剖学的な同定が正攻法であろう。しかし、「細くて長い」というチョウの肢の構造的特徴と色素の浸透速度を鑑みるに、ふ節からの直接染色は極めて困難と予想された。昆虫の感覚神経染色の専門家である北海道大学電子科学研究所の西野浩史助教の助力を得て、代替手法を検討した。ふ節に存在する神経細胞由来の選択的軸索退縮を誘導すべく、片側のみ前肢ふ節を切除した。その上で前肢腿節基部側からの色素注入を行い、「前肢ふ節味覚神経細胞の一次投射先」を未切除側との染色パターン之差分として捉えることを試みた。

現在までに、ふ節の一部の神経細胞が脳（食道下神経節）へ投射する様子が観察されている（図4）。この結果により、前脚ふ節から伸びる軸索の中には、脳に投射しているものがあることが明らかになった。これらが味覚神経であれば、前脚ふ節感覚子で発生した「化合物を感知した」という情報が、脳に届いているのではないかと期待される。引き続き西野助教の協力を受けながら、ふ節の味覚感覚子を選択的に除去した個体での染色実験を実施する。

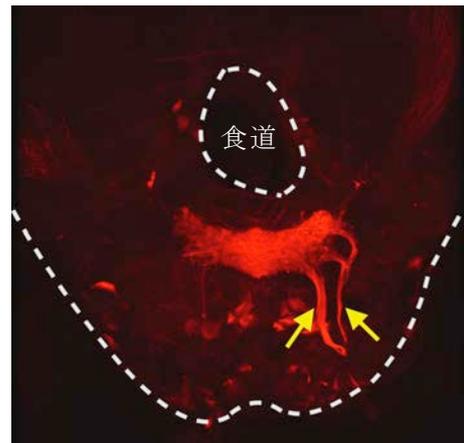


図4 ふ節から脳への投射

左側の前肢ふ節を切除した個体に対するローダミン染色像。右の未切除側でのみ食道下神経節への投射（矢印）が観察された。一部の軸索は正中線を越えて左側まで伸びている。

1-2. 産卵刺激物質によって活性化する脳領域

昆虫の脳は脊椎動物と比べて遥かに少数の細胞で構成されているものの、それでも数十万個の神経細胞を含んだ組織である。さらに、前肢や翅を激しく動かしながらか行われる食草認識—

産卵行動への電気生理学的手法の適用は困難である。自由に動き回る状態での動物の行動の神経機構を研究するうえで有効と考えられるのが、「初期応答遺伝子 (Immediate early genes: IEGs)」を利用したアプローチである。神経細胞が活動した際、その細胞内で急速かつ一過的な発現上昇を示す遺伝子群を IEGs と称する。IEGs は活動した神経細胞の機能と直接関連する遺伝子ではないが、ある行動後に IEGs を発現する細胞を検出することで、その行動に関わる神経細胞の同定が可能となる、発現マーカーとして利用される遺伝子である。この手法は脊椎動物で頻用されており、感覚刺激への応答や記憶・学習、性行動といった様々な行動を対象に、関わる神経細胞が同定されてきた⁸。昆虫においても *Egr*, *Hr38* という 2 遺伝子が脊椎動物とよく保存された IEG の性質を持つことが近年報告されたため^{9, 10}、ナミアゲハへ適用できる可能性を検討した。

GABA 受容体阻害薬であるピクロトキシン

(Picrotoxin: PTX) をナミアゲハ頭部へインジェクションすることで脳に広範な神経活動を誘導し、*Egr*,

Hr38 の発現変動を解析した。両遺伝子とも 30 分後をピークとする典型的な IEG 型の一過的な発現上昇を示した (図 5)。蛍光 *in situ* hybridization の結果と併せ、*Hr38* による活動神経細胞の可視化が脳の複数の領域で可能と考えられた。

交尾済みメスの前脚ふ節にミカン葉粉末水溶液を 20 分間提示した後、脳内で *Hr38* を発現する細胞の検出を試みた。様々な感覚情報が統合される高次中枢キノコ体において、少数ではあるが明瞭な *Hr38* 発現細胞が観察された (図 6)。この結果から、前脚化学感覚毛でミカン葉に含まれる水溶性化合物を感知したという情報が、脳へ伝わっている可能性が高いと考えられる。アゲハチョウの食草認識と産卵場所の選択に、脳での神経活動が関与している可能性が示唆される。

