

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06765

研究課題名（和文）ミツバチのナビゲーションにおける方向と距離の情報統合の脳内メカニズム

研究課題名（英文）Brain integration mechanism of the direction and distance information for navigation in honey bees.

研究代表者

岡田 龍一（Okada, Ryuichi）

神戸大学・理学研究科・学術研究員

研究者番号：20423006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ナビゲーションに関わる脳メカニズムについてミツバチをもちいて組織化学的、行動学的、薬理学的研究を行ったところ、（1）方向と距離の情報統合は脳内で概日時計の制御を受ける精巧なシステムである可能性が高いこと、（2）そのシステムの出力である定位飛行方向は過去の経験の影響をうけること、（3）過去の記憶の形成にはオクトパミンが関与している可能性が高いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ミツバチの概日時計による偏光情報の時間補償が視葉メダラ背側で起きている可能性があることがわかった。また、飛行方向に影響する経験が長期記憶になることがわかった。この長期記憶にオクトパミンが重要な役割を果たしていることが強く示唆された。これらのことは、動物のナビゲーションにおける方向検出の脳機構解明へつながる大きな一歩になると期待される。

研究成果の概要（英文）：To reveal the brain mechanism of the navigation, histological, behavioral, and pharmacological experiments were performed using honey bees. Double staining of polarization responding neurons and PDF neurons strongly suggested that a small region in the dorsal medulla must be a potential site for recognizing a flight direction during navigation. Behavioral experiments showed that flight orientation was affected by experience. Bees treated by an associative conditioning between a colored rectangle and sucrose solution significantly oriented to the learned colored rectangle when both rewarded and non-rewarded colored rectangles were presented. Pharmacological experiments showed that epinastine impaired the learned orientation, suggesting that octopamine is involved in this learning.

研究分野：神経行動学

キーワード：脳 ナビゲーション 空間認識 昆虫 学習

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物が行う目的地へのナビゲーションの脳メカニズムの解明は現在の神経科学の重要な課題のひとつであるだけでなく、工学分野でも注目されている。渡り鳥やウミガメ、昆虫などは、海洋や砂漠などを数十 m~数百 km 以上先の目的地へ移動する。数十 m を超えるような移動時に、主に使われる経路積算では、方向情報と距離情報はともに重要で、ナビゲーション中は常に更新され統合される。

ミツバチはランドマークのない状況下でも数百 m~数 km 離れた餌場を繰り返し訪問する。また、ミツバチの尻振りダンスは良好な餌場の位置を、巣から見た方向と距離に変換して巣の仲間に伝えていることから、ミツバチが採餌飛行に方向と距離の情報を利用していることは明らかである。

ナビゲーション中の自身の位置の把握には自身の移動した方向と距離から現在地をえる「経路積算」と移動経路中にあるランドマークの位置関係から得る「認知地図」の方法がある。これらは状況によって使い分けられているが、過去の経験がどのように飛行方向の決定にかかわっているのかについてはわからないことが多い。

また、ナビゲーション中の自身の飛行方向の把握には、天空にできる偏光パターンを利用していることが有力とされており、複眼の背側部の一部 (DRA) に偏光を受容する視細胞が並んでいる。しかし、天空の偏光パターンは1日の中で時刻とともに変化するために、それらの視細胞が脳のどこで概日リズムの制御を受けているのかは不明のままである。

2. 研究の目的

巣や餌場などの目的地へ移動するナビゲーション行動では、移動中に方向情報と距離情報を逐次取得しそれらを統合して移動を完遂する。時刻とともに変化する天空の偏光パターンから飛行方向を決定するには、自身の記憶した偏光方向を時間補償して天空の偏光パターンと照合しなければならない。そのため、DRA のニューロンが概日リズムによって制御されていることが予想される。また、ミツバチは何度も同じ餌場を訪れ、熟練するに従って餌場へ直線的に飛行することから、過去の経験をもとに飛行方向が決定されていることも予想される。

