昆虫の嗅覚中枢情報処理と光学計測法

藍 浩之*・神崎 亮平**

動物の脳内における嗅覚情報処理機構については、神経解剖学的、形態学的、生理学的、薬理的、そして神経行動学的手法により様々な研究が行われてきた。一方、脳内の神経回路、その動態およびその可塑的变化を調べるためには脳内の複数のニューロンから神経活動をモニターすることが必要不可欠であり、その1つの手段として光学計測法が挙げられる。本稿では、前半で昆虫の嗅覚系一次中枢である触角葉における形態学的、生理学的研究で分かってきたことを記述する。また後半では、光学的計測法を用いた研究の現状を概説し、さらに著者らが行なっている膜電位感受性色素を用いた光学計測法による解析で分かったことを紹介する。

1. はじめに

昆虫にとって嗅覚は種を存続するための主要な感覚受容機構であり、さらに記憶や学習といった高度な脳機能にも密接な関係をもつ¹⁹⁾。そのため嗅受容器、嗅受容体、嗅受容細胞内トランスダクション、嗅覚一次中枢の構造及び機能、匂い識別、行動解析等様々なレベルで嗅覚情報処理に関係する研究が今まで盛んに行われてきた²⁰⁾。さらに最近、脊椎動物の嗅覚系一次中枢である嗅球と昆虫の触角葉がともに複数の糸球体から構成されること、細胞内記録および染色法により介在ニューロンの生理学的特徴、および

その神経連絡に共通点が多く見られることが明らかにされてきた²⁵⁾。

2. 触角葉

嗅受容ニューロンにおいて神経情報に変換された匂い情報は、触角神経を上行して触角葉に伝達される。触角葉は、触角葉内のみで分枝する局所介在ニューロンと触角葉から他の脳内領域に出力する投射ニューロンから構成される(図1)^{28,38)}。多くの昆虫は複数の糸球体を持ち、個々の糸球体が匂い識別において何らかの機能的単位になっていると考えられてきた。

昆虫種によって触角葉を形成する糸球体の数は異なり、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の43個からサバクバタ *Schistocerca americana* の1000個まで様々である⁶⁾。我々が材料として用いてきたカイコガ *Bombyx mori* の触角葉は58個の常糸球体と1個の大型の糸球体(大糸球体)からなる³³⁾。大糸球体(macrogglomerular complex, 直径約200 μm)は雄のみがもち、常糸球体(ordinary glomerulus, 直径約50 μm)とは組織学的に区別される³¹⁾。雌にはこの大糸球体は存在せず、常糸球体のみで構成される(性的二型)。1つの嗅受容ニューロンの軸索は1つの糸球体で終末する。大糸球体には性フェロモン受容ニューロンが終末し³³⁾、フェロモン情報を特異的に処

図1 触角葉の模式図とその主要ニューロン素子。ガにおいて同じ匂い応答特性を持つ嗅覚系一次ニューロンは、触角葉の同じ糸球体内に終末する。糸球体内で嗅受容は局所介在ニューロンと投射ニューロンにシナプス連絡する。雄の場合、性フェロモン感受性ニューロン(模式図中で匂いAとBに応答する)は、大糸球体の2つのコンパートメントのいずれかに、匂い応答特性に依存して投射する。宿主植物由来を含む一般臭に応答する嗅覚系一次ニューロンは常糸球体に投射する(Hansson and Christensen, 1999を改変)。

*Hiroyuki AI, 福岡大学理学部地球圏科学科生物学分野(〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1)

**Ryohei KANZAKI, 筑波大学生物科学系(〒305-8572 つくば市天王台1-1-1)

理する機能的単位と考えられている。一方、常糸球体には性フェロモン以外の嗅受容ニューロンの軸索が終末している。鱗翅目昆虫においてこれらの常糸球体が、匂い識別においてどのような機能的単位になっているかはいまだ明らかではない。常糸球体に関してはこの数年間にキイロショウジョウバエの嗅受容体タンパク質¹¹、それに続き嗅受容体遺伝子が同定され¹⁵、同じ受容体を発現する嗅受容ニューロンは触角葉内の1つまたは2つの糸球体に投射することが分かってきている^{16, 48, 54}。

昆虫のフェロモンは通常、複数成分からなる。また、大糸球体は組織学的に複数のコンパートメントからなる(図1, 4)。鱗翅目昆虫類(カブラヤガ *Agrotis segetum*²⁴、ニセタバコガの仲間 *Heliothis virescens*²¹、ハスモンヨトウの仲間 *Spodoptera littoralis*⁴¹)では、それぞれのフェロモン構成成分に特異的に反応する嗅受容ニューロンがそれぞれ異なるコンパートメントに投射している。そのため、投射ニューロンがどのコンパートメントに樹状突起をもつことによって、複数のフェロモンコンポーネントに対する応答特性が決定される。タバコスズメガ *Manduca sexta* では、大糸球体は3つのコンパートメント toroid, cumulus,

horseshoeから成り、toroid に入力領域を持つ投射ニューロン(toroid-PNs)はフェロモン主成分に興奮応答するが、副成分には興奮応答しないこと、cumulus に樹状突起をもつ投射ニューロン(cumulus-PNs)はフェロモン副成分に興奮応答するが、主成分には興奮応答しないことがわかっている²³。このように触角からのフェロモン情報は、それぞれのフェロモンコンポーネントが並列に信号処理される標識ラインシステム(labeled line system)として大糸球体から高次中枢(前大脳)に伝達される²⁵。

最近、共焦点レーザースキャン型顕微鏡を用いた解析により、雄カイコガの触角葉の光学切片を作成し3次元構築した結果、タバコスズメガと同様に大糸球体は3つのコンパートメントからなり、大糸球体の構造がタバコスズメガと類似することが示された(図4 A, B)³⁰。それらのコンパートメントを toroid, cumulus, horseshoe と同定し、それぞれのコンパートメントに樹状突起を持つ投射ニューロンの、フェロモンコンポーネントに対する応答特性を細胞内記録法により調べた。その結果、雄カイコガの性フェロモンに反応する投射ニューロンは4種のフェロモン応答特性を示す群に分けられることが分かった³⁰。それらは、