今後は再現性の確認をした上で、刺激の種類や個体の条件を様々に変えて同様の実験を行い、食草認識—産卵行動に関わる脳領域の同定を本格的に進めていく。

2. 幼虫は餌からどのような影響を受けるのか

これまでの取り組みにより、食性転換は成虫の好みが変わることで食草に産卵しなくなることから始まると推定された

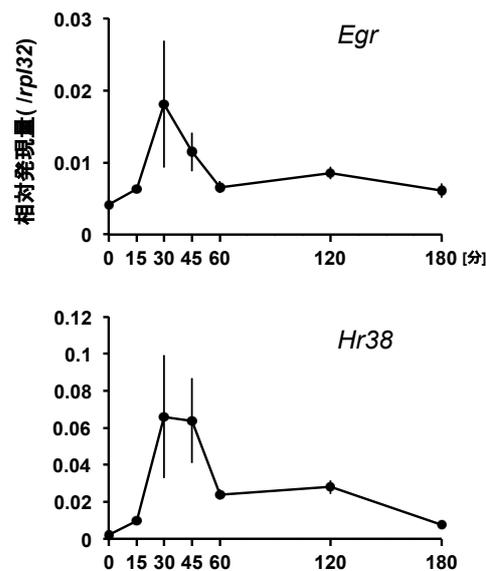


図 5 神経活動後の一過的な脳内 IEG 発現上昇

PTX 投与の 30 分後に *Egr* は約 4 倍、*Hr38* は約 30 倍の発現上昇を示した。各時点とも 4 個体分のデータ。

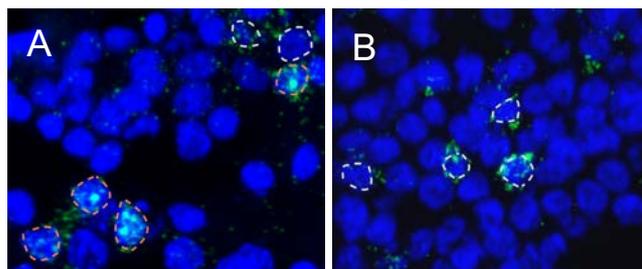


図 6 ミカン葉粉末水溶液提示時のキノコ体における *Hr38* 発現細胞

(A) ミカン葉粉末水溶液の前肢ふ節への提示を 20 分間繰り返した個体

(B) 水のみを同様に提示した個体

(A) では、*Hr38* 転写産物が核外に局在する細胞 (核を白点線で囲んだ) に加えて、核内に局在する細胞 (核を橙点線で囲んだ) が観察された。転写産物が核外に局在する細胞は、提示前に活動していた細胞と考えられる。

⁶ (16年度活動報告書)。幼虫の解毒機能や成虫の産卵誘導に関与する遺伝子群は、後から最適化されるかのように変化すると考えられる。このことから、当初の研究計画である産卵刺激物質受容体遺伝子の種間比較では、食草が変わった後の最適化過程の理解にとどまり、食草転換による進化の開始点については理解できない可能性が高いと考えられるため、研究計画のアップデートが必要になった。

アゲハチョウ科に関しては、食草転換と種分化に相関が見られることが報告されているが⁷、そもそも、食草が変わるとなぜ種分化が起きるのだろうか。食草とは異なる植物を食べた場合には、幼虫の体内ではどのような変化が起きているのかについては未解明である。種分化における、食草転換の影響はどのようなものなのか知る手がかりを得るため、同腹仔（1個体のメス成虫が産んだ卵から孵化した幼虫：兄弟・姉妹の関係にあるもの）を異なる餌条件で同時に飼育し、トランスクリプトーム解析を行った。餌の違いによる発現変動から、食性転換の初期段階でどのようなことが起きていたのか理解する手がかりが得られると期待できる。

2-1. 発育速度に見られる違い

同腹仔の幼虫を、以下の6グループに分けて同時に飼育を行った。遺伝的背景が均質に近いことに加え、温度や湿度など発育に関する条件がほぼ一致する環境であるため、観察される変化は餌の影響によるものであると期待できる。

- ・カラスザンショウ生葉
- ・ミカン生葉
- ・人工飼料-カラスザンショウ粉末混合（ホルマリンあり）
- ・人工飼料-カラスザンショウ粉末混合（ホルマリンなし）
- ・人工飼料-ミカン粉末混合（ホルマリンあり）
- ・人工飼料-ミカン粉末混合（ホルマリンなし）

これら6グループのうち、カラスザンショウの生葉でだけ発育速度が速いことが観察された（図7）。最初の蛹が観察されるまでの期間が、他のグループに比べて5~6日短い。発育速度には個体差があり、同腹仔を同じ条件で飼育してもばらつきが出るが、無事に成長した全個体が蛹になるまでの期間で見てもカラスザンショウで育ったものがほかと比べて早かった。ミカン生葉と各種人工飼料では、発育速度に違いは見られなかった。また、蛹の重さや成虫のサイ

