〔農化 第 52 卷, 第 10 号, R139~R149, 1978〕

昆虫のフェロモンに関する研究†

(昭和 53 年度農芸化学奨励賞受賞)

桑 原 保 正

(筑波大学応用生物化学系)

は じ め に

1959 年に Butenandt らがカイコガ *Bombyx mori* L. 処女雌の腹部末端から雄を性的に興奮させる物質 sexual lockstoff として (E, Z)-10, 12-hexadecadienol を単離同定した⁽¹⁾。そしてこのような“生物が体外に分泌し, 同種他個体に特定の行動や発育過程などの特異な反応をひきおこす物質をフェロモン (pheromone) と命名した⁽²⁾。このフェロモンのうち特に性フェロモンは超微量で雄を興奮させ, 別の種には全く無効であるという種特異性のために, 生物学者や化学者の注目を引くこととなり, 既存合成農業に替わる新しい防除手段と期待され, 機器分析手段の発達とともに過去 20 年間に飛躍的に発展してきた。そして生物学とりわけ生態学と天然物有機化学の新しい学際分野, 生態生化学を誕生させた。フェロモンはその機能から性フェロモン, 警報フェロモン, 集合フェロモン, 道しるべフェロモン, 階級分化フェロモン等に分類できる。フェロモン全般に関してはすぐれた成書⁽³⁾があるので, ここでは筆者らの研究を中心に, 主として貯蔵食品害虫のフェロモン類一性フェロモンと警報フェロモンについて概説したい。Table I に, 現在までに明らかになっている食品害虫のフェロモンをあげておいた。

マダラメイガ類の性フェロモン

メイガ科マダラメイガ亜科に属するスジマダラメイガ

the almond moth, *cadra cautella* walker (以下 C.C と略), ノシメマダラメイガ the Indian meal moth, *plodia interpunctella* Hübner (以下 P.I と略), スジコナマダラメイガ the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuhniella* Zeller (以下 A.K と略) の 3 種の蛾は体長 1cm 内外の貯穀害虫で, 米糠を飼料に容易に飼育できる。わが国はもちろん広く温帯地方に 2 種または 3 種が分布し, 混棲できる同所種 (sympatric pest) である⁽²³⁾。これらの雌は性フェロモンを発散し, しかも種特異性がないことが R. Barth⁽²⁴⁾により指摘されている。追試の結果, 3 種の蛾に種特異性がないことを確認した。このことは, どの雌もフェロモンとして同じ物質を分泌するのか, あるいは相互に異なった化合物を分泌しているにもかかわらず, どの雄も同様に感應するのか, いずれかの場合が考えられる。そこで 3 種の性フェロモンを単離し, 種特異性の生物的化学的解明を試みた。

まず C.C を用いて, 生物試験法を定め, フェロモン含量の変動を追跡した。性フェロモンは羽化直後から 3 時間後まで増加し, 以後死ぬまで処女雌では同一レベルを保つ。交尾をすれば 4~5 時間後から急激に減少し, 1 日後には消失する⁽²⁵⁾。

フェロモンの単離を行なう前に, いわゆる官能基試験が性フェロモン研究に有効に利用できる。粗フェロモン抽出物に種々の定性反応を施し, 雄蛾で生物試験する。反応処理により活性が消失すれば当該官能基があると推定され, 次に逆反応を施して活性の回復を見ればより確実となる⁽²⁶⁾。3 種の蛾の粗抽出物はこの試験で同一の挙動を示し, 炭素-炭素二重結合を持つアルコールの酢酸エステルと推定された。また粗抽出物をガスクロマトグラフ分析 (以下 Glc と略) し, 検知器として雄蛾を用いるいわゆる生物検知器⁽²⁷⁾を利用すると, フェロモンの保

† Study of Insect Pheromones, Focused on Stored Product Pests.

Yasumasa KUWAHARA (Institute of Applied Biochemistry, The University of Tsukuba, Ibaraki-ken 300-31)

