Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-08

シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害作用に関する行動学的および電気生理学的解析

小嶋，健

(Degree)
博士（理学）
(Date of Degree)
2023-03-06
(Date of Publication)
2025-03-06
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙第3427号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482224

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（別紙様式 3）

論 文 内 容 の 要 旨

氏　　名　　小嶋　健

専　　攻　　生物学専攻

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害作用に関する行動学的および電気生理学的解析

指導教員

大和　誠司　教授（生物制御科学講座）

植物は，植食性昆虫に対して防御物質として機能する多種多様な二次代謝物質を産生する．防御物質の主な機能は摂食阻害作用と有害性（致死性）であり，有害性物質の大半は昆虫の神経系を構成するイオンチャネルに作用する神経毒である．これまでに，植物が産生する致死性の神経毒は数多く発見されてきたが，それらの防御物質としての機能は極めて不明瞭である．一般的に，神経毒は昆虫の行動や生理に影響を及ぼす亜致死作用を示す．亜致死濃度で摂食阻害作用を示す事例は多く知られているが，その中の一部は，潜在的に昆虫の味覚受容器を刺激する．従って，植物が産生する神経毒の一部は，致死性を有するものの，摂食を抑止する摂食阻害物質として機能している可能性がある．神経毒の潜在的な摂食阻害作用の機序を解明することは，植物がイオンチャネルを標的とした神経毒の生合成能を獲得した進化的背景を探ることにつながる．

ピレトリンは，シロバナムシヨケギク *Tanacetum cinerariifolium*（除虫菊）が産生する殺虫性の化合物であり，その作用点は神経細胞に存在する電位依存性ナトリウムチャネル（Nav）である．高濃度のピレトリンを含む除虫菊抽出物は天然殺虫剤として古くから産業利用され，日本では主に蚊取り線香として使用されてきた．ピレトリンから派生した合成ピレスロイド系殺虫剤は世界で広く使用されていることもあり，ピレトリンの殺虫作用の機序は，分子から神経細胞，神経系，行動レベルまで体系的に理解されている．これまでの研究から，ピレトリンや数種のピレスロイド系殺虫剤は，幅広い分類群の植食性昆虫に対して摂食忌避活性を示すことが明らかになっている．そこで私は，味覚や摂食行動に関する知見の蓄積があるクロキンバエ *Phormia regina* をモデルとして用いて，行動と電気生理学のアプローチからピレトリンの摂食阻害作用の機序を解明することにした．

第2章では，クロキンバエに対する摂食阻害活性を選択型摂食試験で調べた．ショ糖溶液に溶解したピレトリン抽出物（以下，ピレトリン）とその主成分であるピレトリンI・IIは，ノックダウンが生じない濃度から喫食選好性を低下させた．すなわち，ピレトリンとピレトリンI・IIはいずれも亜致死濃度でクロキンバエに対して摂食阻害作用を示した．ピレトリンやピレトリンI・IIが摂食阻害作用を示した下限濃度は62.5 μMであり，塩化ナトリウム（塩味物質）やクイニン（苦味物質），酒石酸（酸味物質）が摂食阻害作用を示した濃度よりも1/16以上低かった．さらに，ピレトリンやピレトリンI・IIの摂食阻害作用には，口吻の激しいグルーミングや嘔吐を伴った．これらの量的・質的な差異は，ピレトリンはクロキンバエの口器にある味覚システムに作用するが，その機序は塩味や苦味，酸味物質とは本質的に異なることを支持した．

そこで，第3章では，拘束したハエの口吻にキャピラリー管で餌水を与えるキャピラリー摂食試験を行い，脚や胴体に化合物が接触する機会を排除した条件下でピレトリンと6つの殺虫性成分（ピレトリンI・II，シネリンI・II，ジャスモリンI・II）の正味の摂食阻害活性を評価した．ピレトリンとその構成成分は，塩味，苦味，酸味物質と同様に化合物濃度の増加に応じて摂取時間を短くさせ，摂取量を減少させた．その後，味覚物質を摂取

したクロキンバエは直ぐにショ糖溶液を摂取したが，ピレトリンやその有効成分を摂取した場合は，摂取を中断してから摂取行動を再開するまでの時間は化合物濃度の増加に応じて長くなった．濃度応答性のロジスティック回帰により半数阻害濃度を得たところ，化合物の種類に依らず，摂取量と摂取時間の間で半数阻害濃度に差が認められなかったため，摂取量の減少は摂取時間の短縮に起因することが明確になった．

