

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07945

研究課題名(和文) 刷り込み学習の臨界期を決定する脳内分子機構

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 (Yamaguchi, Shinji)

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) 3,800,000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。その結果、臨界期を過ぎたニワトリヒナ脳では、T3静脈注射によりIMHA領域でWnt-2b mRNAが上昇した。そこで、薬理的にIMHA領域でWntシグナル伝達を阻害したところ、T3による感受性期の回復が阻害された。この結果は、Wntシグナル伝達がT3の下流で感受性期間の開始に重要な役割を果たすことを示している。

研究成果の概要(英文)：Filial imprinting is the behavior observed in chicks during the sensitive or critical period of the first 2 to 3 days after hatching; however, after this period they cannot be imprinted. Our previous study showed that temporal augmentation of the endogenous thyroid hormone (T3) in the telencephalon, by imprinting training, starts the sensitive period just after hatching. Intravenous injection of T3 enables imprinting of chicks, even when the sensitive period has ended. However, the molecular mechanism of how T3 acts as a determinant of the sensitive period is unknown. Here, we show that Wnt-2b mRNA level is increased in the T3-injected telencephalon. Pharmacological inhibition of Wnt signaling in the intermediate hyperpallium apicale (IMHA), which is the caudal area of the telencephalon, blocked the recovery of the sensitive period following T3 injection. These results indicate that Wnt signaling plays a critical role in the opening of the sensitive period downstream of T3.

研究分野：神経科学

キーワード：刷り込み 甲状腺ホルモン 感受性期

## 1. 研究開始当初の背景

ある種の学習は、生後の限られた時期（臨界期）にしか習得できず、その時期を過ぎると習得できなくなる。刷り込み学習は、鳥類ヒナが、孵化直後に親を記憶する早期学習の典型的な例で、臨界期を伴う学習の分子メカニズムを解析するのによりモデルとなる。刷り込み学習は、スパルディングにより 19 世紀には既に報告されていたにもかかわらず (*Macmillan's Magazine* 27, 282-293 (1873))、140 年間以上、刷り込みの臨界期を開始する因子は不明であった。

代表者らは、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 (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、ヒナはよく刷りこまれた。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 (山口ら, *Nat. Commun.* (2012))。

以上のような経緯に基づき、本研究では学習臨界期を開く  $T_3$  の作用メカニズムを分子レベル、神経微細構造の変化のレベルで解明する。

## 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 (*Nat. Commun.* (2012))。本研究では、独自に確立した *in vivo* 遺伝子導入法を用いて、 $T_3$  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で解明する。

## 3. 研究の方法

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、 $T_3$  と同様に臨界期を再び開くメモリープライミング活性を有することを見出した。Rho ファミリー情報伝達経路に関わる様々な阻害剤を臨界期が閉じたヒナ脳に注入して、メモリープライミング活性を持つかどうか検討し、メモリープライミングの情報伝達経路を明らかにする。さらに、RhoGTPase ファミリー以外の臨界期開始に関わる遺伝子群を cDNA マイクロアレイ解析により網羅的に同定する。また、 $T_3$  の脳内注入によりリン酸化が亢進する蛋白の同定をフォスホプロテオーム解析により行う。これらの解析を通して、 $T_3$  の細胞内情報伝達機構の全貌を明らかにする。

## 4. 研究成果

私たちは、刷り込み開始後、甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) が脳内へ急速流入し、臨界期を開く決定因子となること、そして遺伝子的発現を伴わず速やかに作用し (nongenomic)、ヒナは記憶を獲得することを発見した。平成 27 年度では、学習臨界期の開始を決定する分子機構の解明を試みた。私たちは、 $T_3$  の脳内注入によりリン酸化が亢進する蛋白の同定を

フォスホプロテオーム解析により行った。その結果、nucleotide diphosphate kinase2 (NDPK2) のリン酸化が亢進されることが分かった。NDPK2 のキナーゼ活性を特異的阻害剤により抑制すると、刷り込みの感受性期が再び開かなくなることから、T<sub>3</sub> の下流で、臨界期を再び開く情報伝達経路に関わっていると考えられた。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、T<sub>3</sub> と同様にメモリープライミング活性を有することを見出している。今後は、Rho キナーゼ情報伝達経路と NDPK2 の関連を調べていこうと考えている。この成果は、Neurosci Lett. (2016) 612:32-37 にて報告した。

昨年度までに、刷り込み感受性期を開くのに必要な脳領域も新たに同定した。これまで哺乳類の連合野と相同な脳領域 Intermediate Medial Mesopallium (IMM) は刷り込みの記憶の獲得に必須であることが分かっていた。我々は IMM の下流で働く脳領域の一つとして、Intermediate Medial hyperpallium apicale (IMHA) に着目した。T<sub>3</sub> が IMM で働いた後、IMM で刷り込みの記憶が形成され、IMHA は IMM からの神経投射を介して情報を受け取ることが明らかとした。IMHA は、一度覚えた刷り込みの記憶を思い出すこと（想起）に必要であることが分かった。この成果を、Neuroscience 誌に報告した(2015)。本年度は、cDNA マイクロアレイ解析のより、T<sub>3</sub> の静脈注射によりヒナ大脳で遺伝子発現が上昇する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、臨界期を過ぎたニワトリヒナ大脳では、T<sub>3</sub> 静脈注射によりいくつかの遺伝子発現が上昇しており、そのうちの 하나가 Wnt-2b であった。In situ hybridization の結果、Wnt-2b mRNA は IMHA 領域でそこで、薬理的に IMHA 領域で Wnt シグナル伝達を阻害したところ、T<sub>3</sub> による感受性期の回復が阻害された。この

結果は、Wnt シグナル伝達が T<sub>3</sub> の下流で感受性期間の開始に重要な役割を果たすことを示している。その成果は、Hormones and behavior (2018) に掲載された。

臨界期を有する学習では、孵化直後の親子間の刷り込みの他にも、ソングバードにおける歌学習がある。ニワトリなど巣を作らない鳥のヒナは、卵からかえるとすぐに歩くことができる。そして親鳥の後をついて行って、餌を食べることができる。それに対してソングバードなどの巣を作る鳥のヒナは、卵からかえった後自分では餌をとることができず、親の世話を必要とする。これらのヒナには刷り込みが存在しない。刷り込みが存在しない鳥でも甲状腺ホルモンは、学習に重要な機能を果たすのだろうか。ソングバードの一種であるキンカチョウの脳内甲状腺ホルモンの量変化をラジオイムノアッセイにより定量した。その結果、オスとメスで T<sub>3</sub> はピークを迎える時期が異なっていた。キンカチョウのオスは、親から歌を習い、自分で親の歌の真似をして習得する時期がある。メスは歌を歌わず、このような歌の習得はない。T<sub>3</sub> の脳内での濃度変化のオスとメスの違いが、歌学習に影響しているのかもしれない。この結果は、PloS one 2017, 12, e0169643 に報告した。

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5件)

Yamaguchi S, Aoki N, Matsushima T,

Homma KJ

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*)

*Hormones and Behavior* 2018 102:120-128.

査読あり

doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.05.011.

Takemura Y, Yamaguchi S, Aoki N, Miura M, Homma KJ, Matsushima T.

Gene expression of Dio2 (thyroid hormone converting enzyme) in telencephalon is linked with predisposed biological motion preference in domestic chicks.

*Behav Brain Res.* 2018 Apr 25;349:25-30.

doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.039.

査読あり

Yamaguchi, S., Hayase, S., Aoki, N., Takehara, A., Ishigohoka, J., Matsushima, T., Wada, K., Homma, K. J.

Sex Differences in Brain Thyroid Hormone Levels during Early Post-Hatching Development in Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*).

*PloS one* 12, e0169643 (2017).

doi: 10.1371/journal.pone.0169643.

査読あり

Yamaguchi, S., Aoki, N., Takehara, A., Mori, M., Kanai, A., Matsushima, T., Homma KJ

Involvement of nucleotide diphosphate kinase 2 in the reopening of the sensitive period of filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*).

*Neurosci. Lett.* 612, 32-37 (2016).

doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.004.

査読あり

Aoki, N., Yamaguchi, S., Kitajima, T., Takehara, A., Katagiri-Nakagawa, S., Matsui, R., Watanabe, D., Matsushima, T., Homma, KJ.

Critical role of the neural pathway from the intermediate medial mesopallium to the intermediate hyperpallium apicale in filial

imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*).

*Neuroscience* 308, 115-124 (2015).

doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.014.

査読あり

[学会発表](計6件)

武原顕彦、青木直哉、山口真二、本間光一  
ニワトリヒナにおいて甲状腺ホルモンは学習  
経験依存の学習促進効果をもたらす

日本動物学会第 68 回関東支部大会

平成 28 年 3 月

青木直哉、山口真二、佐伯百合子、武原  
顕彦、松島俊也、本間光一

GABA-A 受容体と GABA-B 受容体の機能的な役割の転換が鳥類刻印付けの学習臨  
界期を決定する

第 39 回日本神経科学大会 (横浜)

平成 28 年 7 月

青木直哉、山口真二、武原顕彦、松島俊也、  
本間光一

刷り込みの課題転換学習に対する促進効  
果

日本動物学会第 88 回大会 (富山)

平成 29 年 9 月

山口真二、青木直哉、松島俊也、本間光  
一

甲状腺ホルモンはアクチンダイナミクスを制  
御し、閉じた刷り込み臨界期を開く

日本動物学会第 88 回大会 (富山)

平成 29 年 9 月

山口真二、青木直哉、本間光一

Critical role of the novel neural pathway in  
the cerebrum in filial imprinting of  
newly-hatched domestic chicks

Integrative Network Linking Multiple Brain  
Areas for Behavioral Adaptation

平成 29 年 3 月、同志社大学(京都)

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

Thyroid hormone-mediated actin dynamics  
regulate the reopening of the sensitive  
period of filial imprinting in chicks

Society for Neuroscience, 47th Annual  
Meeting (Washington, D.C., USA)

平成 29 年 11 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 真二 (YAMAGUCHI, Shinji)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：60398740

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

青木 直哉 (AOKI, Naoya)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：50525334

(4) 研究協力者

該当なし