

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440175

研究課題名(和文) ミツバチをもちいた嗅覚記憶形成過程の脳内ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Brain mechanism

研究代表者

岡田 龍一 (Okada, Ryuichi)

兵庫県立大学・環境人間学部・研究員

研究者番号：20423006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、学習訓練中(記憶が形成されている過程)に脳内でどのようなことが起こっているかを明らかにすることを目的にミツバチ脳のニューロンであるPE1ニューロンの神経活動と記憶の関係を調べた。匂い学習をしながらミツバチのPE1の自発的な活動(自発発火)を記録したところ、PE1の活動度は約5秒周期で増減する振動現象が見つかり、記憶が成立する直前に振動周期が長くなり、PE1の活動が抑えられていることが示唆された。さらに神経間の情報伝達様式を調べたところ、学習によるPE1の神経抑制は、直接的な抑制性入力というよりも他の細胞が抑制されることによる、間接的な神経抑制が支配的かもしれない可能性を見つけた。

研究成果の概要(英文)：To examine neural mechanisms underlying memory formation, the activities of a mushroom body output neuron, PE1 neuron, was analyzed because this neuron shows a learning-related plasticity. However, it is still unknown whether and when PE1 changes its responses during the acquisition period. Using chronic recording from PE1 of a learning bee, we analyzed the spontaneous activity of PE1 between acquisition trials. The spectrum analysis for spontaneous activity showed that the peak of power spectrum of PE1 was shifted to the lower frequency along acquisition trials, suggesting that the inhibition of PE1 spiking activity became stronger than before learning. Next, to reveal inhibitory synaptic connections about PE1, we performed immuno-staining against GABA, iono-, and metabotropic GABA receptors. Immunohistology suggested that PE1 has no GABA-receptors, and thus an indirect neural control might be dominant in an inhibitory connection to PE1.

研究分野：神経行動学

キーワード：脳

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の背景

「脳の10年」以来の20年間で、記憶や学習によって脳の中で何がどう変化するかについては遺伝子レベルから神経回路レベルまで飛躍的に理解が進んだ。しかしその一方で、これまでの研究は記憶の前後での変化を比較したものが多く、実際に記憶の獲得中(学習訓練中)に脳の中で何が起きているのかについてはほとんどわかっていなかった。

(2) ミツバチのPE1ニューロンを利用する利点

社会性昆虫であるミツバチは高度な学習能力を示す。また、昆虫脳の高次中枢であるキノコ体の出力神経であるPE1ニューロンは生理形態学的に同定されており、ミツバチ脳内に1対しかない。しかも、ミツバチのPE1は、学習訓練終了後、学習した匂いに対してのみ神経応答が減弱する、神経可塑性を示す。よって、PE1は、単一神経細胞レベルでの記憶学習のメカニズムを解明するためのよいモデルになると期待されている。

(3) 学習訓練に関連するPE1の活動

これまでの研究で、PE1の自発的神経活動(自発放電)の発火頻度は、約5秒を周期とした増減を繰り返す振動をしており、その振動周波数が学習成立直前に一時的に低周波数領域にシフトすることがわかってきた。さらに、学習成立後は振動周波数が若干高周波側に戻るものの、学習前の周波数よりは低周波数側にとどまる(図1)。これらのことはPE1が抑制性シナプス入力を受けており、学習訓練中に抑制を受け始め、学習成立とともに抑制が固定されることを強く示唆している。

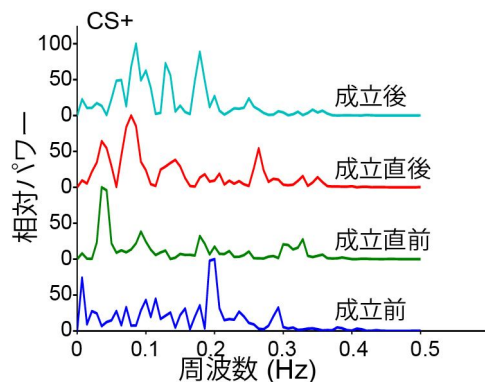


図1 PE1の自発的神経活動のパワースペクトル。学習成立直前にパワーのピークが低周波側にシフトする。

(4) これまでの問題点

学習訓練中の自発放電の振動周波数が低周波側にシフトする発見は、単なる生体现象の発見にすぎず、振動の仕組み、周波数のシフトのメカニズム、およびそれを実現している神経回路などの詳細は不明のままである。そこで、人為的にPE1の活動をコントロールす

