

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22570079

研究課題名(和文)ミツバチの尻振りダンス解読に関わる異種感覚統合神経機構の解明

研究課題名(英文)Neural mechanism of multi-sensory integration related for deciphering the waggle dance of honeybee

研究代表者

藍 浩之(AI, Hiroyuki)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：20330897

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)：蜜源から帰巢した採餌バチは、尻振りダンスにより、餌場の場所や餌場の匂い情報を巣仲間
に知らせる。しかし、巣仲間のミツバチがどのように尻振りダンサーに誘引されるのか、尻振りダンサーへの誘引の際
、脳内で何が起こるのかはよくわかっていない。本研究では、採餌バチが発する可能性のある2種類の刺激、花の匂い
と尻振りダンス音により誘発される歩行様式を解析した。その結果、蜜(報酬)と連合学習した花の匂いと羽ばたき
による振動が巣仲間を誘引すること、その誘引行動を指令する脳内候補ニューロンを発見した。さらに蜜源への距離と方
向を統合する脳内領域を発見した。これらは尻振りダンス解読機構解明の糸口になる成果である。

研究成果の概要(英文)：Honeybees share information concerning profitable flowers by a species-specific
behavior, the waggle dance (von Frisch, 1967). During waggle-dance communication, hive-mates of the
dancer are able to decipher the positional and floral information contained within the dance, and
subsequently, they arrive at the indicated flower patch. We have investigated how the hive-mates encounter
the waggle dancer and what neural mechanism controls the searching behavior toward the dancer. It was
found that the honeybee is attracted to the dancer by both floral scent and air-borne vibration caused by
wingbeats of the dancer, and a possible candidate of a descending neuron related with the searching
behavior. Moreover the center for detecting positional vector information encoded in waggle dance was
identified morphologically. These results will be the clue for understanding the neural mechanism related
with deciphering the positional information and floral odor encoded in the waggle dance.

研究分野：神経行動学

キーワード：脳・神経 行動学 神経科学 昆虫 生理学

1. 研究開始当初の背景

ミツバチは、巣内で蜜源情報を尻振りダンスから得ることで、その後の効率的な採餌に役立っている。これまでの尻振りダンスに関する研究は、尻振りダンスや、その追従蜂のその後の採餌行動に注目した研究が多く、尻振りダンスの際、巣内のミツバチが、どのように尻振りダンスに定位するのかについては、よくわかっていない。尻振りダンスを行っている間、ダンス蜂は花の匂いを発する(花粉や蜜の匂い)と同時に翅ばたきにより振動を起こす。本研究では採餌バチから生じる花の匂いと尻振りダンス時の振動刺激に対するミツバチの行動を、匂いアリーナと歩行軌跡追跡システム上で調べた。ミツバチは栄養交換を通して匂い学習が成立するので、あらかじめ学習させた匂いと、非学習の匂いによって誘発される歩行の違いに着目した。また、風洞内で、学習した匂い源を探索する際の飛行軌跡を解析し、歩行による匂い源探索歩行との比較を行った。

ミツバチは蜜源への振動と匂いを脳内で統合的に処理することで、ダンス蜂への追従行動や蜜源への採餌行動に活用していると考えられる。しかし、追従蜂がどのように匂いと振動情報を脳内で統合処理しているかはわかっていない。代表者らはこれまでに、ミツバチの振動情報処理について神経解剖学的、神経生理学的に調べてきた。その結果、振動受容器官であるジョンストン器官が複数の感覚細胞群から構成されていることを示した。さらに、ジョンストン器官由来の感覚線維の脳内投射領域の形態学的同定を行ない、ミツバチのジョンストン器官由来の感覚線維が中大脳のみならず前大脳、食道下神経節にも投射し、並列情報処理回路を形成していることを明らかにしてきた。また、細胞内記録および染色法により、現在までに振動情報処理に関わる介在ニューロンを同定した。しかし、これらの同定されたニューロン

含む振動応答性介在ニューロンが、尻振りダンスコミュニケーションの際に尻振りダンスから生じる感覚刺激(振動と匂いのくみあわせ刺激)に対し、どのように応答するのか、そのような3次元形態を持つのか?これらの情報処理に関わる神経回路はいかなるものかは未だ不明である。