Table I. Pheromones on Stored Product Insects

Male sex pheromone				
Bruchidae				
<i>Acanthoscelides obtectus</i>	Methyl (-)-(E), (E), (E)-2, 4, 5-Tetradeca-trienoate			(4)
Galleriidae				
<i>Achroia grisella</i>	Undecanal	(Z)-11-Octadecenal		(7)
<i>Galleria mellonella</i>	Undecanal	Nonanal		(5, 6)
Female sex pheromone				
Anobiidae				
<i>Stegobium paniceum</i>	2,3-Dihydro-2,3,5-trimethyl-6-(1-methyl-2-oxobutyl)-4H-pyran-4-one			(8)
Dermestidae				
<i>Anthrenus flavipes</i>	(Z)-3-Decenoic acid			(9)
<i>Attagenus megatoma</i>	(E), (Z)-3, 5-Tetradecadienoic acid			(10)
<i>Trogoderma glabrum</i>	(E)-14-Methyl-8-hexadecenal			(11)
<i>granarium</i>	(Z)-14-Methyl-8-hexadecenal			(11)
	(E)-14-Methyl-8-hexadecenal			
<i>inclusum</i>	(Z)-14-Methyl-8-hexadecenal			(11)
<i>variabile</i>	(Z)-14-Methyl-8-hexadecenal			(11)
Tenebrionidae				
<i>Tribolium confusum</i>	1-Pentadecene	Hexadecane	1-Heptadecene	(12)
Gelechiidae				
<i>Sitotroga cerealella</i>	(Z), (E)-7, 11-Hexadecadien-1-ol acetate			(13)
Pyralidae				
<i>Anagasta kuehniella</i>	(Z), (E)-9, 12-Tetradecadien-1-ol acetate			(14)
<i>Cadra cautella</i>	(Z), (E)-9, 12-Tetradecadien-1-ol acetate			(15, 16)
	(Z)-9-Tetradecen-1-ol acetate			(17)
<i>Cadra figuliella</i>	(Z), (E)-9, 12-Tetradecadien-1-ol acetate			(18)
<i>Ephestia elutella</i>	(Z), (E)-9, 12-Tetradecadien-1-ol acetate			(19)
<i>Plodia interpunctella</i>	(Z), (E)-9, 12-Tetradecadien-1-ol acetate			(15, 16)
	(Z), (E)-9, 12-Tetradecadien-1-ol			(20)
Alarm pheromone of grain mites				
Acaridae				
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	3, 7-Dimethyl-(Z)-2, 6-octadien-1-ol formate			(21)
<i>Carpoglyphus lactis</i>	3, 7-Dimethyl-(E)-2, 6-octadienal			(22)
	3, 7-Dimethyl-(Z)-2, 6-octadienal			
<i>Lardoglyphus kono</i>	3, 7-Dimethyl-(E)-2, 6-octadienal			(22)
	3, 7-Dimethyl-(Z)-2, 6-octadienal			

	Female moths (1, 200, 000)	
Insoluble matters	—extracted with methylene chloride	
	—evaporated	
	Active oil (1800 g)	Activity ; 10^{-3} mg/ml
Insoluble matters	—extracted with methanol at -20°C (6l $\times$ 5)	
	—evaporated	
	Active oil (313 g)	Activity ; 10^3 - 10^{-4} mg/ml
	—chromatographed four times on silica gel column	
	Active oil (25mg)	Activity ; 10^{-8} mg/ml
	—chromatographed on silica gel-15% silver nitrate column	
	Pure sex pheromone (6.1 mg)	Activity ; 10^{-9} mg/ml

Fig. 1. Isolation of the Sex Pheromone of the Almond Moth.

持時間を知ることができる。3種をこの方法で調べると、3種共に同一化合物で、直鎖状化合物とすれば炭素数 14 のアルコールアセテートで二重結合が 2 個以上存在すると推定できた⁽²⁸⁾。

大量飼育して集めた C. C 処女雌 120 万頭を塩化メチレンで抽出し、性フェロモンの単離を行なった。過程の概略を Fig. 1 に示す。中性脂質をメタノール不溶部として除き、カラムクロマトグラフィーを繰り返し、単一物質として性フェロモン 6.1 mg を得た。各精製過程ごとに生物試験で活性部の行方をモニターし、活性を Fig. 1 に付記した。

構造決定の概略を Fig. 2 に示す。高分解能質量分析により分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_2$; すなわち不飽和度 2 の炭素数 14 アルコールの酢酸エステルと結論した。接触還元生成物が酢酸ミリスチルを与えたことから、直鎖状化合物と判

Fig. 2. Identification of the Sex Pheromone of the Almond Moth.

明した。核磁気共鳴吸収スペクトル(以下 PMR と略)の解析により分子の両端がアリル性メチル基と -OAc 基であり, その他に 2 個の二重結合とその間に挟まれたメチレン基の存在が判明し, 直鎖状化合物であることから, 9,12-tetradecadienyl acetate と結論された。さらにオゾン分解生物の 1 成分を ω -acetoxynonanal と同定

Route 1

Fig. 3. Synthetic Routes of Sex Pheromone and Its Geometric Isomers.

Route 2

Route 3

Route 4

Route 5

Table II. Phomonal Activity of Geometric Isomers by Glass-rod Method

	Isomer of 9,12-tetradecadienyl acetate			
	cis-cis	cis-trans	trans-cis	trans-trans
<i>C. cautella</i>	10 ⁻⁹	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹	10 ⁰
<i>P. interpunctella</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹	10 ⁻²
<i>A. kuehniella</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁴	10 ⁻²
<i>E. elutella</i>	10 ⁻⁵	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁴	—

Unit ; mg per ml.

