

コオロギの生得的行動の変化

蒲原実希也 中鶴奨 西田みのり 原田寛 平松梨花 廣田亮太郎
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

私たちは、学習実験によってコオロギの生得的行動の一つである音波走性を変換する研究を行った。自作の実験装置、録音した誘引歌（呼び鳴き）と食塩水（コオロギが忌避する）を使って、古典的条件づけ（感覚刺激と報酬/罰を連合させる学習実験）を行い、80個体のコオロギの中で音波走性が変化した個体の割合を測定した。その結果、「フタホシコオロギのメスの音波走性は学習によって変換される」という仮説の正当性が示された。

1. はじめに

1.1. 研究の背景

私たちは、研究の計画段階で学習記憶というものに興味を持った。そこで生物図録を調べてみると、「生得的行動は経験などによって変化することがある。（鈴木孝仁ほか、2016）」という興味深い記述を目にした。一般に生得的行動と習得的行動（学習行動）は対極にあるとされる。遺伝子にプログラムされている生得的行動が変化し、異なる行動を取るようになるということが本当にあるのだろうか？私たちはこの問題を確かめるため、生得的行動の代表例であるフタホシコオロギの音波走性に注目し、研究を行った。ここで研究タイトルについて説明すると、

- ・生得的行動→音波走性
- ・変化→誘引歌を聴いても誘引行動が起こらなくなる

という対応があるのである。

1.2. 研究の意義

次に、この研究の意義について述べる。まず、生得的行動は可変的であるか疑ってみる視点がユニークだ、ということが挙げられる。先行研究では、メスのコオロギがどのような誘引歌に最も誘引される（引き寄せられる）か、という実験しか行われなかった。加えて、生得的行動を変換する学習実験は前例が見つからなかった。

さらに、この研究によって微小脳を持つ昆虫であってもヒトと同様、本能行動に抗えることが証明できる。昆虫の行動をイヌの「しつけ」のようにコントロールする可能性すら見えてくるのである。

1.3. 仮説

私たちは「フタホシコオロギのメスの音波走性は学習によって変換されるが、長期記憶として固定（定着）することはない」という仮説を立てた。

前半部分の根拠としては、先に言及したヒトやイヌの例のように、生得的行動は絶対的なものとは限らないということがある。交尾行動は、逃避行動など生命に直接関わる行動に比べると優先度が低く、有害な高濃度食塩水の摂取を回避する方向に動くのではないかと考えた。後半部分は、音波走性を失った状態が長期的に持続すると種の存続が危う

くなるため、固定した学習記憶を忘却し修正するシステムがある、という予想に基づいた仮説である。この理論によるとやはり生得的行動は変化しないのではないかと、と思われるかもしれないが、私たちは「一時的にでも」変化するかに着目しているのである。そのため、実験では学習が終わった直後に誘引行動の割合を調べた。現時点で仮説後半部分の検証には至っていない。

2. 予備実験・誘引割合の測定

2.1. 実験材料・使用機器

- ・フタホシコオロギのメス（成体）
- ・円形実験装置（図2）
- ・カメラ
- ・三脚
- ・オーディオスピーカー「JBL社 JBL Pebbles」
- ・懐中電灯（赤セロハンを用いて赤色光にした）
- ・温度計
- ・照度計
- ・フリー音声合成ソフト「Audacity」（図1）
- ・フリー波形表示ソフト「振駆郎」
- ・マイク
- ・フリー統計ソフト「R」

今回の研究では、学習実験に頻繁に使われるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を使用した。フタホシコオロギのメスは、オスの誘引歌に誘引されるという音波走性を生まれながらに持っている。フタホシコオロギは学習能力が高く、学習記憶の書き換えが可能であることは既に知られている。

ここで注意してほしいのは、個体をラベリングして区別した訳ではないということである。ある個体の実験結果がどのような変化をしたか、については考えていない。

円形実験装置は、円形、段ボール製、壁の一カ所にスピーカーがはまる隙間 6 cm、壁の高さ 5 cm、周の長さ 162 cm である。当初は直線形実験装置であったが、コオロギが全方位に自由に進めるよう円形に改良した。しかし、2.2 の予備実験を行う際、円形実験装置内でスピーカーに近づくとつれ、壁の反響のため誘引歌の音量が小さくなる状態であることが明らかになった。これではコオロギは誘引歌の音源に向かって進むことができず、音波走性を示さない。

そこで、壁を取り除きつつコオロギが逃避を諦めるよう水上に装置を浮かせる案を考えたが、コオロギが泳げることが分かり却下となった。最終的に壁を限界（5 cm）まで低くすることで反響の問題は解決した。

また赤色ライトは、人間の視界を確保しつつコオロギを暗条件下におくために、すべての実験で用いた（昆虫は赤色を識別できない）。フタホシコオロギの成体は夜行性で、夜間に交尾行動が活発になるので暗条件に設定した。但し、暗条件下である程度誘引行動は促進されるだろうが、本来であれば実験を夜間に合わせるのが理想的である。今回は諸事情により妥協した。暗条件にするのは、太陽光や蛍光灯の光などの影響を考慮に入れないためでもある。

誘引歌は、飼育していたフタホシコオロギのオスのものを録音した。誘引歌・合成音は同一のwavデータを使用した。

上記の物品の他に、飼育用として熱帯魚の餌「TetraMin」、自作の温室等を使用した。

2.2. 予備実験

私たちは、コオロギが誘引歌と他の音声を区別しているか検証する必要があると考えた。他の音声としては、誘引歌に似ている（振幅、1振動の波形が同じ）が誘引歌でない音が適切だと思われる。コオロギにとっての誘引歌の特殊性を見るのである。その「ダミーの音」は誘引歌の音声データを音声合成ソフト「Audacity」で合成して作成した（以後、合成音と表記）。具体的には、シラブルと呼ばれる誘引歌の基本単位をコピーし、多数繋ぎ合わせて32秒間の音声データにした（図1）。

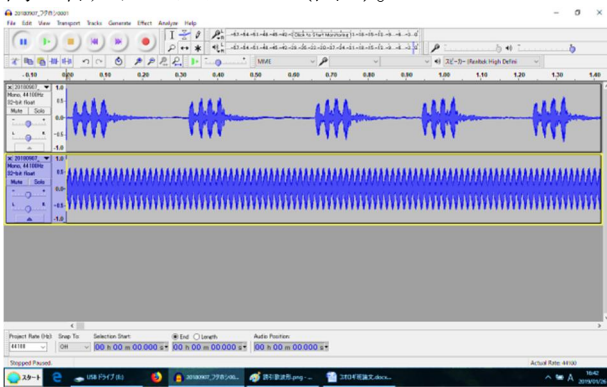


図1. 誘引歌と合成音

<方法>

- ① 円形実験装置にフタホシコオロギのメス（成体）を入れ、3分間で鎮静化させる（移動を止めるまで刺激を与えない）（図2）。



図2. 円形実験装置

- ② 誘引歌、または合成音をスピーカーで再生し、特徴的な誘引行動（音源に向けての歩

行と停止を繰り返す行動）が見られるか観察する。

- ③ 2分間で実験を終了する。
- ④ 別個体で1回ずつ同じ操作を行う。

<結果>

計15個体で実験を行ったが、誘引歌、合成音ともコオロギは明瞭な誘引行動を示さなかった。

<考察>

誘引行動の客観的な判定基準を設定する必要がある。また、交尾したことのあるメスは誘引行動を示さないで、コオロギを幼生から育てるべきである。さらに、壁の反響の影響で誘引行動を示していない可能性があるため、実験装置を改良する（2.1参照のこと）。

再度合成音を使用した予備実験をすることは研究期間の都合でできなかったが、以降の研究はこれらの改善をした状態で行った。

2.3. 誘引割合の測定

本実験（学習、試験と呼んでいる）の最終準備段階として、「誘引割合の測定」を行った。この実験の目的は、

- ① 誘引歌を再生した際、ランダム歩行（誘引歌の影響を受けず、自由に歩行すること）しているのではなく誘引されている、と示すこと
- ② ①の仮説が正しいとき、個体数ベースでどの程度の割合誘引されているのか、データを得ること

