

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300113

研究課題名(和文) 昆虫脳における適応的な行動制御信号の生成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding the neuronal mechanisms underlying emergence of adaptive behavior in insect

研究代表者

青沼 仁志 (Aonuma, Hitoshi)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：20333643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の闘争行動を題材に、適応的な行動が実時間で動機づけられる神経機構を研究した。特に、攻撃行動の動機づけにかかわる脳内オクトパミンの働きについて理解が深まった。また、攻撃行動の動機づけにかかわる生体アミン類のオクトパミン、ドーパミン、チラミン、セロトニンについて合成酵素、受容体等の遺伝子配列を同定するとともに、脳内生体アミン類の働きを任意に操作する遺伝子改変技術の開発を進めた。さらに、小型移動ロボットを使い実験個体の攻撃行動を誘導する実験系を確立し、自由行動個体の神経活動や体内生体アミン類の計測を可能にした。

研究成果の概要(英文)：We focused on the aggressive behavior between male crickets to understand how animals alter their behaviors on the demand of changing circumstances. Biogenic amines modulate motivation of many kinds of behaviors. In our behavior and pharmacological studies demonstrate that octopamine in the brain initiates aggressive motivation in the cricket. In order to get better understand, we have been developing transgenic technique to manipulate octopaminergic system in the brain. We identified biogenic amine related genes including octopamine, serotonin, dopamine and tyramine. We also developed some tools for genetic approaches. We also developed micro robot system to manipulate cricket aggressive behavior. This system makes us perform electrophysiological experiment using free moving animal with predicting the result of fight between male crickets.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：実時間適応 情報生成 生体アミン 闘争行動 昆虫 動機付け 神経修飾 分子機構

## 1. 研究開始当初の背景

私たちを取巻く環境は、刻一刻と変化し、動物は状況に応じた適応的な行動をとることができる。適応行動の実時間性を創り出す、脳のメカニズムを理解することは、生物学的にも重要であるとともに、新奇な情報処理や人工物の制御の開発にとっても重要な課題である。

本研究では、他者が存在する社会をひとつの環境要因とみなし、個体間相互作用に伴って実時間で変容する行動発現の神経メカニズムを解明するため、闘争行動を題材とした動物の同種内での闘争行動は普遍的に見られ、多くの場合、餌・縄張り・配偶者等を争い、激しい攻撃的な行動を伴う。闘争は、一方の個体が攻撃を中止しその場を退く（負ける）と終結し、両者の間に優劣関係が形成される。闘争の行動学的な知見は多く示されているが、個体が負ける際の脳の神経生理機構はほとんど明らかになっていない。この課題は、行動の開始や中止の動機付けにかかわる神経機構を理解する上でも闘争行動の発現機序を理解することは重要である。

闘争過程における攻撃性の調節には、脳で働く神経修飾物質や神経ホルモンなどの神経作用物質の機能的な役割が重要である。

ほ乳類(マウス)では、脳の一酸化窒素(NO)シグナル系とその下流にあるセロトニン(5-HT)系の機能やステロイドホルモン系の機能が阻害されると異常な攻撃的な行動が表出することが示唆されている(Nelson et al., 1995)。昆虫でも攻撃的な行動の表出には、中枢神経系で神経修飾物質として働く生体アミン類の機能的な役割が重要であることが示唆されている(e.g. Anstey et al., 2009)。一方、青沼等は、これまでに不完全変態昆虫であるクロコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を使い、個体間の相互作用(社会環境の変化)に伴って適応的に行動を切替える脳のはたらきについて研究を行ってきた。特に、闘争行動の発現機序に着目し、脳内の一酸化窒素や生体アミン類などの神経修飾物質のはたらきが攻撃行動の誘発にどのようにかかわるのかを調べた。また、動物実験で得られた知見をもとに、個体が社会環境の変化に応じて攻撃性を変容させる神経生理機構について動的モデルを構築し、社会的な適応行動を実現するメカニズムとして、個体間相互作用と脳神経系に内在する多重フィードバック構造の重要性について考察した。

