

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03319

研究課題名（和文）記憶形成タイムコースを担う脳内機構の解明と制御

研究課題名（英文）Research on the mechanism regulating the time-course underlying memory formation

研究代表者

安部 健太郎（Abe, Kentaro）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70462653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：動物の記憶形成の過程において脳内の細胞における新規な遺伝子の発現が必要であることは知られる。転写因子は細胞の遺伝子発現を直接制御する因子であり、トランスクリプトームの変化を介して神経の可塑的な変化を制御する因子であるが、生体脳内において記憶形成の過程で転写因子の活性がどのように変化しそれが神経系の可塑的な変化と記憶形成にどのように影響するのかが不明である。本研究は、新規技術を用いマウス記憶形成過程における多数の転写因子の活性変化タイムコースを明らかにし、それが記憶形成に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、記憶の形成過程において脳内に起こる遺伝子発現変化とその制御因子の活性変化を新規技術を用いて明らかにした。本研究によって確立した技術と知見は、記憶形成の分子機構を明らかにし、それにかかわる脳神経機構やそのような能力の発達機構を解明する研究の進捗に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The crucial role of novel gene transcription within brain neurons during the memory formation is well established. Transcription factors, which are vital components that directly modulate gene expression, are known to orchestrate the plastic change of the nervous system via the dynamic influence to the transcriptome. Despite their importance, there are lack of understanding regarding the dynamic activity patterns of transcription factors within a live brain during the memory formation process. The current study had harnessed a cutting edge technology to elucidate the temporal dynamics of activity across a multitude of transcription factors in mice brain. Consequently, the study had revealed the pivotal role these transcription factors play in the regulation of time-course of memory formation.

研究分野：神経科学

キーワード：転写因子 記憶形成 可塑性

1. 研究開始当初の背景

動物の記憶形成の脳内機構は、神経科学におけるとりわけ重要な研究分野であるものの、現在までに明らかにできている部分は少ない。記憶は脳内神経伝達効率の長期的・可塑的な変化として捉えられ、それらの背景には脳内神経回路の物質的変化が伴うことは広く認知されている。実際、動物の長期記憶の形成には、記憶に関わる神経回路を構成する細胞において、新たな遺伝子の発現とその転写産物の生成が必要であることは広く知られる。単純な神経系をもつアメフラシなどの動物では、記憶形成の分子機構の解明が進み、特定の遺伝子の発現長期記憶の獲得に必須であることが知られる。転写因子は遺伝子発現を直接制御する普遍的因子であり、神経系において記憶形成にも関わることが多くの動物種において知られている。哺乳類においても生体外で培養した神経細胞の研究から、神経活動依存的な活性を示す転写因子がシナプス可塑性に必要であることが知られる。しかしながら、哺乳類の生体内において、記憶の形成過程にどの転写因子の活性が、どのような時間経過で、どの程度変化するのかについては明らかにできていない部分が多い。とりわけ成体の動物脳内において転写因子の活性がどのように変化するのかに関して定量的、効率的な解析を行える実験系は存在せず、その確立が求められていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、近年、成体脳内の転写因子活性を定量的に計測・可視化することを可能にする新規ウイルスベクター系と、それを利用した“転写因子活性プロファイリング法”を開発した (Abe et al., PNAS 2015)。本手法は生体脳内の細胞が内在的に発現する多数の転写因子の活性を数値化することができる、研究代表者らによる独自開発技術である。既に、本手法を用いて、生体外において、マウス大脳皮質神経細胞の分散初代培養系において、活動依存的な転写因子活性を約 70 種の転写因子について定量的に計測し、多数の転写因子の活性が神経活動依存的に変化すること、また、個々の転写因子はそれぞれ特徴的な活性のタイムコースをとることを明らかにしている。本研究では、本手法を生体脳に適用し、生体内において刺激や学習に応じた転写因子活性の変化を測定することを目的とする。具体的には、本研究においてはマウス (*Mus musculus*) の記憶形成過程の生体脳内において約 50 種の転写因子活性が、それぞれどのようなタイムコースで活性が変化するのかを解明した。また、反復学習刺激による長期記憶形成をモデルに、短期間における集中的な学習刺激を与える集中刺激条件と、刺激間に時間間隔を開けた間隔刺激条件における各転写因子の活性と短期・長期記憶形成の関連性を明らかにすることを実行した。さらに、転写因子活性のタイムコース解析を基にシミュレーションを行い、転写因子活性を指標にすることで、情報提示の適切な時間間隔・繰り返し数など、長期記憶の形成を促進するような情報提示法を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者の独自開発技術を用いて、マウスの記憶学習形成過程において生体内脳内で多数の転写因子活性を定量計測する。記憶形成過程における多数の転写因子活性の活性を表す「転写因子活性プロファイル」を経時的に取得し比較することにより、長期記憶形成に関与する転写因子を明らかにするとともに、それらの転写因子の遺伝子転写活性の活性が増減するタイムコースを明らかにする。反復して提示された刺激に対し長期記憶を形成する学習過程をモデルに、各転写因子活性の活性変化タイムコース解析、数理モデル化、活性シミュレーションにより、記憶形成を最も促進する刺激提示法を明らかにする。本研究手法により、学習に関わる脳内内部の“可塑性状態”を計測しながら、適切な刺激を提示することにより、記憶学習の分子・神経メカニズムを明らかにするとともに、動物における記憶獲得の効率化を図る。