の二点である。得られたデータは本実験の結果と比較するために用いた。つまり、メスのコオロギが恐怖条件づけをしていない状態（自然状態）で誘引歌に誘引される割合と、恐怖条件づけをした状態で誘引歌に誘引される割合を比べた。

<方法>

- ① フタホシコオロギのメス（成体）を80個体用意し、2日間飢餓状態（水・餌を与えない状態）にしておく（詳しくは3.3参照のこと）。これはできるだけ本実験（学習、試験）の条件に近づけるため、使用したのは本実験用の個体である。
- ② 1個体ずつコオロギを円形実験装置の中央にセットする。セットとは小さなプラスチック製のカバーでコオロギを閉じ込め、鎮静化させることである。
- ③ スピーカーで誘引歌を再生し、20秒後に静かにカバーを取り除く。コオロギは最初に置いた方向に進みやすいため、作為的にコオロギの体の向きを決めることがないようにした。このときコオロギを刺激したならば、②からやり直す。
- ④ コオロギの行動を録画し、スピーカーの中央から左右9 cm、計18 cmの範囲（円周）へ「最初に到達した」コオロギの個体数を記録する。これは本実験でも共通に用いた誘引行動の定義である。スピーカーの幅が6 cmであることを考慮すると、18 cmは少し長いのではないか？これには狙いがある。もしコオロギが誘引歌を受容していて実際に音波走性を示しているならば、

少なくともこの範囲に入るだろう、という見立てなのである。この定義は必要条件ということになる。このため、誘引された個体を見逃すことはないが、誘引されていないのにも拘らず定義に当てはまった個体が若干数存在する可能性がある。この誤差をどう考えるのか。私たちは、学習有の実験で誘引されない個体がより多くなる時、「理想の誘引範囲」に入らず「定義」に入る個体数も多くなると考えた。よって、検定の結果はより保守的となり、この定義を用いることが認められる。以降、定義を満たしたとき「誘引行動を示した」と表現する。

⑤ 80 個体で②～④の操作を行う。

<結果>

表 1. 誘引割合の測定結果 (個体数)

	誘引	非誘引	計
測定値	19	61	80
ランダム歩行	9±5.5	71±5.5	80

ランダム歩行 (誘引歌の影響を受けず、自由に歩行すること) していると仮定した場合の 95%信頼区間を α の検定 (5.1 参照のこと) と同様の方法で求めたところ、表 1 下段のような誤差範囲となり、ランダム歩行していないと言える有意な数字が測定できたことになった。確率分布のグラフを下に示す (図 3)。赤線は 19 個体 (測定値: 誘引) の目安である。

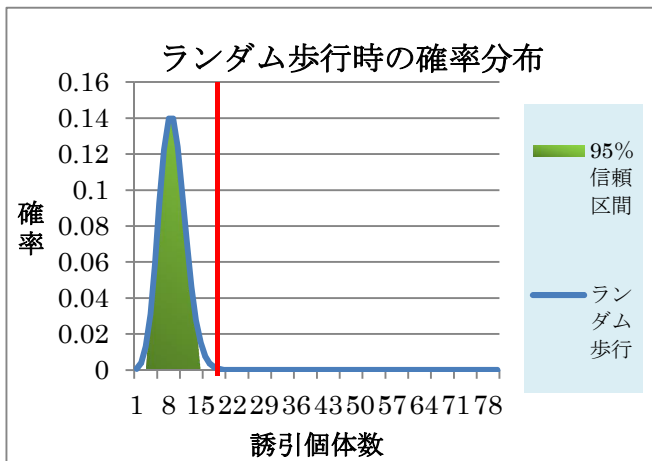


図 3. ランダム歩行時の確率分布

<考察>

基本的にコオロギは未知の音声に対して警戒し近づかないと思われるが、それに反して、ランダムに歩行しているという仮定での値よりも顕著に誘引行動を示した (範囲内に到達した)。

