実用的な EAG/GLC 連結装置の組立と それを利用したクス蚕フェロモンの検出

富田一郎 · 布施 隆 · 畑中顕彦 信州大学農学部 生物資源科学科 生物機能利用学講座

Simple and Practical Construction of Gas Chromatography Linked to Electroantennography and Its Application to Detection of Kusu-Silk Moth Pheromone

Ichiro Tomida, Takao Fuse and Akihiko Hatanaka

Division of Biochemistry and Cell Biology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

Summary

A practical and simple apparatus linking gas chromatography (GLC) to electroantennography (EAG) was constructed. The effluent from the column in gas chromatograph was splitted fifty-fifty, the one half sent to FID-detector as usual, and another introduced to the antenna, which was cut off from the insect and inserted at the both ends into saline solution of recording and reference electrodes in a shielded chamber. The electric current caused by the pheromone molecule was amplified by an electroantennograph instrument and recorded on the same fractogram as FID. Delicate conditions for the total performance of EAG-detection were investigated. Some applications of this linking of EAG/GLC to detection of pheromone of some insects, including a noxious one, giant-silk moth, *Dictyoploca japonica*, were demonstrated.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 29: 37—46, 1992)

Key words: pheromone, electroantennograph, kusu-silk moth (=giant silk moth), フェロモン, 触角電図, クス蚕.

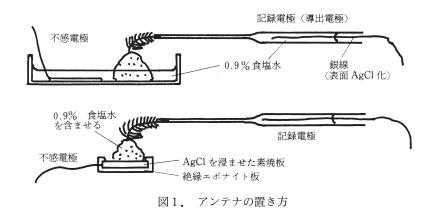
緒 論

昆虫フェロモンの化学的研究を行う際、先ずその力価を正確に測定する必要がある。そして実験室的な方法としては、古典的にはいわゆる羽ばたきテスト法が用いられてきた。しかし、定量的な判断を得るにはかなりの困難があり、これに代わる今一つの方法として触角電

図法(electroantennography: EAG)も用いられてきた。これはフェロモンのような揮発性 刺激物質を触角に当てると、触角上に分布する感覚細胞のレセプターの膜の部分で分極が起こり、これにより電位が発生するが、これを検出する方法の事をいい、Schneider¹⁾によって初めて触角の基部と先端に刺入したミクロ電極を用いて測定されたものである。それ以来この検出法はフェロモン研究によく用いられてきてが、特にこれを GLC の検出法として使用する事は、GLC の高度な分離機能と相俟って、刺激物質が2、3の混合物でもそれらを分離した上で、各々の EAG 活性が測定できるという点で極めてユニークな方法である。そして、この方法については外国では多くの報告がなされているが、これの実際の実行には様々のデリケートな条件が必要であって、本邦においてはこれを成功裏に行ったという事は最近²⁾に至るまで聞かなかった。しかし、我々としてはどうしてもこの方法を克服して利用できるようにする事が、以後のフェロモンの研究を進める上に絶対に必要であった。そして今回辛うじてその実行の実現を見たので以下報告する。その際特に簡便にかつ実際的に用い得るようにという事に主眼をおいた*。

EAG/GLC の測定の準備

- (1) 触角:エリ蚕雄の触角を根元の部分からはさみで切断し、先端の部分も少し切り落として、内部のリンパ液が直接電極の食塩水に接触するように配慮する。又、先端の部分の両側の鞭状部を少し切り除き、その主幹の部分で電極に差し込みやすくする。
- (2) 電極:不感電極の方に触角の基部をつなぎ、記録電極の方に先端部分をつなぐようにする。不感電極は図1 (上図) に示すように食塩水 (0.9%) をシャーレに入れ、脱脂綿あるいはスポンジを食塩水に浸ませて一部が液面より露出するように置き、それに触角の基部を埋め込む。なおこの食塩水中には銀板を沈め、それより導線でアースに導くようにする。



^{*} これらのデータの一部は平成2年10月,第105回農芸化学会中部支部例会で発表した。富田一郎・小野 純・平井義彦: EAG/GLC 連結装置の組立とそれによるエリ蚕フェロモンの研究,日本農芸化学会中部支部 第105回例会発表(名古屋),平成2年10月6日。

