

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570087

研究課題名(和文) 匂い受容野の形成に寄与する神経基盤の解明

研究課題名(英文) Neural substrate underlying the formation of local receptive fields on an single antenna

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：夜行性昆虫の嗅覚器(触角)は長く、しかも自発的に動くため、匂いの空間分布を捉えるのにすぐれた特徴を持つ。我々は細胞内記録・染色法を用いることによって、オスのゴキブリの触角の基部～先端の特定領域の性フェロモン刺激に応じる介在ニューロン9個を形態学的、生理学的に同定することに成功した。各々のニューロンの樹状突起は大系球体に入力する感覚細胞の触角上の位置に応じて明瞭に組織化されていた。また、これらのニューロンの軸索終末は多種感覚連合中枢であるキノコ体傘部の異なる領域に投射する一方で、前大脳側葉部には収束していた。以上より、キノコ体が匂いの空間構造の把握に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Convergence of cognate olfactory sensory axons in the same glomerulus of the olfactory bulb is a unique adaptation for detecting and differentiating volatile chemicals, but makes representation of stimulus topography challenging. We have identified several pheromone-responsive interneurons in the cockroach that exhibit small or large receptive fields on the antenna that arise from intraglomerular segregation of sensory inputs based on soma location. These interneurons project to distinct domains of the mushroom body, then converge in the lateral protocerebrum. The existence of interneurons that convey information about the architecture of odor plumes provides important new insight into odor processing.

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 嗅覚 細胞内記録 触角 キノコ体 ナビゲーション 受容野 系球体

## 1. 研究開始当初の背景

我々が普段感じる匂いは、匂いが風上から運ばれてきたものである。この匂いのたなびき（ブルーム）はフィラメントと呼ばれる不連続かつ高濃度の匂い分子のかたまり（数 mm 以上）から構成される（Köehl, 2006）。フィラメントのサイズ、分布、移動方向は空気の流れによって絶え間なく変化する。そのため、触覚、視覚、味覚、聴覚のように局在性、指向性の強い情報を処理するシステムとは対照的に、単一の嗅覚器（触角、嗅上皮）への入力のみで匂いの位置や方向を検出するのは不可能とされてきた。事実、同じ匂い受容体遺伝子を発現している感覚細胞は嗅覚器内に広く分布する一方、その軸索は直径数十ミクロンの単一の糸球体に収束し、そこで文字通り糸玉のごとくランダムに絡み合った構造を形成する。よって、空間的に分離された個々の糸球体は一次嗅覚中枢内において特定の嗅質を処理するためのユニットとして機能する。このことは嗅質依存的組織化（odotopic organization）と呼ばれる。この特徴は昆虫から脊椎動物に至るまで広く保存されている。

以上の構造的制約のもと、動物が匂い源の方向を知るためには、左右一対の感覚器に当たる匂い強度の差、あるいは匂いパルス頻度の差の検出が重要とされる。この点はカイコガを用いた神経行動学的解析により早くから予見されてきた（Kanzaki et al., 1992）。近年、ショウジョウバエ（Duistermars et al., 2009）、サメ（Gardiner and Atema, 2010）、モグラ（Catania, 2013）、ラット（Rajan et al., 2006; Kikuta et al., 2010）、さらにはヒト（Porter et al., 2006）においても左右の嗅覚器への入力差が匂い源定位に利用さ

れることが知られている。

一方、遮蔽物に富み、空気揺らぎの少ない環境に生息する地上性動物が匂い源への方向づけをどう行っているのかについては謎が多い。ワモンゴキブリは 5 cm という動物有数の長さの触角を持ち、これを自発的に動かしながら資源探索行動を行う。性フェロモン源への定位能力は視覚の利用できない状況下でも損なわれることはない（Willis et al., 2011）。また、驚くべきことに 1 本の触角のみでも 2 本の触角をもつ個体と遜色ない早さで数メートル離れたフェロモン源に定位できる（Bell and Tobin, 1983）。これらの知見はゴキブリが匂い源定位に匂いの空間分布パターンを探る航行法を用い（Willis, 2008）、しかも左右の触角による匂いの比較を必ずしも必要としないことを示唆している。

