

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590096

研究課題名(和文)細胞骨格結合蛋白が制御する鳥類記憶形成の分子機構

研究課題名(英文)Molecular basis of the avian memory formation regulated by cytoskeleton binding protein

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鳥類の刷り込みを記憶学習のモデルとし、記憶を形成する分子メカニズムを明らかにする。細胞骨格を制御するMAP2に注目し、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。さらに、MAP2の薬理的解析を行った。MAP2による細胞骨格の制御は、リン酸化の変化によってもなされ、beta-tubulinの脱重合を促進する。代表者は、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。このことは、刻印付けに伴い、MAP2が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していることを示唆している。

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. Here, we used in vivo gene-transfer technique 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.

研究分野：生化学

キーワード：生化学 行動生化学 分子生物学 記憶 刻印付け

1. 研究開始当初の背景

刻印付けは、1973年のノーベル医学・生理学賞受賞者コンラッド・ローレンツにより発見された現象で、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いかける行動である。この行動が不可逆的な記憶として固定されるためには、自発的な反復学習が必要である。しかし、どのような遺伝子群の発現がこの記憶の形成に重要であるのかは、現在でもほとんど明らかにされていない。そこで、代表者は、刻印付けに関わる遺伝子を同定するために、刻印付けに伴い発現上昇する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、slingshot、MAP (microtubule-associated protein) 1B、MAP2などの細胞骨格の制御に関わる遺伝子の数が最も多く、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(山口ら、*Brain Res. Bull.* 76,275-281 (2008))。これらのことから、刻印付けは神経の分子的再編成を伴った記憶である可能性が考えられた。発現上昇が最も高かった細胞骨格結合蛋白MAP1B、MAP2についてはさらに解析を進めた。その結果、刻印付けに必要な大脳IMM領域でMAP1B、MAP2の蛋白発現が、細胞骨格蛋白beta-tubulinと共に刻印付けに伴い高まることを見出した(山口ら、*Brain Res. Bull.* 76,282-288 (2008))。これは、MAP1B、MAP2蛋白が刻印付けに伴い、細胞骨格を部分的に変化させることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鳥類ヒナに見られる「刻印付け(刷り込み)」を記憶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。代表者は、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、細胞骨格を制御する細胞骨格結合蛋白の遺伝子発現が、刻印付けに伴い上昇することを見出した。この知見に基づき、独自に確立した*in vivo* 遺伝子導入法を用い、細胞骨格結合蛋白が刻印付けとどのように関わるのかを解析し、記憶形成の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、cDNAマイクロアレイ解析により見出した細胞骨格結合蛋白に着目して、刻印付けに伴った神経回路改編の分子メカニズムを以下の方法により解析する。

- (1) *in vivo* 発現抑圧により、生後のヒナの大脳で局所的にMAP1B、MAP2の遺伝子発現を抑圧し、刻印付け記憶の成立に影響がみられるかどうかを解析する。
- (2) *in vivo* 発現抑圧により、刻印付けに伴う神経回路の変化(神経微細構造の形態変化)に影響が見られるかどうか、2光子励起顕微鏡を用いて経時的に観察する。
- (3) 薬理的、細胞生化学的方法により、刻印付けに伴った神経細胞骨格のダイナミクスの制御を解析する。

4. 研究成果

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、細胞骨格を制御する細胞骨格結合蛋白の遺伝子発現が、刻印付けに伴い上昇することを見出した。この知見に基づき、細胞骨格結合蛋白が刻印付けとどのように関わるのかを解析した。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。さらに、MAP2の薬理的、細胞化学的解析を行った。MAP2による細胞骨格の制御は、遺伝子発現の量的変化のみならず、リン

酸化の変化によってもなされる。MAP2 はリン酸化により細胞骨格の主要な構成蛋白 beta-tubulin から離れ、beta-tubulin の脱重合を促進する。代表者は、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。このことは、刻印付けに伴い、リン酸化された MAP2 が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していることを示唆している。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かどうか、MAP2 のリン酸化酵素阻害剤（リチウムクロライドなど）をニワトリヒナに静脈注射、若しくは、大脳に直接注入し、記憶形成への影響を解析した。その結果、MAP2 のリン酸化が阻害され、刻印付けの記憶形成が阻害された。

さらに、刷り込み臨界期の開始を制御する分子メカニズムを明らかにするために、より早期に発現変化する遺伝子を単離すべく刷り込みトレーニング開始 1 時間後において、発現量に違いのある遺伝子群を同定した。方法は、孵化後 1 日目のヒナに対して 1 時間の刷り込みトレーニングを行った後、大脳全体から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイと定量的 RT-PCR を行った。その結果、刷り込みに伴って発現上昇する 18 個の遺伝子を同定した。その中には Dio2(ヨードチロニン脱ヨウ素酵素タイプ 2)が含まれていた。Dio2 は、甲状腺ホルモンの前駆体チロキシン(T_4)から活性型トリヨードチロニン(T_3)への脱ヨウ素化を触媒する酵素である。これらのことから、脳血管内皮細胞が血中由来の T_4 を取り込み、細胞内に存在する Dio2 が T_3 に変換したあと T_3 が脳内に流入し、神経細胞に作用することを明らかとした。さらに、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(山口ら、*Nat. Commun.* (2012))。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。さらに、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でも、 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。また、 T_3 が脳内で一過的に作用し、閉じた臨界期を再び開くと、ヒナは刷り込み学習以外の学習課題も効率よく習得できることが分かった。このように T_3 がプライマー（導火線）としてヒナに学習能力を与えることから、その作用をメモリープライミングと名付けた。これらの成果を *Nat. Commun.* (2012) に発表した。