一方、追従蜂は尻振りダンスの際に、蜜源へのベクトル情報を検出、解読する。これまでの研究で、蜜源への距離は、尻振りダンスにおける尻振りの数と比例関係にあることが分かっている。尻振りは横方向に一定の頻度で起こり(15Hz)、尻が最も横に振れたタイミングで羽ばたきのため、尻振りダンス近傍では30Hzの空気振動が生じる。近年、尻振りダンスの追従バチは、この空気振動の数を積算し、蜜源への距離を算出している行動学的証拠が得られてきた。一方、尻振りダンス中、蜜源への方向情報は体軸方向に符号化されており、その体軸方向は頸部器官で検出している(図1)。しかし、ミツバチの尻振りダンスに含まれるベクトル情報が脳内のどの領域で情報処理されて、解読されているのかは不明のままである。

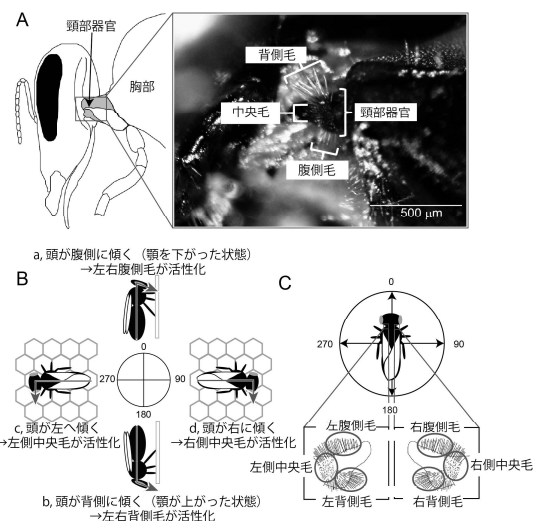


図 1. 体軸方向を検出する頸部器官 A: 頸部器官には感覚毛が分布し、頭部の傾きを検出する。その分布域から3つのクラスター(背側毛、中央毛、腹側毛)に区別できる。B: 垂直巣面上において、体軸方向が上向きの時

(a)、体軸方向が下向きの時 (b)。体軸方向が水平の時 (c, d)、それぞれ頭が前後左右に傾き、頸部器官の毛の押される部位が変わる。C: 左右の感覚毛が押される位置から、体軸方向が検出される。

2. 研究の目的

(1) 匂い学習したミツバチを、歩行軌跡記録装置を用いて、その学習した匂いや尻振りダンスで生じる振動刺激によって誘発される歩行の特徴を調べる。

(2) ミツバチの振動応答性介在ニューロンが、花の匂いおよび尻振りダンスの際に生じる振動刺激に対しどのように応答するのかを明らかにする。

(3) 脳内のベクトル情報の感覚一次中枢を形態的に同定し、振動応答性介在ニューロンとの空間的位置関係を解析する。

3. 研究の方法

本研究は(1)歩行軌跡記録実験、(2)細胞内記録および色素注入、(3)感覚器官からの色素注入、3次元形態の観察および標準脳を用いた形態解析から成る。(1)においては、ミツバチをあらかじめ吻伸展反応を用いた匂い条件付けを施し、トラックボールを用いた歩行軌跡追跡システムでミツバチの匂いおよび振動刺激で誘発される歩行を記録した。(2)において、ミツバチの脳から細胞内記録を行うと同時に、尻振りダンスで生じる振動刺激と匂い刺激を行う。(3)では、ジョンストン器官と頸部器官から蛍光色素を注入し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡で、ベクトル情報一次中枢の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 吻伸展反応を用いた匂い条件付けにより、報酬と関連づけて学習した匂い刺激は、その歩行を活性化することが明らかとなった(図2)。さらに、匂い刺激で誘発される歩行が、匂い刺激中、刺激直後、刺激後でその歩行様式に変化があるのかを調べた。その結果、普段採餌に用いていると考えられるオレンジ

の匂いを報酬と関連づけて学習させた後、その匂い刺激を与えると、ミツバチは小さな左右ターンを繰り返し直進歩行し、匂い刺激後は、ターン角度が大きくなり、歩行範囲、歩行距離も大きくなること分かった(図3)。