これまでの知見から、神経修飾物質のはたらきが適応的な行動制御において重要な神経メカニズムであることがわかったものの、脳内で神経修飾物質が量的に変化することが行動の動機付けを引き起こすメカニズムとどのように関係しているのか、また、脳内物質の量的な変化が行動の結果なのか原因なのかについての明確な証拠が得られていなかった。さらに、脳の中のどの細胞でどのようなタイミン

グで神経修飾物質がはたらくことが重要なのかについての知見が得られていなかった。

## 2. 研究の目的

無限定な環境の中で、動物が状況に応じて実時間で適応的な行動を発現する脳の神経生理機構を理解することが大きな目的である。なかでも、脳システムが、受容した感覚刺激の中から重要な情報を抽出し、その情報を経験や記憶と照合して状況に応じた行動を発現するための運動制御信号をリアルタイムで生成するメカニズムを構成論的に理解することを目指した。

特に着目した点は、動物が状況に応じて内部状態を調節することで行動を変容させる現象である。動物は、抽出した感覚情報を内部状態と照合し、運動制御信号を生成する。すなわち、動機づけに基づく適応行動を実時間で実現するしくみ(神経基盤)を理解することが重要である。そこで、小規模な脳神経系を持ち、脳神経系の構造と動作を行動と直接的に結びつけて研究できる昆虫を使い、多くの動物に共通して見られる攻撃行動を研究対象とした。

## 3. 研究の方法

適応的な行動が実時間で動機づけられ、発現し、また中止する過程の脳の働きを調べるため、闘争行動中の脳の神経活動と神経修飾物質の作用ダイナミクスを自由行動個体で調べた。特に、小規模な脳神経系をもつ昆虫のクロコオロギを使い以下の実験を行った。

(1) 昆虫の闘争行動における攻撃行動の誘発と中止(負けを認め攻撃を諦める)行動発現にかかわる神経修飾物質の動的な変化について高速液体クロマトグラフィー法を使って詳細に調べた。また、薬理的な実験で、脳内ではたらく神経修飾物質のアゴニストやアンタゴニストを使い神経修飾機構を操作し、動機付けにかかわる神経生理機構を調べた。

(2) 闘争行動の発現や調節にかかわる神経修飾物質について、その関連遺伝子の同定を行う。また、神経修飾物質の働きを分子生物学の方法で機能操作し、個体の内部状態の変容にかかわる神経基盤を解明するため、遺伝子改変コオロギを作成する。

(3) 小型移動ロボットを使った行動発現の操作法の開発と改良。ビデオトラッキング技術を使って自動で小型ロボットを制御し実昆虫との相互作用による昆虫行動の解析システムを構築する。動物実験で得られた知見をもとに、攻撃行動の誘発について動的なシステムモデルの構築を行った。

#### 4. 研究成果

脳システムが、受容した感覚刺激から重要な情報を抽出し、その情報を経験と照合して実時間で状況に応じた行動を発現する脳のメカニズムについて研究を推進した。特に、昆虫のクロコオロギを使い、闘争において攻撃の開始と中止のメカニズムに注目した。

(1) 攻撃行動の動機付けの神経メカニズムについて、脳内の神経修飾物質である生体アミン類の働きについて調べた。従来、行動発現にかかわる神経修飾物質の働きを調べるためには、候補物質のアゴニストやアンタゴニストを体腔内へ微量投与し行動の変化を観察して来た。しかしながら、細胞に発現する生体アミン類の受容体は複数存在し、どの薬物が何に作用しているのかを十分に議論できなかった。そこで、我々は、闘争行動の動機付けに深くかかわると考えている生体アミン類のうち、オクトパミン、ドーパミン、チラミン、セロトニンについて合成酵素、受容体等の遺伝子配列を同定した(図1)。また、オクトパミンや合成にかかわる酵素に対する抗体を作成し、オクトパミン産生細胞の特定を進めた。オクトパミン抗体およびチラミン抗体を使った抗体染色実験の結果と比較し脳で機能するオクトパミン系の神経回路の同定を進めている。

