

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06732

研究課題名（和文）嗅覚並行処理経路の統合様式の解明

研究課題名（英文）Integration mechanisms of parallel olfactory processing pathways

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：嗅覚を発達させた動物では一次中枢から高次中枢へ投射するニューロンが複数の並行経路を形成する。本研究ではワモンゴキブリを用い、2本の並行経路の入力を処理するキノコ体の層、非層の外來性ニューロンの細胞内記録/染色により、その統合様式を精査した。その結果、葉部には入力ニューロンと出力ニューロンがあり、前者は層、非層の両方を広く覆うものが大多数を占めるのに対し、後者では非層のみ、層のみ、層と一部の非層を覆うもの、に分けられること、各タイプの形態や生理学的性質に顕著な違いがみられることがわかった。以上、キノコ体の出力レベルでは並行経路は一部統合、一部保持されていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚並行経路は同じ匂いに付随する異なる性質を処理すると推定される経路で、無脊椎動物、脊椎動物に広く見られるが、並行経路がどこでどう統合されるのかは理解されていない。本研究は嗅覚依存度の高い夜行性の動物（ゴキブリ）を用い、その2本の並行経路の統合様式を高次中枢（キノコ体）の外來性ニューロンの細胞内記録/染色により探る独自性の高い研究であり、得られた結果は並行経路の機能的意義や進化のみならず、嗅覚中枢の発達、匂いの情報統合、記憶の形成機構、行動決定など神経科学の諸課題に深い示唆を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Parallel olfactory pathways are prevalent in both vertebrates and invertebrates. Our previous studies have shown that two parallel pathways that stem from distinct types of sensilla in the antenna are delivered to gamma and non-gamma regions of the mushroom body via distinct populations of projection neurons in the American cockroach. In order to elucidate how these pathways are integrated in the mushroom body, we applied intracellular recordings and stainings to extrinsic neurons of the mushroom body in the male cockroach. The extrinsic neurons were classified into input and output neurons. Whereas input neurons had axon terminals extensively in both gamma and non-gamma regions, output neurons had dendrites in either or both regions. Each type of output neurons had distinct physiological properties. These results suggested that two parallel pathways are generally segregated but partly integrated at the level of the mushroom body output.

研究分野：神経行動学

キーワード：昆虫 キノコ体 細胞内記録 統合処理 ケニオン細胞 嗅覚情報処理 前大脳側葉 層構造

## 1. 研究開始当初の背景

嗅覚のすぐれた無脊椎動物、脊椎動物において匂い情報を高次中枢に運ぶ経路はしばしば並行分離する。各々の並行経路がどのような機能的役割をもつのかは神経科学の重要課題のひとつで、これまで多くの研究者がこの問題に挑んできた。

たとえば、ミツバチの一次嗅覚中枢である触角葉の背側と腹側には2つの糸球体グループ(各々約80個)が存在する。背側、腹側の糸球体グループから出力する投射ニューロンの束はそれぞれ前大脳の側方(lateral)、内側(medial)を通過し、キノコ体の入力部である傘の先端と基部に終末する。この並行経路については電気生理学的手法や光学計測を用いた詳細な研究が行われ、処理する嗅質に大きな重複のみられる重複並行経路(dual parallel pathways)であること(Galizia and Rössler, 2010)、1) 腹側の糸球体から出力する投射ニューロン(m-PN)の方が背側から出力する投射ニューロン(l-PN)よりも匂い応答の特異性が高い(=特定の匂いのみに応じる)こと、2) m-PNの方がl-PNよりも強い濃度依存的応答を示すこと、3) m-PNは複合臭に対して興奮性応答の強度が増すのに対し、l-PNでは逆に抑制性の応答を示すこと、が示されている(Müller et al., 2002; Brill et al., 2014; Carcaud et al., 2015, 2016)。

