

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440165

研究課題名(和文) マーブルクレイフィッシュ光走性スイッチング機構に関する行動生理学的解析

研究課題名(英文) Behavioural physiological analyses of phototaxis of the marbled crayfish

研究代表者

長山 俊樹 (NAGAYAMA, Toshiki)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：80218031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マーブルクレイフィッシュは光刺激に対し、日中は負の光走性を示し、夜間は逆に正の性質を示すことをまず明らかにした。次に、その光走性の性質逆転が脳内セロトニン・ドーパミン濃度変動に基づくサイクリックAMP濃度の違いに依存していることを明らかにした。そして、日中負の光走性を示すマーブルクレイフィッシュに対し、T字迷路の片側から餌のけん濁液を流すと同時に光を与え条件付けすることで、光＝餌と学習し、餌の匂いなしでも光側に定位するようになることを明らかにし、遺伝的にプログラムされた光走性の性質が学習によって可逆的に変化可能であることが確かめられた。

研究成果の概要(英文)：Phototaxis is a one of essential elements for innate behaviour. Phototactic behaviours are observed from prokaryotes to amphibian and basic form of orientation. marbled crayfish are shown phototaxis in which sign reversed from negative to positive depending on external light conditionings. LD animals reared with 12L/12D light cycle showed negative phototaxis during day-time and positive phototaxis during night-time. DD animals reared under constant dark conditioning showed positive phototaxis during day-time. Injection of serotonin caused a reversed positive phototaxis in LD animals while dopamine caused a reversed negative phototaxis in DD animals. Injection of serotonin 5HT1 receptor antagonist blocked the reverse of phototaxis from negative to positive, while dopamine DA1 receptor antagonist blocked the reverse from positive to negative. Serotonin mediates positive phototaxis owing decrease in cAMP level while dopamine mediated negative phototaxis owing increase in cAMP level.

研究分野：行動生理学

キーワード：生得的行動 習得的行動 走性 定位 光 学習 可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物は、外界からの刺激に対し特定の応答を示す。節足動物などの無脊椎動物は主に遺伝的にプログラムされた生得的行動を示すのに対し、脊椎動物は経験や学習によって獲得された習得的行動を主に示すとされてきた。しかし、近年、節足動物が脊椎動物同様の学習能力を備えていること、また、生得的行動の応答パターンが、その時の環境条件、動物自身の動機付け、加齢、他個体との社会的接触等によって可塑的に変化することがわかってきた。この行動発現のスイッチングが神経回路のどのような可塑的变化に因っているのか、ザリガニは神経系が比較的単純で、ニューロンの数も少なく、その多くが同定可能なことから、個々のニューロンの機能的役割を細胞レベルで詳細に解析でき、行動発現の基盤となる神経機構を明らかにすることができる。

走性とは、光や音、化学物質等の刺激源に対し、動物が定位する、あるいは遠ざかる性質の運動であり、多くの生得的行動の基本要素となっている。特に、節足動物では正・負という光走性の性質がその動物の生理的状態や外部環境条件に依存して切り替わることが観察されているが、その詳しいスイッチングメカニズムについては未だよくわかっていなかった。最近、我々の実験室ではアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* に極めて近縁な *P. fallax* の単為生殖型であるマーブルクレイフィッシュを実験生物として導入した。このザリガニは好奇心が強く、活動性も高く、光に強く応答することを見だし、光走性の行動解析に最適な研究対象となることがわかった。

## 2. 研究の目的

予備実験から、マーブルクレイフィッシュの光走性はより柔軟で、昼夜で負から正の性質へとスイッチングが起こることを確認した。この定位行動切り替えのメカニズムがどのような神経基盤に因っているのかを解明する目的に、(1)なぜマーブルクレイフィッシュの光走性の性質が本当に昼夜で逆転しているのか？もしそうならば、それがザリガニ自身の体内時計のような内因性な変化なのか、それとも光といった外部環境に依存したものなのかをまず明らかにする。次に昼夜での正・負、光走性の逆転に(2)どのようなスイッチング機構が働いているのか？その神経化学的基盤を明らかにする。そして最後に(3)光刺激を、ほかの報酬・忌避匂い刺激と組み合わせる条件付けを行い、操作的に光走性のスイッチングを起こすことが可能なのか解析し、遺伝的にプログラムされた生得的行動の性質が、学習の結果、習得的に変化できるのか検証した。

