

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 5月 7日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22570078

研究課題名（和文）学習時の動機によって記憶・学習効率の違いを生み出す神経メカニズムの解明

研究課題名（英文）Neural mechanisms of motivation-dependent learning and memory

研究代表者

岡田 龍一（OKADA RYUICHI）

徳島文理大学・薬学部・研究員

研究者番号：20423006

研究成果の概要（和文）：学習時の動機によって学習や記憶の効率が異なるのはなぜかを神経科学的に明らかにすることを目的としてミツバチに学習訓練をさせながら脳の神経活動を記録した。神経回路レベルでの仕組みは現在、解析中であるが本研究課題遂行中に記憶が獲得されていく過程の脳活動の記録に成功した。完全に記憶が形成されると刺激に対する反応が弱くなる PE1 と呼ばれるニューロンは、記憶が形成される直前に自然状態での活動が抑えられ、記憶が形成した直後から刺激への反応が弱くなることがわかった。

研究成果の概要（英文）：To clarify neurophysiologically how motivation influences the efficiency of the learning and memory, I recorded the activities of the brain neurons from honeybees under training for olfactory learning. I have been progressively analyzing data at the level of the neural circuit. With executing experiments, I successfully recorded brain activities in the entire process when olfactory memory is forming. One of honeybee brain neurons, PE1, is known to reduce the responses to learned odor after the memory was absolutely consolidated. I found that the voluntary activity of the PE1 decreased just before forming memory and the first reduction of the odor response was taken place just after the memory was formed, not when the memory was formed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：記憶、学習、動機、脳、昆虫、電気生理

1. 研究開始当初の背景

この20年間で感覚知覚などの脳神経メカニズムは飛躍的に理解が進んだ。今後は動機（モチベーション）や情動など抽象的でさら

に高次な現象の脳メカニズムを解明することが新たな課題になると予想される。学習時に、積極的に取り組むか受動的に取り組むかで学習効率や記憶保持期間が異なることは

経験的によく知られているが、今のところその神経メカニズムはほとんどわかっていない。

社会性昆虫であるミツバチは、採餌の際に「よい餌場」を見つけると、ダンス行動によって仲間に餌場の位置情報を伝えることが知られている。私はこれまでのダンス行動に関する研究のなかで (Okada et al., 2008, *Adv. Robotics*)、ダンスをしているミツバチに近寄って積極的に何度もダンスに追従するミツバチとすぐに追従をやめるミツバチがいることに気付いた。また、巣内のミツバチはたとえ採餌の経験がなくてもダンスバチの持ち帰った蜜に残留したにおいを記憶している (Gil & De Marco, 2006, *Biol Lett*)。よって、ミツバチ巣内には、(1) 積極的に記憶するミツバチ、(2) 記憶しなければならないが積極的ではないミツバチ、さらに、(3) 巣内で無意識ににおいを記憶したミツバチがいることになる。

2. 研究の目的

一般に、動物の行動にはそれぞれに特異的な神経回路があり、その神経回路の決定信号を出力する司令ニューロンが存在していると考えられている。特定の行動にバリエーションがある場合は既存の神経回路が修飾を受けたあと、司令ニューロンから行動司令が出力されることが多い。従って、学習時の動機による記憶・学習効率の違いも、特定の神経回路が修飾を受けたためであると予想される。

ミツバチは高度な嗅覚学習能力を持っている。ミツバチの触角に砂糖水刺激を与えるとミツバチは吻を伸ばす。匂いを与えながら砂糖水を与えるとミツバチはこの関係を学習し、次回からは匂いを与えただけで砂糖水を期待し、吻を伸ばすようになる (匂いの条件付け)。昆虫脳の高次中枢であるキノコ体の出力ニューロンである PE1 の神経活動を記録しながら学習訓練を 5 回繰り返すと、砂糖水と関係があったにおいに対して、反応が弱くなることがわかっている (Okada et al., 2007, *J Neurosci*)。実際、PE1 が GABA と呼ばれる抑制性の神経伝達物質を持つ抑制性ニューロンとシナプスしていることがほぼ確実であり、嗅覚学習における脳の神経モデルが提案されている (Okada et al., 2007, *J Neurosci*)。このモデルと他の研究結果を合わせると、興奮性と抑制性のニューロンがシナプス入力している PE1 が修飾を受けている可能性が高い。また、PE1 は脳に 1 対しかない同定されたニューロンであるので単一細胞レベルでの神経可塑性を解析することが可能である。

そこで、本研究では学習時の動機によって記憶・学習効率の違いを生み出す神経メカニ

ズムの解明を目標に、PE1 に着目してミツバチのにおい記憶のメカニズムを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的研究

