

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570079

研究課題名（和文）昆虫の空間行動の神経基盤：新たな行動－神経活動計測システムの開発と応用

研究課題名（英文）Neural basis of spatial behavior in insects: Development of a new recording system for locomotor and neural activities and its application.

研究代表者

岡田 二郎 (OKADA JIRO)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：10284481

研究成果の概要（和文）：本研究は、非拘束の自由歩行昆虫から行動と神経活動を同時記録するための新たな実験系を開発し、これをコオロギの脳に適用することで、空間行動の神経機構を明らかにすることを目的として実施された。コオロギの空間認知と直接的関連をもつニューロンの発見には至らなかったが、体移動（歩行）と密接な関係をもつニューロンのスパイク活動を記録し、それらの特徴付けと分類をおこなった。さらにこれらのニューロンの多くが分布している領域を脳内で特定した。

研究成果の概要（英文）：Toward understanding the neural basis of spatial behavior in insects, we have developed a novel experimental system for simultaneous recording of the locomotor behavior and neural activities from freely walking insects. The system measures 2-D coordinates of the animal's position, orientation of the body axis, and 2 CH extracellular neural activities. We applied this system to the field cricket and recorded spike unit activity from the brain neurons during spontaneous walking. Locomotor-related neurons were mainly located in the protocerebral area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：神経行動学・脳神経・昆虫・空間行動・歩行

1. 研究開始当初の背景

行動生理学は、行動観察と生理実験を軸足として発展してきた。高度に発達した脳をもつ脊椎動物、特に哺乳類では、古くより多大な知見の蓄積がある。しかし哺乳動物の超複雑な巨大脳のシステムの理解には依然とし

て程遠い感があり、ましてや個々の脳ニューロンと行動の間には、未だ大きな隔りがある。これに対して無脊椎動物は、その神経系の単純さ、実験材料としての扱い易さなどから、行動の神経機構に関する数々の重要な示唆を与えてきた。とりわけニューロンのサ

イズが大きい無脊椎動物は、行動を単一ニューロン現象から説明しうる実験材料として盛んに用いられてきた。無脊椎動物では単一ニューロンからの細胞内記録法により、スパイクに加えてシナプス電位や膜特性などを調べる「マイクロ生理学」が展開されてきたが、哺乳類の脳における多点神経計測のような「グロスなシステム生理学」、とりわけ行動遂行中の動物を用いた研究例は少なかった。その理由は、上述のように「微小脳の生理学とは単一ニューロンレベルの調査」という図式が慣例化している点もあるが、加えて微小脳のシステム行動生理学に見合った実験ツールが存在しなかったことがあげられる。

代表者は本研究開始以前より昆虫の空間行動について調べてきた。空間行動とは、動物個体が周囲の空間環境（物体の位置や形状など）を知覚・記憶する能力、すなわち空間認知に関わる行動であり、哺乳類では、その神経機構も含めて従来より活発に議論されていた。しかし昆虫では、興味深い空間行動が数多くあるにも関わらず、神経機構のレベルまで議論が達していないのが当時の現状であった。本研究着手以前に代表者は、昆虫の空間行動を生理学的に説明するための行動—神経活動計測システム（従来型）を開発していたが、これは埋込み固定電極1チャンネル仕様で、1回あたり実験で得られる情報は極めて限定され、体系的理解までには多大な時間と労力を要するという問題点を抱えていた。

2. 研究の目的

本研究では、上述の問題点、すなわち実験の低い生産性を克服するため、昆虫に搭載可能なサイズの可動多点電極ユニットを新たに開発し、既存の行動—神経活動計測システムに組み込み、完全実用化することを第一の目的とした。次に新システムを非拘束の自由歩行昆虫に適用し、空間行動に関わる脳内ニューロンの網羅的検索、およびニューロンの活動様式と脳内局在を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 可動多点電極ユニット

