

平成 21年 6月 9日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006 -2008

課題番号：18370028

研究課題名（和文） マルチスケール分析による嗅覚系神経回路の基本デザインの解明

研究課題名（英文） Understanding of neural basis of olfactory circuit employing multiscale analysis

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：生物の匂い識別機構を理解するために、カイコガの嗅覚一次中枢である触角葉の構成神経を対象として、マルチスケール分析を行った。まず、触角葉を構成する糸球体の再構成を行い、空間的位置情報から糸球体を個体間で同定する技術を確立した。つづいて投射神経の匂いに対する神経活動を糸球体に再構成することで、匂い情報が糸球体の時空間的な活動パターンによって表現されていることを示した。さらに局所介在神経の網羅的形態分析から、これらの特性が領域特異的に分枝する局所介在神経の動作によることを示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：神経行動学

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，嗅覚

## 1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する多様な匂いを比較的少数のニューロンで識別する匂い識別機構の仕組みは、生体特有の高次な時空間的な情報処理機構を含むものとして大きな関心がもたれている。カイコガの嗅覚一次中枢である触角葉は、 $61 \pm 1$  個の球状のニューロパイルである糸球体から構成されており、個々の糸球体が匂い識別の機能単位であると考えられている。これは、哺乳類の形態・機能的に相似な器官である嗅球の糸球体数(約 1000 個)よりはるかに少なく、カイコガは匂い識

別研究のモデル生物に適している。匂いの情報は嗅覚受容細胞により触角葉へ入力され、局所介在神経により修飾・調節されて、投射神経から高次中枢へと伝達される。触角葉における匂い識別機構の研究では、ガラス微小電極を用いた単一神経の細胞内記録および染色、触角葉糸球体マップのカルシウムイメージングなどが中心に行なわれてきた。Christensen と Hildebrand らはタバコスズメガを用い、糸球体が匂い識別の単位であることをフェロモン情報経路の解析から明らかにした。Laurent らはサバクバツタを用

い、時空間的コーディングによる匂い識別機構の存在を明らかにした。Menzel と Galizia らはミツバチでカルシウムイメージングを行い、匂いの識別が糸球体の組み合わせにより表現されることを明らかにした。また、近年、Axel らを中心に複数のグループが、シヨウジョウバエに分子遺伝学的手法を適用し、匂いの受容体と糸球体との対応関係を明らかにし、匂いの受容における嗅覚情報処理の理解を大きく前進させた。一方で、これらの研究は一部の糸球体や神経細胞を対象にしたものであり、これまで触角葉全体を対象にした研究は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、カイコガ触角葉をモデル系として、触角葉を構成する嗅覚受容細胞、局所介在神経、投射神経の機能・形態をマルチスケールな手法により、網羅的に解析することで、匂い情報処理機構を解明することを目的とした。

具体的には、嗅覚受容細胞から触角葉への匂い情報の入力マップおよび触角葉から投射神経への出力マップを構築し、これらを比較することで、触角葉における匂い情報修飾・変換様式を明らかにすることを目的とした。さらに、触角葉の入力と出力間の情報修飾を行う局所介在神経の形態と機能を網羅的に分析することで、触角葉における情報修飾の神経機構を解明することを目的とした。これらの研究結果を統合することにより、触角葉へ入力された匂い情報がどのような処理を経て高次中枢へと出力されるか総合的に解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)触角葉の3次元再構成

Lucifer yellow で背景染色を行った脳の触角葉の領域について、共焦点レーザー走査型顕微鏡で連続光学切片を取得した。光学切片上にある全ての糸球体の構造のトレースを全切片について行った。トレースしたデータを用いて触角葉の糸球体構造を再構成することで、触角葉の3次元構造を得た。糸球体毎に個別に、直径、表面積、体積を求めた。変異糸球体の確認のためには、シナプトタグミン抗体染色を用いた。

