

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370031

研究課題名(和文) 甲殻類における目標指向行動の自発的開始機構：脳内多点記録法による神経生理学的解析

研究課題名(英文) Mechanisms underlying spontaneous initiation of goal-oriented behavior in crustaceans: Neurophysiological analyses by multiple unit recording of brain activities

研究代表者

高畑 雅一 (Takahata, Masakazu)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10111147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：捕食・攻撃など明確な意図で行われる目標指向行動は、高度な運動制御が必要であり、また目標への注意・動機づけなどの高次中枢機能も関わるため、その神経生理機構の解明は一般に非常に困難である。本研究では、甲殻類鋏脚の挟み行動を対象とし、生理学実験のためのオペラント条件づけの可能性を調査すると共に、その神経機構を細胞外多重ユニット解析法を用いて同定細胞レベルで調べた。その結果、視覚刺激を合図として挟み行動を開始させる実験プロトコルを確立し、視覚刺激に応答するユニット及び行動開始に先行するユニットを生理学的に同定した。これらは目標指向行動発現の中核機構を解明するための重要な足がかりとなるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Goal-oriented behavior is carried out with a definitive intention directed to an object such as food, prey and enemy. Since the behavior involves higher central nervous functions including attention and motivation, it is difficult in general to clarify its neurophysiological mechanism. This study, focused on the gripping action of chelipeds in crustaceans, aimed to examine if crustaceans could be trained to intentionally initiate gripping behavior in response to a visual cue and to analyze the neuronal mechanism underlying the initiation of such behavior by multiple unit recording techniques. The results demonstrated that functional units associated with the cue presentation or the behavioral initiation could be identified physiologically in an experimental protocol where the animal was instructed by the cue to initiate gripping behavior. Those units would provide an important clue for future research on the central nervous mechanism of goal-oriented behavior at the cellular level.

研究分野：動物生理学

キーワード：甲殻類 目標指向行動 中枢神経機構 多重ユニット記録解析法 アメリカウミザリガニ アメリカザリガニ 鋏脚 挟み行動

1. 研究開始当初の背景

(1) 無脊椎動物は、標本作成が容易であり、また少数ニューロン系の実験利点を多数持つため、これまでの行動制御機構の研究において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発見に貢献してきた典型例である。しかし、その実験利点がしばしば強調されるのに対し、無脊椎動物の個体としての行動それ自体とその中枢機構に関する研究は決して十分になされてきたとは言えない。逃避行動や摂食行動など一部の明確な行動については、その神経機構が詳細に調べられているが、従来の研究における着眼点は、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、同定細胞レベルで解明しようとする試みであった。

(2) 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 selective attention や、規則学習 rule learning 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。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無脊椎動物の行動」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無脊椎動物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。にもかかわらず、無脊椎動物の行動を神経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。

(3) 「刺激に対する応答としての行動」に対局するフレームワーク（理解の枠組）は、「自発的に開始される行動」である。

誘発性刺激に依存せず、動物個体の内因的要因のみに基づく行動の開始は、上述したミツバチの諸行動ほど派手ではないが、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。したがって、自発的な行動開始の中枢シナプス機構の解明は、無脊椎動物の高度な認知的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ものである。しかしながら、従来は、「刺激に対する応答としての行動」というフレームワークが強固であったことに加えて、1) 自発的な行動開始を調べる際に動物の行動状態を実験者がコントロールする困難、2) 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、そして、3) 同定ニューロンを含む多数の脳内ニューロンの活動を同時的に記録解析する困難、などの実験技術的な理由により、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

