

ワモンゴキブリの集合性と繁殖戦略に関する研究

2020

田中真史

## 目次

第1章 序論 .....	1
第2章 ワモンゴキブリの集合フェロモンの産生部位の解析 .....	5
2-1 概要 .....	5
2-2 材料と方法 .....	7
2-2-1 ワモンゴキブリの飼育 .....	7
2-2-2 通常飼料、寒天飼料、及びそれらの飼料に由来するフンの抽出 .....	8
2-2-3 虫体全体の抽出 .....	8
2-2-4 消化管各部の抽出 .....	9
2-2-5 生物試験 .....	9
2-2-6 データ解析 .....	10
2-3 結果 .....	10
2-3-1 通常飼料、寒天飼料とそれらに由来するフンの抽出物の誘引活性 ..	10
2-3-2 虫体全体の抽出物の誘引活性 .....	11
2-3-3 消化管の誘引活性 .....	12
2-4 考察 .....	15
第3章 ワモンゴキブリの誘引物質の絶対立体配置の決定 .....	17
3-1 概要 .....	17
3-2 実験方法と結果 .....	19
3-2-1 化合物 A-F の平面構造 .....	19
3-2-2 化合物 A の絶対立体配置の決定 .....	20
3-2-3 化合物 B の絶対立体配置の決定 .....	21
3-2-4 化合物 C の絶対立体配置の決定 .....	24
3-2-5 化合物 D の絶対立体配置の決定 .....	24
3-2-6 化合物 E の絶対立体配置の決定 .....	28
3-2-7 化合物 F の絶対立体配置の決定 .....	28
3-3 考察 .....	33

第4章 ワモンゴキブリの単為生殖 .....	36
4-1 概要 .....	36
4-2 材料と方法 .....	38
4-2-1 ワモンゴキブリの飼育 .....	38
4-2-2 単為生殖で産まれた幼生のマイクロサテライト解析 .....	38
4-2-3 フローサイトメトリーによる核相の分析 .....	39
4-3 結果 .....	39
4-3-1 未交尾雌が形成した卵鞘からの幼生の孵化 .....	39
4-3-2 マイクロサテライト解析 .....	42
4-3-3 フローサイトメトリー .....	45
4-4 考察 .....	47
5 総合考察 .....	50
5-1 集合フェロモン研究の困難 .....	50
5-2 集合フェロモン研究の課題 .....	52
公表論文 .....	55
謝辞 .....	56
引用文献 .....	57

## 第1章 序論

同種の複数個体が集合を形成することは、多くの昆虫で観察される普遍的な現象である。衛生状態の悪い家屋内ではゴキブリが、光源の周りでは多数のガ類が、夏の公園では大量のセミが集合を形成していることがしばしば観察される。昆虫の集合の要因は多様で、その場所で発生した個体数が多いこと、温度、湿度、光、食餌などの環境要因、個体間の相互作用といったものがあげられる。マイマイガ (*Lymantria dispar*) は数年に一度、大量発生して (Inoue et al. 2019)、それが正の走光性によって光源に誘引される。大量発生の極端な例は周期ゼミ (*Magicicada*) で、発生周期の同調によって 13 年や 17 年に一度、集合を形成する (Sota et al. 2013)。個体間の相互作用で集合が形成、維持されている典型的な例はハチやシロアリなどの社会性昆虫で、生活史を通して集合する。

ゴキブリ類 (Blattodea) については、集合の形成に関わる至近要因として、しばしばフンに含まれる「集合フェロモン」が言及されてきた。集合フェロモンなる化学的因子の存在がチャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) の研究に基づいて提唱されて以降 (Ishii and Kuwahara 1967)、チャバネゴキブリ、ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) といった数種のゴキブリで、この興味深いフェロモンの研究が続けられてきた。ゴキブリ類の集合フェロモンの研究は、チャバネゴキブリについては先行研究が充実しているものの (Ishii and Kuwahara 1967; Sakuma and Fukami 1990, 1993; Wada-Katsumata et al. 2015)、フェロモンの種間比較や害虫の制御といったテーマにつながるような幅広い発展は、未だ達成されていない (佐久間 1994)。チャバネゴキブリについても、集合フェロモンの同定といった基本的な事柄について、継続的に研究が積み重ねられている (Sakuma and Fukami 1990, 1993; Wada-Katsumata et al. 2015)。

本研究では材料としてワモンゴキブリを用いた (図 1-1)。ワモンゴキブリは成虫の体長が 4 cm を超える大型のゴキブリで、アフリカが原産とされているが、現在では全世界に分布している (朝比奈 1991)。飼育が比較的容易で、サイズが大きく取り扱いやすいため、実験材料として古くから用いられてきた (Roth and

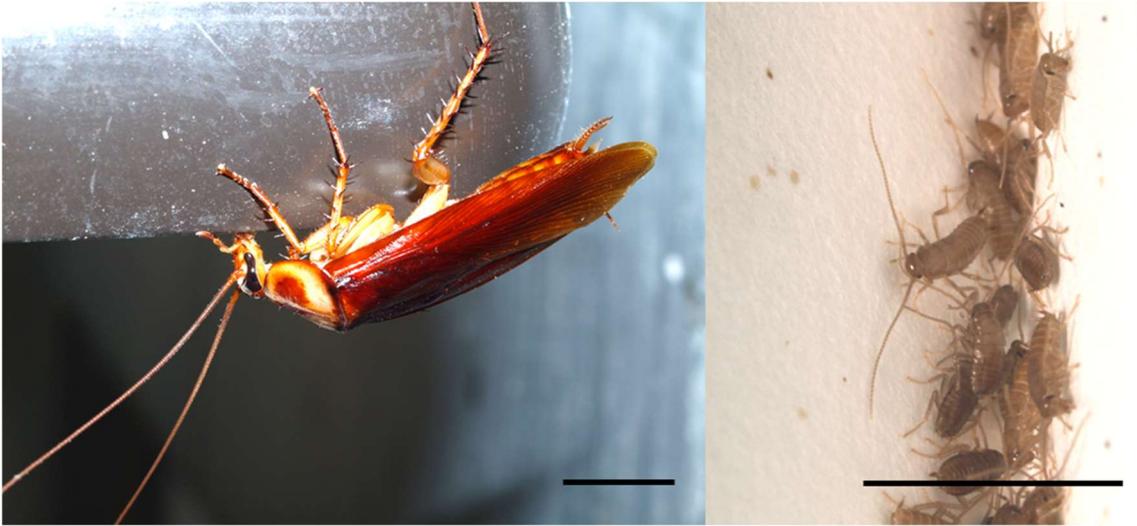


図 1-1: ワモンゴキブリの雄成虫（左）と 1 齢幼生（右）  
スケールバーは 1 cm を表す。

Willis 1952)。人との関わりの中では、衛生害虫や不快害虫として、駆除の対象となる昆虫である。

化学生態学の分野では、雌成虫が放出して、雄成虫の配偶行動を解発する性フェロモン（ペリプラノン類）の構造決定が 1970 年代から 1990 年代にかけて精力的に行われ（Adams et al. 1979; Kuwahara and Mori 1990; Persoons et al. 1976, 1979; Still 1979）、分泌部位や神経応答のメカニズムの詳細も明らかになっている（Abed et al. 1993; Nishino et al. 2018）。

他方、ワモンゴキブリの集合フェロモンの研究は、本種を含む数種のゴキブリ類のフンに含まれる誘引物質の種特異性の調査に始まる（Bell et al. 1972）。その後、本種のフンや体表に含まれる誘引物質として、体表炭化水素、酪酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ペンタエチレングリコール、イソクロマノン類が報告されてきた（McFarlane and Alli 1987; 西村ら 2015; Saïd et al. 2005, 2015）。

これらの先行研究では、ワモンゴキブリの集合フェロモンの存在を当然のように仮定していると思われる。しかしながら、ワモンゴキブリのフン抽出物はチャバネゴキブリなど他種のゴキブリを誘引し、ワモンゴキブリは多くのゴキブリ類のフン抽出物に誘引されることが知られている（Bell et al. 1972; Roth and

Cohen, 1973)。比較的高い種特異性を持つ性フェロモンとはこの点で状況が異なり (Takahashi et al. 1988)、ワモンゴキブリは集合フェロモンで同種を認識して集合しているのではなく、各種ゴキブリ類のフンに含まれている一般的な食餌誘引物質 (餌の匂い) に誘引されている可能性がある (Tsuji 1965)。このため、ワモンゴキブリの集合フェロモンの研究では、フンの中に残留した食餌誘引物質の効果と、集合フェロモンの効果を分離する必要がある。

ゴキブリ類の集合フェロモンについては、腹部末端に分泌部位があるといった、種を超えた共通性は未解明である。分泌部位はフェロモンを研究する際の糸口のひとつであるが、ワモンゴキブリの集合フェロモンの分泌部位は報告されていない。なお、他のゴキブリ類では、*Blaberus craniifer* で大顎腺 (Brossut et al. 1974)、チャバネゴキブリで直腸 (rectal pad) や肛門付近のクチクラ (supra-anal plate) が集合フェロモンの分泌部位として提案されており (Ishii and Kuwahara 1967; Sakuma and Fukami 1991)、チャバネゴキブリでは腸内微生物が生合成に関与することも示唆されている (Wada-Katsumata et al. 2015)。

ワモンゴキブリの雌成虫は通常、性フェロモンを用いて雄成虫を誘引し、有性生殖を行う (Barth 1970; Roth and Willis 1952)。そのため、性フェロモンと別に集合フェロモンで個体が集合を形成することの生物学的意義は、明らかではないと思われる。さらにワモンゴキブリでは、雌のみで単為生殖を行って次世代を残すことが可能であることが知られている (Katoh et al. 2017; Roth and Willis 1956; 高橋 1924; Xian 1998)。集合を形成して雌雄が会う場合は、その地域の個体密度が低すぎないことが必要であるため、個体密度が低い地域では単為生殖は有性生殖よりも有利な繁殖戦略となり得る。

本研究では、ワモンゴキブリの集合フェロモンの存在そのものを検証することから始めた。その上で、集合フェロモンの虫体内での分布を調べ、中腸付近を食餌が通過する際に、フンに集合フェロモンが混入することを明らかにした (第2章)。また、集合フェロモンの候補物質であるイソクロマノン類化合物の絶対立体配置を決定し、化学構造と誘引活性の相関を調べるための基礎となる知見

を得た（第3章）。さらに、ワモンゴキブリが集合できなかつた場合の非常手段となり得る単為生殖の細胞学的メカニズムを明らかにした（第4章）。これらはいずれも、ワモンゴキブリの集合性の化学的基盤や繁殖戦略の詳細を明らかにするために重要となる知見であり、今後のゴキブリ類の研究のさらなる発展に寄与するものと思われる。

## 第2章 ワモンゴキブリの集合フェロモンの産生部位の解析

### 2-1 概要

本章では、ワモンゴキブリの集合フェロモンの虫体内での産生と、その局在部位を明らかにすることを目的とした。ワモンゴキブリの集合フェロモンが記載されてから40年以上が経過したものの (Bell et al. 1972)、その化学的実体には不明な点が多い。その原因として、集合フェロモンの分泌部位が解剖学的に明らかではなく、集合フェロモンの抽出材料として、ゴキブリが排泄したフンを利用しなければならなかった点が挙げられる。ほとんどの先行研究で、ワモンゴキブリの集合フェロモンの抽出材料としてフンを選択しているが (Bell et al. 1972; McFarlane and Allie 1987; 西村ら 2015; Saïd et al. 2015)、フンの抽出物は、食餌誘引物質など、様々な夾雑物を含んでおり、それらの誘引活性が生物試験に影響を与えている可能性がある。ゴキブリ類の食餌誘引物質は、学術論文として報告されているものから (Tsuji 1965)、経験的に知られているものまで豊富に存在している。そのため、フン抽出物で得られる誘引活性が、ゴキブリの分泌した集合フェロモンではなく、食餌に由来する可能性が否定できない。

そこで本章では、食餌誘引物質の影響を可能な限り排除し、ワモンゴキブリの集合フェロモンの効果のみを評価できる実験系の確立を試みた。ワモンゴキブリが雑食性であるという性質を利用して、食餌誘引物質をほとんど含まない寒天及びシヨ糖のみからなる食餌 (寒天飼料) でワモンゴキブリを飼育し、フンや虫体に含まれる食餌誘引物質の影響を減らした。集合フェロモンの産生部位を特定するため、寒天飼料で消化管の内容物を置換した後に、その消化管をいくつかの部位に解剖して、各部位の抽出物の誘引活性を調べた。ワモンゴキブリのフンには雌が分泌し、雄を誘引する性フェロモン (ペリプラノン類; Adams et al. 1979; Barth 1970; Kuwahara and Mori 1990; Persoons et al. 1976, 1979; Roth and Willis 1952; Rust et al. 1976; Still 1979) が混入する可能性があるため、生物試験には性フェロモンの影響をほとんど受けないと考えられる1齢幼生を用いた (Bell et al. 1984; Chow and Wang 1981)。

本章の結果は、ワモンゴキブリのフンに含まれる誘引物質が実際に虫体に由来する化合物であること、すなわち「集合フェロモン」であることを示した。また、中腸の抽出物と消化管の他の部位の抽出物の誘引活性を比較して、中腸が集合フェロモンの分泌部位もしくは貯蔵部位であることを示した。これらの結果は、ワモンゴキブリの集合フェロモンの同定や合成経路といった、さらなる詳細の解明に寄与すると思われる。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 ワモンゴキブリの飼育

ワモンゴキブリのコロニーは、温度  $25 \pm 1.5$  °C、明暗周期 16:8 h の条件で維持した。ワモンゴキブリの継代飼育にはマウス及びラット用の飼料 (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan; 以後、通常飼料と称する) を用いたが、本章では、新たに作成した砂糖入り寒天飼料 (以後、寒天飼料と称する) を与えることで、通常飼料に含まれている食餌誘引物質の影響を除くことを試みた。寒天飼料は 0.5% の寒天 (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) と 10% のグラニュー糖 (Mitsui Sugar, Tokyo, Japan) を蒸留水に混ぜて煮沸し、100 mL ずつポリプロピレン容器上で凝固させたものである。孵化後 18 週齢のワモンゴキブリ幼生 (頭幅  $4.15 \pm 0.51$  mm) の一部を隔離し、寒天飼料を与えて実験に用いた (図 2-1)。寒天飼料を与えたことによる死亡率の極端な増加、生育の遅延といった現象は観察されなかった。寒天飼料を与えて 3 ヶ月後の幼生の生存率は約 85% (1714 匹 / 2013 匹) で、成虫変態の時期は孵化後約 24 週であった。本章の実験では、食餌とフンの誘引活性を対比する試験以外では、寒天飼料を用いて飼育した虫体やその虫の直腸内のフンを抽出材料として用いた。オルファクトメーター (Sakuma and Fukami 1985) による生物試験には 1 齢幼生 (孵化後 7-10 日齢) を用いた。

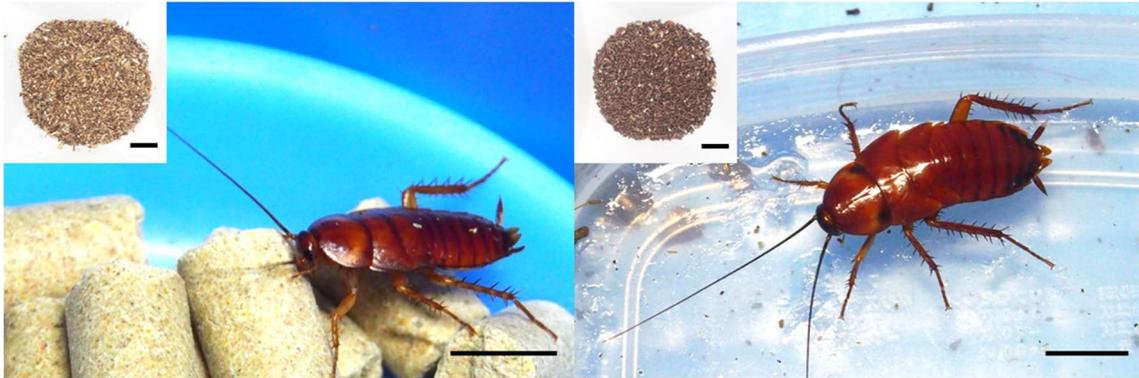


図 2-1: ワモンゴキブリの食餌の変更

腸管内容物から通常飼料を除くために、幼生の食餌を孵化後 18 週目に通常飼料（左）から寒天飼料（右）へ変更し、2 週間以上飼育してから抽出を行った。それぞれの写真の左上には、通常飼料（左）及び寒天飼料（右）で飼育したワモンゴキブリから採取したフンの写真を挿入した。スケールバーは 1 cm を表す。

#### 2-2-2 通常飼料、寒天飼料、及びそれらの飼料に由来するフンの抽出

通常飼料、寒天飼料、及びそれらの飼料で飼育したワモンゴキブリのフンをジクロロメタンで 30 分間抽出した。成虫が高い割合で入っている飼育容器の底に、1 週間以内に堆積した乾燥状態のフンを抽出に用いた。抽出では重量／溶媒量を、通常飼料は 10 g/35 mL、寒天飼料は 20 g/50 mL、通常飼料由来のフンは 5 g/10 mL、寒天飼料由来のフンは 10 g/25 mL とした。寒天飼料を 4 週間以上与えた幼生（頭幅 4.6 mm）の体内のフンは、幼生の腹部を軽く押して、直腸内のフンの排泄を促し、そのフンをジクロロメタンで 30 分間抽出した。重量／溶媒量は 12.8 mg/1.5 mL とした。