### (2)遺伝子組換えカイコガを用いた嗅覚受容細胞の投射領域の解析

嗅覚受容細胞と糸球体の対応付けを行うために、カイコガ性フェロモン主成分であるボンピコールの受容体遺伝子 BmOR1 と副成分であるボンピカル受容体遺伝子 BmOR3 の上流領域をプロモーターとして GAL4 遺伝子を発現する組換えカイコガを転移因子

piggyBac を利用して作出した。細胞の標識は GAL4-UAS システムを用いて行い、作出した組換え体を UAS-GFP 系統のカイコガと交配し、得られた次世代の触角および脳における GFP 発現パターンを共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。

### (3)細胞内記録・染色法による投射神経の機能形態解析

実体顕微鏡下において触角葉近辺へガラス微小電極を刺入し、細胞内記録法によって、投射神経の匂い刺激に対する応答を計測した。さらに、投射神経の匂い応答特性を糸球体の構造と関連付けるために、計測後の神経について細胞内染色をおこなった。染色に成功したニューロンは共焦点レーザー走査型顕微鏡により、詳細な3次元形態の観察を行った。

膜電位のデータは、発火頻度に変換し、試行間・個体間の類似度の評価は、積率相関係数を用いた。糸球体間の距離、投射神経の応答による触角葉出力マップの再構築には AMIRA を使用した。主成分分析・クラスター分析を用い、集団としての匂い識別能の視覚化、糸球体間の接続関係の評価を行った。

### (4)視認下電極刺入法による局所介在神経の網羅的形態解析

触角葉には構成ニューロンが細胞体を持つ2つの細胞体クラスター(MC:内側細胞体クラスター,LC:外側細胞体クラスター)がある。先行研究の結果より、局所介在神経は約860個の細胞体から構成されるLCに細胞体を持つことがわかっている。本研究では、局所介在神経の網羅的なサンプリングを行うために、視認下電極刺入法により、LCの細胞体を標的に細胞内染色をおこなった。染色に成功したニューロンは共焦点レーザー走査型顕微鏡により、詳細な3次元形態の観察を行った。

### (5)エレクトロポレーション法によるカルシウム感受性色素導入法とカルシウムイメージング

カルシウム蛍光指示薬である、Calcium Green のデキストラン体を、電気泳動的に、約10本程度までの複数の細胞を選択的に染色した。匂いによる蛍光強度変化を、CCDカメラによって検出した。デキストランを用いることにより、イメージング後の染色細胞の形態観察が可能となり、共焦点顕微鏡にてこれを行った。

## 4. 研究成果

### (1)触角葉の詳細な3次元マップの構築

カイコガの触角葉は60個の糸球体構造から構成される。糸球体は、個体間で比較・同定

可能である、とされてきたが、先行研究ではわずか 2, 3 例の標本に基いており、我々は多くの標本に基づき、数理的な解析手法も組み合わせることによって、より精密な分析を行った。

糸球体の大きさ、形態、空間的位置の情報を利用して、10 個の異なる触角葉を 3 次元に再構成し(図 1)、個体間の形態学的パラメータを詳細に分析することにより、39 個の糸球体についての同定法を確立した。また、これ以外の糸球体についても、領域毎の分類法を確立した。この結果、触角葉において糸球体構造が個体間で保存されない場合があり、さらに、こうした変異が起こる部位に再現性があることを明らかにした。

これらの部位は最大 5 か所程度であり、これ以後の解析には、これらの変異好発領域は除外した。

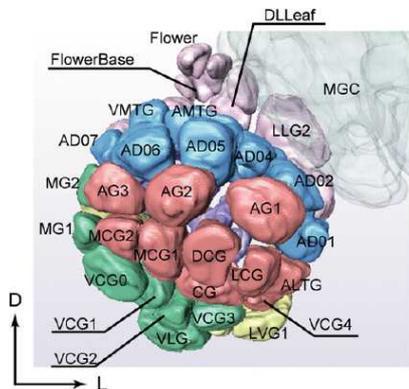


図 1 . 触角葉と同定糸球体

## (2)性フェロモン受容体の投射糸球体の同定

性フェロモンの情報はオスの触角葉だけに存在する大糸球体により処理される。これまでに大糸球体に分枝する投射神経の分析から、カイコガの 2 種の性フェロモンであるボンピコールとボンピカルは、それぞれ大糸球体のトロイドとキュムラスと呼ばれる領域で処理されることが示唆されていた。本研究では、カイコガボンピコール受容体 BmOR1 とボンピカル受容体 BmOR3 を発現する細胞で選択的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する遺伝子組換えカイコガを作出し、ボンピコール受容細胞とボンピカル受容細胞はそれぞれ大糸球体のトロイドとキュムラスに選択的に投射していることを示した(図 2)。これらの結果から、性フェロモンについては少なくとも質的には、入出力間で情報が保存されていることが示唆された。