ノックダウンは，ピレトリンやピレスロイド系化合物に特有の即効的な麻痺作用であり，それらの化合物が昆虫の中枢神経系を即座に過興奮させることによって生じる．ノックダウンや殺虫作用はいずれも，神経細胞においてインパルスの生成に関わるNavへの薬理作用に起因する．そこで，クロキンバエの胸部腹面にピレトリンやピレトリンの有効成分を局所施用し，ノックダウン活性を評価した．キャピラリー摂食試験で得た摂食阻害活性はノックダウン活性と高度に相関したことから，摂食阻害作用を引き起こすピレトリンの標的分子はノックダウンや殺虫作用と同一であり，神経毒としての生理活性が摂食阻害を引き起こすことが示された．

第4章では，ピレトリンの摂食阻害作用を特徴づける口吻の嫌悪応答の行動解析を行い，摂食阻害の発現に関わるピレトリンの作用感覚器官を操作実験により特定した．拘束したクロキンバエの口吻運動のビデオ撮影により，摂食を阻害する味覚物質とは異なり，ピレトリンの摂取の中断は口吻や唇弁の震えを伴い，その後，口吻の部分的な伸展や引き戻しが断続的に繰り返されることが示された．また，時折，嘔吐く様な胸部下方への口吻の伸展が引き起こされた．この嫌悪的な口吻伸展応答は最も目立つ行動応答であり，餌を探す時に繰り出す通常の口吻伸展応答とは明確に異なった．ワイヤ電極を用いた口吻の筋電図記録によって，これらの特徴的な口吻の運動応答は，口吻を構成する筋肉群の持続的な過興奮から描写することができた．このことから，摂取したピレトリンは，反復的な口吻の嫌悪応答を即座に引き起こすことで，摂食を中断させるだけでなく，摂取行動の再開を遅延させることがわかった．

消化管で速やかに吸収されたピレトリンが腹胸部の中枢神経系に作用することで，摂食行動が妨げられた可能性を否定するため，クロキンバエの咽頭を食道下神経節の手前で結紮する操作実験を行った．咽頭を結紮した条件でも，クロキンバエは咽頭が膨満するまでショ糖溶液を摂取した．ピレトリンを口吻に含ませると，口吻の持続的な過興奮が引き起こされたことから，ピレトリンの摂食阻害は，口吻や咽頭に存在する味覚器官への作用に基づいていることが明らかになった．ピレトリンの摂食阻害活性は，唇弁の周囲にある毛状味覚感覚子に触れない摂食条件でも再現されたことから，ピレトリンは，唇弁の内側に存在するペグ状味覚感覚子と咽頭の内側にある咽頭味覚器官のいずれか，または両方を標的とすることが示された．

第5章では，ピレトリンに対する口吻の味覚神経応答を電気生理学手法を用いて調べた．ペグ状味覚感覚子と咽頭味覚器官に由来する感覚ニューロンのピレトリンに対する応答を調べるため，それぞれに繋がる唇弁神経と咽頭神経に含まれる求心性神経の複合イン

パルスを吸引電極で記録しながら，クロキンバエにピレトリン入りのショ糖溶液を摂取させた．ピレトリンの摂取は，ペグ状味覚感覚子を構成する多数の感覚ニューロンを直ちに過興奮させ，過興奮の状態は口吻の筋活動の活性化と対応するように持続した．一方，咽頭味覚器官を構成する感覚ニューロン群は，1分程度の潜時を経て漸進的に興奮した．これらの味覚感覚器の持続的な過興奮は，クイニンの摂取では生じなかった．これらの結果から，ピレトリンの摂食阻害作用をもたらす口吻の反復的な嫌悪応答は，唇弁のペグ状味覚感覚子の持続的な過興奮に起因することが明らかになった．

私は，昆虫に対して神経毒として作用するピレトリンが亜致死濃度で摂食阻害物質としてふるまうことをクロキンバエで明らかにした．この研究により，植物が産生する神経毒が摂食に関わる味覚感覚器を速やかに刺激することで昆虫に対して摂食阻害作用を示すことを初めて実証した．得られた行動学的および電気生理学的知見を元に，摂取したピレトリンが味覚感覚器を構成する感覚ニューロンのインパルス生成部位にまで浸透し，Navのゲーティングのキネティックを調節することで，味覚受容ニューロンや機械感覚性ニューロンを持続的に興奮させる，摂食阻害作用発現機序の新奇な仮説モデルを提案した．

