

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06269

研究課題名（和文）神経活動マーカー分子の免疫染色によるカマキリ運動調節の神経回路の解明

研究課題名（英文）Revealing the neural circuit underlying motor control in the mantis by immunostaining the molecular marker for neural activity

研究代表者

山脇 兆史（Yamawaki, Yoshifumi）

九州大学・理学研究院・講師

研究者番号：80325498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫では外骨格や筋肉の弾性が運動に大きな影響をあたえるため、脊椎動物とは異なる独自の運動制御の仕組みを持つ可能性がある。運動は多数の筋肉の協調的活動によって成り立ち、それぞれの筋肉の収縮は運動ニューロンの興奮によって引き起こされる。本研究では、カマキリにおける前肢運動の調節機構の解明するために、電気刺激によって人為的に前肢運動を引き起こし、運動中に興奮した運動ニューロンを同定する手法を確立した。この手法を用いて、関節運動の増加に伴い、興奮する運動ニューロン数の増加を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した手法は、昆虫における運動制御機構の研究の発展に寄与するものである。昆虫の運動制御の研究は飛翔や歩行などの反復運動において盛んに行われており、その神経回路が明らかになりつつある。一方、カマキリの捕獲行動のような、目標にあわせて動きを調節する運動は、繰り返し運動を再現することが容易でないため神経回路の解明はほとんど進んでいない。本研究で確立した手法はこの問題点を克服するものであり、今後研究を進めることで、カマキリ前肢運動の大きさを調整する仕組みの解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：Insect behaviors are largely affected by elasticity of exoskeleton and muscles. Their mechanisms underlying motor control might be specific to insects. The movements are achieved by coordinated activities of many muscles, and muscle contractions are elicited by excitation of motor neurons. In this study, to reveal the adjustment mechanism in foreleg movements of the mantis, we established methods for eliciting foreleg movements artificially and for identifying the motor neurons excited during movements. Applying this methods, we observed that the number of excited motor neurons increased as the amplitude of foreleg movements increased.

研究分野：神経行動学

キーワード：運動制御 感覚運動変換 胸部神経節 昆虫

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫では外骨格や筋肉の弾性が運動に大きな影響をあたえるため、脊椎動物とは異なる独自の運動制御の仕組みを持つ可能性がある。昆虫の運動制御の研究は飛翔や歩行などの反復運動において盛んに行われており、その神経機構の理解が進んでいる。一方、カマキリの捕獲行動では動きを反復せずに目標に合わせて動きを調節する。このタイプの運動は目標指向型運動と呼ばれ、その神経機構の理解はあまり進んでいない。目標指向型運動の研究はサルで盛んに行われ、計算機構の理論モデルが提唱されているものの、具体的な神経回路は未だ不明である。

飛翔や歩行などの反復運動の研究が進んでいる理由として、外部刺激や薬物の投与により行動を引き起こしやすい点がある。例えば多くの昆虫は、脚が地面から離れた状態で前方から気流をあてることで飛翔を開始する。また、頭部に薬物を投与することで歩行を引き起こすことができる。カマキリ捕獲行動も視覚刺激によって引き起こすことが可能だが、あくまでも確率的にしか行動が起きない。特に神経活動の観察のために拘束された状態の個体では、捕獲行動の発現はほとんど期待できない。

そこで本研究では、拘束状態のカマキリの神経系を電気刺激することで捕獲行動に似た前肢運動を引き起こした。神経系への電気刺激により昆虫の運動を引き起こした先行研究はあるが、カマキリでの研究例はなかったため、適切な刺激条件の探索を行った。

さらに、運動中に興奮したニューロン群を神経活動マーカー分子への抗体を使って免疫染色することで、前肢運動の調節に関与する神経回路の同定を目指した。この手法は広く用いられているもののカマキリへの適用例は報告されていなかったため、適切な実験条件の探索を行った。

2. 研究の目的

本研究では、カマキリの前肢運動を電気刺激で引き起こし、神経活動マーカーとなる分子を免疫染色することにより、運動調節に関与するニューロン群の同定を試みた。そのために、運動を引き起こすのに適切な刺激部位や電気パルス刺激のパラメータを探索し、異なる大きさの前肢運動を自在に引き起こす手法の開発を目指した。

また、カマキリにおける神経活動マーカー分子の免疫染色手法の確立を目指した。神経活動マーカー分子は多数あるため、その中でカマキリ神経系に適切なものを選択し、濃度やインキュベーション時間などの実験条件の最適化を試みた。以上の手法により、前肢運動の大きさと興奮する運動ニューロン集団の関連を明らかにすることを研究の目的とした。

