

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究B

研究期間：2009～2012

課題番号：21370029

研究課題名（和文） マルチスケール分析による匂い情報から運動指令情報への統合・変換機構の解明

研究課題名（英文） Deciphering mechanisms underlying integration and conversion of odor information to motor command information by multiscale analysis of the silkworm brain

研究代表者

神崎 亮平（KANZAKI RYOHEI）

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：40221907

研究成果の概要（和文）：

カイコガのフェロモン情報処理に関わる神経経路を特定した。これまでに触角葉から前大脳側部の感覚系領域および側副葉の運動系領域を構成する神経細胞群について解析が行われていたが、本研究では、これらの領域を接続する神経経路を同定した。まず神経細胞集団の染色法を用い、既知のフェロモン情報経路と接続関係を持つ複数の領域を特定した。続いて単一細胞形態の解析、フェロモン応答性の調査に基づき、触角葉・前大脳側部・前大脳内側部・側副葉という直列型のフェロモン情報経路が存在することを明らかにした。また単一細胞の性質をより詳細に分析するための、新規な生理計測の実験手順を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Information flow for pheromone source orientation behavior has been studied. First we have identified the several candidate brain regions that have anatomical connectivity with the known areas that process pheromone signal, such as the antennal lobe or lateral accessory lobe. We then investigated the pheromone responsiveness for the neurons in every candidate region and found the superior medial protocerebrum was in the pheromone processing pathway, connecting sensory and motor areas. In addition, we have established the procedure for physiological recordings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	1,0140,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：昆虫、脳・神経、遺伝子、神経科学、生理学

1. 研究開始当初の背景

脳による匂い識別の仕組みは、特徴的な情報処理機構を含むことから、その機構解明に大きな関心もたれている。昆虫は比較的小

規模の脳でこうした情報処理を実現するため、そのモデル生物と位置づけられている。なかでもカイコガ(*Bombyx mori*)は、単一のフェロモンの匂いによって特定の行動パタ

ーンを発現することから、脳内の匂い情報処理過程を追うことで、感覚入力から行動発現にいたる神経機構をシステムティックに解明できる数少ない優れたモデル生物となっている。

昆虫の嗅覚系一次中枢である触角葉の糸球体の構造と機能が詳細に研究され、匂い情報が個々の糸球体の時間空間的な活動パターンとして表現されることが明らかになった^{(1),(2)}。また近年、分子遺伝学的手法を用いたショウジョウバエの研究から、キノコ体傘部や前大脳側部において、触角葉糸球体間と位相空間的な関係のあることが報告されるなど^{(3),(4)}、感覚系の上位中枢での処理機構の解明も進められている。しかしながら、ショウジョウバエでは行動発現に複数のモダリティの刺激が必要なことや、行動そのものの定量的解析が比較的困難であることから、匂い情報処理から行動発現に至る神経機構の解明は容易ではない。一方、申請者らはカイコガのフェロモン源定位行動に着目し、フェロモン感覚系の情報が触角葉からキノコ体、前大脳側部へと至る情報処理経路^{(5),(6)}、さらには行動パターンの司令情報を生成する側副葉の神経回路の詳細を明らかにしてきた^{(7),(8)}。そしてこの研究過程で、神経細胞、神経回路、さらには行動レベルのデータをデータベース化して、それらを統合してモデル化し、評価・検証する技術を開発した。これらのマルチスケールの分析技術や統合技術を活用することで、高次感覚中枢と側副葉を結ぶ神経回路の構造と機能の解明が可能となり、匂いによって発現する動物行動の感覚系から運動系に至る脳内情報処理のシステムティックな理解が初めて実現されるものと考えた。

(1) Galizia CG, Menzel R (2001) *J Insect Physiol* 47:115-130. (2) Namiki S, Kanzaki R (2008) *Frontiers in Neural Circuit* 2: Article 1. (3) Jefferis G et al. (2007) *Cell* 128: 1187-1203. (4) Lin HH et al. (2007) *Cell* 128: 1205-1217. (5) Kanzaki R et al. (2003) *Chem Senses* 28:113-130. (6) Seki Y et al. (2005) *J Comp Neurol* 481:340-351. (7) Mishima T, Kanzaki R (1998) *J Comp Physiol A* 183:273-282. (8) Mishima T, Kanzaki R (1999) *J Comp Physiol A* 184:143-160.

