

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700340

研究課題名(和文) 脳内における記憶情報の転送メカニズムの解明

研究課題名(英文) Memory transfer across neural networks

研究代表者

坂口 昌徳 (SAKAGUCHI, MASANORI)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：60407088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：脳内で記憶情報が転送されている直接的な証拠を示すために、1. 特定の記憶を貯蔵している神経回路に遺伝子発現を誘導する技術、2. その神経回路が投射する脳内部位の神経回路を遺伝学的に追跡する技術、3. その投射先の神経回路を操作する技術、の3つを検討した。1について、海馬にて記憶貯蔵回路をCREB遺伝子によって誘導することは困難であることが判明した。そこで、光遺伝学を用いて人工的に記憶回路を誘導する技術を新たに考案した(未発表)。2についてWGA-Creを用いる方法が困難であったためVSVウイルスを使う方法を模索中である。3について、光遺伝学的手法を検討し、一定の成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To provide evidence that memory transfers across neuronal networks, the following three attempts were made: 1.) inducing expression of target genes in the neuronal circuit which encodes memory, 2.) tracing brain areas where the above neuronal circuit projects its axons, and 3.) manipulating the aforementioned neuronal circuits. For the first attempt, it was proven difficult to induce the neuronal circuit in the hippocampus to encode memory by CREB gene overexpression. Therefore, a new approach to artificially induce memory encoding by optogenetics has been carried out (unpublished results). Since it was deemed problematic to utilize WGA-Cre for the purpose of the second attempt, a new approach utilizing VSV has been undertaken. Finally, the optogenetic technique was established in the third attempt which produced some usable data.

研究分野：記憶

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経科学一般

キーワード：神経科学 脳・神経 記憶方式 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

我々人間が、脳内で記憶情報をどのように貯蔵しているかは明らかでない。この点においてもっとも研究の進んでいる脳内の機構として、記憶の固定化過程が挙げられる。最初のブレイクスルーは、海馬を外科的に除去した患者(H.M.氏)の症状の研究から得られた。この患者は手術後に起こった物事を全く記憶することができなくなった。対照的に、数年前以前の記憶については保たれていた。この事実から、海馬が最初の記憶の形成に重要な役割を果たしていること、そして一旦形成された記憶は、海馬の外において固定化されるという仮説が立てられた。

以降、記憶の固定化に関する多くの研究成果が得られた。例えば海馬内の CA1 領域もしくは CA3 領域における神経を特異的に障害する実験系を用い、齧歯類において記憶は約 3 週間程度海馬に留まることが示唆された(Shimizu et al., Science, 2000, Nakashiba et al., Neuron, 2009)。一方、申請者の留学先研究室の主催者である Frankland らは、海馬から文脈記憶情報が転送される脳内部位として、大脳皮質の一領域である前帯状回的重要性を示唆した。すなわち固定化した記憶を想起する際に前帯状回が活性化されること、さらに最初の記憶の記銘から 1 日目および 3 日目に、前帯状回に神経毒を注入すると記憶は傷害されないが、18 日目および 32 日目に注入すると記憶が障害されることを示した(Frankland et al., Science, 2004)。最近、匂い記憶情報が海馬で記銘されると、30 日後には眼窩前頭皮質に依存するようになることが明らかにされた。また匂い情報への海馬の寄与期間は約 2 週間程度であった(Lesburguères et al., Science, 2011)。

これらの研究にも関わらず、海馬と他の脳領域の間において記憶情報が転送されていることは直接証明されていない。主な理由として、これまでの研究では海馬で記憶を担う神経細胞集団を同定すること、およびそれら特定の神経集団を正確な時間分解能を持って同時に操作することが困難であったことが挙げられる。

2. 研究の目的

記憶が脳内で貯蔵される過程において、最初に海馬で記銘された記憶情報は、時間を経た後に、大脳皮質において長期記憶として固定化されることが示されている(図 1)。しかしながら、この過程において、神経細胞間でどのように記憶情報が伝達されているかの詳細は明らかでない。本研究においては、光遺伝学的手法(Optogenetics)を用い、脳内の神経細胞間で記憶情報が転送されていることを直接証明する。このために、まず記憶情報の転送過程における時系列を明らかにする。次に、記憶情報の転送先の神経細胞を可視化する。最後に、記憶情報が転送された神経細胞集団の活動を人工的に制御すること

