

微小脳の高次中枢のモジュール構造と情報表現

「形とはたらき」領域 水波 誠

要 旨

本研究では、昆虫の脳「微小脳」の構造と働きについて解析し、その基本設計原理に迫ることを目指しました。特に、昆虫の最高次中枢であるキノコ体とその関連領域の「形とはたらき」に焦点を当てつつ、脳システムの全体像の解明を視野に入れた研究を進めました。最初に、学習行動実験によって、ゴキブリやコオロギが極めて優れた嗅覚学習能力を持つことを明らかにしました。次に電気生理学および行動薬理学的な研究により、キノコ体の特定の内在ニューロン群や出力ニューロン群がそれぞれ嗅覚学習に関わる可能性を示唆する結果を得ました。また、キノコ体からの出力信号が投射する側葉には、触覚で受容した食べ物などの一般の匂い、雌の放出する性フェロモン、温度、湿度の情報を整然と並べた「感覚地図」があることが明らかになりました。これらの地図情報は探索行動の対象の選択に用いられると考えられます。さらに、網羅的な組織学的研究によってゴキブリの脳の神経配線について調べた結果、ゴキブリの脳は多数の並列的な神経経路から構成される一方、それらを階層的に修飾する神経経路も存在することが明らかになりました。前者の並列経路は種々の反射的行動や本能行動を、後者の階層的経路は学習による行動の修飾を司ることが示唆されました。これらの成果は、微小脳の設計原理の解明に向けての大きな一歩と言えます。

1. 研究の狙い

私はわずか百万個のニューロンから構成され小さな体での生活や行動に適合した昆虫の脳を「微小脳」という概念で捉えることを提唱し、その基本設計の解明を目指しています。本研究の当初の狙いは、キノコ体のモジュール構造の機能的な意味を実験的に明らかにすることを通して、微小脳の機能設計に迫ることでした。しかし研究が進行するにつれ、そのような研究だけでは微小脳の機能設計に迫るのには限界があることが明らかになってきました。そこで研究の焦点を微小脳全体のシステム設計に向け直し、微小脳全体での情報の流れに目を向けたアプローチを進めました。

2. 研究方法と成果

研究材料としては、ワモンゴキブリとフタホシコオロギを用い、その脳の「形とはたらき」について、学習実験、電気生理学、組織学、分子生物学的な方法、などを総合した研究を行い、以下のような成果を得ました。

2-1 昆虫の嗅覚学習能力

昆虫の学習能力の解析は、その脳のシステムとしての特性を明らかにするための重要な基盤となります。本研究では、嗅覚学習に着目し、ゴキブリとコオロギを対象に、1つの匂いを水または砂糖水（報酬）と連合させ、もう1つの匂いを食塩水（罰）と連合させる弁別学

