アマクサアメフラシおよびゾウアメフラシのインクと皮膚抽出物の
イセエビに対する摂食阻害作用

Chemical defenses in the skin and the ink of sea hares

Aplysia juliana and *Aplysia gigantea*

林原信子・神尾道也*

東京海洋大学. 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

Nobuko HAYASHIHARA and Michiya KAMIO*

Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

Abstract: Chemical defense using secretion of ink containing purple pigments derived from red algae is common in sea hares. *Aplysia juliana*, however, prefers green algae, and thus, its ink is white, not purple. Since opaline, the sea hares' other defensive secretion, is also white, ink and opaline were not distinguished from each other in previous experiments. Thus, deterrence of this white ink alone towards predators has never been tested. In this study, we tested the deterrence of the white ink of *A. juliana* as well as the extract of their skin, using the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* as a model predator. Parallel experiments on *Aplysia gigantea*, a sea hare with purple ink, were performed to test whether *P. japonicus* is deterred by purple ink. The skin extract, but not the white ink, of *A. juliana* was deterrent. In contrast, purple ink, but not the skin extract, of *A. gigantea* was deterrent. These results show that the skin of *A. juliana* contains defensive chemicals against *P. japonicus*, whereas the white ink itself does not.

Key Words: chemical defense, chemical ecology, deterrent, white ink, aplysioviolins, phycoerythrobilin

はじめに

アメフラシ類 (Anaspidae, Aplysiidae) は浅海域に生息する痕跡的な小さい殻しか持たない裸の軟体動物であり (Carefoot 1987), 動きも遅いため, 皮膚に含まれる化合物および2種の分泌腺, インク腺とオパリン腺からの2種の分泌物, インクとオパリンに含まれる化合物を用いて捕食者から身を守っている (Johnson & Willows 1999). 近年, ジャンボアメフラシ *Aplysia californica* を用いて, これら2種の分泌物中の防御物質群の同定とその作用機構の詳細な研究がおこなわれた結果, インクには escapin というアミノ酸酸化酵素 (L-amino acid oxidase, LAAO) が, オパリンにはその基質となるアミノ酸のリシンが高濃度で含まれていることが明らかとなった (Johnson et al. 2006). そして, これら2種の分泌物の混合時に LAAO によるリシンの酸化が起こり, 発生した過酸化水素やその他の酵素反応生成物群や, その他の酵素反応には関わらないインク中の低分子化合物も防御に関わることが明らかにされた (神尾 2012). これらの防御物質の捕食者に対する作用は摂食阻

害 (Aggio & Derby 2008; Kamio et al. 2010a; Kicklighter & Derby 2006; Nusbaum & Derby 2010b), 摂食刺激効果を持つアミノ酸類による疑似食物効果 (phagomimic) (Kicklighter et al. 2005), 触覚の表面を粘性の高いオパリンが覆い水中の化合物の嗅覚受容細胞への到達を妨げる物理的な化学感覚の阻害 (Love-Chezem et al. 2013), 同種他個体への警報 (Kamio et al. 2011; Kicklighter et al. 2007; Kicklighter et al. 2011) 等多岐にわたる.

ほとんどのアメフラシ類が紫色のインクを持ち (Johnson & Willows 1999), その紫色の正体である2つの紫色素アプシジオビオリン (aplysioviolins) と前駆体のフィコエリスロビリン (phycoerythrobilin) は, 紅藻の持つ赤色の集光性アンテナ色素タンパク質フィコエリスリン (phycoerythrin) を原料としてアメフラシ類の体内で生合成される (Kamio et al. 2010b). これらの色素はブルークラブ (Kamio et al. 2010a) や魚類 (Nusbaum & Derby 2010a) の摂食行動を阻害することから, 紫のインクを持つ多くのアメフラシ類 (Johnson & Willows 1999) の防御物質であると考えられる.

