

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440175

研究課題名(和文) 単一嗅覚器による匂い方向検出の神経基盤の解明

研究課題名(英文) Neural basis of coding for odor direction by a single olfactory organ

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)：空気中の匂いの分布や移動方向は時々刻々と変化する。このように瞬時に変化する感覚情報を動物がどう読み取り、匂い源に定位するのは神経科学の重要課題のひとつである。夜行性昆虫の代表格であるゴキブリは採餌や交尾相手の発見を全面的に嗅覚に依存し、視覚の手がかりのない状況でも正確に匂い源に定位できる。申請者は触角全域に分布する性フェロモン応答性の感覚細胞が触角内の三次元的位置に応じて大系球体内の特定の領域に投射する傾向をもつことを発見した。また、大系球体から出力する投射ニューロンの1つが触角を横切るフェロモンの方向変化によって顕著に異なる応答パターンを示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The distribution of odor filaments in a fluid is ever-changing. How animals read out such instantaneously changing signals in the central nervous system and locate an odor source is an enigma of neuroscience. Typical nocturnal animals, cockroaches are able to locate an odor source based solely on antennal input but not on visual cues. We found that axons of sex pheromone-receptive neurons are orderly represented in different regions of the macroglomerulus based on the three-dimensional soma locations. Our intracellular recordings further revealed that a single projection neuron with dendrites throughout in the macroglomerulus exhibits different temporal patterns to odors given from different directions across the longitudinal antenna.

研究分野：神経行動学

キーワード：昆虫 ナビゲーション プルーム 触角 投射ニューロン キノコ体 感覚子 性フェロモン

(1) 研究開始当初の背景

匂いの分布や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、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、その軸索は径数十 μm 程度の単一の糸球体に収束する。これにより、二次嗅覚ニューロンへの収れん比が上がり、匂いの検出感度を上げることができる (Grabe et al., 2016)。一方で、匂いの位置情報の中樞での表現は難しくなってしまう。

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よる匂い強度差の検出が重要とされる (Kanzaki et al., 1992; Rajan et al., 2006; Porter et al., 2006; Duistermars et al., 2009; Gardiner and Atema, 2010)。しかし、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不明な点が多い。ワモンゴキブリは動物有数の長さ (5 cm) の触角を持つが、片側 1 本の触角のみでも無風のフェロモン源や風上のフェロモン源にインタクトの個体と同じように定位できる (Bell and Tobin, 1983; Lockey et al., 2015)。

私はこれらの研究から着想を得て、一次嗅覚中樞の解剖学的研究に取り組んできた。その結果、メスの出す性フェロモンの主成分 (ペリプラノン B) を処理する感覚細胞はオスの触角葉中の大糸球体に投射するが、その求心繊維 (軸索) が触角内の前後、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を動物で初めて発見した (Nishino and Mizunami, 2006; 2007)。この組織化は幼虫期の脱皮のたびに起こる触角基部の伸長とともに徐々に形成される (Nishino et al., 2009; 2010)。さらに、この発生依存的投射地図は糸球体の一部に樹状突起を持ち、情報を高次中樞へと運ぶ 12 本の投射ニューロンによって利用される (Nishino et al., 2011; 2012)。そのうち 11 本の投射ニューロンの樹状突起は糸球体内で側方-内側方向に徐々にずれを生じ、触角上で基部-末梢領域に形成

される興奮性受容野と対応関係を結ぶ。その受容野が触角全域に及ぶニューロンも 1 本存在する。ところが、触角の前後に依存した求心繊維の組織化が投射ニューロンによってどう利用されるのかについては不明であった。

(2) 研究の目的

触角前半分、後半分の嗅覚細胞の軸索が大糸球体のそれぞれ前方、後方に投射する傾向をもつことはこれらの入力を受ける介在ニューロンが触角の前後方向のフェロモン刺激の違いを検出できる可能性を示唆する。

本研究では投射ニューロンの方向感受性を生み出す解剖学的・生理学的基盤を明らかにすることを目標とした。具体的には、1) 触角背側・腹側に由来する感覚細胞の投射に違いがみられるのか、2) 大糸球体から出力するどの投射ニューロンが方向感受性を持つのか、3) 方向の符号化様式は何か、4) 方向検出の神経基盤は何か、以上の問いについて明らかにすることをこころみた。

