

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21013

研究課題名(和文) 永続的記憶形成における、海馬-大脳皮質記憶保持細胞集団の統合機構の解明

研究課題名(英文) The role of cortico-hippocampal interaction for systems consolidation

研究代表者

佐野 良威 (Sano, Yoshitake)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教

研究者番号：90415175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：記憶を脳のシステムレベルで保存する神経基盤を明らかにするため研究を進めた。本研究課題では「学習後の海馬および大脳皮質の同期的な神経活動によりSystems consolidationが完遂する」との仮説を立てこれを検証した。学習時に活動した海馬および大脳皮質の神経細胞群を、学習後の安静時に2日間にわたり活性化させた。その結果、記憶のgeneralizationの亢進、および記憶想起の海馬依存性が低下する傾向が観察された。今後、神経細胞の刺激パターンなどを再検討し仮説の検証を進める。

研究成果の概要(英文)：We addressed the mechanism for systems consolidation and especially tested the hypothesis that “cortico-hippocampal co-activation following learning has an impact on systems consolidation”. To address this hypothesis, we developed the systems labeling and manipulating cell assembly activated during learning. Then, cortico-hippocampal neurons activated during learning were co-stimulated during sleep after learning. We observed mice tended to show that memory generalization was enhanced and hippocampal-dependency for memory retrieval was decreased. But to confirm these results, we have to improve methods for activating cell assembly.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 大脳皮質 海馬 Systems consolidation エングラム

1. 研究開始当初の背景

出来事に関する記憶は初期には主に海馬に保存されると考えられている。その後、時間をかけて大脳皮質等の脳領域に分散して安定的に記憶は保存されると考えられている。この脳のシステムレベルでの記憶形成は **Systems consolidation** と呼ばれている。これまでに、**Systems consolidation** に伴い記憶想起の海馬依存性が低下すること、そして前帯状皮質や内側前頭前皮質等の大脳皮質領域が **Systems consolidation** 後の記憶保存領域として同定された。また **Systems consolidation** により記憶がより意味的になることが知られているが、記憶想起の海馬依存性の低下と記憶が意味的になる度合いが相関することなどが明らかとなっていた。さらには、**Systems consolidation** 前後で記憶想起に必要な脳領域が変化することなども示された。このように、**Systems consolidation** 後の記憶保存領域の同定などに関する研究が多く行われてきたが、どのようにして **Systems consolidation** が完遂するのか、その神経基盤は十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

これまでに海馬において、学習後に直前の学習時に観察された神経活動と関連した神経活動が観察されること、この時に観察されるリップル波が記憶形成に重要であること、学習時に活性化された神経細胞で興奮性の上昇が観察されることなどが知られており、これらの知見は学習後の特定の神経活動が、記憶形成に重要であることを示唆する。また、学習後に海馬のシナプス伝達を長期的に阻害すると、**Systems consolidation** が障害されることも報告されている。また、睡眠時には海馬で発生するリップル波と大脳皮質の神経活動が同期的に起きることなどが報告されている。このような背景から「学習後の海馬-大脳皮質の同期的な神経活動により **systems consolidation** が起きる」との仮説に至った。以下の実験から仮説を検証し、**Systems consolidation** の神経基盤の一端を明らかにすることが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

これまでに学習時に活動した神経細胞に記憶が保存され、同様の細胞群が再活動することにより記憶が想起されることが報告されている。そこで **Systems consolidation** においても学習時に活動した神経細胞群が、その後の記憶形成を担い、記憶保存細胞になると考えた。そこで、活動した神経細胞を標識し操作するための手法を確立した。

c-fos 遺伝子のプロモーターは、神経活動依存的に下流の遺伝子の発現を誘導する。また、転写活性化因子 **tTA** はドキシサイクリン (**DOX**) 非存在下で **TRE** 配列に結合し **TRE**

の下流の遺伝子発現を誘導する。そのため、**c-fos** プロモーターにより **tTA** の発現が制御される **c-fos tTA** トランスジェニックマウス (**Tg** マウス) と、**TRE** の下流に任意の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを組み合わせると、学習時に活動した神経細胞群において任意の遺伝子を発現させることが可能となる。

本研究課題では **TRE** 配列の下流に **hM3Dq** 受容体遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを作製した。**hM3Dq** 受容体はヒトムスカリン受容体 3 型のリガンド結合部位を改変し外来性のリガンドである **CNO** によってのみ活性化される受容体である。**hM3Dq** 受容体の活性化により神経細胞の活動性が高まる。

c-fos tTA Tg マウスの大脳皮質および海馬に **TRE-hM3Dq** レンチウイルス (**LV**) を感染させた。そして **DOX** 投与下では学習を行っても **hM3Dq** の発現は観察されず、学習前に **DOX** 投与を停止し学習を行うことにより疎らな神経細胞群で **hM3Dq** の発現が観察されたことから、学習時に活動した神経細胞を標識する手法が確立されたことを確認した。