図2 触角葉におけるフェロモン情報処理に関与する神経回路のモデル Christensen et al. (1993)を改変。詳細は本文参照。

タバコズメガでみられた toroid-PNs, cumulus-PNs, toroid+cumulus PNs (toroid と cumulus を含む複数の大糸球体コンパートメントに入力領域をもつ投射ニューロン)の他に, horseshoe に入力領域を持つ投射ニューロン (horseshoe-PNs)である。toroid-PNs と cumulus-PNs はそれぞれボンピコール (性フェロモン主成分) とボンピカル (性フェロモン副成分) に特異的に興奮応答する。toroid+cumulus-PNs はボンピコールおよびボンピカル刺激に対し, 強い興奮性反応を示す。また今まで他の昆虫でその機能が不明であった horseshoe に入力領域を持つ horseshoe-PNs が同定され, それがボンピカルに対してのみ興奮応答することが示された。このことはボンピコールは toroid で, ボンピカルは cumulus と horseshoe という2つの領域で処理されていることを示す。またボンピカル処理系において cumulus と horseshoe がどのように機能的な差があるのかについては今後さらなる研究が必要である。

3. 触角葉内の神経回路

触角葉内の信号処理機構は, 1980年代前半から投射ニューロンおよび局所介在ニューロンで細胞内記録法および染色法を用いて研究されてきた。ここでは, 特に研究の進んでいるタバコズメガを例に触角葉内の神経回路について以下に述べる。アリゾナ大学の Hildebrand と Christensen のグループは, タバコズメガを用いて, 触角で受容された性フェロモン情報の処理に関わる触角葉における神経回路の解析を精力的に行なってきた。そして, 薬理学的, 組織学的および神経生理学的実験結果に基づき, 大糸球体投射ニューロンへの3つの異なる径路を示した (図2)⁹⁾。第一の系は複数の興奮性局所介在ニューロンを介して投射ニューロンを興奮させる系, 第二の系は GABA 作動性抑制性ニューロンを介して投射ニューロンを抑制する系である。投射ニューロンからこの抑制性ニューロンへのフィードバック径路も存在する。フェロモン刺激を触角に受けると, 第一, 第二の系によって大糸球体出力ニューロンはある定型的な応答パターンを示す。すなわち, 刺激開始直後の一過性の過分極性電位 (I_1) とそれに続く群放電 (E), および数秒間持続する過分極電位 (I_2) である。第三の系は直列に並んだ2つの抑制性ニューロンを介して投射ニューロンを興奮させる系である。彼等は局所介在ニューロンへ過分極性電流を通电することにより, 投射ニューロンのスパイク発火頻度の増加を引き起こすことを示した。このことはこの投射ニューロンの興奮に脱抑制回路 (disinhibitory pathway) が関わっていることを示唆する¹⁰⁾。しかしこの第三の系が第一, 第二の系とどのように関係しているのかについては不明である。

4. 脊椎動物および無脊椎動物の嗅覚系一次中枢における情報処理の比較

昆虫の嗅覚情報処理に関する研究が進むにつれて, 昆虫と脊椎動物の嗅覚系一次中枢の構造と生理機能における類似性が明らかになってきた。このことは, 系統進化の上でかなり早い時期に分岐した動物群の間においても, 同様の神経機構によって匂い情報処理が行なわれていることを示唆する。以下にその類似点について述べる。

糸球体構造と感覚ニューロンの投射様式

触角または嗅上皮から脳内に投射した嗅覚系一次ニューロンは糸球体に投射し, 二次ニューロンとシナプスを形成する。糸球体の数はウサギ, マウス, ラットでは2000から3000個であるのに対し, 昆虫では数十個から千個と桁違いに少ない。それぞれの糸球体の機能的解析は, 昆虫では単一ニューロンレベルにおける電気生理学的解析や重金属イオン・蛍光色素による細胞内染色により詳細に行われてきた^{5, 7, 21, 24)}。最近ではキイロショウジョウバエにおいて個々の嗅受容ニューロンは, 80個の嗅受容体遺伝子のうち1つを発現していることが明らかにされた¹⁵⁾。嗅受容体遺伝子の in situ hybridization によって, 嗅受容体遺伝子の触角と小顎肢での分布がマッピングされた。さらに, それぞれの受容体遺伝子を発現する嗅受容ニューロンが触角葉の1つまたは2つの糸球体に収斂することが示された⁵⁴⁾。一方哺乳動物の嗅球においては200万個の嗅受容ニューロンがそれぞれ1000個の嗅受容体遺伝子の内の1つを発現することが示された³⁷⁾。またトランスジェニックマウスを使った実験から, ある嗅受容ニューロンは嗅上皮ではランダムに分布しているが, その軸索は嗅球の1800個の糸球体の内の1つまたは2つの糸球体に正確に収斂することが示された^{40, 44, 51, 55)}。このように脊椎動物と無脊椎動物で糸球体の数は異なるものの, 同じ受容体をもつ嗅受容ニューロン群が共通の糸球体に収斂することが動物種を問わず普遍的な特徴となっているようである。

嗅覚系一次中枢における情報処理機構

昆虫の場合, 1つの嗅受容ニューロンからのびる軸索は1つの糸球体へと投射し, そこで触角葉の2次ニューロンである局所介在ニューロンまたは投射ニューロンの樹状突起とシナプスを形成する。同様のシナプス連絡は脊椎動物の嗅球でも見られ, 僧帽細胞は昆虫の投射ニューロンに相当する。これらニューロンは共に匂い刺激に対し, 短い過分極性電位, 脱分極性電位に続き過分極性緩電位から成る3相性 (または2相性) の応答パターンを示す^{10, 18)}。この匂い応答パターンの類似は, 触角葉および嗅球における神経回路の基本的デザインが共通していることを示唆するものである。

