

研究報告書

「実行動下動物における方向情報の脳内表現と変換機構の解明と展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 小川 宏人

1. 研究のねらい

様々な感覚入力の情報や運動出力情報は、個々のニューロンの活動だけではなく複数のニューロンの集団的な活動の時空間パターンによって表現されている。しかし、多くの研究では、1種類の刺激についての情報（視覚での光刺激の位置や方向、聴覚での音刺激のパターンや高低等）、特に各刺激の物理的な特性に関する表現がほとんどであった。しかし、実際に動物が行動する場合、多くの感覚入力からいろいろな情報を抽出・統合し、その結果をもとに特定の運動出力を決定する。その中でも、あらゆる動物にとって重要な感覚性の抽出情報の一つが方向である。動物にとって「刺激がどの方向からもたらされたか」という情報は、感覚の種類や刺激の質によらず抽出されなければならない。例えば、動物が捕食者の放つ特定の匂い刺激に対して負の走性を持つ動物は、常にその匂い刺激の濃度勾配の高い方向に捕食者の姿や近づく音を捉える経験を積むと、捕食者の姿や近づく音に対してもそれから遠ざかろうとする行動をとるようになる。この場合、学習が成立する鍵となるのは刺激の時間的関連性だけでなく、刺激から抽出された方向という情報の一致性である。この一致性を判断するためには、異なる種類の刺激から抽出された方向という情報だけを刺激から独立させて表現し、それらを照らし合わせる過程が必要となる。本研究が第一のねらいとするのは、この異なる刺激から抽出された「方向情報」の脳内表現様式を明らかにすることである。

このような感覚刺激から抽出された方向情報は、動物の移動運動の方向を決定する上でも重要である。ゾウリムシや線虫などのような単純な動物の場合、例えば繊毛打の逆転回数や定型的なターン運動の頻度を変えることで、光刺激の方向や化学物質の濃度勾配に対し“結果として”方向性を持った移動を行う。しかし、移動速度が速い昆虫や脊椎動物では、時々刻々運動の方向を修正するというよりも、「ある方向に歩こう、飛ぼう」という、一定の移動方向を決めた運動出力を企画・実行する。この場合、運動企画の要素である方向は感覚刺激から抽出された方向情報をもとに決定されるはずであり、脳内のどこかで感覚性の方向情報が運動企画の方向情報に変換・反映されなければならない。本研究の第二のねらいは、この運動性の「方向情報」の表現様式を明らかにし、感覚性情報から運動性情報への変換機構を解明することである。

2. 研究成果

(1) 概要

上記の研究のねらいに基づき、本さきがけ研究では、シンプルな脳神経系をもつコオロギをモデルとして、気流や音刺激の方向情報の神経表現と、それらの刺激によって誘発される歩行運動の刺激方向依存的制御に関与する神経機構の解明を試みた。

気流や音の感覚情報を脳に伝える上行性ニューロンの活動を解析したところ、気流応答性ニューロンは聴覚性ニューロンよりも高い方向選択性を示すものが多く、気流応答性ニューロンの多くは体軸の外側後方に選択性を持つものに対して、聴覚性ニューロンは比較的前方への選択性が高かった。これは感覚器官そのものの特性を反映した違いであると思われる。どちらの感覚系においても、刺激の方向情報は複数の上行性ニューロンによる集団活動によって符号化されていると考えられることから、上行性スパイクの全ユニットの刺激方向ごとの応答をデコードして、どの程度正確に刺激方向を予測できるかを検証した。その結果、気流感覚系は聴覚系よりもコーディング精度が高く、より少数のニューロンで方向情報を搬送していることが分かった。以上の結果から、方向情報をコーディングするニューロン群の規模はモダリティによって異なることが示唆された。また、気流応答性の上行性ニューロンの脳内投射領域において in vivo カルシウムイメージングを行ったところ、ごく近接した領域でもカルシウム応答の方向選択性が大きく異なることがわかった。これらの結果は、脳内では気流や音の方向情報はトポグラフィックに表現されていないことを示しており、これらの方向情報は、より高次のレベルで統合されている可能性が示唆された。

