

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06915

研究課題名(和文) 鳥類刷り込みの臨界期及び記憶形成に関わる神経伝達物質の行動薬理的・生理学的解析

研究課題名(英文) Behavioral pharmacological analyzes of neurotransmitters and hormones involved in the memory formation of filial imprinting

研究代表者

青木 直哉 (Aoki, Naoya)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：50525334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：刷り込みとは、生得的に動くものを追いかける性質を持つヒナが、孵化直後から親を繰り返し追いかけることにより記憶する学習である。刷り込みには、甲状腺ホルモンの働きが重要であることが明らかとなっている。甲状腺ホルモンの脳内濃度は孵化直前に上昇し、さらに刷り込みトレーニングによって上昇する。これまで、甲状腺ホルモンが刷り込みの習得過程にどのように寄与しているかは明らかではなかった。本研究では、まず刷り込みの習得過程を「生得的な追従」、「学習による追従」、「弁別」の3つに分けて解析するための実験装置を開発した。孵化直前の甲状腺ホルモンの上昇が刷り込みの「学習による追従」に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

刷り込みは孵化直後に親に対して愛着を形成する早期学習である。本研究の結果は、発生時の甲状腺ホルモンが孵化直後の愛着形成に必要であることを示唆している。今回用いた抗甲状腺剤であるメチマゾールは、バセドウ病などの甲状腺機能亢進症の治療に用いられている。バセドウ病の妊婦には、より影響が少ない抗甲状腺剤チウラジールが処方されることが多いが、胎児期での甲状腺ホルモンの欠乏の影響はまだ不明な点が多く、本研究の結果は抗甲状腺剤を処方する上で参考になると考える。また、今回行ったニワトリヒナを用いた実験系は甲状腺ホルモンの欠乏が脳発達に与える影響を調べるために有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In filial imprinting, newly-hatched Chicks innately approach a moving object, and memorize it as their parents by repeatedly approaching them. We revealed thyroid hormone in the brain is important for imprinting acquisition. Thyroid hormone levels in the brain rise just before hatching and are further increased by imprinting training. It was not clear how the thyroid hormones contribute to the learning process of the imprinting. In this study, we developed a behavioral apparatus for analyzing the learning process of imprinting by dividing it into three categories "innate approach", "acquired approach", and "discrimination". Then, we examined if the increased thyroid hormone in the just before hatching involved in the learning processes of imprinting. we clarified that the increase of thyroid hormone just before hatching contributes to "acquired approach".

研究分野：神経科学

キーワード：刷り込み アセチルコリン ムスカリン受容体 甲状腺ホルモン

#### 1. 研究開始当初の背景

離巢性の巣を持たないニワトリのヒナは、孵化直後から自由に歩くことができる。それにより、動くものを追いかけて親として記憶する刷り込みが可能となる。我々の研究により、刷り込みには甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) の働きが重要であることが明らかとなっている。脳内の  $T_3$  濃度は胚発生 14 日ごろから上昇し、刷り込みトレーニングによりさらに上昇する。また、大脳 IMM (intermediate medial mesopallium) 領域では刷り込みによって、いくつかの神経伝達物質の分泌量が多くなる。それらの中で代表者らは GABA とアセチルコリンに着目した研究を行ってきた。代表者らの研究により刷り込みには、抑制性神経伝達物質 GABA とその GABA-B 受容体、そしてアセチルコリンとそのムスカリン受容体の働きが重要であることが明らかとなった。GABA については 2 つの受容体 (イオンチャネル型の GABA-A と代謝型の GABA-B) の量的なバランスが臨界期の開閉に重要であることを明らかにした (Aoki *et al*, 2018)。アセチルコリンについては、ムスカリン受容体の阻害薬を IMM 領域に注入すると刷り込みの獲得が阻害されることを発見し、アセチルコリン系の中でもムスカリン受容体が重要な働きをしていることを新たに見出した (Aoki *et al*, 2020)。しかし、ムスカリン受容体のどのサブタイプが刷り込みに寄与するかは明らかではなかった。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、刷り込みの習得過程に寄与する神経伝達物質と脳内機構の発達を明らかにすることである。

そのために、以下の 3 つを明らかにすることを目的とした実験を行った。

- (1) ムスカリン受容体のどのサブタイプが刷り込みに重要であることを明らかにする。
- (2) 新たな刷り込み行動装置を開発し、刷り込みの習得過程を解析できるようにする。
- (3) 発生後期に上昇する甲状腺ホルモンの刷り込みへの寄与を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