5. 光学計測法 による嗅覚情報処理の解析

昆虫の脳において匂い情報のコード化を理解するためには複数ニューロンの空間的, 経時的活動パターンの解析が重要である。従来, ニューロンおよびニューロン群の電気活動をモニターする方法として, 電気生理学的手法が用いられてきた。しかしこの方法では神経回路を形成する多数のニューロンの電気的活動を同時にモニターすることや, 電極の刺入が困難な部位では計測ができなかった。昆虫の脳のように一ヶ所に密にニューロンが分布している部位から電極を用いて多点同時計測をする場合, 電極の間隔を数10 μ m レベル, またはそれ以下にした特殊な電極が必要となる。Christensen らは多チャンネル電極プローブを150 μ m の間隔でタバコズメガの触角葉に刺入し複数ユニット同時記録に成功している⁸⁾。神崎らはさらに小さい多チャンネル電極プローブを試作し, 現在計測をはじめている。また触角葉より更に高次中枢には刺入困難なサイズのニューロンまたはニューロン群 (たとえばキノコ体を構

成するケニオン細胞の細胞体の直径は2 μm しかない)が重要な役割を果たしていることが示唆されており、電極を使わずに神経の電気活動をモニターする手法の開発が次世代に求められている。近年、検出能の優れたイメージセンサの開発とそれに伴い光学計測機器の開発が進み、複数神経活動の同時記録が試みられ、今まで得ることのできなかった脳内神経回路レベルの活動の動態がモニターできるようになってきた。以下に光学計測法の例を紹介する。

5-1. 内因性信号による嗅覚情報処理の解析

昆虫において光学計測法が行なわれたのは、1993年のLieke³⁵⁾によるミツバチ *Apis mellifera* の触角葉を対象とした研究である。これは、内因性信号をモニターすることによるニューロン活動の光学計測で、ニューロンの活動に伴う脳組織の代謝の変化を反映した反射光信号を計る方法である。Liekeは触角葉のスライス標本を用い、触角神経の電気刺激によって生じる内因性信号を薬理学的に解析し、それが時間経過の早い成分と時間経過の遅い成分からなることを示した。これら時間経過の異なる成分の役割は不明である。また触角への匂い刺激(カーネーション)によって触角葉の一部の領域で内因性信号の著しい上昇を計測している。

5-2. カルシウムイメージングによる嗅覚情報処理の解析

ミツバチの触角葉

Menzelらは、ミツバチの吻伸反反射(proboscis extension reflex; PER)を指標とした匂いの古典的条件づけを行い、可塑的变化をする脳内神経回路の解析を進めている。以下に彼等の研究を紹介する。1990年代前半に嗅覚学習に関わる複数の脳内ニューロンが電気生理学的に同定された。そのうちPE1ニューロンはキノコ体出力ニューロンの一つであり、 α 葉の付根から入力を受け、前大脳側葉(LPL)に出力する³⁹⁾。このPE1ニューロンは、匂い刺激とショ糖の連合刺激の後、この匂い刺激によってその活動性が減少する。またHammerら¹⁹⁾は、匂い条件づけの過程で触角へのショ糖のかわりにVUMmx1ニューロンに脱分極性電流を流すことによって、連合学習が成立することを突き止めた。またVUMmx1ニューロンは触角や吻へのショ糖刺激でスパイク頻度を上昇させる性質をもつ。さらに免疫組織学的研究によりVUMmx1ニューロンはオクトパミン作動性であることも分かった。VUMmx1ニューロンは、キノコ体傘部、触角葉、前大脳側葉など嗅覚情報処理経路に広く分枝をはり巡らしている。これらの結果から、VUMmx1ニューロンは複数箇所神経の可塑的变化を引き起こさせている可能性が示唆されている。

このような単一ニューロンレベルでの研究成果を背景に、Menzelらは1990年代後半より脳内でのニューロン活動の多点同時計測を開始した。主に触角葉を対象に、匂い情報コーディングパターンの研究を進めてきた。当初彼等はカルシウム指示薬と膜電位感受性色素の両方を用いた光学計測を行ない、匂い刺激によって触角葉で生じた空間的応答パターンをイメージングしているが¹⁴⁾、膜電位イメージングが技術的に困難であることから、主にカルシウム指示薬を用いた計測のみを行なっている。まず彼等は、カルシウムイメージングによってミツバチの触角葉における匂い応

答の空間マップを作成した。ミツバチの組織学的に同定された160個の糸球体のうち38個の糸球体で36の異なる匂い分子に対する反応を計測した結果、糸球体によって反応する官能基、炭素鎖の長さに特異性があることを明らかにした⁴⁶⁾。さらに彼等は投射ニューロンにカルシウム指示薬fura-dextranを取り込ませ、それら投射ニューロンの活動の同時記録も行なっている⁴⁶⁾。その結果、それぞれの匂いは糸球体によって興奮性および抑制性から成る複雑な時空間パターンの活動を引き起こすことを示した。この抑制性反応の起源を調べるため薬理学的効果を調べ、2つの抑制性回路の存在を明らかにした。1つはピクロトキシン感受性反応で、触角葉全体で見られる。2つ目はピクロトキシン非感受性の反応であり、この反応は刺激した匂いの種類に特異的な組み合わせの糸球体で生じる。SachseとGaliziaは、前者を触角葉全体の活動を調節する反応であり、後者はある糸球体のみを特異的に抑制する側抑制に相当すると考えている⁴⁶⁾。

キイロショウジョウバエの触角葉

最近、蛍光カルシウムプローブを遺伝子に組み込むことによるカルシウムイメージングによってキイロショウジョウバエの触角葉の匂い応答空間マップが作成されつつある。このプローブは生理研の中井氏らが開発、作成した(G-CaMP)で、すでに本雑誌 vol.19, No. 2 の総説で紹介されている。Axelらは、このプローブを感覚ニューロンおよび投射ニューロンに発現させ、16個の匂い物質に対する応答を23の糸球体で調べた。また彼等はある嗅受容ニューロンに遺伝的操作をすることによって本来ある種の匂い刺激に対し反応しない糸球体が、ある受容体遺伝子を発現させることによって反応するようになることを実験的に示し、それぞれの糸球体の反応は、そこに投射する嗅受容ニューロンで発見した受容体によって決定されることを示した⁵⁴⁾。