(Glc, 質量分析) できたことから確認された。赤外線吸収スペクトル (以下 IR と略) から二重結合の幾何構造の少なくとも 1 個は *E* (970 cm⁻¹) と考えたが, 結果的には可能な 4 異性体をすべて Fig. 3 に示す方法で合成し, 天然化合物と比較して決定した。天然化合物は PMR, IR, および Goley カラム (Ucon oil LB 550 X) による Glc と生物活性より, (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate と同定した⁽¹⁵⁾。

一方大量飼育した P.I と A.K では, 雌雄を分けることなく抽出し, 雌 335,000 頭, 285,000 頭相当より同様の方法で, 性フェロモン 0.5 mg と 0.8 mg を単離した。

Glc (Goley カラム) およびオゾン分解の結果, C.C と同一化合物と決定した^(14,15)。

合成 4 異性体を生物試験した (Table II)。種により異性体の力価が異なるが, (Z,E)-9,12-異性体が 4 種に共通して最大の活性を示した。単離した性フェロモンを各種の雄で試験すると, 各種共に合成物と同様の活性を示した。したがって C.C, A.K, P.I の 3 種は, 同じ化合物を性フェロモンとしていると判明した⁽²⁹⁾。マダラメイガ類には述べてきた 3 種以外に, 貯穀害虫としてチャマダラメイガ, the tobacco moth, *Ephestia elutella* と *Cadra figulilella* があり, 共に性フェロモンが (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate と同定されている^(18,19)。

さて同一化合物を性フェロモンとして共有し, しかも混棲できる, すなわち同所種であるこれらのマダラメイガ類がどうして正しく同種の異性とめぐり合うか, 換言すれば生殖隔離機構の解明が必要となる。これには第 2 物質によるとする考えと, 生物的なメカニズムによるとする考えがある。前者の考えにより, C.C. からは (Z)-9-tetradecenyl acetate が第 2 成分として単離され⁽¹⁷⁾,

Fig. 4. Diurnal Rhythm of Emergence of Phycitid Moths.

Fig. 5. Diurnal Rhythm of Calling Pose Exhibited by Unmated Females. ↓; dark-shock by the temporary stoppage of electric current.

Fig. 6. Onset of Calling Behavior of Phycitid Moths after Their Emergence under Light and Dark Condition. Moth emerged in the shaded period. Solid line indicates the time-group at which the largest numbers of moths emerge.

P.I からは多量の (Z,E)-9,12-tetradecadienol の存在が指摘された⁽²⁰⁾. このアルコールは, C.C と A.K にも微量存在する⁽³⁰⁾. 後者の生物学的な解決を目論み, まず生態的な観察をした. 4 種の羽化時刻は Fig. 4 に示すように, 明期の羽化種 (P.I と E.E) と暗期の羽化種 (C.C と A.K) がある. 雌の求愛行動である性フェロモン発散のための独特の姿勢を calling pose と呼び, その行動を calling という. この calling の時間帯に雄の行動が活発化し, したがって交尾時間帯と考えられている⁽³¹⁾. そこで処女雌の calling の時間帯を調べた. Fig. 5 に示すように日周性を示し, A.K は明期に, P.I と C.C は暗期に calling を行なう. さらに詳しく羽化時刻との関連で見た場合を Fig. 6 に示す. A.K は羽化後, 少なくとも 2 時間以上の暗期が必要である. 明期羽化の

P.I は暗期開始 1 時間以内に calling を開始する. 暗期開始後 1 時間以内に大部分が羽化する C.C では, 暗期開始後 2 時間以上が必要である. 別に E.E では明期に羽化し, 約 100 分後には 50% の雌が calling を始めることを観察している. 結果としてマダラメイガ類 4 種では calling の時間帯が異なり, したがって交尾の時間帯も異なると推定した^(32,33).

配偶行動を観察すると, E.E を含めた 4 種で 2 様式に分類できる⁽³²⁾. 一方は雄の前翅に wing gland と称する分泌腺を持つ E.E, P.I, C.C が含まれ, wing gland を開いて後方より接近する雄を迎えるように雌が 180° 反転し, 対面する型である. 他方はスジコナマダラメイガの場合に見られ, 雄に wing gland がなく, 終始雄主導型で交尾が完了する. 前者の場合, wing gland を切除すると交尾の成功率が下がる⁽³⁴⁾ことが知られており, 化学物質の関与も考えられるが, 同種認識の手段と示唆できる結果は得られていない.

マダラメイガ類 3 種の交尾継続時間は P.I 平均約 60 分, C.C および A.K では平均約 100 分と観察した. 一方 C.C, A.K, P.I の異種雌雄間の組合せのうち, 全く異種間での交尾の成立しない P.I 雌と A.K 雄の組合せを除く, 5 種類の種間交尾の継続時間は最長 14 分, 24 例平均 3 分以内と短時間に終り, その産下卵はふ化しない. 異種間交尾した雌を後で同種の雄と置くと, 交尾して正常卵を産下する. したがって交雑は起らない⁽³²⁾.