私はこれらの研究から着想を得て、一次嗅覚中枢の解剖学的研究に徹底的に取り組んだ。その結果、メスの出す性フェロモン（ペリプラノン B）を処理する感覚細胞の軸索はオスの同側触角葉中の大糸球体に収束するが、その内部に触角表面の三次元的な細胞体の位置に応じた組織化がみられることを動物で初めて発見した（Nishino and Mizunami, 2006, 2007）。さらに、私はこの組織化が幼虫期の脱皮のたびに起こる触角基部への新生感覚細胞の付加とともに徐々に形成されること（Nishino et al., 2009, 2010）を明らかにした。

私は感覚細胞の発生依存的投射地図が実際に利用されているのかどうかを確認するため、大糸球体から出力し、フェロモン情報を前大脳（キノコ体と側葉）に伝える介在ニューロン（投射ニューロン）の全同定に挑戦した。

## 2. 研究の目的

私は糸球体から出力する投射ニューロンは複数個存在し、そのうちの小さいタイプは糸球体内の一部に樹状突起を持つことを確認していたが (Nishino et al., 2011)、1) 出力ニューロンの実数、2) 各出力ニューロンが触角上のどの領域 (受容野) の性フェロモン刺激に応じるのか、3) 受容野がどのようなニューロン間のシナプス接続によって形成されるのか、については不明のままであった。これらの点を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ルシファーイエローCH (Sigma)、またはアレクサハイドラザイド (Life Technologies) を用いた細胞内記録・染色法を主たる方法として用いた。脳内の神経トラクトやニューロパイルの標識にはローダミンやFITC (Life Technologies) を用いた。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, Pascal) を用いて観察した。光学切片のデータは形態解析ソフトウェア (Amira ver. 3.1) に取り込み、三次元立体構築、体積計算を行った。活動電位の記録データは市販のソフトウェア (Spike 2) に取り込み、詳細な解析を行った。

嗅覚細胞の求心繊維と投射ニューロンのシナプス接続様式については以下の手順によって調べた。1. 投射ニューロンをルシファーイエローで細胞内標識する一方で、触角神経へのデキストラン・ビオチン・ローダミン (Life Technologies) の順行性注入による求心繊維を標識、2. 二重標識した標本の固定、3. ビブラトーム切片、4. DAB 発色、5. 樹脂包埋、6. 超

薄切、7. 免疫染色 (一次抗体, IgG-gold 二次抗体)、8. 電子染色。1~8の行程については総研大との共同研究により行った。

## 4. 研究結果

- (1) まず、ペリプラノンBを処理する糸球体への局所的な蛍光色素注入により、糸球体から出力する投射ニューロンの概数を調べたところ、10~12個 ( $11 \pm 0.28$ ,  $n=8$ ) の投射ニューロンが出力していることがわかった。さらに、低抵抗の細胞内記録電極を用いることで、全出力ユニットの染色を試みたところ、上記とほぼ同数の出力ニューロンが染色されることがわかった。以上より、出力ニューロンの実数は11個に近いと結論づけられた。
- (2) 触角の長軸方向の8カ所の異なる領域に5mm間隔で直径1mmの局所フェロモン刺激を与えることによって、投射ニューロンの受容野を厳密に精査したところ、少なくとも8つの異なる形態学的タイプが存在することを突き止めた。各々のニューロンは触角の基部から末梢にかけて、1.1~1.4 cmの幅の受容野を持っていた。各受容野間には大きな重複が存在した。また、隣接する受容野を持つ投射ニューロンの樹状突起にも明瞭な重複がみられた。一方、触角全域に受容野を持つ大きな投射ニューロンも1つ存在した (下記6参照)。
- (3) 触角を途中で切断すると切断端から末梢側の全感覚細胞の軸索の退化、消失が起こる。この退化現象を利用して、触角を様々なレベルで切断したときの糸球体中の投射パターンと投射ニューロンの樹状突起の位置関係を回帰分析によって調べたところ、糸球体中心の樹

状突起の幅をもとに触角上の受容野の幅を 8 割以上の確度で推定できることを示した。この結果は触角の一部に受容野を持つ投射ニューロンが感覚細胞と直接のシナプス接続を持つ可能性を強く示唆するものである。

(4) 触角の一部に受容野を持つ投射ニューロンのキノコ体および側葉への投射パターンを調べたところ、これらのニューロンの軸索はキノコ体の傘の異なる領域に投射する一方で、側葉では大きく重複することがわかった。以上の結果は、キノコ体が匂いナビゲーションの際のフィラメントの空間分布の識別に、側葉はペリプラノン B の存在化で解発されるような本能行動（一連の求愛行動など）の準備に寄与することを示唆している。