昆虫は，食性の拡大とともに摂食形式や口器の形状を多様化させた一方で，味覚受容に関わる細胞構成を共有している．また，昆虫の神経細胞で機能するNavは基本的に1種類であり，ピレトリンの感受性は中枢—末梢神経系を通して変わらない．普遍的な味覚受容の神経基盤は，幅広い昆虫種に対してピレトリンが実効的な摂食阻害作用を示すことを保証する．つまり，シロバナムシヨケギクの葉や子房に蓄積されたピレトリンは，摂食を試みるあらゆる昆虫に対して摂食阻害物質として機能することを意味する．コショウ科の植物が種皮に蓄えるピペロバチンやペリトリン，あるユリ科の植物が産生するベラトリジンは，ピレトリンとは異なる骨格の化学構造を有するが，いずれもNavに結合し，昆虫の神経細胞に対してピレトリンと同様の薬理作用を示す．系統的に離れたこれらの植物における二次代謝の進化の背景には，強力な摂食阻害作用を有する神経毒を産生することによる適応度の向上があったと考えられる．

私は，シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害物質としての作用機序を明らかにした．昆虫の神経系が機能する上で必要不可欠な電位依存性ナトリウムチャネルは，植物が昆虫に対する防御形質を獲得するにあたり，これまで認識されていた以上に適応度に寄与する標的分子であることを示した．今後，ピレトリンをモデルとした研究が展開し，ピレトリンの味覚コーディング様式の細胞基盤や，摂食様式が異なる様々な植食性昆虫に対する摂食阻害作用の発現機序が明らかになることで，ピレトリンを筆頭とした一群の神経毒が摂食阻害物質として見直されることが期待される．

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	小嶋　健		
論文題目	シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害作用に関する行動学的および電気生理学的解析		
審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	教授	大和　誠司
	副　査	教授	青沼　仁志
	副　査	准教授	佐倉　緑
	副　査	教授	河村　伸一
	副　査		印

要　　旨

植物は，植食性昆虫に対して防御物質として機能する多種多様な二次代謝物質を産生する．防御物質の主な機能は摂食阻害作用と有害性（致死性）であり，有害性物質の大半は昆虫の神経系を構成するイオンチャネルに作用する神経毒である．致死性の神経毒の防御物質としての機能は不明瞭な部分が多い．神経毒は行動や生理に影響を及ぼす亜致死作用を示すことが一般的である．亜致死量の摂取によって摂食阻害作用を示す事例は数多く報告されており，その中の一部の神経毒は昆虫の味覚受容器を刺激する．従って，植物体内に蓄積される神経毒は，昆虫に致死量を摂取させるよりも前に摂食を抑止する摂食阻害物質として機能している可能性がある．神経毒の潜在的な摂食阻害作用の機序を解明することは，植物がイオンチャネルを標的とした神経毒の生合成能を獲得した進化的背景を探ることにつながる．

ピレトリンはシロバナムシヨケギク *Tanacetum cinerariifolium*（除虫菊）が産生する殺虫性物質であり，その作用点は電位依存性ナトリウムチャネル（Nav）である．高濃度のピレトリンを含む除虫菊抽出物は天然殺虫剤として古くから産業利用され，日本では主に蚊取り線香として使用されている．ピレトリンから派生した合成ピレスロイド系殺虫剤は世界で広く使用されていることもあり，ピレトリンの殺虫作用の機序は，分子から神経細胞，神経系，行動レベルまで体系的に理解されている．これまでの研究から，ピレトリンや数種のピレスロイド系殺虫剤は，幅広い分類群の植食性昆虫に対して摂食忌避活性を示すことが明らかになっている．本学位論文では，味覚や摂食行動に関する知見の蓄積があるクロキンバエ *Phormia regina* をモデルとして用いて，行動と電気生理学のアプローチからピレトリンの摂食阻害作用の機序を解明した．

第２章では，クロキンバエに対する摂食阻害活性を選択型摂食試験で調べた．ショ糖溶液に溶解したピレトリン抽出物（以下，ピレトリン）やその主成分であるピレトリンⅠ・Ⅱは，ノックダウンが生じない濃度から喫食選好性を低下させた．すなわち，ピレトリンとピレトリンⅠ・Ⅱはいずれも亜致死濃度でクロキンバエに対して摂食阻害作用を示した．ピレトリンやピレトリンⅠ・Ⅱが摂食阻害作用を示した下限濃度は 62.5 μM であり，塩化ナトリウム（塩味物質），クイニン（苦味物質）および酒石酸（酸味物質）が摂食阻害作用を示した濃度よりも 1/16 以上低かった．さらに，ピレトリンやピレトリンⅠ・Ⅱの摂食阻害作用には，口吻の激しいグルーミングや嘔吐を伴った．これらの量的・質的な差異は，ピレトリンやその主成分はクロキンバエの口器にある味覚システムに作用するが，その機序は塩味や苦味，酸味物質とは本質的に異なることを支持した．

そこで，第３章では，拘束したハエの口吻にキャピラリー管で餌水を与えるキャピラリー摂食試験を行い，脚や胴体に化合物が接触する機会を排除した条件下でピレトリンと６つの殺虫性成分（ピレトリンⅠ・Ⅱ，シネリンⅠ・Ⅱ，ジャスモリンⅠ・Ⅱ）の正味の摂食阻害活性を評価した．ピレトリンとその構成成分は，塩味，苦味，酸味物質と同様に化合物濃度の増加に応じて摂取時間を短くさせ，摂取量を減少させた．その後，味覚物質を摂取したクロキンバエは直ぐにショ糖溶液を摂取したが，ピレトリンやその有効成分を摂取した場合は，摂取を中断してから摂取行動を再開するまでの時間は化合物濃度の増加に応じて長くなった．濃度応答性のロジスティック回帰から半数阻害濃度を得たところ，化合物の種類に依らず，摂取量と摂取時間の間で半数阻害濃度に差が認められなかったため，摂取量の減少は摂取時間の短縮に起因することが明確になった．

ノックダウンは，ピレトリンやピレスロイド系化合物に特有の即効的な麻痺作用であり，それらの化合物が昆虫の中枢神経系を即座に過興奮させることによって生じる．ノックダウンや殺虫作用はいずれも，神経細胞においてインパルスの生成に関わる Nav への薬理作用に起因する．そこで，クロキンバエの胸部腹面にピレトリンやピレトリンの有効成分を局所施用し，ノックダウン活性を評価した．キャピラリー摂食試験で得た摂食阻害活性はノックダウン活性と高度に相関したことから，摂食阻害作用を引き起こすピレトリンの標的分子はノックダウンや殺虫作用と同一であり，神経毒としての生理活性が摂食阻害を引き起こすことが示された．

氏名	小嶋　健

第４章では，ピレトリンの摂食阻害作用を特徴づける口吻の嫌悪応答の行動解析を行い，摂食阻害の発現に関わるピレトリンの作用感覚器官を操作実験により特定した．拘束したクロキンバエの口吻運動のビデオ撮影により，摂食を阻害する味覚物質とは異なり，ピレトリンの摂取の中断は口吻や唇弁の震えを伴い，その後，口吻の部分的な伸展や引き戻しが断続的に繰り返されることが示された．時折，胸部がある下方への口吻の完全な伸展が引き起こされた．この嫌悪的口吻伸展反射は最も目立つ行動応答であり，餌を探す時に繰り出す通常の口吻伸展反射とは明確に異なった．ワイヤ電極を用いた口吻の筋電図記録によって，これらの特徴的な口吻の運動応答は，口吻を構成する筋肉群の持続的な過剰興奮から描写することができた．このことから，ピレトリンの摂取は口吻の嫌悪的な運動を繰り返し引き起こすことで，摂食を中断させることに加えて，正常な摂食行動を妨げることで摂取の再開をも延長させることがわかった．

消化管で速やかに吸収されたピレトリンが腹部の中枢神経系に作用することで，結果的に摂食を中断した可能性を棄却するため，クロキンバエの咽頭を食道下神経節の手前で結紮する操作実験を行った．咽頭を結紮した状況でもクロキンバエは咽頭が膨満するまでショ糖溶液を摂取した．ピレトリンを口吻に含ませることで，口吻の持続的な過剰興奮が引き起こされたことから，口吻や咽頭に存在する味覚器官にピレトリンは作用することが明らかになった．ピレトリンの摂食阻害作用は，唇弁の周囲にある毛状味覚感覚子に触れない様にピレトリンを摂取させた場合でも同様に引き起こされたことから，唇弁の内側に存在するペグ状味覚感覚子と咽頭の内側にある咽頭味覚器官のいずれか，または両方にピレトリンが作用することが示された．

