

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06667

研究課題名(和文) 学習臨界期を開く甲状腺ホルモンが制御するアクチンダイナミクス

研究課題名(英文) Thyroid hormone-mediated actin dynamics regulate the reopening of the sensitive period of filial imprinting in chicks

研究代表者

山口 真二 (Shinji, Yamaguchi)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：60398740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の学習は、生後の限られた臨界期にしか習得できない。ニワトリヒナを用いて、孵化後2、3日に限られる刷り込み学習の臨界期を開く因子が、甲状腺ホルモン(T3)であることを発見した。一方、アクチン重合因子の活性阻害剤が、T3と同様に臨界期を開くことを見出した。このことから、T3が作用すると、神経微細構造でのアクチン重合状態が変化しているのではないかと考えられた。2光子起レーザー走型顕微鏡を用い、ヒナを生かしたまま大脳の神経微細構造を解析した。その結果、T3投与後1-3時間では、神経細胞のアクチンフィラメントの重合を解除し、重合の進んだスパインの割合が増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある種の学習は、生後の限られた臨界期又は感受性期と呼ばれる時期にしか習得できない。刷り込み学習はその典型例である。臨界期が閉じたヒナに、T3を注射すると、再び臨界期が開く。本研究では、T3が学習臨界期を開く分子機構の解明を試みた。そして、薬理学的にアクチン重合因子の活性阻害剤が、T3と同様に臨界期を開くことを見出した。このことから、T3が作用すると、神経微細構造でのアクチン重合状態が変化しているのではないかと考えられた。T3がヒナの脳内の神経細胞に作用し、刷り込み記憶を成立させるためには、神経細胞のアクチンダイナミクスを一過的に再編成することが必要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Some types of learning can only be learned during the limited critical period after birth. Using newly-hatched chicks, we found that thyroid hormone (T3) opens the critical period of imprinting learning, which is limited to a few days after hatching. On the other hand, it was found that inhibitors of actin polymerization activity open a critical period similar to the effect of T3. From this, it was considered that the actin polymerization state in the spines was changed by the action of T3. Using a two-photon laser scanning microscope, we analyzed the spine structures while keeping the chicks alive. As a result, it was clarified that 1-3 hours after the administration of T3, the actin filaments of nerve cells were depolymerized and the proportion of highly polymerized spines increased.

研究分野：神経科学

キーワード：刷り込み 記憶 甲状腺ホルモン アクチン

1. 研究開始当初の背景

ある種の学習は、生後の限られた臨界期又は感受性期と呼ばれる時期にしか習得できない。鳥類ヒナが孵化直後に親を記憶する刷り込み学習は、その典型的な例であるが、臨界期を決定する因子は不明であった。私たちは、ニワトリヒナを用いて、孵化後2, 3日に限られる刷り込み学習の臨界期を開く因子が、甲状腺ホルモン(T_3)であることを発見した。つまり、刷り込み学習の間に、脳内へ T_3 が急速に流入し、 T_3 の脳内濃度が一過的に閾値を超えることで、臨界期が開きヒナは刷り込まれた。この反応は、遺伝子発現を伴わない速やかな生化学反応であった。また、孵化後数日が経過し、臨界期が終了し刷り込まれなくなったヒナは T_3 の脳内濃度が下がっているが、 T_3 を静脈注射すると閉じた臨界期が再び開き、ヒナはよく刷り込まれた。 T_3 が、刷り込み臨界期を開く分子機構を解析したところ、アクチン重合因子 Rho キナーゼの活性阻害剤が、 T_3 と同様に臨界期を開くことを見出した。このことから、 T_3 が作用すると、神経微細構造でのアクチン重合状態が変化しているのではないかと考えられた。一方、 T_3 を静脈注射せずに刷り込み学習をすると、神経細胞内のアクチンフィラメントの重合が進むことが分かった。さらに、トレーニングすることで進むアクチン重合に対して、 T_3 の静脈注射によりアクチンフィラメントの脱重合が拮抗的に起こることが分かった。これらのことから、 T_3 により進むアクチンフィラメントの脱重合が、刷り込みトレーニングにより進むアクチンフィラメントの重合と拮抗的に起こり、ヒナの記憶が形成されたのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、刷り込み学習の臨界期を開く甲状腺ホルモン(T_3)に注目して、学習臨界期の分子基盤を解明することである。鳥類ヒナに見られる刷り込み学習は、生後の限られた時期にしか習得できないことから、臨界期を伴った学習の典型例と言える。これまでに、ヒナが刷り込み学習を行うと、 T_3 が脳内に急速流入し臨界期が開始されること、臨界期終了後でも T_3 を一過的に投与すると閉じた臨界期が再び開き、刷り込みが可能となることを明らかにした。本研究では、独自に確立した *in vivo* 遺伝子導入法、*in vivo* イメージング法を用いて、 T_3 がどのようなメカニズムで学習臨界期を開くのか、という問題に対して分子レベルおよび神経微細構造のレベルで解明する。

