

## オオセンチコガネの索餌行動に關与する嗅感覺子の匂応答

井濃内 順<sup>1)</sup>・渋谷 達明<sup>1)</sup>・畑中 恒夫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 筑波大学生物科学系

<sup>2)</sup> 千葉大学教育学部生物学教室

Odor Responses and Role of the Olfactory Sensilla of the Japanese Dung  
Beetle, *Geotrupes auratus*

JUN INOUCHI<sup>1)</sup>, TATSUAKI SHIBUYA<sup>1)</sup> and TSUNEO HATANAKA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

<sup>2)</sup> Biological Institute, Faculty of Education, Chiba University

### Synopsis

Odor responses of the single olfactory cells on the antennae in the dung beetle (*Geotrupes auratus*) were studied. The receptor cells well responded respectively to a part or all of the five characteristic odors (2-butanone, phenol, p-cresol, indole, skatole) from cattle's dung. The olfactory cells could be divided into the following two types of responses.

(1) R-Type I: Only 2-butanone was effective for all cells of this type. The impulse frequency increased with increase of stimulus concentration. The slope of the dose-response curve was relatively steep. Threshold concentration of the individual olfactory cells varied in the value. Impulse discharges of some of the cells to 2-butanone disappeared or decreased by stimulus of the mixture with other four odors.

(2s) R-Type II: All cells in this type responded to 2-butanone but the responses to the other four odors were different with cells. The dose-response curve to 2-butanone of this type of cells resembled with that of R-Type I. Threshold values of the cells to the odors were differed from each other.

2-butanone in the dung may be volatilized faster than the other four odors, it is thus suggested that the dung beetles may be oriented to 2-butanone odor contained in their food.

### 緒 言

動物の生得的行動を開発する「鍵刺激」として、視覚的に単純な形や色、聴覚的な一定周波数の音、また、物理的な接触刺激などの存在が知られている。一方、化学的、特に嗅覚的な匂いも鍵刺激として重要であり、鱗翅目昆虫の性フェロモンは、配偶行動を開発する、種に固有な匂いであることは良く知られている。これらのフェロモンの多くは化学的に構造決定が成され、また、近年、それらを受容する嗅覚系の神経生理学的研究が幾つか見られる (KAISLING, 1971; KANZAKI and SHIBUYA, 1986a, b; SASS, 1983; BURROWS et al., 1982; BOECKH et al.,

1983, 1984; BOECKH and SELSAM, 1984)。

動物が種を維持して行く上で、配偶行動に劣らず重要な行動として、餌を探し求める索餌行動が挙げられる。特に、昆虫においては雌が幼虫の成育の為に、その種特有の食草などから発散される匂いを頼りに探索して産卵することが知られている。しかし昆虫の生得的な索餌行動を開発する餌の匂いを化学的に分析・同定し、さらに、餌に含まれるこれらの匂いが、嗅覚系にどのように受容されるのかを神経生理学的に調べた報告はごくわずかである (SELZER, 1981)。

嗅覚に依存して、摂食・産卵の為に索餌行動を発現する代表的な昆虫として、鞘翅目コガネムシ主科に属するフン虫類が良く知られている。しかし、フン虫類の嗅細胞の詳細な形態、また、嗅細胞はフンのどのような匂成分に反応するのか、さらに、末梢からの感覚情報が脳にどのように受け取られるのかは、全く分かっていない。我々は、索餌行動の開発に関与する嗅神経系の基本的な性質を明らかにする為に、日本産の2種のフン虫、オオセンチコガネ、ミヤマダイコクコガネを材料に、まず、触角に存在する嗅感覚子の微細構造を形態学的に調べた。(SHIBUYA and INOUCHI, 1982; INOUCHI et al., 1987)。さらに索餌行動開発に関与すると思われる嗅神経系、特に、匂いを受容する嗅細胞の牛フン、および、フンに特有な匂いの単一刺激に対するインパルス応答を調べ、ミヤマダイコクコガネについて得られた結果の一部を報告した (SHIBUYA and INOUCHI, 1982)。

本研究では、神経生理学的な実験に主に用いたオオセンチコガネのフンならびにフン特有な匂いの単一、混合刺激に対する嗅感覚子内の単一嗅細胞のインパルス応答、さらに触角電図 (EAG) について調べた結果を報告する。また、その結果と行動開発との関連について考察した。

#### 材料および方法

材料として用いたオオセンチコガネ (*Geotrupes auratus*) の雌雄の成虫は、長野県菅平牧場などで、牛フンを用いた「ザル法」トラップ (HOSOGI et al., 1979) によって採集した後、実験室に持ち帰り、採集地の土を満したプラスチック製容器 (260 x 200 x 215 mm) に入れ、餌 (牛フン) 約 50 g を2週間毎に与え、恒温庫内 (11-20°C) で飼育した。

単一嗅細胞インパルスの記録には、虫体を小型の固定台に固定し、顕微鏡下でメスを用いて、触角 (計 11 節から成る) の基部から 10, 11 節目を除去した後、9 節目の末梢側を露出させるように触角全体を歯科用ワックスで固定した。電極には、先端直径 1-5  $\mu\text{m}$  のエルジロイ電極を用いた。電極を嗅感覚子の基部に刺入し、匂刺激を与え、導出されたインパルスは前置増幅器 (Nihonkohden, MEZ-8201) を通して、オシロスコープ (Nihonkohden, VC-10) で観察し、同時にデータレコーダ (TEAC, R-60) に記録した。

