

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04399

研究課題名(和文) 昆虫嗅覚中枢の精細モデルの構築による匂い情報表現の解明

研究課題名(英文) Elucidation of odor representation in insects through a detailed modeling of insect olfactory network

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動的に変化するフェロモン入力を処理するカイコガ触角葉の神経機構をシステムティックに記述することを目的とした。触角葉構成神経の機能的結合を調べるための遺伝子組換えカイコガシステムを作成するとともに、触角葉の神経回路モデルを単一コンパートメントモデルに加え、マルチコンパートメントモデルとして構築し、実験的に見出されていた触角葉投射神経における連続刺激に対する応答感度の変化や機械感覚入力によるフェロモン応答の調節といった現象を再現することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand neural mechanisms to process dynamically changing pheromone information in the antennal lobe of male silkmoths. We generated several transgenic silkmoth lines that are useful for investigating functional connectivity of neurons in the antennal lobe of silkmoths. Based on experimental data, we constructed single compartment and multi-compartment simulation models of the antennal lobe of male silkmoths. We demonstrated that these simulation models can reproduce experimentally observed phenomena such as modulation of pheromone responses of the antennal lobe projection neurons to successive pheromone stimuli or by mechanosensory input to antennae.

研究分野：神経行動学

キーワード：脳・神経 シミュレーション 遺伝子 データ同化 昆虫

1. 研究開始当初の背景

匂いは自然環境下では濃度勾配を作り連続的に分布するのではなく、プルーム構造と呼ばれる匂いの塊(フィラメント)からなる構造で、非連続的、離散的に分布する。そのため生物が匂いの発生源に定位するために、光源や音源探知のような濃度(強度)勾配を利用することはできない。そのため、匂い源への定位には、断続的に受容するフィラメントの頻度、個々のフィラメントの匂いの濃度情報、さらにはフィラメント内の局所的な匂いの空間分布パターンの情報が重要であると考えられてきたが、これらの情報がどのように脳内でコーディングされているかはわかっていなかった。

昆虫、特にカイコガのオスはメスの放出する2種類の性フェロモン成分(ボンピコール、ボンピカル)のうちボンピコールの刺激だけでプログラム化された行動(匂い源定位行動)を発現することから、匂い源定位行動を生成する神経機構の解明の格好のモデル生物として研究が進められてきた⁽¹⁾。昆虫では、匂いの情報は嗅覚受容細胞により嗅覚中枢である触角葉へ入力され、局所介在神経により修飾・調節されて、投射神経(出力神経)から高次中枢へと伝達される⁽¹⁾。代表者らは、自然環境下と類似した断続的なフェロモン刺激に対するカイコガの触角葉構成神経の生理応答のマルチスケール分析により、個々のフィラメントの絶対濃度情報が触角葉の神経回路により、過去に受けた匂いに対する相対濃度情報に変換されて高次へ出力されることを明らかにした⁽²⁾。また単一のフィラメントと同じタイムスケールで発生した触角でのきわめて微小な神経活動を時間的に統合して信号増幅する機構が触角葉に存在することを見出した⁽³⁾。

このように、匂いの広域的(プルーム構造)さらには、単一フィラメント内の局所的なダイナミクスをコードする新しいメカニズムが明らかとなり、自然環境下で動的に変化する匂い情報処理の一端が解明されつつある。しかし、単一細胞もしくは少数の同一種類の細胞を対象とする従来の実験アプローチでは、触角葉の一部の神経群の生理応答からメカニズムを推定するにとどまっている。さらには、風による機械感覚入力やフェロモン副成分(ボンピカル)などの他の匂いによる投射神経のフェロモン応答への修飾機構も示唆されている(神崎ら、未発表データ)。そのため、触角葉への入力から出力に至る過程で起こっている情報処理、情報変換の神経機構を定量的に把握し、システムとしての神経回路の機能を理解するためには、個々の実験データを集積するだけでなく、理論的研究との融合により、システムティックなデータ取得とデータに基づいた神経回路モデルの構築が必要不可欠であると考えられる。