しかしながら, アマクサアメフラシ *Aplysia juliana* は食性とインクの色においてアメフラシ類の中の例外であり, フィコエリスリンを持たない緑藻や褐藻を食べ (Carefoot 1970; 斎藤・中村 1961; 藤田 1990), 白いインクを放出する (Kamiya et al. 1989; Marcus & Marcus 1955). この白い

Received 6 July 2015 Accepted 25 January 2016

* Corresponding author

E-mail: mkamio@kaiyodai.ac.jp

インクが単独で化学防御として効果を持つのかどうかは現在まで明らかにされていない (Johnson & Willows 1999). Pennings (1994) はアマクサアメフラシの白色分泌物をイソガニ *Hemigrapsus sanguineus* が避けることを報告しているが、この実験においてはインクとオパリンが混ざったものを使用していると考えられ (Johnson & Willows 1999), イソガニは単独の混ざりのないインクではなく, LAAO とリシンの酵素反応の生成物群を避けた可能性がある。またアマクサアメフラシとアメフラシ *Aplysia kurodai* の皮膚をイソガニに選択させた場合にアメフラシを選んで食べることから (Pennings 1994), アマクサアメフラシの皮膚には摂食阻害物質が含まれていることが示唆される。

そこで、本研究ではアマクサアメフラシの持つ白いインクが単独で化学防御作用を持つのかどうかを明らかにするために、イセエビ *Panulirus japonicus* を用い摂食阻害実験を行った。また、アマクサアメフラシの皮膚抽出物についても摂食阻害効果を検証した。さらに、イセエビがアメフラシ類の紫色のインクを嫌がるのかどうかを確認するために、ゾウアメフラシ *Aplysia gigantea* の紫色のインクと皮膚の抽出物に対する摂食阻害実験も行った。

材料と方法

生物試料

アマクサアメフラシは体重 350–450 g の成体を神奈川県横浜市金沢区の野島公園の潮間帯から 2011 年 5 月に採集した。ゾウアメフラシは体重 550–650 g の成体を千葉県館山市坂田の東京海洋大学館山ステーション前の潮間帯で 2012 年 7 月に採集した。採集後、各個体をその場で解剖しインク腺、オパリン腺、皮膚に分け、それぞれ -30°C 下で保存し、オパリンと混合していないインクを得た。イセエビは房総半島および伊豆諸島で捕獲された個体を漁業者から購入し、東京海洋大学品川キャンパスにて、容量 10 L の循環水槽中で人工海水を用い飼育した。飼育用の餌としてオキアミを与えた。

インクおよび皮膚抽出物の調製

アマクサアメフラシは 4 個体分、ゾウアメフラシは 3 個体分のインク腺を解凍し、氷上のシャーレにとり、ピンセットで固定しながらスパーテルで表面をこすことで、インクを絞り出した。流れ出たインクを、パスツールピペットを用いそれぞれガラス製のバイアルに集め、 -60°C で保存した。皮膚は各アメフラシ 5 個体分を解凍し、解剖ばさみで 2 mm 角に切り、湿重量 100 g 分を凍結乾燥し、そこに 200 mL のメタノール (鹿 1 級, 関東化学株式会社) を加え、可溶物を抽出した。この皮膚メタノール抽出物を減圧化で乾固し、再びエタノール (一般アルコール 99 度合成無変性, 日本アルコール販売株式会社) 100 mL に溶かしたものを皮膚抽出物として、試験に用いた。

摂食阻害試験

試験用の餌として乾燥テナガエビ (カンシャ, 富城物産) の腹部の筋肉 0.10 g を用い、前述の方法で調製したインクや皮膚抽出物を餌の表面全体に塗布した。この餌を柄つき針 (0.3×16 cm のプラスチック棒の先端にテルモ注射針 20G×1 1/2" を取り付けしたもの) の先端に刺してイセエビの第三顎脚に接触させ、その反応を観察した。コントロールとして、試験する試料がインクの場合には蒸留水を、皮膚抽出物の場合にはエタノールを、それぞれ 100 μL ずつ餌に塗布した。試験の 3 時間前にオキアミを 2 匹与えたイセエビに、さらにコントロール (Pre) を与えて、それらをすべて食べた個体について試験を行った。試験ではコントロール (Pre) に続き、その 30 分後に各種アメフラシのインクまたは皮膚抽出物をそれぞれ 100 μL 塗布した餌 (Sample) を与え、さらにその 30 分後にもう一度コントロール (Post) を与え、空腹度の違いのイセエビの摂食行動への影響の有無を検証した。餌が第三顎脚の外側に接触すると、イセエビは餌を第三顎脚で挟んで保持しながら摂食するので、それぞれの試料についての反応のタイプを 1. 完食した (Eat), 2. 保持し部分的にちぎって吐き出しながら食べた (Bite & Peel), 3. 顎脚で保持すらせず、まったく食べなかった (Reject) の 3 段階に順位づけして記録し、1 および 2 の場合は食べきるのにかかった時間 (handling time) を計測し、3 の場合は handling time を観察を打ち切った時間と同じ 160 秒とした。この試験により得られた反応の種類の記録および handling time について、それぞれ Pre-Sample 間および Pre-Post 間で有意差の有無を統計ソフト R (R Core Team 2013, URL <http://www.R-project.org/>) を用いて Wilcoxon matched pair test を行うことで調べた。有意差の判定基準は有意水準 5% で両側検定とした。インクは両アメフラシ共に 8 個体のイセエビ、アマクサアメフラシの皮膚は 11 個体、ゾウアメフラシの皮膚は 10 個体のイセエビに対して試験を行った。

