

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07479

研究課題名(和文)明瞭分離された2つの嗅覚経路のシグナルフローの意義の解明

研究課題名(英文)Functional significance of two parallel olfactory pathways

研究代表者

西野 浩史(NISHINO, HIROSHI)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：80332477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚の優れた多くの動物は脳内に並行経路を持つ。並行経路の具体的な機能についての示唆を得るため、一次嗅覚中枢から二次嗅覚中枢(キノコ体)に至る2本の明瞭な並行経路を持つゴキブリを用いた形態・生理学的研究を行った。まず、局所色素注入実験により、この並行経路がどこまで維持されているか調べたところ、キノコ体の出力部位まで維持されていること、を明らかにした。次に一次嗅覚中枢中の単一嗅覚系球体に樹状突起を持ち、この情報をキノコ体に運ぶ介在ニューロンの性質について調べたところ、匂いの種類のみならず、匂いを運ぶ属性(気流)による自発発火の修飾様式が経路依存的に異なることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本発見は2本の嗅覚並行経路を形成する単一系球体投射ニューロンが嗅質の違いのみならず、匂いを運ぶ媒体(=気流)によっても修飾されることを示した。また、嗅覚並行経路がキノコ体までは維持されるが、これ以降の階層では並行処理された情報の統合がおこることを明確に示した。以上の成果は進化的に古い昆虫においても周囲の環境の違いに応じたダイナミックな匂い情報処理がなされること、キノコ体(記憶中枢)においても匂いの並列処理が維持されることを示した研究であり、動物の匂い情報処理の動的性質について多大な示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Parallel olfactory pathways were seen in brains of both vertebrates and invertebrates, but the functional aspects of segregated olfactory pathways is still unclear. To address this problem, we have used the cockroach *Periplaneta americana* which heavily relies on olfaction for resource searching. Our aim of this study was to characterize 1) whether two parallel pathways are maintained in Kenyon cells that constitute the mushroom body, 2) which information is encoded by the two parallel pathways. Dye injections into the axons of small populations of Kenyon cells revealed that two pathways are maintained by distinct subgroups of Kenyon cells, class I and class II cells. Intracellular recordings from output neurons of the first-order olfactory center (antennal lobe) revealed that activity of these neurons is modified by air flow that deliver odor molecules and that the modification manners differed between output neurons belonging to two distinct pathways.

研究分野：神経行動学

キーワード：昆虫 嗅覚 並行経路 投射ニューロン 触角葉 キノコ体 ケニオン細胞 記憶中枢

1. 研究開始当初の背景

無脊椎動物、脊椎動物問わず、嗅覚のすぐれた動物の一次嗅覚中枢から出力し、高次嗅覚中枢へと投射する嗅覚処理経路はしばしば複数の介在ニューロンからなる束（機能的まとまり）を形成することが知られる。これは並行経路と呼ばれる。

まず、哺乳動物、昆虫の一次嗅覚中枢には嗅覚糸球体と呼ばれる糸玉状の構造がある。同種の受容体を発現している嗅感覚細胞の軸索は特定の糸球体に収束する。よって、個々の糸球体は特定の嗅質を処理するための機能単位である。糸球体の数は動物種によって異なっており、マウスでは約 1800 個 (Mori et al., 2006)、ショウジョウバエでは 43 個 (Couto et al., 2005)、ミツバチのワーカーでは 173 個 (Nishino et al., 2009)、ゴキブリでは 205 個 (Watanabe et al., 2010) である。

並行経路の機能として濃度の異なる同じ匂いや異なる嗅質の匂いに対する異なる行動発現に寄与するとする証拠が存在する。たとえば、ショウジョウバエやマウスでは個々の糸球体から出力し、二次嗅覚中枢の異なる領域に情報を運ぶ並行分散経路 (parallel-distributed pathways) が精査されている。マウスにおいては、各糸球体から mitral cell、tufted cell という二種類の投射ニューロンが出力するが、これらはそれぞれ嗅質および濃度情報を運び、嗅皮質の異なる領域に投射する (Igarashi et al., 2012)。ショウジョウバエにおいては二酸化炭素を処理する単一糸球体から出力する複数の投射ニューロンが濃度依存的に動員されることで、異なる行動出力を生み出す (Lin et al., 2013)。