このような状況下で申請者は、触角葉におけるフェロモン情報処理のシステムとして

の理解に向けて、単一神経細胞の形態と生理計測データおよび複数神経細胞群の生理計測データのデータベース化に加え⁽⁴⁾、これらのデータを基盤とした神経回路モデル構築の要素技術開発を推進し、カイコガ脳神経のリアリスティックな回路モデルの開発を進めてきた⁽⁵⁾。さらに、遺伝子工学的手法により特定の神経細胞群の生理応答の測定したり、活動を制御する技術を確立し⁽³⁾、モデルで推定された神経細胞や回路の機能を実際の生体内で検証することを可能とした。これらの技術統合により、実験データに基づいた触角葉のリアリスティックな神経回路モデルをベースとして、生体内での検証結果に合わせて回路モデルのパラメータを修正していく「データ同化」のスキーム確立が可能となってきた。この一連の「回路モデルの構築(改良)シミュレーションによる機能推定実験による生体内での機能検証」を繰り返すことにより、回路モデルを生体内での実際の機能を反映したものに修正していくことが可能となり、最終的に、触角葉の入力から出力にいたる過程で起こる情報処理をシステムティックに回路モデルとして記述することが初めて実現されるものと考えた。

引用文献

(1) Sakurai T et al. *Front Physiol* 5, Article 125 (2014). (2) Fujiwara T et al. *J Neurosci* 34, 16581-16593 (2014). (3) Tabuchi M et al. *Proc Natl Acad Sci*, 110, 15455-15460. (4) Kazawa T et al. *Neural Netw* 21, 1047-1055 (2008). (5) Ikeno H et al. *Computational Intelligence and Neuroscience* 2012: 795291 (2012).

2. 研究の目的

本研究では、カイコガの触角葉の精緻な神経回路モデルを構築する。さらに、生体の脳から取得した実験データに基づきシミュレーションモデルを修正していく「データ同化」の手法により、触角葉における情報処理機構、特に、自然環境下で観察される時間空間的に動的に変化するフェロモン入力を処理する神経機構をシステムティックに記述することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換えカイコガ系統の作出と解析
遺伝子組換え系統は転移因子 piggyBac を利用した方法により作出した。カイコガのコリンアセチル基転移酵素遺伝子(ChAT)の開始コドンの上流配列(約2.0 kb)とグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子(GAD)の上流配列(約1.9 kb)の下流に GAL4 遺伝子をつないだ遺伝子組換え用ベクターをそれぞれ構築した。UAS 系統として、UAS 配列下流に改良版 GCaMP および RCaMP、RGECO 遺伝子をつないだベクターを構築した。構築したベクターを piggyBac のトランスポゼースを発現するヘルパーDNA とカイコ卵に共インジェクションし、次世代で組換え体を選抜し、組換え系統

を得た。作出した GAL4 系統は UAS-GFP 系統のカイコガと交配し、得られた次世代のオス個体の脳における GFP 発現パターンを、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的手法により解析した。UAS 系統はフェロモン受容細胞特異的なドライバー系統である BmOR1-GAL4 系統と交配し、触角葉における蛍光強度、フェロモン刺激への蛍光強度変化を検証した。

(2)シミュレーション関係，モデル関係

シミュレーションには神経の電気的な活動のシミュレータとして広く使われている NEURON を高並列むけに独自のチューニングを施した NEURON K+を用いた。嗅覚受容神経は生理的な測定をもとに触角葉構成神経への統計的なスパイク入力によるシナプス後電位をひきおこすポイントプロセスとしてその出力だけを再現した。触角葉構成神経のイオンチャンネルとしては通常の電位依存性の K チャンネル・Na チャンネルのほかカルシウムチャンネル・SK チャンネル(カルシウム依存性 K チャンネル)、異常整流性 K チャンネル、リーク電流を仮定し、実験データに対して進化的アルゴリズムである CMA-ES を適用することでコンダクタンスを推定した。

4. 研究成果

(1)神経回路モデル構築に向けた要素技術

本研究では、神経回路モデル構築に向けて、特に神経回路モデルに適切な機能的結合情報を付与するために必要な神経細胞間の接続関係のデータを得るための技術開発を実施した。

まず、複数の異なる神経細胞群からの同時計測系の確立に向けて、アセチルコリン合成酵素(ChAT)遺伝子および GABA 合成酵素(GAD)遺伝子のプロモーターを利用した GAL4 ドライバー系統を作出した。UAS-GFP 系統との交配により得られた次世代個体の脳の蛍光観察から、ChAT-GAL4 系統では、触角葉の常系球体に入力する神経線維で蛍光が検出された。この結果から、ChAT-GAL4 系統は一般臭の嗅覚受容細胞で遺伝子発現を誘導する活性を有することが示された(図 1)。また ChAT-GAL4 の別系統では、触角で受容した風等の機械感覚情報の処理に関わると考えられている領域である、触角機械感覚運動情報中枢(AMMC)に投射する神経線維で選択的に GFP の発現が検出された(図 2)。

