

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03293

研究課題名(和文)匂いのアンタゴニズムの神経機構

研究課題名(英文)Neuronal basis of olfactory antagonism in moths

研究代表者

並木 重宏(Namiki, Shigehiro)

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：40567757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずカイコガを用いて、脳内情報経路中の4つの脳領域のうち、2次中枢以降の領域で匂いのアンタゴニズムの作用が起こっていることを明らかにした。続いてエビガラスズメにおいて、アンタゴニストの情報を前大脳側部へ伝達する細胞を同定した。カイコガ脳における2次中枢である前大脳側部では、性フェロモンとアンタゴニストを処理する領域が分かれていることが知られている。エビガラスズメでも軸索投射の分布を比較したところ、同じように性フェロモン情報が内側へ、アンタゴニストの情報が外側に出力されていることを確認した。異なる種で共通しており、この解剖学的特徴が匂いのアンタゴニズムに寄与している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガ類では性フェロモンによるコミュニケーションの発達に伴い、種の顕著な多様化がみとめられる。多様な信号が混在する実環境下で、異種のフェロモンによって、性フェロモン行動が抑制されるアンタゴニズムの機構は、フェロモン選好性の変化による生殖隔離において必要不可欠なプロセスであり、種分化のメカニズムを理解するうえで重要である。本研究成果はアンタゴニズムの機構について、解剖学的な知見を提供したという点で学術的な価値がある。

研究成果の概要(英文)：Electrophysiological techniques using silkworm *Bombyx mori* revealed that antagonism occurs in the second and later of the four brain regions in the information pathway. The second region in the silkworm moth brain, the lateral protocerebrum, is known to have separate areas for processing sex pheromones and antagonists. We then tested whether similar functional structures exist in insects other than the silkworm moth using a hawkmoth *Agrius convolvuli*, for which physiological measurements are relatively easy. In *Agrius*, we identified cells that transmit antagonist information to the lateral protocerebrum. By standardizing the experimental data, we compared the distribution of axonal projections and confirmed that, as in the silkworm moth, sex pheromone information is output inward and antagonist information outward. The commonality among different species suggests that this feature may contribute to antagonism.

研究分野：神経行動学

キーワード：匂い源探索 神経回路 フェロモン 細胞内記録 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

自然界には多彩なコミュニケーションの手段が存在する。嗅覚は、視覚や聴覚と比べ、桁違いに多い種類のセンサーを有する。他のモダリティのように連続的な物理量に対応しないため、信号のわずかな変化がコミュニケーションに影響を与えることが多く、種の多様化につながっている¹。夜行性のガ類は、性フェロモンによるコミュニケーションを発達させている。メスからの脂肪酸由来の化合物であるフェロモンは、オスの触角にある受容体によって検出され、メスへの定位行動が引き起こされる。性フェロモンの信号は、専用の嗅覚受容体で検出され、脳の感覚中枢である触角葉に送られる。その後、特化した神経回路(フェロモン情報処理経路)によって処理される²。性フェロモンと同時に異種のフェロモンを受容した場合、行動が抑制されることがある。このように、異種のフェロモンによって行動が抑制される現象をアンタゴニズム、これを引き起こす化合物のことを行動学的アンタゴニストとよぶ。アンタゴニズムは、混信を避ける機能を持ち、ガ類にみられる性フェロモン成分の顕著な多様化の要因となっている。アンタゴニストについても同様に専用の嗅覚受容体が存在し、性フェロモンとは異なる経路で処理されるが、高次中枢におけるアンタゴニストの情報処理経路は未だ明らかにされていなかった³。