結 果

アマクサアメフラシのインクを塗布した実験

供試した全 8 個体が Sample および Pre と Post のコントロールを完食し (Eat), 反応のタイプに Pre-Sample および Pre-Post 間で差は見られなかった (Fig. 1-A)。また、食べ終わるまでに要した時間を比較したところ、Sample は 30.5 秒 (中央値) かかり、Pre は 31.0 秒で Pre-Sample 間に有意差はなく (Wilcoxon matched pair test $P=0.94$, $Z=0.070$), Pre-Post のコントロール間にも有意差はなかった (Wilcoxon matched pair test $P=0.25$, $Z=1.15$) (Fig. 2-A)。

ゾウアメフラシのインクを塗布した実験

Sample を完食した (Eat) イセエビは 8 個体中 0 個体、保持し部分的にちぎって吐き出しながら食べた (Bite &

Fig. 1. Mean percentage of Japanese spiny lobsters *Panulirus japonicus* that ate the shrimp (eat), bit, peeled, and ate the shrimp (bite & peel), or rejected the shrimp (reject) in the ink-deterrence assay. A: Ink of *Aplysia juliana*. B: Ink of *Aplysia gigantea*. Pre: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested before ink sample, Ink sample: Freeze-dried shrimp that contained ink of sea hares, Post: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested after ink sample. N.S. means not significant and * indicates $p < 0.05$ between Pre and the other types of shrimp based on Wilcoxon matched pair test.

Fig. 2. Handling times of food with or without the ink of sea hares by Japanese spiny lobsters in the ink-deterrence assay. A: Ink of *Aplysia juliana*. B: Ink of *Aplysia gigantea*. Pre: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested before ink sample, Ink sample: Freeze-dried shrimp that contained ink of sea hares, Post: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested after ink sample. Values are medians and interquartile ranges. N.S. means not significant and * indicates $p < 0.05$ between Pre and the other types of shrimp based on Wilcoxon matched pair test.

Peal) ものが7個体、顎脚で保持すらせず、まったく食べなかった (Reject) ものが1個体、Preを完食した (Eat) ものは8個体であり、Pre-Sample間に有意差が見られた。(Wilcoxon matched pair test, $P = 0.0083$, $Z = -2.63$) (Fig. 1-B). Postのコントロールはすべての個体が完食し (Eat), Pre-Post間に差はなかった。ちぎって吐き出した場合 (Bite & Peel) は、口器周辺からインクが鰓からの水流に乗って流れ出る様子が観察された。乾燥エビを食べるまでに要した時間を比較したところ、Sampleは30.5秒(中央値)かかり、Preは19.0秒でPre-Sample間に有意差が見られ (Wilcoxon matched pair test $P = 0.0070$, $Z = 2.65$) たがPre-Postのコントロール間には有意差はなかった (Wilcoxon matched pair test $P = 0.84$, $Z = 0.20$) (Fig. 2-B)。

アマクサアメフラシの皮膚抽出物を塗布した実験

Sampleを完食した (Eat) イセエビは11個体中10個

Fig. 3. Mean percentage of Japanese spiny lobsters *Panulirus japonicus* that ate the shrimp (eat), bit, peeled, and ate the shrimp (bite & peel), or rejected the shrimp (reject) in the skin extract-deterrence assay. A: Skin extract of *Aplysia juliana*. B: Skin extract of *Aplysia gigantea*. Pre: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested before skin sample, Skin sample: Freeze-dried shrimp that contained skin extract of sea hares, Post: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested after skin sample. N.S. means not significant and * indicates $p < 0.05$ between Pre and the other types of shrimp based on Wilcoxon matched pair test.

