

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500388

研究課題名(和文) 幼少期の学習過程における神経系の可塑的变化のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of plastic changes in the nervous system that enable juvenile learning

## 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類の刷込み行動は、学習可能な時期が幼若期にあるため、幼少期の学習の優れたモデルとなる。刷込み行動の成立には、脳内の主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を受け取る受容体の活性化が関与している。刷込み行動には、視覚中枢と記憶の貯蔵領域との間の神経経路が働いており、この経路の細胞はこの受容体を持っている。刷込みのトレーニングを行うと、この神経経路の細胞でこの受容体の活性化と増加が正のフィードバック機構によって進む。その結果、この経路における神経情報伝達が短時間のうちに促進・強化される。これが、幼少期における様々な学習の成立メカニズムであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Imprinting behavior in birds is a good model for juvenile learning, because its critical period resides in several days after hatching. Major excitatory neural transmitter in the brain is glutamate, and an activation of one of its receptors plays a role in the establishment of imprinting behavior. A neural circuit connecting a brain area similar to the visual cortex and a memory storing region is involved in the imprinting behavior, and cells in this neural circuit express this receptor. Imprint training activates and enhances this receptor expressed in these cells by positive feedback. Consequently, transduction of neural information in this circuit is accelerated and enhanced in a short time. It is suggested that this is a mechanism for various juvenile learning.

研究分野：神経科学

キーワード：行動生理学 刷込み行動 グルタミン酸受容体 ニワトリ 幼若期 記憶学習 神経可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

鳥類の中でも鴨などは、孵化後まもなく歩き始めることができる。このような種類の鳥では、親の姿を記憶してその後についていく刷込み（インプリンティング）行動を示す。この刷込み行動にみられる学習能力は、鳥が幼若なヒナの時期に高いが、その後は減弱していく。また、学習成立までの時間が短いこと、いったん成立した刷込み行動は、容易に消去されないという特徴ももつ。これらの特徴は、ヒトの幼児期の学習の特徴に似ていることから、鳥類の刷込み行動は、幼若期に起こりやすい学習の優れたモデルといえる。ホーンらは、ニワトリのヒナ(chick)は孵化後間もない時期に刷込み行動を示すので、刷込み行動の解析に適していることを報告した。彼らは、人工的な視覚刺激をニワトリの声とともに chick に見せることで刷込み行動を成立させ、この行動を定量化することに成功した。さらに、哺乳類の大脳皮質連合野に相当する intermediate medial mesopallium (IMM) と呼ばれる脳の領域が鳥類の刷込み記憶の貯蔵に重要であることを示した(Horn ら, Nat. Rev. Neurosci., 5:108, 2004)。

われわれは、簡略化した視覚刺激のみを用いて、chick で刷込み行動の分子基盤を解明している。液晶画面上を一定の速さで動く赤四角などの単純な図形を視覚刺激として見せること（刷込みのトレーニング）で刷込み行動を成立させ、ホーンらの方法を参考にして行動を定量化する行動実験系を確立した (Maekawa ら, BMC Neurosci., 7:75, 2006 等)。そして刷込み学習が、哺乳類の皮質視覚領と機能的な類似性が認められる visual Wulst (VW) 領域の神経細胞の反応性を変化させることを見出した(Maekawa ら, BMC Neurosci., 7:75, 2006)。また、この変化の分子的基盤として、上述の VW と IMM、さらにこの2領域間の神経細胞に特徴的に発現するニューロペプチドの一つコレシストキニンが関与していることを報告した。これらの結果は、刷込みのトレーニングによって IMM のみでなく VW や2領域間においても神経の活動性に変化が起きていることを示していた。

一方、VW と IMM 間の神経伝達についての解析を行った結果、VW と IMM をつなぐ神経経路（VW-IMM 経路、図1）が存在し、働いていることが確認できた。この VW-IMM 経路と刷込みとの関連を調べると、刷込みが起きていない孵化後7日目（P7）の chick の脳では、VW-IMM 間の情報伝達はイメージング法によっては検出できなくなっていたが、学習が容易に起こる時期（臨界期）である P1 でトレーニングを行って刷込みの成立した P7 の chick の脳では、VW から IMM へ至る強い情報伝達の反応がみられた。このとき、VW の尾側にある core region of the hyperpallium densocellulare (HDCo) と名付けた領域の神経細胞の機能が特に重要であった。