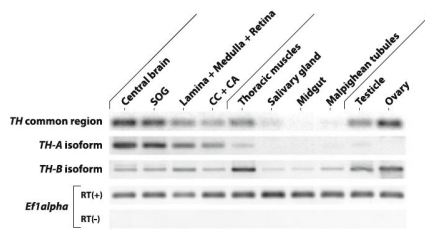


図1. Tyrosine hydroxylase (TH)の組織特異的な発現様式 (Watanabe et al., 2013)

(2) クロコオロギ闘争行動を調節する脳神経基盤を明らかにするため、遺伝子導入コオロギを利用した神経遺伝学的研究手法の確立に取り組んだ(図2)。これまでコオロギを材料として組換え酵素を用いた外来遺伝子の site-direct 挿入法の確立に取り組んだ。

組換え酵素  $\phi$ C31 integrase の組換え標的配列を遺伝子導入したコンジェニック系統を6系統選抜し、 $\phi$ C31 integrase による遺伝子導入効率の評価を行った。当初、野生型  $\phi$ C31 integrase を用いて遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入が成功したコオロギを得ることができなかった。そのため、コオロギでこれまで同定された遺伝子群より算出したコドン使用頻度をもとに、コオロギ細胞での発現に最適なコドン使用頻度をもつ  $\phi$ C31 integrase 遺伝子を人工合成した。現在、この人工合成遺伝子をもちいた遺伝子導入効率の評価実験を進めている。また、平行して、コオロギ

脳生体アミン系の機能操作実験に必要な遺伝学ツールを開発した(Watanabe and Aonuma, 2014)。

神経遺伝学実験に有用であると考えられるコビキタスに発現する遺伝子( $\beta$ -actin)や神経マーカ遺伝子(*found in neurons* 遺伝子)のプロモーター領域を単離することに成功した。これまでに得たプロモーター配列の転写調節活性は、今後、遺伝子導入法を利用して調査して行く。今後の課題は残ったものの、これまでほとんど手つかずであった非モデル生物に対して積極的に分子生物学の手法を取り入れる方法論の確立に至ったことはひとつの成果と言える。

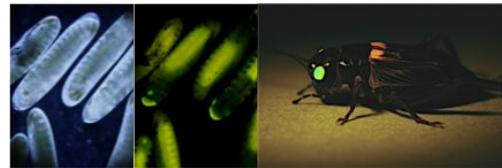


図2. 作成した遺伝子改変コオロギ系統 .gwhit 系統コオロギに蛍光タンパク質 EYF を複眼特異的に発現させた。

(3) 小型の移動ロボットとクロコオロギが共存する環境を作り、コオロギの攻撃行動を誘導する実験を行った(図3)。移動ロボットを使った実験では、従来リモートコントローラーを使いロボットの行動を制御していた。そのひとつのメリットはコオロギの行動に応じて実験者がロボットを操作できるのでコオロギの行動を誘導しやすかった点である。しかしながら、実験者の操作の熟練度がコオロギの行動の誘発に影響を与える点が懸念材料であった。そこで、ロボットの制御を自動化することを検討した。カメラを使い実験アリーナ内のコオロギを撮影し、リアルタイムで行動をトラッキングしコオロギから一定の距離を保つように自動で小型ロボットを制御するように改変した(Kawabata et al., 2013, 2014)。ロボットはコオロギを追いかけるように動きになるものの、実際のコオロギがロボットを攻撃する速度はロボットの移動速度よりも早いため攻撃行動の誘発は可能であった。

