



平成 21 年度～平成 25 年度
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析

ー 行動解析、生理実験、遺伝子発現、神経回路モデルの融合 ー

研究成果報告書

学校法人玉川学園 玉川大学学術研究所
研究代表者 佐々木正己

平成 26 年 3 月



平成21年度～平成 25 年度
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析
— 行動解析、生理実験、遺伝子発現、神経回路モデルの融合 —

研究成果報告書

平成 26 年 3 月
学校法人玉川学園 玉川大学学術研究所
研究代表者 佐々木正己

記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析
ー 行動解析、生理実験、遺伝子発現、神経回路モデルの融合 ー

目 次

- 3 代表挨拶
4 研究概要
5 研究者紹介
6 研究事業の位置づけ
7 本事業の意義・目的

研究概要

- 8 生理学的小および行動学的解析
24 遺伝子発現解析・分子生物学的解析
36 受容体・シナプスから細胞レベルの生理的解析
62 細胞からネットワークレベルの生理学的小および理論モデルの構築

論文紹介

- 71 【1】 Honeybee foragers adjust crop contents before leaving the hive
Ken-ichi Harano, Akiko Mitsuata-Asai, Takayuki Konishi, Takashi Suzuki, Masami Sasaki
81 【2】 Transduction of baculovirus vectors to queen honeybees, *Apis mellifera*
Takashi Ikeda, Jun Nakamura, Seiichi Furukawa, Panuwan Chantawannakul, Masami Sasaki, Tetsuhiko Sasaki
92 【3】 An Analysis of Synaptic Transmission and its Plasticity by Glutamate Receptor Channel Kinetics
Models and 2-Photon Laser Photolysis
Hiroshi Kojima, Shiori Katsumata
99 【4】 Cholinergic modulation on spike timing-dependent plasticity in hippocampal CA1 network
E. Sugisaki, Y. Fukushima, M. Tsukada, T. Aihara
110 【5】 Reinforcement learning for discounted values often loses the goal in the application to animal learning
Yoshiya Yamaguchi, Yutaka Sakai

代表挨拶

平成 21 年（2009 年）度に採択された私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析」（以下：本事業）を終えるにあたり、本事業が採択になるまでの歩みを振り返るとともに、推進を応援いただいた内外の関係者の皆様に、心から感謝申し上げます。

本事業に至る流れは、1996 年、玉川大学学術研究所に脳科学研究施設が設置された時に遡ります。当時すでに、塚田らを中心とした工学部の脳研究グループはザリガニからネコを研究対象とし、生理実験と理論モデルの双方を駆使した研究を展開していましたが、そこに農学部、ミツバチ科学研究施設の佐々木らのグループと、文学部で哲学・倫理学を進めていた福井らのグループが加わり、玉川らしい総合的な脳研究プロジェクトの基盤が整いました。

その活動は、平成 14 年、21 世紀 COE プログラム「全人的人間科学プログラム」（5 年間）の採択という形に発展、翌平成 15 年には私立大学学術フロンティア推進事業（5 年間）の採択を期に、純粋な研究用としては珍しい f-MRI 設備と、当時としては最新の遺伝子解析設備を備えた GBI（Genetic Analysis and Brain Activity Imaging Laboratory）棟が完備しました。これらの実現は、小原哲郎総長および小原芳明学長の強力なバックアップなしにはあり得ませんでした。その後、2 回目の COE であるグローバル COE プログラム「社会に生きる心の創成」（5 年間）に続き、私立大学学術フロンティア推進事業の終了から 1 年の間を置いて、今回の本事業の採択に至ったというのが、これまでの流れです。

グローバル COE プログラムは「社会に生きる心の創成」のタイトルが示すように、社会科学的視点からの研究に軸足を移しましたが、本事業は私立大学学術フロンティア推進事業の流れを汲み、動物実験を中心とした自然科学的解析に力点を置きました。ただ、タイトルに掲げた「統合的」解析、副題に挙げた異なる切り口からの研究の「融合」という点では、今後もまだまだ先の長い研究が玉川大学で続けられることを願っております。

なおこの 5 年の間に、玉川大学の脳研究を中心となって牽引してこられた塚田稔教授と、私立大学学術フロンティア推進事業および本事業で代表を務めさせていただいた佐々木は、ひとつの区切りを迎えることとなりました。ともに「生涯研究者」の心を持ち続ける所存ですが、一方で、グローバル COE プログラムや本事業を通じ、若手を中心とした交流が活発に行われるようになっています。次の世代を担う人たちの研究が進展する中で、さらに統合的な脳科学研究の実現を目指していただければと期待するものです。

規模が大きいとは言えない私立大学において、惜しみなく応援していただいた小原芳明学長に重ねて御礼申し上げるとともに、心の通ったバックアップをいただいた事務局の皆様にも、この場を借りて感謝の意を表する次第です。

玉川大学戦略的研究基盤形成支援事業 プロジェクトリーダー
玉川大学学術研究所
佐々木正己



研究概要

生理学および行動学的解析

100 万個の神経細胞からなる集積回路のような脳を持つミツバチを主材料に、ダンス言語による情報伝達、発熱による対オオスズメバチ防衛戦略（Nature, 2005）時の脳機能を解析する。また発育環境の影響が大きい記憶・学習能力の“可塑的”発達、長期記憶メカニズム、脳の左右性について、連合学習（行動解析）および薬理学的手法から究明する。

遺伝子発現解析・分子生物学的解析

21 世紀 COE プログラム、学術フロンティア推進事業を通じて、本学ではミツバチの学習能力の発達に関わるいくつかの候補遺伝子を見い出している。これらの候補遺伝子の詳細な発現解析から、学習能力との関連性を検証する。また、脳内で発現する遺伝子の RNAi 法による機能抑制、ミツバチへの遺伝子導入を試みる。エピジェネティックな転写調節についても解析を進める。

受容体・シナプスから細胞レベルの生理的解析

シナプス可塑性が、シナプス前部に起因するのかシナプス後部に起因するのかは、現在のところまだ統一的な知見が得られていない。本プロジェクトではシナプスの可塑性の要因を明らかにするために、おもにラットの脳切片を材料として、二光子レーザー顕微鏡によるシナプスレベルでの形態観察、微小レーザービームによる神経細胞の微小領域刺激による電気生理実験などを行う。

細胞からネットワークレベルの生理学的解析および理論モデルの構築

細胞からネットワークレベルの統合的理解のために、理論的な学習記憶仮説を提案する。また、ラットおよびサルを用いた電気生理実験により、シナプス結合強度パターンとしての記憶形成というミクロなレベルから、細胞集団システムにおける記憶形成というマクロなレベルにわたる検証を行う。



研究者紹介

*所属は平成 21 年度採択時



佐々木正己（学術研究所）



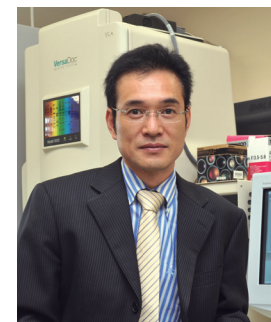
小野正人（農学研究科）



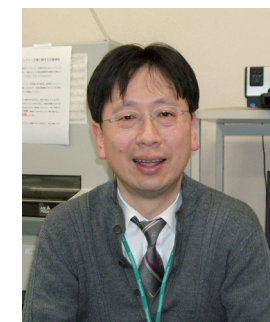
中村純（学術研究所）



吉田忠晴（学術研究所）



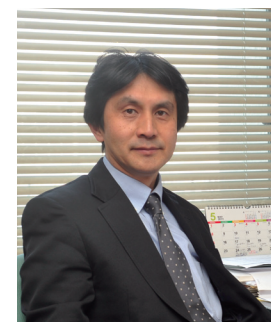
佐々木哲彦（学術研究所）



肥塚信也（農学研究科）



塚田稔（脳科学研究所）



相原威（工学研究科）



小島比呂志（工学研究科）



丹治順（脳科学研究所）



酒井裕（脳科学研究所）



平成21年度選定

「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析

— 行動解析、生理実験、遺伝子発現、神経回路モデルの融合 —

採択期間：平成21年度～平成25年度

研究代表：玉川大学学術研究所 佐々木 正己

研究事業の位置づけ

—— 構想調書(平成21年度採択時)より抜粋

玉川大学には研究部門を推進する12の付置研究センターがある。私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析」（以下：本事業）は、この中の「ミツバチ科学研究センター」および「脳科学研究センター」を中核とし、これに農学研究科と工学研究科の一部教員が加わった形の学際的、かつ特色ある構成となっている。

平成14年に採択された21世紀COEプログラムでは、本事業の研究員の約半数と社会科学系の教員が研究基盤を整備すると共に優秀な成果を挙げた実績があり、平成20年度からは「ヒトの心の理解」を目指した文理融合のプロジェクトがグローバルCOEプログラムに採択されている。これらの基盤をもとに、本プロジェクトは脳機能の中核をなす記憶・学習の問題に、自然科学の立場から実験的な解析を進めている。ヒトは対象とせず、ラット、サルにミツバチを加えるという本学の特徴を生かしたユニークな構成は、量子情報分野、次世代型植物工場と並び、本学の研究基盤形成の中で牽引的位置づけとなるものである。中規模の大学ではあるが、その分、研究者同士の連携がしやすいメリットがあり、副題に掲げている学際的、融合的研究の展開が十分に期待できる。



本事業の意義・目的

—— 構想調書(平成21年度採択時)より抜粋

本事業より1年先に走り始めたグローバルCOEプログラムが、ヒトの心のはたらき（特に意思決定のメカニズムの解明）に的を絞っているのに対し、本事業は同じ脳機能の中でも記憶・学習の基本メカニズムの理解を目的としており、方法的にもあくまで動物実験を中心に展開している。こまでは平成15年度に採択された私立大学学術フロンティア推進事業（～19年度）と同じ目的であるが、本事業はラットの神経細胞を用いてレーザー高速局所刺激システムを駆使した実験を行うほか、基盤整備が進んだ遺伝子実験施設をさらに移転・拡充し（平成20年3月に新たな実験施設が完成）、分子生物学的な解析を本格的に展開している。これまでの研究成果を基に、新たに「学習能力の可塑的発達」を可能にしているメカニズムの解明を目指している。

本事業の独創的な点として、高度な社会性と学習能力を進化させたミツバチをモデル動物にしていることが挙げられる。学習の基本メカニズムは、分子・細胞レベルではヒトもミツバチも同じであり、ミツバチは、サルやヒトのような霊長類に匹敵する「概念理解」までできる高度な脳機能や社会性を発達させている。一方でミツバチはヒトやサルと違い、脳内に実験的に外来遺伝子を導入したり、ノックアウトしたりすることが可能である。加えてごく最近（平成18年）解読された「全ゲノム」の成果も存分に取り入れた研究を行うことができる。

本事業の先行研究により、ミツバチは1回の学習では数時間で忘れてしまうことも3回学習すれば生涯覚えていること、社会から隔離して育てると学習能力の発達や記憶の保持が著しく損なわれることなど、ヒトとよく似た点があることがわかってきている。これらの基本メカニズムの解明は、ヒトの脳機能の理解にも大いに役立つものと期待できる。

生理学および行動学的解析



研究内容

約 100 万個の神経細胞からなる微小集積回路のような脳をもつミツバチを主材料に、発育環境の影響が大きい記憶・学習能力の“可塑的”発達、長期記憶メカニズム、脳の左右性について、連合学習による解析を行った。また、ミツバチのダンス言語による情報伝達に関する新しい視点からの研究、社会性ハチ類の社会行動を制御する嗅覚情報処理の解析を行った。

担当研究者

①ミツバチの記憶・学習メカニズムとその可塑的発達の解析

佐々木正己（学術研究所）

②最適採餌戦略としてのダンス言語と経験を積むことによる行動の可塑的变化

佐々木正己（学術研究所）

吉田忠晴（学術研究所）

③マルハナバチの生体リズムとその可塑的発現メカニズムに関する解析

佐々木正己（学術研究所）

小野正人（農学研究科）

④社会性ハチ類が示す行動可塑性の化学生態学的解析

小野正人（農学研究科）



①ミツバチの記憶・学習メカニズムとその可塑的発達の解析

ミツバチは少数であれば数を数えられ、「同じ」「違う」などの概念を認識することが知られており、これらの能力は高等なサルにも匹敵すると考えられている（佐々木 2009）。学習能力もきわめて優れており、嗅覚の連合学習ではわずか 1 回の条件付けで短期記憶が成立するほか、10 分以上の間隔で行われる 3～5 回の条件付けで、1 週間以上、場合によっては生涯にわたる長期記憶が可能である。しかしこれらの能力を支える脳の発達は、成虫期を前にした蛹期に急激に進むもので、幼虫時には、徹底した親からの保護と食料供給の中で、そもそも眼も触角も存在しないといってよい位未発達のままである。一方、成虫に羽化すればすぐに学習ができるかというそれは無理で、働きバチの場合、半数のハチが学習できるようになるまでに 3～5 日、すべてのハチが学習できるようになるには 8 から 10 日を要する（Ichikawa and Sasaki 2003）。しかも我々の先行研究により、コロニーから隔離された条件で飼育されたハチでは、この学習能力の発達が著しく遅れる、または抑制されることが明らかになっている。すなわちこの学習能力の発達には大きな可塑性がみられ、学習できるハチとできないハチの間では、後述するように遺伝子の発現パターンが異なるほか、記憶の座とされ、異種感覚入力統合機能を司るキノコ体ニューロピルの容積でも、違いが見いだされている（Ichikawa et al. 未発表）。

そこで、この学習能力とその可塑的発達についてさらに解析を進めるべく、これまでの嗅覚系の学習に加え、同じく多様な情報処理が行われている視覚を対象とした解析系の開発を進めることとした。ミツバチの視覚学習の解析例は少ないが、いずれも自由飛翔状態のハチをもちいる方法であり、嗅覚系の場合のように固定したハチでの解析は長い間不可能とされてきた。そんな中、東京大学の堀らと我々により、視覚系の学習でも固定バチが使えるアッセイ系が開発された（Hori et al. 2006）。これを受け、2003 から 2007 年までの私立大学学術フロンティア推進事業の成果の上に、本プロジェクトでは視覚系の学習を中心に解析を進めてきたので、その中から主要な点を述べたい。

（1）LED・光ファイバーおよびディスプレイ利用の新アッセイ系の開発

堀らの固定バチでの視覚学習系の成功は画期的な成果ではあるものの、その学習率は 30～40%と低かった。そこで嗅覚学習で高い学習率を得ている Ichikawa and Sasaki (2003) による蜜胃内の蜜を人為的に吐かせて糖に対する要求度を高めるとともに斉一化する方法を導入し、視覚学習系でも高く、かつ安定した学習率を得られる方法を確立した。その上で、左右の複眼に独立的にトレーニングができる新規な解析法として、LED の光源と光ファイバーを組み合わせた照射（条件刺激）法を開発した（図 1）。

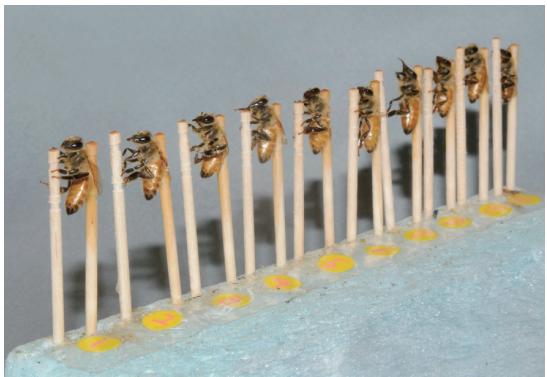
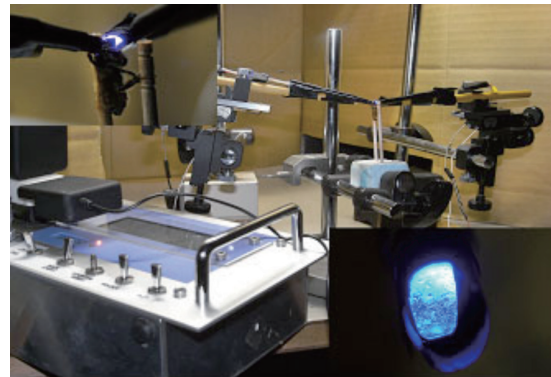


図 1 左：LED と光ファイバーを組み合わせた条件付けの装置一式。左手前は照射秒数をコントロールする小型コンピュータ 写真左の右下はミツバチの複眼に当てる照射装置の先端部分／右：写真右は条件付けの順番を待つ固定された働きバチたち

さらに、今後より複雑な課題を提示することを想定し、コンピュータのディスプレイの前にハチを固定し、ハチがディスプレイ上に示される色や形、あるいは動きなどを学習させられないかを検討した。その結果、普通に普及している液晶型のディスプレイでも、バックライトや時間解像度の問題はあるものの、色や動きを学習させられることが明らかになった（図2）。



図2 コンピュータのモニタの前で画面をみている形の働きバチ

（2）条件刺激の光強度と学習との関係

視覚学習において、条件刺激として与える光の強度と学習との関係はこれまで報告されていないことから、波長 470 nm の青色 LED 光を光源とし、学習が可能な低限光強度を求めた。その際照射光は、積分球の原理を使ってアルミ薄で作った半球型のドーム内で反射させ、ハチの両複眼に万遍なく照射されるようにした。

光強度を減少させるには、ND フィルターあるいは ND フィルム（1/10 あるいは 1/100）を使用し、遮光無しから 1/100,000 までのレンジとした。

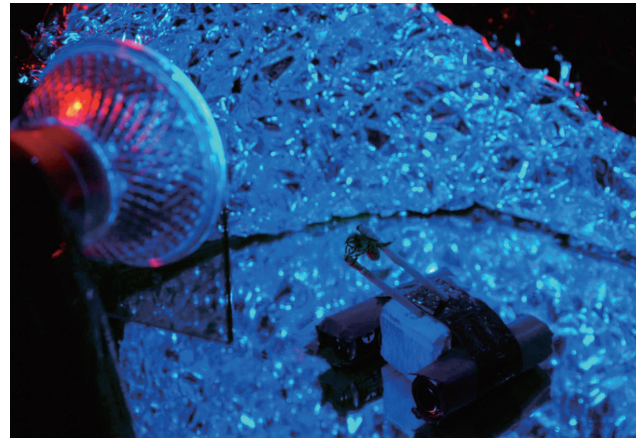


図3A 光強度と連合学習率の関係を調べた実験の様子

結果は図3A-Cのとおりで、1/1000 までは学習率の低下は見られず、1/10,000 で 50% まで低下し、1/100,000 では 7% と大きく低下した。エネルギーレベルでいえば低限強度は $0.05 \sim 0.005 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ であった。

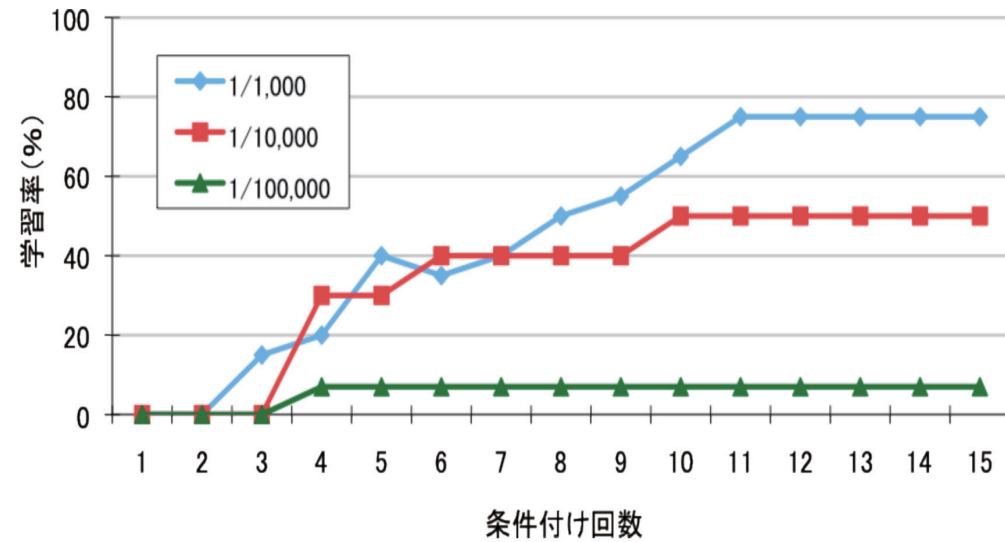


図3B 光強度 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000 での学習率

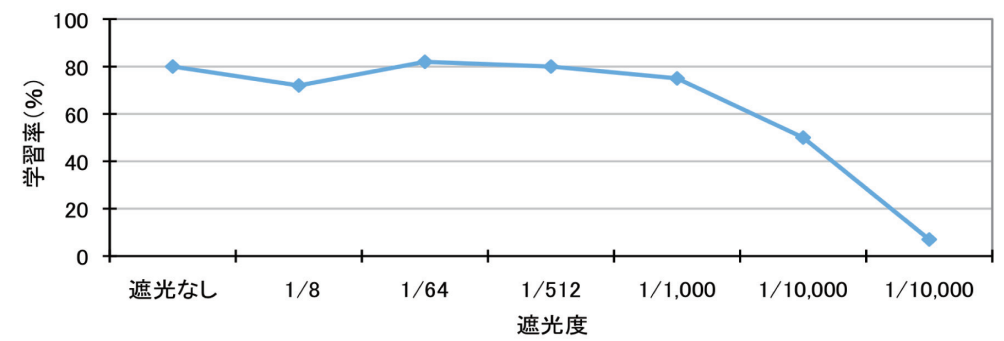


図3C 波長 430nm の青色 LED を光源とした場合の光強度と学習率の関係
低限強度は $0.05 \sim 0.005 \mu\text{W}/\text{cm}^2$

（3）LED 光の学習を利用した色覚の解析

ミツバチの色覚については、電気生理学的な知見はかなりのもの（Autrum 1959, Menzel et al. 1986）、行動学的にはいまだ詳しく解析されていない。そこで近年急速に発達し、事実上全ての波長が揃うといってもよい LED を光源として解析を行った。375 (UV)、430 (青)、525 (黄)、600nm (橙～赤) の 4 波長を選び、それぞれを条件づけ（学習）させた後、4 波長の光すべてを提示した場合の反応（学習）の有無、あるいは程度を調べた。その結果、375, 430nm で条件づけた個体ではテストでそれぞれ 375, 430nm のみに反応し、それ以外の波長にはまったく反応しなかった。しかし 525, 600nm の長波長側で条件づけした個体では、それぞれ 525, 600nm に反応したのに加え、さらに長波長側の

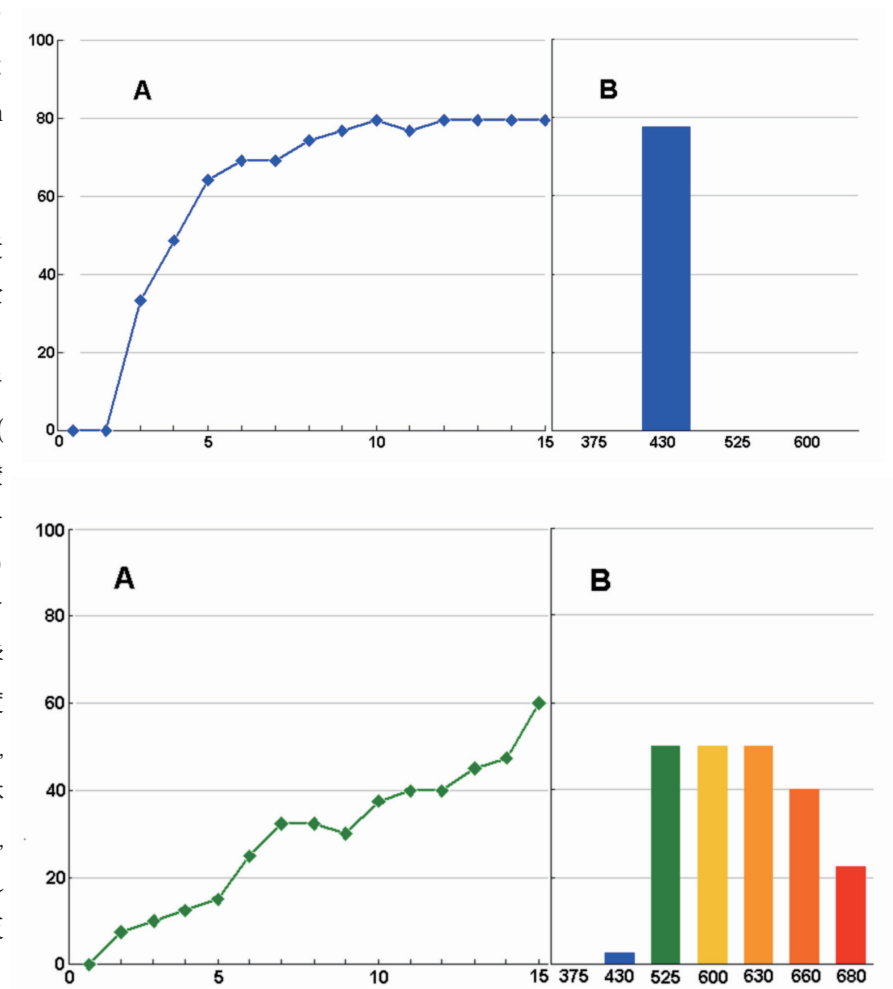


図4 波長 430nm と（上）および 525nm （下）で条件付けした場合の学習曲線と学習後に各波長の光を照射した場合の応答率（右）

630,660,680nm にも反応した (図 4)。これはミツバチが、少なくとも短波長で行った場合、緑から赤にかけての広い波長域に渡って色の識別ができないことを示唆している。

この識別能の解釈として、受容波長域を異にする 3 種の受容細胞 (S,M,L) に対し、2 種以上の細胞が興奮すれば、その興奮度の違い (組み合わせ) により異なる色として識別できるが、1 個の受容細胞しか興奮しない場合には、入力する波長が異なってもこれらを識別できないと仮定すると説明がつくと考えられる (図 5)。一方前述の実験結果からだけでは、黄色の花や橙色の花は、2 種の花色の間だけでなく、緑の葉との区別もついていないことになりかねない。しかし現実には、ミツバチは黄色いアブラナの花やキバナコスモスの橙色の花を好んで訪れ、葉と混同しているようには見えない。自然界の花は、LED のように自身で発光しているわけではなく、太陽からの放射スペクトルを反射して自分たちの色を表現しているわけで、たとえば UV を反射する色素を花弁に配することで、ヒトには同じ色に見えても、ハチには別の色に見えている可能性が高い。

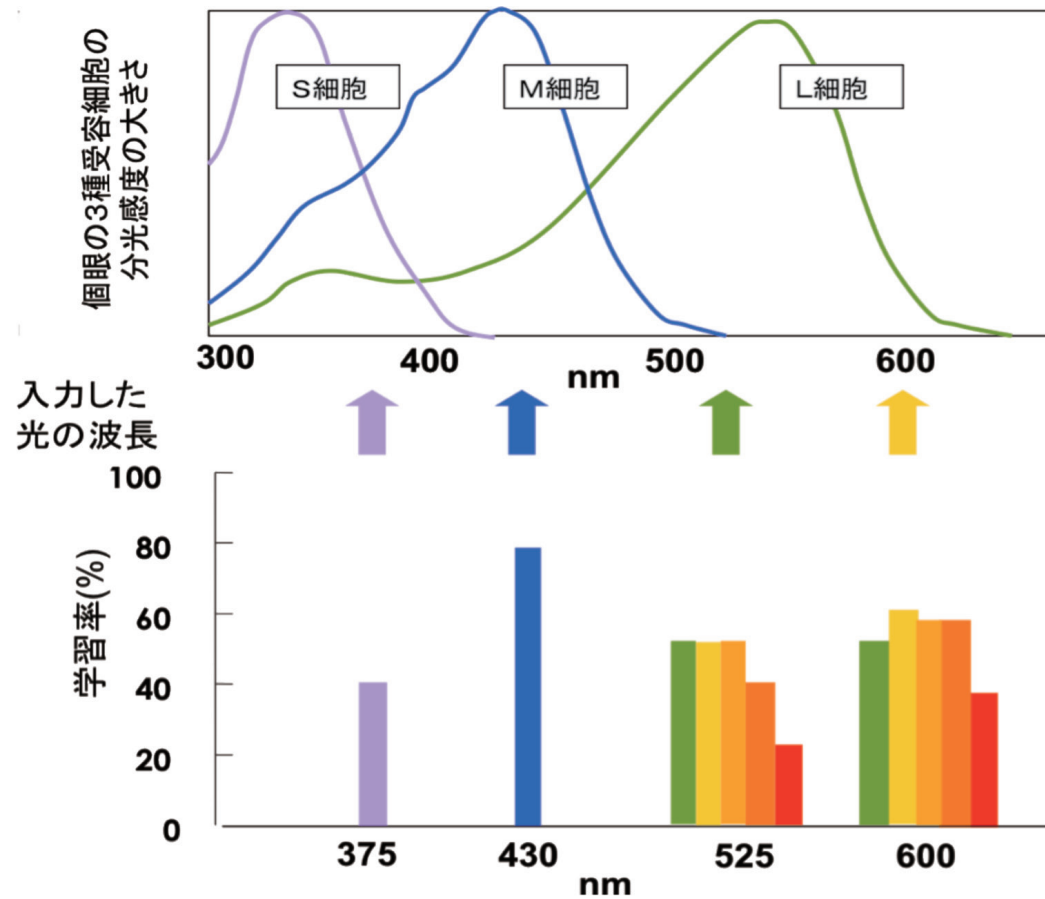


図 5 ミツバチの複眼に存在する 3 種の視細胞の分光感度 (上) と 4 種波長の光で条件付け (学習) したハチの各波長に対する応答を比較したもの 説明は本文参照

(4) 光ファイバー利用アッセイ系による脳の左右性の解析

最近嗅覚学習に続いて視覚学習でも、右で学習させた方が左で学習させるより学習率が高いとの結果が報告されている (Letzkus et al. 2008)。しかし Letzkus らの方法では光を当てない側の眼をペイントで遮光処理をしてしまっているため、学習成立後に左右の眼に任意に光を当てての解析が出来ていない。そこで今回開発した光ファイバーを利用し左右の眼に限定して光刺激 (青色 LED: 430nm) を与えられるアッセイ系での左右性の解析を行った。

その結果、最終回とした 15 回目の条件付け時の学習率が、右眼で 81%、左目では 60% (両目では 82%) となり、有意 ($p < 0.05$) に右眼の方が学習率が高かった。1 時間後のテストでは、右眼で条件付けした個体は右眼で有意に反応し、左で条件付けした個体は左で有意に反応した (ともに $p < 0.01$) (図 6)。

次に、同じ青色 LED の刺激で、右が点灯した場合は報酬 (1.5M ショ糖溶液)、左の場合は罰 (1M 食塩水) とし、右と左をそれぞれ報酬と罰に関連づけて学習できるか否かを調べたところ、これらに関連づけて覚えらることも確認できた (最終回とした 20 回目の条件付け時で、それぞれ 42% および 0%)。ただし学習後、両目に同時に青色を見せたところ、識別学習が成立していた個体のうち 40% のものは反応してしまった。

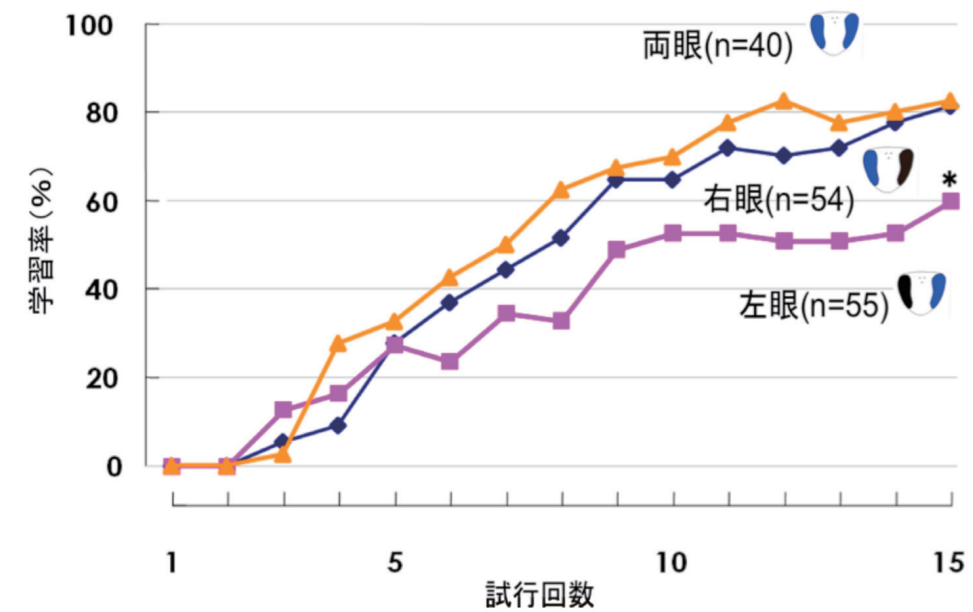


図 6 右眼と左眼で条件付けした場合の学習率の違い (*: $p < 0.05$)

さらに右眼と左眼に与える光刺激の波長を変え、右を青、左を黄の特定の組み合わせの場合のみに報酬を与える条件付けを試みたところ (刺激を与える順序はランダムになるようにし、規則性を覚える可能性は排除した)、こうした左右と色の特定の組み合わせでも学習できることが判明した。

たとえば、同じ青と黄の組み合わせでも、その左右を条件付け時と反対にしたテストでは、これに反応してしまう個体はいなかった。

これらの結果から、ミツバチが左右の視覚系から入力される情報を区別して扱える能力を有していることは証明できたと思われる。しかしこれをもって右と左を概念認識として処理しているかについては、これらの実験からだけでは確証したことにはならない。それには、前述のディスプレイを使ったさらなる解析が有効に使えるものと期待される。

②最適採餌戦略としてのダンス言語と経験を積むことによる行動の可塑的变化

ミツバチは、採餌に出るときに少量のハチミツを飲んで巣を離れる。我々はこのことに注目し、ミツバチがどのように自分自身の記憶や巣仲間が学習した餌場情報を利用し、いかに効率的に採餌を行っているのかについて解析を進めた。

採餌蜂が出巣時に蜜胃に入れる蜜を「出巣時積載蜜」と呼ぶことにする（図7）。飛行等に必要なエネルギーはこの蜜を消費することで生産される。出巣時積載蜜は、多すぎれば体重増加から飛行のエネルギー効率を低下させてしまうが、少なすぎれば蜂は餌場に到着できない。しかし、出巣時積載蜜量にどのような調節がなされているかは、これまで解析例がない。

出巣時積載蜜量への餌場までの距離の影響を調べたところ、ミツバチは遠い餌場に向かって出巣するときほど、多量の蜜を積載していることが明らかになった（順位相関係数 $\rho = 0.72$; Harano et al. 2013）。また、巣仲間からダンス言語によって伝達された餌場位置情報をもとに採餌を始める蜂（ダンス追従蜂）は、すでに餌場を利用している蜂よりも有意に多い蜜を積載して出巣し、採餌経験を積むにしたがってこれを減少させていることもわかった（図8）。ダンス言語は、餌場のおおまかな位置のみを伝えるため、この情報をもとに餌場を捜す蜂は、餌場に到達できないこともある。ダンス追従蜂は、そういった状況（餌場で蜜を補給することができない）でも帰巣できるよう蜜を多めに持っているのである。また、採餌経験を重ねることに

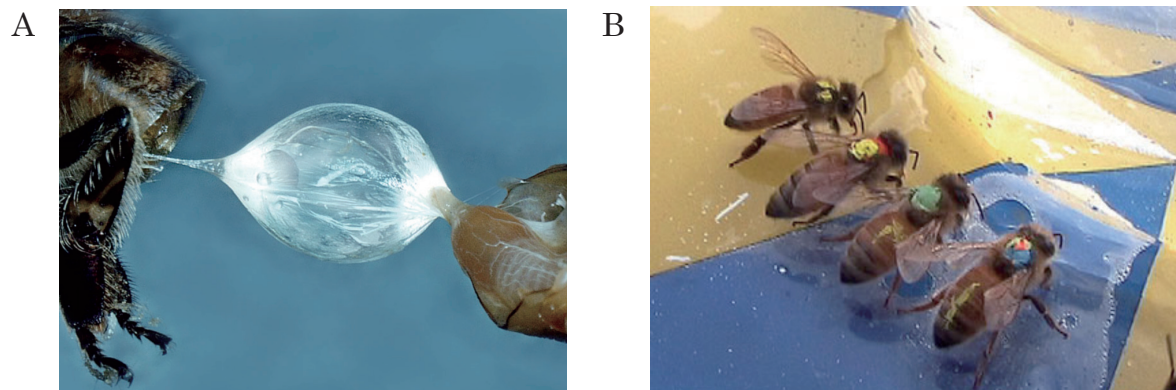


図7 A. ミツバチの蜜胃、食道の一部が伸縮自在の袋状になったもので、最大自身の体重の半分量の蜜を保持できる
B. 人工の餌場に通ってきたミツバチを個体識別するためにマークしたところ

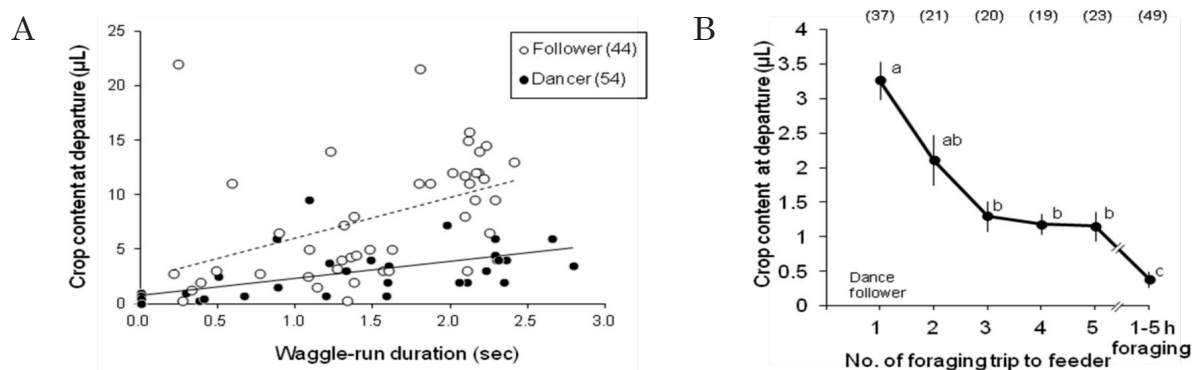


図8 A. ダンス追従バチ (Follower) とダンスバチ (Dancer) が出巣時にもっていく燃料蜜の量の違い
尻振り走行時間 (Waggle-run duration) は、ダンス中に暗号化された餌場までの距離を示す
B. 採餌経験による出巣時積載蜜量の減少（どちらの図も Harano et al. 2013）

よって、餌場の詳しい位置情報を獲得するだけではなく、餌場の資源供給の安定性をモニターしており、安定的に蜜が採餌できるときには、さらに出巣時積載蜜量を減少させるとの結果も得ている。

一方、ミツバチは蜜に加えて、花粉も採餌する。花粉を採餌している蜂の出巣時積載蜜量を解析したところ、蜜採餌の場合とは異なる結果を得た。この場合、蜜採餌時に比べ、出巣時積載蜜量が有意に多く、採餌経験を積んでも減少しなかった。ミツバチは、花粉を蜜と一緒に練り合わせ、後肢に団子状にまとめて巣へ持ち帰る。この「つなぎ」として用いられる蜜の少なくとも一部が、巣から持ち出されているために、出巣時積載蜜量が蜜採餌の場合と比べ多くなっていることを、人工餌場で代用花粉を採餌させる実験（図9）と、野外採餌時の解析から確認した（図10）。さらに、持ち帰る花粉の量に応じて、巣から持ち出すつなぎ蜜の量を調節していることも明らかにした（図11）。

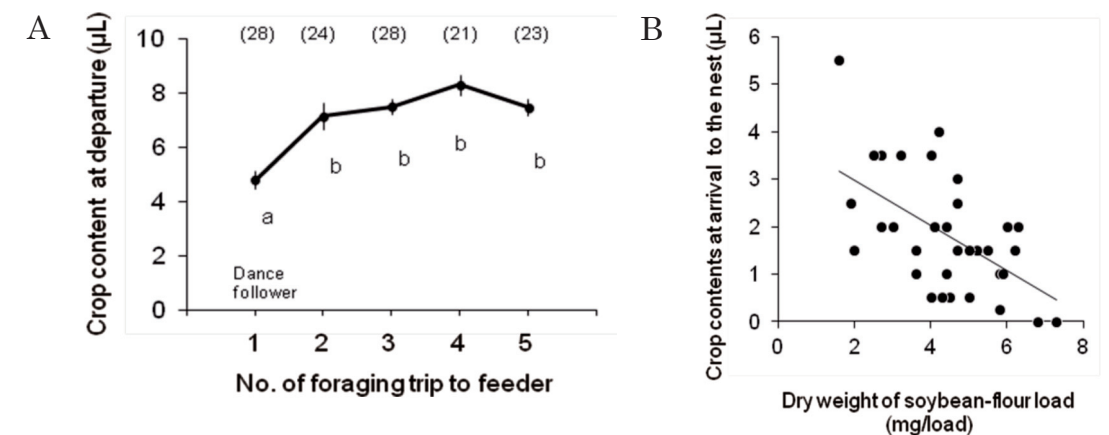


図9 A. 代用花粉採餌時の採餌経験による出巣時積載蜜量の変化。花蜜採餌時と異なり、経験を積むと、積載蜜量が増加する
B. 代用花粉 (Soybean flour) を採餌した蜂の採餌量と帰巣時の残存蜜量の関係。多くの代用花粉を持ち帰ると残存蜜量が減少していることから、蜜胃中の蜜をつなぎとして使っていることが示された
(どちらの図も Harano et al. 2013)

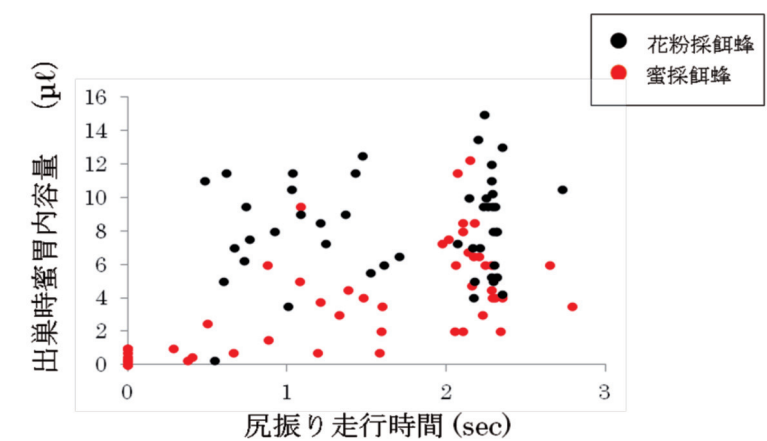


図10 花蜜採餌ダンス蜂と花粉採餌ダンス蜂の出巣時積載蜜量の比較
花粉採餌蜂は燃料となる蜜に加えつなぎ蜜を巣から持ち出しているため、花粉採餌蜂よりも多くの蜜胃内容量が見られる

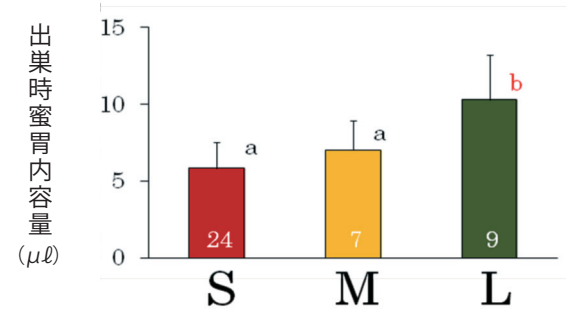


図 11 持ち帰った花粉ダンゴの大きさと出巣時積載蜜量の関係
花粉採餌蜂は、持ち帰った花粉団子の大きさに応じて次の出巣時に積載する蜜量を調節している。
花粉団子サイズ：S < M < L。コロニーの南約 2 キロの地点の花粉源植物で採餌している蜂のデータ

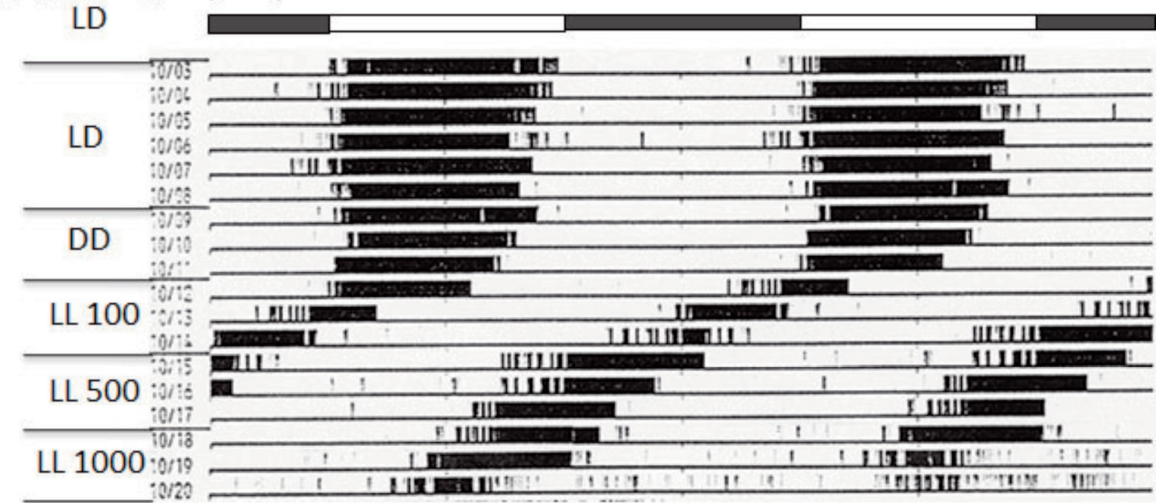
花粉採餌蜂に関する発見でとくに興味深いのは、正確な餌場位置に関する情報を持たないために長時間の探索飛行を迫られるはずの追従蜂も、出巣時積載蜜量を増加させていない、ということである。我々は採餌に失敗した追従蜂に残存している蜜量を調べることで、この謎についても答えることができた。花粉ダンゴを作るのに必要とされるつなぎ蜜量は、約 $7 \mu l$ と推定されるが、採餌に失敗した追従蜂は持ち出した蜜をほとんど使い切っているか、多くても $5 \mu l$ ほどしか残していなかった。これは、餌場を発見できなかった追従蜂が、つなぎ蜜として持ち出した蜜を燃料として消費したことを示唆している。花粉採餌の場合には、追従蜂も多く蜜をつなぎとして持っているため、餌場探索用の蜜を追加で持ちだす必要がないのである。

これらの結果は、ダンス言語の情報を読み取った蜂が、距離情報や採餌すべきもの（蜜か花粉か）を認識している事実、それらに基づき、蜂が「先」の行動を予測してそれに備える行動を取っていることを初めて明示したものである。また本解析によって、餌場に関しての情報量が不足している時には、採餌効率を犠牲にして採餌失敗のリスクを減らすような採餌戦略をミツバチが持つことを明らかにし、動物の採餌行動全般に対して新しい視点を提供することができた (Harano et al. 2013)。

③マルハナバチの生体リズムの可塑的発現に関する解析

我々はこれまでミツバチのサーカディアンリズムが、育児期には発現せず、加齢に伴って顕在化すること、リズムに社会的な同調が見られることを明らかにしてきた (Sasaki 1990,1992, 佐々木 2005)。ミツバチが南方起源であるのに対し、マルハナバチは、同じミツバチ科の社会性昆虫でありながら北方系で、その分布の北限は極地にも及んでいる。我々はこれまで、このマルハナバチが一定以上の光強度の恒明条件下で、外見上リズムを無くし、長い場合は 1 ヶ月にもわたって「のべつまくなし」に活動を続けることを見だし、これが複眼に光が当たっていることによりリズムがマスクされるためであろうことを明らかにした (図 12)、この特異な現象が北緯 66 度以北の北極圏でみられる白夜への適応ではないかと考え、北緯 69.4 度にある世界最北のトロムソ大学の協力を得て現実の白夜環境下でこの「のべつまくなし」行動を確認した。さらに、時計遺伝子を代表する period 遺伝子の発現状態を恒明下でモニターすることで、外見上の行動リズムのみがマスクされて発現しないことを確かめた (投稿準備中)。

ウスリーマルハナバチ



オオマルハナバチ



図 12 北方系マルハナバチで強光下にリズムのマスクングが起こることを示すアクトグラム
上：温帯系のウスリーマルハナバチの場合／下：北方系のオオマルハナバチ
いずれの場合も LD 下では昼行性の明瞭なリズムを示しているが、500 ~ 1000lx の照明下では、オオマルハナバチでリズムがマスクされ、のべつまくなし型の活動となっている。ここでは詳細は示さないが、照明下にもリズムが振動を続けていることは、行動反応、時計遺伝子の発現の解析から明らかとなっている

④社会性ハチ類が示す行動可塑性の化学生態学的解析

ニホンミツバチは、捕食性の天敵であるオオスズメバチの攻撃を受けると、多数の働きバチがスズメバチを包み込んで発熱して熱殺（熱殺蜂球：図13）するという特異な防衛行動を発現する。この行動自体は1995年に発見されたものであるが（Ono et al. 1995）、その高度な社会行動の成因の詳細は不明のままであった。本研究プロジェクトにより、この防衛行動は、ニホンミツバチの働きバチがオオスズメバチの発する化学物質を受信すると体温が上昇し（図14）、その後にミツバチ自身の警報フェロモンを受信することで誘発されることを明らかにした（学会発表：小野ら 2011）。本事業支援により導入された昆虫触角電位増幅システム付キャピラリーガスクロマトグラフ（GC/EAD）により、ニホンミツバチの触角にオオスズメバチの体臭成分の1つである 1-Methylbutyl-3-methylbutanoate（R体）に対する電位反応を確認した（図15）。熱殺蜂球の行動は、秋にスズメバチの捕食を受けると素早く発現するものの、春のスズメバチの出現前には発現せず、行動を誘導する記憶・学習に関連づけられる外的刺激が必要であることが追認できた。また、本事業支援により導入された昆虫触角電位増幅システム付キャピラリーガスクロマトグラフ（GC/EAD）を利用した解析でも、熱殺蜂球の形成にはオオスズメバチにかみ殺されたニホンミツバチが発する警報フェロモンが関与していることが示され、野外での行動レベルでの生物検定の結果を受容器の応答性においても確認することができた（学会発表：歌川、小野 2013）。セイヨウミツバチには、このオオスズメバチの体臭成分に対する反応は認められず、捕食を受けても熱殺蜂球形成は起きなかった。東京大学大学院理学系研究科との共同研究により、熱殺蜂球を形成しているワーカーの脳内のキノコ体（クラスIIケニオン細胞）に初期応答遺伝子（Acks）を認め、それを神経活動の指標として、脳が高温情報処理に関与していることの可能性を示した。この仕組みにより、熱殺蜂球内の温度が、スズメバチの上限致死温度である45℃を上回り、ニホンミツバチの上限致死温度（50℃）を超えない範囲に制御されている事が強く示唆された（Ugajin et al. 2012）。

さらに、キイロスズメバチは、オオスズメバチ由来の化学物質を受信すると、血縁関係の無いコロニー間で共同防衛行動をとることを明らかにした（学会発表：村本、小野 2010）。また、スズメバチの警報フェロモンによる集団防衛、スズメバチやマルハナバチの社会寄生に関わる情報化学物質（学会発表：松山、小野、2012）、嗅覚情報と報酬の連合学習によるマルハナバチやミツバチの訪花行動が亢進（学会発表：宮本ら 2010）、植食性昆虫に被害を受けたウンシュウミカンの葉からのHIPVの発散（学会発表：小山、小野、2014）、キアシナガバチの嗅覚による天敵スズメバチ種の識別のメカニズム（学会発表：本田、小野、2014）などを明らかにした。



図13 ニホンミツバチのオオスズメバチに対する熱殺蜂球
（右：サーモグラフィーにより発熱を可視化）



図14 オオスズメバチの体臭成分をろ紙ディスクに塗布してニホンミツバチの巣箱前に提示
（左：匂いを感知して動きまわる門番蜂／右：匂い刺激だけで胸部の温度が上昇）

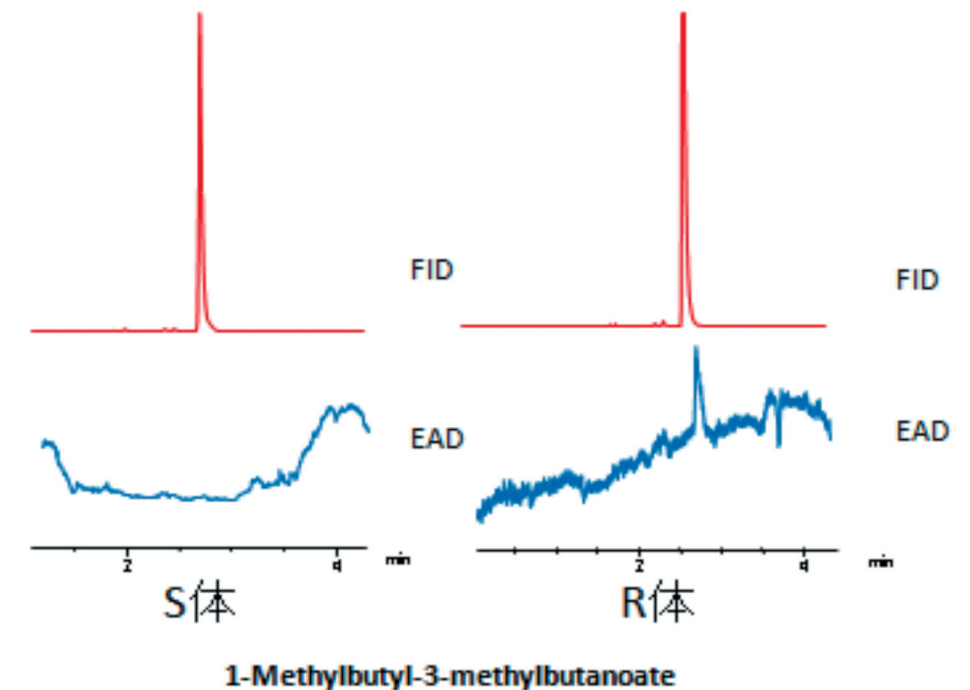


図15 オオスズメバチの体臭および毒液に含まれる揮発成分（1-Methylbutyl-3-methylbutanoate）に対するニホンミツバチ（働き蜂）の触角応答

業績一覧

雑誌論文

Kubo R. and Ono M. (2014) Innate attractant for long-tongued bumblebee, *Bombus diversus diversus* in floral scent of bumblebee-pollinated epiparasitic plant, *Monotropastrum humile* (Ericaceae). Entomological Science In Press (査読有)

Harano K., Mitsuhata-Asai A., Konishi T., Suzuki T. and Sasaki M. (2013) Honey bee foragers adjust crop contents before leaving the hive: effects of distance to food source, food type, and informational state. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67, 1169-1178 (査読有)

吉垣茂、駒形由佳里、中村純、内田治、長島俊夫、安藤達彦 (2013) ハチミツの花粉分析と微量元素分析による種類の判別. 日本健康医学会雑誌 21: 277-282. (査読和文)

山村聖、佐々木正己 (2012) 北海道東部産マ加里キンウワバにおける人工飼育を用いた幼虫生態に関する知見. 蛾類通信 263:326-331.

Shimomura K., Sugiyama Y., Nakamura J., Ahn M. R. and Kumazawa, S. (2012) Component analysis of propolis collected on Jeju Island, Korea, *Phytochemistry* 93, 222-229. (査読有)

Shimomura K., Inui S., Sugiyama Y., Kurosawa M., Nakamura J., Choi S. J., Ahn M. R. and Kumazawa, S. (2012) Identification of the plant origin of propolis from Jeju island, Korea, by observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (11), 2135-2138. (査読有)

Ugajin A., Kiya T., Kunieda T., Ono

M., Yoshida T. and Kubo T. (2012) Detection of neural activity in the brains of Japanese honeybee workers during the formation of a "hot defensive bee ball" *PLoS ONE* 7: e32902. (査読有)

小野正人 (2012) 天敵オオスズメバチを熱殺蜂球で蒸し殺すニホンミツバチ、昆虫と自然 47(10)、30 – 35. Yamasaki, K., Takahashi J., Ono M. and Tsuchida K. (2011) Reproductivity of early males of temperate paper wasp *Polistes rothneyi iwatai*, *Entomological Science*, 14, 383-386 (査読有)

久保良平、小野正人 (2011) 送粉共生系における香りの機能―特に真社会性ハチ類との係わりについて. 植物の生長調節 46(1): 51-57.