第５章では，ピレトリンに対する口吻の味覚神経応答を電気生理学的に調べた．ペグ状味覚感覚子と咽頭味覚器官を構成する感覚ニューロンのピレトリンに対する応答を調べるため，それぞれに繋がる唇弁神経と咽頭神経に含まれる求心性神経の複合インパルスを吸引電極で記録しながら，クロキンバエにピレトリン入りのショ糖溶液を摂取させた．ピレトリンの摂取は，口吻の筋活動の活性化と対応するように，ペグ状味覚感覚子に由来する多数の感覚ニューロンを直ちに興奮させた．この過剰興奮は，キャピラリー摂食に伴う機械刺激や摂食を阻害する濃度の苦味刺激では活性化しない感覚ニューロン群のバーストを多く含んだ．一方，咽頭味覚器官を構成する感覚ニューロン群は，１分程度の潜時を経て漸進的もしくは突発的に興奮した．これらの結果から，ピレトリンの摂食阻害作用の要である摂取の中断は，唇弁のペグ状味覚感覚子の過剰興奮によって引き起こされることが明確になった．

以上のように，昆虫に対して神経毒として作用するピレトリンが亜致死濃度で摂食阻害物質としてふるまうことをクロキンバエで明らかにした．この研究により，植物が産生する神経毒が摂食に関わる味覚感覚器を速やかに刺激することで昆虫に対して摂食阻害作用を示すことを初めて実証した．得られた行動学的および電気生理学的知見を元に，摂取したピレトリンが味覚感覚器を構成する感覚ニューロンのインパルス生成部位にまで浸透し，味覚受容ニューロンや機械感覚性ニューロンを持続的に興奮させることで摂食を中断させ続ける，摂食阻害作用発現機序の新奇な仮説モデルを提案した．

昆虫は，食性の拡大とともに摂食形式や口器の形状を多様化させた一方で，味覚受容に関わる細胞構成を共有している．また，昆虫の神経細胞で機能する Nav は基本的に１種類であり，ピレトリンの感受性は中枢―末梢神経系を通して変わらない．味覚受容における普遍的な神経基盤は，幅広い昆虫種に対してピレトリンが実効的な摂食阻害作用を示すことを保証する．つまり，シロバナムシヨケギクの葉や子房に蓄積されたピレトリンは，加害を試みるあらゆる昆虫に対して摂食阻害物質として機能することを意味する．コショウ科の植物が種皮に蓄えるピペロバチンやペリトリン，あるユリ科の植物が産生するベラトリジンは，ピレトリンとは異なる骨格の化学構造を有するが，いずれも Nav に結合し，昆虫の神経細胞に対してピレトリンと同一の薬理作用を示す．系統的に離れたこれらの植物における二次代謝の進化の背景には，強力な摂食阻害作用を有する神経毒を生合成することによる適応度の向上があったと考えられる．

本研究は，シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害物質としての作用機序を明らかにした．昆虫の神経系が機能する上で必要不可欠な電位依存性ナトリウムチャネルは，植物が昆虫に対する防御形質を獲得するにあたり，これまで認識されていた以上に適応度に寄与する標的分子であると考えられる．今後，ピレトリンをモデルとした研究が展開し，ピレトリンの味覚コーディング様式の細胞メカニズムや，摂食様式が異なる様々な植食性昆虫に対する摂食阻害作用の発現機序が明らかになることで，ピレトリンを含む一部の神経毒が摂食阻害物質として見直されることが期待される．

第２章の内容は，以下の論文として，Insects 誌に受理されている。

Takeshi Kojima, Seiji Yamato and Shinichi Kawamura. Natural and synthetic pyrethrins act as feeding deterrents against the black blowfly, Phormia regina (Meigen)

本研究はシロバナムシヨケギクが産生するピレトリンが亜致死濃度において昆虫の味覚感覚器の味覚受容ニューロンや機械感覚性ニューロンを速やかに刺激することで摂食阻害を引き起こすことを明らかにしたものであり，昆虫に対する植物の防御機構を解析する上で，重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める．よって，学位申請者の小嶋健は，博士（理学）の学位を得る資格があると認める．

氏名	小嶋　健

・特記事項　なし

・特許登録数　０件

・発表論文数　１編