Fig. 4. Handling times of food with or without the skin extract of sea hares by Japanese spiny lobsters in the ink-deterrence assay. A: Skin extract of *Aplysia juliana*. B: Skin extract of *Aplysia gigantea*. Pre: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested before skin sample, Skin sample: Freeze-dried shrimp that contained skin extract of sea hares, Post: Freeze-dried shrimp that contained deionized water; tested after skin sample. Values are medians and interquartile ranges. N.S. means not significant and * indicates $p < 0.05$ between Pre and the other types of shrimp based on Wilcoxon matched pair test.

体、保持し部分的にちぎって吐き出しながら食べた (Bite & Peel) ものが1個体、コントロールのPreを完食した (Eat) ものは11個体であり、PreとSample間に有意差は見られなかった (Wilcoxon matched pair test $P = 1.0$, $Z = 0.00$)。またコントロールのPostを完食した (Eat) ものは11個体中9個体、顎脚で保持すらせず、まったく食べなかった (Reject) ものは2個体であり、Pre-Post間にも有意差はなかった (Wilcoxon matched pair test $P = 0.34$, $Z = 0.94$) (Fig. 3-A)。しかしながら、皮膚抽出物を塗布した乾燥エビに対しては、イセエビはコントロールを食べるときには行わなかった顎脚で餌表面をこする行動をとったため、乾燥エビを食べるのにかかる時間が長くなった。乾燥エビを食べるまでに要した時間を比較したところ、Preは37.0秒(中央値)かかり、Sampleは46.4秒でPre-

Sample 間に有意差が見られた (Wilcoxon matched pair test $P=0.032$, $Z=2.1470$)。Post の場合も 39.7 秒と長くなり、Pre-Post のコントロール間でも有意差が見られた (Wilcoxon matched pair test $P=0.0068$, $Z=2.70$) (Fig. 4-A)。

ゾウアメフラシの皮膚抽出物を塗布した実験

Sample を完食した (Eat) イセエビは 10 個体中 9 個体、保持し部分的にちぎって吐き出しながら食べた (Bite & Peel) ものが 1 個体、コントロールの Pre は 10 個体すべてが完食し (Eat)、Pre-Sample 間での反応の違いに有意差は見られなかった (Wilcoxon matched pair test $P=1.0$, $Z=-0.00$) (Fig. 3-B)。乾燥エビを食べるまでに要した時間を比較したところ Sample は 36.2 秒 (中央値) かかり、Pre は 36.4 秒でその間に有意差が見られず (Wilcoxon matched pair test $P=0.56$, $Z=0.59$)、コントロールの Pre-Post 間でも有意差は見られなかった (Wilcoxon matched pair test $P=0.23$, $Z=1.19$) (Fig. 4-B)。

考 察

インクおよび皮膚の摂食阻害効果の有無

アマクサアメフラシの白色のインク単独ではイセエビに対し摂食阻害効果を持たず、皮膚に摂食阻害効果があることが明らかとなった。一方、紫色のインクを放出するゾウアメフラシの場合は皮膚に摂食阻害効果が認められず、インクに摂食阻害効果が認められた。ほぼすべての実験で試験前後のコントロール間にイセエビの摂食行動および摂食時間の違いは見られないため、連続した試験中にイセエビの空腹度が変わり、後に与えた餌ほど食べなくなることはなかった。しかしながら、アマクサアメフラシの皮膚抽出物を与えた場合に限っては、試験後のコントロールを食べる時間が延びた。このことは、皮膚中の摂食阻害物質には、次に与えられた阻害物質を含まない餌の摂食も阻害するという長期的な作用があることを示唆している。以上のことから、アマクサアメフラシのインクには単独で摂食阻害効果を持つ物質は含まれていないが、皮膚にはイセエビの摂食を阻害する物質が含まれていると考えられる。

アメフラシ類の皮膚中の化学物質が捕食者となりうる生物の摂食を阻害する報告はいくつかあり、*Aplysia brasiliensis* の皮膚はカモメに拒否される (Ambrose III et al. 1979)。また、クロヘリアメフラシ *Aplysia parvula* の外套膜は野外実験において魚類に拒否され、その外套膜中には餌である紅藻ホソバナミノハナ *Portieria hornemannii* 由来の摂食阻害物質である apakaochtodene A と B が含まれている (Ginsburg & Paul 2001)。これらは紅藻を食べ紫色の色素を放出するアメフラシ種の例であるが、アマクサアメフラシの場合は緑藻に含まれる防御物質を取り込みそれを皮膚に貯蔵して化学防御に使用している可能性がある。Pennings (1994) は緑藻のアオサ類 *Ulva* spp. は化学防御物