- (1) ムスカリン受容体のどのサブタイプが刷り込みに重要であることを明らかにする。  
ムスカリン受容体のサブタイプ特異的な阻害剤を大脳 IMM 領域に局所注入し、刷り込みトレーニング、テストを行った。また、イムノプロットングを用いて IMM 領域での各サブタイプの発現を確認し、in situ hybridization 法により、各サブタイプの脳内での発現分布を調べた。

- (2) 新たな刷り込み行動装置を開発し、刷り込みの習得過程を解析できるようにする。

刷り込みトレーニング中の行動をミリ秒単位で記録解析するために、円盤型の刷り込み装置を作成した。モニターを円盤の前に設置し、モニターに刷り込みオブジェクトを提示した。ニワトリヒナがモニターに近づこうとすると円盤が回転する。円盤が十分の一回転するごとに、信号を PC に送り、記録した。トレーニングスケジュールについても、生得的な動くものへの追従とその追従を繰り返すことによって刷り込み対象への嗜好性を獲得するまでの習得過程を解析できるように新たに開発した。

- (3) 発生後期に上昇する甲状腺ホルモンの刷り込みへの寄与を明らかにする。

胚発生日 18 日目 ~ 20 日目に甲状腺ホルモン合成阻害剤を投与して、孵化直前の甲状腺ホルモンの上昇を抑えた。孵化後 1 日齢で円盤型の刷り込み装置で刷り込みトレーニング・テストを行い、刷り込みのどの習得過程に影響があるかを調べた。

#### 4. 研究成果

- (1) ムスカリン受容体のサブタイプ M2、M3、M5 が刷り込みに重要であることを明らかにした (Aoki *et al*, *Behav. Brain Res.*, 2022, Mori *et al*, *Behav. Brain Res.*, 2022)。

ムスカリン受容体のサブタイプには、興奮性の制御をする M1、M3、M5 と抑制性の制御をする M2 と M4 がある。哺乳類の海馬で多く発現しており記憶形成に関わるとされる M1 は、鳥類ではなく、哺乳類の M1 の機能を M3 と M5 が代替している可能性がある。各サブタイプの阻害剤を両側 IMM 領域に注入し、刷り込み記憶の形成への影響を調べたところ、神経細胞を興奮性に調節する M3 及び M5 の阻害剤については、共に刷り込みの記憶形成を阻害した (図 1)。一方、神経細胞を抑制性に調節する M2 及び M4 の阻害剤については、M2 阻害剤は刷り込みを阻害したが、M4 阻害剤では影響がなかった。また、それらのムスカリン受容体サ

ブタイプの IMM 領域での発現を、イムノブロットングを用いて確認した。これらの結果から、刷り込みの記憶形成に必要な IMM 領域のアセチルコリンが関わる興奮性の調節は、M3 と M5 が共に行っていることが示唆された。また、IMM 領域での記憶形成に必要な抑制性の調節は、M2 が行っていることが示唆された。興奮性の M3、M5 と抑制性の M2 によって、刷り込みの記憶形成に必要なアセチルコリン系のバランスが保たれていると考えられる。

in situ hybridization 法により、mAChR サブタイプの発現分布を調べた。その結果、IMM 領域以外の刻印付けに関わる領域である intermediate hyperpallium apicale (IMHA)、nidopallium dorsocaudal (Ndc)、arcopallium において、全てのサブタイプの発現が確認された。IMHA は視覚野、Ndc は前頭前野、arcopallium は運動野に相当すると考えられている。mAChR が刻印付け記憶の形成だけでなく、刻印付けに関わる視覚、認知、運動にも寄与していることが示唆された。

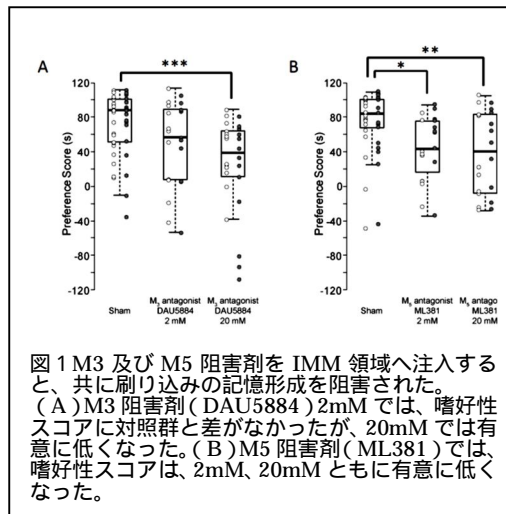


図1 M3 及び M5 阻害剤を IMM 領域へ注入すると、共に刷り込みの記憶形成を阻害された。(A) M3 阻害剤 (DAU5884) 2mM では、嗜好性スコアに対照群と差がなかったが、20mM では有意に低くなった。(B) M5 阻害剤 (ML381) では、嗜好性スコアは、2mM、20mM とともに有意に低くなった。