2. 研究の目的

ガ類では性フェロモンによるコミュニケーションの発達に伴い、種の顕著な多様化がみとめられる。多様な信号が混在する実環境下で、異種のフェロモンによって、性フェロモン行動が抑制されるアンタゴニズムの機構は、フェロモン選好性の変化による生殖隔離において必要不可欠なプロセスであり、種分化のメカニズムを理解するうえで重要である。アンタゴニストの情報経路から、性フェロモン情報経路への神経活動の抑制が起こり、行動の抑制が起こるといふ仮説(図1)に基づき、フェロモン情報経路における神経活動抑制の作用点・作用機序を検討することにより、匂いのアンタゴニズムが脳のどこでどのように起こっているかを明らかにすることを目的とした。

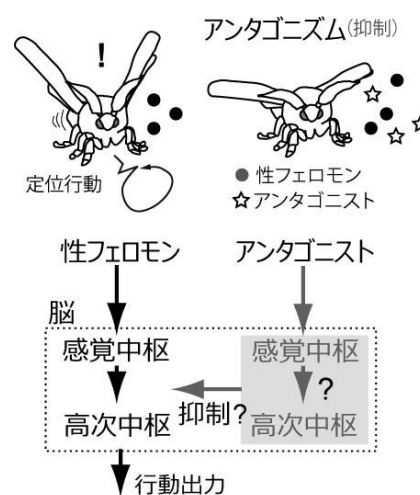


図1. アンタゴニズムにおける性フェロモン応答の抑制。性フェロモン(●)に反応して典型的なメスへの定位行動を示すが(左上)、他種フェロモン(アンタゴニスト, ☆)の存在下で行動が抑制される(右上)。アンタゴニストの情報処理経路から性フェロモンの情報処理経路への抑制入力が存在すると考えられる(下)。

3. 研究の方法

細胞内計測法 中空のガラス管を加熱して牽引し、先端径1μm以下の微小電極を作製した。毛細管現象により、電解質の水溶液を充填し、脳近傍に配置した参照電極との差として細胞内電位を計測した。この際、性フェロモン等の匂い刺激を提示して、細胞内電位の変化を観察した。

細胞内染色法

電極内液には電荷をもつ蛍光色素を同時に充填しておき、計測後に電流を印可することにより、計測を行った細胞の内部を標識した。その後組織の処理を経て、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、細胞の三次元形態を取得した。同時に組織の自家蛍光を取得することで、細胞以外の神経構造を取得した。

画像解析

AVIZO 6.3 (Visage Imaging, Carlsbad, CA, USA) を用いて、神経細胞と神経突起の自動トレースを実施した。手動でトレースした後、個々のオブジェクトを「smooth label」機能を使って平滑化した。誤検出は手動で修正した。セグメンテーションデータは、神経突起の分布の解析に使用された。マスキング処理は自作プログラム(MathWorks, Natick, MA, USA)を用いて行った。最大強度投影は、画像処理プログラムImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて実施した。

異なる個体から得られた組織データを比較するために、座標変換を実施した。変換アルゴリズムとして、アフィン変換を使用した。アフィン変換には、池野ら(Fiji plugin <https://github.com/sc4brain/neuroregister>)が開発したソフトウェアNeuroRegisterを用いた。基準点として解剖学的に再現性のあるランドマークである、デルタ領域最内部、デルタ領域最外部、デルタ領域基底部分先端、キノコ体茎部の基底部分(茎部と傘部の境界)、中心体上部の側方頂点の4点を選択した。神経突起分布を定量化するため、アフィン変換処理した神経細胞データを用いて、脳内外軸に沿ったボクセル数を計測した。

4. 研究成果

(A) 脳内のアンタゴニズムの作用点の探索 (カイコガによる研究)

これまでに嗅覚情報処理に関わる知見が蓄積されているカイコガを対象として、アンタゴニストによるフェロモン応答抑制の作用部位の探索を試みた。カイコガでは直列に接続されている4つの脳領域が性フェロモンの情報伝達経路として特定されている⁴ (図2)。

