



クオオオアリ触角錐状感覚子内嗅覚受容神経感覚突起の微細構造：特徴的なビーズ構造と推定機能

竹市, 裕介

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2020-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7446号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007446>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

クロオオアリ触角錐状感覚子内嗅覚受容神経感覚突起の
微細構造：特徴的なビーズ構造と推定機能

平成 31 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

竹市 裕介

目次

要 旨	-----	2
第一章		
序論	-----	4
材料と方法	-----	9
第二章		
結果	-----	17
第三章		
考察	-----	35
謝 辞	-----	52
引用文献	-----	53
補足図	-----	64

要 旨

真社会性昆虫であるアリは自分と同じコロニーの個体に対しては栄養交換をするなどの寛容な振る舞いを見せる一方で、同種であっても他コロニーの個体に対しては威嚇や攻撃をするというように明らかに異なる行動を示す。このような行動の切り替えは相手が巣仲間かどうかを識別する巣仲間-非巣仲間識別能力によるものである。多くのアリ種では、同じコロニーに所属するワーカーは、種特有の炭化水素成分を同様な組み合わせと比率で混合し体表に纏い、巣仲間-非巣仲間の識別のためのフェロモンとして使っている。この体表炭化水素 (CHCs) においてはコロニーごとに異なっており、それらは、触角上に存在する嗅覚感覚子の一種である錐状感覚子によって感知される。この感覚子の機能を担う微細形態学的な構造基盤を調べるために、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM)、透過型電子顕微鏡および超高压電子顕微鏡を用い、クロオオアリ錐状感覚子を詳細に観察した。SBF-SEM による観察から得られた 352 枚の連続横断面画像をもとに錐状感覚子内部の 3 次元モデルを構築した。その結果、錐状感覚子の内部には 100 本以上の枝分かれの無い嗅覚受容神経の感覚突起が緩くより合わされた束となって格納されていることが明らかとなった。感覚子の基部にあたる場所では、それぞれの受容神経の感覚突起の内部に結合繊毛がみられた。連続断面画像を細かく観察すると、小さな感覚突起の断面積が急激に大きくなり、また小さな断面積に戻る部分が多く存在していた。3 次元モデルを構築してみると、このような部分は、細い感覚突起に沿ってところどころにみられるこぶのように膨らんだ特徴的なビーズ構造に相当していた。ビーズの玉の部分では、隣り合った感覚突起の細胞膜どうしが相互に入り組んで近接しており、ギャップ結合を介した電気シナプスの存在が予見された。ギャップ

結合の存在を調査するために、無脊椎動物におけるギャップ結合構成タンパク質として知られているイネキシンに対する特異的な抗血清を作成した。クロオオアリの触角には 5 種類のイネキシンサブタイプが発現していることがわかったが、その一つ、CjapInx3 の抗体標識シグナルが錐状感覚子の内部にドット状に検出されることが、免疫組織化学実験から明らかとなった。また、連続横断面画像をもとに作り上げた 3 次元モデルと免疫組織化学実験から得られた画像を重ね合わせることによって、感覚突起に沿ったビーズ構造の部分における細胞膜密着領域の分布と CjapInx3 の局在を示す蛍光輝度分布がよく一致することが分かった。これらの微細形態学的実験結果は、この感覚子内部における嗅覚受容神経は、それぞれ独立平行に感覚突起を伸ばしているのではなく、ビーズ構造部分で相互に連絡しあい、感覚突起間のギャップ結合を介して電氣的なネットワークを形作っていることを示唆していた。この錐状感覚子がコロニー特異的な自他の CHCs の混合パターンや他種のおいを検出した際には、本研究で明らかになった感覚子内神経ネットワークによるおい情報のふるい分け、ないし改変を経て中枢へと運ばれる情報が調節され、巣仲間に対しては寛容な、しかし、非巣仲間や他種に対しては攻撃的な、明確な働きアリの行動の切り替えが引き起こされている可能性が考えられた。

第一章

序 論

生物を取り巻く自然環境は化学情報で満たされており、特に社会性動物においては、巣ごとのコロニー集団で利用する食資源の確保や、カースト間の相互認識、コロニー内外の巣仲間・非巣仲間間の識別などを行うために様々な化学情報を利用することが知られている。このため、社会性動物においては、その独特な集団生活に適応した化学感覚機能が発達している。多くの昆虫は「感覚子」と呼ばれる毛状、盤状、壺状、錐状など特徴的な形状のクチクラ装置を伴う感覚器官を持ち、それらには感覚モダリティーごとにいくつかの種類がある (Steinbrecht, 2007; Nakanishi et al., 2009)。嗅覚に関与する感覚子には、一般的なにおいの感知に関与するもののみならず、フェロモンの感知に特化しているものがある (Hallberg and Hansson, 1999; Steinbrecht, 1999; Hansson and Stensmyr, 2011; de Fouchier et al., 2017)。多くの嗅覚感覚子は、それぞれ複数の受容神経を格納しており、特異的な生物学的用途に対応する感覚器ユニットとして働く。例えば、多くの昆虫は、異性を誘引する手段として性フェロモンを用いるが、性フェロモンのにおいを受容するには、フェロモンのにおいを構成する成分に応じる複数の受容神経を格納した感覚子が、一つの感覚ユニットとして働いていることが知られている (Kaissling, 1987; Haupt et al., 2010)。

社会性昆虫は、様々なフェロモンを用いる洗練された化学コミュニケーション能力を発達させてきた (Hölldobler, 1995; Vander Meer, 1998; Ozaki et al., 2005; Mizunami et al., 2010; Nick and d' Ettore, 2012; Ozaki and Hefetz,

2014; Sharma et al., 2015; Leonhardt et al., 2016)。アリのコロニーにおいては、働きアリは、同巢の仲間を許容し同種異巢や異種の働きア리를排撃するために、まず、触角探査と呼ばれる、触角で相手に触れる行動をとって巢仲間かそれ以外かを認識する。多くのアリ種では、働きアリはコロニー特異的な体表炭化水素 (CHCs) の混合物を巢仲間認識のための社会性フェロモンとして使用している (Vander Meer, 1998; Lahav et al., 1999; Ozaki et al., 2005; Brandstaetter et al., 2008; Guerrieri and d' Ettore, 2008; Guerrieri et al., 2009; Nick and d' Ettore, 2012; Ozaki and Hefetz, 2014)。働きアリは、種特異的な炭化水素成分を使ってコロニーごとに異なる比率で混合したものをクチクラ表面に分泌して体表にまとっている (Ozaki et al., 2005)。即ち、働きアリが使っている CHCs 構成成分は種間で異なり、種内で同じである (Ozaki et al., 2005)。しかし、同一種であってもコロニーが違えば、同じ構成成分をコロニーごとに異なる混合比で調合した CHCs を持つことになる (Ozaki et al., 2005)。一般的に、においては、それを構成する化学成分の種類だけでなく混合比に依存して異なる嗅覚を誘起するため、働きアリは、巢仲間どうしでは同じにおいを共有し、その他の相手に対しては、自分や巢仲間とは異なるにおいを感じていることになる (Ozaki et al., 2005)。

クロオオアリ (*Camponotus japonicus*) は、18 種類の種特異的な CHC 成分の混合物を様々な比率で混ぜ合わせたにおいをコロニー特異的なにおいとして持ち、これを巢仲間かどうかの識別に用いている (Ozaki et al., 2005)。Ozaki ら (2005) は、アリの巢仲間と非巢仲間の識別を司る化学感覚システムを、クロオオアリを使って探索し、触角上に存在する錐状感覚子が CHC 感覚子として機能することを最初に証明した。最近、この錐状感覚子が雌 (働きアリおよび女王アリ) の触角に特異的に存在することが確認された (Nakanishi et al., 2009)。

クロオオアリの錐状感覚子の中には、100 本以上の嗅覚受容神経の感覚突起が伸びている (Ozaki et al., 2005)。嗅覚受容膜として働く嗅覚受容神経から伸びてきた感覚突起の細胞膜部分は、常に感覚子内部を満たす感覚子リンパに囲まれ、感覚子リンパには、化学感覚タンパク質 (Chemosensory protein, CSP) と呼ばれる水溶性タンパク質が多量に含まれていることが分かっている (Ozaki et al., 2005; Hojo et al., 2014)。CSP は、外側は親水性のアミノ基でできているが、内側に疎水性のポケットをもち、疎水性の CHC は CSP の内側のポケット部分に結合して、感覚子リンパの親水環境の中を、受容神経感覚突起の嗅覚受容膜まで運ばれると考えられている (Ozaki et al., 2005; Hojo et al., 2015)。

アリの巣仲間-非巣仲間識別フェロモンである CHCs に対する電気生理学実験は、疎水性物質運搬タンパク質として機能する上述の CSP を大腸菌を用いて大量発現させ、その CSP と CHC を一緒に電解液に拡散させた刺激液を記録電極に詰めて、クロオオアリの錐状感覚子を用いた感覚子先端に接触させることで、インパルス記録に最初に成功した (Ozaki et al., 2005)。巣仲間の CHCs に応答する錐状感覚子の数は、非巣仲間の CHCs に応答する錐状感覚子の数よりも有意に少なく、他のアリ種でも同様の結果が見られた (Kidokoro-Kobayashi et al., 2012)。この差については、錐状感覚子内の受容神経の一部は、自己の CHCs に対して常時順応している状況にあるために、自分と同じにおいをもつ巣仲間の CHCs 刺激に対して脱感作され応答しにくくなっているのに対し、非巣仲間のおいに対しては順応していないために、応答しやすいのであろうと考察されている。一方で、その後、例えば *Camponotus floridanus* の錐状感覚子を、CHCs を加熱しその蒸気によって刺激すると、同一感覚子が、非巣仲間の CHCs だけでなく巣仲間の CHCs にも反応したという報告がなされ (Sharma et al., 2015)、その筆者らは、*C. floridanus* の触角上の錐状感覚子には形態学的には区別がで

きないが機能的に異なるサブタイプが存在し、また、一般的にアリの錐状感覚子は、巢仲間－非巢仲間の識別だけでなく、炭化水素や一般的なにおいを感知するためサブタイプに分類可能な多機能嗅覚器官であるという意見を述べている (Kropf et al., 2014; Couto et al., 2017)。

このように、アリの巢仲間識別に関与する錐状感覚子について、ここ数年、その機能特性と感覚機構が盛んに研究されるようになってきたが、内部に 100 本以上の多数の嗅覚受容神経を有し、それら一つ一つが特定の嗅覚受容体 (OR) 遺伝子を発現するという複雑さのために、まだ完全には理解されていない。このような複雑なつくりを有するセンサーユニットとしての錐状感覚子においては、内在する受容神経が単ににおい情報を受容し高次の神経に伝達する並列ケーブルとして機能的に独立して存在するのではなく、受容神経どうしの相互作用によって、情報をふるい分けて選択したり改変したりするシステムが内包されているのではないかと推測した。つまり、同一感覚子内の受容神経は機能的に連絡し互いに影響を及ぼしている可能性が考えられ、さらに、そういう可能性があるのであれば、それが感覚子内の感覚突起の存在様式における微細構造にも反映されるだろうと思われた。

細胞間接着には、それぞれ役割が異なる、密着結合、接着結合、デスモソーム、ギャップ結合の 4 種類が知られている (Alberts. et al., 1994)。密着結合は細胞どうしを膜タンパク質で結合し細胞間の隙間から水溶性分子を漏らさないようにする役割を持つ。接着結合とデスモソームはどちらも細胞外に接着部を持つ膜貫通タンパク質を中心に形成され、それらが細胞内の強固な細胞骨格繊維 (接着結合はアクチンフィラメント、デスモソームは中間径フィラメント) と連結することで機械的な強度を上げている。ギャップ結合は近接する 2 つの細胞の細胞膜に多数存在するタンパク質複合体の末端どうしがつながり細胞膜間を連絡

するチャンネルを形成する。このチャンネルを通して無機イオンや水溶性の小分子が細胞質間を移動することができる。神経細胞どうしの連絡におけるギャップ結合は電気シナプスを形成する。脊椎動物におけるギャップ結合では、コネクソンと呼ばれる膜貫通型のタンパク質サブユニット 6 個がイオンの通過できる孔を取り囲むように会合して形成するコネクソンと呼ばれるヘミチャンネルタンパク質どうしが隣り合う細胞膜から頭を突き合わせるような形で会合してイオンチャンネルを形成し、そのようなイオンチャンネルが多数集まるパッチ状の領域で膜どうしが隣接し細胞間の連絡を可能にしている (Kumar and Gilula, 1986; Paul, 1986)。無脊椎動物におけるギャップ結合においては、イネキシンが 8 量体のヘミチャンネルを形成しコネクソンに代わって同様な働きを担っていることが明らかになっている (Phelan et al., 1998; Fushiki et al., (2010a, b))

本論文では、錐状感覚子内の嗅覚受容神経の感覚突起を立体的に可視化し、感覚突起上に新たに見出だされた部分的なふくらみのある構造 (ビーズ構造) に注目して、その数と局在について詳細に記述した。ビーズ構造の部分では、周辺を受容神経の感覚突起の細胞膜が近接してみえるので、嗅覚受容神経間の機能的連結のためのプラットフォームとしての役割を担っているのではないかと考え、さらに、嗅覚受容神経間の機能的連結の分子基盤を、電気シナプス機能を担うギャップ結合に求め、その構成タンパク質であるイネキシンの局在を調べようと考えた。しかし、このように小さい錐状感覚子において詳細な電気生理学的実験を行い、その応答記録から電気シナプスを介した機能的修飾を証明するための適切な実験結果を得ることは困難である。そこで、感覚子内のビーズ構造と他の細胞膜との密着が見られた場所や頻度などから嗅覚受容神経間の機能的接続を予想して、共同研究者とともにそれらの微細構造学的データを共有し、数学的な回路モデルを解くことによって、機能的修飾に関する考察を加えることにした。

材料と方法

アリ

クロオオアリの働きアリは神戸大学六甲台構内のいくつかの巣穴の周りで採集した。それぞれのコロニーから採集した働きアリは、赤い透明のシートを被せた小さな巣箱 ($5 \times 7.5 \times 1.8 \text{ cm}^3$) を設置したプラスチックケース ($23 \times 16 \times 8 \text{ cm}^3$) に移し、実験に使用するまでの数日あるいは数週間、神戸大学の研究室内 (室温) で飼育した。アリには餌として人工飼料 (Dussutour and Simpson, 2008) と水を自由に得られるようにした。また、女王アリと数百頭の働きアリを含む一つの巣全体を掘り起こして入手し、それを川崎医科大学で飼育した。川崎医科大学では、 $5 \times 7.5 \times 1.8 \text{ cm}^3$ の複数のプラスチックケースを、内径 8 mm のチューブで連結して人口巣に見立て、その中で巣取りしたアリを飼育した。アリには希釈したメープルシロップとミールワーム、水を与えた。川崎医科大学で行った電子顕微鏡実験用の試料作製にはこの働きアリを使用し、その他の実験には、神戸大学で飼育したアリを用いた。

電子顕微鏡の試料作成

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) の実験手順は Deerinck et al. (SBEM Protocol v7_01_2010; <https://ncmir.ucsd.edu/sbem-protocol>) を参考に行った。クロオオアリの働きアリを氷上で 10 分間麻酔し、触角を頭部から切り離し剃刀の刃で約 1 mm に切断した。2 mM CaCl_2 含有 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) を用いて 2.5% グルタルアルデヒド、2% パラホルムアルデヒド溶液を調製し、触角試料を 4°C で 18 時間前固定した。2 mM CaCl_2 含有 0.1 M カコジル酸緩衝液で洗った後、1.5% フェロシアン化カリウム含有 0.1 M カコジル

酸緩衝液 (pH7.4) で調製した 2%四酸化オスミウム中に移し 4°C で 2 時間後固定した。次いで、蒸留水で洗浄し、ミリポア濾過したチオカルボヒドラジド (TCH) 溶液中に移し 20 分間置いた。その後蒸留水で調製した 2%四酸化オスミウムで室温にて 1 時間固定した。蒸留水で再洗浄し、1%水溶性ウラニル酸溶液に移し 4°C で 18 時間保存した。蒸留水で洗浄した後、60°C のオーブン内で予め保温しておいたアスパラギン酸鉛溶液に移し、再びオーブンに戻し 30 分保温した。蒸留水で洗浄した後、エタノールシリーズ (50%、70%、90%、100%、100%) にそれぞれ 15 分ずつ浸して脱水した。次いで、プロピレンオキシド中に室温で 20 分浸した。その後プロピレンオキシドとエポキシ樹脂 (49.6% LUVEAK812; 21.8% DDSA; 26.7% MNA; 2.0% DMP30, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 1 : 1 混合液に移し、試料を入れたチューブをドラフト内の回転振盪器に固定して、室温で一晩浸透させた。翌日、100%エポキシ樹脂に試料を移動し、再びドラフト内の回転振盪器に固定して、ゆっくりと回転させながら室温で 3 時間浸透させた。以上の操作は、1.5 ml エッペンドルフチューブを用いて行った。その後、新しい 100%エポキシ樹脂を用いてビームカプセル中試料を包埋し、60°C で 48 時間重合させた。試料ブロックをビームカプセルから取り出し、単一の錐状感覚子が観察できる状態にトリミングし、SBF-SEM、透過型電子顕微鏡 (TEM) および超高压電子顕微鏡 (UHV-EM) にて観察した。

錐状感覚子のクチクラ装置は特徴的な形状をしているので、実体顕微鏡 (SZX9 Olympus) 下で観察してこの感覚子を見つけることは難しくない。錐状感覚子の内部には 100 を超える嗅覚受容神経が格納されていることが知られており、触角上に存在する感覚子にはこれほど多くの嗅覚受容神経をもつものは存在しないため (Nakanishi et al., 2009)、電子顕微鏡標本として選択したすべての感覚子は、内部の嗅覚受容神経の数を数えることによって錐状感覚子であ

ることを確認することができた。

しかしながら、クロオオアリにおいては、触角上の錐状感覚子にサブタイプが存在するのかどうか、サブタイプ間に形態的または機能的な違いがあるかどうかは明らかになっていない。したがって、ここでは錐状感覚子にサブタイプが存在することは想定せず、観察する標本の選別は特に行わなかった。

