

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570073

研究課題名(和文) 実行動下における昆虫脳神経活動の in vivo イメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging of neuronal activity in insect during actual behavior

研究代表者

小川 宏人 (OGAWA HIROTO)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：70301463

研究成果の概要：本研究は、昆虫の行動を制御する脳・神経機能の解明に向けて、行動下にある昆虫の脳神経節の神経活動を光学的に測定することを目的とした。2007年度は、マイクロインジェクション法によって、のフタホシコオロギ脳神経節へのAM体カルシウム感受性蛍光色素の導入に成功し、キノコ体傘部の神経活動をカルシウムイメージングすることに成功した。2008年度は、顕微鏡ステージ上で嗅覚-味覚連合学習を行う刺激装置を作成し、同一標本から学習前後でのキノコ体のカルシウム応答を捉えることを試みた。その結果、条件付け前後で匂い刺激に対するカルシウム応答パターンが変化した。この結果は、同一個体における学習前後の脳神経活動の光学計測に初めて成功した例であり、今後さらに詳細な解析が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：昆虫，キノコ体，カルシウムイメージング，古典的条件付け，神経可塑性，嗅覚，連合学習，光学計測

## 1. 研究開始当初の背景

神経活動の光学的測定は1970年代から試みられはじめ、その後カルシウム濃度感受性色素等の蛍光プローブの開発や光学計測デバイスとコンピュータ技術の発展に伴って、80年代後半から脳・神経科学分野に積極的に導入されるようになった。しかし、ほ乳類の脳神経活動の光学的測定は、脳深部からの光学シグナルが非常に微小であること、非麻酔

下では脳・神経組織の動きが大きく、安定した画像取得が困難であることなどの理由から、脳スライス標本で行われたものがほとんどであった。一方、昆虫を材料とした神経活動の光学測定は脳神経節の小ささなどの理由から、当初より in vivo のプレパレーションで行われてきた。代表的な例としては、ハエの視覚系介在ニューロンの解析 (Borst and Egelhaaf, 1992) とミツバチの糸球体応答の

カルシウムイメージング (Joerges et al., 1997) が挙げられる。しかし、これらの研究も完全に拘束した動物に視覚刺激や匂い刺激を与えたときの応答を解析したもので、実際に動物が刺激に対して反射運動を起こしたり、自発的な運動を行ったりするなど、実際に行動している動物の神経活動を光学的に測定した例はない。

本申請者はこれまでに、主にコオロギの最終腹部神経節を材料として、気流応答性巨大介在ニューロンおよび求心性感覚神経線維の *in vivo* カルシウムイメージングを行い (Ogawa et al., 1999, 2004, 2006), 神経細胞間の気流方向情報の抽出と統合メカニズムを明らかにしてきた。その研究過程で、独自の蛍光プローブの導入法や画像処理法、神経節の固定方法を開発し、単一ニューロンの局所的な神経活動のイメージングと、複数のニューロンの集団的活動パターンの同時イメージングに成功した。光学測定による気流感覚系の解析をほぼ終えたことから、次にこれらの技術を用いて、昆虫の中樞神経である脳神経節の神経活動を、実際の行動下でイメージングするという本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、昆虫の様々な行動を制御する脳・神経機能の解明に向けて、行動下にある昆虫の脳神経節の神経活動を光学的に測定することを目的とする。

具体的には、フタホシコオロギを材料として、キノコ体傘部の神経活動の光学計測を目指す。キノコ体は昆虫の脳神経節の前脳に一对存在し、多種感覚の統合や記憶の形成・貯蔵、さらに運動の企画や準備を行う高次連合中枢であると考えられている (Okada et al., 2003) が、その機能には依然として未知の部分が多い。キノコ体はケニオン細胞と呼ばれるニューロン群で構成され、その数は昆虫の脳内に存在する全ニューロンの3-4割を占めるといわれている。キノコ体内部には薄層 (スラブ) 状のモジュール構造が存在することから (Mizunami et al., 1997), 個々のケニオン細胞が特定の情報を運んでいるのではなく、むしろこのスラブ状モジュールが機能単位となって、多数の細胞集団の活動として情報をコードしたり、処理を行ったりしていると考えられている。したがってキノコ体の機能を明らかにするためには、個々のケニオン細胞の活動を電気生理学的に調べるよりも、細胞集団の活動の時空間パターンを解析できる光学測定が有効である。