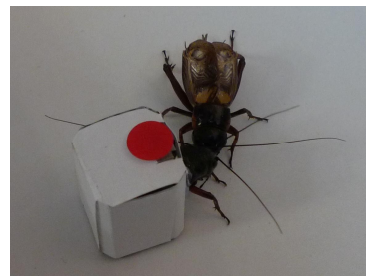


図3. 小型移動ロボットを使った雄コオロギの攻撃行動の誘導。

(4) 攻撃行動を動機付ける生理機構解明のための比較生物学。適応的な動機付けの神経生理機構のなかで、脳内生体アミン類の働き

をより詳細に考察するため、他の昆虫を使った実験も取り入れた。特に、社会性昆虫のクロヤマアリの異種昆虫(クロコオロギ)に対する攻撃行動を調べたところコオロギでは特定できなかった知見が得られた。アリは、コオロギなどの単独生活を送る昆虫とは異なり、カーストや役割分担をもつことが特徴である。この特徴を利用し、攻撃に対する動機付けの違いと脳内のオクトパミンレベルの違いを調べたところ、攻撃性の高い個体ではオクトパミンレベルが高く、逆に低い個体では低いことが判明した(Aonuma and Watanabe, 2012a)。また、薬理学実験により脳内のオクトパミンレベルを操作すると攻撃性を操作することもできることから、脳内のオクトパミンレベルが攻撃行動の動機付けに直接的に寄与することが確かめられた。さらに、女王アリでは、交尾後に新生コロニーの営巣行動を始める。この時にもやはり脳内の生体アミン類が行動の動機付けに重要な役割を担うことが示唆された(Aonuma and Watanabe, 2012b)。

以上の研究成果から、本研究では、個体間の相互作用は、個体の内部状態を変容させ、適応的な行動制御情報の生成と発現に寄与するが、その際、脳内の生体アミン類のはたらきが内部状態の調節を担うことを示せた。

## 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 22 件)

Kawabata K., Aonuma H., Takahashi S., Hosoda K. and Xue J. (2014 *accepted*) Image-based pose estimation for analyzing cricket-robot interaction behavior. *J. Signal Pro.* (査読あり)

Okada R., Ikeno H., Kimura T., Ohashi M., Aonuma H. and Ito E. (2014) Error in the honeybee waggle dance improves foraging flexibility. *Sci. Rep.* 4: 4175, DOI:10.1038/srep04175 (査読あり)

Watanabe T. and Aonuma H. (2014) Tissue-specific promoter usage and diverse splicing variants of the found in neurons; an ancestral Hu/ELAV-like RNA binding protein gene of insects, in a direct developing-insect *Gryllus bimaculatus*. *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 26-41. (査読あり)

Kawabata K., Aonuma H., Hosoda K. and Xue J. (2013) Active interaction utilizing micro mobile robot and on-line data gathering for experiments in cricket pheromone behavior. *J. Robot. Auton. Syst.*, 61: 1529-1538. (査読あり)

Watanabe T., Sadamoto H. and Aonuma H. (2013) Molecular basis of the dopaminergic system in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Invert. Neurosci.*, 13: 107-123. (査読あり)

Yano S., Watanabe T., Aonuma H. and Asama H. (2013). Pitchfork bifurcation in a receptor theory-based model of the serotonergic system. *Mol. BioSyst.*, 9: 2079-2084. (査読あり)

Sakura M. and Aonuma H. (2013) Aggressive behavior in the antennectomized male cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.*, 216 (12): 2221-2228. (査読あり)

Kawabata K., Aonuma H., Hosoda K. and Xue J. (2013) A system for automated interaction with the cricket utilizing a micro mobile robot. *J. Robot. Mech.*, 25(2): 333-339. (査読あり)

Aonuma H. and Watanabe T. (2012b) Changes in the content of brain biogenic amine associated with early colony establishment in the queen of the ant, *Formica japonica*. *PLoS ONE*, 7(8): e43377. (査読あり)

Yoritsune A. and Aonuma H. (2012) The anatomical pathways for antennal sensory information in the central nervous system of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Invert. Neurosci.*, 12: 103-117. (査読あり)

