

博士論文（要約）

絹糸腺分泌物と成虫跗節感覚子を介した
カイコとクワの相互作用に関する研究

高井嘉樹

植食性昆虫と寄主植物の関係は、一見すると昆虫が植物を一方向的に食害しているだけのように見えるが、実際には両者の間は複雑な相互作用で成り立っている。典型的なのが植物の防御応答である。すなわち、食害を受けた植物は、プロテアーゼインヒビターや二次代謝産物を産生し、昆虫の食害を抑えようとする。より高度な相互作用として、植物・植食性昆虫・植食性昆虫の天敵による三者関係が知られている。これは、食害を受けた植物が、植食者の天敵（寄生蜂や寄生バエ）を誘引する揮発性成分を放出することにより、植物の損傷が軽減させる現象である。その場合、食害部位に付着した昆虫由来の成分が、植物の誘導防衛を促進あるいは抑制することが示されている。これは植物と昆虫の間のせめぎ合いの結果と解釈されているものの、分子的な実体は不明である。

植食性昆虫の多くは特定の植物のみを寄主とする単食性ないし狭食性の昆虫である。これらの昆虫は、嗅覚器や味覚器によって寄主植物を認識して産卵することで、次代幼虫の生存を保証している。植物が産生する二次代謝産物を、チョウの雌成虫が産卵場所の認識に利用している例が知られているが、寄主認識の機構についての一般的理解には遠いのが現状である。

私は、このように未解明の昆虫-植物間相互作用の理解に貢献することをめざし、古くからの研究蓄積があるカイコとクワをモデルとして利用して、以下の2つの研究を行なった。

(1) カイコの絹糸腺分泌物の桑葉への移行に伴う生態的機能

鱗翅目昆虫の絹糸腺は、絹糸を産生し分泌するための組織として認識されているが、近年、他の機能も注目されるようになった。例えばオオタバコガの幼虫は、摂食中の植物に絹糸腺分泌物を塗布することで植物の防衛応答を阻害することが報告されている。つまり、絹糸腺の分泌物が、寄主植物へ適応するために一役買っていると考えられるが、カイコの絹糸腺分泌物とクワの相互作用については研究されていない。

高井（2014、修士論文）により、カイコの絹糸腺に、桑葉の香り成分の生成を阻害する因子が存在することが明らかになった。すなわち、桑葉を破砕する際に、絹糸腺抽出物を添加すると桑葉の香り生成が阻害される。しかし、カイコの幼虫が、阻害因子を本当に体外に分泌するのか、さらに実際に桑葉の香り生成を阻害するのかは検証されていない。そこで、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて観察した結果、桑葉の食痕に高頻度で絹糸が付着しており、幼虫が摂食時に絹糸腺分泌物を積極的に吐き出していることが示された。桑葉の香り生成における絹糸腺分泌物の影響を評価するために、絹糸腺の分泌を人為的に阻害したカイコ（吐糸管焼灼幼虫）を準備した。この焼灼幼虫と無処理幼虫が摂食した桑葉の香りをGC-MSを用いて分析した結果、両実験区とも13種類の揮発性成分が検出された。このうち10種類の揮発性成分（テルペン類及びサリチル酸メチル）については、両実験区で顕著な差がなかった。しかし、残り3種類の揮発性成分、すなわち(Z)-3-hexen-1-yl acetate、(Z)-3-hexen-1-ol、および(Z)-3-hexen-1-yl butanoate

に関しては、焼灼区で約3倍に増加していた。これらの揮発性成分は、みどりの香り (Green leaf volatiles; GLVs) と呼ばれており、損傷を受けた高等植物の葉が産生する普遍的な香り成分である。カイコの幼虫が、絹糸腺分泌物を用いて GLVs の生成を阻害していることが示唆された。

次に、GLVs の生成阻害の生態学的意義を検討した。昆虫の食害によって誘導される植物の揮発性成分 (Herbivore-induced plant volatiles; HIPVs) は、植食性昆虫の天敵である寄生蜂や寄生バエを誘引することが明らかになっている。そこで、カイコの幼虫に寄生する *Zenillia dolosa* (ヤドリバエ科) を用いて実験を行ったところ、吐糸管焼灼幼虫の誘導する HIPVs (GLVs を多く含む) に対して、*Z. dolosa* の雌は 65.2% の産卵率を示し、無処理幼虫の誘導する HIPVs に対しては 30.4% の産卵率しか示さなかった。つまり、GLVs の生成阻害は、寄生バエの産卵回避に寄与していると考えられる。

絹糸腺から単離された過酸化脂質脱水酵素 [*Bombyx mori* fatty acid hydroperoxide dehydratase (BmFHD)] が GLVs 生成経路中間体を分解することから (高井、同)、この酵素が GLVs の生成を阻害している可能性が高い。本研究では、それを検証するために、桑葉を精製 BmFHD の存在下および非存在下で破碎し、生じる揮発性成分を GC-MS に供した。その結果、BmFHD の添加によって有意に GLVs が減少した。

次に、カイコが食害した桑葉の浸漬液中のタンパク質を、抗 BmFHD ウサギポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットティングした結果、食害痕 1 cm 当たり約 12 ng の BmFHD が付着していることが分かった。この付着量は、GLVs の生成を阻害するに十分な量と考えられた。