SBF-SEM 観察と 3D モデル構築

SBF-SEM Gatan 3view (Gatan, Inc., CA, USA)-Zeiss SIGMA/VP & MARLIN (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) を用いて、1.2 kV の加速電圧で単一錐状感覚子の連続横断面画像を得た。得られた連続画像を目視でアラインメントし、画像処理用ソフト、Amira (Indeed Visual Concepts GmbH, Berlin, Germany; TGS Inc.) に読み込ませた。各横断面画像上に現れた感覚突起の領域の境界を手作業で枠取りし、前後の関係から同一の感覚突起はすべて同じ色で枠取りを行った。最終的に、表面レンダリング法を使い、感覚子内の感覚突起の束について 3次元モデルを構築した。

TEM および UHV-EM 観察

JEM-1400 (加速電圧 80 kV、JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いた TEM 観察のために、ウルトラマイクロトーム用いて、サンプルブロックの超薄切片 (70 nm 厚) を作成した。また H-3000 (加速電圧 2,000 kV、Hitachi Co., Tokyo, Japan) を用いた UHV-EM 観察のため、厚さ 2 μm の切片を作成した。

UHV-EM による観察においては、厚さ 2 μm の切片をフォルムバル被覆グリッドに載せ、70%メタノールで調製した 3%酢酸ウランに浸漬し、電子レンジ

で 30 秒間加熱した。その後室温に 10 分間置き、蒸留水で洗浄した。次いで SATO 鉛染色溶液に浸し、電子レンジで 30 秒間加熱した。その後室温に 10 分間置き、蒸留水で洗った。これらの切片をフォルムバル膜を用いて被覆し、両側に蒸発した炭素をコーティングし、続いて 20 nm の金粒子をスタッディングした。角度を変えて撮影をするたびに個々の画像どうしずれが生じてしまわないように、単一軸を中心に 2°間隔で -60°~+ 54°まで角度を動かし 20,000 倍で画像を撮影し、486BK CCD カメラ (Hitachi Co., Tokyo, Japan) を使用して、ピクセルサイズ 0.85 nm で 4096×4096 ピクセルの解像度画像を取得した。傾斜画像の各セットは、金粒子を基準マーカーとして用いてアラインメントし、同時反復再構成技術 (SIRT) (Gilbert, 1972) を用いて感覚子の観察部分を厚みのある画像データとして再構築した。すべての断層像を IMOD ソフトウェア (Kremer et al., 1996) を用いて解析した。3D 表面モデルは、IMOD の画像編集項目である「3DMOD」を使用して膜構造をトレースすることによって描いた。

クロオオアリエネキシファミリー検索

クロオオアリ触角に発現する mRNA ライブラリーをもとに、BLASTp を使って、 1×10^{-15} の e-value 以上を切り捨てたショウジョウバエイネキシタンパク質配列を参照して、クロオオアリのイネキシ候補のタンパク質コーディング領域を調べた (Hojo et al., 2015)。また、イネキシスーパーファミリー (pf00876) を検索情報として用いて隠れマルコフモデル検索を行い、クロオオアリのイネキシ候補のタンパク質の配列を絞り込んだ。

クロオオアリエネキシ 3 (CjapInx3) に対する触角タンパ

ク質のウェスタンブロット

氷上麻酔した 230 匹のクロオオアリの働きアリから触角鞭節を切り離し、液体窒素中で凍らせた。凍らせた触角を液体窒素で冷やした乳鉢に入れ 30 分間摩砕した後に 460 μ l の SDS-PAGE 用サンプルバッファー (62.5mM Tris \cdot HCl, pH6.8、5% 2-メルカプトエタノール、10%グリセリン、2% SDS) で可溶化した。可溶化は室温で 30 分間行った。クロオオアリ触角に発現している 5 種類のイネキシンサブタイプの特異的アミノ酸配列を選定し、それぞれのペプチドにキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させた複合体を抗原としてウサギ 1 羽ずつに注射し抗血清を作成した。錐状感覚子の超微細構造に注目する本研究においては、錐状感覚子に局在が期待されたイネキシンサブタイプ、CjapInx3 の特異的配列 (LGIDEGERRYHS) を持つペプチドを KLH と結合させた複合体を抗原としてウサギ 1 羽に注射して作成した抗 CjapInx3 抗血清を用いた。この抗 CjapInx3 抗血清をもとに CjapInx3 抗原ペプチドを用いて精製し抗 CjapInx3 抗体を得た。(図 9)。アクリルアミド濃度 10%の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を準備し、1 レーンあたりアリ触角鞭節 5 匹分等量を含む 10 μ l のサンプルバッファーを添加した。電気泳動後、セミドライブロットティング装置用いて、タンパク質をゲルから PVDF 膜 (immobilon-P; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) に転写した。PVDF 膜を Blocking One 液 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) に浸し室温にて 2 時間ブロッキング処理を行い、抗 CjapInx3 抗体 (Can Get Signal Solution 1 液で 1000 希釈、Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) とともに室温で 2 時間静置、処理した。その後 donkey anti-rabbit IgG-HRP (sc-2313, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, U.S.A) (Can Get Signal Solution 2 液で 5000 希釈、TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) で処理した。抗 CjapInx3 抗血清や精製抗体で標識され

たシグナルは Chemi-Lumi One Superr (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いて検出した。

触角鞭節から膜画分と水溶性画分の分離を行うには次のような手順をとった。氷上麻酔した 60 匹のクロオオアリの働きアリから触角鞭節を切り離し、速やかに液体窒素中で凍らせた。凍らせた組織を液体窒素で冷やしながらマイクロホモジナイザー中で約 30 分間摩砕した後に懸濁用バッファー(62.5 mM Tris·HCl, pH 6.8) 60 μ l で懸濁した。その後、その懸濁液を 200,000 \times g で 55 分間超遠心機 (HITACHI himac CS 120GX, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) にかけて、上清と沈殿に分離して、それぞれを水溶性画分、膜画分とした。続けて電気泳動やウェスタンブロッティングを行う場合には、必要量の各画分の試料を所定の SDS-PAGE 用サンプルバッファー組成になるよう適宜調整した。

抗 CjapInx3 抗血清を用いた触角断片の免疫組織染色

氷上麻酔したクロオオアリの働きアリから切り取った触角をほぼ 1 節ごとに細かく輪切りにし、すぐに 1%パラホルムアルデヒド、0.25% ZnCl₂、127 mM NaCl、3.5 mM ショ糖溶液に移し 4°Cで一晩固定した。固定後、触角を 30% ショ糖含有アリリンガー溶液 (4.8 mM TES、127 mM NaCl、6.7 mM KCl、2 mM CaCl₂、3.5 mM Sucrose) に移し 4°Cで 1 時間置いた後、溶液を新しいものに入れ替え再び 4°Cで一晩おいた。その後 O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)に包埋し、極低温冷却装置 (CM1850; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) 中で凍結して、厚さ 8 μ m の凍結切片を作成してスライドガラスにマウントした。スライドガラスを-20°Cで 30 分間アセトン洗浄し、1 時間乾燥させ、ART (0.05% Triton-X100 を含むアリリンガー溶液、1 回つき 5 分) で 3 回洗浄し、次いで HistoVT One 液 (Nacalai

Tesque, Inc., Kyoto, Japan) に移し 70°C で 20 分間おいた。ART で 3 回洗浄した後、Blocking One 液 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) に入れ室温で 2 時間おき、クロオオアリネキシン 3 に対するウサギ抗血清または免疫免疫前のウサギ血清 (Can Get Signal 溶液 B で 300 倍希釈、Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を加えて一晩おいた。翌日、スライドを ART で 4 回 (1 度につき 5 分) 洗浄し、Alexa594 結合ヤギ抗ウサギ IgG (Can Get Signal 溶液 B で 800 倍希釈、A11012; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) にて 4°C でさらに一晩おいた。続いて、スライドを ART で 4 回洗浄し、Fluoromount (K024; Diagnostic Biosystems Inc, Pleasanton, CA, USA) でマウントし、検鏡まで 4°C の暗所で保管した。検鏡は ECLIPSE Ti2-E 倒立顕微鏡 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) による超解像顕微鏡システム (N-SIM; Nikon Corporation, Tokyo, Japan; レンズ: SR Plan Apo IR 60×, NA1.27 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan)、レーザーユニット: LU-N3-SIM (Nikon Corporation, Tokyo, Japan)、カメラ: ORCA-Flash 4.0 sCMOS (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan)) を用いて行い、錐状感覚子の蛍光画像を取得した。励起波長は 561 nm、吸収フィルターは 605 nm フィルターを用いた。NIS 素子 AR ソフトウェア (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) を用いて感覚子の縦方向 (厚さ 0.64 μm) および輪切り方向 (厚さ 6 μm) の蛍光画像を再構築した。縦方向の微分干渉画像は 60 倍の液浸対物レンズ (UPLSAPO60XW, NA 1.20; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)、BX61W1 顕微鏡 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) を合わせた FV1000 共焦点顕微鏡 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) を用いて取得した。

時々感覚子外表面に生じる非特異的シグナルは、主に感覚子表面に付着している汚れに抗体が付着して生じる輝度の高い偽シグナルである。このような非

特異的シグナルを除くため、ブロッキング、洗浄および抗血清処理を様々な条件で行いこの免疫組織染色実験を試みたが、非特異的シグナルを完全に除くことはできなかった。固定液中で触角を超音波洗浄すれば、非特異的なシグナルが減少する可能性はあったが、それを行うことで触角上の感覚子が破損する危険性が増えるため、この処理は行わなかった。異なる励起波長による観察を行い、感覚子クチクラの輪郭形状を明らかにすることを試みたが効果がなかった。しかし、N-SIMによって再構成された蛍光画像から感覚子のクチクラの輪郭を、NIS要素 AR ソフトウェアを用いて回転させることにより認識することができた。さらにこのソフトウェアを使用することで、感覚子内部の蛍光シグナルと感覚子表面についての蛍光シグナルをかなり効果的に区別して見分けることができた。

第二章

結 果

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡観察：錐状感覚子内部の微細構造

クロオオアリ働きアリの錐状感覚子試料を任意に9本選び、SBF-SEMを用いて観察した。それらの感覚子どうしで、ビーズ構造の数や局在を正確に比較することはできなかった。しかしながら、観察した9本すべての感覚子において、内部に格納されている感覚突起上にビーズ構造が認められた。そこで、代表的な感覚子のデータを丁寧に取得し、基本的にこの代表感覚子のデータをもとに、以下に示す3Dモデル構築やビーズ構造の分布解析を行った。図1Aには、代表感覚子とは別の感覚子を用いて取得した、嗅孔(矢頭)のある感覚子の先端付近から、感覚子のソケットのクチクラ(アスタリスク)が部分的にみえる基部にかけて、約20 μm 長の錐状感覚子のほぼ全長を斜めに切断した画像を示す。感覚子先端付近において、クチクラに複数の嗅孔が貫通しているようにみえる部分では、他の部分に比べてクチクラ壁が薄くなっていることがわかる。嗅孔の開口直下の感覚子先端の内部には、感覚突起が伸びてきていない感覚子リンパに満たされた空間があり、感覚子の中央から基部にかけて多くの感覚突起の断面が見られる。

図1B-Eには、SBF-SEMを使って得た、代表的な感覚子の微細構造の横断面連続画像のうち、感覚子の軸に沿った異なる場所におけるいくつかの画像を示す。感覚突起の細胞膜に焦点を合わせて撮影を行う必要があったため、感覚子の

最先端から基部へ向かって $12\ \mu\text{m}$ の部分から感覚突起の出現を確認して以降、さらに基部へ向かって連続画像の取得を行った。結果的に、この代表感覚子において、全ての感覚突起の横断面が視野から外れるまで、 $70\ \text{nm}$ 間隔で先端から基部へ向かって 596 枚の連続画像を得ることができた。図 1B は、 102 本の感覚突起を有する断面図の一例を示しており、この断面図に写っているいくつかの感覚突起の内部には、嗅覚受容神経の感覚突起と内節との接合部に存在する結合繊毛の断面がみられる。図 1C、D は、触角のクチクラ表面の位置を基準として、感覚子先端に向かって $6\ \mu\text{m}$ および $1\ \mu\text{m}$ の位置の断面図であり、図 1E は触角のクチクラ表面から基部へ向かって $4\ \mu\text{m}$ の位置の断面図である。ちなみに図 6、7、12 に示すように、触角クチクラ表面の位置を 0 レベルと呼び、先端へ向かって正の、基部へ向かって負の数値で当該横断面までの長さを表示するならば、図 1C、D、E は、それぞれ $+6$ 、 $+1$ 、 $-4\ \mu\text{m}$ の位置の断面図となる。図 1C、D、E の横断面画像間で少しずつ違いがみられるが、この錐状感覚子に沿ったすべての断面において 102 本の感覚突起を確認できた。ほとんど全ての横断面画像において、小さめの感覚突起の断面が見られた。しかしながら、図 1C と E においては、それぞれ大きめの断面積を有する感覚突起が 5 本ないし 9 本見られた。この感覚子において、撮影した全 596 枚の連続画像のうち、 352 枚の画像を用いて、感覚子の長軸方向に $24.6\ \mu\text{m}$ にわたる範囲で、3D 微細構造モデルを再構成した (図 2)。感覚子の中に格納されている 102 本の感覚突起は束になって緩やかにより合わさることによって、構造的なまとまりをつくっているようにみえた。また各々の感覚突起は枝分かれせず、図 1C~E において、感覚突起の大きな断面積を示す部分が特徴的なビーズ構造として確認できた。

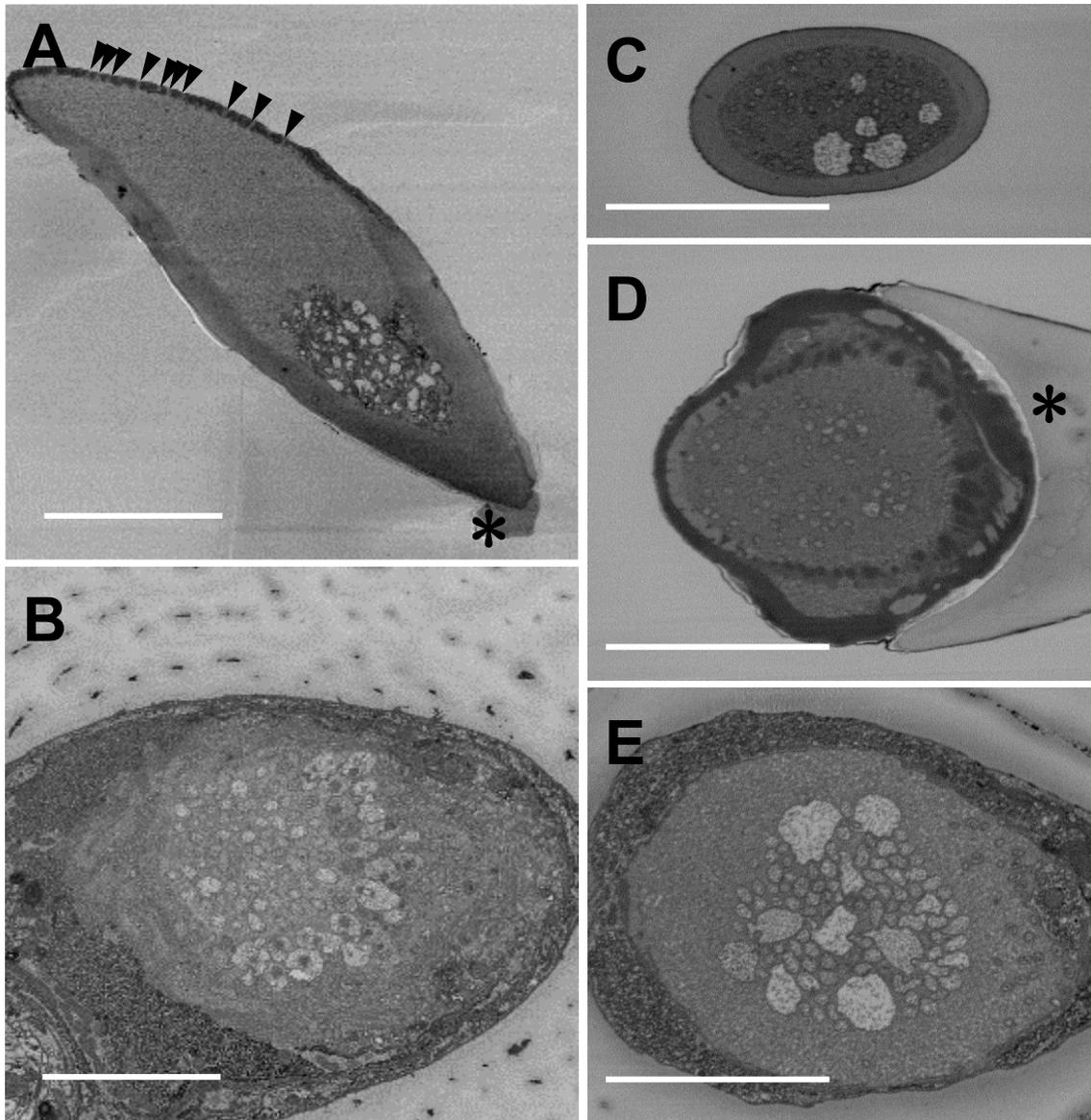


図 1 クロオオアリ働きアリの触角上にある錐状感覚子の連続ブロック表面走査型電子顕微鏡画像

(A) 錐状感覚子を斜めに切断した像。矢頭は嗅孔を、アスタリスクは感覚子基部のソケット部分のクチクラを示す。(B) 102本の感覚突起がみられる錐状感覚子の横断面像。(C~E) 錐状感覚子の横断面像。それぞれ触角クチクラ表面から感覚子先端方向へ6 μm の位置(C)、1 μm の位置(D)、触角内部方向へ4 μm の位置(E)の像を示す。スケールバーは5 μm を示す。