EAG 記録には、単一嗅細胞インパルスの記録の場合と同様に、虫体および触角を固定し、基部から 9 節目の末梢側を露出させ、この節の先端部にエルジロイ電極を刺入して、穴を開け、この穴に先端直径約 10-20  $\mu\text{m}$  の 15% 赤血塩水溶液を満したガラス細管電極を刺入し、匂刺激を与え、発生した EAG を観察、記録した。

匂刺激として、牧草を主体とする牛の給与飼料の香気成分とこの飼料を食べた牛が排泄したフンの臭気成分とを比較した結果、フンに特有な揮発性の臭気成分と報告されている 2-プタノン、フェノール、p-クレゾール、インドールおよびスカトールを用いた (AU et al., 1980)。p

-クレゾールは Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. から、他の試薬は Wako Pure Chem. Ind., Ltd. から入手した。2-ブタンオンは試薬を原液 (10°濃度) とした。他の刺激は活性炭で脱臭した再蒸留水に、以下の濃度 (ほぼ飽和濃度) で溶かし、これを原液とした (p-クレゾール (1 g/100 ml), フェノール (4 g/60 ml), インドール (0.4 g/100 ml), スカトール (0.04 g/100 ml))。原液は、再蒸留水で希釈し、 $10^{-6}$ — $10^0$ 濃度の範囲で匂刺激として用いた。各刺激液 1 ml をろ紙 (10 x 10 mm) に滴下し、これを 30 ml の注射筒に挿入、モーター (Oriental Motor) 駆動により、注射筒の内筒を押し、臭気を注射針 (内径 1.5 mm) を介して触角に導き、一定流量 (1 ml/秒) で 3 秒間、単一匂刺激として与えた。混合匂刺激は、2-ブタンオンを 1 ml 滴下したろ紙 (10 x 10 mm) を 30 ml の注射筒に入れ、一方他の 4 種類の刺激溶液各 1 ml を滴下した 4 枚のろ紙を別の注射筒に入れ、2 本の注射筒の内筒を同時に駆動させて混合の匂刺激とした。また、新鮮な牛フン (約 8 g) を 30 ml の注射筒内に入れ、同様に、臭気を匂刺激として与えた。実験中は匂の滞留を防ぐために、排気装置を作動し続けた。

## 結 果

触角の基部から 9, 10, 11 節目は大きく鰓葉状に発達しており、これらの 3 節の鞭節上に触角の殆どの感覚子が密集している。特に、感覚子の表面にある小孔 (密度約  $45 \text{個}/\mu\text{m}^2$ ) がその内腔まで貫通しているため、錐状嗅感覚子 (基部直径  $2.5\text{--}3 \mu\text{m}$ , 長さ  $5\text{--}10 \mu\text{m}$ ) と同定された感覚子は、他の毛状、棘状などの感覚子に比べて数が多く、片側の触角当たり約 28,000 個であった (INOUCHI et al., 1987)。また、1 個の錐状嗅感覚子には、2 個の嗅細胞が含まれることが確認された (INOUCHI, 未発表)。

次に感覚子内にある嗅細胞の匂応答を調べた。フン臭刺激を与えると嗅細胞は良く応答し、1 回の刺激に対して 10-20 個のインパルスを発生させた。(Fig. 1A)。また、フン特有の臭気成

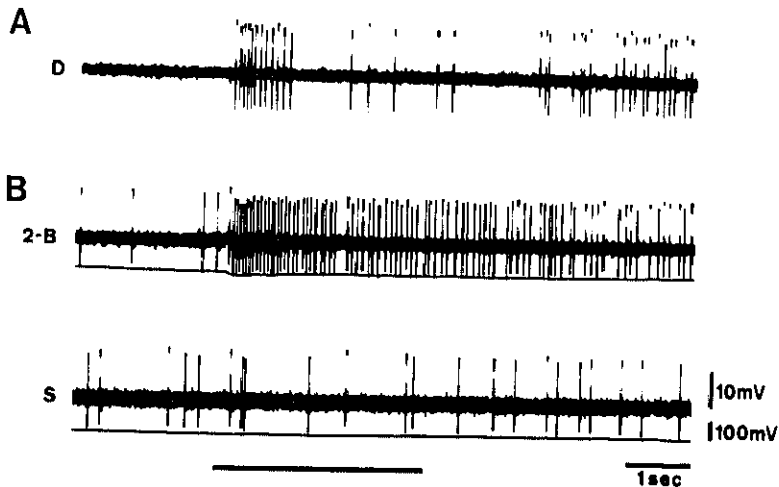


Fig. 1 Responses of single olfactory cells to odors. A: Response to cattle's dung (D). B: Responses of an olfactory cell to 2-butanone (2-B) and skatole (S).

