

機関番号：32643

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790094

研究課題名 (和文) 鳥類刻印付けにおける細胞骨格制御因子の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of microtubule regulating factors in filial imprinting

研究代表者

山口 真二 (YAMAGUCHI SHINJI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：60398740

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、鳥類ヒナに見られる「刻印付け」(刷り込み)を記憶学習のモデルとして利用し、記憶学習における神経回路改編の分子メカニズムを明らかにする。cDNA マイクロアレイ解析により、刻印付けに伴い発現が上昇する遺伝子をこれまでにいくつか見出してきた。これらのうち、細胞骨格を制御する MAP2 に注目し、独自に確立した *in vivo* 遺伝子導入法を用いて、刻印付けとどのように関わっているかを解析した。その結果、MAP2 の遺伝子抑圧を行ったヒナでは、刻印付けが阻害されていた。このことは、MAP2 遺伝子が刻印付けに重要な機能を果たしていることを示している。

研究成果の概要 (英文)：

Birds have a diverse behavioral repertoire and are thus ideal models for experimental analyses of neural and behavioral plasticity. The domestic chick has been intensively studied as a model for filial imprinting. To elucidate the molecular processes underlying the neural mechanism of filial imprinting in newly-hatched chicks more extensively, we previously conducted a cDNA microarray and the quantitative RT-PCR study. One of the genes was microtubule-associated protein 2 (MAP2), which is involved in cytoskeletal organization. The levels of MAP2 transcripts and proteins were increased in the mesopallium and the hippocampus after imprinting training. Here, we used *in vivo* gene-transfer technique we have originally developed and showed that transfected microRNA vectors preferentially silence exogenous DNA expression in neuronal cells. Using this system, the up-regulation of MAP2 accompanying filial imprinting was suppressed *in vivo*, which impaired the filial imprinting in chicks. Our results suggest that the regulation of MAP2 expression is required for filial imprinting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学・生化学・行動神経科学

1. 研究開始当初の背景

親子間の刻印付けは、孵化後間もないヒナ鳥が初めて見た動くものを親と認識し追従する行動である。この行動は不可逆的で非常に強固な記憶として固定されることから、記憶学習の一つのモデルとして1970年代から研究が進められていた。その過程で、大脳のIMM(Intermediate and Medial Mesopallium)と呼ばれる局所的な領域が、記憶獲得に必要であるということが組織破壊の実験を基に報告された (*Brain Res.* **205**, 29-37(1981)。また、この領域の全体的なRNA合成が、刻印付けに付随して上昇することも報告された (*Brain Res.* **168**, 361-373(1979), *Brain Res.* **39**, 449-465(1972))。これらのことから、IMM領域での遺伝子発現の変化が刻印付けに重要であると考えられている。これまでに、Rose S.やStewart M.らが、他の動物種で記憶学習との関連が示されていた初期応答遺伝子 *c-fos* や NMDA 受容体などの遺伝子に注目し、刻印付けに伴った IMM 領域での遺伝子発現変化を解析した例が報告されているが (*Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 108-121(2004))、遺伝子発現を網羅的に解析するという方法は取られていなかった。そのため、刻印付けに伴う遺伝子変化の全体像を理解することは難しかった。そこで、申請者らは、刻印付け個体の大脳 IMM 領域から、マイクロアレイを用いて網羅的に刻印付けに伴って発現変動する遺伝子の同定を行った。その結果、申請者は、刻印付けに伴って発現上昇する52種類の遺伝子群を、cDNA マイクロアレイ解析により同定した。同定した遺伝子群の特徴としては、Slingshot、MAP (Microtubule-associated protein)1B、MAP2などの細胞骨格の制御に関わる遺伝子群の数が最も多く、次いで netrin, ephrinB など軸索誘導に関わる遺伝子、その他に神経活動、神経分化、スプライシングに関与する遺伝子が含まれていた (*Brain Res. Bull.* **76**, 275-281 (2008))。これらのことから、刻印付けに伴って、神経回路が部分的に改編されることが予想された。

本研究では、これら神経細胞骨格を制御する遺伝子をはじめ、cDNA マイクロアレイにより同定した遺伝子群がどのように刻印付けと関わっているかを解析し、刻印付けに伴った神経改編の分子メカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

鳥類ヒナに見られる「刻印付け」(刷り込み)を記憶学習のモデルとして利用し、記憶学習における神経回路改編の分子メカニズムを明らかにすることである。申請者は、cDNA マイクロアレイ解析により刻印付けに

関連する遺伝子の同定を試みた。その結果、細胞骨格制御因子、軸索誘導因子、神経分化因子などのいくつかの遺伝子発現が、刻印付けに伴い上昇することを見出した (*Brain Res. Bull.* **76**, 275-281 (2008))。この知見に基づき、独自に確立した *in vivo* 遺伝子導入法 (*Neuroreport* **18**, 735-739 (2007)) を用いて、これら遺伝子が刻印付けとどのように関わっているかを解析し、記憶形成に伴って神経回路が改編される分子メカニズムを解明していく

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現抑圧による刻印付け遺伝子群の記憶形成に及ぼす機能解析

これまでに、生きたヒナ大脳で *in vivo* エレクトロポレーション法を用いて RNA 干渉をおこし、部域特異的に遺伝子発現を抑圧する系を確立した。MAP2の遺伝子の発現を特異的かつ局所的に低下させると、刻印付けにどのような影響があらわれるか、行動解析を行う。具体的には、miRNA 発現ベクターをニワトリヒナ大脳神経細胞にエレクトロポレーション法により導入する。そして遺伝子発現を低下させたときの刻印付け学習への影響を解析する。この時、1) あらかじめ RNAi によって遺伝子発現を低下させ、その後、刻印付け学習への影響を調べる実験と、2) 刻印付け学習を行なって記憶を成立させた後に RNAi を起こすことで、記憶の維持や想起への影響を見る、二通りの実験を行う。これらの実験を通して、刻印付け関連遺伝子が記憶の形成や維持、想起といったどの段階に関与しているか調べる。

(2) ルシフェラーゼ発光を利用した *in vivo* リアルタイムイメージングの確立

従来の *in situ* hybridization などを用いた方法では、固定した脳切片を作成し遺伝子発現の解析を行うため、刻印付けに伴った遺伝子発現を同一個体で経時的に計測することは出来なかった。そこで、ルシフェラーゼ発光を利用した *in vivo* イメージングにより、脳内での遺伝子発現変化を同一個体でリアルタイムに計測する方法の確立を試みた。この方法により、刻印付けに伴って、いつ、どこで、どのくらい発現しているかということが、リアルタイムで明らかとなる。さらに、この *in vivo* イメージングを利用して、神経再編成がヒナ大脳内で起こっている領域を大脳全体にわたって調べていく。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現抑圧による MAP2 の記憶形成に及ぼす機能解析

細胞骨格を制御する MAP2 が刻印付けに必要な遺伝子であるかどうかを解析するために、独自に確立した *in vivo* 遺伝子導入系を用い、MAP2 に対する miRNA 発現ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、発現を局所的に抑圧した。遺伝子抑圧を行う脳領域として、刻印付けに伴い MAP2 遺伝子発現の上昇が明らかとなっている IMM 領域に注目した。遺伝子導入を行った領域では、定量 PCR と免疫染色により効率的に MAP2 の mRNA とタンパクの発現が抑圧されていることが分かった。そして、刻印付けにどのような影響があらわれるかを解析した。その結果、MAP2 の遺伝子抑圧を IMM 領域で行ったヒナでは、刻印付けの成立が阻害されていた。このことは、MAP2 遺伝子が刻印付けに重要な機能を果たしていることを示している。その成果は *Neurosci. Res.* (2011) に発表した。