(5) ゴキブリの触角表面には様々な形状の突起（嗅覚子）が多数存在し、その中には 1 個～4 個の嗅覚細胞が存在する。各感覚細胞は特定の匂いを処理していることが知られている。我々は触角感覚子の先端を切断して、そこに色素を充填した微小ガラス電極をかぶせる手法を用いることで (Nishino et al., 2005)、感覚子のタイプ依存的な軸索投射パターンを明らかにした。5 つの感覚子タイプはそれぞれ一次嗅覚中枢（触角葉）中の異なる糸球体グループに投射し、グループ間のオーバーラップはみられなかった。同一タイプの感覚子からの入力を受ける糸球体同士は近接する傾向がみられた。また、糸球体内の軸索終末が触角の基部/末梢の細胞体の位置に応じて組織化されていること (Nishino et al., 2007) を単一感覚細胞においても再確認した。

(6) ペリプラノン A と B を処理する糸球体は隣

接しているが、ここから出力する投射ニューロンのうち、触角全域に受容野を持つタイプの形態と生理学的性質について詳しく調べた。その結果、ペリプラノン A を処理する投射ニューロンの応答スペクトルが狭いのに対し、ペリプラノン B は構造の近いテルペン類に対して弱い興奮性の応答を示すことから、広い応答スペクトルをもつことが示唆された。また、両者の投射先について調べたところ、キノコ体の傘においては明瞭な領域差が存在したのに対し、側葉では多くの重複が見られた。ペリプラノン A、ペリプラノン B ともに同一の求愛行動を解発することを考慮すると (Seelinger, 1985; Okada et al., 1990)、キノコ体が嗅質の細かな違いの検出に、側葉が求愛行動の解発に寄与することが示唆された。このことは上記 (4) の見解と矛盾しない。

(7) 昆虫のキノコ体は多種感覚連合中枢として学習などの高次機能を司ることが知られる。我々はまず、ゴキブリの視葉への色素注入により視葉に樹状突起を持ちキノコ体の入力部位（傘部）に軸索終末を持つ視覚投射ニューロンが 3 本程度しか存在しないこと、これらのニューロンが視覚刺激に対して特異的な興奮性応答を示すことを明らかにした。このことは触角葉からキノコ体の傘部へ入力する嗅覚投射ニューロンが数百本存在することと対照的である。また視覚投射ニューロンの軸索終末はキノコ体の傘の最外層に局在しており、嗅覚投射ニューロンの軸索終末がみられる傘の内層とは明瞭に隔てられていた。このことからゴキブリのような原始的な昆虫のキノコ

体においても感覚モダリティーに依存した精緻な組織化が存在することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Ichikawa, T., Toh, Y., Ohkubo K., **Nishino H.** Microscopic analysis of mechanosensory system monitoring the dynamic claw actions in the tenebrionid beetle *Zophobas atratus*, **Zoomorphology** 印刷中 DOI: 10.1007/s00435-014-0225-8. 査読有
- ② Mizunami, M., Matsumoto, Y., **Nishino H.** Olfactory and visual learning in cockroaches and crickets. Invertebrate **Learning and memory** eds. R. Menzel, P. Benjamin Chapter 41: 547-560 (2013) 査読有
- ③ **西野 浩史** 「擬死、仮死」項目、行動生物学辞典、P75 (仮死), P99 (擬死) 東京化学同人 (2013) 査読有
- ④ 高梨 琢磨、深谷 緑、小池 卓二、**西野 浩史** 「昆虫における振動情報の機能解明と害虫防除への応用」、**生物科学**、65(2): 102-107 (2013) 査読無
- ⑤ Matsumoto, C.S., Kuramochi, T., Matsumoto, Y., Watanabe, H., **Nishino, H.**, Mizunami, M. Participation of NO signaling in formation of long-term memory in salivary conditioning of the cockroach, **Neuroscience Letters**, 541: 4-8 (2013) 査読有
- ⑥ **Nishino, H.**, Iwasaki, M., Kamimura, I., Mizunami, M. Divergent and convergent projections to the two parallel olfactory centers from two neighboring, pheromone-receptive

glomeruli in the male American cockroach, **Journal of Comparative Neurology**, 520: 3428-3445 (2012) 査読有

