

機関番号：10101
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2008～2010
課題番号：20370028
研究課題名（和文） 無脊椎動物における行動の自発性開始に関わる脳機構の神経生理・解剖学的解析
研究課題名（英文） Neurophysiological and neuroanatomical analyses of brain mechanisms subserving spontaneous initiation of behavior in invertebrates
研究代表者 高畑 雅一（TAKAHATA MASAKAZU） 北海道大学・大学院理学研究院・教授 研究者番号：10111147

研究成果の概要（和文）：球形トレッドミル上での細胞外電極法を用いた実験解析により、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* が自発的に歩行運動を開始する時に、その行動開始に先行して脳内でのニューロン活動が増加することを無脊椎動物では初めて見出した。細胞内記録・染色法により、この準備活動ニューロンを同定し、その形態を明らかにするとともに、準備活動が逐次的な興奮性および抑制性シナプス入力によって形成されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Extracellular recordings from the brain of crayfish, *Procambarus clarkii*, fixed on a sphere-type treadmill have revealed for the first time in invertebrates that a specific set of descending interneurons show a noticeable increase in their spike activity, i.e., the readiness activity, before the animal spontaneously initiates locomotor behavior. Using intracellular recording and staining techniques, we could identify those readiness discharge neurons by characterizing their physiological and morphological features in the brain. Furthermore, we showed that the readiness activity is shaped by sequential synaptic excitation and inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：行動生理・神経行動・神経生物

## 1. 研究開始当初の背景

無脊椎動物は、実験標本作成が容易であり、少数ニューロン系の実験利点を多数持つため、従来の神経生物学の研究で広く用いられて来た。イカを用いた Hodgkin と Huxley による活動電位のイオン機構の研究や、Kandel によるウミウシを用いた学習の神経機構の研究などは、無脊椎動物が神経・行動生理の研

究において重要な貢献をしてきた典型例である。しかし、実験的利点がしばしば強調されるのに対し、無脊椎動物の自然な行動それ自体とその中枢機構は、決して十分に理解されてきたとは言えない。逃避・摂食・交尾行動などは、その神経機構が詳細に調べられているが、従来の着眼点は、主に「刺激に対する応答としての行動」の制御機構であり、い

わば無脊椎動物を反射機械とみなしてその詳細なからくりを、でき得ればその実験系としての長所を生かして、同定細胞レベルで説明しようとする試みであった。

最近、特に社会性行動を示すミツバチを用いた広汎な行動学的な研究において、選択的注意行動や、規則学習など、彼らが示す高度の認知的行動が実証され、さらにアシナガバチでは、視覚情報に基づく個体識別の可能性が示唆されている (Menzel et al., 2007)。ヒト言語にも共通する *symbolic communication* として位置づけられるミツバチの尻振りダンスによる情報伝達に関する古典的な報告も含めて、これらの行動学的知見は、従来の<刺激に対する応答としての行動>というフレームワークとは異なる視点に基づいた行動生理学的研究の喫緊の必要性を示している。残念ながら行動生理学の立場からは、上述した高度に認知的な行動をただちに神経回路網あるいはニューロンレベルで解析することは容易ではない\*。これらの複雑な行動を実時間で定量化すると同時に神経活動を記録解析するための生理学的な実験基盤が確立されていないからである。にも拘らず、無脊椎動物の行動を行動生理学的に理解するための新しい視点に基づく実験解析が今日必要とされていることは確かである。

<刺激に対する応答としての行動>と正反対のフレームワークは、<自発的に開始される行動>である。外部刺激に依存せず、動物個体の内的要因のみに基づく行動の自発的開始は、上述したミツバチの諸行動ほど複雑ではないが、それらに共通する知能的な脳内過程 (*prerational intelligence*) に基づくと考えられている (Dean et al., 2000)。従って、自発的な行動開始の脳内シナプス機構解明は、無脊椎動物の高度な認知行動を支える脳内過程を生理学的に理解するための基盤となる。しかし、従来は、<刺激に対する応答としての行動>という視点が強固に継続されたことに加えて、1) 動物の行動状態を実験者がコントロールする困難、2) 行動遂行中の動物からの脳内ニューロン活動を記録する困難、そして、3) ニューロン活動を行動と定量的に関係づけて解析する困難、などの実験技術的困難の理由により、無脊椎動物の自発的な行動開始に関わる神経機構の研究はほとんどなされていないのが実情である。