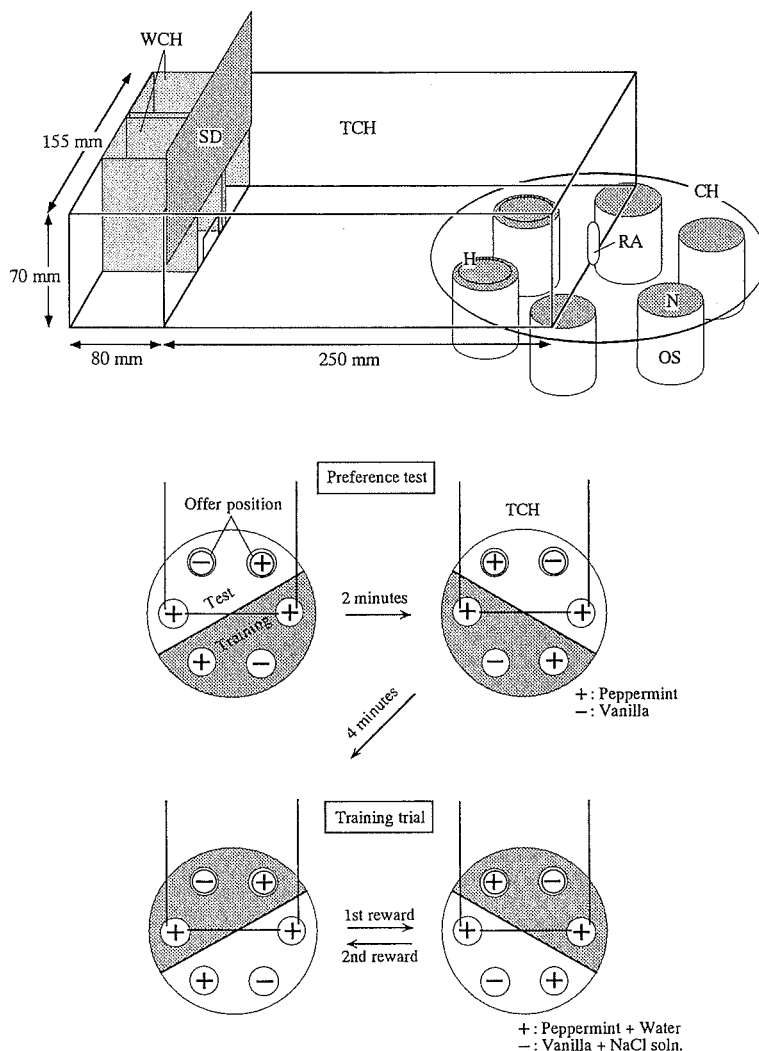


図1 コオロギの匂い嗜好性テストおよび匂い学習訓練に用いた装置（上）、および嗜好性テストおよび学習訓練の手順（下）。匂い嗜好性テストではペパーミントとバニラの匂い源を2つ並べてコオロギに自由に訪問させ、訪問時間の比を匂い嗜好性の指標としました。学習訓練時にはペパーミントの匂い源には水（報酬）を、バニラの匂い源には食塩水（罰）を置き、コオロギに自由に探索させました。

習訓練法の開発に取り組み、幾種類かの学習訓練法を開発することに成功しました。

それらの訓練法を用いてゴキブリとコオロギの嗅覚学習能力について調べたところ、ゴキブリでは匂いと砂糖水との連合学習がわずか1回の訓練で成立し、3回の訓練で成立した記憶は少なくとも4週間は保持されること、また3回の訓練により成立した記憶は3回の消去訓練により容易に書き変えることが明らかになりました。コオロギでも同様な結果が得られました(図2)。

さらにコオロギの嗅覚学習能力について、1) 記憶はどれだけの期間保持できるか(記憶保持能力)、2) 同時に何種類の匂いを報酬と連合記憶できるか(記憶容量)、3) 周囲の状況の違いに応じてそれぞれ異なる匂いを報酬と連合させることができるか(状況依存的記憶)、の3点について調べました。まず最初に、2種類の匂いの一方を水(報酬)と他方を食塩水(罰)と連合させる学習訓練を、4齢幼虫のコオロギに5日間行いました。6週間後にほとんどの個体が成虫になってから行った匂い嗜好性テストにおいて、ほとんどのコオロギは報酬と連合させた匂いを選択しました。さらに学習訓練の10週間後のテストでも匂いの記憶は

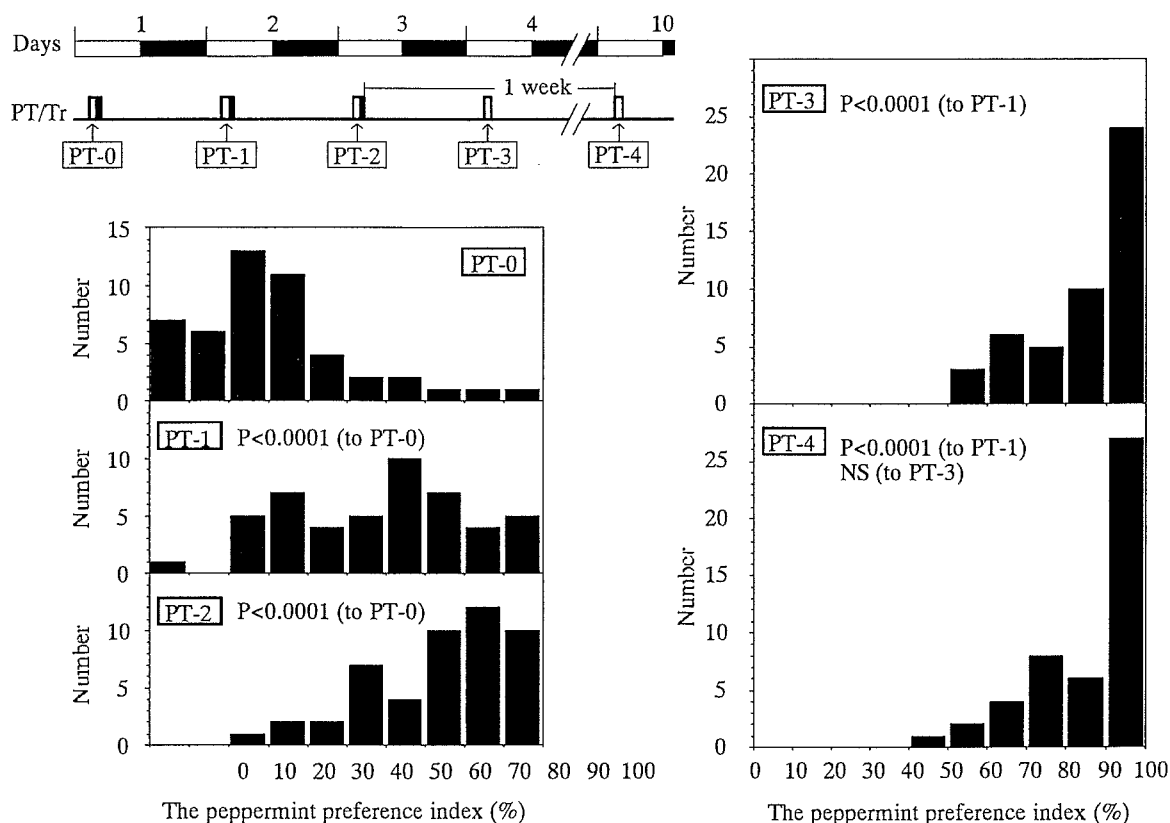


図2 ほとんどのコオロギは学習訓練の前にはペパーミントよりもバニラを好みました、ペパーミントの匂いを水に、バニラの匂いを食塩水に連合させる学習訓練を行うと、わずか1回の訓練でバニラよりもペパーミントを有意に選択するようになりました。3回の訓練で成立した記憶は少なくとも1週間は保持されました。

保持されていました。我々の飼育条件下ではコオロギの寿命は12～16週なので、コオロギでは一旦強固に成立した嗅覚記憶は生涯保持されると結論づけられました。この記憶はいわゆる「刷り込み」とは異なり、逆転学習訓練により容易に書き換え（または上書き）が達成されました。次に、14種類の匂いを用意して7組に分け、それぞれ一方を水と一方を食塩水と連合させる学習訓練を4日間行くと、その後の匂い選択性テストにおいてほとんどのコオロギは全ての匂いの組において水と連合させた匂いを選択しました。コオロギは少なくとも7種類の異なる匂いを同時に報酬と連合させることができると結論づけられました。さらに、明時にはペパーミントを水とバニラを食塩水と連合させ、暗時にはペパーミントを食塩水とバニラを水と連合させる訓練を3日間行ったところ、コオロギは明時にはペパーミントを、暗時にはバニラを選択しました。このような状況依存的な嗅覚学習能力はこれまで昆虫ではほとんど報告がないもので、今後このような高次の嗅覚学習に脳の最高次中枢であるキノコ体がどのように関わるのかを調べていきたいと思えます。