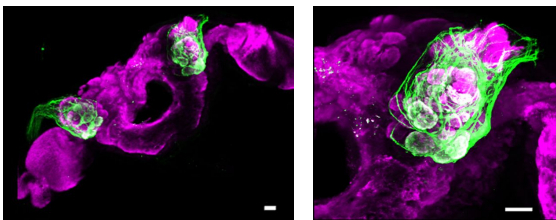


図 1 一般臭の嗅覚受容細胞を標識した ChAT-GAL4 系統。Scale bar: 50 μm

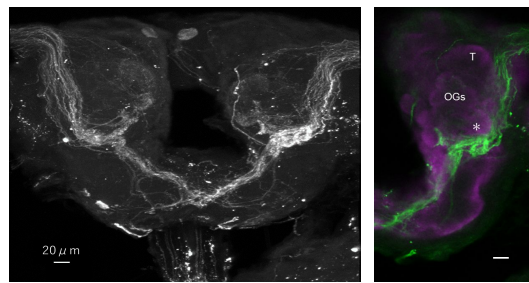


図 2 ChAT-GAL4 系統による触角機械感覚運動情報中枢(AMMC)の遺伝的標識。Scale bar: 50 μm (右図)

一方で GAD-GAL4 系統では、触角葉の側方にある局所介在神経から構成されるセルクラスタの一部の細胞体と触角葉内側にある細胞体クラスタの一部で蛍光が観察された。さらに、これらの細胞の触角葉における分枝パターンから GAD-GAL4 系統は一部の局所介在神経で遺伝子発現を誘導する活性を有することが示唆された(図 3)。

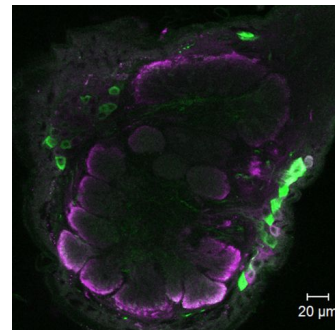


図 3 GAD-GAL4 系統による触角葉局所介在神経の遺伝的標識。

これらの結果から、作出した 3 種類のドライバー系統を用いることで、触角葉を構成する 2 つの異なる細胞群に加え、触角葉への機械感覚入力に関与する細胞群で選択的にレポーター遺伝子、エフェクター遺伝子を発現する系の作出に成功した。

異なる細胞群の機能的結合を検討するために、多色でのカルシウムイメージングは有効である。そこで、既存の GCaMP リポーター系統とは異なる赤色蛍光波長を示す 2 種類のカルシウム感受性蛍光タンパク質 RCaMP および RGECCO の UAS リポーター系統を作出した。これらの系統を BmOR1-GAL4 系統と交配し、フェロモン受容細胞で発現を誘導したところ、いずれの系統においても、フェロモン受容細胞の投射先である触角葉のトロイドにおける赤色蛍光が確認された RCaMP と RGECCO のベース蛍光強度比較の結果、RCaMP の方が蛍光強度が高い傾向があり、RCaMP がカイコガ脳の多色イメージングに適している可能性が示唆されたものの、イメージングの条件検討に時間を要し、本研究期間内での RCaMP の匂い応答のイメージングデータ取得にはいたらなかった。

また、自然環境中での変動する匂い刺激に対する応答計測のための高感度、高時間分解能カルシウムイメージングに向けて、改変型 GCaMP である GCaMP6s、GCaMP6f を発現するリポーター系統を作出した。それぞれのリポーター遺伝子をフェロモン受容細胞で発現させ、触角へのフェロモン刺激に対する触角葉における濃度依存応答を解析した。その結果、GCaMP6s、6f はいずれも、これまでに当研究室で利用していた GCaMP2 と比較し、蛍光強度変化が約 10 倍に増加し、検出限界が少なくとも一桁、低濃度側にシフトすることが明らかになった (図 3)。