山村聖、國府祐美子、佐々木正己 (2011) 日本産タンポキンウワバにおける幼生期の生態・形態に関する知見 ―光周誘導される幼虫休眠および潜在的な年2化性についての考察― 蛾類通信 259: 213-223.

Kubo R. and Ono M. (2010) Comparative analysis of volatile components from labial glands of male Japanese bumblebees (*Bombus* spp.). Entomological Science 13(2): 167-173. (査読有)

小野正人 (2010) ハチ・ハチ毒：スズメバチ類の行動と生態―複雑な社会生活と刺針行動を誘起する諸要因について. 公衆衛生 74 (5): 367-372.

久保良平、小野正人 (2010) 真社会性ハチ類の情報源としての花香成分. 昆虫と自然 45: 12-15.

中村純 (2010) ハチミツの真正評価とその問題点. ミツバチ科学 27(3/4):133-140.

熊澤茂則、中村純、太田敏郎、矢崎一史、宮城健、福本修一 (2010) 沖縄産プロポリスの起源植物. 化学と生物 48(1): 35-42.

中村純 (2010) 養蜂分野における国際協力―ネパールを事例に―. 畜産の研究 64(1): 123-130.

Koyama, S., Takagi T., Martin S. J., Yoshida T. and Takahashi J. (2009) Absence of reproductive conflict during queen rearing in *Apis cerana*. Insect Soc. 56: 171-175. (査読有)

宮本雅章、久保良平、小野正人、佐々木正己、剣持伊佐男 (2009) ミツバチを利用した半促成ナスの着果促進技術体系の開発 III. ナス花香成分と餌の報酬による条件付けが訪花に及ぼす影響. 日本応用動物昆虫学会誌 53: 21-28. (査読有)

山村聖、佐々木正己 (2009) キンウワバ亜科の生態学 II. 亜高山性から山地性のキンウワバ6種、キシタギンウワバ、ケイギンモンウワバ、ムラサキキンウワバ、タンポキンウワバ、オオヒサゴキンウワバ、オオキンウワバの日周 95.

著書

小野正人 (2012) はちみつ (たべるのだいすき！食育えほん) チャイルド本社、監修

佐々木正己 (2011) ミツバチの脳が発達した要因、ヒトの場合との比較. In 「学習の生物学 (星元紀編)」国際高等研究所. pp.40-46. 分担執筆

中村純 (指導), 斎藤雅緒 (絵), 寺越慶司 (絵) (2011) はちみつ. キンダーブック「しぜん -4」. フレーベル館

佐々木正己 (2010) 「蜂からみた花の世界：四季の蜜源植物とミツバチからの贈り物」海游舎. 東京 413 pp. 単著

吉田忠晴 (2009) ミツバチの不足と日本農業のこれから. 飛鳥新社. 94 pp. 単著

佐々木正己 (2009) 「動物は何を考えているのか？ 学習と記憶の比較生物学」(曾我部正博編) 共立出版. pp.197-213. 分担執筆

中村純 (2009) 農村開発と養蜂. In 「開発途上国での養蜂振興と実務―アフリカを事例として― (社団法人国際農林業協働協会, 編)」. 社団法人国際農林業協働協会, 東京. pp.105-109. 分担執筆

中村純、藤善博人 (2009) 産業化と高品位生産. In 「開発途上国での養蜂振興と実務―アフリカを事例として― (社団法人国際農林業協働協会, 編)」. 社団法人国際農林業協働協会, 東京. pp.119-127. 分担執筆

中村純 (2009) 蜜源植物としてのニセアカシア, 養蜂業におけるニセアカシア林の利用の実態. In 「ニセアカシアの生態学. 外来樹の歴史・利用・生態とその管理(崎尾均, 編)」. 文一総合出版, 東京. pp.43-67 ; 69-80. 分担執筆

国際学会等

A) 個体レベルの生理・行動解析 Harano K., Konishi T., Susuki T., Asai A. and Sasaki M. (2012) Do honeybee foragers use dance information to determine the amount of fuel honey loaded at departure? 11th Asian Apicultural Association Conference (Sep.28 - Oct.2, Kuala Terengganu, Malaysia).

Kihara, Y. and Nakamura J. (2012) Non-heat stress induced water collection by honeybees. The 11th Asian Apicultural Association Conference (Sep. 28 - Oct. 2, Kuala Terengganu, Malaysia)

Ugajin A., Kiya T., Kunieda T.,

Ono M., Yoshida T. and Kubo T. (2012) Neural activity in the brains of the Japanese worker honeybees involved in a hot defensive bee ball reflects thermal stimuli processing. 10th International Congress of Neuroethology (ICN2012), PO219 (Aug. 5-10, Maryland University, USA)

Sasaki M., Hasegawa K. and Yamashita M. (2012) Flight performance of bumblebees under Mars' micro gravity (0.38G). 24th International Congress of Entomology (Aug. 19-25, Daegu, Korea)

Sasaki M. (2011) Current status of Japanese bee keeping and bee flora. Intetnational Symposium of Prospective strategy for the development of Insect Industry (Oct. 14, Yecheon, Korea)

Harano K, Sasaki K, Nagao T, Sasaki M and Tanaka S. 2010. Role of dopamine in reproduction of honeybee reproductives. Joint Tamagawa-Keio-Caltech Lecture Course on Neuroeconomics. Tokyo, Japan.

国内学会・研究会等

松山日名子、小野正人 (2014) 社会寄生がクロマルハナバチのコロニー発達へ及ぼす影響―実験室内での検証. 日本応用動物昆虫学会第 58 回大会 (3 月 27-29 日、高知大学、高知市)

小山理絵、小野正人 (2014) ナミアゲハ幼虫に食害されたウンシュウミカンの葉から発散する揮発性物質―天敵誘引の可能性. 日本応用動物昆虫学会第58回大会(3月27-29日、高知大学、高知市)

本田真士、小野正人 (2014) キアシナガバチのスズメバチ類に対するコロニーレベルでの防衛行動. 日本応用動物昆虫学会第 58 回大会 (3

月 27-29 日、高知大学、高知市)

林雅貴、小野正人、原野健一 (2014) セイヨウミツバチの採餌蜂は花粉の特性を学習して出巢蜜量を変化させる. 日本応用動物昆虫学会第 58 回大会 (3 月 27-29 日、高知大学、高知市)

林雅貴、小野正人、原野健一 (2013) ミツバチにおいてダンス蜂の採餌量と餌場距離が追従蜂の採餌に及ぼす影響. 日本動物行動学会第 32 回大会 (11 月 29 日 – 12 月 1 日、広島大学、東広島市)

原野健一、高橋和万、佐々木正己 (2013) ミツバチの採餌蜂は不安定な蜜源に向かう時に多くの燃料蜜を持っていくか？日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (3 月 27-29 日、日本大学、藤沢市)

松香光夫、干場英弘、佐々木正己 (2013) ミツバチ科学分野の構造と情報提供について. 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (3 月 27-29 日、日本大学、藤沢市)

中村純、楠岡友美、仲田諒、野村洋平、山崎栞 (2013) ミツバチの貯蔵行動の諸段階における糖度基準. 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (3 月 27-29 日、日本大学、藤沢市)

宇賀神篤、國枝武和、小野正人、久保健雄 (2013) 初期応答遺伝子を利用したニホンミツバチとセイヨウミツバチにおける高温曝露時のキノコ体神経活動の解析. 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (3 月 27-29 日、日本大学、藤沢市)

小山理絵、小野正人 (2013) ナミアゲハ幼虫に食害されたウンシュウミカンの葉から発散する揮発性物質. 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (3 月 27-29 日、日本大学、藤沢市)

久保良平、宮本雅章、佐々木正己、小野正人 (2013) ミツバチ不足に

対応するための養蜂技術と花粉交配利用技術の高度化ーその2ー人工花を用いた授粉昆虫の訪花促進システムと連合学習効果の検証。日本応用動物昆虫学会第57回大会（3月27-29日、日本大学、藤沢市）

宮本雅章、手塚俊行、田中栄嗣、佐々木正己、小野正人、久保良平、村井保（2013）ミツバチ不足に対応するための養蜂技術と花粉交配利用技術の高度化ーその3ー訪花促進・給餌装置の開発と実証。日本応用動物昆虫学会第57回大会（3月27-29日、日本大学、藤沢市）

歌川智士、小野正人（2013）ニホンミツバチにおける熱殺蜂球形成の成因とそれに参加するワーカーの日齢。日本応用動物昆虫学会第57回大会（3月27-29日、日本大学、藤沢市）

松山日名子、小野正人（2013）マルハナバチ属における巣の乗っ取りと引き継ぎの起こる要因について。日本応用動物昆虫学会第57回大会（3月27-29日、日本大学、藤沢市）

Harano K., Konishi T., Susuki T., Asai A. and Sasaki M. 2013. How much do honeybees carry for foraging?: complicated and fine regulation. 日本生理生化学会第35回大会（7月13-15日、イーグレ姫路、姫路市）

原野健一、小西崇之、佐々木正己 2012. ミツバチの花粉採餌蜂はどのように出巢時積載蜜量を決定しているか？ 日本応用動物昆虫学会第56回大会。（3月27-29日、奈良県新公会堂、奈良市）

佐々木正己、長谷川克也、山下雅道（2012）火星の重力場（0.38G）におけるマルハナバチの飛行可能性. 第72回日本昆虫学会大会（9月16-17日、玉川大学、町田市）

原野健一、佐々木正己（2012）ミ

ツバチ花粉採集蜂における出巢時積載蜜量と花粉団子サイズの関係。日本昆虫学会第72回大会。（9月16-17日、玉川大学、町田市）

下田和秀、佐々木正己、中村純（2012）ハウス内作物の資源量が交配用ミツバチの花粉採餌成果に与える影響。日本昆虫学会第72回大会。（9月16-17日、玉川大学、町田市）

久保良平、宮本雅章、佐々木正己、小野正人（2012）ミツバチ不足に対応するための養蜂技術と花粉交配利用技術の高度化 - 施設内における人工花を用いた授粉昆虫の訪花促進システムの効果検証。日本昆虫学会第72回大会。（9月16-17日、玉川大学、町田市）

牧野孝洋、小野正人（2012）キアシナガバチのアリ避け物質によるコロニー防衛。日本昆虫学会第72回大会。（9月16-17日、玉川大学、町田市）

宇賀神篤、木矢剛智、國枝武和、小野正人、吉田忠晴、久保健雄（2012）熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ脳内の神経興奮は高温情報処理を反映する。日本昆虫学会第72回大会。（9月16-17日、玉川大学、町田市）

松山日名子、小野正人（2012）同所的に生息する日本在来種マルハナバチにおける相互作用。日本昆虫学会第72回大会。（9月16-17日、玉川大学、町田市）

中村純（2012）みんながよく知っている昆虫ミツバチは本当によく知られているか。日本昆虫学会第72回大会 大会主催シンポジウム（2012年9月16日、玉川大学、町田市）

久保良平、宮本雅章、佐々木正己、小野正人（2012）ミツバチ不足に対応するための養蜂技術と花粉交配利用技術の高度化ーその2ー人工花の作製に有効な花香成分の選定とそ

れを用いた授粉昆虫の訪花誘導。日本応用動物昆虫学会第56回大会（3月27-29日、近畿大学、奈良市）

宮本雅章、久保良平、佐々木正己、小野正人（2012）ミツバチ不足に対応するための養蜂技術と花粉交配利用技術の高度化ーその3ー人工花を用いた授粉昆虫の訪花促進システムの効果検証ー。日本応用動物昆虫学会第56回大会（3月27-29日、近畿大学、奈良市）

宇賀神篤、木矢剛智、國枝武和、小野正人、吉田忠晴、久保健雄（2012）熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ働き蜂の脳の神経興奮は高温情報処理を反映する。日本応用動物昆虫学会第56回大会（3月27-29日、近畿大学、奈良市）

松山日名子、小野正人（2012）日本在来種クロマルハナバチとオオマルハナバチの相互作用。日本応用動物昆虫学会第56回大会（3月27-29日、近畿大学、奈良市）

原野健一、佐々木正己（2011）ミツバチの出巢時積載蜜量は調節されているか？：野外採餌の場合。日本動物行動学会第30回大会（9月8-11日、慶応義塾大学、港区）

小野正人、熊田友弥、田中勇史（2011）ニホンミツバチの“発熱蜂球”による対スズメバチ防衛戦略ー蜂球形成のリリーサーとなる化学的要因。日本応用動物昆虫学会第55回大会（3月27-29日、九州大学、福岡市）

久保良平、小野正人（2011）腐生植物ギンリョウソウの花香に対するトラマルハナバチの触角応答。日本応用動物昆虫学会第55回大会（3月27-29日、九州大学、福岡市）

宇賀神篤、木矢剛智、國枝武和、小野正人、吉田忠晴、久保健雄（2011）ニホンミツバチ脳における熱殺蜂球形成行動時の興奮領域の解析。日本

応用動物昆虫学会第55回大会（3月27-29日、九州大学、福岡市）

松山日名子、小野正人（2011）社会寄生種チャイロスズメバチと2種ホストとの警報フェロモン成分とその認識に関する研究。日本応用動物昆虫学会第55回大会（3月27-29日、九州大学、福岡市）

木原佑輔、黒澤美穂、中村純（2011）ミツバチコロニーの採餌行動解析に基づく周辺資源環境の評価。日本応用動物昆虫学会第55回大会（3月27-29日、九州大学、福岡市）

仲田諒、中村純（2011）ミツバチは花蜜の糖組成を認識して貯蜜への酵素添加行動を調節するのか。日本応用動物昆虫学会第55回大会（3月27-29日、九州大学、福岡市）

原野健一、小西崇之、鈴木崇、佐々木正己（2010）ミツバチにおける採餌物および採餌経験の「燃料蜜」積載量への影響。日本動物行動学会第29回大会（11月19-21、沖縄県男女共同参画センター、那覇市）

宮本雅章、金井幸男、久保良平、佐々木正己、小野正人（2010）ミツバチを利用した半促成ナスの着果技術の開発（第4報）花香成分の学習と花の認識。日本応用動物昆虫学会大会第54回大会（3月26-28日、千葉大学、千葉市）

村本翔平、小野正人（2010）キイロスズメバチのスーパーコロニーとその適応的意義。日本応用動物昆虫学会第54回大会（3月26-28日、千葉大学、千葉市）

吉田忠晴、西谷慶太（2010）樹冠上部でのニホンミツバチ女王蜂と雄蜂の交尾行動。日本応用動物昆虫学会第54回大会（3月26-28日、千葉大学、千葉市）

木村澄、吉田忠晴（2009）セイヨウ

ミツバチとトウヨウミツバチ間における交雑可能性の検討とその評価法の確立。第1回新農業展開ゲノムプロジェクトシンポジウム（12月24日、農林水産省、千代田区）

吉田忠晴、坂元吉守（2009）ミツバチ蜂群に飛来するクロメンガタスズメは盗蜜を目的にしているのか。日本動物行動学会第28回大会（11月27-29日、筑波大学、つくば市）

吉田忠晴（2009）ニホンミツバチ、大都会に生きる。日本動物学会関東支部2009年公開講演会「東京に生きる動物たちに学ぶ」（7月18日、早稲田大学、新宿区）

中村純（2009）花粉交配用ミツバチ不足が私たちに伝えること。地力保全研究会第26回全国大会（基調講演）（6月16-17日、鬼怒川御苑、日光市）

遺伝子発現解析・分子生物学的解析



①ミツバチの脳における遺伝子発現解析

ミツバチは優れた学習能力を持ち、個体間で密接にコミュニケーションをとりながら、コロニー全体として極めて調和のとれた社会生活を営んでいる。働きバチが担当する労働は、齢差分業制になっており、羽化後の若い個体が幼虫への給仕（育児）などの巣内の仕事を担当し、老齢の個体が採餌を行う。採餌行動では好ましい蜜源場所をダンス言語で伝達しあうなど、ミツバチがもつ優れた情報処理能力が最大限に発揮される。採餌行動では巣内の仕事に比べ、高度な情報処理が要求されることに関連し、ミツバチの学習能力は成虫脱皮後の加齢に伴って発達する。ところが、成虫になったばかりの個体を巣から隔離して単独で飼育すると学習能力の発達が著しく阻害される。社会性昆虫の学習能力の発達に他個体からの何らかの刺激が重要な役割を果たしていることを示唆する興味深い観察である。

我々は私立大学学術フロンティア推進事業（平成 15~19 年度）において、ミツバチの学習能力の発達に関与する遺伝子を検索する目的で、通常のハチと隔離飼育したハチの脳内遺伝子発現をマイクロアレイ法で比較し（図 1）、隔離飼育により発現量が低下する遺伝子として、*slit homolog 1*, Major Royal Jelly Protein 1 遺伝子 (*mrjp1*) , Major Royal Jelly Protein 7 遺伝子 (*mrjp7*) などを同定した (Hojo et al. 2009)。Slit homolog 1 は軸索伸長の方向性を調節するガイダンス因子である Slit と低い相同性をもつ。Slit はミツバチ以外の昆虫類にも存在するが、Slit homolog 1 はミツバチ以外の昆虫では見つからない。また、MRJP 遺伝子もミツバチに固有な遺伝子群である。MRJP は女王バチや幼虫に与えられるローヤルゼリーに含まれる主要なタンパク質である。MRJPs は育児バチの下咽頭腺で発現することが知られているが、マイクロアレイの結果は MRJP1 と MRJP7 が脳でも発現していることを示唆するものである。

研究内容

ミツバチは高度な学習能力を持ち、複雑な社会行動を示す。2006 年にはゲノム情報が公開され、分子生物学の新興モデル生物としても注目されている。本研究課題ではミツバチの脳機能の分子基盤を明らかにすることを目的とし、脳内での遺伝子発現解析、遺伝子の機能解析に必要な方法論の開発、および遺伝子のエピジェネティックな転写調節の解析を計画・実施した。

担当研究者

①ミツバチの脳における遺伝子発現解析

佐々木哲彦（学術研究所）

佐々木正己（学術研究所）

②ミツバチへの遺伝子導入法の開発

佐々木哲彦（学術研究所）

中村純（学術研究所）

③ミツバチのエピジェネティクス

佐々木哲彦（学術研究所）

肥塚信也（農学研究科）

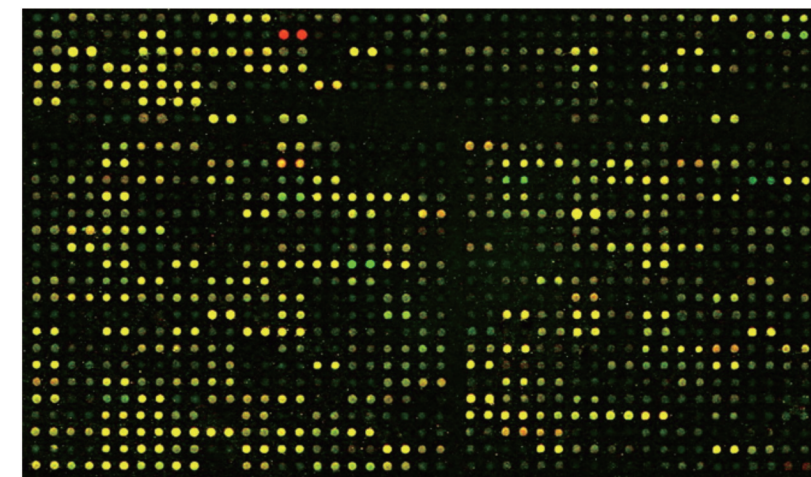


図 1 マイクロアレイ法によるミツバチ脳キノコ体の遺伝子発現解析
隔離飼育した働きバチの cDNA を Cy5(赤)、巣内で飼育した働きバチの cDNA を Cy3(緑) で標識した

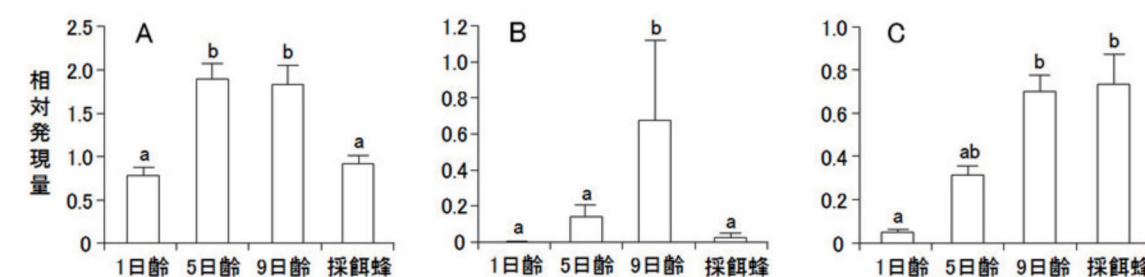


図 2 働きバチの脳内での *slit homolog 1* (A)、*mrjp 1* (B) および *mrjp 7* (C) の発現量
 β -actin に対する相対的な発現量を示す（平均値 \pm 標準偏差、N=5）

ここでは、*slit homolog 1*, *mrjp1* および *mrjp7* の発現を定量 PCR 法で解析し、学習との関連をさらに詳しく検討した (図 2)。まず、マイクロアレイ解析の結果を確認するために、巣内で育ったハチと隔離飼育した個体について 3 つの遺伝子の発現量を定量し、マイクロアレイでの解析と一致する結果を得た。次いで、働きバチの加齢に伴う発現の変化を調べたところ、*slit homolog 1* の発現量は羽化後上昇し、老齢の外勤バチでは低下した。発現量がピークとなる時期はミツバチの脳が構造的に発達する時期とよく一致しており、Slit homolog 1 もガイダンス因子としての機能をもつことが示唆された (Kagami et al. 2010)。*mrjp1* も *slit homolog 1* と似た発現パターンを示した (Hojo et al. 2010)。*mrjp7* は加齢にともない発現量が増加した。MRJP1 や MRJP7 が脳においてどのような機能を有するかは不明であるが、学習能力の発達や学習能力そのものに関与していると考えられる。ミツバチの MRJP 遺伝子群は、進化的には多くの昆虫に保存されている Yellow 遺伝子群の 1 つで *yellow-e3* から遺伝子重複により生じたと推定されている。ショウジョウバエでは、Yellow-e3 が脳の発達に関与することが示唆されており、ミツバチの MRJP が脳においても重要な機能をもつことは、分子進化的にも十分あり得ることである。*mrjps* はミツバチの社会性獲得にともなって多様化した遺伝子群であり、脳における機能を保持しながら、一方で幼虫や女王バチの餌としての栄養上の機能も担うようになったと推察される。

②ミツバチへの遺伝子導入法の開発

2006 年にミツバチのゲノムが解読されて以降、ミツバチの分子生物学的な研究は加速的に発展しつつある。しかし、トランスジェニック法など遺伝子機能を解析するための方法論はまだ十分には確立されていない。トランスジェニック・ミツバチを作出する 1 つのアプローチとして、昆虫ウイルスの感染力を利用して女王バチの卵巣に外来遺伝子を導入し、染色体 DNA と組み換えを起こさせる方法が考えられる。バキュロウイルスは自然界ではチョウ目の昆虫に感染する昆虫ウイルスであるが、他の昆虫細胞にも感染力をもち、多くの昆虫細胞への遺伝子導入ベクターとして利用されている。我々はトランスジェニック・ミツバチの作出にバキュロウイルスを利用できるかを検証するため、Green Fluorescent Protein (GFP) を発現するバキュロウイルスを調製し、女王バチへの感染力を検証した。

Cytomegalovirus immediate-early gene promoter の下流に、*Aequorea coerulescens* 由来の GFP gene (*AcGFP1*) と SV40 の poly(A) signal をつないだバキュロウイルスベクターを作製し、ヨトウガの一種 *Spodoptera frugiperda* の培養細胞でウイルス粒子を調製した。ウイルスを接種する女王バチは、孵化後 2 日以内の幼虫をプラスチック製の人工王台に移虫して巣内で養成し、蛹化後は実験室内で 34℃ のインキュベーターで飼育した。

女王バチの蛹期は約 5 日間で、蛹化後 2 日目の蛹の腹部に 1×10^5 または 1×10^6 IFU のウイルスを接種した。 1×10^6 IFU のウイルスを接種した蛹からは、翅の縮れた奇形の成虫しか羽化しなかったが、 1×10^5 IFU を接種した蛹からは少なくとも外部形態は正常な成虫が羽化し、腹部から GFP のシグナルが見られた (図 3)。GFP のシグナルは接種した腹部だけに局所的に存在し、シグナルの拡大は観察されなかった。このことは、接種したウイルスは女王バチの組織に感染するが、新しいウイルス粒子が生成して感染が拡大 (二次感染) することはないことを示唆している。成虫腹部を解剖して内部の感染状況を確認したところ、期待に反して、卵巣には感染が認められず、GFP のシグナルは脂肪体だけに限られていた (Ikeda et al. 2011)。現状においてはバキュロウイルスをミツバチのトランスジェニックに利用することは難しいと考えられるが、ウイルスが感染しても正常な成虫が羽化できるタイターが存在すること、ウイルスの二次感染による悪影響はないことなどから、ウイルスを改変して卵巣に感染できるようにすることで、トランスジェニックに利用できる

かもしれない。

バキュロウイルスベクターは卵巣には感染力を示さなかったが、脂肪体には感染することから、脂肪体への遺伝子導入や、脂肪体での 2 本鎖 RNA の発現による RNAi 法による遺伝子機能解析に利用できると考えられる。蛹期に導入した外来遺伝子が羽化後も発現することは、逆転写 PCR 法により確認した (図 4)。脂肪体で発現する遺伝子の中には、*vitellogenin* や insulin-like signaling pathway を構成する遺伝子など、働きバチと女王バチのカースト分化に関与する興味深い遺伝子が含まれており、これらの遺伝子の機能解析に応用されることが期待される。

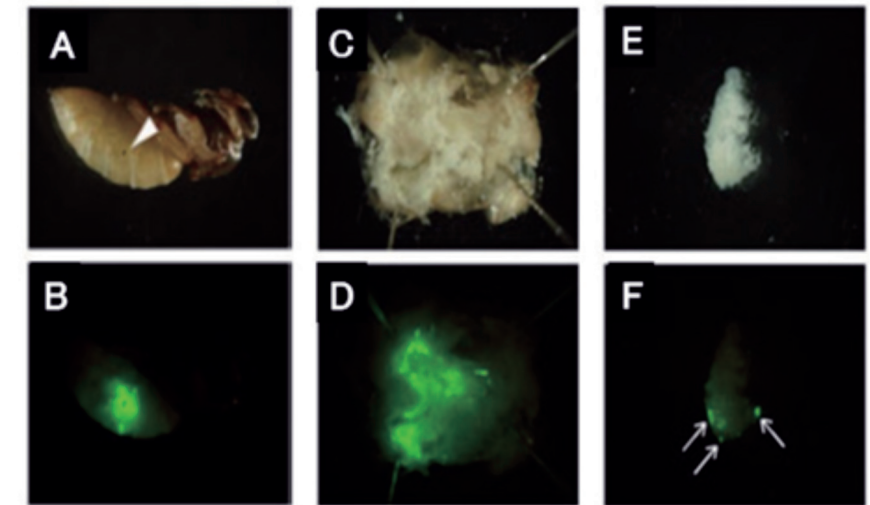


図 3 GFP 発現バキュロウイルスを接種した女王バチ蛹
外部形態の観察では腹部にのみ GFP のシグナルが見られる (A, B)。腹部を解剖したところ、脂肪体にのみシグナルが見られ (C, D)、卵巣からはシグナルが検出されなかった (E, F)。F に点在するシグナルは卵巣に付着した脂肪体組織による

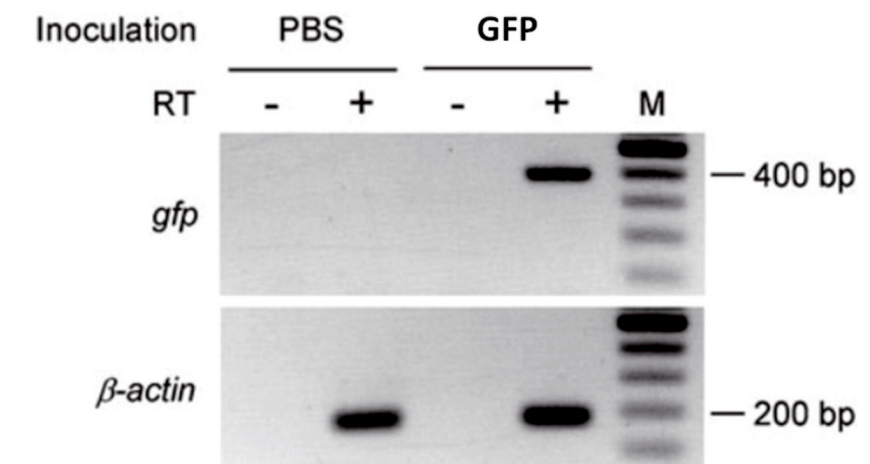


図 4 女王バチ成虫における GFP の発現
蛹化後 2 日目の女王バチ蛹の腹部に 1×10^5 IFU のウイルスを接種し、羽化後 2 日目に脂肪体から RNA を抽出し cDNA を合成した。対照区には phosphate-buffered serine (PBS) を注射した。調製した cDNA を鋳型として、*gfp* と *β-actin* を PCR で増幅した

③ミツバチのエピジェネティックス

近年、哺乳類では記憶形成に DNA のメチル化やヒストンの修飾などのエピジェネティックな遺伝子転写調節が関与していることが明らかにされつつある。しかし、無脊椎動物の DNA メチル化の生物学的意義はほとんどわかっていない。ショウジョウバエやカイコなどのモデル昆虫では DNA はメチル化されないが、ミツバチなどの膜翅目昆虫では昆虫としてはむしろ例外的に DNA がメチル化される。ミツバチでは幼虫期に RNAi 法で DNA メチル化酵素の発現を抑制すると働きバチ幼虫が女王バチ化することや、成虫の脳でのメチル化を薬理的に阻害すると学習能力が低下することなどが報告されており、DNA メチル化の研究の新しい研究対象として注目されつつある。そこで、ミツバチの行動様式や学習能力の変化とエピジェネティックな遺伝子発現調節の関係を明らかにするため、DNA のメチル化の解析を行った。

ミツバチの DNA メチル化は、哺乳類と同様に DNA 上の C (シトシン) と G (グアニン) が並んだ CpG ジヌクレオチドの C にメチル基が付加される。これまで、ミツバチの DNA メチル化に関する先行研究はほとんどなく、メチル化される CpG サイトを含む数個の遺伝子が同定されているだけであった。我々はまず、バイサルファイト・シーケンス法でミツバチの数個の遺伝子のメチル化の有無を調査した。バイサルファイト・シーケンス法は、DNA を重亜硫酸ナトリウム (sodium bisulfite) で処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンはこの変換を受けないことを応用した方法である。バイサルファイト処理した DNA を鋳型として PCR で増幅すると、非メチル化シトシンから生じたウラシルはチミンとして増幅される。一方、メチル化シトシンはシトシンのまま増幅される。PCR 産物をクローニングして複数のクローンについて塩基配列を決定し、各 CpG サイト毎に C/T 比を算出することで、そのサイトのメチル化の程度を解析することができる。

数個の遺伝子について解析を行った結果、貯蔵タンパク質の 1 つであるヘキサメリン 110 をコードする遺伝子 (*hex110*) にメチル化される数個の CpG サイトがあることが明らかになった。そこで、働きバチと女王バチで *hex110* の発現量をノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法と逆転写半定量的 PCR 法で調べたところ、*hex110* の発現量は幼虫期と成虫期、およびカースト間で異なることが示された (図 5)。

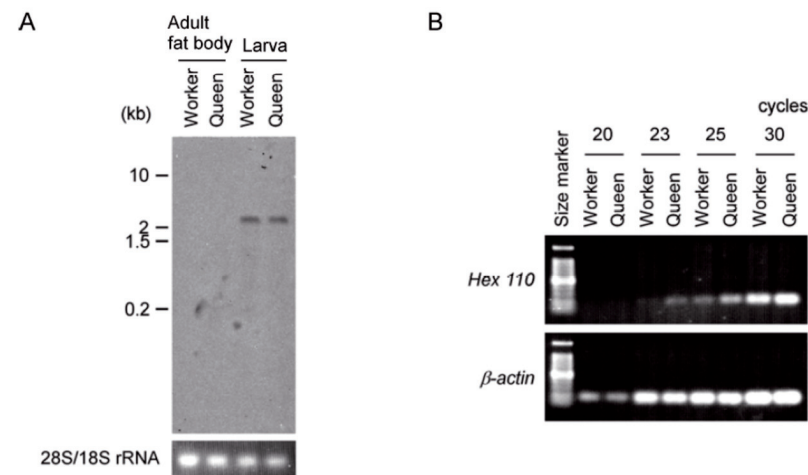


図 5 働きバチと女王バチにおける *hex110* の発現量の比較
(A) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションによる解析。幼虫期での発現量が高いが、成虫期では低下する
(B) 逆転写半定量的 PCR 法による解析。女王バチでの発現量のほうが高い

次いで *hex110* のメチル化の特徴を明らかにするため、8 個のエクソンを含む全長約 4 kbp の *hex110* に含まれる 96 個の全 CpG サイトのメチル化を解析した (図 6)。働きバチと女王バチの幼虫全組織と成虫の脂肪体から抽出した DNA を材料とした。各 DNA 試料は 1 個体から抽出し、各実験区について 3 コロニーに由来する 3 個体を供試虫として用いた。その結果、1) *hex110* の全体的なメチル化パターンは、カーストの違いや、幼虫全組織と成虫脂肪体の違いによらず似通っているが、成虫脂肪体のほうが幼虫組織よりもメチル化頻度がやや高い傾向にあること、2) 部分的に女王バチと働きバチでメチル化度が異なるサイトが存在すること、3) 同一実験区内では異なるコロニーに由来する個体間でメチル化のパターンはよく一致していること、などが明らかとなった (Ikeda et al. 2011)。この成果は、ミツバチの特定の遺伝子に着目してメチル化を詳細に解析した最初の例である。

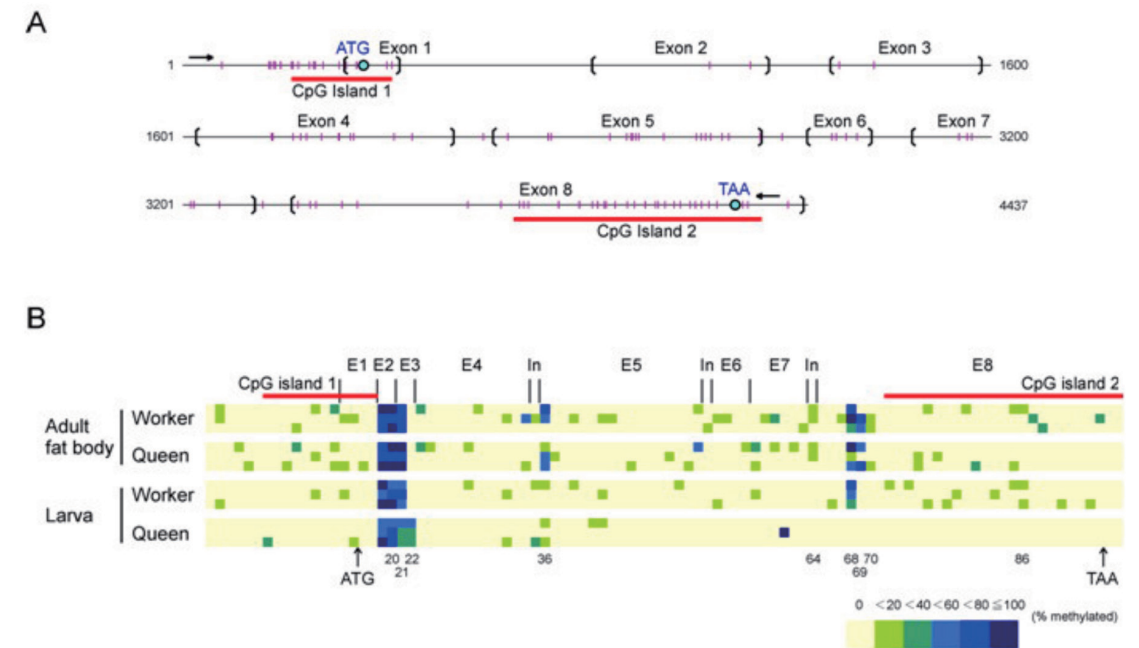


図 6 ミツバチ *hex110* のメチル化パターン
(A) ミツバチ *hex110* の構造。*hex110* は 8 個のエクソンを含む全長約 4 kbp の遺伝子で、96 個の CpG サイトを含む
(B) *hex110* の CpG サイトのメチル化。各実験区について、3 コロニー由来の 3 個体から DNA を抽出し、*hex110* に含まれる 96 個の全 CpG サイトのメチル化をバイサルファイトシーケンス法で解析した

hex110 のメチル化の解析は、ミツバチの遺伝子のメチル化の特徴を明らかにする上では重要な解析であったが、*hex110* は脳で機能する遺伝子ではない。ミツバチの働きバチは、羽化してからの日齢に応じて社会的な仕事を変化させる。比較的若い働きバチは幼虫の世話などの巣内の仕事を担当し、羽化後 2 ～ 3 週間ほど経つと、花粉や花蜜の採餌を行うようになる (齢差分業)。育児行動に比べ採餌行動では、より高度な情報処理が必要となることに関連して、育児バチから採餌バチへの仕事変化に伴って、学習・記憶能力は大きく向上することが知られている。我々は、加齢に伴う脳機能の向上と DNA メチル化の関連を解析するために、育児バチと採餌バチの脳における DNA メチル化のパターンを解析した。ここでは、ゲノム・ワイドにメチル化修飾を受ける遺伝子を検索するために、次世代シーケンスを利用した。育児バチと採餌バチのそれぞれ約 200 匹の頭部から脳キノコ体領域を摘出し、そこから抽出した DNA をバイサルファイト試薬で処理し、これを鋳型としてアダプター配列を用いて増幅した PCR 産物を次世代シーケンサー HiSeq2000

で解析した。育児バチのサンプルからは 1.47 億本、採餌バチのサンプルからは 2.46 億本のリードを得た。これらのリードをミツバチゲノム配列 Amel4.5 上の最も良く一致する領域にマッピングし、各 CpG サイト毎にマッピングされた複数のリードの C/T 比からそのサイトのメチル化度を算出した。

ミツバチのゲノムサイズは約 260 Mbp で約 900 万の CpG サイトを含む。解析の結果、ゲノム中の全 CpG サイトの約 80% について、メチル化の状態を解析するために十分な精度のデータを得ることができた。個々の CpG サイトについてメチル化の有無を調べたところ、育児バチの脳では 42,172 の CpG サイト、採餌バチ脳では 55,784 の CpG サイトがバックグラウンドレベルと比べて有意にメチル化されていた。メチル化される CpG サイトは全体の約 0.5% ほどで、ミツバチのゲノム DNA はほとんどメチル化されず、ごく一部の CpG サイトだけがメチル化修飾を受けることが示された。ゲノム上には遺伝子領域と非遺伝子領域が存在する。メチル化される CpG サイトのゲノム上での分布を調べたところ、80% 以上の CpG サイトが遺伝子上に局在していることが明らかになった（表 1）。また、遺伝子内の領域をエクソンとイントロンに分けて見てみると、メチル化されるサイトはエクソン上に多い傾向が顕著であった。

キノコ体	メチル化 CpG	遺伝子内		遺伝子外
	合計	Exon	Intron	
育児バチ	41172	22325 (54.2%)	11528 (28.0%)	7319 (17.8%)
採餌バチ	55784	34832 (62.4%)	13334 (23.9%)	7618 (13.7%)

表 1 有意にメチル化される CpG サイトの分布
10 本以上のシークエンス・リードがマッピングされた CpG サイトについて、二項検定でバックグラウンドレベルと比較し、Benjamini-Hochberg 法による多重検定補正を行った（FDR < 0.05）

次いで、育児バチと採餌バチでメチル化頻度が異なる CpG サイトを Fisher の正確確率検定により検出した。その結果、774 個の CpG サイトで育児バチと採餌バチで有意差が検出された。一つの遺伝子内に 2 個以上の有意差のあるサイトが含まれることもあり、遺伝子単位でみると、439 個の遺伝子に両者でメチル化の程度が異なる CpG サイトが存在していた。これらの遺伝子のうち 214 個は育児バチでのメチル化率が高い CpG サイトを含み、164 個は採餌バチでメチル化率の高い CpG サイトを含んでいた。残りの 61 個の遺伝子には、育児バチでのメチル化率が高いサイトと、採餌バチでメチル化率の高いサイトが混在していた。ミツバチ・ゲノムには約 11,000 個の遺伝子が存在していると推定されている。本研究により、育児バチと採餌バチでメチル化のパターンが異なる遺伝子は、全遺伝子の 5% 未満であることが示された。

育児バチと採餌バチでメチル化パターンの異なる遺伝子が、どのような機能を持っているかを明らかにするために遺伝子オントロジー（gene ontology, GO）解析を行った（図 7）。生物学的プロセス（Biological Process）、細胞の構成要素（Cellular Component）および分子機能（Molecular Function）について調べたところ、分子機能の GO で、*armitage*、*haywire*、*Iswi*、LOC100576404、LOC727008、LOC411250 など、核酸の二次構造に影響を与えるヘリカーゼをコードする遺伝子が見出された（表 2）。特に LOC100576404 では、メチル化度の異なる CpG サイトが 5 個存在し、DNA メチル化がこの遺伝子の転写調節に大きく影響していることが示唆された。ヘリカーゼは多くの遺伝子の転写・翻訳の過程を制御すると考えられている。ヘリカーゼをコードする遺伝子がメチル化修飾によって転写調節を受け、さらにその遺伝子産物が下流の遺伝子の発現に影響すると考えられる。

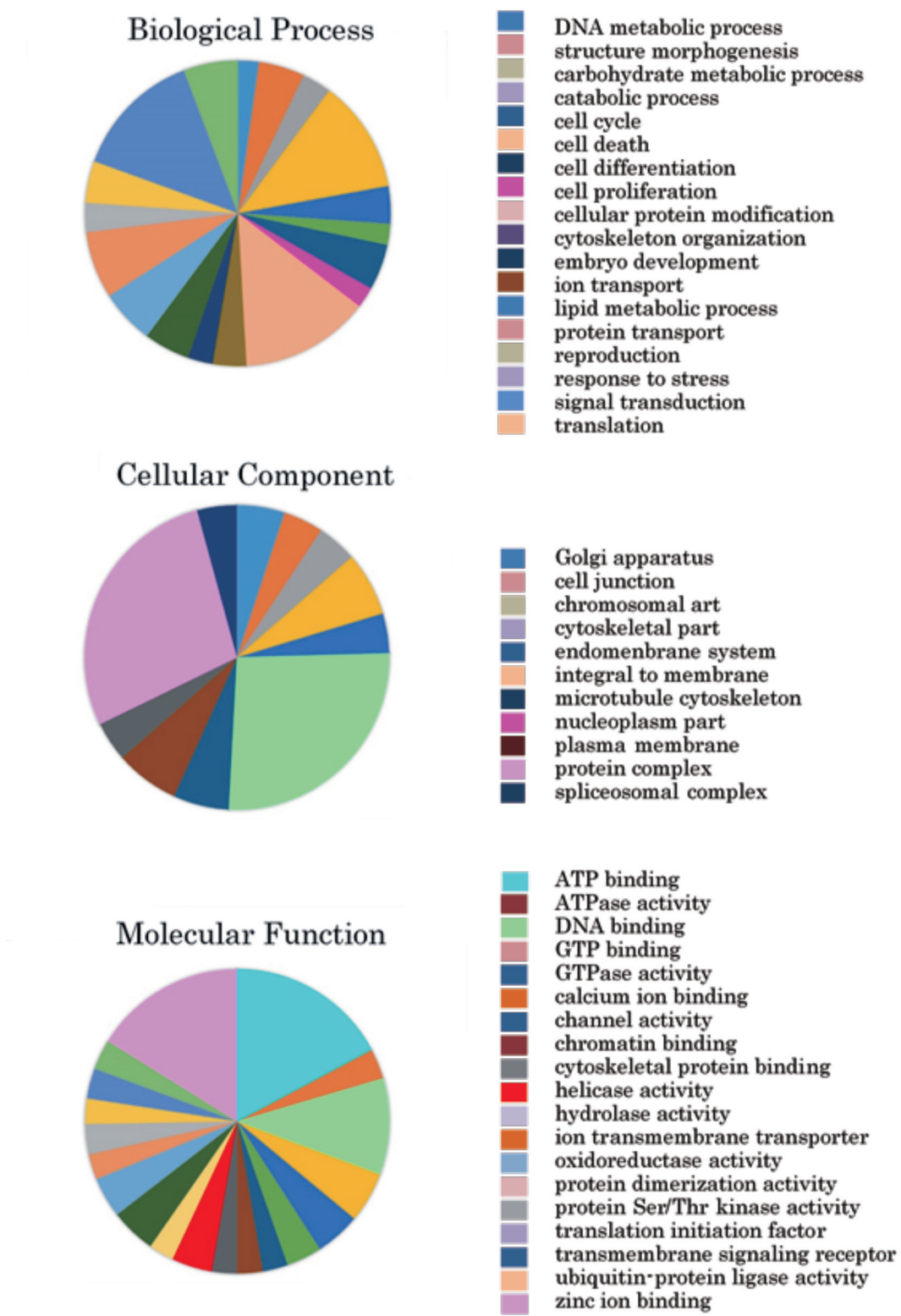


図 7 メチル化が変化する CpG サイトを含む遺伝子の遺伝子オントロジー（GO）
育児バチと採餌バチの脳でメチル化の程度が異なる CpG サイトを含む 439 個の遺伝子を Blast to GO で解析した

遺伝子名	有意差のある CpG サイト数			遺伝子産物の機能
	育>採*	育<採	計	
LOC726768	-	1	1	probable ATP-dependent RNA helicase DDX17-like
LOC726778	-	2	2	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16-like
LOC727008	2	-	2	probable ATP-dependent RNA helicase DDX46-like
LOC100576404	-	5	5	probable helicase with zinc finger domain-like
LOC411250	-	2	2	RNA-dependent helicase p72
LOC551822	-	1	1	ATP-dependent RNA helicase DDX42-like
LOC552515	2	-	2	helicase at 25E ortholog
LOC725306	-	1	1	helicase 89B ortholog
LOC551824	2	1	3	putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15-like

* (育) 育児バチ、(採) 採餌バチ

表 2 育児バチと採餌バチでメチル化の程度が異なるヘリカーゼ遺伝子

また、育児バチと採餌バチでメチル化のパターンが異なる興味深い遺伝子として、哺乳類の長寿遺伝子として知られる *Sirtuin* (*Sir2*) のミツバチ・ホモログが見いだされた。哺乳類では *Sir2* の発現量の増大が寿命延長効果をもつことが報告されている。*Sir2* はヒストン脱アセチル化酵素であり、ヒストンー DNA 間の構造を変化させることにより多くの遺伝子の発現を制御する。ミツバチの *Sir2* の CpG サイトのメチル化の状態をみみると、5つの Exon からなる遺伝子の第 5 Exon 先頭の 2 つが育児バチにおいて高度にメチル化されており、この遺伝子の alternative splicing に関与している可能性が示唆された (図 8)。すなわち、

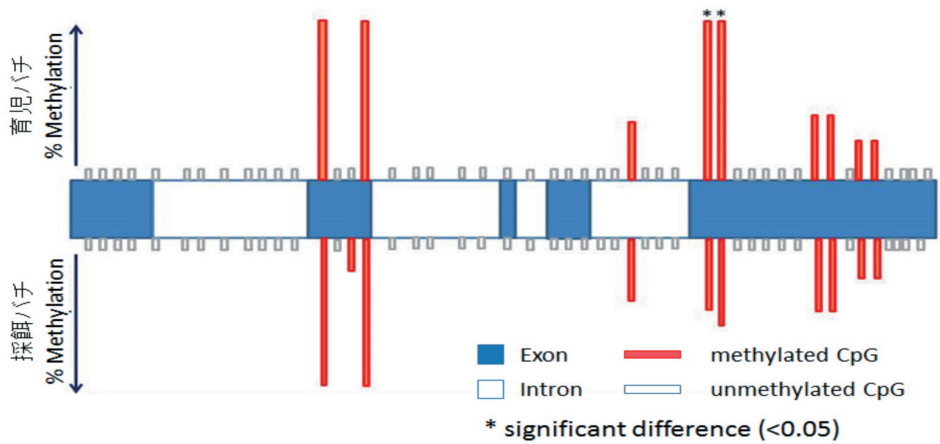


図 8 Sirtuin (*Sir-2*) の構造と CpG サイトのメチル化
Sir-2 は 5 個のエクソンを含む全長約 8 kbp の遺伝子である。第 5 エクソンの最初の二つの CpG サイトのメチル化の程度は、育児バチのほうが採餌バチより有意に高い

育児バチと採餌バチで、活性の異なる *Sir2* タンパク質が合成されると考えられる。*Sir2* のメチル化パターンと発現様式の関連、および遺伝子産物が寿命に及ぼす影響を調べることで、無脊椎動物での *Sir2* の機能解析が進められると期待される。

以上に述べた通り、働きバチの脳キノコ体では加齢に伴って DNA メチル化のパターンが変化することが明らかにされた。このようなメチル化の特徴は脳で特異的な現象だろうか？この点を検証するために、比較対象として下咽頭腺についてもメチローム解析を行った。下咽頭腺は働きバチの頭部にある外分泌腺で、加齢によって外分泌腺としての機能が変化する興味深い器官である。育児バチの下咽頭腺では、幼虫や女王バチに与えるためのローヤルゼリーのタンパク質成分が合成される。一方、老齢の採餌バチの下咽頭腺は花蜜をハチミツに変換するために必要な酵素を合成する。

下咽頭腺から抽出した DNA を用いてキノコ体と同様の解析を行い、育児バチからは 1.9 億リード、採餌バチから 0.6 億リードの配列を得た。これらのリードをミツバチ・ゲノムにマッピングし、育児バチでは 34,022 サイト、採餌バチでは 10,232 サイトのメチル化修飾を受ける CpG サイトを同定した。採餌バチでのメチル化サイト数がやや少ないのは、次世代シーケンスで得られたリード数が少なかったためである。

図 9 に育児バチ脳、採餌バチ脳、育児バチ下咽頭腺、採餌バチ下咽頭腺の 4 つの実験区でメチル化の程度が有意に異なる CpG サイト数をまとめた。育児バチの脳と採餌バチの脳の比較や、下咽頭腺同士の比較に比べ、脳と下咽頭腺での比較でメチル化度の異なるサイトが顕著に多かった。同一器官での変化より、二つの器官での違いが大きいことから、器官特異的にメチル化のパターンが異なることが明らかになった。また、脳と下咽頭腺の比較では、脳で強くメチル化されているサイトが顕著に多く検出され、脳の DNA のほうが高度にメチル化されていることが示された。このことは脳では下咽頭腺以上にエピジェネティックな調節機構が重要な役割を果たしていることを示唆しているのかもしれない。

育児バチと採餌バチの下咽頭腺の比較では、77 個の遺伝子から合計で 120 個のメチル化度の異なるサイトが検出された。これらの遺伝子の GO 解析の結果を図 10 に示す。脳に比べて、解析対象となった遺伝子数が少ないために GO 解析の精度は良くないが、例えば Biological Process では、脳の GO では検索されなかった RNA process という term がヒットしている。また、Molecular Function について見ると、脳では DNA binding という term が検索されたが、下咽頭腺では DNA binding はみられず、RNA binding が検索でヒットしている。これらの結果からも、器官特異的なエピジェネティックな調節が機能していることが示唆された。

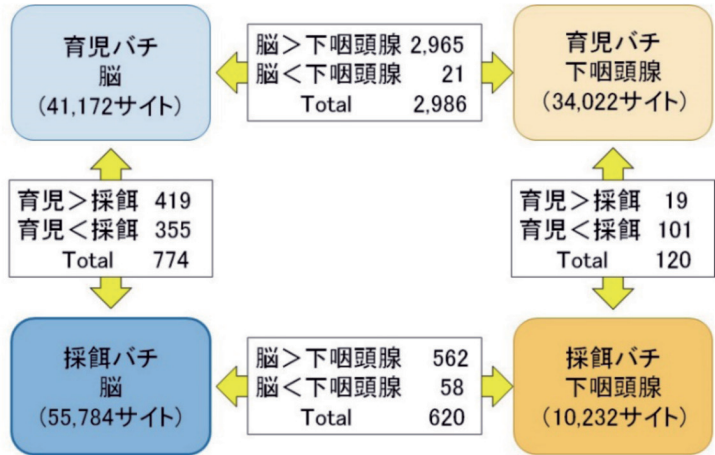
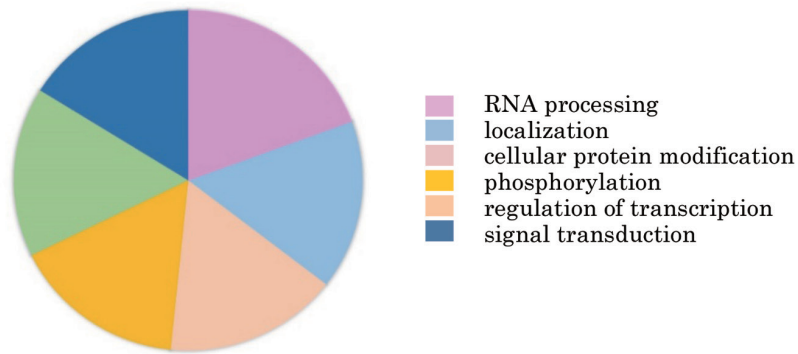
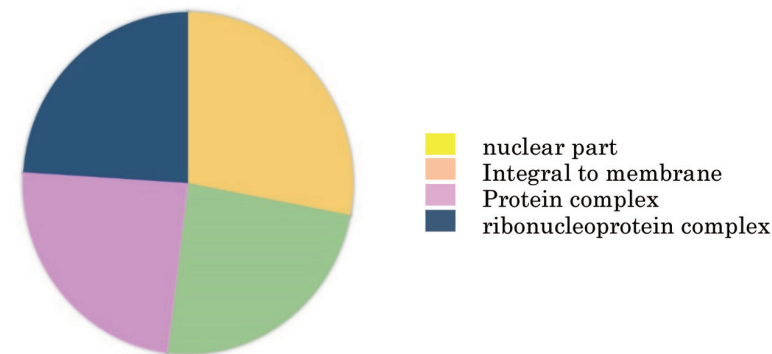


図 9 育児バチの脳と下咽頭腺および採餌バチの脳と下咽頭腺の 4 つの実験区の比較
各実験区でバックグラウンド・レベルより有意にメチル化されている CpG サイト数と、実験区間でメチル化の程度が有意に異なる CpG サイト数を示す

Biological Process



Cellular Component



Molecular Function

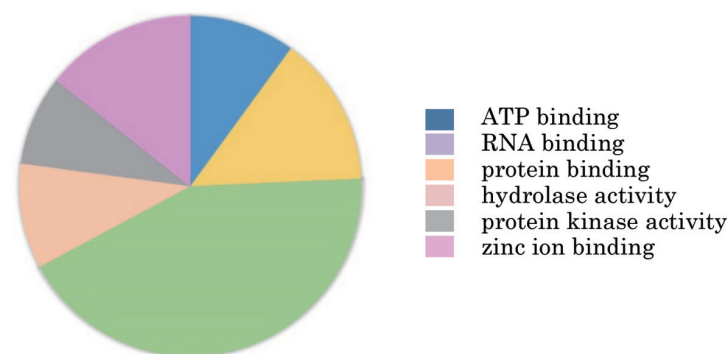


図 10 メチル化が変化する CpG サイトを含む遺伝子の遺伝子オントロジー (GO) 育児バチと採餌バチの下咽頭腺でメチル化の程度が異なる CpG サイトを含む 77 個の遺伝子を Blast to GO で解析した