一方、ミツバチにおいては触角葉中に 2 つの糸球体クラスターが存在し、両者は異なる束を通る投射ニューロンのセットによってキノコ体の傘の異なる領域に運ばれる (Zwaka et al., 2016)。両クラスターの機能的違いは電気生理学的手法を用いて精査されてきたが、両者が処理する嗅質、刺激に対する応答潜時、発火パターンについては多くの類似性があり、明確な違いは見いだされていない (Carcaud et al., 2012; Brill et al., 2013)。

ゴキブリの並行経路は感覚細胞から一次嗅覚中枢の出力ニューロン (= 投射ニューロン) にいたるまで最も明瞭に分離されている (図 1 A)。触角葉で一般臭を処理する常糸球体は 1) 前方背側に位置し、形状の良く似た小さな糸球体約 100 個 (図 1 B) と 2) 後方腹側に位置し、形状の異なる大きな糸球体約 100 個 (図 1 C) に分かれる。2 グループの糸球体は異なるタイプの感覚子からの入力を受ける (図 1 A ; Watanabe et al., 2012)。各糸球体からは原則 1 本の投射ニューロンが出力し、キノコ体の傘と側葉に投射するが、両グループの投射域は明瞭に隔てられている (図 1 A ; Nishino et al., 2012; Watanabe et al., 2012)。傘の 2 つの入力部位のうち、辺縁部は 1 個のノンスパイキングニューロンを含む 3 個の GABA 作動性ニューロンによる抑制を受け、基部は 1 個の巨大 GABA 作動性ニューロンによる抑制を受ける (図 1 A; Takahashi et al., 2016)。このことは棒状感覚子 (basiconic sensilla) に由来する入力があるキノコ体において複数の抑制性ニューロンによるきめ細かい制御を受けるのに対し、毛状感覚子 (trichoid sensilla)、錐状感覚子 (coeloconic sensilla) に由来する入力が 1 つの抑制性ニューロンによって一緒に制御されることを意味する。

ところが、これほど解剖学的に明瞭に隔てられた経路にも関わらず、処理する嗅質には大きな重複があり、応答潜時にも有意な差はみいだされていない (Watanabe et al., 2012)。唯一の違いが応答の時間的パターンの違いであった (Watanabe et al., 2012)。この一見冗長にもみえる 2 つの経路の本質的な役割はこれまでわかっていなかった。