昆虫に搭載可能な超小型駆動素子として圧電リニアアクチュエータ（SQL-RV-1.8, New Scale Technologies Inc, 外寸 1.8 × 1.8 × 12 mm、重量 0.2 g）を採用した（図1）。本駆動素子は外部に置いた専用ドライバを介してパソコンで制御した。直線移動するアクチュエータのシャフト先端に、被覆銅ワイヤ（外径 20 μm）2本束ねた双極電極を取付け、これをポリエチレン製のガイドチューブに挿入し、可動電極ユニットとした。アクリル製マウントに同ユニット2個を並置し、こ

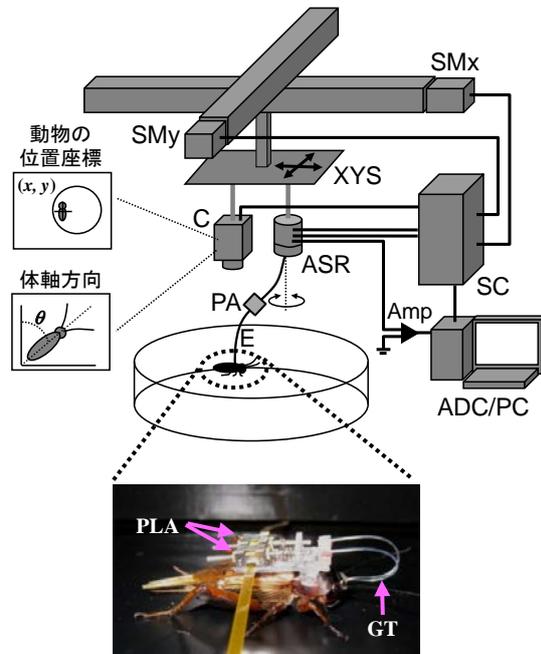


図1. 新たな行動—神経活動計測システム上はシステム全体の概略図、下はコオロギに搭載した可動多点電極ユニットの写真。ADC/PC, ADコンバータ、システム制御、データ記録解析用PC; Amp, 生体アンプ; ASR, アクティブスリップリング; C, CCDカメラ; E, ワイヤ電極; GT, ガイドチューブ; PA, 前置増幅器; PLA, 圧電リニアアクチュエータ; SC, システムコントローラ; SMx, SMy, X,Y軸用サーボモータ; XYs, XYリニアステージ

れを実験材料であるフタホシコオロギ背面に装着した。この2チャンネル版可動電極ユニットの総重量は0.8gであった。

(2) 行動—神経活動計測システムの改良

既存の行動—神経活動計測システム（図1）は、サーボモータ制御の2次元XYリニアステージに搭載したCCDカメラにより、動物を強拡大で追跡しながらその絶対位置と体軸方向を30Hzで記録しつつ、同時に脳ニューロン活動を記録する。動物の脳に埋め込んだ電極ワイヤのリード線は、動物の回転運動によりねじれが生じるが、これらをアクティブスリップリングが自動補償するため、長時間にわたってローノイズな生体信号が記録可能である。新システムでは、計測点の多点化に加えて、アクチュエータ制御用ケーブル、前置増幅器（ヘッドアンプ）の電源用ケーブル等も増設されるため、旧型スリップリングを換装した。生体信号用には、接点抵抗が極めて低い水銀接点式のスリップリング（Model 830, Mercotac Inc）を、アクチュエータ制御信号と電源用としては、水銀接点スリップリングの外周に中空機械接点式のス

リップリング (SPM-100-24P-03, 遠藤工業) を取り付け、改良型アクティブスリップリングとした。

(3)記録と解析

可動多点電極を脳表面に設置・固定し、生体電気現象と行動を監視しつつ各電極を徐々に挿入した。スパイクユニットを特定し、行動とともに、そのスパイク活動を記録した。感覚応答を確認するために、動物の体表面に対して接触刺激を与えた。実験終了後、スパイクユニットを専用ソフトウェア (Spike2, CED) で分離し、空間行動の各種パラメータ (位置、体軸方向、歩行速度) との関連付けをおこなった。予めワイヤ電極先端部に蛍光色素 (ルシファーイエロー) を塗布し、実験後に脳全載標本の電極痕を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察することにより記録部位を推定した。