性フェロモンの定量には従来生物試験法が利用されて

Fig. 7. Trichloroacetylation Procedure for Simultaneous Determination of Alcohol and Acetate Pheromone by ECD-GLC. Pentadecanol was added for internal standard.

Fig. 8. Quantities of Pheromone Present at the 8th and 9th Abdominal Segments of Virgin Female Almond Moth during 8 days Period after Emergence.

Fig. 9. Change of Pheromone Content within 24 hr Period from 2 Days to 3 Days after Emergence.

いる。高感度であるが精度が悪く、生物相手のために手数がかかる欠点がある。一般に性フェロモンが不飽和脂肪族アルコールの誘導体であることと、Glc法のECD（電子捕獲型検知器）が適当な化学種についてきわめて高い検出感度を示す事実に着目して、性フェロモンの微量定量法を考案した。マダラメイガ類性フェロモンの粗抽出物をアルカリ加水分解後、改めてトリクロロ酢酸エステルに誘導してECD-Glc法で定量する方法である⁽³⁰⁾。試料の調製法をFig.7に示す。内部標準物質としてペンタデカノールを利用した。1ng~100ngの範囲を高い精度で定量可能であり、雌蛾1頭で定量できる。この方法により、C.C未交尾雌の羽化後の含量変化をみた結果をFig.8に示す⁽³⁵⁾。性フェロモンは羽化直後から増加し始め、3日目の暗期に最大値に達する。明期に少なく、暗期に多い日周期性を認めた。最も大きな変動を示す48~

72時間目の24時間を2時間ごとに詳しく調べた結果（Fig.9）、暗期に二山型の増大期があり、明期に一時全く消失する時間があるといった複雑なプロファイルを示した。P.Iも明期に少なく（20~30ng）、暗期に多く（60~80ng）、C.Cと同様の日周変化を示した⁽³⁶⁾。SowerらはP.Iの分泌腺を溶媒で洗い、その洗液中のフェロモンを直接Glc分泌することにより、定量を試み、暗期に4ng/hr/雌、明期に2ng/hr/雌と推定し、1日約50ngを分泌すると推定した⁽³⁷⁾。

ジンサンシバンムシの性フェロモン

ジンサンシバンムシ *Stegobium paniceum* L. は体長2~3mmの甲虫で、鞘翅目シバンムシ科に属する昆虫である。主として乾燥植物質を加害し、特に生薬等を加害するために the drugstore beetle, 俗にクスリヤ泣カセと称され、世界的に分布する。この虫の性フェロモンの存在が指摘されている⁽³⁸⁾。ラッテ・マウス飼育用固型飼料を用いて大量飼育した虫を、塩化メチレンに浸漬して性フェロモン粗抽出物を得た。この抽出物は雄の特異な配偶行動を指標とする生物試験法で 10^{-2} μ g (10^{-5} 雌等量)で活性があった。生物試験をモニターとして、Fig.10に示す方法で常法により単離した。精製できた化合物は無色柱状結晶 mp 52.5~53.5°C となった。性フェロモンの収量は雌1頭あたり200ng前後と計算され、平均個体重2.1mgから得られる量としては多い⁽³⁹⁾。

フェロモンの質量分析は分子イオン M^+ ; m/e 224.1413を与え、分子式 $C_{13}H_{20}O_3$ と決定した。 M^+-56 として m/e 168.1117 ($C_{10}H_{16}O_2$) および基準ピークとして m/e 57 が観察されることから、分子中にエチルケトン基の存在が推定された。不飽和度は4と計算される。IR測定より $1600\sim 1700\text{cm}^{-1}$ に特徴的な3本の強い吸収を認

Drugstore beetles (214,000 ♀ eq.)
 |
 Methylene chloride extractives, 82.5g
 |
 Methanol soluble fraction, 10.5g
 |
 —Silicic acid column
 150g, Bz : EtOAc, stepwisely
 10g, Chloroform
 10g, Bz : EtOAc (90 : 10)
 |
 Active fraction, 56mg
 |
 —Recrystallization
 from hexane
 |
 Pure pheromone, prism, 35.2mg
 mp 52.5~53.5°C

Fig. 10. Isolation of the Sex Pheromone of the Drugstore Beetle.

Fig. 11. PMR Spectrum of the Sex Pheromone of the Drugstore Beetle in CDCl_3 , 90 MHz.

Fig. 12. Partial Structures Supposed from Physico-chemical Data.

め, うち 1615cm^{-1} は炭素-炭素二重結合, 1673cm^{-1} および 1730cm^{-1} はカルボニル基 2 個と推定した。したがって不飽和度 4 個のうち 3 個が説明できる。炭素-炭素二重結合 (1615cm^{-1}) はその強度が異常に強いため, カルボニル基 (1673cm^{-1}) と共役していると判断した。

^{13}C -NMR スペクトルより分子中の全炭素数は 13 個と測定でき, 化学シフトおよび off-resonance の結果より, 各シグナルはメチル基 5 個 (7.947 ppm, 9.403 ppm, 9.403 ppm, 12.862 ppm, 15.713 ppm), メチレン基 (33.915 ppm), メチン基 (43.804 ppm, 49.264 ppm), 酸素原子と結合したメチン基 (77.112 ppm), 二重結合炭素 (109.511 ppm, 168.908 ppm), カルボニル炭素 (196.938 ppm, 207.434 ppm) と決定した。したがって二重結合 1 個, カルボニル基 2 個以外の不飽和度を説明できる官能基はなく, 残る 1 個は必然的に環の存在となる。IR で水酸基の

吸収がなく, ために残る 1 個はエーテルまたはエステルと考えた。PMR を Fig. 11 に示す。メチル基が 4 個, δ 1.01 doublet, δ 1.03 triplet, δ 1.27 doublet, δ 1.28 doublet, アリル性メチン基 δ 1.76 singlet, 結果的にはメチレン基 δ 2.42 quartet とメチン基 δ 2.37 double-quartet からなる multiplet, メチン基 δ 3.62 quartet と δ 4.44 double-quartet, 計 20 個の水素が確認できた。デカップリングおよびシフト試薬を用いた測定等の結果を合わせて Fig. 12 の部分構造 (I ~ V) を推定した。UV スペクトル ($\lambda_{\text{max}}^{95\% \text{EtOH}}$ 272 nm, ϵ ; 8400, $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 266 nm, ϵ ; 8600) は IR で

推定した発色団 en-one だけでは説明できず, さらにアルコキシ基の置換を考え, 部分構造 V または VI (Fig. 12) を推定した。この場合計算値とよく一致する。

PMR, UV, その他の結果を満足する部分構造を組み合わせると, Fig. 13 に示す推定構造 (VII ~ XII) がある。二重結合に着目してオゾン分解すると, 単一生成物を与えたことから, 二重結合は環内に存在すると判断した。分解生成物の IR より α -ジケトン 1722cm^{-1} , ケトン 1707cm^{-1} , エステル 1735cm^{-1} の存在および UV の塩基性シフトより β -ケト酸を推定した。分解生成物は o-phenylene diamine との反応により, 単一成分キノキサリン誘導体を与えた。その質量分析は Fig. 14 に示すスペクトルを与え, つづいて高分解能質量分析で, その構成化学種をすべて同定し, オゾン分解生成物の構造を 2-メチル-3-オキソ-吉草酸 1,2-ジメチル-3,4-ジオキソペンチルと一義的に結論した。4 個のカルボニル基のう

Fig. 13. Possible Gross Molecular Structures from Physico-chemical Data.

Fig. 14. 75 eV Mass Spectrum of the Quinoxaline Derivative of the Ozonolysis Product.

ち2個を炭素-炭素二重結合として分解前の構造を再構築すると、UV および PMR を満足する構造はⅪのみである。以上の結果より、ジンサンシバンムシの性フェロモンの構造は 2,3-dihydro-2,3,5-trimethyl-6-(1-methyl-2-oxobutyl)-4H-pyran-4-one (Ⅺ) と結論できた⁽⁶⁾。分子中の3個の不整炭素の絶対構造については今後の研究に待たねばならない。PMR のカップリング常数から判断すると、ジヒドロピラノン環上の2個の隣接メチル置換メチン基 δ 2.37, δ 4.44 のそれは 3.4 Hz であり, *trans*-および *cis*-2,3-dimethyl chromanone 類の場合⁽⁴⁰⁾を根拠とすれば, シスと考えられる。

コナダニ類の警報フェロモン

社会性昆虫の警報フェロモンは従来よく知られているが、近年幼虫および成虫が集合性を示す準社会性昆虫⁽⁴¹⁾や海で固着生活を営むイソギンチャク⁽⁴²⁾でその存在を認められるようになった。一方同じ節足動物門で、昆虫綱とは親戚関係にある蜘蛛形綱の動物について、そのフェロモン類の研究は少ない。マダニ類とハダニ類の性フェロモンの同定^(43,44)およびマダニの集合物質⁽⁴⁵⁾の存在が指摘されているにすぎない。筆者はすでに述べたマダラメイガ類の研究中に、しばしば貯蔵食品害虫のケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*, Schrank, the cheese mite の大発生に見舞れ、警報フェロモンの存在に気付くこととなった。

ケナガコナダニは、最も普遍的に見られる乳白色で運動性の鈍い集合性のダニであり、肉眼では動く白粉としか見えない体長 0.5 mm 前後の微小動物である。このダニを潰すと特有の青臭い香りがする。集合したダニの中心部の数頭を針先等で潰すと、数分で集団が壊滅し、ダニは逃避行動を示す。同様の現象は抽出物を含ませた濾紙片で再

現できることから警報フェロモンと考え、活性物質の単離を行なった。試料を含ませた濾紙片 (5 mm×5 mm) に対する忌避作用を指標とする生物試験法でモニターしながら、ダニ虫体 (沈降容積 9 ml) をペンタンで抽出し、常法に従ってクロマトグラフ法により精製した。TLC で単一スポット (R_f 0.44, 酢酸ミリスチルの R_f 0.38) を、Glc(5% PEG-20M, 75 cm 100°C) で単一ピーク (酢酸 *n*-デシルに対する相対保持値 0.91) を与える活性物質 121 μ g (Glc 法による) を得た。

質量分析により m/e 136 (18%), 121 (17%), 93 (59%), 69 (100%), 53 (21%), 41 (100%) などの開裂イ

Fig. 15. Pheromonal Activity of Neryl Formate and Its Related Monoterpenoids.