で、海馬外のどの脳領域に、いつ、どの程度記憶情報が依存するようになるかを明らかにする。

具体的には以下の三点を目的として研究を遂行した。

(1) 記憶情報の転送過程における時系列を明らかにする

記憶固定化のプロセスの異なる時間地点において、海馬内で記憶を保持している神経細胞集団を選択的に不活性化することで、記憶情報の転送にかかる正確な時間経過を明らかにする。

(2) 記憶情報の転送先の神経ネットワークを可視化する

記憶を保持している海馬の神経細胞から、シナプスを介して接続している神経細胞を可視化することで、記憶の転送に関与する神経回路を明らかにする。

(3) 記憶情報転送先の個別の神経細胞集団の、記憶全体における寄与度を明らかにする

最初に記憶を形成した海馬の神経細胞にシナプスを介して接続した海馬外の神経細胞を選択的に活性化および不活性化することで、海馬外の特定の神経細胞集団における記憶への寄与度を明らかにする。

3. 研究の方法

成体マウスに海馬依存性の記憶学習課題を与えた後、CREB 遺伝子の強制発現技術を用いて海馬内の神経細胞に記憶の貯蔵を誘導する。光遺伝学的手法を用いて、それらの神経細胞を選択的に活性化および不活性化する。学習課題から神経細胞の不活性化までの期間を様々に変更して、その記憶における影響を検討する。海馬神経細胞の不活性化が記憶の想起に影響を受けなくなる最短の時間が、記憶転送完了の時間と考えられる。つぎに、記憶を貯蔵する神経細胞が海馬外の脳組織と作る神経回路を、神経トレーサー分子および Immediate early gene 染色を同時に用いて可視化する。これにより記憶の転送先の神経細胞の局在が求められる。さらに、これらの海馬外の神経細胞に実際に記憶が転送されたかを確認するために、光遺伝学的手法および iDTR/DTsystem を用いることでこれらの神経細胞を活性化および不活性化し、記憶全体における寄与を検討する。

方法 1

海馬 CA1 領域は、文脈情報の貯蔵が起こることが証明されており、かつ海馬のなかで最も多くの脳部位への神経投射が存在する場所である。実際に記憶の転送先と予想さ

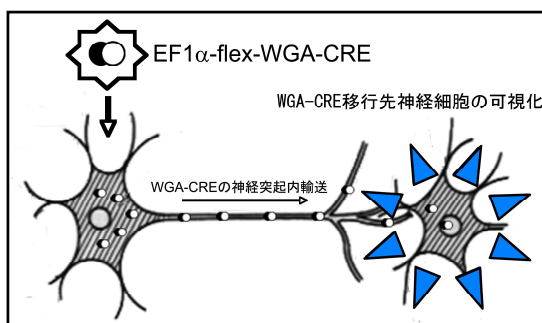
れる皮質部位(Retrosplenial Cortex 等)との接続も証明されている。そこで、記憶を貯蔵する海馬 CA1 神経細胞を様々なタイミングで選択的に不活性化し、記憶に対する影響を観察する事で記憶情報転送の時間経過を明らかにする。

遺伝子を導入させた神経細胞に選択的に記憶を貯蔵させるために、CREB (と ArchT)遺伝子を LT-HSV ウイルスペクターを用い同時に海馬に発現する。この動物で学習課題を実行すると、CREB を過剰発現した神経細胞に恐怖記憶が選択的に貯蔵されることが知られている(Han et al., Science, 2009, Zhou Y et al., Nat. Neurosci.,2009)ので、その神経活動を ArchT にて不活性することが出来る。なお、記憶を貯蔵しない神経細胞を不活性化する影響を最小限にするため、記憶に影響を与えうる最少必要量の LT-HSV 投与量を予備実験により同定する。以降、上記同様に学習課題後の様々なタイミングで ArchT を発現する神経細胞に光刺激を与え、記憶転送の期間を明らかにする。尚 LT-HSVvector は HSV ベクターの改良型であり、神経に選択的に感染しかつ5週間以上の目的遺伝子の発現が可能である(申請者検証済み)。

方法 2

記憶を貯蔵する海馬 CA1 神経細胞が投射する神経細胞を可視化するために、シナプスを越えて働く WGA-Cre あるいは TTC-Cre を CA1 細胞に発現する。次に WGA(TTC)-Cre が移行した投射先のニューロンを Cre 活性を利用したレポーター系で検出する(図 1)

