ナミアゲハの産卵刺激物質を認識する味覚受容体 チョウと植物を結ぶ絆を化学感覚の仕組みから解明する

現在、学名がつけられている全生物種（動物のみではなく、植物・菌類・原生生物など、すべての生物を含む）は約200万種とされているが、昆虫がその過半数を超えている。多種多様な昆虫の生活史もさまざまで、本能行動の規則的な連鎖で構築される複雑な生命現象は、ダーウィン進化論を否定するつもりはなくとも、本当に偶然の積み重ねだけで成り立つものなのかと疑問を抱いてしまうほど巧妙である。昆虫は化合物を認識することで外界の情報を得て、寄主選択・配偶行動・集団生活の維持・社会性の構築など、生存上重要となるさまざまな場面で利用しているので、化合物を認識する仕組みを解明することができれば、生命現象をより深く理解することができるはずである。

地球上で最も多様化している昆虫のなかで、植食性昆虫がその過半数を占める。鱗翅目昆虫（チョウとガ）は2番目に多くの種が記載されているグループであるが、大部分が植食性で、その多くは幼虫が特定の植物のみを食べるという性質がある。

アゲハチョウの仲間も、幼虫が狭い範囲の植物のみを食べることが知られている。私たちが研究材料として用いているナミアゲハ（*Papilio xuthus*：一般的に単に「アゲハ」と呼ばれることも多いが、アゲハチョウ科全体の話なのか紛らわしいこともあるので、ここでは明確にするためにナミアゲハと呼ぶ）も、幼虫がミカン科の植物のみを食べる。しかし、卵から孵ったばかりの初齢幼虫は、体長が約1.5 mmと小さく、移動能力が低いので、広い環境中から自力で餌を見つけ出すのは難しい。そこで、飛ぶことができて移動能力が高いメス成虫が、植物種を正確に見分けて幼虫が食べられるものを選んで産卵する。成虫は花の蜜を飲んでいるので植物を食べることはないが、産卵行動を引き起こすキーになっているのが「味覚」である。

体外の化合物を認識するという意味においては味覚も嗅覚も同様の機能であるが、陸棲生物に関しては、水溶性や脂溶性の不揮発性の化合物を感覚組織が接触して認識するものを「味覚」、空气中を漂う揮発性の化合物を非接触的に認識しその情報が糸球体（嗅受容細胞と、情報を受発信する出力神経や局所介在神経が球状に絡み

合った神経繊維の集合体）へ投射される場合を「嗅覚」と定義される。アゲハチョウの仲間の前脚先端部にあるふ節と呼ばれる組織には味覚感覚子があり（図1A）、前脚で植物を叩くドラミング行動によって「味見」をして、幼虫が食べられる植物を見分けているのである。ナミアゲハについては、主な食草であるミカン科植物から、葉に含まれている化合物10種が「産卵刺激物質」として同定されており（図2）、これらを混合すると生

図1 ■ ナミアゲハの組織と味覚受容体遺伝子（7TMP）の発現部位

A: チョウの組織と前脚ふ節感覚子。緑丸は第5ふ節の感覚子が目立つ部分。B: 味覚受容体が発現している組織。RT-PCRによる電気泳動の結果、メスの前脚ふ節でのみ発現が見られた。

図2 ■ シトラス属植物から同定されたナミアゲハの産卵刺激物質

10種の化合物をすべて混ぜると、生の葉と同等の産卵活性が観察されるが、単独の溶液ではどれも産卵活性がない。

葉と同程度に産卵行動を誘発する⁽¹⁾。興味深いことに、産卵刺激物質はどれも単独では全く産卵行動を誘発することができず、最低2種類以上の混合が必須である。この化合物を認識する仕組みが変化して食性が変わると棲み分けが起こり、それをきっかけとして種分化が起きるのではないかと考えられる。

脊椎動物などほかの生物と同様に、昆虫の味覚・嗅覚には7回膜貫通型の受容体（7TMP）が働いている。しかし、昆虫の化学感覚受容体は塩基配列の保存性が極端に乏しく、既知の受容体遺伝子の配列情報を手がかりとして探索するのは困難であったため、大部分は全ゲノムが解読された昆虫からコンピュータを使って探索されている。ゲノムが解読されていないナミアゲハから新規の7TMPを探索するには、独自の工夫が必要であった。

まず、未知の遺伝子を探査することを目的として、プラスミドベクターに組み込むまでの手順を最少化する工

夫を凝らしてcDNAライブラリーを作成した⁽²⁾。次に、磁性ビーズを用いたプラスミド精製キットを使って、96穴プレートで手作業でも大量に精製できる工夫をした。こうして各種自動化装置などが無い小規模な研究室でありながら、キャピラリー式シーケンサーを使って1万クローン以上の塩基配列を短期間で決定した。配列が読めたらコンピュータの出番である。塩基配列をアミノ酸配列に変換し、膜貫通領域をもつものが見つかったら全長配列を決定するという作業を繰り返した結果、1989番目に解析した遺伝子のみがメス成虫ふ節に特異的に発現する7TMPであった（図1B）。

メス成虫のふ節で発現する7TMPが見つかったので、産卵刺激物質の認識にかかわっているか確認する必要がある。受容体が化合物を認識すると化学感覚ニューロン内のカルシウム濃度が上昇するという反応が起きるので、カルシウムに反応して蛍光を発する物質を使って、蛍光を検出するのが一般的である。このような実験方法をカルシウムイメージング法というが、蛍光検出装置は高価であるため、安価で購入できる微弱発光計測装置を改造してリアルタイムに発光量の変化を計測できる装置を作製した。そして、受容体遺伝子と同時にイクオリン（*aequorin*：発光クラゲから見つかった、カルシウム依存的に発光するタンパク質）の遺伝子をバキュロウイルス異所的発現系を用い、本来味覚に関する機能をもたない培養昆虫細胞内で発現させた。これを化合物溶液で刺激することで、細胞の発光を観測できる。培養細胞の数と感染させるバキュロウイルスの数を適切に調整し、感染後の培養期間を適度にするすることで、再現性の高い結果が得られることを確認した。この半手作りカルシウムイメージング措置により、ナミアゲハの7TMPは産卵刺激物質の一つであるシネフリンに特異的に反応する化学感覚受容体であることが確認できた（図3）。シネフリンへの応答は、ミカンの葉から抽出した化合物すべてが混合された溶液と同等であった（図3）。味覚細胞ではない培養細胞が、7TMPの異所的発現によって味覚機能を獲得したのである。

また、7TMP遺伝子の部分配列（392塩基）から合成した二重鎖RNA（dsRNA）が存在すると、培養細胞内での遺伝子発現を阻害し受容体機能を抑制することを確認した。

遺伝子の働きを調べるには、その遺伝子のメッセンジャーRNAの発現を阻害するため、dsRNAを生体に

図3 ■ カルシウムイメージング法によるナミアゲハ7TMPを発現させた培養昆虫細胞の発光の比較

発光の倍率は、刺激を行う前の状態を1として、相対的な発光の強さを表す。矢頭は、化合物溶液を入れたタイミングを示す。

図4 ■ 定量的RT-PCRを用いた、二重鎖RNA注射によるナミアゲハ7TMP遺伝子発現量への影響の確認

羽化直後の成虫からふ節をとり、発現量を調べた。-1:羽化前日に注射、-3:羽化3日前に注射、-5:羽化5日前に注射。比較対象区(注射なし、超純水、GFP dsRNA)はすべて、羽化5日前に注射。

導入するRNA干渉(RNAi)がよく使われる。しかし鱗翅目昆虫では、dsRNAの注射によって遺伝子の発現量を抑えることはできるが、その効果が持続せず、この方法による機能阻害は難しいとされてきた。しかし私たち

