

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19386

研究課題名(和文) 刷り込み記憶の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis for the imprinted memory

研究代表者

西住 裕文(Nishizumi, Hirofumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：30292832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：高等生物は、新生仔期の外環境からの感覚刺激によって脳神経を可塑的に変化させ、嗜好性・社会性・環境適応性などを獲得する。本研究ではマウス嗅覚系において、生後一週間という臨界期のSema7AとPlxnC1の相互作用が、嗅細胞軸索と僧帽細胞樹状突起間のシナプス形成を促進し、匂い刷り込みを成立させていることを明らかにした。また、特定の匂いを嗅がせて刷り込み記憶させると、扁桃体内側前部が活性化されるようになり、例えその匂いが本能的には忌避性であっても、刷り込み後は誘引性に変化することを見出した。更に、刷り込み記憶の誘引的価値付けに、新生仔期に高発現するオキシトシンが重要であることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚系の刷り込み現象を明らかにした本研究の成果は、百年以上前から広く知られているが未解明であった刷り込み現象、例えばアヒルのヒナが孵化後に初めて見た動く物体を親と記憶して生涯追従する行動や、サケ・マスが産卵のために生まれた支流に戻って来る母川回帰行動などにも敷衍でき、刷り込み現象を分子・神経回路レベルで理解する突破口となった。将来的には、臨界期における適切な感覚刺激や体験の欠如が、ヒトの精神発達障害、特に愛着障害や自閉症を引き起こす原因の理解へと繋がり、予防法や新たな治療法の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Sema7A/PlxnC1 signaling is key to inducing post-synaptic events within glomeruli in the mouse olfactory system. Odor exposure in neonates increases Sema7A expression in the responding glomeruli to promote primary-dendrite selection of mitral/tufted cells. This enhancement establishes imprinted odor memory that increases the sensitivity to the conditioned odorant and reduces stress reactions as adults. Imprinting does not occur when conditioning is performed after the critical period or in the absence of Sema7A/PlxnC1 signaling. We found that the imprinted odor activates the anterior medial-amygdala that mediates attractive social responses. Blockage of Sema7A/PlxnC1 signaling in neonates causes impairment of odor-mediated social behaviors, leading to abnormal avoidance of unfamiliar mice. Knockout and rescue experiments indicate that oxytocin in neonates is needed for imposing the positive quality on imprinted odor memory and for smooth social interactions as adults.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅覚 遺伝子改変マウス 臨界期 刷り込み 記憶 シナプス形成 神経回路 神経科学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臨界期(critical period)は敏感期や感受性期とも言われ、元来は植物発生上の用語として使われ始めた。発芽後、ある一定期間の日光照射は植物の成長に大きな効果があるが、その期間を外すと効果が激減する等の現象を指していた。しかし現在は拡張解釈されて、人間や動物の行動発生の過程において、潜在している機能が具現化・変容・抑制される上で、環境要因の作用、特に、ある特定刺激の提示に高い感受性を示す、限られた発生期間をも指すようになってきている。19世紀後半から20世紀前半にかけて、Spalding 博士、Heinroth 博士、Lorenz 博士らによって示された、ガンやカモ等の大型離巢性鳥類が、孵化した直後に初めて出会った動く物体を親と記憶し、追従するようになる刷り込み(imprinting)は非常に有名な例である。ヒトでも、幼児期までが人格教育や認知的学習の臨界期であるとか、言語獲得の臨界期は12~13歳までに限られるとする研究報告がなされている。しかしこれらの研究では、どのような分子基盤に則って臨界期が定められているのかについて、ほとんど未解明であった。