5-3. 膜電位感受性色素を用いた光学計測法による嗅覚情報処理の解析

電位感受性色素は細胞膜に結合し、細胞内外の膜電位差に比例して蛍光強度または吸光強度を変化させる性質を持つ。光学計測法は主に脊椎動物の脳内情報処理の解析、具体的には、ラット、モルモット、サンショウウオ、カエル、ガンギエイで精力的に行なわれてきた。これらはすべて膜電位感受性色素を脳全体にbath applyすることによって行なう手法をとり、記録面全体での時空間活動パターンを解析したものである。また膜電位感受性色素には神経束から逆行性に色素を注入できるものもある。これらの手法により電極法では困難であった複数ニューロンからなる神経回路の動態の解析が可能となってきた。著者らは本手法を昆虫の脳内の神経活動の時空間パターンの解析に適用し、シグナルを検出することに成功した^{1, 2, 3, 4, 27, 42, 43)}。以下に著者らが筑波大学生物科学系神崎研究室で行なった研究を中心に紹介する。

(1) 大糸球体内における興奮性および抑制性応答の時空間分布

光学計測法で取得した反応(ここでは光学反応と呼ぶ)に対する薬理学的効果を解析することにより、複数の脳内介在ニューロン活動の性質を調べることができる。また興奮性活動と抑制性活動の脳内分布を調べることにより、脳に

入力された情報の処理過程を詳細に調べることが可能である。大糸球体は性フェロモンの質と量の情報を処理する一次中枢であると同時に、嗅覚刺激における他の物理的性質(匂いが触角を刺激する頻度)も情報処理される。著者らは触角上のトポロジカルな情報が糸球体内でどのように処理されているのかを調べるため、雄カイコガ糸球体内の二次ニューロンの興奮性及び抑制性活動の時空間パターンを調べた。

光学計測に用いた装置

光学計測のために用意した計測装置は、倒立顕微鏡(Axiovert S100, Carl Zeiss), 光源としてメタルハライドランプ(3台, KMH-250, BMH-250; 清原光学), 光検出系にMOS型イメージセンサ(Fuji HR Deltaron 1700, Fujifilm Microdevise)を用いた。これは128×128のphotopixelからなり、それぞれの素子は14.3 μ m×14.3 μ mの組織の領域を、イメージセンサ全体で1.83mm×1.83mmの領域をカバーする(対物レンズPlan-Apochromate×10/0.45, Carl Zeissの場合)。

触角から触角葉への2つの経路

匂い情報を動物が受容する時、匂いの質・量以外の情報も動物の行動発現においては重要な意味を持つ。たとえば、空気中に3次的に漂う匂い物質の分布を昆虫は飛翔しながら(または歩行しながら)検知し、その匂い源に定位する。カイコガは左右の触角がそれぞれ3次的に広がった形態をし、空気中の匂いの分布を検知できる可能性を示唆する。そこで触角上のそれぞれ異なる部位に存在するフェロモン受容細胞で生じた情報が糸球体でどのように処理されるかについて調べた。触角は鞭節の主軸をなすantennal stemとそこから両側に伸びる約60対の分枝(正中線側に伸びるmedial flagellaと側方側に伸びるlateral flagella)からなる。また触角神経は触角の中で2つの分枝(正中線

側を走行するmedial nerve(MN)と側方側を走行するlateral nerve(LN))に分かれる。MNおよびLNを切断し、その末梢側断端からコバルトリジンを注入し、MNとLN内感覚線維群の触角における投射領域を調べた。MNから注入するとmedial flagella内の線維のみが染色され、LNから注入するとlateral flagella内の線維のみが染色される。このことはMNおよびLNがそれぞれmedial flagellaおよびlateral flagella上の感覚ニューロン群から中枢に伸びる線維束からなることを示す(図3)。またMNおよびLNの中枢側断端から触角葉にむけてテトラメチルローダミンデキストランを注入し糸球体内投射領域を調べた。その結果、MN内神経線維、LN内神経線維はそれぞれある密度勾配をもって糸球体に投射していることがわかった(図4C, D)。その密度勾配がmedial-lateral軸であることから、それぞれ糸球体のtoroidを3つの部域(medial toroid, central toroid, lateral toroid)に、cumulusを2つの部域(medial cumulus, lateral cumulus)に区分けし感覚線維の投射パターンを調べた(horseshoeは光学計測の記録面から外れているため今回の解析からは除外した)。糸球体表層域およびcentral coreを通る糸球体中層域でMNはmedial側に、LNはlateral側に密な線維が投射する。糸球体下層域でMNは糸球体全体に投射しているのに対し、LNはlateral側に局所的に投射する(図4E, F)。光学計測ではcentral coreを通る面に焦点をあわせ、この5つの部域(medial toroid, central toroid, lateral toroid, medial cumulus, lateral cumulus)で記録、比較解析を行なった。光学計測で記録された触角葉における活動

触角上のmedial flagellaおよびlateral flagellaから入力したフェロモン情報の触角葉糸球体での空間的処理様式を明らかにするため、膜電位感受性色素による光学計

図3 medial nerve (MN)および lateral nerve (LN) からコバルトリジンを注入した触角 MN 内の神経線維は medial flagella から由来し(A), LN 内の神経線維は lateral flagella から由来する(B)。スケールは1 mm。触角の表面には多数の双極性細胞が染色された(B)。スケールは100 μ m。

図4 大系球体におけるMN および LN 内感覚線維の投射領域 A, Bは雄カイコガ触角葉の3次元構築図。前方の光学切片からは大系球体のtoroid(T)とcumulus(C)が確認でき(A), 後方からはhorseshoe(H)が確認できる(B)。C-F, MN および LN からテトラメチルローダミンデキストランを注入した。C, DはそれぞれMN および LN 感覚線維の触角葉への投射パターンを示す。それぞれのイメージは、表層から $50 \pm 20 \mu\text{m}$ の深さの光学切片を重ね合わせた。E, MN から伸びる線維は、触角葉表層域($20\text{--}40 \mu\text{m}$)およびcentral coreを通る中層域($40\text{--}60 \mu\text{m}$)ではtoroid, cumulusともにmedial側に線維が片寄って投射する。触角葉後層域($60\text{--}80 \mu\text{m}$)では全体に均等に投射する。F, LN から伸びる線維は、触角葉表層域, central coreを通る中層域, 後層域で大系球体のlateral toroid および lateral cumulusに感覚線維の投射が局在していた。スケール; $100 \mu\text{m}$ (A-D), $50 \mu\text{m}$ (E, F)

