

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24530918

研究課題名(和文) 記憶と干渉の脳内表象と臨界期終了に伴う変化

研究課題名(英文) Neuronal plasticity during memory consolidation process in imprinting

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：刻印づけに必須な脳部位であるintermediate and medial mesopallium(IMM)は学習後の決まった時期に神経細胞活性に変化があることが知られており、即初期遺伝子c-fosをマーカーに、訓練刺激の脳内表象を検討した。記憶固定化に関連する、刻印づけ後8時間の睡眠時のFosタンパクの増加を睡眠群(装置を固定)と妨害群(ランダムに回転)とで検討したところ、睡眠群で左IMMで特に増加がみられた。視覚野に相当するvisual Wulst、海馬においても増加はなく、IMMとの連動も左右差もなかった。記憶固定化のプロセスは視覚入力関連脳部位との相互作用なしに行われると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Undisturbed sleep is important for memory consolidation in imprinting in the domestic chick. In the intermediate and medial mesopallium (IMM), critical forebrain region for visual imprinting, imprinting leads to an increase in the proportion of neurons that are selectively responsive to a visual imprinting stimulus. This increase is dependent on undisturbed sleep 5-12 h after the first exposure to the stimulus. We have examined whether sleep during this period is associated with a change in neuronal activity in the IMM, using Fos immunoreactivity as a marker. Dark-reared chicks were trained in individual running wheels by exposure to a red box for 2h. Chicks were assigned to Rest group (immobilized wheel) or Disturbed group (randomly rotated wheel to prevent continuous sleep) and killed 9 or 11 h after the start of training. In the IMM, but not in hippocampus or visual Wulst, there were more Fos-positive cells in the Rest group than in the Disturbed group.

研究分野：行動神経科学

キーワード：初期学習 記憶の固定化 睡眠

1. 研究開始当初の背景

記憶プロセスの初期において、細胞がどのように応答し、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、近年ではIEGそのものが記憶に関わる神経可塑性に関連していることが示されつつある[1]。ラットでは海馬のCA3領域を中心に、場所細胞の形成やcontextual fear conditioning、鳥類では歌学習等において、ongoingな学習の中でどの程度の細胞が関連づけられるのかが検討されてきた[2]。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。本研究では学習開始まで視覚経験のまったくない刻印付けを用いることによって、特定の物体に対して関連づけられた細胞群を特定し、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と考へた。

刻印付けとはヒヨコなどの早成鳥類で、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(Fig. 1)。臨界期の存在が特徴的であり、獲得した偏好は成熟後の性選択にも影響を与える[3]。古くは一度学習が成立すると、再学習が不可能であると考えられてきたが、臨界期の間であれば、他の刺激の提示によって偏好が新しい刺激に対して生じる現象が報告され、その状態でも最初に学習された物体への記憶は保持されているということが示されている。しかし第1の刺激として雌鳥の剥製などの生得的偏好の強い物体を使った場合にはこのような偏好の逆転は生じない[4]。これらの特徴は記憶の干渉の検討にとって大変適しているといえる。

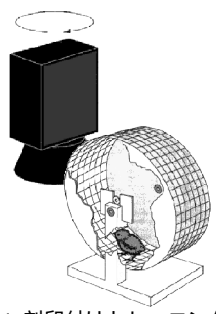


Fig 1: 刻印付けトレーニング

さらに、刻印づけにおいては記憶の固定化のプロセスのタイミングが明らかになっており、記憶の初期プロセスで使われた細胞が固定化のプロセスにおいてどのような役割を果たすのかを検討することができる。

2. 研究の目的

ある事象を学習した直後に別の刺激を提示すると、記憶は干渉を受けることが知られている。第1の刺激に対する神経可塑性のカスケードがはじまっている状態で新たな刺激が提示された時には神経細胞はどのようにリクルートされ、第1のカスケードにどのような影響を与えるのだろうか？本研究では学習における記憶の脳内表象と記憶干渉のメカニズムの解明を目的とする。特に刻印付

けという初期学習を用いることによって、一般に用いられる成熟マウスのケースと異なり、特定の物体に対する細胞群の関連づけが明確であり、干渉の結果を神経細胞レベルと同時に動物の自発行動によって確認出来ることが、本研究の特色である。

これまでに当研究グループでは、刻印付けをモデルとして記憶に関連した神経可塑性、特に初期プロセスについて検討してきた。

(1)刻印付けの初期プロセスにおける行動：実験室場面での刻印付けは人工刺激に対して暴露されることで、訓練が行われる。通常、1-2時間の訓練をもって刻印付けを起こしていたが、15分間の訓練で従来と同様な強度の刻印付けが成立し、維持されることを示した。刻印付け後24時間の発声や活動を検討し、個体のストレスと学習強度に関連性がないことを確かめた [7, 9, 10]。