#### 2-2-3 虫体全体の抽出

2 週間以上寒天飼料で飼育した 10 匹の幼生（頭幅  $4.78 \pm 0.21$  mm）を二酸化炭素で麻酔した。ガラス容器中で 25 mL のヘキサンを用いてその体表を 1 分間抽出し、体表炭化水素をある程度取り除いた。その後、25 mL のジクロロメタ

ンで 30 分間抽出を行った。ヘキサン抽出物とジクロロメタン抽出物を生物試験に用いた。

#### 2-2-4 消化管各部の抽出

寒天飼料で 2 週間以上飼育した幼生（頭幅  $4.71 \pm 0.17$  mm）を二酸化炭素で麻酔し、ヘキサンで 1 分間体表を抽出した後に、解剖を行い、消化管（食道から直腸及び腹部 9、10 節）を得た。その消化管を分割し、10 個体から得られた各部をまとめて、5 mL のジクロロメタンで 30 分間抽出した。消化管（食道から直腸及び腹部 9、10 節）を除いた虫体の残りの部分（胴体）は、10 匹分を 50 mL のジクロロメタンで 30 分間抽出して、生物試験に供した。ワモンゴキブリの消化管各部の名称は、Cornwell (1968) と Day and Powning (1949) に準じた（図 2-3A）。

#### 2-2-5 生物試験

抽出物の誘引活性は T 字型オルファクトメーター（Sakuma and Fukami 1985）を用いて測定した。生物試験は、温度  $25 \pm 1.5$  °C、相対湿度  $50 \pm 10\%$  の条件で行った。装置の中心からスタートした供試虫（孵化後 7–10 日齢のワモンゴキブリ 1 齢幼生）に、抽出物で匂い付けされた風速 5 cm/s の気流と、対照の清浄な気流を選択させた。各試行では、約 200 匹の 1 齢幼生を同時に用い、暗黒下で 5 分間の選択を行わせた。1 回の試行では合計 40–150 匹の幼生が試料区と対照区にトラップされた。トラップされた幼生の数が合計で 100 匹以上になるまで、同一の用量での試験を繰り返した。1–3 回の試行で得られた数値をまとめて、1 用量での試験結果とした。ネガティブコントロール（ジクロロメタン）とポジティブコントロール [ワモンゴキブリのフンで汚染された濾紙のメタノール抽出物（乾物重量 10 µg）] を用いた実験系の確認を、抽出物の試験の前後で行った。抽出物の用量は、試料及びフン抽出物については抽出に用いたサンプルの重量等量で測り、幼生の抽出物については匹等量で測った。抽

出物は減圧濃縮を行いフンと通常飼料は 1 g equivalent (eq.)/mL、寒天飼料は 4 g eq./mL、直腸内のフンは 10 mg eq./mL、虫体及び消化管抽出物は 10 nymph eq./mL に調整し、生物試験ではそれらの 10 倍希釈系列を試料区に供した。

#### 2-2-6 データ解析

選択試験では、試料区にトラップされた供試虫の数 ( $N_s$ ) と対照区にトラップされた供試虫の数 ( $N_c$ ) を数えた。選好性指数 (PI; preference index) を、

$$PI = (N_s - N_c) / (N_s + N_c)$$

と定義し、誘引活性の判定に用いた (Sakuma and Fukami 1985)。定義より  $-1 \leq PI \leq 1$  で、 $PI = 0$  は試料区と対照区に同数の供試虫がトラップされたことを、 $PI = 1$  はすべての供試虫が試料区にトラップされたことを表す。PI の 95%信頼区間は、Clopper-Pearson の方法で求めた。各用量の PI の有意性はカイ 2 乗検定を用いて判定し、多重性はボンフェローニ法で補正した。異なるサンプル間の用量反応曲線の比較には尤度比カイ 2 乗検定を用いた。PI = 0.5 となるような用量を中央有効用量 ( $ED_{50}$ ; Effective Dose 50) と定義し、プロビット回帰分析を用いて推定した (Sakuma 1998)。すべての統計解析は R-3.4.2.を用いて行った (R Core Team 2018)。

### 2-3 結果

#### 2-3-1 通常飼料、寒天飼料とそれらに由来するフンの抽出物の誘引活性

ワモンゴキブリの 1 齢幼生は通常飼料の抽出物に誘引されたが ( $ED_{50} = 6.0 \times 10^3 \mu\text{g eq.}$ ; 表 2-1)、寒天飼料の抽出物は  $10^4 \mu\text{g eq.}$  及び  $10^5 \mu\text{g eq.}$  の用量でも誘引活性が認められなかった (図 2-2A)。

一方、通常飼料と寒天飼料で飼育したワモンゴキブリのフンの抽出物は、飼料の種類によらず同等の誘引活性を示した (尤度比カイ 2 乗検定、 $p = 0.52$ ; 図 2-2B)。通常飼料由来のフンの  $ED_{50}$  は  $5.5 \times 10^2 \mu\text{g eq.}$  で、寒天飼料由来のフンの  $ED_{50}$  は  $4.4 \times 10^2 \mu\text{g eq.}$  だった (表 2-1)。

以上のことから、飼料に含まれる食餌誘引物質以外に、ワモンゴキブリの虫体内で産生される誘引物質が存在することが推測できた。また、通常飼料で飼育した虫体を抽出材料とすると、飼料に含まれている食餌誘引物質が実験結果に影響する可能性があることが分かった。そのため、以降の虫体を抽出する実験では、寒天飼料で飼育した虫体を抽出材料とした。

フンに含まれる誘引物質がフンの排泄後に生成する可能性を考慮して、寒天飼料で飼育したワモンゴキブリの直腸内の排泄前のフンを抽出し、その誘引活性を調べた。抽出物は排泄後のフンの抽出物と同程度の強い誘引活性を示し

( $ED_{50} = 2.9 \times 10^2 \mu\text{g eq.}$ ; 表 2-1、図 2-2C)、フンに含まれる誘引物質がワモンゴキブリの虫体内で産生されることが強く示唆された。

### 2-3-2 虫体全体の抽出物の誘引活性

虫体を段階的に抽出して、虫体のヘキサン抽出物とジクロロメタン抽出物を作成した。無極性溶媒のヘキサンによってワモンゴキブリの体表炭化水素を抽出し、ジクロロメタンによって分子内に極性官能基を持つ揮発性有機化合物を抽出した。このうち、ヘキサン抽出物には誘引活性を確認できなかった (表 2-1、図 2-2D)。先行研究では体表炭化水素の誘引活性が示唆されているものの (Baker et al. 1963; Saïd et al. 2005)、本研究で用いた試験法では体表炭化水素の影響は無視できるものと考えられた。ジクロロメタン抽出物には、幼生に対する誘引活性を確認できた ( $ED_{50} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ nymph eq.}$ ; 表 2-1、図 2-2D)。

表 2-1: 飼料、フン、虫体の抽出物の中央有効用量 (ED<sub>50</sub>)<sup>a</sup>

試料	ED <sub>50</sub>	単位
通常飼料	6.0×10 <sup>3</sup>	µg diet eq.
寒天飼料	- <sup>b</sup>	
通常飼料由来のフン	5.5×10 <sup>2</sup>	µg feces eq.
寒天飼料由来のフン	4.4×10 <sup>2</sup>	µg feces eq.
直腸内のフン	2.9×10 <sup>2</sup>	µg feces eq.
虫体 (ヘキササン抽出)	-	
虫体 (ジクロロメタン抽出)	1.7×10 <sup>-3</sup>	nymph eq.

<sup>a</sup> 中央有効用量はプロビット回帰分析を用いて推定した。

<sup>b</sup> -は誘引活性が認められなかったことを示す。

### 2-3-3 消化管の誘引活性

消化管全体（食道から直腸及び腹部 9、10 節）の抽出物には幼生に対する誘引活性が確認できた（図 2-3B）。消化管以外の胴体の抽出物にも誘引活性は認められた。それらの用量反応曲線に統計的有意差は存在しなかったものの（尤度比カイ 2 乗検定、 $p = 0.22$ ; 図 2-3B）、消化管と胴体の乾燥重量 [消化管 21 mg、胴体 178 mg（10 匹の平均値）] の差を考慮すると、虫体の誘引物質は高濃度で消化管に分布と考えられた。消化管における誘引物質の分布を詳細に調べるために、消化管各部の抽出物の誘引試験を行った。その結果、中腸から結腸の抽出物にその前後の部位（食道から盲嚢、直腸と腹部 9、10 節）の抽出物を上回る誘引活性が認められた（尤度比カイ 2 乗検定、 $p < 0.01$ ; 図 2-3C）。次いで、中腸と結腸をそれぞれ抽出して抽出物の誘引活性を調べた。抽出材料のロットの異なる独立した 2 回の試験で結果が異なったものの、中腸に誘引活性が集中する傾向が認められた（図 2-3D）。これらの一連の結果から、ワモンゴキブリの集合フェロモンが主に中腸に分布することが示唆された。

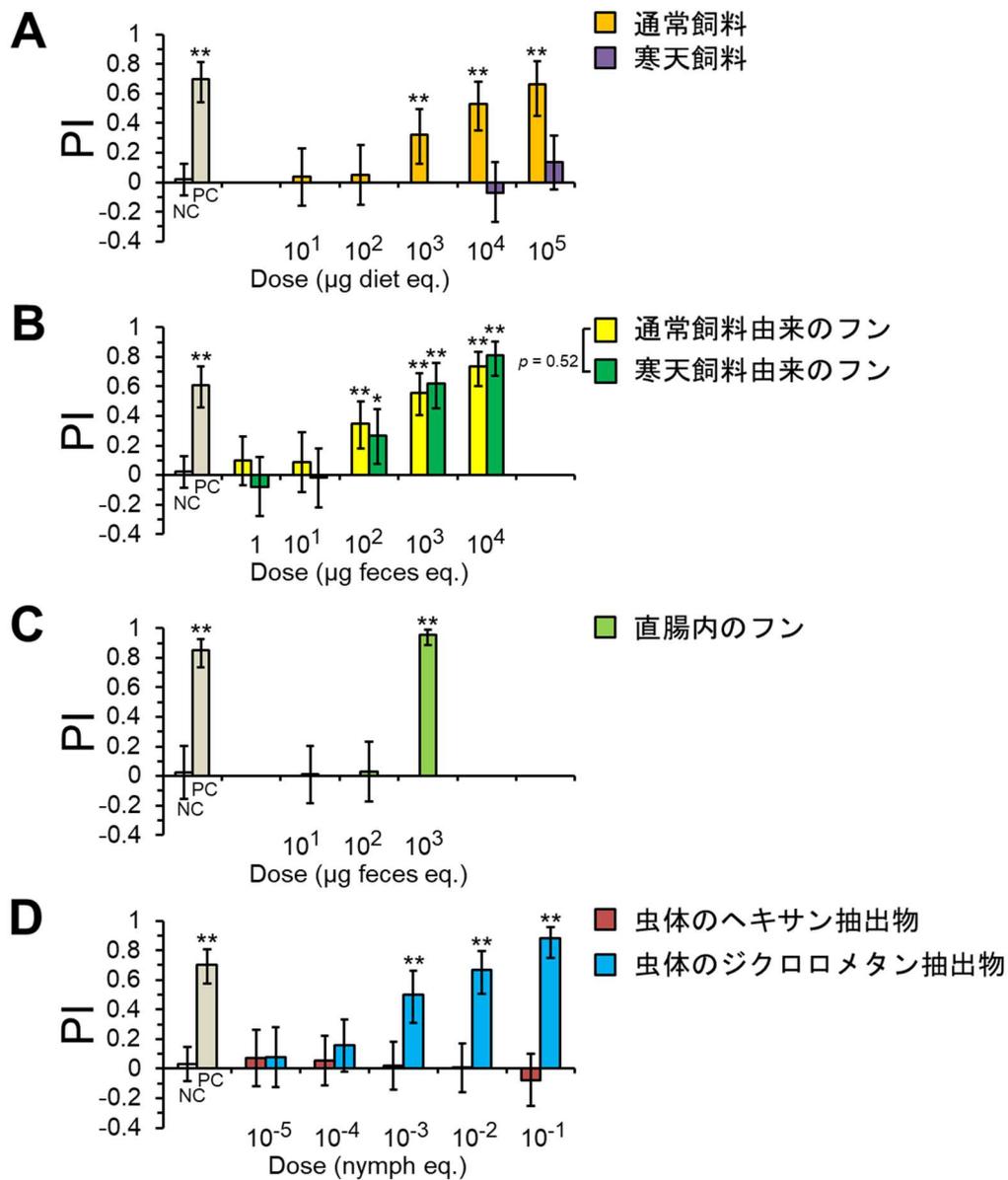


図 2-2: 様々な抽出物に対するワモンゴキブリ 1 齢幼生の行動応答

飼料 (A)、フン (B、C)、虫体全体 (D) の抽出物に対するワモンゴキブリ 1 齢幼生の行動応答を、オルファクトメーター (Sakuma and Fukami 1985) を用いた選択試験で測定した。グラフの縦軸は選好性指数 (preference index; PI) を、エラーバーは 95% 信頼区間を表す ([2-2-6 データ解析] 参照)。飼料とフンの抽出物 (A、B、C) は抽出材料の μg 等量 (equivalent; eq.) で、虫体全体の抽出物 (D) は匹等量でサンプルの用量を表した。選好性指数の有意性はカイ 2 乗検定で判定した (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ボンフェローニ補正)。グラフ内の NC はネガティブコントロール (溶媒のみ) を、PC はポジティブコントロールを意味する ([2-2-5 生物試験] 参照)。

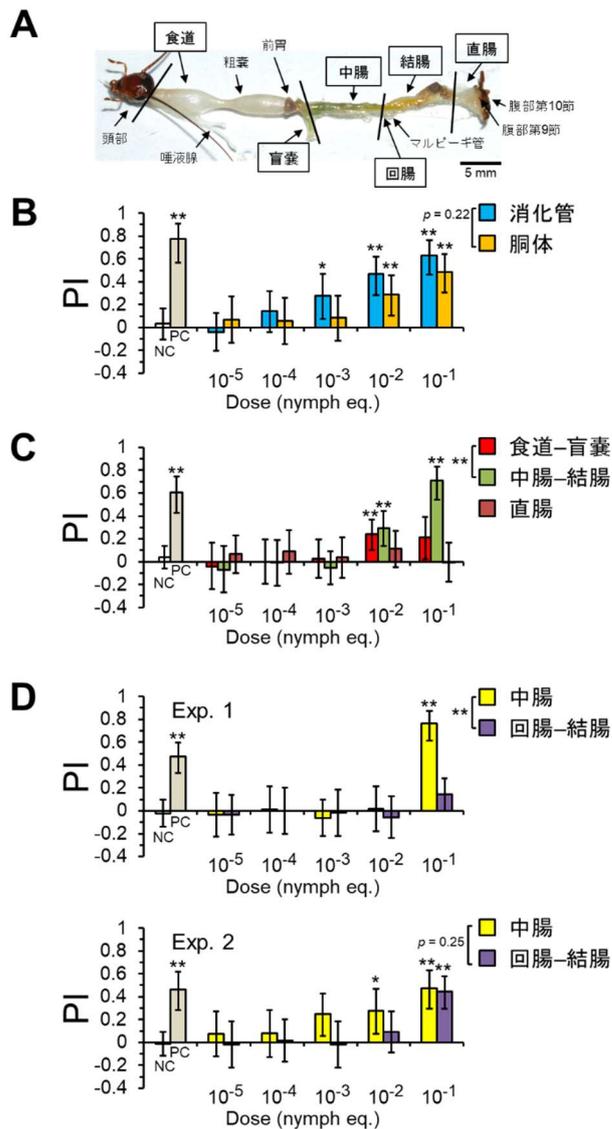


図 2-3: 消化管の各抽出物に対するワモンゴキブリ 1 齢幼生の行動応答

(A) ワモンゴキブリの消化管各部の名称。用語は Cornwell (1968) と Day and Powning (1949) に準じた。スケールバーは 5 mm を表す。(B) 消化管全体と胴体の抽出物に対する行動応答。(C) 消化管の前部、中央部、後部の抽出物に対する行動応答。(D) 中腸及び回腸から結腸の抽出物に対する行動応答。試験は独立に 2 回行った [experiment (exp.) 1, 2]。

生物試験は  $10^{-5}$ – $10^{-1}$  匹等量の抽出物で行い、選好性指数 (PI) の有意性はカイ 2 乗検定で判定した (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ボンフェローニ補正)。グラフ内の NC はネガティブコントロール (溶媒のみ) を、PC はポジティブコントロールを意味する ([2-2-5 生物試験] 参照)。

## 2-4 考察

ワモンゴキブリの集合フェロモンに関する先行研究では、食餌誘引物質がフンに残留している可能性について、慎重な検討を行ってこなかったものと思われる。しかしながら、本章での「通常飼料」やそれに類似した飼料でワモンゴキブリを飼育した場合、そのフンは集合フェロモンの性状を解析する際に、理想的なサンプルとはいえない。そのため本章では、食餌誘引物質をほとんど含まない寒天飼料をワモンゴキブリに与え、その虫体やその虫の排泄したフンを抽出材料に用いた。寒天飼料で飼育したワモンゴキブリのフンにも強い誘引活性が存在することは、フンに含まれる誘引物質がワモンゴキブリの体内で産生されていることを強く示唆する。