又,これの代わりに素焼きの板に AgCl を浸ませて作った既製品の電極も同様に使用しうる(図 1,下図)。一方記録電極の方は,スポイド(例えば,揃って作られた既製のもの,6 mm 外径×16cm長さで,先端の細い部分が1.4mm×4.5cmのものを利用)に0.9%食塩水を入れ,それに銀線の,しかも表面を AgCl 化したものを差し込み,他端は EAG のプローブにつなぐ。触角は先端の主幹の部分で十分確実にこのスポイドの先端に差し込んで微動しないようにし,かつ食塩水に確実に接するようにする事が肝要である。なお,その後の経験では不感電極の方もこのようなスポイドを用い,触角の基部を差し込んで実験に用いる事が可能である事を認めた。なお,これら両電極はミクロマニュピレーターに装着して,微動調製が可能であるようにしておき,触角を容易にスポイド先端の中に差し込めるようにする事も有用である。

- (3) 測定環境の整備:これら全体の EAG 測定部分は、EAG のプローブの部分と共にアースした銅網で囲ったチャンバーの中に入れ、リード線はすべてアースした金属網で被った2重覆線を用いる。測定の妨害ノイズを除去する事が実際上極めて重要かつ困難であるが、この際アースの取り方を確実にする事も一つの解決手段である事を経験した。
- (4) フェロモン含有気体の触角部分への誘導:ガラス管の出口を触角の0.5mm~1 cmの所におき、ここからフェロモンの含有気体を一定条件で排出して、フェロモン分子が触角に当たるようにする。その際触角鞭状部分が直角に排出気体に当たるようにする。
- (5) EAG 装置及び記録計:EAG 装置としてはダイヤメディカル製触角電図計測装置(入力インピーダンス $10^{11}\Omega$,増幅20000倍)を用いた。そして,記録電極からのリード線はプローブにつなぐ。又,EAG-レスポンスはこの装置に組み込まれたオシロスコープでも見られるが,普通のデュアルペンレコーダー(例えば,national pen recorder VP6621A)につなぎ,記録するようにした。

EAG/GLC の連結法

1. フラッシュ方式(貯留排出方式)

ガスクロマトグラフからの流出物と雄触角からの EAG-レスポンスを同時に記録する事については、最初 Moorhouse³⁾によって報告され、最近では Cork 等の研究⁴⁾がある。それはガスクロマトグラフのカラムからの気体を一旦ガスクロマトグラフの槽内で10ml位のガラス容器に貯留し、それを周期的に一定量の気流(N_2)で完全に押し出して、それを第 2 の気流と共に EAG 測定の触角の所に誘導して EAG-レスポンスを測定する方法である。

我々も先ずこの原理による連結法を検討し,図 2 に示すような装置を作った。ガスクロマトグラフ流出気体の貯留のためにはマーゲン型の10ml容位のものをガラス細工で自作した。そして槽内と外部の間は大型注射器の注入針の少し長いものを利用し,それをガスクロマトグラフの槽壁の孔で貫通させて外壁と連絡する。これらの管と内部の貯留マーゲンとの接続はガスクロマトグラフ用耐熱パッキングを利用した。マーゲンに貯留された気体は外部から送られる気体(N_2 又は空気)で一定時間毎に排出され,もう一方の定常流の空気と混合されて,EAG 測定の触角の所に排出されるようにした。

この時マーゲン中の気体はかなり高温であるが定常気流と混合する事により冷却される。

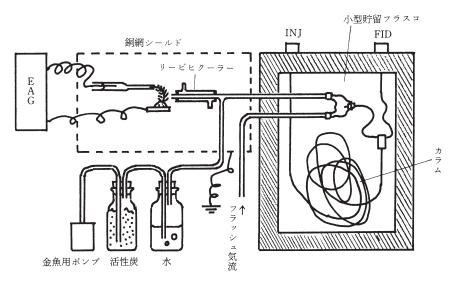


図2. フラッシュ方式による EAG/GLC 連結組立図

しかし、それでも尚冷却が十分でないときには、EAG 測定部分までの管を長くするか、ここに小型リービヒクーラーを装着して冷却する。但し、誘導管が余り長いとフェロモン蒸気の拡散する恐れがある。

なお、貯留のための容量は、特にキャピラリーカラムを使用した時はもっと少なくてよく、内径 $3\sim 4\,\mathrm{mm}$ のガラス管をU字型に曲げたものでも十分である事を認めた。又、この量を必要最小限にする事により、フェロモン蒸気の拡散も少なくなり、気体の冷却も少なくてすむので、以後ほとんどU字ガラス管を使用する方法によった。