さらに、前肢運動中の筋繊維や外骨格の変形を観察することで、筋収縮や弾性力が運動調節において果たす役割の解明を試みた。

3. 研究の方法

電気刺激実験では、脳と前胸神経節をつなぐ神経である縦連合に設置した電極からパルス刺激を与え、生じた前肢運動を高速度カメラで撮影した。縦連合には脳の下降性ニューロンの軸索が多数通っている。下降性ニューロンは軸索を胸部神経節や腹部神経節まで伸ばし、そこで運動ニューロンや介在ニューロンにシナプス接続する。そのため、縦連合の電気刺激により下降性ニューロンが興奮し、それが運動ニューロンを興奮させることを期待して実験を行った。

縦連合への電気刺激により前肢運動を誘発することができたものの、複数の関節運動が同時に起こるため解析が複雑になるという欠点があった。そこで、前胸神経節から前肢筋肉系に向かって伸びる神経への電気刺激を試した。これらの神経は運動ニューロンの軸索を含むため、運動ニューロンを直接興奮させる効果が期待された。

電気刺激により目標の前肢運動を高頻度で引き起こし、その運動に関わるニューロン群を何度も興奮させたあとは、前胸神経節を取り出して固定した。そして、神経活動マーカー分子である pERK に対する抗体を用いた免疫染色を行った。染色されたニューロン群を高速共焦点イメージングシステムにより観察し、三次元形態を計測した。それらの形態データをカマキリ前胸神経節の標準地図に登録し、多数の試料から得られたデータの比較を行った。

ニューロンが興奮すると細胞内の pERK 濃度が上昇するため、染色強度が興奮の程度の指標となる。免疫染色の結果、電気刺激によって興奮したと想定される運動ニューロンの細胞体が観察できたが、この pERK シグナルが実際に神経活動を反映するかどうかは未確認であった。そこで薬理学的手法により神経興奮を促進または抑制したカマキリの前胸神経節において pERK の免疫蛍光染色を行った。

以上の手法により運動ニューロンの染色に成功したものの、それらのニューロンが前肢のどの筋肉を神経支配するかは不明であったため、結果の解釈が困難であった。そこで、本手法で興奮が観察された運動ニューロンを識別するために、運動ニューロンの同定作業を行った。前肢筋肉を神経支配する運動ニューロンの逆行性染色とニューロパイルの免疫染色を同時に行なって、ニューロパイル構造との相対配置を手がかりに運動ニューロンを同定する作業を進めた。

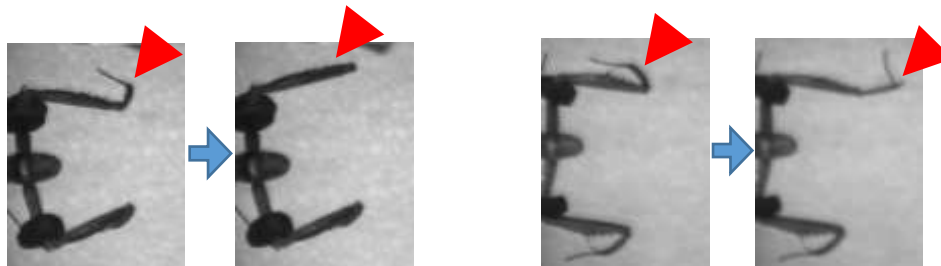
前肢運動中の筋繊維や外骨格の変形は、X線マイクロCT (computed tomography) を用いて観察した。電気刺激により前肢運動を引き起こした直後に液体窒素で冷凍し、乾燥させたのちにX線マイクロCTで内部の筋繊維や外骨格の三次元構造を計測した。

4. 研究成果

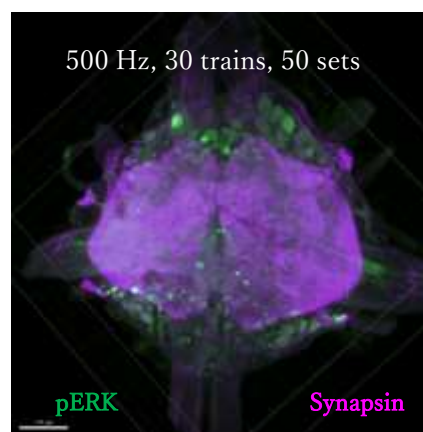
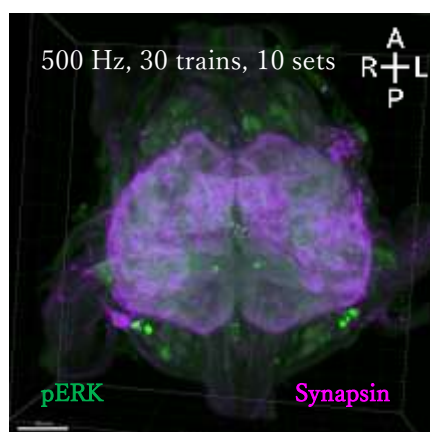
電気刺激実験では、カマキリの拘束台、刺激部位、電気パルス刺激のパラメータなどを工夫することで、縦連合の電気刺激により各関節の伸展を伴う前肢運動を誘発することに成功した。



しかし、縦連合の電気刺激では複数の関節運動が同時に起こるため解析が複雑になり、無処置で拘束したカマキリを使用していたため自発的な活動の影響を受けるという欠点もあった。そこで頭部と中胸以降を取り除いた前胸だけの試料を作成したうえで、拘束台や刺激部位などを工夫することで、単関節の前肢運動を引き起こし撮影する方法を確立できた。さらに、刺激部位を微調整することで関節運動の方向（屈曲もしくは伸展）を操作できたため、今後はより安定的に目標とする前肢運動を引き起こすことが可能になった。

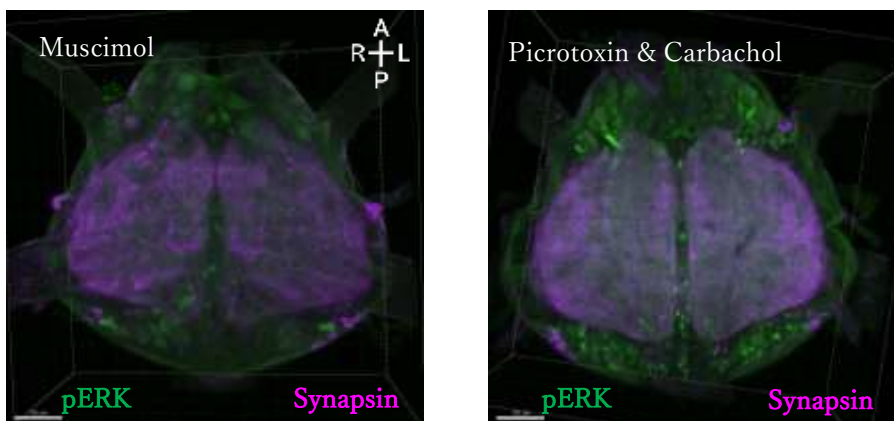


免疫染色実験は、使用する抗体に応じて実験手順の調整が必要となる。特に pERK 抗体の場合、神経活動の後 pERK の濃度が最大になる時間で標本の固定処理を行う必要がある。実験条件を工夫し試行錯誤した結果、最終的に運動ニューロンの染色に成功した。縦連合に 500 Hz の電気パルス刺激を与えた場合、刺激を繰り返す回数を増やすと染色されるニューロン数が増える傾向がみられた。



これらの染色結果がニューロンの興奮の程度を反映していることを確認するために、薬理的にニューロンを興奮もしくは抑制させた後に pERK 抗体による免疫染色を行った。薬理学的実験は今回初めて行ったので、神経興奮や抑制を効果的に引き起こす物質の選定や効果的な投与方法を模索した。抑制作用を持つ物質としてムシモールを、興奮作用をもつ物質としてピクロトキシンやカルバミルコリンを用いた。カマキリ前胸腹側を開いて神経節を露出した状態にし、これらの薬物の水溶液を滴下した後、カマキリの行動を観察した。その結果、ムシモールの投与後には不動状態になり、ピクロトキシンやカルバミルコリンの投与では脚の痙攣が観察されたことから、これらの薬物の効果が確認された。そこで、これらの薬理学的処理をしたカマキリ前胸

神経節に pERK 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、染色された細胞体数がムシモール投与群では少なく、ピクロトキシンやカルバミルコリンの投与群では多かったことから、pERK シグナルが神経興奮の指標となることが確認できた。



上記の実験で染色されたニューロンの識別に役立てるために、前肢筋肉を神経支配する運動ニューロンの逆行性染色とニューロパイルの免疫染色を行った。その結果、カマキリ前胸神経節のほぼ全ての運動ニューロンの染色に成功し、ニューロパイル構造との相対的配置をもとにそれぞれのニューロンの同定を行った。現在は同定した運動ニューロンが神経支配している筋肉の確認作業を進めており、その完了により前肢運動の調節に関与する運動ニューロンが明らかになることが期待される。

前肢運動中の腿節の筋繊維や外骨格の三次元構造を観察した実験では、腿節屈筋において筋繊維の短縮や繊維方向の変化が確認できた。今後、この手法を併用することで、運動ニューロンの興奮と筋繊維の収縮パターンに関連が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池本陽向子、山脇兆史
2. 発表標題 カマキリ前胸神経節における運動ニューロンの同定と標準地図への登録
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池本 陽向子、山脇 兆史
2. 発表標題 カマキリ前胸神経節における運動ニューロンの同定と神経活動の観察
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ENDO Koji, HOSODA Yutaka, YAMAWAKI Yoshifumi
2. 発表標題 Observation of the motor neurons activated during the foreleg movements induced by electrical stimulation in the praying mantis
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第44回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤貢司、山脇 兆史
2. 発表標題 カマキリ神経系への電気刺激によって誘発される前肢運動と神経活動の観察
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mahiro Kuwazuru, Yoshifumi Yamawaki
2. 発表標題 Three-dimensional observation of the musculoskeletal system of forelegs in the mantis using X-ray micro-computed tomography
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学研究院生物科学部門 細胞機能学研究室 http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~funcell/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------