質である 2 次代謝物質をあまり持たない海藻であり、それを食べるアマクサアメフラシも 2 次代謝物をあまり持たないと論じているが、アオサ類も藻類に一般的な防御物質であると考えられているジメチルスルホニオプロピオナート DMSP を含んでおり (Lyons et al. 2010)、その DMSP 等をアマクサアメフラシが防御物質として皮膚などに蓄積 (Kamio et al. 2016)、イソガニ (Pennings 1994) などの摂食行動を抑える可能性がある。

摂食試験に用いたイセエビが野外でアマクサアメフラシとゾウアメフラシを捕食しようとするかどうかは不明だが、飼育環境下では殻で守られた軟体動物であるムラサキイガイを食べることが確認されている (小池ら 2003)。よって、イセエビが小型のアメフラシに遭遇した場合は捕食行動をとることが予想され、その場合インクおよび皮膚による化学防御が捕食の速度を落とすことで逃げる確率を上げている可能性が考えられる。他種のイセエビ類の例では、カリフォルニアイセエビ *Panulirus interruptus* が同所的に生息するジャンボアメフラシを捕食することが実験室内で観察されており、この場合はオパリン腺とインク腺を切り取ったジャンボアメフラシ個体は化学防御が出来ず食べられてしまうが、分泌腺以外の場所に傷をつけたシヤムコントロールは分泌物を放出することでイセエビの化学感覚を攪乱し、捕食を逃れることが確認されている (Kicklighter et al. 2005)。

インクとオパリンによる化学防御の可能性

本研究では、アマクサアメフラシの白いインク単独ではイセエビに対する摂食阻害効果を持たないことが明らかとなったが、アマクサアメフラシの白いインクには抗菌タンパク質である julianin-S が含まれている (Kamiya et al. 1989)。julianin-S の分子量は 64 KDa とジャンボアメフラシのインクに含まれる LAAO である escapin の分子量 60 KDa と同等であることから同様の酵素活性を持つことが予想される。よって、アマクサアメフラシでも、インクとオパリンが混合したときに julianin-S がオパリン中のリシンを酸化し、過酸化水素を含む低分子化合物群が生じることで、捕食者に対する摂食阻害効果を持つ可能性がある。これを明らかにするにはオパリン中のアミノ酸組成の検証などが必要であろう。

なぜ、アマクサアメフラシは白いインクを生産するのか

アマクサアメフラシが白いインクを持つ第一の理由は、紫の色素を持たない事であり、次に白色の物質をインク内に持つことである。紫色色素を持たないのは紫色色素を合成する能力がないからではなく、紫色色素の原料を含まない緑藻や褐藻を多く食べ、紅藻を十分な量食べないからである。実際にアマクサアメフラシに紅藻を食べさせるとインク腺内に緑藻のみを食べていた時には存在しなかった紫色の顆粒が現れる (Prince & Johnson 2006)。また、紫色色素を消化

腺の細胞内で生合成する過程が組織学的に観察されている (Prince & Johnson 2013). 逆に、紫色のインクを作るアメフラシ類もフィコエリスリンを含まない緑藻や褐藻を食べ続けた場合には紫色素を作らなくなり (Bezerra et al. 2004; Chapman & Fox 1969), LAAO 様のタンパク質のみをインク腺に蓄積する (Bezerra et al. 2004).

アマクサアメフラシのインクおよびインクを貯蔵しているインク腺内の顆粒 (Prince & Johnson 2006) の白色が何の化合物に由来するのかわかり不明である. タンパク質 (LAAO の julianin-S 等) がコロイドを形成し、白色を呈する可能性も考えられるが、ジャンボアメフラシのインクから精製された LAAO の escapin 溶液および escapin を含むインク腺中の顆粒は白色ではなく、透明な琥珀色である (Johnson et al. 2006). 白色を呈するカルシウム塩を含む顆粒がビワガタナメクジ *Dolabrifera dolabrifera* のインク腺 (Prince & Johnson 2006) およびジャンボアメフラシの皮膚 (Prince et al. 2006) に存在することが顕微鏡下で認められているが、アマクサアメフラシのインクの白色がカルシウム塩によるものなのかどうかは現在のところ分からない.