- ⑦ Watanabe, H., Stephen, H.S., **Nishino, H.**, Nishikawa, M., Yokohari, F. Sensillum-specific, topographic projection patterns of olfactory receptor neurons in the antennal lobe of the cockroach *Periplaneta americana.*, **Journal of Comparative Neurology**, 520: 1687-1701 (2012) 査読有
- ⑧ Matsumoto, C., Matsumoto, Y., Watanabe, H., **Nishino, H.**, Mizunami, M. Context-dependent olfactory learning monitored by activities of salivary neurons in cockroaches, **Neurobiology of Learning and Memory**, 97: 30-36 (2012) 査読有
- ⑨ **Nishino, H.**, Iwasaki, M., Yasuyama, K., Watanabe, H., Mizunami, M. Visual and olfactory input segregation in the mushroom body calyces in a basal neopteran, the American cockroach, **Arthropod Structure & Development** 41: 3-16 (2012) 査読有
- ⑩ Pflüger, H.J. Field, L.H., **Nishino, H.**, Currie, M.J. Neuromodulatory unpaired median neurons in the New Zealand tree weta, *Hemideina femorata*, **Journal of Insect Physiology**, 52: 1420-1430 (2011) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 岩崎 正純、**西野 浩史** 「性フェロモンの質・位置情報処理に寄与する脳内の神経基盤ーワモンゴキブリをモデルとしてー」、第 58 回日本応用動物昆虫学会大会、高知大学朝倉キャ

- ンパス (2014年3月26日)
- ② Takanashi, T., Kojima, W., **Nishino, H.** Vibration signals in insects and their application to pest control, Joint International Symposium on Nature-Inspired Technology 2014 and Engineering Neo-Biomimetics V, 札幌 (2014年2月12日)
- ③ **西野 浩史**、岩崎 正純 「匂い位置検出ニューロンの応答特性」、日本動物学会第84回大会、岡山大学 (岡山市) (2013年9月26日)
- ④ 岩崎 正純、**西野 浩史** 「ワモンゴキブリ性フェロモン副成分の情報処理に寄与する神経経路」、日本動物学会第84回大会、岡山大学 (岡山市) (2013年9月26日)
- ⑤ **西野 浩史**、岩崎 正純、頼経 篤史、上村 逸郎 「匂いの位置情報を符号化するニューロン」、日本動物学会第83回大会、大阪大学豊中キャンパス (2012年9月13日)
- ⑥ 市川 敏夫、大久保 和彦、藤 義博、**西野 浩史** 「甲虫類ゴミムシダマシの肢先端のセンサーシステム」、日本動物学会第83回大会、大阪大学豊中キャンパス (2012年9月13日)
- ⑦ **西野 浩史** 「自己受容から振動受容へ-昆虫の擬死行動のメカニズム-」、第56回日本応用動物昆虫学会大会 小集会: 昆虫音響学への招待-振動感覚と行動、奈良市・近畿大学農学部 (2012年3月26日)
- ⑧ **西野 浩史**、岩崎 正純、上村 逸郎 「ゴキブリ性フェロモン情報処理における高次中枢の役割」、日本動物学会第82回大会、旭川市大雪クリスタルホール (2011年9月21日)
- ⑨ 岩崎 正純、水波 誠、**西野 浩史** 「ワモンゴキブリのキノコ体における視覚と嗅覚情報の

入力部位の比較」、日本動物学会第82回大会、旭川市大雪クリスタルホール (2011年9月21日)

- ⑩ **西野 浩史** 「化学生態学への神経行動学的アプローチ: ゴキブリの性フェロモンコミュニケーション」、第6回化学生態学研究会、湯の川プリンスホテル渚亭 (函館) (2011年6月17日)
- ⑪ **Nishino, H.**, Iwasaki, M., Mizunami, M. Detection of female sex pheromone by male and female cockroaches: a comparative study, ICCPB2011, Nagoya Congress Center (2011年5月31日)
- ⑫ 泰山 浩司、松村 龍成、有井 達夫、村田 和義、夏秋 友香、西川 道子、横張 文男、**西野 浩史** 「ゴキブリ口器付属肢の感覚神経が形成する後大脳系球体の構造解析」、日本動物学会中国四国支部大会2011、香川大学幸町北キャンパス (2011年5月14日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/nishino/>

## 6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし