

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K04430

研究課題名(和文) 初期学習における記憶の固定化と並行処理メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of memory acquisition and consolidation in filial imprinting in domestic chicks

研究代表者

菅 理江 (Suge, Rie)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10342685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：刻印付けは、孵化直後の短時間の対象への暴露で成立するが、その固定化のプロセスは8-10時間後に、学習獲得に必須の部位であるintermediate and medial mesopallium(IMM)での神経可塑性を伴う反応と関連している。Fosタンパク陽性細胞の検出によって確認されたこの現象は、主に左側のIMMで起こることがわかっているが、右のIMMにおいても、この時期に陽性細胞の増加が左側よりも遅い時間帯に起こる傾向が観察され、この増加は学習強度との関連性は見られなかった。また新奇刺激を提示することによる干渉効果は各刺激への走行距離の変化によって観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

刻印付けは生得的なバイアスを基盤とした初期学習であり、人間の発達期の記憶や言語獲得などの臨界期をもつ学習メカニズム解明の基盤となる。さらに発達初期の経験(生育環境)が潜在的に成熟後の行動に影響を与えるメカニズムの解明は社会性の発達などヒトの豊かな育成という側面の基礎的な知見が得られる。

本研究の成果は初期学習の獲得と固定化のプロセスがある程度並行的に処理されており、新奇刺激による干渉効果も訓練刺激への嗜好を強く抑制するものではなく、刺激それぞれに対する処理が進んでいくメカニズムを示唆している。これらの結果はより一般的な短期記憶から長期記憶への並行処理のメカニズムの理解にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Imprinting is a type of leaning whereby social preference becomes restricted to an object following exposure to that object. In domestic chicks, this preference is maintained by consolidation process, in which sleep have an important role. Imprinting lead to an increase in the proportion of neurons in the intermediate and medical mesopallium (IMM) that are selectively responsive to an imprinting stimulus. Around the same time as this increase, number of Fos-immunopositive neurons in the IMM increased, 8-11 h after the start of exposure. Disturb of sleeping in this period inhibited this increase. There were more Fos-positive cells in the left than right IMM. This side difference decreased from 8.8 h to 10.8 h, since Fos-positive cells increased in the right IMM.

We examined effect of exposure to a novel stimulus before the consolidation on chick's preference. This procedure affects approach activity to each stimulus although preference for the first stimulus was kept on the next day.

研究分野：行動神経科学

キーワード：初期学習 記憶 刻印づけ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一時的な記憶が、しっかり定着するまでの間にはどのようなメカニズムがあるのだろうか。定着する前に別の新しいものに触れてしまったら、記憶はどのように影響を受けるのだろうか？

刻印付けとはニワトリやアヒルなどの早成鳥類で、孵化直後に見た物体に対して社会的偏好を形成する現象である。臨界期の存在が特徴的であり、獲得した偏好は長じて成熟後の性選択にも影響を与える[1]。このことから、この学習プロセスは、非常に短い時間に成立し、他の刺激の干渉に対して強固であると長い間考えられてきた。しかし実際には、特徴の獲得のプロセスは15分以内に行動でも特定の脳部位の神経活動としても捉えられるのに[2, 3]、その後の変化は決して線形的なものではなく、質的な変化がみられること[4]、臨界期の間であれば他の対象に対する偏好を獲得できること[5]などがわかってきた。臨界期の間、そして刻印付けが成立する間にどのようなメカニズムが記憶の固定化を進めていくのかを考えたい。

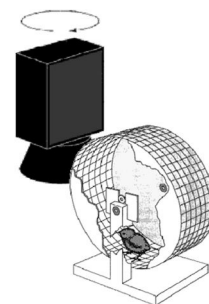


Fig 1: 刻印付けトレーニング

記憶プロセスの初期において、関連する神経細胞がどのようなタイミングで応答し、神経可塑性を伴う記憶の固定を引き起こすかは、即初期遺伝子(Immediate early gene: IEG)の発現を細胞の活動性マーカーとした研究が進み、可塑性のカスケードのトリガーされるタイミングが(それがどのレベルの事象かは難しい問題であれ)明らかになりつつある。このような記憶研究において難しい点は、神経細胞の変化・応答を特定の事象に結びつけにくいという点であり、特に記憶の干渉を検討する際には、記憶の獲得と既に学習された事象の再認の区別がつきにくいという点が問題となる。そのためカスケードのトリガーを検討する研究では「新奇性」に対する偏好を用いたモデルや「新奇性」のある環境の挿入を用いた記憶実験が多く扱われている(例えば[6])。従来の繰り返すタイプの学習ではなく単回の暴露で事象との結びつきが比較的明確であり、それらに関連するドーパミン放出が記憶に関連する脳部位に影響を与えることが明らかになってきたためである。

