

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成14年度博士課程入学

氏名 松村 幸一

指導教員名 松永 茂樹

論文題目 Studies on school recognition substance in the catfish *Plotosus lineatus*

(ゴンズイの群認識物質に関する研究)

生物が備える認識システムは、極めて単純なものから高度に発達したものまで多様である。特に、他個体の認識をはじめとして、複雑なコミュニケーションには特徴的なシグナル、精緻な処理機構、そして行動発現が不可欠になる。シグナルの一つとして化学信号は多数の生物に見られる。例えば、高度な社会性を備えるアリのコミュニケーションは、体表の炭化水素により担われていることが明らかにされ、この研究に基づいてアリ社会が極めて動的なことが示された。同時に、その社会は自律適応型システムと呼ばれ、複雑な数理問題を解決する手段として利用できることも示されている。一方、脊椎動物でも他個体（親子、雌雄、階層、敵味方、そして集団）の認識に匂い物質に関わることが報告されているが、その本体が明らかにされた例はほとんどない。

ゴンズイ *Plotosus lineatus* は孵化直後から同腹個体で構成される群を形成する。この群は他の群と交わった後、すぐにもとの群に戻るが、組み合わせる群によっては、交わったまま一つの安定な群を形成する場合や、分離後に各群由来の特定の個体が新たに群を構成する場合がある。このことから、群の融合と分離は何らかの理由で規定され、融合と分離を繰り返しながら多様な群が持続的に維持される機構が備わっていることが予想される。このような群の認識を司る因子に関して、すでに研究がなされ、以下のことが明らかにされている。(1) ゴンズイは自群の飼育海水や自群個体から採取した粘液に誘引されること。(2) 他群よりも自群の海水を選択すること。(3) 鼻腔を詰めると自群の匂いを選択できないことから、受容器官が嗅覚であること。これらの結果から、群の認識は化学物質、すなわち群認識物質 (school recognition substance、SRS)により担われていることが予想できるが、その本体は明らかにされていない。群認識物質は認識システムや群間相互作用の解明の手掛かりとなり、さらに、生物を模倣した分散型自律システムへの応用が期待できる。そこで本研究ではゴンズイの群認識物質を解明することを目的とした。

1 生物試験法の開発、活性物質の単離、構造決定

これまでの *P. lineatus* の群認識物質に関する研究では、長方形容器の上流の二箇所からおのおの試料を流し、どちらかを選択させるという方法が用いられてきたが、本法は多量の試料を必要するため、活性物質の単離、同定のための生物試験法として不適切であった。そこで、活性物質に対する行動特性を少量の試料を用いて検出する手法の開発を目指した。まず、自群個体から採取した体表粘液を寒天に混ぜ、それに対する行動を観察した。すると、寒天を通り過ぎた後にすぐさま方向転換して寒天に向かって泳ぐという行動 (Turn behavior) が認められた。この行動は群から離れた個体が群に戻る時や、異なる群と交わった後に自群に戻る時にも観察される。そこで、長方形の容器 (68 × 40 × 15 cm) に 3cm の深さになるように海水を入れ、容器の片端に粘液を加えた寒天を、他端に試料を加えていない寒天を置き、魚の行動をビデオで 5 分間記録した。この行動を定量化するにあたり、以下のように活性を定義した。RT = (m/n) × 100, m:寒天を通り過ぎた後に 5 秒以内に戻った回数, n:寒天を通り過ぎた回数, Transformed value (TV, degree) = arcsin (RT/100)^{1/2}, RI = {(RTT - RTC)/(RTT + RTC)} × 100. RTT:試験寒天側の RT, RTC:試料不添加寒天側の RT。ビデオを再生して計測した結果、粘液の濃度に依存して活性(RI)を検出できたことから、本法は生物試験として使用可能であるものと判断した。次に、本試験法に基づき、活性物質の単離を試みた。*P. lineatus* の体表粘液をエタノールで抽出し、抽出物を溶媒分画後、各種クロマトグラフィーに付し活性画分を得た。この画分に含まれる化合物を核磁気共鳴と質量分析により調べた結果、脂肪酸組成の異なるホスファチジルコリン (PC) の混合物であることがわかった。さらに、群から海水中に PC が溶出していることも確認した。