コオロギは短いエアパフに対して刺激から遠ざかる歩行を示すが、最初期の瞬間的な運動においても移動方向やターン角度は刺激方向に対して正確に制御されていた。この刺激方向依存的制御には脳からの下行性神経活動が必須であった。また、下行性ニューロンの気流刺激に対する神経応答には方向選択性を示すものが存在した。これらは脳内で気流刺激方向が抽出され、歩行運動の刺激角度依存的制御信号に変換されていることを意味している。さらに下行性神経活動はその応答性によって、方向制御、運動の開始、ターン角度、最初期運動持続時間などに関与するものなどに分類されたことから、運動の異なるパラメータは下行性ニューロンによって分担されて制御されていることが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ1 「気流刺激および音刺激の方向情報の表現様式の解明」

気流刺激および音刺激の方向情報が脳へ搬送する上行性ニューロン群によってどのように表現されているかを明らかにするため、それぞれの1次感覚ニューロンが投射する最終腹部神経節および前胸神経節から伸びる腹側縦連合の両側の求心側切断端から、全ての上行性スパイクを吸引電極で記録した。0.31m/s 定常流エアパフまたは 10kHz トーン音をそれぞれ 8 方向から 200ms 与えた時の応答を、波形相互相関解析法により片側の記録につき 80~100 のユニットに分離した。各方向に対するそれぞれのユニットの応答から、特定のタイムウィンドウにおけるスパイク数をカウントし、それを最大応答方向で規格化して方向選択指標値 (Direction Selectivity Index: DSI) を算出した。また、各ユニットの応答データを基に Leave-one-out cross validation (LOOCV) 法によって方向予測の正答率を解析し、さらに複数のユニットの応答から予測した正答率が最大になるニューロン群を推定した。その結果、最大正答率は気流刺激が約 75% であるのに対し、音刺激では約 55% にとどまった。また、最大正答率が得られるタイムウィンドウは、気流刺激が刺激開始から 50ms~250ms、音刺激は 0ms~150ms であった。各読み出し時刻における正答率の推移については、気流刺激の場合、刺激開始から正答率は徐々に上昇し、200ms でほぼピークに達した後、300ms ぐらいまで

正答率はほとんど変わらなかった。一方、音刺激に対しては、刺激開始後 50ms でほぼピークに近い正答率を示した。以上の結果は、気流感覚は方向情報のコーディング精度が高いが、高い精度を得るために遅延を持ったやや長いタイムウィンドウが必要であるのに対し、聴覚では精度は低い、刺激直後から最大値に近い精度の方向情報をコードしていることを示している。また、最大正答率が得られるニューロン集団の細胞数は、気流刺激では約 16 個、音刺激では約 24 個であり、いずれも正答率の高い時間帯ではニューロン集団を構成するユニットはほとんど入れ替わらなかった。すなわち、どちらの感覚においても 100 個以上の上行性ユニットのうち、30 個以下の特定のニューロン群が方向情報のデコードに用いられていると考えられる。特に気流方向情報をコードすると思われる上行性ニューロン数(16個)が、これまでに同定されている巨大介在ニューロン数(8タイプの Paired neuron)と一致したのは興味深い。さらに、それぞれの感覚で方向情報をコードしているニューロン群を構成する個々の細胞の応答特性を比較したところ、気流応答性ニューロンでは DSI が高いのに対して、聴覚性ニューロンでは DSI よりも方位選択性(Orientation Selectivity Index: OSI)が高かった。脳内における聴覚性の刺激方向の抽出は、気流感覚とは異なるデコーディング手法で行われている可能性がある。

次に、in vivo カルシウムイメージング法を用いて、機械感覚性上行性介在ニューロンが投射する前大脳腹側葉(Ventro-lateral neuropile: VLNP)領域の気流応答を解析した。その結果、いくつかの細胞体と思われる狭い領域で、気流刺激に伴うカルシウム上昇が観察された。領域ごとにカルシウム応答の時間変化や方向感受性が異なるだけでなく、特定の方向に対して蛍光強度が減少(カルシウム濃度が減少)する反応も観察された。これは上行性ニューロンではほとんど観察されなかった応答であり、また刺激終了後にも持続した応答もみられたことから、より高次の気流情報処理に関与する介在ニューロンの活動であると思われる。しかし、細胞体位置と方向感受性に相関は認められなかった。そこで、これらの介在ニューロンの活動をより詳細に解析するため、タングステン電極を用いて VLNP の異なる複数個所から細胞外記録を行った。どの部位からの記録も 15~20 のユニットに分離された。分離されたユニットの方向感受性を解析したところ、全ユニットの 70~80%が全ての方向に対して興奮性の応答を示し、残りのユニットはすべて8方向のうちいずれかの方向に対してスパイク発火が減少する抑制性の応答を示す興奮/抑制混合型であった。これはカルシウムイメージングの結果と一致する。また、その方向感受性は DSI が高い単方向選択型と OSI の高い双方向選択型がほぼ同じくらいの割合で存在したが、方向感受性やチューニングカーブの形状(型)に記録個所による特異性は認められなかった。以上の結果から、気流の方向情報は VLNP 領域ではトポグラフィックに表現されていないと考えられる。脳内での気流刺激の方向情報は上行性ニューロンにみられるようなポピュレーション・コーディングではなく、単一細胞レベルで符号化されている可能性があり、それを明らかにするためには個々のニューロンからの細胞内記録によるより詳細な解析を行う必要がある。最後に、脳内の細胞外記録で得られたデータを上行性ニューロンと同じ手法で解析したところ、正答率の高い時間は、より刺激開始から遅い時刻の広いタイムウィンドウに広がっており、最大正答率を出すユニット数は1記録部位につき 5~7 ユニットであった。したがって、コーディング精度による予測結果も、脳内ではより少数のニューロンによって方向情報が表現されていることを示唆しており、しかもその活動は刺激

終了後も一定時間保持されていると考えられる。

研究テーマ2 「気流誘導性歩行運動における刺激方向依存的制御の神経機構の解明」

コオロギが感覚刺激の方向情報に基づいて、自身の運動をどのように制御するのかを明らかにするため、運動をモニタするトラックボール型トレッドミルシステムを用いて、気流誘導性歩行における移動方向、移動速度、体軸角度、ターン角速度を 1 kHz で計測した。停止しているコオロギに周囲8方向に配置したノズルから定常流エアパフ刺激 ($0.62\text{m/s} \cdot 200\text{ms}$) を与えると、歩行速度およびターン角速度は運動開始から 500~600 ms でいったん停止近くまで減少し、そのまま停止するかもしれないもしくは再び運動を継続した。この刺激直後の最初期反応の終了時における歩行方向(y)とターン角度(θ)を刺激角度(x , ただし反応とは左右前後が逆)に対してプロットすると、歩行方向は $y = x$ の直線で、またターン角度は $\theta = k \sin x$ の正弦波状の曲線で近似された。これは、刺激直後の最初期反応においても歩行方向・ターン角度ともに刺激角度依存的に制御されていることを意味している。さらに、刺激持続時間を 50, 100ms にすると、最初期反応における歩行方向は 200ms のときと同様に刺激角度依存性を示したのに対し、ターン角度は刺激角度によらず0に近づいた。刺激開始から歩行開始までの latency は刺激角度によらずほぼ 70~90 ms であることから、歩行方向は 50 ms 以内の刺激に含まれる方向情報で制御可能であるが、体軸角度制御には少なくとも歩行開始時まで刺激を受容することが必要であることが分かった。これは、歩行方向と体軸角度制御に用いられる刺激の方向情報の量や質が異なることを示しており、それぞれの情報が別のニューロンによって搬送／処理されている可能性が示唆された(Ogawa and Oe, 2011 SfN abstract)。

脳からの下行性ニューロンの軸索が走行する腹側縦連合を一部切断したところ、歩行方向およびターン角度の刺激角度依存性は失われた。したがって、気流誘導性歩行における刺激角度依存性な運動制御処理は脳内の神経回路で行われており、その実行には下行性神経信号が必須であると考えられる(Ogawa and Oe, 2012 SfN abstract)。そこで、頸部腹側縦連合の片側を切断し、その遠心側断端から下行性スパイクを計測して、その気流応答性を調べた。その結果、下行性スパイクは 50~60 のユニットに分離され、そのうち 80%が気流応答性を示した。これらのユニット群は自発性活動の有無や発火パターンから4タイプに大別された。Sparse 型は発火頻度が低いが高い DSI を示すユニットが多く、前方を除く全方向に対する選択性をもつものが含まれることから、最初期反応の刺激角度依存性な移動方向をコードすると思われる。Transient 型は刺激に対して一過性の高頻度発火を示すが、DSI が低く後方からの刺激に比較的大きな感受性を持つものが多いことから、歩行運動のトリガもしくは最初の駆動力の発生に関与している可能性がある。刺激期間中、高頻度発火が持続または上昇し続ける sustained 型は、その発火頻度ピークのタイミングによってさらに2タイプに分類された。刺激終了時にピークが一致する sustained I 型は最も刺激持続時間に依存した情報をコードしていると考えられる。また、DSI はそれほど高くないが、記録側からの刺激に比較的高い感受性を持つことから、最初期反応で制御されるターン角度をコードしていると予想される。一方、刺激終了後も発火が持続してピークを迎える sustained II 型は、記録側と同側の刺激に感受性を持つことから、最初期反応における歩行時間もしくは運動の持続に関与することが示唆された。すなわち、下行性ニューロンは運動制御の異なるパラメータを分担していると