脳の興奮性神経伝達物質として重要なグ

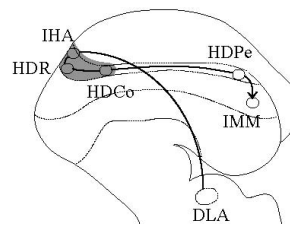


図1 chick の脳の様子。視床の DLA 核から終脳の VW (灰色の部分), そして HDCo, HDPe を経由して IMM に至る経路を示す。左が吻側, 上が背側。

ルタミン酸受容体の中で、イオンチャネル型グルタミン酸受容体には、AMPA 型受容体と、NMDA 型受容体などがある。NMDA 型受容体は、NR1 サブユニットを共通に持つほか、NR2A や NR2B などの計4個のサブユニットで構成されている。受容体を構成するサブユニットの種類により、受容体の示す電流特性なども違ってくる。われわれは、刷込みのトレーニングを行った chick の脳では、NR2B 含有 NMDA 型受容体を発現する細胞が増加していることを発見した。そして、刷込みが成立した P7 の chick の脳では、NR2A 含有 NMDA 型受容体を介したシグナル伝達による HDCo 細胞の活性化が起きており、VW-IMM 間の情報伝達も活性化していることがわかった。この結果は、HDCo 細胞の活動性が上昇し、VM-IMM 間の情報伝達が強化されることで、刷込み行動が成立することを示唆していた(Nakamori ら, J. Neurosci., 30:4467, 2010)。

## 2. 研究の目的

これまでの研究では、刷込みのトレーニングを P1 に行い、刷込みが成立してからしばらく後の P7 において生理学的解析を行った。そして、NMDA 型受容体を介した VW-IMM 間の情報伝達の強化が刷込み成立の基盤であることを示した。本研究では、この過程をさらに詳細に捉えるために、刷込み行動の成立に不可欠である HDCo 細胞に焦点をあて、P1 でのトレーニング開始後に、神経細胞にはどのような変化がもたらされるのかに注目する。そして、NR2B 含有 NMDA 型受容体による細胞の活性化が起きるメカニズム、さらに HDCo 細胞の活性化が、どのように VW-IMM 経路の神経伝達の促進・増強という変化に結びつくのかを明らかにする。具体的には、(1)刷込み成立直後の P1 における HDCo 細胞の活動性と HDCo 細胞が発現するグルタミン酸受容体(NR2B 含有 NMDA 型受容体と AMPA 型受容体)の活性変化、(2)これらの活動性・活性変化のトレーニングの時間経過に伴う起こり方と刷込み成立との関係、(3)NR2B 含有 NMDA 型受容体を発現する HDCo 細胞の活性化が起きるメカニズム、を明らかにする。さらに、(4)最初期遺伝子の一つである Arc/arg3.1(Arc)遺伝子の発現を指標にして、トレーニングにより活性化された HDCo 細胞の変化をとらえることをめざす。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

ホワイトレグホン(*Gallus gallus domesticus*)の有精卵を入手し、chick を孵化させて使用した。本研究中の動物を用いた実験は、北里大学動物実験委員会の審査を経て学長の承認を受け、北里大学における動物実験等に関する規程を遵守して行った。

#### (2) 刷り込みの行動実験

これまでに行ってきた刷り込み行動実験のプロトコール通り、液晶画面に映した動く図形(例えば赤四角)を、回し車に入れた孵化後1日(P1)の chick に20分以上見せることにより刷り込みのトレーニングを行った。最短20分間の図形の提示により、chick は赤四角に刷り込まれ、2時間後に行うテストでは、chick は赤四角を映した画面には近寄るが、青丸を映した時には近寄らないか、むしろ逃げるといった行動を示した。

刷り込みのトレーニングは、通常連続20分間以上行っている。本研究では、20分間のトレーニングを前半10分間と後半10分間に分け、間に1時間の休憩(chick は暗条件におく)をはさむというスケジュールでも行った。この場合でも、スケジュールの終了後には刷り込み行動が成立することを確認した。

