

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22570074

研究課題名(和文) 昆虫を用いた行動と神経系の可塑性に関する研究

研究課題名(英文) A study of neural and behavioral plasticity in insects

研究代表者

加納 正道 (KANOU, MASAMICHI)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：80183276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：片側尾葉切除後に生じるフタホシコオロギの空気流刺激に対する逃避方向の回復は、歩行の際の自己刺激空気流を手がかりとして引き起こされる。静止歩行時に人工の空気流刺激(偽自己刺激空気流)を与えて調査したところ、自発歩行開始から偽自己刺激空気流を与えるまでの潜時とその持続時間は、逃避方向の回復に対して取引(trade-off)可能な要素としてはたらくことが明らかとなった。

また、腹部神経索内下行する介在神経のバースト発生時の活動量と後肢のEMGとの間には、非常に強い相関があることが確認された。このような下行性の介在神経は、歩行時の運動出力の遠心性コピーシグナルを伝えている有力な候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The compensational recovery of the escape direction in the wind-evoked escape behavior in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, is guided by the self-generated wind during walking. The relationship between the delay and duration of artificial self-generated winds for the compensational recovery was investigated. It was revealed that the two parameters of the stimulus air current, i.e., the delay and duration, have a trade-off relationship for the completion of the compensational recovery of the escape direction.

Activities of some descending neurons in the ventral nerve cord and those of leg muscles showed a strong correlation, i.e., activities of descending neurons increased proportionally to the activity of leg muscles. From the result, it is thought that such descending neurons are good candidates that carrying efference copy signals that considered to be essential for the compensational recovery of the escape direction.

研究分野：神経行動学

キーワード：コオロギ 空気流感覚 尾葉 逃避行動 行動補償 可塑性 巨大介在神経

1. 研究開始当初の背景

動物はさまざまな感覚を用いて外界の状況を把握している。的確な状況認識は的確な行動発現をもたらす、ひいてはその動物種より高い生存率を保障する。主要な感覚系は動物種ごとに異なっており、それはその種が生活している環境と密接な関係がある。例えば視覚情報が得にくい環境に生息する動物はそれ以外の感覚、すなわち聴覚や化学感覚あるいは振動などの感覚を発達させている場合が多い。そのような種にとっては、それらの感覚が周囲の状況を知るためのメインのチャンネルであり、その感覚系の正常な動作はその動物種が生存していく上でもっとも重要な条件であると言える。

自然環境の中では、時としてその感覚系に何らかの損傷を受ける場合がある。損傷を受けた感覚系は、事実とは異なる間違った情報を中枢へと伝える。このような情報が不適切な行動の発現につながれば、その動物にとっては致命的である。事実、感覚系の損傷が発現行動に不具合を生じるさせることは、多くの動物で報告されている。しかしながら、一方においては、そのような不適切な行動が次第に正常なものへと修正されていく“行動補償”が生じる場合もある(Kanou et. al., Zool. Sci., 1999)。多くの動物行動、とりわけ下等無脊椎動物の行動の多くは定型的であり融通のきかない面があるが、このように非常に柔軟な一面ももちあわせている。

言うまでもなく、全ての動物行動は神経系の働きによって裏打ち(コントロール)されている。したがって、“行動補償”のベースには必ず神経系の機能変化が伴う。このような神経系のもつ柔軟さは“可塑性”と呼ばれ、学習等や記憶をはじめとする高次神経機能の基盤となっていることは周知の事実である。このような可塑性の性質は神経系のもつ最も重要な性質の一つでもあると考えられている。

一方、近年の神経行動学的研究により、動物行動とその神経基盤については多くの知見が蓄積されてきた。特に、動物の「定型的行動」はあらかじめ中枢内にプログラムされている神経活動のシーケンスにしたがっ

て発現し、その発現のきっかけとなるのは“鍵刺激”と呼ばれる特定の刺激であるという“生得的解発機構”の概念は、動物行動とそれに関係する神経動作を研究していく上で大きな手がかりとなった。この考え方の上に立って、行動発現に直接関与する神経あるいは鍵刺激を受容・処理する神経システムについて、神経系全体としてはもちろんのこと、細胞内記録および細胞内染色法を用いることにより、個々の同定可能ニューロンレベルでの研究が進展してきた。すなわち、複雑な動物行動の発現機序を個々のニューロンの活動と関連づけて議論できるようになってきている。

