



# 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。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏名 竹市 裕介

専攻 生物学専攻

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

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

指導教員 尾崎 まみこ

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。本研究ではクロオオアリ (*Camponotus japonicus*) を用いて、巣仲間-非巣仲間識別能力を担う、触角上に存在する錐状感覚子の内部にある嗅覚受容神経感覚突起の構造を明らかにし、その機能の推定を行うことを目的とした。

第一章では、序論としてこれまでの社会性動物に対する知見とそれに基づいた本研究の目的と意義について詳しく述べた後、材料と方法を記している。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が、アリにおいては、同巢の間を許容し同種異巢や異種のアリを排撃するという働きアリの巣仲間-非巣仲間識別能力が知られている。働きアリは触角探査と呼ばれる、触角で相手に触れる行動をとって巣仲間かそれ以外かを認識する。多くのアリ種では、コロニー特異的な体表炭化水素 (CHCs) の混合物が巣仲間認識のための社会性フェロモンとして使用されている。働きアリが使っている CHCs 構成成分は種間で異なり、種内では同じであるが、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 を持っている。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、巣仲間同士では同じにおいを共有し、その他の相手に対しては、自分や巣仲間とは異なるにおいを感じていることになる。

クロオオアリは、18 種類の種特異的な CHC 成分の混合物を持ち、その混合比の違いから巣仲間かどうかを識別する。巣仲間と非巣仲間の識別を司る化学感覚システムが触角上に存在する CHC 感受性の錐状感覚子である。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。アリの錐状感覚子については、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。私は、この研究を着想するに当たり、アリの錐状感覚子には、内在する受容神経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考えた。

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、アリの巣仲間-非巣仲間機能の土台となる微細形態を調べ、新たな知見を見出すことを目的とした。新規に見出したビーズ構造の数と局在について詳細に観察しながら、ビーズ構造の部分で、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、嗅覚受容神経間のギャップ結合による電気的接続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、研究を進めた。また、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考察を深めた。

アリの錐状感覚子の内部の微細な構造を観察するため、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 (TEM) および超高圧電子顕微鏡 (UHV-EM) を使用した。また感覚子内にギャップ結合による電氣的接続が存在する可能性を示すため、クロオオアリ触角に発現する mRNA ライブラリーをもとに、ギャップ結合構成タンパク質であるイネキシン候補のタンパク質コーディング領域を調べ、イネキシン候補のタンパク質の配列を絞り込んだ。さらにその配列もとにイネキシン (CjapInx3) に対する抗血清および精製抗体を作成しクロオオアリ触角タンパク質のウェスタンブロットおよび触角断片の免疫組織染色を行った。

第二章では研究結果について述べている。SBF-SEM 錐状感覚子のほぼ全長を斜めに切断し観察したところ、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存在した。次に感覚子の横断面連続画像を感覚子中間から基部に向かって取得したところ、感覚子内部には 102 本の神経感覚突起が枝分かれ無く存在し部分的に感覚突起の断面積が大きくなる様子が見られた。断面積が大きくなっている部分では周辺感覚突起と、細胞膜が複雑に密着していた。この連続画像をもとに感覚突起の立体構築を行ったところ、断面積が大きくなっていた部分は特徴的なビーズ構造をしていることがわかった。

錐状感覚子を TEM で観察したところ、感覚子先端部では感覚突起がほとんど見られず、感覚子中間から基部にかけて多くの感覚突起が見られた。また、感覚突起の断面積が大きくなっている部分では細胞膜どうしが密着している領域もよく見られた。UHV-EM での観察では、一方のビーズ構造の細胞膜がもう一方の細胞膜に陥入している像が得られた。

SBF-SEM から得た連続画像を用いて、感覚突起にあるビーズ構造と細胞膜間の密着領域の全てを目視で抽出したところ、全ての突起にビーズ構造が見られ、全ビーズ構造のうち、7割以上が膜-膜間の密着領域を有していた。膜-膜間の密着領域の数の分布図では触角クチクラ表面から先端側と基部側で2つのピークを有することがわかった。

抗 CjapInx3 抗血清と精製抗体を用いてクロオオアリ触角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。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、33 kDa のバンドは、その一部が分解されたものと考えた。高分子側のバンドは、CjapInx3 の2量体ではないかと推測した。抗 CjapInx3 抗血清に替えて免疫前血清を用いた場合や、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においては、これら3本のバンドは見られなくなった。次にクロオオアリの触角においてこの CjapInx3 の局在を調べるため免疫組織学的実験を抗血清を用いた試行実験を行ったところ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た。