具体的な実験方法としては、研究代表者が作成し、すでに論文発表しているレンチウイルスベクターをもとにした CREB 転写因子活性測定ベクターを改変し、生体内において主要な働きをすることが報告されている 100 種程度の転写因子の活性測定を可能にする多数ウイルスベクターシステムを開発する。その後、そのウイルスベクターシステムを用いてマウス脳内の特定の細胞における生体脳内転写因子活性測定を実施し、多数のマウスの多数の転写因子活性のデータからなる「転写因子活性プロファイル」を取得する。実際の測定の際にはマウス新生個体の脳に複数の異なる転写因子に対するレポーターウイルスを混合して感染させることで、このマウスが成体になった後に、特定の細胞種における複数の転写因子の活性の定量測定を行う。本研究で使用した転写因子活性測定ウイルスベクターは、各ベクターに 2 種類の独立なプロモーターとレポーター遺伝子を搭載する。1つのプロモーターは恒常的な活性をもつ PGK プロモーターを使用し、他方のプロモーターは特定の転写因子の転写因子結合配列と Minimum プロモーターから構成され、当該転写因子の活性に依存してレポーターの発現量が変化するように設計されている。転写因子活性の測定は、各転写因

子毎に行い、転写因子活性測定ウイルスベクターに搭載するそれぞれ2種類のレポーター遺伝子の mRNA 量をそれぞれに対する特異的な PCR プライマーを使用した定量 RTPCR 法によって行う。脳内の転写因子活性測定は動物の学習刺激提示後複数のタイムポイントにて行い、動物から迅速に脳を摘出し特定の脳部位を切除後、組織から総 RNA を精製し、それをもとに定量的 RTPCR 解析を実施する。測定した各転写因子の活性は、未学習群マウスのデータと比較することで転写因子活性変化を解析する。複数の転写因子の活性を統合し、多数の転写因子活性を包括的に表す「転写因子活性プロファイル」を作成する。この転写因子活性プロファイルを学習前後および異なる学習刺激条件において取得し、その解析を行うことで記憶形成の背後にある転写因子の同定と、その活性タイムコースの測定を実行する。

本研究ではマウスでの記憶形成過程の分子機構変化を調べるため、上記手法において作成したマウス成体（8-12週齢程度）を用い、恐怖条件づけ試験における文脈記憶形成、および他個体社会相互作用試験における社会記憶形成に関して調査を実施した

4. 研究成果

これまでに研究代表者らはウイルスベクターを用いて鳴禽類脳内の CREB 転写因子の活性を定量計測することを実現している（Abe et al., PNAS 2015）。本研究では、この技術に改良を加え、生体動物脳内の多数の転写因子の内在活性を効率的に定量的測定し、転写因子活性プロファイルとして表現する新規技術を確立し、これを論文発表した（Abe and Abe, iScience, 2022）。また、マウスにおいて効率的に脳内転写因子活性を測定し、転写因子活性プロファイルとして表す技術を確立し、この詳細を論文発表した（Yamamoto and Abe, STAR Protocols, 2022）。本研究では上記の新規技術を活用し、マウスにおいて記憶形成の過程で脳内の転写因子活性が時間とともに変化する過程の詳細を明らかにすることに取り組んだ。