消化管各部の誘引活性は、ワモンゴキブリの集合フェロモンが主に中腸に分布していることを示唆する。チャバネゴキブリでは、無菌状態で飼育した個体にコロニーから単離した微生物を与えることで、その個体のフンに吉草酸、イソ吉草酸などの揮発性有機酸が混入して、それらの混合物が集合誘引物質として機能することが報告されている (Wada-Katsumata et al. 2015)。一方で、ワモンゴキブリの集合フェロモンに対する腸内微生物の関与については、今後の課題である。

約50年前に石井象二郎と桑原保正の研究によってチャバネゴキブリの集合フェロモンが記載されて以来 (Ishii and Kuwahara 1967)、ゴキブリ類の集合フェロモンの単離と同定には多大な労力が費やされ、多くの興味深い報告が行われてきた。チャバネゴキブリの集合フェロモンに関しては、本章でも用いたT字型オルファクトメーターの開発に始まる一連の報告があり、匂いとして作用し、遠方から個体を誘引する集合誘引物質としてアミノアルコールが、集合拘束物質としてステロイド配糖体が記載された (Sakuma and Fukami 1985, 1990, 1991, 1993; Sakuma et al. 1997)。集合拘束物質とは、接触化学受容され、受容した個体の移動を抑制する化合物であり、集合誘引物質とは異なる集合フェロモンの形態である (佐久間 1994; Sakuma and Fukami 1991)。チャバネゴキブリで

は、集合拘束物質が肛門付近のクチクラ (supra-anal plate) から分泌されることが報告された (Sakuma and Fukami 1991)。一方、近年の研究は、フンに含まれる脂肪酸の混合物が誘引物質として機能し、その産生には腸内の微生物が寄与していることを報告している (Wada-Katsumata et al. 2015)。

これまでワモンゴキブリでは、フンに含まれる集合フェロモンの成分や種特異性が報告されてきた (Bell et al. 1972; Leoncini and Rivault 2005; McFarlane and Alli 1987; 西村ら 2015; Roth and Cohen 1973; Saïd et al. 2005, 2015)。しかしながら、集合フェロモンの分泌部位や、食餌誘引物質も豊富に存在する屋内や野外における集合フェロモンの効果といった重要な事柄については、課題として残されている部分が多い。本章の内容が、今後のゴキブリ類の集合フェロモン研究の一助となることを願う。

## 第3章 ワモンゴキブリの誘引物質の絶対立体配置の決定

### 3-1 概要

ワモンゴキブリの集合フェロモンの単離、同定は長年試みられてきた。そしてフンや虫体に含まれる誘引物質として、体表炭化水素、酪酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ペンタエチレングリコール、イソクロマノン類が提案されてきた (McFarlane and Alli 1987; 西村ら 2015; Saïd et al. 2005, 2015)。本章では、ワモンゴキブリのフンから単離された6種のイソクロマノン類 (化合物 A-F) の絶対立体配置の決定を行った。これらのイソクロマノン類は、ワモンゴキブリのフン 176 kg の抽出物を、分画、精製し、オルファクトメーター (Sakuma and Fukami 1985) を用いた生物試験で、誘引活性を有する画分を特定する作業を繰り返すことで単離された (西村ら 2015; 表 3-1)。すべての化合物に、不斉炭素原子が2個ずつ存在していたため、その絶対立体配置を決定した (表 3-1、図 3-1)。

化合物の絶対立体配置が異なると、その生理活性に大きな差が表れる場合がある。例えばワモンゴキブリの性フェロモン (ペリプラノン-B) では、雄に性的興奮を引き起こす濃度の閾値が、天然物とその対掌体で  $10^4$ – $10^5$  倍の差があり、対掌体の活性は天然物に比べてかなり低いことが報告されている (Adams et al. 1979)。このように絶対立体配置が生理活性に大きな影響を与えている場合、化合物に特異性の高いレセプターを想定することができる。実際、ワモンゴキブリの性フェロモンについては、触角上の特徴的な感覚子や、その下流の神経系の応答が詳しく調べられている (Nishino et al. 2018)。

本章では、6種のイソクロマノン類の絶対立体配置を、円二色性スペクトルの測定と、キラル HPLC による分析で決定し、絶対立体配置と化合物の誘引活性の関係や、生合成経路についての考察を行った。

表 3-1: ワモンゴキブリのフンから単離されたイソクロマノン類の平面構造

化合物	平面構造	分子式	分子量
A, B <sup>a</sup>		$C_{12}H_{14}O_3$	206
C, D <sup>b</sup>		$C_{13}H_{16}O_3$	220
E		$C_{15}H_{20}O_3$	248
F		$C_{16}H_{22}O_3$	262

<sup>a</sup> 化合物 A は 3、4 位が *trans* 型、化合物 B は 3、4 位が *cis* 型。

<sup>b</sup> 化合物 C は 3、4 位が *trans* 型、化合物 D は 3、4 位が *cis* 型。

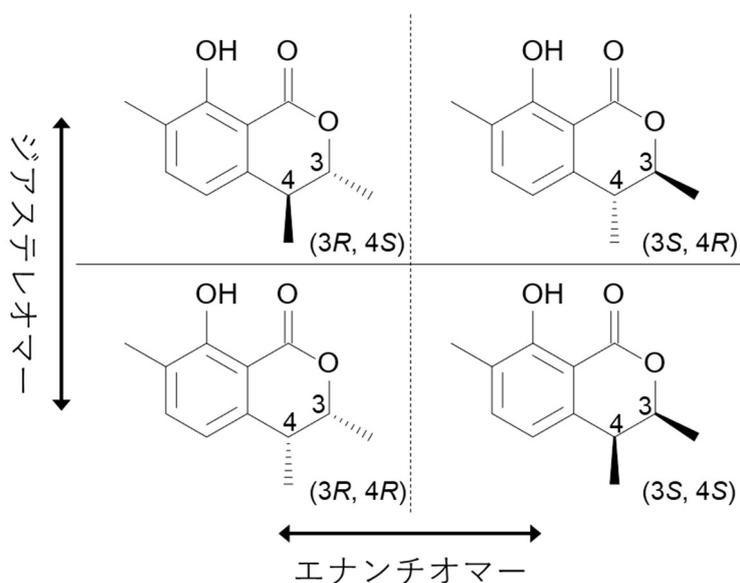


図 3-1: ジアステレオマーとエナンチオマーの関係

化合物 A (上段)、B (下段) を例として、ジアステレオマーとエナンチオマーの関係を図示した。

### 3-2 実験方法と結果

#### 3-2-1 化合物 A-F の平面構造

ワモンゴキブリのフン 176 kg の抽出物の活性画分を、T 字型オルファクトメーター (Sakuma and Fukami 1985) を用いた生物試験で追跡することによって、0.16–4.9 mg の天然 (Nat.) イソクロマノン類 (Nat. A–F) が単離された。Nat. A–F の相対立体配置は、精密質量分析による分子式の決定および、マススペクトルと二次元 NMR スペクトルの解析で推定され、ラセミ体の合成物 (Syn.) を用いて決定された (表 3-1; 西村ら 2015)。Nat. A–F は、8-hydroxy-7-methyl-isochroman-1-one を共通の基本骨格とする化合物で、それぞれ 2 個ずつ不斉炭素原子を持ち、化合物 A と B、化合物 C と D はジアステレオマーの関係だった。化合物 E と化合物 F も、エナンチオマーを無視すると、理論的には平面構造を同じくする 2 種類のジアステレオマーが存在する。しかしながら、Nat. A–D のジアステレオマーを分離できる HPLC 条件で分析しても Nat. E, F は分離することはなく、どちらの天然物もほぼ単一のジアステレオマーからなると推定した。本章では、Nat.

A-F の絶対立体配置を、キラル HPLC による光学分割及び、円二色性スペクトルの解析を用いて決定した。キラル HPLC 分析では、化合物に応じて、アミロース系、セルロース系、シクロデキストリン系のキラルカラムを用いてエナンチオマーの光学分割を行い、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M10Avp, Shimadzu, Kyoto, Japan) で吸光度を測定することで、化合物を検出した。天然物のエナンチオマー存在比は、吸光度 (254 nm) のクロマトグラフの面積から推定した。円二色性スペクトルは 190–400 nm の波長で測定し、200–280 nm のコットン効果の符号に着目した (J-805, JASCO, Tokyo, Japan)。以下、各化合物の絶対立体配置の決定について、手順と得られた結果を示す。

### 3-2-2 化合物 A の絶対立体配置の決定

Syn. A (3*R*, 4*S*)と Syn. B (3*S*, 4*S*)からなるジアステレオマー混合物 (西村ら 2015) を、順相 HPLC (silica-gel, MtOAc/*n*-hexane) で分割して、Syn. A (3*R*, 4*S*)を得た。Nat. A と Syn. A (3*R*, 4*S*)の円二色性スペクトルはどちらも 245 nm 付近に特徴的な正のコットン効果を示したため、Nat. A の主要なエナンチオマーの絶対立体配置を(3*R*, 4*S*)と推定した (図 3-2B 上下)。Syn. A (エナンチオマー混合物) はアミロース系のキラルカラム (YMC Amylose-C 4.6×250 mm, 5 μm, 2%EtOH/*n*-hexane) で光学分割ができた (図 3-2A 上)。HPLC 分取物の円二色性スペクトルの測定によって、キラルカラム上でリテンションタイムが早いエナンチオマー [Syn. A (1st)] の絶対立体配置が(3*R*, 4*S*)、遅いエナンチオマー [Syn. A (2nd)] の絶対立体配置が(3*S*, 4*R*)であると決定した (図 3-2B 下)。Nat. A を同一の条件で HPLC 分析すると、単一のエナンチオマーではなく、2 種類のエナンチオマーの混合物であることが判明し、それらのキラルカラム上でのリテンションタイムの測定、及び Syn. A (エナンチオマー混合物) との同時注入 (co-injection) によって、主要なエナンチオマーの絶対立体配置を(3*R*, 4*S*)と決定した (図 3-2A 中下)。この結果は、円二色性スペクトルを用いた推定と整合した。紫外線吸光 (254 nm) のクロマトグラムの面積比を用いて、Nat. A のエナンチオマーの混合比を(3*R*,

4*S*):(3*S*, 4*R*) = 94:6 と推定した (図 3-2A 下)。

### 3-2-3 化合物 B の絶対立体配置の決定

Syn. B (エナンチオマー混合物) がセルロース系のキラルカラム (YMC Cellulose-SB 4.6×250 mm, 5 μm, 5%MTBE/*n*-hexane) で光学分割できることを確かめたのち、分取物と Syn. B (3*R*, 4*R*) (西村ら 2015) の円二色性スペクトルを照合した (図 3-3B)。その結果、リテンションタイムが早いエナンチオマー [Syn. B (1st)] の絶対立体配置が(3*S*, 4*S*)、遅いエナンチオマー [Syn. B (2nd)] の絶対立体配置が(3*R*, 4*R*)であると判明した (図 3-3A 上)。Nat. B を同一の条件で HPLC 分析すると、単一のエナンチオマーではなく、2 種類のエナンチオマーの混合物であることが判明し、それらのキラルカラム上でのリテンションタイムの測定、及び Syn. B (エナンチオマー混合物) との同時注入 (co-injection) によって、主要なエナンチオマーの絶対立体配置を(3*R*, 4*R*)と決定した (図 3-3A 中下)。紫外線吸光 (254 nm) のクロマトグラムの面積比を用いて、Nat. B のエナンチオマーの混合比を(3*R*, 4*R*):(3*S*, 4*S*) = 83:17 と推定した (図 3-3A 下)。

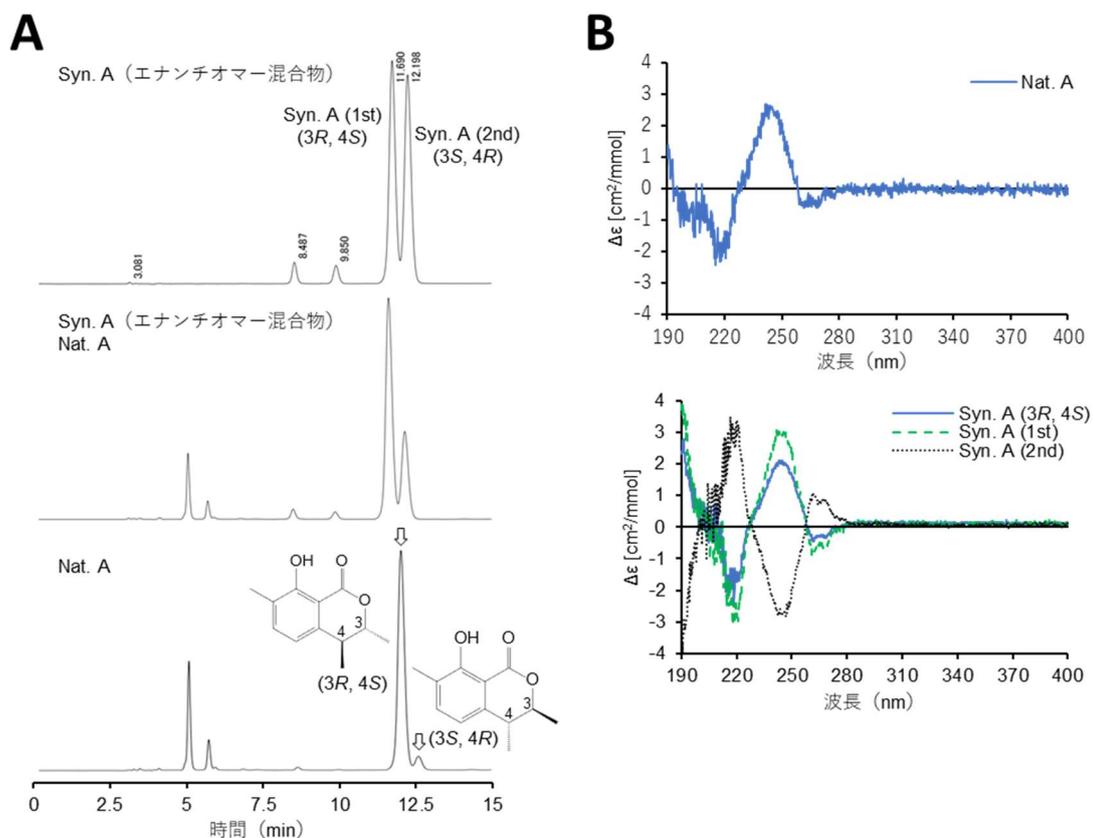


図 3-2: 天然の化合物 A (Nat. A) の絶対立体配置の決定

(A) アミロース系のキラルカラムを用いた HPLC 分析 [エナンチオマー混合物 (Syn. A; 上)、エナンチオマー混合物と天然物 (Nat. A) の同時注入 (中)、天然物 (下)]。合成物はキラルカラム上で保持時間の異なる Syn. A (1st) と Syn. A (2nd) に分離した。

(B) 天然物 (Nat. A; 上) 及び、光学活性体 [Syn. A (3*R*, 4*S*)]、エナンチオマー合成物の HPLC 分取物 [Syn. A (1st)、Syn. A (2nd)] の円二色性スペクトル (下)。

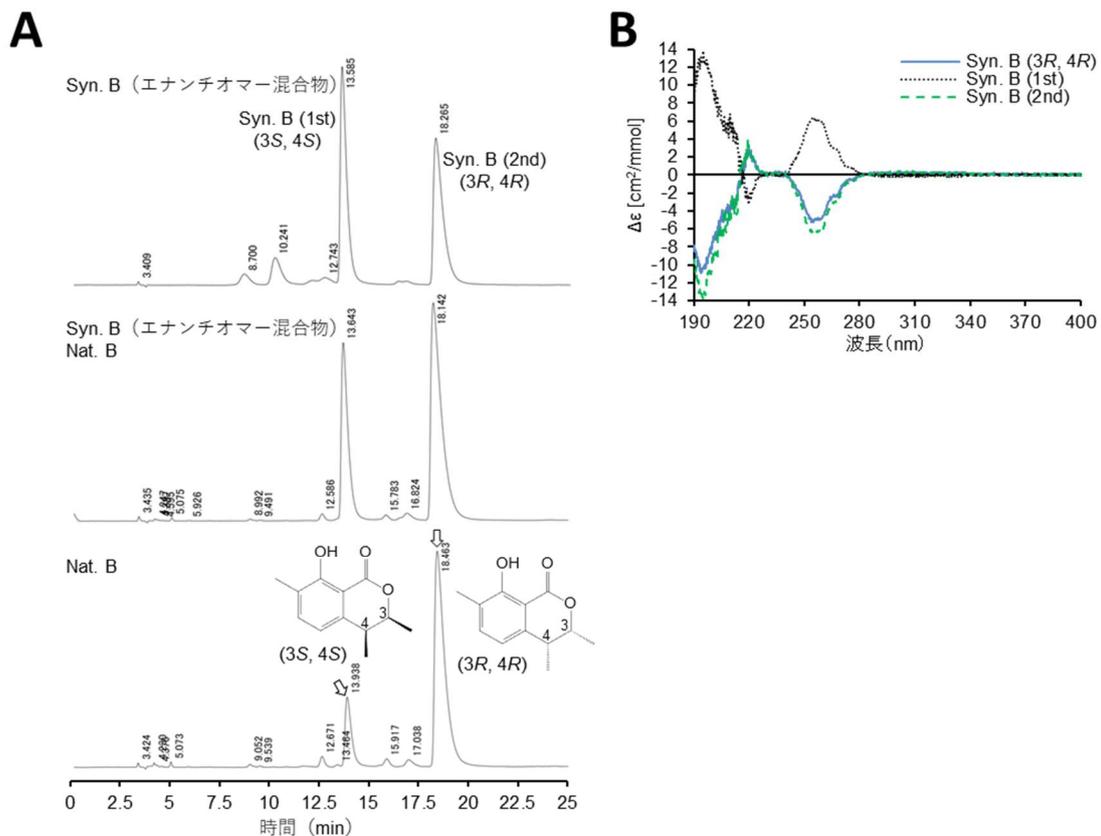


図 3-3: 天然の化合物 B (Nat. B) の絶対立体配置の決定

(A) セルロース系のキラルカラムを用いた HPLC 分析 [エナンチオマー混合物 (Syn. B; 上)、エナンチオマー混合物と天然物 (Nat. B) の同時注入 (中)、天然物 (下)]。合成物はキラルカラム上で保持時間の異なる Syn. B (1st)と Syn. B (2nd)に分離した。