本研究では、実験室内孵化によって、学習開始まで視覚経験のまったくないヒヨコを用いた刻印付けを用いている(Fig.1)。この視覚環境のコントロールにより、特定の物体に対して反応を示した細胞群を特定し、記憶の初期プロセスと行動との対応の検討が可能である。刻印付けに必要な脳部位である intermediate and medial mesopallium (IMM) では刻印付け開始から90-120分後をピークとした学習強度依存的な Fos 発現が見られ[7, 8]、申請者らの研究によってこれらの発現は刺激提示開始後15分以内のイベントに関連する事が明らかになった[2, 3](Fig. 2)。Fos を含め IMM では刻印付け直後から臨界期の終了にむけて様々な神経細胞の可塑やシナプスの変化を示すカスケードが報告されてきた(Fig. 3)。脳損傷実験から左右半球の IMM には、刻印付けにおいてそれぞれ異なる機能があることが指摘されており、獲得には左、長期的維持には右の IMM が必須であると考えられている。しかしながら、右の IMM はいわゆる長期貯蔵庫ではなく、長期的な維持に必須ではあるが、学習後8時間前後経過と部位の損傷によっても獲得した学習が損なわれないことから、記憶の固定化のプロセスそのものにかかわる場所と考えられている。Horn らは右 IMM での固定化プロセス後に記憶が保存される場所を仮に「S」と名付け、そのメカニズムを検討してきたが、今のところはっきりとした候補は提案されていない[1]

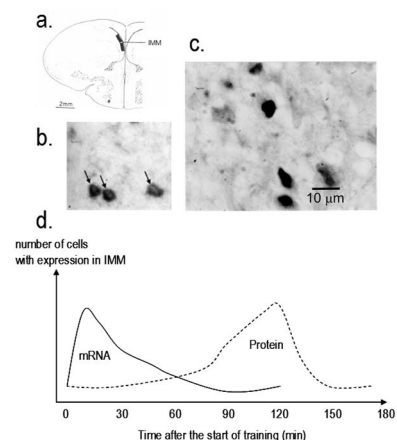


Fig 2: a. IMMの位置(ヒヨコ脳水平断) b. *c-fos* mRNA陽性細胞 c. Fos抗体陽性細胞 d. 刻印付けによる*c-fos*およびFosの発現タイムコース

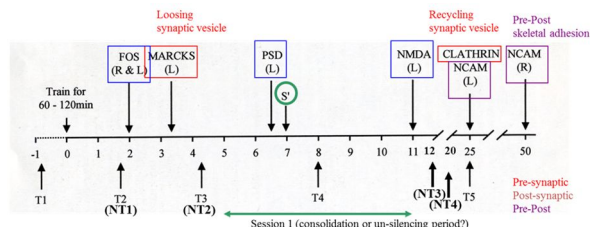


Fig. 3: 実験場面での刻印付け後に起こるシナプス可塑性に関連する事象 (Horn, 2004, Nat Rev Neurosci, 5:108-120 より加筆変更)。横軸は刻印付け後の経過時間 (h)を示し、Lは左 IMM, Rは右 IMM での事象を示す。矢印で示される T1, NT1 等の記号は先行論文における神経細胞活性計測のタイミングを示す。

2. 研究の目的

初期学習における記憶の固定化メカニズムの解明が本研究の目的である。臨界期を持つ初期学習はその発達初期に獲得した記憶が長期にわたって保存され、成熟後の行動にも影響を与える。誕生直後の初期学習であるヒヨコの刻印付けでは、固定化 (consolidation) のプロセスは学習後8-12時間後に起こることが分かっている[9]。これまでの研究で明らかにした刻印付けの脳部位

特異的な神経細胞活性とグルタミン酸受容体の分布特性に着目し、1)学習獲得に必須の脳部位 IMM のうち固定化に関連すると考えられる右側 IMM の神経細胞活性のタイミングを検討する。2) 二つの刺激を時間差で提示することで獲得と固定化のメカニズムの差を同一個体上で比較する、ことから固定化のメカニズムを明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1)行動実験装置を用いた刻印付け実験