業績一覧

雑誌論文

Ikeda T., [Nakamura J.](#), Furukawa S., Chantawannakul P., [Sasaki M.](#) and [Sasaki T.](#) (2011a) Transduction of baculovirus vectors to queen honeybees, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 42: 461–471. (査読有)

Ikeda T., Furukawa S., [Nakamura J.](#), [Sasaki M.](#) and [Sasaki T.](#) (2011b) CpG methylation in the hexamerin 110 gene in the European honeybee *Apis mellifera* L. *J. Insect Science* 11: Article 74. (査読有)

Hojo M., Kagami T., [Sasaki T.](#), [Nakamura J.](#) and [Sasaki M.](#) (2010) Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie* 41: 194-202. (査読有)

Hasegawa M., Asanuma S., Fujiyuki T., Kiya T., [Sasaki T.](#), Endo D., Morioka M. and Kubo T. (2009) Differential gene expression in the mandibular glands of queen and worker honeybees, *Apis mellifera* L., Implication for caste-selective aldehyde and fatty acid metabolism. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 661-667. (査読有)

Tanaka K., Furukawa S., Nikoh N., [Sasaki T.](#) and Fukatsu T. (2009) Complete WO phage sequence revealed putative functional elements required for integration into Wolbachia genome. *Appl. Environmental Microbiology*. 75: 5676-86. (査読有)

Nomura S., Takahashi J., [Sasaki T.](#), [Yoshida T.](#) and [Sasaki M.](#) (2009) Expression of the dopamine transporter in the brain of the honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae). *Appl. Entomol. Zool.* 44: 403-411. (査読有)

Hojo M., Kagami T., Nomura S., Kubo Y., [Nakamura J.](#), [Sasaki M.](#) and [Sasaki T.](#) (2009) Influence of social stimuli deprivation on gene expression in brain of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Tamagawa University Research Review* 15: 31-38. (査読無)

国際学会・シンポジウム等

Sakamoto H., Suzuki M. and [Sasaki T.](#) (2013) Comparison of genome-wide DNA methylation pattern between queen larvae and worker larvae in the European honeybees. The 2nd Grobal Conference on Entomology (Nov. 8-12, Kuching, Malaysia)

Sakamoto H., Suzuki M. and [Sasaki T.](#) (2012) DNA methylation during the caste determination in the European honeybees, *Apis mellifera*. The 24th International Congress of Entomology (Aug. 19-25, Daegu, Korea)

Furukawa S., Tanaka K., Fukatsu T. and [Sasaki T.](#) (2010) Quantitative analysis of lytic cycle of WO bacteriophage in Wolbachia, an endosymbiont of arthropods. Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology: Biology of Symbiosis (Dec. 7-8, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba)

Furukawa S. and [Sasaki T.](#) (2010) Studies on glutamate receptor in the honeybee brain. Joint Tamagawa-Keio-Caltech Lecture Course on Neuroeconomics (Sep. 8-10, Keio University, Minato-ku)

国内学会・シンポジウム等

坂本洋典、緒方法親、[佐々木哲彦](#) (2014) 「セイヨウミツバチ働きバチの脳における DNA メチル化解析」日本応用動物昆虫学会第 58 回大会 (3 月 26 日 ~ 28 日 (発表 27 日), 高知大学, 高知市)

坂本洋典、鈴木美穂、[佐々木哲彦](#)

(2013) 「セイヨウミツバチのカーズト間におけるゲノムメチル化の比較」日本応用動物昆虫学会第 57 回大会 (3 月 27 日 ~ 29 日 (発表 29 日), 日本大学, 藤沢市)

石井進之輔、[佐々木哲彦](#)、鈴木美穂 (2012) 「セイヨウミツバチのカーズト決定期における DNA メチル化の解析」日本応用動物昆虫学会第 56 回大会 (3 月 27 日 ~ 29 日 (発表 28 日), 近畿大学, 奈良市)

古川誠一、田中康次郎、深津武馬、[佐々木哲彦](#) (2011) ポルバキア WO ファージの溶菌活性の動態計測」日本応用動物昆虫学会第 55 回大会 (3 月 27~29 日, 九州大学, 福岡市)

石井進之輔、及川洋平、川上知泰、池田隆、[佐々木哲彦](#) (2011) セイヨウミツバチ *Apis mellifera* における DNA メチル化の解析. 日本応用動物昆虫学会第 55 回大会 (3 月 27-29 日、九州大学、福岡市)

[佐々木哲彦](#) (2010) 昆虫細胞内共生系における異種ゲノムの対話. 第 5 回化学生態学研究会 (6 月 10-11 日、函館湯の川プリンスホテル、函館市)

池田隆、古川誠一、[中村純](#)、[佐々木哲彦](#) (2010) セイヨウミツバチ Hex110 遺伝子のメチル化の解析. 日本応用動物昆虫学会第 54 回大会 (3 月 26-28 日、千葉大学、千葉市)

古川誠一、池田隆、[佐々木正己](#)、[佐々木哲彦](#) (2010) セイヨウミツバチの AMPA 受容体サブユニット遺伝子の単離. 日本応用動物昆虫学会第 54 回大会 (3 月 26-28 日、千葉大学、千葉市)

[佐々木哲彦](#) (2009) 昆虫細胞内における微生物共生系. 早稲田大学総合研究機構ケミカルバイオリジー研究所シンポジウム「動的平衡としての微生物共生系と天然物化学」(12 月 25 日、早稲田大学、新宿区)

[佐々木哲彦](#) (2009) 昆虫の生殖を操作する細胞内共生細菌. 日本農芸化学関東支部 2009 年度大会 (10 月 31 日、玉川大学、町田市)

池田隆、中村純、古川誠一、Panuan Chantawannakul、[佐々木正己](#)、[佐々木哲彦](#) (2009) バキュロウイルスを利用したミツバチへの遺伝子導入法の開発. 玉川北大ジョイントシンポジウム (10 月 24 日、玉川大学、町田市)

古川誠一、市川直子、加々美貴弘、野村祥吾、久保葉子、[中村純](#)、[佐々木正己](#)、[佐々木哲彦](#) (2009) コロニーから隔離したミツバチの学習能力と脳内遺伝子発現の解析. 玉川北大ジョイントシンポジウム (10 月 24 日、玉川大学、町田市)

受容体・シナプスから細胞レベルの生理的解析



研究内容

シナプスの可塑性がどのようなメカニズムで発現し、どのように情報表現を行っているか、まだその詳細までは明らかになっていない。このシナプスの可塑性の受容体レベルから細胞レベルまでの要因を明らかにすることを目的とし、ラットの海馬スライスを用いて電気生理実験を行い、計測データから理論モデルを構築し、下記の研究計画を達成した。

担当研究者

①シナプス情報伝達の制御機構

小島比呂志（工学研究科）

②ラット海馬におけるシナプス可塑性と情報表現

相原威（工学研究科）

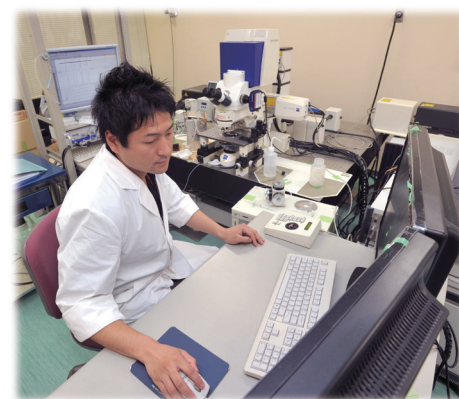
塚田稔（脳科学研究所）

酒井裕（脳科学研究所）

③ラット海馬のパターン分離機能とアトラクタ構造

塚田稔（脳科学研究所）

相原威（工学研究科）



①シナプス情報伝達の制御機構

i) 実験機器の開発と成果

1 個の神経細胞や少数個で構成される神経回路網での信号処理の解析は、神経科学の重要な問題の一つである。このシナプスレベルでの情報制御機構を *in vitro* の標本で解析する技術として従来の研究方法は、複数の刺激電極を標本に導入するという方法が用いられてきた。しかし、この方法では、種々の物理的制約があった。これに対してレーザービームによる uncaging 法は有効な方法である。一方、これまでの uncaging 法では、脳スライスのような厚みのある標本では極狭い領域をピンポイントで刺激することができなかったり、標本上の多点を高速で刺激することができないなどの問題があった。本研究開発ではこうした問題を解決するために以下の 2 点の開発をおこなった。1) 既成の共焦点及び 2 光子レーザー顕微鏡 (LSM510-meta) をベースにしてレーザービーム（紫外 (UV) 及び 2 光子 (IR) レーザー）による uncaging で標本の多点を高速で刺激できるようにするために、beam-deflector と全体の光学系及びそれをコントロールするためのソフト（プログラム）の開発を行った。2) さらに上記の機器においてスパインなどの微小領域まで刺激できるように顕微鏡の光学系や対物レンズを新しく開発した。

本開発に当たって 3 カ国の 3 機関（2 研究機関、1 企業）と共同開発を行った。① Princeton University, Department of Molecular Biology (USA) ②理化学研究所脳科学総合研究センター ③Carl Zeiss Microimaging GmbH (Germany) 初期の装置の性能をみる試験実験において優れた仕様を持つ装置（図 1）が得られた（文献参照）。

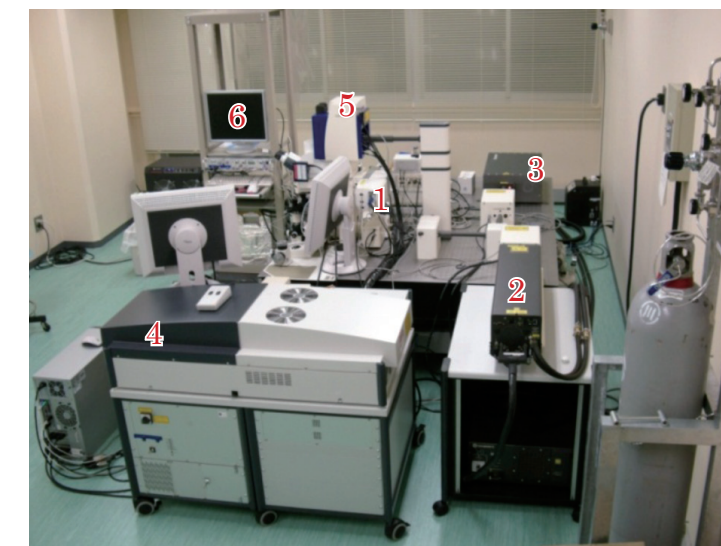


図 1 高速多点刺激装置の全システム概観

1. 多点刺激のための beam-deflector
2. Uncaging 用の紫外線 (UV) レーザー
3. 赤外線 (IR) レーザー（カメレオン XR）
4. 共焦点用可視レーザー
(Ar レーザー：458, 477, 488, 514nm)
(GHeNe レーザー：543nm)
(RheNe レーザー：633nm)
5. スキャナーと検出器および顕微鏡
6. 電気生理用計測機器

しかしながら、装置の最初の uncaging 分解能は、対物レンズ下の蛍光色素スポット径の大きさから間接的に測定されたもので実際の uncaging による生理学的な活性化の分解能に対応していない。実際の標本（小脳急性スライス標本など）から電位固定化に電流信号を記録しながら正確な水平方向の分解能を測定した。さらにこの uncaging 刺激装置の垂直方向の刺激の分解能も同様に電気生理実験により示された。

一方、uncaging 刺激に用いる異なる caged 化合物による刺激効果を比較検討するためにラット大脳皮質スライス標本の錐体細胞から細胞内及び細胞外電位同時記録を行い反応電位を記録した（図 2）。これによって、 γ -CNB caged glutamate より MNI-caged glutamate の方がより効率よくグルタミン酸受容体を活性

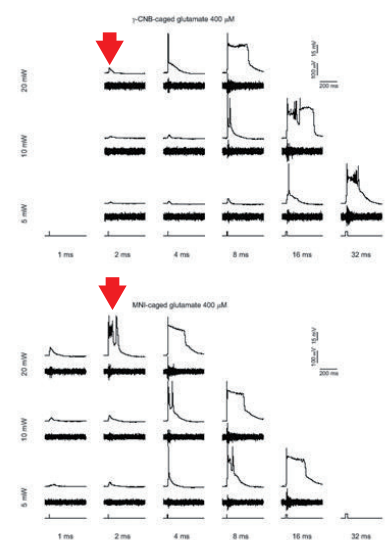


図2 2種類のcaged-glutamateの比較

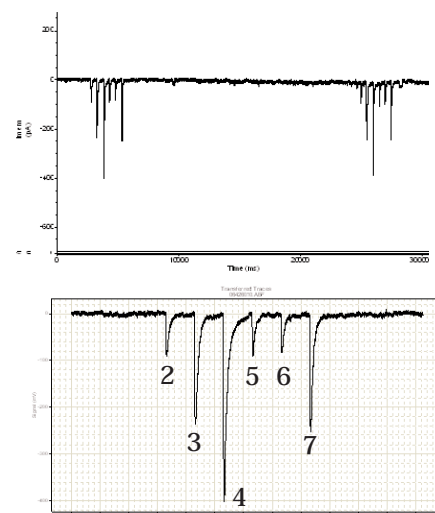
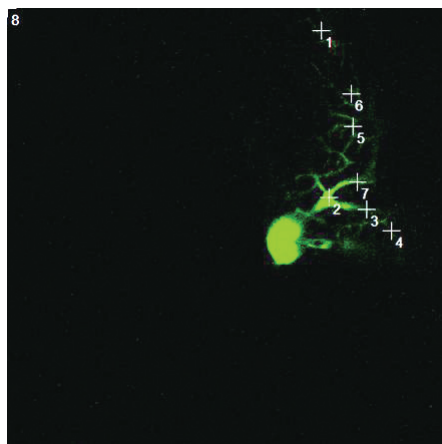


図3 ラット小脳プルキンエ細胞樹状突起上の刺激点と樹状突起の各点（左図）に対応する電流反応記録（右図）

以上の結果より本装置で1個の神経細胞・樹状突起上の多点を高速で再現性よく刺激可能であることが示された（図3右上）。この実験においてMNI-caged glutamateを本装置と同時に平行して開発した方法で樹状突起近傍に局所的に一定濃度で与えた。図3のようにプルキンエ細胞の樹状突起上の刺激位置をマウスでクリックすることにより任意の場所をuncaging刺激できた。

さらに、スパインなどの微小領域での神経刺激を可能にするために、UVレーザーによるuncaging刺激よりさらに高い空間分解能が得られるIRレーザー（2光子レーザー）による刺激が行えるように装置の改良を行った。標本は海馬培養神経細胞及び急性スライス標本を利用した（36ページ上段の写真参照）。MNI-caged glutamateを上記の方法により局所投与し、IR uncagingを行なったところ、電位固定した細胞体から電流反応が得られた。この電流反応は樹状突起膜に存在するグルタミン酸受容体の活性化によるものであると考えられ、刺激の空間分解能は、水平方向で数 μm 、垂直方向でこれよりすこし大きい値が得られた。また、最近の国外の報告ではUVレーザーによる多点の高速uncaging刺激は報告されているが、IRレーザー（2光子レーザー）による高速多点uncaging刺激はまだ報告されていない。本機器を用いて以下の3点に焦点を絞って実験を試みた。①開発した機器ではIRレーザーによる高速多点刺激が可能であり、実際の

電気生理実験からその限界を見極めることを目標とした。②さらに樹状突起上の多点を各点でレーザーパワー及びillumination time（照射時間）を変化させながら高速で刺激するためにマクロ・プログラムの新たな開発を行い、従来からのプログラムに追加して、より複雑なIR刺激を与えることができるようにした。これにより、*in vivo*での生理的な刺激を模倣した神経刺激をIRレーザーにより行うことが可能である。下図（図4）においてはラット急性スライス標本プルキンエ細胞の樹状突起スパイン上にuncaging刺激を与えた場合の細胞体からの電流反応を示している。

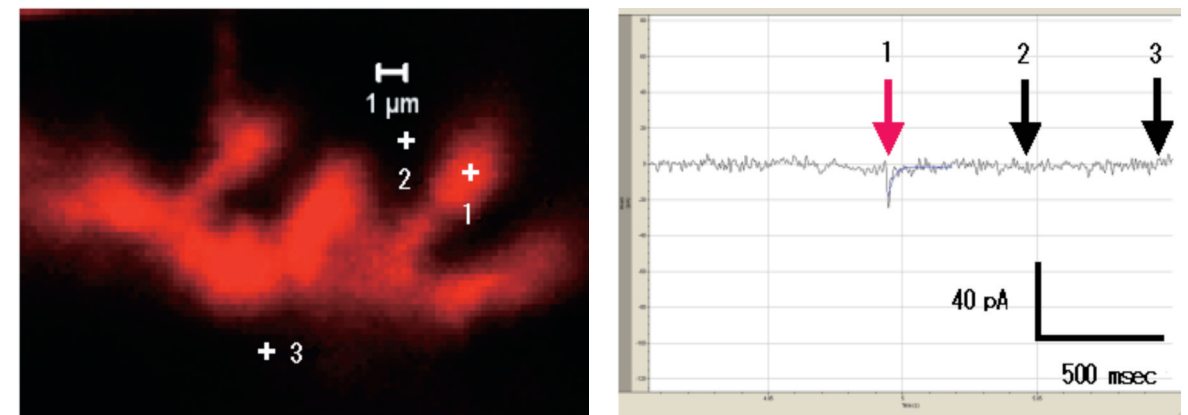


図4 プルキンエ細胞樹状突起スパイン及びその近傍の刺激点3点（左図）および各点をIR-uncaging uncaging刺激して得られた電流反応（右図）

この実験結果によりほぼ1個のスパインに相当する微小領域のuncaging刺激が各点の刺激の時間間隔を約1msec以下の時間間隔で正確に本装置で行えることが示された。一般にガルバノ・ミラーによる方式では、2個のミラーの機械的振動数によってこの刺激の時間間隔が決定される。現時点で技術的に可能な最大の1msec以下が得られた。上記の様にUVレーザーによる速いuncagingではAOD（acousto-optical-deflector）を利用したシステムによって2点間の刺激の時間間隔が約30 μs にまで短縮された機器が開発されている。しかし、IRレーザーによる刺激ではこの方式は利用できない。本プロジェクトで開発した装置は、多点の微小領域を約1msecという短い時間間隔で刺激できる国内外で最初の装置である。

また、この装置のために、波長の短いUVと波長の長いIRレーザーを同時に高い効率で透過させることが可能な対物レンズ系を開発した。レンズ系を交換することなくUVやIRレーザーによるuncaging刺激を行うことができる（本装置において採用している種々の機器の詳細は文献参照）。

—— 開発成果によって得られた研究例（1）

ラット海馬錐体細胞での連合性長期増強などのシナプス可塑性のメカニズムを明らかにするために尖頭樹状突起への2入力刺激（図5A）を今回の装置を使って行った。電気信号は細胞体よりホールセルパッチクランプ法により興奮性シナプス後電位（EPSP）を記録した。2入力として強刺激（3発入力）と弱刺激（1発入力）を樹状突起上の場所（図5B）と時間タイミングを変化させて与えた。それぞれの刺激によるEPSP（図5C1）及びそれらの加算電位（図5C2）と2入力同時刺激によるEPSP（図5C3）の時間経過と振幅を比較した結果（図5C4）、樹状突起において非線形なシナプス入力統合が行われており、これが連合性シナプス可塑性を引き起こす可能性が示唆された。

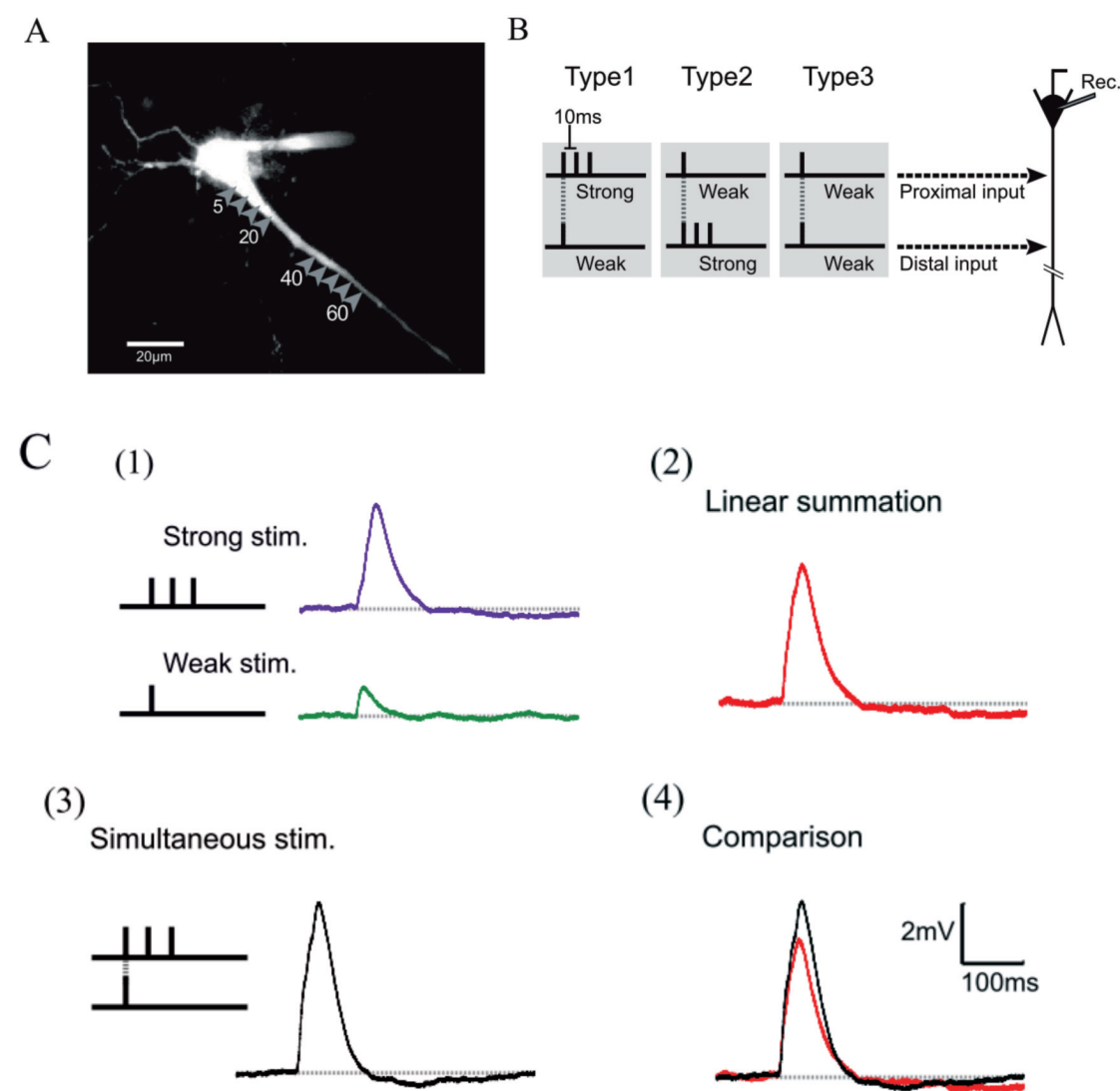


図 5A 海馬錐体細胞尖頭樹状突起の刺激部位
 図 5B 樹状突起への 2 入力刺激プロトコール
 図 5C 細胞体から記録された EPSP の線形加算と非線形加算

—— 開発成果によって得られた研究例 (2)

中枢神経系においてシナプス情報伝達は、種々の生理学的・分子生物学的制御を受けている。特に神経系の発達に伴うシナプス形成やその後の学習にともなうシナプス伝達効率変化は、その生理学的・分子生物学的基盤の解明が大きな焦点となっている課題である。これらシナプス伝達効率変化は、以下の 2 つのオリジンが考えられる①シナプス前部からの伝達物質放出過程の変化、②シナプス後部受容体における変化。ここでは、②の受容体変化のうちそのイオンチャネル・カインेटイクス変化に焦点をあて、実験と計算機による結果の比較検討を行い、シナプス伝達効率変化に寄与する可能性のある生理学的・分子生物学的要因を推定した。小脳プルンキエ細胞と平行線維間の長期抑圧では②であることが知られている。

ラット小脳平行線維とプルンキエ細胞間におけるシナプス伝達効率の長期抑圧に關与する AMPA 型受容

体チャネルのカインेटイクスとして以下図 6 のモデルを採用し、開状態の時間経過の確率分布を求めることで電位固定化のシナプス後電流 (EPSC と略) を求めた。ここで、 $C_0 \sim C_2$ 、 O 、 $C_0 \sim C_3 \sim C_7$ は、それぞれイオンチャネルの開状態、開状態、脱感作状態を示している。各状態間は、それぞれの速度定数に従って変化し、 $k_{C_0C_1}$ と $k_{C_1C_2}$ は、アゴニストのシナプス間隙における濃度に依存している。

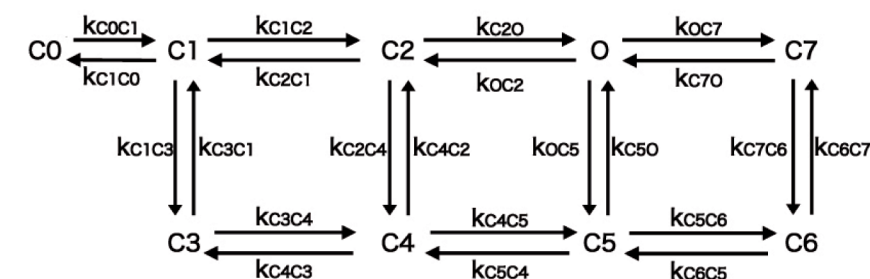


図 6 小脳プルンキエ細胞における 9-state AMPA 型受容体のカインेटイクス・モデル

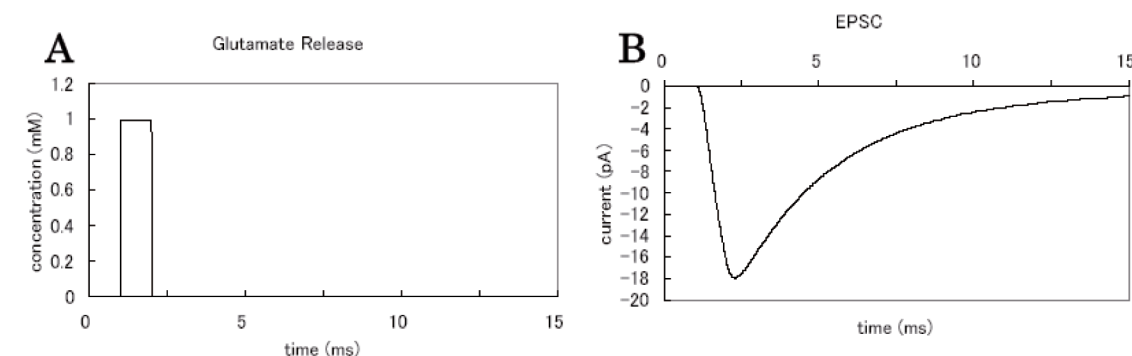


図 7A シナプス間隙におけるアゴニスト濃度変化の時間経過 図 7B 電位固定化のシナプス電流

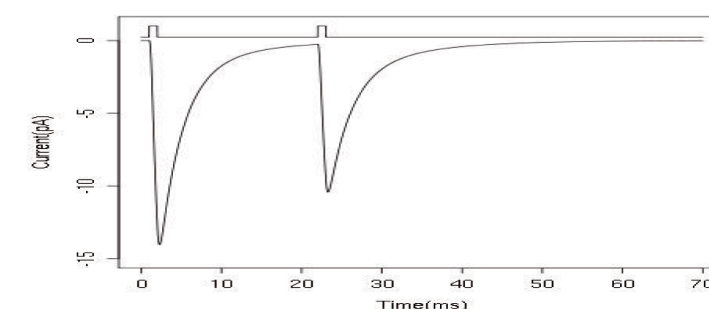


図 8 Paired Pulse Depression (PPD) のシミュレーション結果

シナプス間隙におけるグルタミン酸濃度の時間経過を矩形波関数で仮定し (図 7 A)、EPSC (興奮性シナプス電流) (図 7 B) を求めた。

このカインेटイクス・モデルによって求めた EPSC (興奮性シナプス後電流) が、別のカテゴリーの生理学実験をシミュレーションすることができれば、このモデルは一般化して他の実験結果に用いることができる。このために Paired Pulse Depression (PPD) およびアゴニストの速い適用での電流反応という 2 種類の

実験でシミュレーションの適合性を検証した (図 8)。

この計算機による結果から、1msec で 1mM の濃度のグルタミン酸をアウトサイド・アウトパッチ上の電極先端の膜に 20msec の時間間隔で与えた実験結果と同様の結果が得られた。従って、このカイネティクスモデルを別の実験結果に応用できることが示された。

このカイネティクスモデルを利用して、シナプス長期抑圧 (LTD) が起こる際に重要な役割を果たすパラメータを推測した。実験結果から LTD が起こった際 EPSC の時間経過には変化がないことから、この条件を満たしつつ EPSC の振幅のみ減少させる速度定数を求めると koc2 (開状態から閉状態の速度定数) と kc2c4 (2 個アゴニストが結合した閉状態から 2 個アゴニストが結合した脱感作状態) の 2 つの速度定数が長期抑圧において重要な役割を果たしていることが示唆された。

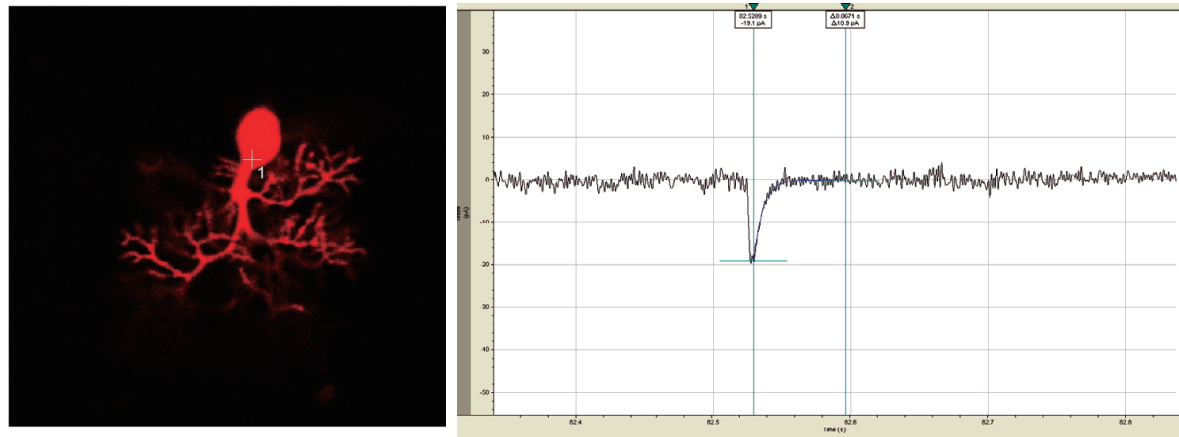


図 9A プルキンエ細胞 2 光子レーザー uncaging 図 9B 微小シナプス電流記録

図 4 以外の今までの実験結果はすべて紫外線レーザーを使った uncaging 刺激であるが、より効率がよく、微小領域を刺激できる 2 光子レーザーによる uncaging 刺激実験を行った。図 9A におけるプルキンエ細胞の細胞体上における AMPA 型受容体を 2 光子レーザーで刺激した際の電位固定化の電流反応は、減衰相を一次指数関数で近似するとその時定数は 6.34msec、大きさは 20pA であり、図 9B に示すこの細胞から記録された微小シナプス電流の時間経過とほぼ等しくなった。この結果より、2 光子レーザーによって活性化されるプルキンエ細胞・細胞体膜の AMPA 型受容体は、図 6 で示されたカイネティクスを持っていることが示唆された。

本プロジェクトで開発された高速で多点を uncaging できる装置は、当初目的としていた仕様をほぼ達成することができた。以下に結論を列挙して示す。

- ① UV レーザー及び IR レーザーによる同一標本の刺激が可能。これによって uncaging 刺激のみでスパイクタイミング依存性シナプス可塑性などの複雑なプロトコールによるシナプス可塑性を引き起こすことが可能。
- ② 各刺激の時間間隔を約 1 msec という短い時間間隔に設定可能。これは現時点で得られるハードウェアの理論的限界値でありこれを達成できた。
- ③ 直径数 μ m および単一スパインレベルの微小領域の刺激が可能。
- ④ 電気生理実験と組み合わせ可能な多彩なトリガーなどの同期信号を得ることが可能。
- ⑤ in vitro 標本において in vivo の状態と同様なダイナミックなシナプス入力を神経細胞に加えることが可能になった。

今後以上のような主な種々の特徴を持つ本装置を用いて多くの生理学的実験を行うことが可能になった。

ii) アルツハイマー病の原因特定の理論的研究

認知症の代表であるアルツハイマー病の原因特定をアミロイドタンパク前駆体 (APP) の代謝平衡異常とシナプス情報伝達異常の 2 つの視点から理論的に考察した。さらに遺伝子・タンパクネットワーク制御モデルからニューロンの確率論的振る舞いまでを一般的に取り扱える理論モデルを構築することを試みた。

生体内のアミロイド前駆体タンパク (APP) 代謝の生化学反応代謝経路の複雑な全体像を把握して相互作用を正確に推測するには限界があるが (図 10 参照)、一部計算機による研究が可能である。一方、アルツハイマー病の発症メカニズムとしてアミロイド β ($A\beta$) と神経性 nACh 受容体の相互作用やシナプス伝達のコリナージック修飾などが示唆されている。これらを解析することによりアルツハイマー病の発症へ至るメカニズムを一部解明できる可能性が高い。

本研究は、アルツハイマー病発症過程を「電気生理学実験」と「計算論的方法」によって解明することを目的としている。本疾患の要因として、APP の代謝産物であるアミロイド β ($A\beta$) の蓄積及びその後の $A\beta$ と nACh 受容体の相互作用にその一因があると報告されている。この問題に焦点をあて、以下の 2 点に焦点を絞って研究を行える方向性を示した。① APP 代謝過程の平衡数理モデルの構築及び APP 代謝異常による $A\beta$ 蓄積過程の解明 ② その結果による $A\beta$ と nACh 受容体の相互作用の素過程の解明。この研究を以下の 2 段階に分けて行へることを提唱した。(I) 理論モデルの構築と (II) この構築したモデルと電気生理学の実験との比較検討。得られた結果から、コリナージック修飾によるシナプス情報伝達制御機構の解明及びアルツハイマー病発症機構との関連を調べることが可能である。

上記の問題に焦点を絞り、他 2 名の研究者により共著論文 (N. Kasobov, H. Kojima et al. *IEEE transactions on Autonomous Mental Development*, (2011)) を発表した。また、小島がすでに発表している電気生理学・生化学実験結果を含む (H. Kojima, *Springer Handbook of Bio- and Neuroinformatics*, (2013)) 一般化された計算論的神経遺伝子ネットワークモデル (probabilistic Computational Neurogenetic Model, pCNGM と略) を導出できる方向性を示した。

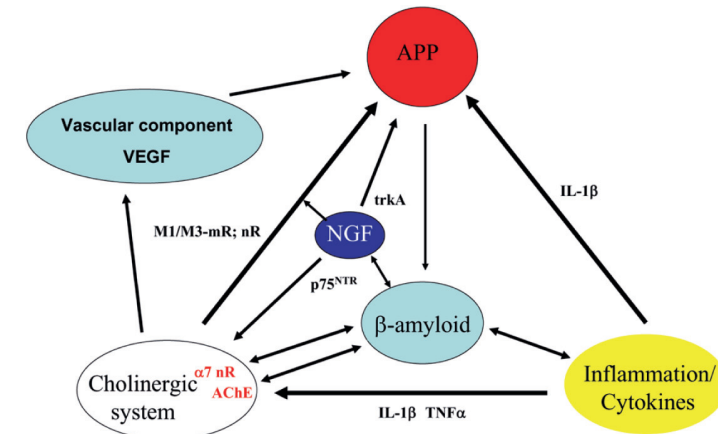


図 10 アミロイド前駆体代謝経路相互関係

アルツハイマー病の研究には、多くの分野で各々の視点と方法があるが、本研究には 2 つの特徴がある。

- ① 「生理学実験」と「計算論的研究」の 2 つの異なる方法による共同研究は試みられていなかった。
- ② シナプス伝達・受容体レベルでの発症メカニズムの解明を目的としており、他の疾患のシナプス伝達・受容体レベルでの解明へとつながる新しい研究方法を開発できる可能性が高い。

これまでに電気生理学・生化学実験結果を含む (H. Kojima, *Springer Handbook of Bio- and Neuroinformatics*, (2013)) 一般化された計算論的神経遺伝子ネットワークモデル (probabilistic Computational Neurogenetic

Model, pCNGM と略) を導出できる方向性を示してきた。今後、アルツハイマー病の原因の一つと考えられている APP の代謝と A β 蓄積過程に影響を及ぼす要因を明らかにするために、代謝過程の定常状態数理モデルを導出し、この理論的なモデルを神経細胞の活動やシナプス伝達機構などの生理学的パラメータを含む生理学実験結果と比較検討できるモデル (pCNGM) に拡張する。さらに A β と神経性 nACh 受容体の相互作用を *in vitro* 標本 (アフリカツメガエル卵母細胞発現系、スライス標本など) を用いた電気生理学的な解析によりモデル (pCNGM) と実験結果を比較検討し、シナプス伝達コリナージック修飾の観点からアルツハイマー病発症機構を明らかにすることを試みる。

iii) 脳と心の関係の生理学的研究

学際領域の発展とともに脳の働きを含む生体系を理解しようとする機運が高まってきている。特に脳の働きには多くの社会的関心が集まってきている。この状況の下、心や意識などの問題をその物質的基盤と考えられる脳の働きとして自然科学的に理解しようとする試みが行われている。本研究では以下の2点を目的とする。

これら心や意識を脳の科学である「神経生物学」と自然科学の基本原理解である「物理学」を基盤として自然科学の方法で理解しようとする試みである。しかし、この問題は、結論を一気に得ることは、現在までの歴史的状況などから判断して難しいので、この問題のアプローチの方法や戦略をまず構築することを第一の目標とする。

さらに、脳の機能に関する重要な問題として「クオリア」がある。これに関してミツバチの行動との関連で考察されている。この問題をさらに解明することを次の目的とする。

この上記問題にはすでに多くの研究者が種々の実験や考察を行ってきているので、まずこれらの過去の成果を検討した。特にこれらの問題のさまざまな角度の専門家 (自然科学の立場、哲学の立場、心理学の立場) の考えを分類しながら検討していき、最も妥当と思われる考え方を選定し、これを発展させる。以下に検討を加えた研究者を列挙する。

(1) ペンローズとハメロフ理論の検討:

ペンローズの提起している二つの問題: ①ルーカス・ペンローズ問題と②心や意識の自然科学的理解には新しい自然科学を構築する必要があるとする主張の二点を検討した。

ペンローズとハメロフの提唱する脳内の意識の働きを具体的に担っている場として神経細胞内の「チューブリン」の働きを生理学的に検討した。

(2) トレイフル説の検討

理論物理学的な考察をよりどころとして、脳の働きは最終的に「適応複雑系」の「創発」として理解できるという考えを提唱している。

(3) コッホの意識の探求の検討

Neural Correlate Consciousness (NCC) を見出すことに重点をおき、特に視覚情報処理が行われる際の意識の問題に生理学的検討を加えている。

(4) サールの心の探求の検討

心や意識の問題の解明には、哲学や心理学などの領域の学問は無力であり、神経生物学によってのみ解明できると提唱している。

(5) ラマチャンドランの神経学の病理学的知見による考察。

意識とクオリアは表裏一体であるとの考えを唱え、これらに直接関連する脳部位として側頭葉をあげている。

以上の他に検討を加えた研究者は、「ジェームス・ギブソン」、「ダニエル・デネット」、「ベンジャミン・リベット」、「アントニオ・ダマシオ」、「デビット・チャーマース」、「ライナス・ポーリング」、「デニス・ノーブル」、「ジョンジョー・マクファデン」、「トール・ノーレットランダーシュ」、「茂木健一郎」、「河野哲也」、「中田力」、「治部真理」、「保江邦夫」である。

本研究の成果として、2013 年 9 月、「第 77 回日本心理学会大会」の公募シンポジウム: 「脳は何をしているのか: 心と脳の関係を再考する」を以下のメンバーで行い成果を発表した。大谷悟 (了徳寺大学・医学教育センター)、茂木健一郎 (ソニーコンピュータサイエンス研究所)、河野哲也 (立教大学)、小島比呂志 (玉川大学)、森直久 (札幌学院大学)

そのアブストラクトを以下に示す。

「近年、心理学では脳科学・神経科学の果たす役割がますます大きくなっている。脳科学の重要な目的は、わたくしたちが一般に「心」と呼ぶ機能を成り立たせる物的なメカニズムを解明することである。このまま脳科学が発達すれば心理学は不要になってしまうのだろうか。脳科学ではひとつの暗黙の前提が共有されているように思われる。すなわち、心と脳とを同一視する心脳同一説 (Mind-Brain identity theory) である。しかし、心はすなわち脳だといえるのだろうか。「心の世界」が脳の活動によって「生み出される」と言うてよいのだろうか。心は脳内だけで成り立つのだろうか。そもそも、脳波何をする器官なのか。こうした心脳関係に関する基本問題を曖昧にしたままに、脳科学に依拠した心理学を展開することはできないように思われる。本シンポジウムでは、心脳関係を改めて問い直し、心理学と脳科学の関係性について議論する。」

このシンポジウムによって今後神経科学の立場に立ってどのように心の働きを考えていくかの方向性が得られた。また課題の第二のクオリア問題に関しては、これとミツバチの蜜のありかを示す「8 の字ダンス」との関連を検討した。これまでの研究により今後の方向性が得られたので、引き続き解析を行い、特ににペンローズの第 2 の課題とその延長と考えられる治部真理の説を発展させたい。

②ラット海馬におけるシナプス可塑性と情報表現

i) 海馬 CA1 野におけるスパイクタイミング依存可塑性へのアセチルコリン効果

脳は感覚系からの作用 (ボトムアップ型) と内在的活動による作用 (トップダウン型) の情報処理を司っており、特に海馬では様々な感覚系からのボトムアップ入力と報酬や情動系などからのトップダウン入力の情報統合がなされている。

海馬 CA1 野において、ボトムアップ型の入力として CA3 野および嗅内野からシナプス入力がある。またトップダウン型入力には、中隔核のコリン作動性ニューロンからの投射があり、そのシナプス前終末から放出されるアセチルコリンによる slow EPSP が報告されている。

また近年、前シナプス入力をもたらす EPSP (Excitatory Post-synaptic plasticity: 興奮性シナプス後電位) と後シナプスニューロン発火に伴い樹状突起を逆伝播する BPAP (Back-propagating Action Potential: 逆伝播活動電位) のタイミング (時間差 Δt) により、シナプス可塑性の増減が異なる STDP (Spike Timing Dependent Plasticity: スパイクタイミング依存性可塑性) が報告されており (Bi and Poo, 1998)、これらはデンドライトにおける情報統合処理のメカニズムとして着目されている。

しかしボトムアップ入力とトップダウン入力がいかに影響し統合されるかという研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、トップダウン情報がボトムアップ情報に与える影響に着目し、海馬 CA1 領域における情報統合のメカニズムを S T D P のプロトコルを用いて調べた。

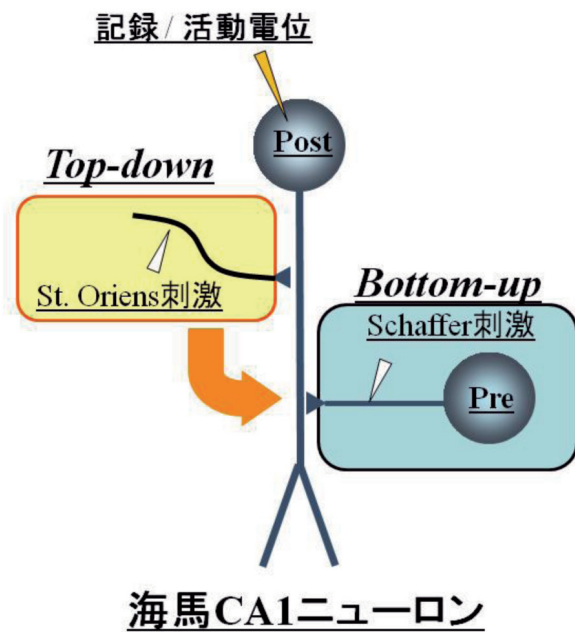


図 11

＜実験方法＞（図 11 参照）

2～3 週齢の Wister Rat から抽出した海馬を厚さ 400 μ m にスライスし、ACSF 溶液で 1 時間程度休ませた後、チェンバーに設置する。パッチクランプ法により CA1 領域 Pyramidal 層の細胞体にパッチ電極を挿入し、細胞内電位変化の記録とともに発火誘導刺激も可能とする。また、EPSP を観測するために電気刺激用電極を Schaffer 側枝に挿入する。さらに、コリン作動性ニューロンを刺激し内性アセチルコリンを放出させるため Oriens 層に電気刺激用電極を挿入する。刺激パターンは、Schaffer 側枝での EPSP 刺激に続くパッチ電極による発火刺激とのペアリングタイミングを $\Delta t=12\text{msec}$ (Positive Timing)、 $\Delta t=20\text{msec}$ (Negative Timing) として 5Hz で 16 秒間刺激を行う (STDP 誘起のプロトコル)。ペアリング刺激注入から 10 秒後にトップダ

ウン入力として Oriens 層へ 40Hz を 0.5sec 間刺の刺激を行い、slow EPSP が観測できる状態にする。そしてこれら一連の刺激を入力する前 10 分間と後 30 分間をコントロール刺激 (20 秒間隔) による EPSP 応答の傾斜で比較し、変化率を算出する。

＜結果と考察＞（図 12 参照）

コリン作動性ニューロンへの刺激によるアセチルコリン放出が与える STDP への影響は、与えなかったとき (コントロール) に比べ EPSP の変化率が大きくなることが確認された。これによりアセチルコリンがシナプスの可塑性を増強することから、海馬 CA1 領域でトップダウン情報はボトムアップ情報と統合され、効果的に作用することが言える。

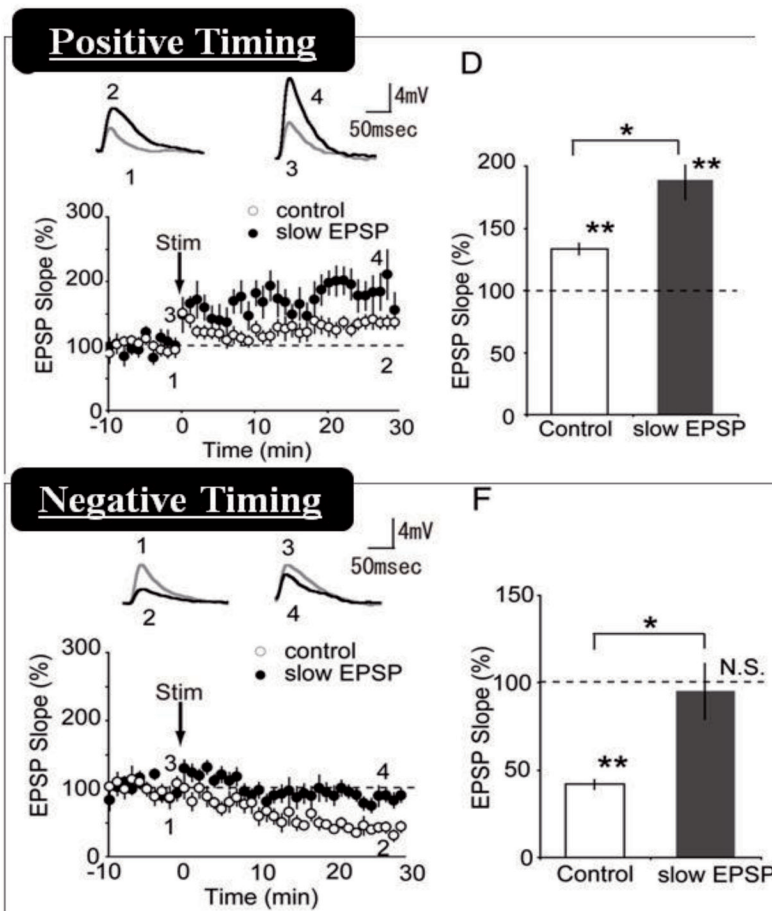


図 12

ii) 海馬 CA1 樹状突起における入力統合機能の解析

記憶情報処理に重要な部位とされる海馬 CA1 領域を対象とし、STDP について、(本来であれば、ある EPSP を引き起こすシナプス前細胞と、後細胞の発火タイミングで定義されるが) ふたつの空間的・時間的に独立なシナプス入力があるとき、それぞれのシナプス入力他方の STDP に及ぼす影響について議論した。樹状突起における膜電位応答を多点同時計測する方法はいくつかあるが、本研究では実際の神経細胞の活動と同じ時間スケールで膜電位変化を測定することができ、パッチクランプ法を用いるより簡便な膜電位感受性色素 (VSD; voltage-sensitive dye) を用いた光イメージング法を使用した。またお互いのシナプスにおける STDP に影響を与える手段として、シナプス後細胞が発火した際に樹状突起へ伝搬する逆伝搬スパイク (bAP) を考えた。

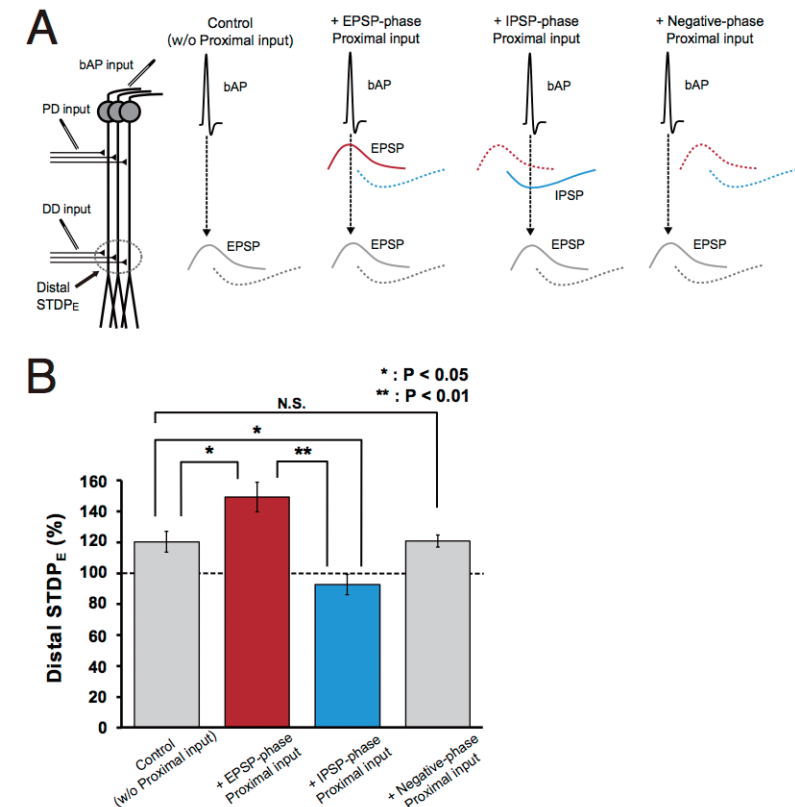


図 13 PD 入力による DD-STDP の調節

A: STDP 誘導刺激パラダイム。DD 入力の、bAP 入力に対する相対刺激タイミングは +5 ms (DD に LTP が起きる) に固定した。それに加えて、PD 入力を【なし (control)】【+5 ms】【+20 ms】【-5 ms】とし、bAP・PD・DD 入力のペアリング刺激を行った
B: PD 入力の相対タイミングに依存して、DD における STDP が変化した。通常、DD においては +5 ms のタイミングでは LTP が起きる (グラフ最左) が、STDP 誘導刺激時に PD 入力を相対タイミング【+5ms】で加えると、さらに LTP が上昇した (グラフ赤)。一方で PD 入力タイミングを【+20 ms】で加えると LTP は減少した (グラフ青)。PD 入力タイミングを【-5 ms】で加えた場合には、LTP に変化は見られなかった

細胞体からの距離 (近・遠) が異なる 2 点に、それぞれ時間的・空間的に独立なシナプス入力を行うための刺激電極 2 本 (PD 入力・DD 入力) と、シナプス後細胞の発火を誘発するための刺激電極 1 本 (bAP 入力)、合計 3 本の刺激電極を VSD で染色したスライス標本に刺入し、PD 入力・DD 入力と bAP 入力との相対タイミングが異なるペアリング刺激プロトコルを用いて STDP を誘導した。このとき、DD 入力と bAP 入力の相対タイミングに関しては、入力部に LTP が誘導されるタイミング (Tsukada et al., 2005) に固定

した。その結果 (図 13)、PD 入力を行わず、DD 入力と bAP 入力のペアリング刺激による STDP 誘導では、Tsukada ら (2005) の報告と同様にシナプス応答は増強された。しかしこれに対して、PD 入力を加えた PD・DD、bAP 入力によるペアリング刺激を行ったところ、シナプス応答は PD 入力のタイミングに依存して変化した。この理由は、bAP が樹状突起を伝搬する際、PD 入力によるシナプス電位と重畳すると考えられるが、PD 入力と bAP 入力の刺激タイミングによって異なる調節を受け、そのことが DD における STDP の大きさを調節する可能性が示された (図 14)。これらの結果は、多数のシナプス入力が存在する場合、個々のシナプスにおける STDP は、他のシナプス入力との入力タイミングによって調節されることを示唆するものである。また同時に、これは STDP においても連合性が存在し、それは影響を与えるシナプス入力と bAP のペアリングタイミングによって、増幅・抑圧の双方向的な効果があることは特筆すべき点である。このことは、STDP に関する神経生理学および理論神経科学の知見に対し、新たな展望を与えるものであり、Hebb 可塑性および STDP を拡張した因果的学習則の存在を示唆すると考えられる。

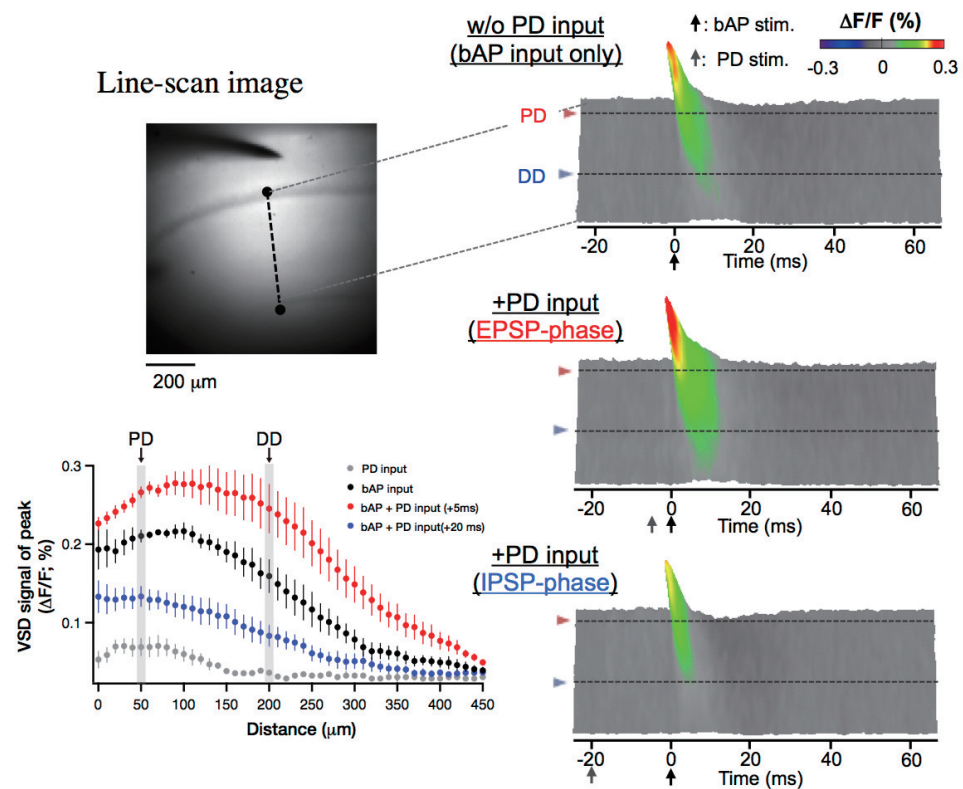


図 14 シナプス入力による、樹状突起に沿った bAP の調節
細胞体の発火にともなう、樹状突起へと伝搬する bAP を VSD イメージングによって可視化した。遠位に伝搬するに従って bAP は減衰していく (右上) が、その途中で相対タイミング【+5ms】の PD 入力を加えるとその振幅は増大し、DD まで伝搬した (右中)。対して相対タイミング【+20 ms】の PD 入力を加えると、その振幅は減少した (右下)。
左下は細胞体層からの距離に対する bAP 入力時の VSD シグナルを示している
(黒点：bAP 入力のみ、灰点：PD 入力のみ、赤点：bAP 入力 + PD 入力【+5 ms】、青点：bAP 入力 + PD 入力【+20 ms】)

iii) 海馬歯状回顆粒細胞における樹状突起分岐周辺の入力統合

歯状回顆粒細胞の樹状突起の分岐点周辺に着目して時空間的に異なる入力があるどのように統合されているのかを調べる為に高速アンケーシング刺激を使用して実験を行った。樹状突起分岐点周辺の 2 つの樹状突起入力による EPSP 加算の線形性について評価するために時空間的に異なる刺激を施した。具体的には、分