ワモンゴキブリの触角葉中には異なる感覚子タイプの投射を受ける2つの糸球体グループが存在する(Watanabe et al., 2010; 図1)。前部背側の105個は形状の良く似た小さい糸球体(type 2 糸球体グループ)で、後部腹側100個は形状の異なる大きな糸球体(type 1 糸球体グループ)である(図1A)。常糸球体から出力する投射ニューロンの数は原則1本だけである(Nishino et al., 2010, 2011)。Type 2 糸球体からの投射ニューロンは1. 自発発火少、2. 匂い応答特異性低、3. 短い興奮性応答、type 1 糸球体からの投射ニューロンは1. 自発発火多、2. 匂い応答特異性高、3. 抑制性の入力を含む複雑な応答パターン、を示す(Watanabe et al., 2017)。これら2つの経路が処理する匂いの種類には大きな重複があるため、ミツバチと同様に同じ匂いを2つの経路で処理する重複並行経路であることが支持される。Type 2 投射ニューロンはキノコ体の入力部(傘)の先端に、type 1 投射ニューロンは傘の基部に終末する(Watanabe et al., 2017)。いずれのタイプの投射ニューロンもキノコ体に加え、前大脳の側角の異なる領域に軸索終末を持つ(図1)。

記憶中枢であるキノコ体は脳半球あたり25万個もの小さな内在性ニューロン(ケニオン細胞)によって構成されるため、傘の組織化については長い間不明であった。申請者はケニオン細胞の軸索の集合体である葉部に注目した。グリア細胞で隔てられた葉部の異なる層に色素を取り込ませることにより、ケニオン細胞の樹状突起の局在について調べたところ、 $\gamma$ 層に軸索を伸ばすclass II ケニオン細胞が傘の先端にほぼ排他的な樹状突起を持つ一方、非 $\gamma$ 層に軸索を伸ばすclass I ケニオン細胞は傘の基部側に樹状突起を持つことがわかった(Nishino et al., 2018)。これにより、type 2 投射ニューロンはclass II ケニオン細胞に、type 1 投射ニューロンがclass I ケニオン細胞に出力することが強く支持された(図1)。

問題はその先の経路である。水波、岩崎らはワモンゴキブリの銀染標本や透過電顕標本の観察により、キノコ体葉部が哺乳動物の大脳皮質の機能コラムを想起させる2層の $\gamma$ 層と13層の非 $\gamma$ 層の計15層から構成され、各層が交互の明暗層からなる“モジュール構造”を

もつことを示した (Mizunami et al., 1998; Iwasaki et al., 1999)。Farris ら (2001) は孵化直後の一齢幼虫の葉部が  $\gamma$  層と 1 層の非  $\gamma$  層からなり、幼虫期の成長にしたがって非  $\gamma$  層の後端に新生ケニオン細胞の軸索が付加されることで新たな非  $\gamma$  層が形成されることを示した。非  $\gamma$  層の数は脱皮の回数 (12 回) と対応するいわば年輪様の構造である (図 1)。キノコ体葉部からの出力ニューロンとそこから情報を受け取り、これを再び傘に戻すフィードバックニューロンの同時細胞内記録からは情報統合がおこる場所がキノコ体の葉部であることが示唆され (Takahashi et al., 2019)、この問題に取り組む舞台は整った。

キノコ体葉部の機能的役割についてはショウジョウバエの分子遺伝学的手法を用いた機能脱落実験によって明らかになってきている。コンセンサスとしては  $\gamma$  層が短期記憶の形成に、非  $\gamma$  層が記憶の読み出しに寄与する (Zars 2010; Gwen-Ozkan and Davis, 2014)。外来性のドーパミン作動性、オクトパミン作動性のニューロンはそれぞれ罰情報、報酬情報を葉部に運ぶ働きをする (Unoki et al., 2005)。垂直葉と水平葉は報酬の価値に応じて拮抗する役割を果たすことが示されている。 $\gamma$  層は報酬もしくは罰情報の入力と匂い情報入力の同期検出器 (coincident detector) として機能することが提案されている。

以上、並行経路と記憶中枢の役割はそれぞれ異なる昆虫を用いた研究により追求されてきたが、並行経路の情報統合がどこでどのように行われるのかについては不明な点が多かった。