(B) 光学活性体 [Syn. B (3R, 4R)] 及び、エナンチオマー混合物の HPLC 分取物 [Syn. B (1st)、Syn. B (2nd)] の円二色性スペクトル。

#### 3-2-4 化合物 C の絶対立体配置の決定

Syn. C (エナンチオマー混合物) をアミロース系のキラルカラム (YMC Amylose-C 4.6×250 mm, 5 μm, 2%EtOH/*n*-hexane) を用いて、リテンションタイムが早いエナンチオマー [Syn. C (1st)] と遅いエナンチオマー [Syn. C (2nd)] に光学分割した (図 3-4A 上)。分取物の円二色性スペクトルを、3 位のアルキル鎖のみが異なる化合物 A の円二色性スペクトルと比較をすることで、Syn. C (1st) の絶対立体配置を(3*R*, 4*S*)、Syn. C (2nd) の絶対立体配置を(3*S*, 4*R*)と決定した (図 3-4B)。化合物 C の 2 種類のエナンチオマーのキラルカラム上での挙動は、(3*R*, 4*S*)のエナンチオマーが先に溶出する点で、化合物 A と類似したものだった。Nat. C を HPLC 分析すると、単一のエナンチオマーではなく、2 種類のエナンチオマーの混合物であることが判明し、それらのキラルカラム上でのリテンションタイムの測定によって、主要なエナンチオマーの絶対立体配置を(3*R*, 4*S*)と決定した (図 3-4A 上下)。紫外線吸光 (254 nm) のクロマトグラムの面積比を用いて、Nat. C のエナンチオマーの混合比を(3*R*, 4*S*):(3*S*, 4*R*) = 98:2 と推定した (図 3-4A 下)。

#### 3-2-5 化合物 D の絶対立体配置の決定

Syn. D (エナンチオマー混合物) をセルロース系のキラルカラム (YMC Cellulose-SB 4.6×250 mm, 5 μm, 5%MTBE/*n*-hexane) を用いて、リテンションタイムが早いエナンチオマー [Syn. D (1st)] と遅いエナンチオマー [Syn. D (2nd)] に光学分割した (図 3-5A 上)。分取物の円二色性スペクトルを、3 位のアルキル鎖のみが異なる化合物 B の円二色性スペクトルと比較をすることで、Syn. D (1st) の絶対立体配置を(3*S*, 4*S*)、Syn. D (2nd) の絶対立体配置を(3*R*, 4*R*)と決定した (図 3-5B)。化合物 D の 2 種類のエナンチオマーのキラルカラム上での挙動は、(3*S*, 4*S*)のエナンチオマーが先に溶出する点で、化合物 B と類似したものだった。Nat. D を HPLC 分析すると、単一のエナンチオマーではなく、2 種類のエナンチオマーの混合物であることが判明し、それらのキラルカラム上でのリテンションタ

イムの測定によって、主要なエナンチオマーの絶対立体配置を(3*R*, 4*R*)と決定した (図 3-5A 上下)。紫外線吸光 (254 nm) のクロマトグラムの面積比を用いて、Nat. D のエナンチオマーの混合比を(3*R*, 4*R*):(3*S*, 4*S*) = 90:10 と推定した (図 3-5A 下)。

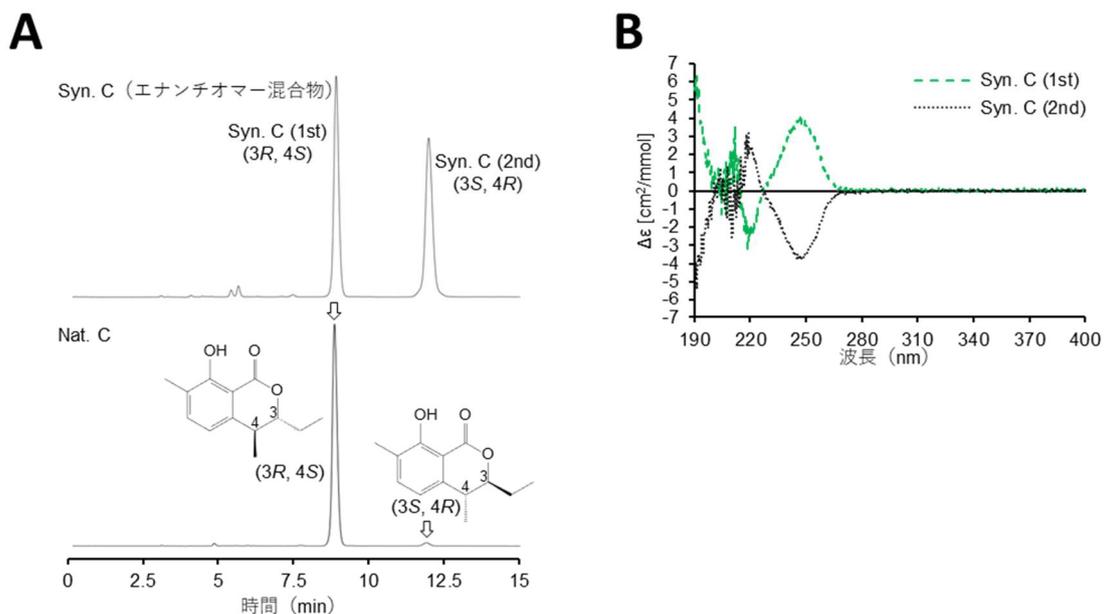


図 3-4: 天然の化合物 C (Nat. C) の絶対立体配置の決定

(A) アミロース系のキラルカラムを用いた HPLC 分析 [エナンチオマー混合物 (Syn. C; 上)、天然物 (Nat. C; 下)]。合成物はキラルカラム上で保持時間の異なる Syn. C (1st) と Syn. C (2nd) に分離した。

(B) エナンチオマー合成物の HPLC 分取物 [Syn. C (1st)、Syn. C (2nd)] の円二色性スペクトル。

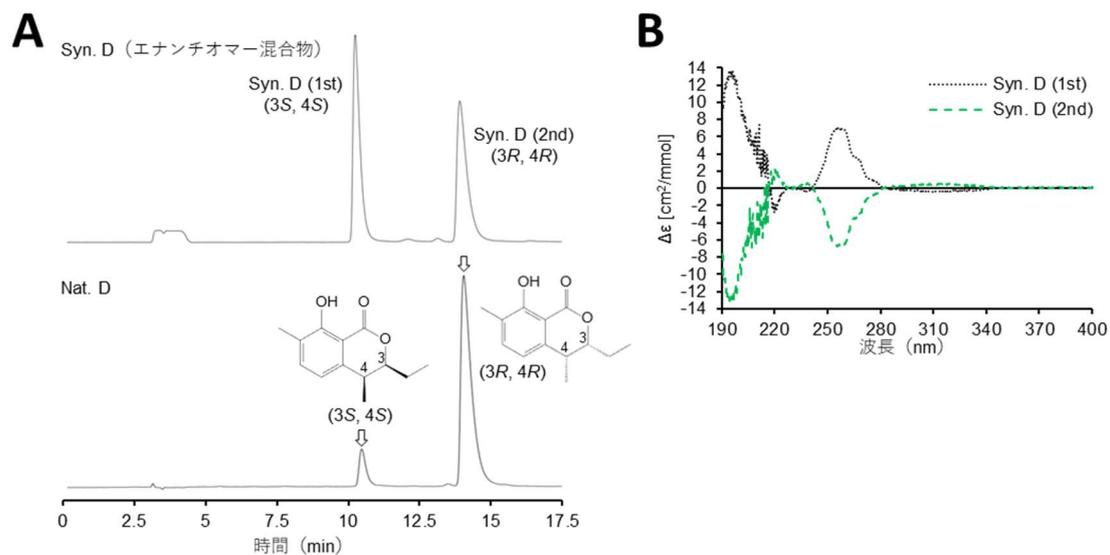


図 3-5: 天然の化合物 D (Nat. D) の絶対立体配置の決定

(A) セルロース系のキラルカラムを用いた HPLC 分析 [エナンチオマー混合物 (Syn. D; 上)、天然物 (Nat. D; 下)]。合成物はキラルカラム上で保持時間の異なる Syn. D (1st) と Syn. D (2nd) に分離した。

(B) エナンチオマー合成物の HPLC 分取物 [Syn. D (1st)、Syn. D (2nd)] の円二色性スペクトル。

### 3-2-6 化合物 E の絶対立体配置の決定

Nat. E 及び、Syn. E (3*S*, 1*R*) (西村ら 2015) の円二色性スペクトルを照合することで Nat. E の絶対立体配置を(3*S*, 1*R*)と推定した (図 3-6B 上下)。加えて、順相 HPLC (silica-gel, MtOAc/*n*-hexane) で Syn. E [(3*R*, 1*R*)、(3*R*, 1*S*)、(3*S*, 1*R*)、(3*S*, 1*S*)の混合物] のジアステレオマーを分離して Syn. E (3*R*, 1*S*)、Syn. E (3*S*, 1*R*) のエナンチオマー混合物を得て、それをキラル HPLC で分析した (図 3-6A 上)。なお、化合物 E の異なるジアステレオマーは <sup>1</sup>H-NMR のスペクトルが異なるため、Nat. E がどちらのジアステレオマーに属するかは容易に判別できた。Syn. E (3*R*, 1*S*)、Syn. E (3*S*, 1*R*)のエナンチオマー混合物はシクロデキストリン系のキラルカラム (Daicel CHIRALPAK ID 4.6×150 mm, 5 μm, 1%IPA/*n*-hexane) を用いて光学分割ができた。分取物の円二色性スペクトルの測定によって、リテンションタイムが早いエナンチオマー [Syn. E (1st)] の絶対立体配置が(3*R*, 1*S*)、遅いエナンチオマー [Syn. E (2nd)] の絶対立体配置が(3*S*, 1*R*)であると判明した (図 3-6B 下)。Nat. E を同一の条件で HPLC 分析すると、ほぼ単一のエナンチオマーからなることが分かり、リテンションタイムの比較、及び Syn. E (エナンチオマー混合物) との同時注入 (co-injection) によって、Nat. E の絶対立体配置が(3*S*, 1*R*)であることを再び確認した (図 3-6A 中下)。

### 3-2-7 化合物 F の絶対立体配置の決定

化合物 E と同様、順相 HPLC (silica-gel, MtOAc/*n*-hexane) で Syn. F [(3*R*, 1*R*)、(3*R*, 1*S*)、(3*S*, 1*R*)、(3*S*, 1*S*)の混合物] のジアステレオマーの分離を行い、Syn. F (3*R*, 1*S*)、Syn. F (3*S*, 1*R*)のエナンチオマー混合物を得た。キラルカラム (Daicel CHIRALPAK ID 4.6×150 mm, 5 μm, 1%IPA/*n*-hexane) 上でリテンションタイムが早いエナンチオマー [Syn. F (1st)] と遅いエナンチオマー [Syn. F (2nd)] の円二色性スペクトルを、化合物 E の円二色性スペクトルと比較することで、Syn. F (1st)の絶対立体配置を(3*R*, 1*S*)、Syn. F (2nd)の絶対立体配置を(3*S*, 1*R*)と決定した (図 3-7A 上、B)。化合物 F の 2 種類のエナンチオマーのキラルカラム上での挙

動は、(3*R*, 1'*S*)のエナンチオマーが先に溶出する点で、化合物 E と類似したものであった。Nat. F を同一の条件で HPLC 分析すると、ほぼ単一のエナンチオマーからなることが分かり、リテンションタイムの比較、及び Syn. F (エナンチオマー混合物) との同時注入 (co-injection) によって、Nat. F の絶対立体配置を(3*S*, 1'*R*)と決定した (図 3-7A 中下)。

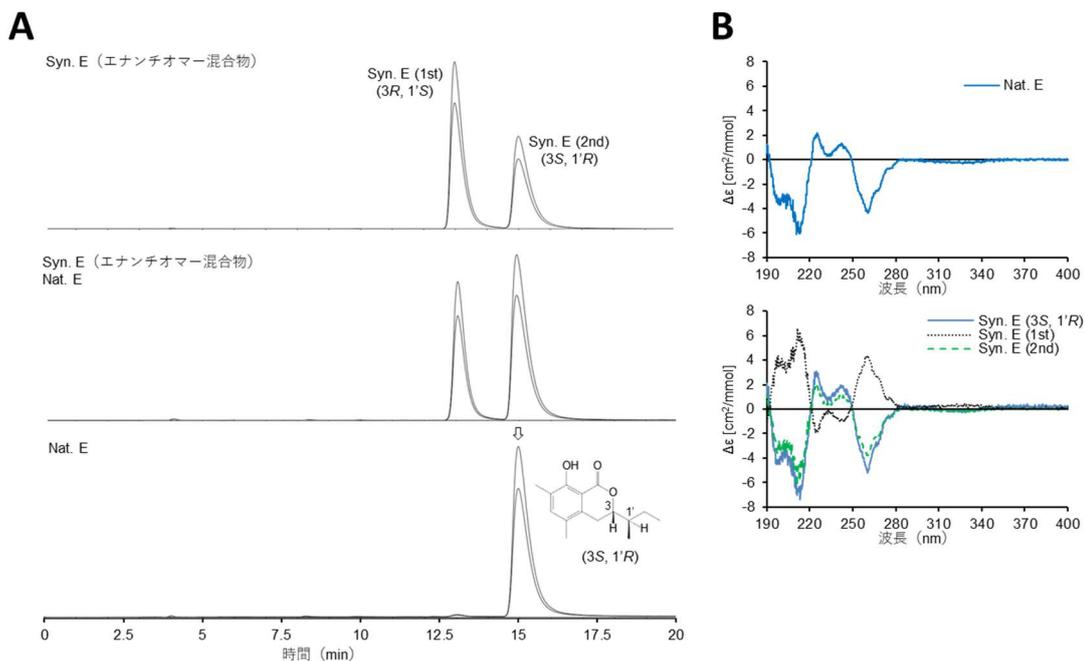


図 3-6: 天然の化合物 E (Nat. E) の絶対立体配置の決定

(A) シクロデキストリン系のキラルカラムを用いた HPLC 分析 [エナンチオマー混合物 (Syn. E; 上)、エナンチオマー混合物と天然物 (Nat. E) の同時注入 (中)、天然物 (下)]。合成物はキラルカラム上で保持時間の異なる Syn. E (1st) と Syn. E (2nd) に分離した。クロマトグラムは 254 nm、316 nm の 2 波長からなり、化合物 E では、254 nm の吸光度の方が、316 nm の吸光度より大きかった。

(B) 天然物 (Nat. E; 上) 及び、光学活性体 [Syn. E (3*S*, 1'*R*)]、エナンチオマー合成物の HPLC 分取物 [Syn. E (1st)、Syn. E (2nd)] の円二色性スペクトル (下)。