(3) 研究の方法

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用いた細胞内記録・染色法を主たる方法として用いた。大糸球体から出力する投射ニューロンの軸索にガラス管微小電極を刺入し、細胞内記録を行なった。フェロモン刺激は 6 方向刺激装置 (電子科学研究所・技術部、太田隆夫氏作成) に触角を通すことで行った (図 1)。刺激装置は任意の角度調整が可能であった。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 5 Pascal, Zeiss) を用いて観察した。



図 1 6 方向匂い刺激装置

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) を用いて、詳細な解析を行った。単一嗅感覚子からの投射についてはローダミンを充填したガラス管微小電極を嗅感覚子に被せ、数日温室中 (5) でインキュベーションすることで行った。

嗅感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・ピオチン・ローダミン (Life Technologies) の順行性注入により求心繊維を標識、2. 二重標識した標本の固定、3. ピプラトーム切片、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の行程については連携研究者である総研大の松下敦子氏との共同で行った。

(4) 研究成果

- 1) 触角内部を並行に走行する2本の触角神経を各々2~4分割し、異なる蛍光色素を注入することで詳細な投射パターンについて調べた。その結果、触角前側、背側、腹側、後方表面に由来するフェロモン受容細胞の求心繊維がそれぞれ大系球体の最前端、前側中央、後方中央、最後端に偏向した投射を示すことを明らかにした。つまり、触角の前面、後面に由来する嗅感覚細胞からの軸索終末は腹側、背側に由来する軸索終末に比べ空間的に離れた領域に分布する傾向が強かった。また、この分離傾向は触角末梢よりも基部に由来する求心繊維で強かった。これらの結果は単一感覚細胞の投射パターンと良く合致した。以上、フェロモン感覚細胞の投射地図は良く知られる体表機械感覚細胞の投射地図に匹敵するほど精緻なものであることが明らかとなった。
- 2) 大系球体から出力する12本の投射ニューロンが方向依存的な応答を示すのかどうかについて調べた。その結果、触角全域にわたって興奮性受容野を持つ大きな投射ニューロン (L1) が6方向からの刺激に対して最も顕

著な方向感受性をもつことを発見した (図2)。

- 3) L1の方向依存的応答であるが、前方からの刺激ではシンプルな発火の上昇と速やかな減少がおこるのに対し、後方からの刺激では抑制性入力が増加することにより、複雑な時間構造を持った応答が生じることがわかった。
- 4) L1は触角末梢 (径: 100 μm) よりも基部 (径: 400 μm) の刺激に対し、より明瞭な方向特異的応答を示した。
- 5) 触角後方からの刺激を特徴づける L1 への抑制性入力は GABA_A 受容体のアンタゴニストであるピクロトキシンの触角葉への投与によって消失した。
- 6) L1の樹状突起の中にシナプス小胞、すなわち出力シナプスが存在することが明らかとなった。また、局所介在ニューロンからの入力シナプスも存在する。局所介在ニューロンの大多数が γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性であることを考慮すると、フェロモン刺激に対して局所的かつ抑制的なゲイン制御が可能であることを示唆している。(5), (6)の結果を踏まえ、L1の方向感受性は GABA 作動性の局所介在ニューロンの入力によって生み出されると結論づけられた。

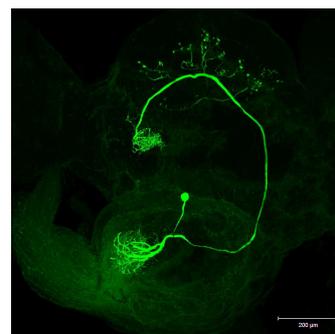


図2 L1 共焦点像

(5) 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- 1) Katoh K., Iwasaki M., Hosono S., Yoritsune A., Ochiai M., Mizunami M., Nishino H. Group-housed females promote production of asexual ootheca in American cockroaches. Zoological Letters, 査読有, 3(3): 1-9.