4. 研究成果

(1) 新たな行動—神経活動計測システムの実用評価

単体としての可動電極ユニットは実用に十分耐えるものであった。しかし多チャンネル化については、当初4チャンネルを目標としていたが、電極装着作業に相当な時間を要すること、3本以上の電極刺入は脳へのダメージが大きいことが問題となった。検討を重ねた結果、現段階では2チャンネル型が最も生産的にデータを得ることができるとの結論に至った。電極をアクチュエータで前進させる過程で記録できるニューロンの数は、1チャンネル当たり最大で3個に留まった。これは当初見込んでいた数より少なく、改善の余地が残された。実験効率の向上には、さらなる電極の精細化が重要な改善ポイントと考えている。具体的には金属ワイヤ電極の線材をさらに細いもの (外径 $15 \mu\text{m}$ 以下) に変える必要がある。単一ニューロンの記録時間については、電極装着法の工夫等により最長で約6時間が可能となっており、目標はほぼ達成できた。

今回開発したシステムは、昆虫のみならず様々な小型動物に適応可能な世界初のデバイスであり、システム行動生理学の今後の発展に多大な貢献が期待される。

(2)空間行動に関わるニューロンの解析

これまで我々が得た結果と他種昆虫で得られた知見をもとに、前大脳を目標領域としてここへ電極を刺入し、実験アリーナ内を自由歩行するコオロギからニューロン活動と空間行動のパラメータ (2次元座標および体軸方向) を同時記録した (図2)。

総計150個以上のスパイクユニットについて解析した結果、特定の場所で活動パターン

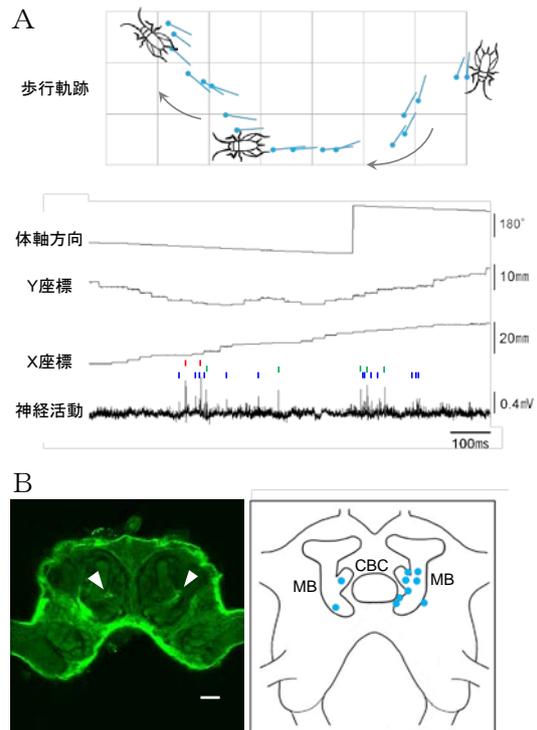


図2 A 行動とニューロン活動の記録例
 上段は位置座標および体軸方向から再構成したコオロギの歩行軌跡 (1マスは 50 mm に相当)。下段は各種行動パラメータと神経活動の時系列データ。本例では3種類のスパイクユニットが記録された。各ユニットの発火のタイミングが赤、緑、青の縦棒で示されている。**B** 左側はワイヤ電極の刺入部位 (矢じり) を示す蛍光顕微鏡画像 (白い横棒は $200 \mu\text{m}$ に相当)。右側は脳を前方から見た模式図で、記録をおこなった部位が青いドットで示されている。CBC, 中心複合体; MB, キノコ体