図5 MN と LN の電気刺激により誘発した触角葉での脱分極性反応 Aは標本の蛍光実像。模式図中の四角で囲まれた領域は光学計測で用いたMOS型イメージセンサーのカバーする領域。スケールは $500 \mu\text{m}$ 。Bは光学計測で得られた脱分極性の時空間応答パターン。Cは大系球体での脱分極性反応。high cut filter ($>246\text{Hz}$)処理後の波形。刺激後、約 7.2ms で反応のピークがみられ、その後、時間経過の緩い脱分極性電位(矢尻)がみられる。

測を行なった。MN または LN の電気刺激を行い、大糸球体における反応パターンを調べた。電気刺激により、脱分極性反応が触角神経から触角葉に流れていく様子が光学イメージで確認できた。MN を電気刺激すると大糸球体の正中線側半分域に強い脱分極応答がみられるのに対し、LN を電気刺激すると大糸球体の側方側半分域に強い脱分極性応答がみられた(図5)。

Ca²⁺ free によって分離された後シナプス反応

MN または LN の電気刺激で生じた大糸球体の光学反応の時間経過を見ると、振幅の大きい脱分極性反応の後に時間経過の遅い脱分極性反応が生じることが分かる(図5 C 矢頭)。それぞれのシグナル源を調べるために、次の薬理学的実験を行なった。触角上の感覚ニューロンは触角葉内ニューロンと化学的シナプスを介し結合していることから、Ca²⁺ free 条件下で化学シナプスを遮断した状態で感覚ニューロンの反応のみを起こさせた。その結果、MN および LN の電気刺激で生じた時間経過の遅い成分は消失した(図6 A, 図7 A)。いずれの場合も最初に生じる振幅の大きい脱分極性反応の振幅および時間経過に変化は見られなかった。このことから最初に生じる振幅の大きい脱分極性反応は感覚ニューロン群の活動であり、時間経過の遅い脱分極性反応は触角葉ニューロン群の反応であることが分かる。次に正常生理塩類溶液下で生じた光学反応から Ca²⁺ free 条件下で生じた光学反応を差し引くことにより、大糸球体内の後シナプス反応を分離し、前述した大糸球体の5つの領域での後シナプス反応の分布を調べた。その結果、MN 刺激によって生じた後シナプス反応は大糸球体全体で見られ、その最大振幅を比較すると medial toroid と central toroid の後シナプス反応が lateral toroid の後シナプス反応よりも有意に大きく、medial cumulus の後シナプス反応が lateral cumulus の後シナプス反応よりも有意に大きいことが分かった。一方、LN を電気刺激した場合、lateral toroid および lateral cumulus でのみ後シナプス反応がみられた。このように大糸球体内の後シナプス反応は、MN では medial 側に、LN では lateral 側に片寄っていることがわかった。また、LN の電気刺激では MN の電気刺激に比べ、その反応がより局所的であることがわかった。LN 刺激による大糸球体の反応が局所的である理由については、MN から大糸球体への投射領域が後層では全体に分布しているのに対し、LN からの投射領域は表層から後層に渡って lateral 側に片寄っているためと考えられる。

ピキュキュリンによって分離された GABA 作動性抑制性反応

タバコスズメガ²⁹⁾、ワモンゴキブリ *Periplaneta americana*¹²⁾ で、GABA が触角葉における抑制性介在ニューロンの主要な伝達物質であることが示唆されてきた。カイコガにおいても1997年横川と神崎⁹⁷⁾ が免疫組織学的にその存在を最初に示した。先に示した光学計測で分離した後シナプス反応には、GABA による抑制性効果が含まれている。そこで GABA の拮抗物質であるピキュキュリン存在下で光学反応に対する効果を調べた。MN または LN を電気刺激した時、ピキュキュリンは感覚ニューロン群の光学反応(first peak)の振幅および時間経過には効果を及ぼさないが、その後に生じる時間経過の遅い応答の振幅を増加させた(図6 B, 図7 B)。

次に正常生理塩類溶液下で生じた光学反応からピキュキュリン存在下で生じた光学反応を差し引くことにより、大糸球体内の GABA 作動性抑制性反応を分離し、その分布を調べた。その結果、大糸球体内のいずれの領域間でも GABA 作動性抑制性反応の最大振幅に有意な差は見られなかった。これは、大糸球体内の計測を行なったいずれの領域においても GABA 作動性抑制性反応が同等に引き起こされていることを示す。複数の昆虫種で電気生理学的に同定された触角葉内介在ニューロンの多くは、触角葉の広い範囲に分枝を伸ばし、複数の糸球体にニューロピルを形成する。カイコガにおいても最近、関と神崎による微分干涉顕微鏡を用いた細胞内染色法により、100個以上の局所介在ニューロンの形態学的同定が行なわれた。その結果、局所介在ニューロンは、その分枝様式によって8つのタイプに分類できるが、その多くはすべての糸球体に均一に分枝することが示された。今回ピキュキュリンで分離できた光学反応は、この GABA 作動性抑制性ニューロンによって引き起こされた反応であることが推定できる。

またピキュキュリン投与によって分離された GABA 作動性抑制性反応と Ca²⁺ free 下で分離された後シナプス反応の時間経過を比較すると、大糸球体のすべての領域において GABA 作動性抑制性反応が先行して生じることが分かった。この GABA 作動性抑制性応答の起源は2つの可能性が考えられる。第一の可能性は大糸球体投射ニューロンでフェロモン刺激で最初に見られる I₁ を生じる抑制性局所介在ニューロンである(図2)。今まで雄カイコガの大糸球体投射ニューロンのフェロモンコンポーネント刺激に対する応答パターンは、脱分極を伴う群放電(E)とそれに続く過分極性電位(I₂)であり²⁹⁾、タバコスズメガの大糸球体投射ニューロンに見られる I₁ (図2)はカイコガでは生じないと考えられてきた。しかし、この結果はカイコガでも I₁ が大糸球体のすべての領域で生じる可能性を示すものである。第2の可能性は脱抑制経路の抑制性局所介在ニューロンである(図2)。このニューロンはフェロモン刺激で抑制性反応を起こすことが考えられている。しかしこの経路が GABA 作動性の経路であるか否かは不明である。今回の光学計測で分離した GABA 作動性抑制性反応が上記2つのいずれの起源で生じるのかについては、さらに研究が必要である。

