

目次

第 1 章 緒言

第 2 章 GC-MS によるフェロモン腺抽出物の確認

- (1) 目的
- (2) 材料および方法
- (3) 結果および考察

第 3 章 GC による triene 化合物と 3-epoxy 体の定量

- (1) 目的
- (2) 材料および方法
- (3) 結果および考察

第 4 章 断頭処理による triene 化合物と 3-epoxy 体の量の変化

- (1) 目的
- (2) 材料および方法
- (3) 結果および考察

第 5 章 光学活性体の野外誘引試験

摘要

参考文献

謝辞

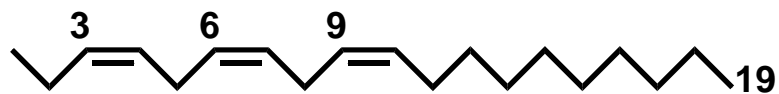
第 1 章 緒言

現在まで農業において害虫を駆除する方法としては、主に化学農薬が用いられてきた。しかし、化学農薬の大量使用によって環境汚染、生態系の破壊などが生じた。最近ではこれらの化学農薬の散布による害虫防除ではなく、環境に影響を与えることなく害虫の生育、繁殖を妨げ、農作物への被害を減らせる方法が考えられてきている。その方法の一つとして昆虫の生理活性物質であるフェロモンの利用がある。

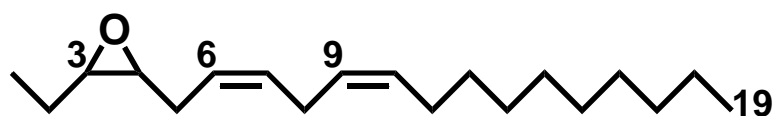
フェロモンは、生物が生産・体外へ分泌し、同種他個体の行動に影響を与える化学物質である。昆虫のフェロモンには、性フェロモン、警報フェロモン、道しるべフェロモン、集合フェロモンなどがある。この中でも性フェロモンは、生殖行動に関係する重要なフェロモンである。鱗翅目蛾類の性フェロモンとしては現在のところ、末端にアルコール、アセテート、アルデヒドなどを持つ不飽和脂肪族物質が数多く同定されている。が、近年、末端に官能基を持たない不飽和炭化水素、またはその epoxy 誘導体の性フェロモンがシャクガ科およびヤガ上科で発見されてきている。当研究室では、炭素数 17 から 23 の diene 化合物、triene 化合物およびその monoepoxy 誘導体の合成品を用いて野外誘引試験を行っている。

ヨモギエダシャク (*Ascotis selenaria cretacea* Butler) はシャクガ科に属する昆虫で、茶園・リンゴ園などで葉を食い荒らす害虫である。この昆虫は、八王子波丘地における野外誘引試験において 3,4-epoxy-(6Z,9Z)-nonadecadiene に特異的に誘引されることが確認されている。

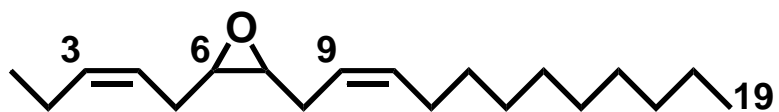
本研究ではヨモギエダシャクについて、3-epoxy 体が真の性フェロモンであることの確認、および炭素数の等しい triene 化合物と epoxy 体の位置異性体の有無の確認を行うことを目的とした。



(Z,Z,Z)-3,6,9-nonadecatriene
(Z3,Z6,Z9-19:H)



cis-3,4-(Z,Z)-6,9-epoxynonadecadiene
(epo3,Z6,Z9-19:H)



cis-6,7-(Z,Z)-3,9-epoxynonadecadiene
(Z3,epo6,Z9-19:H)



cis-9,10-(Z,Z)-3,6-epoxynonadecadiene
(Z3,Z6,epo9-19:H)

Fig.1 Z3,Z6,Z9-19:H and the monoepoxy derivatives.

第 2 章 GC-MS によるフェロモン腺抽出物の確認

(1) 目的

鱗翅目シャクガ科のヨモギエダシャク (*Ascotis selenaria cretacea* Butler) の雄成虫は、合成性フェロモン関連化合物を用いた野外誘引試験において、3,4-epoxy-(6Z,9Z)-nonadecadiene に特異的に誘引されることが確認された。本章では、人工飼料により継代飼育されたヨモギエダシャク雌成虫からフェロモン腺抽出物を得た。GC-MS を用いて分析し、合成標品との比較による 3-epoxy 体の確認を目的とした。

(2) 材料および方法

a, 材料昆虫

人工飼料により継代飼育されたヨモギエダシャク雌の蛹を、三重県病害虫防除所より送っていただいた。飼育条件は、4 令までは暗黒中、5 令からは明期 16 時間、暗期 8 時間 (16L-8D) にて飼育し、当研究室にて羽化したものを使用した。

b, フェロモン腺成分の抽出法

羽化後 20 時間を経過した (羽化 1 日目、暗期中) 処女雌性フェロモン腺をピンセットを用いて引き出し、切断。dist *n*-Hx 中に 30 分間浸漬し、この抽出液を無水硫酸ナトリウムによりろ過した。また、抽出は 5 頭一組で行った。

c, 合成標品

抽出物成分確認のため、本研究室の山下が合成した (3Z,6Z,9Z)-nonadecatriene、3,4-epoxy-(6Z,9Z)-nonadecadiene、6,7-epoxy-(3Z,9Z)-nonadecadiene、9,10-epoxy-(3Z,6Z)-nonadecadiene を使用。

GC-MS による特徴的な開裂イオンの生成を検討、確認した。

d, GC-MS

フェロモン腺抽出物および合成標品の分析に、以下の機種、以下の条件で GC-MS 分析を行った。1 回の分析には、1 頭/ μl (in *n*-Hx)の抽出液 1 μl を用いた。

