

ケガニ類の性フェロモンに関する研究

Studies on Sex Pheromones of Hair Crabs

研究代表者 東京大学大学院農学生命科学研究科教授 伏谷 伸宏
Prof., Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo
Nobuhiro Fusetani

共同研究者 北海道立網走水産試験場 佐々木 潤
Hokkaido Abashiri Fisheries Experimental Station
Jun Sasaki

共同研究者 東京大学大学院農学生命科学研究科助教授 松永 茂樹
Assoc.Prof., Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
University of Tokyo
Shigeki Matsunaga

In recent years, an increasing awareness of chemical communication in marine organisms have resulted in substantial accumulation of knowledge of signal substances involved in interaction between marine organisms. Although sex pheromones of crustaceans have long been one of the most popular subjects, their chemical structures remained to be elucidated. In the present study, we have attempted at isolation and structure elucidation of sex pheromones of two closely related crabs of the family Atelecyclidae (hair crabs), *Erimacrus isenbeckii* and *Telmessus cheiragonus*. The first part of the present study focuses on the sex pheromone released from sexually attractive females of *E. isenbeckii*. We were able to isolate a mixture of closely related ceramides which induced sexual behaviors in males from the female water, and their structures were confirmed by chemical synthesis. The second part of our study focuses on the sex pheromone of *T. cheiragonus*. We could also detect the pheromone in the female water, though we have not isolated or characterized it.

研究目的

水棲動物の多くは、視覚や聴覚が発達していないため、種間、種内における情報伝達を化学物質によって行っていると考えられている。これらのケミカルシグナルはごく微量、水中に放出されるため、その本体の解明は困難であったが、近年の分離・分析技術の進歩により、シグナルの本体が徐々に明らかにされつつある。そのうち、エビ、カニなど甲殻類の性

フェロモンは、化学生態学的な興味あるいは水産増養殖への応用への関心から、最も詳しく研究されてきた。ところが、フェロモン本体の解明は古くから試みられているものの、未だに成功した例はない。本研究においては、水産上重要種であるケガニ *Erimacrus isenbeckii* とその近縁種のクリガニ *Telmessus cheiragonus* のメスが放出する性フェロモンの化学構造を解明し、甲殻類の化学物質を介した生殖行動を理解すると

もに、現在、資源の枯渇が懸念されているケガニ漁業および増養殖への応用を目的としている。

研究経過

カニ類などの短尾甲殻類の多くは、メスの脱皮の直後に交尾を行うが、脱皮前後の数日から数週間にわたり、オスはメスを抱きかかえる「ガード行動」と呼ばれる特有の保護行動をとる。これら一連の生殖行動は、メスが放出する性フェロモンによって誘起されることが、多くの種で示されている。しかしながら、現在まで、それらの性フェロモンの構造が明らかにされていない原因として、適確な生物試験法が開発されていないことが挙げられる。

佐々木 (1991) はケガニ *E. isenbeckii* のメスが性フェロモンを放出することを、脱皮中のメスの飼育水を含ませたスポンジをオスに提示し、オスの反応を観察するという方法を用いて証明した。この方法では、オスは実際のメスに対するのと同様に、スポンジを抱きかかえ、ガード行動や交尾行動を示すため、従来の方法と比べ、オスの行動の意義が非常に明確で、性フェロモンを精製する際の指標として用いるのに好適であると考えられた。

そこで本研究では、ケガニとクリガニのメスが放出する性フェロモンを、上記の「スポンジ法」を用いて分離・精製するとともに、化学構造の解明を試みた。

研究成果

(1) ケガニの性フェロモン

北海道、釧路沖で採集した脱皮直後のメスガニを水槽に飼育し、その飼育水に含まれるフェロモンをポリスチレン樹脂カラムに通過させることにより回収し、水-エタノール混液で溶出した。スポンジ法を活性

の指標としながら、ODS フラッシュクロマトグラフィーとシリカゲルのHPLCで順次精製し、活性画分を得た。

FAB マススペクトルおよび各種 2 次元 NMR スペクトルの解析結果から、本画分は α -ヒドロキシ脂肪酸とフィトスフィンゴシンから成るセラミドの混合物であることが判明した。そこで、この混合物をメタノリシスし、脂肪酸のメチルエステルおよびスフィンゴシンに導き、それぞれについて解析を行った。

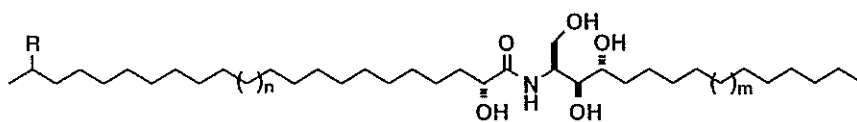
脂肪酸メチルエステルの NMR スペクトルは、イソ型が主成分で、直鎖型のものが少量存在することを示した。さらに CD スペクトルで、215nm に負のコットン効果が観測されたことから、 α 位水酸基の立体配置を R と決定した。

一方、フィトスフィンゴシン部分は、NMR スペクトルから直鎖型のみであることが判明した。さらに、テトラアセチル体に導き、NMR スペクトルと旋光度のデータを、文献既知のフィトスフィンゴシンの 4 種類の異性体と比較検討し、その立体配置を 2S, 3S, 4R と決定した。

この混合物画分を、さらに ODS の HPLC で分離したところ、8 つのピーク (セラミド A ~ H) を得た。それらの NMR スペクトルおよび FAB-MS/MS スペクトルから、それぞれの脂肪酸とスフィンゴシンの組成を明らかにすることができた。以上の結果、セラミド A ~ H の構造を図 1 のように決定できた。

次に、これらのセラミドの構造および生物活性を確認するために、分岐脂肪酸を含むセラミド 6 種からなる混合物の合成を試みた (図 2)。

まず、スフィンゴシン部分については、 β -D-galactose pentaacetate から 5 段階で生成するアルデヒドに、 C_{10} あるいは C_{11} の



	m	n	R		m	n	R		m	n	R
A	1	1	CH ₃	D	1	3	H	G	2	3	CH ₃
					2	2	H				
B	1	2	H	E	1	3	CH ₃	H	2	4	CH ₃
	2	1	H		2	2	CH ₃		3	3	CH ₃
C	1	2	CH ₃	F	2	3	H				
	2	1	CH ₃								

図1. 脱皮メス飼育水より得られたセラミド類の構造

の Wittig 試薬を反応させることにより、対応する側鎖をもつアルケンに導いた。次に、2 位水酸基をメシル化後、アジド反転で窒素原子を導入し、最後に、アジドを接触還元してスフィンゴシンへと導いた。

次に、脂肪酸部分については、まず 9-bromononanol から 3 段階で得られる Wittig 試薬と、C₈、C₉、および C₁₀ のプロモアルデヒドから、C₂₁、C₂₂、C₂₃ の 3 種類の臭化物をそれぞれ合成した。さらに、これらを Sorensen 法により α-アミ

ノ酸へと導いた後、NaNO₂ で処理して α-ヒドロキシ脂肪酸とした。

合成したスフィンゴシンと脂肪酸は、縮合に先立ち、天然物の分析から割り出した比率に混合し、縮合、脱保護を行った後、生成するエピマーをシリカゲルクロマトグラフィーにより分離し、セラミド混合物の合成を完了した。合成品の NMR スペクトル、マススペクトルおよび ODS-HPLC による溶出のパターンは、天然物のものと良く一致した。

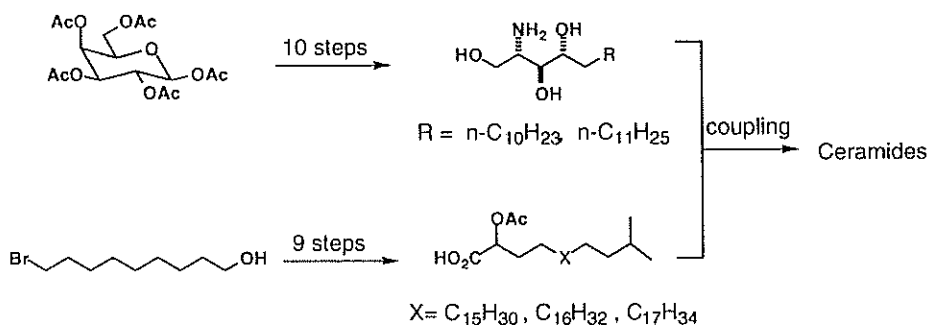


図2. セラミドの合成スキーム

合成したセラミド混合物の生物活性を、スポンジ法により検討したが、オスガニの反応は見られなかった。しかし、生物試験を行ったのが交尾期ではなかったため、今後さらに検討する必要があると思われる。

(2) クリガニの性フェロモン

クリガニはケガニと同じクリガニ科に属し、ケガニと同様の配偶行動を示す。従って、クリガニにおいても、ケガニの場合と同様に、スポンジ法を適用した活性物質の単離が可能であるかどうか検討したところ、オスは脱皮直後のメスの飼育水に対してガード行動や交尾行動を示した。よって、クリガニでもメスが放出する性フェロモンが存在することを証明できた。しかし、オスの反応率が25%程度と低く、再現性にも乏しかったため、活性の有無の評価が困難であり、フェロモンの単離には至らなかった。

そこで、ビデオ撮影によりクリガニの配偶行動を観察したが、ワタリガニ類で報告されているような、フェロモンによって引き起こされるオスの特徴的な求愛行動などは見られなかった。よって、Y-mazeを用いてフェロモンの誘引性に基づく生物試験法を試みた。この方法では脱皮前、脱皮後のどちらのメスに対しても、オスの反応が見られたので、スポンジ法よりも感度が高い可能性が示唆された。

以上、ケガニのメスが交尾期に放出する物質を単離し、その構造を明らかにできた。また、クリガニでは、性フェロモンの単離を行うための生物試験法に、新たな知見を加えることができた。

今後の課題と発展

ケガニの性フェロモン研究では、ケガ

ニの交尾期に、合成セラミド混合物の生物活性を詳細に検討することが重要である。合成品にフェロモン活性が見られれば、甲殻類としては最初に性フェロモンが構造決定された例となる。また、クリガニについては、行動評価の信頼性が高いスポンジ法と感度のよいY-maze法とを併用することにより、性フェロモンの単離が可能であると考えられる。なお、本研究は助成期間終了後も続行されており、1997年のクリガニ生殖期に脱皮メスから尿を採る方法を開発でき、さらに尿が微量(数十 μ l)でオスガニの性行動を誘起することが確認できたので、フェロモンの解明が期待できる。さらに本方法をケガニに応用すれば、効率よくフェロモンの採取とその全容解明が期待できる。

ケガニ、クリガニの性フェロモンの解明は、甲殻類における性フェロモンの役割や機能、ひいては生理・生態の研究に大きなインパクトを与えるばかりでなく、水産増養殖や水産資源保全へも寄与できるものと思われる。

発表論文リスト

- 1) N. Asai: "Studies on Sex Pheromones of Hair Crabs", Ph. D. Thesis, The University of Tokyo, 1996.
- 2) N. Asai, J. Sasaki, S. Matsunaga, N. Fusetani: Isolation and Structure Elucidation of Ceramides, Potential Sex Pheromones of the Hair Crab *Erimacrus isenbeckii*, *Experientia* (submitted).
- 3) N. Asai, J. Sasaki, S. Matsunaga, N. Fusetani: Total Synthesis of the Ceramide Mixture, Potential Sex Pheromones of Hair Crab *Erimacrus isenbeckii*, *Tetrahedron* (submitted).
- 4) 佐々木 潤: ケガニの性フェロモンと配偶行動. 化学と生物 32, 322-325 (1994).