#### (3) 神経活動の記録

深麻酔下の Chick から脳を採取し、厚さ300  $\mu\text{m}$  の矢状断切片を作成した。電気刺激は400  $\mu\text{A}$ 、250  $\mu\text{s}$  で VW に行い、長期増強(LTP)は、5 Hz、400  $\mu\text{A}$ 、60 s の刺激で誘発した。

##### 神経活動の光学的イメージング

切片は膜電位感受性色素で染色し、洗浄後に、VW の物側を刺激した時の神経活動を464チャンネルのフォトダイオードアレイを用いて検出した。

##### 電気生理学的記録

HDCo 細胞を識別するために、HDPe 領域にテキサスレッド(蛍光色素)を注入しておき、軸索末端から逆行性に HDCo 細胞の細胞体に色素を取り込ませた。1日後に、赤い蛍光を発する HDCo 領域の細胞をホールセルパッチクランプ法により電気生理学的に解析した。VW 領域に細胞体があって HDCo 細胞へ軸索を伸ばしている HDR 細胞を電気刺激して反応を誘発した。

#### (4) 脳内へのマイクロインジェクション

蛍光色素や各種阻害剤の HDCo や HDPe への注入は、麻酔下の Chick にシリンジを用いて行った。

#### (5) NR2B の short hairpin (sh) RNA によるノックダウン

NR2B のターゲット配列として 5'-GGGCTCATCTCTGTCTCATAT、コントロールのスクランブル配列として、5'-GGGATTCTCGCTTACTCTAT、を設定し、

RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen vector (Clontech 社)を用い、麻酔下の chick の HDCo に注入し、エレクトロポレーションにより遺伝子を導入した。

#### (6) 生化学的方法

##### タンパク質の抽出

P1 の chick を深麻酔し、左脳の HDCo を採取し、緩衝液中で氷冷しながら細胞を破碎し、遠心分離後の上清をタンパク質抽出液とした。また、Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher 社)を使用して細胞を分散させ、細胞表面タンパク質をビオチン化後に、細胞表面タンパク質を分離した。タンパク量はタンパクアッセイキット(Bio-Rad 社)を用いて測定した。

##### ウエスタンブロッティング

タンパク質試料は SDS-PAGE により分離し、メンブレンに転写し、各種抗体と反応させてバンドを可視化した。

#### (7) Arc/arg3.1(Arc)遺伝子の発現解析

Arc 遺伝子に対するプローブを作製し、常法に従って *in situ* hybridization を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究の主な成果

刷り込みのトレーニングによって HDCo 細胞に長期増強が起こる

刷り込み行動は、30分間のトレーニングの終了から10分後には観察されることが明らかとなった。そこで、トレーニング後10分に chick を深麻酔して脳スライスを作製した。そして、神経活動の光学的イメージング法により、VW を刺激した時に見られる VW から HDCo を通って IMM に至る反応を解析した。その結果、30分間のトレーニング直後の chick 脳では、この反応が増大していることが明らかとなった。この反応の増大は、長く続くこと、また、非トレーニング群の chick 脳の VW に高頻度刺激を加えた時の反応に類似していたことから、長期増強(LTP)と関連していることが考えられた。

30分間のトレーニング後に起こる HDCo 細胞の活性化には、グルタミン酸受容体のうちの AMPA 型受容体と NR2B 含有 NMDA 型受容体の両方が関与している

可視化した HDCo 細胞の反応をパッチクランプ法により電気生理学的に解析した。30分間のトレーニング直後の chick 脳では、AMPA 型受容体依存性の興奮性後シナプス電流(EPSC)が増大していたほか、NR2B 含有 NMDA 受容体依存性の EPSC も増大していた。また、抗体を用いたウエスタンブロッティング法によって解析を行うと、HDCo 細胞表面では、AMPA 型受容体を構成するサブユニットである GluR1 と、NMDA 型受容体を構成する NR2B サブユニットの両方が増加しており、これが AMPA 型受容体と NR2B 含有