さらにコオロギでは、炭酸ガス麻酔の効果やタンパク合成阻害剤（シクロヘキシミド）投与の効果調べる実験により、コオロギの嗅覚記憶には、学習直後の短期記憶、炭酸ガス麻酔に感受性のある中期記憶、およびタンパク合成阻害剤に感受性のある長期記憶の3つの過程があることがわかりました。これらの過程を担う分子的な仕組みについても今後研究を進めていきたいと思えます。

2-2 キノコ体の一酸化窒素シグナル伝達系と嗅覚学習

コオロギのキノコ体は形態的に異なる幾つかの内在ニューロン群から構成されています。組織化学的な研究により、そのうちの特定の内在ニューロン群が高濃度の一酸化窒素合成酵素を含んでいることが判りました。一酸化窒素は、神経細胞間のシナプス接合部において、逆向性のシグナル伝達を担うことが知られています。コオロギに一酸化窒素合成の阻害剤を注射すると、学習訓練直後の短期記憶は正常であるが、それに続く記憶段階（中期記憶）が失われることが判りました。嗅覚学習に関与する可能性のある脳領域で、一酸化窒素合成酵素の高い活性が見られるのはこれらの内在ニューロン群だけでしたので、これらの内在ニューロン群の一酸化窒素シグナル伝達系が中期記憶の成立に関与している可能性が考えられます。今後、この可能性の検証のため、さらに研究を進めていきたいと思えます。

2-3 キノコ体で嗅覚学習訓練の直後に発現する遺伝子

コオロギの脳からメッセンジャーRNA (mRNA) を抽出し、脳で発現する遺伝子の

cDNA ライブラリーの作製を進めました。また、匂い学習訓練を行った直後のコオロギと非学習訓練（学習が成立しないコントロール訓練）を行った直後のコオロギのキノコ体の内在ニューロンの細胞体を摘出して mRNA を抽出し、学習訓練の直後にキノコ体で特異的に発現する遺伝子群をディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて探索しました。そのような遺伝子は長期記憶の成立に関わる可能性があります。その結果、興味深い新規遺伝子を少なくとも 1 つ見つけました。今後、この遺伝子の学習訓練後の脳内発現様式について調べ、その機能についての研究を進めていきたいと思えます。

2-4 キノコ体内在ニューロンの活動と嗅覚学習

先端がやや太いガラス管電極をゴキブリのキノコ体に刺入すると、キノコ体内在ニューロンの集団的な活動を電場電位として細胞外記録することができます。ゴキブリの触角に匂い刺激を与えるとキノコ体内在ニューロンが 20~30Hz の振動的・同調的な電気活動を示すことが電場電位解析により明らかになりました。このような振動的活動が嗅覚学習に関わる可能性について検討しました。あらかじめ匂いと砂糖水や食塩水の連合学習をした個体と学習していない個体で匂い刺激時の内在ニューロンの振動的電気活動の周期やパワーに違いが見られるのかを、相関解析法を用いて詳細に調べましたが、非常に残念なことに、両者の間で明白な違いは認められませんでした。そこで、以降の電気生理学的な研究は、対象をキノコ体出力ニューロンに定めることにしました。

2-5 嗅覚学習とキノコ体出力ニューロンの活動

あらかじめ匂いの連合学習訓練を行ったゴキブリのキノコ体ニューロンにガラス管微小電極を刺入し、砂糖水と連合させた匂い、食塩水と連合させた匂い、および未経験の匂いに対する応答をそれぞれ細胞内記録し、匂い学習に伴うキノコ体出力ニューロンの活動変化について調べました。大部分の出力ニューロンは学習特異的な応答は示しませんでした。ごく一部の出力ニューロンは学習した匂いに対して特異的と思われる応答を示しました。これらの出力ニューロンが嗅覚学習に関わる可能性について、今後さらに検討を進めて行きたいと思えます。

2-6 側葉の感覚地図

多くのキノコ体の出力ニューロンは前大脳の側葉に投射するので、キノコ体出力ニューロンからの細胞内記録を行う場合には、ガラス管微小電極を側葉に刺入します。そのような記

