

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K03369

研究課題名(和文) 初期学習における記憶の固定化のトリガーを探る

研究課題名(英文) The triggers of memory consolidation in early learning

研究代表者

菅 理江 (Suge, Rie)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10342685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：学習の獲得から長期的な維持へのプロセスはどのように引き起こされるのだろうか？刻印付けは、誕生後の早い時期に特定の物体に対して偏好をしめし、追従する現象である。その固定化は学習開始後8-12時間に起こり、24時間後には強い偏好が確かめられる。獲得・維持に必須な脳部位である intermediate and medial mesopallium (IMM) では臨界期の間、獲得に関連した神経可塑性が様々なタイミングで観察される。獲得に伴って IMM の働きがどのように変化するか、即初期遺伝子 c-fos のタンパク発現を中心に検討したところ、左右の IMM の機能変化が学習獲得によっても起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒヨコの刻印付けを用いて、臨界期内の固定化によって、学習した物体の再認や新しい物体への神経科学的な反応の変化を示し、同一脳部位の機能的な変化を示唆した。記憶の獲得に伴う脳の形態的・機能的変化は初期学習のみならず一般的な記憶の短期記憶から長期記憶への並行処理への理解に役立つ。また刻印付けは生得的なバイアスを持つ初期学習であり、ヒトの幼少期の記憶や愛着形成、言語獲得等、臨界期を持つ学習メカニズムの解明に役立つ。特に初期経験が成熟後の人生に影響を与えるメカニズムは、昨今注目されている、様々な発達に関わる問題や社会性の発達への影響など、ヒトの多様なあり方の理解の基本的な基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Imprinting is a type of early learning, whereby social preference becomes restricted to an object. Chicks learn characteristics of the object and its preference for the object is maintained by consolidation with neural plasticity during a sensitive period. Imprinting leads to an increase in the proportion of neurons in the intermediate and medial mesopallium (IMM) that are selectively responsive to the stimulus. During the sensitive period, chicks can learn characteristics of stimuli other than the imprinting stimulus. Effect of new stimulus and re-exposure of learned stimulus on the neural activity in the IMM was investigated using Fos-like immunoreactivity. Number of Fos-positive cells increased both sides of the IMM after the first exposure. New stimulus exposure as the 2nd stimulus increases significantly that in the right IMM and trend in the other groups with experience of the first exposure. The first exposure may made different use of learning system for the second exposure.

研究分野：行動神経科学

キーワード：初期学習 刻印付け 固定化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

学習の獲得からその学習の長期的な維持につながるプロセスはどのように引き起こされるのだろうか？特に刻印付けや言語学習などの初期学習においては、誕生後の比較的早い特定の時期の経験が非常に長期間にわたって影響を及ぼすことが分かっている。この獲得から維持へのメカニズムを明らかにしたい。

刻印付けとはニワトリやアヒルなどの早成の鳥類で見られる、孵化直後に見た物体に対して追従行動を示し、社会的偏好を形成する現象である。初期学習の一つであり、孵化後数日の臨界期の存在が特徴的である。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]。このため、この学習は非常に短い時間に成立し、成立後は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。しかしながら、獲得からしばらくの間、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、新奇刺激に暴露されることで対象物への偏好が影響を受けるなどのことがわかっている[2, 3]。この影響を受ける時期が固定化 (consolidation) のプロセスと考えられる。刻印付けの固定化のプロセスは学習開始後 8-12 時間に起こり、24 時間後には対象物に対する強い偏好が確かめられる[1]。

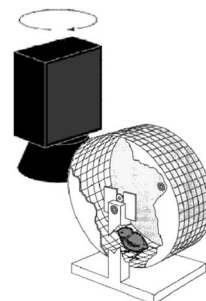


Fig 1: 刻印付けトレーニング

記憶・学習プロセスの初期に神経細胞がどのように応答し、可塑性を伴う変化が固定化につながるかは、即初期遺伝子(Immediate early gene: IEG)の発現を細胞の活動性のマーカーとして検討が進み、可塑性のカスケードがトリガーされるタイミングが、様々なレベルで明らかになりつつある。これらの記憶・学習研究の難点は神経細胞の応答・変性を特定の事象に結びつけることであり、特に記憶の新規獲得と獲得済みの事象への反応(再認)の区別は難しい。このため、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明確な、「新奇性」がカギとなる学習モデルが使われるようになってきた(例えば[4])。