(2) 新たな刷り込み行動装置を開発し、刷り込みの習得過程を解析できるようになった。(Aoki et al, Front Physiol., 2022)

ミリ秒単位で行動データを記録する円盤型の刷り込み装置を作成した。行動データを解析した結果、トレーニング及び、テスト時の習得過程を「生得的追従」、「学習によって獲得した追従」、「弁別」の3つに分けて、定量的に評価することに成功した(図2)。次にこの装置を用いて、臨界期の1日齢のヒナの刷り込みトレーニング時の行動と臨界期終了後の4日齢のヒナの行動を比較した。4日齢のヒナでは、「生得的追従」が1日齢に比べて有意に少なく、その後の「学習によって獲得した追従」も有意に少なかった。この結果から、臨界期を終了すると習得過程の初期の「生得的追従」が弱くなるために、刷り込みができなくなることが示唆された。

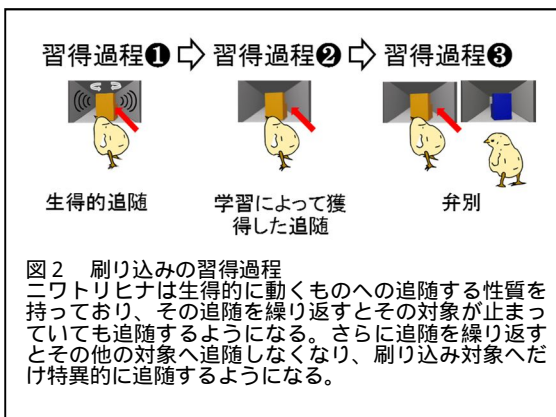


図2 刷り込みの習得過程ニトリヒナは生得的に動くものへの追従する性質を持っており、その追従を繰り返すとその対象が止まっても追従するようになる。さらに追従を繰り返すとその他の対象へ追従しなくなり、刷り込み対象へだけ特異的に追従するようになる。

(3) 発生後期に上昇する甲状腺ホルモンの刷り込みへの寄与を明らかにした。(Serizawa, Aoki et al, Front Physiol., 2023)

孵化直前の一時的な T4 の上昇を抑えるために、胚 18 日目から 20 日目まで一日一回、卵内(気室内)にメチマゾール(MMI; 甲状腺ホルモン合成阻害剤)を投与した。ELISA 法によって T4 濃度を測定したところ、胚 20 日目の MMI 群では、対照群 (Vehicle として PBS を投与) よりも有意に低かった(図3)。つまり、孵化前の一時的な T4 濃度の上昇を抑えたことが確かめられた。一方、孵化後の1日齢では、血中 T4 濃度は MMI 群と対照群では差がなかった。両群孵化1日齢で、刷り込みトレーニング・テストを行い刷り込みの習得過程における甲状腺ホルモン低下の影響を調べた。MMI 群では、2段階目の「学習によって獲得した追従」と3段階目の「弁別」が成立しないことが分かった。3段階目の弁別スコアは、MMI 群において、対照群よりも有意に低かった。さらに、2段階目の学習による追従の量と3段階目の弁別スコアの間には、有意な正の相関があった。このことは、2段階目の不成立によって、3段階目の不成立が引き起こされたことを示唆している。この結果は、孵化直前の甲状腺ホルモン上昇が刷り込みの習得過程に必要な脳の発達に寄与するというを示すものである。

