

# ハブの生殖行動に伴いメスの皮膚で生成する長鎖脂肪族炭化水素

平良淳誠, 西村昌彦

## Long Chain-Aliphatic Compounds in Female Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) Skin with Sexual Behavior

Junsei Taira and Masahiko Nishimura

**Abstract :** It has been reported that long chain methyl ketones are identified as sex pheromone of the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*), but the habu (*Trimeresurus flavoviridis*) is not still clear because the observation of their sexual behavior is rarely. Thus, this study focused on examination of habu skin with sexual behavior. The skin after courtship behavior was separated and extracted with hexane. These samples were analyzed by Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS) and Infrared Resonance (IR). Although long chain methyl ketones were not found, long chain-aliphatic compounds (C<sub>22</sub>-C<sub>29</sub>) were identified in female of courtship behavior, but is not in both male and immature female. These findings suggest that the long chain-aliphatic compounds in skin of female may contribute to physiological function related to sexual behavior.

**Key Words :** Habu (*Trimeresurus flavoviridis*), Sexual Behavior, Sex Pheromone, Aliphatic Compound, Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS)

### I はじめに

蛇類における性フェロモンについての研究報告で、性フェロモンとして同定されたのは僅かにアカスジガーターズネイク (*Thamnophis sirtalis parietalis*) から単離され、その性フェロモン作用がバイオアッセイによって確認された長鎖の2-メチルケトン類のみである<sup>1-2)</sup>。生殖行動の観察例がほとんどないハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) においては、性フェロモンの発見は極めて困難と考えられ、まだその報告はない。

国内におけるハブの性フェロモンの研究は緒についたばかりで、数年前から国土庁による奄美群島振興開発事業の中で始められている。その一連の研究の中で、これまでに主にハブの体表面脂質の分析が行われ、単離された脂肪酸の量はコレステロール量に比べてかなり少ないことが明らかになっている<sup>3)</sup>。さらに研究を進める中で、メスのハブ表面脂質が7月、10月に捕獲されたものと3月では、前者の脂肪酸が全てメチルエステル型されているのに対して、後者は遊離型で存在していることを報告している。丹羽らは、このような脂質成分の違いから、脂肪酸のメチルエステル型か遊離型かが生殖活動に関連性をもつ物質ではないかと推察している<sup>4)</sup>。このようにハブの脂質成分も徐々に明らかにされてきているが、性

フェロモンの決定に至る物質は未だ見つかっていない。

これまでの研究を踏まえて、今回の研究は生殖行動に伴うハブの皮膚の成分に着目した。すなわち生殖行動をしたメスの皮膚と未成熟メス (全長100cm以下の性生殖できない個体) 及びオス皮膚の成分比較を行い、その成分の違いを指標にハブの皮膚に存在するであろう性フェロモンの探索を試みた。

### II 方法

#### 1. 検体

ハブは3月末から5月中旬に生殖行動をしたメス (Female) 2匹 : F<sub>1</sub> (129cm, 648g); F<sub>2</sub> (113cm, 421g) とオス (Male) : M (128cm, 527g)<sup>5)</sup> および未成熟メス (Immature Female) 2匹 : IF<sub>1</sub> (69cm, 81g), IF<sub>2</sub> (67.5cm, 77g) をコントロールとして比較した。

#### 2. 生殖行動の観察

ハブの生殖行動は24時間、タイムラプスビデオカセットレコーダー (AG-6740, National) を設置して観察をした。

#### 3. 皮膚成分の抽出及び分析

実験に供したハブはクロロホルムで死亡させ、剥離した皮膚はヘキサンで抽出後、エバポレーターで濃縮した。

乾固した試料は、適量のヘキサンに溶解して試料を調製した。

成分分析は装置 GC-MS (HP5973, HEWLETT PACARD) を用いて、キャピラリーカラム DB-1 (30 m, 内径 0.32 μm, 膜厚 0.25 μm, J&W Scientific) で次の条件で行った。

ガスクロマトグラフィー : 45 (1 min) で保持, 10 / min で 290 まで昇温  
 注入口 250 (スプリットレス)