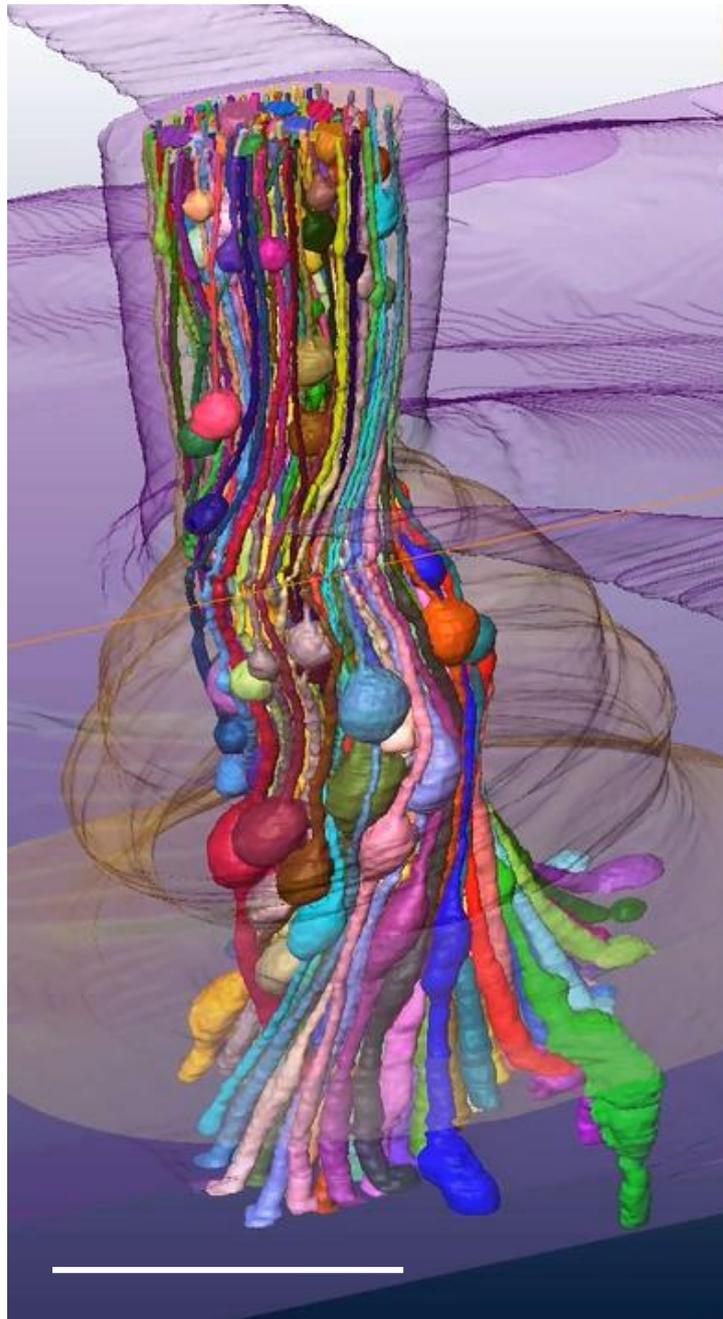


図2 クロオオアリ働きアリの触角上にある錐状感覚子内部における嗅覚受容神経の感覚突起の3次元構築像
色分けされた感覚突起の3D構築画像。70 nm ごとに取得した352枚の画像をもとに作成した(全長24.6 μm)。スケールバーは5 μm を示す。

透過型電子顕微鏡観察：嗅覚受容神経の感覚突起の細胞膜間の接着の形態学的証拠

TEM を用いて錐状感覚子をさらに観察したところ、図 1A に示すように、やはり感覚子のごく先端寄りの内部には、細胞に由来する構造物が見られないことが分かった。先端から基部へ向かうにつれて、図 3A では、感覚突起の小さな断面が 3 つ (矢頭) 見られるだけだが、感覚子全長のなかほどの断面像を示す図 3B と、より基部の断面像を示す図 3C においては、100 本ちかくの感覚突起断面が認められる。TEM で得られた図 3 の各断面像は、SBF-SEM で得られた図 2 の断面像の様子と類似していた。3D 構築した際にビーズ構造として見られる部分、即ち、TEM 像や SBF-SEM 像において感覚突起の横断面積が大きくなっている部分では、感覚突起の細胞膜どうしが近接している部分がしばしば見られた (図 4A の双頭矢印で挟まれた部分)。

図 4B は、図 4A の四角で囲った部分の高倍率画像である。図 4B では感覚突起の断面積が大きくなっている部分において、隣りあった他の感覚突起の細胞膜と密着していた (双頭矢印 a、b)。さらに、隣接する感覚突起のビーズ間において双方の細胞膜が密着している領域に焦点を当てた UHV-EM 画像 (図 5A の四角で囲った部分) において、細胞膜表面のトレースを行うと、一方のビーズ構造の細胞膜 (図 5B、C マゼンタ) がもう一方の細胞膜 (図 5B、C 緑) に陥入している像が得られた。

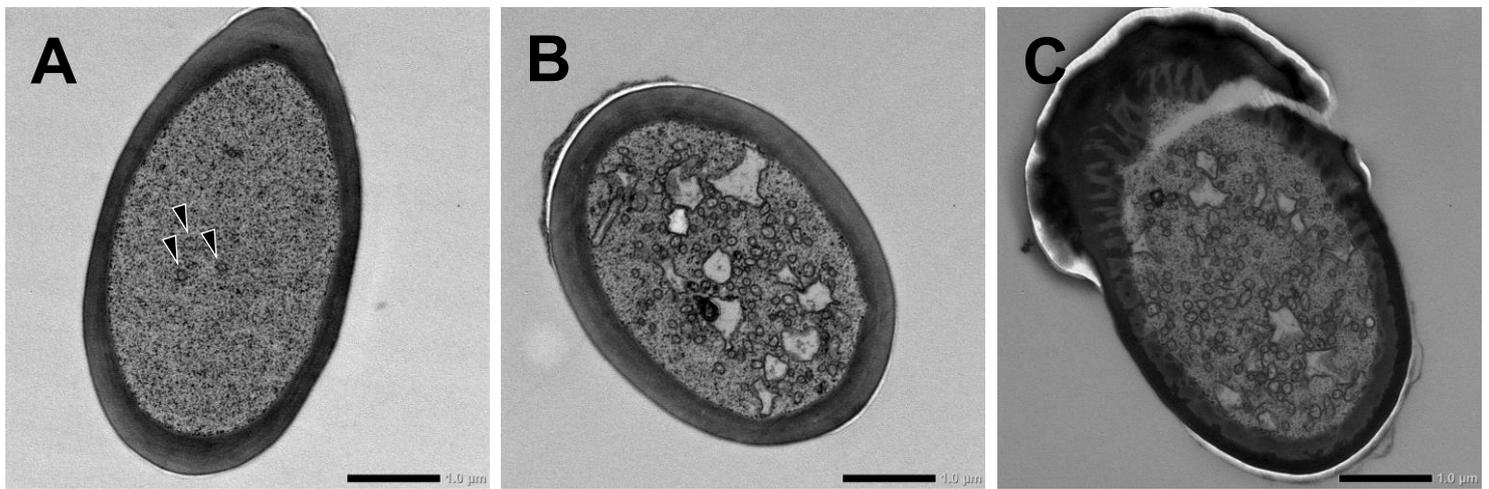


図3 錐状感覚子の透過型電子顕微鏡画像

クロオオアリ働きアリの錐状感覚子の横断面画像。3枚の像は感覚子の鞭節からそれぞれ、(A) 少数の神経感覚突起が見られる感覚子先端部、(B) そこからやや基部側の部分、(C) 基部のソケット部分を示す。B、CではAに比べて明らかに多くの神経感覚突起が見られる。スケールバーは1 μm を示す。

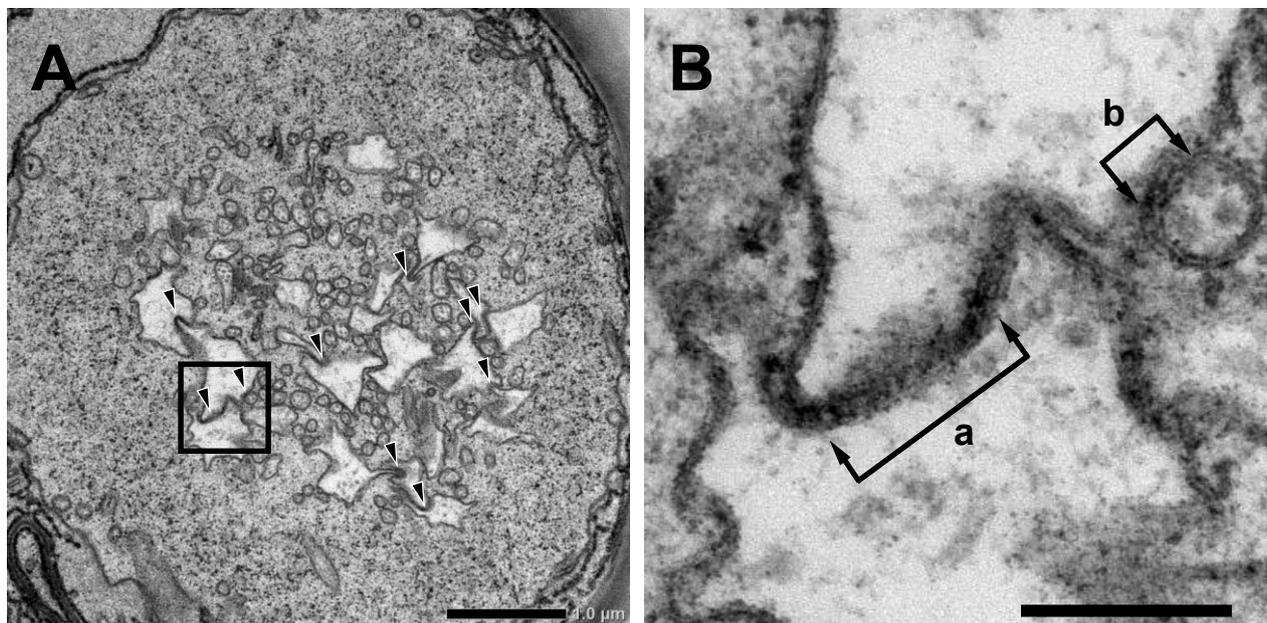


図4 嗅覚受容神経の感覚突起の細胞膜どうしが密着している部分

(A) 触角クチクラ表面より下部の位置での感覚子の横断面画像。(B) Aの四角で囲んだ部分の高倍率画像。双頭矢印 a と b の範囲で細胞膜どうしの密着が見られる。Aのスケールバーは1 μm 、Bのスケールバーは200 nmを示す。

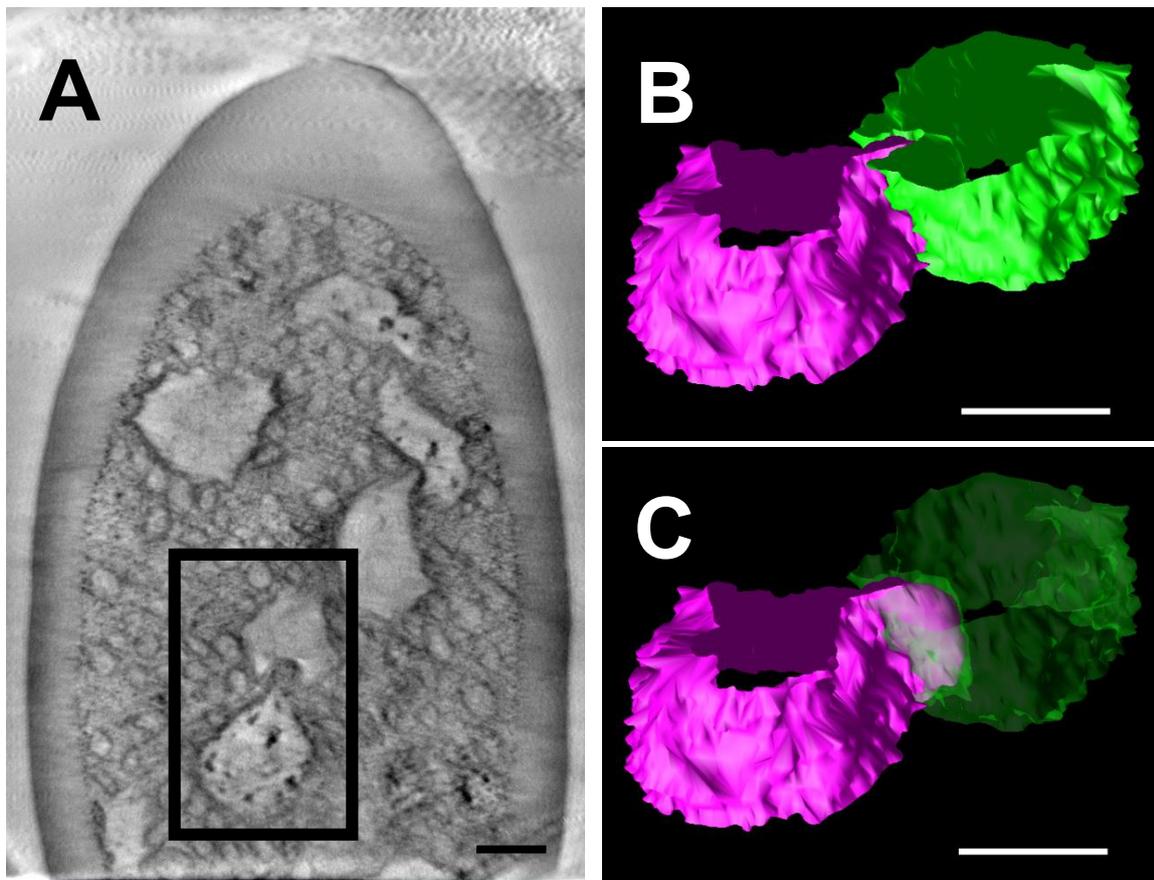


図5 錐状感覚子の超高圧電子顕微鏡観察とトモグラフィ解析

(A) クロオオアリワーカーの錐状感覚子の断層撮影スライス画像 (厚さ 3.4 nm)。 (B, C) A の四角で囲まれた部分の拡大図。隣接した受容神経感覚突起における 2つのビーズ構造の 3次元断層撮影モデル。マゼンダと緑に色分けした表面をもつビーズ構造の部分において、細胞膜どうしが入り組んで隣接している。Cでは、Bにおいて緑に色づけしたビーズ構造を半透明にして、マゼンダに色づけした細胞膜の陥入を見やすく示す。スケールバーは 50 nm を示す。

感覚突起上の「ビーズ」の局在

SBF-SEM (図 2) によって得られた感覚子横断面の連続画像を用いて、102 本の感覚突起にあるビーズ構造を全て列挙し、細胞膜間の密着領域の全てを目視で抽出した。感覚子先端から約 $9.5\ \mu\text{m}$ 基部側へ向かった位置から $24.6\ \mu\text{m}$ 基部側へ向かった位置までの範囲において、388 個のビーズ構造と、それらビーズ構造がある部分で見られる膜-膜間の密着領域が 696 個あることが分かった。図 6 に示す模式図では、102 本の垂直線は感覚子内に見られた全感覚突起を示す。黒丸は各受容神経の感覚突起上にある個々のビーズの位置を、黒丸に添えた数字はそれらのビーズ構造それぞれに細胞膜間の密着領域がいくつ存在するかを示す。図 6 および図 7 の縦軸は、感覚子の長軸に沿った感覚突起の位置を、触角クチクラ表面からの距離として示す。図 6 同様、図 7 においても、黒丸は感覚突起上に分布しているビーズに対応しているが、図 7 においては、横軸は各ビーズにおいてみられる密着領域の数を示しており、錐状感覚子内のビーズ構造の分布と膜-膜間の密着領域数の相関が概観できる。従って、膜-膜間の密着領域数の分布は、触角クチクラ表面から先端側および基部側に 2 つのピークを有することがわかる。先端側および基部側のピークは、それぞれ 191 および 505 の密着領域を有している。触角クチクラ表面から少し先端側にずれた感覚子根元の位置には、ビーズはわずかしか見られず、密着領域は存在していない。

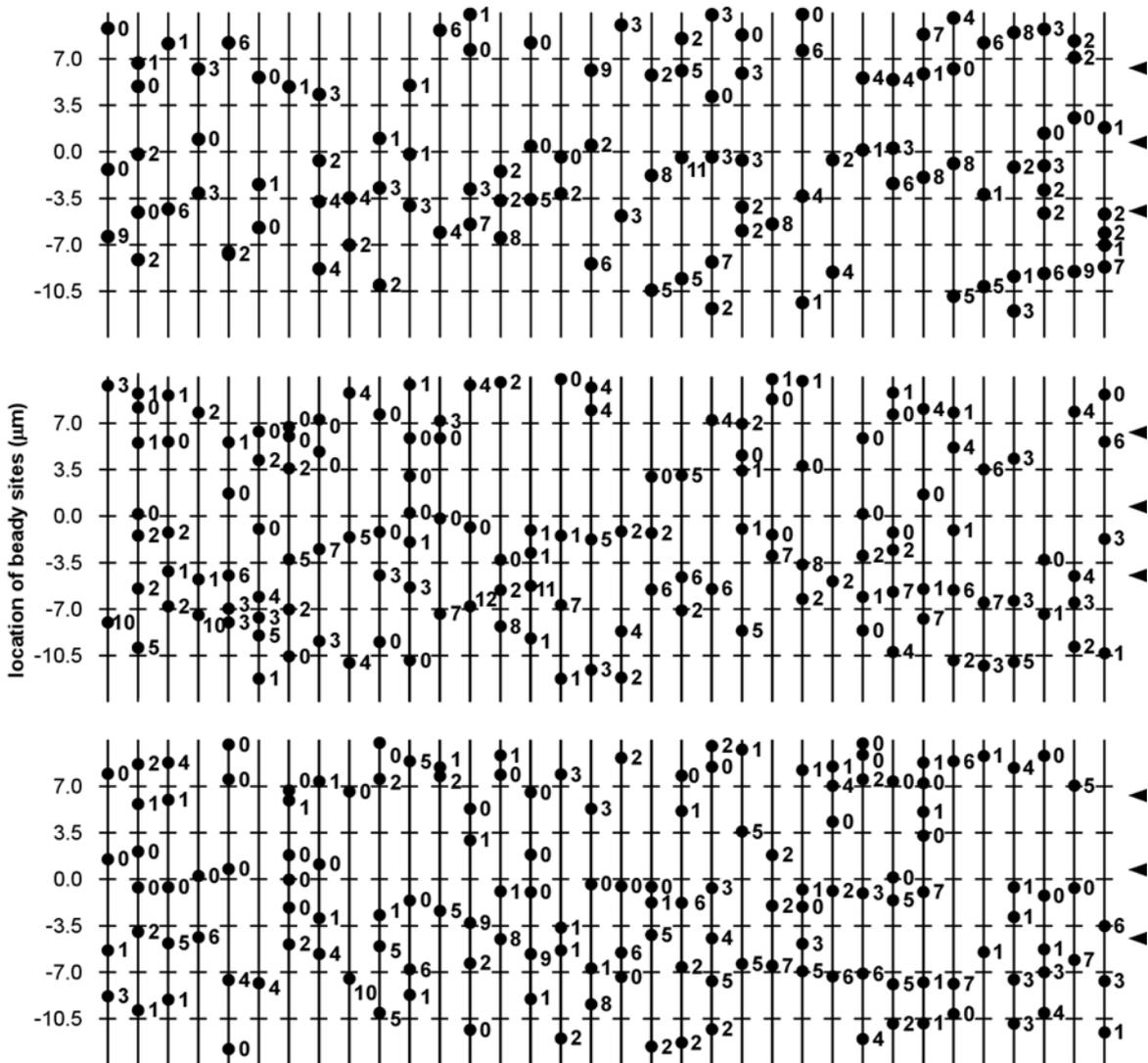


図6 嗅覚受容神経の感覚突起上のビーズ構造の位置を示す模式図

錐状感覚子内の嗅覚受容神経の感覚突起（全 102 本）上に存在する個々のビーズ構造の位置を黒丸で示す。縦軸は、触角のクチクラ表面の位置を 0 として感覚子の長軸に沿って先端へ向かう距離を正の数で、その反対方向へ向かう距離を負の数で示す。黒丸の横の数字はそれぞれのビーズにおいて、他の感覚突起が密着している領域の数を表す。また右の矢頭は、図 1C~E の横断面画像が取得された位置を示す。