以上のことを踏まえて、本研究では、ナビゲーション研究のモデル動物としてミツバチを利用して、DRA ニューロンの概日時計からの制御を明らかにするために、DRA ニューロンの投射先を調べるとともに時計分子のひとつである PDF の脳内分布を調べる。さらに、学習によって飛行方向がどのように影響を受けるかをバーチャルリアリティ環境下でミツバチに疑似採餌飛行させ、その脳メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) DRA ニューロンと概日時計ニューロンの免疫組織化学

DRA ニューロンの投射先を明らかにするために、先端を鋭くした小さなメスで DRA の角膜をそぎ落とし、網膜を露出させて蛍光色素 (Dextran Texas-Red) の小さな結晶を乗せ、湿室に入れて 4 °C で一晩静置した。その後、脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した。固定後、洗浄したあと 6%アガーに包埋して厚さ 100 μ m の切片にし、共焦点レーザー顕微鏡で観察、撮影した。

概日時計に関連する領域を調べるために、解剖して取り出した脳を 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した。洗浄後、6%アガーに包埋して、厚さ 100 μ m の切片にした。切片は抗 PDF 抗体と 4 °C で 6 日間反応させた後、2 次抗体と反応させて蛍光標識した。標本は共焦点レーザー顕微鏡で観察、撮影した。

さらに、DRA ニューロンと概日時計ニューロンとの解剖学的関係を明らかにするために二重染色を行った。まず、DRA ニューロンを上記のように順行染色したあと、脳を取り出して上記の方法で PDF に対する抗体染色を行った。

(2) バーチャルリアリティ環境下での学習による視覚定位行動

ミツバチをトルクメータに取り付け、ミツバチの正面のディスプレイに青い四角と黄色い四角を提示してバーチャルリアリティ環境下でミツバチを飛翔させた。ミツバチが飛行方向を変える時に発生するトルクを検出してモニターへフィードバックさせ、飛行方向の変化に連動させて提示した四角が水平方向に動くようにし、ミツバチに疑似採餌させた。それぞれに定位した時間を測定して学習前の選好性 (PI) を得た。そのうち、PI の低かった方の色の四角を提示しながら報酬 (スクロース溶液) を与えて条件付けを行い、色と報酬を連合させた。条件付け 5 分後と 24 時間後に、再び青い四角と黄色い四角を提示して疑似採餌飛行をさせて、条件付け後の PI

を得た。

(3) バーチャルリアリティ環境下での視覚定位行動の脳内メカニズム
学習による視覚定位行動の脳内メカニズムを推定するために、オクトパミンを介在する神経伝達の阻害剤であるエピナスチンを投与した。(2)と同じ手順だが、学習前のPIを測定する前に200 nLのエピナスチン(4 mM または0.4 mM)を単眼トラクトから投与した。投与後30分してから(2)の手順を行った。コントロール群にはPBSを投与した。

4. 研究成果

(1) DRAニューロンと概日時計ニューロンの免疫組織化学

DRA領域から蛍光色素を順行的に流したところ、ほぼ全てのDRAの視細胞がメダラの背側の小領域に局限して投射していることがわかった(図1A)。さらに、PDFに対する抗体染色を行ったところ、脳の広範囲にPDFシグナルが見つかった(図1B)。視葉のメダラにシグナルがあった(図1A)ので、DRAの順行染色とPDFの二重染色を行ったところ、メダラ後方の背側に両者のシグナルがきわめて近傍に位置し、一部重なっている箇所が見つかった(図1C-E)。このことは、ミツバチの偏光情報処理機構に何らかの時間補償機構があり、それが視葉の背側で行われていることを意味する。