考えられる。さらに、頸部腹側縦連合からの逆行性染色により、脳内の下行性ニューロンの細胞体は4つのクラスターに分布することがわかった。トレッドミル上で歩行するコオロギの前大脳からカルシウムイメージングを行ったところ、特に Lateral accessory lobe (LAL) 領域から運動開始に先行したカルシウムシグナルが観察された。LAL 領域のクラスターに存在する下行性ニューロンは運動開始に関与している Transient 型の可能性がある。

研究テーマ3 「光活性型イオンチャネル操作による刺激方向依存的制御機構の検証」

歩行運動における方向制御やターン運動制御に関与する下行性ニューロンの機能を検証するため、これらのニューロンへの光駆動型イオンチャネル Channel-rhodopsin 2 (ChR2) の発現を試みた。まずフタホシコオロギ由来の actin promoter (*Gb-act*) の下流に EGFP をつないだ DNA プラスミドを脳内へマイクロインジェクションし、エレクトロポレーターを用いて遺伝子導入を行ったところ、最大で 100~200 個の細胞で蛍光タンパク質を発現させることに成功した (Matsumoto et al., 2013 投稿中)。これは、コオロギをはじめとする直翅目昆虫でニューロンへ外来遺伝子を成功させたはじめての報告である。さらに、エレクトロポレーションの電圧パルスのパラメータや電極位置、プラスミドの注入位置を工夫することによって、脳内の局所的な領域で GFP を発現させることができた。すなわち、我々の開発した手法は、特定のプロモーターを使用することなく、狙った領域のニューロンに遺伝子導入を行うことが可能であり、特に分子生物学的な研究が進んでいない非モデル動物では有効である。これまでに、GFP のほか、ChR2 や遺伝子コード型カルシウムセンサーである Cameleon 3.6 の発現にも成功した。残念ながら、本研究期間中に光刺激による下行性ニューロンの機能検証を行うことはできなかったが、今後、下行性ニューロンの各クラスターに特異的に ChR2 を発現させたコオロギに光刺激を与え、それによって運動を誘発できるか、また歩行運動を制御できるかを検証したい。

3. 今後の展開

本研究は、昆虫の移動運動が単純な反射の連鎖ではなく、刺激に関する緻密な空間情報処理とそれに基づく運動制御によって実行されていることを示した。この研究成果は、より少数のニューロンによる神経回路で複雑な随意運動を制御できる可能性を示唆しており、BMI 技術によって脳情報から運動制御を実行する際のシステム設計に有効な手掛かりを与えることが期待できる。今後は、脳内の刺激方向情報を抽出する神経回路と運動制御に関与する下行性ニューロンへの接続をより詳細に解析し、感覚刺激情報の抽出～処理～運動制御を行う神経システムの全容を同定細胞レベルで明らかにしていく。

4. 自己評価

研究のねらいの第1項目に対しては、研究テーマ1での成果が位置づけられる。上行性ニューロンのコーディング様式については、気流感覚と聴覚で詳細に比較することができたが、脳内で方向情報をデコードするシステムについては、当初予想した刺激方向を表現する空間マップが得られず、それに代わる新たな仮説を提唱するデータを得るには至らなかった。研究のねらいの第2項目に対しては、研究テーマ2および3の成果が位置づけられる。下行性ニューロンによる制御について興味深いデータが得られたが、実際の運動時の計測データが不十分であったため、細胞レベルでの機能同定には至らなかった。その理由として、下行性ニューロンの多くが脳の深