(2)刻印付けの初期プロセスにおける神経活性：(1)の結果を用いて、1時間の訓練の結果学習強度依存的に発現するIEG、FosのIMMにおける免疫抗体反応を検討し[5, 6]、この発現が刻印付け訓練15分以内に引き起こされたことを示し、*c-fos* mRNAの初期発現をin situ hybridisationを使って確認した。またFosのIMMでの発現が刺激の種類によって異なることから、IMMにおける脳内表象の存在を示唆した[7, 8]。これらの研究から、*c-fos* mRNAおよびFosの詳細なタイムコースが明らかになり、この発現時間のずれから刺激提示時間を調節することによって、刺激ごとの脳内表象を同一個体内で検討出来るのではないかと考へた(Fig 2) [see also 11]。

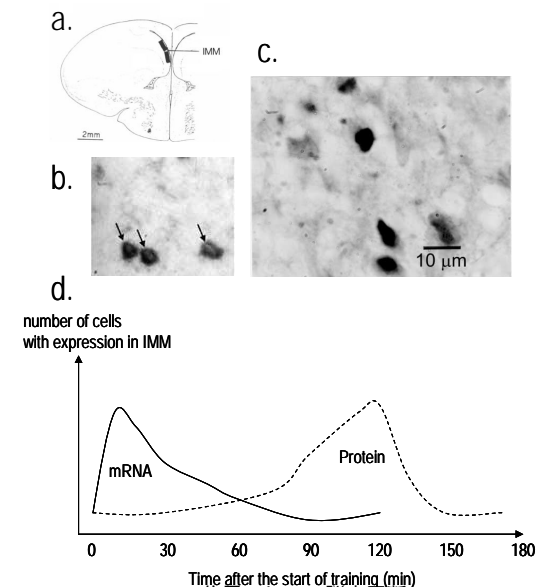


Fig 2: a. IMMの位置(ヒヨコ脳水平断) b. *c-fos* mRNA陽性細胞 c. Fos抗体陽性細胞 d. 刻印付けによる*c-fos*およびFosの発現タイムコース

刻印付けでは”2ndary imprinting”と呼ばれる、新刺激に対する一過性の偏好があり、刺激の種類によって偏好が変動する[4]。この現象を使うことで、行動と脳内表象との関連づけが容易になる。さらに第1の刺激に対する記憶は保持されていることが分かっている

るため、短期記憶、長期記憶の独立したプロセスや新刺激の提示による記憶の干渉を神経細胞レベルで検討できるのではないかと考えた。

(3)刻印付けの固定化プロセスにおける神経活性：

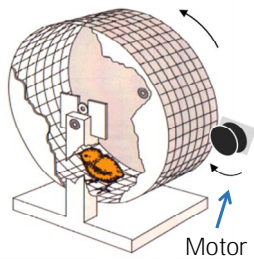
刻印づけ後、IMM において刻印づけ刺激に反応するニューロンが増えることが知られているが、徐々に増加していくのではなく、刻印づけ後 8 時間あたりでいったん減少し、24 時間後にははっきりとした増加がみられる。この間の睡眠が固定化の大きな要因であることを、刻印づけ 5-10 時間の睡眠を妨害することで確かめたところ、応答細胞数および、偏好の強度の減衰と云う形で、確認することができた[11]。

これらのことから、(1)(2)の成果と合わせ、刻印づけの記憶の固定化のプロセスに関わる IMM の役割を免疫組織化学的手法を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1)行動実験装置を用いた刻印付け実験
実験室内での刻印付けでは、ヒヨコは孵化後 36-48 時間後、一羽ずつ輪回しに入れられ、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示すと強い訓練刺激に対する偏好を示す。この時の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で示される。

睡眠の阻害については、右図のように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輪回しを固定した。



(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%パラフォ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 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。IMM 以外に

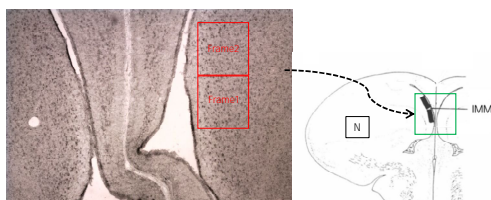


Fig.3: Fos 陽性細胞の解析と切片上の位置

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 でも計測を行い、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みられる visual Wulst においても検討を行った。