機種：GC 部 - 5890 SERIES (HEWLETT・PACKARD)
MS 部 - JEOL JMS-SX102A (日本電子(株))
カラム - キャピラリーカラム (DB-23、0.25mm、30m
J&W SCIENTIFIC)

昇温条件：40 :1min-(10 /min) 160 -(4 /min) 220 :10min

(3) 結果および考察

GC-MS による抽出物の分析の結果、18.8 分に m/z 278 の分子イオンピークを与える炭素数 19 の epoxy 体が確認できた。また、13.7 分には m/z 262 の分子イオンピークを与える炭素数 19 の triene 化合物の存在が確認できた。炭素数 19 の 3 種類の epoxydiene 位置異性体は GC 上、全て 18 分から 19 分の間に隣接して流出するために、リテンションタイムだけで区別することが困難なので、特徴的なフラグメントイオンを調べることによって epoxy 環の位置を決定することにした。3 つの異性体は、Fig.4 のような開裂を示す。今回性フェロモンとして注目される 3-epoxy 体は、206 と 220 に特徴的なフラグメントイオンを与えることが分かった。そこで、合成標品を用いた GC-MS によって得られたこれらのフラグメントイオンを指標として、マスクマトグラムにて解析した(Fig.5)。6-epoxy 体は 18.6 分に、9-epoxy 体は 18.9 分に検出された。抽出物は、6-epoxy 体の 195 と 111、9-epoxy 体の 169 と 155 には、全くピークがでておらず、220

と 206 のピークが確認できた。このことから、18.8 分に流出する炭素数 19 の epoxy 体は、3,4-epoxy-(6Z,9Z)-nonadecadiene であることが確認でき、合成標品による野外誘引試験の結果を裏付けることができた。また、13.7 分に確認された炭素数 19 の triene 化合物も他のシャクガ科昆虫の性フェロモンとして同定されており、ヨモギエダシャクの性フェロモン成分の 1 つとして考えることができる。

それを確認すべく、次の実験を検討した。

TIC

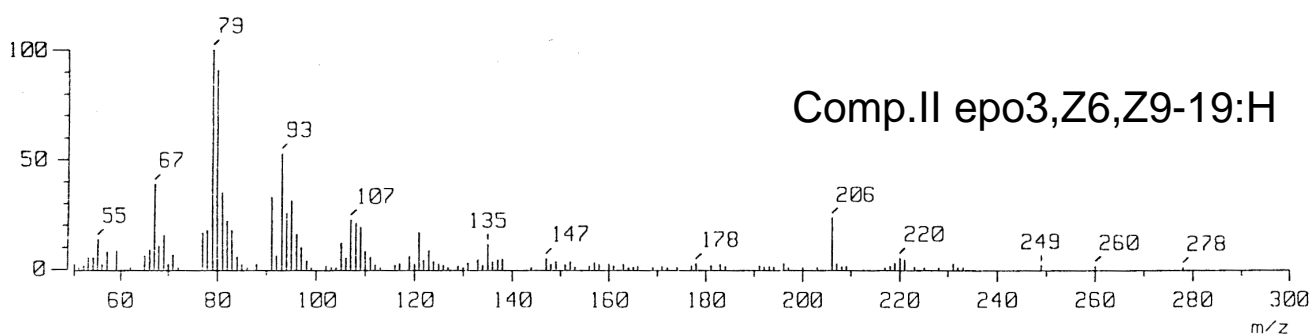
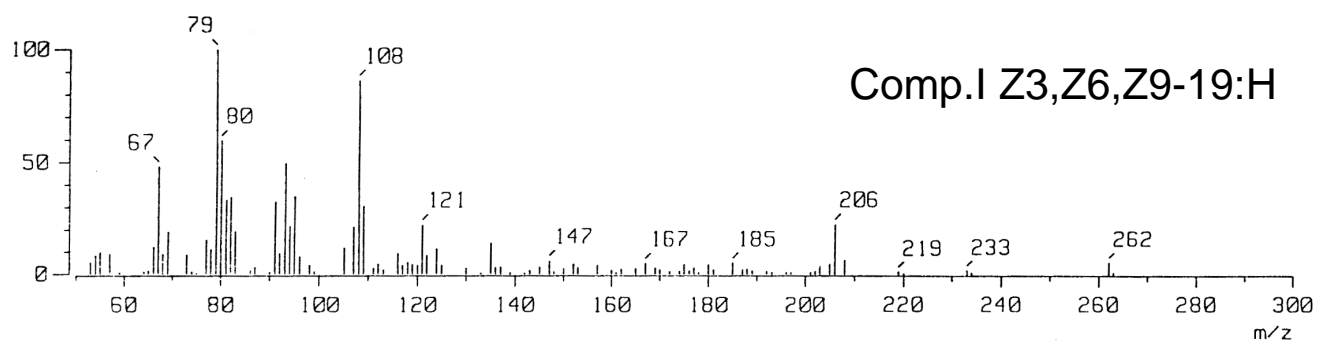
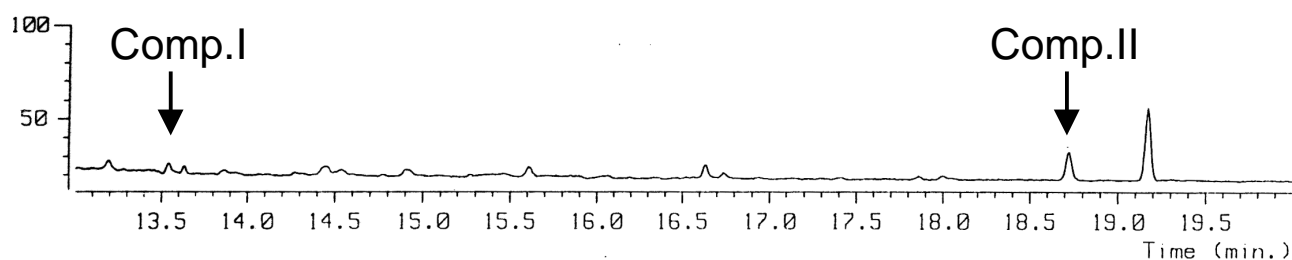


Fig.2 GC-MS analysis of the pheromone gland extract of *A. selenaria cretacea*.