分のうち2-ブタノンの匂刺激に対してはほとんどの嗅細胞が良く応答したが、同じ嗅細胞でも他のフン特有の成分に対してはほとんど応答せず、インパルスを発生させないものも見られた (Fig. 1B)。発生するインパルスの大きさは、通常、2-20 mV、また、受容器電位の振幅は大きなもので約50 mVであった。そして、各臭気成分に対する応答性の違いから、嗅細胞は2群に大別された (INOUCHI and SHIBUYA, 1984)。1群は、2-ブタノンにのみ応答する嗅細胞で、R-Type Iと名づけた。他方は、2-ブタノンばかりでなく、他の成分に対しても応答する嗅細胞群 (R-Type II) である。R-Type Iの2-ブタノン濃度に対する応答の一例を Fig. 2 に示した。この嗅細胞では、濃度増加に伴い  $10^{-2}$  までは徐々に、 $10^{-1}$  からは急激にインパルス頻度が増加した。R-Type IIの2-ブタノンとスカトールの濃度に対する応答の例をそれぞれ Fig. 3 に示した。インパルス頻度は2-ブタノンの濃度増加に伴い徐々に増加し、 $10^{-2}$  で急激に増加した。スカトールに対する濃度応答例では、匂刺激によって発生するインパルス頻度は、比較的低濃度域ですでに飽和状態にあり、濃度が上昇しても殆ど変化せず、最大インパルス数は2-ブタノンに比べて少なかった。Fig. 4 に、R-Type I と R-Type II の濃度-応答曲線を示した。2-ブタノンに対する濃度-応答曲線は、R-Type I, R-Type II ともに、 $10^{-4}$  から  $10^{-2}$  で曲線が立ち上がる傾向を示した。R-Type II の他のフン特有の成分に対する濃度-応答曲線は、 $10^{-5}$  から  $10^{-4}$  以下で既に立ち上がり、それ以上の濃度での曲線の上昇角度は低い傾向が見られた。R-Type I と R-Type II の2-ブタノンに対する閾値濃度は、個々の嗅細胞によって異なった (Fig. 5)。しかし、R-Type I と R-Type II の間で閾値濃度に顕著な違いは認められなかった。R-Type II の、他のフン特有な臭気成分に対する閾値濃度は、個々の嗅細胞で異なった (Fig. 5)。R-Type

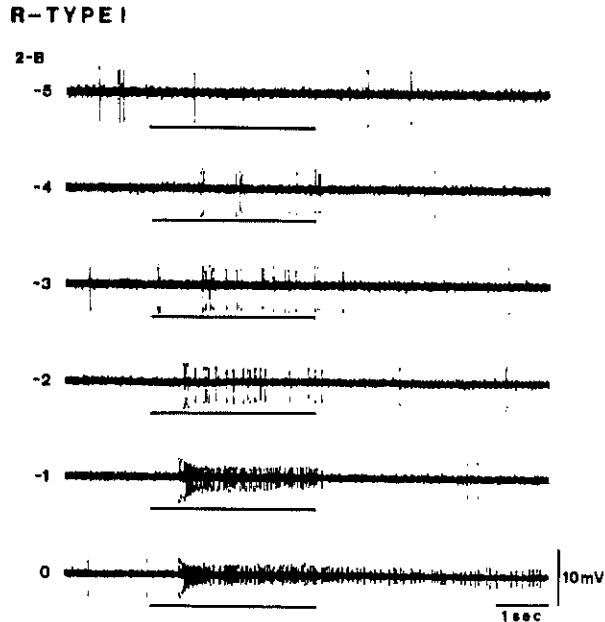


Fig. 2 Responses of a single olfactory cell (R-Type I) to 2-butanone (2-B). Neumerals (-5 to 0) indicate relative log concentrations of the stimuli.

R-TYPE II

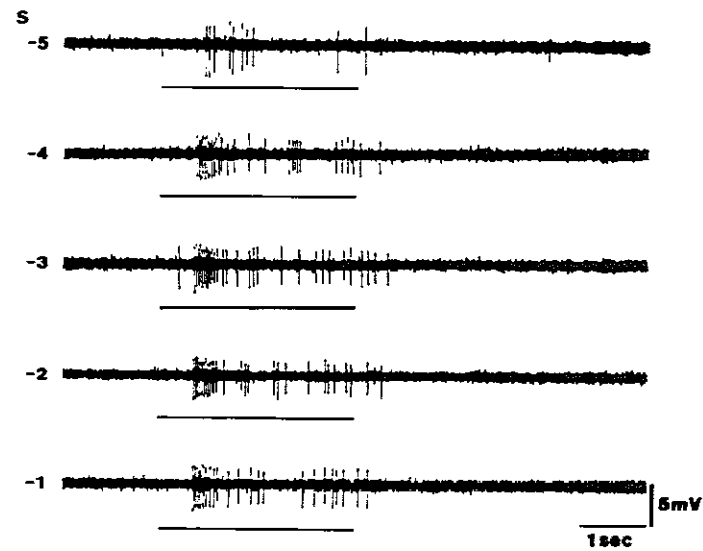
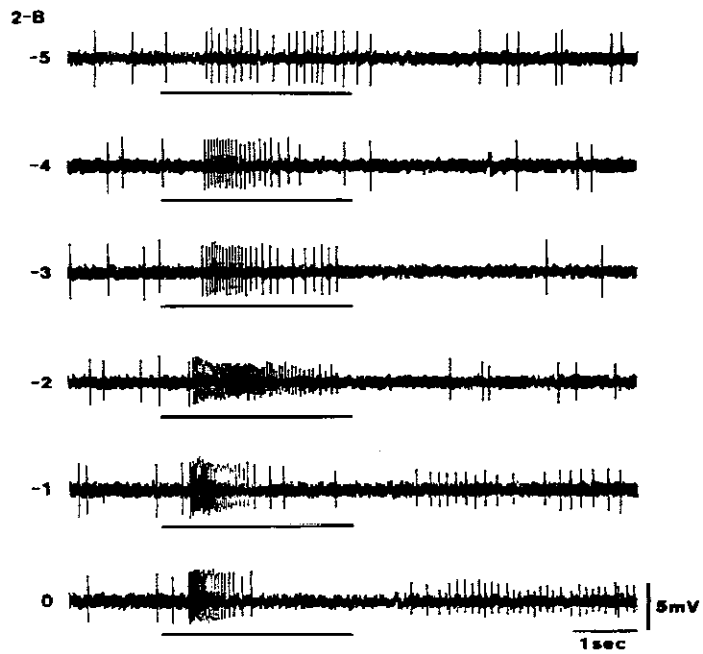