学習時に活動した大脳皮質および海馬の神経細胞群を学習後に同期的に活動させることにより **Systems consolidation** が起きるかどうかを、記憶の **generalization** および記憶想起の海馬依存性を指標に解析を行った。

4. 研究成果

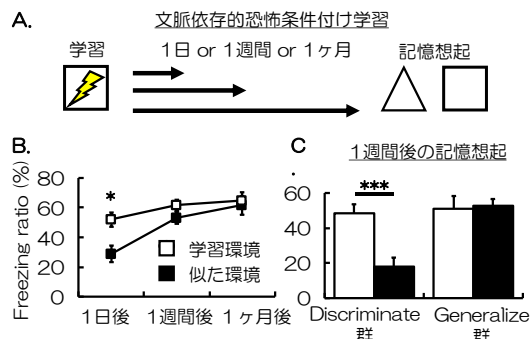


図1. 記憶のGeneralizationの時間的推移と集団の二極化

はじめに **Systems consolidation** の時間的推移を明らかにするために以下の実験を行った。なお本研究課題では学習課題として文脈依存的恐怖条件付け学習を用いた。本学習課題において、マウスは環境と嫌悪経験（電気ショックを受けた）の関連性を覚える。学習直後は、電気ショックを受けた環境を詳細に覚えているが、時間が経つと似た環境でも恐怖記憶を想起（フリージング行動）するようになる。この現象は記憶の **generalization** と呼ばれ、**Systems consolidation** により記憶が意味的になる一側面を反映していると考えられている。そこで、学習の1日後、1週間後、1ヶ月に、学習した環境、そしてそれと似た環境で記憶想起テストを行った (図 1)。その結果、学習の1日後には学習環境を見分

けるが、1週間後には見分けなくなることを観察した。興味深いことに、学習の1週間後には電気ショックを受けた環境を詳細に覚えている群（Discriminate 群）と Generalization が起きた群（Generalize 群）に2極化し始めることを観察した。

次に、記憶想起の海馬依存性を解析した。学習の1、3日後または2週間後に AMPA 受容体の阻害剤である CNQX を投与し海馬の興奮性シナプス伝達を阻害し、記憶想起テストを行った（図2）。その結果、学習の3日後までは記憶想起に海馬活動が必要であるが、2週間後には海馬非依存的に記憶が想起された。これまでマウスを用いた文脈依存的恐怖条件付け学習において、Systems consolidation が1ヶ月程度かかることが示されていた。しかし本実験においては、これまで考えられていたよりも早く、学習の約1週間後には Systems consolidation が起きていることが明らかとなった。

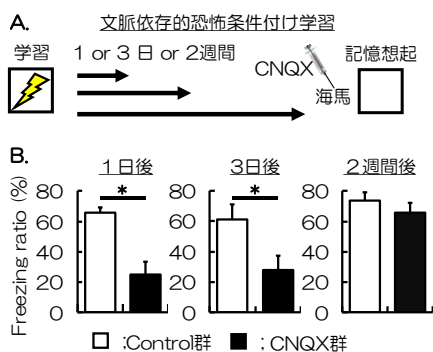


図2. 記憶想起の海馬依存性の時間的推移

学習の3日後では、Systems consolidation が起きていないことが示されたため、学習後の2日間海馬-大脳皮質の神経細胞群の活動を操作し3日目に記憶想起テストを行うこととした。そのため、学習時に活動した神経細胞で発現した hM3Dq 受容体が学習の2日後においても、神経活動を誘導できるかどうか検証した（図3A）。学習時に発現した hM3Dq 受容体を2日後に CNO によって活性化させたところ、c-fos タンパク質の発現が誘導された。また、学習の4日後においても hM3Dq 受容体の発現が観察された（図3B）。これらの結果から、学習後の2日間神経活動を操作することが可能であることが示された。

確立したシステムを用いて、学習時に活動した大脳皮質、および海馬の神経細胞群に hM3Dq 受容体を発現させた。その後、2日間、CNO を1日2回投与し、神経細胞群を同期的に活性化させた。その後、記憶の generalization（図4A）、および記憶想起の海馬依存性（図4B）を検証した。その結果、学習後に CNO を投与し海馬と大脳皮質の神経細胞群を活性化させた群（活性化群）において、記憶の generalization が亢進する傾向が観察された（図4A）。また、活性化群において記憶想起の海馬依存性が低下する傾向が観察された（図4B）。これらの結果は、学