マススペクトロメトリー : イオン化エネルギー 70eV  
 イオン源温度 250  
 インターフェース温度 200

赤外線吸収分光器 FT/IR-300 (JASCO) を用いて試料中のメチルケトン基の確認を行った。

### III 結果と考察

タイム ラプスビデオカセットレコーダーによるハブの生殖行動を図 1 に示す。図に示される生殖行動は、1999年 5月17日に観察されたもので、生殖行動は数時間に亘った。生殖行動をとったオス及びメスの皮膚から生殖行動に伴う成分の分泌は GC-MS で検討した。図 2 にその時の交尾をした 2 匹のメス F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub> のガスクロマトグラムを示す。この交尾をしたメス F<sub>1</sub> とオスのガスクロマトグラムを比較したものを図 3 に示した。図 2, 3 に示されるように交尾をしたメスには明らかにオスとは異なる 7 つの成分 (a, b, c, d, e, f, g) が存在することを確認した。さらにこれらのピークがコントロールの未成熟メス IF<sub>1</sub> に認められるかを比較したところ、図 4 に示されるように明らかに確認された 7 つの成分は交尾

をしたメスに特有な成分であることがわかった。また、オスとメスの成分の比較をしたところ、その性差を示すいくつかのピークを認めたが、今回の研究では同定までには至らなかった。

次に図 2 で示された交尾をしたメスにみられた個々のピークのフラグメンテーションを図 5-a, b, c, d, e, f, g に示した。個々のフラグメンテーションは何れも長鎖

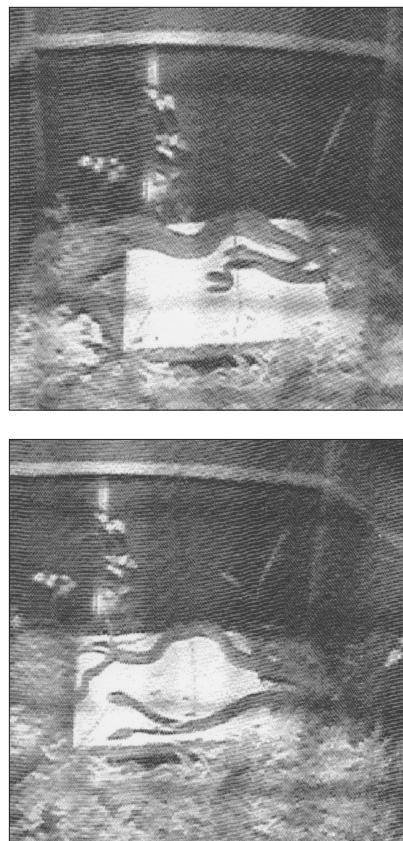


Fig. 1 The courtship behavior of habu. Video was taken on May 17th in 1999. Photograph is showing the moment of sexual behavior at 2:24 pm (a) and 6:14 pm (b).

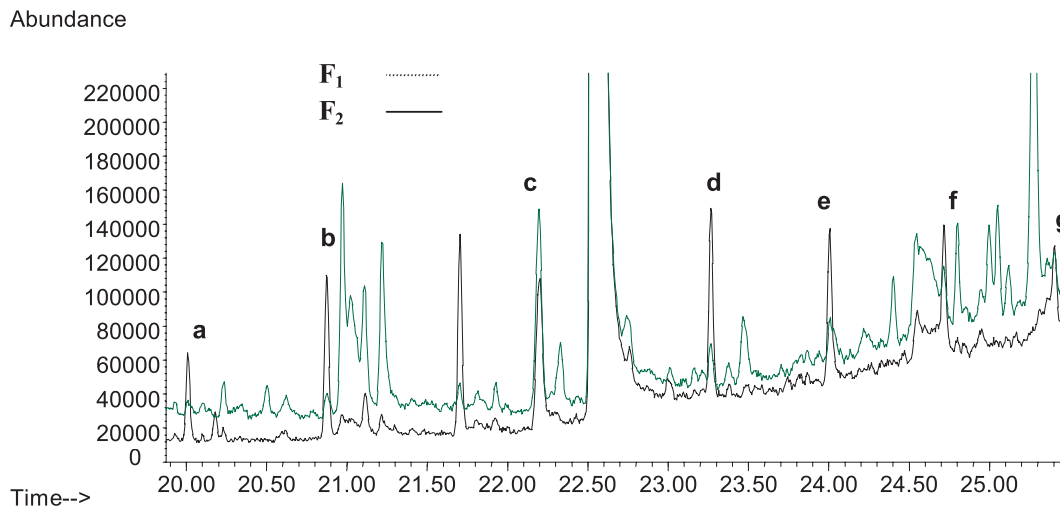


Fig.2 Gas chromatogram of skin extracts of females (F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>) of courtship behavior.

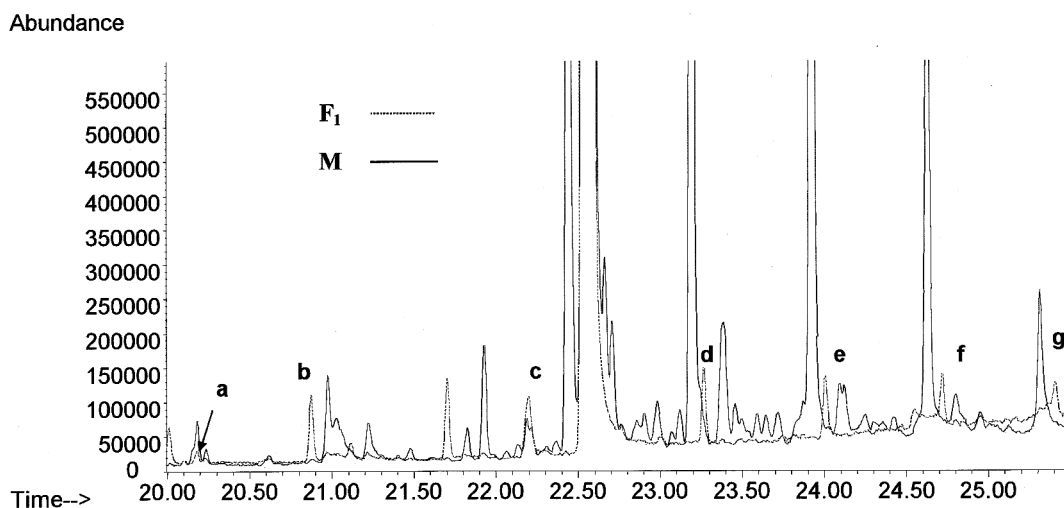


Fig. 3 Gas chromatogram of skin extracts of female (F<sub>1</sub>) and male (M<sub>1</sub>). These habu were conducted sexual behavior as shown in Figure 1.

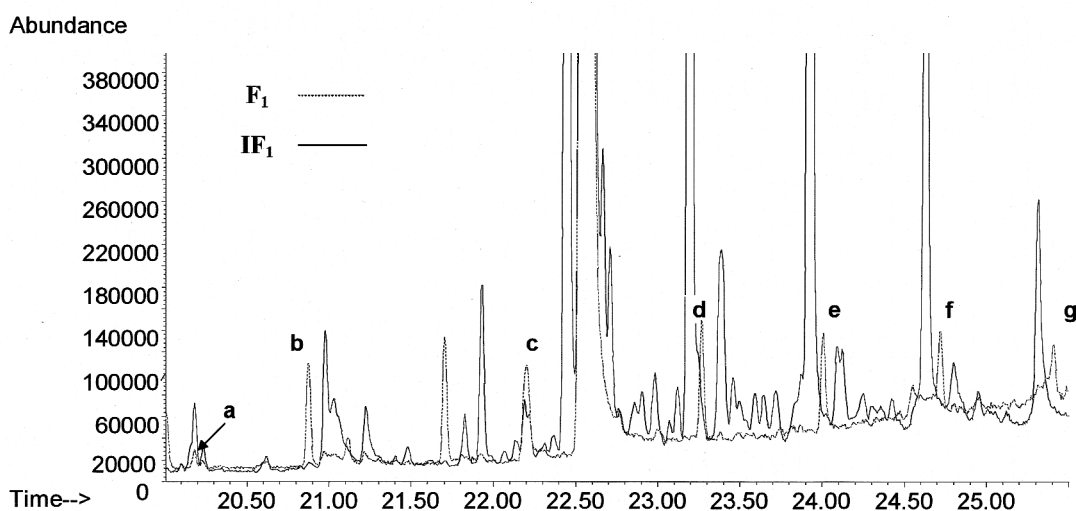


Fig. 4 Comparison of skin components of female (F<sub>1</sub>) with sexual behavior and immature female (IF<sub>1</sub>) as control.

の脂肪族炭化水素の構造であることを容易に予想させた。低質量領域にはメチルケトンを予測させるm/z 57が特徴的にみられ、同系成分はメチルケトン基を有していることが推察された。しかしながら、低質量領域にはm/z 43のプロピル基を示すピークは検出されたが、マクラファティー転移によるm/z 58のメチルケトンに特徴的なピークはみられなかった。またIRからもメチルケトン基の確認はできなかったことから、検出された成分は炭素数22~29を有する直鎖の脂肪族炭化水素であることが支持された。今回の研究で明らかになった生殖行動を示したメスに特異的に検出された成分を表1にまとめた。

長鎖の炭化水素化合物の生理作用については、昆虫のクチクラの長鎖飽和炭化水素に飽和、不飽和、モノ、ジ、トリメチルがあり、アシナガバチでは、その存在比によっ

て女王、雄、働きバチの識別及び群同士間の識別にも利用されていることが報告されている<sup>5)</sup>。蛇類では二ホン

Table 1. Aliphatic compounds in female habu skin with courtship behavior

Peak	Compound	Molecular weight (M <sup>r</sup> )	Molecular formula
a	Docosane	310	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
b	Tridocosane	324	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>
c	Tetradocosane	338	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>
d	Hexadocosane	366	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>
e	Heptadocosane	380	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>
f	Octadocosane	394	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>
g	Nonacosane	408	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>



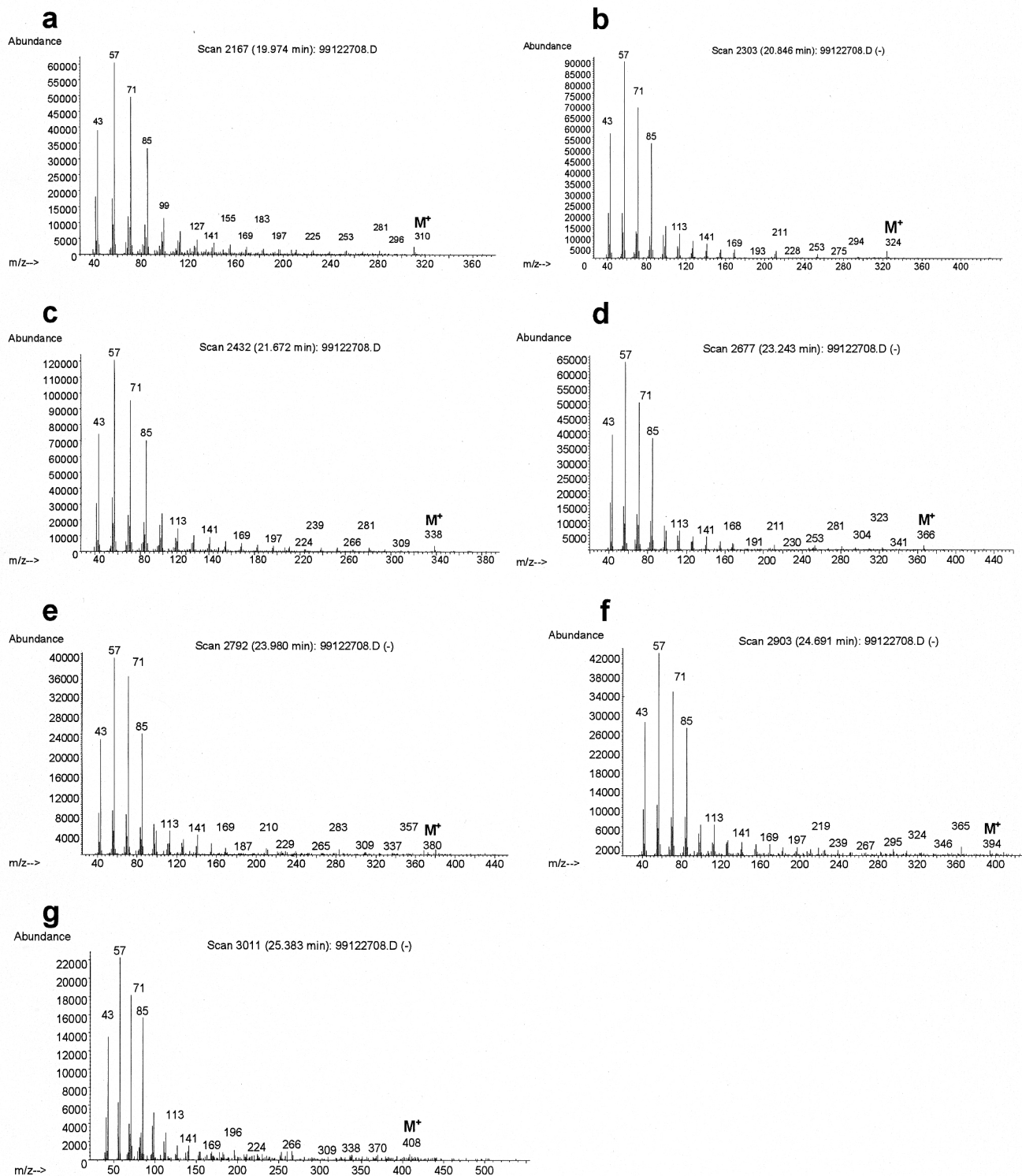


Fig. 5 Total ion chromatograms of female skin extracts (F<sub>1</sub>) in Figure.2.

マムシから直鎖の飽和炭化水素以外に、モノ、ジメチルの分岐鎖化合物の存在が見つかったが、その生理的意義はまだわかっていない<sup>3)</sup>。また蛇類の性フェロモンとしてはガーターヘビから飽和、不飽和のメチルケトン脂質が報告されている<sup>1)</sup>。今回の研究もハブにも同系の成分が含まれていることを予想し研究に着手した。Masonらの方法に準じて長鎖のメチルケトン類の検出を

試みたが確認できなかった。丹羽らは、ハブ表面脂質の分析を詳細に進めてきているが、これまでにメチルケトン類の確認はされていない。むしろ脂肪酸のメチルエステル型か遊離型かが、生殖活動に関連性をもつのではないかと推察している<sup>4)</sup>。

今回の研究で、生殖行動をしたメスのみに長鎖の脂肪族炭化水素が検出されたことは、ハブではじめて交尾時

における成分の違いを見いだしたものである。今回の結果のみでは長鎖の炭化水素がハブの生理にどのような生物学的意義をもつのかはまだ明確ではない。しかし、ハブの生殖行動に何らかの関連をもつ性フェロモンとしての可能性を考える上では、興味深い結果であると思われる。一方でバイオアッセイによる同物質の確認を進めることが、今後のハブの性フェロモンを考える上で重要な課題になるであろう。

#### IV まとめ

アカスジガーターズネイクから単離した2-メチルケトン類が、はじめて蛇類における性フェロモンとして報告された事例である。生殖行動の観察例がほとんどないハブでは、性フェロモンの発見は極めて困難と考えられまだその報告はない。今回、ハブの皮膚に存在する性フェロモン作用物質の探索を行った。対象は交尾をしたメスハブの皮膚と未成熟メス及びオスの皮膚からヘキササン抽出した成分について、GC-MSを用いて分析を行い、比較をした。報告している長鎖の2-メチルケトン類はGC-MS及びIRでも確認できなかった。しかし交尾をしたメスのみに炭素数22~29を有する長鎖の脂肪族炭化水素の存在を確認した。この結果はハブの交尾時における成分の違いをはじめて見出したもので、ハブの生殖行動に何らかの関連をもつ性フェロモンとしての可能性を示唆するものである。まだ緒についたばかりの研究であるが、さらに研究データを蓄積していくことで、有効なハブ誘因剤の開発につながる可能性がある。

#### <謝辞>

IRの測定に際し、ご協力頂いた当研究所水質室・新垣和代研究員並びに琉球大学・海洋自然科学科安里英治助教授に感謝します。

#### V 参考文献

- 1) Mason, R.T. (1992) Reptilian pheromones. in C. Gans & D. Crews (eds.), *Biology of the Reptillia*, vol. 18, Physiology E, Hormones, Brain, and Behavior, pp.114-228. Univ. Chicago Press, Chicago.
- 2) Mason, R.T., Fales, H.M., Jones, T.H., Pannell, L.K., Chinn, J.W. and Crews, D. (1989) Sex pheromones in snakes. *Science*, 245: 290-293.
- 3) 丹羽 孝・鳥羽通久・服部政策 (1993) ハブ表面脂質の分析. 平成4年度ハブ誘因捕獲総合研究報告書(奄美群島振興開発事業). 国土庁・鹿児島県・奄美ハブ誘因捕獲総合研究会, pp.36-41.
- 4) 丹羽 孝・服部政策 (1995) ハブ表面脂質の分析. 平成6年度ハブ誘因捕獲総合研究報告(奄美群島振興開発事業). 国土庁・鹿児島県・奄美ハブ誘因捕獲総合研究会, pp.45-50.
- 5) 西村昌彦 (2000) ハブの行動観察からみた誘因忌避剤の開発10 - 野外ケージなどにおける雄や雌からの抽出物にたいする雄の反応 - 沖縄特殊有害動物駆除対策基本調査報告書 (23), 沖縄県, pp.7-18.
- 6) Layton, J.M., Camann, M.A. and Espelie, K.E. (1994) Cuticular lipid profiles of queens, workers, and males of social wasp *polistes metricus* SAY are colony-specific. *J. Chem. Ecol.*, 20: 2307-2321.