薬理学的に分離した興奮性後シナプス反応の大糸球体内分布

Ca²⁺ free 条件下で分離した後シナプス反応からピキュキュリン存在下で分離した GABA 作動性抑制性反応を差し引くことにより、触角葉内の興奮性後シナプス反応を分離した。まず2つの大糸球体のコンパートメント(toroid と cumulus)における興奮性後シナプス反応の局在性の有無を調べた。MN の電気刺激により生じた medial toroid と central toroid の興奮性後シナプス反応がそれぞれ lateral toroid より有意に大きいこと、そして medial cumulus の興奮性後シナプス反応が lateral cumulus より有意に大きいことが分かった。また LN の電気刺激によって生じた lateral toroid の興奮性後シナプス反応が central toroid より有意に大きいことが分かった。これらの結果は MN および LN からのそれぞれの情報は、medial 側、または lateral 側に片寄って入力し、それぞれの領域で介在ニューロンによる処理を受けることを示す。

図6 MNの電気刺激により生じた触角葉の光学反応に対する Ca^{2+} free および 10^{-4} M ビキュキュリンの効果 toroid (mT, cT, lT) と cumulus (mC, lC) のそれぞれの領域で計測, 比較をした。スケールは $100\mu\text{m}$ 。A, Ca^{2+} free 条件下で分離された後シナプス応答(灰色線)。正常生理塩類溶液下での反応(黒実線)から Ca^{2+} free 条件下での反応(破線)を差し引くことにより, 後シナプス応答(灰色線)を分離した。興奮性後シナプス反応(薄い灰色線)は後シナプス反応(Aの灰色線)から GABA 作動性抑制性反応(Bの灰色線)を差し引くことにより算出した。mT, cT および mC における興奮性後シナプス反応の最大振幅は他の領域よりも有意に大きい。B, ビキュキュリン下で後シナプス反応の振幅が上昇する(矢尻)。正常生理塩類溶液下での反応(黒実線)からビキュキュリン下での反応(破線)を差し引くことにより, GABA 作動性抑制性反応(灰色線)を分離した。GABA 作動性抑制性反応の最大振幅はいずれの領域においても有意な差はない(二重矢尻)。

図7 LNの電気刺激により生じた触角葉の光学反応に対する Ca^{2+} free および 10^{-4} M ビキュキュリンの効果 A, lT と lC における興奮性後シナプス反応(薄い灰色線)の最大振幅は他の領域よりも有意に大きい。B, ビキュキュリン下で消失する光学シグナルは(二重矢尻), mT を除くすべての大糸球体領域においてみられた。GABA 作動性抑制性反応の最大振幅はいずれの領域においても有意な差はない(二重矢尻)。

大糸球体のトポジカルな情報の局所的処理

以上の結果は, 触角の medial flagella および lateral flagella に由来する感覚ニューロンのトポジカルな情報を, 大糸球体の medial region と lateral region で処理していることを示す。大糸球体から上位の中枢(前大脳)に情報を伝達する投射ニューロンについては, toroid-PN が

toroid の局所的領域に樹状突起を形成することがわかっている²⁹⁾。toroid に投射する嗅受容ニューロンは toroid の局所的領域に終末を形成していることから, ある嗅受容ニューロンは特定の toroid-PN と toroid の局所的な領域でシナプス連絡している可能性が考えられる²⁹⁾。一方, cumulus-PN は cumulus 内ではほぼ同様の密度で分布して

いる。したがって cumulus-PN は MN または LN 両方の感覚ニューロン群から入力を受け取っている可能性がある。このように、toroid と cumulus において、投射ニューロンレベルでのトポロジカルな情報処理機構の違いが推定される。今後は toroid-PN および cumulus-PN が、触角上の medial flagella および lateral flagella へのフェロモン刺激に対しどのように応答するかを詳細に調べていくことが必要である。

(2) セロトニン作動性ニューロンの触角葉ニューロンに対する調節効果

セロトニンは昆虫の触角葉における嗅覚情報のコード化の過程で重要な役割を果たしており、左右両方の触角葉に分枝を伸ばすセロトニン免疫陽性細胞が多くの昆虫で同定されている。タバコスズメガにおいてセロトニンは、触角への嗅覚および電気刺激による触角葉介在ニューロンの反応の大きさを増大させることが分かっている³¹⁾。またタバコスズメガとワモンゴキブリにおける光学顕微鏡および電子顕微鏡による研究により、それらのセロトニン免疫陽性ニューロンが触角葉において出力シナプスをもち、前大脳から触角葉へのフィードバック系に関係することが提示されている^{46, 49)}。しかし、これらのセロトニン免疫陽性ニューロンの生理学的研究はなかった。

Hill と神崎²⁶⁾ は雄カイコガ触角葉のセロトニン免疫陽性ニューロンから細胞内記録を試み、その形態学的及び生理学的特徴を調べた。細胞内にルシファーイエローを電気泳動的に注入しその形態を調べたところ、このニューロンは触角葉の側方細胞体群の近傍に細胞体をもち、細胞体のある触角葉の対側の大糸球体のすべてのコンパートメント cumulus, toroid, horseshoe およびすべての常糸球体に分枝を伸ばしていた。また同側の触角葉において少数の分枝をもつ(図8)。その他、前大脳の両側キノコ体、中心体、同側側副葉(lateral accessory lobe, LAL)、さらに両側の前大脳前葉(superior protocerebrum)に分枝を伸ばす。さらに Lucifer yellow で細胞内染色した標本に対してセロトニン免疫抗体による二重染色を行ない、このニューロンがセロトニン免疫陽性であることを示した。共焦点レーザー顕微鏡による精査の結果、このニューロンは同側の触角葉、前大脳前葉、キノコ体傘部、中心体を入力領域とし、対側の触角葉、側副葉を出力領域とするセロトニン作動性フィードバックニューロンである可能性が示唆された。また細胞内記録によりこのニューロンは活動電位の幅が広い自発活動性をもち、触角への機械的刺激に対して興奮応答を示した。前述したようにタバコスズメガでセロトニンは、触角葉介在ニューロンの反応の大きさを増大させることが分かっていることから、セロトニン作動性フィードバックニューロンは触角への機械的刺激により嗅覚情報処理中枢(触角葉、側副葉)におけるセロトニンレベルを増大させ、それらの領域に分枝する介在ニューロンの感受性の増大を引き起こす役割を持っていることが示唆される。実際、カイコガへのセロトニンの脳内注入によりフェロモンに対する応答閾値が有意に下がること、さらにセロトニン受容体拮抗物質の投与により応答閾値が上がることから、セロトニンが匂いによって発現する行動の感受性を増大させる効果があることが示されている。