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の無麻酔全体標本を用いて、餌報酬と連合させたレバー把握行動の自発的な開始に関わる脳内神経回路網活動を細胞内電極法と多点細胞外電極法の併用によって同定ニューロンレベルで解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)の困難をレバー把握行動の自発的開始を光刺激によって統制することにより、また、2)をこれまでのトレッドミル実験での細胞内・外の慢性的記録方法を発展させて、行動開始時の動物の脳内活動を、行動と定量的に関係づけて解析することにより、さらに3)をマルチユニット細胞外記録を単一ニューロン細胞内記録と併せ行なうことによって（研究計画・方法の項を参照）それぞれ排除して、自発的な目標指向行動の開始に関わる脳内部位を機能解剖学的に確定するとともに、そこでの神経回路網動作ダイナミクスの神経生理学的な解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究計画は、まず1) 実験動物のレバー把握行動の光刺激による統制のためのオペラント学習訓練を行ない、2) 自発的なレバー把握行動開始に先行ないし随伴する神経活動を脳内の部域的に近い複数ニューロンから細胞外的に記録し、行動と関連づけて解析する、という2段階からなる。その遂行によって、特定のタスク(光刺激およびその組み合わせにより統制されるレバー把握行動)について、その自発的開始に関わる脳内神経活動とその神経回路網動作の空間的および継時的変化のダイナミクスを定量的に記述する。最終的には、異なるタスク間での回路網動態の差異を比較解析して、自発性(随意性)に共通の脳内神経回路網活動を明らかにする。年次計画としては、これら2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、その比率を適宜変化させることによって、最終年度での効果的な目標達成を目指した。

(2) 実験動物 主として大型甲殻類であるアメリカウミザリガニ *Homarus americanus* を用いる。行動実験の予備調査でウチダザリガニ *Pacifastacus leniusculus*、また、予備的神経生理実験ではアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* をもちいる。なお、ウチダザリガニは特定外来種としてその飼育・実験使用等は制限されているが、環境省北海道地方環境事務所より飼養許可を得ている(環北地野許第090609001号)。

(3) オペラント学習訓練 本研究計画で対象とする行動は、これまでに調べてきた歩行運動(locomotor behavior)よりも特殊性の高い目標指向行動である。すなわち、特定の付属肢である鋏脚(第1歩脚)でレバーを挟む行動で、空腹時の動物はこの行動によって餌を報酬として受け取るように訓練される。訓練の最初期段階では、通常のオペラント学習と同様の priming (この場合は餌抽出物をレバーに塗り、無条件反動的にレバーへの関心を高める)を行なうが、その後は、動物が自発的にレバーを把握するという行動について強化を行なうという手続きを進める(図1)。

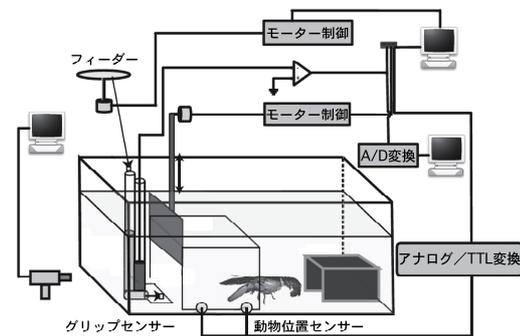


図1 レバー把握行動の訓練装置概念図 水槽中での *Homarus* の学習訓練。自発的なレバー把握(一定の力以上)により餌報酬が与えられる強化実験

本研究計画では、さらに進んでこのレバー把握行動を光刺激によって統制できるように動物を訓練する。その目的は、まず第一に実験動物が自発的にレバー把握行動を起こすタイミングを実験者がコントロールできるようにすることである。これまでの単純なタスクを用いても、レバー把握行動の開始に先行する脳内活動を記録解析することは可能であるが、この場合の問題は、毎回の行動が質的に多様化することを防ぐことが困難であるため、神経活動に毎回ばらつきが出る点にある。この点については、歩行運動の自発的開始に関わる脳内メカニズムに関して発表した論文でも議論した(#3)。そこで本研究計画では、特定の光刺激(LEDによる発光)を与えた時にのみ、一定時間以内にレバーを把握すると餌報酬が得られるよう訓練する。この成立、消去等についても、これまでの予備調査で確認が取れており(2010年度日本動物行動学会にてポスター発表)、技術的な目処は立っている。ただし、本研究ではこれまでと異なり、神経生理学実験用のチェンバーでのレバー把握行動を自発的に起こさせる必要があり、この点については、本研究計画の実施によって方法論を確立したい。なお、光刺激によって動物のレバー把握行動をコントロールする第二の目的は、複数の光刺激の時間的あるいは空間的な組み合わせを種々に変化させることで、外界刺激の規則抽出能力や一般化(普遍化)能力、識別能力など実験動物の可能的な認知機能を自発性(随意性)と関連づけて調査するための今後の道筋を見通すためでもある。水槽・装置開発では低価格で大型の *Pacifastacus* を用いる。