本研究ではマウスでの記憶形成過程の分子機構とその活性の変動を調べるため、学習後1日以上持続する長期記憶形成に着目し、主に恐怖条件づけ試験における文脈記憶形成、および他個体社会相互作用試験における社会記憶形成の2通りの記憶に関して調査を実施した。脳内転写因子活性測定のためには研究代表者らがすでに作成しているレンチウイルスベクターによる転写因子活性レポーターコンストラクト（Abe et al., PNAS 2015）で使用した測定法を基盤とし、さらに大幅な改良を加え、同一サンプルから多数の転写因子活性測定と、測定対象の細胞種を限局できるウイルスベクターシステムをアデノ随伴性ウイルスベクターにおいて作成した。これらの多数転写因子活性測定レポーターシステムを脳内神経細胞に発現させた遺伝子改変マウスを作成し、定量的 RTPCR 法によってそれらのレポーター遺伝子の発現量を定量評価し、それぞれのレポーターコンストラクトが対象とする各転写因子の内在的活性を算出した。転写因子活性レポーターコンストラクトはマウス1個体あたり20程度を混合して使用し出産直後の新生仔マウスの大脳皮質および海馬に遺伝子導入し、成長後に学習刺激を行い適切なタイムポイントにおいて脳組織を回収し、RNA サンプルを取得した。本研究では Cre-LoxP 遺伝子組み換えシステムを併用することで細胞腫特異的な転写因子活性測定技術を確立した（Abe and Abe, iScience, 2022）。本研究においてはこの改変コンストラクトを使用し、シナプシンプロモーターを用いて神経細胞特異的な Cre リコンビネースの発現を使用することで成体脳内の限局した脳領域において神経細胞特異的な転写因子活性測定を行った。

まず、マウス社会記憶課題において反復した学習情報の提示によって1日以上持続する記憶が形成される長期記憶条件（LMP）と、1日未満しか持続しない記憶が形成される短期記憶条件（SMP）を導出し、および学習刺激を反復しない単回学習条件（SLP）と比較した。まず、免疫、発生、がん、神経など生体内の様々な局面において主要な役割をすることが報告されている転写因子50余種を対象に、転写因子の活性を SLP 条件において学習後の時間経過とともに測定した。この SLP 条件では、20余種の転写因子の活性を複数個体において測定したところ、複数の転写因子に関して学習刺激後の活性の変動が認められた。また、学習刺激後0h、1h、2h、4h、8h、24hにおいて転写因子活性測定を実施したところ、転写因子活性のタイムコースは様ではなく、転写因子によって様々な活性動態を示すことが明らかになった。例えばある転写因子は2hで大きな活性上昇が見られ、その活性は4hにおいては低下しており、別の転写因子は2h時点においては活性変化が認められないものの8h時点において大きく活性変動が見られた。このような結果は、生体脳内の転写因子の活性は時間的にダイナミックに変動するものであることを示しており、また、その変動タイムコースは転写因子によって異なることを示唆している。次に LMP 条件、SMP 条件においても同様の転写因子活性測定を実施し、それらの活性プロファイルを SLP 条件と比較した。この解析により、反復した刺激によって形成される記憶の性質と相関のある転写因子の活性変化を明らかにすることができる。この解析の結果、SMP 条件、LMP 条件ともに活性が変化する転写因子（CREB 等）の他、SMP 条件のみで活性変化が見られる転写因子、LMP 条件のみで活性変化が認められる転写因子を同定した。次に実際に学習後の活性変化が観察される転写因子の活性を CRISPR・Cas9 法を用い、海馬において操作したところ学習の形成に影響が見られたことから、本研究で観察した学習後に活性の変化が見ら

れる転写因子は実際に記憶形成に必要であるものがあることが明らかになった。

次に、これまでにマウスにおいて記憶の形成に影響があると考えられている刺激が脳内転写因子活性に及ぼす影響に関して解析を実行した。急性および慢性的ストレス経験は記憶形成効率に影響することが知られているが、その効果に関しては記憶の増強に働く場合や阻害に働く場合などが報告されており、実験系や刺激条件の違いによって共通した意見は得られていない。本研究ではマウスに2時間の拘束ストレスを負荷し、その後の記憶形成と脳内転写因子活性測定を実施することでストレスの負荷が学習に関与する転写因子に及ぼす影響を探索した。まず、2時間の拘束ストレスを負荷し、その1時間後において恐怖条件づけ学習課題を課し、記憶形成を調べた結果、ストレス負荷により、学習後1日以上持続するの長期記憶形成の効率が有意に低下することが明らかになった。一方で、学習直後30分後の短期記憶には有意な影響は見られなかった。このような急性ストレス負荷の後、上記の脳内転写因子活性プロファイル取得法を用いて多数の転写因子活性の測定を実施した結果、2時間の拘束ストレス負荷後1時間時点において複数の転写因子の活性が変化していることが明らかになった。そのようなストレスに応じた転写因子活性変化の中には、CREB転写因子の低下も含まれていた。CREBはマウスにおいても記憶形成に重要な役割を果たすことが報告されている転写因子であり、本研究の実験系においても恐怖条件づけ学習課題の記憶形成に関わることがCREB転写因子を対象にしたCRISPR/Cas9による活性操作の実験によって明らかになった。

