

研究成果報告書（第27回学術研究助成）

2020年 4月 1日

公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団

理事長 野村茂樹 殿

所属機関名 茨城大学大学院 理工学研究科

職 名 博士前期課程 1年

氏 名 小林 貴浩

1. 研究課題

造網性クモ類の性フェロモン：その放出源と物質は何か

2. 共同研究者

茨城大学 准教授 諸岡歩希 考察・論文分担執筆

3. 研究報告

I. 研究の目的

本研究の目的は、造網性クモ類の性フェロモンの放出源とその物質の特定である。

クモ類において、異性間の情報伝達には、性フェロモンが広く用いられ、多くの種のメスが揮発性と接触性の2種類の性フェロモンを持つ。揮発性フェロモンは離れた場所にいるオスを誘引し、接触フェロモンはそれに触れたオスの求愛行動を誘発させる(Gaskett, 2007)。このことから、性フェロモンはクモの繁殖システムにおいて重要な役割を担っていると考えられる。しかし、これまで性フェロモンに対する齢や餌の影響が行動実験などで調査されてきた一方で(Baruffaldi and Andrade, 2015; Cory and Schneider, 2016; Henneken *et al.*, 2017)、その生産場所や放出経路は未だ明らかになっていない(Kořínková, 2013)。また、昆虫類ではこれまで1000種以上のフェロモンが同定されてきたが(Haynes, 2017)、クモ類の性フェロモンは8属10種でしか同定されていない(Fischer, 2019)。これらの現状は、クモ類の性フェロモンの生合成機構などの生理学的研究や、性フェロモンがどのように獲得されてきたかなどの進化学的な研究が進んでいない要因の1つである。そこで本研究では、造網性クモ類であるヤマシロオニグモ *Neoscona scylla* とキザハシオニグモ *Araneus abscissus* を用いて、解剖したクモの生体バイオアッセイによる性フェロモンの放出源の調査と、GC-MS分析による性フェロモンの同定を試みた。

II. 研究の方法

2019年6月に *N. scylla*、同年11月に *A. abscissus* のオスとメスの亜成体を、それぞれ茨城県水戸市渡里町の里山にて採集した。クモは湿らせた綿と共に、400 mlのプラスチックカップで個別に保管した。それぞれ自然日長下の室温で、週に1度ミールワームを与えて飼育した。クモは毎日観察し、成熟日と採餌日を記録した。

放出源の特定

当初はクモの出糸器官を解剖し生体バイオアッセイによって放出源を調査する予定だったが、解剖が難航したため、本研究では *A. abscissus* の未交接の成体のメス本体と、その糸にオスが誘引されるかどうかを検証する実験のみを行った。これは2018年に著者が *N. scylla* を用いて行った実験と同様のものであり、造網性クモ類における性フェロモンの放出動態のデータを補強する。実験には Miyashita and Hayashi, 1996 の装置を改変したものを用いた(図1)。

この装置で、メスBOXに成体の未交配メスの本体のみを入れた状態(メス成体)、成体の未交配メスの糸のみを入れた状態(糸)、何も入れない状態(コントロール)の3つの条件を作った。それぞれの条件で、オスを装置内のオス投入位置にゆっくり置き、1時間放置した。1時間後にオスの位置を確認し、オスがメスBOX側から10 cm以内の場所にいたとき、「誘引された」と記録した。同時に、実験中の装置をカメラで撮影し、オスがどのように動いたかも記録した。これにより、ランダムな動きにも関わらず、「誘引された」と判断することを防いだ。

統計解析には一般化線形混合モデルを用いた。応答変数は誘引されたか否かの二値変数で、説明変数には実験条件を当てはめた。実験条件間で同じ個体のオスを用いたため、ランダム効果にはオスの個体番号を指定した。メス本体-コントロール、糸-コントロールの組み合わせでモデルを作り、それぞれ実験条件を区別するモデルと区別しないモデル間で尤度比検定を行った。解析にはR(ver.3.5.1)を使用した。