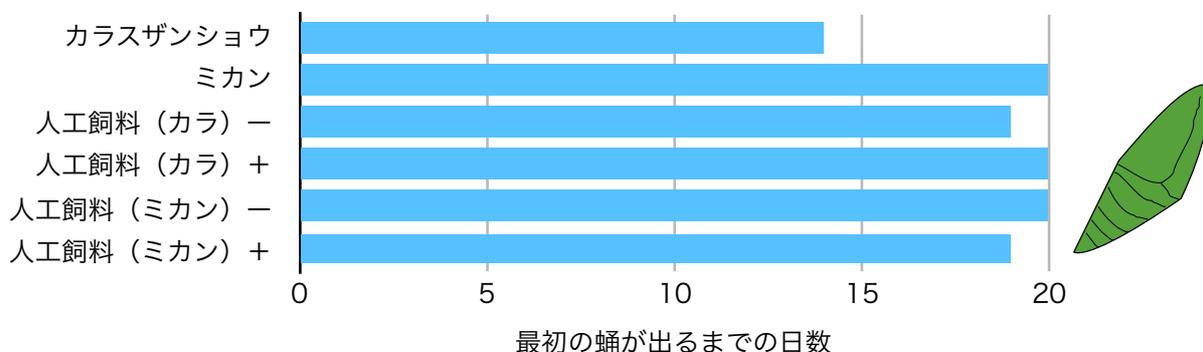


図7 幼虫の発育速度に見られる餌の影響

同腹仔を6グループに分け、異なる餌を与えて同時に飼育した。カラスザンショウの生葉を与えた場合で最も発育速度が速く、最初の蛹が出るまでの期間が他のグループと比べて5~6日早い。

ズ、蛹から成虫になるまでの期間に違いは見られないため、餌の違いが影響を与えたのは幼虫の発育速度のみであった。

2-2. 幼虫全身のトランスクリプトーム解析

餌の違いによって、遺伝子発現に影響があるのか調べるため、幼虫全身のトランスクリプトーム解析を行った。各試験区から5個体ずつ、一晚絶食させてフンを出させた4齢幼虫の全身からRNAを抽出し、Illumina MiSeqを用いて塩基配列を決定した(試験区毎に約2千万リード、合計1億2千万リード)。以下に結果を要約する。

1. カラスザンショウを食べた幼虫で発現が上昇している解毒関連遺伝子がある

毒物の排出を促進するUDP-glucuronosyltransferase 3A1-likeや、毒物代謝に関連するCYP6Bサブファミリーに属するもので発現変動が認められた。Cytochrome p450 6B1とcytochrome p450 6B2-like、cytochrome p450 6B5-likeはカラスザンショウ生葉を食べさせた個体で発現量が上昇していた。cytochrome p450 6B5-like遺伝子は、カラスザンショウの粉末を加えて作成した人工飼料を与えた幼虫でも発現が上昇していた。

UDP-glucuronosyltransferase 3A1-likeは、ミカン(生葉・人工飼料)を摂食した個体では発現していなかった(約6,000万リードのデータから、1リードも検出されなかった)。

2. ホルマリンの影響は小さい

人工飼料の作成時、防カビ剤としてホルマリンを少量添加しているが、解毒や消化に関連すると推定される遺伝子にはホルマリンの有無による明確な発現変動は観察されなかった。昆虫表皮の主成分であるクチクラ合成に関わる遺伝子のいくつかは、ホルマリン添加区でわずかに上昇していた。

3. 味覚・嗅覚の受容体遺伝子の発現については、餌による変動は見られなかった

カラスザンショウも柑橘類も同じミカン科であり、ナミアゲハの食草であるが、発育の途中でこれらの中で餌を変えることが難しい場合が多い。途中まで柑橘類の葉で育った幼虫にカラスザンショウを与えても、食べることができずに死んでしまう幼虫が多く観察される。その反対も同様であり、最初に食した餌に特化する傾向がある。

この行動に、摂食行動に関わる味覚受容体遺伝子の発現変動が影響している可能性に期待していたが、味の感じ方については経験した餌の違いはないことが明らかになった。異なる食草への変更が難しいことは、味覚的な好みが変わるのではなく、解毒機能など味覚とは異なる遺伝子の発現の違いによる影響である可能性が示唆された。

4. シネフリン受容体遺伝子は幼虫では発現していない

ナミアゲハにとって最も重要な産卵刺激物質であるシネフリンの受容体遺伝子は、幼虫では発現していないことが明らかになった(約1億2千万リードのデータから、1リードも検出されなかった)。成虫と幼虫では食草の認識に違いがあり、成虫にとっての産卵刺激物質が幼虫の摂食刺激物質と同じではないことは以前から知られていたが、化合物の認識が遺伝子発現レベルで異なっていることが確認された。