Fukumitsu Y., Irie K., Satho T., Aonuma H., Dieng H., Ahmad A.H., Nakashima Y., Mishima K., Kashige N. and Miake F. (2012) Elevation of dopamine level reduces host-seeking activity in the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Parasite Vector*, 5 (92). doi:10.1186/1756-3305-5-92. (査読あり)

Okada R., Akamatsu T., Iwata K., Ikeno H., Kimura T., Ohashi M., Aonuma H. and Ito E. (2012) Waggle dance effect: dancing in autumn reduces the mass loss of a honeybee colony. *J. Exp. Biol.*, 215: 1633-1641. (査読あり)

Yano S., Ikemoto Y., Aonuma H. and Asama H. (2012) Forgetting curve derived by serotonin hypothesis in cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Robot. Auton. Syst.*, 60: 722-728. (査読あり)

Kawabata K., Fujii T., Aonuma H., Suzuki T., Ashikaga M., Ota J. and Asama H. (2012) A neuro-modulation model of behavior selection in the fighting behavior of male crickets. *Robot. Auton. Syst.*, 60: 707-713. (査読あり)



Mizuno T., Sakura M., Ashikaga M., Aonuma H., Chiba R. and Ota J. (2012) Model of a sensory-behavioral relation mechanism for aggressive behavior of crickets. *Robot. Auton. Syst.*, 60: 700-706. (査読あり)

Sakura M., Watanabe T. and Aonuma H. (2012) Aggressive behavior of the white-eye mutant crickets *Gryllus bimaculatus*. *Act. Biol. Hung.*, 63 (suppl. 2): 69-74. (査読あり)

Watanabe T. and Aonuma H. (2012) Identification and expression analyses of a novel serotonin receptor gene, 5-HT<sub>2</sub> $\beta$ , in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Act. Biol. Hung.*, 63 (suppl. 2): 58-62. (査読あり)

Aonuma H. and Watanabe T. (2012a) Octopaminergic system in the brain controls aggressive motivation in the ant, *Formica japonica*. *Act. Biol. Hung.*, 63 (suppl. 2): 63-68. (査読あり)

Sakura M., Okada R. and Aonuma H. (2012) Evidence for instantaneous e-vector detection in the honeybee using an associative learning paradigm. *Proc. Roy. Soc. B.*, 279 (1728): 535-542. (査読あり)

Watanabe T., Sadamoto H. and Aonuma H. (2011) Identification and expression analysis of the genes involved in serotonin biosynthesis and transduction in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Insect Mol. Biol.*, 20(5): 619-635. (査読あり)

[学会発表](計 48件)

川端 邦明, 青沼 仁志, 杉本 靖博, 細田 耕, 薛 建儒 (2014年1月22-23日) 個体間相互作用から学ぶコトミメティクス - 昆虫-ロボット相互作用系による行動実験 -, 第26回自律分散システムシンポジウム, 東京大学

矢野 史朗, 渡邊 崇之, 青沼 仁志, 淺間 一 (2014年1月22-23日) 受容体理論による縫線核セロトニン神経のモデル化と解析, 第26回自律分散システムシンポジウム, 東京大学

青沼 仁志 (2014年1月22-23日) 個体間相互作用から学ぶコトミメティクス - 昆虫の個体間相互作用によって変容する内部状態, 第26回自律分散システムシンポジウム, 東京大学

Kawabata K., Aonuma H., Hosoda K. and Xue J. (2013年12月12-14日) Controlled interaction with the cricket based on on-line pose estimation of mobile robot,

IEEE Intern. Conf. Robot. Biomim., Shenzhen, China (査読あり)

青沼 仁志, 渡邊 崇之 (2013年9月26-28日) クロヤマアリの攻撃行動の動機付けに関わる脳内アミン 日本動物学会 第84回岡山大会, 岡山大学

Aonuma H. and Watanabe T. (2013年7月12-14日) Brain biogenic amine associated with early colony establishment in the queen of Japanese wood ant, 日本比較生理生化学会第35回大会, イーグレひめじ (兵庫県姫路市)