が変化するなど空間認知と直接的に関わるニューロンの発見には至らなかったが、体移動 (歩行) と関連する活動を示したニューロンは大きく以下の様に分類された。1) 歩行中持続的に活性化 (活動頻度が増大) するニューロン、2) 歩行中持続的に不活性化 (活動頻度が減少) するニューロン、3) 歩行開始時に一過的に活性化するニューロン、4) 歩行停止時に一過的に活性化するニューロン。

これらのニューロンの多くはいずれも歩行開始または停止より数百ミリ秒程度先行して活動頻度が変化し、また様々な体表部位への接触刺激に対して興奮反応を示した。一部については、活動頻度と歩行速度の間に極めて高い正の相関が存在した。記録部位を脳内で推定したところ、多くがキノコ体柄部周辺に分布していた (図2 B)。また歩行と関連する複数のスパイクユニット間において、発火タイミングの相互相関を調べたところ、

静止時と歩行時で相関様式が変化する現象を見出した。

これらの結果は、今回注目した前大脳領域がコオロギの空間行動の中でも特に自発歩行と関わっており、末梢機械感覚器からの情報を統合しつつ歩行調節をおこなっている可能性を示すものである。

今後も本システムに改良を加えつつ実験を継続し、ニューロン活動と行動パラメータ間の綿密な解析により歩行調節の神経機構を明らかにするとともに、将来的には空間認知と密接に関わるニューロンの発見を期待したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

①甲斐加樹来、岡田二郎、自由歩行する昆虫から行動と神経活動を同時計測するための新たな実験システム、比較生理生化学、査読有、29巻、2011、18-25

②Jiro Okada, Shogo Mizuta, Yoshihiro Toh, Refuge Size Preference in the Field Cricket *Gryllus bimaculatus*. Zoological Science, 査読有, 2011, 243-248

③Kazuki Kai, Jiro Okada, Behavioral and Electrophysiological Analysis of Locomotor-related Brain Neurons in Crickets. Proceedings of the 11th Joint Symposium of Nagasaki University and Jeju National University on Science and Technology, 査読無, 2010, pp.236-239

[学会発表] (計10件)

①甲斐加樹来、岡田二郎、フタホシコオロギの歩行と関連した前大脳ニューロンの活動様式と細胞形態、日本動物学会年次大会、2011年9月22日、旭川市神楽地区公共施設群

②Kazuki Kai, Jiro Okada, Locomotor-related spike activity of protocerebral neurons in freely walking crickets. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011年6月3日、名古屋国際会議場

③甲斐加樹来、岡田二郎、自由歩行昆虫の脳ニューロン活動を細胞外記録するための搭載型可動電極の開発、日本動物学会年次大会、2010年9月25日、東京大学駒場キャンパス

④甲斐加樹来、大久保和彦、岡田二郎、拘束歩行時のフタホシコオロギにおける前大脳ニューロンの活動様式、日本比較生理生化学会年次大会、2010年7月17日、九州産業大

学

⑤赤嶺齊亮、岡田二郎、触覚刺激に対するフタホシコオロギの行動応答、日本比較生理生化学会年次大会、2009年10月23日、千里ライフサイエンスセンター

⑥甲斐加樹来、岡田二郎、コオロギの歩行に関連した前大脳ニューロンの活動様式、日本動物学会年次大会、2009年9月19日、静岡コンベンションアーツセンター

[その他]

ホームページ

http://www.env.nagasaki-u.ac.jp/kyouiku/shoukai_67.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 二郎 (OKADA JIRO)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：10284481

(2)研究協力者

甲斐 加樹来 (KAI KAZUKI)

長崎大学・大学院生産科学研究科・環境科学専攻

大久保 和彦 (OHKUBO KAZUHIKO)

長崎大学・環境科学部・環境科学科

赤嶺 齊亮 (SEIRYO AKAMINE)

長崎大学・環境科学部・環境科学科