部か後方側に存在したために、脳前面から行う運動中のイメージングでは、下行性ニューロンのシグナルを得ることができなかったことがあげられる。また、研究テーマ3については、トランスジェニック動物の作成を2年間にわたって試みたが成功せず、3年目にエレクトロポレーションに切り替えてようやく遺伝子導入に成功した。もう少し早く手法を切り替えていれば、ChR2による検証実験を研究期間中に行うことができたかもしれない。研究期間全体を通して、当初の研究計画の70%程度は達成できたのではないかと考えている。

5. 研究総括の見解

課題目標をほぼ達成した。少数のニューロンによる感覚・運動系を実験的に解明し、BMI 技術の設計に生かす上での手がかりとなることが期待される。

本研究では、脊椎動物より単純な体制を持つが、ゾウリムシ等よりはるかに複雑な行動様式を持つ昆虫を用い、行動の方向選択性の神経制御機構を、気流／音刺激、電気生理学的測定／カルシウムイメージング測定等を用い、トラックボールを導入する等の工夫した実験系により *in vivo* で運動中に解明した。シンプル系を用いることにより、感覚から行動に至る神経情報変換機構を体系的に把握することが期待される。

気流に対する歩行運動は、移動方向やターン角度などの運動パラメータが刺激方向に対して正確に制御されており、それには脳からの下行性神経活動が必須であることを見いだした。感覚系では、上行性気流ニューロンは 10-20 個の少数のニューロンで精度の高い方向情報を搬送することが示された。気流系の上行性ニューロンの直接の脳内投射領域では、*in vivo* カルシウムイメージングを行い、ごく近接した領域でもカルシウム応答の方向選択性が大きく異なり、この脳レベルでは方向情報はトポグラフィックに表現されず、より高次のレベルでの統合が示唆された。運動系では、短いエアパフに対する応答では、最初期から運動方向やターン角度は刺激方向に対して正確に制御されていた。脳内で気流刺激方向が抽出され、歩行運動の刺激角度依存的制御信号に変換されたと考えられる。下行性神経活動はその応答性により、方向制御・運動開始・ターン角度・最初期運動持続時間などに関与するものに分類された。

少数のニューロンによる神経回路で複雑な随意運動を制御できることを実態的に示したもので、BMI技術によって脳情報から運動制御を実行する際のシステム設計について手掛かりとなることが期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Ogawa, H.**, Kagaya, K., Saito, M. and Yamaguchi, T. (2011)
Neural mechanism for generating and switching motor patterns of rhythmic movements of ovipositor valves in the cricket. *J. Insect Physiol.* 57: 326-338
2. **Ogawa, H.**, Kawakami, Z. and Yamaguchi, T. (2011)
Proprioceptors involved in stinging response of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 57: 1358-1367
3. Suzuki, M., Kimura, T., **Ogawa, H.**, Hotta, K. and Oka, K. (2011)

Chromatophore activity during natural pattern expression by the Squid *Sepioteuthis lessoniana*: Contributions of miniature oscillation. *PLoS ONE* 6: e18244

4. Baba, Y., Tsukada, A. and Ogawa, H. (2010)

Sexual dimorphism in shape and distribution of GABA-like immuno-reactive neurons in cricket terminal abdominal ganglion. *Zool. Sci.* 27: 506-513

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 著書

Ogawa, H. and Miller, J.P. (In Press) *In vivo* Ca²⁺ imaging of neuronal activity. In: Methods in Neuroethological Research. Ogawa, H. and Oka, K., eds. Springer Japan, Tokyo.

2. 国際会議招待講演

1) Ogawa, H. (2011)

Directional-dependent plasticity in neural and behavioral responses to air currents in the cricket. (2011 年 5 月 31 – 6 日 5 日 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry・Nagoya)

2) Ogawa, H. (2012)

Neuronal mechanism for directional-dependent plasticity in wind-evoked walking behavior of the cricket. (2012 年 3 月 18 – 3 日 23 日 The 2nd International Conference on the Cricket / RNAi Symposium for Medicine-Agriculture-Engineering Collaboration Project Joint Meeting・Tokushima)

3) 国際会議発表

1) Ogawa, H., and Oe, M. (2012)

Distinct role of identified giant interneurons in directional control of wind-evoked walking behavior in the cricket. (2012 年 10 月 13 –17 日 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience・New Orleans)

2) Ogawa, H., and Oe, M. (2011)

Neural control of walking orientation and body-axis angle in wind avoidance behavior in the cricket. (2011 年 11 月 12 –16 日 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience・Washington, DC)