

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03261

研究課題名（和文）微小脳における習慣記憶形成とその神経基盤の解明

研究課題名（英文）Neural mechanisms underlying habitual memory formation in insect microbrains

研究代表者

水波 誠（Mizunami, Makoto）

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：30174030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：コオロギの匂いと水の条件付け訓練において訓練の初期には報酬を十分に与えられたコオロギ学習した匂いを嗅がせても条件反応は起こさない。しかし訓練を繰り返すと、報酬を十分に与えても匂いへの条件反応が起こるようになる。このような「習慣形成」は哺乳類ではオペラント条件付けで起こるが、パブロフ型条件付けでは起こらない。本研究の結果、コオロギのパブロフ型条件付けで形成される習慣記憶の性質は、哺乳類のオペラント学習で形成される習慣記憶とは非常に異なることが分かった。さらに習慣形成の研究に有用な味覚嫌悪学習系の確立に成功し、習慣形成に関わるオクトパミンニューロンの活動のラベリング法の開発に進展があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は私がコオロギを用いて発見したパブロフ型条件付けにおける習慣形成について、その性質が従来調べられてきた哺乳類のオペラント学習における習慣形成とは非常に異なる性質を持つことを初めて明らかにしたものであり、動物の学習系の理解に大きく貢献するものであり、ヒトの学習訓練で起こる習慣形成の理解についても新たな洞察を与えた。昆虫の学習系に哺乳類の学習系にも勝るとも劣らない精妙な仕組みがあることを解明した本研究は、社会的にも大きなインパクトが予想される。

研究成果の概要（英文）：In Pavlovian conditioning in crickets, a conditioned response (CR) to a conditioned stimulus (CS) is sensitive to devaluation of the unconditioned stimulus (US) early in training but it becomes insensitive to current value of US after extended training. Similar effect of extended training, called “habit formation”, has been found in instrumental conditioning in mammals, but not in Pavlovian conditioning in any animals. In this study I showed that the nature of memory after extended Pavlovian training in crickets fundamentally differs from that in instrumental conditioning in mammals concerning context specificity and effect of extinction trials. Moreover, I established taste aversion learning procedure that is useful for the study of the habit formation and developed methods to monitor activities of octopamine neurons that I have shown to play critical roles in habit formation.

研究分野：神経生物学

キーワード：学習 昆虫 報酬 オクトパミン コオロギ 報酬価値引き下げ 行動の自動遂行 パブロフ型条件付け

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類のオペラント条件づけでは、学習訓練を繰り返すと、学習行動の性質が次第に変容することが知られている。オペラント条件づけとは、ラットがレバーを押すと餌がもらえることの学習がそれに当たる。ラットのオペラント条件づけの訓練初期には、ラットは空腹で餌が欲しい時のみレバーを押す。しかし訓練を繰り返すと、ラットは満腹であってもレバーを押すようになる。すなわち訓練の繰り返すと学習行動が本来の目的と乖離し自動的に起こるようになる。この自動化は、ヒトにおいてはアルコール依存症や麻薬中毒と深く関わると考えられ、医学への応用のためにもその神経メカニズムの解明が切望されている。

研究代表者は、昆虫の連合学習の基本原則について調べてきた。コオロギに匂いと水(報酬)のパプロフ型条件づけの訓練を4回行うと、ほぼ永続的な記憶が成立した。また訓練後、テストの前に水を十分量飲ませると、学習した匂いを嗅がせても条件反応は起こらなかった。しかしこの訓練を3日間繰り返すと、水を十分に飲ませても条件反応が起こった(引用文献1)。従来の哺乳類での研究からは、繰り返し訓練による習慣形成はオペラント条件づけ(特定の行動の繰り返し)のみで起こり、パプロフ型条件づけ(特定の感覚経験の繰り返し)では起こらないとされてきた。私たちの発見はこの定説を覆すものである。