図5 ■ 蛹へのdsRNA溶液の注射

メスの蛹に対し、胸部と腹部の境界部分に、斜め後方から細い注射針を突き刺し、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のdsRNA溶液を $10\mu\text{L}$ 注入する。

は、ナミアゲハ7TMPの発現量がピークになる前にdsRNAを導入し、発現レベルの低い状態が維持されるようにすれば、阻害効果が得られるのではないかと考えた。そこで成虫だけでなく蛹からもふ節を取り出し、定量的RT-PCR(quantitative RT-PCR)でナミアゲハ7TMPの発現量を調べてみると、羽化3日前から発現が始まり、羽化前日の蛹で発現量がピークとなることがわかった。そこで、羽化日を0日として-1、-3、-5、-7、-9日の蛹にdsRNAを注射で導入し、羽化直後の発現量を調べてみた結果、蛹化後の早い時期にdsRNAを注射するほどこの遺伝子の発現を効果的に抑制することがわかった(図4)。しかし、蛹化後早い時期は体が柔らかく、注射によるダメージが大きいためか、蛹の死亡率がやや高まる傾向がある。十分な遺伝子発現抑制効果が得られ、蛹の死亡率は低い時期として、羽化5日前が最良と考え、以後のRNAi実験では、羽化5日前の蛹にdsRNAを注射した(図5)。

ナミアゲハの7TMPが生体内でシネフリン受容体として機能しているのか確かめるため、メス成虫の前脚を使って電気生理実験を行った。化学感覚ニューロンがリガンドを認識すると、活動電位が発生する。生物の組織に電極を固定して、ニューロンを流れる微弱な電気の電圧変化を測定するのが電気生理実験である。ナミアゲハから切り取った前脚の付け根に電極を挿入し、化合物の溶液を満した電極で感覚子の先端に触れることで、化学感覚ニューロンの反応を検出することができる。正常なチョウの場合、60%を超える感覚子がシネフリンに反

図6 ■ 電気生理実験

A: シネフリンによる刺激への感覚子の応答。7TMP dsRNAの注射により、応答が消えている。GFP dsRNAの注射では、全く影響を受けていない。B: RNAiチョウとノーマルのチョウの、化合物に対する応答の比較。シネフリンの刺激に応答する感覚子の割合は、7TMP dsRNAの注射により有意に減少しているが ($p < 0.001$), スタキドリンやカイロ・イノシトールによる刺激では、変化が見られない。

応じた。

これに対し、RNAi処理を施したナミアゲハ (RNAiチョウ) の前脚では、シネフリンによる刺激に対してだけ化学感覚ニューロンの応答が有為に減少し、スタキドリンやカイロ・イノシトールといった別の化合物での刺激に対しては、応答は変化しなかった (図6)。また、ナミアゲハ7TMPと無関係であるGFP遺伝子のdsRNAを注射した場合、シネフリンへの応答に変化は見られなかった。この結果により、ナミアゲハ7TMPが感覚子ニューロンでシネフリンに特異的に応答する受容体として機能していることが確認できた。

最後に、RNAiチョウを用いて自由飛翔による産卵実験を行った。アゲハチョウの仲間の産卵行動は飛ぶことから始まる。自由に飛び回り、主に視覚を利用して半ば手当たりしだいに植物へ着地し、前脚で植物を叩くドラミングによって産卵するか否かを判断する。そこで、チョウが飛び回るのが十分な広さがある約50センチ四方の容器の中にナミアゲハを放し、プラスチック製の人工葉を見せて、メス成虫が自ら人工葉に接近・ドラミング

図7 ■ ナミアゲハの産卵実験

ミカン葉抽出物 (産卵刺激物質を含む) を塗布した人工葉に産卵している様子。

し、産卵するか否かを観察するという気の長い実験を行うのである (図7)。RNAiを施していない通常のナミアゲハのメス成虫に、ミカンの葉から抽出した化合物や、10種類ある産卵刺激物質のうち水に溶けやすい5種類を

