

## ホオズキ葉から分離されたニジュウヤホシテントウの摂食刺激因子

堀 雅敏\*・荒木 佑子・菅野 亘・臼井 義隆・松田 一寛

東北大学大学院農学研究科生物制御機能学分野

Luteolin 7-O-glucoside in Hozuki Leaves, *Physalis alkekengi*, Is Involved in Feeding Stimulation in *Epilachna vigintioctopunctata*. Masatoshi HORI,\* Yuko ARAKI, Wataru SUGENO, Yoshitaka USUI and Kazuhiro MATSUDA Laboratory of Insect Science and Bioregulation, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University; Sendai 981-8555, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 49: 251-254 (2005)

**Abstract:** Hozuki, *Physalis alkekengi*, is one of the host plants of the twenty eight-spotted ladybird, *Epilachna vigintioctopunctata*. We investigated feeding stimulants for *E. vigintioctopunctata* in hozuki leaves. The methanol extract of hozuki leaves and its chloroform-soluble fraction stimulated feeding of the adult beetle. Although the butanol-soluble and water-soluble fractions were inactive by themselves, the butanol-soluble fraction or the deposit formed during concentration of this fraction acted synergistically with the water-soluble fraction. The deposit was identified as luteolin 7-O-glucoside. This compound is considered to be one of the factors in hozuki that induce feeding in *E. vigintioctopunctata*.

**Key words:** *Epilachna vigintioctopunctata*; feeding stimulant; luteolin 7-O-glucoside; *Physalis alkekengi*; host selection

### 緒 言

ニジュウヤホシテントウ *Epilachna vigintioctopunctata* は、ナス科の農作物、特にジャガイモの大害虫として知られている食植性のテントウムシである。寄主植物に含まれる *Epilachna* 属の摂食刺激物質に関しては、*E. varivestis* がリマ豆に含まれるスクロース、グルコース、フルクトースに (Augustine et al., 1964)、また、ファゼオルナチン、リナマリンおよび lotaustraline に摂食を刺激され (Nayer and Fraenkel, 1963)、ジュウニマダラテントウ *E. boisduvali* がククルピタシン B (Abe et al., 2000) に、トホシテントウ *E. admirabilis* がククルピタシン E, B, I, E-グルコシド (Abe and Matsuda, 2000) に、オオニジュウヤホシテントウ *E. vigintioctomaculata* がリノレン酸メチル (Endo et al., 2004) に刺激されることが知られている。

ホオズキはニジュウヤホシテントウの寄主植物の1つであるが、オオニジュウヤホシテントウは同じ *Epilachna* 属でありながらこれを寄主としない。そこで本研究では、その選好性の違いを明らかにする目的の一環として、ニジュウヤホシテントウの摂食刺激物質をホオズキ葉中から単離・同定し、同定された物質の活性をオオニジュウヤホシテントウに対しても調べた。

### 材料および方法

#### 1. 供試虫

ニジュウヤホシテントウは神奈川県平塚市郊外のジャガイモ畑より採集し、恒温室 (24±1°C, 明期: 暗期 = 16 時間: 8 時間) 内で、主にジャガイモ、トマトの生葉を食餌として累代飼育したものである。オオニジュウヤホシテントウは宮城県名取市郊外のジャガイモ畑より採集し、上述の条件下で累代飼育したものである。ニジュウヤホシテントウ、オオニジュウヤホシテントウいずれも、雌雄は判別せずに羽化後 4~11 日目の成虫を供試した。

#### 2. 供試植物

ホオズキは東北大学農学部内の圃場で栽培したものである。

#### 3. 生物検定

生物検定には以下に述べる濾紙法を用いた。直径 9 cm、高さ 2 cm のプラスチック製ペトリ皿に、直径 7 cm の濾紙 (東洋濾紙株式会社, No. 1) を 3 枚重ねて敷き、蒸留水 3 ml を湿度保持のために加えた。この上に外径 7 cm、内径 2 cm のプラスチック製ドーナツ板を載せ、これに試験濾紙片 (東洋濾紙, No. 52, 2×2 cm) を等間隔に置き、向かい合った 2 枚をそれぞれ処理区および対照区とした。以上の

\* E-mail: hori@bios.tohoku.ac.jp

2005年6月14日受領 (Received 14 June 2005)

2005年8月16日登載決定 (Accepted 16 August 2005)

DOI: 10.1303/jjaez.2005.251

ように設定したペトリ皿内にあらかじめ24時間絶食させたニジュウヤホシテントウは5頭, オオニジュウヤホシテントウは15頭を入れ,  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温室(明期:暗期=16時間:8時間)に24時間静置した。