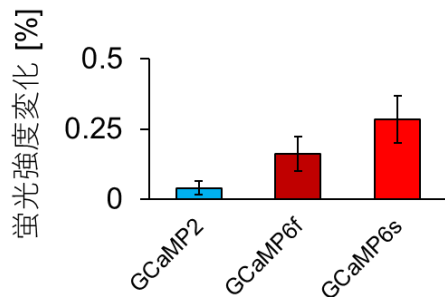


図3 異なる GCaMP 系統間のボンビコール検出限界 (10 ng) での蛍光強度変化の比較

(2) 触角葉神経回路モデルの構築

本研究ではまず、嗅覚受容細胞、触角葉出力神経、局所介在神経の神経細胞モデルを単一コンパートメントモデルとして実験データから組み上げ、その接続について試行した。嗅覚受容細胞の応答はフェロモン刺激に対する単一触角の応答の強度依存性と最大応答に対する応答のタイムコースを測定して嗅覚受容細胞の応答特性を決定した (図 4)。出力神経の応答は GABA 受容体のアンタゴニストを投与したあとのフェロモン刺激に対する応答に対してフィッティングを行うことによって決定した。局所介在神経に対しては基本的に Belmabrouk の論文⁽⁶⁾のモデルを使用した。

我々のグループでは実験的に、1 Hz 程度でフェロモンの連続刺激を与えたときに触角葉出力神経の応答は二回目から大きく変化し、最終的にはどの濃度においても同じような応答になるように濃度感受性が変化することを明らかにしている⁽⁴⁾ (図 4 上)。

この触角葉の連続刺激に対する応答感度の変化の実験結果を、主に GABA_B 受容体を介した局所介在神経間の相互抑制ネットワークによる局所介在神経の活性の推移を背景とした出力神経の抑制として解釈し、連続刺激に対する出力神経の応答の時間変化を再現することに成功した (図 4 下)。この解釈だと連続刺激中に局所介在神経が活動しつづけることが重要であり、その結果として、局所介在神経から出力神経への抑制が適応的に変化することによって触角葉出力神経の感度が変化する。

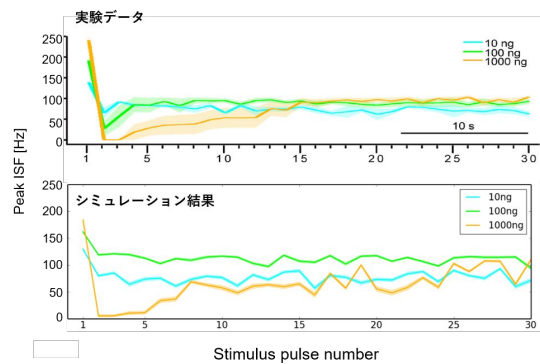


図 4 フェロモンの連続刺激に対する投射神経の瞬間発火頻度の実験データ (上) とシミュレーション結果 (下)

つづいて、触角葉ニューロンモデルのマルチコンパートメント化を行い、触角葉の腹側側から入力される風刺激をモデルに導入した。ヨトウガでの報告⁽⁷⁾をもとに、触角からの機械感覚情報が収斂する領域と考えられている AMMC からの抑制性の入力を想定して、直接機械感覚神経とつながっていない出力神経での機械感覚応答を再現した。また 40 ニューロンモデルにしてフェロモンパフ刺激に対して局所介在神経の応答が抑制性の応答と興奮性の応答の 2 つに分化するというシミュレーション結果を得た (図 5)。これは研究室で過去に行った実験結果 (Evan Hill ら 未発表) と一致するものである。

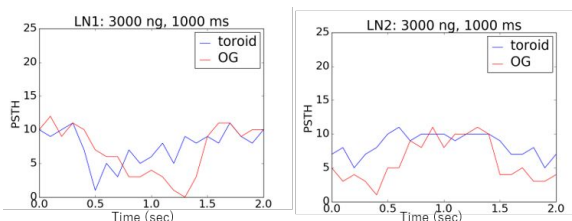


図 5 フェロモンパフ刺激に対する局所介在神経のシミュレーション結果。細胞により抑制性 (左) と興奮性 (右) 応答を示した。

引用文献 (6) Belmabrouk H et al. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**,19790-5. (7) Han et al. (2005) *J Comp Physiol A*, **191**, 521-528.