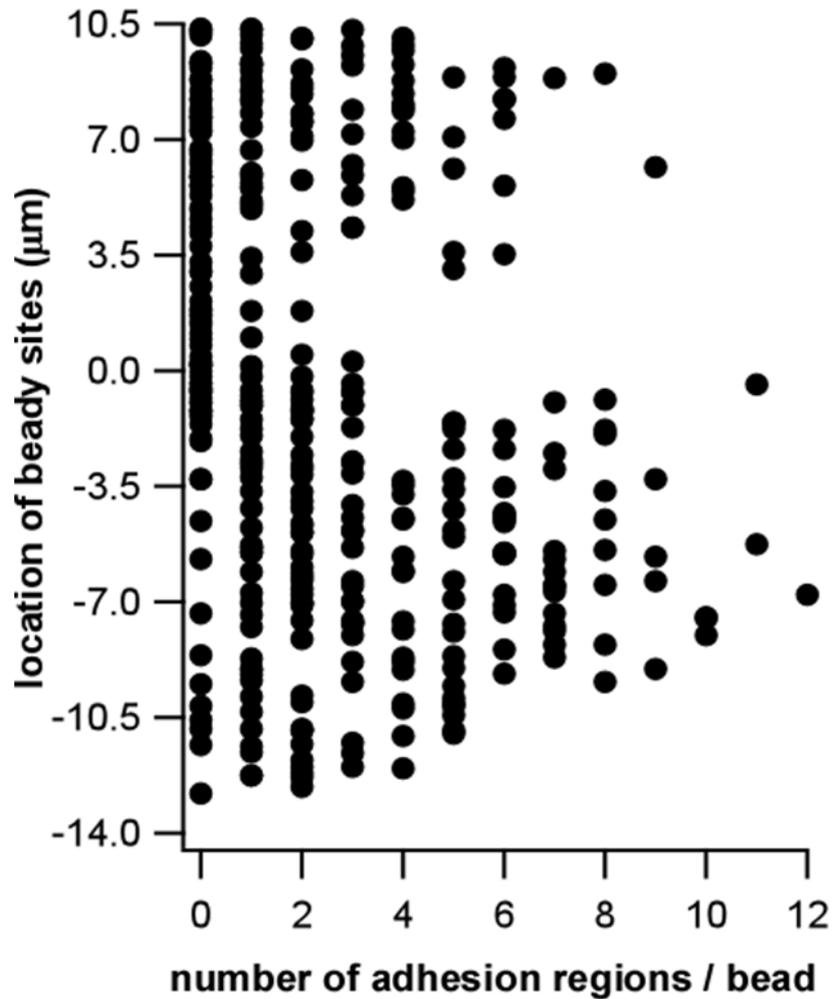


図7 錐状感覚子内のビーズ構造の分布と膜-膜間の密着領域数の相関
 感覚子の軸に沿った全ビーズ構造の分布と、隣接する受容神経の感覚突起の細胞膜どうしの密着領域数との相関図。縦軸は感覚突起上のビーズの位置、横軸は個々のビーズが持つ他の感覚突起との膜-膜間の密着領域の数を示す。

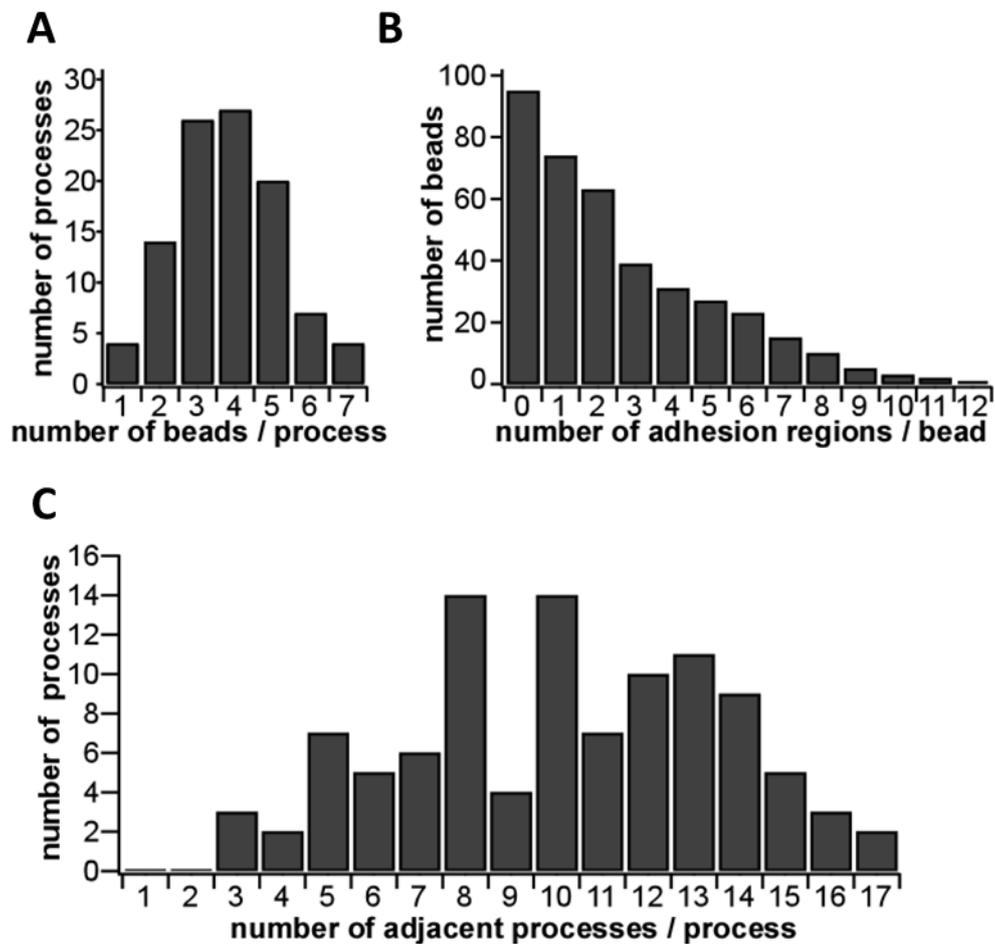


図8 感覚突起上に存在するビーズ構造の数と密着領域の数の相関分布
 (A) 個々の感覚突起に存在するビーズ構造の分布。(B) 個々のビーズ構造における密着領域の分布。(C) 個々の感覚突起に存在する密着領域の分布。

図 8A は、各感覚突起がもつビーズの数の分布を示す。すべての感覚突起が 1～7 個のビーズを有し、感覚突起当たりのビーズの平均数は 4 個であった。全 388 個のビーズのうち 95 個は密着領域を持っていなかったが、残り 293 個のビーズは、各ビーズがもつ密着領域数の分布を示す図 8B にあるように、1～12 個の密着領域をもっていた。図 8C は、各感覚突起が他のいくつの感覚突起と密着領域を介して連絡しているかを示す分布図で、すべての感覚突起が、3～17 本の他の感覚突起と連絡していることが示唆された。

CjapInx1	M----YKLLGDLGSGYFK----RQEIITDSMVFMRHNFHTVLLFTCSILITATQYVGNPISCIT---QGLPHTAINTYCWITSTFTMPDA	150
BmorInx1	M----FQLLGGLRVYFQ----YQPIRTDNAVFRHLNVFTVLLLTCSMIITASQYVGNPIMCIV---NGIPANVNTFCWITSTFTMPDA	150
CjapInx2	M----FEVFGSVKGLLK----LDSVCI DNNVFRHLHYKATVIGLIIIFSLVTSRQYIGDPIDCIV---DEIPLHVMDTYCWISTFTIPDR	150
BmorInx2	MF----DVFGSVKGLLK----LDSVCI DNNVFRHLHYKATVIGLIIIFSLVTSRQYIGDPIDCIV---DEIPLAVMDTYCWISTFTIPDR	150
CjapInx3	MV--VFGLVSAVAGFVKVRYLIDKAVIDNMVFRMHYRITSAMLFLCCIIVSANNLIGDPINCIS--ELAGAGHVINTFCWITYTFTLPLAN	150
BmorInx3	MA--VFGLVSSVAGFVKVRYLIDKAVIDNMVFRMHYRITSAILFLCCILVTANNLIGEPICIS--DGANPGHVINTFCWITYTFTMLNT	150
BmorInx4	M----IDLMPFRSFLK----FENVCTDNNIFRMHYKLTVILLVFTLLVTSKQFFGEPHICMSGNDKGNKDAVNISWCWYGTYYTLKSKQ	150
CjapInx7	MAANVLAASFVLKNHVNFKVNQNAVAIDNLVFRHLHYRITFMLLFIIGSILVSSRQFIDGEHRCIT--DIAI PAHVVTFCFFMSTYTVVKK	150
BmorInx7-like1	M-----	150
BmorInx7-like2	M----LVASLNSLSPRLRFQ--FSKPKIENVAFRHLHYQLTVTILLFAVILVCAREYFGDHIKCLS--DQGVDPDHVIQTYCFEMATFTIVRH	150
CjapInx8	M----LDIFRSLKSLIK----ISHIHTDSAVFRHLHYSLTVILLTAFSLIVTRQYVGNPIDCIIH--SKDLPEDVLTNYCWIHSTYTTITAA	150
BmorInx8	M----LDVFRGLKNLIK----VNYVHIDSPVFRHLHYSLTVILLTAFSLIVTRQYVGNPIDCIIH--TKDIPEDVLTNYCWIHSTYTLKSY	150
	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90	
CjapInx1	FNRQ--VGLEVAHPGVANDFGDV---DARKYYTYQWVCVFLVFFQAILCYIPQWLWSLWEGGLMNALVMGMNHG-----	150
BmorInx1	FARE--VGKEVAHPGVGPEFEG---TEKKYYTYQWVCVFLVFFQAIMCYTPKFLWDAFEGGLLRTIVMGLNIG-----	150
CjapInx2	-TGI--VGKDLVQPGVAAHVEGE---DEVKYHKYQWCVFLVFFQAILFYIPRYLWKTWEGGRKIMLVLDLNCP-----	150
BmorInx2	LIGR--VGKDYVQPGVGHVEGQ---DEVKYHKYQWCVFLVFFQAILFYIPRYLWKTWEGGRKIMLVLDLNCP-----	150
CjapInx3	NAKP--VSTHVAHPGLGIDE-----GERRYHSYQWVFPVFLVFFQGVLFYIPHWMMKQWEEGKIRIIESEGMRGS-----	150
BmorInx3	TSKT-----AAHPGLGDDN-----DEKRIHSYQWVFPVFLVFFQGLLFYIPHWIKNWEEGKVRILIESEGMRGT-----	150
BmorInx4	LLGV--EGRHMAVYGVGPAKSDD---DEQIKHTYQWCVFLVFGQATMFAPRYLWKMWEGGRKALAAALDSSP-----	150
CjapInx7	LNATAVLQGEPLHPGVGPAAKG----DPVIHHAYYQWVFPVFLVFFQALLFYLPHYIWRKMEGNRLSMLVSLGHMAALLSETELNVNDVK	150
BmorInx7-like1	M-----	150
BmorInx7-like2	YNESLLQGEFLPHPGVGPILAT-----DETIHTTYQWVFPVFLVFIQSICFYLPHYIWKTEGGRKIKALVDGLQYAGLALHDDITVNGTT	150
CjapInx8	EGGKHALMMDLDIG-----YRKK--EGYEVFPFGIDNSKSYPE---SERKEYRYQWVCVFLVFFQAILFYTPRWLWKGW	150
BmorInx8	EGGKIRALMMDLDVA-----FEKT--VGVEVFPYPIGNSREKGEDMSDRKVKYQWVCVFLVFFQAILFYAPRWLWKGW	150
100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180	
CjapInx1	MDT--EENITKKKALMMDYL--IQHIRSHNTYVYRYFACEALCLINIFGQLYLMNRFDFGFFSYGLRVLQFSDTPQ-----EERVDPMV	300
BmorInx1	VCH--QDEKKEKKDVIIDYL--LRHERTHKLYAFRYWGCCELLCLVNIILQMMMDNFFNGEFMSYGRVLYGSEVFPQ-----EERYDPMI	300
CjapInx2	VVS--EDCKSDRRKLLVDYF--TSNLHSQNFYAYRFFLCELLNLINVIQIIFIDFPLDGEFTTYGSDVLRFTMEMP-----EQRMDPMA	300
BmorInx2	IVE--DECKSGRRKLLVDYF--HTNLHTQNFYAFRFFICEVLFNINVRQIFFMDFPLDGEFTTYGSDVVSFTMEMP-----EERVDPMA	300
CjapInx3	MIEPKQRQAKVERLVQYL--VETMHLHNSYAAAYFCEALNFVNTICNIIFVDAFLGGAFLTYGTEVLKFSNMNQ-----EQRTDPMI	300
BmorInx3	MASIAADDKNNRQNRVLQYL--LDTSHMHTYSFGYFFCEVLFNFANVFNANVGNIFFLDTFLGGAFLTYGTDVVRFSNMNQ-----EQRTDPMI	300
BmorInx4	MVS--KDWSEFRKELVSYFNVTNMYTHNMALRYAFCELLNLNVNVGQIFILDFLGGSFRNYGAARVAFTHTPRI PNDFTNFTSVNPM	300
CjapInx7	VPS--KKDRDERIQIRTGF--INRHLNRFWAYGLTFCEILNLINVMQIFLTDWFLGGAFGLGGRSI---SQPRS-----KDEVDPD	300
BmorInx7-like1	M-----EVANLLHVMFQVWVINKFLNGAFMSLGRVLETKDW-----SHIVDPLE	300
BmorInx7-like2	VPS--KKTLENKLDLIRKDIILRYEIE-----CNLYNL-----EE-----	300
CjapInx8	LCS--EVEKKQKKMLLDYL--WENLRVHNWWAYRYLCEVALLLVNVIQMFMLNRFDFGAFLTFGIDVLRFLSDQ-----EDRDVPMI	300
BmorInx8	VCT--EIEKTKKLLLDYL--WENLRVHNWWAYRYLCEVALLLVNVIQMFMLNRFDFGAFMTFGLKVKIKYMESDQ-----EIRIDPMI	300
190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270	
CjapInx1	YVFPRTVKCI--FHKGASGTIQQHDALCVLPLNIVNEKIYIFLWFWFIILALMLFGLLVYRVVVIIFAPMVRPRLHLSTRLLPIE----	360
BmorInx1	YVFPRTMKT--FHKFGASGSIQTHDLCVPLNIVNEKIYIFLWFWFIILAVVLTLLVMYRLVVIIFMPAVRPRLLHARSRLSLE----	360
CjapInx2	RVFPKVTKCT--FHKGASGTQKFDGLCVLPLNIVNEKIYVFLWFWFIILAAALSGLSLRYRVAVLIGPKLRMLVLRARSRLSPQD----	360
BmorInx2	VVFPKVTKCT--FHKGASGTQKFDGLCVLPLNIVNEKIYVFLWFWFMILSILSGISLRYMAVAVAGPRVRLYLLRARSRLAPQE----	360
CjapInx3	EVFPRTKCT--FHKFGASGSIQKDALCVLALNINLEKIYIFLWFWFIILVSVVSGLALVYSAVCLLPSTRETILKRRFRFGTGN----	360
BmorInx3	EVFPRTKCT--FHKFGASGSIQKDALCVLALNINLEKIYIFLWFWFIILVSVVSGLALVYSAVCLLPSTRETILKRRFRFGTGN----	360
BmorInx4	EFFPKLTKCW--LRNYGSPSGSLELKDRLCVLPLNIVNEKIYVFLWFWFIILTAFLSILAVFRFLLLLYPLRTVMIRGQIRVVKRS----	360
CjapInx7	IVFPKVTKCI--FHKGSPSGGIQKDALCVMALNINVEKIYVFLWFVVLAIITGLGLVVRVLTMLHARSTSFNKFVFSMACPGKYNPW	360
BmorInx7-like1	LVFPKVTKCI--FHKGSPSGSIQKDALCVMALNIIHEKIYVFLWFVVLAVIWRVVSFFLYRRSLRFNEMMFRVSNKAFNPY	360
BmorInx7-like2	ATFPR-----RLHFAL-----	360
CjapInx8	YVFPRTMKT--FYKYGVSGEVRHDAVCLPLNVNNEKIYVFLWFVFLVGLVLSFFTVLYRILIIFSPRTRVYLLRMRFRVLRD----	360
BmorInx8	YVFPRTMKT--FYKYGVSGEVRHDAVCLPLNVNNEKIYIFLWFVFLVGLVLSFFTVLYRILIIFSPRTRVYLLRMRFRVLRD----	360
280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360	
CjapInx1	TCHSVSNKVDLGDWMIILYLSANMDSLLYKDFLMEFTKMKANTNS-----KSATA	449
BmorInx1	TAVAVSRRTDLGDWMLLMLARNMDPLIYRELMIDLVKRMGEK-----IPPRA	449
CjapInx2	QVKTISDKCQIGDWFLYQLGKNIDPLVYKQIADLAIKLGK-----ENV	449
BmorInx2	QIEAVARKLQIGDWFLYQLGKNIDPLIYKELMTELAEKFEKN-----DKV	449
CjapInx3	TVNALIRKTQVGDFLILHLGQNMNLMFNTELEELCRRQLFGSGSGASPTSVPSAPSTLE---MSPIY---PEIEKYA---KDTEI	449
BmorInx3	GVEALVRKTQVGDFLLLHLGQNMNLRVFEVDELDELRRNLNLSGSH-----APSAPSTLE---MAPIY---PDIDKYS---KETET	449
CjapInx4	VVSRIVKRFEGFDWFLHLHLGKNMNIIFKDLVLELAKAIEHN-----AIMV	449
CjapInx7	NVLKVTHEYVFGDWFLFYIYIAKNLDNIVYKELLQKLAEDLENKHHAR--FKILPPEQSMKLNQWDDI-----KPSVN	449
BmorInx7-like1	NVIRVVGCEFADWFLFYIYLAKNMQGFVQALFVRLAEELEKRE-----LPYDDQGTTEKGAEPILVVGKVIDIDETMPLKRDKSS	449
BmorInx7-like2	M-----KQD	449
CjapInx8	AVETIVRRSKVGDWFLYMLGENLDTVIVRDMHELANKLASRHHHG---VPGVKG-----ELQEA	449
BmorInx8	NIDTIVRRSKMGDWYLLYLGENLDSIIFRDMQEFANKLNHNHYQH---IHGV-----PDA	449
370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....	