## 2. 研究の目的

\*この点については、東北大学の水波誠氏とともに2007年度日本動物学会大会でのニューロエソロジー談話会主催シンポジウム「社会性昆虫の遺伝子・脳・行動—社会行動の進化解明をめざして—」をオーガナイズし、そこでも議論した。

本研究では、<自発的に開始される行動>という新たな視点に基づき、行動生理学実験に有利な大型甲殻類を用いて、外界刺激に依存しない歩行の自発的な開始に関わる脳内シナプス機構を同定ニューロンレベルで説明することを目的とする。自発的な行動開始の脳機構解析を進めるためには、上述の技術的諸困難が厳存する。本研究では、上記1)の困難を、自発的な歩行運動遂行が可能な無麻酔全体標本に慢性記録法を適用することにより、また、2)を、新しく独自に開発した光テレメータ (研究計画・方法の項を参照) とビデオ解析システムを併せ用いて、自由行動中の動物から脳内ニューロン活動を記録すると同時にその行動を定量化することにより、さらに3)については、これまでに確立したトレッドミル記録法を発展させて、歩行中の動物の脳内活動の細胞内記録を、行動と定量的に関係づけて解析することにより、それぞれ排除して、自発的歩行開始に関わる脳内部位を機能解剖学的に確定し、そこでの神経回路網動作のダイナミクスを神経生理学的に解明する。

## 3. 研究の方法

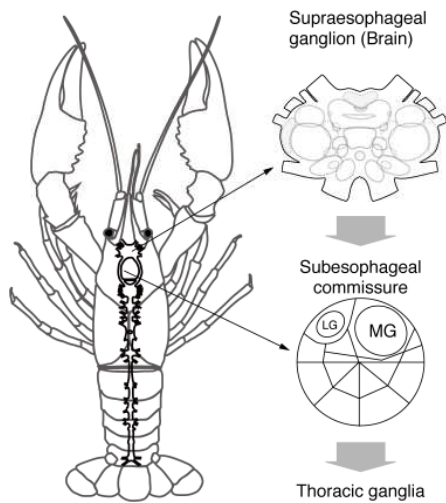
本研究計画は、自発的に開始される歩行行動に関する、1) 行動学的観察と実験に基づく定量的な継時記載、2) 神経生理学的実験による神経回路網の同定とその動作解析、および3) 脳内部位の特定とそこでの機能的細胞構築の神経解剖学的な解析、の3つの柱から構成される。各実験において、外部刺激によって誘発される歩行と比較することにより、自発的な歩行開始の行動的態様および神経生理学的メカニズムを特徴づけると共に、それぞれの歩行開始にかかわる脳内部位を解剖学的に確定する。行動学実験においては、光テレメータを用いて、自由行動中の動物から筋電図 (同時4チャンネル) を記録するとともに行動のビデオ解析を行って、自発的な歩行の開始と外部刺激に誘発される歩行との間での行動および筋活動における共通/相違点を明らかにする。神経生理学実験では、球形トレッドミル上で行い、自発的に開始される歩行に先行する脳内シナプス活動から歩行を終了した直後の活動までを一貫して細胞内誘導して、電流および電圧固定モードで記録し、トレッドミルの動きおよびビデオ画像と照合して行動との連関を解析する。神経解剖学的解析では、生理学実験で細胞内染色により明らかにしたニューロンおよびその投射部位の三次元形態を共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて定量的に記載して、歩行の自発性開始にかかわる脳内部位 (複数) を確定するとともに、それらの機能分担を形態学的に解析する。年次計画としては、

これら3方向からの研究を各年度ごとに適切な比率で並行して進め、常時それぞれの進行度合いを斟酌しながら、その比率をダイナミックに変化させることによって、最終年度で効果的に目標を達成する。