2. 研究の目的

本研究では、①前大脳側部から側副葉にいたるフェロモン情報の主要経路と、②キノコ体を介して側副葉にいたる神経回路の構造と機能をマルチスケールの分析技術や統合技術を活用し解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞集団の染色

蛍光色素をガラス微小電極に充填し、30-50 nAの直流電流を数分間印加することにより特定の部位に分枝する神経集団の選択

的な染色を行った。微分干渉顕微鏡により、刺入位置を精確に定めることによって、目的部位の染色の成功率を向上させた。

(2) 単一細胞記録法

主にガラス微小電極を用いた細胞内記録法を用い、単一神経細胞の膜電位を計測し、続いて、蛍光色素の注入によって該当細胞の標識を行った。

単離触角葉標本を作成し、パッチクランプ法を実施した。カイコガでの実施は初めてであるため、電極内液、電極作製の至適パラメータを検討した。

特定タイプの細胞から、再現性良く計測を行うため、腹髄神経索からの蛍光色素の逆行性染色により、脳を下行する下行性ニューロンを選択的に標識し、蛍光標識によって、単離された細胞体より計測を行った。

(3) 神経細胞群の接続関係の解析

画像処理ソフトウェア AVIZO を用いて、染色された単一神経細胞の三次元再構築を行った。単位体積当たりの神経細胞としてラベルされたボクセルの密度を求めることにより、神経投射の定量的な取り扱いを行った。神経投射の比較は、脳内のランドマークの座標を用いて、個体間の誤差の補正を行った。分布の重複の程度を用いて、神経細胞同士の接続関係の推定を行った。

前大脳側部と同様に、触角葉からのフェロモン情報の入力を受けるキノコ体の神経回路の分析を行った。キノコ体への入力細胞である触角葉投射神経について、前シナプス部の存在を示すボタン状の構造の座標を検出し、 $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ の格子に区切り、各格子におけるボタン様構造の密度を求めた。樹状突起では、シナプス部を示す明瞭な特徴の検出は困難であったため、神経突起の密度を取って、分布の指標とした。投射神経のボタン様構造の位置、ケニオン細胞の樹状突起分布は、キノコ体傘部の重心によって規格化を行った。

4. 研究成果

(1) フェロモン情報経路の解剖学的な接続関係

蛍光色素を電気泳動によって組織に注入して集団染色を行い、フェロモン情報を処理する触角葉、前大脳側部デルタ領域、側副葉と解剖学的な接続関係を持つ領域を調査したところ、新たに前大脳内側部(Superior medial protocerebrum, SMP)、腹側前大脳側部(Ventral lateral protocerebrum, VLP)、中心複合体、後傾斜を同定した。

さらに、デルタ領域構成神経と一般臭の情報処理に関与する側角構成神経の投射領域が異なることを見出し、フェロモン情報と一

般臭の情報が高次中枢においても異なる経路で処理される可能性を示唆した。

(2) フェロモン情報経路の機能的な接続関係

集団染色に並行して、脳内の 11 領域から網羅的な細胞内記録を行ったところ、触角葉・前大脳側部・側副葉とともに、SMP、後傾斜において、フェロモンに応答する細胞が多く含まれることが分かった。側副葉と後傾斜を接続する細胞群の形態を、単一細胞レベルで分析したところ、ほとんどのケースにおいて側副葉ではシナプス前部の特徴である滑らかな分枝、後傾斜においてシナプス後部の特徴である粒状構造が観察されたため、後傾斜は、フェロモン情報を処理するものの、側副葉の下流に位置する回路であると推察された。中心複合体・VLP については、フェロモン応答性が認められなかったことから、フェロモン情報に積極的に関わる部位ではないことが予想される。フェロモン情報処理の基本回路として、触角葉・前大脳側部・前大脳内側部・側副葉という神経回路群が重要な役割を持つことが分かった。

