

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 神尾 道也

エビやカニなどの甲殻類には、古くから性フェロモンの存在が認められている。特に、交尾前ガード、メスの脱皮とその後続く交尾という **soft female mating** 型の配偶行動をとるカニ類については研究が活発に行われてきたが、フェロモンの本体が明らかにされた例はない。そこで、本研究では、ケガニの近縁種のクリガニ *Telmessus cheiragonus* の性フェロモンの解明を目指し、交尾行動の観察、バイオアッセイの開発、およびフェロモン分子の単離と同定を試みた。その概要は以下の通りである。

まず、性フェロモンの解明に必要な、配偶行動の観察を行った。すなわち、個別の水槽に隔離したペアをビデオテープで連続的に撮影して測定したところ、クリガニの配偶行動のタイプは交尾前ガード、メスの脱皮につづく交尾、そして交尾後ガードという典型的は **soft female mating** 型で、交尾前ガードは 11.0 ± 5.0 SD 日続き、脱皮から交尾までは 41.2 ± 10.9 SD 分の間隔があり、交尾は 110.6 ± 6.6 SD 分間行われ、さらに交尾後ガードは 4.0 ± 6.6 SD 時間続いた。オス間競争では、大型個体が優位であり、最も小さいグループのオスは一度もメスをガードできなかった。性比に依存した交尾前後ガード時間の可塑性は認められなかった。交尾はメスの脱皮後に行われたが、ひとつの水槽内に脱皮前のペアと脱皮後交尾中のペアが存在すると脱皮前のペアでもオスが交尾を試み、失敗に終わることが観察された。これは、狭い水槽中では、脱皮後のメスから放出されるフェロモンが、正常な交尾行動を攪乱すると考えられた。

次に、バイオアッセイの開発を試みた。メスの尿をスポットしたスポンジに対して抱きつき行動を示したので、さらに飼育条件を種々検討した結果、 10°C で飼育したオスをアッセイの 2 時間前に 15°C の水槽中で個別飼育すると、高い確率でメス尿に反応することが分かった。オス尿、脱皮前、後のメス尿、海水のフェロモン活性をこの方法を用いて試験したところ、メス尿にのみ活性が認められた。海水で希釈したメス尿の検出限界は 100 倍希釈であり、スポットする体積は $20\ \mu\text{L}$ で十分であった。

甲殻類で実験的に存在が証明されている性フェロモンは、すべて交尾前行動を引き起こすものであり、オスの交尾行動がどのような刺激によって開始されるのかは不明であった。上述のクリガニの行動観察で交尾行動を引き起こすフェロモンの存在が示唆されたが、メスの尿は交尾前ガード行動しか引き起こさなかったことから、交尾行動を刺激するフェロモンが脱皮後のメスの触角腺開口部以外から放出されると考えた。そこで、脱皮後のメスの飼育水および脱皮前のメスの飼育水に対するオスの反応をスポンジ法で調べたところ、脱皮後のメスの飼育水に対してのみ交尾行動を示すことが観察され、一方、脱皮前の飼育

水に対しては交尾前ガードのみが観察されたことから、オスの交尾行動を引き起こすフェロモンが脱皮後のメスから放出されていると判断した。次に、このフェロモンがどこから放出されるのかを検討したところ、触角腺開口部、肛門、生殖孔、そして腹部内面以外の場所から放出されるものと判断できたものの、未解明のまま残された。なお、クリガニの交尾は脱皮後 1 時間以内に始まること、および殻の硬化したメスは交尾しないことから、交尾行動刺激フェロモンの放出は殻が硬化する前に終わると予想された。ところが、スポンジ法で放出期間を測定した結果、脱皮後 21 日以上にわたって交尾行動刺激フェロモンは放出され続けていた。また、限外ろ過から本フェロモンの分子量は 1000 以下の水溶性物質と推定された。

後述の通り、行動実験からだけではフェロモンの検出に限界あると思われたので、昆虫のフェロモンのスクリーニングに広く用いられている触角電位 (electroantennogram: EAG) の開発を試みた。すなわち、オスクリガニの第一触角を切り取り、流水中に設置し、エビ抽出液、オス尿および、メス尿で刺激し、触角に含まれる全神経を触角外に取り出して活動電位をまとめて記録したところ、外肢、内肢ともに化学受容器として働くことが分かった。そこで外肢あるいは内肢を切除後反応の変化をスポンジ法で観察した。その結果、外肢を切除したときのみフェロモンに対する反応が無くなったことから、第一触角外肢がフェロモン受容器であることが確認された。さらに、第一触角外肢の EAG 反応は濃度依存的なので、本法はフェロモンの検出に有効であると考えられた。

最後に、尿に含まれる抱きつき行動刺激フェロモンの同定を試みた。予備実験で、フェロモンは分子量 1000 以下の不揮発性かつ高極性分子であることが明らかとなったので、Sephadex G50 および Toyopearl HW40SF を用いたゲル濾過で尿を分画したところ、スポンジ法による活性および EAG による反応は多くの画分にわたり認められた。そこで、ゲルろ過活性画分中に含まれる化合物の同定を試みた結果、トリゴネリン、トリメチルアミンオキシド、尿素、酢酸イオンが検出されたが、これらの化合物と混合物には活性が見られなかった。さらに、オス尿とメス尿の成分比較を行ったところ、コハク酸、トリメチルアミンオキシド、酢酸塩がメス尿のみに認められたが、いずれも活性を示さなかった。なお、オスとメス尿間で、アミノ酸組成、糖類、および核酸関連化合物の含量に大きな違いは見出されなかった。また、オス尿に高濃度のホマリンが検出され、交尾直前直後のメスの尿中には検出されなかった。交尾終了後、単独生活のメス尿には高濃度で含まれていることから本物質を含まないことも尿のフェロモン活性の条件である可能性が考えられる。

以上本研究では、クリガニの性フェロモンの同定を目的に、行動観察、行動および神経レベルでのフェロモン検出法の開発、配偶行動のフェロモンによる段階的な制御機構の解明を試みた結果、一連の配偶行動を明らかにすることとともに、カニ類では最初の交尾行動刺激フェロモンの存在を明らかにし、さらにスポンジを用いるアッセイ法を開発して抱きつきフェロモンの性質を明らかにしたもので、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値があるものと認めた。