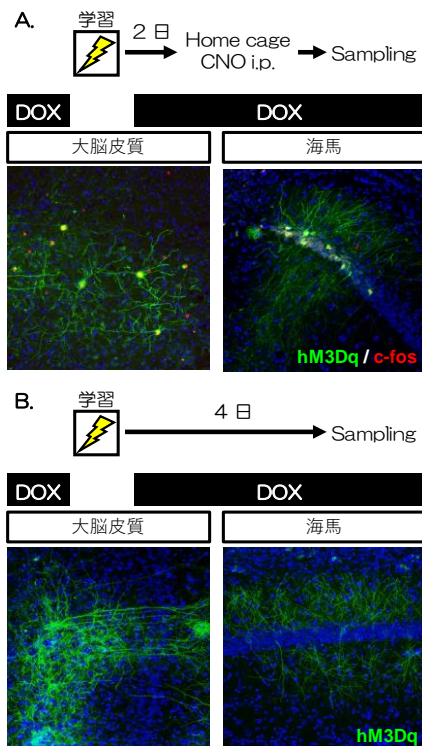


図3. 学習時に活動した神経細胞の標識と操作

習時に活動した海馬および大脳皮質の神経細胞群の同期的な活動が Systems consolidation に必要である可能性を示唆する。しかし顕著な差は観察されず、この原因としては、神経細胞群を適切なパターンで刺激できていない可能性が考えられる。今後、神経活動の刺激様式、および Systems consolidation の完遂を評価する手法を再検討する必要がある。

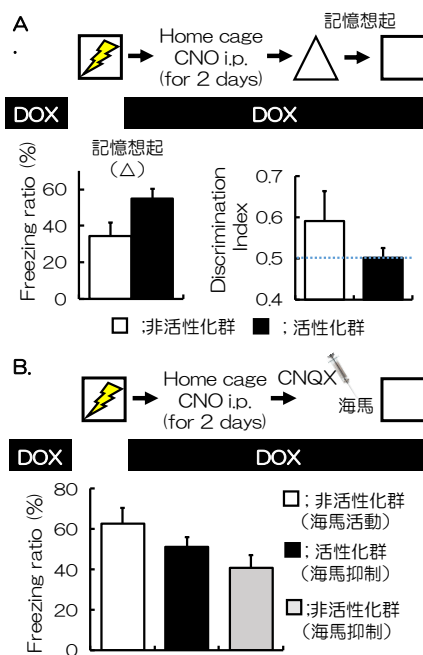


図4. 学習後の大脳皮質-海馬神経細胞活動操作

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 6 件)

1. Kanehiro Hayashi, Asako Furuya, Yuriko Sakamaki, Takumi Akagi, Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Tsutomu Hashikawa, Kazuki Shimizu, Haruka Minami, Yoshitake Sano, Manabu Nakayama, Teiichi Furuichi

[The brain-specific RasGEF very-KIND is required for normal dendritic growth in cerebellar granule cells and proper motor coordination] PLoS One. 12(3):e0173175. 2017

2. Miou Zhou, Stuart Greenhill, Shan Huang, Tawnie K Silva, Yoshitake Sano, Shumin Wu, Ying Cai, Yoshiko Nagaoka, Megha Sehgal, Denise J Cai, Yong-Seok Lee, Kevin Fox and Alcino J Silva.

[CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory.] eLIFE, 5:e20985. 2016

3. Fumio Yoshikawa, Yumi Sato, Koujiro Tohyama, Takumi Akagi, Tamio Furuse, Tetsushi Sadakata, Mika Tanaka, Yo Shinoda, Tsutomu Hashikawa, Shigeyoshi Itoharu, Yoshitake Sano, M. Said Ghandour, Shigeharu Wakana and Teiichi Furuichi

[Mammalian-Specific Central Myelin Protein Opalin Is Redundant for Normal Myelination: Structural and Behavioral Assessments] PLoS One, 11(11):e0166732. 2016

4. Thomas Rogerson, Balaji Jayaprakash, Denise J Cai, Yoshitake Sano, Yong-Seok Lee, Yu Zhou, Pallavi Bekal, Karl Deisseroth and Alcino J Silva.

[Molecular and Cellular Mechanisms for Trapping and Activating Emotional Memories] PLoS ONE, 11(8): e0161655. 2016

5. Yo Shinoda, Chiaki Ishii, Yugo Fukazawa, Tetsushi Sadakata, Yuki Ishii, Yoshitake Sano, Takuji Iwasato, Shigeyoshi Itoharu and Teiichi Furuichi

[CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus] Scientific Reports, 6, Article number: 31540. 2016

6. Denise J. Cai, Daniel Aharoni, Tristan Shuman, Justin Shobe, Jeremy Biane, Weilin Song, Brandon Wei, Michael Veshkini, Mimi La-Vu, Jerry Lou, Sergio Flores, Isaac Kim, Yoshitake Sano, Miou Zhou, Karsten Baumgaerte, Ayal Lavi, Masakazu Kamata, Mark Tuszynski, Mark