(4) 神経生理学実験 *Homarus* の自発的なレバー把握行動に先行・随伴する脳内ニューロン活動の解析に先立ち、挟み行動遂行時の鋏脚筋から筋電図記録を行う。筋電図は運動ニューロン活動を示す指標であり、行動記録では得られない中枢神経活動に関する情報を提供する。筋電図はクチクラに小さな穴を開け、そこから筋肉に被覆導線を挿入することにより行う。筋電活動の記録は以下の神経活動の記録と同じ増幅器・濾過器および A/D 変換器によって行う。脳の神経活動は、環食道縦連合から細胞外的に行なう。環食道縦連合は、脳と胸部第一神経節（鋏脚筋を支配する運動ニューロンが存在する）とを食道下神経節を挟んで連絡する軸索束であり、脳から胸部神経節へ下行性介在ニューロン軸索を含む。本研究においては、*Homarus* の鋏脚によるレバー把握行動そのものの神経機構（腹部第一神経節内に局在）については、そのメカニズムを調査することはせず、鋏脚レバー把握行動の開始・継続・停止のために脳から下行する司令信号に着目することとする。

4. 研究成果

本研究では、採餌行動としての鋏脚挟み運動に着目して新たな学習実験系を立ち上げ、定量的な行動・筋電図・神経活動の解析技術を用いてその自発的開始機構を調査した。

(1) 挟み行動のオペラント条件づけ 挟み行動とその直後に現れる報酬との連合が可能であり、ロブスターが基本的なオペラント報酬学習能を有することを明らかにした。グリッピングと報酬を連合させる訓練を繰り返すと、行動頻度は次第に増加した(図2)。行動に対して報酬を与えない条件に切り替

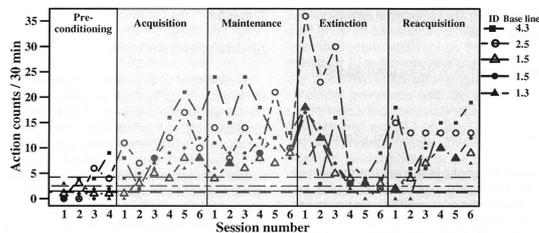


図2 *Homarus* 挟み行動の学習曲線 刺激提示に対する挟み行動発現の確率が訓練と共に上昇している。

えると、その頻度は次第に低下するが、訓練を再開すると行動頻度は速やかに回復した。さらに鋏む強度に着目し、分化強化能を検証した実験では、報酬基準閾値を上昇させてより強い力を要求する訓練を課し、鋏力のピー

ク値の平均的变化を調べた結果、鋏力の上昇は閾値の上昇に依存することが判明した。

(2) 挟み行動開始の光弁別学習による制御 神経生理学的手法が適用可能な拘束条件において、グリッピングの開始を光弁別学習によって制御し、報酬獲得に対する目標指向行