本研究では遮光した孵卵器によって実験室内で孵化し、実験開始まで視覚経験がコントロールされたヒヨコを用いた刻印付けを使った(Fig 1)。この視覚経験の制限により、特定の物体に対して反応する細胞群の特定や行動との対応の検討が可能である。刻印付けの獲得と固定化までの維持に必須の脳部位である 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 (IEG のひとつ *c-fos* のタンパク発現)が見られ、私と共同研究者のこれまでの研究によって、この発現が刺激提示開始後 15 分以内のイベントに関連すること、150 分後には Fos 陽性細胞数はコントロールと同じレベルに戻ることがわかっている (Fig 2, [5, 6, 7])。学習獲得時の Fos 発現では両側の IMM で変化がみられるが、脳損傷実験から左右半球の IMM には昨日的な違いがあることが指摘されている[8]。獲得には左、長期的維持には右の IMM が必須とされ、刻印付け直後から IMM で見られる神経細胞の可塑・シナプスの変化を示すカスケードも左右で異なるタイミングで報告されているものが多い[1]。

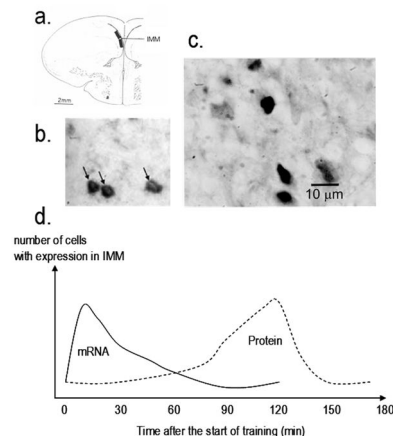


Fig 2: a. IMMの位置 (ヒヨコ脳水平断) b. *c-fos* mRNA陽性細胞 c. Fos抗体陽性細胞 d. 刻印付けによる*c-fos*およびFosの発現タイムコース

記憶の固定化の問題は短期記憶から長期記憶への接続の問題として捉えることもできるが、従来のボックスモデルからはかなり離れて、神経科学的には並列なプロセスやランダム刺激による重みづけのモデル等様々な形の検討が行われている。そのひとつとして睡眠との関わりが指摘されており、刻印付けにおいても刻印付け後 6 - 10 時間の間の睡眠の妨害が、翌朝の学習の維持を阻害することが示されている[9]。この時間帯の左 IMM では Fos 陽性細胞の増加がみられたが睡眠妨害群では少なかったことから、IMM が固定化においても何らかの可塑性を伴う役割を担っている可能性が高い[10]。さらに同一条件において右の IMM は左側より遅れて変化がみられ、左右の IMM の働きの違いが示唆される。

固定化のもうひとつのパラメータとして訓練時間の問題がある。実験場面での刻印付けは人口刺激に対して暴露されることで訓練が行われる(Fig 1)。これまでの研究で、15 分間の訓練でも刻印付けが成立し、維持されることを示した。しかし、24 時間後の学習強度は 60 分間訓練したものと比較して低く、途中で新奇刺激を提示した場合の干渉効果も強く受けることが分かった。