岐点をまたぐようにして樹状突起に沿った入力と 2 本の分枝への入力を距離とタイミングを変えつつ施し、その時の応答を計測し評価した。また、その時の分子メカニズムを調べるために薬理実験を行った。本研究では 2 種類のペア刺激 Line 刺激 (分岐点を跨いだ樹状突起に沿った刺激) と Branch 刺激 (2 本の分枝のある 2 点を刺激) を施した (図 15)。

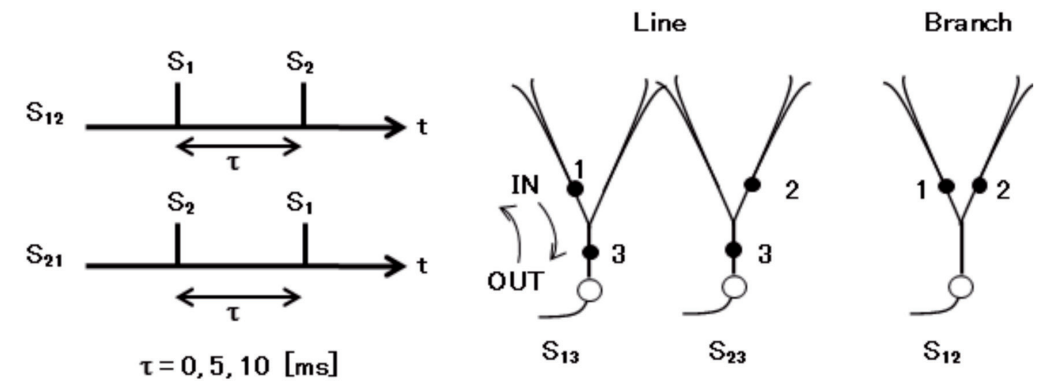


図 15

まず初めに、2 入力の同時刺激によって誘起した加算 EPSP における非線形性を評価した。Line 刺激を時間間隔 $\tau = 0$ ms で分岐点から同じ距離 (5, 10, 20 μ m) へ施した場合、分岐点から先端方向への距離を増やしても入力・出力関係に有意差は見られなかった。これらの結果から遠位樹状突起から細胞体へ沿った方向への閾値下の連続入力によって誘起された加算 EPSP は線形であった (図 16)。一方で、Branch 刺激を時間間隔 $\tau = 0$ ms で分岐点から同じ距離 (5, 10, 20, 30 μ m) へ施した場合、5 μ m と 10 μ m の刺激距離では有意差が見られ、この非線形性は距離を離していくと徐々に小さくなった。これらの結果は分岐点からの分枝 10 μ m 以内での入力の EPSP 統合は同時に分岐に入力が入ると増強されることが増強されることが示された。その入力統合は分岐点近傍によって増強された (図 17)。さらに、細胞体と分岐点間の距離を計測し、非線形性の距離依存性を Branch 刺激で計測した。すると加算 EPSP において優位的な非線形性が観察された。細胞体から分岐点までの距離が少なくとも 100 μ m 以下では増強された非線形性が確認された (図 18)。歯状回顆粒細胞における樹状突起分岐点は近位樹状突起と中位樹状突起では広く分布しており、遠位部ではスパースであることが報告されている (Claiborne et al. 1990)。よって、その結果から加算 EPSP プーストは交差交連入力、そして嗅内皮質から遠位・中位樹状突起への入力などの様々な情報処理を行っている可能性が考えられる。

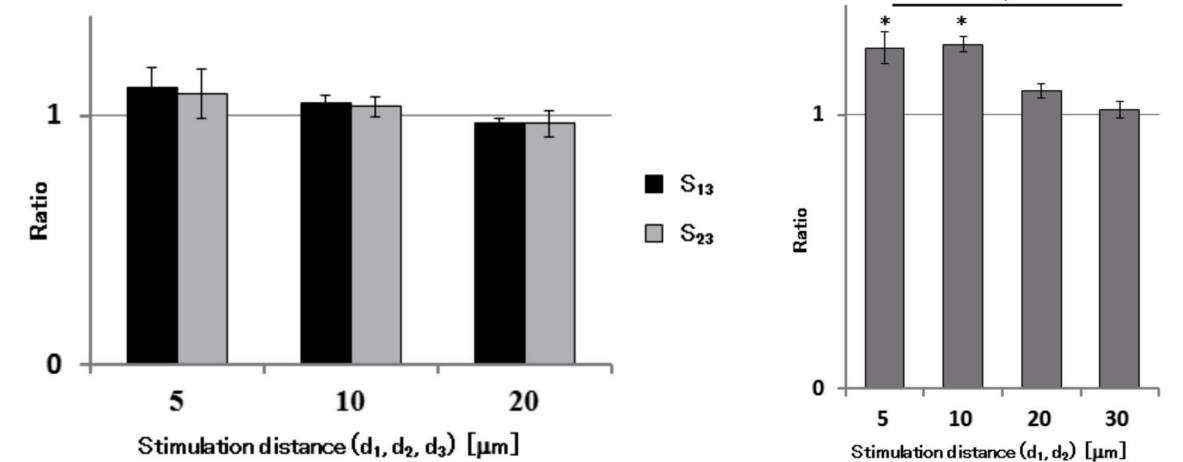


図 16

図 17

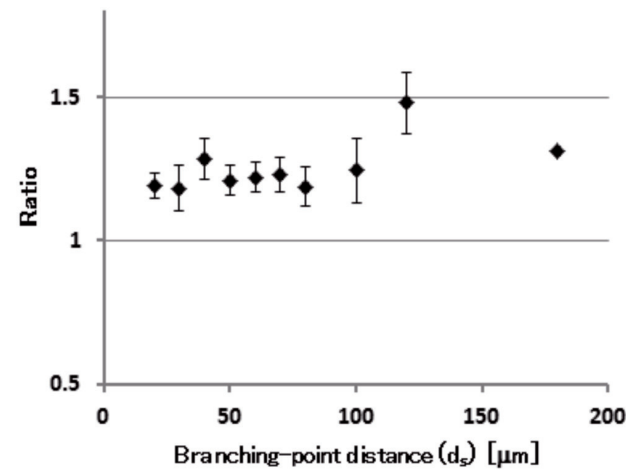


図 18

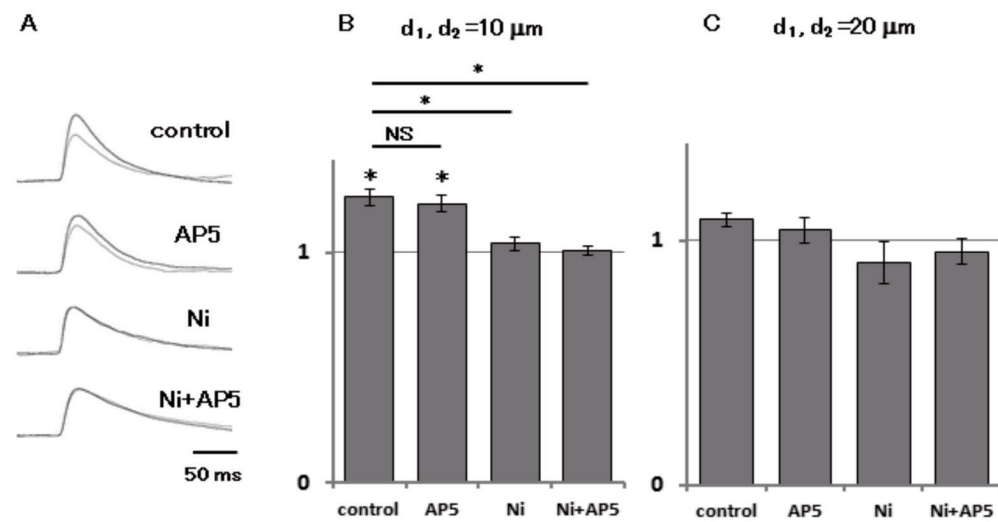


図 19

最後に EPSP の非線形加算の分子メカニズムを明らかにするために、2 種類のアンタゴニストを ACSF 中へ加えた。超線形性は主に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに依存し、NMDA チャンネルの影響は僅かだった。(図 19) 結果をまとめると、海馬歯状回の顆粒細胞分岐点周辺では、樹状突起に沿った同時入力線形に細胞体へ伝わり、分岐から等距離への同時入力は単純加算した値よりも大きく伝わるのがわかった。そして、それは主に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの影響であることを明らかにした。我々は、この非線形性が歯状回において、ポジティブフィードバックや振動入力の同時検出器としてシナプス入力の統合に関して重要な働きを果たしていると考えられる。

iv) 恐怖条件づけにより聴覚野に生じる異なる感覚モダリティの統合

脳は外界のモデルを個体の目的に合わせて脳内に再構成し、しかもその状態を操作することができる。この操作が新しい知識を生み出す情報創成の根源である。このような脳内モデルの形成には外界からのボトムアップの情報だけでなく、トップダウンの情報も融合する必要がある。従来の研究によってボトムアップ情

報のみに依存した外界モデルの形成メカニズムは実験的にも理論的にもかなり明らかになってきているが、情報創成の視点から見たトップダウン機能を実現するメカニズムに関する研究はほとんどない。

ここではまずトップダウンの作用として、報酬・罰の程度（情動的情報）に応じた感覚情報（ボトムアップ情報）統合への修飾に注目し、個体の目的に合わせた脳内モデルの自己組織化を可能にするメカニズムを探る。またそうした情動的情報は、個体間のコミュニケーションで重要な情報と直結しており、脳内モデルの自己組織化に与えるコミュニケーションの影響として捉えることができる。ボトムアップとトップダウンというヘテロな系の相互作用ダイナミクスを実験と理論の両側面から明らかにすることで、コミュニケーションの脳内神経機構を探る糸口としていく。具体的には「モルモット聴覚野におけるボトムアップ・トップダウン情報の相互作用」を調べた。すなわち、モルモットの聴覚皮質において、聴覚によるボトムアップ情報と恐怖条件づけによる情動系のトップダウン情報がいかに相互作用するかを調べることを目的とした。

<実験方法> (図 20 参照)

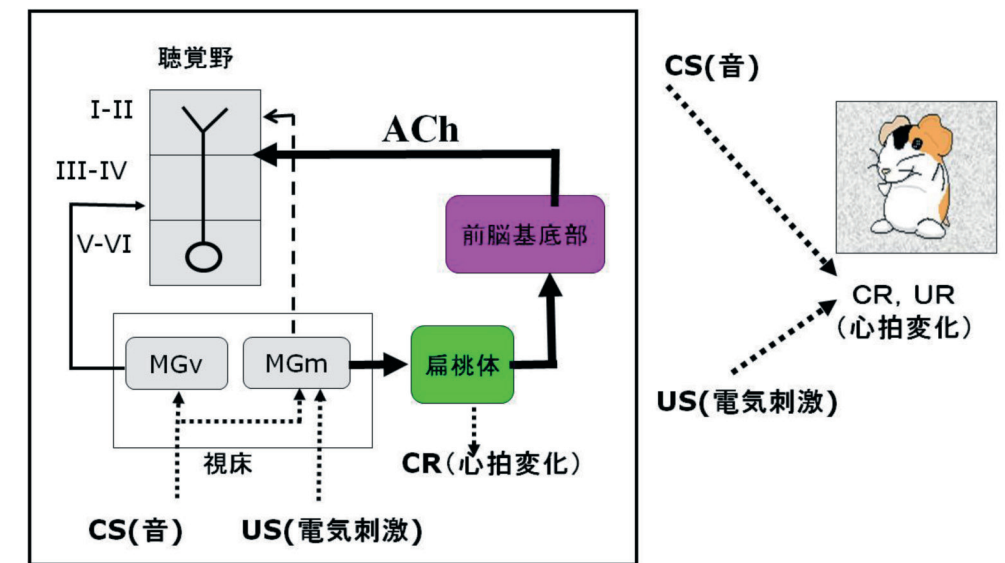


図 20

モルモットに対して条件刺激 (Conditioned Stimulus, CS) に純音、無条件刺激 (Unconditioned Stimulus, US) に両足への電気刺激を用いる恐怖反応条件づけを行った。この恐怖条件づけにより聴覚野に生じる可塑的な変化について光計測法を用いた 2 つの実験により調べた。まず、純音と両足電気刺激による連合学習を行う前後で、条件づけに用いた CS 音 (12 kHz) と条件づけに用いていない Non-CS 音 (4.8, 16 kHz) に対する聴覚野の応答変化について調べた。その結果、CS 音を提示した場合に限り、条件付け後に応答領域の増大が確認された。一方、音刺激ではなく、両足への電気刺激によっても、連合学習した音に関する情報が想起されるのではないかとこの観点から、音刺激を提示せず両足電気刺激だけを与えた場合の聴覚野応答を調べた。

<結果と考察> (図 21 参照)

結果として、条件付け前には全く見られなかった両足電気刺激に対する聴覚野の応答が条件付け後に観測された。さらに、CS 音と両足電気刺激に対する聴覚野応答領域には、相関が見られた。これらの結果は、恐怖条件刺激である電気刺激による US 情報が、扁桃体、前脳基底部を経て聴覚野へアセチルコリンと GABA が放出される。また同時に聴覚皮質の 1、2 層へも直接投射がある。ここで CS 音に対する聴覚入力により

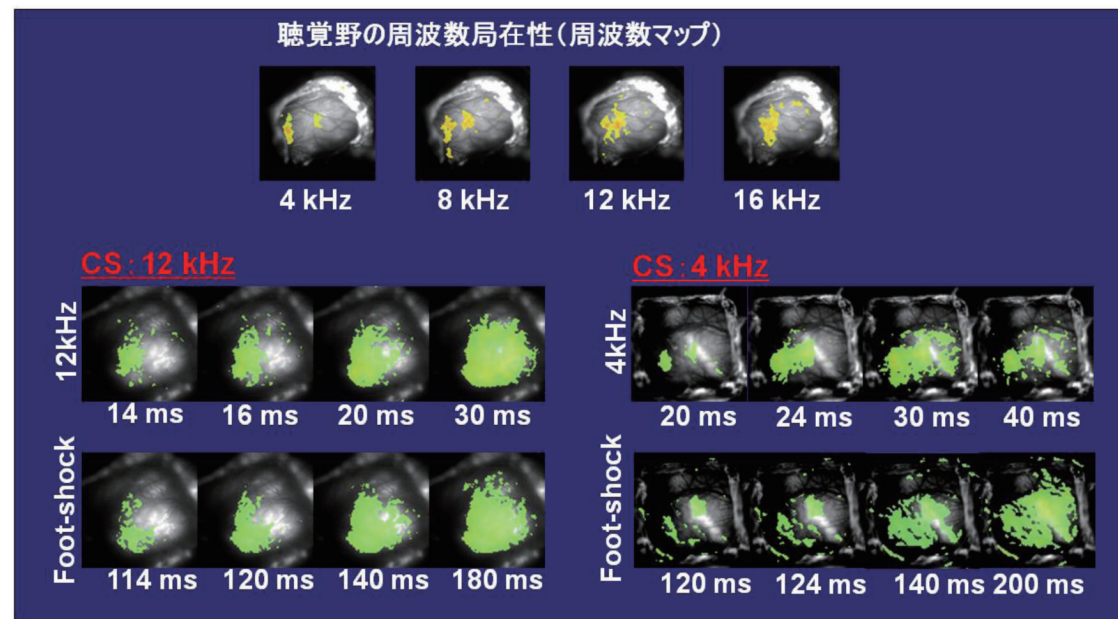


図 21

活性化した錐体細胞において、ボトムアップ入力と US 刺激によるトップダウン入力の連合により音刺激のみでも聴覚野に応答が起こるようになり、その結果、条件付けに使用した聴覚刺激の応答領域と音刺激の領域に相関がみられるものと考えられる。

最終年度は、聴覚刺激と両足電気刺激に加え視覚刺激による 2 次条件付けを行った。結果として、条件付け無しの個体では、フットショックに対して体性感覚野の応答のみであったが、2 次条件付けした個体では、聴覚野と視覚野にも応答が見られた。これは、エピソード記憶のセルアセンブリを示すものであると考える。あるいは、触覚が見えたり、聞こえたりする事を示唆し、共感覚のメカニズムを神経レベルで実証する事に成功したとも考えられる。

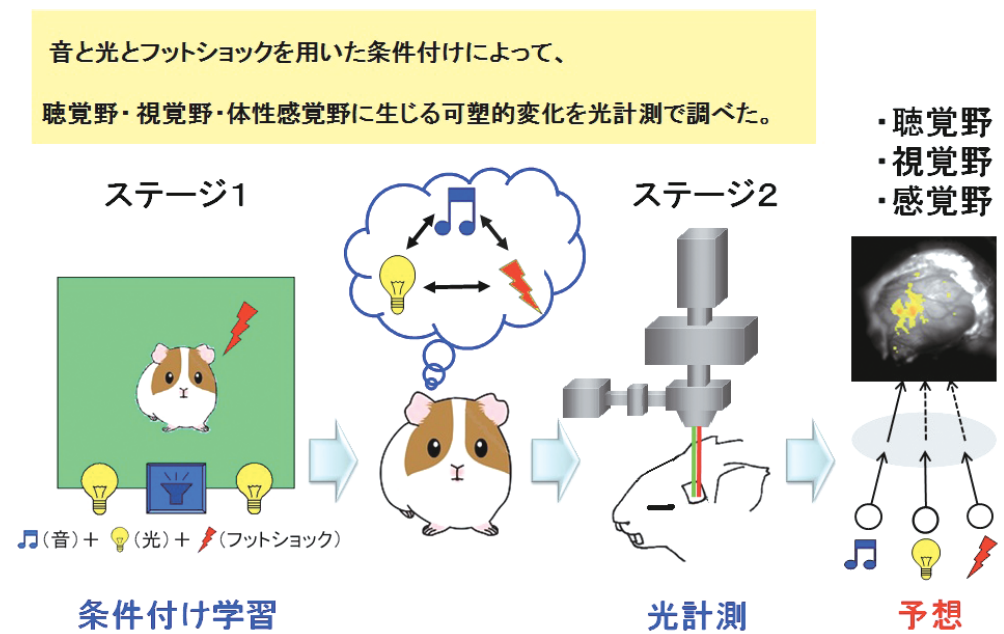


図 22

実験結果：音・光・フットショックによる2次条件付け

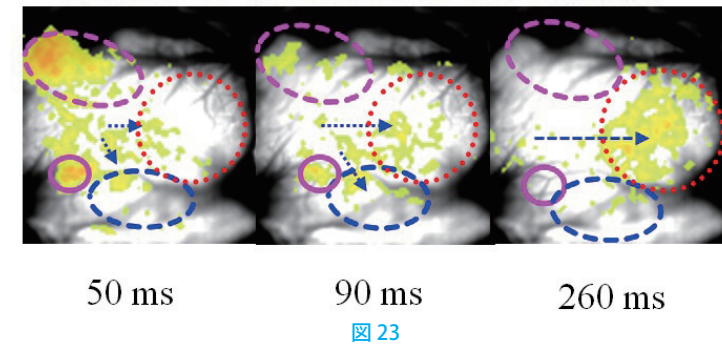


図 23

v) 海馬 CA3 野の自己組織的なシータ進行波の生成に関する計算機シミュレーション

記憶に関わる脳領域として知られる海馬は、3 つの下位領域 (DG、CA3、CA1) からなり、特に CA3 は再帰的な結合を持つ特異な構造となっている。海馬の神経活動はシータリズムと呼ばれる 8 Hz 付近の局所電場電位によって調節されることが知られており、シータリズムと海馬の神経活動との関係を明らかにすることが、海馬情報処理の解明において重要である。従来、シータリズムは海馬全体で同期していると考えられていたが、行動中のラットの CA1 から計測されたシータリズムは進行波として海馬の長軸方向に向かって伝播し、海馬内で同期していないことが報告されている。伝播するシータ進行波の発生メカニズムは明らかではないが、再帰的な結合を持つ海馬 CA3 における指向性を持つ神経活動の伝播がその原因の 1 つの可能性として示唆されている。

そこで、本研究では CA3 の構造を考慮し、錐体細胞と抑制性介在細胞からなる CA3 の計算モデルを構築し、CA3 で指向性を持つシータリズム進行波が自己組織的に生成できることを示した。これまで、神経細胞のスパイクタイミングに依存した可塑性則による CA3 の再帰的な構造の変化によって、放射状（無指向）の進行波が自己組織的に生成されることがわかっていた。本研究では、抑制性介在細胞が特定の方向で長い異方的な軸索投射構造を持つことで、自己組織的に生成されるシータ進行波が指向性をもつことを明らかにした（図 24）。長い抑制性の軸索投射を持つ方向には強い抑制が生じ、その方向には伝播することができないと考えられるが、その構造とは矛盾する抑制性の軸索投射方向に伝播する指向性の進行波が生成された。実際、CA3 で報告されている異方的な軸索投射を持つ抑制の O-LM 介在細胞は、シータリズムの伝播方向である海馬長軸方向に長い軸索を持つことから、本研究の成果は CA3 の実験的な知見と一致している。そのため、本研究の成果は海馬 CA3 が伝播するシータリズムの発生源であることを強く支持し、さらに海馬の情報処理はその進行波に基づき実現されていることを示唆している。

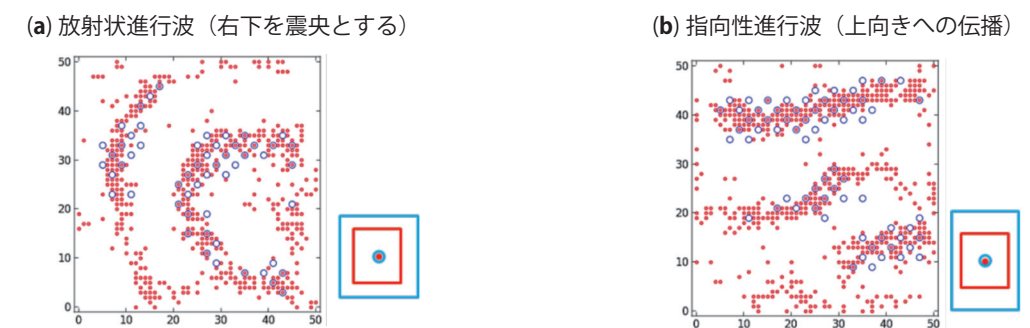


図 24 CA3 ネットワークに生成された進行波が伝播中の細胞の活動（●：錐体細胞、○：抑制性介在細胞）
(a) 錐体細胞と抑制性介在細胞の軸索投射（□、□）を等方的に設定し、放射状進行波が生成された場合
(b) 錐体細胞と抑制性介在細胞の軸索投射（□、□）をそれぞれ等方的、異方的に設定し、指向性進行波が生成された場合

③ラット海馬のパターン分離機能とアトラクタ構造

脳発達が急速に高まる臨界期において神経回路網の機能的可塑性と構造的可塑性が知られている。生後、生物が外界の環境に適応して生きていくためには外界の敵から生命を守るためにも外界を適切に認識しなければならない。そのために脳内に適切な外界のモデルを創る必要がある。そのためには、外界の物事を分離する（パターン分離）能力を脳内の神経回路網に創りださなければならない。この発達期において、抑制性ニューロン（GABA ニューロン）の発達が重要であることが知られている。雑音や暗闇の中で育てられたラットはこのようなパターン分離機能の発達が促進されないとの報告がある。

記憶システムを備えている動物は、ある状況に直面したとき、それを以前の経験と比較し、それらを総合して最も適切と考えられる行動をとろうとする。

このような脳発達の過程において、神経回路網がどのように脳内モデルを創りパターン分離機能を獲得するかを明らかにすることが重要である。我々のグループでは記憶形成のメカニズムであるパターン分離とアトラクター構造に注目し以下のような研究成果を得た。

i) ラット海馬のパターン分離機能

海馬 CA1 ではニューロンの膜電位の履歴に自己相似的符号として階層的に埋め込むことによって、時間系列パターンを分離している [Tsuda et al.2008 (ref*); Yamaguchi et al., 2010]。その時空間系列の記憶の書き込みに塚田が提案した時空間学習則が有効に働いており、それは樹状突起状のシナプス間の非線形な荷重特性に基づく入力間連合のメカニズムであことが明らかとなった。そのメカニズムの根底に膜電位 Ca] 受容体、NMDA 受容体のダイナミックな非線形特性が密接に関係していた（塚田稔 2009; Yoneyama et al. 2011）。

Ref*: Tsuda, Yamaguti, Kuroda, Fukushima and Tsukada (2008)
A mathematical model for the hippocampus:
towards the understanding of episodic memory and imagination,
Progress of Theretical Physics Supplement 99.

ii) 記憶形成のアトラクター形成機序

感覚入力を引き込むアトラクターの形成には 2 つの学習則（時空間学習則と Hebb の学習則）が相互作用し、ボトムアップ情報とトップダウン情報を統合してアトラクターを形成していることを理論と実験によって明らかにした [Taukada and Fukushuma 2011; 学会発表 Tsukada 2011 (ICCN 国際会議 ICCN 功績賞・招待講演)]。

業績一覧

雑誌論文

Kamijo C.T., Hayakawa H., Fukushima Y., Kubota Y., Isomura Y., Tsukada M., and Aihara T. (2014) Input integration around the dendritic branches in hippocampal dentate granule cells. *Cognitive Neurodynamics in press* (査読有)

Kojima H. (2013) “Non-stationary Noise Analysis and Synaptic Transmission”, *The Proceedings of the Faculty of Engineering Tamagawa University* (玉川大学工学部紀要), 48, pp51-74 (査読無)

Kojima H. (2013) Single channel recording and synaptic transmission. *Tamagawa Brain Science Institute Bulletin* No. 6, p15-37

Samura T., Sakai Y., Hayashi H., and Aihara T.(2013) Distance- and direction-dependent synaptic weight distributions for directional spike propagation in a recurrent network: Self-actuated shutdown of synaptic plasticity. *Lecture Notes in Computer Science*, Vol. 8228, pp. 1-8. (査読有)

Kondo M., Kitajima T., Fujii S., Tsukada M. and Aihara T. (2013).

Modulation of synaptic plasticity by the coactivation of spatially distinct synaptic inputs in rat hippocampal CA1 apical dendrites. *Brain Res.* 1526, 1-14. (査読有)

Fujiwara H., Sawa K., Takahashi M., Lauwereyns J., Tsukada M. and Aihara T. (2012) Context and the renewal of conditioned taste aversion: The role of rat dorsal hippocampus examined by electrolytic lesion. *Cognitive Neurodynamics*, 6:399-407. (査読有)

Fukushima Y., Isomura Y., Yamaguchi Y., Kuroda S., Tsuda I. and Tsukada M. (2012) Inhibitory network dependency in Cantor coding. In: Omori T, Tsuda I, Yamaguchi Y (Eds.), *Advances in Cognitive Neurodynamics III. Amsterdam*, The Netherlands: Springer.

Samura T. and Hayashi H. (2012) Directional spike propagation in a recurrent network: Dynamical firewall as anisotropic recurrent inhibition. *Neural Networks*, Vol. 33, pp.236-246. (査読有)

Samura T., Sato Y., Ikegaya Y., Hayashi H. and Aihara T. (2012) “Power-Law Scaling of Synchronization Robustly Reproduced in the Hippocampal CA3 Slice Culture Model with Small-World Topology” *Lecture Notes in Computer Science* 7664 (査読有)

Aihara T., Sugisaki E., Fukushima Y. and Tsukada M. (2012) “Influence of the Endogenous Acetylcholine on STDP Induction” *Advances in Cognitive Neurodynamics III*. The Amsterdam, Netherlands: Springer, pp.387-392.

Yamazaki Y., Fujii S., Goto J., Sugihara T., Sugita M., Fujiwara H., Kaneko K., Aihara T. and Mikoshiba K. (2012) Suppressive effect of pre-

conditioning low-frequency stimulation on subsequent induction of long-term potentiation by high frequency stimulation in hippocampal CA3 neurons. *Brain Research*. Vol.1449, p15-23. (査読有)

Yamazaki Y., Fujii S., Aihara T., Mikoshiba K. (2012) Activation of Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors during preconditioning low-frequency stimulation leads to reversal of long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience* 207, p1–11. (査読有)

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J., Sandner G, Tsukada M. and Aihara T. (2012 a) Fear Conditioning Induces Guinea Pig Auditory Cortex Activation by Foot Shock Alone *Cognitive Neurodynamics*, Vol.6 , p1-10. (査読有)

Ide Y., Miyazaki T., Lauwereyns J., Sandner G., Tsukada M. and Aihara T.(2012b) Optical imaging of plastic changes induced by fear conditioning in the auditory cortex. *Cognitive Neurodynamics*.Vol 6, p1-10. (査読有)

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J, Tsukada M. and Aihara T. (2012C) “Integration of Hetero Inputs to Guinea Pig Auditory Cortex Established by Fear Conditioning” *Advances in Cognitive Neurodynamics III*. The Netherlands: Springer, pp.765-772.

Tsukada M and Fukushima Y. (2011) A Context Sensitive Mechanism in Hippocampal CA1 Networks, *Bull Math Biol* 73, 417-435. (査読有)

Yoneyama M., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2011) Spatio-temporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons as revealed by laser uncaging stimulation. *Cognitive Neurody-*

namics 5, 333-342. (査読有)

Sugisaki E., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2011) Cholinergic modulation on spike timing-dependent plasticity in hippocampal CA1 network. *Neuroscience* 192: 91-101. (査読有)

Kasabov N., Schliebs R. and Kojima H. (2011) Comptational Neurogenetic Modelling: A Brain Research Framework and a Case Study on Alzheimer’s Disease. *IEEE transactions on Autonomous Mental Development* 3(3): 1-12. (査読有)

Yamaguchi Y, Kuroda S, Fukushima Y, Tsukada M, Tsuda I, (2011) A mathematical model for Cantor coding in the hippocampus. *Neural Networks*, 24:45-53.

Yamaguchi Y., Kuroda S., Fukushima Y., Tsukada M. and Tsuda I. (2010) A mathematical model for Cantor coding in the hippocampus. *Neuralnetworks* 24(1): 43-53. (査読有)

Nishiyama M., Togashi K., Aihara T. and Hong K. (2010) GABAergic activities control spike timing- and frequency-dependent long-term depression at hippocampal excitatory synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2 (22): 1-15. (査読有)

Yoneyama M., Fukushima Y., Kojima H. and Tsukada M. (2010) Analysis of the spatial-temporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons as revealed by laser uncaging stimulation. *Journal of the Japan Neural Network Society* 17(1): 2-11. (査読有)

Kojima H. and Katsumata S. (2009) An Analysis of Synaptic Transmission and its Plasticity by Glutamate Receptor Channel Kinetics Models

and 2-photon Laser Photolysis. LNCS. 5506: 88-94. (査読有)

著書

Kojima, H. (2014) “Information Regulation Mechanisms and Stochastic Processes in Synapses and Neurons”. Springer, pp1~200 (in preparation)

小島比呂志 編集・著 (2014)「脳とニューロンの生理学－情報伝達・発生・意識」 丸善出版 pp1-272 (2014 年 2 月 25 日刊)

Kojima, H. (2013) Information Processing in Synapses. In “Springer Handbook of Bio/Neuro-Informatics” Ed. by N. Kasabov (担当ページ) pp587-624

小島比呂志 監修・翻訳 (2013)「脳・神経科学の研究ガイド」 朝倉書店 pp1-243

加藤総夫, 小島比呂志, 持田澄子 翻訳代表 (2009)「ニューロンの生理学」 フランス語原著 “Physiologie du Neurone” 京都大学学術出版会 pp1-759

塚田稔 (2009)「脳の可塑性」In 自己組織化ハンドブック エヌ・ディー・エス

国際学会等

Sugisaki E., Fukushima Y., TsukadaM. and Aihara T. (2013) Endogenous acetylcholine contributes to STDP. The 4th International Conference on Cognitive Neurodynamics, ICCN2013, June 24, Sigtuna

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J., Tsukada M. andAihara T. (2013) Optical imaging of plastic changes induced by fear conditioning in auditory, visual, and somatosensory cortices. ICCN2013 The 4th International Conference on Cognitive Neurodynamics, June 24, Sweden

Kondo M. and Aihara T. (2013) Spread of back-propagating action potential regulates the layer-specific location arising neural plasticity along dendrites: An optical imaging study with voltage-sensitive dye, Neuroscience 2013 Society for Neuroscience 43rd annual meeting, Nov.14

Hayakawa H., Kamijo T., Yamazaki Y., Fujii S. and Aihara T. (2013) Spatio-temporal interaction of inputs in hippocampal granule cells. Neuroscience 2013 Society for Neuroscience 42th annual meeting, Nov.13, San Diego

Kamijo T., Fukushima Y., Kubota Y., Hida E., Aihara T. and Hayakawa H. (2013) The analysis of input integration around the dendritic branches in dentate granule cells. Neuroscience 2013 Society for Neuroscience 42th annual meeting, Nov.13, San Diego

Samura T., Sakai Y., Hayashi H. andAihara T. (2013) Distance- and direction-dependent synaptic weight distributions for directional spike propagation in a recurrent network: self-actuated shutdown of synaptic plasticity. The 20th International conference on neural information Processing, Nov. 6, Daegu

Samura T., Sakai Y., Hayashi H. and Aihara T. (2013) Input-dependent transition of traveling waves self-organized in the paradoxical direction of the hippocampal CA3 network with anisotropic inhibition. The Society for Neuroscience, Neuroscience 2013, Nov. 12, San Diego

Kondo M., Kitajima T., Fujii S., Nishiyama M. and Aihara T. (2012) Location-dependent influence of feed-forward and feed-back inhibitions in hippocampal CA1 neurons: Analysis using optical imaging method with voltage-sensitive dyes. The 42th

annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2012) (Oct.13-17, New Orleans, USA)

Hayakawa H., Kamijou T., Fukushima Y., Hayashi H., Hida E. and Aihara T. (2012) Spatio-temporal interaction between lateral and medial dendritic inputs in hippocampal granule cell. The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2012) (Oct.13-17, New Orleans, USA)

Kamijo T., Tsuda I., Yamaguchi Y., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2012) Cantor coding for a spatio-temporal input sequence in the CA1. The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2012) (Oct.13-17, New Orleans, USA)

Samura T., Sato Y. D., Ikegaya Y., Hayashi H. and Aihara T. (2012) Diverse background activities hidden in power-law spontaneous activity of hippocampal CA3 slice culture. The 6th International Conference on Soft Computing and Intelligent Systems and the 13th International Symposium on Advanced Intelligent Systems (Nov. 20-24, Kobe, Japan)

Samura T., Sato Y. D., Ikegaya Y., Hayashi H. and Aihara T. (2012) Power-Law Scaling of Synchronization Robustly Reproduced in the Hippocampal CA3 Slice Culture Model with Small-World Topology. The 19th International Conference on Neural Information Processing (Nov. 12-15, Doha. Qatar)

Kojima H., Nikaido M., Maruo T. and Kurihara M. (2011) Quantal nature of Excitatory Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Cells of Rat and AMPA Receptor Kinetics (II). The 41th Annual Meeting of the Society for

Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Kamijo T., Hayakawa H., Sashi A., Fukushima Y., Hida E. and T. Aihara. (2011) Nonlinearity of the input integration of in the dentate Granule cell. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Hayakawa H., Kamijou T., Fukushima Y., Kitajima T. and Aihara T. (2012) Different information processing depending on the dendritic locations in hippocampal granule cell. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J.M., Tsukada M., and Aihara T. (2012) Activation of Guinea Pig Auditory Cortex Induced by Foot Shock Alone after Fear Conditioning. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Segawa Y., Aihara T., Feng Z., Kang S. and Kitajima T. (2011) Inductive property of the voltage-dependent Ca2+-channels to subthreshold resonance. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Sugisaki E., FukushimaY., Tsukada M. and Aihara T. (2011) Acetylcholine modulation on STDP in CA1 region of hippocampus. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Hayakawa H., Kamijou T., Fukushima Y. and Aihara T. (2011) Location dependency of information processing in the dendrite of hippocampal

granule cells. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, IBRO2011, A125, (Jul. 14-18, Florence. Italy)

Kamijo T., Hayakawa H., Fukushima Y. and Aihara T. (2011) Integration of different inputs in the rat hippocampal dentate gyrus. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, IBRO2011, A128, (Jul. 14-18, Florence. Italy)

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J., Sandner G., Tsukada M. and Aihara T. (2011) The Influence of Fear Conditioning on Activation of Guinea Pig Auditory Cortex in the Absence of Sound. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, IBRO2011, B279, (Jul. 14-18, Florence. Italy)

Kondo M., Tsukada M., Sasaki H. and Aihara T. (2011) Interaction of dendritic locations on STDP of hippocampal CA1 area using optical imaging. 8th IBRO World Congress of neuroscience, IBRO2011, D192, (Jul. 14-18, Florence. Italy)

Sugisaki E., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2011) Modulation by acetylcholine of STDP in rat hippocampal CA1 network. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, IBRO2011, D217, (Jul. 14-18, Florence. Italy)

Tsukada M. (2011)Memory Information Representation in the Hippocampus. The 3rd International Conference on Cognitive Neuroscience (Jun. 9-13, Niseko Japan) (招待講演、ICCN 功績賞)

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J., Tsukada M. and Aihara T. (2011) Integration of Hetero Inputs to Guinea Pig Auditory Cortex Established by Fear Conditioning. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics, ICCN2011, P39 (Jun.

9-13, Niseko, Japan)

Aihara T., Sugisaki E., Fukushima Y. and Tsukada M. (2011) Influence of the endogenous acetylcholine on STDP induction. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics, ICCN2011 (Jun. 9-13, Niseko, Japan)

Kondo M., Kitajima T. and Aihara T. (2011) Backpropagating action potentials mediate other sites of STDP among hippocampal CA1 neuronal dendrites. The 15th annual meeting of the ASSC satellite A joint Tamagawa University-Caltech Lecture Course (June 7-8, Kyoto University, Kyoto)

Kamijo T., Hayakawa H., Fukushima Y. and Aihara T. (2011) Information processing on the dendrite in hippocampal granule cells. The 15th annual meeting of the ASSC satellite A joint Tamagawa University-Caltech Lecture Course (Jun. 7-8, Kyoto University, Kyoto)

Sugisaki E., Fukushima Y., Hayakawa H., Tsukada M. and Aihara T. (2010) The effect of cholinergic inputs on STDP in hippocampal CA1 network. 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2010) (Nov. 9-13, San Diego, USA)

Ide Y., Tsukada M. and Aihara T. (2010) Optical imaging of plastic changes induced by fear conditioning in the auditory cortex. 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2010) (Nov. 9-13, San Diego, USA)

Yoneyama M., Fukushima Y., Kojima H., Aihara T. and Tsukada M. (2010) Characteristics of spatial-temporal summation of local EPSP in hippocampal CA1 pyramidal neurons using laser uncaging stimulation. 40th

Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2010) (Nov. 9-13, San Diego, USA)

Kondo M., Kitajima T., Tsukada M. and Aihara T. (2010) Interaction between temporal information of dendritic inputs in hippocampal CA1 neurons. 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2010) (Nov. 9-13, San Diego, USA)

Sugisaki E., Fukushima Y., Hayakawa H., Tsukada M. and Aihara T. (2010) The effect of cholinergic input for STDP in hippocampal CA1 pyramidal neuron. Joint Tamagawa-Keio-Caltech Lecture Course on Neuroeconomics (Sep. 8-10, Keio University, Minato-ku)

Ide Y., Tsukada M. and Aihara T. (2010) Optical imaging of plastic changes induced by fear conditioning in the auditory cortex. Joint Tamagawa-Keio-Caltech Lecture Course on Neuroeconomics, 40 (Sep. 8-10, Keio University, Minato-ku)

Yoneyama M., Fukushima Y., Aihara T. and Tsukada M. (2010) The spatial-temporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons as revealed by laser uncaging stimulation. Joint Tamagawa-Keio-Caltech Lecture Course on Neuroeconomics, (Sep. 8-10, Keio University, Minato-ku)

Kondo M., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2010) The interaction of dendritic inputs in hippocampal CA1 neurons. Joint Tamagawa-Caltech Lecture Course on DECISION MAKING (Mar. 3-5, Tamagawa Univ., Tokyo)

Sugisaki E., Fukushima Y., Hayakawa H., Tsukada M. and Aihara

T. (2010) The effect of colinergic inputs for STDP induction in hippocampal CA1 pyramidal cells. Joint Tamagawa-Caltech Lecture Course on DECISION MAKING (Mar. 3-5, Tamagawa Univ., Tokyo)

Aihara T., Fukushima Y. and Tukada M. (2010) Interaction among dendritic inputs in Hippocampal CA1 network. Dynamic Brain Forum '09, p.17 (Mar. 2-4, Atami, Shizuoka).

Kawaguchi A., Toyoshima C., Nakamura S. and Kojima H. (2009) A study of synaptic transmission of cerebellar Purkinje cells by laser photolysis and glutamate receptor channel kinetics model. 39th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) (Oct. 17-21, Cicago, USA)

Kondo M., Fukushima Y., Kitajima T., Tukada M. and Aihara T. (2009) The analysis of interaction among dendritic inputs in Hippocampal CA1 neurons. 39th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) (Oct. 17-21, Cicago, USA)

Kojima H. (2009) Experimental and theoretical development of neural dynamic data analysis. Invited symposium speaker, New Zealand, (Aug. 8, University of Technology, Auckland) (招待講演)

Kondo M., Fukushima Y., Tukada M. and Aihara T. (2009) The influence of modulating the Back-Propagating Action-Potential on STDP in hippocampal CA1 area. IUPS2009 39th International Congress of Physiological Sciences (Jul. 27-Aug. 1, Kyoto)

Kojima H., Katsumata S., Okabe S., Sakai K. and Shoham S. (2009) Glutamate receptor channel kinetics models and synaptic plasticity

-Future application of 2 photon laser photolysis-. 39th International Congress of Physiological Sciences. (Jul. 27th - Aug. 1, Kyoto, Japan)

国内学会・シンポジウム等

Masashi Kondo and Takeshi Aihara (2013) "Regulation of spike back-propagation by synaptic inputs and the plasticity in hippocampal CA1 neurons" 2013 年 包括脳夏のワークショップ (8 月 31 日、名古屋)

Masashi Kondo and Takeshi Aihara (2013) "Spatio-temporal visualization of the theta-burst induced long-term potentiation at hippocampal CA1 area: analysis using an optical imaging method with voltage-sensitive dye" Neuro2013 (6 月 23 日、京都)

武石歴名、近藤将史、相原威 (2013) 光計測法による海馬 CA1 野の抑制による非線形性の解析 電子情報通信学会総合大会 (3 月 20 日、岐阜)

海江田岳、近藤将史、相原威 (2013) 光計測法を用いた海馬 CA1 野の LTP 多点同時計測 電子情報通信学会総合大会 (3 月 20 日、岐阜)

近藤将史、相原威 (2013) 海馬 CA1 野における興奮性 / 抑制性シナプス入力による樹状突起膜電位ダイナミクスの調節 ～ 膜電位感受性色素を用いた光学的測定 ～ 電子情報通信学会 ニューロコンピューティング研究会 (1 月 25 日、北海道)

杉崎えり子、福島康弘、塚田稔、相原威 (2013) アセチルコリン作用による STDP に対する抑制性細胞の効果、Neuro2013、(6 月 20 日、京都) (査読有)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2013) 海馬歯状回顆粒細胞における非空間情報が空間情報に与える影響の解析、ライフエンジニアリング部門シンポジウム (9 月 13 日、東京)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2013) 海馬歯状回における空間情報処理の解析、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ (8 月 31 日、名古屋)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2013) 海馬歯状回における空間情報処理メカニズム、Neuro 2013 (6 月 21 日、京都)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2013) 海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起上における空間情報・非空間情報の相互作用、ニューロコンピューティング研究会 NC2012-129 (1 月 25 日、北海道)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2013) 海馬歯状回顆粒細胞における入力情報の相互作用、日本神経回路学会 第 13 回 冬のワークショップ『脳と心のメカニズム』(1 月 9 日、北海道)

上條中庸、早川博章、福島康弘、窪田芳之、磯村宜和、相原威 (2013) 海馬顆粒細胞樹状突起分岐周辺の入力統合の解析、日本神経回路学会 第 13 回 冬のワークショップ『脳と心のメカニズム』(1 月 9 日、北海道)

佐村俊和、酒井裕、林初男、相原威 (2013) 海馬 CA3 ネットワークにおけるシータ進行波の自己組織的生成と指向性の制御、平成 25 年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ (8 月 31 日、名古屋)

佐村俊和、酒井裕、林初男、相原威 (2013) 異方的抑制を持つ CA3 リカレントネットワークに生成される指向性シータ進行波、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会合同大会 (6 月 21 日、京都)

佐村俊和、酒井裕、林初男、相原威 (2013) 海馬 CA3 ネットワークに生成される指向性を持つシータ進行波、「知的ナノ集積システムの課題と展望」

平成 24 年度研究会 (3 月 11 日、仙台)

小島比呂志 (2013) “脳は何をしているのか：脳と心を再考する”，第 77 回日本心理学会大会 (シンポジウム：茂木健一郎、大谷悟、河野哲也、小島比呂志、森直久)

平倉洋輔，二階堂雅矩，川口陽仁，小島比呂志 (2012), “Quantal Analysis of Excitatory Postsynaptic Transmission and Kinetics of AMPA Receptor Channels in Cerebellar Purkinje Cells”, P4-a36, 35th Japanese Neuroscience Society, September, 21st, Nagoya (日本神経科学学会 学会発表)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2012) 海馬顆粒細胞の樹状突起部位に依存した情報処理、日本神経回路学会 JNNS2012、(9 月 14 日、名古屋市)

近藤将史、相原威 (2012) 海馬 CA1 野ニューロンにおける feed-forward/feed-back shunting 効果の時空間的解析、第 35 回 日本神経科学大会 (9 月 20 日、名古屋市)

近藤将史、相原威 (2012) 海馬 CA1 神経細胞における抑制入力の動的膜電位抑制：光計測法を用いた解析、日本神経回路学会 第 22 回全国大会、(9 月 13 日、名古屋市)

近藤将史、相原威 (2012) 膜電位イメージング法を用いた海馬 CA1 野フィードフォワード・フィードバック抑制入力の時空間ダイナミクス解析、2012 年 包括脳夏のワークショップ (7 月 26 日、仙台市)

早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威 (2012) 海馬歯状回における空間・非空間情報の処理様式の解析、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ (7 月 26 日、仙台市)

佐村俊和、杉崎えり子、酒井裕、林

初男、相原威 (2012) 長期抑圧の調節によるリカレントネットワークに生じる距離に依存する結合強度分布と指向性興奮伝播への影響、ニューロコンピューティング研究会 NC2012-10 (10 月 5 日、北九州市)

佐村俊和、酒井裕、林初男、相原威 (2012) 興奮伝播を生ずるリカレントネットワークに生じる距離依存結合強度分布、日本神経回路学会 第 22 回全国大会 (9 月 14 日、名古屋市)

佐村俊和、杉崎えり子、酒井裕、林初男、相原威 (2012) 興奮伝播を生ずるリカレントネットワークが獲得する方向・距離に依存した結合強度分布と LTD の影響、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ (7 月 26 日、仙台市)

Kamijo T., Hayakawa H., Fukushima Y., Kubota Y., Isomura N. and Aihara T. (2012) Supralinearity of input integration at dendritic branches in dentate granule cells. The 22nd Annual Conference of the Japanese Neural Network Society, Sep. 13, 2012, Nagoya.

上條中庸、海江田岳、早川博章、福島康弘、相原威 (2012) 海馬歯状回顆粒細胞における非線形性、第 89 回日本生理学会大会 (3 月 29 日、松本市)

上條中庸、早川博章、福島康弘、相原威 (2012) 海馬歯状回における非線形情報処理の解析、ニューロコンピューティング研究会 (3 月 14 日、東京)

Aihara T., Kamijo T. and Hayakawa H. (2011) Nonlinear information processing of the dentate granule cell in hippocampus. The 26th Symposium on Biological and Physiological Engineering, Neurorobotics I, 3B1-2 (Sep. 20-22, Ritumeikan University Biwako, Shiga)

Sugisaki E., Fukushima Y., Hayakawa H.,Tsukada M. and Aihara T. (2011) Influence of acetylcholine on spike timing-dependent plasticity in CA1 network of rat hippocampal slices. Neuro2011 (9 月 14-17 日、横浜市) (ポスター P2-a18, 9 月 15 日)

Hayakawa H., Kamijou T., Fukushima Y. and Aihara T. (2011) Frequency-dependent information processing in the dendrite of hippocampal granule cells. Neuro2011 (9 月 14-17 日、横浜市) (ポスター P2 - b08, 9 月 15 日)

Kamijo T., Hayakawa H., Fukushima Y. and Aihara T. (2011) Interaction of different inputs in the rat hippocampal dentate gyrus. Neuro2011, 2011, Neuro 2011 (9 月 14-17 日、横浜市) (ポスター P2 - b17、9 月 15 日)

Ide Y., Takahashi M., Lauwereyns J., Tsukada M., and Aihara T. (2011) Integration of Different Sensory Modalities in the Auditory Cortex Established by Fear Conditioning. Neuro2011 (9 月 14-17 日、横浜市) (ポスター P4-i17, 9 月 17 日)

早川博章、上條中庸、福島康弘、相原威 (2011) 海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起における情報処理の解析 . FIT2011 第 10 回情報科学技術フォーラム (9 月 7-9 日、函館大学、函館市) RG-002

早川博章、上條中庸、福島康弘、相原威 (2011) 海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起における 2 点間の情報処理の違い. ニューロコンピューティング研究会 NC2011-3 pp9-13 (6 月 23 日、琉球大学、那覇市)

早川博章、上條中庸、米山誠、福島康弘、相原威 (2011) 海馬顆粒細胞の樹状突起における情報処理. 電子情報通信学会第 16 回東京支部 学生会研究発表会 (3 月 12 日) p27

上條中庸、早川博章、福島康弘、相原威 (2011) 海馬歯状回における異なる入力情報の相互作用. 電子情報通信学会第 16 回東京支部 学生会研究発表会 (3 月 12 日) p29

近藤将史、武石歴名、佐々木寛、相原威 (2011) 光計測を用いた海馬 CA1 野樹状突起の入力統合機能. 電子情報通信学会第 16 回東京支部 学生会研究発表会 (3 月 12 日) p31

武石歴名、近藤将史、佐々木寛、相原威 (2011) 海馬 CA1 樹状突起の時空間入力加算：光計測法を用いた解析. 電子情報通信学会第 16 回東京支部 学生会研究発表会 (3 月 12 日) p32

瀬川友作、相原威、北嶋龍雄 (2011) 閾値下共鳴振動現象へのカルシウム依存性 K+ チャネルの関わり. 電子情報通信学会技術報告 (3 月 7 日、玉川大学、町田市) NC2010-141, pp.83-87

近藤将史、塚田稔、相原威 (2011) 海馬 CA1 領域のネットワーク構造に拠った逆伝搬活動電位の変調 - A Network-structure dependent modulation of Back-propagating Action Potential in Hippocampal CA1 area. 日本神経回路学会 第 11 回冬のワークショップ「脳と心のメカニズム」(1 月 11-13 日、留寿都リゾート、北海道)

早川博章、上條中庸、米山誠、福島康弘、相原威 (2011) 海馬歯状回の樹状突起における情報処理. 日本神経回路学会 第 11 回 冬のワークショップ「脳と心のメカニズム」(1 月 11-13 日、留寿都リゾート、北海道)

Kojima H. (2011) Cerebellar Purkinje cell synaptic modulation and AMPA receptor channel kinetics. Invited seminar, Yamaguchi University, School of Science (Mar. 21, Yamaguchi University, city) 招待講演

小島比呂志 (2011) グルタミン酸受容

体イオンチャネル動力学と小脳プルキンエ細胞における学習過程，(3 月 21 日、山口大学理学部、招待講演、山口市)

Yoneyama, M., Fukushima, Y.,Kojima H., Isomura, Y.,Aihara, T.,Tsukada, M. (2010) The spatial-temporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons using laser uncaging stimulation. Neuroscience Research Suppl. P1-a21 日本神経科学会 学会発表)

小島比呂志 (2010) 小脳プルキンエ細胞におけるシナプス伝達効率変化と AMPA 型受容体チャネルのカイネテイクス . (1 月 20 日、2010、佐賀大学医学部、招待講演、佐賀市)

杉崎えり子、福島康弘、早川博章、塚田稔、相原威 (2010) 海馬 CA1 ネットワークにおけるアセチルコリンの STDP への効果. 第 25 回生体・生理工学シンポジウム(9 月 24 日、岡山市)

Hayakawa H., Kamijo T., Yoneyama M., Fukushima Y., Aihara T. (2010) Information processing on the dendrite in hippocampal granule cells. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Yoneyama M., Fukushima Y., Kojima H., Isomura Y., Aihara T. and Tsukada M. (2010) The spatial-temporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons using laser uncaging stimulation. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Sashi A., Emata N., Fujii S., Aihara T. and, Sasaki H.(2010) Event-related

potential during memory encoding of words analyzed by pre/post-sleep recognition performanc. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Ide Y., Tsukada M., and Aihara T. (2010) Optical Imaging of Plastic Changes Induced by Fear Conditioning in The Auditory Cortex. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Kondo M., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2010) Interaction between dendritic inputs in Hippocampal CA1 neurons: the analysis using optical imaging method. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Sugisaki E., Fukushima Y., Tsukada M. and Aihara T. (2010) Cholinergic modulation on STDP in hippocampal CA1 network. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

相原威、藤井聡、酒井裕 (2010) 内因性コリン作動性入力のカボトムアップ情報統合への影響包括脳ネットワーク 夏のワークショップ「ヘテロ複雑システムによるコミュニケーション理解のための神経機構の解明」(7 月 27-28 日)

井出吉紀、塚田稔、相原威 (2010) モルモット聴覚野におけるボトムアップ・トップダウン情報の相互作用. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ (7 月 27-30 日、札幌市)

吉田典弘、興石健一、早川博章、北嶋龍雄、相原威 (2010) 海馬 CA1 ニューロンの樹状突起における逆伝

搬活動電位の伝送特性. 第 29 回日本シミュレーション学会大会 (6 月 20 日、山形大学工学部、米沢市)

相原威、近藤将史、福島康弘、佐々木寛、塚田稔 (2010) 海馬 CA1 ニューロンの入力間相互作用. 日本生理学会第 87 回日本生理学会大会 (5 月 21 日、盛岡市)

Aihara T., Kondo M., Fukushima Y., Sasaki H. and Tsukada M. (2010) The interaction between distal and proximal dendritic inputs in hippocampal CA1 neurons. The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (May 18-21, Morioka)

杉崎えり子、福島康弘、早川博章、塚田稔、相原威 (2010) 海馬 CA1 野におけるトップダウン入力による情報統合メカニズム. 電子通信学会総合大会 (3 月 16 日、仙台市)

早川博章、上條中庸、坂田幸介、相原威 (2010) 海馬歯状回における入力情報の統合. 電子通信学会総合大会 (3 月 16 日、仙台市)

上條中庸、高橋英之、相原威 (2010) 不安感写真鑑賞時の視線の動きに反映される. 日本神経回路学会 脳と心のメカニズム 第 10 回冬のワークショップ (1 月 12-14 日、留寿都リゾート、北海道)

Kojima H. (2010) An Analysis of AMPA receptor kinetics during synaptic efficacy change in cerebellar Purkinje cell. Invited Seminar, Saga University Medical School. (1 月 20 日、佐賀大学医学部) (招待講演)

近藤将史、福島康弘、塚田稔、相原威 (2010) 海馬 CA1 樹状突起の入力情報統合機能. 日本神経回路学会 脳と心のメカニズム第 10 回 冬のワークショップ (1 月 12-14 日、留寿都リゾート、北海道)

Yoneyama M., Fukushima Y., Kojima H., Isomura Y., Aihara T. and Tsukada M. (2010) The spatial-temporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons using laser uncaging stimulation. Neuroscience Research Suppl. P1-a21

豊嶋知佳、宮本愛喜子、佐々木哲彦、小島比呂志 (2009) AMPA 型受容体チャネルによるシナプス電流と TARP (γ7) の役割 . Vol.65, S85, 2009 (日本神経科学会 9 月 10、国際会議場、名古屋市)

小島比呂志、豊嶋知佳、川口陽仁、東條諭、中里陽子 (2009) An analysis of synaptic transmission mediated by AMPA receptor channels by laser photolysis. Neuroscience Research Suppl. (65)S85 (日本神経科学会 9 月 10、国際会議場、名古屋市)

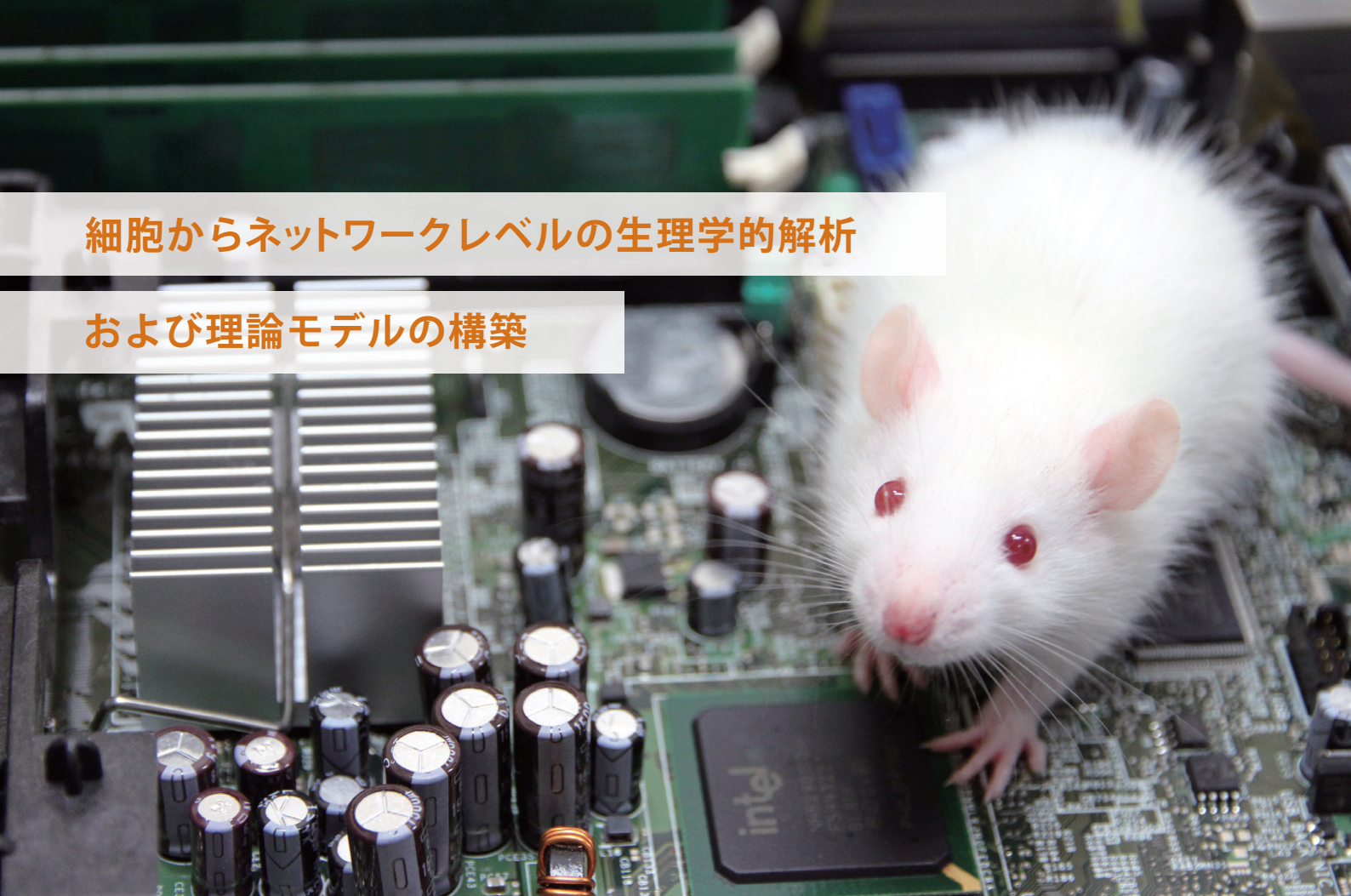
Kojima H. (2009) Synaptic transmission and its plasticity by kinetics models: a future application of 2-photon laser photolysis. Riken Brain Science Institute (BSI) invited and forum seminar. February 18, 2009 (言語：英語、理化学研究所招待講演)

小島比呂志 (2009) 高速多点刺激システムの開発及び神経回路機能解析 (IV) S40, 2009 統合脳ワークショップ、(8 月 21 ～ 23 日、厚生年金会館、札幌市)

興石健一、杉崎えり子、相原威 (2009) 海馬 CA1 ニューロンにおける入力タイミングによる情報処理への影響 FIT2009 (9 月 2-4 日、東北工業大学、仙台市)

細胞からネットワークレベルの生理学的解析

および理論モデルの構築



研究内容

シナプスの可塑性強度パターンというミクロなレベルから、細胞ネットワークにおける記憶形成というマクロなレベルに渡って記憶システムの検証を試みた。また、サルの行動発現の機構の解明と行動学習の脳生理学的な理解を目指し、学習原理の導出へと発展を試みた。

担当研究者

①ラットの海馬に関わる行動生理実験

塚田稔（脳科学研究所）

相原威（工学研究科）

②霊長類脳における行動学習および制御の可塑的機構

丹治順（脳科学研究所）

③脳の学習原理の導出

酒井裕（脳科学研究所）



①ラットの海馬に関わる行動生理実験

【静止状態の海馬におけるニューロン活動の解析】

海馬は記憶・学習に関与する脳領域であり、特に行動を一時的に停止した遅延期間中における情報の保持（作業記憶）に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、海馬のニューロン活動は空間の違いに感受性が高く（場所ニューロン）、頭部の向いている方向、移動速度など様々な要因によっても大きく修飾されることが知られている。海馬の神経活動による記憶関連の情報表現を捉えるためには、被験体の受ける感覚入力や、身体的要因の適切な統制が不可欠となる。そこで本研究では、ノーズポーク法を用いた空間的遅延交代反応課題（delayed spatial alternation task）を作成した（図 1 A；Takahashi et al., 2009a, 2009b）。この課題は、ノーズポーク反応（実験装置内に設置した直径 2 cm 程度の穴に、鼻を突っ込む行動（ポーキング）を行動反応として検出する。検出は穴の内部に設置した赤外線センサを用いた。）を 1 秒間維持させることによって作り出した静止期間（fixation）を介して左右の選択行動がなされるようにデザインしてある。このため、静止期間は比較的良好な感覚入力と身体的要因の統制が期待でき、なおかつ正確な課題の遂行のためには、異なる作業記憶的内容（行動系列の違い）を試行ごとに保持する必要がある。本研究ではまず、この静止期間における海馬のニューロン活動を詳細に解析した。被験体のラットには、12 本の計測電極を慢性的に埋め込み、課題遂行中の自由行動下の状態において、各電極から海馬の神経活動（ニューロン活動および局所脳波（local field potential; LFP））を記録した。

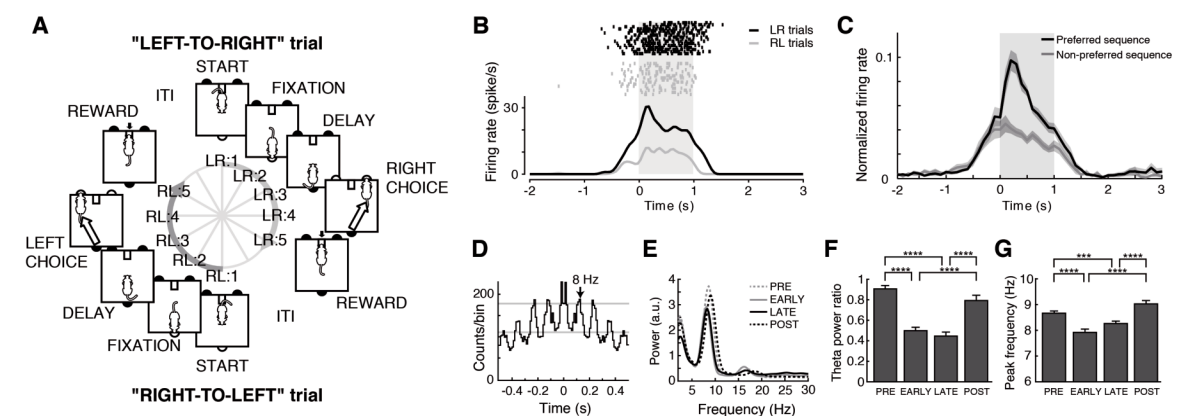


図 1 空間的遅延交代反応課題と fixation に選択的な海馬の神経活動

A) ノーズポーク法による実験課題の流れ

B) エピソード依存性のあるニューロン活動の例（0 ～ 1 秒が fixation）

C) エピソード依存性のあるニューロン活動の集合平均ヒストグラム（n=28）

D) B で示したニューロンの fixation 中の発火周期の自己相関ヒストグラム

E) fixation 前後の CA1 細胞層で記録した LFP のパワースペクトル密度（EARLY, LATE は fixation の前後半の 0.5 秒。PRE, POST は fixation の ± 0.5 秒前後）

F) シータ帯域のパワー

G) 各区間の平均周波数

その結果、海馬の 3 シナプス性回路の出力層にあたる CA1 領域において、fixation 中に選択的に活動頻度を上昇させるニューロン活動が確認された（図 1 B）。また、これらのニューロン（錐体細胞）の中にはエピソード依存性（空間的遅延交代反応課題において、次に右を選択する試行の fixation と、左を選択する試行の fixation との間で活動頻度に差を示す性質）を示すタイプが存在することも確認された（図 1 B, C）。これらのニューロンが発見されたことにより、静止期間中における作業記憶的な情報の保持は、移動行動中

に活動するニューロン（場所ニューロン）とは異なる細胞集団によって表現されている可能性が示された。この可能性は、海馬の破壊によって静止を伴う迷路課題の正答率のみが選択的に悪化する過去の行動実験報告とも一致するものである。

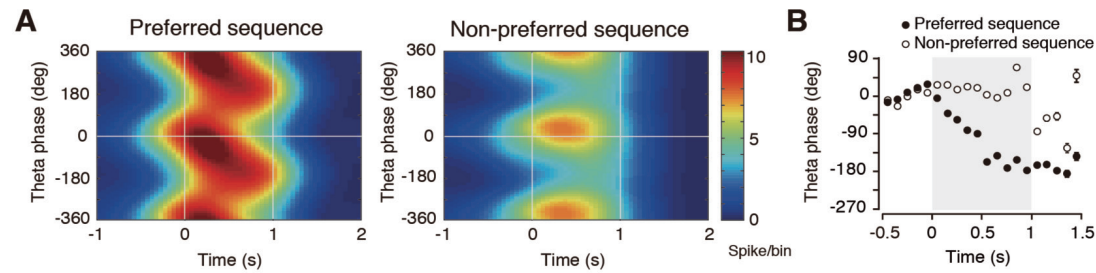


図2 静止期間におけるニューロン活動の位相シフト
A) エピソード依存性を示したニューロン活動データの集合平均データにおける、発火タイミングと LFP 内のシータ波の位相との関係性 (n = 24。0°がシータ波の山)
B) 0.1 秒幅ごとの平均活動位相

【静止状態に見られる CA1 ニューロン活動の位相シフト】

次に、fixation 中のニューロン活動と LFP に見られるシータリズム (図 1 D, E) の関係性を解析し、以下のような特性を発見した (Takahashi et al., in press)。まず、CA1 錐体細胞は、fixation 開始直後には同領域の細胞層で記録されるシータ波の山 (図 2 の 0°に相当) に位相ロックする形で活動電位を発生させるが、1 秒間の fixation 後半になるとシータ波の谷で活動するように変化する (位相シフト)。この現象と類似するものとして、移動行動中に見られる場所ニューロンの位相歳差現象 (場所ニューロンの活動領域 (place field) をラットが通過する際に、発火タイミングがシータ波の位相を少しずつ前進して行き、最終的に約 360°位相が前進する現象) が知られている。しかし、これに対して fixation 中の位相変化は 180°にとどまっている。1 秒以外の長さの fixation についても、同様の 180°の位相シフトが fixation 中に確認されたことから、この現象は、次の行動再開に向けた情報処理と関連した現象である可能性が考えられる。

さらに興味深い点として、この位相シフトがエピソード依存性を示すことが挙げられる。図 2 A には、fixation 中の活動頻度をエピソード依存的に (交代反応課題における行動系列の違いによって) 変化させるニューロンについて、より多くの活動電位を発生させるシーケンスを preferred シーケンス、他方を non-preferred シーケンスとして、fixation 中の位相シフトの集団的傾向 (population trend) を表示している。すると、位相シフトは preferred シーケンスでは顕著に確認されるが、non-preferred シーケンスについてはシータ波の山に位相ロックした活動傾向が fixation 期間のほぼ全域にわたって継続していることがわかる (図 2 B も参照)。このような性質も、従来の位相歳差現象には見られなかった特性である。

以上のように、移動行動中と静止中の CA1 領域のニューロン活動とシータ波との関係性には、類似点とともに、多くの相違点も確認された。これらのメカニズムが統一的な視点から説明可能であるか否かについては、今後のより詳細な検討が必要である。

【CA1 領域で計測されるガンマ波の解析】

静止状態における位相シフト現象の機序を理解するためのアプローチのひとつとして、同期間に CA1 領域がどのような信号入力を受けているのかを検討する方法がある。海馬には、嗅内野 II 層からの入力を歯状回に受け、その後 CA3、CA1 を経由して嗅内野 V 層へと信号を出力するいわゆる 3 シナプス性回路と、

嗅内野 III 層から CA1 へと直接入力が行われる経路が知られている (図 3)。過去の薬理実験や破壊実験から、CA3 からの入力には 30 ~ 40Hz の比較的低周波なガンマ波が伴っており、嗅内野からの入力には 60 ~ 90Hz の高周波なガンマ波が伴っていることが明らかになっている。従って、これらのガンマ帯域 LFP のダイナミクスを捉えることで、CA1 領域が受けている入力信号の変化を類推することが可能となる。

本研究で fixation 中のガンマ帯域 LFP を解析した結果、高周波ガンマは fixation 開始直後に強いパワーを示し、その後減衰していくこと、そして低周波ガンマは fixation 開始後に徐々にパワーを高め、fixation 中盤にピークを示し、その後 fixation が完了するまで高い値を維持した後に、急激に消失することを発見した (図 4 A; Takahashi et al., in press)。

また、fixation 中のガンマ波の各周波数帯域についてシータ波による変調の影響を検討したところ、高周波ガンマは錐体細胞層で観測されるシータ波の山に位相ロックする形でパワーが高まり、それとは逆に低周波ガンマはシータ波の谷に位相ロックしてパワーが高まる傾向が確認された (図 4 B; Takahashi et al., in press)。従って、高周波ガンマを伴う嗅内野からの入力と、低周波ガンマを伴う CA3 からの入力は、CA1 領域において相反する位相で取り込まれていることが明らかになった。

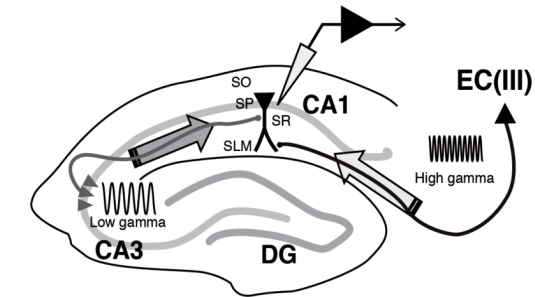


図3 CA1 領域へのふたつの神経連絡経路
(EC: 嗅内野; DG: 歯状回; SP: 細胞層; SO: 上昇層; SR: 放線層; SLM: 網状分子層)

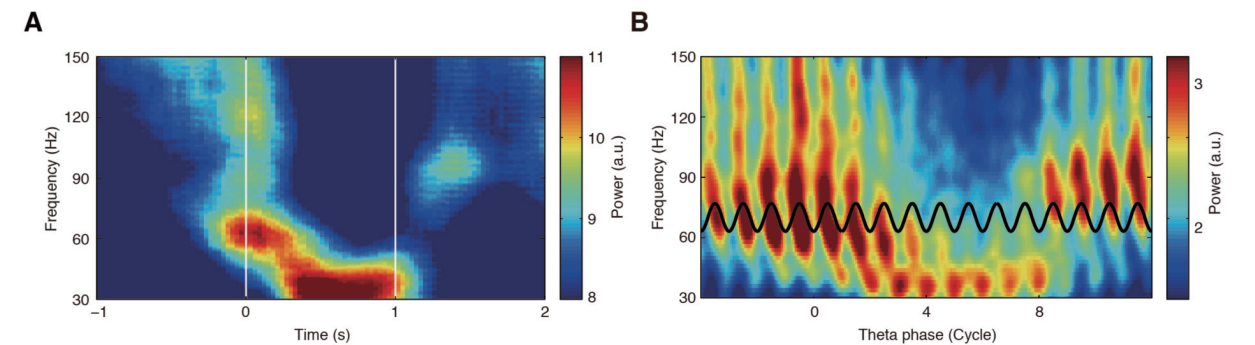


図4 静止期間の CA1 細胞層におけるガンマ帯域パワーのダイナミクス
A) パワースペクトラム (0.5 Hz 幅ごとに t = -1.5 ~ +2.5 に含まれるパワーで標準化)
B) ガンマ帯域パワーのシータ変調プロット。各試行のデータは fixation 開始時点に最も近いシータ波の谷が原点になるように変換し、シータ波の位相を横軸として表示。
図中に 8 Hz のシータ成分を示す

【静止状態の海馬における情報処理モデル】

ラットが移動行動を停止すると、高周波ガンマが高まることから嗅内野から海馬への信号入力が強くなることが推測される (図 5 A)。このときに海馬へと送られてくる情報としては、海馬外部の脳領域 (例え

ば前頭前野や連合野)からの課題の遂行に必要な作業記憶的信息が考えられる。嗅内野と海馬の線維連絡を考慮すると、これらの情報は歯状回、CA3、CA1のすべての海馬領域に送られていると考えられる。そして、これらの情報は海馬内部、特にCA3ニューロンの密な相互結合によって構成される自己連想記憶型のネットワーク回路を駆動し、次にとるべき行動に必要な情報(fixationの時間長の予測や、次に選択するべき方向決定など)を想起する機能へと結びついている可能性が考えられる。このような情報処理モデルは、fixationの中盤以降になってCA3からの出力強度を反映する低周波ガンマがCA1領域で強まる(そしてそのパワーはfixation終了と同時に急激に減衰する)現象の解釈としても妥当なものであると考える。

前節で述べたfixation中のニューロン活動に見られた位相シフトもまた、fixation開始時に嗅内野由来の入力が強い時間帯であるシータ波の山に位相ロックした活動をみせ、fixation後半にはCA3からの入力が強い時間帯であるシータ波の谷に位相ロックした活動へと移行を見せた(図5B)。この事実はCA1のニューロン活動が同領域への入力のスイッチを反映して活動タイミングをシフトさせたことを示唆するものだが、同時に、このニューロン活動の位相シフトにはエピソード依存性があったことに留意する必要がある。つまり、もしもニューロン活動の位相シフトが単純な入力のスイッチを反映した受動的な現象であるとするれば、押し並べて全てのCA1錐体細胞があらゆる試行においてこのような位相シフトを示してしかるべきであるのに対して、本研究でのデータは、特定の行動系列の試行では位相シフトを示さないといった、非常に機能的な性質を示唆するものとなっている。したがって、ニューロン活動の位相シフトは確かにCA1領域の入力変化の影響を受けた現象である可能性が高いものの、そのメカニズムには、各ニューロンあるいはその集団が形成しているニューロン・ネットワークの機能的な挙動が大きく影響している可能性が考えられる。

本研究では、ラットが行動を停止した期間の作業記憶の情報表現をニューロン活動の発火頻度レベルにおいてまず確認し(エピソード依存的なCA1錐体細胞の活動)、さらにローカルな脳内リズム(LFP)とそれらのニューロン活動のタイミングに着目したネットワークレベルでの情報表現の可能性を示すことに成功した(位相シフト現象のエピソード依存性)。脳内リズムと個々の細胞(または局所的な細胞集団)との同期・相関は、脳内に分散的に表現されているとされる様々な情報や機能を、いかにして結びつけるのかという脳の動作原理の根本的な謎のひとつを明らかにするための重要な鍵となる現象である。今後もさらに詳細で多角的なアプローチによる検討が必要であると考えられる。

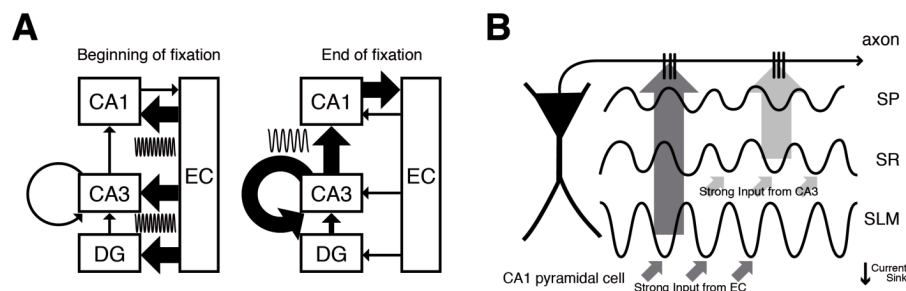


図5 静止期間の海馬における情報処理モデル

A) 静止期間中の情報処理の流れ

左図: fixation直後は海馬外部からの入力が海馬に送信される。この時間帯の海馬内の信号は弱い

右図: fixation終了時には、海馬外部からの情報入力は弱まるが、海馬内部の情報処理回路によって生成された信号がCA1を経由して海馬外部へと伝えられる

B) CA1領域の深さ方向に対するシータ波の特性

異なるLFP位相におけるニューロン活動は異なるタイプの情報を下流組織に伝達している

②霊長類脳における行動学習および制御の可塑的機構

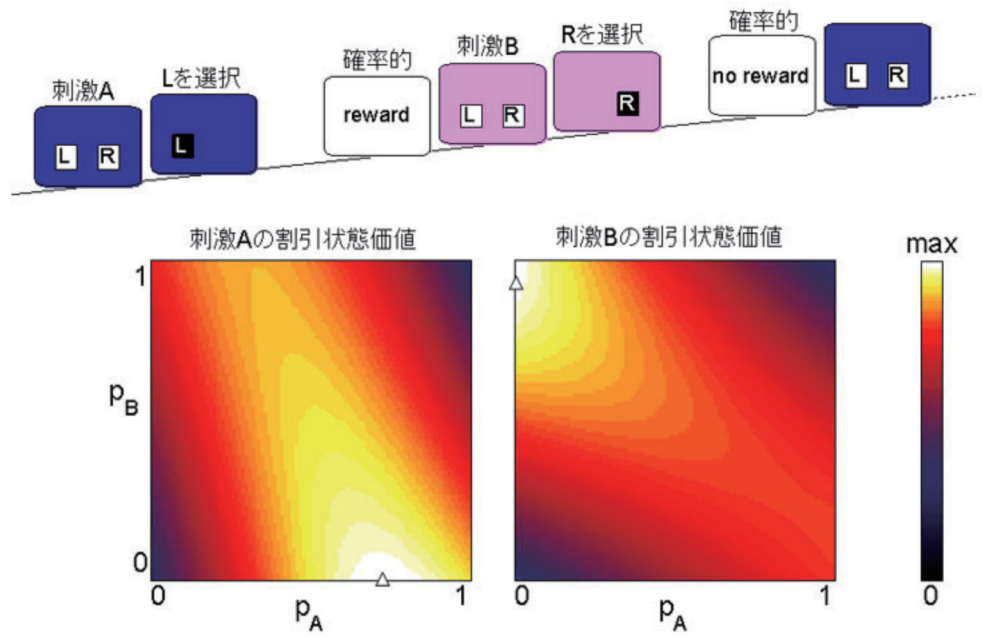
行動学習および行動の制御に必要な脳内の機構を、霊長類を対象とした神経生理学的実験により、細胞レベルで解析した。まず自発的に発現する行動の学習・制御機構について、その動作原理を解明した(Nakajima et al. 2009; Mita et al. 2009; Sawamura et al. 2010; Saga et al. 2011a)。次に、外界の情報を認知し、その情報を変換して行動を達成する学習過程および学習結果について、それらの過程を担う神経機構を明らかにした(Yamagata et al. 2009; Hashimoto et al. 2010)。さらに、自発開始性および外界情報依拠性という区別を統合するメカニズムについても解明を進めることができた(Saga et al. 2011b)。

③脳の学習原理の導出

自然界で動物が生きていくためには、自らの行動の結果がより良いものになるように行動選択の仕方を学習していく必要がある。行動を選択する際、脳にとっては知覚情報や自らの行動の履歴という膨大な情報を利用可能である。このような高次元の状態空間の中で標準的な学習アルゴリズムを用い、得られる結果を最良にしようとする、膨大な試行回数が必要であることが知られている。しかし、実際の動物はいとも簡単に適切な行動選択を取れるように学習できる。利用可能な情報の中からほんの一部の情報だけを抜き出し、その上でより良い結果をもたらす行動を学習しているとしか考えられない。これはどのような機構で実現しているのだろうか。ここでは、逆に動物が報酬最大化に失敗する例、つまり非合理的な選択行動に注目し、その行動特性から動物の脳で行われている学習原理を探り、この問題の解決の糸口にしている。

本プログラムの期間に、我々が注目して研究成果につながった動物の非合理的な選択行動は、報酬が与えられるまでの遅延が異なるような行動選択をさせた場合の選好性に関する法則である。ヒトや動物は目先の利益にとらわれがちである。後で得られる大きな利益より、目先の小さな利益をしばしば選択する。動物のこのような行動特性は、2択の選択課題を繰り返す行うことで調べられている。一方を選ぶと、短い遅延の後、少量のエサが与えられる。もう一方を選ぶと、それより長い遅延の後、より多いエサが与えられる。どちらを選んでも次の試行が始まるまでの時間を一定にしてある。そのため、遅延の長さによらず単純にエサの量の多い方が得である。しかし、動物は、遅延時間のパターンによって、小さい方を選ぶことがある。客観的には損に見えるこのような行動特性は、動物が主観的に将来の利益の価値を割り引いており、主観的価値の高い方を選んだ結果である、と解釈されている。

遅延の分を割り引いた主観的価値を最大化するための学習の枠組みは、強化学習理論の中で「割引価値問題」として定式化されている。強化学習理論は、そのときの状態に応じて適切な行動を取れるように学習するための枠組みである。「割引価値問題」は割引状態価値という値を最大化する問題として定義されている。ある状態の割引状態価値とは、ある時点でその状態にいたとき、それ以後の各時点で得られる利益に遅延の割引の程度をかけながら積分した値の期待値として定義される。割引状態価値は様々な状態で定義される値であり、複数存在する。その全ての割引状態価値を最大化する問題が「割引価値問題」である。強化学習理論の中には「割引価値問題」以外の枠組みも多く存在するが、「割引価値問題」が最も広く分野を越えて広まっており、神経科学、神経経済学、心理学、認知科学において、行動データを解析するツールとして使われている。しかし、強化学習理論が前提としている条件(マルコフ決定過程)が成立しない場合に適用している例も多い。そのような場合にも「割引価値問題」が動物行動を理解する枠組みとして、本当に適しているのだろうか。この論文では、動物の行動実験によく用いられるような単純な選択課題でも、強化学習理論が前提としている条件が崩れ、「割引価値問題」の問題設定自身が崩壊し、最適な行動が存在しなくなる、ということを指摘した(Yamaguchi Sakai 2012)。



上図のように感覚刺激 A もしくは B が提示され、左右にある L か R のボタンを選ぶと、確率的に報酬が与えられる、という試行を繰り返す単純な選択課題を考える。このとき、動物が与えられる感覚刺激 {A or B} を状態として設定している場合を考える。A のときに L ボタンを選ぶ確率を p_A とし、B のときに L ボタンを選ぶ確率を p_B とすると、それぞれ R ボタンを選ぶ確率は $1-p_A$, $1-p_B$ で、 (p_A, p_B) の組で行動選択の仕方が定まる。このとき、A と B の割引状態価値を両方とも最大化するような (p_A, p_B) の組にたどり着くことが、「割引価値問題」における目標となる。しかし、状態 A の割引状態価値は、その後訪れた状態 B でどちらを選ぶかに依存する。したがって、状態 A の割引状態価値を最大化しようとする、状態 B の割引状態価値が最大でなくなる、というようなことが一般には起こりうる。報酬や感覚刺激の提示を決める確率ルールとして、あるルールを設定したときに、 (p_A, p_B) の関数として、A と B の割引状態価値を求め、擬似カラーで図に示した。A の割引状態価値が最大になる (p_A, p_B) と B の割引状態価値が最大になる (p_A, p_B) が大きく異なっており、両方を最大化するような行動選択の仕方が存在しないことがわかる。「割引価値問題」の解が存在せず、学習の目標を失っていることがわかる。「割引価値問題」の枠組みを使うと、一体、何のために学習しているのかわからず、学習行動の理解の枠組みとして崩壊していることを示している。

この欠陥を解決する糸口として、遅延期間に待っている間の割引の効果と試行をまたぐときの割引の効果は異なるという知見に注目した。この両者をつなぐため、イベント発生によって進む離散的な時間ステップを導入し、そのイベント間の実間隔は変動することを想定した。その上で、従来の「割引価値問題」の欠陥を解決するため、最大化すべき値は 1 つであるような問題設定で、動物の行動を再現するものは何か、検討した。その結果、イベントの間は連続的な実時間に従って従来の遅延時間に対するような割引が起こり、イベントをまたいで時間ステップが進むときには、掛け算で割引の効果が起こるような主観的価値を定義すると、1 試行内の割引の効果も試行をまたいだ割引の効果も再現することがわかった。この問題設定は、最大化すべき値は 1 つであるため、どんな状況でも最適行動は存在し、そのための学習を評価することが可能である。

「割引価値問題」に則った枠組みは分野を越えて広まっている。この論文は、適用条件を越えた安易な適用に対して警鐘を鳴らすと共に、破綻しない適切な枠組みを提案した。

業績一覧

雑誌論文

Takahashi M., Sakurai Y., Isomura Y., [Tsukada M.](#), and Lauwereyns J. (2013) The theta cycle and spike timing during fixation in rat hippocampal CA1. *Advances in Cognitive Neurodynamics III*, 773-779. (査読有)

Fujiwara H., Sawa K., Takahashi M., Lauwereyns J., Sandner G., [Tsukada M.](#), and [Aihara T.](#) (2012) Context and the renewal of conditioned taste aversion: the role of rat dorsal hippocampus examined by electrolytic lesion. *Cogn. Neurodyn.* 6: 399-407. (査読有)

Yamaguchi Y. and [Sakai Y.](#) (2012) Reinforcement learning for discounted values often loses the goal in the application to animal learning. *Neural networks* 35C: 88-91. (査読有)

Kimura R., Saiki A., Fujiwara-Tsukamoto Y., Ohkubo F., Kitamura K., Matsuzaki M., [Sakai Y.](#), and Isomura Y. (2012) Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *Journal of neurophysiology* 108: 1781-1792. (査読有)

佐村俊和、杉崎えり子、[酒井裕](#)、林初男、[相原威](#) (2012) 長期抑圧の調節によるリカレントネットワークに生じる距離に依存する結合強度分布と指向性興奮伝播への影響。電子情報通信学会技術研究報告 112(227): 73-78.

Saga Y., Hirata Y., Takahara D., Inoue K. I., Miyachi S., Nambu A., [Tanji J.](#), Takada M. and Hoshi E. (2011b) Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor area in macaques. *Eur. J. Neurosci.* 33(2): 285-297. (査読有)

Shinomoto S., Omi T., Mita A., Mush-

iake H., Shima K., Matsuzaka Y. and [Tanji J.](#) (2011) Deciphering elapsed time and predicting action timing from neuronal population signals. *Front Comput. Neurosci.* 5(29): 1-11.

Saga Y., Iba M., [Tanji J.](#) and Hoshi E. (2011a) Development of multidimensional representations of task phases in the lateral prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 31(29): 10648-10665. (査読有)

Hashimoto M., Takahara D., Hirata Y., Inoue K., Miyachi S., Nambu A., [Tanji J.](#), Takada M. and Hoshi E. (2010) Motor and non-motor projections from the cerebellum to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor cortex in macaques. *Eur. J. Neurosci.* 31: 1402-1413. (査読有)

Sawamura H., Shima K. and [Tanji J.](#) (2010) Deficits in action selection based on numerical information after inactivation of the posterior parietal cortex in monkeys. *J. Neurophysiol.* 104(2): 902-910. (査読有)

[酒井裕](#) (2010) シナプス可塑性と学習—新たな学習原理の発見へ、未来材料 10(8): 67-72. (解説)

Takahashi M., Lauwereyns J., Sakurai Y., and [Tsukada M.](#) (2009a) A code for spatial alternation during fixation in rat hippocampal CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* 102: 556-567. (査読有)

Takahashi M., Lauwereyns J., Sakurai Y., and [Tsukada M.](#) (2009b) Behavioral state-dependent episodic representations in rat CA1 neuronal activity during spatial alternation. *Cogn. Neurodyn.* 3: 165-175. (査読有)

[Sakai Y.](#) and Wada K. (2009) Multiple topological representation self-organized by spike-timing-dependent synaptic learning rule. *Cognitive Neurodynamics* 3(1): 33-38. (査読有)

Nakajima T., Hosaka R., Mushiake H. and [Tanji J.](#) (2009) Covert representation of second-next movement in the pre-supplementary motor area of monkeys. *J. Neurophysiol.* 101: 1883-1889. (査読有)

Mita A., Mushiake H., Shima K., Matsuzaka Y. and [Tanji J.](#) (2009) Interval time coding by neurons in the presupplementary and supplementary motor areas. *Nat. Neurosci.* 12: 502-507. (査読有)

Tachibana K., Suzuki K., Mori E., Mura N., Kawashima R., Horie K., Sato S., [Tanji J.](#) and Mushiake H. (2009) Neural activity in the human brain signals logical rule identification. *J. Neurophysiol.* 102(3): 1526-37. (査読有)

Yamagata T., Nakayama Y., [Tanji J.](#) and Hoshi E. (2009) Processing of visual signals for direct specification of motor targets and for conceptual representation of action targets in the dorsal and ventral premotor cortex. *J. Neurophysiol.* 102: 3280-3294. (査読有)

著書

[丹治順](#)、山鳥重、河村満 (2011) 「アクション (神経心理学コレクション)」医学書 分担任筆

[Tanji J.](#) and Hoshi E. (2009) "Premotor areas: medial." in 「Encyclopedia of Neuroscience」 pp. 925-933, Elsevier.

[Tanji J.](#) and Hoshi E. (2009) Premotor areas. In *Medial Encyclopedia of Neuroscience*. pp.925-933. Elsevier. 分担任筆

Morecraft R. and [Tanji J.](#) (2009) Cingulofrontal interactions and the cingulate motor areas. In *Cingulate Neurobiology and Disease*. Ed. by B. Vogt, New York, Oxford University Press. pp.113-144. 分担任筆

国際学会・シンポジウム等

Yamaguchi Y and [Sakai Y.](#) (2012) A theoretical approach to animal's impulsive preference - Impulsive choice behavior is interpreted as a result of reward-maximization failure. The 6th International Conference on Soft Computing and Intelligent Systems and the 13th International Symposium on Advanced Intelligent Systems (Nov. 20-24, Kobe, Japan)

Lauwereyns J., Takahashi M., Sakurai Y., Isomura Y., and [Tsukada M.](#) (2011) Enhancement of rat hippocampal gamma-band activity during memory-guided spatial alternation. The 41st annual meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 12-16, Washington DC, USA).

Takahashi M., Sakurai Y., Isomura Y., [Tsukada M.](#), and Lauwereyns J. (2011) Frequency shift of hippocampal gamma-band activity during alert immobility in rats. The 41st annual meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 12-16, Washington DC, USA).

Takahashi M., Sakurai Y., Isomura Y., [Tsukada M.](#), and Lauwereyns J. (2011) The theta cycle and spike timing during fixation in rat hippocampal CA1. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics (Jun. 9-13, Niseko, Japan).

Yamaguchi Y and [Sakai Y.](#) (2011) Discounted value problem becomes ill-posed by subject's strategy. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, IBRO2011, D217, (Jul. 14-18, Florence. Italy)

Kimura R., Saiki A., Fujiwara-Tsukamoto Y., [Sakai Y.](#) and Isomura Y. (2011) Coordinated multineuron activities related to externally- and internally-initiated movements in rat motor cortex. The 41th Annual Meet-

ing of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011) (Nov. 12-16, Washington DC, USA)

Takahashi M., Lauwereyns J., Sakurai Y., and [Tsukada M.](#) (2010) Theta phase precession-like activity during alert immobility in rat hippocampal CA1 neurons. The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 13-17, San Diego, USA).

国内学会・シンポジウム等

Yamaguchi Y. and [Sakai Y.](#) (2012) Impulsive preference emerges as a result from reward-maximization failure, Neuroscience 2012 (Sep. 18-21, Nagoya)

Saiki A., Kimura R., Fujiwara-Tsukamoto Y., [Sakai Y.](#) and Isomura Y. (2012) Ensemble spiking activity in rat primary and secondary motor cortices during execution/non-execution of voluntary movement. Neuroscience 2012 (Sep. 18-21, Nagoya)

Fujiwara-Tsukamoto Y., Kimura R., Saiki A., [Sakai Y.](#) and Isomura Y. (2012) Spout-lever manipulation: efficient learning of forelimb movements by head-fixed rats. Neuroscience 2012 (Sep. 18-21, Nagoya)

Kimura R., Saiki A., Fujiwara-Tsukamoto Y., [Sakai Y.](#) and Isomura Y. (2012) Coordinated multineuronal spiking activities related to externally- and internally-initiated movements in rat primary and secondary motor cortices. Neuroscience 2012 (Sep. 18-21, Nagoya)

高橋宗良, 櫻井芳雄, 磯村宜和, [塚田稔](#), Lauwereyns J. (2011) 「不動状態のラット海馬 CA1 領域に見られるガンマ帯域活動の周波数シフト」 第 34 回日本神経科学大会 (9 月 14 ~ 17 日 (発表 15 日), パシフィコ横浜, 横浜市)

西田洋司, 高橋宗良, [塚田稔](#), 伊良

皆啓治, 櫻井芳雄, 磯村宜和, Lauwereyns J. (2011) 「静止中のラット海馬 CA1 領域におけるガンマ帯域の局所脳波ダイナミクス」 電気関係学会九州支部第 64 回連合大会 (9 月 26 ~ 27 日 (発表 26 日), 佐賀大学, 佐賀市)

[酒井裕](#) (2011) 非合理行動の背後にある合理的学習戦略, 日本基礎心理学会第 30 回大会 (12 月 3-4 日、慶應義塾大学日吉キャンパス、横浜市)

Yamaguchi Y. and [Sakai Y.](#) (2011) Discounted value problem becomes ill-posed by subject's strategy. JNNS2011, Dec. 14-17, Okinawa, Japan)

山口良哉, [酒井裕](#) (2011) 強化学習における時間割引の再考. 日本物理学会 第 66 回年次大会 (3 月 15 日、新潟大学, 新潟市)

高橋宗良, Lauwereyns J., 櫻井芳雄, [塚田稔](#) (2010) 「不動状態のラット海馬 CA1 ニューロン活動に見られる位相シフト現象」 第 33 回日本神経科学大会 (9 月 2 ~ 4 日 (発表 3 日), 神戸コンベンションセンター, 神戸市)

[Sakai Y.](#) (2010) A hypothesis of efficient learning rule: dopamine-dependent metaplasticity. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2 ~ 4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Yamaguchi Y. and [Sakai Y.](#) (2010) Purpose or Strategy? Reconsideration of temporal discount in non-Markov situation. 33rd annual meeting of the Japan neuroscience society (Neuro2010) (9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

Behav Ecol Sociobiol (2013) 67:1169–1178
DOI 10.1007/s00265-013-1542-5

ORIGINAL PAPER

Honeybee foragers adjust crop contents before leaving the hive

Effects of distance to food source, food type, and informational state

Ken-ichi Harano · Akiko Mitsuhashi-Asai · Takayuki Konishi · Takashi Suzuki · Masami Sasaki

Received: 28 January 2013 / Revised: 3 April 2013 / Accepted: 8 April 2013 / Published online: 8 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Upon leaving the hive, foragers carry a small amount of honey, which they subsequently consume to generate energy for flight. We investigated the relationship between waggle-phase duration and crop volume in foragers (both dancers and dance followers) leaving the hive. Our findings indicate that these variables were positively correlated in the two types of bee, suggesting that they were able to adjust the amount of food that they carry depending on the distance to a food source. We also found that dance followers left the hive with a larger amount of honey than dancers. We suggest two possible explanations: (1) dance followers have less information about the location of the food source than dancers, who have a better knowledge of the surrounding area; or (2) honeybees lack a precise calibration method for estimating energy needs from waggle-run duration. The effect of foraging experience was confirmed: bees decreased their honey load at departure with repeated trips to a sugar-syrup feeder. Honeybees showed a different pattern of change when the feeder provided soybean flour as a pollen substitute, possibly because honeybees use honey not only as an energy source but also as “glue” to form “balls” of pollen on their hind legs. Based on our observations that followers of sugar-syrup foragers carry a different amount of honey in their crop than followers of soybean-followers, we suggest that waggle dancers also convey information concerning food type.

Communicated by D. Naug

K. Harano (✉) · M. Sasaki
Honeybee Science Research Center, Tamagawa University,
Machida, Tokyo 194-8610, Japan
e-mail: kharano@lab.tamagawa.ac.jp

A. Mitsuhashi-Asai · T. Konishi · T. Suzuki · M. Sasaki
Department of Agriculture, Tamagawa University, Machida,
Tokyo 194-8610, Japan

Keywords Flight energetics · Foraging · Optimal foraging strategy · Social learning · Waggle dance

Introduction

Flying animals consume much energy (Peters 1983). Honeybee foragers fly great distances from their hive even though they have limited energy reserves, such as fat and glycogen (Panzenböck and Crailsheim 1996). As an energy source, honeybee foragers take small amounts of honey from nestmates through trophallaxis shortly before leaving the hive (von Frisch 1967). The honey is stored in the crop (honey stomach) and is consumed to provide energy during a foraging trip (Gmeinbauer and Crailsheim 1993). Males leaving the hive on a mating flight (Free 1957) and workers preparing to leave in a swarm (Combs 1972) are also known to fill their crops with honey.

Although a large honey load enables a worker to fly a long distance, there may be costs associated with carrying the load. For example, increased body weight due to the honey load might increase flight energy cost (Wolf et al. 1989; Feuerbacher et al. 2003; but also see Balderrama et al. 1992; Moffatt 2000). A large honey load might also reduce maneuverability and agility, and consequently increase predation risk. These costs have been reported in birds in association with fat accumulation (Witter and Cuthill 1993). In addition, there may be additional costs specific to bees. Since bees transport liquid loads (nectar and water) in the crop, carrying honey limits space for these loads. Visscher et al. (1996) argued that this is why water-collecting bees carry only a little fuel when leaving the hive.

Considering these costs, the amount of honey loaded before departing the nest should be regulated in an adaptive fashion. Beutler (1950, 1951) investigated the relationship between the crop contents of foragers leaving the nest and

the distances to their food sources. She found that foragers collecting sugar syrup at a distant feeder left the nest with larger amounts of honey than those foraging at a feeder nearby, suggesting that bees adjust their fuel load as a function of the expected energy requirement of a foraging trip.

It is well known that honeybees communicate the locations of food sources to nestmates by means of dance communication (von Frisch 1967). The distance and direction to a food source are expressed in the duration and direction, respectively, of the waggle run in waggle dances. Nestmates can obtain this information by following the dances (von Frisch 1967; Michelsen et al. 1992; Riley et al. 2005). Therefore, it is possible that dance followers, that is, potential recruits, determine the amount of fuel needed based on the dance information, as previously mentioned by Beutler (1950).

Conversely, dance followers may be expected to have a larger honey load than dancers because waggle dances indicate only the approximate location of a food source. Followers may therefore require more energy to find the food source than dancers that have already learnt the route from the hive. Esch and Bastian (1970) reported that indeed recruits need more time to reach a feeder than dancers. Other studies have shown that the dance language contains a certain amount of intrinsic inaccuracy in terms of the indication of distance and direction to a food source (von Frisch 1967; De Marco et al. 2008). This inaccuracy in the encoding of spatial information is, at least partially, due to a sensory constraint in dancers (Tanner and Visscher 2010). The waggle dance recruits bees to a relatively wide area of 25–100 m in radius around a food source (von Frisch 1967; Gould 1975a, b, 1976; Towne and Gould 1988). The fact that a considerable proportion of followers fail to find a food source (Seeley 1983; Biesmeijer and Seeley 2005) also suggests that dance information does not provide sufficient guidance to a food source and that recruits need to search the target after arriving at the general area indicated by the dance.

To examine whether foragers use distance information in waggle dances to determine the amount of fuel loaded at departure and how this determination is influenced by foraging experience, we investigated the relationship between waggle-run duration and crop contents at departure from the nest in both dancers and dance followers. We also evaluated the effect of foraging experience in another experiment in which bees were allowed to visit an identical feeder multiple times.

Honeybees collect not only nectar but also pollen as food. Typically, individual workers tend to collect either—but not both—of these substances (Free 1960). Beutler (1950) showed that pollen foragers carried a greater amount of honey than did sugar-syrup foragers working on feeders and explained this finding by arguing that pollen foragers need additional honey for collecting pollen. Pollen foragers typically regurgitate a bit of honey or nectar and then mix it with

collected pollen to ensure that the grains are sufficiently sticky to form pollen balls (Hodges 1952). If Beutler's argument is correct, pollen foragers may adjust the amount of honey carried at departure differently from nectar foragers because the honey will be used for an additional purpose, not just for fuel. In our study, we compared the regulation of honey crop content at departure between foragers collecting a pollen substitute and those collecting sugar syrup.

Methods

Bees and hive

A colony of honeybee *Apis mellifera* L. housed in a glass-walled observation hive was used for our experiments (Fig. 1a). The colony consisted of a queen and 3,000–4,000 worker bees with two frames of comb. Each frame contained a large area of brood in the center, both sealed and open cells of honey in the periphery, and pollen stores in a belt-like zone between these two areas. The conditions were maintained as above during observation in some experiments, but brood and food stores gradually decreased in the other experiments carried out in a flight cage. In the latter experiments, the colony was fed 500 ml of 50 % sugar syrup using a feeder placed at the entrance of the hive and with a patty of pollen substitute (Feed Bee; Bee Processing Enterprises Ltd., Canton ON, Canada) placed in the hive about once every 2 weeks. The hive was placed in an air-conditioned (27 ± 2 °C) room.

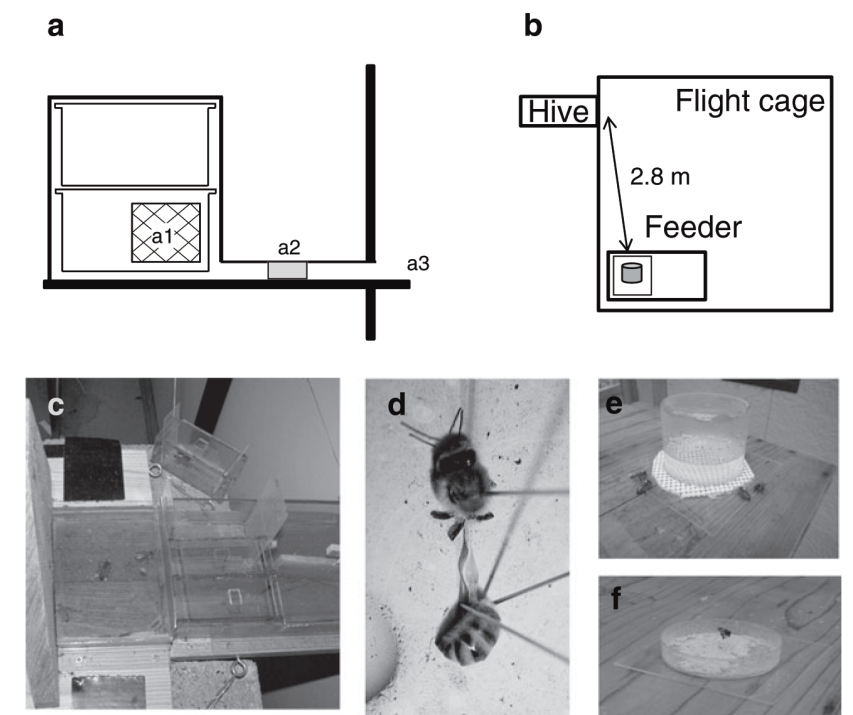
The hive was connected either to the field or to an outdoor flight cage ($3.7 \times 3.7 \times 2.4$ m; Fig. 1b) with a transparent corridor ($9.5 \times 33 \times 3$ cm) made of polyvinyl chloride except for the wooden floor. The corridor was equipped with a sampling apparatus to catch workers returning to or leaving the hive (Fig. 1a, c). The sampling apparatus consisted of three tube-like chambers that were open at both ends. These were placed at the middle of the corridor so bees had to pass through one of them when exiting or entering the hive. Bees were captured by closing the chamber with two pieces of plastic board after they had entered the chamber (Fig. 1c).

Bees returning from foraging were guided to one side of the lower frame by a wedge-shaped wooden block placed in the entrance of the hive (Seeley 1995) so that one observer could observe all of the dances performed. An area of comb adjacent to the entrance (“dance floor”) was covered with a nylon screen (18×20 cm, 4.2 mesh; Fig. 1a) through which the bees were marked by the observer as described below.

Marking bees

The thoraces of bees performing a waggle dance or those following a dance were marked with a small amount of

Fig. 1 Experimental apparatus. **a** Horizontal view of experimental colony housed in a two-frame observation hive: *a1* nylon screen covering dance floor, *a2* sampling apparatus, *a3* colony entrance. **b** Vertical view of experimental set-up in a flight cage. **c** Sampling apparatus. Departing bees were confined in a chamber by inserting two pieces of plastic board vertically. Each chamber can be used separately. **d** Crop exposed by separating thorax and abdomen. **e** Sugar-syrup feeder. **f** Soybean-flour feeder



colored chalk powder using a fine paint brush (no. 0; Sakura Co. Ltd., Tokyo, Japan) inserted through the nylon screen covering the dance floor. We adopted this method to minimize disturbance to the bee upon marking. In many studies (e.g., von Frisch 1967; Seeley 1995), bees were marked with artists' paint. However, while such markings have advantages in terms of visibility and persistency, the method sometimes induces intensive self-grooming that interrupts bee behavior, including dance following. Bees marked with chalk powder seldom show this undesirable response. Markings with chalk powder tend to persist for only a few hours, but this length of time was adequate for our purpose.

Measurement of crop contents

Marked bees leaving the hive were captured using the sampling apparatus and fixed on a dissection dish by an insect pin. Each bee's abdomen was gently pulled from the thorax using tweezers to expose the crop (Fig. 1d). The content of the crop was then quantified in a 50-μL microsyringe (Hamilton, Reno, NE). When the contents were too small to be collected, even though a small amount of liquid was seen in the crop, the quantity was considered to be 0.25 μL since the quantification limit of this method was 0.5 μL.

Relationship between waggle-run duration and crop contents

To examine the effects of distance to a food source on the amount of honey in a forager's crop upon departure, we investigated the relationship between waggle-run duration

in the dances performed ($N=54$) or followed ($N=44$) by bees and the crop contents of these bees as they left the hive. The experiment was carried out from late June to early August, 2011 with a colony in which bees were allowed to forage freely in the field. The duration of the waggle run in waggle dances was recorded with a digital voice recorder (model ICR-PS401RM; Sanyo, Tokyo, Japan). Three to six waggle runs were recorded per dance, and the average duration was calculated from the record. We focused only on dances performed without pollen loads.

Dance followers were sampled only when they went to the hive entrance within 3 min after following a dance. A dance was usually followed by several bees. We sampled the bee that most actively followed a given dance.

Determination of crop contents in relation to foraging experience in a flight cage

To investigate the effect of foraging experience on the crop content of bees departing for foraging, we allowed bees to visit a feeder multiple times before we measured the crop contents. In this series of experiments, an observation hive was connected to a flight cage, and bees were prevented from foraging on natural food sources. The experiments were carried out from September to November, 2010.

A sugar-syrup feeder (Fig. 1e) was placed in the flight cage on a table that was 2.8 m distant from the entrance of the observation hive and 1.2 m above the ground (Fig. 1b). The feeder consisted of a plastic board ($12 \times 12 \times 0.2$ cm), a piece of polyvinyl chloride screen (diameter 9.5 cm,

thickness 2 mm, mesh size 5) placed on the board, and a glass vessel (diameter 7.5 cm, height 6 cm) which was filled with 40 % sucrose solution and placed upside down on the screen. Bees fed on the sugar syrup that leaked from the gap formed by the screen between the glass vessel and the plastic board (Fig. 1e).

To recruit the first bee to the feeder, a cotton ball soaked in sugar syrup was initially placed at the entrance of the hive; once bees were sucking the syrup, the cotton ball (with bees) was moved to the feeder. Some of these “priming” bees began to commute between the feeder and the hive and subsequently recruited other bees. When some of the bees had been trained to visit the feeder in previous days, they appeared at the feeder and recruited other bees a short time after the feeder was provided in the morning of the experimental day. In the absence of these priming or previously trained bees, the feeder was often not found for several hours. We did not use the priming or previously trained bees for analysis.

When bees arrived at a feeder, we marked each one on the thorax and/or abdomen with different colors of acrylic paint (Acryla Gouache; Holbein Works Ltd., Osaka, Japan) for individual identification. These bees were captured on departure from the hive after they had visited the feeder one to four times and sacrificed for the determination of crop contents (19–23 bees each). Only a small number of bees (<10) were allowed to forage at any one time to avoid crowding at the feeder. In addition, a few bees were allowed to forage continuously so that naive bees were always being recruited to the feeder. Excess bees arriving at the feeder were captured and not allowed to return to the colony. When unmarked bees were going to leave the hive after following a waggle dance, they were sampled as followers; crop content was measured in 37 followers. These bees were considered to be making their first trip to a feeder; it was always certain that these bees had never visited the feeder before being captured because (1) the feeder was provided only during an observation period and (2) all bees that had previously visited a feeder were marked. We also determined the crop contents at departure after bees were allowed to forage on the feeder continuously for 1–5 h. In this experiment, multiple bees were allowed to visit the feeder at the same time and marked with paint upon the first visit. Measurement of crop content was started 1 h after the last bee was marked and ended within 5 h after the first bee appeared at the feeder. Most of these bees were not individually identified, but some were in order to record the number and rate of their visits during the foraging period. Forty-nine bees were sampled for the measurement of crop content.