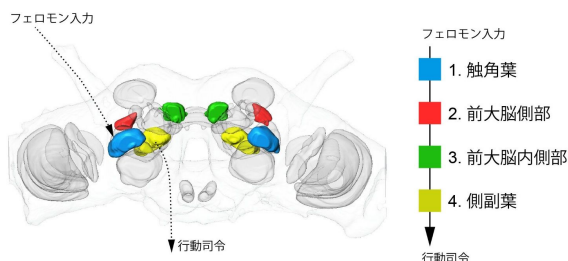


図2. カイコガで明らかにされた嗅覚情報経路。触角で検出された嗅覚情報は触角葉、前大脳側部、前大脳内側部、側副葉の順に伝達され、行動司令情報が下降性神経によって胸部神経系へと出力される。

触角葉の神経細胞は、性フェロモンであるボンピコールに対して興奮性応答を示すが、アンタゴニストであるボンピカールを付加することによってこの活動が抑制されない。この実験結果では行動観察において、アンタゴニストの付加によって、性フェロモン行動が抑制されることを説明することは難しい。東京大学の神崎らによって整備されたニューロデータベース⁵を検索することにより、4つ目の中枢である側副葉からの神経細胞からのデータを特定した (図3右)。この神経細胞では、性フェロモンであるボンピコールに興奮性応答を示すが (図3左最下段)、アンタゴニストであるボンピカールを付加すると興奮性応答が抑制される (図3左下から二段目)。2次、3次の中枢である前大脳側部、前大脳内側部での性フェロモンとアンタゴニストの作用については明らかになっていないが、触角葉の下流である前大脳側部から側副葉のいずれかの脳領域で、アンタゴニストによるフェロモン応答の抑制が起こることが分かった。

今回カイコガでの生理学実験は神経系のサイズが小さいこともあり、分析に十分な実験データを取得することができなかつたため、よりサイズが大きく生理学的な計測が比較的容易なエビガラスズメを対象とした。

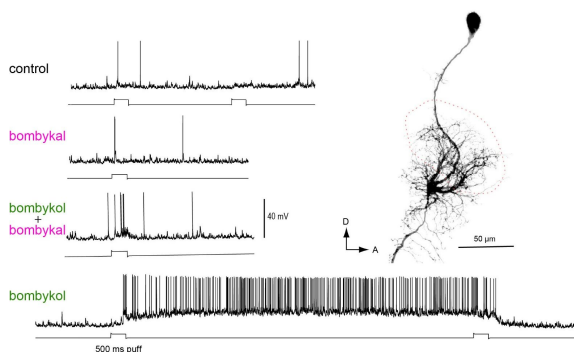


図3. アンタゴニスト付加による下行性神経の匂い応答の抑制。頭部と胸部を接続する下降性神経細胞の形態 (右上)。性フェロモンであるボンピコール (bombykol) に興奮性応答を示すが (最下段)、アンタゴニストであるボンピカール (bombykal) を付加すると興奮性応答が抑制される (下から二段目)。

(B) 前大脳側部の機能構造 (エビガラスズメによる研究)

カイコガの研究において、前大脳側部には性フェロモンとアンタゴニストに対応する機能的な構造があることが明らかにされている^{6,7}。成果 4-(A) から、アンタゴニストによるフェロモン応答抑制の作用部位の候補として、前大脳側部、前大脳内側部、側副葉の3領域があげられるが、前大脳側部は回路の構造として、フェロモンとアンタゴニストが相互作用することが推察される。

カイコガにおいては前大脳側部は、フェロモン情報を担う神経細胞は内側に投射し、反対にアンタゴニストの情報を担う神経細胞は外側に投射する。この構造がフェロモンの作用に重要であるのであれば、近縁の鱗翅目昆虫にも効率的な手段として、同様の機能的な構造があるのではないかと考え、続いて大型で生理学的計測が容易なエビガラスズメ *Agrius convolvuli* を用いた研究を行った。