表1 ■ 7TMP dsRNA の注射による産卵行動への影響 (産卵率%)

刺激物質	注射			
	なし	超純水	GFP dsRNA	7TMP dsRNA
超純水	0	0	0	0
シネフリン (A)	0	0	0	0
カイロ・イノシトール (B)	0	0	0	0
混合液 (A)+(B)	72.1	77.8	62.5	21.1
ミカン葉抽出物	100	100	100	100

試験個体数：注射なし：43, 超純水：9, GFP dsRNA：16, 7TMP dsRNA：19. 混合液 (A) + (B) の有意差：注射なし *vs.* RNAi チョウ： $p < 0.001$, 超純水 *vs.* RNAi チョウ： $p < 0.001$, GFP dsRNA *vs.* RNAi チョウ： $p < 0.001$, two-way ANOVA (Fisher LSD)

混ぜた溶液を塗布した人工葉を触らせた場合、生の葉を触らせた場合と同等の高い産卵活性を示す。水溶性の産卵刺激物質のうち、シネフリンとカイロ・イノシトールの2種類だけを混ぜた場合には、生の葉と比較して約70%の産卵活性が見られる。しかし、どの産卵刺激物質も、単独では全く産卵活性がない。そこで、RNAiによってシネフリン受容体であるナミアゲハ7TMPの発現を抑制したチョウは、シネフリンを認識できないのだから、シネフリンとカイロ・イノシトールの混合溶液に触らせても、カイロ・イノシトールのみでの産卵実験と同じように卵を産まなくなるはずだと考えた。

実際に、容器内で自由に飛翔するRNAiチョウにシネフリンとカイロ・イノシトールの混合液を付着させた人工葉を提示したところ、飛翔行動とドラミング行動は通常のチョウと全く変わらないのに、産卵活性が有意に低下した(表1)。通常、卵を産む場合には、ドラミングの直後に迷うことなく腹部を曲げて卵を産みつけ、産まない場合はあっさりと飛び去ってしまう。水や単独の産卵刺激物質溶液を塗布した人工葉など産卵刺激がない場合、ドラミングの直後にさっと飛び去る。チョウはドラミングによって極短時間で卵を産むか否かを判断するのである。それに対し、シネフリンとカイロ・イノシトールの混合溶液に触れたRNAiチョウでは、普通のチョウとは比べものにならないくらい長時間ドラミングを繰り返し、さんざん悩んだあげく卵を産まずに飛び去るという独特な行動が観察された。おそらく、RNAiによる遺伝子の発現阻害(遺伝子ノックダウン)では、遺伝子自体を破壊する遺伝子ノックアウトと違って発現を完全になくすることはできないので、RNAiチョウもほんの少しだけシネフリンの味を感じることができているのではないだろうか。しかし産卵活性を引き起こす閾値には達

しない程度の刺激であるため、悩んだ末に産まないという判断をしているのではないかと思われる。このような“迷い”は、RNAiという実験手法だからこそ観察できた行動であろう。RNAiチョウもミカン葉抽出物や生葉には正常に産卵し、水や単独化合物の水溶液ではすぐに飛び去ることから、RNAiによる遺伝子発現阻害の影響は、シネフリンの認識のみにみられる現象である。この結果により、ナミアゲハ7TMPが産卵刺激物質受容体として産卵行動に関与していることが確認できた。

以上で見てきたとおり、*in silico* (コンピュータ上の解析)・*in vitro* (生体外での実験)・*in vivo* (生体を使つての実験)の総合的な研究により、私たちが発見した受容体遺伝子は、産卵刺激物質の一つであるシネフリンを特異的に認識し、産卵行動の誘発に関与することで、ナミアゲハの食草認識において重要な役割を担っていることがわかった⁽³⁾。研究例の多いショウジョウバエですら、機能が解明されている味覚受容体はまだ少ないなか、産卵という本能行動に関与する味覚受容体をナミアゲハから解明できた意味は大きいと考えている。