図9 クロオオアリの触角に発現するイネキシン分子のアミノ酸配列のアライメント

クロオオアリの触角に発現するイネキシンのサブタイプ (CjapInx1, CjapInx2, CjapInx3, CjapInx7, CjapInx8) のアミノ酸配列をカイコガのイネキシンのアミノ酸配列と比較した。この研究の免疫組織染色に用いた抗体を作成する際に参照したエピトープの配列を黒地白抜き文字で示している。

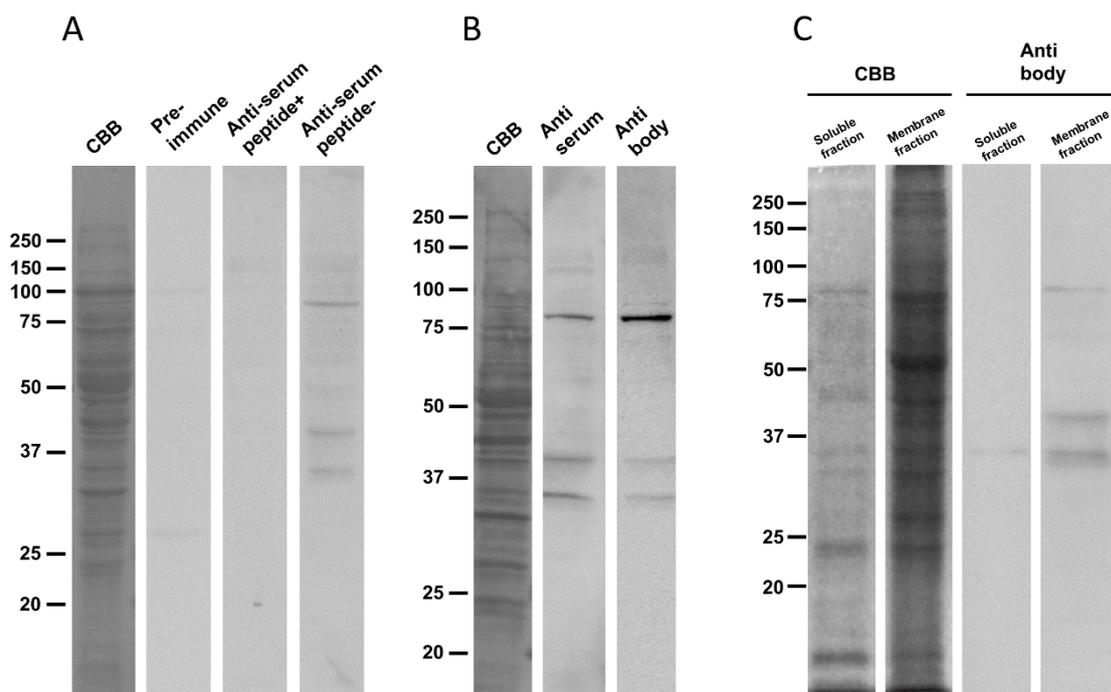


図 10 抗 CjapInx3 血清と精製抗体を用いたクロオオアリ触角タンパク質のウェスタンブロット

(A) 左から順に第 1 レーンから第 4 レーンまで、クロオオアリ触角タンパク質の CBB 染色、免疫前血清を用いたウェスタンブロット、抗原ペプチドによる抗体吸収処理済の抗 CjapInx3 抗血清を用いたウェスタンブロット、抗 CjapInx3 抗血清を用いたウェスタンブロットの結果をそれぞれ示す。(B) 左から順に第 1 レーンから第 3 レーンまで、クロオオアリ触角タンパク質の CBB 染色、抗 CjapInx3 抗血清を用いたウェスタンブロット、精製した抗 CjapInx3 抗体を用いたウェスタンブロットの結果をそれぞれ示す。(C) 左から順に第 1 レーンから第 4 レーンまで、クロオオアリ触角鞭節水溶性画分の CBB 染色、同膜画分の CBB 染色、抗 CjapInx3 抗体を用いた水溶性画分のウェスタンブロット、同膜画分のウェスタンブロットの結果をそれぞれ示す。

抗 CjapInx3 抗体作製とそれを用いたウェスタンブロット

クロオオアリ触角に発現する全遺伝子の mRNA 配列を解析した結果 (Hojo et al., 2015) から、クロオオアリ触角においては、ギャップ結合構成タンパク質であるイネキシンのサブタイプが 5 種類 (CjapInx1、2、3、7、8) 発現していることがわかった (図 9)。さらに、それらの配列から相互に交差反応をしない抗体を作成するために、サブタイプ特異的なエピトープを選定し、各サブタイプの抗血清を得た。その中のひとつが、CjapInx3 の細胞外ループ内のアミノ酸配列 LGIDEGERRYHS (図 9) に対する抗 CjapInx3 抗血清である。

抗 CjapInx3 抗血清を用いて、ほとんどの感覚子が分布しているクロオオアリの触角の鞭節のタンパク質に対してウェスタンブロットを行ったところ、見かけ上 84 kDa、38 kDa、33 kDa の 3 本のバンドが標識された (図 10)。38 kDa と 33 kDa のタンパク質のうち、38 kDa のタンパク質がアミノ酸配列から計算される CjapInx3 の分子量に近く、もう一方のバンドは、その一部が分解されたものかもしれないと考えている。高分子側のバンドは、CjapInx3 の 2 量体ではないかと推測している。抗 CjapInx3 抗血清に替えて免疫前血清を用いた場合 (図 10 A)、また、抗原ペプチド処理をして抗体を吸収した後の抗 CjapInx3 抗血清を用いた場合 (図 10 B)、いずれにおいても、これら 3 本のバンドは見られなくなった。

しかし、抗原ペプチドの特異性を期待して、これらのバンドで示されるタンパク質を全て CjapInx3 に由来するものと考え、CjapInx3 の局在を調べる高解像度免疫組織染色実験に進むには、作製した抗血清についてイネキシン以外のタンパク質との交差反応の問題を回避する必要がある。実際に、クロオオアリ遺伝子のコーディング配列ライブラリー (Hojo et al., 2015) を用いて検索した結果、推定質量 90kD のユビキチンリガーゼの 1 種と推定質量 88kDa の RAF プ

ロテインキナーゼの一種が、それぞれ、CjapInx3 の抗血清作成のために用いた抗原ペプチドのアミノ酸配列 LGIDEGERRYHS と一部が重なる、ERRYH と GERRYH のアミノ酸配列をもつことが分かった。つまり、図 10A の電気泳動の第 4 レーン、および図 10B の第 2、第 3 レーンの高分子側の見かけ質量 84 kDa のバンドが、抗 CjapInx3 抗血清ないし抗 CjapInx3 抗体がこれらのタンパク質に対して交差反応した結果現れたシグナルである可能性がでてきたのである。しかし、膜タンパク質である CjapInx3 に対して、ユビキチンリガーゼも RAF プロテインキナーゼも水溶性タンパク質であり概ね細胞内のマトリックスに存在していると考えてよい。そこで、「材料と方法」に述べた手順に従って触角鞭節を膜画分と水溶性画分に分け、それぞれを電気泳動して、図 10B で用いた抗 CjapInx3 抗体を使ったウェスタンブロッティングを行った (図 10C)。その結果、膜画分においては、図 10A の第 4 レーン、図 10B の第 2、第 3 レーンと同様の 3 本のバンドが認められ、見かけの質量 33kDa と 38 kDa の 2 本のバンドは、比較的ブロードで濃く、見かけの質量 84 kDa のバンドは、このブロットでは比較的薄くシャープにみえた。さらに、水溶性画分においては、見かけの質量 84 kDa のバンドはみられず、見かけの質量 33kDa のバンドの一部と思われる比較的薄くシャープなバンドがみられた。抗 CjapInx3 抗体によって標識される見かけ質量 84 kDa のタンパク質は水溶性分画ではなく、膜画分に現れるため、ユビキチンリガーゼや RAF プロテインキナーゼに由来するとは考えにくく、CjapInx3 に由来すると考えてさしつかえないことが示唆された。ところが、弱いながら水溶性画分の見かけ質量 33kDa のタンパク質への交差反応が新たな問題として浮上してきた。これらについては考察で改めて論じることにする。

次に、クロオオアリの触角においてこのイネキシンスサブタイプの局在を調べ

る目的で免疫組織学的実験を進めることになるのだが、手始めに、精製抗体ではなく抗 CjapInx3 抗血清を用いた試行試実験を行った。参考のため、補足図 1 にその結果を示した。図 1 0 B のウェスタンブロットの結果で明らかのように、抗 CjapInx3 抗血清をもとに抗原ペプチドとの親和性を利用して精製した抗 CjapInx3 抗体を用いても、抗 CjapInx3 抗血清を用いた時と同じ 3 本のバンドが標識され TEM いるので、試行実験段階の免疫組織化学的実験に抗 CjapInx3 抗血清を用いても大きな問題はないと考えられる。計 19 本の錐状感覚子を調べ、そのうち 9 本の感覚子において明らかに内部が染色されていた。他の 10 本の感覚子試料においては、主に、縦断スライスを行った際に内部の受容神経がきれいに残っていなかったなどの理由で満足な染色がみられず、現段階の感覚子内組織染色の成功率は 50%弱といったところである。錐状感覚子内部の染色の再現性が確認できるように、補足図 1 A-C (左、微分干渉像；中、蛍光像；右、微分干渉像と蛍光像の重ね合わせ) に、同じ抗血清を用いて行った 3 本の感覚子の染色像を示しておく。補足図 1 D は抗血清に替えて正常血清を用いて行ったコントロールの染色像である。補足図 1 A で最もよく分かるように、微細なドット状の蛍光シグナルが、感覚子内部に分布している。補足図 1 D のコントロール像では、A-C のように感覚子内部に微細なスポット状のシグナルは認められない。時おり異常に強い蛍光シグナルがみられることがあったが、画像データを全方向から立体視することでこれらは感覚子の外面に見られる非特異的なシグナルであることがわかった (「材料と方法」参照)。得られた蛍光画像を NIS 要素 AR ソフトウェア (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) で読み込み、全方位から立体視して調べると、9 つの感覚子全てで特異的なシグナルが感覚子内腔に存在することが示唆されたが、補足図 1 A にあげた代表例では、感覚子の内部に見られる CjapInx3 の局在を示す蛍光シグナルは、感覚子の先端から $11.84 \pm 0.99 \mu\text{m}$

(平均±標準誤差、n = 9) よりも基部側に集中していた。さらにこの代表例において、感覚子の長軸に沿った内部シグナルの蛍光の輝度分布を測定することに成功し、CjapInx3 の分布密度を示唆する蛍光強度は伸びてきた感覚突起が存在する領域に重なることが推測された。さらに詳しく見ると、感覚子の基部側半分ですべてひとつ蛍光強度のピークを示し、感覚子の根元部分では蛍光強度が低く、そこからさらに深部の位置で再び蛍光強度の上昇が見られた。この輝度分布は、図 7 のビーズ構造と密着領域の出現頻度と非常に類似していた (補足図 1 E)。

第三章

考 察

抗 CjapInx3 抗血清ないし精製抗体の特異性の検証

図 10 のウェスタンブロットの結果で示したように、ここで使用した抗 CjapInx3 抗血清は、クロオオアリ触角鞭節の膜画分に含まれるタンパク質のうち見かけの質量の異なる 3 本のバンド(見かけの質量 33kDa、38kDa、84 k Da)を標識した。イネキシンのウェスタンブロットの標識がこのようなパターンで現れることがあるかどうかを調べたところ、ショウジョウバエのイネキシン 1 とイネキシン 2 のオルソログを発現したウシガエルの卵母細胞の膜画分に対するウェスタンブロットの報告において、単量体のイネキシンのバンドのほか、高分子側にオリゴマーのバンドが検出されていた (Holcroft et al., 2013)。イネキシンサブタイプはそれぞれ構造的に類似しているため (Fushiki et al., 2010a, b)、図 10 において抗 CjapInx3 抗血清ないし精製抗体を用いたウェスタンブロットにおいて検出された高分子量側の見かけ質量 84kDa のバンドは、CjapInx3 のオリゴマー、おそらく 2 量体を示している可能性が考えられた。イネキシンは 8 量体となってヘミチャネルの立体構造を形成し、向かい合った細胞膜の合致する場所で 8 量体どうしが会合し 16 量体のチャネルを作ると考えられているが (Oshima et al., 2016)、一般的な SDS-PAGE のウェスタンブロットにおいてより大きな多量体ではなく 2 量体が優先的に検出されると考える理由は先行研究でも触れられておらず、不明である。

抗 CjapInx3 抗血清ないし精製抗体を用いて検出された見かけ質量 84kDa のバンドが、本当に CjapInx3 由来のものかどうかについては、選定した抗原ペプチドのアミノ酸配列を部分的に共有する異なる 2 種類の水溶性タンパク質が、クロオオアリ触角に発現していると推察されることから、慎重な検証が必要であったことは、第 3 章「結果」において既に述べた通りである。それを検証する手立てとして行った実験は、図 10C に示した触角鞭節を膜画分と水溶性画分に分けて行ったウェスタンブロットのみであるが、結果として、CjapInx3 が含まれるクロオオアリ触角鞭節の膜画分に、見かけの質量、84 kDa、38 kDa、33 kDa の 3 本のバンドが標識され、その標識パターンは、触角鞭節全体を試料に用いたウェスタンブロットの結果を示した図 10A の第 4 レーン、図 10B の第 2、第 3 レーンの標識パターンとよく似ていた。一方で、ユビキチンリガーゼと RAF プロテインキナーゼが含有されるはずの水溶性画分には見かけの質量 84kDa のバンドはみられなかった。ために、ここで使用した抗 CjapInx3 抗血清ないし精製抗体は、ユビキチンリガーゼと RAF プロテインキナーゼと交差反応したとしても、CjapInx3 に対する反応に比較して、格段に弱いと推察された。

しかし一方、水溶性画分には見かけの質量 33 kDa のシャープなバンドが標識されていた。これと同様なシャープなバンドは膜画分においてもブロードなバンドに重なって現れていた。再び、クロオオアリ遺伝子のコーディング配列ライブラリー (Hojo et al., 2015) を用いて検索した結果、このバンドの候補タンパク質として、推定分子量 20 kDa の HDAC subunit SAP30 homolog が浮上してきた。HDAC subunit SAP30 は核に局在していることが知られているタンパク質サブユニットであるが (The Human Protein Atlas project)、抗 CjapInx3 抗血清作成時に選定した抗原 12 アミノ酸残基からなるペプチドの中ほどのアミノ酸配列 DEGER を共有していた。図 10C の水溶性画分に現れた標識バンド

の見かけの質量 33 k Da に比べて小さめの推定質量をもつとはいえ、他に候補となるタンパク質がみつからなかったので、図 10C ではこのタンパク質が水溶性画分に、また、未破碎の核内に残った一部が膜画分に、それぞれ同じみかけ質量を示す標識バンドとして見えている可能性が高い。以上のような考察に加え、注目する錐状感覚子内には受容神経の感覚突起だけが格納されており、核のある細胞体塊は含まれないということも考え合わせるにより、感覚子の免疫組織化学的染色においてみられる標識は、概ね CjapInx3 の局在を示すもとと考えてよいと判断できる。

嗅覚情報についてのフィルター効果と修飾

本研究で注目したアリの触角上の錐状感覚子は、小さいが複雑な嗅覚感覚ユニットである。膜翅目において特異的に進化した 9 エクソンサブファミリーと呼ばれる大きな嗅覚受容タンパク質ファミリーを形成する CHC 受容タンパク質遺伝子の多様性が、この錐状感覚子に機能的な複雑性を与えている (Engsontia et al., 2015; Zhou et al., 2015; McKenzie et al., 2016; Pask et al., 2017; Slone et al., 2017)。これら 100 種を超える CHC 受容タンパク質の遺伝子群は、錐状感覚子に格納された嗅覚受容神経に各々発現しており、それらの受容神経の軸索は一次嗅覚中枢である触角葉内の T6 領域と呼ばれる特定の領域の同数の糸球体に投射している (Zube et al., 2008; Kelber et al., 2010; Nakanishi et al., 2010; Nishikawa et al., 2012; Kropf et al., 2014; McKenzie et al., 2016; Couto et al., 2017)。

これまで、アリの巢仲間識別のしくみについては、脳において予め形成しておいた巢仲間 CHCs における記憶を鋳型として、新たに遭遇した相手の CHCs におけるその鋳型と比較することによって巢仲間を識別できると考えられて

きた。これは「鑄型仮説」と呼ばれている (Ozaki and Heifetz, 2014)。その仮説によると、錐状感覚子内の嗅覚受容神経は、自身の持つ CHCs を受容し、その定性的および定量的な情報をインパルスに変換して触角葉から脳に送る。ここでは巣仲間の CHCs における鑄型となる記憶を形成するために、関与する神経がネットワークを形成される。そして改めて、別のアリと遭遇した際に、そのアリから CHCs における情報を取得し、脳において記憶されている鑄型との比較によって、巣仲間かどうか判断されると考えられている。従来、錐状感覚子から嗅覚情報が入り、行動が引き起こされるまでの一連の流れの中で、巣仲間の CHCs および非巣仲間の CHCs における情報は、触角葉を介してキノコ体に送られて鑄型と照らし合わされるとされてきた。

しかし、クロオオアリを含む複数のアリ種では、巣仲間識別のために使われるコロニー特異的な CHCs におけるパターンは日々の生活の中で徐々に変化していくため、鑄型としての巣仲間における記憶もまたコロニー特異的な CHCs におけるパターンの変化に応じて絶え間なく更新されていく必要がある (Brandstaetter and Kleineidam, 2011; Brandstaetter et al., 2011; Nishikawa et al., 2012; Ozaki and Hefetz, 2014)。また、同種異巣の働きアリ間の CHCs における差は、においを構成する 18 種類の CHC 成分の相対的な割合の違いのみであるため、このような微妙な定量的な変化を特定の神経回路の活動パターンに変換する仕組みがなければならない。しかし各 CHC 成分の正確な比率を神経情報として高次脳にあげ鑄型と比較するしくみについては未だ知られていない。

このようなことを考慮すると、アリの巣仲間識別に関しては、脳における巣仲間における情報の鑄型形成とその利用とは別に、より末梢のレベルにおけるにおい情報の修飾や選択が行われていても不思議でなないだろう。メスのマウス

は一旦受容して交尾したオスの、フェロモンのにおい記憶をもとに、未知のオスと遭遇した際にはそのオスを拒絶するが、この受容・拒絶の判断のもとになる嗅覚情報は一次嗅覚中枢である副嗅球で処理されることが知られている (Kaba et al., 1989)。そこで、アリにおいても、受容・拒絶の判断を伴う巣仲間識別のためにおい情報処理が高次脳に至る以前になされている可能性も否定できないと考えた。

今回の研究をもとに、脳内での巣仲間のおいに関するにおい情報の記憶の更新に加え、嗅覚情報の末梢感覚器レベルでのフィルター効果や修飾の可能性について考察する。慢性的に自身や巣仲間が持つコロニー特異的な CHCs のにおいにさらされていると、それらの匂いの CHC 成分を受容する受容神経が刺激の強さに応じて順応し、その結果、自己および巣仲間の CHCs におい刺激に対する応答が低下すると考えられる。非巣仲間の CHCs 刺激に対しては、この順応が崩れ、応答がみられることから、Ozaki et al. (2005) は、巣仲間識別については末梢において何らかの嗅覚情報の選択が起きていると考え、「プレフィルター仮説」を提唱した。しかし当時は、感覚子内に、受容神経どうしの相互作用によって情報をふるい分けて選択したり改変したりするシステムが内包されているのではないかという発想に乏しく、そういう働きを実現しうる構造的特徴についての予測は皆無であった。

クロオオアリの錐状感覚子内には、実際に 100 本以上の嗅覚受容神経の感覚突起が伸び出てきている (Ozaki et al., 2005)。今回の研究における感覚子の微細構造観察によって得られた予想外の結果のひとつは、感覚子クチクラ装置の内腔の先端側半分、嗅孔直下の部分に、細胞由来の構造物が見られない空間があるということである (図 1)。CSP (CjapCSP) が多量に溶け込んでいる感覚子リンパで満たされているこの空間は、嗅孔を介して外部環境の化学物質に対し

開放されている (Ozaki et al., 2005; Hojo et al., 2015)。受容神経から伸びる感覚突起の細胞膜、すなわち、受容膜を取り囲む親水性の感覚子リンパは、外部環境から入り込んだ親油性化学物質が受容膜に向かって自由に拡散するのを妨げる。しかしながら、感覚子リンパに多量に溶け込んでいる親油性物質結合タンパク質 CjapCSP が、親油性化合物を選択的に結合して感覚子リンパ中を運搬し、CHC の受容膜への到達を助けていると考えられている。したがって、感覚子内の先端側半分に当たる空間は、CjapCSP への結合性をもつ刺激化学物質だけを受容膜に到達させる、第 1 のフィルターとして機能するということができる。ガの性フェロモン感受性感覚子では感覚子リンパを横切り、嗅孔から受容膜に向かって直接化学物質が通っていきけるようなクチクラの細い管が存在することが報告されているが (Steinbrecht, 1999)、アリの錐状感覚子内にはそのような通路になる細管状のクチクラ構造は見られない。そのため、アリの CHCs は CHC-CjapCSP 複合体となって、拡散によって受容膜に到達するしか方法がないように思われる。働きアリの体表は触角を含めて巣仲間認識に利用されるコロニー特異的な CHC 混合物で覆われている (Wang et al., 2016)。Hojo et al. (2015) のクロオオアリの触角における RNAseq 分析の論文には、錐状感覚子には少なくとも 2 種類の異なる CSP が存在し、それらが同一の感覚子において、別のおい分子を運ぶための異なる機能を有することが示唆されている。

クロオオアリと同属である *Camponotus floridanus* においては、形態的に一様にみえる錐状感覚子に CHCs やその他のにおいを提示し電気生理的実験を行ったところ、感覚子の応答に違いが見られたことから、錐状感覚子には 3 種類のサブタイプが存在すると報告されている (Sharma et al., 2015)。クロオオアリにおいても、これと同様に、錐状感覚子におけるサブタイプが存在する可能性があるが、本形態学的研究においては、サブタイプの存在を示唆するデータが得

られていないため、特にこれを考慮することはできなかった。

クロオオアリにおいては、自己の CHCs は嗅孔から入り込んで CHC-CjapCSP 複合体の形で、触角表層に存在する比率と同じ比率で受容膜を取り巻く感覚子リンパ内に溶け込んで常在していることが示唆されている (Ozaki et al., 2005 の supplementary material 参照)。前述のように、多くのアリ種においてコロニー特異的な CHCs の構成成分の比率は日々経時的に変化することが知られているが (Ozaki and Hefetz, 2014)、感覚器レベルの順応を考えると、自己の CHCs の混合様式が変化したとしてもその時々自己 CHC 構成成分に対応する嗅覚受容神経において個々の成分の量比に応じて順応が進み、脱感作がおけると考えることができる。Ozaki et al. (2005) や Ozaki and Hefetz (2014) によると、錐状感覚子は巢仲間の CHCs に対する応答が弱いのに対し、非巢仲間 CHCs に対しては激しく応答することから、自己 CHCs や巢仲間 CHCs に対する嗅覚受容神経の感度は他の嗅覚受容神経よりも鈍くなっていると述べている。したがって、自己の CHCs を結合した CSP が存在する感覚子内腔の先端部、感覚突起が伸びてきていない空間は、巢仲間や自己 CHCs 情報に対する受容神経の感度を下げることによって、相対的に異種や非巢仲間の CHCs 情報を受け取る受容神経の感受性を高くするための第 2 のフィルターとして機能しているのかもしれない。

さらに、本論文では、クロオオアリの錐状感覚子内の感覚突起間において、ギャップ結合を介する電氣的接続を想定し、嗅覚感覚器における新たなにおい情報修飾機構の可能性を提案した。しかし、昆虫の感覚子の小さなクチクラ装置内の嗅覚受容神経を操作して、例えば隣り合った嗅覚受容神経間のダイカップリングを調べるなどの実験は技術的に困難であり、今のところ直接的な証拠を得ることは困難である。

それでも、図 2、5、7、補足図 1 に示した形態学的データは錐状感覚子内の微小ネットワークの存在を支持している。図 2 に示した、特徴的なビーズ構造が見られる 102 本の感覚突起の束の全体の形態は、全ての感覚突起がより合わさり網のような構造になることで、互いに隣接した感覚突起どうしがリンパ内で支え合い、安定的に存在できるようになっているかにみえる。図 5 はビーズ部分で感覚突起膜が密着している様子を示している。また図 7、10、補足図 1 を合わせて考えると、錐状感覚子内の近位側半分に CjapInx3 が局在すること（補足図 1 A-C）、さらに、ビーズ部分における密着領域の分布と抗 CjapInx3 抗血清標識の輝度分布が重複していることが分かる（補足図 1 E）。本研究では、錐状感覚子における感覚突起間の密着領域の数を正確に数え上げ、すべての感覚突起に沿ってそれらの分布を示した（図 6）。本論文で例示したサンプルにおいては、触角クチクラ表面より先端側の位置には 191 個の密着領域が、またそれより基部側には 505 個もの密着領域が見られた。このことは、クロオオアリの錐状感覚子における神経ネットワーク形成におけるギャップ結合の関与を強く示唆している。

クロオオアリの触角には CjapInx3 のほかに 4 種類のイネキシンが発現していることがわかっている（図 9）。すべてのイネキシンタンパク質に対する特異的抗血清を得ることはできなかったものの、CjapInx2、CjapInx3、CjapInx8 に対する抗血清はすでに作成できており、CjapInx2、CjapInx8 は CjapInx3 が存在する錐状感覚子内（補足図 1）とは異なる領域に局在していた（Uebi et al., 未発表）。感覚子内に見られる細胞要素としては、嗅覚受容神経由来の感覚突起のみが認められ（図 1~3）、それらの感覚突起を伸ばしている受容神経の細胞体は感覚子の基部、触角表面よりも近位に位置している。感覚突起内には、細胞膜の陥入を除いて、細胞内膜構造はほとんどみられない。目に見える細胞内器官とし

では、感覚突起内に存在する多数の微小管と、感覚子の基部において結合繊維だけが認められる（図 1）。感覚突起内に細胞膜のターンオーバーに用いられる膜小胞がみられるはずだが殆ど認められなかった。したがって、イネキシンのような膜タンパク質が感覚子の内部で免疫組織学的に検出された場合には、感覚突起の細胞膜上に位置すると考えられる。

CjapInx3 がクロオオアリの錐状感覚子内の感覚突起にあるビーズ構造に局在し、それがギャップ結合を形成することを確認するためには電子顕微鏡レベルでのさらなる免疫組織学的調査および電気生理学的手法を用いた機能的な研究が必要である。しかし、今回の研究の構造的データと、後述する数学的モデリングによって、ギャップ結合による感覚突起どうしのカップリングが、感覚子内で嗅覚情報を修飾する第 3 のフィルターとして働くことが示唆される。

数学的シミュレーションにより提案された錐状感覚子におけるマイクロネットワークの推定機能

神経突起上のビーズ構造、ないしそれと類似の構造については、古くは哺乳類の神経軸索において報告されており（Ochs, 1963）、昆虫触角上の嗅覚感覚子内の受容神経感覚突起についていえば、フェロモンに暴露した生殖齢に達した雄のゴキブリの触角上のフェロモン感覚子の感覚突起上にビーズ構造が観察され、その観察頻度はゴキブリの求愛活動が高まる夜間に多くなる傾向がみられた（Marianna and Kapitsky, personal communication at ESITO 2015）。雄のカイコガヤスズメガの性フェロモン感覚子内の感覚突起の微細構造についての報告の中にも特に感覚突起上のビーズ構造に注目したものがある（Keil, 1984a, b, 1989）。これらの研究においては、雄のガの感覚子からフェロモン受容神経をシ

ヤーレのリンガー中に無固定のまま遊離させ、生きた受容神経の感覚突起をその後 30 分間程度光学顕微鏡下で経時的に観察すると、ビーズが感覚突起上を 1 分間に約 1 μm の速さで移動したことが認められている (Williams, 1988)。この感覚突起の受容膜にフェロモン刺激を与えたり損傷を与えたりして、ビーズ構造の消長が、刺激の受容経験の有無に関係すると思われること、さらに、ビーズの移動が、感覚突起を通じた受容膜の代謝や修復に関わることが、考察されている。したがって、昆虫の嗅覚感覚子内の受容神経感覚突起上に現れるビーズ構造の存在自体が固定によるアーティファクトである可能性は既に除外されていると考えてよいだろう。しかし、その後、昆虫嗅覚受容神経の感覚神経突起上のビーズ構造に関する論文はほとんどなく、その働きについての議論は依然として確かといえるものではなかった。これまで、いかなる動物種においても、嗅覚受容神経ネットワークの潜在的役割を、誰も提唱していない。アリの錐状感覚子はガの性フェロモン感覚子よりもはるかに複雑な嗅覚感覚ユニットであり、これまでに知られていた感覚突起上のビーズ構造は、クロオオアリの錐状感覚子におけるものほど数量的に大規模なものではなかったため、本研究は、においに対する神経応答、行動応答の修飾に関与する可能性を持つビーズ構造にスポットをあてた最初の報告であるといえる。

そこで、簡略化した数学的モデルを考えることにより、感覚突起を模して仮想的に作られたマイクロネットワークにおいて、その感覚突起間の連絡がインパルス発生部位、つまり、電位依存性チャネルの存在部位、とされる感覚子基部近くに想定された場合に、より強い入力であれば情報を拡散しより弱い入力であれば情報を断つといったように、入力の強弱という特定の条件に依存したフィルターとして機能することが示唆された。今回、簡略化した数学的モデルを導入した目的は、複数の受容神経の感覚突起間にギャップジャンクションが存在す

るときに何が起こるかを数値的に調べることに焦点を絞ったものである。そこで、実際は 102 本ある感覚突起の束をおよそ 10 分の 1 の規模に縮小して 10 本の感覚突起を平面に展開したモデルを想定した。また、クロオオアリの CHCs の個々の成分で単一の錐状感覚子を刺激し、得られたインパルス応答のラスタ解析を施したとき、数種類のインパルスの発生が認められ、これらのインパルスは同数の個別の受容神経に由来する活動電位と考えられることから (Watanabe et al., 未発表)、10 本の仮想感覚突起のうち任意の 7 本に入力刺激を与えることにした。

実際の昆虫の嗅覚感覚子内の受容神経においては、嗅孔に近い感覚突起最先端近く (補足図 2、3A の第 1 コンパートメントに相当する) において受容体分子が刺激物質を受容することによってチャンネルが開き、内向き電流が生じる (Steinbrecht, 1999)。内向き電流は一定の減衰をしながら感覚突起内を基部 (補足図 2、3 の第 10 コンパートメントに相当する) へ向かって流れ、基部において電位依存性のチャンネルを開けてインパルスを生じる。インパルスを生じるための電位依存性のチャンネルは、感覚突起全体に分布しているのではなく、基部のコンパートメントに集中して局在している (密度は不明)。今回は、このような既知の条件に従ってモデルを立て、ケーブル理論を適用するため、図 2A、3A のように、#1 から #10 の 10 本の各ケーブルを第 1 から第 10 のコンパートメントに区切り、最も遠位の第 1 コンパートメントをイオンチャンネル内蔵型受容体が関与する情報変換機構を有する入力端に、最も近位の第 10 コンパートメントを電位依存性イオンチャンネルが関与するインパルス発生機構を有する能動的な出力端コンパートメント (他はすべて受動的なコンパートメントとして考える) に見立てている。実際の嗅覚受容神経の感覚突起は、一様ではなくそれぞれに違いがあると予想されるが、ここでは、均一な電気的性質をもつケーブルと

している。

まず、ギャップ結合がない場合に、入力端（補足図 2、3 の第 1 コンパートメントに相当する）から十分な内向き電流を入力すると出力端（補足図 2、3 の第 10 コンパートメントに相当する）からインパルスを生じるための外向き電流が出力されるように設定をしている。そのうえで、ケーブルの入力端から出力端までを 10 コンパートメントに区切り第 1 から第 10 までの通し番号を付けたときに、第 3（先端側）、第 5（中央）、第 9（末端側）のそれぞれのコンパートメント部分にギャップ結合を模した電氣的連絡が存在した場合の入力 - 出力関係を強い入力を与えた場合と弱い入力を与えた場合に分けて計算しそれぞれ補足図 2 および 3 に示してある。なお、ここには示していないが、仮想感覚突起の数を 10 本から 20 本に増やし、任意の 7 本に入力刺激を加えても、基本的に同じ現象が起きることが確かめられている (Takeichi et al., 2018)。

ここで、アリの CHC 感覚子の入力電流の強弱がどのような場合に生じる可能性があるか、もう少し論を進める。上述したように、アリの錐状感覚子内の嗅覚受容神経は、触角表面上に絶えず分泌される自己 CHCs にさらされていると考えられる。そのため、非巢仲間の CHCs よりも自己 CHCs と似ている巢仲間の CHCs に対する感度は大きく落ちていると考えられる。この感度の差により、巢仲間 CHCs によって誘発される入力電流は、非巢仲間 CHCs によって誘発される入力電流よりも弱くなると予想できる。巢仲間 CHCs によって誘発される弱い入力電流が生じた場合は補足図 3 に示されるように直接入力を受けた感覚突起のインパルスの発生さえも抑えられてしまう傾向が予想される。より弱い入力電流は、隣接する受容神経に分割された後、インパルス発生部位に到達しても、それぞれの神経のインパルス発生閾値以下まで弱められてしまうためである。

