

広食性系統を用いた  
カイコの食物選択に関する味覚神経機構の解析

2004年 2月

朝 岡 潔

# 広食性系統を用いた カイコの食物選択に関する味覚神経機構の解析

朝 岡 潔

## 目 次

緒 論	2
第 1 章 広食性蚕系統の選抜とLP-1人工飼料摂食性の遺伝的解析	6
第 2 章 カイコの摂食行動の時間的解析とその飼料・系統間差異	19
第 3 章 カイコの味覚器官の微細形態とその系統間差異	38
第 4 章 カイコの上咽頭感覚子味覚細胞の電気生理学的解析	57
第 5 章 日601号×中601号、沢 J 等の広食性蚕系統の味覚応答	71
第 6 章 食性異常突然変異蚕 <i>Nps</i> の摂食行動とその味覚の関与について	86
総合考察	104
摘 要	109
引用文献	114

## 結 論

鱗翅目昆虫の幼虫は、一部の例外を除きそのほとんどが植物の葉を餌とする植食性であり、有用昆虫であるカイコその他、害虫としても農業上重要な種が多い。その食性は種により異なり、一種の植物のみを特異的に摂食する単食性、ある特定の分類上の植物のグループを食べる狭食性、植物の分類群を越え多岐にわたる多くの植物を食べる広食性に便宜上分類されている。昆虫が植物を餌として摂食するかしないかの判断は、体内の栄養状態などの生理条件とともに感覚器官から得られた情報に依存する。鱗翅目昆虫の幼虫においては嗅覚とともに接触化学感覚（味覚）が重要な役割を果たしており、葉の表面のワックス成分や葉を噛み砕いたときに浸出する植物成分を感知して判断していると考えられている。その味覚器官は小腮と上咽頭に存在するといわれ、味覚感覚子数あるいはその感覚子に附属する味覚神経細胞の総数は他の昆虫類、生物に比較して非常に少ない。このため、味覚細胞の応答と摂食行動・食物選択行動の関係を解析するためには非常に有利な研究材料となる。中でもカイコにおいては、寄主である桑に含まれる摂食に関与する物質の単離、多種多様な人工飼料の開発、小腮の味覚細胞の性格づけ、多様な遺伝的特性を持つ系統の作出と維持などの多彩な研究蓄積があるため、これらを利用した味覚神経機構の解明のための研究の展開が可能である。

カイコは、桑のみを寄主とする単食性昆虫の代表のように扱われ、「カイコはなぜ桑しか食べないのか？」という疑問に答えるため、桑の葉から誘引と摂食に関する数多くの物質が単離同定されてきた。Watanabe (1958) 及び Hamamura *et al.* (1961, 1962) は、誘引因子として  $\alpha$ 、 $\beta$ -ヘキセナール、 $\beta$ 、 $\gamma$ -ヘキセノール、シトラール、酢酸リナリル、リナロールなどを、噛みつき因子として、モリン、 $\beta$ -シトステロール、イソケルシトリンを、飲み込み因子としてセルロースのほか、糖、イノシトール、リン酸カリウム、シリカを同定している。その後も、アスコルビン酸、*n*-ヘキサコサノール、*n*-オクタコサノール、炭酸カルシウムなどが摂食促進因子として同定されている (Ito 1961; Mori 1982a, 1982b; 常山・田中 2001)。さらには、*n*-プロピオン酸ブチルなどの匂い物質が摂食に大きく関わっていることが報告された (Ishikawa *et al.* 1968)。これらの結果は、摂食の促進に関与する物質は単一ではなく、多くの物質が関与していることを示している。しかし一方で、ショ糖には強い摂食促進作用があり、ショ糖のみを含む餌が桑葉の粉末のみを含む餌よりもカイコがよく摂食すること (Ito, 1960; Niimura and Ito 1964)、通常摂食しない植物の葉の粉末やその抽出物を含む寒天飼料や熱処理濾紙にショ糖を添加することにより摂食が可能になったり、摂食量の増加が見られた

こと（石川・平尾 1966）などから、最も重要な摂食促進物質は意外とどこにでもあるショ糖という単純な物質である可能性がある。

これらの摂食に関与する物質の同定や、その作用を調べる実験が盛んに行われていた同時期に、石川らは、チップレコーディング法とよばれる電気生理学的な手法を用いてカイコの味覚を調べる実験を行い、小腮の粒状体上にある2対の有柄感覚子に含まれる味覚細胞の性質を詳細に調べている（Ishikawa 1963; Ishikawa 1966; Ishikawa 1967; 石川・平尾 1963）。外側有柄感覚子には、摂食促進物質として同定されたショ糖をはじめとする糖類を受容する細胞とミオイノシトールを特異的に受容する細胞があることがわかり、ほかにもグルコース受容細胞、塩受容細胞、アブラナ科植物の抽出物に応答する細胞を同定している。内側有柄感覚子には、苦味を受容する細胞、水受容細胞と2つの塩受容細胞を同定している。中でも特筆すべき重要な発見は苦味受容細胞であり、この細胞が受容する物質が摂食阻害行動を引き起こすことを示した（Ishikawa, 1966; 石川・平尾, 1966）。著者らが行った実験においても、非寄主植物より単離された配糖体など、カイコに摂食阻害作用を示す物質に対して、この細胞が顕著な濃度応答をすることを示している（Shimizu and Asaoka 1999; Shimizu *et al.* 1995; Tanaka *et al.* 1994）。Ishikawa（1966）の報告後、この種の細胞は、鱗翅目昆虫の幼虫に広く存在することがわかったが、現在ではハエやバッタなど他目の昆虫においても発見されており、摂食や産卵行動の抑制要因として重要な影響を及ぼす「デターレント細胞」として知られている（cf. Schoonhoven, *et al.* 1992）。摂食阻害物質を受容する感覚器官が、摂食行動に重要な役割を果たすことは、石川らの研究以前にも小腮の切除により通常カイコが摂食しない植物の葉を摂食することを示した研究から示されている（伊藤ら 1959; 鳥居・森井 1948）。近年では、神田（1992）が小腮上の内側有柄感覚子の切除により広食性用の人工飼料を摂食することを明らかにしており、この味覚器官の役割を再認識させた。しかし、鱗翅目昆虫の幼虫の味覚器官は小腮の有柄感覚子の他に小腮肢や上咽頭にもあることが一部の昆虫で知られている（Albert 1980; Asaoka and Akai 1991; De Boer *et al.* 1977; Glendinning *et al.* 1998; Ma 1972）。カイコでは、小腮肢の切除による行動実験から、小腮肢が食物選択の上で重要な役割を果たしていることがわかっており、匂いに対する神経応答も記録されている。（平尾ら 1972; 平尾ら 1976; 石川・平尾 1966; Ishikawa *et al.* 1969）。しかし、カイコの上咽頭に存在する味覚器官に関する知見はこれまでなかった。一方、Dethier（1937）及び石川・平尾（1966）は、鱗翅目昆虫幼虫は小腮以外にも糖を受容する器官が存在することを示唆しており、下咽頭等にも味覚器官が存在する可能性があるが、未だ他の味覚器官の発見には至っていない。

カイコはチシャなどの桑科の植物による飼育が可能であるほか、生育の程度を考慮しなければ桑科以外にも数多くの摂食可能な植物が記載されている (Fraenkel 1959; 堀内・清水 1961; 伊藤 1959; 新倉 1971; 渡辺 1970)。このため、狭食性に分類する方が適当であるともいわれている。しかし、実際には摂食する植物の種類はカイコの系統によっても著しく異なる (田村 1988)。また、各種の人工飼料に対するカイコの系統の摂食性を調べ、系統による食性の違いを示した数多くの研究が存在する (浜野ら 1986; 神田ら 1988; 山本・清水 1982; 井口ら 1975; 中村 1973; 長島 1968; 清水・松野 1975; 高宮 1968)。中には人工飼料を全く摂食しない系統も見いだされ、この行動形質を支配する第25連関群 (染色体) の劣性1遺伝子 *nfad* が同定されている (榎島ら 1984; 山本 1983)。人工飼料による摂食性の選抜が行われていない品種に人工飼料を与えると個体による摂食性のばらつきがあることは経験的にもしばしば認められる現象であり、人工飼料の摂食性の高い実用品種の育成のためには摂食個体の選抜が欠かせない。

食性において最も極端な系統に、沢 J (横山 1970; 横山 1975) や *Np* 遺伝子を保有する系統 (田島ら 1984)、*Nps* 遺伝子を保有する系統 (田島・大沼 1986; 大沼・田島 1989) などが存在する。沢 J は横山により在来の保存系統からキャベツによって選抜された系統であるが、サクラやカキを含む多くの種類の植物葉や果実を食べるほか、通常はほとんど摂食しない低コスト人工飼料 LP-1 もよく摂食する (横山・望月 1973; 横山・望月 1974; 横山・中山 1980; 神田ら 1988)。沢 J の LP-1 人工飼料に対する摂食性は、第3連関群上の劣性の1遺伝子 *pph* によって支配され、その他修飾遺伝子が関与している (神田 1992)。*Np* と *Nps* は、X線や $\gamma$ 線の照射によって引き起こした突然変異個体からフダンソウにより選抜されて見いだされた遺伝子でそれぞれ第11、第3連関群上に座位し、ともにホモ致死となる (田島ら 1984; 大沼・田島 1989, 1990)。沢 J 系統の作成は、通常摂食しないような餌による個体選抜により桑以外の植物や低コストの人工飼料をよく摂食する極端な食性の実用品種を作成できる可能性を示したともいえる。

以上のような多くの知見からカイコの食性は遺伝的な支配を受けていることは間違いなく、1遺伝子の変異でも摂食行動に大きな変異をもたらすことがすでにわかっている。しかし、これらの遺伝子がどこで発現し、どのように機能しているのかについては全くわかっていない。

著者は、育成中の実用蚕系統のなかから LP-1 人工飼料による選抜を試み、低コスト人工飼料に適応できる二元交雑蚕品種「日601号×中601号 (通称あさぎり)」を育成することに成

功した。この日601号×中601号のほか沢J、*Nps*などの食性異常系統は、桑以外の多くの植物を摂食するが、それはなぜなのか、あるいは、これらの系統では食性を支配するメカニズムのどこかに遺伝的な変異が起きているはずであるがそれはどこなのか、という疑問を解明する必要がある。上述したように、味覚が食性や摂食行動に重要な役割を果たしていることはすでに認められているため、味覚細胞やその情報処理系に異常があることは十分予想できる。食性の異なる系統が同一種に複数存在する生物はまれであり、これらのカイコの系統は食性を支配する神経のメカニズムを調べるための優れた材料となるに違いない。

本論文の研究は、広食性蚕品種日601号×中601号の育成に端を発し、日601号×中601号を含めたいくつかの食性異常系統について、食性の異常と味覚機能との関連を調べることにより、昆虫の食物選択、摂食行動に関与する味覚の神経機構を明らかにすることを目的として行った。そのため、食性の遺伝的性質の解析、味覚刺激物質が行動に及ぼす影響を調べるための行動の解析、これまで調べられていなかった上咽頭に存在する味覚器官の形態と電気生理的性質等についての解析をすすめるとともに、沢J、日601号×中601号、*Nps*などの食性異常系統を用いて摂食行動、味覚感覚子、味覚細胞の形態と電氣的応答についての系統間比較を行い、カイコの食物選択に関与する味覚神経機構を解析した。

## 第1章 広食性蚕系統の選抜とLP-1人工飼料摂食性の遺伝的解析

カイコの人工飼料に家畜用の飼料素材を導入することにより低コスト化する試みが最初に新村（1973）及び堀江ら（1980）によって行われた。その後、飼料組成を線形計画法により設計した数多くの低コスト化された人工飼料が作出された（堀江・渡辺 1983; 柳川ら 1988a）。しかし、これらの飼料に対するカイコの摂食性は著しく低いため、この飼料による飼育方法を実用化するためには蚕品種の食性を改良し、家畜用の飼料素材を良く摂食する広食性の品種を育成することが必要であると考えられるようになった。広食性の実用品種を育成するためには二つの方法が考えられる。一つは保存系統である沢Jの持つ広食性遺伝子を交配により日本種や中国種の原種に導入する方法である（神田・田村 1991）。もう一つは各種の原種や育成現場の育成素材に強い選抜をかけることにより、広食性品種を育成する方法である。我々は後者の可能性について検討し、多糸量実用品種として育成中の系統についてLP-1人工飼料（Table 1-1, 堀江・渡辺 1983）に対して適合する系統の選抜・育成を行った。その結果、広食性の二元交雑蚕品種日601号×中601号（あさぎり）の育成に成功した（真野ら 1991）。本研究では、異なる飼料及び異なるステージ（齢）における摂食性の関係、選抜系統の摂食性の遺伝解析など、広食性品種の初期選抜・育成過程において見られた人工飼料の食性に関する性状についての遺伝的解析を行った。

### 材料及び方法

#### ① LP-1 飼料を摂食する蚕系統の検索

LP-1人工飼料による摂食性の選抜には、蚕糸試験場松本支場蚕品種改良第一研究室（その後、蚕糸・昆虫農業技術研究所松本支所耐性蚕育種研究室に改変、現在は農業生物資源研究所）において維持されている指定蚕品種及び育成中系統の合計日本種26系統、中国種57系統を用いた。摂食性の検定は、9cm径のシャーレ内にLP-1飼料を置き、これにふ化直後の蟻蚕を掃き立て、27℃室内に4日間放置した後の毛振るい率（明らかに生育が確認された個体数の割合）を求めることによって行った。

#### ② 飼料及びステージによる摂食性の比較

指定蚕品種17品種については4種の人工飼料を用いて飼料間での摂食性の比較を行った。人工飼料は、LP-1飼料のほか、LPY-5人工飼料（柳川ら 1988a）、桑葉粉末22%を含

む 1-4 齢用人工飼料 M22 (堀江ら 1973) 及び 2-4 齢用準合成飼料 M0 (伊藤ら 1974) を用いた (Table 1-1)。摂食性は掃き立て 2 日後に調べた毛振るい率と 5 日後に 2 齢になっている個体の割合を指標として調べた。

1 齢と 4 齢における摂食性の比較は、日本種 8 系統、中国種 5 系統について 3~5 蛾分の蚕種を貼り合わせるにより混合蛾区 2 区を作成し、一方を 1 齢の摂食性試験用に用い、残りを 4 齢の摂食性試験用に用いて行った。1 齢の摂食性試験は、①で用いた摂食性の検定と同様に行った。4 齢の摂食性試験は、1~3 齢を市販の人工飼料 (ヤクルト原種稚蚕用) で飼育し、各系統毎に 100 頭または 200 頭の 4 齢起蚕に LP-1 飼料を給餌し、27°C の室内に 7 日間放置後、生存個体のうち明らかに成長が認められた個体の割合を求めることにより行った。

### ③ LP-1 飼料による摂食性の選抜と遺伝

①によって摂食性が良好であり実用系統として育成が有望であると判断された系統について、摂食個体を市販の人工飼料 (ヤクルト原種稚蚕用) によって飼育し継代し、第 2 世代目以降は 1 から 20 蛾区に展開し、第 4 世代まで蛾区及び個体の選抜を繰り返した。2 世代目以降の摂食性の選抜は、①で用いた摂食性の検定と同様に行った。

選抜された日本種、中国種それぞれ 1 系統について、LP-1 飼料を全く摂食しない中 150 号との F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 及び戻し交雑世代 (BF<sub>1</sub>) を作成し、LP-1 飼料の摂食性の遺伝を①と同様な方法により調べた。

LP-1 飼料で 3 回選抜を繰り返した日本種 1 系統、中国種 2 系統については、②で用いた 4 種の人工飼料の摂食性を調査し、無選抜系統と比較した。選抜系統は 1 齢期に 3 回選抜を行ったものを用い、非選抜系統は選抜を行わず桑葉または市販の人工飼料により 2 回継代したものを用いた。摂食性の試験は、2~3 蛾を切り貼りすることにより混合した蛾区の約 1 蛾分を各区について掃き立て、その 2 日後の毛振るい率及び 5 日後の 2 齢蚕率を調べた。



**Table 1-1** Composition of artificial diets used in this study.

M22 (for 1st–4th instar larvae) (Horie <i>et al.</i> 1973)		M0 (Semi-synthetic Diet, Grower) (Ito <i>et al.</i> 1974)	
Mulberry leaf powder	22.5%	Potato starch	8.4%
Potato starch	6.8	Soybean meal, defatted	33.4
Soybean meal, defatted	32.4	Sucrose	8.4
Sucrose	7.2	Soybean oil	2.5
Soybean oil	1.4	$\beta$ -sitosterol	0.4
$\beta$ -sitosterol	0.2	Cellulose powder	28.4
Cellulose powder	18.7	Agar	12.5
Agar	6.8	Citric acid	0.4
Citric acid	0.3	Ascorbic acid	1.7
Ascorbic acid	0.9	Sorbic acid	0.2
Sorbic acid	0.2	Salt mixture	3.8
Salt mixture	2.7	(Total)	(100.0)
(Total)	(100.0)	Vitamin B mixture	added
Vitamin B mixture	added	Antiseptics	added
Antiseptics	added		

LPY-5 (Yanagawa <i>et al.</i> 1988)		LP-1 (Horie and Watanabe 1983)	
Mulberry leaf powder	10.0%	Rice bran	44.4%
Corn meal	20.0	Soybean meal	38.9
Soybean meal, defatted	30.0	Fish meal	5.0
Rice bran, defatted	19.6	Gluten meal	5.1
Sucrose	6.0	KR-yeast	5.0
Soybean oil	2.0	Vitamin mixture	1.3
Phytosterol	0.2	Methionine	0.1
Carragheenan	4.0	Lysine	0.2
Citric acid	4.0	(Total)	(100.0)
Ascorbic acid	1.0		
Salt mixture	1.9		
Vitamin mixture	0.3		
Tryptophan, Valine	0.1		
Antiseptics	0.9		
(Total)	(100.0)		

## 結 果

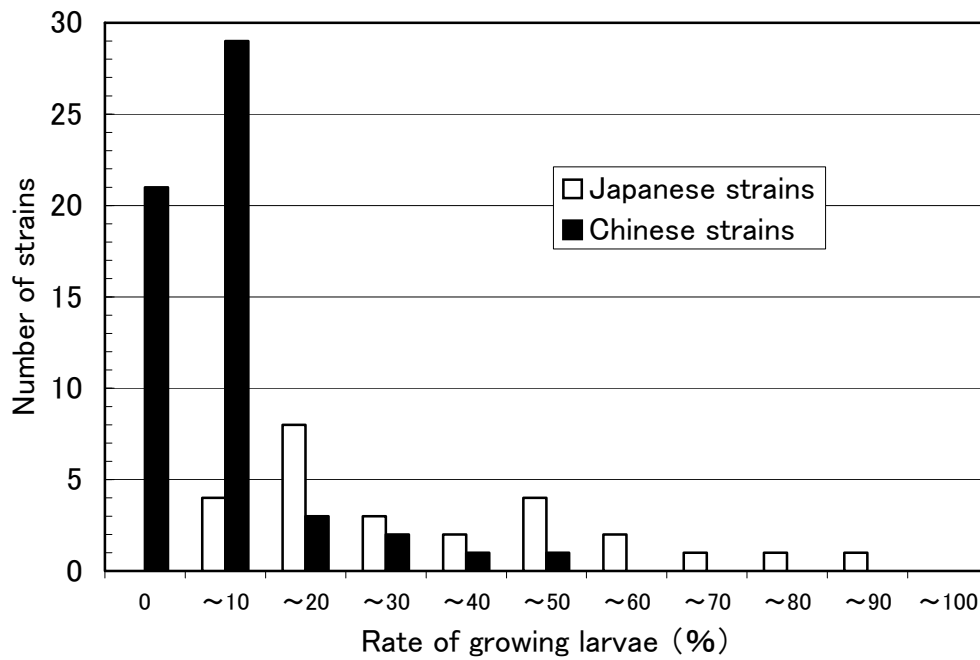
### ① LP-1 飼料を摂食する蚕系統の検索

各種の育成系統の蟻蚕の LP-1 飼料に対する摂食性を調べた。その結果、日本種では 26 系統のうち 15 系統が 30%以下の毛振るい率を示し、8 系統が 30~60%、3 系統が 60~90%であった。中国種は日本種に比べて著しく摂食性が劣り、57 系統のうち全く摂食しなかった 21 系統を含め、全ての系統が 50%以下の毛振るい率であった (Fig. 1-1)。摂食性の比較的高い系統においても成育の早さは個体間にばらつきがみられた。また、飼料を摂食しなかった個体は 1 齢においては 4 日後、4 齢において 7 日後には大部分が弊死した。

### ② 飼料及びステージによる摂食性の比較

指定蚕品種 17 品種について 4 種の人工飼料を用いて飼料間での摂食性の比較を行った (Table 1-2)。一般に普及している人工飼料の基本となった M22 飼料は、一部の中国種で摂食性がやや劣ったが、ほとんどの品種の摂食性は高く、生育も良好であった。交雑原種の 5 齢用の低コスト人工飼料として開発された LPY-5 飼料は、日本種では日 134 号を除き 2 日後の毛振るい率は 95%以上と高く、その後の生育も比較的良好であった。しかし、中国種は全般に成績が劣り、人工飼料による選抜を加えた支 140 号 A と支 145 号のみが良好に生育した。桑葉粉末を含まない M0 と LP-1 飼料では、日本種の一部では良好に生育したが、多くの品種で生育は劣り、特に中国種はほとんど摂食する個体が見られなかった。また、酵母や魚粉を含む LP-1 飼料は、M0 飼料に比較して摂食は悪く、また生育も遅い傾向が見られた。分散分析の結果、いずれの指標についても品種、飼料について有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

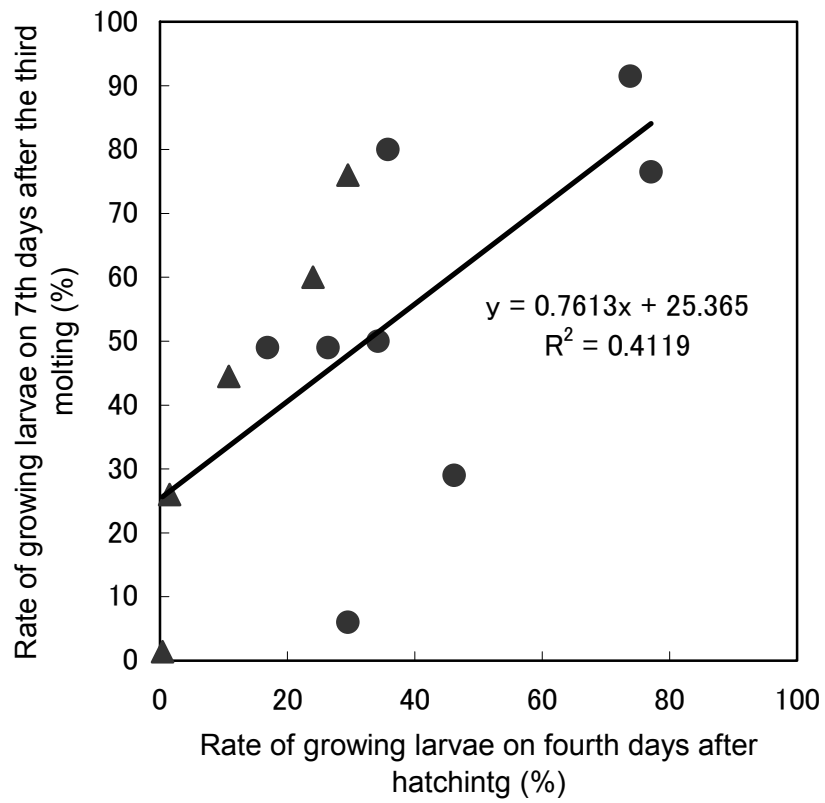
次に、1 齢期と 4 齢期における LP-1 飼料に対する摂食性を系統別に調べた結果得られた摂食性の関係を Fig. 1-2 に示す。1 齢 4 日後の毛振るい率と 4 齢 7 日後の成育個体の割合の間の相関係数は 0.643 で、5%の水準で有意であった。日本種 3 系統を除いた 10 系統では 4 齢の摂食性が 1 齢よりも高く、Fig. 1-2 に示したような回帰直線が得られた。この結果、1 齢期に摂食性を調べることにより 4 齢期の摂食性をある程度推定できることがわかった。



**Fig. 1-1** Distribution of the number of strains in which the newly hatched were able to feed on the LP-1 diet. Feeding ability was designated by the rate of growing larvae counted on fourth days after hatching and feeding the diet.

**Table 1-2** Feeding ability of the parent strains of authorized hybrids on four kinds of different artificial diets. Feeding ability was designated by both the rate of growing larvae counted on two days after hatching, and the rate of second instar larvae counted on fifth days after hatching.

Strains	Rate of growing larvae on two days after hatching (%)				Rate of second instar larvae on fifth days after hatching (%)			
	M22	LPY-5	M0	LP-1	M22	LPY-5	M0	LP-1
日 134 号	97.5	75.9	0.0	1.5	92.4	24.7	0.0	0.0
日 137 号	100.0	97.2	17.5	2.0	98.5	85.5	15.7	0.0
日 140 号	100.0	100.0	83.6	79.5	100.0	99.6	71.2	0.0
日 145 号	100.0	99.6	55.1	12.7	99.2	98.9	63.0	0.0
日 146 号	90.3	93.6	20.2	39.7	91.1	61.8	11.1	0.0
日 147 号	98.6	98.1	55.1	55.3	99.2	93.1	36.9	1.0
日 150 号	100.0	95.9	36.2	1.5	98.6	92.4	29.9	0.0
日 506 号	99.5	100.0	17.9	3.5	99.5	94.0	7.9	0.0
日 601 号	99.3	100.0	95.9	73.1	98.6	99.3	96.7	48.5
支 135 号	77.8	9.9	0.0	0.0	63.7	3.8	0.0	0.0
支 137 号	21.8	2.5	0.0	0.0	13.0	2.5	0.0	0.0
支 145 号	100.0	97.4	3.2	0.0	100.0	90.2	3.2	0.0
支 146 号	70.3	20.5	0.0	0.0	33.7	1.0	0.0	0.0
中 147 号	90.7	51.5	0.0	0.0	71.6	23.7	0.0	0.0
中 150 号	100.0	56.8	0.4	0.0	91.3	31.6	0.4	0.0
中 506 号	97.7	26.0	0.0	0.0	97.7	17.1	0.0	0.0
支 140 号 A	100.0	99.6	2.4	2.7	100.0	94.6	1.6	0.0



**Fig. 1-2** Relationships of the feeding ability on the LP-1 diet between first and fourth instar larvae. Feeding ability was designated by the rate of growing larvae counted on fourth days after hatching for the first instar, and by the rate of growing larvae counted on seventh days after the third molting for the fourth instar. (●Japanese strains, ▲Chinese strains)

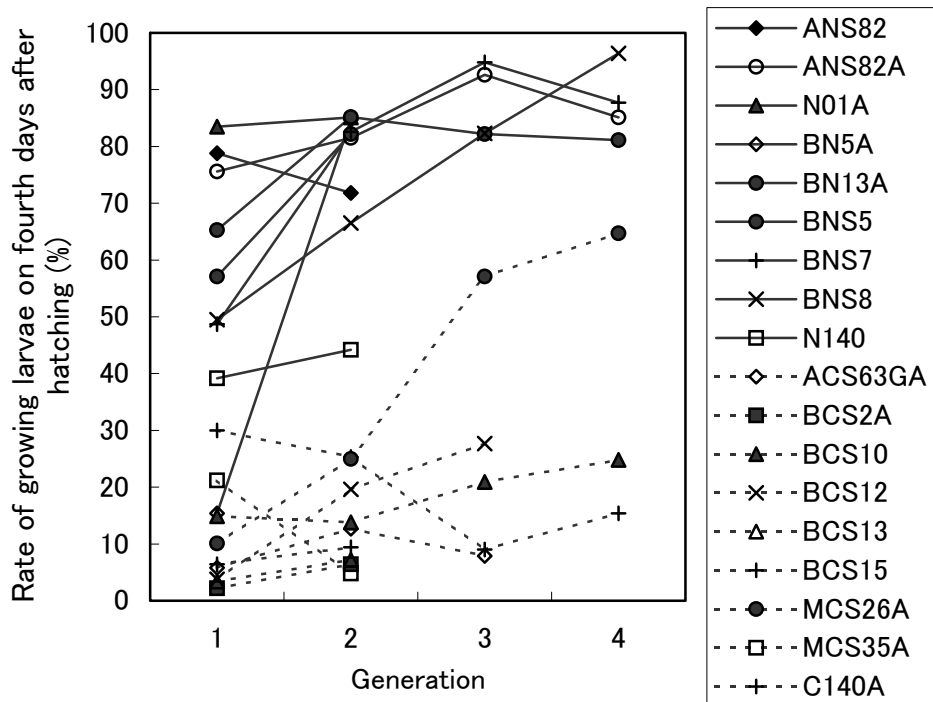
### ③ LP-1 飼料による摂食性の選抜と遺伝

①によって摂食性が良好であり実用系統として育成が有望であると判断された系統について、摂食個体を市販の人工飼料によって飼育し継代した。以降蛾区及び個体の選抜を繰り返した結果、日本種の4系統で毛振るい率が選抜世代を重ねるとともに向上した。中国種では1系統のみで毛振るい率の向上が見られたが、その他の系統は選抜の効果が明らかでなかった (Fig. 1-3)。

次に、摂食性の高い系統として日本種 ANS82A と中国種 MCS26A を選び、LP-1 飼料を全く摂食しない原種である中 150 号との  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $BF_1$  を作成し、LP-1 飼料に対する摂食性を調べた (Table 1-3)。その結果、両系統とも  $F_1$  においては正逆ともに摂食個体は非常に少なく、1 蛾区を除いて 5% 以下の毛振るい率であった。 $F_2$  は  $F_1$  に比較して摂食個体が多く出現し、10~20% の毛振るい率を示した。また ANS82A との  $BF_1$  の摂食性は ANS82A にはやや劣るが 70% 程度の高い毛振るい率であるのに対し、中 150 号との  $BF_1$  においては摂食個体がほとんど出現しなかった。MCS26A との  $BF_1$  についても同様な傾向が認められた。これらの結果は ANS82A 及び MCS26A が保有する LP-1 飼料の摂食性に関与する主遺伝子が劣性であることを示している。

さらに、1 齢期に LP-1 飼料に対する摂食性の選抜を 3 世代にわたって行った系統 (S4) と、無選抜の系統 (N) の各種人工飼料に対する摂食性を比較した (Table 1-4)。日本種の BN13A 系統についてみると、選抜系統と無選抜系統の間で LP-1 飼料に対する摂食性は 2 日後の毛振るい率では差はないが、5 日後の 2 齢蚕率では有意な差が見られた。M0 飼料に対しては毛振るい率、2 齢蚕率とも選抜系統の方が高かった。中国種の BCS15 について見ると、LP-1 飼料に対する選抜系統の摂食性は無選抜系統よりわずかに高くなるに過ぎず、2 齢蚕率ではほとんど差がなかった。M0 の人工飼料に対する摂食性は大幅に向上した。しかしながら、これら 2 系統では LPY-5 飼料に対する摂食性は他の飼料の場合と異なって現れ、毛振るい率でも 2 齢蚕率でも無選抜系統の方が明らかに高かった。また MCS26A についてみると選抜系統は無選抜系統に比較して LP-1 飼料に対する摂食性が著しく高いだけでなく、他の人工飼料に対する摂食性も明らかに高かった。

さらに、選抜により最も摂食性が向上した MCS26A と他の選抜系統間で  $F_1$  を作成し、その摂食性を調べた (Fig. 1-4)。その結果、蛾区間のばらつきはあるが、正逆交雑による相違は認められず、 $F_1$  は両親の中間程度の摂食性を示すことが分かった。



**Fig. 1-3** Change of feeding ability of breeding stocks in early generations by selection on the LP-1 diet. Feeding ability was designated by the rate of growing larvae counted on fourth days after hatching. (solid lines: Japanese strains, dotted lines: Chinese strains)

**Table 1-3** Feeding ability of the first instar larvae of F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and BF<sub>1</sub> produced by crossing between the selected strain, ANS82A or MCS26A, and a normal strain, C150, tested on the LP-1 diet. Feeding ability was designated by the rate of growing larvae counted on fourth days after hatching.

Strains	Rate of growing larvae on fourth days after hatching (%)			
	Egg batch No.1	Egg batch No.2	Egg batch No.3	Average
ANS82A S3 (A)	80.5	83.6	94.3	85.5
C150 (B)	0.0	0.0	0.0	0.0
A × B	4.7	16.3	4.0	9.5
B × A	3.0	4.6	3.4	3.6
(A × B) F2	10.9	21.9	23.6	18.5
(A × B) × A	75.3	67.3	64.8	68.8
(A × B) × B	0.0	0.3	2.2	0.9
MCS26A S4 (C)	94.6	78.5	56.6	73.5
C × B	1.0	2.5	0.0	1.5
B × C	3.6	0.0	2.1	2.1
(C × B) F2	10.0	16.4	14.4	13.4
(C × B) × C	33.3	34.6	34.2	34.2
(C × B) × B	0.0	0.5	0.0	0.2

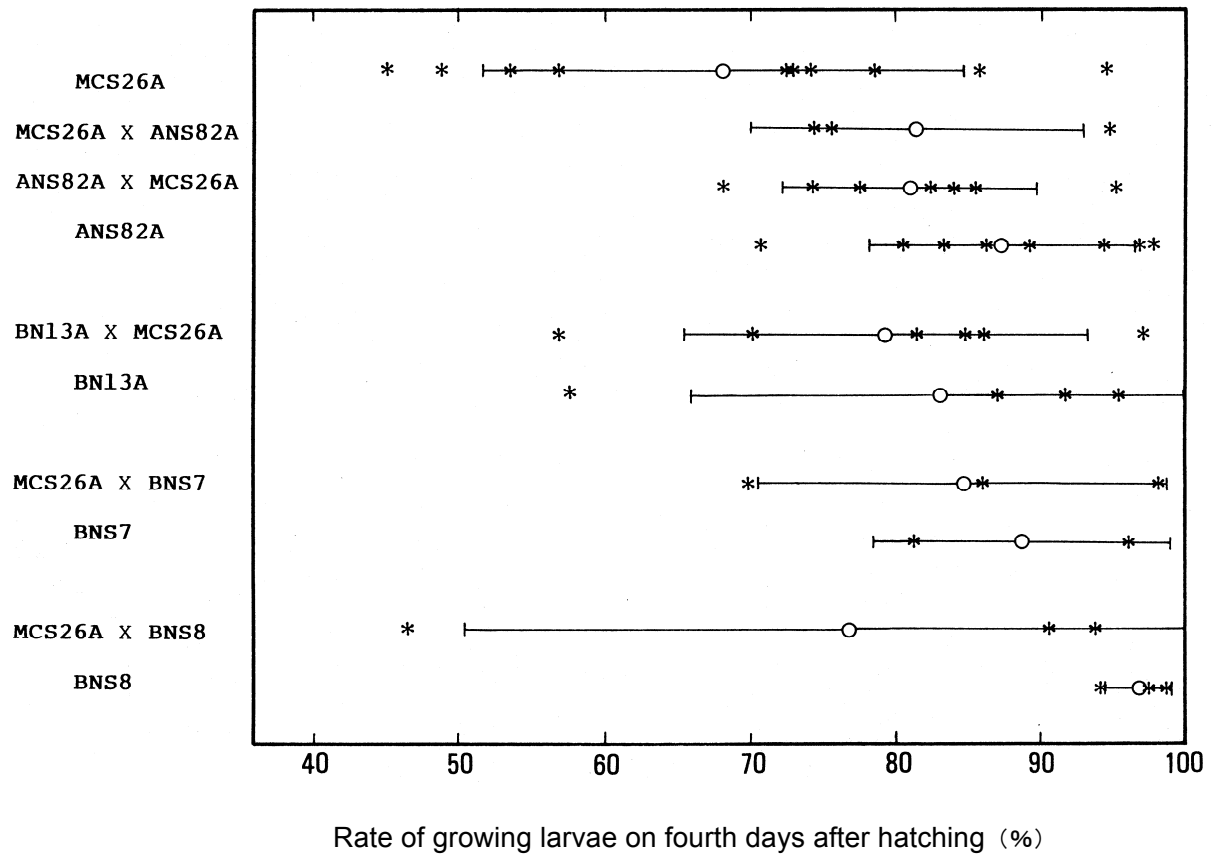


**Table 1-4** Feeding ability of three strains selected by the LP-1 diet (S4) in comparison with their original strains (N) tested on four kinds of different artificial diets. Feeding ability was designated by both the rate of growing larvae counted on two days after hatching, and the rate of second instar larvae counted on fifth days after hatching.

Strains	Rate of growing larvae on two days after hatching (%)				Rate of second instar larvae on fifth days after hatching (%)			
	M22	LPY-5	M0	LP-1	M22	LPY-5	M0	LP-1
BN13A(N)	99.3	100.0	79.2	81.6	97.9	93.3	80.0	12.8
BN13A(S4)	99.3	97.6*	93.6**	81.3	98.7	78.8**	93.6**	33.8**
BCS15(N)	100.0	98.9	0.0	4.0	100.0	86.5	0.0	0.5
BCS15(S4)	100.0	93.7*	28.2**	7.2	100.0	63.4**	26.2**	0.7
MCS26A(N)	99.6	95.6	3.3	2.1	98.6	72.1	2.6	0.0
MCS26A(S4)	97.3	98.9*	96.5**	69.0**	96.3	97.8**	77.3**	20.6**

t-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01

BN13A is a Japanese strain. BCS14 and MCS26A are the Chinese strains.



**Fig. 1-4** Feeding ability of the first instar larvae of the selected strains and their F<sub>1</sub> crossing between the Japanese strains (ANS82A, BN13A, BNS7, and BNS8) and a Chinese strain (MCS26A), tested on the LP-1 diet. Feeding ability was designated by the rate of growing larvae counted on fourth days after hatching.