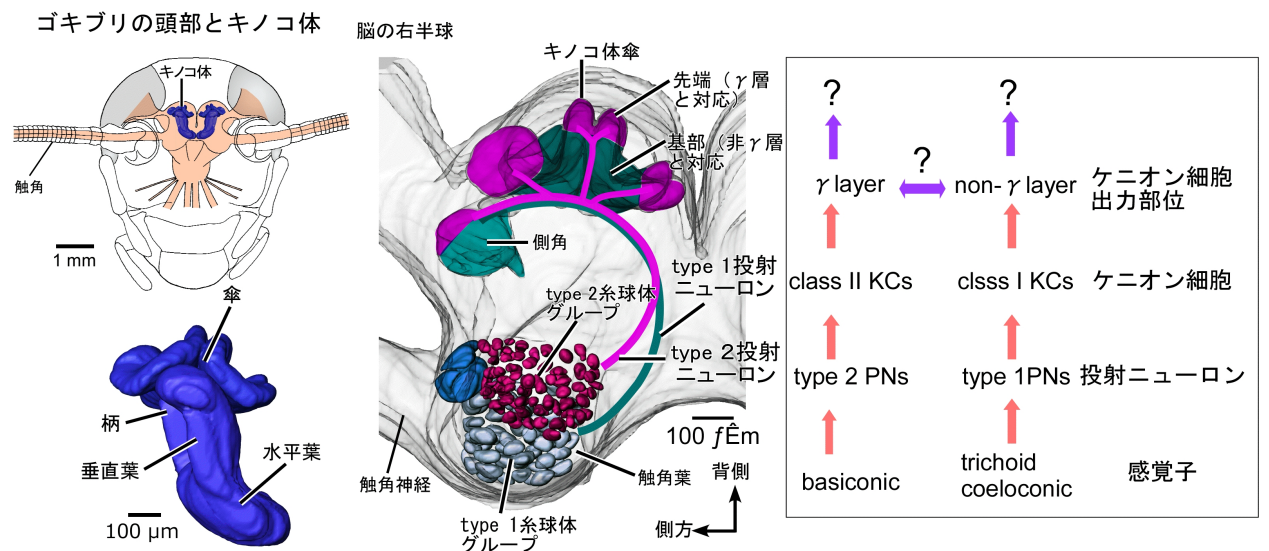


図 1 ワモンゴキブリゴキブリ嗅覚並行処理経路の概略図。右端は並行経路を構成する神経要素を示す。?はブラックボックスの部分。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は「最高次嗅覚中枢であるキノコ体が並行経路をどう利用するのか」を理解することにある。並行経路をなすキノコ体葉部の  $\gamma$  層と非  $\gamma$  層が学習において異なる機能的役割を果たす可能性を念頭においたうえで、葉部を支配する外来性ニューロンからの細胞内記録/染色により、その機能構築を明らかにする。

## 3. 研究の方法

キノコ体を構成する個々のケニオン細胞の軸索は 2 又に分かれることで垂直葉と水平葉を形成する。本研究では、8%ルシファーイエローを充填した 1 本のガラス管微小電極 (電極抵抗: 50-70 M $\Omega$ ) を垂直葉内に刺入し、単一ニューロンの細胞内記録・染色を行った。

記録後の染色はルシファーイエローを電気泳動的にニューロン内に注入することにより行った。匂い刺激としてアルコール、アルデヒド、脂肪酸、性フェロモン、フルーツの匂い（複合臭）を用いた。刺激時間は100~300 msとし、複数回刺激を行った。

染色されたニューロンを含む脳は固定後に透徹し、共焦点レーザー顕微鏡でホールマウントでの観察を行った。脳の水平切片（厚み200  $\mu\text{m}$ 程度）は両刃カミソリを用いた手切りにより作製し、油浸対物レンズ（40倍）を用いた微分干渉光下での観察で、葉部のどの領域に神経線維が分布するのかについて評価した。入出力部位は電極刺入位置での電位波形やニューロンの形態の評価により推定した。

#### 4. 研究成果

- 1) 記録/染色されたニューロンはその形態学的形状と生理学的形状により、葉部以外に樹状突起（入力部位）を持ち、葉部内に軸索終末（出力部位）を持つ介在ニューロンと葉部内に樹状突起を持ち、葉部以外に軸索終末を持つ介在ニューロンの2種類に大別された。以下、前者を入力ニューロン、後者を出力ニューロンと定義する。
- 2) 記録された入力ニューロンは活動電位を出すスパイクニューロンと活動電位を出さず、刺激に対して緩電位応答をするノンスパイクニューロンに分けられた。スパイクニューロンは軸索の太いものが多く、神経線維は前大脳側葉部の側角（lateral horn）を除く領域と葉部周辺に広く分布し、 $\gamma$ 層と非 $\gamma$ 層を広く覆う特徴があった（図2A）。垂直葉内の神経線維の幅は長軸方向に35-45  $\mu\text{m}$ であった（図2G）。なお、明暗層の両方を支配するニューロンは存在せず、いずれかに強い分布のバイアスがあった（図2A）。匂い刺激に対してシナプス後電位（EPSP）に活動電位が重畳するような興奮性応答を示すことから、葉部には出力部位だけでなく、入力部位も存在することが示唆された（図3、一番上のトレース）。また、例数は少ないが、非 $\gamma$ 層に入力するスパイクニューロンも同定された（図2B）。一方、ノンスパイクニューロンの軸索は細く、匂いに対して緩電位応答を示すことを除き（図3）、その形態はスパイクニューロンと良く似ていた（図2C）。
- 3) 記録された出力ニューロンには非 $\gamma$ 層のみに樹状突起を持つタイプ（図2D）、 $\gamma$ 層、非 $\gamma$ 層の前半部に樹状突起を持つタイプ（図2E）、 $\gamma$ 層のみに樹状突起を持つタイプ（図2F）が存在した。非 $\gamma$ 層からの出力ニューロン、 $\gamma$ 層と非 $\gamma$ 層の両方に樹状突起を持つタイプについては、全てがスパイクニューロン、 $\gamma$ 層から特異的に出力するニューロンについては全てがノンスパイクニューロンだった。いずれのタイプの樹状突起も明暗層のいずれかに強いバイアスを持っていた（図2D-f）。
- 4) 非 $\gamma$ 層から出力するスパイクニューロンには神経線維の太いものが多く、解析に十分なサンプル数を得た。これらのニューロンの垂直葉内の樹状突起の幅は長軸方向に20-25  $\mu\text{m}$ で（図2H）、出力部位は葉部の前側、側角周囲にあった。その自発発火は多く、リズム的な増減パターンを示した。応答は嗅質依存的であり、興奮性応答を示す場合が多いが、抑制性の応答を示す場合もあった。これらの応答は自発発火が多く、匂いに対して持続的な応答を示すシナプス前ニューロン（Type 1 投射ニューロン）の特徴を強く反映するといえる。
- 5)  $\gamma$ 層から出力するノンスパイクニューロンは神経線維が1.5  $\mu\text{m}$ 以下と非常に細く、細胞内記録は困難を極めた。垂直葉内の樹状突起の幅は長軸方向に10-15  $\mu\text{m}$ であ

り (図 2 I)、その終末は葉部前のニューロピルに局限していた。匂いを与えていない時の電位振動がほぼないことから、自発発火が少なく、匂いに対して一過性の応答を示すシナプス前ニューロン (Type2 投射ニューロン) の特徴を強く反映するといえる。

### まとめ

これまで、キノコ体葉部への外来性ニューロンはスパイクニューロンのみの生理、形態が知られてきたが (Li and Strausfeld 1997; 1999)、入出力ニューロンの中には相当数のノンスパイクニューロンが含まれていることが初めて明らかとなった。これまでの形態学的研究を考慮すると (Li and Strausfeld, 1997; 1999; Strausfeld et al. 2009)、垂直葉で発見されたニューロン構成は水平葉にも当てはまると思われる。ノンスパイクニューロンの中にはドーパミン免疫陽性の介在ニューロン (DSP1, DCa1) と形態学的特徴が一致するものがあり (Hamanaka et al., 2016)、今後は細胞内記録と免疫染色を組み合わせたアプローチが重要である。γ層から特異的に出力するニューロンは葉部の前側のみに軸索終末が見られることから、これまで重要視されてこなかった前大脳表面のニューロピルが情報統合に重要な役割を果たすことが示された。キノコ体の出力ニューロンの解析からは、γ層と一部の非γ層の情報が統合される経路と分離されたままの並行経路の両方が存在する、と結論づけられた。

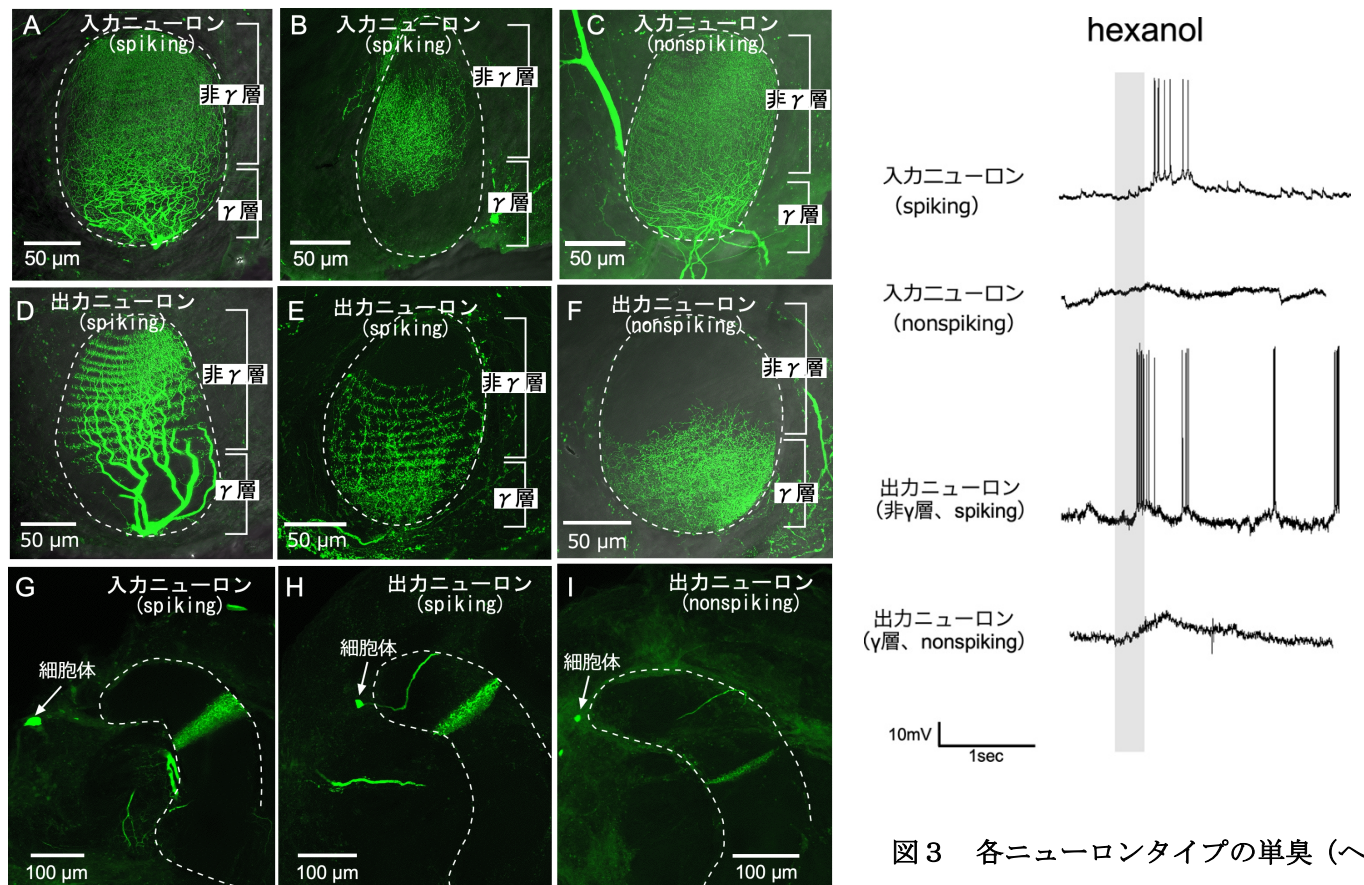


図 3 各ニューロンタイプの単臭 (ヘキサノール) に対する応答例。

図 2 各ニューロンタイプの葉部内の神経線維の形態 (A-F、水平切片) と垂直葉での分布様式 (G-I、前方図)。破線が葉部の輪郭を示す。いずれの図も左側が脳の側方。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tateishi K., Watanabe T., Nishino H., Mizunami M., Watanabe H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Silencing the odorant receptor co-receptor impairs olfactory reception in a sensillum-specific manner in the American cockroach.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ISCIENCE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 西野浩史	4. 巻 52
2. 論文標題 ゴキブリは視るように匂いをかく	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 におい・かおり環境学会誌	6. 最初と最後の頁 287-294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurihara K., Ito T., Sato Y., Uesugi T., Yamauchi S., Komatsu M., Saito S., Domae M., Nishino H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Management of nuisance macromoths in expressways through academic-industrial collaboration: light trap designed on the basis of moths' preferences for light attributes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi R., Nishino H., Watanabe H., Yamamoto S., Iba Y.	4. 巻 108
2. 論文標題 Reconstructing the ecology of a Cretaceous cockroach: destructive and high-resolution imaging of its micro sensory organs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Science of Nature	6. 最初と最後の頁 45(1-8)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00114-021-01755-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Komatsu, K. Kurihara, S. Saito, M. Domae, N. Masuya, Y. Shimura, S. Kajiyama Y. Kanda, K. Sugisaki, K. Ebina, O. Ikeda, Y. Moriwaki, N. Atsumi, K. Abe, T. Maruyama, S. Watanabe, H. Nishino	4. 巻 6
2. 論文標題 Management of flying insects on expressways through an academic-industrial collaboration: evaluation of the effect of light wavelengths and meteorological factors on insect attraction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-020-00163-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西野浩史	4. 巻 57