なお、マーゲンの貯留気体を排出するためには、20秒毎に最初の頃は20ml注射器で空気を送って行ったが、その後 N_2 ボンベから電磁弁を用いて一定時間毎に一定の条件で解放する事により、一定量の N_2 でフラッシュする方法でも良い結果を得る事を知った。

定常流の空気は金魚用ポンプで送り、先ず活性炭をつめた瓶を通し、次いで水の瓶を通して十分湿気を含ませてから送るようにした。そしてこれが図2のようにフェロモン蒸気を誘ってEAG測定部分にもたらされるようにしたが。この時の定常気流の速度は130ml/分位で好ましい結果を得た。

2. 連続検出方式

ガスクロマトグラフのカラムからの気体はその出口にT字管をつけて2分し,各々同じ長さ(50cm位)の空のキャピラリーカラムで,一方は通常通り FID にもたらして分析に供し,一方は EAG 測定部分に持ってくる。なおこの時,枝分かれの部分にはメイクアップ気流 (N_2) をT字枝の分かれの直前に入れて,流出気体の拡散を防ぎかつそれの EAG への通導を確実にする事が必要である。

フェロモン蒸気をガスクロマトグラフの槽外に誘導するには,図3に示すように槽の壁の 所で導出管(空のキャピラリーカラム管)を加熱して,フェロモン蒸気が凝固しないように

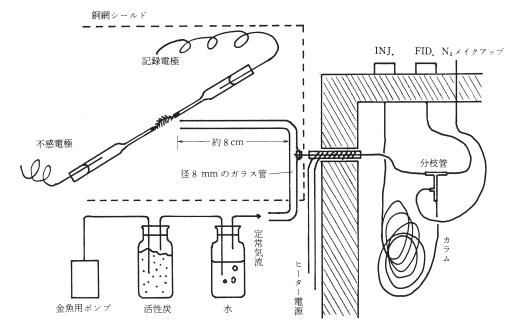


図3. 連続検出方式による EAG/GLC 連結組立図

する事が肝要であるが、このためにはニクローム線を外側から導いて外から加熱できるようにし、その管の中を通す事によって可能になる。この温度はカラム温度(240° C)に対してやや低い($200\sim210^{\circ}$ C)のが適当である事を認めた。

次に槽外に出てから、フェロモン蒸気を定常気流の中に排出させる際、この距離はそれが 凝固しないようにできるだけ短くする事が必要であり、ガスクロマトグラフからの導出口と ほとんど接するようにしてシールドチャンバーを置くように構成した。なお排出部分はガス クロマトグラフのパッキングを利用し、それはキャピラリーカラムの出口を突き刺して、それを定常気流管の側面に作った孔にはめ込むようにした(図3)。

2,3の昆虫のフェロモンに対する上記の EAG/GLC 法の適用実験

上記の2種の方法について、2、3の昆虫のフェロモンの検出に適用した実験例を以下に示す。

- (1) この際のガスクロマトグラフの設定条件: a) 島津 GC-8A (充塡カラム: $1 \text{ m} \times 3 \text{ mm }$ mm j \text
- (2) 昆虫よりのフェロモンフラクションの調製:昆虫(エリ蚕、カイコ、クス蚕など)の蛹を 37° Cの恒温槽に置き、明期/暗期(16時間/8時間)の条件下で羽化せしめ、 $1 \sim 3$ 日

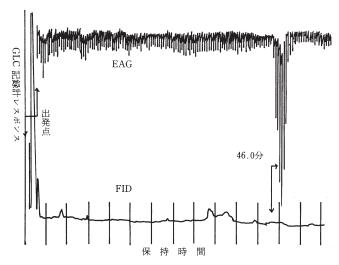


図4. カイコのアンテナに対するカイコ雌の腹部末端部抽出物の EAG/FID (フラッシュ方式による)

後のもので、しかもそれの暗期開始後 4 時間を経たものを取り出し、羽ばたきテストでフェロモンの存在を確認できるものについて、その腹部末端部を切断する。さらに実体顕微鏡下でフェロモン産生部分、即ち第 9 と第10節の間の柔膜の部分を切りとり内部の筋肉組織等の部分も除去して、膜の部分だけを取り出す。これを融点測定用のキャピラリーの一端を閉じて作ったミクロテストチューブ中で 1、2 匹分のものを $10\mu l$ のヘキサンでとかし、この上澄液の $5\mu l$ を GLC に注入して分析する。