\* : Rate of growing larvae in each egg batch, ○ : Mean rate of growing larvae ( $\pm$ SEM)

## 考 察

本研究で行ったLP-1飼料に対する摂食性は日本種が一般に高く、中国種が劣った。この傾向は神田ら（1988）の結果とも一致し、他の人工飼料で比較した場合でもその傾向が見られている。さらにANS82A及びMCS26Aの保有するLP-1飼料の摂食性に関与する主遺伝子は、沢Jと同じく劣性であることが示された（神田ら 1988）。修飾遺伝子の存在も含めてこれらの摂食性に関与する遺伝子は中国種に比べ日本種により広く分布していることが推定される。しかし、中国種においても摂食性の高い個体が存在することは、選抜により摂食性が向上する可能性を示した。また、選抜系統間のF<sub>1</sub>のLP-1飼料摂食性は両親の中間程度の摂食性を示すことから、LP-1飼料に対する摂食性の高い交雑種を選定するためには、日本種と中国種両方の原種の摂食性を高めることが必要であることがわかった。

また、ある人工飼料をよく摂食する系統は人工飼料の組成が変わっても摂食性が一般に高い傾向があることから、LP-1飼料による摂食性の指標が蚕系統の人工飼料に対する一般的な食性をある程度反映するものと考えられた。さらに、1 齢期で摂食性が良好であった系統は4 齢でも良好であることから、蟻蚕の毛振るい率を摂食性の指標とすることにより壮蚕の人工飼料摂食性をも反映するものと考えられた。

しかし、人工飼料に適合する品種を育成するために通常の人工飼料により選抜されてきた支140号Aや支145号などの系統は、必ずしもM0やLP-1飼料の摂食性が高いとはいえない。また、LP-1飼料で3回選抜を繰り返した系統について、4種の人工飼料の摂食性を調査し、無選抜系統と比較した結果、M0飼料の摂食性が向上したが、LPY-5飼料の摂食性は減少した系統が見られたことなど、系統及び飼料によって選抜効果が異なることがわかり、摂食性は飼料の組成が異なれば異なる要因が関与することが推定された。藤巻ら（1982）は、沢Jを用いて桑用粉末を含む人工飼料に対する摂食性の遺伝分析を行っているが、優勢的に支配する遺伝子の存在を認めている。したがって、LP-1飼料に対する摂食性に関しては劣性の1 遺伝子が主にその食性を支配しているが、他の飼料であれば、異なる遺伝子の作用が存在することを示している。

同じ方法で選抜した場合でも系統により選抜効果が異なることがわかり、MCS26Aの場合特異的にLP-1飼料による選抜が有効であったと解釈できるが、その原因の詳細については明らかでない。MCS26Aは中国種であるが、この研究を始める以前の育成の過程で日本種との交配が行われており、その際日本種の持つ人工飼料の摂食性に関与する遺伝子が導入されていたものと考えられる。これらの遺伝子(群)がどのように機能しているのかが課題である。

## 第2章 カイコの摂食行動の時間的解析とその飼料・系統間差異

カイコの餌は、クワの葉が最も生育に適切であるが、市販の人工飼料によっても飼育・継代は十分可能である。このことは、カイコの餌となる植物の好みや摂食行動を制御・修飾する植物の成分などに関する数多くの研究 (e.g. Fraenkel 1959; Hamamura *et al.* 1962; 石川・平尾 1966; Ishikawa *et al.* 1969; 伊藤 1959; Ito 1960, 1961; Ito *et al.* 1964; Lin 1976; Mori 1982a, 1982b; Nayer and Fraenkel 1962; 田村 1988) やカイコの必要とする栄養に関する研究と種々の人工飼料の開発 (e.g. Ito 1961, 1980; Ito *et al.* 1964; Horie and Ito 1963, 1965; 堀江・渡辺 1983; 柳川ら 1988a; 須藤ら 1995) によって可能になったものである。さらに、低コストの人工飼料に適合する広食性品種が育成され (e.g. 真野ら 1991; 神田 1992)、人工飼料による飼育は益々容易になってきたといえよう。

これらの多くの研究では、カイコの嗜好性・摂食性を評価する実験を行う必要があったが、その定量化を行うための指標として、数日間にわたって得られた体重の増加、摂食量や糞の量、さらに目で見た摂食量の評価が用いられている。しかし、昆虫の摂食行動は、餌の味、昆虫の生理的状态、それまで食べてきた餌の経験等を含めた数多くの内的、外的要因が複雑に絡み合っ制御されている (Dethier 1982; Miller and Strickler 1984)。これらの制御機構を解明するためには、様々な条件の餌で様々な条件にある個体の摂食行動のパターンを詳細に解析する必要がある。

摂食行動のパターンの詳細な解析は、咀嚼型昆虫の場合、バッタ類の他、鱗翅目昆虫の幼虫ではタバコスズメガで行われており、食餌量を制御する要因が明らかにされている (cf. Simpson 1995)。しかし、餌の味の影響を調べる研究は不足しており、そのためには餌を与えて直後からの比較的短い時間内における、より詳細な摂食行動の観察が必要である。カイコにおいては、電気的アクトグラフを用いた摂食行動の微細な記録が行われているが、摂食行動の制御機構を詳細に調べるまでには至っていない (平尾・山岡 1981)。また、この手法は特殊な装置を必要し、短期間に多くの個体からデータを得るためには適しているとはいえない。

本章の研究では、カイコの摂食行動の個体追跡サンプリング (focal sampling) を行い、異なる種類の餌 (2種類の人工飼料、クワの葉、異なる味覚刺激物質を浸み込ませた人工飼料) を与えたときの代表的行動時間を記録した。それまで経験した餌 (クワの葉または人工飼料) が異なる個体をクワの葉でテストして、その比較をする実験も行った。本研究の最初の目的は、このような実験によって記録した摂食行動の時間的なパラメータが、カイコの嗜好性・

摂食性を評価するために用いることができるかどうかを調べることである。そのための、食事（ミール）の形態などの基礎的な解析を行った上で、餌の種類や味覚刺激物質の添加によってカイコの摂食行動がどのように変わるのか、さらに、広食性系統と呼ばれるカイコが、摂食行動においてどのようなところが正常な系統と異なるのかを、特に味覚の影響を調べることに重点を置いて調べた。

## 材料及び方法

### 蚕系統と飼料

最初に、日 137 号×支 146 号を用いて 3 時間にわたる摂食行動パターンの記録・解析を行った。次に、45 分間の観察時間を設定し、餌に含まれる味覚刺激物質の影響を調べるため、日 137 号×支 146 号、日 601 号×中 601 号、沢 J、中 02 号、CSJ02 の 5 品種（系統）を用いて同様の行動記録を行った。日 601 号×中 601 号、沢 J、CSJ02 は、広食性蚕と呼ばれ、正常な品種は摂食しない LP-1 試料（堀江・渡辺 1983）を摂食する。CSJ02 は、中 02 号に沢 J を交配して中 02 号に戻し交雑して作成された系統である（神田・田村 1991; 神田 1992）。日 137 号×支 146 号、日 601 号×中 601 号の原種と中 02 号は、蚕糸・昆虫農業技術研究所（現 農業生物資源研究所）の原蚕種製造研究室から、沢 J と CSJ02 の卵は蚕糸・昆虫農業技術研究所の神田氏から分譲いただいた。交雑種の卵は著者の研究室で製造した。

餌となる試験飼料は、2 種類の人工飼料（以下「Y 飼料」と「P 飼料」と呼ぶ。）とクワの葉を用いた。Y 飼料とは、市販のヤクルト社製の原種壮蚕用人工飼料であり、その粉末をステンレスの箱に入れて 2.8 倍量の蒸留水を加えて約 30 分間蒸し、再び混ぜ合わせて流水下で箱を冷却して作成した。これを冷蔵庫に入れて保存し、実験時に各試験個体あたり約 3g の四角柱の断片を包丁で切って使用した。P 飼料とは、須藤ら（1995）の開発した LP ペレット人工飼料であり、桑葉粉末を 10% 含むものを蚕品種研究所（現 蚕業技術研究所）から分譲を受け使用した（Table 2-1）。このペレット飼料は、成型された乾燥飼料であり、適当量の水溶液を浸み込ませることによって飼料として即座に餌として供給可能になる。円柱形の乾燥飼料を縦に半分に切断し、重量が約 0.5g になるようにその端をさらに削った。これに、2 倍量の蒸留水又は試験用水溶液を浸み込ませて実験に供与した。クワの葉で試験する際には、研究所内の畑から摘んだ「わせみどり」新鞘の 4 枚目から 6 枚目の横幅 9~10cm、縦 12~13cm 程度の大きさの展開葉を使用した。

実験に用いたカイコは、1、2 齢は 28℃全暗条件で、3、4 齢は、25℃16 時間明 : 8 時間暗条件で、Y 飼料により飼育した。ただし、餌の経験による影響を調べる実験（実験④）

に用いたカイコの一部は、同じ温度、光周期の条件でクワの葉により飼育した。4 眠脱皮後 24~30 時間経過し、餌を与えていないカイコ 5 齢幼虫を全ての実験に用いた。

### 実験①（3 時間の観察時間における人工飼料の摂食行動）

Y 飼料と P 飼料の 2 種類の人工飼料を与えたときのカイコの摂食行動を 3 時間連続して観察し、動物行動実験用のイベントレコーダソフトウェア Observer 3.0 (Noldus 1991) を用いて記録した。実験用の人工飼料を準備した後、1 つずつの人工飼料の断片を顕微鏡観察用のカバーガラス (18 × 32 mm) 上に載せ、濾紙を敷いた 9cm 径のシャーレの中央に置いた。その飼料から約 1cm の距離に 1 頭の幼虫を置いて記録を開始し、湿度を高く維持させるために、蒸留水で湿らせたティッシュペーパーを側面に貼り付けた 150 φ × 35 mm のシャーレを蓋としてかぶせた。1 回の観察で 5 頭から 8 頭の幼虫の行動を個体毎に同時に目で観察し、パソコンのキー入力により記録した。全部で Y 飼料は 32 頭、P 飼料は 33 頭から記録を行った。実験は全て 25 ± 1°C の空調下の実験室内で行った。

行動は、「摂食 (feeding)」、「静止 (resting)」、「探索 (exploring)」の 3 つの状態に分類して記録した。大顎の咀嚼運動を行っているときは、餌から離れて空中で行っている場合でも摂食に分類した。静止はほとんど動かない状態、探索は摂食中以外の活動している全ての状態とし、歩行移動している状態、頭部を振って匂いをかいでいるような状態、小脛を餌に接触させるようにして味を見ているような状態などがこの中に含まれる。記録したデータから、食事期間 (ミール ; meal) を定義するために、一続きの摂食している時間とその合間の摂食していない時間 (ギャップ ; Gap : すなわち静止又は探索の時間) の分布を対数生存曲線にあてはめ、それぞれの行動の長さの分布を示す曲線のなかに、異なるグループに分類する境界点が存在するかどうかを調べた (Simpson 1982)。また、1 つ 1 つのミールが始まる時間のタイミングと 1 つのミールの中での摂食時間の合計、さらには観察時間中での合計の摂食時間、探索時間、静止時間を 2 つの飼料の間で比較した。

### 実験②（クワの葉の摂食と摂食経験の影響）

クワの葉に対する摂食行動は、人工飼料の場合とどのような違いがあるのか、また、4 齢まで摂食してきた餌の影響があるのかどうかを調べるために、4 齢まで Y 飼料で飼育した場合とクワの葉で飼育した場合とで、試験用の飼料をクワの葉として実験①と同様な記録を行った。クワの葉は、カイコが食べやすいように少し浮かせるため、25 φ × 12 mm のバイアルキャップの上に両面テープによって貼り付けて直径 15cm のシャーレの中央に置

いた。各シャーレに入れた葉の上にカイコを置いた直後に記録を開始し、150φ×35mmのシャーレで蓋をした。1回に5頭のカイコの行動を同時に記録し、全部で、Y飼料で飼育した30頭とクワの葉で飼育した20頭のカイコを使用した。

### 実験③（味覚刺激物質の影響）

この実験では、代表的な摂食刺激物質と摂食阻害物質の影響が摂食行動の時間のパラメータにどのような形で現れてくるのかを調べた。このため、刺激物質の水溶液を浸み込ませたP飼料を与えて、実験①と同様の記録方法で45分間の観察を行った。水溶液は、(1)蒸留水（対照）、(2)50mM ショ糖、(3)50mM ミオイノシトール、(4)50mM ショ糖と50mM ミオイノシトールの混合液、(5)100mM サリシン、(6)0.05mM 硝酸ストリキニーネの6種類とした。ショ糖とミオイノシトールはカイコの摂食促進物質として知られ（Ito 1960; Hamamura *et al.* 1962; Ishikawa *et al.* 1969）、サリシンと硝酸ストリキニーネは摂食を阻害することが知られている（Ishikawa 1966）。合計の摂食時間、探索時間、静止時間に加えて、実験開始から1分以上の連続した最初の摂食が始まるまでの時間「潜時（latency）」を異なる試験飼料の間で比較した。試験飼料と対照飼料との間の統計的な比較は $\alpha=0.01$ とするMann-Whitney *U* testで行った。この $\alpha$ 値は、結果的に0.05としてBonferroni補正を行った場合に相当する。統計比較を行う場合には、連続摂食が全くなかった個体の潜時を仮に2700秒として計算した。この値は、45分間の観察時間が終わった後に連続摂食が起こる場合を仮定しても最短時間を想定したものである。

### 実験④（系統による摂食阻害物質の影響）

この実験は、摂食阻害物質の影響が、広食性系統と正常系統とで異なった傾向で時間のパラメータに現れてくるのかどうかを調べる目的で行った。また、低濃度の摂食阻害物質を用いることによって、摂食行動に及ぼす濃度の効果を同時に調べた。2つの異なる濃度の摂食阻害物質（10mMと100mMのサリシン、0.005mMと0.05mMの硝酸ストリキニーネ）の3系統（日137号×支146号、日601号×中601号、沢J）の摂食行動に対する影響を実験③と同じ方法で調べた。沢Jに対する10mMサリシンと、日601号×中601号に対する0.005mM硝酸ストリキニーネについては試験を行わなかった。100mMサリシンは中02号とCSJ02に対しても試験した。統計的な比較は、実験③と同様に行った（Mann-Whitney *U* test,  $\alpha=0.01$  and 0.05）。

**Table 2-1** Composition of the LP-pellet diet used.

LP-pellet (Sudo <i>et al.</i> 1995)	
Mulberry leaf powder	10.0%
Soybean meal, defatted	34.7
Corn meal	38.2
Rape bran	3.8
Soybean oil	1.1
Phytosterol	0.2
Citric acid	2.8
Ascorbic acid	0.9
Salt mixture	4.5
Vitamin mixture	2.9
Antiseptics	0.9
(Total)	(100.0)



## 結 果

### 実験①（3時間の観察時間における人工飼料の摂食行動）

Y飼料とP飼料のそれぞれについて、試験を行った全ての個体の摂食時間と非摂食時間（ギャップ）の分布を対数生存曲線に当てはめた結果を Fig. 2-1 に示す。時間の長さの分布が不連続であれば、生存曲線の傾きが急速に変化する屈曲点をバウト基準間隔として検出できる。ギャップの分布では、ミール内のギャップとミール間のギャップを分ける基準値となる。P飼料の場合 300 秒付近がこれにあたり（Fig. 2-1D 矢印）、Y飼料ではこれよりやや短い。摂食時間に関しては、両飼料とも曲線の傾きにあまり顕著な変化を示さなかったが、P飼料において 60 秒付近に緩やかな変化が見て取れる（Fig. 2-1C 矢印）。もし、ミールが始まる前にミール中の摂食時間とは異なる短い摂食時間があるとすれば、それはその餌が食べ続けるのに適したもののなかどうかを幼虫が決断するために行っているサンプリングの時間であると考えられる。従って、60 秒以上の連続した摂食時間が始まり、300 秒以上の非摂食時間が始まったときまでをミールと定義することが可能である。この定義は餌の種類や他の別の要因によっても変化するものと考えられるが、少なくとも以後の解析においてはこれを基準として用いることにする。

ギャップの対数生存曲線のバウト基準間隔より長い部分の形状は、両飼料とも凸状であるが、これは、ミールとミールの間では時間の経過とともに次のミールが始まる確率が増加していることを示している。これに対し、摂食時間の分布は直線に近く、両飼料ともランダムに分布していることを示している。一方、Y飼料に比べて、P飼料を摂食する個体の方が長時間のギャップがより頻繁に観察された。

ここで得られたミールの定義によって、各ミールの開始時間、各ミール及びミール間隔の長さ、さらには3時間の観察時間内のミール数を各個体毎に算出することができる。ミール数はY飼料に比べてP飼料で有意に少なく、2回目以後のミールはP飼料の方が長く続く傾向がある（Table 2-2, Fig. 2-2）。摂食行動パターンを制御しているメカニズムを解明する糸口を得るために、各ミール中の摂食時間とその前後のミール間隔との相関を調べたところ、ミール前のミール間隔に対してのみ有意な相関がみられた（Table 2-2）。しかしながら、P飼料においてはその有意性はやや低く、前後のミール間隔との相関係数に大きな違いがなかった。

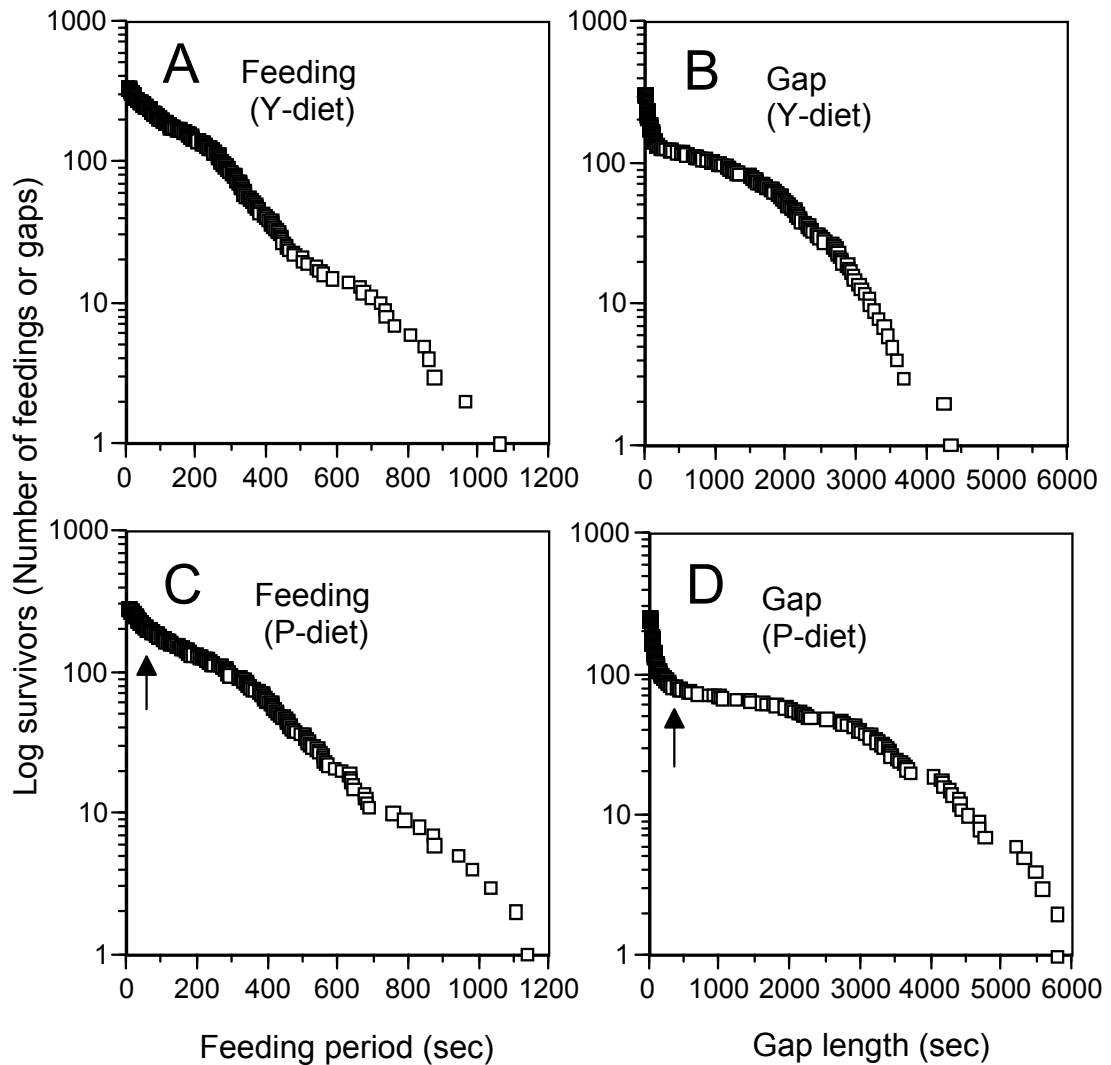
3時間の観察時間内での合計の摂食時間、探索時間、静止時間をY飼料とP飼料を与えた個体間で比較した（Fig. 2-3A）。その結果、摂食時間は2つの飼料の間で違いがなかったが、P飼料において有意に探索時間が長く、静止時間が短かった。

P 飼料を摂食したほとんど全ての個体は実験開始後 45 分以内に最初のミールは終わっており、終盤は静止状態にあった。カイコが実験用の餌を十分食べているときのこの実験条件においては、最初の 45 分間の合計摂食時間は、第 1 ミール内における摂食時間にほぼ等しいといえる。より短時間の観察で同様な傾向を得ることが可能かどうかを確かめるために、上記と全く同じ観察データの中から最初の 45 分間の部分を取り出して、同じ比較を行った (Fig. 2-3B)。その結果、2 種類の飼料間で有意な相違を検出することができたため、45 分間の観察によって摂食行動に及ぼす餌の影響を調べるということが可能であることがわかった。

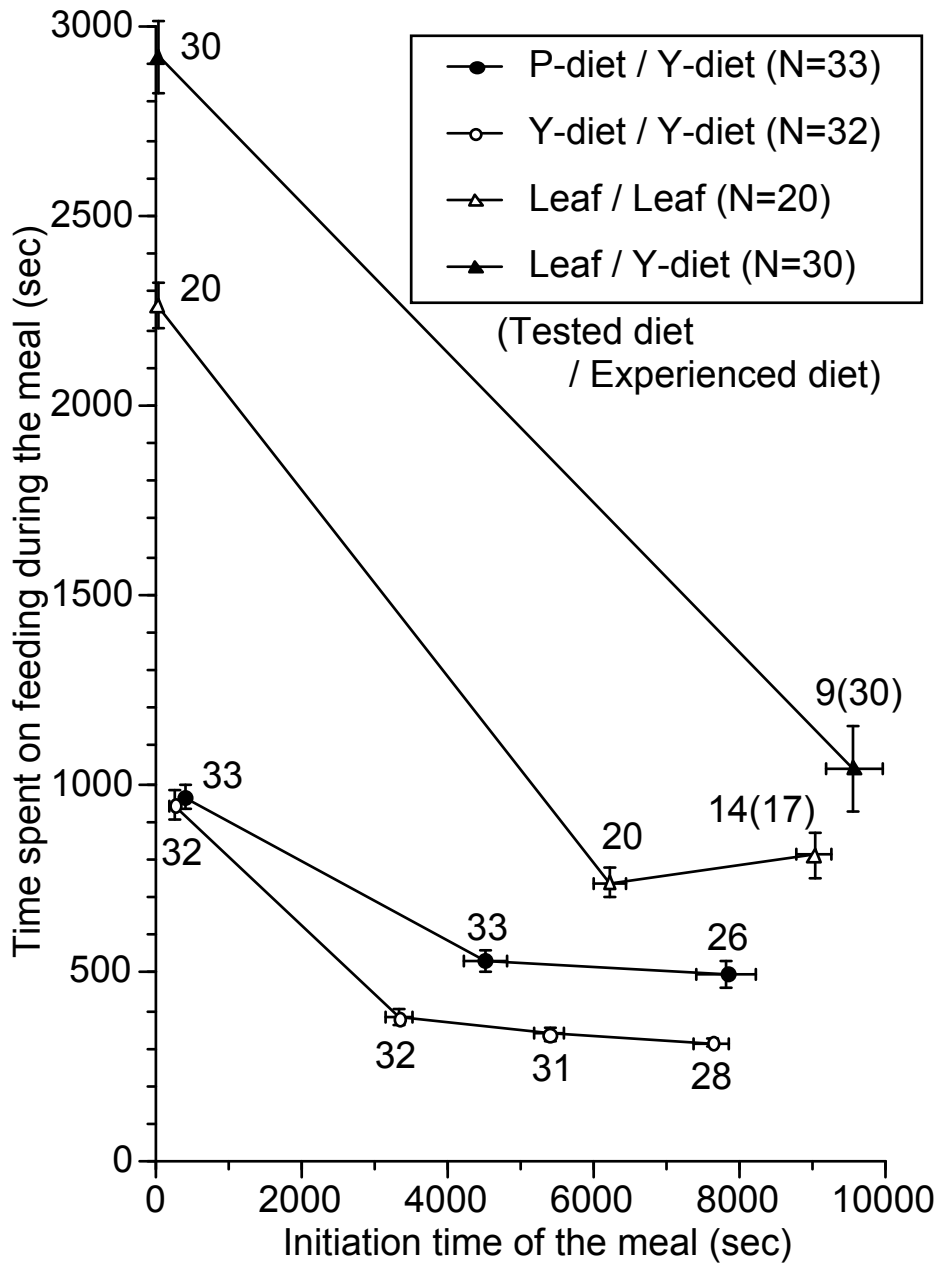
## 実験② (クワの葉の摂食と摂食経験の影響)

実験①と同様に、クワの葉を試験用の飼料として与えた場合の摂食時間とギャップの長さを対数生存曲線にプロットした (Fig. 2-4)。4 齢まで Y 飼料で飼育していたカイコにおいては、摂食時間とギャップのバウト基準間隔はそれぞれ 60 秒と 300 秒であった (Fig. 2-4A, B 矢印)。これらの値は、P 飼料で試験を行ったカイコの場合とよく一致した (Fig. 2-1A, B)。一方、クワの葉で飼育していたカイコの場合は、ギャップの長さのバウト基準間隔は短く、摂食時間の対数生存曲線の 60 秒付近には屈曲率に変化はみられなかった (Fig. 2-4C, D)。Y 飼料で飼育したカイコに比較して、クワの葉で飼育したカイコの摂食時間は、よりランダムに分布しており、長い摂食時間が多いことがわかった。

実験①と同じミールの定義に従って、各ミールの始まるタイミングと長さを Fig. 2-2 の x-y 軸上にそれぞれプロットした。クワの葉を与えられたカイコは、2 種類の人工飼料で試験を行った場合と比較して、ミール数は少なく、各ミール中の摂食時間は長く、最初と 2 番目のミールの間隔が長い傾向があった。これらのパラメータには、Y 飼料かクワの葉かというそれまで食べてきた食物の経験の違いによっても相違が認められた。



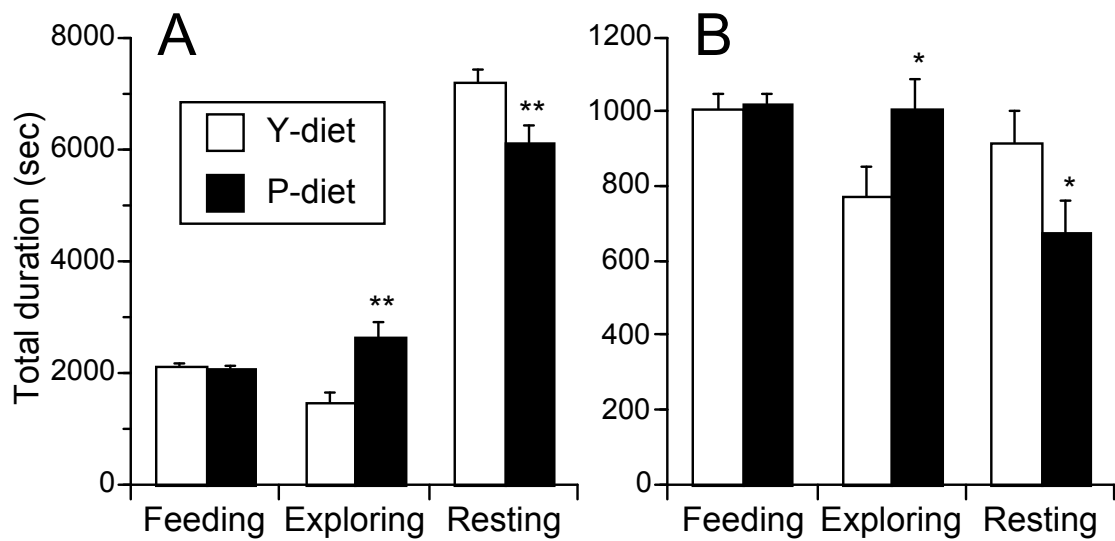
**Fig. 2-1** Log-survivor curves of feeding periods (**A** and **C**) and gap lengths (**B** and **D**) from all tested silkworm larvae with two different artificial diets, the Y-diet (**A** and **B**;  $n=32$ ) and the P-diet (**C** and **D**;  $n=33$ ). Each point gives the number of feeding periods or gap lengths longer than the time given on the abscissa. Arrows in **C** and **D** indicate possible bout criterions.



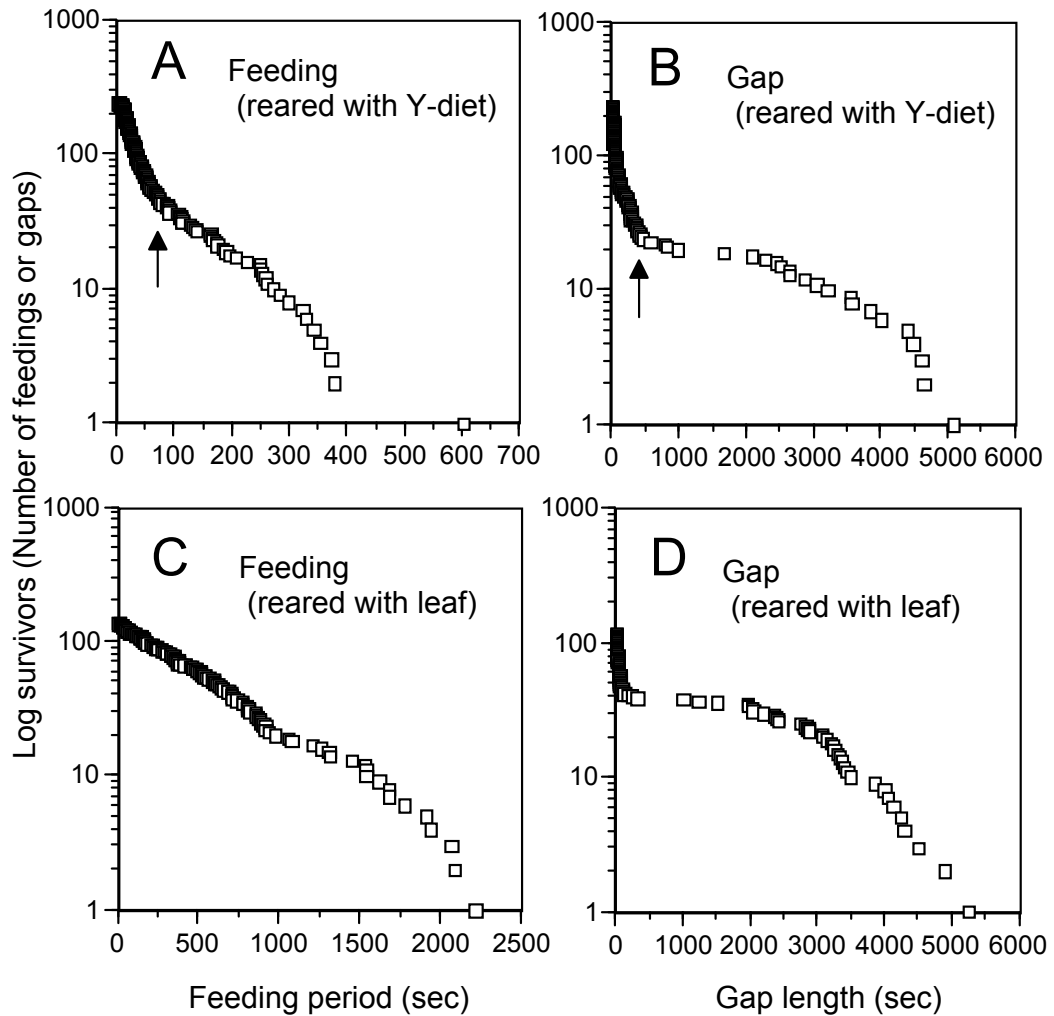
**Fig. 2-2** Relational plots between means ( $\pm$ SEM) for initiation time of each meal and total time spent feeding during each meal. Each larva was tested with three different foods, the P-diet (closed circles), the Y-diet (open circles) and a mulberry leaf (closed and open triangles) at the beginning of the fifth instar. The tested larvae had been fed on the Y-diet until the end of the fourth instar, except for the 20 larvae that had been fed on mulberry leaves and was tested with the leaf (open triangles). Numbers on each point indicate the number of larvae that accomplish the meal within the observation period for three hours. Numbers in parenthesis indicate the larvae that sustained feeding at the end of the observation periods, so that the larvae were included to correct data for the initiation time.

**Table 2-2** Characteristics of meals exhibited by silkworm larvae fed on the two kinds of artificial diets during the observation for three hours.

Tested diet	Number of larvae	Number of meals per larva (mean±SEM)	Correlation coefficients and p values		
			Total number of meals	Previous inter-meals	Following inter-meals
Y-diet	32	4.47±0.17	111	0.417, p<0.0001	0.109, p=0.256
P-diet	33	3.12±0.14	70	0.256, p=0.032	0.215, p=0.073



**Fig. 2-3** Total time spent feeding, exploring and resting during the observation period for three hours (A) and the first 45 minutes (B) tested on the Y-diet (open columns) and the P-diet (closed columns). Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) duration of each behavior in 32 larvae for the Y-diet and 33 larvae for the P-diet. Asterisks indicate the significant difference between the two diets. (Mann-Whitney U test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )



**Fig. 2-4** Log-survivor curves of feeding periods (**A** and **C**) and gap lengths (**B** and **D**) tested on mulberry leaves. **A** and **B** are given from 30 larvae that had been fed on Y-diet until the end of the fourth instar and were tested at the beginning of fifth instar. **C** and **D** are given from 20 larvae reared with mulberry leaves. Each point gives the number of feeding periods or gap lengths longer than the time given on the abscissa. Arrows in **A** and **B** indicate possible bout criteria.

### 実験③（味覚刺激物質の影響）

摂食促進物質と摂食阻害物質を含む溶液で処理した5種類の試験飼料を与えたときの、45分間の摂食行動記録から得られた時間のパラメータをTable 2-3に示す。50mM ショ糖、50mM イノシトールとそれらの混合液は、今回用いた摂食行動のパラメータには全く影響を与えなかった。一方、100mM サリシンと0.05mM 硝酸ストリキニーネの処理によって、合計の摂食時間が長くなり、探索時間が短くなったことは、摂食阻害効果が現れた結果と見てとれる。また、100mM サリシンでは有意差こそなかったが、最初の連続的な摂食が始まるまでの潜時がこれらの摂食阻害物質の混入によって長くなる傾向があった。

### 実験④（系統による摂食阻害物質の影響）

3つの広食性系統、日601号×中601号、沢J、CSJ02と正常な2系統、日137号×支146号と中02号を用いて得られた、摂食阻害物質で処理した試験飼料に対する摂食行動の時間的なパラメータをTable 2-4に示す。各蚕系統の特徴が、まず、蒸留水を浸み込ませただけの対照飼料に対する時間的なパラメータに現れた。中02号では、極端に短い摂食時間、長い探索時間、長い潜時が得られたが、これは飼料を避けて摂食しようとしないうちがいたためである。この中02号を系統比較から除外したとしても、摂食時間、探索時間、潜時にみられる4系統間の相違は有意性が非常に高かった（Kruskal-Wallis,  $p < 0.01$ ）。

日137号×支146号に対して行った100mM サリシンの実験は、実験③の繰り返しになるが、今回の実験ではトータルの摂食時間には有意な相違が検出できなかった。しかしながら、実験③で観察された阻害効果（すなわち、短い摂食時間、長い探索時間、長い潜時）は、0.05mM 硝酸ストリキニーネとともに100mM サリシンでも観察された。統計的な比較では有意性はなかったが、同様な傾向は、希釈した摂食阻害物質（10mM サリシン、0.005mM 硝酸ストリキニーネ）によっても得られた。一方、日601号×中601号を10mM サリシンによって試験したときには摂食時間はやや減少したものの、探索時間、潜時はほとんど影響を受けないかまたは減少さえみられた。100mM サリシンと0.05mM 硝酸ストリキニーネの摂食阻害効果は、3つの広食性系統においても明らかに認められた。



**Table 2-3** Time parameters for the feeding behavior of silkworm larvae during the observation for 45 min (2700 sec) on the P-diets infiltrated with some feeding stimulants and deterrents. (Means±SEM)

Treated solution	No. of larvae	Total time during observation (sec)			Latency†
		Feeding	Exploring	Resting	
Distilled water	20	991±47	994±92	715±94	742±89 (100)
50mM Sucrose	20	853±92	1083±138	764±95	879±196 (85)
50mM Inositol	20	981±60	921±98	798±95	945±80 (100)
50mM Sucrose + 50mM Inositol	20	970±46	1060±119	670±103	638±126 (100)
100mM Salicin	20	509±114*	1615±162*	576±109	1677±243 (55)
0.05mM Strychnine nitrate	20	129±68*	2161±112*	410±88	2411±139* (20)

† : Latency to the first sustained feeding that continued for more than 60 sec. The latency of the larva that did not show any sustained feeding was tentatively applied to be 2700 sec. Percentages of the number of larvae presenting at least one sustained feeding are indicated in parentheses.

\* : Significant difference in comparison with the control diet (Distilled water): Mann-Whitney U test,  $p < 0.01$

**Table 2-4** Time parameters for the feeding behavior of silkworm larvae from five different strains during the observation for 45 min (2700 sec) on the P-diets infiltrated with the deterrents, salicin (Sal) and strychnine nitrate (Str). (Means±SEM)

Strain	Treated solution	No. of larvae	Total time during observation (sec)			Latency <sup>†</sup>
			Feeding	Exploring	Resting	
N137xC146	Distilled water	25	877±38	1002±94	821±89	510±102 (100)
	10mM Sal	25	803±61	1340±127	556±94	887±145* (92)
	100mM Sal	25	573±83*	1564±123**	563±86*	1450±193** (72)
	0.005mM Str	25	737±48*	1238±109	725±102	861±141* (96)
	0.05mM Str	25	153±58**	1814±95**	733±89	2228±161** (20)
N601xC601	Distilled water	20	856±47	707±73	1137±101	288±38 (100)
	10mM Sal	20	786±43	655±76	1259±77	236±34 (100)
	100mM Sal	20	728±54	1236±124**	736±120*	750±154** (95)
	0.05mM Str	20	108±38**	2020±102**	571±95**	2443±128 ** (30)
Sawa-J	Distilled water	20	1380±71	390±32	930±70	81±13 (100)
	100mM Sal	20	1101±61**	1032±89**	567±102*	158±27* (100)
	0.05mM Str	20	578±82**	1508±175**	614±137	1062±219** (85)
C02	Distilled water	20	481±122	1971±141	248±79	1795±233 (50)
	100mM Sal	14	251±111	2248±109	200±66	2325±167 (29)
CSJ02	Distilled water	20	1428±62	734±84	537±104	147±24 (100)
	100mM Sal	20	1255±53*	1096±87**	349±77	283±61 (100)

† : Latency to the first sustained feeding that continued for more than 60 sec. The latency of the larva that did not show any sustained feeding was tentatively applied to be 2700 sec. Percentages of the number of larvae presenting at least one sustained feeding are indicated in parentheses.

\* \*\*: Significant difference in comparison with the control diet (Distilled water): Mann-Whitney *U* test, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01

## 考 察

### ミールの特徴

通常、ミールなどのバウトの分布を調べる場合は、個体間の変異が大きいため、個体毎に行われている。しかし、カイコの場合は系統が存在し、それぞれの系統は長い過程を経て育成・維持されてきているため、系統内の変異は野生昆虫における種内変異に比較すれば非常に小さいといえる。したがって、本章における行動実験においては異なる個体のデータを全て合わせて解析を行った。実際、ギャップの長さの分布からバウト基準間隔を求めたところ、今回試験したどの飼料に対しても、明確な分布の不連続点となる屈曲点が得られた (Fig. 2-1B, D, Fig. 2-4B, D)。さらに、各ミールの開始時間や各ミール内の摂食時間の標準誤差は小さく、個体間のばらつきは少ないことを示している (Fig. 2-2)。

ギャップのバウト基準間隔が存在すること自体が、カイコにおいても食事時間に相当するミールが存在することを示している。今回求めた 300 秒という基準の長さは、既に調べられてきた他の鱗翅目昆虫幼虫のそれと比べてやや長いものの大きな違いはない。すなわち、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) で 65-210 秒 (Reynolds *et al.* 1986; Bowdan 1988; Timmins *et al.* 1988; Bernays and Woods 2000)、数種の *Spodoptera* 属で 120 秒 (Blaney *et al.* 1988)、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) で 290 秒 (Mitchell *et al.* 1996) である。しかしながら、今回調べたカイコの場合では Y 飼料で飼育したカイコを Y 飼料でテストした場合の基準間隔 (Fig. 2-1B) とクワの葉で飼育してクワの葉でテストした場合のそれ (Fig. 2-4D) は、300 秒より短かったことから、この長さは餌の経験などの実験条件によっても異なるものであることがわかる。一方、摂食時間のバウト基準間隔はギャップに比べて明瞭な分布の不連続点が見いだせなかったものの、Y 飼料で飼育して P 飼料でテストしたカイコと Y 飼料で飼育してクワの葉でテストしたカイコにおいて作成した対数生存曲線には 60 秒付近に不連続性が認められた (Fig. 2-1C, Fig. 2-4A)。4 齢までに摂食を経験してきた餌と異なる餌で試験したカイコにおいて、通常の摂食時間に加えて短めの摂食時間の分布が区別でき、比較的長いミール間隔が観察されたが、これらの結果は、与えられた餌が適切かどうかの判断を、虫は経験に基づいて行っていることを反映したものかもしれない。

いずれの試験飼料においても、最初のミール中の摂食時間は次のミールに比べて非常に長い (Fig. 2-2) が、これは、テストしたカイコが 4 眠脱皮後 24~30 時間餌を与えられず絶食していたためであろう。タバコスズメガでは、絶食個体は通常の摂食を行っている個体に比べて、最初のミールにおける咀嚼のスピードが速く、ミールの長さは長く、ミール

数も多いことが報告されている (Bowdan 1988; Timmins and Reynolds 1992)。このような補償といえる行動は、今回の3時間の観察時間を通して現れているかもしれないが、2回目以降のミールの長さについては、餌がいつでも食べられる条件下にある正常のカイコが示すミールの長さに徐々に近づいているものと考えられる。Y飼料とP飼料でテストした場合の結果の違いは、2回目以降のミール中の摂食時間においても観察されている。

ミールの長さや頻度については、試験飼料によって、また飼育してきた餌の経験によって違いが認められた (Fig. 2-2)。摂食行動に影響を及ぼす餌の要因についての全てをここで明らかにすることはできないが、飼料の化学的組成は、最も重要な要因の1つであることは間違いない。味と匂いのほかに、飼料中の栄養素や水分の量についても幼虫が不足していればそれを補う形で摂食時間に影響を与えていることがわかっている (Timmins *et al.* 1988)。今回の実験と同じように、タバコスズメガでも人工飼料よりも植物の葉を食べた個体の方がミールの長さは長い傾向にあることが示されている (Reynolds *et al.* 1986)。また、カイコでは電気的アクトグラフの記録にも同様な傾向が認められている (平尾・山岡 1981)。Reynolds *et al.* (1986) が示したように、植物の葉と人工飼料を摂食した場合には、摂食した乾燥量にはそれほど大きな相違はないと思われる。したがって、本研究においてクワの葉と人工飼料でみられたミールの長さの大きな違いを生み出す要因としては、1回の咀嚼あたりの摂食量や飼料の水分量の違いが重要であると考えられる。

ミールの特徴を決める要因を示唆する証拠として、ギャップの対数生存曲線が双曲線の形状を示すことと、各ミール内の摂食時間とその前のミール間隔の間に相関関係が存在することがあげられる。すなわちミールとミール間の非摂食状態にある虫がモニターしている摂取した量(体積)のフィードバックと栄養のフィードバックのいずれか又は両方が、ミールの開始と終了のタイミングに影響を与えていると考えられる。Timmins and Reynolds (1992) は、タバコスズメガのミールの大きさを制御する要因としては、栄養のフィードバックが重要であり、量的な情報の影響は少ないと推測している。もしこれが真実であれば、本研究で異なる飼料に見られたミールの大きさの違いは、飼料中の栄養素の違いによることになる。餌の経験が異なるカイコの場合も、比較的長時間にわたる栄養のフィードバックが摂食行動を変えている可能性がある。

本研究のみでは、摂食行動の時間的なパターンの違いを生み出す原因の各要素を特定することはできないが、本研究で用いたミールの特徴を表す時間的な解析方法は、飼料条件がカイコの摂食行動に及ぼす影響を明らかにするための実験をこの先さらに行うにあつ

では、適切な方法の1つになると思われる。

### 味覚刺激物質の影響

摂食の開始と同様に摂食の持続も昆虫の口器に存在する味覚感覚子によって受容される化学的情報によってある程度制御されており、基本的には摂食促進作用のある栄養素と摂食阻害物質の量と質のバランスが重要である (cf. Chapman 1995)。Bowdan (1995) は、タバコスズメガのミールの長さが、飼料中に含まれるショ糖によって長くなり、キニーネによって短くなったことを示した。また、*Spodoptera exempta* と *S. littoralis* においても摂食阻害物質であるクロダンアルカロイドによって最初のミールの長さの減少が観察されている (Blaney *et al.* 1988)。カイコにおいても飼料中に添加した味覚刺激物質の影響が Table 2-3 に示した摂食行動のパラメータに現れてくることが期待できたが、摂食促進物質とされるショ糖とイノシトールの影響は本実験の結果には現れてこなかった。Glendinning *et al.* (2000) は、グルコースとショ糖はタバコスズメガの摂食行動に大きな影響を示さないが、イノシトールは摂食を引き起こすとともに摂食阻害物質の阻害効果を中和する作用があることを示した。カイコにおいては摂食促進物質が摂食行動の時間的なパターンに与える影響が少ないのか、あるいは、その影響は本実験では調べなかった咀嚼頻度に現れていたのかもしれない。別の可能性としては、試験溶液を添加しない元の飼料には十分な量の糖が既に含まれていて、摂食促進効果はすでに最大値に達していることも考えられる。