3. 方法

3.1. 実験材料・使用機器

2.1 の物品に加え、飽和食塩水 (約 20%)、マイクロピペット、ビーカー、シャーレを用いた。

3.2. 実験環境

日時: 2018 年 12 月 24 日 10 時 55 分～15 時 24 分

2018 年 12 月 25 日 9 時 49 分～14 時 22 分

場所: 神戸高校科学棟 2 階 生物講義室

室温: 20 °C

照度: 赤色ライト消灯時 0.2 lx

赤色ライト点灯時 7.7 lx

生物講義室は遮光し、雑音を可能な限り排除した。フタホシコオロギの活動気温は一般に 25°C～30°C と言われているが、暖房の限界であった 20°C でも充分活発に活動した。

3.3. 学習

ここでの学習は、食塩水を用い、メスが誘引歌を忌避するよう恐怖条件づけを行うことである。イヌはベルを鳴らしながら餌を与えると、ベルの音を聴くだけで唾液を分泌するようになる (パブロフの犬実験)。これと同様に、コオロギが誘引歌を聴くだけで忌避行動を起こさせるよう、「訓練する」のである。コオロギが食塩水を摂取したと判断するには、

- ① 触角や口器を前肢で拭うような行動を示す
 - ② 触肢を引っ込める行動を示す
- の 2 条件を満たすことが必要である。これらは、食塩水を摂取したときに特異的に起こす反応である。因みに、食塩水が原因で検体が死に至ることはなかった。
- ① フタホシコオロギのメス (成体) を 80 個体用意し、3 日間飢餓状態 (水・餌を与えない状態) にしておく。飢餓状態にする目的は、コオロギが水分の摂取を自発的に行うようにすることである。与えられるのが食塩水であると学習すると積極的に摂取しなくなるが、この場合恐怖条件づけは完了しているので問題ない。
 - ② 80 個体を 5 個体ずつ、16 グループに分割し、1 グループずつ学習・試験の工程を最後まで行う。コオロギは個別にシャーレに入れ、食塩水を摂取していない (恐怖条件づけをしていない) ときに誘引歌を聴くことがないようにする。
 - ③ コオロギ 1 個体をビーカーに入れ、鎮静化するまで待つ。
 - ④ 誘引歌を再生すると同時に、食塩水をマイクロピペットで水滴状にして与える。スピーカーはビーカーの口で固定する。マイクロピペットの先端はコオロギの触肢付近に固定し、強制的に摂取させようとししない (と言うよりも強制的に摂取させることが不可能である)。
 - ⑤ ③～④の操作をグループ内でローテーションし、1 個体当たり 3 回の学習を行う。学習間隔はおよそ 5 分間とする。学習終了後は、1 分以内に試験を行う。

3.4. 試験

私たちは、実験データの評価方法を 2.3 誘引割合の測定との比較とした。そのため、試験と誘引割合の測定で学習の有無以外の条件を極力揃えた。実験者も同一人物にしたが、飢餓状態期間に 1 日間の差があるのはご容赦願いたい。

- ① 誘引割合の測定と同様の方法を用い、誘引行動を示したコオロギの個体数を記録する。

4. 結果

表 2. 試験の結果 (個体数)

誘引	非誘引
7	69

計 76 個体となっているのは、4 個体が実験中に逃走したためである。

5. 考察

5.1. 検定

考察には、フィッシャーの正確確率法 (*Fisher's exact probability test*) と独自の検定法 (α の検定) の二種類を用いた。フィッシャーの正確確率法は帰無仮説の下での期待度数が小さい場合に用いられ、 χ^2 独立性検定にイエーツの連続性補正 (*Yate's continuity correction*) を施すよりも正確な手法である。原理は割愛する。その結果は有意確率 $P=0.01801$ であったので、95%信頼区間で帰無仮説は棄却できた。

しかし私たちは、個体数の観点だけでなく、「真の誘引割合 α 」の観点から独自の検定を行おうと考えた。また、 α を変数とした確率分布から α を推定することができる考えた。検定と呼ぶには稚拙なものであるだろうが、ご了承願いたい。

この原理を説明する。まず、個体数が十分に大きくなると誘引割合が α に収束するとし、それを真の誘引割合 α とする。この α の値が成り立つ確率は、

$$\alpha^{19} (1-\alpha)^{61} \times \frac{80 \times 79 \times \dots \times 62}{19!}$$

(誘引割合の測定 80 個体中 19 個体誘引のとき)

$$\alpha^7 (1-\alpha)^{69} \times \frac{76 \times 75 \times \dots \times 70}{7!}$$

