

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16571

研究課題名(和文) 幼少期における学習の臨界期終了を制御する新規遺伝子の発見

研究課題名(英文) Researching of genes controlling the critical period of the learning in early child.

研究代表者

中森 智啓 (Nakamori, Tomoharu)

北里大学・一般教育部・助教

研究者番号：50725348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ニワトリ雛の刷込み行動を学習モデルとして用い、幼若期の学習における高い神経可塑性のメカニズム解明を目指して行われた。網羅的な遺伝子発現解析から、特定の利尿ペプチドファミリーが刷込み学習に重要な脳領域において刷込みの成立ができる時期(臨界期)に高発現しており、学習に伴って発現量が変化することが分かった。ペプチドの脳への注入によって、刷込み学習の効率の上昇や、臨界期の延長が観察された。また、特定されたペプチドをその受容体の結合能解析を、鳥類において初めて行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the visual imprinting behavior of chicks as a learning model and aimed at elucidating the mechanism of high neural plasticity in juvenile learning. With comprehensive gene expression analysis, we identified some peptides included a diuretic peptide family were highly expressed in the brain region, which was important for imprinting learning, at the time when imprinting can be established (critical period). And the expression level of these genes were changed after imprinting learning. Moreover, Improvement in efficiency of imprinting learning and prolongation of the critical period were observed by injection of the peptide into the brain. Analysis of the binding ability of the peptides of chicks was performed.

研究分野：神経科学・生理学

キーワード：幼若期学習 刷込み行動 神経可塑性 臨界期

1. 研究開始当初の背景

(1) 鳥類の「刷込み行動」は、学習可能な時期(臨界期)が限られており(ヒヨコでは孵化後1~4日目)短時間の刺激により学習が成立する点等から、幼若期の動物の脳神経系に起こる可塑的变化の制御メカニズムを調べる上で重要な学習モデルである(Horn, Nature review Neuroscience., 2004)。申請者は、鳥類の視覚的刷込みの際に活動する終脳内神経回路の全貌を初めて明らかにした(Nakamori et al., JNS., 2010)。この回路において、NR2Bを持つNMDA受容体は臨界期終了後に比べ臨界期中で高い発現が見られ、その活動が刷込み学習時における長期増強現象の誘導に必須であった(Nakamori et al., Journal of Neurochemistry (JNC), accepted)。また申請者は、神経ペプチドのコレシストキニン(Maekawa, Nakamori et al., JNC, 2007)や、神経栄養因子のBDNF(Suzuki, Nakamori et al., JNC, 2012)が刷込み行動の成立に重要な働きを持つことを明らかにしている。しかしながら、臨界期の制御メカニズムの全容を解明するためには、臨界期制御に関わる遺伝子の網羅的な探索が必要不可欠であった。

(2) 臨界期制御に関わる遺伝子は、臨界期中に発現が高く終了後では発現が低い遺伝子群と、臨界期中は発現が低く終了の時期に発現が増加する遺伝子群に分けることができ、前者は神経可塑性の上昇に関与し、後者は神経可塑性を低下させ臨界期を終了させる役割を持つと見なせた。刷込み行動は、学習が成立すると強い記憶の固定が起こり、新たな対象による刷込み学習の上書きは難しいことが知られていた。このことは、刷込みにより神経細胞の可塑性が低下する、つまり臨界期の終了が早まる変化を誘導する可能性を示しており、発育依存的に発現を変化させる遺伝子の中で、刷込みにより発現量の変化が起こる遺伝子が、臨界期を制御している遺伝子の有力候補であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点であった。

- (1) 網羅的な遺伝子解析から、臨界期の終了を制御している新規遺伝子の特定を行う。
- (2) 特定した遺伝子の機能解析から、臨界期制御のメカニズムを目指す。