一方、サリシンと硝酸ストリキニーネの摂食阻害効果は、摂食時間とともに探索時間と連続摂食までの潜時に明らかに認められた。しかし、これらのパラメータのうち特に摂食時間と探索時間の長さにはサリシンと硝酸ストリキニーネの毒性の影響が現れている可能性を除外できない。さらにいえば、「探索」と「静止」行動の全てが直接的に餌と関連がある行動とはいえない。

タバコスズメガの摂食の開始には、内的な周期的振動が重要な要因となっていることが示されているが (Bernays and Woods 2000)、このことは本実験においては考慮していない。しかし、本実験では最初のミールを開始するまでの時間には個体間で大きな変異はみられなかった。これはおそらく、餌が十分与えられた状態で通常の摂食活動を行っている幼虫に比較して、今回の実験に用いた幼虫は、相当程度の空腹状態にあるためと思われる。したがって、内的な周期変動とともに前のミールがもたらす抑制的な効果は排除できるものと考えられる。一方、「味見」している状態のようにみえる1分間以下の比較的短時間の摂

食時間は、どの飼料においても持続的な摂食が起こる前にはしばしば観察されるが、クワの葉を与えられたときには希にしか観察されることはない。また、硝酸ストリキニーネを含む飼料を与えられたカイコの中には全く持続的な摂食を示さず、探索行動に中断される短い断続的な摂食時間のみが記録されるものがあった。このような観察も考慮に入れれば、最初の持続的な摂食が始まるまでの時間である「潜時」が、味覚入力摂食行動に及ぼす影響を評価するためには最も信頼性の高いパラメータであると考えられる。

### 系統間差異と食性との関係

沢 J と CSJ02 のトータル摂食時間は、日 137 号×支 146 号と日 601 号×中 601 号に比較して長かった (Table 2-4)。これはミールの長さが系統によって異なるが、「広食性」と正常の食性の違いを反映しているわけではないことを示している。また、沢 J は他の系統に比べて体の大きさが小さいことから、このミールの長さの違いは、試験昆虫の大きさによるものではないこともわかった。沢 J と CSJ02 は摂食時間が似ているだけでなく潜時が短い点においても共通するが、CSJ02 は神田 (1992) により沢 J と中 02 号の交配により作成されたことから、CSJ02 のこのような摂食行動を支配する遺伝子は沢 J に由来していることが考えられる。

食性範囲の違い (すなわち「広食性」と「正常」な系統の違い) は、対照とした P 飼料に対する潜時によって区別が可能であるように見える。また、サリシンを含む飼料に対する潜時や持続的な摂食が観察された個体の割合にも、広食性系統には耐性・非感受性があることが現れている。しかし、広食性系統は摂食阻害物質に対して全く感受性がないわけではないことは明らかである。このことは、広食性系統は「味盲」であると結論づけた矢澤ら (1992) の結果とは矛盾するものである。この点に関しては、本論文第 5 章において述べるように、味覚応答の記録からも裏付けられている。

### 第3章 カイコの味覚器官の微細形態とその系統間差異

鱗翅目昆虫幼虫の口器には、触角、小腮、上咽頭（上唇の腹側、大顎に接する部分）に匂いや味を感受する化学感覚器官が存在する（Schoonhoven 1987）。これらの感覚器官の切除や酸による不活性化による多くの摂食行動実験から、餌の探索には、匂いを手がかりとした比較的遠い距離からの探索に触角が用いられ、餌に接触してから摂食行動の解発に至る過程には小腮と上咽頭に存在する味覚器官が重要な働きをしていることがわかっている（Blom 1978; de Boer *et al.* 1977; Glendinning *et al.* 1999; Hanson and Dethier 1973; 伊藤ら 1959; 神田 1992; Ma 1972; Schoonhoven and Dethier 1966; 鳥居・森井 1948; Waldbauer and Fraenkel 1961）。小腮肢には味覚とともに嗅覚機能があり、食物の選択に関与しているといわれている（Albert 1980; Dethier and Kuch 1971; Glendinning *et al.* 1998; Hanson and Dethier 1973; 平尾ら 1976; 石川・平尾 1966; Ishikawa *et al.* 1969; Schoonhoven 1972）。

カイコにおいては、これまで摂食促進物質の同定や小腮の粒状体上の2対の有柄感覚子の電気生理学的性質など、食物の選択に関与する要因に関する多くの先駆的研究が行われてきたにもかかわらず、小腮と上咽頭に存在する感覚子の電子顕微鏡を用いた微細形態に関する研究は報告されていない。小腮の有柄感覚子に付属する感覚細胞数なども明らかでなく、特に上咽頭には味覚器官が存在するかどうかもわかっていない。そこで、本章においては、カイコの小腮と上咽頭の感覚子について、走査型電子顕微鏡による外部形態、透過型電子顕微鏡による感覚子内部の微細形態、さらには、光学顕微鏡を用いたメチレンブルー染色による細胞数や細胞体の位置などの形態観察を行った。

一方、先述のようにカイコには摂食する植物の範囲や人工飼料の摂食性が異なる様々な系統が存在し、日 601 号×中 601 号をはじめとする広食性品種や食性異常系統が作成されてきた。これらの食性異常の原因として味覚器官の形態異常も考えられるため、系統間で小腮の味覚器官に形態的な変異・相違があるのかどうかを併せて調べた。

#### 材料及び方法

##### 蚕系統

透過型電子顕微鏡（TEM）による小腮有柄感覚子の超薄断面の観察には、2つの二元交雑蚕品種、日 140 号×支 145 号及び日 601 号×中 601 号を用いた。この2品種に加え、日 137 号、日 01 号、日 02 号、支 146 号、中 02 号、沢 J の各品種・系統、さらに S2 系統のうち *Nps* 遺伝子をもつ食性異常個体においては、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて小腮

の有柄感覚子や小腮肢の先端に存在する感覚子のクチクラ外部形態を観察した。上咽頭上の感覚子の外部形態観察については日 02 号×中 02 号を用い、系統間の比較は行わなかった。また、日 02 号×中 02 号においては、メチレンブルーにより頭部を生体染色し、光学顕微鏡 (LM) によるホルマウント観察によって小腮粒状体と上唇・上咽頭部に存在する感覚細胞の細胞体の位置や数などを観察した。日 601 号×中 601 号、沢 J、日 01 号、及び S2 (*Nps*) は、正常の系統は摂食しないような低コストの人工飼料や植物葉を食べる「広食性 (polyphagous)」あるいは「嗜好性異常 (non-preference)」とよばれる系統である。(真野ら 1991; 神田 1992; 田島・大沼 1986)。沢 J と日 01 号の卵は蚕糸・昆虫農業技術研究所 (現 農業生物資源研究所) の神田氏から、S2 系統は蚕品種研究所 (現 蚕業技術研究所) 大沼氏から、他の卵は蚕糸・昆虫農業技術研究所の原蚕種製造研究室から分譲いただいた。実験に用いたカイコの幼虫は、1～2 齢は 28°C 全暗条件で、3～4 齢は 25°C 16 時間明 : 8 時間暗条件でヤクルト製原蚕用人工飼料を用いて飼育し、4 眠脱皮から 1 日経過した 5 齢幼虫を形態観察のための試料作成に供した。

#### SEM 用試料

口器を含む頭蓋の腹側半分を切り取り、4%グルタルアルデヒド、0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 4°C で 1 時間固定した。その後、緩衝液で数回洗浄し、超音波洗浄器中で 30 秒間超音波をかけた後、四塩化炭素中に移して沸騰させてクチクラ表面を洗浄した。四塩化炭素による洗浄は液を取り替えて数回繰り返した (Cuperus 1985)。試料は、最後にイソアミルアセテート中に置換し、臨界点乾燥し、金コーティングした後、日立 S-700 または JSM6301F の走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

#### TEM 用試料

小腮を切り取り、4%グルタルアルデヒド、0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 4°C で 2 時間固定した後、緩衝液で数回洗浄し、同じ緩衝液中の 2%四酸化オスミウムにより 1～2 時間室温で後固定した。固定後、試料は蒸留水で 2 回洗浄し、順次エタノールの濃度を上げて脱水し、酸化プロピレンに置換した。さらに、試料をエポン 812 と酸化プロピレンの比 1 : 1 又は 2 : 1 の溶液に 1 時間からオーバーナイト放置した後、エポン 812 に包埋した。包埋した試料は、LKB ウルトロトームを用いて切片とし、蒸留水に溶かした飽和酢酸ウラン中で 20 分間浸漬した後、佐藤の鉛染色液 (佐藤 1968) で 7 分間染色し、JEM-100 CX II 透過型電子顕微鏡によって観察した。



## LM 用試料

生理食塩水中に溶かした 0.15%メチレンブルー約 1ml を幼虫頭部に注射して 1 時間生きのまま放置して神経染色を行った後、小腮及び上唇を切り取って 12%モリブデン酸アンモニウム中に 4℃、オーバーナイトで固定した。その後、蒸留水で洗浄しアルコール脱水を行い、キシレンで透徹して光学顕微鏡下でホールマウント観察した。

## 結 果

小腮は下唇一下咽頭複合体の両側、大顎の腹側部に位置する 1 対の器官であり (Fig. 3-1A)、内側の粒状体、外側の小腮肢とその両方を支える柄部からなる (Fig. 3-1B)。

### 小腮粒状体上の感覚子

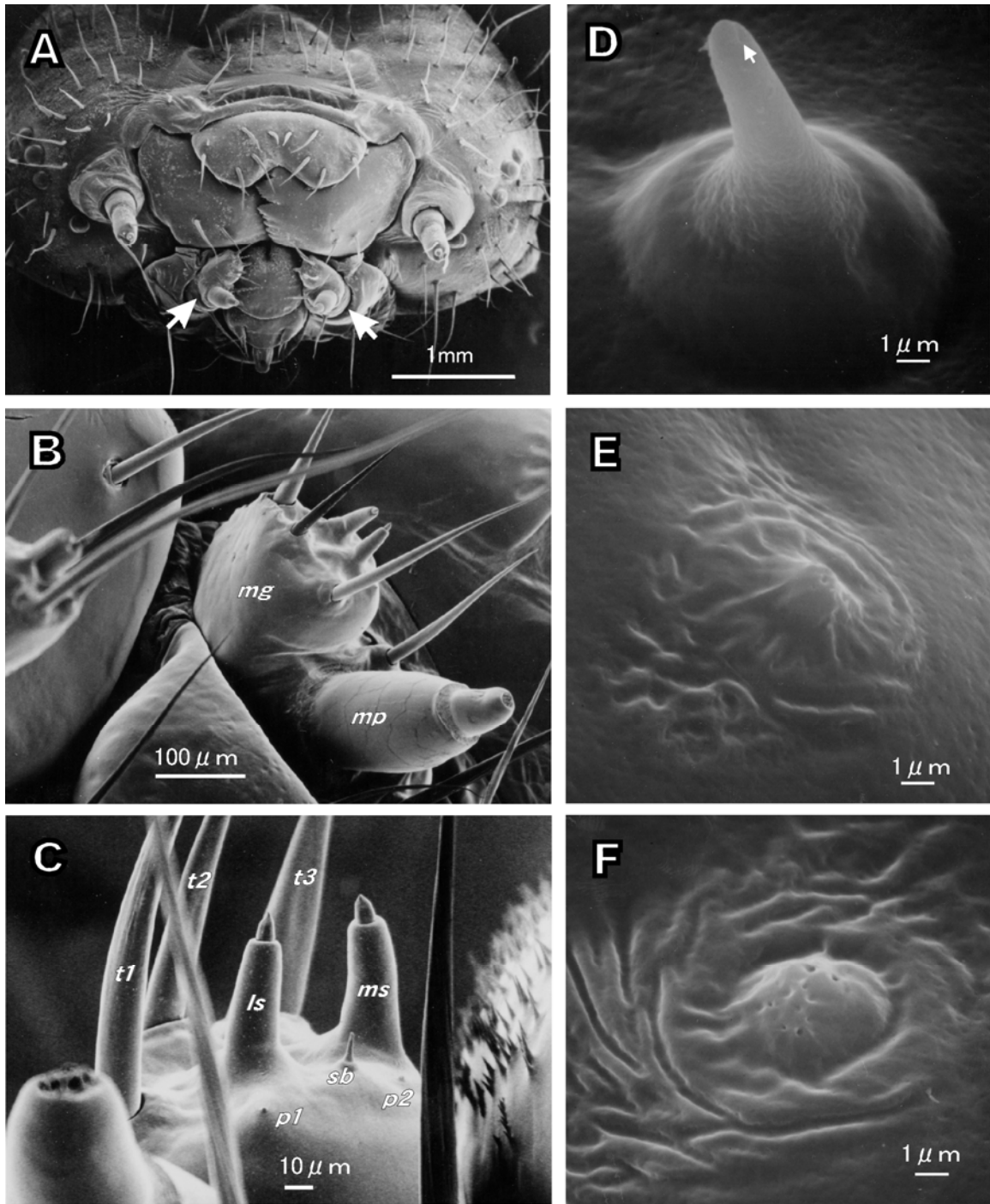
小腮粒状体の SEM 像から 8 個の感覚子が観察できた。すなわち粒状体の背側の肩に位置する 3 個のソケット状の毛状感覚子 (*Sensilla trichodea*)、その感覚子の腹側で粒状体の頂点に近い部分に位置する 2 個の有柄感覚子 (歯状感覚子ともいう; *Sensilla styloconica*)、その内側と外側有柄感覚子の中間のやや腹側で粒状体の中央部に位置する 1 個の小さな尖塔形錐状感覚子 (*Sensilla basiconica*)、外側・内側有柄感覚子の近傍で、粒状体の腹側の肩に位置する 2 個の小さな乳頭状の感覚子 (*papilla-like sensilla*) が存在する (Fig. 3-1C)。尖塔形の錐状感覚子は、基部の周囲のクチクラが盛り上り、先端に近い部分には穴が見られた (Fig. 3-1D)。外側の乳頭状感覚子は錐状に近い形態をしており (Fig. 3-1E)、内側の感覚子はドーム形であり鐘状に近い構造である (Fig. 3-1F)。これらの感覚子の周囲のクチクラは皺のような構造を持ち、感覚子の先端にあたる中央部には、1 つあるいは複数の穴が見られる。

外側有柄感覚子と内側有柄感覚子の形と大きさはほぼ等しく、それぞれ、先端部の小さな円錐状の突起 (*conical peg*; 高さ 8-12  $\mu\text{m}$ 、基部の幅 5-6  $\mu\text{m}$ ) とソケットのない基部の筒状の突起 (*basal style*; 高さ 45-55  $\mu\text{m}$ 、基部の幅 10-15  $\mu\text{m}$ ) から構成される。通常突起の先端には直径 0.2~0.3  $\mu\text{m}$  の 1 つの穴が開いているが (Fig. 3-2A)、中には先端付近に 1 から 10 個までの数個の様々な大きさの穴が観察される。この複数の穴は特に日 601 号×中 601 号と中 02 号の試料で多く見られた (Table 3-1)。また、突起部分の形態は系統により特異的な構造が見られた。すなわち、日 137 号と S2 は先端部が細く尖った構造をしており、支 146 号の先端部は不規則な小さなとげのようなクチクラの凹凸が見られる。中には、

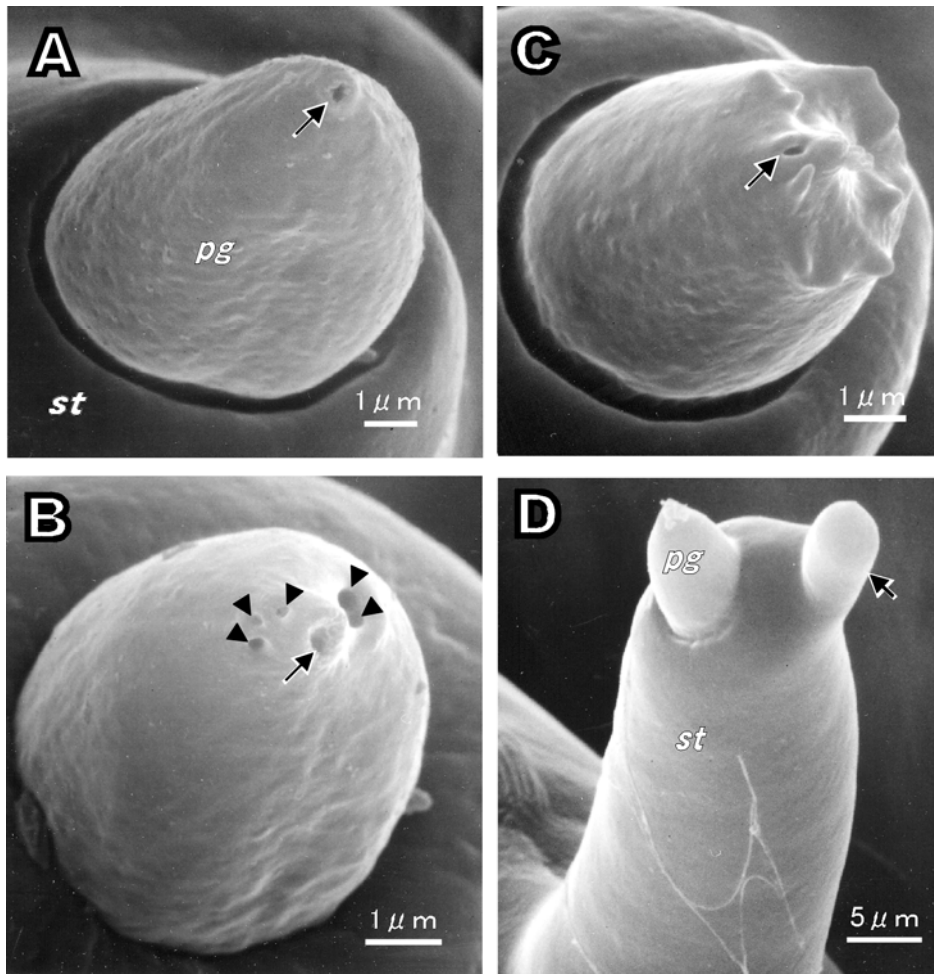
先端の円錐状突起部分が2個ある感覚子、あるいは内側の有柄感覚子がない試料があったが、これらは明らかに異常といえる形態をしていた。しかし、各系統におけるこれらの有柄感覚子のクチクラ形態の特徴や異常感覚子の出現割合は、系統の食性とは直接の関係はないものと思われる。

小腮をメチレンブルーで染色することにより、有柄感覚子に付属する神経細胞の細胞体が、感覚子の基部からおよそ50~80 μm下の粒状体の内部にいくつか塊となって存在することがわかった (Fig. 3-3A)。各神経細胞は細胞体から感覚子の先端部に向かって樹状突起を延ばし、基部は中枢へ向かって軸索を延ばしている。

感覚突起内の先端側樹状突起の領域で作成した横断切片をTEMで観察した結果、それぞれの有柄感覚子にはクチクラ鞘で囲まれた5本の樹状突起が観察された (Fig. 3-3B-F)。樹状突起の数には、外側有柄感覚子と内側有柄感覚子の間でも、食性の異なる2品種、日140号×支145号及び日601号×中601号の間にも違いがなかった。先端側の円錐状突起の中間付近の切片には、薄いクチクラ鞘 (dendritic sheath) で囲まれた4本の樹状突起が観察された (Fig. 3-3B)。円錐状突起の基部がソケット状になって円筒状突起の先端に重なる領域の切片では、5本の樹状突起のうちの1本は、円錐状突起のクチクラ壁に接しており、クチクラ鞘がその樹状突起の周囲に沿って入り込んだ形で発達している。そのやや基部では、クチクラ鞘が完全に1つの樹状突起を取り囲み、その樹状突起の断面は、電子密度の高い物質が周囲に散在している細管体 (tubular body) とみられる構造が観察された (Fig. 3-3C 矢印)。円錐状突起から円筒状突起の前半部にかけてのこの領域では、感覚子のクチクラ壁とクチクラ鞘の間の空間は、感覚子液 (sensillar sinus) で満たされているが (Fig. 3-3B, C, D)、より基部になると付属細胞の先端部が感覚子液を取り囲むようになる (Fig. 3-3E)。ここでは、クチクラ鞘が個々の樹状突起を部分的に取り囲むように張り出している。円筒状突起の基部に接する小腮粒状体の先端部の切片では、樹状突起は末端部及び基部のセグメント (distal and proximal dendritic segments) の境界部にあたり、9×2+0の配列の典型的な微小官構造をもつ樹状突起断面が見られ、周囲にクチクラ鞘はなく、内鞘細胞 (inner sheath cell) によって囲まれた繊毛液中 (ciliary sinus) に存在した (Fig. 3-3F)。いくつかの樹状突起の断面には放射状の電子密度の濃い物質を含むが、おそらくこれらはこの領域に通常存在する末端部及び基部の基底小体 (distal and dorsal basal bodies) である (Zacharuk 1985)。



**Fig. 3-1** SEM micrographs. **A**; Frontal view of head, showing the location of bilateral maxillae (arrows). **B**; Lateral view of the right maxilla. *mg*, maxillary galea; *mp*, maxillary palpus. **C**; Ventral view of the tip of the maxillary galea. *t1*, *t2* and *t3*, three dorsal tricoid sensilla; *ls*, lateral styloconic sensillum; *ms*, medial styloconic sensillum; *sb*, spire-shaped basiconic sensillum; *p1* and *p2*, two small papilla-like sensilla. **D**; Close view of the spire-shaped basiconic sensillum on the galeal lobe (*sb* in Fig. 3-1C). An arrow indicates the cuticular cavity. **E**; Close view of the lateral small papilla-like sensillum on the galeal lobe (*p1* in Fig. 3-1C). **F**; Close view of the medial small papilla-like sensillum on the galeal lobe (*p2* in Fig. 3-1C).



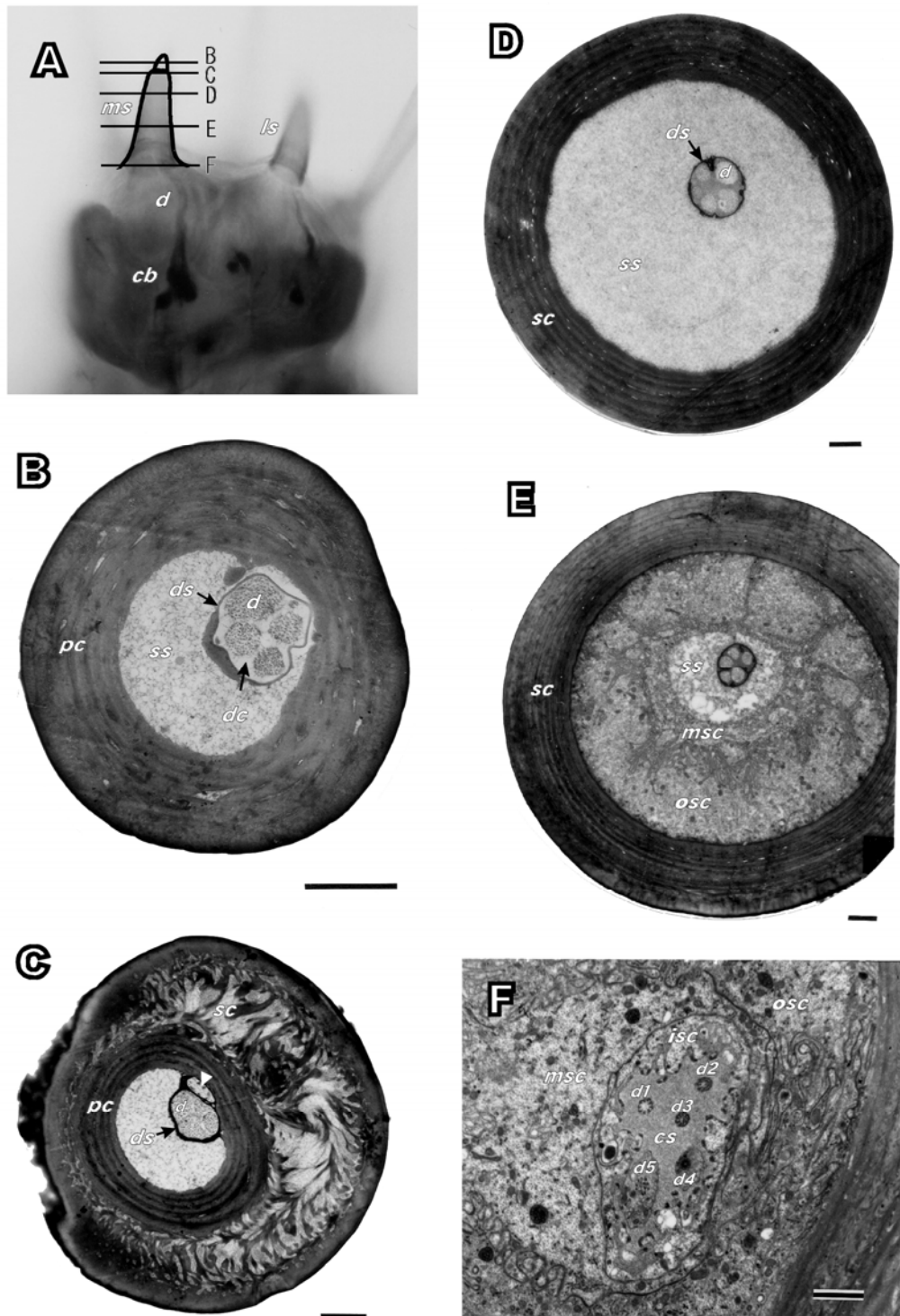
**Fig. 3-2** SEM micrographs showing the peculiar cuticular structure of the galeal styloconic sensilla observed in different specimens. **A**; Apical view of a styloconic sensillum of a N140xC145 larva with a terminal pore (arrow) at the tip. *pg*, conical peg; *st*, basal style. **B**; Apical view of the styloconic sensillum of a C02 larva with several cavities (arrowheads) around the terminal pore (arrow). **C**; Apical view of a styloconic sensillum of a C146 larva with rugged cuticular protuberance around the terminal pore (arrow). **D**; A side view of a styloconic sensillum of a N01 larva with another peg-like cuticular structure (arrow) in addition to the normal peg (*pg*) on the basal large style (*st*).

**Table 3-1** Characteristic differences in the cuticular structure of the maxillary chemosensilla observed in the different strains of *Bombyx mori*

Strains	No. of larva	No. of maxillary palpi				No. of characteristic shapes of styloconic sensilla						Other characteristics of styloconic sensilla
		No. of basiconic sensilla				LS			MS			
		0 <sup>1)</sup>	7 <sup>2)</sup>	8 <sup>3)</sup>	9 <sup>4)</sup>	Total	<b>B</b> type <sup>5)</sup>	<b>D</b> type <sup>6)</sup>	Total	<b>B</b> type <sup>5)</sup>	<b>D</b> type <sup>6)</sup>	
N140xC145	11		1	20		19	9 (8)		20	11 (8)		
N137	12		1	23		22	2 (1)		21	1		Sharp tip
N02	10			20		17	8 (6)		18	7 (6)		
C146	11			18	4 (4)	21	5 (4)		20	5 (4)	1	Rugged tip <sup>7)</sup>
C02	12			20	4 (4)	24	20 (12)		24	24		
N601xC601	11	1		21		19	19 (11)		21	18 (11)		Lack of unilateral MS (1)
N01	12			24		23			21		2 (2)	
Sawa-J	10			17	1	17		1	20		4 (4)	
S2 ( <i>Nps</i> )	8		1	13	2 (2)	16			16			Sharp tip

Lower four strains are called ‘polyphagous’ strains or ‘non-preference’ mutants. Number of larva having the abnormal sensilla is indicated in the parentheses.

<sup>1)</sup> Maxillary palpus with no basiconic sensilla on the apical tip as seen in Fig.3-5D. <sup>2)</sup> Maxillary palpus with 7 basiconic sensilla on the apical tip as seen in Fig.3-5C. <sup>3)</sup> Maxillary palpus with 8 basiconic sensilla on the apical tip as seen in Fig.3-4A. <sup>4)</sup> Maxillary palpus with 9 basiconic sensilla on the apical tip as seen in Fig.3-5A and B. <sup>5)</sup> Sensilla with plural pores around the tip as seen in Fig. 3-2B. <sup>6)</sup> Sensilla with an extra cuticular peg-like structure on the basal style as seen in Fig.3-2D. <sup>7)</sup> Sensilla with a rugged cuticular structure around the tip of the peg as seen in Fig.3-2C.



**Fig. 3-3** Whole mount preparation stained with methylene blue (**A**) and thin cross sections (**B-F**) of the maxillary styloconic sensillum. **A**; A specimen of a left galea from a N140xC145 larva. **B, C, D, E** and **F**; Specimens from a lateral styloconic sensillum of a N601xC601 larva. Approximate position of each TEM micrograph (**B-F**) is shown with bars in the LM micrograph **A**. *ls*, lateral styloconic sensillum; *ms*, medial styloconic sensillum; *cb*, cell body; *d*, dendrite; *dc*, dendritic channel; *ds*, dendritic sheath; *ss*, sensillar sinus; *pc*, peg cuticle; *sc*, style cuticle; *isc*, inner sheath cell; *msc*, intermediate sheath cell; *osc*, outer sheath cell; *cs*, ciliary sinus; *d1-d5*, basal dendritic segments of five sensory neurons. An arrow head in **C** indicates a separated dendrite with a structure like a tubular body surrounded by a dendritic sheath. Bars in **B-F**: 1  $\mu$ m

## 小腮肢上の感覚子

小腮肢は3つの節から構成される (Fig. 3-1B)。先端節の頂部には多数の穴が周囲にみられる3個の多孔性感覚子と1つの穴が先端に開口する5つの単孔性感覚子の通常計8個の短い錐状感覚子が存在する。多孔性の感覚子は中心部で正三角形をなす位置に存在し、2個及び3個の単孔性感覚子はその三角形の二つの辺の外側にそれぞれ存在する (Fig. 3-4A)。全ての感覚子の大きさには著しい違いはなく、長さ及び基部の幅ともに3~4  $\mu\text{m}$  である。多孔性感覚子の先端には指を合わせたような形のクチクラの突起に囲まれた窪みが見られ、側面のクチクラ壁には多数の縦の溝と多数の穴が存在する (Fig. 3-4B)。単孔性感覚子の先端の穴を形成する周囲のクチクラは2、3個の小さな膨らみで構成され、感覚子側面のクチクラ壁の表面は滑らかである (Fig. 3-4C)。

TEMによる超薄切片の観察から、それぞれの多孔性錐状感覚子には3個又は4個の感覚神経細胞が、単孔性感覚子には4個又は5個の感覚神経細胞がその樹状突起を先端部に延ばしていることがわかった (Fig. 3-4D)。樹状突起の先端部はクチクラ鞘で囲まれた繊毛液中に存在し、いくつかの試料では樹状突起が分枝していることが確認できた。

小腮肢上の錐状感覚子の数は観察したほとんどの試料で8個であったが、中には7個及び9個である場合が見られた (Fig. 3-5A, B, C)。1つだけ全く感覚子がない小腮肢が存在した (Fig. 3-5D)。この感覚子数の変異はカイコの系統によって異なり、日01号や日02号では観察した10個体は全て8個の感覚子が存在したが、支146号及び中02号では8個でなかった小腮肢が4つずつ (18%及び17%) 存在した。しかし、その違いは広食性と正常系統という食性の違いとは関連性がなかった (Table 3-1)。

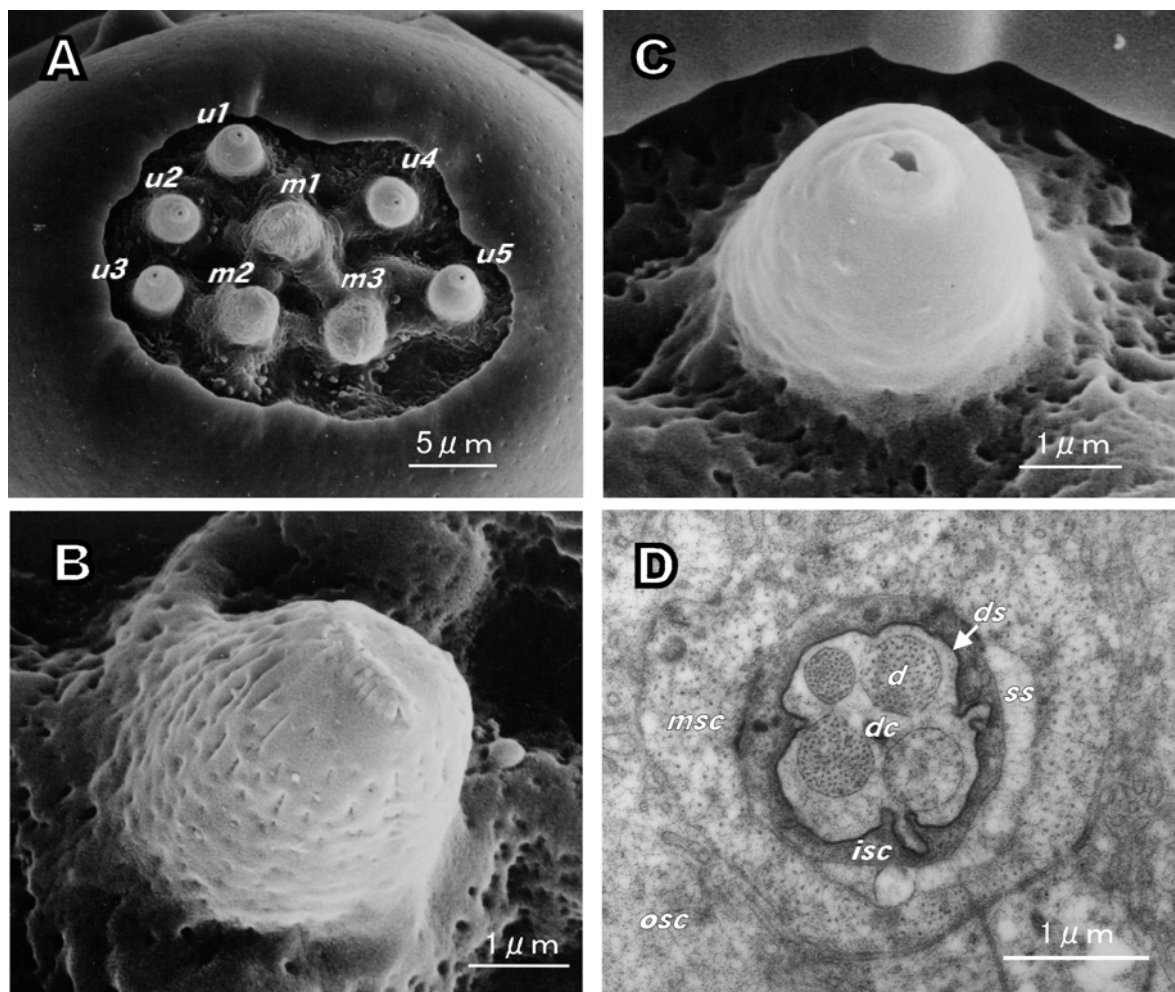
## 上唇・上咽頭上の感覚子

上唇には6対の毛状感覚子、上咽頭の先端部には3対の棘状感覚子 (*Sensilla chaetica*) が存在する (Fig. 3-6A, 3-7A)。よく見るとこの他に上咽頭部の最も内側の棘状感覚子の基部に3つの鐘状感覚子のようなクチクラ突起が観察された (Fig. 3-6A, B)。その最も内側の突起が上咽頭感覚子であり、次章における電気生理学的な実験により味覚器官であることがわかった。拡大して観察すると、直径約20  $\mu\text{m}$  のドーナツ状のクチクラの膨らみに囲まれた中心部に、長さ基部の幅ともに1  $\mu\text{m}$  程度の小さな乳頭状の突起が見られた (Fig. 3-6C)。さらに拡大すると、多くの試料でその先端部に粘性のあると思われる物質が覆っている像が観察されたが (Fig. 3-6D)、中にはそれが洗い落とされ、1つの穴が観察できるものがある。

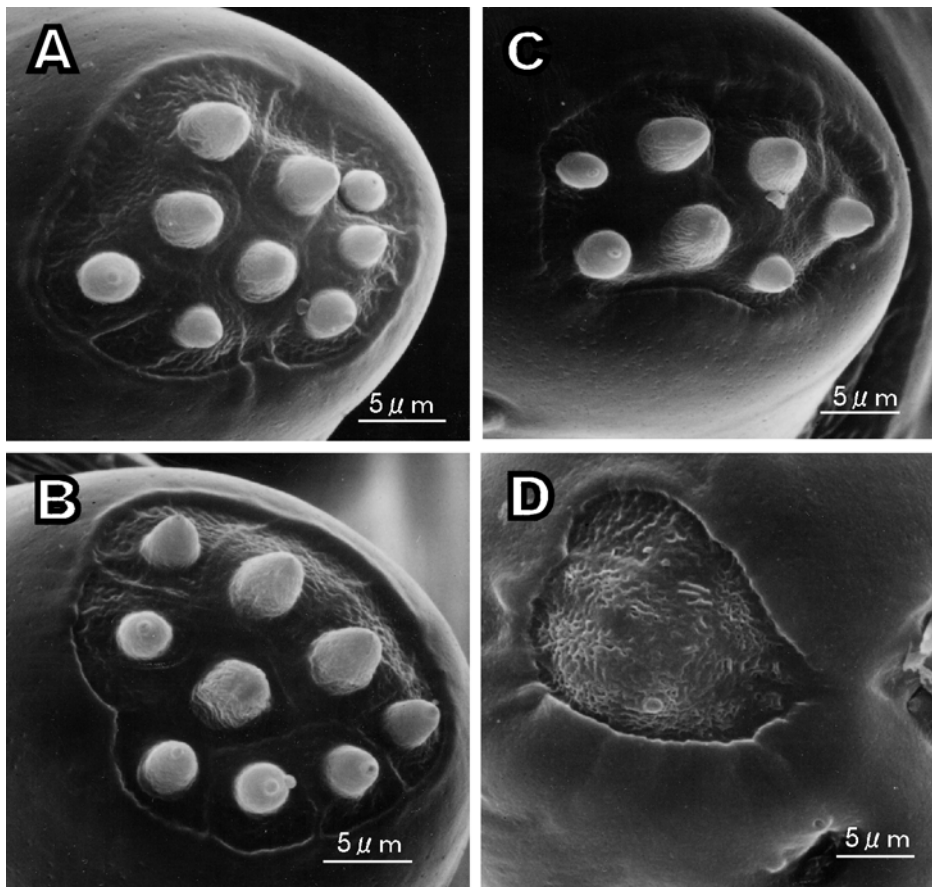
った (Fig. 3-6E)。

メチレンブルーにより、上唇（または上咽頭）に存在する感覚子に分布する神経細胞を染色し、LM により観察したところ、3個の双極性の神経細胞が樹状突起を上咽頭感覚子に延ばしていることがわかった (Fig. 3-7)。その細胞体は長径が約 10  $\mu\text{m}$  で、乳頭状のクチクラ突起部位からは 70~80  $\mu\text{m}$  離れた位置に存在する (Fig. 3-7B, C)。また、上咽頭感覚子の近傍に存在する2対の鐘状感覚子を含めてその他の上唇、上咽頭に存在する感覚子は全て1つの神経細胞が付属していた (Fig. 3-7A)。この観察により、上唇外側には外部形態では容易に観察されなかった3対の未確認の感覚子がさらに存在することがわかった (Fig. 3-7A; Sc)。これを改めて SEM により観察したところ、凹凸の少ない弦状感覚子 (Sensillum scolopophora) と思われる構造が見られた (Fig. 3-6F)。

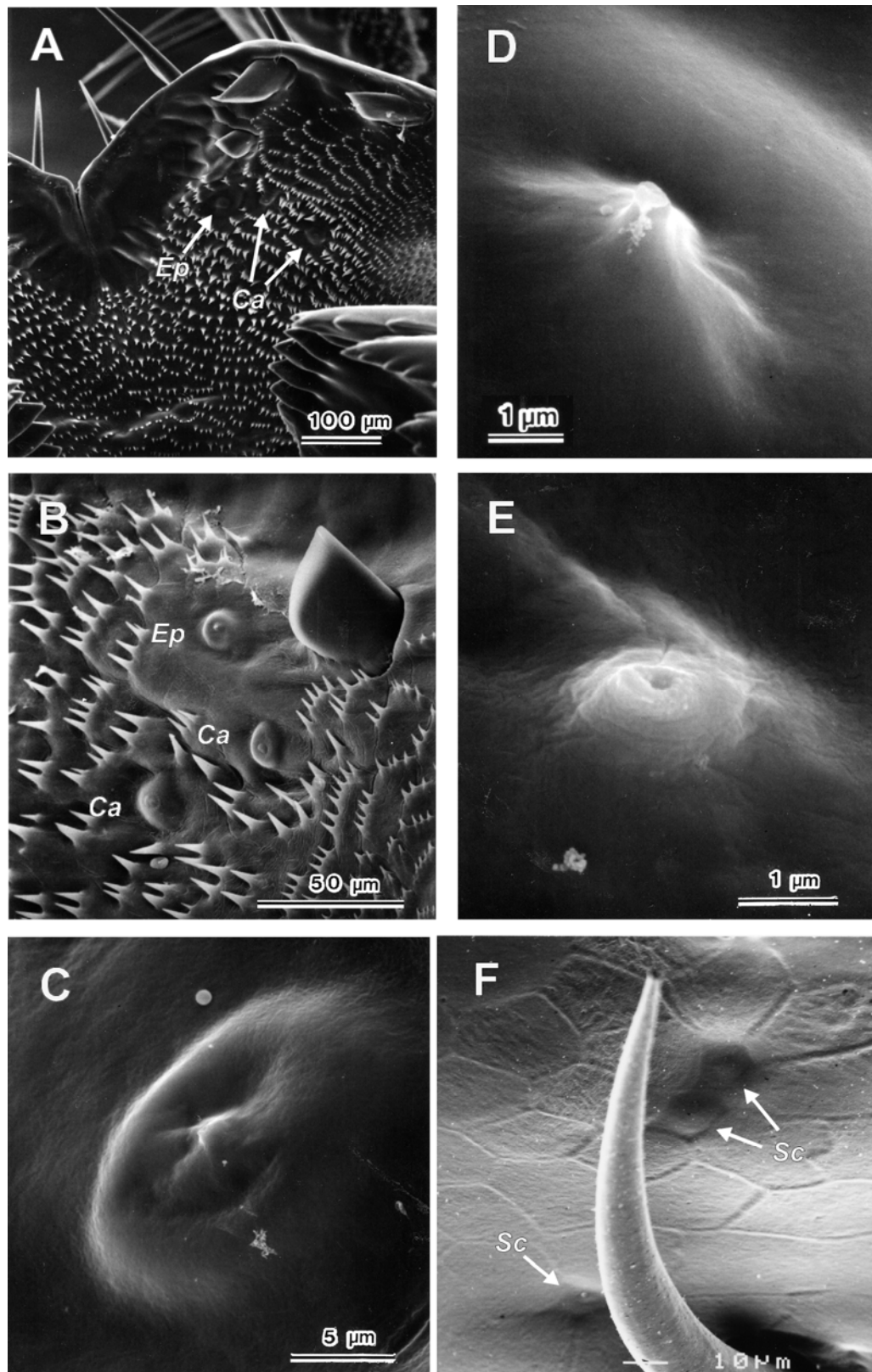




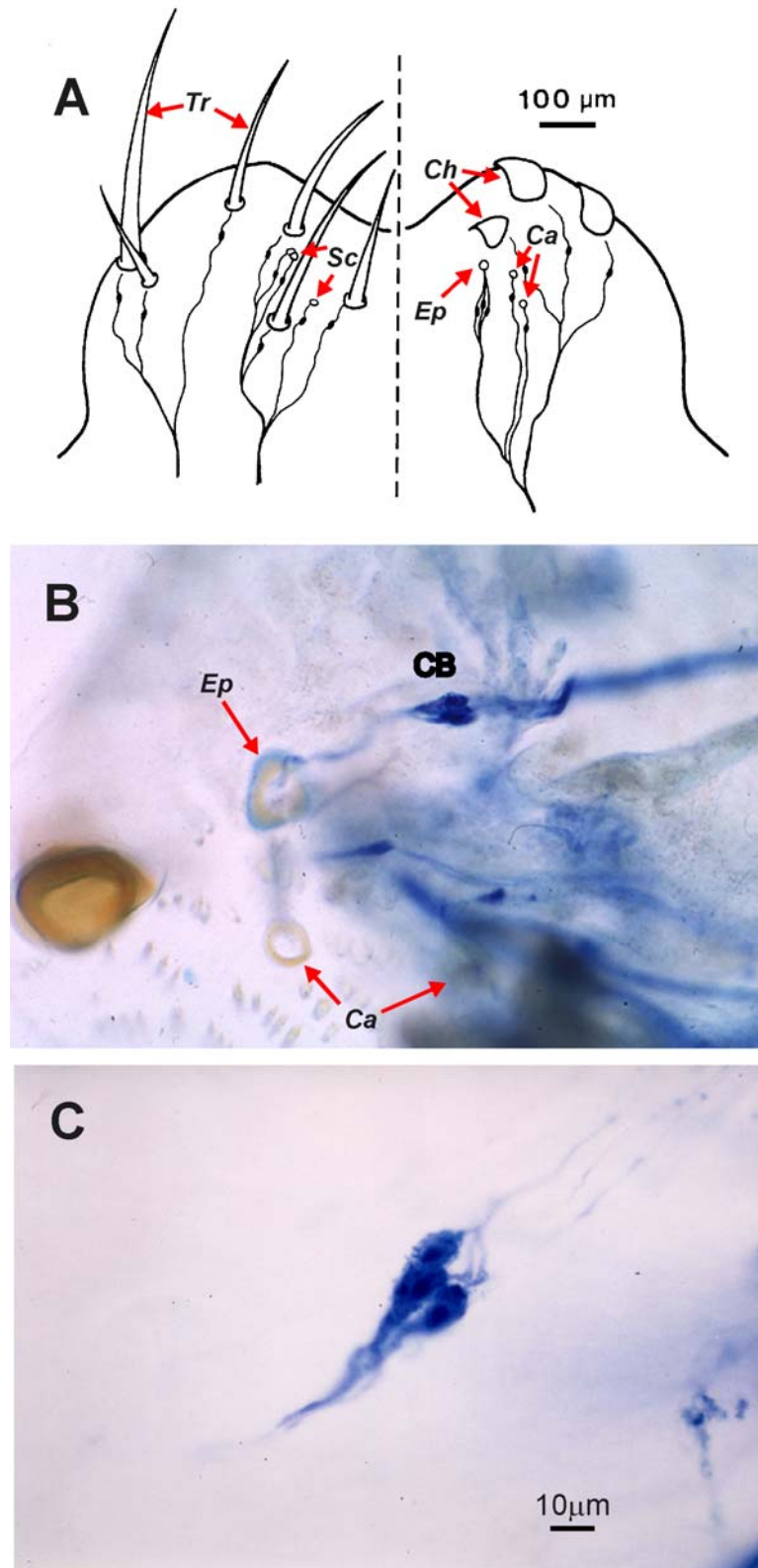
**Fig. 3-4** SEM micrographs (**A**, **B**, and **C**) and a TEM micrograph (**D**) of the basiconic sensilla on the apical tip of the maxillary palpus of a N140xC145 larva. Three multiporous (*m1* – *m3* in **A**) and five uniporous sensilla (*u1* – *u5* in **A**) are present normally. **B** and **C** represent each type of sensilla (*m2* and *u1* in **A**, respectively) at higher magnification. **D** is a thin cross section of the dendritic region in one of these sensilla (same location as *u4* in **A**) of a different specimen, in which four dendrites (*d*) are observed within the dendritic channel (*dc*) encased by a dendritic sheath (*ds*). *ss*, sensory sinus; *isc*, inner sheath cell; *msc*, intermediate sheath cell; *osc*, outer sheath cell.



**Fig. 3-5** SEM micrographs of the apical tip of the maxillary palpus with different number of basiconic sensilla observed in different specimens. **A**; A specimen of a C146 larva with 4 multiporous sensilla and 5 uniporous sensilla. **B**; A specimen of a C146 larva with 3 multiporous sensilla and 6 uniporous sensilla. **C**; A specimen of a N140xC145 larva with three multiporous sensilla and four uniporous sensilla. **D**; A specimen of N601xC601 with no basiconic sensilla.



**Fig. 3-6** SEM micrographs of the sensilla on the labrum. **A**; Left-hand ventral side of the labrum (the epipharynx) showing locations of the epipharyngeal sensillum (*Ep*) and two associated campaniform sensilla (*Ca*). **B**; Higher magnification of the three sensilla indicated in **A**. **C**; Higher magnification of the epipharyngeal sensilla showing a small papilla and swelling of citicle encircling the papilla. **D, E**; Higher magnification of the papilla. A viscous substance (**D**) or a pore opening (**E**) can be seen at the tip of the papilla. **F**; Three scolopophora sensilla (*Sc*) located on the right-hand dorsal side of the labrum. See Fig. 3-7A for their locations on the labrum.



**Fig. 3-7 A;** Schematic drawing of the distribution of sensilla on the outer surface of the labrum (left) and on the epipharynx (right), and their innervating neurons based on the LM observation of the labrum stained with methylene blue. *Ep*: epipharyngeal sensillum. *Ca*: campaniform sensilla, *Sc*: scolopophora sensilla, *Tr*: trichoid sensilla, *Ch*: chaetic sensilla. **B;** LM micrograph of neurons innervating the epipharyngeal sensillum (*Ep*) and the two campaniform sensilla (*Ca*). *CB* indicates the cell bodies of neurons innervating the epipharyngeal sensillum. **C;** Higher magnification of the part of cell bodies showing three neurons innervating the epipharyngeal sensillum.

## 考 察

小腮の位置と形態から見て、カイコは、食物を咀嚼する前に小腮によって食物の表面に接触して味や匂いを感じることができるものと思われる。さらに、咀嚼中は、口腔の外部にある食物は、小腮粒状体状の感覚子に、口腔内にはいって大顎によって砕かれた食物は上咽頭の感覚子に接触する。したがって、それぞれの感覚子が、それぞれの段階で食物の選択と摂食行動に重要な役割を果たしていることが考えられる。

### 小腮粒状体上の感覚子

小腮粒状体上の3本の毛状感覚子のうち、最も内側のものは、他の毛状感覚子に比べて基部の幅が太いため、Ishikawa (1963) は棘状感覚子 (*Sensillum chaetica*) と分類している。このような分類の相違は、しばしば起こることであり、感覚子の形態が非常に多様であることを示している。これらの毛状感覚子は機械受容感覚子であり (石川・平尾 1961)、食物の硬さや大顎の動きを感知していると考えられている (Grimes and Neunzig 1986)。

カイコの粒状体上の有柄感覚子は Ss- I と Ss- II と呼ばれてきた (Ishikawa 1963)。この2つの有柄感覚子はこれまで調べられてきた全ての鱗翅目昆虫の幼虫に存在し、一般的にはそれぞれ外側有柄感覚子 (*lateral styloconic sensillum*) 及び内側有柄感覚子 (*medial styloconic sensillum*) と呼ばれている (e.g. Blom 1978; Dethier 1973; Dethier and Kuch 1971; Grimes and Neunzig 1986; Ma 1972; Schoonhoven 1972; Schoonhoven and Dethier 1966; van Drongelen 1979; Wieczorek 1976)。カイコにおいては、これらの感覚子の味覚受容の機能が、行動学的にも電気生理学的にも調べられている (Ishikawa 1963, 1966, 1967; 石川・平尾 1963, 1966; 平尾・荒井 1990; 平尾・荒井 1991)。今回の形態学的観察からも明らかなように、感覚子の先端に開口する穴とそこへ伸びる内部の樹状突起先端部の間で、外界化学物質の情報の受け渡しが行われている。

Ishikawa (1967) は、チップレコーディング法により記録したスパイク応答から味覚細胞の数を推定し、外側有柄感覚子には5つの味覚細胞が、内側有柄感覚子には4つの味覚細胞が存在し、機械受容感覚細胞は存在しないと報告している。しかし、今回の研究では、それぞれの感覚子に付属する神経細胞は全部で5つであることがわかった。この数は、これまで鱗翅目昆虫の幼虫で調べられてきたものと一致する。(Devitt and Smith 1982; Ma 1972; Schoonhoven and Dethier 1966; Shields 1994b)。また、そのうち1つの神経細胞の樹状突起が円錐状突起の基部でクチクラ壁に密着し、細管体様構造を形成していることから、

その感覚細胞は機械受容細胞であり、円錐状突起部のクチクラのたわみを検知していると考えられる。

カイコの小腮粒状体上の小さな錐状感覚子は、Ishikawa (1963, 1967) により、「小さな有柄感覚子」または「Ss-III」と呼ばれていた。しかし、「有柄」とは、先端の円錐状の感覚突起が、基部の円筒状あるいは類似の形のクチクラ突起部からソケット状に張り出していることを意味していることから使われるものであり、穴がなくソケットの形状をしていないこの感覚子の場合、Shields (1994a) や Grimes and Neunzig (1986) が *Mamestra configurata* や他の鱗翅目昆虫幼虫において記しているように、錐状感覚子と分類した方がより適切と考えられる。この感覚子の機能は不明であるが、Shields (1994a) は、*M. configurata* の尖塔形の錐状感覚子は温度-湿度受容器と類似の特徴があるとしている。

小腮粒状体の腹側の肩部に存在する2つの乳頭状突起は、他の鱗翅目昆虫幼虫にも存在するが、形態的な変異があると思われる。例えば、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) では、内側が「錐状 (basiconica)」で外側が「鐘状 (campaniform)」であり (Schoonhoven and Dethier 1966)、*Euxoa messoria* では、「小さな穴のない乳頭 (small aporous papilla)」であり (Devitt and Smith 1982)、41種の2門亜目 (*Ditryisia*) の記載では、内側、外側ともにほとんどの場合「錐状」としているが、外側に関しては「ドーム状、または円屋根型 (dome or cupola shape)」とする種がある (Grimes and Neunzig 1986)。*M. configurata* では、「錐状」としている (Shields 1994a)。カイコのこの2つの乳頭状突起はクチクラ表面に他の種には見られないような皺や窪みが観察された。これらの感覚子は形態的な特徴から機械受容感覚子と考えられる。

この小腮粒状体上の乳頭状突起の周囲の窪みが、感覚子の中の樹状突起に貫通する穴になっているのかは今回の研究では明らかではない。同様に、小腮有柄感覚子の先端にある通常の味孔の他に穴のような構造が周囲に複数見られる試料が多く存在したが、この構造も樹状突起へ開口する穴なのかどうかは明らかではない。眠中に古いクチクラ鞘が接着した跡が脱皮傷 (molting scar) といわれる穴のような構造となって存在することが、味覚以外の感覚子においてもあるといわれている (Zacharuk 1985)。一方、Shields (1994a) は、*M. configurata* の尖塔状錐状感覚子の先端にある溝がメチレンブルーを内部へ透過させることを確かめている。今回観察した溝は、脱皮傷か、あるいは何らかの物質を透過させる穴と考えられるが、単なるクチクラの窪みである可能性もあり、穴が貫通しているかどうかは明らかではない。

## 小腮肢上の感覚子

単孔性の感覚子と多孔性の感覚子は、それぞれ味覚感覚子、嗅覚感覚子の典型的な特徴であるため、小腮肢上の単孔の錐状感覚子はおそらく味覚物質を受容し、多孔性感覚子は匂いを受容するものと考えられる。カイコの小腮肢が味覚と嗅覚の機能を有していることは、感覚子を不活性化する実験から推察されていた (Ishikawa *et al.* 1969)。さらに、匂い刺激物質に対する小腮神経からの電気生理学的応答の記録も行われている (平尾ら 1976)。小腮肢の錐状感覚子から電気生理学的な味覚応答を記録した実験はほとんどないが、Glendinning *et al.* (1998) は、タバコスズメガの小腮肢全体から非寄主植物の抽出物に対する応答を記録している。著者は、予備実験においてカイコ小腮肢に存在するそれぞれの単孔の感覚子からチップレコーディング法によりスパイク応答を記録することができたが、応答する物質を特定するには至っていない。

小腮肢上の多孔感覚子の先端に見られる指のような特徴的なクチクラ形態が何を意味するのかは明らかではない。この感覚子に似た形態が、*Shistocerca gregaria* 成虫の小腮肢にある感覚子に見られることが報告されており、「15 か 16 の不規則に間隔を置いた溝が先端の峰に集積し、唇状物が並んでクチクラ鞘の開口部の周囲を形成している。(Some 15 or 16 irregularly spaced grooves converging distally to a linear crest which is formed by the apposition of lips surrounding the opening of the dendritic sheath)」と表現している (Blaney and Chapman 1969)。その形状から、開閉する可能性があり、その先端が開いたときにのみ、樹状突起が外部環境にさらされて味覚感覚子として機能するものと考えられている。今回のカイコの多孔性感覚子でも数個の試料で、その先端部の唇状の構造が開口しているものが観察された。したがって、この多孔性感覚子も、先端の穴が空いたときに接触化学物質に応答する可能性がある。一方、タバコスズメガでは、小腮粒状体の有柄感覚子に嗅覚機能があるという報告 (Stadler and Hanson 1975) があることからみても、味覚と嗅覚を区別することはそれほど重要なことではないという見方もできよう。小腮肢には約 30 もの感覚細胞を持つこと、摂食開始前に食物の表面に小腮肢を接触させる行動をみせることなどから考えて、これらの小腮肢上の感覚子が摂食行動において重要な役割をもつことが推測されるが、機能を探るためには、今後より詳細な電気生理学的な解析が必要である。

## 上咽頭上の感覚子

本研究により味覚器官としての存在が明らかとなった上咽頭感覚子は、形態的な特徴か

ら窩状感覚子 (*Sensilla coeloconicum*) に分類されるものと考えられる。カイコのこの感覚子は、既に報告のあるオオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) (Ma 1972) や *Spodoptera exempta* (Ma 1976) の上咽頭感覚子と比べて乳頭状突起の位置するクチクラの窪みが平坦で広い。一方、タバコスズメガ (*M. sexta*) は、周囲のクチクラの膨らみがほとんどない (de Boer *et al.* 1977) などの点で種による変異がある。実体顕微鏡下では、カイコの上咽頭感覚子の周囲のクチクラは茶色みを帯びたドーナツ状に観察できるが、タバコスズメガにおいては色でその位置を識別することは不可能に近い。この感覚子の味孔は小さく、味孔から内部の感覚子液と思われる物質も浸み出ていると思われるため、電子顕微鏡による味孔の観察は困難であったが、本研究で初めて味孔を観察することに成功した。一方、メチレンブルーによりカイコの上咽頭感覚子には3個の神経細胞が観察されたが、この数は、オオモンシロチョウ、タバコスズメガ、トウヒシントメハマキ (*Choristoneura fumiferana*) で調べられた他の文献とも一致する。

上唇・上咽頭部に存在する他の感覚子に付属する神経細胞は全て1つであった。棘状感覚子と毛状感覚子はその形状から見ても典型的な機械受容感覚子であると思われる。上咽頭感覚子に隣接して存在する鐘状感覚子と上唇背側の弦状感覚子の機能は不明であるが、化学感覚子には通常複数個の感覚細胞が付属していることから、機械受容などの化学感覚以外の機能を持つと考えられる。

## 系統間比較

日 601 号×中 601 号、沢 J、日 01 号と S2 系統の *Nps* 遺伝子保有個体のような広食性系統又は食性異常ミュータントと、食性に関しては正常な系統である日 140 号×支 145 号、日 137 号、日 02 号、支 146 号、中 02 号の2つのグループ間には、小腮粒状体の有柄感覚子、小腮肢上の錐状感覚子ともにクチクラ表面の構造に明白な相違は認められなかった。また、有柄感覚子に分布する神経細胞の数に関しても、少なくとも日 140 号×支 145 号と日 601 号×中 601 号の間で違いはなかった。日 601 号×中 601 号と沢 J については、数種の摂食阻害物質に対する感受性が失われていることが示されているが (矢澤ら 1991; 本論文第5章)、食性異常突然変異遺伝子である *Np* と *Nps* をもつ個体の味覚応答に関しては異常がないことがわかっている (石川ら 1963; 本論文第6章)。本章における形態観察に加えて、第5、6章で示すように広食性蚕や食性異常ミュータントの有柄感覚子からも様々な味覚刺激物質に対するスパイク応答が記録できることから、何らかの形態的な異常があ



るために味覚受容ができなくなっていたり、味覚細胞が欠失していたりする可能性は低い。

しかしながら、本研究では有柄感覚子のクチクラ形態や小腮肢上の錐状感覚子の数に系統による特徴や個体間の変異が認められた。特に錐状感覚子の数については確かに8個のものが通常であると思われるが、異なる数からなる小腮肢があまりに多く観察されたため、7個や9個のものを異常と表現するのは適当でないかもしれない。これらの形態的な変異が何に起因するのか、それがどう摂食行動に反映されるのかについては不明である。

## 第4章 カイコの上咽頭感覚子味覚細胞の電気生理学的解析

Hodgson *et al.* (1955) によってチップレコーディング法とよばれる電気生理学的手法が開発されて以来、数多くの種類の昆虫で味覚感覚子に存在する味覚細胞の性質が調べられてきた。昆虫の味覚感覚子は小腮（肢）、上唇、下唇（肢）あるいはその変異形である口吻や唇弁などの口器ばかりでなく、触角や脚、産卵管などにも分布しており、それぞれが摂食や産卵などの行動に異なる役割を持っている（cf. Bernays and Chapman 1994）。通常1つの味覚感覚子には4個か6個の感覚細胞が存在するが、各味覚細胞は受容する物質の範囲が異なり、その組み合わせから行動の決定につながる情報を受け取る仕組みになっていると考えられる。

鱗翅目昆虫の幼虫の味覚器官は、他の昆虫種に比べて数は格段に少なく、小腮の2対の有柄感覚子の他に上咽頭に1対の感覚子があることが知られている（cf. Schoonhoven 1987）。小腮の有柄感覚子からは、数多くの鱗翅目昆虫において味覚応答が記録されているが、上咽頭感覚子からは、オオモンシロチョウ（*Pieris brassica*）（Ma 1972）、トウヒシントメハマキ（*Choristoneura fumiferana*）（Albert 1980）、タバコスズメガ（*Manduca sexta*）（de Boer and Hanson 1987; Glendinning *et al.* 1999）、ヤママユガ（*Antheraea yamamai*）（Asaoka and Akai 1991）において報告されているにすぎない。また、ヨトウガ（*Mamestra brassicae*）（Blom 1978）と *Euxoa messoria*（Devitt and Smith 1982）においては、上咽頭感覚子が存在しないと報告されている。

カイコにおいては、先にも述べたとおり、他の昆虫にも先駆けて古くからチップレコーディング法を用いた研究が行われており、小腮有柄感覚子の味覚細胞の性質が明らかになっている（石川・平尾 1963; Ishikawa 1963, 1966, 1967; 平尾・荒井 1990, 1991）。しかし、上咽頭に存在する味覚器官については調べられていなかったため、著者は、第3章においてその形態的特徴を調べ、3つの双極性の神経細胞が付属していることを明らかにした。本論文は、広食性系統を材料として正常な系統と比較することにより、昆虫の食物選択、摂食行動に関与する味覚の神経機構を明らかにすることを目的としているが、このためには、まず正常な系統を用いてカイコの上咽頭感覚子に存在する味覚細胞の基本的な性質を調べることが必要である。そこで、本章の研究においては、カイコの上咽頭感覚子に付属する味覚細胞からチップレコーディング法を用いることによりスパイク応答を記録し、その性質を明らかにした。

## 材料及び方法

カイコは、日 02 号×中 02 号を用い、人工飼料「くわのはな」によって飼育した。5 齢起蚕後人工飼料を与えて 12~48 時間経過した幼虫の頭部を切り離し、そこから大顎、小腮、下唇を取り除き、パラフィンを流し込んで作ったプレート上に上咽頭部を上面に向けて虫ピンで固定した。上咽頭感覚子の味覚細胞が発するインパルス応答を記録するためには、チップレコーディング法 (Hodgson *et al.* 1955) を用いた。記録電極は、内径 1 mm のガラス微小管を電極プラーによって作成した後、先端径が 5~10  $\mu\text{m}$  程度の適当な形になるように、ティッシュペーパーを先端にあてて破碎し、電極内部には味覚刺激液を充填した。これを油圧 3 次元マイクロマニピュレータに取り付け、実体顕微鏡下で記録電極の先端を感覚子の中心部にかぶせることにより、刺激と記録を同時に行った。不関電極として用いたガラス微小管には、リンガー液 (Narahashi 1963) を充填し、先端を上咽頭近くの体液が露出した部位に接触させることにより、試料を乾燥から防ぐ役割も同時に担うようにした。両電極には白金線を挿入し、不関電極はアースに、記録電極はプローブを通してアンプに接続した。記録電極から伝導される電氣的応答はアンプで増幅した後、オシロスコープによって観察し、FM テープレコーダに記録し、サーマルアレイレコーダによって印刷した。

味覚刺激物質としては、種々の塩、酸、糖、アルカロイド等を用いた。各刺激の間には、上咽頭感覚子を蒸留水により洗ってその前の刺激液が残らないようにした。さらに刺激の直前には、記録電極の先端をティッシュペーパーの小片に軽くあてて、先端部の刺激液を少量吸い取ることによって刺激液の濃度が乾燥によって変わらないように注意した。塩以外の刺激液には電気伝導度をよくするために 20mM NaCl を混入するが、刺激の合間には、20mM NaCl のみに対する応答を記録して、テストする刺激液の応答の対照として比較に用いた。実験は、 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  の実験室内で行った。

## 結 果

上咽頭感覚子から得られた数種の塩類に対する応答の記録例を Fig. 4-1 に示す。100mM の NaCl、KCl、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$  とクエン酸に対しては、比較的大きな振幅のスパイクが常に発火し、その他に頻度の低い 1、2 種の小さなスパイクが見られた。4 個体から記録した結果を比較すると、KCl が最もスパイク頻度が低いが、他の 4 種の塩類のスパイク頻度には大きな差異はなかった。 $\text{CaCl}_2$  に対しては、全く応答がないか希に小さなスパイクが見

られる程度であった。NaClの濃度を変えると、濃度に伴ってスパイク頻度は増加しているように見えた (Fig. 4-1B)。この応答記録から判断して、酸類、糖類、アルカロイド等を刺激液として用いるために混入する電解質として 20mM NaCl を用いることにした。

シュウ酸に対する応答には、2、3種類のスパイクが見られ、2mM、10mM、50mM と濃度とともに頻度が増加した (Fig. 4-2A)。一方、これらのシュウ酸と同じ pH 値 (pH 2.7, pH 2.1, pH 1.5) に合わせた溶液を塩酸によって作成し刺激したところ、シュウ酸と似た応答が得られた (Fig. 4-2B)。この結果は、スパイクを発火している細胞が水素イオン濃度に応答している可能性を示唆する。しかし、50mM シュウ酸または pH 1.5 の塩酸で刺激した後に対照である 20mM NaCl に対する応答を見たところ、順応のない異常なスパイク応答が記録され、正常に戻らない場合が多かった。したがって、酸の濃度が高い場合の応答は、酸によって細胞がダメージを受けた結果発火したスパイクである可能性がある。

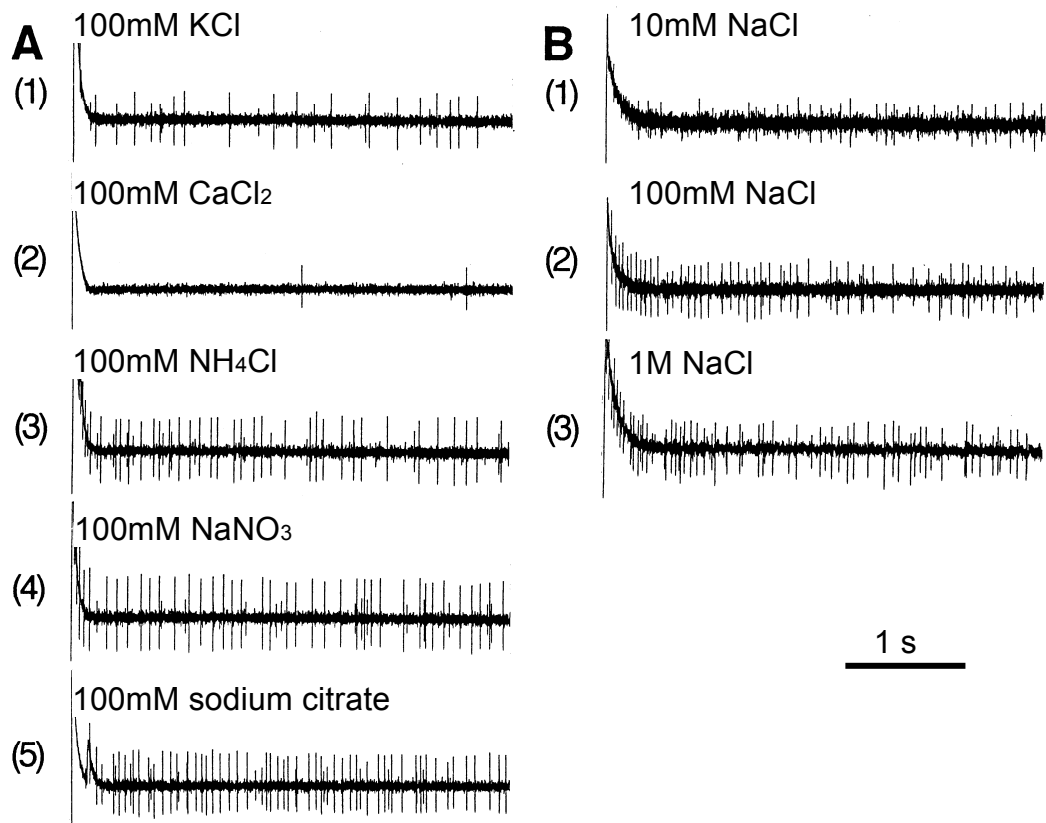
濃度を変えたミオイノシトール溶液に対する応答例を Fig. 4-3 に示す。イノシトール応答のスパイクの振幅は濃度によって変化し、低濃度ではイノシトールに反応するスパイクと NaCl に反応する2種のスパイクの大きい方のスパイクが高さに違いが少ないため、この2つを区別することが困難である場合が多かった。したがって、濃度応答曲線を作る際には総スパイク数を数えることにし、20mM NaCl のみに対する応答値を別に示して比較した (Fig. 4-4A)。このイノシトール細胞のミオイノシトールに対する受容閾値は 0.1mM 程度であり、最大応答値が得られる濃度は 10mM 付近であった。4mM イノシトールに対する応答の順応曲線は phasic-tonic な様相を示し、最初の 500msec の間に急激に減衰することがわかった (Fig. 4-4B)。D-グルコース、ショ糖、D-キシロース、D-リボース、D-フルクトース、D-フコース、 $\alpha$ メチル D-クルコシド、ソルビトール、マンニトール、ダルシトールに対しては明瞭なスパイク応答は見られなかった。したがって、イノシトールに反応する細胞はイノシトール特異的な受容細胞であると思われる。

摂食阻害物質であり、小腮の内側有柄感覚子を刺激することが知られている硝酸ストリキニーネ、ニコチン、サリシンと塩化コリンに対しては、大きな振幅の激しいスパイク応答が記録された。硝酸ストリキニーネに対する応答にみられるスパイクの振幅と頻度は、各刺激の開始から時間とともに、また濃度の増加に伴って増加した (Fig. 4-6(1), (2))。硝酸ストリキニーネに対する濃度応答曲線と順応曲線を Fig. 4-5A, B に示す。20mM NaCl と低濃度の硝酸ストリキニーネに対する応答がよく似ていることから、NaCl に反応するスパイクを発する細胞のうちの1つと硝酸ストリキニーネに反応する細胞とは同じものである可

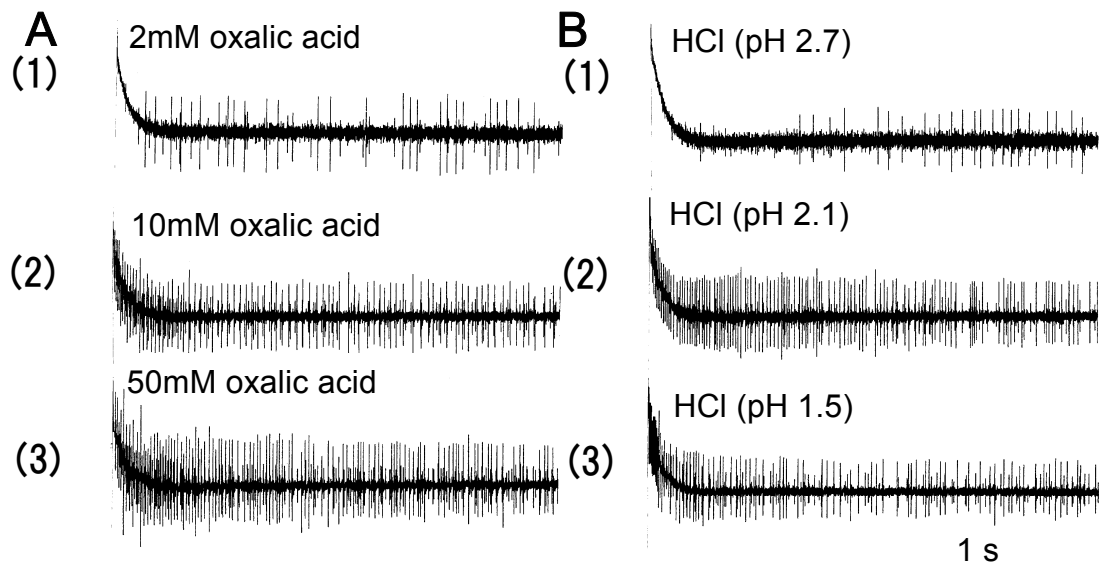
能性がある。硝酸ストリキニーネに対するこの細胞の閾値は約  $0.1\mu\text{M}$  であり、刺激開始後 1 秒間のスパイク数で見ると  $4\mu\text{M}$  までは濃度とともに増加するが、それ以上になるとほぼ一定になった。これは、濃度によって順応の様相が異なることにも起因する。 $4\mu\text{M}$  では、最大の応答に達するまでの遅れが長く、 $100\sim 300\text{ms}$  で最大に達し、その後は 2、3 秒かけて徐々に減衰した。一方、 $0.1\text{mM}$  では、イノシトールの順応曲線と似て、最初の  $200\text{ms}$  で頻度が最大から急激に減衰し、 $300\text{ms}$  付近の応答だけ見れば  $4\mu\text{M}$  の応答より低くなる。ニコチンと塩化コリンに対する閾値は、それぞれ  $0.1\text{mM}$ 、 $10\text{mM}$  であった。

イノシトール受容細胞と硝酸ストリキニーネに応答する細胞が異なることを証明するためにイノシトールと硝酸ストリキニーネの混合溶液によって刺激し、各単一物質の刺激に対する応答と比較した (Fig. 4-6)。その結果、混合液に対する応答には、2つの振幅の異なるスパイクが見られ、その両方とも高い頻度で応答した (Fig. 4-6 (4), (5))。それぞれのスパイクの応答パターンは各単一刺激に対する応答とよく似ており、デターレント細胞の応答は時間と濃度によってスパイクの振幅が変化するが、イノシトール受容細胞のスパイクの振幅は時間によって変化しない様子が、混合液に対する応答にも見られた。

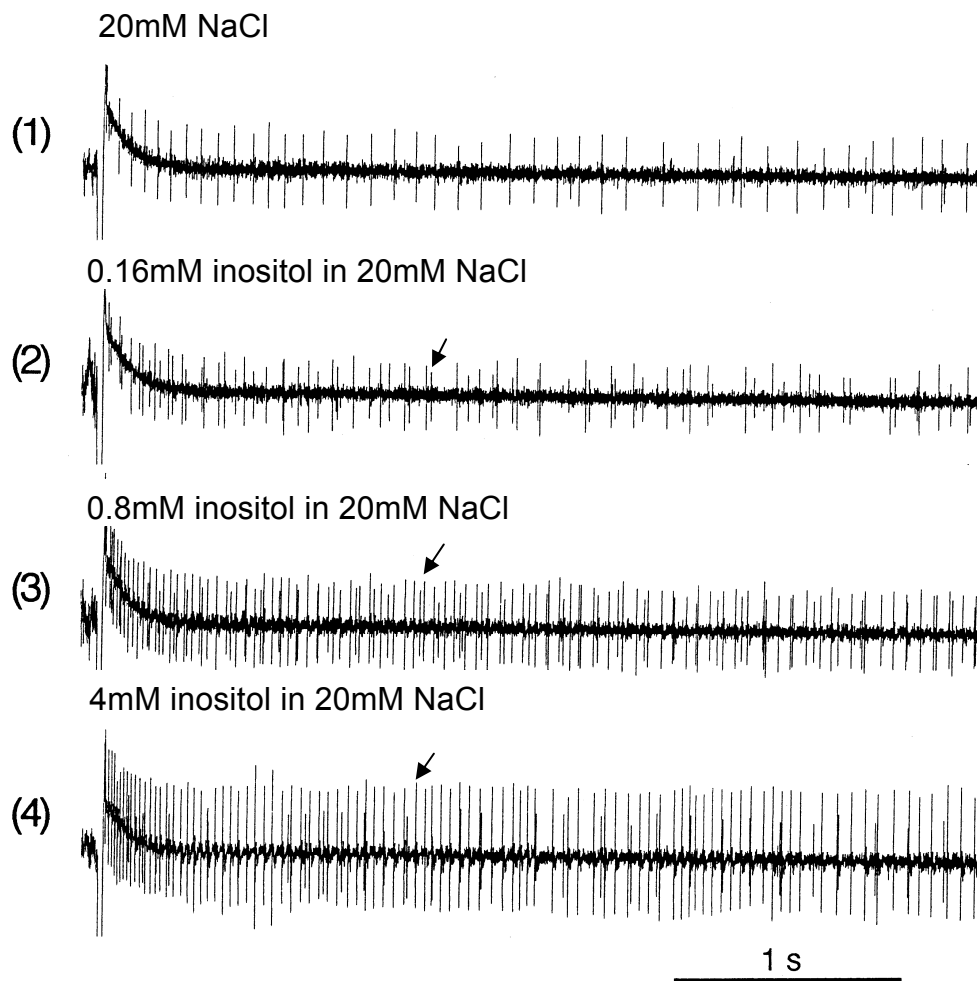
上咽頭感覚子に存在する残りのもう 1つの細胞は、塩や酸類で刺激したときにスパイクを出す細胞のうちの 1つと考えられる。この結論は、クエン酸ナトリウムで刺激したときに 2種類のスパイクが見られ、クエン酸ナトリウムとイノシトールの混合溶液で刺激したときには 3種類のスパイクが見られたことから確かめられた (Fig. 4-7)。



**Fig. 4-1** Responses from an epipharyngeal sensillum to some salts and three different concentrations of NaCl. **A**; (1) 100mM KCl, (2) 100mM CaCl<sub>2</sub>, (3) 100mM NH<sub>4</sub>Cl, (4) 100mM NaNO<sub>3</sub>, (5) 100mM sodium citrate. **B**; (1) 10mM NaCl, (2) 100mM NaCl, (3) 1M NaCl. Each response in the same group (**A** and **B**) was recorded from a single sensillum.

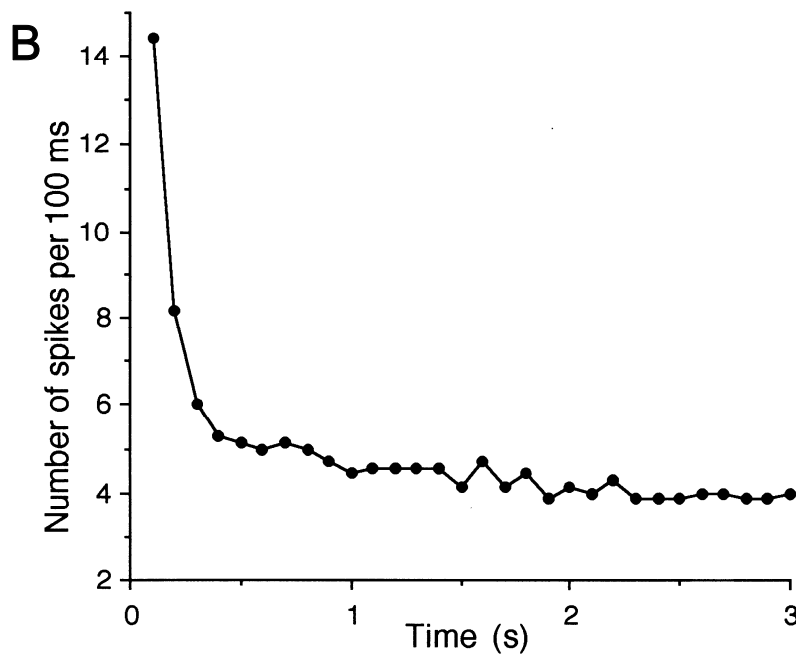
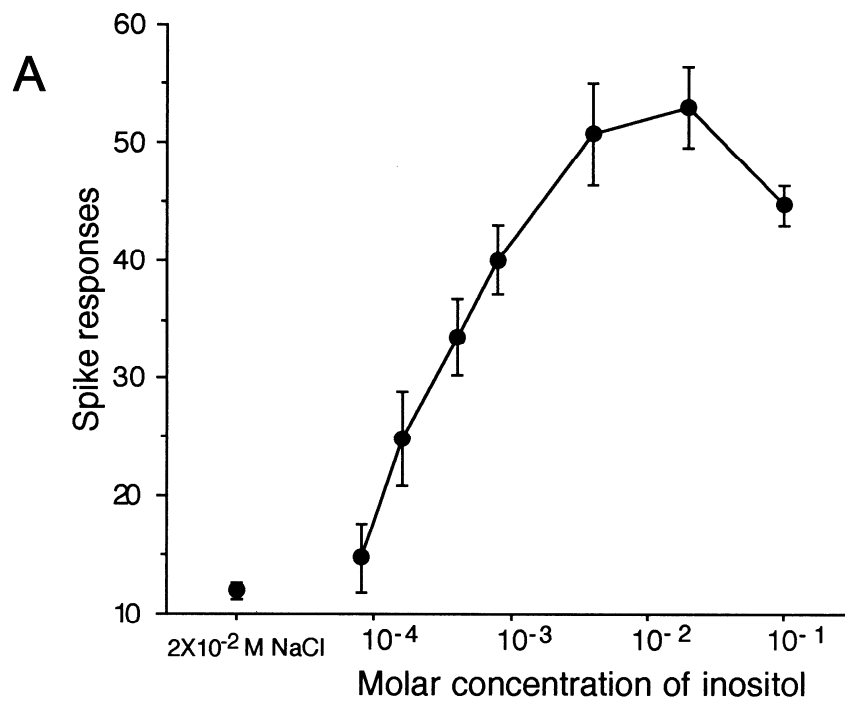


**Fig. 4-2** Responses from a single epipharyngeal sensillum when stimulated with three different concentrations of oxalic acid and with HCl solutions of same pH values as their oxalic acid solutions. **A**; (1) 2mM oxalic acid, (2) 10mM oxalic acid, (3) 50mM oxalic acid. **B**; (1) HCl (pH 2.7), (2) HCl (pH 2.1), (3) HCl (pH 1.5). All stimuli are dissolved in 20mM NaCl.