## 2. 研究の目的

初期学習における記憶の固定化、特にそのプロセスを引き起こすメカニズムを解明することが本研究の目的である。誕生直後の初期学習である刻印付けは、誕生後の早い時期に特定の物体に対して嗜好をしめし、追従する現象である。固定化のプロセスは学習開始後 8-12 時間起こり、24 時間後には対象物に対する強い嗜好が確かめられる。これまでの研究で、刻印付けは非常に短い時間で学習が成立するが、24 時間後の嗜好は必ずしも安定的でないことがわかっている。暴露時間の差によって、学習獲得に必須であり、固定化にも関わる脳部位 IMM の神経可塑性がどのように変化するか検討し、学習の獲得から維持へ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嗜好試験を行うと訓練刺激に対する嗜好を示す。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。今回はさらに、液晶画面上に提示される 3 DCG 画像(Shade3D ver.16 にて作成)を用いた実験をおこなった。立体の刺激と同様の回転運動(自転)に加え、物体そのものの移動を加えた動画を用いて刺激とした(Fig 3B 参照)。

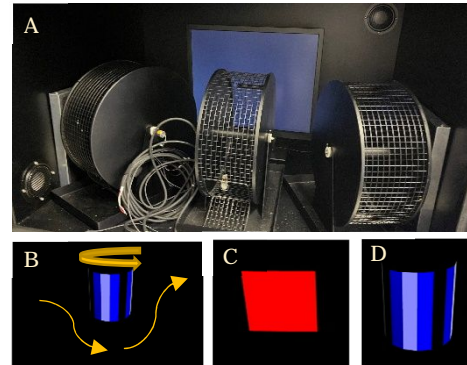


Fig 3: A. 実験装置装置全景 B. 3DCG 動画の青い筒の刺激の動き C. 赤い箱刺激 D. 青い筒刺激

### (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 Ark, Egr-1 の免疫組織化学解析を行った。25 μm 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(“Auto-count” command in Advan View, Advan Vision)。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 Neostriatum 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。

## 4. 研究成果

### (1) 3DCG 画像を用いた刻印付け実験

従来、実際の物体を使った刻印付けに比べて、2D のスクリーンに映し出される刺激を使った場合学習強度が弱いといわれていた。今回、3DCD の刺激を用いて実験を行ったが、自転運動のみの場合、まったく反応のない個体がみられた。そこで、スクリーン上での移動を加えた結果、非常に強いアプローチが観察された。

### (2) 刺激への再暴露で見られる即初期遺伝子発現パターンの検討

刻印付け訓練後に、訓練刺激の再暴露、新奇刺激への暴露による IMM での Fos 陽性細胞数を検討した。これまでの研究データより、2 日目の実験開始から 100 ± 10 分の間で脳サンプルを採取した。

遮光条件で孵化したヒヨコを 5 群に分け、DD: 刺激提示なしコントロール、RD: 1 日目赤い箱刺激で訓練、2 日目再暴露なし、DR: 1 日目訓練なし、2 日目赤い箱刺激で訓練、RR: 1 日目赤い箱刺激で訓練、2 日目赤い箱刺激に再暴露、RB: 1 日目赤い箱刺激で訓練、2 日目青い筒刺激で訓練、という形で訓練を行ったこの実験では実験の性質上、実験途中での学習強度の確認は行っていない。(Fig 4)。

この実験に先立って、1 日目のうちに再暴露する実験(1 回目の刻印付け開始後 150 分の時点で再暴露する)を行ったが、明確な差は見いだせなかった。個体差が大きく、刻印付けから時間が過ぎるだけばつきが大きくなった結果だと予想される。このため、固定化を区切りとして 2 日目に再暴露する形で実験を行った。

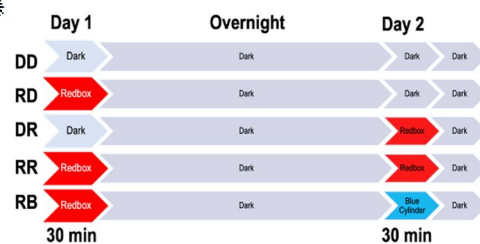
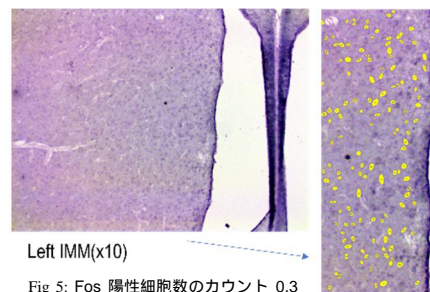