(3) 今後の展望

本研究により、触角葉のコンパートメントモデルを構築し、実験的に見出されていた触角葉投射神経における連続刺激に対する応答感度の変化や機械感覚入力によるフェロモン応答の調節といった現象を再現することに成功した。また新規なドライバー系統、リポーター系統が作出され、モデルの精緻化に向けたデータ取得のツールが整備された。さらに、当初の目的であったデータ同化によるシミュレーションの精緻化に関しては個々の触角葉神経細胞に対してはデータフィッティングによってオフラインで最適化を行うことで現実に近いモデルを得ること

ができた。一方で、回路レベルにおけるパラメータフィッティングやオンラインデータ同化においては十分な成果を得るにいたっておらず、今後、本研究で構築した神経回路モデルに加え、データ同化のためのデータ取得のために開発した技術を統合して、触角葉における嗅覚情報処理の精緻モデルの構築を早急に実施する予定である。

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, Fujii T, Shimada T, Kanzaki R (2017) The morphology of antennal lobe projection neurons is controlled by a POU-domain transcription factor *Bmacj6* in the silkworm *Bombyx mori*. Scientific Reports, 7:14050. DOI:10.1038/s41598-017-14578-4
- (2) Hara C, Morishita K, Takayanagi-Kiya S, Mikami A, Uchino K, Sakurai T, Kanzaki R, Sezutsu H, Iwami M, Kiya T (2017) Refinement of ectopic protein expression through the GAL4/UAS system in *Bombyx mori*: application to behavioral and developmental studies. Scientific Reports, 7:11795. doi: 10.1038/s41598-017-12102-2.
- (3) 櫻井健志, 光野秀文, 神崎亮平 (2017) 匂いセンサカイコガ開発の可能性. アグリバイオ, 1: 641-646.
- (4) Nirazawa T, Fujii T, Seki Y, Namiki S, Kazawa T, Kanzaki R, Ishikawa Y (2017) Morphology and physiology of antennal lobe projection neurons in the hawkmoth *Agrius convolvuli*. Journal of Insect Physiology 98:214-222. doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.010
- (5) Iwamatsu T, Miyamoto D, Mitsuno H, Yoshioka Y, Fujii T, Sakurai T, Ishikawa Y, Kanzaki R (2016) Identification of repellent odorants to the body louse, *Pediculus humanus corporis*, in clove essential oil. Parasitology Research 115, 1659-1666 DOI: 10.1007/s00436-016-4905-9
- (6) Harada Y, Kazawa T, Kanzaki R, Nakamoto T (2016) Response Prediction of an Insect's Olfactory Receptor Neuron by Using Structural Parameters of Odorant and Self-Organizing Map. IEEE SENSORS JOURNAL 16(3):580-585. DOI: 10.1109/JSEN.2015.2487820
- (7) Namiki S, Kanzaki R (2016) The neurobiological basis of orientation in insects: insights from the silkworm mating dance. Current Opinion in Insect Science 15: 16-26. doi:10.1016/j.cois.2016.02.009
- (8) Namiki S, Kanzaki R (2016) Comparative neuroanatomy of the lateral accessory lobe in the insect brain. Frontiers in Physiology 7:244. doi: 10.3389/fphys.2016.00244
- (9) 並木重宏, 神崎亮平 (2016) 昆虫の匂い源探索を担う神経基盤. アロマリサーチ 17(1): 37-41
- (10) 並木重宏, 神崎亮平 (2016) 虫の匂い源探索を司令する中枢. 昆虫と自然. ニューサイエンス社 51:23-26.
- (11) Tabuchi M, Dong L, Inoue S, Namiki S, Sakurai T, Nakatani K, Kanzaki R (2015) Two types of local interneurons are distinguished by morphology, intrinsic membrane properties, and functional connectivity in the moth antennal lobe. Journal of Neurophysiology 114(5): 3002-3013. doi: 10.1152/jn.00050.2015
- (12) 加沢知毅, 宮本大輔, 後藤晃彦, 朴希原, 福田哲也, 神崎亮平 (2015) 昆虫全脳シミュレーションへむけて. -その構成技術と進展- 日本神経回路学会誌 22(3): 89-102. doi.org/10.3902/jnns.22.89
- (13) 宮本大輔, 加沢知毅, 神崎亮平 (2015) 昆虫嗅覚系全脳シミュレーションに向けて: スーパーコンピュータによる大規模脳シミュレーションの現在とその展望 (特集 脳神経系シミュレーション). 人工知能: 人工知能学会誌: Journal of the Japanese Society for Artificial Intelligence, 30: 630-638.