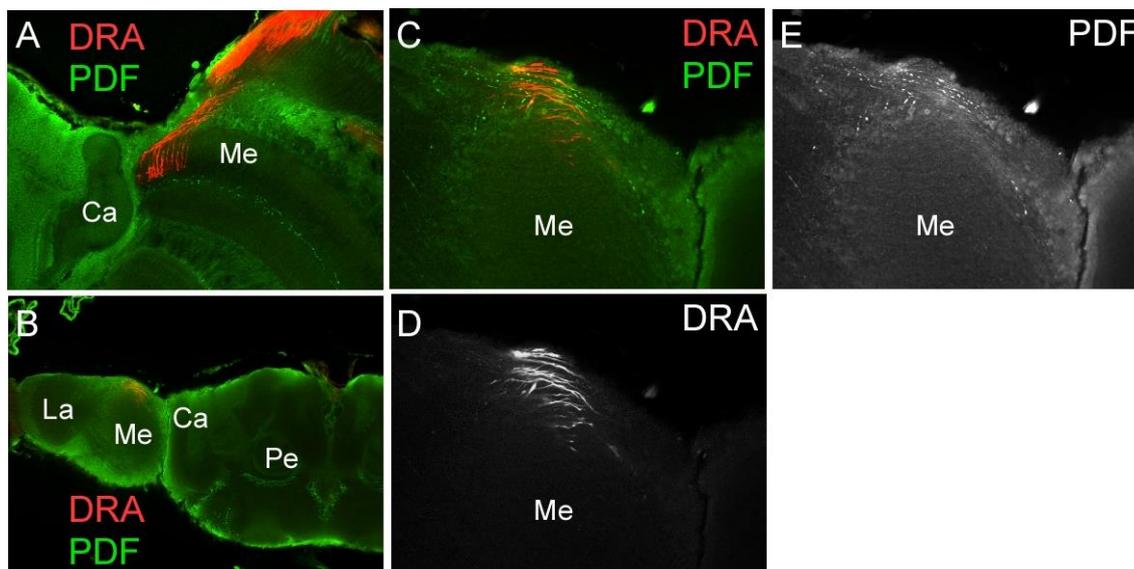


図1 免疫組織化学の結果。A: DRAニューロンはメダラ(Me)の背側の限られた領域に投射する。B: PDFは脳内に広く分布する。C-E: DRAニューロンとPDFの二重染色像。Bの拡大。メダラ(Me)に投射するDRAニューロンの極近傍にPDFのシグナルがあり、シグナルが重なる箇所(黄色)があった。

(2) バーチャルリアリティ環境下での学習による視覚定位行動

条件付けを行ったところ、スクロース溶液と連合した色の四角に優位に長時間定位するようになった(図2)。逆行条件付けでは定位に変化はなかった。さらに、この学習による記憶は24時間後も保持される長期記憶になることがわかった(図2b)。

(3) バーチャルリアリティ環境下での視覚定位行動の脳内メカニズム

エピナスチンを投与しオクトパミンの神経伝達を阻害すると、5分後も24時間後も条件付けによる定位飛行の変化はみられなかった(図3)。この結果は4 mMでも0.4 mMでも同じであった。一方、対照実験のPBSの投与では短期記憶も長期記憶も成立した。

上記(2)と(3)は、ミツバチはナビゲーションにおいて、過去の経験によって飛行方向が変化し長期記憶として保持されること、さらに、その記憶にはオクトパミンが関与していることを示唆している。

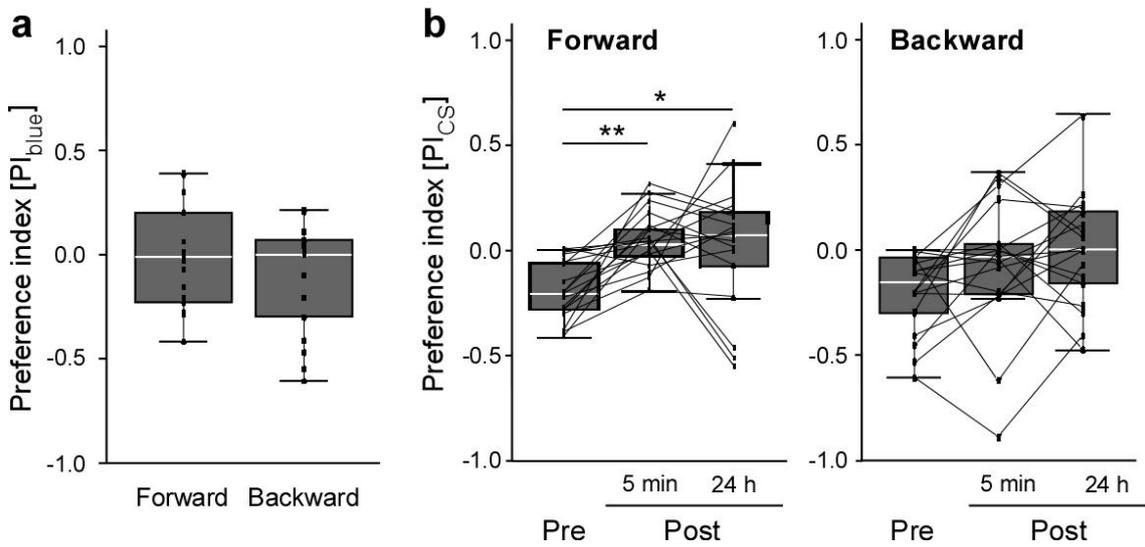


図2 バーチャルリアリティ環境下での学習の結果。a: 条件付け前。b: 条件付け後の結果。左は順行条件付け（遅延条件付け）、右は逆行条件付け。順行条件付けで形成された記憶は24時間後も保持されていた。

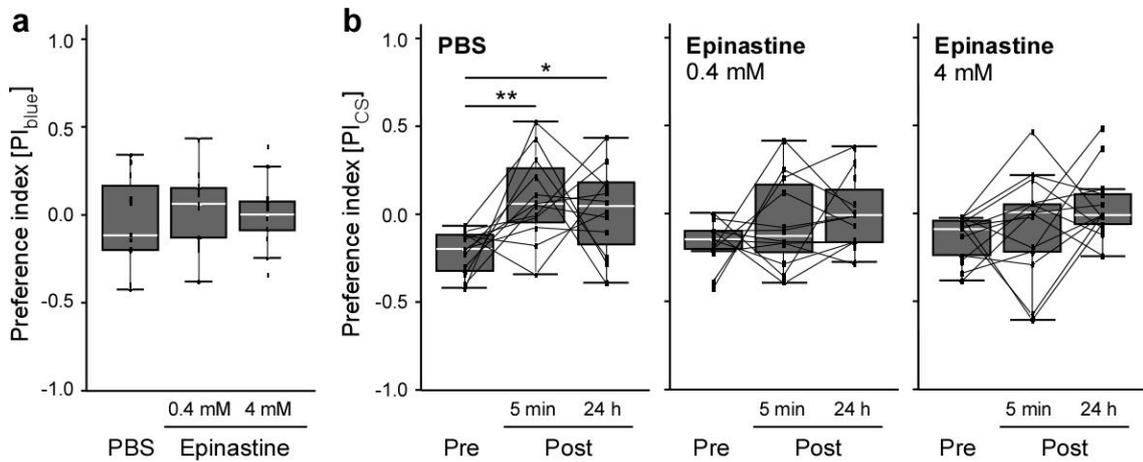


図3 薬理学実験の結果。a: 条件付け前。b: 条件付け後の結果。エピナスチンの投与によって学習効果が消失した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 3件）