Fig. 3 Responses of single olfactory cells (R-Type II) to 2-butanone (2-B) and skatole (S).

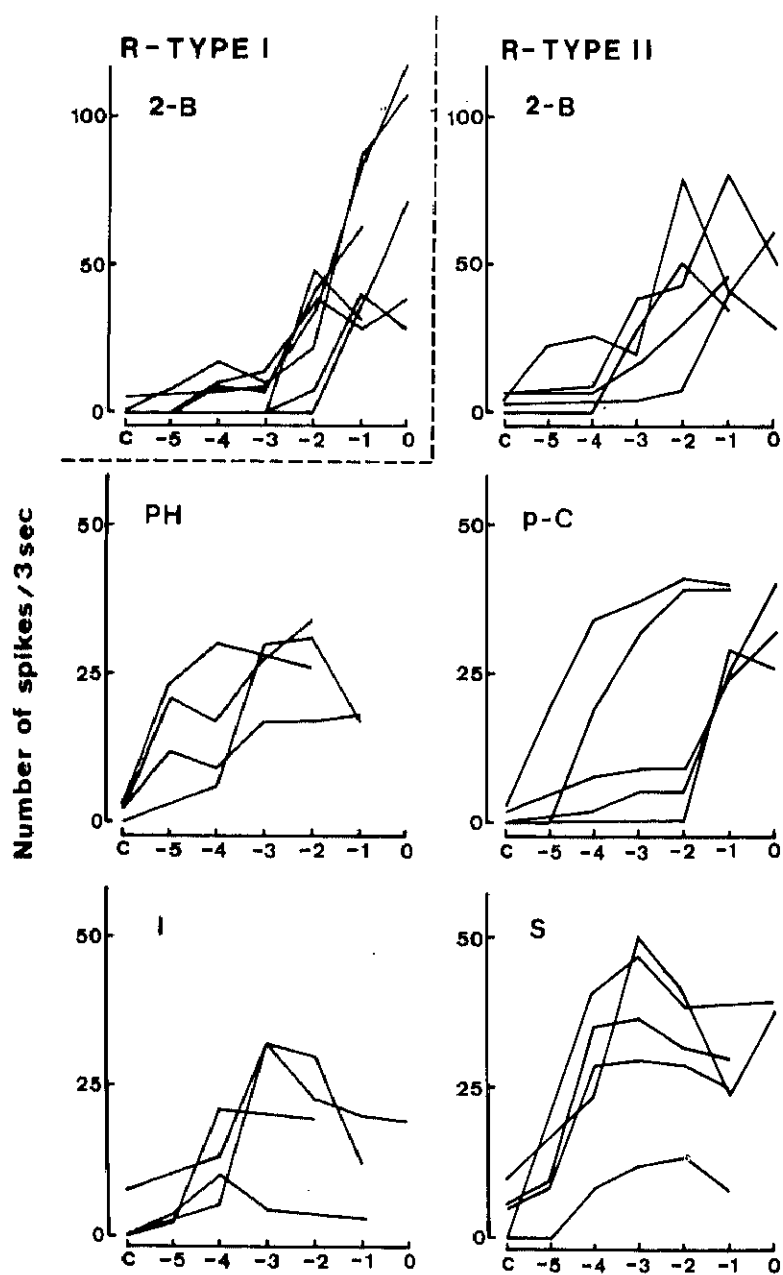


Fig. 4 Dose-response curves to 2-butanone (2-B) of R-Type I and to five odors (2-B, PH, p-C, I, S) of R-Type II. PH: phenol; p-C: p-cresol; I: indole; S: skatole. C: control.