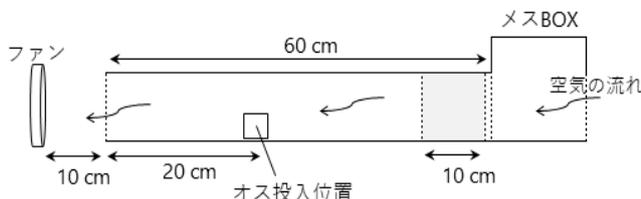


図1: 実験装置図

60 cmの亚克力パイプとプラスチックケースを組み合わせた。パイプの両端にはネットを貼り、空気が流れるようになっている。

性フェロモンの特定

*N. scylla*と*A. abscissus*それぞれの垂成体と未交配成体の本体と糸の抽出物に存在する化学物質を比較し、性フェロモン候補の絞り込みを行った。

性フェロモン抽出

- ① 本体抽出：生きたクモを- 4 °Cの環境に3分間飼育容器ごと置いて殺し、その後すぐに本体を2 mlバイアル(Agilent Technologies)に移した。そのバイアルにジクロロメタン40 μ lを入れ、少なくとも1時間抽出した。
- ② 糸抽出：クモを割りばしで作られた一辺28 cmの立方体に放した。それを全暗23 °Cの環境に2日間置き、網を張らせた。その網をガラス棒で巻き取り、手で丸めて200 μ lバイアル(Agilent Technologies)に移した。そのバイアルにジクロロメタン5 μ lを入れ、少なくとも48時間抽出した。

GC-MS分析

GCとMSはそれぞれ7890A(Agilent technologies)とJMS-Q1000GC(JEOL)、カラムはHP-5(30 m \times i. d. 0.320 \times Film 0.25 μ l)を使用した。キャリアガスはヘリウムで流速は1.5 ml/ minに設定した。スプリットレスモードで、1 μ lのサンプルを分析した。インジェクタ温度は250°C、オープン温度は80-280 °Cまでは5 °C/ minで昇温させ、280-320°Cは10 °C/ minで昇温させた。イオン化エネルギーは70 eVに設定し、40-600 m/ s の範囲をスキャンした。分離された化合物はNISTライブラリー(2008 version, Agilent Technologies)と比較して同定した。

III. 研究結果

放出源の特定

*A. abscissus*のメス成体の本体には20個体のうち13個体のオスが誘引され、メス成体の糸には19個体のうち12個体のオスが誘引された。一方、コントロール実験の23個体のオスのうち、誘引されたのは7個体であった(図2)。一般化線形混合モデルを用いた尤度比検定では、メス本体と糸に対するオスの誘引率は、コントロールに比べて有意に高かった(メス本体;GLMM $X^2=5.2362$, $n = 43$, $p = 0.02212$, 糸; GLMM $X^2=5.4165$, $n = 42$, $p = 0.01995$)。

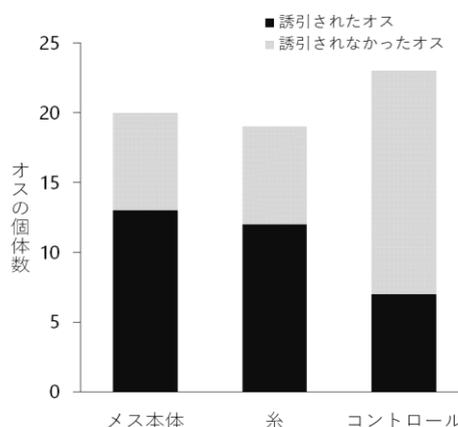


図2: 各条件におけるオスの誘引数

性フェロモンの特定

オスの誘引実験の結果から、オスを誘引する*A. abscissus*の揮発性フェロモンは、成体のメス本体だけでなくその糸からも放出されていることが示唆された。そのため性フェロモンは、メスが成体になった段階で増加する且つメス本体と糸の両方に存在する物質であると考えられる。GC-MS分析で得られたクロマトグラムから、上記2つの条件を満たす性フェロモン候補3つを決定した(図3)。3つの性フェロモン候補のマススペクトルと、NISTライブラリーに登録されているマススペクトルの照合を行ったが、類似のマススペクトルが多数存在したため、同定には至らなかった。