Hill と神崎²⁷⁾ はさらに触角葉におけるセロトニンのそ

図8 セロトニン作動性フィードバックニューロンの形態 スケールは100 μ m。(Evan et al., 2002より引用)

れぞれの領域における効果を調べるために、光学計測法を用いた。その結果、触角神経への電気刺激によって生じる大糸球体および常糸球体の脱分極性反応の振幅の顕著な増大と脱分極反応時間の延長効果が確認された(図9)²⁷⁾。また大糸球体の toroid におけるその効果が、cumulus におけるそれよりも有意に大きいことを明らかにした。このように大糸球体内のセロトニンの効果が領域によって異なる原因は、それぞれの領域におけるセロトニン受容体の分布および密度が異なることによると考えられる。

カイコガの場合、ボンビコール単体で匂い源探索行動が誘発するが、ボンビコールのみでは反応がおこらない。カイコガ性フェロモンの主要コンポーネントであるボンビコールの一次中枢である toroid が、サブコンポーネントであるボンビコールの一次中枢である cumulus に比べてセロトニンの増大効果が大きいことは、行動発現の上興味深い。

また、常糸球体においても領域によってその効果が異なることもわかった。常糸球体で処理される一般臭は食料源や産卵宿主を探索する行動において重要な役割を果たす。この常糸球体においてもセロトニンによる活動の増大効果が見られたことは、セロトニンが性フェロモンのみならず一般臭に対する感受性を増大させる効果があることを示す。

(3) 匂い刺激で生じた振動電位の触角葉における空間分布
様々な動物の嗅覚情報系において振動電位が生じることが証明され、それらが匂い特有のニューラルアセンブリの同期した活動に起因していることが示唆されている^{17, 34)}。昆虫ではサバクバッタ、ワモンゴキブリ、ミツバチのキノコ体において触角への匂い刺激によって振動電位が記録され⁴⁹⁾、特にサバクバッタにおいてはその振動電位が触角葉内の局所介在ニューロンと投射ニューロン間の局所回路によって生じた、複数の投射ニューロンの同期発火に起因していることが推定されている³⁶⁾。また最近、岡田と神崎は

A

B 触角神経における光学反応

C 大系球体における光学反応

図9 セロトニンを投与することにより、触角神経への電気刺激によって生じる大系球体および常系球体の脱分極性反応の振幅の顕著な増大と脱分極応答時間の延長効果が確認された (Evan et al., 2003 より引用)。

マルハナバチ *Bombus terrestris* の嗅覚一次中枢である触角葉において匂い刺激によって生じる振動電位を記録し、その空間分布を膜電位イメージングにより計測することに成功している。そして、糸球体が振動電位生成の単位になっていることを示した⁴²⁾。しかし、様々な匂いがこれら糸球体でどのような処理を経て識別されているのか、また振動電位がこの識別機構にいかに関わっているのかについては不明のままである。

またブレリミナリーではあるが、藍ら⁴⁾は雄ワモンゴキブリ触角葉において異なる匂い情報が時空間的にどのように表現されているかを、膜電位感受性色素を用いた光学

計測法により調べた。触角の嗅受容ニューロンは、応答する匂いの種類によって8グループに分類されている¹³⁾。これらのグループの指標となる匂い物質に対する触角葉の応答パターンを光学計測した結果、少なくとも6種類の匂い刺激によって異なる組み合わせの領域で同期的電位変化が生じることが分かった。さらに共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて触角葉内で同期的電位変化がどの糸球体由来しているのかを推定した。その結果、同期的電位変化が6種類の匂い物質での刺激によってそれぞれ異なる組み合わせの糸球体で生じることが確認された。このように、電位振動と匂い識別がなんらかの関係のあることが示唆されてきており、今後、膜電位感受性色素を用いた匂い応答の時空間分析により、より詳細な識別機構が明らかになってくるだろう。

6. まとめ

昆虫は地球上の広範な領域で最も適応した動物群であり、その進化の過程で嗅覚情報を利用し、個体間でのコミュニケーションを行ってきた。我々は昆虫の匂い識別の脳内機構を様々なレベルで多角的に研究し、その中で光学計測法を神経回路の動態を調べる有用なツールとして発展させてきた。また脊椎動物の脳を理解する上でのモデル動物としてより単純な脳をもつ昆虫が注目されるようになってきた。今後脳内の高次機能を解明するための研究がさらに進んで行くであろう21世紀に、昆虫の脳研究およびその有効なツールとしての光学計測法はその根本的な問題を解決する糸口を提供してくれることは間違いないであろう。

文 献

- 1) Ai, H. and Inouchi, J.: Neurosci. Lett. 216, 77-80 (1996)
- 2) Ai, H. and Kanzaki, R.: J. Exp. Biol. (in press)
- 3) Ai, H., Okada, K., Hill, E.S. and Kanzaki, R.: Neurosci. Lett. 258, 135-138 (1998)
- 4) 藍, 西川, 伊東, 横張: 日本味と匂学会誌 9, 341-344 (2002)
- 5) Almaas, T.J., Mustaparta, H.: J. Chem. Ecol. 16, 1331-1347 (1990).
- 6) Anton, S. and Homberg, U.: In Insect olfaction. Hansson, B. S. ed. 98-125 (1999).
- 7) Berg, B., Tumlinson, J.H., Mustaparta, H.: J. Comp. Physiol. A 177, 527-534 (1995)
- 8) Christensen, T.A. and Pawlowski, V.M., Lei, H. and Hildebrand, J.G.: Nature Neurosci. 3, 927-931 (2000)
- 9) Christensen, T.A., Waldrop, B.R. and Hildebrand, J.G.: J. Neurosci. 18(15), 5999-6008 (1998)
- 10) Christensen, T.A., Waldrop, B.R., Harrow, I.D. and Hildebrand, J.G.: J. Comp. Physiol. 173, 385-399 (1993)
- 11) Clyne, P.J., Warr, C.G., Freeman, M.R., Lessing, D., Kim, J. and Carlson, J.R.: Neuron 22, 327-338 (1999)