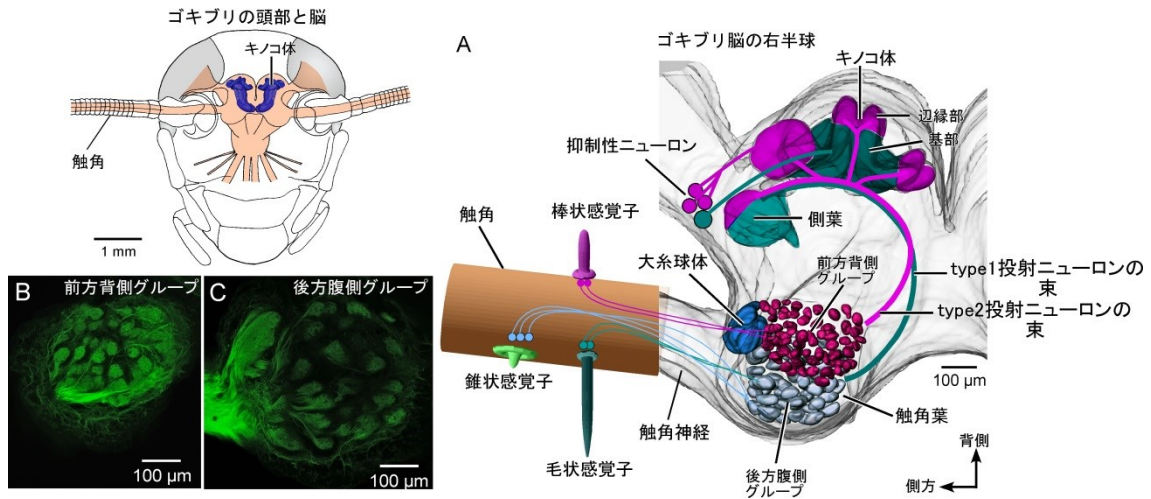


図1 ワモンゴキブリの並行処理経路の概略図

2. 研究の目的

本研究では、2本の並行経路が脳の上位中枢のどの階層まで維持されているのかについての経路精査を行ったうえで、一次嗅覚中枢である触角葉からの出力ニューロン（投射ニューロン）、二次嗅覚中枢であるキノコ体からの出力ニューロンの活動記録により、気流速度を変化させたときの活動電位応答を記録する。これらの実験を通じて、一般臭を処理するための並行経路の情報処理における具体的な機能を明らかにする。

3. 研究の方法

まず、キノコ体を構成する少数のケニオン細胞を染色するためにテトラメチルローダミン (Dextran, Tetramethylrhodamine, 3000 MW, Anionic, Lysine Fixable, D3308, ThermoFisher) の結晶をガラス管微小電極に付着させ、キノコ体の垂直葉を構成する14層の軸索の束のうち、連続する1~3層に導入することで行った (図参照)。染色された脳は冷蔵庫 (5 °C) 中の湿室で約1日静置してから、4%ホルムアルデヒドで固定、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い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 Pascal, Zeiss) で観察した。

触角葉から出力する投射ニューロンの細胞内記録はルシファーイエローCH (Sigma) を充填したガラス管微小電極を前大脳側葉に刺入することで行った。染色された脳は固定・脱水・透徹後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 5 Pascal, Zeiss) を用いて観察した。活動電位の記録データは市販のソフトウェア (Spike 2, CED) を用いて、詳細な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 不完全変態昆虫であるゴキブリの実験上の利点は、孵化後の後胚発生がゆっくりと、しかも付加的に進む点にある。一齢幼虫から11回の脱皮を経て成虫になるまでに、触角長は4 mm から5 cm まで10倍以上、触角感覚細胞の総数は14,000個から270,000個まで約20倍増加する (Schaller, 1978)。クラスIIケニオン細胞 (clawed dendrites) は孵化直後の1齢幼虫にすでに存在しており、クラスIケニオン細胞 (spiny dendrites) が成長とともに付加される (Farris and Strausfeld, 2001)。ケニオン細胞の軸索部位である葉部には発生依存的な年輪様の構造が明瞭にみられるが (Mizunami et al., 1997)、樹状突起のある傘部において部域差が存在するのかどうかについては長らく不明であった。

微量色素注入により、クラスIIケニオン細胞の樹状突起が傘部の辺縁部に (図2 A,B)、ク

ラス I ケニオン細胞の一部の樹状突起が傘の基部に強いバイアスを持つことを見いだした (図 2 C,D)。このことは、2本の並行経路が投射ニューロンよりもひとつ上の階層、すなわち、ケニオン細胞のレベルまでは維持されていることを示す。また、発生の観点からは前方背側系球体に由来する経路が孵化直後にすでに形成されており、後方腹側に由来する経路は脱皮を通じて徐々に完成することが強く示唆された。