### 2. 研究の目的

我々は長年、マウス嗅覚系の研究に携わって来た。その過程で、新生仔期に鼻腔を塞ぎ嗅覚入力を遮断すると、一週間後に鼻腔の閉塞を解除してやっても、成体になった後の社会的誘引行動に異常が現れ、他個体を避ける自閉症様の症状を呈する事を見出した。この結果は、生後一週間がマウス嗅覚系にとって重要な臨界期であることを示唆している。一方、この臨界期に任意の匂いを提示したところ、この個体は成体になった後も、出生直後に嗅いだ匂いに対しより鋭敏になるだけでなく、興味・愛着行動を示すことが明らかとなった。これらの結果は、昔から知られているマス科の魚の母川回帰や雛鳥の刷り込み行動等とも関連していると考えられる。そこで本研究では、生後一週間という臨界期に脳内で何が起きているのか、嗅覚神経回路形成を中心にその分子基盤を明らかにする事を目指した。

### 3. 研究の方法

我々の予備実験に基づき本研究では、生後一週間という臨界期における外界からの匂い刺激の有無が、マウスの嗅覚神経回路形成にどのような可塑的变化を及ぼすか、更には、その後のマウスの情動や行動にどのような影響を及ぼすかについて解析を行った。具体的には、以下の通りである。

#### (1) 臨界期における嗅覚神経回路形成の分子基盤の解明

臨界期における匂い刺激の有無は、嗅球の糸球体内で生じる嗅神経細胞の軸索と僧帽/房飾細胞の樹状突起間のシナプス形成に多大な影響を与えていると予想された。そこで臨界期を中心に、匂い刺激の有無によって、このシナプス形成が受ける影響を組織解剖学的手法によって解析すると共に、嗅覚刺激に依存したシナプス形成の分子メカニズムの解明を目指した。

#### (2) 臨界期の嗅覚刺激の有無により影響を受けるマウスの情動や行動の解析

臨界期に受容する匂い刺激の有無が、マウスの情動や行動にどのような影響を及ぼすかを、preference test、3-chamber test などの行動実験を行い、詳細に解析した。また、臨界期に刷り込んだ匂い刺激によって、脳内のどの領域が特異的に活性化あるいは不活性化されるようになるかを、活性化初期発現誘導因子である Egr1 の発現を指標に詳細に調べた。更には、臨界期に刷り込んだ匂いに対して成体マウスが誘引・愛着行動を示すようになる要因として、どのような報酬系脳内ホルモンが関与しているかについても同定を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) シナプス形成不全の検証

生後一週間という臨界期に、マウス鼻腔閉塞により嗅覚入力を遮断した場合、嗅細胞軸索と僧帽細胞樹状突起間のシナプス形成がどのような影響を受けるかを調べた。具体的には、特定の糸球体に着目し、嗅細胞軸索と僧帽細胞樹状突起間のシナプス形成の度合いを、嗅球切片上でシナプスマーカー分子に対する免疫染色を行うことにより解析した。その結果、臨界期に嗅覚入力を遮断すると、このシナプス形成はずっと未熟なまま留まることを見出した。

#### (2) シナプス形成に関与する分子の解析

シナプス形成に関与する分子の同定と解析を行った。神経活動依存的に嗅細胞の軸索末端で発現しシナプス形成に関わる分子を探索し、Sema7A を同定した。また、Sema7A のリガンド PlxnC1 が、僧帽細胞の樹状突起に生後一週間限定で発現することも見出した。さらに Sema7A 及び PlxnC1 欠損マウスをそれぞれ解析した結果、Sema7A-PlxnC1 シグナルが嗅細胞と僧帽細胞間のシナプス形成促進に必須であることが明らかになった(図1)。