一方、非巢仲間 CHCs によって発生するより強い入力電流は、直接刺激を受

ける受容神経だけでなく、直接刺激を受けていない隣接する受容神経においてもインパルスを誘発する可能性がある（補足図2）。この数学モデルでは、感覚突起を模したケーブルどうしがインパルス発生部位に近い場所で接続されている場合にのみ、そのような効果がもたらされることが分かった。

ところが、Brandstaetter and Kleineidam（2011）による報告では、巣仲間 CHCs を提示した時でも触角葉の糸球体が活性化されていた。末梢での巣仲間 CHCs に対するインパルス発生の抑制は提示された刺激の強さ、この場合は巣仲間 CHCs の量の如何によっては完全に機能しないことを示唆していると思われる。しかし、場合によって不完全ではあれ、適当量の、通常とは異なるにおい、または全く新規なにおいを敏感に検出するのに有利に働くこの仕組みは、巣仲間識別において非巣仲間と巣仲間に対する攻撃行動のオン・オフを即時に切り替える上で重要な役割を果たすと考えられる。

動物の行動意思決定において、対向する個体の個々のにおいを感度よく細かく分析して個別に認識するためには、このような、それぞれの受容神経が受け取った情報を近隣の神経どうしで分けもつような仕組みは優れたシステムとはいえないだろう。しかし、その生物学的意味を考える際、対向する個体を出身コロニーの如何を問わず巣仲間と非巣仲間に分けて素早く区別し、非巣仲間と判断した個体に対して即座に闘争行動をとる、そのために有利なにおい識別の仕組みとして発達してきたシステムと考えることも可能であろう。また、アリ社会の単位であるそれぞれのコロニーに帰属する個体のアイデンティティーを示す CHCs の混合パターンは日を追って変化するのである。そのため過去の巣仲間においては、2週間たつと半数の巣仲間から敵のにおいとして認識され攻撃される標的へと変化することになる（Ozaki and Hefetz, 2014）。たとえそうであっても、自己と巣仲間においては巣ごとの働きアリの CHCs の匂いの経時的な変

化に同調して同じように変化するので、この状況においても、自他の匂いの比較、殊に、自己と非巢仲間のにおいの差分と自己と巢仲間のにおいの差分の違いを明瞭にして末梢から中枢へ送れば、その情報を、攻撃行動をとるか否かの判断に用いることができる。末梢において、自己と巢仲間のにおいの差分に由来する比較的小さな入力からは抑制された出力が生じ、自己と非巢仲間のにおいの差分に由来する比較的大きな入力からは隣接する受容神経をも巻き込む拡散した出力が生じる。このような、入力-出力関係の転換を可能にする「プレフィルター」の構造実体は、「プレフィルター仮説」が提唱されてから今日まで明らかにされてこなかった。本学位論文において筆者は、長い間懸案であったこの問題を取り上げ、感覚子内のネットワークシステムを「プレフィルター」の構造実体の有力な候補として提案する。このような末梢の「プレフィルター」は、一定しないコロニー特有の巢仲間のにおいの記憶や刷り込みによって構成される「鋳型」に依存する中枢の巢仲間識別機構を主張する「鋳型仮説」の弱点を補うものであるといえる。

昆虫における嗅覚受容神経間の相互作用の可能性と今後の展望

最近、昆虫の感覚子のようなクチクラに囲まれた狭い空間に格納された、互いに隣接している嗅覚受容神経どうしにおいて、応答している神経から近隣の他の神経に対し阻害効果や増強効果が及ぼされることが知られるようになり ephaptic coupling 効果と呼ばれている (White et al., 1990; Su et al., 2012; Van der Goes van Naters, 2013; Chen, 2015; Miriyala et al., 2018)。アリの錐状感覚子の場合にも、ephaptic coupling 効果は無視できないかもしれないが、他の

昆虫の化学感覚器でこれまでに報告されている *ephaptic coupling* に比べると、接続部分の可塑的な変更が可能なギャップ結合による接続の方に何らかの利点があるかもしれない。まだ実験的な証明には至っていないが、クロオオアリの錐状感覚子では、年齢、性別、カースト、あるいは社会的役割によって、機能的結合部位が変化するらしいことが明らかになりつつある。Sharma ら (2015) は電気生理学的データに基づいて、*C. floridanus* の触角には機能的に異なる錐状感覚子のサブタイプが存在すると示唆した。ギャップ結合ネットワークは可塑的に構築できるため、機能的な観点から報告された錐状感覚子のサブタイプは、それぞれの役割によって違った形の神経ネットワークの形状をとるようになった錐状感覚子と考えることができるかもしれない。

本研究では、クロオオアリの錐状感覚子における微細構造を明らかにし、そこに受容神経どうしの相互作用のためのプラットフォームとしての特徴的なビーズ構造を見出した。しかし、SBF-SEM 観察画像から再構築したビーズの形状は概ね球形に近かったのに対し (図 1、2)、同じ固定法を用いて作成した試料の TEM 画像のビーズ部分の横断面はいびつで、球形の推定形状を示すものではなかった (図 3、4)。この矛盾は、主に電子顕微鏡試料の固定の良し悪しによるものと推察された。固定液の浸透の悪いクチクラに囲まれた感覚子の微細構造内の神経組織を適切に化学固定することは容易ではないが、さらに、最適条件を見出す、あるいは、化学固定ではなく、加圧凍結置換法を試みるなどして電子顕微鏡の試料作成法を改良する余地がある。感覚突起どうしの連絡がビーズの部分で生じる必然性についてはこれまで何も言及してこなかったが、実際、観察した 9 つの錐状感覚子試料の SBF-SEM 画像を目視で確かめた限りにおいては、ビーズでない部分で、感覚突起どうしが密に接着している事例はほとんど見いだせなかった。現在、共同研究者らが、筆者の目視による判断を初期の教師事例

としてディープラーニングを用いる錐状感覚子連続横断面の電子顕微鏡連続画像解析プログラムをつくり、図2で用いた感覚子の画像データについてのセグメンテーション解析を進めているが、その結果からも、感覚突起どうしがビーズでない部分で密に接着している場面は見出されていない (Takaya et al., 2019)。すなわち、この semi-supervised learning プログラムを用いて検証する限りにおいては、ビーズ以外の部分に存在する感覚突起どうしの連絡が目視によって抽出されずに見過ごされていたというような可能性は小さいといえる。もっとも、これまでに観察した感覚子の数はそれほど多くなく、ビーズでない部分で、感覚突起どうしが、密に接着している事例が無いとは言い切れない。今後は、このプログラムを使用することにより、同様の画像解析が効率よく進められるようになると予想されるため、多くの試料についての検証が格段に容易になりこの疑問は遠からず解明されると考える。現行の SBF-SEM 用の試料のためのブロック染色法は通常の TEM 用の試料の超薄切片染色法にくらべ細胞膜構造の染色が明瞭でない。ギャップ結合の膜-膜間の距離は数 nm といわれているが、膜の染色が不明瞭であるぶん、どちらかという目視による接点の数は過大に見積もられる恐れがあることを銘記しておく必要がある。

いずれにしても、今回の錐状感覚子の形態学的研究だけから、その微細構造に基礎を置く錐状感覚子の全体システムとしての機能性を洞察するのには限りがある。実験的限界を補うために数学的シミュレーションの結果 (Takeichi et al., 2018) に照らして、新に発見されたビーズ構造とそれに依存する神経ネットワークについて、情報の改変、修飾に関与する可能性をもつ機能を推定することはある程度有効であったが、シミュレーションによって予見される嗅覚情報の改変をより強く示唆するためには、免疫電子顕微鏡法および電気生理学的実験による、より説得力のある機能的証明が、将来において必要となると考えられる。

ここで共同研究者が行った簡略化した数学モデルのシミュレーション実験は、感覚突起間の相互連絡を担うギャップ結合 (図 6 参照) を現実に即して実装した数学モデルを作成し *in silico* 実験を行う前段階として、この様な相互連絡が感覚子全体の働きを修飾しうるかどうかを探るためのパイロット実験と位置づけられる。今回この簡略化モデルを使ったシミュレーション実験において、入力刺激の強さと感覚突起間相互連絡の位置の条件によって、それぞれに入力刺激が修飾されて出力応答が生じる可能性が示唆されるに至り (補足図 2、3)、現実に即した数学モデルを使った次の段階の *in silico* 実験にむけ準備ができるようになったといえる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である尾崎まみこ教授には、忍耐強く、丁寧な指導をしていただいた。ここに感謝の意を表す。

電子顕微鏡用の試料作成と TEM 実験は、川崎医科大学に出向いて行った。使用したアリは神戸大学で採集したものを守山禎之助教授が川崎医科大学の研究室で飼育していたものを譲っていただいた。川崎医科大学の泰山浩司教授には TEM 用の固定、染色など試料作成から超薄切片の作成、検鏡まで電子顕微鏡実験の基礎を教えていただいた。SBF-SEM 実験は、生理学研究所との共同研究として行った。生理学研究所の村田義和教授と宮崎直幸助教には、実験の手ほどきとディスカッションで大変お世話になった。UHV-TEM 実験は大阪大学超高压電子顕微鏡との共同研究として行った。井上加奈子助教、梶村直子研究員には、超高压電子顕微鏡用の切片の作成、検鏡、断層像構築について大変お世話になった。抗イネキシン 2 (カイコガ) 抗体は京都工芸繊維大学の遠藤泰久教授から譲渡していただいた。さらに、考察における討論を深めるために、感覚子内のネットワークを簡略化した数学モデルを組み、PC 上で仮想的な神経ネットワーク実験をくださった、北海道大学理学研究科の久保英夫教授、神戸大学工学研究科の大森敏明准教授、大森研究室の大学院生の高野城さんと、SBF-SEM の画像からギャップ結合を抽出する作業を効率よく進めることができるように、ディープラーニングを用いた画像解析プログラムの開発に多大な貢献をして下さった、慶応大学理工学研究科の栗原聡教授、栗原研究室の大学院生の高屋英知さんに感謝の意を表す。

また、洲崎敏伸准教授、上尾達也研究員はじめ尾崎研究室の皆様の助力なしには、本研究は成しえなかったと思う。ここに心より感謝の意を表す。

引用文献

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1994). Cell junction, cell adhesion, and the extracellular matrix, in *Essential Cell Biology* 3rd edition, 950-962.

Brandstaetter, A. S., Endler, A., and Kleineidam, C. J. (2008). Nestmate recognition in ants is possible without tactile interaction. *Naturwissen.* 95, 601–608. doi: 10.1007/s00114-008-0360-5

Brandstaetter, A. S., and Kleineidam, C. J. (2011). Distributed representation of social odors indicates parallel processing in the antennal lobe of ants. *J. Neurophysiol.* 106, 2437–2449. doi: 10.1152/jn.01106.2010

Brandstaetter, A. S., Rössler, W., and Kleineidam, C. J. (2011). Friends and foes from an ant brain's point of view – neuronal correlates of colony odors in a social insect. *PLoS ONE* 6:e21383. doi: 10.1371/journal.pone.0021383

Chen, Y.-C. (2015). The interactions between bitter and sweet taste processing in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 35, 9542–9543. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1552-15.2015

Couto, A., Mitra, A., Thiéry, D., Marion-Poll, F., and Sandoz, J. C. (2017). Hornets have it: a conserved olfactory subsystem for social recognition in hymenoptera? *Front Neuroanat.* 11:48. doi: 10.3389/fnana.2017.00048

de Fouchier, A., Walker, W. B. III, Montagné, N., Steiner, C., Binyameen, M., Schlyter,

F., Chertemps, T., Maria, A., François, M., Monsempes, C., Anderson, P., Hansson, B. S., and Larsson, M. C. (2017). Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nat. Commun.* 8:15709. doi: 10.1038/ncomms15709

Dussutour, A., and Simpson, S. J. (2008). Description of a simple synthetic diet for studying nutritional responses in ants. *Insectes Sociaux* 55, 329–333. doi: 10.1007/s00040-008-1008-3

Engsontia, P., Sangket, U., Robertson, H. M., and Satasook, C. (2015). Diversification of the ant odorant receptor gene family and positive selection on candidate cuticular hydrocarbon receptors. *BMC Res.* 8:380. doi: 10.1186/s13104-015-1371-x

Fushiki, D., Yoshimura, R., and Endo, Y. (2010a). Immunocytochemical study of gap junction-related protein, innexin 2, in *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) *Appl. Entomol. Zool.* 45(2):245-251. doi: 10.1303/aez.2010.245

Fushiki, D., Yoshimura, R., and Endo, Y. (2010b). Phylogenetic and bioinformatic analysis of gap junction-related proteins, innexins, pannexins and connexins. *Biomed. Res.* 31 (2) 133-142. doi: 10.2220/biomedres.31.133

Gilbert, P. (1972). Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections. *J. Theor. Biol.* 36, 105–117. doi: 10.1016/0022-5193(72)90180-4

Guerrieri, F. J., and d’Ettorre, P. (2008). The mandible opening response: quantifying aggression elicited by chemical cues in ants. *J. Exp. Biol.* 211, 1109–1113. doi: 10.1242/jeb.008508

Guerrieri, F. J., Nehring, V., Jørgensen, C. G., Nielsen, J., Galizia, C. G., and d’Ettorre, P. (2009). Ants recognize foes and not friends. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2461–2468. doi: 10.1098/rspb.2008.1860

Hallberg, E., and Hansson, B. S. (1999). Arthropod sensilla: morphology and phylogenetic considerations. *Insect Sens. Struct.* 47, 428–439. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19991215)47:63.0.CO;2-P

Hansson, B. S., and Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of insect olfaction. *Neuron* 72, 698–711. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.003

Haupt, S. S., Sakurai, T., Namiki, S., Kazawa, T., and Kanzaki, R. (2010). “Chapter 3. Olfactory information processing in moths,” in *The Neurobiology of Olfaction*, ed A. Menini (Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor and Francis), 71–112.

Hojo, M. K., Ishii, K., Sakura, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., and Ozaki, M. (2015). Antennal RNA-sequencing analysis reveals evolutionary aspects of chemosensory proteins in the carpenter ant *Camponotus japonicus*. *Sci. Rep.* 5:13541. doi: 10.1038/srep13541

Holcroft, C.E., Jackson, W.D., Lin, W.H., Bassiri, K., Baines, R.A., Phelan, P. (2013). Innexins Ogr and Inx2 are required in glial cells for normal postembryonic development of the *Drosophila* central nervous system. *J Cell Sci.* 126, 3823-34. doi: 10.1242/jcs.117994.

Hölldobler, B. (1995). The chemistry of social regulation: multicomponent signals in ant societies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 19–22. doi: 10.1073/pnas.92.1.19

Kaba, H., Rosser, A., Keverne, B. (1989). Neural basis of olfactory memory in the context of pregnancy block. *Neuroscience.* 32, 675-662. doi: 10.1016/0306-4522(89)90287-X

Kaissling, K.-E. (1987). *Wright Lectures on Insect Olfaction*. Burnaby, BC: Simon Fraser University.

Keil, T. A. (1984a). Surface coats of pore tubules and olfactory sensory dendrites of a silkmoth revealed by cationic markers. *Tissue Cell* 16, 705–717. doi: 10.1016/0040-8166(84)90004-1

Keil, T. A. (1984b). Reconstruction and morphometry of silkmoth olfactory hairs: a comparative study of sensilla trichodea on the antennae of male *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi* (Insecta, Lepidoptera). *Zoomorphology* 104, 147–156. doi: 10.1007/BF00312133

Keil, T. A. (1989). Fine structure of the pheromone-sensitive sensilla on the antenna of

the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* 21, 139–151. doi: 10.1016/0040-8166(89)90028-1

Kelber, C., Rössler, W., and Kleineidam, C. J. (2010). Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (*A. vollenweideri*). *Dev. Neurobiol.* 70, 222–234. doi: 10.1002/dneu.20782

Kidokoro-Kobayashi, M., Iwakura, M., Fujiwara-Tsujii, N., Fujiwara, S., Sakura, M., Sakamoto, H., Higashi, S., Hefetz, A., and Ozaki, M. (2012). Chemical discrimination and aggressiveness via cuticular hydrocarbons in a supercolony-forming ant, *Formica yessensis*. *PLoS ONE* 7:e46840. doi: 10.1371/journal.pone.0046840

Kremer, J. R., Mastrorarde, D. N., and McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116, 71–76. doi: 10.1006/jsbi.1996.0013

Kropf, J., Kelber, C., Bieringer, K., and Rössler, W. (2014). Olfactory subsystems in the honeybee: sensory supply and sex specificity. *Cell Tissue Res.* 357, 583–595. doi: 10.1007/s00441-014-1892-y

Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103, 767–776. doi: 10.1083/jcb.103.3.767

Lahav, S., Soroker, V., Hefetz, A., and Vander Meer, R. K. (1999). Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissen.* 86, 246–249. doi: 10.1007/s001140050609

Leonhardt, S. D., Menzel, F., Nehring, V., and Schmitt, T. (2016). Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell* 164, 2177–1287. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.035

McKenzie, S. K., Fetter-Pruneda, I., Ruta, V., and Kronauer, D. J. C. (2016). Transcriptomics and neuroanatomy of the clonal raider ant implicate an expanded clade of odorant receptors in chemical communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 14091–14096. doi: 10.1073/pnas.1610800113

Miriyala, A., Kessler, S., Rind, F. C., and Wright, G. A. (2018). Burst firing in bee gustatory neurons prevents adaptation. *Curr. Biol.* 28, 1585.e3–1594.e3. doi: 10.1016/j.cub.2018.03.070

Mizunami, M., Yamagata, N., and Nishino, H. (2010). Alarm pheromone processing in the ant brain: an evolutionary perspective. *Front. Behav. Neurosci.* 4:28. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00028

Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M., and Campbell, S. L. (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93, 8312–8317.

Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., and Nishikawa, M. (2009). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Res.* 338, 79–97. doi: 10.1007/s00441-009-0863-1

Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., and Nishikawa, M. (2010). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: glomerular organizations of antennal lobes. *J. Comp. Neurol.* 518, 2186–2201. doi: 10.1002/cne.22326

Nick, B., and d’Ettorre, P. (2012). Recognition of social identity in ants. *Front. Psychol.* 3:83. doi: 10.3389/fpsyg.2012.00083

Nishikawa, M., Watanabe, H., and Yokohari, F. (2012). Higher brain centers for social tasks in worker ants, *Camponotus japonicus*. *J. Comp. Neurol.* 520, 1584–1598. doi: 10.1002/cne.23001

Ozaki, M., and Hefetz, A. (2014). Neural mechanisms and information processing in recognition systems. *Insects* 5, 722–741. doi: 10.3390/insects5040722

Ochs, S. (1963). Beading phenomena of mammalian myelinated nerve fibers. *Science* 139, 599–600. doi: 10.1126/science.139.3555.599

Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K., and Fujiyoshi, Y. (2016). Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. *J Mol Biol*, 428(6), 1227-1236.

Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nishimura, T., and Yamaoka, R. (2005). Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309, 311–314. doi: 10.1126/science.1105244

Pask, G. M., Slone, J. D., Millar, J. G., Das, P., Moreira, J. A., Zhou, X., Bello, J., Berger, S. L., Bonasio, R., Desplan, C., Reinberg, D., Liebig, J., Zwiebel, L. J., and Ray, A. (2017). Specialized odorant receptors in social insects that detect cuticular hydrocarbon cues and candidate pheromones. *Nat. Commun.* 8:297. doi: 10.1038/s41467-017-00099-1

Paul, D. L. (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103,123-134. doi: 10.1083/jcb.103.1.123

Phelan, P., Bacon, J. P., Davies, J. A., Stebbings, L. A., Todman, M. G., Avery, L., Baines, R. A., Barnes, T. M., Ford, C., Hekimi, S., Lee, R., Shaw, J. E., Starich, T. A., Curtin, K. D., Sun, Y., and Wyman, R. J. (1998). Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.* 14, 348–349. doi: 10.1016/S0168-9525(98)01547-9

Sharma, K. R., Enzmann, B. L., Schmidt, Y., Moore, D., Jones, G. R., Parker, J., Berger, S. L., Reinberg, D., Zwiebel, L. J., Breit, B., Liebig, J., and Ray, A. (2015). Cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. *Cell Rep.*

12, 1261–1271. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.031

Slone, J. D., Pask, G. M., Ferguson, S. T., Millar, J. G., Berger, S. L., Reinberg, D., Liebig, J., Ray, A., and Zwiebel, L. J. (2017). Functional characterization of odorant receptors in the ponerine ant, *Harpegnathos saltator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 8586–8591. doi: 10.1073/pnas.1704647114

Steinbrecht, R. A. (1999). "Olfactory receptors," in *Atlas of Arthropod Sensory Receptors –Dynamic Morphology in Relation to Function*, eds E. Eguchi and Y. Tominaga (Tokyo: Springer), 155–76.

Steinbrecht, R. A. (2007). "Structure and Function of Insect Olfactory Sensilla": 158–183. doi:10.1002/9780470514948.ch13. ISSN 1935-4657.

Su, C.-Y., Menuz, K., Reisert, J., and Carlson, J. R. (2012). Non-synaptic inhibition between grouped neurons in an olfactory circuit. *Nature* 492, 66–71. doi: 10.1038/nature11712

Takaya, E., Takeichi, Y., Ozaki, M., and Kurihara, S. (2019). Neuronal structure segmentation in serial electron microscopy images using semi-supervised learning. *Proceedings of IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI2019)*. [1http://imagej.net/Segmentation evaluation after border thinning Script](http://imagej.net/Segmentation%20evaluation%20after%20border%20thinning%20Script)

Takeichi, Y., Uebi, T., Miyazaki, N., Murata, K., Yasuyama, K., Inoue, K., Suzaki, T.,

Kubo, H., Kajimura, N., Takano J., Omori, T., Yoshimura, R., Endo, Y., Hojo, M. K., Takaya, E., Kurihara, S., Tatsuta, K., Ozaki, K., and Ozaki, M. (2018). Putative Neural Network Within an Olfactory Sensory Unit for Nestmate and Non-nestmate Discrimination in the Japanese Carpenter Ant: The Ultra-structures and Mathematical Simulation. *Front Cell Neurosci.* 12: 310. doi: 10.3389/fncel.2018.00310

Van der Goes van Naters, W. (2013). Inhibition among olfactory receptor neurons. *Front. Hum. Neurosci.* 7:690. doi: 10.3389/fnhum.2013.00690

Vander Meer, R. K. (1998). *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, CO: Westview Press.

Wang, Q., Goodger, J. Q., Woodrow, I. E., and Elgar, M. A. (2016). Location-specific cuticular hydrocarbon signals in a social insect. *Proc. Biol. Sci.* 283:20160310. doi: 10.1098/rspb.2016.0310

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The Raf proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 875-885.

White, P. R., Chapman, R. F., and Ascoli-Christensen, A. (1990). Interactions between two neurons in contact chemosensilla of the grasshopper, *Schistocerca Americana*. *J. Comp. Physiol. A* 167, 431–436. doi: 10.1007/BF00192578

Williams, J. L. D. (1988). Nodes on the large pheromone-sensitive dendrites of olfactory

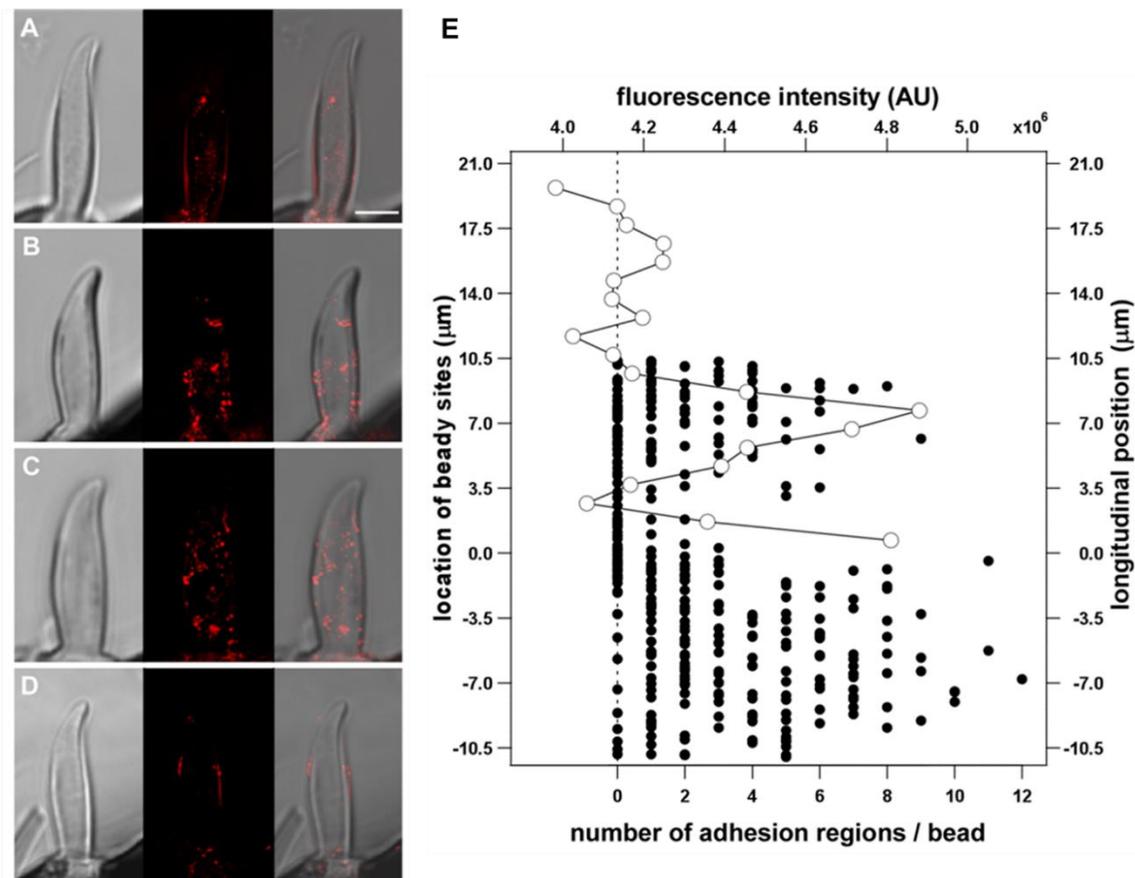
hairs of the male silkworm, *Antheroepolyphemus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae).

Int. J. Insect Morphol. Embryol. 17, 145–151. doi: 10.1016/0020-7322(88)90008-6

Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P. (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102 (4), 533–539.

Zhou, X., Rokas, A., Berger, S. L., Liebig, J., Ray, A., and Zwiebel, L. J. (2015). Chemoreceptor evolution in hymenoptera and its implications for the evolution of eusociality. *Genome Biol. Evol.* 7, 2407–2416. doi: 10.1093/gbe/evv149

Zube, C., Kleineidam, C. J., Kirschner, S., and Nee, f., J., Rössler, W. (2008). Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Comp. Neurol.* 506, 425–441. doi: 10.1002/cne.21548

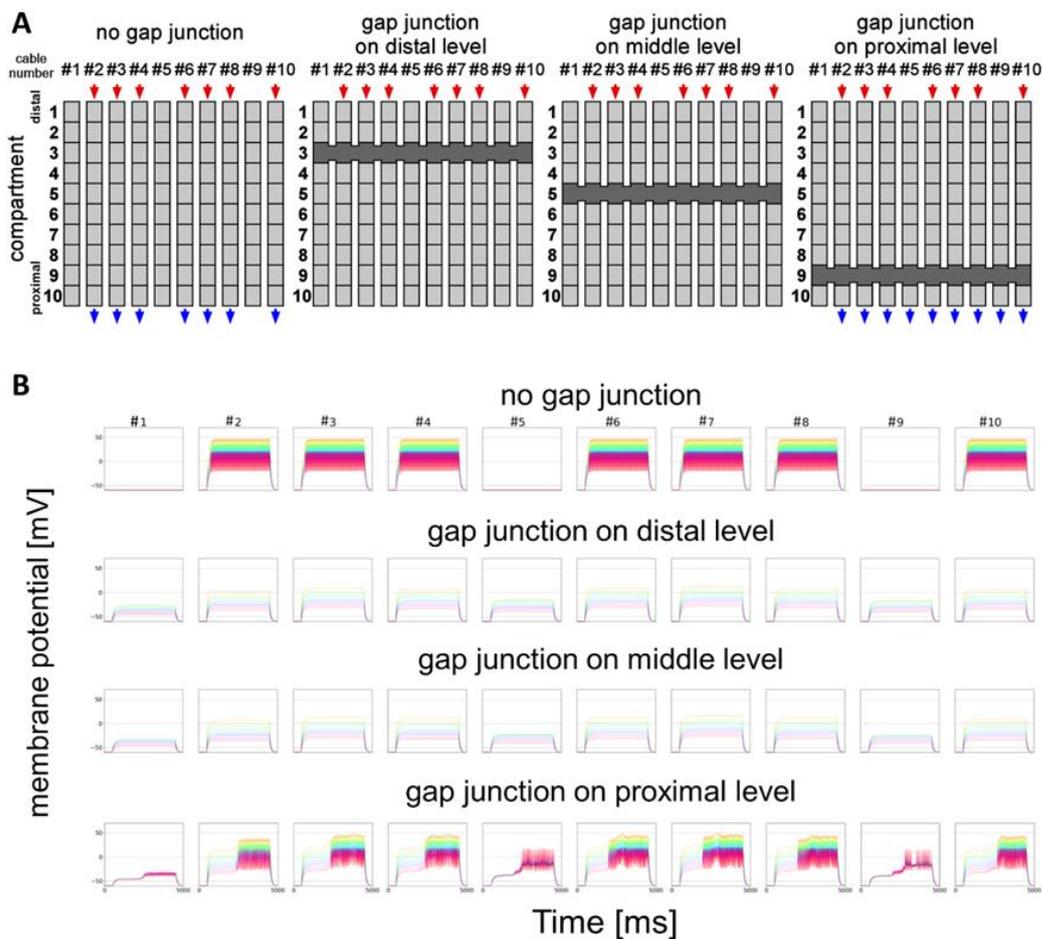


補足図1 抗 CzapInx3 抗血清による錐状感覚子の免疫組織染色と内部シグナルの分布

(A~C) 抗クロオオアリイネキシン 3 抗体で処置をした錐状感覚子の長軸方向の微分干渉画像 (左) と蛍光画像 (中央) およびそれらを重ね合わせた画像 (右)。

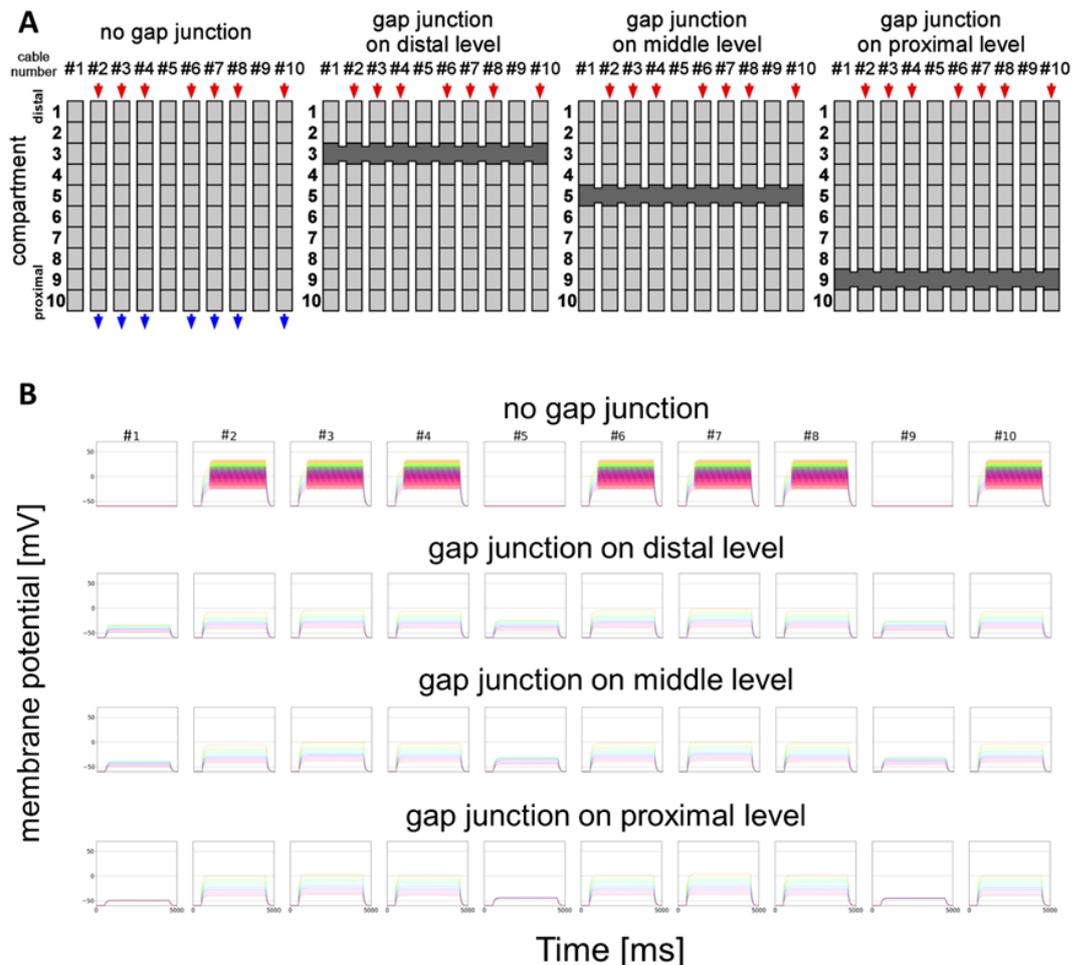
(D) 免疫前血清で処置をした錐状感覚子の長軸方向の微分干渉画像 (左) と蛍光画像 (中央) およびそれらを重ね合わせた画像 (右)。スケールバーは 5μm。

(E) CzapInx3 の局在を示す蛍光シグナルの分布とビーズ構造における密着領域の数の分布比較。白丸は、(A) に示した錐状感覚子の軸に沿った CzapInx3 の局在を示す蛍光シグナル強度を示す。(A) の蛍光画像をもとに、蛍光強度 (横軸) を感覚子の長軸方向に積み重ねた $1 \times 1 \times 0.64 \mu\text{m}$ の直方体区画毎に測り、蛍光測定区画の位置を示す右側の縦軸目盛りに対してプロットした。黒丸は、図7と同じビーズ構造とそこに見られる密着領域の分布を示す。



補足図2 ギャップ結合による相互の結合を持つ10本の疑似的受容神経応答の多コンパートメント（10コンパートメントのケーブル理論を適用）モデルのシミュレーション結果：簡略化数学モデルに強い刺激を入力した場合

(A) シミュレーションに用いたネットワーク構造。濃いグレーはギャップ結合による異なるケーブルどうしの電気的結合を有するコンパートメントを示す。赤矢印および青矢印はそれぞれ刺激入力とそれによって生じるインパルス出力を示す。(B) ギャップ結合の有無と位置によって異なる4通りのパターンの応答を示す。刺激によって誘起された受容電流の影響による膜電位変化は第1コンパートメントから第10コンパートメントまで時間を追って現れるが、第10コンパートメントに達した膜電位変化によって誘発されるインパルス応答のコンパートメントごとにおける観測を濃い色のトレースで示してある（第1から第10コンパートメントにおけるインパルス応答のトレースはオレンジ、黄、黄緑、緑、シアン、空色、青、紫、ピンク、赤の順）。薄い色のトレースはインパルス発生に関わらない閾値以下の膜電位変化のトレースである。本シミュレーション結果は高野、久保、大森より許可を得て記載 (Takeichi, et al., 2018 参照)。



補足図3 ギャップ結合による相互の結合を持つ10本の疑似的受容神経応答の多コンパートメント（10コンパートメントのケーブル理論を適用）モデルのシミュレーション結果：簡略化数学モデルに弱い刺激を入力した場合

(A) 補足図2と同じ。(B) 補足図2と同じだが、弱い刺激入力を与えているため、ギャップジャンクションを想定するとその位置に関わらず、薄い色のトレースで示すインパルス発生閾値以下の膜電位変化のみがみられ、インパルス発火は認められない。本シミュレーション結果は高野、久保、大森より許可を得て記載 (Takeichi, et al., 2018 参照)。