2. 研究の目的

本研究では、空気流刺激により解発されるフタホシコオロギの逃避行動をモデルとして、感覚除去後の“行動補償”とその基盤となる神経系の機能変化について調査を行うことを目的とした。空気流刺激に対し、フタホシコオロギはほぼ正反対の方向に逃避行動を発現する(Kanou et. al., Zool. Sci., 1999)。空気の動きは、腹部末端に存在する一対の尾葉と呼ばれる突起上の機械感覚毛により受容される。空気流情報はさらに中枢内の巨大介在神経(Giant Interneuron; 以下 GI)によって統合され(Kanou and Shimozawa, J. Comp. Physiol. 1984)、その情報をもとに逃避行動が発現すると考えられる。片側の尾葉を除去されたコオロギの逃避方向は不正確となるが、特定の条件下で飼育すると約2週間で補償的回復を示す(Kanou et. al., Zool. Sci., 1999)。本研究では、このようなコオロギの逃避行動における補償作用がどのようなメカニズムで進行するのかについて定量的に解析を行うが、この系はこれまでに申請者が長年にわたり解析を継続してきたものであり、多くの行動学的あるいは神経生理学的な知見が蓄積されている。それらの知見は本研究の土台となるものであり、それによりかなり進んだレベルから申請研究を開始することが可能である。昆虫に特徴的な部分はもちろんのこと、広く高等動物にも共通してみられる補償作

用のメカニズムの特性についても明らかにしていくことを目的とした。

これまで申請者は、空気流刺激に対するコオロギの逃避行動解発のメカニズム、感覚除去後の行動の補償的回復、および行動の回復に関与すると思われる神経レベルでの機能変化などについて調査してきた。その結果、感覚除去後のコオロギの逃避行動の正確さや反応率が低下すること、またそれらは特定の飼育条件下では補償的に回復することなどを明らかにしてきた。一方、行動の回復期間中には神経レベルでも機能変化が見られることから、それらの機能変化が行動の回復に関与している可能性も示唆してきた。それらの結果をまとめることにより、行動補償を具体的に説明するための神経メカニズムについての仮説を提唱し(Kanou et. al., Zool. Sci., 2002) 現在その検証を進めている(研究計画・方法の項参照)。これまでに得られた多くの結果は、すべてその仮説を支持するものであったが、それらの調査の過程で感覚除去後のコオロギの逃避行動が補償的に回復を示すために重要な期間は、除去後の比較的短い期間にある程度限定されていることも明らかになった。これは、脊椎動物における刷り込みや両眼視機能の発達における臨界期あるいは感受性期の存在と類似しているおり、神経系の可塑性の性質における種をこえた共通の特性の一端が現れていると考えられる。

コオロギは高等脊椎動物と比べて比較的簡単な神経系をもつ。そのため、同定可能ニューロンとして個々の神経の活動をそれらの形態と共に明らかにすることができ、それらが行動発現にどのように関与しているかについての調査も可能である。このような研究は、昆虫等の無脊椎動物でなければなし得ないものであるが、得られた基礎的な知見は人間をも含むさらに高等な動物における神経系の可塑性を理解する上でもきわめて有用なものになるものになると考えられる。

3. 研究の方法

片側尾葉切除後のコオロギは空気流刺激に対して不正確な方向へと逃避行動を行う

が、歩行可能な状態で飼育を行えば、逃避方向は約2週間で補償的回復を示すことが明らかとなっている。さらに、静止歩行中(後述)のコオロギに、歩行方向と整合性のある人工的な空気流刺激(偽自己刺激空気流)を与えることによっても、逃避方向に補償的回復を引き起こすことができることもできる。本申請研究では、そのような偽自己刺激空気流を、歩行開始からさまざまな遅れをもたせて与え、その後の逃避方向の回復の程度を調査することにより、コオロギの神経系がどの程度の遅れまでを自己刺激によるものと認識するのかを調査した。さらにこの結果をもとに、行動の回復の基礎となっている個々の神経レベルでの補償的变化が、どのような時間経過あるいはメカニズムによって引き起こされるのかを電気生理学的手法を用いて調査した。