Fig 4: 実験プラン



Left IMM(x10)

Fig 5: Fos 陽性細胞数のカウント 0.3 mm x 0.9 mm のサンプリングフレーム中の染色された細胞数をソフトウェアで自動カウントした

IMM 内のサンプリングフレーム内の Fos 陽性細胞数を実験群×サイド(左 IMM・右 IMM)のランダムブロックデザインの分散分析(実験のレプリケーションごとにブロックとする)を用いて検討した(Fig 5)。

実験群とサイドの間に有意な相互作用が見られた( $P=0.025$ )。特に RB グループで右 IMM の陽性細胞数が優位に左 IMM より高いことが分かった(Fig 6,  $P < 0.05$ , Fisher's protected least significant difference test)。

上にも書いた通り、刻印付けに関連した左右の IMM で起こる神経可塑性に関連するイベントは多くの場合左右の差やタイミングの違いが示されてきたが、獲得時の Fos 陽性細胞の数は左右で差が見られない。今回の DR 群(1 回目の獲得時と同等)においても同じ結果が得られた。それに比較して、1 日目に経験のある 3 群(RD, RR, RB)で右 IMM が左 IMM より多い傾向がみられた(2 日目に何もしていない RD 群でも)。これらのことから1日目の経験が2日目の細胞の応答に影響を与えており、同じ IMM という脳部位を獲得と再認で違う形で使っていると考えられる[11]。

同じサンプルを用いて IEG の Ark と Egr-1 についても免疫組織化学実験を行ったが、発現パターンは Fos とことなり、Ark は新奇性(DR, RB) Egr-1 は再認(RR, Fig 7)で陽性細胞が多くみられたが、明確な左右差は見られなかった(発現のタイムコースが異なることからあくまでも連動を検討したもの)。

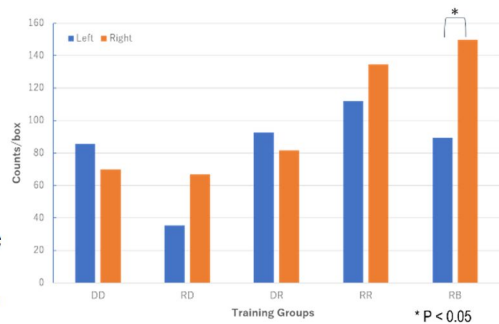


Fig 6: 各実験群の左右の IMM の Fos 陽性細胞数

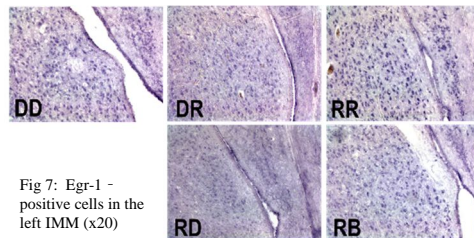


Fig 7: Egr-1 - positive cells in the left IMM (x20)

#### <引用文献>

- Horn G, Pathways of the past: the imprint of memory, Nat Rev Neurosci, 2004, 108-20
- Horn G, Nicol AU, Brown MW, Tracking memory's trace, Proc Natl Acad Sci USA, 98, 2001, 5282-5287
- BolhuisJJ, Batson P, The importance of being first: a primacy effect in filial imprinting, Anim Behav, 40, 1990, 472-483
- Duszkiewicz 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
- 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
- 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
- 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
- Jackson C, McCabe BJ, Nicol AU, Grout AS, Brown MW, Horn G, Dynamics of a Memory Trace: Effects of Sleep on Consolidation, Curr Biol, 18, 2008, 393-400
- 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
- Suge R, Expression pattern of immediate early genes observed on re-exposure to stimuli after memory consolidation in filial imprinting in the domestic chick, The 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, 2024, Kitakyusyu

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅 理江
2. 発表標題 Expression pattern of immediate early genes observed on re-exposure to stimuli after memory consolidation in filial imprinting in the domestic chick
3. 学会等名 第101回日本生理学会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------