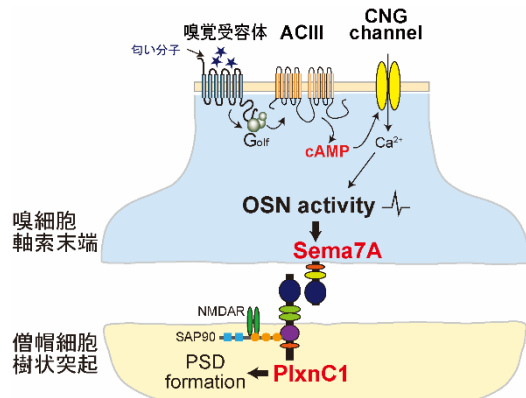


図1 外界入力によって神経活動依存的に誘導される Sema7A シグナル。このシグナルによって糸球体内でのシナプス形成と僧帽細胞の主樹状突起の選別が促進される。

(3) 臨界期における特定の匂い刺激がシナプス形成に及ぼす影響

鼻腔閉塞という loss-of-function 実験とは逆に、gain-of-function 実験として、臨界期に特定の匂いを嗅がせ、Sema7A シグナルによるシナプス形成を積極的に促進した場合、何が起こるかについて解析を行った。嗅覚受容体 MOR29A のリガンドの一つ vanillin を臨界期の新生仔マウスに嗅がせると、MOR29A を発現する嗅細胞特異的に Sema7A の発現量が上昇し、MOR29A の糸球体形成時期が通常よりも数日早まり、糸球体のサイズが約 1.5 倍大きくなることが判明した。しかし、生後一週間を過ぎた臨界期後に vanillin を嗅がせても、このようなことは起こらなかった。

(4) 臨界期における特定の匂い刺激がマウスの情動行動に及ぼす影響

臨界期の新生仔マウスに特定の匂いを嗅がせておくと、成長後の成体マウスは、刷り込まれた匂いに対して検出感度が千倍程度上昇していた。また驚いたことに、例え嗅がせた匂いの質感が 4 メチルチアゾール(4MT) のように先天的に忌避性のものであっても、臨界期に嗅がせて刷り込むことで、成体マウスはその匂いに対して誘引性の行動を示すようになることを見出した(図 2)。また、マウスは新規環境に置くとストレスを感じて体温が一過的に上昇するが、刷り込まれた匂いを提示することで、新規環境によるストレスが緩和され、上昇した体温も速やかに平熱まで戻ることが明らかとなった。

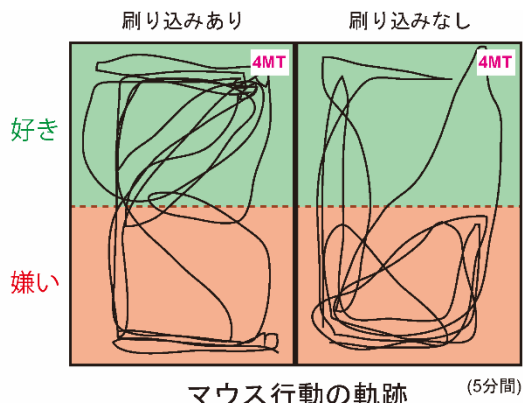


図2 匂いに対する好き嫌いテスト  
ケージの隅に忌避臭(4MT)を染み込ませた濾紙を置いて、マウスの動きをトレースした。マウスは通常 4MT を避けて近寄らないが(右)、新生仔期に 4MT の刷り込み記憶を持つマウスは、4MT の匂いを好ましいと感じそれに近づく時間が長くなる(左)。

(5) 匂い刷り込みによって活性化されるようになる脳領野の特定

新生仔期に忌避性の匂い 4MT を刷り込んだマウスに対し、成長後再び 4MT を嗅がせ、神経活動依存的に発現が上昇する Egr1 を指標に免疫染色を行い、扁桃体を含む嗅皮質の活性化解析を行った。その結果、4MT を嗅がせたマウスでは、先天的忌避回路により CoA 後半部は活性化されるものの、その忌避出力であるストレスホルモン ACTH の血中濃度は上昇せず、その誘導に関わる AmPir の活性化も抑制される事が判明した。更に 4MT の刷り込み記憶により、誘引的社会行動を誘発する MeA 前方部の活性化が見られる事も示された。

(6) 匂い刷り込み記憶に誘引的質感を付与する仕組み

臨界期に刷り込んだ匂いに対して成体マウスが誘引・愛着行動を示すようになる要因として、どのような報酬系脳内ホルモンが関与しているかについても同定を試みた。ドーパミンやアドレナリンなどの可能性も考えられたが、我々は俗に「幸せホルモン」と呼ばれるオキシトシンの濃度が授乳中の新生仔で高いことに着目し、オキシトシンが刷り込み記憶の誘引的価値付けに関与して可能性を解析した。オキシトシンのノックアウト(KO)マウスを用いて匂い刷り込みの影響を調べたところ、KO マウスでも 4MT に対する検出感度の強化は生じるものの、誘引的質感の付与が行われず、刷り込み記憶による aMeA の活性化や、ストレス反応の抑制などは見られなかった。従って、新生仔のオキシトシンが、匂い刷り込み記憶に誘引的質感を付与するのに重要な因子であることが明らかとなった(図 3)。

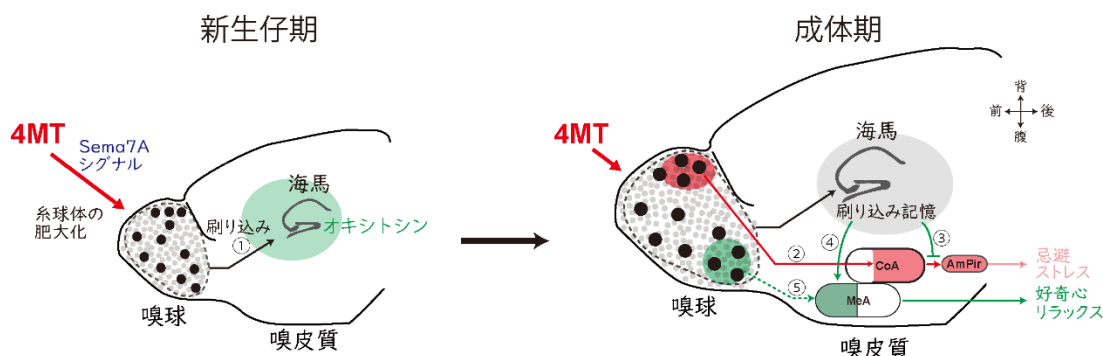


図3 匂い刷り込みの概略図

新生仔期に特定の匂いを嗅がせると、活性化した糸球体が Sema7A シグナルによって肥大化し、刷り込みが行われる(①)。例えその匂いが生来忌避性のものであっても、刷り込まれることによって、成体となった後に嗅ぐと興味を持ち、リラックス効果が生まれるようになる。このように、刷り込み記憶に誘引的質感を付加するのに、オキシトシンが必要である。忌避性の匂い分子(4MT)の情報は、嗅球背側後方の糸球体を介して CoA の中央・後方へと送られ、忌避・ストレス行動を誘起する(②)。しかし、新生仔期に 4MT を嗅がせておくと、刷り込み記憶によって CoA を経由する負のシグナルはブロックされ(③)、ストレスホルモン(ACTH)の分泌も抑制される。同時に刷り込み記憶は、社会的誘引行動を誘発する MeA 前方へ情報を送り、好奇心やリラックス効果を生む(④)。新生仔期に 4MT を嗅がせることによって、4MT に反応する嗅球腹側後方の糸球体が肥大化し、ここに接続した僧帽細胞が MeA へ投射するように神経回路再編を行っている可能性(⑤)については、今後の検証が必要である。