- 12) Distler, P.: *Histochemistry* 93, 617-626 (1990)
- 13) Fujimura, K., Yokohari, F. and Tateda, H.: *Zool. Sci.* 8, 243-255 (1991)
- 14) Galizia, C. G., Joerges, J., Kuttner, A., Faber, T. and Menzel, R.: *J. Neurosci. Methods* 76, 61-69 (1997)
- 15) Gao, Q. and Chess, A.: *Genomics* 60, 31-39 (1999)
- 16) Gao, Q., Yuan, B. and Chess, A.: *Nat. Neurosci.* 3, 780-785 (2000)
- 17) Gelperin, A. and Tank, D.W.: *Nature* 345, 437-440 (1990)
- 18) Hamilton, K.A. and Kauer, J.S.: *J. Neurophysiol.* 62 609-625 (1989)
- 19) Hammer, M. and Menzel, R.: *J. Neurosci.* 15 (3), 1617-1630 (1995)
- 20) Hansson, B.S.: In *Insect Olfaction*. Hansson, B. S. (ed) Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1999)
- 21) Hansson, B.S., Almaas, T.J. and Anton, S.: *J. Comp. Physiol. A*, 177: 535-543, (1995)
- 22) Hansson, B.S. and Christensen, T.A.: In *Insect Olfaction*. Hansson, B.S. ed., Springer, Berlin, 125-161 (1999)
- 23) Hansson, B.S., Christensen, T.A. and Hildebrand, J.G.: *J. Comp. Neurol.* 312, 264-278 (1991)
- 24) Hansson, B.S., Ljungberg, H., Hallberg, E. and Lofstedt, C.: *Science* 256, 1313-1315 (1992)
- 25) Hildebrand, J.G.: *J. comp. Physiol. A* 178, 5-19 (1996)
- 26) Hill, E.S., Iwano, M., Gatellier, L. and Kanzaki, R.: *Chemical senses* 27, 475-483 (2002)
- 27) Hill, E.S., Okada, K. and Kanzaki, R.: *J. Exp. Biol.* 206, 345-352 (2003)
- 28) Homberg, U., Montague, R.A. and Hildebrand, J.G.: *Cell Tissue Res.* 254, 255-281 (1988)
- 29) Hoskins, S.G., Homberg, U., Kingan, T.G., Christensen, T.A. and Hildebrand, J.G.: *Cell Tissue Res.* 244, 243-252 (1986)
- 30) Kanzaki, R., Soo, K., Seki, Y. and Wada, S.: *Chem. Senses* 28: 113-130 (2003)
- 31) Kanzaki, R. and Shibuya, T.: *Zool. Sci.* 3, 409-418 (1986)
- 32) Kloppenborg, P., Ferns, D. and Mercer, A.R.: *J. Neurosci.* 19, 8172-8181 (1999)
- 33) Koontz, M.A. and Schneider, D.: *Cell Tissue Res.* 249, 39-50 (1987)
- 34) Laurent, G.: *TINS* 19, 489-496 (1996)
- 35) Lieke, E.E.: *European J. Neurosci.* 5, 49-55 (1992)
- 36) MacLeod, K. and Laurent, G.: *Science* 274, 976-979 (1996)
- 37) Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. and Buck, L.B.: *Cell* 96, 713-723 (1999)
- 38) Matsumoto, S. G. and Hildebrand, J.G.: *Proc. R. Soc. Lond. B*213, 249-277 (1981)
- 39) Maueishagen, J.: *J. Neurophysiol.* 69, 609-625 (1993)
- 40) Mombarets, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. and Axel, R.: *Cell* 87, 675-686 (1996)
- 41) Ochieng, S.A., Anderson, P. and Hansson, B.S.: *Tissue Cell* 27, 221-232 (1995)
- 42) Okada, K. and Kanzaki, R.: *Neurosci Lett* 316, 133-136 (2001)
- 43) Okada, K., Kanzaki, R. and Kawachi, K.: *Neurosci. Lett.* 209, 197-200 (1996)
- 44) Ressler, K.J., Sullivan, S.L. and Buck, L.B.: *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 588-596 (1994)
- 45) Saches, S., Rappert, A. and Galizia, C.G.: *European J. Neurosci.* 11, 3970-3982 (1999)
- 46) Saches, S. and Galizia, C.G.: *J. Neurophysiol.* 87, 1106-1117 (2002)
- 47) Salecker, I. and Distler, P.: *Histochemistry*, 94, 463-473 (1990)
- 48) Scott, K., Brady, R., Jr., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C. and Axel, R.: *Cell* 104, 661-673 (2001)
- 49) Stopfer, M., Wehr, M., Macleod, K. and Laurent, G.: In *Insect Olfaction*. Hansson, B. S. Ed. Springer 163-180 (1999)
- 50) Sun, X.J., Tolbert, L.P. and Hildebrand, J. G.: *J. Comp. Neurol.*, 338, 5-16 (1993)
- 51) Vassar, R., Ngai, J., and Axel, R.: *Cell* 74, 309-318 (1993)
- 52) Vickers, N.J., Christensen, T.A. and Hildebrand, J.G.: *J. Comp. Neurol.* 400, 35-56 (1998)
- 53) Vosshall, L.B., Amrein, H., Morozov, P.S., Rzhetsky, A. and Axel, R.: *Cell* 96, 725-736 (1999)
- 54) Vosshall, L.B., Wong, A.M. and Axel, R.: *Cell* 102, 147-159 (2000)
- 55) Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M. and Axel, R.: *Cell* 93, 47-60 (1998)
- 56) Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B. and Axel, R.: *Cell* 112, 271-282 (2003)
- 57) Yokokawa, T. and Kanzaki, R.: *Zool. Sci.* 14, 114 (1997)