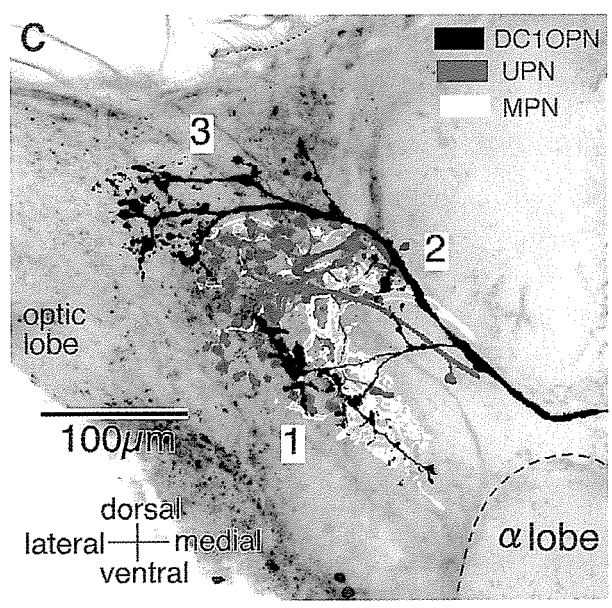
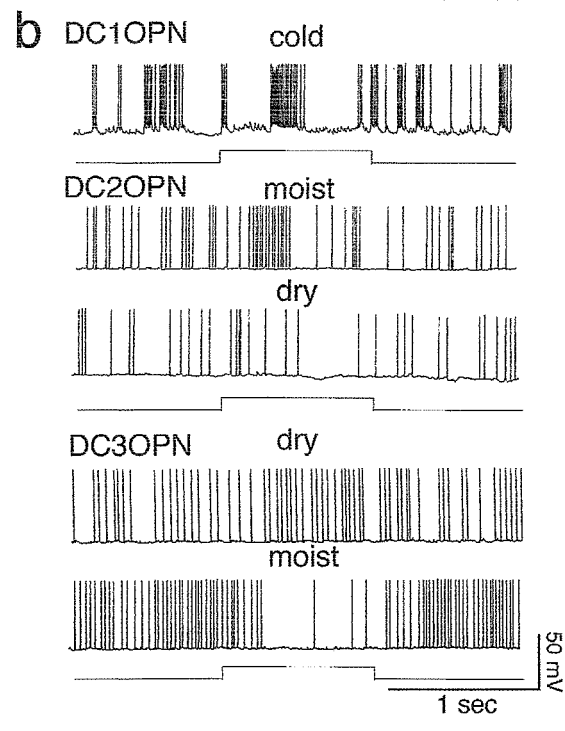
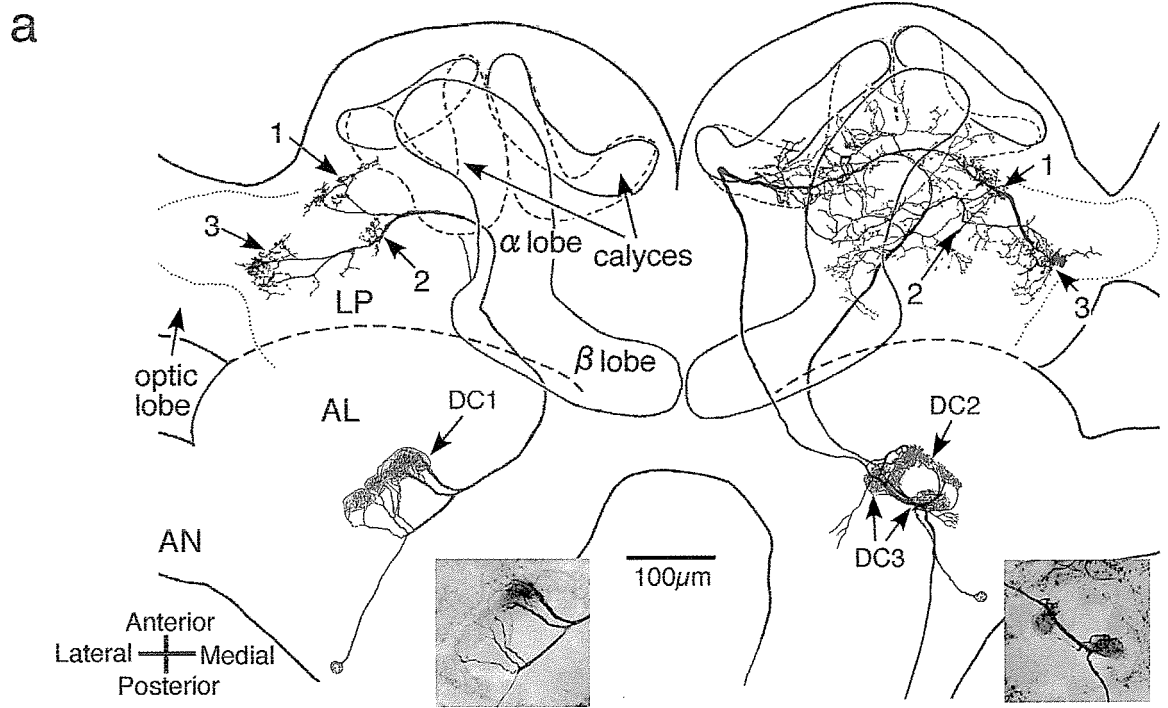