2-3. 食草の変更が種分化に与える影響

例え食草であっても、植物種が異なると幼虫の発育速度や遺伝子発現に違いが見られることが明らかになった。カラスザンショウ生葉を与えた幼虫とミカン生葉を与えた幼虫では、解毒に関わると予想される遺伝子の発現に変化が見られた。植物種ごとに異なる二次代謝物質に対応するための変化ではないかと考えられる。フラノクマリン類の多くには毒性があり、カラスザンショウには含まれているが柑橘類には含まれていない（千葉大学佐藤愛氏より私信）。カラスザンショウ摂食区で発現が上昇し、ミカン摂食区で発現していなかった

UDP-glucuronosyltransferase 3A1-like 遺伝子が、フラノクマリン類への耐性に関与している可能性が考えられる。このような遺伝子発現の変化は、植物種によって発育速度が異なる現象に関連する可能性がある。ヒメカンアオイをナミアゲハ幼虫に与えた場合、幼虫期間が2週間から20日程度遅延することが観察されている（吉川寛顧問より私信）。食草ではないものの餌として利用可能な植物を食べた場合には、幼虫期間の差が大きなものになる可能性を示していると考えられる。

幼虫の発育速度が異なるということは、成虫になる時期にも変化が見られるということになる。成虫が発生する時期のズレによって、食性が異なる集団間では交配が起こらなくなり、やがて生殖的な隔離につながる可能性が考えられる。このように、食草が変わるということは、種分化に対して影響を持つのではないかと推定される。

おわりに

今年度は、これまでの成果を基盤にしつつ新規の取り組みに挑戦することができ、今後の展開に向けて有意義な結果が得られたと考えている。食草を認識し選択的に産卵するという行動が、どのような神経活動によって「判断」されているのか。食草転換による進化という現象の、最初の一步となった変化は何か。どちらも挑戦的な問いではあるが、解明に向けた大きな一步を踏み出すことができた。

特に、食草の情報の入り口となる味覚と、出口となる産卵行動をつなぐ神経活動に関しては、全くのブラックボックスであった状態から、脳が関与していることが示唆されるという大きな進展があった。今後は、食草であると「認識」すること、そして産卵するべき場所であると「判断」することに関与する脳領域の同定を進めていく。

人工飼料を与えることによる遺伝子発現への影響は小さく、混合する植物粉末によって生葉と同様の発現変動が観察される遺伝子があることから、食草とは異なる植物の粉末を混ぜた場合の影響を観察することが可能である。食草ではない植物を生の状態では幼虫に食べさせることは困難であるが、人工飼料に少量混ぜることで容易に食べさせることが可能である。食性転換の初期段階に幼虫に起きた変化を、人工的に再現する実験に取り組むことができる可能性がある。

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（九州大）、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）、西野浩史助教（北海道大）、佐藤愛氏（千葉大学：大学院生）、澤田実氏（北海道札幌市）、伊丹市昆虫館（兵庫県伊丹市）、樫原市昆虫館（奈良県樫原市）に多大な協力と助言を頂いた。

引用文献

1. Ozaki, K. *et al.* A gustatory receptor involved in host-plant recognition for oviposition of the butterfly, *Papilio xuthus*. *Nature communications* **2**:542, (2011).
2. Thompson, J. N. Evolutionary genetics of oviposition preference in swallowtail butterflies. *Evolution* 1223-1234 (1988). doi:10.2307/2409006
3. 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).
4. Ryuda, M. *et al.* Gustatory sensing mechanism coding for multiple oviposition stimulants in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *J Neurosci* **33**, 914-24 (2013).
5. Honda, K. Identification of host-plant chemicals stimulating oviposition by swallowtail butterfly, *Papilio protenor*. *J Chem Ecol* **16**, 325-337 (1990).
6. 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).
7. Muto-Fujita, A. *et al.* Data integration aids understanding of butterfly-host plant networks. *Scientific reports* 43368 (2017). doi:10.1038/srep43368
8. Guzowski, J. F. *et al.* Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 599-606 (2005).
9. Chen, X., Rahman, R., Guo, F. & Rosbash, M. Genome-wide identification of neuronal activity-regulated genes in *Drosophila*. *Elife* **5**, (2016).
10. Ugajin, A. *et al.* Identification and initial characterization of novel neural immediate early genes possibly differentially contributing to foraging-related learning and memory processes in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* (*in press*)

問い合わせ先：

JT 生命誌研究館 〒569-1125 大阪府高槻市紫町 1-1
072-681-9750 (代表)