## 3. 研究の方法

マーブルクレイフィッシュの光走性の性質が昼夜で逆転するスイッチング機構解明のため、(1)内因性・外因性どちらの要因で光走性の性質が逆転するのか、ザリガニを恒暗・恒明条件下で飼育し、光刺激に対する継日的応答変化を検証すると共に、(2)光走性のスイッチング機構にセロトニン、ドーパミンといった生体アミンが関与している可能性を、行動薬理的に検証し、(3)報酬や忌避性匂い刺激と連合させることで、光走性の性質が学習によって変化するのか、Y字迷路を用いた条件付け実験により検証した。

両端のゴールに光源ライトを設置、スタート地点のゲートを開き、ザリガニがどちらのゴールに向かって前進するか解析できるT字迷路を作成し、様々な光条件で飼育したマーブルクレイフィッシュ(12時間ずつの明暗サイクルで飼育したLD個体、恒明恒暗状態で飼育したLL、DD個体)のT字迷路出口選択性を先ず定量解析した。次に様々な行動変化を引き起こすことが知られている神経修飾物質であるセロトニン・オクトパミン・ドーパミンといった生体アミン、その前駆物質、及びその受容体ブロッカーをザリガニ体腔内に投与することで、光走性にどのような影響が生じるのか、薬理行動学的に解析した。そして最後に、報酬物質の匂いを光刺激と同時に呈示する条件付けを行うことで、光走性の性質が連合学習によって可塑的に変化できるのか検証した。

## 4. 研究成果

### (1)マーブルクレイフィッシュ光走性の性質

透明なアクリル板を用い、エントランスアーム、サイドアームそれぞれ長さ250mm、幅50mm、高さ50mmのT字迷路を作成した。サイドアーム両端には天井に穴を開け、白色光のLEDライトを設置できるようにした。エントランスゲートに5分間ザリガニを入れておき、左右どちらかのライトを任意にオンにすると同時にゲートを開き、ザリガニがどちらの出口を選択するか定量解析した。どちらのライトも点灯しない場合、左右の出口選択率は昼夜問わずほぼ変わらなかった。

LD個体は日中の実験では、光源側の出口選択は21.4%と、光側の出口を避ける負の光走性を示したのに対し、夜間の試行では光側に62.9%定位し、統計学的に有意に正の光走性を示した。一方、LL個体の光側出口選択率は23.3%、夜間は31.7%と、昼夜を問わず常に負の光走性を示したのに対し、DD個体は逆に昼夜ともに85.0%、77.5%と正の光走性を示した。

また明期から暗期への移行時、あるいは暗

期から明期へ移行時のLD個体の光に対する応答性は移行後徐々に逆転し、4時間後には完全に逆転すること、日中4時間暗黒下に置き暗順応させたLD個体は、前日同じ時間帯の25.0%から、74.6%に光源への選択率が上昇し、正の光走性を示すようになることが明らかとなった。またDD個体は、日中4時間光環境においた後実験すると、順応前の75.0%から25.0%に光源への応答率が減少し、負の光走性を示すようになることがわかった。

これらの結果から、マーブルクレイフィッシュは、外部光環境に同調して光走性の性質が切り替わることが明らかとなった。

さらに光量を減少させた光源ランプを用い、同様の実験を行ったところ、1/10まで落としても光源を避ける応答を示した。そこで明るさの異なる光源ランプを左右から提示し、ゴールを選択させたところ、暗い光側の光源を選択したが、明るさの差が1/4以下になるとランダムにゴールを選択するようになった。また、白色光以外にも青色・緑色・赤色のLEDライトを光源として用い、T字迷路選択実験を行ったところ、赤色に対しては光源側・非光源側ほぼランダムに選択した。一方、青色光・緑色光に対しては、負の光走性を引き起こした白色光点灯時とは対照的に、光源に向かって定位する正の光走性の性質を示した。