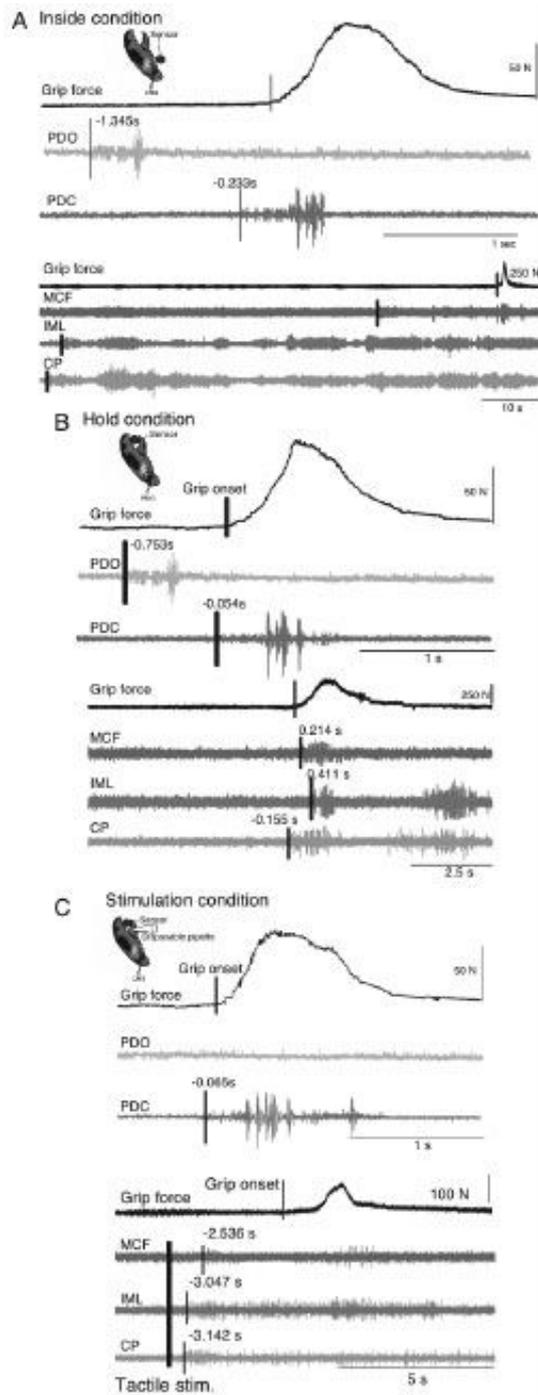


図3 *Homarus* 挟み行動遂行中の鋏脚筋活動記録 鋏脚の対象接近行動と挟み行動は、それぞれ異なる筋によって遂行される。

動を神経生理学的に解析するための基盤を

開発した。ここでは任意の強度の光提示下において行動を示した場合のみ、報酬を提示する学習実験系を新規に開発した。1セッション中に一定の回数・間隔・持続時間の光点灯を行い、点灯下における行動回数を成績とした。単純な明暗弁別から訓練を行い、最終的に3段階の強度の光信号を行動トリガーとして用いた。これら全光強度で行動を強化した後、光強度差に基づく選択的弁別学習を行った。その結果、報酬ありの信号提示では行動頻度が増加し、報酬なしの信号提示では行動頻度が減少した。引き続き信号の種類と報酬有無の条件を逆転させた逆転学習では、行動頻度もそれに依りて変化したため、報酬提示と結びついた特定の光信号をトリガーとする学習が可能と結論づけた。

(3) 挟み行動の筋電図解析 運動の開始点を筋活動レベルで明確に定義し、目標指向性の挟み行動を特徴づけるために筋電図解析を行った。クラッシャー・鋏脚の複数節の筋群に埋め込み慢性電極を用いることで筋活動を同時計測した(図3)。挟み行動の指標となり得る筋群を特定するため、自発的に物体を挟む際に動員される主要筋群の活動開始タイミングと筋活動開始時の持続性筋活動の長さなどのパラメータを解析した。その結果、自発的に開始される挟み行動を特徴づける生理学的指標として前節閉筋・開筋および底節伸筋の3種類の筋群を絞り込んだ。また、餌への動機づけに基づいて記憶誘導された目標指向的な挟み行動では、到達運動関連節である底節伸筋が活動開始してから挟み行動が完了されるまでの時間が短縮される傾向にあることを見いだした。

(4) 挟み行動開始に関わる神経活動解析 これまでに開発したグリップ行動のオペラント条件づけを利用して、目標提示に対して実験動物が自発的に惹起する鋏脚の挟み行動遂行に関わる中枢神経活動を記録解析した。当初はこれまでと同様にアメリカウミザリガニ *Homarus americanus* での記録を試みたが、長時間の記録を安定して維持することが技術的に困難であることが判明したため、神経活動記録の容易なアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* を実験動物として採用した。予備研究でこの種での挟み行動条件づけは困難であったが、提示・強化方法や適切な個体選別によって条件づけが可能となった(図4)。そこでアメリカザリガニで挟み行動のオペラント条件づけおよび挟み行動中の神経活動の細胞外記録・解析を行った。

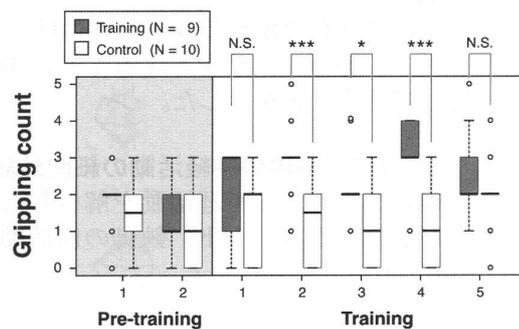


図4 *Procambarus* 挟み行動のオペラント条件づけ 対象の視覚的提示に対する挟み行動発現の確率は、訓練と共に増大した。

その結果、脳から腹髄を下行する神経活動には、1) 挟み対象の提示時に発火頻度が変化するユニットおよび2) 鋏脚の筋活動に先行して発火頻度が変化するユニットが見出さ

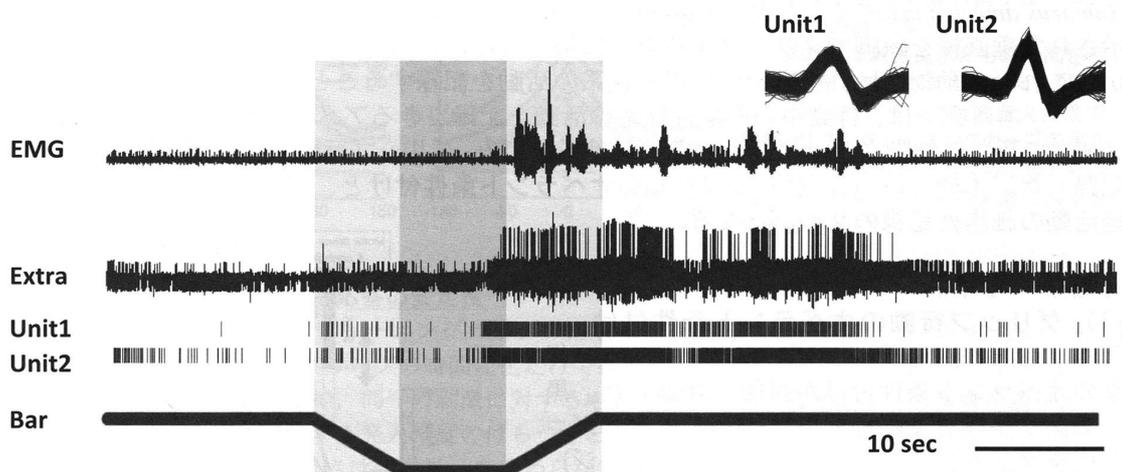


図5 挟み行動中の神経活動 薄グレー部分で挟みの対象が動き、濃グレー部分で提示された。詳細は本文を参照。

れた。ただし1)については、条件づけ群とナイーブ群との間で記録回数に有意差がなく、条件づけ群に特異的なものではないと考えられた。その多くが鋏脚筋活動とも相関を示したことから、鋏脚運動の開始・制御に視覚情報が使われていることが示唆された。2)の多くは対象物提示に反応し、かつ鋏脚筋活動との相関も示したが、これらは脳から出力される運動命令を伝達している可能性がある。

図5は、挟み行動遂行中のザリガニからの神経活動記録を示す。上から順に左鋏脚の筋活動(1段目)、細胞外多重ユニット記録の生データ(2段目)、これから同一波形として抜き出した結果(3、4段目)、および挟み対象のアクリル棒の上下の位置(5段目)をそれぞれ示す。時間軸は左から右に進む。薄いグレーの部分でアクリル棒が上下に動き、濃いグレーの部分で動物に提示された。右上の波形は、ここに示されているユニット(3、4段目)の波形を、それぞれの同一性を確認するために重ね合わせた結果である。

今回の記録がすべて脳から下行するユニット記録であることから、条件づけ群に特異的な神経活動は脳内で完結している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Tomina, Y. and Takahata, M. Electro-myographic analysis of goal-directed grasping behavior in American lobster. *J. Exp. Biol.* 査読有 **217**: 3688-3699 (2014)
DOI:10.1242/jeb.107771
2. Tomina, Y., Kibayashi, A., Yoshii, T. and Takahata, M. Chronic electromyographic analysis of circadian locomotor activity in crayfish. *Behav. Brain Res.* 査読有 **249**: 90-103 (2013)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.029>
3. Tomina, Y. and Takahata, M. Discrimination learning with light stimuli in restrained American lobster. *Behav. Brain Res.* 査読有 **229**: 91-105 (2012)
DOI: 10.1016/j.bbr.2011.12.044
4. Kagaya, K. and Takahata, M. Sequential synaptic excitation and inhibition shapes readiness discharge for voluntary behavior. *Science* 査読有 **332**: 365-368 (2011)
DOI: 10.1126/science.1202244

[学会発表](計9件)

1. 高橋直美・高畑雅一 ザリガニにおける鋏グリップ行動の神経生理学的解析. 日本動物学会第85回大会、2014年9月11-13日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)
2. Takahashi, N., Takahata, M. Neural activity during goal-directed gripping behavior in operant

conditioned crayfish, the 11th International Congress of Neuroethology (ICN) and the 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry (JSCP), 2014年7月28 - 8月1日、札幌市コンベンションセンター(北海道札幌市)

3. Tomina, Y., Kibayashi, A., Yoshii, T., and Takahata, M. : Chronic electro-myographic analysis of circadian locomotor activity in crayfish: Is it initiated spontaneously or reflexively? 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, 2013年11月13日, San Diego Convention Center (San Diego, California, USA) .
4. 高橋直美、高畑雅一: 甲殻類における鋏脚グリップ行動のオペラント条件付け. 日本動物学会第84回大会、2013年9月26日、岡山大学(岡山県岡山市)
5. Tomina, Y., Kibayashi, A., Yoshii, T., and Takahata, M. Electromyographic characterization of circadian locomotor activity in crayfish. 日本比較生理生化学会第35回大会、2013年7月14日、兵庫県立大学(兵庫県姫路市)
6. 富菜雄介、木林章弘、吉井大志、高畑雅一 概日リズムを示すアメリカザリガニ移動運動の筋電図解析: 自発性/反射性の検証. 日本動物学会第83回大会、2012年9月13-15日、大阪大学豊中キャンパス(大阪府豊中市)
7. 加賀谷勝史、高畑雅一 ザリガニ自発性歩行の開始、維持、停止における下行性神経の賦活機構. 日本動物学会第81回大会、2011年9月21-23日、旭川市大雪クリスタルホール(北海道旭川市)
8. Tomina, Y. and Takahata, M. Discrimination learning with light stimuli in restrained American lobster *Homarus americanus*. The 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011年5月31 - 6月5日(名古屋国際会議場 愛知県名古屋市)
9. Kagaya, K. and Takahata, M. Characterization of brain neurons involved in spontaneously initiated walking in crayfish. Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting 2011, 2011年1月3-7日(Salt Lake City Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA)

[図書](計2件)

1. 酒井正樹, 高畑雅一(2014) 神経インパルス物語 (Alan J. McComas, "Galvani's Spark: The Story of the Nerve Impulse") 458pp. 共立出版
2. 高畑雅一(2012) アメリカザリガニ 研究者が教える動物飼育1 (日本比較生理生化学会編) pp.155-161 共立出版

[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