れば匂い学習訓練中に記憶が形成されていく過程のダイナミクスを電気生理学的に明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

学習訓練中の脳神経メカニズムは、これまで提唱してきたミツバチの匂い学習における脳の神経モデルが基盤になっている可能性が高い。また、PE1はほぼ確実にGABAニューロンからの抑制性シナプスを受けているので、GABA関連物質による薬理実験を組み合わせれば、新たに発見された神経モデルの真偽を確かめることも可能である。これらのことから、まずはにおい学習訓練中のPE1の自発発火活動とミツバチの学習成立の時期との関係を解析し、記憶が形成されていく過程とその脳内神経メカニズム、およびそれを実現している神経回路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 匂い学習訓練中のミツバチからの神経記録

(1.1) 匂いの学習訓練

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、匂いを与えただけで吻を伸ばすようになる(匂いの条件付け)。訓練では砂糖水と同時に与えた匂い(CS+)と砂糖水とは無関係な匂い(CS-)を2.5分間隔で5回ずつ提示した。

(1.2) 電気生理

学習訓練中のミツバチからのPE1の神経記録はこれまでに確立した埋めこみ電極法で行った。この方法では、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(図2)。脳の表面から目的とした深度に極細被覆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。記録後は電極からプラス通電し、電極先端を染め、顕微鏡下で記録部位を確認した。さらに、記録した神経のスパイクパターンとこれまでに蓄積したPE1の神経活動データベースと照合してPE1からの記録であることを確認した。神経活動と行動の詳細な相関は、吻の伸展筋であるM17の筋電図と同時にビデオカメラでミツバチの行動を記録し、オフライン解析した。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した。

(1.3) 記憶形成の成立と神経記録の相関解析

得られたスパイク列を周波数解析した。周波数解析には前段階の処理として、スパイクの発火頻度をヒストグラムにし、そのヒストグラムをFFTし、相対パワースペクトルを得

た。物の伸展により学習が成立したかどうかの判断を行い、初めて吻伸展を示した訓練を記憶成立訓練と定義した。成立訓練を基準に、訓練間の PE1 の自発発火を記憶形成前、形成直前、形成直後、形成後にわけ、パワースペクトルを計算した。

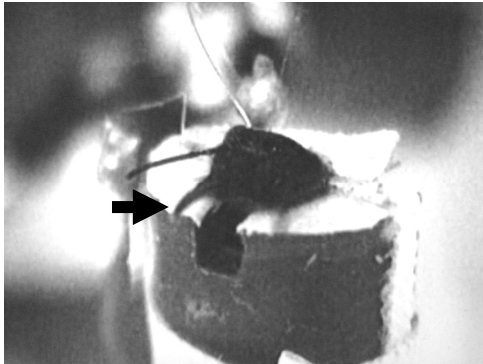


図2 脳に電極が埋め込まれたまま、吻(矢印)伸展反応をするミツバチ

(2) GABA 関連の抗体染色

期待される抑制性神経連絡を明らかにするために、ミツバチ脳の抑制性神経伝達物質である GABA および GABA の受容体の抗体を用いて抗体染色した。GABA 受容体はイオン型および代謝型受容体を対象にした。GABA 抗体は Sigma-Aldrich 社の市販の抗体を用いた。GABA 受容体はゲノムデータベースを用いて、特異的な配列を検索・抽出し、外注して作製した。染色手順は、昆虫類の組織化学的研究において、一般的な抗体染色法に則って抗体染色を行った。すなわち、4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBS で十分洗浄し、6%アガロースに包埋した。ピプラトームで厚さ 100 μm の連続切片にした後、エタノール系列で脱水・脱アルコールした。それを、ヤギ血清でブロッキングし、1次抗体を反応させた。1次抗体反応後、アレクサ蛍光物質を融合させた2次抗体で反応させ、共焦点顕微鏡で観察・撮影した。

4. 研究成果

(1) 記憶形成過程の PE1 の神経活動

学習中の PE1 の自発発火を、記録に成功した7例それぞれで個別に解析したところ、記憶成立前には確かに 0.2Hz 付近にパワースペクトルのピークが見られ、学習成立に従って低周波側へのシフトが見られた。しかし、多くの場合で、高い相対パワーが複数の周波数で見られた(図3)。これは、PE1 の自発発火のスパイクパターンが画的でなく、多様で揺らぎのあるパターンを持っていることを示唆している。実際、バースト状の発火パターンを示す PE1 のスパイクを解析するときに、解析対象のスパイク間隔をさまざまに変化させると、パワースペクトルが異なっていた。網羅的にスパイク間隔を変化させて解析し、PE1 の神経スパイクの生波形、および興奮性