行動実験装置を使った刻印付けにおいては、ヒヨコは遮光した孵卵器で孵化され、孵化後 36-48 時間で実験が行われる。一羽ごとに輪回しに入れられ、人工的な刺激(回転する赤い箱、青い筒等、Fig.1 参照)の前におかれた。提示している間、ヒヨコは刺激に向かって走り、数時間後に見せた刺激と新奇な刺激を提示する偏好試験を行うと訓練刺激に対する偏好を示す。この時、学習強度は、テスト中の走行距離に対する訓練刺激に向かって走った距離の相対値によって示される。睡眠の阻害については、輪回しの輪にモーターを付け、ランダムなタイミングで(平均して 15 分に一回程度)強制的に輪を動かし、被験体を深く眠らせないようにした。コントロール群においては、同じ時間帯に輪回しを固定した(自分が動いても輪が揺れない)。なお、一部の実験では立体刺激の代わりに、液晶モニターをもちいた映像による刺激を導入し実験を行なった。

(2)IMM における免疫組織学的検討

被験体は麻酔、心臓より灌流脱血後 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定した。凍結切片作製後、Fos およびチャンネルタンパクの免疫組織化学解析を行った。20 μ m の切片上にて、左右の IMM における陽性細胞数を同時に染色する。すべての切片に統一の閾値に基づいて、コンピュータによる画像解析ソフトを用いて自動的にカウントした(実施者はサンプルの実験条件を知らされない状態で閾値を決定した)。IMM 以外に対照箇所として、学習や運動、ハンドリングによる変動が予想されない Neo striatum についても計測を行い、個体の活性の違いによる変動を検討した。さらに学習関連性はないが刺激提示によって Fos 発現がみられる海馬(哺乳類における海馬と機能的に異なる)と考えられ、刻印づけでは学習対象に特異的な神経活動は海馬では記録されない)と、哺乳類の視覚野に相当し、学習直後に学習に関連した神経細胞活性が報告されている visual Wulst においても検討を行った[10]。

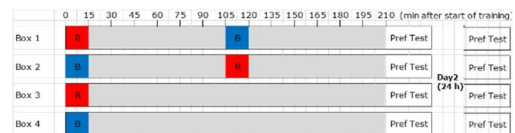
4. 研究成果

(1)刻印付け後の新奇刺激への暴露による偏好への干渉

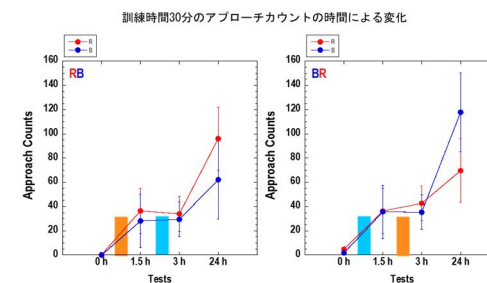
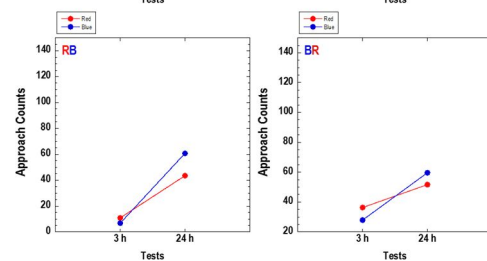
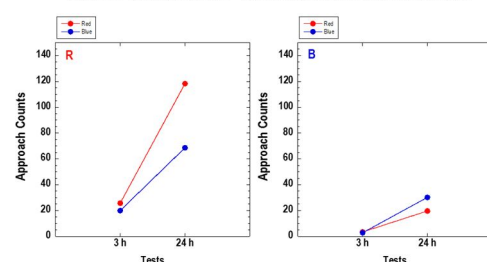
刻印付け訓練後に、訓練で用いていない新奇刺激を同じ時間訓練することによって第一の刺激に対する偏好がどのように変化するか検討した。

・訓練時間による違い(15分間と30分間)

15 分間の訓練は、少なくとも翌朝まではその偏好を維持することは明らかにされている。干渉効果検証するために、臨界期内で被験体を 2 種類の刺激に時間を空けて暴露した(右図)。固定に関わる時期よりも早く、かつ訓練後十分な時間(第一の刺激による訓練から次の刺激訓練までの時間と同じ時間。訓練直後は直前にみた物を選びやすい傾向が知られている)を空けたところで 2 つの刺激の偏好をテストした。この場合、偏好テスト(プレファレンステスト)は相対値で示されるため、テスト中のそれぞれの刺激への走行距離(アプローチカウント)の実数も検討することにより、それぞれの刺激に対するアプローチの度合いの変化を検討した。15 分の訓練での実験では、105 分後に新奇刺激を導入すると、導入しない場合に比べて、第一の刺激に対する偏好が 24 時間後のテストで有意に弱まった。アプローチカウントの実数で検討すると、1 回目と 2 回目のテストの比較で全体に増加傾向がみられたが、有意な変化は観察されなかった。これらの結果から、15 分のトレーニングでは臨界期内での新奇刺激の提示がある程度、最初の刺激への偏好に対して干渉効果をもつということがわかった。訓練時間を 30 分に延ばした実験ではプレファレンステストの成績に違いは見られなかった。アプローチカウントを詳細に検討したところ、新奇刺激を挿入することで 3 時間から 24 時間後の変化の仕方が変化している傾向が観察された。さらにより細かく 0, 1.5, 3, 24 h での変化を確認したところ、固定化の前に提示された新奇刺激に



実験プラン (訓練時間15分のケース。Boxは実験箱で各3羽同時に訓練される)



新奇刺激の提示によるアプローチカウントの変化の詳細

よって一時的に刻印付け刺激に対するアプローチが抑制されるものの、固定化の期間後に上昇していく様が確認できた。

・プライミングによる違い

今回の実験ではヒヨコの孵化率が低い時期があり、そのためにヒヨコの自発的活動量が通常よりも低いために刻印付けの学習強度が弱いという結果をもたらした。そのため、トレーニングに入る前に一定時間ライトを当てるプライミングというプロセスを導入した。プライミングは確かにアプローチカウントの増加に繋がったが、刺激によってその効果に違いが見られた。

(2)固定化プロセスにおける右側 IMM の役割

刻印付け後の固定化に関連する時間帯において、IMM の神経細胞活性がどのようになっているか Fos 陽性細胞数を睡眠群と睡眠妨害群で比較し、右側の学習強度との関連性とピークポイントについて検討した(Fig.4)。

2つのサンプリングタイムとサンプリングフレームを設定した。睡眠群と睡眠妨害群を比較すると、睡眠群において有意に Fos タンパク陽性細胞の増加が見られた[11]。そしてその増加は左の IMM で顕著であった(Fig.5)。さらに、学習強度(5時間後のプレファレンステスト)と Fos 陽性細胞数との関連を詳しく見ると(Fig.6) 全体として学習強度に比例して陽性細胞数は増加し、その関係性に明確な左右差はないこと、睡眠妨害群の方がむしろ学習強度との関連性が強く、睡眠群ではあまり差が見られない。左右それぞれについて解析すると、左が2つのサンプリングタイムの平均はさほど変わらずであるのに対し、右は8.8 10.8hの間に学習強度との関係性はさほど変わらずに増加傾向であることがわかる。このことは、右の IMM の増加は10.8hより後に来る可能性があり、左右の Fos 発現のタイムコースが異なっていることを示している。

以上の結果はフレーム1のデータの検討から得られた結果である。フレーム2および2つのフレームの合計を用いた解析では同様の傾向がみられるものの、変化や条件による違いは顕著ではなかった。IMM 内の部位としては、背側より腹側部分が固定化に関連していると考えられる。Neo striatum, visual Wulst いずれの部位も IMM と相互にあるいは連動した変化はない。

これらのことから、刻印付けの記憶固定化のプロセスにおいて左の IMM が重要な役割を担っていて、それが神経細胞の可塑性を伴うものであることに加え、右の IMM についてもタンパク発現の仕方が左とかなりちがいで固定化において独立した役割を担っている可能性が高い。今回、Fos とグルタミン酸受容体の分布特性の行動実験による偏好の強度との関わりは明確な結果を得ることは出来なかった。

Fig.6 : 学習強度と Fos 陽性細胞数の検討
 (左上) 左(右サイド、上右) 睡眠群、睡眠妨害群 (左下)
 左 IMM における 8.8 と 10.8 時間での関係、(下右) 右 IMM における 8.8 と 10.8 時間での関係を検討した

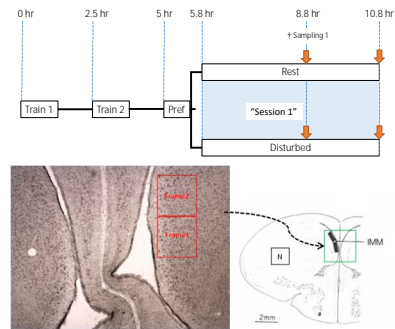


Fig.4 : 2つのサンプリングタイムとサンプリングフレーム
 実験のスケジュールは1時間のトレーニングを2回同一刺激で行ったのち、睡眠条件を分けて検討した。サンプリングタイムは8.8hと10.8h後。タンパク発現にかかる時間を考えると約7-9時間後のプロセスが反映する。下の図はIMMのサンプリングフレームの位置を示している。

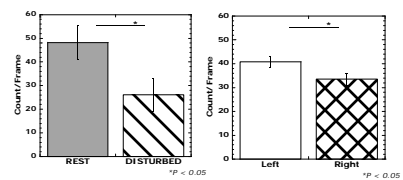
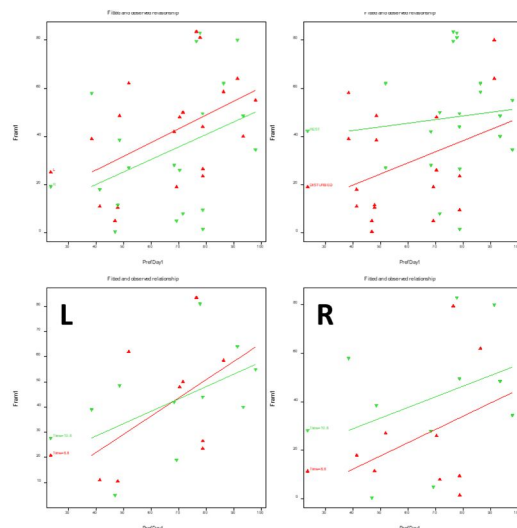


Fig.5 : 睡眠の妨害は Fos 陽性細胞数を抑制する
 左の IMM での増加がみられた



< 引用文献 >

Horn G, Pathways of the past: the imprint of memory, Nat Rev Neurosci, 2004, 108-20
 Suge R, McCabe BJ, Early stages of memory formation in filial imprinting: Fos-like immunoreactivity and behavior in the domestic chick, Neurosci, 123, 2004, 847-56
 Suge R, Kato H, McCabe BJ, Rapid induction of the immediate early gene c-fos in a chick forebrain system involved in memory, Exp Brain Res, 200, 2010, 183-188
 Horn G, Nicol AU, Brown MW, Tracking memory's trace, Proc Natl Acad Sci USA, 98, 2001, 5282-5287
 Bolhuis JJ, Batson P, The importance of being first: a primacy effect in filial imprinting, Anim Behav, 40, 1990, 472-483
 Duszkiwicz AJ, McNamara CG, Takeuchi T, Ganzel L, Novelty and Dopaminergic Modulation of Memory Persistence: A Tale of Two Systems, Trends Neurosci, 42, 2019, 102-114
 McCabe BJ, Horn G, Learning-related changes in Fos-like immunoreactivity in the chick forebrain after imprinting, Proc Natl Acad Sci USA, 91, 1994, 11417-21

Ambalavanar R, McCabe BJ, Potter KN, Horn G, Learning-related fos-like immunoreactivity in the chick brain: time-course and co-localization with GABA and parvalbumin, *Neurosci*, 93, 1999, 1515-24

Jackson C, McCabe BJ, Nicol AU, Grout AS, Brown MW, Horn G, Dynamics of a Memory Trace: Effects of Sleep on Consolidation, *CurrBiol*, 18, 2008, 393-400

Nakamori T, Sato K, Atoji Y, Kanamatsu T, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H, Demonstration of a Neural Circuit Critical for Imprinting Behavior in Chicks, *J Neurosci*, 30, 2010, 4467-4480

Suge R, Nicol AU, McCabe BJ, Fos-like immunoreactivity during sleep in a chick forebrain memory system after filial imprinting, 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018, Berlin

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 R Suge, A Nicol, B McCabe
2. 発表標題 Fos-like immunoreactivity during sleep in a chick forebrain memory system after filial imprinting
3. 学会等名 The 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 R Suge, A Nicol, B McCabe
2. 発表標題 Fos-like immunoreactivity in the intermediate and medial mesopallium during sleep after filial imprinting in the domestic chick
3. 学会等名 日本動物心理学会第78回大会
4. 発表年 2018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
研究協力者	マッケイブ ブライアン (McCabe Brian)	ケンブリッジ大学・Sub-Department of Animal Behaviour	
研究協力者	ニコル アリスター (Nicol Alister)	ケンブリッジ大学・Department of Physiology, Development and Neuroscience	