オンピークを与えることから、鎖状モノテルペン化合物と推定した。TLC, Glc の挙動から判断して m/e 136 は分子イオンではなく、それから中性分子が脱離して生じたラジカルイオン ($C_{10}H_{20}^+$) と考えた。質量分析を満足するモノテルペノイドを集め、Glc でその t_R を比較すると、活性物質は蟻酸ネリルと同一値を与えた。さらに活性物質の生物試験、各種反応 (加水分解、接触還元、オゾン分解) の結果は、蟻酸ネリルのそれと完全に一致した。したがって、ケナガコナダニの警報フェロモンは蟻酸ネリル, 3,7-dimethyl-(Z)-2,6-octadienyl formate と同定した⁽²¹⁾。

ネロールおよびその誘導体 (ネラール, 蟻酸および酢酸エステル) と幾何異性体ゲラニオールおよびその誘導体についてフェロモン活性を調べると (Fig. 15), 活性はすべてネロールの誘導体, すなわち Z-異性体の系列に限られ, 例外的にゲラニールに弱い活性を認めた。また誘導体の酸素原子の形態はエステル, アルコール, アルデヒドと分類できるが, 活性発現の強さの順序は蟻酸エステル > アルデヒド > アルコール ≡ 酢酸エステルとなった。次にネロールから二重結合を 1 個少なくしたシトロネロールおよびその蟻酸エステル, シトロネラールの活性を調べたところ, 濃度 1000ppm ですべて活性を認めず (Fig. 15 参照), 念のため二重結合を完全に除いた 3,7-dimethyl octanol およびその誘導体も調べたが, 不活性であった。以上の結果から活性発現のためにはモノテルペン骨格で $C_2 \sim C_8$ 間の二重結合の存在が必要と推定した。そこで 6-methyl heptan-2-one と carboethoxy methylene triphenyl phosphorane の Wittig 反応後, 分離し還元して, (Z)-および (E)-3,7-dimethyl-2-octenol を, さらに蟻酸エステルを合成した。生物試験を行なうと, 予想通り Z-系列の異性体が活性を示し,

Fig. 16. Synthetic Monoterpenoid and Their Alarm Pheromone Activity.

特に蟻酸エステルが天然物の 1/10 の強い活性を示した (Fig. 16)。したがって活性発現には $C_2 \sim C_8$ 間の二重結合の幾何構造の重要性が理解できた⁽⁴⁶⁾。

ケナガコナダニより蟻酸ネリルが警報フェロモンとして分泌される状況を確認するために、驚かせの効果を検討した。驚かせたときに分泌発散される香り物質を porapak Q カラムに捕集し⁽⁴⁷⁾, ペンタンで溶出し, 静置時のそれと Glc で比較する方法である。驚かせの方法として 1 時間振とうして刺激した。驚かせた場合に実験例 5 回平均 102 倍多くの蟻酸ネリルの分泌を認めた⁽⁴⁸⁾。

フェロモン類のうち警報フェロモンは最も種特異性がなく, 多種の同族または同科のアリが同一化合物にフェロモン活性を示すことが知られている。分類学的に近縁の 4 種のコナダニ類を用いて, ケナガコナダニ (以下 TP と略) に対するフェロモン活性を調べた。ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* (AO と略), コノホシカダニ *Lardoglyphus konoi* (LK と略), サトウダニ *Carpoglyphus lactis* (CL と略) およびコナヒョウダニ *Dermatophagoides farinae* (DF と略) であり, 分類学的には順に TP との親戚関係は亜科内, 亜科間, 科間, 団間と遠くなる。各ダニ虫体 5~7 ml をヘキササン抽出 (約 1 ml) し, Glc および生物試験した。その結果, TP に対して AO 以外の 4 種は警報フェロモン活性を示すにもかかわらず, 蟻酸ネリル相当ピークは TP が最も少なく, したがって他の 4 種の活性物質は別の化合物と推定された。Glc ピークの最も多いサトウダニ (5 ml) より活性物質を精製した。活性物質として最終的に 2 成分 (40%, 60%) の混合物 (105 μ g) を得, Glc-MS より両成分が同一分子イオンピーク m/e 152 と基準イオンピーク m/e 41 を与え, 結果的にネラール (40%), ゲラニール (60%) の混合物シトラールと同定した。Glc による精査 (5% PEG-20 M, 5% DEGS) の結果 TP 以外の他の 4 種にはすべてシトラールが含まれ, TP には蟻酸ネリルとともに微量のシトラールを認めた。市販シトラール (ネラール 35%, ゲラニール 65%) の活性を 5 種で比較すると LK (1 ppm) > CL $\div$ TP (100 ppm) > AO $\div$ Df (1000 ppm) の順となった。蟻酸ネリルに対する活性は LK が最も強く, LK (1 ppm) > TP (100 ppm) > CL (100~1000 ppm) > AO (1000 ppm) > Df (10,000 ppm) の順となった。

集合したダニの中心部の数匹を潰した場合, CL と LK は忌避行動を示す。また 100~200 頭の体液または抽出

液(ダニ 2g/ml)を濾紙に含ませ、生物試験すると、CL と LK のみが同種のダニ体液または抽出物に活性を示した。このことから CL と LK ではシトラールが警報フェロモンと判断した。その他のダニのシトラールの役割は目下不明である⁽²²⁾。

TP をガムクロラル液 (Faure's 液) で封入し、1 週間以上放置すると側胞腺 Latero-abdominal gland または油腺 oil gland と呼ばれる腹部後半部の左右に 1 対ある機能不明の分泌腺の着色する個体を認められる。一方蟻酸ネリルとガムクロラル液を混合すれば、蟻酸ネリル層が黄色に変化する。そこでこの分泌腺を警報フェロモンの分泌腺と推定して、その証明を試みた。TP を 1% 硝酸銀含有 3% 寒天液 (約 50°C) に封入し、固化後 28% アンモニア水少量で塩基性とし、冷暗所に 48 時間放置する。その後寒天中のダニを取り出し、検鏡すると、口器付近の飲み込みによると思われる発色以外に、側胞腺の着色を認めた。一方シトラールを分泌する 4 種のダニでは、鋭敏なアルデヒド呈色試薬、4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1, 2, 4-triazol を利用できる。硝酸銀の場合と同様に 1% 試薬 3% 寒天液で封入し、アンモニア水でアルカリ性とした後 1 夜放置した。この染色処理により 4 種共に側胞腺のみに紫色の鮮明な発色を認めた。ケナガコナダニも微量のシトラールを含むため発色できる。

以上の結果コナダニ類の警報フェロモンは無気門垂目のダニに一般的に存在し、分類の指標となっている側胞体または油腺から分泌されることを認めた⁽⁴⁸⁾。

おわりに、この分野への研究の契機を与えていただいた京都大学の中島稔教授、ご指導いただいた京都大学の当時の教授石井象二郎先生、同深海浩教授、およびご協力いただいた東京女子医科大学の松本克彦助教授、同和田芳武講師、もとウィスコンシン大学 (現ミシガン州立大) の松村文夫教授と同 W. E. Burkholder 教授、および京都大学農薬研究施設の諸氏に深謝いたします。

- (1) A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm and E. Hecker : *Z. Naturforsch.*, **B 14**, 283 (1959).
- (2) P. Karlson and A. Butenandt : *Ann. Rev. Entomol.*, **4**, 39 (1959); P. Karlson and M. Lüscher : *Nature*, **183**, 155 (1959).
- (3) 石井象二郎 : 昆虫の生理活性物質, 南江堂, 1969; 鈴木健二 : フェロモン, 三共科学選書, 1974; 湯島 健 : 昆虫のフェロモン, 東京大学出版会, 1976.