シナプス入力との関係を考慮したところ、約 20 ミリ秒のスパイク間隔で解析するのが、もっとも現実を反映しているという結論に至った。

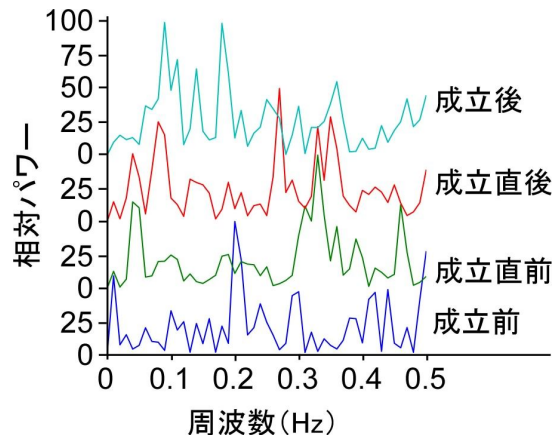


図3 PE1 の自発発火のパワースペクトル。発火間隔が 20 ミリ秒以下のスパイクを除外した。ノイズが多く、図1ほどピークは明確ではないが、想定されている周波数にはピークが見られる。

そこで、20 ミリ秒のスパイク間隔で解析を続けたところ、確かに学習成立過程において、学習成立直前に 0.05 Hz の周波数成分が顕著に増加することが見つかった(図4)。この増加は、砂糖水と連合していない CS-刺激後や、コントロールの動物ではみられなかった。また、PE1 でない他のニューロンでも見られなかった。

以上のことから、学習成立直前に PE1 の振動周期は確かに長くなるということが示唆される。しかし、1個体において顕著なピークがただひとつだけ観察されるわけではなく、パワーが分散することが、本来 PE1 の振動現象に多様な揺らぎがあるのか、それとも技術的な問題によるのかを検討する必要がある。また、詳細な神経メカニズムの解明は今後の課題である。

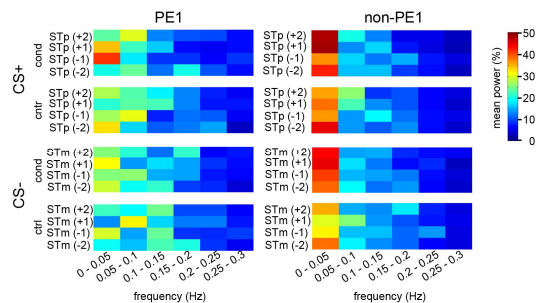


図4 発火間隔 20 ミリ秒以下のスパイクを除去したパワースペクトルの全サンプルでのまとめ。相対パワーを平均化して、カラーコードした。学習成立直前に PE1 でのみ、低周波側に顕著なピークのシフトが見られた。

(4) GABA 関連の抗体染色

PE1 に関する抑制性神経連絡を明らかにするために、GABA 関連の抗体染色を行った。GABA に対する抗体染色では PE1 そのものは GABA 陰性であった。しかし、PE1 の樹状突起と目される部位に GABA 陽性シグナルが多数検出された。このことは PE1 が GABA シグナルを受容していることを強く示唆するものである。そこで、GABA 受容体に対する抗体染色をおこなった。しかし、イオン型受容体、代謝型受容体のいずれにおいても PE1 と推察される神経細胞はまったく染色されなかった。しかも、キノコ体の出力部である柄部と葉部にも強いシグナルがまったく検出されなかった。その一方で、キノコ体の内在神経であるケニオン細胞の細胞体ではシグナルが観察された。特に細胞体層の内側の細胞体に強いシグナルが局在していた。ケニオン細胞には大型、小型の2種類が存在し、それらは互いに異なる領域を占めていることから、ケニオン細胞に GABA 受容体を持つものと持たないものの機能的なクラスがあることが示唆される。しかし、その一方で、GABA 陽性シグナルの近辺に GABA 受容体陽性シグナルがないことから、抗体の特異性と受容体の検出能力を再検討する必要があるかもしれない。今回わかったように、もし PE1 が GABA を受容していないのであれば、PE1 の神経抑制は例えばヒスタミンのような、GABA 以外の抑制性伝達物質をシナプスに利用しているのかもしれない。あるいは、GABA シナプスによる直接的な神経抑制を受けているのではなく、PE1 の場合は GABA 受容体陽性のケニオン細胞からの間接的な神経抑制が支配的なものかもしれない。今後の課題である。