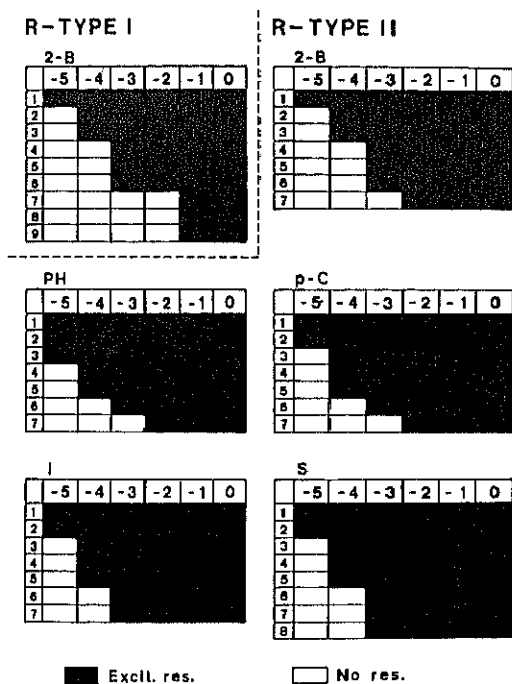


Fig. 5 Threshold values of R-type I to 2-B and of R-type II to five odors (2-B, PH, p-C, I, S). Neumerals (1 to 9) indicate the cell number. Symbols are as in Fig. 4.

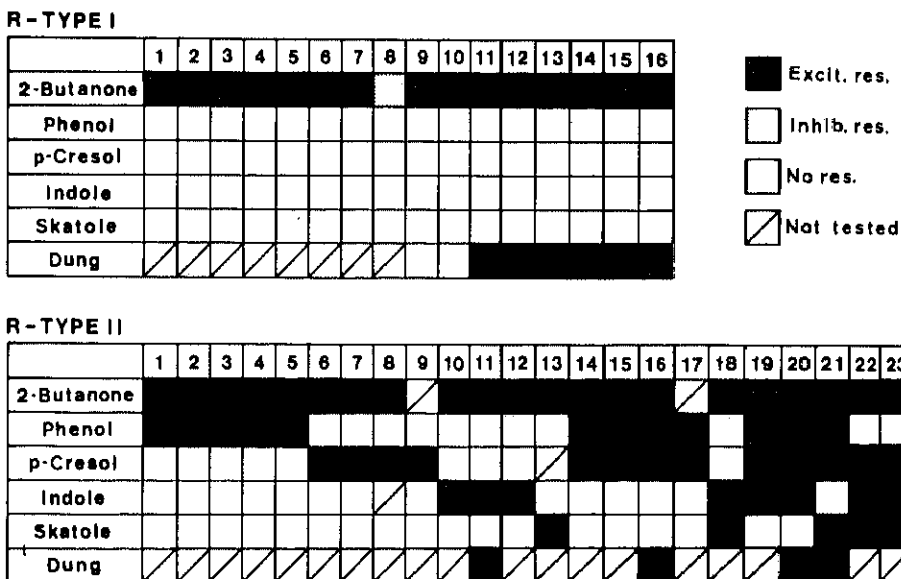


Fig. 6 Response patterns of single olfactory cells (R-Type I and R-Type II) to characteristic odors from cattle's dung. Neumerals indicate the cell number.

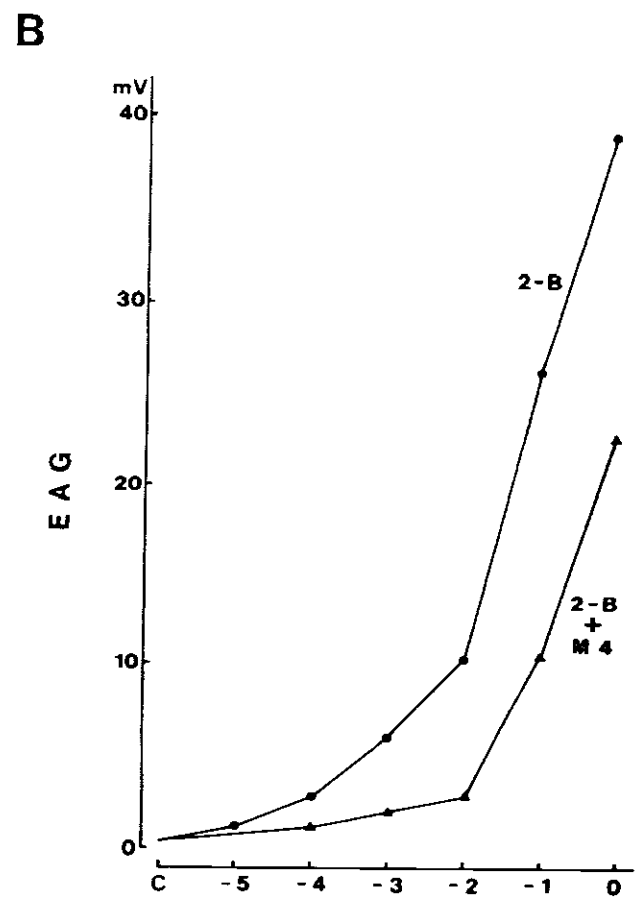
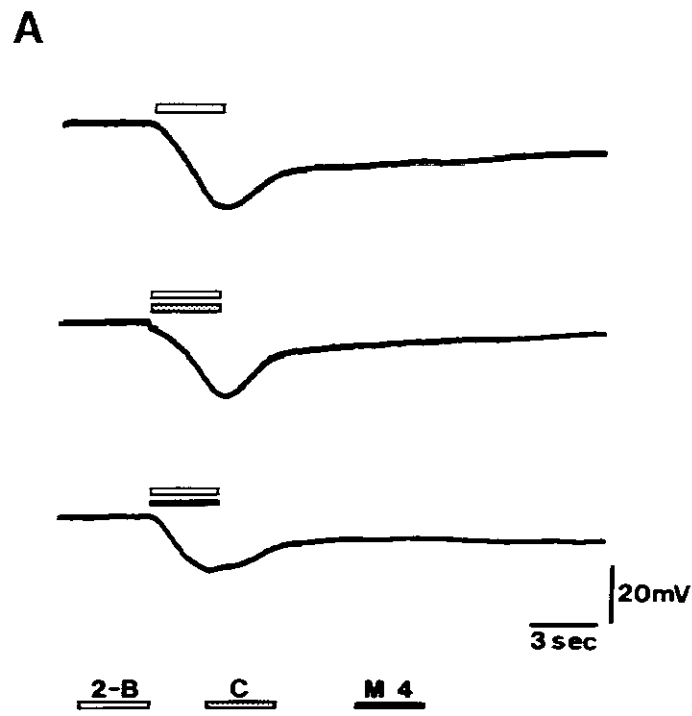