図3 (a, b) ゴキブリ触覚葉の冷 (DC1)、湿 (DC2) および (DC3) 糸球体に樹状突起を持ち、その軸索は前大脳に投射して側葉 (LP) に終末突起を持つ触覚葉出力ニューロン (DC1-3OPN) の形態と応答。(c) 側葉では、それらのニューロン (青) と一般の匂いおよび性フェロモンの情報を伝える触覚葉出力ニューロン (赤および黄) の終末突起は、それぞれ隣接した領域を占めています。

録の副産物として、側葉に神経突起を持つ様々なニューロンからの記録が得られました。そのような記録の中から、以下のような予期せぬ発見がありました。

昆虫はヒトなどの哺乳類には感じられないような極めて僅かな温度や湿度の変化を検知する感覚器を発達させています。ゴキブリの触角には匂いや機械感覚（気流や触覚）の受容器とともに湿度や温度の受容器があります。湿度や温度の感覚細胞の軸索は触角葉に投射し、その軸索終末は糸球体と呼ばれる球状のニューロピル（神経叢）を形成して触角葉の出力ニューロンにシナプス連絡します。

本研究の過程で、温度糸球体や湿度糸球体に樹状突起を持ち、その軸索は前大脳に投射して側葉に終末突起を広げる触角葉出力ニューロンからの記録が10例得られました（図3 b）。それらのニューロンの形態を蛍光色素の細胞内注入と共焦点レーザー顕微鏡観察によって調べたところ、これらは全て側葉の背部の特定の小領域で終末していました（図3 a）。温度糸球体の出力ニューロンと湿度糸球体の出力ニューロンの終末領域はほぼ完全に重なりあっていました。興味深いことに、食べ物などの一般の匂いを受容する感覚細胞の軸索が投射する糸球体の出力ニューロンや、雌の放出する性フェロモンの匂いを受容する感覚細胞の軸索が投射する糸球体の出力ニューロンは、それぞれ側葉の中心部および前腹部で終末し、温度糸球体や湿度糸球体の出力ニューロンの終末領域とは明確に異なっていました（図3 c）。この結果から、側葉には触角で受容した種々の感覚情報を整然と並べて表現する「感覚地図」があると結論づけられました。

側葉の「感覚地図」の各領域からの出力信号は、それぞれ高温・低温源、水（高湿度源）、食物（匂い源）、雌（性フェロモン源）の探索行動の統御に用いられると考えられます。これは、ヒト（哺乳類）において本能行動を統御する視床下部には飲水行動、体温調節行動、摂食行動、性行動のための中枢が整然と配置されているのと類似していますので、異なる系統の動物の間での脳の構造や機能の収斂進化という観点から大変興味深い成果です。