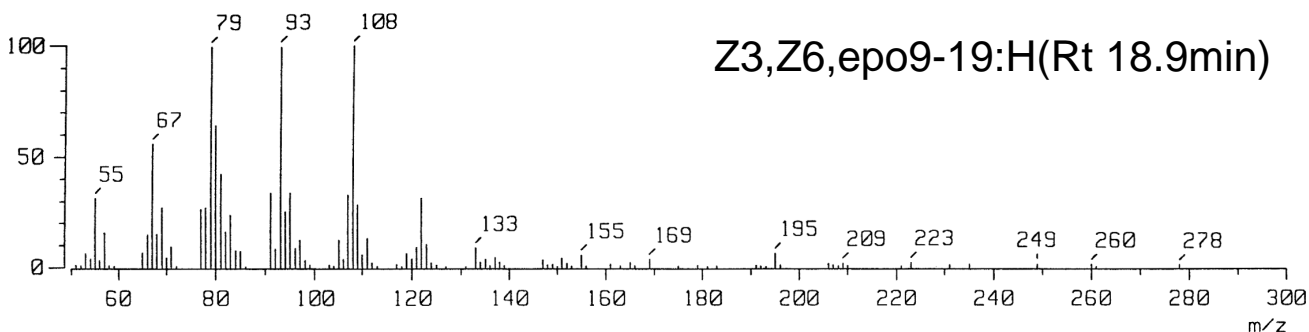
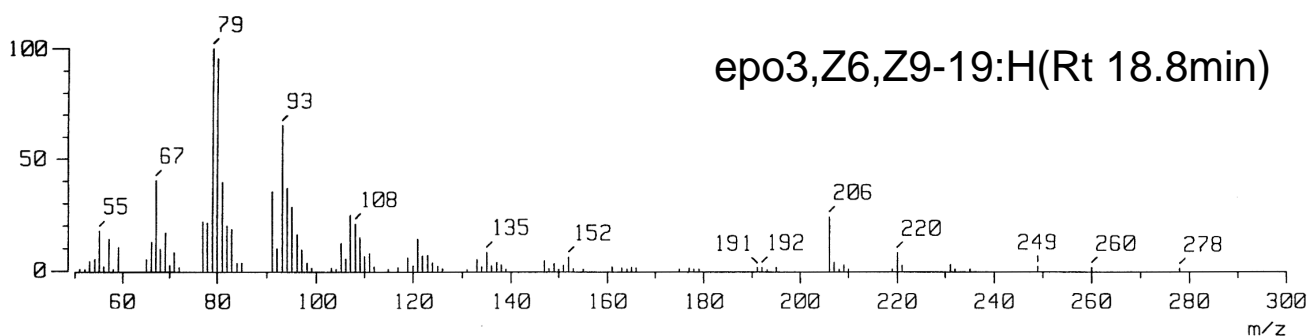
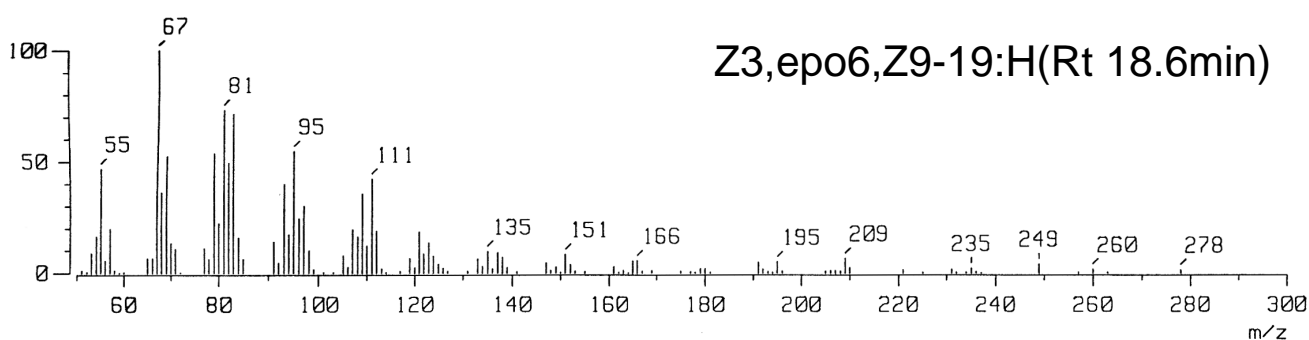
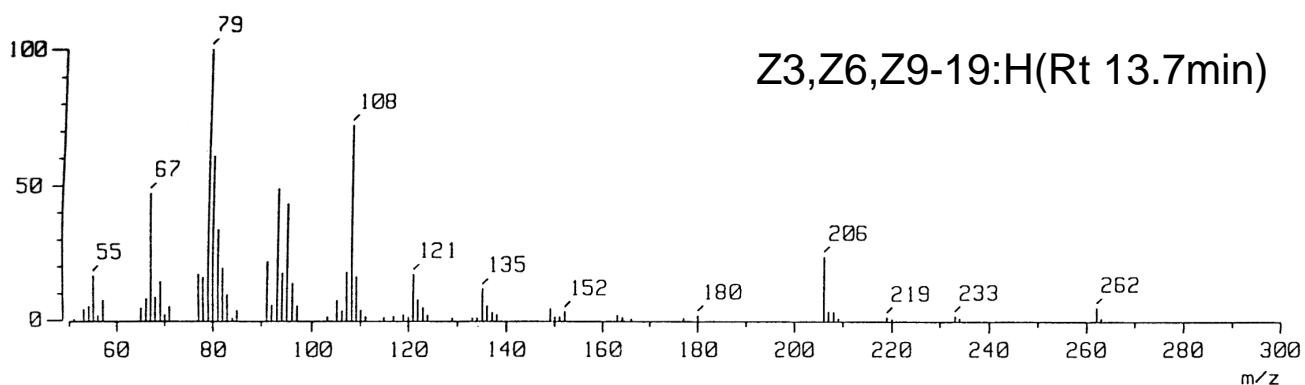


Fig.3 Mass spectra of synthetic Z3,Z6,Z9-19:H and the monoepoxy derivatives.

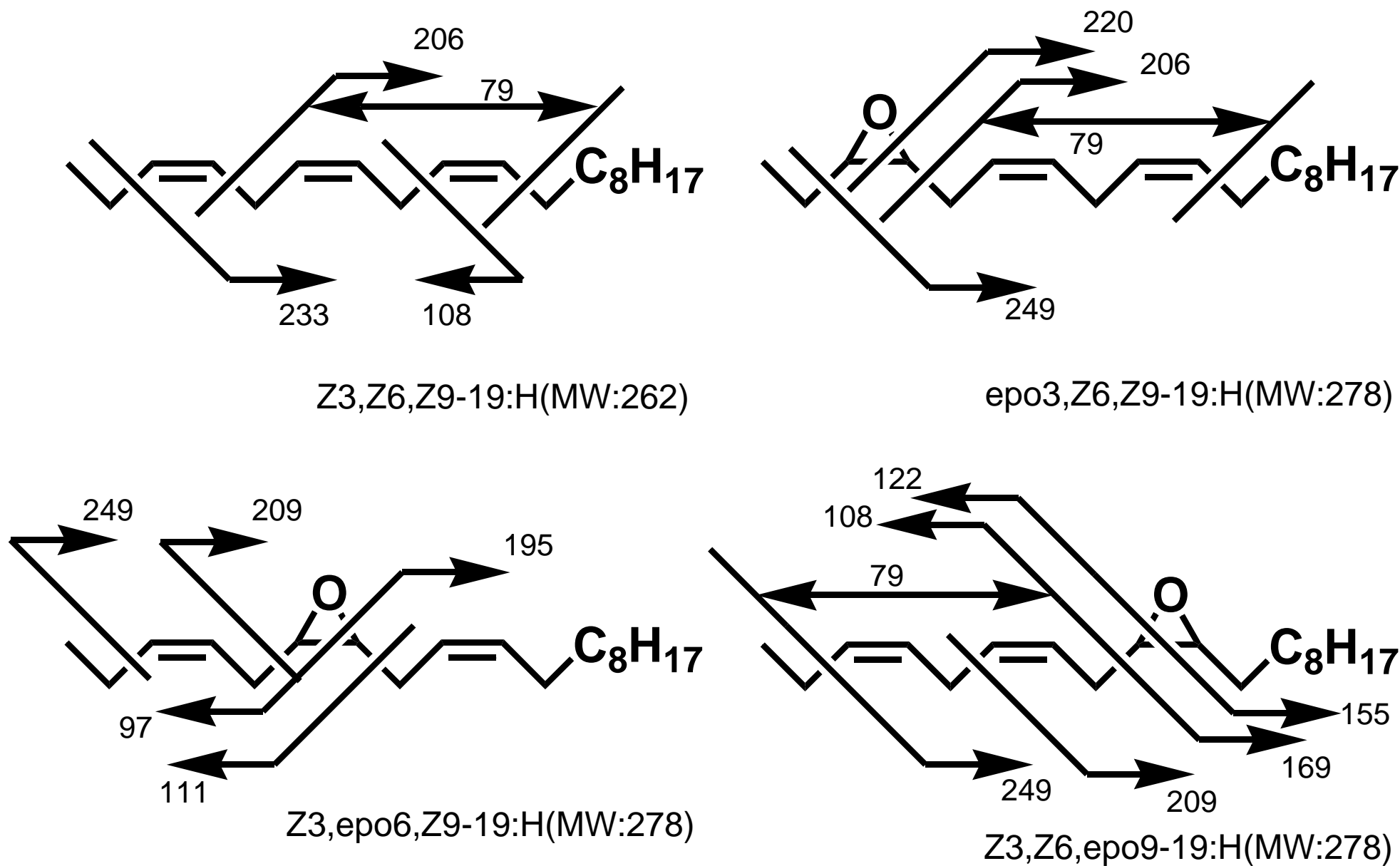
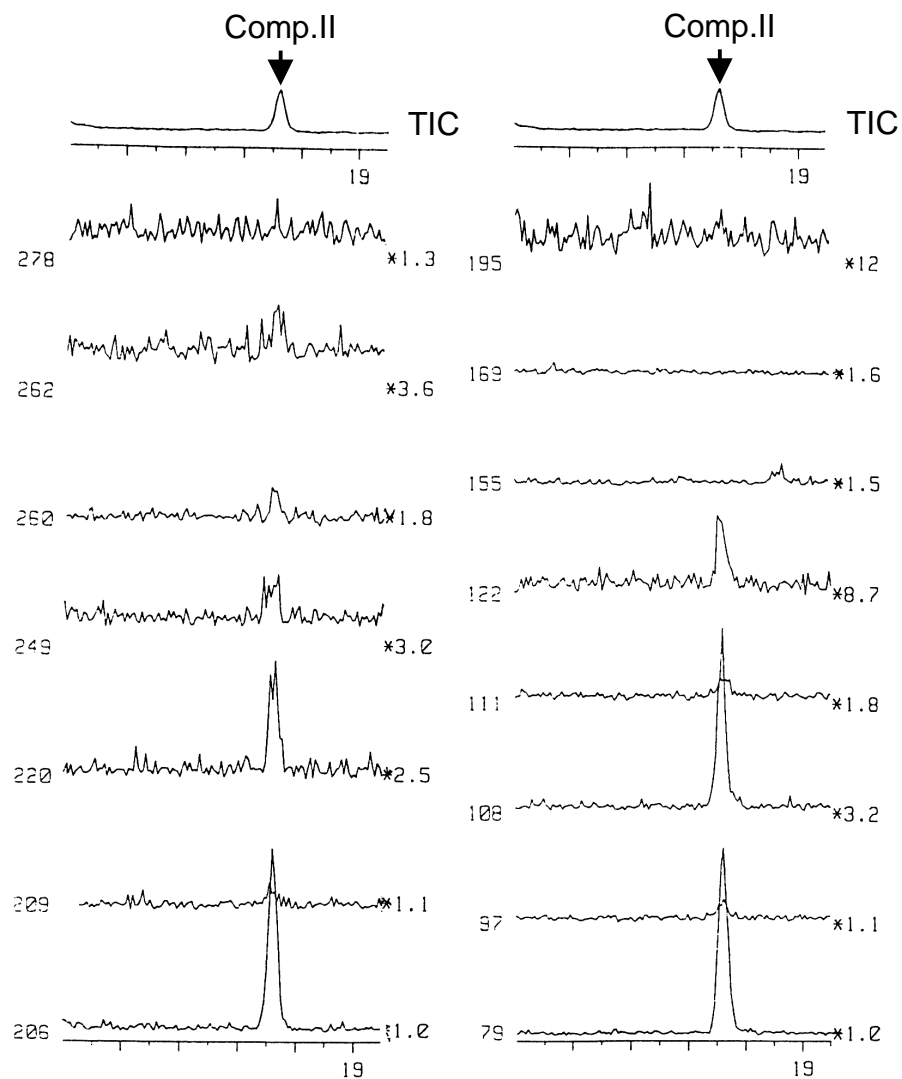