2007年度は、フタホシコオロギの体を固定した状態で脳神経節のキノコ体傘部の神経活動をカルシウムイメージングによって計

測することを研究目標とした。特に2007年度前半は、これまで研究実績のある最終腹部神経節を用いて、カルシウム感受性色素の導入方法の検討を行う。コオロギの体を固定した状態で触角に匂い刺激や味覚刺激、機械刺激を行い、キノコ体傘部の神経活動をカルシウムイメージング法によって測定する。刺激の種類や強さによってカルシウム応答の時空間パターンがどのように変化するかを解析する。それによって、ケニオン細胞群による匂い情報や味覚情報のコーディング様式を明らかにする。

2008年度は、顕微鏡ステージ上で嗅覚-味覚連合学習を行う刺激装置を作成し、同一標本から学習前後でのキノコ体のカルシウム応答を捉えることを試みる。生得的にコオロギが好む味覚刺激 (砂糖水など) と、特に強い嗜好性を持たない匂い刺激を連合させて学習させ、学習前後で匂い刺激に対する応答パターンを比較する。それによって、学習におけるキノコ体傘部の神経活動の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) *in vivo* イメージングの標本作製

低温麻酔したコオロギの翅および肢を切除し、プラスチックチューブ内にコオロギを入れる。この際、呼吸による体液圧力変化によって脳が動くことを防ぐため、腹部クチクラに切れ込みを入れ、体液圧を逃がすようにした。頭部と胸部の間に薄いワッシャを加工した板を差し込み、頭部をデンタルワックスで固定した。さらに大顎の駆動筋を切断後、顎の動きで脳神経節が揺れないように動かないように大顎をデンタルワックスで固めた。その後、頭部クチクラを切開し、脳神経節を露出した (図1)。

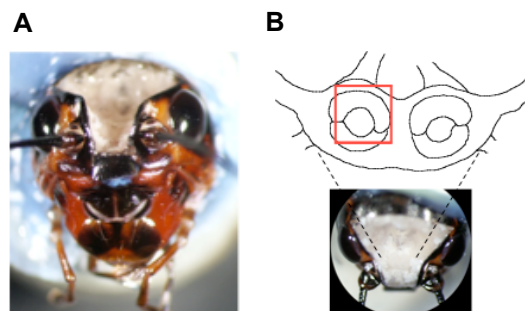


図1 脳神経節を露出したコオロギの頭部  
A:正面像, B:頭頂側像。上は脳神経節のイメージング領域 (赤線) を示す模式図

## 2) カルシウム感受性色素の導入およびイメージング

0.05% Oregon Green 488 BAPTA-1 AM, 0.5% Texas Red dextran, 2% Pluonic F127 をコオロギリンゲル液に溶解したものを Injection solution として使用した。Injection solution を充填したガラスピペットを、マイクロマニピュレータを用いて脳神経節のシース下に刺入し、空気圧により色素を脳内に注入した。色素注入後、コオロギを 4°C 暗黒下に 12~24 時間静置し、その後正立蛍光顕微鏡 (E600FN, Nikon) 下で背側より脳神経節を観察した。蛍光観察およびカルシウムイメージングに用いた光学系は以下のとおりである。励起光源: 150W キセノンランプ, 対物レンズ: ×10 水浸, NA 0.3, 励起フィルタ: 450-490, ダイクロイックミラー: FT505, 蛍光フィルタ: 515-565。

脳神経節の蛍光画像はデジタル CCD カメラ (ORCA-ER, 浜松ホトニクス) で撮像し, 34.3 ms/frame のサンプリングレートで取得した。その後、画像解析装置 (AQUACOSMOS/Ratio, 浜松ホトニクス) を用いて相対蛍光強度変化量 (DF/F) を算出した。