Fig. 7 EAGs. (A) and the dose-response curves (B) to 2-B and the mixture (2-B+M4: PH+p-C+I+S). Symbols are as in Fig. 4.



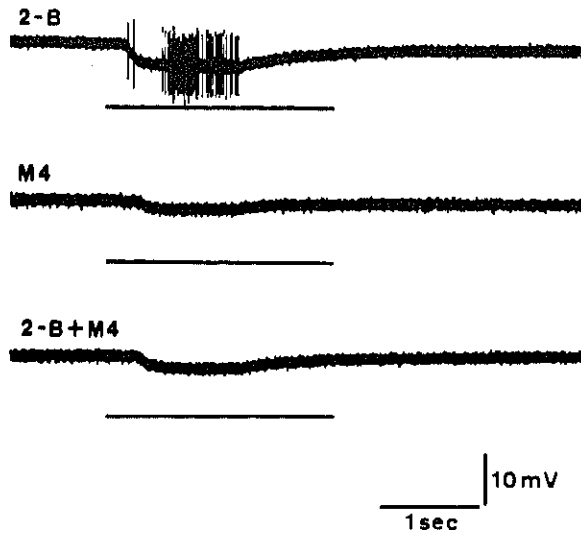


Fig. 8 Responses of single olfactory cell (DC recording) to odors. Symbols are as in Figs. 4 and 7.

	1	2	3	4	5	6	7	8
2-Butanone	■	■	■	■	■	■	■	■
M4(PH,p-C,I,S)	□	□	□	□	□	□	□	□
2-B + M4	▨	▨	▨	▨	▨	■	■	■
Dung	□	□	▧	▧	▧	▧	▧	▧

■ Exclt. res.

▨ Suppres. res.

□ No res.

▧ Not tested

Fig. 9 Response patterns of R-Type I to odors. Symbols are as in Figs. 4 and 7.

I, R-Type II の匂応答性を比較し, Fig.6 に示した。これらの結果は, R-Type I は, 2-ブタノンにのみ応答するので, "specialist"的な性質を持つ嗅細胞であり, R-Type II は 2種類以上の匂いに応答する, いわゆる, "generalist" 的な性質を有していることを示している。

次に, 嗅細胞の 5 種類の臭気成分の混合刺激に対する応答を調べた。まず, 匂刺激によって個々の嗅細胞に発生する受容器電位を集散的に捕らえる EAG を調べた結果, 2-ブタノンの単一刺激によって, 発生する EAG の振幅が, 他の 4 種類の臭気成分との混合刺激によって減少し (INOUCHI and SHIBUYA, 1985) (Fig.7A), また, 2-ブタノンの各濃度における EAG の振幅は, 同濃度の他の 4 種類の臭気成分との混合刺激により減少することが分かった(Fig.7B)。さらに, 受容器電位とインパルスとを同時に記録し, 個々の嗅細胞レベルで, 2-ブタノンに対する応答が, 他の 4 種類の成分との混合刺激によりどのような影響を受けるかを調べた。Fig.8 はその記録の一例である。2-ブタノン刺激によって, 受容器電位とこれに重なるインパルスが発生させる嗅細胞に, 他の 4 種類の成分の混合刺激を与えると, 僅かに受容器電位の発生が見られるが, インパルスはまったく発生しない。次に, この嗅細胞に混合刺激を与えると, 2-ブタノン単一刺激の時より受容電位の振幅が減少し, インパルスの発生も見られなかった。Fig.9,