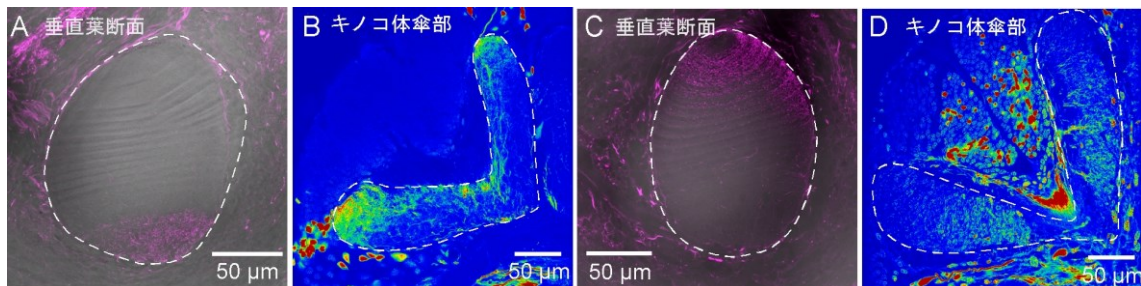


図2 キノコ体葉部への局所的色素注入実験によるケニオン細胞の樹状突起の部域差

(2) 嗅覚情報を処理する単一系球体投射ニューロンの細胞内記録を行った。記録中には触角に定常的に与えられる気流の速度や加速度に対し、投射ニューロンの自発発火がどのように変化するかについて調べた。記録後のニューロンには通電による細胞内染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその形態を詳細に観察した。その結果、一般臭を処理する投射ニューロンのほとんどが匂い刺激を行わない状態において、1-10 Hz 程度の自発発火を示すことがわかった。単一系球体に樹状突起を持つ投射ニューロンの約半数は気流に対する発火頻度の変化が見られないか、もしくは変化の不明瞭なタイプであり、残り半数が気流に対して明確な発火頻度変化がおこるタイプであった。発火頻度の変化がおこるタイプには流速を徐々に増加することでその自発発火が徐々に増大するものと自発発火が減弱するもの (図 3) が存在した。興味深いことに風速を徐々に上げたときと徐々に下げたときとで、同じ風速でも活動頻度が異なる履歴現象 (ヒステリシス) が見いだされた (図 3)。一方、キノコ体出力ニューロンについては投射ニューロンでみられたような嗅質による応答特異性が減少し、どの匂いに対しても良く似た応答を示すとともに、風速依存的な活動変化が不明瞭となった。この点は以下 (3) に記載された成果と矛盾しない。

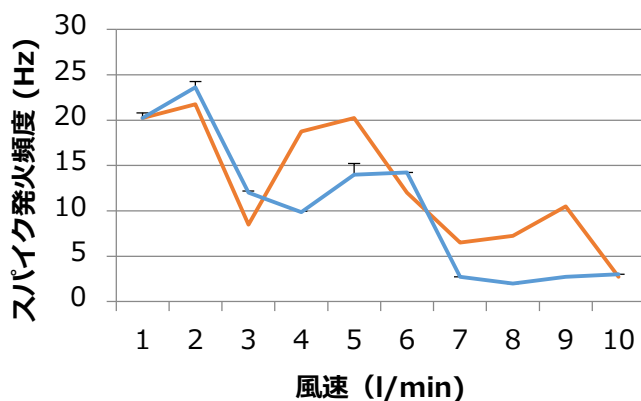


図3 触角葉の後方腹側の同定系球体 (E12) から出力する投射ニューロンの風応答性。風速に対する平均スパイク発火頻度 (平均±標準誤差) を示す。

(3) ワモンゴキブリの前大脳側葉にはキノコ体の出力ニューロンからの入力を受け、これをキノコ体の入力部位である傘に戻す GABA 作動性の巨大介在ニューロンが存在する。投射する 4

本の抑制性ニューロンの各々とキノコ体の出力ニューロンの活動の同時細胞内記録・染色を様々な組み合わせで行い、ニューロン間のシナプス接続について精査した（図3）。その結果、キノコ体に投射する抑制性ニューロンは形態学的・生理学的にみてもキノコ体出力ニューロンから直接のシナプスを受けると判断されること（図3）、またこの抑制性ニューロンがキノコ体出力ニューロンの匂い応答の強度を調節する役割を担っていることがわかった。さらにケニオン細胞の1つ先の階層であるキノコ体の出力ニューロンのレベルにおいては2つの並列的な経路で処理された情報が統合処理されていることがわかった（図4）。これは並列的な情報処理経路がどの階層まで維持されているのかを明示した研究で、ヒトなどの哺乳類がもつ脳の嗅覚情報処理系の基本構築の理解にもヒントを与える研究成果と言える。