- (2017) DOI: 10.1186/s40851-017-0063-x
- 2) Takahashi N., Katoh K., Watanabe H., Nakayama Y., Iwasaki M., Mizunami M., **Nishino H.** Complete identification of four giant interneurons supplying mushroom body calyces in the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*, 査読有, 525: 204-230. (2017) DOI: 10.1002/cne.24108
 - 3) **Nishino H.**, Mukai H., Takanashi T. Chordotonal organs in hemipteran insects: unique peripheral structures but conserved central organization revealed by comparative neuroanatomy. *Cell and Tissue Research*, 査読有, 366: 549-572. (2016) DOI: 10.1007/s00441-016-2480-0
 - 4) Takanashi T., Fukaya M., Nakamuta K., Skals N., **Nishino H.** Substrate vibrations mediate behavioral responses via femoral chordotonal organs in a cerambycid beetle. *Zoological Letters*, 査読有, 2 (18) 1-7. (2016) DOI: 10.1186/s40851-016-0053-4
 - 5) Hamanaka Y., Minoura R., **Nishino H.**, Miura T., Mizunami M. Dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brain of the American Cockroach, *Periplaneta americana*. *Plos One*, 査読有, 11(8): e0160531 1-27. (2016) DOI: 10.1371/journal.pone.0160531
 - 6) Mizunami M., **Nishino H.**, Yokohari F. Status of and future research on thermosensory processing. *Frontiers in Physiology*, 査読有, 7 (150) 1-5. (2016) DOI: 10.3389/fphys.2016.00150
 - 7) **Nishino H.**, Watanabe H., Kamimura I., Yokohari F., Mizunami M. Coarse topographic organization of pheromone-sensitive afferents from different antennal surfaces in the American cockroach. *Neuroscience Letters*, 査読有, 595: 35-40. (2015) DOI: 10.1016/j.neulet.2015.04.006
 - 8) Mizunami M., Hamanaka Y., **Nishino H.** Toward elucidating diversity of neural mechanisms underlying insect learning. *Zoological Letters*, 査読有, 1 (8) 1-10. (2015) DOI: 10.1186/s40851-014-0008-6
 - 9) 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*, 査読有, 133: 273-284. (2014) DOI: 10.1007/s00435-014-0225-8
- [学会発表] (計 26 件)
- 1) 田中 真史、加藤 巧、**西野 浩史**、大門 高明
ワモンゴキブリの単為生殖のメカニズム、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)、(2017 年 3 月 28 日)
 - 2) 古賀 晴華、渡邊 英博、**西野 浩史**、北條 優、大村 和香子、横張 文男 シロアリの触角葉糸球体構成のカーブ間比較、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)(2017 年 3 月 28, 29 日)
 - 3) 向井 裕美、**西野 浩史**、Skals・Niels、高梨 琢磨 カメムシは左右脚部の振動受容器が生む強度差比較により振動源に定位する、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)(2017 年 3 月 29 日)
 - 4) Mukai H., **Nishino H.**, Skals N. Takanashi T. Male jewel bug localizes female calling vibrations: directional vibration sensing by chordotonal organs. 第 3 回生物音響学会年次研究発表会、伊良湖シーパーク & スパ(愛知県田原市)(2016 年 12 月 10 日)
 - 5) **Nishino H.**, Iwasaki M., Takahashi N., Katoh K., Matsushita A. A neuron coding odor direction. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

- (2016年11月17, 18日)
- 6) Koga H., Watanabe H., **Nishino H.**, Hojo M., Ohmura W., Takanashi T., Yokohari F. Similarity and variability of glomerular organizations of the antennal lobes in seven species of termites. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) (2016年11月17, 18日)
 - 7) Watanabe H., **Nishino H.**, Mizunami M., Yokohari F. Two parallel coding strategies to process general odor in basal insects. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) (2016年11月17, 18日)
 - 8) Takanashi T., Sakamoto H., Skals N., Fukui S., Matsui Y., Koike T. **Nishino H.** Vibration sensitivity in cerambycid beetles and its potential for insect pest control. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) (2016年11月17, 18日)
 - 9) Takahashi N., Katoh K., Watanabe H., Mizunami M. **Nishino H.** Complete identification of four calycal giant interneurons in an insect brain. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) (2016年11月17, 18日)
 - 10) Katoh K., Takahashi N., Watanabe H., Mizunami M. **Nishino H.** Aggregation pheromone processing in a cockroach brain. JSCP B 2016 Tokyo, 玉川大学(東京都町田市) (2016年9月2日)
 - 11) **Nishino H.**, Katoh K., Iwasaki M., Takahashi N., Watanabe H. Activity of a pheromone-responsive projection neuron is inhibited by pheromonal stimulation to the contralateral antenna. JSCP B 2016 Tokyo, 玉川大学(東京都町田市) (2016年9月2日)
 - 12) Terao K., Watanabe T., Aonuma H., **Nishino H.**, Mizunami M. Distribution of putative octopaminergic and tyraminergetic neurons in a cockroach brain. JSCP B 2016 Tokyo, 玉川大学(東京都町田市) (2016年9月2日)
 - 13) Watanabe H., **Nishino H.**, Mizunami M., Yokohari F. Olfactory processing via temporally and spatially segregated parallel pathways in an insect brain. Environmental Sensing and Animal Behavior (ESAB), 東京大学(東京都目黒区駒場) 2016年6月10日)
 - 14) 古賀 晴華、渡邊 英博、**西野 浩史**、北條 優、大村 和香子、高梨 琢磨、横張 文男 7種のシロアリの触角葉系球体構成の比較解析、動物学会・植物学会・生態学会三学会合同鹿児島大会、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市) (2016年5月28日)
 - 15) 加藤 巧、岩崎 正純、水波 誠、**西野 浩史** ゴキブリのグループ効果：単為生殖における卵鞘形成同調、日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会・合同大会、大阪府立大学・中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市) (2016年3月27, 28日)
 - 16) 高橋 直美、加藤 巧、渡邊 英博、水波 誠、**西野 浩史** Complete identification of four types of calycal giant interneurons in an insect brain, CompBiol 2015 広島大会、JMS アステールプラザ (広島県広島市) (2015年12月11日)
 - 17) 加藤 巧、岩崎 正純、水波 誠、**西野 浩史** Dormitory effect in cockroaches: synchronization of asexual ootheca production in females. CompBiol 2015 広島大会、JMS アステールプラザ (広島県広島市) (2015年12月12日)
 - 18) **西野 浩史** Traditional insect hearing organ revisited: key anatomical feature for frequency discrimination、CompBiol 2015 広島大会、JMS アステールプラザ (広