アマクサアメフラシの餌の選択試験を行うと、紅藻を避け、緑藻もしくは褐藻を好んで食べ、よく成長する (Carefoot 1970; Rogers et al. 1995; 斎藤・中村 1961) ので、アマクサアメフラシは緑藻と紅藻が混ざって繁茂する場所に生息した場合は食物の大部分が緑藻となり、ほぼ純粋な白色のインクを持つことになる予想される. 紫色素を部分的に含むインク腺をもった個体が稀に野外で観察される (神尾・林原 私信) が、これらは緑藻よりも紅藻が圧倒的に多い状況で一定の期間生活した個体であろう.

系統学的には、*Aplysia* 属の四つの亜属として *Pruvotaplisia*, *Aplysia*, *Neaplysia*, *Varria* が提唱されており、アマクサアメフラシは、他の白いインクを作る 5 種と共に亜属 *Aplysia* に分類されている (Eales 1960; Medina et al. 2001). 亜属 *Pruvotaplisia* に分類されるクロヘリアメフラシは、紫色と白色のインクを同時に持つ場合がある (Prince & Johnson 2013) が、紅藻上で生育することが数多く報告されている (de Nys et al. 1996; Ginsburg & Paul 2001; Morton & Miller 1973; Paul et al. 2006; Prince & Johnson 2013; Rogers et al. 2000; Rogers et al. 2002; Rogers et al. 1995; Vergés et al. 2008; Willan 1979). クロヘリアメフラシの摂食選択試験を行うと、紅藻の *Laurencia obtusa* と緑藻の *Ulva lactuca* を好んで食べる (Rogers et al. 1995) ことから野外では緑藻も食べるが、インクを作るのに十分な量の紅藻を食べ、その結果として紫色インクを持つことが多いのであろう. 白い物質を常に持つのかどうかは不明である. *Aplysia* 属に属さない近縁種であるビワガタナメクジはインク腺中に紫色素を作る細胞によく似た細胞を持っているが、分泌物を作らない. この細胞の機能は不完全であり、その細胞内に紅藻の紅色体 (rhodoplast) を取り込むが、紅色体から取り出したフィコエリスリンタンパク質から紫色素部分を切り

出すことが出来ず、紫色素を作れない (Prince & Johnson 2013). このビワガタナメクジおよび *Aplysia* 属の各亜属を代表する種が紫色素を合成する細胞を持つことから、紫インクを合成する能力はこれらの生物の祖先形質であると考えられる (Prince & Johnson 2013). アマクサアメフラシが褐藻と緑藻を多く食べて紅藻をほとんど食べなくなり、白いインクを持つようになった過程には、皮膚の化学防御や、隠れる、泳ぐなどの紫色素の代わりとなる防御戦略の獲得があったと考えられる. この考察を進めるためには、アマクサアメフラシと他の紫のインクを放出するアメフラシ間での生息環境及び、それぞれのアメフラシ類の生息地における捕食回避行動の比較研究等が必要であろう.

以上のように、緑藻を主に食べるアマクサアメフラシは紫色素を持たず、その白いインク単独ではイセエビに対する摂食阻害活性をもたないが、皮膚に摂食を減速させる効果を持つ化合物を含む. この機構が実際にアマクサアメフラシの生存に役立っているかどうかは、アメフラシ類を捕食する可能性が高い魚などをを用いた室内および野外実験により検証する必要がある. またジャンボアメフラシで明らかにされた分泌物による疑似食物効果、物理的な化学感覚の阻害、警報などの摂食阻害以外の防御機構もアマクサアメフラシが持っている可能性があり、それぞれ検証する必要がある.

謝辞: 本研究を進めるにあたって東京海洋大学の永井宏史博士および土屋光太郎博士には多大な助言とご協力をいただきました. 米国の Georgia State University の Charles Derby 博士には英文校閲と助言をしていただきました. University of Miami の Jeffrey Prince 博士および Paul M. Johnson 博士には分泌腺についての情報を提供していただきました. 首都大学東京の黒川信博士にはアメフラシ類の同定においてご協力いただきました. また、アメフラシ類の捕獲と飼育にご協力をいただいた東京海洋大学館山ステーションの職員及び学生の方々にお礼を申し上げます. 本研究はミキモト海洋生態研究助成基金から林原への助成を受けて行われました.