## 3) 刺激方法および条件付けプロトコル

匂い刺激は、窒素ガスボンベに接続したピコポンプ (PV820, WPI) により加圧した気流を、匂い源 (バニラエッセンスまたはペパーミントオイル) をしみ込ませた脱脂綿を通して、ガラスピペットから触角に与えた。また、蒸留水をしみ込ませた脱脂綿を通した気流をコントロールとして用いた。味覚刺激は、コオロギが生得的に好む 10% ショ糖液、及び嫌悪する 1 M NaCl 水溶液をしみ込ませた濾紙片を、電磁石駆動のアームを用いて小顎鬚に接触させて与えた (図 2)。

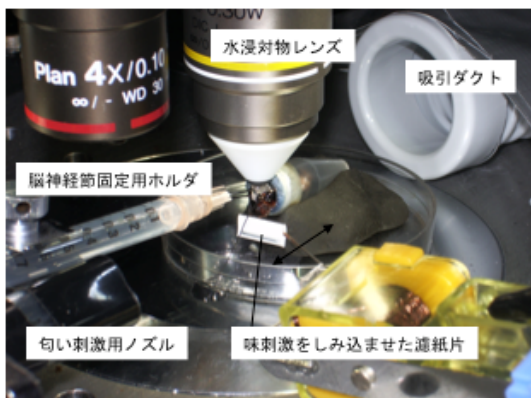


図 2 in vivo イメージング刺激装置

嗅覚-味覚学習のための条件付けでは、匂い刺激を条件刺激 (Conditioning stimulus: CS), 味覚刺激を条件刺激 (Unconditioning stimulus: US) として用いた。各 3 秒間の CS と US を 1 秒間重ね合わせた組合せ刺激を 30 秒おきに 5 回与えて条件付けした。

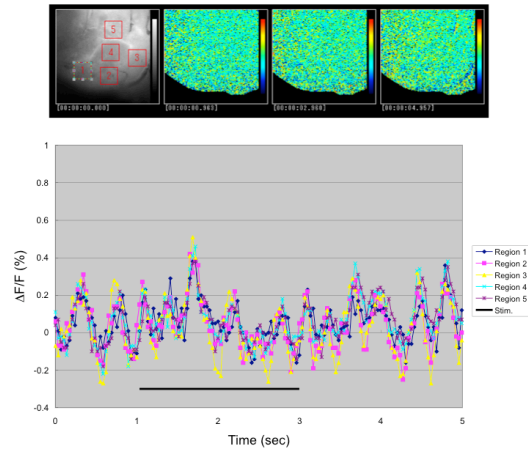
## 4. 研究成果

2007 年度前半は、これまで研究実績のある最終腹部神経節を用いて、カルシウム感受性色素の導入方法の検討を行った。その結果、多数のニューロンによる集団的な神経活動をモニタするためには、神経節のシース下に AM 体色素をマイクロインジェクションする方法が最も適切であることが分かった。以上の結果を踏まえ、脳神経節シース下にカルシウム感受性色素 Oregon Green BAPTA-1 AM を注入し、正立蛍光顕微鏡下で in vivo プレパレーションでのキノコ体傘部のイメージングを行った。

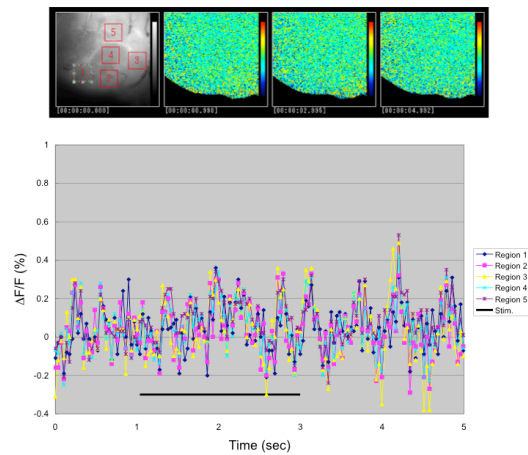
その結果、条件付け前では、蒸留水を通した気流にも条件刺激ペパーミントの匂い刺激にもカルシウム応答はみられなかったが、バニラの匂い刺激に対しては弱い応答を示した (図 3)。次に同じ標本にペパーミントの匂い刺激とショ糖溶液の味覚刺激を組み合わせた嗜好条件付けを行うと、ペパーミントの匂い刺激に対して弱いカルシウム応答を示し、またバニラの匂い刺激に対しての応答が増大した (図 4)。嗜好条件付け後に続けて、さらにバニラの匂い刺激と食塩水の味覚刺激を組み合わせた嫌悪条件付けを行うと、ペパーミントの匂い刺激に対するカルシウム応答はみられたが、バニラの匂い刺激に対する応答は消失した (図 5)。また、嫌悪条件付け後のペパーミント匂い刺激に対する応答は、嗜好条件付けのみを行った時に比べて、よりキノコ体傘周辺部に局所的な応答となった。以上の結果から、嗜好性条件付けと忌避性条件付けではキノコ体神経活動の時空間パターンが変化することが示唆された。

当初の研究計画では、2008 年度にトラックボールシステムによる歩行運動下のコオロギにおける in vivo イメージングの実験を予定していたが、2008 年 10 月に所属研究機関を異動したため、研究室の移転・設営に時間が費やされてしまい、残念ながら実施することができなかった。

### DW air



### Peppermint



### Vanilla

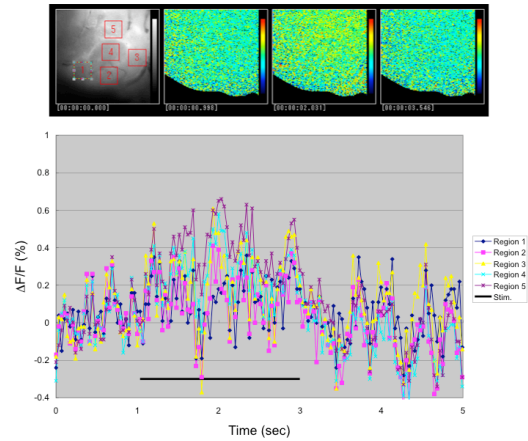
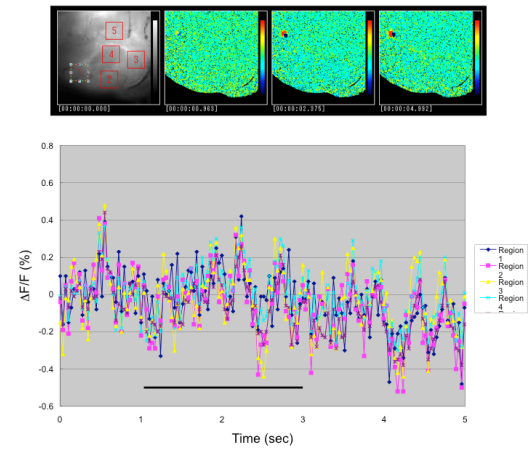
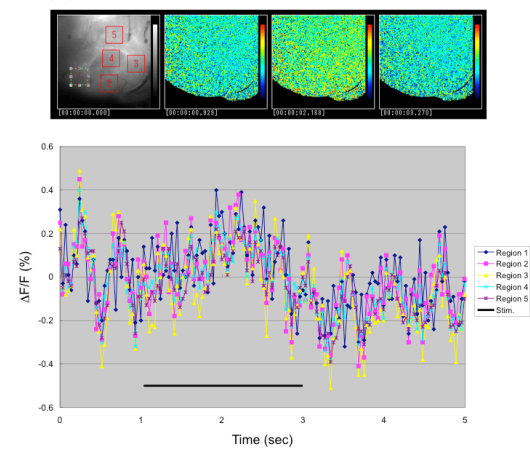


図3 キノコ体傘部における匂い刺激に対するカルシウム応答  
各パネルの上段はキノコ体傘部の蛍光画像（左）と蛍光強度変化を示す疑似カラーイメージ（右）。下のグラフは蛍光画像内に表示した領域における相対蛍光強度(DF/F)の揭示変化。蒸留水、ペパーミントの匂い刺激では応答は見られないが、バニラの匂いに対しては弱い反応が観察された。

### DW air



### Peppermint



### Vanilla

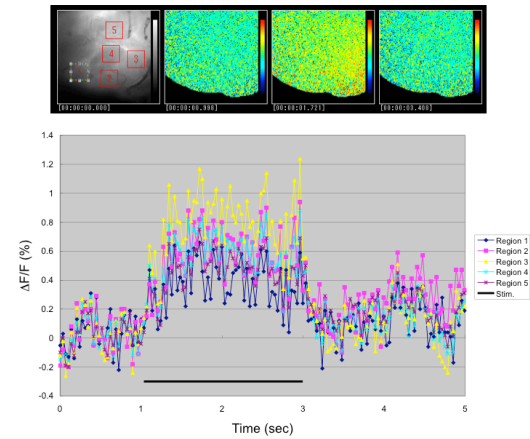
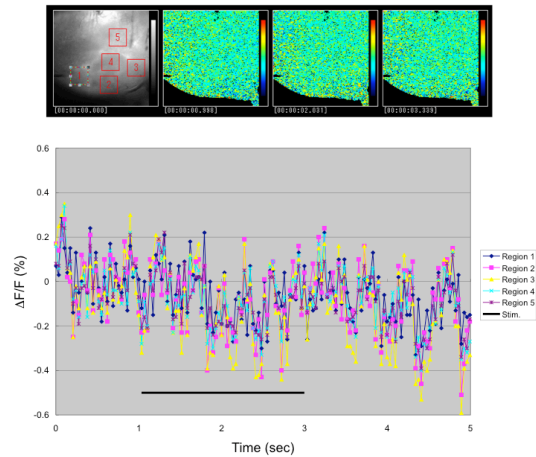
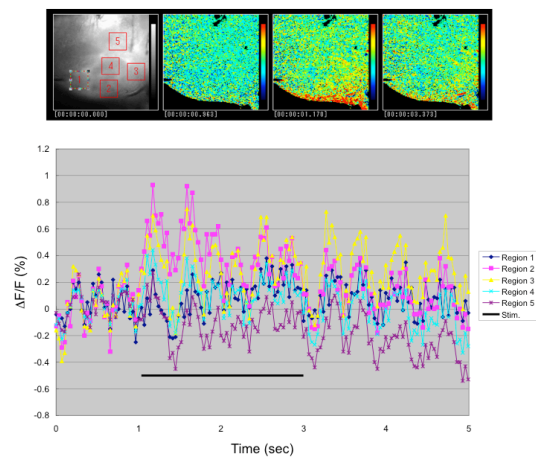


図4 嗜好条件付け後の匂い刺激に対するカルシウム応答  
コオロギが好むシヨ糖溶液と条件付けしたペパーミントの匂いに対して弱いカルシウム応答を示すようになるが、条件付けしていないバニラの匂いに対する応答は大きく増強された。