2. 論文標題 匂いのかたちを把握する昆虫	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 180-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.57.3_180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tateishi K, Watanabe T., Nishino H., Mizunami M., Watanabe H.
2. 発表標題 Sex pheromone receptors in the American cockroach
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌オンライン大会, 札幌
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石康介、渡邊崇之、西野浩史、水波誠、渡邊英博
2. 発表標題 ワモンゴキブリの性フェロモン受容体の同定
3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会、米子コンベンションセンター
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石康介、渡邊崇之、西野浩史、水波誠、渡邊英博
2. 発表標題 ワモンゴキブリの嗅覚共受容体 (Orco)の同定と機能解析
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高梨琢磨、衣浦晴生、上地奈美、西野浩史、浦野忠久、加賀谷悦子、田村繁明、蔭山健介
2. 発表標題 振動によるクピアカツヤカミキリの行動制御機構ー成虫・幼虫の室内実験
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口諒、西野浩史、伊庭靖弘
2. 発表標題 微小感覚器官の高分解能可視化による化石ゴキブリの生態復元
3. 学会等名 第170回日本古生物学会例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 H. Nishino, M. Sakai	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 189
3. 書名 Tonic immobility in a cricket: behavioral characteristics, neural substrate, and functional significance in Death-feigning in Insects: mechanism and function of tonic immobility	



1. 著者名 H. Nishino	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 189
3. 書名 Tonic immobility in a cricket: neuronal underpinnings of global motor inhibition in Death-feigning in insects: mechanism and function of tonic immobility	

1. 著者名 西野浩史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 367
3. 書名 バイオミメティクス・エコミメティクス -持続可能な循環型社会へ導く技術革新のヒント- 第III編第4章 生物の世界観：昆虫の振動・音受容とバイオミメティクス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

西野研究室 <a href="https://www.es.hokudai.ac.jp/labo/nishino/">https://www.es.hokudai.ac.jp/labo/nishino/</a> Nishino Lab1 <a href="https://www.youtube.com/channel/UCyPUBf6ysfnIjNjdt-ebPxQ">https://www.youtube.com/channel/UCyPUBf6ysfnIjNjdt-ebPxQ</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------