4. 研究成果

(1)新奇刺激の導入による行動の変化

刻印づ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。第一刺激を繰り返し提示する群と比較したところ、2 回目に提示された刺激が既知であるか新奇であるかによって、刺激に対するアプローチの時間的分布が異なっていることがわかった。これは学習の一つの指標として考えることができる。

(2)固定化プロセスにおける IMM の役割

刻印づ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た(Fig.4)。

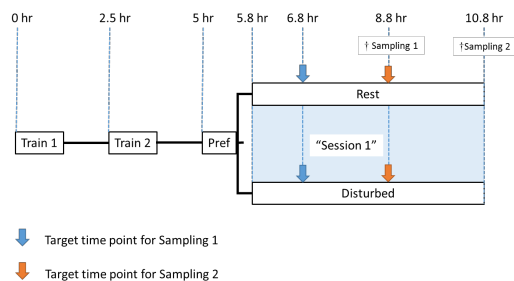


Fig.4: 実験プラン、サンプリングのタイミング
全体のスケジュールは Jackson et al [11]に準拠

2 つのサンプリングポイントを設定したが、時間による差は見られなかった。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見られた。そしてその増加は左の IMM で顕著であった (Fig.5)。さらに哺乳類の視覚野に相当する visual Wulst では学習直後に学習に関連した神経細胞活性がみられるが、今回の実験では大きな変化は見られず、刻印づけ直後に学習強度と関連しない増加がみられる海馬にも差は見られなかった。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、刻印づ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が分かった。右の IMM についてもタンパク発現のタイムラグの可能性を考えると何らかの役割を担っている可能性が高い。さらに今回の研究においては海馬や視覚野との連動がみられないことから、この固定化のプロセスが情報入力に関わる部位と独立したものであると考えられる。

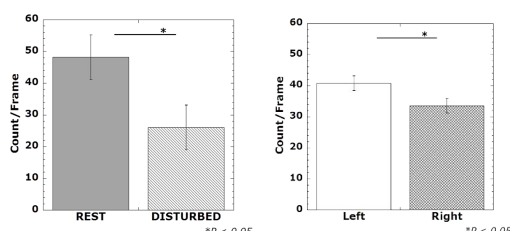


Fig.5: IMMにおける Fos 陽性細胞数

睡眠群に Fos 陽性細胞数が有意に増加していた。そしてそれには左右差がみられた。

<引用文献>

- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF、 Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation、 Neurobiol Learn Mem、 89、 2008、 269-84
- Hübener M, Bonhoeffer T、 Searching for engrams、 Neuron、 67、 2010、 363-71
- Horn G、 Pathways of the past: the imprint of memory、 Nat Rev Neurosci、 2004、 108-20
- Bolhuis JJ, Batson P、 The importance of being first: a primacy effect in filial imprinting、 Anim Behav、 40、 1990、 472-483
- 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
- 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
- Suge R、 Neural mechanisms of early stages of filial imprinting in the domestic chick. Robinson College, University of Cambridge, 2001
- Suge R, McCabe BJ、 Fos-like immunoreactivity in the forebrain of the domestic chick (*Gallus gallus domesticus*) after brief imprinting training、 Proc Physiol Soc、 528P、 2000、 76
- 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

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)

[学会発表](計4件)

Suge, R, Nicol, AU, McCabe, BJ、 Fos-like immunoreactivity during sleep in a chick forebrain memory system after filial imprinting、 Hokkaido Neuroethology Workshop 2014、 2014年7月26日、北海道大学理学部(北海道札幌市)

Suge, R, Nicol, AU, McCabe, BJ、 Sleep and Fos-like immunoreactivity in a chick forebrain memory system after filial imprinting、 2014 International Congress of Neuroethology、 2014年7月29日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Suge, R, Nicol, AU, McCabe, BJ、 Fos-like immunoreactivity in the intermediate and medial mesopallium (IMM) during sleeping after filial imprinting in the domestic chick、 日本動物心理学会第74回大会、 2014年7月19日、犬山国際観光センター“フロイデ”(愛知県犬山市)

Suge, R, Nicol, AU, McCabe, BJ、 Sleep and Fos-like immunoreactivity in a chick forebrain memory region after filial imprinting、 Neuroscience 2013, annual meeting of Society for Neuroscience、 2013年11月11日、San Diego (USA)

6. 研究組織

(1)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

(4)研究協力者

McCabe, Brian
University of Cambridge・Sub-Department of Animal Behaviour・Director