3. 研究の方法

以下の方法で本研究を行った。

- (1) DNAマイクロアレイの解析から、刷込み行動の臨界期終了に伴い脳内で発現量が増加している遺伝子をピックアップした。また、刷込み学習を行った個体と行っていない個体を比較して、刷込み学習によって遺伝子の発現量が増加する遺伝子を探索した。
- (2) ピックアップした遺伝子のニワトリ雛の脳における発現領域を解剖学的に詳

細に解析した。また、リアルタイムPCRを行い、遺伝子発現量の発育に伴う変化や、学習に伴う変化について解析を行った。この過程で、刷込み行動の臨界期制御に深く関与している可能性が高い遺伝子の候補を数種類に絞りこんだ。

- (3) 絞り込んだ遺伝子(特定の利尿ペプチドをコードしている)のサブタイプや関連遺伝子(ペプチドの受容体をコードしている)の発現分布や発現量変化の解析を詳細に行った。
- (4) 絞り込んだ遺伝子が刷込み学習の成立や記憶の維持に関与しているのかを調べるために、刷込み学習を行ったからの時間経過によるHDCoにおける発現量の変化を調べた。
- (5) 培養細胞に受容体をそれぞれ単独で発現させ、それぞれのペプチドとの結合能を調べた。
- (6) 合成したペプチドを脳内へ注入し、刷込み行動の効率や、刷込み学習の臨界期への影響を調べた。

幼若期における発育段階に雌雄差がある可能性が考えられたため、上記の全ての研究は雌雄別に行われた。

4. 研究成果

(1) DNAマイクロアレイを行い、刷込み行動の臨界期中と臨界期終了以降で、遺伝子発現量を比較した。また刷込み学習を行った個体と、行っていない個体を比較し、刷込み学習によって発現量が増加する遺伝子を探索した。2種類のマイクロアレイデータをもとに、発育に伴い発現量が増加し、かつ、刷込み学習によって発現量が増加する遺伝子を約100種類選別した。これらの遺伝子の中に、臨界期を直接的に制御している遺伝子の候補が含まれると考えられた。

(2) 選別した遺伝子のニワトリ雛の脳における発現局在を調べるために、in situ hybridization法によって網羅的に発現部位の解析を行った。その結果、約20種類の遺伝子が終脳において発現が観察され、さらに約10種の遺伝子は、HDCo(the core region of the hyperpallium densocellulare)と呼ばれる、哺乳類の皮質視覚野に相当し、刷込み学習に重要であることが知られている領域において高い発現が見られた。これらの遺伝子について、HDCo領域から抽出したtotal RNAをもとに合成したcDNAを用いて、リアルタイムPCR法によって発現量の定量的解析を行った結果、数種類の遺伝子は発育に伴い発現量が大きく変動しており、これらの遺伝子が制御に関わる可能性が示唆された。

(3) 臨界期の制御に直接的に関与していることが示唆された遺伝子の中から、特定の利尿ペプチドファミリー6種類(X1~6)とその受容体3種類(Y1~3)に注目し、詳細な発現解析・機能解析を行った。このペプチドフ

ファミリーに属する一部のペプチド(X4およびX6)や受容体(Y3)はHDCo領域に強い発現が見られた。

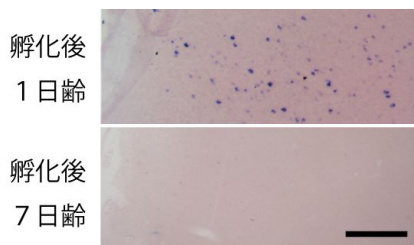


図1、ペプチド X4 の HDCo 領域における発現

また、ペプチド X3 および X5 と受容体 Y1 および Y2 は終脳に広く発現していた。ペプチド X1 および X2 は HDCo 領域には発現が確認できなかった。発現量解析を行った結果、ペプチド X3 および X6 は刷込みの臨界期中よりも臨界期終了後における発現量が高く、ペプチド X4 は臨界期中における発現量が高いことが分かった。