雌カイコ抽出物の EAG

2. エリ蚕に対する合成物質の EAG 実験

エリ蚕雄の触角に対する合成物 (4E,9E)-4,9-テトラデカジエニル=ホルメートのフェロモン活性の検出例を図 5 に示す。これは連続検出方式によったものである。この際,ガスクロマトグラフに対する物質の注入量は $1 \, \text{mg/ml}$ のものを $1 \, \mu \text{l}$,即ち $1 \, \mu \text{g}$ であるが,EAG-レ

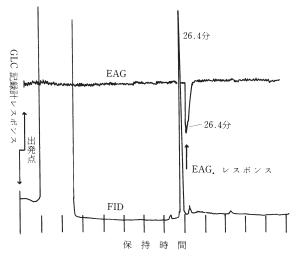


図 5. エリ蚕アンテナに対する(4E, 9E)-4,9-テトラ デカジエニル=ホルメートの EAG/FID (連続検出 方式による)

スポンス及び FID のピークがいずれも26.4分で両者は完全に一致していることがわかる。

3. 雌エリ蚕抽出物の EAG

1, の場合と同様の事をエリ蚕について行ったもので、これは2, の場合と同様、連続検出方式で行ったものである(図6)。EAG-レスポンスの位置は31.8分であるが、これでも相

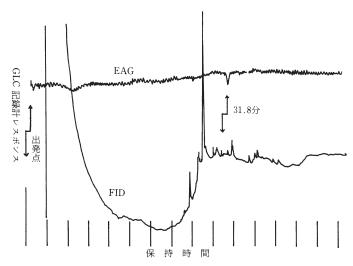


図6. エリ蚕アンテナに対するエリ蚕雌腹部末端部抽出物の EAG/FID (連続検出方式)

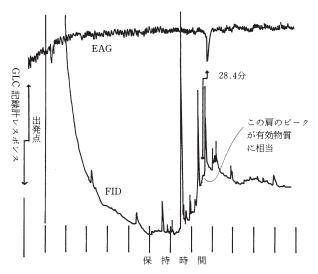


図7. クス蚕のアンテナに対するクス蚕雌腹部末端部抽 出物の EAG/FID (連続検出方式)

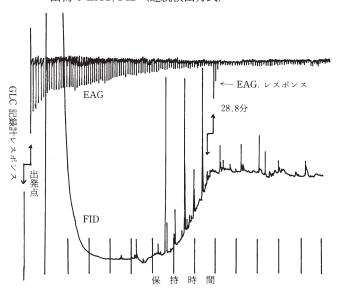


図8. クス蚕のアンテナに対するクス蚕雌の腹部末端部抽出物の EAG/FID (フラッシュ方式)

当する FID のピークは見出されていない。この場合にも FID ピークが出ない程の少量でも EAG 活性が検出されている事を示している。なおこの位置は別途合成したフェロモンと同一の構造の(4E,6E,11Z)-4,6,11-ヘキサデカトリエナールの位置と完全に一致する。

4. クス蚕の性フェロモンの EAG 実験

害虫の一例として、クス蚕について上記の方法を用いてフェロモンの検出の実験を行った。

クス蚕の成虫の雌蛾は、いわゆる羽ばたきテストでは全くフェロモンの存在が検出されない 5)。しかし、今回 EAG/GLC テストでは、 $t_R=28.4$ 分の所に EAG 活性を示す事を初めて確認した。しかしこれに対応する FID のピークは別のピークの肩としてしか見い出されず、極めて微量しか存在しない事を示している(図 7)。なお、これについてはフラッシュ方式でも検出する事ができた(図 8)。この際、ブランクのレスポンスが測定中漸次少なくなっているが、それは使用した触角の機能が測定中にも漸次そこなわれている事を示していると考えられ、この事についてはさらに改良すべく検討が必要である。しかし、明らかにクス蚕のフェロモンの存在が示されている($t_R=28.8$ 分) * 。