#### 4. 研究成果

##### <はじめに>

随意行動の開始に先行して起こる神経活動は、準備電位・準備活動と呼ばれ、明確な感覚刺激が存在しない条件での自発的な行動開始に先行して記録される。ヒトを含む霊長類、齧歯類において多くの報告がある[1]が、単一ニューロンレベルでの神経機構については不明である。



**Fig.1** Central nervous system of crayfish. LG: Lateral Giant Interneuron, MG: Medial Giant Interneuron.

ヒト以外の脊椎動物や無脊椎動物において随意行動と呼べるものが存在するのかは、現代生物学の重要な争点の一つであるが、哺乳類で見出される準備活動が無脊椎動物でも存在するか、その神経機構はどのようなものか、我々はこれら疑問を細胞レベルで解明するため、アメリカザリガニを用いて実験的解析を行っている。

ザリガニでは、脳から下行する腹髄内では(Fig. 1)特定の位置を走行する神経軸索繊維に対して電気刺激を与えると歩行運動が起こることが知られている。この知見は、Bowerman と Larimer らによって報告され、刺激された繊維は歩行の「司令繊維」と名づけられた[2]。

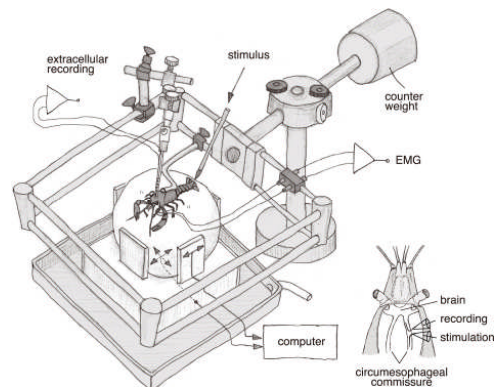
しかしザリガニの歩行は特定の感覚刺激を与えなくとも自発的に起こる。この自発性歩行開始に先行して、司令繊維は自発的に活動電位を発生させて行動が開始するのだろうか？ それともこれらの司令繊維は、さらに上流の神経活動によって賦活されるのだろうか？

##### <実験材料と方法>

###### 実験動物と標本

実験には体長 8-10 cm のアメリカザリガニ

*Procambarus clarkii* を用いた。内的動機づけを一定に保つために、2-3 日は絶食状態にした。はさみを切り落した個体も用いたが、正常個体と比べて歩行のパフォーマンスが変わらないものだけを用いて実験を行った。スチール性のナットをザリガニの頭胸部に固定し、球形 treadmill システム (Fig. 2) にとりつけた。筋肉の活動は二本のワイヤー電極(テフロンコートされた径 125 $\mu$ m の銀線)をクチクラに埋め込み、第二步脚長腕節屈筋より記録した。頭部に小さな穴を開け、脳を露出した。手術は最小限にとどめて、できるだけ長時間行動可能な状態にした。



**Fig.2** Spherical treadmill system used for extracellular recording from the brain of crayfish during walking and its quantification.

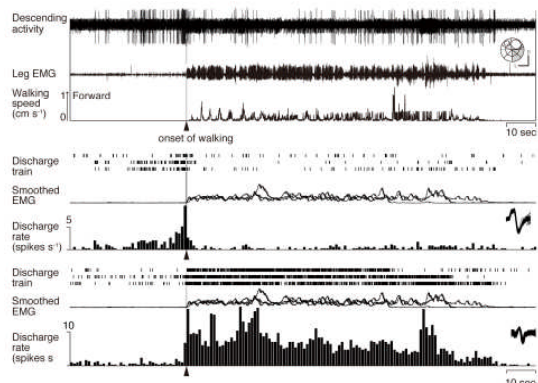
##### 筋活動の解析

行動開始のタイミングを決めるために、統計的推定方法を用いた[4]。筋活動は基本的には非定常な変化をするが、十分に短い時間では定常とみなすことができる。少なくとも1秒以上のブロックを筋活動記録からとった。そのブロックには行動開始によって分けられる二つのブロックが含まれるようにした。変化時点を決めるために、暫定的に二つのブロックに分けた。それぞれのブロックに対して自己回帰モデル(高々20次)を適用し、それぞれのモデルの良さを赤池情報量基準AICによって測った。暫定的に決めた時点を動かし、それぞれのAICの和が最小となる時点を探した。その時点を行動開始とした。注意したいのは、実際に動きとして表われるのは、さらに数百ミリ秒後であるということであるが[4]、以上のように筋活動の変化時点を「行動開始」として神経活動および行動の解析を行った。