(2) MAP2 リン酸化が記憶形成に及ぼす影響の解析

細胞骨格を制御する MAP2 はリン酸化により細胞骨格から離れ、細胞骨格の脱重合を促進する。MAP2 のリン酸化は細胞骨格のダイナミクスを制御し、神経細胞の樹状突起などの構造変化に影響をおよぼす。私は、MAP2 のリン酸化が刻印付けの過程で亢進されることを見出した。そこで、MAP2 のリン酸化を阻害すると刻印付けの記憶形成過程に影響があるのではないかと考え、MAP2 のリン酸化酵素阻害剤の一つリチウムクロライドをニワトリヒナに静脈注射し、刻印付けトレーニングを行った。その結果、MAP2 のリン酸化は亢進されず、さらに記憶形成も阻害された。これらのことは、MAP2 のリン酸化が刻印付けにおける記憶形成に必要であることを示している。この成果は *Neurosci. Res.* (2011) に発表した。

(3) ルシフェラーゼ発光を利用した刻印付け遺伝子の *in vivo* リアルタイムイメージング

従来の *in situ* hybridization などを用いた方法では、固定した脳切片を作成し遺伝子発現の解析を行うため、刻印付けに伴った遺伝子発現を同一個体で経時的に計測することは出来なかった。そこで、ルシフェラーゼ発光を利用した *in vivo* イメージングにより、脳内での遺伝子発現変化を同一個体でリアルタイムに計測する方法の確立を試みた。刻印付けとの関連が知られている初期応答遺伝子 *c-fos* のプロモーター下流にルシフェラーゼをつなぎ、ヒナ大脳に遺伝子導入した。そして、導入したルシフェラーゼの発光を利用し、刻印付けに伴い

変動する *c-fos* の遺伝子発現を *in vivo* で測定することに成功した。その成果は *Neurosci. Res.* (2010) に発表した。今後は MAP2 の刻印付けに伴う遺伝子発現変化をリアルタイムで計測する予定である。

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 3 件)

1. Molecular function of microtubule-associated protein 2 for filial imprinting in domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*).
Yamaguchi, S., Katagiri, S., Aoki, N., Iikubo, E., Kitajima, T., Matsushima, T., Homma, K.J.
(査読有り)
Neurosci Res. **69**, 32-40 (2011)

2. Bioluminescence imaging of *c-fos* gene expression accompanying filial imprinting in the newly hatched chick brain.
Yamaguchi, S., Iikubo, E., Hirose, N., Kitajima, T., Katagiri, S., Kawamori, A., Fujii-Taira, I., Matsushima, T., Homma, K.J.
(査読有り)
Neurosci Res. **67**, 192-195 (2010)

3. Suppression of the ecdysteroid-triggered growth arrest by a novel *Drosophila* membrane steroid binding protein.
Fujii-Taira, I., Yamaguchi, S., Iijima, R., Natori, S., Homma, K.J. (査読有り)
FEBS Lett. **583**, 655-660 (2009).

[学会発表] (計 4 件)

1. 発表者 山口 真二
発表標題 Brain-derived neurotrophic factor/TrkB Signaling is involved in filial imprinting of domestic chicks
発表年 2010 年
学会名 第 33 回日本神経科学会
発表場所 神戸

2、発表者 北島 孝明
発表標題 ニワトリヒナ刻印付けに関
わる新たな大脳領域の同定
発表年 2009年
学会名 第82回 日本生化学会大会
発表場所 神戸

3、発表者 片桐 幸子
発表標題 鳥類刻印付けにおける神経
骨格制御因子 Microtubule A
ssociated Protein2 (MAP2)
の解析
発表年 2009年
学会名 第82回 日本生化学会大会
発表場所 神戸

4、発表者 平 郁子
発表標題 ニワトリVSP はホスファタ
ーゼ活性の発現によって線維
芽細胞の形態変化を引き起こ
す。
発表年 2009年
学会名 第82回 日本生化学会大会
発表場所 神戸

〔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

帝京大学薬学部ホームページ
<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 真二 (YAMAGUCHI SHINJI)
帝京大学・薬学部・准教授
研究者番号：60398740

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し ()

研究者番号：