一方、定量 PCR によって、カイコ幼虫での *BmFHD* mRNA の組織別の発現を調査したところ、中部糸腺の前区で特異的に発現していた。続いて、中部糸腺前区での時期特異的発現を調査した結果、*BmFHD* mRNA は、4 齢 2 日で高い発現量を示し、眠期にかかる 4 齢 3 日には急激に発現量が減少した。その後、5 齢 0 日から 5 齢 4 日にかけて再び高い発現量を示し、営繭の直前になるとほとんど発現しなくなった。*BmFHD* mRNA が、摂食期 (成長期) に高い発現量を示すことは、摂食時に発生する GLVs を抑え、それによって寄生バエの産卵を防ぐという仮説を支持している。ゲノム情報を検索すると、カイコ以外の鱗翅目昆虫も、*BmFHD* 遺伝子のホモログを有していることが分かった。そのため、FHD が GLVs の生成を阻害する現象は、他の鱗翅目昆虫にも存在する可能性がある。

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*BmFHD* 遺伝子のノックアウトを試みた結果、*BmFHD* の第 3 エクソンに 5 塩基の欠損 (*BmFHD*^{KO (Δ-5)}) を生じさせることに成功した。*BmFHD*^{KO (Δ-5)} をホモ接合で保有する個体は、完全な BmFHD タンパク質を翻訳できず、BmFHD の酵素活性を発現できないはずである。実際に、ホモ個体の中部糸腺の抽出物をウェスタンブロットティングに供した結果、BmFHD タンパク質は検出されなかった。また、正常なカイコの中部糸腺の抽出物には、GLVs 生成経路中間体であるリノレン酸 13S-ヒドロペルオキシドを分解す

る活性があるが、*BmFHD*^{KO (Δ-5)}ホモ個体はその分解活性を完全に喪失していた。したがって、*BmFHD* は GLVs の生成阻害に必須の分子であると考えられる。

(2) クワコとカイコの成虫附節に存在する味覚感覚子の微細形態と電気生理学的特性

クワコは、カイコにごく近縁の野生種である。単食性昆虫であるクワコは、雌成虫が桑樹に産卵しなければ、孵化した幼虫が餌に辿り着けずに死んでしまう。一方カイコは、クワの有無に関わらず、交尾した日に紙の上にほとんどの卵を産んでしまう。ナミアゲハにおいて、成虫附節の味覚感覚子が、産卵場所の認識に寄与していることが知られており、同様の機構がクワコにも備わっている可能性がある。本章の研究では、クワコの成虫肢に存在する感覚子の機能解析を行い、カイコにおいても同様の解析を行うことで、家畜化の影響を考察した。

東京都西東京市で採集したクワコと、それと同程度の体サイズを有するカイコ N4 系統を用いて成虫肢の形態観察を行った。実体顕微鏡による観察の結果、前肢、中肢、後肢とも、第 5 附節に味覚感覚子と思われる毛状突起が密集して存在していた。SEM 観察の結果、両種とも、雌雄ともに、2 種類の感覚子、すなわち太型感覚子（基部約 9 μm）と細型感覚子（基部約 6 μm）が存在していた。細型感覚子の本数は、種間や雌雄間で顕著な差がなかったが、太型感覚子の本数は種間および雌雄で異なっていた。前肢の太型感覚子の本数は、クワコ雌が約 66 本、クワコ雄が約 10 本、カイコ雌が約 38 本、カイコ雄が約 11 本であった。この結果から、雌成虫は、雄成虫に比べて太型感覚子の本数が多いことが分かった。系統による差異を知るために、カイコ p50T 系統および錦秋×鐘和の雌成虫についても同様の調査を行ったところ、前肢の太型感覚子の平均本数は、p50T 系統が約 45 本、錦秋×鐘和が約 61 本であった。表面積当たりの太型感覚子の本数（密度）を比較した結果、いずれのカイコの系統においても太型感覚子の密度が、クワコに比べて顕著に低かった。

太型感覚子が味覚感覚子であることを確かめるために、チップレコーディング法を用いて、桑葉の水溶性抽出物に対する電気生理学的応答を調査した。クワコの雌成虫では、桑葉抽出物で刺激したときに、高頻度で電気パルスを放出する太型感覚子が存在していた。しかし、カイコの雌成虫からは、桑葉抽出物に強く応答する感覚子を見つけることができなかった。続いて、クワコの太型感覚子が、クワ以外のクワ科植物の葉の抽出物に対しても応答するかどうかを調査した。その結果、ハリグワ、イチジク、カジノキ、ガジュマル、イヌビワの抽出物に対しては、ほとんど応答しなかったが、クワクサの抽出物には明らかに応答した。ただし、クワへの電気生理学的応答とクワクサへの応答のパターンには明瞭な違いがあり、クワコの太型感覚子は両者を識別していると推定された。さらに、桑葉抽出物に触れたクワコの雌成虫は、その後の産卵数が顕著に増加したことから、附節感覚子の機能の 1 つが産卵場所の認識であることが示された。このように、クワコの附節感覚子には、カイコにはないクワへの認識機構が存在す

ることが判明した。

以上、本研究は、カイコ・クワコとクワの間に、従来知られていなかった2種類の相互作用が存在することを明らかにした。1つはカイコの幼虫が、絹糸腺分泌物を利用して桑葉の香り成分の産生を阻害し、それによって寄生バエに産卵される可能性を低下させていることである。もう1つは、クワコの雌成虫が、跗節の味覚感覚子でクワを認識・産卵することにより、効率的に次世代を残していることである。これらの知見は、カイコとクワの関係性の解明のみならず、広く昆虫-植物間相互作用の理解にも貢献するものである。