引用文献

- Aggio, J. F. and C. D. Derby 2008. Hydrogen peroxide and other components in the ink of sea hares are chemical defenses against predatory spiny lobsters acting through non-antennular chemoreceptors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 363: 28–34.
- Ambrose III, H., R. Givens, R. Chen and K. Ambrose 1979. Distastefulness as a defense mechanism in *Aplysia brasiliana* (Mollusca: Gastropoda). *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 6: 57–64.
- Bezerra, L. E. A., A. F. U. Carvalho, L. A. Barreira, V. L. R. Nogueira, J. R. F. Silva, I. Vasconcelos and V. M. M. Melo 2004. The relationship between seaweed diet and purple ink production in *Aplysia dactylomela* Rang, 1828 (Gastropoda: Opisthobranchia) from Northeastern Brazil. *Journal of Shellfish Research*, 23: 581–584.
- Carefoot, T. H. 1970. A comparison of absorption and utilization of food energy in two species of tropical *Aplysia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 5: 47–62.
- Carefoot, T. H. 1987. *Aplysia*: Its biology and ecology. *Oceanogra-*

- phy and Marine Biology: An Annual Review, 25: 167–284.
- Chapman, D. J. and D. L. Fox 1969. Bile pigment metabolism in the sea hare *Aplysia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 4: 71–78.
- de Nys, R., P. D. Steinberg, C. N. Rogers, T. S. Charlton and M. W. Duncan 1996. Quantitative variation of secondary metabolites in the sea hare *Aplysia parvula* and its host plant, *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series*, 130: 135–146.
- Eales, N. B. 1960. Revision of the world species of *Aplysia* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Bulletin of British Museum (Natural History) Zoology*, 5: 266–404.
- 藤田大介 1990. 富山県氷見市で起こったアマクサアメフラシによる養殖ワカメの食害. ちりばたん, 21: 14–16.
- Ginsburg, D. W. and V. J. Paul 2001. Chemical defenses in the sea hare *Aplysia parvula*: importance of diet and sequestration of algal secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series*, 215: 261–274.
- Johnson, P. M., C. E. Kicklighter, M. Schmidt, M. Kamio, H. C. Yang, D. Elkin, W. C. Michel, P. C. Tai and C. D. Derby 2006. Packaging of chemicals in the defensive secretory glands of the sea hare *Aplysia californica*. *Journal of Experimental Biology*, 209: 78–88.
- Johnson, P. M. and A. O. D. Willows 1999. Defense in sea hares (Gastropoda, Opisthobranchia, Anaspidea): Multiple layers of protection from egg to adult. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 32: 147–180.
- 神尾道也 2012. アメフラシ類の化学防御: 捕食者と同種個体の化学感覚に働く複数の化学物質. 比較生理化学, 29: 12–18.
- Kamio, M., M. Koyama, N. Hayashihara, K. Hiei, H. Uchida, R. Watanabe, T. Suzuki and H. Nagai 2016. Sequestration of dimethylsulfoxide (DMSO) and acrylate from the green alga *Ulva* Spp. by the sea hare *Aplysia juliana*. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 452–460.
- Kamio, M., T. V. Grimes, M. H. Hutchins, R. van Dam and C. D. Derby 2010a. The purple pigment aplysiocyanin in sea hare ink deters predatory blue crabs through their chemical senses. *Animal Behaviour*, 80: 89–100.
- Kamio, M., C. E. Kicklighter, L. Nguyen, M. W. Germann and C. D. Derby 2011. Isolation and structural elucidation of novel mycosporine-like amino acids as alarm cues in the defensive ink secretion of the sea hare *Aplysia californica*. *Helvetica Chimica Acta*, 94: 1012–1018.
- Kamio, M., L. Nguyen, S. Yaldiz and C. D. Derby 2010b. How to produce a chemical defense: structural elucidation and anatomical distribution of aplysiocyanin and phycoerythrobilin in the sea hare *Aplysia californica*. *Chemistry & Biodiversity*, 7: 1183–1197.
- Kamiya, H., K. Muramoto, R. Goto, M. Sakai, Y. Endo and M. Yamazaki 1989. Purification and characterization of an antibacterial and antineoplastic protein secretion of a sea hare, *Aplysia juliana*. *Toxicon*, 27: 1269–1277.
- Kicklighter, C. E. and C. D. Derby 2006. Multiple components in ink of the sea hare *Aplysia californica* are aversive to the sea anemone *Anthopleura sola*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 334: 256–268.