アゲハチョウ科昆虫の進化の歴史のなかで、産卵刺激物質受容体遺伝子に何らかの変化が起こり認識する化合物が変わる、または発現するニューロンが変わることで同じ物質に別の意味をもたせるといった変化が食草の認識に影響を与えたのではないだろうか。私たちは、チョウの仲間が食草を転換することを出発点として棲み分けが起こり、それをきっかけとして種分化につながったのではないか、という仮説の証明を目指している。今後は格段に安くなってきた次世代型シーケンサーの能力を最大限に活用し、複数種のアゲハチョウの仲間から産卵刺激物質の認識にかかわる遺伝子を複数見つけ、その変化を比較することで、植食性昆虫の進化・多様化の仕組み

について理解を深め、アゲハチョウの仲間が種分化の出発点に立ったときにゲノム上で何が起きていたのかを知る手がかりを見つけたいと考えている。

謝辞：本研究の遂行にあたり、谷村禎一先生、石元広志博士（九州大学）、Frederic Marion-Poll先生、Delphine Calas博士（INRA）に多大なご協力をいただいたことに感謝いたします。

- 1) T. Ohsugi, R. Nishida & H. Fukami: *Applied Entomology and Zoology*, **26**, 29 (1991).
- 2) K. Ozaki, A. Utoguchi, A. Yamada & H. Yoshikawa: *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 969 (2008).
- 3) K. Ozaki, M. Ryuda, A. Yamada, A. Utoguchi, H. Ishimoto, D. Calas, F. Marion-Poll, T. Tanimura & H. Yoshikawa: *Nat. Commun.*, **2**, 542 (2011), doi:10.1038/ncomms1548.

（尾崎克久，龍田勝輔，吉川 寛，JT生命誌研究館）

プロフィール

尾崎 克久 (Katsuhisa OZAKI)

＜略歴＞2000年岩手連合大学院（弘前大学）農学研究科博士課程修了／2000～2001年農林水産省生物系特定産業技術推進機構ポスドク／2001～2004年JT生命誌研究館奨励研究員（ポスドク）／2004年～現在，JT生命誌研究館研究員＜研究テーマと抱負＞分子の情報を手がかりとして，生命現象を司るメカニズムを解明し，生命現象を深く理解していきたいと考えている。莫大に蓄積されている生態学的知見と，爆発的に増え続ける分子の情報を融合させる研究に取り組みたい。なかでも化学感覚は重要な役割をもつので，味覚・嗅覚の仕組みを中心に解明していきたい＜趣味＞子どもたちと遊ぶこと，景色の良いところへ出かけて写真撮影

龍田 勝輔 (Masasuke RYUDA)

＜略歴＞2008年鹿児島大学大学院連合農学研究科修了／2008～2009年佐賀大学農学部特定研究員／2009年～現在，JT生命誌研究館奨励研究員＜研究テーマと抱負＞電気生理学的手法によるアゲハチョウ科昆虫の産卵刺激物質受容メカニズムの解明／＜趣味＞水棲生物の飼育（アクアリウム），釣り

吉川 寛 (Hiroshi YOSHIKAWA)

＜略歴＞1975年東京大学理学部化学科卒／1961年東京大学理学系大学院博士課程修了／同年米国イリノイ大，プリンストン大でポスドク／1964～1969年米国カリフォルニア大（バークレイ校）助教授，准教授／1969～1985年金沢大学癌研究所教授／1986～1993年大阪大学医学部教授，名誉教授／1993～2001年奈良先端科学技術大学院大学教授，名誉教授／2001～2006年JT生命誌研究館顧問＜研究テーマと抱負＞遺伝学，分子生物学，ゲノム科学の歴史，昆虫の本能などに興味をもち，読書，執筆活動を行っている＜趣味＞昆虫採集を卒業して，専らデジタルカメラで蝶の生態を収集している