Fig.4 Characteristic fragment ions of C₁₉-epoxydienes and trienes.

(A) Pheromone Extract



(B) Pheromone+Synthetic Standards

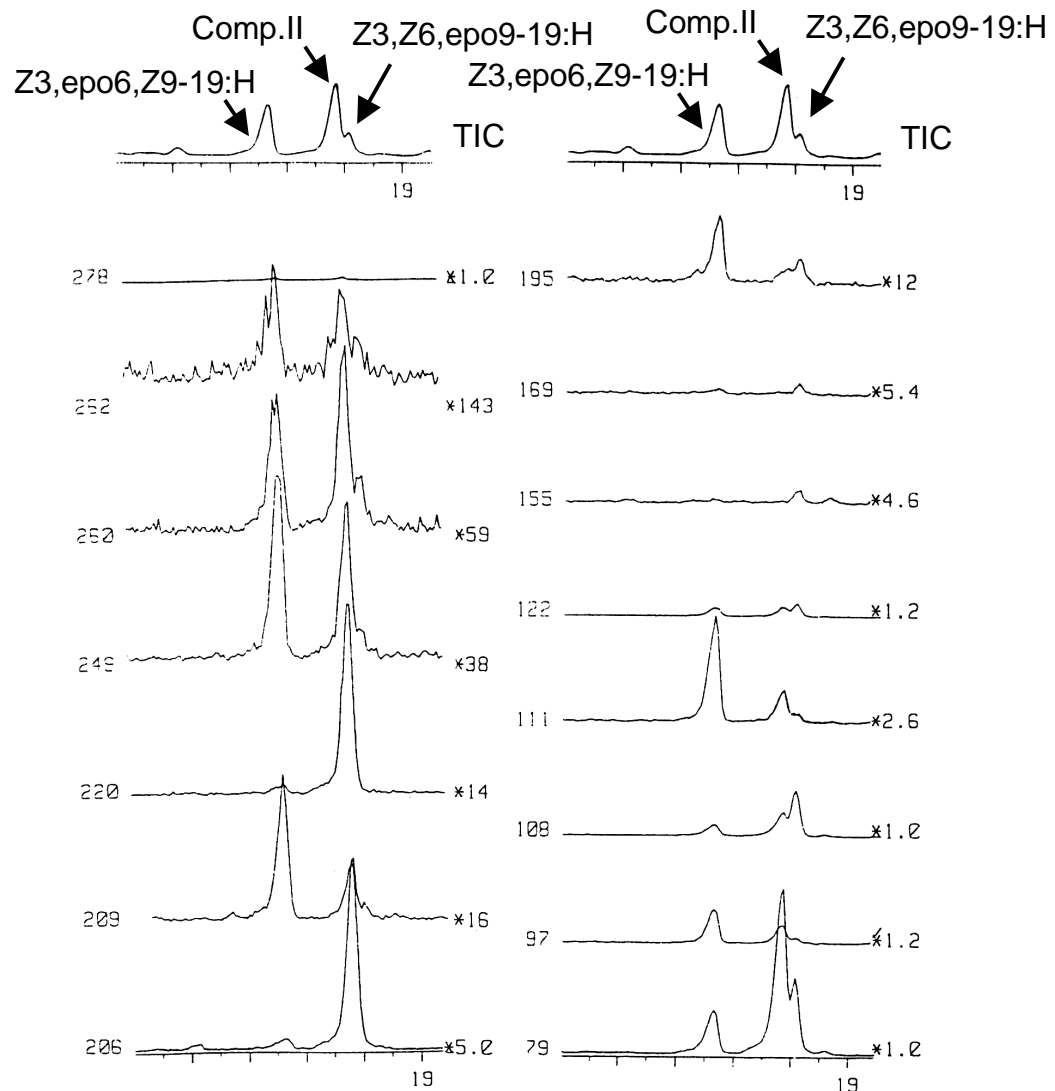


Fig.5 GC-MS analysis of the pheromone gland extract of *A. selenaria cretacea* and synthetic standards.

第 3 章 GC による triene 化合物と 3-epoxy 体の定量

(1) 目的

炭素数 19 の triene 化合物は、他のシャクガ科昆虫の性フェロモンとして同定されている。また、昆虫の性フェロモンは常に単一の化合物からなるわけではなく、複数の化合物から成ることもある。このため、ヨモギエダシャク雌成虫のフェロモン腺抽出物から確認された炭素数 19 の triene 化合物が性フェロモン成分の一つである、と考えることもできる。

ところで、ヨモギエダシャクは夜行性であり、暗期になるとコーリングポーズと呼ばれるフェロモン腺を突出させた姿勢をとる。よって、性フェロモン成分は暗期中に盛んに生産され、明期には生合成が止まると考えられる。

本章では、triene 化合物とヨモギエダシャクの性フェロモン成分として同定されている 3-epoxy 体の比率を調べることにより、triene 化合物が性フェロモン成分の一部であるか確認することを目的とし、実験を行った。

(2) 材料および方法

a , フェロモン腺の切断、抽出

羽化後 20 時間以上経過したヨモギエダシャク雌成虫(16L-8D)のフェロモン腺を明期の 4 時間目、12 時間目、暗期の 2 時間目、6 時間目の計 4 回切断した。フェロモン腺からの抽出は 5 頭一組で行った。

b , GC による分析

フェロモン腺抽出物中の triene 化合物および 3-epoxy 体の定量のため、以下の機種、以下の条件で分析を行った。また、注入量は 0.1 頭/ μl の抽出液を 1 μl とした。

機種 : HP 6890 SERIES (HEWLETT・PACKARD)

カラム : キャピラリーカラム (DB-23、 0.25mm、 30m
J&W SCIENTIFIC)

昇温条件 : 40 :1min-(10 /min) 160 -(4 /min) 220 :10min

(3) 結果および考察

GC による定量の結果を Table.1 に示す。暗期中および明期 4 時間目には triene 化合物と 3-epoxy 体の比率は 1:30 前後であるが、明期 12 時間目に triene 化合物が増加、3-epoxy 体は減少し、1:1 となっている。triene 化合物が性フェロモン成分の一部ならば、明期に 3-epoxy 体とともに減少し、比率に大きな変化がないことが期待される。この結果から、triene 化合物が性フェロモン成分の一部であるとは考えにくく、3-epoxy 体の生合成前駆体であると考えられる。

この事をより明確にするために、次の実験を行った。

Table 1 Quantitative Analysis of Comp.I(Z3,Z6,Z9-19:H) and Comp.II (epo3,Z6,Z9-19:H) in the Pheromone Grand of *A. selenaria cretacea*

Time ^{a)}	Z3,Z6,Z9-19:H(ng)	epo3,Z6,Z9-19:H(ng)	ratio
4hr after lighting	2.5 ± 0.8	66 ± 14	0.04:1
12hr after lighting	17 ± 13	17 ± 11	1:1
2hr after light off	2.2 ± 0.8	74 ± 37	0.03:1
6hr after light off	2.7 ± 0.8	56 ± 22	0.05:1

a) Reared on a 16L-8D cycle from the 5th instar.

第4章 断頭処理による triene 化合物と 3-epoxy 体の量の変化

(1) 目的

一般に、蛾類性フェロモンの生合成は、頭部に存在する食道下神経節 (SG) から分泌されるホルモン (PBAN) によって活性化されることが知られている。蛾類昆虫の処女雌の頭部を切除することで、ホルモンの働きをなくし、性フェロモン生合成を停止させることができる。この処理をヨモギエダシャク処女雌に施すことにより、triene 化合物が性フェロモン成分であるか否かを明確にすることができる。また、断頭処理を施した雌に合成 PBAN に注射することによる、triene 化合物および 3-epoxy 体の量の変化も調べることにした。

(2) 材料および方法

方法を Fig.6 に示す。羽化後一日目のシャクガ処女雌を断頭、傷口を口ウを用いてふさいだ。断頭処理後 24 時間目にリンガー液 20 μ l を注射したものと、それに合成 PBAN (Bom-PBAN I, 20ng) を溶かして注射したもの、および無処理のもの、3 つを用意した。その 3 時間後にフェロモン腺を切断、前章と同様に抽出、分析した。

(3) 結果および考察

GC による定量の結果を Table.2 に示す。断頭のみのは、3-epoxy 体が存在せず、triene 化合物は通常よりも多量に確認できた。また、リンガー液のみ注射したのも 3-epoxy 体はわずかに確認されただけであった。これらのことから、断頭処理によって性フェロモン生合成が停止されることが確認された。PBAN を注射したものは、断頭処理のみのもよりも triene 化合物の減少および 3-epoxy 体の増加が見られる。この 3-epoxy 体は合成 PBAN の注射後に新たに生合成されたものと思われる。

これらの結果から、triene 化合物は性フェロモン成分ではなく、

3-epoxy 体の生合成前駆体であると考えられる。

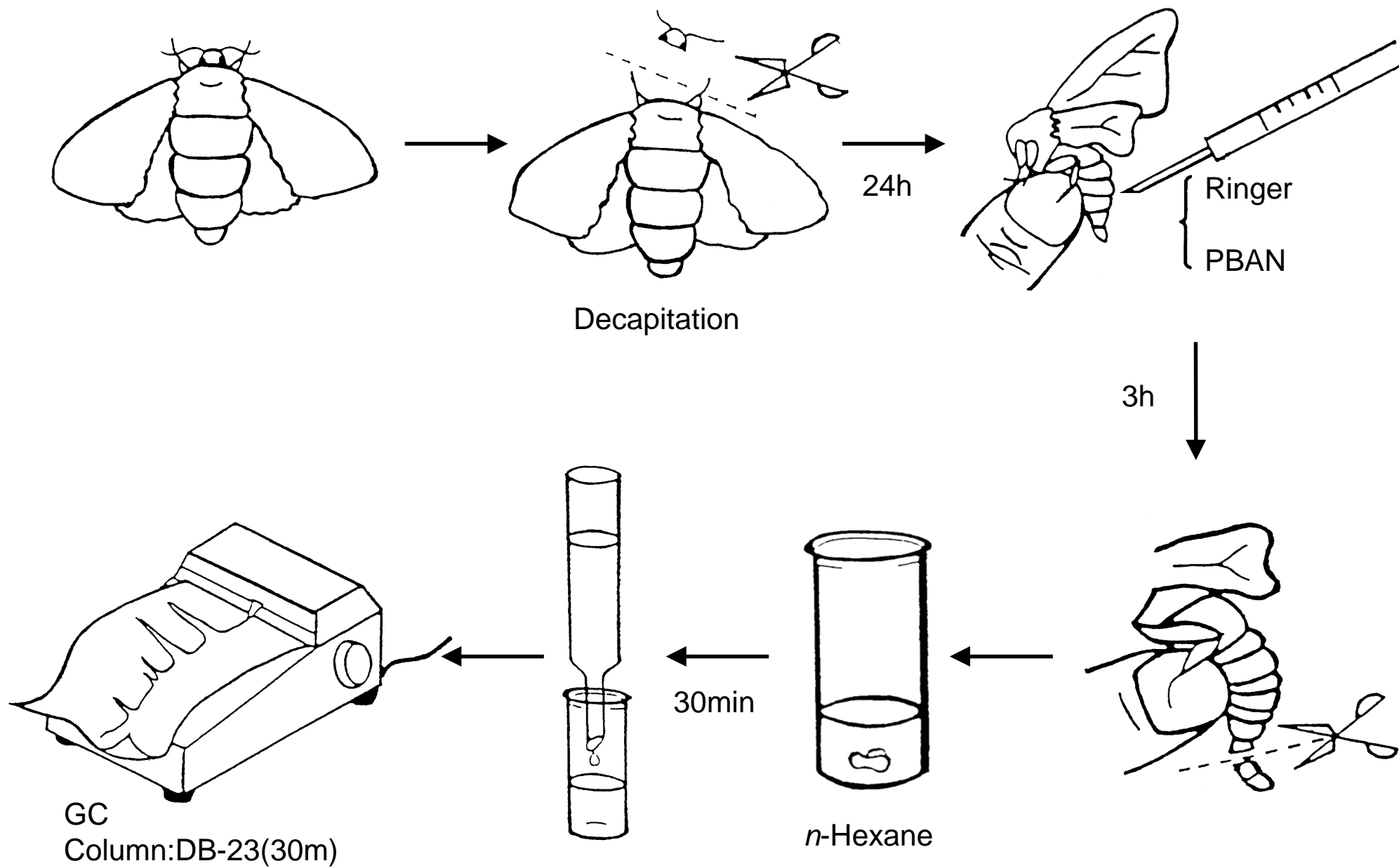


Fig.6 Decapitation of *A. selenaria cretacea*.

Table 2 Effect of Decapitation and Hormone(PBAN) Injection of the Pheromonal Components of *A. selenaria cretacea*

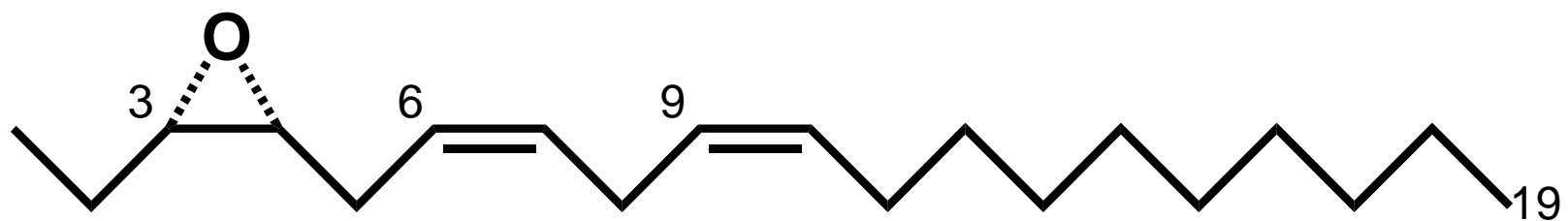
Treatment	Z3,Z6,Z9-19:H(ng)	epo3,Z6,Z9-19:H(ng)	ratio
Decapitation	9.6 ± 7.9	0.0 ± 0.0	∞:1
Decap.+Inject.(Ringer)	1.1 ± 0.7	0.5 ± 0.6	2.2:1
Decap.+Inject.(PBAN) ^{a)}	1.7 ± 0.3	22 ± 13	0.08:1

a) Synthetic Bom-PBAN I(20ng)

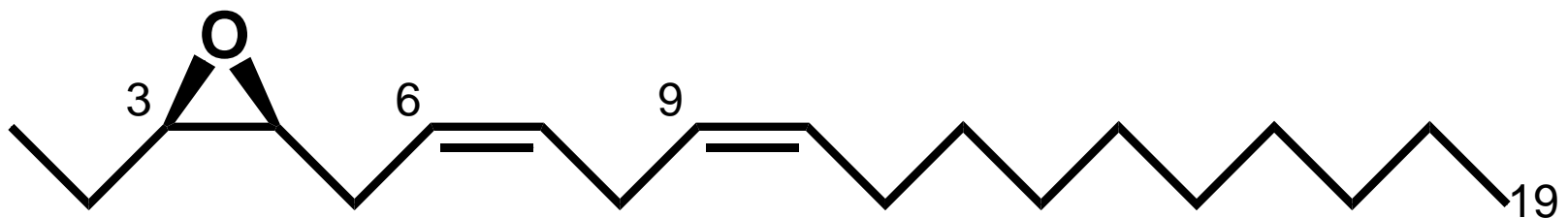
第 5 章 光学活性体による野外誘引試験

epoxy 体は、不斉炭素を持つ。3-epoxy 体は Fig.7 に示すように (3*S*,4*R*)体と(3*R*,4*S*)体を持つ。epoxy 体を光学分割することによって、誘引試験においてそれぞれ異なる誘引特性を示すことが知られている。ヨモギエダシャクの性フェロモンであると同定された 3,4-epoxy-(6*Z*,9*Z*)-nonadecadiene をキラルカラム HPLC を用いて光学分割し、どのような誘引特性を持つかを知ることが目的として野外誘引試験を行ったところ、Table.3 に示すような結果が得られた。ヨモギエダシャクは、(3*R*,4*S*)体に特異的に誘引された。これは、八王子波丘地および三重県の病害虫防除所の両方で同様の結果が得られた。また、同じくシャクガ科に属するナカウスエダシャク (*Alcis anglifera*)は逆に、(3*S*,4*R*)体に特異的に誘引されることが確認できた。

今後、ヨモギエダシャクのフェロモン腺抽出物を 3-epoxy 体のみ
に精製し、キラルな HPLC を用いて光学活性を調べる予定である。



(3*S*,4*R*)-epo3,Z6,Z9-19:H



(3*R*,4*S*)-epo3,Z6,Z9-19:H

Fig.7 Optical active epo3,Z6,Z9-19:H.

Table 3 Numbers of Male Moths, Attractanted to the Optical Active epo3,Z6,Z9-19:H and Mixtures in Field Screening Tests in 1995

Lure		Total of captured males		
epo3,Z6,Z9-19:H ^{a)}		<i>Ascotis selenaria cretacea</i>		<i>Alcis anglifera</i>
(3S,4R)- isomer	(3R,4S)- isomer	Hachiohji-shi (8/23-10/6)	Isshin-gun (9/26-10/25)	Hachiohji-shi (10/6-11/2)
100	0	0	0	78
80	20	1	3	8
50	50	21	5	28
20	80	17	10	1
0	100	42	26	9
0	0	0	0	0

a) 0.4mg / rubber septum

摘要

鱗翅目シャクガ科およびヤガ上科の昆虫を中心に、末端に官能基を含まない直鎖状の不飽和炭化水素およびそのエポキシ誘導体が性フェロモン成分として同定されてきている。ヨモギエダシャク (*Ascotis selenaria cretacea* Butler) はシャクガ科に属する昆虫で、時として茶園・リンゴ園にて大発生し被害をもたらす。シャクガ科昆虫を対象にした一連の合成性フェロモン関連化合物の野外試験において、本種の雄成虫は、3,4-epoxy-(6Z,9Z)-nonadecadiene に特異的に誘引された。そこで今回、この化合物が真の性フェロモンであることを確認すべく実験を行った。

人工飼料により継代飼育され 16L8D で育てたヨモギエダシャク雌成虫から、性フェロモン腺のヘキサン抽出物を得た。キャピラリーカラム (DB-23, 30m) を備えた GC-MS にて抽出物を分析したところ、合成標品と同一な特徴的な開裂イオン (m/z 220, 206) をあたえる 3-epoxy 体 (R_t 18.8 分) が存在し、その位置異性体である 6-epoxy 体 (R_t 18.6 分, m/z 195, 111)、9-epoxy 体 (R_t 18.9 分, m/z 169, 122, 108) は存在せず、誘引結果を裏付けることができた。また (3Z,6Z,9Z)-nonadecatriene (R_t 13.7 分) の存在も確認できた。

ヨモギエダシャクは夜行性であり、暗期にコーリングポーズとよばれるフェロモン腺を突出させた姿勢をとる。シャクガ処女雌のフェロモン腺を明期、暗期のそれぞれで切断、ヘキサンで抽出し GC によって定量したところ、明期には epoxy 体の量が減り、triene 化合物が増えることが明らかとなった。ところで、一般に蛾類性フェロモンの生合成は、頭部に存在する食道下神経節 (SG) から分泌されるホルモン (PBAN) によって活性化されることが知られている。本種処女雌の頭部を切除し、ホルモンの働きをなくしたところ、epoxy 体はフェロモン腺中に全く検出されなくなったが、triene 化合物の含量は逆に増加した。一方、この断頭雌に合成 PBAN (Bom-PBAN I, 20ng) を注射したところ、triene 化合物含量の減少と、epoxy 体の新たな生

成が見られた。これらの結果から、triene 化合物は性フェロモン成分ではなく、epoxy 体の生合成前駆体であると考えられた。現在、風洞実験で epoxy 体の示す誘引効果に対する triene の効果を調査中である。

epoxy 体は、不斉炭素を持つ。キラルカラムを用いた HPLC によって分離された 3-epoxy 体の(3*S*,4*R*)体および(3*R*,4*S*)体を用いて野外誘引試験を行ったところ、ヨモギエダシャク雄成虫は(3*R*,4*S*)体に特異的に誘引された。今後、抽出物を材料に本種性フェロモンの立体化学を調べていく予定である。

参考文献

- 1) 齊藤 奈美子 平成6年度卒業論文
- 2) ANDO, T., KISHI, H., AKASHIO, N., X. QIN, SAITO, N., ABE, H., and HASHIMOTO, S., (1995), *J. Chem. Ecol.*, **21**:299-311.
- 3) ANDO, T., OHSAWA, H., UENO, T., KISHI, H., OKAMURA, Y., and HASHIMOTO, S., (1993), *J. Chem. Ecol.*, **19**:787-798.
- 4) BECKER, D., CYJON, R., COSSE, A., MOORE, I., KIMMEL, T., and WYSOKI, M., (1990), *Tetrahedron Lett.*, **31**:4923-4926.
- 5) 性フェロモン剤等使用の手引き 社団法人日本植物防疫協会

謝辞

本研究を遂行するにあたり、随時ご指導をいただきました本研究室の安藤哲教授、安部浩教授、夏目雅裕博士に深く感謝致します。また、本研究において合成標品、フェロモン腺の切断、シაკガの飼育等で当研究室の山下学氏に大変にお世話になり、深く感謝致します。更に、シაკガの提供、誘引試験等で三重県病虫害防除所の大谷一哉氏に大変にお世話になり、深く感謝致します。

最後に、実験に際しご協力下さいました当研究室のみなさまに厚くお礼申し上げます。