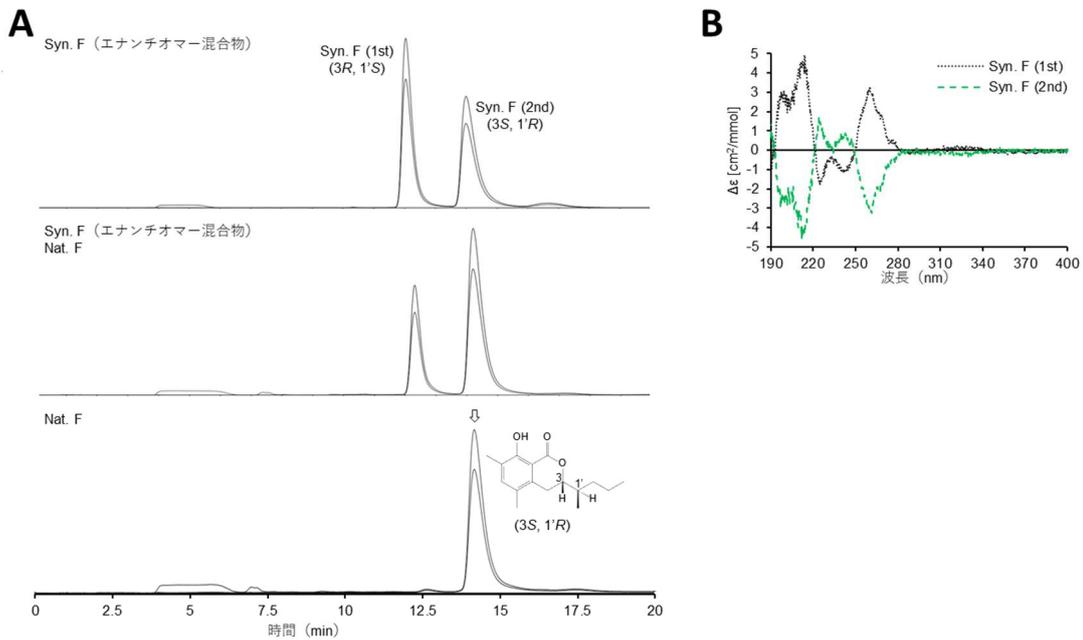


図 3-7: 天然の化合物 F (Nat. F) の絶対立体配置の決定

(A) シクロデキストリン系のキラルカラムを用いた HPLC 分析 [エナンチオマー混合物 (Syn. F; 上)、エナンチオマー混合物と天然物 (Nat. F) の同時注入 (中)、天然物 (下)]。合成物はキラルカラム上で保持時間の異なる Syn. F (1st) と Syn. F (2nd) に分離した。クロマトグラムは 254 nm、316 nm の 2 波長からなり、化合物 F では、254 nm の吸光度の方が、316 nm の吸光度より大きかった。

(B) エナンチオマー合成物の HPLC 分取物 [Syn. F (1st)、Syn. F (2nd)] の円二色性スペクトル。

表 3-2: 天然の化合物 A-F のエナンチオマー比、重量、及び ED<sub>50</sub> で表した誘引活性

化合物	化合物名	エナンチオマー比 <sup>a</sup> (%)	重量 <sup>b</sup> (mg)	ED <sub>50</sub> <sup>c</sup> (pg)
A	<i>trans</i> -8-hydroxy- 3,4,7-trimethylisochroman- 1-one	(3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> ) 94, (3 <i>S</i> , 4 <i>R</i> ) 6	0.62	0.28
B	<i>cis</i> -8-hydroxy- 3,4,7-trimethylisochroman- 1-one	(3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> ) 83, (3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> ) 17	0.42	0.40
C	<i>trans</i> -3-ethyl-8-hydroxy- 4,7-dimethylisochroman- 1-one	(3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> ) 98, (3 <i>S</i> , 4 <i>R</i> ) 2	0.28	0.45
D	<i>cis</i> -3-ethyl-8-hydroxy- 4,7-dimethylisochroman- 1-one	(3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> ) 90, (3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> ) 10	0.16	0.54
E	8-hydroxy- 5,7-dimethyl- 3-(1-methylpropyl)- isochroman-1-one	(3 <i>S</i> , 1' <i>R</i> )	4.9	0.45
F	8-hydroxy- 5,7-dimethyl- 3-(1-methylbutyl)- isochroman-1-one	(3 <i>S</i> , 1' <i>R</i> )	0.39	0.30

<sup>a</sup> 吸光度 (254 nm) のクロマトグラムのピーク面積比で推定した。

<sup>b</sup> ワモンゴキブリのフン 176 kg から単離された重量 (GC-FID; 西村ら 2015)。

<sup>c</sup> オルファクトメーター (Sakuma and Fukami 1985) を用いた推定値 (西村ら 2015)。

### 3-3 考察

ワモンゴキブリのフンから単離された 6 種の天然イソクロマノン類 Nat. A-F の絶対立体配置を、円二色性スペクトルの測定とキラル HPLC による分析で決定することができた (表 3-2)。6 種の天然物のうち、Nat. A-D は、一对のエナンチオマーを不等な割合で含むエナンチオマー混合物であり、主要でないエナンチオマーを 2-17% 含んでいた。Nat. E, F については、主要なエナンチオマーの対掌体を検出することはできなかった。Nat. A-F の主要なエナンチオマーは、イソクロマノン骨格の 3 位の絶対立体配置についてアルキル側鎖が伸びる方向が共通しており、これらのイソクロマノン類が同一の経路で生合成されていることが示唆された。

興味深いことに、化合物 A-F と類似のイソクロマノン類やその配糖体が、中国医学においてワモンゴキブリから得られる生薬の成分としてすでに報告されている (Luo et al. 2014; 図 3-8、化合物 1-7)。それらの絶対立体配置は、すべて Nat. A-F の主要なエナンチオマーと同等であり、共通の生合成経路が存在する可能性がある。化合物 1-7 の含量は乾燥したワモンゴキブリ 2.5 kg に 7-24 mg (Luo et al. 2014) と化合物 A-F (フン 176 kg に 0.16-4.9 mg; 表 3-2; 西村ら 2015) に比べて 100 倍ほど多い。この点を踏まえると、将来の生合成経路の探索においては、化合物 A-F に加えて、化合物 1-7 にも注目する必要がある。

その他に天然から得られたイソクロマノン類として、*Aspergillus* (コウジカビ) 属の産生するメレインや (Mori and Gupta 1985; Nishikawa 1933; 藪田・住木 1933)、*Formica* (ヤマアリ) 属及び *Lasius* (ケアリ) 属のアリの道しるべフェロモンが知られている (Bestmann et al. 1992; Kern et al. 1997)。ワモンゴキブリを宿主とするエメラルドゴキブリバチ (*Ampulex compressa*) の幼虫も (R)-(-)-メレインを分泌し、*Serratia marcescens* (セラチア菌) に対する抗菌作用が報告されている (Herzner et al. 2013)。(R)-(-)-メレインやアリから同定されたイソクロマノン類の 3 位の絶対立体配置は化合物 A-F の主要なエナンチオマーと同等であり、共通の生合成経路が存在する可能性がある。特に、アリの道しるべフェロモンのひとつの 7-

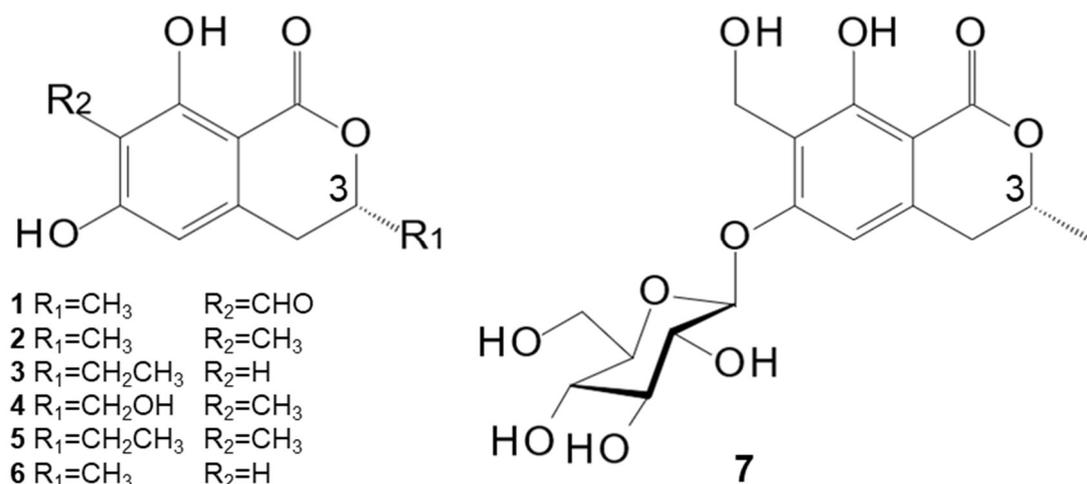


図 3-8: ワモンゴキブリから単離された既知のイソクロマノン類

Luo et al. (2014)で報告されたイソクロマノン類を化合物 A-F との比較のために図示した (化合物 1-7)。これらの化合物の 3 位の絶対立体配置は、Nat. A-F の主要なエナンチオマーと同等だった (本文参照)。

メチルメレインは、ヒドロキシ基の隣の 7 位にメチル基が存在する点で化合物 A-F と類似性が高く、腸内微生物が関与したポリケチド経路で生合成されていることが示唆されている (Bestmann et al. 1997)。腸内微生物の集合フェロモン産生への関与がチャバネゴキブリで報告されていること (Wada-Katsumata et al. 2015)、そしてワモンゴキブリでも腸管が集合フェロモンの産生部位あるいは貯蔵部位であることを踏まえると、ワモンゴキブリの腸内微生物と化合物 A-F の産生には関連がある可能性がある。

化合物 A-F のワモンゴキブリに対する誘引活性の起源は、イソクロマノン骨格の 7 位のメチル基と、ヒドロキシ基、カルボキシ基間の分子内水素結合であり、アルキル側鎖の違いは、誘引活性に大きな影響を与えなかった (表 3-2; 西村ら 2015)。加えて、化合物 A-F のうち、フンからの収量で全体の 72%を占めた化合物 E について、(3*R*, 1'*R*)、(3*R*, 1'*S*)、(3*S*, 1'*R*)、(3*S*, 1'*S*)の 4 種のエナンチオマーの誘引活性はほぼ同等で、ワモンゴキブリの性フェロモンのように、絶対立体配置の違いで誘引活性が大きく変化することはなかった (西村ら 2015)。これ

らの報告は、8-ヒドロキシ-7-メチル-イソクロマノン骨格の分子内水素結合に特異性の高い嗅覚受容体の存在を示唆する。一方で、その受容体は、絶対立体配置を判定するほど、化合物 A-F に特異的とは思われない。脂肪酸などの様々な化合物群にワモンゴキブリに対する誘引活性が報告されていることを考えると (McFarlane and Alli 1987; Saïd et al. 2005, 2015)、ワモンゴキブリが集合を形成する際には、イソクロマノン類も含めたフンに含まれる幅広い化合物群を集合フェロモンとして用いていると思われる。

## 第4章 ワモンゴキブリの単為生殖

### 4-1 概要

脊椎動物と異なり、昆虫類では単為生殖はそれほど珍しくない生殖様式である (Vershinina and Kuznetsova 2016)。ゴキブリ類でも、未交尾雌が単為生殖で子孫を産む能力を持つことが数種で報告されている (Roth and Willis 1956; Vershinina and Kuznetsova 2016)。野外で単為生殖を行うゴキブリはオガサワラゴキブリ (*Pycnoscelus surinamensis*; Roth 1967) 以外に知られておらず、単為生殖はゴキブリ類にとって主要な繁殖戦略とはいえないが、雌成虫と雄成虫を人工的に隔離すると、ワモンゴキブリ (Kato et al. 2017; Roth and Willis 1956; 高橋 1924; Xian 1998)、トビイロゴキブリ (*Periplaneta brunnea*; Willis et al. 1958)、トウヨウゴキブリ (*Blatta orientalis*; Roth and Willis 1956)、*Ectobius lapponicus* (Brown 1973)、*E. pallidus* (Brown 1973)、ハイイロゴキブリ (*Nauphoeta cinerea*; Corley et al. 1999, 2001) といった種が雌性単為生殖 (雌の子孫のみを産む単為生殖) を行うことが報告されている。一方、チャバネゴキブリに単為生殖を行わせる試みは成功していない (Roth and Willis 1956; Xian 1998)。

個体密度が高く、容易に集合の形成と交配相手の探索ができる状況下では、単独で子孫を残す単為生殖の能力で、雌のゴキブリが大きな利益を得ることは考えにくい。しかしながら、ゴキブリが集合フェロモンで積極的に集合を形成しようとしても、個体密度などの諸要因によって、集合を形成できないことは当然あり得る。野外において、ゴキブリ類が単為生殖と有性生殖を使い分けるという報告はないが、単為生殖能力は個体密度が極端に低い場合の非常手段となり得るであろう。加えて、単為生殖は社会性の成立と維持に関連付けられ、進化生物学的な観点からも興味深い繁殖様式である (Hamilton 1964; Lin and Michener 1972)。社会性のシロアリ類はゴキブリ類と極めて近いグループであり、ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) や *R. virginicus* では、一次女王が二次女王を単為生殖で産み、そのメカニズムは末端融合型であることが知られている。そして、一次女王が単為生殖で子孫を残すことが、一次女王とその子孫の間の血縁度の上昇

をもたらす (Matsuura 2017; Matsuura et al. 2004, 2009; Vargo et al. 2012)。

単為生殖は昆虫の繁殖戦略や社会性の進化と大きな関わりを持っているが、ゴキブリ類の単為生殖のメカニズムは、ほとんど解明されていない。単為生殖のメカニズムが記載されている唯一の種はハイイロゴキブリで、雌成虫は、遺伝的に同一のクローンをアポミクシス (減数分裂を経ない卵の単為的な発生) で産むと推定されている (Corley et al. 1999, 2001)。ワモンゴキブリについては、産雌単為生殖を行うことが先行研究で指摘されてきたものの (Katoh et al. 2017; Roth and Willis 1956; 高橋 1924; Xian 1998)、単為生殖の細胞学的メカニズムは解明されてこなかった。

本章では、近年報告されたワモンゴキブリのマイクロサテライトマーカーを用いて (Chen et al. 2015)、常染色体上のアリルをヘテロで持つ未交尾雌が、そのアリルをホモで持つ幼生を単為生殖で産むことを発見した。また、フローサイトメーターを用いて、単為生殖で産まれた幼生の核相を分析し、単為生殖で産まれた幼生が2倍体であることを示した。

これらの結果は、ゴキブリ類がオートミクシスで単為生殖を行うことを示す分子遺伝学的な初めての証拠であり、ゴキブリ類の繁殖戦略がこれまで考えられてきた以上に多様であることが明らかとなった。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 ワモンゴキブリの飼育

ワモンゴキブリは京都大学昆虫生理学研究室で12年以上維持されてきた系統を用いた。温度  $25 \pm 1.5$  °C、明暗周期 16:8 h の条件下で、飼料として固形飼料 (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を与えた。ワモンゴキブリの未交尾雌が次世代を残すことを確認するために、23 匹の雌を幼生時 (18–24 週齢) にコロニーから隔離し、個別に飼育した。成虫変態の後、それぞれの未交尾雌が卵鞘を形成しているかを週に 2 回観察し、産み落とされた卵鞘を回収した。未交尾雌が形成した卵鞘と、交尾した雌が形成した卵鞘の孵化率の差を調べるために、別に用意した 3 匹の未交尾雌を雄と交配し、個別に飼育して卵鞘を回収した。卵鞘は、それを形成した雌ごとに管理し、幼生が孵化するか否かと、孵化した幼生の数を調べた。

### 4-2-2 単為生殖で産まれた幼生のマイクロサテライト解析

ゲノム DNA は、成虫及び中齢幼生では脚から、若齢幼生では虫体全体から抽出した。抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) と DNAzol (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いた。ワモンゴキブリの既知の 7 種類のマイクロサテライトマーカーを調べたところ (Chen et al. 2015)、4 種類のマーカー (CR-9、CR-18、CR-24、CR-50) で多型が確認できた。このうち CR-24 と CR-50 のアリルをヘテロで持つ未交尾雌が単為生殖で幼生を産んだため、この 2 つのマーカーを実験に用いた。ただし、CR-50 については、Chen et al. (2015) の PCR プライマーを用いると、PCR 産物に非特異的増幅の結果と思われる塩基鎖が混入した。その影響を減らすために、新たに一組のプライマー (5'-GTCCCGGGTTCAGTCATG-3'、5'-TATTCCTGAGACCATTCTGAAAG-3') を作成した。PCR は、1×PCR バッファーに各プライマーを 0.5 μmol/L、各 dNTP を 0.2 mmol/L、ExTaq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, Shiga, Japan) を 0.2 U 含む 12 μL の反応液で、T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて

行った。PCR 産物は 12%のポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行い (Maniatis et al. 1975)、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線を当てて蛍光を観察した。

#### 4-2-3 フローサイトメトリーによる核相の分析

単為生殖で生まれた幼生の各相が単相 (n) か複相 (2n) かを調べるためにフローサイトメーターを用いた。単為生殖で生まれた幼生 5 個体とコロニーから無作為に選びだした雌雄の成虫を同一条件で測定し、細胞核内の DNA 量のヒストグラムを比較した。試料には二酸化炭素で麻酔した個体から切り取った腿節を用いて、Cycletest PLUS DNA Reagent kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で前処理をして測定を行った。サンプルの前処理の手順はキットの説明書及び、Nozaki and Matsuura (2016)に準じた。ワモンゴキブリの腿節と雌のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の頭部 (内部標準) を 100  $\mu$ L の A 液 (トリプシンバッファー) の中で破碎し 10 分間室温で静置した。そこに 80  $\mu$ L の B 液 (トリプシン阻害剤) を加え、10 分間室温で静置した後に、80  $\mu$ L の、プロピジウムイオジン (PI) を含む C 液を加えた。4  $^{\circ}$ C で 10 分間静置した後に、50  $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過し、フローサイトメーター (Accuri C6, BD Biosciences) を用いて、DNA-PI 結合体が発する 488 nm の蛍光を測定した。それぞれのサンプルについて、2n の細胞核の FL2-A の測定値 (203431–350078) に設定したゲートで、1000 回の観測が行われるまで測定を行った。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 未交尾雌が形成した卵鞘からの幼生の孵化