< 偽自己刺激空気流を用いた実験 >

これまでの研究で適切な方向から与えられた偽自己刺激空気流は逃避方向の補償的回復に有効であることが確かめられていたが、その偽自己刺激空気流がコオロギの歩行開始とどのような時間関係の時に有効であるのかを以下のような手順で調査した。まず、発泡スチロールの球体の上に背中中で固定されたコオロギをのせる。この状態では、歩行の際の肢の動きにともない発泡スチロールの球は回転するようになっている。しかし、コオロギは背中中で固定されているため前方へは進めず、その場で肢のみを動かす「静止歩行」となる。体は動かないので、通常の歩行の際には必ず生じる自己刺激空気流は生じない。この時、歩行に同期させて人工の空気流刺激(偽自己刺激空気流)を与える。これまでの研究で、偽自己刺激空気流はコオロギの歩行方向と反対、すなわち歩行と整合性のある方向からでないとは逃避方向の補償的回復を引き起こせないことがわかっている(Takuwa et. al., Zool. Sci. 2008)。しかしながら、コオロギの自発歩行のほとんどは前方に向かって引き起こされるので、偽自己刺激を前方から与えることにより、高い確率で実際の歩行時における自己刺激空気流を再現することができる。このような設定において、偽自己刺激空気流を与えるタイミングを歩行開始から特定の時間だけ後にずらし

て(刺激遅延)約2週間トレーニングを行う。異なる刺激遅延を経験したコオロギごとに空気流刺激に対する逃避方向を調査する。それらの逃避方向の回復の程度を比較することにより、コオロギが自分の動きとどの程度まで同期した空気流を自己刺激によるものと認識するのかわかることができる。

<電気生理学的手法を用いた実験>

ここまでの行動実験の結果は、自分の動きを指令する運動系の神経情報と、自己刺激空気流による感覚系の神経情報とがコオロギの神経系内でどのように関連づけられ処理されているかを知るための重要な手がかりになる。そこで行動実験と並行して神経生理学的な調査を進める。これまで申請者は、コオロギの神経系内で「自分の動きを指令する神経情報」のコピー信号(遠心性コピー信号)から予測される自己刺激の大きさや方向と「実際の歩行の際に生じる自己刺激空気流からの感覚情報」とを照合させることにより感覚系の欠損を知り、行動補償の手がかりにしているとの仮説を立て、それを少しずつ実証してきた。そして、この回復機構に重要な役割をもつ遠心性コピー信号を担う神経についても同定を試みてきた。これまでにその候補と考えられているものは腹部神経索内を走行する下行性介在神経であり、腹部最終神経節までその情報を伝えているという仮定の下に検索を行ってきた。その結果、実際にそのような神経が存在するであろう事は細胞外記録によりある程度視野に入ってきたが、まだ個々の神経細胞レベルでの同定には至っていない。電気生理学的手法を用いてこの神経あるいは神経回路の同定を試みる。

4. 研究成果

コオロギは空気流刺激に対し、反対方向へと逃避行動を発現する。空気流の感覚器である機械感覚毛が密生している1対の尾葉の片側を除去すると、逃避の方向が不正確となるが、自由歩行できる環境で飼育すると、約2週間で逃避方向に補償的回復が見られる。これまでの研究で、コオロギの神経系は自分が動いたことにより生じる自己刺激空気流の方向を基準として、空気流情報を処理する機能を修正していること、また、体を固定した状態で引き起こされた歩行運動(静止歩行)に