##### マルチユニットレコーディング

吸引電極によって咽食道縦連合の一部切断断端より下行性スパイク活動を記録した。スパイク活動はサンプリング周波数 20kHz でデジタル化し記録した。すべてのスパイクから閾値以上の大きさのスパイクを抽出した(Spike2, CED, v.6.0)。次に得られたスパイクデータの波形に対して主成分分析を行い、第三主成分まででクラ

スターカットし、ひとつの記録から 2-13 ユニット得た。行動開始のタイミングを原点として、それぞれのユニットの発火系列からラスタ表示およびスパイクヒストグラムを作成し、個々の下行性ユニットの活動変化を解析・表現した。



**Fig.3** Descending spike activities involved in initiation and continuation of voluntary walking.

### 細胞内記録・染色

ガラス管微小電極に、3%の Lucifer yellow を 1M の LiCl 溶液に溶かし充填した。この状態で生理食塩水の中では電極の抵抗は 30-50MΩ だった。この抵抗は神経節内になると 90MΩ 以上になった。この電極を高入力抵抗増幅器につなぎ膜電位変化を計測した。細胞内記録した後、Lucifer yellow を過分極性電流 (8-10nA, 500ms duration, 1Hz) を注入し電気泳動的に色素を細胞内に導入し染色した。脳をただちに取り出し、10%ホルマリンで 30 分間固定、アルコールシリーズ各 20 分で脱水、サリチル酸メチルで透徹した。透徹した脳は共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いてスキャンし、ニューロンの三次元的な光学連続切片を作成し、突起の投射部位を調査した。

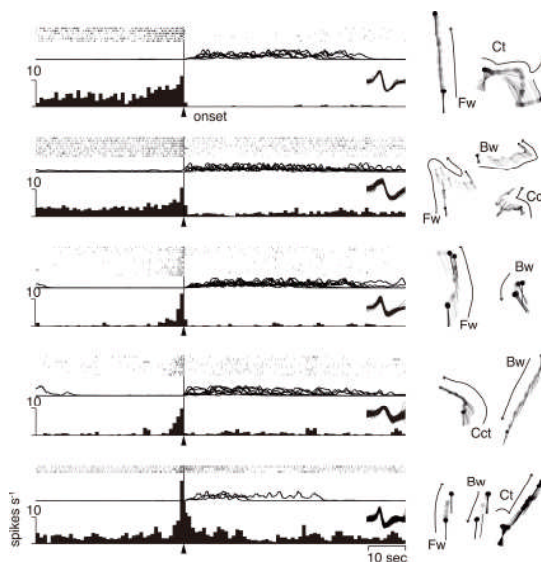
### <実験結果>

#### 開始・継続・停止に関わる下行性スパイク活動

32 個体 180 ユニットの下行性ユニットの中で、58 ユニットで自発性歩行開始前にスパイク活動の変化が観察された。中でも特徴的な変化を示したユニットが、Fig. 3 の上段の記録において最も大きなスパイクとして記録されているユニットである。歩行開始に数秒以上も先行して発火頻度の増加が観察された。歩行が開始されると発火頻度は減少した。3 回の前方歩行に対してこのユニットは常に先行した発火頻度増加を示した。外部感覚刺激を与えていないため、この活動変化は内発的に引き起こされたものであり、歩行の準備、開始に関わると考えられる。

同一個体の動物で同時に得られたユニットの中で、歩行中に発火頻度の増加が持続的に観察されるものがあった (Fig. 3 下段)。このユニットの活動も若干先行して発火頻度の上昇が見ら