埋めこみ電極法 (Okada et al., 2007, *J Neurosci*) で PE1 の神経記録を行う。本手法では、電気生理実験をしながらミツバチが学習したかどうかを直接視認できる。作動増幅器に接続した直径 $17\ \mu\text{m}$ の極細被覆銅ワイヤを 2 本束ねて電極とした。脳の表面から約 $170\ \mu\text{m}$ 奥にある PE1 にワイヤ電極を刺入したのち、シリコンで頭部をシールした。これにより、吻を伸展させた時でも脳と電極が一緒に動き、PE1 の神経活動を記録し続けられる。PE1 の神経活動は専用ソフトを用いてパソコンに保存した。記録後は正の通電により、電極先端を染め出し、顕微鏡下で記録部位を確認した。実験終了後、記録した神経のスパイクパターンと私がこれまでに蓄積した PE1 のデータベースとを照合して PE1 からの記録であることを確認し、専用ソフトウェアと自作のプログラムによって神経活動と行動の詳細な相関を解析した。さらに、神経活動とミツバチの行動との詳細な解析のために、(1) ミツバチの吻の伸展筋である M17 の筋電図を記録し、同時に (2) ビデオカメラでミツバチの行動を記録した。このことで、神経活動と触角など吻以外の部位の運動との相関を否定する。

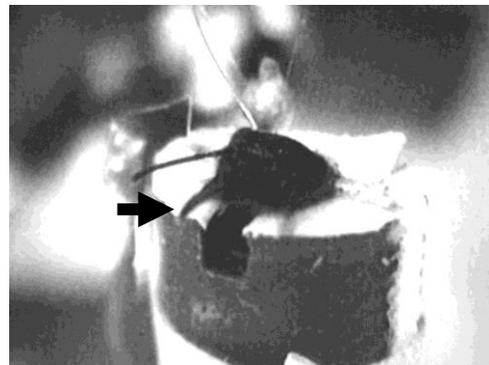


図 1 脳に電極が埋め込まれたまま、吻 (矢印) 伸展反応をするミツバチ

(2) 学習の条件付け

3 種類のにおい物質 (オクタノール、ペパーミント、リモネン) を用いてミツバチににおいの差分条件付けを行った。3 種類のうちのふたつを訓練に用いた。ひとつは砂糖水と連合させ (CS+)、もう片方は連合させなかった (CS-)。残りのにおいはコントロールとして、訓練には用いず訓練前と訓練後のにおい刺激の時にだけ用いた。CS+、CS-、コントロールのにおいは、組み合わせによる予期せぬ効果が出ないように、偏りが出ないように組

み合わせた。

訓練では3秒間のおい刺激 (CS+) を与え、最後の1秒間が重なるように30%の砂糖水を3秒間与えた。CS-にはおい刺激だけを3秒間与えた。CS+とCS-の間隔は2分30秒にした。これを5回繰り返し、訓練とした。におい刺激だけが与えられている2秒間に吻を伸ばしたミツバチを学習したミツバチとした。

(3) データ解析

すべての神経スパイクは50ミリ秒当たりの発火頻度のヒストグラムに変換してから解析した。神経活動は刺激前1秒間の平均発火頻度を引いたものを活動とした。訓練による効果は、訓練での活動と訓練前の活動の差分で表した。

4. 研究成果

(1) 訓練中のおい刺激に対する反応

電極が脳に刺さった状態のミツバチでも、無処理のミツバチと同等の学習能力を見せた。当初目指していた、動機によって学習の効率に違いが生じる神経メカニズムはまだ確証を得るに至っておらず、現在も解析途中である。しかし、本研究遂行中に、副産物として大変興味深い現象が見つかった。

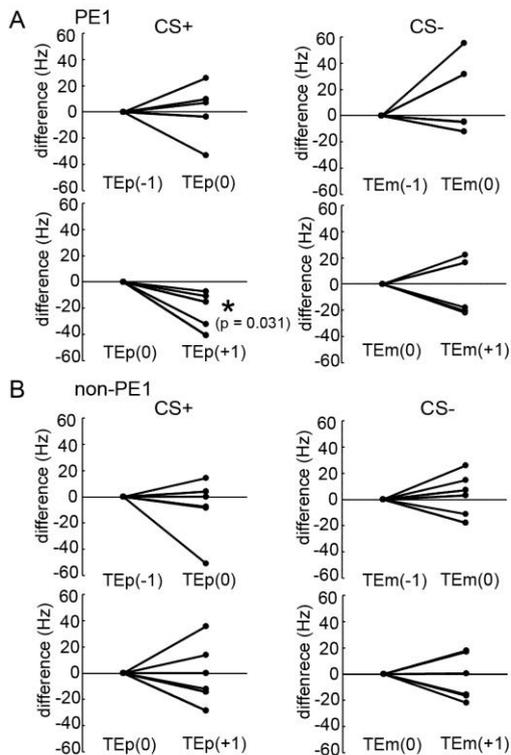


図2 PE1 と PE1 以外のニューロンの訓練によるにおいに対する反応の変化

学習訓練中、ミツバチはにおいと砂糖水の5回の対提示 (においと砂糖水を対にして提示すること。CS+刺激) によって学習が成立し、記憶が形成される。初めて学習行動を示した (吻を伸ばした) 対提示の訓練を記憶成立訓練 (TE) と呼ぶこととし、訓練を実際に行った回数ではなく、記憶成立訓練を基準にした。その際、成立訓練後は正の数字で、成立訓練前は負の数字で表した。PE1 と PE1 以外のニューロン別々で CS+、CS- に対する反応を解析したところ、PE1 だけで学習に関連する変化が見つかった (図2)。

PE1 では5例すべてで、CS+に対する応答が弱くなった。その一方でCS-に対しては、変化はなかった。この反応の変化は記憶成立訓練ではなく、記憶の形成の直後の訓練 (TEp(+1)) で初めて見られた。PE1 以外のニューロンではどちらのにおいに対しても全く変化が見つからなかった。これらのことはにおい学習にPE1 が強く関与していることを示すのみならず、学習による神経可塑性が記憶の形成時にはまだPE1 に生じないことを示唆している。

(2) 記憶が形成されている時の脳の活動

以上の発見はにおいの刺激に対する反応の変化が記憶の形成直後から見られることを意味している。したがって、学習によってPE1 に変化を生じさせる脳内活動がそれ以前に起こっているはずである。そこで、PE1 の自発発火に着目した。自発発火とは神経が外部からの入力がない無刺激の状態を観察される神経の発火活動のことである。PE1 の自発発火頻度を前後1秒間でスムージングする信号処理を施したところ、100ミリ秒当たり1.5-2.5発のスパイクが観測された (図3)。スパイクの頻度は周期的に増減しているように観察されたが (図3のSTp(-2))、記憶の形成直前で増減の振幅が小さくなり、かつ周期が変動しているようにみえた (図3のSTp(-1))。そこで、記憶成立訓練の2回前から記憶成立訓練から2回後までの訓練間の自発発火活動の周波数解析を行った。

その結果、PE1 は記憶の形成の前には約

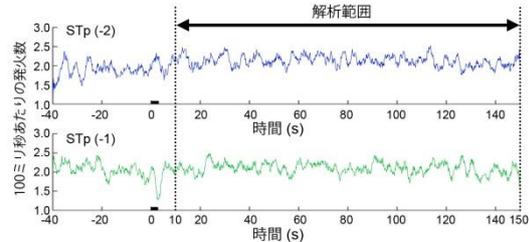


図3 記憶の形成前 (上) と成立直前 (下) のPE1 の自発発火頻度。

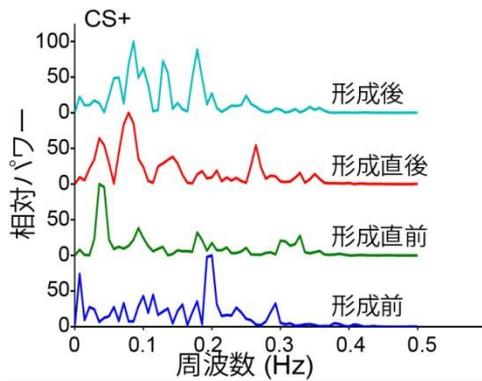


図4 訓練中のCS+刺激後のPE1の自発発火のパワースペクトル。記憶の形成前、成立直前、記憶の形成直後、成立後を並べて表示した。

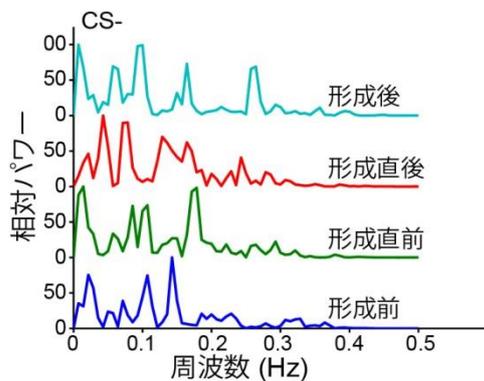


図5 訓練中のCS-刺激後のPE1の自発発火のパワースペクトル。記憶の形成前、成立直前、記憶の形成直後、成立後を並べて表示した。

0.15-0.2 Hz にパワースペクトルのピークがあることがわかった(図4)。つまり5-6秒の周期で増減していた。このピークが記憶の成立直前に約0.05 Hz(周期は約20秒)にシフトした(図4)。この低周波側へのシフトは記憶の形成直後や記憶の形成後では若干、高周波側へ再シフトするものの、成立前の周波数である0.2 Hz まで戻らず、成立前に比べて低い周波数のままで維持されていた。このようなピークのシフトはCS+によって引き起こされ、CS-ではみられなかった(図5)。パワースペクトルのピークが低周波数側にシフトするということは、PE1の神経発火が抑制されていることを意味している。今回観察したPE1の活動は無刺激状態の自発発火であるので、学習訓練によってPE1は継続的に発火活動が抑制されていたことを示す。