- Kicklighter, C. E., M. Germann, M. Kamio and C. D. Derby 2007. Molecular identification of alarm cues in the defensive secretions of the sea hare *Aplysia californica*. *Animal Behaviour*, 74: 1481–1492.
- Kicklighter, C. E., M. Kamio, N. Linh, M. W. Germann and C. D. Derby 2011. Mycosporine-like amino acids are multifunctional molecules in sea hares and their marine community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 11494–11499.
- Kicklighter, C. E., S. Shabani, P. M. Johnson and C. D. Derby 2005. Sea hares use novel antipredatory chemical defenses. *Current Biology*, 15: 549–554.
- 小池 隆・山崎博貴・内田 誠 2003. イセエビの摂餌活動の周年変化. 日本水産学会誌, 69: 568–574.
- Love-Chezem, T., J. F. Aggio and C. D. Derby 2013. Defense through sensory inactivation: sea hare ink reduces sensory and motor responses of spiny lobsters to food odors. *Journal of Experimental Biology*, 216: 1364–1372.
- Lyons, D. A., R. E. Scheibling and K. L. Van Alstyne 2010. Spatial and temporal variation in DMSP content in the invasive seaweed *Codium fragile* ssp. *fragile*: effects of temperature, light and grazing. *Marine Ecology Progress Series*, 417: 51–61.
- Marcus, E. and E. Marcus 1955. Sea-hares and side-gilled slugs from Brazil. *Boletim do Instituto Oceanografico*, 6: 03–49.
- Medina, M., T. M. Collins and P. J. Walsh 2001. mtDNA ribosomal gene phylogeny of sea hares in the genus *Aplysia* (Gastropoda, Opisthobranchia, Anaspidea): implications for comparative neurobiology. *Systematic Biology*, 50: 676–688.
- Morton, J. E. and M. C. Miller 1973. *The New Zealand Sea Shore*. Collins.
- Nusbaum, M. and C. D. Derby 2010a. Effects of sea hare ink secretion and its escapist-generated components on a variety of predatory fishes. *Biological Bulletin*, 218: 282–292.
- Nusbaum, M. and C. D. Derby 2010b. Ink secretion protects sea hares by acting on the olfactory and nonolfactory chemical senses of a predatory fish. *Animal Behaviour*, 79: 1067–1076.
- Paul, N. A., R. de Nys and P. D. Steinberg 2006. Seaweed-herbivore interactions at a small scale: direct tests of feeding deterrence by filamentous algae. *Marine Ecology Progress Series*, 323: 1–9.
- Pennings, S. C. 1994. Interspecific variation in chemical defenses in the sea hares (Opisthobranchia, Anaspidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 180: 203–219.
- Prince, J. S. and P. M. Johnson 2006. Ultrastructural comparison of *Aplysia* and *Dolabrifera* ink glands suggests cellular sites of anti-predator protein production and algal pigment processing. *Journal of Molluscan Studies*, 72: 349–357.
- Prince, J. S. and P. M. Johnson 2013. Role of the digestive gland in ink production in four species of sea hares: an ultrastructural comparison. *Journal of Marine Biology*, 2013.
- Prince, J. S., M. J. Lynn and P. L. Blackwelder 2006. White vesicles in the skin of *Aplysia californica* Cooper: a proposed excretory function. *Journal of Molluscan Studies*, 72: 405–412.
- Rogers, C. N., R. de Nys, T. S. Charlton and P. D. Steinberg 2000. Dynamics of algal secondary metabolites in two species of sea hare. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 721–744.
- Rogers, C. N., R. de Nys and P. D. Steinberg 2002. Effects of algal diet on the performance and susceptibility to predation of the sea hare *Aplysia parvula*. *Marine Ecology Progress Series*, 236: 241–254.
- Rogers, C. N., P. D. Steinberg and R. de Nys 1995. Factors associated with oligophagy in two species of sea hares (Mollusca: Anaspidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192: 47–73.
- 斎藤雄之助・中村中六 1961. ワカメの害敵としてのアメフラシの生態に関する研究-I. 日本水産学会誌, 27: 395–400.
- Vergés, A., N. A. Paul and P. D. Steinberg 2008. Sex and life-history stage alter herbivore responses to a chemically defended red alga. *Ecology*, 89: 1334–1343.
- Willan, R. C. (1979). *The ecology of two New Zealand opisthobranch molluscs*. University of Auckland.