エビガラスズメは、カイコガと同様に単一の化合物をフェロモンとして利用し、他種のフェロモンであるボンピカールがアンタゴニストとして作用する。エビガラスズメにおいては、フェロモン情報を伝達する神経細胞が同様に前大脳側部の内側に投射することが分かっていた⁸。今回の研究で、アンタゴニストの情報を伝達する神経細胞を新たに特定した (図4, 5)。続いて、エビガラスズメにおいても前大脳側部における性フェロモン、アンタゴニストが処理される領域の解剖学的な分析を行った。個々の実験データは異なる個体から取得したものであるが、同定可能な組織構造を基準点とした座標変換を用いることにより、標準化された座標における神経細胞の空間分布を比較した (図6 A-E)。その結果、フェロモ

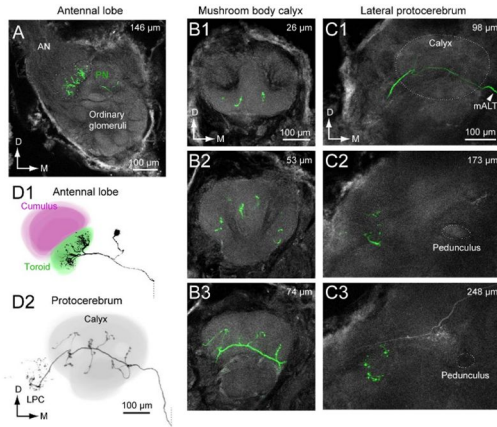


図4．エビガラスズメにおいてアンタゴニストの情報を伝達する細胞の形態。(A) 触角葉(Antennal lobe)の構造と神経細胞(緑)の樹状突起分布。(B) キノコ体(Mushroom body)と前大脳側部(Lateral protocerebrum)におけるアンタゴニストに反応する細胞の軸索投射。(D) 触角葉と前大脳の神経形態の三次元再構築。

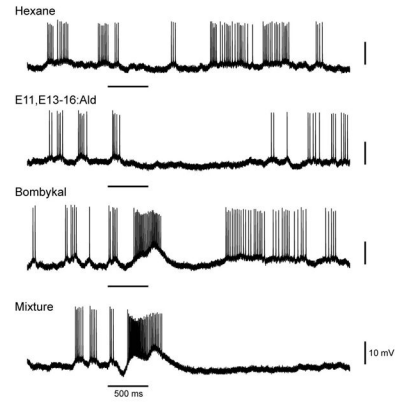


図5．エビガラスズメにおいてアンタゴニストの情報を伝達する細胞の匂い応答。ヘキサン(Hexane)、性フェロモン(E11,E13-16:Ald)には応答を示さなかったが、アンタゴニストであるボンビカル(Bombykal)には興奮性の応答を示した。

ン情報を伝達する神経細胞はより内側に、アンタゴニストの情報を伝達する神経細胞はより外側に投射することが分かった(図6F)。

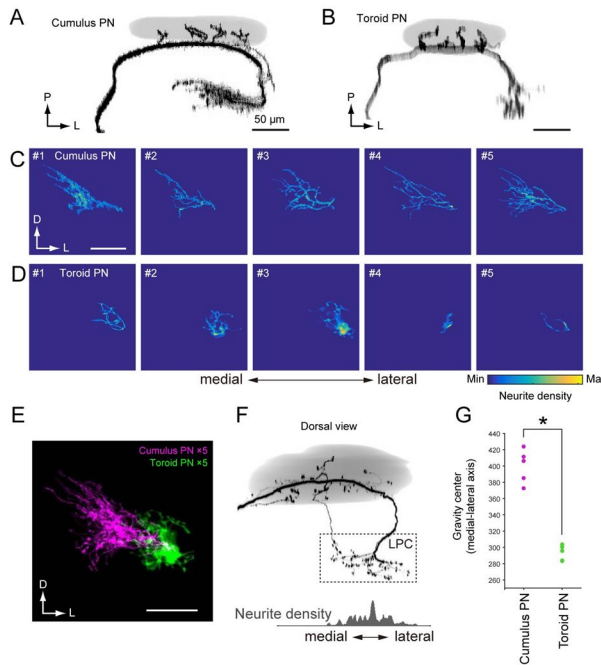


図6．エビガラスズメの前大脳側部において性フェロモンとアンタゴニストの情報は異なる領域で処理される。(A) 性フェロモン情報を伝達する触角葉神経(cumulus PN)の3次元再構築像。黒は神経細胞、灰色はキノコ体傘部の外形を示す。(B) アンタゴニスト情報を伝達する触角葉神経(toroid PN)の3次元再構築像。(C) 性フェロモン情報を伝達する触角葉神経5例の軸索の分布密度。(D) アンタゴニスト情報を伝達する触角葉神経5例の軸索の分布密度。(E) 性フェロモン情報(マゼンタ)とアンタゴニスト情報を伝達する神経細胞軸索密度(緑)の比較。(F) 水平方向の軸索密度の評価方法。(G) 性フェロモン情報(マゼンタ)とアンタゴニスト情報を伝達する神経細胞分布の重心(緑)の比較。両者の軸索終末の位置は異なっていた(* $p=0.0079$, Mann-Whitney U Test)。

前大脳へ性フェロモンが内側、アンタゴニストが外側に入力するという様式はカイコガと共通する特徴であるため、昆虫種間で共通する戦略となっている可能性がある(図7)。

本研究では、匂いのアンタゴニズムにおける前大脳側部の重要性を明らかにし、全大脳側部の内部において、性フェロモンとアンタゴニストの情報が表現される機能的な構造の存在を示唆した。それぞれの匂い情報を担う領域を接続する細胞が報告されている⁷。今後はこれらの領域の相互作用に関する機能的な研究が必要である。

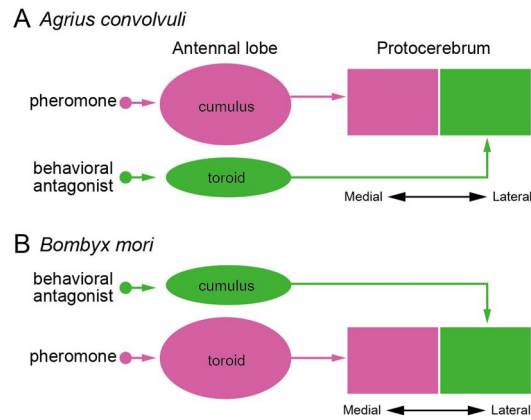


図7. エビガラスズメ(*Agrius convolvuli*)とカイコガ(*Bombyx mori*)の嗅覚情報経路。単一のフェロモン成分を用いる両種では、フェロモン情報は触角葉では異なる部位で処理されているが、ともに前大脳側部の内側に伝達されている。(A) エビガラスズメの脳内のフェロモン経路。性フェロモン情報は前大脳の内側(medial)に送られるが、アンタゴニストの情報が外側(lateral)に送られる。フェロモンとアンタゴニストを処理する領域をマゼンタと緑で示す。(B) カイコガの脳内フェロモン経路。エビガラスズメと同様に、性フェロモン情報は前大脳の内側に送られるが、アンタゴニストの情報が外側に送られる。