続いて、フェロモン応答の左右性を各段階で評価したところ、触角葉では、同側の触角の刺激のみに対して応答性が観察されたのに対し、以後の 3 領域では、両側の触角への刺激に対して、応答性を示した。集団染色においても前大脳側部において、両側性の神経投射が確認され、この段階で左右の情報の統合が起こることを示唆する。また単一細胞レベルでは、前大脳側部から SMP へは同側・反対側両方への投射が存在したのに対し、同側の SMP から側副葉への入力経路は観察されず、この段階では反対側への入力が主要な経路であると考えられる。

この成果により、嗅覚系高次中枢から前運動中枢への経路が示され、入力から出力に

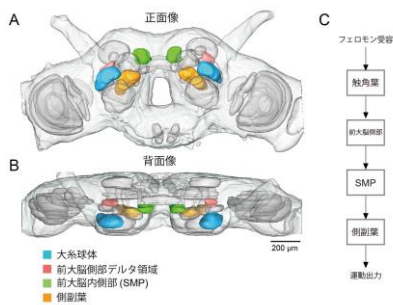


図 1. カイコガ脳におけるフェロモン情報経路。A/B. 脳内の主要神経構造の再構築(正面像(A)および背面像(B))。フェロモン情報処理の基本回路をカラーで示す。C. フェロモン情報経路の接続関係。感覚入力から行動司令信号の出力まで 4 つの神経回路が直列に配置されている。

いたる全経路が初めて明らかになった(図 1)。

(3) 側副葉の情報処理機構の分析

並行して、フェロモン源探索行動でみられるジグザグ行動を制御する下行性介在神経のフリップフロップ活動の生成機構を調べるために、側副葉構成神経について細胞内記録および細胞内染色を行い、形態から 3 つのタイプの片側性神経と 3 つのタイプの両側性神経を同定した。

並行して、フェロモン源定位行動の初期相にみられる直進歩行の方向を指令する情報を同定するために、細胞内記録法により側副葉構成神経のフェロモン応答の計測を行い、各神経細胞が、入力部位と同側の触角に対するフェロモン刺激により強く応答することが分かった(図 2)。カイコガは、より強いフェロモン情報の入力を受けた方向に進むことが明らかになっており⁹⁾、歩行の方向性が左右半球の側副葉における神経集団の活動量の差異によって決定されていることを示唆する。

側副葉が、昆虫が移動する際の視覚情報の変化(オブティックフロー)を処理するロビュラ複合体からの直接投射を受けることが初めて明らかになった。この投射は側副葉の外側に局限していた。側副葉外側部は、他にも多くの脳領域の投射を受けており、これらの投射も外側部に集中しており、内側部が入力を受けるケースは一例であった。

側副葉の内側部と外側部のフェロモン応答性を評価したところ、持続時間、左右刺激に対する発火率の差が、内側部において大きかったことから、外側部で受容された情報が、内側部に伝わる過程で、情報変換が起こることが示唆された。歩行の司令情報であると考えられる持続発火活動は、内側部に分枝をもつ細胞で顕著にみられるため、この結果は、側副葉の内側部が司令情報の生成部位であることを示唆する。

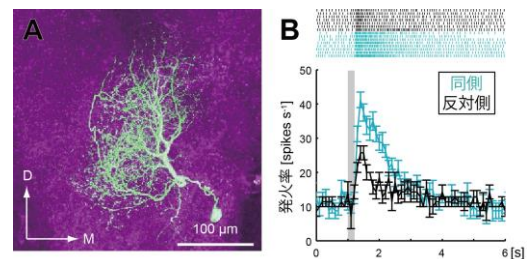


図 2. 側副葉の局所介在神経。A. 細胞形態。B. 生理応答。フェロモン刺激(灰色部)に対する発火率変化を示す。同側の刺激に対して、より強い応答を示した。

(4)キノコ体におけるフェロモン情報処理の分析

キノコ体傘部における投射神経のボタン様構造の分布を分析したところ、フェロモン主成分、副成分、植物臭の情報を担う投射神経の分布が、同心円様の分布を示すことが分かった。副成分と植物臭の領域は重複しており、主成分と植物臭の領域では認められなかった(図3)。キノコ体は、嗅覚の長期記憶に関わる領域であり、フェロモン副成分・植物臭の連想が起こる可能性を示唆する。