- (4) D. F. Horler : *J. Chem. Soc.*, **C 1970**, 759 (1970).
- (5) R. L. Leyrer and R. E. Monroe : *J. Insect Physiol.*, **19**, 2267 (1973).
- (6) H. Rölller, K. Biemann, J. S. Bjerke, D. W. Norgand and W. H. McShan : *Acta Entomol. Bohemoslov.*, **65**, 208 (1968).
- (7) K. H. Dahm, D. Meyer, W. E. Finn, V. Reinhold and H. Rölller : *Naturwiss.*, **58**, 265 (1971).
- (8) Y. Kuwahara, H. Fukami, R. Howard, S. Ishii, F. Matsumura and W. E. Burkholder : *Tetrahedron*, **34**, 1769 (1978).
- (9) H. Fukui, F. Matsumura, M. C. Ma and W. E. Burkholder : *Tetrahedron Lett.*, **40**, 3563 (1974).
- (10) R. M. Silverstein, J. O. Rodin, W. E. Burkholder and J. E. Gorman : *Science*, **157**, 85 (1967).
- (11) J. H. Cross, R. C. Byler, R. F. Cassidy, Jr., R. M. Silverstein, R. E. Greenblatt, W. E. Burkholder, A. R. Levinson and H. Z. Levinson : *J. Chem. Ecol.*, **2**, 457 (1976).
- (12) R. Keville and P. B. Kownowski : *J. Insect Physiol.*, **21**, 81 (1975).
- (13) K. W. Vick, H. C. F. Su, L. L. Sower, P. G. Mahany and P. C. Drummond : *Experientia*, **30**, 17 (1974).
- (14) Y. Kuwahara, H. Hara, S. Ishii and H. Fukami : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 447 (1971).
- (15) Y. Kuwahara, C. Kitamura, S. Takahashi, H. Hara, S. Ishii and H. Fukami : *Science*, **171**, 801 (1971).
- (16) U. E. Brady, J. H. Tumlinson, III, R. G. Brownlee and R. M. Silverstein : *Sicence*, **171**, 802 (1971).
- (17) U. E. Brady : *Life Sci.*, **13**, 227 (1973).
- (18) U. E. Brady and R. C. Daley : *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **65**, 1356 (1972).
- (19) U. E. Brady and D. A. Nordland : *Life Sci.*, **10**, 797 (1971).
- (20) L. L. Sower, K. W. Vick and J. H. Tumlinson : *Environ. Entomol.*, **3**, 120 (1974).
- (21) Y. Kuwahara, S. Ishii and H. Fukami : *Experientia*, **31**, 1115 (1975).
- (22) 桑原保正, 深海 浩, 石井象二郎, 和田芳武, 松本克彦 : 昭和 51 年度日本農芸化学会西日本支部・関西支部合同大会講演要旨集, 高知, 1976, p. 41.
- (23) R. M. M. Traynier : *Can. Entomol.*, **102**, 534 (1970).
- (24) R. Barth : *Zool. Jb. (Abtlg. allg. Zool und Physiol. Tiere)*, **58**, 297 (1937).
- (25) 桑原保正, 北村実彬, 高橋史樹, 深海 浩 : 防虫科学, **33**, 158 (1968).
- (26) I. Tomida and S. Ishii : *Appl. Entomol. Zool.*, **3**, 103 (1968).

- (27) E. Bayer : *J. Gas Chromatogr.*, **4**, 67 (1966).
(28) T. K. Miwa, K. L. Mikalajczak, F. R. Farle and I. A. Wolf : *Anal. Chem.*, **32**, 1739 (1960).
(29) 桑原保正, 原 英俊, 石井象二郎, 深海 浩 : 昭和 46 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1971, p. 346.
(30) Y. Kuwahara and J. E. Casida : *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 681 (1973).
(31) L. L. Sower, H. H. Shorey and L. K. Gaston : *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **63**, 1090 (1970).
(32) 桑原保正, 榊井昭夫, 徳永 修, 高橋史樹, 石井象二郎, 深海 浩, 昭和 46 年度日本応用動物昆虫学会大会講演要旨, p. 6.
(33) F. Takahashi : *Memoirs of the College of Agriculture, Kyoto University*, No. 104, 1973, p. 13.
(34) G. G. Grant, E. B. Smithwick and U. E. Brady : *Can. J. Zool.*, **53**, 827 (1975).
(35) 米原 徹, 桑原保正, 深海 浩 : 昭和 49 年度日本農芸化学会関西支部・西日本支部合同大会講演要旨集, 那覇市, p. 35.
(36) 桑原保正 : 未発表.
(37) L. L. Sower and J. C. Fish : *Environ. Entomol.*, **4**, 168 (1975).
(38) B. I. P. Barratt : *Bull. Entomol. Res.*, **64**, 621 (1974).
(39) Y. Kuwahara, H. Fukami, S. Ishii, F. Matsu-mura and W. E. Burkholder : *J. Chem. Ecol.*, **1**, 413 (1975).
(40) G. H. Stout and K. L. Stevens : *J. Org. Chem.*, **29**, 3604 (1964) ; G. H. Stout and K. D. Sears : *ibid.*, **33**, 4185 (1968) ; G. H. Stout, G. K. Hickernell and K. D. Sears : *ibid.*, **33**, 4191 (1968).
(41) W. S. Bowers : *Science*, **177**, 1121 (1972).
(42) N. R. Howe and Y. M. Sheikh : *Science*, **189**, 386 (1975).
(43) R. S. Berger : *Science*, **177**, 704 (1972).
(44) S. Regev and W. W. Cone : *Environ. Entomol.*, **5**, 133 (1976).
(45) Y. Rechav, G. B. Whitehead and M. M. Knight : *Nature*, **259**, 563 (1976).
(46) 桑原保正, 石井象二郎, 深海 浩 : 昭和 51 年度日本応用動物昆虫学会大会講演要旨, p. 7.
(47) K. J. Byrne, W. E. Gore, G. T. Pearce and R. M. Silverstein : *J. Chem. Ecol.*, **1**, 1 (1975).
(48) 桑原保正, 石井象二郎, 深海 浩, 松本克彦, 和田芳武 : 昭和 52 年度日本応用動物昆虫学会大会講演要旨, p. 79.

(昭和 53 年 7 月 20 日受理)