< 参考文献 >

1. Symonds, M. R. E. & Elgar, M. A. The evolution of pheromone diversity. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 220–228 (2008).
2. Hildebrand, J. G. & Shepherd, G. M. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 595–631 (1997).
3. Vickers, N. J., Christensen, T. A. & Hildebrand, J. G. Combinatorial odor discrimination in the brain: attractive and antagonist odor blends are represented in distinct combinations of uniquely identifiable glomeruli. *J. Comp. Neurol.* **400**, 35–56 (1998).
4. Namiki, S., Iwabuchi, S., Pansopha Kono, P. & Kanzaki, R. Information flow through neural circuits for pheromone orientation. *Nat. Commun.* **5**, 5919 (2014).
5. Kazawa, T., Ikeno, H. & Kanzaki, R. Development and application of a neuroinformatics environment for neuroscience and neuroethology. *Neural Netw.* **21**, 1047–1055 (2008).
6. Seki, Y., Aonuma, H. & Kanzaki, R. Pheromone processing center in the protocerebrum of *Bombyx mori* revealed by nitric oxide-induced anti-cGMP immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* **481**, 340–351 (2005).
7. Namiki, S. & Kanzaki, R. Morphology and physiology of olfactory neurons in the lateral protocerebrum of the silkworm *Bombyx mori*. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
8. Nirazawa, T. *et al.* Morphology and physiology of antennal lobe projection neurons in the hawkmoth *Agrius convolvuli*. *J. Insect Physiol.* **98**, (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Namiki Shigehiro, Ros Ivo G., Morrow Carmen, Rowell William J., Card Gwyneth M., Korff Wyatt, Dickinson Michael H.	4. 巻 32
2. 論文標題 A population of descending neurons that regulates the flight motor of Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1189 ~ 1196.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.01.008	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 Dombrowski Mark, Peek Martin Y., Park Jin-Yong, Vaccari Andrea, Sumathipala Marissa, Morrow Carmen, Breads Patrick, Zhao Arthur, Kurmangaliyev Yerbol Z., Sanfilippo Piero, Rehan Aadil, Polsky Jason, Alghailani Shada, Tenshaw Emily, Namiki Shigehiro, Zipursky S. Lawrence, Card Gwyneth M.	4. 巻 613
2. 論文標題 Synaptic gradients transform object location to action	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 534 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05562-8	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 Meissner Geoffrey W, Nern Aljoscha, Dorman Zachary, DePasquale Gina M, Forster Kaitlyn, Gibney Theresa, Hausenfluck Joanna H, He Yisheng, Iyer Nirmala A, Jeter Jennifer, Johnson Lauren, Johnston Rebecca M, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A searchable image resource of Drosophila GAL4 driver expression patterns with single neuron resolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.80660	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shigehiro Namiki
2. 発表標題 Accessible science laboratory environment for students with physical disabilities
3. 学会等名 4th International Disability Inclusion Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 並木重宏
2. 発表標題 大学でのインクルーシブな教育研究環境の構築
3. 学会等名 UDXワークショップ基調講演，計測自動制御学会システムインテグレーション部門ユニバーサルデザイン応用システム部会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 並木重宏
2. 発表標題 科学の多様性を支えるしくみについて
3. 学会等名 日本木材学会ダイバーシティ推進委員会公開シンポジウム「ポストコロナを踏まえた 教育・研究におけるダイバーシティの取り組み」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 並木重宏
2. 発表標題 障害と科学/JAASでの取り組み
3. 学会等名 すべての人が科学を楽しむ場を作るために，日本科学振興協会第一回総会キックオフミーティング（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 並木重宏
2. 発表標題 インクルーシブデザインラボの取り組み
3. 学会等名 東京都立大学バリアフリー講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 並木重宏
2. 発表標題 科学の多様性に関わる最近の話題
3. 学会等名 ワークショップ「動物の生きるしくみを学ぶ仕掛け」, 日本比較生理生化学会第44回高知大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazwa T, Higuchi K, Sakai B, Namiki S, Haupt SS, Kanzaki R
2. 発表標題 Drosophila connectome based insect brain simulations on Fugaku using multi-compartment Hodgkin-Huxley type neuron models
3. 学会等名 第43回日本比較生理生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Namiki S	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Descending neuron for freezing behavior in Drosophila melanogaster	5. 総ページ数 312
3. 書名 Death-Feigning in Insects: Mechanism and Function of Tonic Immobility	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関