In other experiments, dry soybean flour (CanDo Co. Ltd., Tokyo, Japan) was provided in a Petri dish (diameter 9 cm, height 1.5 cm) placed on a plastic board (Fig. 1f) to compare honey crop contents at departure between bees collecting this material and those collecting the sucrose solution.

Soybean flour is commonly substituted for pollen in bee-keeping practice. Sampling of bees and determination of crop contents were carried out ($N=21$ –49 each) as described in the experiments with a sugar-syrup feeder. The experiment was repeated twice in different weeks using the same colony. The amount of remaining honey in the bees’ crops was also measured when foragers returned to the hive after collecting soybean flour to estimate the consumption of honey during a foraging trip. In addition, the size of soybean-flour loads collected by those bees was measured by weighing the loads after drying at 100 °C overnight.

Crop contents in followers depending on the food type collected by dancers

To test whether dance followers regulate the amount of honey load at departure depending on the food type collected by the dancers that they followed, both sugar-syrup and soybean-flour feeders were placed 20 cm apart on a table at the same time. Bees visiting one of the two feeders were marked with paint of different colors to identify which food they were collecting. Most bees solely foraged on one feeder, and bees that changed feeders were eliminated from the analysis. When these bees performed a waggle dance in a hive, 40 or 50 followers were captured for determination of crop contents upon departure. The contents were compared between followers that paid attention to a sugar-syrup forager ($N=40$) and those that watched a soybean-flour forager ($N=50$).

Statistics

The degree of correlation between waggle-run duration and honey crop content at departure from the hive was determined using Spearman’s correlation coefficient (r_s) for both dancers and followers. After obtaining regression equations for the data, fitness of the equations to plots was compared between dancers and followers. Differences between actual data and expected values based on the regressions were calculated for crop contents as well as between the two types of bees using Mann–Whitney’s U test. Analysis of covariance (ANCOVA) was applied to test the difference in crop contents between the two types of bees under consideration on the effects of waggle-run duration.

The effect of the number of visits to a feeder on the size of the honey load at departure from the hive was tested by Steel–Dwass multiple comparison after Kruskal–Wallis test. The Mann–Whitney U test was used to examine whether dance followers adjusted their honey load size at departure depending on the food type that a dancer had collected. We adopted non-parametric methods because inequality of variance was detected for some data sets. All statistical analyses except for ANCOVA were carried out using Excel add-in

software Ekuseru-Toukei ver. 2007 (SSRI Co. Ltd., Tokyo, Japan). ANCOVA was conducted with JMP ver. 9.0.2 (SAS Institute, Cary, NC). All statistical tests were performed at the 5 % significance level.

Results

Correlations between waggle run durations and honey crop contents

When bees were allowed to forage on flowers in the field, dancers showed a positive correlation between the waggle-run duration of their dances and the size of the crop content at departure (Spearman’s rank correlation $r_s=0.74$, $N=54$, $P<0.001$; Fig. 2). A similar correlation was found in followers which significantly increased the amount of honey taken from the hive with increases in waggle-run duration in a dance that they followed ($r_s=0.58$, $N=44$, $P<0.001$; Fig. 2). When the amounts of crop content were compared between dancers and followers taking into account the effects of waggle-run duration, the values were generally lower in the former than in the latter (ANCOVA $F_{1, 95}=23.26$, $N=54$ and 44, respectively, $P<0.001$).

From these data, regression equations were obtained as $y=1.5399x+0.7879$ in dancers and $y=3.7244x+2.3053$ in followers ($P<0.001$ each), where y =honey crop content upon departure from the hive and x =waggle-run duration. When the variances of the actual data from the expected value were calculated for crop contents in the two bee groups, these were statistically smaller in dancers [1.76 ± 1.82 μL (mean \pm standard deviation, SD), $N=54$] than in followers (3.57 ± 3.32 μL , $N=44$) (Mann–Whitney U test $Z=3.89$, $P<0.001$), indicating that the regression equation fit better in the former group.

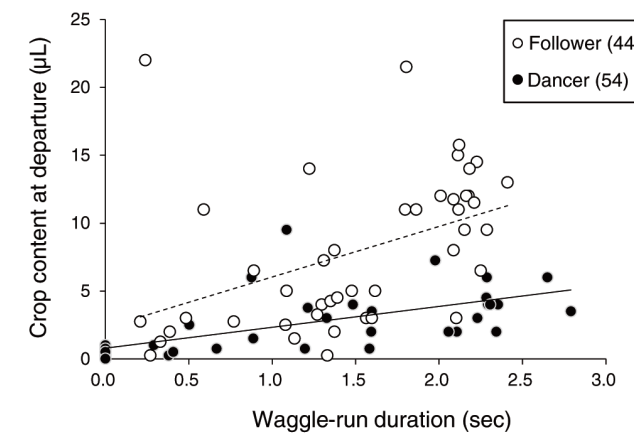


Fig. 2 Relationships between waggle-run duration in a dance performed or followed and crop contents in waggle dancers and followers upon departure from the hive. Solid and dashed lines Regression lines for dancers ($y=1.5399x+0.7879$, $P<0.001$) and followers ($y=3.7244x+2.3053$, $P<0.001$), respectively, numbers in parenthesis sample size

Effects of foraging experience in sugar-syrup foragers

With repeated trips to the sugar-syrup feeder, bees decreased their crop contents at departure (Kruskal–Wallis test $H_5=91.09$, $N=169$, $P<0.001$; Fig. 3). A sharp decline was found between the first and third trip, but the decline appeared to continue after this point because the mean value had decreased still further after 1–5 h of continuous foraging (Steel–Dwass test $P<0.01$). In the continuous foraging experiment, bees visited the feeder a mean of 11.2 ± 2.8 times ($N=16$) during the first hour, but we could not record the number of their visits in the later period because we had to leave the feeder for the measurement of crop contents (see Methods).

Effects of foraging experience in soybean-flour foragers

In the soybean-flour experiment, bees briefly landed on the mound of soybean flour once at the soybean-flour feeder and made balls of the soybean flour on their hind legs while making hovering flights. The soybean-flour loads were brought back to the hive and unloaded to a cell in a similar fashion as observed in pollen foragers coming back from flowers.

The crop content in bees leaving the hive after following a waggle dance was smaller than that of other bees (Fig. 4). It is possible that being marked with chalk powder disturbed followers so that they did not receive a sufficient amount of honey from nestmates. We tested this possibility by marking experienced foragers on the dance floor with chalk. Bees

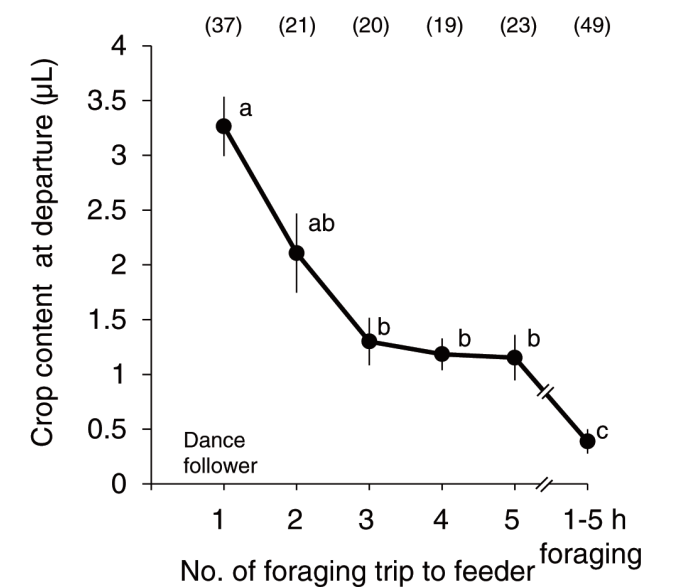


Fig. 3 Influence of foraging experience on size of honey load upon departure from the hive in sugar-syrup foragers. Different letters on plot indicate significant differences (Steel–Dwass test $P<0.01$). Error bars Standard error of the mean (SEM), numbers in parenthesis sample sizes

leaving the nest for a second trip were marked with chalk powder before they received honey from nestmates; this was also done in followers. We detected no statistical difference in crop contents at departure between second-trip foragers marked with chalk and those without chalk marking (with marking, $5.9 \pm 1.6 \mu\text{L}$, $N=29$; without marking, $6.4 \pm 1.9 \mu\text{L}$, $N=20$; Mann–Whitney U test $Z=0.47$, $P=0.64$). The chalk-marked second-trip foragers left the nest with statistically significant larger amounts of honey than chalk-marked followers ($4.1 \pm 1.7 \mu\text{L}$, $N=30$) (Steel–Dwass test $P<0.01$). Therefore, the smaller crop content in followers was not attributed to the handling effect of marking.

Honey crop contents in bees leaving for the soybean-flour feeder changed depending on foraging experience, but the pattern of change was different from that obtained with sugar-syrup foragers (Fig. 4). After returning back from their first successful trip, the bees left the hive with an increased amount of honey in the crop (Steel–Dwass test $P<0.01$; Fig. 4). The amount of honey load did not significantly change thereafter, even when the bees continuously foraged for 1–5 h ($P>0.05$). This pattern was confirmed in a

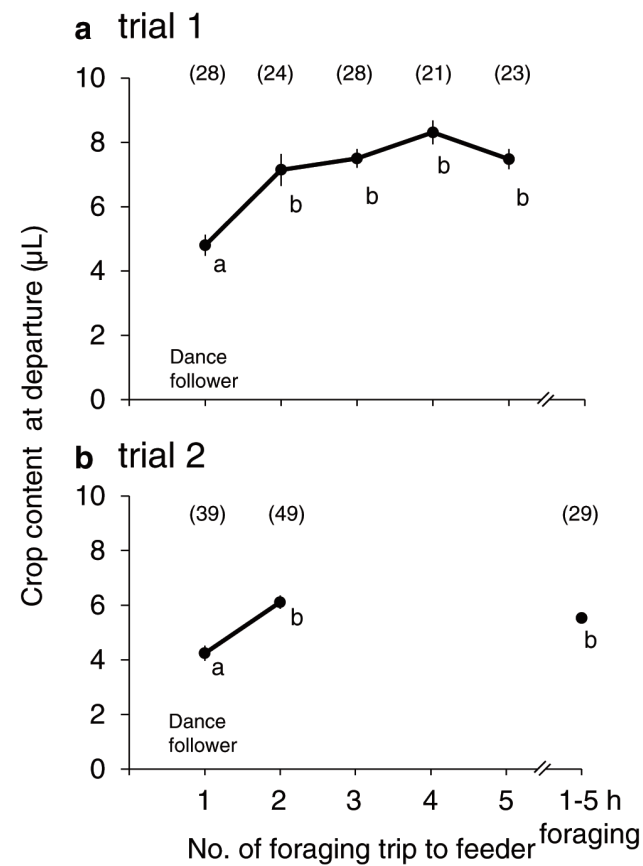


Fig. 4 Influence of foraging experience on size of honey load upon departure from the hive in soybean-flour foragers. Different letters accompanying plots indicate significant differences by the Steel–Dwass test ($P<0.01$). Error bars SEM, numbers in parenthesis Sample sizes

replicated experiment (Fig. 4b). In the continuous foraging experiment, bees visited the soybean-flour feeder 11.2 ± 2.5 times (mean \pm SD, $N=10$) during the first 1 h.

Effects of food type that dancers collected on dance followers

When the results described above were compared between sugar-syrup and soybean-flour foragers, the followers of soybean-flour foragers appeared to load a larger amount of honey at departure than sugar-syrup foragers (Mann–Whitney U -test $Z=3.51$, $N=37$ and 67 , respectively, $P<0.001$; Figs. 3 and 4). This difference was confirmed in another experiment in which the two feeders were provided during the same period so that data were collected under the same conditions ($Z=3.46$, $P<0.001$; Fig. 5).

Honey load remaining at arrival at the nest and size of soybean-flour load

To estimate how much honey was consumed during a single trip in soybean-flour foraging, crop contents were measured in bees arriving at the hive. These bees still had $2.0 \pm 1.3 \mu\text{L}$ (mean \pm SD, $N=51$) of honey in their crops. Because bees foraging on soybean flour loaded $6.7 \pm 1.9 \mu\text{L}$ of honey at departure ($N=198$, bees that had visited a feeder once or more), we estimated that an average of $4.7 \mu\text{L}$ was used during a round trip. In this measurement, bees returning from the first successful trip were not sampled because they left the hive with a smaller amount of honey than the others.

We also sampled loads of soybean flour from the bees' hind legs upon arrival at the hive. Figure 6 shows a negative correlation between dry weight of the load and amount of remaining honey in their crop on arrival (Spearman's rank correlation $r_s=-0.51$, $N=35$, $P<0.01$).

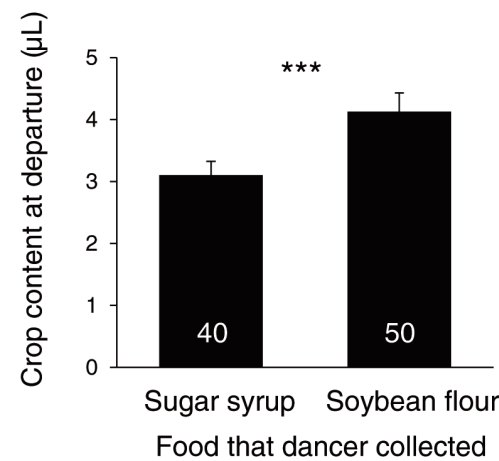


Fig. 5 Influence of food type that dancers collected on size of the honey load of the respective dance followers upon departure from the hive. Error bars SEM, numbers in bars sample size. *** $P<0.001$ by Mann–Whitney U test

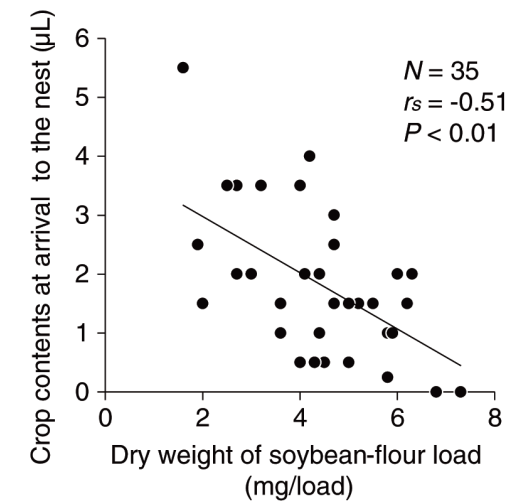


Fig. 6 Relationship between size of soybean-flour load and amount of remaining crop content in returning bees. A regression line ($y=-0.4767x + 3.9292$; $P<0.001$) is shown in the figure

Discussion

The results of our study confirm those of Beutler (1950) that foragers load a certain amount of honey at departure depending on the distance to a food source. We further found that the amount of honey loaded was influenced by dance communication, foraging experience, and food type. These results demonstrate that honey bees possess a complicated and finely tuned mechanism through which they are able to regulate the amount of honey loaded before departure from the hive.

One question is whether the amount of honey loaded corresponds to the energy expended in flight to the food source. A regression obtained for dancers (Fig. 2) predicts that dancers showing a waggle run for 1.3 s, which indicates a distance of 1 km from the hive to the food source in our bee strain (M. Sasaki, unpublished data), have a honey load of $2.8 \mu\text{L}$ at departure. Assuming that the concentration of honey is 20–80 % (Gary 1992; Seeley 1995), the sugar content of the load is calculated to be 0.5–2.2 mg. According to an estimation by Visscher et al. (1996) based on Gmeinbauer and Crailsheim (1993), workers can fly 2 km on 1 mg of sugar. Therefore, bees can fly 1–4.5 km with $2.8 \mu\text{L}$ of honey. When the waggle-run duration increased by 1 s, which corresponds to an increase in flight distance of 1,087 m (M. Sasaki, unpublished data), dancers increased the crop load by approximately $1.5 \mu\text{L}$ of honey (Fig. 2). Following the estimation described above, the additional honey increases the distance to which the bees can fly by 0.6–2.4 km. Although the concentration of honey that foragers load at departure was not closely investigated, it would appear from our results that dancers adjust their crop loads in relation to the energy requirement in the foraging trip.

Do dance followers determine the amount of honey load at departure based on dance information?

The crop contents of dance followers leaving a hive were positively correlated with the respective waggle-run durations of the dances that they followed. This relationship may reflect a determination of the amount of fuel load based on dance information. Although this explanation appears to be reasonable because followers can use the dance information to locate the advertised food source (von Frisch 1967; Michelsen et al. 1992; Riley et al. 2005), our results might exaggerate the effect of dance communication on the regulation of honey load in followers. In our study, we did not control the foraging experience of dance followers, and when dancers advertised food sources by dancing, some followers may have already visited the sources. In this case, followers attending the dancer could adjust their crop load size without any reference to the information provided by the dance on location because a flower scent carried by dancers would be sufficient to re-activate them to visit a previously visited food source based on their navigational memory (Reinhard et al. 2004).

It is known that some followers ignore dance information and that they visit a previously visited food source other than an advertised site under certain conditions (von Frisch 1968; Grüter et al. 2008). These bees may load a quantity of fuel based on their own memory independent of the distance indicated by dances. In our results, however, the sizes of crop loads correlated well with waggle-run durations in the dances that had been followed. We sampled the most active followers among many followers attending to a dancer. This method might have helped us to avoid sampling bees that would ignore dance information because bees that have followed waggle runs many times (and so appear to be especially active in dance following) tend to use dance information (Wray et al. 2011).

When discussing how followers determine the size of a honey load by referencing dance information, we should note that waggle dances do not convey explicit information on energy needs for a foraging trip. Srinivasan et al. (2000) demonstrated that the waggle-run duration encodes amounts of optic flow in the route, but not absolute distances, to a food source. Since the rate of optic flow per unit distance varies depending on the visual features of the ground en route to the food source (Esch et al. 2001), waggle-run durations do not always show a certain correlation with energy needs for flight. How followers estimate the energy needs and determine the amounts of fuel required based on waggle-run duration is still an open question. One possible strategy of followers is to fill the crop with the maximum amount of fuel when they are activated to visit unfamiliar food source by waggle dances. Although in our study the crop content was generally correlated with waggle-run

duration in followers, the dataset does contain a number of extreme outliers with large crop contents. If we assume that these outliers only represent naïve followers (followers that had not visited a food source indicated by the dance), the presence of these outliers could be explained by this hypothesis. Another hypothesis is that naïve followers use a gross calibration method, which may be innate or produced by averaging optic-flow rate under the specific circumstances, to estimate energy needs based on waggle-run duration. The calibration would subsequently be modified to match the actual energy expenditure after making flights to the food source. If this is the case, dancers are expected to estimate the energy needs more precisely than followers. In accordance with this prediction, the variance of the plot of the respective regressions was statistically smaller in dancers than in followers (Fig. 2; also see Results). These hypotheses should be examined closely in future studies.

The effects of foraging experience

Followers had larger amounts of honey at departure than dancers. We demonstrated that this difference resulted from a difference in foraging experience between the two groups of bees by showing a gradual decrease in crop contents at departure as bees repeatedly visited a syrup feeder. Consistent with these results, Brandstetter et al. (1988) reported that the total sugar content of a bee's whole body (including the crop) was larger in foragers that visited a feeder only 6–12 times relative to those that had foraged there for 2–5 days. These data suggest that foragers change the amount of fuel taken from the nest depending on their information state.

Followers may leave the nest with additional fuel for searching flights because waggle dances only indicate the approximate location of a food source. Once they find a food source and learn the route from the hive, they would reduce the fuel loaded at the nest. However, this is not the only explanation for a decline in load size at departure with foraging experience. Followers may load a lot of fuel because they do not have a precise calibration method to estimate energy needs from waggle-run duration. Upon making several flights, they may decrease fuel to actual needs. However, there are no data to exclude either hypothesis at present.

Difference between nectar and pollen foragers

In our study, bees collecting soybean flour were characterized by a large honey load at departure. This result is consistent with the findings of Beutler (1950), who observed larger amounts of honey in departing pollen foragers than in departing sugar-syrup foragers. In our study, bees needed to take some honey from the hive to make balls of collected soybean flour because our feeder did not provide any liquid

food. The need for “glue honey” should be a major cause of the increase of honey load at departure in soybean-flour foragers, as suggested by Beutler (1950). A possible increase in the metabolic rate due to a burden of soybean-flour load during a return trip is unlikely to account for the increased honey load in soybean-flour foragers because this load was estimated to increase only by 10 % compared with that of nectar foragers (Feuerbacher et al. 2003) and the feeder was located very close to the hive in our experiment.

Assuming that foragers did not consume honey during a foraging trip to the feeder in our experiments, the amount of glue honey used to make a pair of soybean-flour balls was estimated to be approximately 5 μ L on average—that is, 70 % of the total honey load taken from the hive. However, the honey remaining in their crops at arrival at the hive was negatively correlated with the size of the soybean-flour loads, and the bees that returned with large loads had used up almost all of the honey that they had brought (6.7 μ L on average). Considering these results, soybean-flour foragers would appear to have had a sufficient amount of honey for making the largest possible pollen balls but that some bees returned to the hive before collecting this much food, suggesting that honey load is not always the limiting factor in pollen collecting.

Soybean-flour foragers did not decrease the honey load at departure over a course of consecutive foraging trips, unlike sugar-syrup foragers. An increase was found after bees visited a feeder once, but no significant change was observed in subsequent foraging trips. These honeybees may have learned the actual requirement for glue honey during the first visit and loaded this amount of honey before subsequent departures. Whether pollen foragers working on flowers also show this increase is unknown, but our results suggest that foraging experience differently influences the amount of honey taken when it is used for glue versus fuel.

The regulation of honey load at departure, including a response to the distance to a food source, is little understood in pollen foragers. The amount might be affected by the availability of nectar on pollen-source plants because bees could use nectar collected from the flowers as glue for pollen loads. Honeybees, however, often forage on flowers providing pollen without nectar (Shuel 1992). Parker (1926) suggested that pollen foragers working on such flowers take larger amounts of honey from the hive than those working on flowers that also provide nectar, although this tendency was not observed by Beutler (1950). Thus, the regulation of honey load at departure might be more complicated in pollen foragers than in nectar foragers.

Do waggle dancers convey information on food type?

In our study, followers left the hive with significantly larger amounts of honey when a waggle dance was performed by

soybean-flour foragers than by sugar-syrup foragers. This difference suggests that waggle dancers convey information on food type because the followers had never visited any feeder. This may not be surprising because pollen foragers usually perform waggle dances with pollen loads on their hind legs, whereas nectar foragers do not. Díaz et al. (2007) reported differences in dance-following behavior depending on the presence or absence of pollen loads on dancers. It is also known that recruits tend to collect the same type of food as has been collected by dancers that they follow (Lindauer 1953). These observations agree with our point of view that followers can learn which type of food is available at a food source through a dance.

The results of our study show that the size of the honey load at departure changed depending on various factors, such as the distance to the food source, the type of food to be collected, and the informational state of the foragers. These findings support the hypothesis that a honey load taken from the hive is associated with certain costs and that bees have evolved to optimize foraging efficiency by regulating the size of the honey load. It remains unclear which costs are produced by the honey load. An increase of energy requirement for flight seems to be one cost, but Balderrama et al. (1992) and Moffat (2000) suggest that the amount of nectar load does not affect metabolic cost in honeybees. Both the costs and the benefits of the honey load need to be determined if the ecological significance of the regulation of honey load at departure is to be elucidated.

Acknowledgments We would like to thank Prof. T. D. Seeley of Cornell University for his valuable comments and kind suggestions on this manuscript. We are grateful to Dr. Y. Sakai of the Brain Science Institute, Tamagawa University for stimulating discussions. Thanks are also due to Ms. K. Tsuruta and Ms. K. Matsuoka for experimental assistance in the preliminary studies. Two anonymous reviewers improved the manuscript greatly. This work was partially supported by a Strategic Research Center Establishment Program of Tamagawa University [S0901017] funded by the Ministry of Education, Culture, Sport, Science and Technology, Japan.

References

- Balderrama NM, de Almeida LOB, Núñez JA (1992) Metabolic rate during foraging in the honeybee. *J Comp Physiol B* 162:440–447
- Beutler R (1950) Zeit und Raum im Leben der Sammelbiene. *Naturwissenschaften* 37:102–105
- Beutler R (1951) Time and distance in the life of the foraging bee. *Bee World* 32:25–27
- Biesmeijer JC, Seeley TD (2005) The use of waggle dance information by honey bees throughout their foraging careers. *Behav Ecol Sociobiol* 59:133–142
- Brandstetter M, Crailsheim K, Heran H (1988) Provisioning of food in the honeybee before foraging. *BIONA Rep* 6:129–148
- Combs GF (1972) The engorgement of swarming worker honeybees. *J Apic Res* 11:121–128

- De Marco RJ, Gurevitz JM, Menzel R (2008) Variability in the encoding of spatial information by dancing bees. *J Exp Biol* 211:1635–1644
- Díaz PC, Grüter C, Farina WM (2007) Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers. *Behav Ecol Sociobiol* 61:1589–1597
- Esch H, Bastian JA (1970) How do newly recruited honey bees approach a food site? *Z Vergl Physiol* 68:175–181
- Esch HE, Zhang S, Srinivasan MV, Tautz J (2001) Honeybee dances communicate distances measured by optic flow. *Nature* 411:581–583
- Feuerbacher E, Fewell JH, Roberts SP, Smith EF, Harrison JF (2003) Effects of load type (pollen or nectar) and load mass on hovering metabolic rate and mechanical power output in the honey bee *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 206:1855–1865
- Free JB (1957) The food of adult drone honeybees (*Apis mellifera*). *Anim Behav* 5:7–11
- Free JB (1960) The behaviour of honeybees visiting the flowers of fruit trees. *J Anim Ecol* 29:385–395
- Gary NE (1992) Activity and behavior of honey bees. In: Graham JM (ed) The hive and the honey bee. Dadant and Sons, Hamilton, pp 269–373
- Gmeinbauer R, Crailsheim K (1993) Glucose utilization during flight of honeybee (*Apis mellifera*) workers, drones and queens. *J Insect Physiol* 39:959–967
- Grüter C, Balbuena MS, Farina WM (2008) Informational conflicts created by the waggle dance. *Proc R Soc B* 275:1321–1327
- Gould JL (1975a) Honey bee recruitment: the dance-language controversy. *Science* 189:685–693
- Gould JL (1975b) Communication of distance information by honey bees. *J Comp Physiol* 104:161–173
- Gould JL (1976) The dance-language controversy. *Q Rev Biol* 51:211–244
- Hodges D (1952) The pollen loads of the honeybee: a guide to their identification by colour and form. Bee Research Association, London
- Lindauer M (1953) Division of labour in the honeybee colony. *Bee World* 34(63–73):85–90
- Michelsen A, Andersen BB, Storm J, Kirchner WH, Lindauer M (1992) How honeybees perceive communication dances, studied by means of a mechanical model. *Behav Ecol Sociobiol* 30:143–150
- Moffatt L (2000) Changes in the metabolic rate of the foraging honeybee: effect of the carried weight or of the reward rate? *J Comp Physiol A* 186:299–306
- Panzenböck U, Crailsheim K (1996) Glycogen in honeybee queens, workers and drones. *J Insect Physiol* 43:155–165
- Parker RL (1926) The collection and utilization of pollen by the honeybee. *Mem Cornell Univ Agric Exp Sta* 98:1–55
- Peters RH (1983) The ecological implications of body size. Cambridge University Press, New York
- Reinhard J, Srinivasan MV, Zhang S (2004) Scent-triggered navigation in honeybees. *Nature* 427:411
- Riley JR, Greggers U, Smith AD, Reynolds DR, Menzel R (2005) The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature* 435:205–207
- Seeley TD (1983) Division of labor between scouts and recruits in honeybee foraging. *Behav Ecol Sociobiol* 12:253–259
- Seeley TD (1995) The wisdom of the hive. Harvard University Press, Cambridge
- Shuel RW (1992) The production of nectar and pollen. In: Graham JM (ed) The hive and the honey bee. Dadant and Sons, Hamilton, pp 401–436
- Srinivasan MV, Zhang S, Altwein M, Tautz J (2000) Honeybee Navigation: Nature and Calibration of the “Odometer”. *Science* 287:851–853

■論文紹介【1】

1178Behav Ecol Sociobiol (2013) 67:1169–1178

Tanner DA, Visscher PK (2010) Adaptation or constraint? Reference-dependent scatter in honey bee dances. Behav Ecol Sociobiol 64:1081–1086

Towne WF, Gould JL (1988) The spatial precision of the honey bees' dance communication. J Insect Behav 1:129–155

Visscher PK, Crailsheim K, Sherman G (1996) How do honey bee (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flight? J Insect Physiol 42:1089–1094

von Frisch K (1967) The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, Cambridge

von Frisch K (1968) The role of dances in recruiting bees to familiar sites. Anim Behav 16:531–533

Witter MS, Cuthill IC (1993) The ecological costs of avian fat storage. Phil Trans R Soc Lond B 340:73–92

Wray MK, Klein BA, Seeley TD (2011) Honey bees use social information in waggle dances more fully when foraging errors are more costly. Behav Ecol 23:125–131

Wolf TJ, Schmid-Hempel P, Ellington CP, Stevenson RD (1989) Physiological correlates of foraging efforts in honey-bees: Oxygen consumption and nectar load. Funct Ecol 3:417–424

Apidologie (2011) 42:461–471

© INRA, DIB-AGIB and Springer Science+Business Media B.V., 2011

DOI: [10.1007/s13592-011-0014-z](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0014-z)

Original article

Transduction of baculovirus vectors to queen honeybees, *Apis mellifera*

Takashi IKEDA^{1,4}, Jun NAKAMURA², Seiichi FURUKAWA¹,
Panuwan CHANTAWANNAKUL³, Masami SASAKI^{1,2}, Tetsuhiko SASAKI^{1,2}

¹Brain Science Institute, Tamagawa University, Tamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

²Honeybee Science Research Center, Research Institute, Tamagawa University, Tamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

³Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

⁴Department of Regenerative Medicine, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

Received 24 December 2009 – Revised 23 August 2010 – Accepted 24 August 2010

Abstract – The potential uses of baculovirus as a gene vector to queen honeybees were examined in this study. We used a green fluorescent protein-expressing baculovirus with wild-type envelope and two pseudotype viruses of which one overexpressed GP64 and the other expressed a virion protein of a honeybee virus on the envelope. After injection of these baculoviruses into queen pupae, infection was detected in the fat bodies, but not in the ovaries. Pupae injected with a titer of 1×10^5 infectious units survived to eclose, and the infection was also detected in the fat bodies of adult queen honeybees, suggesting that baculoviruses can transiently express genes in the fat bodies, and therefore, can be used for further analysis of gene functions. In addition, although the viruses examined in this study failed to express the reporter gene in the ovaries, the infection in the fat bodies suggests that baculoviruses could be potentially useful for transgenesis, if appropriately developed.

honeybee / virus vector / gene transfer / transgenesis / pseudotype

1. INTRODUCTION

Insect transgenesis is important for studies on gene functions and is essential in the establishment of useful transgenic insects. For stable transgenesis to occur, exogenous genes must be introduced into germ line cells. A common method to introduce an exogenous gene into the genomes of insect germ line cells is embryonic microinjection of two plasmids: a helper plasmid carrying a transposase gene originating from a transposon such as *P* element or *piggyBac* and a donor plasmid carrying the gene of interest inserted between a set of recognition sites of

the transposase (reviewed by Handler 2001; Kimura 2001; Handler 2002). Using this technique, transgenic lines have been established in various insect species, including *Drosophila melanogaster* (Rubin and Spradling 1982), *Bombyx mori* (Tamura et al. 2000), *Aedes aegypti* (Coates et al. 1998; Jasinskiene et al. 1998), *Anopheles gambiae* (Grossman et al. 2001), *Culex quinquefasciatus* (Allen et al. 2001), *Tribolium castaneum* (Berghammer et al. 1999), *Ceratitis capitata* (Loukeris et al. 1995), *Athalia rosae* (Sumitani et al. 2003), and *Bicyclus anynana* (Marcus et al. 2004). In addition to embryonic microinjection, exogenous genes can also be introduced into cells by utilizing the infection ability of certain viruses, such as the baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV), whose natural

Corresponding author: T. Sasaki,
tsasaki@lab.tamagawa.ac.jp
Manuscript editor: Monique Gauthier

host is the alfalfa looper moth, *A. californica*. The AcNPV genome is a double-stranded DNA that is maintained extrachromosomally in host cells. Successful gene transduction into germ line cells has been performed using two recombinant AcNPVs: a helper virus carrying a transposase gene and a donor virus carrying the gene of interest within the recognition sites (Yamamoto et al. 2004; Kawashima et al. 2007).

The European honeybee, *Apis mellifera* L., is a beneficial insect that provides useful products and mediates the pollination of agricultural plants. The honeybee is also an interesting model organism for basic biology to explore the insect sociality and brain function because it has a sophisticated eusociality and exhibits high abilities of learning, memory, and communication. Several molecular biological studies can be performed using the honeybee. The whole genome sequence of the honeybee has been determined (Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006), and microarrays are available for genome-wide expression analyses. In addition, RNA interference (RNAi) is useful in determining gene functions of honeybees (Amdam et al. 2003; Nunes and Simões 2009). However, a method to produce transgenic honeybees has not been established. This is partly because the honeybee larvae are naturally grown in hives and cared for by workers and handling of eggs or larvae in the laboratory is laborious, even though possible (Robinson et al. 2000; Aase et al. 2005; Patel et al. 2007; Kucharski et al. 2008). To date, only transient expressions of exogenous genes have been reported for the honeybee using techniques such as electroporation of adult brain cells (Kunieda and Kubo 2004), instrumental insemination of sperm mixed with a plasmid (Robinson et al. 2000), and injection of an AcNPV vector into worker larvae and pupae (Ando et al. 2007).

Wild-type baculovirus forms two types of virions: occlusion-derived and budded virions of which the latter is utilized as a gene vector. The budded virion is surrounded by a phospholipid bilayer (envelope) that contains membrane proteins. The major envelope protein, GP64, is critical for attachment to host cells, induction of

endocytosis, membrane fusion and budding of the virus (Volkman and Goldsmith 1985; Blissard and Wenz 1992; Hefferon et al. 1999; Oomens and Blissard 1999). The infectivity of a baculovirus can be manipulated by modifying GP64, e.g., overexpression of this protein drastically increases the infection of baculovirus to mammalian cells (Tani et al. 2001, 2003). The infectivity to mammalian cells can also be enhanced by displaying a virion protein of a mammalian virus outside the envelope as a fusion protein with GP64; this technique is referred to as the surface display method (Boublik et al. 1995; Ernst et al. 2006; Matilainen et al. 2006).

One approach that can be used to obtain a transgenic honeybee line is to integrate an exogenous gene into the gonads of individuals with reproductive potential. In this study, we examined the ability of a baculovirus to infect queen honeybees and evaluated its ability to transiently express genes in queen honeybee tissues especially in the ovaries, which is an essential process for mediating the integration of an exogenous gene into the genome using a helper/donor system. To achieve these objectives, we used queen pupae with actively developing ovaries and examined the following: (a) infectivity of the baculovirus into queen pupae and its effect on host viability and (b) whether the tropism of this virus to the ovaries is increased by GP64 overexpression or the surface display of a virion protein of the honeybee deformed wing virus (DWV). We injected a baculovirus with wild-type envelope and two pseudotype viruses into queen pupae and detected the infection of these viruses in the fat bodies, but not in the ovaries. The potential uses of baculoviruses as gene transfer vectors for queen honeybees are discussed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of recombinant baculoviruses

First, plasmids containing the insertion sequences shown in Figure 1a were prepared. A green fluores-

cent protein (GFP) expression cassette was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) from the pAcGFP1-C1 plasmid (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and ligated into the pENTR/D-TOPO plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to obtain pENTR/WT/GFP. The *polyhedrin* promoter (P_{PH}), *gp64* coding sequence, and SV40 poly(A) signal were amplified by PCR and inserted into pENTR/WT/GFP to obtain the pENTR/64+/GFP plasmid. PCR-amplified P_{PH} , *gp64* signal peptide sequence, coding sequence of DWV virion protein 1 (*VP1*; see below), and *gp64* mature protein sequence were ligated to form a VP1 surface display cassette. This cassette was subsequently inserted into the pENTR/WT/GFP to construct a pENTR/VP1/GFP plasmid.

Second, recombinant baculoviruses (AcNPV) designated WT/GFP, 64+/GFP, and VP1/GFP were prepared using these constructed plasmids and the BaculoDirect Baculovirus Expression System (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The plasmids were recombined with baculovirus genomic DNA using LR clonase II (Invitrogen) to replace the *polyhedrin* coding sequence of the baculovirus genome with the insertion sequences of the plasmids. Subsequently,

the recombinant virus DNA was transfected into Sf9 cells (Invitrogen), an AcNPV-permissive insect cell line derived from *Spodoptera frugiperda*. Viral virions that budded from the cultured cells were concentrated by centrifugation of the culture media at 144,000×g for 1 h (Tani et al. 2001) and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.5). Titers of the viral solutions were determined as infectious unit (IFU) using the BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit (Clontech).

2.2. Isolation of DWV VP1

Total RNA was extracted from an adult worker honeybee with deformed wings using the Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). First-strand cDNA was synthesized using SuperScript III (Invitrogen) and a gene-specific primer DWV_VP1_SmaI_R (5'-TCC CCC GGG TTC TGG AAT AGC CTC AAT AAA-3'). The full-length cDNA of DWV VP1 (accession no. AY292384; Lanzi et al. 2006) was amplified using the primers DWV_VP1_KpnI_F (5'-CGG GGT ACC GAT AAT

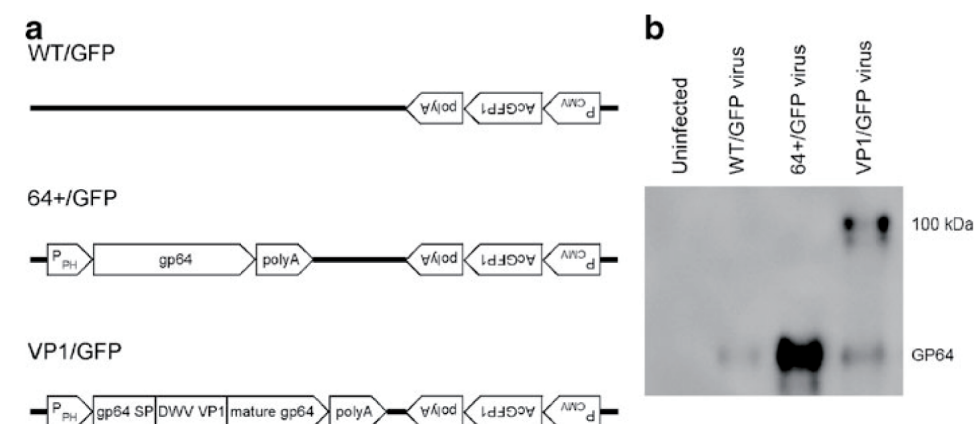


Figure 1. Baculovirus vectors inoculated into queen honeybees. **a** Structures of insertion sequences used. WT/GFP carries a GFP expression cassette comprising a cytomegalovirus immediate-early gene promoter (P_{CMV}), *Aequorea coerulescens* GFP gene (*AcGFP1*) and SV40 poly(A) signal. The GP64 overexpression cassette in 64+/GFP consists of the *polyhedrin* promoter (P_{PH}), *gp64* coding sequence, and SV40 poly(A) signal. VP1/GFP has the deformed wing virus (DWV) VP1 coding sequence in the 64+/GFP cassette between the GP64 signal peptide sequence (SP) and GP64 mature protein sequence. **b** Western blot analysis of Sf9 cells infected with recombinant baculoviruses. Sf9 cells were subjected to Western blot analysis using an anti-GP64 monoclonal antibody at 3 days after infection with recombinant baculoviruses.

CCT TCT TAT CAA CAA-3') and DWV_VP1_SmaI_R. The PCR product was cloned and sequenced to confirm its identity.

2.3. Western blot analysis

Sf9 cells were infected with the recombinant viruses (see above) at a multiplicity of infection of 0.4, and 1 mL of each cell culture was collected by centrifugation 3 days after infection. Cells were lysed with 100 μ L of an SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 6% β -mercaptoethanol, 12% glycerol, 0.025% bromophenol blue, pH 6.8) and boiled. A 0.1- μ L aliquot of each protein sample was subjected to Western blot analysis. Western blotting was performed according to the method of Towbin et al. (1979) with modifications. The blotted membrane was incubated with an anti-GP64 monoclonal antibody (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) and subsequently with a horseradish peroxidase-conjugated, affinity-purified goat anti-mouse IgG2b antibody (Cosmo Bio). Immunoreacted bands were detected using a VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.4. Rearing of queen pupae and virus injection

Queen honeybees were reared by transferring 1st instar larvae to artificial plastic queen cell cups. Queen larvae undergo four larval molts at approximately 24-h intervals. Following the last larval molt, the queen cell is sealed and the queen larva completes pupation about 3 days after the cell is sealed (Laidlaw and Page 1997). Pupal development in the queen honeybee takes about 5 days. To inoculate the virus, queen pupae were collected 4 days after the cells had been sealed (8–9 days after the transfer of the larvae to the queen cell cups) and injected with the viral solutions into the abdominal region using a 33-G needle (TERUMO, Tokyo, Japan). The injected queen pupae were placed on a filter paper in a 6-well plate and kept in an incubator at 33°C and 70% relative humidity.

2.5. Analysis of reporter gene expression in adult fat bodies

Transcription of *gfp* was assessed in the fat bodies of adult queen honeybees injected with WT/GFP at

the pupal stage. Abdominal carcasses (integument and subjacent fat body) were collected by removing the entire digestive system and the ovaries from queen honeybees at 24–48 h after eclosion. These carcasses were used as the source of fat bodies (Bitondi et al. 2006). Total RNAs were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and reverse-transcribed (RT) using SuperScript III and oligo(dT)₂₀ primer (Invitrogen). A partial 400-bp *gfp* sequence was PCR-amplified using the primers 5'-GCA GTG CTT CTC ACG CTA C-3' and 5'-CAG GTA GTG GTT ATC GGG C-3'. A 181-bp fragment of a β -actin sequence (AB023025) was amplified using primers 5'-AGG AAT GGA AGC TTG CGG TA-3' and 5'-AAT TTT CAT GGT GGA TGG TGC-3' (Chen et al. 2005a) and used as a positive control. PCR cycle conditions were as follows: 94°C for 5 min followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 1 min, and 72°C for 5 min. The PCR products were cloned and sequenced to confirm their identities.

3. RESULTS

3.1. Inoculation of baculovirus into queen pupae

To examine the infectivity of the baculovirus in the queen honeybee, we prepared a recombinant baculovirus (WT/GFP) that carried *gfp* under the regulation of the cytomegalovirus immediate-early promoter (P_{CMV} ; Figure 1a, top panel). P_{CMV} is known to promote gene expression in worker honeybees (Kunieda and Kubo 2004). Before injecting the WT/GFP virus into queen honeybees, we injected a baculovirus without *gfp* into worker pupae to confirm that the virus without *gfp* did not induce significant fluorescence (data not shown). When the WT/GFP virus vector was inoculated into the abdomen of queen pupae at a titer of 1×10^5 IFU, fluorescence was detected around the injected site in all injected pupae within 3 days after inoculation. The fluorescence was limited to the injection site without extending much into the surrounding tissues (Figure 2a–d; Table I); this observation was consistent with observations of worker pupae reported by Ando et al. (2007).

On dissecting the abdomens of the pupae, we did not detect infection in the ovaries (Figure 2q–t). Instead, strong fluorescence was observed in the fat bodies (Figure 2i–l). Punctate fluorescence was observed in the removed ovaries, but this fluorescence was probably from the remnant fat body cells attached to the ovaries (Figure 2q–t). All individuals injected with the virus vector at 1×10^5 IFU eclosed to adult queens, in which fluorescence was detected in the fat bodies, but not in the ovaries (Table I; Figure 3a–d, i–l). Transcription of *gfp*

in the fat bodies of adult queen honeybees was confirmed by an RT-PCR assay of adult queen honeybees at 24–48 h after eclosion (Figure 4). When the virus was injected at a higher titer (1×10^6 IFU), fluorescence was observed in a wider region compared with that observed on injection at 1×10^5 IFU (Figure 2a–d, S1a–d). However, there was still no observable fluorescence in the ovaries (Figure S1i–l). At 1×10^6 IFU, only approximately half of the individuals survived to eclose (Table I), and the wings of the eclosed adults were noticeably shrunken

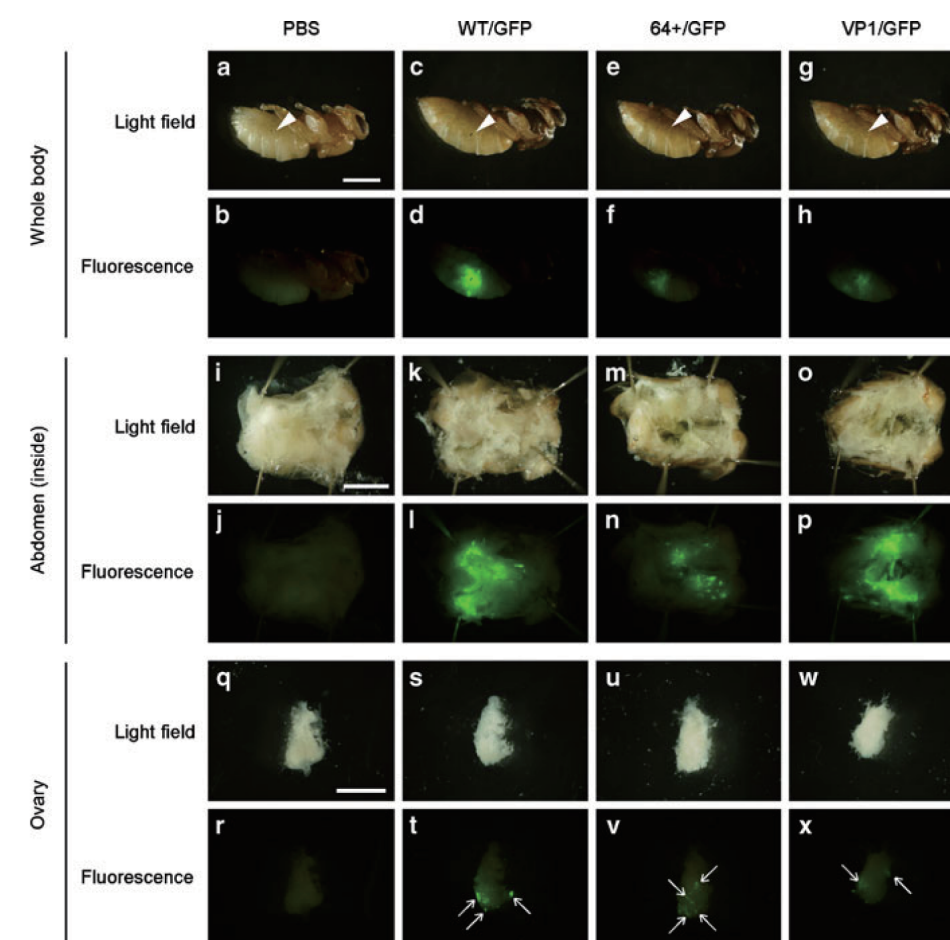


Figure 2. Queen pupae at 3 days after inoculation with baculovirus vectors at a titer of 1×10^5 IFU. Queen pupae were injected with PBS (a, b, i, j, q, r), WT/GFP virus (c, d, k, l, s, t), 64+/GFP virus (e, f, m, n, u, v), or VP1/GFP virus (g, h, o, p, w, x). Arrow heads indicate the injected points. a–h Outward appearances of injected pupae. i–p Internal views of the dissected abdominal region. q–x Removed ovaries from injected pupae. Punctate signals on the ovaries indicated by the arrows were not derived from the ovaries but from the remnant fat body cells attached to the ovaries. Bars indicate a scale of 5 mm.

Table I. Eclosion rates and fluorescence in queen honeybees abdominally injected with baculovirus vectors at the pupal stage.

Injection	Infectious units	Eclosion (%)	Fluorescence (%)	
			In the pupal stage	After eclosion
PBS	0	8/8 (100)	0/9 (0)	0/8 (0)
WT/GFP	1.0×10^5	7/7 (100)	8/8 (100)	7/7 (100)
	1.0×10^6	5/9 (56)	10/10 (100)	5/5 (100)
64+/GFP	1.0×10^5	7/7 (100)	8/8 (100)	7/7 (100)
	1.0×10^6	5/9 (56)	10/10 (100)	5/5 (100)
VP1/GFP	1.0×10^5	7/7 (100)	8/8 (100)	7/7 (100)
	1.0×10^6	4/9 (44)	10/10 (100)	4/4 (100)

(data not shown). Thus, inoculation at this titer seems to be harmful to queen pupae.

3.2. Injection of pseudotype baculovirus vectors into queen pupae

Expecting that GP64 overexpression might enhance baculovirus tropism in honeybee ovaries, we prepared a pseudotype baculovirus vector (64+/GFP) that contained an additional *gp64* coding sequence under the regulation of the strong *polyhedrin* promoter (Figure 1a, middle panel). As another strategy to alter the infectivity of the baculovirus, we also prepared a pseudotype baculovirus (VP1/GFP) that displayed the VP1 of DWV as a fusion protein with GP64 on the surface of the baculovirus envelope (Figure 1a, bottom panel). DWV is known to infect various tissues of worker honeybees (Yue and Genersch 2005; Lanzi et al. 2006), most prominently in the pupal stage (Chen et al. 2005a), and also infect queen honeybees (Chen et al. 2005b; Williams et al. 2009). Insect picorna-like viruses including DWV resemble the mammalian picornaviruses, i.e., both have a single-stranded RNA as the genome and the form, an icosahedral capsid composed of four types of virion proteins (VP1–VP4; Lanzi et al. 2006). Since the host cell binding site is located on VP1 in mammalian picornaviruses (Fox et al. 1989; Colston and Racaniello 1994; Tate et al. 1999; Liljas et

al. 2002; Estrozi et al. 2008), we hypothesized that the host cell-interacting site of DWV is also on VP1.

To confirm the GP64 overexpression and expression of the GP64-VP1 fusion protein, we analyzed the total proteins from Sf9 cells, with which the virus vectors were produced, by Western blot analysis using an anti-GP64 monoclonal antibody. The signal for GP64 was detected in 64+/GFP virus-infected cells at a level far higher than that in WT/GFP virus-infected cells. A band of approximately 100 kDa (the size expected for the fusion protein of GP64 and DWV VP1) was detected from VP1/GFP virus-infected cells in addition to endogenous GP64 (Figure 1b).

We injected these pseudotype baculoviruses into the abdominal regions of queen pupae at 1×10^5 IFU and detected fluorescence in all pupae within 3 days of inoculation (Table I; Figure 2a, b, e–h). Dissection of the abdomen showed that the fat bodies emit significant fluorescence (Figure 2i, j, m–p), but the ovaries did not (Figure 2q, r, u–x). All injected individuals eclosed to adult queen honeybees (Table I), in which fluorescence was detected in the fat bodies (Figure 3a, b, e–h), but not in the ovaries (Figure 3i, j, m–p). Even when the viral titer was increased to 1×10^6 IFU, no fluorescence was detected in the ovaries, and approximately half of the injected pupae died just before metamorphosis (Figure S1i, i, m–p;

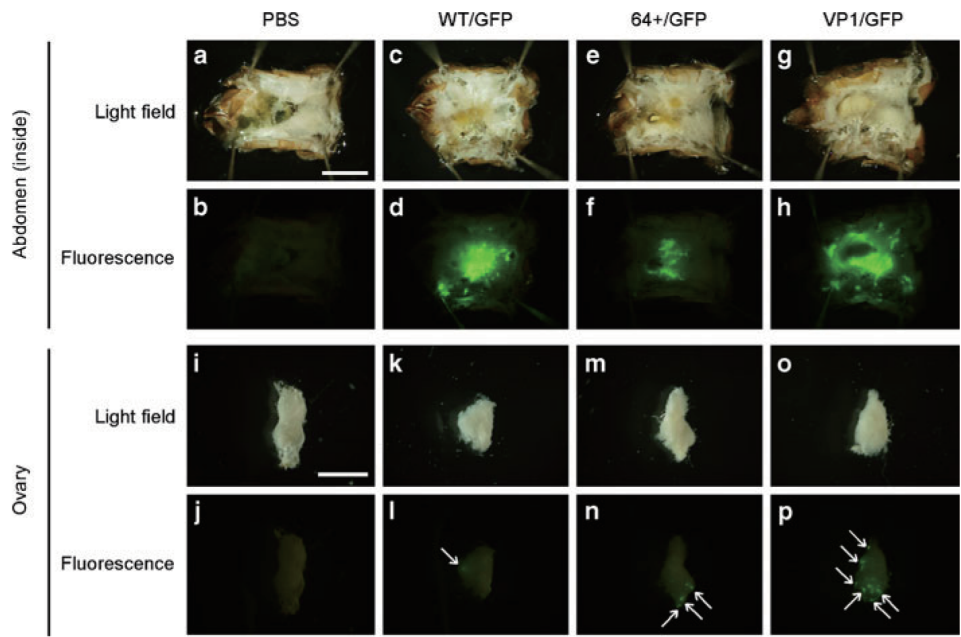


Figure 3. GFP expression in adult queen honeybees inoculated with baculovirus vectors at a titer of 1×10^5 IFU at the pupal stage. The queen honeybees were injected with PBS (a, b, i, j), WT/GFP virus (c, d, k, l), 64+/GFP virus (e, f, m, n), or VP1/GFP virus (g, h, o, p). a–h Internal views of the dissected abdominal region. i–p Removed ovaries from adult queen honeybees. Arrows indicate punctate signals derived from the remnant fat body cells attached to the ovaries. Bars indicate a scale of 5 mm.

Table I). These observations suggest that neither GP64 overexpression nor a surface display of DWV VP1 can effectively enhance baculovirus tropism in the ovaries.

4. DISCUSSION

We examined the ability of three recombinant baculoviruses to induce exogenous gene expres-

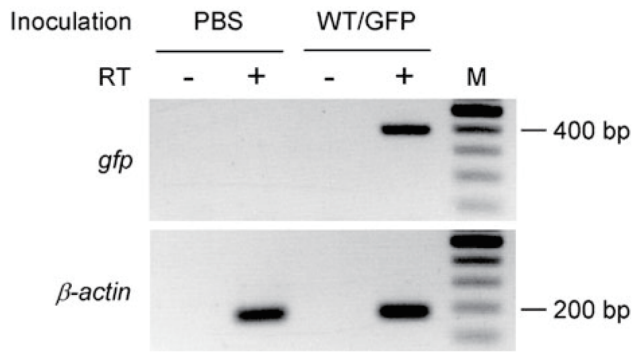


Figure 4. RT-PCR used to assess GFP expression in the fat bodies of adult queen honeybees. The queen honeybees were infected with WT/GFP at 1×10^5 IFU or PBS at the pupal stage, and their fat bodies were collected at 24–48 h after the final ecdysis. Bands of expected size were amplified from cDNA synthesized with reverse transcriptase (RT+), but not from negative controls (RT–).

sion in queen honeybees. In all cases, no significant gene expression was detected in the ovaries, but the virus vectors did express GFP in the fat bodies (Figures 2, 3, and S1). Some genes expressed in the fat body, such as *vitellogenin* and factors of insulin-like signaling pathway, have been suggested to be involved in caste differentiation (Seehuus et al. 2006; Corona et al. 2007). The baculovirus would be a useful tool for the analyses on such interesting genes. Baculovirus could be used to express double-stranded RNA and induce RNAi in loss-of-function experiments and to overexpress exogenous genes in gain-of-function experiments.

After inoculation of the viruses, the GFP-positive region remained near the injected site and did not extend much into the surrounding tissues (Figures 2 and 3): this observation was consistent with observations of worker pupae by Ando et al. (2007). It suggests that inoculated viruses can be transduced into host cells, but they cannot spread further through secondary infection. New infectious virions seem to be rarely produced in honeybees. This property is preferable for the use of baculovirus as a gene transfer vector. In fact, baculovirus is considered to be an attractive candidate for a gene transfer vector in humans, partly because it does not cause secondary infection in mammalian cells (reviewed in Yu-Chen 2005).