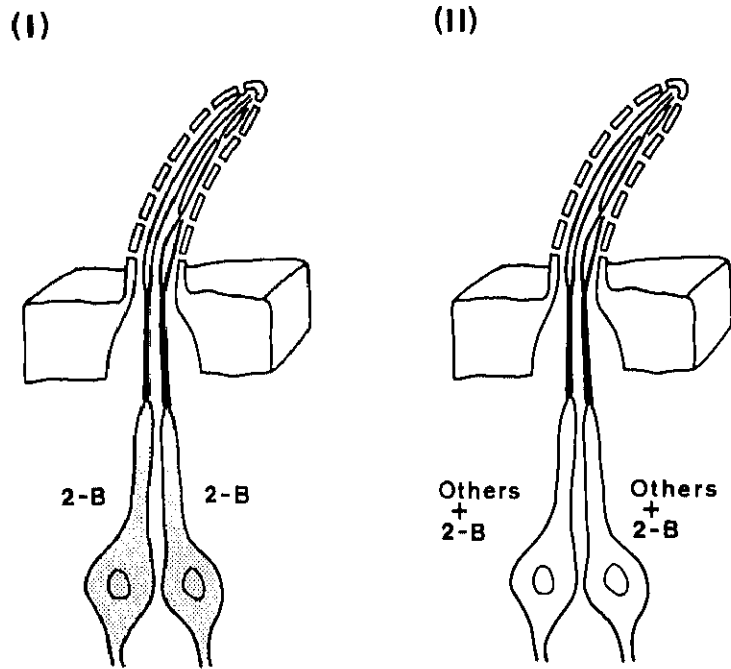


Fig. 10 Schematic drawings of olfactory sensilla. R-Type I and R-Type II may be contained in the sensillum (I) and (II), respectively.

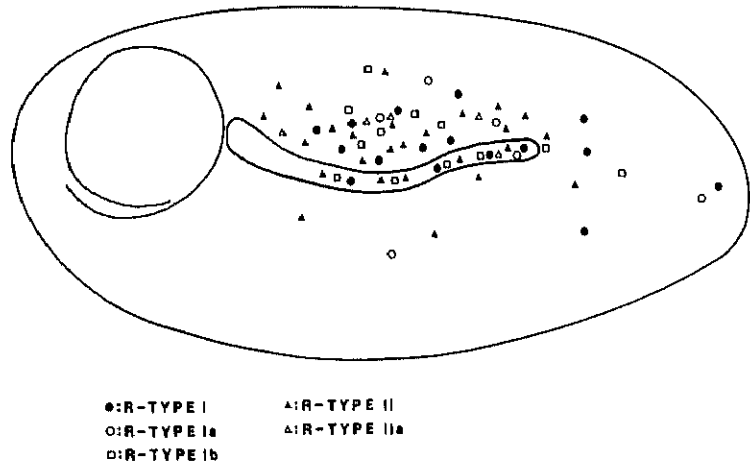


Fig. 11 Distribution of recording sites of R-Type I (R-Type Ia, Ib) and R-Type II (R-Type IIa) on the distal side of the 9th segment. The response to 2-B of R-Type Ia is suppressed by M4. R-Type Ib and R-Type IIa do not have such characteristics. Symbols are as in Fig. 4.

は、2-ブタノン単一刺激によって発生するインパルス数が、混合刺激によって50%以下に減少したものをまとめたものであり、このような応答を示すのは、R-Type Iの嗅細胞であることが分かった。以上の結果は、R-Type Iのなかに、2-ブタノンの匂刺激による受容器電位の発生が、他の4種類の成分との混合刺激によって抑えられ、その振幅が減衰し、そして発生するインパルスが、減少あるいは消失するものが存在していることを示している。さらに、嗅覚覚子には2個の嗅細胞が含まれることから、R-Type Iは、2-ブタノンに“specialist”的に応答する2個の嗅細胞から構成され、一方、R-Type IIは、“generalist”的な性質を持つ2個の嗅細胞が含まれる嗅覚覚子であろうと推察される (Fig.10)。R-Type IとR-Type IIの嗅細胞の鞭節上での分布を調べて見ると、それらはほぼ一様に混在していることが分かった (Fig.11)。

### 考 察

鞭節上における、フン臭刺激に応答する嗅細胞を含む嗅覚覚子の密生は、彼等の鋭敏な嗅覚とその索餌行動との密接な関連性を暗示していると思われる。

フン特有な5種類の臭気成分が、牛フンと同様に誘引効果を持つのかを調べるために、菅平牧場などで、これらの成分を用いたトラップによる実験を行った。その結果、オオセンチコガネは5種類すべての臭気成分を用いたトラップに最も多く捕集された。したがってこれら5種類の成分は、牛フンと同様に彼等にとって生物学的な意味を持つことが示唆された (Inouchi, 未発表)。

嗅細胞は、5種類の臭気成分のなかで最も揮発性の高い2-ブタノンに特に鋭敏に応答し、その濃度-応答曲線の上昇角度が急峻であり、閾値濃度も個々の細胞で異なることから、2-ブタノンの濃度変化の情報を中大脳の2次ニューロンへ伝達していると考えられる。5種類すべての臭気成分の存在によって、フンと同様な誘引性が見られ、また、R-Type Iのなかに、2-ブタノン刺激で発生するインパルスが、他の4種類の成分との混合刺激による受容器電位の減衰に起因して減少あるいは消失するものが存在する。