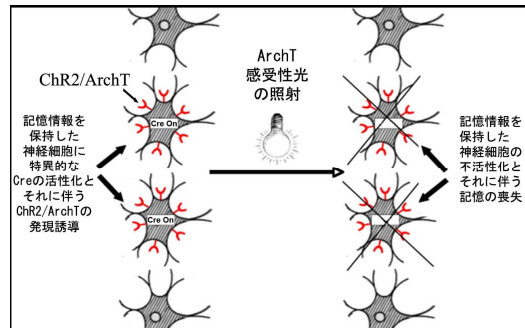
図 1



方法 3

実験 2 にて同定された学習時に記憶を貯蔵した神経細胞が投射している海馬外の神経細胞がいつ、どの程度記憶に寄与するか明らかにする。このため、投射先の細胞に ChR2/ArchT を発現させ、これらの神経細胞を選択的に(不)活性化し、記憶への影響を観察する(図 2)。

図 2



4. 研究成果

本研究では、脳内で記憶情報が転送されている直接的な証拠を示すことを目指した。本研究を達成するためには以下の3つの要素技術が必要である。1. 特定の記憶を貯蔵している神経回路に選択的に目的遺伝子の発現を誘導する技術。2. その神経回路が投射する他の脳内部位の神経回路を遺伝学的に追跡する技術。3. その投射先の神経回路を操作する技術である。1を達成するために、当初 CREB 遺伝子の強制発現を使う方法を模索したが、様々な条件検討の結果、海馬において記憶貯蔵回路を CREB 遺伝子の強制発現によって誘導することは困難であることが判明した。そこで、光遺伝学を用いて人工的に記憶回路を誘導する技術を新たに考案し、それに対して一定の成果を得ることができた(未発表)。また、c-fos 遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いる方法についても検討を開始した。2を達成するために WGA-Cre という遺伝子を用いる方法を模索したが、これについてもレンチウイルスを使って以前論文に発表された結果を再現することができなかつたため VSV という別のウイルスを使う方法を現在も模索中である。3について、光遺伝学的手法を検討し、一定の成果を得ることができた。研究半ばでは有るが、これらの成果が評価され、研究期間中に、筑波大学で独立した研究室を持つこととなり、本研究の完成を目指し現在も研究を継続中である。

本研究は、PTSD などのヒト疾患に応用することで、社会的に重要な意義を与えることができる。現在、筑波大学精神保健衛生グループ、国立精神・神経センター精神保健研究所との共同研究などにより、本研究の精神科領域への臨床応用可能性を模索中である。

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 3 件)

1. Sakaguchi M and Hayashi Y, Catching the engram: strategies to examine the memory trace, Mol. Brain 2012Oct, 5:32(359 viewed in the first

10days, 6th best viewed during the 1st month)査読有り, doi:
10.1186/1756-6606-5-32.

2 . Hirota Y, Sawada M, Kida Y, Huang SH, Yamada O, Sakaguchi M, Ogura T, Okano H, Sawamoto K, Roles of planar cell polarity signaling in maturation of neuronal precursor cells in the postnatal mouse olfactory bulb, Stem Cells, 2012 Aug;30(8):1726-33.査読有り

3 . Sakaguchi M, Okano H. Neural stem cells, adult neurogenesis and galectins: from bench to bedside, Dev. Neurobiol., 2012 Jul;72(7):1059-67. doi:
10.1002/dneu.22023.査読有り

〔学会発表〕(計4件)

1 . Sakaguchi M., Sleep and Memory, The summer research workshop of Comprehensive Brain Science Network, Nagoya, Japan, 2013Aug30

2 . Sakaguchi M., Discovering sleep governed by orexin at the International Institute for Integrative Sleep medicine., The 38th annual meeting of the Japanese Society of Sleep Research, Akita, Japan, 2013Jun27-28

3 . Sakaguchi M., Neural Stem Cells, Adult Neurogenesis and Memory: an overview of my past work and vision in IIS, The 1st Annual IIS Symposium - Solving the mystery of sleep, Tsukuba, Japan, 2013Mar27

4 . Sakaguchi M., Function of adult neurogenesis in visual discrimination memory, Symposium on Behavioral Molecular Neuroscience 2012, Tokyo, Japan, 2013Mar26

〔その他〕

ホームページ等

本研究を動画を用いて紹介するホームページを作成した

<http://sakurai-sakaguchi.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂口 昌徳 (Sakaguchi, Masanori)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：60407088