(試験 76 個体中 7 個体誘引のとき)

横軸を α 軸とし、この 2 つの確率分布のグラフを書く。次に、グラフと α 軸に挟まれた面積を求め、全体の 95% の面積を信頼区間とする。ここでやっていることは、19 個体ないし 7 個体が誘引される真の誘引割合 α の範囲 (95% の確率で α が含まれる範囲) を調べる、ということである。そして、2 つのグラフに α の 95% 信頼区間を表示した (図 4)。

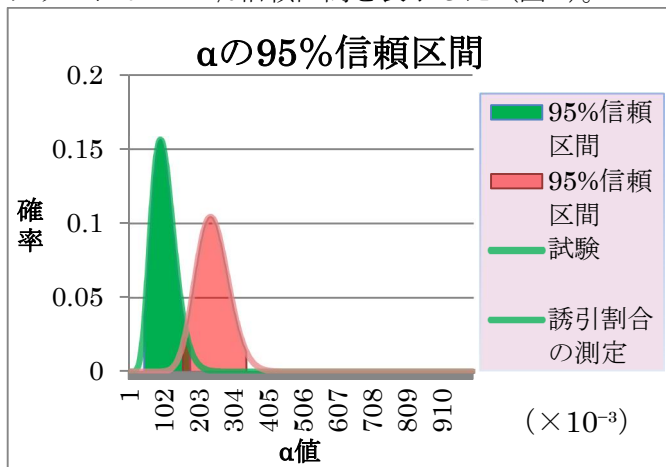


図 4. α の 95% 信頼区間

誘引割合の測定では誘引行動が起こっているが、試験では誘引行動が起こっていないと期待される。

しかし、この α の検定方法では 95% 信頼区間が重なりを持つので、誘引割合の測定と試験が共通の誘引割合 α を持つと断定することには不確実性が伴う。つまり、「誘引割合の測定」で得られたサンプルと「試験」で得られたサンプルが同一母集団のサンプルでないとは言い切れない。言い換えると、学習の効果があつたとは断定できない結果となった。

但し、90% 信頼区間の場合とフィッシャーの正確確率法では明確に有意差が認められるため、共通の誘引割合 α を持つことは僅かな確率でのみ起こると判断できる。真の誘引割合 α は、誘引割合の測定で $0.1575 < \alpha < 0.3415$ 、試験で $0.0455 < \alpha < 0.1785$ と推定できる。

5.2. 理論

ここまでの議論で、

- ・誘引割合の測定 (学習前) では誘引歌に誘引された。
- ・誘引割合の測定 (学習前) と試験 (学習後) では異なる結果が得られた。

ということが明らかになった。この 2 つの知見を総合すると、「誘引歌に対し誘引行動を示す本来の状態から、学習という操作によって、何らかの異なる状態にすることができた」という考察になる。

よって、音波走性という生得的行動を変換することは可能である。

6. 結論

一連の実験の結果、恐怖条件づけ後のコオロギは条件づけ前に比べ、有意に誘引行動を示さなくなった。このことから、学習によって生得的行動である音波走性が変換されたと結論づけられる。研究期間の都合で、この学習記憶の忘却の様子を調べることはできなかった。

実験系の課題点としては、やはり実験回数が 1 回であった点が一番に挙げられる。サンプル数を 80 個体と、飼育・実験を行える最大限の数字に設定したものの、研究期間中に 80 個体を複数回幼生から飼育することはできなかった。

今回、音波走性という生得的行動が学習によって変化することを確認した。これは非常に独創的な観点であり、従来の「生得的行動 = 不変」という概念に疑問符を投げかけることとなった。

私たちの研究を発展させていくと、どのような生得的行動が学習の効果を受けず、またどのような生得的行動が学習によって変化しやすいのか、ということが明らかになるかもしれない。さらに、生得的行動を変換した際の忘却曲線と通常の学習の忘却曲線を比較してみても面白いだろう。生物の行動や学習は分子レベルで研究が進んでいる分野なので、将来その角度からも曖昧になっている部分を掘り下げていきたい。

7. 引用文献

鈴木孝仁ほか、三訂版生物図録、数研出版、2016