*N. scylla*を用いた実験では性フェロモンの抽出に失敗したため、データを得られなかった。

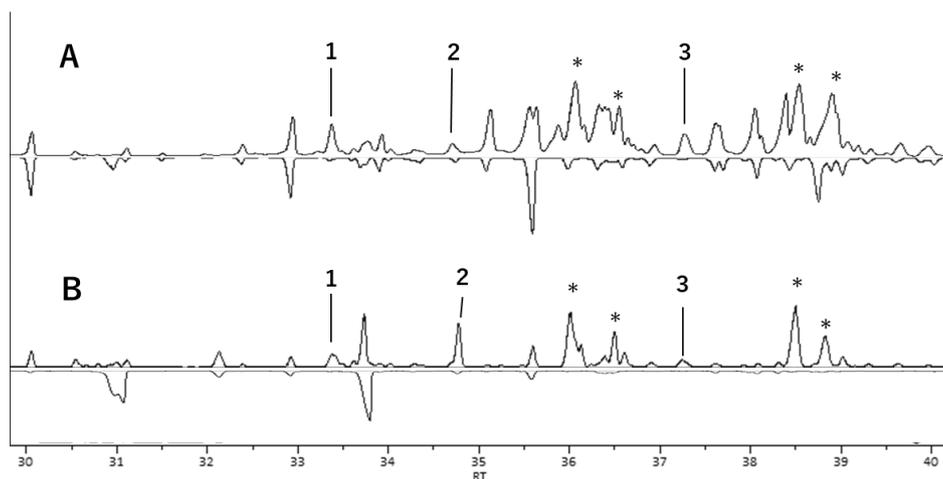


図3: 保持時間30:00 - 40:00の範囲のガスクロマトグラム. A) メス本体, B) 糸. 上向きのクロマトグラムが成体, 下向きのクロマトグラムが垂成体のデータを表す. *は餌由来の成分.

IV. 考察

本研究では、*A. abscissus*のメスの本体と糸の両方にオスの誘引作用があることが示唆された。これは、造網性のクモである*Argiope*属で得られた結果と一致する(Cory and Schneider, 2016)。糸に誘引性があることから、これらのクモの性フェロモンは出糸器官などに由来するかもしれない(Uhl and Elias, 2011)。しかし、*N. scylla*を用いた実験では、オスはメスの糸には誘引されなかった(Kobayashi, 未公表)。*Nephila*属など糸に誘引性を持たない造網性クモ類も存在し(Miyashita and Hayashi, 1996)、これらのクモの性フェロモンは前述のクモとは異なる由来を持つ可能性がある。

さらに本研究では、造網性クモ類*A. abscissus*の性フェロモン候補を3つ決定した。これら3つの候補物質のマススペクトルは、全て14質量単位間隔のピークを持っていた。このピークは、物質が断片化される時メチレン基(-CH₂)を1個ずつ失ったことによるもので、鎖式飽和炭化水素の特徴である(Silverstein *et al.*, 2005)。このことから、3つの性フェロモン候補は全て鎖式飽和炭化水素だと考えられる。*A. abscissus*と同属のクモである*A. diadematus*の性フェロモンも、炭素数30ほどの5つの分岐飽和炭化水素を性フェロモンとして持っており(Fischer, 2019)、*A. abscissus*の性フェロモン候補も似た構造を持つ可能性がある。

V. 成果発表

- ・日本蜘蛛学会 第51回大会シンポジウム(2019年8月24日 鶴岡メタボロームキャンパス レクチャーホール 山形県鶴岡市)
- ・学術論文 投稿準備中

VI. 今後の課題

今回実行できなかった、クモの各器官の生体バイオアッセイを行い、詳細な放出源の調査を進める。また、さらなる化学分析を行い性フェロモン候補物質の完全に同定をすること、その生理活性を調査することが求められる。