同調して与えられた人工の空気流刺激(偽自己刺激空気流)も、回復に有効に作用することが明らかとなっている。

まず、片側尾葉を切除したコオロギを静止歩行させ、その際に同調して与える偽自己刺激空気流のタイミング(自発歩行開始からの潜時)、あるいはその持続時間を様々に変化させることにより、それぞれの刺激が逃避方向の補償的回復におよぼす影響を調査した。用いた潜時は250、500、750、1000 msec、持続時間は50、100、150、200 msecであり、これらのうちから8通りの組み合わせで、14日間にわたり偽自己刺激空気流によるトレーニングを行った。このように、調査した範囲内で、逃避方向に補償的回復を生じさせるための潜時と持続時間は、比例関係を示すように変化していく傾向があった。例えば、持続時間が50msecの刺激の場合、潜時が500msecだと効果がないが、250msecになると逃避方向に回復が生じた。また、潜時が500msecの場合でも、持続時間を100msecと長くすると効果が現れる。すなわち、偽自己刺激空気流の持続時間と、自発歩行開始からの潜時は取引(trade-off)可能な要素であることが明らかとなってきた。このような行動補償のメカニズムについて、以前に提唱した仮説を発展させる形で新たな仮説を提唱し、論文として発表した(Zoological Science, 30: 339-344, 2013)。前提となる以前の仮説は、肢への運動出力の遠心性コピー信号を元に空気流感受性介在神経の反応を予測し、それを実際に生じる反応と比較する事により自身の空気流感受システムが正常か否かを認識し、それらに不一致があったときはその誤差シグナルを用いて空気流感受システムを補正する、というものであった。今回の仮説は、そのような補正を引き起こす引金となるのは、遠心性コピー信号と自己刺激空気流(あるいは偽自己刺激空気流)によって生じる介在神経の反応が、一定の時間内に収斂する事によりそれらの情報を用いて活動を示すような神経の存在を予測するものである。

上記の仮説の妥当性を証明するため、まず偽自己刺激空気流の強度(流速)をこれまでの流速30mm/secから2倍(60mm/sec)に変化させ、同様の実験を行った。これまでと同様、トレーニングは14日間行った。これは、刺激を大きくする事により空気流感受性介在神経

の反応量が増加するので、遠心性コピー信号と重なり合う確率が増加し、補償が起きやすくなると考えたからである。この実験では、以前の調査で回復が見られなかった持続時間50msecと潜時500msecの組み合わせ、潜時750msecと持続時間100msecの組み合わせ、および、潜時1000msec、持続時間100msecの組み合わせの偽自己刺激空気流刺激を用いて実験を行った。これらは、流速30mm/secの偽自己刺激空気流では回復が見られなかった組み合わせである。その結果、今回用いた3つの組み合わせにおいて、それらの刺激が逃避方向の補償的回復を引き起こすために有効であることが判明した。

さらに、逆の実験として、これまでよりも遅い流速の空気流を用いて行動補償の発現を調査した。用いた空気流は流速15 mm/secであり、最初の実験(30mm/sec)の1/2である。遅延は500msecのみを用いたが、持続時間は100 msec、150 msecおよび200 msecと変化させた。その結果、持続時間が100 msecおよび150 msecの刺激では補償的回復は生じなかったが、200 msecにおいては回復が見られた。すなわち、流速を遅くすることにより、回復を生じさせることのできる持続時間の範囲が長い方向へシフトしたことから、これまでの結果と整合性のある結果が得られた。すなわち、刺激強度も行動の補償的回復を引き起こす上で重要な要素であり、潜時、持続時間とともにトレード可能なパラメータであることが明らかとなった。このことにより、新たに提唱した行動補償の神経メカニズムにおける仮説の妥当性が、より確かなものとなった。

また、行動補償に関係するであろう神経系の検索にも着手した。行動補償の仮説においては、遠心性コピーシグナルが重要な役割を果たすと考えられている。その考えに基づき、歩行中のコオロギの腹部神経索から電気生理学的に記録を行い、遠心性コピーと考えられる神経の検索を行った。それと同時に肢の運動神経からの記録も試みた。しかしながら、肢の運動神経からの記録は歩行そのものに支障をきたしたので、後肢の筋肉からの記録(EMG)に切り替え、腹部神経索内の介在神経の活動とEMGの同時記録を行った。歩行中、下行性の介在神経のリズミカルなバーストが確認された。このような介在神経の活動は以前から確認されていたが、遠心性コピーシ

グナルそのものか否かについての結論は得られていなかった。記録される下行性の介在神経の活動電位は非常に小さく、また前述のように出力側は筋肉からの記録であったため、個々のスパイクの対応関係の比較はあまり意味がないので、全体の反応量の比較を行った。具体的には、下行性の介在神経および後肢のEMGにおいて、それぞれベースラインより一定量上のレベル(SDの3倍)を閾値として、それより上の部分の面積を積分した。その結果、下行性の介在神経のバースト発生時の活動量と後肢のEMGとの間には、非常に強い相関があることが確認された($r=0.87$)。このことは、この下行性の介在神経が歩行時の運動出力の遠心性コピーシグナルを伝えている有力な証拠と考えられる。