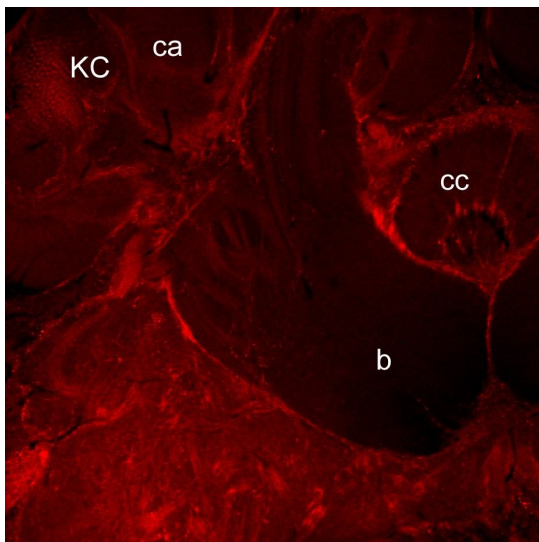


図5 イオン型 GABA 受容体に対する抗体染色。ケニオン細胞細胞体層の内側に位置するケニオン細胞群で強いシグナルが観察された。b: キノコ体ベータ葉、ca: キノコ体傘部、cc: 中心複合体、KC: ケニオン細胞細胞体層。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. 岡田龍一(2015)昆虫の脳と匂いの記憶、昆虫と自然 50 (14): 40-44. (査読なし)
2. Ito E, Matsuo R, Okada R (2013) Involvement of nitric oxide in memory formation in microbrains. Neurosci Lett: 541:1-3. (査読あり)
3. 岡田龍一、伊藤悦朗(2013)「脳科学のフロンティア」脳はどこまでわかってきたか：神経可塑性に着目して、パリティ 28: 24-32. (査読あり)

〔学会発表〕(計 8件)

1. 佐倉緑、岡田龍一(2016)フライトシミュレータを用いたミツバチの採餌行動の解析、第28回自律分散システムシンポジウム、広島大学東広島キャンパス(広島県東広島)、2016年1月21日
2. Okada R, Menzel R (2014) Spiking activity of an identified mushroom body extrinsic neuron during olfactory memory acquisition in the honeybee. The 11th International Congress of Neuroethology, Sapporo Convention Center (Hokkaido, Sapporo) Jul 31.
3. Okada R, Menzel R (2014) Olfactory learning-related plasticity of the mushroom body neurons in the honeybee. Small brains, bright minds: Learning and memory in invertebrates. In: Hokkaido Neuroethology Workshops 2014, Hokkaido University (Hokkaido, Sapporo), Jul 27.
4. Harada A, Ai H, Sugahara M, Okada R, Sakura M (2014) Sensory responses to the oriental orchid odors in the Japanese and European honeybees. The 11th International Congress of Neuroethology, Sapporo Convention Center (Hokkaido, Sapporo) Jul 31.

〔図書〕(計 5件)

1. 岡田龍一(2015)濃度当てアッセイ:「感じる」を測ろう -ミツバチの甘味感覚とそれを利用したバイオアッセイ-、「研究者が教える動物実験 第1巻:感覚」、尾崎まみこ、村田芳博、藍浩之、定本久世、吉村和也、神崎亮平、日本比較生理生化学会編、pp. 14-17、共立出版
2. 岡田龍一(2015)歩行中の脳の活動を見よう-自由行動中の昆虫の脳の神経活動記録および記録部位の染色-、「研究者が教える動物実験 第2巻:神経・筋」、尾崎まみこ、村田芳博、藍浩之、定本久世、吉村和也、神崎亮平、日本比較生理生化学会編、pp. 90-93、共立出版

3. 佐倉緑、岡田龍一、藍浩之(2015)パプロフのミツバチ：餌のにおいはどれ？-ミツバチの吻伸反反射を用いた味とにおいの連合学習実験-、「研究者が教える動物実験 第3巻：行動」、尾崎まみこ、村田芳博、藍浩之、定本久世、吉村和也、神崎亮平、日本比較生理生化学会編、pp. 178-181、共立出版
4. Okada R. (2015) Associative plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee olfactory learning. In: Memory Consolidation (Eds: Manabu Sakakibara and Etsuro Ito), 19-35, NOVA Science Publisher, New York, NY, USA.
5. 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

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 龍一 (Ryuichi Okada)

兵庫県立大学・環境人間学部・非常勤研究員

研究者番号：20423006