1. 著者名 Norihiko Kobayashi, Yuji Hasegawa, Ryuichi Okada, Midori Sakura	4. 巻 -
2. 論文標題 Visual learning in tethered bees modifies flight orientation and is impaired by epinastine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00359-023-01623-z	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 Ryuichi Okada, Hidetoshi Ikeno, Hitoshi Aonuma, Midori Sakura, Etsuro Ito	4. 巻 -
2. 論文標題 Honey Bee Waggle Dance as a Model of Swarm Intelligence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Robotics and Mechatronics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Matsubara N, Okada R, Sakura M	4. 巻 38
2. 論文標題 Possible role of polarized light information on spatial recognition in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 297-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs200081	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 Kobayashi N, Okada R, Sakura M	4. 巻 223
2. 論文標題 Orientation to polarized light in tethered flying honeybees.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 jeb228254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb228254	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 Yamamoto T, Sugahara M, Okada R, Ikeno H	4. 巻 52
2. 論文標題 Differences between queen piping temporal structures of two honeybee species, <i>Apis cerana</i> and <i>Apis mellifera</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Apidologie	6. 最初と最後の頁 524-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13592-021-00840-2	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 Matsubara M, Okada R, Sakura M	4. 巻 -
2. 論文標題 Possible role of polarized light information on spatial recognition in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ai H, Okada R, Sakura M, Wachtler T, Ikeno H	4. 巻 19
2. 論文標題 Neuroethology of the waggle dance: how followers interact with the waggle dancer and detect spatial information.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects10100336	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 該当する

1. 著者名 岡田龍一	4. 巻 28
2. 論文標題 ミツバチとにおいと植物の関係	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アロマトピア	6. 最初と最後の頁 46-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林宜弘、長谷川雄二、岡田龍一、佐倉緑
2. 発表標題 ライトシミュレータを用いたセイヨウミツバチの色識別に基づく定位学習
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村敏文、池野英利、大橋瑞江、岡田龍一、尾崎まみこ、藍浩之、波部峻也、磯川梯次郎
2. 発表標題 個体検出・追跡に基づいた昆虫の行動解析システム開発、インテリジェント・システム・シンポジウム
3. 学会等名 インテリジェント・システム・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsubara N, Ando N, Okada R, Ogawa H, Sakura M
2. 発表標題 Aversive e-vector orientation learning in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> using the treadmill device.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林宜弘、長谷川雄二、岡田龍一、佐倉緑
2. 発表標題 フライトシミュレータを用いたセイヨウミツバチの視覚定位学習
3. 学会等名 ミツバチシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村敏文、池野英利、大橋瑞江、岡田龍一、尾崎まみこ、藍浩之、波部峻也、磯川梯次郎
2. 発表標題 機械学習を用いた行動解析支援プログラムの開発
3. 学会等名 ミツバチシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉置弘憲、岡田龍一、佐倉緑
2. 発表標題 セイヨウミツバチの概日時計が複眼の偏光検出領域の光感度にも与える影響
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kobayashi N, Hasegawa Y, Okada R, Sakura M
2. 発表標題 Conditioned visual flight orientation in tethered honeybees.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsubara N, Ando N, Okada R, Ogawa H, Sakura M
2. 発表標題 Spatial recognition based on polarized light information in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村敏文、池野英利、大橋瑞江、岡田龍一、尾崎まみこ、藍浩之、波部峻也、磯川梯次郎
2. 発表標題 機械学習を用いた行動解析のための個体追跡手法の開発
3. 学会等名 インテリジェント・システム・シンポジウム (FANシンポジウム)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田龍一
2. 発表標題 振動で符号化される尻振りダンスからひも解くミツバチの採餌戦略
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田龍一
2. 発表標題 ミツバチのにおい学習の神経基盤
3. 学会等名 ミツバチサミット2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuga Ueno, Haruka Onishi, Ryuichi Okada, Midori Sakura
2. 発表標題 Bees decide their flight direction based on the polarized-light pattern in the sky.
3. 学会等名 第41回日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mai Otani, Ryuichi Okada, Midori Sakura
2. 発表標題 Comparative study of olfactory responses to odor components of the oriental orchid flower in Japanese and European honeybees.
3. 学会等名 第41回日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野由雅、岡田龍一、佐倉緑
2. 発表標題 セイヨウミツバチの採餌経験に基づく偏光定位行動の解析
3. 学会等名 日本動物学会近畿支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 生物音響学会、岡田龍一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 464
3. 書名 生き物と音の事典、中枢による発音の制御	

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www2.kobe-u.ac.jp/~okd/index.html

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
---------	---------