Mayford, Peyman Golshani and Alcino J. Silva
[A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time] Nature, 534 (7605): 115-118. 2016

[学会発表] (計 12 件)

1. A deficiency of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 affects hippocampal long-term potentiation.

Y.ISHII, C.ISHII, Y.SHINODA, Y.SANO, T.FRUICHI

2016年11月12日～11月16日

Society for Neuroscience
San Diego (USA)

2. Adaptor protein, X11 and X11L have distinct roles in exploratory activity.

T. SATO, R. MOTODATE, Y. SANO, S. KAMADA, S. UCHIDA, T. SUZUKI

2016年11月12日～11月16日

Society for Neuroscience
San Diego (USA)

3. Linking memories across time

D.J. CAI, D. AHARONI, T. SHUMAN, J. SHOBE, J. BIANE6, W. SONG, B. WEI, M. VESHKINI, M. LA-VU, J. LOU, S. FLORES, I. KIM, Y. SANO, M. ZHOU, K. BAUMGAERTEL, A. LAVI, M. KAMATA, M. TUSZYNSKI, M. MAYFORD, P. GOLSHANI and A. J. SILVA

2016年11月12日～11月16日

Society for Neuroscience
San Diego (USA)

4. Role of CCR5 in learning and memory and in HIV V3 peptide induced cognitive deficits

M. ZHOU, S. GREENHILL, S. HUANG, T. SILVA, Y. SANO, S. WU, Y. CAI, Y. NAGAOKA, M. SEHGAL, D. CAI, Y.-S. LEE, K. FOX and A. J. SILVA

2016年11月12日～11月16日

Society for Neuroscience
San Diego (USA)

5. Linking Memories Across Time

Denise Cai, Daniel Aharoni, Tristan Shuman, Justin Shobe, Jeremy Biane, Melissa Song, Brandon Wei, Michael Veshkini, Mimi La-Vu, Jerry Lou, Sergio Flores, Yoshitake Sano, Mark Tuszynski, Baljit Khakh, Mark Mayford, Peyman Golshani, Alcino Silva

2016年11月10日～11月11日

Molecular and Cellular Cognition Society
San Diego (USA)

6. Role of CCR5 in learning and memory and in HIV V3 peptide induced cognitive deficits
Zhou M, Greenhill S, Huang S, Silva TK, Sano Y,
Wu S, Cai Y, Nagaoka Y, Sehgal M, Cai D, Lee Y,
Fox K, Silva AJ
2016年11月10日～11月11日
Molecular and Cellular Cognition Society
San Diego (USA)

7. メモリーアロケーションの神経基盤 ～これから起きる出来事はどの神経細胞に保存されるのか？～
佐野 良威
第159回日本獣医学会学術集会
2016年9月6日～9月8日
日本大学（神奈川県・藤沢市）

8. Neuronal memory allocation ～記憶を保存する神経細胞群は学習前に決められているのか？～
佐野 良威
2016年3月14日
東京理科大学 特別講演
東京理科大学（千葉県・野田市）

9. CCR5 is a suppressor for learning and memory
M. ZHOU, S. GREENHILL, S. HUANG, T. SILVA, Y. SANO, S. WU, Y. CAI, Y. NAGAOKA, D. CAI, Y.-S. LEE, M. CHU, K. WONG, K. YAMAMOTO, K. FOX, A. J. SILVA
2015年10月17日～10月21日
Society for Neuroscience
Chicago (USA)

10. CREB/DREADD system: switching on/off recovery of motor function after stroke
L. CARACCILO, A. HAMADE, T. BULFONE, A. GUZNER, Y. SANO, A. J. SILVA, S. T. CARMICHAEL
2015年10月17日～10月21日
Society for Neuroscience
Chicago (USA)

11. 記憶を保持するセルアセンブリの選択機構 ～メモリーアロケーションの分子細胞基盤～
佐野 良威
2015年5月26日
福井大学 社会行動研究会
子どものこころの発達研究センター
福井大学（福井県・吉田郡）

12. メモリーアロケーションの分子細胞機構～記憶を保持する神経細胞はどのように選択されるのか？～

佐野 良威
2015年5月14日
北海道大学 特別講演会
主催：北海道大学大学院薬学研究院
日本薬学会北海道支部
共催：日本生化学会北海道支部
北海道分子生物学研究会
北海道大学（北海道・札幌市）

〔図書〕（計 1 件）

生体の科学 67(1)
「記憶痕跡とメモリーアロケーション」
佐野 良威、大川 宜昭、鈴木 章円、井ノ口 馨
金原一郎記念医学医療振興財団
2016年、92ページ（22-26）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 良威（Yoshitake Sano）
東京理科大学・理工学部・
応用生物科学科・助教
研究者番号：90415175

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者