## (2) 光走性に対する生体アミンの役割

脊椎動物や節足動物において生体アミンが様々な神経修飾作用を持つことが知られている。この光走性応答切り替えに生体アミンが関与していると想定し、ザリガニ体腔内にセロトニン・オクトパミン・ドーパミンを注射し、光刺激に対する応答変化を解析した。ベヒクルの生理食塩水のみを投与した個体をコントロールに、1  $\mu$ MセロトニンをLD個体に投与した結果、コントロール個体の22.2%のみが光源側に定位したのに対し、セロトニン投与個体の76.7%が光源側に定位し、LD個体の光応答が負から正へ切り替わった。LL個体へのセロトニン投与でも同様に、光走性は負から正へ切り替わったが、DD個体へのセロトニン注入では注入後も78.3%の個体が光源側に定位し、正の光走性のままであった。節足動物においてよくセロトニンと拮抗的に作用するオクトパミン投与は、LD個体、LL個体、DD個体すべてにおいて全く影響を持たなかったが、脊椎動物においてセロトニンと拮抗的に作用するドーパミン投与はLD・LL個体の応答性には効果はなかったが、DD個体の光応答が正から負へ逆転した。LD個体の光応答率はドーパミン投与でも27.5%、LL個体は12.5%とコントロールと変わらなかったのに対し、DD個体ではコントロールの80.0%に対し、ドーパミン投与時には、25.0%と有意に減少

した。つまり、セロトニンとドーパミンが拮抗的に作用していることが明らかとなった。そこでセロトニンの前駆物質である5-HTPをLD個体に投与したところ、77.5%の個体が光源側に定位するようになり、負から正へ光走性の性質が逆転し、一方、DD個体へドーパミン前駆物質のDOPAを投与したところ、20.05%の個体しか光源側に定位せず、負の光走性を示すようになった。

これらの結果から、セロトニンとドーパミンが並列的にさらに拮抗的に光走性の性質逆転に寄与していることが明らかとなった。セロトニンは正の光走性を、一方ドーパミンは負の光走性を引き起こす。

## (3) 光走性スイッチとしてのcAMPの機能

セロトニン、ドーパミン受容体のほとんどはGタンパク質共役の代謝型受容体であり、二次メッセンジャー系を賦活化することで、作用を及ぼす。セロトニン、ドーパミン受容体はそれぞれ機能の異なるいくつかのサブタイプに分類され、ザリガニではセロトニン受容体は5HT<sub>1</sub>と5HT<sub>2</sub>サブタイプが同定されており、一方、ドーパミン受容体はD<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>という2つのサブタイプが知られている。5HT<sub>1</sub>、5HT<sub>2</sub>それぞれの受容体ブロッカーを順応直前に投与し、暗順応前後のLD個体の光走性を比較した。何の処理を施していない場合、LD個体は日中の実験遂行であるにも関わらず、順応後有意に正の光走性を示すように行動が切り替わり、暗順応前後で有意差が見られたが、5HT<sub>1</sub>型受容体ブロッカー存在下では顕著な正の光走性への切り替えは認められず、暗順応前後での応答に有意な違いは確認できなかった。一方、5HT<sub>2</sub>型受容体ブロッカー存在下では、コントロール同様、順応前負の光走性を示していたLD個体は暗順応後には有意に正の光走性を示すようになった。日中DD個体を4時間明順応させると、光走性の性質は正から負に切り換わる。D<sub>1</sub>受容体ブロッカー投与により、この切り換えは観察されなかったのに対し、D<sub>2</sub>受容体ブロッカー投与では有意に切り換わった。つまり、5HT<sub>1</sub>型受容体とD<sub>1</sub>受容体が光走性切り換えに深く関わっていることが判明した。

5HT<sub>1</sub>受容体は二次メッセンジャー系cAMP濃度を低下させ、D<sub>1</sub>受容体はcAMP濃度を上昇させる。つまり、光走性スイッチの終着点がcAMP濃度の増減であると考えた。そこで、負の光走性を示すLD個体に膜透過型のcAMPアナログを注射し、人為的に体内cAMPを増加させ暗順応させたところ、LD個体は正の光走性を示さなかった。一方、DD個体にcAMP合成酵素阻害剤を投与し明順応させても、正から負への光走性の切り換えは起こらなかった。

これらの結果から、セロトニンとドーパミン

ン信号系が収斂する cAMP 信号伝達系が行動切り替えの本体であることが分かった。cAMP 濃度上昇は負の光走性を引き起こし、一方、cAMP 濃度減少に伴って光走性の性質が正に切り換わることが明らかとなった。