NMDA 型受容体それぞれの活性化に寄与していることが示唆された。

トレーニング時の NR2B 含有 NMDA 型受容体の阻害は、刷込み行動を抑制し、HDCo 細胞の長期増強も抑える

トレーニング時に NR2B が働くことが重要であることを確認するために、shRNA を用いて NR2B をノックダウンしたところ、刷込み行動が阻害された。また、NR2B 含有 NMDA 型受容体に対する阻害剤を加えた脳スライスでは、HDCo 細胞の長期増強が起こらなかった。

10 分間のトレーニングは、NR2B 含有 NMDA 型受容体の発現増加と EPSC の増大をもたらす

10 分間のトレーニング後の HDCo 細胞の反応変化を調べた。10 分間のトレーニングでは刷込み行動は誘発されないにもかかわらず、NR2B 含有 NMDA 型受容体が活性化しており、HDCo 細胞表面の NR2B も増加していた。一方、AMPA 型受容体の活性化や細胞表面での GluR1 の発現増加は見られなかった。

HDCo 細胞の NR2B 含有 NMDA 型受容体を増加させておくと、10 分間のトレーニングで刷込み行動が起こる

カゼインキナーゼ 2 は、NR2B をシナプス膜から消失させる働きがある。そこで、HDCo 領域にカゼインキナーゼ 2 の阻害剤であるテトラプロモベンゾトリアゾール(TBB)を投与すると、10 分後には脳細胞表面の NR2B が増加していることがわかった。TBB 投与群と生理食塩水投与群に 10 分間のトレーニングを行ったところ、TBB 投与群でのみ刷込みが成立し、この効果は NR2B 含有 NMDA 型受容体に対する阻害剤の同時投与により消失した。

HDCo 細胞表面の NR2B 含有 NMDA 型受容体は、ポジティブフィードバックにより増加する

10 分間トレーニングを 1 時間の休憩をはさんで 2 回行う行動実験プロトコルを用いた。NR2B 含有 NMDA 型受容体に対する阻害剤を 1 回目の 10 分間のトレーニング時のみに働くように投与すると、刷込みは成立しなかった。また、1 回目の 10 分間トレーニングが終了した時点で、NR2B 含有 NMDA 型受容体の細胞表面での増加は起きていなかった。

細胞表面の NR2B 含有 NMDA 型受容体の増加には、p35 の減少が関与している

マウスにおいては、NR2B の C 末端にあるチロシン残基のリン酸化が促進されると NR2B のエンドサイトーシスが減少するため、結果として細胞表面での NR2B の発現が増加する。サイクリン依存性キナーゼ 5(cdk5) は p35 により活性化されるが、この C 末端部分

のリン酸化を阻害する。そこで、chick 脳における NR2B 含有 NMDA 型受容体の細胞表面での発現変化にも、これらの分子が関与しているかについて検討した。10 分間トレーニングにより HDCo 細胞の p35 は減少し、この効果は NR2B 含有 NMDA 型受容体の阻害剤により消失した。このことから、10 分間トレーニングによる NR2B 含有 NMDA 型受容体の活性化は p35 を減少させるので cdk5 の活性が低下し、C 末端のリン酸化阻害が起こらないために細胞表面の NR2B 含有 NMDA 型受容体の割合が増える、というメカニズムが考えられた。

刷込みのトレーニングにより、VW で反応する細胞集団が変化する

刷込みトレーニングを実施した個体と未実施の個体について、評価後の VW における Arc 遺伝子を核内、細胞質内、あるいは両方に発現する細胞の分布を調べると、刷込み後では、刷込み刺激に反応する細胞の分布が局在することが明らかとなった。

## (2)本成果の国内外における位置づけ

本研究では、HDCo 細胞に注目して刷込み学習を可能にする神経の可塑的变化を調べた。その結果、トレーニングによって NR2B 含有 NMDA 型受容体を介した細胞の活性化が起こると、ポジティブフィードバックによってますます NR2B/NR1 の発現が増加し、細胞反応の増強が起こり、これが刷込み行動成立のキーとなっていることが明らかになった(図 2)。他の動物でも幼少期の神経細胞は NR2B/NR1 を多く発現するため、このメカニズムによる神経細胞の可塑的变化が学習経路で起こることが、幼少期の学習メカニズムの 1 つであることが示唆された。