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3件)

- 1・Takuwa H, Kanou M (2015) Sensitive Period for the Recovery of the Response Rate of the Wind-Evoked Escape Behavior of Unilaterally Cercus-Ablated Crickets (*Gryllus bimaculatus*). *Zoological Science* 32: 119-123 査読有
- 2・Kanou M, Matsuyama A, Takuwa H (2014) Effects of Visual Information on Wind-Evoked Escape Behavior of the Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science* 31: 559-564 査読有
- 3・Takuwa H, Mori D, Ozaki N, Kanou M (2013) Effects of the delay and duration of self-generated wind on behavioral compensation in unilaterally circus-ablated crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science* 30: 339-344 査読有

[学会発表](計11件)

- 1・Masamichi Kanou, Tomoko Yano, Megumi Kida, Shinobu Asano and Hiroyuki Takuwa “Effects of the artificial self-generated wind for the compensation of the escape direction in unilaterally cercus-ablated crickets, *Gryllus*

- bimaculatus* ". The 11th Congress of the International Society of Neuroethology. Abstracts of the 11th Congress of the International Society of Neuroethology. P02098. Sapporo, Hokkaido, Japan, 7/28-8/1, 2014
- 2・加納正道・矢野朋子・田桑弘之 「偽自己刺激空気流の流速の違いがコオロギの行動補償に与える影響について」 Effects of the velocity of the artificial air puff for the behavioral compensation in unilaterally cercus-ablated crickets. 日本動物学会第 83 回大会、大阪大学豊中キャンパス、大阪府豊中市 2012.9.15
 - 3・松山茜・田桑弘之・加納正道 「空気流刺激由来の逃避行動と視覚情報との関係」 日本動物学会中四国支部・愛媛県例会、愛媛大学、愛媛県松山市 2011.12.17
 - 4・松山茜・田桑弘之・加納正道 「空気流刺激に対するコオロギの逃避方向と視覚刺激との関係」 Relation between the direction of wind-evoked escape and the visual information in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. 日本動物学会第 82 回大会、旭川市大雪クリスタルホール、北海道旭川市 2011.9.22
 - 5・松山茜・田桑弘之・加納正道 「空気流刺激に対するコオロギの逃避行動に視覚情報が及ぼす影響」 Effects of visual information on wind-evoked escape behavior of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. 日本動物学会中四国支部大会、香川大学、香川県高松市 2011.5.14
 - 6・松山茜・田桑弘之・加納正道 「視覚入力がコオロギの逃避行動におよぼす影響」 日本動物学会中四国支部・愛媛県例会、愛媛大学、愛媛県松山市 2010.12.18
 - 7・松山茜・田桑弘之・加納正道 「空気流刺激に対するコオロギの逃避行動に視覚情報がおよぼす影響」 Effects of visual information on the wind-evoked escape behavior of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. 日本動物学会第 81 回大会、東京大学、東京都目黒区駒場 2010.9.25
 - 8・田桑弘之・森太地・加納正道 「人工空気流刺激がコオロギの行動補償を引き起こすための条件」 Conditions of

- artificial air-current stimulus required for the behavioral compensation in unilaterally cercus-ablated crickets. 日本動物学会第 81 回大会、東京大学、東京都目黒区駒場 2010.9.25
- 9・田桑弘之・尾崎直子・森太地・加納正道 「コオロギの行動補償を引き起こす偽自己刺激の持続時間と遅延との関係」 Relationship between the duration and delay of artificial air puff for the behavioral compensation in unilaterally cercus-ablated crickets. 日本比較生理生化学会第 32 回大会、九州産業大学、福岡県福岡市 2010.7.19
 - 10・松山茜・田桑弘之・加納正道 「視覚情報がコオロギの逃避行動におよぼす影響」 The effect of visual information on the air-puff-evoked escape behavior of crickets. 日本比較生理生化学会第 32 回大会、九州産業大学、福岡県福岡市 2010.7.17
 - 11・松山茜・田桑弘之・加納正道 「空気流により引き起こされるコオロギの逃避方向に視覚情報がおよぼす影響」 Effects of visual information on the direction of wind-evoked escape of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. 日本動物学会中四国支部大会、山口大学、山口県山口市 2010.5.15
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
加納 正道 (KANOU MASAMICHI)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：80183276
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし