

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06717

研究課題名(和文) 幼少期におけるインプリンティング行動の成立と社会性の発達を支える分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of imprinting behavior and development of social behavior in juvenile period.

研究代表者

浜崎 浩子 (Ohki-Hamazaki, Hiroko)

北里大学・一般教育部・教授

研究者番号：00211483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリのヒナで見られる視覚的インプリンティングは、右側にヒナがいると成立しやすくなったことから、社会的促進が起こることが示唆された。インプリンティングにおける社会性の発現に關与する部位として、脳の扁桃体内側部と皮質部が挙げられた。この領域で発現する利尿ペプチドの1つは、臨界期(感受性期)やインプリンティングによってその発現量が変化し、脳内への注入はインプリンティングを促進した。この結果は、発達期における社会性行動の制御メカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Visual imprinting in chicks could be facilitated by the presence of another chick at the right side. Medial and cortical divisions of amygdala were suggested to regulate the expression of social emotion in imprinting. One of the natriuretic peptides was expressed in these regions. Its expression in the brain was enhanced during the critical period as well as after the imprinting training. Moreover, injection of this peptide facilitated imprinting. We expect that these results can lead to elucidate the mechanism by which development of social behavior is regulated in juveniles.

研究分野：神経科学

キーワード：ニワトリ インプリンティング 社会性 ニューロペプチド 扁桃体

1. 研究開始当初の背景

ガンヤカモ、ニワトリなど、孵化後の早期から歩き始める鳥類では、親の姿を認識して追従するインプリンティング行動(刷込み行動)を示す。インプリンティングにおける学習は、幼若期(ヒナの時期)の特定期間のみに可能であり、この時期は臨界期あるいは感受性期と呼ばれる。ヒヨコのインプリンティング行動は、幼若期の学習を解析するための良いモデルとなっている。

われわれは、液晶画面上の動く視覚刺激をニワトリのヒナに見せること(以下トレーニングと呼ぶ)でもインプリンティング行動が成立することを初めて見出し、Hornらの方法(Horn, 2004)に基づいて行動を定量化し、簡便に解析可能な行動実験系を確立した(Maekawa et al., 2006; 2008)。そして、視覚的インプリンティングを支配する終脳(大脳に相当するニワトリ脳の部分)の神経経路について解剖学的・生理学的に解析を行い、哺乳類の大脳皮質視覚野に相当する visual Wulst (VW) から、哺乳類の大脳皮質連合野に相当する intermediate medial mesopallium (IMM) につながる神経経路 (VW-IMM 経路) を同定した。

また、神経活動のイメージングによる解析では、VW-IMM 間の情報伝達は、臨界期中(孵化後 1 日~4 日; P1~P4)には活発であるが、その後減弱して P7 では検出不可能となる一方、インプリンティングが成立した個体では、P7 でも強い情報伝達を観察された。インプリンティングの成立には、グルタミン酸受容体の 1 つである NMDA 型受容体のうち、臨界期に発現が高く、チャンネルの開口時間が長いという特性を持つ NR2B 含有 NMDA 型受容体 (NR2B/NR1) の発現が重要であり、反応の増強による神経細胞の可塑的変化が学習回路で起きることが、幼少期の学習メカニズムであることが示唆された。

一方、インプリンティングは社会性行動としての側面を持つことから、この行動が成立するためには、個体がすでにある程度の社会性、あるいは社会性への指向性を持つことが条件となることが考えられた。ヒヨコの変化を調べた研究によると、1 羽だけで隔離飼育されたヒヨコは、他の個体を怯えたり他の個体から逃げたりといった、集団飼育のヒヨコとは異なる反応を示す。しかし、P6~P9 の間であればこの反応を変化させることができるので、社会性の臨界期は P6~P9 にあると報告されている (Mimura et al., 2013; Koshiba et al., 2013)。

また、われわれはこれまでの研究で、インプリンティング学習の成績には個体によるばらつきがあることを示したが、自然界では、カモなどのヒナの集団は、一団となって親鳥の後についていく (Lorenz, 1937)。これは、個々の個体が親鳥に対して刷込まれているばかりでなく、他個体に親愛行動を示して追従した結果であるとも考えられる。また、イ

ンプリンティングが成立した個体は、刷込みの対象となった個体と同じ種の個体と一層親密に関わる (filial imprinting) ばかりでなく、成熟後の生殖行動の対象と認識することが知られている (sexual imprinting)。これは、インプリンティングの獲得が後の社会性行動に影響を及ぼすことを示している。

そこで、インプリンティング行動と社会性の相互関係について、雌雄差に注目しながら、分子から個体レベルをターゲットにして解析することをめざした。

2. 研究の目的

本研究では、インプリンティングと社会性の関連について、以下の点を調べることを当初の研究目的とした。

- (1) インプリンティングの成立と発現における他個体の影響
- (2) インプリンティング学習に関連した社会性を制御する脳の「候補部位」
- (3) 「候補部位」と VW-IMM 回路との連絡
- (4) 「候補部位」で働く社会性の制御に関連する「候補遺伝子」
- (5) 「候補遺伝子」の発現細胞とインプリンティングにおける機能
- (6) インプリンティングの成立が個体の社会性に与える影響と「候補遺伝子」の関与

3. 研究の方法

- (1) 視覚的インプリンティングにおける他個体の影響

われわれのこれまでの研究で実績のある視覚的インプリンティングの行動実験装置を一部改変して使用した。従来のプロトコルに従い、液晶画面にインプリンティング刺激として動く図形(赤四角)を映し、P1 のヒヨコに 10 分間提示してトレーニングを行った。評価では、インプリンティング刺激(赤四角)と、無関係の刺激(青丸)に対する追従・逃避反応を定量化した。トレーニングは、2 羽のヒヨコを 1 羽ずつ回し車に入れ、互いが右または左に見える状態、隣の回し車に入れたボールが右または左に見える状態、あるいは 1 羽のみ、のいずれかの条件で行い、その後インプリンティングの成績を比較した。なお、隣のヒヨコが見える状態で評価を行ったものも用いた。

- (2) 最初期遺伝子 cFos の発現を指標にしたインプリンティング行動における社会性関与部位の探索

上記(1)の装置を使用したが、2 羽のヒヨコは互いが見えないように間に不透明の仕切り板を置いた。P1 のヒヨコを用いて、実験群にはトレーニングで赤四角を 30 分間提示し、対照群には、何も映さない暗い液晶画面を提示した(コントロールトレーニング)。実験群では刺激図形(赤四角)に対するインプリ

ンティング行動が成立するが、対照群では成立しない。1 時間後の脳を用いて、組織化学的方法により最初期遺伝子である cfos の発現について、実験群と対照群の間で発現量の異なる部位を特定し、「候補部位」とした。

(3)破壊実験による「候補部位」のインプリンティングへの関与の確認

同定された「候補部位」について、イボテン酸を微量注入することにより、神経細胞を破壊し、インプリンティング行動成立への影響を調べた。

(4)社会性関連部位で発現する遺伝子のマイクロアレイを用いた同定

30 分間のインプリンティングのトレーニングを行った実験群と、コントロールトレーニングを行った対照群を準備し、それぞれから社会性に関連する「候補部位」や VW-IMM 回路の部位を切り出し、マイクロアレイ解析を行った。対照群と比較して実験群で有意に発現が多いもの、あるいは少ないものをピックアップし、「候補遺伝子」とした。

(5)個体の発達とトレーニングに伴う「候補遺伝子」の発現量変化と発現部位の解析

社会性に関与することが予想される各「候補遺伝子」に対するプライマーを設計し、リアルタイム PCR により、手始めに VW における発現を調べた。インプリンティングの臨界期中(P1)と終了後(P7)、さらにトレーニング群とコントロールトレーニング群間での遺伝子発現を比較した。また、各「候補遺伝子」について Insitu ハイブリダイゼーションにより、臨界期中と終了後、さらにトレーニングとコントロールトレーニング群間での発現部位の比較を行った。

(6)「候補遺伝子(分子)」のインプリンティングに対する働き

「候補遺伝子」の産物に対応する合成ペプチドをヒヨコの VW に注入することで、インプリンティング学習に対する促進効果を調べた。促進効果は、短時間トレーニングによるインプリンティングの成立の有無を指標とした。さらに、臨界期終了後に注入した時の、インプリンティング学習に対する効果を調べた。

(7)候補分子の機能解析

この候補遺伝子産物のペプチドと受容体が結合して機能するかを調べるために、予測された受容体遺伝子をヒヨコ脳からクローニングして培養細胞に発現させ、合成ペプチドを加えた時の細胞内情報伝達物質である cGMP の産生量を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1)インプリンティングにおける社会性促進

と側性化

互いが見える状態で 2 羽のヒヨコに赤四角を刺激としてトレーニングを行うと、右側に他個体を見ていた左側の個体のインプリンティングが促進される傾向があった。一方、左側に他個体を見ていた右側の個体では、他個体が見えることでインプリンティングが抑制される傾向が見られた。ニワトリヒナのインプリンティングでは、右目からの視覚情報が重要であり、視神経はほぼ完全に交差しているため、右目由来の視覚情報は左脳で処理されることが知られている。右目でインプリンティング刺激だけでなく他個体も見ることで、社会性に何らかの影響が及んでインプリンティングが促進されたと考えられた。

(2)インプリンティング行動における社会性関与部位

視覚的インプリンティングのトレーニングあるいは刺激提示の無いコントロールトレーニングを 30 分間行った個体を用いて終脳での cFos 発現を比較したところ、情動を司ることが知られている扁桃体での発現の違いが示唆された。詳細な解析のために、扁桃体の各領域を特異的に可視化できるプローブが必要となった。そこで、マウスの扁桃体を構成する核群で特異的に発現する遺伝子 (Zirlinger et al., 2001) のニワトリホモログの遺伝子配列を使いそれらの発現を insitu ハイブリダイゼーションで調べたところ、ニワトリの扁桃体の亜核の識別に役立つ数種の有用な遺伝子が見つかった。これらのマーカー遺伝子の発現も考慮した結果、インプリンティングの有無で扁桃体のテニア核(内側の核)や皮質核で cFos 発現細胞の分布の違いが示唆され、分布領域と細胞数を定量的に調べる目途を立てることができた。

なお、ニワトリの扁桃体のテニア核や内側部は、VW-IMM 経路を構成する IMM を含む領域と連絡があることが報告されている (Csillag et al., 1994)。

(3)破壊実験による「候補部位」のインプリンティングへの関与の確認

上記の結果から、扁桃体に焦点を当てて実験を進めることとした。右目からの情報は左脳で処理されることに基づき、左脳の扁桃体をイボテン酸の注入により破壊し、左目を覆って右目のみでインプリンティングのトレーニングと評価を行った。扁桃体が破壊されたヒヨコでは、インプリンティングの成績が悪くなる傾向が見られているので、扁桃体内の破壊部位とインプリンティングの成績との関係を詳細に検討している。

(4)社会性関連部位で発現する遺伝子の同定と発現変化

マイクロアレイの結果から、インプリンティングのトレーニングにより VW と扁桃体の両方で発現が変化する複数の遺伝子をピッ

クアップし、VW と扁桃体での発現を確認した。VW と扁桃体の両方で興味深い発現パターンであった利尿ペプチドに注目することにした。文献やニワトリゲノムの情報を調べたところ、このペプチドには3種類の類似ペプチドがあり、受容体も3種類あることがわかった。これらの遺伝子は、どれも VW と扁桃体で発現していたが、特に3番のペプチドはVW-IMM 経路に沿ったユニークな発現をしていた。この3番のペプチドはインプリンティングの臨界期中であるP1では発現が高いが、P7では発現が低下し、インプリンティングのトレーニング後には発現が増加していた。

(5)「候補遺伝子(分子)」のインプリンティングに対する働き

P1のヒヨコ脳に3番のペプチドの類似ペプチドを注入して、通常より短いインプリンティングのトレーニングを行ったところ、インプリンティングの成立が促進された。さらに臨界期終了後のP7のヒヨコでも、類似ペプチドを脳に注入するとインプリンティングが成立することが明らかとなった。雌雄での違いも観察された。

(6)候補分子の機能解析

この利尿ペプチドは受容体に結合して機能を発揮すると考えられたが、ニワトリではこの点に関する情報が皆無であった。そのため、受容体を培養細胞に発現させて、この利尿ペプチドに対する反応を調べた。クローニングしたニワトリの受容体1と2の遺伝子から予想されたアミノ酸配列を比較すると相同性は約61%であり、ニワトリとヒトの受容体1の相同性は約74%、受容体2の相同性は80%であった。ニワトリの受容体1と2を別々に発現させた培養細胞を作製し、3種類の合成ペプチドを加えて産生されたcGMPを測定した。その結果、3番のペプチドはどちらの受容体にも高い親和性で結合し細胞内シグナル伝達系を駆動することが明らかとなった。

(7)今後の展望

感受性期にあるヒヨコ脳のVWやIMMでは、インプリンティング学習を促進する分子がいくつか働いていることがすでに知られている。本実験では、扁桃体でも発現する新たな分子の手がかりを得た。この分子の脳での機能の多くは、哺乳類でも未だ知られていない。そのため、インプリンティングに限らず、発達期における様々な社会性行動に影響を与える因子の発見につながることを予想される。さらに、学習による記憶の形成と社会性の獲得に必要なそれぞれの回路の結びつきが明らかになると予想される。インプリンティング学習は、学習の成立が容易であること等、ヒトの幼児期の学習と同様の特色を持つ。そのため、本研究を発展させることで、幼児の学習障害や社会への不適応の原因究

明や、学習効果の向上、社会性の獲得や発達を促進するための方法についての端緒が得られることが期待できる。

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2件)

(1)Nakamori, T., Kato, T., Sakagami, H., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2017) 査読有 Regulation of visual Wulst cell responsiveness by imprinting causes stimulus-specific activation of rostral cells. Scientific Rep., 7, Article number: 42927, DOI:10.1038/srep42927.

(2)Vibulyaseck, S, Luo, Y., Fujita, H., Oh-Nishi, A., Ohki-Hamazaki, H. and Sugihara, I. (2015) 査読有 Compartmentalization of the chick cerebellar cortex based on the link between the striped expression pattern of aldolase C and the topographic olivocerebellar projection. J. Comp. Neurol., 523:1886-1912. DOI: 10.1002/cne.23769.

[学会発表](計11件)

(1)千葉ゆりの(2017)
刷込み行動により活性化される扁桃体領域とナトリウム利尿ペプチドの発現
第41回鳥類内分泌研究会

(2)加藤智美、白石純一、前川文彦、浜崎浩子(2017)
遺伝的・内分泌制御の相互作用によりニワトリ初期脳に生み出される性差の探索
第42回日本比較内分泌学会大会

(3)Ohki-Hamazaki, H. (2017)
Characterization of natriuretic peptides and their receptors in the avian brain. International Society for Neurochemistry meeting

(4)加藤智美、白石純一、浜崎浩子(2016)
遺伝的制御により形成されるニワトリ脳の性的二型の探索
第41回日本比較内分泌学会大会

(5)浜崎浩子(2016)
ホルモンによる脳の可塑的発達と行動
第41回日本比較内分泌学会大会

(6)浜崎浩子(2016)
「柔軟に発達する幼児の脳の謎を追って」

日仏会館一般公開シンポジウム「すこやかな
脳の発生・発達とそれを育む環境」

(7)浜崎浩子 (2016)
脳の性分化における性ホルモンの役割 - 動物をモデルとした解析から
第 50 回日本小児内分泌学会学術集会、第 9
回アジア太平洋小児内分泌学会

(8)中森智啓 (2016)
刷込み行動の学習効率を上昇させるペプチドについて
第 40 回鳥類内分泌研究会

(9)千葉ゆりの (2016)
ニワトリの刷込み行動を制御する領域における遺伝子の発現
第 40 回鳥類内分泌研究会

(10)Nakamori, T. (2016)
Parvalbumin cells are activated by juvenile learning and contribute to the long-term modification of neural pathway.
第 39 回日本神経科学大会

(11)Ohki-Hamazaki, H. (2016)
Imprint learning modulates activity of the visual Wulst cells in chicks.
Avian Model Systems 9: A New Integrative Platform

〔図書〕(計 3 件)

(1)浜崎浩子 (2016)
鳥類の性行動とホルモン
「ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ 求愛・性行動と脳の性分化」
pp. 53-69、裳華房.

(2)Ohki-Hamazaki, H. (2015)
Bombesin-Like Peptide Family.
In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", pp. 189-190, Academic Press, Elsevier.

(3)Ohki-Hamazaki, H. (2015)
Neuromedin B..
In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", pp. 193-194, Academic Press, Elsevier.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.clas.kitasato-u.ac.jp/bio/personal/hamazaki/index16a.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者

浜崎 浩子 (OHKI-HAMAZAKI, Hiroko)
北里大学・一般教育部・教授
研究者番号 : 00211483

(2)連携研究者
加藤 智美 (KATO, Tomomi)
北里大学・一般教育部・講師
研究者番号 : 10327455