

令和 5 年 6 月 5 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：19K06766

研究課題名(和文) 昆虫のナビゲーションにおける方向選択の神経基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the neural mechanisms underlying orientation in insect navigation

研究代表者

佐倉 緑 (Sakura, Midori)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60421989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの昆虫は天空の偏光パターンから方向を検出する。これまでに、脳の中心複合体における偏光情報の符号化やオプティックフローとの統合が示されているが、実際のナビゲーション中に行動が制御されるしくみには未解明な点が多い。本研究では、神経行動学のモデル生物であるコオロギを用い、偏光定位行動と脳内神経活動の関係を直接的に解析できる実験系を構築し方向決定の脳内機構に迫ることを目的とした。コオロギは、アリーナでの場所学習実験とトレッドミルを用いた偏光定位罰条件付けのどちらにおいても、偏光のe-ベクトル方向に基づいたナビゲーションを示した。現在、偏光定位学習の成立過程における脳内神経活動の解析をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫のナビゲーションの脳内機構は、近年飛躍的に研究がすすんでいる分野であるが、これまでのほとんどの研究は、外界からの刺激の符号化と統合や自己の動きのモニタリングに着目したものであり、個体が経験によって確立した空間認識に基づいて行動を制御するしくみについては未解明な点が多い。本研究では、生理学的な実験に適したコオロギを用いて、このナビゲーション行動発現の神経機構に切り込むための新しいパラダイムを確立できた。定住性のない単独性昆虫であるコオロギのような種においても、適切な条件づけによってナビゲーション行動の変容を捉えられたことは、今後の当該分野の研究の可能性を大きく広げる結果である。

研究成果の概要(英文)：Many insects deduce orientation using skylight polarization. It has been elucidated that the central complex in the brain encodes polarized information and integrates it with other visual information such as optic flows. However, it is still unknown how the brain control navigational behavior based on these information. In this study, using the cricket *Gryllus bimaculatus*, a new experimental paradigm was established to analyze neural responses in the brain during the place learning process. Both place-searching and polarotactic behaviors were modified by aversive conditioning procedures in an arena and on a treadmill device. Analyses of the neural responses in the brain during the e-vector orientation learning are in progress.

研究分野：神経行動学

キーワード：偏光定位 昆虫 学習

1. 研究開始当初の背景

多くの動物は空間認識に基づいたナビゲーションを行う。昆虫は、比較的少数のニューロンからなる神経系にも関わらず、自分の動きをモニターしながら移動する「経路積算」による非常に精巧なナビゲーション能力を示すことから、経路積算の神経基盤を調べるモデル系として幅広く利用されている。

経路積算を実現するためには、自らの動く方向と距離をリアルタイムに把握し、これらの情報を統合して次に進む方向を決定する必要がある(図1)。一般に昆虫は方向を天空の偏光パターン(図2)から検出しており、複眼の偏光を検出する領域(dorsal rim area: DRA)の形態学的、生理学的特性や、脳内の偏光感受性ニューロンの応答特性はすでに明らかとなっている。特に、昆虫脳における偏光視の最高次中枢と考えられている中心複合体(central complex: CX)では、様々な応答特性を持つ偏光感受性ニューロンが同定され、偏光情報の入出力経路だけでなく、色やオプティックフロー等の他の視覚情報との統合のしくみも明らかになりつつある。

一方、これらのニューロンが実際のナビゲーション行動中にどのように行動を制御するのかに関しては、ほとんど明らかでない。その主な理由として、実際のナビゲーション行動と神経活動の関係を直接的に解析する良い実験系が存在しないことが挙げられる。そこで本研究では、脳内の偏光感受性ニューロンに関する知見があるコオロギを対象として、偏光定位行動と罰学習を組み合わせた新たな実験パラダイムを確立し、ナビゲーションに関わる方向選択の神経基盤を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、コオロギの偏光定位行動を利用して、特定の e-ベクトル方向への定位を学習させるような実験系を確立し、その獲得過程のメカニズムを探ることである。ナビゲーション中の脳内ニューロンの応答特性に関する研究は少ないが、近年の多光子顕微鏡による Ca^{2+} イメージング技術の確立により、行動中のショウジョウバエを用いた研究が盛んになりつつある。例えば、歩行/飛行中のショウジョウバエ脳 CX から、個体が特定の方向を向いた時に選択的に発火するニューロン(head-direction cell)が見つかった。このようなショウジョウバエ脳からのライブイメージング技術は、行動発現に関わる脳機能の解明において非常に有効なツールであるが、ナビゲーション行動を研究する上での大きなデメリットは、「ナビゲーション」すなわち「目的地へと移動する」ための明確な行動が見られないことである。動物は自らの経験によって確立した空間認識に基づいてナビゲーションを行う。つまり、経験による行動変化とそれともなう神経活動の変化をとらえなければ、ナビゲーションの神経機構の本質を記述することができない。本研究で用いるコオロギは、神経系の電気生理学的解析が比較的容易であり、古くより様々な行動の神経メカニズムの解明に利用されてきた。またこれまでの研究から、彼らが定住性のない単独性であるにも関わらず、偏光を手がかりとした定位行動場を示すことが明らかとなっている(図3)。そこで本研究では、コオロギのこのような利点を生かし、新しい実験系の確立に取り組み、ナビゲーションのメカニズム解明の一端を担うことを目指す。

3. 研究の方法

実験にはフタホシコオロギを用いる。コオロギは偏光感受性が高く、トレッドミル上に載せたコオロギに、ゆっくりと e-ベクトル方向が回転するような刺激を与えると、ある特定の e-ベクトル方向に定位するような歩行が観察される(図3)。このように、彼らは頭上の偏光を参照して歩行方向を決定するが、個々が定位する e-ベクトル方向はランダムであり、彼らが偏光を明

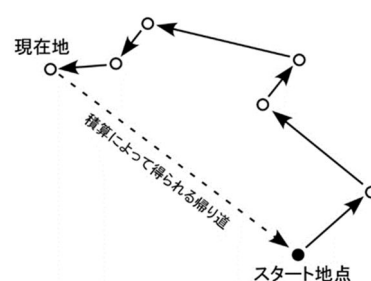


図1 経路積算の概念図。連続した細かい移動軌跡を積算することで、現在地からスタート地点までのショートカットを計算できる。

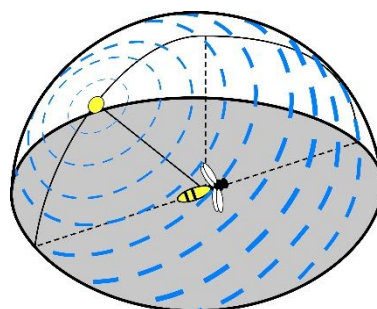


図2 天空の偏光パターン。太陽を中心として同心円状に偏光が分布し、昆虫は頭上の偏光方向から、自らの移動方向がわかる。

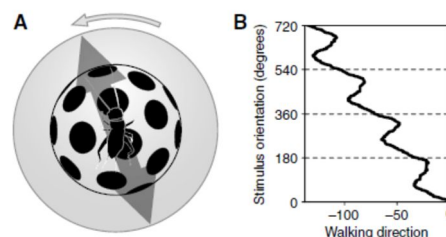


図3 コオロギの偏光定位行動。トレッドミル上のコオロギの頭上から e-ベクトル方向が回転するような偏光刺激を与える(左)と、刺激の回転に同期したターンを示す(右)。(Henze and Labhart 2007 より)

確に「方向」の情報を得るために使っているのか、それとも単に真っ直ぐ移動するための指標としているだけなのかについては不明である。そこでまず、コオロギが頭上の偏光を手がかりとした場所学習をするのかどうかについて検証を行った。すでにコオロギにおいて、げっ歯類における「モリスの水迷路」を改変したパラダイムによって、アリーナ壁面のランドマークを手掛りとした場所学習が成立することが明らかとなっているため、同様な手法により偏光情報に基づく場所学習が成立するかどうかを調べた。一部を除いた床面をホットプレートで熱したアリーナにコオロギを放し、熱からの逃避行動を発現させ、一部の熱していない領域をゴール地点として探索させた。アリーナの天井には偏光板を組み合わせて配置し、上方からの偏光によってのみゴールを見つけることを可能とした(図4)。ある個体に対してこのような試行を繰り返し、その前後で探索行動の変化をテストした。テストにおいては床一面を均一に熱し、ゴールに到達するまでの探索時間と距離、およびアリーナ内における存在確率分布を算出し、刺激のe-ベクトル分布との関連を調べた。