第三章では本研究の考察と今後の展望について述べている。これまで、アリの巢仲間識別のしくみについては、巢仲間 CHCs のにおいを高次脳に送り鑄型として記憶し、新たに遭遇した相手の CHCs のにおいをその鑄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 (鑄型仮説)。しかし日々の生活で徐々に変化する各 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、脳における巢仲間のおい情報の鑄型形成とその利用とは別に、より末梢レベルでの巢仲間識別のためにおい情報処理がなされている可能性も否定できないと考えた。そこで今回の研究をもとに、嗅覚情報の末梢感覚器レベルでのフィルター効果の可能性について考察した。本論文での形態学的データは錐状感覚子内の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おり、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フィルターとして働くことが大いに考えられる。

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できていない。そこで、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を想定し、簡略化した数学的モデルを考えた。その感覚突起間の接続がインパルス発生部位であ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、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わかった。このことは非巢仲間 CHCs によって発生するより強い入力電流は、直接刺激された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一方で、巢仲間 CHCs によって発生される弱い入力電流が生じた場合は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。通常とは異なるにおいや全く新規なおいを敏感に検出するのに有利に働くこの仕組みは、巢仲間識別において非巢仲間と巢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。

今回の錐状感覚子の形態学的研究だけでなく、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を洞察するには限りがある。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に照らして、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必要となる。しかしながら、これまで高次脳におい情報が送られ、一定しないコロニー特有のおいの記憶によって構成される「鑄型」に依存する中枢の巢仲間識別機構を主張する「鑄型仮説」の弱点を補う形として、これらの末梢におけるフィルター機能が働くことは有意義であろうと考えている。

氏名	竹市 裕介		
論文 題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	尾崎 まみこ
	副査	教授	前川 昌平
	副査	准教授	洲崎 敏伸
	副査	准教授	影山 裕二

## 要 旨

本学位論文の第一章では、序論としてこれまでの社会性動物に対する知見とそれに基づいた本研究の目的と意義について詳しく述べた後、本研究で用いた材料と方法を記している。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が、アリにおいては、同巢の仲間を許容し同種異巢や異種のアリを排撃するという働きアリの巢仲間-非巢仲間識別能力が知られている。働きアリは触角探索と呼ばれる、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、コロニー特異的な体炭化水素（CHCs）の混合物が巢仲間認識のための社会性フェロモンとして使用されている。働きアリが使っている CHCs 構成成分は種間で異なり、種内では同じであるが、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 を持っている。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、巢仲間同士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。

クロオオアリは、18種類の種特異的な CHC 成分の混合物を持ち、その混合比の違いから巢仲間かどうかを識別する。巢仲間と非巢仲間の識別を司る化学感覚システムが触角上に存在する CHC 感受性の錐状感覚子である。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。アリの錐状感覚子については、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、まだ完全に理解されていない。申請者は、この研究を着想するに当たり、アリの錐状感覚子には、内在する受容神経の相互作用によって、情報をふるい分けて選択したり変更したりするシステムが内包されているのではないかと考えた。

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されたふくらみのある構造（ビーズ構造）に注目して、アリの巢仲間-非巢仲間機能の土台となる微細形態を調べ、新たな知見を加えることを目的とした。新規に見出したビーズ構造の数と局在について詳細に観察したところ、その部分で周辺の受容神経の感覚突起の細胞膜が近接してみえたため、ビーズ構造が、嗅覚受容神経間のギャップ結合による電気的接続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、研究を進めた。また、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のデータを共有し、数学的な回路モデルを解くことによって考察を深めた。

アリの錐状感覚子の内部の微細構造を観察するため、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（TEM）および超高压電子顕微鏡（UHV-EM）を使用した。また感覚子内にギャップ結合による電気的接続が存在する可能性を示すため、クロオオアリ触角に発現するmRNA ライブラリーをもとに、ギャップ結合構成タンパク質であるイネキシン候補のタンパク質のコーディング領域を調べ、その配列をもとにイネキシン（CjapInx3）に対する抗血清および精製抗体を作成しクロオオアリ触角タンパク質のウェスタンブロットおよび触角断片の免疫組織染色を行った。

第二章では研究結果について述べている。SBF-SEM 錐状感覚子のほぼ全長を斜めに切断し観察したところ、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存在した。次に感覚子の横断面連続画像を感覚子中間から基部に向かって取得したところ、感覚子内部には102本の神経感覚突起が枝分かれ無く存在し部分的に感覚突起の断面積が大きくなる様子が見られた。断面積が大きくなっている部分では周辺の感覚突起と、細胞膜が複雑に密着していた。この連続画像をもとに感覚突起の立体構築を行い、感覚突起上に多くの特徴的なビーズ構造を見出した。

氏名	竹市 裕介
<p>錐状感覚子を TEM で観察したところ、感覚子先端部では感覚突起がほとんど見られず、感覚子中間から基部にかけて多くの感覚突起が見られた。また、感覚突起の断面積が大きくなっている部分では細胞膜どうしが密着している領域もよく見られた。UHV-EM での観察では、一方のビーズ構造の細胞膜がもう一方の細胞膜に陥入している像が得られた。</p> <p>SBF-SEM で得た連続画像を用いて、感覚突起にあるビーズ構造と細胞膜間の密着領域の全てを目視で抽出したところ、全ての突起にビーズ構造が見られ、全ビーズ構造のうち、7割以上が膜-膜間の密着領域を有していた。膜-膜間の密着領域の数の分布図を作製すると、触角クチクラ表面から先端側と基部側で2つのピークを有することがわかった。</p> <p>抗 CjapInx3 抗血清と精製抗体を用いてクロオオアリ触角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。38 kDa のタンパク質がアミノ酸配列から計算される CjapInx3 の分子量に近いものであったので、より低分子の 33 kDa のバンドは、その一部が分解されたものと考え、高分子側のバンドは、CjapInx3 の2量体ではないかと推測した。抗 CjapInx3 抗血清を替えて免疫前血清を用いた場合や、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においては、これら3本のバンドは見られなくなった。次にクロオオアリの触角においてこの CjapInx3 の局在を調べるため抗血清を用いた免疫組織学的試行試実験を行ったところ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様子がみられた。</p> <p>第三章では本研究の考察と今後の展望について述べている。これまで、アリの巢仲間識別のしくみについては、予め巢仲間 CHCs のにおいを高次脳に送り鑄型として記憶しておけば、新たに遭遇した相手の CHCs のにおいをその鑄型と比較することによって巢仲間かどうかを識別できると考えられてきた（鑄型仮説）。しかし日々の生活で徐々に変化する各 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明らかにされていない。このようなことを考慮すると、脳における巢仲間のおい情報の鑄型形成とその利用とは別に、より末梢レベルで巢仲間識別のためのにおい情報処理がなされている可能性も否定できなかと考えた。そこで今回の研究をもとに、嗅覚情報の末梢感覚器レベルでのフィルター効果の可能性を考察した。本論文での形態学的データは錐状感覚子内の神経ネットワーク形成におけるギャップ結合の関与を示唆しており、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フィルターとして働くことが大いに考えられる。</p> <p>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、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できていない。そこで、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を想定し、簡略化した数学的モデルを考えた。感覚突起間の接続がインパルス発生部位である感覚子基部近くに想定された場合、より強い入力であれば情報を拡散、より弱い入力であれば情報を断つといったように、入力の強弱の条件に依存したフィルターとして機能することがわかった。即ち、非巢仲間 CHCs によって発生するより強い入力電流は、直接刺激された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一方で、巢仲間 CHCs によって弱い入力電流が発生した場合は直接入力を受けた受容神経のインパルスさえも抑えられてしまう傾向が予測できた。嗅覚器の順応を前提として通常とは異なるにおいや全く新規なおいにより敏感に検出するために有利に働く可能性のあるこの仕組みは、アリの巢仲間識別において、非巢仲間と巢仲間に対する攻撃行動のオン・オフを即時に切り替える際に重要な役割を果たすと考えられる。</p> <p>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的なシステムとしての機能を洞察するには限りがある。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に照らして、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、嗅覚情報の変更や修飾に関与する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変更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の実験による、より説得力のある機能的証明が必要となる。しかしながら、一定しないコロニー特有のにおいの記憶によって構成される「鑄型」に依存する中枢に限った巢仲間識別機構を主張する「鑄型仮説」の弱点を補う形として、これらの末梢におけるフィルター機能が働く可能性を論じることは有意義であると考えられる。</p> <p>本研究は、複合フェロモンでコミュニケーションをとって社会を形成しているアリの巢仲間識別を司る嗅覚感覚子について、その微細形態を研究したものであり、その観察をもとに感覚子内部に格納されている嗅覚受容神経どうしの接着の可能性とその推定機能について重要な知見を得たのものと評価のある集積であると認める。よって、学位申請者の竹市裕介は、博士（理学）の学位をとる資格があると認める。</p>	