研究に用いた系統のワモンゴキブリが単為生殖能力を持つことを確かめるために、未交尾雌を個別に飼育して卵鞘を回収した。先行研究と同様に (Katoh et al. 2017; Roth and Willis 1956; 高橋 1924; Xian 1998)、未交尾雌は高い割合で卵鞘を形成し (17/23 = 73.9%)、卵鞘を形成した 17 匹の未交尾雌から、合計で 67 個

の卵鞘が回収できた。67 個の卵鞘のうち、孵化したのは 3 匹の未交尾雌 [Virgin female (VF)-1、VF-2、VF-3] から得られた 17 個の卵鞘のみだった (孵化率 25.4%、図 4-1B、表 4-1)。VF-1、VF-2、VF-3 の形成した卵鞘のうち、孵化したものはそれぞれ 10 個、5 個、2 個で、卵鞘の孵化率はそれぞれ 83.3%、62.5%、66.7% だった。17 個の卵鞘からは合計 129 匹の幼生が孵化した。VF-1 からは 96 匹 ( $9.6 \pm 2.0$  匹/卵鞘)、VF-2 からは 22 匹 ( $4.4 \pm 0.49$  匹/卵鞘)、VF-3 からは 11 匹 (2 個の卵鞘から 8 匹と 3 匹) の幼生が得られた。幼生が孵化した卵鞘からは、平均して、 $7.6 \pm 3.0$  匹の幼生が孵化した (表 4-1)。一方で、交尾した雌から得られた卵鞘は、未交尾の雌から得られた卵鞘よりも高い孵化率を示し ( $27/35 = 77.1\%$ ; カイ 2 乗検定、 $p < 0.01$ ; 図 4-1B、表 4-1)、卵鞘が孵化した場合は、未交尾雌が形成した卵鞘に比べて多くの幼生が孵化した ( $13.6 \pm 2.7$  匹; ウェルチの t 検定、 $p < 0.01$ ; 表 4-1)。単為生殖で産まれた幼生の成長過程を調べるために、VF-3 から単為生殖で得られた幼生 11 匹を観察した。幼生のうち 2 匹は孵化直後及び若齢期に死亡したが、他の 9 個体の成長過程に有性生殖で産まれた幼生との明らかな差異は見られなかった (図 4-1A)。孵化から成虫変態までの期間は約 24 週で、本章の飼育条件下では、有性生殖で産まれた幼生と同等だった。

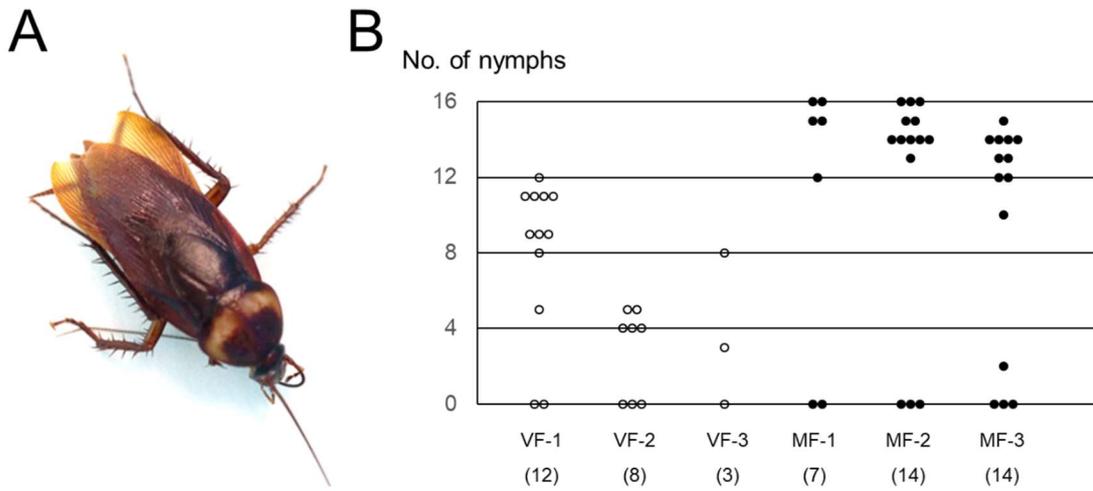


図 4-1: ワモンゴキブリの未交尾雌の卵鞘から出現した幼生の数

(A) 単為生殖で産まれたワモンゴキブリの雌成虫。

(B) 未交尾雌 (VF-1、VF-2、VF-3) 及び交尾済みの雌 (MF-1、MF-2、MF-3) が形成した卵鞘から産まれた幼生の数を、○ (未交尾雌) と● (交尾済みの雌) で示した。括弧内の数値でそれぞれの雌が形成した卵鞘の総数を示した。

表 4-1: ワモンゴキブリの単為生殖と有性生殖における卵鞘の孵化率と幼生の数

	単為生殖	有性生殖
卵鞘の孵化率 (%)	25.4** ( $n = 67$ ) <sup>a</sup>	77.1 ( $n = 35$ )
孵化した卵鞘から出現した幼生の数 (Mean ± S.D.)	7.6 ± 3.0** ( $n = 17$ )	13.6 ± 2.7 ( $n = 27$ )

<sup>a</sup>  $n$  は卵鞘の数

\*\*  $p < 0.01$  [カイ 2 乗検定 (上段)、ウェルチの  $t$  検定 (下段)]

#### 4-3-2 マイクロサテライト解析

単為生殖で産まれた幼生と、その親である未交尾雌の遺伝的関係を調べるために、ワモンゴキブリのマイクロサテライトマーカーを解析した。最初に、本章で用いたワモンゴキブリの系統が、Chen et al. (2015)で報告されたマイクロサテライトマーカーで多型を示すかを調べた。その結果、VF-1、VF-2、VF-3の未交尾雌がCR-50のアリルをヘテロで持ち、VF-1、VF-2の未交尾雌がCR-24のアリルをヘテロで持つことが判明した。これらのマイクロサテライトマーカーの反復回数の異なるアリルのPCR産物はポリアクリルアミドゲル状で明確に分離したため、本研究では遺伝マーカーとしてCR-24とCR-50を用いた(図4-2)。CR-24とCR-50をヘテロで持つ雄個体が存在したことと、ワモンゴキブリの性決定様式(雄XO、雌XX; John and Lewis, 1957, 1960; 斎藤・斎藤 1967)から、これらの遺伝子座は常染色体上に存在することが分かった。DNAシーケンスで配列を解析すると、CR-24では2種類の、CR-50では4種類のハプロタイプが、本章で用いた個体から得られた(表4-3)。

3匹の未交尾雌(VF-1、VF-2、VF-3)及び、それらの未交尾雌が単為生殖で産んだ幼生55匹のCR-24とCR-50の遺伝子型を調べたところ、全ての幼生がCR-24とCR-50の遺伝子座についてアリルをホモで持っており、アリルをヘテロで持つ個体は、1匹も確認できなかった(図4-2、表4-2)。CR-50の有性生殖の際の遺伝のパターンを調べるために、CR-50のアリルをヘテロで持つ未交尾雌(VF-3、CR-50<sup>B/D</sup>)とホモで持つ雄(CR-50<sup>D/D</sup>)を交配し、有性生殖で幼生を得て、それらのマイクロサテライトマーカーも解析した(図4-2、表4-2)。有性生殖で産まれた幼生30匹のうち、CR-50をホモで持つ個体(CR-50<sup>D/D</sup>)とヘテロで持つ個体(CR-50<sup>B/D</sup>)は15匹ずつで(表4-2; ヘテロ接合度0.5、95%信頼区間0.31–0.69)、CR-50がメンデルの法則に従って遺伝することが確認できた。これらの遺伝的な解析によって、ワモンゴキブリの雌がオートミクシス型の単為生殖で幼生を産むことが強く示唆された。

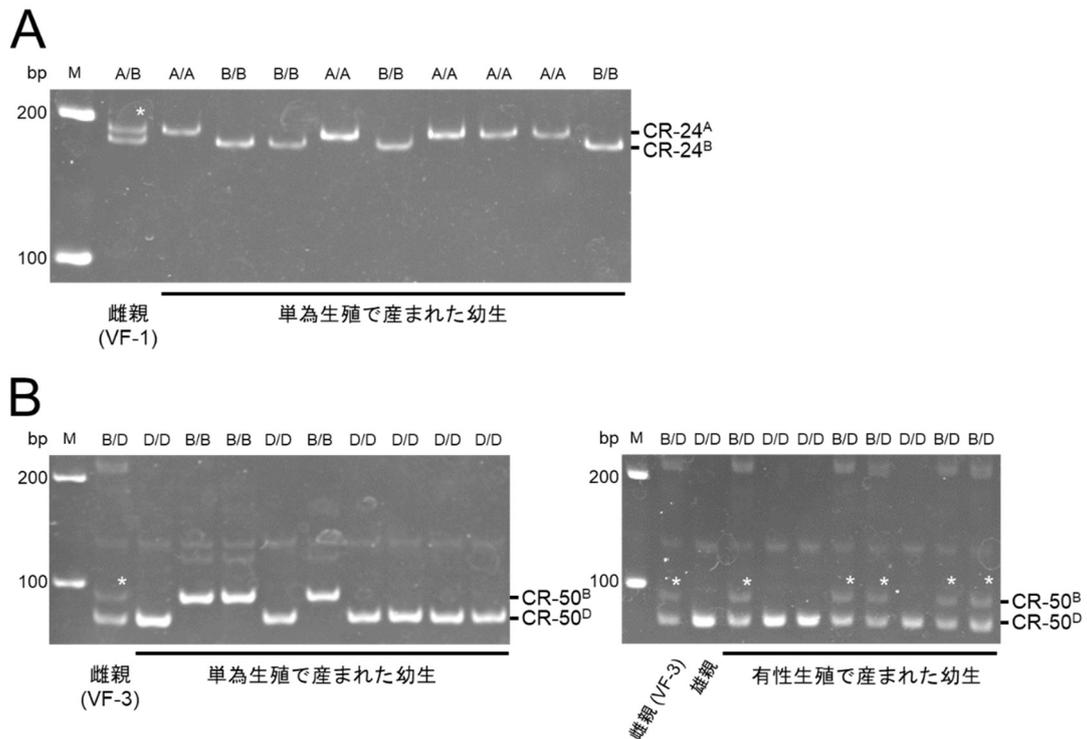


図 4-2: 単為生殖で産まれたワモンゴキブリのマイクロサテライト解析

CR-24 (A) と CR-50 (B) のマイクロサテライト解析。ゲルの 1 レーンが 1 個体に対応しており、各個体の遺伝子型を上部に示した。DNA マーカー (M) のサイズ (base pairs; bp) は左に示した。アスタリスク (\*) で遺伝子型がヘテロの個体を示した。

(A) 未交尾雌 VF-1 (CR-24<sup>A/B</sup>) と VF-1 が単為生殖で産んだ幼生のマイクロサテライト解析の結果を示した。単為生殖で産まれたすべての幼生が CR-24 のアリルをホモで持っていた。

(B) 未交尾雌 VF-3 (CR-50<sup>B/D</sup>)、VF-3 が単為生殖で産んだ幼生 (左)、及び有性生殖で産んだ幼生 (右、CR-50<sup>D/D</sup> の雄と交配) のマイクロサテライト解析の結果を示した。単為生殖で産まれたすべての幼生は CR-50 のアリルをホモで持っていた (左)。一方、有性生殖で産まれた幼生には CR-50 のアリルをヘテロで持つ個体も含まれていた (右)。

表 4-2: 親個体と F<sub>1</sub> 個体のマイクロサテライト解析の結果

親個体 (遺伝子型)	F <sub>1</sub> 個体の遺伝子型	個体数
VF-1 (CR-24 <sup>A/B</sup> ; CR-50 <sup>C/D</sup> ), 単為生殖	CR-24 <sup>A/A</sup> ; CR-50 <sup>C/C</sup>	13
	CR-24 <sup>A/A</sup> ; CR-50 <sup>D/D</sup>	8
	CR-24 <sup>B/B</sup> ; CR-50 <sup>C/C</sup>	7
	CR-24 <sup>B/B</sup> ; CR-50 <sup>D/D</sup>	8
	Heterozygous genotypes	0
VF-2 (CR-24 <sup>A/B</sup> ; CR-50 <sup>A/D</sup> ), 単為生殖	CR-24 <sup>A/A</sup> ; CR-50 <sup>A/A</sup>	4
	CR-24 <sup>A/A</sup> ; CR-50 <sup>D/D</sup>	2
	CR-24 <sup>B/B</sup> ; CR-50 <sup>A/A</sup>	3
	CR-24 <sup>B/B</sup> ; CR-50 <sup>D/D</sup>	1
	Heterozygous genotypes	0
VF-3 (CR-50 <sup>B/D</sup> ), 単為生殖	CR-50 <sup>B/B</sup>	3
	CR-50 <sup>D/D</sup>	6
	Heterozygous genotype	0
VF-3 (CR-50 <sup>B/D</sup> ) × 雄親 (CR-50 <sup>D/D</sup> ), 有性生殖	CR-50 <sup>B/B</sup>	0
	CR-50 <sup>B/D</sup>	15
	CR-50 <sup>D/D</sup>	15

表 4-3: CR-24 と CR-50 のハプロタイプ

遺伝子座	ハプロタイプ	反復モチーフ	PCR 産物のサイズ (bp)
CR-24	CR-24 <sup>A</sup>	(AAGA) <sub>6</sub>	179
	CR-24 <sup>B</sup>	(AAGA) <sub>5</sub>	173 <sup>a</sup>
CR-50	CR-50 <sup>A</sup>	(GGT) <sub>10</sub> <sup>b</sup>	98
	CR-50 <sup>B</sup>	(GGT) <sub>9</sub>	95
	CR-50 <sup>C</sup>	(GGT) <sub>8</sub>	92
	CR-50 <sup>D</sup>	(GGT) <sub>5</sub>	83

<sup>a</sup> 反復配列の付近に 2 bp の欠損が存在した。

<sup>b</sup> GGT の反復配列の 1 個が TGT に置換されていた。

#### 4-3-3 フローサイトメトリー

マイクロサテライトマーカーのアリルをヘテロで持つ雌が、そのアリルをホモで持つ幼生を単為生殖で産むことが明らかになった。しかしながら、単為生殖で産まれた幼生が単相 (n) で、そのために PCR 産物がポリアクリルアミドゲル上で単一のバンドを与えた可能性も考えられた。この可能性を否定するために、VF-3 が単為生殖で産んだ 5 匹の幼生の核相を、フローサイトメーターを用いて調べた。

その結果、単為生殖で産まれた幼生とコロニーから無作為に選んだ雌雄の細胞核内の DNA 量の分布が類似していることが分かり、単為生殖で産まれた幼生の核相が複相 (2n) であることが強く示唆された (図 4-3)。ただし、外見上は正常個体と考えられた 1 個体 (図 4-3 の個体 4) からは、単相 (n) に相当する細胞が全体の約 35% 検出され、この結果は、核相が正常に回復されない場合があることを示唆した。

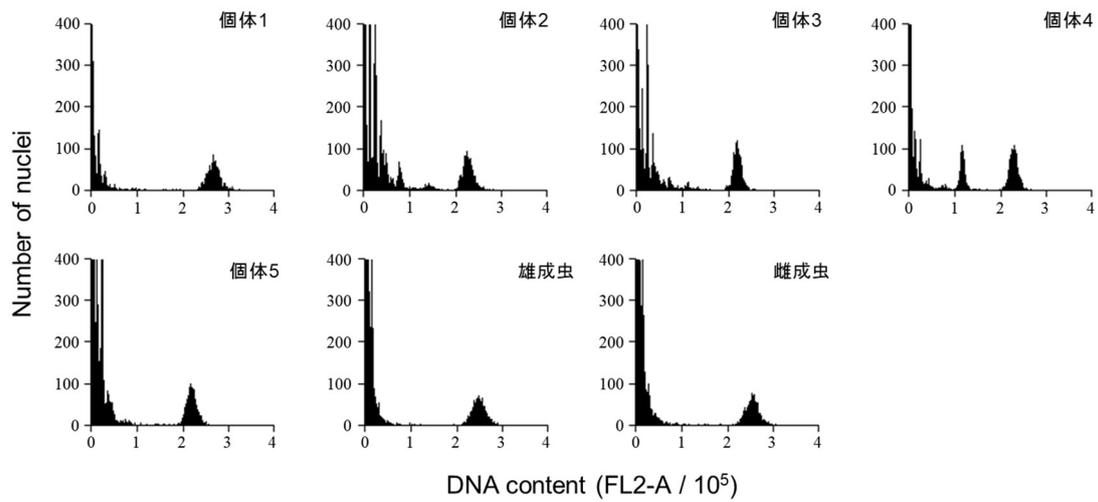


図 4-3: フローサイトメーターを用いたワモンゴキブリの核相の解析

未交尾雌 VF-3 から単為生殖で産まれた幼生（個体 1-5）とコロニーからランダムに選んだ雌雄の成虫の核相をフローサイトメーターで解析した。ヒストグラムは細胞核内の DNA 量の分布を表す。単為生殖で産まれたすべての幼生及び雌雄は、強度 200000–300000 の範囲にピークを示し、これが複相 (2n) の核に相当すると考えられた。個体 4 は強度 120000 付近にピークを示し、このピークは单相 (n) の核の存在を示している可能性がある（本文参照）。