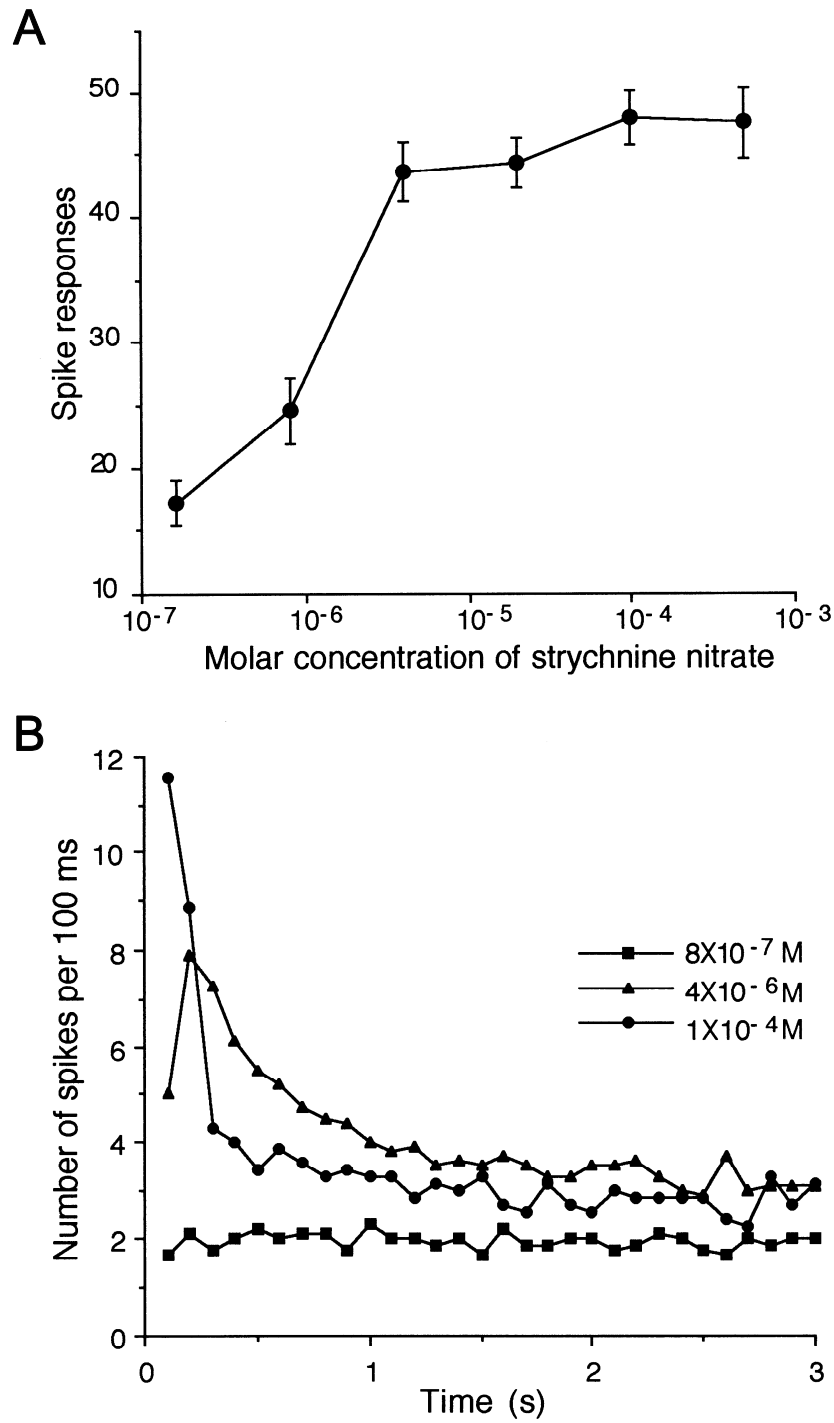


**Fig. 4-3** Responses from a single epipharyngeal sensillum when stimulated with different concentration of myo-inositol. (1) 20mM NaCl, (2) 0.16mM inositol, (3) 0.8mM inositol, (4) 4mM inositol. Inositol was dissolved in 20mM NaCl solution. An arrow in each record indicates one of the spikes generated by the inositol cell.

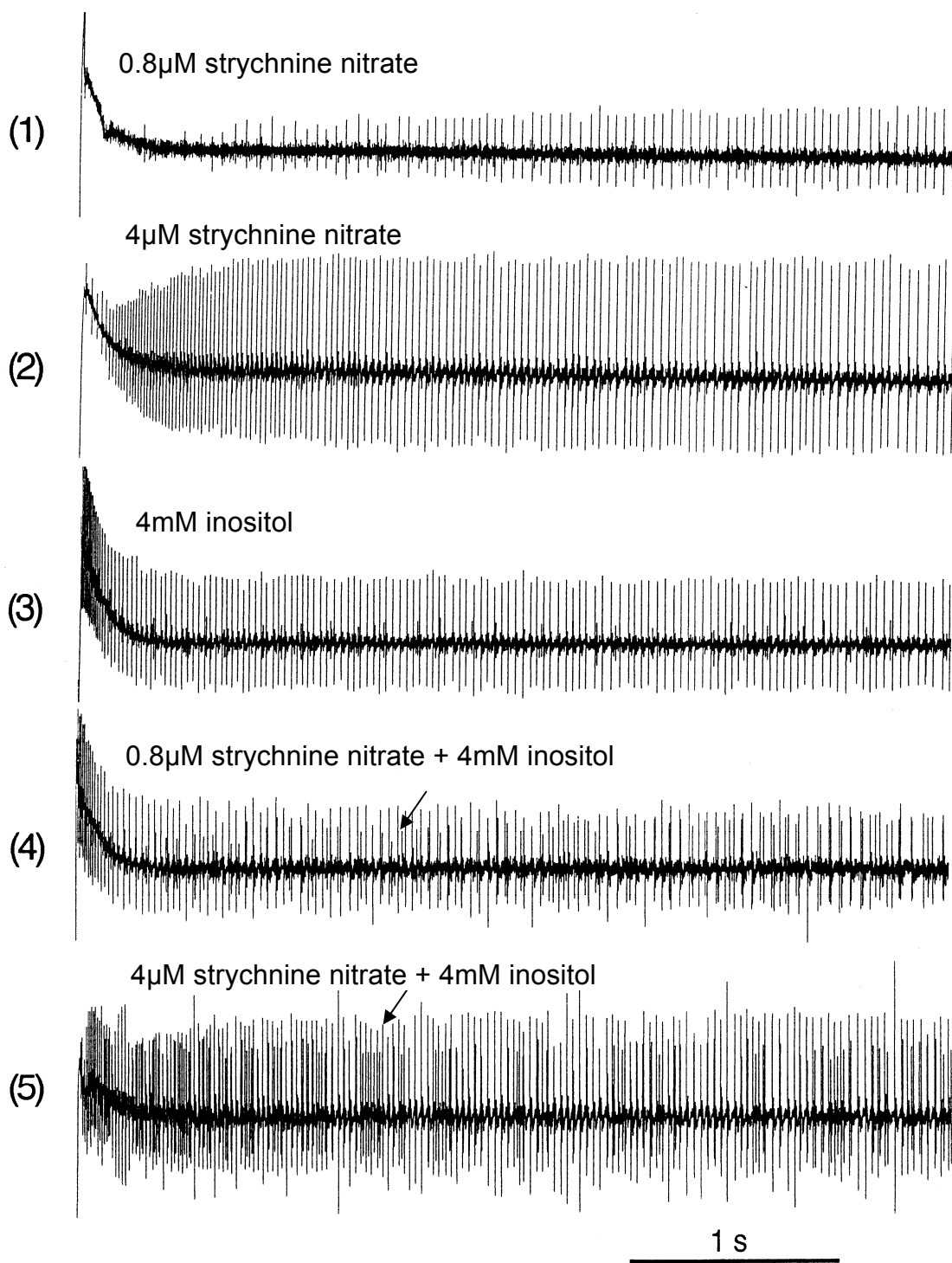




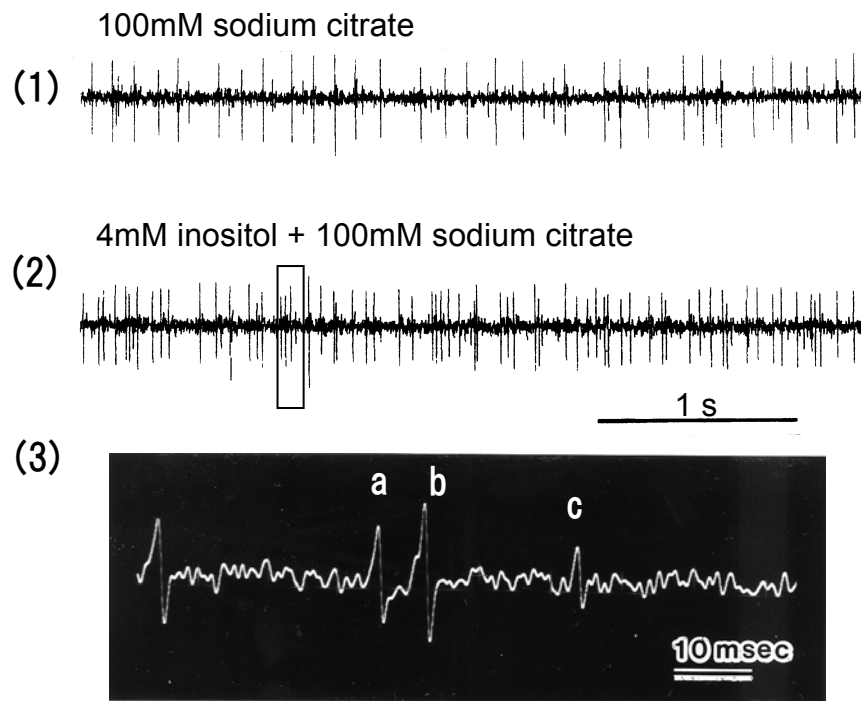
**Fig. 4-4 A;** Dose-response relationship for inositol obtained from nine epipharyngeal sensillum on nine preparations. Spike responses are the mean ( $\pm$ SEM) number of spikes for one second after the onset of stimulation. The mean ( $\pm$ SEM) response to stimulation with 20mM NaCl is shown at the left. **B;** Time course of response to 4mM inositol over three seconds. Each point represents the mean number of spikes for 100ms from 11 epipharyngeal sensilla on 11 preparations.



**Fig. 4-5 A;** Dose-response relationship for strychnine nitrate obtained from nine epipharyngeal sensillum on nine preparations. Spike responses are the mean ( $\pm$ SEM) number of spikes for one second after the onset of stimulation. **B;** Time courses of response to three different concentrations of strychnine nitrate over three seconds. Each point represents the mean number of spikes for 100ms from ten epipharyngeal sensilla on ten preparations for 0.8 $\mu$ M and 4 $\mu$ M and from seven epipharyngeal sensilla on seven preparations for 0.1mM.



**Fig. 4-6** Responses from a single epipharyngeal sensillum when stimulated with strychnine nitrate, inositol, and their mixtures. (1) 0.8 $\mu$ M strychnine nitrate, (2) 4 $\mu$ M strychnine nitrate, (3) 4mM inositol, (4) 0.8 $\mu$ M strychnine nitrate + 4mM inositol, (5) 4 $\mu$ M strychnine nitrate + 4mM inositol. Each stimulus was dissolved in 20mM NaCl solution. Arrows in records (4) and (5) indicate one of the spikes generated by the deterrent cells.



**Fig. 4-7** Responses from a single epipharyngeal sensillum when stimulated with (1) 100mM sodium citrate and (2) 4mM inositol + 100mM sodium citrate. The records begin one second after the onset of stimulations. (3) An oscillograph showing a part of the response to the mixed solution (a rectangle in (2)). Three kinds of spikes can be seen (a, b and c).

## 考 察

カイコの上咽頭感覚子には3つの味覚細胞、イノシトール受容細胞、デターレント細胞、塩受容細胞が存在すると考えられる。鱗翅目昆虫幼虫の上咽頭感覚子のデターレント細胞はオオモンシロチョウ (*P. brassica*)、タバコスズメガ (*M. sexta*)、ヤママユガ (*A. yamamai*)にも存在し、塩受容細胞は、オオモンシロチョウ (*P. brassica*)、タバコスズメガ (*M. sexta*)、*C. fumiferana*の上咽頭感覚子にも存在すると報告されている (Albert 1980; Asaoka and Akai 1991; Glendinning *et al.* 1999; Ma 1972; de Boer and Hanson 1987)。しかし、上咽頭感覚子にイノシトール受容細胞があることを発見したのは本研究のカイコがはじめてである。カイコには、イノシトール受容細胞が小腮粒状体上の外側有柄感覚子にもあり、他の多くの鱗翅目昆虫の幼虫の有柄感覚子にも存在することが報告されている (cf. Schoonhoven 1987; Asaoka and Akai 1991)。上咽頭感覚子のイノシトール受容細胞の順応曲線は石川・平尾 (1963) によって報告されている有柄感覚子のそれとよく似ている。また、著者はヤママユガ幼虫 (*A. yamamai*) のイノシトール受容細胞の順応の様相についても調べ、最初の400msまでに急激に減少するカイコと同様な特有の現象を報告している (Asaoka 1996)。カイコでは、イノシトールはショ糖と混ぜることによってショ糖の摂食促進効果を相乗的に増加する効果があるといわれている (Hamamura *et al.* 1962; 石川・平尾 1963)。また、カイコの成長には、飼料中に少なくとも2mMのイノシトールが必須であり、この量はコリンと同じ程度で他のビタミンB群に比べるとはるかに多いと報告されている (堀江ら 1966)。ミオイノシトールはクワの葉からも単離されており (内藤・浜村 1961; 石川・平尾 1963)、クワの水分含量を70%と仮定して計算するとその濃度は約10mMである。イノシトール受容細胞の閾値は、有柄感覚子と上咽頭感覚子いずれも約0.1mMであり、最大応答に達する濃度も20mM程度である。したがって、これらの受容細胞は、飼料中の必要量のイノシトールの濃度を感知するのに適した性質を持つものと考えられる。

硝酸ストリキニーネに対するカイコの上咽頭感覚子のデターレント細胞の応答は、タバコスズメガの小腮有柄感覚子にあるデターレント細胞のカンナの抽出物やアリストロキア酸に対する応答とよく似た特徴的な応答を示した (Peterson *et al.* 1993, Glendinning *et al.* 1999)。すなわち、スパイクの振幅が刺激開始直後からの時間とともに、また濃度とともに増加する様子が見られた。また、有柄感覚子の糖応答や同じ感覚子にもあるイノシトール受容細胞などの応答に比べて、刺激直後から徐々に頻度が増加し、最大の応答値に達するまでに時間がかかる。カイコには、似たようなデターレント細胞が内側の有柄感覚子にも

あり、同様な応答の特徴を示すとともに、その細胞の興奮と摂食の減少・阻害行動との間に相関関係があることがわかっている (Ishikawa 1966; 石川・平尾 1966)。このタイプの味覚細胞は、特にカイコのような狭食性昆虫においては寄主選択に重要な役割をしていると考えられている (Schoonhoven *et al.* 1992) ので、カイコにおいて小腮の有柄感覚子と上咽頭感覚子の両方に重複して存在することは合理的とも考えられる。

20mM NaCl を含む硝酸ストリキニーネに対する応答には2種類の振幅の大きなスパイクが同時に現れることがないことから、塩に対する応答に見られる大きなスパイクはデターレント細胞のスパイクである可能性が高い。しかし、1 $\mu$ M 硝酸ストリキニーネに 1M NaCl を混合したときの応答は 1M NaCl の応答とほとんど違いがなかったことから、デターレント細胞と塩受容細胞が互いに抑制し合っている可能性も否定できない。この関係は内側有柄感覚子のデターレント細胞と塩受容細胞の関係にもみられている (Ishikawa 1966)。この細胞はおそらく、小腮の外側有柄感覚子にある N1 細胞と内側有柄感覚子にある N2 細胞と似た特徴 (石川・平尾 1963) を持っていると考えられるが、未だ不明な点が残されている。

これまで、カイコの味覚感覚器官の存在と摂食行動におけるその役割が行動実験によって明らかにされ、小腮の切除によって通常は摂食しない植物が摂食可能になることがわかっている (鳥居・森井 1948; 伊藤ら 1959; Waldbauer and Fraenkel 1961; 石川・平尾 1966; 神田 1992)。しかしながら、小腮切除個体であっても非寄主植物を長い時間は摂食しないことが記述されている (鳥居・森井 1948; 伊藤ら 1959)。また、内側有柄感覚子を酸によって不活性化したカイコは、クヌギの葉の抽出物や硝酸ストリキニーネを浸み込ませた濾紙を食べるようになるが、その量は、摂食阻害物質を含ませていない対照の濾紙の摂食量と比較すれば少ない。さらには、糖受容細胞やイノシトール受容細胞がある外側有柄感覚子を不活化した場合も、カイコは糖を検知できるという実験結果も得られている (石川・平尾 1966)。これらの結果から、カイコの口器には未知の感覚子が存在するのではないかという予測がされていた。この小腮だけでは説明できなかった食物選択に関わる味覚識別能力の少なくとも一部は、本研究で明らかになった上咽頭感覚子に依存することは十分考えられる。

Ma (1972) は、オオモンシロチョウを用いて行われた行動実験によって、小腮の味覚細胞は咀嚼を制御し、上咽頭感覚子の味覚細胞は飲み込みを制御すると結論している。Glendinning *et al.* (1999) がタバコスズメガを用いて行った行動実験では、小腮有柄感覚子と上咽頭感覚子を全て切除した場合は、苦味物質に対する摂食阻害作用が見られなくなる

のに対し、小腮有柄感覚子を除去した場合でも、上咽頭感覚子が残っていれば、そのデーターレント細胞が応答する物質に対する摂食阻害作用が、摂食量や咀嚼数などの低下となって行動に現れることを示した。上咽頭は、大顎により咀嚼する度に破碎される餌の断片に接触する口器であることから考えて、カイコの上咽頭感覚子も、最初は小腮の有柄感覚子や小腮肢によって識別して噛み砕いた食物を、再度食べるべき食物かどうかを判断する際に、2番目の味覚器官として寄主選択に関与していると考えられることができる。

## 第5章 日601号×中601号、沢J等の広食性蚕系統の味覚応答

植食性昆虫の食性の範囲を決定する2つの主要因としては、植物中の2次代謝産物がもつ毒作用に対する感受性、すなわち解毒能力の違いと、2次代謝産物の味に対する感受性、すなわち摂食阻害物質の検出能力の違いがあげられる (Krieger *et al.* 1971; Rose 1985; Berenbaum 1991)。植物の2次代謝産物は、単食性・狭食性の昆虫にとっては寄主の存在を示す目印ともなるが、一方でその植物を寄主とし得ない他の多くの昆虫にとっては摂食阻害物質として作用する場合が多い (cf. Bernays and Chapman 1994)。単食性・狭食性の昆虫は、広食性昆虫に比べてより多くの植物種によって摂食が阻害されるため、広食性昆虫は摂食阻害物質に対する味覚の感受性が低く、食性の進化には摂食阻害物質に対する味覚の感受性の変異が関与するのではないかという仮説が提唱されている (Jermy 1966; Bernays and Chapman 1994)。

本章の研究は、カイコの広食性系統を用いてこの仮説を実験的に検証するものともいえる。日601号×中601号、沢J、CSJ02、S2 (*Nps*) などの広食性の系統・個体は、正常の系統・個体が摂食しないような植物種の葉や実を食べるが、植物によっては長時間食べさせると斃死する場合がしばしば観察される (横山・中山 1980; Table 5-1)。これは、これらの系統は植物に含まれる毒物質に対する解毒機構を持っていないためと考えられる。したがって、広食性系統が正常系統に比べて食性が広く、キャベツやLP-1飼料をよく食べるのは、植物や飼料に含まれる摂食阻害物質に対する感受性が低いことが原因である可能性は十分考えられる。第3章では、その原因が感覚器官の形態的な異常ではないことを示した。このため、摂食阻害物質に対する感受性の違いは、味覚細胞における受容過程か、中枢におけるその情報処理の過程にみられる可能性が考えられる。本研究に先駆けて行われた矢澤ら (1991) の研究では、沢Jと日601号×中601号にはサリシンに対する応答が全くないことが報告されており、苦味に対して味盲であることが食性異常の原因であると結論されている。しかし著者は、第2章において行った行動実験において、これらの系統であってもサリシンや硝酸ストリキニーネによって摂食阻害行動が見られ、味覚による阻害が起きている可能性が高いことを示した。そこで本章の研究においては、矢澤らの実験結果とともに、Jermy (1966) や Bernays and Chapman (1994) の前述の仮説を検証するため、広食性系統の異常が発現している場所が味覚細胞であるのかどうかを調べ、広食性系統である日601号×中601号、沢J、CSJ02の味覚



感受性を、特に植物の2次代謝産物である摂食阻害物質の種類と濃度を変えたデターレント細胞の応答に注目し、正常な系統である日137号×支146号、中02号と比較した。

## 材料及び方法

### 蚕系統

沢J、CSJ02、中02号の卵は、蚕糸・昆虫農業技術研究所（現 農業生物資源研究所）の神田氏により、日137号、支146号、日601号、中601号は、同研究所の蚕種製造研究室により分譲いただいた。日137号×支146号と日601号×中601号の交雑は著者の研究室で行った。

広食性系統（日601号×中601号、沢J、CSJ02）の孵化幼虫には、LP-1飼料を与え、3日間経過した後によく生育している個体を選抜した。これを市販の人工飼料（ヤクルト社製原種稚蚕用）に移して飼育を続け実験に供した。正常の系統（日137号×支146号、中02号）については、孵化幼虫から市販の人工飼料を与えた。また、全ての幼虫を、1、2齢は28℃全暗条件で、3、4齢は、25℃16時間明：8時間暗の条件で飼育した。実験には、5齢起蚕後24～36時間経過し、餌を与えていない幼虫を用いた。

### 電気生理実験

小腮粒状体上の2対の有柄感覚子と上咽頭感覚子の味覚細胞からのスパイク応答の記録を、チップレコーディング法を用いて行った（第4章、材料と方法参照）。記録は、A/Dコンバーターによりデジタル化してSAPID tools (Smith *et al.* 1990) を用いて解析し、レーザープリンターにより印刷した。応答値は刺激開始後0.05秒から1秒間のスパイク数とした。得られた応答には、塩受容細胞と思われる小さなスパイクがしばしば観察されるが、多くの場合、1つの細胞の発するより大きな振幅の1種類のスパイクを区別することが可能である。しかし、第4章においても述べたように、スパイクの振幅は濃度や刺激開始後の時間によっても変化することがあるので、目的とする細胞の応答を区別するためには、スパイクの振幅に加えて、スパイク発火の規則的なパターンを考慮した。

刺激と刺激の間には少なくとも2分間は間隔をあげ、刺激の順序は多くの場合、低い濃度から濃度を上げていった。刺激の直前には、記録電極の先端をティッシュペーパーの小片に軽くあてて、先端部の刺激液を少量吸い取ることによって刺激液の濃度が乾燥によって変わらないように注意した。

各刺激物質に対する応答は、各個体から対で存在する感覚子のうちの片側のみの応答を記録し、9~13個体の幼虫を用いた。本実験で得られた応答値は必ずしも正規分布をすることは限らなかったため、図に示した応答値は中央値（±中央絶対偏差）を採用し、Fig. 5-5、Fig. 5-6で行った系統間の比較にはMann-Whitney *U*検定を行った。

## 刺激物質

外側有柄感覚子の糖受容細胞とイノシトール受容細胞の応答は、5系統全てから記録し、それぞれショ糖とミオイノシトールを刺激物質として用いた。さらに、サリシンと硝酸ストリキニーネに対する外側有柄感覚子と上咽頭感覚子のデターレント細胞からの応答を、5系統全てから記録した。沢Jと日137号×支146号については、ニコチン、ブルシン、カフェイン、フロリジン、クマリン、20-ヒドロキシエクダイソン、アルブチン、アミグダリン、塩酸ベルベリン、キニーネ、テオフィリン、塩酸ピロカルピンを刺激物質として内側有柄感覚子からの記録を行った。デターレント細胞の刺激に用いた物質の化学構造をFig.5-1に示す。ニコチンについては、日601号×中601号からも記録した。サリシン、硝酸ストリキニーネ、ニコチン、ブルシン、塩酸ベルベリン、塩酸ピロカルピンはカイコのデターレント細胞を刺激すると報告されている物質である（Ishikawa 1966）。20-ヒドロキシエクダイソンについてもカイコに対する摂食阻害作用とデターレント細胞からの応答が確認されている（Tanaka *et al.* 1994）。全ての刺激物質は、電気伝導性をよくするため、20mM NaClに溶解した。ただし、キニーネについては、メタノールで溶解した後20mM NaClを加えてメタノールの最終濃度が1%になるように調整した。

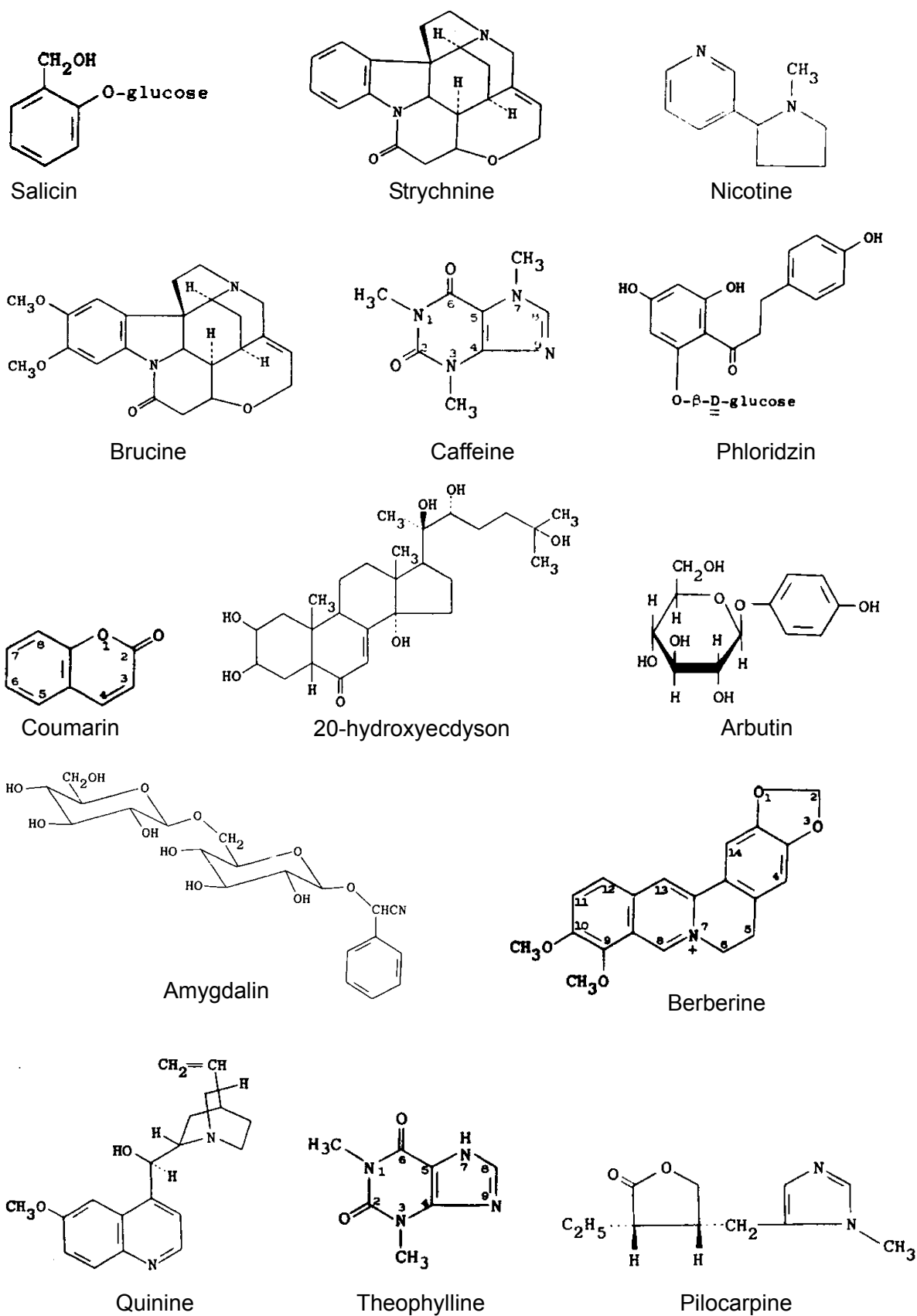
**Table 5-1** Feeding responses of different strains of *B. mori* to the LP-1 artificial diet and different plant tissues.

+: ingest food, -: do not ingest food, ±: some larvae ingest food and others do not

<i>B. mori</i> strains	<i>Morus alba</i> L.	LP-1 diet <sup>1</sup>	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis <sup>2</sup>	<i>Brassica oleracea</i> L. <sup>2</sup>
N137×C146	+	-	-	-
C02	+	-	-	-
N601×C601	+	+	±	-
CSJ02	+	+	+	±
Sawa-J	+	+	+	+

<sup>1</sup> tested with 1st instar larvae (Kanda 1992; Mano *et al.* 1991)

<sup>2</sup> tested with 5th instar larvae



**Fig. 5-1** Chemical structures of stimulants for the deterrent cell (from Merck Index 12th edition, 1996). Strychnine was used as a nitrate salt, and both berberine and pilocarpine were used as hydrochloride salts in this study.

## 結 果

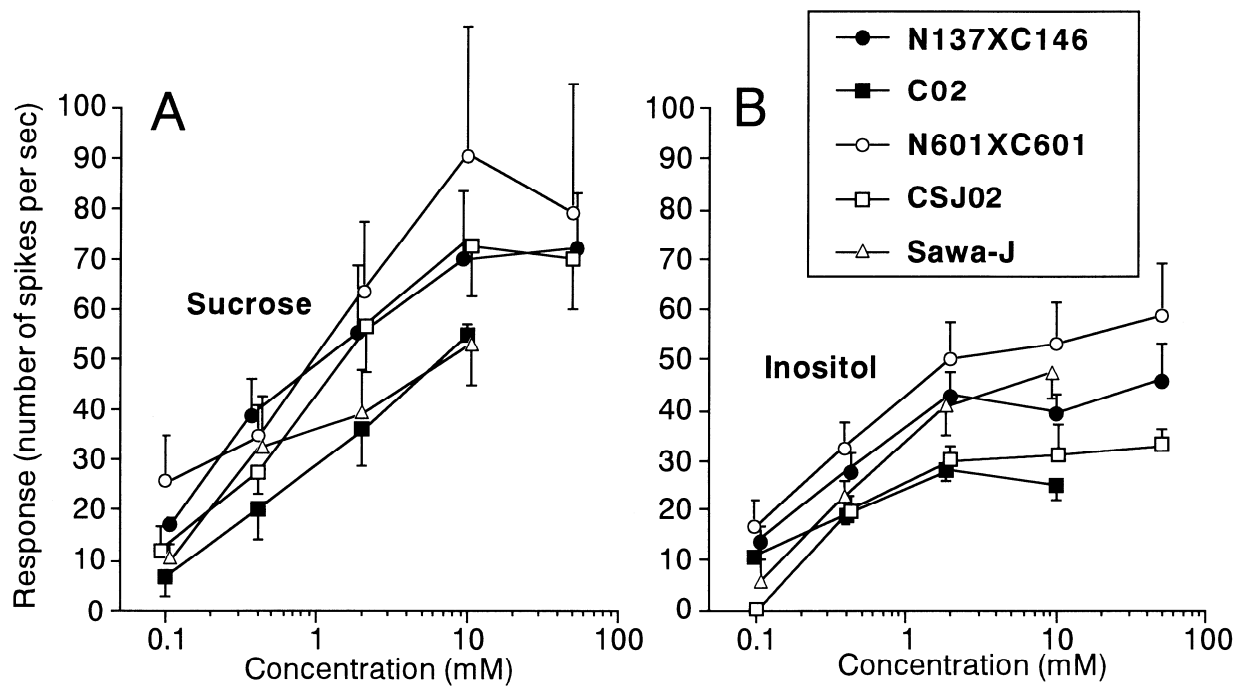
5系統の外側有柄感覚子から記録したショ糖とミオイノシトールに対する応答の濃度応答曲線をFig. 5-2に示す。両物質に対する応答の最大値は日601号×中601号で最も高く、中02号で最も低い傾向がみられたが、食性による違いはないと思われる。ショ糖とイノシトールに対する応答の閾値はどの系統も0.1mM程度であり、最大の応答に達する濃度はショ糖で10mM、イノシトールでは1mMの前後であった。

5系統の内側有柄感覚子から記録したサリシンと硝酸ストリキニーネに対する応答の濃度応答曲線をFig. 5-3Aに示す。硝酸ストリキニーネに対しては、全ての系統で1 $\mu$ M以上の濃度で明らかなスパイク応答が得られた。一方、0.1mM、1mM、10mMのサリシンに対する応答には、特記すべき系統間差異があった。2つの広食性の系統である沢JとCSJ02には、1mMサリシンに対して応答がなく、2つの正常系統の日137号×支146号と中02号には、0.01mMですでにデターレント細胞のものと思われるスパイクが見られた (Fig. 5-3B)。このデターレント細胞のスパイク応答は、一定の大きさの比較的大きな振幅のスパイクが一定の間隔で頻度高く発火する点で、塩受容細胞の応答とは明らかに区別できる。0.001mMサリシンに対する応答のスパイク数は、対照である20mM NaClに対する応答よりも少ない場合が多いが、これはおそらくサリシンが塩受容細胞の応答を阻害しているためと思われる。日601号×中601号の0.1mM、1mMサリシンに対する応答は2つのグループの中間程度であった。これらの結果は、サリシンに対するデターレント細胞の応答の閾値に、広食性系統と正常系統の間には顕著な違いがあることを示している。

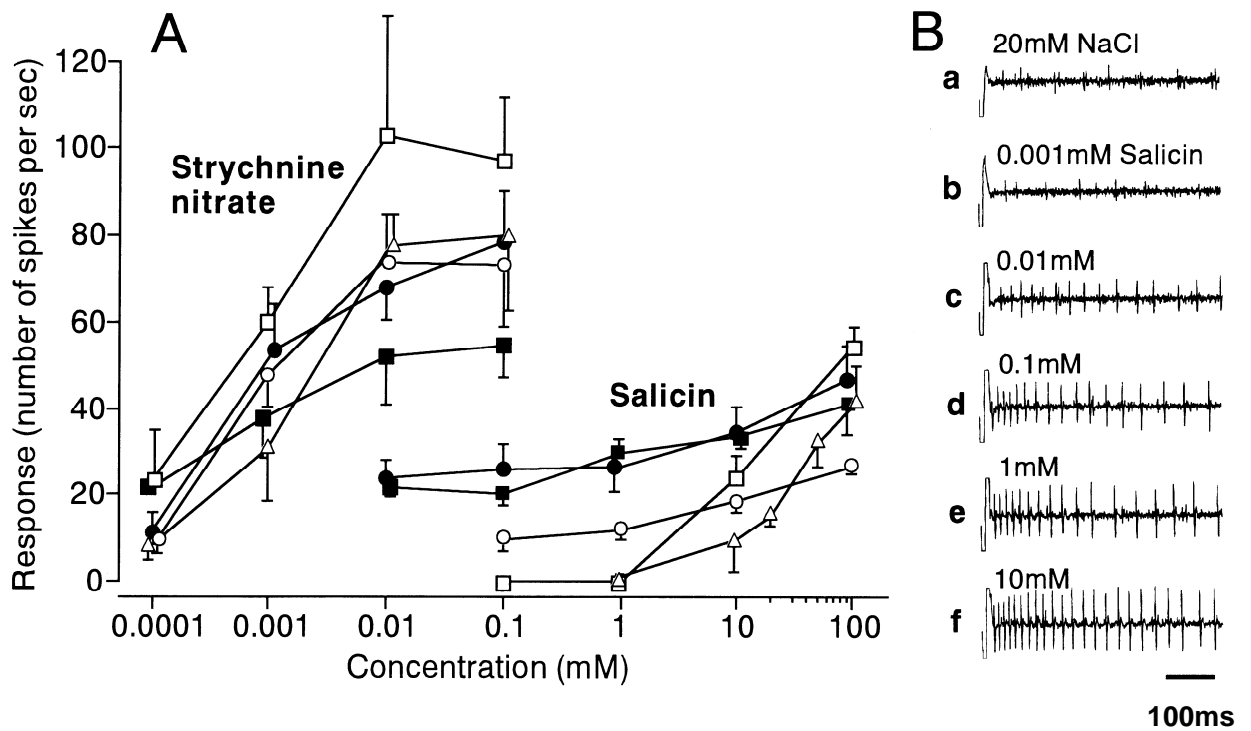
サリシンと硝酸ストリキニーネに対する応答は、上咽頭感覚子に存在するデターレント細胞からも5系統から記録した。その濃度応答曲線をFig. 5-4に示す。応答は、小脛有柄感覚子のものに比較して各濃度で少し低い傾向が見られたが、閾値や系統間の相対的な違いなどのその他の傾向に関しては両者でよく似ていた (Fig. 5-3A参照)。

ニコチン、ブルシン、カフェイン、フロリジン、クマリン、20-ヒドロキシエクダイソンに対する小脛の内側有柄感覚子からの濃度応答をFig. 5-5に示す。フロリジンに対する応答例はFig. 5-6A; b, cにも示したが、他の応答についても典型的なデターレント細胞の応答の様相を示した。系統間の違いではフロリジンに対する応答が最も際立ち、日137号×支146号では、閾値が0.01mM以下の濃度依存的な応答を示すのに対し、沢Jは1mM以下では応答がほとんどなく、1mMでデターレント細胞のものと思われるスパイクがわずかに見られる程度であった (Fig. 5-6A; k, l)。

さらに、日137号×支146号と沢Jの内側有柄感覚子からは、摂食阻害物質又は苦味物質として知られるアルブチン、アミグダリン、塩酸ベルベリン、キニーネ、テオフィリン、塩酸ピロカルピンの1mM溶液に対する応答を記録し、応答例と中間値の応答をFig. 5-6に示した。沢Jにはアルブチン、アミグダリンには全く応答しない個体が過半数を占め、塩酸ベルベリンに対しても応答値は低かった。しかし、塩酸ピロカルピンに対しては日137号×支146号よりも強く応答した (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05$ )。沢Jは日137号×支146号に比べて、対照である20mM NaClに対する応答も弱く (Fig. 5-6A; a, j)、データは示していないが同様な傾向は上咽頭感覚子においても見られた。

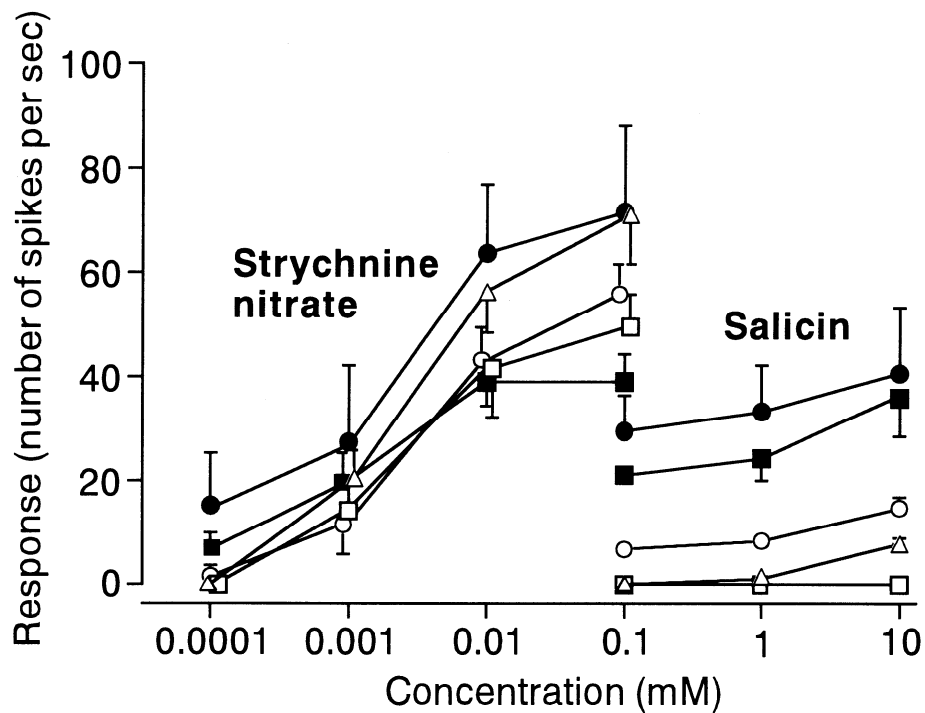


**Fig. 5-2** Sensory response of the sugar (A) and inositol (B) cells from the lateral styloconic sensilla to different concentrations of sucrose and myo-inositol, respectively. I present results from two normal strains (N137×C146, C02) and three polyphagous strains (N601×C601, CSJ02, Sawa-J) of *B. mori*. Responses are quantified by the number of spikes generated from 0.05 until 1.05 s after the onset of stimulation (median ± median absolute deviation (MAD)).