一方で、一般臭の入力マップの構築のために、嗅覚受容細胞の約 80% で発現する BmOR2 のプロモーターを利用した遺伝子組

換えカイコガの作出を試みたが、組換え遺伝子の発現が観察されず、一般臭の入力マップの構築は今後の課題として残された。

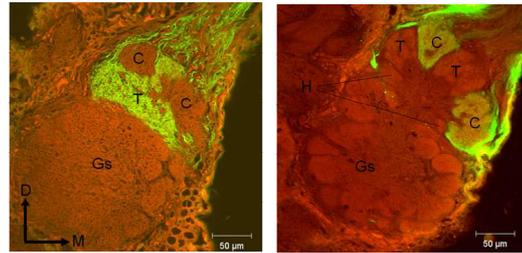


図 2 BmOR1(左), BmOR3(右)発現細胞の触角葉への軸索投射パターン。T:トロイド, C: キュムラス。

## (3)投射神経の匂い表現の解明

156 個の触角葉投射神経について、細胞内染色を行い、単一の糸球体から入力を受けるタイプの投射神経を同定した。このタイプの生理応答に基づき、匂い刺激に対する発火頻度の応答を解析したところ、投射神経の匂い応答は試行毎の再現性が高く、また、個体が異なっても、同一糸球体に分枝する投射神経は類似の応答プロファイルをもつことが分かった。

これら同定ニューロン群のデータに基づき、触角葉の投射神経の集団としての応答を再構築した(図 3)。活動パターンは匂い固有であり、触角葉の匂いの出力マップは動的であることが分かった。刺激後概ね 200ms 程度で最も匂い識別能が高く、また刺激終了後も 2 秒程度は識別情報を維持する可能性が示唆された。

更に、触角葉内の情報処理機構を分析するため、入力領域である糸球体の配置と、投射神経の応答を統合した解析を行ったところ、

入力糸球体間の物理的な距離と投射神経の応答プロファイルの類似度は無相関であり(図 4)、従来の距離依存型の側方抑制機構を否定する結果を得た。また、糸球体間の機能的結合を評価したところ、表層部の糸球体同士が密、深部の糸球体同士では反対に疎なネットワーク構造であり、触角葉内の機能構造は一様でないという結果を得た。これらの特性は、領域特異的に分枝する局所介在神経の動作によると考えられる。