私たちはこの現象を説明するための神経回路モデルを提案した(引用文献1)。このモデルでは、(1)脳のキノコ体に投射するオクトパミンニューロンが水(報酬)の情報を伝える、(2)学習の初期には、学習した匂いを嗅がせると、水の情報をコードするオクトパミンニューロンが活性化し、その活性化が条件反応の遂行に必須である、(3)訓練を繰り返すと、このニューロンの活性化がなくても条件反応が遂行されるようになる、と仮定した。モデルの予測の1つは、学習初期にはテストの前にオクトパミン受容体阻害剤(エピナスチン)をコオロギに投与すると匂いへの条件反応が起こらなくなるが、訓練を繰り返すとエピナスチンを投与しても条件反応が阻害されなくなることである。実験結果はこの予想とよく一致した(引用文献1)。

## 2. 研究の目的

本研究の核心的な問いは、「条件づけ訓練の繰り返しにより形成される習慣記憶には、条件づけの種類や動物の系統の違いを超えた、共通の性質やメカニズムがあるのだろうか?」である。本研究の目的は、上記の「問い」に挑み、研究代表者がこれまで独自に切り開いてきた動物の学習・記憶システムの普遍性・多様性とその進化の解明に迫る研究をさらに大きく推し進めることである。

具体的には、コオロギのパプロフ型条件づけ訓練の繰り返しによって形成される習慣記憶の性質を分析し、哺乳類のオペラント条件づけで報告された習慣記憶の性質との共通点・相違点を明らかにする。また昆虫の習慣形成を支える脳内変化を脳の局所破壊実験と脳ニューロン応答の解析などにより明らかにし、哺乳類のオペラント条件づけでの知見との共通点・相違点を探る。

## 3. 研究の方法

本研究では、学習行動実験を主体に、薬理実験、脳の神経活動解析を総合し、繰り返し訓練で形成される記憶の性質の解明し、さらにその脳内機構の解明をめざす。

実験材料としてはフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いる。コオロギでは、繰り返し訓練によって成立する習慣記憶の性質の解析、特にコンテキスト依存性と消去訓練の効果の解析、「報酬価値引き下げ法」の確立、オペラント条件付けの確立及びオペラント条件づけの訓練の繰り返しにより成立する記憶の性質の解析を行う。

コオロギでの通常の訓練では、匂いと水(報酬)を対提示する条件づけ訓練を1日4回行う。繰り返し訓練では、この訓練を3日間繰り返す。訓練の前と後に、学習した匂いとコントロールの匂いへのコオロギの相対的な訪問時間を調べるテストを行い、条件反応(記憶の読み出し)の有無やその程度について評価する。

習慣形成に伴うオクトパミンニューロンの活動変化の解析には渡邊(総合研究大学院大学)らが開発したイメージング法(引用文献2)を用いる。具体的には最初期応答遺伝子 *egr-B* の発現の蛍光イメージングによる神経活動ラベリングを可能とした遺伝子改変コオロギを用い、オクトパミン合成酵素の抗体染色と組み合わせる。

## 4. 研究成果

本研究では上記の目標の達成のために、(1)習慣記憶のコンテキスト依存性の解明、(2)習慣記憶への消去訓練の効果の解明、(3)味覚嫌悪学習による報酬価値引き下げ実験系の確立、(4)最初期応答遺伝子 *egr-B* の発現を指標としたオクトパミンニューロンの神経活動ラベリング法を用いた解析、の4つの課題に取り組んだ。

さらに、コオロギのオペラント条件付け系の開発、ワモンゴキブリのパプロフ型条件付けの繰り返し訓練による習慣形成の確認にも取り組んだが、それらについての成果は予備段階にとどまった。

#### 4-1. 習慣記憶のコンテキスト依存性の解明

コオロギのパブロフ型条件づけにおいて、明暗のコンテキストを訓練時とテスト時で変えた時の影響を調べる実験を行った。その結果、繰り返し訓練で成立した習慣記憶は学習初期の記憶よりもコンテキスト依存性が低いことが明らかになった。興味深いことに、これは哺乳類のオペラント条件付けでは習慣記憶は学習初期の記憶よりコンテキスト依存性が高いという報告とは真逆の結果であった。これは哺乳類のオペラント条件付けとコオロギのパブロフ型条件付けの間に、習慣形成のメカニズムに相違点があることを示している。そこでこれらの違いを昆虫のパブロフ型条件付けと哺乳類のオペラント条件付け匂いける記憶想起の仕組みの違いによって説明するモデルを提案した。このモデルの核心は昆虫の記憶想起にはオクトパミンニューロンの活動が必須であるが、繰り返し訓練をするとその必要性が失われるというものである。このモデルはオクトパミン受容体阻害剤を用いた薬理的な解析によって支持された。