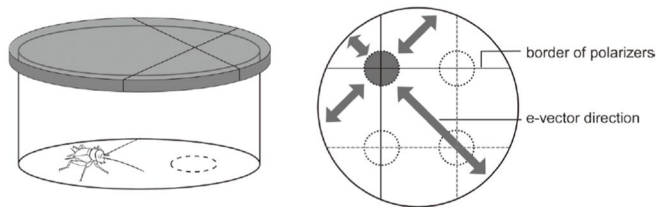


図4 実験アリーナの模式図。一部分(点線)を除いて床面を熱し、コオロギに探索させる(左)。天井には、e-ベクトル方向に沿って歩くとゴールに到達できるように偏光板を組み合わせて配置する(右)。(Matsubara et al. 2021より)

上述の場所学習パラダイムは、行動解析には有用であるが、脳内メカニズムを調べるための電気生理学的実験との併用が困難である。そこで、トレッドミル上でコオロギが示す偏光定位行動を利用し、同様な学習行動が解析できるようなパラダイムを確立した。トレッドミル上のコオロギに上方からe-ベクトルが回転する偏光刺激を与え、その時の歩行活動をトレッドミルの球の動きからモニターした。ある特定のe-ベクトル方向(例えば、体軸と垂直な方向)以外のe-ベクトル方向に定位している場合には、罰刺激として腹部への赤外線レーザー照射を行った(図5)。このような条件付けの前後に、レーザー照射の無い状態で個体の定位するe-ベクトル方向を解析し、罰刺激が与えられないe-ベクトル方向への指向性が見られるかどうかを確認した。この偏光定位学習のための実験装置は、安藤規泰博士(前橋工科大学)と小川宏人博士(北海道大学)の協力を得て製作した。次に、条件付けの操作と電気生理学的解析を組み合わせ、条件付け中の個体の脳内神経活動の記録を試みた。記録には、コオロギやゴキブリで自由行動中の脳内神経活動記録の実績がある「銅ワイヤ脳埋め込み電極」を用いた細胞外記録を採用した。昆虫のhead-direction cellの所在であるCXを記録領域とし、ニューロンのe-ベクトル指向性およびその時の体軸方向と刺激のe-ベクトル方向の関係を、学習の前後に着目して解析した。

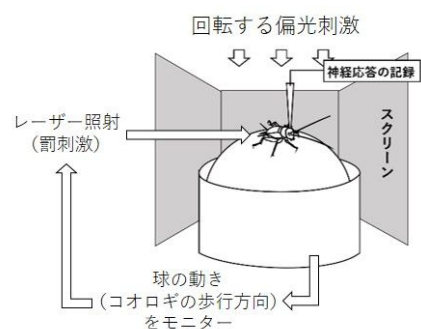


図5 条件付け用のトレッドミルの概要。

この偏光定位学習のための実験装置は、安藤規泰博士(前橋工科大学)と小川宏人博士(北海道大学)の協力を得て製作した。次に、条件付けの操作と電気生理学的解析を組み合わせ、条件付け中の個体の脳内神経活動の記録を試みた。記録には、コオロギやゴキブリで自由行動中の脳内神経活動記録の実績がある「銅ワイヤ脳埋め込み電極」を用いた細胞外記録を採用した。昆虫のhead-direction cellの所在であるCXを記録領域とし、ニューロンのe-ベクトル指向性およびその時の体軸方向と刺激のe-ベクトル方向の関係を、学習の前後に着目して解析した。

4. 研究成果

天井に偏光板を配置し床面を熱したアリーナにコオロギを放すと、熱から逃避するためにアリーナ内をランダムに探索し、熱されていないゴール地点に到着するとそこに長く滞在した。このような試行を繰り返すと、試行ごとに探索時間と距離は短くなった(図6)。アリーナには上方からの偏光以外の手がかり(ランドマーク、匂いなど)は無く、彼らが偏光情報に基づいてゴール地点を探索することが示唆された。偏光板の配置とゴールとの位置関係が常に一定の条件(以下、fixed)と試行ごとに位置がランダムに変化する条件(以下、random)で、探索時間と距離の変化を比較した結果を図7に示す。fixedでは探索時間、距離ともに有意に短く変化するが、randomではそのような変化は見られず、コオロギが上方の偏光を手掛りとした探索をすることが明らかとなった。

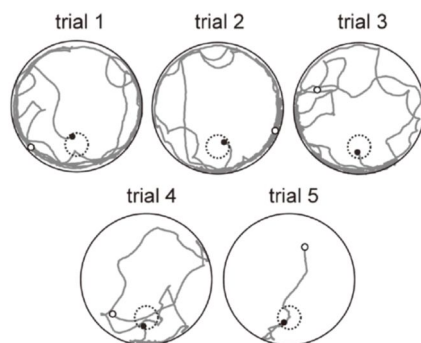


図6 ある個体における5回試行を繰り返した時のゴール到達までの探索の軌跡。試行ごとに距離が短くなる。(Matsubara et al. 2021より)