一世紀以上も昔から、発育期の様々な環境入力「神経回路形成」や「成長後の生体の情動や行動」に影響を及ぼすこと、更に、異常な環境入力により神経発達障害が生じることが断片的に報告されて来た。しかしながら、その全容を説明する仕組みは未解明のままであった。本研究では、マウスの主要な感覚である嗅覚系をモデルとして、臨界期における感覚情報入力の影響を、分子・神経回路レベルで理解することを目指し、一定の成果が得られた。臨界期における刷り込み記憶の基本原理は、嗅覚以外の感覚系でも共通する部分が多いと予想されるので、本研究から得られた成果は、今後様々な感覚分野の臨界期に関する研究の進展に寄与すると考えられる。また、近年は精神発達障害と診断される児童数が急増しているが、本研究の成果はヒトに関しても、臨界期における適切な刺激や体験の欠如が、語学習得や社会性獲得の障害となる原因を、分子・神経回路レベルで理解し、新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 H. Nishizumi, H. Sakano	4. 巻 11
2. 論文標題 Agonist-independent GPCR activity and receptor-instructed axonal projection in the mouse olfactory system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Future Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3091-3096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4155/fmc-2019-0178	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 H. Nishizumi, A. Miyashita, N. Inoue, K. Inokuchi, M. Aoki, H. Sakano	4. 巻 2
2. 論文標題 Primary dendrites of mitral cells synapse unto neighboring glomeruli independent of their odorant receptor identity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-018-0252-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 N. Inoue, H. Nishizumi, H. Naritsuka, H. Kiyonari, H. Sakano	4. 巻 9
2. 論文標題 Sema7A/PlxnCl signaling triggers activity-dependent olfactory synapse formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-04239-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 H. Saito, H. Nishizumi, S. Suzuki, H. Matsumoto, N. Ieki, T. Abe, H. Kiyonari, M. Morita, H. Yokota, N. Hirayama, T. Yamazaki, T. Kikusui, K. Mori, H. Sakano	4. 巻 8
2. 論文標題 Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 16011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ncomms16011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 K. Inokuchi, F. Imamura, H. Takeuchi, R. Kim, H. Okuno, H. Nishizumi, H. Bito, T. Kikusui, H. Sakano	4. 巻 8
2. 論文標題 Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odour-induced attractive social responses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 15977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms15977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 西住 裕文、井ノ口 霞、井上 展子、坂野 仁
2. 発表標題 マウス嗅覚系の神経回路形成と意思決定
3. 学会等名 第53回日本味と匂学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Nishizumi, K. Inokuchi, F. Imamura, N. Inoue, H. Sakano
2. 発表標題 Circuit formation and decision making in the mouse olfactory system
3. 学会等名 "Circuits Development & Axon Regeneration" -3rd AXON Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Nishizumi, N. Inoue, K. Inokuchi, H. Sakano
2. 発表標題 Circuit formation and decision making in the mouse olfactory system
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回 日本神経科学大会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 H. Nishizumi, K. Inokuchi, F. Imamura, N. Inoue, H. Sakano
2 . 発表標題 Circuit formation and decision making in the mouse olfactory system
3 . 学会等名 EMBO Workshop; Neural guidance molecules in development and disease ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 H. Nishizumi, K. Inokuchi, N. Inoue, H. Saito, H. Sakano
2 . 発表標題 Circuit formation and decision making in the mouse olfactory system
3 . 学会等名 Keystone Symposia: Mammalian Sensory Systems ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 H. Nishizumi, N. Inoue, H. Sakano
2 . 発表標題 Neonatal olfactory memory induces attractive responses even to aversive odorants in adult mice
3 . 学会等名 The 28th Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organization ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 H. Nishizumi, K. Inokuchi, N. Inoue, H. Saito, H. Sakano
2 . 発表標題 Circuit formation and decision making in the mouse olfactory system
3 . 学会等名 Cold Spring Harbor Symposium: Brains & Behavior: Order & Disorder in the Nervous System ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Nishizumi, N. Inoue, K. Inokuchi, H. Sakano
2. 発表標題 Olfactory neural circuit formation in the mouse olfactory system
3. 学会等名 EMBO/EMBL Symposium “Neural Circuits in the Past, Present and Future” (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Nishizumi, N. Inoue, H. Sakano
2. 発表標題 Olfactory imprinting during the critical period in mice
3. 学会等名 The 44th Naito Conference “Decision Making in the Brain - Motivation, Prediction, and Learning” (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 H. Nishizumi, H. Sakano	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 17
3. 書名 The Senses: A Comprehensive Reference 2nd Edition, Editor-in-Chiefs: Bernd Fritzsche	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福井大学研究者総覧  <a href="http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/profile/ja.75dd2bfbfea687f1520e17560c007669.html">http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/profile/ja.75dd2bfbfea687f1520e17560c007669.html</a></p>
---



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----