3. 研究の方法

アクチン骨格の主要な重合因子 Rho キナーゼの阻害剤も T_3 と同様に閉じた臨界期を開く。この阻害剤も、アクチンフィラメントの脱重合を促進し、神経微細構造のアクチン細胞骨格のダイナミクスを調節すると予想される。代表者らは、2光子励起レーザー走査型顕微鏡を用い、個体(ヒナ)を生かしたまま大脳の神経微細構造を解析する *in vivo* イメージング法を確立した。この方法を用い、 T_3 投与、刷り込み学習トレーニングに伴う、アクチン細胞骨格のダイナミクスを解析する。

アクチン骨格が変化すると、シナプス上で AMPA 受容体や NMDA 受容体の局在も変化し、神経伝達効率も変化する。 T_3 の作用によるアクチン脱重合が、トレーニングにより進むアクチン重合を拮抗的に阻害するという一方で、シナプス上で AMPA 受容体の局在が変化し、神経伝達効率も変化するのではないかと考えた。生化学的な分画や免疫染色により T_3 や Rho キナーゼ阻害剤を注入した大脳神経細胞で、AMPA、NMDA 受容体の局在変化を解析する。

4 . 研究成果

まず、Rho - Rock 経路の主要なアクチン脱重合因子コフィリンに注目した。これまでに、代表者は RhoGTPase ファミリー蛋白質の一つである Rho キナーゼの活性阻害剤が、T3 と同様に臨界期を再び開く活性を有することを見出している。刷り込みに必要な脳領域にアデノ随伴ウイルスベクターをもちいて野生型と constitutive active 型を、強制発現させた。その結果、T3 を投与しなくてもアクチン脱重合がトレーニングによる重合と拮抗的に起こり、刷り込みトレーニングにより進むアクチン重合と拮抗的に起こり、ヒナの記憶が形成される臨界期が開くことが明らかとなった。コフィリンを介したアクチン脱重合が刷り込みの記憶獲得に重要であることが分かった。

次に、代表者は、T₃ の作用により進むアクチン脱重合が、トレーニングにより進むアクチン重合を拮抗的に阻害することで、シナプス上で NMDA 受容体や AMPA 受容体の局在が変化し、神経伝達効率が変わるのではないかと考えた。そこで、NMDA 受容体や AMPA 受容体がシナプス上に集積するかどうか、シナプス接続部を含んだ Synaptoneurosomal (SNS) 画分を生化学的に分画し、これら受容体の集積を検討した。その結果、AMPA 受容体は、トレーニングのみでは、SNS 画分へと移行しないが、T3 存在下のトレーニングにより SNS 画分へと移行することが分かった。一方、NMDA 受容体は T3 存在下のトレーニングにより SNS 画分へ移行しないことが分かった。また、大脳切片を作成し、免疫染色により、T3 存在下のトレーニングにより、シナプスのマーカータンパク質 (PSD-93) と AMPA 受容体の局在が一致するようになることが分かった。アクチン骨格が変化すると、シナプス上で AMPA 受容体の局在も変化し、神経伝達効率が変わると考えられた。

さらに、2 光子起レーザー走型顕微鏡を用い、ヒナを生かしたまま大脳の神微細構造を解析する in vivo イメージング法を用いて、T₃ がどのようなメカニズムで学習臨界期を開くのか、という問題を解析した。具体的には、神経細胞棘突起でのアクチン重合を可視化するため、重合アクチンと結合する LifeAct(17 アミノ酸のペプチド) と GFP(Green Fluorescent Protein) の fusion タンパク (LifeAct-GFP) を、神経細胞棘突起に発現させ、T₃ 投与に伴う、アクチン細胞骨格のダイナミクスの変化を in vivo イメージングにて解析した。その結果、T₃ 投与後 1 - 3 時間では、神経細胞のアクチンフィラメントの重合を解除し、重合の進んだスパインの割合が増加することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujita T, Aoki N, Mori C, Fujita E, Matsushima T, Homma KJ, Yamaguchi S	4. 巻 10
2. 論文標題 The dorsal arcopallium of chicks displays the expression of orthologs of mammalian fear related serotonin receptor subfamily genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 21183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78247-9	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 Aoki N, Fujita T, Mori C, Fujita E, Yamaguchi S, Matsushima T, Homma KJ.	4. 巻 379
2. 論文標題 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 2020年
3. 雑誌名 Behav Brain Res.	6. 最初と最後の頁 112291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbr.2019.112291.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Fujita T, Aoki N, Fujita E, Matsushima T, Homma KJ, Yamaguchi S.	4. 巻 9
2. 論文標題 The chick pallium displays divergent expression patterns of chick orthologues of mammalian neocortical deep layer-specific genes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 20400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56960-4.	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 Aoki N, Yamaguchi S, Fujita T, Mori C, Fujita E, Matsushima T, Homma KJ.	4. 巻 9
2. 論文標題 GABA-A and GABA-B Receptors in Filial Imprinting Linked With Opening and Closing of the Sensitive Period in Domestic Chicks (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Physiol.	6. 最初と最後の頁 1837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2018.01837. eCollection 2018.	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 Miura M, Aoki N, Yamaguchi S, Homma KJ, Matsushima T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Thyroid Hormone Sensitizes the Imprinting-Associated Induction of Biological Motion Preference in Domestic Chicks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Physiol.	6. 最初と最後の頁 1740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2018.01740. eCollection 2018.	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 Yamaguchi S, Aoki N, Matsushima T, Homma KJ.	4. 巻 102
2. 論文標題 Wnt-2b in the intermediate hyperpallium apicale of the telencephalon is critical for the thyroid hormone-mediated opening of the sensitive period for filial imprinting in domestic chicks (Gallus gallus domesticus).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Horm Behav.	6. 最初と最後の頁 120-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yhbeh.2018.05.011.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Takemura Y, Yamaguchi S, Aoki N, Miura M, Homma KJ, Matsushima T.	4. 巻 349
2. 論文標題 Gene expression of Dio2 (thyroid hormone converting enzyme) in telencephalon is linked with predisposed biological motion preference in domestic chicks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Behav Brain Res.	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2018.04.039.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤田俊之、青木直哉、藤田永子、本間光一、山口真二
2. 発表標題 ニワトリ終脳における、哺乳類の大脳新皮質深層選択的遺伝子オルソログの発現解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木直哉、藤田俊之、藤田永子、山口真二、本間光一
2. 発表標題 ニワトリヒナの大脳巢外套尾側部は刻印付け記憶の保持に関わる
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木直哉、藤田俊之、山口真二、本間光一
2. 発表標題 ニワトリヒナの大脳巢外套尾側部は刻印付けの想起に必要である
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 (Neuro2019) 新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木直哉、藤田俊之、藤田永子、山口真二、本間光一
2. 発表標題 甲状腺ホルモンは課題転換での柔軟性を向上させる
3. 学会等名 第43回 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口真二、藤田俊之、青木直哉、藤田永子、本間光一
2. 発表標題 Wnt-2b は、甲状腺ホルモンの下流で働くニワトリヒナの刻印付け臨界期の開始因子である
3. 学会等名 第29回日本行動神経内分泌研究会、神奈川県藤野
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木 直哉、山口 真二、本間 光一
2. 発表標題 鳥類刻印付けでは、GABA-A受容体とGABA-B受容体が相反する役割を担うことにより成否を決める
3. 学会等名 日本動物学会 第89回札幌大会 札幌
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 俊之、青木 直哉、藤田 永子、本間 光一、山口 真二
2. 発表標題 ニワトリNR4A2は、哺乳類大脳新皮質 V, VI 層と機能的な相同領域に発現する
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第71回大会 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木 直哉、藤田 俊之、藤田 永子、山口 真二、本間 光一
2. 発表標題 鳥類刻印付けでは相反する役割を担GABA-A受容体とGABA-B受容体の量的バランスによって成否が決まる
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第71回大会 東京
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------