Aonuma H. (2013年3月11-14日) Emergence of social adaptability in insects. The 6th International Symposium on Adaptive Motion of Animals and Machines (AMAM2013), Darmstadt, Germany. (Keynote Lecture, 招待講演)

Kawabata K., Aonuma H., Hosoda K. and Xue J. (2012年12月11-14日) Development of a cricket interaction system utilizing mobile robot for behavioral data collection. IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics, Guangzhou, China (査読あり)

渡邊 崇之, 青沼 仁志 (2012年9月13-15日) クロコオロギにおける Hu/ELAV ホモログ found in neurons 遺伝子の同定と発現解析, 日本動物学会第83回大会, 大阪大学

佐倉 緑, 山本 康生, 青沼 仁志 (2012年9月13-15日) クロコオロギの闘争経験と歩行量の変化, 日本動物学会第83回大会, 大阪大学

Aonuma H. (2012年8月5-10日) Task dependent interspecific aggression in the ant, *Formica japonica*, 10th International Congress of Neuroethology, Univ. Maryland, College Park, USA

Watanabe T. and Aonuma H. (2012年8月5-10日) Molecular basis of the biogenic amine system in the field cricket *Gryllus bimaculatus*, 10th International Congress of Neuroethology, Univ. Maryland, College Park, USA

Aonuma H. (2012年7月6-8日) Octopaminergic control of interspecific aggression in the ant, *Formica japonica*, 日本比較生理生化学会第34回大会, 総研大(葉山)

川端 邦明, 青沼 仁志, 細田 耕, 薛 建儒 (2012年5月27-29日) マイクロロボットを用いたクロコオロギへの能動的相互作用による行動誘引. ロボティクス・メカトロニクス講演会 (ROBOMECH2012), 浜松

渡邊 崇之, 青沼 仁志 (2011年9月21-23日) クロコオロギにおける環状ヌクレオチドシグナル伝達系関連遺伝子の解析, 日本動物学会第82回大会, (旭川市大雪クリスタルホール)

Aonuma H. and Watanabe T. (2011年8月31日-9月4日) Octopaminergic control of task dependent aggression in the ant, *Formica japonica*, 12th ISIN Symposium on the Neurobiology of Invertebrates, Tihany, Hungary.

Sakura M., Watanabe T. and Aonuma H. (2011年8月31日-9月4日) Fighting behavior of white-eye mutants in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 12th ISIN Symposium on the Neurobiology of Invertebrates, Tihany, Hungary.

Watanabe T., Sadamoto H. and Aonuma H. (2011年8月31日-9月4日) Identification and expression analysis of the genes involved in the biogenic amine systems in the field cricket *Gryllus bimaculatus*, 12th ISIN Symposium on the Neurobiology of Invertebrates, Tihany, Hungary.

Aonuma H., Sakura M., Kawabata K., Ota J. and Asama H. (2011年5月30-6月4日) Synthetic approach for understanding internal state changes in subordinate cricket in fighting, The 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya, Japan.

Watanabe T., Sadamoto H. and Aonuma H. (2011年5月30-6月4日) Identification and expression analysis of the biogenic amine-related genes in the field cricket *Gryllus bimaculatus*, The 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya

〔図書〕(計 2件)

Aonuma H. (2013 *accepted*) Fighting behavior- Understanding the mechanisms of group size dependent aggression. *in* Cricket as a model organism for the 21<sup>st</sup> century; Development, Regeneration, and Behavior. (Eds: Noji S., Horch H.W., Ohuchi H. and Mito T.) Springer (編集集中)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ncmac2.es.hokudai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

青沼 仁志 (AONUMA, Hitoshi)  
北海道大学・電子科学研究所・准教授  
研究者番号: 20333643

(2)研究分担者

細田 耕 (HOSODA, Koh)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号: 10252610

(3)連携研究者

渡邊 崇之 (WATANABE, Takayuki)  
北海道大学・電子科学研究所・学振PD  
研究者番号: 70547851