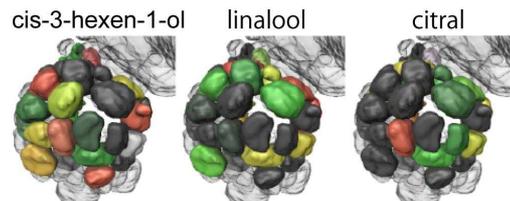


図 3 . 投射神経による出力マップ

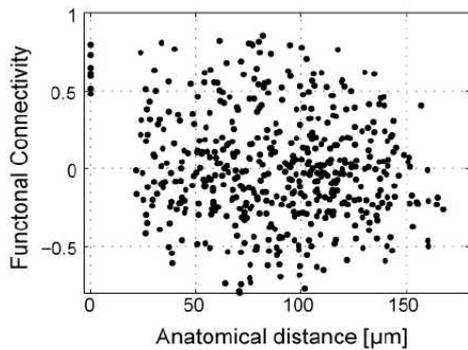


図4．糸球体間距離と機能的結合の関係

#### (4)局所介在神経の網羅的形態分析

153個の局所介在神経について視認下電極刺入法を用いて細胞内染色を行い、分枝パターンおよび糸球体内での樹状突起密度を基準とし分類を行った。その結果、局所介在神経は5つのタイプに分類されることを示した。さらにこのほとんどが抑制性神経伝達物質GABAをもつ可能性が高いことが分かった。主要なタイプは、全ての糸球体に分枝するものであった。また、触角葉内の特定領域を接続する、領域特異的な分枝パターンを有するタイプが発見され、それぞれ、全体的ないしは局所的な糸球体間相互作用に重要な機能を持っていると推測された。また、糸球体内部においては、芯部のみに分枝するタイプ（投射神経のみと相互作用）、表層部も含め全域に分枝するタイプ（投射神経・嗅覚受容細胞の両者と相互作用）が存在した。これは、局所介在神経が、嗅覚受容細胞-投射神経における情報伝達において、少なくとも2段階の作用機構をもつことを示唆する。

#### (5)イメージングによる触角葉神経応答の分析

触角葉大糸球体に分枝する細胞を、選択的に染色し、内側、外側細胞体クラスタ(MC, LC)の細胞体の蛍光シグナルを観察した(図5左)。これらはおおむね、投射神経、局所介在神経に対応することを、イメージング後の染色によって、確認した。匂い応答を観察したところLCの細胞体が先行して活動することが分かった(図5右)。これは、局所介在神経による投射神経に対するフィードフォワード抑制機構の存在を示唆する。

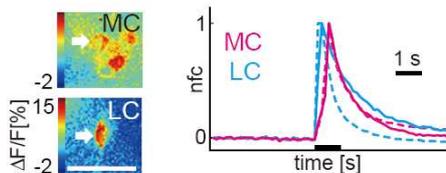


図5．内側、外側細胞体クラスタ(MC, LC)のフェロモン応答。

#### 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 15件)

1. Fujiwara T, Kazawa T, Haupt SS and Kanzaki R. Ca<sup>2+</sup> imaging of identifiable neurons labeled by electroporation in insect brains. Neuroreport in press, 査読有
2. Fukushima, R. and Kanzaki, R. Modular subdivision of mushroom bodies by Kenyon cells in the silkworm. J. Comp. Neurol. 513, 315-330, 2009, 査読有
3. Kazawa, T. Namiki, S., Fukushima, R., Terada, M., Soo, K and Kanzaki, R. Constancy and Variability of glomerular organization in the antennal lobe of the silkworm. Cell Tissue Res., 336, 119-136, 2009, 査読有
4. Kanzaki, R, Ando, N., Sakurai, T. and Kazawa, T. Understanding and reconstruction of the mobiligence of Insects employing multiscale biological approaches and robotics. Advanced Robotics, 22, 1605-1628, 2008, 査読有
5. Seki, Y. and Kanzaki, R. Comprehensive morphological identification and GABA immunocytochemistry of antennal lobe local interneurons in *Bombyx mori*. J. Comp. Neurol., 506, 93-107, 2008, 査読有
6. Namiki, S. and Kanzaki, R. Reconstructing the population activity of olfactory output neurons that innervate identifiable processing units. Front. Neural Circuits, 2, 1-11, 2008, 査読有
7. Kazawa, T., Ikeno, H. and Kanzaki, R. Development and application of a neuroinformatics environment for neuroscience and neuroethology. Neural Networks, 8, 1047-1055, 2008, 査読有
8. Namiki S., Iwabuchi S. and Kanzaki R. Representation of a mixture of pheromone and host plant odor by antennal lobe projection neurons of the silkworm *Bombyx mori*. J. Comp. Physiol. A 194, 501-515, 2008, 査読有
9. Yamagata, T., Sakurai, T., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T. and Kanzaki, R. GFP labeling of neurosecretory cells with the GAL4/UAS system in the silkworm brain enables selective