試験物質の処理法は, 処理区の濾紙片には, 植物1g当量/mlになるように調整した試験溶液を0.075ml加えて溶媒を風乾後, 蒸留水0.075mlを加えた。対照区の濾紙片には溶媒のみを同様に処理し, 風乾後, 蒸留水0.075mlを加えた。水可溶区またはスクロース溶液との共力作用を調べる場合は, 上記と同様に試験溶液を加えて風乾した濾紙に, 後述の抽出操作で得られた水可溶区(植物1g当量/ml)または0.05Mスクロース, 0.075mlを加えた。対照区の濾紙片には溶媒のみを同様に処理し, 風乾後, それぞれの水可溶区または0.05Mスクロースを加えた。刺激の判定は試験終了後, 濾紙片を取り出し, 摂食刺激指数を求めた。摂食刺激指数とは濾紙片を $2 \times 2\text{mm}$ のマス目に区切り, この中に咬み痕が認められた場合1点とし, 濾紙片1枚につき100点満点, つまり1試験区あたりの処理区, 対照区をそれぞれ200点満点とするものである。試験はいずれの場合も5反復行った。摂食刺激活性の有無はMann-Whitney *U*-testにより判定した。

#### 4. 摂食刺激物質の抽出・単離

ホオズキ新鮮葉(728.0g)をメタノール15lで浸漬抽出した。これは3回繰り返した。メタノール抽出液は $40^\circ\text{C}$ 以下で減圧乾固した。得られたメタノール抽出物(収量:44.7g)のうち40gを蒸留水1lに転溶し, クロロホルム, ブタノール(1l $\times$ 3)で順次振とう抽出した。得られた画分は $40^\circ\text{C}$ 以下で減圧乾固した。クロロホルムで抽出された画分をクロロホルム可溶区, ブタノールで抽出された画分をブタノール可溶区, クロロホルム, ブタノールのいずれでも抽出されなかった画分を水可溶区とした。ブタノール可溶区は濃縮の途中で析出物を生じた。これは濾過し, 淡黄色の物質を得た(ブタノール可溶区沈殿物, 収量:2.8g)。メタノール抽出物およびその分画画分はそれぞれ1g葉当量で摂食試験を行った。また, クロロホルム可溶区, ブタノール可溶区およびブタノール可溶区沈殿物は, 1g葉当量に1g葉当量濃度の水可溶区を加えたものについても摂食試験を行った。

植物中には幅広く多様なフラボノイドが分布しており, 昆虫, 特に甲虫目の寄主決定因子として重要な役割をしている例が多い(Hsiao, 1985)。そこで本研究では, 水可溶区を加えることで強い摂食刺激活性を示し, かつ, フラボノイドと思われたブタノール可溶区沈殿物に着目して分析を進めた。ブタノール可溶区沈殿物は薄層クロマトグラフィー(Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck,  $5 \times 10\text{cm}$ )によって展開(ブタノール:酢酸:水=4:1:2)したところ, Rf値0.73の単一物質と判明したので, これを各種機器分析に供し

た。同定された物質は1g葉当量(2.7mg/ml)およびその0.5倍, 2倍, 5倍濃度に1g葉当量濃度の水可溶区または0.05Mスクロース溶液を加え, 摂食試験を行った。また, オオニジュウヤホシテントウに対しても同様に摂食試験を実施した。

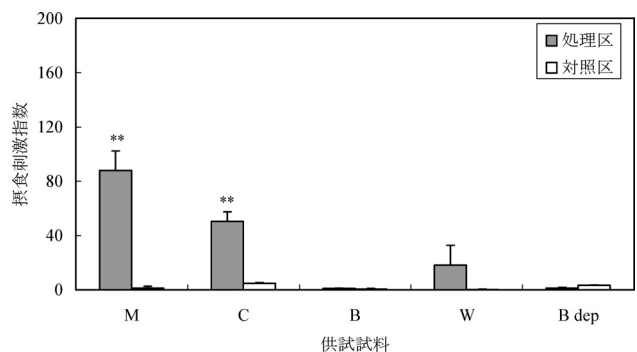
#### 5. 機器分析

$^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ 測定にはVarian Unity INOVA 500(500MHz)を使用した。溶媒はジメチルスルホキシド-*d*<sub>6</sub>(DMSO)を使用し, 内部標準物質はテトラメチルシランとした。MSの測定にはJEOL JMS-700を使用した。