結 論

以上,我々の研究室において組立てたEAG/GLC連結装置により,フェロモンのEAG-レスポンスによる検出が可能である事,及びこれを用いて今回初めてクス蚕にもフェロモンが存在する事を確認する事が出来た。

なお、2、3の他の昆虫についても本装置によるフェロモンの存在の検出のテストを行ったが、鱗翅目昆虫でその雌雄の成虫があれば、雄のアンテナを EAG に用い、一方雌の尾部末端部の抽出物を GLC に注入すれば、そのフェロモンの存在及び t_R の値を容易に求め得る事を知った。従って本方法はフェロモンの研究において極めて有用であり、又 EAG の活性と FID のピークからそれの活性の強さを定量的に判定できるため、以後の研究にとって極めて有効である事が予想される。そしてこの事は単にフェロモンだけでなく、他の臭物質の検索にも適用されうると考えられ、今後このような簡単な装置でも新しい昆虫のフェロモンの検索・研究に、又、さらに他の種類の臭覚刺激化合物質の検索にも威力を発揮し得るものと考えている。

要 約

ガスクロマトグラフと触角電図(エレクトロアンテノグラフ)とを連結して、フェロモンを検出する方法について検討し、そのための実用的かつ、簡易な組立てを実行した。そしてそれによって2、3の昆虫フェロモンの検出が可能である事を示した。又、特に害虫の一種

^{*} なお、クス蚕のフェロモンに関してはその構造を解明すべく、エヤランゲン大学のベストマン教授の研究室と共同研究するため、我々の研究室よりクス蚕の蛹を送付して、先方でもこの昆虫のフェロモンの存在を EAG/GLC 法で検討してもらったが、ほぼ同様のカラムを用いて、ほぼ同様の t_R (=28分) の所に EAG 活性を示す事を見い出している。そしてこれに対応する FID の位置も極めて小さいながらピークを見い出している。なお先方の研究室ではこのピークがジメチルヒドラジンでエリ蚕のフェロモンの場合と同様消去され、かつ EAG も消去される事から、このフェロモンがアルデヒド化合物である事を推定している。しかし、構造については、余りにも微量であるため GC/MS にて測定する事すら不可能との事であった。しかし、両研究室において一致した位置に EAG 活性を見い出し得た事は、本研究方法が極めて有効である事を示し、又、我々の研究室でも立派にデータを出し得る事を示している。

でもあるクス蚕(*Dictyoploca japonica*, Lepidoptera Saturniidae)の性フェロモンについては、従来の羽ばたきテストではその存在が認められなかったものであるが、今回この方法で初めてその存在を確認することができた。

謝辞 実験に用いたエリ蚕の蛹は名古屋大学石崎宏矩教授のご好意により供与して頂いた。英国の海外発展天然資源研究所の Hall 博士及び農水省蚕糸・昆虫農業試験研究所の若村定男博士からは EAG 及び EAG/GLC 法に関して種々有益なる御教示を賜った。又,エヤランゲン大学の Bestmann 教授からはクス蚕のフェロモンの分析に関して貴重なるデータを御報知頂いた。ここに記して感謝の意を表する。なお,研究費の一部は長野県テクノハイランド開発機構の補助金及び松籟科学技術振興財団の助成金に依った事を附記する。

文 献

- 1) Schneider, D.: Electrophysiologische untersuchungen von chemo- und mechanorezeptoren der antenne seidenspinners Bombyx mori L., Z. vergl. phys., **40**, 8-41, 1957.
- 2) W. S. レアル・望月文昭・若村定男:コガネムシの行動制御物質:ドウガネブイブイの性フェロモンの GC-EAD, 日本農芸化学会大会(京都), 平成3年3月31日, p. 2(要旨集)。
- 3) Moorhouse, J. E., Yeadon, R., Beevor, P. S., Nesbitt, B. F.: Method for use in studies of insect chemical communication, Nature, 223, 1174-1175, 1969.
- 4) Private Communication (1990) from Hall, D. R. in Overseas Development Natural Resources Institute, UK. Cork, A., Beevor, P. S., Gough, A. J. E. and Hall, D. R.: Gas chromatography linked to electroantennography: A versatile technique for identifying insect semiochemicals.
- 5) Tomida, I.: A pheromonally active substance toward male eri-silk moth in the extract from female giant-silk moth, Part I. Functional group tests of the active substance, Agric. Biol. Chem., 45 (9), 2135-2137, 1981.