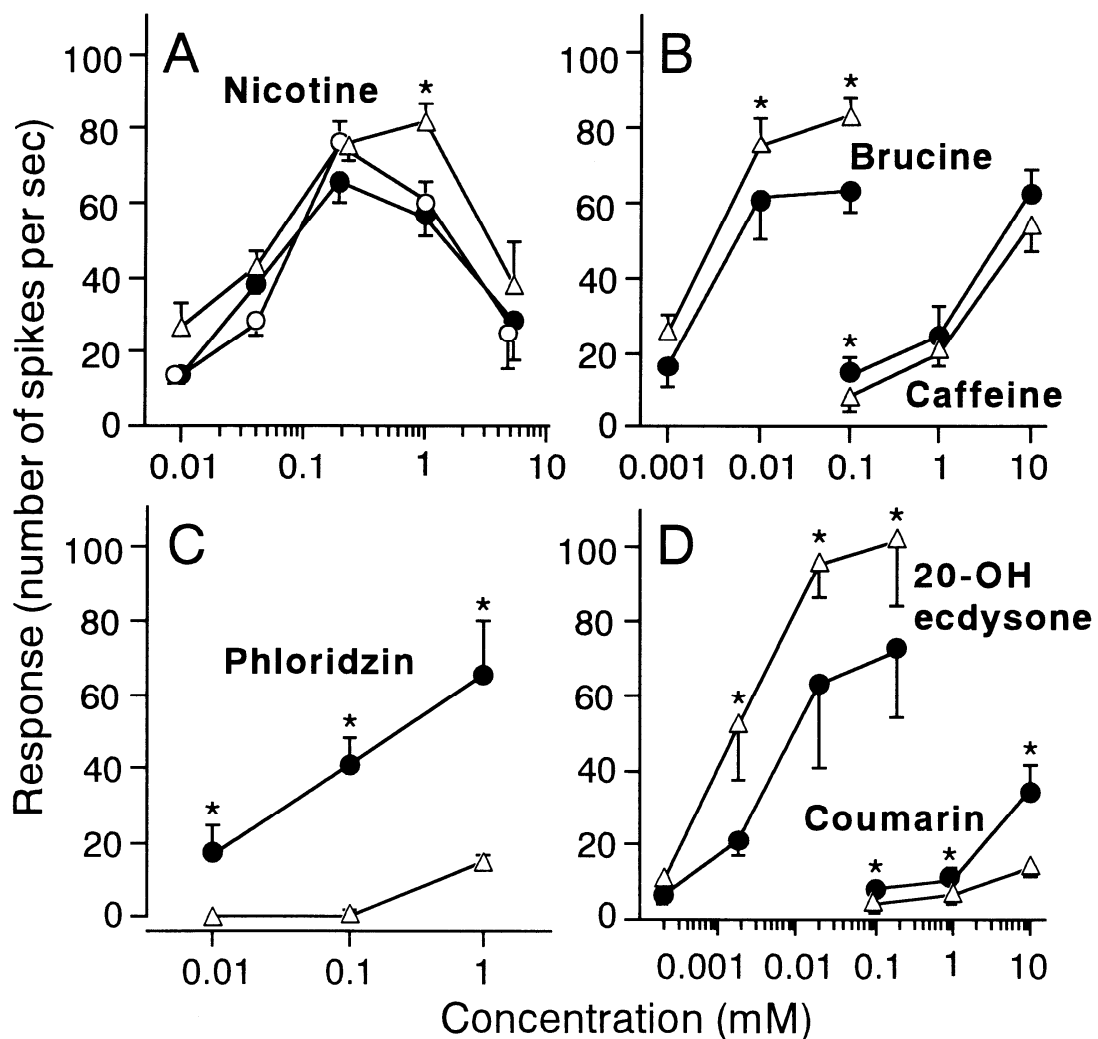


**Fig. 5-3 A;** Sensory response of the deterrent cell in the medial styloconic sensilla to different concentrations of strychnine nitrate (**left**) and salicin (**right**) in two normal strains (closed symbols) and three polyphagous strains (open symbols) of *B. mori*. Symbols as in Fig. 5-1. Responses are quantified by the number of spikes generated from 0.05 until 1.05 s after the onset of stimulation (median  $\pm$  MAD). **B;** Typical records from a single sensillum of a normal strain, N137 $\times$ C146, in response to (a) 20mM NaCl, (b) 0.001mM salicin, (c) 0.01mM salicin, (d) 0.1mM salicin, (e) 1mM salicin, (f) 10mM salicin.

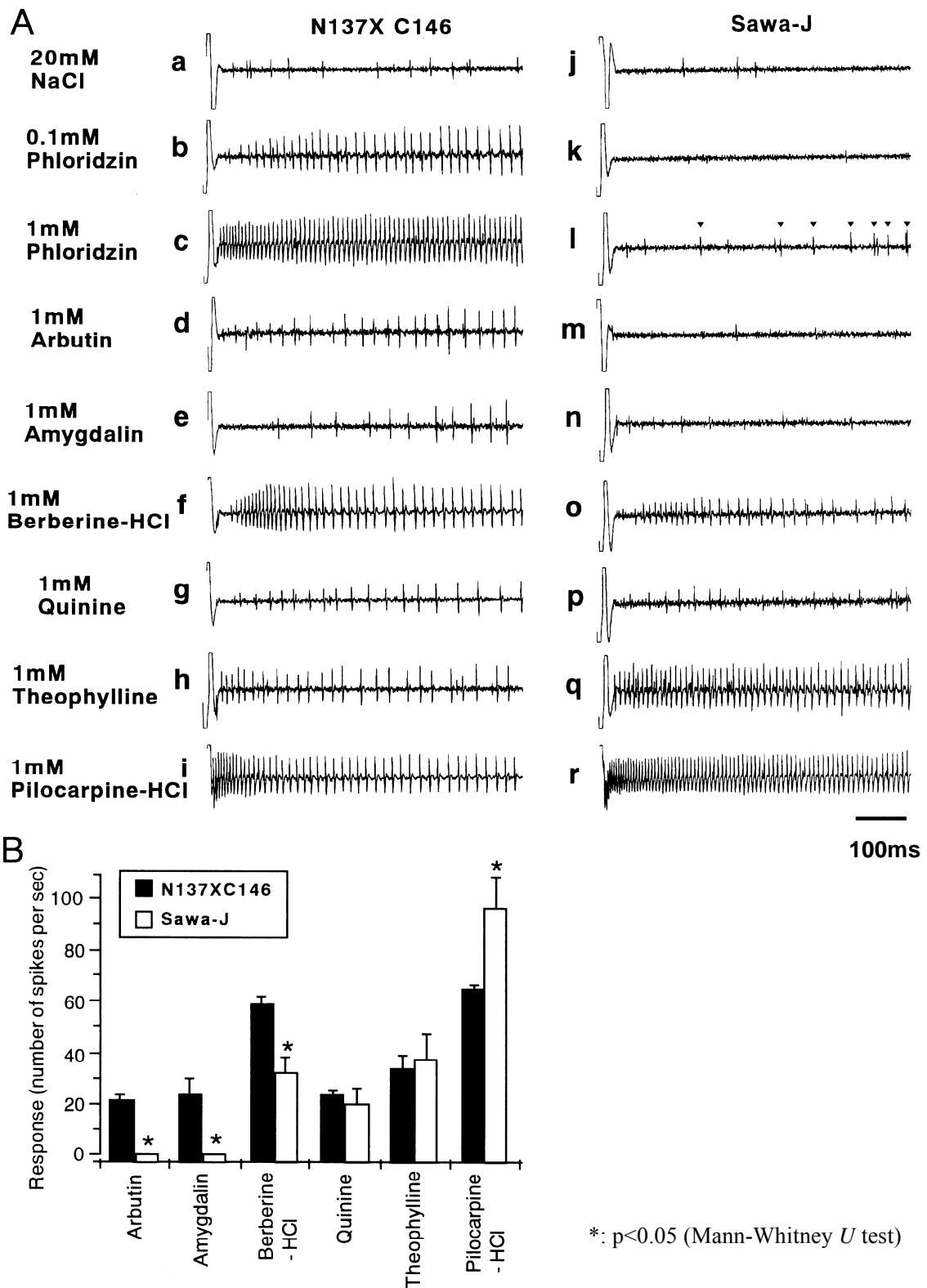




**Fig. 5-4** Sensory response of the deterrent cell in the epipharyngeal sensilla to different concentrations of strychnine nitrate (**left**) and salicin (**right**) in two normal strains (closed symbols) and three polyphagous strains (open symbols) of *B. mori*. Symbols as in Fig. 5-1. Responses are quantified by the number of spikes generated from 0.05 until 1.05 s after the onset of stimulation (median  $\pm$  MAD).



**Fig. 5-5** Sensory response of the deterrent cell in the medial styloconic sensilla to different concentrations of (A) nicotine, (B) brucine, caffeine, (C) phloridzin, (D) coumarin and 20-hydroxyecdysone in N137×C146 (closed circle) and Sawa-J (open triangle). N601×C601 (open circle) was included only for nicotine. Responses are quantified by the number of spikes generated from 0.05 until 1.05 s after the onset of stimulation (median ± MAD). Asterisks indicate significant differences between N137×C146 and Sawa-J, tested separately for each compound and concentration (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05/5$  for nicotine,  $p < 0.05/4$  for 20-hydroxyecdysone, and  $p < 0.05/3$  for brucine, caffeine, phloridzin and coumarin).



**Fig. 5-6** Sensory response of the deterrent cell in the medial styloconic sensilla of N137×C146 and Sawa-J. **A**; Examples of records in N137×C146 (**a-i**) and Sawa-J (**j-r**), in response to 20mM NaCl (**a, j**), 0.1mM phloridzin (**b, k**), 1mM phloridzin (**c, l**), 1mM arbutin (**d, m**), 1mM amygdalin (**e, n**), 1mM berberine-HCl (**f, o**), 1mM quinine (**g, p**), 1mM theophylline (**h, q**), and 1mM pilocarpine-HCl (**i, r**). Arrowheads in **l** indicate the presumed deterrent spikes. **B**; Median (+MAD) responses to each deterrent compound at 1mM in N137×C146 and Sawa-J quantified by the number of spikes generated from 0.05 until 1.05 s after the onset of stimulation.

## 考 察

サリシンに対する応答の閾値は、小腮の有柄感覚子と上咽頭感覚子のどちらのデターレント細胞においても、3つの広食性系統（日601号×中601号、沢J、CSJ02）は2つの正常系統（日137号×支146号、中02号）に比べて高く、100倍以上である場合もあった。また、濃度応答を調べてはいないので確かではないが、沢Jにおいて1mMのアルブチンとアミグダリンの応答が低いのは、それらの物質に対する閾値が1mMより高いためである可能性が高い。沢Jのカフェイン、クマリン、塩酸ベルベリンに対する感受性も顕著な差ではないが、低い傾向がある。

矢澤ら（1991）は、沢Jと日601号×中601号は10mMのサリシンに対して全く応答しないことを報告しており、広食性系統はデターレント細胞の感受性が消失した「味盲」であるとしている。しかしながら今回著者の行った実験では、この2系統とCSJ02を加えた広食性系統はいずれもサリシンに対して完全に感受性を失っているわけではなく、高濃度においては応答が見られることがわかった。さらには、硝酸ストリキニーネに対する濃度応答に関しては正常系統との違いはなかった。したがって、広食性系統のデターレント細胞は感受性を完全に失っているわけではなく、少なくとも味覚細胞のレベルで摂食阻害物質を検知することは可能であることが明らかとなった。沢Jのデターレント細胞は他のアルカロイド溶液に対しては正常に応答しており、むしろニコチン、ブルシン、塩酸ピロカルピン、20-ヒドロキシシエクダイソンの場合には、応答値は正常系統に比べて高かった。

広食性系統に共通する特徴は、デターレント細胞がサリシンを含む何らかの物質のグループに対して感受性が低いことである。この感受性の違いがカイコの食性範囲を支配している可能性がある。すなわち、広食性系統のカイコが通常はカイコが摂食しない餌を食べることができるのは、正常な系統のカイコのデターレント細胞には強く応答するが、広食性系統のカイコのデターレント細胞には応答しない物質がその餌に含まれているからではないかという推測が成り立つ。このことは、摂食阻害物質に対する感覚細胞の感受性が、植食性昆虫の寄主範囲を決定する大きな要因であるとするJermy（1966）の仮説に一致するものである。カイコにおいては、同様な結論は既に行動実験により出されており、デターレント細胞を含む小腮の内側有柄感覚子を酸により不活性化することにより摂食阻害作用が抑えられるという報告がある（石川・平尾 1966; Ishikawa 1966; Ishikawa *et al.* 1969）。本研究は本来、これらのこれまでの知見から考えて、広食性系統はデターレント細胞の感受性が低いのではないかという予測の元に行ったものであるが、実際にその事実を明らかにすることができた。

しかし、広食性蚕の摂食行動を支配する遺伝子にはいくつかの修飾遺伝子の関与が指摘されていることから（神田 1992; 田島・大沼 1991; Tazima 1994）、デターレント細胞に見られたある特定の物質に特異的な感受性の欠如が、広食性系統の食性を支配する唯一の要因であると結論するのは早計であろう。たとえば、沢 J は塩に対しても感受性が低い傾向があったが、これが摂食行動に影響を及ぼすことも考えられる。匂いに対する反応が異なるかもしれないし、今後中枢神経系に異常が見つかる可能性も否定できない。

一方、今回の実験結果から、カイコのデターレント細胞には複数の受容サイトがあることが推論できた。すなわち、日137号×支146号に比べて沢 J の感受性が低かった物質は、サリシン、フロリジン、アルブチン、アミグダリンであるが、これらはすべて糖鎖のある芳香環をもつO-グリコシドである（Fig. 5-1参照）。そこで、デターレント細胞にはアルカロイドや他の物質を受容する部位とは異なるO-グリコシドの受容部位が存在し、沢 J は、このO-グリコシド受容部位のどこかに異常があるという可能性がある。同様な推察は他の鱗翅目昆虫の幼虫のデターレント細胞においてもすでに報告されており、ヨトウガ (*Mamestra brassicae*) の遺伝的に異なる2つの系統の味覚応答の違いから、グリコシド受容細胞には少なくとも2つの受容部位が存在するといわれている (Wieczorek 1976)。また、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) のサリシン受容細胞には多くの場合グルコースと結合した芳香環を持つ物質を受容するサイトとプリン骨格を持つ物質を受容する部位の2つがあると報告されている (Schoonhoven 1972)。Glendinning and Hills (1997) はタバコスズメガのデターレント細胞に存在する複数の受容部位を交差順応の手法を用いて証明している。著者の行った本研究においてカイコのデターレント細胞に存在すると推測されたO-グリコシド受容部位はこれらの受容部位の1つとよく似たものであるかもしれない。

ある特定のグループの苦味物質に対する受容の欠失は、脊椎動物においてもよく知られている。我々ヒトにおいては、フェニルチオカーバマメイト (PTC) に対する味盲が有名であり、Fox (1931) によりはじめて報告された。このPTC味盲はマウスにおいても見つかっている (Klein and DeFries 1970)。マウスではこの他、キニーネ味盲 (Lush 1984)、sucrose octaacetate (SOA) 味盲 (Warren and Lewis 1970) も報告されている。SOA味盲マウスの場合、行動に現れた味覚感受性を支配する遺伝子は、電気生理的な味覚の応答や (Shingai and Beidler 1985)、情報変換過程に関与すると考えられているinositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) の生成 (Spielman *et al.* 1992) と強い相関があることがわかっている。昆虫においては、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) で、糖類、塩、キニーネの受容に関する行動のミュ

ータントが得られており、そのうちのいくつかは味覚応答の違いに起因することがわかっている (Isono and Kikuchi 1974; Falk and Atidia 1975; Rodrigues and Siddiqi 1981; Arora *et al.* 1987)。最近、脊椎動物を含めてはじめてリガンドが確定した味覚受容体の遺伝子としてトレハロース受容体が単離されたが、これはこのうちのトレハロースに対する行動突然変異を利用してはじめてなすうるのものであった (Ishimoto *et al.* 2000; Ueno *et al.* 2001)。ショウジョウバエの嗅覚のミュータントについても詳細な遺伝解析が行われており、イオンチャンネルや他の情報変換経路に関係することを証明している (cf. Carlson 1996)。

今回用いた広食性カイコは、植食性昆虫の味覚受容のメカニズム、特に脊椎動物の苦味に相当するデターレントの受容メカニズムを解明するための優れた材料になる可能性を秘めている。沢 J などに見られたデターレント応答の欠失は、マウスやショウジョウバエにおいて証明されたように、味覚受容体やそれに特異的な情報変換や伝達の経路のどこかに作用するタンパク質の遺伝子に異常があるためかもしれない。

## 第6章 食性異常突然変異蚕 *Nps* の摂食行動とその味覚の関与について

電気生理学的手法を用い、沢 J、CSJ02、日 601 号×中 601 号の 3 つの広食性系統の味覚応答を解析した前章の研究では、O-グリコシドと思われる 1 群の物質に対して、デターレント細胞の感受性が低いことがわかった。これらの 3 つの蚕系統では第 3 連関群（染色体）に座位する劣性の遺伝子 *pph* が摂食行動に重要な影響を及ぼしていると考えられる（神田 1992; 第 1 章）。もちろんこれは *pph* の作用部位の候補の 1 つに過ぎないが、カイコの食性に関与するとされている突然変異遺伝子の存在はこの他にも数多く報告されているにもかかわらず、*pph* 以外の突然変異遺伝子の発現形質については全く明らかになっていない状況である。唯一、味覚細胞の生理的性質が調べられたのは、“非選好性（Non-preference）”の突然変異 *Np*（Tazima 1989; 田島ら 1984）であるが、石川ら（1963）は、この系統の味覚応答には異常はないことを報告している。

本章における研究は、これらの食物選択に関与する遺伝子の中でも *Nps* に着目して行った。この *Nps* (“Non-preference Shokei”) は、雄の蛹に  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$  線を照射した中国種「諸桂」の後代からフダンソウの摂食個体を選抜することによって明らかになった食性異常突然変異遺伝子である（田島・大沼 1986）。*Nps* 遺伝子は *Np* とは異なり第 3 連関群上に座位し、染色体異常を伴うことがわかっている（大沼・田島 1989, 1990）。

既に第 3 章において、*Nps* 遺伝子保有個体には味覚器官の外部形態に異常は認められないことを明らかにした。本章における研究の目的は、*Nps* 遺伝子を持つ食性異常突然変異カイコの異常形質を探索し、食物選択を支配する神経機構を調べることにある。そこでまず、摂食する植物の種類、人工飼料の摂食性に関するデータを集積するとともに、特に苦味物質に対する行動を第 2 章で調べたような摂食行動の時間的解析を行うことによって、どのような行動異常が発現しているのかを調べた。次に、*pph* 遺伝子を持つ系統と同じように *Nps* 遺伝子保有個体も味覚異常を伴うのか、第 5 章と同様な電気生理学的手法を用いて調べた。さらに、中枢神経系における異常の可能性を考え、味覚細胞の軸索の投射形態の観察を行った。

## 材料及び方法

### 蚕系統

*Nps* 突然変異遺伝子を持つ S2 系統 (大沼・田島 1989) のカイコ卵は、蚕品種研究所 (現蚕業技術研究所) の大沼氏からいただいた。この系統は、*Nps* 遺伝子に形質マーカーとして *Ze* 遺伝子が連鎖されており、幼虫の各体節にある黒い縞模様によって *Nps* 遺伝子保有個体を区別できる。*Nps* 遺伝子はホモ致死であるため、*Nps* 遺伝子を持つ個体は全て *Nps* 対立遺伝子に関してヘテロである。また、雌では交差が起こらないことから、*Nps-Ze* ヘテロの雌と正常個体の雄を交配することによって得られた卵から孵化した幼虫は、*Nps-Ze* 個体と正常個体 (+*Nps*-+*Ze*) が 1 : 1 で分離する。

一方、味覚細胞の軸索投射部位をホールマウント観察により調べる際、通常のカイコでは神経節の表面が紫褐色の色素顆粒で覆われているために神経節の内部で染色されるニューロンの観察が困難になる。そこで、蚕糸・昆虫農業技術研究所 (現 農業生物資源研究所) の遺伝素材研究室よりこの色素が見られない *w-2* 遺伝子を持つ系統の分譲を受け、S2 系統の *Nps-Ze* 個体の雌に *w-2* 系統の雄を交配し、さらに *w-2* 系統に戻し交配して、第 3 連関群上の *Nps-Ze* に加え、第 10 連関群上に *w-2* 遺伝子を持つ新たな系統を作成した。軸索投射部位の形態観察のほか本章における摂食行動実験はこの系統を用いて行った。

幼虫は、クワで飼育した場合と人工飼料で飼育した場合の比較を行った摂食行動実験を除き、1 ~ 2 齢を 28°C 全暗で、3 ~ 5 齢は 25°C、16 時間明:8 時間暗の条件下で市販の人工飼料により飼育した。摂食行動実験及び味覚応答の電気生理実験では、4 眠脱皮後絶食下で 1、2 日経過した 5 齢幼虫を用い、同じ母蛾から得られた卵から分離した同数の遺伝子型の異なる個体 (*Nps* 遺伝子保有個体のはずであるが、*Ze* の体表模様で判断したため、以下 *Ze* 個体と +*Ze* 個体と呼ぶ) を抽出して比較した。味覚細胞の軸索投射形態を調べる実験には 4 眠脱皮後、人工飼料を摂食して 1、2 日経過した幼虫を任意に抽出して用いた。

### 摂食行動実験

*w-2* を付与した *Nps-Ze* 系統の *Ze* 個体と +*Ze* 個体間の摂食性の違いを調べるため、まず、予備的な実験として、1 ~ 2 齢を原種稚蚕用シルクメイト (日本農産工業)、3 ~ 4 齢を交雑種用シルクメイト 2M (日本農産工業) で飼育し、4 眠脱皮後絶食下で 2 日経過した 5 齢幼虫を用い、研究所内に植栽されている数種類の植物の葉を与えて約 5 分間の摂食の程度を観察した。つぎに、同様に人工飼料で飼育した 5 齢幼虫とともに 1 ~ 4 齢をクワで飼



育し4眠脱皮後絶食下で2日経過した5齢幼虫を用い、LP-1飼料、広食性蚕品種用シルクメイト4LM（日本農産工業）、及び交雑種用シルクメイト2M（日本農産工業）の3種類の人工飼料に対する摂食性を調べた。このとき、Ze個体と+Ze個体それぞれ10頭ずつの幼虫を70×100×30mm（縦、横、深さ）のタッパー容器に入れて各飼料を給与後、25℃で24時間経過した時点での廃糞数を摂食性の指標とした。この実験を飼育時期、蛾区の異なる4回に分けて行い、Ze個体と+Ze個体それぞれ合計10区として統計処理を行った。

一方、摂食阻害物質に対する摂食行動をさらに詳しく調べるために、第2章において行った摂食行動の時間的解析を行った。実験方法は第2章と同様であるが、以下簡潔に記載する。1～4齢をヤクルト社製原種稚蚕用人工飼料で飼育し、5齢起蚕後絶食条件下で26±2時間経過した幼虫を用いた。10%桑葉粉末を含むLPペレット飼料（Table 2-1, 須藤ら1995）に、乾燥飼料の2倍の重量（v/w=1.0）のテスト溶液（蒸留水、100mM サリシン、0.05mM 硝酸ストリキニーネ）を浸み込ませて18×32mmのカバーグラスにのせ、濾紙を敷いた9cm径シャーレの中央に置き、幼虫を飼料から10mm程度の距離に置いて150mm径のシャーレで蓋をかぶせた後Observer 3.0（Noldus 1991）を用いて記録を開始した。1回の観察には2つの遺伝子型をもつ幼虫と3種類のテスト飼料の組み合わせからなる6サンプルを同時に観察し、25±1℃の空調下の実験室内で「摂食（feeding）」、「静止（resting）」、「探索（exploring）」の3つの状態に分類した行動を45分間記録した。各個体について記録された時間から4つのパラメータ（すなわち（a）合計摂食時間、（b）合計探索時間、（c）実験開始後最初の1分間以上の連続した摂食が始まるまでの潜時（latency）、（d）各1つづきの摂食時間の長さの平均）を算出し、同じ遺伝子型の幼虫の中での対照飼料（蒸留水）と苦味物質の処理飼料（100mM サリシンと0.05mM 硝酸ストリキニーネ）の間の比較と、同じ飼料におけるZe個体と+Ze個体の間での比較を、Mann-Whitney U検定を用いて行った。ただし、有意差の検出レベルは前者（飼料間の比較）は $\alpha=0.05/2$ とし、後者（遺伝子型間の比較）は $\alpha=0.05$ とした。各試験区について20個体を供試したが、中には全く摂食しなかった個体や、摂食しても1分間以上の連続した摂食が見られなかった個体が存在したため、潜時及び各摂食時間の長さの平均のデータを統計解析する際にはこれらの個体を除外して行った。

#### 味覚スパイク応答の電気生理実験

第5章における実験と同様に、4眠脱皮後絶食下で1日経過した5齢幼虫の小腮粒状体

の外側有柄感覚子に存在する糖受容細胞とイノシトール受容細胞、及び、内側有柄感覚子に存在するデターレント細胞の応答をチップレコーディング法を用いて記録した。本実験においては頭部を切り落とさず生きたまま記録する方法を考案した。すなわち、幼虫の動きを抑制するために、腹面を上にして背部をデンタルワックス（GC Co. Ltd.、青）で軽く押しつけて固め、さらに幼虫の体をワックスとともにパラフィルムにより巻いた。また、口器の周りをさらに細かいパラフィルムの小片で巻いて小腮を突き出して露出させて固定した。また、先端を鋭く尖らせた白金線を小腮の近くに刺入し、不関電極とした。記録された応答は 50-3000 Hz のバンドパスフィルターを通して増幅し、刺激開始後 0.05 秒から 1.05 秒の間のスパイク数を数えて応答値とした。

刺激液は濃度の異なるショ糖、ミオイノシトール、硝酸ストリキニーネ溶液を作成し、電解質として 20mM NaCl を含むように調整した。刺激と刺激の間の時間を少なくとも 3 分おき、刺激の順番は通常は低い濃度から行った。1 つの幼虫からは、対で存在する感覚子の片側のみを用い、9 個体から記録した。各濃度の刺激液に対する応答値と刺激開始後の各時間単位におけるスパイク数を Mann-Whitney *U* 検定法 ( $\alpha=0.05$ ) を用いて遺伝子型間で比較した。

上咽頭感覚子からの記録は今回は数多く行わなかったが、2、3 個体から第 4 章で行われた方法で記録した。小腮肢の先端部に通常 5 つ存在する単孔の感覚子も味覚感覚子であることが予想されるが、サリシンや硝酸ストリキニーネに対して応答しないことを確認している（第 3 章参照）。今回の実験ではこれらの感覚子からの応答は記録しなかった。

### 味覚感覚子神経の中樞投射経路の観察

小腮粒状体上のそれぞれの有柄感覚子に付属する神経細胞の軸索の中樞投射経路を、コバルト-リジン複合体を感覚子から順行性に拡散させ、発色させて観察した。幼虫の感覚子を露出固定させる操作は電気生理実験の項で述べた方法と同様に行った。片側の小腮について外側又は内側の有柄感覚子のいずれか 1 つの周囲をワセリンで囲んで、その中にコバルト-リジン複合体の溶液（和光製薬）を感覚子先端部が十分浸るように入力し、さらに乾燥を防ぐために、その上からワセリンで蓋をした。この状態で 20°C のインキュベータに 24 時間放置した後、解剖して脳-食道下神経節連合を取り出し、カイコ用リンガー液 (Ai *et al.* 1994) に浸した。この液中に硫化水素を 30 秒間泡立たせて通し、硫化コバルトの沈殿ができるように 5 分間放置した。その後神経節をリンガー液で洗浄し、アルコールブア

ン液で固定した。さらに Timm の硫化物—銀増感法を改変した方法 (Bacon and Altman 1977) を用いて増感し、アルコールシリーズによる脱水、サリチル酸メチルによる透徹を行って顕微鏡下でホールマウント観察を行った。染色された神経細胞は、カメラルシダを用いてトレースした。

## 結 果

### 摂食行動

w-2 を付与した *Nps-Ze* の系統の異なる遺伝子型の個体間の摂食行動 (摂食性) は、各種の植物葉 (Table 6-1) 及び人工飼料 (Fig. 6-1) を与えた場合にも明らかに異なった。植物や人工飼料の種類による摂食性の違いは *Ze* 個体、+<sup>Ze</sup> 個体ともに存在し、その傾向はよく似ていた。すなわち、植物葉ではシンジュ、クチナシが、アジサイ、ドクダミ、キハダ、カエデに比較して摂食性が高く、人工飼料では 2M、4LM、LP-1 の順に摂食性が高かった。2M 飼料に対する摂食性が高いのは、4 歳までの餌が 2M 飼料であったことが影響している可能性も考えられるが、クワで飼育してきた場合にも同様な傾向は認められた。クワで飼育した場合の 3 種人工飼料に対する摂食性は、*Ze*、+<sup>Ze</sup> 個体ともに 2M 飼料で飼育した場合に比べて低く、経験している餌に対する慣れと考えられる現象は両遺伝子型個体に共通して存在した。

さらに、苦味物質を混入したペレット飼料に対する摂食行動の時間的解析を行った結果を Fig. 6-2 に示す。蒸留水、100mM サリシン及び 0.05mM 硝酸ストリキニーネを浸み込ませた飼料 (それぞれ対照飼料、サリシン飼料、ストリキニーネ飼料とよぶ) を与えた各 20 頭の +<sup>Ze</sup> 個体のうち、サリシン飼料で 1 頭、ストリキニーネ飼料で 7 頭は観察時間中に摂食の行動は見られなかった。一方、全ての *Ze* 個体はいずれの飼料も摂食した。

対照飼料、サリシン飼料、ストリキニーネ飼料に対するトータルの摂食時間をみると、+<sup>Ze</sup> 個体のサリシン飼料、ストリキニーネ飼料に対する摂食時間は対照飼料に比べて有意に短かった (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05/2$ ) (Fig. 6-2A)。*Ze* 個体についても 2 つの苦味物質により摂食時間は短くなるが、その傾向は +<sup>Ze</sup> 個体に比較して小さく、ストリキニーネ飼料に対してのみ有意差が認められた。一方、*Ze* 個体と +<sup>Ze</sup> 個体との間の比較ではサリシン飼料、ストリキニーネ飼料ともに有意差が認められた (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05$ )。探索時間については、+<sup>Ze</sup> 個体は、サリシン、硝酸ストリキニーネの混入によって有意に長くなるが、*Ze* 個体はその影響を受けず (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05/2$ )、遺伝子型間には明

らかな違いがあり (Mann-Whitney  $U$  test,  $p < 0.05$ )、 $Z_e$  個体は苦味物質の影響をあまり受けないことがわかった (Fig. 6-2B)。

ストリキニーネ飼料を摂食した 20 頭中 13 頭の $+Z_e$  個体のなかで、1 頭は 1 分以上の持続した摂食が観察されなかった。これを除く 1 分以上の持続した摂食時間が記録できた個体について最初の持続する摂食が始まるまでの遅れを比較した (Fig. 6-2C)。この時間は探索時間と短い摂食時間からなり、私の観察では、適当な摂食場所を探索する時間に加え、特に口器を使って飼料の表面をたたか、試しにかじって味見している時間に相当すると考えられる。この潜時は、 $+Z_e$  個体はサリシンと硝酸ストリキニーネによって相当長くなる一方、 $Z_e$  個体では、対照飼料とストリキニーネ飼料の比較で有意差はあるものの (Mann-Whitney  $U$  test,  $p < 0.05/2$ )、 $+Z_e$  個体とは明らかに反応が異なり、苦味物質による影響はあまり受けないことがわかった。

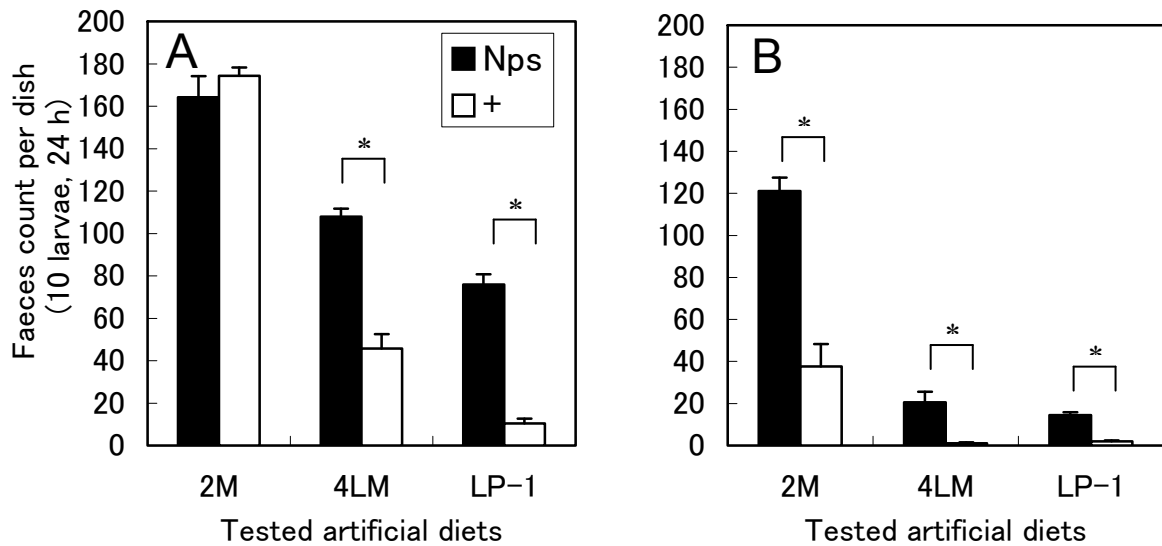
探索時間または休息時間に遮られる 1 つ 1 つの摂食時間の長さの平均値は、正常個体に比較して  $Z_e$  個体はどの飼料においても長かった (Fig. 6-2D, Mann-Whitney  $U$  test,  $p < 0.05$ )。対照飼料との比較では、 $+Z_e$  個体のストリキニーネ飼料においてのみ有意差が認められた (Mann-Whitney  $U$  test,  $p < 0.05/2$ )。

**Table 6-1** Feeding responses of the *Nps-Ze* and normal larvae to the different plant leaves

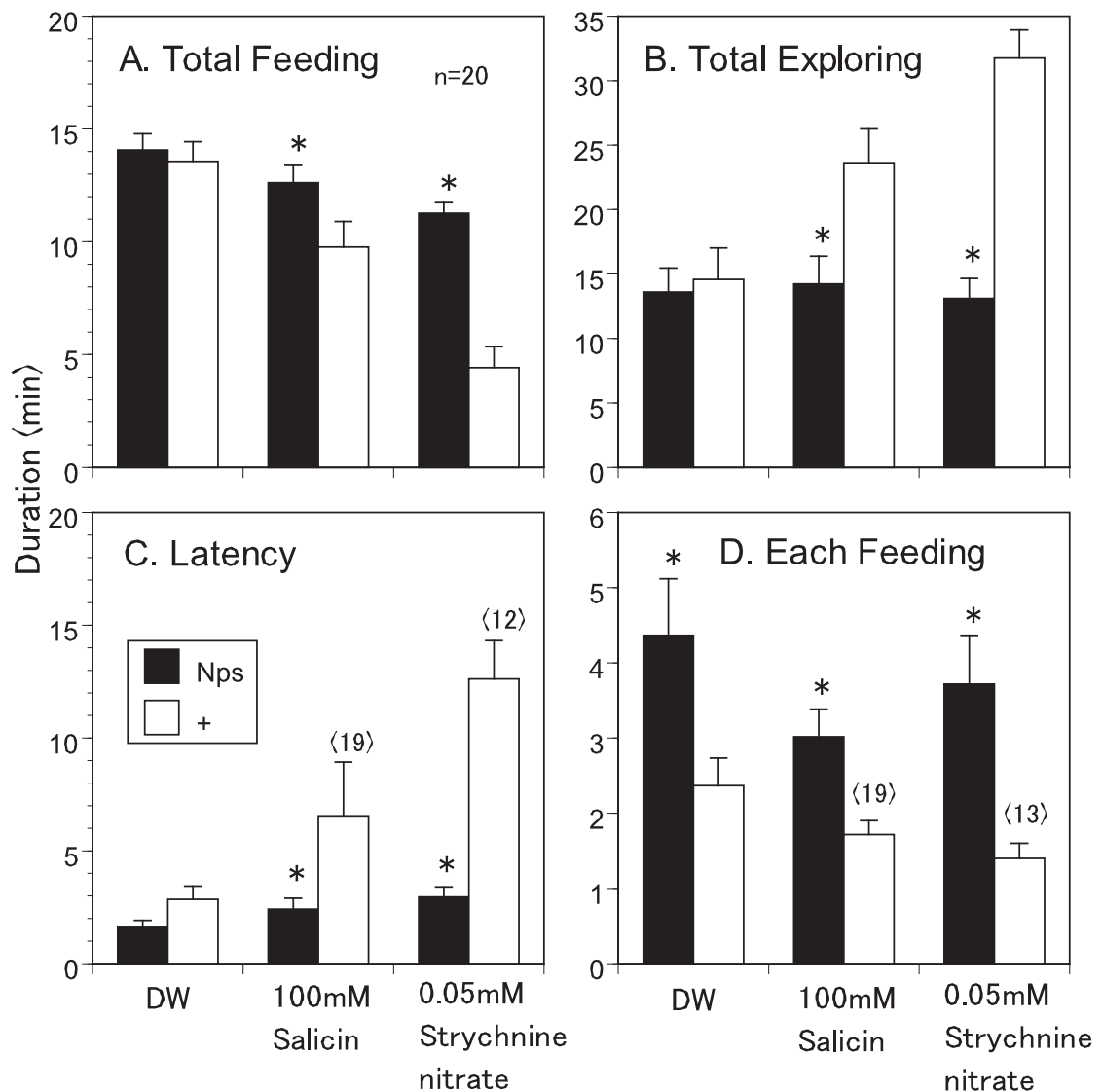
Plant species	Feeding ability*	
	<i>Nps-Ze</i>	+ <sup><i>Nps</i></sup> - + <sup><i>Ze</i></sup>
<i>Hydrangea macrophylla</i>	++	+
<i>Acer spp.</i>	++	-
<i>Phellodendron amurense</i>	++	-
<i>Gardenia jasminoides</i>	+++	++
<i>Ailanthus altissima</i>	+++	++
<i>Houttuynia cordata</i>	++	-

\*Following four grades of feeding ability were evaluated by several observations; each observation was lasted for about five minutes after each plant leaf was placed close to larvae of both genotypes.

- +++ Almost larvae ingest leaves continuously as well as they ingest mulberry leaves
- ++ Some larvae ingest leaves continuously, and many larvae bite the edge of leaves intermittently
- + No larvae ingest leaves continuously, and some larvae bite the edge of leaves intermittently
- Almost larvae do not bite even the edge of leaves



**Fig. 6-1** Feeding behavior of *Nps-Ze* (Nps, filled columns) and normal (+, open columns) larvae fed on different artificial diets, represented by the number of feces. Unfed fifth instar larvae two days after the fourth ecdysis were fed on the three different artificial diets: 2M (SILKMATE 2(M), Nosan Corporation), 4LM (SILKMATE 4L(M), Nosan Corporation), and LP-1 (Horie and Watanabe 1983). Tested larvae were reared on the 2M artificial diet (A) or mulberry leaves (B) until the end of fourth instar. Total numbers of feces produced by ten larvae for 24 h were counted. Data are means with SEM of 10 repetitions. Comparisons with Mann-Whitney *U* test are performed between *Nps-Ze* larvae and normal larvae (\*,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 6-2** Feeding behavior of *Nps-Ze* (Nps, filled columns) and normal (+, open columns) larvae during 45 min of observation on the control diet (DW), the salicin-diet (100mM salicin) and the strychnine-diet (0.05mM strychnine nitrate), represented by (A) total time spent on feeding, (B) total time spent on exploring, (C) latency to the first sustained feeding that last for more than 1 min, and (D) means of each feeding bout. Data are means with SEM of 20 tested larvae. Exceptions of the number are indicated on bars in C and D, because the larvae that did not show any feeding or sustained feeding were excluded from the data. Comparisons with Mann-Whitney *U* test are performed between *Nps-Ze* and normal larvae (\*,  $p < 0.05$ ).

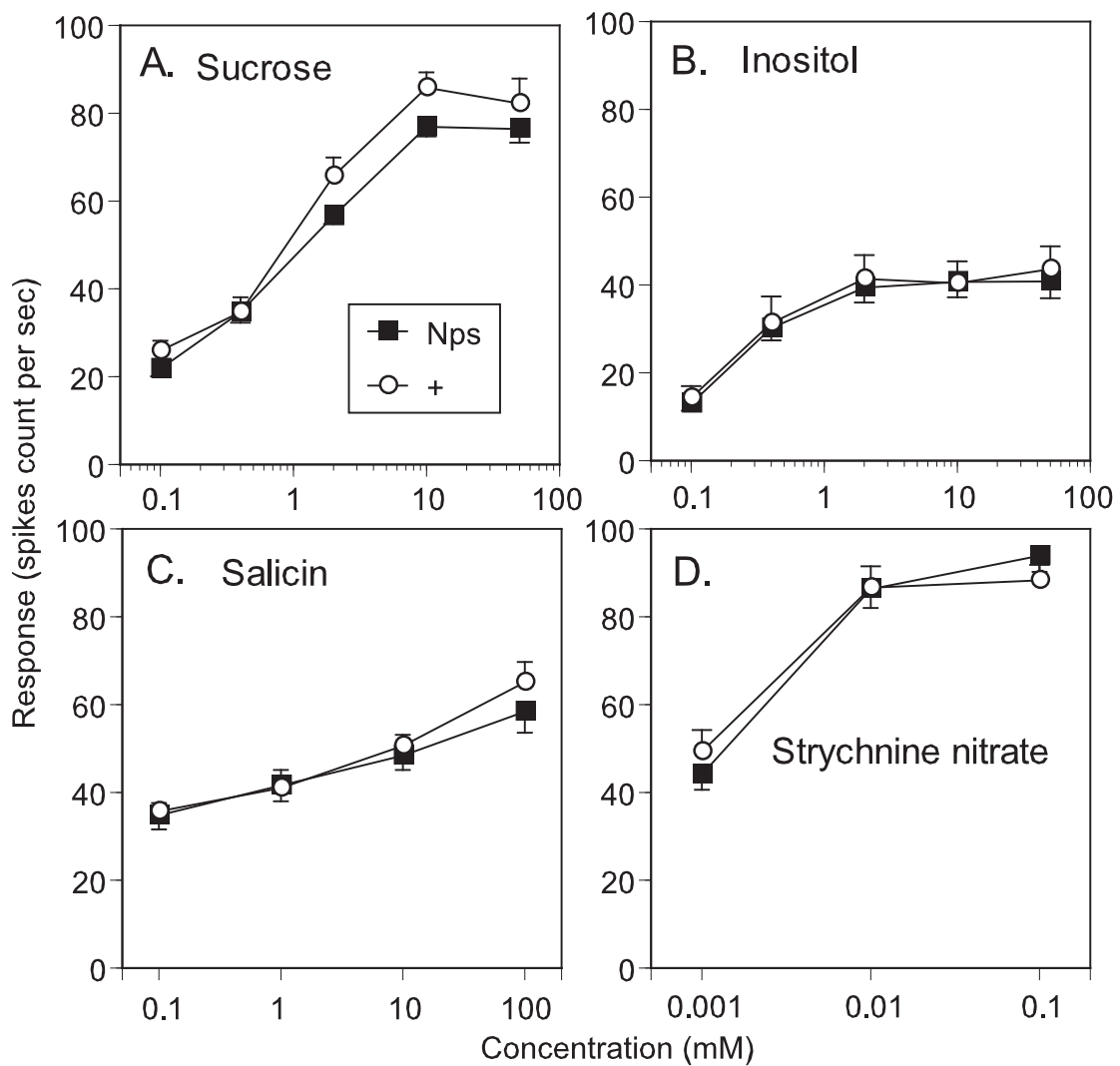
## 味覚スパイク応答

小腮外側有柄感覚子の糖受容細胞、イノシトール受容細胞から、それぞれショ糖、ミオイノシトールに対する味覚応答を記録し、内側有柄感覚子のデターレント細胞からサリシン、硝酸ストリキニーネに対する応答を記録した。それぞれの刺激液に対する濃度応答曲線の  $Z_e$  個体と  $+Z_e$  個体の間での違いは、各濃度で比較した場合に 2mM ショ糖の応答にのみ有意差があったが (Mann-Whitney  $U$  test,  $p < 0.05$ )、総体では顕著な違いはみられなかった (Fig. 6-3A, B, C, D)。 $Z_e$  個体のデターレント細胞は、100mM サリシン、0.05mM 硝酸ストリキニーネで最大の応答値を記録したが、この濃度は上記の行動実験に用いた濃度に一致する。

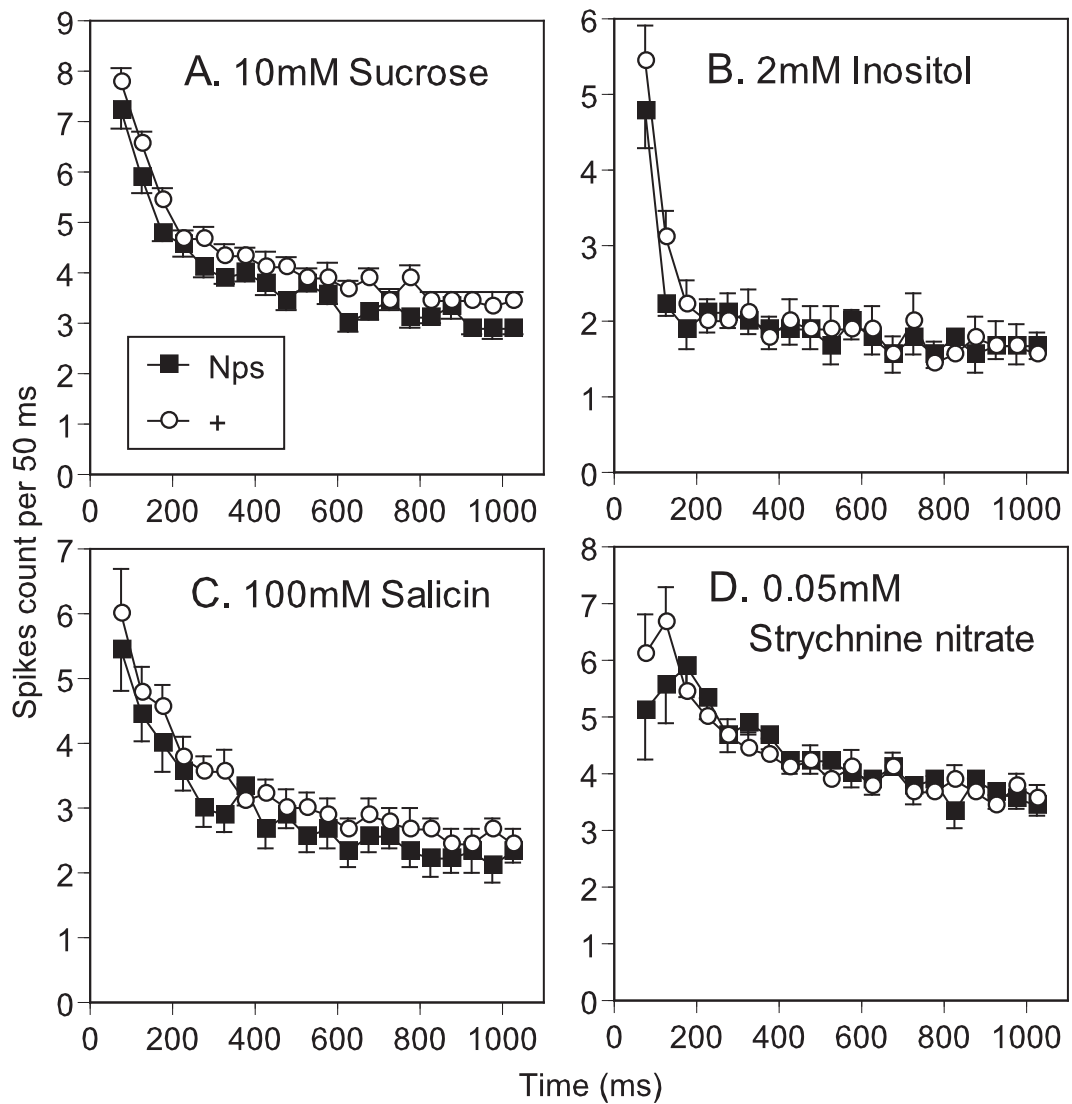
Fig. 6-4A, B, C, D は、それぞれ 10mM ショ糖、2mM ミオイノシトール、100mM サリシン、0.01mM 硝酸ストリキニーネに対する記録開始から 50ms 毎の発火頻度の変化を示した。これらの刺激液の濃度は Fig. 6-3 で示したように最大の応答値を示した濃度に近いものである。各細胞の用いた刺激物質に対する応答は、遺伝子型に関わらずそれぞれに特徴的なスパイク頻度の順応パターンを示した。すなわち、糖受容細胞は、刺激直後の頻度の高い phasic 応答の後に、連続的に徐々に減少する順応がみられる (Fig. 6-4A)。イノシトール受容細胞からは刺激直後の phasic 応答の後に急激にスパイク頻度は減少して、その後は変化の少ない緩慢な順応の応答がみられた (Fig. 6-4B)。一方、デターレント細胞の応答は刺激物質により異なり、サリシンに対しては、糖受容細胞に似た phasic-tonic 応答パターンを示すが (Fig. 6-4C)、硝酸ストリキニーネに対しては、刺激後からスパイク頻度とともにスパイクの高さが徐々に増加し、最大の応答頻度を示すまでに 100~200ms の遅れが生じるとともに、その後の tonic 応答では高い頻度を維持したまま徐々に順応が見られる傾向がある (Fig. 6-4D)。これらの各細胞にみられる応答の特徴は、 $Z_e$  個体と  $+Z_e$  個体に共通してみられた。

また、用いた個体数は少ないが、10 秒以上のより長い時間で刺激した場合でも、遺伝子型間で比較を行ったが顕著な違いは見られなかった。さらに、上咽頭感覚子にあるデターレント細胞からも、10mM サリシンと 0.01mM 硝酸ストリキニーネに対する応答を記録したが、遺伝子型に関わらず激しいスパイク応答が記録された。





**Fig. 6-3** Responses of the taste receptor cells in the maxillary styloconic sensilla of *Nps-Ze* (Nps, filled squares) and normal (+, open circles) larvae to different concentrations of four stimuli: **(A)** sucrose and **(B)** myo-inositol recorded respectively from the sugar-sensitive taste cell and the inositol-sensitive taste cell in the lateral styloconica, and **(C)** salicin and **(D)** strychnine nitrate recorded from the deterrent cell in the medial styloconica. Responses are quantified by the mean number of spikes with SEM generated from 0.05 until 1.05 s after the onset of stimulations (n=9).

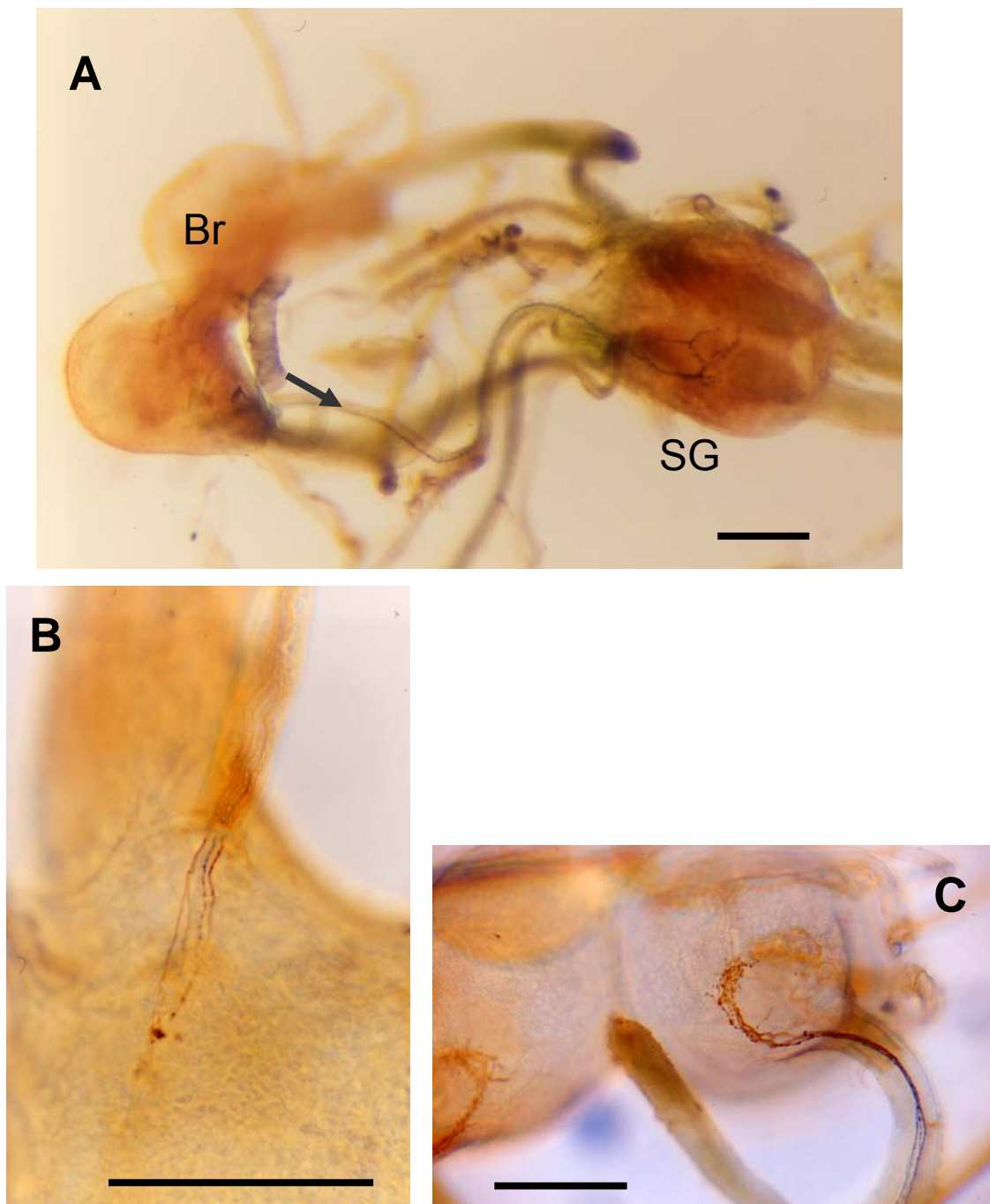


**Fig. 6-4** Temporal responses of the taste receptor cells in the maxillary styloconic sensilla of *Nps-Ze* (*Nps*, filled squares) and normal (+, open circles) larvae in stimulation with (A) 10mM sucrose and (B) 2mM myo-inositol, recorded respectively from the sugar-sensitive taste cell and the inositol-sensitive taste cell in the lateral styloconica, and (C) 100mM salicin and (D) 0.01mM strychnine nitrate recorded from the deterrent cell in the medial styloconica. Same data sets were used as in Fig. 6-3. Responses are quantified by the mean number of spikes per each 50 ms bin with SEM ( $n=9$ ). Initial 50ms after the onset of stimulations were eliminated because a part of each recording was lost by the contact artifact.

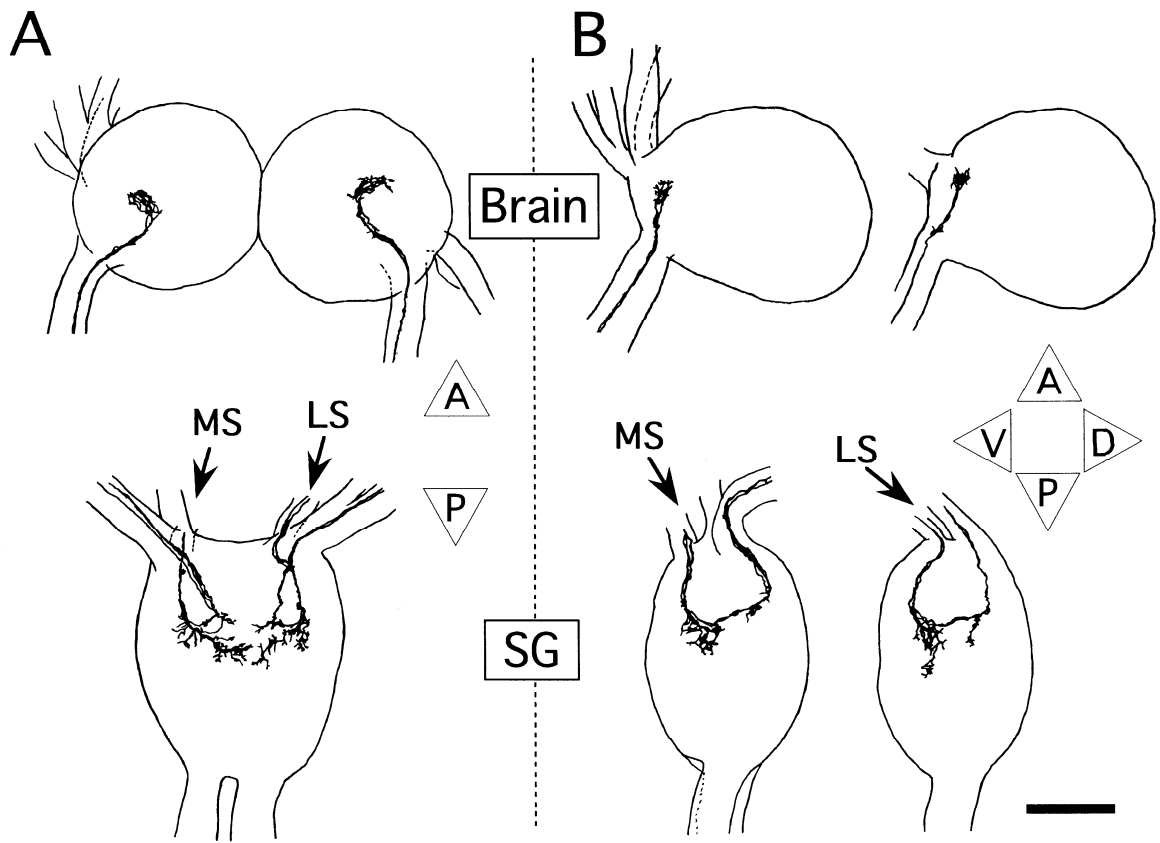
## 中枢投射

$Z_e$  個体の異常部位が味覚細胞の形態的な異常、特に軸索の投射経路である可能性を考え、コバルトーリジンにより小腮の外側有柄感覚子、内側有柄感覚子に付属する神経細胞を染色して  $Z_e$  個体と  $+Z_e$  個体で比較した。これらの細胞の軸索は、外側有柄感覚子、内側有柄感覚子ともに小腮神経から食道下神経節の腹側に入り、食道下神経節の前半部後方の腹側外側部位と背側中央部位で約 90 度の角度で折れ曲がり、同側の食道神経環を通過して同側の脳半球の中央部腹側に延び、約 90 度外側に折れて細かな樹状突起を形成した (Fig. 6-5A, Fig. 6-6)。食道下神経節内では 2 箇所軸索が曲がる領域でいくつかの軸索は分枝して中央部へ延び、正中線付近でさらに細かく分枝した。腹側外側の領域で分枝した軸索は、背側中央部で分枝した軸索に比べて長く、より分枝の密度が高かった。これらの軸索経路の特徴は、 $Z_e$  個体においては、外側、内側有柄感覚子ともに 16 個の染色された試料に、 $+Z_e$  個体においては外側有柄感覚子 10 個と内側有柄感覚子 8 個の試料で共通に認められた。染色された軸索の本数、すなわち細胞数については大部分の試料で確認することは不可能であるが、2、3 個体ではある程度の観察ができ、小腮神経から食道下神経節にはいる入り口付近では、4 本又は 5 本であることがわかった (Fig. 6-5B)。また、脳へ投射する食道下神経環内の軸索の数は 4 個である個体が確認できた (Fig. 6-5C)。この結果は、小腮の外側有柄感覚子、内側有柄感覚子にはともに 5 つの双極性神経細胞が付属しており、そのうちの 1 つはデンドライトの位置や形態の電子顕微鏡による観察から機械受容細胞であるとする第 3 章の実験結果と符合する。このほか、 $Z_e$  個体、 $+Z_e$  個体とも 2、3 個の試料では、食道下神経節で分枝した細い軸索が、同側の正中線付近を通過して前胸神経節にまで延びて染色された。

軸索の形態には個体間の変異があり、今回行った染色方法やホルマウントによる観察方法などに方法論的な限界があるであろうが、少なくとも軸索の幹線経路や分枝の位置などの大まかな形態には、2 つの遺伝子型間のほか、2 つの有柄感覚子間についても違いは認められなかった。



**Fig. 6-5** Wholemout observations of neurons stained with cobaltous-lysine solution applied from the tip of the maxillary styloconic sensillum of *Nps-Ze* larvae. **A**; A dorsal view of the brain (Br) and subesophageal ganglion (SG) complex. An arrow indicates maxillary nerve where the axons were stained and enter the SG. **B**; Ventral view of the stained axons from a lateral styloconicum (LS; right side) entering the SG. **C**; Dorsal view of termination and arborization of the stained axons in the brain. Scale bar: 100 $\mu$ m.



**Fig. 6-6** Camera lucida drawings of central projections of neurons arising from the galeal styloconic sensillum of the *Nps* larva. (A) Dorsal views of the brain and suboesophageal ganglion (SG), and (B) side views of the brain and SG, showing axons stained from a lateral styloconic (LS; right side) and a medial styloconic (MS; left side). Arrows indicate maxillary nerve where the axons were stained after cobaltous-lysine solution had been applied to the cut end of each sensillum and enter the SG. A, P, D and V in triangle indicate directions, anterior, posterior, dorsal and ventral, respectively. Scale bar: 100 $\mu$ m.

## 考 察

植物葉に対する摂食行動の観察や、人工飼料に対する摂食性を調べた結果から、*Ze* 個体すなわち *Nps* 遺伝子保有個体 (*Nps-Ze*) は、 $+^{Ze}$  個体 ( $+^{Nps}+^{Ze}$ ) に比べて明らかに摂食性は高いが、 $+^{Ze}$  個体にみられるものと似た餌に対する好みは持ち合わせていることがわかった (Table 6-1, Fig. 6-1)。また、*Nps* 遺伝子が学習能力に関係する可能性を完全には否定できないが、*Ze* 個体も経験した餌をより好むことから、慣れといわれる単純な学習能力は持っていることがわかった。

さらに詳細に摂食行動を調べるために、第2章で行ったような時間的な解析方法を用いて苦味物質に対する反応をみたところ、*Ze* 個体と  $+^{Ze}$  個体の摂食行動の違いは、サリシンや硝酸ストリキニーネなどの摂食阻害物質 (デターレント) に対する反応の違いに起因することがわかった。すなわち、餌にデターレントがあると  $+^{Ze}$  個体では摂食時間の短縮や探索時間の延長、摂食開始までの時間の遅れがみられるが、*Ze* 個体では、その影響が小さかった (Fig. 6-2A, B, C)。第2章でも考察したように、摂食の開始に関わる要因には、餌の場所や化学的・物理的特性に加えて、虫のステージや栄養状態、内的な摂食リズムの存在などがあるが (cf. Bernays and Simpson 1982; Simpson 1995; Bernays and Woods 2000)、今回の実験では摂食阻害物質の添加以外の要因は *Ze* 個体と  $+^{Ze}$  個体ではほぼ同一と考えられるのでデターレントの影響が結果に現れたものと解釈できる。特に潜時の違いは、摂食後の消化、解毒等の能力に関わる要因を排除するため、*Ze* 個体はデターレント物質に対して行動にあらわれる感受性が低いことを示している。

一方、食事 (ミール) は、摂食の促進にかかる要因の合計レベルが摂食の抑制にかかる要因の合計レベルより低くなったときに終了するが、ミール中の摂食の興奮に係る主要因としては、感覚器官から入る摂食促進物質の情報があり、摂食抑制に係る要因には、摂食阻害物質の受容に加え、摂食量と栄養のフィードバックがあると考えられる (Simpson 1995)。タバコスズメガ (*Manduca sexta*) の幼虫では、摂食促進には口器や脚の動きからのフィードバックが関係し、摂食量のフィードバックは摂食の抑制 (ミールの長さの減少) にあまり関与していないと考えられている (Griss *et al.* 1991; Rowell and Simpson 1992; Timmins and Reynolds 1992)。また、餌に含まれる毒物質の影響により突然ミールが終了することもある (Glendinning 1996)。本実験においては、対照となる通常のペレット人工飼料に対する合計の摂食時間には、遺伝子型の異なる個体間で有意な差はなかったため、栄養のフィードバックに関しては *Nps* 遺伝子保有個体においても正常に機能していると考え

られる (Fig. 6-2A)。一方、探索や静止に挟まれる 1 つ 1 つの摂食時間の長さの平均を比べると、対照飼料においても *Ze* 個体の方が長いことがわかった (Fig. 6-2D)。これは、*Ze* 個体は一度摂食を始めると摂食を途中でやめずに続ける傾向が強いことを示している。すなわち、餌に含まれる摂食阻害物質の影響が断続的な摂食行動を引き起こすが、これが *Ze* 個体に比べて +*Ze* 個体の方がより顕著に現れたものと解釈できる。(この場合、対照飼料の中にもある程度摂食阻害物質が含まれていたと考えられる。)あるいは、咀嚼の運動パターンを動かす興奮性の入力がある *Ze* 個体の方が強いとか長く持続することも考えられる。

以上のように、摂食行動実験の結果は、*Nps* 遺伝子保有個体には摂食阻害物質をはじめとする味覚刺激物質を受容してからその感覚入力により影響を受けて発現する摂食行動に至るまで神経機構のどこかに何らかの異常があることを示唆する。

もし、*Nps* 遺伝子保有個体の異常が末梢の味覚細胞の受容部位にあるのであれば、*Ze* 個体のデターレント細胞の応答が全くないか、あっても摂食促進物質の受容細胞の感受性に比べて相対的に低いケースが予測できる。あるいは、デターレント細胞の応答の順応が異常に早かったり、細胞による順応パターンの違いから、時間とともに摂食促進物質受容細胞の応答が勝る場合なども考えられる。しかしながら、電気生理実験の結果からこれらの可能性は否定された。各濃度や時間における差を見れば、部分的に有意差を検出した点もあるが、全体的に見ればその差はわずかであり、摂食行動の差を説明できるものとは考えられない。+*Ze* 個体に対して明らかに摂食阻害作用を示す濃度のサリシンや硝酸ストリキニーネに対して、*Ze* 個体のデターレント細胞は +*Ze* 個体同様激しいスパイク応答をするにも関わらず、摂食行動にはその作用が余り現れない。このことは、デターレント細胞で受容した化学的情報が、*Ze* 個体では中枢神経系へ正常に伝達されていないか、あるいは伝達されていても、運動神経に至るまでのネットワークのどこかに異常があるために、その情報が正常に処理されないものと思われる。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では軸索の経路に異常が見られるミュータントがいくつか知られており、この経路の認識には様々な分子的なメカニズムが関与すると考えられている (e.g. Steller *et al.* 1987; Budnik *et al.* 1990; Baird *et al.* 1993; Whitlock 1993; Callahan *et al.* 1995; Lundgren *et al.* 1995)。このため、*Ze* 個体の味覚細胞の軸索も、中枢神経系の正確な位置に投射することができず、1 次インターニューロン (介在神経) や運動神経へ情報が正常に伝達されていない可能性が考えられた。そこで次に軸索投射経路を調べたのであるが、小腮の 1 つ 1 つの味覚感覚子からコバルトを取り込ませてホールマ

ウントによる観察を行った本実験では、遺伝子型の間で違いを見つけることはできなかった。なお、観察された経路は、タバコスズメガ (*M. sexta*) (Kent and Hildebrand 1987) やヤマユガ (*Antheraea yamamai*) (Asaoka 2002) で観察されたものとほぼ一致しており、鱗翅目昆虫の幼虫に共通するものと考えられ、*Ze* 個体においても大まかな経路に関しては正確に投射していることがわかった。ただし、この方法では1つ1つの神経細胞の細かい分枝の違いまでは見ることはできないため、本実験の結果は、*Nps* 遺伝子が味覚細胞の軸索投射経路を支配しているかどうかの可能性を完全に否定するものではない。

では、*Nps* 遺伝子保有個体の異常形質が他に発現しているとしたら、どんな異常が考えられるのであろうか。タバコスズメガ (*M. sexta*) では、大顎の運動パターンを制御する食道下神経節内のインターニューロンについての形態学的、電気生理学的な研究があり、規則的な咀嚼運動を生み出すセントラルパターンジェネレーター (CPG) とそのパターンを修飾する感覚入力が存在すると考えられている (Rohrbacher 1994a, b)。このことから、*Nps* 遺伝子保有個体では、デターレント細胞から来る情報の抑制的な入力や摂食促進に働く興奮性の細胞の入力に関わるシナプス結合の数や結合強度に違いがあり、情報が CPG へ正確に伝わっていないことが考えられる。あるいは、生体アミンが摂食行動をはじめとする様々な行動のアクティビティを支配していることから、アミンの代謝経路や分泌・受容に関与する要因に関与している可能性も考えられる。*Nps* 遺伝子の機能、すなわち *Nps-Ze* 個体のどこに異常があり、異常な摂食行動となって現れるのか、その解明が食物選択に関わる中枢神経系の仕組みの解明につながるものと期待されるが、そのためにはさらなる研究が必要である。



## 総合考察

二元交雑蚕品種日601号×中601号（あさぎり）は、本研究の第1章に示したとおり、カイコの育成中の実用系統からLP-1人工飼料に対する摂食性の選抜を行うことによって育成されたもので、その後広食性実用系統として初めて指定（登録）された画期的な品種である。この原種2系統と同時に育成を行ったいくつかの系統はその後育成された「しんあさぎり」「ありあけ」等の新たな広食性品種の原種の育成材料にもなって、その普及に貢献している。一般のカイコの系統に比較してこれらの品種はLP-1飼料に限らず、他の低コスト人工飼料や桑以外の植物葉をよく摂食する。本研究は、日601号×中601号の育成に端を発して、その食性の違いを生み出す要因に関して生まれた疑問から、昆虫の食物選択のメカニズムを探ることを目的として行った。そのため、カイコの摂食行動を観察することから始まって、味覚がカイコの摂食行動に及ぼす影響を摂食時間の記録から見だし、さらに味覚感覚子、味覚細胞の形態を観察してその基本的性質を明らかにしたほか、上咽頭感覚子については電気生理学的手法を用いて3個の細胞を新たに同定するなど、カイコの味覚と摂食行動に関する新たな基礎的知見を得ることもつながった。そしてこれらの成果をもとに、日601号×中601号以外の広食性系統も含めて、摂食行動、味覚器官の形態、味覚細胞の応答を正常系統と比較することにより、食物選択に関与する味覚神経機構の一端を明らかにすることができた。

本研究を始める以前から、鱗翅目昆虫の幼虫の食物選択に関しては味覚の役割の重要性を示す多くの報告があることから、広食性系統の食性を支配する遺伝子が味覚機能に関与することは予想できた。実際、矢澤ら（1991）は日601号×中601号と沢Jについて味覚細胞の応答を調べ、これらはサリシン等苦味物質に対して味盲であると報告している。しかし、本研究で行った摂食行動実験の結果では、これらの広食性蚕は正常系統に比較するとサリシンによる摂食阻害作用がやや弱いものの、サリシン及び硝酸ストリキニーネに対しては明らかに摂食阻害作用が見られた（第2章）。摂食開始までの時間においてもその作用が見られることから苦味物質を感知しているものと思われた。

電気生理実験においては、矢澤らが用いたサリシン以外にも、硝酸ストリキニーネ等の他の苦味物質の濃度応答を比較したところ、サリシン、フロリジンでは広食性蚕の閾値が高く、硝酸ストリキニーネ等の他の多くの物質には広食性蚕も強く応答することがわかった（第5章）。したがって、広食性蚕は苦味物質すべてに対して味盲なのではなく、苦味の種類によっては感受性が低いものが存在するという結果であった。サリシンに対する感受性の低下は、

日601号×中601号、沢Jのほか、沢JのLP-1飼料の摂食性に関与する遺伝子を現行の蚕品種に交配することにより導入して作成したCSJ02（神田・田村 1991）にも見られた。また、小腮の有柄感覚子ばかりでなく上咽頭感覚子のデターレント細胞においても同様な結果が得られた。このことは、広食性蚕の食性関連遺伝子がサリシン等のある苦味物質のグループに対する感受性を支配している可能性を示唆している。もしそうであれば、ショウジョウバエのトレハロース低感受性ミュータントからトレハロース受容体の単離・同定が可能になった（Isono *et al.* 2001）ように、この広食性蚕の存在が、ある特定の苦味受容体などの同定に一役買える可能性をも示している。

なお、広食性蚕は味覚器官の形態に異常があることも考えられるが、走査型電子顕微鏡によって観察した外部形態には、系統による特徴や個体による異常は認められたが、広食性蚕に限らないため、食性との関連は認められなかった（第3章）。透過型電子顕微鏡による有柄感覚子の断面の観察によると、日601号×中601号においても正常系統と同じく5つの神経細胞が見られており、細胞の欠失などの大きな異常はないものと思われる。

また、細胞の応答が摂食促進的に働くとされている糖受容細胞とイノシトール受容細胞については濃度応答の違いと食性との関連性はなかった。したがって、デターレント細胞の応答する物質の種類及びその物質に対する感受性の微妙な違いが、食物選択という生物にとっては生命維持に欠かせない重要な行動に大きく関与することが伺い知れた。

本研究においては、カイコのデターレント細胞は内側有柄感覚子の他にも上咽頭感覚子に存在することが明らかになった（第4章）。タバコスズメガにおいても、やはり小腮の有柄感覚子とともに上咽頭感覚子にデターレント細胞が存在するが、上咽頭感覚子のみでも摂食阻害行動を引き起こすに十分な役割を果たしていることがわかっている（Glendinning *et al.* 1999）。上咽頭感覚子は大顎によって噛み砕かれた餌の味を直に感じ取れる位置にある味覚器官であることから、食べた餌の飲み込みなどに関わる可能性があり、小腮の有柄感覚子とは摂食行動に及ぼす作用時期や段階が異なる可能性があるが、この点に関しては今後調べる必要がある。タバコスズメガでは、小腮と上咽頭のデターレント細胞は受容する物質の種類やその感受性に違いがあることがわかったが、カイコでは、今回用いた刺激物質の濃度応答を観察した限りでは大きな違いがなかった。したがって、摂食を完了するまでに小腮と上咽頭の2重のチェックが働いているものと思われる。この細胞の存在自体が、食物選択にはデターレント細胞が受容する物質の情報が重要であることを物語っているといえよう。

神田ら（1988）は広食性の系統として沢Jや日01号を用い、LP-1飼料の摂食性を支配

する遺伝子は劣性であることを報告しているが、LP-1 飼料摂食性には *pph* のほかに修飾遺伝子の存在を示唆している。今回、育成中の系統から作出した中 601 号 (MCS26A) 及び日 601 号 (ANS82A) の場合でも、摂食性は同様に劣性の遺伝子により支配されることが分かった。選抜系統間の F<sub>1</sub> は両親の中間の摂食性を示すことから、選抜系統の摂食性の遺伝子は共通の劣性遺伝子と修飾遺伝子群であると考えられる。

一方、同じ沢 J においては、桑葉粉末を含む一般の人工飼料の摂食性を支配する遺伝子は優性的に発現することが知られている (藤巻ら 1982)。今回の LP-1 飼料を用いた選抜においては、この優性的に発現する遺伝子に関しては考慮されていなかったが、LP-1 飼料で選抜した BN13A や BCS15 の LPY-5 飼料に対する摂食性が無選抜系統より低下したのはそのことも一つの原因であると思われる。一方、田島・大沼 (1991) は、沢 J と日 601 号の桑を含まない基本飼料に対する摂食性は優性の遺伝子 *Ph* によって支配されていると提唱しており、さらにその表現型を抑制する方向に働く劣性遺伝子 *ex* の存在を提唱しているが、その真偽は定かではない。

昆虫の摂食行動は摂食阻害物質によってのみ説明できるものではなく、むしろ、摂食促進物質の存在により寄主選択を行っていることを示す数多くの証明がなされている。したがって、味覚による摂食開始の判断は、飼料中に含まれる摂食刺激物質や摂食阻害物質のバランスによって決定されるものであることは疑いない (e.g. Dethier 1982)。カイコにおいても、多くの摂食促進物質が同定されているほか、摂食阻害物質が入っているために通常は摂食しない人工飼料でもモリンや桑葉粉末の添加によって摂食する場合があることが示されている (矢澤ら 1991; 神田 1992)。モリン、β-シトステロール、イソケルシトリン、n-ヘキサコサノール、n-オクタコサノール、炭酸カルシウムなどこれまで同定されてきた摂食促進物質がどのようにカイコで受容されているのか、その味覚器官は未だに特定されていない。カイコの食性には、これらの摂食促進物質の受容に関する遺伝子の働きも関与すると考えられる。

一方、*Nps* 遺伝子を持つ S2 系統の変異個体 (大沼・田島 1989) には、サリシン、硝酸ストリキニーネによる摂食阻害作用が正常個体に比べて顕著に現れないにもかかわらず、これらの物質に対してデターレント細胞は正常に応答していた (第 6 章)。この結果は、前記の広食性蚕とは異なるものであり、デターレント細胞の応答が必ずしも摂食行動及び食性とは関連しないことを示している。おそらく、デターレント細胞が受容して中枢神経系に伝達した情報が正常に処理されていないものと思われる。これに似た現象は、*Np* 突然変異系統においても既に報告されている (石川ら 1963)。*Nps* 個体については、コバルトイオンの取り込み

による味覚細胞の軸索投射形態については調べたが、著しい異常は認められなかった。今回の観察では見ることでできないより微細な部分の細胞形態に異常があることも考えられるが、これらの味覚細胞の情報を伝達・修飾する細胞、さらには運動神経系に至る一連の神経の異常であることが考えられる。食性範囲が異なるにも関わらず、味覚応答に違いが見いだせなかった例は、カイコの*Np*のほか、他種の鱗翅目昆虫幼虫においても報告があり、食性範囲が異なる*Heliothis*属の2種の近縁種の間 (Bernays and Chapman 2000)、シニグリンを処理した飼料に対する摂食行動が異なるイラクサギンウワバの2つのグループ間 (Mitchell *et al.* 1996) でも見られている。*Nps*の変異がもたらす異常はどこに発現し作用しているのかについては、現在も引き続き調べているところであり、今後味覚の受容段階とは異なる部分での食性支配のメカニズムが明らかになることを期待している。

カイコにおいてこれまで同定されている食性に関与する遺伝子は、*pph*、*Np*、*Nps*のほかに*Bt*、*Sk*、*nfad*などが報告されている (大沼・田島 1986, 1996; 山本 1983)。これらの事実は、食性に関与する遺伝子は複数あることは確かであり、単純でないことを示している。それは、食べるか食べないかの行動の決定、食性の決定には感覚細胞の受容から運動ニューロンに至るまでに関わるであろうインターニューロンや神経修飾の役割を果たす生体アミンなどの関与、さらには経験・学習などの要素も含めて複雑な神経機構が関わっていることから当然のことであろう。また、栄養状態やその他の生理状態など多くの要因が時間、空間的に複雑な要因が関わっていることが想像できる。既にカイコで同定されているこれらの突然変異遺伝子の機能がわかれば、その機構の解明に一步一步近づいていくことになると考えられる。本研究は、その一部だが、その重要な一端を明らかにしたほか、今後の課題を明らかにしたものといえよう。

これらの遺伝子の存在とその機能は、食性の進化に関する興味にも結びつく。カイコは野外に生息できる昆虫ではなく、完全に人間の意図的操作によって進化が成り立つ昆虫であり、進化という言葉に当てはまるものかということ自体にも疑問があるが、そのモデルと考えることはできる。すでに、寄主植物を識別する味覚に関与する形質の遺伝的な変異は、昆虫とその寄主植物の関係の進化を生み出す1つの大きな要因とする考えは一般的にも広く受け入れられている。(e.g. Bernays and Chapman 1987; Dethier 1980; Jermy 1984, 1993; Menken *et al.* 1992)。さらに、Bernays and Chapman (1994) は、デターレント細胞の感受性が低下する遺伝的な変異が起これば、昆虫はより広食性の方向へ進化するはずであることを仮説として提唱している。第5章で得られた本研究の結果はこれらを支持するものであると考えられる。植

食性の昆虫では、広食性に比較して単食性や狭食性が多く存在することから、広食性から単食性 (generalistからspecialist) への進化の要因について多く議論されている (e.g. Bernays and Chapman 1994; Bernays 1996)。カイコに見られた広食性への変異はその方向とは逆であるが、specialistへの進化の過程においても寄主の変換が起こる際には、一時的に食性が広がる必要があるとも考えられており (Menken 1996)、カイコの広食性系統はそのモデルとなりうると考えている。カイコでは広食性の形質は中国種に比べ、日本種に多く残されているといわれ、このことは本研究でも確かめられたが、カイコの起源に関する研究からは、カイコの日本種は、中国種から分岐してきたものと推定されている (吉武 1968; 蒲生・大塚 1980)。その意味では日本種は全般的に広食性の変異集団となっているのかもしれない。広食性となるためには、デターレント細胞の感受性の低下やその情報を伝達処理する神経系をはじめとする味覚に關与する遺伝子の変異が1つの要因となるに違いない。しかし、実際に寄主転換が起こるためには、植物に含まれる毒性物質に対する防御システムを備える必要があるため、味覚などの感覚器による適応のみでは成り立たず、それらの遺伝的変異を併せて獲得したときに起こるものである。カイコの広食性系統は、各種の植物葉を摂食してもその後死亡する場合がほとんどであるが、おそらくその植物に含まれる毒性物質の影響であり、実際に生育や繁殖に利用可能な寄主植物の範囲が広い「広食性」として確立した系統ではない。

以上のように、本研究では、鱗翅目昆虫の幼虫の食物選択には味覚細胞 (特にデターレント細胞) の感受性が重要な役割を果たしていることを強く支持する結果を示すことができた。さらに、本研究の結果から、昆虫が寄主を変えて進化していく過程においては、寄主を認識するための感覚細胞の感受性の遺伝的変化、またはその情報の中樞神経系における情報処理過程の遺伝的変化が大きな要因になっていることが推定できた。しかし、食物選択の遺伝的、生理的メカニズムの解明につながる味覚細胞の変異をもたらす遺伝子の特定や味覚情報の受容から摂食行動に至る中樞神経系における情報処理のメカニズムは依然として未解明の部分が多く今後の課題となっている。

## 摘 要

動物の食物選択は、嗅覚とともに接触化学感覚(味覚)の情報に依存するところが大きく、植食性の昆虫では、葉の表面のワックス成分や葉を噛み砕いたときに浸出する植物成分を感知して判断していると考えられる。鱗翅目昆虫の幼虫の味覚器官の数は他の昆虫に比較しても非常に少ないため、食物選択に関与する味覚神経機構を解析するためには有利な研究材料である。中でもカイコには、摂食刺激物質の単離・同定、人工飼料の開発、小腮の味覚細胞の性格づけ、多様な遺伝的特性を持つ系統の作出と維持などの多彩な研究蓄積があるため、これらを利用した研究の展開が可能である。特に、キャベツの摂食により在来日本種から選抜された沢Jや放射線を照射して作成した*Nps*等の突然変異系統など、桑葉粉末を含まない低コスト人工飼料や桑以外の多くの植物をよく摂食する広食性とよばれる食性異常系統が存在するため、食物選択の研究にはユニークな材料を提供する。そこで本研究では、カイコを用い、味覚が摂食行動へ及ぼす影響や、未知の味覚器官の形態と性質の解析を進めるとともに、実用系統の選抜により育成した広食性蚕品種を含めた数種の食性異常系統の味覚機能を調べることにより、食物選択に関与する味覚の神経機構についての解析を行った。

### 1. 広食性蚕系統の選抜とLP-1人工飼料摂食性の遺伝的解析

近年、様々な低コストの人工飼料が開発されてきたが、これらをよく摂食し、繭生産を可能にする実用系統はなかった。そこで、中でもカイコの摂食性が最も低いとされていた低コスト人工飼料LP-1を用い、育成中の実用系統の摂食性を検索し、その中から食性の広い系統の選抜を試み、その人工飼料摂食性に関する遺伝的解析を行った。