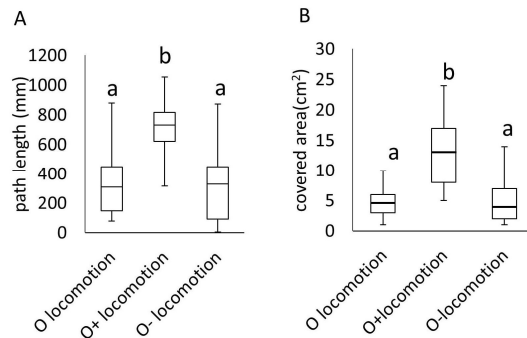


図 2. ミツバチのオレンジの匂い刺激で誘発された歩行に対する匂い条件付けの効果。A: 歩行距離、B: 歩行範囲。報酬組み合わせ条件付けされた個体の、匂いに対する歩行(O+ locomotion)は、条件付けしていない個体の歩行(O locomotion)、報酬と非組み合わせ条件付けされた個体の歩行(O- locomotion)に比べ、長い距離を歩行し、歩行範囲も広い。

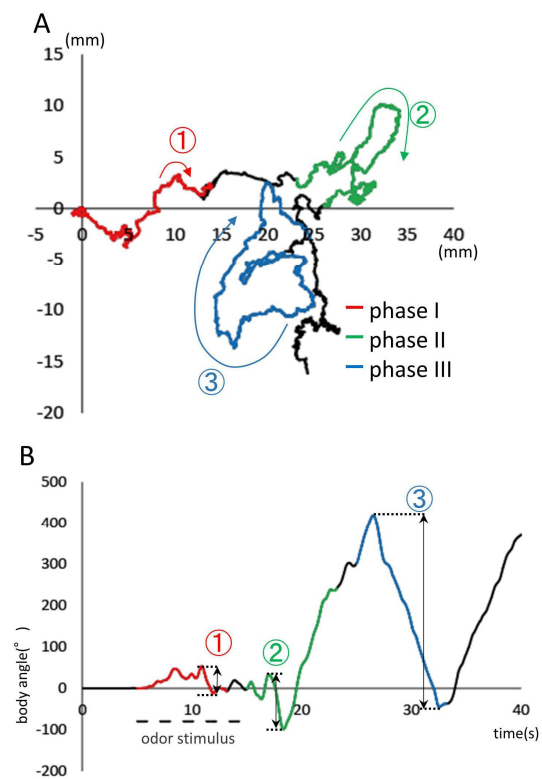


図 3 報酬と関連付けたオレンジの匂い刺激で誘発される歩行 (A は歩行の軌跡、B はタ

ーン角度の経時変化)。匂い刺激中はターン角度が小さく()、刺激後はターン角度が大きくなる傾向がみられた(、)。

また、報酬と関連づけて学習した匂いによって生じる左右ターンを伴う直進歩行は、匂い源付近での局所探索歩行、その匂い刺激終了後の歩行範囲、歩行距離、左右ターン角度の大きい歩行は、一旦匂いを見失った際に生じる、匂いの有る場所を探索する歩行であると考えられる。一方、普段採集に用いていないクローブの匂いを用いた場合、匂い刺激中と刺激後の歩行範囲、歩行距離、平均ターン角度に変化は見られなかった。この結果は、匂いの種類によって報酬条件付けの歩行に対する効果が異なることを示唆するものである。さらに、尻振りダンスで生じる振動刺激の影響を調べた。オレンジの匂い刺激による歩行中に尻振りダンス音を提示すると、歩行範囲、歩行速度、平均ターン角度が上昇することが分かった。

(2)上記の歩行を制御する神経機構を調べるため、拘束下歩行パターン解析装置上で疑似自由歩行状態のミツバチ個体の脳内の神経活動を記録しながら匂いと振動刺激を行い、刺激受容前後の神経活動状況の記録を試みた。しかし、頭部を固定した状態で、自然な歩行を誘発させることができず、歩行と神経活動の関連を調べることはできなかった。そのため、ミツバチを固定した状態で、匂いと振動刺激を組み合わせると、脳神経活動の記録を行った。その結果、振動刺激だけでは神経応答しないが、匂い刺激中に振動刺激を与えると、持続的な興奮応答する脳下降性ニューロンを同定した(図4)。このニューロンが、匂い刺激と同時に振動刺激で生じる歩行に関わる可能性が示唆される。

(3)尻振りダンスに符号化された距離と方向の情報の統合機構を調べるため、振動受容器官であるジョンストン器官と方向受容器官

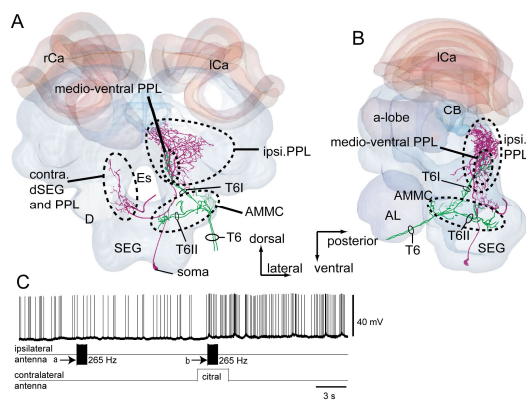


図4 振動と匂い刺激に応答する脳下降性ニューロン。A, B: ジョンストン器官一次中枢の前大脳後葉に樹状突起をもつ。C: 振動刺激単独では応答しないが、匂い刺激中に振動刺激を与えると興奮性持続応答をする。

である頸部器官から色素を注入し、その一次中枢を同定した。すでに著者らの先行研究において、ジョンストン器官由来の感覚ニューロン群は、前大脳後葉、背側葉、食道下神経節に投射することが明らかになっていた。本研究では、頸部器官由来の感覚繊維の投射が、ジョンストン器官の投射領域の一部(食道下神経節背側領域)にあり、さらに食道下神経節背側領域において、頸部器官由来の感覚繊維終末が細胞体位置に依存して組織化されていることを明らかにした(図5)。このことは、食道下神経節背側領域が、ミツバチの尻振りダンスに含まれるベクトル情報の一次処理中枢であり、この脳領域において体軸の方向を符号化する地図を形成し、距離情報との統合が行われていることを強く示唆するものである(図6)。

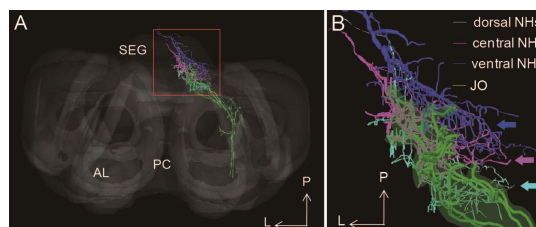


図5 標準脳に登録したジョンストン器官由来感覚ニューロン(緑)と頸部器官由来感覚ニューロン。水色: 背側頸部器官、マゼンタ:

中央頸部器官、青：腹側頸部器官。A: 標準脳背面像。B: Aの赤部位の拡大図。

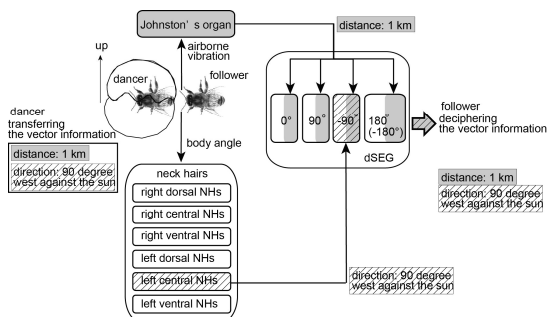


図 6 ベクトル情報統合に関わる脳内経路。追従蜂は、ジョンストン器官で空気振動を、頸部器官で体軸方向を検出し、それぞれの情報は食道下神経節背側領域で統合される。

フリッシュは尻振りダンスの研究から、ミツバチが具象を記号で表現できることを証明し、これをダンス言語と呼んだ(1973年にノーベル医学・生理学賞受賞)。ダンス言語解読はヒトの言語解読に通じる共通のメカニズムを秘めている。本研究成果により尻振りダンスに符号化されたベクトル情報および匂い情報により生じる行動とその神経メカニズムの一部が解明された。ミツバチの脳は、様々な点で哺乳動物の脳高次機能を解明するためのモデル動物になりうる共通性を備えている。今後は脳内のダンス言語解読に関わる神経機構の脳内メカニズムの解明をさらに進めていく予定である。