以上の結果は、学習して記憶が形成されていく過程での脳の活動を初めて記録することに成功したということだけにとどまらず、学習によって脳神経が変化していく過程の

解明への強力なブレイクスルーとなる可能性がある。

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1件)

1) 岡田龍一 (2012) ミツバチの尻振りダンスと採餌行動における効果, *比較生理生化学*29: 121-130 査読有り

〔学会発表〕(計14件)

1) 岡田龍一 (2013) ミツバチが匂いを記憶している時の脳の活動、ミツバチミニシンポジウム、姫路(兵庫県立大学)、2月22日

2) Okada R (2012) Neural network involved in olfactory learning in the honeybee brain., シンポジウム「昆虫神経科学の可能性」、日本神経科学会(Neuroscience 2012)、Nagoya、9月19日

3) 岡田龍一 (2012) ダンス行動によるミツバチコロニーの環境適応: コンピュータシミュレーションによる解析、関連集会「環境センシングにもとづく行動スイッチング研究の現状とこれから」、日本動物学会、豊中、9月13日

4) 岡田龍一 (2011) 数理モデルをもちいた8の字ダンスによるミツバチの適応的採餌行動の解析、第23回自律分散システムシンポジウム、札幌、1月30日

5) Okada R, Ikeno H, Kimura T, Ohashi M, Aonuma H, Ito E. (2010) Biological benefits of the honeybee waggle dance by computer simulation analyses. The 9th International Congress of Neuroethology, Salamanca, Spain, Aug 2-7.

6) Okada R, Ikeno H, Ohashi M, Kimura T, Aonuma H, Ito E. (2011) Computational analysis of the foraging strategy in the honeybees, *Apis mellifera*. The International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2011, Nagoya, Japan, May 31-Jun 5.

7) 岡田龍一、池野英利、木村敏文、大橋瑞江、青沼仁志、伊藤悦朗 (2012) 動的環境下でのミツバチ採餌行動におけるダンス情報の誤差の効果、日本動物学会、豊中、9月13日

8) 岡田龍一 (2012) ミツバチのキノコ体ニューロンの嗅覚学習関連神経活動、無脊椎動物神経生物研究会、掛川、8月29日

9) Okada R, Menzel R (2012) Spontaneous activity of an identified mushroom body extrinsic neuron during olfactory memory acquisition in the honeybee, *Apis mellifera*.、日本比較生理生化学会、葉山、7月6-7日

10) 岡田龍一、ランドルフ・メンゼル (2012) ミツバチにおける嗅覚記憶獲得中の同定脳ニューロンの自発発火、日本動物学会中国四国支部大会、松江、5月13日

11) 岡田龍一、池野英利、木村敏文、大橋瑞江、青沼仁志、伊藤悦朗 (2011) コンピュータシミュレーションによるミツバチ8の字ダンスの採餌行動における効果、日本動物学会、旭川、9月22日

12) 岡田龍一、池野英利、木村敏文、大橋瑞江、青沼仁志、伊藤悦朗 (2011) コンピュータシミュレーションによるミツバチの採餌戦略の解析、日本動物学会中国四国支部大会、高松、5月14日

13) 岡田龍一、池野英利、木村敏文、大橋瑞江、青沼仁志、伊藤悦朗 (2010) 計算機シミュレーションによるミツバチ8の字ダンスの採餌行動における効果、日本動物学会、東京、9月25日

14) 岡田龍一、池野英利、木村敏文、大橋瑞江、青沼仁志、伊藤悦朗 (2010) 数理モデルによるミツバチの8の字ダンスの生物的意義の解析、日本比較生理生化学会、福岡、7月19日

〔図書〕(計1件)

1) 岡田龍一他(2013) 行動生物学辞典、上田恵介、菊水健史、坂上貴之、辻和希、友永雅己、中島定彦、松島俊也編、東京化学同人(印刷中)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/peridroapis/>

マスコミ:

1) 「虫が教えてくれること」 (2012年3月5日、四国新聞「一日一言」)

2) 「多分野への応用期待 姫路で「ミツバチ」シンポ」 (2012年2月25日、神戸新聞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 龍一 (OKADA RYUICHI)

徳島文理大学・薬学部・研究員

研究者番号: 20423006