掃き立て4日後の毛振り率を指標に摂食性を調べた結果、日本種の摂食性が一般に高く、中国種が劣った。また、LP-1飼料をよく摂食する品種は組成が異なる他の人工飼料の摂食性も高い傾向があることがわかった。一方、1齢期で摂食性が良好であった系統は4齢でも良好であった。実用系統として育成が有望であると判断された系統については摂食個体を継代し、以降、蛾区及び個体選抜を繰り返した結果、摂食性の比較的良好な日本種4系統、中国種1系統を得た。これらについて交雑種の摂食性を調べたところ、蛾区間のばらつきはあるもののF<sub>1</sub>は両親の中間程度の摂食性を示した。このうち1つの組み合わせが後に日601号×中601号(あさぎり)として品種指定された。選抜された日本種、中国種それぞれ1系統についてLP-1飼料の摂食性の遺伝を調べた結果、これに関与する主遺伝子は劣性であることが

わかった。LP-1飼料で3回選抜を繰り返した日本種1系統、中国種2系統については、他種の人工飼料に対する摂食性を調査し、無選抜系統と比較したが、系統及び飼料によって選抜効果が異なることがわかり、飼料組成の違いにより異なる遺伝子が関与する可能性が示唆された。

## 2. カイコの摂食行動の時間的解析とその飼料・系統間差異

摂食性を調べるための指標としては、上記の毛振り率や成長量のほか、従来から摂食量や排糞数(量)等がその指標として用いられてきた。しかし試験時間が長い場合は、飼料に含まれる栄養や毒性物質の影響、慣れや学習等の可塑的神経機構等の多くの要因が摂食行動に関与することが考えられる。そこで、比較的短時間内における「摂食」「静止」と、餌の探索や味見などの行動を含んだ摂食以外の活動の「探索」の3つの行動の時間記録を行う方法について検討し、味物質の影響やその系統間差異の解析を行った。

日137号×支146号を用い、桑と2種類の人工飼料で3時間記録したところ、ミール(近接する摂食時間からなる一連の食事期間)の構成に違いが見られた。特に桑は人工飼料に比べて最初のミール時間、2回目のミールまでの静止時間が顕著に長く、また4齢までの餌の経験がこれらに影響する可能性が示唆された。3時間の観察時間内における各行動時間を合計し、2種の人工飼料間で比較すると、摂食時間には差はないが、探索時間に差が見られた。この傾向は最初の45分間でも見ることができた。さらに、味覚による摂食行動への影響を調べるため、味刺激溶液を浸透させたペレット飼料を与え45分間の記録を行ったところ、ショ糖やイノシトールの摂食促進効果は見られなかったが、苦味物質(10mMサリシン、0.05mM硝酸ストリキニーネ)の摂食阻害効果が、合計の摂食時間や探索時間、摂食開始までの時間等に現れることがわかった。そこで日137号×支146号に加え、広食性蚕の日601号×中601号と沢Jについてサリシンと硝酸ストリキニーネの摂食阻害効果を比較した。その結果、100mMサリシンと0.05mM硝酸ストリキニーネに対しては全ての系統で摂食阻害効果が見られ、広食性系統と正常系統の違いは明瞭ではなかった。しかし、水のみを加えた対照飼料に対して、広食性蚕は探索時間や摂食開始までの時間が短い傾向があった。また、10mMサリシンに対する日137号×支146号の摂食開始までの時間が対照飼料に比較して有意に長く、100mMサリシンに対する日601号×中601号の合計摂食時間には有意差がない点等において食性の違いを反映した。

### 3. カイコの味覚器官の微細形態とその系統間差異

鱗翅目昆虫幼虫の味覚器官には、小腮粒状体上の外側有柄感覚子 (LS) と内側有柄感覚子 (MS) がよく知られているほか、上唇の腹側に存在する上咽頭感覚子 (EP) についての記載があり、小腮肢にも嗅覚とともに味覚機能があるといわれている。カイコのこれら感覚器の形態に関しては詳細な報告がなかったため、その基本的な形態を調べ、広食性を含めた系統間での比較を行った。

走査型電子顕微鏡による観察により、LS、MSともに先端部の突起の長さは約10 $\mu\text{m}$ 、基部を合わせた全体の長さは70~80 $\mu\text{m}$ 程度あり、先端には味孔が存在した。小腮肢の先端には、高さ3~5 $\mu\text{m}$ の8個の錐状感覚子が存在し、中心部の3個は多孔性の嗅覚器官の特徴を持ち、周辺部に位置する5個は単孔性の味覚感覚子様構造をしている。上咽頭には、3対の棘状感覚子のほか1対の窩状感覚子と2対の鐘状感覚子が存在した。窩状感覚子の中心に存在する約1 $\mu\text{m}$ の小突起の先端には単孔が見られ、本研究では電気生理実験により応答も確かめられたため、味覚機能を持つEPであることが判明した。メチレンブルー染色により、LS、MS、EPとも感覚突起の基部から70~100 $\mu\text{m}$ 離れて細胞体を持ち、感覚子先端に樹状突起を伸ばす複数の双極性神経細胞が観察された。EPには3個の神経細胞が存在した。日140号×支145号と日601号×中601号についてはLS、MSの横断切片を透過型電子顕微鏡で観察したが、感覚子間、及び品種間で顕著な違いは認められず、それぞれ5個の神経細胞が存在した。形態的な特徴から1個は機械受容細胞と思われる。広食性蚕を含む9系統について外部形態を比較したところ、LS、MSの先端部の形状に系統による特徴が存在し、通常8個である小腮肢の錐状感覚子数が異なる個体も少なからず見られたが、これらと食性との関連はなかった。

### 4. カイコの上咽頭感覚子味覚細胞の電気生理学的解析

カイコの小腮の味覚機能については、LSには糖受容細胞、イノシトール受容細胞が、MSには苦味物質受容細胞が存在することなどが電気生理学的な研究により既に判っている。糖は摂食促進的に働き、イノシトールにはショ糖の摂食促進作用を相乗的に高める効果があるとされる。苦味物質受容細胞は、昆虫では一般にゲターレント細胞とよばれ、この応答が摂食阻害行動を引き起こすといわれている。一方、カイコのEPの味覚細胞については全く調べられていなかったため、その性質をチップレコーディング法を用いて電気生理学的に調べた。

CaCl<sub>2</sub>以外の塩や酸に対しては、少なくとも2種のスパイクが見られ、顕著ではないが濃度応答もみられた。これにイノシトールを加えると新たにスパイクが加わりその濃度の増加



とともにスパイク数とスパイクの高さが増加した。糖類には応答がないため、イノシトール受容細胞が存在することがわかった。硝酸ストリキニーネ、サリシン等の苦味物質に対しても大きなスパイクが濃度応答するため、デターレント細胞が存在すると思われた。濃度等によりスパイクの高さが変わるこのデターレント細胞の性質により、細胞の同定が曖昧な場合があるが、デターレント細胞が塩や酸に応答する大きなスパイクを出す細胞と同一である可能性がある。

## 5. 日601号×中601号、沢J等の広食性蚕系統の味覚応答

広食性蚕の日601号×中601号、沢J、及び沢Jと中02号を交配してLP-1飼料の食性関連遺伝子を導入したCSJ02は、LP-1飼料の摂食性に関しては3系統とも同一の遺伝子に支配されている可能性が高い。そこで、これら広食性蚕の味覚応答を記録し、この遺伝子の機能を探るとともに食性と味覚との関連を調べた。

LSの糖受容細胞、イノシトール受容細胞のショ糖、イノシトールに対する濃度応答を上記広食性の3系統と日137号×支146号、中02号の計5系統で比較したところ、系統の違いはあるが、食性との相関はなかった。MSのデターレント細胞の硝酸ストリキニーネとサリシンの濃度応答を比較したところ、硝酸ストリキニーネに対しては広食性と正常系統の間での顕著な違いは認められなかったが、サリシンに対して広食性蚕の閾値が高いことがわかった。EPのデターレント細胞の応答についても同様な違いが見られた。ニコチン、ブルシン、カフェイン、フロリジン、クマリン、20-ヒドロキシエクダイソンについては、日137号×支146号と沢Jの2系統間でMSのデターレント細胞の濃度応答を比較したところ、フロリジンで沢Jの応答の閾値が高い点でサリシンと類似の差が見られた。一方、ニコチン、ブルシン、20-ヒドロキシエクダイソンについては各濃度で沢Jの方がスパイク頻度が高かった。その他の数種の物質について1mMの濃度で応答を比較したが、アルブチン、アミグダリンに対して沢Jには応答がほとんどない点で特に顕著な違いが見られた。したがって、デターレント細胞の苦味物質に対する感受性は、系統や物質によって異なり、食性の違いと関連があることが示された。そして、食性関連遺伝子がO-配糖体のような特定グループの苦味物質の感受性を支配し、デターレント細胞の応答する物質の種類やその感受性の違いが食性の違いに関与すると考えられた。

## 6. 食性異常突然変異蚕*Nps*の摂食行動とその味覚の関与について

前記の広食性蚕の他にも、異なる遺伝子に支配される食性異常系統が知られている。このうち、 $\gamma$ 線照射によって作られた突然変異である*Nps*が発現する異常形質を探索する目的で、同一蛾区に分離する*Nps-Ze*個体と正常個体の間で、苦味物質に対する摂食行動、味覚細胞の電気生理的応答及び軸索投射経路の比較を行った。

摂食行動は、硝酸ストリキニーネやサリシン溶液を浸透させたペレット飼料を与えて、摂食開始までの時間と45分間の合計摂食時間等を比較した。その結果、*Nps*個体に対する摂食阻害作用はいずれの指標においても低く、また個々の摂食時間の平均が長い傾向が認められた。味覚細胞の応答は、LS、MSからショ糖、イノシトール、硝酸ストリキニーネ、サリシンに対する濃度応答を記録したが、いずれの物質に対してもスパイク頻度の時間的変化や濃度応答には違いが見られなかった。味覚細胞の軸索投射は、単一感覚子からコバルトリジンを取り込ませてホールマウント観察したが、食道下神経節から脳に投射する経路に大きな違いはなかった。この結果は前記の広食性蚕とは異なり、*Nps*個体ではデターレント細胞の応答が必ずしも摂食行動や食性とは関連しないことを示している。おそらく、味覚細胞が受容して中枢神経系に伝達した情報が、運動神経に至るまでのネットワークのどこかに異常があるために正常に処理されないものと思われる。

以上のように本研究では、味覚刺激物質（特に摂食阻害物質）が摂食行動に及ぼす影響を摂食時間の記録から見だし、その味覚刺激物質を受容するカイコの味覚感覚子、味覚細胞の基本的形態を明らかにした。中でもカイコでは初めての記載となる上咽頭感覚子については電気生理的応答から3個の細胞を新たに同定した。さらにこれらの成果をもとに、本研究で育成した日601号×中601号を含む数種の広食性系統の摂食行動、味覚器官の形態、味覚細胞の応答を正常の系統と比較することにより、食物選択に関与する味覚神経機構の一端を明らかにすることができた。特に、デターレント細胞の物質選択的な感受性が食性を支配する可能性を示唆した上記5の結果は、昆虫の寄主変換の進化的過程のモデルともなる重要な発見である。一方、*Nps*については異常形質を特定するに至らなかったが、中枢神経系における味覚情報処理過程の遺伝的変化が食物選択、さらには寄主変換に関与することを示したことは意義深い。

## 引用文献

- Ai H., Kuwasawa K., Yazawa T., Kurokawa M., Shimoda M. and Kiguchi K. (1995) A physiological saline for lepidopteran insects: effects of ionic composition on heart beat and neuromuscular transmission. *J. Insect Physiol.* **41**, 571-580.
- Albert, P.J. (1980) Morphology and innervation of mouthpart sensilla in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. J. Zool.* **58**, 842-851.
- Arora K., Rodrigues V., Joshi S., Shanbhag S., Siddiqi O. (1987) A gene affecting the specificity of the chemosensory neurons of *Drosophila*. *Nature* **330**, 62-63.
- Asaoka, K. (1996) Characteristics of gustatory impulse response to inositol in the maxillary styloconic sensilla of *Antheraea yamamai* larva. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **2**, 15-19.
- Asaoka, K. (2002) Central projections of sensory neurons in the medial and lateral maxillary styloconic sensillum of *Antheraea yamamai* larva. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **7**, 43-46.
- Asaoka, K. and Akai, H. (1991) Morphology of the larval taste organs of *Antheraea yamamai* and their spike responses to stimulation with certain sugars and alkaloids. In: Akai, H. and Kiuchi, M. (eds.), *Wild Silkmoths '89- '90*, pp. 35-42.
- Bacon, J.P. and Altman, J.S. (1977) A silver intensification method for cobalt-filled neurones in wholemount preparations. *Brain Res.* **138**, 359-363.
- Baird, D.H., Koto, M. and Wyman, R.J. (1993) Dendritic reduction in *Passover*, a *Drosophila* mutant with a defective giant fiber neuronal pathway. *J. Neurobiol.* **24**, 971-984.
- Berenbaum, M.R. (1991) Comparative processing of allelochemicals in the Papilionidae (Lepidoptera). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **17**, 213-221.
- Bernays, E.A. (1996) Selective attention and host-plant specialization. *Entomol. Exp. Appl.* **80**, 125-131.
- Bernays, E.A. and Arthur Woods, H. (2000) Foraging in nature by larvae of *Manduca sexta* – influenced by an endogenous oscillation. *J. Insect Physiol.* **46**, 825-836.
- Bernays, E.A. and Chapman, R.F. (1987) The evolution of deterrent responses in plant-feeding insects. In: Chapman, R.F., Bernays, E.A. and Stoffolano, J.G. (eds.) *Perspectives in chemoreception and behavior*, Springer-Verlag, New York, pp 159-173.

- Bernays, E.A. and Chapman, R.F. (1994) In: Bernays EA, Chapman RF (eds) Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- Bernays, E.A. and Chapman, R.F. (2000) A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of *Heliothis* with different diet breadths. *J Insect Physiol.* **46**, 905-912.
- Bernays, E.A. and Simpson, S.J. (1982) Control of food intake. *Adv. Insect Physiol.* **16**, 59-118
- Blaney, W.M. and Chapman, R.F. (1969) The fine structure of the terminal sensilla on the maxillary palps of *Shistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera, Acrididae). *Z. Zellforsch.* **99**, 74-97.
- Blaney, W.M., Simmonds, M.S.J., Ley, S.V. and Jones, P.S. (1988) Insect antifeedants: a behavioural and electrophysiological investigation of natural and synthetically derived clerodane diterpenoids. *Entomol. Exp. Appl.* **46**, 267-274.
- Blom, F. (1978) Sensory activity and food intake: a study of input-output relationships in two phytophagous insects. *Neth. J. Zool.* **24**, 58-63.
- Bowdan, E. (1988) The effect of deprivation on the microstructure of feeding by the tobacco hornworm caterpillar. *J. Insect Behav.* **1**, 31-50.
- Bowdan, E. (1995) The effects of a phagostimulant and a deterrent on the microstructure of feeding by *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol. Exp. Appl.* **77**, 297-306.
- Budnik, V., Zhong, Y. and Wu C.-F. (1990) Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J. Neurosci.* **10**, 3754-3768.
- Callahan, C.A., Muralidhar, M.G., Lundgren, S.E., Scully, A.L. and Thomas, J.B. (1995) Control of neuronal pathway selection by a *Drosophila* receptor protein-tyrosine kinase family member. *Nature* **376**, 171-174.
- Carlson, J.R. (1996) Olfaction in *Drosophila*: from odor to behavior. *Trends in Genetics* **12**, 175-180.
- Chapman, R.F. (1995) Chemosensory regulation of feeding. In Chapman, R.F. and de Boer, G. (eds.) *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*, Chapman & Hall, New York, pp. 101-136.
- Cuperus, P.L. (1985) Inventory of pores in antennal sensilla of *Yponomeuta* spp. (Lepidoptera: Yponomeutidae) and *Adoxophyes orana* F. v. R. (Lepidoptera: Tortricidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* **14**, 347-359.

- de Boer, G., Dethier, V.G. and Schoonhoven, L.M. (1977) Chemoreceptors in the preoral cavity of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and their possible function in feeding behaviour. *Entomol. Exp. Appl.* **21**, 287-298.
- de Boer, G. and Hanson, F. (1987) Differentiation of roles of chemosensory organs in food discrimination among host and non-host plants by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Physiol. Entomol.* **12**, 387-398.
- Dethier, V.G. (1937) Gustation and olfaction in lepidopterous larvae. *Biol. Bull. Woods. Hole Mass.* **72**, 7-23.
- Dethier, V.G. (1973) Electrophysiological studies of gustation in Lepidopterous larvae II. Taste spectra in relation to food-plant discrimination. *J. Comp. Physiol.* **82**, 103-134.
- Dethier, V.G. (1980) Evolution of receptor sensitivity to secondary plant substances with special reference to deterrents. *Am. Nat.* **115**, 45-66.
- Dethier, V.G. (1982) Mechanism of host-plant recognition. *Entomol. Exp. Appl.* **31**, 49-56.
- Dethier, V.G. and Kuch, J.H. (1971) Electrophysiological studies of gustation in Lepidopterous larvae. I. Comparative sensitivity to sugars, amino acids, and glycosides. *Z. vergl. Physiologie* **72**, 343-363.
- Devitt, B.D. and Smith, J.J.B. (1982) Morphology and fine structure of mouthpart sensilla in the dark-sided cutworm *Euxoa messoria* (Harris)(Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* **11**, 255-270.
- 榎島守利・山本俊雄・上条伊喜男 (1984) 支 1 3 6 号の人工飼料低摂食性を支配する遺伝子分析. *蚕糸研究* **130**, 36-41.
- Falk, R. and Atidia, J. (1975) Mutation affecting taste perception in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **254**, 325-326.
- Fox, A.L. (1931) Six in ten "taste blind" to bitter chemicals. *Science News-Letter* **19**, 249.
- Fraenkel, G.S. (1959) The raison d'Étre of secondary plant substances. *Science* **129**, 1466-1470.
- 藤巻胡友・山本俊雄・田中教夫 (1982) 食性異常蚕「沢 J」の人工飼料摂食性の遺伝様式. *日蚕雑* **51**, 235-236.
- 蒲生卓磨・大塚雍雄 (1980) 血液の蛋白質多型にもとづく蚕品種の系統発生学的研究. *蚕試報* **28**, 15-50.

- Glendinning, J.I. (1996) Is chemosensory input essential for the rapid rejection of toxic foods? *J. Exp. Biol.* **199**, 1523-1534.
- Glendinning, J.I., Hills, T.T. (1997) Electrophysiological evidence for two transduction pathways within a bitter-sensitive taste receptor. *J. Neurophysiol.* **78**, 734-745.
- Glendinning J.I., Nelson, N.M. and Bernays, E.A. (2000) How do inositol and glucose modulate feeding in *Manduca sexta* caterpillars? *J. Exp. Biol.* **203**, 1299-1315.
- Glendinning, J.I., Tarre, M. and Asaoka, K. (1999) Contribution of different bitter-sensitive taste cells to feeding inhibition in a caterpillar (*Manduca sexta*). *Behav. Neurosci.* **113**, 840-854.
- Glendinning, J.I., Valcic, S. and Timmermann, B.N. (1998) Maxillary palps can mediate taste rejection of plant allelochemicals by caterpillars. *J. Comp. Physiol. A* **183**, 35-43.
- Griss, C., Simpson, S.J., Rohrbacher, J. and Rowell, C.H.F. (1991) Localization in the central nervous system of larval *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) of areas responsible for aspects of feeding behavior. *J. Insect Physiol.* **37**, 477-482.
- Grimes, L.R. and Neunzig, H.H. (1986) Morphological survey of the maxillae in last-stage larvae of the suborder *Ditrysia* (Lepidoptera): mesal lobes (Laciniogaleae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **79**, 510-526.
- Hamamura, Y., Hayashiya, K. and Naito, K. (1961) Food selection by silkworm larvae, *Bombyx mori*. *Nature* **190**, 879-881.
- Hamamura, Y., Hayashiya, K., Naito, K., Matsuura, K. and Nishida, J. (1962) Food selection by silkworm larvae. *Nature* **194**, 754-755.
- 浜野国勝・宮沢清・向山文雄 (1986) カイコにおける食性の品種間差異. *日蚕雑* **55**, 68-72.
- Hanson, F.E. and Dethier, V.G. (1973) Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **19**, 1019-1034.
- 平尾常男・荒井成彦 (1990) カイコ幼虫のアミノ酸に対する味覚応答および摂食反応. *応動昆* **34**, 73-76.
- 平尾常男・荒井成彦 (1991) カイコの寄主植物選択における味覚認識の役割. *応動昆* **35**, 197-206.
- 平尾常男・石川誠男・荒井成彦 (1972) カイコの摂食機構に関する研究 I. 走化性と摂食に  
関与する嗅覚器の役割. *日蚕雑* **41**, 413-417.
- 平尾常男・山岡景行 (1981) カイコの摂食行動パターンの解析—感電型アクトグラフ. *日蚕*

- 雑 **50**, 335-342.
- 平尾常男・山岡景行・荒井成彦 (1976) カイコの摂食機構に関する研究 II. 小腮の嗅覚入力と大腮の嚙咬運動. 蚕試報 **26**, 385-407.
- 堀江保宏・井口民夫・渡辺喜二郎・中曽根正一・柳川弘明 (1973) 家蚕の人工飼料の組成改善に関する二, 三の試験. 蚕試彙報 **96**, 7-20.
- Horie, Y. and Ito, T. (1963). Vitamin requirements of the silkworm. *Nature* **197**, 98-99.
- Horie, Y. and Ito, T. (1965). Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*. X. Vitamin B requirements and the effects of several analogues. *J. Insect Physiol.* **11**, 1585-1593.
- 堀江保宏・渡辺喜二郎 (1983) 線形計画法による家蚕人工飼料組成の設計とくに家畜用飼料素材の導入について. 蚕試報 **29**, 259-283.
- 堀江保宏・渡辺喜二郎・伊藤智夫 (1966) 家蚕の栄養に関する研究 XIV. ビタミンB群の要求について (続報). 蚕試報 **20**, 393-409.
- 堀江保宏・山本尚義・柳川弘明・渡辺喜二郎・中曽根正一 (1980) 線形計画法を利用したカイコの人工飼料設計の試み. 日蚕雑 **49**, 100-106.
- 堀内彬明・清水滋 (1961) ノニレによる蚕児の飼育について. 日蚕雑 **31**, 50-52.
- Hodgson, E.S., Lettvin, J.Y. and Roeder, K.D. (1955) Physiology of a primary chemoreceptor unit. *Science* **122**, 417-418.
- 井口民夫・中村晃三・吉村亮・新倉克巳・野尻邦雄(1975)人工飼料中の桑葉粉末量と原蚕の摂食および生育. 蚕試彙報 **102**, 59-68.
- Ishikawa, S. (1963) Responses of maxillary chemoreceptors in the larva of the silkworm, *Bombyx mori*, to stimulation by carbohydrates. *J. Cell.Comp.Physiol.* **67**, 1-11.
- Ishikawa, S. (1966) Electrical response and function of a bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larva of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Cell. Physiol.* **67**, 1-12.
- Ishikawa, S. (1967) Maxillary chemoreceptors in the silkworm. In: Hayashi, T. (ed.), *Olfaction and Taste II*, Pergamon Press, Oxford & New York, pp. 761-777.
- 石川誠男・平尾常男 (1961) 家蚕幼虫頭部の接触感受器官について. 日蚕雑 **30**, 17-22.
- 石川誠男・平尾常男 (1963) 家蚕幼虫の味覚に関する電気生理学的研究 小腮の sensilla styloconica の感受性. 蚕試報 **18**, 297-357.
- 石川誠男・平尾常男 (1966) 家蚕の食性に関する研究 (I) 宿主植物選択性特に摂食抑制機構の分析. 蚕試報 **20**, 291-321.

- Ishikawa, S., Hirao, T. and Arai, N. (1968) Some aspects of food preference in silkworm larvae, *Bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* **3**, 148-150.
- Ishikawa, S., Hirao, T. and Arai, N. (1969) Chemosensory basis of hostplant selection in the silkworm. *Entomol. Exp. Appl.* **12**, 544-554.
- 石川誠男・田島弥太郎・平尾常男 (1963) 食性異常蚕における糖感覚毛、水感覚毛に分布する化学受容細胞の反応. *日蚕雑* **32**, 125-129.
- Ishimoto, H., Matsumoto, A. and Tanimura, T. (2000) Molecular identification of a taste receptor gene for trehalose in *Drosophila*. *Science* **289**, 116-119.
- Isono K and Kikuchi T (1974) Autosomal recessive mutation in sugar response of *Drosophila*. *Nature* **248**: 243-244.
- 伊藤智夫 (1959) 蚕児の食性について. *日蚕雑* **28**, 52-57.
- Ito, T. (1960). Effect of sugars on feeding of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **5**, 95-107.
- Ito, T. (1961). Effect of dietary ascorbic acid on the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature* **192**, 951-952.
- Ito, T. (1980). Application of artificial diets in sericulture. *JARQ* **14**, 163-168.
- 伊藤智夫・堀江保宏・Fraenkel, G. (1959) 小腮切除蚕によるキャベツと桜葉の食下について. *日蚕雑* **28**, 107-113.
- 伊藤智夫・堀江保宏・渡辺喜二郎・高宮邦夫・古山三夫・宮林満雄・山本一雄・長島政喜 (1974) 準合成飼料による家蚕の全齢飼育について. *農化* **48**, 403-407.
- Ito, T., Kawashima, K., Nakahara, M., Nakanishi, K. and Terahara, A. (1964) Effects of sterols on feeding and nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* (L). *J. Insect Physiol.* **10**, 225-238.
- Jermey T (1966) Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. *Entomol. Exp. Appl.* **9**, 1-12.
- Jermey T (1984) Evolution of insect/host plant relationships. *Am. Nat.* **124**, 609-630.
- Jermey T (1993) Evolution of insects-plant relationships - a devil's advocate approach. *Entomol. Exp. Appl.* **66**, 3-12.
- 神田俊男 (1992) カイコにおける線形計画人工飼料の摂食性に関する遺伝育種学的研究. *蚕糸昆虫研報* **5**, 1-89.
- 神田俊男・田村俊樹 (1991) 広食性蚕品種の育種素材の作出. *蚕糸昆虫研報* **3**, 7-16.
- 神田俊男・田村俊樹・井上元 (1988) 線形計画法による人工飼料 LP-1 に対するカイコの摂



- 食性とその遺伝. 日蚕雑 **57**, 489-494.
- Kent, K.S. and Hildebrand, J.G. (1987) Cephalic sensory pathways in the central nervous system of larval *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* **315**, 1-36.
- Klein, T.W. and DeFries JC (1970) Similar polymorphism of taste sensitivity to PTC in mice and men. *Nature* **225**, 555-557.
- Krieger, R.I., Feeny, P.P. and Wilkinson, C.F. (1971) Detoxication enzymes in the guts of caterpillars: an evolutionary answer to plant defenses? *Science* **172**, 579-581.
- Lin, K. (1976). Studies on the substances of leaves affecting positive and negative phagoactivities of the domestic silkworm. *Mem. Fac. Kyoto Univ., Ser. Biol.* **7**, 67-94.
- Lundgren, S.E., Callahan, C.A., Thor, S. and Thomas, J.B. (1995) Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homedomain gene *apterous*. *Development* **121**, 1769-1773.
- Lush, I.E. (1984) The genetics of tasting in mice III Quinine. *Genet. Res. Camb.* **44**, 151-160.
- Ma, W.C. (1972) Dynamics of feeding responses in *Pieris brassica* Linn as a function of chemosensory input: a behavioural, ultrastructural and electrophysiological study. *Med. Land. Wag.* **72**, 1-162.
- Ma, W. C. (1976) Mouth parts and receptors involved in feeding behavior and sugar perception in the african armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera, Noctuidae). *Symp. Biol. Hung.* **16**, 139-151.
- 真野保久・朝岡潔・井原音重・中川浩・平林隆・村上正子・永易健一 (1991) 広食性多糸量蚕品種「あさぎり」の育成. 蚕糸昆虫研報 **3**, 31-56.
- Menken, S.B.J. (1996) Pattern and process in the evolution of insect-plant associations: *Yponomeuta* as an example. *Entomol. Exp. Appl.* **80**, 297-305.
- Menken, S.B.J., Herrebut, W.M. and Wiebes, J.T. (1992) Small ermine moths, *Yponomeuta*: their host relations and evolution. *Ann. Rev. Entomol.* **37**, 41-66.
- Miller, J.R. and Strickler, K.L. (1984) Finding and accepting host plants. In Bell, W.J. and Carde, R.T. (eds.), *Chemical Ecology of Insect*, Chapman & Hall, New York, pp. 127-157.
- Mitchell, B.K., Justus K.A. and Asaoka, K. (1996) Deterrency and the variable caterpillar: *Trichoplusia ni* and sinigrin. *Entomol. Exp. Appl.* **80**, 27-31.
- Mori, M. (1982a) Effect of n-hexacosanol and n-octacosanol on the feeding of larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* **51**, 347-348.

- Mori, M. (1982b) n-Hexacosanol and n-octacosanol: feeding stimulants for larva of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. **28**, 969-973.
- 長島政喜 (1968) 人工飼料に対する蚕品種の適合性. 蚕試彙報 **92**, 1-20.
- 中村正雄 (1973) 人工飼料に適する蚕品種の適合性調査. 蚕試彙報 **96**, 159-165.
- 内藤謙一・浜村保次 (1961) 桑葉中の微量成分に関する研究 (第4報) 桑葉より myo-inositol の単離. 農化 **35**, 1106-1107.
- Narahashi, T. (1963) The properties of insect axons. Adv. Insect Physiol. **1**, 175-256.
- Nayar, J.K. and Fraenkel, G. (1962) The chemical basis of hostplant selection in the silkworm, *Bombyx mori* (L). J. Insect Physiol. **8**, 505-525.
- 新倉克巳 (1971) オオジシバリによる蚕の飼育. 蚕糸研究 **79**, 21-24.
- 新村正純 (1973) 畜産飼料原料及び家畜飼料のカイコの人工飼料への適応. 農化 **47**, 251-257.
- Niimura, M. and Ito, T. (1964) Feeding on filter paper by larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Insect Physiol. **10**, 425-430.
- Noldus, L.P.J.J. (1991) The Observer: A software system for collection and analysis of observational data. Behavior Research Methods, Instruments & Computers **23**, 415-429.
- 大沼昭夫・田島弥太郎 (1986) 蚕の食性突然変異に関する研究 (第2部) 第3報 伴性遺伝をする食性異常蚕 *Bt* について. 蚕研彙報 **34**, 17-25.
- 大沼昭夫・田島弥太郎 (1989) 蚕の食性突然変異に関する研究 (第2部) 第9報 諸桂由来の食性突然変異 *Nps* の連関検索. 蚕研彙報 **37**, 13-19.
- 大沼昭夫・田島弥太郎 (1990) 蚕の食性突然変異に関する研究 (第2部) 第12報 食性変異遺伝子 (*Nps*) の第3連関群における座位. 蚕研彙報 **38**, 15-22.
- 大沼昭夫・田島弥太郎 (1996) “世界一”に見出された新しい広食性遺伝子 *Sek*. 蚕研彙報 **44**, 1-13.
- Peterson, S.C., Hanson, F.E. and Warthen, Jr. (1993) Deterrence coding by a larval *Manduca* chemosensory neurone mediating rejection of a non-host plant, *Canna generalis* L. Physiol. Entomol. **18**, 285-295.
- Reynolds, S.E., Yeomans, M.R. and Timmins, W.A. (1986) The feeding behaviour of caterpillars (*Manduca sexta*) on tobacco and on artificial diet. Physiol. Entomol. **11**, 39-51.

- Rodrigues, V. and Siddiqi, O. (1981) A gustatory mutant of *Drosophila* defective in pyranose receptors. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 406-408.
- Rohrbacher J (1994a) Mandibular premotor interneurons of larval *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* **175**, 619-628.
- Rohrbacher J (1994b) Fictive chewing activity in motor neurons and interneurons of the suboesophageal ganglion of *Manduca sexta* larvae. *J. Comp. Physiol. A* **175**, 629-637.
- Rose, H.A. (1985) The relationship between feeding specialization and host plants to aldrin epoxidase activities of midgut homogenates in larval Lepidoptera. *Ecol. Entomol.* **10**, 455-467.
- Rowell, C.H.F and Simpson, S.J. (1992) A peripheral input of thoracic origin inhibits chewing movements in the larvae of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **38**, 475-483.
- 佐藤泰山 (1968) 超薄切片用鉛染色法の一改良法. *電子顕微鏡* **17**, 158-159.
- Schoonhoven, L.M. (1972) Plant recognition by lepidopterous larvae. In: Van Emden, H.F. (ed.) *Insect/Plant Relationships Symposia of the Royal Entomological Society of London No.6*, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne, pp 87-99.
- Schoonhoven, L.M. (1987) What makes a caterpillar eat? The sensory code underlying feeding behavior. In: Chapman, R.F., Bernays, E.A. and Stoffolano Jr., J.G. (eds.) *Perspectives in Chemoreception and Behavior*, Springer-Verlag, New York, pp. 69-97.
- Schoonhoven, L.M., Blaney, W.M. and Simmonds, M.S.J. (1992) Sensory coding of feeding deterrents in phytophagous insects, In: Bernays, E.A. (ed.), *Insect-Plant Interactions*, vol. 4, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 59-79.
- Schoonhoven, L.M. and Dethier, V.G. (1966) Sensory Aspects of host-plant discrimination by lepidopterous larvae. *Arch. Neerl. Zool.* **16**, 497-530.
- Shields, V.D.C. (1994a) Ultrastructure of the aporous sensilla on the galea of larval *Mamestra configurata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Can. J. Zool.* **72**, 2032-2054.
- Shields, V.D.C. (1994b) Ultrastructure of the uniporous sensilla on the galea of larval *Mamestra configurata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Can. J. Zool.* **72**, 2016-2031.
- 清水久仁光・松野道雄 (1975) 保存蚕品種の蟻蚕の人工飼料摂食性. *蚕糸研究* **97**, 9-24.
- Shimizu, T. and Asaoka, K. (1999) Responses of maxillary sensilla styloconica in *Bombyx mori* to glucosides from the traveler's joy, *Clematis peniculata*, a nonhost plant. *Sericologia* **39**, 129-132.

- Shimizu, T., Asaoka, K. and Numata, A. (1999) Osmundalin (lactone glucoside) stimulates receptor cells, associated with deterency, of *Bombyx mori*. *Z. Naturforsch.* **50c**, 463-465.
- Shingai, T. and Beidler, L.M. (1985) Interstrain differences in bitter taste responses in mice. *Chem. Senses* **10**, 51-55.
- Simpson, S.J. (1982) Patterns in feeding: behavioral analysis using *Locusta migratoria* nymphs. *Physiol. Entomol.* **6**, 315-324.
- Simpson, S.J. (1995) Regulation of a meal: chewing insects. In Chapman, R.F. and de Boer, G. (eds.) *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. Chapman & Hall, New York, pp. 137-156.
- Smith, J.J.B., Mitchell, B.K., Rolseth, B.M., Whitehead, A.T. and Albert, P.J. (1990) SAPIID tools: microcomputer programs for analysis of multi-unit nerve recordings. *Chem. Senses* **15**, 253-270.
- Spielman, A.I., Huque, T., Whitney, G. and Brand, J.G. (1992) The diversity of bitter taste signal transduction mechanisms. In: Corey, D.P. and Roper, S.D. (eds) *Sensory transduction*, The Rockefeller University Press, New York, pp 307-324.
- Stadler, E. and Hanson, F.E. (1975) Olfactory capabilities of the “gustatory” chemoreceptors of the tobacco hornworm larvae. *J. Comp. Physiol.* **104**, 97-102.
- Steller, H., Fischbach, K.-F. and Rubin, G.M. (1987) *disconnected*: A locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. *Cell* **50**, 1139-1154.
- 須藤光正・平田保夫・藤原裕紀・堀江保宏 (1995) ペレット飼料による蚕の飼育及び繭質成績. *蚕研彙報* **43**, 23-34.
- 高宮邦夫 (1968) 人工飼料に対する蚕品種の適応性. *蚕糸研究* **69**, 27-34.
- 田村俊樹 (1988) 数種の植物に対する保存蚕品種の摂食性とその遺伝. *蚕試彙報* **131**, 79-94.
- Tanaka, Y., Asaoka, K. and Takeda, S. (1994) Different feeding and gustatory responses to ecdysone and 20-hydroxyecdysone by larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Chem. Ecol.* **20**, 125-133.
- Tazima, Y. (1989) Alteration of food habit of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia* **29**, 437-453.
- Tazima, Y. (1994) Genetic analyses of polyphagous mutant strains of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia* **34**, 601-617.
- 田島弥太郎・小林義彦・小沢民治・町田勇 (1984) 蚕の食性突然変異 (*Np*) の研究. *蚕研彙報* **32**, 7-30.

- 田島弥太郎・大沼昭夫 (1986) 蚕の食性突然変異に関する研究 (第2部) 第2報 各種食性突然変異系統の後代追跡と系統間の相互作用. 蚕研彙報 **34**, 1-16.
- 田島弥太郎、大沼昭夫 (1991) 蚕の食性突然変異に関する研究 (第2部) 第13報 2種の広食性系統の遺伝的解析. 蚕研彙報 **39**, 1-9.
- Timmins, W.A., Bellward, K., Stamp, A.J. and Reynolds, S.E. (1988) Food intake, conversion efficiency, and feeding behaviour of tobacco hornworm caterpillars given artificial diet of varying nutrient and water content. *Physiol. Entomol.* **13**, 303-314.
- Timmins, W.A. and Reynolds, S.E. (1992) Physiological mechanisms underlying the control of meal size in *Manduca sexta* larvae. *Physiol. Entomol.* **17**, 81-89.
- 鳥居一男・森井謙介 (1948) 蚕児の食性に関する研究. 蚕研彙報 **2**, 3-12.
- 常山泉・田中幸夫 (2001) 蟻蚕の摂食性に及ぼす炭酸カルシウムの影響. 日蚕雑 **70**, 97-101.
- Ueno, K., Ohta, M., Morita, H., Mikuni, U., Nakajima, S., Yamamoto, K. and Isono, K. (2001) Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene Gr5a. *Curr. Biol.* **11**, 1451-1455.
- van Drongelen, W. (1979) Contact chemoreception of host plant specific chemicals in larvae of various *Yponomeuta* species (Lepidoptera). *J. Comp. Physiol.* **134**, 265-279.
- Waldbauer, G.P. and Fraenkel, G. (1961) Feeding on normally rejected plants by maxillectomized larvae of the tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Lepidoptera, Sphingidae). *Ann. Ent. Soc. Amer.* **54**, 477-485.
- Warren, R.P., Lewis, R.C. (1970) Taste polymorphism in mice involving a bitter sugar derivative. *Nature* **227**, 77-78.
- 渡辺昭典 (1970) ホソバワダンによる蚕児飼育について. 蚕糸研究 **77**, 54-57.
- Watanabe, T. (1958) Substances in mulberry leaves which attract silkworm larvae (*Bombyx mori*). *Nature* **182**, 325-326.
- Whitlock, K.E. (1993) Development of *Drosophila* wing sensory neurons in mutants with missing or modified cell surface molecules. *Development* **117**, 1251-1260.
- Wieczorek, H. (1976) The glycoside receptor of the larvae of *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Comp. Physiol. A* **106**, 153-176.
- 山本俊雄 (1983) 人工飼料摂食異常蚕の遺伝学的解析. 日蚕雑 **52**, 330-335.
- 山本俊雄・清水久仁光 (1982) 蟻蚕における人工飼料摂食性の遺伝学的解析. 日蚕雑 **51**,

- 332-336.
- 柳川弘明・渡辺喜二郎・中村匡利 (1988a) 線形計画法による原蚕用人工飼料の組成設計. 蚕試報 **30**, 569-588.
- 柳川弘明・渡辺喜二郎・中村匡利 (1988b) 広食性蚕利用による人工飼料への家畜用飼料素材の導入. 日蚕雑 **58**, 401-406.
- 矢澤盈・平尾常男・荒井成彦・八木繁実 (1991) 広食性蚕 (あさぎり及び沢 J) の摂食反応と味覚反応. 日蚕雑 **60**, 363-371.
- 横山忠雄 (1970) 食性異常蚕の品種別分布とその人工飼料に対する反応について. 蚕研彙報 **18**, 16-23.
- 横山忠雄 (1975) カイコの食性に関する研究 (XI) 食性異常蚕沢 J の由来と性質. 蚕研彙報 **24**, 27-30.
- 横山忠雄・望月澄子(1973) 突然変異蚕の食性に関する研究 (IV) リンゴその他の果実に対する食性. 蚕研彙報 **22**, 46-49.
- 横山忠雄・望月澄子 (1974) 突然変異蚕の食性に関する研究 (IX) 突然変異蚕のカキその他の果実に対する食性ならびに栄養に関する 2 - 3 の実験. 蚕研彙報 **23**, 11-21.
- 横山忠雄・中山政人 (1980) 突然変異蚕の食性に関する研究 (XVII) ウメ、サクラ、または、カキの葉に対するカイコの食性 附. 蚕の食べる植物の種の総括. 蚕研彙報 **28**, 7-17.
- 吉武成美 (1968) 家蚕日本種の起源に関する一考察. 日蚕雑 **37**, 83-87.
- Zacharuk, R.Y. (1985) Antennae and sensilla. In: Kerkut, G.A. and Gibert, L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Vol. 6, Pergamon, New York, pp. 1-69.

#### 【本論文の内容を印刷公表した文献】

- Asaoka, K. (2000) Deficiency of gustatory sensitivity to some deterrent compounds in "polyphagous" mutant strains of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol. A* **186**, 1011-1018.
- Asaoka, K. (2003) Ultrastructure of maxillary sensilla in the silkworm, *Bombyx mori*: Difference among strains? *J. Insect Biotech. Sericology* **72**, 117-125.
- 朝岡潔・真野保久(1992) 蚕における LP-1 人工飼料による広食性の初期選抜. 日蚕雑 **61**, 1-5.
- Asaoka, K. and Shibuya, T. (1995) Morphological and electrophysiological characteristics of the epipharyngeal sensilla of the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Exp. Appl.* **77**, 167-176.