- 島県広島市) (2015年12月12日)
- 19) **西野 浩史**、岩崎 正純、加藤 巧、高橋 直美
単一ニューロンによる匂いの方向検出、日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市) (2015年9月17日)
 - 20) 渡邊 英博、**西野 浩史**、高梨 琢磨、横張 文男
マツノマダラカミキリ弦音器官がもつセロトニン免疫陽性の細胞内微細構造、日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市) (2015年9月17日)
 - 21) Takanashi T., Fukaya M., **Nishino H.**
Substrate vibrations mediate behavioral responses via leg chordotonal organ in the Japanese pine sawyer beetle, 15th International Meeting on Invertebrate Sound & Vibration, Lord Elgin Hotel, Ottawa, Ontario (Canada) (2015年7月14-16日)
 - 22) Mukai H., **Nishino H.**, Takanashi T.
Vibratory signals detected by leg chordotonal organs enhance mating success in a jewel bug. 15th International Meeting on Invertebrate Sound & Vibration, Lord Elgin Hotel, Ottawa, Ontario (Canada) (2015年7月14-16日)
 - 23) 向井 裕美、**西野 浩史**、高梨 琢磨
求愛シグナルの振動を脚で感知する: キンカメムシ類における振動受容機構の解明」、応用動物昆虫学会第59回大会、山形大学小白川キャンパス(山形県山形市) (2015年3月27日)
 - 24) **Nishino H.**, Iwasaki M., Yoritsune A., Kamimura I., Mizunami M.
Sensing the structural architecture of odor plumes with a single antenna, 11th International Congress of Neuroethology, Convention Center, Sapporo, Hokkaido (2014年7月29日)
 - 25) Watanabe H., **Nishino H.**, Yokohari F.
Temporal activity patterns of two different types of projection neurons revealed by simultaneous intracellular

recordings in the cockroach, 11th International Congress of Neuroethology, Convention Center, Sapporo, Hokkaido (2014年7月31日)

- 26) Takanashi T., Fukaya M., **Nishino H.**
Substrate vibrations mediate startle behavior via femoral chordotonal organ in a cerambycid beetle, 11th International Congress of Neuroethology, Convention Center, Sapporo, Hokkaido (2014年7月31日)

[図書] (計2件)

- 1) **西野 浩史**、渡邊 英博
振動・聴覚受容器のかたちとはたらき、昆虫と自然・特集「昆虫の生物音響学」、ニューサイエンス社、669(10) 4-8 (2015)
- 2) 高梨 琢磨、**西野 浩史**
第2章 生物の五感に学ぶ機能とその製品開発への応用 第9節 昆虫の振動情報と受容器に学ぶ-振動情報を受容する仕組み、その応用の可能性、生物模倣技術と新材料・新製品開発への応用、技術情報協会: 208-213 (2014)

[産業財産権] 該当なし

[その他] ホームページ

<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) 連携研究者
松下 敦子 (MATSUSHITA, Atsuko)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・助教
研究者番号: 50450416