ケニオン細胞の樹状突起分布の解析を行ったところ、水平軸に沿って樹状突起分布が類似した左右対称なモジュールが存在することが分かった。左右のモジュールは類似した投射神経の入力を受け取り、機能的にも類似した構造であることが推察される。キノコ体が発達した双翅目・膜翅目昆虫において内側・外側に解剖学的に明瞭な区画が存在する。解剖学的に明瞭でないが、カイコガにおいても類似の構造が存在することが示唆される。また、キノコ体傘部の背腹軸に沿って、フェロモン情報・植物臭情報を担う投射神経の割合が変化することが分かった。

フェロモン主成分を担う投射神経は、限局した領域に分布しており、この領域のみに樹状突起分布をもつケニオン細胞は観察されなかったことから、キノコ体の出力において、純粋なフェロモン主成分の情報は維持されないことが推察された。

さらに細胞内記録法を行って、ケニオン細胞のフェロモン応答性を調査したところ、多くの細胞がフェロモンに脱分極性の応答を示したものの、いくつかの植物臭に対しても同様の応答を示し、形態学的解析と同様、フェロモン主成分に選択的な情報が維持されていないことが示唆された。

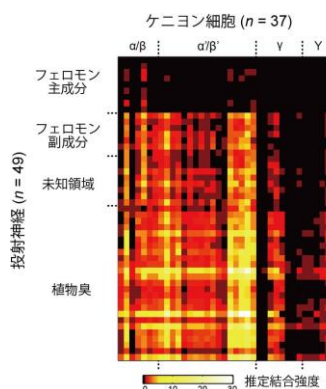


図3. キノコ体傘部における触角葉投射神経とケニオン細胞の接続関係。両者の分布の重複の程度を擬似カラーで示す。フェロモン主成分を担う投射神経のみから、入力を受けるケニオン細胞は発見されなかった。

また、キノコ体でのフェロモン情報表現の解析に向けてキノコ体のケニオン細胞で発現する cAMP 依存性キナーゼのプロモーター下で蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換え系統の作出を試みた。組換え系統は得られたものの、目的とする領域での蛍光タンパク質の発現は検出できなかったため、プロモーター領域を再検討する必要性が生じた。

(5)新規生理学的計測法の適用

加えてこれまでガラス微小電極法では、実施が難しかった電流の解析、薬理的な解析を実現するために、これまでカイコガで例のなかったホールセルパッチクランプ法の実験系を確立した。視認下で電極を挿入するため、神経回路が保存された状態の触角葉の単離脳標本、下行性神経から選択的な計測を行うための単離細胞標本を作製する手順を確立した。

ケニオン細胞の膜特性の解析を行い、情報処理機構の理解に向けた基礎的な知見を集積した。

(9) Takasaki et al., (2012) *J Comp Physiol A* 198:295-307..

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Namiki S, Takaguchi M, Seki Y, Kazawa T, Fukushima R, Iwatsuki C, Kanzaki R (2013) Concentric Zones for Pheromone Components in the Mushroom Body Calyx of the Moth Brain. *J Comp Neurol* 521: 1073-1092 査読有
2. Takasaki T, Namiki S, Kanzaki R (2012) Use of bilateral information to determine the walking direction during orientation to a pheromone source in the silkworm *Bombyx mori*. *J Comp Physiol A* 198: 295-307 査読有
3. Tabuchi M, Inoue S, Kanzaki R, Nakatani K (2012) Whole-cell recording from Kenyon cells in silkworms. *Neuroscience Letters* 528: 61-66 査読有
4. Namiki S, Kanzaki R (2011) Heterogeneity in dendritic morphology of moth antennal lobe projection neurons. *J. Comp. Neurol.* 519: 3367-3386 査読有
5. Namiki S, Kanzaki R (2011) Offset response of the olfactory projection neurons in the moth antennal lobe. *Biosystem* 103: 348-354 査読有
6. Sakurai T, Mitsuno H, Haupt SS, Uchino K, Yokohari F, Nishioka T,