2 PC 分子種による群認識機構の解析

まず、活性画分(以後 PCF)と粘液の活性を濃度応答実験で比較した。5 段階の濃度 (0.3, 0.15, 0.075, 0.015, 0.0015 mg PCF/ml agar) で試験を行ったところ、PCF は、体表粘液と同様の濃度依存性および同等の活性を示した。次に、活性画分をホスホリパーゼ A2 で処理したところ活性が消失したため、PC が PCF 中の活性本体であることが確実になった。ついで、PCF が自他の群の識別に関わるか否かを調べた。すると、自群の粘液や PCF は活性を持つが、他群の粘液や PCF は活性を持たず、PCF が群の識別に関わるということが明らかになった。一方、市販の卵黄および大豆由来の PC は活性が認められなかった。以上のことから、活性物質に関して以下の二つの可能性が考えられる。(1) 自群由来の PC に含まれ、他群や卵黄および大豆由来の PC には含まれない特定の脂肪酸組成を持つ分子種が活性発現に関わる。(2) PC 分子種の組成比が活性に関与する。まず、活性画分を、逆相 HPLC を用いて二分し調べたところ、いずれの画分も活性を示さなかった。しかし、両者を混ぜ合わせると、活性は分画前の 90%まで回復した。すなわち、活性を保持するには、少なくとも二種類の PC 分子種が必要であることがわかり、(2) の可能性が高まった。このことを検証する目的で、PCF に合成 PC (16:0-22:6n3, 16:0-20:4n6) を添加して PCF の PC 分子種の組成を意図的に変え、活性を調べた。合成 PC を 10, 1 および 0.1wt% の濃度で加えた結果、無添加の時と比べ、それぞれ 13-29%、40-47 および 85-88% の活性を示した。一方、合成 PC (16:0-22:6n3, 16:0-20:4n6) 単独では活性を示さなかった。このことから、PCF の脂肪酸組成が群認識を決定づけていることがわかった。すなわち、PC 分子種の組成が群の融合と分離に関与することが示された。

3 PC 分子種の組成分析と多変量解析

群ごとの PC 分子種の組成を調べるために、定量分析法を確立した。まず、PC をホスホリパーゼ C で処理してジアシルグリセロールに変換し、これを 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートと反応させて、ジニトロフェニルウレタン誘導体にした。これを、ODS カラム (250×4.6mm) を 5 本直列に結合し固定相とし、アセトニトリル/イソプロパノール (8:2) を移動相として、検出は UV (254nm)、カラム温度 23 度という条件下で HPLC を行った。本条件下で認められた約 60 個のピークのうち 19 個を選択し、脂肪酸組成を調べた。すなわち各ピークを単離し質量分析に付すと同時に、メタノリシス生成物を GC で分析した。この手法を用いて、36 群の PCF の組成分析を行った。いずれの群の PCF も、多数の PC 分子種から構成される複雑な組成を示した。

ついで、群間での組成の違いを調べるために主成分分析を行った。まず、各群の PCF における前述の 19 個のピークの相対比を算出した。相対比は $Z_{ij} = \ln[Y_{ij}/g(Y_j)]$, (Z_{ij} は計算後のピーク面積、 Y_{ij} は群 j のピーク i の面積; $g(Y_j)$ は群 j のピークの幾何平均) で変換した。次に、標準化を行い、ヤコビ法で固有値、固有ベクトルを求め、最後に主成分得点、主成分負荷、寄与率を算出した。各群の第一主成分 (寄与率 51.71%) と第二主成分 (14.51%) を二次元マップ上にプロットした。さらに各群を第一主成分得点の順に並べた PC 相対比から相関係数 (相関係数行列) を算出し、その値に基づいて二次元可視化を行った。この結果、群の PC パターンによる分離が明瞭に確認できた。すなわち、PC 分子種の組成が群により異なることを示した。

一方、任意の 2 群を同一水槽に入れ、融合し続けるか分離するかを行動実験で調べた。7 組について調べた結果、4 組が分離し、3 組が融合した。行動実験前に採取した粘液中の PC 分子種の組成に基づき、各組み合わせの相関係数を算出した。融合した群と分離した群で比べると、分離した群の方が融合した群より相関係数が低かった。すなわち、群の融合と分離は PC 分子種の組成に依存することが支持された。

以上のようにして、*P. lineatus* が群独自の PC 分子種の組成にもとづいて自他の群を識別していることを明らかにした。今後、組み合わせ実験を重ねれば、群間相互作用のアルゴリズムが明らかになるものと思われる。また、本研究の結果をもとにすれば、群認識物質を利用した *P. lineatus* の嗅覚および脳内情報表現の研究が可能となった。