#### 結果および考察

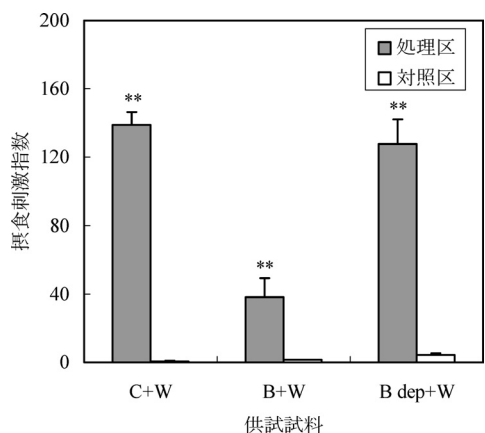
ホオズキ新鮮葉のメタノール抽出物およびそのクロロホルム可溶区は単独でもニジュウヤホシテントウに対して摂食刺激活性を示した(メタノール抽出物摂食刺激指数, 88; クロロホルム可溶区摂食刺激指数, 51; 第1図)。これに対して, ブタノール可溶区, 水可溶区およびブタノール可溶区の濃縮途中で析出した淡黄色の物質(ブタノール可溶区沈殿物)は, 単独では摂食刺激活性を示さなかった。クロロホルム可溶区に水可溶区を加えると, クロロホルム可溶区単独のときよりも摂食刺激活性は大幅に上昇した(摂食刺激指数, 139; 第2図)。またブタノール可溶区も水可溶区を加えることで摂食刺激活性を示した(摂食刺激指数, 38)。ブタノール可溶区沈殿物は水可溶区を加えることで, クロロホルム可溶区と同程度の強い摂食刺激活性を示した(摂食刺激指数, 128)。

ブタノール可溶区沈殿物はメタノールに難溶, ピリジンに易溶であった。 $^1\text{H-NMR}$ では,  $\delta$  3.71 (1H, *d*,  $J=10.7\text{Hz}$ , H-6'), 5.08 (1H, *d*,  $J=7.3\text{Hz}$ , H-1'), 6.45 (1H, *d*,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-6), 6.76 (1H, *s*, H-3), 6.79 (1H, *d*,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-8), 6.91 (1H, *d*,  $J=8.5\text{Hz}$ , H-5'), 7.43 (1H, *d*,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-2'), 7.45 (1H, *dd*,  $J=2.3, 8.4\text{Hz}$ , H-6'), 13.00 (1H, *s*, -OH (C-5)),



第1図 ホオズキメタノール抽出物および各分画画分のニジュウヤホシテントウに対する摂食刺激活性  
M: メタノール抽出物; C: クロロホルム可溶区; B: ブタノール可溶区; W: 水可溶区; B dep: ブタノール可溶区沈殿物。  
\*\*: Mann-Whitney *U*-検定により  $p < 0.01$  で処理区と対照区間に有意差が認められたことを示す。

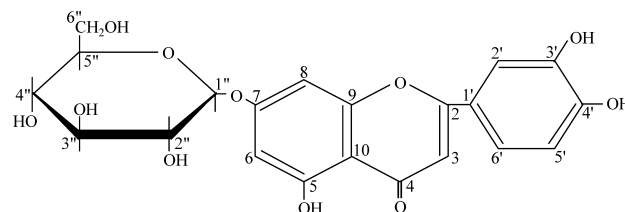
に特徴的なシグナルが認められた。<sup>13</sup>C-NMR では、 $\delta$  60.59 (C-6''), 69.52 (C-4''), 73.12 (C-2''), 76.40 (C-5''), 77.18 (C-3''), 94.77 (C-8), 99.62 (C-6), 99.95 (C-1''), 103.26 (C-3), 105.41 (C-10), 113.69 (C-2'), 116.07 (C-5'), 119.28 (C-6'), 121.48 (C-1'), 145.94 (C-3'), 150.08 (C-4'), 157.12 (C-9), 161.32 (C-5), 163.13 (C-7), 164.65 (C-2), 182.13 (C-4) のシグナルが確認された。FAB-MS スペクトルの結果, ポジティブイオンモードで  $m/z$  449 (M+H)<sup>+</sup>,  $m/z$  287 (M+H-162)<sup>+</sup>, ネガティブイオンモードで  $m/z$  447 (M-H)<sup>-</sup>,  $m/z$  285 (M-H-162)<sup>-</sup> のイオンピーク