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9件)

Rautenberg, P. L., Ai, H., Ikeno, H. (10名中8番目と10番目): NeuronDepot: Keeping your colleagues in sync by combining modern cloud storage services, the local file system, and simple web applications. *Frontiers in Neuroinformatics* 01/1900; 8:55, 2014, doi: 10.3389/fninf.2014.00055, 査読有

Okada, R., Ikeno, H.(6名中2番目): Error in the honeybee waggle dance improves foraging flexibility. *Sci. Rep.*, 4, 4175, 2014,

doi: 10.1038/srep04175, 査読有

Kimura, T., Ikeno, H. (7名中7番目): Development of a New Method to Track Multiple Honey Bees with Complex Behaviors on a Flat Laboratory Arena. *PLoS ONE* 9(1): e84656, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0084656, 査読有

Ikeno, H., Akamatsu, T., Hasegawa, Y., Ai, H.: Effect of Olfactory Stimulus on the Flight Course of a Honeybee, *Apis mellifera*, in a Wind Tunnel. *Insects*, 5, 92-104, 2014, doi: 10.3390/insects5010092, 査読有

Ai, H.: Sensors and Sensory Processing for Airborne Vibrations in Silk Moths and Honeybees. *Sensors*, 13, 9344-9363, 2013, doi: 10.3390/s130709344, 査読有

Ai, H., Hagio, H.: Morphological analysis of the primary center receiving spatial information transferred by the waggle dance of honeybees. *J Comp Neurol.* 521:2570-2584, 2013, doi: 10.1002/cne.23299, 査読有

Okada, R., Ikeno, H.(8名中4番目) Waggle dance effect: dancing in autumn reduces the mass loss of a honeybee colony. *J. Exp. Biol.* 215, 1633-41, 2012, doi: 10.1242/jeb.068650, 査読有

藍 浩之: 昆虫の振動をどのように行動に利用しているのか? 日本神経回路学会誌 18, No. 2, 73-84, (2011), 査読有

Ai, H.: Vibration-processing interneurons in the honeybee brain. *Frontiers in System Neurosci.* 3, doi: 10.3389/neuro.06.019.2009 (2010), 査読有

[学会発表](計25件)

Ai, H.: The parallel systems in the primary auditory center of the honeybee. 11th Göttingen Meeting of German Neurosci. Soc., Göttingen, Germany, 18-21 March, 2015.

Ai, H.: Topological organization of vibration-sensitive neurons of honeybee, Meeting Honeybee Standard Brain, 16-17, Mar., 2015, Freie Universität Berlin

Ikeno, H.: Segmentation of neuronal structure from confocal image and its applications, Meeting Honeybee Standard Brain, 16-17, Mar., 2015, Freie Universität Berlin

Ikeno, H. (13名中1番目): Simulation Platform: Application Server for Testing and Sharing Mathematical Model and Experimental Data, INCF Japan Node Int. Workshop: Advances in Neuroinformatics 2014, 25-26, Sep., 2014, RIKEN, Wako

Kanzaki, R., Ikeno, H. (7名中6番目): The Invertebrate Brain Platform (IVB-PF) - Comparative Expositions and Data Collection about Invertebrate Brain -, INCF Japan Node Int. Workshop: Advances in Neuroinformatics 2014, 25-26, Sep., 2014, RIKEN, Wako

Ai, H., Kishi, N.: How does the waggle dance communication mature after the adult emergence? ICN/JSCP B 2014, Sapporo Convention Center, Japan, 28 July - 1 August.

Harada, A., Ai, H. (5 名中 2 番目): Sensory responses to the oriental orchid odors in the Japanese and European honeybees. ICN/JSCP B 2014, Sapporo Convention Center, Japan, 28 July - 1 August.

Kimura, T., Ikeno, H. (7 名中 7 番目): Improving tracking accuracy of the software to track multiple honey bees, K-Track, ICN/JSCP B 2014, Sapporo Convention Center, 28 July - 1 August.

Ai, H., Kai, K., Ikeno, H.: Vibration processing and olfactory locomotion related to honeybee communication. 17th IUSSI, Cairns, Australia, 13-18 July, 2014.

Ikeno, H. (6 名中 1 番目): Toward collaboration in NIJC platforms: Standard brain database linked with application server, Front. Neuroinform. doi: 10.3389/conf.fninf.2013.09.00109, INCF Congress 2013, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, 27 Aug - 29 Aug 2013.

Ai, H., Hagio, H.: Morphological analysis of the primary center receiving spatial information transferred by the waggle dance of honeybee. JSCP B 2013 Egret Himeji, Japan, 13-15 July, 2013

Kai, K., Ikeno, H., Ai, H.: Physiology and morphology of antenna-vibration sensitive neurons in the dorsal lobe of the honeybee, *Apis mellifera*. JSCP B 2013, Egret Himeji, Japan, July 13-15, 2013

Kimura, T., Ikeno, H. (7 名中 7 番目): Development of a tracking program, K-Track, for analyzing honeybee's behaviors, JSCP B 2013, Egret Himeji, Japan, 13-15 July, 2013

Kimura, T., Ikeno, H. (6 名中 6 番目): Tracking of Multiple Honey Bees on a Flat Surface, ICETET-12, Egret Himeji, 5-7 Nov., 2012.

Takashima, A., Ikeno, H. (8 名中 6 番目): Interactive brain map in the Invertebrate Brain Platform (IVB-PF), Neuroinformatics 2012, Munich, 10-12 Sep., 2012.

Ikeno, H. (11 名中 1 番目): Improvement of Simulation Platform for providing reliable and easy use model simulation environment, Neuroinformatics 2012, Munich, 10-12 Sep., 2012.

Ai, H. (4 名中 1 番目): Neuroethological analysis of vibration and olfactory processing related to in-hive communication of the honeybee. 第 35 回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、18-21 Sep, 2012.

Ai, H. (7 名中 1 番目): Specific locomotion patterns induced by learned odors in the honey bee (*Apis mellifera* L.). JSCP B 2012,

総研大, Hayama, Japan, 6-8 July, 2012

Ikeno, H. (4 名中 1 番目): Spatiotemporal change of honeybee fanning property in an observation hive, JSCP B 2012, 総研大, Hayama, Japan, 6-8 July, 2012.

Takashima, A., Ikeno, H. (8 名中 6 番目): Recent advances of the Invertebrate Brain Platform (IVB-PF) JSCP B 2012, 総研大, Hayama, Japan, 6-8 July, 2012

21 Ai, H., Ikeno, H. (6 名中 1 番目と 5 番目): Two types of odor-triggered walking behaviors of honeybees controlled by classical olfactory conditioning. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. 名古屋国際会議場, Japan, May 31-June 5, 2011

22 Ai, H., Ikeno, H. (6 名中 1 番目と 2 番目): Modelling and comparative analysis of an identified vibration-sensitive interneuron of honeybee brain. Japan-Germany Joint Workshop on "Computational Neuroscience". OIST, Okinawa, March 2-5, 2011.

23 Ai, H.: The Auditory System of the Honeybee. International Symposium in Honeybee Neuroscience, Berlin, June 10-13, 2010.

24 Ai, H., Ikeno, H. and Itoh, T.: Parallel processing in the auditory center of the honeybee brain. 9th ICN, Salamanca, Spain, Aug. 2-7, 2010.

25 Akamatsu, T., Hasegawa, Y., Ai, H., Ikeno, H.: Analysis of flight trajectory of honeybee (*Apis mellifera*) for the olfactory stimulus in a wind tunnel., 9th ICN, Salamanca, Spain, Aug. 2-7, 2010.

[図書] (計 1 件)

Ai, H., Itoh, T.: The Auditory System of the Honeybee. In "Honeybee Neurobiology and Behaviors. (Eds.: Eisenhardt, D., Galizia, C. G. and Giurfa, M.)" Chapter 4.3, 2nd ed. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. Germany, 2012, pp. 269-283, 査読有

[その他]

https://invbrain.neuroinf.jp/modules/newdb112/list.php?id=2&n=20&sort=1&sort_method=desc&item=0&ml_lang=ja
<https://projects.g-node.org/ginjang/description.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藍 浩之 (AI, Hiroyuki)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号 : 2 0 3 3 0 8 9 7

(2) 研究分担者

池野 英利 (IKENO, Hidetoshi)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号 : 8 0 1 7 6 1 1 4