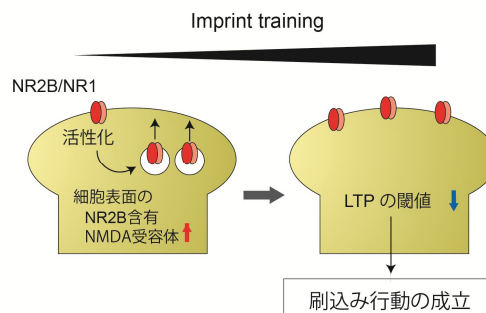


図 2 刷込み行動成立のメカニズム。刷込みのトレーニングによって chick 脳の HDCo 細胞にある NR2B 含有 NMDA 受容体が活性化すると、この受容体の細胞表面での発現がますます増える。これにより、LTP が起こりやすくなり、VW-IMM 経路が増強されて、刷込み行動が成立すると考えられる。

幼少期の学習について研究するためのモデルが少ないため、この研究成果は貴重な知見を提供しており、国際学術雑誌に原著論文や総説を公表したほか、国際学会で招待講演を行った。

### (3)今後の展望

最初期遺伝子を発現する細胞の解析を進めることで、今後、可塑的に変化する細胞の特徴を抽出し、高い可塑性の基盤となっている分子メカニズムを調べることが可能となる。これが実現すれば、老化や疾病・傷害によって失われた神経細胞の機能をとりもどすための新たな糸口が見つかることも期待できる。

### 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9件)

Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Kanamatsu, T., Sakagami, H., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2014) 査読有  
Positive feedback of NR2B-containing NMDA receptor activity is the initial step toward visual imprinting: a model for juvenile learning.  
J. Neurochem., 132:110-123.  
DOI: 10.1111/jnc.12954.

Nakamori, T., Maekawa, F., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2013) 査読有  
Neural basis of imprinting behavior in chicks.  
Develop. Growth Differ., 55: 198-206.  
DOI: 10.1111/dgd.12028.

浜崎浩子 (2012) 査読無  
インプリンティング(刷込み記憶)の神経科学.  
BRAIN and NERVE, 64: 657-664 (医学書院)

Suzuki, K., Maekawa, F., Suzuki, S., Nakamori, T., Sugiyama, H., Kanamatsu, T., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2012) 査読有  
Elevated expression of brain-derived neurotrophic factor facilitates visual imprinting in chicks.  
J. Neurochem., 123:800-810.  
DOI: 10.1111/jnc.12039.

#### [学会発表](計11件)

浜崎浩子(2014) 招待講演  
インプリンティング(刷込み)行動を司る神経回路とその制御機構を探る.  
日本動物学会第85回大会, 東北大学(宮城・仙台市), 2014年9月12日.

シンポジウム「動物の心の仕組みを探る～神経回路形成と行動制御を司る分子機構～」

Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2014)  
NR2B-dependent neural plastic changes constitute the initial step of juvenile learning.  
第37回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014年9月11日.  
ポスター (P1-267)

Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2014)  
Visual imprinting in chicks requires activation of highly-expressed NR2B-containing NMDA receptors in the neural circuit of the hyperpallium.  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 'Avian Model Systems', ニューヨーク(アメリカ), 2014年3月6日.

Ohki-Hamazaki, H. (2012) 招待講演  
Imprinting behavior in chicks: an excellent model for the study of juvenile learning and memory.  
Chick 7: Avian Model Systems. 7<sup>th</sup> International Chick Meeting. 名古屋大学(愛知県・名古屋市), 2012年11月17日.

Nakamori, T., Kinoshita, M., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2012)  
NR2B activation is the first phase of juvenile learning.  
第35回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2012年9月20日.  
ポスター (P3-a10)

#### [その他]

北里大学一般教育部生物学・大学院医療系研究科・浜崎浩子研究グループ ホームページ  
<http://www.clas.kitasato-u.ac.jp/bio/personal/hamazaki/index2b.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