(4) 走性の性質は習得的に変更可能である

最初にマールクレイフィッシュに学習能力があるのか、MGフリップの馴化を対象に検証した。ザリガニは頭部への機械的刺激に対し、巨大ニューロンMGによる後方へのテイルフリップで応答する。繰り返し刺激を与えることで、その応答性が低下するか否かまず解析した。10秒間隔で刺激をくり返すと、ザリガニは平均50回前後の試行で刺激に全く応答しなくなり、馴化が成立、つまりマールクレイフィッシュに学習能力があることが確認できた。馴化成立後、インターバルを変え、再刺激に対する応答率を測定したところ、20秒のインターバルでは80%以上の個体が馴化が維持され、1分後でも50%以上の個体が応答しなかったのに対し、10分後では75%の個体が応答、30分後からはほぼ100%の個体で応答が回復した。応答の回復した個体は再び10秒間隔で2回目の繰り返し刺激を与えたところ、休息インターバル60分までの個体の二度目の馴化に至るまでの試行回数は最初の回数に比べ有意に短縮され、潜在的に学習の経験が記憶されていることもわかった。

マールクレイフィッシュは緑色光・青色光に対しては日中でも正の光走性を示す。そこで両者の光を同時に与え選択実験を行ったところ、多くのザリガニは緑色光をより好んで定位した。光量の違いを反映している可能性を検討するため、その光量を測定したところ、緑色LEDの方が高かった。つまり、ザリガニは明るい方のゲートを避けているのではなく、緑色という波長に向かって定位していることがわかった。そこで、T字迷路の片側から餌のけん濁液を流すと同時に青色光を照射し、青色光 = 餌と条件付けを行った。一度条件付けを行い、30分後に再び青色光・緑色光を同時に提示したところ、条件付けした多くの個体は、緑ではなく青色光のゲートを選択するようになった。

そこで、日中負の光走性を示すマールクレイフィッシュに対し、T字迷路の片側から餌のけん濁液を流すと同時に光を与え条件付けすることで、光 = 餌と学習し、餌の匂いなしでも光側に定位するようになるか、解析した。条件付けトレーニングを一回し、10分後にメモリーテストを行ったところ、65%以上のマールクレイフィッシュは光点灯側の出口を選択するようになり、遺伝的にプログラムされた光走性の性質が学習によって可逆的に変化可能であることが確かめられた。しかし、条件付け30分後に行ったメモリーテストでは、白色光選択率は3

0%以下に減少した。一方、10秒間隔で3回条件付けトレーニングを行った場合には、60%以上のザリガニが30分後のメモリーテストで白色光側の出口を選択、記憶の強化が起こっていることも併せて明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Momohara Y., Minami H., Kanai A. and Nagayama T. (2016)  
Role of cAMP for winner and loser effects in crayfish agonistic encounters.  
Eur J Neurosci in press

Watanabe S., Momohara Y., Minami H. and Nagayama T. (2016)  
Two types of orienting behaviour during agonistic encounters in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: cambaridae).  
J Crust Biol 36:147-153  
DOI:10.1163/1937240-00005411

Kasuya A. and Nagayama T. (2016)  
Habituation of backward escape swimming in the marbled crayfish.  
Zool Sci 33:6-12  
DOI:10.2108/zs150099

Momohara Y., Yoshida M. and Nagayama T. (2015)  
Serotonergic modulation of social status-dependent behavioural plasticity of the crayfish avoidance reaction.  
J Comp Physiol A 201:1063-1074  
DOI:10.1007/s00359-015-1038-z

Namba H. and Nagayama T. (2015)  
Excitatory connections of nonspiking interneurons in the terminal abdominal ganglion of the crayfish.  
J Comp Physiol A 201:773-781  
DOI:10.1007/s00359-015-1017-4

Nagayama T. and Araki M. (2015)  
Habituation of LG-mediated tailflip in the crayfish.  
Invert Neurosci 15:2  
DOI:10.1007/s10158-015-0178-8

Mita A., Yoshida M. and Nagayama T. (2014)  
Nitric oxide modulates a swimmeret beating rhythm in the crayfish.  
J Exp Biol 217:4423-4431  
DOI:10.1242/jeb.110551

Momohara Y., Kanai A. and Nagayama T.  
(2013)  
Aminergic control of social status in  
crayfish agonistic encounters.  
PLOS One 8:e74489  
DOI:10.1371/journal.pone.0074489

Araki M., Hasegawa T., Komatsuda S. and  
Nagayama T. (2013)  
Social status-dependent modulation of  
LG-flip habituation in the crayfish.  
J Exp Biol 216:681-686  
DOI:10.1242/jeb.075689