## DW air



## Peppermint



## Vanilla

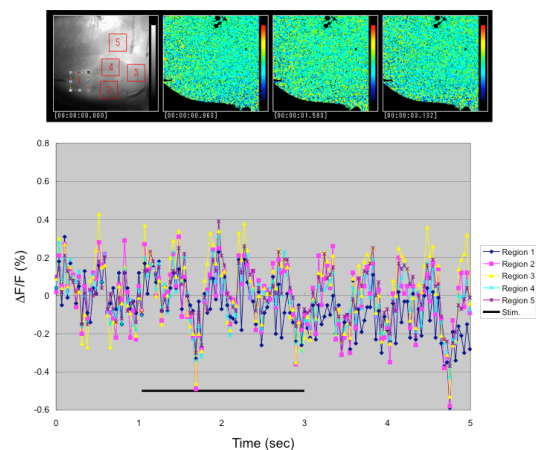


図5 嗜好条件付けに続いて嫌悪条件付けを行った後の匂い刺激に対するカルシウム応答  
ペパーミントの匂いに対する応答は維持されるが、コオロギが嫌う NaCl 溶液と条件付したバニラの匂いに対する応答は消失した。また、ペパーミントに対しては傘の後方周辺部でより大きな反応が起こった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ogawa, H., Cummins, G. I., Jacobs, G. A. and Oka, K. (2008)  
Dendritic design implements algorithm for extraction of sensory information.  
*J. Neurosci.* 28: 4592-4603 (査読有)
- ② Aonuma, H., Kitamura, Y., Niwa, K., Ogawa, H. and Oka, K. (2008)  
Nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling in the local circuit of the cricket abdominal nervous system. *Neurosci.* 157: 749-761 (査読有)
- ③ 小川宏人 (2008)  
神経生物学研究におけるイメージング技術の最近の動向  
比較生理生化学 25: 21-22 (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 小川宏人, 岡浩太郎 (2008)  
コオロギキノコ体傘部における学習依存的なカルシウムシグナル 生物物理 48 Suppl.1: S163  
(2008年12月3-5日 日本生物物理学会第46回年会・福岡)
- ② Ogawa, H., and Oka, K. (2008)  
In vivo calcium imaging of mushroom body calyx in the tethered cricket for odor-taste conditioning. Program No. 362.20. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008  
(2008年11月15-19日 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience・Washington, DC)
- ③ 小川宏人, 岡浩太郎 (2008)  
嗅覚-味覚連合学習前後におけるコオロギキノコ体傘部の in vivo カルシウムイメージング *Comp. Biochem. Physiol.* 151B: 455  
(2008年7月19-21日 日本比較生理生化学会第30回大会・札幌)
- ④ 小川宏人, 岡浩太郎 (2008)  
コオロギ巨大介在ニューロンの気流応答性における方向依存的可塑性 *Neurosci. Res.* 61, Suppl. 1: S183  
(2008年7月9-11日 Neuroscience 2008 -第31回日本神経科学大会・東京)
- ⑤ 小川宏人 (2008)  
コオロギ気流応答性巨大介在ニューロンにおける方向情報抽出アルゴリズム  
(2008年1月25日 京都大学21世紀COE

プログラム「昆虫科学が拓く未来型食料環境学の創生」第25回昆虫科学セミナー)

- ⑥ 小川宏人, 馬場欣哉, 北村美一郎, 青沼仁志, 岡浩太郎 (2007)  
コオロギ気流応答性介在ニューロンの応答性に対するNOによる調節 生物物理 47 Suppl. 1: S77  
(2007年12月21 - 23日 日本生物物理学会第45回年会・横浜)
- ⑦ 小川宏人 (2007)  
昆虫神経細胞の樹状突起形態に潜む感覚情報抽出アルゴリズム  
(2007年9月10 - 12日 Neuro 2007-第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会-シンポジウム「新世代神経行動学のストラテジー」)
- ⑧ Ogawa, H., and Oka, K. (2007)  
Decoding algorithms implemented in dendritic design of cricket cercal sensory interneurons. The 8th International Congress of Neuroethology Program and Abstracts: 239  
(2007年7月22 - 27日 8th International Congress of Neuroethology・Vancouver, Canada)
- ⑨ 小川宏人, 馬場欣哉, 北村美一郎, 青沼仁志, 岡浩太郎 (2007)  
コオロギ最終腹部神経節における一酸化窒素の生理機能の解析 Comp. Biochem. Physiol. 148B: 348  
(2007年7月6 - 8日 日本比較生理生化学会第29回大会・岡山)

[図書] (計 1 件)

- ① 小川宏人, 岡浩太郎 (2008)  
光学計測法が明らかにするニューロン内情報処理機構  
「昆虫ミメティクスー昆虫の設計に学ぶー」(下澤楯夫, 針山孝彦 監修)  
p650-656.

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~hogawa/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 宏人 (OGAWA HIROTO)  
北海道大学・大学院理学研究院・准教授  
研究者番号: 70301463

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

岡 浩太郎 (KOTARO OKA)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号: 10276412