- intracellular staining of neurons. *Zool. Sci.* 25, 509-516, 2008, 査読有
10. Kanzaki, R. How does a microbrain generate adaptive behavior? International Congress Series, 1301, 7-14, 2008, 査読有
  11. 神崎亮平, 安藤規泰, 櫻井健志, 加沢知毅. 遺伝子・ニューロン・神経回路・ロボットでみる昆虫行動. 可視化情報学会誌, 28, 117-124, 2008, 査読有
  12. 神崎亮平, 昆虫のセンサ・脳・行動機能の分析と工学利用の現状と展開. テクノイノベーション, 17, 39-43, 2008, 査読無
  13. Ikeno, H., Nishioka, T., Hachida, T., Kanzaki, R., Seki, Y., Ohzawa, I. and Usui, S. Development and application of CMS-based database modules for neuroinformatics. *Neurocomputing* 70, 2122-2128, 2007, 査読有
  14. 神崎亮平, 微小脳のフェロモン中枢情報処理. AROMA RESEARCH, 27, 214-219, 2006, 査読無
  15. 櫻井健志, 関洋一, 西岡孝明, 神崎亮平, 昆虫のフェロモン受容と匂い識別の分子・神経基盤. 比較生理生化学学会誌, 23, 11-25, 2006, 査読無
- [学会発表](計 41 件)
1. Masashi Tabuchi, Millisecond photoactivation of bombykol receptor neurons expressing Channelrhodopsin-2 triggers pheromone searching behavior in male silkmoths, 脳と心のメカニズム 第9回冬のワークショップ, 2009年1月13日, ルスツリゾート, 北海道
  2. 藤原輝史, 昆虫の複数の単一神経細胞の構造分析を可能とする  $Ca^{2+}$  イメージング, 第17回日本バイオイメージング学会学術集会, 2008年11月1日, 千葉大学, 千葉
  3. 神崎亮平, 分析と統合による昆虫の適応脳の理解, 細胞・発生研究への数理科学的アプローチ, 2008年9月2,3日, 理化学研究所, 神戸
  4. Takeshi Sakurai, Activation of bombykol receptor neurons by ectopically expressed olfactory receptor triggers pheromone searching behavior in male silkmoths. 15th International Symposium on Olfaction and Taste, 2008年7月21-26日, サンフランシスコ, アメリカ
  5. Hidefumi Mitsuno, Identification of sex pheromone receptors from four moth species. 15th International Symposium on Olfaction and Taste, 2008年7月21-26日, サンフランシスコ, アメリカ
  6. Ryota Fukushima, Anatomical and functional organization of Kenyon cells in the mushroom bodies of male *Bombyx mori*. 15th International Symposium on Olfaction and Taste, 2008年7月21-26日, サンフランシスコ, アメリカ
  7. 藤原輝史, 電気穿孔法による昆虫触角葉の複数の単一神経細胞  $Ca^{2+}$  イメージング, 第30回日本比較生理生化学会, 2008年7月19-21日, 北海道大学, 北海道
  8. 神崎亮平, 昆虫とロボットで探る脳, 第30回日本比較生理生化学会 吉田記念講演, 2008年7月20日, 北海道大学, 北海道
  9. 神崎亮平, 昆虫力を測る・創る・利用する - 遺伝子・神経・行動からロボットへ -, 京都大学 COE セミナー, 2008年7月14日, 京都大学, 京都
  10. Ryohei Kanzaki, Insect-Machine hybrid system for understanding an adaptive behavior. The 10th International Conference on the Simulation of Adaptive Behavior, 2008年7月7-12日, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪
  11. 神崎亮平, 昆虫の嗅覚力を測る・創る・利用する - 遺伝子・神経・行動からロボットへ -, 第40回WIN定例講演演会, 2008年6月10日, 東京大学, 東京
  12. 藤原輝史, 電気穿孔法による昆虫の単一神経細胞群のカルシウムイメージング, 電気学会 医用・生体工学研究会, 2008年4月12日, 東京工業大学, 東京
  13. 藤原輝史, 昆虫の単一神経細胞群のカルシウムイメージング法の開発, 第3回移動知シンポジウム, 2008年3月5-7日, ホテル松島大観荘, 宮城
  14. Takeshi Sakurai, Axonal projections of pheromone receptor neurons to the antennal lobe macroglomerular complex in the silkmoth, *Bombyx mori*. The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007年9月10-14日, エポカルつくば, つくば市
  15. 神崎亮平, 昆虫脳にひそむ環境適応能 - 遺伝子・神経・脳・行動からロボットへ -, 日本進化学会第9回大会, 2007年8月31日 - 9月2日, 京都大学, 京都
  16. Takeshi Sakurai, Molecular and neural bases of pheromone discrimination in the silkmoth, *Bombyx mori*. The 7th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2007年8月12-16日, サルバドール, ブラジル