We demonstrated that inoculations to pupae at 1×10^5 IFU caused gene transduction and allowed all injected pupae to eclose (Figure 2; Table 1). We assume that the toxicity of baculovirus to honeybee pupae is relatively low probably due to the low ability to cause secondary infection. To utilize the baculovirus as a gene vector for honeybee transgenesis, an inoculation titer at which the queen honeybees are infected and survive must be used. The results of this study suggest that baculovirus has a titer that meets this necessary condition and hence, imply that methods using baculoviruses could be potentially useful for stable transgenesis if the virus is appropriately constructed such that the virus can efficiently infect and induce exogenous genes in the ovaries.

In contrast to the fat bodies, no significant fluorescence was detected in the ovaries. The viruses used might be unable to infect the ovaries or the infection levels might be, if any, very low. Although we attempted to alter the infectivity of baculovirus by overexpression of GP64 and a surface display of DWV VP1, both modifications appeared not effective. We used DWV VP1 because the surface display of a partial sequence of a mammalian picornavirus VP1 was reported to increase the infectivity of baculovirus in mammalian cells (Ernst et al. 2006; Matilainen et al. 2006). One possible explanation of the results obtained in this study is that the host-binding site of DWV might reside in virion proteins other than VP1. Although insect picorna-like viruses and mammalian picornaviruses have similar constitutions, including their sizes and icosahedral structures of the four types of virion proteins, the amino acid sequences of VP1 are distinct between the two virus groups. In addition, crystal structures of VP1 from insect picorna-like viruses and picornaviruses are somewhat different (Tate et al. 1999; Liljas et al. 2002; Estrozi et al. 2008). Therefore, surface displays of other virion proteins (VP2–VP4) might effectively alter virus tropism in honeybee ovaries. Another interpretation for the failure to detect the GFP signal from the ovaries may be that the reporter gene was not expressed, despite the fact that the virus infected the ovaries. The CMV promoter that functions in the fat bodies might not functions in the ovaries. It might be worth using other promoters to study this possibility.

The queen honeybee is polyandrous and mates with males at so-called “drone congregation areas” in nature. However, instrumental insemination of virgin queen honeybees with sperm is a standard procedure (Laidlaw 1977; Harbo 1985), and honeybee colonies can be maintained in an indoor flight room for several generations (Robinson et al. 2000). Once a method for germ line transformation is developed, transgenic honeybees could be produced, which will contribute to molecular biological studies of honeybees.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Mariko Miyagawa, Mr. Takuma Ishiai, and Mr. Ryo Shirai (Tamagawa University) for their help in maintaining the honeybee colonies. We also thank Dr. Mizuko Osanai-Futahashi (University of Tokyo) for the technical advice on virus preparation. This work was supported in part by Strategic Research Center Establishment Program (S0901017) and Global COE Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Transduction de vecteurs baculovirus sur des reines d’abeilles, *Apis mellifera*.

abeille / vecteur de virus / transfert de gène / transgénèse / pseudotype

Zusammenfassung – Der Einsatz von Baculovirus-Vektoren zur Transduktion bei Königinnen der Honigbiene, *Apis mellifera*. Die europäische Honigbiene, *Apis mellifera* L., ist ein Modell für Studien über Sozialität bei Insekten. Verschiedene molekularbiologische Ansätze können an der Honigbiene verfolgt werden. Das Genom ist komplett sequenziert und Mikroarrays sind verfügbar für genomumfassende Expressionsstudien. Des weiteren besteht die Möglichkeit, RNA-Interferenz (RNAi) für Untersuchungen über Genfunktionen einzusetzen. Eine Methode zur Herstellung transgener Honigbienen ist jedoch noch nicht etabliert. Wir untersuchten hier die Möglichkeit, ob sich Baculoviren zur Herstellung transgener Honigbienen eignen. Baculovirus-Vektoren werden bereits erfolgreich in der Produktion transgener Insekten, wie zum Beispiel des Seidenspinners, eingesetzt. Wir stellten ein Baculovirus her, das ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) als Reportergen enthält (Abb. 1) und inokulierten dieses in das Abdomen von Puppen. Fluoreszenz war in der Umgebung des Injektionsorts bereits innerhalb von drei Tagen detektierbar (Abb. 2). Nach Dissektion des Abdomens der Puppen fanden wir dass das GFP-Gen zwar im Fettkörper, jedoch nicht in den Ovarien exprimiert war (Table 1; Abb. 2, S1). Alle mit einem Baculovirus-Titer von 1×10^5 Infektionseinheiten inokulierten Puppen entwickelten sich zu adulten Königinnen, in denen die Fluoreszenz nach wie vor im Fettkörper, jedoch

nicht in den Ovarien zu finden war (Table 1; Abb. 3 und 4). Um den Infektionsgrad des Virus zu erhöhen und das Zielgen in den Ovarien zu exprimieren, stellten wir zwei andere Baculoviren her (Abb. 1). Ein Virus überexprimierte GB64, ein Protein, das für die Anheftung und das Eindringen des Virus in Wirtszellen von Bedeutung ist. Das andere Virus enthielt ein Kapselprotein des Flügeldeformations-Virus (DWV), das Honigbienen natürlicherweise befällt. Nach Injektion dieser Viren zeigte sich, dass auch diese Viren vorzugsweisen den Fettkörper, befielen, jedoch nicht in die Ovarien eingedrungen waren (Table 1; Abb. 2, 3, und S1).

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass Baculoviren für Untersuchungen von Genfunktionen in Fettkörperzellen geeignet sein können. Obwohl keines der drei Baculoviren die Expression des GFP-Reportergens in den Ovarien ermöglichte, besteht dennoch die Möglichkeit, Baculoviren für potentiell stabile Transgenesis bei Honigbienen einzusetzen, wenn sie so modifiziert werden können, dass sie effizient die Expression exogener Gene in den Ovarien induzieren.

Honigbiene / Virusvektor / Gentransfer / Transgenesis / Pseudotypus

REFERENCES

- Aase, A.L., Amdam, G.V., Hagen, A., Omholt, S.W. (2005) A new method for rearing genetically manipulated honey bee workers. *Apidologie* **36**, 293–299
- Allen, M.L., O’Brochta, D.A., Atkinson, P.W., Levesque, C.S. (2001) Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **38**, 701–710
- Amdam, G.V., Simões, Z.L., Guidugli, K.R., Norberg, K., Omholt, S.W. (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.* **3**, 1
- Ando, T., Fujiyuki, T., Kawashima, T., Morioka, M., Kubo, T., Fujiwara, H. (2007) *In vivo* gene transfer into the honeybee using a nucleopolyhedrovirus vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 335–340
- Berghammer, A.J., Klingler, M., Wimmer, E.A. (1999) A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370–371
- Bitondi, M.M., Nascimento, A.M., Cunha, A.D., Guidugli, K.R., Nunes, F.M., Simões, Z.L. (2006) Characterization and expression of the *Hex110* gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **63**, 57–72

Blissard, G.W., Wenz, J.R. (1992) Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* **66**, 6829–6835

Boublik, Y., Di Bonito, P., Jones, I.M. (1995) Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnol. (NY)* **13**, 1079–1084

Chen, Y.P., Higgins, J.A., Feldlaufer, M.F. (2005a) Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 436–441

Chen, Y., Pettis, J.S., Feldlaufer, M.F. (2005b) Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J. Invertebr. Pathol.* **90**, 118–121

Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., James, A.A. (1998) *Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3748–3751

Colston, E., Racaniello, V.R. (1994) Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* **13**, 5855–5862

Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E. (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7128–7133

Ernst, W., Schinko, T., Spenger, A., Oker-Blom, C., Grabherr, R. (2006) Improving baculovirus transduction of mammalian cells by surface display of a RGD-motif. *J. Biotechnol.* **126**, 237–240

Estrozi, L.F., Neumann, E., Squires, G., Rozas-Dennis, G., Costabel, M., Rey, F.A., Guerin, D.M.A., Navaza, J. (2008) Phasing of the Triatoma virus diffraction data using a cryo-electron microscopy reconstruction. *Virology* **375**, 85–93

Fox, G., Pary, N., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D. J., Brown, F. (1989) The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J. Gen. Virol.* **70**, 625–637

Grossman, G.L., Rafferty, C.S., Clayton, J.R., Stevens, T.K., Mukabayire, O., Benedict, M.Q. (2001) Germ-line transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the *piggyBac* transposable element. *Insect. Mol. Biol.* **10**, 597–604

Handler, A.M. (2001) A current perspective on insect gene transformation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **31**, 111–128

Handler, A.M. (2002) Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1211–1220

Harbo, J.R. (1985) Instrumental insemination of queen bees. *Am. Bee J.* **125**, 282–287

Hefferon, K.L., Oomens, A.G., Monsma, S.A., Finnerty, C.M., Blissard, G.W. (1999) Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**, 455–468

Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931–949

Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Rafferty, C.S., James, A.A., Collins, F.H. (1998) Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3743–3747

Kawashima, T., Osanai, M., Futahashi, R., Kojima, T., Fujiwara, H. (2007) A novel target-specific gene delivery system combining baculovirus and sequence-specific long interspersed nuclear elements. *Virus Res.* **127**, 49–60

Kimura, K. (2001) Transposable element-mediated transgenesis in insects beyond *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **15**, 179–192

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* **319**, 1827–1830

Kunieda, T., Kubo, T. (2004) In vivo gene transfer into the adult honeybee brain by using electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 25–31

Laidlaw, H.H. (1977) Instrumental insemination of honey bee queens. *Dadant and Sons, Hamilton*

Laidlaw, H.H., Page, R.E. (1997) Queen rearing and bee breeding. *Wicwas, Cheshire*

Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S.M., Rossi, C. (2006) Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* **80**, 4998–5009

Liljas, L., Tate, J., Lin, T., Christian, P., Johnson, J.E. (2002) Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picorna-like viruses. *Arch. Virol.* **147**, 59–84

Loukeris, T.G., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S., Savakis, C. (1995) Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* **270**, 2002–2005

Marcus, J.M., Ramos, D.M., Monteiro, A. (2004) Germ-line transformation of the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proc. Biol. Sci.* **271**, S263–S265

Matilainen, H., Mäkelä, A.R., Riikonen, R., Saloniemi, T., Korhonen, E., Hyypiä, T., Heino, J., Grabherr, R., Oker-Blom, C. (2006) RGD motifs on the surface of baculovirus enhance transduction of human lung carcinoma cells. *J. Biotechnol.* **125**, 114–126

Nunes, F.M., Simões, Z.L. (2009) A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 157–160

Oomens, A.G.P., Blissard, G.W. (1999) Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **254**, 297–314

Patel, A., Fondrk, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K., Amdam, G.V. (2007) The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE* **2**, e509

Robinson, K.O., Ferguson, H.J., Cobey, S., Vaessin, H., Smith, B.H. (2000) Sperm-mediated transformation of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect. Mol. Biol.* **9**, 625–634

Rubin, G.M., Spradling, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348–353

Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V. (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 962–967

Sumitani, M., Yamamoto, D.S., Oishi, K., Lee, J.M., Hatakeyama, M. (2003) Germ-line transformation of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta), mediated by a *piggyBac*-derived vector. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 449–458

Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C., Couble, P. (2000) Germ-line transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* **18**, 81–84

Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., Matsuura, Y. (2001) Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* **279**, 343–353

Tani, H., Limn, C.K., Yap, C.C., Onishi, M., Nozaki, M., Nishimune, Y., Okahashi, N., Kitagawa, Y., Watanabe, R., Mochizuki, R., Moriishi, K., Matsuura, Y. (2003) In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculovirus. *J. Virol.* **77**, 9799–9808

Tate, J., Liljas, L., Scotti, P., Christian, P., Lin, T., Johnson, J.E. (1999) The crystal structure of cricket paralysis virus: the first view of a new virus family. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 765–774

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354

Volkman, L.E., Goldsmith, P.A. (1985) Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* **143**, 185–195

Williams, G.R., Rogers, R.E., Kalkstein, A.L., Taylor, B.A., Shutler, D., Ostiguy, N. (2009) Deformed wing virus in western honey bees (*Apis mellifera*) from Atlantic Canada and the first description of an overtly-infected emerging queen. *J. Invertebr. Pathol.* **101**, 77–79

Yamamoto, M., Yamao, M., Nishiyama, H., Sugihara, S., Nagaoka, S., Tomita, M., Yoshizato, K., Tamura, T., Mori, H. (2004) New and highly efficient method for silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* transposable elements. *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 849–853

Yu-Chen, H.U. (2005) Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* **26**, 405–416

Yue, C., Genersch, E. (2005) RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* **86**, 3419–3424

An Analysis of Synaptic Transmission and Its Plasticity by Glutamate Receptor Channel Kinetics Models and 2-Photon Laser Photolysis

Shiori Katsumata¹, Ko Sakai¹, and Hiroshi Kojima^{2,*}

¹Computational Vision Science Laboratory, Tsukuba University, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8573, Japan

²Laboratory for Cellular and Molecular Physiology, Tamagawa University, Tokyo 194-8610, Japan
hkojima@lab.tamagawa.ac.jp

Abstract. We predicted the rate constants of AMPA receptor channels kinetics models of neural cells which could induce the change in efficacy of synaptic transmission by computer simulation. Excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were reconstructed by computer calculation with the proposed kinetics models. Moreover, electrical responses were measured from the cells by using 2-photon laser uncaging. It was shown that the properties of the evoked current responses by photolysis and those obtained from spontaneous synaptic currents have the similar properties which indicates that the present AMPA receptor channel models mediate the evoked responses by laser photolysis. We investigated and proposed the possible rate constants, which could explain the changes in the EPSCs amplitude during LTP/LTD without changing the waveform, and corresponding physiological elements to them. Moreover, it is suggested that the present method based on kinetics models could be used for the investigation of other experiments evoked by laser photolysis.

1 Introduction

One of the most important synaptic receptor channels, AMPA receptor has been investigated in order to characterize the excitatory synaptic transmission and its plasticity in the central nervous system. Moreover, it has been suggested that changes in the efficacy of synaptic transmission such as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), which are thought to be elementary mechanisms and substrates of learning and memory, are partly due to modifications and/or trafficking AMPA receptor channels in the postsynaptic membrane at the synapses. These kinetic models of receptor channels constructed from experiments have described precisely the physiological observations especially obtained by patch clamp technique. We estimated the rate constants in the kinetics models of AMPA receptor channels that might contribute to the enhancement and reduction of EPSC amplitudes during LTP and LTD by examining the computer generated EPSCs under an experimental constraint. At first

* Corresponding author.

the computer-generated EPSCs were reconstructed from the kinetics models proposed by other groups. They used the experimental results obtained from the membrane patches (in out-side out patch configuration) of both Pyramidal and Purkinje cells. We have recorded spontaneous miniature EPSCs and current responses activated by ultra-violet and 2 photon laser photolysis from the somata of neurons. The detailed analysis of the spontaneous (and/or miniature) EPSCs and laser-evoked current responses showed that they have the same properties and are mediated by the same types of AMPA receptor channels. We investigated and proposed the possible parameters from computer simulations that could explain the changes in the EPSCs waveform during LTP/LTD and also its corresponding biological factors. It was shown that the present method could be used for the investigation of synaptic plasticity in the central nervous system.

2 Model and Experimental Method

2.1 Computer Simulation of Synaptic Current Based on Kinetics Model

2.1.1 AMPA Receptor Channel Kinetics Model Obtained from CA3 Pyramidal Cell

The model has to predict the experimentally obtained ensemble current responses of outside-out patches to fast glutamate molecule applications (2). The model (figure 1) that we finally adopted assumes fast desensitization upon agonist binding before and after opening of the channel (4), where C_0 is the unliganded closed state, C_1 is the singly and C_2 is doubly liganded closed states, respectively. C_3 , C_4 and C_5 are desensitized, closed states, and O is the doubly liganded open state. c denotes the concentration of the glutamate molecules at the synaptic cleft and the vicinity of the receptor channels in the post-synaptic membrane. The rate constants used in the present simulation are not shown (10).

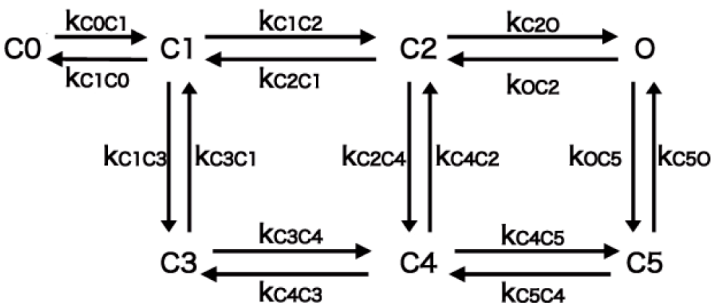


Fig. 1.

2.1.2 AMPA Receptor Channel Kinetics Model from Purkinje Cell

Kinetics models for AMPA receptor channels in cerebellum have been proposed from many laboratories (3, 8). A reaction scheme employed in the present study for the synapse between parallel fiber and Purkinje cell was basically the same as those

proposed previously by Hausser and Roth (5). The model has a total nine states, where C_0 is the unliganded closed state, C_1 is the singly liganded closed state, and C_2 is the doubly liganded closed state (c denotes glutamate concentration). C_3 to C_7 are desensitized (closed) states, with C_3 being singly liganded and C_4 to C_7 doubly liganded. O is doubly liganded open (conducting) state. The initial estimates for the rate constants in this model were the values in table 2 of Jonas *et al.* (7) together with estimates for the rate concerning to C_6 and C_7 .

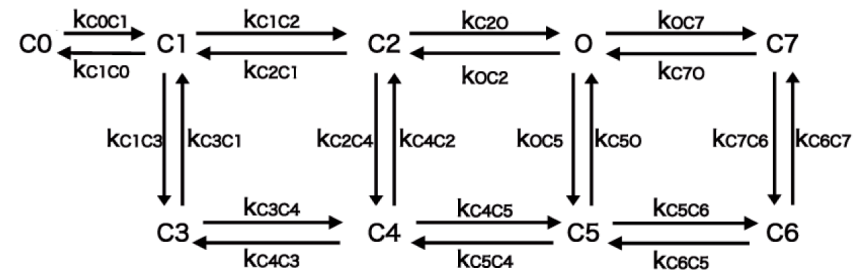


Fig. 2.

2.2 Design of the System for Photolysis

The present system for uncaging is originally designed in combination with a conventional confocal laser microscopy (LSM510 Meta, Carl-Zeiss, Jena, Germany) equipped with several visible wavelength laser. Ultraviolet (UV) light source for photolysis in the system is a commercial model (Enterprise II model 653, Coherent, CA) of an argon gas laser (351 and 364 nm, 80 mW) attached to the output exit of UV laser controls the output power of the ultraviolet laser beam. The preliminary experiment by using the present system were given in the previous paper.

2.3 Cerebellar Rat Slices, Hippocampal Neurons in Culture and Uncaging of MNI-Caged-L-Glutamate

Wistar rats (12-19 day old) were anaesthetized by diethylether and rapidly decapitated. Transverse cerebellar slices (270-300 μ m thickness) were cut in ice-cold ACSF (artificial cerebro-spinal fluid solution) using a vibrating slicer. They were moved to the recording chamber which was continuously perfused by normal ACFS at a rate of 2 ml/min bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 . Patch pipettes were pulled from borosilicate glass tubing having a DC resistance of 4-7 M Ω . The internal solution had the composition of methanesulfonic acid (133 mM) based one. MNI-caged -L-glutamate was delivered to regions of cells for uncaging through a fine tube. Hippocampal pyramidal cells in culture were prepared by the protocol described elsewhere (9). The cultured cells were identified by Nomarski microscope inspection before use for experiments and transferred to a chamber which is continuously perfused with Tyrode solution. The internal solution of patch electrodes for recording had composition of CsCl (140mM) based one.

3 Results

3.1 EPSC Reconstructions from the AMPA/Kainate Receptor Channel Kinetics Model

The waveforms of the EPSCs reconstructed by these two kinetics models were investigated for LTP and LTD observed in CA1 pyramidal cell (Scheme 1) and cerebellar Purkinje cell (Scheme 2), respectively. The time course of transmitter release from the presynaptic terminal, which is represented by the concentration of glutamate molecules in the synaptic cleft, were given as two kinetics model (step-function (1.0 mM, 1.0 msec) and α -function (Fig. 3A, C)(3).

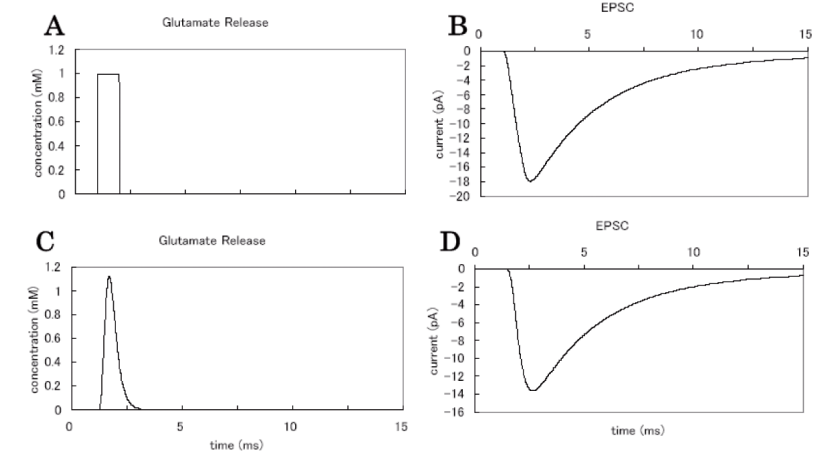


Fig. 3.

With these conditions and parameters, the reconstructed EPSC of pyramidal cell has a fast rise time less than 0.5 msec and a decay of single exponential function with time constant of 1.15 msec ($\tau = 1.15$ msec) which is shown in Fig. 3B and D. For simplicity, the profile of the concentration of transmitters at the synaptic cleft was assumed to be a step-function of which duration and amplitude are 1.0 msec and 1.0 mM, respectively. (Fig. 3A)

The reconstructed EPSC has the waveform of Fig. 3D for α -function and 3B for step function, respectively. The results suggests that two waveforms from the present two types of profiles of transmitter concentration give the same time course of EPSC and thus the simple step-like concentration change in the synaptic cleft is acceptable for transmitter release mechanism from the presynaptic terminal. Moreover, this assumption was also applicable for the EPSCs reproduced from the Purkinje cell type kinetics model of scheme 2 in Fig. 2 (result is not shown).

Next we have to test whether the present models could explain other sets of experimental results or not. Fig. 4 illustrates the computer generated paired-pulse stimulation in which two sequential transmitter pulses were applied to a larger outside out patches by using piezo driven theta tube. The result suggested that simulation of the paired pulse application of the glutamate molecules showed the depression of second current response that was already measured by patch-clamp experiment. The same kind of verification of the Purkinje cell kinetics model was also carried out. (data are not shown).

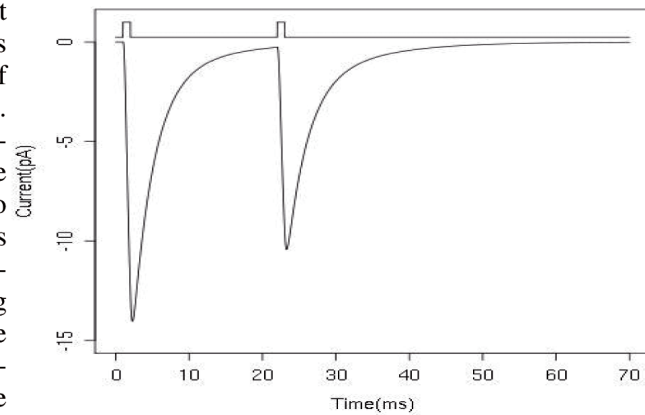


Fig. 4.

3.2 Change in Efficacy of Synaptic Strength and Rate Constants of Kinetics Models

From the experiments (whole-cell current recording), it has been reported that the waveforms of EPSCs before and during LTP/LTD have no change in their time course (rise time and decay time constant) except their amplitude. These three parameters determine uniquely the waveform of EPSC. Thus, we estimated the rate constants of the kinetics models that increase (for LTP) and decrease (for LTD) the amplitude of EPSCs without changing their time courses. The results of the estimation with 7-state model for LTP were listed in graph 5 which shows the change of three parameters (rise time τ_{rise} , decay time τ_{decay} , amplitude) by shifting a rate constants (C_0C_1 , C_1C_0 etc.) to the $10\times$ larger, and $0.1\times$ smaller value than control one without change in other all rate constants. Under the experimental condition, when the rate constant k_{C1C2} was increased $10\times$ larger than control value, the rise time changes to 95% of control value, decay time to 104%,

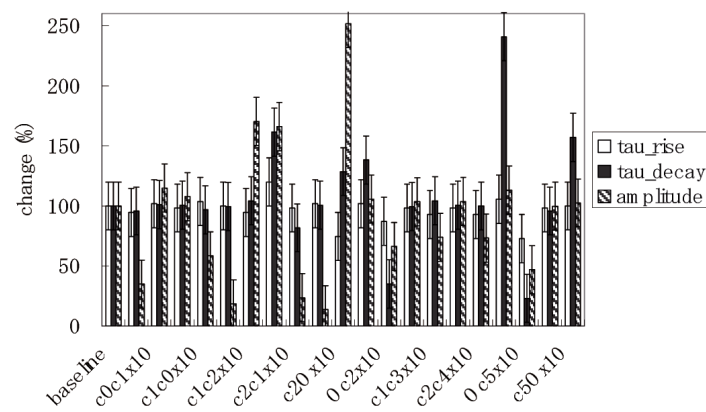


Fig. 5.

amplitude to 170%. The k_{C1C2} determines the binding speed of second agonist cule to AMPA receptor channel which has been already singly occupied and is closed state and thus increase in this rate constant means that once the receptor is singly occupied state, the second agonist molecule is easily bind to the receptor. It is concluded from the present calculation based on the 7-states kinetics model that the rate constant k_{C1C2} would increase due to unknown mechanisms such as phosphorylation etc after a treatment which causes LTP and that this change in rate constant leads to the enhancement of the amplitude of synaptic current (EPSC) during LTP (1). In order to find the parameter that may cause LTD in Purkinje cell, the same estimation was conducted with the kinetics model proposed for AMPA receptor channels in the Purkinje cell membrane. The obtained results suggested that simultaneous modification of both k_{c2c4} (the rate constant of the transition from the state of the receptor having two agonists to desensitization state) and k_{Oc2} (the rate constant of the transition from the open state to the closed state) induces the reduction of the EPSC amplitude during LTD of cerebellar Purkinje cell (data is not shown).

3.3 Responses by Laser Photolysis and AMPA/Kainite Receptor Channel Kinetics Model

We measured the current responses from the soma of Purkinje cells by uncaging of MNI-caged glutamate using IR laser beam, which is focused (diameter of $3\sim 5\mu m$) on a dendritic trees and soma of the cells. Figure 6A shows the location of the Purkinje cell soma on which the 2-photon (720 nm) laser beam was focused. The laser evoked current response measured from pipette accessed to the soma is shown in Figure 6B.

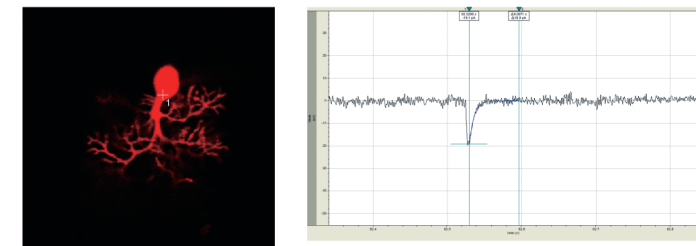


Fig. 6.

The decay time constant of the evoked response is 6.34 msec with 20 pA peak amplitude. Figure 6C is a typical example of a spontaneous miniature EPSC recorded from the soma of the same Purkinje cell. The decay phase of this miniature EPSC is fitted by a single exponential function having the decay time constant of 6.17 msec. Both recorded currents have the same decay phases that are well fitted by a single exponential function and the value of the time constants are almost equal. Together with pharmacological experiments (data is not shown), it is suggested that the current responses evoked by 2-photon laser uncaging are mediated by AMPA receptor channel which have the kinetic scheme shown in the previous section.

4 Conclusions and Summary

Firstly, by computer simulation, we reconstructed the synaptic currents (EPSC) from the proposed AMPA receptor channel kinetics model. Furthermore, we predicted the possible rate constants that could induce synaptic plasticity such as hippocampal LTP and cerebellar LTD. It was suggested from the present calculation that, for example, the rate constant k_{CIC2} in the kinetics model of pyramidal cells increases the speed of the second binding of agonist to receptor, which indicates that the change in affinity of glutamates to receptors partly causes LTP of hippocampus. The present method using reconstructed EPSC based on receptor channel kinetics model makes it possible to predict the physiological and molecular biological factors which are responsible for the synaptic plasticity. Secondary, the current responses measured by 2-photon laser uncaging have the same kinetics properties with those of the EPSCs recorder from the cells in slice preparations. Thus, the 2-photon laser photolysis can be widely applicable as a method for the stable and controllable simulation of fine areas of the neurons. Furthermore, the similar type of AMPA receptor channels models used in the present analysis mediate the evoked current responses by photolysis under voltage-clamp condition.

References

- Andrasfalvy, B.K., Magee, J.C.: Changes in AMPA receptor currents following LTP induction on rat CA1 pyramidal neurons. *Journal of Physiology* 559(2), 543–554 (2004)
- Colquhoun, D., et al.: Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainate receptor s in Patches from different neurones of rat hippocampal slices. *Journal of Physiology* 459, 261–287 (1992)
- Destexhe, S., et al.: In: Koch, C., Segev, I. (eds.) *Methods in neuronal modeling*, 2nd edn., pp. 1–25. MIT Press, Cambridge (1998)
- Dudel, J., et al.: Rapid activation, desensitization, and resensitization of synaptic channels of crayfish muscle after glutamate pulses. *Biophysical Journal* 57, 533–545 (1990)
- Hausser, M., Roth, A.: Dendritic and somatic glutamate receptor channels in rat cerebellar Purkinje cells. *Journal of Physiology* 501(1), 77–95 (1997)
- Jonas, P., Sakmann, B.: Glutamate receptor channels in isolated patches from CA1 and CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *Journal of Physiology* 455, 143–171 (1992)
- Jonas, P., et al.: Quantal Components of Unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *Journal of Physiology* 472, 615–663 (1993)
- Kojima, H., et al.: Properties of AMPA receptor channels during long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. In: Kuba, et al. (eds.) *Slow Synaptic Responses and Modulation*, pp. 307–317. Springer, Heidelberg (2000)
- Kojima, H., et al.: Ultraviolet laser beam and confocal microscopy –A system for rapid patterned photolysis. *IEEE Circuit & Devices, The electronics & Photonics Magazine* 22(6), 66–74 (2006)
- Lin, B., et al.: Long term potentiation alters the modulator pharmacology of AMPA-type glutamate receptors. *Journal of Neurophysiology* 87, 2790–2800 (2002)

CHOLINERGIC MODULATION ON SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY IN HIPPOCAMPAL CA1 NETWORK

E. SUGISAKI,^a Y. FUKUSHIMA,^b M. TSUKADA^b AND T. AIHARA^{a,b,*}

^aGraduate School of Engineering, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

^bBrain Science Institute, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

Abstract—Cholinergic inputs from the medial septum are projected to pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region and release acetylcholine (ACh) from their terminals. The cholinergic inputs are considered to be integrated with sensory inputs and to play a crucial role in learning and memory. Meanwhile, it has been reported that the relative timing between pre- and post-synaptic spiking determines the direction and extent of synaptic changes in a critical temporal window, a process known as spike timing-dependent plasticity (STDP). *Positive timing* where excitatory postsynaptic potential (EPSP) precedes the postsynaptic action potential induces long-term potentiation (LTP) while *negative timing* where EPSP follows the action potential induces long-term depression (LTD). To investigate the influence of muscarinic activation by cholinergic inputs on synaptic plasticity, STDP-inducing stimuli were applied during the muscarinic induction of a slow EPSP followed by repetitive stimulation in the stratum oriens. As a result, LTP was facilitated and LTD was abolished by the muscarinic activation. Furthermore, interestingly, LTP was also facilitated and LTD was switched to LTP with an increase in ACh concentration following application of the cholinesterase inhibitor eserine. These results indicate that the orientation of plasticity was shifted for potentiation by muscarinic activation. On the other hand, the application of excess ACh concentration completely suppressed STDP, LTP and LTD. In addition, STDP was suppressed in the presence of atropine, a muscarinic ACh receptor antagonist. Taken together, the findings suggest that synaptic plasticity modulation depends on the amount of cholinergic inputs. The modulation of synaptic plasticity by muscarinic activation might be an important stage in the integration of top-down and bottom-up information in hippocampal CA1 neurons. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: acetylcholine, hippocampus, muscarinic receptor, slow EPSP, STDP.

The cholinergic system is deeply involved in cognitive processing, playing an important role in learning and memory (Blokland, 1995; Parent and Baxter, 2004). Sensory stimuli

*Corresponding author. Tel: +81-42-739-8432; fax: +81-42-739-8858. E-mail address: aihara@eng.tamagawa.ac.jp (T. Aihara). *Abbreviations:* Ach, acetylcholine; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; CCh, carbachol; EPSP, excitatory postsynaptic potential; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; mAChR, muscarinic acetylcholine receptors; NMDA-R, NMDA receptor; STDP, spike-timing dependent plasticity.

0306-4522/11 \$ - see front matter © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.064

such as visual, auditory, and tactile inputs increase acetylcholine (ACh) release in the hippocampus (Inglis and Fibiger, 1995), where it is considered that these inputs are integrated.

ACh is considered to be a versatile modulator of various brain activities and functions (Ovsepián, 2008), and it has been shown to enhance cognitive functions such as learning and memory (Blokland, 1995). Cholinergic neurons are distributed mainly in the medial septum, diagonal band of Broca, and the nucleus basalis of Meynert and project to the cerebral cortex and limbic system (Butcher et al., 1993; Mesulam, 1990). The cholinergic neurons projecting to the hippocampus originate from the medial septum. They project to the CA1 pyramidal neurons and interneurons via the fimbria (Nicoll, 1985). Stimulating the medial septum or applying carbachol (CCh) in the hippocampus generates a theta rhythm (Buzsáki et al., 1986; Huerta and Lisman, 1993). Stimulation of the cholinergic neurons projecting to the hippocampus specifically releases ACh and enhances long-term potentiation (LTP) (Ovsepián et al., 2004; Nakao et al., 2003). Sensory inputs enhance the release of ACh in the hippocampus (Inglis and Fibiger, 1995) and the magnitude of change in ACh release is positively correlated with spatial memory performance (Fadda et al., 2000). However, ACh seems to be more involved in attentional processes than in learning and memory processes (Blokland, 1995).

Spike timing-dependent plasticity (STDP), one of the protocols used to induce synaptic plasticity, is characterized by temporal coincidence of the excitatory postsynaptic potential (EPSP) induced by electrical stimulation of the CA3-CA1 Schaffer collaterals and a back-propagating action potential (BPAP) from postsynaptic neuron firing (Magee and Johnston, 1997; Bi and Poo, 1998; Nishiyama et al., 2000). Stimulation of presynaptic terminals following a BPAP from the postsynaptic neuron induces LTP, while the opposite timing induces long-term depression (LTD). Therefore, STDP is a protocol that can induce both LTP and LTD in the same synapse by changing the relative timing of spikes.

Repetitive stimulation of cholinergic axons projecting to the hippocampus at 40 Hz for 0.5 s was reported to induce a short (2 s) inhibitory postsynaptic potential (IPSP) and then a consequent small (1 mV) and long-lasting (60 s) EPSP, called “slow EPSP” (Cole and Nicoll, 1984). Shinoe et al. (2005) reported that a long EPSP activated muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) through repetitive stimulation of cholinergic neurons, and ACh released in hippocampal slices enhanced LTP induced by tetanic stimulation. Tetanic stimulation is a sequence of relatively strong stimulations and therefore is rarely found under moderate conditions. Adams et al. (2004) observed the

influence of cholinergic inputs on the induction of LTP using a mAChR agonist, carbachol (CCh), and the STDP protocol. No LTP enhancement was observed, which is contrary to the finding of Shinoe et al. (2005). Hence, it is not clear how mAChR activated by cholinergic inputs influences LTP induction or how cholinergic inputs influence the induction of LTD.

In the present study, in order to evaluate synaptic plasticity with the activation of mAChR through cholinergic inputs, the STDP protocol was applied either with a slow EPSP induced by muscarinic activation following electrical stimulation of the oriens or with a change in ACh concentration following application of eserine, a cholinesterase inhibitor. As a result, the effect of ACh on the plasticity induced by the STDP protocol was shown. Furthermore, the effect of mAChR activation on synaptic plasticity was investigated in detail by controlling the concentration of ACh. The influence of muscarinic activation not only on LTP but also on LTD was estimated using the STDP protocol, and we demonstrate that synaptic plasticity in the CA1 area is modulated by mAChR activation depending on the amount of cholinergic inputs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparations and patch-clamp recording

All procedures were approved by the Tamagawa University Animal Care and Use Committee. All effects were made to minimize the number of animals used and their suffering. Hippocampal slices (400 μ m in thickness) were prepared from Wistar rats (2–4 weeks old) according to the standard procedure reported by Tsukada et al. (2005). Prior to recording, slices were incubated in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) 124 NaCl, 2 MgSO₄, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 3.1 CaCl₂, 22 NaHCO₃, and 11 glucose, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ for at least 60 min at room temperature (25 °C). The hippocampal CA3 region was surgically removed from individual slices to prevent potential recurrent inputs. Slices were then placed in a recording chamber superfused with the aCSF at room temperature. Submerged slices were viewed with a computer-controlled display camera (Hamamatsu, Japan). Whole cell patch clamp recordings using an electrical amplifier (CEZ-2400; Nihonkohden, Tokyo, Japan) were made from the soma of CA1 pyramidal neurons. A recording electrode was pulled at a resistance of 4–8 M Ω . The internal solution of the electrode contained (in mM) 120 KMeSO₄, 20 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 4.0 Mg²⁺ ATP, 0.3 Tris guanosine 5'-triphosphate, 14 phosphocreatine, and 4 NaCl (pH 7.25 with KOH). The starting voltage for recording neurons was –50 mV or less (–53.2 \pm 0.32 mV). The membrane potential was kept at –60 \pm 1 mV by somatic current injection unless otherwise specified. Picrotoxin at 25 μ M (Sigma, St. Louis, USA) was added to aCSF in order to block a GABA_A-R-related response. Atropine (1 μ M) and eserine (0.6, 2, and 20 μ M) (Sigma) were also added when necessary.

Electrical stimulation

Extracellular stimulation of Schaffer collaterals was performed for a duration of 50–100 μ s at 10 μ A using a stimulating electrode (glass pipette filled with aCSF and glued to a silver rod) to induce EPSPs (Fig. 1A). The elicited EPSPs were adjusted to an amplitude of 2–4 mV as a baseline. A modified version of the STDP protocol of Nishiyama et al. (2000) was used. An action potential was induced by a 2–2.5 nA current injection with a duration of 2 ms to the soma. In STDP protocols, positive timing is defined as an EPSP preceding the postsynaptic action potential (positive

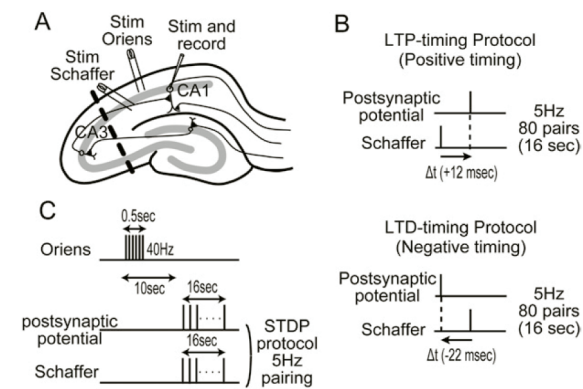


Fig. 1. Experimental procedure and stimulation pattern. (A) Schematic drawing of the rat hippocampal slice. One stimulating electrode was placed extracellularly in the Schaffer collaterals and another was placed in the stratum oriens. Whole cell patch clamp was made for current injection and recording of CA1 pyramidal neurons. (B) The two STDP-inducing protocols used in the study: the positive timing protocol (top), in which stimulation of the Schaffer collaterals was applied prior to the postsynaptic action potential, that is, at positive timing ($\Delta t = +12$ ms); and the negative timing protocol (bottom), in which stimulation of the Schaffer collaterals was applied after the postsynaptic action potential, that is, at negative timing ($\Delta t = -22$ ms). Each STDP protocol was applied at 5 Hz for 16 s. (C) Stimulation pattern used to investigate the effect of ACh release on STDP induction. The STDP protocol was applied at 10 s after the onset of repetitive stimulation (40 Hz for 0.5 s) in the stratum oriens.

timing protocol: $\Delta t = 12$ ms), while negative timing is defined as an EPSP following an action potential (negative timing protocol: $\Delta t = -22$ ms) (Fig. 1B). In both cases, stimuli were applied at 5 Hz for 16 s. To induce the release of ACh, another stimulating electrode was placed in the stratum oriens for stimulation at 40 Hz for 0.5 s with 80–300 μ s at 80 V (Cole and Nicoll, 1984; Shinoe et al., 2005) (Fig. 1A, C). In order to elucidate the effect of ACh on STDP, STDP was induced 10 s after the stimulation in the stratum oriens (Fig. 1C) because the peak latency of a slow EPSP is around 10 s. EPSP (0.05 Hz) was induced by applying stimulation in the stratum radiatum before and after the stimulation to induce STDP. At 2-min intervals, 100 mM NMDA (Sigma) was applied by current-balanced micro-iontophoresis (100 nA) in the stratum radiatum for a duration of 500 ms.

Data acquisition and analysis

Recording data were sampled at 20 kHz and stored on a personal computer using Clampex 9.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). An EPSP slope in the first 4–5 ms of the trace was calculated by Clampfit 9.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Three slope data every 20 s were averaged and shown as one data point in the graphs. The data points are presented as means \pm SEM. The magnitude of plasticity was defined as (averaged EPSP slopes obtained from 20 to 30 min after STDP-inducing stimulus)/(averaged baseline EPSP slopes). ANOVA followed by Fisher's PLSD test was used in statistical analysis ($P < 0.05$).

RESULTS

Cole and Nicoll (1984) showed that the electrical stimulation in the stratum oriens at 40 Hz for 0.5 s induced a slow EPSP, which caused the activation of mAChR through the release of ACh from the synaptic terminals originating from the medial septum. To achieve a slow EPSP in the present

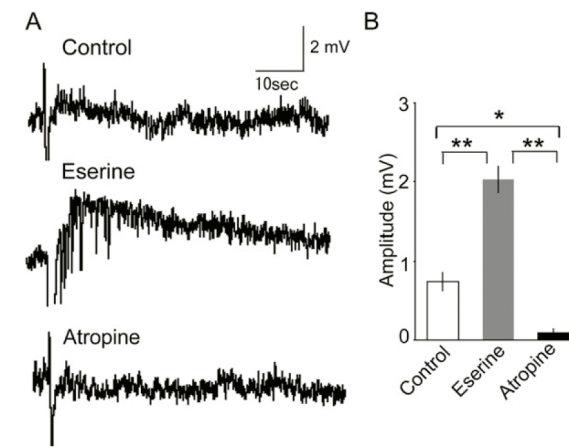


Fig. 2. Influence of endogenous ACh on pyramidal cells. (A) Slow EPSP elicited by repetitive stimulation. Slow EPSPs due to the excitability of the pyramidal cell were elicited by the release of endogenous ACh following repetitive stimulation of the oriens. Representative traces show typical examples of slow EPSPs in the absence (top) and presence (middle) of 2 μ M eserine, and the presence of 1 μ M atropine (bottom). Membrane potential was maintained at –53 mV. (B) Summary of slow EPSP amplitudes. Peak amplitudes in the absence (control) and presence of eserine and in the presence of atropine were measured. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA, Fisher's PLSD test.

study, strong repetitive stimulation was applied to the stratum oriens in the CA1 area. A representative EPSP trace is shown in Fig. 2A (top panel). The mean peak amplitude of slow EPSPs induced under the control condition was 0.73 \pm 0.11 mV ($n = 4$; Fig. 2B). With the bath application of 2 μ M eserine, a cholinesterase inhibitor, the peak amplitude of slow EPSPs was strongly increased (Fig. 2A, middle panel) to 2.02 \pm 0.17 mV ($n = 8$, $P < 0.01$ vs. control; Fig. 2B). On the other hand, in the presence of 1 μ M atropine, a nonselective mAChR antagonist, the mean peak amplitude of slow EPSPs was drastically decreased (Fig. 2A, lower panel) to 0.10 \pm 0.007 mV ($n = 4$, $P < 0.05$ vs. control; $P < 0.01$ vs. eserine; Fig. 2B). From these results, we conclude that slow EPSPs were induced by the activation of mAChR under our experimental conditions.

Influence of mAChR activation on STDP

First, to investigate the influence of physiologically released ACh on the induction of STDP, the positive timing protocols were applied to CA1 pyramidal neurons with and without slow EPSP induction following stimulation of the cholinergic axons. Change of the EPSP slope was measured before and after the STDP-inducing stimulus as the magnitude of STDP. In the positive timing protocol, as shown in Fig. 3A, D, the resulting LTP that was induced with slow EPSPs through the activation of mAChR was significantly enhanced (188.9 \pm 16.0%, $n = 5$, $P < 0.01$; $P < 0.05$ vs. control) compared to the LTP that was induced in the absence of slow EPSPs, that is, in the control condition (134.9 \pm 5.0%, $n = 10$, $P < 0.01$). This result suggests that the activation of mAChR facilitates LTP induction in the STDP protocol at positive timing. Next, in order to clarify

the dependence of ACh intensity on STDP induction, the positive timing protocol was applied to CA1 pyramidal neurons in the presence of different concentrations (0.6 and 2 μ M) of the cholinesterase inhibitor eserine. When an STDP-inducing stimulus was applied at positive timing, LTP was induced in the presence of 0.6 μ M eserine (154.7 \pm 22.3%, $n = 6$, $P < 0.05$; $P = 0.425$ vs. control), as shown in Fig. 3B, D. Furthermore, the magnitude of LTP was significantly increased in the presence of 2 μ M eserine (187.3 \pm 16.2%, $n = 6$, $P < 0.01$; $P < 0.05$ vs. control; Fig. 3C, D). These results show that LTP induction was facilitated further as the concentration of eserine increased, suggesting a positive relation between the effect of STDP facilitation and the concentration of ACh. In addition, to determine whether synaptic transmission is modified or not by application of only slow EPSP or eserine, the change in EPSPs at the Schaffer collateral-CA1 pathway by application of slow EPSP or eserine (0.6, 2 and 20 μ M; Fig. 4A–E) was examined. The EPSP slopes did not significantly differ between those without slow EPSP induction or eserine (slow EPSP: 105.8 \pm 2.4%, $n = 6$, $P = 0.07$; 0.6 μ M: 96.4 \pm 6.3%, $n = 6$, $P = 0.60$; 2 μ M: 102.1 \pm 13.1%, $n = 7$, $P = 0.86$; 20 μ M: 112.4 \pm 11.2%, $n = 7$, $P = 0.29$; Fig. 4A–E).

On the other hand, when negative timing protocols were applied to CA1 pyramidal neurons with and without slow EPSP induction following the stimulation of cholinergic axons, no significant synaptic plasticity was induced with slow EPSP (95.2 \pm 15.9%, $n = 5$, $P = 0.77$; $P < 0.01$ vs. control; Fig. 5A, D) compared with the control condition (39.6 \pm 2.9%, $n = 6$, $P < 0.01$). This result suggests that the activation of mAChR might cancel out the depression or shift in the plasticity to the opposite direction of depression, namely, the direction for potentiation. Furthermore, when the negative timing protocol was applied, with the STDP-inducing stimulus at negative timing, the LTD observed in the control condition was abolished in the presence of 0.6 μ M eserine (119.2 \pm 15.4%, $n = 5$, $P = 0.13$; $P < 0.01$ vs. control; Fig. 5B, D), while LTP was significantly induced in the presence of 2 μ M eserine (140.6 \pm 13.9%, $n = 6$, $P < 0.05$; $P < 0.01$ vs. control; Fig. 5C, D). These results indicate that synaptic plasticity was changed from LTD to LTP depending on the concentration of eserine. The orientation of plasticity appeared to shift toward potentiation as the concentration of ACh increased.

Influence of excess ACh on STDP induction

Second, to clarify the modulation of STDP under high concentrations of ACh, an STDP-inducing stimulus (5 Hz for 16 s) was applied at positive or negative timing under excess concentrations of ACh. These excess concentrations were produced in two ways: either with additional slow EPSPs which resulted in moderate potentiation of STDP during eserine (2 μ M) treatment or application of the STDP-inducing stimulus under a high concentration of eserine (20 μ M). In the positive timing protocol, with both slow EPSPs and the presence of 2 μ M eserine, STDP was not significantly induced (86.9 \pm 9.1%, $n = 5$, $P = 0.11$; Fig. 6A, C), even though moderate induction of LTP was observed in the presence of 2 μ M eserine as shown in Fig.

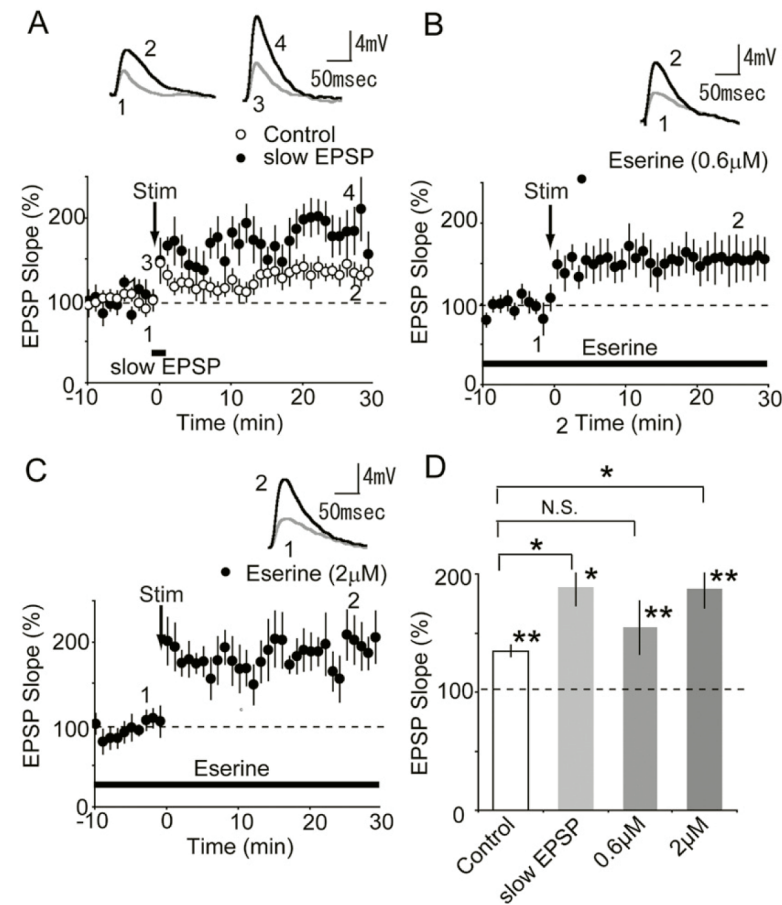


Fig. 3. Influence of AChR activation on STDP induced by the positive timing protocol. (A) Influence of slow EPSPs on STDP induction at positive timing ($\Delta t=12$ ms). STDP, LTP induced by the positive timing protocol, was enhanced by the slow EPSPs. EPSP slopes in the absence (\circ : control) and presence (\bullet) of slow EPSPs are presented as percentages. EPSP traces were recorded at the time corresponding to the numbers indicated in the time course of the EPSP slopes. (B, C) Influence of different concentrations of eserine, a cholinesterase inhibitor, on STDP at positive timing ($\Delta t=12$ ms). Application of eserine inhibited cholinesterase, which led to an increase in ACh concentration. LTP induction was facilitated as the concentration of eserine increased; \bullet (0.6 μ M eserine) in (B) and \bullet (2 μ M eserine) in (C). (D) Summary of slow EPSPs and the eserine effect on LTP, STDP by the positive timing protocol. Mean changes in the magnitude of the EPSP slopes are shown for the control, with slow EPSPs, in the presence of 0.6 μ M eserine and presence of 2 μ M eserine. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, one-way ANOVA. Fisher's PLSD test; N.S., not significant.

3C ($P<0.05$ vs. slow EPSP+2 μ M eserine). STDP was also not significantly induced when an STDP-inducing stimulus was applied at positive timing in the presence of 20 μ M eserine ($84.4\pm 10.9\%$, $n=7$, $P=0.10$; $P<0.05$ vs. 2 μ M eserine; Fig. 6B, C). Thus, STDP was not induced in the presence of excess concentrations of eserine, which suggests that the induction of STDP was obstructed by excess ACh or that the direction of STDP induction was changed away from that of potentiation.

On the other hand, in the negative timing protocol, STDP was not significantly induced with both slow EPSPs and the presence of 2 μ M eserine ($109.6\pm 11.3\%$, $n=5$, $P=0.22$; Fig. 7A, C), even though LTP was observed in the presence of 2 μ M eserine as shown in Fig. 5C ($P<0.01$ vs. slow EPSP+2 μ M eserine). When the negative timing protocol was applied in the presence of 20 μ M eserine, LTD was induced ($86.9\pm 2.8\%$, $n=5$, $P<0.01$; $P<0.05$ vs. 2 μ M eserine; Fig. 7B, C), which is in contrast to LTP that was induced in the presence of 2 μ M eserine.

These results indicate that STDP induced by the positive timing and negative timing protocols was abolished or depressed in the presence of excess ACh.

STDP induction in the absence of mAChR activation

Third, to pharmacologically clarify the influence of mAChR activation on STDP induction, an STDP-inducing stimulus was applied at positive or negative timing in the presence of 1 μ M atropine, a nonselective mAChR antagonist.

In the positive timing protocol, LTP induced in the control (Fig. 3A) was abolished, while LTD was observed with atropine application ($81.7\pm 6.7\%$, $n=6$, $P<0.05$; $P<0.01$ vs. control; Fig. 8A, C). No synaptic plasticity was observed with slow EPSPs in the presence of atropine ($90.5\pm 6.2\%$, $n=8$, $P=0.09$; $P<0.01$ vs. slow EPSP; Fig. 8B, C), but LTP was induced with slow EPSPs in the absence of atropine (Fig. 3A).

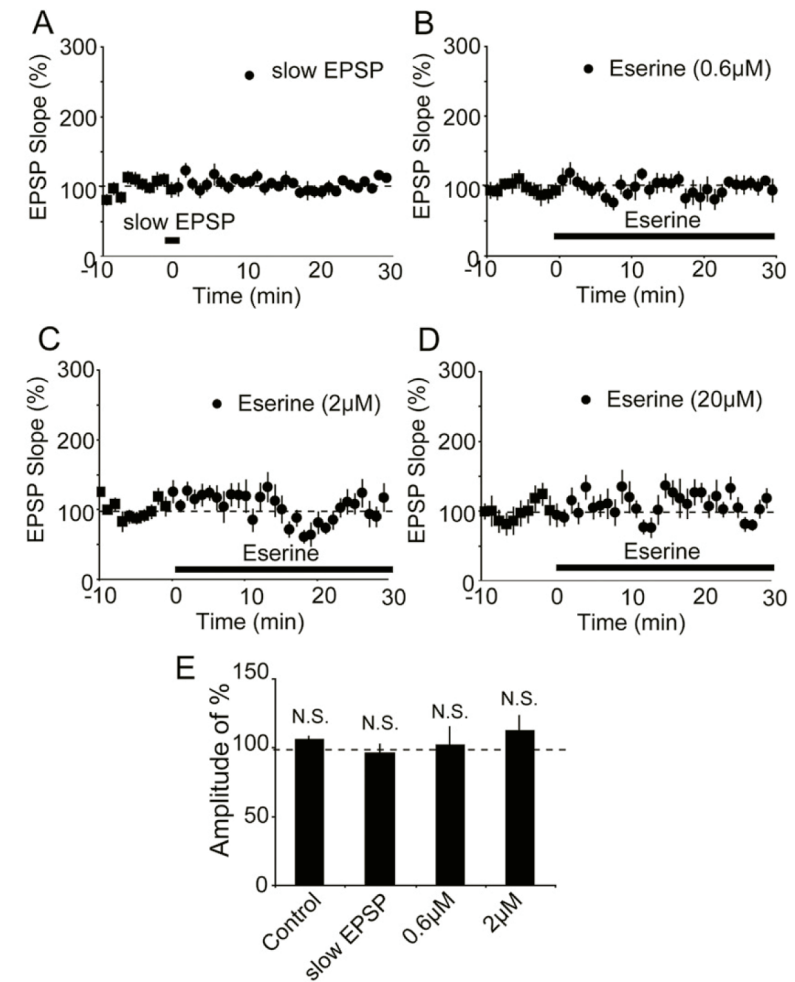


Fig. 4. Influence of ACh on EPSP slopes. (A–D) EPSP slope comparison in the absence and presence of either slow EPSP or eserine, where \blacksquare indicates EPSP slope without slow EPSP or eserine treatment. \bullet indicates EPSP slope after slow EPSP in (A), in the presence of 0.6 μ M eserine in (B), 2 μ M eserine in (C), and 20 μ M eserine in (D). (E) Mean changes in the magnitude of the EPSP slope without the STDP protocol under each condition.