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 6 件)

1. Potential role of voltage-sensing phosphatases in regulation of cell structure through the production of PI(3,4)P₂
Yamaguchi, S., Kurokawa, T., Taira, I., Aoki, N., Sakata, S., Okamura, Y., and Homma, K. J. (査読有り、原著論文)
J. Cell. Physiol. 229, 422-433 (2014)
2. Expression of the voltage-sensing phosphatase gene in the chick embryonic tissues and in the adult cerebellum.
Yamaguchi, S., Aoki, N., Kitajima, T., Okamura, Y. and Homma, K. J. (査読有り、原著論文)
Communicative & Integrative Biology (in press)
3. A primer for learning: thyroid hormone is a determining factor to start the sensitive period of filial imprinting of domestic chicks.
Homma, K. J., Yamaguchi, S. and Aoki, N.

(査読有り、日本語総説)
Seikagaku, 85, 315-327(2013)

4. 鳥類の刷り込みに見られるメモリープライミング (査読有り、日本語総説)
本間光一、山口真二、青木直哉
分子精神医学, 13, 243-250 (2013)
5. Thyroid hormone determines the start of the sensitive period of imprinting and primes later learning.
Yamaguchi, S., Aoki, N., Kitajima, T., Iikubo, E., Katagiri, S., Matsushima, T. and Homma, K. J. (査読有り、原著論文)
Nat. Commun. 3, 1081(2012)
6. 3' phosphatase activity toward PI(3,4)P2 by voltage-sensing phosphatase, VSP
Kurokawa, T., Takasuga, S., Sakata, S., Yamaguchi, S., Horie, S., Homma, K. J., Sasaki, T. and Okamura, Y. (査読有り、原著論文)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 10089-10094(2012)

[学会発表](計 10 件)

1. Thyroid hormone determines the start of the sensitive period of visual imprinting
S. YAMAGUCHI, N. AOKI, T. KITAJIMA, T. MATSUSHIMA, K. J. HOMMA Society for Neuroscience 2012
2012年10月17日 New Orleans
2. Rapid inflow of thyroid hormone induced by visual imprinting primes later learning.
N. AOKI, S. YAMAGUCHI, T. KITAJIMA, T. MATSUSHIMA, K. J. HOMMA Society for Neuroscience 2012
2012年10月17日 New Orleans
3. 甲状腺ホルモンは鳥類親子刷り込みの感

受性期の開始を決定する
本間 光一、山口真二、青木直哉、松島俊也
日本動物学会 第83回大会 2012
2012年09月15日大阪

4. Imprinting behavior in birds as a model of learning potency and the sensitive period
Yamaguchi, S
Gordon Research Conference, Genes & Behavior
2014年02月09日 ~ 2014年02月14日
Hotel Galvez in Galveston, TX, USA
5. 鳥類刻印付け感受性期の開始を決定するメモリープライミング
山口真二、青木直哉、北島孝明、松島俊也、本間光一
Neuro2013(第36回日本神経科学大会)
2013年06月21日 ~ 2013年06月21日
国立京都国際会館
6. 甲状腺ホルモンは、刷り込み学習の感受性期の開始を決定し、その後の学習のプライマーとして働く
山口真二、青木直哉、松島俊也、本間光一
第87回日本生化学会大会
2014年10月15日 ~ 2014年10月18日
国立京都国際会館
7. Hormonal regulation of the sensitive period for filial imprinting in domestic chicks.
山口真二、青木直哉、本間光一
2014 International Congress of Neuroethology, Hokkaido Neuroethology workshops 2014年07月26日 ~ 2014年07月27日
北海道大学理学部生命科学科
8. Neural circuits of the sensitive period triggered by thyroid hormones in filial

imprinting.

青木直哉、山口真二、本間光一
2014 International Congress of
Neuroethology, Hokkaido Neuroethology
workshops
2014年07月26日～2014年07月27日
北海道大学理学部生命科学科

9. 鳥類刻印付けの成立に大脳後背側部IMHA
は必須である

青木直哉、山口真二、北島孝明、松島俊也、
本間光一
第37回日本神経科学大会
2014年09月11日～2014年9月13日
パシフィコ横浜

10. 鳥類刻印付けにおいて大脳背側部IMHAは
獲得・想起に必要である

青木直哉、山口真二、北島孝明、本間光一
第67回日本動物学会関東支部大会
2015年03月14日
早稲田大学先端生命医科学センター

〔図書〕(計 1件)

Insect papain homologues

Homma, K. J., Yamaguchi, S. and Aoki, N.

(査読有り、著書)

*In Handbook of Proteolytic Enzyme, 3rd
Edition (A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and
J. D. Woessner, eds)", Academic Press.,
1959-1964 (2012)*

〔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：
出願年月日：
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 ()

(3) 連携研究者

青木 直哉 (AOKI NAOYA)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：60525334