れた。このユニットの活動は、歩行の継続などにかかわると考えられる。このように、準備活動ユニットから継続活動ユニットへの順次的な動員によって信号が胸部神経節へと伝えられ、内発的に歩行運動が開始されるものと考えられる。歩行の開始時には、はさみを除いた 8 本の歩脚すべての筋活動が数十ミリ秒の範囲で同期して高まる [4]。これらの並列下行性活動は、この開始のタイミング制御をしているのであろう。

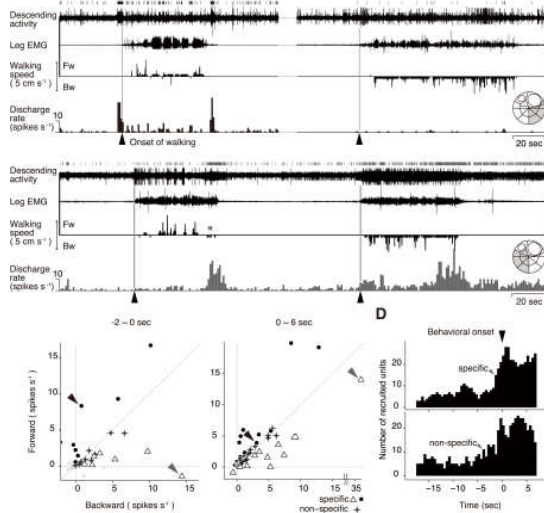


**Fig.4** Readiness spike activities irrespective of walking direction. Fw:Forward walking, Bw: Backward walking, Ct:Clockwise turning, Cct: Counter clockwise turning.

歩行にともなう運動そのものではなく、タイミング制御にかかわると考えられる理由のひとつに、このスパイク活動の変化は、歩行の方向にはよらないということがあげられる (Fig. 4)。Fig. 4 は、上段からそれぞれ別の 5 個体から得られた準備活動である。それぞれの活動の仕方には若干の違いはあるものの、いずれも先行して発火頻度が上がり、開始とともに発火頻度が下がった。右側に示してあるのはそれぞれの個体が示したすべての歩行パターンをプロットしたものである。いずれの歩行パターンにおいても発火頻度が増加した。

さらに歩行方向との関連について詳しく解析した。歩行方向特異的に動員される下行性ユニットも存在した (Fig. 5)。72 個の傾向は Fig. 5C に示した。とくに前方歩行特異的なのが Fig. 5A、後方歩行特異的なのが Fig. 5B で示したユニットである。いずれも先行した特異的な変化を示すが、歩行の方向に非特異的な変化を示すユニットのほうがさらに先行して動員されていた (Fig. 5D)。このことは、非特異的信号から特異的信号の生成が、順次的なニューロンの動員によって起こっていることを示唆する。また、歩行が停止するときに動員されるユニットも見出

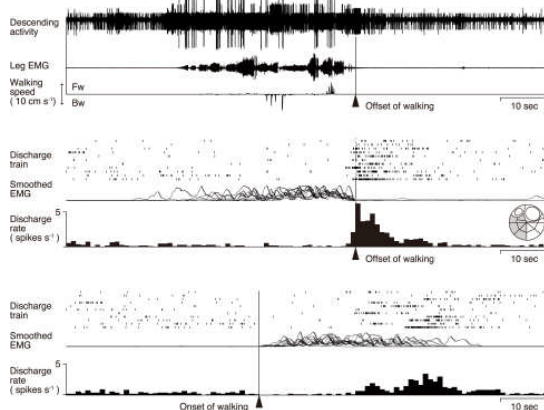
された (Fig. 6)。このユニットは歩行停止のタイミングでヒストグラムをつくと停止時の頻度が高いのに対し (Fig. 6 中段)、開始のタイミングでは頻度の変化は見られなかった (Fig. 6 下段)。このことはこのユニットが停止のタイミングの制御にかかわることを示唆する。



**Fig.5** Walking direction specific and non-specific descending spike activities.

脳内ニューロンのシナプス活動と突起投射部位

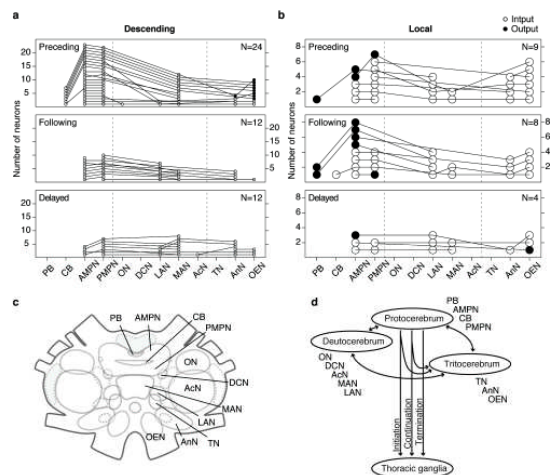
細胞内電極でシナプス活動を記録し、蛍光色素で染色したニューロンの突起投射部位を解析した結果、歩行開始に先行してシナプス活動が変化するニューロンを先行型、開始とともに変化するものを随伴型、歩行と関連した変化を示さない、あるいは1秒以上遅れて変化するものを遅延型に分けることができた。軸索を咽食道縦連合へ伸ばすニューロンを下行性、脳内に局所的に突起を伸ばすニューロンを局所性とした。



**Fig.6** Descending spike activities involved in termination of voluntary walking.

それぞれのタイプの脳内投射部位を調べた結果が Fig. 7 である。下行性ニューロンでは、前大脳の CB、AMPN と PMPN に先行型が投射する傾向があった。また、先行型と随伴型局所性ニュー

ロンでは、軸索分枝と樹状突起の両方の投射が、とくに前大脳で観察された。この結果は、前大脳で起こるシナプス活動によって下行性活動が生成されることを示唆している。



**Fig.7** Distribution of input and output regions in the brain connected by descending and local neurons.

とりわけ準備活動を示した先行型下行性ニューロンでは、先行して興奮性、随伴して抑制性のシナプス入力を受けることが判明し、さらに軸索分枝を後大脳の OEN に持つことが分かった。すなわち軸索分枝が随伴性の信号を胸部を介さずに脳内で出力すれば、歩行開始の信号を別のニューロンが「知る」ことができる。この脳内局所回路で歩行運動の制御にかかわる計算処理を歩行開始に先行して行っていると考えられる。

<参考文献>

[1] Roskies, A. L. How does neuroscience affect our conception of volition? *Annu Rev Neurosci* 33: 109-30 (2010).  
 [2] Bowerman, R. and Larimer, J. Command fibres in the circumoesophageal connectives of crayfish. *J Exp Biol* 60: 95-117 (1974).  
 [3] Kagaya, K. and Takahata, M. Readiness discharge for spontaneous initiation of walking in crayfish. *J Neurosci* 30: 1348-62 (2010).  
 [4] Chikamoto, K., Kagaya, K., and Takahata, M. Electromyographic characterization of walking behavior initiated spontaneously in crayfish. *Zool Sci* 25: 783-92 (2008).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Kagaya, K. and Takahata, M. (2011) Sequential synaptic excitation and inhibition

- shapes readiness discharge for voluntary behavior. *Science* **332**: 365-368 [査読あり]
2. Tomina, Y. and Takahata, M. (2010) A behavioral analysis of force-controlled operant tasks in American lobster. *Physiol. & Behav.* **101**: 108-116 [査読あり]
  3. Kagaya, K. and Takahata, M. (2010) Readiness discharge for spontaneous initiation of walking in crayfish. *J. Neurosci.* **30**: 1348-1362 [査読あり]
  4. 高畑雅一 (2010) 脳と神経系：ザリガニの脳と神経における構造と機能の連関をめぐって ザリガニの生物学 (川井唯史・高畑雅一編著) pp. 155-191 北海道大学出版会 [査読あり]
  5. 高畑雅一 (2009) ザリガニの学習と記憶 動物は何を考えているのか? (日本比較生理生化学会編) pp. 47-64 共立出版 [査読あり]
  6. Newland, P. L., Hunt, E., Sharkh, S. M., Hama, N., Takahata, M. and Jackson, C. W. (2008) Static electric field detection and behavioural avoidance in cockroaches. *J. Exp. Biol.* **211**: 3682-3690 [査読あり]
  7. Ikeno, H., Kanzaki, R., Aonuma, H., Takahata, M., Mizunami, M., Yasuyama, K., Matsui, N., Yokohari, F. and Usui, S. (2008) Development of invertebrate brain platform: Management of research resources for invertebrate neuro- science and neuroethology. *ICONIP, Springer- Verlag, Berlin 2007 (Part II)* 905-914 [査読なし]
  8. 高畑雅一 (2008) 甲殻類の姿勢制御とその神経機構 昆虫ミメティクスー昆虫の設計に学ぶー (下澤楯夫・針山孝彦篇) NTS pp. 522-532 [査読あり]
- [学会発表] (計 12 件)
1. Kagaya, K. and Takahata, M. (2011) Characterization of brain neurons involved in spontaneously initiated walking in crayfish. Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting 2011 (Salt Lake City Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA, January 3-7, 2011)
  2. 富菜雄介・高畑雅一 (2010) 拘束条件下のアメリカウミザリガニにおける光刺激に対するオペラント弁別学習能の検証. 日本動物行動学会第 29 回大会 (沖縄県男 共同企画センター 那覇市 11 月 19-21 日)
  3. 加賀谷勝史・高畑雅一 (2010) ザリガニ自発性歩行開始・継続の移行にかかわる下行性・上行性神経活動. 日本動物学会第 81 回大会 (東京大学 東京都目黒区 9 月 23-25 日)
  4. 高畑雅一 (2010) ザリガニの行動とその神経機構. 日本比較生理生化学会第 32 回大会 (九州産業大学 福岡市 7 月 17-19 日)
  5. 加賀谷勝史・高畑雅一 (2010) アメリカザリガニにおける歩行方向の集団符号化による神経制御機構. 日本比較生理生化学会第 32

- 回大会 (九州産業大学 福岡市 7 月 17-19 日)
6. 富菜雄介・高畑雅一 (2010) アメリカウミザリガニのグリッピングによるオペラント学習能の検証. 日本比較生理生化学会第 32 回大会 (九州産業大学 福岡市 7 月 17-19 日)
7. 富菜雄介・高畑雅一 (2009) アメリカウミザリガニはオペラント学習が可能か? : マニピュレーションタスクによる行動分析学的検証. 日本動物行動学会第 28 回大会 (筑波大学 つくば市 11 月 27-29 日)
8. 加賀谷勝史・高畑雅一 (2009) 自発性行動開始の制御機構：ザリガニ下行性神経活動の歩行運動開始における役割. 日本動物学会第 80 回大会 (静岡県コンベンションアーツセンター 静岡市 9 月 17-20 日)
9. 高島總・高畑雅一 (2008) ザリガニ前運動性及び機械感覚性ノンスパイキング介在神経樹状突起における機能的差異. 日本動物学会第 79 回大会 (福岡大学 福岡市 9 月 5-7 日)
10. 加賀谷勝史・高畑雅一 (2008) ザリガニの自発性歩行運動開始にかかわる局所性脳内シナプス表現. 日本動物学会第 79 回大会 (福岡大学 福岡市 9 月 5-7 日)
11. 加賀谷勝史・高畑雅一 (2008) ザリガニの自発性歩行の開始・維持・停止における並列下行性制御機構. 日本比較生理生化学会第 30 回大会 (北海道大学 札幌市 7 月 19-21 日)
12. 濱徳行・土田義和・高畑雅一 (2008) 行動遂行時及び感覚刺激に対するザリガニ脳内各微小構造の神経応答. 日本比較生理生化学会第 30 回大会 (北海道大学 札幌市 7 月 19-21 日)

[図書] (計 1 件)

1. 川井唯史・高畑雅一 (編著) ザリガニの生物学. 北海道大学出版会, 2010, 556pp.

[その他]

ホームページ等

<http://crayfish3.sci.hokudai.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高畑 雅一 (TAKAHATA MASAKAZU)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：10111147

(2) 研究分担者                   なし

(3) 連携研究者                   なし