In the negative timing protocol, STDP was not induced in the presence of atropine ($93.9\pm 7.1\%$, $n=5$, $P=0.4$; $P<0.01$ vs. control; Fig. 8D, F), but LTD was induced in the control (Fig. 5A). STDP was also not induced with slow EPSPs in the presence of atropine ($92.3\pm 4.2\%$, $n=6$, $P=0.08$; $P=0.90$ vs. slow EPSP; Fig. 8E, F), the same as in the case of STDP with slow EPSPs in the absence of atropine (Fig. 5A).

Taken together, these results suggest that the activation of mAChR is required for both LTP and LTD induced by the STDP positive and negative timing protocols.

Finally, in order to clarify the influence of ACh on the NMDA receptor (NMDA-R), 100 mM NMDA, an NMDA-R agonist, was ionophoretically applied to the stratum radiatum in CA1 pyramidal neurons. The NMDA-R-evoked response ($100.0\pm 0.04\%$, $n=6$) was enhanced in the presence of 2 μ M eserine ($171.4\pm 0.05\%$, $n=4$, $P<0.05$ vs. control; Fig. 9A, B). This enhancement was abolished by

the application of 1 μ M atropine ($98.7\pm 0.01\%$, $n=4$, $P=0.58$ vs. control; $P<0.01$ vs. 2 μ M eserine; Fig. 9A, B).

DISCUSSION

In this study, to investigate the influence of muscarinic activation on synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons, STDP-inducing stimulation consisting of the evoked firing activities of neurons was applied to hippocampal CA1 neurons during slow EPSPs, that is, depolarization, which was caused by activation of mAChR resulting from the release of ACh following repetitive electrical stimulation in the stratum oriens (Nicoll, 1985). To begin with, it was confirmed that slow EPSPs were elicited in our study (Fig. 2A, B). The amplitude of the slow EPSPs was increased in the presence of the cholinesterase inhibitor eserine, and was completely blocked by the nonselective mAChR antagonist atropine (Fig. 2C). These results corresponded with those of previous reports (Cole and Nicoll, 1984;

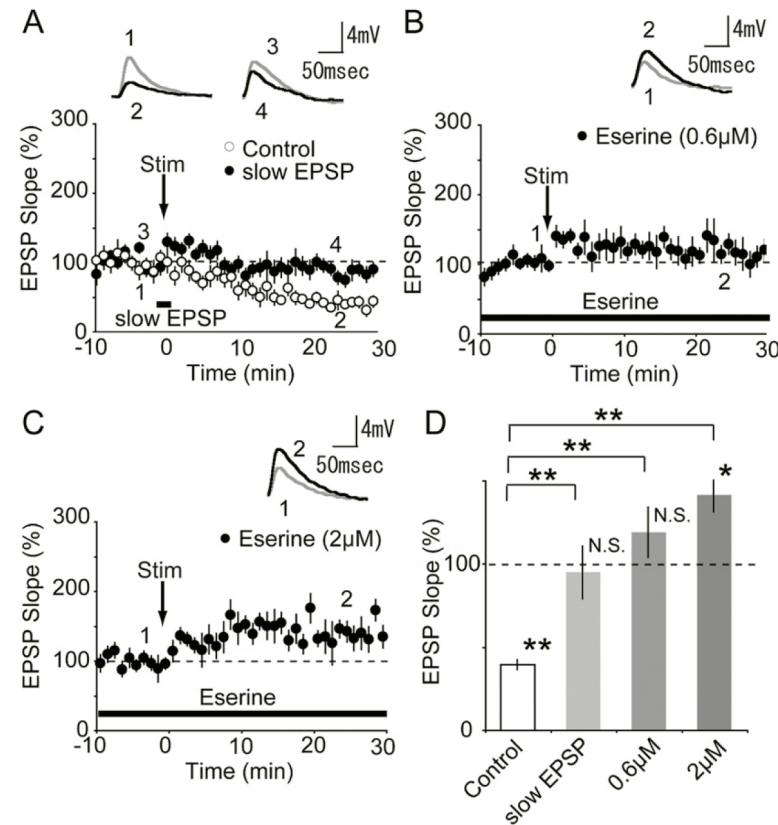


Fig. 5. Influence of AChR activation on STDP induced by the negative timing protocol. (A) Influence of slow EPSPs on STDP induction at negative timing ($\Delta t = -22$ ms). STDP, LTD induced by the negative timing protocol was abolished by the slow EPSPs. EPSP slopes in the absence (\circ : control) and presence (\bullet) of slow EPSPs are presented as percentages. EPSP traces were recorded at the time corresponding to numbers indicated in the time course of EPSP slopes. (B, C) Influence of different concentrations of eserine on STDP at negative timing ($\Delta t = -22$ ms). STDP was abolished in the presence of $0.6 \mu\text{M}$ eserine (\bullet in B) and was changed to LTP in the presence of $2 \mu\text{M}$ eserine (\bullet in C). (D) Summary of slow EPSPs and the eserine effect on LTD, STDP by the negative timing protocol. Mean changes in magnitude of the EPSP slopes are shown for the control, with slow EPSPs, and in the presence of $0.6 \mu\text{M}$ eserine and presence of $2 \mu\text{M}$ eserine. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA, Fisher's PLSD test; N.S., not significant.

Shinoe et al., 2005). In our study, although the amplitude was smaller than that seen in the previous reports, a similar tendency was confirmed. Therefore, in our experiment, mAChR was activated by repetitive synaptic stimulation and resulted in the induction of slow EPSPs.

Shinoe et al. (2005) showed that LTP induced by tetanic stimulation was enhanced by slow EPSP which was mediated by the activation of M1 mAChR. In our experiment, STDP protocols were applied to elicit synaptic plasticity. The stimuli were closer to moderate firings than those which can be induced by tetanic stimulus in the hippocampus. Furthermore, we could induce not only LTP using the positive timing of pre- and post-synaptic spikes (the positive timing protocol) but also LTD using negative timing (the negative timing protocol) with the same number and duration of stimuli. This is because, when homo-synaptic stimulation is applied to induce LTD, the period of the stimulation (1 Hz, 400–1000 pulses) exceeds the duration of slow EPSPs (~60 s). Therefore, we investigated the influence of activation of mAChR on both LTP and LTD induced by the STDP protocols.

First, LTP was significantly enhanced in the presence of slow EPSPs compared with LTP in the control conditions without slow EPSPs (Fig. 3A, D). These results indicate that the slow EPSPs, induced by the activation of mAChR, facilitated LTP in the STDP induction protocol with positive timing. LTP was also enhanced in the presence of eserine ($0.6 \mu\text{M}$ and $2 \mu\text{M}$), as shown in Fig. 3B–D. The results suggest that, when cholinesterase is blocked by eserine application, which prevents ACh from breaking down, the resultant appropriate increase in ACh from cholinergic inputs in the STDP protocol leads to mAChR activation, thereby enhancing LTP. Shimoshige et al. (1997) reported that the magnitude of LTP induced by tetanus stimulation with different concentrations of exogenously applied CCh, an agonist of mAChR, was significantly increased compared with the control condition without CCh application. In addition, in our study, no EPSP slope changes were induced without the STDP induction protocol in the presence of slow EPSP or eserine. Thus, the baseline of synaptic transmission was not changed by mAChR activation.

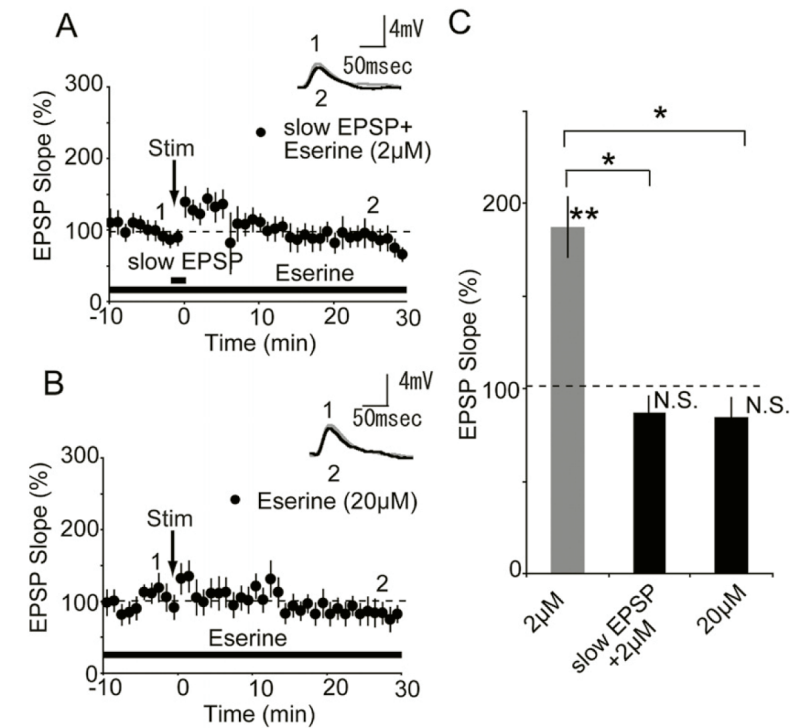


Fig. 6. Influence of excess ACh on STDP induced by the positive timing protocol. (A, B) Influence of excess ACh on STDP at positive timing ($\Delta t = 12$ ms). STDP was abolished by excess ACh both in the presence of slow EPSPs and additional $2 \mu\text{M}$ eserine (\bullet in A) and in the presence of $20 \mu\text{M}$ eserine (\bullet in B). EPSP traces were recorded at the time corresponding to the numbers indicated in the time course of the EPSP slopes. (C) Summary of the effect of excess ACh on STDP induced by the positive timing protocol. Mean changes in magnitude of the EPSP slopes are shown in the presence of eserine at $2 \mu\text{M}$ (data from Fig. 3C), presence of $2 \mu\text{M}$ eserine with slow EPSPs and presence of $20 \mu\text{M}$ eserine. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA, Fisher's PLSD test; N.S., not significant.

We consider that LTP was enhanced due to the following mechanism. It is generally known that the depolarization evoked by the STDP induction protocol releases the blockade of Mg^{2+} from the NMDA-R, which in turn increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on the dendrite by an influx of Ca^{2+} via the NMDA-R (Nicoll and Malenka, 1995; Connor et al., 1994). Nishiyama et al. (2000) reported that the sign (LTP or LTD) of STDP was decided depending on the Ca^{2+} influx. Aihara et al. (2007) showed the high and low Ca^{2+} influx dynamics related to the promotion of the above two systems, respectively. These reports demonstrated that the estimation for the relation between STDP and Ca^{2+} influx is consistent with the extended BCM rule (Bienenstock et al., 1982; Artola et al., 1990; Tamura et al., 1992), in which plasticity is shifted from LTD to LTP following the function of the BCM rule, which presents as a plasticity change from depression to potentiation depending on the cell activity (the influx of Ca^{2+} in present study). In addition, Clopath et al. (2010) also tried to theoretically explain the bidirectional connectivity pattern using a model of STDP in which synaptic changes depend on presynaptic spike arrival and postsynaptic membrane potential.

Responses to NMDA-R are selectively potentiated by ACh, acting on mAChR, in rat hippocampal CA1 neurons (Markram and Segal, 1990; Jo et al., 2010). Here, we also confirmed that the response to NMDA was enhanced in the presence of eserine (Fig. 9). Thus, the enhanced NMDA

response by the activation of mAChR leads to the increase in Ca^{2+} influx during induction of LTP by applying the positive timing STDP induction protocol. Therefore, it was considered that the activation of mAChR by synaptic stimulation for slow EPSP induction or eserine application contributes to the facilitation of LTP induction. Furthermore, it is reported that estrogen-induced LTP was increased when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission was increased (Smith and McMahon, 2005). It is possible that the mAChR-induced LTP was increased by a similar mechanism.

In addition, when the synaptic stimulation was applied to activate mAChR, slow EPSP (depolarization) was generated by muscarinic blockade of background potassium leak conductance (Cole and Nicoll, 1984; Madison et al., 1987). When the STDP-protocol was applied in the presence of slow EPSPs, the slow EPSPs served to elevate the magnitude of the depolarization induced by the protocol, which increased the release of Mg^{2+} blocked from the NMDA-R and led to the increase in Ca^{2+} influx. Consequently, LTP induced by positive timing is additionally enhanced to facilitate modulation of the NMDA response. Furthermore, Fernandez de Sevilla et al. (2008) reported that the Ca^{2+} released from endoplasmic reticulum stores by the activation of mAChR is required to induce IP_3 -related LTP. We conclude, therefore, that the change in synaptic plasticity is influenced by Ca^{2+} influx, which de-

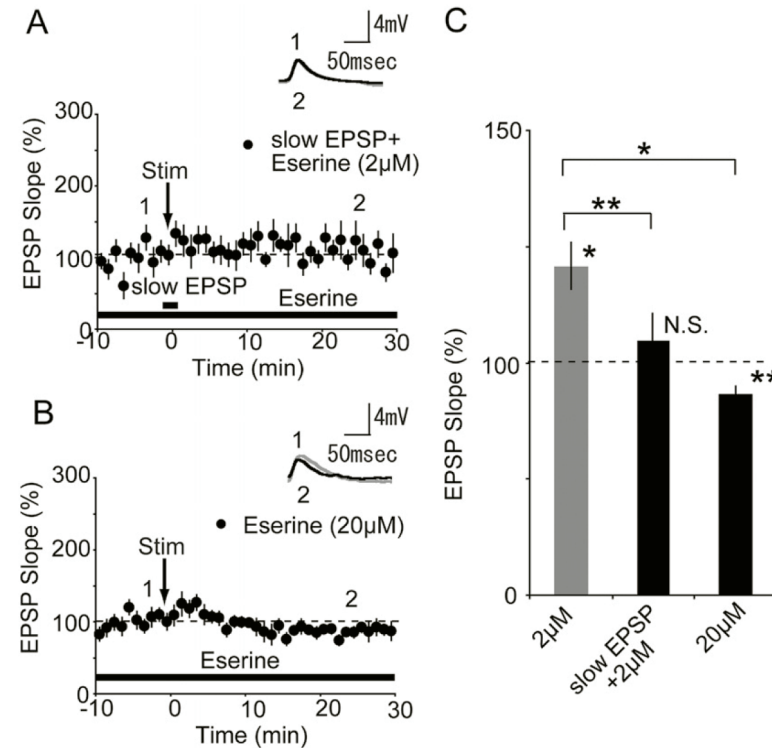


Fig. 7. Influence of excess ACh on STDP induced by the negative timing protocol. (A, B) Influence of excess ACh on STDP at negative timing ($\Delta t = -22$ ms). STDP was abolished by excess ACh both in the presence of slow EPSPs and additional 2 μ M eserine (● in A), and LTD was induced in the presence of 20 μ M eserine (● in B). EPSP traces were recorded at the time corresponding to the numbers indicated in the time course of the EPSP slopes. (C) Summary of the effect of excess ACh on STDP induced by the negative timing protocol. Mean changes in magnitude of the EPSP slopes are shown in the presence of eserine at 2 μ M (data from Fig. 5C), presence of 2 μ M eserine with slow EPSPs and presence of 20 μ M eserine. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA, Fisher's PLSD test; N.S., not significant.

depends on both NMDA-R modulation and depolarization (slow EPSP).

On the other hand, LTD was abolished when the negative timing protocol was applied with slow EPSPs (Fig. 5A, D), whereas the appropriate ACh effect in the presence of eserine abolished LTD (0.6 μ M eserine; Fig. 5B, D) or interestingly switched it to LTP (2 μ M eserine; Fig. 5C, D). These results indicate that the influence of mAChR activation on STDP modified the direction of synaptic plasticity from depression to potentiation, suggesting that STDP in the negative timing protocol is influenced by the same molecular mechanism as in the positive timing protocol, in which the activation of the mAChR increases the NMDA response and membrane potential, then shifts the plasticity from depression to potentiation depending on the Ca^{2+} influx. Our present results showed that mAChR activation enhanced LTP in the positive timing protocol, and abolished LTD or changed the sign from LTD to LTP in the negative timing protocol. Both LTP and LTD were modified toward synaptic potentiation by mAChR activation. Therefore, the modification of STDP in our results can be explained as a shift in plasticity that follows the BCM rule.

Next, we demonstrated that LTP was not induced by the positive timing protocol with slow EPSPs and the additional application of 2 μ M eserine (Fig. 6A, C). Furthermore, LTP was also suppressed in the presence of a high

concentration of eserine (20 μ M; Fig. 6B, C). These findings suggest that excess ACh prevented the induction of synaptic plasticity. This is because Ca^{2+} influx from the NMDA channel is decreased due to desensitization of the postsynaptic mAChR caused by receptor phosphorylation induced by an excess concentration of ACh (van Koppen and Kaiser, 2003; Kwatra and Hosey, 1986) and to the depression of transmitter (L-glutamate) release by mAChRs on presynaptic terminals (Qian and Saggau, 1997). Adams et al. (2004) showed the effect of ACh on STDP induction by applying CCh, where CCh also inhibited LTP. They concluded that the modification was due to desensitization of the mAChR by the continued presence of the agonist. Our results regarding the use of excess eserine support their conclusion. On the other hand, STDP was not significantly induced at negative timing with slow EPSPs and additional 2 μ M eserine (Fig. 7A, C). Moreover, LTD was induced in the presence of excess eserine (20 μ M), while LTP was induced in the presence of 2 μ M of eserine (Fig. 7B, C). These results may also be due to the same mechanism as that induced by positive timing which decreased Ca^{2+} influx because of mAChR desensitization and depression of transmitter release by excess ACh, so that the sign of STDP was decided depending on the Ca^{2+} influx.

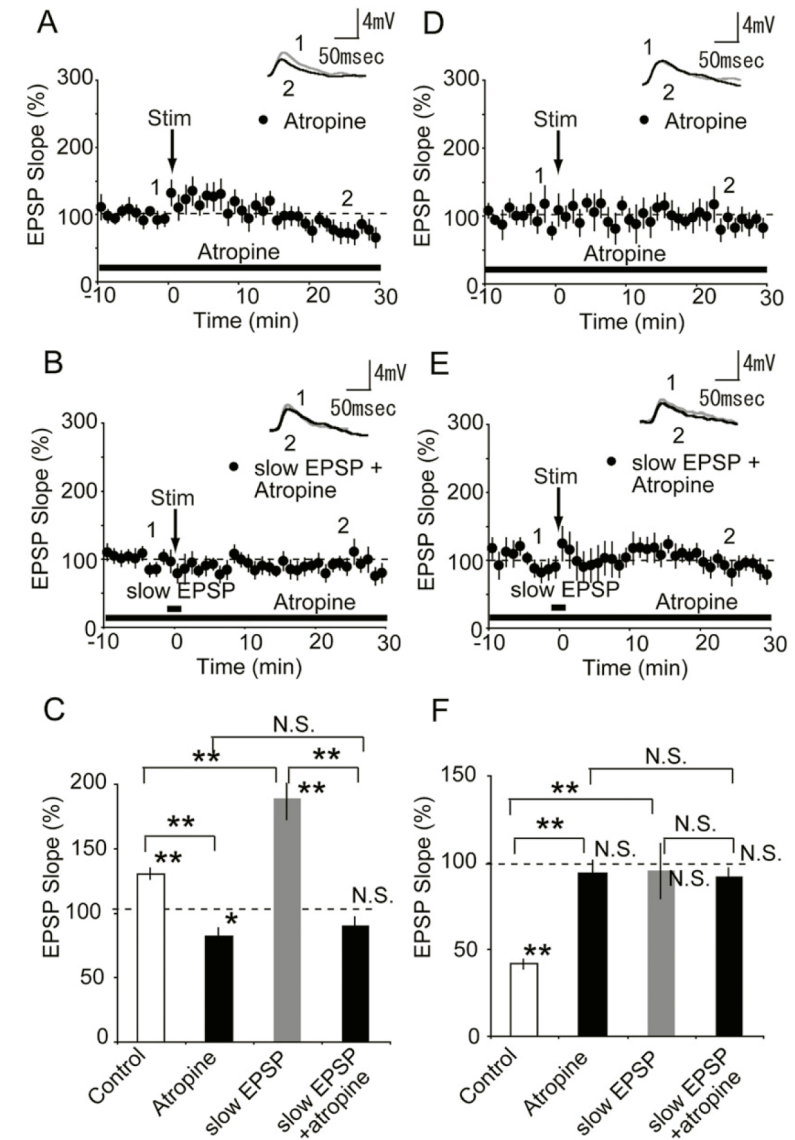


Fig. 8. STDP induction in the absence of mAChR activation. (A) Effect of 1 μ M atropine on STDP induced by the positive timing protocols. STDP was depressed to LTD in the presence of atropine (●). EPSP traces were recorded at the time corresponding to the numbers indicated in the time course of the EPSP slopes. (B) Effect of 1 μ M atropine on STDP induced by the positive timing protocols with slow EPSPs. STDP with slow EPSPs was depressed in the presence of atropine (●). (C) Summary of the influences of atropine on STDP induction at positive timing. Control data and slow EPSP in the absence of atropine are taken from Fig. 3A. (D) Effect of 1 μ M atropine on STDP induced by the negative timing protocols. STDP was also abolished in the presence of atropine (●). (E) Effect of 1 μ M atropine on STDP induced by the negative timing protocols with slow EPSPs. STDP with slow EPSPs was also abolished in the presence of atropine (●). (F) Summary of influences of atropine on STDP induction at negative timing. Control data and slow EPSP in the absence of atropine are taken from Fig. 5A. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in one-way ANOVA, Fisher's PLSD test; N.S., not significant.

Finally, when we applied the mAChR antagonist atropine to block the mAChR, both LTP and LTD were suppressed (Fig. 8). These results indicate that mAChR activation leading to slow EPSPs by physiologically released ACh from cholinergic fibers is required to induce and facilitate STDP.

The cholinergic neuron projecting from the medial septum to the hippocampus extends its axon to terminate on the pyramidal neurons and interneurons in CA1 via the fimbria,

and ACh is released from the synaptic terminals by repetitively stimulating the axon of the cholinergic neuron (Cole and Nicoll, 1984; Nicoll, 1985). The present study focused on the modulation of plasticity in CA1 pyramidal neurons by the release of ACh from the synaptic terminals. Our results indicate that the priming effect of endogenous ACh was mediated by mAChR and modulated STDP (both LTP and LTD), in which LTP was facilitated and LTD was abolished by slow EPSPs, which is close to the physiological condition of

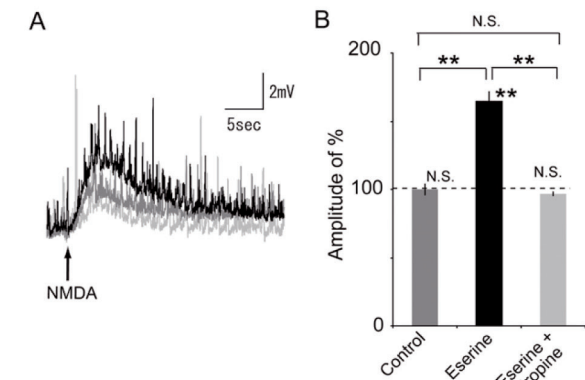


Fig. 9. Influence of ACh on the response of NMDA-R. (A) The voltage responses to NMDA ionophoretic application (arrow; 100 nA) in the absence or presence of 2 μ M eserine or 1 μ M atropine (absence of eserine in dark gray, presence in black, and presence of atropine in light gray). (B) Summary of influences of eserine and atropine on the responses to NMDA. ** $P < 0.01$ in one-way ANOVA, Fisher's PLSD test; N.S., not significant.

mAChR activation. Interestingly, ACh was found to be the modulating system that shifts plasticity in the potentiating direction depending on Ca^{2+} influx. Thus, our results suggest that ACh may regulate learning and memory performance, indicating a crucial role for learning and memory in the hippocampus. Our experimental procedure enabled us to observe the synaptic modulation occurring in CA1 neurons and revealed that appropriate concentrations of ACh modulate plasticity toward potentiation, where LTP was facilitated and LTD was changed to LTP. We conclude that ACh plays a critical role as a modulator for spatial-temporal information processing in the hippocampus, and thus attention modulates learning and memory at cell level.

Acknowledgments—We thank Drs. Kyonsoo Hong, Makoto Nishiyama, Satoshi Fujii, and Hiroshi Fujii for valuable discussions and advice on physiological experiments. This work was supported by the Global COE Program at Tamagawa University and Grants-in-Aid for Scientific Research 20500278 and 21120006 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

REFERENCES

Adams SV, Winterer J, Müller W (2004) Muscarinic signaling is required for spike-pairing induction of long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Hippocampus* 14:413–416.

Aihara T, Abiru Y, Yamazaki Y, Watanabe H, Fukushima Y, Tsukada M (2007) The relation between spike-timing dependent plasticity and Ca^{2+} dynamics in the hippocampal CA1 network. *Neuroscience* 145:80–87.

Artola A, Bröcher S, Singer W (1990) Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 347:69–72.

Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and post-synaptic cell type. *J Neurosci* 18:10464–10472.

Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW (1982) Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci* 2:32–48.

Blokland A (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev* 21:285–300.

Butcher LL, Oh JD, Woolf NJ (1993) Cholinergic neurons identified by in situ hybridization histochemistry. *Prog Brain Res* 98:1–8.

Buzsáki G, Czopf J, Kondákor I, Kellényi L (1986) Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res* 365:125–137.

Clopath C, Büsing L, Vasilaki E, Gerstner W (2010) Connectivity reflects coding: a model of voltage-based STDP with homeostasis. *Nat Neurosci* 13:344–352.

Cole AE, Nicoll RA (1984) Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 352:173–188.

Connor JA, Miller LD, Petrozzino J, Müller W (1994) Calcium signaling in dendritic spines of hippocampal neurons. *J Neurobiol* 25:234–242.

Fadda F, Cocco S, Stancampiano R (2000) Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport* 11:2265–2269.

Fernandez de Sevilla D, Núñez A, Borde M, Malinow R, Buño W (2008) Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 28:1469–1478.

Huerta PT, Lisman JE (1993) Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 364:723–725.

Inglis FM, Fibiger HC (1995) Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 66:81–86.

Jo J, Son GH, Winters BL, Kim MJ, Whitcomb DJ, Dickinson BA, Lee YB, Futai K, Amici M, Sheng M, Collingridge GL, Cho K (2010) Muscarinic receptors induce LTD of NMDAR EPSCs via a mechanism involving hippocampal, AP2 and PSD-95. *Nat Neurosci* 13:1216–1224.

Kwatra MM, Hosey MM (1986) Phosphorylation of the cardiac muscarinic receptor in intact chick heart and its regulation by a muscarinic agonist. *J Biol Chem* 261:12429–12432.

Madison DV, Lancaster B, Nicoll RA (1987) Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *Neuroscience* 7:733–741.

Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209–213.

Markram H, Segal M (1990) Acetylcholine potentiates responses to N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 113:62–65.

Mesulam MM (1990) Human brain cholinergic pathways. *Prog Brain Res* 84:231–241.

Nakao K, Ikegaya Y, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N (2003) Fimbrial control of bidirectional synaptic plasticity of medial perforant path-dentate transmission. *Synapse* 47:163–168.

Nicoll RA (1985) The septo-hippocampal projection: a model cholinergic pathway. *Trends Neurosci* 8:533–536.

Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115–118.

Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K (2000) Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408:584–588.

Ovsepian SV (2008) Differential cholinergic modulation of synaptic encoding and gain control mechanisms in rat hippocampus. *Neurosci Res* 61:92–98.

Ovsepian SV, Anwyl R, Rowan MJ (2004) Endogenous acetylcholine lowers the threshold for long-term potentiation induction in the CA1 area through muscarinic receptor activation: in vivo study. *Eur J Neurosci* 20:1267–1275.

Parent MB, Baxter MG (2004) Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 11:9–20.

Qian J, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Br J Pharmacol* 122:511–519.

Shimoshige Y, Maeda T, Kaneko S, Akaike A, Satoh M (1997) Involvement of M2 receptor in an enhancement of long-term potentiation by carbachol in Schaffer collateral-CA1 synapses of hippocampal slices. *Neurosci Res* 27:175–180.

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T (2005) Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 25:11194–11200.

Smith CC, McMahon LL (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of

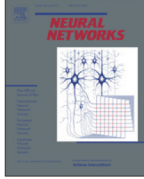
NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci* 25:7780–7791.

Tamura H, Tsumoto T, Hata Y (1992) Activity-dependent potentiation and depression of visual cortical responses to optic nerve stimulation in kittens. *J Neurophysiol* 68:1603–1612.

Tsukada M, Aihara T, Kobayashi Y, Shimazaki H (2005) Spatial analysis of spike-timing-dependent LTP and LTD in the CA1 area of hippocampal slices using optical imaging. *Hippocampus* 15:104–109.

van Koppen CJ, Kaiser B (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98:197–220.

(Accepted 22 June 2011)
(Available online 28 June 2011)



Neural networks letter

Reinforcement learning for discounted values often loses the goal in the application to animal learning

Yoshiya Yamaguchi^a, Yutaka Sakai^{a,b,*}

^a Graduate School of Brain Sciences, Tamagawa University, Tokyo, Japan

^b Tamagawa University Brain Science Institute, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2012

Received in revised form 29 July 2012

Accepted 16 August 2012

Keywords:

Inter-temporal choice

Delay discounting

Impulsivity

Reinforcement learning

ABSTRACT

The impulsive preference of an animal for an immediate reward implies that it might subjectively discount the value of potential future outcomes. A theoretical framework to maximize the discounted subjective value has been established in the reinforcement learning theory. The framework has been successfully applied in engineering. However, this study identified a limitation when applied to animal behavior, where in some cases, there is no learning goal. Here a possible learning framework was proposed that is well-posed in any cases and that is consistent with the impulsive preference.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Animals often prefer a small reward given immediately to a large reward given later, even though they receive a less total amount of rewards (Ainslie, 1974; Mazur & Biondi, 2009; Richards, Mitchell, de Wit, & Seiden, 1997; Schultz, 2010). The preference observed in inter-temporal choices of rewards suggests that an animal might subjectively discount the value of a delayed reward and attempt to maximize the discounted subjective value (Becker & Murphy, 1988). The nature of delay discounting has been studied in various fields both experimentally (Ainslie, 1974; Mazur & Biondi, 2009; Richards et al., 1997; Schultz, 2010) and theoretically (Nakahara & Kaveri, 2010; Sozou, 1998; Takahashi, 2005), and has often been discussed in relation to impulsivity or addiction (Kim & Lee, 2011; Takahashi, 2011).

A theoretical framework to maximize the discounted subjective value is formulated in the reinforcement learning theory, which deals with the learning of action choosing for a given situation (Bertsekas & Tsitsiklis, 1996; Sutton & Barto, 1998). The framework is constructed as follows: Assume a discrete time step t , and a subject that is required to choose an action a_t from the available options at each step and that is given a reward of amount r_{t+1} at the next time step $t + 1$. Let the state variable s_t represent a given

situation at a time step t . Note that the temporal order of the states, actions, and rewards in this notation is $s_t, a_t, r_{t+1}, s_{t+1}, a_{t+1}, \dots$. In the learning system, an action is chosen with a conditional probability for a given state s_t : $p_{as} \equiv P(a_t = a | s_t = s)$. The set of state-dependent choice probabilities $\{p_{as}\}$ is optimized through trial-and-error learning. The learning goal depends on the learning problem. The “discounted problem” (Bertsekas, 1995; Bertsekas & Tsitsiklis, 1996; Sutton & Barto, 1998) is to find a set $\{p_{as}\}$ that maximizes the temporally discounted subjective values for *all* states, each of which is defined as

$$V_s \equiv E \left[\sum_{k=1}^{\infty} \gamma^k r_{t+k} \mid s_t = s \right], \quad (1)$$

where $E[\cdot \mid \cdot]$ denotes the conditional expected value, and the discount factor γ represents the extent of the discount, $0 \leq \gamma < 1$.

Multiple state-values V_A, V_B, \dots exist for their respective states $s = A, B, \dots$. Each state-value V_s depends on the choice made in another state s' visited after $s_t = s$, and hence, each state-value cannot be maximized independently of other state-values. The “discounted problem” is, so to speak, an optimization problem for *multiple* objective functions. A solution to such an optimization problem does not generally exist, since a solution that maximizes one function does not necessarily maximize another. However, a solution to the “discounted problem” does exist under the condition of the Markov decision process (Bertsekas, 1995; Bertsekas & Tsitsiklis, 1996), which is usually presupposed in standard frameworks. This framework for the “discounted problem” has provided many practical algorithms for engineering

including the temporal difference learning, which is known to be consistent with the activities of dopamine neurons (Schultz, Dayan, & Montague, 1997), and has been used for the model-based analyses of neural activity (O'Doherty, Dayan, Friston, Critchley, & Dolan, 2003; Tanaka et al., 2004). However, there is a need to reconsider whether this is a suitable framework for the modeling of animal learning.

In a natural situation, animals are not explicitly given a current state s_t , and must therefore assess the current situation for themselves from available information that consists of sensory stimuli and their history. Different individuals may assess the current state in different ways. The definition of the state s_t depends on the individual and occasion. The condition of the Markov decision process depends on the definition of the state s_t ; hence, it may not hold for a certain state definition. This poses the question of whether there exists a solution to the “discounted problem” for an arbitrary state-definition. In the next section, we demonstrated examples in which there is no solution to the “discounted problem” for some state-definitions in simple choice tasks.

2. No solution to the “discounted problem”

Consider a simple choice task that is iterated successively (see Fig. 1(a)). At each time step t , a subject is given one of two sensory cues, $c_t = A$ or B , and is required to choose one of two responses, $a_t = L$ or R . After that, an identical reward is stochastically given, $r_{t+1} = 1$ or 0 , at the beginning of the next time step. Information available to the subject before the choice at trial t consists of the history of sensory cues, past rewards, and responses, $\{c_t, r_t, a_{t-1}, c_{t-1}, \dots\}$. A naive definition of the state s_t is the current sensory cue, $s_t \equiv c_t$. If the learning system uses the sensory cue c_t as the state s_t and makes a state-dependent choice,

$$P(a_t = L | c_t = A) = 1 - P(a_t = R | c_t = A) = p_{LA},$$

$$P(a_t = L | c_t = B) = 1 - P(a_t = R | c_t = B) = p_{LB},$$

the learning system attempts to find a set (p_{LA}, p_{LB}) to maximize both the discounted state-values V_A and V_B to solve the “discounted problem”. Fig. 1(b) shows V_A and V_B as functions of (p_{LA}, p_{LB}) for an example set of task parameters in which the reward probability was determined by a combination of the sensory cue and the response, and in which the sensory cue was determined by the two steps previous response,

$$P(r_{t+1} = 1) = \begin{cases} 0.9 & (c_t = A \text{ and } a_t = L) \\ 0.1 & (\text{otherwise}), \end{cases} \quad (2)$$

$$c_t = \begin{cases} A & (a_{t-2} = R) \\ B & (a_{t-2} = L). \end{cases}$$

It is clear that both V_A and V_B are simultaneously maximized at a point (p_{LA}, p_{LB}) for any value of the discount factor $\gamma = 0.2, 0.4, 0.6$ and 0.8 (rows of plots). Thus, there is a solution to the “discounted problem”. The “discounted problem” is well-posed in these cases.

In contrast, if the learning system uses the response chosen at the previous time step as the state, $s_t \equiv a_{t-1}$, and makes a choice independent of the cue being given currently,

$$P(a_t = L | a_{t-1} = L) = 1 - P(a_t = R | a_{t-1} = L) = p_{LL},$$

$$P(a_t = L | a_{t-1} = R) = 1 - P(a_t = R | a_{t-1} = R) = p_{LR},$$

the values V_L and V_R are maximized at different points of (p_{LL}, p_{LR}) respectively, for any value of the discount factor $\gamma = 0.2, 0.4, 0.6$ and 0.8 (Fig. 1(c)). The set (p_{LL}, p_{LR}) maximizing V_L does not maximize V_R , and therefore, there is no solution to the “discounted problem”. The “discounted problem” is ill-posed in these cases.

For another set of task parameters in which the reward probability was determined by a combination of the two consecutive

choices, and in which the sensory cue was randomly selected with probability

$$P(r_{t+1} = 1) = \begin{cases} 0.9 & (a_{t-1} = R \text{ and } a_t = L) \\ 0.1 & (\text{otherwise}), \end{cases} \quad (3)$$

$$P(c_t = A) = 0.6,$$

there is no solution to the “discounted problem” for the state definition $s_t \equiv c_t$ (Fig. 1(d)), while there is a solution for the state definition $s_t \equiv a_{t-1}$ (Fig. 1(e)). Even in inter-temporal choice situations, there is no solution to the “discounted problem” for some state definitions (Supplementary Figure).

Animals actually receive high-dimensional sensory inputs. Hence, the state can be defined in many ways. State-definition, which depends on the individuals, cannot be determined using only the external environment. Since the “discounted problem” is defined in a manner that depends on each state-definition, there must exist a learning goal for each state-definition. These results show that there is no learning goal for some state-definitions. When an animal adopts such a state-definition, does the animal actually lose the goal of the learning? Is there any possibility that an animal attempts to solve another learning problem well-posed for any state definition? In the next section, we propose an example of the learning problem in which a solution always exists for an arbitrary state definition.

3. Event-timing value problem

The defect in the “discounted problem” arises in the existence of multiple values to be maximized. Hence, an answer would be to define a single value to be maximized.

A naive suggestion for such a value would be the average of the discounted state-values over all states, $\sum_s V_s P(s)$, where $P(s)$ is the probability distribution of the state s . However, this value is proportional to the average reward,

$$\sum_s V_s P(s) = E \left[\sum_{k=1}^{\infty} \gamma^k r_{t+k} \right] = \frac{\gamma}{1-\gamma} E[r].$$

The maximization of the average state-value is equivalent to the maximization of the average reward, which is inconsistent with the inter-temporal choice behavior of animals. The above transformation is supported by the constant discount factor γ . If event-based time steps are introduced into the framework instead of regular time steps, as formulated in the semi-Markov decision process (Bertsekas, 1995; Daw, Courville, & Touretzky, 2006; Sutton & Barto, 1998), and if the discount factor γ is assumed to be a function of the inter-event interval τ_t from the $(t - 1)$ -th event to the t -th event, then the average discounted value

$$U \equiv E \left[\sum_{k=1}^{\infty} \left(\prod_{j=1}^k \gamma(\tau_{t+j}) \right) r_{t+k} \right], \quad (4)$$

can not generally be factorized into $\sum_k E \left[\prod_j \gamma(\tau_{t+j}) \right] E[r_{t+k}]$; hence, the maximization of U generally deviates from the average reward maximization (e.g., Supplementary Figure). They both coincide only if inter-event intervals $\{\tau_j\}$ and rewards $\{r_k\}$ are independent.

The type of event that results in the progression of a time step is subjective. Although there may exist multiple types of events, the definition (4) is the average over all types of events. Therefore, the value to be maximized is single, and there is always a solution to maximize U . The maximization problem of U is always well-posed. Here the value U defined by Eq. (4) is called as “event-timing value”, and the maximization problem is called as “event-timing value problem”.

* Corresponding author at: Tamagawa University Brain Science Institute, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan. Tel.: +81 42 739 8400; fax: +81 42 739 8400.

E-mail address: sakai@eng.tamagawa.ac.jp (Y. Sakai).

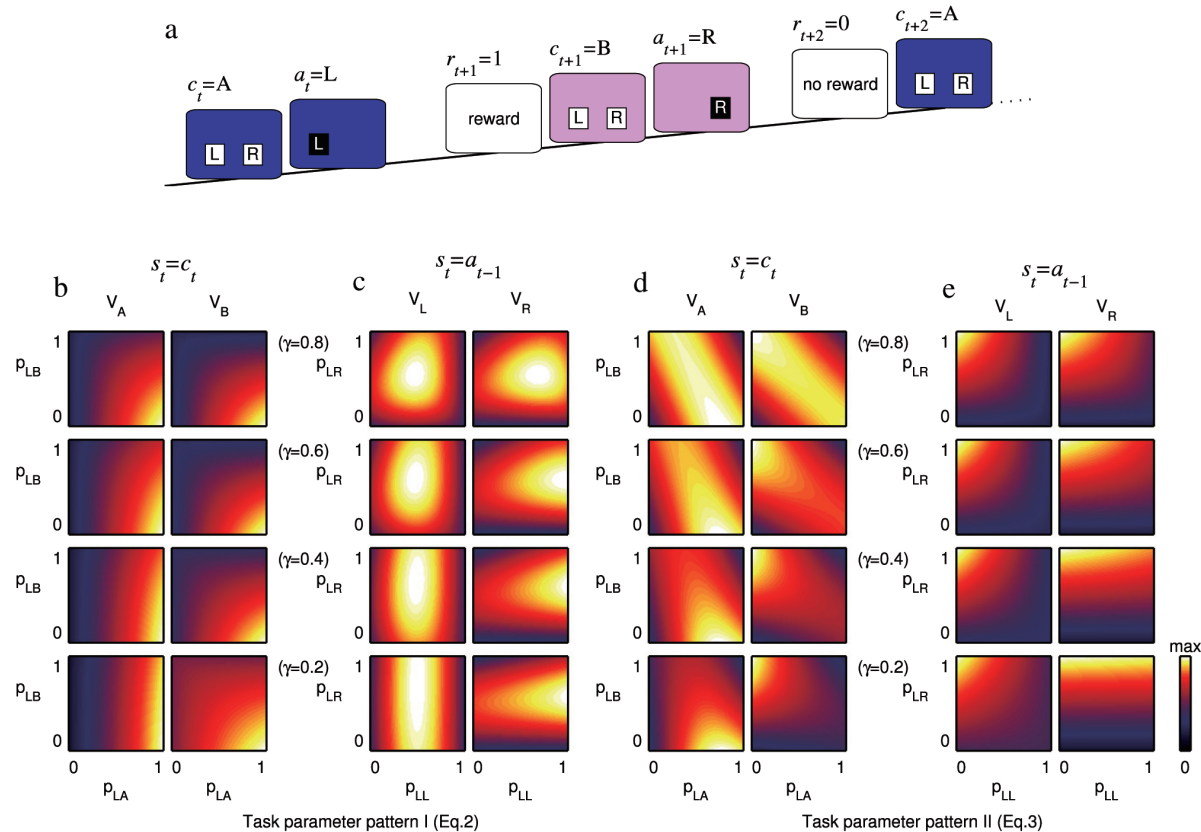


Fig. 1. Discounted state values are not simultaneously maximized for some state-definitions. (a) An example of the time steps of the choice task used for the calculation of the discounted state values (b–e). In this illustration, the sensory cue is presented as a specific background color, and the available options are the left and right buttons. The cue presentation and the reward delivery obey a stochastic rule of two different patterns: Eq. (2) for (b,c) and Eq. (3) for (d,e). (b–e) Discounted state values are shown with pseudo color as the functions of the state-dependent choice probabilities for different state-definitions using the two patterns of the task parameters. The pseudo color is normalized in the range from $V = 0$ to the maximum in each plot. The scale bar is common to all plots, shown at the bottom right of (e). The plots in the left column of each figure show the state-value V_A for (b,d) and V_L for (c,d). The plots in the right columns show the state-value V_B for (b,d) and V_R for (c,e). The plots in different rows correspond to different values of the discount factor: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8.

The event-timing value (Eq. (4)) can be written in another form,

$$U = E \left[r_t \sum_{k=0}^{\infty} \prod_{j=0}^k \gamma(\tau_{t-j}) \right] \equiv E[r_t \Gamma_t], \quad (5)$$

where the stochastic variable $\Gamma_t \equiv \sum_{k=0}^{\infty} \prod_{j=0}^k \gamma(\tau_{t-j})$ holds a recurrence formula $\Gamma_t = \gamma(\tau_t)(1 + \Gamma_{t-1})$, and can be easily calculated online. Thus, the event-timing value problem results in the maximization of the subjective reward $r_t \Gamma_t$. Therefore, the learning for the event-timing value problem can be achieved by the standard frameworks of the average reward maximization (Daw et al., 2006; Tsitsiklis & Van Roy, 2002; Williams, 1992), only by substituting the subjective reward $r_t \Gamma_t$ for the reward r_t .

The maximization of the event-timing value U reproduces the inter-temporal choice behavior of an animal for a certain function $\gamma(\tau)$. In a standard inter-temporal choice task, each response a is associated with a reward of certain delay D_a and amount R_a . If the events consist of only the onset of the start cue (t_{cue}), the response timing (t_{res}), and the reward timing (t_{rwd}), then the respective inter-event intervals when the response a is always chosen are $\tau_{\text{cue}} = L - D_a$, $\tau_{\text{res}} = RT$ and $\tau_{\text{rwd}} = D_a$, where RT denotes the response time from the start cue, which is assumed here to be independent from the past event series, and L denotes the total time from a choice response to the start cue of the next trial that was fixed in standard inter-temporal choice tasks (Mazur & Biondi,

2009; Richards et al., 1997). By using the recurrence formula, $E[\Gamma_{t_{\text{rwd}}}] = \gamma(D_a)(1 + E[\Gamma_{t_{\text{res}}}]) = \gamma(D_a)(1 + E[\gamma(RT)](1 + E[\Gamma_{t_{\text{cue}}}]]) = \gamma(D_a)(1 + E[\gamma(RT)](1 + \gamma(L - D_a)(1 + E[\Gamma_{t_{\text{rwd}}}])))$. Solving this equation for $E[\Gamma_{t_{\text{rwd}}}]$, the event timing value U when the response a is always chosen was calculated as

$$U = \frac{1}{3} (E[0 \times \Gamma_{t_{\text{cue}}}] + E[0 \times \Gamma_{t_{\text{res}}}] + E[R_a \Gamma_{t_{\text{rwd}}}] = \frac{R_a \gamma(D_a)(1 + E[\gamma(RT)](1 + \gamma(L - D_a)))}{3(1 - \gamma(D_a)E[\gamma(RT)]\gamma(L - D_a))}. \quad (6)$$

For sufficiently small $\gamma(L - D_a) \simeq 0$, the event timing value $U \simeq R_a \gamma(D_a)(1 + E[\gamma(RT)]) / 3 \propto R_a \gamma(D_a)$ approximately. This form coincides with the standard delay discounting form (Mazur & Biondi, 2009; Richards et al., 1997; Schultz, 2010; Takahashi, 2011), in which the delay discounting function estimated from behavioral data can be fitted successfully by using the near hyperbolic function $\gamma(D) \simeq (1 + \kappa D)^{-1}$. In fact, the dependence of the event-timing value (6) on the delay D approximately coincides with the function $\gamma(D)$, $U(D)/U(0) \simeq \gamma(D)$, when the function $\gamma(D)$ was set as $(1 + \kappa D)^{-1}$ and the parameter values were set as those obtained in the experiment by Mazur and Biondi (2009) (Fig. 2). Thus, the maximization of the event-timing value U is consistent with the impulsive preference of animals observed in inter-temporal choice tasks.

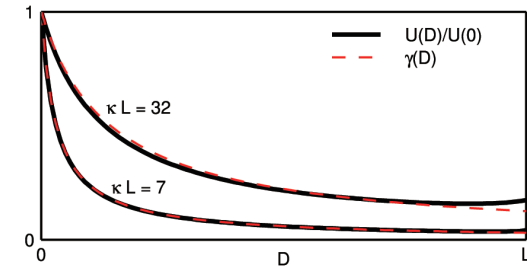


Fig. 2. Event-timing value U for the inter-temporal task in Eq. (6) shown as a function of the reward delay D (solid lines) in comparison to the discounting function $\gamma(D) = (1 + \kappa D)^{-1}$ (dashed lines). The response time was set as a constant $RT = 0.02L$. The parameter values $\kappa L = 7$ and 32 correspond to those fitted to the behaviors of pigeons and rats respectively, in the experiment by Mazur and Biondi (2009), in which the trial length $L = 50$ s.

4. Conclusion

It was found that there is no solution to the standard reinforcement learning problem: “discounted problem” (Bertsekas & Tsitsiklis, 1996; Sutton & Barto, 1998) for certain state-definitions (Fig. 1). Such state-definitions may be out of the scope of the current reinforcement learning theory, but plausible for animals. Here, a learning problem: “event-timing value problem” was proposed (Eq. (4)) to provide a subjective value that is well-posed for an arbitrary state-definition and consistent with inter-temporal choice behavior observed in animals (Fig. 2).

5. Discussion

Animals must use one of a number of ways to define state, because they are not explicitly given the current state as presupposed in reinforcement learning theory. The adoption of a certain state-definition restricts choice behavior from all possible response sequences. If the state-definition is inappropriate for the given environment, the truly maximum outcome cannot be generally obtained. The truly maximum outcome is obtained for a state-definition on which the condition of the Markov decision process is satisfied (Sakai & Fukai, 2008). The “discounted problem” is well-posed under the condition (Bertsekas & Tsitsiklis, 1996). It is not necessary in engineering to establish the learning problem for an inappropriate state-definition.

However, an animal may adopt an inappropriate state-definition. Is the learning goal for an animal actually lost when an inappropriate state-definition is adopted? Do unstable choice behaviors sometimes observed (Yoshida & Ishii, 2006) imply the loss of goal? Otherwise, there may be still some subjective goal for the individual to attempt to achieve. We proposed a possible framework “event-timing value problem” in which the learning goal is not lost for arbitrary state-definition. As event timings are subjective, it is difficult to test the validity of the event-timing value directly. However, it can be tested implicitly by observing how additional external events change the preferences of animals.

The key factor in the definition of the event-timing value is the introduction of event-based time steps and the physical-time-dependent discounting. This combination is common to the discounted problem in the semi-Markov decision process (Bertsekas, 1995; Sutton & Barto, 1998). There are other frameworks using event-dissected time steps and a constant discount factor independent from inter-event intervals (Nakahara & Kaveri, 2010). Although the possible origins of the discounting function $\gamma(\tau)$ were not highlighted in this study, an online estimation method (temporal difference learning) to approximate the hyperbolic discounting was proposed (Alexander & Brown, 2010), and relations between the subjective time perception and the hyperbolic

discounting are discussed (Nakahara & Kaveri, 2010; Takahashi, 2005). In addition to the above mentioned previous studies, the event-timing value problem also provides a framework to discuss the nature of subjective time for decision and discounting.

Here we presupposed that the impulsive preference of an animal may be a result of the subjective value maximization. However, there is another interpretation. The impulsive preference can be reproduced as a result of a robust transient of the reward maximization using the temporal difference learning (Daw & Touretzky, 2000). The subjective value maximization is only one of several possibilities. Moreover, the event-timing value is only one possible subjective value. The defect in the standard reinforcement learning problem highlighted in this study shows the need for establishing a framework for reinforcement learning suitable for animals exhibiting impulsivity.

Acknowledgments

This work was partially supported by Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (21120006), Grant-in-Aid for Young Scientists (21700174) and JSPS Global COE Program in Tamagawa University (J11): “Origins of the social mind”.

Appendix. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neunet.2012.08.004>.

References

- Ainslie, G. (1974). Impulse control in pigeons. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 21, 485.
- Alexander, W., & Brown, J. (2010). Hyperbolically discounted temporal difference learning. *Neural Computation*, 22, 1511–1527.
- Becker, P. L., & Murphy, R. A. (1988). Depression of mechanical function due to active shortening in the chick anterior latissimus dorsi muscle. *Journal of Physiology (London)*, 399, 451–466.
- Bertsekas, D. (1995). *Dynamic programming and optimal control*. Belmont, MA: Athena Scientific.
- Bertsekas, D. P., & Tsitsiklis, J. N. (1996). *Neuro-dynamic programming*. Belmont, MA: Athena Scientific.
- Daw, N., Courville, A., & Touretzky, D. (2006). Representation and timing in theories of the dopamine system. *Neural Computation*, 18, 1637–1677.
- Daw, N., & Touretzky, D. (2000). Behavioral considerations suggest an average reward TD model of the dopamine system. *Neurocomputing*, 32, 679–684.
- Kim, S., & Lee, D. (2011). Prefrontal cortex and impulsive decision making. *Biological Psychiatry*, 69, 1140–1146.
- Mazur, J. E., & Biondi, D. R. (2009). Delay-amount tradeoffs in choices by pigeons and rats: hyperbolic versus exponential discounting. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 91, 197–211.
- Nakahara, H., & Kaveri, S. (2010). Internal-time temporal difference model for neural value-based decision making. *Neural Computation*, 22, 3062–3106.
- O’Doherty, J., Dayan, P., Friston, K., Critchley, H., & Dolan, R. (2003). Temporal difference models and reward-related learning in the human brain. *Neuron*, 38, 329–337.
- Richards, J. B., Mitchell, S. H., de Wit, H., & Seiden, L. S. (1997). Determination of discount functions in rats with an adjusting-amount procedure. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 67, 353–366.
- Sakai, Y., & Fukai, T. (2008). When does reward maximization lead to matching law? *PLoS One*, 3, e3795.
- Schultz, W. (2010). Subjective neuronal coding of reward: temporal value discounting and risk. *European Journal of Neuroscience*, 31, 2124–2135.
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275, 1593.
- Sozou, P. D. (1998). On hyperbolic discounting and uncertain hazard rates. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 265, 2015–2020.
- Sutton, R. S., & Barto, A. G. (1998). *Reinforcement learning*. Cambridge, MA: MIT press.
- Takahashi, T. (2005). Loss of self-control in intertemporal choice may be attributable to logarithmic time-perception. *Medical Hypotheses*, 65, 691–693.
- Takahashi, T. (2011). A neuroeconomic theory of rational addiction and nonlinear time-perception. *Neuro Endocrinology Letters*, 32, 221–225.
- Tanaka, S. C., Doya, K., Okada, G., Ueda, K., Okamoto, Y., & Yamawaki, S. (2004). Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. *Nature Neuroscience*, 7, 887–893.
- Tsitsiklis, J., & Van Roy, B. (2002). On average versus discounted reward temporal-difference learning. *Machine Learning*, 49, 179–191.
- Williams, R. (1992). Simple statistical gradient-following algorithms for connectionist reinforcement learning. *Machine Learning*, 8, 229–256.
- Yoshida, W., & Ishii, S. (2006). Resolution of uncertainty in prefrontal cortex. *Neuron*, 50, 781–789.

平成 21 年度～平成 25 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

記憶・学習の可塑的発達機構に関する統合的解析
— 行動解析、生理実験、遺伝子発現、神経回路モデルの融合 —
研究成果報告書

平成 26 年 3 月

学校法人玉川学園 玉川大学学術研究所
研究代表者 佐々木正己

事務局
玉川大学学術研究所 研究促進室
〒 194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1
Tel : 042-739-8666
t.instit@adm.tamagawa.ac.jp
<http://www.tamagawa.jp/research/>



学校法人玉川学園 玉川大学学術研究所
研究代表者 佐々木正己

事務局

玉川大学学術研究所 研究促進室

〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1 Tel : 042-739-8666
t.instit@adm.tamagawa.ac.jp <http://www.tamagawa.jp/research/>