試行前と5回目の試行後で、床面を均一に熱したアリーナを使って探索させると、fixedでのみ、試行前後の探索パターンに変化が認められた。当初の想定では、fixedではゴール付近を重点的に探索するようになると予測していたが、予想に反しfixedではアリーナの壁面に沿って歩く接触走性の行動が強く発現するようになった。これに対し、試行前やrandom試行の後では、アリーナ全体をまんべんなく探索するパターンが見られた。この結果から、この学習パラダイムによって、コオロギが偏光を手がかりに空間認識し、自らの探索パターンを変化させるが、当初意図していたようなe-ベクトル方向に沿った定位を示すような学習にはなっていないと結論づけた。

これは、有限空間のアリーナにおける空間認識においては、偏光のe-ベクトル方向という自然状態では無限に提示される刺激を利用した方向検出が強く発現しないためであると考えられる。

そこで、偏光定位行動がより自然に発現するような無限空間をトレッドミル装置によって再現し、同様な学習実験を試みた。罰条件付けでは、トレッドミル上の個体に400秒間自由に歩行させ、その歩行方向に合わせて頭上の偏光板を回転させた。個体が45~135°(以下、Condition 1)もしくは-45~45°(以下、Condition 2)のe-ベクトル方向を向いて移動している間、腹部に赤外線レーザーによる熱刺激を与えた。条件付け前後での偏光定位行動の指向性を調べるため、個体の頭上で偏光板をゆっくりと回転させ(100秒/回転)、400秒間の歩行軌跡を記録した。軌跡のFFT解析から、刺激の回転に同期した歩行を示した個体を「偏光に定位した個体」と定義し、その個体数を条件付けの前後で比較した。

その結果、定位した個体の割合は条件付け後に有意に増加し、罰条件付けにより偏光刺激に対する応答性そのものが強くなることが示唆された。そこで、これらの個体について、回転周期成分の位相から定位方向を算出し、条件付け前後で分布を比較した。Condition 1では条件付けの前後で定位方向の分布が有意に異なり、条件付け後は罰刺激が提示されないe-ベクトル範囲に定位する個体が多く見られた(図8左)。個体の歩行方向に関係なく一定間隔で罰刺激を与えるコントロール実験ではこのような分布の変化は見られないことから、少なくともこの条件においては偏光定位学習が成立することが示された。一方Condition 2においては、条件付け前後で分布に差が見られず(図8右)、罰刺激の範囲によって学習の成立に差があることが示唆された。この理由は不明であるが、当研究室におけるミツバチを用いた採餌訓練においても、体軸に平行なe-ベクトルに対する定位行動が発現しないという結果を得ており、昆虫一般に見られる特性である可能性がある。体軸に平行なe-ベクトルに定位しながら移動するという状態は、自然条件下では太陽を自身の真横に見ながら移動する状態に相当する。このようなケースでは、左右の明るさや色の勾配など偏光以外の情報が優先的に使われるのかもしれない。

現在この結果をふまえ、特にCondition 1の条件下において、脳内に銅ワイヤ電極を埋め込んだ個体を用いてCXの神経活動を記録しながら条件付けを行う実験を行っている。トレッドミルを用いた学習実験の条件検討に想定以上の時間がかかったため、現時点ではまだ確定的な結論を得ることができていないが、引き続き解析をすすめて定位学習におけるCXニューロンの応答変化から、移動方向決定の脳内メカニズムを明らかにする計画である。

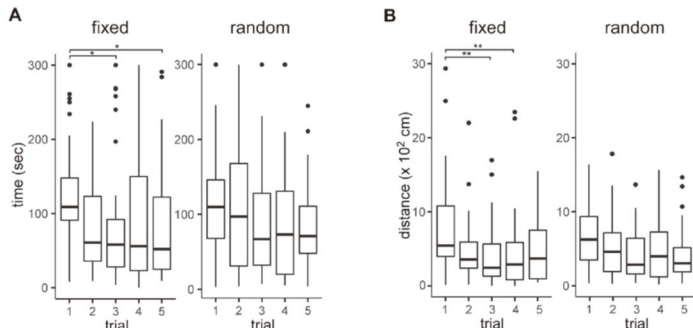


図7 偏光パターンとゴールとの位置関係が一定な条件(fixed)とランダムに変化する条件(random)における探索時間と距離の試行ごとの変化。時間、距離ともにfixedでのみ試行によって有意に減少する(*, **; $p < 0.05, 0.01$; Steel test)。(Matsubara et al. 2020より)

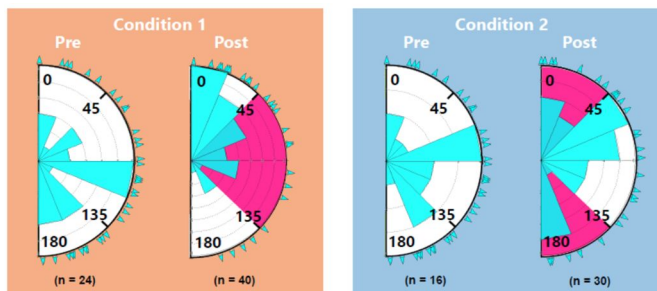


図8 トレッドミル装置における偏光定位学習。体軸に対して45-135°(Condition 1)と135-45°(Condition 2)のe-ベクトル方向に対する罰条件付けの前後での定位方向の分布。条件付け前には90°付近に弱いピークを示すが、条件付け後には罰方向への指向性が下がる(Condition 1; $p < 0.05$; Mardia-Watson-Wheeler test)。

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okada R, Ikeno H, Aonuma H, Sakura M, Ito E	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 Kobayashi Norihiro, Hasegawa Yuji, Okada Ryuichi, Sakura Midori	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 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 Obayashi N, Iwatani Y, Sakura M, Tamotsu S, Chiu M-C, Sato T	4. 巻 31
2. 論文標題 Enhanced polarotaxis can explain water-entry behavior of mantids infected with nematomorph parasites.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 R777-R778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.05.001	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 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/jeb.228254	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 Sato T, Iritani R, Sakura M	4. 巻 33
2. 論文標題 Host manipulation by parasites as a cryptic driver of energy flow through food webs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 69-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cois.2019.02.010	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 10	4. 巻 10
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

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

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第44回高知大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakura M
2. 発表標題 Orientation to the polarized light in flying honeybees.
3. 学会等名 日本動物学会第93回東京大会（招待講演）
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色識別に基づく定位学習
3. 学会等名 日本動物学会第93回東京大会
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 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第43回札幌大会（オンライン）
4. 発表年 2021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第43回札幌大会（オンライン）
4. 発表年 2021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と与える影響
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsubara N, Okada R, Sakura M
2. 発表標題 Spacial recognition based on polarized light information in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .
3. 学会等名 日本比較生理学会第42回山形大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩谷 靖, 大林 奈園, 佐倉 緑, 佐藤 拓哉
2. 発表標題 深度カメラの意図的な誤差を利用した微小体のトラッキング.
3. 学会等名 第21回 計測自動制御学会 システムインテグレーション部門講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 由雅, 岡田 龍一, 佐倉 緑
2. 発表標題 セイヨウミツバチにおける採餌経験に基づく偏光定位行動の解析.
3. 学会等名 第10回ミツバチシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大林 奈園, 岩谷 靖, 佐倉 緑, 保 智己, 佐藤拓哉
2. 発表標題 ハリガネムシ感染カマキリの入水行動に寄与する活動量と水平偏光走性の影響評価.
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 淳成, Chiu M-C, 相樂 理嘉, 大石 紗友美, 佐藤 拓哉, 佐倉 緑
2. 発表標題 ハリガネムシ寄生によるカマキリ宿主の走光性変化とその分子基盤
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021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研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Otani M, Okada R, Sakura M
2. 発表標題 Comparative study of olfactory responses to the oriental orchid flower in Japanese and European honeybees.
3. 学会等名 日本比較生理学会第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueno Y, Onishi H, Okada R, Sakura M
2. 発表標題 Bees decide their flight direction based on the polarized-light pattern in the sky.
3. 学会等名 日本比較生理学会第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大林 奈園, 岩谷 靖, Chiu M-C, 佐々木 淳成, 佐倉 緑, 佐藤 拓哉
2. 発表標題 緻密な行動操作?:ハリガネムシ感染コオロギにおける活動パターンの状況依存性
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木淳成, Chiu M-C, 木村文, 大石紗友美, 青沼仁志, 橋口康之, 三品達平, 武島弘彦, 佐藤拓哉, 佐倉緑
2. 発表標題 チョウセンカマキリにおけるハリガネムシによる行動操作とその生理メカニズム
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	安藤 規泰 (Ando Noriyasu)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	小川 宏人 (Ogawa Hiroto)		

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