17. Takeshi Sakurai, Molecular cloning and expression pattern of elav-like genes from silkworm, *Bombyx mori*. The 7th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2007年8月12 - 16日, サルバドール, ブラジル
18. Ryota Fukushima, Anatomical organization of Kenyon cells in the mushroom body of the silkworm moth, *Bombyx mori*. The 8th Congress of the International Society for Neuroethology, 2007年7月22-27日, バンクーバー, カナダ
19. 神崎亮平, 昆虫の脳科学からみた昆虫の新しい利用法, 「昆虫科学の未来 昆虫を学ぶ, 昆虫に学ぶ」公開シンポジウム, 2006年11月18日 秋葉原コンベンションホール, 東京
20. 並木重宏, 昆虫脳を用いた匂いの脳内表現の再構成, 第21回生体・生理工学シンポジウム, 2006年11月18日, かごしま県民交流センター, 鹿児島
21. 神崎亮平, 脳研究のモデル動物としてのカイコリソースの利用, National Bioresource Project シンポジウム, 2006年10月18日, 九州大学国際ホール, 福岡
22. Yoichi Seki, Comprehensive analysis of antennal lobe local interneurons in the silkworm provides a novel neural system for olfactory processing. The society for Neuroscience 36th annual meeting, 2006年10月14 - 18日, アトランタ, アメリカ
23. Ryohei Kanzaki, How does a microbrain generate adaptive behavior? ~from gene and neurons to neural networks and behavior~, BrainIT2006, 2006年9月27 - 29日, 九州工業大学, 福岡
24. 吉川美都子, 雄カイコガ嗅覚系高次中枢における匂い情報の空間表現, 日本動物学会第77回大会, 2006年9月21 - 24日, 島根大学, 島根
25. Takeshi Sakurai, Convergent projections of pheromone receptor neurons to a specific subdivision of macroglomerular complex in the antennal lobe of the silkworm, *Bombyx mori*, 17th Congress of the European Chemoreception Research Organization, 2006年9月4 - 8日, グラナダ, スペイン
26. 神崎亮平, カイコガの嗅覚中枢におけるフェロモンおよび一般臭の情報表現, 第28回日本比較生理生化学会, 2006年7

- 月27 - 29日, クリエート浜松, 静岡
27. 並木重宏, 昆虫嗅覚系常系球体群による嗅覚情報表現の解析, 2006年7月19 - 21日, 第29回日本神経科学大会, 国立京都国際会館, 京都
  28. Yoichi Seki, Multiscale analysis for understanding the microbrain systems of the moths, Insect Olfactory CNS MMX, 2006年5月15 - 19日, Kristianstad, Sweden
- 他13件

〔図書〕(計 7 件)

1. 神崎亮平, ロボットで探る昆虫の脳と匂いの世界 - ファーブ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142, 2009
2. 神崎亮平, 理工学系からの脳科学入門, 東京大学出版(合原一幸, 神崎亮平編), 総ページ数219, 2008
3. 神崎亮平, 昆虫ミメティクス~昆虫の設計に学ぶ~(下澤楯夫, 針山孝彦 監修) NTS, 895-905, 2008
4. 神崎亮平, 昆虫はスーパー脳(山口恒夫 監修), 技術評論社, 41-71, 2008
5. 神崎亮平, シリーズ 21 世紀の動物科学 第8巻「行動とコミュニケーション」(岡良隆, 蟻川謙太郎編), 培風館, 37-69, 2007
6. 大塚晃嗣, 浦田宏樹, 磯川悌次郎, 関洋一, 上浦尚武, 松井伸之, 神崎亮平, 池野英利, 自己組織化マップとその応用(徳高平蔵, 大北正昭, 藤村喜久郎編), シュプリンガー・ジャパン, 123-135, 2007
7. 関洋一, 櫻井健志, 神崎亮平, 匂いと香りの科学(澁谷達明, 市川真澄 編著), 朝倉書店, 217-225, 2007

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.imi.i.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

### (3) 連携研究者