#### 4-2. 習慣記憶への消去訓練の効果の解明

繰り返し訓練により形成される習慣記憶は学習初期に記憶とほぼ同様な消去訓練への感受性を持つことがわかった。これは哺乳類のオペラント条件付けでは習慣記憶は学習初期の記憶よりも消去訓練への耐性が高いとの報告や、ヒトにおいても一旦形成された「習慣」は消去訓練による是正が起こりくいとの報告とは、大きく異なっていた。私の考案したモデルは、これらの違いをよく説明するものであった。どちらの性質の習慣記憶の方がより適応的かを考察すると、それぞれ一長一短であり、ある局面においては昆虫の習慣記憶の性質の方がより適応的だと結論され、これは動物の生き方の違いに帰結された。

#### 4-3. 味覚嫌悪学習による報酬価値引き下げ実験系の確立

習慣記憶の解析には条件反応の遂行への「報酬価値引き下げ」の効果を調べることが必須である。これまでは報酬を十分に与える方法を用いてきたが、その妥当性を確認するためにも、異なる方法での「報酬価値引き下げ」の確立が必要である。味覚嫌悪学習系はその有力な候補となる。そこでコオロギでの味覚嫌悪学習系の開発に取り組んだ。

まずスクロース(ショ糖)またはグルコースを若い梅の実に含まれる毒素であるアミグダリンと連合させる学習系を開発した。アミグダリンは消化管内でグルコシダーゼにより分解されシアンイオンを発生させる毒物である。しかしこの味覚嫌悪学習系の報酬価値引き下げ実験への適用には不適な性質があることが明らかになった。

そこで次に、スクロースを塩化リチウム(毒物)と連合させる味覚嫌悪学習法について検討した。この方法ではアミグダリンを用いる学習法に比べて遥かに高い学習効果が得られることが分かった。糖溶液の濃度、糖の種類(スクロース、フルクトース、グルコース)、糖溶液の消費テストの方法、訓練からテストまでの時間間隔などについて詳細な検討を行った結果、非常に安定した実験結果を出せるようになった。この味覚嫌悪学習系は、報酬価値引き下げ実験への応用に最適と考えられた。今後の更なる研究進展に大きく資するものである。

#### 4-4. 習慣形成時のオクトパミンニューロンの活動解析法の確立

私たちの研究により、コオロギの条件付けにおいて、訓練初期にはオクトパミンニューロンの神経活動が、学習行動遂行には必須であることが示唆されている。一方、私の提案するモデルでは、習慣記憶形成後には学習行動の遂行にオクトパミンニューロンの活動は必要なくなると予想された(引用文献1)。この仮説は、すでにいくつかの証拠により支持されているが、学習訓練時のオクトパミンニューロンの活動モニターによる直接的な検証が必要である。そこで渡邊らが開発した最初期応答遺伝子 *egr-B* の発現を指標としてオクトパミンニューロンの活動をラベリングできる遺伝子改変コオロギ(引用文献2)を用いた研究を進めた。本研究の結果、スクロースを飲ませた際のオクトパミンニューロンの神経活動を捉えることができた。しかし習慣形成に伴うオクトパミンニューロンの活動変化については、それを確実に捉えるには至らず、本実験法の更なる改良が必要であることと結論づけられた。

#### <引用文献>

- (1) Mizunami et al. (2019). Development of behavioural automaticity by extended Pavlovian training in an insect *Proc R. Soc. B.* 286,20182132.
- (2) Watanabe et al. (2018). Immediate-early promoter-driven transgenic reporter system for neuroethological research in a hemimetabolous Insect. *eNeuro* 5,e0061-18.2018 1-23.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizunami Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 What Is Learned in Pavlovian Conditioning in Crickets? Revisiting the S-S and S-R Learning Theories	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 661225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2021.661225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Misato, Alvarez Beatriz, Mizunami Makoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Reduction of contextual control of conditioned responses by extended Pavlovian training in an insect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Learning & Memory	6. 最初と最後の頁 17~23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/lm.052100.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ebina Hiroki, Mizunami Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Appetitive and aversive social learning with living and dead conspecifics in crickets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10:9340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66399-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi N, Nishino H, Domae M, Mizunami M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Separate but interactive parallel olfactory processing streams governed by different types of GABAergic feedback neurons in the mushroom body of a basal insect.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 8690-8704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0088-19.2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Domae M., Iwasaki M., Mizunami M. and Nishino H.	4. 巻 708
2. 論文標題 Functional unification of sex pheromone-receptive glomeruli in an invasive cockroach derived from the genus <i>Periplaneta</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci. Lett.	6. 最初と最後の頁 134320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.134320.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizunami M., Hirohata S., Sato A., Arai R., Terao K., Sato M. and Matsumoto Y.	4. 巻 286
2. 論文標題 Development of behavioral automaticity by extended Pavlovian training in an insect.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. R. Soc. B.	6. 最初と最後の頁 21182132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rspb.2018.2132.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamanaka Y. and Mizunami M.	4. 巻 376
2. 論文標題 Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the mushroom body of the field cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 97-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-2969-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Makoto Mizunami
2. 発表標題 Habit formation by extended Pavlovian training in crickets.
3. 学会等名 2nd Virtual Symposium of Comparative Psychology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanta Terao, Yukihisa Matsumoto, Beatriz Alvarez, Makoto Mizunami
2. 発表標題 Overexpectation and its spontaneous recovery in crickets
3. 学会等名 2nd Virtual Symposium of Comparative Psychology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石康介, 渡邊崇之, 西野浩史, 水波誠, 渡邊英博
2. 発表標題 ワモンゴキブリの性フェロモン受容体の同定
3. 学会等名 日本動物学会米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hui Lyu, Makoto Mizunami.
2. 発表標題 Conditioned taste avoidance in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .
3. 学会等名 日本動物学会米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Tateishi, Takayuki Watanabe, Hiroshi Nishino, Makoto Mizunami, Hidehiro Watanabe
2. 発表標題 Sex pheromone receptors in the American cockroach.
3. 学会等名 JSCPB 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺尾 勸太、Beatriz Alvarez, 水波誠
2. 発表標題 予測誤差理論のさらなる検証：コオロギの連合学習におけるoverexpectation現象
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺尾勸太、Alvarez Beatriz, 松本幸久、水波誠
2. 発表標題 過剰予期効果をコオロギの連合学習で検証する
3. 学会等名 日本基礎心理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立石康介、渡邊崇之、西野浩史、水波誠、渡邊英博
2. 発表標題 ワモンゴキブリの嗅覚共受容体 (Orco)の同定と機能解析
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Watanabe, Atsushi Ugajin, Makoto Mizunami,
2. 発表標題 Immediate-early promoter-driven transgenic reporting system for 3-D single-cell resolution activity mapping in the cricket nervous systems.
3. 学会等名 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, Hungary. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊崇之、水波誠
2. 発表標題 昆虫脳性決定機構の進化を探る～doublesex 遺伝子はコオロギ脳の性を決めるのか？
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水波誠、佐藤貴光、呂恵、渡邊崇之
2. 発表標題 フタホシコオロギ味覚嫌悪学習系の確立
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木敦己、木下充代、向井歩、小口晃平、水波誠、蟻川謙太郎、後藤慎介、三浦徹、久保健雄
2. 発表標題 様々な昆虫種におけるキノコ体ケニヨン細胞サブタイプの探索と比較解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naomi Takahashi, Hiroshi Nishino, Makoto Mizunami
2. 発表標題 Separate but interactive parallel olfactory processing streams governed by different types of GABAergic feedback neurons in the mushroom body of cockroaches.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 M. Mizunami
2. 発表標題 Computational algorithms for associative learning in insects: Do they differ from those in mammals ?
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Mizunami
2. 発表標題 The design of memory systems in insects: Do they differ from that in mammals?
3. 学会等名 Symposium on bioinspired design of advanced materials sponsored by American Society of Mechanical Engineers etc. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 末光 隆志編、執筆者水波 誠など	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典	

1. 著者名 Jae Choe (editor), Mizunami M. et al. (authors)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 3048
3. 書名 Encyclopedia of Animal Behavior 2nd Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学水波研ホームページ  
<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~mizunami/MICROB-2/>

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		
スペイン	Universidad Publica de Navarra		