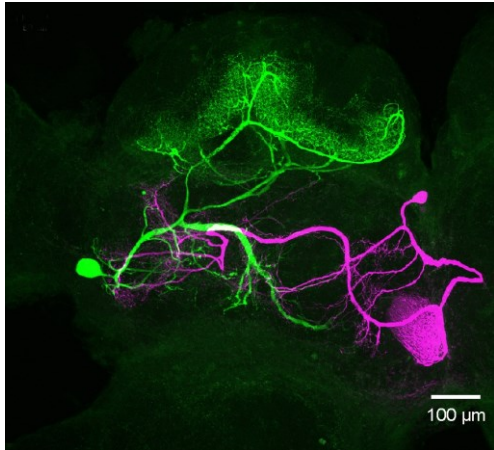


図3 キノコ体の傘部を支配する巨大抑制性ニューロン（緑）とそこに入力を与えるキノコ体出力ニューロン（マゼンタ）。

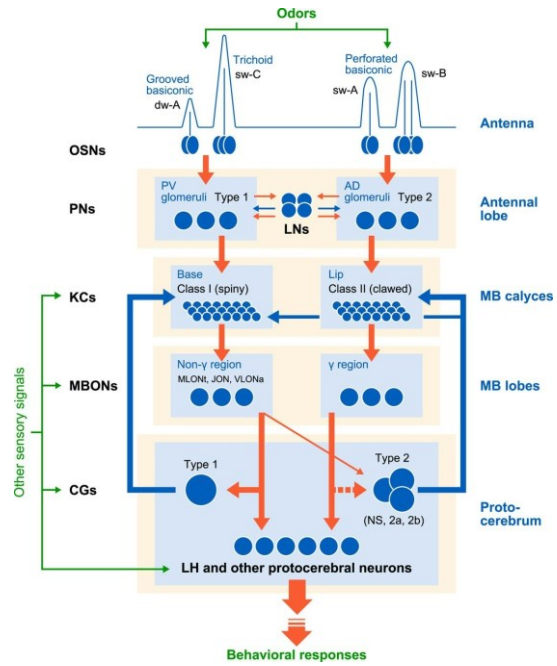


図4 ゴキブリ嗅覚並行経路についての作業仮説

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Paoli Marco, Nishino Hiroshi, Couzin-Fuchs Einat, Galizia C. Giovanni	4. 巻 223
2. 論文標題 Coding of odour and space in the hemimetabolous insect <i>Periplaneta americana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.218032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Naomi, Nishino Hiroshi, Domae Mana, Mizunami Makoto	4. 巻 39
2. 論文標題 Separate But Interactive Parallel Olfactory Processing Streams Governed by Different Types of GABAergic Feedback Neurons in the Mushroom Body of a Basal Insect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8690~8704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0088-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Domae Mana, Iwasaki Masazumi, Mizunami Makoto, Nishino Hiroshi	4. 巻 708
2. 論文標題 Functional unification of sex pheromone-receptive glomeruli in the invasive Turkestan cockroach derived from the genus <i>Periplaneta</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134320~134320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishino Hiroshi, Domae Mana, Takanashi Takuma, Okajima Takaharu	4. 巻 377
2. 論文標題 Cricket tympanal organ revisited: morphology, development and possible functions of the adult-specific chitin core beneath the anterior tympanal membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 193~214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-019-03000-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Hidehiro, Koike Yukino, Tateishi Kosuke, Domae Mana, Nishino Hiroshi, Yokohari Fumio	4. 巻 526
2. 論文標題 Two types of sensory proliferation patterns underlie the formation of spatially tuned olfactory receptive fields in the cockroach <i>Periplaneta americana</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2683 ~ 2705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino H., Iwasaki M., Paoli M., Kamimura I., Yoritsune A., Mizunami M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Spatial receptive fields for odor localization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 600-608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2017.12.055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe H., Nishino H., Mizunami M., Yokohari F.	4. 巻 11
2. 論文標題 Two Parallel Olfactory Pathways for Processing General Odors in a Cockroach	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 32 (1-20)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2017.00032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takahashi N., Nishino H., Mizunami M.
2. 発表標題 Separate but interactive parallel olfactory processing streams governed by different types of GABAergic feedback neurons in the mushroom body of cockroaches.
3. 学会等名 JSCPB2019, 東京大学 (駒場リサーチキャンパス)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurihara K., Ito T., Sato Y., Domae M., Komatsu M., Masuya N., Nishino H.
2. 発表標題 Flying insect management in summer highways through academic-industrial collaboration.
3. 学会等名 JSCPB2019, 東京大学(駒場リサーチキャンパス)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe H., Otsuka Y., Domae M., Ai H., Nishino H.