2-7 微小脳の基本配線様式

従来、昆虫の脳での情報の流れについては、個々の感覚系からの投射経路や、幾つかの特定の行動に関わる脳内経路については調べられてきましたが、脳で形成された司令を胸部の運動回路に伝える出力系の全体像が明らかになっていないために、脳の感覚-運動系の基本構成は明らかではありませんでした。そこでゴキブリを材料に脳の下降性ニューロンの脳内分布を詳細に調べた結果、下降性ニューロンの樹状突起は脳の非常に広い領域に分布していることが判りました。この結果に基づき、脳の内各領域を、1次感覚ニューロンの投射する感

覚中枢（図4ではsで表示）、胸部の運動中枢（m）を支配する下降性ニューロンが発する前運動中枢（p）、感覚中枢と前運動中枢を結ぶ連合中枢（a）に分け、その間の神経連絡についての現在の知見をまとめたのが図4です。脳の感覚中枢から胸部神経節の運動中枢に至る神経回路には、感覚中枢から運動中枢に直接伝える経路や、種々の前運動中枢を経る経路が多数併置されています。さらに感覚中枢からキノコ体や中心体などの連合中枢を通る経路の出力が前運動中枢に投射し、階層的な経路を形成しています。これまでの様々な研究を総合すると、直接的な経路は姿勢制御反応や逃避行動を、前運動領域を介する経路は多数の感覚を統合しての姿勢制御反応や本能的行動それぞれ担い、連合中枢から前運動中枢への階層的な投射経路が学習による行動の可塑性を担うと言えます。驚くべきことに、このような並列的および階層的な回路構築は哺乳類を含む脊椎動物の脳の感覚運動経路の基本構築とよく似ています。昆虫の脳と脊椎動物の脳の基本設計の収斂進化は、動物が果たすべき行動課題の共通性や、そのような共通課題遂行のための行動制御システムの進化過程における類似性によって説明できると私は考えています。