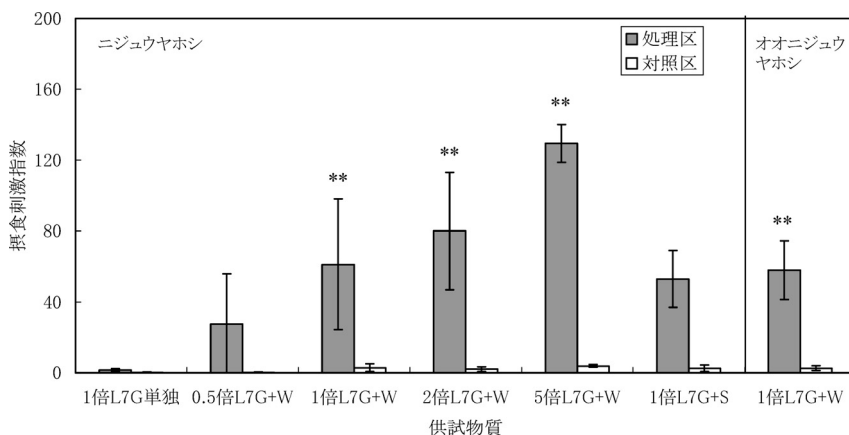
第2図 クロロホルム可溶区, ブタノール可溶区, ブタノール可溶区沈殿物に水可溶区を加えた場合のニジュウヤホシテントウに対する摂食刺激性  
C+W: クロロホルム可溶区に水可溶区を加えたもの; B+W: ブタノール可溶区に水可溶区を加えたもの; B dep+W: ブタノール可溶区沈殿物に水可溶区を加えたもの. \*\*: Mann-Whitney *U*-検定により  $p < 0.01$  で処理区と対照区間に有意差が認められたことを示す.

が認められた。また, 酸加水分解して得た糖を2つの溶媒系 (ブタノール:酢酸:水=4:1:2 および酢酸エチル:ピリジン:水=2:1:2) を用いて薄層クロマトグラフィー (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck, 5×10 cm) によって展開し, 5% 硫酸を噴霧して 105°C で 10 分間加熱して発色させたところ, 前者溶媒系では Rf 値 0.51 に, 後者溶媒系では Rf 値 0.76 にそれぞれ黒色のスポットが認められた。これらはグルコースの標品と一致したことから, 糖鎖部分はグルコースと判断された。以上の結果を既知のスペクトルデータ (Markham and Chari, 1982; Markham and Geiger, 1994) と比較検討したところ, 摂食刺激物質はルテオリン 7-O-グルコシド (第3図) であると推定され, 標品のルテオリン 7-O-グルコシドの NMR と比較したところケミカルシフトが一致した。以上のことより, この物質はルテオリン 7-O-グルコシドと同一した。

水画分の存在下で, ルテオリン 7-O-グルコシドの生葉 1 g 当量 (2.7 mg/ml) および 0.5, 2, 5 倍濃度における摂食刺激活性を調べた。ニジュウヤホシテントウに対し, ルテオリン 7-O-グルコシドは葉に含まれる濃度で摂食刺激活性が認められた (摂食刺激指数, 61; 第4図)。また, 濃度が高くなるにつれて活性が高くなる傾向が見られた。オオ



第3図 ルテオリン 7-O-グルコシドの構造式



第4図 ルテオリン 7-O-グルコシドのニジュウヤホシテントウおよびオオニジュウヤホシテントウに対する摂食刺激活性  
L7G: ルテオリン 7-O-グルコシド; W: ホオズキ葉 1 g 当量濃度の水可溶区; S: 0.05 M スクロース溶液. \*\*: Mann-Whitney *U*-検定により  $p < 0.01$  で処理区と対照区間に有意差が認められたことを示す. 単独はルテオリン 7-O-グルコシドのみで水可溶区およびスクロース溶液を加えていないもの, L7G+W はルテオリン 7-O-グルコシドに水可溶区を加えたもの, L7G+S はルテオリン 7-O-グルコシドにスクロース溶液を加えたものである。また, 1 倍がホオズキ葉 1 g 当量のルテオリン 7-O-グルコシドであり, その 0.5, 2, 5 倍濃度についても摂食刺激活性を調査した。

ニジュウヤホシテントウに対して摂食試験を試みたところ、ニジュウヤホシテントウと同程度の摂食刺激活性（摂食刺激指数, 58）が認められた。また、0.05 Mのスクロースを添加した場合は中程度の活性（摂食刺激指数, 53）が認められた。

以上の結果から、ホオズキ葉中に含まれるニジュウヤホシテントウの摂食刺激に関与する物質の一つとして、二次物質であるルテオリン7-O-グルコシドが明らかになった。ルテオリン7-O-グルコシドは必ずしもホオズキに特異的に含まれるフラボノイドではないが、ニジュウヤホシテントウがホオズキを摂食する上で一つの鍵刺激として働いているものと思われる。また、本物質はニジュウヤホシテントウの他の代表的な寄主植物であるジャガイモやトマト葉中にはその存在が確認されていない（堀ら, 未発表）ことから、本種の寄主選択において共通的に働いているフラボノイドではないと考えられる。