2. 発表標題 Postembryonic development of projection neurons in the cockroach antennal lobe
3. 学会等名 JSCPB2019, 東京大学(駒場リサーチキャンパス)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西野浩史、堂前愛
2. 発表標題 明瞭分離された2つの嗅覚経路は気流情報を符号化する
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marco Paoli, Einat Couzin-Fuchs, Milena Sekulic, Hiroshi Nishino, Giovanni C. Galizia
2. 発表標題 Neural representation of spatial odour perception in the American cockroach
3. 学会等名 International Congress of Neuroethology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野浩史
2. 発表標題 昆虫の聴覚・振動受容器-発見と観察のテクニック
3. 学会等名 日本昆虫学会第78回大会昆虫分類学若手懇談会シンポジウム「昆虫の発音と振動-その多様なアプローチ」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuma Takanashi, Hiroshi Nishino
2. 発表標題 Vibration sensitivity in a cerambycid pest and its potential for pest management
3. 学会等名 2nd International Symposium on Biotremology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊英博、小池雪乃、立石康介、堂前愛、西野浩史、横張文男
2. 発表標題 ワモンゴキブリの嗅覚局所受容野の形成機構
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Nishino, Mana Domae
2. 発表標題 Sex pheromone processing in Turkestan cockroach
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇賀神篤、西野浩史、尾崎克久
2. 発表標題 ナミアゲハのメス成虫におけるミカン葉抽出物提示時の活動脳領域の解析
3. 学会等名 第63回応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishino H.
2. 発表標題 Spatial odor coding in the cockroach
3. 学会等名 Mini symposium for olfactory processing in insects at University of Konstanz (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西野浩史
2. 発表標題 不動の神経メカニズムー擬死の進化的起源を探るー
3. 学会等名 第65回日本生態学会全国大会 W20自由集会 「昆虫の動きと不動を科学する」：生理学と生態学の融合を目指して
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishino H., Katoh K., Domae M.
2. 発表標題 Axonal layer-dependent dendritic organization of Kenyon cells in a hemimetabolous insect
3. 学会等名 JSCPB 2017 Fukuoka
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koga H., Watanabe H., Nishino H., Hojo M., Omura W., Takanashi T., Yokohari F.
2. 発表標題 Comparative study of antennal lobe glomeruli in seven species of termites
3. 学会等名 JSCPB 2017 Fukuoka
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takanashi T., Fukui S., Koike T., Nishino H.
2. 発表標題 Vibration sensitivity in cerambycid beetles and its potential for pest control
3. 学会等名 17th Invertebrate Sound and Vibration Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koga H., Watanabe H., Nishino H., Hojo M., Omura W., Takanashi T., Yokohari F.
2. 発表標題 Interspecies and intercaste comparisons of antennal lobe constitution in seven species of termite
3. 学会等名 2017 ISCE/APACE
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Paoli M., Nishino H., Galizia G.
2. 発表標題 How the cockroach brain can encode spatial olfactory information
3. 学会等名 Goettingen School
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 生物音響学会（高梨琢磨、編集委員代表）、西野浩史, et al.</p>	<p>4. 発行年 2018年</p>
<p>2. 出版社 丸善出版</p>	<p>5. 総ページ数 464</p>
<p>3. 書名 動物学の百科事典 8章（8番）、9章（15番）</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>西野研究室 http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/nishino/ Nishino Lab1 https://www.youtube.com/channel/UCyPUBf6ysfnIjNjdt-ebPxQ 北海道大学 電子科学研究所 http://www.es.hokudai.ac.jp/ 西野研究室 http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/nishino/ 北海道大学電子科学研究所 https://www.es.hokudai.ac.jp/</p>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----