[学会発表](計 42 件)

- (1) Ryohei Kanzaki (2017) Novel Technology Innovated by Insect Sciences. University of Cambridge - The University of Tokyo Joint Workshop
- (2) Ryohei Kanzaki (2017) Super-Sensing Learned from Insect Sciences. THE AGE OF SUPER SENSING 2017 International Conference on Advanced Sensing Design and Technology
- (3) Tomoki Kazawa (2017) The experimental data-driven construction of neural circuit simulation of insect brain using estimations on a single neuron and circuit level. Advances in Neuroinformatics 2017
- (4) Ryohei Kanzaki (2017) Accuracy and flexibility in odour plume tracking of insects. 第40回日本神経科学大会
- (5) Ryohei Kanzaki (2017) Future Technology: Learning from Biological Systems. Supersensing Forum Design

- and Technology Modeled on Biological Systems
- (6) 神崎亮平 (2017) 生物に学ぶ先端技術の未来 .2017 年度前期「イノベーションフォーラム 21」第 5 回
 - (7) 櫻井健志 (2017) Molecular and neural mechanisms underlying efficient pheromone source localization in the silkmoth *Bombyx mori*. 日本比較生理科学会第 39 回福岡大会
 - (8) 並木重宏 (2017) ガ類のフェロモン嗜好性を決める神経回路 . 日本進化学会第 19 回大会
 - (9) Takuya Nirazawa (2017) Difference of the neural pathways between the sex pheromone and behavioral antagonist in the hawkmoth, *Agrius conbolvuli*. 日本比較生理生化学会第 39 回福岡大会
 - (10) 櫻井健志 (2017) 遺伝子組換えカイコガを利用したフェロモン受容体遺伝子の発現制御領域の探索 . 第 61 回日本応用動物昆虫学会
 - (11) Ryohei Kanzaki (2016) Super-Sensing and Processing for adaptability (intelligence) New Science and Technology Innovated by Insect Sciences. 2016 International Symposium on Convergence Technologies “ Education and Cooperation for Convergence ”
 - (12) Ryohei Kanzaki (2016) Brain-Machine Integrated System. International Symposium on Advanced Manufacturing Science for Future Systems “ Biomimetics ” .
 - (13) Takeshi Sakurai (2016) Physiological and behavioral analysis of pheromone binding protein gene knockout silkmoth. The 17th International Symposium of Olfaction and Taste.
 - (14) 神崎亮平 (2016) 昆虫科学が拓くあたらしい科学と技術～センサ, 脳を創り, 理解し, 活用する～. SCI-TECH (サイエンステクノフロンティアフォーラム)
 - (15) 神崎亮平 (2016) 昆虫に潜む能力を活かす - 遺伝子から鼻を, ニューロンから脳を再現する - , 第 4 回生物の優れた機能から着想を得た新しいものづくりシンポジウム
 - (16) 神崎亮平 (2016) 昆虫の嗅覚を再現した匂いセンサと匂い源探索ロボット . 未来 ICT シンポジウム 2016 ~ 材料・機能から始まる ICT 技術革新 ~
 - (17) Ryohei Kanzaki (2015) Neural Basis of Odor Navigation in Insects: From Genes, Neural Networks and Behavior to Robots. Neuroethology: Behavior, Evolution & Neurobiology: Gordon Research Conferences
 - (18) Ryohei Kanzaki (2015) Neural Basis of

- Pheromone Orientation in the Silkmoth: from genes, neural networks, and behavior to robots. The 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry
- (19) Ryohei Kanzaki (2015) The Invertebrate Brain Platform (IVB-PF) - Comparative expositions and data collection about invertebrate brain - Advances in Neuroinformatics 2015
 - (20) Tomoki Kazawa (2015) Solving single neuron properties with multi-compartment model simulation and CMA-ES. Advances in Neuroinformatics 2015
 - (21) 神崎亮平 (2015) 昆虫の嗅覚機構を再現した匂いセンサと匂い源探索ロボット - 遺伝子から鼻を, ニューロンから脳を再現する - 精密工学会 知的ナノ計測専門委員会特別講演
 - (22) 神崎亮平 (2015) 昆虫科学が拓く新しい工学: 昆虫のセンサと脳の再現による理解と工学応用. JBA バイオセミナーシリーズ “ 未来へのバイオ技術 ” 勉強会 バイオロボティクス
 - (23) 神崎亮平 (2015) 遺伝子から鼻を, ニューロンから脳を再現する . 平成 27 年度第 2 回技術部会活動
 - (24) 神崎亮平 (2015) 昆虫に潜む能力を活かす - 遺伝子から鼻を, ニューロンから脳を再現する - 感性センシング応用ロードマップ技術分科会
- 他 18 件

〔その他〕
東京大学先端科学技術研究センター 神崎・高橋研究室ホームページ
<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
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
- 櫻井 健志 (SAKURAI, Takeshi)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任講師
研究者番号 : 20506761