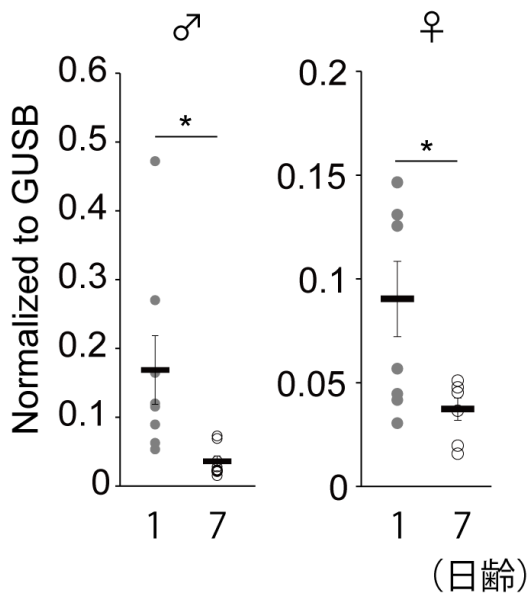


図2、ペプチド X4 の発育に伴う発現量変化

(4) HDCo 領域に発現していたペプチド X3～X6 のいずれが刷込み学習の成立や記憶の維持に関与しているのかを調べるために、刷込み学習を行ってからの時間経過による HDCo における発現量の変化を調べた。その結果、ペプチド X4 および X6 は刷込み学習の3～6時間後において、遺伝子発現が上昇することが分かった。このことから、ペプチド X4 および X6 が、刷込み成立やその臨界期の調節機構に重要な働きを持っていることが考えられた。