- Kobayashi I, Sezutsu H, Tamura T, and Kanzaki R (2011) A Single Sex Pheromone Receptor Determines Chemical Response Specificity of Sexual Behavior in the Silkworm *Bombyx mori*. *PLoS Genet* 7(6):1-10 査読有
7. Misawa N, Mitsuno H, Kanzaki R, Takeuchi S (2010) A highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 15340-15344 査読有
 8. Iwano M, Hill ES, Mori A, Mishima T, Mishima T, Ito K, Kanzaki R (2010) Neurons Associated with the Flip-Flop Activity in the Lateral Accessory Lobe and Ventral Protocerebrum of the Silkworm Moth Brain. *J Comp Neurol* 518: 366-388 査読有
 9. Fujiwara T, Kazawa T, Haupt SS and Kanzaki R. Ca²⁺ imaging of identifiable neurons labeled by electroporation in insect brains. Neuroreport in press, 査読有
 10. Nakajima K, Morithita S, Asama H, Kazawa T, Kanzaki R, Mishima T (2009) Structural comparison of premotor neurons in silkworm moths. *FORMA* 24, 67-78 査読有
 11. Namiki S, Haupt SS, Kazawa T, Takashima A, Ikeno H, Kanzaki R (2009) Reconstruction of virtual neural circuits in an insect brain, *Front Neurosci* 3: 206-213, doi: 10.3389/neuro.01.028.2009 査読有
- 他 2 件
- [学会発表] (計 52 件)
1. 神崎亮平、次代の技術を担う「昆虫力」～昆虫科学が迫る昆虫の感覚・脳・行動のしくみとその応用～、第 83 回蚕糸学会公開シンポジウム特別講演、2013 年 03 月 18 日～2013 年 03 月 18 日、つくば農林ホール、茨城 (招待講演)
 2. 神崎亮平、昆虫パワーの科学－昆虫からみた脳科学・ロボット・教育の未来－、第 29 回浜松コンファレンス、2012 年 11 月 03 日～2012 年 11 月 03 日、アクトシティ浜松中ホール、静岡 (招待講演)
 3. Ryohei Kanzaki, Analysis and synthesis of odor source localization in the silkworm. International Symposium Olfaction in insects under debate, 2012 年 07 月 20 日～2012 年 07 月 20 日, Wurzburg, Germany (招待講演)
 4. 並木重宏、神崎亮平、性フェロモン情報処理する脳内の基本回路、第 56 回日本応用動物昆虫学会大会 2012 年 03 月 27 日～2012 年 03 月 29 日、近畿大学農学部、奈良、(招待講演)
 5. Ryohei Kanzaki, Analysis and synthesis of adaptive behavior in insects: from genes, neural networks, and behavior to robots. The 6th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2011 年 10 月 11 日～2011 年 10 月 15 日, Beijing, China (招待講演)
 6. 並木重宏、神崎亮平、カイコガ触角葉糸球体群による匂い表現の解析、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 09 月 21 日～2011 年 09 月 23 日、旭川市大雪クリスタルホール、北海道 (招待講演)
 7. Ryohei Kanzaki, How does an insect brain generate an orientation behavior toward odor sources? Workshop on Bioinspired computation for chemical sensing, 2011 年 3 月 9 日－11 日, バルセロナ, スペイン (招待講演)
 8. Ryohei Kanzaki, Analysis and Synthesis in Insect Brain for Biomimetics. The 2nd International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics, 2011 年 2 月 25 日－26 日, AIST Tsukuba Central1, 茨城 (招待講演)
 9. 神崎亮平、昆虫の嗅覚機構を再現した匂いセンサの構築、第 8 回香りのセンシングと再現による感性マルチメディア調査専門委員会、2010 年 12 月 20 日、東京工業大学、東京 (招待講演)
 10. 神崎亮平、昆虫の嗅覚機能を利用した匂いセンサおよび匂い源探索ロボットの構築、第 3 回香りに関する産学フォーラム、2010 年 11 月 22 日、東京大学山上会館、東京 (招待講演)
 11. 神崎亮平、昆虫力、TEDxSeeds 2010、2010 年 11 月 20 日、横浜赤レンガ倉庫 1 号館、神奈川 (招待講演)
 12. 神崎亮平、昆虫の嗅覚機能を用いた匂い源探索ロボット、第 27 回「センサ・マイクромашинと応用システム」シンポジウム、2010 年 10 月 14 日－15 日、くにびきメッセ、島根 (招待講演)
 13. 神崎亮平、生物学と工学の融合から探る昆虫の環境適応能力。比較生理生化学のインパクト、第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23 日－25 日、東京大学、東京 (招待講演)
 14. Ryohei Kanzaki, Brain mechanisms for the generation of adaptive behavior. The Neuroinformatics 2010 Congress 2010 年 8 月 30 日－9 月 1 日、神戸国際

- 会議場, 兵庫 (招待講演)
15. 神崎亮平, 匂いセンサー-匂いをハイスピードで検知する“鼻”, 第 27 回香りの図書館「香りトワ・エ・モア」セミナー, 2010 年 8 月 20 日, 香りの図書館, 東京 (招待講演)
 16. 神崎亮平, 昆虫力を観る・知る・利用する-昆虫とロボットの融合-, (社) 自動車技術会中部支部通常総会, 2010 年 6 月 8 日, 名古屋国際会議場, 愛知 (招待講演)
 17. 神崎亮平, ロボットで探る昆虫の脳と匂いの世界 第 10 回アロマサイエンスフォーラム 2009, 2009 年 10 月 2 日, アルカディア市ヶ谷, 東京 (招待講演)
 18. 神崎亮平, Interdisciplinary Research Reveals How an Insect-Brain Generates Adaptive Behavior, 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会 2009 年 10 月 22 日 - 24 日 千里ライフサイエンスセンター, 大阪 (招待講演)
 19. 神崎亮平, 昆虫-機械融合システムで探る適応能 第 47 回日本生物物理学会年会 2009 年 10 月 30 日 - 11 月 1 日 徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島 (招待講演)
 20. 神崎亮平, ロボットで探る昆虫の感覚・脳・行動のしくみ, 日本動物行動学会, 第 28 回大会, 2009 年 11 月 27 日 - 29 日 筑波大学, つくば (招待講演)
 21. 神崎亮平, 昆虫とロボットの融合から探る環境適応, 第 10 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2009 年 12 月 24 日 - 26 日 芝浦工業大学豊洲キャンパス, 東京 (招待講演)
 22. 神崎亮平, 昆虫脳-機械融合システムを用いた生物の適応能力の理解 日本学術振興会 分子ナノテクノロジー第 174 回委員会 第 32 回研究会 2010 年 3 月 5 日 京都テルサ, 京都 (招待講演)
- 他 30 件

[図書] (計 2 件)

1. Haupt SS, Sakurai T, Namiki S, Kazawa T, Kanzaki R (2009) Olfactory processing in moths in “The Neurobiology of Olfaction” (Frontiers in Neuroscience) CRC Press, 72-112
2. 神崎亮平 (2009) ロボットで探る昆虫の脳と匂いの世界-ファール昆虫記のなぞに挑む- フレグランスジャーナル社, 総ページ数 141

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 亮平 (KANZAKI RYOHEI)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号: 40221907

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

櫻井 健志 (SAKURAI TAKESHI)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教
研究者番号: 20506761

加沢 知毅 (KAZAWA TOMOKI)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員
研究者番号: 00507824