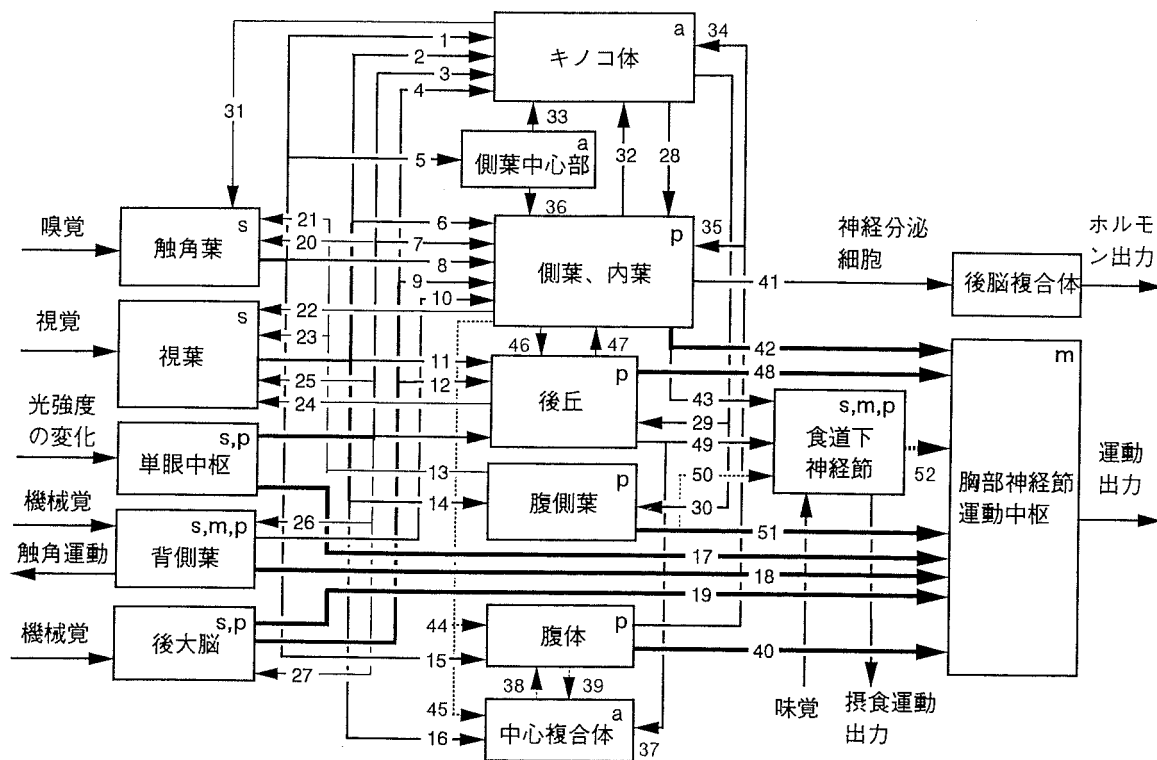


図4 ゴキブリの脳での情報の流れを示した模式図。脳の感覚中枢（s）と胸部の運動中枢（m）は直接または前運動中枢（p）を経由する多数の並列経路で接続されていますが、前運動中枢は連合中枢（a）を経由する階層的な神経経路による修飾を受けます。

3. 今後の展望

本研究で得られた数々の研究成果は、いずれも今後の微小脳的设计原理解明の研究のための貴重な手がかりを与えるものばかりです。今後、これらの成果を踏まえて、さらに微小脳のシステム设计の核心に迫る研究を大胆に展開したいと思います。そのような研究により、昆虫の微小脳と哺乳類の巨大脳との共通性や、微小脳に特有な性質についての理解を更に深め、「脳の多様性と進化」の解明に挑みたいと意気込んでいます。

4. 発表リスト

(1) 論文

- 1) H. Nishino, Y. Yamazaki, M. Nishikawa, F. Yokohari and M. Mizunami Insects smell humidity and temperature. (submitted)
- 2) R. Okada, M. Sakura and M. Mizunami Parallel and hierarchical processing streams in an insect brain: an integrated evolutionary perspective (submitted)
- 3) Y. Matsumoto and M. Mizunami Lifetime olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. (submitted)
- 4) Y. Matsumoto and M. Mizunami Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. (submitted)
- 5) M. Sakura and M. Mizunami (2001) Olfactory learning and memory in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zool. Sci.* 18: 21-28.
- 6) Y. Matsumoto and M. Mizunami (2000) Olfactory learning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 203: 2581-2588.
- 7) M. Mizunami, F. Yokohari and M. Takahata (1999) Exploration into the adaptive design of the arthropod "Microbrain". *Zool. Sci.* 16: 703-709.

(2) 総説・解説

- 1) 水波誠、木村哲也 (2001) 微小脳の記憶システム (分担執筆)、桑沢清明・富永佳也・山口恒夫編、もうひとつの脳?微小脳の研究入門、培風館 (印刷中)
- 2) Y. Matsumoto Y. and M. Mizunami (2000) Olfactory learning in crickets. In *Proceedings of The 18th Tsukuba Insect Science Symposium: Learning in Insect Foraging*. pp. 33-43.

(3) 口頭発表

- 1) M. Mizunami and Y. Matsumoto (2001) Elementary and context-dependent olfactory learning in crickets. The 6th International Congress of Neuroethology, 2001年7月、ボン (招待講演)
- 2) 松本幸久、野地澄晴、水波誠 (2001) フタホシコオロギの匂い学習と記憶、動物学会関連集会「動物の適応戦略における記憶の生物学的基盤」、2001年10月、福岡 (招待講演)
- 3) Y. Matsumoto and M. Mizunami (2000) Olfactory learning in crickets. The 18th Tsukuba Insect Science Symposium, 2000年10月17日, 筑波 (招待講演)
- 4) M. Mizunami (1999) Exploration into higher centers of the cockroach. 国際ワークショップ : Interface between Systems Brain Science and Neuroethology, 1999年9月、仙台 (招待講演)

その他、国際学会口頭発表 5 件、国内学会口頭発表15件