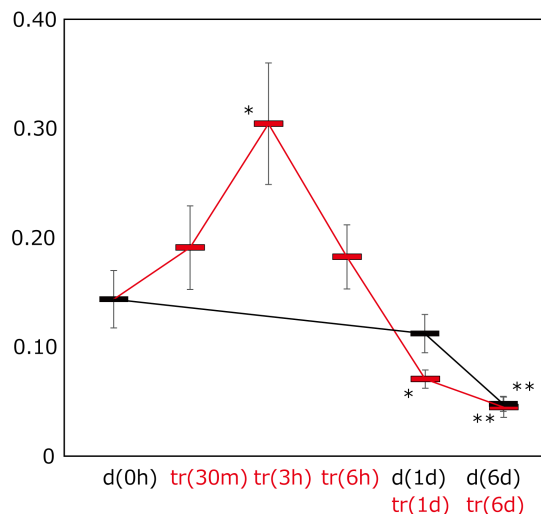


図3、ペプチド X4 の刷込み学習に伴う発現量変化

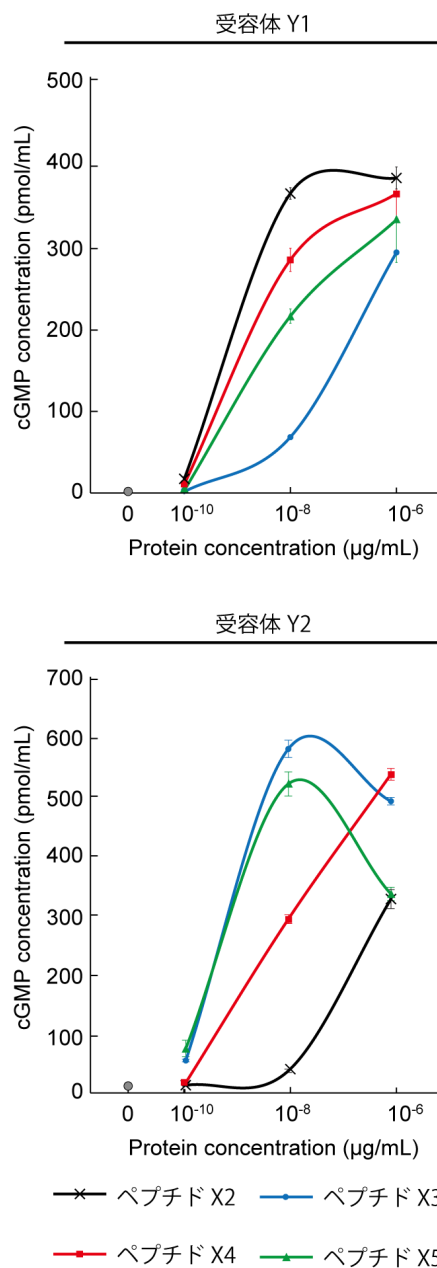


図4、ペプチドと受容体の結合能

(5)特定されたペプチドの鳥類における受容体との結合能についての詳細はこれまで知られていなかった。そこで、培養細胞(HEK293)にそれぞれの受容体を単独で発現させ、それぞれのペプチドとの結合能を調べた。その結果、受容体 Y1 にはペプチド X4 が、受容体 Y2 には X3 が最も結合能を持つことが分かった。また、受容体 Y3 にはペプチド X6 が結合すると考えられた。

(6)合成したペプチド X4 を刷込みの臨界期中のニワトリ雛の HDCo 領域に注入し、学習効率の変化を調べた。その結果、刷込み成立までにかかる学習時間が短縮することが分かった。また、刷込み臨界期が終了している孵化7日後の雛の HDCo 領域にペプチド X4 を注入したところ、刷込みの成立が可能になることが分かった。

以上の結果から、利尿ペプチド X4 の発現量が刷込み行動の臨界期の制御を行っていることが考えられ、ペプチド X4 が受容体 Y1 を介して特定の神経細胞に作用することが、刷込みの成立に重要であることが分かった。また、ペプチド X6 が受容体 X3 を介して、刷込み記憶の維持に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1, Nakamori T, Kato T, Sakagami H, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H.
Regulation of visual Wulst cell responsiveness by imprinting causes stimulus-specific activation of rostral cells.
Scientific Reports (査読あり)
2017 Feb 23;7:42927
doi: 10.1038/srep42927.

[学会発表](計7件)

1, Nakamori T, Sato K, Kinoshita M, Kanamatsu T, Sakagami H, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H.
Positive feedback of NR2B-containing NMDA receptor activity is the initial step toward visual imprinting: a model for juvenile learning.
International Society for Neurochemistry Meeting (招待講演, 2017)
2, Ohki-Hamazaki H, Chiba Y, Nakamori T.
Characterization of Natriuretic Peptides and their Receptors in the Avian Brain.
International Society for Neurochemistry Meeting (2017)
3, Nakamori T, Tashiro E, Kato T, Sakagami H, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H.

Parvalbumin cells are activated by juvenile learning and contribute to the longterm modification of neural pathway.
日本神経科学大会(2016)

4, 中森智啓、大久保つぐみ、平井霞、牧田愛美、浜崎浩子

刷込み行動の学習効率を上昇させるペプチドについて

鳥類内分泌研究会(2016)

5, 加藤智美、中森智啓、千葉ゆりの、前川文彦、浜崎浩子

ニワトリのヒナでみられる雌雄差について

日仏生物学会例会(2016)

6, Nakamori T, Tashiro E, Kato T, Sakagami H, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H.

Modification of neurotransmission pathway by activation of parvalbumin cells essential for the establishment process of juvenile learning.

日本神経科学大会(2015)

7, Nakamori T, Kato T, Sakagami H, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H.

Visual imprinting localizes the area of neurons responding to visual stimulation. Analysis of intracellular expression of Arc/arg3.1.

日仏生物学会例会(2015)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
北里大学 一般教育部生物・大学院医療系研究科 浜崎浩子研究グループ
<http://www.clas.kitasato-u.ac.jp/bio/personal/hamazaki/index16a.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中森 智啓 (Nakamori, Tomoharu)

北里大学・一般教育部・助教

研究者番号：50725348

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()