〔学会発表〕(計 17件)

長山俊樹 (2015)  
動物における価値評価の比較生物学  
日本比較生理生化学会第37回広島大会シン  
ポジウム 2015年12月12日 JMS アステール  
プラザ 広島県広島市

高橋和也、長山俊樹 (2015)  
A prior resident effect of the marbled  
crayfish  
日本比較生理生化学会第37回大会 2015年  
12月12日 JMS アステールプラザ 広島県広  
島市

吉田美咲、長山俊樹 (2015)  
ザリガニ遊泳肢律動における神経節間同期  
性  
日本動物学会第86回大会 2015年9月19日  
朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター  
新潟県新潟市

桃原悠人、長山俊樹 (2015)  
ザリガニ二個体間地位形成に伴うノンスパイ  
キング介在ニューロンの応答変化  
日本動物学会第86回大会 2015年9月19日  
朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター  
新潟県新潟市

小山大河、長山俊樹 (2015)  
オスのアメリカザリガニはフェミニスト？  
日本動物学会第86回大会 2015年9月19日  
朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター  
新潟県新潟市

南寛樹、桃原悠人、長山俊樹 (2014)  
アメリカザリガニ勝者・敗者効果の基盤とな  
るcAMPシグナル伝達経路  
日本動物学会第85回大会 2014年9月11日  
東北大学川内北キャンパス 宮城県仙台市

高橋和也、長山俊樹 (2014)  
マーブルクレイフィッシュにおけるシエル  
ター選好性  
日本動物学会第85回大会 2014年9月11日  
東北大学川内北キャンパス 宮城県仙台市

桃原悠人、長山俊樹 (2014)  
アメリカザリガニ勝者効果の獲得プロセス  
日本動物学会第85回大会 2014年9月11日  
東北大学川内北キャンパス 宮城県仙台市

吉田美咲、長山俊樹 (2014)  
アメリカザリガニ優劣成立後の回避行動応  
答パターンの変化  
日本動物学会第85回大会 2014年9月11日  
東北大学川内北キャンパス 宮城県仙台市

Yoshida M., Mita A. and Nagayama T.  
(2014)  
A NO/cGMP pathway modulates the rhythmic  
bursting activity of swimmeret motor  
neurons in the crayfish.  
11th International Congress of  
Neuroethology, 29th July 2014 Hokkaido  
Sapporo Japan

Momohara Y. and Nagayama T. (2014)  
Serotonin and octopamine affect winner and  
loser effects during agonistic encounters  
of the crayfish.  
11th International Congress of  
Neuroethology, 29th July 2014 Hokkaido  
Sapporo Japan

Minami H., Momohara Y. and Nagayama T.  
(2014)  
Long-term memory of social dominant and  
subordinate statuses in the crayfish.  
11th International Congress of  
Neuroethology, 29th July 2014 Hokkaido  
Sapporo Japan

Nagayama T., Suzuki N. and Shiratori C  
(2014)  
Reversal of phototaxis of the marbled  
crayfish.  
11th International Congress of  
Neuroethology, 29th July 2014 Hokkaido  
Sapporo Japan

桃原悠人、長山俊樹 (2013)  
ザリガニは自己の強さをどのように認知し  
ているのか  
日本動物学会第84回大会 2013年9月27日  
岡山大学 岡山県岡山市

三田純岐、長山俊樹 (2013)  
ザリガニ遊泳肢律動的リズムの神経節間同  
期性  
日本動物学会第84回大会 2013年9月27日  
岡山大学 岡山県岡山市

南寛樹、長山俊樹 (2013)  
ザリガニ勝者・敗者効果はどれ位維持される  
のか？

日本動物学会第 84 回大会 2013 年 9 月 26 日  
岡山大学 岡山県岡山市

鈴木菜花、白取千尋、長山俊樹 (2013)  
Opposing actions of dopamine and serotonin  
on phototactic behavior in the marbled  
crayfish

日本比較生理生化学会第 35 回大会 2013 年  
7 月 14 日イーグレ姫路 兵庫県姫路市

〔その他〕

ホームページ等

<http://s-crawfish.kj.yamagata-u.ac.jp/welcome.htm>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

長山 俊樹 (NAGAYAMA, Toshiki)  
山形大学・理学部・教授  
研究者番号 : 80218031