本研究では学習に伴う脳内の転写因子活性の変化を新規技術において計測し、脳内の転写因子は刺激に応じて時間的にダイナミックにその活性を変化させること、また、そのような活性の変化が記憶形成に関連することを明らかにした。本手法を適用し、より詳細に各転写因子の活性を測定し、転写因子活性と記憶形成との因果関係を実験的に明らかにすることで記憶形成にともなう脳内可塑性の分子機構をより詳細に明らかにすることができる。また、本技術を活用することにより、疾患や生活習慣、ストレスなどが脳の機能へ及ぼす影響に関して転写因子活性を指標にした解析を実行することで、それらの影響から脳機能低下を予防する手段の確立につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hitomi Abe, Kentaro Abe	4. 巻 25
2. 論文標題 PCR-based profiling of transcription factor activity in vivo by a virus-based reporter battery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103927 ~ 103927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hajime, Abe Kentaro	4. 巻 3
2. 論文標題 Protocol for viral vector-mediated measurement of transcription factor activity of mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101633 ~ 101633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hajime Yamamoto, Ryoichiro Hara, Kentaro Abe
2. 発表標題 Comparison of the activity profiles of transcription factors in the brains of mice experienced different stressors
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島海大、森田裕也、鎌田里実、安部健太郎
2. 発表標題 昼夜の学習効率の違いを生み出す脳内細胞状態変化の分子機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大森彩音, 山本創, 安部仁美, 安部健太郎
2. 発表標題 生体内転写因子活性プロファイリングが明かす生活習慣による認知機能変化の機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福江遼太郎, 白石健, 小野寺諒馬, 安部健太郎
2. 発表標題 記憶形成に関わる脳内転写因子の同定とその制御の試み
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoma Onodera, Ryotaro Fukue, Takeru Shiraishi and Kentaro Abe
2. 発表標題 Quantitative measurement of the activity of transcription factors in the brain during memory formation.
3. 学会等名 ACC International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hajime Yamamoto, Satomi Araki and Kentaro Abe
2. 発表標題 Identification of Transcription Factors Associated with Depressive Behavior with Transcription Factor Activity Profiling
3. 学会等名 ACC International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satomi Kamada and Kentaro Abe
2. 発表標題 Molecular mechanisms related to the cognitive decline after acute stress in rodents.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・CJK第1回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riku Tateyama, Takeru Shiraishi and Abe Kentaro
2. 発表標題 Comparison of the activity pattern of transcription factors in vivo during learning
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・CJK第1回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hajime Yamamoto, Satomi Araki and Abe Kentaro
2. 発表標題 Comparing the activity profiles of transcription factors in the brains of mice experiencing stressful events
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・CJK第1回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間美緒、安部健太郎
2. 発表標題 末梢免疫の賦活化が脳機能へ及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原龍一郎、安部健太郎
2. 発表標題 習慣的な運動負荷が脳内転写因子活性に及ぼす影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riku Tateyama, Takeru Shiraishi and Kentaro Abe
2. 発表標題 Comparison of the activity pattern of transcription factors in vivo during learning
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hajime Yamamoto, Satomi Araki and Kentaro Abe
2. 発表標題 Comparing the activity profiles of transcription factors in the brains of mice experiencing stressful events
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satomi Kamada and Kentaro Abe
2. 発表標題 Molecular mechanisms related to the cognitive decline after acute stress in rodents.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hajime Yamamoto, Satoka Nozawa and Kentaro Abe
2. 発表標題 Exploring the molecular mechanism for how early-life stress impacts on the mice brain
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 健太郎
2. 発表標題 経験依存的な脳の変化を転写因子活性プロファイリングにより解明する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡部 真緒, 安部 健太郎
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおける脳内転写因子活性の変化
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生体内細胞の多数の転写因子の活性測定法を開発 https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2022/02/press20220222-01-profiling.html</p>
--

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	山本 創 (Yamamoto Hajime)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	
研究協力者	小野寺 諒馬 (Onodera Ryoma)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	
研究協力者	福江 遼太郎 (Ryotaro Fukue)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	
研究協力者	白石 健 (Shiraishi Takeru)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	
研究協力者	鎌田 里実 (Kamada Satomi)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	
研究協力者	大森 彩音 (Ohmori Ayane)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	

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