この物質はホオズキを寄主としないオオニジュウヤホシテントウにも同程度の摂食刺激活性を示したことから、両種のホオズキに対する寄主適合性の違いには、他の物質が関与していると考えられる。本種の寄主であるトマト葉にホオズキの熱湯抽出物を塗布すると摂食が著しく阻害されることが確認されている（堀ら, 未発表）。ホオズキ中にはオオニジュウヤホシテントウの摂食阻害物質が存在し、摂食刺激物質の活性を阻害するため、オオニジュウヤホシテントウはホオズキを摂食できないと考えられる。

ルテオリン7-O-グルコシドの摂食刺激には水画分の添加が必要であった。水画分にはルテオリン7-O-グルコシドと共力的に働いて本物質の活性を発現させる物質が含まれていると考えられる。有意差は認められなかったものの、スクロースはルテオリン7-O-グルコシドと共力的に働いているので、糖類が共力物質となっている可能性が考えられる。

また、クロロホルム可溶区は単独でも弱い摂食刺激活性を示し、水可溶区と混合することで、ブタノール可溶区沈殿物と同程度の摂食刺激活性を示した。ジャガイモ葉メタノール抽出物のクロロホルム可溶画分にはリノレン酸メチルが含まれており、オオニジュウヤホシテントウに強い摂食刺激作用を示すことが明らかになっている（Endo et al., 2004）。ホオズキについても、リノレン酸メチルまたは関連化合物が含まれている可能性がある。クロロホルム画分に関しては現在追求中である。

## 摘 要

ホオズキに対するニジュウヤホシテントウの寄主選択機構を明らかにする目的で、ホオズキ葉中に含まれるニジュ

ウヤホシテントウの摂食刺激物質の単離、同定を試みた。ホオズキ新鮮葉のメタノール抽出物およびそのクロロホルム可溶区は単独でもニジュウヤホシテントウに対して摂食刺激活性を示した。またクロロホルム可溶区は水可溶区を加えることで活性が大幅に上昇した。これに対してブタノール可溶区、水可溶区およびブタノール可溶区の濃縮途中に析出した物質（ブタノール可溶区沈殿物）は単独では活性を示さず、ブタノール可溶区およびブタノール可溶区沈殿物は水可溶区を加えることで、摂食刺激活性を示した。特に、ブタノール可溶区沈殿物に水可溶区を加えた場合はクロロホルム可溶区に水可溶区を加えた場合と同程度の活性を示した。ブタノール可溶区沈殿物は各種分析の結果、ルテオリン7-O-グルコシドと同定され、水可溶区を加えることで、葉に含まれる濃度でニジュウヤホシテントウに対して摂食刺激活性を示した。以上の結果から、ルテオリン7-O-グルコシドは、ニジュウヤホシテントウがホオズキを摂食する上で一つの鍵物質として働いていると考えられた。

## 引用文献

- Abe, M. and K. Matsuda (2000) Feeding responses of four phytophagous lady beetle species (Coleoptera: Coccinellidae) to cucurbitacins and alkaloids. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 257-264.
- Abe, M., K. Matsuda and Y. Tamaki (2000) Differences in feeding response among three cucurbitaceous feeding leaf beetles to cucurbitacins. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 137-142.
- Augustine, M. G., F. W. Fisk, R. H. Davidson, J. B. Lapidus and R. W. Cleary (1964) Host plant selection by the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 57: 127-134.
- Endo, N., M. Abe, T. Sekine and K. Matsuda (2004) Feeding stimulants of solanaceae-feeding lady beetle, *Epilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) from *Solanum tuberosum* leaves. *Appl. Entomol. Zool.* 39: 411-416.
- Hsiao, T. H. (1985) Feeding behavior. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 9 (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 471-512.
- Markham, K. R. and V. M. Chari (1982) Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids. In *The Flavonoids: Advance in Research* (J. B. Harborne and T. J. Marbry eds.). Chapman and Hall, New York, pp. 19-34.
- Markham, K. R. and H. Geiger (1994) <sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethyl sulfoxide. In *The Flavonoids: Advance in Research since 1986* (J. B. Harborne ed.). Chapman and Hall, New York, pp. 441-497.
- Nayer, J. K. and G. Fraenkel (1963) The chemical basis of the host selection in the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 56: 174-178.