このことから、R-Type Iの嗅細胞は彼等がフンに定位して行く際に、2-ブタノンと2-ブタノン以外の成分の存在を知らせる、すなわち、餌への接近を知らせる情報を2次ニューロンへ送ることが可能と考えられる。R-Type IIは、2-ブタノン以外の成分に対しても応答する。応答する成分の種類や数が異なること、さらに、その濃度増加によってインパルス頻度が上昇し、閾値濃度も個々の嗅細胞で異なることから、R-Type Iと同様に餌への定位に重要な情報を中枢へ送っていると考えられる。

鞭節上のある領域に混在するこれらの嗅細胞の軸索が投射している糸球体において、末梢からの情報が統合・処理された結果生じる2次ニューロンの5種類の臭気成分に対する応答を調べてみると、2次ニューロンにおいても2-ブタノンに特異的に応答するものが存在することが明らかになった (INOUCHI and SHIBUYA, 1986)。

以上の結果から、鞭節上の嗅覚覚子は、この昆虫の索餌行動の開発と餌への定位に重要な役割をはたしていることが強く示唆された。今後、さらに、索餌行動の開発に参与する中枢 (中大脳・前大脳) ニューロンの神経機構について、報告する予定である。

### 謝 辞

本研究の費用の一部は、筑波大学学内プロジェクト研究費 (昭和61年度)、および本能特別

プロジェクト研究費によったことを付記し、感謝の意を表します。

#### 引用文献

- ALL, T., M. YONAGA and TANAKA H. (1980) Changes in headspace volatiles of feed in the digestive tract of cattle. *J. Jpn. Grassl. Sci.*, **26**: 223-230.
- Boeckh, J. and ERNST K. -D. (1983) Olfactory food and mate recognition. *In* "Neuroethological and Behavioral physiology," (eds. by F. HUBER and H. MARKL,) Springer-Verlag, Berlin, pp. 351-431.
- BOECKH, J., ERNST, K. -D. SASS H. and WALDOW U. (1984) Anatomical and physiological characteristics of individual neurons in the central antennal pathway of insects. *J. Insect Physiol.*, **30**: 15-26.
- BOECKH, J. and SELSAM P. (1984) Quantitative investigation of the odour specificity of olfactory neurons in the American cockroach. *Chemical Senses*, **9**: 369-380.
- BURROWS, M., BOECKH J. and ESSEN J. (1982) Physiological and morphological properties of interneurons in the deutocerebrum of male cockroaches which responded to female pheromone. *J. Comp. Physiol.*, **145**: 447-457.
- HOSOGI, Y., HAYAKAWA, H. SHIMONISHI K. and MIYAO M. (1979) Studies on the utilization of dung beetles for the management of pasture and pasture sanitation. 4. Collecting method of dung beetles in pastures. *Kouchi-chikushiho*, **10**: 11-16. (in Japanese).
- INOUCHI, J. and SHIBUYA T. (1984) Odor responses of olfactory receptor cells on the antennae in dung beetles. *Zool. Sci.*, **1**: 869.
- INOUCHI, J. and SHIBUYA T. (1985) Odor responses of the olfactory receptor cells in the dung beetles. *Zool. Sci.*, **2**: 859.
- INOUCHI, J. and SHIBUYA T. (1986) Odor responses and morphological identification of the deutocerebral neurons in the Japanese dung beetle, *G. auratus*. *Zool. Sci.*, **3**: 983.
- INOUCHI, J., SHIBUYA., T. MATSUZAKI O. and HATANAKA T. (1987) Distribution and fine structure of the olfactory sensilla in Japanese dung beetles, *Geotrupes auratus* Mots. (Coleoptera: Geotrupidae) and *Copris. pecuarius* Lew. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int. J. Insect Morphol. and Embryol.*, (in press).
- KAISLING, K. -E. (1971) Insect olfaction. *In* "Handbook of Sensory Physiology, vol. 4," (ed. L. M. BEIDLER), Springer-Verlag, Berlin, pp. 351-431.
- KANZAKI, R. and SHIBUYA. T. (1986a) Identification of the deutocerebral neurons responding to the sexual pheromone in the male silkworm moth brain. *Zool. Sci.*, **3**: 409-418.
- KANZAKI, R. and SHIBUYA T. (1986b) Descending protocerebral neurons related to the mating dance of the male silkworm moth. *Brain Res.*, **377**: 378-382.
- SASS, H (1983) Production, release and effectiveness of two female sex pheromone components of *Periplaneta americana*. *J. Comp. Physiol.*, **152**: 309-317.
- SELZER, R. (1981) The processing of a complex food odor by antennal olfactory receptors of *Periplaneta americana*. *J. Comp. Physiol.*, **144**: 509-519.

- SIMBUYA, T. and INOUCHI J. (1982) Fine structure and odor responses of olfactory sensilla of the Japanese dung beetle, *Copris pecuarius* (Coleoptera : Scarabaeidae). Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 26 : 194-195. (in Japanese). 11