#### 4-4 考察

本章では、ワモンゴキブリが雌性単為生殖を行うことの分子遺伝学的な証拠を初めて提示することができた。マイクロサテライト解析とフローサイトメトリーの結果は、ワモンゴキブリの未交尾雌がオートミクシス型の単為生殖を行うことが可能であることを示した。オートミクシス型の単為生殖は、核相の回復の様式によって、生殖核倍加型、末端融合型、中央融合型の3つの型に分類できることが知られている (Engelstädter 2008)。子孫のヘテロ接合度は、生殖核倍加型と末端融合型では低下し、中央融合型では維持される (Engelstädter 2008)。単為生殖で産まれたワモンゴキブリの幼生は、複相 (2n) でかつ、常染色体上のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型がすべてホモであったため、それらの幼生は、生殖核倍加型か末端融合型 (卵核と第2極体の融合) の様式で核相が回復したものと考えられる。生殖核倍加型ではすべてのアリルがホモになるが、末端融合型では染色体の端のアリルほど、組み換えのためにヘテロになる確率が高くなる。単為生殖で産まれたワモンゴキブリの幼生 55 個体のマイクロサテライトマーカーを解析したところ、マーカーをヘテロで持つ個体は確認できなかった (表 4-2)。合計で 101 個の遺伝子座のアリルがホモであったことから、ワモンゴキブリの未交尾雌は生殖核倍加型で単為生殖をおこなっている可能性が高いと思われる。ただし、本研究で使用した2種類のマーカーが、それぞれ異なる染色体上の、セントロメア周辺の組み換えが起きにくい領域に存在しているならば、単為生殖のメカニズムが末端融合型であっても、ほとんどの幼生の遺伝子型がホモになると考えられる。一方で、仮に2種類のマーカーが同じ染色体上に存在しているとすれば、末端融合型では、VF-1の未交尾雌から単為生殖で得られた幼生が4種類の遺伝子型を示す結果を説明できない (表 4-2)。この点についての考察をさらに深めるためには、本章で用いた2種類のマイクロサテライトマーカーの染色体上の位置に関するデータが必要であろう。

ゴキブリ類の単為生殖のメカニズムについて、ハイイロゴキブリの単為生殖がアポミクシス型である可能性が示唆されている (Corley et al. 1999, 2001)。本

章では、ワモンゴキブリがオートミクス型の単為生殖を行うことを示し、ゴキブリ類の単為生殖のメカニズムが、従来考えられていたよりも多様であることが明らかとなった。進化生態学的な観点からは、他の様々なゴキブリ類がどのメカニズムを用いて単為生殖を行っているかが興味深い課題であろう。また、単為生殖は近親交配と同様に、致死遺伝子を含む有害遺伝子の影響を受けやすいシステムであるため、単為生殖の進化は、それらの遺伝子によって抑制される傾向があると考えられる (Engelstädter 2008)。本章では、ワモンゴキブリの未交尾雌と交尾をした雌の卵鞘の孵化率を比較し、また、単為生殖で産まれた幼生の成長を観察した。未交尾雌が形成した卵鞘の孵化率は交尾した雌の卵鞘の孵化率より有意に低く、1個の卵鞘から産まれる幼生の数も、未交尾雌が形成した卵鞘では有意に少なかった (図 4-1B、表 4-1)。未交尾雌が形成した卵鞘の孵化率の低さは、ワモンゴキブリのゲノム中の有害遺伝子の影響かもしれない。一方、孵化した幼生には、ヘテロ接合度の極端な低さにもかかわらず、明らかな形態的異常は認められなかった。さらに近年、単為生殖で産まれたワモンゴキブリの幼生が、成虫変態後に次世代を単為生殖で産み、雌のみのコロニーを形成できることが報告された (Katoh et al. 2017)。このコロニーは3年間 (約6世代) 維持されており、これらの結果は有害遺伝子がある程度除去されている系統においては、ワモンゴキブリが有性生殖を用いず、単為生殖のみで子孫を残す戦略を潜在的な選択肢として持っていることを示している。興味深いことに、有性生殖のゴキブリ *Pycnoscelus indicus* (東南アジアやハワイ諸島に分布し、単為生殖は未報告) から、野外でも単為生殖を行うオガサワラゴキブリ *Py. surinamensis* (東南アジア、オーストラリアの熱帯、アメリカ南部に分布) が分化した例が既に知られている (Roth 1967; Roth and Willis 1961)。そして、有性生殖の *Py. indicus* は *Py. surinamensis* と同所的に分布することもある (Komatsu et al. 2015)。

本章では、ワモンゴキブリの繁殖戦略の興味深い一面を取り上げた。ワモンゴキブリは通常、幼生と成虫が集合フェロモンを用いてコロニーを形成し (Bell et al. 1972)、雌は有性生殖のために性フェロモンで雄を誘引する (Barth 1970; Roth

and Willis 1952)。一方、個体密度が低いなどの諸条件でコロニーが形成できず、交配相手を見つけられない場合でも、ワモンゴキブリの雌はオートミクシス型の単為生殖で次世代を残している可能性がある。

## 5 総合考察

本研究では、ワモンゴキブリの集合性の一端を集合フェロモンを通して理解することを試みた。最後に、ゴキブリ類の集合フェロモン研究における、先達も直面してきたと思われる困難と今後の課題について考察を行う。

### 5-1 集合フェロモン研究の困難

集合を形成、維持する至近要因として、チャバネゴキブリの研究に基づいて集合フェロモンが提唱されたのは、カイコ (*Bombyx mori*) の性フェロモン (ボンビコール) が同定されてから 10 年もたたない時期であった (Butenandt et al. 1959; Ishii and Kuwahara 1967; Karlson and Lüscher 1959)。研究者らは当時を、

Riding the wave of pheromone research during the 1960s, these authors\* dubbed the fecal chemical "aggregation pheromone." (\* Ishii and Kuwahara)

と回顧しており (Bell et al. 2007)、昆虫の行動を支配する情報化学物質に強い注目が集まっていた時代の雰囲気は想像できる。以降、性フェロモンの研究は、雄成虫の強い行動応答に支えられながら、化合物の同定から受容体や生合成経路の特定、フェロモンを利用した害虫制御に至るまで順調に進められてきた (El-Sayed 2007)。一方で、ゴキブリ類の集合フェロモンの研究には、ふたつの困難があった。

そのひとつは、分泌部位が形態的に明らかではなく、化合物の同定を試みる際に、抽出材料として、夾雑物が多いフンを用いなければならなかったことである (McFarlane and Alli 1987; 西村ら 2015; Saïd et al. 2005, 2015)。2 章では、ワモンゴキブリが食餌の種類によらず集合フェロモンを分泌していること及び、集合フェロモンが主に中腸に分布していることを明らかにした。また、ワモンゴキブリを飼育する際に食餌として寒天ゲルを与えることで、食餌由来の夾雑物が少ないフンが得られ、そのフンの抽出物の誘引活性が、通常の飼育法で得られるフンの抽出物の誘引活性と同等であることも示した。飼育に用いる食餌の種類を変更してフン抽出物に含まれる夾雑物を減らす手法は、他のゴキブリ類の集合

フェロモン研究にも適用できると思われる。

集合フェロモン研究のもうひとつの困難として、性フェロモンに比べると集合フェロモンの効果が検出しにくいことが挙げられる。ワモンゴキブリについては、野外試験で多数の個体を誘引する効果を示す化合物は、性フェロモンのペリプラノン-B 以外には報告されていないと思われる (Bell et al. 1984; Chow and Wang 1981)。実際に筆者がペリプラノン-B をワモンゴキブリのコロニーに提示すると、雄成虫が興奮して走り回ることや翅を上げるなどの特徴的な行動を示すことがほぼ確実に観察でき、先行研究 (Barth 1970; Roth and Willis 1952) を再現できた。一方で、フンの抽出物やイソクロマノン類といったオルファクトメーター試験では誘引活性を検出できるサンプルをコロニーに提示しても、性フェロモンの提示によって見られるような激しい反応を引き起こすことはできなかった。コロニー中の個体はフンで汚染された環境に長時間置かれているため、慣れによって反応性が下がっていた可能性もあるが、集合フェロモンの効果が性フェロモンに比べて検出しにくいことを、この観察結果は示唆している。

性フェロモンと異なり、集合フェロモンでは雄成虫の性的興奮のような特異的な行動を生物試験の指標とできない。そのため、効果の検出には多数の個体を用いた実験と統計的な処理が重要となる (Sakuma 1998; Sakuma and Fukami 1985)。2 章では各用量の誘引活性についてカイ 2 乗検定 (選好性指数  $PI = 0$  が帰無仮説、危険率 5%、ボンフェローニ補正) を行ったので、供試虫が  $N$  匹、用量が 5 段階として、 $N \times PI^2 > \chi^2_{1, 0.01} = 6.635$  を満たすときにサンプルに有意な誘引活性が存在すると判定できた。すなわち、供試虫が 100 匹の場合は、 $PI = \sqrt{6.635/100} \doteq 0.26$  が誘引活性の有無の基準となった。ゴキブリ類の集合フェロモンの研究では、研究グループごとに生物試験系が異なっているため、各報告の  $PI$  を直接比較することが難しい。そのため各試験系を定量的に比較する実験、統計学的手法、さらに、汎用性があり安定した標準的な生物試験系の開発が、集合フェロモンの研究を発展させるためには必要であろう。

## 5-2 集合フェロモン研究の課題

ワモンゴキブリが食餌の種類によらず集合フェロモンを分泌していることを2章で示したが、個体密度が極めて低く、他個体と遭遇できないような状況はあり得る。ワモンゴキブリは集合が形成できなかつたとしても産雌単為生殖で子孫を残すことができ、4章では、その細胞学的メカニズムを分子遺伝学的手法によって明らかにした。未交尾雌が形成した卵鞘の孵化率の低さを考えると、あくまで非常時の繁殖戦略と思われるが、ワモンゴキブリにとって集合性が不要であるかのように解釈できてしまう点が興味深い。

ゴキブリ類が集合することの生物学的意義については、主にチャバネゴキブリを用いて様々な実験や考察がなされてきた (Bell et al. 2007)。例えば、Ishii and Kuwahara (1967)はチャバネゴキブリの1個の卵鞘から孵化した約40匹の幼生のうち20匹を集団で、20匹を個別に飼育して成虫変態までの日数を比較した。その結果、集団で飼育すると孵化から成虫変態までの日数が7-10日短くなり、集合に成長促進効果が存在することが明らかとなった。また、Dambach and Goehlen (1999)は相対湿度が低くなるにつれてチャバネゴキブリの集合の密度が高くなることを明らかにし、絶食時の寿命が乾燥状態では短くなることから、チャバネゴキブリの集合の湿度調節効果を提唱した。現在では、分子系統学によって、ワモンゴキブリはチャバネゴキブリとそれほど近縁ではなく、代表的な社会性昆虫であるシロアリ類により近縁であることが示されている (Inward et al. 2007)。ただし、社会性を持たないという点で、ワモンゴキブリやチャバネゴキブリといったゴキブリ類とシロアリ類の間には明確な差異がある。社会性を持つシロアリ類にとって集合の形成は必要不可欠だが、ゴキブリ類が集合を積極的に形成する理由は明らかでなく、それこそがゴキブリ類の集合の意義について様々な仮説が与えられる理由であろう。ゴキブリ類がなぜ集合を形成し、シロアリ類の社会性と進化的にどのような関係にあるのかは興味深く、さらなる研究が期待される。

昆虫の集合に興味を持った場合、集合を形成する各個体の定位行動とそれを

解発する至近要因に着目することは自然な態度であろう。本研究では、匂い源へのワモンゴキブリの移動が観察されたら、その匂いがワモンゴキブリの集合を引き起こす原因のひとつと推測した。この理屈は現実的な研究方針ではあるが、一個体の行動から多個体が形成する集合の動態を論じる点に議論の飛躍があり、他の至近要因の影響、集合内部の個体間相互作用、偶然による個体の集中といった難しい問題を避けている。実際、ゴキブリ類の集合の形成と維持には、集合フェロモンのような化学的因子の他に、暗闇、温度、湿度といった環境条件、狭い隙間や壁といった周囲の幾何学的形状など、様々な要素が関わっていることが指摘されている (Bell et al. 2007)。近年のゲノム解析技術の発展により、ワモンゴキブリやチャバネゴキブリでもゲノムの全塩基配列が決定された (Harrison et al. 2018; Li et al. 2018)。また、RNAi 法を用いた遺伝子ノックダウンはゴキブリ類ですすでに行われており (Hrycaj et al. 2010; Saari et al. 2018)、ゲノム編集技術による遺伝子のノックアウトやノックインが様々な昆虫で実践されつつある (Chen et al. 2016)。これらの技術を用いて嗅覚や視覚に関わる遺伝子をノックダウン、ノックアウトした個体の集合性を解析することで、ゴキブリ類の集合性をいくつかの行動要素に分解して、それらの集合性への寄与率を推定できると思われる。ワモンゴキブリの場合は、単為生殖によって産まれた雌成虫のヘテロ接合度が極めて低いため、単為生殖で産まれた F<sub>1</sub> 個体から再び単為生殖で産まれた F<sub>2</sub> 個体群は遺伝的にはほぼ均一になる。そのため、理論的には単為生殖で維持している系統を戻し交配に用いることで、遺伝子型がほぼ均一な雌雄からなる純系の個体群が得られる。また、単為生殖で産まれた F<sub>1</sub> 個体が単為的に卵を形成する際にゲノム編集を行うことで、F<sub>2</sub> 個体群について、ゲノム編集の標的遺伝子以外の遺伝子型を同一にできるかもしれない。ワモンゴキブリは昆虫遺伝学の非モデル昆虫であるが、単為生殖を容易に行わせることができることが研究を行う上でアドバンテージとなり得る。野外や家屋内といった環境下で、集合フェロモンがワモンゴキブリの集合や繁殖にいかに関与しているのかを明らかにするには、このような様々な分野の応用と慎重な検討が必要であろう。

本研究が、ゴキブリ類の集合のメカニズムと繁殖戦略の詳細を解明する一助となれば幸いである。

## 公表論文

Tanaka Masashi, Daimon Takaaki (2018) Tissue localization of aggregation pheromones in the American cockroach, *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae). *Applied Entomology and Zoology* 53:447–452. doi: 10.1007/s13355-018-0573-9

Tanaka Masashi, Daimon Takaaki (2019) First molecular genetic evidence for automictic parthenogenesis in cockroaches. *Insect Science* 26:649–655. doi: 10.1111/1744-7917.12572

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々に様々な面で御支援を頂きました。紙幅が限られているため、ここで全員のお名前を挙げることは叶いませんが、改めて深く感謝申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、指導教員の大門高明先生（京都大学大学院農学研究科昆虫生理学分野教授）に全面的な御指導と御支援を賜りました。大出高弘先生（同助教）、福井昌夫先生（同元助教）、森 直樹先生（同研究科化学生態学分野教授）、小野 肇先生（同助教）、吉永直子先生（同助教）には、各専門分野に関して貴重な御支援と御助言を賜りました。集合フェロモンの研究全般につきまして、前指導教員の佐久間正幸先生（京都大学名誉教授）、故 上野民夫先生（同名誉教授）、西村至央様に御指導と御支援を賜りました。昨年逝去されました上野先生の御冥福を心よりお祈り申し上げますとともに、先生に本稿をお渡しできないことを申し訳なく思います。イソクロマノン類の構造決定は、松尾憲忠先生（大日本除虫菊、現・関西学院大学大学院理工学研究科田辺研究室、住化エンバイロメンタルサイエンス）、香谷康幸様（大日本除虫菊）の合成物がなければ研究を行うことができませんでした。円二色性スペクトルの測定は、入江一浩先生（京都大学大学院農学研究科生命有機化学分野教授）、村上一馬先生（同准教授）に装置をお借りし、測定方法を御教示頂きました。ワモンゴキブリの核相の測定は、松浦健二先生（京都大学大学院農学研究科昆虫生態学分野教授）、野崎友成様に装置をお借りし、測定方法を御教示頂きました。西野浩史先生（北海道大学電子科学研究所人間数理研究分野助教）、加藤 巧様にはワモンゴキブリの単為生殖の研究全般で御助言を賜りました。重ねて深く感謝申し上げます。

旧農薬系研究施設の方々には、日々の生活に関して様々な御助言と御協力を賜りました。研究その他に励む施設の学生が、豊かな結果を得られることを願っています。最後に、いつも私を支え、暖かく見守ってくださっている故郷の家族に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- Abed D, Cheviet P, Farine JP, Bonnard O, Le Quéré JL, Brossut R (1993) Calling behaviour of female *Periplaneta americana*: Behavioural analysis and identification of the pheromone source. *Journal of Insect Physiology* 39:709–720. doi: 10.1016/0022-1910(93)90045-S
- Adams MA, Nakanishi K, Still WC, Arnold E V., Clardy J, Persoons CJ (1979) Sex pheromone of the American cockroach: absolute configuration of periplanone-B. *Journal of the American Chemical Society* 101:2495–2498. doi: 10.1021/ja00503a049
- 朝比奈正二郎 (1991) 日本産ゴキブリ類. 中山書店
- Baker GL, Vroman HE, Padmore J (1963) Hydrocarbons of the American cockroach. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 13:360–365. doi: 10.1016/0006-291X(63)90348-6
- Barth RH (1970) The Mating Behavior of *Periplaneta americana* (Linnaeus) and *Blatta orientalis* Linnaeus (Blattaria, Blattinae), with Notes on 3 additional Species of *Periplaneta* and Interspecific Action of female Sex Pheromones. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 27:722–748. doi: 10.1111/j.1439-0310.1970.tb01897.x
- Bell WJ, Fromm J, Quisumbing AR, Kydonieus AF (1984) Attraction of American Cockroaches (Orthoptera: Blattidae) to Traps Containing Periplanone B and to Insecticide-Periplanone B Mixtures. *Environmental Entomology* 13:448–450. doi: 10.1093/ee/13.2.448
- Bell WJ, Parsons C, Martinko EA (1972) Cockroach Aggregation Pheromones: Analysis of Aggregation Tendency and Species Specificity (Orthoptera: Blattidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 45:414–421
- Bell WJ, Roth LM, Nalepa CA (2007) Cockroaches: Ecology, Behavior, and Natural History. *The Quarterly Review of Biology*. doi: 10.1086/590617
- Bestmann HJ, Kern F, Schäfer D, Witschel MC (1992) 3,4-Dihydroisocoumarins, a

- New Class of Ant Trail Pheromones. *Angewandte Chemie International Edition in English* 31:795–796. doi: 10.1002/anie.199207951
- Bestmann HJ, Übler E, Hölldobler B (1997) First Biosynthetic Studies on Trail Pheromones in Ants. *Angewandte Chemie International Edition in English* 36:395–397. doi: 10.1002/anie.199703951
- Brossut R, Dubois P, Rigaud J (1974) Le grégairisme chez *Blaberus craniifer*: Isolement et identification de la phéromone. *Journal of Insect Physiology* 20:529–543. doi: 10.1016/0022-1910(74)90161-9
- Brown VK (1973) Aspects of the reproductive biology of three species of *Ectobius* (Dictyoptera: Blattidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 16:213–222. doi: 10.1111/j.1570-7458.1973.tb00267.x
- Butenandt, Von A, Beckmann R, Stamm D, Hecker E (1959) Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. *Zeitschrift für Naturforschung* 14b:283–284
- Chen L, Wang G, Zhu YN, Xiang H, Wang W (2016) Advances and perspectives in the application of CRISPR/Cas9 in insects. *Dong wu xue yan jiu = Zoological research* 37:220–228. doi: 10.13918/j.issn.2095-8137.2016.4.220
- Chen W, Liu Y-X, Jiang G-F (2015) De novo Assembly and Characterization of the Testis Transcriptome and Development of EST-SSR Markers in the Cockroach *Periplaneta americana*. *Scientific Reports* 5:11144. doi: 10.1038/srep11144
- Chow YS, Wang SF (1981) Attraction responses of the American cockroach to synthetic periplanone-B. *Journal of Chemical Ecology* 7:265–272. doi: 10.1007/BF00995749
- Corley LS, Blankenship JR, Moore AJ (2001) Genetic variation and asexual reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea*: implications for the evolution of sex. *Journal of Evolutionary Biology* 14:68–74. doi: 10.1046/j.1420-9101.2001.00254.x

- Corley LS, Blankenship JR, Moore AJ, Moore PJ (1999) Developmental constraints on the mode of reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Evolution and Development* 1:90–99. doi: 10.1046/j.1525-142x.1999.99001.x
- Cornwell PB (1968) The cockroach. Volume 1. A laboratory insect and an industrial pest. *London, Hutchinson*.
- Dambach M, Goehlen B (1999) Aggregation density and longevity correlate with humidity in first-instar nymphs of the cockroach (*Blattella germanica* L., Dictyoptera). *Journal of Insect Physiology* 45:423–429. doi: 10.1016/S0022-1910(98)00141-3
- Day M, Powning R (1949) A Study of the Processes of Digestion in Certain Insects. *Australian Journal of Biological Sciences* 2:175. doi: 10.1071/BI9490175
- El-Sayed A (2007) The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. In: <http://www.pherobase.com/index.htm>
- Engelstädter J (2008) Constraints on the evolution of asexual reproduction. *BioEssays* 30:1138–1150. doi: 10.1002/bies.20833
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology* 7:17–52. doi: 10.1016/0022-5193(64)90039-6
- Harrison MC, Jongepier E, Robertson HM, Arning N, Bitard-Feildel T, Chao H, Childers CP, Dinh H, Doddapaneni H, Dugan S, Gowin J, Greiner C, Han Y, Hu H, Hughes DST, Huylmans A-K, Kemena C, Kremer LPM, Lee SL, Lopez-Ezquerria A, Mallet L, Monroy-Kuhn JM, Moser A, Murali SC, Muzny DM, Otani S, Piulachs M-D, Poelchau M, Qu J, Schaub F, Wada-Katsumata A, Worley KC, Xie Q, Ylla G, Poulsen M, Gibbs RA, Schal C, Richards S, Belles X, Korb J, Bornberg-Bauer E (2018) Hemimetabolous genomes reveal molecular basis of termite eusociality. *Nature Ecology & Evolution* 2:557–566. doi: 10.1038/s41559-017-0459-1

- Herzner G, Schlecht A, Dollhofer V, Parzefall C, Harrar K, Kreuzer A, Pilsl L, Ruther J (2013) Larvae of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* sanitize their host, the American cockroach, with a blend of antimicrobials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:1369–1374. doi: 10.1073/pnas.1213384110
- Hrycaj S, Chesebro J, Popadić A (2010) Functional analysis of Scr during embryonic and post-embryonic development in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Developmental Biology* 341:324–334. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.02.018
- Inoue MN, Suzuki-Ohno Y, Haga Y, Aarai H, Sano T, Martemyanov V V, Kunimi Y (2019) Population dynamics and geographical distribution of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, in Japan. *Forest Ecology and Management* 434:154–164. doi: 10.1016/j.foreco.2018.12.022
- Inward D, Beccaloni G, Eggleton P (2007) Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters* 3:331–335. doi: 10.1098/rsbl.2007.0102
- Ishii S, Kuwahara Y (1967) An Aggregation Pheromone of the German Cockroach *Blattella germanica* L. (Orthoptera: Blattellidae): I. Site of the Pheromone Production. *Applied Entomology and Zoology* 2:203–217. doi: 10.1303/aez.2.203
- John B, Lewis KR (1960) Chromosome structure in *Periplaneta americana*. *Heredity* 15:47–54
- John B, Lewis KR (1957) Studies on *Periplaneta americana*. I. experimental analysis of male meiosis. *Heredity* 11:1–9
- Karlson P, Lüscher M (1959) ‘Pheromones’: a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* 183:55–56. doi: 10.1038/183055a0
- Katoh K, Iwasaki M, Hosono S, Yoritsune A, Ochiai M, Mizunami M, Nishino H (2017) Group-housed females promote production of asexual ootheca in American cockroaches. *Zoological Letters* 3:3. doi: 10.1186/s40851-017-0063-x
- Kern F, Klein RW, Janssen E, Bestmann HJ, Attygalle AB, Schäfer D, Maschwitz U

- (1997) Mellein, a trail pheromone component of the ant *Lasius fuliginosus*. *Journal of Chemical Ecology* 23:779–792. doi: 10.1023/B:JOEC.0000006410.35938.49
- Komatsu N, Kawakami Y, Banzai A, Ooi HK, Uchida A (2015) Species clarification of Ogasawara cockroaches which inhabit Japan. *Tropical biomedicine* 32:98–108
- Kuwahara S, Mori K (1990) Synthesis of (-)-periplanone-B a sex pheromone component of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Tetrahedron* 46:8075–8082. doi: 10.1016/S0040-4020(01)81464-2
- Leoncini I, Rivault C (2005) Could Species Segregation be a Consequence of Aggregation Processes? Example of *Periplaneta americana* (L.) and *P. fuliginosa* (Serville). *Ethology* 111:527–540. doi: 10.1111/j.1439-0310.2005.01073.x
- Li S, Zhu S, Jia Q, Yuan D, Ren C, Li K, Liu S, Cui Y, Zhao H, Cao Y, Fang G, Li D, Zhao X, Zhang J, Yue Q, Fan Y, Yu X, Feng Q, Zhan S (2018) The genomic and functional landscapes of developmental plasticity in the American cockroach. *Nature Communications* 9:1008. doi: 10.1038/s41467-018-03281-1
- Lin N, Michener CD (1972) Evolution of Sociality in Insects. *The Quarterly Review of Biology* 47:131–159. doi: 10.1086/407216
- Luo S, Huang X, Wang Y, Jiang R, Wang L, Bai L-L, Peng Q-L, Song C-L, Zhang D-M, Ye W-C (2014) Isocoumarins from American cockroach (*Periplaneta americana*) and their cytotoxic activities. *Fitoterapia* 95:115–120. doi: 10.1016/j.fitote.2014.03.004
- Maniatis T, Jeffrey A, Van deSande H (1975) Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 14:3787–3794. doi: 10.1021/bi00688a010
- Matsuura K (2017) Evolution of the asexual queen succession system and its underlying mechanisms in termites. *The Journal of Experimental Biology* 220:63–72. doi: 10.1242/jeb.142547
- Matsuura K, Fujimoto M, Goka K (2004) Sexual and asexual colony foundation and the

- mechanism of facultative parthenogenesis in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux* 51:325–332. doi: 10.1007/s00040-004-0746-0
- Matsuura K, Vargo EL, Kawatsu K, Labadie PE, Nakano H, Yashiro T, Tsuji K (2009) Queen Succession Through Asexual Reproduction in Termites. *Science* 323:1687–1687. doi: 10.1126/science.1169702
- McFarlane JE, Alli I (1987) The effect of lactic acid and the volatile fatty acids on the aggregation behavior of *Periplaneta americana* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 86:45–47. doi: 10.1016/0742-8413(87)90142-3
- Mori K, Gupta AK (1985) Chiral synthesis of (*R*)-(-)-mellein and (3*R*,4*aS*)-(+)-ramulosin. *Tetrahedron* 41:5295–5299. doi: 10.1016/S0040-4020(01)96780-8
- Nishikawa H (1933) Biochemistry of Filamentous Fungi III. A Metabolic Product of *Aspergillus melleus* Yukawa. Part II. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 9:148–151. doi: 10.1271/bbb1924.9.148
- 西村至央, 田中真史, 上野民夫, 松尾憲忠, 香谷康幸, 佐久間正幸 (2015) ワモンゴキブリの集合フェロモンの同定. In: 天然有機化合物討論会講演要旨集. pp 115–120
- Nishino H, Iwasaki M, Paoli M, Kamimura I, Yoritsune A, Mizunami M (2018) Spatial Receptive Fields for Odor Localization. *Current Biology* 28:600-608.e3. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.055
- Nozaki T, Matsuura K (2016) Termite queens have disproportionately more DNA in their fat body cells: reproductive division of labor and endoreduplication. *Entomological Science* 19:67–71. doi: 10.1111/ens.12156
- Persoons CJ, Verwiel PEJ, Ritter FJ, Talman E, Nooijen PJF, Nooijen WJ (1976) Sex pheromones of the american cockroach, *Periplaneta americana*: a tentative structure of periplanone-B. *Tetrahedron Letters*. doi: 10.1016/S0040-

4039(00)93816-4

- Persoons CJ, Verwiel PEJ, Talman E, Ritter FJ (1979) Sex pheromone of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Chemical Ecology* 5:221–236. doi: 10.1007/BF00988237
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing
- Roth LM (1967) Sexual Isolation in Parthenogenetic *Pycnoscelus surinamensis* and Application of the Name *Pycnoscelus indicus* to Its Bisexual Relative (Dictyoptera: Blattaria: Blaberidae: Pycnoscelinae). *Annals of the Entomological Society of America* 60:774–779. doi: 10.1093/aesa/60.4.774
- Roth LM, Cohen S (1973) Aggregation in Blattaria. *Annals of the Entomological Society of America* 66:1315–1323. doi: 10.1093/aesa/66.6.1315
- Roth LM, Willis ER (1956) Parthenogenesis in Cockroaches. *Annals of the Entomological Society of America* 49:195–204. doi: 10.1093/aesa/49.3.195
- Roth LM, Willis ER (1961) A Study of Bisexual and Parthenogenetic Strains of *Pycnoscelus surinamensis* (Blattaria : Epilamprinae). *Annals of the Entomological Society of America* 54:12–25. doi: 10.1093/aesa/54.1.12
- Roth LM, Willis ER (1952) A study of cockroach behavior. *The American Midland Naturalist* 47:66–129
- Rust MK, Burk T, Bell WJ (1976) Pheromone-stimulated locomotory and orientation responses in the American cockroach. *Animal Behaviour* 24:52–67. doi: 10.1016/S0003-3472(76)80099-1
- Saari P, Immonen E-V, French AS, Torkkeli PH, Liu H, Heimonen K, Frolov R V. (2018) Electrical interactions between photoreceptors in the compound eye of *Periplaneta americana*. *The Journal of Experimental Biology* 221:jeb189340. doi: 10.1242/jeb.189340
- Saïd I, Costagliola G, Leoncini I, Rivault C (2005) Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera). *Journal of Insect*

- Physiology* 51:995–1003. doi: 10.1016/j.jinsphys.2005.04.017
- Saïd I, Malosse C, Durier V, Rivault C (2015) Intraspecific Signals Inducing Aggregation in *Periplaneta americana* (Insecta: Dictyoptera). *Environmental Entomology* 44:713–723. doi: 10.1093/ee/nvv035
- 斎藤和夫, 斎藤光夫 (1967) ワモンゴキブリとチャバネゴキブリの染色体. *Kontyû* 35:337–342
- 佐久間正幸 (1994) 昆虫の集合フェロモン. *Journal of Pesticide Science* 19:S15–S23. doi: 10.1584/jpestics.19.S15
- Sakuma M (1998) Probit analysis of preference data. *Applied entomology and zoology* 33:339–347
- Sakuma M, Fukami H (1993) Aggregation arrestant pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Isolation and structure elucidation of blattellastanoside-A and -B. *Journal of Chemical Ecology* 19:2521–2541. doi: 10.1007/BF00980688
- Sakuma M, Fukami H (1990) The Aggregation Pheromone of the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Isolation and Identification of the Attractant Components of the Pheromone. *Applied Entomology and Zoology* 25:355–368. doi: 10.1303/aez.25.355
- Sakuma M, Fukami H (1991) Aggregation Pheromone of the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Choice-Chamber Assay for Arrestant Component(s). *Applied Entomology and Zoology* 26:223–235. doi: 10.1303/aez.26.223
- Sakuma M, Fukami H (1985) The Linear Track Olfactometer: An Assay Device for Taxes of the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) toward Their Aggregation Pheromone. *Applied Entomology and Zoology* 20:387–402. doi: 10.1303/aez.20.387
- Sakuma M, Fukami H, Kuwahara Y (1997) Aggregation Pheromone of the German

- Cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Controlled Release of Attractant Amines by Salt Formation. *Applied Entomology and Zoology* 32:143–152. doi: 10.1303/aez.32.143
- Sota T, Yamamoto S, Cooley JR, Hill KBR, Simon C, Yoshimura J (2013) Independent divergence of 13- and 17-y life cycles among three periodical cicada lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:6919–6924. doi: 10.1073/pnas.1220060110
- Still WC (1979) (±)-Periplanone-B. Total synthesis and structure of the sex excitant pheromone of the American cockroach. *Journal of the American Chemical Society* 101:2493–2495. doi: 10.1021/ja00503a048
- 高橋良一 (1924) ゴキブリ類の生活史. *Dobutsugaku Zasshi = Zoological Magazine* 36:215–230
- Takahashi S, Takegawa H, Takabayashi J, Abdullah M, Fatimah AS, Mohamed M (1988) Sex Pheromone Activity of Synthetic Periplanone-B in Male Cockroaches of Genera *Periplaneta* and *Blatta*. *Journal of Pesticide Science* 13:125–127. doi: 10.1584/jpestics.13.125
- Tsuji H (1965) Studies on the behaviour pattern of feeding of three species of cockroaches, *Blattella germanica* (L.), *Periplaneta americana* L., and *P. fuliginosa* S., with special reference to their responses to some constituents of rice bran and some carbohydrates. *Medical Entomology and Zoology* 16:255–262. doi: 10.7601/mez.16.255
- Vargo EL, Labadie PE, Matsuura K (2012) Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:813–819. doi: 10.1098/rspb.2011.1030
- Vershinina AO, Kuznetsova VG (2016) Parthenogenesis in Hexapoda: Entognatha and non-holometabolous insects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 54:257–268. doi: 10.1111/jzs.12141

- Wada-Katsumata A, Zurek L, Nalyanya G, Roelofs WL, Zhang A, Schal C (2015) Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:201504031. doi: 10.1073/pnas.1504031112
- Willis ER, Riser GR, Roth LM (1958) Observations on Reproduction and Development in Cockroaches. *Annals of the Entomological Society of America* 51:53–69. doi: 10.1093/aesa/51.1.53
- Xian X (1998) Effects of mating on oviposition, and possibility of parthenogenesis of three domestic cockroach species, the American cockroach, *Periplaneta americana*; the Smoky brown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*; and the German cockroach, *Blattella germanica*. *Medical Entomology and Zoology* 49:27–32. doi: 10.7601/mez.49.27\_1
- 藪田貞治郎, 住木諭介 (1933) *Aspergillus ochraceus*の一新生産物Ochracinに就て. *Journal of the agricultural chemical society of Japan* 9:1264–1275. doi: 10.1271/nogeikagaku1924.9.1264