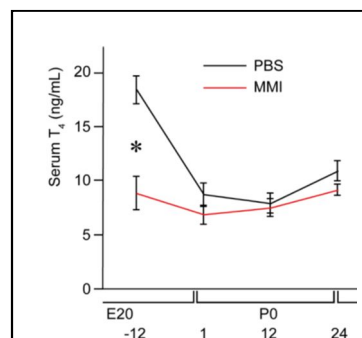


図3 メチマゾールによる一時的な甲状腺ホルモン合成阻害。胚 18 日目から 20 日目まで甲状腺ホルモン合成阻害剤メチマゾールを投与したところ、胚 20 日目では対照群と有意な差があった。一方、孵化後1日目には差がなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Serizawa Shouta, Aoki Naoya, Mori Chihiro, Fujita Toshiyuki, Yamaguchi Shinji, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J.                       | 4. 巻<br>14                    |
| 2. 論文標題<br>Temporal hampering of thyroid hormone synthesis just before hatching impeded the filial imprinting in domestic chicks                   | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>1084816         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fphys.2023.1084816  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Saheki Yuriko, Aoki Naoya, Homma Koichi J., Matsushima Toshiya   | 4. 巻<br>13                    |
| 2. 論文標題<br>Suppressive Modulation of the Chick Forebrain Network for Imprinting by Thyroid Hormone: An In Vitro Study                              | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>822638          |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fphys.2022.881947   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Aoki Naoya, Mori Chihiro, Fujita Toshiyuki, Serizawa Shouta, Yamaguchi Shinji, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J.                       | 4. 巻<br>424                   |
| 2. 論文標題<br>Subtype-selective contribution of muscarinic acetylcholine receptors for filial imprinting in newly-hatched domestic chicks             | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Behavioural Brain Research   | 6. 最初と最後の頁<br>113789 ~ 113789 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbr.2022.113789   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Aoki Naoya, Mori Chihiro, Fujita Toshiyuki, Serizawa Shouta, Yamaguchi Shinji, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J.                       | 4. 巻<br>13                    |
| 2. 論文標題<br>Imprintability of Newly Hatched Domestic Chicks on an Artificial Object: A Novel High Time-Resolution Apparatus Based on a Running Disc | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>881947          |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fphys.2022.822638   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Mori Chihiro, Aoki Naoya, Fujita Toshiyuki, Yamaguchi Shinji, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J.   | 4. 巻<br>420                   |
| 2. 論文標題<br>Gene expression profiles of the muscarinic acetylcholine receptors in brain regions relating to filial imprinting of newly-hatched domestic chicks | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Behavioural Brain Research  | 6. 最初と最後の頁<br>113708 ~ 113708 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbr.2021.113708   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujita Toshiyuki, Aoki Naoya, Mori Chihiro, Fujita Eiko, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J., Yamaguchi Shinji | 4. 巻<br>12           |
| 2. 論文標題<br>Serotonergic Neurons in the Chick Brainstem Express Various Serotonin Receptor Subfamily Genes                | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>815997 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fphys.2021.815997  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujita Toshiyuki, Aoki Naoya, Mori Chihiro, Fujita Eiko, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J., Yamaguchi Shinji                   | 4. 巻<br>13           |
| 2. 論文標題<br>Chick Hippocampal Formation Displays Subdivision- and Layer-Selective Expression Patterns of Serotonin Receptor Subfamily Genes | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>882633 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fphys.2022.882633  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Fujita Toshiyuki, Aoki Naoya, Mori Chihiro, Fujita Eiko, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J., Yamaguchi Shinji                      | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>The dorsal arcopallium of chicks displays the expression of orthologs of mammalian fear related serotonin receptor subfamily genes | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>21183 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-78247-9  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Aoki Naoya, Fujita Toshiyuki, Mori Chihiro, Fujita Eiko, Yamaguchi Shinji, Matsushima Toshiya, Homma Koichi J.   | 4. 巻<br>379                   |
| 2. 論文標題<br>Blockade of muscarinic acetylcholine receptor by scopolamine impairs the memory formation of filial imprinting in domestic chicks ( <i>Gallus Gallus domesticus</i> ) | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Behavioural Brain Research   | 6. 最初と最後の頁<br>112291 ~ 112291 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbr.2019.112291  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>青木直哉・森千紘・芹澤祥太・本間光一                 |
| 2. 発表標題<br>鳥類刻印付けにおけるムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプの寄与 |
| 3. 学会等名<br>第93回日本動物学会                         |
| 4. 発表年<br>2022年 ~ 2023年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>青木直哉・森千紘・藤田俊之・山口真二・本間光一                      |
| 2. 発表標題<br>ムスカリン性アセチルコリン受容体M2, M5はニワトリの刷り込みにおける記憶形成に関わる |
| 3. 学会等名<br>第44回日本神経科学大会                                 |
| 4. 発表年<br>2021年 ~ 2022年                                 |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>青木直哉・森千紘・藤田俊之・山口真二・本間光一 |
| 2. 発表標題<br>円盤型トレーニング装置を用いた刷り込み行動解析 |
| 3. 学会等名<br>第92回日本動物学会              |
| 4. 発表年<br>2021年 ~ 2022年            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>芹澤祥太・青木直哉・森千紘・本間光一                |
| 2. 発表標題<br>ニワトリ胚後期における甲状腺ホルモン合成の低下は刷り込みを阻害する |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会関東支部 第74回大会                 |
| 4. 発表年<br>2021年～2022年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Naoya AOKI, Chihiro Mori, Toshiyuki Fijita, Eiko Fujita, Shinji Yamaguchi, Koichi J. Homma |
| 2. 発表標題<br>Acetylcholine is involved in memory formation of filial imprinting in domestic chicks.     |
| 3. 学会等名<br>第43回日本神経科学大会   |
| 4. 発表年<br>2020年～2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |