

多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理

**Principles of memory dynamism elucidated
from a diversity of learning systems**

2013 年度～2017 年度

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

新学術領域研究（研究領域提案型）

研究成果報告書

領域略称名「記憶ダイナミズム」

領域番号（ 3505 ）

2019 年 5 月

領域代表者

公益財団法人東京都医学総合研究所

基盤技術研究センター・センター長

齊藤実

目 次

1	はしがき	
2	領域全体の概要	
2.1	研究組織	11
2.2	交付決定額	14
2.3	研究発表	14
2.3.1	雑誌論文	
2.3.2	学会発表	
2.3.3	図書	
2.4	研究成果による産業財産権の出願・取得状況	74
2.5	報道記事	75
2.6	研究成果の概要	87
2.6.1	研究領域の設定目的	
2.6.2	主な成果	
2.6.3	まとめ	
2.7	総括班の活動	95
2.7.1	班会議、ワークショップ	
2.7.2	アウトリーチ	
2.8	評価委員による評価	99
3	個別研究成果報告	
3.1	計画研究	
	記憶情報の変換ダイナミズムを担うショウジョウバエ神経・分子マシナリーの解明 東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野 齊藤 実	103
	哺乳類の脳機能老化メカニズムの解明を通じた記憶ダイナミズムの理解 東京大学・大学院新領域創成科学研究科 久恒 辰博	107
	ショウジョウバエの匂い記憶情報処理の時空間ダイナミズムの解明 東京大学定量生命科学研究所 多羽田 哲也	111
	学習記憶に関わる新規分子の発見と神経系における動態・機能の解明 東京大学・大学院理学系研究科 飯野 雄一	115
	げっ歯類の記憶再固定化システムをモデルとした記憶ダイナミクス of 共通原理の理解 富山大学大学院・医学薬学研究部 (医学) 井ノ口 馨	119
	ショウジョウバエ聴覚馴化システムをモデルとした記憶ダイナミズム of 共通原理の解明 名古屋大学大学院・理学研究科 上川内 あづさ	123
	記憶情報を担う細胞集団の時空間的变化の解析 大阪大学大学院・医学系研究科 松尾 直毅	127
	線虫 <i>C.elegans</i> の忘却制御機構から探る記憶のダイナミズム 九州大学大学院・理学研究院 石原 健	131
	ゼブラフィッシュにおける嗅覚記憶ダイナミズム of 分子・細胞・神経回路メカニズム 国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター 吉原 良浩	135
3.2	公募研究	
	記憶の形成と精緻化の神経機構の解明 川崎医療福祉大学医療技術学部 細川 貴之	139
	睡眠中の新生ニューロンの活性化が記憶に及ぼす機能 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構 坂口 昌徳	142
	レム睡眠の操作が可能なマウスを用いた睡眠の質が記憶に及ぼす影響の解明 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構 林 悠	145
	運動学習における長期記憶機構の研究 埼玉大学・理工学研究科 中井 淳一	148
	記憶システムの恒常性維持機構の解明 千葉大学大学院・薬学研究院 殿城 亜矢子	151
	匂い学習記憶を支える嗅覚系の多領域ネットワーク機能の解析 高知大学・医学部 山口 正洋	154

Dual FRET技術を用いた長期神経可塑性機構の解読 東京大学・大学院医学系研究科 尾藤 晴彦	-----	157
個体記憶が異性の好みを生み出す神経動作原理の解明 岡山大学・大学院自然科学研究科 竹内 秀明	-----	160
神経ネットワークの内部状態による記憶の形成、想起の制御 北海道大学・大学院薬学研究院 野村 洋	-----	163
小脳神経回路にコードされる恐怖応答記憶のメカニズムの解明 名古屋大学・生物機能開発利用研究センター 日比 正彦	-----	166
記憶の多様な形成と再形成を実現するセル・アセンブリの解析 同志社大学大学院・脳科学研究科 櫻井 芳雄	-----	169
長期記憶の不安定化を司る分子メカニズムと神経基盤の解明 京都大学・医学研究科 平野 恭敬	-----	172
Cellular environment-dependent RNA methylation at synapse during learning and memory 京都大学・高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 王 丹	-----	175
記憶ダイナミズムをもたらす局所回路形成メカニズムの解析 大阪大学・大学院生命機能研究科 八木 健	-----	176
エピソード学習で動的に変化する海馬発火活動とCA1シナプスの多様な可塑性 山口大学大学院・医学系研究科 美津島 大	-----	179
記憶ダイナミクスの時空間的解析 横浜市立大学・大学院医学研究科 高橋 琢哉	-----	182
運動に関わる局所神経回路の流動性が担う機能 自然科学研究機構生理学研究所・視覚情報処理研究部門 木村 梨絵	-----	184
学習記憶能力を賦与するホルモンの脳内作用メカニズムの解明 帝京大学・薬学部 本間 光一	-----	187
情動記憶ダイナミズムの解明 東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター 渡部 文子	-----	190
記憶を操作するケミカルプローブの開発 東邦大学・理学部 古田 寿昭	-----	192
神経と多臓器間で制御される温度適応メモリーの解析 甲南大学・理工学部 久原 篤	-----	195
注意レベルによって制御される聴覚記憶形成のための神経メカニズムの解明 沖縄科学技術大学院大学・臨界期の神経メカニズム研究ユニット 杉山 陽子	-----	198
状況特異的な報酬学習記憶の高次制御機構 京都大学・大学院医学研究科 小川 正晃	-----	201
幼児性健忘における歯状回成熟度の意義の解明 富山大学・研究推進総合支援センター 高雄 啓三	-----	204
海馬における動的な記憶情報表現の可視化とそのメカニズムの解明 国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター 佐藤 正晃	-----	207
活性酸素種が担うマウス運動記憶の分散効果 東京都健康長寿医療センター研究所 遠藤 昌吾	-----	210
脳内エピジェネティクス変化による運動パターン学習と維持メカニズムの解明 北海道大学・大学院理学研究院 和多 和宏	-----	213
多重解像度カルシウムイメージングデータの解析手法の確立とその応用 東京工業大学・情報理工学院 青西 亨	-----	216
視床下部神経による積極的記憶消去のメカニズム解明 名古屋大学・環境医学研究所 山中 章弘	-----	219
線虫の温度走性を行動モデルとする記憶・学習の制御機構 名古屋大学・大学院理学研究科 森 郁恵	-----	222
AMPA型グルタミン酸受容体の糖鎖修飾による新たなシナプス可塑性の動作原理 宮崎大学・医学部 高宮 考悟	-----	225
学習前の神経回路の操作を可能にする革新的光学技術の開発 横浜市立大学・医学部 竹本 研	-----	227
生後発達に伴う運動記憶ダイナミズムの解明と制御 慶應義塾大学・医学部 掛川 渉	-----	230

連合記憶想起における側頭葉サブ領域間神経回路の研究	
順天堂大学・医学部 竹田 真己	----- 233
記憶の成立と移動を担う小脳神経回路の機能変化	
京都大学・産官学連携本部 川口 真也	----- 236
新規分子活性操作法によるシナプスダイナミズムの意義の解明	
生理学研究所・脳機能計測・支援センター 村越 秀治	----- 239
空間探索における海馬とワーキングメモリの相互作用の回路モデル	
国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター 深井 朋樹	----- 242
自己と他者の空間情報記憶	
国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター 檀上 輝子	----- 245
Noradrenergic regulation of fear and extinction learning	
国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター Joshua Johansen	---- 248
記憶形成、固定、想起における海馬背側CA1セルアセンブリの長期可視化	
京都大学大学院・医学研究科 林 康紀	----- 250
霊長類の作業記憶を制御する神経回路と神経活動の解明	
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター 肥後 剛康	----- 253
神経活動の可塑性と記憶におけるレム睡眠の役割	
大阪市立大学・大学院医学研究科 水関 健司	----- 255

1 はしがき

1 はしがき

本報告書は、2013年度 - 2017年度に実施された文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」（略称：記憶ダイナミズム）の研究成果をまとめたものである。記憶は生命体が進化の過程で獲得、発達した脳の高次機能であり、個体の生存と種の保存に貢献するだけでなく、ヒトでは生活の質の維持・向上を可能とし、個性の創出といった精神活動の基盤となることから非常に魅力的な科学的好奇心を揺さぶる研究対象となっている。心理学から始まった記憶の研究は、今日では分子生物学、分子解剖学、細胞生物学、生理学、生物物理学など様々な研究分野からの成果を取り込むことで発展すると同時に、そこから多くの課題を生んできた。本研究領域が取り組んできた研究は、そうした記憶の仕組みの理解の上で明らかになってきた記憶の新たな側面「記憶情報の流動性」と「記憶機構の変化」である。記憶情報は不安定な記憶情報から安定な記憶情報への統合、蓄えられた記憶情報のアップデートや再固定化などの流動性を示す一方、記憶機構も個体の加齢や睡眠、摂食といった内外環境の変化により変化する。本研究領域ではこうした研究情報の流動性と記憶機構の変化を「記憶ダイナミズム」と名付け、これを対象に行動から分子に至る包括的な研究を行なった。

これまで多くの医学・生物学上の重要な原理が、各種モデル動物の傑出した特徴を生かして発見されてきた。記憶研究においても各種無脊椎、脊椎モデル動物が示す多様な記憶表現型の特徴と技術的アドバンテージを利用した研究が進められている。それは例えば無脊椎動物の学習能力が低いことを利用した効率的な記憶過程の遺伝学的分離・解析であり、より小型で単純な神経ネットワークを利用した最も基本的な学習記憶回路の同定と機能解析や、逆に高度に分化した脳を利用した、マクロな細胞集団としての振る舞いの解明などである。本領域では各種モデル動物の示す多様な記憶表現型をベースとした神経活動のリアルタイム解析などにより、分子・神経動態—回路機能—記憶行動の包括的な研究を行ない、その成果を有機的に集約することで記憶ダイナミズムの仕組みと共通原理が解き明かされ、動物種特異的に獲得された記憶機構が発見された。

本領域は計画研究9件（2013年度～）および公募研究26件（2014年度～）、28件（2016年度～）よりなり、毎年の班会議、ワークショップ、シンポジウムなどを介して広範な共同研究、研究協力が進んだことは、本研究領域の発展が研究環境のハード面だけでなく、ソフト面からも支えられていたことを物語っている。また各班員の活発なアウトリーチ活動により本研究領域の成果に留まらない、最新の脳神経研究の発信、啓蒙が行われたことは日本の神経科学の発展にも幾ばくかの寄与を果したものと考えている。最後に本研究領域の活発な推進にご尽力頂いた班員および総括班員、有形無形のご助力とご評価を頂いた関係分野の諸先生方に、この場を借りて深い感謝の意を表わせて頂きたい。

2 領域全体の概要

2.1 研究組織（計画研究、公募研究）

計画研究

役割	氏名	所属
領域代表者	齊藤 実	公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・センター長

総括班

役割	氏名	所属
研究代表者	齊藤 実	公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・センター長
研究分担者	久恒 辰博	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
研究分担者	多羽田 哲也	東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
連携研究者	飯野 雄一	東京大学・大学院理学系研究科・教授
連携研究者	井ノ口 馨	富山大学大学院・医学薬学研究部(医学)・教授
連携研究者	上川内 あづさ	名古屋大学大学院・理学研究科・教授
連携研究者	松尾 直毅	大阪大学大学院・医学系研究科・准教授
連携研究者	石原 健	九州大学大学院・理学研究院・教授
連携研究者	吉原 良浩	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター シニア・チームリーダー
研究分担者	佐藤 守俊	東京大学大学院総合文化研究科・教授

計画研究班

2013年度～2017年度

研究代表者	所属	研究課題名
齊藤 実	公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・センター長	記憶情報の変換ダイナミズムを担うショウジョウバエ神経・分子マシナリーの解明
久恒 辰博	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授	哺乳類の脳機能老化メカニズムの解明を通じた記憶ダイナミズムの理解
多羽田 哲也	東京大学・分子細胞生物学研究所・教授	ショウジョウバエの匂い記憶情報処理の時空間ダイナミズムの解明
飯野 雄一	東京大学・大学院理学系研究科・教授	学習記憶に関わる新規分子の発見と神経系における動態・機能の解明
井ノ口 馨	富山大学大学院・医学薬学研究部(医学)・教授	げっ歯類の記憶再固定化システムをモデルとした記憶ダイナミクスの共通原理の理解
上川内 あづさ	名古屋大学大学院・理学研究科・教授	ショウジョウバエ聴覚馴化システムをモデルとした記憶ダイナミズムの共通原理の解明
松尾 直毅	大阪大学大学院・医学系研究科・准教授	記憶情報を担う細胞集団の時空間的変化の解析
石原 健	九州大学大学院・理学研究院・教授	線虫 <i>C.elegans</i> の忘却制御機構から探る記憶のダイナミズム
吉原 良浩	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・シニア・チームリーダー	ゼブラフィッシュにおける嗅覚記憶ダイナミズムの分子・細胞・神経回路メカニズム

公募研究

公募研究班 (2014年度～2015年度)

研究代表者	所属	課題名
細川 貴之	東北大学・生命科学研究所・助教	記憶の形成と精緻化の神経機構の解明
坂口 昌徳	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授	睡眠中の新生ニューロンの活性化が記憶に及ぼす機能
林 悠	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授	睡眠中の神経回路ダイナミズム
中井 淳一	埼玉大学・理工学研究科	運動学習における長期記憶機構の研究
殿城 亜矢子	千葉大学大学院・薬学研究院・助教	老化に伴う代謝恒常性の破綻による記憶低下機構の解明
山口 正洋	東京大学・大学院医学系研究科・講師	覚醒睡眠サイクルに基づく匂い学習記憶と嗅覚神経回路の可塑性の解析
尾藤 晴彦	東京大学・大学院医学系研究科・教授	Dual FRET 技術を用いた長期神経可塑性機構の解読
竹内 秀明	岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授	社会認知を介した意思決定に関わる神経ネットワークの解明
野村 洋	東京大学・大学院薬学系研究科・研究員	神経ネットワークの内部状態による記憶の形成、想起の制御
日比 正彦	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター教授	小脳神経回路にコードされる恐怖応答記憶のメカニズムの解明
櫻井 芳雄	同志社大学大学院・脳科学研究科・教授	記憶の多様な形成と再形成を実現するセル・アセンブリの解析
平野 恭敬	京都大学・メディカルイノベーションセンター准教授	長期記憶の不安定化を司る分子メカニズムと神経基盤の解明
王 丹	京都大学・物質・細胞統合システム拠点・助教	Cellular environment-dependent RNA methylation at synapse during learning and memory
八木 健	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	記憶ダイナミズムをもたらす局所回路形成メカニズムの解析
美津島 大	山口大学大学院・医学系研究科・教授	エピソード学習で動的に変化する海馬発火活動と CA1 シナプスの多様な可塑性
高橋 琢哉	横浜市立大学・大学院医学研究科生理学・教授	記憶ダイナミクスの時空間的解析
木村 梨絵	生理学研究所・生体情報研究系・特任助教	運動に関わる局所神経回路の流動性が担う機能
本間 光一	帝京大学・薬学部・教授	学習記憶能力を賦与するホルモンの脳内作用メカニズムの解明
渡部 文子	東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・教授	情動記憶ダイナミズムの解明
古田 寿昭	東邦大学・理学部・教授	光で記憶を操作するケミカルプローブの開発
久原 篤	甲南大学・理工学部・教授	神経と多臓器間で制御される温度適応メモリーの解析
杉山 陽子 (矢崎陽子)	沖縄科学技術大学院大学・臨界期の神経メカニズム研究ユニット・准教授	注意レベルによって制御される聴覚記憶形成のための神経メカニズムの解明
小川 正晃	生理学研究所・発達生理学研究所系・特任助教	報酬に基づく学習記憶ダイナミズムの高次制御機構
高雄 啓三	富山大学・研究推進総合支援センター・教授	幼児性健忘における歯状回成熟度の意義の解明
佐藤 正晃	国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員	海馬における動的な記憶情報表現の可視化とそのメカニズムの解明
遠藤 昌吾	東京都健康長寿医療センター・研究部長	活性酸素種が担うマウス運動記憶の分散効果

公募研究班（2016年度～2017年度）

研究代表者	所属	課題名
和多 和宏	北海道大学・理学研究院・准教授	脳内エピジェネティクス変化による運動パターン学習と維持メカニズムの解明
林 悠	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構准教授	レム睡眠の操作が可能なマウスを用いた睡眠の質が記憶に及ぼす影響の解明
殿城 亜矢子	千葉大学大学院・薬学研究院・講師	記憶システムの恒常性維持機構の解明
山口 正洋	高知大学・医学部・教授	匂い学習記憶を支える嗅覚系の多領域ネットワーク機能の解析
野村 洋	北海道大学・大学院薬学研究院・講師	観察と実体験を融合する神経回路の解明
尾藤 晴彦 ^{*1}	東京大学・大学院医学系研究科・教授	CREB-Arc シグナル活性化による長期記憶制御機構の解明
青西 亨	東京工業大学・情報理工学院・准教授	多重解像度カルシウムイメージングデータの解析手法の確立とその応用
高雄 啓三	富山大学・研究推進総合支援センター・教授	幼児性健忘における歯状回成熟度の意義の解明
山中 章弘	名古屋大学・環境医学研究所・教授	視床下部神経による積極的記憶消去のメカニズム解明
森 郁恵	名古屋大学・大学院理学研究科・教授	線虫の温度走性を行動モデルとする記憶・学習の制御機構
平野 恭敬	京都大学・メディカルイノベーションセンター准教授	記憶の固定化、および書き換えに寄与する新規予測誤差神経の探求
八木 健	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	記憶ダイナミズムをもたらす局所回路形成メカニズムの解析
竹内 秀明	岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授	個体記憶が異性の好みを生み出す神経動作原理の解明
高宮 考悟	宮崎大学・医学部・教授	AMPA 型グルタミン酸受容体の糖鎖修飾による新たなシナプス可塑性の動作原理
竹本 研	横浜市立大学・医学部・助教	学習前の神経回路の操作を可能にする革新的光学技術の開発
掛川 渉	慶應義塾大学・医学部・准教授	生後発達に伴う運動記憶ダイナミズムの解明と制御
竹田 真己	順天堂大学・医学部・特任准教授	連合記憶想起における側頭葉サブ領域間神経回路の研究
古田 寿昭	東邦大学・理学部・教授	記憶を操作するケミカルプローブの開発
櫻井 芳雄	同志社大学大学院・脳科学研究科・教授	記憶の多様な形成と再形成を可能にするセル・アセンブリの動的変容
川口 真也	京都大学・産官学連携本部・特定准教授	記憶の成立と移動を担う小脳神経回路の機能変化
村越 秀治	生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授	新規分子活性操作法によるシナプスダイナミズムの意義の解明
小川 正晃	京都大学・医学研究科・講師	状況特異的な報酬学習記憶の高次制御機構
深井 朋樹	国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニア・チームリーダー	空間探索における海馬とワーキングメモリの相互作用の回路モデル
檀上 輝子	国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員	自己と他者の空間情報記憶
Joshua Johansen	国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー	Noradrenergic regulation of fear and extinction learning
林 康紀	京都大学大学院・医学研究科・教授	記憶形成、固定、想起における海馬背側 CA1 セルアセンブリの長期可視化
肥後 剛康	国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・スタッフ研究員	霊長類の作業記憶を制御する神経回路と神経活動の解明
水関 健司	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授	神経活動の可塑性と記憶におけるレム睡眠の役割

(*1) 2017年6月29日付で辞退

2.2 交付決定額(配分額)

(千円)

		2013年度	2014年度	2015年度	2016年度	2017年度	合計
総括班	直接経費	119,500	27,800	15,400	13,000	13,000	188,700
	間接経費	35,850	8,340	4,620	3,900	3,900	56,610
計画研究	直接経費	140,000	120,500	131,700	134,300	134,900	661,400
	間接経費	42,000	36,150	39,510	40,290	40,470	198,420
公募研究	直接経費	-	91,100	90,900	90,500	89,700	362,200
	間接経費	-	27,330	27,270	27,150	26,910	108,660

2.3 研究発表

2.3.1 雑誌論文

- 研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付した。
- 融合研究論文として整理した論文については、冒頭に◎を付した。
- 本研究課題に係り交付を受けて行った研究の成果であることを表示したもの（論文等の場合は謝辞に課題番号を含め記載したもの）について記載したもののについては、冒頭に▲を付した。

A01 (計画・齊藤実) 計 10 件 (査読有 10 件)

- ▲ Sato, S., Ueno, K., Saitoe, M., and *Sakai, T. (2018). Synaptic depression induced by postsynaptic cAMP production in the Drosophila mushroom body calyx. *J. Physiol* doi:10.1113/JP275799.[Epub ahead of point]. 査読有
- ▲ Suzuki-Sawano, E., Ueno, K., Naganos, S., Sawano, Y., Horiuchi, J., and *Saitoe, M. (2017). A Drosophila ex vivo model of olfactory appetitive learning. *Sci. Rep.* 7, 17725. 査読有
- ▲ *Ueno, K., Suzuki, E., Naganos, S., Ofusa, K., Horiuchi, J., and *Saitoe, M. (2017). Coincident postsynaptic activity gates presynaptic dopamine release to induce plasticity in Drosophila mushroom bodies. *Elife* 6. 査読有
- ▲ Hirano, Y., Ihara, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Iwata, I., Takahashi, A., Awata, H., Nakamura, N., Takakura, M., Suzuki, Y., Horiuchi, J., Okuno, H., and *Saitoe, M. (2016). Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in Drosophila mushroom bodies. *Nat. Commun.* 7, 13471. 査読有
- ▲ Naganos, S., Ueno, K., Horiuchi, J., and *Saitoe, M. (2016). Learning defects in Drosophila growth restricted chico mutants are caused by attenuated adenylyl cyclase activity. *Mol. Brain* 9, 37. 査読有
- Nonaka, T., Suzuki, G., Tanaka, Y., Kametani, F., Hirai, S., Okado, H., Miyashita, T., Saitoe, M., Akiyama, H., Masai, H., and *Hasegawa, M. (2016). Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J. Biol. Chem.* 291, 5473–5483. 査読有
- ▲ Matsuno, M., Horiuchi, J., Yuasa, Y., Ofusa, K., Miyashita, T., Masuda, T., and *Saitoe, M. (2015). Long-Term Memory Formation in Drosophila Requires Training-Dependent Glial Transcription. *J. Neurosci.* 35, 5557–5565. 査読有
- ▲ Yamazaki, D., Horiuchi, J., Ueno, K., Ueno, T., Saeki, S., Matsuno, M., Naganos, S., Miyashita, T., Hirano, Y., Nishikawa, H., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Honda, Y., Kodama, T., Masuda, T., and *Saitoe, M. (2014). Glial Dysfunction Causes Age-Related Memory Impairment in Drosophila. *Neuron* 84, 753–763. 査読有
- ▲ *Hirano, Y., and Saitoe, M. (2013). Hunger and memory; CRTG coordinates long-term memory with the physiological state, hunger. *Commun. Integr. Biol.* 6, e25152. 査読有
- ▲ Kamimura, K., Ueno, K., Nakagawa, J., Hamada, R., Saitoe, M., and *Maeda, N. (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the Drosophila neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 200, 219–233. 査読有

A01 (計画・久恒辰博) 計 15 件 (査読有 15 件)

- ◎▲ Qiong, D., Kitora, T., Jun, K., Mamoru, T., Yoshinori, K., Etsuko, I., Hiroshi, M., Tatsuhiko, H., Qiong, D., Kitora, T., Jun, K., Mamoru, T., Yoshinori, K., Etsuko, I., Hiroshi, M., and *Tatsuhiko, H. (2018) Anserine/Carnosine Supplementation Preserves Blood Flow in the Prefrontal Brain of Elderly People Carrying APOE e4. *Aging Dis.* 9, 334-345. 査読有
- ◎▲ Chen, S.C.-J., Abe, Y., Fang, P.-T., Hsieh, Y.-J., Yang, Y.-I., Lu, T.-Y., Oda, S., Mitani, H., Lian, S.-L., Tyan, Y.-C., Huang, C.-J., and *Hisatsune, T. (2017). Prognosis of Hippocampal Function after Sub-lethal Irradiation Brain Injury in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Sci. Rep.* 7, 14697. 査読有

3. ◎ Togo, H., Rokicki, J., Yoshinaga, K., *Hisatsune, T., Matsuda, H., Haga, N., and Hanakawa, T. (2017). Effects of Field-Map Distortion Correction on Resting State Functional Connectivity MRI. *Front. Neurosci.* 11, 656. 査読有
4. ▲ Katakura, Y., Totsuka, M., Imabayashi, E., Matsuda, H., and *Hisatsune, T. (2017). Anserine/Carnosine Supplementation Suppresses the Expression of the Inflammatory Chemokine CCL24 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Elderly People. *Nutrients* 9, 1199. 査読有
5. ▲ Kaneko, J., Enya, A., Enomoto, K., Ding, Q., and *Hisatsune, T. (2017). Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged AβPPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice. *Sci. Rep.* 7, 12571. 査読有
6. ▲ Matsuda, T., and *Hisatsune, T. (2017). Cholinergic Modification of Neurogenesis and Gliosis Improves the Memory of AβPPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's Disease Model Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Alzheimers. Dis.* 56, 1–23. 査読有
7. ◎ Jomura, N., Shintani, T., Sakurai, K., Kaneko, J., *Hisatsune, T. (2017) Mouse BOLD fMRI imaging during operant learning at ultra-high field (14 T). *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 25, 5365. 査読有
8. ◎▲ *Hisatsune, T., Kaneko, J., Kurashige, H., Cao, Y., Satsu, H., Totsuka, M., Katakura, Y., Imabayashi, E., and Matsuda, H. (2016). Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People. *J. Alzheimers. Dis.* 50, 149–59. 査読有
9. ◎ Rokicki, J., Li, L., Imabayashi, E., Kaneko, J., Hisatsune, T., and *Matsuda, H. (2015). Daily Carnosine and Anserine Supplementation Alters Verbal Episodic Memory and Resting State Network Connectivity in Healthy Elderly Adults. *Front. Aging Neurosci.* 7, 219. 査読有
10. ◎ Yang, Y.-I., Lu, T.-Y., Chiu, Y.-Y., Chang, C.-C., Lai, J.-J., Huang, C.-J., Lian, S.-L., Hisatsune, T., Wan, Y.-T., Hong, Y.-J., and Chen, S.C.-J. (2015). Using fMRI to evaluate working memory differences in cognitive function of NPC patients before and after radiotherapy. *Chinese J. Radiol. Technol.* 39, 121–129. 査読有
11. ◎ *Hisatsune, T. (2014) Research and development of Ultra High Field MRI. *Magnetics Jpn*, 9, 180-185. 査読有
12. Nochi, R., Kaneko, J., Okada, N., Terazono, Y., Matani, A., and *Hisatsune, T. (2013). Diazepam treatment blocks the elevation of hippocampal activity and the accelerated proliferation of hippocampal neural stem cells after focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci. Res.* 91, 1429–39. 査読有
13. Chin, Y., Kishi, M., Sekino, M., Nakajo, F., Abe, Y., Terazono, Y., Hiroyuki, O., Kato, F., Koizumi, S., Gachet, C., and *Hisatsune, T. (2013). Involvement of glial P2Y₁ receptors in cognitive deficit after focal cerebral stroke in a rodent model. *J. Neuroinflammation* 10, 95. 査読有
14. Herculano, B., Tamura, M., Ohba, A., Shimatani, M., Kutsuna, N., and *Hisatsune, T. (2013). β-alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 33, 983–97. 査読有
15. ◎ Abe, Y., Sekino, M., Fukazawa, Y., Yawo, H., Ohsaki, H., and *Hisatsune, T. (2013). Functional Analysis of the Hippocampus Using Opto-fMRI. *In Advances in Cognitive Neurodynamics* (III) (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 803–807. 査読有

A01 (計画・多羽田哲也) 計 8 件 (査読有 8 件)

1. ▲ Yamazaki, D., Hiroi, M., Abe, T., Shimizu, K., Minami-Ohtsubo, M., Maeyama, Y., Horiuchi, J., and *Tabata, T. (2018). Two Parallel Pathways Assign Opposing Odor Valences during Drosophila Memory Formation. *Cell Rep.* 22, 2346–2358. 査読有
2. ▲ Murakami, S., Minami-Ohtsubo, M., Nakato, R., Shirahige, K., and *Tabata, T. (2017). Two Components of Aversive Memory in Drosophila, Anesthesia-Sensitive and Anesthesia-Resistant Memory, Require Distinct Domains Within the Rgk1 Small GTPase. *J. Neurosci.* 37, 5496–5510. 査読有
3. ▲ Ueoka, Y., Hiroi, M., Abe, T., and *Tabata, T. (2017). Suppression of a single pair of mushroom body output neurons in Drosophila triggers aversive associations. *FEBS Open Bio* 7, 562–576. 査読有
4. ▲ Nitta, Y., Yamazaki, D., Sugie, A., Hiroi, M., and *Tabata, T. (2017). DISCO Interacting Protein 2 regulates axonal bifurcation and guidance of Drosophila mushroom body neurons. *Dev. Biol.* 421, 233–244. 査読有
5. Tachibana, S.-I., Touhara, K., and *Ejima, A. (2015). Modification of Male Courtship Motivation by Olfactory Habituation via the GABAA Receptor in Drosophila melanogaster. *PLoS One* 10, e0135186. 査読有
6. ▲ Yamazaki, D., Horiuchi, J., Ueno, K., Ueno, T., Saeki, S., Matsuno, M., Naganos, S., Miyashita, T., Hirano, Y., Nishikawa, H., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Honda, Y., Kodama, T., Masuda, T., and *Saitoe, M. (2014). Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila. *Neuron* 84, 753–63. 査読有
7. ▲ Abe, T., Yamazaki, D., Murakami, S., Hiroi, M., Nitta, Y., Maeyama, Y., and *Tabata, T. (2014). The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in Drosophila mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. *Development* 141, 4716–4728. 査読有
8. ◎ Hiroi, M., Ohkura, M., Nakai, J., Masuda, N., Hashimoto, K., Inoue, K., Fiala, A., and *Tabata, T. (2013). Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in Drosophila. *Genes to Cells* 18, 1070–1081. 査読有

A01 (計画・飯野雄一) 計 26 件 (査読有 26 件)

1. Sudo, A., *Kanagawa, M., Kondo, M., Ito, C., Kobayashi, K., Endo, M., Minami, Y., [Aiba, A.](#), and *Toda, T. (2018). Temporal requirement of dystroglycan glycosylation during brain development and rescue of severe cortical dysplasia via gene delivery in the fetal stage. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1174–1185. 査読有
2. [Sakai, N.](#), [Ohno, H.](#), [Tomioka, M.](#), and *[Iino, Y.](#) (2017). The intestinal TORC2 signaling pathway contributes to associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 12, e0177900. 査読有
3. ▲ [Ohno, H.](#), Yoshida, M., Sato, T., Kato, J., Miyazato, M., Kojima, M., *[Ida, T.](#), and *[Iino, Y.](#) (2017). Luqin-like RYamide peptides regulate food-evoked responses in *C. elegans*. *Elife* 6. 査読有
4. ▲ [Ohno, H.](#), [Sakai, N.](#), Adachi, T., and *[Iino, Y.](#) (2017). Dynamics of Presynaptic Diacylglycerol in a Sensory Neuron Encode Differences between Past and Current Stimulus Intensity. *Cell Rep.* 20, 2294–2303. 査読有
5. Nakamura, T., *[Ueyama, T.](#), Ninoyu, Y., Sakaguchi, H., Chojookhuu, N., Hishikawa, Y., Kiyonari, H., Kohta, M., Sakahara, M., de Curtis, I., Kohmura, E., Hisa, Y., [Aiba, A.](#), and *[Saito, N.](#) (2017). Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development. *Development* 144, 1863–1875. 査読有
6. Kanayama, M., Hayano, T., Koebis, M., Maeda, T., Tabe, Y., Horie, S., and *[Aiba, A.](#) (2017). Hyperactive mTOR induces neuroendocrine differentiation in prostate cancer cell with concurrent up-regulation of IRF1. *Prostate* 77, 1489–1498. 査読有
7. ▲ Wang, L., [Sato, H.](#), Satoh, Y., [Tomioka, M.](#), [Kunitomo, H.](#), and *[Iino, Y.](#) (2017). A Gustatory Neural Circuit of *Caenorhabditis elegans* Generates Memory-Dependent Behaviors in Na + Chemotaxis. *J. Neurosci.* 37, 2097–2111. 査読有
8. ◎ [Toyoshima, Y.](#), Tokunaga, T., Hirose, O., Kanamori, M., Teramoto, T., Jang, M.S., Kuge, S., Ishihara, T., Yoshida, R., and *[Iino, Y.](#) (2016). Accurate Automatic Detection of Densely Distributed Cell Nuclei in 3D Space. *PLoS Comput. Biol.* 12, e1004970. 査読有
9. ▲ *[Tomioka, M.](#), Naito, Y., Kuroyanagi, H., and *[Iino, Y.](#) (2016). Splicing factors control *C. elegans* behavioural learning in a single neuron by producing DAF-2c receptor. *Nat. Commun.* 7, 11645. 査読有
10. Narushima, M., Uchigashima, M., Yagasaki, Y., Harada, T., Nagumo, Y., Uesaka, N., Hashimoto, K., [Aiba, A.](#), Watanabe, M., *[Miyata, M.](#), and *[Kano, M.](#) (2016). The Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 Mediates Experience-Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus. *Neuron* 91, 1097–1109. 査読有
11. Kikuchi, I., Takahashi-Kanemitsu, A., Sakiyama, N., Tang, C., Tang, P.-J., Noda, S., Nakao, K., Kassai, H., Sato, T., [Aiba, A.](#), and *[Hatakeyama, M.](#) (2016). Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways. *Nat. Commun.* 7, 12887. 査読有
12. *[Ichikawa, R.](#), Hashimoto, K., Miyazaki, T., Uchigashima, M., Yamasaki, M., [Aiba, A.](#), Kano, M., and *[Watanabe, M.](#) (2016). Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 2282–7. 査読有
13. Nakao, H., Harada, T., Nakao, K., Kiyonari, H., Inoue, K., *[Furuta, Y.](#), and *[Aiba, A.](#) (2016). A possible aid in targeted insertion of large DNA elements by CRISPR/Cas in mouse zygotes. *Genesis* 54, 65–77. 査読有
14. ◎ Endo, M., Hattori, M., Toriyabe, H., [Ohno, H.](#), Kamiguchi, H., [Iino, Y.](#), and *[Ozawa, T.](#) (2016). Optogenetic activation of axon guidance receptors controls direction of neurite outgrowth. *Sci. Rep.* 6, 23976. 査読有
15. *[Matsuda, I.](#), Shoji, H., Yamasaki, N., Miyakawa, T., and *[Aiba, A.](#) (2016). Comprehensive behavioral phenotyping of a new Semaphorin 3 F mutant mouse. *Mol. Brain* 9, 15. 査読有
16. Hamakawa, M., Uozumi, T., Ueda, N., [Iino, Y.](#), and *[Hirotsu, T.](#) (2015). A role for Ras in inhibiting circular foraging behavior as revealed by a new method for time and cell-specific RNAi. *BMC Biol.* 13, 6. 査読有
17. ◎ Kato, H.E., Inoue, K., Abe-Yoshizumi, R., Kato, Y., Ono, H., Konno, M., Hososhima, S., Ishizuka, T., Hoque, M.R., [Kunitomo, H.](#), Ito, J., Yoshizawa, S., Yamashita, K., Takemoto, M., Nishizawa, T., Taniguchi, R., Kogure, K., Maturana, A.D., [Iino, Y.](#), Yawo, H., Ishitani, R., *[Kandori, H.](#), *[Nureki, O.](#) (2015). Structural basis for Na(+) transport mechanism by a light-driven Na(+) pump. *Nature* 521, 48–53. 査読有
18. Yamazoe-Umemoto, A., Fujita, K., [Iino, Y.](#), Iwasaki, Y., and *[Kimura, K.D.](#) (2015). Modulation of different behavioral components by neuropeptide and dopamine signalings in non-associative odor learning of *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Res.* 99, 22–33. 査読有
19. Mizutani, E., Oikawa, M., Kassai, H., Inoue, K., Shiura, H., Hirasawa, R., Kamimura, S., Matoba, S., Ogonuki, N., Nagatomo, H., Abe, K., Wakayama, T., [Aiba, A.](#), and *[Ogura, A.](#) (2015). Generation of cloned mice from adult neurons by direct nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 92, 81. 査読有
20. Suzuki, W., *[Yamada, A.](#), Aizawa, R., Suzuki, D., Kassai, H., Harada, T., Nakayama, M., Nagahama, R., Maki, K., Takeda, S., Yamamoto, M., [Aiba, A.](#), Baba, K., and [Kamijo, R.](#) (2015). Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinology* 156, 314–22. 査読有
21. Takenaka, N., Yasuda, N., Nihata, Y., Hosooka, T., Noguchi, T., [Aiba, A.](#), and *[Satoh, T.](#) (2014). Role of the guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated plasma membrane translocation of GLUT4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Cell. Signal.* 26, 2460–9. 査読有
22. Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., and *[Aiba, A.](#) (2014). Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell Rep.* 7, 1626–1639. 査読有

23. Uesaka, N., Uchigashima, M., Mikuni, T., Nakazawa, T., Nakao, H., Hirai, H., [Aiba, A.](#), Watanabe, M., and *Kano, M. (2014). Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. *Science* 344, 1020–3. 査読有
24. Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Kassai, H., Watabe, A.M., Nakao, K., [Aiba, A.](#), Watanabe, M., and *Manabe, T. (2014). The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3136–3146. 査読有
25. ©▲ Satoh, Y., [Sato, H.](#), [Kunitomo, H.](#), Fei, X., Hashimoto, K., and *[Iino, Y.](#) (2014). Regulation of Experience-Dependent Bidirectional Chemotaxis by a Neural Circuit Switch in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 34, 15631–15637. 査読有
26. ▲ [Ohno, H.](#), Kato, S., Naito, Y., [Kunitomo, H.](#), [Tomioka, M.](#), and *[Iino, Y.](#) (2014). Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science* 345, 313–7. 査読有

A01 (計画・井ノ口馨) 計 13 件 (査読有 13 件)

1. ▲ Abdou, K., Shehata, M., Choko, K., Nishizono, H., Matsuo, M., Muramatsu, S., and *[Inokuchi, K.](#) (2018). Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. *Science*. 360, 1227-1231. 査読有
2. ▲ Alam, J., Kitamura, T., Saitoh, Y., Ohkawa, N., Kondo, T., and *[Inokuchi, K.](#) (2018). Adult Neurogenesis Conserves Hippocampal Learning Capacity. *J. Neurosci.*, 200253. 査読有
3. ▲ Shehata, M., Abdou, K., Choko, K., Matsuo, M., Nishizono, H., and *[Inokuchi, K.](#) (2018). Autophagy Enhances Memory Erasure through Synaptic Destabilization. *J. Neurosci.* 38, 3809–3822. 査読有
4. ▲ Nomoto, M., and *[Inokuchi, K.](#) (2018). Behavioral, cellular, and synaptic tagging frameworks. *Neurobiol. Learn. Mem.* 査読有
5. ▲ Yokose, J., Okubo-Suzuki, R., Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A.M., Sasahara, M., Kato, F., and *[Inokuchi, K.](#) (2017). Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories. *Science* 355, 398–403. 査読有
6. ▲ Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Yokose, J., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A.M., Kato, F., and *[Inokuchi, K.](#) (2016). Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioural tagging. *Nat. Commun.* 7, 12319. 査読有
7. ▲ Okubo-Suzuki, R., Saitoh, Y., Shehata, M., Zhao, Q., Enomoto, H., and *[Inokuchi, K.](#) (2016). Frequency-specific stimulations induce reconsolidation of long-term potentiation in freely moving rats. *Mol. Brain* 9, 36. 査読有
8. ▲ Omura, Y., Carvalho, M.M., *[Inokuchi, K.](#), and *Fukai, T. (2015). A Lognormal Recurrent Network Model for Burst Generation during Hippocampal Sharp Waves. *J. Neurosci.* 35, 14585–14601. 査読有
9. ▲ Nihonmatsu, I., Ohkawa, N., Saitoh, Y., and *[Inokuchi, K.](#) (2015). Targeting of ribosomal protein S6 to dendritic spines by in vivo high frequency stimulation to induce long-term potentiation in the dentate gyrus. *Biol. Open* 4, 1387–94. 査読有
10. ▲ Ohkawa, N., Saitoh, Y., Suzuki, A., Tsujimura, S., Murayama, E., Kosugi, S., Nishizono, H., Matsuo, M., Takahashi, Y., Nagase, M., Sugimura, Y.K., Watabe, A.M., Kato, F., and *[Inokuchi, K.](#) (2015). Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory. *Cell Rep.* 11, 261–9. 査読有
11. ▲ Tsubota, T., Okubo-Suzuki, R., Ohashi, Y., Tamura, K., Ogata, K., Yaguchi, M., Matsuyama, M., [Inokuchi, K.](#), and *Miyashita, Y. (2015). Cofilin1 controls transcolumar plasticity in dendritic spines in adult barrel cortex. *PLoS Biol.* 13, e1002070. 査読有
12. ▲ Shehata, M., and *[Inokuchi, K.](#) (2014). Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? *Rev. Neurosci.* 25, 543–57. 査読有
13. ▲ Kitamura, T., and *[Inokuchi, K.](#) (2014). Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol. Brain* 7, 13. 査読有

A01 (計画・上川内あづさ) 計 7 件 (査読有 7 件)

1. ▲ Yamada, D., Ishimoto, H., Li, X., Kohashi, T., Ishikawa, Y., and *[Kamikouchi, A.](#) (2018). GABAergic Local Interneurons Shape Female Fruit Fly Response to Mating Songs. *J. Neurosci.* 38, 4329–4347. 査読有
2. ▲ Li, X., Ishimoto, H., and *[Kamikouchi, A.](#) (2018). Auditory experience controls the maturation of song discrimination and sexual response in *Drosophila*. *Elife* 7. 査読有
3. ▲ Ishikawa, Y., Okamoto, N., Nakamura, M., Kim, H., and *[Kamikouchi, A.](#) (2017). Anatomic and Physiologic Heterogeneity of Subgroup-A Auditory Sensory Neurons in Fruit Flies. *Front. Neural Circuits* 11, 46. 査読有
4. ▲ Matsuo, E., Seki, H., Asai, T., Morimoto, T., Miyakawa, H., Ito, K., and *[Kamikouchi, A.](#) (2016). Organization of projection neurons and local neurons of the primary auditory center in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 524, 1099–1164. 査読有
5. Sano, H., Nakamura, A., Texada, M.J., Truman, J.W., Ishimoto, H., [Kamikouchi, A.](#), Nibu, Y., Kume, K., Ida, T., and Kojima, M. (2015). The Nutrient-Responsive Hormone CCHamide-2 Controls Growth by Regulating Insulin-like Peptides in the Brain of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 11, e1005209. 査読有
6. ▲ Matsuo, E., Yamada, D., Ishikawa, Y., Asai, T., Ishimoto, H., and *[Kamikouchi, A.](#) (2014). Identification of novel vibration- and deflection-sensitive neuronal subgroups in Johnston’s organ of the fruit fly. *Front. Physiol.* 5, 179. 査読有

7. Yoon, J., Matsuo, E., Yamada, D., Mizuno, H., Morimoto, T., Miyakawa, H., Kinoshita, S., Ishimoto, H., and *Kamikouchi, A. (2013). Selectivity and plasticity in a sound-evoked male-male interaction in *Drosophila*. *PLoS One* 8, e74289 査読有

A01 (計画・松尾直毅) 計4件 (査読有4件)

1. ▲ Kitanishi, T., and *Matsuo, N. (2017). Organization of the Claustrum-to-Entorhinal Cortical Connection in Mice. *J. Neurosci.* 37, 269–280. 査読有
2. ▲ Yoshii, T., Hosokawa, H., and *Matsuo, N. (2017). Pharmacogenetic reactivation of the original engram evokes an extinguished fear memory. *Neuropharmacology* 113, 1–9. 査読有
3. ▲ Yokoyama, M., and *Matsuo, N. (2016). Loss of Ensemble Segregation in Dentate Gyrus, but not in Somatosensory Cortex, during Contextual Fear Memory Generalization. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 218. 査読有
4. ◎▲ *Matsuo, N. (2015). Irreplaceability of Neuronal Ensembles after Memory Allocation. *Cell Rep.* 11, 351–7. 査読有

A01 (計画・石原健) 計4件 (査読有4件)

1. ▲ Hara-Kuge, S., Nishihara, T., Matsuda, T., Kitazono, T., Teramoto, T., Nagai, T., and *Ishihara, T. (2018). An improved inverse-type Ca²⁺ indicator can detect putative neuronal inhibition in *Caenorhabditis elegans* by increasing signal intensity upon Ca²⁺ decrease. *PLoS One* 13, e0194707. 査読有
2. ▲ Kitazono, T., Hara-Kuge, S., Matsuda, O., Inoue, A., Fujiwara, M., and *Ishihara, T. (2017). Multiple Signaling Pathways Coordinately Regulate Forgetting of Olfactory Adaptation through Control of Sensory Responses in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 37, 10240–10251. 査読有
3. ▲ *Fujiwara, M., Aoyama, I., Hino, T., Teramoto, T., and Ishihara, T. (2016). Gonadal Maturation Changes Chemotaxis Behavior and Neural Processing in the Olfactory Circuit of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 26, 1522–1531. 査読有
4. ▲ *Fujiwara, M., Hino, T., Miyamoto, R., Inada, H., Mori, I., Koga, M., Miyahara, K., Ohshima, Y., and Ishihara, T. (2015). The Importance of cGMP Signaling in Sensory Cilia for Body Size Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 201, 1497–510. 査読有

A01 (計画・吉原良浩) 計4件 (査読有4件)

1. ▲ *Koide, T., Yabuki, Y., and *Yoshihara, Y. (2018). Terminal Nerve GnRH3 Neurons Mediate Slow Avoidance of Carbon Dioxide in Larval Zebrafish. *Cell Rep.* 22, 1115–1123. 査読有
2. ▲ Wakisaka, N., Miyasaka, N., Koide, T., Masuda, M., Hiraki-Kajiyama, T., and *Yoshihara, Y. (2017). An Adenosine Receptor for Olfaction in Fish. *Curr. Biol.* 27, 1437–1447.e4. 査読有
3. ▲ Yabuki, Y., Koide, T., Miyasaka, N., Wakisaka, N., Masuda, M., Ohkura, M., Nakai, J., Tsuge, K., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y., and *Yoshihara, Y. (2016). Olfactory receptor for prostaglandin F_{2α} mediates male fish courtship behavior. *Nat. Neurosci.* 19, 897–904. 査読有
4. ◎▲ *Miyasaka, N., Arganda-Carreras, I., Wakisaka, N., Masuda, M., Sümbül, U., Seung, H.S., and *Yoshihara, Y. (2014). Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labelling. *Nat. Commun.* 5, 3639. 査読有

A01 (公募・和多和宏) 計5件 (査読有5件)

1. Hayase, S., and *Wada, K. (2018). Singing activity-driven Arc expression associated with vocal acoustic plasticity in juvenile songbird. *Eur. J. Neurosci.* 48, 1728–1742. 査読有
2. ▲ *Merullo, D.P., Asogwa, C.N., Sanchez-Valpuesta, M., Hayase, S., Pattnaik, B.R., Wada, K., and Ritters, L. V (2018). Neurotensin and neurotensin receptor 1 mRNA expression in song-control regions changes during development in male zebra finches. *Dev. Neurobiol.* 78, 671–686. 査読有
3. Yamaguchi, S., Hayase, S., Aoki, N., Takehara, A., Ishigohoka, J., Matsushima, T., Wada, K., and *Homma, K.J. (2017). Sex Differences in Brain Thyroid Hormone Levels during Early Post-Hatching Development in Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). *PLoS One* 12, e0169643. 査読有
4. Sato, D., Mori, C., Sawai, A., and *Wada, K. (2016). Familial bias and auditory feedback regulation of vocal babbling patterns during early song development. *Sci. Rep.* 6, 30323. 査読有
5. Imai, R., Sawai, A., Hayase, S., Furukawa, H., Asogwa, C.N., Sanchez, M., Wang, H., Mori, C., and *Wada, K. (2016). A quantitative method for analyzing species-specific vocal sequence pattern and its developmental dynamics. *J. Neurosci. Methods* 271, 25–33. 査読有

A01 (公募・林悠) 計1件 (査読有1件)

1. ▲ *Hayashi, Y., Kashiwagi, M., Yasuda, K., Ando, R., Kanuka, M., Sakai, K., and *Itoharu, S. (2015). Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science* 350, 957–61. 査読有

A01 (公募・殿城亜矢子) 計5件 (査読有5件)

1. ▲ Yang, P., Kajiwara, R., Tonoki, A., and *Itoh, M. (2018). Successive and discrete spaced conditioning in active avoidance learning in young and aged zebrafish. *Neurosci. Res.* 130, 1–7. 査読有

2. ▲ Tanabe, K., Itoh, M., and *Tonoki, A. (2017). Age-Related Changes in Insulin-like Signaling Lead to Intermediate-Term Memory Impairment in *Drosophila*. *Cell Rep.* 18, 1598–1605. 査読有
3. ▲ Okano, M., Matsuo, H., Nishimura, Y., Hozumi, K., Yoshioka, S., Tonoki, A., and *Itoh, M. (2016). Mib1 modulates dynamin 2 recruitment via Snx18 to promote Dll1 endocytosis for efficient Notch signaling. *Genes Cells* 21, 425–41. 査読有
4. Tonoki, A., and *Davis, R.L. (2015). Aging Impairs Protein-Synthesis-Dependent Long-Term Memory in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 35, 1173–1180. 査読有
5. Chihara, T., Kitabayashi, A., Morimoto, M., Takeuchi, K., Masuyama, K., Tonoki, A., Davis, R.L., Wang, J.W., and *Miura, M. (2014). Caspase inhibition in select olfactory neurons restores innate attraction behavior in aged *Drosophila*. *PLoS Genet.* 10, e1004437. 査読有

A01 (公募・山口正洋) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. *Yamaguchi, M. (2017). Functional Sub-Circuits of the Olfactory System Viewed from the Olfactory Bulb and the Olfactory Tubercle. *Front. Neuroanat.* 11, 33. 査読有
2. *Yamaguchi, M. (2017). The role of sleep in the plasticity of the olfactory system. *Neurosci. Res.* 118, 21–29. 査読有
3. ▲ Murata, K., Kanno, M., Ieki, N., *Mori, K., and *Yamaguchi, M. (2015). Mapping of Learned Odor-Induced Motivated Behaviors in the Mouse Olfactory Tubercle. *J. Neurosci.* 35, 10581–10599. 査読有
4. Komano-Inoue, S., Murata, K., Mori, K., and *Yamaguchi, M. (2015). Rapid induction of granule cell elimination in the olfactory bulb by noxious stimulation in mice. *Neurosci. Lett.* 598, 6–11. 査読有
5. Komano-Inoue, S., Manabe, H., Ota, M., Kusumoto-Yoshida, I., Yokoyama, T.K., Mori, K., and *Yamaguchi, M. (2014). Top-down inputs from the olfactory cortex in the postprandial period promote elimination of granule cells in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 40, 2724–2733. 査読有

A01 (公募・野村洋) 計 6 件 (査読有 6 件)

1. ▲ Nakayama, D., Hashikawa-Yamasaki, Y., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and *Nomura, H. (2016). Late Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala is essential for persistence of newly-acquired and reactivated contextual fear memories. *Sci. Rep.* 6, 21007. 査読有
2. ▲ *Nomura, H., Hara, K., Abe, R., Hitora-Imamura, N., Nakayama, R., Sasaki, T., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2015). Memory formation and retrieval of neuronal silencing in the auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 9740–4. 査読有
3. ▲ Hitora-Imamura, N., Miura, Y., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and *Nomura, H. (2015). Prefrontal dopamine regulates fear reinstatement through the downregulation of extinction circuits. *Elife* 4. 査読有
4. ▲ Nakayama, D., Iwata, H., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and *Nomura, H. (2015). Long-Delayed Expression of the Immediate Early Gene Arc/Arg3.1 Refines Neuronal Circuits to Perpetuate Fear Memory. *J. Neurosci.* 35, 819–830. 査読有
5. ▲ Nakayama, D., Baraki, Z., Onoue, K., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and *Nomura, H. (2015). Frontal association cortex is engaged in stimulus integration during associative learning. *Curr. Biol.* 25, 117–23. 査読有
6. ▲ Nonaka, A., Toyoda, T., Miura, Y., Hitora-Imamura, N., Naka, M., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and *Nomura, H. (2014). Synaptic Plasticity Associated with a Memory Engram in the Basolateral Amygdala. *J. Neurosci.* 34, 9305–9309. 査読有

A01 (公募・尾藤晴彦) 計 9 件 (査読有 9 件)

1. ▲ Honjoh, S., de Vivo, L., Okuno, H., Bito, H., Tononi, G., and *Cirelli, C. (2017). Higher Arc Nucleus-to-Cytoplasm Ratio during Sleep in the Superficial Layers of the Mouse Cortex. *Front. Neural Circuits* 11, 60. 査読有
2. ▲ Jenks, K.R., Kim, T., Pastuzyn, E.D., Okuno, H., Taibi, A. V., Bito, H., *Bear, M.F., and *Shepherd, J.D. (2017). Arc restores juvenile plasticity in adult mouse visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 9182–9187. 査読有
3. ▲ Takemoto-Kimura, S., Suzuki, K., Horigane, S.-I., Kamijo, S., Inoue, M., Sakamoto, M., Fujii, H., and *Bito, H. (2017). Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J. Neurochem.* 141, 808–818. 査読有
4. ▲ Rapanelli, M., Frick, L., Pogorelov, V., Ohtsu, H., Bito, H., and *Pittenger, C. (2017). Histamine H3R receptor activation in the dorsal striatum triggers stereotypies in a mouse model of tic disorders. *Transl. Psychiatry* 7, e1013. 査読有
5. ▲ Kim, C.K., Yang, S.J., Pichamoorthy, N., Young, N.P., Kauvar, I., Jennings, J.H., Lerner, T.N., Berndt, A., Lee, S.Y., Ramakrishnan, C., Davidson, T.J., Inoue, M., Bito, H., and *Deisseroth, K. (2016). Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat. Methods* 13, 325–8. 査読有
6. Gaffield, M.A., Amat, S.B., Bito, H., and *Christie, J.M. (2016). Chronic imaging of movement-related Purkinje cell calcium activity in awake behaving mice. *J. Neurophysiol.* 115, 413–22. 査読有
7. Inoue, M., Takeuchi, A., Horigane, S., Ohkura, M., Gengyo-Ando, K., Fujii, H., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., *Nakai, J., *Kitamura, K., and *Bito, H. (2015). Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat. Methods* 12, 64–70. 査読有

8. Nonaka, M., Kim, R., Fukushima, H., Sasaki, K., Suzuki, K., Okamura, M., Ishii, Y., Kawashima, T., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Okuno, H., Kida, S., and *Bito, H. (2014). Region-specific activation of CRTCI-CREB signaling mediates long-term fear memory. *Neuron* 84, 92–106. 査読有
9. ▲ Nonaka, M., Kim, R., Sharry, S., Matsushima, A., Takemoto-Kimura, S., and *Bito, H. (2014). Towards a better understanding of cognitive behaviors regulated by gene expression downstream of activity-dependent transcription factors. *Neurobiol. Learn. Mem.* 115, 21–9. 査読有

A01 (公募・青西亨) 計 4 件 (査読有 4 件)

1. ▲ *Ikeda, H., and Aonishi, T. (2018). White noise analysis for the correlation-type elementary motion detectors with half-wave rectifiers. *Neural Netw.* 102, 96–106. 査読有
2. *Ikeda, H., and Aonishi, T. (2017). Performance Comparison of Motion Encoders: Hassenstein–Reichardt and Two-Detector Models. In (Springer, Cham), pp. 885–893. 国際会議論文査読有
3. *AONISHI, T., MARUYAMA, R., and MIYAKAWA, H. (2017). Automatic Cell Detection from Calcium Imaging Data Using Non-negative Matrix Factorization. *Seibutsu Butsuri* 57, 036–039. 総説査読有
4. ◎ *Ikeda, H., Suzuki, Y., Morimoto, T., and Aonishi, T. (2016). Model Selection of Early Vision System of Drosophila melanogaster. *IPJS Trans. Math. Model. Its Appl.* 9, 24–31. 査読有

A01 (公募・高雄啓三) 計 28 件 (査読有 28 件)

1. Inoue, R., Talukdar, G., Takao, K., Miyakawa, T., and *Mori, H. (2018). Dissociated role of D-serine in extinction during consolidation vs. reconsolidation of context conditioned fear. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 161. 査読有
2. *Ueno, H., Fujii, K., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Aoki, S., Okamoto, M., Ishihara, T., and Takao, K. (2018). Expression of aggrecan components in perineuronal nets in the mouse cerebral cortex. *IBRO Reports* 4, 22–37. 査読有
3. Okuda, K., Takao, K., Watanabe, A., Miyakawa, T., Mizuguchi, M., and *Tanaka, T. (2018). Comprehensive behavioral analysis of the Cdk15 knockout mice revealed significant enhancement in anxiety- and fear-related behaviors and impairment in both acquisition and long-term retention of spatial reference memory. *PLoS One* 13, e0196587. 査読有
4. *Ueno, H., Takao, K., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Okamoto, M., Aoki, S., and Ishihara, T. (2018). Age-dependent and region-specific alteration of parvalbumin neurons and perineuronal nets in the mouse cerebral cortex. *Neurochem. Int.* 112, 59–70. 査読有
5. Yoshioka, N., Miyata, S., Tamada, A., Watanabe, Y., Kawasaki, A., Kitagawa, H., Takao, K., Miyakawa, T., Takeuchi, K., and *Igarashi, M. (2017). Abnormalities in perineuronal nets and behavior in mice lacking CSGalNacT1, a key enzyme in chondroitin sulfate synthesis. *Mol. Brain* 10, 47. 査読有
6. Umeda, T., Kimura, T., Yoshida, K., Takao, K., Fujita, Y., Matsuyama, S., Sakai, A., Yamashita, M., Yamashita, Y., Ohnishi, K., Suzuki, M., Takuma, H., Miyakawa, T., Takashima, A., Morita, T., Mori, H., and *Tomiya, T. (2017). Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer’s disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 59. 査読有
7. *Umemura, M., Ogura, T., Matsuzaki, A., Nakano, H., Takao, K., Miyakawa, T., and Takahashi, Y. (2017). Comprehensive Behavioral Analysis of Activating Transcription Factor 5-Deficient Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 125. 査読有
8. Fujita, Y., Masuda, K., Bando, M., Nakato, R., Katou, Y., Tanaka, T., Nakayama, M., Takao, K., Miyakawa, T., Tanaka, T., Ago, Y., Hashimoto, H., *Shirahige, K., and *Yamashita, T. (2017). Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. *J. Exp. Med.* 214, 1431–1452. 査読有
9. *Ueda, H., Sasaki, K., Halder, S.K., Deguchi, Y., Takao, K., Miyakawa, T., and Tajima, A. (2017). Prothymosin alpha-deficiency enhances anxiety-like behaviors and impairs learning/memory functions and neurogenesis. *J. Neurochem.* 141, 124–136. 査読有
10. Okamoto, K., Yamasaki, M., Takao, K., Soya, S., Iwasaki, M., Sasaki, K., Magoori, K., Sakakibara, I., Miyakawa, T., Mieda, M., Watanabe, M., Sakai, J., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. (2016). QRFP-Deficient Mice Are Hypophagic, Lean, Hypoactive and Exhibit Increased Anxiety-Like Behavior. *PLoS One* 11, e0164716. 査読有
11. Morishita, Y., *Yoshioka, Y., Takimura, Y., Shimizu, Y., Namba, Y., Nojiri, N., Ishizaka, T., Takao, K., Yamashita, F., Takuma, K., *et al.* (2016). Distribution of Silver Nanoparticles to Breast Milk and Their Biological Effects on Breast-Fed Offspring Mice. *ACS Nano* 10, 8180–91. 査読有
12. Takao, K., Shoji, H., Hattori, S., and *Miyakawa, T. (2016). Cohort Removal Induces Changes in Body Temperature, Pain Sensitivity, and Anxiety-Like Behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 99. 査読有
13. Ip, J.Y., Sone, M., Nashiki, C., Pan, Q., Kitaichi, K., Yanaka, K., Abe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Blencowe, B.J., and *Nakagawa, S. (2016). Gomafu lncRNA knockout mice exhibit mild hyperactivity with enhanced responsiveness to the psychostimulant methamphetamine. *Sci. Rep.* 6, 27204. 査読有
14. Ohashi, R., Takao, K., Miyakawa, T., and *Shiina, N. (2016). Comprehensive behavioral analysis of RNG105 (Caprin1) heterozygous mice: Reduced social interaction and attenuated response to novelty. *Sci. Rep.* 6, 20775. 査読有
15. Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., and *Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol. Brain* 9, 11. 査読有

16. *Shibasaki, K., Sugio, S., [Takao, K.](#), Yamanaka, A., Miyakawa, T., Tominaga, M., and Ishizaki, Y. (2015). TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. *Pflugers Arch.* 467, 2495–507. 査読有
17. [Takao, K.](#), Hagihara, H., and *Miyakawa, T. (2015). Reply to Warren et al. and Shay et al.: Commonalities across species do exist and are potentially important. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E347-8. 査読有
18. [Takao, K.](#), and *Miyakawa, T. (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1167–72. 査読有
19. Yasumura, M., Yoshida, T., Yamazaki, M., Abe, M., Natsume, R., Kanno, K., Uemura, T., [Takao, K.](#), Sakimura, K., Kikusui, T., Miyakawa, T., and *Mishina, M. (2014). IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. *Sci. Rep.* 4, 6613. 査読有
20. Watanabe, S., Ageta-Ishihara, N., Nagatsu, S., [Takao, K.](#), Komine, O., Endo, F., Miyakawa, T., Misawa, H., Takahashi, R., Kinoshita, M., and *Yamanaka, K. (2014). SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol. Brain* 7, 62. 査読有
21. Zheng, L.-S., Hitoshi, S., *Kaneko, N., [Takao, K.](#), Miyakawa, T., Tanaka, Y., Xia, H., Kalinke, U., Kudo, K., Kanba, S., Ikenaka, K., and Sawamoto, K. (2014). Mechanisms for Interferon- α -Induced Depression and Neural Stem Cell Dysfunction. *Stem Cell Reports* 3, 73–84. 査読有
22. *Hayashi, Y., Nabeshima, Y., Kobayashi, K., Miyakawa, T., Tanda, K., [Takao, K.](#), Suzuki, H., Esumi, E., Noguchi, S., Matsuda, Y., Sasaoka, T., Noda, T., Miyazaki, J., Mishina, M., Funabiki, K., and Nabeshima, Y. (2014). Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Mol. Brain* 7, 44. 査読有
23. Hagihara, H., Ohira, K., [Takao, K.](#), and *Miyakawa, T. (2014). Transcriptomic evidence for immaturity of the prefrontal cortex in patients with schizophrenia. *Mol. Brain* 7, 41. 査読有
24. Fujioka, R., Nii, T., Iwaki, A., Shibata, A., Ito, I., Kitaichi, K., Nomura, M., Hattori, S., [Takao, K.](#), Miyakawa, T., and *Fukumaki, Y. (2014). Comprehensive behavioral study of mGluR3 knockout mice: implication in schizophrenia related endophenotypes. *Mol. Brain* 7, 31. 査読有
25. Onouchi, T., *Kobayashi, K., Sakai, K., Shimomura, A., Smits, R., Sumi-Ichinose, C., Kurosumi, M., [Takao, K.](#), Nomura, R., Iizuka-Kogo, A., Suzuki, H., Kondo, K., Akiyama, T., Miyakawa, T., Fodde, R., and Senda, T. (2014). Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. *Mol. Brain* 7, 21. 査読有
26. Shoji, H., [Takao, K.](#), Hattori, S., and *Miyakawa, T. (2014). Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *J. Vis. Exp.* 査読有
27. Koshimizu, H., [Takao, K.](#), Matozaki, T., *Ohnishi, H., and Miyakawa, T. (2014). Comprehensive behavioral analysis of cluster of differentiation 47 knockout mice. *PLoS One* 9, e89584. 査読有
28. Kobayashi, M., Nakatani, T., Koda, T., Matsumoto, K.-I., Ozaki, R., Mochida, N., [Takao, K.](#), Miyakawa, T., and *Matsuoka, I. (2014). Absence of BRINP1 in mice causes increase of hippocampal neurogenesis and behavioral alterations relevant to human psychiatric disorders. *Mol. Brain* 7, 12. 査読有

A01 (公募・山中章弘) 計 22 件 (査読有 22 件)

1. Miyazaki, K., Miyazaki, K., [Yamanaka, A.](#), Tokuda, T., Tanaka, K., and *Doya, K. (2018). Reward probability and timing uncertainty alter the effect of dorsal raphe serotonin neurons on patience. *Nat. Commun.* 9(1):2048. 査読有
2. Koizumi, K., Inoue, M., Chowdhury, S., Bito, H., [Yamanaka, A.](#), Ishizuka, T., and *Yawo, H. (2018). Functional emergence of a column-like architecture in layer 5 of mouse somatosensory cortex in vivo. *J. Physiol. Sci.* 69(1):65-77. 査読有
3. *Black, S.W., Sun, J.D., Santiago, P., Laihsu, A., Kimura, N., [Yamanaka, A.](#), Bersot, R., and Humphries, P.S. (2018). Partial ablation of the orexin field induces a sub narcoleptic phenotype in a conditional mouse model of orexin neurodegeneration. *Sleep*, 234765. 査読有
4. *Ono, D., Honma, K., Yanagawa, Y., [Yamanaka, A.](#), and Honma, S. (2018). Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. *J. Physiol. Sci.* 68(4):333-343. 査読有
5. Futatsuki, T., Yamashita, A., Ikbar, K.N., [Yamanaka, A.](#), Arita, K., Kakihana, Y., and *Kuwaki, T. (2018). Involvement of orexin neurons in fasting- and central adenosine-induced hypothermia. *Sci. Rep.* 8, 2717. 査読有
6. Suda, Y., Kuzumaki, N., Narita, M., Hamada, Y., Shibasaki, M., Tanaka, K., Tamura, H., Kawamura, T., Kondo, T., [Yamanaka, A.](#), and *Narita, M. (2018). Effect of ghrelin on the motor deficit caused by the ablation of nigrostriatal dopaminergic cells or the inhibition of striatal dopamine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 1102–1108. 査読有
7. Watanabe, M., Narita, M., Hamada, Y., Yamashita, A., Tamura, H., Ikegami, D., Kondo, T., Shinzato, T., Shimizu, T., Fukuchi, Y., Muto, A., Okano, H., [Yamanaka, A.](#), Tawfik, V.L., Kuzumaki, N., Navratilova, E., Porreca, F., and *Narita, M. (2018) Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer. *Mol. Pain* 14, 1744806918756406. 査読有
8. Watanabe, M., Sugiura, Y., Sugiyama, E., Narita, M., Navratilova, E., Kondo, T., Uchiyama, N., [Yamanaka, A.](#), Kuzumaki, N., Porreca, F., and *Narita, M. (2018) Extracellular N-acetylaspartylglutamate released in the nucleus accumbens

- modulates the pain sensation: Analysis using a microdialysis/mass spectrometry integrated system. *Mol. Pain* 14, 1744806918754934. 査読有
9. Nasanbuyan, N., Yoshida, M., Takayanagi, Y., Inutsuka, A., Nishimori, K., Yamanaka, A., and *Onaka, T. (2018). Oxytocin-Oxytocin Receptor Systems Facilitate Social Defeat Posture in Male Mice. *Endocrinology* 159, 763–775. 査読有
 10. *Kikusui, T., Kajita, M., Otsuka, N., Hattori, T., Kumazawa, K., Watarai, A., Nagasawa, M., Inutsuka, A., Yamanaka, A., Matsuo, N., Covington, H.E., and Mogi, K. (2018). Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala. *Behav. Brain Res.* 346, 96–104. 査読有
 11. *Hashimoto, M., Yamanaka, A., Kato, S., Tanifuji, M., Kobayashi, K., and Yaginuma, H. (2018). Anatomical Evidence for a Direct Projection from Purkinje Cells in the Mouse Cerebellar Vermis to Medial Parabrachial Nucleus. *Front. Neural Circuits* 12, 6. 査読有
 12. Black, S.W., Yamanaka, A., and *Kilduff, T.S. (2017). Challenges in the development of therapeutics for narcolepsy. *Prog. Neurobiol.* 152, 89–113. 査読有
 13. Hayashi, K., Katanosaka, K., Abe, M., Yamanaka, A., Nosaka, K., Mizumura, K., and *Taguchi, T. (2017). Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contractions in rats depends on stretch velocity and range of motion. *Eur. J. Pain* 21, 125–139. 査読有
 14. *Dergacheva, O., Yamanaka, A., Schwartz, A.R., Polotsky, V.Y., and Mendelowitz, D. (2017). Optogenetic identification of hypothalamic orexin neuron projections to paraventricular spinally projecting neurons. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 312, H808–H817. 査読有
 15. Yamashita, T., and *Yamanaka, A. (2017). Lateral hypothalamic circuits for sleep–wake control. *Curr. Opin. Neurobiol.* 44, 94–100. 査読有
 16. Ono, D., and *Yamanaka, A. (2017). Hypothalamic regulation of the sleep/wake cycle. *Neurosci. Res.* 118, 74–81. 査読有
 17. Branch, A.F., Navidi, W., Tabuchi, S., Terao, A., Yamanaka, A., *Scammell, T.E., and Diniz Behn, C. (2016). Progressive Loss of the Orexin Neurons Reveals Dual Effects on Wakefulness. *Sleep* 39, 369–77. 査読有
 18. *Dergacheva, O., Yamanaka, A., Schwartz, A.R., Polotsky, V.Y., and Mendelowitz, D. (2016). Direct projections from hypothalamic orexin neurons to brainstem cardiac vagal neurons. *Neuroscience* 339, 47–53. 査読有
 19. *Dergacheva, O., Yamanaka, A., Schwartz, A.R., Polotsky, V.Y., and Mendelowitz, D. (2016). Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats. *J. Neurophysiol.* 116, 2250–2259. 査読有
 20. Chowdhury, S., and *Yamanaka, A. (2016). Optogenetic activation of serotonergic terminals facilitates GABAergic inhibitory input to orexin/hypocretin neurons. *Sci. Rep.* 6, 36039. 査読有
 21. Inutsuka, A., *Yamanaka, A., Chowdhury, S., Nakai, J., Ohkura, M., Taguchi, T., and Yamanaka, A. (2016). The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Sci. Rep.* 6, 29480. 査読有
 22. Miyamoto, D., Hirai, D., Fung, C.C.A., Inutsuka, A., Odagawa, M., Suzuki, T., Boehringer, R., Adaikkan, C., Matsubara, C., Matsuki, N., Fukai, T., McHugh, T.J., Yamanaka, A., and *Murayama, M. (2016). Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. *Science* 352, 1315–8. 査読有

A01 (公募・森郁恵) 計 5 件 (査読有 3 件、査読無 2 件)

1. 塚田祐基, *森 郁恵. (2018) 線虫の温度走性行動における神経活動による温度空間勾配のエンコーディング. *生物物理* 58(1):31-33. 査読有
2. ▲ Aoki, I., Tateyama, M., Shimomura, T., Ihara, K., Kubo, Y., Nakano, S., and *Mori, I. (2018). SLO potassium channels antagonize premature decision making in *C. elegans*. *Cold Spring Harbor Laboratory bioRxiv*, 243220. 査読無
3. Taniguchi, A., Kimura, Y., Mori, I., Nonaka, S., and *Higashijima, S. (2017). Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes. *Dev. Growth Differ.* 59, 741–748. 査読有
4. Sasakura, H., Moribe, H., Nakano, M., Ikemoto, K., Takeuchi, K., and *Mori, I. (2017). Lifespan extension by peroxidase and dual oxidase-mediated ROS signaling through pyrroloquinoline quinone in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* 130, 2631–2643. 査読有
5. Yamaguchi, S., Naoki, H., Ikeda, M., Tsukada, Y., Nakano, S., *Mori, I., and Ishii, S. (2018). Identification of animal behavioral strategies by inverse reinforcement learning. *PLOS Comput. Biol.* 14, e1006122. 査読無

A01 (公募・平野恭敬) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. ▲◎ *Hirano, Y., Ihara, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Iwata, I., Takahashi, A., Awata, H., Nakamura, N., Takakura, M., Suzuki, Y., Horiuchi, J., Okuno, H., and *Saitoe, M. (2016). Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in *Drosophila* mushroom bodies. *Nat. Commun.* 7, 13471. 査読有
2. ▲ Yamazaki, D., Horiuchi, J., Ueno, K., Ueno, T., Saeki, S., Matsuno, M., Naganos, S., Miyashita, T., Hirano, Y., Nishikawa, H., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Honda, Y., Kodama, T., Masuda, T., and *Saitoe, M. (2014). Glial Dysfunction Causes Age-Related Memory Impairment in *Drosophila*. *Neuron* 84, 753–763. 査読有

A01 (公募・八木健) 計 17 件 (査読有 17 件)

1. ▲ Katori, S., Noguchi, Y., Okayama, A., Kawamura, Y., Leo, W., Sakimura, K., Hirabayashi, T., Iwasato, T., and *[Yagi, T.](#) (2018). Protocadherin- α C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *Sci. Rep.* 7, 15908. 査読有
2. Onishi, K., Uyeda, A., Shida, M., Hirayama, T., [Yagi, T.](#), Yamamoto, N., and *Sugo, N. (2017). Genome Stability by DNA polymerase β in Neural Progenitors Contributes to Neuronal Differentiation in Cortical Development. *J. Neurosci.* 37, 8444-8458. 査読有
3. ▲ Jiang, Y., Loh, Y.E., Rajarajan, P., Hirayama, T., Liao, W., Kassim, B.S., Javidfar, B., Hartley, B.J., Kleofas, L., Park, R.B., Labonte, B., Ho, S.M., Chandrasekaran, S., Do, C., Ramirez, B.R., Peter, C.J., C W, J.T., Safaie, B.M., Morishita, H., Roussos, P., Nestler, E.J., Schaefer, A., Tycko, B., Brennand, K.J., [Yagi, T.](#), Shen, L., and *Akbarian, S. (2017). The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nature Genet.* 49, 1239-1250. 査読有
4. Nakamura, F., Okada, T., Shishikura, M., Uetani, N., Taniguchi, M., [Yagi, T.](#), Iwakura, Y., Ohshima, T., Goshima, Y., and *Strittmatter, S. (2017). Protein Tyrosine Phosphatase δ mediates the Sema3A-induced cortical basal dendritic arborization through the activation of Fyn tyrosine kinase. *J. Neurosci.* 37, 7125-7139. 査読有
5. Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.Q., Ohya, Y., Anderson, J.E., Shibata, A., Kawaguchi, M., Ohya, S., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ojima, K., Nishimatsu, S., Nohno, T., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Nishimura, T., [Yagi, T.](#), *Allen, R.E. (2017). Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells. *Stem Cells* 35, 1815-1834. 査読有
6. ▲ Hirayama, T., and *[Yagi, T.](#) (2017). Regulation of clustered protocadherin genes in individual neurons. *Semin. Cell Dev. Biol.* 69, 122-130. 査読有
7. ▲ Hasegawa, S., Kobayashi, H., Kumagai, M., Nishimaru, H., Tarusawa, E., Kanda, H., Sanbo, M., Yoshimura, Y., Hirabayashi, M., Hirabayashi, T., and *[Yagi, T.](#) (2017). Clustered Protocadherins Are Required for Building Functional Neural Circuits. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 114. 査読有
8. Nakamura, T., Nagata, M., [Yagi, T.](#), Graybiel, A.M., Yamamori, T., and *Kitsukawa, T. (2017). Learning New Sequential Stepping Patterns Requires Striatal Plasticity during the Earliest Phase of Acquisition. *The Eur. J. Neurosci.* 45, 901-911. 査読有
9. ▲ Hasegawa, S., Kumagai, M., Hagihara, M., Nishimaru, H., Hirano, K., Kaneko, R., Okayama, A., Hirayama, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Watanabe, M., Hirabayashi, T., and [Yagi, T.](#) (2016). Distinct and cooperative functions for the protocadherin- α , β and γ clusters in neuronal survival and axon targeting. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 155. 査読有
10. ▲ Tarusawa, E., Sanbo, M., Okayama, A., Miyashita, T., Kitsukawa, T., Hirayama, T., Hirabayashi, T., Hasegawa, S., Kaneko, R., Toyoda, S., Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., Nakauchi, H., Hirabayashi, M., *[Yagi, T.](#), and *Yoshimura, Y. (2016). Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the Dnmt3b DNA methyltransferase and clustered protocadherins. *BMC Biol.* 14, 103. 査読有
11. Kaneko, R., Sato, A., Hamada, S., [Yagi, T.](#), Ohsawa, I., Ohtsuki, M., Kobayashi, E., Hirabayashi, M., and *Murakami, T. (2016). Transgenic rat model of childhood-onset dermatitis by overexpressing telomerase reverse transcriptase (TERT). *Transgenic Res.* 25, 413-424. 査読有
12. ▲ *Kitsukawa, T., and [Yagi, T.](#) (2015). The transfer and transformation of collective network information in gene-matched networks. *Sci. Rep.* 5, 14984. 査読有
13. Uchimura, A., Higuchi, M., Minakuchi, Y., Ohno, M., Toyoda, A., Fujiyama, A., Miura, I., Wakana, S., Nishino, J., and *[Yagi, T.](#) (2015). Germline mutation rates and long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genomic Res.* 25, 1125-1134. 査読有
14. *[Yagi, T.](#) (2015). Role of clustered protocadherins in promoting neuronal diversity and function. *Neural Surface Antigens*, 141-152. 査読有
15. Meguro, R., Hishida, R., Tsukano, H., Yoshitake, K., Imamura, R., Tohmi, M., Kitsukawa, T., Hirabayashi, T., [Yagi, T.](#), Takebayashi, H., and *Shibuki, K. (2015). Impaired clustered protocadherin- α leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. *J. Neurochem.* 133, 66-72. 査読有
16. ▲ Kaneko, R., Abe, M., Hirabayashi, T., Uchimura, A., Sakimura, K., Yanagawa, Y., and *[Yagi, T.](#) (2014). Expansion of stochastic expression repertoire by tandem duplication in mouse Protocadherin-a cluster. *Sci. Rep.* 4, 6263. 査読有
17. Toyoda, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, T., Tarusawa, E., Toyama, T., Okano, M., Oda, M., Nakauchi, H., Yoshimura, Y., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Hirayama, T., Hirabayashi, T., and [Yagi, T.](#) (2014). Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered protocadherin genes, generating single neuron diversity. *Neuron* 82, 94-108. 査読有

A01 (公募・竹内秀明) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. ▲ *Wang, M.-Y., and [Takeuchi, H.](#) (2017). Individual recognition and the “face inversion effect” in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Elife* 6. 査読有
2. ▲ Okuyama, T., *Yokoi, S., and *[Takeuchi, H.](#) (2017). Molecular basis of social competence in medaka fish. *Dev. Growth Differ.* 59, 211-218. 査読有
3. ▲ Isoe, Y., Konagaya, Y., Yokoi, S., Kubo, T., and *[Takeuchi, H.](#) (2016). Ontogeny and Sexual Differences in Swimming Proximity to Conspecifics in Response to Visual Cues in Medaka Fish. *Zoolog. Sci.* 33, 246-254. 査読有

4. ▲ Yokoi, S., Ansai, S., Kinoshita, M., Naruse, K., Kamei, Y., Young, L.J., Okuyama, T., and *Takeuchi, H. (2016). Mate-guarding behavior enhances male reproductive success via familiarization with mating partners in medaka fish. *Front. Zool.* 13, 21. 査読有
5. ▲ Yokoi, S., Okuyama, T., Kamei, Y., Naruse, K., Taniguchi, Y., Ansai, S., Kinoshita, M., Young, L.J., Takemori, N., Kubo, T., and *Takeuchi, H. (2015). An essential role of the arginine vasotocin system in mate-guarding behaviors in triadic relationships of medaka fish (*Oryzias latipes*). *PLOS Genetics* 11, e1005009. 査読有

A01 (公募・高宮考悟) 計1件 (査読有1件)

1. Chiu, S.-L., Diering, G.H., Ye, B., Takamiya, K., Chen, C.-M., Jiang, Y., Niranjana, T., Schwartz, C.E., Wang, T., and *Huganir, R.L. (2017). GRASP1 Regulates Synaptic Plasticity and Learning through Endosomal Recycling of AMPA Receptors. *Neuron* 93, 1405–1419.e8. 査読有

A01 (公募・掛川渉) 計6件 (査読有3件、査読無3件)

1. Wakayama, S., *Kiyonaka, S., Arai, I., Kakegawa, W., Matsuda, S., Ibata, K., Nemoto, Y.L., Kusumi, A., Yuzaki, M., *Hamachi, I. (2017). Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nat. Commun.* 8, 14850. 査読有
2. 河野まや, 掛川渉, *柚崎通介 (2017). 中枢神経の可塑性とは. *Clinical Neuroscience.* 5, 523-527. 査読無
3. Elegheert, J., Kakegawa, W., Clay, E. J., Shanks, N., Behiels, E., Matsuda, K., Kohda, K., Miura, E., Rossmann, M., Mitakidis, N., Motohashi, J., Chang, T.V., Siebold, C., Greger, H.I., Nakagawa, T., *Yuzaki, M., *Aricescu, R.A. (2016). Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes. *Science* 353, 295-299. 査読有
4. Matsuda, K., Budisantoso, T., Mitakidis, N., Sugaya, Y., Miura, E., Kakegawa, W., Yamasaki, M., Konno, K., Uchigashima, M., Abe, M., Watanabe, I., Kano, M., Watanabe, M., Sakimura, K., *Aricescu R.A., *Yuzaki, M. (2016). Transsynaptic modulation of kainite receptor functions by C1q-like proteins. *Neuron* 90, 752–767. 査読有
5. *掛川渉, 柚崎通介 (2016). シナプスに架かる記憶への架け橋：Neurexin–Cbln1–GluD2 三者複合体構造. *実験医学* 34, 3181-3184. 査読無
6. *掛川渉, 松田恵子, 柚崎通介 (2016).「補体ファミリー分子」とシナプス形成・維持. *Annual Review 神経* 2016. 35-46. 査読無

A01 (公募・竹田真己) 計4件 (査読有4件)

1. ▲ Tamura, K., Takeda, M., Setsube, R., Tsubota, T., Hirabayashi, T., Miyamoto, K., and *Miyashita, Y. (2017). Conversion of object identity to object-general semantic value in the primate temporal cortex. *Science* 357, 687–692. 査読有
2. ▲ Miyamoto, K., Osada, T., Setsube, R., Takeda, M., Tamura, K., Adachi, Y., and *Miyashita, Y. (2017). Causal neural network of metamemory for retrospection in primates. *Science* 355, 188–193. 査読有
3. ▲ Koyano, K.W., *Takeda, M., Matsui, T., Hirabayashi, T., Ohashi, Y., and *Miyashita, Y. (2016). Laminar Module Cascade from Layer 5 to 6 Implementing Cue-to-Target Conversion for Object Memory Retrieval in the Primate Temporal Cortex. *Neuron* 92, 518–529. 査読有
4. ▲ *Nakahara, K., Adachi, K., Kawasaki, K., Matsuo, T., Sawahata, H., Majima, K., Takeda, M., Sugiyama, S., Nakata, R., Iijima, A., Tanigawa, H., Suzuki, T., Kamitani, Y., and *Hasegawa, I. (2016). Associative-memory representations emerge as shared spatial patterns of theta activity spanning the primate temporal cortex. *Nat. Commun.* 7, 11827. 査読有

A01 (公募・古田寿昭) 計7件 (査読有5件、査読無2件)

1. ◎ Ohta, Y., Furuta, T., Nagai, T., and *Horikawa, K. (2018). Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Sci. Rep.* 8, 1866. 査読有
2. ◎ *古田寿昭 (2017) ケージドヌクレオチドによる細胞機能の光制御, *生体の科学*, 68,502-503 査読無
3. ◎ 鈴木商信, *古田寿昭 (2015) 細胞内シグナル伝達と遺伝子発現を光制御するケージド化合物, *生体の科学*, 66 (2) 126-131. 査読無
4. Takano, H., Narumi, T., Nomura, W., Furuta, T., and *Tamamura, H. (2015). Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Group. *Org. Lett.* 17, 5372–5. 査読有
5. Ieda, N., Hishikawa, K., Eto, K., Kitamura, K., Kawaguchi, M., Suzuki, T., Fukuhara, K., Miyata, N., Furuta, T., Nabekura, J., and *Nakagawa, H. (2015). A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 3172–5. 査読有
6. Takano, H., Narumi, T., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., Nomura, W., and *Tamamura, H. (2014). Development of the 8-aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl group as a new entry of photolabile protecting groups. *Tetrahedron* 70, 4400–4404. 査読有
7. ◎ Watanabe, T., Hoshida, T., Sakyō, J., Kishi, M., Tanabe, S., Matsuura, J., Akiyama, S., Nakata, M., Tanabe, Y., Suzuki, A.Z., Watanabe, S., and *Furuta, T. (2014). Synthesis of nucleobase-caged peptide nucleic acids having improved photochemical properties. *Org. Biomol. Chem.* 12, 5089–93. 査読有

A01 (公募・櫻井芳雄) 計6件 (査読有5件、査読無1件)

1. ▲ *[Sakurai, Y.](#), Osako, Y., Tanisumi, Y., Ishihara, E., Hirokawa, J., and Manabe, H. (2018). Multiple approaches to the investigation of cell assembly in memory research—present and future. *Front. Syst. Neurosci.* 12, 21. 査読有
2. ◎▲ *Ishino, S., Takahashi, S., *Ogawa, M., and [Sakurai, Y.](#) (2017). Hippocampal-prefrontal theta phase synchrony in planning of multi-step actions based on memory retrieval. *Eur. J. Neurosci.* 45, 1313–1324. 査読有
3. ▲ *Sakaguchi, Y., and [Sakurai, Y.](#) (2017). Left-right functional asymmetry of ventral hippocampus depends on aversiveness of situations. *Behav. Brain Res.* 325, 25–33. 査読有
4. ▲ *[Sakurai, Y.](#), Ohnuki, T., Shiroshita, R., Sakaguchi, Y., Shiotani, K., and Lee, C.J. (2017). Multipotentiality of the Brain to Be Revisited Repeatedly. In: I. Opris, M.F. Casanova (eds.), *The Physics of the Mind and Brain Disorders*, Springer, Switzerland pp.451–463. 査読無
5. ▲ *[Sakurai, Y.](#), and Song, K. (2016). Neural Operant Conditioning as a Core Mechanism of Brain-Machine Interface Control. *Technologies* 4, 26. 査読有
6. ▲ *Nakazono, T., Sano, T., Takahashi, S., and [Sakurai, Y.](#) (2015). Theta oscillation and neuronal activity in rat hippocampus are involved in temporal discrimination of time in seconds. *Front. Syst. Neurosci.* 9, 95. 査読有

A01 (公募・川口真也) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. ▲ *[Kawaguchi, S.-Y.](#), and [Sakaba, T.](#) (2017). Fast Ca²⁺ Buffer-Dependent Reliable but Plastic Transmission at Small CNS Synapses Revealed by Direct Bouton Recording. *Cell Rep.* 21, 3338–3345. 査読有
2. ▲ Zorrilla de San Martin, J., *Trigo, F.F., and *[Kawaguchi, S.-Y.](#) (2017). Axonal GABAA receptors depolarize presynaptic terminals and facilitate transmitter release in cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 595, 7477–7493. 査読有

A01 (公募・村越秀治) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. ▲ *[Murakoshi, H.](#), and Shibata, A.C.E. (2017). ShadowY: a dark yellow fluorescent protein for FLIM-based FRET measurement. *Sci. Rep.* 7, 6791. 査読有
2. ▲ *[Murakoshi, H.](#), Shin, M.E., Parra-Bueno, P., Szatmari, E.M., Shibata, A.C.E., and *Yasuda, R. (2017). Kinetics of Endogenous CaMKII Required for Synaptic Plasticity Revealed by Optogenetic Kinase Inhibitor. *Neuron* 94, 690. 査読有
3. Nakahata, Y., Eto, K., [Murakoshi, H.](#), Watanabe, M., Kuriu, T., Hirata, H., Moorhouse, A.J., Ishibashi, H., and *Nabekura, J. (2017) Activation-Dependent Rapid Postsynaptic Clustering of Glycine Receptors in Mature Spinal Cord Neurons. *eNeuro* 4. 査読有
4. ▲ Nakahata, Y., Nabekura, J., and *[Murakoshi, H.](#) (2016). Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca²⁺ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. *Sci. Rep.* 6, 39564. 査読有
5. Hedrick, N.G., Harward, S.C., Hall, C.E., [Murakoshi, H.](#), McNamara, J.O., and *Yasuda, R. (2016). Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature* 538, 104–108. 査読有

A01 (公募・小川正晃) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. Chuong A, Miri M, Busskamp V, Matthews G, Acker L, Sorensen A, Young A, Klapoetke N, Henninger M, Kodandaramaiah S, [Ogawa, M.](#), Ramanlal S, Bandler R, Allen B, Forest C, Chow B, Han X, Lin Y, Tye K, Roska B, Cardin J, *Boyden E. (2014). Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nat. Neurosci.* 17, 1123–9. 査読有
2. ▲ *Ishino, S., Takahashi, S., *[Ogawa, M.](#), and Sakurai, Y. (2017). Hippocampal-prefrontal theta phase synchrony in planning of multi-step actions based on memory retrieval. *Eur. J. Neurosci.* 45, 1313–1324. 査読有

A01 (公募・深井朋樹) 計 4 件 (査読有 3 件、査読無 1 件)

1. ▲ *Hiratani, N., and [Fukai, T.](#) (2017). Detailed Dendritic Excitatory/Inhibitory Balance through Heterosynaptic Spike-Timing-Dependent Plasticity. *J. Neurosci.* 37, 12106–12122. 査読有
2. ▲ Hiratani, N., and *[Fukai, T.](#) (2017). Selection of Synaptic Connections by Wiring Plasticity for Robust Learning by Synaptic Weight Plasticity. In: *The Rewiring Brain* (eds. Arjen van Ooyen and Markus Butz-Ostendorf) pp. 275–292, Academic Press 査読無
3. Hiratani, N., and *[Fukai, T.](#) (2016). Hebbian Wiring Plasticity Generates Efficient Network Structures for Robust Inference with Synaptic Weight Plasticity. *Front. Neural Circuits* 10, 41. 査読有
4. ▲ Handa, T., Takekawa, T., Harukuni, R., Isomura, Y., and *[Fukai, T.](#) (2017). Medial Frontal Circuit Dynamics Represents Probabilistic Choices for Unfamiliar Sensory Experience. *Cereb. Cortex* 27, 3818–3831. 査読有

A01 (公募・檀上輝子) 計 1 件 (査読有 1 件)

1. ▲ [Danjo, T.](#), Toyozumi, T., and *Fujisawa, S. (2018). Spatial representations of self and other in the hippocampus. *Science* 359, 213–218. 査読有

A01 (公募・Joshua Johansen) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. Luo, R., Uematsu, A., Weitemier, A., Aquili, L., Koivumaa, J., McHugh, T., and *[Johansen, J.P.](#) (2018). A dopaminergic switch for fear to safety transitions. *Nat. Commun.* 9(1):2483. 査読有

2. ◎ Ozawa, T., and *[Johansen, J.P.](#) (2018). Learning rules for aversive associative memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 49, 148–157. 査読有
3. Yeh, L.-F., Watanabe, M., Sulkes-Cuevas, J., and *[Johansen, J.P.](#) (2018). Dysregulation of aversive signaling pathways: a novel circuit endophenotype for pain and anxiety disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 48, 37–44. 査読有
4. *Uematsu, A., Tan, B.Z., Ycu, E.A., Cuevas, J.S., Koivumaa, J., Junyent, F., Kremer, E.J., Witten, I.B., Deisseroth, K., and *[Johansen, J.P.](#) (2017). Modular organization of the brainstem noradrenergic system coordinates opposing learning states. *Nat. Neurosci.* 20, 1602–1611. 査読有
5. Ozawa, T., Ycu, E.A., Kumar, A., Yeh, L.-F., Ahmed, T., Koivumaa, J., and *[Johansen, J.P.](#) (2017). A feedback neural circuit for calibrating aversive memory strength. *Nat. Neurosci.* 20, 90–97. 査読有

A01 (公募・林康紀) 計 3 件 (査読有 3 件)

1. *Sato, M., Kawano, M., Mizuta, K., Islam, T., Lee, M.G., and [Hayashi, Y.](#) (2017). Hippocampus-Dependent Goal Localization by Head-Fixed Mice in Virtual Reality. *eNeuro* 4. 査読有
2. *Bosch, M., Castro, J., Sur, M., and *[Hayashi, Y.](#) (2017). Photomarking Relocalization Technique for Correlated Two-Photon and Electron Microscopy Imaging of Single Stimulated Synapses. *Methods Mol. Biol.* 1538, 185–214. 査読有
3. *Sato, M., Kawano, M., Yanagawa, Y., and [Hayashi, Y.](#) (2016). In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 135, 146–151. 査読有

A01 (公募・水関健司) 計 3 件 (査読有 3 件)

1. ▲ *[Mizuseki, K.](#), and [Miyawaki, H.](#) (2017). Hippocampal information processing across sleep/wake cycles. *Neurosci. Res.* 118, 30–47. 査読有
2. ▲ [Kitanishi, T.](#), Ito, H.T., Hayashi, Y., Shinohara, Y., *[Mizuseki, K.](#), and *[Hikida, T.](#) (2017). Network mechanisms of hippocampal laterality, place coding, and goal-directed navigation. *J. Physiol. Sci.* 67, 247–258. 査読有
3. Durand, S., Iyer, R., [Mizuseki, K.](#), de Vries, S., Mihalas, S., and *[Reid, R.C.](#) (2016). A Comparison of Visual Response Properties in the Lateral Geniculate Nucleus and Primary Visual Cortex of Awake and Anesthetized Mice. *J. Neurosci.* 36, 12144–12156. 査読有

A01 (公募・細川貴之) 計 1 件 (査読有 1 件)

1. ◎▲ *[Tsutsui, K.-I.](#), [Hosokawa, T.](#), Yamada, M., and Iijima, T. (2016). Representation of Functional Category in the Monkey Prefrontal Cortex and Its Rule-Dependent Use for Behavioral Selection. *J. Neurosci.* 36, 3038–3048. 査読有

A01 (公募・坂口昌徳) 計 4 件 (査読有 4 件)

1. ◎▲ *[Akers, K.G.](#), Chérasse, Y., Fujita, Y., Srinivasan, S., Sakurai, T., and *[Sakaguchi, M.](#) (2018). Concise Review: Regulatory Influence of Sleep and Epigenetics on Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive and Emotional Function. *Stem Cells.* 査読有
2. ◎▲ *[Purple, R.J.](#), Sakurai, T., and *[Sakaguchi, M.](#) (2017). Auditory conditioned stimulus presentation during NREM sleep impairs fear memory in mice. *Sci. Rep.* 7, 46247. 査読有
3. ◎▲ Fujinaka, A., Li, R., Hayashi, M., Kumar, D., Changarathil, G., Naito, K., Miki, K., Nishiyama, T., Lazarus, M., Sakurai, T., Kee, N., Nakajima, S., Wang, S.-H., and *[Sakaguchi, M.](#) (2016). Effect of context exposure after fear learning on memory generalization in mice. *Mol. Brain* 9, 2. 査読有
4. ◎▲ *[Sakaguchi, M.](#), Kim, K., Yu, L.M.Y., Hashikawa, Y., Sekine, Y., Okumura, Y., Kawano, M., Hayashi, M., Kumar, D., Boyden, E.S., McHugh, T.J., and Hayashi, Y. (2015). Inhibiting the Activity of CA1 Hippocampal Neurons Prevents the Recall of Contextual Fear Memory in Inducible ArchT Transgenic Mice. *PLoS One* 10, e0130163. 査読有

A01 (公募・中井淳一) 計 16 件 (査読有 16 件)

1. Hiroi, M., Ohkura, M., [Nakai, J.](#), Masuda, N., Hashimoto, K., Inoue, K., Fiala, A., and *[Tabata, T.](#) (2013). Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in Drosophila. *Genes Cells* 18, 1070–81. 査読有
2. Hira, R., Ohkubo, F., Masamizu, Y., Ohkura, M., [Nakai, J.](#), Okada, T., and *[Matsuzaki, M.](#) (2014). Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. *Nat. Commun.* 5, 5551. 査読有
3. Kobayashi, C., Ohkura, M., [Nakai, J.](#), Matsuki, N., Ikegaya, Y., and *[Sasaki, T.](#) (2014). Large-scale imaging of subcellular calcium dynamics of cortical neurons with G-CaMP6-actin. *Neuroreport* 25, 501–6. 査読有
4. Ogino, K., Low, S.E., Yamada, K., Saint-Amant, L., Zhou, W., Muto, A., Asakawa, K., [Nakai, J.](#), Kawakami, K., Kuwada, J.Y., and *[Hirata, H.](#) (2015). RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2859–64. 査読有
5. Manita, S., Suzuki, T., Homma, C., Matsumoto, T., Odagawa, M., Yamada, K., Ota, K., Matsubara, C., Inutsuka, A., Sato, M., Ohkura, M., Yamanaka, A., Yanagawa, Y., [Nakai, J.](#), Hayashi, Y., Larkum, M.E., and *[Murayama, M.](#) (2015). A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception. *Neuron* 86, 1304–16. 査読有

6. *Sato, M., Kawano, M., Ohkura, M., Gengyo-Ando, K., Nakai, J., and Hayashi, Y. (2015). Generation and Imaging of Transgenic Mice that Express G-CaMP7 under a Tetracycline Response Element. *PLoS One* 10, e0125354. 査読有
7. Podor, B., Hu, Y.-L., Ohkura, M., Nakai, J., Croll, R., and *Fine, A. (2015). Comparison of genetically encoded calcium indicators for monitoring action potentials in mammalian brain by two-photon excitation fluorescence microscopy. *Neurophotonics* 2, 021014. 査読有
8. Inoue, M., Takeuchi, A., Horigane, S., Ohkura, M., Gengyo-Ando, K., Fujii, H., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., *Nakai, J., *Kitamura, K., and *Bito, H. (2015). Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat. Methods* 12, 64–70. 査読有
9. *Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. (2016). Allogeneic transplantation of iPSC cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538, 388–391. 査読有
10. Inutsuka, A., Yamashita, A., Chowdhury, S., Nakai, J., Ohkura, M., Taguchi, T., and *Yamanaka, A. (2016). The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Sci. Rep.* 6, 29480. 査読有
11. Yabuki, Y., Koide, T., Miyasaka, N., Wakisaka, N., Masuda, M., Ohkura, M., Nakai, J., Tsuge, K., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y., and *Yoshihara, Y. (2016). Olfactory receptor for prostaglandin F2 α mediates male fish courtship behavior. *Nat. Neurosci.* 19, 897–904. 査読有
12. Monai, H., Ohkura, M., Tanaka, M., Oe, Y., Konno, A., Hirai, H., Mikoshiba, K., Itohara, S., Nakai, J., Iwai, Y., and *Hirase, H. (2016). Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nat. Commun.* 7, 11100. 査読有
13. ◎ *Sato, M., Motegi, Y., Yagi, S., Gengyo-Ando, K., Ohkura, M., and *Nakai, J. (2017). Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain. *Biomed. Opt. Express* 8, 4049–4060. 査読有
14. Kondo, M., Kobayashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., and *Matsuzaki, M. (2017). Two-photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion. *Elife* 6. 査読有
15. Tanimoto, Y., Yamazoe-Umemoto, A., Fujita, K., Kawazoe, Y., Miyanishi, Y., Yamazaki, S.J., Fei, X., Busch, K.E., Gengyo-Ando, K., Nakai, J., Iino, Y., Iwasaki, Y., Hashimoto, K., and *Kimura, K.D. (2017). Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in *C. elegans*. *Elife* 6. 査読有
16. ◎ *Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, Y., Ohkura, M., Fei, X., Chen, M., *Hashimoto, K., and *Nakai, J. (2017). A new platform for long-term tracking and recording of neural activity and simultaneous optogenetic control in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci. Methods* 286, 56–68. 査読有

A01 (公募・日比正彦) 計 6 件 (査読有 6 件)

1. ▲ Takeuchi, M., Matsuda, K., Yamaguchi, S., Asakawa, K., Miyasaka, N., Lal, P., Yoshihara, Y., Koga, A., Kawakami, K., Shimizu, T., and *Hibi, M. (2015). Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. *Dev. Biol.* 397, 1–17. 査読有
2. ▲ Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Yonemura, S., Kakiguchi, K., Sato, Y., Higashiyama, T., Shimizu, T., and *Hibi, M. (2015). Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish. *PLoS Genet.* 11, e1005587. 査読有
3. Scalise, K., Shimizu, T., Hibi, M., and *Sawtell, N.B. (2016). Responses of cerebellar Purkinje cells during fictive optomotor behavior in larval zebrafish. *J. Neurophysiol.* 116, 2067–2080. 査読有
4. ▲ Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Sakakibara, Y., Hayashi, T., Matsuda, K., Hara, Y., Tanegashima, C., Shimizu, T., Kuraku, S., and *Hibi, M. (2017). Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 525, 1558–1585. 査読有
5. Takeuchi, M., Inoue, C., Goshima, A., Nagao, Y., Shimizu, K., Miyamoto, H., Shimizu, T., Hashimoto, H., Yonemura, S., Kawahara, A., Hirata, Y., Yoshida, M., and *Hibi, M. (2017). Medaka and zebrafish contactin1 mutants as a model for understanding neural circuits for motor coordination. *Genes Cells* 22, 723–741. 査読有
6. ▲ Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., *Hibi, M., and Shimizu, T. (2017). Granule cells control recovery from classical conditioned fear responses in the zebrafish cerebellum. *Sci. Rep.* 7, 11865. 査読有

A01 (公募・王丹) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. ▲ Daria Merkurjev, Wan-Ting Hong, Kei Iida, Ikumi Oomoto, Belinda J Goldie, Hitoshi Yamaguti, Takayuki Ohara, Shin-ya Kawaguchi, Tomoo Hirano, Kelsey C Martin, Matteo Pellegrini, *Dan Ohtan Wang (2018) Synaptic N6-methyladenosine (m⁶A) epitranscriptome reveals functional partitioning of localized transcripts. *Nature Neuroscience*, 21(7):1004-1014. 査読有
2. ▲ Merkurjev, D., Hong, W.-T., Iida, K., Goldie, B., Yamaguti, H., Oomoto, I., Ohara, T., Kawaguchi, S., Hirano, T., Martin, K.C., Pellegrini, M., and Wang, D.O. (2017). Synaptic m⁶A Epitranscriptome Reveals Functional Partitioning of Localized Transcripts for Dynamic Tripartite Synapse Modulation. *bioRxiv*, 221374. 査読有

A01 (公募・美津島大) 計 9 件 (査読有 9 件)

1. ▲ *Kida, H., and Mitsushima, D. (2018). Mechanisms of motor learning mediated by synaptic plasticity in rat primary motor cortex. *Neurosci. Res.* 128, 14–18. 査読有
2. ▲ Kida, H., Sakimoto, Y., and *Mitsushima, D. (2017). Slice Patch Clamp Technique for Analyzing Learning-Induced Plasticity. *J. Vis. Exp.* e55876. 査読有
3. *Mitsushima, D. (2017). Synaptic Diversity and Quantification of Intra-Hippocampal Contextual Memory. *Neurol. Neurother.* 2, 000113. 査読有
4. *Mitsushima, D. (2017). Learning-Induced Synaptic Diversity and Quantification of Intra-Hippocampal Entropy. *J. Psychol. Clin. Psychiatry* 8, 1–4. 査読有
5. *Sakimoto, Y., and Mitsushima, D. (2016). Examination of configural association theory and conflict resolution model through hippocampal theta activity. *Neurotransmitter* 3. 査読有
6. ▲ Kida, H., Tsuda, Y., Ito, N., Yamamoto, Y., Owada, Y., Kamiya, Y., and *Mitsushima, D. (2016). Motor Training Promotes Both Synaptic and Intrinsic Plasticity of Layer II/III Pyramidal Neurons in the Primary Motor Cortex. *Cereb. Cortex* 26, 3494–507. 査読有
7. Ebrahimi, M., Yamamoto, Y., Sharifi, K., Kida, H., Kagawa, Y., Yasumoto, Y., Islam, A., Miyazaki, H., Shimamoto, C., Maekawa, M., Mitsushima, D., Yoshikawa, T., and *Owada, Y. (2016). Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia* 64, 48–62. 査読有
8. *Mitsushima, D. (2015). Contextual Learning Requires Functional Diversity at Excitatory and Inhibitory Synapses onto CA1 Pyramidal Neurons. *AIMS Neurosci.* 2, 7–17. 査読有
9. Hosokawa, T., Mitsushima, D., Kaneko, R., and *Hayashi, Y. (2015). Stoichiometry and phosphoisotypes of hippocampal AMPA-type glutamate receptor phosphorylation. *Neuron* 85, 60–67. 査読有

A01 (公募・高橋琢哉) 計 12 件 (査読有 12 件)

1. Tani H, Tada M, Maeda T, Konishi M, Umeda S, Terasawa Y, Mimura M, Takahashi T*, Uchida H*. (2018). Comparison of emotional processing assessed with fear conditioning by interpersonal conflicts in patients with depression and schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, doi: 10.1111/pcn.12805. 査読有
2. Abe H, Jitsuki S, Nakajima W, Murata Y, Jitsuki-Takahashi A, Katsuno Y, Tada H, Sano A, Suyama K, Mochizuki N, Komori T, Masuyama H, Okuda T, Goshima Y, Higo N & Takahashi T.(2018). CRMP2 Binding Compound, Edonergic Maleate, Accelerates Motor Function Recovery from Brain Damage. *Science*, 360:50-57. 査読有
3. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Taguchi A, Kawai H, Komiya K, Suyama K, Abe H, Sano A & Takahashi T.(2017). Social isolation suppresses actin dynamics and synaptic plasticity through ADF/cofilin inactivation in the developing rat barrel cortex. *Scientific Reports*. 7: 8471, DOI:10.1038/s41598-017-08849-3. 査読有
4. Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, and Takahashi T.(2017). Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. *Nature Biotechnology*, 35(1);38-47. 査読有
5. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A, and Takahashi T.(2016). Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex. *PNAS*, E7097-E7105, 1606351113. 査読有
6. Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhi Zhou, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T., Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, and Okano H.(2016). Functional Neurons Generated from T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Neurological Disease Modeling. *Stem Cell Reports*, doi:10.1016. 査読有
7. Nakajima W, Jitsuki S, Sano A, Takahashi T. (2016). Sustained Enhancement of Lateral Inhibitory Circuit Maintains Cross Modal Cortical Reorganization. *Plos One*, 11(2):e0149068. 査読有
8. Jitsuki S, Nakajima W, Takemoto K, Sano A, Tada H, Takahashi-Jitsuki A and Takahashi T. (2016). Nogo Receptor Signaling Restricts Adult Neural Plasticity by Limiting Synaptic AMPA Receptor Delivery. *Cereb. Cortex*, 26(1):427-39. 査読有
9. Tada M, Uchida H, Maeda T, Konishi M, Umeda S, Terasawa Y, Nakajima S, Mimura M, Miyazaki T, Takahashi T. (2015). Fear Conditioning Induced by Interpersonal Conflicts in Healthy Individuals. *Plos One*, 10(5):e0125729. doi: 10.1371/journal.pone.0125729. 査読有
10. Tada H, Koide M, Ara W, Shibata Y, Funabashi T, Suyama K, Goto T, Takahashi T. (2015). Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0131359. 査読有
11. Tada M, Uchida H, Maeda T, Konishi M, Umeda S, Terasawa Y, Nakajima S, Mimura M, Miyazaki T, Takahashi T. (2015). Fear Conditioning Induced by Interpersonal Conflicts in Healthy Individuals. *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0125729. 査読有
12. Uchimoto K, Miyazaki T, Kamiya Y, Mihara T, Koyama Y, Taguri M, Inagawa G, Takahashi T. Goto T.(2014) Isoflurane impairs learning and hippocampal long-term potentiation via the saturation of synaptic plasticity. *Anesthesiology*, 121(2):302-10. 査読有

A01 (公募・木村梨絵) 計 1 件 (査読有 1 件)

1. ▲ *[Kimura, R.](#), Saiki, A., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Sakai, Y., and Isomura, Y. (2017). Large-scale analysis reveals populational contributions of cortical spike rate and synchrony to behavioural functions. *J. Physiol.* 595, 385–413. 査読有

A01 (公募・本間光一) 計 6 件 (査読有 6 件)

1. Takemura, Y., Yamaguchi, S., Aoki, N., Miura, M., [Homma, K.J.](#), and *[Matsushima, T.](#) (2018). Gene expression of Dio2 (thyroid hormone converting enzyme) in telencephalon is linked with predisposed biological motion preference in domestic chicks. *Behav. Brain Res.* 349, 25–30. 査読有
2. ▲ Yamaguchi, S., Hayase, S., Aoki, N., Takehara, A., Ishigohoka, J., [Matsushima, T.](#), Wada, K., and *[Homma, K.J.](#) (2017). Sex Differences in Brain Thyroid Hormone Levels during Early Post-Hatching Development in Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). *PLoS One* 12, e0169643. 査読有
3. ▲ Yamaguchi, S., Aoki, N., Takehara, A., Mori, M., Kanai, A., [Matsushima, T.](#), and *[Homma, K.J.](#) (2016). Involvement of nucleotide diphosphate kinase 2 in the reopening of the sensitive period of filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Neurosci. Lett.* 612, 32–37. 査読有
4. ▲ Aoki, N., Yamaguchi, S., Kitajima, T., Takehara, A., Katagiri-Nakagawa, S., Matsui, R., [Watanabe, D.](#), [Matsushima, T.](#), and *[Homma, K.J.](#) (2015). Critical role of the neural pathway from the intermediate medial mesopallium to the intermediate hyperpallium apicale in filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Neuroscience* 308, 115–24. 査読有
5. ▲ Yamaguchi, S., Aoki, N., Kitajima, T., Okamura, Y., and *[Homma, K.J.](#) (2014). Expression of the voltage-sensing phosphatase gene in the chick embryonic tissues and in the adult cerebellum. *Commun. Integr. Biol.* 7, e9705021. 査読有
6. Yamaguchi, S., Kurokawa, T., Taira, I., Aoki, N., Sakata, S., *Okamura, Y., and [Homma, K.J.](#) (2014). Potential role of voltage-sensing phosphatases in regulation of cell structure through the production of PI(3,4)P2. *J. Cell. Physiol.* 229, 422–33. 査読有

A01 (公募・渡部文子) 計 7 件 (査読有 7 件)

1. ▲ Sugimura, Y.K., Takahashi, Y., [Watabe, A.M.](#), and Kato, F. (2016). Synaptic and network consequences of monosynaptic nociceptive inputs of parabrachial nucleus origin in the central amygdala. *J. Neurophysiol.* 115, 2721–39. 査読有
2. Tsuji, M., Takahashi, Y., [Watabe, A.M.](#), and Kato, F. (2016). Enhanced long-term potentiation in mature rats in a model of epileptic spasms with betamethasone-priming and postnatal N-methyl-D-aspartate administration. *Epilepsia* 57, 495–505. 査読有
3. ▲ [Watabe, A.M.](#), Nagase, M., Hagiwara, A., Hida, Y., Tsuji, M., Ochiai, T., Kato, F., and Ohtsuka, T. (2016). SAD-B kinase regulates pre-synaptic vesicular dynamics at hippocampal Schaffer collateral synapses and affects contextual fear memory. *J. Neurochem.* 136, 36–47. 査読有
4. ▲ Sato, M., Ito, M., Nagase, M., Sugimura, Y.K., Takahashi, Y., *[Watabe, A.M.](#), and Kato, F. (2015). The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice. *Mol. Brain* 8, 22. 査読有
5. ▲ Ohkawa, N., Saitoh, Y., Suzuki, A., Tsujimura, S., Murayama, E., Kosugi, S., Nishizono, H., Matsuo, M., Takahashi, Y., Nagase, M., Sugimura, Y.K., [Watabe, A.M.](#), Kato, F., and Inokuchi, K. (2015). Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory. *Cell Rep.* 11, 261–9. 査読有
6. Nagase, M., Takahashi, Y., [Watabe, A.M.](#), Kubo, Y., and Kato, F. (2014). On-Site Energy Supply at Synapses through Monocarboxylate Transporters Maintains Excitatory Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* 34, 2605–2617. 査読有
7. Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Kassai, H., [Watabe, A.M.](#), Nakao, K., Aiba, A., Watanabe, M., and Manabe, T. (2014). The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3136–3146. 査読有

A01 (公募・久原篤) 計 8 件 (査読有 6 件、査読無 2 件)

1. ▲ Okahata, M., Ohta, A., Mizutani, H., Minakuchi, Y., Toyoda, A., and *[Kuhara, A.](#) (2016). Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Physiol. B.* 186, 985–998. 査読有
2. ◎▲ Ujisawa, T., Ohta, A., Uda-Yagi, M., and *[Kuhara, A.](#) (2016). Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 11, e0165518. 査読有
3. Kage-Nakadai, E., Ohta, A., Ujisawa, T., Sun, S., Nishikawa, Y., [Kuhara, A.](#), and Mitani, S. (2016). *Caenorhabditis elegans* homologue of Prox1/Prospero is expressed in the glia and is required for sensory behavior and cold tolerance. *Genes Cells* 21, 936–48. 査読有
4. ▲ Sonoda, S., Ohta, A., Maruo, A., Ujisawa, T., and *[Kuhara, A.](#) (2016). Sperm Affects Head Sensory Neuron in Temperature Tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Rep.* 16, 56–65. 査読有
5. ◎ Tsukada, Y., Yamao, M., Naoki, H., Shimowada, T., Ohnishi, N., [Kuhara, A.](#), Ishii, S., and Mori, I. (2016). Reconstruction of Spatial Thermal Gradient Encoded in Thermosensory Neuron AFD in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 36, 2571–2581. 査読有
6. ◎▲ Ohta, A., Ujisawa, T., Sonoda, S., and *[Kuhara, A.](#) (2014). Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 5, 4412. 査読有
7. ▲ Kuhara, A., Ujisawa, T., Ohta, A., Okahata, M., Sonoda, S., and *[Kuhara, A.](#) (2014). Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protoc. Exch.* 査読無

8. ▲ Ujisawa, T., Ohta, A., and *Kuhara, A. (2014). Long-term calcium imaging of ASJ sensory neuron controlling cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Protoc. Exch.* 査読無

A01 (公募・杉山 (矢崎) 陽子) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. ▲ Yanagihara, S., and *Yazaki-Sugiyama, Y. (2018). Social interaction with a tutor modulates responsiveness of specific auditory neurons in juvenile zebra finches. *Behav. Processes.* 査読有
2. ▲ Yanagihara, S., and *Yazaki-Sugiyama, Y. (2016). Auditory experience-dependent cortical circuit shaping for memory formation in bird song learning. *Nat. Commun.* 7, 11946. 査読有

A01 (公募・佐藤正晃) 計 1 件 (査読有 1 件)

1. ◎▲ *Sato, M., Kawano, M., Mizuta, K., Islam, T., Lee, M.G., and Hayashi, Y. (2017). Hippocampus-Dependent Goal Localization by Head-Fixed Mice in Virtual Reality. *eNeuro* 4. 査読有

A01 (公募・遠藤昌吾) 計 17 件 (査読有 16 件、査読無 1 件)

1. ▲ Yanai, S., Ito, H., and *Endo, S. (2018). Long-term cilostazol administration prevents age-related decline of hippocampus-dependent memory in mice. *Neuropharmacology* 129, 57–68. 査読有
2. ▲ Yanai, S., Toyohara, J., Ishiwata, K., Ito, H., and *Endo, S. (2017). Long-term cilostazol administration ameliorates memory decline in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) through a dual effect on cAMP and blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 116, 247–259. 査読有
3. ▲ Yamazaki, S., Tanaka, Y., Araki, H., Kohda, A., Sanematsu, F., Arasaki, T., Duan, X., Miura, F., Katagiri, T., Shindo, R., Nakano, H., Ito, T., Fukui, Y., Endo, S., and *Sumimoto, H. (2017). The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci. Rep.* 7, 17402. 査読有
4. ▲ 柳井 修一, *遠藤 昌吾(2017). cAMP 系増強薬と認知症の治療 - 既存薬再開発の応用 -. *Geriatr. Med.* 55, 503–506. 査読有
5. ▲ Tanahashi, H., Tian, Q.-B., Hara, Y., Sakagami, H., Endo, S., and *Suzuki, T. (2016). Polyhydramnios in Lrp4 knockout mice with bilateral kidney agenesis: Defects in the pathways of amniotic fluid clearance. *Sci. Rep.* 6, 20241. 査読有
6. ▲ Yufune, S., Satoh, Y., Akai, R., Yoshinaga, Y., Kobayashi, Y., Endo, S., and *Kazama, T. (2016). Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Sci. Rep.* 6, 21859. 査読有
7. ▲ Yanai, S., and *Endo, S. (2016). Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Behav. Brain Res.* 308, 187–95. 査読有
8. ▲ Yanai, S., and *Endo, S. (2016). Data on the optimization of behavioral tasks for senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Data Br.* 8, 262–6. 査読有
9. ▲ Toyohara, J., Sakata, M., Hatano, K., Yanai, S., Endo, S., Ishibashi, K., Wagatsuma, K., Ishii, K., and *Ishiwata, K. (2016). Preclinical and first-in-man studies of [(11)C]CB184 for imaging the 18-kDa translocator protein by positron emission tomography. *Ann. Nucl. Med.* 30, 534–43. 査読有
10. ▲ Yufune, S., Satoh, Y., Takamatsu, I., Ohta, H., Kobayashi, Y., Takaenoki, Y., Pagès, G., Pouysségur, J., Endo, S., and *Kazama, T. (2015). Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Sci. Rep.* 5, 10252. 査読有
11. ▲ Kurioka, T., Matsunobu, T., Satoh, Y., Niwa, K., Endo, S., Fujioka, M., and *Shiotani, A. (2015). ERK2 mediates inner hair cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Sci. Rep.* 5, 16839. 査読有
12. Yanai, S., and *Endo, S. (2015). Knowledge of Signal Transduction Provides an Approach to Attacking Memory Decline. *Aging Mechanisms; Longevity, Metabolism, and Brain Aging* (N. Mori, and I. Mook-Jung, Inhee eds), pp257-274, Springer. (査読無)
13. ▲ Yanai, S., Semba, Y., Ito, H., and *Endo, S. (2014). Cilostazol improves hippocampus-dependent long-term memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 231, 2681–93. 査読有
14. Ulm, S., Liu, W., Zi, M., Tsui, H., Chowdhury, S.K., Endo, S., Satoh, Y., Prehar, S., Wang, R., Cartwright, E.J., and *Wang, X. (2014). Targeted deletion of ERK2 in cardiomyocytes attenuates hypertrophic response but provokes pathological stress induced cardiac dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 72, 104–16. 査読有
15. ▲ Srimontri, P., Endo, S., Sakamoto, T., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Itohara, S., Hirabayashi, Y., and *Kato, K. (2014). Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects against temporal lobe epilepsy. *J. Neurochem.* 131, 675–87. 査読有
16. ▲ Shuichi Yanai, Yuki Semba, *Endo, S. (2014). The effect of diazepam on mouse PTSD-like behaviors induced by the 2011 Tohoku earthquake. *行動科学* 53, 27–36. 査読有
17. ▲ Setogawa, S., Yamaura, H., Arasaki, T., Endo, S., and *Yanagihara, D. (2014). Deficits in memory-guided limb movements impair obstacle avoidance locomotion in Alzheimer’s disease mouse model. *Sci. Rep.* 4, 7220. 査読有

2.3.2 学会発表

<計画研究>

齊藤実

- 1.長野慎太郎、齊藤 実「In vivo voltammetry analysis of single dopaminergic neuron function during olfactory associative learning」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2018年3月5-7月、富山国際会議場
- 2.黒見 坦、上野耕平、長野慎太郎、齊藤 実「Social enhancement of heat avoidance in *Drosophila melanogaster*」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2018年3月5-7月、富山国際会議場
- 3.上野耕平、齊藤 実「Dopamine release is gated by post-synaptic neurons via retrograde signaling in *Drosophila* brain」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2018年3月5-7月、富山国際会議場
- 4.宮下知之、齊藤 実「Glial vesicular release of glutamate transmits aversive information required for aversive associative conditioning in *Drosophila*」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2018年3月5-7月、富山国際会議場
- 5.齊藤 実「Molecular and Cellular bases of Dopamine Release Gated by Postsynaptic Activity」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2018年3月5-7月、富山国際会議場
- 6.齊藤 実 次世代脳シンポジウム・新学術領域合同若手シンポジウム 企画・運営、2017年12月20日、一橋講堂
- 7.長野慎太郎、齊藤 実「電気化学的手法を用いた匂い連合学習を担う単一ドーパミン神経機能の解明」(招待講演) ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会、2017年12月6日、神戸国際会議場
- 8.齊藤 実、飯野雄一「記憶を作り出す分子と細胞ネットワーク」 ConBio2017第40回日本分子生物学会年会 ワークショップ企画・運営、2017年12月6日、神戸国際会議場
- 9.黒見 坦、上野耕平、長野慎太郎、齊藤 実「個体間相互作用による熱逃避行動の亢進」記憶回路研究会、2017年10月11-12日、岡崎生理学研究所
- 10.齊藤 実 第10回分子高次機能研究会「脳機能のロバストネスとフラジリティ」企画・運営、2017年9月4-6日、山形県天童市
- 11.松野元美、堀内純二郎、増田朋子、大房京子、齊藤 実「加齢性長期記憶障害は記憶固定時のドーパミン神経の過剰活性化により生じる」第40回日本神経科学大会、2017年7月22日、幕張メッセ
- 12.齊藤 実「ショウジョウバエ微小脳による記憶回路動作機構の分子生理学的解析」第40回日本神経科学大会時実利彦記念賞受賞講演、2017年7月21日、幕張メッセ
- 13.宮下知之、村上佳奈子、齊藤 実「グリアのグルタミン酸小胞放出は、ショウジョウバエの連合学習に必要な嫌悪情報を伝達する」第40回日本神経科学大会、2017年7月20日、幕張メッセ
- 14.長野慎太郎、齊藤 実「電気化学的手法を用いたショウジョウバエの脳内モノアミン放出のリアルタイム定量解析」第40回日本神経科学大会、2017年7月20日、幕張メッセ
- 15.上野耕平、齊藤 実「共役入力を受けた後シナプス神経細胞はシナプス前終末cGMP/リアノジン受容体シグナルを活性化しドーパミン放出を誘導する」第40回日本神経科学大会、2017年7月20日、幕張メッセ
- 16.Saitoe M.「A novel mode of dopaminergic synaptic vesicular exocytosis gated by postsynaptic neuronal activity.」第16回東京都医学総合研究所国際シンポジウム、2017年5月17日、東京都医学総合研究所
- 17.松野元美、堀内純二郎、大房京子、増田朋子、齊藤 実「加齢体では繰り返し学習後の神経細胞過興奮により長期記憶が障害される」第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜
- 18.村上佳奈子、宮下知之、菊池絵実、宮地孝明、森山芳則、齊藤 実「グリア細胞からの小胞性グルタミン酸放出は連合学習に必要である」第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜
- 19.Ueno K, Saitoe M.「Pre-synaptic dopamine release is regulated by post-synaptic activity to induce neural plasticity in *Drosophila*.」 in Neuroscience 2016、2016年11月15日、San Diego, CA, USA
- 20.Kori K, Ueno K, Saitoe M.「Pyridoxamine deficiency induces carbonyl stress and schizophrenia-like phenotypes in *Drosophila*.」 in Neuroscience 2016、2016年11月14日、San Diego, CA, USA
- 21.齊藤 実 第9回分子高次機能研究会「脳の柔軟性を生み出す準安定性の多次元的理解」企画・運営、2016年8月25-27日、愛知県
- 22.Saitoe M.「A history of memory and dopamine signaling in the fruit fly.」 in Developmental Neurobiology Course、2016年8月2日、Okinawa Inst Sci Tech Graduate Univ, Okinawa
- 23.郡 香日美、上野耕平、齊藤 実「ピリドキサミン欠乏はショウジョウバエにおいてカルボニルストレス性統合失調症様表現型を誘発する」第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜

- 24.長野慎太郎、平野恭敬、齊藤 実「空腹によるドーパミンシグナリングの活性化がショウジョウバエの匂い学習を亢進する」第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜
- 25.齊藤 実「ドーパミン放出の標的細胞による新たなゲーティング機構」第46回日本神経精神薬理学会シンポジウム(招待講演)、2016年7月2日、ソウルCOEX
- 26.齊藤 実「Genetics of age-related memory impairment」第14回医学研国際シンポジウム、2016年6月30日、東京都医学総合研究所
- 27.鈴木恵雅、上野耕平、齊藤 実「Reward learning in cultured fly brain」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2016年6月27-29日、静岡県掛川市
- 28.長野慎太郎、齊藤 実「Spatiotemporal dopamine release in Drosophila olfactory aversive memory」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2016年6月27-29日、静岡県掛川市
- 29.上野耕平、齊藤 実「Dopamine release is gated by postsynaptic neurons」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2016年6月27-29日、静岡県掛川市
- 30.齊藤 実「Synaptic transmission directed by postsynaptic neurons」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2016年6月27-29日、静岡県掛川市
- 31.Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M. 「Dopamine release is gated by coincidentally activated postsynaptic mushroom body neurons to establish plasticity.」 in Chronological change in Brain function、2016年3月8日、Chiba Univ, Chiba, Japan
- 32.喜田聡、小林和人、齊藤 実「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム」マイクロ精神病態・適応回路シフト・記憶ダイナミズム三領域合同若手シンポジウム、企画・運営、2015年12月19日、東京学術総合センター
- 33.宮下知之、齊藤 実「繰り返し学習の休息は長期記憶符号化神経細胞においてc-fos/creb転写サイクル生成のために必要である」第38回日本分子生物学会年会、2015年12月3日、神戸国際会議場
- 34.齊藤 実「Dopamine release is gated by coincidentally activated postsynaptic neurons to reinforce plasticity」、新学術領域「記憶ダイナミズム」国際シンポジウム「Memory Dynamismー記憶のメカニズムをさぐる」、2015年11月6日、京都芝蘭会館
- 35.鈴木恵雅、齊藤 実「Effects of hunger and satiety states on feeding related motor neuron responses in isolated Drosophila brain」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2015年11月4-5日、京都ガーデンパレス
- 36.上野太郎、齊藤 実「Manipulation of cellular functions by chemical genetics」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2015年11月4-5日、京都ガーデンパレス
- 37.長野慎太郎、齊藤 実「Cellular basis of learning enhancement by fasting in Drosophila」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2015年11月4-5日、京都ガーデンパレス
- 38.宮下知之、齊藤 実「Rest intervals during training are required to generate c-fos/CREB transcriptional cycling in long-term memory encoding neurons」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2015年11月4-5日、京都ガーデンパレス
- 39.Naganos S, Saitoe M. 「Dopamine receptor activities regulate learning-dependent odor preference changes in Drosophila.」 in Neuroscience 2015、2015年10月20日、Chicago, IL, USA
- 40.Ueno K, Saitoe M. 「Dopamine release is gated by coincidentally stimulated postsynaptic neurons to reinforce plasticity.」 in Neuroscience 2015、2015年10月19日、Chicago, IL, USA
- 41.齊藤 実 「新規On-demand型ドーパミン放出機構について」新学術領域「記憶ダイナミズム」数理シンポジウム、2015年9月18日、東京大学
- 42.齊藤 実 第8回分子高次機能研究会「パラダイムシフトへの転回期」企画・運営、2015年8月17-19日、石川県
- 43.上野耕平、齊藤 実「Presynaptic dopamine release is gated by postsynaptic activity in Drosophila brain」第38回日本神経科学大会、2015年7月29日、神戸国際会議場
- 44.齊藤 実「Neuron-glia interactions involved in memory formation and age-related memory impairment in Drosophila」新学術領域「グリアアセンブリ」夏の国際ワークショップ、2015年7月11日、岡崎コンファレンスセンター
- 45.齊藤 実、本多祥子「各種モデル動物による記憶過程の可視化」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/第92回日本生理学会大会、2015年3月22日、神戸国際会議場・展示場
- 46.上野耕平、齊藤 実「単離脳解析から見出されたドーパミン放出の新機構」平成26年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2014年12月12日、東京ホテルガーデンパレス
- 47.上野耕平、齊藤 実「Dopamine release is gated by coincident stimulation of mushroom body neurons to establish plasticity」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜
- 48.松野元美、堀内純二郎、齊藤 実 「Aging reduces glial protection from memory-induced cell death」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜

49. Horiuchi J, Matsuno M, Masuda T, Saitoe M. 「Glial regulation of age-related memory impairment in Drosophila.」 in Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees Janelia Farm HHMI Conference. 、2014年9月21日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA
50. Saitoe M. Ueno K. 「Dopamine release is gated by coincident stimulation of postsynaptic mushroom body neurons to establish plasticity.」 in Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees Janelia Farm HHMI Conference. 、2014年9月21日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA
51. 宮下知之、齊藤 実 「Spaced Training時に形成されるc-fos / CREB transcription cycle」第37回日本神経科学大会、2014年9月12日、パシフィコ横浜
52. 長野慎太郎、上野耕平、川端有紀、齊藤 実 「匂い連合学習によって生じる匂い嗜好性変化のメカニズム」第37回日本神経科学大会、2014年9月11日、パシフィコ横浜
53. 齊藤 実 第7回分子高次機能研究会「微小脳が生み出すビックデータへの挑戦」企画・運営、2014年8月25-27日、静岡県
54. Saitoe M. 「Age-related impairment of long-term memory is caused by reduced neuron-glia interaction.」2014年6月19日、in 2014 Yonsei BK21 plus-IGAKUKEN Joint symposium.、Yonsei Univ, Seoul, Korea
55. Naganos S, Ueno K, Kawabata Y, Saitoe M. 「Molecular and physiological basis of learning defects caused by growth restriction in Drosophila.」 in 2014 Yonsei BK21 plus-IGAKUKEN Joint symposium.、2014年、6月19日、Yonsei Univ, Seoul, Korea
56. 齊藤 実 「A novel mode of dopamine release identified from brain in a vat.」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2014年6月16日、札幌
57. 平野恭敬、齊藤 実 「Dual role of CREB/CRTC in long-term memory maintenance and extinction.」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2014年6月16日、札幌
58. 上野耕平、堀内純二郎、大房京子、齊藤 実 「Dopamine release is gated by coincident stimulation of postsynaptic mushroom body neurons to establish plasticity.」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2014年6月16日、札幌
59. 上野太郎、桑和彦、齊藤 実 「Controlling sleep in Drosophila using a homolog of AWP1, a potential gene for sensitivity to anesthetics.」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2014年6月16日、札幌
60. 堀内純二郎、松野元美、増田朋子、齊藤 実 「Memory-induced cell death increases with age.」新学術領域「記憶ダイナミズム」班会議、2014年6月16日、札幌
61. 松野元美、齊藤 実 「長期記憶形成に必要なグリア転写因子Repoによる遺伝子発現」記憶回路研究会、2013年12月12日、岡崎生理学研究所
62. Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M. 「On-demand dopamine release, triggered by coincident stimuli, determines Drosophila mushroom body plasticity.」 in Cell Symposia: Networked Brain.、2013年11月8日、Sheraton San Diego Hotel and Marina, SD, USA
63. Matsuno M, Horiuchi J, Saitoe M. 「Long-term memory formation requires neuron-glia signaling to induce glial protein synthesis.」 in Cell Symposia: Networked Brain.、2013年11月7日、Sheraton San Diego Hotel and Marina, SD, USA
64. Horiuchi J, Yamazaki D, Saitoe M. 「Age-related memory impairment in Drosophila is caused by an oxidative stress-independent impairment of glial neuromodulator release.」 in Neurobiology of Drosophila.、2013年10月4日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
65. Ueno K, Saitoe M. 「Coincident stimulation induces dopamine release required for long-term enhancement of Ca²⁺ influx in mushroom body neurons.」 in Neurobiology of Drosophila.、2013年10月4日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
66. Naganos S, Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M. 「Olfactory aversive conditioning forms two distinct memory components in Drosophila.」 in Neurobiology of Drosophila.、2013年10月3日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
67. 齊藤 実 第6回分子高次機能研究会「分子と行動の狭間でテラーメード化する先端神経遺伝学」企画・運営、2013年9月17-19日、長野県
68. 上野耕平、堀内純二郎、齊藤 実 「神経可塑性に必要なドパミン放出はどのように決定されるのか」第36回日本神経科学大会、2013年6月22日、国立京都国際会館
69. Saitoe M. 「Fasting to make memory faster.」 in The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Symposium.、2013年6月19日、Kyoto International Conference Center, Kyoto

久恒辰博

1. Tatsuhiko Hisatsune. 「Aging and Anti-Aging of Cognitive Functions」 in 21st US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference Neurodegenerative Diseases: Biology, Cellular and Gene Therapy, 2018 年3 月1 日, FDA White Oak Campus, Silver Spring, Maryland U. S. A. 招待講演 (国際シンポジウム)

2. [Hisatsune T.](#) 「Visualization of Mouse Executive Functions by Operant Learning Task-fMRI」 in Invited Seminar of Center for Neuroscience Imaging Research Institute for Basic Science, Sungkyunkwan University (成均館大学)、2017年9月22日、水原市 (大韓民国) 招待講演
3. [Hisatsune T.](#) 「Neuroimaging of Mouse Executive Functions by Operant Learning task-fMRI」 in Invited Lecture for Program of Brain & Cognitive Engineering, KAIST, 2017年9月21日、Daejeon, (大韓民国) 招待講演
4. [Hisatsune T.](#) 「Neuroimaging of mouse executive functions by operant learning task fMRI」 in Neuroimaging -from Molecules to Networks, Hot Topics in Molecular Imaging, Ecole de Physique des Houches, 2017年2月19日～24日、Les Houches, (フランス国)
5. [Hisatsune T.](#) 「Mouse BOLD fMRI during Operant Reversal Learning in 14.1 Tesla MR Scanner」 in Bruker preclinical Imaging User's Meeting, 2016年10月12日、Ettlingen (ドイツ国) 招待講演 (国際シンポジウム)
6. Keisuke Sakurai, Yuki Tanaka, Akiko Enya, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「Reversal learning test using light stimulus operant conditioning task: For the real-time imaging in the MRI apparatus.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日～22日、神奈川県横浜市
7. Hiroataka Asai, Yoshifumi Abe, Thomas J McHugh, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The effect of attenuated neurotransmitter release in hippocampal adult born neurons on hippocampal neurogenesis, microstructure and function.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日～31日、兵庫県神戸市
8. Hiroataka Asai, Thomas J. McHugh, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The impact of transgenic blockade of neurotransmitter release in newborn neurons on spatial learning」 in Adult Neurogenesis: Evolution, Regulation and Function、2015年5月7日、ドレスデン (ドイツ国)
9. Hiroataka Asai, Yoshifumi Abe, Thomas J. McHugh, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The effect of attenuating neurotransmitter release in hippocampal newborn neurons on memory tasks.」 2014年北米神経科学会、2014年11月17日、ワシントンDC (米国)
10. Hiroataka Asai, Thomas J McHugh, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The impact of transgenic blockade of neurotransmitter release in newborn neurons on hippocampal dependent memory.」 第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、神奈川県横浜市
11. Yoshifumi Abe, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「Live mouse functional MRI using normal bore 600 MHz NMR magnet.」 第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、神奈川県横浜市
12. Jun Kaneko, Megumi Shibahara, Kohta Kimura, Bruno Herculano, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「Impairment of hippocampal GABAergic network in a type 2 diabetes-Alzheimer's disease model mice was ameliorated by the treatment with β -alaninyl-L-histidine.」 第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、神奈川県横浜市
13. [Hisatsune T.](#) 「Impact of adult hippocampal neurogenesis on the mammalian memory system」 in Invited Seminar at Department of Psychology, University of Cambridge, 2014年7月10日、Cambridge, (英国) 招待講演
14. [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「Promotion of Ultra High Field-MRI Research and Development in Univ. Tokyo Kashiwa Campus」 in 2nd joint international symposium "Ultra High Field MRI" 2013年11月14日、東京都
15. Hiroataka Asai, Thomas J McHugh, Yoshifumi Abe, Jun Kaneko, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「Affected memory function in transgenic mice with the attenuated presynaptic neurotransmission of hippocampal adult-born neurons.」 第36回日本神経科学大会、2013年6月20日～23日、京都市
16. Jun Kaneko, Ken Aizawa, Natsumi Okada, Kohta Kimura, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The involvement of diazepam binding inhibitor in the maintenance of neural progenitor cells in the adult dentate gyrus.」 第36回日本神経科学大会、2013年6月20日～23日、京都市
17. Takeshi Matsuda, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The role of hippocampal cholinergic system on the maturation of adult born neurons.」 第36回日本神経科学大会、2013年6月20日～23日、京都市
18. Sharon Chen, Yoshifumi Abe, Yi-ting Wan, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) Gin-Chung Liu, Yu-Ting Kuo, Chih-Jen Huang, Shi-Long Lian. 「fMRI base-estimation of memory recovery for NPC patients treated by ionizing radiation therapy.」 第36回日本神経科学大会、2013年6月20日～23日、京都市
19. Yoshifumi Abe, Masaki Sekino, Ryota Imaoka, Hiroyuki Ohsaki, Yasushi Terazono, Shoji Oda, Hiroshi Mitani, Yugo Fukazawa, Hiromu Yawo, [Tatsuhiko Hisatsune.](#) 「The decrease in CA3 BOLD response after the optic stimulation of the dentate gyrus in ChR2-expressing rats suffered from the radiation exposure.」 第36回日本神経科学大会、2013年6月20日～23日、京都市

多羽田哲也

1. 廣井誠、[多羽田哲也](#) 「Functional imaging of the extrinsic neurons of the mushroom body in Drosophila」 日本比較生理生化学会第39回大会、2017年11月25日～26日、福岡県福岡市
2. 山崎大介 「ショウジョウバエ嗅覚連合記憶における価値情報の維持機構」 第40回日本分子生物学会年会、2017年12月6日～9日、兵庫県神戸市
3. 山崎大介 「Olfactory valence in Drosophila」 第10回分子高次機能研究会、2017年9月5日～6日、山形県天童市
4. Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Maki M Ohtsubo, Yuko Maeyama, [Tetsuya Tabata.](#) 「Bidirectional switch of dishibition for differentiating positive and negative associations.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日～21日、千葉県幕張市

5. Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Takashi Abe, Yuko Maeyama, Maki M Ohtsubo, Tetsuya Tabata. 「Two parallel pathways assinging opposite odor valences in Drosophila olfactory memory. 」 Structure and Function of the Insect Mushroom Body, 2017年3月5日～8日、バージニア州アメリカ
6. 村上智史 「olfactory aversive memory, gene expression, smallGTPase」 第9回分子高次機能研究会、2016年8月31日～9月1日、愛知県豊橋市
7. 江島亜樹、東原和成 「Plastic control of pheromone sensitivity and male reproductive performance」 XXV International Congress of Entomology 「Molecular basis of insect learning and behavior」、2016年9月25日～30日、フロリダ
8. 江島亜樹 「～可塑性を生み出す情報統合機構～背景依存的・経験依存的なショウジョウバエ求愛行動制御機構」 比較動物学と現象数理学から考える「海の霊長類」の知の表現法、2016年12月15日、東京都
9. 山崎大介 「記憶形成による匂い情報への価値変化を規定する双方向回路の同定」 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2015年12月17日～19日、東京都千代田区
10. 村上智史 「rgk1, a small GTPase of REM family, regulates olfactory memory maintenance possibly by counteracting Rac-dependent forgetting process. 」 第38回日本分子生物学会、2015年12月3日～4日、兵庫県神戸市
11. 山崎大介、廣井誠、前山有子、南真樹、多羽田哲也 「記憶形成による匂い情報への価値変化を規定する双方向回路の同定」 第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1日～4日、兵庫県神戸市
12. 廣井誠、多羽田哲也 「ショウジョウバエ嗅覚連合学習における3次及び4次神経の細胞集団応答解析」 第3回ケモビ研究会、2015年11月17日～18日、神奈川県箱根町
13. 山崎大介 「報酬記憶と罰記憶を切り替える双方向性脱抑制スイッチ」 第8回分子高次機能研究会、2015年11月17日～18日、石川県金沢市
14. 廣井誠、多羽田哲也 「Functional imaging of the third-order olfactory neurons Kenyon cells in the mushroom body of Drosophila」 第13回国際シンポジウム「嗅覚味覚の分子神経機構」、2015年11月3日、福岡県福岡市
15. 江島亜樹、橘真一郎、東原和成 「Modification of Male Courtship Motivation by Olfactory Habituation via the GABAA Receptor in Drosophila」 Neurobiology of Drosophila 2015、2015年9月29日～2015年10月3日、ニューヨーク
16. 江島亜樹、橘真一郎、東原和成 「ショウジョウバエの匂い馴化：性フェロモン受容の可塑的制御機構」 日本味と匂学会第49回大会、2015年9月24日～26日、岐阜県岐阜市
17. 廣井誠、多羽田哲也 「Functional imaging of the third-order olfactory neurons Kenyon cells in the mushroom body of Drosophila.」 14th European Symposium for Insect Taste and Olfaction(ESITO)、2015年9月20日～25日、イタリア
18. 廣井誠、多羽田哲也 「ショウジョウバエのキノコ体軸索部における匂い情報受容の定量的解析」「記憶のメカニズムを理解する一数理解析からのアプローチ」 シンポジウム、2015年9月18日、東京都文京区
19. Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Yuko Maeyama-Kamoshida, Maki Ohtubo-Minami, Tetsuya Tabata 「CREB activity-dependent genetic dissection of the Drosophila mushroom body highlights the novel functions of γ neurons in olfactory memory」 第38回日本神経科学学会大会、2015年7月28日～31日、兵庫県神戸市
20. 多羽田哲也、阿部崇、上岡雄太郎、廣井誠 「ショウジョウバエ3次嗅覚神経の機能イメージング -- 嗅覚コードと嗅覚記憶をめぐって」 第38回日本神経科学学会大会シンポジウム、2015年7月28日、兵庫県神戸市
21. 阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也 「The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in Drosophila mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway」 2015 Annual Drosophila Research Conference、2015年3月4日～8日、シカゴ
22. 江島亜樹、橘真一郎、東原和成 「ライバルは気にしない：嗅覚系フェロモン馴化と求愛意欲」 日本動物行動学会第33回大会、2014年11月1日～2日、長崎県長崎市
23. 江島亜樹 「ショウジョウバエの目から：モデル動物の比較行動学」 日本動物行動学会第33回大会、2014年11月3日、長崎県長崎市
24. hin-Ichiro Tachibana, Kazushige Touhara, Aki Ejima. 「Plastic control of olfactory pheromone coding for decent courtship decision in Drosophila」 Cold Spring Harbar Asia meeting, Neurobiology: Diverse Species and Conserved、2014年9月15日～19日、中国蘇州
25. Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata. 「A mushroom-body-specific small GTPase Rgk1 regulates the anesthesia-resistant component of Drosophila olfactory memory」 第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、神奈川県横浜市
26. 廣井誠、多羽田哲也 「キイロショウジョウバエ嗅覚記憶中枢における匂い応答のライブイメージング解析」 第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、神奈川県横浜市
27. 上岡雄太郎、山崎大介、市之瀬敏晴、大坪真樹、廣井誠、多羽田哲也 「CREB レポーターを用いたショウジョウバエ嗅覚記憶に関わる神経の解析」 第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、神奈川県横浜市

- 28.阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也。「Sickie, a human MAP Nav2 homolog, facilitates F-actin-mediated axonal growth in Drosophila MB neurons by relaying non-canonical Rac signaling to the Cofilin pathway」第11回日本ショウジョウバエ研究会、2014年6月4日～6日、石川県金沢市
- 29.Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Maki Ohtsubo-minami, Tetsuya Tabata. 「Genetic dissection of the mushroom bodies by CREB reporter flies that causes unique phenotypes in aversive olfactory memory」79th CSHL Symposium、2014年5月30日、アメリカ
- 30.Aki Ejima 「ショウジョウバエの匂い馴化：性フェロモン受容の可塑的制御機構」第58回日本応用動物昆虫学会大会、2014年3月26日～28日、高知県
- 31.Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata. 「The requirement of a mushroom-body-specific RGK family protein in Drosophila olfactory memory retention」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、兵庫県神戸市
- 32.Hiroi M, Ohkura M, Nakai J, Masuda N, Hashimoto K, Inoue K, Fiala A, Tabata T. 「Principal component analysis of odor coding at the level of third order olfactory neurons in Drosophila」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、兵庫県神戸市
- 33.Daisuke Yamazaki 「Functional analyses of CREB reporter-positive mushroom body neurons in middle- and long-term memory in Drosophila」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、兵庫県神戸市
- 34.Aki Ejima 「揮発性メスフェロモン成分の同定」第六回分子高次機能研究会、2013年9月17日～2013年9月19日、群馬県
- 35.Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata. 「The requirement of a mushroom-body-specific RGK family protein in Drosophila olfactory memory Retention」平成25年度『包括型脳科学研究推進支援ネットワーク』夏のワークショップ、2013年8月29日～9月1日、愛知県名古屋市

飯野雄一

- 1.Masahiro TOMIOKA and Yuichi IINO, Regulation of behavioral plasticity by insulin-like signaling in *C. elegans*., 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018年03月06日, Toyama International Conference Center (Toyama)
- 2.Yasuaki Ike, Tao Jiang, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, E3 ubiquitin ligases regulate taste avoidance learning in *C. elegans*., 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018年03月06日, Toyama International Conference Center (Toyama)
- 3.Takashi Nagashima, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, The DAF-16/FOXO transcription factor controls associative learning in *C. elegans*., 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018年03月06日, Toyama International Conference Center (Toyama)
- 4.Park ChanHyun(パク チャンヒョン)、櫻井裕樹、飯野雄一、國友博文, Roles of the CLC chloride channel CLH-1 in salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*., 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018年03月06日, Toyama International Conference Center (Toyama)
- 5.Keita Mori, Michinori Koebisu, Shizuka Kobayashi, Yuji Kiyama, Toshiya Manabe, Atsu Aiba, Yuichi Iino, Generation and characterization of calyntenin triple knockout mice., "Principles of memory dynamism elucidated from a diversity of learning systems"2018 Workshop & Meeting, 2018年03月06日, Toyama International Conference Center (Toyama)
- 6.國友博文、佐藤博文、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の塩濃度の記憶と走化性の分子・神経機構」次世代脳プロジェクト・冬のシンポジウム4領域合同若手シンポジウム, 2017/12/20, 一橋大学 一橋講堂
- 7.森 啓太、古戎 道典、小林 静香、城山 優治、真鍋 俊也、饗場 篤、飯野 雄一「哺乳類におけるカルシネチンの機能：トリプルノックアウトマウスを用いた解析」ConBio2017(第40回日本分子生物学会年会), 2017年12月07日, 神戸ポートアイランド(神戸)
- 8.富岡 征大、永嶋 宇、後屋敷 舞、飯野 雄一「多彩なインスリン様シグナル伝達により制御される *C. elegans* の学習記憶」ConBio2017, 2017年12月07日, 神戸ポートアイランド(神戸)
- 9.森 啓太、古戎 道典、大野 速雄、小林静香、真鍋俊也、饗場 篤、飯野 雄一, Generation and characterization of calyntenin triple knockout mice.,第40回 日本神経科学大会, 2017年07月22日, 幕張
- 10.Masahiro Tomioka, Takashi Nagashima, Mai Goyashiki, Yuichi Iino, A versatile role of insulin-like signaling in learning behavior in *C. elegans*, 第40回 日本神経科学大会, 2017年07月22日, 幕張メッセ (千葉市)
- 11.Takashi NAGASHIMA, Masahiro TOMIOKA, Yuichi IINO, Multiple isoforms of a DAF-16/FOXO transcription factor are involved in learning and memory in *C. elegans*, 第40回 日本神経科学大会, 2017年07月20日, 幕張
- 12.Hayao Ohno, Naoko Sakai, Takeshi Adachi, and Yuichi Iino, Diacylglycerol encodes differences between past and current stimulus intensity., 21st International *C. elegans* Meeting, 2017年06月24日, UCLA(Los Angeles)

13. Masahiro Tomioka and Yuichi Iino, A versatile insulin-like signaling regulates taste avoidance learning, 21st International *C. elegans* Conference, 2017年06月24日, UCLA(Los Angeles)
14. M.S. Jang, Y. Toyoshima, H. Kunitomo, Y. Iino, Identification of neurons and analysis of the neural circuit involved in the learned salt-avoidance behavior in *C. elegans*., 21st International *C. elegans* Meeting, 2017年06月23日, Los Angeles
15. ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Roles of the CLC chloride channel *clh-1* in food-associated salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*., 21st International *C. elegans* conference, 2017年06月23日, Los Angeles
16. Takashi NAGASHIMA, Masahiro TOMIOKA, Yuichi IINO, Multiple isoforms of the DAF-16/FOXO transcription factor regulate taste avoidance learning., 21st International *C. elegans* Meeting, 2017年06月22日, Los Angeles
17. YUICHI IINO, Molecular and neural circuit mechanisms for experience-dependent behavioral switching in *C. elegans*., 37th Blankenese Conference, 2017年05月09日 Blankenese (Hamburg, Germany)
18. Shuichi Yanagi, Mai Uemura, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Long-lasting memory of salt chemotaxis learning in *C. elegans*., 37th Blankenese Conference, 2017年05月06日, Blankenese(Hamburg, Germany)
19. ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Roles of the CIC chloride channel *clh-1* in salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*., 第17回東京大学生命科学シンポジウム, 2017年04月15日, 東京
20. Keita Mori, Michinori Koebis, Hayao Ohno, Shizuka Kobayashi, Toshiya Manabe, Atsu Aiba, Yuichi Iino, Generation and characterization of calyntenin triple knockout mice, 第94回日本生理学会大会, 2017年03月30日, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)
21. Masahiro Tomioka, Takashi Nagashima, Yuichi Iino, Role of the insulin-like signaling pathway in learning in *C. elegans*, Gordon Research Conferences IGF & Insulin System in Physiology & Disease, 2017年03月15日, Ventura Beach Marriott (CA, U.S.A.)
22. Masahiro Tomioka, The role of insulin-like signaling in learning behavior in *C. elegans*, JSPS Core-to-Core Project International Seminar, 2017年01月25日
23. Yasuaki Ike, Tao Jiang, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, Analysis of a regulatory mechanism of taste avoidance learning in *C. elegans*, The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP), 2016年12月04日, 九州大学(福岡県・福岡市)
24. Takashi NAGASHIMA, Masahiro TOMIOKA, Yuichi IINO, Roles of FOXO transcription factor in taste avoidance learning in *C. elegans*, The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2016年12月03日 ~ 2016年12月03日, 九州大学(福岡県・福岡市)
25. 池 泰明、姜 涛、富岡 征大、飯野 雄一「線虫 *C. elegans* のインスリン/PI3K経路による飢餓学習の制御機構の解析」第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月01日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
26. 永嶋宇、富岡征大、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の学習・記憶における DAF-16/FOXO 転写因子の役割」第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月01日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
27. ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, 線虫 *C. elegans* の CIC 型クロライドチャネル *clh-1* の塩濃度走性における機能の解明 (Roles of the CIC chloride channel *clh-1* in salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*), 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
28. Yuichi Iino, Molecules and the neural circuit for switching the chemosensory behavior in *C. elegans*, NSF-AMED Workshop: Comparative Principles of Brain Architecture and Functions, 2016年11月18日, Marriott Marquis San Diego Marina, San Diego, U.S.A.
29. Takashi Nagashima, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, Analysis of DAF-16/FOXO, a transcription factor that is involved in learning and memory in *C. elegans*, CeNeuro2016 (*C. elegans* Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR), 2016年07月28日, 名古屋大学豊田講堂(愛知県・名古屋市)
30. ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, The CIC chloride channel CLH-1 is required for salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*, CeNeuro2016 (*C. elegans* Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR), 2016年07月27日, 名古屋大学豊田講堂(愛知県・名古屋市)
31. Hayao Ohno and Yuichi Iino, Diacylglycerol encodes differences between past and current stimulus intensity, CeNeuro2016 (*C. elegans* Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR), 2016年07月27日, 名古屋大学豊田講堂(愛知県・名古屋市)
32. Park ChanHyun、櫻井祐樹、飯野 雄一、國友博文「線虫 *C. elegans* の CIC 型クロライドチャネル *clh-1* の塩走性学習における機能の解明」第46回日本神経精神薬理学会年会, 2016年07月02日, COEX(韓国・ソウル)
33. Lifang WANG, Hirofumi Sato, Yohsuke Sato, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, A neural circuit for memory-dependent Na⁺ chemotaxis dissected in *Caenorhabditis elegans*, 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), 2016年06月08日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

- 34.大野速雄、井田隆徳、加藤紳也、内藤泰樹、國友博文、富岡征大、飯野雄一「線虫*C. elegans*の摂食状態に依存した行動変化を司る分子機構」第30回日本糖尿病・肥満動物学会,2016年03月12日,大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
- 35.國友博文、飯野雄一「線虫*C. elegans*の塩濃度の記憶と走化性の分子・神経機構」包括脳冬のシンポジウム, 2015年12月19日,一橋大学一橋講堂学術総合センター(東京都千代田区)
- 36.池 泰明、姜 涛、富岡 征大、飯野 雄一「線虫*C. elegans*のインスリン/PI3キナーゼ経路による塩濃度学習の制御機構の解析」BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第82回日本生化学会大会合同大会),2015年12月03日,神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 37.片江 圭太、富岡 征大、上岡 雄太郎、飯野 雄一「線虫*C. elegans*の糖濃度走性を制御する神経機構の解析」 BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第82回日本生化学会大会合同大会), 2015年12月03日,神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 38.後屋敷舞、富岡征大、飯野雄一「線虫*C. elegans*の飢餓学習において餌情報を伝達するインスリン様ペプチドの探索」BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第82回日本生化学会大会合同大会), 2015年12月02日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 39.桜井裕樹、朴燦賢、飯野雄一、國友博文, Roles of a CIC chloride channel CLH-1, which is required for salt chemotaxis of *Caenorhabditis elegans*. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第82回日本生化学会大会合同大会),2015年12月02日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 40.永嶋宇、富岡征大、飯野雄一「線虫*C. elegans*の記憶学習に関わるDAF-16/FOXO転写因子の解析」BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会),2015年12月01日,神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 41.佐藤陽介、佐藤博文、國友博文、飯野雄一「線虫の化学走性における定位行動の神経機構」BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第82回日本生化学会大会合同大会),2015年12月01日,神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 42.L. WANG, M. TOMIOKA, H. KUNITOMO, Y. IINO, A Neural Circuit of *Caenorhabditis elegans* for Memory-Dependent Na⁺ Chemotaxis, 20th International *C. elegans* Meeting, 2015年06月27日, Los Angeles, U.S.A.
- 43.Naoko Sakai, Masahiro Tomioka, Hayao Ohno, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, TOR signaling pathway is involved in regulation of salt chemotaxis learning., 20th International *C. elegans* Meeting,2015年06月26日, Los Angeles, U.S.A.
- 44.Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto, Yuichi Iino, A gustatory neural circuit for experience-dependent salt chemotaxis in *C. elegans*.,20th International *C. elegans* Meeting,2015年06月26日,Los Angeles, U.S.A.
- 45.H. Ohno, Y. Iino, In vivo imaging of diacylglycerol signaling in a taste receptor neuron involved in salt-concentration memory, 20th International *C. elegans* Meeting),2015年06月26日,Los Angeles, U.S.A.
- 46.Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Yohsuke Satoh, and Yuichi Iino, Dissecting the roles of primary interneurons that regulate memory-dependent salt concentration chemotaxis., 20th International *C. elegans* Meeting,2015年06月26日,Los Angeles, U.S.A.
- 47.Yuichi Iino, Molecular and Neural Circuit Mechanisms for Experience-Dependent Modulation of Chemotaxis, Gordon Research Conference "Modulation of Neural Circuits & Behavior",2015年06月25日,Hong Kong, China
- 48.中尾 晴美, 中尾 和貴, 原田 武志, 清成 寛, 古田 泰秀, 沼野 利佳, 饗場 篤「CRISPR/Cas9システムを用いたノックインマウスの作製」第37回 日本分子生物学会年会,2014年11月25日,パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 49.饗場 篤「遺伝子操作による精神疾患モデル動物の作製」第33回 躁うつ病薬理生化学的懇話会,2014年10月17日,大丸別荘(福岡県筑紫野市)
- 50.A. Aiba, The synaptic targeting of mGluR1 by its carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function, 8th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors,2014年09月29日, Sicily, ITALY
- 51.Lifang WANG; Masahiro TOMIOKA; Hirofumi KUNITOMO; Yuichi IINO, Role of ASE Left Gustatory Sensory Neuron in worms' behavior of NaCl Chemotaxis,2014 *C. elegans* Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014年07月17日, Nara Prefectural New Public Hall, Nara
- 52.Yohsuke Satoh, Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, Neural basis of plasticity and bidirectionality of klinotaxis, 2014 *C. elegans* Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014年07月16日, Nara Prefectural New Public Hall, Nara
- 53.Yohsuke Satoh, Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, Neural basis of plasticity and bidirectionality of klinotaxis, 2014 *C. elegans* topic meeting: Neuronal Development, Synaptic Function and behavior, 2014年07月08日,University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA
- 54.Naoko Sakai, Masahiro Tomioka, Takeshi Adachi, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, Identification of molecules downstream of the insulin/PI3K pathway involved in the regulation of salt chemotaxis learning” 2014 *C. elegans* topic meeting: Neuronal Development, Synaptic Function and behavior, 2014年07月08日, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA
- 55.植村 舞、飯野 雄一、國友 博文「線虫*C. elegans* を用いた塩走性学習の長期記憶形成」第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日,パシフィコ横浜(横浜市)

- 56.片江 圭太、富岡 征大、上岡 雄太郎、飯野 雄一「線虫*C. elegans* の糖濃度走性に潜む行動戦略の解析」第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(横浜市)
- 57.内山 千紘、富岡 征大、上岡 雄太郎、飯野 雄一「線虫*C. elegans* の糖濃度連合学習に関わる遺伝子の探索」第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(横浜市)
- 58.川崎 瑞己、國友 博文、飯野 雄一「線虫*C. elegans* の塩濃度学習におけるモノアミン神経伝達物質の働き」第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(横浜市)
- 59.大野速雄、飯野雄一「線虫*C. elegans* の記憶学習に関わるジアシルグリセロールのin vivoイメージング」第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(横浜市)
- 60.佐藤博文、國友博文、Xianfeng Fei、橋本浩一、飯野雄一「線虫の経験塩濃度依存的な行動を制御する神経回路の解明」第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(横浜市)
- 61.Hirofumi Kunitomo, Yohsuke Satoh, Hirofumi Sato, and Yuichi Iino, Dissecting the roles of primary interneurons that regulate memory-dependent navigation behavior in *C. elegans*, 2014 Cold Spring Harbor Asia Conference, Neurobiology: Diverse Species & Conserved Principles, 2014年09月17日, Suzhou/China
- 62.Masahiro Tomioka, Yasuki Naito, Hidehito Kuroyanagi, Yuichi Iino, Combinatorial expression of evolutionally conserved RNA binding proteins determines neuron-type specific alternative splicing of the *daf-2* insulin/IGF receptor in *C. elegans*, 2014 *C. elegans* Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014年07月17日, Nara Prefectural New Public Hall, Nara
- 63.Yuichi Iino, Memory formation by axonal transport of an insulin receptor isoform in *Caenorhabditis elegans*, AND Mini Conference, 2015年01月22日, KKR熱海(熱海市)
- 64.Yuichi Iino, Axonal transport of insulin receptor in the salt-sensing neuron mediates taste avoidance learning in *C. elegans*, The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2014年11月03日, 九州大学(福岡市)
- 65.Yuichi Iino, Where to go? - Neural Circuit Mechanisms for Migration behaviours in *C. elegans*, UTokyo Forum 2013, 2013年11月07日, チリ大学(サンティアゴ, チリ)
- 66.飯野雄一、大野速雄、佐藤博文、佐藤陽介、富岡征大、國友博文「線虫の化学走性の可塑性の分子神経機構」日本動物学会第84回大会, 2013年09月26日, 岡山大学(岡山市)

井ノ口馨

2018 Poster presentation

- 1.Suzuki A., Kosugi s., Murayama E., Ohkawa N., Tsujimura S., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Dissociation of CS-US association in fear memory by manipulating the activity of parietal association cortex.」 The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Symposium 「Front line of the pathological analysis of neuropsychiatric disorders」、2018年3月30日、Takamatsu, Japan.

2017 Oral presentation

- 2.Inokuchi K. 「Cell assembly mechanisms underlying memory association.」 The 6th Annual IIS Symposium、2017年12月14日、Tokyo.
- 3.井ノ口馨「記憶をつくりかえる」第21回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、2017年12月9-10日、富山
- 4.大川宜昭, 井ノ口馨「記憶痕跡セル・アンサンブルによる記憶情報処理」第36回日本認知症学会学術集会・シンポジウム：記憶のメカニズムとシナプスイメージング、2017年11月24-26日、金沢
- 5.Inokuchi K. 「Mechanisms underlying the association and the identity of memories.」 The 16th Annual MCCS meeting、2017年11月10日、Washington DC, USA.
- 6.Inokuchi K. 「Neuronal ensemble distinguishes overlapping memories by engram-specific synaptic plasticity.」 The 12th International Conference of Neurons and Brain Diseases, Association for the study of neurons and diseases、2017年10月7-9日、Taormina, Italy.
- 7.Inokuchi K. 「Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories.」 The 20th Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Science "Challenge the Brain, Change the Future"、2017年8月30-31日、Seoul.
- 8.井ノ口馨「エンGRAMから探る『記憶が関連づけられる仕組み』」第29回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、2017年8月24-25日、伊那市、長野県.
- 9.Inokuchi K. 「Cell ensemble mechanisms underlying memory association.」 Pain and Cortex Summer Meeting、2017年8月14-15日、Toronto, Canada.

10. Inokuchi K. 「Overlapping memory trace is indispensable for linking, but not recalling, individual memories.」 Molecular and Cellular Cognition Society - Asia 2017 Meeting、2017年8月1-3日、Singapore.
11. Inokuchi K. 「Dynamics of Memory Engram Cells.」 第40回日本神経科学大会 シンポジウム、2017年7月20-23日、千葉.
12. Inokuchi K. 「Manipulating memories based on engram technology.」 2017 International Brain Science Summit、2017年6月25-27日、Nanning, Hangzhou, China.
13. 横瀬 淳, 井ノ口馨 「記憶同士を関連付ける細胞集団」第16回日本トラウマティック・ストレス学会、2017年6月10-11日、東京.
14. Inokuchi K. 「Overlapping memory trace is indispensable for linking, but not recalling, individual memories.」 The 2017 Cold Spring Harbor Asia Symposium, Francis Crick Symposium - Transforming Neurosciences: Questions & Experiments、2017年5月8-12日、Suzhou, China.

2017 Poster presentation

15. Abdou K.M., Shehata M., Zhao Q., Nishizono H., Matsuo M., Muramatsu S., and Inokuchi K. 「Complete erasure of memory trace from engram cells.」 Neuroscience 2017, Annual Meeting of Society for Neuroscience、2017年11月11-12日、Washington DC, USA.
16. Ghandour K., Ohkawa N., Fung C.C.A., Saitoh Y., Takekawa T., Asai H., Okubo-Suzuki R., Nomoto M., Soya S., Tsujimura S., Nishizono H., Matsuo M., Sato M., Ohkura M., Nakai J., Hayashi Y., Sakurai T., Osanai M., Fukai T., and Inokuchi K. 「Unraveling the dynamism of engram cells during contextual memory processing.」 Neuroscience 2017, Annual Meeting of Society for Neuroscience、2017年11月11-12日、Washington DC, USA.
17. Abdou K.M., Shehata M., Zhao Q., Nishizono H., Matsuo M., Muramatsu S., and Inokuchi K. 「Complete erasure of memory trace from engram cells.」 The 16th Annual MCCA meeting、2017年11月9日、Washington DC, USA.
18. Ghandour K., Ohkawa N., Fung C.C.A., Saitoh Y., Takekawa T., Asai H., Okubo-Suzuki R., Nomoto M., Soya S., Tsujimura S., Nishizono H., Matsuo M., Sato M., Ohkura M., Nakai J., Hayashi Y., Sakurai T., Osanai M., Fukai T., and Inokuchi K. 「Unraveling the dynamism of engram cells during contextual memory processing.」 The 16th Annual MCCA meeting、2017年11月9日、Washington DC, USA.
19. Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Murayama E., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Specific regulation of CS-US association in fear memory by manipulating the activity of parietal association cortex.」第40回日本神経科学大会、2017年7月20-23日、千葉.
20. Abdou K.M., Shehata M., Zhao Q., Nishizono H., Matsuo M., Muramatsu S. and Inokuchi K. 「Irreversible erasure of memory engram.」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20-23日、千葉.
21. Ghandour K., Ohkawa N., Fung C.C.A., Saitoh Y., Takekawa T., Asai H., Okubo-Suzuki R., Nomoto M., Tsujimura S., Nishizono H., Matsuo M., Tsujimura M., Ohkura M., Nakai J., Hayashi Y., Fukai T., and Inokuchi K. 「Identification of characteristic dynamism of engram cells during learning.」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20-23日、千葉.
22. Osanai M., Ohkawa N., Sakamoto K., Miwa H., Kikuta S., Tamura A., Sato A., Ohkura M., Kojima T., Kohmura Y., Nakai J., Hayashi Y., Yanagawa Y., Inokuchi K., Homma N., Mushiaki H. 「Ultra-thin fluorescence endoscope imaging system for functional brain imaging.」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20-23日、千葉.

2016 Oral presentation

23. Alam M.J., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis in maintenance of the hippocampal learning capacity.」 The 15th Annual MCCA meeting、2016年11月10-11日、San Diego, USA.
24. Inokuchi K. 「Neural ensemble mechanisms underlying the interaction between distinct memories.」 The 19th Korean Society for Brain and Neural Science、2016年9月28-29日、Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea.
25. Inokuchi K. 「Autophagy induction enhances memory destabilization beyond reconsolidation boundary.」 The 11th International Conference of Neurons and Brain Diseases、2016年7月14-16日、Vancouver, Canada.

2016 Poster presentation

26. Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Optical manipulation of parietal association cortex regulates contextual fear memory.」 Neuroscience 2016, Annual Meeting of Society for Neuroscience、2016年11月12-16日、San Diego, USA.
27. Yokose J., Okubo-Suzuki R., Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Suzuki A., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A.M., Sasahara M., Kato F., and Inokuchi K. 「Neuronal ensemble orchestrated intersection of two distinct emotional memory traces.」 Neuroscience 2016, Annual Meeting of Society for Neuroscience、2016年11月12-16日、San Diego, USA.
28. Alam M.J., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis in maintenance of the hippocampal learning capacity.」 Neuroscience 2016, Annual Meeting of Society for Neuroscience、2016年11月12-16日、San Diego, USA.

29. Shehata M.H., Zhao Q., Abdou K., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Autophagy induction enhances memory destabilization beyond reconsolidation boundary.」 Neuroscience 2016, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2016年11月12-16日、San Diego, USA.
30. Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Optical manipulation of parietal association cortex regulates contextual fear memory.」 The 15th Annual MCCA meeting, 2016年11月10-11日、San Diego, USA.
31. Yokose J., Okubo-Suzuki R., Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Suzuki A., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A.M., Sasahara M., Kato F., and Inokuchi K. 「Neuronal ensemble orchestrated intersection of two distinct emotional memory traces.」 The 15th Annual MCCA meeting, 2016年11月10-11日、San Diego, USA.
32. Shehata M.H., Zhao Q., Abdou K., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Autophagy induction enhances memory destabilization beyond reconsolidation boundary.」 The 15th Annual MCCA meeting, 2016年11月10-11日、San Diego, USA.
33. Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Artificial regulation of contextual fear memory by manipulating the parietal association cortex.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20-22日、横浜.
34. Yokose J., Nomoto M., Okubo-Suzuki R., Takahashi Y., Suzuki A., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「The functional role of neuronal ensemble activated in intersection of two distinct memories.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20-22日、横浜.
35. Alam M.J., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis conserves the hippocampal learning capacity.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20-22日、横浜.
36. Abdou K.M., Shehata M., Zhao Q., Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., and Inokuchi K. 「Enhancing memory destabilization through protein degradation induction.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20-22日、横浜.
37. Takekawa T., Nemoto T., Fujii A., Tanaka T., Ohkawa N., Sato M., Hayashi Y., Inokuchi K., and Fukai T. 「Enhancing memory destabilization through protein degradation induction.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20-22日、横浜.
- 2015 Oral presentation**
38. Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Yokose J., Takahashi Y., Nagase M., Suzuki A., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Overlapping in two cellular ensembles in the hippocampal CA1 region is important for behavioral tagging.」 The 14th Annual MCCA meeting, 2015年10月15-16日、Chicago, USA.
39. 井ノ口馨 「Cellular Ensemble Mechanisms Underlying the Interaction of Distinct Units of Information.」 東北大学知のフォーラム 脳科学最前線『Memory and Mind』、2015年9月28-29日、仙台.
40. 井ノ口馨 「虚記憶を創り出す：細胞集集体理論を基として」 第39回日本神経心理学会学術集会、2015年9月10-11日、札幌.
41. Inokuchi K. 「Cell ensemble mechanisms underlying the association of two independent memories.」 The 10th International Conference of Neurons and Brain Diseases, 2015年6月22-24日、Xian, China.
- 2015 Poster presentation**
42. Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., Inokuchi K. 「Generating an artificial CS-US associative memory by manipulation of parietal association cortex.」 Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015年10月17-21日、Chicago, USA.
43. Shehata M., Zhao Q., Abdou K., Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., Kitamura T., Nishizono H., Matsuo M., Ohkawa N., and Inokuchi K. 「Enhancing memory destabilization through protein degradation induction.」 Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015年10月17-21日、Chicago, USA.
44. Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Yokose J., Takahashi Y., Nagase M., Suzuki A., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Overlapping in two cellular ensembles in the hippocampal CA1 region is important for behavioral tagging.」 Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015年10月17-21日、Chicago, USA.
45. Yokose J., Nomoto M., Okubo-Suzuki R., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Suzuki A., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Synergistic activity during retrieval of neuronal ensembles between two distinct memory traces generates cross-modal linkage.」 Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015年10月17-21日、Chicago, USA.
46. Alam M.J., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis modulates the hippocampal learning capacity.」 Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015年10月17-21日、Chicago, USA.
47. Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Generating an artificial CS-US associative memory by manipulation of parietal association cortex.」 The 14th Annual MCCA meeting, 2015年10月15-16日、Chicago, USA.
48. Shehata M., Zhao Q., Abdou K., Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., Kitamura T., Nishizono H., Matsuo M., Ohkawa N., and Inokuchi K. 「Enhancing memory destabilization through protein degradation induction.」 The 14th Annual MCCA meeting, 2015年10月15-16日、Chicago, USA.

49. Yokose J., Nomoto M., Okubo-Suzuki R., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Suzuki A., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Synergistic activity during retrieval of neuronal ensembles between two distinct memory traces generates cross-modal linkage.」 The 14th Annual MCCA meeting、2015年10月15-16日、Chicago, USA.
50. Alam M.J., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis modulates the hippocampal learning capacity.」 The 14th Annual MCCA meeting、2015年10月15-16日、Chicago, USA.
51. Ohkawa N., Saitoh Y., Suzuki A., Tsujimura S., Murayama E., Kosugi S., Nishizono H., Matsuo M., Takahashi Y., Nagase M., Sugimura Y.K., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Artificial association of pre-stored information in hippocampus and amygdala.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
52. Suzuki A., Kosugi S., Ohkawa N., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Parietal association cortex regulates CS-US association of contextual fear memory.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
53. Shehata M., Nishizono H., and Inokuchi K. 「Enhancing memory destabilization through protein degradation induction.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
54. Nomoto M., Yokose J., Takahashi Y., Nagase M., Suzuki A., Ohkawa N., Nishizono H., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Overlapping in two cellular ensembles in the hippocampal CA1 region is required for behavioral tagging.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
55. Yokose J., Nomoto M., Okubo-Suzuki R., Takahashi Y., Nagase M., Suzuki A., Ohkawa N., Nishizono H., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Synergistic activity between distinct neuronal ensembles creates the association of memory.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
56. Zhao Q., Yamamoto A., Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., and Inokuchi K. 「LTP reconsolidation revealed by field EPSP recording in freely moving rats.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
57. Jahangir A.M., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis modulates the hippocampal learning capacity.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
58. Takekawa T., Sato M., Ohkawa N., Inokuchi K., Hayashi Y., and 「Automatic detection system of cell shape and spike timing for calcium imaging data using iterative sequential quadratic programming.」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸.
- 2014**
59. Ohkawa N., Saitoh Y., Suzuki A., Tsujimura S., Murayama E., Nishizono H., Matsuo M., Takahashi Y., Nagase M., Sugimura Y.K., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Artificial association of information residing in hippocampus and amygdala.」 Neuroscience 2014, Annual Meeting of Society for Neuroscience、2014年11月19日、Washington DC, USA.
60. Ohkawa N., Saitoh Y., Suzuki A., Tsujimura S., Murayama E., Nishizono H., Matsuo M., Takahashi Y., Nagase M., Sugimura Y.K., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. 「Artificial association of information residing in hippocampus and amygdala.」 The 13th Annual MCCA meeting、2014年11月13日、Washington DC, USA.
61. 井ノ口馨 「神経細胞集団の動態による記憶統合プロセス」 第37回日本神経科学大会大会、2014年9月11-13日、横浜.
62. 大川宜昭, 斎藤喜人, 鈴木章円, 辻村周平, 村山絵美, 西園啓文, 松尾美奈, 高橋由香里, 長瀬将志, 杉村弥恵, 渡部文子, 加藤総夫, 井ノ口馨 「異なるセルアンサンブルの光遺伝学的活性化による連合記憶の人工的創出」 第37回日本神経科学大会大会、2014年9月11-13日、横浜.
63. 横瀬淳, 野本真順, 鈴木(大久保)玲子, 鈴木章円, 井ノ口馨 「繰返し想起による異なる二つの記憶痕跡の相互作用」 第37回日本神経科学大会大会、2014年9月11-13日、横浜.
64. 野本 真順, 横瀬 淳, 大澤 香織, 鈴木 章円, 井ノ口馨 「行動タグの成立時には海馬の歯状回、CA3ではなくCA1において細胞の重複した活動が増える」 第37回日本神経科学大会大会、2014年9月11-13日、横浜.
65. Jahangir A.M., Kitamura T., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. 「Adult neurogenesis and the hippocampal learning capacity.」 第37回日本神経科学大会大会、2014年9月11-13日、横浜.
66. Inokuchi K. 「Artificial Association of Pre-Stored Information.」 The 9th International Conference of Neurons and Brain Diseases、2014年7月16日、Madrid.
67. Inokuchi K. 「Optical stimulation of distinct cell assemblies generates a new artificial associative-memory.」 International Frontier Symposium for Neuroscience、2014年3月10日、Xian, China.
68. 井ノ口馨 「恐怖記憶と脳」 第6回日本不安障害学会学術大会・教育講演、2014年2月1-2日、東京.
69. Inokuchi K. 「Artificial activation of distinct cell ensembles facilitates an association between two memories.」 International Symposium on Glyco-Neuroscience、2014年1月10日、Awaji.
- 2013**

- 70.大川宜昭, 斎藤喜人, 鈴木章円, 辻村周平, 村山絵, 西園啓史, 松尾美奈, 高橋由香里, 永瀬将志, 杉村弥恵, 渡部文字, 加藤総夫, 井ノ口馨 「異なるセルアセンブリの人為的活性化による人工連合記憶の創出」 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸。
- 71.Inokuchi K., Saitoh Y., Suzuki A., Tsujimura S., Murayama E., Nishizono H., Matsuo M., Takahashi Y., Nagase M., Sugimura Y.K., Watabe A.M., Kato F., and Ohkawa N. 「Artificial activation of distinct cell assemblies makes new associative memory.」 The 12th Annual MCCS meeting、2013年11月7日、San Diego, USA.
- 72.井ノ口馨 「神経ネットワークから眺めた PTSD の病態」 第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、2013年10月25日、沖縄。
- 73.井ノ口馨 「記憶制御の理解に向けて—分子から回路・行動へ—」 第22回海馬と高次機能学会・特別講演、2013年10月12日、金沢。
- 74.大村佳之, 深井朋樹, 井ノ口馨 「独立した情報を関連付けるニューロンモデル」 第22回海馬と高次機能学会、2013年10月12日、金沢。
- 75.井ノ口馨 「恐怖記憶形成のメカニズムと PTSD 予防」 第184回北陸精神神経学会、2013年7月14日、金沢。
- 76.Inokuchi K. 「Synaptic reconsolidation.」 The 8th International Conference of Neurons and Brain Diseases in Singapore、2013年7月2-4日、Singapore.
- 77.Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., Zhao Q., Enomoto H., and Inokuchi K. 「Reconsolidation in synaptic level.」 Neuro 2013 (Joint Conference of: The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, The 23rd Annual Meeting of Japanese Neural Network Society)、2013年6月21日、Kyoto.

上川内あづさ

- 1.上川内あづさ 「ショウジョウバエ聴覚系の神経解剖学」 第123回日本解剖学会総会・日本学術総会、2018年3月1日、東京
- 2.Azusa Kamikouchi 「Auditory neural circuits in the fly brain. From sender to receiver: physics and sensory ecology of hearing in insects and vertebrates」 The Royal Society、2017年12月1日、ロンドン
- 3.Hiroshi Ishimoto, Maho Ohara, Yusuke Makino, Chiaki Iida, Azusa Kamikouchi 「Neuropeptide F negatively regulates stability of courtship-associated memory in *Drosophila*」 The 3rd International Insect Hormone (21st Ecdysone) Workshop、2017年7月9日、那須
- 4.Xiaodong Li, Hiroshi Ishimoto, Azusa Kamikouchi 「Experience-dependent tuning of the auditory behavior in *Drosophila*」 Towards elucidation of memory engram、2016年12月5日、岡崎
- 5.Azusa Kamikouchi 「Auditory neural circuits in the brain of the fruit fly」 第22回国際動物学会、第87回日本動物学会(同時開催)、2016年11月18日、沖縄
- 6.N. Morimoto, Azusa Kamikouchi 「Plasticity in the auditory behavior of fruit flies」 2016 Association for Research in Otolaryngology MidWinter Meeting、2016年2月20日、サンディエゴ
- 7.上川内あづさ 「The central auditory pathways of fruit flies」 H27年度新学術領域研究国際シンポジウム、2015年11月6日、京都
- 8.上川内あづさ 「ハエにおける音脈分擬」 第3回神経回路合同研究会、2015年9月11日、名古屋
- 9.上川内あづさ 「ショウジョウバエを用いた聴覚神経回路の理解」 第27回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、2015年8月26日、大津
- 10.N. Morimoto, Azusa Kamikouchi 「Plasticity in the auditory behavior of fruit flies」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日～31日、神戸
- 11.Y. Ishikawa, N. Okamoto, Azusa Kamikouchi 「The establishment of behavioral analysis for auditory response of single fruit flies; SMART (Single Male Auditory Response Test)」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日～31日、神戸
- 12.H. Ishimoto, Y. Kondo, Azusa Kamikouchi 「Central brain neurons regulate female courtship receptivity」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日～31日、神戸
- 13.E. Matsuo, H. Seki, T. Asai, T. Morimoto, H. Miyakawa, K. Ito, Azusa Kamikouchi 「Auditory neural circuit in the fruit-fly brain」 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日～31日、神戸
- 14.N. Morimoto, Azusa Kamikouchi 「Plasticity in the auditory behavior of fruit flies」 Modulation of Neural Circuits & Behavior The Hong Kong University of Science and Technology、2015年6月23日、香港
- 15.上川内あづさ 「Auditory neural pathways in the fly brain」 3rd Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC)、2015年5月14日、北京

16. Xiaodong Li, Hiroshi Ishimoto, [Azusa Kamikouchi](#) 「Auditory plasticity induced by long-term sound exposure in *Drosophila*」 Systems Neurobiology Spring School 2015、2015年3月6日、京都
17. [Azusa Kamikouchi](#) 「The organization of auditory neural circuits in the fruit-fly brain」第8回日本薬理学会年会、2015年3月20日、名古屋
18. [Azusa Kamikouchi](#) 「Neuronal encoding of sound and gravity in the fruit fly」2015 Midwinter Meeting、2015年2月21日、ボルチモア
19. Hiroko Sano, Akira Nakamura, Michael Texada, Jim Truman, Hiroshi Ishimoto, [Azusa Kamikouchi](#), Kazuhiko Kume, Takanori Ida, Masayasu Kojima 「CCHamide-2 controls the synthesis and secretion of insulin-like peptides in *Drosophila melanogaster*」The 35th Annual Meeting of Japan Society for the Study of Obesity、2014年10月24日、宮崎
20. Daichi Yamada, Eriko Matsuo, Yuki Ishikawa, Hiroshi Ishimoto, [Azusa Kamikouchi](#) 「Ca²⁺ imaging analysis of the auditory neurons in the fly brain」Neurofly2014、2014年10月8日、クレタ島
21. Eriko Matsuo, Haruyoshi Seki, Takako Morimoto, Kei Ito, [Azusa Kamikouchi](#) 「Auditory Neural Circuit in the Fly Brain」Neurofly2014、2014年10月8日、クレタ島
22. Yuki ISHIKAWA, Yusuke YONEYAMA, [Azusa Kamikouchi](#) 「Species Specificity of Male Auditory Response in *Drosophila*」Neurofly2014、2014年10月8日、クレタ島
23. Daichi Yamada, Eriko Matsuo, Yuki Ishikawa, Hiroshi Ishimoto, [Azusa Kamikouchi](#) 「Identification of a novel vibration and deflection center in the brain of the fruit fly」The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2014年9月12日、横浜
24. Eriko Matsuo, Daichi Yamada, [Azusa Kamikouchi](#) 「A spatial representation of the pattern of antennal movement in the fruit-fly brain」The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2014年9月12日、横浜
25. Nao Morimoto, [Azusa Kamikouchi](#) 「Plasticity in the auditory behavior of the fruit fly」International Congress of Neuroethology、2014年7月29日、札幌
26. Daichi Yamada, Eriko Matsuo, [Azusa Kamikouchi](#) 「The pattern of antennal movement is spatially represented in the brain of fruit flies」International Congress of Neuroethology、2014年7月29日、札幌
27. Eriko Matsuo, Haruyoshi Seki, Tomonori Asai, Takako Morimoto, Hiroyoshi Miyakawa, Kei Ito, [Azusa Kamikouchi](#) 「The auditory circuit in the central nervous system of *Drosophila*」11th Japanese *Drosophila* Research Conference、2014年6月4日、金沢
28. Natsuki Okamoto, Yuki Ishikawa, [Azusa Kamikouchi](#) 「Functional analysis for the chaining behavior of the IR84a-expressing olfactory sensory neurons」11th Japanese *Drosophila* Research Conference、2014年6月4日、金沢
29. [Azusa Kamikouchi](#), Nao Morimoto, Hiroshi Ishimoto 「The temporal pattern of pulse bursts modifies the level of suppression in a sound-evoked chaining behavior of fruit flies」11th Japanese *Drosophila* Research Conference、2014年6月4日、金沢
30. Yuki Ishikawa, [Azusa Kamikouchi](#), Daisuke Yamamoto 「Neuronal Mechanisms Underlying Species Specificity of Mating Preference」11th Japanese *Drosophila* Research Conference、2014年6月4日、金沢
31. [上川内あづさ](#) 「ショウジョウバエ聴覚行動の嗜好性とその分子基盤」第六回分子高次機能研究会、2013年9月17日～19日、軽井沢
32. Daichi Yamada, Eriko Matsuo, [Azusa Kamikouchi](#) 「Elucidation of the response characteristics of auditory nerve cells in the *Drosophila* brain」Neuro2013、2013年6月20日～23日、京都
33. Eriko Matsuo, Haruyoshi Seki, Tomonori Asai, Takako Morimoto, Hiroyoshi Miyakawa, Kei Ito, [Azusa Kamikouchi](#) 「The auditory circuit in the central nervous system of *Drosophila*」Neuro2013、2013年6月20日～23日、京都
34. Daichi Yamada, Eriko Matsuo, [Azusa Kamikouchi](#) 「Elucidation of the response characteristics of subgroup-D sensory neurons in the fruit-fly ear」2nd Asia-Pacific Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC)、2013年5月13日～16日、ソウル
35. Eriko Matsuo, Haruyoshi Seki, Tomonori Asai, Takako Morimoto, Hiroyoshi Miyakawa, Kei Ito, [Azusa Kamikouchi](#) 「Auditory map in the central nervous system of *Drosophila*」2nd Asia-Pacific Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC)、2013年5月13日～16日、ソウル

他

松尾直毅

1. [Naoki Matsuo](#) 「Manipulating Neuronal Ensembles in Memory」The 3rd Karolinska Institutet-Osaka University Joint Symposium、2018年2月1日、Stockholm
2. [松尾直毅](#) 「記憶神経回路の研究」第1回これからの神経回路研究会、2018年1月27日、吹田市
3. [Naoki Matsuo](#) 「Manipulating Neuronal Ensembles in Memory」第40回日本分子生物学会(生命科学系学会合同年次大会)シンポジウム、2017年12月6日、神戸市

4. 松尾直毅「記憶に関わる神経アンサンブルの可視化と人為的操作」第36回日本認知症学会 シンポジウム、2017年11月25日、金沢市
5. 松尾直毅「恐怖記憶の消去と記憶痕跡」第6回大阪大学神経難病フォーラム、2017年8月19日、吹田市
6. 松尾直毅「遺伝子改変マウスを用いた記憶の脳内表現の可視化と操作」九州大学生体防御医学研究所 第745回生医研セミナー、2017年8月17日、福岡市
7. Naoki Matsuo「Dynamism of Neuronal Ensembles during Memory Generalization」Spring Hippocampal Conference「Neuronal ensembles in memory」、2017年6月13日、Taormina, Italy
8. 松尾直毅「遺伝子改変マウスを用いた記憶の脳内表現の可視化と操作」国立長寿医療研究センター CAMD セミナー、2017年5月25日、大府市
9. Naoki Matsuo「Observation and Manipulation of Memory Engram」第94回日本生理学会大会 シンポジウム、2017年3月28日、浜松市
10. 松尾直毅「記憶情報の脳内表現の可視化と操作」立命館大学システム視覚科学研究センター セミナー、2017年2月9日、草津市
11. Naoki Matsuo「Visualization & Manipulation of Memory Engram」NIPS International Workshop「Towards elucidation of memory engram」、2016年12月5日、岡崎市
12. Naoki Matsuo「Visualization & Manipulation of Memory Engram」The 47th NIPS International Symposium「Decoding Synapses」、2016年10月26日、岡崎市
13. 松尾直毅「実験動物としてマウスを用いた記憶学習の仕組みの研究」第131回関西実験動物研究会、2016年9月10日、吹田市
14. 松尾直毅「恐怖記憶の汎化に伴う活動神経アンサンブルの変化」第5回大阪大学神経難病フォーラム、2016年8月20日、吹田市
15. 松尾直毅「記憶情報の脳内表現の可視化と操作」生理学研究所 部門公開セミナー、2016年6月16日、岡崎市
16. Naoki Matsuo「Genetic Manipulation of Memory Engram」遺伝研研究会「Circuit construction in the mammalian brain」、2015年12月6日、三島市
17. Naoki Matsuo「Visualization of Memory Dynamism in Mice」Memory Dynamism International Symposium、2015年11月6日、京都市
18. 松尾直毅「記憶情報の脳内表現の可視化と操作」第91回大阪大学未来医療セミナー、2015年9月30日、吹田市
19. 松尾直毅「記憶の汎化に伴う活動神経アンサンブルの変化」第45回日本精神神経薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会 合同年会 シンポジウム、2015年9月26日、江戸川区
20. Naoki Matsuo「Genetic manipulation of memory engram」第58回日本神経化学学会大会 シンポジウム、2015年9月13日、さいたま市
21. 松尾直毅「記憶の脳内表現の可視化と操作」大阪大学理学部生物科学セミナー、2015年9月4日、豊中市
22. 松尾直毅「遺伝子改変マウスを用いた記憶痕跡の活動操作」第4回大阪大学神経難病フォーラム、2015年7月25日、吹田市
23. 松尾直毅「記憶の脳内表現の可視化と操作」第9回新適塾「脳はおもしろい」、2015年6月24日、豊中市
24. Naoki Matsuo「Visualization of Neural Representations of Memory」第92回日本生理学会大会 シンポジウム、2015年3月22日、神戸市
25. Naoki Matsuo「Dynamic Changes in Hippocampal Ensemble Activities Associated with Contextual Fear Memory Generalization」第88回日本薬理学会年会 シンポジウム、2015年3月19日、名古屋市
26. Naoki Matsuo「Visualization and manipulation of memory engram」筑波大学 人間総合科学研究科 感性認知脳科学専攻 第44回「こころ」の科学セミナー、2015年1月8日、つくば市
27. Naoki Matsuo「Manipulation of Memory Engram Using Chemical Genetics」第37回日本神経科学大会 シンポジウム、2014年9月12日、横浜市
28. 松尾直毅「情動記憶の脳内表現と制御」第3回大阪大学神経難病フォーラム、2014年8月9日、吹田市
29. 松尾直毅「情動記憶の脳内表現と表出の制御」生理学研究所 研究会「情動研究会」、2014年9月3日、岡崎市
30. Naoki Matsuo「Approach for Understanding the Mechanism Linking Multimodal Information to Emotional Behavior」第36回日本神経科学大会 シンポジウム、2013年6月20日、京都市

石原健

1. Jamine H. Teo, Takeshi Ishihara「Analyses in forgetting of an olfactory memory in *C. elegans*」, 21st International *C. elegans* Conference, 2017 ロサンゼルス

2. Sayuri Kuge, Tomonobu Nishihara, Tomoki Matsuda, Takayuki Teramoto, Takeharu Nagai, Takeshi Ishihara “An inverse-type of fluorescent Ca²⁺ indicator for detecting neuronal inhibition”, 21st International C.elegans Conference, 2017 ロサンゼルス
3. Mary Arai, Akitoshi Inoue, Takeshi Ishihara “Analysis of the regulation of forgetting by the food signals in the olfactory learning of C. elegans.” 21st International C.elegans Conference, 2017
4. N. Iwase, E. Sawatari, T. Ishihara “Mechanisms of holding memory of butanone enhancement of C. elegans”, 21st International C.elegans Conference, 2017 ロサンゼルス
5. Ryo Takahashi, Takeshi Ishihara “Effects of monoamine neurotransmitters on forgetting of olfactory adaptation in C. elegans”, 21st International C.elegans Conference, 2017 ロサンゼルス
6. 北園 智弘, 井上明俊, 石原健 “線虫 C. elegans において、嗅覚順応の忘却は複数のシグナル伝達経路による感覚応答の調節により、協調的・時間的に制御される”, 第 40 回日本神経科学大会, 2017
7. Jamine H Teo, Takeshi Ishihara “Cellular and molecular analyses in forgetting of an olfactory memory in C. elegans”, 第 40 回日本神経科学大会, 2017 幕張
8. 新井 美存, 井上明俊, 石原健 “C. elegans の嗅覚学習をモデルとした餌シグナルを介した忘却の制御機構の解析”, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 横浜
9. 北園 智弘, 井上明俊, 石原健 “線虫 C. elegans において、記憶の忘却は、感覚応答をコントロールを介して、複数のシグナル伝達経路により、協調的・時期特異的に行われる”, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 横浜
10. 石原 健, “線虫における嗅覚記憶の忘却とその制御”, 情動研究会, 2017
11. Takeshi Ishihara, “Whole brain imaging reveals the roles of gap junctions for the synchronized oscillatory activity”, CeNeuro and Nagoya BNC, 2016 名古屋
12. Manabi Fujiwara, Itaru Aoyama, Takahiro Hino, Takayuki Teramoto, Takeshi Ishihara “Gonadal maturation changes chemotaxis behavior and neural processing in the olfactory circuit of C. elegans”, CeNeuro and Nagoya BNC, 2016 名古屋
13. Mary Arai, Takeshi Ishihara “Analyses of the regulation of forgetting by the food signals in the olfactory learning of C. elegans” CeNeuro and Nagoya BNC, 2016 名古屋
14. Tomohiro Kitazono, Akitoshi Inoue, Takeshi Ishihara “The novel components regulating forgetting of the olfactory adaptation at the downstream of the TIR-1/JNK-1 pathway” CeNeuro and Nagoya BNC, 2016 名古屋
15. Takahiro Hino, Manabi Fujiwara, Takeshi Ishihara “The change of odor preference over development in C. elegans”, CeNeuro and Nagoya BNC, 2016 名古屋
16. Jamine H. Teo, Tomohiro Kitazono, Takeshi Ishihara “AIA interneurons are required for normal forgetting of an olfactory memor”, CeNeuro and Nagoya BNC, 2016 名古屋
17. 新井 美存, 井上明俊, 石原 健 “C. elegans の嗅覚学習をモデルとした餌シグナルを介した忘却の制御機構の解析”, 第 39 回日本分子生物学会, 2016 横浜
18. Jamine H. Teo, Tomohiro Kitazono, Takeshi Ishihara “Neuronal circuitry for normal forgetting of an olfactory memory in C. elegans”, 第 39 回日本分子生物学会, 2016 横浜
19. Manabi Fujiwara, Itaru Aoyama, Shinichi Maruyama, Takeshi Ishihara “The germline growth affects the neuronal circuits and the behavioral patterns of worms.”, 20th C. elegans International Meeting, 2015
20. Tomohiro Kitazono, Akitoshi Inoue, Takeshi Ishihara “Analysis of downstream regulatory components of the TIR-1/JNK-1 pathway for forgetting of the olfactory adaptation in C. elegans”, 20th C. elegans International Meeting, 2015 ロサンゼルス
21. 北園 智弘, 井上明俊, 石原 健 “線虫 C. elegans において、嗅覚順応の忘却を制御する TIR-1/JNK-1 経路の下流制御因子”, 第 38 回日本神経科学大会, 2015 神戸
22. 新井 美存, 井上明俊, 石原 健 “線虫 C. elegans の嗅覚学習をモデルとした餌シグナルを介した忘却の制御機構の解析”, 日本分子生物学会, 2015 神戸
23. 北園 智弘, 井上明俊, 石原 健 “線虫 C. elegans における嗅覚順応の記憶の忘却を制御する新規因子の解析”, 日本分子生物学会, 2015 神戸
24. Tomohiro Kitazono, Akitoshi Inoue, Takeshi Ishihara “Downstream regulatory components of the TIR-1/JNK-1 pathway for forgetting in C. elegans”, C. elegans Neuro 2014, 2014 奈良
25. Manabi Fujiwara, Noriko Sato, Shinichi Maruyama, Takeshi Ishihara, “How does the animal change its behavioral patterns during growth?”, C. elegans Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in associated with The 6th Asia-Pacific C. elegans meeting, 2014 奈良
26. Takeshi Ishihara, “Active forgetting of the olfactory memory in C. elegans”, Neurobiology: Diverse Species & Conserved Principles, 2014 中国 蘇州

- 27.藤原 学、佐藤 則子、丸山 新一、石原 健“線虫の感覚行動のライフサイクルにおける変化”, 第36回日本分子生物学会年会, 2013 神戸
- 28.北園 智弘、井上明俊、石原 健“線虫 *C. elegans* における忘却を制御する TIR-1/JNK-1 経路の下流院試の探索”, 第36回日本分子生物学会年会, 2013 神戸
- 29.Tomohiro Kitazono, Akitoshi Inoue, Takeshi Ishihara “Identification of regulatory factors for forgetting in *C. elegans*”, 19th International *C.elegans* Meeting, 2013 ロサンゼルス

吉原良浩

- 1.吉原良浩「魚が好きな匂いと嫌いな匂い：嗅覚情動行動の神経回路メカニズム」第95回日本生理学大会、2018年3月28日、高松
- 2.吉原良浩「ゼブラフィッシュの嗅覚記憶」第40回日本分子生物学会年会/第90回日本生化学会大会、2017年12月7日、神戸
- 3.Yoshihiro Yoshihara「Olfactory receptors, circuits and behaviors in zebrafish」Monell Chemical Center Seminar、2017年11月20日、Philadelphia, USA
- 4.Yoshihiro Yoshihara「Carbon dioxide evokes slow escape behavior through nasal trigeminal pathway in larval zebrafish」International Workshop on Zebrafish Neural Circuits and Behavior、2017年11月15日、Bethesda, USA
- 5.吉原良浩「匂いを感じる脳のメカニズム」Allergic Rhinitis Outlook 2017、2017年10月15日、東京
- 6.吉原良浩「ゼブラフィッシュの情動行動を司る嗅覚神経回路メカニズム」平成29年度生理学研究所研究会（先天的と後天的なメカニズムの融合による情動・行動の理解と制御）、2017年10月10日、岡崎
- 7.吉原良浩「ゼブラフィッシュ嗅覚行動の神経回路メカニズム」第12回化学生態学研究会、2017年6月23日、函館
- 8.Yoshihiro Yoshihara「An attractive scent of ATP: Fishes equip a unique adenosine receptor for olfaction」5th Bioscience and Biotechnology International Symposium: Sense, Sensor, Sensation、2017年1月11日、Yokohama, Japan
- 9.Yoshihiro Yoshihara「Olfactory receptors, circuits and behaviors in zebrafish」4th Imaging Structure and Function in the Zebrafish Brain Conference、2016年12月3日、Munich, Germany
- 10.Yoshihiro Yoshihara「Olfactory alarm reaction in zebrafish」17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)、2016年6月8日、Yokohama, Japan
- 11.Yoshihiro Yoshihara「Neural circuit genetics of the claustrum」National Institute of Genetics Workshop (Circuit Construction in the Mammalian Brain)、2015年12月6日、Mishima, Japan
- 12.吉原良浩「嗅覚行動の神経回路メカニズム-魚が好きな匂いと嫌いな匂い」花王株式会社講演会、2015年11月17日、宇都宮
- 13.Yoshihiro Yoshihara「Olfactory receptors, circuits and behaviors in zebrafish」25th International Conference of European Chemoreception Research Organization (ECRO)、2015年9月3日、Istanbul, Turkey
- 14.Yoshihiro Yoshihara「Neural circuit genetics of the claustrum」第38回日本神経科学大会、2015年7月30日、Kobe, Japan
- 15.吉原良浩「ゼブラフィッシュの嗅覚行動を司る神経回路メカニズム」森憲作教授退官記念シンポジウム（嗅覚神経回路と行動発現のメカニズム）、2015年2月28日、東京
- 16.吉原良浩「匂い受容から嗅覚行動へと至る神経回路メカニズムの解明へ向けて」平成26年度日本醸造学会（特別講演）、2014年10月7日、東京
- 17.Yoshihiro Yoshihara「Olfactory behaviors in zebrafish: Does it smell good, dangerous or sexy?」24th International Conference of European Chemoreception Research Organization (ECRO)、2014年9月12日、Dijon, France
- 18.吉原良浩「嗅覚行動の神経回路メカニズム-魚が好きな匂いと嫌いな匂い」高砂香料 第1000回雑誌会記念特別講演会、平塚
- 19.吉原良浩「ゼブラフィッシュの嗅覚行動を司る神経回路メカニズム」日本発生生物学会2013年秋季シンポジウム、2013年11月18日、神戸
- 20.Yoshihiro Yoshihara「Olfactory neural circuitry in zebrafish: Does it smell good, bad, or sexy?」Neuro2013（第36回日本神経科学大会）、2013年6月20日、Kyoto, Japan

<公募研究>

細川貴之

- 1.Hosokawa T, Nakamura S, Matsui Y, Yamada M, Iijima T, and Tsutsui K 「Involvement of monkey prefrontal cortex in category-based top-down behavioral adaptation」第40回日本神経科学大会（2017年7月21日、幕張）
- 2.細川 貴之「カテゴリに基づく論理的思考と行動制御の神経機構」生理研研究会 2016「行動を制御する神経ネットワーク機能の解明に向けて」（2016年12月9日、岡崎）

3. Hosokawa T, Nakamura S, Yamada M, Iijima T, Tsutsui K 「Neural correlates of abstract thought process in monkey prefrontal cortex」 第 39 回日本神経科学大会 (2016 年 7 月 21 日、横浜)
4. Hosokawa T, Nakamura S, Matsui Y, Yamada M, Iijima T, and Tsutsui K 「The effect of inactivation of prefrontal cortex on immediate behavioral adaptation in group reversal task by offline repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in monkeys.」 1st International Brain Stimulation Conference (2015 年 3 月 2 日、シンガポール)
5. Hosokawa T. 「Representation of functional category and its integration with context information for behavioral selection within the prefrontal cortex.」 TOHOKU Brain Science Symposium (2015 年 1 月 20 日、鳴子)
6. Hosokawa T, Nakamura S, Matsui Y, Yamada M, Iijima T, and Tsutsui K 「Involvement of dorsolateral and ventrolateral prefrontal cortex in behavioral adaptation to group reversal.」 Society for Neuroscience (2014 年 11 月 19 日、ワシントン DC)
7. Hosokawa T, Nakamura S, Yamada M, Iijima T, and Tsutsui K 「グループ逆転課題遂行中のサル前頭連合野におけるカテゴリ情報の表現 (Neuronal coding of category information in monkey prefrontal cortex in group reversal task)」 第 37 回日本神経科学大会 (2014 年 9 月 12 日、横浜)

坂口昌徳

1. 坂口昌徳 「成体脳に新生するニューロンの光制御により明らかにする、睡眠中の記憶形成機構」 比較記憶研究会、2015 年 10 月、東京大学
2. 坂口昌徳 「The function of adult born neurons during sleep」 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸
3. 坂口昌徳 「Regeneration of neural circuits in the adult brain」 KAIST seminar series, 2014 年 12 月、KAIST, Korea
4. 坂口昌徳 「How memory engram is formed?」 成体脳ニューロン新生 懇談会、2014 年 12 月、東京大学

中井淳一

1. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H 「Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2」 第 58 回日本神経化学大会、2015 年 09 月 11 日、さいたま市
2. Matsuoka K, Yoshida M, Asakawa K, Ohkura M, Nakai J, Kawakami K, Hibi M, Shimizu T 「Roles of zebrafish cerebellar neural circuitry in classical fear conditioning」 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 07 月 28 日、神戸市
3. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H 「Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2」 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 07 月 28 日、神戸市
4. Nakai J, Ohkura M, Kagawa-Nagamura Y, Muto A, Inoue M, Bito H, Kawakami K, Gengyo-Ando K 「Real-time visualization of neuronal activity in zebrafish and *C. elegans*」 第 38 回日本神経科学大会シンポジウム、2015 年 07 月 28 日、神戸市
5. 小泉協, 佐藤正晃, 中井淳一, 大倉正道, 林康紀, 八尾寛 「生体内光刺激・計測によるマウス大脳皮質層間信号統合の可視化」 生理研研究会 「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」、2015 年 12 月 02 日、岡崎市
6. 大倉正道, Borbala Podor, Yi-ling Hu, Roger Croll, Alan Fine, 中井淳一 「2 光子イメージング法での神経発火活動の検出に適した蛍光カルシウムプローブ蛋白質の比較検討」 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 03 月 09 日、横浜市
7. 山下哲, 犬東歩, Chowdhury S, 中井淳一, 大倉正道, 田口徹, 桑木共之, 山中章弘 「意識下活動動物からの特定神経活動記録法の開発」 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 03 月 22 日、札幌市
8. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H 「Rational design of ultrafast, high-affinity calcium indicators for monitoring neuronal activity」 Neuroscience 2015、2015 年 10 月 17 日、シカゴ市
9. 中井淳一, 大倉正道, 安藤恵子 「蛍光タンパク質 G-CaMP による in vivo カルシウムイメージング」 東京理科大学総合研究機構イメージングフロンティア研究部門 2014 年度シンポジウム、2014 年 12 月 20 日、東京
10. Podor B, Zhao Y, Wu J, Hu Y, Ohkura M, Nakai J, Campbell R, Croll R, Fine A 「A comparative study of the two-photon performance of GCaMPs and GECOs」 Neuroscience 2014、2014 年 11 月、Washington DC
11. 大倉正道, 小林千晃, 貞苜純子, 佐々木拓哉, 池谷裕二, 中井淳一 「神経細胞内局所カルシウム動態の可視化を目指した高感度シナプスカルシウムプローブ G-CaMP6-actin の応用」 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月、京都
12. 中井淳一, 大倉正道, 安藤恵子 「蛍光カルシウムプローブ G-CaMP6 による in vivo カルシウムイメージング」 第 58 回日本薬学会関東支部会、2014 年 10 月、東京
13. 平理一郎, 大久保文貴, 正水芳人, 大倉正道, 中井淳一, 岡田尚巳, 松崎政紀 「2 光子イメージングを用いた単一細胞オペラント条件付けによる局所回路の報酬タイミング依存的活動変化」 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月、横浜

14. Ohkura M, Kobayashi C, Sadakari J, Sasaki T, Ikegaya Y, Nakai J 「Imaging subcellular Ca²⁺ dynamics of neurons with a highly responsive genetically encoded Ca²⁺ indicator」 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, 2014年7月.
15. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M 「Single-neuron operant conditioning by two-photon imaging induces reward-timing-dependent bidirectional modulations in cortical microcircuit」 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014年7月、Milan
16. 大倉正道, 安藤恵子, 中井淳一 「高性能な蛍光カルシウムプローブの開発と神経活動イメージングへの応用」 脳末梢科学研究センターシンポジウム「脳と末梢の最先端研究」、2014年6月、埼玉
17. 大倉正道, 武藤彩, 阿部玄武, 川上浩一, 中井淳一 「改良型緑色蛍光カルシウムプローブ蛋白質 G-CaMP7a を用いたゼブラフィッシュの視覚認知における神経活動の可視化」 第87回日本薬理学会年会、2014年3月、仙台
18. 平理一郎, 大久保文貴, 正水芳人, 大倉正道, 中井淳一, 岡田尚巳, 松崎政紀 「2光子カルシウムイメージングを用いた単一オペラント条件付けにおける自発神経活動の報酬依存的な活動変化」 第91回日本生理学会大会、2014年3月、鹿児島

殿城亜矢子

1. 殿城 亜矢子, 小笠原 美奈, 于 智華, 伊藤 素行 「生存利益を伴う報酬記憶は加齢に対して頑強性を示す」 第40回日本神経科学学会大会、2017年7月20日、千葉
2. 田辺憲人, 伊藤素行, 殿城亜矢子 「記憶の維持と加齢性記憶障害におけるインスリン様シグナルによる全身性制御」 第39回日本分子生物学会、2016年12月1日、横浜
3. 吉岡佐保, 永井咲紀, 小林航, 栗崎健, 伊藤素行, 殿城亜矢子 「ショウジョウバエにおける加齢性記憶低下とNotchシグナルの関係性の検討」 第39回日本分子生物学会、2016年12月1日、横浜
4. Ayako Tonoki, Kento Tanabe, Motoyuki Itoh. "A critical role of insulin-like signaling in memory maintenance and age-related memory impairment in *Drosophila*." 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016年9月10日、東京
5. Saho Yoshioka, Wataru Kobayashi, Saki Nagai, Takeshi Awasaki, Motoyuki Itoh, Ayako Tonoki. "Notch signaling in glial cells regulates long-term memory in *Drosophila*." 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016年9月9日、東京
6. Makoto Okano, Hiromi Matsuo, Yuya Nishimura, Ledi Liu, Katsuto Hozumi, Saho Yoshioka, Ayako Tonoki, Motoyuki Itoh. "Mib1 promotes Dll1 endocytosis and Notch signaling through ubiquitination of Dynamin2 and Snx18." BMB2015, 2015年12月2日、神戸
7. 吉岡佐保, 伊藤素行, 殿城亜矢子 「ショウジョウバエにおける老化に伴う長期記憶変化とNotchシグナル」 BMB2015, 2015年12月2日、神戸
8. 田辺憲人, 伊藤素行, 殿城亜矢子 「記憶の維持と加齢性記憶障害におけるインスリン様シグナルの重要な役割」 BMB2015, 2015年12月1日、神戸
9. 殿城亜矢子 「記憶システムの恒常性維持機構の解明」 生理研研究会「比較記憶研究会」、2015年10月8日、愛知
10. Kento Tanabe, Motoyuki Itoh, Ayako Tonoki. "A critical role for insulin-like signaling in memory maintenance and age-related memory impairment in *Drosophila*." EMBO Meeting, Neural circuits and behavior, 2015年7月9日、ギリシャ・クレタ
11. Ayako Tonoki, Ronald L. Davis. "Aging impairs protein synthesis dependent long-term memory in *Drosophila*." The 11th Japanese Drosophila research conference, 2014年6月6日、金沢
12. Ayako Tonoki, Ronald L. Davis "Aging impairs protein synthesis dependent long-term memory in *Drosophila*." Janelia Conference, "Structure and Function of the Insect Mushroom Body", 2014年4月27日、米国・ワシントンDC

山口正洋

1. 山口正洋 「Neural circuit for acquiring distinct odor-guided motivated behaviors in mice」 第95回日本生理学会、2018年3月28日、香川県高松市
2. 山口正洋 「Neural circuit mechanism of odor-induced motivation of feeding」 第40回日本分子生物学会・第90回生化学会合同大会、2017年12月9日、兵庫県神戸市
3. 山口正洋 「食行動における嗅覚系情動回路」 第93回日本生理学会、2016年3月22日、北海道札幌市

尾藤晴彦

1. Bito H. Specification of a remote memory cell ensemble during cortical tagging through activity-dependent Arc signaling. The Brain Conferences "Learning, Memory and Synaptic Plasticity" 2017年4月25日 Rungstedgaard, Denmark.
2. Bito H. Deciphering the Role of Arc and Inverse Synaptic Tagging in Long-Term Memory. Gordon Research Conference on Dendrites: Molecules, Structures and Function. 2017年3月27日, Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lugga, Italy.
3. Bito H. Activity-dependent Arc expression: mechanisms, function and applications. 19th Korean Society for Brain and Neural Sciences. 2016年9月28日. KINTEX, Goyang-si, Korea.

4. Bito H. Labeling, monitoring and manipulating active ensembles. Conferences Jacques Monod. 2015年6月14日. Roscoff, France
5. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. Rational design of ultrafast, high-affinity red calcium indicator for monitoring neuronal activity. 2015年10月21日 Chicago, Illinois, USA.
6. Bito H. Synapse-to-Nucleus Signaling and CREB Regulation in Fear Memory. Gordon Research Conference on Amygdala in Health and Disease. 2015年8月6日. Stonehill College, Easton, Massachusetts, USA.
7. Bito H. Understanding Arc to understand a memory engram. 28th Annual Meeting on the Neurobiology of Learning and Memory. 2015年4月24日. University of California at Irvine, Irvine, California USA.
8. Bito H. Activity-dependent gene expression in health and diseases. 第36回日本生物学的精神医学会/第57回日本神経化学会合同大会、2014年9月30日 奈良
9. Bito H. Activity-dependent Arc expression: mechanism, function and application. 4th Leibniz Institute of Neurobiology Symposium. 2014年8月28日 Tangermuende, Germany.

竹内秀明

1. 竹内秀明 (招待講演)「メダカを用いた社会障害の原因となる分子基盤の解析」日本農芸化学会2018年度大会シンポジウム「メダカ ～ 有用モデル生物としての産業応用への展開～」, 2018年3月, 名古屋
2. Hideaki Takeuchi (招待講演)“Molecular basis underlying fish social competence ~ Social Neuropeptide in medaka fish.” Symposium on Oxytocin and Social Behavior: Animal and Human Studies toward ASD Pathophysiology and Therapeutic Effects, 2017年6月, 浜松
3. 竹内秀明 (特別講演)「メダカの社会的コンピテンスを生み出す分子神経機構」, 第70回栃木県精神医学会, 2017年3月, 宇都宮市
4. Hideaki Takeuchi (招待講演)“Molecular basis of social competence in medaka fish” 18th International Congress of Comparative Endocrinology, 2017年4月, Chateau Lake Louise, Canada
5. Hideaki Takeuchi (基調講演)“Exploring the neural geography of the social brain using medaka fish” 17th Australia & New Zealand Zebrafish Meeting, 2016年2月, Flinders, Australia
6. Hideaki Takeuchi (基調講演)“Exploring the neural geography of the social brain using medaka fish” 3rd Medaka Strategic Meeting, 2016年2月, Flinders, Australia
7. Hideaki Takeuchi (招待講演)“Neural mechanism of female preference mediated by social memory” Symposium on Memory and Mind, Tohoku Forum for Creativity, 2015年9月, 仙台
8. Hideaki Takeuchi (招待講演)“Proximate and ultimate causes of socially-regulated mating preference in medaka fish” 2nd Strategic Meeting for Medaka Research, 2014年4月, Seville, Spain.

野村洋

1. Hiroshi Nomura 「Central histamine reactivates weak memory engrams and restores forgotten memories」脳と心のメカニズム第18回冬のワークショップ、2018年1月11日、ルスツリゾート（北海道蛇田郡留寿都村）
2. Hiroshi Nomura, Hiroto Mizuta, Hiroaki Norimoto, Fumitaka Masuda, Yuki Miura, Hiroto Kojima, Aoi Ahizuka, Noriko Matsukawa, Zohal Baraki, Natsuko Hitora-Imamura, Daisuke Nakayama, Tomoe Ishikawa, Ryoki Saito, Yamato Sano, Hiroyuki Kusuhara, Masabumi Minami, Hidehiko Takahashi, Yuji Ikegaya 「Central histamine reactivates weak memory engrams and restores apparently forgotten object memories in mice and humans」 Neuroscience 2017、2017年11月15日、ワシントンDC（アメリカ）
3. Hiroshi Nomura, Hiroto Mizuta, Hiroaki Norimoto, Fumitaka Masuda, Yuki Miura, Hiroto Kojima, Aoi Ahizuka, Noriko Matsukawa, Zohal Baraki, Natsuko Hitora-Imamura, Daisuke Nakayama, Tomoe Ishikawa, Ryoki Saito, Yamato Sano, Hiroyuki Kusuhara, Masabumi Minami, Hidehiko Takahashi, Yuji Ikegaya 「Central histamine reactivates weak memory engrams and restores apparently forgotten object memories in mice and humans」 16th Annual MCCA Symposium、2017年11月9日、ワシントンDC（アメリカ）
4. Hiroshi Nomura, Kojiro Hara, Reimi Abe, Natsuko Hitora-Imamura, Ryota Nakayama, Takuya Sasaki, Norio Matsuki, Yuji Ikegaya, Masabumi Minami 「Reward seeking by neuronal silencing in the auditory cortex」 第44回内藤コンファレンス、2017年10月5日、シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ（北海道札幌市）
5. 野村洋、水田弘人、乗本裕明、増田文貴、三浦友樹、小島寛人、芦塚あおい、松河理子、Zohal Baraki、人羅（今村）菜津子、中山大輔、石川智愛、齋藤瞭毅、佐野大和、楠原洋之、南雅文、高橋英彦、池谷裕二「ヒスタミン H3 受容体逆アゴニストは、思い出せなくなった物体記憶を回復させる」 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会 合同年会、2017年9月29日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

6. 齋藤瞭毅、人羅菜津子、五十嵐ひかる、高橋大樹、池谷裕二、南雅文、野村洋「前帯状皮質から中脳水道周囲灰白質への神経投射の活性化はマウスの探索行動を増大させる」第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会、2017年9月28日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
7. 齋藤瞭毅、人羅菜津子、五十嵐ひかる、高橋大樹、池谷裕二、南雅文、野村洋「前帯状皮質-中脳水道周囲灰白質経路によるマウス探索行動の制御」第31回北海道薬物作用談話会、2017年8月5日、北海道薬科大学（北海道札幌市）
8. Hiroshi Nomura, Hiroaki Norimoto, Fumitaka Masuda, Yuki Miura, Hiroto Kojima, Zohal Baraki, Natsuko Hitora-Imamura, Daisuke Nakayama, Tomoe Ishikawa, Ryoki Saito, Yamato Sano, Hiroyuki Kusuhara, Masabumi Minami, Yuji Ikegaya「Histamine H3 receptor inverse agonists restore apparently forgotten memories」第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
9. Ryoki Saito, Natsuko Hitora-Imamura, Hikaru Igarashi, Daiki Takahashi, Yuji Ikegaya, Masabumi Minami, Hiroshi Nomura「Activation of projection from the anterior cingulate cortex to the periaqueductal grey upregulates mouse exploratory behaviors」第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ（千葉県千葉市）
10. Hiroshi Nomura「Neuronal circuits for learning and memory」The 2nd HU-TMU-KU joint symposium for pharmaceutical sciences、2016年9月5日、台北（台湾）
11. 野村洋「境界条床核ニューロンによる不安行動の処理機構」第8回光操作研究会、2016年9月30日、慶應義塾大学（東京都港区）
12. 中山大輔、野村洋、バラキゾハル、尾上広祐、松木則夫、池谷裕二「学習時における前頭連合野による情報の統合」第89回日本薬理学会年会、2016年3月11日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
13. 五十嵐ひかる、野村洋、池谷裕二「ACC-BLA経路の活性化による嗜好性の誘導」第38回日本神経科学大会、2015年7月29日、神戸国際展示場（兵庫県神戸市）
14. 尾上広祐、野村洋、石塚恭理、五十嵐ひかる、松木則夫、池谷裕二「扁桃体オリゴデンドロサイトの脱落による不安様行動の発現」第8回先端分子薬理研究会、2014年11月29日、北里大学（東京都港区）
15. 原宏士朗、野村洋、池谷裕二「聴覚皮質の光遺伝学的抑制によって作られる連合記憶」第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会、2014年11月22日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市中区）

日比正彦

1. Hibi, M., Takeuchi, M., Matsuda, K., Ito, T., Nimura, T., Hara, Y., Kuraku, S., Kawakami, K., Yoshida, M., Shimizu, T. Formation and function of cerebellar neural circuits in zebrafish. 第23回小型魚類研究会 2017年8月30日、甲府
2. Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Cerebellar neural circuitry is involved in the classical fear conditioning in zebrafish. 第2回モナッシュ大学脳科学研究所-富山大学理学部国際シンポジウム「神経行動学の最新動向」第12回シンポジウム「水生動物の行動と神経系」合同シンポジウム 2017年12月16日、富山
3. Hibi, M., Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Shimizu, T. Roles of cerebellar neural circuits in classical fear conditioning. International Workshop on Zebrafish Neural Circuits and Behavior. 2017年11月17日、Rockville、USA
4. Shimizu, T., Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M. The cerebellar granule cells control the recovery from classical conditioned fear responses in zebrafish. 第40回日本神経科学大会 2017年7月26-29日、千葉
5. Shimizu, T., Matsuda, K., Kawakami, K., Yoshida, M., Hibi, M. The cerebellar granule cells control recovery from classical conditioned fear responses in zebrafish. 第50回日本発生生物学会大会 2017年5月10-13、東京
6. Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Roles of zebrafish cerebellar neurons in classical fear conditioning. 第22回小型魚類研究会 2016年8月20-21日、岡崎
7. Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Zebrafish cerebellar neural circuitry is involved in the classical fear conditioning. 第39回日本神経科学大会 2016年7月20-22日、横浜
8. Matsuda, K., Yoshida, M., Asakawa, K., Nakai, J., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Zebrafish cerebellum is involved in the classical fear conditioning. 第21回小型魚類研究会. 2015年9月19-20日、吹田
9. Matsuda, K., Yoshida, M., Asakawa, K., Ohkura, M., Nakai, J., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Roles of zebrafish cerebellar neural circuitry in classical fear conditioning. 第38回日本神経科学大会. 2015年7月28-30日、神戸
10. Matsuda, K., Yoshida, M., Takeuchi, M., Asakawa, K., Ohkura, M., Miyasaka, N., Yoshihara, Y., Nakai, J., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Roles of zebrafish cerebellar neural circuitry in the classical fear conditioning. 第20回小型魚類研究会. 2014年9月20-21日、東京
11. Matsuda, K., Takeuchi, M., Asakawa, K., Ohkura, M., Miyasaka, N., Yoshihara, Y., Hayashi, T., Kuraku, S., Kawakami, K., Hibi, M., Shimizu, T. Dissection of cerebellar neural circuitry with zebrafish Gal4 gene/enhancer trap lines. 第47回日本発生生物学会大会 2014年5月27-30日、名古屋

櫻井芳雄

1. 山田基樹, 櫻井芳雄 「バーンズ迷路を用いたラットの他個体観察学習課題。」日本行動科学学会、2018年3月9日、八幡平マウンテンホテル(岩手県・八幡平市)
2. 谷隅勇太, 廣川純也, 櫻井芳雄, 眞部寛之 「“All-Go” Behavioral State with Resetting Associative Neural Activity in Ventral Striatum during Reversal Learning.」The first international symposium for frontend brain science: University of Yamanashi、2018年2月21日、一橋講堂(東京都・千代田区)
3. 大貫朋哉, 櫻井芳雄, 廣川純也 「Representation of goal-related spatial information across different behavioral contexts in rat perirhinal cortex.」The first international symposium for frontend brain science: University of Yamanashi、2018年2月21日、一橋講堂(東京都・千代田区)
4. 大貫朋哉, 櫻井芳雄, 廣川純也 「Retrieval of task-related multimodal memory in rat perirhinal cortex.」次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2017、2017年12月21日、一橋大学 一橋講堂(東京都・千代田区)
5. 塩谷和基, 村田航志, 廣川純也, 森憲作, 櫻井芳雄, 眞部寛之 「匂いで惹起された摂食行動時に応答する腹側テニアテクタの神経活動.」次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2017、2017年12月21日、一橋大学 一橋講堂(東京都・千代田区)
6. 阪口幸駿, 櫻井芳雄 「ラット背外側線条体の習慣形成における機能的半球差.」2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
7. Hirokawa, J., Li, S., Vaughan, A., Pie, J., Desban, L., Osako, Y., Ohnuki, T., Manabe, H., Sakurai, Y., and Kepecs, A. 「Differential routing of reinforcement signals from orbitofrontal cortex to striatum depending on environmental uncertainty.」47th Society for Neuroscience Annual Meeting, 250.08、2017年11月12日、Washington DC(米国)
8. 櫻井芳雄 「高齢な脳と高齢な身体.」第81回日本心理学会大会、2017年9月21日、久留米シティプラザ(福岡県・久留米市)
9. 塩谷和基, 村田航志, 廣川純也, 櫻井芳雄, 森憲作, 眞部寛之 「匂いに基づく摂食行動決定時、摂食中における腹側テニアテクタニューロンの活動.」第6回人材育成フレームワークレクチャー、2017年9月14日、同志社大学 学研都市キャンパス 快風館(京都府・木津川市)
10. 谷隅 勇太, 廣川 純也, 櫻井芳雄, 森 憲作, 眞部寛之 「匂いと報酬の連合学習および逆転学習時の嗅皮質ニューロンの応答パターン」第6回人材育成フレームワークレクチャー2017年9月14日、同志社大学学研都市キャンパス(京都府・木津川市)
11. 谷隅 勇太, 櫻井芳雄, 眞部寛之 「ラットの嗅覚行動課題時および睡眠時の嗅皮質ニューロン活動の多細胞同時記録.」第二回新学術領域「生物ナビゲーションのシステム科学」若手合宿、2017年9月9日、北海道地区国立大学大滝セミナーハウス(北海道・伊達市)
12. 阪口幸駿, 櫻井芳雄 「習慣化におけるラット背外側線条体の左半球優位性.」第40回日本神経科学大会、2017年7月22日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
13. 廣川純也, Li Shujing., Vaughan, Alex., Pie, Lambert, Jean., Desban, Laura., 大迫優真, 大貫朋哉, 眞部寛之, 櫻井芳雄 「眼窩前頭皮質から線条体への投射細胞は環境の不確実性に依存して強化信号を伝達する.」第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
14. 大貫朋哉, 廣川純也, 櫻井芳雄 「ラットの嗅皮質における行動的に関係付けられたクロスモーダル刺激の神経表象.」第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
15. 塩谷和基, 廣川純也, 櫻井芳雄, 森憲作, 眞部寛之 「匂いに基づく摂食行動決定時、摂食中における腹側テニアテクタニューロンの活動.」第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
16. 大迫優真, 櫻井芳雄, 廣川純也 「ラットにおける盲視.」第40回日本神経科学大会、2017年7月20日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
17. 谷隅勇太, 廣川純也, 櫻井芳雄, 森憲作, 眞部寛之 「匂いと報酬の連合学習および逆転学習時の嗅皮質ニューロンの応答パターン.」第40回日本神経科学大会、2017年7月20日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
18. Sakaguchi, Y., Sakurai, Y. 「Left-right hemispheric functional asymmetry of ventral hippocampus and dorsolateral striatum.」26th International Behavioral Neuroscience Society Annual Meeting、2017年6月28日、グラントプリンスホテル広島(広島県・広島市)
19. 塩谷和基, 櫻井芳雄, 眞部寛之 「テニアテクタにおける匂い誘発性摂食行動に相関した神経活動の解析.」第94回日本生理学会大会、2017年3月30日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)
20. 阪口幸駿, 櫻井芳雄 「危機回避におけるラット右腹側海馬の機能的優位性.」第94回日本生理学会大会、2017年3月29日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)
21. 櫻井芳雄 「宇宙環境における脳と神経回路の活動.」同志社大学宇宙医科学研究センター発足シンポジウム、2017年3月10日、同志社大学(京都府・京田辺市)

22. Song, K., Takahashi, S. and Sakurai, Y. 「Volitional modulation of neuronal activities among multiple neuron groups via neuronal operant conditioning.」 46th Society for Neuroscience Annual Meeting、2016年11月14日、San Diego(米国)
23. Machino, Y., Takahashi, S., and Sakurai, Y. 「Hippocampal-prefrontal interaction during original task learning and relearning.」 46th Society for Neuroscience Annual Meeting、2016年11月15日、San Diego(米国)
24. 大迫優真, 櫻井芳雄, 廣川純也 「視覚的気づきに重要な神経回路メカニズムの解明.」 第25回海馬と高次脳機能学会、2016年10月2日、同志社大学寒梅館(京都府・京都市)
25. 阪口幸駿, 櫻井芳雄 「ラット腹側海馬における機能的左右非対称性.」 第25回海馬と高次脳機能学会、2016年10月1日、同志社大学寒梅館(京都府・京都市)
26. 宋基燦, 高橋晋, 櫻井芳雄 「ラット皮質における随意的発火調節のニューロン集団間での転移.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月22日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
27. 町野友理, 高橋晋, 櫻井芳雄 「ラットの海馬・前頭前野における再学習中の神経機構.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
28. 高橋裕美, 廣川純也, 高橋晋, 櫻井芳雄 「報酬確率学習課題中の海馬における神経表象.」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
29. Terada, S., Sakurai, Y., Nakahara, H. and Fujisawa, S. 「Integration of multimodal information in hippocampal-retrosplenial-prefrontal circuit.」 31st International Congress of Psychology、2016年7月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
30. Sakurai, Y., Hirokawa, J. and Manabe, H. 「How can the brain encode unlimited amount of memory? - temporary cell assemblies in hippocampus.」 31st International Congress of Psychology、2016年7月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
31. 町野友理, 高橋晋, 櫻井芳雄 「再学習中の想起に関わる神経メカニズム.」 第93回日本生理学会大会、2016年3月24日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
32. 高橋裕美, 廣川純也, 櫻井芳雄 「Effect of reward history under uncertainty.」 脳と心のメカニズム第16回冬のワークショップ、2016年1月6日、留寿都リゾート (北海道・蛇田郡留寿都村)
33. Song, K., Takahashi, S. and Sakurai, Y. 「Transfer of operantly conditioned firings between different neuron groups with BMI in rats.」 45th Society for Neuroscience Annual Meeting、2015年10月21日、Chicago, (米国)
34. 中園智晶, 高橋晋, 櫻井芳雄 「ルールスイッチングにおけるラット海馬のシータ・ガンマカップリング.」 第24回海馬と高次脳機能学会、2015年10月11日、岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)
35. 中園智晶, 高橋晋, 櫻井芳雄 「ルール学習中のラット海馬におけるシーターガンマ・カップリングはガンマ波のタイプによって異なる.」 第38回日本神経科学学会大会、2015年7月30日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
36. Nakazono, T., Takahashi, S., & Sakurai, Y. 「Rule switching affects cross-frequency couplings in rat hippocampus.」 The 5th aqinternational conference on cognitive neurodynamics、2015年6月5日、Sanya (中国)
37. Ishino, S., Takahashi, S. and Sakurai, Y. 「Coordinated activity between the hippocampus and the prefrontal cortex related to retrieval of learned sequences in rats.」 Vision, Memory, Thought: How Cognition Emerges from Neural Network、2014年12月6日、東京大学 (東京都)
38. Nakazono, T., Takahashi, S. and Sakurai, Y. 「Rule switching affects cross frequency couplings in rat hippocampus. Vision, Memory, Thought: How Cognition Emerges from Neural Network、2014年12月6日、東京大学 (東京都)
39. Ishino, S., Takahashi, S. and Sakurai, Y. 「Hippocampal-prefrontal coordination is involved in recall of learned sequences in rats.」 44th Society for Neuroscience Annual Meeting、2014年11月19日、Washington, DC (米国)
40. Yamaguchi, K., Takahashi, S. and Sakurai, Y. 「Timed pauses of simple spikes and up-and-down patterns of deep cerebellar nucleus activity code cerebellar temporal processing during voluntary movement tasks. 44th Society for Neuroscience Annual Meeting、2014年11月18日、Washington, DC (米国)
41. 中園智晶, 佐野知美, 高橋晋, 櫻井芳雄 「ラット海馬シータオシレーションは時間間隔弁別に関与する.」 第37回日本神経科学学会大会、2014年9月11日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

平野恭敬

1. Yukinori Hirano 「Gene expression for long-term memory formation is triggered by two-types of disinhibition at the neuronal network level and at the transcriptional level in Drosophila.」 日本神経科学学会、2017年7月20日、横浜
2. Hiroko Awata, Yukinori Hirano 「Memory consolidation is induced by a neural network monitoring repetition of the training sessions in Drosophila.」 日本神経科学学会、2017年7月20日、横浜
3. Mai Takakura, Yukinori Hirano 「Molecular switch on HDAC for long-term memory formation in Drosophila.」 日本神経科学学会、2017年7月20日、横浜

4. Yukinori Hirano 「A mechanism of the memory a trace arising in Drosophila」 生理学研究所シンポジウム、2016年12月5日、生理学研究所
5. 平野恭敬 「記憶を司るエピジェネティック制御」 日本神経化学会シンポジウム、2016年9月9日、福岡
6. 平野恭敬 「記憶を司るエピジェネティック制御」 日本遺伝学会、2016年9月7日、三島
7. Yukinori Hirano 「Neuronal computation based on the prediction error within the Drosophila mushroom body promotes long-term memory formation.」 日本神経科学学会、2016年7月20日、福岡
8. Yukinori Hirano 「Decoding epigenetics related to distinct phases of long-term memory in Drosophila.」 日本神経科学学会、2015年7月28日、神戸
9. Yukinori Hirano 「Decoding epigenetics related to distinct phases of long-term memory in Drosophila」 日本神経科学学会シンポジウム、2014年9月12日、横浜
10. 平野恭敬 「エピジェネティクス解析から長期記憶分子メカニズムに迫る」 記憶回路研究会、2014年10月8日、生理学研究所

王丹

1. 王丹(招待講演) “Synaptic epitranscriptome and dynamic RNA imaging” Development and Functions of Brain Circuit: From Molecules to Behaviour (国際), 2016/3/29-30, India
2. 王丹(招待講演) “Synaptic epitranscriptome and dynamic RNA imaging” Seminar at Bordeaux neurocampus (国際), 2016/3/21, France
3. 王丹(招待講演) “Synaptic epitranscriptome and dynamic RNA imaging” Seminar at European Molecular Biology Laboratory (国際), 2016/3/18, Germany
4. Liao, Goldie, 大本, 飯田, 王丹 “A m6A epitranscriptome at mouse synapse” International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016 (国際), 2015/12/15-1, 理化学研究所 和光市
5. 小原孝之, 大本, Liao, 王丹 “Dendritic RNA modification in hippocampal neurons” 多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理 (国際学会), 2015/11/4-5, 京都ガーデンパレス (京都市)
6. Liao Youqi “An m6A epitranscriptome at adult mouse synapse” 多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理 (国際学会), 2015/11/4-5, 京都ガーデンパレス (京都市)
7. 王丹 “Synaptic m6A modification in adult mouse brain” 多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理 (国際学会), 2015/11/4-5, 京都ガーデンパレス (京都市)
8. GOLDIE, Belinda, 王丹 “Conservative miRNA target analysis: are we limiting our discoveries of neuronal miRNA function?” 29th International Mammalian Genome Conference, 2015/11/8-11, 横浜
9. 小原孝之, 大本, Liao, Hong, 王丹 “神経細胞における RNAm6A 修飾の役割” 第17回日本RNA学会, 2015/7/15-17, 札幌市
10. Liao Youqi, 小原, 大本, Hong, Goldie, 飯田, 王丹 “マウス成体脳シナプスにおける m6A-RNA のトランスクリプトーム解析” 第17回日本RNA学会, 2015/7/15-17, 札幌市
11. 小原孝之, 大本, Liao, Hong, 王丹 “The Role of m6A Modification in Neuron Functions” 第14回京都大学・国立台湾大学・筑波大学合同「分子細胞生物学シンポジウム」 (国際学会), 2015/6/13, 京都大学
12. 王丹 “Cellular environment-dependent RNA methylation at synapse during learning and memory” 多様性を明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理, 2014/6/16-17, 札幌

八木健

1. 八木健 「心をうみだす脳と遺伝子」 K-Labo Forum 2018、2018年3月13日、静岡県伊豆の国市
2. Yagi T 「Clustered protocadherins regulate complex neural networks」 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2018年2月10日-11日、新潟県新潟市
3. 内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 福村龍太郎, 西野穰, 豊田敦, 権藤洋一, 八木健 「変異蓄積マウス系統は、放射線の遺伝的影響を理解するための新たな方法論を提供する」 日本放射線影響学会第60回大会、2017年10月25日-28日、千葉県千葉市
4. 内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 豊田敦, 西野穰, 八木健 「変異蓄積マウス系統を用いた生殖系列変異の解析」 第42回中国地区放射線影響研究会、2017年7月27日、広島県広島市
5. Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K 「Analysis of prediction error responses in the posterior parietal cortex of awake mice」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、千葉県千葉市
6. Nishio N, Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K 「Optical imaging of temporal cortical areas involved in audiovisual integration in awake mice」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、千葉県千葉市

7. Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Nishio N, Hishida R, Horii A, Yagi T, Shibuki K 「Complexity of sound stimuli required for sound-shape associative responses in the mouse auditory cortex」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、千葉県千葉市
8. Kaneko R, Abe M, Takatsuru Y, Watanabe M, Sakimura K, Yanagawa Y, Yagi T 「Visualizing single-neuron identity specified by Pcdh-b cluster」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、千葉県千葉市
9. Uyeda A, Sugo N, Ohnishi K, jeonghyun Lyu, Hirayama T, Yagi T, Yamamoto N 「The role of DNA polymerase β in postnatal cortical neuron development」 第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、千葉県千葉市
10. 八木健 「自分でしかできない事に挑戦しよう。独創性とは？」 K-Labo Forum 2017、2017年6月3日、神奈川県鎌倉市
11. 八木健 「神経細胞の個性がつくる神経回路とセルアセンブリ脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」 研究領域最終公開シンポジウム脳神経回路研究の最前線 2017、2017年1月20日、東京都千代田区
12. Uchimura A, Yagi T 「Mutation accumulation experiment with laboratory mice」 International Symposium The start of New Genomics、2017年1月10日-11日、東京都文京区
13. 内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 若菜茂晴, 西野穰, 八木健 「マウスを用いた実験室内進化モデルは、ヒトも含めた哺乳類の進化研究に新たな方法論を提供する」 第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、神奈川県横浜市
14. Yagi T 「Cen codes for generating the complex neural networks in the brain-neural individuality and network formation by clustered protocadherins」 Cell & Molecular Biology Graduate Program、2016年11月18日、Honolulu USA
15. Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y 「High reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is established under the guidance of epigenetic regulation」 Society of Neuroscience2016、2016年11月16日、San Diego USA
16. Shibuki K, Yamagishi T, Kamatani D, Yoshitake K, Tsukano H, Watanabe K, Hishida R, Takahashi K, Takahashi S, Horii A, Yagi T 「Functional footprints of impaired consciousness in mice with reduced molecular diversity of clustered protocadherin- α 」 Society of Neuroscience2016、2016年11月15日、San Diego USA
17. Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K 「Prediction error responses in the mouse posterior parietal cortex are dependent on molecular diversity of clustered protocadherin α 」 Society of Neuroscience2016、2016年11月15日、San Diego USA
18. Yagi T, Hasegawa S, Okayama A, Kaneko R, Hirayama T, Kumagai M, Hirabayashi T 「Protocadherin clusters require neural wiring in reticular formation in spinal cord and brainstem」 Society of Neuroscience2016、2016年11月13日、San Diego USA
19. 八木健 「脳における複雑なニューラルネットワーク形成メカニズム」 富山大学薬学部招聘セミナー、2016年10月16日-17日、富山県富山市
20. 八木健 「脳における複雑なニューラルネットワーク形成メカニズム」 行動遺伝学研究会個体の繋がり分子進化研究、2016年10月13日、静岡県三島市
21. 有賀理瑛, 平山晃斉, 吉武講平, 足澤悦子, 吉村由美子, 澁木克栄, 八木健 「プロトカドヘリン γ は大脳皮質抑制性神経細胞の分布及び機能を制御する」 第38回日本生物学的精神医学会第59回日本神経化学会大会合同大会、2016年9月8日-10日、福岡県福岡市
22. Yagi T 「Gene codes for generating the complex neural networks in the brain」 サテライトシンポジウム、2016年7月25日-26日、東京都目黒区
23. Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K 「Impaired prediction error responses in the posterior parietal cortex of mice with reduced diversity of protocadherin- α 」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、神奈川県横浜市
24. Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Kamatani D, Hishida R, Horii A, Yagi T, Shibuki K 「Higher cortical functions required for sound-shape associative learning in mice」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、神奈川県横浜市
25. Kaneko R, Abe M, Takatsuru Y, Watanabe M, Sakimura K, Yanagawa Y, Yagi T 「Visualizing single-neuron identity specified by Pcdh-b cluster」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、神奈川県横浜市
26. Akiko Uyeda, Sugo N, Ohnishi K, Toyoda S, Hirayama T, Yagi T, Yamamoto N 「Involvement of DNA polymerase β in postnatal development of cortical neurons」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、神奈川県横浜市
27. Ohnishi K, Sugo N, Toyoda S, Hirayama T, Yagi T, Yamamoto N 「DNA polymerase β function in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival and differentiation in the developing cortex」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、神奈川県横浜市
28. Yagi T 「Gene codes for generating the complex neural networks in the brain」 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、神奈川県横浜市
29. Yagi T 「Gene codes for generating the complex neural system in the brain」 FBI Translational Seminar Series、2016年6月16日、New York USA

- 30.内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 若菜茂晴, 西野穰, 八木健「実験用マウスの生殖系列の突然変異率とその後世代への影響」第 63 回日本実験動物学会総会、2016 年 5 月 18 日-20 日、神奈川県川崎市
- 31.Yagi T「Genetic codes for complex neural networks in the brain」Circuit Construction in the Mammalian Brain、2015 年 12 月 6 日-7 日、静岡県三島市
- 32.金子涼輔, 阿部学, 高鶴裕介, De Zeeuw Chris, 渡辺雅彦, 崎村建司, 柳川右千夫, 八木健「ニューロン ID の可視化クラスター型プロトカドヘリンの発現解析」第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、兵庫県神戸市
- 33.平山晃斉, Niels Galjart, 八木健「大脳皮質神経幹細胞における DNA 結合因子 CTCF の役割」第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、兵庫県神戸市
- 34.有賀理恵, 谷垣宏美, 平山晃斉, 吉武講平, 足澤悦子, Niels Galjart, 吉村由美子, 渋木克栄, 八木健「CTCF 欠失は大脳皮質抑制性神経細胞の分布と神経活動に影響を及ぼす」第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、兵庫県神戸市
- 35.角岡佑紀, 平山晃斉, 中山寿子, 足澤悦子, 崎村建司, Niels Galjart, 吉村由美子, 橋本浩一, 八木健「プルキンエ細胞における CTCF 欠損は樹状突起に Giant Lamellar Body の形成を即す」第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、兵庫県神戸市
- 36.竹本健二, 長谷川園子, 井之上幸範, 平林敬浩, 八木健「クラスター型プロトカドヘリン欠損マウスにおける神経細胞死の解析」第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、兵庫県神戸市
- 37.八木健「Genetic cords for complex neural networks in the brain」RIKEN Kobe の動物実験従事者定期研修会、2015 年 11 月 19 日、兵庫県神戸市
- 38.Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Wakana S, Nishino J, and Yagi T 「Germline mutation rates and mutation accumulation lines in mice」第 29 回国際哺乳類ゲノム会議、2015 年 11 月 8 日-11 日、神奈川県横浜市
- 39.八木健「複雑なニューラルネットワークを形成する分子メカニズム」比較記憶研究会異なる動物種間での記憶回路制御機構の総合的理解による記憶回路原理の解明、2015 年 10 月 8 日-9 日、愛知県岡崎市
- 40.内村有邦, 樋口真弓, 新見恵理, 水口洋平, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 西野穰, 八木健「マウス変異蓄積統計を利用した生殖系列の突然変異率の推定」日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 9 月 24 日-25 日、宮城県仙台市
- 41.八木健「Complex neural networks from neuronal individuality」医学・生命科学セミナー、2015 年 9 月 16 日、熊本県熊本市
- 42.金子涼輔, 阿部学, 渡辺雅彦, 崎村建司, 柳川右千夫, 八木健「Visualizing single-neuron identity defined by Pcdh-beta cluster in mouse brain」第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月 13 日、埼玉県さいたま市
- 43.足澤悦子, 三宝誠, 平林敬浩, 長谷川園子, 金子涼輔, 豊田峻輔, 小林俊寛, 平林真澄, 八木健, 吉村由美子「細胞系譜依存的な双方向性シナプス結合形成は、胎生期におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御の影響を受ける」第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、兵庫県神戸市
- 44.吉武講平, 塚野浩明, 菱田竜一, 八木健, 澁木克栄「マウス後部頭頂連合野の予測誤差応答は経験によって形成される」第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、兵庫県神戸市
- 45.長谷川園子, 岡山厚, 平林敬浩, 神田尋, 足澤悦子, 三宝誠, 八木健「クラスター型プロトカドヘリンは脳幹における神経細胞の生存に必要である」第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、兵庫県神戸市
- 46.鎌谷大樹, 渡邊健児, 山岸達矢, 菱田竜一, 八木健, 澁木克栄「空間/形状情報の視覚的短期記憶課題におけるプロトカドヘリン多様性減少マウスの障害」第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、兵庫県神戸市
- 47.中村徹, 永田雅俊, 八木健, 山森哲雄, 木津川尚史「複雑な連続ステップの学習初期に線条体の可塑性が必要である」第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、兵庫県神戸市
- 48.木津川尚史, 八木健「局所回路モデル Gene-Matched Network を利用したネットワーク情報の解析」第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、兵庫県神戸市
- 49.八木健「Genetic bases for generating the complex neural networks in the brain」共同研究拠点国際シンポジウム意識を必要とする脳機能の神経メカニズム、2015 年 7 月 25 日、新潟県新潟市
- 50.八木健「ニューロンの個性がつくる複雑なニューラルネットワーク」第 5 回 CiNet シンポジウム/COI シンポジウム人間力・社会力の脳科学脳長の長所を伸ばし、脳の弱点を補強する最新技術、2015 年 6 月 17 日、東京都千代田区
- 51.八木健「複雑なニューラルネットワーク形成のメカニズム：クラスター型プロトカドヘリンによる神経細胞の個性化」自然科学研究機構プロジェクト合同シンポジウム、2015 年 3 月 11 日、愛知県岡崎市
- 52.八木健「遺伝子と情報—Gene Matched Networks とコミュニティー解析への応用」保育・教育分野における人間行動ビッグデータ活用の方向性を探る公開研究会、2015 年 2 月 28 日-3 月 1 日、北海道札幌市
- 53.八木健「クラスター型プロトカドヘリン：複雑なニューラルネットワークへの挑戦」第 2 回包括的神経グリア研究会、2015 年 1 月 10 日-11 日、愛知県名古屋市

54. 有賀理瑛, 八木健 「シンギングマウス(sng 変異体)の新規ヒト可聴音域発声行動の神経メカニズムの解析」第2回包括的神経グリア研究会、2015年1月10日-11日、愛知県名古屋市

美津島大

1. Mitsushima D: Real-time change of neural activity in hippocampal CA1 after the experienced episodes. US-Japan symposium, 2016年6月、Baltimore
2. 美津島 大: 脳情報の解読を目指して: 動物と話ができるかも? 東京大学 優駿会 ヤンソン賞受賞講演、2016年11月、東京

高橋琢哉

1. 高橋琢哉: てんかん原性中核分子としてのAMPA受容体~新規AMPA受容体可視化技術により見えてきたこと~, Keio Child Neurology Network、2018年3月10日、新宿
2. 高橋琢哉: てんかん原性中核分子としてのAMPA受容体~新規AMPA受容体可視化技術により見えてきたこと~, 脳機能画像カンファレンス、2018年3月9日、福井
3. 高橋琢哉: Development of PET tracer for AMPA receptors. The UK-Japan Spring Neuroscience Symposium. 2018年3月6日、London
4. 高橋琢哉: Novel PET probe to visualize AMPA receptors in living human brain. The 17th mind Brain Conference 2018 “Reimagine Mind Brain Sciences through Photons:Uniting Biomedical and Engineering Innovations” 2018年2月22日、浜松
5. 高橋琢哉: AMPA受容体PET Probeの開発~ペランパネルの抗てんかん作用の科学的根拠~, 城南てんかんセミナー、2018年2月22日、東京
6. 高橋琢哉: Synaptic plasticity: from bench to bed side. Campbell Family Research Institute Special Seminar. 2018年2月7日、トロント
7. 高橋琢哉: AMPA受容体PET probeの開発~ペランパネルの抗てんかん作用の科学的根拠~, フィコンパ発売1周年記念講演会、2017年12月、東京
8. 高橋琢哉: AMPA受容体PET probeの開発~ペランパネルの抗てんかん作用の科学的根拠~, Perampanel Expert Forum、2017年12月、筑波
9. 高橋琢哉: てんかん原性中核分子としてのAMPA受容体~新規AMPA受容体可視化技術により見えてきたこと~, 最新のてんかん診療セミナーin 呉西、2017年12月、富山
10. 高橋琢哉: てんかん原性中核分子としてのAMPA受容体~新規AMPA受容体可視化技術により見えてきたこと~, TOYAMA Epilepsy Seminar (第一報) ~AMPA受容体の新しい話題~, 2017年11月、富山
11. 高橋琢哉: AMPA受容体PET probeの開発~ペランパネルの抗てんかん作用の科学的根拠~, Perampanel Expert Forum①、2017年11月、筑波
12. 高橋琢哉: てんかん原性中核分子としてのAMPA受容体~新規AMPA受容体可視化技術により見えてきたこと~, てんかん診療セミナー~ペランパネルの未来~, 2017年11月、京都
23. 高橋琢哉: AMPA受容体~基礎研究の根拠に基づく臨床応用~, 第2回城南地区てんかん診療を考える会、2017年11月、東京
14. 高橋琢哉: AMPA受容体PET probeの開発~ペランパネルの抗てんかん作用の科学的根拠~, AMPAエキスパートセミナー、2017年11月、大阪
15. 高橋琢哉: てんかん原生中核分子としてのAMPA受容体~新規AMPA受容体可視化技術により見えてきたこと~, 第51回日本てんかん学会学術集会, スポンサーシップシンポジウム、2017年11月、京都
16. 高橋琢哉: 新規AMPA受容体PETイメージング製剤によるてんかん患者脳イメージング. 第51回日本てんかん学会学術集会、2017年11月、京都
17. 高橋琢哉: AMPA受容体と精神疾患. 医療心理懇話会 第2回集会、2017年10月、東京
18. 高橋琢哉: 新規AMPA受容体 PETイメージング製剤の開発. 第57回日本核医学会学術総会, ランチョンセミナー、2017年10月、横浜
19. 高橋琢哉: Novel PET probe to visualize AMPA receptors in living human brain. 第57回日本核医学会学術総会、2017年10月、横浜
20. 高橋琢哉: AMPA受容体標識PET probeの開発. 第58回日本神経学会学術大会 第23回世界神経学会議同時開催 ランチョンセミナー、2017年9月、京都
21. 高橋琢哉: AMPA受容体PET probeの開発~てんかん診療の新たな展開~, 第59回日本小児神経学会学術集会 エーザイ(株) スポンサーシップセミナー2、2017年6月、大阪
22. 高橋琢哉: シナプスの可塑性: 基礎から臨床へ. 第94回日本生理学会大会、2017年3月、浜松

23. Takahashi T : Synaptic plasticity: from bench to bedside. 第40回日本神経科学大会、2017年 7月、幕張
24. Takahashi T : Facilitation of Synaptic AMPA Receptor Delivery Leading to the Acceleration of Recovery of Motor Function with Rehabilitation after Brain Injury. XXIII World Congress of Neurology. 2017年 9月、京都
25. 高橋琢哉: 基礎的知見から考えるAMPA受容体の役割. 神奈川県フィコンパ発売1周年記念講演会、2017年7月、横浜
26. 高橋琢哉: Synaptic plasticity: from bench to bedside. 横浜市大リハビリテーション科弘嗣会総会、2017年4月、横浜
27. Takahashi T: Synaptic Plasticity from bench to bedside. University of Illinois at Chicago Campus Seminer, 2017年 3月、イリノイ州
28. Takahashi T: Synaptic Plasticity from bench to bedside. University of Illinois at Urbana-Champaign Campus Seminer, 2017年 3月、イリノイ州
29. 高橋琢哉: リハビリテーション効果促進薬の開発. 第12回霊長類医学科学フォーラム、2016年11月、東京
30. 高橋琢哉: AMPA受容体標識PET Probeの開発～ペランパネルの可能性～. 第46回日本臨床神経生理学会学術大会 ランチョンセミナー、2016年10月、浜松
31. 高橋琢哉: AMPA受容体標識PET Probeの開発. 第39回日本神経科学大会 ランチョンセミナー、2016年7月、横浜
32. 高橋琢哉 : トレーニング依存的に作用する脳卒中後のリハビリテーション効果促進薬の開発. 第41回日本脳卒中学会総会、2016年4月、札幌
33. 高橋琢哉 : AMPA受容体を切り口とした精神神経疾患の新規診断治療法. 第3回生物学的自閉症研究会、2016年2月、東京
34. Takahashi T : Synaptic plasticity: from bench to bedside. Current Trends and Future Directions of Synaptic Plasticity Research, 2016年 6月、Baltimore
35. 高橋琢哉 : 脳の病気の診断治療の最前線. 神奈川県ヘルスケア・ニューフロンティア講座 第2回公開講座「大学におけるヘルスケア研究と教育の最前線」、2015年12月、横浜
36. 高橋琢哉 : トレーニング依存的に作用する脳卒中後のリハビリテーション効果促進薬の開発. 第33回日本神経治療学会総会、2015年11月、名古屋
37. 高橋琢哉 : 恐怖記憶が形成される際の脳神経細胞の分子メカニズム. 第8回セファロ・ニューロ・サイコロウマトロジー研究会、2015年10月、大阪
38. 高橋琢哉 : Synaptic plasticity: from bench to bedside. 第57回日本小児神経学会学術集会、2015年 5月、大阪
39. 高橋琢哉 : 学習の分子細胞メカニズム. 第92回日本生理学大会、2015年3月、神戸
40. 高橋琢哉 : 経験依存的AMPA受容体シナプス移行. 慶應神経発生研究会2014, 慶應大学信濃町キャンパス、2014年 12月、東京
41. 高橋琢哉 : Visualization of AMPA receptors in vivo. 新学術領域「記憶のダイナミズム」、平成26年度班会議、2014年 6月、札幌

木村梨絵

1. 木村梨絵 「低コントラストの視覚弁別に関わるラット一次視覚野の神経活動」第7回 新潟脳研-霊長研-生理研合同シンポジウム、2018年3月7日、愛知県岡崎市
2. Kimura R, Yoshimura Y 「Novel dependence of neural responses on the contrast of visual stimuli used for an orientation discrimination task in rat primary visual cortex.」 The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2017年7月22日、千葉県千葉市
3. Kimura R, Yoshimura Y 「Cortical spiking activity in rats performing a visual discrimination task.」 2017 Yonsei-Korea-NIPS Symposium、2017年4月21日、韓国ソウル
4. 木村梨絵, 吉村由美子 「視覚弁別課題遂行中のラット視覚野における神経活動」第6回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム、2016年9月24日、愛知県名古屋市
5. Kimura R, Yoshimura Y 「Development of a visuomotor task useful for the analysis of interactions between neuronal activities in the visual and motor cortices of behaving rats.」 The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2016年7月22日、神奈川県横浜市
6. Kimura R, Sakai Y, Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y 「Population characteristics of spike synchrony in rat motor cortices during movement task.」 The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2014年9月11日、神奈川県横浜市

本間光一

1. 青木 直哉、山口 真二、武原 顕彦、松島 俊也、本間 光一 「刷り込みの課題転換学習に対する促進効果」日本動物学会第88回富山大会、2017年9月21日～23日、富山県富山市
2. 山口 真二、青木 直哉、松島 俊也、本間 光一 「甲状腺ホルモンはアクチンダイナミクスを制御し、閉じた刷り込み臨界期を開く」日本動物学会第88回富山大会、2017年9月21日～23日、富山県富山市

- 3.青木 直哉、武原 顕彦、山口 真二、本間 光一 「課題転換学習における甲状腺ホルモンの学習促進効果は学習経験に依存する — Learning-experience dependent facilitation mediated by thyroid hormone in task switching paradigm in domestic chicks」第40回日本神経科学大会, 2017年7月20日~23日, 千葉県千葉市
- 4.本間 光一 (招待講演) 「学習の能力と時期を決定する甲状腺ホルモンの非遺伝子的作用」第27回行動神経内分泌研究会, 2017年4月28日~29日, 岡山県瀬戸内市
- 5.本間 光一 (招待講演) 「甲状腺ホルモンの非遺伝子的作用による学習能力の賦与」創剤フォーラム第22回シンポジウム, 2016年9月9日, 東京都板橋区 帝京大学
- 6.青木 直哉、山口 真二、佐伯 百合子、武原 顕彦、松島 俊也、本間 光一 「GABA-A 受容体と GABA-B 受容体の機能的な役割の転換が鳥類刻印付けの学習臨界期を決定する」第39回日本神経科学大会, 2016年7月20~22日, 神奈川県横浜市
- 7.武原 顕彦、青木 直哉、山口 真二、本間 光一 「ニワトリヒナにおいて甲状腺ホルモンは学習経験依存の学習促進効果をもたらす」日本動物学会第68回関東支部大会, 2016年3月12日, 神奈川県横浜市 神奈川大学横浜キャンパス
- 8.山口 真二、青木 直哉、本間 光一 「Critical role of the novel neural pathway in the cerebrum in filial imprinting of newly-hatched domestic chicks.」 Integrative Network Linking Multiple Brain Areas for Behavioral Adaptation, 2016年3月3日~4日, 京都府京都市 同志社大学
- 9.青木 直哉、山口 真二、北島 孝明、本間 光一 「鳥類刻印付けにおける大脳後背部 IMHA は獲得・想起に必要である」第67回日本動物学会関東支部大会, 2015年3月14日, 東京都新宿区 早稲田大学先端生命医科学センター
- 10.山口 真二、青木 直哉、松島 俊也、本間 光一 「甲状腺ホルモンは、刷り込み学習の感受性期の開始を決定し、その後の学習のプライマーとして働く」第87回日本生化学会大会, 2014年10月15日~10月18日, 京都府京都市
- 11.青木 直哉、山口 真二、北島 孝明、松島 俊也、本間 光一 「鳥類刻印付けの成立に大脳後背側部 IMHA は必須である」第37回日本神経科学大会, 2014年9月11日~9月13日, 神奈川県横浜市
- 12.本間 光一 (招待講演) 「Thyroid hormone confers ‘memory priming’ to start the sensitive period of imprinting in birds.」 2014 International Congress of Neuroethology, 2014年7月28日~8月1日, 北海道札幌市
- 13.山口 真二、青木 直哉、本間 光一 「Hormonal regulation of the sensitive period for filial imprinting in domestic chicks.」 2014 International Congress of Neuroethology, 2014年7月26日~7月27日, 北海道札幌市
- 14.青木 直哉、山口 真二、本間 光一 「Neural circuits of sensitive period triggered by thyroid hormones in filial imprinting.」 2014 International Congress of Neuroethology, 2014年7月26日~7月27日, 北海道札幌市

渡部文子

- 1.渡部文子 「情動行動を制御する扁桃神経回路基盤/Neuronal circuits underlying the regulation of aversive valence in mice.」第95回日本生理学会大会日中合同シンポジウム/Cina-Japan Joint Symposium, 2018年3月28日、高松

古田寿昭

- 1.T. Furuta, Targeting of caged compounds to cells of interest, International Symposium on Caged Compounds, March 9, 2018 (Hiroshima, Japan)
- 2.横山 愛果, 鈴木 商信, 古田 寿昭, リアノジン受容体阻害剤のケージド化合物の設計と合成, 日本化学会 第98春季年会 (2018), 日本大学理工学部 船橋キャンパス, 2018年3月22日
- 3.坂元 琴子, 鈴木 商信, 古田 寿昭, 細胞種選択的に光活性化できるケージド HDAC 阻害剤, 日本化学会 第98春季年会 (2018), 日本大学理工学部 船橋キャンパス, 2018年3月22日
- 4.竹田 詩織, 笈 和之, 鈴木 商信, 古田 寿昭, 標的細胞に選択的に送達される DDS 型ケージド化合物の開発, 日本化学会 第98春季年会 (2018), 日本大学理工学部 船橋キャンパス, 2018年3月22日
- 5.古田寿昭, 細胞種選択的に光活性化できるケージド化合物の設計と合成, 日本薬学会第137年会, 2017年3月27日 (仙台)
- 6.T. Furuta, Caged Compounds as Optochemical Genetic Tools—Design, Synthesis and Their Use, The 17th RIES-HOKUDAI International Symposium on Ju, December 14, 2016 (Sapporo, Hokkaido)
- 7.K. Sakamoto, A. Z. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of modified inhibitors for epigenetic research, The Fourth Asian Chemical Biology Conference (ACBC2016), November 28th~1st December, 2016 (Kaohsiung, TAIWAN)
- 8.T. Sakano, A. Z. Suzuki, T. Furuta, Latent caged cNMP that can be photoactivated only in the b-galactosidase-expressing cells, The Fourth Asian Chemical Biology Conference (ACBC2016), November 28th~1st December, 2016 (Kaohsiung, TAIWAN)
- 9.S. Takeda, A. Z. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of autophagy inhibitors having cell type specificity, The Fourth Asian Chemical Biology Conference (ACBC2016), November 28th~1st December, 2016 (Kaohsiung, TAIWAN)

- 10.S. Takeda, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of autophagy inhibitors having cell type specificity, 日本化学会 第96 春季年会 (2016), 同志社大学京田辺キャンパス, 2016 年 3 月 26 日
- 11.Y. Iketani, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of caged 4-aminopyridine in the presence of PLE, 日本化学会 第96 春季年会 (2016), 同志社大学京田辺キャンパス, 2016 年 3 月 26 日
- 12.T. Sakano, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of new caged cyclic nucleotides which can be photo-activated in the presence of specific enzymes, 日本化学会 第96 春季年会 (2016), 同志社大学京田辺キャンパス, 2016 年 3 月 26 日
- 13.K. Sakamoto, A. Suzuki, T. Furuta, Development of DNA methyltransferase inhibitors having cell type specificity, 日本化学会 第96 春季年会 (2016), 同志社大学京田辺キャンパス, 2016 年 3 月 26 日
- 14.M. Funayama, A. Suzuki, T. Ueno, M. Saitoe, T. Furuta, Design and synthesis of ryanodine receptor agonists with cell type specificity, 日本化学会 第96 春季年会 (2016), 同志社大学京田辺キャンパス, 2016 年 3 月 26 日
- 15.T. Furuta, Modular caging groups – new platforms for multifunctional caged compounds, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 20, 2015 (Honolulu, Hawaii),
- 16.T. Furuta, Toward in vivo manipulation of intracellular signaling pathways, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015 (Honolulu, Hawaii)
- 17.Y. Iketani, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of new caging groups having cell type specificity, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015 (Honolulu, Hawaii)
- 18.T. Sakano, A. Suzuki, T. Ueno, M. Saitoe, T. Furuta, Latent caged cAMPs that can be photoactivated in the presence of specific enzymes, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015 (Honolulu, Hawaii)
- 19.A. Suzuki, R. Aikawa, K. Kakehi, T. Furuta, Design and synthesis of clickable caged compounds, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015 (Honolulu, Hawaii)
- 20.坂元 琴子, 鈴木 商信, 古田 寿昭, 細胞種選択的にエピジェネティクスを制御する分子の開発, 第6回 CSJ 化学フェスタ (2016), タワーホール船堀 (東京都), 2016 年 11 月 16 日
- 21.坂野 太一, 鈴木 商信, 古田 寿昭, 細胞種選択的に光活性を獲得するケージド cNMP の開発, 第6回 CSJ 化学フェスタ (2016), タワーホール船堀 (東京都), 2016 年 11 月 15 日
- 22.T. Furuta, Chemical tools to control cellular chemistry, the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Kobe, March 21-23, 2015

久原篤

- 1.久原篤, 宇治澤知代, 太田茜 「線虫から探る温度応答と記憶のエッセンス」 動物学会近畿支部会 秋期講習会, 2015.12.5, 神戸
- 2.久原 篤, 宇治澤知代, 太田 茜 「線虫から学ぶ温度に対する生体調節」 動物学会ホメオスタシスバイオロジーシンポジウム, 2015.9.18, 新潟
- 3.Tomoyo Ujisawa, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara 「Temperature experience-dependent cold acclimation in nematode *C. elegans*」 生物物理学会, 2015.9.13, 金沢
- 4.園田悟, 田中沙季, 太田茜, 久原篤 「線虫 *C. elegans* の低温適応を制御する精子-神経系を介したネットワーク」 統合ニューロバイオロジー研究所第2回シンポジウム, 2014.12.18, 神戸
- 5.久原篤, 宇治澤知代, 岡畑美咲, 園田悟, 太田茜 「線虫 *C. elegans* を用いた温度感知と記憶の神経機能解析」 実験動物技術者協会 秋季大会シンポジウム, 2014.11.29, 広島
- 6.Atsushi Kuhara, Tomoyo Ujisawa, Satoru Sonoda, Misaki Okahata, Akane Ohta 「light and pheromone sensoryneuron regulates temperature habituation in *C. elegans*」 ISMNTOP2014(The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2014)), 2014.11.2, 九州大学

杉山陽子 (矢崎陽子)

- 1.Yanagihara S. & Yazaki-Sugiyama Y., State-dependent auditory selectivity for familiar songs in the auditory association cortex of juvenile songbirds. The 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov 2015, Chicago, USA
- 2.柳原真, 矢崎-杉山陽子, 「学習した歌に対する選択的神経応答はソングバード幼鳥聴覚野に経験依存的に現れる」 第38回日本神経科学大会, 2015 年 7 月 28~31 日, 神戸
- 3.Yanagihara S. & Yazaki-Sugiyama Y., Emergence of neural selectivity for memorized birdsongs in the higher-level auditory cortex of juvenile songbird. The 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov 2014, Washington DC, USA

- 4.柳原真, 矢崎-杉山陽子,「学習した親鳥の歌に対する選択的応答は、経験依存的にソングバード聴覚野に出現する」第37回日本神経科学大会、2014年9月11~13日、横浜

小川正晃

- 1.小川正晃「刺激-報酬間関係のアップデートにおける眼窩前頭皮質の因果的役割」第95回日本生理学会大会、2018年3月30日、サンポートホール高松(香川県、高松市)
- 2.小川正晃,伊佐正「刺激-報酬間関係のアップデートにおける眼窩前頭皮質の因果的役割」第39回日本生物学的精神医学会、2017年9月28日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
- 3.小川正晃「刺激-報酬間関係のアップデートにおける眼窩前頭皮質の因果的役割」第40回日本神経科学大会、2017年7月20日、幕張メッセ(千葉県、千葉市)
- 4.ONIMARU H, IKEDA K, OGAWA M, IHARA KI, KOBAYASHI K, KAWAKAMI K「Optogenetic analysis of neuronal network of medullary respiratory center in brainstem-spinal cord preparations from transgenic newborn rats expressing Archaelhodopsin in Phox2b positive cells」NEUROSCIENCE 2016、2016年11月13日、サンディエゴコンベンションセンター、カルフォルニア州、アメリカ合衆国
- 5.小川正晃,伊佐正「逆転学習における時間特異的な眼窩前頭皮質の因果的役割」第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
- 6.鬼丸洋,池田啓子,小川正晃,伊原寛一郎,小林和人,川上潔「Phox2b遺伝子の発現制御領域下にアーキドロプシンを発現させたトランスジェニックラットにおける延髄呼吸中枢の神経回路の解析」第93回日本生理学会大会、2016年3月22日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
- 7.小川正晃「意思決定における眼窩前頭皮質の役割」第22回日本行動医学会学術総会、2015年10月16日、東北大学(宮城県、仙台市)

高雄啓三

- 1.上野浩司, 高雄啓三, 藤井一希, 末光俊介, 岡本基, 石原武士. マウス大脳皮質におけるアグリカン陽性ペリニューロナルネットの発現 第95回日本生理学会大会, 2018 Mar 28-30; 高松市
- 2.高雄啓三. Behavioral physiological approach to the pathology and treatment of psychiatric disorders. 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム The BRI International Symposium 2018, 2018 Feb 10-11; 新潟市.
- 3.高雄啓三. 遺伝子改変マウスの行動解析を起点とした精神疾患研究. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017; 2017 Dec 6-9; 神戸市.
- 4.北野翔平, 金子真也, 高雄啓三, 相澤康則. ノンコードゲノム領域の機能理解への Genome Architecture の試み. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017; 2017 Dec 6-9; 神戸市.
- 5.上野浩司, 高雄啓三, 末光俊介, 岡本基, 石原武士. マウス大脳皮質におけるパルブアルブミンニューロンと神経細胞周囲網の年齢に関連した変化. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017; 2017 Dec 6-9; 神戸市.
- 6.J. Borovac, T. Luyben, K. Takao, K. Okamoto. Bidirectional role of postsynaptic cAMP and cGMP in synaptic plasticity and memory. 47th Annual meeting of Society for Neuroscience; 2017 Nov 11-15; Washington DC.
- 7.T. Tanaka, K. Okuda, S. Kobayashi, M. Fukaya, K. Takao, A. Watanabe, T. Murakami, M. Hagiwara, S. Komano- Inoue, H. Manabe, M. Yamaguchi, H. Sakagami, T. Miyakawa, M. Mizuguchi, T. Manabe. CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus, and regulates seizure susceptibility, as well as emotional behaviors and memory. 47th Annual meeting of Society for Neuroscience; 2017 Nov 11-15; Washington DC.
- 8.吉田知之, 山形敦史, 田端彩子, 和泉宏謙, 城島知子, 金主賢, 深田優子, 深田正紀, 高雄啓三, 森寿, 深井周也. シナプスオーガナイザー遺伝子点変異導入マウスを用いた神経発達障害発症機構の解明. 第39回日本生物学的精神医学会第47回日本神経精神薬理学会合同年会; 2017 Sep 28-30; 札幌市.
- 9.上田(石原)奈津実, 深澤有吾, 鈴木悠大, 増田啓吾, 高雄啓三, 宮川剛, 尾藤晴彦, 木下専. 空間弁別に必要なセプチン依存的シナプス制御. 第40回日本神経科学大会; 2017 Jul 20-23; 千葉市.
- 10.田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 村上拓冬, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也. West症候群・Rett症候群の原因遺伝子CDKL5の相互作用蛋白探索と loss-of-function 解析による統合的機能解明. 第40回日本神経科学大会; 2017 Jul 20-23; 千葉市..
- 11.梅村真理子, 小倉多恵, 金子泰之, 中野春男, 高橋滋, 高雄啓三, 宮川剛, 高橋勇二. 転写因子ATF5の欠損は行動異常を引き起こす. 第40回日本神経科学大会; 2017 Jul 20-23; 千葉市.
- 12.中尾章人, 高雄啓三, 大平耕司, 宮崎直幸, 村田和義, 宮川剛. 統合失調症モデル Schnurri-2 ノックアウトマウスの歯状回顆粒細胞における三次元電子顕微鏡解析. 第40回日本神経科学大会; 2017 Jul 20-23; 千葉市.

13. 陳 以珊, 山本友美, 周 麗, 夏目里恵, 今野幸太郎, 上杉志成, 渡辺雅彦, 高雄啓三, 宮川 剛, 崎村健司, 久保義弘. オープン代謝型受容体 Prnr3 の大脳特異的ノックアウトマウスの行動解析、およびそのリガンド同定に向けた小分子ライブラリーのスクリーニング. 第 40 回日本神経科学大会; 2017 Jul 20-23; 千葉市.
14. 河合喬文, 高雄啓三, 崎村健司, 宮川 剛, 岡村康司. ミクログリアに発現する電位依存性プロトンチャネルの脳内における発現差異とその機能. 第 40 回日本神経科学大会; 2017 Jul 20-23; 千葉市.
15. Kagawa T, Yamaguchi Y, Sudo G, Kokubu Y, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Inazawa J, and Taga T. Astroglial development is regulated by DNA and histone methylation: from molecular basis to behavioral abnormalities in gene-manipulated mice. Cold Spring Harbor Asia meeting on Novel Insights into Glia Function & Dysfunction; 2016 Dec 06; China.
16. Takao K. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. 「マウスはやはりヒト炎症性疾患のモデルになる – バイオインフォマティクス的手法によるマウスモデルの再評価 –」. 第 54 回日本生物物理学会年会; 2016 Nov 25-27 ; つくば市.
17. Nakao A, Takao K, Ohira K, Miyazaki N, Murata K, Miyakawa T. Three-dimensional analysis of dendritic spines and mitochondria in dentate gyrus granule cells in Schnurri-2 knockout mice, an animal model for schizophrenia. 46th Annual meeting of Society for Neuroscience; 2016 Nov 12-16; San Diego, U.S.A.
18. Bhandari P, Parajuli LK, Takao K, Miyakawa T, Kobayashi Y, Tanaka KF, Shigemoto R. Role of R-type calcium channel (Cav2.3) in medial habenula to interpeduncular nucleus pathway. 46th Annual meeting of Society for Neuroscience; 2016 Nov 12-16; San Diego, U.S.A.
19. Yamaguchi Y, Hattori S, Takao K, Okumura Y, Suenaga S, Ishii I, Honda A, Ogawa M, Usui S, Miyakawa T. Tutorial contents on neuroinformatics platforms. 46th Annual meeting of Society for Neuroscience; 2016 Nov 12-16; San Diego, U.S.A.
20. 上野浩司, 横内美保子, 石原武士, 末光俊介, 高雄啓三, 宮川剛, 岡本基. Altered Perineuronal net expression in autistic-like behavior in FcγRIIB knockout mice. 「自閉症様行動を示す FcγRIIB 欠損マウスは Perineuronal nets の発現が変化している」. 第 39 回日本神経科学大会; 2016 Jul 20-22 ; 横浜市.
21. 村上拓冬, 奥田耕助, 小林静香, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也, 田中輝幸. 「West 症候群・ Rett 症候群の原因遺伝子 CDKL5 は後シナプス NMDA 受容体局在を制御し、記憶・学習、情動、易癒癲性を調節する」. 第 39 回日本神経科学大会 ; 2016 Jul 20-22 ; 横浜市.
22. 大橋りえ, 高雄啓三, 宮川 剛, 椎名伸之. 「RNG105 ヘテロマウスの網羅的行動解析—社会的相互作用・新奇対象への反応の低下」. 第 39 回日本神経科学大会 ; 2016 Jul 20-22 ; 横浜市.
23. 高雄啓三. 「マウスモデルを用いた統合失調症研究の可能性」. 第 39 回日本神経科学大会, 2016 Jul20-22 ; 横浜市.
24. Satoko Hattori, Hirotaka Shoji, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa. Mouse Behavioral Phenotype Database. INCF Japan International Workshop: Advances in Neuroinformatics ; 2016 May 28-29 ; 和光市.
25. 高雄啓三. Brain-behavior phenotyping of genetically engineered mice in research of psychiatric disorders. 「遺伝子改変マウスの表現型解析を起点とした精神疾患研究」. 第 93 回日本生理学会大会, 2016 Mar22-24 ; 札幌市
26. 大橋りえ, 高雄啓三, 宮川 剛, 椎名伸之. 「RNG105 ヘテロマウスの網羅的行動解析—社会的相互作用・新奇対象への反応の低下」. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学大会合同大会), 2015 Dec1-4; 神戸市.
27. Takao K, Shoji H, Hattori S, Miyakawa T. The effect of the time of day on mice behaviors measured in a comprehensive behavioral test battery. INCF Japan International Workshop: Advances in Neuroinformatics 2015, 2015 Nov26-27; 東京.
28. Tanaka T, Okuda K, Kobayashi S, Murakami T, Fukaya M, Takao K, Watanabe A, Hagiwara M, Mizuguchi M, Sakagami H, Miyakawa T, Manabe T. Functional analyses of the CDKL5, a causative gene for severe neurodevelopmental disorders accompanied by intractable epilepsies. 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2015 Oct17-21; Chicago.
29. Koshimizu H, Hagihara H, Ohira K, Takao K, Miyakawa T. Transcriptomic 'hyper-maturity' of the hippocampus in mice. 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2015 Oct17-21; Chicago.
30. Takao K, Shoji H, Hattori S, Miyakawa T. Effect of time-of-day on mouse behavior measured in a comprehensive behavioral test battery. 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015 Oct17-21; Chicago.
31. Yamaguchi Y, Kashioka H, Miyakawa T, Takao K, Kanzaki R, Ikeno H, Furuichi T, Okamura-Oho Y, Satoh S, Iijima T, Kakei S, Wagatsuma H, Hayashi Y, Nomura T, Isono Y, Okumura Y, Suenaga S, Ishii I, Honda A, Usui S. Data, tools and models of neuroscience on J-Node neuroinformatics platforms. 2015 Oct17-21; Chicago.
32. 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 村上拓冬, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊 紀, 萩原 舞, 阪上洋行, 水口 雅, 宮川 剛, 真鍋俊也. CDKL5 controls NMDA receptor function and regulates learning/memory, emotion and seizure susceptibility. 「West 症候群・ Rett 症候群の原因遺伝子 CDKL5 は、NMDA 受容体機能を制御し、記憶・学習、情動、易癒癲性を調節する」, 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会. 2015 Sep24-26; 東京.
33. 小清水久嗣, 萩原英雄, 大平耕司, 高雄啓三, 宮川 剛. Transcriptomic "hyper-maturity" of the hippocampal dentate gyrus in mice.

- 「マウス海馬歯状回における「過成熟」現象」第38回日本神経科学大会, ゲノム・神経科学的アプローチによる精神疾患のバイオマーカー開発-基礎-臨床連携シンポジウム, 2015 Jul28-31; 神戸市.
34. 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊 紀, 村上拓冬, 萩原舞, 阪上洋行, 水口 雅, 宮川 剛, 真鍋俊也. CDKL5 controls NMDA receptor function and regulates memory, emotion and seizure susceptibility. 「West 症候群・Rett 症候群の原因遺伝子 CDKL5 は、NMDA 受容体機能を制御し、記憶・学習、情動、易痙攣性を調節する」, 第38回日本神経科学大会, 2015 Jul28-31; 神戸市.
35. 上田(石原) 奈津実, 増田博紀, 真野善有, 澤田明宏, 矢野夢生, 高雄啓三, 宮川 剛, 重本隆一, 深澤有吾, 木下 専. Analysis of septin mutant mice with impaired spatial recognition. 「空間認知機能障害を呈するセプチン欠損マウスの解析」, 第38回日本神経科学大会, 2015 Jul28-31; 神戸市.
36. 高雄啓三. Brain-behavior phenotyping of genetically engineered mice in research of psychiatric disorders. 「遺伝子改変マウスの表現型解析を起点とした精神疾患研究」, 第38回日本神経科学大会, ゲノム・神経科学的アプローチによる精神疾患のバイオマーカー開発-基礎-臨床連携シンポジウム, 第38回日本神経科学大会, 2015 Jul28-31; 神戸市.
37. 上野浩司, 岡本 基, 高雄啓三, 宮川 剛. FcyIIB deficient mice showed hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. 「FcyIIB 欠損マウスは多動, 不安様行動の減少を示す」, 第38回日本神経科学大会, 2015 Jul28-31; 神戸市.

佐藤正晃

1. 佐藤 正晃 「マウス空間行動中の海馬神経回路ダイナミクス」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会・合同大会シンポジウム「各種モデル動物における記憶過程の可視化」、2015年3月、神戸
2. 佐藤 正晃 「バーチャル環境下のマウス脳活動イメージング: 記憶回路の動作原理の解明と疾患研究への応用可能性」包括脳ネットワーク冬のシンポジウム「新学術領域研究「マイクロ精神病態」「記憶ダイナミズム」2領域合同若手シンポジウム」、2014年12月、東京
3. 佐藤 正晃 「バーチャルリアリティにおけるマウスの空間行動」第37回日本神経科学大会シンポジウム「脳の現実感を操作するーげっ歯類の神経科学におけるバーチャルリアリティの可能性」、2014年9月、横浜

遠藤昌吾

1. Yusuke Kishimoto, Shuichi Yanai, Shogo Endo, Takaaki Akaike, Hideshi Ihara. The effect of 8-nitro-cGMP on SNARE complex assembly and memory, 第60回日本神経化学大会, 仙台, 2017.09.07-09.09.
2. Shuichi Yanai, Jun Toyohara, Kichi Ishiwata, Tomoko Arasaki, Shogo Endo. Cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, improves blood-brain barrier integrity and ameliorates memory decline in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). 第40回日本神経科学大会, 千葉, 2017.07.20-07.23.
3. Suichi Yanai, Tomoko Arasaki, Shogo Endo. Cilostazol administration ameliorates the impaired conditioned fear in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). 第40回日本基礎老化学会大会, 名古屋, 2017.06.14-06.16.
4. Fujiya Gomi, Yoko Uchida, Shogo Endo. Is Cst-3 p3 peptide a candidate for a CSF biomarker of Alzheimer's disease? 第40回日本基礎老化学会, 名古屋, 2017.06.14-06.16
5. 遠藤昌吾, cAMP系増強薬と記憶障害の治療ー既存薬再開発の応用ー(特別講演)、OYC バイオシンポジウム「老化と加齢性疾患」、東京、2017.06.06.
6. 柳井修一、新崎智子、遠藤昌吾、シロスタゾール投与マウスを用いたPRECISEによる行動解析. TOBIRA第6回研究交流フォーラム, 東京, 2017.05.12.
7. 遠藤昌吾、新崎智子、藤井重元、赤池孝章、8-ニトロ-cGMPによるホスホジエステラーゼの阻害効果、第39回日本分子生物学会、横浜、2016年1130-1202
8. 五味不二也、内田洋子、遠藤昌吾、 β -アミロイドによって発現誘導されるcalsyntenin-3の γ 切断産物 (p3 peptide)はアルツハイマー病髄液バイオマーカーとなりうるか?、第39回日本分子生物学会、横浜、2016年1130-1202
9. 五味不二也、遠藤昌吾、内田洋子、Up-regulation of NSP3 by oligomeric A β accelerates neuronal death through Cas-independent Rap1A activation. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年0720-0722
10. 柳井修一、豊原潤、石渡喜一、新崎智子、遠藤昌吾、 Long-term administration of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, enhances memory functions and cerebral glucose metabolism in aged mice. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年0720-0722
11. 柳井修一、新崎智子、遠藤昌吾、老化促進モデルマウスSAMP8における記憶、学習機能の評価、第31回SAM研究発表会、京都、2016年0709-0710
12. 柳井修一、新崎智子、遠藤昌吾、老化に伴う認知機能低下に対するシロスタゾールとドネペジルの併用効果、第39回日本基礎老化学会大会、伊勢原、2016年0527-0528

13. Jun Toyohara, Muneyuki Sakata, Kenji Ishibashi, Kei Wagatsuma, Kentaro Hatano, Shuichi Yanai, Shogo Endo, Kenji Ishii, Kiichi Ishiwata. Preclinical and first-in-man studies of imidazopyridineacetamide, [¹¹C]CB184, as a novel 18 kDa translocator protein seeker. Society of nuclear medicine and molecular imaging 2016 annual meeting. San Diego, 2016年0611-0616.
14. Shuichi Yanai, Kai Kojima, Tomoko Arasaki, Shogo Endo. Cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, as a potential therapeutic target for the treatment of dementia. 31st International Congress of Psychology. Yokohama, 2016年0724-0729.
15. Yusuke Kishimoto, Suhichi Yanai, Shogo Endo, Takaaki Akaike, Hideshi Ihara. Effect of 8-nitro-cGMP on hippocampus-dependent long-term memory in mice. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide. Sendai, 2016年0520-0522
16. 柳井修一、新崎智子、遠藤昌吾、行動解析を用いたホスホジエステラーゼ3阻害剤シロスタゾールの記憶改善効果の評価、首都大学東京バイオコンファレンス2015、東京、2015年1106
17. 高橋経太、柳井修一、下門顕太郎、遠藤昌吾、新井洋由、石神 昭人、SMP30/ α TTP-ダブルノックアウトマウスを用いたアスコルビン酸および α -トコフェロール欠乏が及ぼす不安、学習、運動機能への影響、日本心理学会第79回大会、名古屋、2015年0922-0924
18. Shuichi Yanai, Kai Kojima, Tomoko Arasaki, Shogo Endo, Long-term administration of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, prevents memory decline in aged mice models., 第38回日本神経科学大会、神戸、2015年0728-0731
19. 柳井修一、新崎智子、遠藤昌吾、老化に伴う認知機能低下に対するホスホジエステラーゼ3阻害剤cilostazolの効果、第38回日本基礎老化学会大会、横浜、2015年0612-0614
20. 遠藤昌吾、記憶改善薬のスクリーニングとSAM、第29回SAM研究協議会研究発表会、特別講演、東京、2014年7月5日
21. 柳井修一、小島開、新崎智子、遠藤昌吾、PDE3阻害剤シロスタゾールによる老化促進モデルマウスの記憶障害改善効果。第37回日本神経科学大会、神奈川、2014.9.11-13
22. 柳井修一、小島開、新崎智子、遠藤昌吾、SAMP8マウスにおけるホスホジエステラーゼ阻害剤cilostazolの恐怖記憶改善効果。第37回日本基礎老化学会大会、愛知、2014.6.26-27
23. Shuichi Yanai, Kai Kojima, Tomoko Arasaki, Shogo Endo, Maintenance of memory functions by chronic administration of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, in aged mice models. Neuroscience 2014, Washington DC, 2014.11.15-19

和多和宏

1. 和多和宏 「鳴禽類ソングバードの種特異的発声パターン生成の神経分子基盤」日本進化学会、2017年8月25日、京都 京都大学
2. 和多和宏 「自発的行動に起因する発声学習表現型の個性創発の神経分子基盤」日本分子生物学会（生命科学系学会合同年次大会）、2017年12月6日、神戸 神戸コンベンションセンター
3. 早瀬 晋、大串 恵理、小林 雅比古、和多和宏 「自発的な発声経験により制御されるソングバードの発声学習臨界期と脳内遺伝子 発現制御」日本神経科学会、2016年7月20日、横浜 横浜国際コンベンションセンター
4. Wada K., Sawai A. Predisposition of vocal learnability in hybrid songbirds. Workshop on Evo-Devo of Vocal Learning and Plasticity, 2016年7月31日、東京 東京大学駒場キャンパス
5. 和多和宏 「発声による脳内遺伝子発現コントロール：行動と進化を結ぶエピジェネティクス」日本進化学会、2016年8月25日、東京 東京工業大学
6. Hayase S., Wada K. Accumulation of vocal experience regulates the critical period of vocal learning in songbirds. NIPS International Symposium, 2016年12月6日、岡崎 生理学研究所

青西亨

1. 斎藤佑馬、伊東翼、太田桂輔、村山正宣、青西亨 「制限ボルツマンマシンによる多細胞信号の検出」ニューロコンピューティング研究会、電子情報通信学会技術研究報告、Vol. 117, No. 508, pp. 3-8, 2018年3月、機械振興会館。
2. 勝又雄基、青西亨 「効用の予測誤差を考慮した合理的な意思決定 ～ 判別閾値の最適化モデル～」ニューロコンピューティング研究会、電子情報通信学会技術研究報告、Vol. 117, No. 231, pp. 37-42, 2017年10月、大阪電気通信大学。
3. 青西亨、平田岳史、桑谷立、藤本万寿人、常青、木村純一「レーザーアブレーション ICP-MS でナノ粒子を捉える —データ駆動科学による計測限界の突破—」地球化学会年会、2017年9月、東京工業大学。
4. 森田大樹、中本竣、森本高子、青西亨 「ハエ動き検知細胞が構成する両側ネットワークの安定性解析、ニューロコンピューティング研究会」電子情報通信学会技術研究報告、Vol. 117, No. 109, pp. 109-114, 2017年6月、沖縄科学技術大学院大学。
5. Uefune F, Sonoda Y, Sakano D, Aonishi T. Kume S. 「Role of vesicular monoamine transporter 2 in insulin secretion」日本発牛生物学会第50回大会、2017年5月、タワーホール船堀。

6. 印南賢弥, 井上雅司, 宮川博義, 青西亨「ラット海馬 CA1 錐体細胞は低周波(1 - 4 Hz)交流電場に膜電位応答の選好性を示す」ニューロコンピューティング研究会, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 116, No. 521, pp. 137-142, 2017年3月, 電気通信大学.
7. 池田英彬, 青西亨「半波整流器を持つ EMD モデルの白色ノイズ解析」ニューロコンピューティング研究会, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 116, No. 424, pp. 19-24, 2017年1月, 九州工業大学.

山中章弘

1. 山中章弘. 起きるべきか?、寝るべきか?、それが問題だ. 第二回名古屋リズム研究会, 2018年3月22日, 名古屋.
2. 山中章弘. 光遺伝学、薬理遺伝学による特定神経活動操作を用いた睡眠覚醒、リズム研究. 時間学特別セミナー, 2018年2月8日, 山口.
3. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 第70回九州精神神経学会 第63回九州精神医療学会, 2018年1月25日, 宮崎.
4. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学を用いた神経活動操作と行動制御. 光量子工学研究領域セミナー, 2017年12月15日, 和光.
5. 山中章弘. シングルセル解析による本能行動に関わる視床下部神経回路の機能解明. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年12月7日, 神戸.
6. 山中章弘. 光遺伝学・光生理による睡眠覚醒と記憶の制御メカニズム解明. 日本比較生理生化学会 第39回福岡大会 シンポジウム「動物と光: 光生理学と光遺伝学」, 2017年11月25日, 福岡.
7. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒・記憶・代謝内分泌調節. 第42回日本比較内分泌学会シンポジウム 「摂食とエネルギー代謝研究の最前線」, 2017年11月19日, 奈良.
8. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 第6回世田谷クリニカルフォーラム, 2017年10月23日, 東京.
9. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 香川県睡眠治療セミナー, 2017年10月20日, 高松.
10. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠と記憶の制御. 第47回日本神経精神薬理学会, 2017年9月28日, 札幌.
11. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた睡眠覚醒調節メカニズムの解明. 第47回日本小児神経学会小児神経学セミナー, 2017年9月17日, 府中.
12. 山中章弘, 向井康敬. オレキシン神経に対するドーパミンの長期的作用の解析. 第52回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 2017年9月9日, 横浜.
13. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学の開発. 第4回包括的緩和医療科学学術研究会・第5回Tokyo 疼痛緩和次世代研究会 合同研究会, 2017年8月27日, 東京.
14. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒調節と記憶の制御. 第40回日本神経科学大会, 2017年7月20日, 千葉.
15. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. SLEEP SYMPOSIUM 2017, 2017年7月12日, さいたま.
16. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. Tochigi Insomnia研究会2017, 2017年7月11日, 宇都宮.
17. 山中章弘. アップコンバージョンを用いたファイバーレス光遺伝学の開発と応用. 第二回ルミノジェネティクス研究会, 2017年6月26日, 箱根.
18. 山中章弘. 特定神経活動操作で迫る. 代謝疾患フォーラム2017, 2017年6月20日, 仙台.
19. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた睡眠覚醒と記憶の制御: メカニズム解明. 第64回日本実験動物学会総会, 2017年5月25日, 福島.
20. 山中章弘. 技術革新が切り拓く最新神経科学研究. 星薬科大学薬理学教室 平成29年度同門会学術セミナー, 2017年5月21日, 東京.
21. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた睡眠覚醒と記憶の制御. 島根大学大学院セミナー, 2017年5月11日, 出雲.
22. 山中章弘. 視床下部神経による摂食代謝・睡眠覚醒・記憶の制御. 第27回日本行動神経内分泌研究会, 2017年4月29日, 瀬戸内.
23. 山中章弘. オレキシン神経活動の操作と記録～摂食行動-睡眠覚醒調節における役割の解明～. 第15回桜山睡眠研究会, 2017年4月27日, 名古屋.
24. 山中章弘. 視床下部神経活動の記録と操作による睡眠覚醒と記憶の制御機構の解明. 第94回日本生理学会大会, 2017年3月28日, 浜松.
25. 山中章弘. 視床下部神経細胞の活動記録と活動操作. 第90回日本薬理学会年会 シンポジウム 25 脳神経疾患のセルアセンブリ解析と神経活動制御研究の最先端, 2017年3月17日, 長崎.
26. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒調節のメカニズム, 第78回原研研究集会, 2017年3月15日, 長崎.

27. 山中章弘. 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた神経活動操作による睡眠覚醒制御と記憶制御. 新潟脳神経研究会特別例会, 2017年2月28日, 新潟.
28. 山中章弘. 睡眠障害モデルマウス作成と機能解析. 都医学研プロジェクトセミナー, 2016年2月15日, 東京.
29. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒と記憶の制御, 都医学研セミナー, 2016年2月15日, 東京.
30. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠と記憶の制御. 神戸大学医学研究科薬理学分野講演会, 2017年2月14日, 神戸.
31. Yamanaka A. Regulatory mechanism of sleep/wakefulness and memory. The BRI International Symposium 2018 "The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models", 2018年2月11日, Niigata, Japan.
32. 山中章弘. 神経ペプチドによる睡眠と記憶の制御. 第2回名古屋大学ーラクオリア創薬 創薬シンポジウム, 2016年12月8日, 名古屋.
33. Yamanaka A. Regulatory mechanism of sleep/wakefulness by the hypothalamic neuropeptide-producing neurons. 120th WPI-IIIS Seminar, 2017年12月4日, Tsukuba, Japan.
34. 山中章弘. 社会性に関わる神経への入力経路同定と回路機能解析. 平成28年度生理研研究会・第6回社会神経科学研究会「社会の成り立ちを支える内分泌学」, 2016年11月24日, 岡崎.
35. 山中章弘. 視床下部神経細胞による睡眠覚醒、睡眠関連機能の調節メカニズム. 第23回日本時間生物学会学術大会, 2016年11月13日, 名古屋.
36. 山中章弘. 様々な神経活動操作法による生理機能の解明. 第10回骨・軟骨フロンティア, 2016年11月5日, 東京.
37. Yamanaka A. Regulatory mechanism of sleep and memory by the hypothalamic neurons. World Sleep, 2017年10月9日, Prague, Czech Republic.
38. Yamanaka A. Generation of sleep disorder model mice by ablation of specific types of neurons. World Sleep, 2017年10月9日, Prague, Czech Republic.
39. Yamanaka A. The physiological role of orexinergic neurons in the regulation of sleep wakefulness, pain and metabolism. International Conference of Sleep Medicine and Research (ISSR 2017), 2017年9月22日, Goa, India.
40. 山中章弘. オレキシン受容体拮抗薬とベンゾ系・非ベンゾ系薬との作用メカニズムの違いについて. 高齢者不眠症セミナー, 2016年9月7日, 名古屋.
41. 山中章弘, 犬東 歩, 山下 哲, 田口 徹. 本能行動調節を目指す創薬・医療薬理. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016, 2016年8月24日, 仙台.
42. 山中章弘. ファイバーレス光遺伝学開発と睡眠覚醒・記憶操作への応用. ルミノジェネティクス研究会, 2016年7月23日, 熱海.
43. 山中章弘, 犬東 歩, 山下 哲, 田口 徹. ファイバーフォトメトリを用いた視床下部オレキシン神経活動の記録. 第39回日本神経科学大会 シンポジウム「ファイバーフォトメトリを用いた行動中動物の脳深部神経活動記録」, 2016年7月22日, 横浜.
44. 山中章弘. 視床下部神経による睡眠覚醒と記憶の制御メカニズム. 広島大学インキュベーション研究拠点「本能行動の発現メカニズムに関する総合科学研究推進拠点—大学生の生活習慣及び科学リテラシーの確立へ向けて—」, 2016年6月16日, 広島.
45. 山中章弘. オレキシンとは? 睡眠覚醒調節における役割について. 長岡不眠症フォーラム, 2016年4月19日, 長岡.
46. Yamanaka A. Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory. The 5th Annual IIS Symposium, 2016年12月12日, Tokyo, Japan.
47. Yamanaka A. Good Sleep: Relief from Sleep Disorder. Fifteenth Japanese-American Kavli Frontiers of Science Symposium, 2016年12月4日, Irvine, California, U.S.A.
48. Yamanaka A. Hypothalamic melanin concentrating hormone (MCH) neurons inhibiting memory formation during sleep. Neuroscience 2016, 2016年11月18日, San Diego, California, U.S.A.
49. Yamanaka A. Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory. CNS Collaborators Day 2016 "Emerging Techniques", 2016年9月22日, Adelaide, Australia.
50. Yamanaka A. The role of hypothalamic peptidergic neurons in the regulation of brain states. 10th FENS Forum of Neuroscience 2016 年7月3日, Copenhagen, Denmark.
51. Yamanaka A. Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory. Mount Sinai seminar, 2017年6月9日, New York, NY, U.S.A.
52. Yamanaka A. Hypothalamic neurons erase memory during sleep. New York University Seminar, 2017年6月8日, New York, NY, U.S.A.
53. Yamanaka A. Optogenetics and pharmacogenetics reveals regulatory mechanism of sleep/wakefulness and memory. Cell biology and systems biology course meeting, 2017年4月21日, Kyoto.

森郁恵

1. Kondo, R., Jurado, P., Aoki, I., Nakano, S., Mori, I. “Learning, memory and decision-making in *C. elegans* thermotaxis” 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」平成 29 年度班会議、2018 年、富山
2. 塚田祐基, 森郁恵 「線虫を用いた感覚-介在神経細胞間の単一シナプスレベル機能解析」生命科学系学会合同年次大会、2017 年、神戸
3. Aoki, I., Tateyama, M., Shimomura, T., Ihara, K., Kubo, Y., Mori, I. “BK potassium channels regulate learning speed in *C. elegans*” 第 48 回生理研国際シンポジウム (国際学会)、岡崎
4. 塚田祐基, 森郁恵 「温度受容神経細胞のシステム同定と温度環境の再構築」第 60 回自動制御連合講演会、2017 年、調布
5. Aoki, I., Tateyama, M., Shimomura, T., Ihara, K., Kubo, Y., Mori, I. “BK potassium channels regulate learning speed in *C. elegans*” 内藤記念科学振興財団第 44 回内藤コンファレンス、2017 年、札幌
6. Ikeda, M., Nakano, S., Giles, A. C., Mori, I. “Information Flow through Local Neural Circuits that Integrate Sensory Input and Behavioral Output during a *C. elegans* Navigation Behavior” 第 40 回日本神経科学大会、2017 年、幕張
7. Tsukada, Y., Mori, I. “Functional analysis of ipsilateral neuronal connection at synaptic level” 第 40 回日本神経科学大会、2017 年、幕張
8. Matsuyama, J.H., Tsukada, Y., Mori, I. “Neural mechanisms underlying behavioral switching among exploitation and exploration modes in the nematode *C. elegans*” 第 40 回日本神経科学大会、2017 年、幕張
9. Aoki, I., Tateyama, M., Shimomura, T., Ihara, K., Kubo, Y., Mori, I. “BK potassium channels regulate learning speed in *C. elegans*” 第 40 回日本神経科学大会、2017 年、幕張
10. Ikeda, M., Nakano, S., Giles, A. C., Mori, I. “Identification and analysis of multifunctional neurons in a *C. elegans* thermotaxis behavior” 21st International *C. elegans* Conference (国際学会)、2017 年、Los Angeles
11. Matsuyama, J.H., Tsukada, Y., Mori, I. “Neural mechanisms underlying behavioral switching in thermotaxis of *C. elegans*.” 21st International *C. elegans* Conference (国際学会)、2017 年、Los Angeles
12. Tsukada, Y., Mori, I. “Laser axotomy and optogenetics for functional analysis of ipsilateral neuronal connection at synaptic level.” 21st International *C. elegans* Conference (国際学会)、2017 年、Los Angeles
13. Nakano, S., Ikeda, M., Giles, A. C., Suzuki, T., Sano, A., Kondo, R., Higashiyama, T., Mori, I. “The *C. elegans* MAST Kinase Acts through Stomatin and Diacylglycerol Kinase to Regulate Thermotaxis Behavior” 21st International *C. elegans* Conference (国際学会)、2017 年、Los Angeles
14. Aoki, I., Tateyama, M., Shimomura, T., Ihara, K., Kubo, Y., Mori, I. “BK potassium channels regulate learning speed in *C. elegans*” 21st International *C. elegans* Conference (国際学会)、2017 年、Los Angeles
15. 森郁恵 「線虫行動と神経回路の包括的解析から記憶、学習、意思決定のメカニズムを探る」第 34 回日本生理心理学会大会 (基調講演)、2016 年 05 月 14 日、名古屋
16. Ikuo Mori “Unveiling principle of neural circuits underlying learning, memory and decisionmaking” Sciece Lecture at Department of Life Sciences, Pekin University (基調講演)、2016 年 05 月 27 日、Pekin University, Beijin
17. Ikeda M., Nakano S., Giles A. C., Mori I. “Local Neural Circuits Integrating Sensory Input and Behavioral Output during a *C. elegans* Navigation Behavior” 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 07 月 20 日、横浜
18. Aoki I., Ihara K., Mori I. “Epilepsy-related mutations in SLO-2 BK potassium channel slow down a behavior change in *C. elegans*” *C. elegans* Topic Meeting Ce Neuro2016 (国際学会)、2016 年 07 月 27 日、名古屋
19. Aoki I., Tateyama M., Shimomura T., Ihara K., Mori I. “Epilepsy-related mutations in SLO-2 K+ channel slow down learning speed in *C. elegans*.” 生理学研究所国際研究集会“Towards elucidation of memory engram” (国際学会)、2016 年 12 月 05 日、岡崎
20. Matsuyama J. H., Tsukada Y., Tsukamoto S., Yamao M., Honda N., Ishii S., Mori I. “Neural mechanisms underlying behavioral switching among exploitation and exploration modes in the nematode *C. elegans*” 定量生物学の会 第 8 回年会、2017 年 01 月 08 日、岡崎

高宮考悟

1. Munal Babu Kandel, Kogo Takamiya, 「N-glycosylation sites are essential for proper tetramer formation and cell surface expression of AMPA-type glutamate receptor」, 第 40 回日本神経科学大会 2017 年 07 月 20 日、幕張
2. Yoshihiko Wakazono, Kogo Takamiya, 「N-glycosylation of AMPA receptor regulates its membrane distribution and channel property」 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 03 月 28 日、浜松
3. Kogo Takamiya, 「A novel regulatory mechanism of synaptic plasticity mediated by AMPA-type glutamate receptor glycosylation」 2016 International Symposium on Neurodegenerative Diseases & the 43rd Annual Conference of Japan Brain Sciences Society, 2016 年 11 月 10 日、中国 西安

4. Munal Babu Kandel, Kogo Takamiya, 「Two N-glycosylation sites regulate cell surface expression of AMPA-type glutamate receptor in neurons」第67回西日本整理学会 2016年10月7日、鹿児島
5. 緑川良介, 高宮考悟 「N型糖鎖修飾による AMPA 受容体チャンネル機能の制御機構」第39回 日本神経学会大会、2016年7月20日、横浜
6. 若園佳彦, 高宮考悟 「AMPA 受容体の N 型糖鎖修飾はシナプス可塑性に重要な役割を担う」第39回 日本神経学会大会、2016年7月20日、横浜

竹本研

1. Takemoto K and Takahashi T “Complex-specific optical inactivation of neurotransmitter receptors for memory decoding” 第40回 日本神経学会、2017年7月22日、幕張
2. Takemoto K and Takahashi T “Complex-specific optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory” 第40回 日本分子生物学会、2017年12月9日、神戸

掛川渉

1. 掛川 渉, 柚崎通介 「A novel D-serine signaling for synaptic plasticity and motor learning.」新学術領域研究「記憶ダイナミズム」班会議、2018年3月6日、富山
2. Kakegawa, W., Yuzaki, M. 「A novel D-serine signaling which underlies synaptic plasticity and motor learning in the cerebellum」第39回日本生物学的精神医学会シンポジウム、2017年9月30日、札幌
3. Kakegawa, W. 「Synergistic action of two different GluD2 ligands on D-serine signaling in the cerebellum.」The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research、2017年7月13日、イタリア
4. 掛川 渉 「シナプス分子群がもたらす運動記憶ダイナミズムの解明.」新学術領域研究次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム、2016年12月21日、東京
5. 掛川 渉, 柚崎通介 「A novel D-serine signaling for synaptic plasticity and motor learning.」新学術領域研究「記憶ダイナミズム」班会議、2016年6月28日、掛川

川口真也

1. 川口真也 「Regulatory mechanism of transmitter release in a small presynaptic terminal」日本神経学会、2017年7月22日、横浜市
2. 川口真也 「Experimental and model analysis of transmitter release mechanisms at small presynaptic terminals in the CNS」日本生理学会、2017年3月30日、浜松市

深井朋樹

1. Tomoki Kurikawa, Takashi Handa, Tomoki Fukai 「Instability of neural trajectories in medial frontal cortex predicts individual differences in perceptual decision making」Neuroscience 2017 (SfN's 47th annual meeting)、2017年11月12日、Washington D.C., USA
2. 栗川 知己, 深井 朋樹 「場所記憶の想起における海馬一嗅内皮質間の動的通信機構：計算モデル Dynamic communications between CA1 and MEC during spatial working memory: computational model」第40回日本神経学会大会、2017年7月20日、千葉県幕張メッセ
3. Tomoki Kurikawa, Tomoki Fukai 「A hippocampal-entorhinal microcircuit model for dynamic communication in a memory-based navigation task」Neuroscience 2016 (SfN's 46th annual meeting)、2016年11月13日、San Diego, USA
4. 栗川 知己, 深井 朋樹 「新規聴覚刺激に対する応答の個体差の神経機構 A mechanism underlying individual difference of susceptibility to novel auditory stimuli」第39回日本神経学会大会、2016年7月22日、パシフィコ横浜
5. Tomoki Kurikawa, Tomoki Fukai 「A hippocampal-entorhinal microcircuit model for adaptive communication through theta and gamma rhythms in a memory-based navigation task」Modeling Neural Activity: Statistics, Dynamical Systems, and Networks、2016年6月22日、Waikoloa, Hawaii, USA

檀上輝子

1. Teruko Danjo, Shigeyoshi Fujisawa, ‘Spatial representations of self and other in the hippocampus’, Society for Neuroscience, 2017年11月11日、Washington D.C., USA
2. Teruko Danjo, ‘Neuronal representations of other’s place in the hippocampus’, 2nd Annual Conference of Neuroscience Society of Nepal, 2017年5月3日、National Academy of Science and Technology, Nepal

3. Teruko Danjo, ‘Spatial representations of self and other in the hippocampus’, NIPS international conference 2016 “Towards elucidation of memory engram”, 2016 年 12 月 5 日, Okazaki, Japan
4. Teruko Danjo, Shigeyoshi Fujisawa, ‘Spatial representations of self and other in the hippocampus’, Society for Neuroscience, 2016 年 11 月 13 日, San Diego, USA
5. Teruko Danjo, Shigeyoshi Fujisawa, ‘Neural representations of other’s place-related information’, Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016 年 7 月 21 日, Yokohama, Japan

Joshua Johansens

1. Joshua Johansens “Brain circuits for adaptive control of emotional learning & memory” *Mount Sinai Seminar Series Invited Talk* May, 2018 (New York, USA)
2. Joshua Johansens “Brain circuits for triggering and reversing emotional memories” *Albert Einstein Medical School Invited Talk* January, 2018 (New York, USA)
3. Joshua Johansens “Feedforward and feedback circuits for instructing and calibrating fear learning” *Winter Conference on Brain Research Symposium* January, 2018 (*Chair*, Whistler, Canada)
4. Joshua Johansens “Feedback circuits for calibrating aversive learning signals” *Society for Neuroscience Meeting Symposium* November, 2017 (*Chair*, Washington D.C., USA)
5. Joshua Johansens “Brain circuits for triggering and reversing emotional memories” *Massachusetts Institute of Technology Invited Talk* September, 2017 (Boston, Massachusetts)
6. Joshua Johansens “Brain circuits for triggering and reversing emotional memories” *New York University Invited Talk* September, 2017 (New York, USA)
7. Joshua Johansens “Teaching the Brain to Fear” *Hokkaido University Summer School Invited Lecturer* August, 2017 (Sapporo, Japan)
8. Joshua Johansens “Distinct Noradrenaline Cell Populations Coordinate Emotional and Flexible Learning States” *Gordon Conference: Amygdala in Health and Disease Invited Talk* August, 2017 (Massachusetts, USA)
9. Joshua Johansens “Distinct Noradrenaline Cell Populations Coordinate Emotional and Flexible Learning States” *University of California, San Francisco Invited Talk* February, 2017 (San Francisco, USA)
10. Joshua Johansens “Brain Circuits for triggering and reversing emotional memories” *Boston University Invited Talk* January, 2017 (Boston, USA)
11. Joshua Johansens “Meta-organization in the locus coeruleus noradrenaline system coordinates emotional and flexible learning states” *Arrowhead 10 years on: What have we learned and what is there still to learn about the neural bases of decision-making? Invited Talk* December, 2016 (Sydney, Australia)
12. Joshua Johansens “Multiplexed signaling across distinct noradrenaline cell populations coordinates opposing emotional learning functions” *Nature Conference: Neural Circuitry of Emotion Invited Talk* Nov, 2016 (Shenzhen, China)

林康紀

1. M. Sato, K. Mizuta, T. Islam, M. Kawano, T. Takekawa, D. Gomez-Dominguez, H. Yamakawa, M. Ohkura, T. Fukai, J. Nakai, Y. Hayashi, Cellular mechanisms for the formation and plasticity of hippocampal cognitive maps, Annual Meeting of Society for Neuroscience Nov 11-15, 2017, Washington, DC, USA.
2. Y. Hayashi, Dynamic embedding of salience coding in hippocampal spatial maps, 記憶ダイナミズム領域会議, Mar. 7, 2018
3. K. Mizuta, M. Sato, Y. Sekine, M. Kawano, T. Islam, R. Takamura, T. Takekawa, M. Ohkura, T. Fukai, J. Nakai, Y. Hayashi Reward event representation in hippocampal CA1 cell ensemble. Annual Meeting of Japan Society for Neuroscience Jul. 20-23, 2017, Makuhari
4. M. Osanai, N. Ohkawa, K. Sakamoto; H. Miwa, S. Kikuta, A. Tamura, M. Sato, M. Ohkura, T. Kojima, Y. Kohmura, J. Nakai, Y. Hayashi, Y. Yanagawa, K. Inokuchi, N. Homma, H. Mushiake Ultra-thin fluorescence endoscope imaging system for functional brain imaging Annual Meeting of Japan Society for Neuroscience Jul. 20-23, 2017, Makuhari

水関健司

1. Kenji Mizuseki 「Regulation of neuronal excitability by REM sleep」 Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, “Principles of memory dynamism elucidated from a diversity of learning systems”, 2018 年 3 月 7 日、富山
2. Kenji Mizuseki 「Temporal coordination of neuronal activity in the entorhinal-hippocampal loop」 The 4th CiNet Conference - Functional and anatomical connectivity, Center for Information and Neural Networks (CiNet) 、2018 年 2 月 28 日、吹田

- 3.北西卓磨、馬場良子、水関健司 「Hippocampal information outflow via subiculum: in vivo recording and anatomical tracing」 新
学術領域「行動適応を担う脳神経回路の機能シフト機構」領域会議、2017年12月18日、東京
- 4.水関健司 「睡眠時における海馬の情報処理機構」 日本睡眠学会「シンポジウム睡眠神経科学の最前線」、2017年6月
29日、横浜
- 5.Kenji Mizuseki 「Information processing in the entorhinal-hippocampal circuit」 National Institute for Physiological Sciences
International Symposium "Towards elucidation of memory engram"、2016年12月5日、岡崎
- 6.水関健司 「海馬・嗅内皮質の情報処理機構」 日本麻酔科学会第62回関西支部学術集会特別講演、2016年9月3日、大
阪
- 7.Kenji Mizueki 「Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers」、日本神経科学学会シンポジウム「ネッ
トワークを基盤とした海馬と海馬関連領域のクロストーク」、2016年7月20日、横浜

2.3.3 図書

<計画研究>

齊藤実

- 1.平野恭敬、齊藤実 (2017) 高次脳機能に関わる転写因子、東京化学同人、「基礎分子生物学Ⅱ：遺伝子発現制御機構—クロマチン、転写制御、エピジェネティクス—」、18章1節
- 2.長野慎太郎、齊藤実 (2016) ショウジョウバエだから分かる学習記憶のメカニズム、医学書院、「生体の科学 67(1)」、13-16.
- 3.齊藤実、堀内純二郎、山崎大介 (2015) 加齢による記憶力の低下とグリア細胞、中外医学社、「Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学 33(9)」、1084-5.
4. Hirano Y, Saitoe M. (2014) Hunger-driven modulation in brain functions. *Brain Nerve.* **66**, 41-48.
- 5.堀内純二郎、山崎大介、齊藤実 (2014) 加齢による記憶力の低下はグリア細胞の機能の不全による、「ライフサイエンス」、新着論文レビュー
- 6.平野恭敬、齊藤実 (2013) 記憶改善に向けた新たな進展：軽度の空腹状態は長期記憶形成を促進する、学研メディカル秀潤社、「細胞工学」、32, 452-453.

久恒辰博

- 1.久恒辰博 (2016) 「食品成分による脳老化改善・認知症予防の可能性」化学と生物 54, 892-900.
- 2.久恒辰博 (2016) 「記憶能力が低下するメカニズムとは何か？」実験医学 (羊土社) 34, 1754-1758.

飯野雄一

- 1.富岡征大、飯野雄一(2015) 「シナプスにおけるインスリン/PI3K 経路と記憶学習」、門脇孝編集(診断と治療社)、「糖尿病学 2015」, 45-52 (168)

井ノ口馨

- 1.Nomoto M. and Inokuchi K. (2018) Behavioral, cellular, and synaptic tagging frameworks., *Neurobiology of Learning and Memory* 153, 13-20. 総説
- 2.野本真順, 井ノ口馨 (2018) 細胞タグ機構：行動タグのための記憶アロケーションの空間的重複, *みにれびゅう. Journal of Japanese Biochemical Society* 90, No.1, 84-89. 総説
- 3.横瀬淳, 井ノ口馨 (2017) 個々の記憶どうしをつなぐ神経細胞集団のメカニズム, *実験医学* 35, 1480-1483. 総説
- 4.井ノ口馨 (2017) 記憶をつくり変える, *日経サイエンス* 11月号, 28-37. 総説
- 5.佐野良威, 大川宜昭, 鈴木章円, 井ノ口馨 (2016) 記憶痕跡とメモリアロケーション, *生体の科学・特集 記憶ふたたび* 67, 22-26. 総説
- 6.井ノ口馨 (2016) 虚記憶を創り出す：細胞集成本理論を基として, *神経心理学* 32, 3-9. 総説
- 7.鈴木章円, 井ノ口馨 (2016) Q & A—神経科学の素朴な疑問 Q ど忘れはどうして起こるのですか?, *月刊 臨床神経科学 ブレインマシンインターフェース* 34, 245. 総説
- 8.大川宜昭, 井ノ口馨 (2015) オプトジェネティクスによる記憶の操作, *実験医学* 33, 3065-3069. 総説
- 9.井ノ口馨 (2015) 記憶をあやつる, 角川選書, 角川書店.
- 10.Okada, D. and Inokuchi K. (2014) Activity-Dependent Protein Transport as a Synaptic Tag, in *Synaptic Tagging and Capture* (Sajikumar, S. ed.), Chapter 6, Springer, New York 79-98.
- 11.佐野良威, 井ノ口馨 (2014) メモリアロケーションのメカニズム, *生体の科学* 65, 482-483. 総説
- 12.Shehata M, and Inokuchi K. (2014) Does autophagy work in synaptic plasticity and memory?, *Reviews in the Neurosciences* 25, 543-557. 総説
- 13.Kitamura T. and Inokuchi K. (2014) Role of the Adult Neurogenesis in Hippocampal-Cortical Memory Consolidation. *Molecular Brain, Molecular Brain* 7, 13. 総説
- 14.井ノ口馨 (2013) 記憶をコントロールする—分子脳科学の挑戦—, 岩波科学ライブラリー, 岩波書店.
- 15.井ノ口馨 (2013) スパインの動態と可塑性 (真鍋俊也, 森寿, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 編), *脳神経科学イラストレイテッド* 改訂第3版, 羊土社, 52-57.
- 16.井ノ口馨 (2013) 恐怖記憶研究鳥瞰—最近の知見と展望—, *不安障害研究* 5, 13-21. 総説

上川内あづさ

- 1.Eberl DF, Kamikouchi A., Albert JT. Auditory Transduction. In: *Insect hearing* (Eds: Pollack GS, Mason AC, Popper AN, Fay RR). Series: Springer Handbook of Auditory Research, Vol. 55, 2016.
- 2.Kamikouchi A., Ishikawa Y. Hearing in *Drosophila*. In: *Insect hearing* (Eds: Pollack GS, Mason AC, Popper AN, Fay RR). Series:

Springer Handbook of Auditory Research, Vol. 55, 2016.

- 3.石元広志、上川内あづさ「音への応答行動を測る 求愛歌は効果あり？ショウジョウバエの聴覚テスト：オスの求愛行動を利用した実験」In: 研究者が教える動物実験 (日本比較生理生化学会編) 2015.
- 4.松尾恵倫子、上川内あづさ「重力への応答行動を測る ショウジョウバエは上に逃げる？ショウジョウバエを使った反重力走性の測定：上方向に移動する割合を決定する」In: 研究者が教える動物実験 (日本比較生理生化学会編) 2015.
- 5.動物行動の分子生物学 (新・生命科学シリーズ) 久保 健雄、上川内あづさ、竹内 秀明、奥山 輝大 裳華房 2014年7月 ISBN:4785358580
- 6.Methods in Neuroethological Research. Kamikouchi A, Fiala A. Springer Japan. 2013年7月 ISBN:978-4431543305

松尾直毅

- 1.松尾直毅 (2017) 「実験動物としてマウスを用いた記憶学習の仕組みの研究」、関西実験動物研究会会報 39, 1-5
- 2.松尾直毅 (2016) 恐怖記憶の弁別と汎化に伴う海馬歯状回神経アンサンブル活動, 日本薬理学雑誌 148, 185-189
- 3.北西卓磨、松尾直毅 (2015) 「海馬体-嗅内皮質における空間認知システム」ライフサイエンス領域融合レビュー 4, e001
- 4.松尾直毅 (2014) 「記憶痕跡の可視化と操作より探る記憶情報の脳内表現」ブレインサイエンスレビュー2014, 233-250.

吉原良浩

- 1.吉原良浩 (2017) 「プロスタグランジンF2のセクシーな香り：ゼブラフィッシュの求愛行動をつかさどるフェロモン受容体の発見」生化学 89, pp.244-246.
- 2.吉原良浩 (2016) 「嗅覚行動の神経機構」小林靖編、Clinical Neuroscience、特集「嗅覚-New Horizon」 pp.1320-1323.
- 3.吉原良浩 (2016) 「脳はなぜ匂いを感じるのか」加藤忠史編、こころの科学、特集「ここまでわかった！脳とこころ」 pp.57-62.
- 4.吉原良浩 (2015) 「発生工学的手法による神経回路の可視化」小林靖編、Clinical Neuroscience、特集「脳の見える化-構造編」 pp.657-661.
- 5.吉原良浩 (2014) 「ゼブラフィッシュの嗅覚神経系」東原和成編、実験医学、特集「化学感覚と脳-見えてきた味・匂い・フェロモンの神経回路-」 pp.2917-2922.
- 6.吉原良浩 (2014) 「魚の嗅覚行動」東原和成編、現代化学、特集「匂い・フェロモン・味の不思議-分子レベルから行動まで-」 pp.48-49.
- 7.Yoshihiro Yoshihara (2014) Zebrafish olfactory system, edited by Kensaku Mori, In “The Olfactory System: From Odor Molecules to Motivational Behaviors”, pp.71-96.

<公募研究>

坂口昌徳

- 1.小柳伊代、李若詩、藤中彩乃、坂口昌徳、トラウマ記憶を弱めるには - マウスの記憶・睡眠研究から考える PTSD ケア、2017Jul academistJournal (日本語総説)
- 2.大石誠、中島聡美、坂口昌徳、The importance of acute intervention for preventing generalization in PTSD patients., 医学のあゆみ、2016Sep, v258i13, p1209-1210
- 3.坂口昌徳、脳内で新生するニューロンと中枢神経再生への応用、ブレインサイエンスレビュー、2016、廣川 信隆(編)、クバプロ(出)

中井淳一

- 1.安藤恵子、中井淳一「カルシウムシグナル」生体の科学 増大特集 細胞シグナル操作法 65: 388-389, 2015
- 2.Ohkura, M, Sadakari, J and Nakai J「Optogenetic manipulation and probing.」 In Optogenetics. eds. Kandori, H, Yawo, H, Koizumi, A, Part2 Chapter 9, 133-147, 2015, Springer-Japan Tokyo
- 3.Takata N, Shinohara Y, Ohkura M, Mishima T, Nakai J, Hirase H「Imaging of astrocytic activity in living rodents.」 In Optical Imaging of Neocortical Dynamics, Neuromethods, vol. 85, chapter 12, 191-207, 2014, Springer Science Business Media

竹内秀明

- 1.奥山輝大、竹内秀明 (2015) 「社会脳の進化的起源の解明を目指して」日本生化学会, 生化学87, 605-608.
- 2.横井佐織、坂本竜哉、坂本浩隆、竹内秀明(2015) 「ヒメダカの三角関係 (雄, 雄, 雌) における勝者を決めるホルモン」生物研究社, 海洋と生物, 37, 591-597.
- 3.奥山輝大、竹内秀明 (2015) 「異性の好みを生み出す分子と神経」現代化学, 東京化学同人, 534, 28-31.
- 4.奥山輝大、竹内秀明 (2014) 「メダカを用いた分子遺伝学的手法による魚類「社会脳」の分子神経基盤の解明」日本比較生理生化学, 比較生理生化学 31, 106-112

櫻井芳雄

1. Sakurai Y., Ohnuki, T., Shiroshita, R., Sakaguchi, Y., Shiotani, K., and Chi Jung Lee. (2018) Multipotentiality of the brain to be revisited repeatedly, *The physics of the mind and brain disorders*, Springer, 513-525.
2. 櫻井芳雄 (2015) 「神経システムの機能発達」, 日本発達心理学会 (編), *脳の発達科学*, 新曜社 (東京), 56-66.

平野恭敬

1. 平野恭敬, 齊藤実 (2017) 「基礎分子生物学Ⅱ：遺伝子発現制御機構—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス—」, 東京化学同人, 18章1節.
2. Saitoe M, Saeki S, Hirano Y., Horiuchi J. (2014) 「Age-related memory impairment in *Drosophila*.」, *BEHAVIORAL GENETICS OF THE FLY (DROSOPHILA MELANOGASTER)*
3. Hirano Y., Saitoe M (2014) 「Hunger-driven modulation in brain functions.」 *Brain Nerve*, 66, 41-48.
4. 平野恭敬, 齊藤実 (2013) 「記憶改善に向けた新たな進展：軽度の空腹状態は長期記憶形成を促進する」, *細胞工学*, vol.32 No.4.
5. 平野恭敬, 齊藤実 (2013) 「空腹と記憶—軽度の空腹状態は長期記憶形成を促進する」, *医学のあゆみ*, 247巻3号.

高橋琢哉

1. 高橋琢哉: (2017年2月発行) 「精神神経疾患における AMPA 受容体の役割: ペランパネルの基礎と可能性」 *科学評論社 精神科*(30)2, 170-175.

久原篤

1. 久原 篤, 太田茜 「緑色にキラリと光る細胞を見てみよう 緑色蛍光タンパク質 GFP による神経細胞の観察」, 比較生理生化学会 編, 研究者が教える動物実験 第2巻 神経・筋, p20-23, 共立出版, 2015
2. 太田茜, 園田悟, 久原 篤 「好きななおいに向かっている行動を見てみよう センチュウの走化性テスト: 嗅覚応答行動の測定」, 比較生理生化学会 編, 研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p32-35, 共立出版, 2015
3. 久原 篤, 太田茜 「好きな温度に向かう行動を調べよう センチュウの温度走性テスト: 温度応答行動の測定」, 比較生理生化学会 編, 研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p36-39, 共立出版, 2015
4. 太田茜, 園田悟, 久原 篤 「遺伝子の突然変異の DNA を見てみよう PCR 法と制限酵素による突然変異部位の可視化」, 比較生理生化学会 編, 研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p40-43, 共立出版, 2015

和多和宏

1. Wada K., Chen C-C., and Jarvis E.D. (2017) Molecular profiling reveals insight into avian brain organization and functional columnar commonalities with mammals, Shigeno S., Murakami Y., and Nomura T. *Brain Evolution by Design: From Neural Origin to Cognitive Architecture*, 273-289.
2. Wada K. (2016) Differential regulation of androgen receptor and DNA methylation in songbirds, Spengler D. and Binder E., *Epigenetics and Neuroendocrinology: Clinical Focus on Psychiatry Volume1*, 233-241

山中章弘

1. 山中章弘. (2017) 第12章 神経系の基礎, 彼末一之, 能勢博 編, やさしい生理学 改訂第7版, 203-217.
2. 山中章弘, 田淵紗和子. (2016) 神経系の機能, 桑名俊一, 荒田晶子編著, コメディカル専門基礎科目シリーズ 生理学, 45-64.
3. 山中章弘. (2016) 遺伝子改変動物による睡眠研究, 三島和夫編, *睡眠科学 最新の基礎研究から医療・社会への応用まで*, 112-123.

森郁恵

1. Aoki I, Nakano S, Mori I. "Molecular Mechanisms of learning in *C. elegans*" In: *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* 2nd Edition, Elsevier ISBN : 9780128051597 (2017).

掛川渉

1. Kohda K, Kakegawa W., Yuzaki M. (2017) Delta glutamate receptor (Review), *Encyclopedia of Signaling Molecules—2nd edition*.
2. Kakegawa W., Yuzaki M. (2016) Physiological functions of D-serine mediated through $\delta 2$ glutamate receptors in the cerebellum. *D-Amino Acids: Physiology, Metabolism, and Application* edited by Tohru Yoshimura, Springer Books.
3. Kohda K, Kakegawa W., Yuzaki M. (2016) Long-term depression (LTD). *Essentials of cerebellum and cerebellar disorders* edited by Donna Gruol, Springer Books.

2.4 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

「産業財産権の名称」発明者、権利者、産業財産権の種類、出願番号、出願年月日

<計画研究>

齊藤実

1. 「リアノジン受容体活性化剤及び利用」上野耕平、齊藤実、平井志伸、岡戸晴生、公益財団法人東京都医学総合研究所、特許、特願 2017-221312、2017 年 11 月 16 日出願

久恒辰博

1. 「ペリサイトの変成を抑制する剤」久恒辰博、金子順 特願 2017-35823 (2017.2.28)
2. 「イミダゾールジペプチドを含む剤」久恒辰博、戸塚護、薩秀夫、金子順、片倉喜範、佐藤三佳子、松本貴之、森松文毅、今林悦子、松田博史 特願 2014-069103 (2014.3.28)

吉原良浩

1. 「魚類の行動制御技術」吉原良浩、脇阪紀子、宮坂信彦、小出哲也、理化学研究所、特願 2017-75796、2017 年 4 月 6 日出願

中井淳一

1. 「特定部位のアミノ酸を置換した緑色蛍光蛋白質またはそのホモログを用いたカルシウムセンサー蛋白質」中井淳一、大倉正道、埼玉大学、特許第 5669080 号、2014 年 12 月 26 日
2. 「カルシウム指示遺伝子」中井淳一、大倉正道、尾藤晴彦、井上昌俊、竹内敦也、独立行政法人科学技術振興機構、特願 2014-120828、2014 年 6 月 11 日

高橋琢哉

1. 「AMPA 受容体に特異的に結合する新規化合物」高橋琢哉、宮崎智之、須原哲也、樋口真人、張明榮、公立大学法人 横浜市立大学、WO 2017/006931 A1(PCT/JP2016/69896)、国際公開日 2018 年 1 月 12 日 (PCT 出願日 2016 年 7 月 5 日)
2. 「AMPA 受容体に関連する疾患の予防及び/又は治療剤」高橋琢哉、宮崎智之、中島和希、公立大学法人 横浜市立大学、PCT/JP2018/000531(基礎出願 2017-002962)、2018 年 1 月 11 日
3. 「霊長類生体の脳内 AMPA 受容体のイメージング方法、プログラム、診断薬、コンパニオン、診断薬、医薬、スクリーニング方法、入力端末、サーバ及びシステム」高橋琢哉、宮崎智之、公立大学法人 横浜市立大学、PCT/JP2018/000532(基礎出願 2017-002960,059301)、2018 年 1 月 11 日

青西亨

1. 「質量分析計，質量分析計の信号処理方法及びプログラム」青西亨，木村純一，桑谷立，平田岳史，特願 2017-084599，2017 年 4 月 21 日出願

2.5 報道記事

<計画研究>

齊藤実

1. 「空腹なほどものおぼえ良く」毎日新聞 (26面)、2016年8月4日
2. 「(ユリイカ!) 一夜漬けは空腹で?」朝日新聞 (31面)、2016年7月28日
3. 「空腹時のほうが効率的に学習できる?」マイナビニュース、2016年7月20日
4. 「Learning and memory: Austerity measures for memory」Nature Rev Neurosci vol.14, p159、2013年4月

井ノ口馨

1. 「New neurons archive old memories」Neuroscience News 2018年7月13日
2. 「New neurons archive old memories」Medical Xpress 2018年7月13日
3. 「Synapse-specific plasticity governs the identity of overlapping memory traces」AlphaGalileo 2018年7月13日
4. 「Synapse-specific plasticity governs the identity of overlapping memory traces」EurekAlert! 2018年7月13日
5. 「脳海馬が記憶力を保つ仕組みを世界で初めて解明 ～記憶力低下の予防に一步前進～」日本の研究、2018年7月11日
6. 「記憶力アップ 運動が鍵? 富山大学教授ら 可能性突き止める」読売新聞 2018年7月10日
7. 「記憶力保つ仕組み解明 富山大学院井ノ口教授ら 神経細胞新たに生産」北日本新聞 2018年7月10日
8. 「New neurons archive old memories」EurekAlert! 2018年7月9日
9. 「記憶の関連づけや区別の仕組み、マウスで発見 富山大」朝日新聞 DIGITAL 2018年6月18日
10. 「記憶の仕分け 仕組み解明 「シナプス」を使い分け 富山大院グループ マウス実験」朝日新聞 2018年6月17日
11. 「記憶の区別 仕組み解明 富山大教授ら 認知症治療などに期待」中日新聞 2018年6月15日
12. 「富山大と JST、記憶のアイデンティティを保つ仕組みを解明」日本経済新聞 2018年6月15日
13. 「富山大学で世界初の発見」BBT WEB 2018年6月15日
14. 「記憶の区別 仕組み解明 富山大教授ら 認知症治療などに期待」北陸中日新聞 2018年6月15日
15. 「記憶関連付け仕組みを解明 富大 認知症など治療に光」富山新聞 2018年6月15日
16. 「記憶保存の仕組み解明 富山大井ノ口教授ら 認知症治療に期待」北日本新聞 2018年6月15日
17. 「井ノ口教授 (富山大学院) 東レ科学技術賞」北日本新聞 2018年3月9日
18. 「井ノ口教授富大初の受賞 東レ科学技術賞 記憶の研究で」富山新聞 2018年3月9日
19. 「Memories can be disconnected- and it could help those with PTSD」New Scientist Magazine 2017年1月24日
<https://www.newscientist.com/article/2119423-memories-can-be-disconnected-and-it-could-help-those-with-ptsd/>
20. 「It's possible to link and then unlink two unrelated memories in mice」The Verge (USA) 2017年1月26日
<http://www.theverge.com/2017/1/26/14397178/memories-mice-optogenetics-ptsd-trauma-triggers-neuroscience>
21. 「記憶つながる仕組み解明 富山大 脳細胞の活動重複がカギ」朝日新聞 2017年1月25日
22. 「記憶つながる脳の仕組み、マウスで解明 富山大など」朝日新聞 DIGITAL. 2017年1月25日
23. 「細胞集団の存在証明 別々の記憶結ぶ働き」北日本新聞 2017年1月25日
24. 「記憶切り離しに成功 神経細胞の働き抑制」富山新聞 2017年1月25日
25. 「つらい記憶、忘れられる? 富山大、マウスの脳操作で」共同通信 47NEWS 2017年1月26日
26. 「記憶連鎖断ち PTSD 防げ」北陸中日新聞 2017年1月26日
27. 「脳内で記憶を結びつける細胞の働きを発見 富山大など」NHK ニュース (テレビ放映), NHK NEWS WEB 2017年1月27日
28. 「How separate memories cleanly」Nature 2017年1月26日
<http://www.nature.com/nature/journal/v542/n7639/full/542009c.html>
29. 「記憶の関連づけのみに関与 神経細胞集団の仕組み解明」科学新聞 2017年1月26日
30. 「Neuron study on linked memories could help people with PTSD」The Asahi Shinbun 2017年1月25日
31. 「富山大など、異なる別々の体験の記憶を関連づける作用を解明」日刊工業新聞 2017年1月23日
32. 「Researchers couple then decouple overlapping memories in mice」Medical Xpress, Health Medicine Network 2017年1月27日
<https://m.medicalxpress.com/news/2017-01-couple-decouple-overlapping-memories-mice.html>
<http://healthmedicinet.com/i/researchers-couple-then-decouple-overlapping-memories-in-mice/>
33. 「Tutkijat onnistuivat manipuloimaan muistia - menetelmä voi auttaa vakavien stressioireiden hoidossa.(重度のストレス症状の治療に役立つ可能性のあるメモリのプロセスの操作に成功)」tekniikka & talous. (フィンランド語) 2017年1月27日
34. 「Triggers for painful memories can be 'erased' using LASERS: Breakthrough could someday help treat PTSD」Mail Online: Science & Tech 2017年1月30日
<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-4170966/Triggers-painful-memories-erased-using-LASERS.html>
35. 「富山大、記憶と神経細胞集団の仕組みを光遺伝学で解明」OPTRONICS ONLINE 2017年1月30日
<http://www.optronics-media.com/news/20170130/45503/>
36. 「Ученые смогли стереть плохие воспоминания лазером(レーザーでの悪い記憶の消去に成功)」Газета.RU.(ロシア語) 2017年1月30日
https://www.gazeta.ru/science/news/2017/01/30/n_9625397.shtml
37. 「Японская методика впервые позволила "объединять" и "разъединять" воспоминания(日本の技術が初めて記憶の結合と分割を可能にした)」Вести.RU. (ロシア語) 2017年1月30日 <http://www.vesti.ru/doc.html?id=2848960>

38. 「記憶同士を関連づける神経細胞集団のメカニズムを明らかにー富山大」医療ニュース QLifePro. 2017年1月31日
<http://www.qlifepro.com/news/20170131/reveal-the-mechanism-of-neuronal-cell-population-relating-memory.html>
39. 「記憶を関連づける神経細胞集団の仕組みを解明 富山大学」大学ジャーナルオンライン 2017年2月1日
<http://univ-journal.jp/11698/>
40. 「「フラッシュバック現象」の仕組み マウス実験で解明」NHK ニュース(テレビ全国放映), NHK 「かぶん」 ブログ 2016年8月1日
<http://www9.nhk.or.jp/kabun-blog/200/250286.html>
41. 「記憶の連動、仕組み解明 PTSD 治療に応用も」共同通信 47NEWS 2016年7月29日
<https://this.kiji.is/132802532543546875>
42. 「「行動タグ」仕組み解明 富山大学院 井ノ口教授ら PTSD 治療に期待」北日本新聞 2016年7月29日
43. 「不安と記憶の連動を解明 富大研究班 PTSD 治療応用も」北陸中日新聞 2016年7月29日
44. 「精神的ショック前後のささいな記憶はなぜ残る? 富山大がメカニズム解明 PTSD 治療も」産経ニュース 2016年8月1日
<http://www.sankei.com/west/news/160801/wst1608010061-n1.html>
45. 「強い記憶、連動の仕組み解明 富山大など」日本経済新聞 電子版 2016年8月2日
46. 「富山大、強烈な体験によってささいな出来事が長く記憶される仕組みを解明」マイナビニュース 2016年8月2日
<http://news.mynavi.jp/news/2016/08/02/309/>
47. 「연구팀, ‘기억의 연동’ 구조 해명(記憶の連動構造解明)」KYODO NEWS (韓国語) 2016年8月2日
http://www.47news.jp/korean/medical_science/2016/08/143171.html
48. 「科学技術振興機構、富山大学、東京慈恵会医科大学、強烈な体験によってささいな出来事が長く記憶される仕組みを解明」日経バイオテク ONLINE 2016年8月3日
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/release/16/08/03/02364/>
49. 「記憶の連動の仕組みを解明 強烈な体験とささいな出来事」サイエンスポータル 2016年8月4日
http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2016/08/20160804_01.html
50. 「強烈な体験するとささいな出来事を長く記憶」科学新聞 2016年8月12日
51. 「“記憶”のミステリー ～最新脳科学が解き明かす記憶の正体～」テレ科学教育番組「サイエンス ZERO」(以後、再放映、NHK オンデマンド、日本語国際放送でも放映) 2016年2月28日
52. 「記憶の分子メカニズムの探求を通して、「人間とは何か」に迫る」いのちの不思議"を考える---生命科学 DOKIDOKI 研究室 2016年1月29日
https://www.terumozaidan.or.jp/labo/class/s2_02/interview01.html
53. 「“記憶の仕組み”が新たに解明！」TBS 情報番組「ひるおび」 2015年4月6日
54. 「Researchers create artificial link between unrelated memories」EurekAlert 2015年4月2日
http://www.eurekalert.org/pub_releases/2015-04/cp-rca032615.php
55. 「Researchers Create Artificial Link between Unrelated Memories」SciGuru Science News 2015年4月2日
<http://www.sciguru.org/newsitem/18834/researchers-create-artificial-link-between-unrelated-memories>
56. 「マウスの脳を操作 2つの記憶合成に成功」NHK NEWS WEB
<http://www9.nhk.or.jp/kabun-blog/200/213513.html>
57. 「マウスで脳内で二つの記憶合成に成功」共同通信
<http://www.47news.jp/CN/201504/CN2015040201001837.html>
58. 「マウスの古い記憶を人為的に連合させ、新しい記憶を創り出すことに成功」財経新聞 2015年4月4日
<http://www.zaikai.co.jp/article/20150404/243832.html>
59. 「古い記憶を人為的に操作し、新しい記憶を生み出すことに成功」Mocosuku Woman
<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20150408-00000012-mocosuku-hlth>
60. 「異なる古い記憶を人為的に組み合わせ、新しい記憶を作り出すことに成功」QLifePro 2015年4月8日
<http://www.qlifepro.com/news/20150408/the-combination-of-different-old-memories-artificially-and-succeeded-in-creating-a-new-storage.html>
61. 「マウスの脳 光で刺激 2つの記憶を合成」日経新聞 2015年4月4日
62. 「Neuroscience: How to form a fake memory in mice」Nature 520(135) 2015年4月8日
63. 「富山大学院・井ノ口教授チーム 二つの記憶 脳内で合成 マウスで実験 世界初の成果」北日本新聞 2015年4月3日
64. 「別々の記憶 脳内で合成 富大チーム マウス実験 新たな記憶獲得 ト라우マ治療に道」富山新聞 2015年4月3日
65. 「2つの記憶 結びつけ成功 脳機能解明に光」読売新聞 2015年4月3日
66. 「脳内で二つの記憶合成」北国新聞 2015年4月3日
67. 「富山大 記憶の人為的操作成功」日刊工業新聞 2015年4月3日
68. 「古い記憶を活動させて新たな記憶形成」科学新聞 2015年4月10日
69. 「マウスの脳を操作 2つの記憶 合成に成功」NHK ニュース 2015年4月3日
70. 「記憶の仕組み 分子レベルで 富山大医学部 井ノ口馨教授」読売新聞 2013年5月30日
71. 「富山大学院医学薬学研究部教授 井ノ口馨さん 記憶、分子レベルで解明」朝日新聞 2013年5月13日
72. 「記憶の仕組み 分子レベルで 富山大医学部 井ノ口馨教授」読売新聞 2013年5月30日
73. 「井ノ口教授(富山大院) 文科大臣表彰」北日本新聞 2013年4月11日
74. 「井ノ口富大教授が文科相表彰科技賞」富山新聞 2013年4月11日
75. 「科学技術賞に井ノ口富大教授」北陸中日新聞 2013年4月11日

上川内あづさ

1. 『「ハエの「求愛歌」、羽音のリズム識別の仕組み解明」名古屋大チーム「人間の音声認識メカニズム解明に」』、産経WEST、2018年4月17日
2. 『ハエの「求愛」伝わる仕組み』、日経新聞、2018年4月17日
3. 『「リズム識別の仕組み解明」ハエ「求愛歌」で名古屋大』、岩手日報、福島民報、So-net、千葉日報オンライン、共同通信、大阪日日新聞、琉球新報、河北新報オンラインニュース、京都新聞、沖縄タイムス+プラス、福井新聞 ONLINE、日本海新聞 Net Nihonkai、Web 東奥・ニュース、qBiz 西日本新聞経済電子版、中日新聞(CHUNICHI Web)、西日本新聞、BIGLOBE ニュース、下野新聞「SOON」、上毛新聞ニュース、新潟日報モア、秋田魁新報電子版、静岡新聞アットエス、徳島新聞、佐賀新聞 LiVE、宮崎日日新聞 (Miyanichi e-press)、四国新聞社、福島民友新聞社 みんなの Net、デイリースポーツ online、信濃毎日新聞 [信毎 Web]、山陰中央新報社、神戸新聞 NEXT、東京新聞、2018年4月17日
4. 「リズム聞き分ける脳の仕組み発見」、NHK 東海のニュース、2018年4月17日
5. 『ハエ 羽音の「歌」学習』、中日新聞、2018年3月23日
6. 「Even Flies Like a Familiar Song - Neuroscience News」EurekAlert!、Asia Research News、Science Daily、Neuroscience News、Phys.org、Bioengineer.org、BrightSurf、AlphaGalileo、Science Newslines、2018年3月22日

松尾直毅

1. 「反復学習 同じ神経使用 阪大、マウスで仕組み解明」日本経済新聞 2015年4月18日

吉原良浩

1. 「嗅覚情報の伝達回路：小魚で配線図表現」日刊工業新聞 2014年4月10日
2. 「フェロモン刺激で・・・魚の求愛行動、促す仕組み解明」朝日新聞デジタル 2016年5月31日
3. 「魚類・両生類に特異的アデノシン嗅覚受容体発見：食べ物のおいさに反応」科学新聞 2017年5月26日

<公募研究>

坂口昌徳

1. 「PTSD ケア、素早さカギ 筑波大などマウス実験」朝日新聞 2016年01月25日

竹内秀明

1. 「メダカ、顔で仲間見分ける 東大など、メカニズム探る」日経新聞2017年08月12日
<https://www.nikkei.com/article/DGXLZO19880710Q7A810C1945M00/>
2. 「メダカは『顔』で仲間見分ける 岡山山などの研究チーム」山陽新聞2017年07月11日
<http://www.sanyonews.jp/article/562105/1/>
3. 「恋人に目移りさせぬ 岡崎の研究所、雄メダカの防衛行動確認」中日新聞 2016年06月03日
4. 「メダカ、恋敵の視界遮る 基礎生物学研など発見」日本経済新聞2016年06月02日
http://www.nikkei.com/article/DGXLASDG02H89_S6A600C1CR8000/
5. 「『僕だけ見て！』メダカの恋戦略 岡山山などがグループ研究」山陽新聞2016年06月03日
<http://www.sanyonews.jp/article/359483>
6. 「メダカ『俺だけを見て』メスの目移りを防ぐ行動」朝日新聞 2016年06月07日
<http://www.asahi.com/articles/ASJ614T7FJ61OJB005.html>
7. 「メダカの三角関係、勝つためのホルモン同定」朝日新聞 2015年02月27日
8. 「メダカ『恋の三角関係』、勝者決めるホルモン発見」日本経済新聞2015年02月27日
http://www.nikkei.com/article/DGXLASDG27H0W_X20C15A2CR0000/

野村洋

1. 「忘れた記憶 薬で回復」産経新聞 2019年1月9日
2. 「かすかな記憶 薬で復活」毎日新聞 2019年1月9日
3. 「めまいの薬で記憶回復？」日本経済新聞 2019年1月9日
4. 「ヒスタミン薬 記憶戻す効果」神戸新聞 2019年1月9日
5. 「記憶力が上がる薬、東大など発表 神経刺激、脳を活性化」朝日新聞 2019年1月10日

王丹

1. 「京都大学」朝日新聞 2018年7月11日 (水) 10版

高橋琢哉

1. 「一流科学雑誌も注目 リハビリ効果アップする初の化合物」日刊ゲンダイ 2018年9月4日
2. 「脳卒中回復に光〜リハビリに効果化合物特定」読売新聞、NHK、The Los Angeles Times 等世界で広く報道された 論文誌 Science に掲載 2018年4月6日
3. 「トラウマ記憶 光で消去」日刊工業新聞 2016年12月6日
4. 「脳卒中リハビリ促進薬開発」化学工業日報 2016年11月24日
5. 「攻撃性高まる仕組み解明」時事通信 2016年10月25日

久原篤

1. 「光やフェロモンを感じるニューロンが腸に働きかけ低温適応を調節」サンテレビ 2014年7月23日
2. 「線虫での温度適応 仕組み解明」朝日新聞 2014年7月23日
3. 「寒さへの生物適応 線虫で仕組み解明」産経新聞 2014年7月23日
4. 「寒さへに耐える仕組み解明」神戸新聞 2014年7月23日

杉山陽子 (矢崎陽子)

1. 「幼鳥の記憶 細胞発見」琉球新報 2016年7月8日

山中章弘

1. 「痛みの感じ方覚醒度で変化」日刊工業新聞 2016年7月11日
2. 「脳中枢で痛み止め」中日新聞 2016年7月29日
3. 「外部から光当て脳神経活動操作」中日新聞 平成31年1月23日

■記憶をコントロールする

分子脳科学の挑戦

井ノ口 馨(著)

「記憶は死に対する部分的な勝利である」とはカズオ・イシグロの名言である。記憶だけが、流転し消滅しつづける世界に私をつなぎ止め、私が私であることを示してくれる唯一の証。では記憶とは何か。著者は最初、この問いを哲学から考えようとし、ついには脳のシステムとして捉えなければならぬと思いつめ、米国に旅立った。私たちが何かを体験すると、脳の海馬でシナプスが回路を作る。それが記憶の元型となる。そして、ここから重要なのだ

どう作られ、保持されるのか

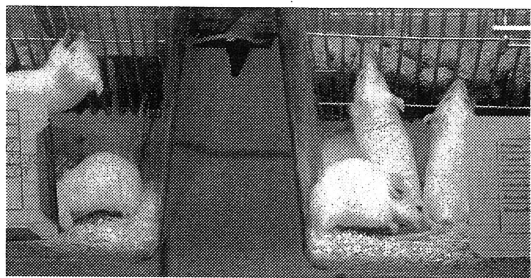
が、海馬で作られた記憶は、大脳皮質に書き写され、海馬の方はクリアされる。しかも、大脳皮質に保持された記憶の回路は、思い出すたびにいったん不安定化され、再度、固定化されることも明らかになった。記憶の美化や自撃証言の信憑性、あるいは意識とは何かまで議論は及ぶ。本書は、著者の一匹狼的な個人史の道のりを縦軸に、脳科学の展開を横軸として描かれた、最も新しい記憶研究の見取り図である。語り口も平易。

福岡伸一 (青山学院大学教授)

岩波科学ライブラリー・1260円

毎日新聞 2013.6.30

⑥ 「認知症」最新研究
「考えても記憶力抜群のマウス」を作った



マウス大活躍

脳研究に我々が最も期待しているのは、認知症の予防・治療ではないだろうか。本人のみならず周囲を奈落の底に落としかねないこの難病に、科学者たちは日々立ち向かっている。

「ヤマイモ成分がアルツハイマー病に効果」
こんな見出しが新聞各紙

に躍ったのは昨年7月のことだった。

富山大学によると、同大和漢医薬学総合研究所の東田千尋准教授らのグループが、ヤマイモなどに多く含まれているジオスゲニンという成分をアルツハイマー病のマウスに20日間投与したところ、神経細胞が回復し、記憶力の改善が見られたという。

これを人間に当てはめた場合、1日10⁶のヤマイモを食べないといけないというオチがつくが、それでも朗報には違いない。

日本人が平均、年に約78回食べているというカレーもアルツハイマー病と関係が深そうだ。

「クルクミン」という成分が、アルツハイマー病の進行を食い止めるとされています」

とは先の久保田名誉教授。クルクミンは、カレー粉の原料であるウコンなどに多く含まれている成分である。

カリフォルニア大学の研究チームが、細胞培養実験で3人のアルツハイマー病患者から免疫細胞を採取しクルクミンで処理したところ、アルツハイマー病の原因の一つとされるアミロイドベータというタンパク質が減少したという。他にもマウス実験などさまざまな方法でクルクミンの効能が確認されている。

「インド人はアメリカ人と比べてアルツハイマー病の発症率が4分の1であるというデータもある」(同)

というのだから、食卓にカレーが登場する頻度は高まりそう。

そして、認知症そのものの研究ではないが、加齢に

伴う記憶力低下」という、程度の差こそあれ誰もが直面する難儀な現象についてある研究が現在、世界中の専門家たちのあいだで話題になっているという。

原因は「RbAp48」

「2000年にノーベル医学・生理学賞を受賞しているコロンビア大学のエリック・カンドール教授、私の留学時代の恩師でもあるのですが、彼のグループが今年8月28日に発表した実験結果がそれです」

と解説するのは、富山大学大学院の井ノ口馨教授。「彼らは、加齢に伴う記憶力低下の原因となるタンパク質を特定しました。RbAp48」と呼ばれるもの

ですが、年を取るにつれて次第に量が減り、働きが悪くなる。今回の実験では、マウスの受精卵に遺伝子操作を施して、老化しても「RbAp48」が減らない特別な種を作り出しました。するとこれらのマウスは、

本来ならば記憶力に衰えがあるはずの15カ月を経過しても、生後3カ月のものと比べて遜色ない記憶力を維持したのです」

つまり、考えても記憶力抜群のマウスを創造したのだ。しかしこれをどうやって人間に応用するのか。「RbAp48」は人体にも存在するタンパク質なので、製薬会社はすぐさま「RbAp48」と結合して働きを促進する化合物の開発に取り掛かるでしょう。

開発に成功すれば、摂取するだけで記憶力低下を抑える新薬が売り出せるのですから、製薬業界にとっては「一大事です」(同)

先に触れたように、この実験は認知症そのものの研究ではない。だが、

「もしかすると、RbAp48の活性化を促す新薬は、同時に認知症予防にも役立つかもしれない」(同)

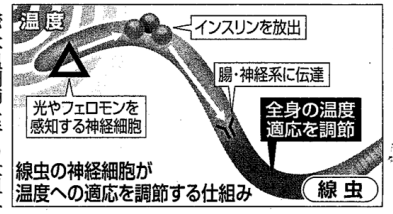
底なし沼のような脳科学の闇にも、着実に曙光が差しつつあるようだ。

寒さへの生物適応 線虫で仕組み解明

甲南大院、神経細胞で感知

光などを感じる神経細胞が、寒い所では外部の温度を感じて腸などに動きかざること体を適応させる仕組みを、甲南大学院などのグループが線虫による実験で突き止め、22日付の英科学誌「ネイチャー・コミュニケーションズ」電子版に発表した。

線虫には人と共通する遺伝子が多く、体内のメカニズムが似ている。グループの久原篤准教授（生体調節学）は「人が温度を感じる遺伝子は知られておらず、



産経新聞 2014.7.23

嗅覚情報の伝達回路 小魚で配線図表現

理研

理化学研究所脳科学総合センターの宮坂信一は、脳内で嗅覚の情報が彦副チームリーダーと舌に伝わる神経回路の配線図

をゼブラフィッシュで実験で明らかにした。1本の嗅覚神経回路だけに蛍光指標を付けた遺伝子改変ゼブラフィッシュを100個体作製。各個体の脳のサイズを画像処理によって平均化しながらそれぞれの神経回路の位

置を描写することで配線図を表現した。神経回路のメカニズムを解明する基礎的な知見になると期待される。

嗅覚の情報は鼻腔にある「嗅細胞」が匂い分子を認識し、脳の「嗅球」という部位を経て高次の情報を処理する脳領域へ伝わっていくと考えられている。今回はゼブラフィッシュの遺伝子改変技術や画像処理技術などを組み合わせることで、嗅球から高次脳領域に情報を伝える神経回路がどのようになっているかを調べた。

その結果、個々の嗅覚情報は、高次脳領域でそれぞれ異なる様式で処理された後、大脳に集まって再編成されることが示唆された。成果は9日、英科学誌「ネイチャー・コミュニケーションズ」電子版に掲載された。

日刊工業新聞 2014.4.10

反復学習 同じ神経使用

阪大、マウスで仕組み解明

特定の学習や訓練でいったん使われた脳の一部の神経細胞は、同じ学習や訓練を行う際にも再度使われることを大阪大がマウスで突き止め、16日付の米科学誌「セル」に電子版に発表した。

学習した記憶の強化や定着に反復学習が有効なことは経験的に知られており、詳しい仕組みの解明につながるとしている。

マウスを箱に入れて電気刺激を与える実験では、嫌な記憶を覚え、次に

からは刺激がなくても体をすくませるようになる。松尾直毅准教授らは遺伝子を改変し、脳の特定の神経細胞群を、毒素によって一時的に働かないようにできるマウスを作製。このマウスと通常のマウスをそれぞれ箱に入れて、電気刺激を与えた。その後、嫌な記憶を覚

えた際に使われた細胞群を、遺伝子改変マウスでは働かない状態にして、それぞれに2度目の刺激を与えた。通常のマウスでは嫌な記憶を反復学習し、体をすくませたままの時間が前回より延びたが、遺伝子改変マウスは延びず、記憶の強化がほとんど起こらなかった。松尾准教授は「同じ細

胞群を使う仕組みが、反復学習の有効性を支えている可能性がある」と話した。

2つの記憶結びつけ成功

富大マウス実験で 脳機能解明に光

もともと関係が弱かった一時的に刺激して結びつけるマウス実験に成功したと、

富山大などの研究グループが3日、米科学誌「セル」に発表した。研究グループは、記憶を結びつけることで知識を作る、脳の高度な機能の解明につながると説明している。

富山大の井ノ口馨教授（脳科学）らのグループは、マウスを丸い箱に入れて場所を記憶させた後、四角い箱の中で電気ショックを与えた。このマウスを丸い箱に戻しても、あまり恐怖を感じないことがわかった。次に、同じように記憶させた別のマウスで、「丸い箱」「電気ショック」を記

憶した脳の神経細胞を探して光の刺激を与え、同時に活動させた。マウスを丸い箱に戻すと、マウスは強い恐怖を感じた。「丸い箱」「電気ショック」の二つの記憶が、細胞が同時に活動したことで結びついたと考えられるという。

井ノ口教授は「記憶を連結する仕組みは人でも共通していると考えられる。心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの研究や、治療法の開発につながる可能性がある」と説明している。

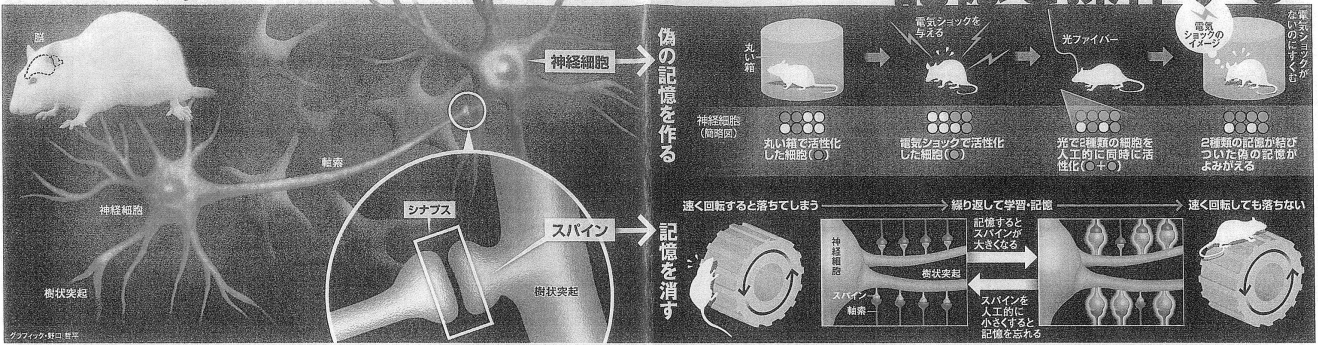
松尾直毅・大阪大准教授（神経科学）の話「複数の記憶情報が連合する仕組みの解明に、道筋を開いた成果だ。ただ人為的な結果なので、自然に記憶する時にも脳で同じ現象が起きているかは、まだ謎だ」

読売新聞 2015.4.03

日本経済新聞 2015.4.18

科学の扉

記憶を操作する



光遺伝学とは
光技術と遺伝学的手法を組み合わせた技術。光に反応する微生物由来の特殊なたんぱく質を特定の神経細胞で働かせ、その細胞を光で自在に活性化したり不活性化したりする。オプトジェネティクスとも呼ばれる。電気刺激や薬物を使っていたこれまでの手法よりも、どの神経細胞を活性化すれば特定の行動に結びつくのか、動物が動き回っている状態でも精度よく調べられるようになった。2005年ごろから使われ始め、急速に普及した。いまも技術の改良が進んでいる。

神経構造に注目

「記憶の痕跡」は、脳の中何処の何処にあり、どのようにして記憶が作られるのか、その仕組みを明らかにすることが、神経科学の重要な課題の一つである。その鍵を握るかもしれないのが、神経細胞の構造である。神経細胞は、長い突起(軸索)と短い突起(樹状突起)を持つ。樹状突起は、他の神経細胞とシナプスを形成し、情報を伝達する。軸索は、神経細胞の体細胞から離れた場所にまで情報を伝達する。この構造が、記憶の痕跡を形成する。研究者は、この構造を人工的に操作し、記憶を操作しようとしている。

光で細胞を刺激

「光で細胞を刺激」は、光を細胞に照射することで、細胞を活性化させる技術である。この技術は、光遺伝学と呼ばれている。光遺伝学は、光に反応するたんぱく質を特定の神経細胞で働かせ、その細胞を光で自在に活性化したり不活性化したりする。この技術は、記憶の痕跡を形成する。研究者は、この技術を利用して、記憶を操作しようとしている。

マウスの脳書き換え成功

「マウスの脳書き換え成功」は、マウスの脳を人工的に書き換えることに成功した。研究者は、マウスの脳に人工的に記憶の痕跡を形成し、その記憶を操作しようとした。その結果、マウスの記憶が書き換えられたことが確認された。これは、記憶の痕跡を人工的に操作できることを示している。

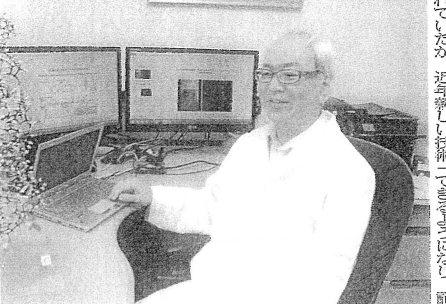
「マウスの脳書き換え成功」は、記憶の痕跡を人工的に操作できることを示している。研究者は、マウスの脳に人工的に記憶の痕跡を形成し、その記憶を操作しようとした。その結果、マウスの記憶が書き換えられたことが確認された。これは、記憶の痕跡を人工的に操作できることを示している。

Chibitronics
「世界トップレベルの心算能力を再現したい」と夢見る若手・山口 富山大学 大学院 工学部 山口 富山大学 大学院 工学部 山口 富山大学 大学院 工学部

朝日新聞 2015.12.20

富山大に脳科学拠点

記憶や情動 仕組み解明目指す



「世界トップレベルの心算能力を再現したい」と夢見る若手・山口 富山大学 大学院 工学部 山口 富山大学 大学院 工学部

精神疾患予防・治療へ

富山大学は、自らの大学院理学部神経科学(博士)の山口 富山大学 大学院 工学部 山口 富山大学 大学院 工学部

先端技術駆使 若手育成も力

富山大学は、自らの大学院理学部神経科学(博士)の山口 富山大学 大学院 工学部 山口 富山大学 大学院 工学部

北日本新聞 2016.3.25

幼鳥の記憶細胞発見

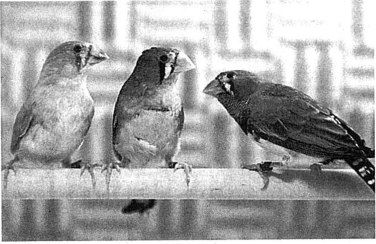
言語習得解明手掛かりに

父鳥から歌学ぶ

沖縄科学技術大学院大学(OIST)臨界期の神経メカニズム研究ユニットの柳原真研究員と矢崎一杉山陽子准教授はこのほど、幼鳥が親鳥の歌を学ぶ際に、歌の記憶を担う神経細胞が脳内に現れることを突き止めた。聴くという経験が記憶として形成される仕組みの一端を明らかにしたもので、人間が言葉を覚える際の脳内の仕組みの解明にもつながるといふ。

OIST柳原氏ら研究

研究成果は6月22日に英科学誌「ネイチャー・コミュニケーションズ」に掲載された。



キンカチヨウの家族。右から父鳥、母鳥、幼鳥(OIST提供)



研究室について会見する(右から)柳原真研究員、矢崎一杉山陽子准教授、OIST提供

形成されるかを調べた。柳原研究員らは聴覚情報に注目し、神経細胞の活動を計測した。父鳥の歌を聞いたことのない幼鳥の神経細胞はさまざまに反応したが、父鳥の歌を学習した幼鳥では父鳥の歌にだけ強く反応する神経細胞が発見された。父鳥の歌を学習することで、大脳聴覚野の神経細胞が変化し、聴いた歌の記憶を担う神経細胞が現れるという生理学的証拠を初めて示したことになるという。

また、活動を抑制する神経伝達を遮断すると、覚えられた父鳥の歌以外にも反応するようになり、柳原研究員は「記憶を担う細胞ができる過程では、抑制系の神経回路が重要な役割を果たすと考えられる」と話した。

研究成果について柳原研究員は「発達の経験によって脳の神経回路が形成され組み変わっていく仕組みの解明につながる。子どもの脳が健やかに発達するための手掛かりが得られると考えている」と話した。

琉球新報 2016.7.8

痛みの感じ方 覚醒度で変化

名大、仕組み解明

名古屋大学環境医学研究所の山中章弘教授らは、スポーツなどで興奮している時はけがをしてもあまり痛みを感じないが、落ち着いてきた際に痛みを感じ始めるという仕組みの



一端を解明した。睡眠や覚醒に関わる脳の「オレキシン神経」の活動が痛みを抑えることを、90匹のマウスを使った実験で明らかにした。けがなどの痛みを抑える治療への応用が期待される。

特定の時期に同神経だけを欠損させられる遺伝子改変マウスを準備。同神経活性を活性化し、痛みの感じ方の変化を調べた。同神経がないと痛みを感じやすくなり、弱い刺激でも痛みを感じるようになった。一方、同神経を活性化させる活性物質と痛みに対する鈍感になることも明らかになった。

山中教授は「動物が痛みを伴うような危険に対し覚醒レベルを上げてその場から逃げるためではないか」と仕組みを推測している。

オレキシン神経の活動が痛みを調節するイメージ(名大提供)

空腹なほどもの覚えよく

空腹時の方が熟睡時よりも学習能力が向上することをショウジョウバエの実験で確認した。東京大学総合研究所の長野真生准教授(神経科学)らの研究チームが発見した。動物の記憶の仕組みは、細胞や生体分子レベルではほぼ共通しており、人にも当てはまる可能性が高いという。

【実験概要】

チームは、通常通りの餌を与えたショウジョウバエのグループと絶食させてお腹にしたグループを比較。また、ある日だけハエの入った容器を通し、電気刺激を与えた。実験後、電気刺激を与えずに別の容器で学習をさせた。これを繰り返すと、ハエは学習し、電気刺激のない容器に集まるようになる。

実験の結果、8、24時間絶食させたハエは、通常餌の餌を与えたハエに比べ、約半分の時間を学習した。

ショウジョウバエで確認 都医学総研

ショウジョウバエを使った学習効率の実験

満腹時、学習に時間がかかる

空腹時、すぐに学習して進む

一緒に電気刺激を与える

繰り返す

別の容器

満腹

空腹

の時間で学習していくことが分かった。また、「記憶力向上の新たなハエの脳の状態を調べ、手がかりが得られた。覚えて、記憶に関わるように神経回路を調節する物質「ドーパミン」の働き、試験の一夜前放出量が、空腹時満腹時を比べると異なる。空腹時の約1.5倍増加していると考えられる」と話している。

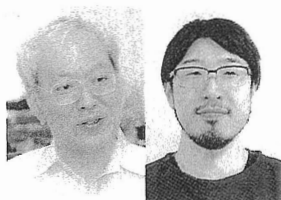
毎日新聞 2016.8.4

脳と心の研究課
侵害受容と鎮痛制御においてオレキシン神経の活動が果たす役割—覚醒度によって痛みの感じ方が変化する仕組み—
研究者：山中 章弘(名古屋大学環境医学研究所 教授)
7月7日解禁(名古屋大学との共同プレスリリース)

日刊工業新聞 2016.7.11

記憶痕跡細胞集団の重複は記憶の関連づけには必要であるが個々の記憶の想起には必要でない

Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories



左から井ノ口 馨、横瀬 淳

井ノ口 馨 *Kaoru Inokuchi*

富山大学大学院 医学薬学研究所 (医学) 生化学講座 教授
科学技術振興機構 (JST) CREST

横瀬 淳 *Jun Yokose*

富山大学大学院 医学薬学研究所 (医学) 生化学講座 特命助教

大久保 (鈴木) 玲子^{1,2} 野本 真順^{1,2} 大川 宜昭^{1,2} 西園 啓文^{2,3} 鈴木 章円^{1,2} 松尾 美奈³
辻村 周平^{1,2} 高橋 由香里⁴ 永瀬 将志⁴ 渡部 文子⁴ 笹原 正清⁵ 加藤 総夫⁴

¹ 富山大学大学院 医学薬学研究所 (医学) 生化学講座

² 科学技術振興機構 (JST) CREST

³ 富山大学研究推進機構 研究推進総合支援センター 生命科学先端研究支援ユニット 動物実験施設

⁴ 東京慈恵医科大学 神経科学研究所

⁵ 富山大学大学院 医学薬学研究所 (医学) 病態病理学講座

Contact

井ノ口 馨 E-mail : inokuchi@med.u-toyama.ac.jp

所在地 : 930-0194 富山県富山市杉谷 2630

U R L : <http://www.med.u-toyama.ac.jp/bmb/index-j.html>

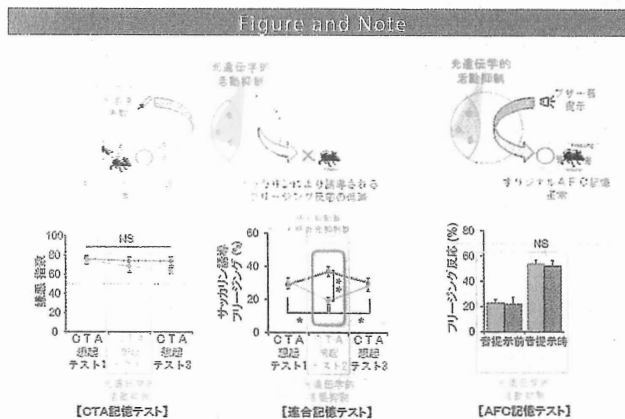
横瀬 淳 E-mail : yokosei@med.u-toyama.ac.jp

記憶を関連づける神経細胞集団の仕組みを解明

私たちは脳に蓄えられているさまざまな記憶情報を関連づけることで、知識や概念を形成していく。記憶はそれぞれ特定の神経細胞集団 (記憶エングラム細胞集団) によって脳内に蓄えられており、記憶同士が関連づけられるときにはそれぞれの記憶を司る細胞集団同士が重複すると報告されているが、重複した細胞集団の役割は不明であった。

本研究では、マウスを用いて味覚嫌悪学習 (CTA) と音恐怖条件付け (AFC) の2つの記憶を関連づける高次連合実験系を用いて、重複した記憶エングラム細胞集団は記憶の関連づけ (連合) のみに関与し、それぞれの記憶を思い出すためには必要ではないことを明らかにした。

記憶が関連づけられる仕組みに関する今回の研究は、記憶情報の関連づけで形成される知識や概念の獲得というヒトの高次脳機能の解明につながる成果である。また、この成果により、個々の記憶に影響を与えることなく、記憶の不要な結びつきのみを切り離すことも可能になり、精神疾患の新たな治療法の創出にもつながると期待される。



図：重複した記憶エングラム細胞集団の光遺伝学的な活動抑制

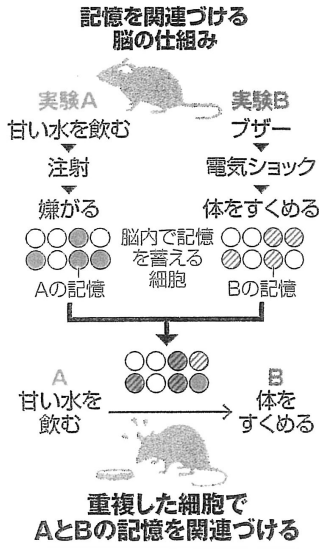
上段：本研究の結果を示した模式図。

下段：連合記憶想起時に光照射で重複細胞集団の活動を抑制したところ、味覚嫌悪 (CTA) 記憶と音恐怖条件付け (AFC) 記憶の連合の結果生じるサッカリン水溶液によるフリージング反応が一過的に低減した (中央図)。一方で、元々のCTA記憶、AFC記憶の想起に対しては、重複細胞集団の活動抑制による変化は認められなかった (左側図および右側図)。



Conceptual advances

基礎研究の進め方には、最初から大物ねらいで仮説を立てて実証していくスタイルと、自分が見出した小さいけれど興味ある現象を追ってボトムアップ型があります。自分に合っていればどちらのスタイルで開始してもいいでしょう。重要なのは自分たちの研究からどのような conceptual advance を出すことが出来るのかを常に問い続ける姿勢です。基礎研究の最終目標は conceptual advance を出すことにあるのですから。



記憶つながる仕組み解明

富山大 脳細胞の活動重複がカギ

ヒトは経験した様々な出来事に関連づけて記憶する。富山大などのグループは、脳の中でどのように関連づけるかをマウスの実験で解明し、27日付の米科学誌サイエンスで発表する。違う記憶どうしを結びつけて新しいアイデアを生み出すなど、脳の高度な働きが解明につながりそうだ。グループが、マウスに甘い水を飲ませた後、腹に薬の注射を繰り返すと甘い水が嫌いになった。次に、プザーを鳴らした後に電気刺激を与えると、プザーの音だけで体をすくめるようになった。さらに甘い水を飲むと、甘い水を飲むだけで体をすくめるようになった。

朝日新聞 2017.1.27

実験したマウスの脳を調べると、好き嫌いの判断にかかわる脳の扁桃体という部分で、甘い水に反応する神経細胞の集まりと、プザーに反応する細胞の集まりがあった。二つの細胞の集まりは一部重複していた。この重複部分の活動を特殊な方法で抑えると、甘い水を飲むだけで体をすくめる割合は減ったが、甘い水は嫌いなままで、プザーの

音に体をすくめる動作も変わらなかった。グループは重複部分は二つの記憶を関連づける働きをしていると結論づけた。富山大の井ノ口馨教授(神経科学)は「ヒトもマウスと共通する仕組みで記憶をつなげているとみられる。記憶の情報を関連づけて知識や概念をつくり出すなど、ヒトの脳の高度な機能の解明につながるだろう」と話す。(瀬川茂子)

魚類・両生類に特異的 アデノシン嗅覚受容体発見

食べ物のにおいに反応

理化学研究所脳科学総合研究センターシナス分子機構研究チームの吉原良浩チームリーダー、脳依紀子客員研究員らの研究チームは、食べ物が発するアデノシン三リン酸(ATP)へと魚が誘引される際に、脳内の嗅細胞で機能する新しいアデノシン受容体「A2c」を発見した。食べ物のにおいへの誘引反応は、すべての生物に共通した根源的行動である。ゼブラフィッシュなどの魚は、食べ物から水中に溶け出す化学物質(アミノ酸、スクレオチドなど)をにおい分子として受容して、餌を探す行動

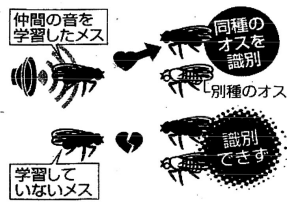
を起こす。研究チームは、今回、そのような化学物質のなかでも特にATPが非常に低濃度で魚を誘引するその受容体が誘引行動を引き起こす神経回路を明らかにしようと試みた。吉原チームリーダーによると、ゼブラフィッシュは、約300種類の嗅覚受容体、約30種類のスクレオチド/スクレオチン受容体を持っている。ATPが活性化される嗅細胞に発現する受容体を網羅的に探索し、

理研グループ

これら330種類の既知の受容体はどれも発現していませんでした」という。ただ、ゲノムデータベースの徹底的な検索により、すべての魚類・両生類に存在する新たなA2cを見つけた。この受容体がATP活性化嗅細胞に発現していることを確認し、1年以上かけて、ようやくこの受容体の同定に成功した。また、どのようにATPのにおいを認識しているかを調べたところ、脳内に入ったATPが酵素反応によって速やかにアデノシンに分解され、A2cを発現する嗅細胞を活性化し、餌を探す行動を引き起こす嗅覚神経細胞回路を駆動させることが分かった。このA2cの遺伝子は、哺乳類、鳥類、爬虫類には存在せず、魚類(淡水魚・海水魚問わず)と両生類に特異的であることも明らかとなった。吉原チームリーダーは「得られた知見は、脳科学、進化生物学、水産業の3つの分野において役立つと思います。脳科学では、におい入力から餌を探す行動、採食行動を引き起こす神経回路の全貌解明に向けて大きなステップを踏み出すことができました。進化生物学では、水棲脊椎動物(魚類・両生類)に特異的なA2c遺伝子の分子進化と機能の進化的な進化過程における新たな知見が得られると予想されます。水産業では、養殖の現場におけるアデノシンを利用した効率的な給餌法の開発や無魚粉飼料の低コスト化などの貢献が期待できます」としている。

科学新聞 2017.5.26

ハエ羽音の「歌」学習



名大院チーム

ハエの一種「シヨウジョウバエ」が交尾相手を認識するため、ほかの種類との羽音の違いを後天的に学習していることを、名古屋大学院理学研究科の上川内あづさ教授と石元広志特任講師らの研究チームが突き止めた。人間の音声認識の生理的な仕組みの解明に役立つことが期待される。成果は「付英科学誌」に掲載された。

(坪井千穂)

シヨウジョウバエは脳が小さく観察や繁殖が容易なことから、生物一般の脳内機構を調べる実験に用いられる。オスは羽音で、求愛の「歌」のような独特なリズムの音を発し、メスにアピールすることが知られているが、生まれてから、生物一般の脳内機構を調べる実験に用いられる。オスは羽音で、求愛の「歌」のような独特なリズムの音を発し、メスにアピールすることが知られているが、生まれてから、生物一般の脳内機構を調べる実験に用いられる。オスは羽音で、求愛の「歌」のような独特なリズムの音を発し、メスにアピールすることが知られているが、生まれてから、生物一般の脳内機構を調べる実験に用いられる。

人間の言語習得解明に期待

果、スピーカーでシヨウジョウバエの羽音だけを聴かせ続けたグループは、シヨウジョウバエの羽音だけに反応し、交尾相手を識別することができた。だが、まったく音を聴かせなかったり、別種のハエの羽音を聴かせ続けたりしたグループは、音の識別ができなかった。

チームは、脳内の神経伝達物質「GABA」が学習機能を担っていることも特定。この量を減らしたグループは音の識別能力が大幅に低下していた。

上川内教授は「人間の言語学習にも、生理的に共通する仕組みがある可能性がある。解明につなげたい」と語った。


中日新聞 2018.3.23

井ノ口教授(博士)

東レ科学技術賞

富山大は8日、同大学院医学薬学部(医学子)が第58回東レ科学技術賞を受賞したと発表した。受賞は東レ科学振興会(東京都)が学術上の業績が顕著な人や重要な発見をした人を対象に、毎年2人前後に贈っている。

井ノ口教授は、記憶の分子機構や回路形成に関する研究を行っている。別々の記憶が結び付いて高次の記憶ができる仕組みの発見などの業績

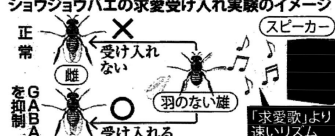


富山大は8日、同大学院医学薬学部(医学子)が第58回東レ科学技術賞を受賞したと発表した。

北日本新聞 2018.3.09

羽音の「愛」伝わる仕組み解明

シヨウジョウバエの求愛受け入れ実験のイメージ



シヨウジョウバエの雄が求愛で出す羽音のリズムを雌が聞き取る仕組みについて解明した名古屋大学の市原あづさ教授(神経科学)らの研究チームが17日付の米科学誌に発表した。チームは人間が音声を認識するメカニズムの解明につながることを示している。

名古屋大チーム 雌のハエ 神経伝達物質関与

カニシタの解明につながる。Aを放出しにくくしたハエを作って音を聞かせた。ハエは求愛の際、片方の羽を振って音を聞かせる。羽を切った雌は求愛を受け入れなかった。羽を切った雌は求愛を受け入れなかった。羽を切った雌は求愛を受け入れなかった。

チームは、音の伝達にGABAが関与していることを示している。GABAは、神経細胞が興奮を抑える働きをする。チームは、GABAの量を減らした雌は、求愛を受け入れなかったことを示している。

毎日新聞 2018.4.18

運動が記憶力を活発にさせる可能性があることを、富山大の井ノ口教授とアラム・ジャハーンギール特命助教らが動物実験で突き止めた。認知症や記憶力の低下の予防・回復につながることを期待され、研究成果は米科学誌「ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス」電子版に掲載された。

記憶は、最初に脳の「海馬」と呼ばれる部分に保存される。ただ、海馬は記憶容量が小さく、大脳皮質へ移って長期の記憶になる。

井ノ口教授は、神経細胞が次々と作り出される「神経新生」という現象が、海馬で古い記憶を消す役割を担っていることを解明していたが、今回の研究で、神経新生によって古い記憶が消されることで海馬の記憶容量が保たれていることを明らかにした。

記憶力アップ 運動が鍵?

富山大教授ら 可能性突き止める

記憶できる量が増えるまでの期間を比べてみると、回し車のあるケージで運動しながら暮らすラットは、そうでないラットに比べて、神経新生がほぼ2倍のスピードで進んだ。

井ノ口教授は「人も運動によって神経新生が促される効果が期待できる」としている。

読売新聞 2018.7.10

記憶関連付け 仕組みを解明

富大 認知症など治療に光

富山大大学院医学薬学部(医学子)が第58回東レ科学技術賞を受賞したと発表した。受賞は東レ科学振興会(東京都)が学術上の業績が顕著な人や重要な発見をした人を対象に、毎年2人前後に贈っている。

井ノ口教授は、記憶の分子機構や回路形成に関する研究を行っている。別々の記憶が結び付いて高次の記憶ができる仕組みの発見などの業績



富山大は8日、同大学院医学薬学部(医学子)が第58回東レ科学技術賞を受賞したと発表した。

つながらぬ可能性がある。研究グループは、マウスに電気ショックを与える実験で、音を記憶する脳野では、より個々の記憶の共有がなされていると示している。一方、個々の記憶はそれぞれ別の異なる領域で神経細胞に刻まれている。

研究グループは、マウスに電気ショックを与える実験で、音を記憶する脳野では、より個々の記憶の共有がなされていると示している。一方、個々の記憶はそれぞれ別の異なる領域で神経細胞に刻まれている。

富山新聞 2018.6.15

忘れた記憶薬で回復

世界初 認知症治療役立つ可能性

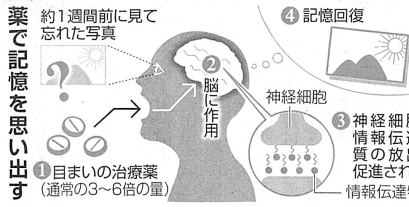
東大など発見

忘れてしまった記憶を薬で回復させる実験に成功したと、東京大や北海道大などの研究チームが発表した。記憶を回復させる効果がある薬の発見は世界初という。アルツハイマー病などの認知症の治療に役立つ可能性がある。米科学誌電子版に8日、論文が掲載された。

チームは20代を中心とした健康な男女計38人に10枚程度の写真を見せ、約1週間後に覚えていたかを調べる実験を実施。目まいの治療薬として使われている「メリスロン」を飲んだ場合と、飲まなかった場合とで正解率を比較した。その結果、薬を飲むと

忘れていた写真を思い出すケースが増え、正解率は最大で2倍近く上昇することが判明。忘れた写真が多かった人ほど効果があり、見たかどうか判別が難しい写真で正解率がより高まる傾向があることも分かった。この薬は脳内の情報伝達に関わる「ヒスタミン」という物質の放出を促進する

働きがある。この効果が記憶を担う神経細胞が活性化し、忘れた記憶の回復につながったとみている。記憶が回復する仕組みを詳しく解明し、認知症の研究成果と組み合わせることで、アルツハイマー病などの新たな治療法につながる可能性がある。チームの池谷裕一東大教授（薬理学）は「記憶回復のメカニズムが分かったので、今後はより効果の高い薬の開発につながりたい。認知症患者らの生活の質を高められる可能性がある」と話している。



産経新聞 2019.1.9

外部から光当て 脳神経活動操作

光を外側から照射することで、脳神経の活動を活性化させたり、抑制したりできる技術を、名古屋大環境医学研究所の山中章弘教授（神経科学）らのグループが開発した。開発が進めば、電気刺激を治療に使っている重度のうつ病などの新しい治療法となる可能性がある。二十三日に米科学誌電子版で発表し

光を当てて特定の細胞の機能を操作する技術は光遺伝学と呼ばれ、二〇〇五年に登場して以来、研究が進んでいる。この技術で脳神経を操作できるが、外からの光では体の深い部分に届かないため、光ファイバーを体に直接差し込む必要があり、体内組織を傷つける問題があった。

名大教授ら開発 うつ病治療に応用期待

グルーブは、体への透過性の高い近赤外光を照射し、体内で神経を操作できる可視光に変換する方法を確立した。マウスを使った実験で、行動を制御する脳の線条体に、近赤外光を可視光に変換する性質のある「フリンター」の深さ「口粒子」を微量注入し、外部から近赤外光を当てた。脳内

27 10版 2018年(平成30年)7月11日(水)

Change our future Kyoto University



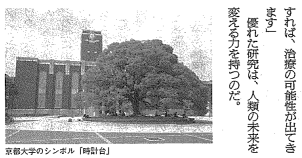
中国出身、米留学で博士号を取得した王丹准教授。「京大には、世界トップレベルの研究ができる環境が整っています」と話す

京都大学

「脳は人間の司令塔であり、あらゆる行動の中心である。脳神経細胞が活性化し、忘れた記憶の回復につながったとみている。記憶が回復する仕組みを詳しく解明し、認知症の研究成果と組み合わせることで、アルツハイマー病などの新たな治療法につながる可能性がある。」

山中教授によると、実験では近赤外光の効果が出るのは体の表面から二〜三センチの深さという。「人間の脳など、さらに深くに効果が出るよう効率を高めたい」と話している。

「脳は人間の司令塔であり、あらゆる行動の中心である。脳神経細胞が活性化し、忘れた記憶の回復につながったとみている。記憶が回復する仕組みを詳しく解明し、認知症の研究成果と組み合わせることで、アルツハイマー病などの新たな治療法につながる可能性がある。」



京都大学のシンボル「時計台」



iGEMには世界各国から優秀な若手研究者が参加

中日新聞 2019.1.23

朝日新聞 2018.7.11

2.6 研究成果の概要

2.6.1 研究領域の設定目的

心的外傷後ストレス障害による記憶の消去障害や、記憶情報をコードする特定神経細胞集団の賦活化による記憶の想起などは、形成された記憶が質的・空間的に不動化される記憶の静的な側面を示している。一方で安定とされる長期記憶情報であっても分子・空間的に留まることのない側面を持つことがショウジョウバエ・マウスなどの研究から示唆されている。例えば長期記憶は想起により脆弱化し、その再固定化に新たな遺伝子発現を必要とする。また長期記憶の維持にも持続的な転写が必要であり且つその転写機構は時系列に沿って変換して行くことが示唆されている。また学習記憶機構そのものも加齢に加えて孤立化や空腹状態、睡眠など外的・内的要因により変わり得ることが分かってきた。本領域ではこうした記憶情報の変化と記憶機構の変換を「記憶ダイナミズム」として、その実体解明を目標とする新たな学問領域を創出した。動物は環境への適応過程で各種生理機能が種ごとに多様な表現型を示すに至った。我々はこの多様性を利用して共通原理を多く見出してきたが、学習記憶システムも動物ごとに多様な表現型を示す。本研究領域では光遺伝学、超高速イメージング等を用いた分子・細胞・回路・行動レベルでの解析手法を、多様なモデル動物の傑出した実験システムに導入し、その成果を集約統合した。これにより「記憶ダイナミズム」の共通原理と、進化上獲得した独自の学習記憶システムを解明するとともに、脳高次機能研究の一つの先進的なモデルを提供することを目指した。

具体的な成果については後述の研究成果にあるが、本研究領域の5年間の研究成果は *Science*, *PNAS*, *Nature Neuroscience*, *Neuron*, *J Neurosci* など主要な総合科学誌、神経科学専門誌に掲載され、多くのインパクトを記憶研究のみならず神経科学全体に与えた。これは記憶が遺伝子・神経細胞・シナプス・神経回路の機能集積により達成される、重要な脳高次機能であることの表裏として、「記憶ダイナミズム」の包括的理解が脳科学の重要な研究領域である神経遺伝学、神経生理学、神経回路学の研究水準の向上に寄与したためと考える。各モデル動物の特徴を利用して記憶ダイナミズムの共通原理を世界に先駆けて明らかにする一方で、各モデル動物の学習記憶システムの独自性を見出し、これら成果を世界に向けて発信して研究領域を確立した。

2.6.2 主な成果

本研究領域では1) 記憶情報の形成過程、2) 記憶情報の回路・分子レベルでの動的特性と、3) 生理状態・環境変化に応じた記憶機構の変化を担う神経回路と分子機構について、共通原理と独自性を明らかにすることを研究目標として設定した。5年間で発表した英文論文(査読有)数は合計338報にのぼり、Science、Neuron、Nature Neuroscience、Nature Methods、Cell Reports、Nature Communication、Journal of Neuroscience、Development、EMBO Reports、PNAS、Current Biology、PNAS、Plos Genetics、elifeなど、多くの一般誌、主要神経科学誌に研究代表者が主体(筆頭著者または責任著者)となって論文が発表される大きな成果を上げることができた。特に5年間の研究期間の後半となる2016年以降に数多くの研究成果が論文となったことは、数多くの研究課題が本研究領域で育まれた事実を明確に示すものといえる。以下に設定目標毎の達成状況を記す。

1) 記憶情報の形成過程: 記憶情報がどのようにして形成されるのか? 記憶が生まれる仕組みを理解することを目的とした研究が進められ、以下の成果を得た。

感覚入力が連合される場が記憶形成の場となるが、そこで起きていることを細胞・シナプスで調べるには連合の場と入出力経路が同定・操作可能な線虫、ショウジョウバエでの遺伝学的イメージング解析が極めて有用である。飯野らは食性塩濃度学習を一細胞レベルで解析・操作する実験システムを構築し、塩の受容に関わるASER神経細胞から介在神経細胞AIBへのシナプス伝達の可塑的变化がホスホリパーゼPLC-1依存性に起こること、さらにASERで、PLC/DAG/PKC経路を担うDAG(ジアシルグリセロール)レベルが塩濃度学習により増減することなどを見出した(**Nat Commun 2013**)。また飢餓と連合した嫌悪性塩濃度学習では、新規に同定したインスリン受容体アイソフォームDAF-2cが、飢餓条件下での塩濃度学習過程で、カルシテニンホモログCASY-1により、ASERの軸索部に運ばれることが、学習の成立を裏打ちするシナプス可塑性の発現に必要なことを示した(**Science 2014**)。

ショウジョウバエの匂い条件付けでは、条件刺激(CS)となる匂い情報が、触覚葉(AL)という嗅覚2次中枢により記憶中枢のキノコ体(MB)に伝達され、そこで無条件刺激(US;報酬または罰情報)と統合され記憶情報が形成される。齊藤と多羽田らはMBと、MBに投射するドーパミン(DA)作動性神経、MBからの入力により条件反応(CR)を制御する遠心性細胞MBONを含む学習回路を対象に、in vivo、ex vivo イメージング解析と神経活動操作による学習記憶行動の解析を行った。多羽田らは発生学的に異なるMB神経細胞、 γ CRE-pと γ CRE-n細胞を同定し、罰学習に必要な γ CRE-pと、報酬学習に必要な γ CRE-n細胞が相互抑制回路を形成し、この二種のMB細胞とMBONとで構成される神経回路活性が、報酬または罰条件付けにより可塑的な変

化を起こすことで、学習した匂いの Valence をコードすることを見出した (**Cell Rep 2018**)。一方、齋藤らは CS と US が同期して入力した MB 細胞で、逆行性シグナルが産生され、神経活動非依存性に DA 放出を誘導する新たな放出機構を見出し、DA による連合学習の強化の回路モデルを提案した (**J Physiol 2013, eLife 2017**)。また上川内らは言語学習の原型ともいえる、求愛歌をハエが学習する仕組みを解剖遺伝学的に解析し、求愛歌に対する配偶行動を制御する神経細胞を同定した (**eLife 2018**)。

線虫、ショウジョウバエで記憶が形成される様子をリアルタイムにイメージング解析で捉え、因果関係を明らかにしていく一方で、公募班の佐藤、林 (康)、美津島らは哺乳類モデルでも記憶形成過程で神経細胞活動遷移を同一動物で捉えることに成功している。佐藤と林 (康)は仮想直線迷路を顕微鏡下に固定したマウスに学習をさせる系を開発し (**eNeuro 2017**)、学習過程で海馬場所細胞の消長を世界に先駆けて捉え、場所細胞の活動が学習した探索行動の神経基盤となっていること、探索する目的地を移動させた再学習に、自閉症に関連したシナプス後部の足場タンパク Shank2 が必要なことを見出した。美津島は海馬 CA1 領域でエピソード体験をさせているときや、経験直後に 600~1200 ms 継続する自発的高頻度発火活動 (super firings) の頻発と、その数分後から現れる 30~100 ms の短期高頻度発火 (ripple) の特徴を捉えた。さらにエピソード曝露 30 分後に急性海馬スライスを作成し、経験したエピソード毎に興奮性・抑制性のシナプスが異なる様式で多様に強化されることを見出した。海馬 CA1 領域には自己の空間配置に対応した神経活動を示す場所細胞があるが、壇上らは海馬 CA1 領域の場所細胞は自己の場所だけでなく、他者の場所も同時に表象していることを見出した (**Science 2018**)。他者の場所に対する発火頻度のマップから、他者の場所が網羅的に表現されていること、場所細胞のうち、85%の細胞が他者の場所特異的に発火すること、場所細胞の発火パターンから、「自己」と「他者」の存在する場所を再構成 (デコーディング) できることも明らかになった。以上の成果は場所細胞が表象する場所記憶のダイナミズムには、他者が存在する場所をも含んでいることを明らかにした重要な発見である。また井ノ口らは異なる音刺激で逐次条件付けされたマウスでは、扁桃体において共有化された記憶痕跡細胞が形成される一方で、各音の周波数情報、即ち記憶のアイデンティティは、痕跡細胞が聴覚野と形成する音特異的なシナプスにコードされることを世界で初めて見出した (**Science 2018**)。

哺乳類は線虫やショウジョウバエより遙かに高度な次元で感覚入力が情報処理されるが、これらの研究から、線虫やショウジョウバエ同様、哺乳類でも学習過程が細胞・シナプスレベルで表象される実体が分かった。分子レベルでは、公募班の高宮は神経活動依存性に糖鎖修飾されない AMPA 型受容体が脂質ラフトに集積する新たなシナプス可塑性モデルを提唱し、公募班の川

口は小型中枢シナプスの直接記録から、Ca²⁺の高緩衝システムとシナプス小胞の開口放出後の高速補充システムにより、シナプス伝達を安定化し可塑的变化を可能にする仕組みを明らかにした (**Cell Rep 2017**)。こうした新知見をイメージング解析などに取り込むことで、記憶が形成される過程を一分子レベルまで落とし込んで解析することも将来可能であろう。またシナプスレベル、細胞レベルで学習過程を捉えるだけでなく、公募班の和多らは学習の進行に伴う、ヒストン修飾 (アセチル化) の変動を、樹状突起スパインの刈り込みと連動してキンカチョウの歌学習から見出している。

魚類は線虫、ショウジョウバエといった下位モデル動物と上位哺乳類モデルとの中間に位置するといえる。公募班の日比はゼブラフィッシュで視覚恐怖条件付けに関与する小脳顆粒細胞を同定した (**Sci Rep 2017**)。一方で、吉原らは二次嗅覚神経回路 (嗅球から高次嗅覚中枢への軸索投射) を包括的に解析し、匂い情報は嗅球から4つの高次脳領域に伝達され、それぞれの脳領域では、匂い情報が異なる様式で表現されるという匂い記憶の解剖学的基盤を確立した (**Nat Commun 2015**)。

2) 記憶情報の回路・分子レベルでの動的特性：ここでは記憶情報の安定化、アップデート、想起・消去といった流動性の特徴とその発生機序を明らかにすることを目的として研究を進めた。長期記憶情報は学習時に同期して働いた細胞同士の結びつき (セルアセンブリ) としてコードされ、安定化すると考えられる。こうした記憶痕跡細胞の特性について、松尾らは特定の細胞集団に記憶情報が配分されると、これが再学習でも使われ、代替え補償が効かないこと (**Cell Rep 2015**)、時間経過と共に起こる記憶の汎化では、学習により形成された海馬での記憶痕跡細胞の集団活動に、学習した文脈特異性が失われることを見出した (**J Neurosci 2018**)。公募班の櫻井と小川は記憶の形成に伴い、海馬から大脳新皮質へと記憶痕跡細胞の形成が移ることを見出し (**Eur J Neurosci 2017**)、記憶情報流動性の基盤となる記憶痕跡細胞の一般的な生理学的特性が次々と明らかになった。一方、井ノ口は記憶同士を関連づけて連合記憶を形成する際、重複した記憶痕跡細胞集団は記憶の関連づけ (連合) のみに関与し、それぞれの記憶想起には必要ではないことを見出した (**Science 2017**)。加えて公募班の竹田は、サルに手がかりの図形から、特定の図形を想起する課題で、大脳皮質の5層に存在する神経細胞が、手がかりとなる刺激と想起の対象との間の連合記憶を符号化する一方、6層の神経細胞は想起された情報を出力しており、5層から6層へと情報が受け渡される過程で、想起の対象へと表象が変換されることを示した (**Neuron 2016**)。同様にサルを用いて、公募班の細川は機能的カテゴリ記憶を基にした想起行動では、カテゴリの情報をコードする神経細胞、予測される結果をコードする神経細胞、刺激と結

果の関係性（ルール）をコードする神経細胞を前頭連合野で見つけ（**J Neurosci 2016**）、前頭連合野がカテゴリやルールという情報から、結果という将来予測情報をダイナミックに計算していることを見出した（投稿中）。これらの結果は記憶痕跡細胞の特性は一様で無く、異なる機能を担っていることを示唆している。記憶痕跡細胞が形成される過程について、公募班の八木はクラスター型プロトカドヘリンの多様性が神経細胞の集合活動（セルアセンブリ）に関与することを示唆し（**Front Mol Neurosci 2017**）、齊藤らはショウジョウバエでも記憶中枢で記憶痕跡細胞が形成されることを見出し、予定記憶痕跡細胞では、最初期遺伝子 *c-fos* と転写因子 CREB 間に転写サイクルが形成され、記憶痕跡が安定化することを明らかにした（**Cell Rep 2018**）。これらの結果から、特定の細胞集団への記憶情報の配分が、種を越えて保存された記憶原理であることが明らかになると共に、個々の記憶痕跡細胞の個性や、記憶痕跡細胞の形成機構についての理解が大きく進んだ。

長期記憶情報の動的特性とは何か？公募班の平野と齊藤は、長期記憶の安定化に形成時とは異なる遺伝子転写機構が必要であり、保持時間経過と共に転写機構も変化することをショウジョウバエで見出した。さらに保持のための転写機構の変化が、記憶情報の消去学習に対する耐性獲得の分子基盤となっていることを明らかにした（**Nat Commun 2016**）。ところで記憶情報の消去学習は再学習でもある。公募班の Johansen らはマウスの恐怖記憶の形成と消去において、扁桃体に投射するノルアドレナリン（NA）神経細胞は、恐怖記憶の形成に関与する一方で、内側前頭前野に投射する NA 神経細胞は恐怖記憶の消去に関与すること（**Nat Neurosci 2017**）、さらに単なる消去学習だけでは（記憶痕跡が残るため）恐怖記憶のフラッシュバックが起きてしまうが、消去学習でオートファジー活性の促進ペプチド tBC を、タンパク質合成阻害剤とともに脳内に注入すると、記憶痕跡（記憶エンGRAM）そのものが消失することを井ノ口らは明らかにした（**Science 2018**）。これらは消去学習が種を越えて、通常の学習とは異なる、分子・神経機構に依存した状況依存的学習であることを示している。では消去学習によらない自発的な記憶情報の消失（忘却）はどのようにして起こるのか？石原らは線虫を用いて、嗅覚順応の消去を制御する因子として膜タンパク MACO-1、受容体チロシンキナーゼ SCD-2、シナプス関連タンパク SNT-3などを同定するとともに、嗅覚順応の形成メカニズムが異なる神経細胞では、忘却を制御する際に異なるシグナル経路を用いていることを明らかにした（**J Neurosci 2017**）。

3) 生理状態・環境変化に応じた記憶機構の変化：記憶機構は加齢、睡眠、自発性などの要因により変化し、記憶力を低下させたり亢進させたりする。こうした記憶機構の変化がどのようにして起こるのか？を明らかにすることを目的に研究を進めた。齊藤らは空腹のショウジョウバエ

では、普通の長期記憶学習では利用しない転写因子 CRTC が関与する機構により長期記憶の形成が亢進することを見出したが (**Science 2013**)、公募班の尾藤らは CRTC が海馬依存性の記憶機構には不要だが、扁桃体依存性の記憶機構には必須であることを見出している (**Neuron 2014**)。扁桃体は情動の処理中枢であるが、ショウジョウバエで CRTC が働くキノコ体は扁桃体、海馬両者との相同性が示唆されている。ショウジョウバエの学習課題は情動性の条件付けであり、空腹により情動の価値が増幅することを CRTC の関与は含意しているのかもしれない。

加齢による記憶力の低下 (加齢性記憶障害) は学習記憶能力を持つ、恐らく全ての動物でみられる記憶機構の変化である。齋藤と公募班の殿城らは寿命が 1-2 ヶ月と短いショウジョウバエの特長を利用して、加齢性記憶障害の分子・神経機構を探った。齋藤らは加齢性記憶障害の抑制変異体を用いたプロテオミクス解析から、グリア細胞で代謝を担うピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) の発現が、加齢により上昇して記憶障害を起こすことを見出した (**Neuron 2014**)。殿城らは脳インスリン産生細胞で産生されるインスリン様ペプチド Dilp3 の産生が加齢により低下することで、脳脂肪細胞のインスリンシグナルが低下し、結果として記憶障害を起こすことを明らかにした (**Cell Rep 2017**)。一方、久恒らは高齢マウスやアルツハイマー病モデルマウスにおいてアストロサイトやミクログリアにおける炎症性サイトカインの産生上昇を見出し、これがシナプス機能の低下と併せて認知機能障害を引き起こすことを見出している (**Sci Rep 2017**)。これらの結果は加齢による記憶機構の変化が、種を越えて神経細胞自身でなく、周辺の細胞組織の機能変化に起因することを示唆している。

上川内らの研究から、ショウジョウバエと鳴禽とで、歌学習の神経機構の類似性が細胞レベルで示唆されたが (**eLife 2018**)、公募班の和多らはキンカチョウで、自発的な発声学習が歌学習機構の活性化に必要であり、発声学習の臨界期を規定していること (**PLoS Biol 2018**)、同じく公募班の杉山 (矢崎)は、注意・覚醒といった内的要因に応じて活性化される歌学習の神経機構の存在を示した (**Behav Proc 2018**)。興味深いことにマウスは自発活動そのものを手掛かりとして、空間学習を達成できることを公募班の野村は示した (**PNAS 2015**)。また視覚記憶に基づく配偶行動を示すメダカでは、ライバルとなる他の雄により、配偶行動に結びつく視覚学習が阻害される、特徴的な記憶機構の存在が公募班の竹内により見出された。

睡眠は形成された記憶情報の安定化や消失に大きな影響を与える要因であるが、公募班から多くの優れた成果が得られた。坂口は海馬新生神経細胞が睡眠中に興奮することが、特定の成熟期では記憶固定化に必要であること、さらに、この特定成熟期に記憶情報の汎化が起きやすいことを明らかにした (**Mol Brain 2016**)。山口は覚醒時の嗅覚学習によって、その後の睡眠中の嗅皮質における神経細胞の同期的発火活動が促進することを明らかにし、この同期的発火が、睡眠中の嗅覚神経回路の可塑性促進シグナルとして働くというモデルを立てた (未発表)。山中は視床

下部のメラニン凝集ホルモン (MCH) 神経細胞の軸索が海馬にも密に投射し、MCH 神経細胞の活動が睡眠覚醒だけでなく、記憶にも影響を与えることを見出した。MCH 神経の活動は主にレム睡眠時に高くなるが、人為的に保持のタイミングで MCH 神経細胞を活性化させると認知記憶、文脈恐怖記憶が有意に低下した。水関はレム睡眠が海馬を始め、外側膝状体と一次視覚野で神経細胞の発火頻度の減少と同期性の上昇を引き起こすことを見出した (投稿中)。これらの結果はレム睡眠時の MCH 神経活動が、海馬を始めとする多様な脳領域において、神経細胞の発火や同期性を調節することで (不要な) 記憶を抑制、または消去することを示唆している。公募班の林 (悠)らはレム睡眠を抑制する神経細胞を同定し、薬理遺伝学的方法によりレム睡眠を阻害し、レム睡眠には徐波をノンレム睡眠中に促進する効果があることを見出したが (**Science 2015**)、こうした睡眠操作技術を利用することで、睡眠が記憶痕跡細胞の形成や保持、それを裏打ちする分子機構をどのように制御しているのか今後明らかになることが期待される。

4) 研究方法の開発他

本領域では記憶ダイナミズムを明らかにする上で重要な研究技術の進展も多くあった。青西は広い脳領域を対象としたカルシウムイメージングから得られるビッグデータから有意な応答を抽出するアルゴリズムを開発し、イメージング解析の可能性を広げた。竹本は学習に伴いシナプス移行する AMPA 受容体 GluA1 ホモマーを光照射により特異的に機能破壊する技術を開発し、*in vivo* で海馬記憶が消失されることを示した (**Nat Biotechnol 2017**)。古田は多様なシグナルを活性化・阻害するケージド化合物を合成し、細胞種特異的なシグナルの ON/OFF を誘導する化学遺伝学的手法を確立し、同一動物で可逆的な表現型の表出を可能にした。さらに光分解性保護基を上記化合物に付与することで時空間的な表現型表出も可能となった。村越は分子間相互作用や分子活性化の蛍光寿命イメージングを行うための新規蛍光タンパク (Shadow Y) や光応答性 CaMKII 阻害分子を開発し、CaMKII 活性化が海馬神経細胞のシナプス可塑性の誘導と記憶形成に必要であり、両者の維持には必要無いことなどを明らかにした (**Neuron 2017**)。

神経活動を計測するため、広く蛍光 Ca^{2+} センサーが利用されているが、これまでの実用的な蛍光 Ca^{2+} センサーは計測波長域が緑色域に限定されており、他の蛍光センサーとの併用が制限されてきた。中井と尾藤らは Ca^{2+} との結合領域に新規の配列を用いることで Ca^{2+} に対する結合能を上げ、高頻度の神経発火の計測に可能な超高感度かつ超高速の赤色 Ca^{2+} センサー“R-CaMP2”を共同で開発した (**Nat Meth 2015**)。イメージング解析において GCaMP は Ca^{2+} 応答を調べるために最もよく利用される蛍光プローブであるが、異なる神経細胞での Ca^{2+} 応答を同時に調べるには、GCaMP とは異なる蛍光波長特性を持つ Ca^{2+} プローブが有用である。本技術の開発はあらゆる神

経科学領域に大きく寄与する成果といえる。

2.6.3 まとめ

以上、簡単に本領域の研究成果を抜粋し紹介したが、設定した1) 記憶情報の形成過程、2) 記憶情報の回路・分子レベルでの動的特性と、3) 生理状態・環境変化に応じた記憶機構の変化を担う神経回路と分子機構について実に多くの成果を得ることが出来た。記憶行動は精神疾患や依存症などとも深い結びつきを持つことは、例えばドーパミンなどモノアミンの持つ多様な生理機能からも良く分かる。ここに上がった本領域では研究成果の多くが、共同研究のみならず、班会議やワークショップにおける討議や情報提供を背景とした有形無形の協力が研究者間で形成された賜物である。

2.7 総括班の活動

2.7.1 班会議、ワークショップ、研究会の開催

【2013年度】

第6回分子高次機能研究会（共催）

日時：2013年9月17日-19日

場所：軽井沢倶楽部ホテル ホテル軽井沢 1130（群馬）

大会長：坂井貴臣（首都大学東京）

第1回総括班会議

日時：2013年10月21日-22日

場所：京都ガーデンパレス（京都）

東京大学新領域バイオイメージングセンター国際ジョイントシンポジウム」（協賛）

日時：2013年11月14日

場所：東京大学本郷キャンパス福武ホール（東京）

【2014年度】

第1回班会議、第2回総括班会議

日時：2014年6月16日-18日

場所：シェラトンホテル札幌（北海道）

第7回分子高次機能研究会（共催）

日時：2014年8月25日-27日

場所：KKR 沼津はまゆう（静岡）

大会長：森本高子（東京薬科大学）

包括脳 冬のシンポジウム

「マイクロ精神病態」「記憶ダイナミズム」2領域合同若手シンポジウム

日時：2014年12月13日

場所：東京ガーデンパレス（東京）

演者：竹内秀明(東京大学)、矢崎陽子(OIST)、上野耕平(東京都医学研究所)、佐藤正晃(JST さきがけ/理化学研究所)、難波寿明(新潟大学)、奥野浩行(京都大学)、久保健一郎(慶應義塾大学)、坂口昌徳(筑波大学)

【2015年度】

第8回分子高次機能研究会（共催）

日時：2015年8月17日-19日

場所：KKR ホテル金沢（石川）

大会長：平野恭敬（京都大学）

イメージング・記憶行動解析機器利用講習会

日時：2015年8月31日-9月4日

場所：東京都医学総合研究所（東京）

シンポジウム「記憶のメカニズムを理解する-数理解析からのアプローチ」

日時：2015年9月18日

場所：東京大学大学院農学生命科学研究科 フードサイエンス棟 中島董一郎記念ホール

演者：青西亨(東京工業大学)、石原健(九州大学)、池谷裕二(東京大学)、齊藤実(東京都医学総合研究所)、石井信(京都大学)、廣井誠(東京大学)、豊泉太郎(理化学研究所)、森本菜央(名古屋大学)、深井朋樹(理化学研究所)（講演順）

第2回班会議および国際シンポジウム、第3回総括班会議

<班会議>

日時：2015年11月4日-5日

場所：班会議京都ガーデンパレス（京都）

<国際シンポジウム>

日時：2015年11月6日

場所：京都大学芝蘭会館稲盛ホール（京都）

海外招聘演者：Mark R. Mayford(The Scripps Research Institute, La Jolla, USA)、Ann-Shyn Chiang(National Tsing Hua University, Taiwan)、Noelle L'Etoile(University of California San Francisco, USA)、Florian Engert(Harvard University, USA)

包括脳 冬のシンポジウム

「適応回路シフト」「記憶ダイナミズム」「マイクロ精神病態」3領域合同若手シンポジウム

日時：2015年12月19日

場所：一橋大学一橋講堂（東京）

演者：中村晋也(東北大学)、渡部文子(東京慈恵会医科大学)、山崎大介(東京大学)、菅谷佑樹(東京大学)、國友博文(東京大学)、船水章大(沖縄科学技術大学)、水口留美子(理化学研究所)、相田知海(東京医科歯科大学)、中澤敬信(大阪大学)（講演順）

【2016年度】

第3回班会議、第4回総括班会議

日時：2016年6月27日-29日

場所：ヤマハリゾートつま恋（静岡）

第9回分子高次機能研究会（共催）

日時：2016年8月25日-27日

場所：ホテルシーパレスリゾート（愛知）

大会長：上川内あづさ（名古屋大学）

次世代脳 冬のシンポジウム

「論文カバーレターとアブストラクト書き方講座」

日時：2016年12月21日

場所：一橋大学一橋講堂（東京）

演者：Charles Yokoyama(理化学研究所)

「適応回路シフト」「記憶ダイナミズム」「マイクロ精神病態」3領域合同若手シンポジウム

日時：2016年12月21日

場所：一橋大学一橋講堂（東京）

演者：佐々木拓哉(東京大学)、北岡志保(神戸大学)、植松朗(理化学研究所)、濱口航介(京都大学)、掛川渉(慶應義塾大学)、佐野裕美(生理学研究所)、豊島学(理化学研究所)、澤田知世(理学研究所)、日置寛之(京都大学)、林悠(筑波大学)、村田唯(熊本大学)、殿城亜矢子(千葉大学)
(講演順)

【2017年度】

第16回医学研国際シンポジウム（共催）

Functions and mechanisms of neuromodulation : a synthesis of knowledge from various organisms

日時：2017年5月17日

場所：東京都医学総合研究所（東京）

第10回分子高次機能研究会（共催）

日時：2017年9月4日-6日

場所：ほほえみの宿（山形）

大会長：殿城亜矢子（千葉大学）

次世代脳 冬のシンポジウム

「適応回路シフト」「記憶ダイナミズム」「オシロロジー」「人工知能と脳科学」4領域合同若手シンポジウム

日時：2017年12月20日

場所：一橋大学一橋講堂（東京）

演者：上野耕平(東京都医学総合研究所)、國友博文(東京大学)、北西卓磨(大阪市立大学)、平田普三(青山学院大学)、鈴木雅大(東京大学)、松本有紀子(京都大学)、中嶋浩平(東京大学)、小林勝哉(京都大学)（講演順）

第4回班会議およびワークショップ、第5回総括班会議

日時：2018年3月5日-7日

場所：富山国際会議場（富山）

海外招聘演者：Joshua Dubnau(The State University of New York at Stony Brook)、Sheena Josselyn(University of Toronto)、Bong-Kiun Kaang(Seoul National University)

2.7.2 アウトリーチ

【2014年度】

「脳老化の予防と改善」

日時：2014年6月11日

場所：東京大学農学部一条ホール（東京）

対象：一般の高齢者

実施者：久恒辰博

「顕微鏡によるイメージング」

日時：2014年12月10日

場所：東京大学分子細胞生物学研究所（現：定量生命科学研究所）（東京）

対象：長崎北陽台高校の生徒

実施者：多羽田哲也

「遺伝子と記憶」

日時：2015年2月3日

場所：東京都医学総合研究所（東京）

対象：学芸大学附属高校の生徒

実施者：齊藤実

【2015年度】

「ムシを使って脳の不思議に迫る」

日時：2015年9月3日

場所：私立光華小学校（京都）

対象：私立光華小学校5・6年生、および女子中学生1～3年生

実施者：上川内あづさ

【2017年度】

「わかりやすく語る「脳研究の最前線」再び」

日時：2017年11月18日

場所：愛知県立半田高等学校（愛知）

対象：中学生、高校生、および保護者

実施者：上川内あづさ

アウトリーチ活動一覧（件数）

種別	2013年度	2014年度	2015年度	2016年度	2017年度
広報誌・パンフレット	0	0	5	5	8
一般向け講演会・セミナー	0	12	15	21	19
小中高向け授業・実験・実習	3	14	13	14	17
サイエンスカフェ	1	2	2	2	2
イベント参加・出展	1	4	1	2	4
プレスリリース	2	6	4	22	17

2.8 評価委員による評価

事後評価に際し、評価委員の先生方より以下の通り評価意見を頂いた。

三品 昌美

(立命館大学 総合科学技術研究機構)

本新学術領域研究が設定されたことにより、ショウジョウバエ、マウス、線虫、ゼブラフィッシュなどのモデル生物を用いて、記憶の実態と学習の過程が神経細胞やシナプスレベルでの解明が進められた。さらに、ドパミン、睡眠や加齢などによる記憶・学習の制御が明らかにされ、記憶・学習のダイナミックな側面が示された。これらの成果は7報の *Science* をはじめとする世界トップレベルの論文として発表され、本新学術領域研究は優れた業績をあげたと高く評価できる。さらに、多様なモデル生物を用いた研究が集約されることにより、学習過程の細胞やシナプスレベルの表象、特定の細胞集団への記憶情報の配分、記憶の消去学習などが種を超えた共通の機構であることが明らかとなった。したがって、本新学術領域研究は当初の目標を十分に達成したものと評価される。

今後の発展として、優れた記憶・学習の実験研究を数理研究者と連携することにより理論モデルを提唱するレベルまで進めることや、ヒトの記憶・学習に関する研究グループとの連携や大きな社会的注目を集めている学習障害、知的障害や認知症の研究グループとの交流など広いスコープの展開を期待したい。

国際シンポジウムの開催や包括脳シンポジウムによる関連新学術領域研究との交流も活発に進められた。先端的な方法論が開発されたことは関連学問分野にも貢献するものと評価できる。さらに、班員や研究分担者が教授、准教授、助教などに昇任するなど人材の育成にも本新学術領域研究は大きな力となったと評価できる。

Charles Yokoyama

(国立研究開発法人理化学研究所)

May 29, 2018

The Memory Dynamism grant of MEXT has completed its funding cycle. In retrospect the selection of this grant topic and leadership was a good decision. The field of memory research has continued to expand in recent years and shows no sign of slowing, and the research publication output from the group exceeded expectations with many fine papers in highly regarded journals that collectively have made a major contribution to global advances in memory, particularly in the dynamical aspects and at the systems level in diverse model animals. The PI selection was done with attention to diversity in career stage, gender, and internationalization. I attended the annual international symposia and was impressed by the discussion and participation of researchers at different career stages and technical fields. I felt the group's legacy can help to build a foundation for memory research in Japan and abroad. Furthermore, I would support renewal of this topic or a similar one in the next rounds of the funding cycle. Some of my suggestions for improvement are the same as before while others are new. I would have liked to see more incentivized and systematic collaboration within the group to achieve greater output, efficiency in new knowledge generation, and integration with global partners in making new concepts in memory research, which due to trends in pre-publication protocol and data sharing in global research consortia and networks will become more critical in the coming years. Likewise, working together with theoretical researchers to build novel models of memory systems will be useful to drive or harness new AI methods. Finally, building on the success of this group, I would like to see a new effort to link this group's output to human and clinical research. The time is right for this step. In summary, the Memory Dynamism group grant was a undeniable success in my opinion, and an outstanding example of the neuroscience community coming together to generate value in research. I hope new efforts will extend this work.

森 憲作

(東京大学・医学部)

「脳は、経験に基づく記憶により適切に働く」といっても過言ではない。脳のほぼすべての領域において、その機能を理解するためには、領域内の神経回路における学習・記憶の神経メカニズムや分子メカニズムを理解する必要がある。また、記憶の形成や保存や想起には、脳の広範囲の領域間のコミュニケーションによる相互作用も必要である。「記憶のダイナミズムの研究」は、分子レベル、細胞レベル、システムレベルのいずれのレベルの研究においても、脳神経科学の中心課題の研究であり、新学術領域研究にふさわしいものである。本領域研究では、様々なモデル動物の脳神経系を用いて記憶ダイナミクス研究が推進され、「1. 記憶情報の形成過程」、「2. 記憶情報のダイナミクス」、「3. 記憶機構の変化」のいずれの課題においても、また、計画研究からも公募研究からも、すでに数多くの質の高い研究成果が報告され論文発表された。このように、世界の記憶研究に大きな貢献をしつつある本領域研究からの成果は、非常に高く評価ができる。

また、まだ論文発表にまで至らないが、本研究領域からの支援により見出された、記憶ダイナミクスに関する新しい興味ある研究成果を数件、本評価者は聞いている。これらの新しい研究を完成させるのに何らかの形で今後も支援し、「記憶ダイナミズムの共通原理の研究」をこれからもさらに展開されることを期待する。

桂 勲

(国立遺伝学研究所)

新学術領域研究「記憶ダイナミズム」の評価委員として、5回の班会議のうち4回に参加して発表と討論を聞き、中間評価と事後評価の報告書を読んだ。その結果、本研究を以下のように評価する。本研究は、新学術領域研究「分子行動学」(平成 20~24 年度)の成果の上に立って、研究目的を行動一般から記憶ダイナミズムに絞って発展させようとしたものである。その一方で、様々な動物種の長所を使った研究を行い種間の比較から一般原理を求める、記憶とその制御に関する細胞の同定と分子メカニズム解明をきちんと行う、実験法や解析法の専門家との共同研究で新たな展開を目指す、有望な若手を支援する、班員間の連携・協力を緊密に行う等の方針は引き継がれている。

研究領域の設定目標は、ほとんど達成されたと考えられる。研究成果については、1) 記憶情報の形成過程、2) 記憶情報の回路・分子レベルでの動的特性、3) 生理状態・環境変化に応じた記憶機構の変化の3項目すべて、特に「記憶ダイナミズム」の中心となる2)においても、予想外の発展も含めて、十分な成果が得られた。動物種を越えた共通性も、いくつか見つかった。班員間の共同研究は非常に多く、一部は既に成果を出している。技術開発では、小型動物用 fMRI の開発、蛍光 Ca²⁺センサーの改良、AMPA 受容体の光不活性化法などが進み、本研究に使われた。若手育成では、公募採択の若手研究代表者約 10 人の昇任が示す通り、的確な人材に的確な支援が行われた。中間評価以降、マウスの研究者が多数参入し優れた研究成果を出したが、霊長類の研究と数理的手法の導入は、改善が見られた程度に留まった。

教科書に載ってもおかしくない研究成果がいくつか得られており、当該学問分野・関連分野への学問的貢献は十分に認められる。波及効果については、研究成果の他に、本研究で開発された技術が期待される。また、本研究の支援で有能な若手研究者が育ったことが、今後の我が国の研究に大きな財産となる。

以上、ひとことで言うと、本学術領域研究は、十分な結果を出したと言える。

3 個別研究成果報告

記憶情報の変換ダイナミズムを担うショウジョウバエ神経・分子マシナリーの解明

研究代表者：齊藤 実¹⁾ 研究分担者：糸 和彦²⁾ 研究分担者：上野太郎³⁾ 研究分担者：坂井貴臣⁴⁾

1) 公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・学習記憶プロジェクト 2) 名古屋市立大学・大学院薬学研究科 3) 東邦大学・理学部 4) 首都大学東京・理工学研究科

<研究の目的と進め方>

ショウジョウバエでは分子遺伝学的解析により、記憶獲得から長期記憶形成に至る各過程を担う遺伝子が多数同定され、キノコ体を中心に、学習記憶に関与する脳領域や細胞集団の同定も進んでいる。しかし感覚情報から記憶情報への変換、また短期記憶から長期記憶への安定化といった情報変換のダイナミズムや、加齢を始めとする内的・外的環境変化に応じた記憶機構自身の変化について、神経回路、分子レベルでの理解は未だ十分でない。本研究では、1) 感覚情報から記憶情報への変換、2) 短期記憶から長期記憶への安定化、3) 保持された記憶情報の質的変換といった「記憶情報の変換ダイナミズム」、4) 加齢に応じた学習記憶機構の変換といった「学習記憶機構の変換ダイナミズム」の実体を、分子・回路レベルで明らかにすることを目的とした。各目的を下記の要領で進めた。

1) 感覚情報から記憶情報への変換では、ショウジョウバエにおいても連合学習の重要な強化シグナルとして働くことが知られているドーパミン(DA)の動作機序を調べた。匂い情報をキノコ体に伝達する匂い中枢、ショック情報を伝達する体性感覚上行神経路、キノコ体、DA神経系で構成される情報変換の神経回路がどのような時系列で動作し、記憶痕跡をキノコ体に形成するのかをシナプスレベルで調べた。

2) 長期記憶への変換では、嫌悪性の匂い長期記憶への安定化に、“間”を空けた繰り返し条件付け(長期記憶学習)が何故必要なのか?その分子生理学的意義を調べた。我々は生化学的解析から、長期記憶学習の“間”でMAPKのERKが特異的に上昇することを見出した。“間”に応じたERK活性上昇が長期記憶への安定化とどのような因果関係を持つのか?全脳を俯瞰したERK活性および転写活動の動態から調べた。

3) 記憶情報の質的変換では、形成された長期記憶情報が時間経過と共に消去学習に耐性となることに着目し、安定とされる長期記憶情報が、どのような仕組みにより、動的に維持されるのか?新規遺伝子発現の要・不要の検証などから調べた。

4) 加齢による学習記憶機構の変化では、加齢体で中期記憶と長期記憶が選択的に障害されることに着目し、加齢による中期記憶機構と、長期記憶機構の変化は同一のものか否か?寿命や老化因子の活性酸素とどのような関係を持つのか?先に我々が見出した、加齢性中期記憶障害の抑制変異体を起点に、実体を分子・神経レベルで調べた。

<研究計画>

リアルタイムに局所回路の活性を調べた研究では、頭に観察窓を空けたショウジョウバエに、顕微鏡下で嫌悪性匂い条件付けを行い、条件刺激の匂いに対するキノコ体(MB)のCa²⁺応答が上昇する記憶痕跡の形成を見た例がある。しかし顕微鏡下のin vivo学習系では、観察中の脳の動きによりシナプスレベルでの解

析が困難であり、観察可能な脳部位、高い時間分解能での遺伝子のON/OFF、生理学・薬理学的手法の適用や解析可能な時間などに高い制約があった。こうした問題点を補うため“単離培養脳”で疑似的な匂い条件付けを行うex vivoイメージング解析系を開発した。

1) 感覚情報から記憶情報への変換：ex vivoイメージング解析では匂い中枢と体性感覚上行神経を刺激し、情報連合中の単離培養脳でキノコ体のCa²⁺応答、DA神経終末でのCa²⁺応答とシナプス小胞開口放出を観察し、薬理学・遺伝学的手法によりキノコ体神経細胞の可塑的变化、DA放出機序などを解析した。in vivo解析では顕微鏡下に固定したハエに、匂いと電気ショックを与え、上記解析法に加えて、電気化学的手法でDAレベルの変化を調べた。

2) 長期記憶情報への変換：“間”を空けた繰り返し学習(長期記憶学習)による嫌悪性匂い長期記憶への安定化を対象に、長期記憶形成に重要な役割を果たすERK活性化動態をリン酸化ERK抗体により調べた。併せて長期記憶学習過程でのCREBの転写活性を最初期応答遺伝子c-fosの発現で調べると共に、CREB自身の発現変化も調べた。c-fosを発現する神経細胞の同定と活性操作はc-fosプロモーターで制御されるGFPまたは、チャンネルロドプシン(ChR2)の発現により、CREB発現は特異的抗体を用いて調べた。

3) 記憶情報の質的変換：行動遺伝学的手法により記憶情報の形成と維持に関与する転写因子の違いを明らかにすると共に、長期記憶が維持されるキノコ体での遺伝子発現動態を検出するため、キノコ体神経細胞の核を特異的に抽出する遺伝学的手法を開発した。各種転写因子及びヒストン修飾酵素に対する特異的な抗体を用いたChIPアッセイにより、転写活性が上昇している遺伝子、エピジェネティックな変化を明らかにした。

4) 加齢による学習記憶機構の変化：中期記憶の加齢による障害が遅延するDC0/+はPKA触媒ユニットの変異体である。DC0/+を利用したプロテオミクス解析を行い、加齢性中期記憶障害の原因となる記憶機構の変容を分子・神経レベルで明らかにすると共に、脳老化と寿命との関わり、活性酸素の代謝変異体を用いた活性酸素との関わりなどを明らかにした。

<得られた研究成果>

1) 感覚情報から記憶情報への変換：単離培養脳で、記憶中枢キノコ体に入力する匂い情報と体性感覚情報の上行経路を同期して刺激すると、キノコ体垂直葉の頭頂部α3/α'3領域でDA放出が起こり、匂い情報経路とキノコ体間のシナプス伝達がDA依存性に亢進した(AL-MB LTE)。DAは匂い情報経路、体性感覚情報経路のいずれかを単独で刺激しても放出されなかった。DA神経細胞はキノコ体の領域全体に軸索終末を投射している。しかしDA

の放出は、ニコチン酸受容体 (nAChR) を介して入力する匂い経路とNMDA受容体 (NR) を介して入力する体性感覚経路の二つの経路からの同期入力があったキノコ体 (MB) 神経細胞に対して選択的に起こった。またこの選択的DAの局所放出にはキノコ体神経細胞に発現するcAMP産生酵素のRut-ACの活性が必要不可欠なことが明らかになった (Ueno et al, eLife 2017)。また匂い情報経路と体性感覚上行経路を同期刺激するとAL-MB LTEがRut-AC依存性に起こるが、一方で匂い情報経路を単独で頻回刺激するとキノコ体入力部位で、Rut-AC依存性にcAMPレベルが上昇すると共に、匂い情報経路からキノコ体へのシナプス伝達が顕著に抑制されることも分かった (Sato et al, J Physiol 2018)。

ではどのような機構で同期入力を受けたMB神経細胞に対してDAが局所放出されるのか?薬理的検索と遺伝学的検証を

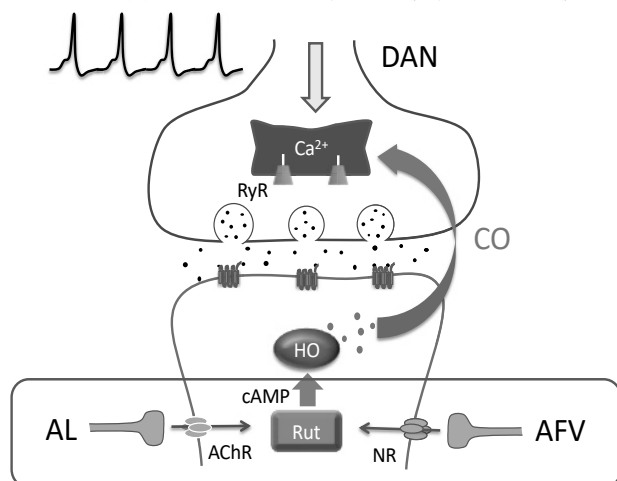


図1 シナプス後神経細胞で産生されたCOにより誘導されるDAの新規放出モデル。匂い経路 (AL) と体性感覚上行経路 (AFV) からの入力を同期して受けたキノコ体 (MB) 神経細胞ではRut-ACが活性化してheme oxygenase (dHO)を活性化し、COをDA依存性にALとMB間のシナプス伝達が増強する。

行ったところ、同期刺激を受けたキノコ体神経細胞では、Rut-AC依存性に一酸化炭素産生酵素 (dHO) が一酸化炭素 (CO) を産生・遊離してDA放出を誘導すること、COのキレート剤を細胞外に投与すると同期刺激に応じたDAの放出が顕著に抑制されることが分かった。COを受容したDA神経終末では、リアノジン受容体 (RyR) を介した細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺流出により、シナプス小胞の開口放出が起こることが分かった。さらにこの開口放出にはDA神経細胞の神経活動および外部から神経終末へのCa²⁺流入、いずれも不要であることが分かった (Ueno et al BioRxiv 2018)。

嫌悪性匂い条件付けでは特定の匂いと電気ショックを組み合わせる。一方報酬性匂い条件付けでは匂い情報を砂糖などの味覚報酬と組み合わせ、条件付けされた匂いが呈示されるとハエは口吻を進展させる。甘味情報の受容経路にチャンネルロドプシンを発現させ、匂いの呈示と同時に、この経路を人為的に刺激したところ、この条件でも矢張り報酬条件付けが成立し、匂いに対して口吻を進展することを見出した。ex vivoで報酬性匂い条件付けが再現できるか検証した。単離培養脳で匂い情報経路と同期して甘味情報経路を刺激すると、以降匂い情報経路の刺激に応じて、口吻進展のために必要な運動神経の活動が上昇することを見出した。これらの結果から報酬性記憶の痕跡も単離培養脳で形成することが分かった (Suzuki-Sawano et al, Sci Rep 2017)。

2) 長期記憶情報への変換: ハエの嫌悪性匂い長期記憶は通常間を空けた繰り返し学習 (spaced training) により、CREB依存性に形成され、間を空けない繰り返し学習 (massed training) では長

期記憶は形成されない。spaced trainingでCREBの転写活性を、CREB依存性の最初期転写産物のc-fosを指標に調べた結果、c-fosの発現はspaced trainingの開始と共に上昇・維持された。c-Fosは転写因子AP-1を形成することで、CREBを含む各種遺伝子の発現を誘導する。そこでCREBの発現も調べたところ、spaced trainingではCREB自身の発現もc-Fos依存性に上昇し、c-FosとCREBの間で転写サイクルが形成されること、転写サイクルの形成を阻害すると長期記憶形成が障害されることなどが分かった。また転写サイクルを形成する神経細胞は主として α/β lobeを構成する神経細胞にみられ、全体の約8%であった。これら神経細胞は記憶形成時と想起時で同期した神経活動を示し、記憶想起時にこれら転写サイクルを形成した神経細胞からのシナプス出力を阻害すると記憶想起が障害される一方、人為的に活性化すると記憶想起に応じた行動が見られた。

転写サイクルはどのようにして形成されるのか?CREBが転写活性を獲得するため、c-FosがAP-1を形成するためにはいずれもMAPKであるERKの活性が必要である。spaced training中のERKの活性動態を調べたところ、ERK活性は各trainingの終了直後から上昇し、次のtrainingが始まると低下することを確認した。さらに遺伝学的操作によりERK活性をtraining中も低下しないようにすると、本来転写サイクルが形成されないmassed trainingでも転写サイクルが形成され、長期記憶が形成されることも分かった。以上の結果から長期記憶学習中の“間”はERK活性を上昇させ、c-fosとCREBの転写サイクルを形成して長期記憶情報をコードする神経細胞でCREB依存性に長期記憶関連遺伝子の発現を誘導することが示唆された (Miyashita et al., Cell Rep 2018)。

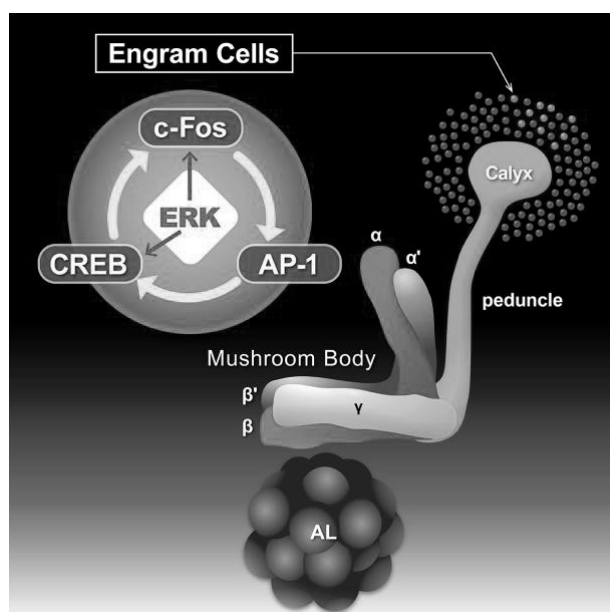


図2 c-Fos/CREB転写サイクルによる記憶情報のコーディング。間隔を空けた繰り返し学習の間はERKを活性化して、主に α/β lobeキノコ体神経細胞で転写サイクルを形成し、長期記憶に必要な遺伝子を発現する。

一方、我々はこれまでの研究からhomophilicな細胞接着因子Klgの発現レベルがspaced trainingによりNotch依存性に上昇することが長期記憶形成に必要なことを見出している (Matsuno et al, PNAS 2009)。Klgの発現部位を調べたところ、神経細胞とグリア細胞との境界で強い発現が見られたため、単離分散培養で調べたところ、Klgは神経細胞とグリア細胞の両方に発現していた。また長期記憶形成には神経細胞とグリア細胞の両者にKlgが発現することが必要なことも分かった。Klgがグリア細胞にも発現していたことから、klg変異体でグリア細胞の発生が障害されていないか、グリア細胞のマーカーとなっている転写因子Repoの

発現を調べたところ、グリア細胞の数は正常だが、Repo の発現が低下していることを見出した。また長期記憶形成には特にアストロサイトグリアでの、Repo による遺伝子発現が必要なこと、長期記憶学習により Repo の発現量が Klg 依存性に上昇することも分かった。さらに Repo をアストロサイトグリアで発現させることで klg 変異体の長期記憶が回復することも分かった。これまで神経細胞での遺伝子発現が必要なが示されている。本研究から我々はグリア細胞においても、遺伝子の新規発現が必要なが見出した。Klg が長期記憶形成に必要な神経-グリア細胞間相互作用を担うこと、長期記憶学習により Klg を介した神経-グリア間相互作用が上昇し、グリア細胞特異的な転写因子 Repo の転写活性を上昇させることが、長期記憶形成に必要なことが分かった (Matsuno et al, J Neurosci 2015)。

3) 記憶情報の質的変換: 長期記憶情報は色々な侵襲に対して耐性を持つ安定な記憶と考えられているが、長期記憶情報の維持は静的なもので無く、継続的な遺伝子発現が必要な動的機構が明らかになった。記憶情報の形成には CBP/CREB による遺伝子発現が必要である。一方記憶情報の維持には CRTC のキノコ体神経細胞の核への移動と CRTC/CREB 複合体による遺伝子発現が長期記憶学習後 4 日まで必要であった。また CRTC/CREB による遺伝子発現には CBP と異なるヒストンアセチル転移酵素 (HAT) の GCN5 (H3K9 のアセチル化) と、Tip60 (H4K16 のアセチル化) が必要ながも分かった。どのような遺伝子のアセチル化が亢進し、転写上昇が起きているのか? を明らかにするため、キノコ体神経細胞の核を単離する遺伝学的操作とクロマチン免疫沈降を行い、転写因子 Bx, Smr とフォスファターゼをコードする Plc21C 遺伝子が GCN5、Tip60 依存性に長期記憶学習後アセチル化され転写を上昇することを見出した。また 4 日以降は CRTC/CREB 依存性に発現した転写因子 Bx が CREB 非依存性に遺伝子を発現することが記憶情報維持に必要なことも明らかにした。

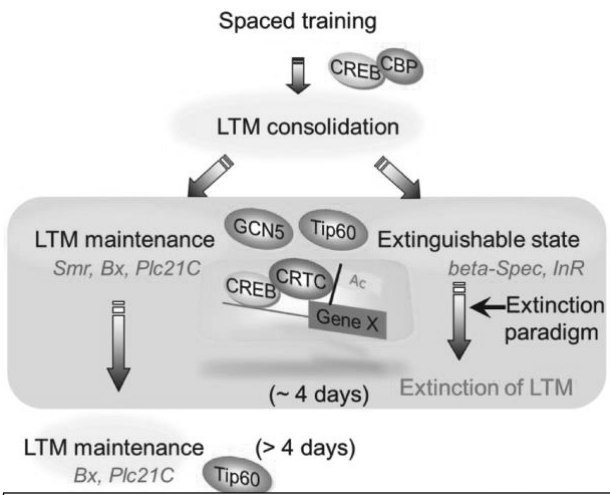


図3 保持過程での記憶情報の質的変換。学習後4日までの記憶は CRTC/CREB による遺伝子発現 (Snr, Bx, Plc21) により保持され、beta-Spec, InR 依存性に消去学習により消去される。しかし4日以降の記憶保持は CRTC/CREB により産生された別の転写因子 Bx 依存性の遺伝子発現 (Plc21C) を行い、CRTC/CREB いずれも不要となり、消去学習耐性になる。

興味深いことに長期記憶学習後4日以内であれば、消去学習 (条件付けでショックと組み合わせた匂いを、条件付け後に匂い単独で繰り返し嗅がせる) により記憶が完全に消去され、消去学習直後、及び4日後に記憶テストをしても記憶行動が現れない。しかし条件付け4日以降に消去学習を行うと、消去学習直後のテストで記憶は想起されないが、消去学習後4日経つと、再度記憶が想起される。前述の通り形成後4日迄の記憶情報は

CRTC/CREB 依存性の遺伝子発現により維持されており、4日以降は CRTC が核から細胞質に再移行して転写活性を失う。そこで CRTC/CREB 依存性に記憶情報が維持されていることが、消去学習による記憶情報の完全消失と関わりを持つのか? CRTC の核から細胞質への移行を遺伝学的阻害した。その結果長期記憶学習後5日であっても CRTC が核に局在していれば、CRTC/CREB 依存性に beta-Spectroline (beta-Spec), insulin receptor (InR) が発現して記憶情報を消去することが分かった。以上の結果から形成された記憶情報の質的流動性が実証され、それを担う分子機構が明らかにされた (Hirano et al, Nat Commun 2016)。

4) 内的・外的環境に応じた記憶機構の変化: 我々のこれまでの研究から、加齢体では中期記憶機構が変化し、加齢性中期記憶障害が起こること (Tamura et al, Neuron 2003)、中期記憶形成に必須の働きをする PKA の活性が、加齢体では中期記憶過程を障害することが明らかになっている (Yamazaki et al, Nat Neurosci 2007)。PKA は過剰発現により若齢体でも記憶障害を誘起するが、加齢による PKA の発現上昇は見られなかった。中期記憶機構の変化の実体を明らかにするため PKA 触媒部位の変異体 DC0 を用いて、加齢に伴い発現変動を示すタンパクの検索を行い、ミトコンドリアタンパクのピルビン酸カルボキシラーゼのショウジョウバエホモログ (dPC) を見出し、これが DC0 変異で発現量が低下する一方、野生型では加齢により発現量が増加すること、dPC のヘテロ変異体では DC0 のヘテロ変異体同様、寿命に影響を与えること無く、加齢による中期記憶障害が抑制されることを見出した。さらに免疫染色から、dPC は脳ではグリア細胞に発現すること、グリア細胞で dPC の発現を抑制すると加齢性長期記憶障害の発現が顕著に遅延することなどを見出した。dPC のグリア細胞での過剰発現も DC0 のキノコ体神経細胞での過剰発現同様、中期記憶を障害する。しかし dPC の変異バックグラウンドで DC0 を過剰発現させても記憶障害は見られない。逆に DC0 変異バックグラウンドであっても dPC を過剰発現すると記憶障害が見られた。これらの結果から dPC が DC0 の下流因子として中期記憶過程に関与すること、加齢により DC0 依存性に dPC の活性が上昇することで中期記憶障害が現れることが示唆された。

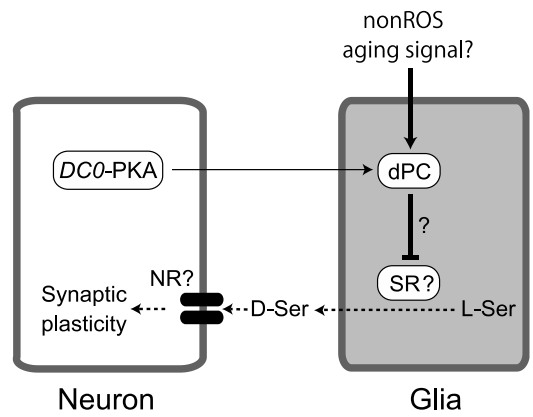


図4 加齢による中期記憶機構の変化。加齢体では活性酸素種 (ROS) とは異なる老化シグナルにより dPC の活性が上昇することで、SR が抑制され記憶に十分な D-Ser が産生出来なくなる。

代表的な老化リスク因子と言われている酸化ストレスの影響を調べたところ、dPC の発現は活性酸素種を上昇させても変化せず、酸化ストレスの上昇による記憶障害は dPC 変異により改善されなかった。これらの結果は dPC の発現量上昇は酸化ストレスとは異なる老化シグナルに依ることを示唆している。NMDA 受容体は記憶の形成・維持に重要な働きを担い、D-セリンはグリア由来の NMDA 受容体アゴニストである。D-セリンはセリン転移酵素 (SR) により L-セリンから産生されるが、哺乳類におい

てグリアの PC は間接的に SR の活性を阻害することが知られている。そこで加齢体、dPC の過剰変異体を調べたところ、D-セリンの産生が顕著に低下していた。逆に加齢性記憶障害が抑制されている dPC 変異体、DCO 変異体では加齢体となっても D-セリンの産生低下は見られなかった。さらに加齢体で D-セリンを摂取させると顕著な記憶の改善が見られた。以上の結果から加齢による PC の上昇が正常な D-セリン産生を障害するため中期記憶が損なわれることが示唆された (Yamazaki et al, Neuron 2014)

<国内外での成果の位置づけ>

1) 感覚情報から記憶情報への変換：後シナプス神経細胞で産生される逆行性シグナルとして、NO や内因性カンナビノイド、ATP などが知られているが、これら逆行性シグナルはシナプス前神経細胞が誘導するシナプス伝達を修飾する。対して後シナプスキノコ体細胞が産生する CO は、後シナプス神経細胞が DA 神経終末からのシナプス伝達を局所的に誘導する新しい仕組みである。DA 受容体は cAMP の産生を介して記憶形成に必要な細胞内シグナルを誘起するが、神経終末は高度に分枝し、複数の放出部位と標的を持っているため、単に神経活動のみで誘導されるシナプス伝達では DA をあらゆる標的細胞に対して放出してしまう。一方 CO による DA 放出誘導は、異なる感覚経路からの同期した入力を受け、CO を産生・遊離したキノコ体神経細胞に対して局所的に DA シグナルを誘導し、記憶関連の可塑的变化を誘導することが可能となる。最近 DA 神経軸索の放出部位の多くが単なる DA 神経細胞の神経活動では DA を放出しないことが分かってきた。本研究結果は単に学習記憶における DA シグナルの動作原理に留まらず、DA が関与する様々な脳神経機能の分子生理学的仕組みと障害を理解する上で重要な知見を与える。

2) 長期記憶情報への変換：spacing effect は 1885 年にエビングハウスにより見出されていたが、その生理学的意義は良く分かっていなかった。Zhong らのグループは spaced training の間において ERK の活性が上昇することを見出し、長期記憶に必要な間の長さが、膜結合型フォスファターゼ SHP2 により制御されていることを報告している。一方我々は間の生理的意義 (何故 ERK の活性が上昇する必要があるのか?) として、c-fos/CREB 間で転写サイクルが ERK に依存して形成されることを示し、間の生理学的意義の一つを明らかにした。また長期記憶形成において、神経細胞で遺伝子の新規発現が必要ことはよく知られていたが、我々はグリア細胞での遺伝子発現も必要であることを明らかにした。我々が見出したグリア細胞での遺伝子発現は接着因子 Klg を介して転写因子 Repo 依存性に起こる。Repo は胎生期のグリア細胞の分化に必要なことが知られていたが、成虫となっても発現しており、その具体的な役割が初めて明らかになった。現在 Repo 依存性に発現する長期記憶関連遺伝子を同定している。

3) 記憶情報の質的変換：トラウマ記憶が日数の経過と共に消去学習耐性となる仕組みについて、色々なモデルが存在している。例えば海馬依存性に読み出される記憶情報が、時間経過と共に大脳皮質依存性且つ海馬非依存性に読み出されるようになるといったシステムレベルでのモデルがある。ショウジョウバエで哺乳類同様に記憶情報の神経機構が転移するのことは未だ検証されていないが、我々は記憶情報の維持機構の変化が、記憶情報が消去学習耐性となる分子生物学的根拠であることを実証した。記憶情報維持の分子メカニズムの変化が哺乳類における記憶情報の転移とどのような関係にあるのか、非常に興味深い。今回我々は記憶情報の維持を担う遺伝子発現の全容を捉えるところまでには到らなかったが、今後記憶を保持している神経細胞に対する特異性と感度が高い遺伝子発現解析法が開発されることで、網羅的

な解析も可能になると思える。

4) 内的・外的環境に応じた記憶機構の変化：加齢による記憶障害はヒトでもみられる自然な記憶機構の変化であるが、その実体は不明な点が多い。我々は加齢により障害される中期記憶と長期記憶のうち、中期記憶過程の変化の実体を加齢性障害特異的な変異体を用いたプロテオミクス解析から明らかにした。意外なことに中期記憶過程の変化は神経細胞でなく、グリア細胞における代謝経路の変化が原因であった。またグリア細胞の代謝機能変化は一般的な老化因子である酸化ストレスには依らないことも明らかになった。これは脳の老化が単なる個体老化の 1 表現型では無いことを示している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

新規 DA の放出機序は ex vivo で見出され、神経機構が明らかにされたが、用いた開口放出プローブが in vivo での解析に適していないため、嫌悪性匂い連合学習中に新規放出機序による DA 放出が実際に起こるのか? の in vivo での検証が出来なかった。これを補うため、炭素電極を用いて電気化学的手法により顕微鏡下に固定したハエで、匂い条件付け中の細胞外 DA レベルの動態を調べた。これはシナプス小胞開口放出のイメージング解析より、ダイナミックレンジも広く、測定領域の自由度が高いため、各キノコ体領域での DA 動態の差などを見出すことが出来た。しかし一方でオクトパミンなど他のモノアミンとの分離が難しく、DA 神経終末における Ca²⁺応答とも想定外の解離が見られた。このため最近開発された DA 受容体をベースにした DA 検知プローブにより、再度 in vivo での測定を行っているところである。

ex vivo での解析により、体性感覚上行経路からのショック情報をキノコ体へ伝える経路は、従来考えられていた DA 神経細胞ではなく、グルタミン酸作動性 (Glu) 神経細胞がキノコ体 NMDA 受容体を介して伝えることが示唆された。事実 NMDA 受容体はキノコ体全体で広範に発現している。しかし Glu 神経細胞のマーカーである小胞性グルタミン酸輸送体 (DVGLUT) でキノコ体に投射する Glu 神経終末を調べると、投射はキノコ体の一部でしか観察されなかった。このため依然として体性感覚上行経路からのキノコ体に入力経路は同定できなかった。現在新たな DVGLT2 をクローニングし、これをマーカーにキノコ体に投射する Glu 神経細胞を検索しているところである。

<今後の課題、展望>

上述の通り、DA 検知プローブにより、再度 in vivo イメージング解析を行い、記憶形成-保持-想起におけるキノコ体への DA 放出動態を検証する。また CO を介してシナプス後細胞により誘導される新規 DA 放出機序を活動電位依存性に DA を放出する古典的機序と遺伝学的に分離した上で、各過程での DA 放出が活動電位依存性か CO 依存性かを検証すると共に、活動電位依存性の DA 放出と、新規 DA 放出とが誘起する細胞内シグナルにどのような違いがあるのか? 各種細胞内シグナルのイメージングプローブを用いて明らかにしていく。

予備的実験から Klg の発現が加齢により低下することを見出している。加齢による長期記憶機構の変化については不明な点が未だ多い。Klg の発現低下が加齢による長期記憶機構の変化に関与するか、Klg がどのような神経細胞に発現して長期記憶を制御しているのか? を明らかにすると共に長期記憶機構の変化が長期記憶形成-維持-想起のどの過程を障害するのか? Repo 依存性に発現する長期記憶関連遺伝子は何か? を解明する。

哺乳類の脳機能老化メカニズムの解明を通じた記憶ダイナミズムの理解

研究代表者：久恒 辰博

東京大学・大学院新領域創成科学研究科

<研究の目的と進め方>

健康な人であっても高齢になれば、年とともに記憶機能や認知機能が低下する。我々は、脳の機能老化メカニズムを解明するために、高齢動物やアルツハイマー病モデルマウスを用いた研究を行った。加えて、健康高齢者を被験者としたヒト試験研究を実施した。そして、加齢による脳機能低下に脳組織内の炎症反応が深く寄与することを見出した。脳内に炎症反応が生じると、グリア細胞（アストロサイトやマイクログリア）では炎症性サイトカインの産生が亢進し、脳血管においては脳血管閉鎖の機能が低下する。このような変化により、各ニューロンにおいてはシナプス機能が低下し、神経回路ネットワークが変調し、記憶機能や認知機能が低下する。神経炎症を、薬剤などで制御し抑制することによって、低下した脳機能を回復させることが可能であることも判った。

また、脳老化に伴う学習・記憶機能の低下メカニズムを調べるために、学習中のマウスの脳回路活動を可視化するオペラント学習タスクfMRI研究法の開発を行った。通常のマウスに比べて、アルツハイマー病モデルマウスでは、海馬や報酬系の脳活動が変化していることなどが示唆された。そこで、海馬新生ニューロンの機能障害マウスやドーパミンニューロン機能不全マウスを用いて、オペラント学習試験を実施した。そして、逆転学習などより複雑な認知機能に対する、海馬や報酬系の寄与を明らかにした。このタスクfMRI研究は、脳機能の低下メカニズムを調べ、記憶ダイナミズムを明らかにすることに加えて、意識や情動の面を含めた脳の全体的な認知機能を調べる上でも、非常に重要な研究ツールになると期待された。

本研究では最終的に、学習記憶に代表される脳高次機能（認知機能）のダイナミズムやアルゴリズムを知ることを目指した。本研究で得られた知見を人々の健康維持や、人類の永続的な発展に役立てる。主に取り組んだ4つの研究を下記に説明する。

<研究計画>

1) 哺乳類の脳機能老化メカニズムの解明に関する研究：

各種アルツハイマー病モデルマウスを用いて、学習記憶機構の変化について調査する。アルツハイマー病モデルマウス（アルツハイマー病原因遺伝子（APP/PSEN）を導入したマウス）に高脂肪食を投与し早期（生後6ヶ月齢）に記憶障害を誘導するモデルを用いて、記憶行動試験（文脈恐怖条件付け課題と水迷路試験）に加え、脳fMRI画像研究、血液成分解析、ならびに脳組織評価を行い、通常マウスとの比較によりこのマウスの記憶機能低下の原因を調べ、どのように記憶機構が変化したのかを明らかにする。

モデルマウスとしては、APP/PSENマウスを長期に飼育する高齢アルツハイマー病モデルマウス（18ヶ月以上飼育）、APP/PSENマウスと認知症リスク遺伝子であるヒトのApoE4遺伝子ノックインマウスを掛け合わせたApoE4-KI-APP/PSENマウス、APP/PSENマウスとtau-P変異マウスを掛け合わせたAPP/PSEN x tau-Pマウス、

そしてこれら3種類のマウスを全て掛け合わせたApoE4-KI-APP/PSEN x tau-Pマウスを用いた研究を実施する。

加えて、健康な高齢者をリクルートするヒト試験研究を行う。ヒト研究においては、記憶機能評価試験、MRI画像研究、血液バイオマーカー試験を実施する。そして、加齢や疾病による記憶機能低下と神経炎症の関与を明らかにする。脳組織内に神経炎症反応が生じると、グリア細胞（アストロサイトやマイクログリア）では炎症性サイトカインの産生が亢進し、脳血管においては脳血管閉鎖の機能が低下する。各種のアルツハイマー病モデルマウス、ならびにヒト高齢者研究を通じて、脳機能が老化するメカニズムの解明を進める。

2) マウスタスクfMRIの開発による記憶ダイナミズムの可視化：

研究科に設置済みの動物MRI装置に、超伝導磁石を更新し装置をバージョンアップすることにより、マウスの記憶回路の活動を、脳全体を網羅する空間的な広がりを持って可視化し、学習記憶課題を遂行中のマウスの脳活動を数十マイクロレベルの高い空間解像度で描出するタスクfMRI画像取得法を確立する。この装置の開発により、生きたままの状態、マウス海馬の記憶回路の活動状態をリアルタイムに描出できるようにする。各種モデルマウスの記憶遂行時の海馬活動を可視化解析し、それを通常マウスと比較することにより、従来にない方法で記憶ダイナミズムの本質的な理解に挑む。

3) 海馬新生ニューロンの記憶ダイナミズムにおける役割解明：

記憶情報の転送・増幅に関わるとされる海馬新生ニューロンの機能を薬剤により制御（Off/On）できる遺伝子組み換えマウスを用いて、このマウスと通常マウスの学習記憶能力を比較する。学習能力の評価には、モリス水迷路を用いた空間記憶学習、ならびに空間記憶の逆転学習などを使用する。学習後のマウスより、脳切片を作成し、記憶に関する脳回路の変化を通常マウスと比較し、調査する。そして、海馬新生ニューロンの学習記憶機能における役割を明確にし、記憶ダイナミズムの理解に繋げる。

4) 学習記憶機能におけるドーパミンニューロンの役割解明：

ドーパミンを放出するニューロンは、中脳に位置する2つの神経核（腹側被蓋野・黒質）に存在し、前頭連合野や側坐核などに投射する。ドーパミンニューロンは報酬に関係するため、報酬に関連する連合学習で中心的な役割を果たす。そこで、ドーパミンニューロンのシナプス伝達機能を自在に制御（Off/On）できる遺伝子組み換えマウスを作成し、このモデルマウスを用いて、学習記憶を調べる研究を行う。学習行動に応じて放出される脳内のドーパミン量を計測するマイクロダイアリス実験や、報酬と条件刺激の関係を学ばせるオペラント学習課題を併用して、ドーパミンニューロンが記憶の神経回路にどのように働きかけているかを明らかにし、その記憶ダイナミズムにおける役割を知る。

<得られた研究成果>

1) 哺乳類の脳機能老化メカニズムの解明に関する研究:

認知機能が障害を受ける加齢性脳疾患である認知症に着目し、動物モデルやヒト試験を行い、認知症分野における神経炎症の寄与に関する研究を行った。加齢により、がんや糖尿病が増加することは周知であるが、認知症についても、加齢により疾病の発症頻度が増加する。現在、我が国の認知症患者はおよそ500万人であり、6年後の2025年には700万人に増加すると見込まれている。この認知症患者の2/3を占める病気がアルツハイマー病である。アルツハイマー病では、脳内に生じたアミロイドペプチドが凝集すること（老人斑）が引き金となって神経炎症が発生し、ニューロン機能が低下することにより、認知機能が障害される。本研究において、脳組織内や脳血管内に生じる神経炎症が原因となり、ニューロン機能が低下することが明らかとなり、神経炎症のコントロールにより、脳機能の低下を改善できる可能性があることも判った（図1）。さらに、本研究では、遺伝子ベクターによる脳内への遺伝子導入や、天然物の低分子物質の投与を用いて神経炎症を制御し、モデルマウスの脳機能を改善させる研究を行った。低分子の投与に関しては、健康な高齢者の協力による有効性評価のためのヒト試験研究を実施した。

1-1) 脳機能老化メカニズムにおけるミクログリアの関与

App/Psenアルツハイマー病モデルマウスを用いて記憶機能が低下した状態を再現し、脳組織内に起こる諸変化について組織化学的方法を用いて調査した。記憶機能の低下が認められる場合、記憶に関わる海馬では、ミクログリアの活性化を伴う神経炎症が生じていることを認めた。アルツハイマー病の治療に用いられているコリンエステラーゼ阻害薬であるリバスチグミンの投与によって、グリアの活性化が抑えられ、炎症性サイトカインであるIL-1βやTNF-αの産生亢進が抑制され、記憶機能の低下が回避された。我々の研究結果は下記二つの研究結果によって支持される。近年Shiらは、ヒトApoE4遺伝子座をノックインしたTau変異(P301S)アルツハイマー病モデルマウスを用いて、ApoE4がP301Sマウスの脳内においてミクログリアの活性化を誘導するとともに、Tauリン酸化を促進し神経変性を加速させることを示した。またVenegasらは、App/Psenアルツハイマー病モデルマウスを用いて、ミクログリアが放出するASC specks（インフラマソーム）によってアミロイド斑の蓄積が拡大し記憶機能が低下することを示し、ASCをノックアウトするとアミロイド斑が減少し記憶機能が改善することを見出した。脳内に存在するマクロファージ様細胞であるミクログリアは、アルツハイマー病の進行過程において炎症性サイトカインやインフラマソームの産生を介して、ニューロン活動を妨げることにより、記憶機能の低下に関わっているものと考えられる。

1-2) 脳機能老化メカニズムにおけるアストロサイトの関与

記憶機能が低下したアルツハイマー病モデルマウスの脳内では、ミクログリアに加えてアストロサイト（星状グリア細胞）が活性化し神経炎症の亢進に寄与する。我々は、記憶機能が低下した脳血管性認知症モデルマウスの海馬において、アストロサイトが活性化し神経炎症が高まること、P2Y1受容体をノックアウトするとアストロサイトの活性化が鎮まり記憶機能の低下が改善することを見出した。我々の研究結果は下記の二つの最近の成果によって支持される。Reichenbachらは、アルツハイマー病患者およびモデルマウスの脳内において、アミロイド斑の周囲ではアストロサイトのP2Y1発現が高まっていることを示し、P2Y1アンタゴニストの投与により神経活動が正常に戻ることを認めた。またGoetzlらは、アルツハイマー病患者の血漿サンプルからアストロ

サイト由来するエクソソームを単離する方法を開発し、患者のサンプルにおいては炎症性サイトカインや補体分子が増加していることを突き止めた。また、我々は、ApoE2遺伝子の遺伝子ベクターによる導入によってApoE4-KI-APP/PSENマウスの神経炎症（アストロサイト活性化）が軽減する傾向を得ている。活性化アストロサイトによる神経炎症の亢進が、脳機能老化に寄与している可能性が高い。

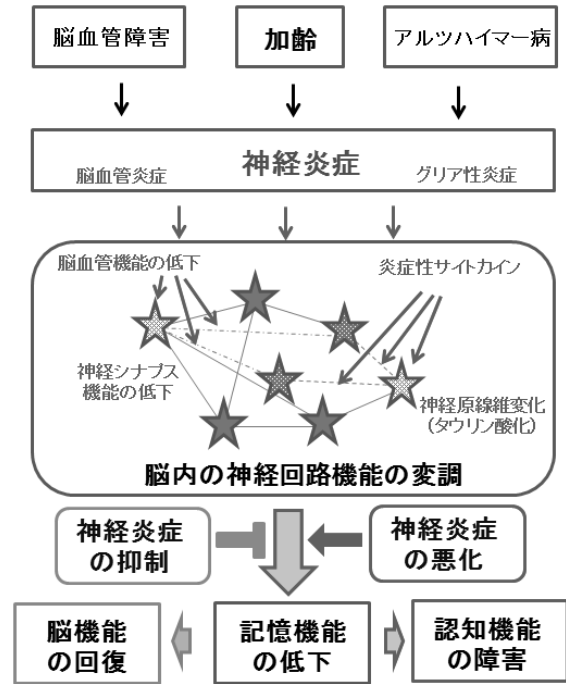


図1： 脳老化に伴う脳機能低下のメカニズム

加齢などにより、脳血管や脳組織内で神経炎症が生じる。この反応により、海馬や前頭連合野などで神経回路機能が変調し、記憶機能などが低下する。神経炎症が悪化すると認知機能の障害がさらに進むが、神経炎症を抑制することによって低下した脳機能を回復させることが可能となる。

1-3) 脳血管における神経炎症の脳機能老化における寄与

アルツハイマー病モデルマウスに高脂肪食を摂取させると従来に比べて短期間（6か月）で記憶機能の低下を誘導できる。この糖尿病併発型のアルツハイマー病モデルマウスの海馬において、ミクログリア細胞やアストロサイトの活性化による神経炎症に加えて、RAGEの蓄積を伴う脳内毛細血管の異常所見を得た。また、生後1年半以上の高齢アルツハイマー病マウスの海馬ならびに大脳皮質において、グリア性の神経炎症に加えて、血管周皮細胞（ペリサイト）の退縮を伴う脳内毛細血管の異常を認めた。筋組織に含まれる抗炎症作用を有するジペプチドの投与によりアルツハイマー病マウスの神経炎症が緩和し、脳血管機能が回復し、記憶機能の低下が改善された。このジペプチドを一定期間摂取する高齢者を対象とした小規模の二重盲検ランダム化比較試験（RCT）を実施し、脳血管機能に対する改善効果の傾向を得た。この傾向は、ApoE4保有者でやや強く見られた。これらの研究成果は、米国のZlokovic博士らの研究グループによる一連の研究に

よって支持される。彼らは、ApoE4分子がペリサイトに作用して脳血管関門の透過性を高めてしまうことをアルツハイマー病モデルマウス、さらにアルツハイマー病患者の脳組織を用いた研究により明らかにした。神経炎症により脳血管の機能が低下し、脳内アミロイドの排出（ドレナージ）が阻害されてしまうことなども、脳機能老化に寄与すると考えられる。

2) タスクfMRIによる記憶ダイナミズムの可視化研究：

脳がはたらくとき、数百億に及ぶニューロンが高速かつ複雑に情報を交換する。この時、脳内では、どのようなメカニズムで、意識や心が生じるのであろうか？この難問にアプローチするために、世界最高水準の磁場性能を持つマウス用fMRI装置を開発し、マウスの脳活動をリアルタイムに観測するタスクfMRIを世界に先駆けて立ち上げた。マウスは、ヒトに比べると脳が発達していないのではないかとされるかもしれないが、周囲の変化に呼応して機敏に行動パターンを変化させる、意識や心に似た能力を有している。この覚醒fMRI技術を用いて、意識や心の在りかを探り、これらの研究成果を人工知能(AI)の開発に繋げていくべく、新しいタイプの分野横断研究を進めた。

具体的には、14.1 テスラMRI 装置をバージョンアップし、製作した横置き超電導コイルをコイル用クリオスタットに組み込み、動物用MRIマグネットとして設置した。周辺機器類をつなぎ込み、高度な工学的技術を含めて研究体制を整えた。行動解析として、オペラント学習に絞り込んだ。現有の傾斜磁場電源とTesla社で設計したコイルをつなぎ合わせ、平成26年度内にfMRI 画像を取得可能とした。平成27年度中にオペラント学習fMRIシステムを稼働させた。その後、ドーパミンニューロンに関してなど、研究領域内での共同研究を実施した。そして、従来では得られなかったマウスの学習課題中の脳領域の神経活動を俯瞰的に計測する技術を確認した(図2)。具体的には、この学習装置を用いて、光刺激(CS)と水報酬(US)の関係を記憶する強化学習をマウスに行わせた。マウスは光刺激に呼応して舌出し(リッキング応答)を行う。この応答を光センサーが検知すると、コンピューターに連動して水報酬が与えられる。この学習を実行中のマウスより連続的にfMRI画像を取得することにより、連合学習により賦活するマウスの脳領域をリアルタイムに描出することが出来た。

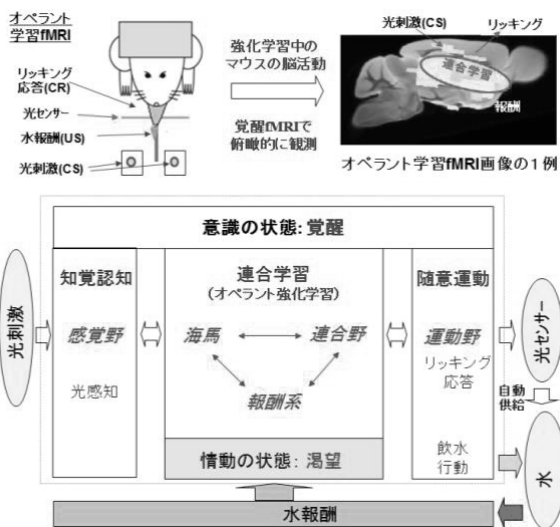


図2：学習中のマウス脳活動を網羅的に観測するオペラント学習タスク fMRI 研究

開発した装置を研究領域内で広く活用し、連携を進めることにより、これまではなかった新たな記憶研究・認知機能研究に発展させた。本タスクfMRI試験において、正解時マウスは報酬として与えられた水を即座に飲水する。一方、光刺激の後、リッキング応答がなければ、水報酬は与えられない。うまく学習が出来ているとき、マウスの脳内ではどのような脳領域が活動をしているのであろうか？

図3に、正解して水報酬を得られた際と、失敗したために水報酬が得られなかった際の脳活動の差分画像解析の結果(多重比較補正後 $p < 0.05$)を示す。正解時には、左右の海馬傍回、左右の運動野(前頭葉を含む)、ならびに視床結合核(海馬と前頭葉をつなぐ脳部位)が賦活化した。光と水の報酬連合学習のために、両者をつなぐ視床結合核が活動したと考えられた。正解時は報酬を得るため、前頭葉の運動前野を含む運動野が活動していた。また、アルツハイマー病モデルマウスにおいては、これらの脳領域に加えて、扁桃体の活動も上昇していた。本タスクfMRI研究は、記憶ダイナミズムを可視化できる手法であることが確認できた。

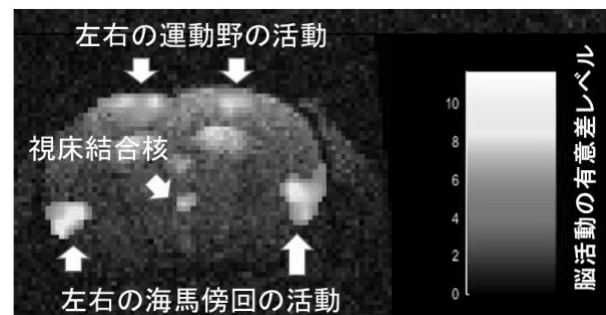


図3：学習正解時に強く活動をしたマウス脳領域

3) 海馬新生ニューロンの記憶ダイナミズムにおける役割

本研究では、3種類の導入遺伝子(Nestin-cre/ER², α CamKII-flox-tTA, TetO-TetX)を用いて、新生ニューロンのシナプス伝達機能のみを自在に制御できるマウスを作出した。このモデルマウスでは新生ニューロン(New-Born Neuron)に限り、そのシナプス放出機能をテタヌストキシン(Tetanus Toxin: TeTX)によって可逆的に阻害することが出来る。このマウスにおいて、海馬新生ニューロンの機能が阻害されていることを確認した。学習記憶試験(水迷路学習)を行い、新生ニューロンの役割を調査した。図4に示すように、新生ニューロン機能不全マウスにおいて、モリス水迷路を用いた逆転学習が遅延することが見出された。

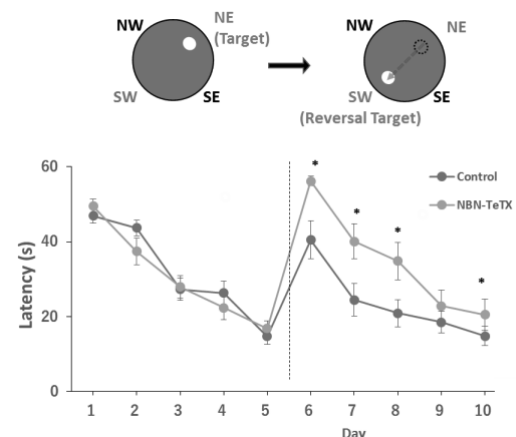


図4：新生ニューロン機能不全マウスにおける学習低下

4) 学習記憶機能におけるドーパミンニューロンの役割

領域内共同研究の一環として、マウスの学習記憶における特徴的なドーパミンニューロンの役割を調べるために、3種類の組み換え遺伝子 (Slc6a3-icre/ER², α CamKII-flox-tTA, Tet0-TetX) を持つトリプルトランスジェニックマウス (DAT-TetX Tg) を用いた研究を実施した。マイクロダイアリシスにより、このマウスの線条体と側坐核のDA放出量の減少を確認した。Rotarod Testにより運動機能の低下を認めた。学習機能の評価試験としてオペラント Conditioning Testを行った。その結果、Tgマウスでは正解率の低下が見られた(図5)。また、Tgマウスでは、報酬が提示されてから獲得するまでの反応時間が有意に低下していた。報酬に対するモチベーションが低下していると示唆された。タスクfMRI研究において、ドーパミンニューロン関連脳領域の活動性が低下している傾向を得た。記憶ダイナミズムにおけるドーパミンニューロンの役割の一端を明らかにすることが出来た。

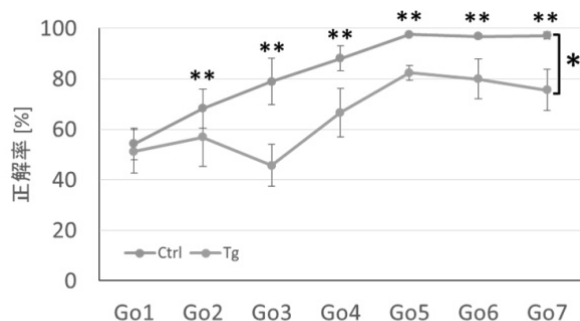


図5: ドーパミンニューロン機能不全マウスにおける学習記憶機能の低下

<国内外での成果の位置づけ>

アルツハイマー病のホールマーク(特徴)はアミロイド斑と神経原線維変化であるが、我々の研究から、グリア細胞の異常な活性化を伴う神経炎症が、脳機能低下を早める要因であることが示された。近年、アルツハイマー病の遺伝的素因に関するGWAS(genome-wide association studies)解析によって、新たに20種の遺伝子が同定されたが、このうちの約半数はTREM2, CD33, HLA-DRB1/5 locusなど神経炎症に深く関りのある遺伝子であった。TREM2はrare mutantであり、アルツハイマー病のリスクを3倍近く高める。TREM2は、ミクログリアに発現するレセプターで神経炎症を制御するはたらきがある。TREM2の機能不全は、ミクログリアにおけるmTORシグナルの低下とエネルギー代謝の悪化につながり、またautophagosomeの増加を誘導することが示された。TREM2機能不全アルツハイマー病マウスにCyclocreatineを投与すると、ミクログリアのエネルギー代謝が改善され、神経変性を伴う病態像が改善することなども報告されている。

本研究のアルツハイマー病モデルマウスを用いた研究から、ミクログリアに加えて、活性化アストロサイトによる炎症性サイトカインの産生亢進が、神経炎症による記憶機能低下の要因であることが見出された。また、神経炎症は脳血管閉鎖の破綻に寄与していた。アルツハイマー病の最も強力な危険因子であるApoE4遺伝子が、神経炎症や脳血管閉鎖の破綻に関わっていることも判ってきた。アルツハイマー病による記憶機能の低下にグリア細胞の活性化を伴う神経炎症が深く寄与すること、この神経炎症をうまく制御することにより認知機能の低下を回避し疾病リスクを軽減できる可能性が、見えてきた。

世界最高水準の磁場性能(14.1テスラ)を有するMRI装置を用いてマウスのタスクfMRI研究の手法を開発した。マウスは遺伝子資源が最も豊富なモデル生物であるが、これまでにマウスの脳活動を全脳レベルで俯瞰的にかつリアルタイムに観測できる技術は無かった。本研究において、世界に先駆けてタスクfMRI研究を立ち上げることができた。アルツハイマー病モデルマウスを含めて、各種のモデルマウスを用いてタスクfMRI研究を実施した。マウスは、周囲の変化に呼応して機敏に行動パターンを変化させる、意識や心に似た能力を有していることが本タスクfMRI研究を進める中で、目に見える形で次第に明らかになってきた。この覚醒fMRI技術を用いて、意識や心の在りかを探り、これらの研究成果を人工知能(AI)の開発に繋げていくべく、新しいタイプの分野横断研究に道を拓くことが出来た。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

超電導コイルの製作過程に若干の遅延があり、14.1テスラMRI装置の設置が数ヶ月遅れてしまった。次年度にスピードアップを図り、平成26年度内にfMRI画像を取得可能とした。この遅延に伴い、装置開発スケジュールの全体の見直しを行い、研究内容においてもオペラント学習に絞り込んだ。高度な工学的技術を含めて研究体制を整え、再現性良く装置を動作させるようにした。平成27年度中にfMRI画像取得に関するシステムを稼働させた。これにより、従来では得られなかったマウスの学習課題中の脳領域の神経活動を俯瞰的に計測する技術を開発することが出来た。平成29年の夏までに全ての種類の遺伝子組み換えマウスの行動試験を行い、平成30年3月までにfMRI研究、脳組織化学研究、マウスの行動試験データの解析、研究成果のとりまとめを行う予定であった。しかしながら、研究実施場所における大規模な空調工事の影響により、想定以上にマウスの飼育環境が悪化し、fMRI研究、行動試験に必要な個体数の確保に困難な状況が生じた。新生ニューロンのシナプス伝達機能阻害マウス、ならびにドーパミンニューロンのシナプス伝達機能阻害マウスを用いたタスクfMRI研究を、研究期間内に十分には実施することが出来なかった。

<今後の課題、展望>

モデルマウス研究で得られた知見から、脳の機能老化の仕組み、特にアルツハイマー病において、神経炎症が機能低下の原因の一つであることが判明した。神経炎症をうまく制御することは、脳の機能老化を防ぐだけでなく、アルツハイマー病の新しい治療戦略につながることも期待された。全身性の慢性炎症と神経炎症とはどのような関係にあるのか、などは今後の大きな課題となるが、脳内の神経炎症や血流の状態を非侵襲的に捉える画像診断技術を組み合わせ、かつ脳血管閉鎖を透過できるウイルスベクターなどを用いて神経炎症をピンポイントに制御できる方法を開発することなどを通じて、この分野からアルツハイマー病に対する新しい治療法が開発されることが期待される。

オペラント学習タスクfMRI研究は、学習記憶の仕組みやその低下メカニズムを調べる研究に加えて、感覚認知から随意運動の実行に至る脳の全体的な認知機能を調べる上で、今後重要な研究ツールになることが期待された。本研究で得られた成果は、細胞レベルで認知機能の機構を解明する研究の基盤になるだけでなく、この基礎研究の成果を、高齢者の健康増進に活かされることを予見する。そしてさらには、このタスクfMRI研究を、将来的な人工知能(AI)の開発も視野に入れた、新しいタイプの生命知能の融合型研究につなげていきたい。

ショウジョウバエの匂い記憶情報処理の時空間ダイナミズムの解明

研究代表者：多羽田 哲也¹⁾

研究分担者：村上 智史¹⁾、山崎 大介¹⁾、廣井 誠¹⁾、阿部 崇志¹⁾、江島 亜樹²⁾

1) 東京大学・定量生命科学研究所 2) 東京大学大学院・農学生命科学研究科

<研究の目的と進め方>

ショウジョウバエの嗅覚系3次神経であるキノコ体は、約2000の内在神経細胞(KCs)より構成され、その神経細胞の活動の組み合わせにより匂いを識別するとともに、匂い記憶を形成する同時検出器として機能することが知られている。本研究では匂いとショ糖による連合学習(報酬学習)および匂いと電気ショックによる連合学習(忌避学習)におけるKCsを中心とした神経回路の機能を明らかにするために、個々の神経細胞の操作、ライブイメージング、トランスクリプトーム解析などを行なう。

<研究計画>

1) キノコ体KCsは発生学、解剖学的に7種のサブタイプに分類され、それぞれ匂い記憶形成における特異的な機能が報告されている。本研究では、CRE配列に依存した転写制御を指標としてKCsをクラス分けすることによりvalenceに依存したKCsの新たな機能を見出したので、その詳細を明らかにする。

2) 匂い忌避学習のパラダイムでは匂い(CS+)を呈示している間に電気ショック(US)を与え、次に電気ショックなしに別の匂い(CS-)を呈示すると、CS-に比べてCS+の匂いを忌避する行動を記憶するようになる。この過程を時間軸に沿って調べることによって神経回路の新たな機構が見えてきた。神経細胞の活動を人為的に操作することによりこの機構を詳細に調べる。

3) KCsで特異的に発現する遺伝子を同定し、記憶形成における機能を明らかにする。

<得られた研究成果>

1) KCsのサブタイプは相反するvalenceをコードしている。ショウジョウバエの匂い記憶実験系では2種の記憶、(1)匂い(条件刺激)と正の非条件刺激である報酬刺激(ショ糖)との連合による報酬記憶及び(2)匂いと負の非条件刺激である罰刺激(電気ショック)との連合による忌避記憶を調べることが可能である。この実験系を用いて転写因子CREB(cAMP binding protein)の記憶形成における機能を調べるためにCREタンデム配列をシスエレメントとしGFPを発現したトランスジーンを導入して発現細胞を調べた。その結果、KCsのγサブグループの3分の2程度の細胞に顕著な発現が見られたのでγCRE-pと名付けた(図1)。

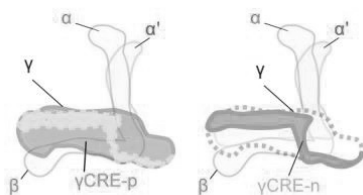


図1 γCRE-pとγCRE-n神経群

γCRE-pの2時間忌避記憶における機能を調べると、記憶の獲得、保持、想起の全てのステージにその出力が必須であることがわかった。次に、γサブグループの中のCREにตอบสนองしない細胞、γCRE-nを調べると、その出力は2時間忌避記憶の獲得、固定には必要とされないながら報酬記憶の獲得、固定及び想起の全てのステージに必要であることがわかった。γCRE-pの出力は報酬記憶には必要とされないが、人為的な活性化は報酬記憶の全てのステージを阻害する。一方、γCRE-nの人為的な活性化は忌避記憶の全てのステージを阻害する。γCRE-nの出力が報酬、忌避記憶双方の想起に必要である例外を除くと、γCRE-pは忌避記憶に必要で報酬記憶に阻害的に働き、γCRE-nは報酬記憶に必要で忌避記憶に阻害的に働く。γサブタイプ全体(γCRE-nとγCRE-pを合わせた細胞種)を阻害しても忌避、報酬記憶の獲得、保持を阻害しない(図2)。

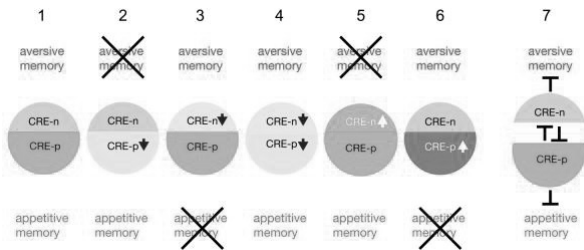


図2 γCRE-pとγCRE-nの記憶獲得、保持における機能

このことからγCRE-pは報酬記憶を、γCRE-nは忌避記憶を阻害しており、報酬記憶はγCRE-nがγCRE-pを抑制することにより、また忌避記憶はγCRE-pがγCRE-nを抑制することによりそれぞれの記憶を形成しているとの仮説を提唱するに至った。

実際、光遺伝学実験によりγCRE-pとγCRE-nは互いに抑制し合っていることが示唆された(図3)。

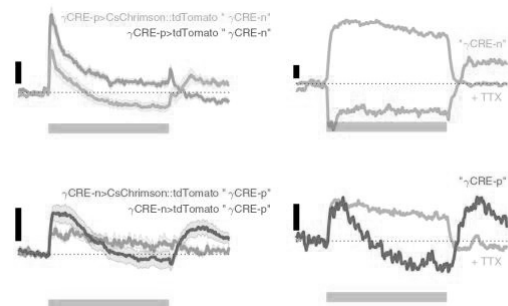


図3 上段、γCRE-pを充進した時のγCRE-nの応答。右は対照との差をTTX存在下での計測と共に示す。下段、γCRE-nを充進した時のγCRE-pの応答。

さらに、KCs上に直接シナプスを形成するMBONsとして知られる一群の出力神経群の中のMBON- $\gamma 5\beta'2a/\beta'2mp$ とMBON- $\gamma 2\alpha'1$ がそれぞれ γ CRE-p と γ CRE-nの下流で働いていることがわかった (図4)。

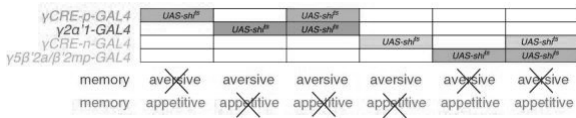


図4 MBON- $\gamma 5\beta'2a/\beta'2mp$ とMBON- $\gamma 2\alpha'1$ はそれぞれ γ CRE-pと γ CRE-nの下流で機能する。

KCsとMBONsの両者を同時に抑制し、記憶形性能を調べてみるとMBONsの抑制効果のみが表現型となる。 γ CRE-pがMBON- $\gamma 2\alpha'1$ を、 γ CRE-nがMBON- $\gamma 5\beta'2a/\beta'2mp$ を抑制していると考えたとこの回路機能を説明できる。しかし、光遺伝学的実験では抑制を観察することはできなかった。 γ CRE-pの下流にMBON- $\gamma 5\beta'2a/\beta'2mp$ が位置し、 γ CRE-nの下流にMBON- $\gamma 2\alpha'1$ が位置して両MBONs間のバランスにより報酬・忌避記憶が形成されるという仮説を提唱した (図5)。

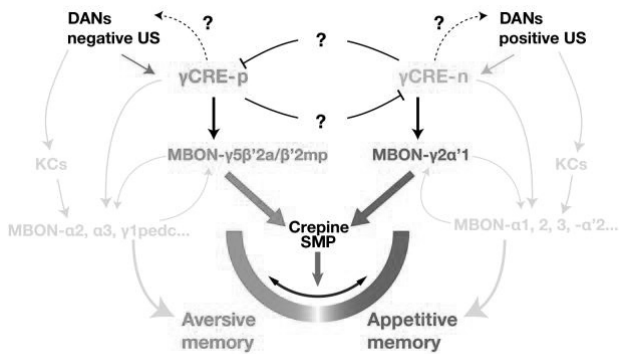


図5 MBON- $\gamma 5\beta'2a/\beta'2mp$ とMBON- $\gamma 2\alpha'1$ はそれぞれ γ CRE-pと γ CRE-nの下流で機能し、忌避/報酬記憶の回路を形成している。

1)の図はYamazaki et al. Cell Rep 22, 2346–2358. 2018から引用。

以上のことはKCsそれ自身がvalenceをコードしていることを示している。そこで、匂いを提示している時に、US無しに、 γ CRE-pを抑制または γ CRE-nを興奮させると短期の匂い報酬記憶が形成された。逆に、 γ CRE-pを興奮または γ CRE-nを抑制すると短期の匂い忌避記憶が形成された。以上のことは γ CRE-pと γ CRE-nはvalenceをコードして、相互に抑制しあっていることを再び示している。この両者を抑制するとどうなるであろうか。結果は個体の生理条件によって、空腹時に抑制するとその匂いは報酬記憶となり、飽食時には忌避記憶となった。

2) ショウジョウバエをモデルに用いた匂い忌避学習のパラダイムでは匂い (CS+)を呈示している間に電気ショック (US) を与え、次に電気ショックなしに別の匂い (CS-) を呈示すると、CS-に比べてCS+の匂いを忌避する行動を記憶するようになる。この時に匂いを弁別するキノコ体KC細胞がCSとUSの同時検出器として働き、キノコ体出力神経群(MBONs)の活性を制御することにより記憶を司っていると考えられている。またUSはドーパミン神経群 (DANs) によりキノコ体に伝達されると理解されている。

短期忌避記憶を調べている過程で、MBONsに属するGABA作動性MBON- $\gamma 1pedc$ が、記憶の想起のみならず獲得にも必要であ

ることがわかった。それは意外にもCS-を呈示している時であった (図6)。CS+を呈示している時にはこのようなことは起こらない。

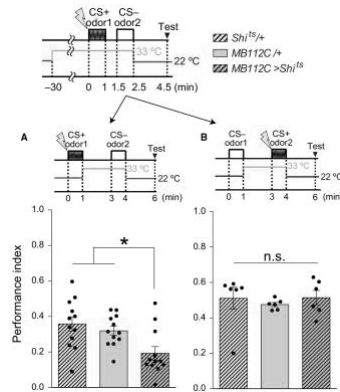


図6 MBON- $\gamma 1pedc$ はCS提示時に必要 (A) であるが、CS+提示時には必要ない (B)。

MBON- $\gamma 1pedc$ を阻害するだけで短期忌避記憶が形成されること (図7) から、MBON- $\gamma 1pedc$ はUS非存在下で不用意な記憶が形成されることを抑制することが示唆された。

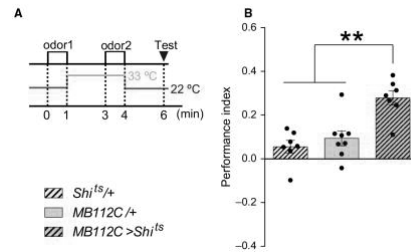


図7 匂いを提示している時にMBON- $\gamma 1pedc$ を抑制する (A) とUS非存在下でも忌避記憶が形成される (B)。

この時に同時にDANsを抑制するとこの阻害から回復すること (図8) から、CS-を呈示している時にはMBON- $\gamma 1pedc$ がDANsの作用を抑制することが必要であることを示唆している。

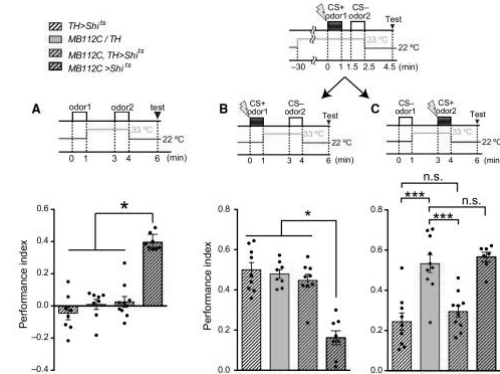


図8 匂いを提示している時にMBON- $\gamma 1pedc$ を抑制するとUS非存在下でも忌避記憶が形成される (A)。CS-提示時にMBON- $\gamma 1pedc$ を抑制すると記憶阻害が起こるが同時にDANsも抑制すると記憶系性能が回復する (B)。CS+提示時にはDANsのみが必要とされる (C)。

DANsはUSを仲介していることからCS+を呈示する時に必要であるが、それ以外にも外界及び生理学的な条件により様々な応答することが観察される。したがって、CS-を呈示している時にDANsが活性化されるとそれはUSと解釈され、CS+と干渉し、記憶の阻害が起こると考えられる。

近年、KCs、MBONsとDANsからなる回路はコンパートメント構造をなしており、コンパートメントを単位としたマイクロサー

キットが様々な機能を果たすことが示されている。そこで、ここで見られる短期記憶の制御がMBON- γ 1pedcに対応するDANsであるPPL1- γ 1pedcに特異的なものであるか、操作するDANsの細胞を限定して記憶形成能を調べた。その結果、少なくともPPL1- γ 1pedcとPPL1- γ 2 α 1が含まれることがわかった (図9)。

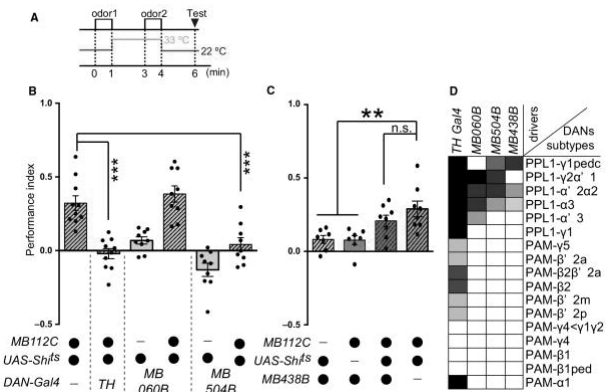


図9 MBON- γ 1pedc と DANs を同時に阻害することにより (A) CS-で機能している DANs を同定した (B,C)。使用した発現ベクターがカバーしている DANs のパネルを示した (D)。

最近、DANs、KCsおよびMBONs間の情報は双方向性で、これらの神経群は複雑なネットワークを形成していることがわかって来た。この結果もこの文脈で理解されるべきものの一つであるかもしれない。

2)の図は Ueoka et al., 2017. FEBS Open Bio 7, 562–576.から引用

3) KCs を単離し、トランスクリプトーム解析により、KCs に特異的に発現している遺伝子を探索し、small GTPase family に属する RGK1 が KCs に特異的に蓄積していることを見出した (図10)。

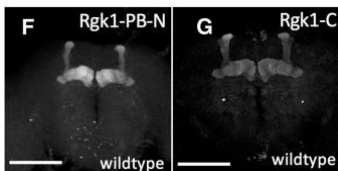


図10 2種のRGK1抗体による組織染色。KCsに強いシグナルが認められる。

さらに、GFPと融合したRGK-1をKCsで発現させ、シナプスのマーカーであるsynaptotagminと共染色することにより、RGK1がシナプスに局在していることが示された (図11)。

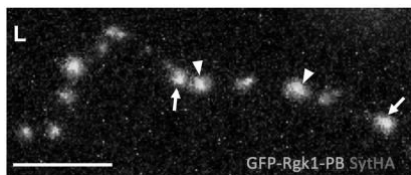


図11 GFP-RGK1 と HA-tagged Synaptotagmin の共局在を示す。

さらに、この遺伝子の欠失変異を作成し、3時間匂い忌避記憶を調べたところ、記憶の低下が見られ、それは全長RGK1cDNAを成虫のKCsで発現させることによって回復したのみならず対照に比べてスコアの上昇も見られた (図12)。このことからRGK1は3時間匂い忌避記憶の形成に必要であると結論づけた。

RGK1の機能を調べるために欠失変異を作成した。C-末を欠失したRGK1 (GTPaseドメインを欠失)はRGK1変異の3時間

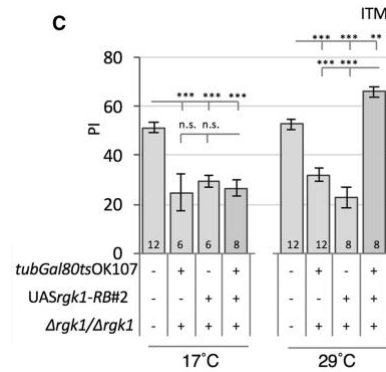


図12 変異による記憶の低下は成虫でKCsにRGK1cDNAを発現させることによりレスキューすることができる。

記憶阻害をレスキューできなかったがN-末を欠失したRGK1 (機能未知の保存された部位を欠失)はレスキューすることができた (図13)。3時間記憶は安定な記憶成分 (麻酔耐性記憶ARM、コールドショック耐性) と不安定な記憶成分ASMからなることが知られている。コールドショック条件下で実験を行うと、全長cDNAのみが記憶形成をレスキューできた (図13)。

以上のことからASM形成にはN-末は不要であるが、ARM形成には必要であることが示された。

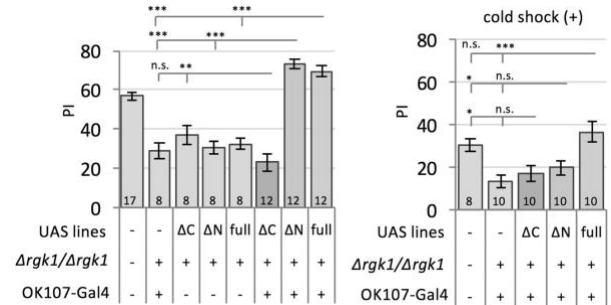


図13 N-末を欠失したRGK1でも3時間記憶の阻害を回復することができる (左) が、コールドショックのスコアを回復することはできない (右)。

rutabaga (rut)はASMにdunce (dnc)はARMに機能することが知られているので、RGK1との二重変異を調べた。コールドショックではrgk1変異はdncともrutとも有意な差は見られなかった (図14A)。dncあるいはrutとの二重変異では、各々の単独の変異に比べて有意にスコアは低下した (図14B)。以上のことからrgk1はARMとASMの両方に必要であると考えられる。

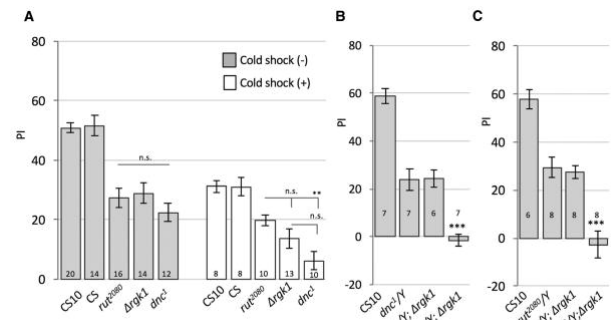


図14 コールドショックにおけるrut, rgk1, dncの3時間記憶スコア (A)。rgk1とdnc (B)あるいはrut (C)との二重変異の表現型。

Small GTPase である Rac は、ASM の忘却を促進すること、Rac と RGK1 は細胞骨格形成を制御することが知られていることから忘却における Rgk1 の関与を調べた。KCs に Rac の構成的活性型を発現させると忘却により記憶のスコアが低下するが、この時に同時に Rgk1 を発現させると記憶は回復する。また、Rac の構成的活性型による記憶スコアの低下は rgl1 を 1 コピー覗くことによってさらに低下する。以上のことから RGK1 の ASM における機能の少なくとも 1 つは Rac 依存の忘却を制御することにあると結論づけた (図 15)。

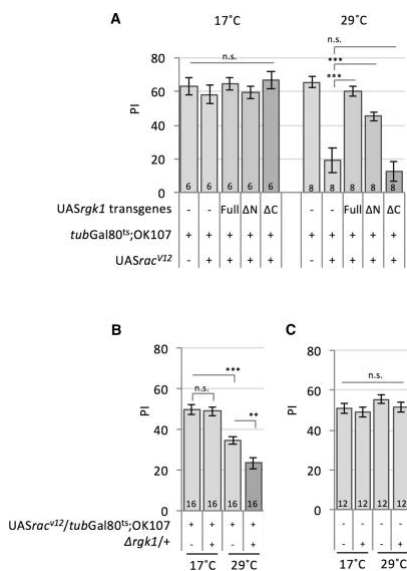


図 15 rgl1 は構成的活性型 Rac^{V12} による忘却を負に制御する (A)。rgk1 をシングルコピー除くと Rac^{V12} の表現型を増強する (B,C)。

3)の図は Murakami et al., J. Neurosci., 2017, 37, 5496-5510.からの引用。

<国内外での成果の位置づけ>

1) 現在、ショウジョウバエの匂い記憶研究はコンパートメント仮説が広く受け入れられている。少数の細胞からなる DANs (ドーパミン作動性神経) は KCs 軸索のある決まった領域にシナプスを作る。そして、その領域に対応する MBONs もシナプスを形成する (図 16)。

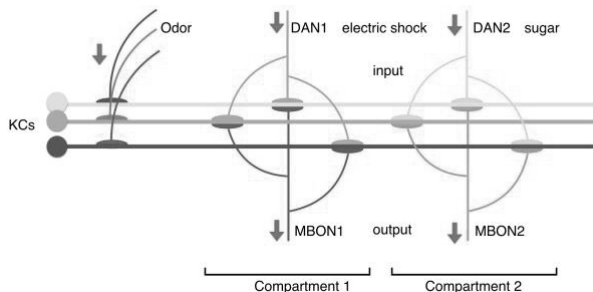


図 16 コンパートメント仮説。少数の細胞からなる DANs は KCs 軸索のある決まった領域にシナプスを作り、その領域に対応して MBONs もシナプスを形成する。

この領域はコンパートメントとよばれ、KCs の情報が DANs による修飾を受け、対になった MBONs によって読み出されるといふマイクロサーキットの機能を想定したものである。例えば同一の KCs 上のコンパートメントであっても DANs に依存して、正あるいは負の valence の入力を受けることが考えられ、多くの実

験結果が匂い記憶形成におけるコンパートメント仮説を支持している。これに対して本研究は KCs 自体も valence をコードしていることを明らかにしたものである。事実、当該 KCs を抑制あるいは興奮させることが US として機能することを示した。最近、マウスの扁桃体の BLA に正と負の valence を担う 2 種の神経の存在が示され (Kim et al., Nature neurosci., 2016, 12, 1636-1646.)、この機構は進化上保存された根源的なものであることが示唆される。今後、本研究の成果をコンパートメント仮説と統合するモデルが必要となる。また近年の研究では情報は DANs>KCs>MBONs と一方向性に流れるだけでなく、各階層間でのフィードバックを含む複雑な回路の存在が示唆されている。

2) 記憶獲得時にドーパミンが強化子として機能することは広く受け入れられている。本研究では、CS+提示のみならず CS-提示時においてもドーパミンが (実験的に US を提示することがなくても) 強化子として機能するポテンシャルがあり、MBONs がそのことを抑制している新たな機構を示すことができた。MBONs が DANs を抑制する例が後に、長期記憶でも示された (Pavlovsky et al., Current Biology, 2018,28,1-11.)

3) KCs に特異的に蓄積される small GTPase が忘却を抑制する可能性を示したことは、新たな知見であり記憶および忘却の機構の理解を一步進めるものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

記憶に伴う KCs の応答の可塑性を信頼に足る精度で解析することができなかった。KCs のサイズが小さいために高度なイメージング技術が必要であり、さらに匂い試行のたびに必ずしも安定で無い事も解析を難しくしている。カルシウム濃度以外の指標も必要であるかもしれない。

<今後の課題、展望>

γCRE-n に正の、γCRE-p には負の valence を付与する機構を理解したい。回路を観察しても DANs がどちらかの細胞種に特異的にシナプスを形成しているようには見えない。MBONs とのシナプス結合も同様である。γCRE-n あるいは γCRE-p の出力を操作しただけで US の代わりとなることから、これらの KCs を含む回路内で拮抗する valence のバランスをとる機構が内在しているものと仮定している。

また KCs は総数 2000 個の神経細胞からなり、そのうちの数%の細胞が個々の匂いに応答することにより匂い情報をコードしていると考えられているので、匂いと valence の情報をどのようにコードし、記憶を形成しているのかを明らかにする。本研究で扱った γ 細胞種以外にも KCs には α/β および α'/β' の 2 種の細胞種があり、α/β は主に記憶の想起に、α'/β' は保持/固定化に機能するとされていた。本研究以前は γ は 2 時間記憶の保持/固定化には不必要とされていたことを考えると、KCs の機能は再考を要する。報酬記憶にはいかなるステージであっても γCRE-p からの出力を必要としないことから、少なくとも報酬記憶の匂いの識別には寄与していないと思われる。一方、γCRE-n は嗅覚情報をコードせず、視覚情報をコードするとされているが、報酬、忌避記憶とも想起には必要とされる。何らかの形で正負両方の Valence をコードしているのであろうか。

γCRE-n と γCRE-p およびその下流の MBON-γ5β2α/β2mp と MBON-γ2α1 の出力は 3 時間記憶の保持/固定化の間も連続して必要とされることから、その機能を明らかにする。

電気生理学的解析の準備も整っているので、イメージング解析に加えて電気生理学的な解析も進めて、個体を用いた記憶形成のシナプス可塑性についてより深い理解を目指す。

学習記憶に関わる新規分子の発見と神経系における動態・機能の解明

研究代表者：飯野 雄一*1、研究分担者：饗場 篤*2

*1 東京大学・大学院理学系研究科、*2 東京大学・大学院医学系研究科

<研究の目的と進め方>

過去の経験を記憶し、その情報を保持して利用する学習記憶の能力は、生存の可能性を最大限にするために動物が発達させてきた巧妙な仕組みである。本研究において、研究代表者らは、神経細胞の数が全部で302個しかなく、おそらく動物界で最も単純な部類の神経系を有する線虫 *C. elegans* を主に用いて本研究を進める。この生物は、以下の2つの、他の動物にみられない特筆すべき特徴を持つ。

1) 神経細胞がすべて同定されており、それらが作る神経回路の構造が完全にわかっているため、神経回路の動作特性を一細胞レベルでの正確さで研究できること。

2) 万単位の個体をスクリーニングして行動を指標に突然変異体を取得することができ、それによって学習に関わる新規遺伝子を発見できること。

このような単純な系であるが、遺伝子の総数は約20,000であり、うち70%以上について哺乳類にホモログが存在すると言われている。これらの利点をもとに、線虫を用いた神経系の研究はここ10年ほどで爆発的に進んだ。その中で、研究代表者らは化学走性行動とそれに関わる学習に重点を置いて研究を進めて来た。その過程で、線虫が経験した塩の濃度を記憶し、その時の餌の有無と連合して学習を行うことを見出した。この学習に関わるインスリン/PI3キナーゼ経路、Gq/PLC/PKC経路、カルシニン、ホスホイノシチド転移蛋白質、Ras-MAPK経路、NMDAタイプグルタミン酸受容体など多くの分子を同定している (Tomioka et al., 2006 など)。行動の機構や神経の活動についても解析を行い、走性行動に二つの機構があることを見出し、学習に際してどの神経のどのような変化が行動変化に結びつくかも明らかになりつつある。このようなバックグラウンドをもとに、本研究ではイメージング技術を駆使して神経回路の動作、特に学習による変化を可視化し、情報の流れのダイナミックな変化を明らかにし、同時に、変異体の分離により新規分子を発見し、その分子動態を調べることでより各階層で学習・記憶の機構を包括的に理解することを計画した。

さらに、カルシニンなど線虫で機能的な解明が進んだ遺伝子のホモログの遺伝子改変マウスを作製し、行動と神経活動についての研究を進めることにより、種間での保存性や種による違いを明らかにすることを目指す。

以上を達成するために研究開始時に以下の計画を立てた。

<研究計画>

1) 短期記憶、特に刺激強度の記憶

線虫は塩の濃度を餌の有無と連合して記憶し、記憶している塩濃度に向かう、またはその濃度を避ける行動をとる。この記憶に関わる重要な情報が感覚神経にあることがわかっていた。他生物においても、刺激の強度を記憶する機構はほとんど分かっていないので、線虫を用いて濃度記憶の分子機構を明らかにする。このために、過去に経験した濃度と異なる濃度に向かう変異体の分離を行う。その原因遺伝子を決定し、遺伝子産物がこの機能にいか

に働くかを決定する。すでに、ホスホリパーゼC (PLC) /ジアシルグリセロール (DAG) /プロテインキナーゼC (PKC) 経路が活性化すると高い塩濃度、不活性化すると低い塩濃度に向かうことが分かっており、この経路が塩濃度記憶の実体である可能性もある。そこで、変異体での神経活動を測定するとともに、DAGの量を分子イメージングにより測定し、塩濃度経験を含むどのような情報によって変化するかを検討し、例えば細胞内の特定部位のDAG量が記憶している塩濃度記憶の実体である可能性などを解明する。

2) 記憶シグナルの細胞間転移

塩の濃度と飢餓を連合させた学習においては、ASER神経の存在と、そこでのインスリン経路の機能が必須である。ところが、ASER神経だけでは塩の忌避が起こらないことを見出し、他の感覚神経の働きも必要であることが示唆されている。ASER感覚神経で認識した塩の濃度がどう他の神経に伝わるのかを解明する。逆に、飢餓のシグナルなどは他の組織で発生し、頭部神経系に伝わるのが感覚情報処理に必要な可能性がある。このような細胞間の連絡による行動制御の機構を多面的に解明する。

3) 長期記憶、短期から長期への固定化

匂い物質ブタノンと餌、および1-プロパノールと塩酸との連合学習においては、繰り返し条件付けにより24時間以上持続する長期記憶が形成されることが示されている。塩を用いた長期記憶の実験系の作製を行い、繰り返し条件付けと記憶の持続時間など基本的な性格付けを行うとともに、固定化異常の変異体の分離を行う。同時に、CREBによる転写制御などの役割についても調べ、長期記憶による回路の動作の変化を調べる。

4) 一細胞での分別記憶の機構

糖が存在する状態で飼育された線虫は糖に向かい、糖のない状態で飼育された線虫は糖を避けることを見出していた。さらに、糖走性/糖濃度記憶にはASEL神経が重要とわかった。ASELはNa⁺などのイオンを受容するが、面白いことに、糖の濃度とNa⁺の濃度は独立に記憶されることがわかってきた。同じ感覚神経で受容されるにも関わらず別個に記憶が形成される機構を調べるため、糖濃度記憶変異体の分離を行い、神経応答のカルシウムイメージングなどの機能解析により分子機構を解明する。

5) 学習・記憶の能力の制限機構

餌の存在下で塩の濃度を変化させたときに、新たな濃度の記憶が野生型より早く起こる変異体、および、塩と飢餓の連合が野生型より早く起こる変異体を分離する。SNPsマッピングと全ゲノムシーケンシングにより原因遺伝子を同定し、機能解析を行って記憶能力の制約機構に迫る。

6) 個体間相互作用による行動可塑性の変化

餌のない状態で匂いにしばらく曝されると匂いへの走性が低下する。この可塑性を嗅覚可塑性（嗅覚学習）と呼ぶ。匂いに晒される以前の培養時に線虫の個体群密度が濃いと、匂いに晒されたときの嗅覚可塑性が向上することがわかってきた。個体群密度の情報はフェロモンにより伝えられ、さらに細胞内ペプチド SNET-1 を介することが分かっていた (Yamada et al., Science, 2010)。フェロモンがどう働くか、それがどう嗅覚学習を制御するかを SNET-1 レポーターを指標とした異常変異体、あるいは SNET-1 を過剰株のサブレッサー変異体の分離・解析により明らかにする。

7) マウスにおける学習関連遺伝子の機能解析

線虫の学習不能変異体として見出した変異体の原因遺伝子である CASY-1 は線虫インスリン受容体 DAF-2 の特定のアイソフォームを軸索輸送するのに必須であることが明らかとなり、その機能が学習に必須であることが分かっていた (Ohno et al., Science, 2014)。CASY-1 の哺乳類での相同遺伝子はカルシネニンと呼ばれ、カルシネニン 1~3 の遺伝子ファミリーを形成している。哺乳類カルシネニンの機能を調べるため、3 つのカルシネニン遺伝子の遺伝子改変マウスを作製し、それらの変異マウスがいかなる異常を示すか、詳しく調べる。

<得られた研究成果>

1) 短期記憶、特に刺激強度の記憶の機構

線虫は、餌を与えて飼育されていた際の塩濃度を記憶し、その塩濃度に向かう。この行動に重要な PLC/DAG/PKC 経路の動態を知るため、FRET により DAG 量に応じて蛍光が変化する Downward DAG2 プローブを ASER 神経に発現させて蛍光測光を行った。その結果、ASER 感覚神経のシナプス部位でのジアシルグリセロール量が感覚入力により両方向に変化することを観測した。この変化は ASER 神経の感覚受容とカルシウム応答に依存していた。さらに、飢餓後にはこの変化が小さく短くなることを明らかにした。ASER 感覚神経における DAG 経路の活性化が行動レベルでは高塩濃度への化学走性を引き起こすことと合わせ、この DAG の挙動は以前に飼育されていた塩濃度への化学走性が生じる機構をうまく説明できる (図 1)。これらの結果を論文発表した (Ohno et al. Cell Rep., 2017)。

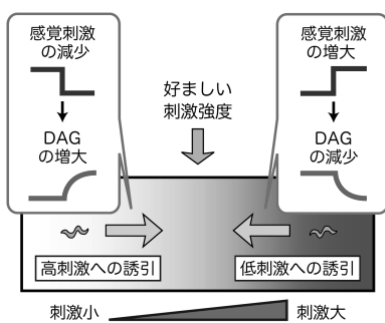


図 1 ジアシシルグリセロール (DAG) による塩走性の制御のモデル
感覚神経内の DAG は塩濃度の低下に伴い増加する。一方 DAG が増加すると線虫は高濃度に向かう。塩濃度上昇時にはその逆となる。(Ohno et al. 2017)

さらに、濃度記憶依存の塩走性の神経機構を調べるため、自由行動中の線虫を追尾しながらカルシウムイメージングにより神経活動を測定する装置を用いて実験を行った。その結果、感覚神経から介在神経に至る段階で、神経応答が経験により正逆に変化することを見出した (Sato et al., 投稿準備中)。

また、低塩濃度で飼育後に、低塩に向かわずより高塩濃度に向かう変異体を分離し、この原因遺伝子が塩化物イオンのチャネルをコードし、それが感覚神経で働くことが明らかになった。

2) 記憶シグナルの細胞間転移

化学走性行動とその可塑性に異常を示す変異体として TOR 経路の変異体を見出した。この経路は飢餓条件下で経験した塩濃度を避ける学習に特に重要である。TOR は共に働く因子の違いにより TORC1、TORC2 の異なる複合体として存在する。化学走性にはこれらの両複合体が関わっていたが、RICT-1、SINH-1 を含む TORC2 については腸で働くことがわかり、腸からのシグナルが頭部感覚神経による塩嗜好性を調節することが示唆された。この結果を論文に発表した (図 2、Sakai et al., PLoS One 2017)。

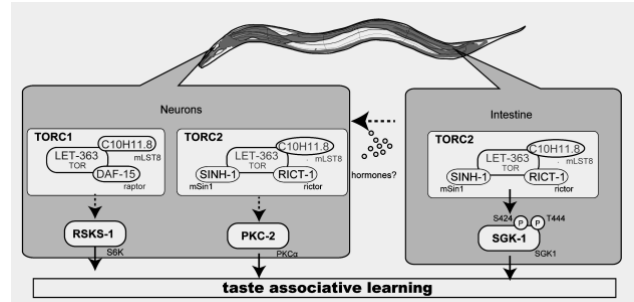


図 2 TOR 経路による塩走性学習の制御
TOR 経路は飢餓後に経験した塩濃度を避ける行動が起こるために必要である。TORC1 経路は主に神経で、TORC2 は腸で働くことが見出された (Sakai et al. PLoS One, 2017)。

一方、飢餓下で経験した塩濃度を避ける学習に必要な感覚神経が以前に調べられ、塩濃度を感じる主たる神経である ASER 神経だけではこの行動が完全に起こるには不十分であることがわかってきた。では他にどの神経が必要かを探索したところ、ASG と呼ばれる頭部感覚神経が必要であることがみつかった。ところが、ASG 神経は塩の濃度変化に対しては全く応答しなかった。光遺伝学により ASER を人為的に刺激する実験によって、ASG が機能しない場合、ASER の活性化は飼育塩濃度に向かう方向の行動を引き起こすのに対し、ASG が機能していると、同じ ASER 活性化が飼育塩濃度から避ける行動を引き起こすことがわかった。さらに、ASG は方向転換行動の際に活性化され、線虫を飼育塩濃度から避ける方向に転回させることも分かった。これら多面的な機能により、ASG 神経が飢餓条件下での行動を引き起こす重要な働きがあることが明らかになった (Jang et al. 投稿中)。

3) 長期記憶、短期から長期への固定化

長期記憶の実験系の構築を試み、塩濃度学習に関する新たなパラダイムを考案した。間を置いた繰り返し条件付けにおいて 2 時間および 4 時間の時点での記憶の保持が向上するようにみえたが、その差異は小さかった (後述)。

前述のように、インスリン経路は飢餓により経験した塩濃度から逃げるようになる学習に必須であることを明らかにしている。この学習においては、インスリン受容体 DAF-2 のアイソフォームの 1 つである DAF-2c が軸索で働くことが重要であるとわかっている (Ohno et al., Science, 2014)。インスリン経路により制御される多くの生命現象においては、FOXO 転写因子がインスリン経路の下流で機能する。その際、インスリン-PI3 キナーゼ経路の AKT キナーゼにより FOXO 転写因子がリン酸化され負に制御される。ところが、線虫の塩忌避学習においてはインスリン受容体 DAF-2 や PI3 キナーゼ AGE-1 の欠損と DAF-16 (FOXO) の欠損は同じ方向の異常を引き起こす。そこで DAF-16 について詳しく調べたところ、軸索の DAF-2c とは別に核で DAF-16 が働き、その

機能はおそらくインスリン受容体のもう一つのアイソフォームである DAF-2a により制御されていることがわかった。さらに、これら 2 つの経路が加算的に働くことが明らかになった。転写を介したこの制御はより長い記憶を作り出すために必要である可能性が示唆される (図 3、Nagashima et al., 投稿中)。

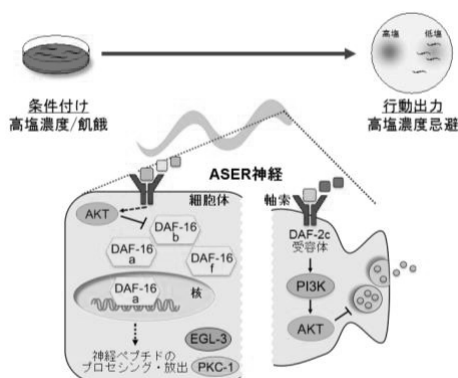


図 3 塩忌避学習における DAF-16 FOXO の働き
インスリン受容体 DAF-2c は軸索のシナプス部位に輸送されてそこで働く。一方、核で DAF-16 が転写制御を行い、その両者が相補的に働く。

4) 一細胞での分別記憶の機構

線虫はグルコースなどの糖への走性を示すが、糖が存在する条件下で飼育された後のみこの糖走性がみられる。感覚神経のカルシウムイメージングにより、糖走性に必要な神経のうちのひとつである ASEL 神経が糖濃度の低下に反応して活性化されることがわかった。興味深いことに、ASEL 神経は Na⁺などのイオンへの走性にも必須であり、Na⁺濃度の上昇により ASEL 神経が活性化されることがすでに知られている。つまり糖とイオンとは ASEL 神経の反応性が逆である。さらに、行動可塑性の基盤について調べたところ、ASEL 神経の糖への応答は飼育条件によらず一定である(糖濃度の低下に同等に反応する)ことがわかった。そこで、光遺伝学により ASEL を人為的に活性化する実験を行ったところ、ASEL の活性化により起こる行動は経験依存で変化することがわかった。つまり、可塑性の原因は ASEL 神経の活動より下流に存在することが推定された。

一方、Na⁺イオンへの走性については、線虫は Na⁺イオンに予め曝されたときのみ Na⁺への走性を示すことを見出した。Na⁺は

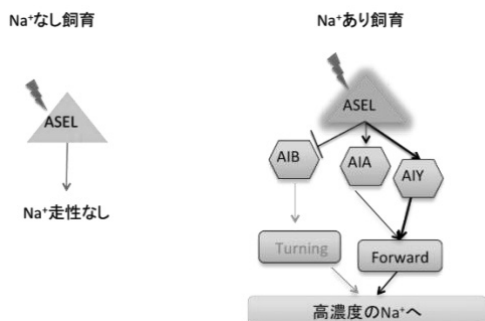


図 4 Na⁺イオンへの化学走性の可塑性とその機構のモデル
Na⁺イオンは主に ASEL で受容され、この神経が走性に必要である。Na⁺なしで飼育された線虫は Na⁺への走性を示さない。これは ASEL の興奮能が低下していることによる。一方、Na⁺ありでの飼育後は ASEL は Na⁺濃度の上昇により活性化され、3 つの介在神経を介して Na⁺への走性を作りだす。

ASEL 感覚神経により受容されるので、ASEL および介在神経を光刺激する実験とカルシウムイメージングの実験を行い、ASEL 神経の興奮性が Na⁺イオン暴露により変化することがこの行動可塑性の主たる機構であることを明らかにした。さらに、神経破壊実験により、Na⁺暴露後の走性行動には ASEL 味覚神経からのシグナルを受け取る一次介在神経である AIA 神経、AIB 神経、AIY 神経が必要であることがわかった。次に、それぞれの一次介在神経を刺激したところ、AIB は方向転換を促進し、AIA と AIY は前進行動を促進することが明らかになった。さらに、ASEL 味覚神経を刺激すると、AIB の活動が減少し、AIA と AIY の活動が上昇することが観察された。これらの神経活動の変化によって、Na⁺への誘引が引き起こされると考えられた。以上の結果をまとめて論文発表した (図 4、Wang et al., J. Neurosci., 2017)。

5) 学習・記憶の能力の制限機構

この項目は実施していない (後述)。

6) 個体間相互作用による行動可塑性の変化

線虫の個体群密度が高い場合には個体間相互作用により嗅覚可塑性が上昇する。この現象において、嗅覚可塑性を負に制御するペプチドである SNET-1 がフェロモンにより転写レベルで負に制御させることがその機構の一部となっている。そこで *snet-1* のプロモーターに蛍光タンパク質をつないだレポーター遺伝子を発現する株を用いて *snet-1* の発現を制御する遺伝子群を探索した。その結果、TGF β /SMAD 経路の変異体が複数発見され、このシグナル経路が発現制御に関わることが示唆された。以前の報告でフェロモンにより発現が変化する感覚受容体の発現制御にもこの経路に関わることが知られているので同様の過程が働いているのではないかと推定される。

7) マウスにおける学習関連遺伝子の機能解析

前述のように、線虫のカルシニンである CASY-1 は塩の学習に必須である。哺乳類におけるカルシニンの機能を探るため、マウスが持つ 3 つのカルシニン遺伝子の CRISPR/Cas9 法による破壊を行った。3 つの遺伝子に対する guide RNA と Cas9 を微小注入し、いろいろな組み合わせで 3 つの遺伝子に変異をもつ集団が得られていることを確認した。RT-PCR や組織染色により、各カルシニンの mRNA や蛋白質が消失していることも確認した。これらの掛け合わせにより得た 3 重遺伝子破壊マウスで、脳の組織染色と行動バッテリーテストを行った。この結果、パルブアルブミン陽性神経の顕著な減少がみられるとともに、過活動性や、不安情動、社会性行動など複数の行動に異常がみられた。これにより、3 つのカルシニンは一部重複した機能を持ち、多くの高次脳機能に重要な働きをすることが明らかとなった (Mori et al. 発表準備中)。

<国内外での成果の位置づけ>

各種の生物を用いて繰り広げられている神経科学の分野の中でも、本研究は分子から行動までを統一的に解明できる系を用いている点でユニークな位置づけを占める。本学術領域においても複数のモデル動物を扱い結果を比較する中で有用な情報を提供していると考えている。線虫の神経系の研究分野においては、本研究で主たる対象としている塩走性は、濃度記憶があること、餌との連合学習がみられ、明確に誘引と忌避の切り替えが起こることなど、極めてロバスタな行動可塑性がみられる点で特徴的な実験系であり、さまざまな示唆を与えうる。実際、本研究の成果である DAG レベルの測定の結果は大きな反響があり、塩走性と同様

の行動可塑性がみられる温度走性の複数の研究者からプローブのリクエストがあった。経験依存の行動変化の分子・シナプス機構に迫る成果であるので波及効果が大いと考えられる。他のそれぞれの行動可塑性において DAG がどのような動態と働きを示すかの知見がまたれる。

Na⁺走性と糖走性については、環境中でのそれぞれの有無により学習がみられたが、Na⁺については感覚神経の興奮性 (excitability) の変化が起こっていることを示唆する結果が得られた。他生物でも学習などによって神経細胞の興奮性が変化する例が知られているが、線虫での報告例は初めてである。この点において波及効果が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

「3) 長期記憶、短期から長期への固定化」については、塩と餌への同時暴露を繰り返し与えた結果、塩への走性が長期に変化するという実験系の構築を試みた。一旦この系が確立されたかにみえたので、この系を用いて関与する遺伝子を見出すことを開始した。しかしながら、系が非常に不安定であり、一括学習と繰り返し学習との差異が必ずしも再現性よく観察できないことが後に問題となってきた。微妙な条件の違いによるものであることを想定し、条件検討を繰り返したが、最終的に繰り返し学習による長期記憶を安定して観察する実験系の構築には至らなかった。ショウジョウバエやマウスで長期記憶の成立に重要な転写因子である CREB の線虫ホモログの遺伝子 *crh-1* の変異体は繰り返し条件付けによる長期記憶の異常があるように当初みえたが、さらに検討した結果、この変異体が塩濃度嗜好性自体に異常があることが明らかとなった。この変異体については引き続き解析を続けている。

また、「5) 学習・記憶の能力の制限機構」については、学習がより早く起こる変異体の単離を計画していたが、具体的な検討を行った過程で、本研究における学習操作が短時間での実験操作となり行動のばらつきが大きいことが問題となった。ノイズの多い実験でかなり大きな労力がかかる一方、確実に求める変異体が得られる保証がないなど、困難な研究であると予想された。そのうえで、敢えてこの課題に挑むという決断には至らなかった。

<今後の課題、展望>

糖走性の可塑性の機構については未だ研究途上であり、今後さらなる解析が必要である。具体的には、感覚神経の活動には経験依存の変化が認められなかったため、感覚神経のシナプス出力の段階か、下流の介在神経での変化が起こっていることが想定される。これを特定するためには下流の介在神経の活動の測定が有効と考えられる。DAG経路の関与についても検討する必要がある。さらに、Na⁺と糖の弁別機構を明らかにする必要がある。残念ながら本研究ではそれぞれの伝達と可塑性の機構の研究に終始し、弁別機構まで研究が及ばなかった。糖の受容体について候補遺伝子アプローチは行ったが今のところ受容体の特定には至っていない。異なる条件付けを行った後に異なる感覚に対するASELの応答を測定する実験も有効であろう。

ジアシルグリセロール (DAG) 経路については、塩濃度記憶・可塑性の実体に近い位置にあることが想像されるので、さらなる研究を進める予定である。特に、DAG下流のキナーゼの標的を見出すことを試みたい。同時に、DAG下流のキナーゼがどのようなタイプのシナプス伝達をどう制御するかを明らかにする必要がある。これらが明らかになったら可塑性の実体とは何かという間に物質レベルで答えることが可能と期待できる。

マウスについては、パルブアルブミン神経の減少の原因を明ら

かにする必要がある。このためにはカルシニンノックアウトマウスにおいて、発生過程の脳の観察が重要となるであろう。さらに、各種行動異常の神経基盤を明らかにしていきたい。

げっ歯類の記憶再固定化システムをモデルとした記憶ダイナミクスの共通原理の理解

研究代表者：井ノ口 馨

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）

<研究の目的と進め方>

記憶は脳内に固定化され蓄えられたあとも、脆弱化・再固定化・連合・減弱・転送などダイナミックなプロセスを経て質的に変化する。げっ歯類における記憶の動的側面に関する研究として、研究代表者らは、海馬から大脳皮質への記憶の転送に神経新生が重要な役割を果たしていることを示した (Kitamura et al, *Cell*, 2009)。またシナプス伝達の減衰にオートファジーによるタンパク質分解が重要な役割を果たしていることを示し

(Shehata et al, *J. Neurosci.*, 2012)、記憶の減衰や脆弱化にはタンパク質分解系が関与していることを示唆してきた。記憶の脆弱化・再固定化は、その後新しく獲得した記憶と照合して記憶情報を動的にアップデートするためのキーププロセスであると想定されているが、そのメカニズムには不明なままである。

近年、個々の記憶は学習時に活動した特定のニューロン集団セットとして符号化されている（記憶エングラム）ことが示されてきた (Liu et al, *Nature*, 2012)。これらの先行研究では、学習時に活動したニューロン集団を選択的に阻害、あるいは活性化することで、その記憶想起がそれぞれ抑制されたり人為的に想起されたりすることが示された。一方で、記憶がダイナミックに変化するときにこれらのニューロン集団がどのように変化するかについては、ほとんど不明であり、詳細な解析が必要であった。

本研究では、記憶の再固定化の前後における記憶エングラムの動的変化を捉えると共に、想起に伴う脆弱化と再固定化メカニズムを理解することを目的とする。さらに、記憶同士が関連付けられて新たな意味を持つ記憶が形成される記憶アップデートのエングラムメカニズムを解明する。

<研究計画>

- 1) *in vivo* LTP 再固定化系を用いて、オートファジーの役割を解析する。
- 2) 記憶の想起に伴う脆弱化・再固定化プロセスにおけるオートファジーの役割を解析する。
- 3) 想起に伴う脆弱化・再固定化を記憶ダイナミクスの代表例として取り上げ、再固定化の阻害による記憶の破壊が、記憶エングラムの消失によるものなのか、あるいはエングラムは残存しているが想起できなくなったためなのかを、遺伝子操作イメージングと光遺伝学を組み合わせたセルアセンブリを自在に操る技術を用いて明らかにする。
- 4) 海馬の記憶容量の確保に神経新生が果たす役割を解析する。
- 5) 2つの記憶が関連付けられるエングラムのダイナミックなメカニズムを解析する。

<得られた研究成果>

1) LTP 再固定化系におけるオートファジーの役割

本研究が始まる前に確立していた *in vivo* 海馬歯状回の長期増強 (LTP) 系は、集合スパイク電位を測定する系であり、得られた変化がシナプス伝達の変化のみに由来するのか、神経細胞の興奮性変化をも反映しているのかが判然としなかった。そこで、8週齢程度の若いラットを用いて、貫通線維 - 歯状回顆粒細胞間のシナプスにおける興奮性シナプス後電位 (EPSP) スロープを測定する系を立ち上げ、EPSPスロープの変化を基にしてシナプス伝達変化を評価できる系を確立した。高頻度電気刺激によりLTPを誘導した1日後に、8 Hzの電気刺激を与えシナプスを再活性化させた。その時にアニソマイシンを注入すると、その翌日からLTPの部分的な減衰が認められた。これは、想起に伴う記憶の脆弱化現象がシナプスレベルで再現されていることを示している。8 Hzの電気刺激直後に、アニソマイシンに加えてTat-Beclinを注入しオートファジー活性を亢進すると、LTPは完全に元のレベルに減弱した。この結果は、オートファジーが再活性化に伴うシナプス伝達の減弱を促進していることを示しており、想起に伴う記憶の脆弱化のシナプスレベルのメカニズムであることを強く示唆している。

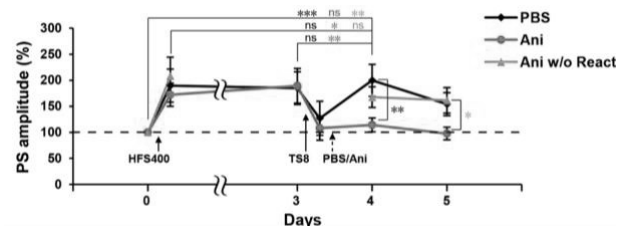


図 1

LTP にも再活性化に伴う再固定化プロセスがある。海馬歯状回 *in vivo* LTP 再固定化系を用いた実験結果。

2) 記憶の再固定化系におけるオートファジーの役割

マウスの恐怖条件付けをモデルとして用い、記憶の想起後に Tat-Beclin 脳内注入でオートファジー活性を亢進するとともに、アニソマイシン注入でタンパク質合成を阻害すると、その後の恐怖反応がほぼ消失し完全な逆行性健忘を引き起こした。オートファジーによるタンパク質分解系が、想起に伴う記憶の脆弱化を促進することが明らかになった (図 2)。また、想起に伴う記憶の脆弱化は、AMPA 受容体がエンドサイトーシスによりシナプス膜から細胞内に取り込まれてオートファジー系で分解されるためであることがわかった (図 3)。

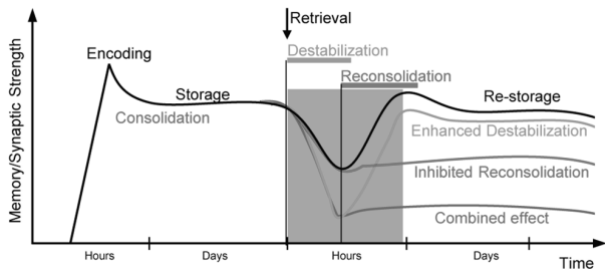


図2 オートファジー系による記憶と LTP の脆弱化
 いったん形成された記憶や LTP は、想起や再活性化に伴い脆弱化するが、その後の再固定化プロセスで元のレベルに戻る。想起、あるいは再活性化時にオートファジー系を亢進しつつアニソマイシンを注入すると（青線, combined effect）、完全な逆行性健忘や LTP の完全な減衰が引き起こされる。赤線、アニソマイシン群（inhibited reconsolidation）。

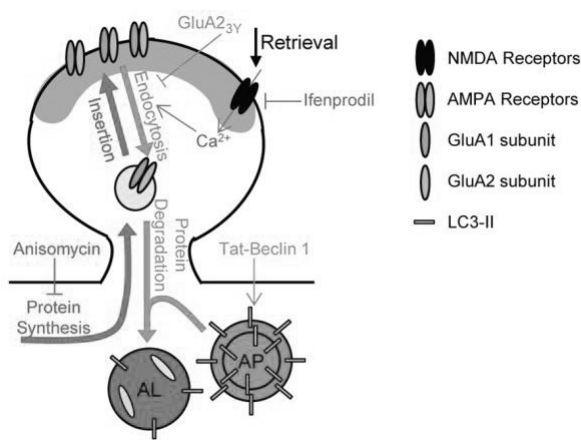


図3 オートファジー系による記憶と LTP の脆弱化の分子メカニズムモデル

3) 逆行性健忘と記憶エングラム

マウスを用い、まず、再固定化の阻害により、音恐怖記憶の逆行性健忘を引き起こす実験系を構築した。

条件刺激として 7 kHz の音、無条件刺激として電気ショックを組み合わせ条件付けを行い、1 日後に 7 kHz の音の提示で音恐怖記憶を想起させた（テスト 1）直後に、この記憶の責任領域の扁桃体に種々の薬液を注入しその効果を測定した（図 4 A）。記憶の想起直後にアニソマイシンを投与したんばく質合成を阻害した群では、次の日に音提示により恐怖反応であるフリージング（すくみ反応）が低下しており、部分的な健忘が引き起こされた。想起に伴う記憶の減弱化を促進することが知られているタットベクリンをアニソマイシンと共に投与した群では、ほとんどすくみ反応を示さず、完全な健忘が引き起こされた（図 4 B）。

また、条件付けの時に活動した扁桃体の神経細胞をオプシン oChIEF で標識しておくことで（図 4 A 左端）照射のみで扁桃体のエングラム細胞を人為的に活性化することができるようにした。逆行性健忘を引き起こした翌日に、音刺激のない状態で照射をすると（図 4、テスト 3）、アニソマイシン投与群では健忘を引き起こしていない実験対照群と同程度の高いすくみ反応を示した。一方でタットベクリン+アニソマイシン投与群では、照射しても全くすくみ反応を示さなかった（図 4 C）。これらの結果より、部分的な健忘ではエングラムは残っているのに対して、完全な健忘状態ではエングラムは消失しており、記憶そのものが消え去っていることが示された。

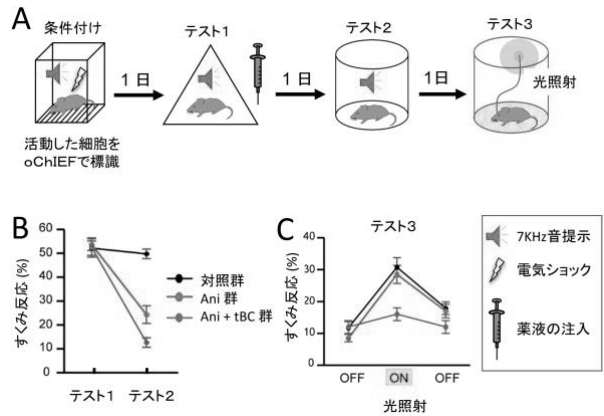


図4 逆行性健忘はエングラムの消失に因る

A：逆行性健忘を引き起こす行動実験の手順。

B：健忘後の音恐怖記憶のレベル。アニソマイシン投与群では、翌日のテスト 2 ですくみ反応が部分的に低下した。一方、タットベクリンを同時に投与した群は 10 パーセント程度のすくみ反応を示し、完全な逆行性健忘が誘導された。縦軸、音を提示している時間のうちすくみ反応を示している時間の割合。マウスの無動状態をすくみ反応として自動判定している。恐怖条件付けされていないマウスのすくみ反応（無動時間）は約 10 パーセントである。Ani、アニソマイシン；tBC、タットベクリン。
 C：健忘後に、照射でエングラム細胞を人為的に活性化したときの音恐怖記憶のレベル。Ani+tBC 群は、照射の前後（OFF）でも照射中（ON）のいずれでも恐怖反応を示さないが、対照群と Ani 群は照射時（ON）に高いすくみ反応を示した。

Ani、アニソマイシン；tBC、タットベクリン

4) 海馬の記憶容量と生後脳神経新生

海馬は学習記憶に重要な脳領域の 1 つである。ヒトを含む多くの動物種において、記憶獲得後、ある種の記憶の想起は、最初は海馬の働きを必要とするが、時間経過に伴い徐々にその海馬依存性が減少する。生後脳の子鼠神経新生がこの過程に関与していることが知られている。齧歯類においては、数週間後には海馬の働きを必要とせず想起できるようになり、記憶の依存する脳領域が大脳皮質へと移行する。

大脳皮質に比べて海馬は非常に小さい脳領域で、記憶を蓄える能力は小さいと想定される。ところが脳は生涯、海馬を通して新しい経験を記憶として蓄えることが可能である。

ここでは、海馬のシナプス伝達を人為的に飽和させて、新たな記憶を獲得できなくなった状態を作り出し、その状態からの回復に神経新生が果たす役割を解析した。

海馬の神経回路に繰り返し高頻度電気刺激（rHFS）を与え長期増強（LTP）を繰り返し誘導し、神経回路を飽和状態にさせた。この状態で海馬依存的な学習課題である文脈性恐怖条件付けを行っても、ラットは恐怖記憶を獲得することができなかった。14 日後に恐怖条件付けを行うと恐怖記憶を形成することができ（図 5 A、対照群）、また、LTP が元の状態に戻っていた（図 5 B、対照群）。この結果は、LTP の自然減衰に伴い神経回路が飽和状態から回復したために、新たに記憶を形成することができる状態に回復したことを示している。

次に、海馬の神経新生が飽和状態からの回復に果たす役割を調べた。神経新生が低下したラットとして、頭部への X 線照射処置をほどこしたラットを用い、海馬の神経新生が促進したラットとして、回し車のある環境で飼育したラットを用いた。

この実験により、以下のことが明らかになった。

- 1) X線照射処置を受けて海馬の神経新生がほぼ消失したラットでは、rHFSによる回路の飽和状態からの回復が遅れており、14日後でも恐怖記憶を獲得することができず、また、LTPは減衰せずに飽和状態を保っていた(図5)。
- 2) 回し車のある環境で飼育され神経新生が促進したラットでは、rHFSによる回路の飽和状態から7日後にはLTPが元の状態に戻っていると同時に、恐怖記憶を獲得することができ、飽和状態からの回復が促進していた(図5)。

以上の結果より、日々新しい記憶が海馬に蓄えられるにもかかわらず、神経新生の働きにより古い記憶は大脳皮質に転送されるため、海馬の記憶容量は飽和することなく新しい記憶を蓄えることができることが明らかになった。

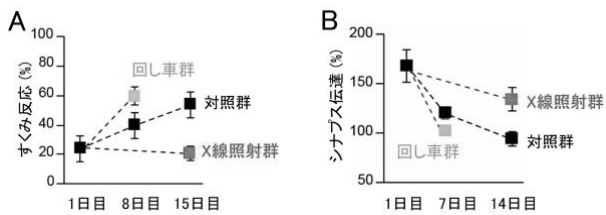


図5 海馬の記憶容量は生後脳神経新生により保たれている
A. 記憶獲得能の回復。記憶獲得能はすくみ反応で測定。
B. シナプス伝達の回復。150%以上でシナプス伝達が飽和状態になる。100%が通常の状態。

神経新生の促進により神経回路は飽和状態から早く回復する(回し車群)のに対して、神経新生の阻害は回復を抑制した(X線照射群)。横軸、rHFSによる神経回路の飽和からの日数。

5) 記憶の関連付けとエングラム動態

私たちは脳に蓄えられているさまざまな記憶情報を関連づけることで、知識や概念を形成していく。それぞれの記憶は特定の神経細胞集団(記憶エングラム細胞集団)によって脳内に蓄えられており、記憶同士が関連づけられるときにはそれぞれの記憶を司る細胞集団同士がオーバーラップすると報告されていたが、オーバーラップした細胞集団の役割は不明であった。

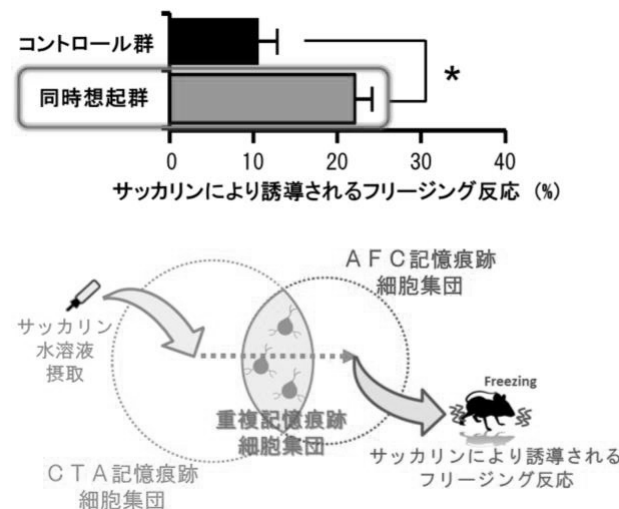


図6 連続した同時想起(記憶連合誘導)により生じた記憶間相互作用

上段:繰返しの同時想起後のCTA記憶テスト時におけるサッカリン水溶液の初回摂取後5分間のフリージング反応。
下段(ベン図):オーバーラップ(重複)した記憶痕跡細胞集団に基づいた記憶連合の仮説モデル。ベン図(円)はCTA記憶の想起時とAFC記憶想起時に活動した記憶痕跡細胞集団を示す。サッカリン水溶液の提示によりCTA記憶痕跡細胞集団が活動する。その時活動した重複記憶痕跡細胞集団を介してAFC記憶痕跡細胞集団が活動し、フリージング反応を引き起こす。

マウスを用いて味覚嫌悪学習(CTA)と音恐怖条件付け(AFC)の2つの連合記憶を関連づける高次連合実験系を確立した(図6)。CTAはサッカリン水溶液と塩化リチウムによる内臓倦怠感、AFCはブザー音と電気ショック(それに対するすくみ反応)がそれぞれ関連付けされる学習である。それぞれの条件刺激(CTAではサッカリン水溶液、AFCではブザー音)を連続して同時に思い出させると、本来別々に得られたCTA記憶とAFC記憶が関連づけられた。すなわち、サッカリン水溶液を飲むと、ブザー音を聞いた時のようにフリージング(すくみ)反応を示すようになった。

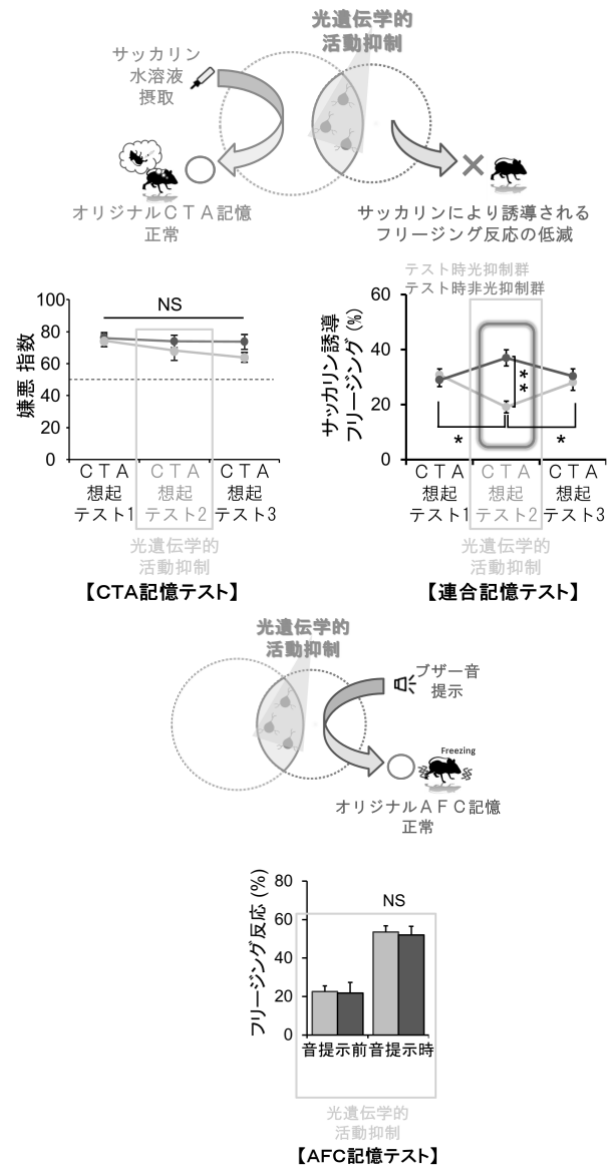


図7 オーバーラップした記憶痕跡細胞集団が記憶の関連付けを担っている

ベン図:本実験の結果を示した模式図。

連合記憶テスト：オーバーラップ（重複）細胞集団のみを ArchT で標識した。連合記憶想起時に光照射で重複細胞集団の活動を抑制したところ、連合の結果生じるサッカリン水溶液によるフリージング反応が一過的に低減した。

CTA 記憶テスト：CTA 記憶想起時の学習評価（嫌悪指数：マウスがどれだけサッカリン水溶液を忌避しているかを示す指標。数値が破線より上部においてCTA 記憶が保存されていることを示す）。元々のCTA 記憶の想起に対しては、重複細胞集団の活動抑制による変化は認められなかった。

AFC 記憶テスト：AFC 記憶想起時の学習評価（AFC 記憶が保存されていることを示している）。元々のAFC 記憶の想起に対しては、重複細胞集団の活動抑制による変化は認められなかった。

上記グラフ上の黄色い四角は重複細胞集団特異的に光遺伝学的な活動抑制を行った時点を示す（NS：有意差無し）。

その時、CTA 記憶と AFC 記憶を司る扁桃体では、各記憶に対応した記憶痕跡細胞集団のオーバーラップが増えた（図7）。逆に、記憶を思い出した時に、オーバーラップした記憶痕跡細胞集団の活動のみを実験的に抑制すると、2つの連合記憶同士が連合する割合が低減した。一方で、CTA および AFC それぞれの記憶、すなわちオリジナルの記憶の想起は正常のままだった。これにより、オーバーラップした記憶痕跡細胞集団は記憶の連合のみに関与し、それぞれの記憶の想起には必要ではないことが明らかになった。

<国内外での成果の位置づけ>

記憶研究において重要な問題について、いずれも世界で初めてとなる複数の重要な発見をしたと高く評価されている。

オートファジー系が記憶やシナプス LTP の不安定化に重要な役割を果たしており、その活性の程度によって逆行性健忘の強さが制御されていること、そして、逆行性健忘の程度と記憶エンングラムの消失の間に相関があることを発見し、部分的な健忘とは異なり完全な健忘は記憶エンングラムそのものの消失を伴うことを世界で初めて明らかにし、「健忘は記憶そのものがなくなったために起きるのか、それとも想起の損傷により引き起こされたのか」という長年にわたる国際的な論争に明確な結論を与えた。この発見に関する論文は、2018 年の Science 誌に公刊されたが、論文内容が同号の perspective で取り上げられて解説されるなど大きな注目を集めた。

神経新生はストレスや加齢に伴い低下し運動で亢進するため、今回の研究により、何故運動が加齢に伴う記憶力の低下予防に役立つのかを説明することができるようになった。また、アルツハイマー病モデル動物では神経新生が低下していることから、海馬の神経新生は認知症に伴う記憶障害の予防の標的になると期待される。

オーバーラップした記憶エンングラム細胞集団は記憶の連合のみに関与し、それぞれの記憶の想起には必要ではないことを明らかにした。この発見に関する論文は、2017 年 1 月の Science 誌に公刊されたが、国内外の多くのジャーナリズムに取り上げられるなど大きな注目を集めた。また、2017 年 2 月の Nature 誌の Research Highlights に取り上げられて解説記事が掲載された。

<今後の課題、展望>

本研究も含めて従来の記憶研究をはじめとする脳研究は、覚醒時に動物が学習課題に意識を向けている状態にフォーカスして、そのメカニズムを解析するものが主流であった。近年になって睡

眠中や休息中など動物が意識を向けていない時の脳活動にも少しずつ注意が向けられてきたが、いずれも現象論に留まっておりそれらの脳活動がどのような機能を持っているのかは推測の域を出していない。

我々人間は、取り組んでいる課題の回答を意識下では得られないが、睡眠後や休息時にその答えが閃くことがあることを経験している。脳は無意識下でも活動（アイドリング状態の脳）しており、今までに蓄積した記憶を呼び出し照合し、情報の統合等を行っていると思われる。

本新学術領域研究と並行して、我々は、学習時に活動した数多くの海馬セルアセンブリのうち、引き続きノンレム睡眠時やレム睡眠時に再活動（リプレイ）したものだけが、その記憶の想起時にも活動することを見いだした。この結果は、特定の選択されたセルアセンブリの再活動が睡眠時における記憶の固定化を担っていることを強く示唆している。一方、これらとは独立した実験で、学習を経験していないナイーブなマウスで、睡眠中に観察されるノイズと思われたセルアセンブリ活動が、その直後の文脈学習時に再活動することを見いだした（プレプレイ）。

このように、記憶エンングラムの活動ダイナミクスを手がかりに、アイドリング中の脳機能を明らかにすることが可能な状況になっており、従来はアプローチされていなかった脳が持つ潜在的な能力を科学的な根拠に基づいて理解することが可能となってきた。現在、科研費特別推進研究として、アイドリング脳活動の解明を目指した研究を展開しつつあり、脳科学に新たなパラダイムシフトを導き学術の変革に資する予定である。

ショウジョウバエ聴覚馴化システムをモデルとした記憶ダイナミズムの共通原理の解明

研究代表者：上川内 あづさ
名古屋大学大学院・理学研究科

<研究の目的と進め方>

動物は、単純な刺激に対する馴れから、生涯保持される長期記憶まで実に多様な記憶システムを持つ。本計画研究は、研究があまり進んでいなかった聴覚学習を制御する神経回路や分子機構を解明するため、記憶研究のモデル生物であるショウジョウバエに着目した。

動物の音コミュニケーションの代表例である求愛歌は、求愛過程において徐々に脳内に蓄積し、特定の行動を制御する。また、このような歌への応答行動は、受け手個体のそれまでの経験によって変化すると考えられる。このような、個体の行動を様々な時間スケールで変化させる求愛歌音は、どのような神経回路上にどのようなダイナミズムを持って受け手の脳内に聴覚の「記憶」として蓄積し、行動を制御するだろうか。私たちはショウジョウバエを用いて、聴覚情報が求愛行動を制御する過程に介在する記憶システムの実体解明と、その動作原理の解明を目指した。

本研究を進める上では、求愛歌情報を処理する脳領域や、実際に情報処理を担う聴覚神経細胞群、それらが形成する神経回路を同定することが必須である。私たちはまず、これらの聴覚情報処理機構を解明し、その後、聴覚記憶システムの実体解明へと進んだ。

<研究計画>

1) 聴覚行動解析法の確立

求愛歌を聞くと求愛行動が活性化する、というオスの本能行動、および求愛歌依存に交尾受け入れ活性が上がる、というメスの本能行動を利用して、様々な音に対する聴覚行動を解析する実験法を確立する。ここでは、これらの聴覚行動を大規模に解析するために必要な、行動自動解析法も開発する。

2) 聴覚神経回路の同定

聴覚記憶を担う脳領域を推定するために、聴覚神経細胞の集中的な投射先を同定する。まずは一次聴覚神経細胞群が構成する神経回路構造を決定して、一次聴覚中枢の内部構造を解明する。その後、一次聴覚中枢から脳の高次領野へ投射する二次聴覚神経細胞群を同定し、それらの投射先を同定分類する。先行して研究が進んでいるショウジョウバエの嗅覚記憶システムにおいては、二次嗅覚神経細胞群の集中的な投射先である「キノコ体」と呼ばれる高次脳領域が、嗅覚記憶中枢として同定されている。そこで、二次聴覚神経細胞群がキノコ体に投射するのにも着目して解析する。

3) 求愛歌の識別学習の解析

鳥の歌学習や人間の言語学習は、音パターンを識別する先天的な脳内機構と幼少期での聴覚経験で成熟する後天的な脳内機構とが協調して働くことで実現される。ショウジョウバエの求愛

歌受容において、そのような可塑性があるかは未解明である。そこでまず、ハエでも同様の機構が存在するかを検討する。存在が確認された場合、その機構解明に進む。

4) 求愛歌の聞き分け機構の解明

ショウジョウバエ求愛歌を聞き分ける際の主要な音成分である「リズム」がどのように脳で解読されるのかを解析する。求愛歌を受容し、その情報を処理する神経経路の初期段階に着目して解析する。

<得られた研究成果>

1) 以前、研究代表者らが実施した、人工的に作成した求愛歌へのオスの応答行動を解析できる聴覚行動実験 (Kamikouchi et al., 2009) を用いて、ショウジョウバエのオスが示す音選択性の範囲、閾値、頑強性、可塑性を詳細解析した。まずは解析ツールを整備するため、コンピュータプログラムを用いて聴覚行動を定量測定する方法 (ChaIN ソフトウェア) を開発した。これにより初めて、ショウジョウバエの聴覚行動を大規模に解析することが可能になった。そこでこの方法を用いて、様々なパターンで音パラメータを改変した人工音に対する応答行動を定量化した。解析の結果、キイロショウジョウバエは、同種の歌に似せて作成した特定の時間パターンを持つパルス音に選好性を示すことが判明した。一方でキイロショウジョウバエの近縁種であるオナジショウジョウバエは、そのような選好性をあまり示さないことが判明した (Yoon et al., 2013)。

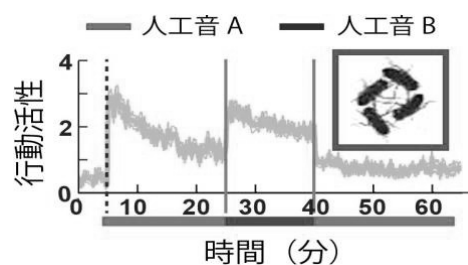


図1 オスが示す聴覚行動の解析系。人工音を与えると行動が増加するが、時間とともに「慣れ」により行動量が減少する。途中で音を変えると、行動活性が復活する。Yoon et al., 2013 より改変。

さらなる解析の結果、キイロショウジョウバエは、長時間の音刺激に対しては応答行動を減弱させることが分かった。この結果は、ハエが音刺激に慣れた結果、行動活性が徐々に低下することを示唆している。面白いことに、行動減弱後に音を変化させると、行動活性が変化した (図1)。この結果から、ショウジョウバエは、二種類の音パターンの聞き分けが可能であることが初めて示された。また、記憶障害の変異体である *rutabaga* 変異体では、この聞き分け行動が弱まっていた。

以上の結果から、キロショウジョウバエにおける聴覚情報処理システムにおいては、特定のパルス音を抽出するフィルターシステムが備わっており、そのシステムの特性は時間とともに変化することが推定できた。また、*rutabaga* 遺伝子がコードするタンパク質が、異なる音に対する応答行動に関与している可能性が示された。

一方でメスも、求愛歌を模した人工音に依存して、オスに求愛された場合の交尾受け入れ活性が上がることを示した (図2; Yamada et al., 2018)。以上の結果により、ショウジョウバエを対象とした、聴覚行動の大規模解析法を確立した。またこれを用いて、聴覚行動特性を解明できた。

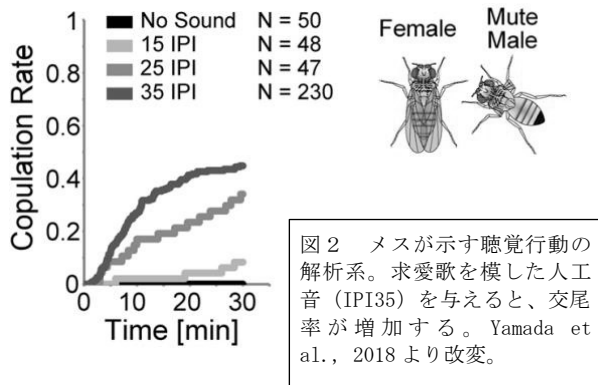


図2 メスが示す聴覚行動の解析系。求愛歌を模した人工音 (IPI35) を与えると、交尾率が増加する。Yamada et al., 2018 より改変。

2) ショウジョウバエは、触角で音を受容する。空気の振動である音が触角を揺らすと、触角の内部にあるジョンストンニューロンと呼ばれる一次聴覚神経細胞群が興奮して、脳に情報を伝える。ジョンストンニューロンの下流では、様々な神経細胞が音の情報を受け取り、段階的に求愛歌の情報を処理すると考えられるが、その情報処理を担う脳領域は未同定であった。聴覚神経細胞群の、脳内での集中的な投射先を同定する目的で、一次聴覚中枢のさらなる解析や、一次聴覚中枢と脳他領域を結ぶ二次聴覚神経細胞の網羅的な同定と神経回路構造の解析を行

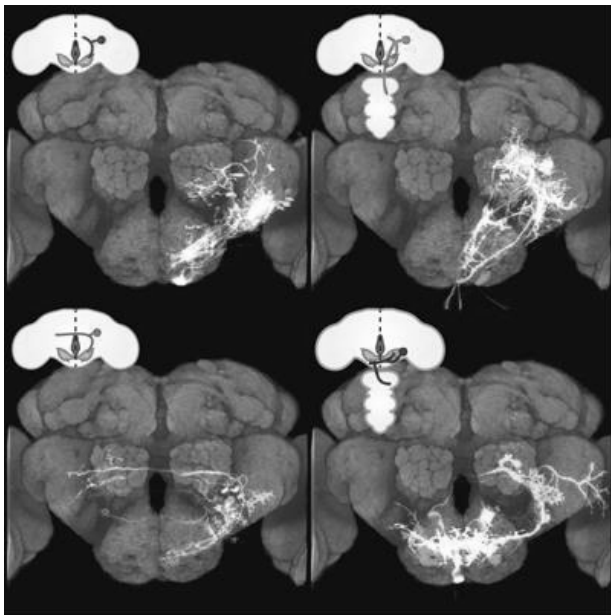


図3 脳内の二次聴覚神経細胞群
一次聴覚中枢に送られた音情報は、様々な領域に伝えられて処理される。Matsuo et al., 2016 より改変。

った。まずは、以前同定した一次聴覚神経細胞群の投射や応答

特性を詳細に解析した。その結果、多様な投射様式と応答特性を持ち高音に強く応答する A 細胞、比較的均一な投射様式と応答特性を持ち低音に強く応答する B 細胞、中域音に加えて風や重力変化にも応答する少数の D 細胞、という 3 種類の聴覚神経細胞群を同定した (Matsuo et al., 2014; Ishikawa et al., 2017)。

次に、単一細胞レベルでの二次聴覚神経回路地図を作成した。様々なパターンで神経細胞を標識する、約 16,600 種類の GAL4 系統からスクリーニングした 37 系統を利用して、熱ショックフリップアウト法により単一神経細胞を体系的に可視化した。これにより合計 44 種類の二次聴覚神経細胞群を同定し、それらの投射先としての二次聴覚中枢を同定した。その結果、ショウジョウバエの聴覚系は、嗅覚系のように特定の脳領域に集中的に投射するのではなく、3つの脳領域を中心とした合計 14 の脳領域に分散的に投射することが判明した (図3; Matsuo et al., 2016)。よって、少なくとも二次聴覚中枢の段階までの解剖学的知見からは、聴覚記憶中枢を推定することは困難であることがわかった。また、キノコ体に直接投射する二次聴覚神経細胞は同定されなかった。哺乳類と同様に、ハエにおいても音情報は脳内で並列分散処理される可能性がある。

3) 求愛中のセミやコオロギと同様に、ショウジョウバエも、近縁種ごとに少しずつパターンの違う求愛歌を発する。このような違うパターンの歌を聞き分けるためには、脳内に「正しい」歌パターンが記憶されている必要がある。この記憶を担う神経機構を解明するために、私たちはハエ幼少期の歌経験に注目した。

私たちはまず、ショウジョウバエに歌経験を積ませるため、新たな訓練手法を開発した (図4; Li et al., 2018)。羽化後すぐに集めた未交尾のオスを餌入りのガラス容器に入れ、スピーカーの前に設置した。このようにして6日間、音を聞かせながらオスバエを育てると、同種の歌と異種の歌の識別能力が上がり、同種の歌に選択的に応答し、求愛行動を示すようになった (図5)。

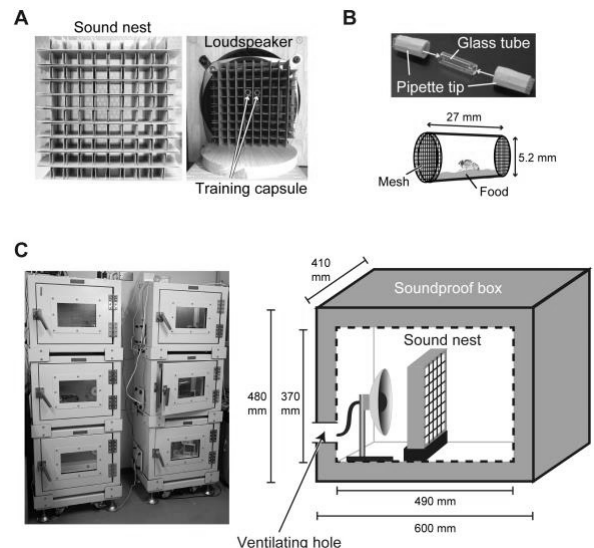


図4 ショウジョウバエの歌訓練装置。ハエを入れた容器をスピーカーの前に設置し、人工求愛歌を再生する。Li et al., 2018 より転載。

また、オスバエを若いうちに他のオスと一緒に育てても、同じように歌の識別能力が上がった。

一方で、メスバエにも人工的な求愛歌を聞かせて育てた後、同種の歌や異種の歌を聞かせながらオスバエに求愛させたところ、同種の歌を伴うオスの求愛をより良く受け入れるようになった。さらに、オスもメスも、異種の歌を聞かせて育てても、識別能力は変化しなかった。これらの結果は、オスもメスも、若い時期に「正しい」、すなわち同種の歌を聞く経験を積むことによって、同種の歌を聞き分けて応答する能力が上がったことを意味している（図5）。



図5 ショウジョウバエの歌学習若い時期に歌を聞く経験をしない場合、成熟時に自分の種と異なる求愛歌でも受け入れるが、自分の種の歌を聞いて育った場合は、異なる求愛歌は拒絶するようになる。Li et al., 2018 より改変。

次に私たちは、ハエが示すこの経験依存の歌識別学習が成立する神経基盤を調べた。ハエと同様に歌を学習するキンカチョウにおいては、音経験に依存した歌識別精度の向上には γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) と呼ばれる抑制性神経伝達物質が関与することが知られている。そこで、ショウジョウバエで発達した分子遺伝学的な手法を利用して、GABA の産生を抑えたハエを作成した。すると、いくら歌を聞く経験をさせても識別能力は上がらなかった。この結果は、ショウジョウバエの歌識別学習にも GABA が必要である、ということの意味する。そこで、脳のどのような神経細胞 (ニューロン) が歌識別学習に必要な GABA を受け取っているのかを調べた。私たちは、求愛情報を取りまとめ、配偶行動を操る役割を持つと考えられている「pC1 ニューロン」に着目した。分子遺伝学を利用し

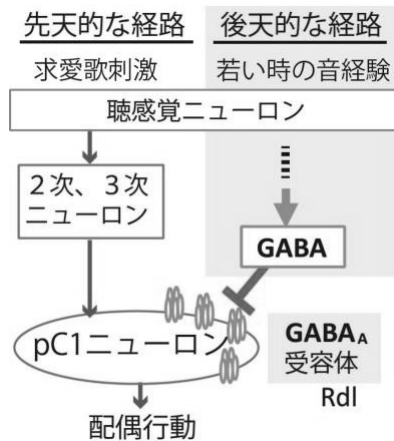


図6 ショウジョウバエの歌学習のメカニズムのモデル。求愛歌の情報は、先天的な脳内経路によって求愛情報を取りまとめる役割を持つ pC1 ニューロン群へと伝えられる。若い時に求愛歌を聞いた経験は、後天的な脳内経路を発生させ、GABA を介して pC1 ニューロン群の性質を調節する。Li et al., 2018 より改変。

て、pC1 ニューロンで GABA 情報を受け取る GABA_A 受容体 (Rdl サブユニット) の遺伝子発現を抑制したところ、同種の歌を聞くという経験に依存した歌識別学習が消失した。これらの結果により、「若い時期に歌を聞く」という経験は、脳内で GABA を介して pC1 ニューロンに作用し、実際に配偶行動を行う際の歌識別能力を向上させる、という一連の機構が明らかになった (図6; Li et al., 2018)。

4) ショウジョウバエのジョンストンニューロンの下流では、様々な神経細胞が音の情報を受け取り、段階的に求愛歌の情報を処理している。この一連の神経回路は、「歌伝達経路」と呼ばれる。私たちは、求愛歌の識別学習の基盤となる、この「歌伝達経路」がどのようにリズムを識別するのか、その情報処理の初期過程の解明に挑んだ。私たちはここでも、「GABA」に着目した。まず、ジョンストンニューロンの B 細胞 (JO-B ニューロン) の下流で求愛歌情報を受け取る AMMC-B1 ニューロンで GABA_A 受容体の発現を抑制したところ、速いリズムの歌への応答が减弱した。また、AMMC-B1 の樹状突起領域が存在する脳内の触角機械感覚野に投射し、GABA 作動性だと報告されている AMMC-LN と AMMC-B2、という2種類の神経細胞の神経伝達を抑制したところ、AMMC-B1 速いリズムの歌への応答が強まった。また、シナプス接続を可視化する GRASP という手法で解析した結果、AMMC-LN や AMMC-B2 が、JO-B から入力を受け、AMMC-B1 に出力するという、フィードフォワード性の神経回路構造を形成することが示唆された。以上の結果から、速いリズムの歌を受容した際に AMMC-LN や AMMC-B2 が GABA を介して、AMMC-B1 ニューロンの応答を抑制する、という神経回路機構が示唆された。さらに AMMC-LN や AMMC-B2 の神経活動を阻害したところ、速いリズムの歌への応答行動が選択的に低下した。これは、動物の持つ時間間隔情報を抽出する神経機構において、抑制性神経細胞の役割と行動変化の、直接的な因果関係を示した初めての報告である。

以上、本研究により私たちは、ショウジョウバエの脳内の特定の神経細胞が、音のリズム検出細胞にリズムの速さに応じた「ブレーキ」をかけることで、特定のリズムの情報を効率的に抽出するシステムを構成することを発見した (図7)。

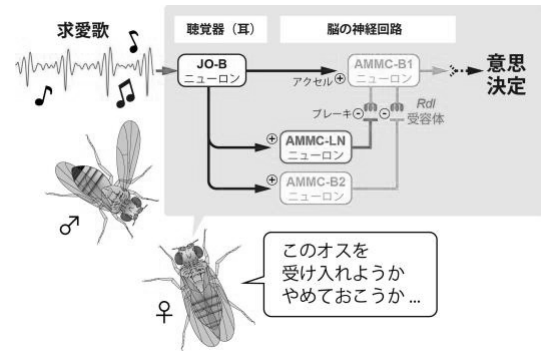


図7 ショウジョウバエのメスが、求愛歌を奏でるオスを受け入れるかどうかを決定するために重要な脳内経路。Yamada et al., 2018 より改変。

<国内外での成果の位置づけ>

私たちは、聴覚記憶システムの実体を理解するために必要な基盤知識として、求愛歌情報を処理する聴覚神経細胞群の同定と神経回路機構の解明を行なった。ショウジョウバエは近年、聴覚研究のモデルとして徐々に用いられるようになってきた。本研究成果では、聴覚研究を進める上で必要不可欠な神経回路

構造の知見を解明した。この成果は、今後の聴覚研究分野の発展に大いに貢献する成果として、高い評価を受けた。

また私たちは、独自に開発した聴覚行動自動解析ツールによって、ハエが示す聴覚行動を高い時間分解能で大規模解析することを可能とした。この解析ツールを利用することで、世界で初めてハエの「歌識別学習」を発見した。この発見により、「若いうちに音を聞いた経験がどのように脳に蓄積して、その後の音への応答行動に影響するのか」という普遍的な問いに挑戦するための新たな実験モデルとして、ショウジョウバエを使う、という革新的な研究戦略が世界で初めて提案された。

言語学習の神経基盤を理解するため、人間そのものを対象とした研究に加えて、実験操作が行いやすい鳴禽類が使われている。鳥の歌学習や人間の言語学習は、音パターンを識別する先天的な脳内機構と、幼少期での音経験で成熟する後天的な脳内機構とが相互作用して実現される。しかし、脳の巨大さや実験手法の不足、世代時間の長さなどの点が、この相互作用を担う分子・神経基盤を解明する研究の進展を阻む要因となっていた。一方でショウジョウバエは、脳が小さく調べやすいうえに、世代時間が短いため、短期間に沢山の個体を使って実験を行える。また、光・熱遺伝学などの分子遺伝学的な研究ツールが良く発達しているため、単一神経細胞といった精密なレベルで、神経活動イメージングや神経活動操作、遺伝子発現操作が可能である。本研究で私たちは、ショウジョウバエも人間や鳥と同じ様なメカニズムで正しい歌を学習することを発見した。私たちのこの成果をもとにして、『言語・歌学習のメカニズム解明のためにショウジョウバエをモデルとする』という世界的にも全く新しい研究分野が切り拓かれることが期待できる。

カエルやコオロギを用いたこれまでの研究から、音の時間間隔情報は脳の神経細胞の時間間隔選択的な神経活動という形で表現され、その選択的活動の形成には興奮性と抑制性の入力が必要であるとされてきた。キイロショウジョウバエを用いた本研究により、音の時間間隔を抽出するための神経機構には、GABA による神経活動調節が関わっていることが示された。この調節機構では、GABA 作動性局所介在神経細胞群が、聴感覚細胞群と二次聴覚神経細胞群の興奮性の主経路にバイパスするような、フィードフォワード性の抑制性経路を構成することで、二次聴覚神経細胞群の時間間隔選択的な神経活動を形成している。このように、興奮性や抑制性、という正負の制御の組み合わせによって音の時間間隔情報の抽出が達成される、というメカニズムがショウジョウバエでも発見された。この発見は、時間間隔情報を抽出する神経機構は、動物種を超えて共通する根本原理を持つ、という可能性を示している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

今回私たちは、脳内で聴覚記憶の座として機能する高次聴覚領域を同定するため、聴覚神経細胞群の集中的な投射先の同定を試みた。しかし、少なくとも二次聴覚中枢の段階までの解剖学的知見からは、聴覚記憶中枢を推定することは困難であることがわかった。これは、聴覚情報は分散的に処理される、という、他の動物種でも見られる聴覚神経回路構造がハエにおいても保存されていることを示しており、共通した聴覚情報処理原理によって支えらえる、種間で保存された神経回路構造の存在を示唆している。

<今後の課題、展望>

私たちが初めて報告した、ショウジョウバエの「歌識別学習」に関わる、さらなる分子機構や神経機構を解明する必要がある。特に、特定リズムへの応答性の制御に様々な段階で関わ

る GABA を介した抑制性制御の神経実体は理解されておらず、今後の同定が必要である。また、神経回路の応答性を制御することが知られるドーパミンやセロトニンなどの神経修飾物質や神経ペプチドに着目した解析も、聴覚記憶のメカニズムの一端を担う可能性があり、今後の解析が必要だと考えられる。

また、私たちは、ショウジョウバエが示す音の聞き分けに、ハエにおいて嗅覚記憶など様々な記憶への関与が知られる *rutabaga* 遺伝子が関わっている可能性を示した。音を聞き分けるためには、それまでに聞いている音を記憶する必要があるため、*rutabaga* 遺伝子は短期の音記憶を担う可能性がある。今後はこの可能性も追求したい。

記憶情報を担う細胞集団の時空間的変化の解析

研究代表者：松尾 直毅

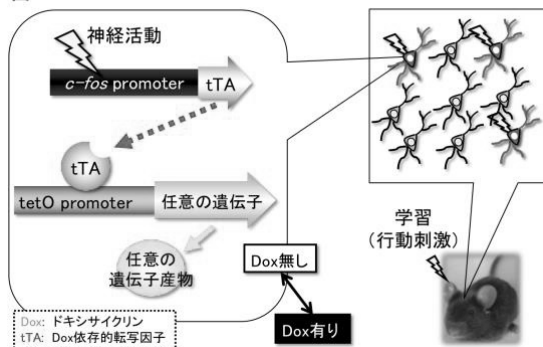
大阪大学大学院・医学系研究科

<研究の目的と進め方>

動物の脳が有する記憶システムはコンピューターのハードディスクのように情報を忠実に記録するだけの装置とは異なり、いったん獲得された後も、その情報が様々な外的・内的要因に依存してダイナミックに変化しうる点に大きな特徴がある。この仕組みにより、動物は刻々と変化する環境に適応して生存していくことが可能となり、また、このような柔軟性と曖昧さを含んだシステムのおかげでヒトの創造やひらめきが産み出されるのかもしれない。しかし、現在の記憶研究は未だ記憶が獲得・固定される初期段階のメカニズムの解明に力が注がれており、獲得後の動的な変化に関する研究は未だ手付かずの状態であると言っても過言では無い。

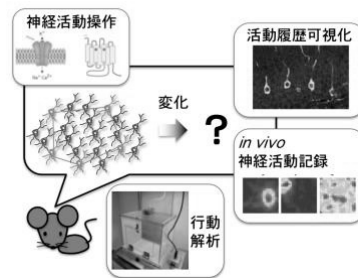
記憶情報は、脳内に散在し協調的に活動する神経細胞間の機能的ネットワークとして存在すると考えられているため (cell assembly仮説)、千億個もの神経細胞から構成される動物の脳内でそれらを同定することや、その神経活動を選択的に制御することは極めて困難である。そこで、研究代表者らは世界に先駆けて任意の時期に任意の行動刺激により活動した細胞集団のみに、任意の遺伝子操作を行うことが可能なトランスジェニックマウスの開発に成功した。このマウスは、その発現が神経活動依存的に迅速かつ一時的に誘導されることが知られている Immediate-Early Genes (IEGs) のひとつ *c-fos* 遺伝子のプロモーターとテトラサイクリン誘導発現系を組み合わせることにより得た (図1)。このシステムを活用することにより、「記憶という実体の捉えがたい現象」と「機能的細胞集団 (cell assembly) の活動」の因果関係が個体レベルで実証され、ようやく記憶というものを特定の細胞集団の活動と捉えた研究を進展させる基盤が築かれた。

図1



研究代表者らが開発した活動痕跡細胞の可視化・操作が可能な遺伝子改変マウスを軸に、行動実験、神経活動操作、解剖学的可視化、*in vivo*脳内活動記録を駆使し、(1) 活動痕跡細胞を操作する遺伝子改変マウスの改良・開発、(2) 記憶情報を担う神経細胞集団の時空間的変化の解析を行う。これら一連の研究により、哺乳類の脳内で記憶情報が時間経過や外界情報に対応してダイナミックに変化していく様子を捉え、その実体と仕組みを理解することを目的とする (図2)。

図2



本研究課題ではいったん獲得された記憶が不安定化、再固定化、連合、一般化、消去などの行動学的に検出されるダイナミックな変化を起こす前後で、脳内の細胞活動のパターンやネットワークに

いかなる変化が生じるのかを検証することから始める。学習課題としては主に文脈依存的恐怖条件付け学習を用いて、研究代表者らが開発した“時間的に離れた2点での神経活動を同一個体の脳内において可視化”することのできる活動履歴可視化マウスや、無麻酔下で行動中のマウスの多数の神経細胞の活動を同時に観測することのできる *in vivo*脳内活動記録などの手法を組み合わせた解析を行う。これらの手法を用いて記憶ダイナミズムに伴う脳内変化を捉え、脳内のどの領域のどの細胞で、どのような変化が生じるのか?などの問題を明らかにすることにより、その神経基盤の解析を行う。

また、記憶を担うとされる細胞集団は、具体的には何の情報を持っているのか?という問題にも取り組む。そのために、optogenetics や DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug)、テタヌス毒素などにより記憶痕跡細胞集団の神経活動の抑制を行い、失われる発火情報を *in vivo*マルチユニット記録法を用いた解析により見いだす。特に場所細胞やグリッド細胞などが存在することが知られている海馬と嗅内皮質を中心に解析を行う。

さらに、上記の研究を推進するために必要な新たな遺伝子改変マウスの開発・改良もアデノ随伴ウイルスベクターによる局所遺伝子導入とも組み合わせて行う。

<研究計画>

1) 研究代表者らが開発した *c-fos* 遺伝子のプロモーターとテトラサイクリン誘導発現系を組み合わせさせたトランスジェニックマウスのシステムにより、学習時に活動した神経細胞集団の遺伝学的標識を行う。さらに、これらの神経細胞集団の活動操作を行うことによる記憶学習への影響を行動解析により明らかにすることにより、因果関係の実証を行う。

2) 記憶はいったん獲得されれば安定不変というわけではなく、むしろ様々な内的・外的要因の影響を受けて、不安定化、再固定化、連合、汎化、消去などのダイナミックな変化が生じることが明らかとなりつつある。これらの変化が生じる前後で脳内の神経細胞集団活動のパターンやネットワークが変化することが想像されるが、まずその検証を行うことから始める。そこで、これらの変化の検出を試み、変化が生じる領域、細胞集団の同定を行い、どのような変化が生じるのか?を明らかにすることにより、その

神経基盤を解明する。

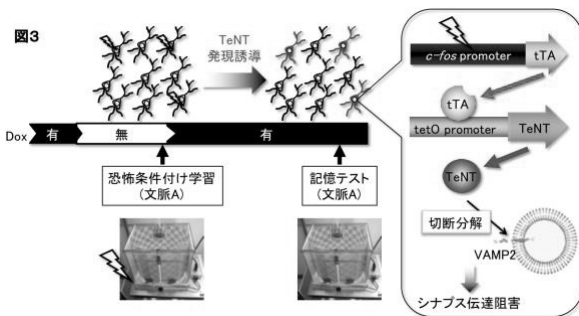
研究代表者らが開発した活動履歴可視化マウスを活用することにより、時間的に離れた2点での神経活動を同一個体の脳内において単一細胞の解像度で可視化を行う。

活動履歴可視化マウスは画期的で極めて有用なシステムであるが、神経活動の変化を連続的に多点(リアルタイム)で捉えるために、無麻酔下で行動中のマウスの多数の神経細胞の発火活動を同時に観測することのできる *in vivo* マルチユニット記録法の導入を行うことにより、解析を進める。

3) 研究代表者らが既に開発した神経活動履歴可視化マウスに改良・応用を加え、生体組織内での蛍光可視化や、順行性・逆行性トレーサータンパク質を用いた機能的ネットワークの可視化、optogeneticsなどにより神経活動操作を行うことが可能な遺伝子改変マウスの作製を行う。ベクター作製後、受精卵への核インジェクションを行い、得られたファウンダーマウスの交配・繁殖を行う。適切な発現を示すマウス系統を得ることができない場合に備え、AAVベクターによる局所遺伝子導入を組み合わせたシステムの開発も同時に進める。

<得られた研究成果>

1) 学習時に働いた神経細胞群(神経アンサンブル)のシナプス伝達を一時的に遮断するために、*c-fos*-tTAマウスと、tetOプロモーターの制御下でtetanus toxin light chain (TeNT)を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニック (Tg)マウスの作製を行った。TeNTは神経活動依存的な前シナプス末端からのシナプス伝達物質放出に不可欠なVAMP2 (synaptobrevin)を切断不活化することが知られている(図3)。



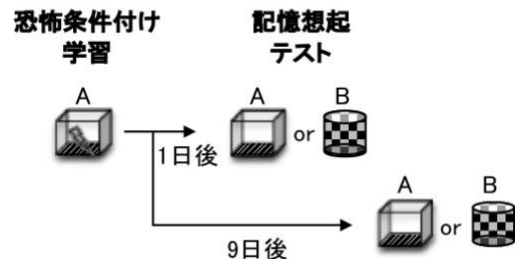
そこで、このダブルTgマウスを用いて、Doxycycline (Dox)を含まない餌を与え始めて3日目に文脈依存的な恐怖条件付け学習訓練を行った。TeNT mRNAに対する *in situ* hybridizationおよびGFPに対する免疫組織化学染色の結果、海馬CA1領域、歯状回、大脳皮質、扁桃体外側核において、~5%の非常に疎らな発現が認められた。また、神経細胞マーカーNeuNや興奮性神経細胞マーカーCaMKII α との二重染色の結果、ほぼ100%のTeNT-GFP陽性細胞が興奮性神経細胞であることを明らかにした。訓練とは無関係な神経活動によるTeNTの発現誘導を防ぐために、訓練後は再びDoxを含む餌を与えた。そこで、学習訓練の24時間後に文脈依存的な恐怖記憶の想起テストを行ったところ、対照群のマウスに比べて有意に低いfreezing(すくみ反応)を示すことを見出した。しかし、学習時に誘導されたTeNT蛋白質が既に分解された28日後に同様の想起テストを行ったところ、対照群のマウスと同程度の顕著なfreezingを示した。これらの結果は、学習時に活動した神経細胞集団の活動を選択的に遮断することにより、記憶の想起が障害されたことを示唆している。つまり、学習時に活動した神経細胞集団の活動が、その記憶の想起に必要なという因果必然性を示した (Matsuo, *Cell Rep.* 2015)。

さらに、野生型マウスでは再学習訓練により記憶の増強(すくみ反応の増加)が認められたが、トランスジェニックマウスでは最初の学習時に活動した神経アンサンブルのシナプス伝達を抑制した状態で同じ学習訓練を再び行っても記憶の強化が起こらないことを見出した。一方、上記と異なる文脈において学習訓練を実施した場合は、その文脈依存的恐怖記憶を獲得し、想起することができたことから、異なる学習には異なる神経アンサンブルが使用されることが示された。これらの結果は、いったん記憶情報が割り当てられた特定の神経細胞の活動の組み合わせが、同じ学習を行う際にも再び使われ、代替補償が効かない仕組みが脳内に存在することを示唆する。記憶の強化や定着には反復学習が有効であることが知られているが、今回の発見は、それを担保する仕組みと考えられる (Matsuo, *Cell Rep.* 2015)。

2) 文脈や出来事の記憶の細部は時間経過に伴って失われ、汎化 (generalization) することが知られている。適切に汎化が生じることは動物が刻々と変化する環境に適応することに貢献していると考えられる。また、概念や知識などの創成の源であるかもしれない。一方で、心的外傷後ストレス障害などの不安障害でも見られるように、恐怖記憶の過剰な汎化は無害な刺激に対してさえも不適切な恐怖不安反応が現れ、日常生活に大きな支障を来すため重大な問題である。このように生物学的かつ臨牀的にも重要な問題であるにも拘わらず、記憶の汎化の神経基盤はほとんど不明である。そこで、記憶ダイナミズムの一例として記憶の汎化に着目した研究を行った。

恐怖記憶の汎化を実験室でモデル化するために、私たちは、条件付けを行う文脈Aの箱と、床の材質、光照度、部屋の形状・模様、つまり体性感覚、視覚情報の一部が文脈Aと異なっている別の文脈Bの箱を用意した(図4)。文脈恐怖条件付け学習課題の1

図4



日後では、条件付けが行われた文脈Aでは恐怖記憶の想起(すくみ反応)が誘導されるが、マウスは文脈の違いを区別して、異なる文脈Bでは恐怖記憶の想起が誘導されない。しかし、学習9日後の想起テストでは、文脈AとBのどちらにおいても顕著な恐怖記憶の想起が誘導されることを見いだした。つまり、時間の経過に伴って記憶の汎化という記憶の動的変化が生じたことを示唆する。

そこで、この記憶の汎化の神経基盤を明らかにするために、時間軸に沿った活動神経アンサンブルの変化を捉えることを試みた。そのために独自の神経活動履歴可視化マウス (*Science* 2007)を利用した。このマウスを用いて学習課題時に活動した神経アンサンブルをtau-lacZで遺伝学的に標識し、想起時に活動したアンサンブルを同一個体脳内において内在性の immediate-early genesのひとつであるZIFの発現で標識した。tau-lacZとZIFの両方で標識される細胞は想起時に再活動した細胞ということになる。記憶の汎化が生じない学習課題1日後に文脈Aに入れられたマウスの一次体性感覚野や背側海馬CA1領域では同じ神経アンサンブルが再活動する傾向が認められた。興味深いことに、背側海

馬歯状回では文脈Bに入れられた場合に、積極的に異なる神経アンサンブルが活動することを示す結果が得られた。いずれの場合も、一次体性感覚皮質、背側海馬CA1、背側海馬歯状回において、神経アンサンブルの活動レベルで二つの異なる文脈情報を区別していることが示唆される。しかし、記憶の汎化が行動レベルで観察される9日後に同様の解析を行った結果、背側海馬CA1領域と背側海馬歯状回において、活動アンサンブルの特徴的な選択性が失われていた。一方で、一次体性感覚皮質では依然として二つの文脈の違いを区別していることを示唆する結果が得られた。これらの結果から、文脈依存性記憶の想起時に、背側海馬（もしくは感覚皮質から背側海馬にいたる経路）における神経アンサンブルの時間経過に伴う活動状態の変化が文脈記憶の汎化の基盤であることが示唆された (Yokoyama & Matsuo, *Front Behav Neurosci* 2016) (図5)。

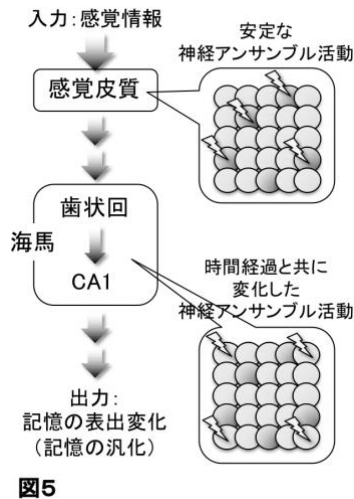


図5

上記の神経活動履歴可視化マウスは、時間的に離れた2点で活動した神経細胞集団を同一個体の脳内において単一細胞の解像度で可視化することができる画期的な手法であるが、2点での活動履歴のスナップショットであるという限界も存在する。そこで、記憶の変化に伴う神経アンサンブルの活動変化を連続的に、より詳細な時間分解能で捉えるために、超小型の内視型蛍光顕微鏡システムを活用したカルシウムイメージングを行った。マウスの背側海馬のCA1領域にアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて、カルシウムセンサータンパク質であるGCaMP6fをCaMKII α プロモーターの制御下で発現させた。その後、超小型の内視型蛍光顕微鏡を脳内に取り付けることで、自由行動下でのマウス脳内での数百個の神経細胞の蛍光強度変化の時系列のデータを取得した。得られた記憶学習の諸過程での神経活動の大量データの数理的解析を進行中である。

3) 獲得された恐怖記憶は、PTSD患者に対する暴露療法モデルである記憶消去訓練により消失する。しかし、この見かけ上の記憶の消失に伴って細胞集団レベルでの記憶痕跡も消し去られているのであろうか？この記憶のダイナミズムに関する基本的な疑問に答えるために、恐怖条件付け記憶の消去訓練後に、恐怖記憶の学習時に活動した細胞集団を DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) を用いて人為的に再活動させた。

そのために、*cfos*-tTA マウスと *tet0*-hM3Dq マウスを掛け合わせたダブル Tg マウスを作製した。このマウスを用いて、Dox 除去期間中に文脈依存的恐怖条件付け学習訓練を行った。この時に活動した神経細胞集団を hM3Dq により標識した後、条件付けを行った環境にマウスを繰り返し暴露することにより記憶の消去訓練を行った。その後、hM3Dq の特異的リガンドである CNO (clozapine-N-oxide) を腹腔投与することにより、hM3Dq 標識細胞集団の人為的な再活動を誘導した (図6)。

その結果、マウスは外部からの条件刺激が存在しないにも関わらず、対照群のマウスと比べて顕著なすくみ反応 (恐怖記憶の想

起の指標) が誘導された。つまり、恐怖条件付け学習時に活動した特定細胞集団を人為的に再活動させることにより、恐怖記憶を再生するのに十分であるという因果十分性を実証した。また、恐怖記憶の痕跡は、ヒトの PTSD (心的外傷後ストレス障害) の治療モデルと知られる消去訓練に耐性であり、忘れ去られたかに見える恐怖記憶が実際には脳内から消し去られた訳では無いことを示唆する (Yoshii, Hosokawa, Matsuo, *Neuropharmacology* 2017)。

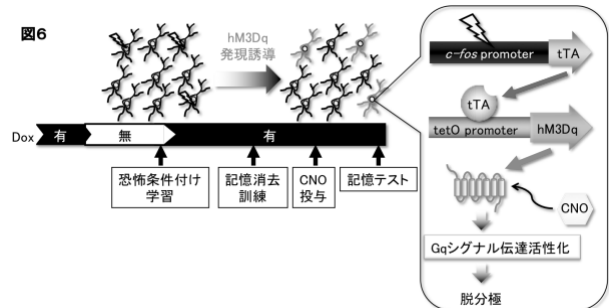


図6

4) 嗅内皮質 (entorhinal cortex) は海馬への入出力の主要な玄関口に当たり、海馬と同様にエピソード記憶に重要な役割を果たすことが知られている。また、海馬に場所細胞が存在して空間情報処理を行っているのと同様、嗅内皮質においても格子細胞、頭部方向細胞、ボーダー細胞などが存在することから、空間認知にも重要な役割を果たすと考えられている。さらに、嗅内皮質における病変がアルツハイマー病やてんかん、統合失調症などの発病と関連すると行った報告もあり、近年、非常に注目を浴びている脳領域である。

そこで、まず逆行性蛍光色素である蛍光標識コレラ毒素Cサブユニット (CTB Alexa) をマウスの内側嗅内皮質 (medial entorhinal cortex, MEC) に注入した解剖学的なトレーシング解析により、内側嗅内皮質に投射する主要な脳領域のひとつとして、意識との関連が示唆されている前障 (claustrum) を同定した。さらに、複数の逆行性蛍光色素をそれぞれ異なる脳領域に注入した解剖学的なトレーシング解析を行うことにより、内側嗅内皮質に投射する前障の神経細胞は、他の大脳感覚皮質に投射する前障の神経細胞とは比較的独立した集団であることを明らかにした。また、前障神経細胞は動物が新規環境に暴露されることで活性化することを *c-fos* 遺伝子発現を指標とした神経活動マッピングにより明らかにした。

さらに、アデノ随伴ウイルス (AAV) を利用した逆行性の Cre と DIO (Double-floxed inverted ORF) システムなどを活用することにより、内側嗅内皮質に投射する前障の一部の神経細胞および神経軸索を選択的に蛍光タンパク質およびチャネルロドプシンなどの光活性化タンパク質により遺伝学的標識を行った。文脈依存的な恐怖条件付け学習中に、この神経回路の活動を光遺伝学的手法により抑制すると、学習1時間後の記憶想起テストでは対照群と比べて顕著な差は認められなかったが、24時間後の記憶想起テストで顕著な障害が認められた。オープンフィールドテストによる自発活動や、高架式十字迷路による不安様行動には影響は認められなかった。これらの結果から、前障から嗅内皮質に投射する神経回路の活動が、記憶の固定に必要なことを示した (Kitanishi & Matsuo, *J Neurosci* 2017)。

<国内外での成果の位置づけ>

記憶情報を担う神経アンサンブルや記憶痕跡細胞の概念、および神経活動依存的な活性化を示す *c-fos* などの immediate-early genes (IEGs) のプロモーターを利用した遺伝学的な研究手法は

記憶学習の研究分野にブレークスルーをもたらし、新たな領域を開拓した。その結果、国内外で広く認められ普及し、世界中の研究室でしのぎを削った競争の激しい研究が展開されている状況となった。実際、この手法を用いた記憶痕跡の操作に関する一連の研究成果は2014年のScience誌のBreakthrough of the Yearに選出されている。

研究代表者自身も、国内外での多数のシンポジウムなどで招待講演を行い、記憶痕跡や記憶を担う神経アンサンブルに関する論文の査読の依頼が多数あることなどから、国際的に研究成果が高く評価されていると判断される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

記憶を担う神経細胞集団の活動を自由行動下のマウスの脳から記録するために、*in vivo* マルチユニット記録法を計画していたが、研究員の他大学への異動により遂行が困難となった。しかし、代わりに超小型の内視型蛍光顕微鏡システムを用いた *in vivo* カルシウムイメージング法の利用に方針を切り替え、その実験システムの確立を行い、データを取得するに至った。結果としては、*in vivo* マルチユニット記録法よりも数多くの遺伝学的に同定可能な神経細胞集団の活動ダイナミクスを単一細胞の分解能で長期間にわたり連続的に捉えることが可能となった。解析結果は順次、論文としてとりまとめを行い、近いうちに国際雑誌に投稿する予定である。

また、研究代表者らが既に開発した神経活動履歴可視化マウスに改良を加えた遺伝子改変マウスの作製を試み、ベクター作製後、受精卵への核インジェクションを行い、数系統のファウンダーマウスを得ることができた。十分な交配、繁殖後に、遺伝子発現の解析を行ったが、残念ながら期待通りの発現を示す系統を得ることはできなかった。トランスジェニックマウスの作製は、外来遺伝子の染色体への挿入位置の制御ができないため、所謂、ポジショナル効果の結果として、目的通りの発現様式を示さないことは普通に起こりえることである。したがって、アデノ随伴ウイルスベクターによる外来遺伝子の導入に方針を切り替え、結果として多くの遺伝子操作のシステムを構築することができた。

<今後の課題、展望>

本研究により、目に見えない実体の捉えがたい記憶というものを自然科学の言葉で扱うことができる基盤を形成することができた。このことは、個々の記憶情報を担う細胞集団（の一部）を脳内で可視化し、活動操作することが可能であることを意味する。今後は、これらの基盤に加えて、*in vivo*カルシウムイメージング法なども組み合わせ、記憶痕跡細胞集団の特性を明らかにする研究の展開が必要と考えられる。例えば、無数に存在する神経細胞集団の中から、どのような仕組みによって、これらの一部の特定の細胞集団が学習過程において選択され、特定の記憶情報が割り当てられるのか？という問題。また、記憶痕跡細胞は周囲の他の細胞集団と、分子、活動などのレベルで何が異なるのか？同一の脳領域内、もしくは複数の脳領域にまたがるcell assemblyの相互作用の解析も重要な研究となる。記憶は私たちヒトの精神活動（心）の基盤とも言える重要な生命機能である。記憶メカニズムの理解は将来的に“心”というものの科学的・物質的基盤の理解の礎となることが期待される。

今後、記憶学習に限らず、様々な動物行動の動作原理や、脳機能システムの破綻を伴う精神神経疾患、痴呆、PTSDなどの病態・原因・予防・治療の開発を心理学的・創薬的に研究するうえでも数多くの応用・発展が将来的に見込まれる。例えばPTSDは心の傷が原因で様々なストレス障害を引き起こし社会的生活を困難に

する深刻な情動障害であるが、過去のトラウマ記憶を忘れることが出来ない一種の記憶障害と言える。しかし、本研究でも示したように現在用いられている暴露療法では、根本的に消去できないと考えられる。PTSDの根本的治療にはその原因となる特定のトラウマ記憶を脳内から消去することが理想であり、原因となる特定の恐怖記憶情報を担う細胞集団を標的とした治療・創薬のスクリーニングを行うことは非常に有効的であると考えられる。しかし、iPS細胞に代表されるような再生医療とは異なり、人の脳（記憶）の治療操作は、一步間違えれば人格の操作を行うことと同一であり、社会において十分に倫理的な審議を必要とする。

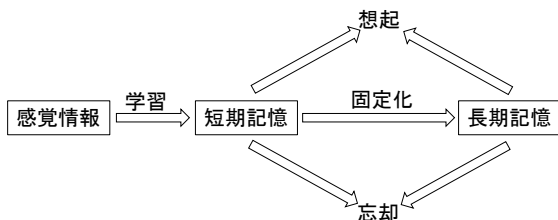
線虫 *C. elegans* の忘却制御機構から探る記憶のダイナミズム

研究代表者：石原 健

九州大学・理学研究院

<研究の目的と進め方>

動物は、獲得した記憶を適切な時間保持することによって、刻々と変化する環境に適応した行動をとることができる。例えば、餌の場所の記憶を必要以上に長く保持すると、餌がなくなっても餌があった場所へ行ってしまう可能性がある。また、一方で飢餓状態にさらされていれば、餌の場所の記憶を長く保持している方が、生存の可能性が高まると考えられる。従って、記憶の保持時間を適切に制御するためには、記憶の獲得だけではなく、忘却も能動的に制御されている必要がある。記憶には、保持時間が数時間以内の短期記憶と、形成にタンパク質合成を伴う固定化が必要で数日から数年にわたって保持される長期記憶とがある。短期記憶の形成過程や、長期記憶への固定化と維持については、これま



記憶の形成・保持・忘却に関わる概念図

で多くの分子機構や神経回路機構が明らかになってきた。一方で、記憶の忘却に関わる分子・神経回路メカニズムに関わる研究は非常に少なく、ほとんど明らかになってこなかった。これは、忘却は受動的に起きていると想定され、能動的な機構の存在に疑問が持たれていたことも理由の1つである。そこで、私達は、線虫 *C. elegans* の嗅覚可塑性や塩走性学習をモデルとして主に用い、記憶を忘れにくい変異体を単離・解析することによって、忘却を制御する分子・神経回路メカニズムの研究を進めていた。

本研究を開始するまでに、私達は、嗅覚学習の忘却に異常がある変異体の同定とその解析から、AWC嗅覚ニューロンの TIR-1/JNK-1経路が神経分泌を制御することによって、AWA嗅覚ニューロンのカルシウム応答を適切に変化させ、その結果行動可塑性としての忘却を制御していることを明らかにした。さらに、忘却時に餌の有無によって、記憶の保持時間が制御されていることを明らかにしていた。また、ショウジョウバエを用いた研究によって、神経細胞内の細胞骨格の制御が忘却に重要であることを示すことが知られていた。

これらの研究成果に基づき、本研究では、ほとんど明らかになっていなかった能動的忘却(active forgetting)の実行・制御メカニズムを分子・神経回路レベルで詳細に明らかにすることを目的とした。

そのために、分子遺伝学的手法を用いて、忘却細胞(AWC嗅覚ニューロン)の下流で忘却を制御する因子や、餌シグナルにより忘却を制御する因子を同定する。また、得られた因子が忘却をどの細胞でいつ制御しているのかを、分子遺伝学的手法を用いて、

明らかにする。さらに、されているのか、忘却が実際に制御されているのか、など嗅覚の忘却機構を明らかにすることを目指した。

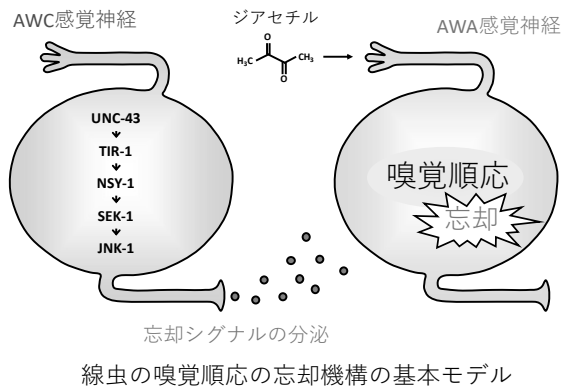
さらに、行動可塑性の一つとして、成長に伴い行動が変化する分子・神経回路メカニズムを明らかにすることを目指した。成長に伴う行動の変化は、ヒトなどの高等生物から、下等生物に至るまで、広くみられる現象である。しかし、そのメカニズムが、分子から神経回路のレベルまでを通じて明らかになった例はほとんどない。私達は、線虫の特定の匂い物質に対する走性が、成長に伴い強くなることを見出し、そのメカニズムを分子遺伝学的手法とカルシウムイメージングを用いて明らかにすることを目指した。

カルシウムイメージングには、遺伝子にコードされたプローブ(GECI)が用いられることが多い。Yellow Camellionに代表されるFRET形プローブや、GCaMPに代表される蛍光強度が変化するプローブがよく用いられる。このうち、GCaMPは、カルシウムイオン濃度が高くなると蛍光が強くなるプローブであり、神経活動が静止状態にあるときには暗く、興奮すると明るくなる。そのため、静止状態では、顕微鏡下での観察が行いにくいという欠点もあった。そこで、神経活動が静止状態にあるときに明るく、興奮すると暗くなるプローブの開発を行うこととした。これは、大阪大学の永井研究室との共同研究として、変異を導入することによって改良したインバース型のプローブを作成することを目指した。

<研究計画>

1) 私達は、忘却のモデル系として、嗅覚順応を用いた。線虫を、匂い物質に一定期間曝すとその匂いに対する応答が弱くなる嗅覚順応を示す。この行動可塑性は、餌のある条件で飼育すると数時間で失われる。そこで、嗅覚順応の条件付けをしたあと4時間飼育したのちに、匂い物質に対する応答性を調べることによって、忘却が起きているかどうかを解析した。

記憶の忘却ができない変異体は、記憶を保持し続けることになるので、記憶の形成や想起には異常がなく忘却に特異的な異常を示す変異体を解析することが可能である。そこで、線虫の *tir-1* 変異体の行動表現型をもとに、そのサブレッサー変異体のスクリーニングにより、下流の変異体を単離する。その原因遺伝子の分子遺伝学的解析から、忘却を制御するシグナル経路を明らかにすることを目指した。また、忘却に関与するニューロンを、ショウジョウバエのヒスタミン作動性クロライドイオンチャネルを用いて、時期特異的に不活性化することによる忘却に対する影響を解析することによって、忘却がそのニューロンによって、いつ制御されているのかを明らかにすることを目指した。さらに、カルシウムイメージングにより、記憶の形成と忘却過程における感覚ニューロンの応答の変化を明らかにする。



線虫の嗅覚順応の忘却機構の基本モデル

2) 記憶の忘却には、単にその記憶を忘れる場合と、別の記憶に上書きされる場合とがあると考えられている。私達は、線虫において、ブタノンエンハンスメントの忘却を解析している過程で、記憶の上書きが起きて記憶が消去されている可能性がある現象を見出した。そこで、この消去が起きない変異体の同定と解析を進めることによって、記憶の消去と忘却とのメカニズムの違いを明らかにすることを目指した。

3) 動物は、成長に伴い行動を変化させる場合がある。私達は、誘引性匂い物質ジアセチルに対する走性が、幼虫が成虫になる過程で強くなることを見出した。このような行動変化は、ほかの匂い物質では起きないことから、ジアセチルに特異的な行動変化であることが分かる。そこで、本研究では、このような行動変化が起こるメカニズムを、分子遺伝学的な解析とイメージングとを組み合わせて明らかにすることを目指した。

4) カルシウムイメージングに用いるインバース型のプローブを改良するために、大腸菌を用いた簡便なスクリーニング法を確立する。これを用いて、インバース型プローブのinverse pericam にエラープローブPCRを用いてランダムな変異をいれ、カルシウム濃度による変化が大きい変異型を作成する。その生化学的な性質を解析するとともに、線虫に導入して、神経活動の測定を行い、どのような変化を測定できるか明らかにすることを目指した。

<得られた研究成果>

1) 線虫において、誘引性匂い物質ジアセチルに対する嗅覚順応の記憶の忘却は、AWCニューロンで働くTIR-1/JNK-1経路が神経分泌を制御することによって、AWA感覚ニューロンのカルシウム応答を回復させることにより起こる。そこで、このTIR-1/JNK-1経路の下流の因子を同定するために、忘却が過剰に起こるtir-1機能獲得型変異体の抑圧変異体を探索した。このスクリーニングで得られた変異体を、次世代シーケンサーによる全ゲノム塩基配列の決定と一塩基多型を用いたマッピングにより解析し、原因遺伝子を同定した。その結果、膜タンパク質MACO-1、受容体チロシンキナーゼSCD-2、そのリガンドHEN-1が嗅覚順応の忘却に重要であることがわかった。

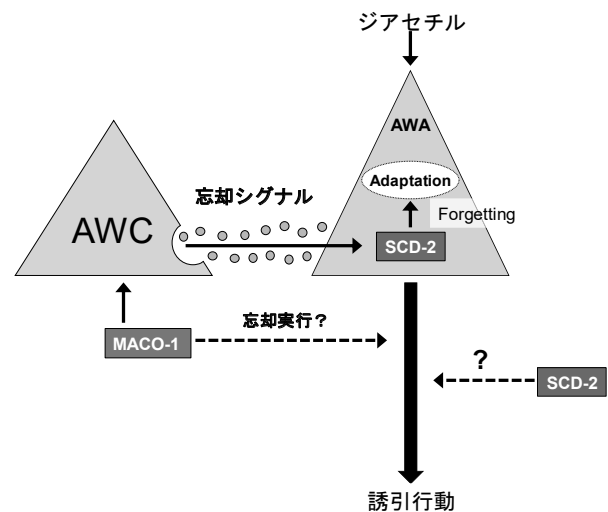
2) TIR-1/JNK-1経路の変異体は、AWA嗅覚ニューロンで受容されるジアセチルとAWC嗅覚ニューロンで受容されるイソアミルアルコールのいずれの匂い物質に対する忘却が起きにくい。そこで、新たに同定した変異体の表現型を解析したところ、*maco-1*変異体では、ジアセチルとイソアミルアルコールのいずれの嗅覚順応の忘却も起きにくかったが、*scd-2*変異体と*hen-1*変異体では、ジアセチルに対する嗅覚順応の忘却にのみ異常があった。これらのことから、AWC感覚ニューロンの下流で、忘却を促進する経路が二

つに分かれていて、*hen-1/scd-2*遺伝子は、AWA嗅覚ニューロンにおける順応の忘却にのみかかわっていると考えられた。

次に、*maco-1*と*scd-2*が、遺伝学的に同一の経路で働いているかを、二重変異体を作成して解析したところ、二重変異体では、それぞれの変異体より忘却が一層起きにくいことがわかった。このことは、これらの経路は遺伝学的に独立の経路で働いていることを示唆している。

次に、これらの遺伝子がどのように忘却を制御しているかを解析した。*maco-1*変異体において、忘却を促進するAWC感覚ニューロンの神経分泌を遺伝学的に亢進させると、忘却が野生型と同じように起こるようになった。このことは、MACO-1がAWC感覚ニューロンの神経分泌を制御している可能性を示唆している。

次に、これらの変異体において、カルシウムイメージングによって、嗅覚ニューロンAWAのジアセチル応答性を調べると、条件付け後に減弱した応答が時間をおいても戻りにくく、行動表現型と一致していた。しかし、細胞特異的な表現型回復実験を行うと、*maco-1*変異体では、行動表現型は回復しても感覚応答は回復しない場合があり、*scd-2*変異体では感覚応答が回復しても行動表現型が回復しない場合があることから、嗅覚ニューロンAWAの感覚応答の下流で、忘却行動を制御している機構があることを示唆している。



嗅覚記憶の忘却を実行する分子機構モデル

3) AWC 嗅覚ニューロン (忘却細胞) からの忘却促進シグナルがいつ働いているかについても、ショウジョウバエのヒスタミン感受性クロライドチャンネルを用いて解析した。線虫では、ヒスタミンは神経伝達物質として用いられていないので、ヒスタミンに曝すことによって、ヒスタミン感受性クロライドチャンネルを発現しているニューロンだけを特異的に抑制することができる。そこで、AWC 感覚ニューロンにのみヒスタミン感受性クロライドチャンネルを発現させた線虫を作成し、嗅覚順応の条件付け時とその後の回復時にそれぞれ時期特異的に抑制した線虫の忘却を解析した。その結果、記憶を形成するときに、抑制しても記憶の形成や忘却に対する影響はないが、学習後に忘却をしている時期に抑制すると、忘却が阻害された。このことは、記憶を形成するときに忘却されるかどうかが決まっているのではなく、学習したあとに忘却細胞からの忘却促進シグナルが分泌されるかどうかによって、忘却が起こるかどうかが決まることが示唆された。

4) これまでの解析から、感覚ニューロンだけでなくその下流の介

在ニューロンも忘却に重要である可能性があることがわかった。そこで、特定の介在ニューロンが欠損した線虫を用いて、ジアセチルに対する嗅覚順応の忘却の行動測定を行った。その結果、特定の一対のアンフィッド介在ニューロンが失われると、記憶が忘却されないことが明らかになった。さらに、遺伝学的な解析から、この介在ニューロンは、忘却をAWC感覚ニューロンの下流で制御していることが示唆された。さらに、アンフィッド介在ニューロンの活動を時期特異的に抑制することによって、AWC嗅覚ニューロンの場合と同じように、実際に忘却している時の活動が重要であることも明らかになった。このことは、単純な行動可塑性である嗅覚順応であっても、神経回路を介した複雑なシステムによって制御されていることを示唆している。

5) 動物が記憶を適切な時間だけ保持するためには、このような忘却を実行する経路が適切に制御される必要がある。そこで、環境シグナルが忘却を制御する機構を分子遺伝学的に解析した。その結果、モノアミン神経伝達物質が、神経伝達を制御することによって、忘却が制御されていることがわかった。さらに、忘却の制御が異常になる変異体をスクリーニングし、忘却の制御に複数のニューロンにおけるジアセチルグリセロールシグナルが関与していることが明らかになった。

6) 線虫は、匂い物質ブタノンに対して弱い化学走性を示すが、ブタノン存在下で餌の上で飼育すると、ブタノンに対する応答が強くなるブタノンエンハンスメントという連合学習が知られている。このブタノンエンハンスメントの条件付け後に、餌の上で飼育すると、ブタノンを忌避するようになる。これは、単なる記憶の忘却ではなく、記憶の消去が起きていると考えられる。そこで、その記憶の消去に異常がある変異体を単離・解析したところ、シナプタグミンと相同性を持つタンパク質に変異があると、記憶の消去が起りにくいことが分かった。このタンパク質はほとんどの神経細胞で発現していた。次に、運動神経と筋肉の間の神経伝達に与える影響を解析したところ、シナプス伝達を負に制御しているタンパク質であることがわかった。このことは、シナプス分泌が過剰になった結果、記憶の消去が起りにくくなったことを示唆している。

さらに、ブタノンを受容する嗅覚ニューロンの応答を解析したところ、ブタノンエンハンスメントにより、ブタノンに対する感覚応答は強くなるが、それは記憶が消去されても維持されていることがわかった。このことは、記憶の形成後にその下流で記憶の消去が起きていることが示唆される。

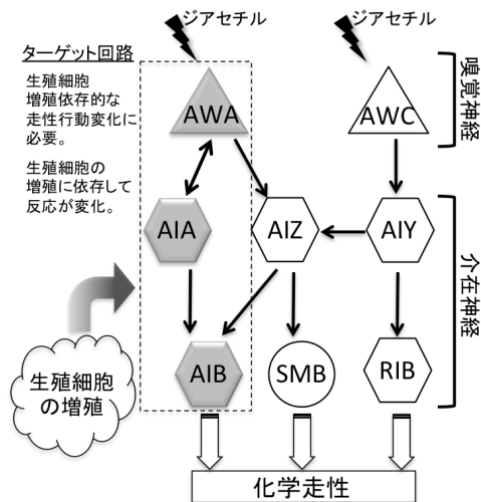
7) 成長に伴うジアセチルに対する行動変化には、生殖細胞が必要であることを見出した。幼虫のときに生殖細胞をレーザーで除去すると、成虫においてもジアセチルに対する化学走性は低いままであった。さらに、生殖細胞の増殖が起かない変異体 *glp-1* においても、成虫におけるジアセチルに対する化学走性は低かった。このことは生殖細胞の増殖が、神経回路に影響を及ぼしてジアセチル特異的な行動変化を引き起こしていると考えられる。

8) 成長に伴うジアセチルに対する行動変化を制御している神経回路を同定することを目的として、ジアセチルを受容する AWA ニューロンとその下流の介在ニューロンの働きを解析した。AWA の下流の介在ニューロンを遺伝学的に欠損させた線虫を用いて、行動変化を解析したところ、AIA 介在ニューロンまたは AIB 介在ニューロンが欠損した線虫では、生殖細胞の有無によって引き起こされる化学走性の違いが観察されなかった。このことは、これらの介在ニューロンが、生殖細胞によるジアセチルに対する行動

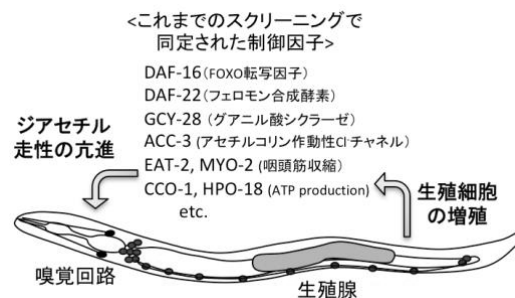
変化に必要であることを示している。そこで、ジアセチルに対するニューロンの応答をカルシウムイメージングにより解析した。

まず、ジアセチルを主に受容している AWA 感覚ニューロンにおける、ジアセチル刺激に依存したカルシウムイオンの応答を解析したところ、生殖細胞がない場合、ある場合に比べて応答がやや小さくなっていることが分かった。さらに、AIB 介在ニューロンの応答を測定したところ、生殖細胞がある線虫ではジアセチル刺激によってカルシウムイオンの自発的な振動が抑えられるのに対して、生殖細胞がない線虫ではそのような抑制がほとんどみられないことが明らかになった。このことは、生殖細胞の増殖によって、感覚受容だけではなく、その下流での情報処理も制御されていることを示唆している。AIB 介在ニューロンの興奮は線虫の後退運動を引き起こすことが知られているので、ジアセチル存在下で生殖細胞のある線虫は後退が抑制され、生殖細胞のない線虫は後退が抑制されないと考えられる。その結果、生殖細胞が正常に発達した線虫はジアセチルに誘引されるが、生殖細胞のない線虫ではそのような誘引が起きなくなっていると説明できる。

線虫の嗅覚回路と、嗅覚行動変化に関わる部分回路



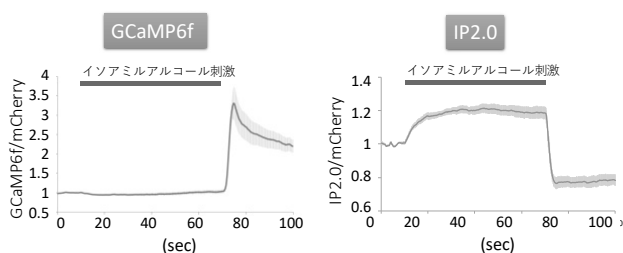
生殖細胞の増殖による回路制御の分子機構を明らかにするために、正常な生殖細胞依存的な走性亢進を示さない変異体の順遺伝学および逆遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、FOXO 転写因子 DAF-16 や、フェロモン合成酵素 DAF-22、咽頭筋の収縮を行う EAT-2 および MYO-2、ミトコンドリア ATP 合成酵素 HPO-18、などの変異体で、生殖細胞の有無によるジアセチルへの走性の変化が起かないことが明らかになった。このことから、多彩な因子がこの制御に関わっていることが示唆された。



9) カルシウムイメージングを用いて神経活動を測定する際には、カルシウムイオン濃度が高くなると蛍光強度が強くなる

GCaMP(及びその改変体)が用いられることが多かった。私達は、カルシウムイオン濃度が低くなると蛍光強度が高くなるプローブ inverse pericam に変異を入れることによって、カルシウムイオン濃度変化に伴う蛍光強度の変化が約7倍大きくなった IP2.0 を開発した。この IP2.0 は、inverse pericam に比べて、カルシウムイオン濃度が低いときの蛍光強度が高く、カルシウムイオン濃度が低いときの蛍光強度が低いことがわかった。

そこで、in vivo における IP2.0 のプローブの有用性をしらべるために、線虫の感覚ニューロンに発現させた。この線虫の行動を解析したところ、IP2.0 の発現によって行動には変化が見られなかった。そこで、IP2.0 を用いて神経活動の測定を行ったところ、刺激に依存した神経活動の興奮だけでなく、抑制も鋭敏に観察することが可能であった。これは、これまでになかったカルシウムイオンプローブの特徴であるので、IP2.0 を用いることによって、神経活動の詳細な変動を測定することが可能になると考えている。



神経活動の抑制を鋭敏に捉える IP2.0

<国内外での成果の位置づけ>

記憶の忘却に関する系統的な研究は、これまで非常に少なかった。このような考え方にに基づき、タンパク質のリン酸化が記憶の形成や維持に重要であることから、タンパク質脱リン酸化活性を亢進させると忘却が起きやすくなることが知られていた。また、PKM ζ の阻害剤によって、記憶の保持時間が短くなることから、記憶の保持に PKM ζ (PKC 1/ λ) が記憶の維持に必要であると考えられている。

能動的な忘却に関する分子機構の研究は、モデル動物を用いた成果がこの5年ほどの間に少しずつ蓄積されてきている。ショウジョウバエにおいては、匂い嫌悪学習において、研究が進められている。スモールGタンパク質の一つである Rac の変異体や、その下流でアクチン細胞骨格を制御しているコフィリンの変異体では、記憶が長く維持されることが明らかになっている。線虫においても、アクチン細胞骨格が記憶の忘却に重要であることが見出されている。また、ショウジョウバエの嗅覚嫌悪学習の形成には、ドーパミン神経細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。一方、記憶の忘却にもドーパミン神経細胞が働いていて、忘却を促進していることが見出された。さらに、記憶の形成時とは異なるドーパミン受容体が働いていることが明らかになった。このように、記憶の忘却については、分子レベル・神経回路レベルの解明が少しずつ進められてきている。しかし、私達の研究のように、バイアスがない順伝学的スクリーニングによって、新しいメカニズムの発見や神経回路レベルの解析を進めている研究はほとんどないことから、今後の研究成果が期待できると考えている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1) AWC 嗅覚ニューロンからは、忘却促進シグナルが分泌され、それによって、直接的または間接的に AWA 嗅覚ニューロンにおけるジアセチル応答が回復する。そこで、この忘却促進シグナ

ルを同定することを目指した。しかし、神経伝達物質や神経ペプチドを探索した中に、見出すことができなかった。神経ペプチドのプロセッシング酵素の一つの変異体で忘却が起きにくかったので、神経ペプチドをさらに網羅的にスクリーニングすることを進めている。

2) 忘却を促進シグナル経路は、最終的には記憶を保持する機構を制御しているはずである。どこで、その下流因子の同定を試みたが、少なくとも最下流因子は得られていない。これは、当初想定していた以上に、記憶の忘却機構が複雑で、多様なシグナル分子が関与している制御機構であることによっていると考えている。今後、より下流の因子をもとに、サブレッサスクリーニングを行うことによって、忘却シグナル経路の下流因子の探索を進めていくことを計画している。

3) カルシウムイメージングは、多数の神経細胞の活動を同時に測定できる手法である。これまで、主に緑の蛍光をもつ GCaMP 関連のカルシウムプローブを用いて、神経活動の測定が行われてきた。GCaMP は、カルシウムイオン濃度が高いときに蛍光強度が高いため、神経活動の興奮を鋭敏に測定することができる。一方で、私達が開発した IP2.0 は、神経活動の抑制を鋭敏に測定することができる。しかし、IP2.0 は蛍光波長が、GCaMP とほぼ同じであるので、GCaMP と同時に用いることはできない。そこで、蛍光波長が異なるインバース型のカルシウムプローブの作成を試みたが、カルシウムイオン変化の測定に用いることができるプローブは得られなかった。この理由の一つとして、赤色のカルシウムプローブが作成しづらいことが挙げられる。赤色の蛍光タンパク質は、緑色の蛍光タンパク質に比べ、成熟に時間がかかるなど発色団の形成に時間がかかることなどが知られている。今後、安定性が高い赤色蛍光タンパク質の開発と並行して、進める必要があると考えている。

<今後の課題、展望>

記憶の忘却を制御するメカニズムは、記憶の形成や維持に関するメカニズムに比べて、不明な点が多い。私達は、線虫の分子遺伝学やカルシウムイメージングによる神経活動の測定などを用いて、能動的な忘却の分子レベル・神経回路レベルの解明を進めている。これにより、単純な記憶の忘却にさえ、複数の分子機構が神経回路レベルで働くことによって、複雑に忘却を制御していることを明らかにした。このような研究は、世界的にも例を見ないのであって、この研究をさらに発展させることにより、忘却メカニズムの全貌を初めて明らかにできる可能性があると考えている。また、性的成熟のような体内環境の変化によって、神経回路での情報処理機構が調節される仕組みを明らかにしてきた。さらに、光遺伝学を用いた神経回路の摂動による行動の制御や全脳イメージングのシステムも、研究室での立ち上げに成功しており、今後の発展が期待できる。

ゼブラフィッシュにおける嗅覚記憶ダイナミズムの分子・細胞・神経回路メカニズム

研究代表者：吉原 良浩

理化学研究所・脳神経科学研究センター・システム分子行動学研究チーム

<研究の目的と進め方>

多くの生物にとって嗅覚は、餌を探し出す、交配相手を見つける、親子を識別する、そして危険から逃避するなど、個体の生存あるいは種の保存に直結する本能的行動に不可欠な感覚である。外界に存在する多種多様な匂い分子が嗅細胞で受容され、その情報が嗅球さらには高次嗅覚中枢へと伝達・処理されて、嗅覚イメージの形成、快不快の情動創出、さらには匂い記憶の成立へと至る。1991年のLinda BuckとRichard Axelによる嗅覚受容体遺伝子群の発見(2004年ノーベル医学生理学賞)が契機となり、嗅覚研究は飛躍的な発展を遂げてきた。特に、嗅球における『匂い地図』の存在が証明され、鼻から脳の入口に至るまでの一次嗅覚神経系の匂い情報コーディング様式については、その全体像がほぼ解明されてきた。しかしながら、嗅球の『匂い地図』は匂い分子の構造を基にした化学構造のマップであり、匂いのイメージ形成を経ての嗅覚記憶は嗅皮質を介してさらに高次の嗅覚中枢において形成されると考えられる。また、報酬と関連づけた匂い物質への誘引反応、恐怖と関連づけた匂い物質からの逃避反応などは、多くの生物に共通の記憶行動原理であるが、それらの入力から出力へと至る神経回路の全貌が明らかとなった例は未だ報告されていない。

本研究では嗅覚記憶の時空間的ダイナミズムの分子・細胞・回路メカニズムの全貌を明らかにすることを目的とし、遺伝学・発生工学・神経解剖学・神経活動イメージング・電気生理学・神経行動学など多様な実験手法を駆使できるゼブラフィッシュをモデル生物とした統合的解析を以下の4つのテーマについて行った。

<研究計画>

1) 嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経回路の精緻な反戦図の解読

遺伝学的単一ニューロン標識法と三次元画像レジストレーション技術を駆使することにより、嗅球から高次嗅覚中枢(終脳・右手網核・視床下部など)へと至る軸索投射パターンを全貌を明らかにする。この研究戦略によって得られたデータを統合し、それぞれの嗅覚二次ニューロンが樹状突起を伸ばして匂い情報を受け取る糸球体と、軸索を投射してその匂い情報を伝達する高次嗅覚中枢領域の関連性を見出し、「嗅球に展開された匂い地図が、高次嗅覚中枢でどのようにデコードされ、記憶・情動・行動などの出力へと結びつくのか?」という嗅覚研究の最も重要な疑問の解明に挑む。

2) サケの母川回帰行動に代表される嗅覚インプリンティングを司る神経メカニズムの解明

ある特定の匂いがそれによつて記憶や当時の感情を誘発する現象を『ブルースト効果』と言う(フランスの文豪マルセル・ブルーストによる『失われた時を求めて』で、マドレーヌ菓子の匂いをきっかけに幼少期の家族の思い出が蘇ったことが由来となっている)。この現象は『嗅覚インプリンティング』とも呼ばれる非常に安定な嗅覚長期記憶であり、海遊したサケが産卵のた

めに母川に戻る行動(母川回帰行動)が嗅覚インプリンティングの代表例として知られている。しかしながら、幼少期の匂い刺激が脳内にどのような記憶痕跡を残し、長期にわたって維持され、成体になってからどのように想起されるのかについての神経メカニズムはまったく分かっていない。そこで本研究テーマでは、遺伝学的操作が可能であり、嗅覚神経回路に関する知見が豊富になってきたゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用い、嗅覚インプリンティングを司る神経回路メカニズムの解明へ挑む。

3) 報酬・恐怖と関連させた嗅覚条件付け記憶を制御する神経メカニズムの解明

ゼブラフィッシュを使って、嗅覚入力と報酬・恐怖の連合学習を制御する神経回路メカニズムの解明を目指す。具体的には、ある特定の匂い分子の入力を、餌などの報酬あるいは電気ショックなどの恐怖と条件付けしたゼブラフィッシュ個体をつくり、遺伝学・神経解剖学・電気生理学・神経活動イメージングなどの手法を組み合わせることにより、嗅覚記憶を司る神経回路を解析する。また同一個体において同じ匂い分子入力を、異なった時期に報酬と罰に関連させ、神経活動の履歴を詳細に解析することによって、記憶痕跡の時空間的ダイナミズムを解明を目指す。

4) 嗅覚系を介した誘引・忌避の生得的行動と後天的行動の比較解析

上記2)及び3)のような記憶に基づいた後天的な嗅覚誘引行動・忌避行動と、生得的な嗅覚誘引行動・忌避行動の神経回路メカニズムの比較解析を行い、嗅覚神経回路の可塑性と安定性さらにはそれらの互換性のメカニズムの解明を目指す。そのためにまず、餌の匂いや異性から発せられる性フェロモンに対しての生得的な嗅覚誘引行動、警報フェロモンや二酸化炭素から逃避する生得的な嗅覚忌避行動の神経回路メカニズムを解明する。その後、分子・細胞・神経回路レベルで生得的嗅覚行動と後天的嗅覚行動を比較して、それらの共通性と相違性を明らかにしようとする研究を進める。

<得られた研究成果>

1) 嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経回路の精緻な反戦図の解読

多種多様な匂い分子の情報は、その化学構造を基にした「匂い地図」として脳の嗅球に表現される。匂い情報はさらに高次嗅覚中枢へと伝達されて、物体の認知、情動の誘起、記憶の形成や想起へと至る。嗅覚記憶の神経回路メカニズムを理解するためには、回路の構成要素であるニューロンが、互いにどのように接続しているかという神経配線図を解明することが必須である。特に、嗅球から高次中枢に至る二次嗅覚回路については、嗅覚記憶の形成・維持・想起に重要であると考えられる。

近年、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエなどのモデル生物において、嗅細胞から嗅球までの一次嗅覚神経回路についての理解は非常に進んできた。しかしながら、生物が匂いの情報を、知覚し、情動を発現し、記憶し、行動を起こす神経メカニ

ズムを知るためには、嗅球から高次中枢へと繋がる二次嗅覚神経回路についての詳細な知識が必要である。そこで私たちは、発生工学的手法を用いて、1匹のゼブラフィッシュでたった1つの嗅球ニューロン(僧帽細胞)を蛍光蛋白質で可視化する方法を開発した。この手法を駆使して約100匹のゼブラフィッシュから約100ニューロンの画像を取得し、三次元画像処理技術を用いて標準化したゼブラフィッシュの脳の座標軸に変換することで、僧帽細胞の軸索投射パターンを三次元再構築することに成功した(図1)。

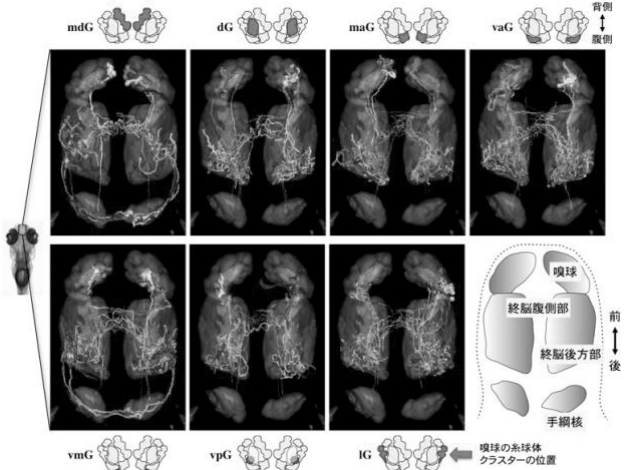


図1 嗅球ニューロンの3次元再構築画像

単一嗅球ニューロン標識によって得られた画像を、画像レジストレーション法を用いて標準脳座標に変換した。同じ糸球体クラスターに樹状突起を接続する嗅球ニューロンごとに、その形態の3次元再構築をおこなった。各画像において、異なる嗅球ニューロンは異なる色で表現されている。

その結果、匂いの情報は嗅球から嗅覚中枢の4つの領域(終脳腹側部、終脳後部、右手綱核、後方結節)に伝達されていること、また各領域で匂いの情報が異なる様式で抽出・統合・解読され、様々な行動と密接に関連した情報へと再編成されることが明らかとなった(図2)。この知見は、嗅覚記憶の座を同定するための基礎的情報となる。本研究結果をNature Communications誌に発表した(Miyasaka *et al.* Nature Communications 5: 3639, 2014)。

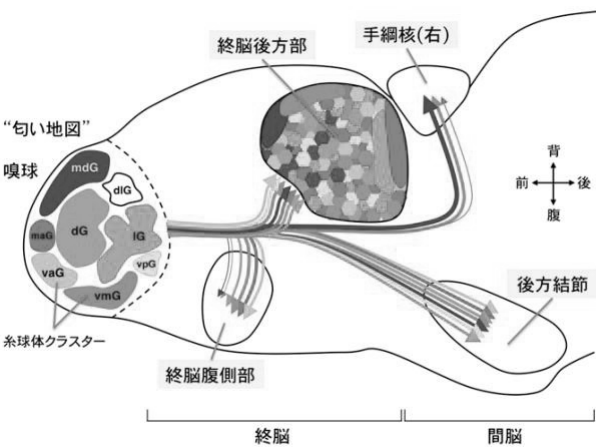
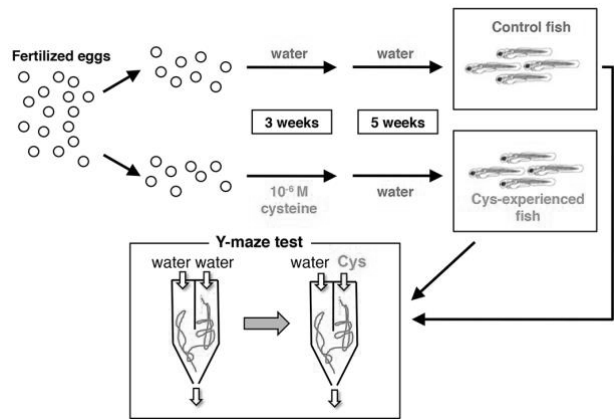


図2 ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経回路の軸索投射マップ

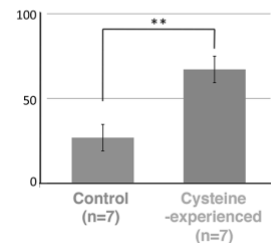
嗅球ニューロンは、終脳腹側部、終脳後部、右手綱核、後方結節(視床下部関連神経核)に軸索を投射する。これら高次嗅覚中枢は、それぞれ固有なパターンで嗅球からの投射を受ける。矢印の大きさと色は、各糸球体クラスターからの投射の頻度を示している。また、終脳後部の中心領域は全ての糸球体クラスターから重複した投射を受け(モザイク柄)、その特徴的な入力様式から嗅覚記憶との関連が強く示唆される。

2) サケの母川回帰行動に代表される嗅覚インプリンティングを司る神経メカニズムの解明

サケの母川回帰と同様の嗅覚長期記憶行動(嗅覚インプリンティング)を、実験室内のゼブラフィッシュで再現できる行動実験システムの確立に成功した。具体的には、受精卵を2群に分け、その1群を特定の匂い分子を含む飼育水で3週間飼育する。その後5週間は通常の飼育水で育て、生後2ヶ月でY迷路選択行動実験に供する。もう1群はコントロールとして、通常の飼育水中で2ヶ月間育てる(図3上)。システインはゼブラフィッシュが忌避を示すことが報告されているアミノ酸であるが、生後3週間システインを含む水で飼育された幼魚は、成魚になってもそれを忌避することなく、むしろ誘引行動を示した(図3下)。すなわちゼブラフィッシュにおいて幼少期に体験した匂いの記憶が成体になってからも保持されていることが証明され、ヒトにおける『プレースト効果』、サケにおける母川回帰を実験的に再現することができた(投稿準備中)。



Percentage of time fish spent on the cysteine side



Preference index

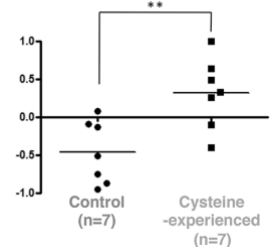


図3 ゼブラフィッシュ嗅覚インプリティング行動実験システムの確立

3) 報酬・恐怖と関連させた嗅覚条件付け記憶を制御する神経メカニズムの解明

ゼブラフィッシュにおいて嗅覚入力と報酬・恐怖の連合学習を制御する神経回路メカニズムの解明を目指して、まずは嗅覚記憶行動解析システムの開発を行った。誘引も忌避も起こさないニュートラルな匂い分子の嗅覚入力と、餌の報酬とを条件付けすることによって、ゼブラフィッシュがその匂い分子を記憶して策餌行動を示すことを見出した。すなわち匂い刺激と餌報酬の連合記憶の形成・維持・想起の行動実験系をゼブラフィッシュにおいて確立することができた。また、遺伝学・神経解剖学・分子生物学などの手法を組み合わせることによって、この嗅覚記憶を司る神経回路の解析を行い、視床の特定の神経核が、餌報酬と関連させた匂い刺激によって活性化されることを見出した(投稿準備中)。

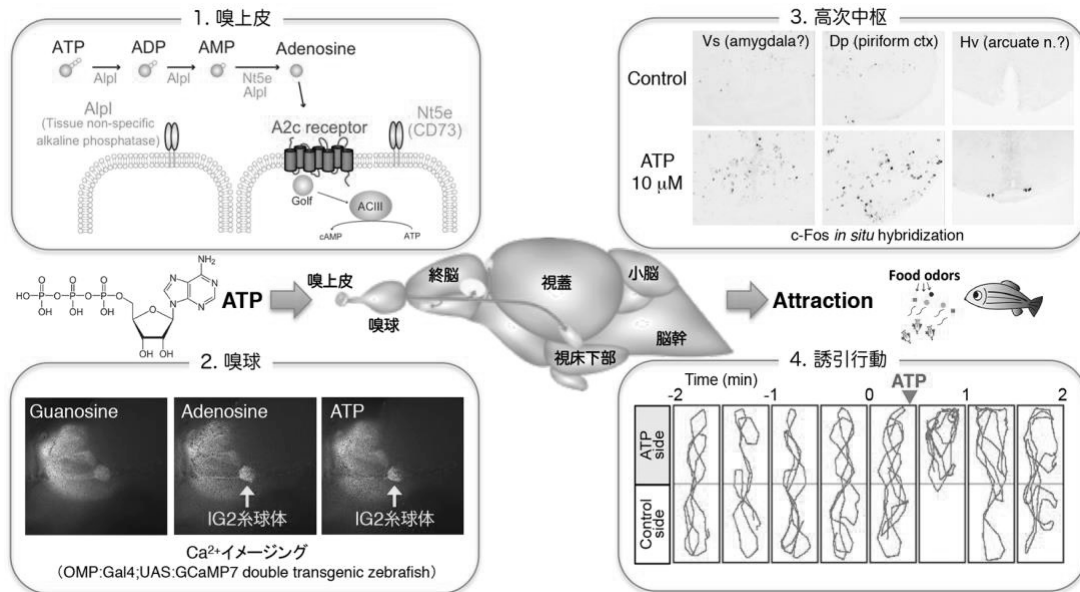


図4 餌から発せられる ATP への魚の誘引行動をつかさどる神経メカニズム

4) 嗅覚系を介した誘引・忌避の生得的行動と後天的行動の比較解析

上記2)及び3)のような記憶に基づいた後天的な嗅覚誘引行動の神経機構を、生得的な嗅覚誘引行動と比較して、それらの共通性と相違性を明らかにするために、(A)餌の匂いへの誘引行動、(B)異性から発せられる性フェロモンによって駆動される誘引・求愛行動、(C)高濃度の二酸化炭素を忌避する危険回避行動について解析し、各々の分子・細胞・神経回路メカニズムを解明した。

4-A) 餌の匂いへの誘引行動：魚類・両生類特異的な新規アデノシン嗅覚受容体『A2c』の発見

ゼブラフィッシュにおいて、水中の食物から発せられるヌクレオチド (ATP) 誘引行動を司る分子・細胞・神経回路の解明を目指し、嗅覚神経系の各レベルにおいて以下の知見を得た(図4)。(i) 嗅上皮レベル：魚類と両生類のみに存在する新規アデノシン受容体遺伝子 A2c を発見し、その mRNA がごく少数の嗅細胞に発現することを見出した。また、水中から鼻腔に入った ATP が嗅上皮に存在する 2 種類の細胞外ヌクレオチド分解酵素 (CD73, TNAP) によって速やかにアデノシンに分解され、A2c 発現嗅細胞を活性化することが分かった。

(ii) 嗅球レベル：pERK 免疫組織化学法及び GCaMP カルシウムイメージング法によって、嗅上皮への ATP あるいはアデノシン刺激が、嗅球側方部のたった 1 つの大きな糸球体 IG2 を特異的に活性化することを見出した。

(iii) 高次中枢レベル：c-Fos in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、高次中枢レベルの解析を行った。嗅上皮への ATP 刺激によって、終脳腹側部交連上核 (Vs)、終脳背側部後方領域 (Dp)、視床下部背側核 (Hd)、視床下部腹側核腹側部 (ventral Hv) などが活性化されることを見出した。Vs は哺乳類の扁桃体中心核、Dp は梨状皮質、ventral Hv は視床下部弓状核に対応すると考えられている。

(iv) 行動レベル：ゼブラフィッシュが ATP あるいはアデノシンに対して顕著な誘引行動を示すことを見出した。またその誘引作用は、魚の誘引物質としてこれまでによく研究されているアミノ酸よりも、強力であることが分かった。

以上のように本研究により、アデノシン受容体が嗅覚受容体として機能することが初めて証明され、嗅上皮においてヌクレオチド分解酵素とアデノシン受容体が共役して ATP を匂い分子とし

て利用することが明らかとなった。また、A2c 受容体は海水魚・淡水魚を問わずすべての魚類が有しており、ATP あるいはアデノシンの強力な誘引効果は、養殖における摂餌促進物質としての利用など、水産業への応用が期待される。本研究成果を Current Biology 誌に発表した (Wakisaka *et al.*, Current Biology 27: 1438-1447, 2017)。

4-B) 異性から発せられる性フェロモンによって駆動される誘引・求愛行動

キンギョなどの魚類において、脂質メディエーターの 1 つである「プロスタグランジン F2α (PGF2α)」が、メスの体内で排卵・産卵を促進するホルモンとして働くだけでなく、メスから水中に放出されてオスの性行動を誘起する性フェロモンとしても機能することが 1980 年代に報告された。しかしそれ以降、PGF2α による性行動誘起の神経回路メカニズムについては解明されてなかった。私たちは、PGF2α を特異的に認識するゼブラフィッシュ嗅覚受容体を同定し、さらに PGF2α 刺激によって活性化される嗅覚中枢領域を見出した。また PGF2α 嗅覚受容体の遺伝子欠損ゼブラフィッシュを作製し、その行動学的解析から PGF2α が本受容体を介してオスの誘引・求愛行動を促進することがわかった。以上の結果から、魚類における性フェロモン PGF2α による性行動発現の嗅覚メカニズムが明らかとなった (図5)。本研究成果を Nature Neuroscience 誌に発表した (Yabuki *et al.*, Nature Neuroscience 19: 897-904, 2016)。

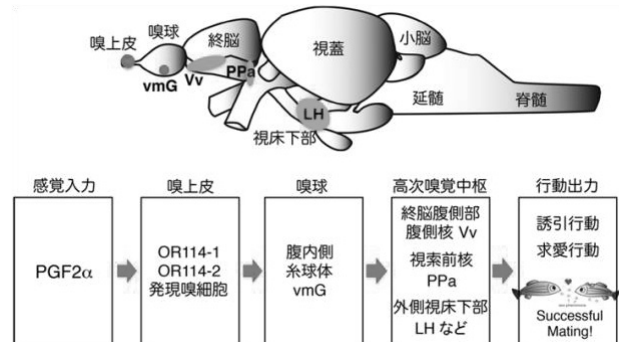


図5 排卵期のメスのゼブラフィッシュが分泌する性フェロモン PGF2α によって誘起されるオスの誘引行動・求愛行動を司る神経回路

4-C) 高濃度の二酸化炭素を忌避する危険回避行動

命を脅かす可能性のある感覚刺激(脅威刺激)からの忌避行動は、全ての動物の生存に必須である。これまでの研究により、触覚・聴覚・視覚の脅威刺激にさらされたゼブラフィッシュの稚魚は、素早い逃避行動を示すことが報告されてきた。しかしながら、化学物質の刺激に対する行動はほとんど分かっていなかった。

私たちは、さまざまな化学物質のうち二酸化炭素(CO₂)刺激がゼブラフィッシュの稚魚に対し、強い忌避反応を引き起こすことを見出した。そこで、脳内のどの神経系がCO₂刺激に対して応答するのかをカルシウムイメージング法で調べたところ、「嗅覚系」、「三叉神経系」、「手綱核-脚間核神経系」に加えて第0脳神経として知られる「終神経」が強く活性化されることが分かった。さらに、これらCO₂応答性の神経系に対し細胞除去実験を行ったところ、終神経と三叉神経の除去によってCO₂刺激に対する応答がなくなることを見出した。この結果は、終神経から三叉神経に至る神経回路が忌避行動に必要なことを示唆している(図6)。今後、終神経がどのようにCO₂刺激の情報処理を行っているのかそのメカニズムの解析を進めることで、ヒトを含む脊椎動物が持つ終神経を介した忌避行動の神経基盤の理解につながると期待される。本研究結果をCell Reports誌に発表した(Koide *et al.*, Cell Reports 22: 1115-1123, 2018)。

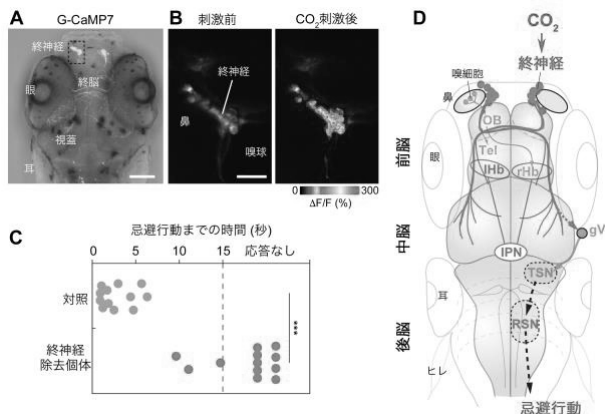


図6 二酸化炭素からの忌避行動には終神経が必要である
A) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)陽性の終神経にカルシウムイオンセンサー(GCaMP7)を発現する、トランスジェニックゼブラフィッシュの脳を背側から観察。B) CO₂刺激前(左)と刺激後(右)の終神経のカルシウムイメージング。終神経がCO₂に応答したことが分かる。C) 頭部へのCO₂刺激に対する稚魚の忌避反応が起こるまでの時間を示す。終神経除去個体の多くはCO₂からの忌避行動を示さない。D) CO₂によって活性化される神経回路。終神経で受容されたCO₂の情報は、三叉神経細胞(gV)→三叉神経感覚核(TSN)→毛様体脊髄神経(RSN)を経て忌避行動が誘起される。OB(嗅球)、Tel(終脳)、rHb(右手綱核)、lHb(左手綱核)、IPN(脚間核)。

<国内外での成果の位置づけ>

ゼブラフィッシュの嗅覚系についての研究は、分子遺伝学・神経解剖学・行動学を専門とする私たちのグループと、電気生理学・神経活動イメージングを特長とする Rainer Friedrich (スイス Friedrich Miescher Institute) が世界を牽引してきた。嗅覚記憶に関する研究においては、線虫・ショウジョウバエ・マウスが三大モデル生物として先頭集団を走っているが、近年これらに迫る勢いでゼブラフィッシュの利用が高まり、注目が集まっている。ゼブラフィッシュの利点として、(a)体外での受精、(b)発達の迅速性、(c)稚魚の透明性、(d)単純であるが哺乳類と同じ基本構造を有する神経系、(e)トランスジェニックフィッシュ作製の簡便性、(f)遺伝子編集技術の適用性、(g)Gal4/UAS および Cre/loxP システムの適用性、(h)大規模変異体スクリーニングの有効性、(i)全脳神経活動イメージング技術の開発、などの一般的な有用性ととともに、(j)マウスに比して少数の嗅覚受容体遺伝子

(約300種類)と嗅球系球体(約200個)、(k)多彩かつ明確な嗅覚行動、といった嗅覚神経系解析についてのメリットもある。本研究ではこれらの利点を最大限に活用して、嗅覚入力から行動出力および記憶形成へと至る嗅覚神経回路の統合的解明に成功し、本研究分野における先駆的役割を果たすことができた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

研究計画1)と4)については予想を上回る研究進展を達成することができた。しかしながら、研究計画2)と3)については、嗅覚記憶行動アッセイシステムの構築と、記憶に関わる一部の神経回路の同定ができたところである。今後、遅延しているこれら2つのテーマについては、さらに必要な実験を加えて論文にまとめ、投稿・発表を行う予定である。

<今後の課題、展望>

これまでに学習・記憶研究の発展に最も大きく貢献したモデル生物はおもにマウス・ショウジョウバエ・アメフラシ・線虫であった。マウス・ショウジョウバエ・線虫においては、特定のタイプのニューロンを標識したり、特定の遺伝子の機能を欠損させたりする発生の工学的手法が可能であり、また神経活動イメージング技術の発展による脳での神経活動パターンの解析と相まって、感覚系の神経回路とコーディング様式の全体像が徐々に明らかになってきた。またアメフラシにおいては、その大きな感覚・運動ニューロンを介した単純な感覚学習行動から、生理学的・分子生物学的解析が進化した。しかしながらこれら4種のモデル生物も決してオールマイティなものではなく、マウスでは母体内での発達とその遅さ、ショウジョウバエや線虫では無脊椎動物としての脳構造の違い、アメフラシでは遺伝学的解析技術の欠如など、多くの欠点も存在している。私たちは、脳の大きさ・神経細胞数がマウスとショウジョウバエの中間に位置し、マウスと同様の脳構造・神経回路網を備え、多くの生物学的かつ実験手法的利点を備えるゼブラフィッシュを、嗅覚研究のための絶好のモデル生物として世界に先駆けて利用し、上述したような多くの新知見を発表してきた。遺伝学を駆使でき、迅速に発生し、神経回路網を詳細に解析できるモデル生物としてのゼブラフィッシュを最大限に利用することによって、記憶ダイナミズムの神経回路メカニズムの基本原理解明へと迫ることができると考える。

記憶の形成と精緻化の神経機構の解明

研究代表者：細川 貴之

東北大学大学院生命科学研究所システム神経科学分野（現 川崎医療福祉大学医療技術学部）

<研究の目的と進め方>

本研究では、機能的カテゴリ（はたらきや用途の類似性に基づくカテゴリ分け）の記憶が形成、利用、再編される過程の神経細胞活動を調べることで、カテゴリ記憶に関係する神経機構のダイナミズムを解明することを目指すものであった。実際にはサルにカテゴリ記憶に基づく認知的課題（グループ逆転課題）を訓練し、サルがこの課題を行っているときの神経活動を記録したり、経頭蓋磁気刺激法（Transcranial magnetic stimulation: TMS）を用い脳活動を操作することで、カテゴリ記憶に関係する脳機能を調べることを目的とした。

<研究計画>

1) サルにグループ逆転課題を訓練する。

グループ逆転課題では8個の視覚刺激の中から1つをランダムに呈示した後、報酬（ジュース）もしくは嫌悪刺激（食塩水）をサルに与える。サルは視覚刺激と結果（報酬もしくは嫌悪刺激）との関係を記憶することが求められ、ジュースを予告する視覚刺激が出たら口元にあるノズルを舐め、逆に食塩水を予告する視覚刺激が出たらノズルを舐めないように行動訓練した。8個の刺激のうち4つはジュースを、残りの4つは食塩水を予告するようになっていた。サルが刺激と結果の関係を学習できたあと、ある時点で刺激と結果の関係を入れ替える。すなわちそれまでジュースを予告していた視覚刺激は食塩水を予告するようになり、食塩水を予告していた視覚刺激はジュースを予告するようになる。もしサルがそれまでジュース（食塩水）を予告していた4つの視覚刺激をグループ（カテゴリ）として認識していたならば、1つの刺激において結果との関係が変化したことを経験したならば、残りの刺激に関しては、結果との関係変化を経験する前から行動を変化させることができると考えられる（すなわちカテゴリ情報を用いたトップダウン的な行動制御）。

2) 神経活動の記録

サルがグループ逆転課題を行っているとき、前頭連合野から単一神経細胞活動を記録した。記録部位としては、側頭葉との神経連絡が多いことが知られている前頭連合野背内側部（ventrolateral prefrontal cortex: VLPFC）、頭頂連合野からの神経連絡が多いことが知られている前頭連合野背外側部（dorsolateral prefrontal cortex: DLPFC）、感情や価値判断に関係するとされている前頭眼窩野（orbitofrontal cortex: OFC）をターゲットとした。

3) 経頭蓋磁気刺激法（Transcranial magnetic stimulation: TMS）による脳活動の操作

サルがグループ逆転課題を開始する前に、前頭連合野の活動を低頻度 TMS 刺激によって活動を抑制したときに、その後の課題成績にどのような影響が及ぶかを調べることで、前頭連合野がグループ逆転課題遂行にどのように関わっているかを調べた。刺激は

DLPFC、VLPFC、さらにコントロールとして DLPFC よりも 10mm 背側側の背側前頭葉（dorsal prefrontal cortex: dPFC）の 3 か所をターゲットとした。

<得られた研究成果>

1) グループ逆転課題では、同じ結果を予告する複数の刺激をカテゴリとして認識することでトップダウン的に行動を適応させることができるようになってきているが、実際サルは逆転時において、1つの刺激で結果との関係性が変化したことを経験すると、その他の刺激に対しては予測的に行動を切り替えることができた。すなわち、同一の結果を予告している4つの視覚刺激をグループ（カテゴリ）として認識するようになっていたと考えられる。

2) サルがこのグループ逆転課題をしているときに前頭連合野から神経活動を記録したところ以下の4つのタイプの神経細胞が見つかった。

(I) カテゴリ情報をコードしている神経細胞。このタイプの神経細胞は、刺激が予告する結果が変化しても同一グループの刺激に対して同じような活動を示した（図1）。このタイプの神経細胞はカテゴリグループの情報をコードしていると考えられ、前頭連合野の背内側部で多く見られた。

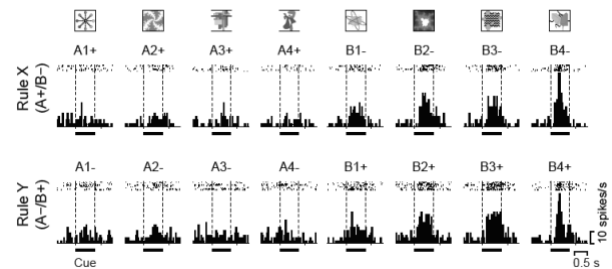


図1 カテゴリ情報をコードしている神経細胞。予告する結果が食塩水の場合（上段）でもジュースの場合（下段）でもグループBの刺激に対して同じような活動をしている。

(II) 課題のルールをコードしている神経細胞。このタイプの神経細胞は、一方のルールの下ではすべての刺激に対して同じような活動をするが、ルールが切り替わると活動が小さくなる（図2）ことから、どちらの刺激グループがどちらの結果を予告しているかという「ルール」をコードしていると考えられる。

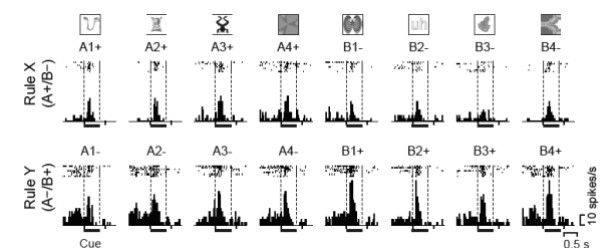


図2 ルールをコードしている神経細胞。グループAの刺激がジュース、グループBの刺激が食塩水を予告するルール (Rule X) の下では活動が小さいが、グループAの刺激が食塩水、グループBの刺激がジュースを予告するルール (Rule Y) の下ではすべての刺激に対して活動が高くなっている。

(III) 予告された結果をコードしている神経細胞。このタイプの神経細胞は、視覚刺激が予告している結果が何であるかに応じて活動を変化させる (図3) ことから、予告された結果の情報を表現していると考えられる。

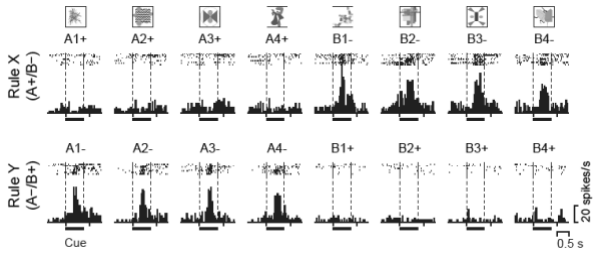


図3 予告された結果をコードしている神経細胞。Rule Xでは食塩水を予告するグループBの刺激に対して活動するのに対し、Rule Yでは食塩水を予告するグループAの刺激に対して活動するようになっている。

(IV) 刺激グループと予告された結果の両方をコードしている神経細胞。このタイプの神経細胞は特定の刺激グループが、特定の結果を予告しているときのみ活動を示すことから (図4)、刺激グループ (カテゴリ) の情報と結果の情報の両方を同時にコードしていると考えられる。

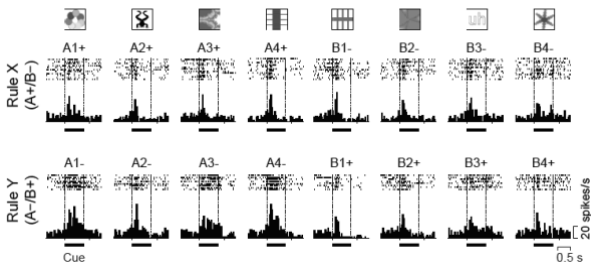


図4 刺激グループと予告された結果の両方をコードしている神経細胞。Rule Yで、刺激グループAが食塩水を予告するときに強い活動を示している。

(2) さらにこれら異なるタイプの神経細胞間でどのような情報伝達が行われているのかを調べた。手がかり刺激が呈示されている期間の各細胞タイプが表現している情報の強さを3次元空間上の位置としてプロットした (図5) と、カテゴリやルールの情報をコードしている神経細胞の情報コーディングはあまり変化しなかったのに対し、複数の情報をコードしている神経細胞は情報コーディングを動的に変化させることが分かった (図3)。情報コーディングの時間的潜時の解析などから、前頭連合野において、カテゴリやルールという情報から結果という将来予測情報が動的に計算されていることが分かった。

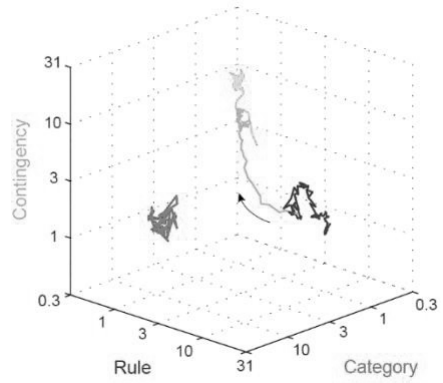
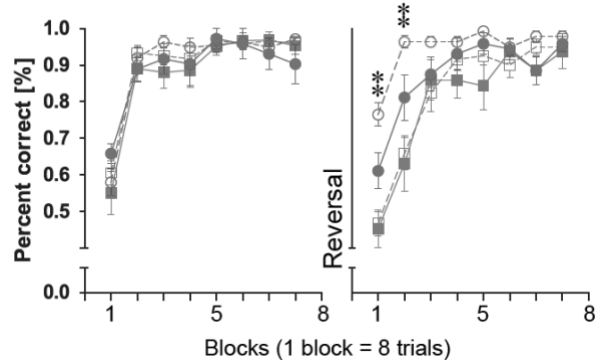


図5 手がかり刺激呈示中に各タイプの神経細胞がカテゴリ、ルール、結果の情報をどのくらいの割合コードしているかを時系列的にプロットした。赤: カテゴリ情報をコードする神経細胞、青: ルール情報をコードする神経細胞、緑: 結果情報をコードする神経細胞、オレンジ: 複数の情報をコードする神経細胞

3) つぎに TMS によって前頭連合野のいくつかの領域を低頻度刺激したとき、グループ逆転課題の成績がどのような影響を受けるかを調べた。これまでの逆転条件 (全体逆転) に加えて、カテゴリ情報を使えない逆転条件 (部分逆転) を加えた。部分逆転においては逆転時、同一グループの刺激すべてにおいて結果との関係が変わるのではなく一部 (2 刺激のみ) が変化する。そのため、逆転後、どの刺激において結果との関係が変化したか分からないため、トップダウン的に行動を変化させることができない (すなわちカテゴリの情報を利用した行動適応ができない)。部分逆転を導入することで、カテゴリ情報を使用できる行動適応 (全体逆転) とカテゴリ情報を使用できない行動適応 (部分逆転) に対する脳の機能を別々に調べることができる。

DLPPFC の活動を TMS によって機能抑制すると、全体逆転時における素早い行動適応に障害が見られたが、部分逆転においては行動成績の低下は見られなかった (図6)。また VLPFC の活動を 1Hz TMS によって抑制したときも同様の結果が得られた (図7)。しかし、dPFC を機能抑制したときには全体逆転、部分逆転ともに行動への影響は見られなかった (図8)。これらの結果は、前頭連合野 (とくに外側部) は初期学習には必要ではないが、カテゴリに基づく行動制御に重要であることが分かる。

図6 1Hz TMS を前頭連合野背外側部 (DLPPFC) に与えたときの行



動成績。(左側) 新規刺激を導入後の学習曲線。(右側) 逆転後の学習曲線。赤線は全体逆転の行動、緑線は部分逆転の行動を示している。点線は TMS を行わなかったセッションでの成績、実線は TMS を行ったセッションでの成績を示している。アスタリスクは TMS を行ったセッションと行わなかったセッションの間で、成績

に有意差があることを示している。

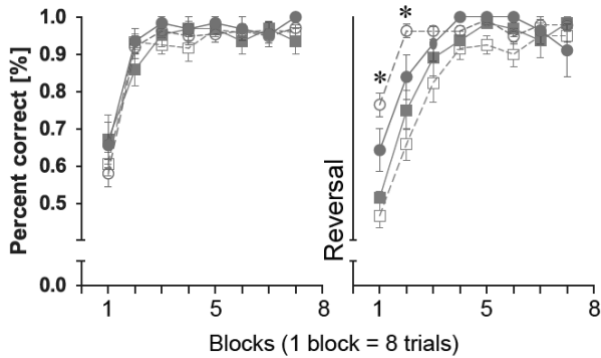


図7 1Hz TMS を前頭連合野背内側部 (VLPFC) に与えたときの行動成績

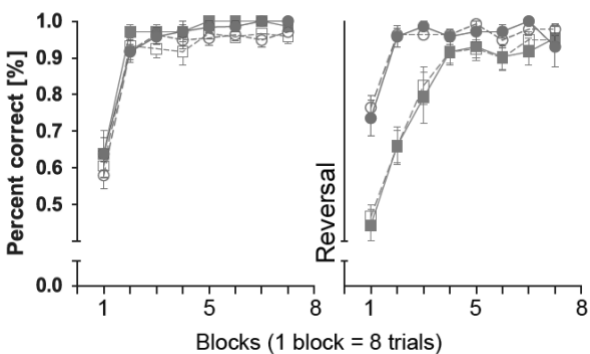


図8 1Hz TMS を背側前頭葉 (dPFC) に与えたときの行動成績

<国内外での成果の位置づけ>

グループ逆転課題を用いることで、サルでもカテゴリ記憶の研究を行うことを示すことができた。もともと動物がカテゴリとしてもものを認識し、その情報に基づいて行動適応できるのかということに関して、心理学の分野において論争があった。Vaughan が1984年にグループ逆転課題を用いて、ハトがカテゴリを学習することができることを示した後、アザラシやチンパンジーでもグループ逆転課題を使って、動物がカテゴリ情報を使用できることが報告されていた。本研究でサルにおいても同様の結果が得られたことは、これら一連の研究を拡張するものであり、さらなる研究の展開が起こることが期待される。特にニホンザルをはじめとするマカクザルは、神経生理学的な研究で広く使われており、グループ逆転課題を用いてカテゴリに関する神経生理学的な研究ができることを示すことができた。

また、前頭連合野においてカテゴリの神経表象そのものがあることを示すことができた。これまでのカテゴリに関する研究では、カテゴリに基づいた行動判断に関する情報をコードする神経細胞(本給において結果をコードするのと同様タイプの神経細胞)は多く報告されていたが、カテゴリそのものを表現する神経細胞の存在は確認されていなかった。本研究において、予告する結果に関係なく刺激グループ(カテゴリ)をコードしている神経細胞が見つかったことで、前頭連合野においてカテゴリそのものの表象があることを初めて示した。とくに前頭連合野のなかでも、下側頭皮質からの神経連絡が多い前頭連合野背内側部(VLPFC)でそのような神経細胞が多く見つかったことは、前頭連合野が側頭葉からカテゴリの情報を引き出して、利用していることが推測される。

さらに前頭連合野にはグループ逆転課題遂行に関係する神経細胞が複数タイプ存在し、手がかり刺激が呈示されている期間に、カテゴリ情報とルールの情報から、結果の情報が生成されていることが分かった。これらの結果は前頭連合野で起こっているダイナミックな情報統合を神経細胞レベルで示した貴重なものである。

また、TMSを用いてVLPFCとDLPFCを機能抑制することにより、全体逆転の成績のみ低下したことから、これらの領域がカテゴリを用いたトップダウン的な行動制御に関係していることが分かった。また、初期学習に対してはTMSの抑制効果が見られなかったことから、記憶学習そのものには前頭連合野が必須ではないことが分かった。これらの結果は、前頭連合野の機能を明確にするうえで非常に重要なものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

部分逆転においても神経細胞活動を記録することを予定していたが、下側頭皮質からの神経活動記録中にサルが不慮の事故で死亡してしまったため、十分なデータを記録することができなかった。下側頭皮質は深い脳部位であり、比較的大きい血管も走っている。そのため、記録電極が血管を傷つけ、脳内出血を起こしたことが死亡の原因であった。研究室にはレントゲン撮影を行う設備がなく、簡便に電極の位置を確認する手段がなかったことが悔やまれる。

<今後の課題、展望>

我々はカテゴリ情報の形成、貯蔵は側頭葉(とくに嗅内皮質を含む下側頭皮質)で行われているのに対し、前頭葉はそのカテゴリ情報を引き出して利用するという役割分担があるという仮説をもっている。この仮説を確かめるために、前頭連合野と下側頭皮質の両方から神経活動を同時記録し、神経情報の流れを調べることが必要であると考えている。予想として、新規刺激導入後、初期学習が起こっているときは課題に関連する活動が側頭葉の神経細胞で多く見られるのに対し、学習成立後、逆転時には関連する活動が前頭葉の神経細胞で多く見られるのではないかと考えている。

また、ヒトを被験者として同様の行動課題を行い、そのときの脳活動をfMRIもしくは機能的近赤外線分光法(fNIRS)で記録することで、カテゴリ記憶の形成およびカテゴリ情報の利用に関係する神経ネットワークを調べることができると考えられる。

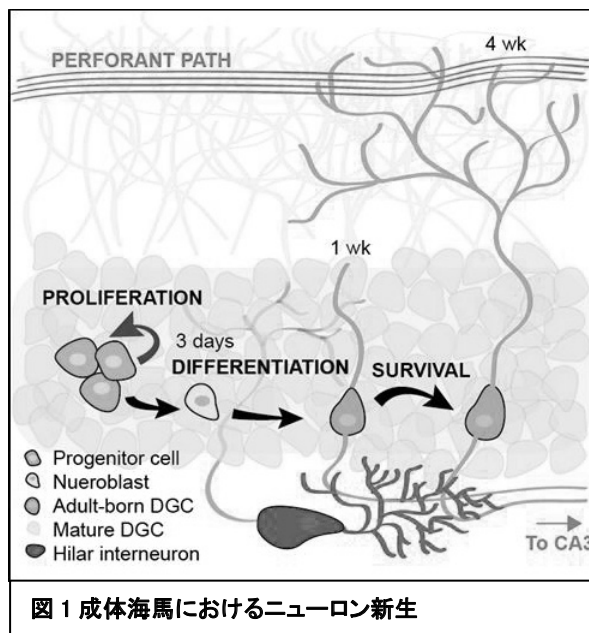
睡眠中の新生ニューロンの活性化が記憶に及ぼす機能

研究代表者：坂口 昌徳

筑波大学・国際統合睡眠研究機構

<研究の目的と進め方>

睡眠中に記憶がどのように固定化されるかのメカニズムは不明な点が多い。哺乳類の睡眠はノンレム睡眠とレム睡眠に大別される。一方で、記憶はまずそれが海馬に依存するかどうかで分類される。例えば、いついつの班会議で訪れたどここの会議場で行ったプレゼンは多くの共同研究につながった、といった種類の記憶はエピソード記憶といわれ、特にその場所の記憶表象は海馬に依存するとされる。ノンレム睡眠におけるエピソード記憶の固定化メカニズムについては多くの知見が重ねられており、特に海馬で起きる Sharp-wave ripple などの特徴的な局所神経活動が現れる際に記憶がリプレイされやすいこと (Wilson, McNaughton, Science, 1993) や、それが LTD を引き起こすこと (Norimoto et al, Science, 2018) など、次第にそのメカニズムが明らかになりつつ有る。一方で、レム睡眠中のメカニズムは、とくに夢との関連が古くから注目されているものの未解明な点が多い。近年になり、レム睡眠や一部の覚醒時に認められる特徴的な海馬の活動パターンであるシータ波を消失させると、海馬依存性の記憶が障害されることが明らかになった (Boyce et al., Science, 2016)。シータ波は特に海馬の歯状回で大きな振幅で観察される。歯状回の構造は、哺乳類で特に発達し特徴的な三層構造を持っており、進化的過程で生存に有利に働いた可能性が示唆されている (Kempermann, Nat. Rev. Neurosci, 2012)。実際、MIT の利根川進博士らの研究によって、歯状回に記憶の痕跡 (エングラム) が形成されることも明らかになっている。しかも、歯状回では成体でもニューロンが新生するという明らかに他の脳の部位とは異なる神経細胞の恒常的代謝システムを備えている (図 1)。



実際成人脳内では、わずかな例外を除きニューロンは新生しない。しかし、海馬の歯状回では、成人後も盛んなニューロンの新生が起こる (Eriksson, Nat. Med., 1998, Spalding et al., Cell, 2013, Koyanagi, Sakaguchi et al., NRR, 2019)。最近、これらの過去の知見とは矛盾し、ヒトの海馬でのニューロン新生はほとんど認められないという報告がなされたが (Sorrells et al, Nature, 2018)、その直後に明らかにこの報告と矛盾し、かなり高齢のヒト海馬でもニューロン新生が認められるとされた (Boldrini et al, Cell, Stem Cell, 2018)。これらの矛盾に対する専門家の見解としては、Sorrell らの研究結果は剖検脳のマーカー染色結果が根拠になっており、その染色自体に技術的な問題がなかったか検討が必要であるとされた (Kempermann, Cell Stem Cells, 2018)。

これまで研究代表者らは、マウス成体の海馬で新生したニューロンが、記憶の、特に詳細な部分の情報を貯蔵することを示した (Carvalho, Sakaguchi et al., J. Neurosci., 2011)。一方で睡眠が、成体マウスの嗅球で新生したニューロンの除去を促進することも示された (Yokoyama et al., Neuron, 2011, v71p883)。このことは、睡眠が、新生したニューロンが担う記憶情報の処理に、積極的な機能を持つことを示唆する。そこで本研究では、睡眠中の成体海馬の、特に新生ニューロンの興奮が記憶に与える機能を検討することとした。

研究代表者は、これまで JSPS 若手研究等からのサポートを受け、新生ニューロンの記憶における機能の解析技術、記憶を貯蔵する神経回路を遺伝学的に捕捉する技術、光遺伝学を用いて海馬依存性の記憶の想起を制御する技術、睡眠解析技術等、本研究に必要な技術を運用してきた。H25 年度より、筑波大学睡眠研究機構にて研究室を主催し、本研究を推進しておりその成果は学会発表等で広く社会に発信してきた。種々の国際への論文発表を行った。本研究の中心的成果については、現在国際誌への投稿を行っており、広く公表する予定である。

<研究計画>

睡眠中の、成体海馬の新生ニューロンの活動が記憶の固定化に果たす意義を検討するため、睡眠段階 (i. e., 覚醒・non-REM 睡眠・REM 睡眠) をリアルタイムで計測しながら、光遺伝学により新生ニューロン興奮または抑制を誘導する (図2) その後、その記憶における影響を、記憶テストにより判定する。記憶のパラダイムとしてはコンテキスト条件付け恐怖記憶課題を用いるが、他にもこれまで新生ニューロンの研究に用いられてきた学習課題に加え、研究代表者が開発した視覚弁別学習課題を用いる。この学習課題は、新生ニューロンが元来持つ、記憶の詳細情報を区別するという機能に依存しているため、新生ニューロンに関与する記憶の評価法として特異性に優れている。また、成体マウスの新生ニューロンの興奮を、生理的に近い条件で、選択的可逆的に操作するため、光遺伝学を用いる。このために、遺伝子改変マウス Nestin-CRE-ERT2/CAG-flox-stop-flox-ChR2 (or eNpH3.0) を用いる。以上により、睡眠中に、新生ニュー

ロン以外の細胞への影響を最小限に抑えつつ、生理学的条件に近い条件で、睡眠中の新生ニューロンの活動が記憶に及ぼす機能を明快に示す。

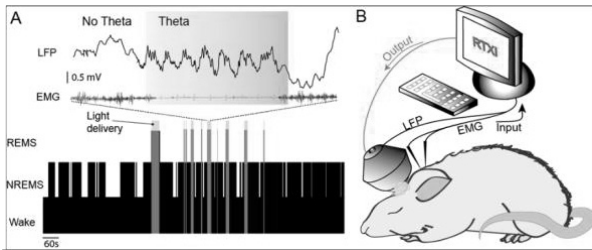


図 2 マウスのリアルタイム睡眠判定と、光による睡眠期特異的な新生ニューロンの興奮制御 A. 脳波および筋電図(上)より睡眠ステージを判定(下), B. Optic cannula を用いて睡眠期特異的に新生ニューロンの興奮を光制御

<得られた研究成果>

i. 光遺伝学により、ミリ秒単位で新生ニューロンの興奮を選択的かつ一過性に制御するシステムを開発した。pNestin-CreERT2 マウス(以降 Nestin マウスと表記)に CAG-loxP-stop-loxP (LSL)-eNpH3.0 マウス(以降 Halo マウス)を掛け合わせ、Tamoxifen を投与することで、対象の期間に生まれた新生ニューロンだけに Halorhodopsin 光受容体(Halo)を発現させることを可能にした(図 3)。本マウスの海馬歯状回に光ファイバーを埋め込み、光照射の期間限定に一過性に新生ニューロンの興奮抑制を可能とした。さらに、リアルタイムで睡眠を分析しながら特定の睡眠ステージに特異的に光照射し、新生ニューロンの興奮を制御するシステムを構築した。

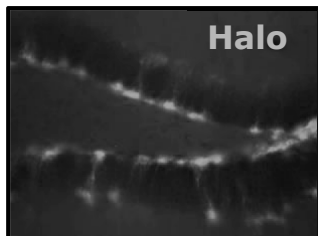


図 3 遺伝子組換えマウスを用いて成体脳の新生ニューロンに特異的に遺伝子発現を誘導

前記マウスを用いて光受容体タンパク質 Halo の発現を誘導した。光照射によって、Halo 陽性細胞の神経活動が抑制されることを電気生理学的に確認した。

ii. 睡眠および覚醒時に新生ニューロンの興奮を抑制する系を確立した。上記 Nestin/Halo マウスを用いて、新生ニューロンに Halo を発現させ学習課題を行った。その後、記憶の固定化に重要である期間に、覚醒・ノンレム・レム睡眠それぞれの時期で新生ニューロンの興奮を抑制した。その後に記憶テストを行った。その際に、睡眠自体の構造に影響は無く、睡眠自体の変化による間接的な記憶固定化への影響はないことが予想された。

iii. 脳内のニューロンの興奮を自由行動下でリアルタイムにモニタリングおよび光操作する技術を開発した。海馬歯状回の個々のニューロンの電気的活動をリアルタイムにモニターすることは電気生理学的に難しいとされてきた。しかし、従来のテトロード電極を用いた方法論では、特定の遺伝子を発現するニューロンの興奮だけをモニターすることは非常に難しい。そこで、我々は光ファイバーをテトロードと組み合わせたオプ

ロードを用いることで、光受容体を発現するニューロン(光に反応する)の興奮を、他の神経細胞と区別して解析することを目指した(Senzai et al., Neuron, 2017で成功例が有る)。我々は、オプロードを用いて、自由行動下の TRE-ArchT マウス(オリジナルに作製)の脳内で、複数のニューロンの興奮を同時にかつリアルタイムでモニターしながら光操作を行った。そして実際に、光に反応するニューロンの興奮を追跡・制御することに成功した。現在この技術を新生ニューロンの睡眠中の興奮モニタリングを可能とするべく、応用実験を行っている。

iv. 新生ニューロンの睡眠中に活動を観察しながら同時に光制御する別の方法として、自由行動下で選択的な光操作が可能な走査型脳内視鏡の開発を試みた。最近二光子顕微鏡と Ca センターを使い世界で初めてリアルタイムで成体新生ニューロンの興奮を解析した研究が発表された。しかし、この研究では自由行動条件下の観察は不可能であることや、観察された新生ニューロンの興奮パターンが実際に行動に及ぼす機能を解析できていない。走査型の構造であれば観察と同時に、狙った細胞選択的な光操作を同じ構造で実現できる。過去に半導体製造技術(microelectromechanical systems: MEMS)による piezoelectric ミラーを用いた小型の二光子レーザー走査型内視鏡が開発されているが、本研究課題のような長期間の自由行動下での運用や感度等の点で問題が残る。今回この基本構造をベースに、小型のレーザーダイオード光源をスリッピング(回転子:自由行動下を実現する)に組み込み込むことと、高感度光電子増倍管(フォトンカウントが可能な浜松ホトニクス H7422P-40)を内視鏡の外に設置することでこの問題の解決を目指した。まずはニューロンの興奮のモニター及び制御が可能な性能(1024 x1024pixels, 20fps)を実現するべく、ミラーの高速動作のための制御系テストを、Arduino を用いて完了した。また、光路についてはスケールを大きくしたデモ機を用いてテストを行ったところ、海馬歯状回を鮮明に捉えた画像を取得できた(図 4)。

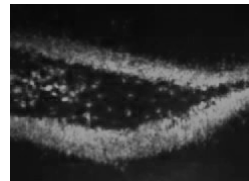


図 4 MEMS ミラーでの運用を想定し Arduino を用い独自に作成したミラー制御系を使い海馬歯状回の切片組織標本の蛍光撮影(NeuN 染色)を行った。

v. 新生ニューロンに選択的にCa蛍光センサータンパク質および光受容体発現を発現させ、リアルタイムで睡眠を解析しながら(Purple, Sakaguchi et al., Sci. Rep., 2017)、新生ニューロンの睡眠中の興奮パターンと、その記憶における機能を検討した。本研究から、新生ニューロンが特定の成熟期に睡眠中に興奮することが、記憶固定化に必要であることが明らかになった。さらに、その際に海馬歯状回で起こる分子変化を Laser Microdissection (LMD)と Transcriptome 解析を組み合わせて明らかにした。

vi. 新生ニューロンが記憶固定化に関与する期間に、恐怖記憶の汎化の起きやすいことが明らかになった(Fujinaka, Sakaguchi et al., Mol. Brain, 2016)。恐怖記憶の汎化は PTSD における症状として頻繁に認められる。上記の研究によってタイミングよく治療介入を行うことでその治療効果を改善できる可能性が示唆された。またその際に、恐怖記憶に睡眠中の無意識下に介入することで、トラウマ記憶に伴う情動反応を減弱できる可能性、すなわち治療効果を増幅できる可能性が示唆された。これに加え、本研究期間中に記憶の光遺伝学による介入技術に資する遺伝子組換えマウスを作成し、その恐怖記憶における介入方法について発表を行った(Sakaguchi et al., Plos One, 2015)。

<国内外での成果の位置づけ>

哺乳類成体海馬で新生するニューロンがどの様に睡眠中に興奮し、それが記憶の固定化に関与するかについては明らかになっていない。新生ニューロンが記憶回路に統合されるメカニズムを知ることで、内在性の細胞可塑性を利用した中枢神経の再生医療に資する新しい技術が開発できる可能性が有る (Akers, [Sakaguchi](#) et al., *Stem Cells.*, 2018)。近年、成人後の海馬でニューロンが新生することが示され (Eriksson et al., *Nat. Med.*, 1998, v4p1313), その機能およびメカニズムの解明と、医療への応用が注目されている。研究代表者を含む研究により、新生ニューロンが記憶回路に取り込まれ (Kee et al., *Nat. Neurosci.*, 2007, v10p355, Imayoshi et al., *Nat. Neurosci.*, 2009, v11p1153), 特に、類似する他の記憶と区別する際に重要な機能を果たすことが示されている (Sahay et al., *Nature*, 2011, v472p466, Nakashiba et al., *Cell*, 2012, v149p188 等)。また、新生ニューロンが記憶の固定化 (Kitamura et al., *Cell*, 2009, v139p814) や、老化に伴う記憶力の減退に関与することが示唆されている (Itou et al., *Hippocampus*, 2011, v21p446)。

一方で、睡眠 (特に non-REM 睡眠) は古くからその記憶への関与が指摘され、近年その強い証拠が提示されつつある。例えば、睡眠中に、学習に用いた刺激 (e.g., 匂い) を与えると、記憶の固定化が強まる (Rasch et al., *Science*, 2007, v315p1426 等)。また、電気生理学的な観察実験から、睡眠中に記憶を貯蔵したニューロンが興奮することが示唆されており (Bendor&Wilson, *Nat. Neurosci.*, 2012, v15p1439 等)、これが、睡眠によって記憶が固定化されたり消去される (Hauner et al., *Nat. Neurosci.*, 2013) メカニズムの一つとして注目されている。

最近になり、睡眠が成体のニューロン新生に及ぼす影響が少しづつ明らかにされつつある。睡眠不足が成体ラット海馬の新生ニューロンの数を減少させる一方で (Mirescu et al., *PNAS*, 2006, v103p19170)、食餌後の睡眠が成体マウス嗅球の新生ニューロンの除去を促進することが示されているが (Yokoyama et al., *Neuron*, 2011, v71p883)、これらの機能的意義は不明な点が多い。

これらの事実から、睡眠中に新生ニューロンが興奮することが、記憶に関与することが強く疑われるが、その直接的な証拠は無かった。この原因として、新生ニューロンを特定の睡眠ステージ特異的に制御することや、新生ニューロンが担う記憶を特異性の高い方法で検出することが難しかったこと挙げられる。本研究では、この方法論的限界を超え、睡眠中の新生ニューロンの興奮が記憶に果たす役割を明らかにした。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

従来、観察と GOF, LOF の3種類が同じ方向性を持った結果になることで理解のしやすいストーリーとなり、論文化することにも困難が少ないと考えられる。しかし、本研究では観察結果から予想されたことが、介入実験では全く逆の表現型を生じることが有った。これには、背景により複雑な生理メカニズムが働いていることが予想された。

<今後の課題、展望>

記憶固定化における睡眠の役割は脳科学としても睡眠学としても重要な研究課題として盛んに研究されている。特にノンレム睡眠と記憶の関係には2つの仮説が盛んに検討されており、1つは覚醒時に賦活化されたシナプスがノンレム睡眠中に全体的に弱まることで、情報価値のある強い結合のものだけが残るといふシナプス恒常性仮説である。2つ目は覚醒時に海馬で記憶の固定化が起こり、ノンレム睡眠中に大脳皮質へと転送され

るといふ二段階仮説である。これらの仮説の共通点は、覚醒時とノンレム睡眠時それぞれで記憶への機能が異なること、その責任回路の詳細は不明であることである。一方でレム睡眠には謎が多く、最近になってようやくレム睡眠中の脳内のシータ振動が記憶の固定化に重要であるとの報告がなされた。しかし、睡眠中の記憶の固定化にはその責任回路を含め未だ不明な点が多く残っている。今後、睡眠・覚醒時の新生ニューロンの興奮が記憶の固定化に果たす分子メカニズムを明らかにし、未知の記憶固定化のメカニズムに迫る。

レム睡眠の操作が可能なマウスを用いた睡眠の質が記憶に及ぼす影響の解明

研究代表者：林 悠

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IHIS）

<研究の目的と進め方>

哺乳類や鳥類の睡眠は、レム（急速眼球運動）睡眠とノンレム睡眠という2つのステージから構成されます。これまでレム睡眠の意義は大きな謎でした。その理由の一つは、レム睡眠を有効に阻害する方法がなかったことです。被験者がレム睡眠に入ったら起こす、という単純な方法では、刺激そのものによるストレスの影響を排除できませんでした。こうした点を踏まえ本研究では、『レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを司る脳部位を特定し、その操作により強制覚醒に依らずにレム睡眠を阻害できる技術を開発し、レム睡眠の意義を解明する』というアプローチをとりました。

レム睡眠とノンレム睡眠が明確に見られるのは、哺乳類や鳥類などの一部の複雑な脳を持つ脊椎動物のみです。従ってこれら二つの睡眠は、脳の高等な機能に関わると考えられてきました。レム睡眠は新生児期や学習直後に多いことは知られていましたが、上述のとおり、レム睡眠を単純な強制覚醒により阻害する実験では、刺激そのものによるストレスが生じてしまうなど、レム睡眠を有効に阻害する方法がなかったため、具体的な役割は分かっていませんでした。

また、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えのメカニズムに関しても、脳のどの細胞がスイッチの役を担っているのかは、正確には分かっていませんでした。私たちは、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを担うニューロンを同定することが、睡眠の制御機構の理解へとつながり、その人為的操作を実現することが、レム睡眠の生理的意義の理解につながると期待し、本研究に取り組みました。

<研究計画>

1) まず、マウスのレム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを担うニューロンの同定に取り組むこととしました。具体的な方法としては、脳幹の橋において、特定のニューロンのサブタイプに選択的なプロモーターを探索し、そのプロモーターの制御下でCreを発現するトランスジェニックマウスを作製しました。さらに、Cre依存的に神経機能を操作できるアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、得られたトランスジェニックマウスにおいて遺伝学的にラベルされたニューロン群が、レム睡眠の制御に関与しているか検証しました。

2) 上記のアプローチにより、レム睡眠を制御するニューロンを同定することができたら、まずは化学遺伝学的手法によりレム睡眠を一過的に操作した際に、脳機能にどのような影響が生じるかを調べました。

3) さらに、長期的にレム睡眠を操作できるマウスの開発に取り組むことにしました。その際には、必要に応じて、新たにレム睡眠を制御するニューロンの探索を行いました。そして、レム睡眠を長期的に操作することに成功したら、上記2) で得られたレム

睡眠の機能に関する知見が、長期的にレム睡眠を減少または増加させた場合にも適用されるかを検証することとしました。

<得られた研究成果>

1) これまでに、レム睡眠とノンレム睡眠との切り替えのメカニズムを解明しようとする研究が多くなされてきました。1960年代に Jouvett らにより、ネコの脳幹以外の脳部位を大きく破壊しても、覚醒・レム睡眠・ノンレム睡眠のような状態が見られるという実験がなされました。従って、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを司るニューロン群は脳幹にあることが推察されました。しかしながら、脳幹はさまざまな機能をもつニューロンがはっきりとした領野を形成せずに混在する複雑な脳部位であったため、具体的にどのニューロンが重要なのかはよく分かっていませんでした。

近年、マウスの胎児期におけるニューロンの細胞系譜が明らかになり、脳幹の一部のニューロンが胎児期に一過的に出現する小脳菱脳唇 (cerebellar rhombic lip) と呼ばれる神経上皮構造に由来することがわかってきました。そこで私たちは、この小脳菱脳唇に由来する細胞系譜や、そのほかの脳幹に寄与する細胞系譜について、発生過程における細胞の挙動を追い、胎児期の各細胞系譜に由来する細胞が成体の脳幹のどの場所に分布しているかを調べました。様々な細胞系譜の中からレム睡眠に関わる系譜を探索したのです。その結果、胎児期に小脳菱脳唇に由来し、*Atoh1* 遺伝子を発現していたニューロンの系譜がレム睡眠に関わっていることが明らかとなりました (図1)。

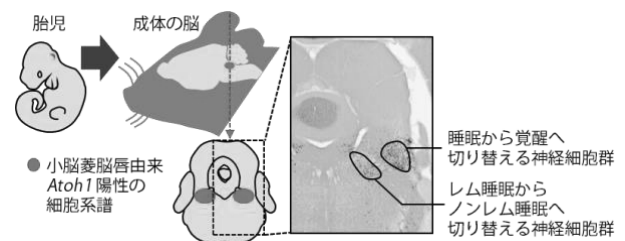


図1 胎児期に小脳菱脳唇の細胞が分裂・移動・分化を経て、睡眠を制御するニューロン群を構成

小脳菱脳唇由来の細胞が *Atoh1* 陽性であることを利用して遺伝学的にラベルし、成体まで追跡してその機能を調べました。その結果、脳幹において、睡眠から覚醒への切り替えを担うニューロン群と、レム睡眠からノンレム睡眠への切り替えを担うニューロン群を同定することに成功しました。

具体的には、胎児期に *Atoh1* 遺伝子を発現していたニューロンのみに、神経活動を人為的に活性化できる DREADD-hM3Dq と呼ばれる遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを構築し、実

際に活性かさせたところ、レム睡眠がほとんどなくなり、この細胞群がレム睡眠を抑制し、レムからノンレム睡眠への切り替えを促す役割をもつことがわかりました。これらの発見により、レム睡眠のみを有効に阻害できるトランスジェニックマウスをつくることに成功しました（図2）。

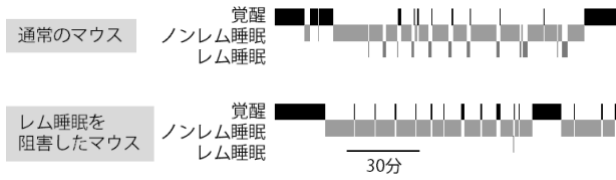


図2 レム睡眠を一時的に阻害できるトランスジェニックマウスの確立

私たちが同定したレム睡眠を抑制し、レムからノンレム睡眠への切り替えを担うニューロン群に、神経活動を一過的に活性化できる hM3Dq 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを樹立することで、レム睡眠を任意のタイミングで阻害できるようになりました。

2) 上記のとおり、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを担うニューロンの同定と操作に成功し、当初の目標であった、外部からの刺激に依らないレム睡眠の阻害方法を確立できました。レム睡眠を一時的に阻害されたマウスは、一見何も無いように見えても、時間が経つにつれ、次第にノンレム睡眠の質に変化が現れました。ノンレム睡眠の特徴である学習や記憶形成を促す脳波（徐波）の強さが次第に弱まったのです（図3）。レム睡眠を元に戻すと、その直後にノンレム睡眠の徐波の強さも元に戻りました（図3）。このことから、レム睡眠には、ノンレム睡眠中の徐波を促す作用があることが示唆されました。さらに、レム睡眠を抑制するニューロン群に、神経活動を阻害する遺伝子を発現することで、非常に長いレム睡眠を人為的に作り出すことにも成功しましたが、そのような長いレム睡眠の直後には、強い徐波が観察されました。また、操作していない自然な睡眠においても、長いレム睡眠ほど、その直後に強い徐波が見られるという有意な正の相関関係が見出されました。以上を踏まえ、レム睡眠の役割の一端が、ノンレム睡眠中の徐波を促すことであると判明しました。徐波は、周波数 4 Hz 以下のゆっくりとした脳波であり、ニューロン同士をつなぐシナプスの柔軟性を高め、記憶の定着などを促す効果があります。本結果から、長年謎であったレム睡眠の生理的意義の一端が初めて明らかとなりました。レム睡眠が徐波の発生に関与するという今回の結果をふまえますと、レム睡眠は徐波を介して記憶学習やシナプス可塑性に関与している可能性が期待されます(以上, Hayashi et al., Science 350; 957, 2015 に報告)。

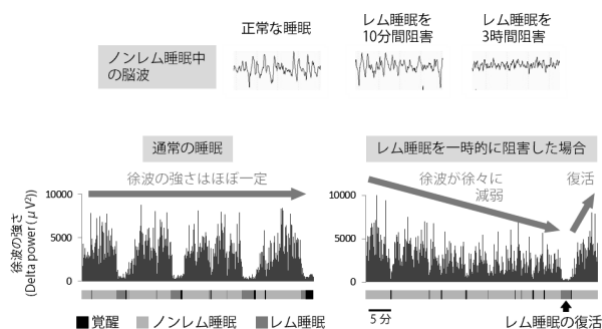


図3 レム睡眠はノンレム睡眠中の徐波の維持に重要

上段：正常な睡眠時と、レム睡眠を10分および3時間阻害した後の徐波の比較。10分のレム睡眠阻害では徐波への影響は見られませんが、長時間レム睡眠を阻害すると徐波の強さが弱まりました。

下段：徐波の強さの定量的・連続的な観測。通常のノンレム睡眠中の徐波の強さがほぼ一定であるのに対し、レム睡眠を阻害すると徐波の強さが次第に減弱しました。レム睡眠が復活すると、その直後に徐波が回復することも判明しました。

3) これまでの研究では、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを担うニューロンを同定するために、発生学的な知見を応用した独自のアプローチをとりました。その結果、これらの細胞がどの細胞に由来するのかを調べ、親となる細胞（小脳菱脳唇の神経前駆細胞）も同定することに成功しました。興味深いことに、この小脳菱脳唇の神経前駆細胞からは、レム睡眠からノンレム睡眠への切り替えを担う細胞だけでなく、睡眠から覚醒への切り替えを担う細胞も生み出されることがわかりました（図1）。すなわち小脳菱脳唇は、覚醒と睡眠、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えに関わる細胞の共通の発生的起源と言え、今回同定した2つの細胞集団はいわば姉妹関係にあるといえます。このように、脳の状態を司る多様なスイッチ細胞を生み出すことに特化した神経前駆細胞の存在が、初めて明らかとなりました。レム睡眠とノンレム睡眠は発達した大脳をもつ哺乳類と鳥類でしか今のところ見つかっていませんが、硬骨魚類にもこの小脳菱脳唇の細胞は高度に保存されています。脊椎動物の共通祖先で睡眠と覚醒の切り替えに特化した細胞であった小脳菱脳唇が、進化の過程のどこかでレム・ノンレム睡眠という状態を作り出すニューロン群も生み出すようになったのかもかもしれません。今後さらに研究を進めることで、睡眠と覚醒だけの単純な脳の状態しか持たない生物から、レム睡眠やノンレム睡眠といったより複雑な脳の状態をもつ生物が進化した歴史を裏付ける重要な証拠が得られるものと期待しています。

4) ここまでは、レム睡眠を負に制御するニューロン群の同定と、そのニューロン群の活動の遺伝学的操作に基づく、レム睡眠の一時的な操作をもたらす影響を調べてきた結果について説明しました。続いて、レム睡眠を長期的に操作するとどうなるか、を解明することを目指してきました。もしこれまでに述べてきた「レム睡眠がノンレム睡眠の徐波を促す作用がある」という発見が正しければ、長期的にレム睡眠が損なわれると、慢性的に徐波の弱い、いわゆる質の悪い睡眠になるはずですが。実際そうなるのか、検証する必要があると考えました。また、そのような睡眠の質が悪化した状況下で、記憶学習能力にどのような影響が生じるのかも気になる場所でした。そこで私たちは、以下に説明するような理由から、これまでに同定したレム睡眠を抑制するニューロン群に加えて、レム睡眠を促進するニューロンも同定することを目指しました。

現在の神経科学の遺伝学ツールをもって、長期的に神経活動を増加させる良い方法はありません。従って、長期的にレム睡眠を抑制したい場合には、レム睡眠抑制ニューロンを長期的に活性化するというアプローチは難しいと私たちは考えました。一方、ニューロンの機能を長期的に阻害する方法としては、（不可逆的ではありませんが、）単純にそのニューロンをアポトーシス誘導により殺してしまうという方法がありました。従って、もしレム睡眠を促進するニューロンを同定することができ、そのニューロンを破壊してしまえば、レム睡眠を長期的に抑制できると期待しました。しかしながら、これまでに、活性化するとレム睡眠を増や

せるニューロン群はいくつか同定されていたものの、破壊するとレム睡眠が大きく減少するような、レム睡眠制御に必要な不可欠なニューロンは見つかっていませんでした。ただ、ネコを対象とした古典的な電氣的破壊実験の論文などからは、脳幹の橋被蓋野にレム睡眠に必要な不可欠なニューロン群があると期待されました。そこで、私たちは脳幹の橋被蓋野の領域に選択的に発現する多くの Cre マウスを作製して、その中から、Cre 発現ニューロンを破壊するとレム睡眠に影響のあるトランスジェニックマウス系統を探索し続けました。具体的には、Cre 依存的に細胞死を誘導するジフテリア毒素 DTA を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入し、脳波を測定する実験を繰り返しました。その結果、多く作製した Cre マウスの中から、DTA による破壊により、レム睡眠が大幅に減少する Cre マウス系統が一つだけ得られたことが分かりました。

5) 上記の通り、レム睡眠を促進するニューロンの同定に成功し、レム睡眠を長期的に阻害できるマウスを作ることができました。このマウスでは、DTA 発現ウイルスの注入 1 週間後からレム睡眠が減少し、3 週間後には 10% 以下まで減少しました。そして、レム睡眠が大きく減ると、ノンレム睡眠中の徐波も弱まり、ノンレム睡眠が非常に浅くなりました。ノンレム睡眠が浅くなったためか、中途覚醒も多く、マウスは頻繁に覚醒と睡眠を行き来するようになりました。このマウスに条件付恐怖記憶学習などの学習課題をさせたところ、成績が大幅に低下することが分かりました。従って、レム睡眠が大きく減少した結果、ノンレム睡眠中の徐波が弱まり、記憶学習能力が低下した可能性が考えられます。すなわち、レム睡眠の短期的な操作から見えてきたレム睡眠の役割に関して、レム睡眠の長期的な操作実験でも、一致する結果を得ることができました。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、レム睡眠を制御する複数のニューロン群の同定に成功し、さらには、レム睡眠の意義の一端を明らかに出来たという点において非常に有意義であると考えられます。

まず、私たちは、これまでほとんど知られていなかったレム睡眠を負に制御するニューロン群を同定することに成功しました。Atoh1 陽性細胞系譜に由来するこれらのニューロンは、グルタミン酸作動性ニューロンであることも判明し、レム睡眠の制御メカニズムの理解に大きく貢献しました。また、これらの細胞を同定する上で、細胞系譜に注目し、特定の細胞系譜を遺伝学的にラベルする、というアプローチをとりましたが、このようなアプローチは非常にユニークであり、今後、新たに特定の機能的ニューロン集団を同定する上でも有用なアプローチになるものと期待されます。

さらに、レム睡眠を正に制御するニューロン群の同定にも成功しました。レム睡眠を正に制御するニューロンとしては、延髄腹側部の抑制性ニューロン群など、いくつか報告がありました。しかしながら、いずれも、破壊または抑制をしても、レム睡眠の量には大きな影響のないニューロン群でした。一方、本研究で新たに同定したニューロンは、破壊するとレム睡眠が大きく低下することが判明しました。従って、レム睡眠の制御中枢を担う可能性が高く、その発見はレム睡眠の制御機構を明らかにする上で非常に有用であると期待されます。こうしたレム睡眠を強く正に制御するニューロン群と、上述のレム睡眠を強く抑制するニューロンの間での説妙なバランスが成り立つことで、私たちはレム睡眠とノンレム睡眠からなる質の高い睡眠を得ることができると考えられます。

そして、冒頭で説明しましたように、レム睡眠の機能について

はこれまでほとんど何も分かっていませんでした。レム睡眠が徐波の促進を介して記憶学習に貢献するという考え方はこれまでにない新しいものであり、レム睡眠の意義に関する考え方を大きく従来から変えたものと期待されます。記憶のダイナミズムを理解する上でも、2 種類の睡眠、レム睡眠とノンレム睡眠があることの意義の一端が明らかに成ったことは有意義であると考えられます。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

レム睡眠を制御するニューロンの探索は、当初想像していた以上に異常に困難を極めました。その理由は、私たちがそもそも睡眠を専門とするバックグラウンドがなかったことに加えて、脳幹の橋という部位が非常にヘテロジニアスなニューロン群の集まりであり、次から次へと新たな分子マーカーが見つかるものの、その多くは Cre トランスジェニックマウスを作製しても睡眠への影響はなんら見られませんでした。今回多くの Cre マウスを作製しましたが、中には、睡眠以外の重要な脳機能に関わっているものがあると期待されます。

<今後の課題、展望>

夢を生み出すレム睡眠は、その役割が脳科学の最大の謎の一つでした。私たちはレム睡眠が徐波と呼ばれる記憶形成や脳機能の回復に重要な神経活動を、ノンレム睡眠中に誘発する役割があることを発見しました。この発見は、レム睡眠の脳発達や回復への貢献を支持するのみならず、レム睡眠の人為的な操作により、様々な神経疾患の症状を改善できる可能性も示唆します。実際、多くの神経疾患がレム睡眠の異常を伴います。今後、幼若期や老齢期のレム睡眠の操作が脳機能に与える影響を解明すると同時に、様々な神経疾患の症状の改善を試みる予定です。本研究により、脳の発達・恒常性維持機構の理解や、全く新しい神経疾患の治療標的の発見に貢献できると期待されます。

また、もしレム睡眠を増やすことが疾患の治療にも有用であると判明した場合には、今後、レム睡眠を遺伝学に依存せずに操作できるようになることが重要な課題であると考えられます。現在の睡眠障害の治療薬は、どれもノンレム睡眠を増やすものの、レム睡眠は増やさないとむしろ減らしてしまうものが殆どです。レム睡眠を増やすことができれば、二次的にノンレム睡眠中の徐波も上がり、結果的に非常に質の高い睡眠が誘導できるようになるのではと期待されます。

運動学習における長期記憶機構の研究

研究代表者：中井 淳一

埼玉大学・理工学研究科

<研究の目的と進め方>

我々の脳では、主に海馬や大脳が関与する宣言的記憶と、主に小脳が関与する運動学習の記憶が知られている。宣言的記憶とともに運動学習においても運動学習の記憶がダイナミックに変化していることは、スポーツにおいて日々のトレーニングが重要なことからもうかがい知れることである。

短期記憶から長期記憶へと移行する現象（記憶の定着）について、運動学習では小脳皮質や小脳核が関係することが報告されている。しかし、小脳における記憶の定着がどのように起こるのか、その分子メカニズムについては不明な点が多い。小脳における記憶の定着の研究に関して、optokinetic response (OKR) ではサル (Shutohら Neurosci, 2006) やマウス (Shutohら Neurosci, 2011), vestibulo-ocular reflex (VOR) でも Broussardら (Exp Brain Res, 2011) の報告がある。魚類ではキンギョでOKRの学習の報告 (Marshら J Neurophysiol, 1997) があるが、OKRの記憶の定着の研究は魚類ではまだ報告がない。OKRでの記憶の定着の研究は電気生理学的研究、薬理学的研究が主で、分子操作や、イメージングによる記憶の可視化、記憶の移動元と移動先の細胞を同定しながら記憶の定着を研究することを目指した研究例は報告がない。分子機構に関しては、能動的回避学習の定着にゼブラフィッシュでもマウス同様 cell adhesion molecule L1が関連すること (Pradelら J Neurobiol, 1999) が報告されているが、運動学習の定着に関しては、マウスの小脳皮質でタンパク合成が記憶の定着に必要ということぐらいしかまだ報告がない (Shutohら Neurosci, 2011)。

我々はこれまでGFPをもとにしたカルシウムプローブであるG-CaMP (Nakaiら Nat Biotechnol, 2001) を開発し、神経回路機能の研究に活用してきた。小型モデル動物であるゼブラフィッシュは脊椎動物に属し、その小脳は哺乳類との類似性において構造的、機能的によく保存されている。ゼブラフィッシュの稚魚は脳が小さく、また透明であるため、可視化による神経回路の実験および解析に都合がよい。そこで本研究計画では、ゼブラフィッシュを用いて、運動学習の記憶に関する光学的測定系を開発するとともに、運動学習の情報が短期記憶から長期記憶へと置き換わっていくダイナミズムを担う神経回路機構の解明を行った。本研究により脳における長期記憶の全体像の理解が深まり、老化で記憶力が落ちるメカニズムの解明やその対処法、記憶に関するヒトの疾患の原因解明、脳卒中後のリハビリの効率化や、スポーツ強化にもつながる可能性がある。

<研究計画>

本研究は、以下の6つの部分からなっている。

1) 行動実験によりゼブラフィッシュでOKRの学習、記憶の定着を確認する。そのためゼブラフィッシュの稚魚のためにもOKR用視覚刺激装置を組み立てる。顕微鏡下でメチルセルロースにより稚魚を固定し、CCDカメラで稚魚の眼の動きを撮影し、画像より眼の

部分を抽出して、サッケードの角度、速度を解析する。

2) ゼブラフィッシュの小脳、脳幹におけるOKRの責任部位を探索する。小脳のカルシウムイメージングによりOKRの際の小脳の活動部位を特定する。また、小脳皮質の一部をレーザーで光除去後、行動実験にてOKRでの運動学習が損なわれる場所を特定し責任部位とする。また、GABA受容体作動薬ムシモール等の薬物をその部位に注入し同じ結果を得られるか調べる。場合によって小脳の一部にハロロドプシンを発現させたゼブラフィッシュを用いて神経活動を光抑制し、運動学習への影響を行動実験にて確認する。

3) 2) で明らかにした小脳皮質の部位において、イメージングによりOKRで活性化されるPCの活動を詳細に解析する。GAL4-UASの下流にG-CaMPまたは赤色蛍光Ca²⁺センサーR-CaMP (Ohkuraら PLoS One, 2012b) の遺伝子をつないだコンストラクトを作成する。トランスジェニック体の作成は受精卵へのDNAマイクロインジェクション法で行い、トランスポゾンTo12 (Kawakamiら Dev Cell, 2004) を用いてDNAをゲノムに組み込む。できたトランスジェニック体をGAL4エンハンサートラップラインと掛け合わせて、目的の部位に遺伝子を発現させる。

4) 小脳の短期記憶現象を可視化し解析する。

5) OKRに関連する記憶の移行先と考えられるECまたは脳幹の神経細胞の活動をイメージングにより解析する。また、長期記憶（記憶の定着）の過程の可視化と解析を行う。

6) 遺伝子操作、光操作等を用いた解析により、記憶の定着の分子メカニズムを解明する。発見した分子機構が哺乳類でも保存されているか検討し、脊椎動物における統一した理解を行う。

<得られた研究成果>

1) ゼブラフィッシュを用いて、OKR用視覚刺激装置を作成し、サッケードの角度、速度を解析した。この装置を用いて、OKRの学習を行わせ、学習後のサッケードの角度、速度を解析した。

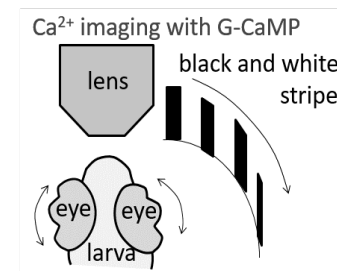


図1 ゼブラフィッシュの稚魚を顕微鏡下に固定し、その周囲に厚紙を用いて湾曲したスクリーンを設置した。プロジェクターで白黒のストライプをスクリーンに投影した。稚魚の目の動きを動画撮影した。

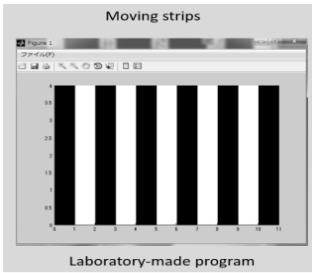


図2 任意の速度で白黒のストライプを動かすことができるようにコンピュータープログラムを作成した。

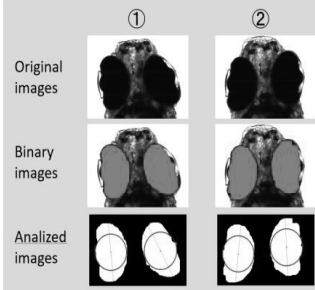


図3 スクリーンに投影された白黒パターンが移動するにつれて、①から②へのサッケードが観察された。サッケードを解析するため解析プログラムを自作した。

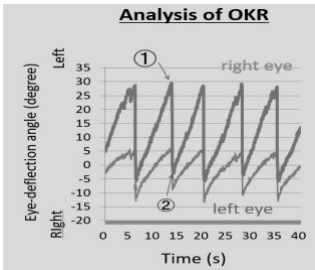


図4 図3の眼球運動の解析結果を図示した。右から左に白黒ストライプが移動するにつれて右目は～5度から～30度へと徐々に変位し、左目も～-10度から～5度へと変位し、左右両眼が同期して急速に元の位置に戻る現象がとらえられた。

2) エンハンサートラップラインを用いて G-CaMP を小脳顆粒細胞、下オリブ核、Eurydendroid cell に発現させ、その際の小脳の顆粒細胞、下オリブ核の細胞活動を G-CaMP を用いたカルシウムイメージングを用いて解析を行った。

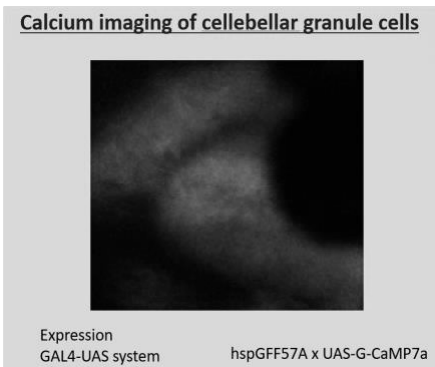


図5 エンハンサートラップライン hspGFF57A と G-CaMP7a を掛け合わせて生まれたゼブラフィッシュを共焦点レーザー顕微鏡下に固定し、小脳顆粒細胞を in vivo カルシウムイメージングした。

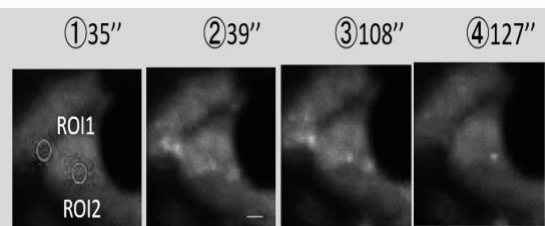


図6 図5の部分のタイムラプス画像。小脳顆粒細胞の細胞体の自発活動によるカルシウム上昇がとらえられている。

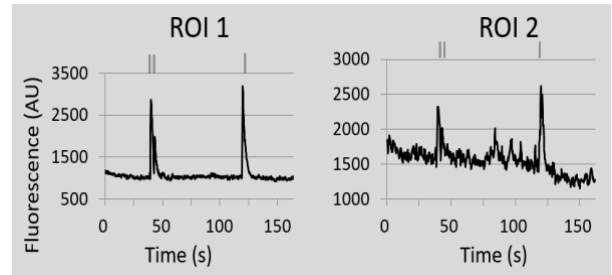


図7 図6の ROI 1、ROI 2 に対応する部位の蛍光の経時変化。

3) 研究途中、ゼブラフィッシュに組み込むカルシウムセンサーとして、R-CaMP の改良型である R-CaMP2 を開発することができた。既に開発していた R-CaMP1.07 を元に、R-CaMP1.07 に含まれるミオシン軽鎖キナーゼの M13 断片をカルモジュリンキナーゼキナーゼのカルモジュリン結合部位 (ckkap-WT) に置き換えることにより R-CaMP2 を作成した。R-CaMP2 は R-CaMP1.07 より rise time, decay time が 3 倍高速に反応することが明らかとなった。マウス大脳および線虫で R-CaMP2 と緑色蛍光カルシウムセンサー G-CaMP を用いた dual imaging が可能となった。本研究の成果を Nat Methods 誌に発表した。また、この R-CaMP2 に関して特許申請した。

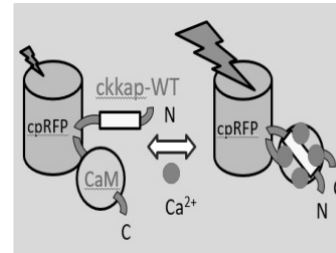


図8 赤色蛍光カルシウムセンサー R-CaMP2 の構造と差動メカニズム。カルモジュリン部分 (CaM) にカルシウム (Ca²⁺) が結合すると CaM は ckcap-WT と結合し、その構造変化が赤色蛍光タンパク (cpRFP) の蛍光強度を増加させる。

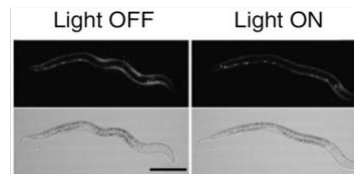


図9 R-CaMP2、G-CaMP6、チャンネルロドプシンを発現する線虫を用いた dual color imaging. 体壁筋に R-CaMP2、GABA ニューロンに G-CaMP6 とチャンネルロドプシンを発現する線虫を作成した。この線虫に青色の光を照射してチャンネルロドプシンを活性化したところ GABA ニューロンの G-CaMP6 の蛍光強度 (緑) は増加し、体壁筋の R-CaMP2 の蛍光強度 (赤) は減少した。

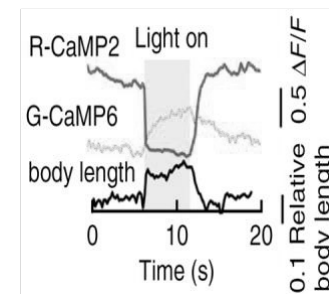


図10 図9の蛍光の経時変化図。光照射中 (図の水色の部分) GABA ニューロンの活動が増加し G-CaMP6 の蛍光は増加し、GABA ニューロンの抑制性入力を受けて体壁筋の R-CaMP2 の蛍光は低下し、それとともに体壁筋は弛緩し body length が伸びている。

<国内外での成果の位置づけ>

記憶の定着のメカニズムはまだ十分解明されておらず本研究はその解明に迫るもので、特にゼブラフィッシュを用いたところがユニークであると評価できる。R-CaMP2 の開発に関して、従来

の赤色カルシウムセンサーに比較して反応速度が速く、従来のセンサーでは計測できなかった高速の神経細胞の発火を検出可能になった点、および研究者の選択の幅を広げた点で評価できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

レーザーで光除去は使用したレーザーのレーザーパワーの問題でうまく光除去できなかった。この点は、より強いレーザーを用いれば可能と考えられる。また、不慮の事故によりゼブラフィッシュ飼育装置に問題が発生し、飼育していた遺伝子改変魚の多くを失った。そのため遺伝子改変魚を用いた研究計画を再開できるまでに時間を要し、4)以下の計画については計画を達成できなかった。

<今後の課題、展望>

記憶の定着のメカニズムを解明するため、今後はブルキンエ細胞にG-CaMPを発現するトランスジェニックラインを用いたカルシウムイメージングによりさらに解析を行っていく必要がある。R-CaMP2に関しては、ダイナミックレンジが従来のR-CaMP1.07には及ばないため改良の余地がある。この点はアミノ酸の変異導入により、より高性能なR-CaMP2を開発できる可能性がある。

記憶システムの恒常性維持機構の解明

研究代表者：殿城 亜矢子

千葉大学・薬学研究院

<研究の目的と進め方>

学習や記憶機能は、加齢にともなって低下する。近年、加齢や糖尿病などに伴う生体内の代謝変化による脳機能への影響が、学習や記憶低下の原因の一つとして示唆されている。たとえば、血糖調節ホルモンであるインスリンは、摂食・代謝調節をはじめとして、発生、成長、老化、さらには学習・記憶機能など様々な局面で重要な役割をもつ。しかし、インスリンの機能が多岐に渡ることからインスリンの時期特異的な機能を評価することは困難であったため、インスリンシグナル経路が学習や記憶の形成にどのように関わっているのか、さらには加齢に伴う記憶低下との関与については不明な点が多い。本研究計画では、インスリンの機能を一過的に制御する系を確立し、**体内の代謝恒常性の変化が記憶機能に与える影響を明らかにすることで、加齢性記憶低下の原因を理解することを目的とする。**

遺伝的に寿命を操作した長寿命個体は、加齢性記憶低下の発症が遅れることが種を通じて知られている。これまでに寿命制御に関する研究は、インスリンシグナル経路を中心に行われ、これらの寿命制御機構は線虫からショウジョウバエ、マウスに至る進化の過程で保存されている。一方で、哺乳類においては加齢にともない、インスリン分泌能の低下やインスリン抵抗性の増大など、代謝恒常性が破綻することが知られている。

これまでに我々は、ショウジョウバエ嗅覚記憶をモデルとして研究を行い、老化個体では安定な記憶が形成されないこと、記憶固定のプロセスを担う機能が低下していることを明らかにしてきた (Tonoki and Davis., *PNAS*, 2012, Tonoki and Davis., *JNeuroscience*, 2015)。ハエ嗅覚記憶は、記憶の固定化と忘却のプロセスを担う両神経系が最近同定されるなど、記憶形成に関与する神経細胞群の同定がもっとも進んでいるモデル系の一つである。ハエ嗅覚系3次神経であるキノコ体は、約2000の神経細胞より構成される。これらのキノコ体に投射する神経細胞群の中で、セロトニン作動性のDPM神経細胞とGABA作動性のAPL神経細胞が記憶の固定化のプロセスを担い、一部の特定のドーパミン作動性神経細胞群が記憶の忘却のプロセスを担うことが明らかになってきた。そこで本研究計画では、記憶の形成機構やインスリンシグナルによる代謝制御機構の種を超えた保存性に着目し、ショウジョウバエ嗅覚連合学習をモデルとして老化にともなう代謝恒常性の変化が記憶形成機構に与える影響を明らかにする。生体内の代謝恒常性の変化が、記憶形成に関与する神経ネットワークや分子ネットワークに与える影響を、嗅覚記憶行動解析、トランスクリプトーム解析を通じて評価することで、老化に伴う記憶低下が生じるメカニズムの理解に迫る。

<研究計画>

1) 生体内の代謝恒常性の変化が記憶形成に与える影響の解析：生体内の代謝を遺伝学的操作により変化させた個体においてハエ嗅覚記憶の行動解析を行い、記憶形成に与える影響を明らかにする。具体的には、ハエのインスリン産生細胞に細胞死誘導因子を発現し、生体内のインスリンシグナル系を一過的に低下させる

方法を確立する。ハエの嗅覚記憶は、時間軸に分けて短期記憶、中期記憶、長期記憶と大別され、徐々に安定化されていく。生体内のインスリン系の変化等による代謝機能の変化が、これらのどのステップに影響するかを行動解析により明らかにする。

2) 記憶の維持に必要なインスリンシグナル分子基盤の検討：

インスリン関連因子やインスリン受容体の下流シグナル因子(インスリン受容体基質、PI3K、Akt等)をノックダウンさせた個体を作製する。これらの個体を用いて記憶を測定し、記憶の維持に必要なインスリンシグナル分子基盤を明らかにする

3) 記憶の維持に関与するインスリンシグナル応答組織の検討：

時期特異的に遺伝子を発現させることが可能なgene-switchシステムを用いて、神経系、グリア、脂肪細胞を含めた様々な組織でインスリン受容体機能欠損型を発現、もしくはインスリン受容体をノックダウンさせた個体を作製する。これらの個体を用いて記憶を測定し、どの組織のインスリンシグナルが記憶の維持に必要なものであるかを同定する。

4) 老齢個体における代謝システムを改変する方法の探索：

老齢個体における代謝機能の低下を改変させる方法として、摂食制限とハエインスリン産生細胞で*diIps*の発現を一過的に上昇させることを計画する。これらの方法に関して、以下の代謝ネットワークに関与する因子や遺伝子発現を調べ、老齢個体における代謝機能の低下が改善しているかを確認する。

A. 代謝ネットワークに関与する因子

1. 体液中グルコース量、2. グルコーストレランス、3. 摂食量、4. 体重、5. 寿命

B. 代謝ネットワークに関与する遺伝子発現

1. インスリン様ペプチド遺伝子、2. インスリン様受容体、3. インスリン様ペプチド結合タンパク質コード遺伝子、4. インスリン分泌促進因子コード遺伝子

5) 加齢に伴う代謝恒常性の変化が記憶機能の低下に与える影響の解析：

加齢にともなう代謝機能の変化を遺伝学的操作により改変し、老齢個体における記憶低下に与える影響を、ハエ嗅覚記憶の行動解析により明らかにする。

6) 代謝恒常性の変化が影響する分子ネットワークの同定：

生体内の代謝変化によって、脳内あるいは特定の神経細胞群の遺伝子プロファイリングが変化している可能性を考え、発現変化する分子ネットワークをRNA-seqを用いたトランスクリプトーム解析により同定する。同定した分子ネットワークの発現量を改変させた老齢個体において、嗅覚記憶を行動解析により測定する。

<得られた研究成果>

1) インスリンシグナルは中期記憶に必要である：

ヒトのインスリンは膵臓のランゲルハンス島β細胞から放出されるのに対し、ショウジョウバエでは脳に存在するインスリン産生細胞 (IPC) からインスリン様ペプチド (Dilp) が分泌される。

まず、IPCから分泌されるDilpが記憶の形成に必要であるか確かめるため、IPC機能を欠損させた個体における記憶の測定を試みた。IISは発生や成長を含む様々な時期や組織において重要な役割を果たすため、薬剤依存的に発現を調節できるGene Switch (GS) システムを用いてIPC機能を一過的に欠損させた個体を作製した。それらの個体を用いて嗅覚記憶を測定したところ、IPC機能欠損させた群でのみ中期記憶の低下が見られた(図1A, 1B)。一方で、短期記憶の変化は見られなかった。このことより、IPCの機能は中期記憶に必要であることが明らかとなった。

老化に伴う記憶低下は様々なモデル動物において観察されるが、ショウジョウバエ嗅覚記憶では中期記憶が低下することが知られている。そこで、老化に伴う中期記憶低下の原因の一つとして老化に伴うIPC機能欠損の可能性を考えた。老齢個体において同様の手法を用いてIPC機能を一過的に欠損させたところ、中期記憶のさらなる低下は見られなかった(図1A, 1B)。これらのことより、老化に伴うIPC機能の欠損が中期記憶の低下を引き起している可能性が示唆された。

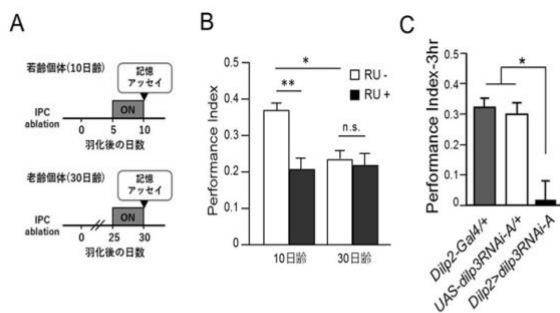


図1: インスリンシグナルは中期記憶に必要である
 A. 若齢個体(10日齢)と、老齢個体(30日齢)それぞれにおける、インスリン産生細胞(IPC)細胞死誘導と記憶アッセイのタイムコース。
 B. 若齢個体のIPCにおいて細胞死誘導される群(RU+)の3時間記憶のスコア(PI)は、コントロール群(RU-)に対し有意に低下した。10日齢に比べて30日齢では中期記憶のPIが低下するが、IPCでの細胞死誘導は30日齢における中期記憶PIに影響しない。
 C. IPCで*dilp3*をノックダウンしたハエ(*Dilp2>dilp3RNAi-A*)における中期記憶(黒)はコントロール群(白、グレー)に対して顕著に低下した。

2) ハエにおいてインスリンシグナルを制御する因子の一つ *Drosophila Insulin-like peptide3* (Dilp3) が記憶の維持に必要である:

IPCに発現するDilp2、3、5のうち中期記憶に必要なDilpを同定するために、それぞれのDilpをIPCでノックダウンさせた個体を作製し記憶を測定した。IPC特異的にDilp3をノックダウンした個体では中期記憶の有意な低下が見られたが、Dilp2やDilp5のノックダウン個体では記憶への影響は見られなかった(図1C)。このことより、IPCに発現するDilp3が中期記憶の形成に必要であることが示唆された。

3) 中期記憶の形成に脂肪組織のインスリン受容体が必要である:

ショウジョウバエのDilpは8種類知られているが、インスリン受容体(InR)は1種類のみ同定されており、神経細胞、グリア細胞、脂肪細胞を含む様々な組織に発現している。どの組織におけるInRの発現が中期記憶に必要であるかを明らかにするために、様々な組織特異的にInRドミナントネガティブを一過的に発現させた個体を作製し中期記憶を測定した。その結果、脂肪細胞特異的にInRドミナントネガティブを一過的に発現させた個体において、短期記憶は変化しないが中期記憶が有意に低下することが明らかとなった。一方で、神経細胞やグリア細胞特異的にInRドミナントネガティブを一過的に発現させた個体では、中期記憶の顕著な変化は見られなかった。このことより、脂肪組織におけるインスリン受容体の発現が中期記憶の形成に必要である

ことが示唆された。さらに、脂肪組織においてインスリンシグナルの下流であるPI3Kをノックダウンさせた個体において記憶が低下したことから、脂肪組織におけるインスリンシグナルの活性化が記憶の維持に必要であることが示唆された。

4) *dilp3*の発現は加齢に伴い低下する:

老化に伴うIPCにおける*dilp*の転写調節の影響を明らかにするために、野生型ハエの若齢・老齢個体における*dilp2*、*dilp3*、*dilp5*、*insulin receptor (inR)*の発現量を定量PCRにより検討した。その結果、*dilp2*、*dilp5*、*inR*の発現は老化により変化がみられなかったが、*dilp3*の発現は老齢個体で低下が見られた。また、IPCにおけるDilp2、Dilp3の発現を免疫染色により確認したところ、Dilp3のみの発現低下がみられた。これらのことより、*dilp3*の発現は転写、タンパク質レベル両方で、加齢に伴い低下することが明らかとなった。

5) Dilp3の一過的な強制発現は中期記憶を増強する:

これまでの結果より、IPCにおけるDilp3の発現が中期記憶に必要であること、*dilp3*の発現は老化に伴い低下することが明らかとなった。そこで、老齢個体における中期記憶の低下が*dilp3*の強制発現により向上する可能性を検討した。老齢個体のIPCに*dilp3*を一過的に発現させ中期記憶を測定したところ、*dilp3*過剰発現群において中期記憶の有意な上昇が見られた(図2)。

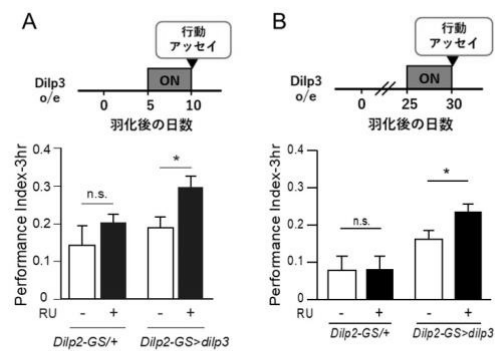


図2: Dilp3の一過的な強制発現は中期記憶を増強する
 A. 10日齢の*Dilp2-GeneSwitch/UAS-dilp3*においてIPCで*dilp3*が誘導される群(RU+)の3時間記憶のPIは、コントロール群(RU-)に対して有意に増加する(* $p < 0.05$, $n = 8$)。Dilp2-GeneSwitch/+においてはRU+とRU-に有意差はない。グラフの上図は10日齢のハエにおける、RU488投与と記憶アッセイのタイムコース。
 B. 30日齢の*Dilp2-GeneSwitch/UAS-dilp3*においてIPCで*dilp3*が誘導される群(RU+)の3時間記憶のPIは、コントロール群(RU-)に対して有意に増加する(* $p < 0.05$, $n = 11$)。Dilp2-GeneSwitch/+においてはRU+とRU-に有意差はない。グラフの上図は30日齢のハエにおける、RU488投与と記憶アッセイのタイムコース。用いたハエ: *Dilp2-GeneSwitch/+*, *Dilp2-GeneSwitch/UAS-dilp3*

本研究では、様々な時期・組織で機能するIISを遺伝学的に一過的に改変させることで、IISの記憶への特異的な影響を検討した。これらの結果より、IPCからのDilp3分泌や脂肪細胞におけるIISを介して中期記憶が調節されること、IISの調節異常が老化による記憶低下に寄与していることが示唆された(図3) (Tanabe et al., *Cell Reports*, 2017)。

6) 加齢性記憶障害に関与する遺伝子群を同定:

RNAseq解析により、加齢に伴い脳内で発現量が変化する遺伝子プロファイリングを得てきた。一方で、記憶形成に関与する網羅的遺伝学的スクリーニングにより、記憶ポジティブ制御因子546遺伝子、記憶ネガティブ制御因子42遺伝子が同定されている(Walkinshaw et al., 2015)。これらのリストを比較解析し、「遺伝子群A」加齢に伴い脳内で発現量が上昇することによって、記憶低下の原因となる可能性のある責任候補遺伝子群を4遺伝子、「遺伝子群B」加齢に伴い脳内で発現量が低下することによって記憶低下の原因となる可能性のある責任候補遺伝子群53遺伝子を同定した。これらの遺伝子群について、時期・場所特異的

に遺伝子を発現させることが可能な Gal4-UAS 遺伝子発現系である“gene-switch システム” (Roman et al., *PNAS*, 2001) を用いて神経細胞で発現量を変化させ、老齢個体における記憶低下が抑制もしくは増悪するか検討した。これまでに、NO の受容体である可溶性グアニルシクラーゼ (sGC) のサブユニットについて、i) 神経細胞でノックダウンすると記憶が向上すること、ii) NO-sGC 経路を薬理的に抑制すると、老齢個体の記憶低下が改善することを明らかにした (未発表)。

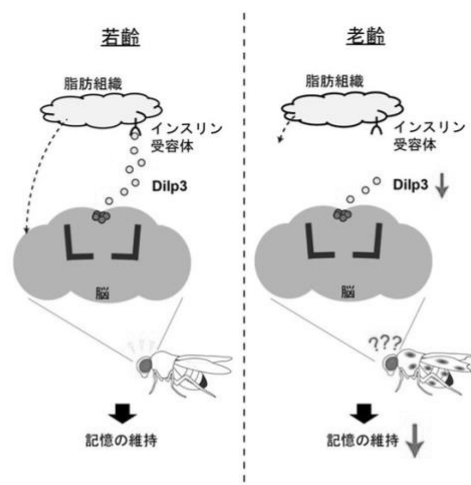


図3：老化に伴う記憶低下と記憶の維持に関するインスリンシグナルの概念図
インスリン産生細胞からのインスリン様ペプチド3 (Dilp3) の分泌や脂肪細胞におけるIISによって記憶の維持が調節されている。またDilp3の発現は老化にともなって特異的に低下することから、IISの加齢に伴う変化が記憶低下の一因であることが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究では、様々な時期・組織で機能する IIS を遺伝学的に一過的に改変させることで、IPC からの Dilp3 分泌や脂肪細胞における IIS を介して中期記憶が調節されること、IIS の調節異常が老化による記憶低下に寄与していることが示唆された。IIS は脳神経系の発生や生体内代謝機能に密接に関与することから、IIS が記憶系を直接制御しているのか、発生や代謝を介して関与しているのかが曖昧であった。しかし、本研究における IIS の遺伝学的な一過的な改変個体における記憶アッセイにより、IIS が記憶系を直接制御していることが示された。これらの結果に関する論文は、*Cell Reports* に掲載された (Tanabe et al., *Cell Reports*, 2017)。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

生体内の代謝変化による脳内の分子ネットワークへの影響を明らかにするために、脳内もしくは特定の神経細胞群の遺伝子プロファイリングを同定することを計画していた。当初、i) 若齢個体、ii) 老齢個体、iii) 代謝を変化させた若齢個体、iv) 代謝を変化させた老齢個体における a) 脳全体、b) 記憶固定を担う DPM 神経細胞、c) 記憶保持を担うキノコ体神経細胞をそれぞれ回収し、次世代シーケンサー (RNA-seq) により遺伝子プロファイリングを比較することを研究計画としていた。脳全体の遺伝子プロファイリングを解析するだけでなく、単一神経細胞群を回収し RNA-seq 解析を行うことで、代謝変化により影響を受ける遺伝子プロファイリングを神経細胞間で比較解析し、代謝が制御する脳神経系の分子ネットワークを明らかにできると考えた。

我々は、GFP 発現ハエシステムを用いて特定の神経細胞をラベルして、GFP ラベルされた神経細胞を解離・単離したのちに、RNA を抽出する検討を行った。しかし、RNA-seq 解析に十分な質と量のサンプルを得ることが未だ難しく、方法を検討している状況にある。

<今後の課題、展望>

本研究は、脂肪細胞における IIS が中期記憶の維持に関与していることを初めて明らかにした。しかし、脂肪細胞におけるどのようなシグナルを介して脳に作用し、記憶の維持に関与しているかは明らかではない。また、老齢個体において特異的なインスリンペプチドの発現量が低下することを示したが、どのようなメカニズムで発現変化が生じるのかは不明である。このように、脳と他組織との関連メカニズムや老化における脳内の分子ネットワークの変化の解明は、今後の研究課題である。

本研究成果は、IIS の加齢性記憶障害への関与を示唆するだけでなく、IIS の人為的な操作により加齢性記憶障害を改善できる可能性も示唆した。インスリンシグナルは種間で保存されている経路であるが、本研究で明らかにした Dilp3 や脂肪組織の関与が哺乳類では何に対応するのかは定かではない。今後、共同研究などを通して保存性の検討を進めたい。

加齢性記憶障害に関与する遺伝子群を同定においては、加齢による嗅覚記憶の低下を制御する因子として NO-sGC 経路を実際に同定することができた。NO-sGC 経路は哺乳類でも保存されており、ヒト加齢性記憶障害を制御する候補遺伝子となり得る。またこれまでに、ハエ嗅覚記憶形成の変異体で同定された遺伝子は、ヒトを含む哺乳類でも機能的に重要であり、ヒトの記憶障害の原因解明につながった例は多い。これら加齢に伴う記憶低下の責任遺伝子群について、将来的にヒトを含む哺乳類でもその保存性を検討し、ヒトの加齢性の記憶障害に対する新薬開発の候補を挙げるなど新たな治療方法へつながる基盤を提供していく。また老化に伴う記憶低下の解析を進めることで、記憶形成に関与する神経基盤の解明や神経変性疾患の晩発性発症の解明にも貢献すると考える。さらには、加齢性記憶障害の生体内マーカーとしての有用性に繋がることを期待される。

匂い学習記憶を支える嗅覚系の多領域ネットワーク機能の解析

研究代表者：山口 正洋

高知大学医学部

<研究の目的と進め方>

嗅覚系は、食べ物の探索・摂取、捕食者からの逃避など、動物の根源的な行動を支えており、日々変わる匂い環境に対して適切な行動をとるために、嗅覚系の学習記憶は極めて重要である。近年、嗅覚学習記憶に伴って嗅球投射ニューロンの活動性がダイナミックに変化することが判明し、嗅覚学習記憶がすでに嗅覚一次中枢の嗅球神経回路の可塑的变化によって担われていることが明らかとなってきた。また、その上位中枢である嗅皮質の可塑的变化も嗅覚学習記憶に重要な役割を担っているはずである。しかしこれらの神経回路機構は全く不明である。

研究代表者はこれまで、成体においても常に新生している嗅球介入ニューロンである顆粒細胞の生死選別機構の解明に取り組み、新生顆粒細胞の選別が覚醒時の嗅覚経験とその後の睡眠という覚醒・睡眠サイクルに基づいて行われることを明らかにしてきた。さらに、睡眠中の嗅皮質から嗅球への top-down 性シナプス入力、新生 GC 選別を促進するシグナルであることを見出してきた。

以上のことから、匂いの学習記憶を支える嗅覚神経回路の可塑性は、複数の脳領域間の情報のやりとりに基づいて行われていると考えられた。また、嗅覚行動は情動を動かすことによって発揮されていることから、脳領域間の相互作用を理解するためには情動行動に関わる嗅覚領域を明らかにすることが重要と考えられた。本研究は以上をふまえ、嗅覚学習記憶の形成機構を、嗅球・嗅皮質の領域間相互作用、多領域ネットワーク機能の観点から検討した。具体的には、①覚醒・睡眠サイクルに基づく嗅球嗅皮質間相互作用 ②嗅球の新生ニューロンの生死選別におけるシナプス入力統合機構 ③嗅覚情動行動に関わる嗅皮質の機能領域の同定とその学習記憶における役割 を主な切り口として進めた。

<研究計画>

1) 嗅覚学習記憶の実験系の確立

匂い提示装置と、自由行動マウスに行動学習を行わせるオペラントチャンバーを組み合わせた実験システムを構築し、マウスに嗅覚学習記憶行動を行わせる。日をまたいだセッションの繰り返し（覚醒・睡眠サイクルの繰り返し）によって嗅覚学習が進み、安定的な学習記憶が獲得されるように嗅覚タスクの条件・難易度を設定する。

2) 嗅皮質機能領域の同定

嗅皮質には様々な亜領域があり、解剖学的な性質に関する知見は多いが機能的な理解はほとんど進んでいない。嗅覚行動は情動に基づく行動であり、匂いの情動行動を司る嗅皮質の機能領域をニューロン活性化のマーカー分子の発現を指標に同定する。

3) 覚醒・睡眠サイクルに基づく嗅覚学習記憶形成過程と嗅球神経回路機能の可塑的变化の解析

嗅覚学習の前後で嗅球および嗅皮質の局所電場電位(LFP)を記録し、覚醒時嗅覚行動中の LFP が学習に伴ってどのように変化

するかを明らかにする。

4) 嗅覚学習記憶の形成における嗅皮質神経活動の役割の解析

覚醒時嗅覚タスクに引き続いておこる(典型的にはタスク後の睡眠中におこる) 嗅皮質から嗅球に入力する top-down シナプス入力、嗅覚学習記憶の形成に果たす役割と、嗅球新生ニューロンの生死選別に果たす役割を、薬剤投与や薬理遺伝学を用いた嗅皮質神経活動抑制によって検討する。

5) 嗅覚学習記憶の形成における情動の役割の解析

情動行動に関わる嗅皮質領域が嗅覚学習記憶に果たす役割を、薬剤投与や薬理遺伝学を用いた神経活動操作抑制によって検討する。

<得られた研究成果>

1) 嗅覚学習記憶の実験系の確立

・報酬に基づく誘引行動について

匂いポートと水(報酬)ポートを組み合わせたオペラントチャンバーを作成し、特定の匂いを供給されると水がもらえる匂い-報酬連合学習の実験系を構築できた。この学習は数日間の繰り返しトレーニングによって成立した。

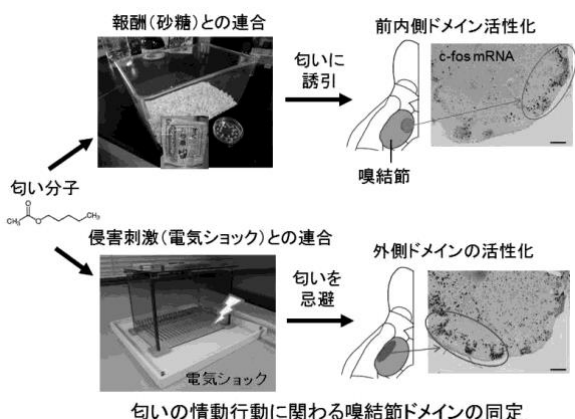
・侵害刺激に基づく忌避行動について

電気ショックチャンバーを用いて匂い刺激と足底への電気ショック(侵害刺激)を組み合わせ、特定の匂いに対して忌避する匂い-侵害刺激連合学習の実験系を構築できた。この学習は数日間の繰り返しトレーニングによってより強固に成立した。

2) 嗅皮質機能領域の同定

上記の匂いに基づく誘引行動・忌避行動の学習系を用いて、匂いの情動行動の際に活性化される嗅皮質領域を最初期遺伝子 c-fos mRNA の発現によって調べ、嗅皮質の一領域である「嗅結節」において、匂いの情動行動に関わる機能ドメインを見出した(下図)。

匂いと報酬(水あるいは餌)の連合学習によって、その匂いに対

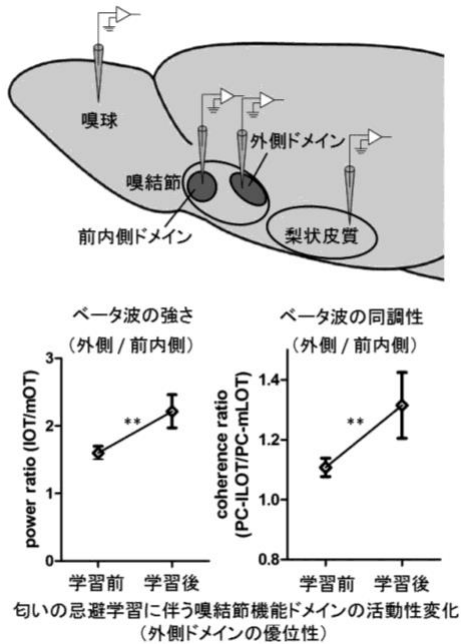


して誘引行動をとる際には嗅結節の「前内側ドメイン」が活性化し、侵害刺激（電気ショック）との連合学習によってその匂いに対して忌避行動をとる際には嗅結節の「外側ドメイン」が活性化することを明らかにした（Murata et al, 2015）。この活性化パターンは匂いの種類にはよらず、誘引・忌避行動という行動様式に対応して生じていることから、嗅結節には匂いの情動行動の機能ドメインが存在することを明らかにした。

3) 覚醒・睡眠サイクルに基づく嗅覚学習記憶形成過程と嗅球神経回路機能の可塑的変化の解析

学習が比較的短期間に効率よく成立する忌避行動学習を用いて、学習前後の嗅覚神経回路の機能的変化を検討した。嗅球、梨状皮質（嗅皮質のなかで最も広い領域）、嗅結節前内側ドメイン、嗅結節外側ドメインの4か所に電極を留置し、匂い提示中のLFPを記録した。異なる周波数帯の変化を解析したところ、低周波数帯のベータ波に最も顕著な変化が観察された。具体的には、①学習前に比べて忌避行動学習後はベータ波の強さ(power)が、記録した4領域すべてで増強した。②嗅結節前内側ドメイン、外側ドメインを比較すると、学習後は外側ドメインにおける強さの増強がより優位であった。③ベータ波の領域間の同調性(coherence)が、学習後に増強した。④梨状皮質—嗅結節前内側ドメイン間の同調性と、梨状皮質—嗅結節外側ドメイン間の同調性を比較したところ、学習後は梨状皮質—嗅結節外側ドメイン間の同調性の増強がより優位であった（下図）。

以上の結果は、匂いの忌避学習によって嗅結節外側ドメインの活動が優位に高まり、このドメインと他の嗅皮質領域との情報のやり取りが優位に活性化していることを示した。



4) 嗅覚学習記憶の形成における嗅皮質神経活動の役割の解析

どのような行動に伴って嗅球の新生顆粒細胞の生死選別が促進するかを検討するため、電気ショックによる恐怖誘導に伴う生死選別を検討したところ、恐怖誘導直後に新生顆粒細胞の生死選別が著しく促進すること、またこの現象が嗅皮質の神経活動依存的に起こることを明らかにした(Komano-Inoue et al, 2015)。このことから、嗅球の新生顆粒細胞の生死選別が、摂食後の睡眠時や、恐怖誘導直後に促進すること、またどちらにおいても嗅皮質からのtop-down入力によって促進されることを明らかにした。

・嗅皮質の神経活動を適切な時期に操作するため、嗅皮質の代表

的領域である梨状皮質にCre recombinaseを発現する遺伝子改変マウス(Ntsr1-Cre マウス)を米国動物会社より入手した。外来性リガンド(CNO)によって神経活動を抑制するG蛋白共役変異型受容体(hM4DGi)をCre依存的に発現するアデノ随伴ウイルスの局所注入によって、梨状皮質ニューロンの神経活動を人為的に抑制できる実験系を確立した。睡眠中の梨状皮質で見られるLFP上のsharp waveが、CNOの腹腔内投与によって抑制されることを確認した。

5) 嗅覚学習記憶の形成における情動の役割の解析

嗅結節にはドーパミン1型受容体、2型受容体を発現するD1細胞とD2細胞があり、匂いの情動行動時には主にD1細胞が活性化することを明らかにした(Murata et al, 2015)。D1細胞の機能操作を行うため、D1細胞にCre recombinaseを発現する遺伝子改変マウス(D1-Cre マウス)を入手し、上記のアデノ随伴ウイルスによって機能抑制できる実験系を確立した。

<国内外での成果の位置づけ>

研究代表者は嗅覚神経回路の可塑性機構を長年研究し、嗅球新生ニューロンの生死選別が嗅皮質からのシナプス入力によって促進されることを見出し、学習記憶に関わる神経可塑性における脳領域間相互作用の重要性を提唱してきた。本研究期間中に匂いの情動行動を司る嗅結節ドメインの存在を明らかにし、この知見を新たに組み込んで研究を推進してきた。本研究は研究代表者自身の発見に基づいて立案し進めたものであり、非常に高い独創性を有し国内外に同様の研究成果を報告したグループは未だ見当たらない。

脳機能は特定の領域だけで発揮されるのではなく複数の領域の相互作用によって成り立っており、近年この重要性が認識され多くの研究が進行している。嗅覚系は感覚系の一つであるため、末梢からの感覚入力という情報の流れが明確であるという利点がある。更にこれとは逆のtop-down性入力に着目することで、双方向の情報の流れの機能的意義を理解できる優れたモデル系と考えられる。本研究はこの点で高い普遍性と発展性を有するものである。

また嗅結節ドメインの発見は、匂いの誘引行動と忌避行動を制御する領域が空間的に分かれて存在することを見出した点で大きな価値がある。本研究ではこの点を生かして2つのドメインの活動性を比較し、学習記憶に基づくドメイン活動の優位性獲得を明らかにした。脳領域間の相互作用の理解を深める上で機能が明確な脳領域に着目することは重要である。この点においても本研究は大きな発展性を有している。嗅結節はこれまであまり注目されてこなかった脳領域だが、匂いを情動行動に結びつける領域として近年国外において論文報告が増えてきている。しかし、嗅結節の機能的ドメインに基づいた論文は研究代表者を除いて殆ど見当たらない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究では、項目4) 嗅覚学習記憶の形成における嗅皮質神経活動の役割 5) 嗅覚学習記憶の形成における情動の役割 について、特定のニューロンの特定の行動様式中における活動性の機能的意義を薬理遺伝学的手法を用いて詳細に明らかにするまでには至らなかった。

研究期間中に研究代表者が異動したため、研究グループの変更や新たな研究室立ち上げに時間と労力を費やす必要が生じたことが、上記の遅れに繋がったと考えている。ただし当初の研究目的や方向性を大きく変える必要が出てきた訳ではなく、解析のための実験系を確立することができたため、現在本研究計

画に沿って機能的意義の検討を進めている。

<今後の課題、展望>

今後、嗅覚系の領域ごと、領域間の神経活動の性質と機能的意義を、マウスの行動様式（嗅覚タスク中、その後の睡眠中、恐怖誘導直後など）に対応づけて理解していく必要がある。そのために、本研究で確立した匂いの誘引行動学習、忌避行動学習の系を生かし、2つの行動学習における共通点、相違点に着目して理解を進めていくことが重要と思われる。この点で、嗅結節ドメインの同定は大きな足掛かりとなり、この領域との相互作用という観点から嗅球や梨状皮質など他の嗅覚領域の可塑性機構を理解していくことができると考えている。嗅覚神経回路を題材として、感覚入力を情動行動に結びつける学習記憶の神経回路機構の理解を深めていきたい。

第1期：Dual FRET 技術を用いた長期神経可塑性機構の解読

第2期：CREB-Arc シグナル活性化による長期記憶制御機構の解明

研究代表者：尾藤 晴彦

東京大学・大学院医学系研究科

<研究の目的と進め方>

第1期：神経伝達物質受容に引き続くシナプス電位の変化は、神経細胞内で電氣的シグナルとカルシウム流入などを引き金とする化学的シグナルの両者を生成する。カルシウムシグナルは、シナプス可塑性を引き起こす原動力となるのみならず、シナプスから核へのシグナリングの引き金となることを我々はこれまで明らかにしてきた。しかし、1) 樹状突起の一部分のみが刺激された時に、どのように核へシグナルは到達するのか、2) このような場合、リン酸化カスケード活性化は核内で起こるのか、核外で起こるのか、という点については、技術的な限界から、ほとんど研究が進んでいない。樹状突起から核へ伝わるシグナリングの謎を解明するため、本研究ではCREBリン酸化のFRETリポーターを作成し、CaMKK-CaMKIVとの同時可視化などを、最近我々が開発したdFOMA(dual FRET with Optical Manipulation)法を用いて定量的イメージングを行う。これらの結果を基に、長期記憶の素過程の一つであるCREBリン酸化の時空間的ダイナミクスの分子基盤を解明し、cellular consolidationの重要メカニズムを解き明かす。

第2期：統合失調症患者の大規模ゲノム解析により、ポストシナプスにおけるArcシグナリング複合体の破綻が、疾患病態と強く相関する可能性がごく最近示唆されている(Fromer et al. Nature 2014; Purcell et al. Nature 2014)。従って、Arcシグナリング(Okuno et al. Cell 2012)を解明することは、認知・記憶の分子基盤を理解する上で、喫緊の課題の一つである。本研究では「ニューロンCa²⁺>CREB>Arcシグナル>長期記憶制御」という長期記憶制御にとって不可欠なパスウェイを取り上げ、1) Arc-KOマウス、ならびに2) 多色Ca²⁺計測技術を駆使して、CREB-Arcシグナリングによる長期記憶の回路ダイナミクス制御機構の全貌を明らかにする。

<研究計画>

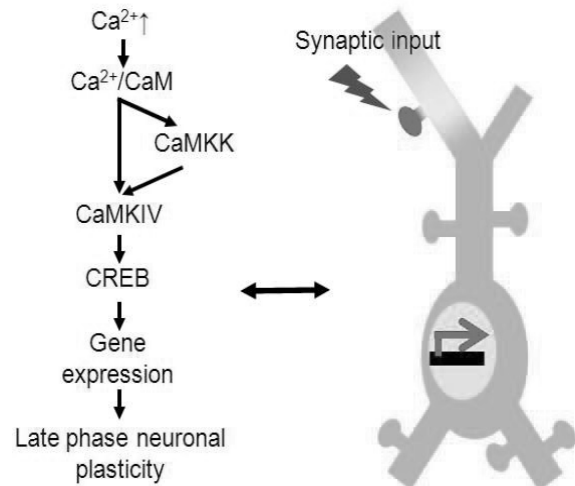
第1期：

- 1) カルシウムシグナルは、シナプス可塑性を引き起こす原動力となるのみならず、シナプスから核へのシグナリングの引き金となることを我々はこれまで明らかにしてきた。しかし、シナプスから核へのシグナリングの全貌は明らかにされていない。そこで、リン酸化CREBを可視化するFRETセンサー分子の構築を試みる。さらに同時にカルシウムも同時に可視化するFRETセンサー分子の設計・改良を実施する。
- 2) 樹状突起の活性化後のシナプスから核へのシグナル伝達機構を明らかにする。
- 3) 特に上記を規定する重要なリン酸化・脱リン酸化イベントを同定し、その意義を検証する。

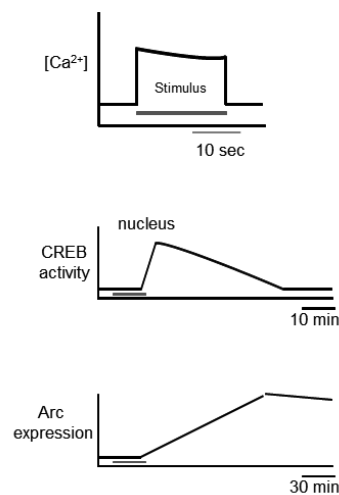
第2期：

第1期では、特に恐怖記憶形成過程に着目し、Arc誘導を引き起こすCREB活性化経路の特異性を探索した。その結果、恐怖条件付けにて、扁桃体Arc誘導はCRTC1というCREB coactivator

の核内移行を不可欠とすることを明らかにした(Nonaka et al.



Neuron 2014)。また、この過程で、in vivoのシナプス活動を可視化可能な赤色Ca²⁺インディケーター-R-CaMP2を開発した(Inoue et al. Nat Met 2015)。



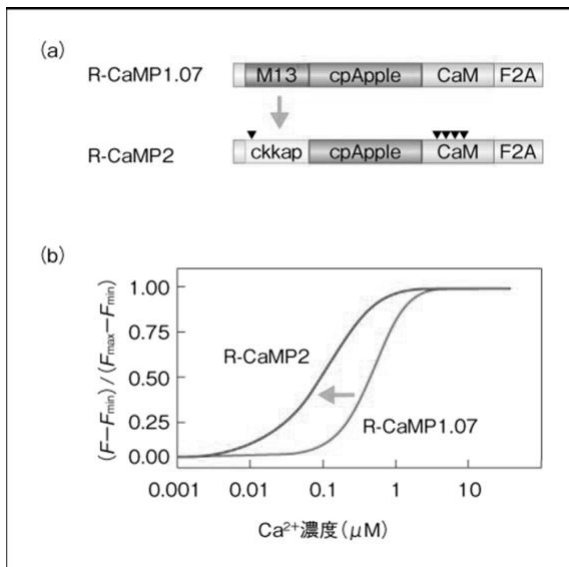
そこで、本研究では、以下の2点に焦点を絞り、解明を試みる。1) CREB下流のArc誘導の意義探索に焦点を絞り、具体的には、「ポストシナプスNMDA受容体=>Ca²⁺流入=>CaMK活性化=>CREBリン酸化=>Arc転写誘導=>Arc産物のポストシナプスターゲティング」のCREBシグナリングの情報フローを生きたマウス個体脳で解明し、その破綻がどのような記憶異常をもたらすかを明

らかにする。

2) 活性化エングラムのライブイメージング可能にするE-SARE技術を、in vivo多色Ca²⁺センサーイメージング技術と組み合わせた技術の開発を試みる。これにより、CREBが活性化された興奮性・抑制性神経細胞集団が織りなす広範な可塑的神経活動をライブイメージングする基盤技術の創成を試みる。この過程で得られた技術を用い、CREB-Arc活性化が引き起こす広範な神経ネットワークダイナミクスの時空間的特性を解明し、長期記憶に対する役割を解明する。

<得られた研究成果>

1) 新規赤色Ca²⁺センサー樹立に伴う神経回路多重化計測・操作法の確立



過去に作出されたリン酸化CREB応答性プローブの構造特性に立脚し、FRET計測に適したgenetically encoded probeを設計し、よりFRET効率の高い変異体作成を試みた。さらにDual FRET技術を実践するために、赤色acceptorを有するカルシウムFRETプローブを作出した。その過程で、線形性が高く、高速性能を有した新規カルシウムセンサーの設計原理が明らかとなった。これを応用して、FRET プローブと同時可視化可能な、赤色高速GECI、R-CaMP2の設計に成功した (Inoue et al. Nature Met 2015)。

その有用性をin vitro, in vivoで実証した結果、R-CaMP2を用いた、in vivo 樹状突起イメージングにおいて、特に有効であることを見出した。

生きた動物の個体における神経活動およびシナプス活動をモニターすることの可能な赤色Ca²⁺センサーを開発したことより、従来の蛍光Ca²⁺センサーのみでは不可能であった2つの異なる種のニューロンにおける神経活動の同時計測が可能かどうか検証した。アデノ随伴ウイルスを用いて、ソマトスタチン陽性の抑制性ニューロンにR-CaMP2を、それと同時に、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII陽性の興奮性ニューロンに緑色Ca²⁺センサーを発現させた。その結果、in vivoにおいてソマトスタチン陽性の抑制性ニューロンとCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII陽性の興奮性ニューロンの神経活動の同時イメージングに成功した。また、これまで電気生理学的手法により見いだされていた知見と一致して、抑制性ニューロンどうしには活動パターンに強い同期性が示されたのに対し、近接している興奮性ニューロンどうしでは活動パターンの同期性に大きなばらつきがあることが示された。このことより、2色の蛍光Ca²⁺センサーを用いた同時イメージングにより、はじめて2つの種の異なるニューロンのあいだの関係を明らかにできることが示された。

光のみによる行動の制御および神経活動の計測が可能であるかどうか検証するため、自由行動している線虫においてイメージングを試みた。GABA作動性抑制性運動ニューロンにチャンネルロドプシンおよび緑色Ca²⁺センサーを発現させ、一方、その投射先である体壁筋にR-CaMP2を発現させて、それぞれの神経活動を同時に計測した。光の照射により、GABA作動性抑制性運動ニューロンでは活動が上昇する一方、標的である体壁筋の細胞ではCa²⁺濃度の急速な低下とともに弛緩が生じ、それまで動いていた線虫を停止させることに成功した。

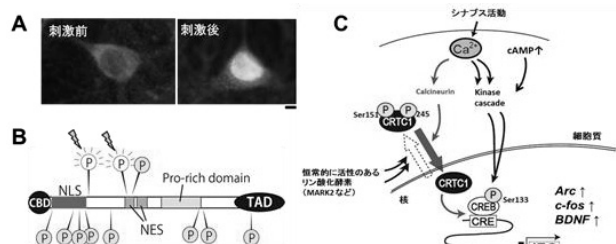
さらに、R-CaMP2イメージングを可能な2色ファイバーフォトメ

トリー技術を構築し、記憶学習・報酬行動などに関与する投射線維の興奮を、同一投射線維内における多数の入力を細胞種別に多色蛍光記録する技術開発を実施した (Kim et al. Nature Met 2016)。

2) カルシニューリン依存のCRTC1核移行による扁桃体特異的恐怖条件付け記憶の制御機構の解明

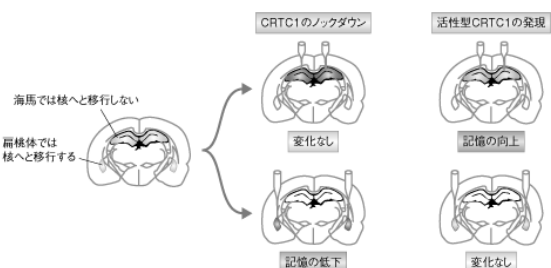
本研究では、活動依存的カルシニューリン活性化がCREB補助活性化因子CRTC1の脱リン酸化による核移行メカニズムを探索した。まず生化学的に、Ser151, Ser 245の2残基の脱リン酸化が必要かつ十分であることを明らかにし、これにより、c-fosやArcなどCREB依存的転写の活性化をもたらすことを明らかにした。また、このCRTC1活性化機構は、in vivoの文脈依存的恐怖条件付け記憶の形成において、海馬CA1では必須ではないが、扁桃体では不可欠であることを見出し、CREB活性化機構が脳部位特異的に選択される初めての事例を発見し、報告した。

CREBはc-fos遺伝子やArc遺伝子といった記憶痕跡マーカー



としても使われている最初期遺伝子群の発現を誘導するが、活性型CRTC1の出現によっても、これら最初期遺伝子の発現が誘導されることを、培養ニューロンおよび個体の脳において示しました。さらに、これら最初期遺伝子の制御領域にCRTC1が結合することをクロマチン免疫沈降アッセイにより、c-fos遺伝子、Arc遺伝子、zif268遺伝子、BDNF遺伝子のプロモーターのCREB結合配列を含む断片が共沈降されることを示した。

CRTC1による最初期遺伝子の発現誘導がCREBのSer133のリン酸化とは独立したシグナル伝達経路による場合、CRTC1を介したCREBの活性化にはどのような意義があるのか？ひとつの可能性は、CRTC1がCREBとは独立した神経活動依存的シグナル伝達経路による制御を受けることができるという点である。つねに核に局在しSer133の1箇所のリン酸化により活性化されるCREBとは対照的に、CRTC1は神経活動休止状態で高度にリン酸化されており、カルシニューリンにより脱リン酸化されて核移行する。CREBのSer133のリン酸化だけでもPKA, ERK, MSK, CaMKIV, CaMKIIなど多くのリン酸化酵素の制御をうけますが、転写補助因子による制御経路を加えることで制御の幅はさらに広がるのかもしれない。もうひとつは、CREBが発現領域によって、いくつかの役割を演じ分けるために、CRTC1などの転写補助因子が手助けしている可能性が考えられる。



そこで、海馬と扁桃体の両方の領域が関わる文脈依存的な恐怖条件づけという長期記憶の学習課題において、両部位におけるCRTC1局在(すなわち活性化状態)を調べた結果、扁桃体では連

合学習に応じた CRTC1 の核移行 (すなわち活性化) が検出できたが、海馬では記憶課題依存的核移行は認められなかった。これらの脳部位で CRTC1 をノックダウンしたところ、扁桃体において CRTC1 を欠くと記憶の低下が認められたが、海馬でのノックダウン操作をしても、記憶に変化はみられなかった。このように、CRTC1 には脳領域に特異的な機能のあることが明らかになった (Nonaka et al. Neuron 2014)。

3) Ca²⁺の下流の新規シグナル可視化分子プローブの設計

Ca²⁺ 流入⇒CaMK 活性化⇒CREB リン酸化のシグナル経路の活性化過程を可視化する分子プローブ設計を行い、実用性のある FRET プローブ等を初代培養神経細胞に遺伝子導入し、その性能検定を実施した (Takemoto-Kimura et al. J. Neurochem. 2017)。

4) CREB-Arcシグナルの生理的意義解析

さらにCREB下流のArc誘導の生理的意義の探索をおこなった。具体的には、長期記憶形成時・遠隔記憶想起時に引き起こされる CREB-Arcシグナル時空間的ダイナミクス情報の一端を明らかにする目的で、CREB-Arc依存的記憶制御がエッセンシャルである時期・部位にて、Arc誘導を検出するリポーターコンストラクトとリポーターマウスの構築を行い、試行的応用を実施した (Rapanelli et al. Transl. Psychiatry 2016; Jenks et al. PNAS 2017; Honjoh et al. Front. Neural Circuits, 2017)。さらに、Arc full-KOマウスの解析を通じ、恐怖記憶の長期層形成の低下を明らかにした。

その上で、記憶形成時・遠隔記憶想起時における興奮性・抑制性神経回路の活動ダイナミクスの操作を目的で、シナプス活動応答性を強化した人工プロモータE-SAREやその変異型を活用し、薬剤誘導型DNA リコンビナーゼを発現させるシステムを構築した。これを用い、記憶形成時期の活性化細胞集団の標識と操作を試みた。

平成29年6月30日付けで平成29年度新学術領域研究(研究領域提案型)「脳情報動態」が採択されたため、本研究は中断・廃止された。

<国内外での成果の位置づけ>

CREB はアメフラシ・ショウジョウバエから哺乳類にいたるまで、様々な種において記憶・学習に関わることが示されており、CREB Ser133 リン酸化による活性化機構、転写補助因子 CBP との結合などの普遍的メカニズムの重要性が示唆されていた。本研究では、CREB の DNA 結合ドメインに結合する CRTC という新規の転写補助因子についても、脱リン酸化依存的核移行の重要性を示し、線虫やショウジョウバエの CRTC 機能との共通性が示された。しかし、本研究では、哺乳類の神経系における CRTC1 による遺伝子発現制御のシグナル伝達は、恐怖条件付け長期記憶形成においては、扁桃体でのみエッセンシャルであり、海馬では不可欠ではないということが明らかになり、その役割の非対称性が実証された。この普遍性と特殊性の同居は大変興味深い。

研究代表者の率いる研究グループは、Arc 遺伝子産物の生理的機能探索を最も先進的に進めていることに加え、最も優れた Arc リポーターコンストラクトを独自に創成して全世界に供給していることなどから、国内外での前初期遺伝子研究のトップを走ってきている。

一方、永らく困難であった、多細胞種の活動電位の同時イメージングと、All-optical interrogation(全光学的検索)の実現が、R-CaMP2 の設計成功によって導き出されたことは、全く予想外で

あり、大きなブレイクスルーとなった。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究では、1) 画期的な CREB 伝達経路解析を実現する分子センサーの確立と、2) これを駆使した新たなシナプスから核へのシグナリング解明を目指した。この目的実現のための手段として、計画当初には、dual FRET 技術の活用を計画の柱としていた。しかし、CRTC1 核移行メカニズムによる長期可塑性・長期記憶の修飾機構を新たに発見したことから、予定を変更し、まず CRTC1 核移行メカニズム探索に焦点を絞ることとした。また、ほぼ同時期に、dual FRET 技術に比べ、cyan-yellow FRET と相補的な赤色カルシウムセンサーの組み合わせの方が、実用性・汎用性があると判明したため、その時点で、赤色カルシウムセンサーR-CaMP2 の開発に全力を注力した。幸いいずれも競争力のある雑誌への掲載と相成ったが、その一方で、CREB リン酸化プローブ等の新規開発は、現在進行中で、より優れたセンサー分子の改良が望まれるところである。

第1期は順調に計画が進行したが、第2期の2年次に入り、別途申請していた平成29年度新学術領域研究(研究領域提案型)「脳情報動態」が採択された。この想定外の事態のため、本研究は中断・廃止せざるを得なかった。本研究の成果の一部は、「脳情報動態」計画研究に一部引き継がれ、より多い成果を今後求めていく所存である。

<今後の課題、展望>

本研究を通じて、CREB-Arc経路活性化を司る上位シグナル伝達経路の活性化機構を、オリジナルな分子プローブ設計により解明していく端緒を築いた。

さらに、Arcそのものの機能探索に資する、いくつかの有効な遺伝子改変マウスラインも樹立できたことも大きな収穫である。今後は、これらブレイクスルーを活用していき、長期記憶形成・貯蔵・想起を制御する、広範な神経ネットワークダイナミクスの時空間的特性の解明に邁進していく所存である。

個体記憶が異性の好みを生み出す神経動作原理の解明

研究代表者：竹内秀明

岡山大学・大学院自然科学研究科（理学部生物学科）

<研究の目的と進め方>

多くの社会性動物において仲間を記憶する能力（個体認知能力）は社会適応に重要な役割を持つ。いくつかの魚類も個体認知能力を持つことが確認されており、順位制を持つシクリッドは集団内のメンバーとその順位を記憶し、上位個体からは逃避し、下位個体に近づく傾向がある（*Nature* 445:429-432, 2007）。またメダカも個体認知能力を持ち、メスとオスのペアをガラス越しに一緒にして、視覚的に親密化させると、メスは「親密な相手」を視覚的に記憶して性的パートナーとして積極的に選択する（*Science* 343:91-94, 2014）。ヒトやサルは他者を見分ける上で視覚情報である顔情報が最も重要である。さらに脳には顔認識に特化した脳領域（顔領域）が存在する（*J Neurosci.* 17:4302-4211, 1997）。この顔領域に障害が起ると、顔を見ても誰の顔か解らず、表情も読みとれない症状（相貌失認）が生じる（*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361:2109-2128, 2006）。また顔が上下逆さになると倒立顔効果が生じる（*J Neurosci.* 35:4268-4279, 2015）。倒立顔効果とは、顔を上下逆にすると表情などの顔の細かい違いを識別することが難しくなる心理学的現象である。倒立顔効果は「サッチャー錯視」としてヒトの心理学分野で有名であるが、他のほ乳類（サル、ヒツジ）においても生じる（*Behav Processes.* 38:19-35, 1996）。しかしながら、魚類の個体記憶の分子神経基盤は全く解明されておらず、社会認知に特化した神経機構を持つのかは不明であった。本研究課題の目的は、メダカを材料にして視覚情報を介した個体記憶の分子神経基盤を解明し、個体記憶が異性の好みを生み出す仕組みを明らかにすることである。本研究ではメダカが個体を記憶する上で顔情報を用いているのかを検証し、ヒトと同様に顔領域があるかどうか推測するために、メダカにおいて倒立顔効果が生じるが検定した。これと併行してメダカメスが親密なオスを性的なパートナーとして選択する適応的意義について考察するために、オス・オス・メスの三者関係において、個体記憶が社会関係に与える影響について解析した。

一方で、メダカメスの配偶者選択において脳全体に投射する巨大ニューロン（GnRH3ニューロン）が中心的な役割を担っている。当該ニューロンの発火リズムが低い状態では、オスを拒絶する傾向があり、特定のオスと親密化すると発火リズムが上昇し、親密なオスを素早く受け入れるようになる（*Science* 343:91-94, 2014）。そのため、GnRH3ニューロンは個体記憶によって活性化し、脳全体の状態を修飾して、異性の好みを生み出していることは推測される。本研究では、GnRH3ニューロンが個体記憶によって活性化するニューロン群を同定する目的で、全脳において持続的な活性化を可視化できる遺伝子改変メダカ系統の確立を行った。

<研究計画>

- 1) メダカの配偶者選択の行動実験系を用いてメスが顔情報でオスを記憶するのかが検定した。
- 2) メスが親密なオスを配偶相手として選択する適応的意義の解明する目的で、三者関係（メス、メス、オス）において、個体記

憶が配偶成功率に与える影響を解析した。

- 3) 全脳において持続的な神経活動の活性化を可視化できる遺伝子改変メダカ系統の確立を試みた。

<得られた研究成果>

- 1) **メダカのメスはオスを顔で見分けている**（研究業績：*eLife* 2017）。

メダカのメスは体のどの部分でオスを識別しているのかを解析した。方法はオスを小型透明容器に入れて体の一部を隠して、メスを視覚的に親密化させる実験を行なった。その結果、頭部を隠した場合、メスは「親密な相手」を見分けられなかったが、尾部を隠した場合は見分けることができた。このことから、メスがオスを認知する際に、頭部の視覚情報が特に重要であることを見出した。さらに正面からの姿だけを見せた場合も相手を見分けることができたため、顔情報が必要であることが示唆された。ヒトの場合、特定のパーツ（目や鼻などの）で相手を識別するのではなく、顔全体の情報を読み取るため、顔にペイントを塗っても相手を識別できる。メダカのオスの顔部にインクを付着させても、メスはオスを見分けることができた。次にメダカに倒立顔効果が生じるか検定した。メダカに倒立顔を見せるために、プリズムを使って左右逆さま、上下逆さまにオスを提示した。その結果、メスは左右逆さまの顔は見分けられたが、上下逆さまは見分けられなかった。

また忌避連合学習によってメダカメスは個体記憶能力を示すことができた。透明小型容器から正面顔だけが見えるオスを用意し、それぞれの両端から1匹のメスに2匹のオスの正面顔を提示した。この状態で片方のオスに近づいた時に電気ショックを与える訓練を繰り返す行くと、メスはそのオスから離れるようになった。記憶成立後に、プリズムを使ってオスを上下逆さまに提示すると、メスはオスを見分けることが困難になった。このことからメダカにおいても倒立顔効果が生じることを強く示唆した。

- 2) **親密なオスを配偶相手として選択する適応的意義の解明**（*PLOS Genetics* 2015, *Frontier in Zoology* 2016）

メダカのメスは親密なオスを積極的にパートナーに選択するメ리트は何だろうか？一夫一妻制を営む動物はパートナーと一緒にいる傾向があるが、メダカはつがいを形成しない。また他の多くの動物は子孫の遺伝的多様性を維持し、近親交配を避けるために「新奇な相手」をパートナーとして選ぶ傾向がある。例えば、グッピーは同じ水槽で育った親密な仲間よりも、別水槽で育った新奇な個体を性的なパートナーとして選ぶ傾向がある（*Anim Behav.* 58,907-916, 1999）。本研究ではメダカの三者関係（オス・オス・メス）におけるオスの行動様式を解析することで、この疑問に対する答えのヒントを見つけた。メダカの三者関係ではオス同士の競争が生じ、優位オスはライバルオスよりもメスから近い位置を維持し、ライバルオスとメスとの間に割り込む行動を頻繁にする（配偶者防衛行動）。さらにメダカのオスはメスが産

卵しない時間帯（午後～夕方）にも配偶者防衛を示した。そこで「オスの配偶者防衛は、メスに自らの存在をアピールして親密化する」という仮説をたてた。この仮説が正しいとするとメスは競争に勝利したオスを個体記憶して、性的パートナーとして選択できるというメリットがあると考えられる。本仮説を検証する目的で、水槽を透明な仕切りで3区画に分け、メス、オス（近いオス）、オス（遠いオス）を各区画に入れて、翌日どちらか一方のオスとメスをペアにして求愛受け入れ時間を評価した。3区画に分けた状態では、「近いオス」は「遠いオス」とメスとの間に割り込む配偶者防衛行動を示す。すると、メスは「遠いオス」を記憶できず、その求愛を受け入れるまでの時間が長かった。一方、配偶者防衛ができない遺伝子変異オスを「近いオス」にした場合は、メスは「遠いオス」を記憶し、その求愛をすぐに受け入れた。このことから配偶者防衛は、メスとライバルオスとの間の位置を持続的にキープすることで、メスにライバルオスを見せず、記憶させない効果があると考えられた。

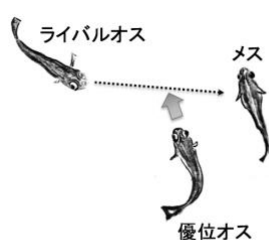


図1 三角関係(オス・オス・メス)におけるメダカのオスの配偶者防衛行動

次に、持続的な配偶者防衛行動は子孫を残す上で重要なのかを検証した。性行動実験前日に、優位オスを翌朝までメスから隔離した。さらに劣位オスとメスを視覚的に親密化した。翌朝、オス、オス、メスの3匹を1つの水槽で一緒にすると、隔離された勝利オスはメスに求愛しても拒絶され続けるが、親密化した劣位オスがメスに求愛するとすぐに受け入れられるという様子が何回か観察された。その結果、隔離をしなかった場合と比較して、優位オスの子供の比率は約20%減少した。以上の結果からメダカの配偶者防衛行動には物理的にライバルを遠ざけるだけでなく、「ライバルオスを記憶できないようにすることで、自らがパートナーとして選ばれる確率を上昇させる」という意義があると考えられる。メダカメスは24時間「親密なオス」と隔離されると求愛を受け入れなくなることから、メスは持続的にそばにいた強いオスをパートナーとして積極的に選択すると想定できる。

これと併行してメダカの配偶者防衛に関与する分子を探索する目的で、薬物投与と実験を行った。その結果、バソトシン受容体阻害剤を投与したオスの割り込み頻度が低下した。次にバソトシンやその受容体を合成できないメダカ変異体を作成した結果、三者関係（ホモ変異体オス、ヘテロ変異体オス、メス）において、ホモ変異体オスの割り込み頻度はヘテロ変異体オスより低く、劣位となる傾向が得られた。よってバソトシンホルモンは配偶者防衛において優位になるために必要であることが示された。また、ホモ変異体オスがヘテロ変異体に勝つことができない原因が、異性に対する性的モチベーションを失ったためか、またはライバルオスに対する競争心を失ったためかを検証した。ホモ変異体オスはヘテロ変異体オスと同程度に、他のオスに対する攻撃行動を正常に示したが、異性に対する求愛頻度はヘテロ変異体オスよりも低く、異性に対する性的モチベーションが低いことが明らかになった。このため、バソトシンは異性に対する性的モチベーションを有するのに必要であり、このモチベーションを失ったことが、バソトシンホモ変異体オスが配偶者防衛でライバルオスに勝てなかった原因になっていると示唆される。

3) 全脳において持続的な神経活動の活性化を可視化できる遺伝子改変メダカ系統の確立

GnRH3 ニューロンによって活性化するニューロン群を同定する目的で、全脳において持続的な活性化を可視化できる遺伝子改変メダカ系統の確立を試みた。本研究では最初期遺伝子 (IEG) のプロモーターを利用して、活性化したニューロンを遺伝学的にラベルする技術をメダカで確立することを目指した。またレポーター遺伝子として DD (薬剤依存的不安定化ドメイン) と mClover3 (緑色蛍光タンパク質) の融合タンパク質が発現するように設計した。DD と融合することで、薬剤 (TMP) 依存にタンパク質の分解速度を制御できるため、長時間の持続的な発火によって蓄積した蛍光タンパク質を検出できることを期待した。IEG は遺伝子の種類によって活性化するニューロンのタイプが異なるため、最初にメダカの脳においててんかん誘導剤により転写誘導される遺伝子をマイクロアレイを用いて検索した。その結果、7種類の IEG を同定した。てんかん誘導剤により最も転写が誘導されたのは *egr-1*, *c-fos* だったため、まずは両遺伝子のプロモーターを利用することにした。*egr-1*, *c-fos* を含む BAC クローンをクローニングして、相同組換えによってベクターにレポーター遺伝子を導入し、*phiC31* インテグラーゼを用いて、メダカゲノムに挿入した。しかしながら神経興奮依存のレポーター遺伝子の転写誘導は確認できなかった。次に遺伝子編集法を用いてレポーター遺伝子を *egr-1*, *c-fos* の遺伝子座にノックインを行った。5'UTR にレポーター遺伝子をノックインした G0 個体は得られたが、F1 個体を得ることができなかったため、ノックインにより致死になってしまった可能性がある。さらに、*egr-1*, *c-fos* の遺伝子座の転写開始部位より上流にミニマムプロモーターによって駆動するレポーター遺伝子をノックインした系統を複数作成した。現在、これらの系統が利用可能か検定している。

<国内外での成果の位置づけ>

(1) メダカの顔認知に関する研究 (研究業績: *eLife* 2017)

ヒトと進化的に遠く離れた魚類で、「倒立顔効果」が見つかったのは本研究が初めてである。顔認知の神経基盤に関する研究はヒトとサルを対象にしたものにほぼ限られており、魚類を対象にした比較生物学的な解析は本研究が初めてである。最近になって他の魚類(シクリッド)も顔で他者を見分けており、「倒立顔効果」が生じることが証明されており (*Anim Cogn.* 2019, in press)、顔認知機構を持つ動物が以前考えられていたよりも広く存在する可能性が考えられる。これからメダカの研究を通して、顔認知の進化的起源の解明へ貢献することが期待される。将来的に、メダカの顔領域の存在が実証できれば、魚類の進化の過程で視覚的な社会認知に特化した脳機能を獲得したことが証明され、動物の認知機能の適応進化に対して新しい見方を与えることができる。また霊長類では分子遺伝学的手法によりその分子神経基盤を解析することが困難である。一方でメダカを研究対象にすることで、脳内で「顔情報」を抽出し、記憶と照合する脳領域ネットワークの情報処理様式を世界に先駆けて分子レベルで解明することが期待できる。

(2) メダカの配偶者防衛に関する研究 (*PLoS Genetics* 2015)

本研究により、メダカを用いることで、動物の三者関係(オス、オス、メス)における配偶者防衛の分子機構の一旦が初めて明らかになった。哺乳類においてバソトシンと同等の機能を持つホルモンとしてバソプレッシンが同定されている。一夫一妻制を営むハタネズミ(プレーリー・ボール)の研究から、哺乳類バソプレッシンはペアーの絆を強める働きを持つことがわかっているが、三者関係における役割は分かっていなかった (*Nature* 365, 545-548, 1993)。実験室での観察の容易なメダカを用いて行動実験系

を確立したことによって、これから分子神経機構の解明が期待される。今後、バソトシンが機能するメダカの神経回路を解明し、メダカと哺乳類の間の共通点を探索することで、嫉妬心や執着心などヒトの三角関係において誘起される感情の神経基盤がメダカの基礎研究からわかるかもしれない。

(3) メダカの個体記憶を介した配偶者戦略 (*Frontier in Zoology* 2016)

本研究により、メダカのオスは持続的に配偶者防衛行動を示すことにより、メスがライバルオスを見ることを妨害し、自らを親密化させていることが示唆された。これまでの研究では、配偶者防衛は「ライバルオスとメスとの物理的な接触を防ぐ」という意義があると信じられていた。しかし、少なくともメダカの三者関係においてはこれに加えて、メスがライバルオスと親密化することを阻止する効果があり、ライバルオスとメスとの配偶行動を二重に妨害するという意義を持つことが初めて示された。一方、メダカのメスが親密なオスを配偶相手として選択する意義もこれまで不明だったが、本研究から「親密なオス」とは「オス間競争の勝利者」である可能性が高く、より強いオスを選択できるメリットがあると考えられる。本研究は個体記憶を介した動物の配偶戦略を行動学、神経科学等の多くの側面から明らかにするモデル系になると期待された。一方で、本研究は研究室内の「三者関係」に着目して研究を行ったの、今後は自然条件の野生のメダカの集団を用いて同様の現象が起きているかを検証することが必要である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究課題の主要目的であった活性化したニューロンを遺伝的にラベルできる遺伝子改変メダカ系統の確立が研究期間内に達成できなかった。BAC クローンから単離した最初期遺伝子のプロモーターが内在性遺伝子のように神経興奮によって転写誘導されなかった。本研究では phiC31 インテグラーゼを用いて特定の遺伝子座にレポーター遺伝子を導入したが、ローカスエフェクトによる影響を受けた可能性もある。また内在性転写プロモーターを利用する目的で、CRISPR/Cas9 による相同組換えを利用し、最初期遺伝子の遺伝子座へレポーター遺伝子のノックインを行ったが、遺伝子導入個体が致死になり、F1 個体が作出できなかった。次は CRISPR/Cas9 による非同組換えを利用して、最初期遺伝子の転写開始部位の上流にミニマムプロモーターとレポーター遺伝子を導入した系統を作成した。現在、これらの系統において、神経活動依存の転写誘導が生じるかどうか検証を行っている。

<今後の課題、展望>

(1) 顔認知（記憶）に関わる脳領域の同定

本研究課題では、メダカにおいても個体認知能力は配偶戦略において適応的な意義があり、顔認知に特化した神経機構が存在する可能性を示した。今後はメダカの顔認知（記憶）に中心的な役割を果たす脳領域を同定し、その賦活様式を記録することで、顔情報や個体のアイデンティティがどのように表現されるかを解明したい。霊長類では外界の視覚情報は網膜で受容され、視床（外側膝状体）を介して大脳皮質の一次視覚野に入力した後に、大脳皮質内の階層的なネットワーク（2次以上の視覚野）を介して「顔情報」が抽出される。また霊長類では個人アイデンティティを表現する脳領域も同定されている。マカクザルでは AFTP（顔領域前部、海馬に隣接）で特定の個体の視覚刺激に反応するニューロンが存在し、さらにヒトの海馬で特定の個人（名前、写真）に特異的に反応するニューロンが存在する。このようにヒト・サルでは顔の認知・記憶は皮質内の互いに近接した脳領域（FFA, AFTP,

海馬体）で情報処理されている (*Brain Nerve*, 69, 439-451, 2017)。そのため、比較生物学的な理解を深めるために、今後はメダカ脳のバリウム（終脳背側）に着目して、顔領域を検索したい。ほ乳類と硬骨魚類の大脳（終脳）の構造は大きく異なり、海馬や大脳皮質に相当する脳領域は硬骨魚類には存在しないと信じられていた。しかし、現在では脳の発生過程や遺伝子発現プロファイルの比較生物学的解析から、バリウム D1（背側外側）領域がほ乳類の海馬に対応すると考えられている (*Science* 336, 1154-1157, 2012)。さらに硬骨魚類では網膜で受容された視覚情報は上丘（視蓋）を経由して、バリウム D1 領域に入力するため、当該脳領域は硬骨魚類の高次視覚野に対応すると考えられている (*J Comp Neurol*. 250, 215-227, 1986)。霊長類では「顔領域」と「顔アイデンティティを表現する脳領域」は海馬体周辺の高次視覚中枢に存在する。そこでメダカにおいてバリウム D1 領域及びその周辺部が顔情報の認知と記憶に関わる候補領域になる。メダカのバリウムは細胞系譜単位で区画化することが可能であり、約 40 箇所の解剖学的小区画にわけられ、D1 領域も 9 箇所に細分できる（未発表データ）。次はバリウムのどの解剖学的小区画が「顔記憶」に対応するか検索したいと考えている。

(2) 行動状態系と認識系（顔認知）との統合ネットワークの解明

ニューロンの基本構造を発見したカハールは脳の基本アーキテクチャーとして、3 系統（感覚系、運動系、認識系）の存在を提唱した。基本的に神経系の機能はこの 3 系統に属しており、外界からの情報を「感覚系」で受容・知覚し、「認識系」で認知・行動選択して、「運動系」を介して行動を出力する。これらの 3 系統に加えてラリー・スワツソンは脳全体的な状態を一斉に切りかえる第 4 の系統「行動状態系」の存在を提唱した (*Brain architecture, Oxford Uni. Press*, 2012)。「行動状態系」は 3 系統（感覚系、認識系、運動系）と密接に接続しており、概日リズムに従う睡眠-覚醒状態、繁殖周期を支配していると想定されている (図 2)。その例としてスワツソンは中枢神経系全体に投射する生体アミン系を上げている。

これまでのメダカの研究から全脳に軸索を投射する GnRH3 ニューロンが繁殖行動を制御する「行動状態系」に対応していると考えられる。GnRH3 ニューロンは脳全体に投射しており、解剖学的に 3 系統（感覚系、認識系、運動系）と接続していることがわかっている。メダカは中間の顔を認知し、メスは特定のオスを記憶すると GnRH3 ニューロンの自発的な活動が活性化することから、顔認知に関わる「認識系」と GnRH3 ニューロン「行動状態系」が密接に連携しながら機能を発現することが予想される。またバソトシン（バソプレッシン）の受容体は脳の広範な領域に発現しており、バソトシン系も「行動状態系」として機能する可能性がある。今後メダカを用いて「顔領域」と GnRH3 ニューロンが連携する動作機構がわかれば、個体記憶が異性の好みを生み出す神経動作原理の解明につながると期待している。

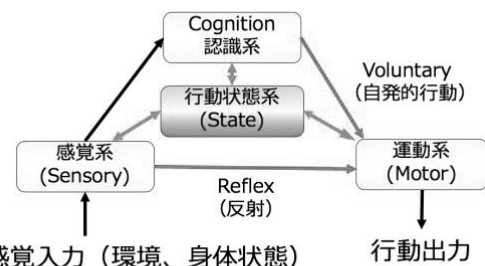


図 2 メダカの繁殖行動における脳情報処理のモデル図

認識系: 顔認知 (顔領域?) *elife* 2017
 行動状態系: GnRH3系 *Science* 2014, バソトシン系 *PLOS Genetics* 2015

神経ネットワークの内部状態による記憶の形成、想起の制御

研究代表者：野村 洋

北海道大学・大学院薬学研究院

<研究の目的と進め方>

脳は外部刺激を受けなくても、秩序を持った意味のある活動を続ける。膜電位は自発的に変動し、発火活動にまで至る。こうした自発活動は、外部刺激を受けない睡眠時にも途切れることがない。従来の記憶研究では、自発活動は背景ノイズとして扱われ、取り除くべきものと考えられてきた。しかし実際には、“脳の内部状態”を反映した自発活動も記憶形成、想起に重要であると考えられる。

大脳皮質の神経細胞も明示的な外部刺激がなくても自発的に活動する。こうした自発活動は外部刺激によって増強するだけでなく、抑制される場合もある。例えば、聴覚刺激は頻度依存的に一次聴覚野神経細胞の一部を抑制する。シナプス抑制はゲイン調節、反応選択性の向上、同期活動に寄与することがわかっている。そのため、抑制による神経調節は刺激によって引き起こされる行動や連合学習に寄与すると考えられるが、神経細胞の抑制そのものが記憶痕跡として働き、記憶に基づいた行動の出力を引き起こすかは不明であった。そこで本研究では、こうした可能性について一次聴覚野の神経細胞を光遺伝学的に抑制することで検証した。

<研究計画>

- 1) 神経細胞の抑制が条件づけ恐怖反応を引き起こすかの検討
- 2) 神経細胞の抑制によって作られた恐怖記憶が長期間保存され、消去学習の影響を受けるかの検討
- 3) 恐怖記憶の形成、想起には少数の神経細胞の抑制で十分であるかどうかの検討
- 4) マウスは神経細胞の抑制をもとにして報酬を見つけることができるかどうかの検討
- 5) 神経細胞の抑制はワーキングメモリーとして保存されるかの検討

<得られた研究成果>

- 1) 神経細胞の抑制が条件づけ恐怖反応を引き起こす
一次聴覚皮質の神経細胞を抑制するため、Archaelrodopsin (Arch) を遺伝子導入した。CaMKIIプロモーターの下流でArchを発現するように設計されたアデノ随伴ウイルス (AAV、AAV-CaMKIIa-Arch-EYFP) をマウスの一次聴覚皮質に注入した。AAV注入の3週間後には、Arch-EYFPの発現が一次聴覚皮質で確認された。また、一次聴覚皮質の神経細胞からパッチクランプ記録を行い、Archが正しく働くかを確認した。EYFP発現細胞からパッチクランプ記録を行いながら、緑色光を照射すると、外向きの電

流が確認できた。また、脱分極性の電流注入によって生じた活動電位は緑色光照射によって抑制された。さらにin vivoでArchの働きを確認するため、マウス聴覚野からマルチユニット活動を記録した。全体的な発火頻度は緑色光照射によって約29%減少した。以上の結果から、本手法で導入したArchが正しく働いていることを確認した。

聴覚野神経細胞の一時的な抑制が恐怖条件づけにおける条件刺激になるかを検証した。もし条件刺激になるのであれば、電気ショックと神経細胞の抑制を連合して受けたマウスは、その後に神経細胞の抑制だけで恐怖反応を示すと予想される。AAV-CaMKII-Arch-EYFPを聴覚野に注入し、さらに聴覚野に光ファイバーを埋め込んだマウスを用いて行動実験を行った。条件づけの日、Arch/pairedグループのマウスには、聴覚野への緑色光照射と弱い電気ショックを組み合わせて与えた (図1)。翌日、Arch/pairedグループのマウスは緑色光を照射中にすくみ反応を示した。緑色光照射をやめると、すくみ反応は減少した。AAV-CaMKII-Arch-EYFPではなく、AAV-CaMKII-EYFPを聴覚野に注入した場合、緑色光照射の照射中にすくみ反応は認められなかった。さらに聴覚野神経細胞の抑制そのものが恐怖反応を示すかを調べるため、Arch/unpairedグループを設けた。Arch/unpairedグループのマウスは、AAV-CaMKII-Arch-EYFPを聴覚野に注入された後、トレーニングにおいて緑色光照射と電気ショックをバラバラに与えられた。この場合、テストにおいて緑色光照射に対するすくみ反応は認められなかった。これらの結果は、聴覚皮質の神経細胞の抑制が、恐怖条件づけ課題における記憶の形成、想起の手がかりになることを示している (図2)。

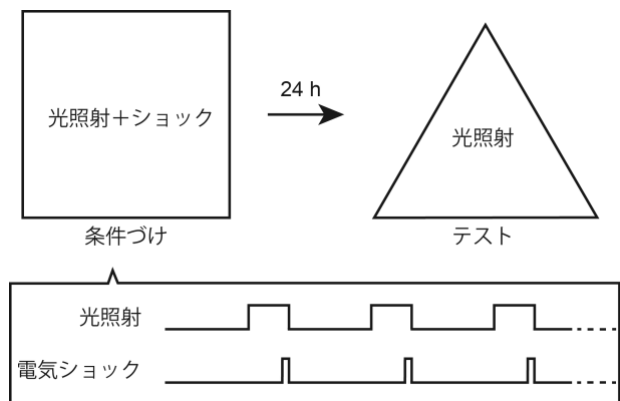


図1. マウスが神経細胞の抑制を手がかりとして恐怖記憶を形成、想起できるかの検討。Archを発現させた聴覚野神経細胞に緑色光を照射して神経活動を抑制した。この神経活動の抑制と電気ショックを組み合わせることで、条件づけが成立するかを検証した。条件づけの24時間後に緑色光の照射だけを行い、マウスがすくみ反応を示すか調べた。

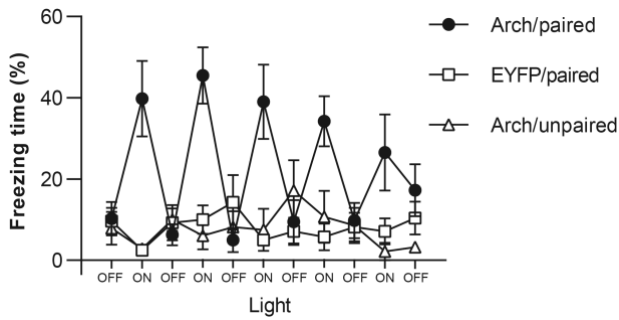


図2. 聴覚野神経細胞の抑制によって恐怖記憶を形成、想起できる。あらかじめ聴覚野神経細胞の抑制と電気ショックを組み合わせ与えられたマウス (Arch/paired グループ) は、その後に再び聴覚野神経細胞を抑制されるとすくみ反応を示した。Archを発現させなかった場合 (EYFP/paired グループ) はすくみ反応を示さなかった。また、聴覚野神経細胞の抑制と電気ショックをバラバラに与えた場合も、テストにおいてすくみ反応を示さなかった。

過去の一部の研究では、光遺伝学的手法を用いて神経活動を抑制した場合、直後にリバウンド発火が生じる例が報告されている。そのため、神経細胞の抑制ではなくリバウンド発火が電気ショックと連合して記憶が形成された、という可能性も考えられる。しかしこうしたリバウンド発火と電気ショックとの連合学習は、本研究で認められた恐怖反応には関与しないと考えられる。上述の実験において、恐怖反応は緑色光照射を行っている間に観察された。しかし緑色光照射が終わった後には認められなかった。例えば、神経細胞の抑制の直後にリバウンド発火が生じていたとしても、恐怖反応が観察されたのは、こうしたリバウンド発火が生じたときではなかったことになる。

2) 神経細胞の抑制によって作られた恐怖記憶は長期間保存され、消去学習の影響を受ける

聴覚野神経細胞の抑制と電気ショックの連合関係が長期間保存されるか調べた。AAV-CaMKII-Arch-EYFPを聴覚野に注入し、光ファイバーを聴覚野に埋め込んだマウスについて、上述のように光照射と電気ショックを組み合わせ与えた。条件づけの1日後に光照射を行った場合、1と同様にマウスはすくみ反応を示した。このマウスに対して、条件づけ30日後に再びテストを行った。1日後と同様に、光照射によってマウスはすくみ反応を示した。この結果は、神経細胞の抑制と電気ショックの連合記憶が少なくとも30日間は持続することを示している。

音や光と電気ショックを組み合わせ与える一般的な恐怖条件づけ課題において、条件づけ後に条件刺激 (光や音など) を繰り返し与えると、条件刺激に対する恐怖反応は減弱する。神経細胞の抑制と電気ショックの連合記憶も、繰り返し刺激によって記憶発現が減弱するかを調べた。30日後のテストを行ったマウスに対して消去学習を課した。消去学習では、20秒の緑色光照射を30回与えた。このとき電気ショックは与えなかった。この1日あたり30回の緑色光照射を4日間に渡って与えた。その結果、神経活動の抑制によって引き起こされる恐怖反応は次第に減弱し、4日目ではマウスはほとんどすくみ反応を示さなかった。

3) 恐怖記憶の形成、想起には少数の神経細胞の抑制で十分である

上述の実験では、聴覚野の非常に多くの神経細胞がArchを発現していた。少数の神経細胞の抑制でも記憶の形成、想起が引き

起こされるかを調べるために以下の実験を行った。少数の神経細胞にArchを高発現させるために、低力価のAAV-CaMKII-mCherry-Creと高力価のAAV-Ef1a-DIO-Arch-EYFPを聴覚野へ注入した。このマウスの聴覚野に緑色光照射を与えると共に電気ショックを組み合わせ与えた。翌日、緑色光照射だけの提示でマウスはすくみ反応を示した。また、条件づけを行わなかった側に緑色光照射を与えた場合はすくみ反応を示さなかった。さらにすくみ反応と発現細胞の割合の関係を調べた。聴覚野の5%以上の神経細胞がmCherryで標識されたマウスは緑色光照射に対してすくみ反応を示した。一方、mCherry標識細胞の割合が5%未満のマウスはほとんどすくみ反応を示さなかった。

4) マウスは神経細胞の抑制をもとにして報酬を見つけることができる

1, 2, 3において、神経細胞の抑制は古典的条件づけ課題における手がかりとして働くことを明らかにした。さらに別の種類の学習であるオペラント条件づけ課題においても神経細胞の抑制が手がかりとして働くかを検証した。T形の迷路を用意し、左右のアームのどちらかに餌を置いた。マウスはスタート地点から課題を開始し、餌が置かれたアームを選べば、餌を食べることができる。餌は隠れているために目で見て判断することはできない。また餌の箱を迷路の外側の中央に置くことで、匂いを手がかりにすることもできないように設定した。そして、左右のどちらのアームに餌があるかは、聴覚野の神経細胞の抑制で判断できるようにした。例えば、右のアームに餌をおいた場合は、聴覚野神経細胞を抑制し、左のアームに餌をおいた場合は聴覚野神経細胞を抑制しなかった (図3)。アームと神経細胞の抑制の関係はマウスごとに設定し、実験期間中は変えなかった。AAV-CaMKII-Arch-EYFP (Archグループ) あるいは AAV-CaMKII-EYFP (EYFPグループ) を聴覚野へ注入されたマウスを用いて実験を行った。1日あたり10回の光照射 ON トライアルと10回の光照射 OFF トライアルを設けた。ON トライアルと OFF トライアルの順序はバラバラに設定した。Archグループのマウスは条件づけ開始3日目、光照射 ON トライアルにおいて餌が置かれたアームを正しく選択できるようになった。本試験において餌が置かれたアームを偶然選択する確率は50%である。3日目において餌が置かれたアームを選択する確率が50%を有意に超えた。光照射 OFF トライアルでもトレーニングを繰り返すことで正解率が上昇し、5日目において正解率が50%を有意に超えた。一方、EYFPグループのマウスは5日間のトレーニングを行っても、正解率が50%程度であった。このことは、光照射だけでは左右のアームを識別して餌を見つけることができないことを示している。以上の結果から、マウスは聴覚野の神経細胞の抑制の有りを区別し、報酬を見つけることができることがわかった。



図3. マウスが神経細胞の抑制をもとにして報酬を見つけることができるかの検討。報酬を左右のどちらのアームにおいたかは、聴覚野に光を照射して聴覚野神経細胞を抑制したかどうか依存した。例えばこの図の条件では、右のアームに餌を置いた場合は聴覚野の神経細胞を抑制し、左のアームに餌を置いた場合は抑制しなかった。

5) 神経細胞の抑制はワーキングメモリーとして保存される

さらに神経細胞の抑制がワーキングメモリーとして保存されるかを調べた。4の検討では、マウスがスタート地点に置かれてから、アームを選択し餌が置かれた場所にたどり着くまで絶えず光照射を行っていた。そこで次の検討では、スタート地点で10秒間だけマウスに光照射を行った。3の実験を行ったマウスを用いて、さらに5日間実験を行った。その結果、スタート地点での光照射だけでも3日目になるとArchグループのマウスは高い正解率を示した。EYFPグループのマウスの正解率は上昇しなかった。Archグループのマウスは左右どちらのアームに進むかの分かれ目の場面で光照射を受けていない。そのため、スタート地点で聴覚野の神経細胞が抑制されたかどうかを思い出して行動を決めていることになる。以上の結果から、マウスは一時的な神経細胞の抑制をワーキングメモリーとして保存し、このワーキングメモリーを使って餌を探し出すことができることがわかった。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究成果は、感覚刺激が感覚野の一部の神経細胞の活動上昇だけでなく、活動抑制によっても情報を伝えることを示唆するものである。従来のシングルユニット記録を用いた研究により、様々な周波数の音刺激は一部の聴覚野神経細胞を活性化させ、また他の一部の神経細胞を抑制することがわかった。こうした結果は、音の周波数は聴覚野の神経細胞集団の活性化だけでなく抑制によっても符号化されることを示唆する。しかし、こうした神経細胞集団の抑制が認知行動に必要な情報として使われるかは不明だった。そこで本研究では光遺伝学を用いて人工的に聴覚野神経細胞集団を抑制し、こうした神経細胞集団の抑制が記憶の形成、想起にとっての手がかりになりうることを明らかにした。

過去の知見と組み合わせて考えると、以下のような神経メカニズムが想定される。神経細胞は例え明示的な外部刺激がなくても、活動電位を発生させている。こうした自発的な活動の抑制は、下流の神経細胞によって検出され、記憶形成や想起の手がかりとして働くのかもしれない。特に、下流の脳領域における抑制性神経細胞が、神経細胞の抑制の検出に関与する可能性が考えられる。扁桃体基底外側核の抑制性神経細胞は聴覚皮質から入力を受け取っており、この抑制性神経細胞から扁桃体基底外側核の興奮性神経細胞への抑制は恐怖条件づけに関与することがわかっている。そのため、聴覚野神経細胞の抑制は、扁桃体基底外側核の抑制性神経細胞を介して、扁桃体基底外側核の興奮性神経細胞を脱抑制し、この脱抑制が記憶形成や想起の手がかりとして働くのかもしれない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

聴覚刺激によって聴覚野の一部の神経細胞は抑制される。こうした神経細胞の抑制が記憶形成、想起の手がかりになることを本研究は明らかにした。本研究では抑制した神経細胞は、ほぼランダムに選ばれている。そのため、実際の聴覚刺激によって抑制される神経細胞を抑制したわけではない。実際に聴覚刺激が与えられたときに生じる神経細胞の抑制が、聴覚情報の処理においてどのような意味をもつか、記憶形成や想起に必要なのかについては検証が十分ではない。こうした検討を行うためには、聴覚刺激を与えたときに抑制される神経細胞に選択的にArchなどの抑制性の光感受性タンパク質を導入する必要がある。近年、様々な方法で特定のタイミングで活性化された神経細胞を標識し、光感受性タンパク質を導入する手法が開発されてきている。こうした方法の多くはc-FosやArcなどの最初期遺伝子プロモーターを活用し活性化した神経細胞を標識して

いる。しかしこれまでのところ、神経活動が抑制されたときに選択的に発現が誘導される遺伝子に関する研究は不十分であり、こうした遺伝子のプロモーターを活用した研究は進んでいない。そのため特定のタイミングで活動が抑制された神経細胞を標識することや、抑制された神経細胞に特定のタンパク質を発現させる方法は確立していない。今後はこのような抑制された神経細胞だけをその後に操作する方法が開発されれば、聴覚刺激によって抑制される神経細胞の生理的な意義についても迫れると考えられる。

<今後の課題、展望>

本研究では、自発活動に関して、自発活動を抑制して行動に与える影響を詳細に解析した。今後は自発活動と外部刺激を受けたときの活動を測定し、自発活動が記憶形成や想起に与える影響を明らかにする必要がある。近年、さまざまな神経活動測定ツールが開発されている。in vivoユニット記録やカルシウムイメージング法を活用することで、自発活動と記憶形成、想起の関係について多細胞に渡って解析が進められると考えられる。一方、神経細胞は活動電位を発生しなくても自発的に膜電位がゆらぎ、こうした閾値下の電位変化の重要性も示唆されている。In vivoユニット記録やカルシウムイメージング法では閾値下の電位変化を検出することは難しい。その場合、解析する細胞数は限られるがin vivoパッチクランプ記録を活用することで細かな電位変化を解析できる。多細胞の膜電位変化を大規模に記録する方法として膜電位イメージングが期待されているが、これまでin vivoで使える膜電位イメージングプローブは存在しなかった。しかし近年より明るくてS/N比の高いプローブが開発されつつある。今後はこうした新しいイメージングツールを活用して、自発活動と記憶形成や想起との関係が明らかになることが期待される。

さらに、今後は測定した実際の神経活動の抑制パターンを再現し、神経細胞の抑制の意義に迫る研究が必要である。本研究では一定の時間、神経細胞を抑制し続けた。実際には特定の時間だけで神経細胞は抑制されると考えられる。また本研究ではArchを発現させた神経細胞をすべて同時に抑制した。しかし実際には外部刺激に応じて、特定の神経細胞が抑制されると考えられる。このように実際の外部刺激によって生じる神経細胞の抑制パターンを正確に測定し、そのパターンで神経回路を操作する研究の展開が期待される。

小脳神経回路にコードされる恐怖応答記憶のメカニズムの解明

研究代表者：日比 正彦

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター

<研究の目的と進め方>

脊椎動物の小脳は、円滑な運動制御のみならず、認識・感情などの高度な精神活動とそれに関連する学習にも関与する。これら精神活動において学習された情報は小脳神経回路に貯蔵されると考えられるが、実際の学習過程で情報がどのように処理・記憶されるかは明らかでない。真骨魚類においては、嫌悪刺激（電気ショック等の無条件刺激）と条件刺激（光刺激等）を連合学習させることにより、条件刺激だけで恐怖情動を誘発し、徐脈・逃避行動を誘導することができる（恐怖応答学習）。魚類・哺乳類共に、小脳を破壊あるいは機能阻害すると、このような学習ができなくなることから、恐怖を伴う連合学習で形作られた記憶痕跡が小脳神経回路に貯蔵されており、条件刺激によりその記憶がリコールされることで恐怖応答が生じるものと考えられる。私達はこれまで、ゼブラフィッシュの小脳神経回路の解剖学的・発生生物学的解析を行い、ゼブラフィッシュの小脳神経回路がヒトを含む脊椎動物の小脳神経回路を理解する良いモデルであることを示してきた。また、個々の小脳神経回路ニューロン特異的に遺伝子を発現するトランスジェニック (Tg) システムを構築し、個々のニューロンの活動を測定・操作することも可能となった。本研究では、蓄積してきた発生遺伝学と行動神経科学の手法を有機的に組み合わせ、(1) 恐怖応答学習に関わる小脳神経回路を明らかにし、(2) 小脳神経回路を構成するニューロンの活性を操作し、恐怖応答学習に与える影響を検討することで、恐怖応答学習における小脳神経回路の役割を解明することを目的とした。

<研究計画>

1) 小脳神経回路の神経活動をモニターまたは神経活動を操作できるTgの作製：個々の小脳神経回路ニューロンに転写活性化因子Gal4を発現するTgを作製している。さらに、Gal4依存性にCa²⁺ indicatorや神経活性調節機能を有する各種タンパク質（光遺伝学要素、ボツリヌス毒素）を発現するTgも作製または入手している。これらのTgを小脳神経回路ニューロン特異的Gal4 Tgと交配し、各種因子を小脳神経回路で発現するTgを作製する。

2) 恐怖応答学習において活動が制御される小脳神経回路の検索：受精後約20日の後期仔魚は、電気ショックを無条件刺激、消灯（照射光を消す）を条件刺激として条件付けが可能であり、条件刺激依存性に徐脈や逃避運動を誘導できる。神経特異的にCa²⁺インジケーターを発現するTgを用いて、恐怖応答学習で活動が活性化あるいは抑制される小脳神経回路素子を検索する。

3) 恐怖応答学習における小脳神経回路の役割の解明：小脳神経回路特異的に、神経活動を調節する機能を有する各種タンパク質を発現するTgを用いて、個々の神経回路を活性化あるいは阻害した際の、恐怖応答学習および学習によって形成された記憶の維持に与える影響を検討することで、個々の小脳神経回路の恐怖応答学習・記憶維持における役割を解明する。結果を総合的に解析し、恐怖応答学習に関わる小脳神経回路の情報処理のモデルを提唱する。

<得られた研究成果>

1) ゼブラフィッシュ後期仔魚は古典的恐怖応答を示す(図1)：哺乳類・真骨魚類において、条件刺激と嫌悪刺激（無条件刺激）を組み合わせると、条件刺激に対して徐脈や逃避行動を示す。恐怖条件付けにおける小脳神経回路の役割を解明するため、遅延型の恐怖条件付け学習実験を行った。遅延型の条件付けでは、条件刺激が無条件刺激に先行して呈示され、両刺激が同時に終了する。遅延型の恐怖条件付け学習は、金魚を含む動物の恐怖学習における小脳の役割を研究するための一般的な方法である。本研究では、白色LEDの消灯を条件刺激として、電気刺激を無条件刺激とした。古典的条件付けはhabituation session、acquisition session、probe sessionの3つのステップから成る。habituation sessionでは10~15回、5秒間条件刺激を呈示した。acquisition sessionでは、条件刺激が呈示されてから4秒後に1ミリ秒の無条件刺激を与える試験を20回行った。probe sessionでは10回、条件刺激のみ呈示した。なお、対照実験（逆行条件付け）では条件刺激呈示の2秒前に無条件刺激を与えた。試行間の間隔時間は50秒に設定した。ゼブラフィッシュ仔魚の心拍を記録し、条件付け反応を評価した。habituation sessionにおいて、受精後約20日のゼブラフィッシュ仔魚は、最初の1~2試行において条件刺激に対し反応を示したが、その後は条件刺激による心拍への影響は受けなくなった。acquisition sessionにおいて、試行の前半においては無条件刺激に対してのみ徐脈が誘発された。約10~15試行後、条件刺激呈示後に徐脈が観察されるようになった。probe sessionにおいて、条件刺激のみで徐脈が観察されるようになった。habituation sessionの後半10試行とprobe session 10試行の心拍数を定量化し、比較した。本研究において、habituation session後半10試行では条件刺激に対して変化が見られなかった相対平均心拍数がprobe session 10試行では有意に減少した場合、学習が成立したと定義した (Welch's t-test, P < 0.05)。その結果、37.5% (n = 15/40) の野生型ゼブラフィッシュ仔魚において、学習が成立した。これらの条件付け徐脈は、probe sessionの間では消失、あるいは徐々に回復することはなかった。また、逆行条件付けでは学習が成立しなかった。

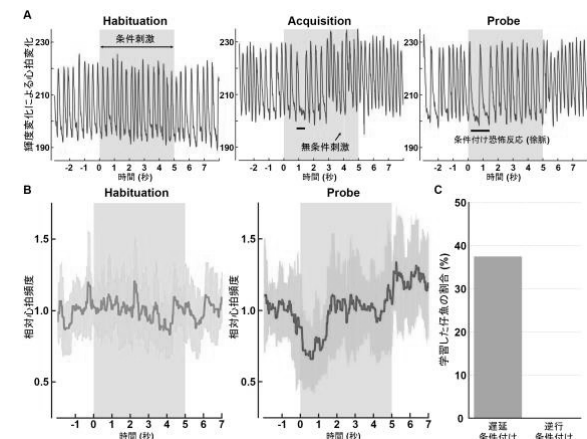


図1 ゼブラフィッシュ後期仔魚の恐怖応答条件付け反応の獲得。

2) 顆粒細胞は古典的恐怖条件付けに關与する: 恐怖条件付け学習における小脳の役割を解明するため、顆粒細胞の機能阻害実験を行った。顆粒細胞特異的Gal4系統であるgSA2AzGFF152Bと、蛍光タンパク質GFPとボツリヌスB毒素の軽鎖の融合タンパク質を発現するTg(UAS:BoTxBLC-GFP)を交配させた。ボツリヌス毒素は神経毒素であり、シナプス小胞がシナプス前膜へ結合するために必要なSNAREタンパク質を切断することで、神経伝達物質の放出を阻害する。本研究においては、顆粒細胞からの神経伝達を阻害した。顆粒細胞でBoTxBLC-GFPを発現している仔魚(顆粒細胞阻害仔魚)を受精後5日目に選別し、同数の顆粒細胞阻害仔魚と対照群を受精後約20日目まで、同じ水槽で飼育した。受精後約20日の仔魚において、BoTxBLC-GFPは小脳に局限した発現が観察された。顆粒細胞のマーカーであるNeurod1を用いて免疫染色を行った結果、顆粒細胞阻害仔魚において小脳体の顆粒細胞層で約半分(約48%)の顆粒細胞がBoTxBLC-GFPを発現していた。一方で、顆粒隆起/小脳尾葉においてはわずかな顆粒細胞(約1.5%)でBoTxBLC-GFPを発現していた。

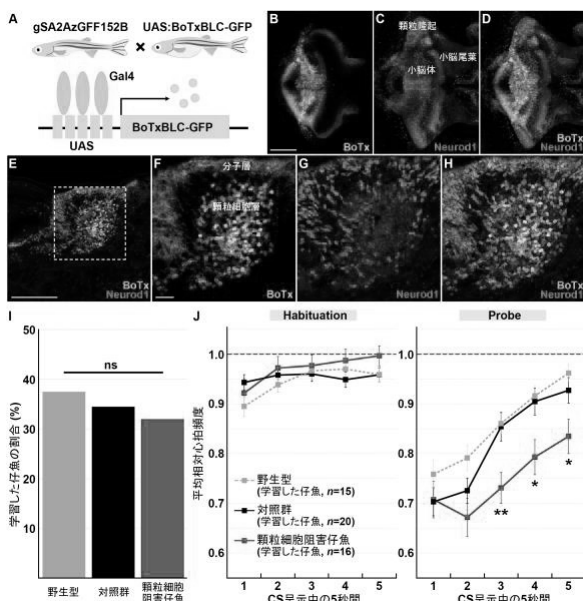


図2 顆粒細胞阻害により恐怖条件付け徐脈反応が延長する。

古典的恐怖条件付け学習後、顆粒細胞阻害仔魚、対照群いずれもprobe sessionにおいて条件刺激誘発徐脈をした。野生型、顆粒細胞阻害仔魚、対照群間で学習効率に有意な差は見られなかった ($P=0.8615$, Fisher's exact test)。また、habituation sessionにおける条件刺激呈示中の平均相対心拍頻度においても、顆粒細胞阻害仔魚、対照群間で差は見られなかった。しかしながら、probe sessionにおける条件刺激誘発徐脈反応において、顆粒細胞阻害仔魚と対照群の2つの群間で有意な違いが見られた。対照群においては条件刺激誘発徐脈反応は迅速に回復し、条件刺激の間に正常値に近づく。一方で顆粒細胞阻害仔魚においては、条件刺激誘発徐脈反応はあまり回復せず、条件刺激の間低い値を維持していた (wo-way repeated measures ANOVA: group effect $P=0.0463$, group x time interaction $P=0.00769$)。これらの結果は、小脳体の顆粒細胞の伝達抑制を行うと徐脈反応からの回復が阻害されることを示しており、顆粒細胞は徐脈反応からの回復に關与していることが示唆された。

3) 古典的恐怖条件付け学習中のゼブラフィッシュ小脳Ca²⁺イメージング (図3): ゼブラフィッシュ小脳の神経活動を記録するため、全新生ニューロンでGal4を発現するTg(elav13:GAL4-VP16)とTg(UAS:GCaMP7a)を交配した。受精後5日目に脳で蛍光が観察される仔魚を選別し、受精後約20日目まで飼育

した。GCaMP7aの蛍光を観察するには、実験の間仔魚の脳に青色励起光を照射し続ける必要がある。しかし、この方法では、条件刺激として用いていた白色LEDのスペクトルと重なってしまい、学習付けが困難であった。そこで、青色照射光と重ならない赤色LEDの消灯を、恐怖条件付け学習における条件刺激として利用した。赤色LEDの消灯と電気刺激を組み合わせた条件付けでも、条件刺激誘発の徐脈反応が起こる ($n=3/10$) ため、赤色LEDを用いて恐怖条件付け学習におけるCa²⁺イメージングを行った。神経活動を評価するため、GCaMP7a蛍光強度変化 ($\Delta F/F$) を計算した。habituation sessionにおいて自発的な活動は観察されるが、条件刺激に対する蛍光強度の増加はほとんど検出されなかった。

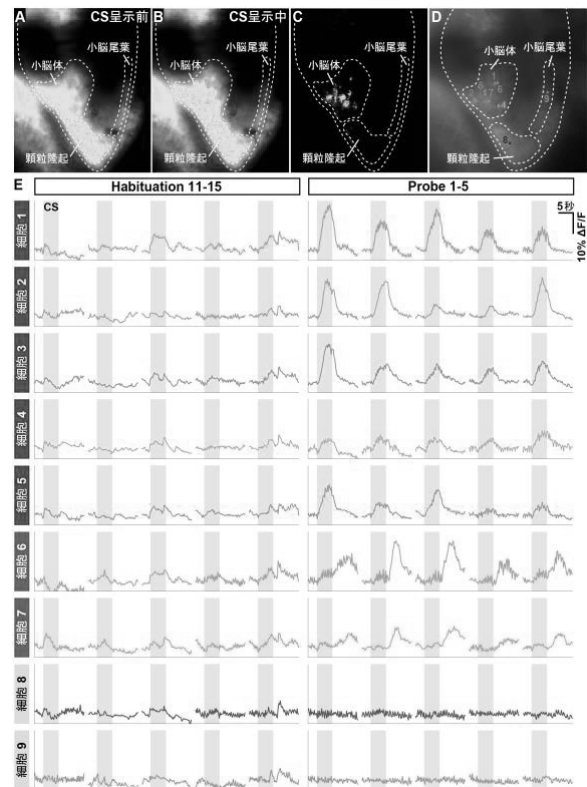


図3 古典的條件付け学習中に小脳ニューロンは活動する。

一方、probe sessionにおいて幾つかの小脳ニューロンで条件刺激に誘発された蛍光強度の増加が観察された。probe session前半の5試行における条件刺激呈示中の平均 $\Delta F/F$ が3%以上であったニューロンを、条件付け関連ニューロンと定義した。小脳内において4つ以上の条件付け関連ニューロンが観察されたのは、36% ($n=9/25$) の仔魚であった。条件付け関連ニューロンは小脳体に位置しており、顆粒隆起や小脳尾葉においては条件付け依存的に活動するニューロンは観察されなかった。

4) 条件付け関連ニューロンの経時変化 (図4): 次に、これらの条件付け関連ニューロンが恐怖条件付けの間どのような蛍光強度変化を示すか検討した。Ca²⁺イメージング後に、probe sessionにおいて条件刺激誘発の活動 ($\Delta F/F$) が観察されたものを条件付け関連ニューロンと特定した。これらのニューロンを選別的に同定し、acquisition sessionの間の活動を調べた。3つの条件付け関連ニューロンの $\Delta F/F$ を解析した。acquisition sessionの2試行目においては、無条件刺激が蛍光強度の増加を誘発したものの、条件刺激に対してはほとんど増加が見られなかった。8試行目では、2つの条件付け関連ニューロンで条件刺激により誘発されたわずかな蛍光強度の増加が観察された。18試行目には、全ての条件付け関連ニューロンにおいて蛍光強度が著者に増加した。その他の条件付け関連ニューロンにおいても同様の変化を

示すかどうか調べるため、学習後に条件付け関連ニューロンを有した5匹の仔魚において、各々5つの条件付け関連ニューロンから平均 $\Delta F/F$ を算出し、解析を行った。無条件刺激により全ての小脳ニューロンで蛍光強度の増加が検出されるため、条件刺激誘発の活動解析には無条件刺激前の条件刺激4秒間における $\Delta F/F_{CS0-4}$ の値を用いた。その結果、条件付け関連ニューロンにおける条件刺激誘発蛍光強度の上昇は、5匹ともacquisition sessionの間に徐々に増加した。さらに、probe session 10試行中の $\Delta F/F$ 解析を行ったところ、probe sessionの間に条件付け関連ニューロンの条件刺激誘発 $\Delta F/F$ は徐々に減少することが分かった。これらのデータにより、記憶（条件付け関連活動）は2種類の刺激の組み合わせ（連合）の間に漸進的に形成され、条件刺激提示のみを繰り返すことで徐々に消失することが示唆された。

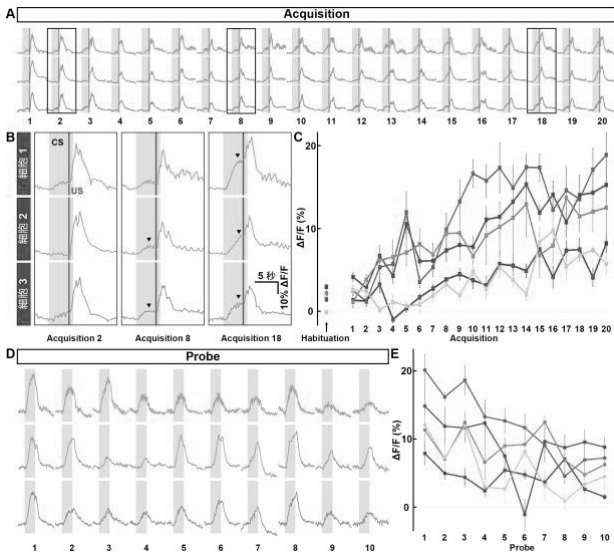


図4 学習中における条件付け関連ニューロンの経時変化。

5) 2種類の条件付け関連ニューロン (図5) : 条件付け関連ニューロンには、活動時期の違いで2種類存在することが分かった。Type Iニューロンは条件刺激提示に伴い即座に活動し、type IIニューロンは遅れて活動した。Type Iニューロンの活動($\Delta F/F$)は条件刺激提示時に増加し始め、条件刺激後期に至る間に最大となり、条件刺激終了後直ちに減少した。Type IIニューロンの活動は条件刺激提示に対しわずかに上昇したが、条件刺激終了後に強く活動を起こした。また、type I とtype IIのニューロンは小脳体内で各々近接して位置していた。免疫組織学的実験から、条件付け関連ニューロンは顆粒細胞であることが示唆された。従って、恐怖条件付け学習には活動時期の異なる2種類の条件付け関連顆粒細胞が存在することが示唆された。

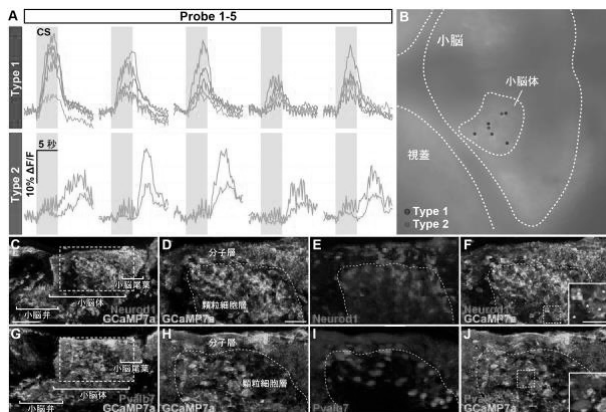


図5 2種類の条件付け関連ニューロン。

<国内外での成果の位置づけ>

これまでゼブラフィッシュ早期仔魚も恐怖応答学習を示すことが国外のグループから報告されてきた。しかし本研究により、受精後 20 日程度の後期仔魚において、真の恐怖応答学習を示すことが示された。早期仔魚 (受精後 5 日前後) においても単純な小脳神経回路の構造が出来ており、顆粒細胞やプルキンエ細胞の活動は認められているものの、複雑な恐怖応答学習を示すためには、小脳神経回路の成熟が必要であると考えられた。

これまで、小脳や、小脳に入力する下オリーブ核、出力する深部小脳核の阻害実験では、恐怖応答学習が抑制されていた。しかし本研究では、小脳の顆粒細胞の阻害により、恐怖応答学習の回復が遅延していた。その違いは、阻害した細胞の種類の違いに依存していると考えられる。これまでの実験は細胞種を特定しない阻害実験である。本研究では、顆粒細胞からの信号伝達を特異的に阻害しており、少なくとも一部の顆粒細胞が、恐怖応答反応からの回復を制御していることを示した。

これまで小脳を依存性学習において、顆粒細胞とプルキンエ細胞の間のシナプスにおける長期抑制 (LTD) や長期促進 (LTP)、苔状線維・深部小脳核間および苔状線維・顆粒細胞間のシナプスにおける LTP が重要であると考えられてきた。本研究は、恐怖応答学習においては、顆粒細胞が条件付け依存性に条件刺激により活性化されることを示した。(条件付け関連ニューロン)。このことから、恐怖応答学習においては、情報の統合が顆粒細胞へのシナプスあるいはその上流で起きている可能性が示唆された。

哺乳類の恐怖応答学習においては、顆粒細胞・プルキンエ細胞間の LTP によりプルキンエ細胞が活性化されるというデータと、反対にプルキンエ細胞が抑制されるという、相反するデータが報告されている。また、金魚を用いた過去の研究では、恐怖条件付けによりプルキンエ細胞は抑制されることが報告されている。本研究では、条件付けにより顆粒細胞が活性化されることが示された (条件付け関連ニューロン)。条件刺激により顆粒細胞が活性化され、その下流でプルキンエ細胞を活性化され、さらにその下流で投射神経 (広樹状突起細胞) が抑制されることで恐怖応答反応を制御しているというモデルが考えられた。

本研究は、ゼブラフィッシュが恐怖応答学習の小脳神経回路の役割を理解する上で有用なモデルを提供した。小脳神経回路の、運動制御・運動学習以外の機能、特に情動に関与する役割を理解する足掛かりとなるものと考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究では、顆粒細胞以外のニューロンの関与について解析が進まなかった。恐怖応答中のプルキンエ細胞や入力線維 (登上線維、苔状線維) の神経活動の検討、またその役割を解析することが出来なかった。また、神経回路形成過程からボツリヌス毒素を発現させた解析では、成長期の異常な神経回路の補償が起きている可能性があり、時期および細胞特異的な阻害実験が必要であると考えられた。

<今後の課題、展望>

今後や、小脳神経回路を構成する種々の細胞に、細胞種特異的な遺伝子制御領域を用いて、 Ca^{2+} インディケーターや細胞膜電位センサーを発現することで、恐怖応答学習中の神経回路の詳細な活動を検討する。さらに光遺伝学ツールを用いることにより、時期・細胞特異的に活動を促進・抑制し、神経活動および恐怖応答学習に与える影響を検討することで、個々の神経回路素子の役割を明らかにする。さらにこれらをデータを統合して、恐怖応答学習における小脳神経回路の情報処理機構のモデルを提唱したい。

記憶の多様な形成と再形成を実現するセル・アセンブリの解析

研究代表者：櫻井 芳雄

同志社大学・脳科学研究科

<研究の目的と進め方>

記憶の形成に関する認知心理学的研究は、記憶が個々の情報をつなぐネットワークとして形成されると仮定した。またそれがさらに変化し再構成されることにより、無限ともいえる多様な記憶が次々形成されると唱えてきた。しかし、そのような多様な記憶の形成と再形成を担う神経回路の実態はまだわかっていない。実際に記憶情報をコードする機能的な神経細胞集団、すなわちセル・アセンブリは、記憶の形成過程でどのように作られ、互いつながるのであるか？ また一旦形成されたセル・アセンブリは、次に新たな記憶が形成される際、どのように変化し再構成されるのであろうか？ 本研究は、これらの疑問に答えることをめざす。具体的には、記憶情報をコードするセル・アセンブリの活動を、神経細胞集団の同期発火から検出し、それが、記憶Ⅰの形成 → 記憶Ⅱの形成 → 記憶Ⅰの再形成、の全プロセスをとおしてどのように変化するのか、電気生理学的に明らかにする。記録部位は海馬、前頭前野、側頭連合野である。また、そのような同期発火を示した神経細胞集団の活動をオプトジェネティクスにより人為的に同期させ、記憶課題における行動の変化を測定することで、セル・アセンブリと記憶形成の直接的な対応も検証する。さらに、記憶の種類や次元に応じたセル・アセンブリの変化を詳細に解析するため、新たな高次記憶の課題も開発する。

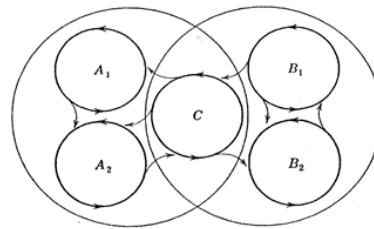
<研究計画>

1) 異なる記憶形成プロセスに対応したセル・アセンブリの変化を検出するため、ラット用の音条件性左右弁別課題を開発する。まず音 A→右反応、音 B→左反応、の関係を数日間にわたり学習させた後（記憶課題Ⅰ）、音 C→右反応、音 D→左反応を数日間かけて学習させ（記憶課題Ⅱ）、最後にもう一度記憶課題Ⅰを再学習させる。これら全ての学習期間をとおしてラットの海馬からテトロード電極によるマルチニューロン活動を同時記録し、異なる記憶の形成と再形成に応じて変化する神経細胞集団の発火頻度と同期発火について解析する。また、同じマルチニューロン活動をより長期間安定して記録する方法についても、電極の作製法や手術法を中心に改良する。

2) セル・アセンブリの活動と記憶行動の対応を因果的に検証するため、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入によるオプトジェネティクス法を開発する。そして記憶形成中に同期発火を示した神経細胞集団を光刺激により活動させ、記憶課題中の行動を解析することで、セル・アセンブリの活動と記憶形成の直接的な対応について検証する。

3) 記憶情報の種類や次元に応じたセル・アセンブリの変化を検証するため、時間情報、順序情報、他個体観察学習など、より抽象的で高次の情報を対象とした記憶課題を開発する。特にセル・アセンブリ間の包含関係（図1）を検討するため、ラットの概念形成課題やメタ認知課題も開発する。

Formation of concept
with cell assemblies encoding memories



(Hebb, 1949)

図 1

<得られた研究成果>

1) ラットが記憶課題Ⅰ → 記憶課題Ⅱ → 記憶課題Ⅰの全ての学習期間をとおして海馬から同じマルチニューロン活動を同時記録し続け解析した。その結果、学習期間（記憶形成期間）に応じた多様な同期発火のパターンを検出したが、一部、記憶課題Ⅰと記憶課題Ⅱの学習過程（Learning1 と Learning2）それぞれにおいて、記憶が形成されつつある時期でのみ同期発火を示すニューロンペアが存在した。またそのようなペアは Learning1 と Learning2 で異なっていた。さらにそれらペアの同期発火は、記憶が形成された学習完成期にはほぼ消失した（図2）。海馬にはこのような記憶形成時に一過性の同期発火（temporary synchrony in learning）を示すニューロンペアが一定数存在していた（図3）。（投稿準備中）

Temporary synchrony in learning

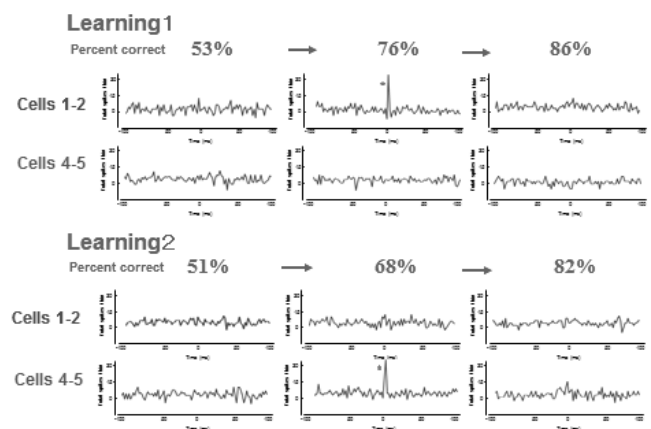


図 2

Proportions of Types of Synchrony in Hippocampus

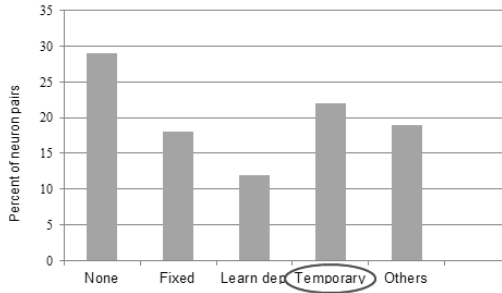


図 3

以上の結果から、本研究は以下の仮説を提示する。
 ・海馬で一時的に作られるセル・アセンブリにより記憶が作られ、その記憶は新皮質に移されることで固定される。
 ・その記憶が固定されるに伴い海馬のセル・アセンブリはリセットされ、次の新しい記憶を形成する際には異なるセル・アセンブリがまた一時的に作られる。
 ・このような海馬のセル・アセンブリのセット・リセットにより、多様な記憶を次々形成することが可能となる。

2) マルチニューロン活動記録法の改良も進め、長期間安定して記録するために、電極とマイクロドライブの材質を変え、より小型軽量化することができた。データ解析法についても、プログラムのアルゴリズムの改良と deep learning の応用により、同期発火検出の精度と検出後の処理速度を上げることができた。

3) 時間弁別課題を遂行しているラットの海馬と内側前頭前野からマルチニューロン活動と局所電場電位 (LFP) を同時記録し解析したところ、個々のニューロンが弁別すべき時間をコードしていることがわかった。また海馬の LFP が示す特定周波数帯のオシレーションが時間の長短をコードしていることもわかり、時間の長短という高次情報に海馬内のマクロなセル・アセンブリが関与していることを示唆できた。(図 4) (Nakazono et al., 2016)

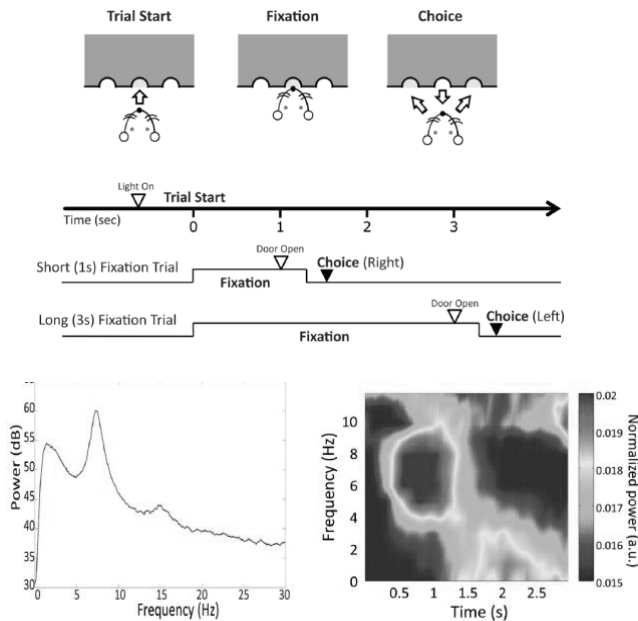


図 4

4) 順序情報の記憶を検討するラット用の記憶課題 (順序弁別課題) を開発し、順序記憶に基づきラットが予測的に行動することを明らかにした (図 5)。(Ishino and Sakurai, 2014)

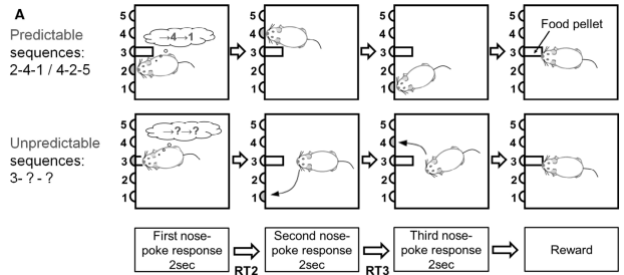


図 5

5) 順序弁別課題を遂行しているラットの海馬ニューロン活動と LFP を解析したところ、手掛かりに基づき順序の記憶を再生する過程を背側海馬の LFP が反映していることがわかった。(公募班員小川正晃先生との共同研究) (Ishino et al., 2017)

6) 同じく順序弁別課題を遂行しているラットの海馬と内側前頭前野にまたがるマクロな神経回路の活動について、海馬のニューロン活動と内側前頭前野の LFP の同期から解析した。その結果、特定の順序の再生時にリズムカルな同期が見られることがわかり、順序記憶の再生時にマクロなセル・アセンブリの反響的活動が生じることがわかった。(図 6) (公募班員小川正晃先生との共同研究) (Ishino et al., 2017)

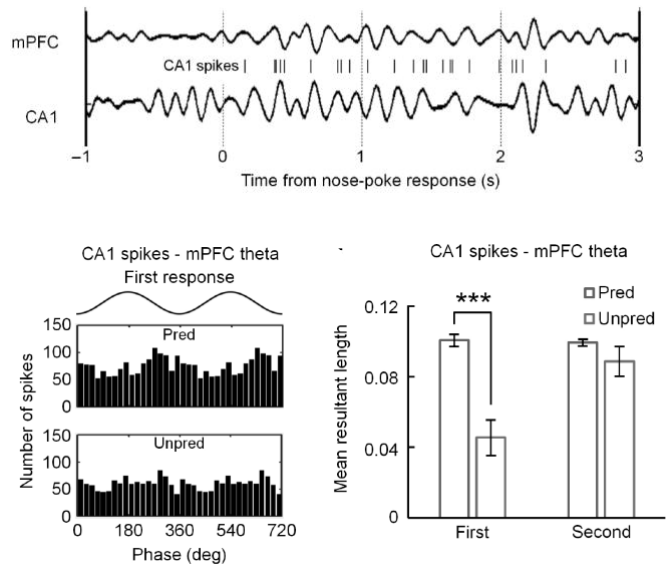


図 6

7) 他個体の学習行動を観察して記憶し自身の学習を促進させる他個体観察学習がラットで可能かどうか、バーンズ迷路を活用することで検討した (図 7)。その結果、他個体がゴールを選ぶ行動を観察したラットはより速くゴールに到達できることがわかった。(Yamada and Sakurai, 2018)

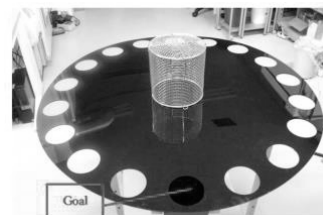


図 7

8) 自身の認知状態を認知するラット用のメタ認知課題を開発した(図8)。左右の光刺激の強度を調節できる光方向弁別課題を設定し、右点灯→右へ反応、左点灯→左へ反応、点灯なし→中央へ反応することを学習させたところ、光の強度が下がるほど中央への反応(選択回避反応)が増大した。中央への反応を許さず左右どちらかに反応することを強制すると、光の強度が下がるほどエラーが増大した。これらの結果から、ラットは自身の認知状態を認知しながら適宜選択を回避できることがわかった。(Osako et al. 2018)

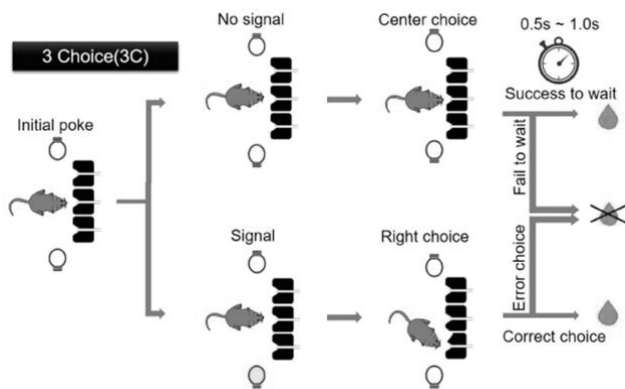


図 8

9) 正反応に必要な手掛り刺激が学習中に突然切り替わるルール・スイッチング課題をラットに学習させ、学習中に海馬よりLFPを記録し、多様な帯域間の関係を解析した(図9)。その結果、ルールの変更に伴いLFPのシータ帯域-ハイガンマ帯域間のカップリングが増強することがわかった。この結果は、神経細胞の集合的活動であるLFPの周波数帯間カップリングがセル・アセンブリの動的な切り替えを反映している可能性を示している。(Nakazono et al. 投稿中)

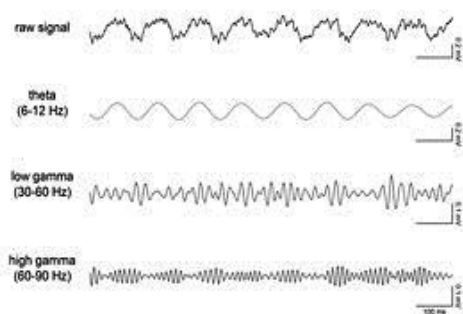


図 9

10) 新たなアデノ随伴ウイルスを用いたオプトジェネティクス法を開発した。ラットにマルチニューロン活動記録用電極を取り付ける際、ウイルスベクター注入用のカニューラと、先端に青色LEDを付けた光刺激電極も同時に取り付けた。そして記憶課題遂行中に発火頻度と同期発火の変化が生じた神経細胞集団にチャンネルロドプシン2(ChR2)を発現する遺伝子を導入した。導入にはレンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた。今後この方法を活用することで、海馬のセル・アセンブリの賦活により記憶課題の学習や遂行が増強されるかどうか因果的に検証することが可能となった。

<国内外での成果の位置づけ>

セル・アセンブリ仮説の再評価と検証は20年ほど前から神経科学の世界で広まっており、Hebb博士による歴史的な名著『The

Organization of Behavior』(1949年刊)も2003年に復刻され、国内でも新訳が2011年に出版されている(『行動の機構』上・下、岩波書店)。そしてマルチニューロン活動を記録し解析することで、セル・アセンブリ仮説を検証しようとする研究が、特にドイツ、イスラエル、米国、日本においていくつか進展している。しかしそれらの研究のほとんどは記憶課題の種類にあまり重点を置かず、訓練が容易な1~2種類の記憶課題を行っている動物のマルチニューロン活動を数分~数時間程度記録し解析しているに過ぎない。本研究のように、抽象的な高次記憶も含む多様な記憶情報処理を対象とし、独自に開発した長期間記録法とデータ解析法を用いることで、複数部位のマルチニューロン活動とLFPを数日間にわたり記録し続けセル・アセンブリのダイナミックな変化を解析しようとした研究は、国内外共にほとんどない。また、局所的セル・アセンブリを構成する近接した複数ニューロンの活動をリアルタイムで記録して分離し、ニューロン間の同期発火を1ミリ秒以下の精度で検出した研究も、本研究以外ではほとんど報告されていない。また本研究は自由行動のラットを用いることで、音条件性左右弁別課題という高次な記憶を数日間で形成させることに成功したが、それ以外にも、時間弁別課題、順序弁別課題、他個体観察学習課題、メタ認知課題などの開発と訓練にも成功しており、より高次な記憶情報処理を対象としてセル・アセンブリの活動を解析することを可能としている。このように多様な記憶とセル・アセンブリの対応を体系的に解析しようとする研究は国内外共にほとんど見られない。本研究のようなアプローチにより、これまで心理学的構成概念であった多様な記憶情報のネットワークをセル・アセンブリという実体と結びつけることができ、認知心理学と神経科学を繋ぐことが可能になると思われる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究の中心となった音条件性左右弁別課題を用いた実験では、記憶形成のプロセスにおいて一過性の同期発火を示すニューロンペアが海馬で見つかった(図2・3)。しかし、他の同期発火パターンを示すニューロンペアとの関係や個々のニューロンの発火頻度との対応などの解析に予想以上に時間がかかり、本領域の期間中に論文化するまでには至らなかった。そのような総合的な解析に必要な数理モデルの開発も含め、今後出来るだけ早急に結果をまとめ出版する予定である。また、多様な記憶を対象とするために必要な記憶課題の開発は十分進み、訓練にも成功して行動データも十分得られたが、電気生理学的記録はまだ途中であり、オプトジェネティクスの活用も期間内に開始することが出来なかった。主な理由は2015年に京都大学文学研究科から現在の所属に異動し、新たな実験室を構築したことであり、現在はより整った設備と人員のもとで研究を加速している。

<今後の課題、展望>

すでに実験心理学が明らかにしてきたように、記憶情報処理の本質がその多様性とダイナミズムにあることは間違いなく、それを実現しているのがセル・アセンブリのダイナミズムであると考えられる。そのため、実験的に容易で単純な記憶課題を用いているだけでは、記憶のダイナミズムに迫ることは難しく、自由行動の動物を用い、低次から高次に至る多様な記憶課題を体系的に設定し、記憶をコードするセル・アセンブリのダイナミックな活動を検出する必要がある。今後は、より多様な記憶課題をより体系的に設定し、それらを遂行中の動物から得られた電気生理学的データとオプトジェネティクスによる行動変容のデータを、どこまで記憶情報処理の種類と対応させ解釈できるかが課題であるが、現在の研究の延長で十分達成できると考えている。

長期記憶の不安定化を司る分子メカニズムと神経基盤の解明

研究代表者：平野 恭敬

京都大学・医学研究科

<研究の目的と進め方>

学習で獲得した情報は、新規遺伝子発現を介して長期記憶として固定化される。一方、刻々と変化する環境に適応するため、固定化された長期記憶は修飾され、ときには消去される必要がある。このような長期記憶の不安定化の現象は知られているが、そのメカニズムを示唆する知見は非常に乏しい。私はショウジョウバエをモデル生物として用い、特異的な転写因子が長期記憶の不安定化に重要な役割を果たしていることを見出していた。本研究では、1：長期記憶の不安定化に関わる転写因子の標的遺伝子を、新規に開発した分子生物学的手法を駆使して同定し、そのメカニズムの解明を目指した。さらに2：長期記憶の不安定化を誘導する神経基盤、特定の神経を抑制、または活性化させるショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて明らかにしようと試みた。これらにより、今まで謎であった長期記憶の不安定化メカニズムの理解にブレークスルーをもたらすことが本研究のねらいである。

<研究計画>

過去の研究では、長期記憶の固定化における転写因子CREBの機能が注目されてきた。しかし私は、ハエの記憶中枢であるキノコ体における持続的なCREB活性が、長期記憶の保持に必須であることを見出した(図1A)。CREBはその結合タンパクであるCBP、あるいはCRTCと結合することにより、転写を活性化させる。私はこれまでに、長期記憶の固定化にはCRTCではなくCBPが必須である

ことを報告した。これはマウスでの報告と一致する。一方、固定化された長期記憶の保持にはキノコ体におけるCRTCが必須であった(図1A)。興味深いことに、CREB/CRTCは学習4日後までの長期記憶保持に必要であるが、それ以降の記憶保持には必要なかった(図1B)。私は、CREB/CRTC依存的な記憶保持には、何か特別な意義、例えばこの期間は記憶の書き換えや消去が可能といった特徴があるのではないかと考えた。実際、学習4日までに忘却トレーニングを行うと記憶は消失したが、学習4日以降に忘却トレーニングを行っても記憶は消失しないことがわかった(図1C)。さらに、学習4日以降にキノコ体でCRTCを活性化させたところ、消失しないはずの学習4日以降の記憶が忘却トレーニングにより消失することを見出した(図1D)。これらの結果から、キノコ体のCREB/CRTCが学習4日後まで記憶を保持させるとともに、記憶を消失可能な状態にしていることが示唆された(図2)。記憶の保持と消失に重要なCREB/CRTC標的遺伝子は異なるのではないかと考えている。CREB/CRTCを活性化させただけでは記憶は消失せず、忘却トレーニングが必須であった(図1D)。従って、CREB/CRTCの活性化とともに、忘却トレーニング中の神経活動が記憶の消失に重要であると考えられる。

本研究では、1：長期記憶の不安定化に関わるCREB/CRTCの標的遺伝子を同定し、今まで謎であった記憶の不安定化の分子メカニズムを明らかにすることを目標とした。また上述のように、CREB/CRTCを活性化させただけでは記憶は消失せず、忘却トレー

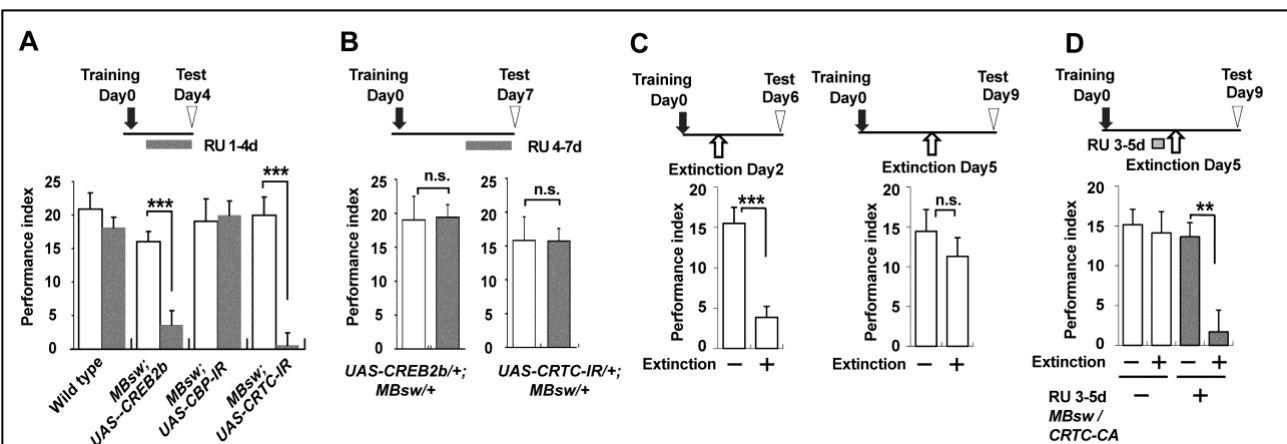


図1. CREB/CRTC は長期記憶の保持と消失に重要な役割を果たす。

(A) 学習4日後までの長期記憶の保持にはCREB/CRTCが必須である。MBswはキノコ体(MB)特異的に発現する改変型GAL4ドライバーで、RUという薬剤をハエに摂取させたときのみUAS下流遺伝子の発現を誘導する。MBswにより抑制型CREB(CREB2b)、CBPのRNAi(CBP-IR)、あるいはCRTCのRNAi(CRTC-IR)を学習1日後から発現させ、4日記憶を測定した。

(B) 学習4日以降の長期記憶保持にはCREB/CRTCは必要ない。MBswにより抑制型CREB(CREB2b)、CRTCのRNAi(CRTC-IR)を学習4日以降から発現させ、7日記憶を測定した。

(C) 学習2日目の忘却トレーニング(Extinction)により、長期記憶は消失するが(左)、学習5日目の忘却トレーニングでは長期記憶は消失しない(右)。

(D) キノコ体で恒常活性化型CRTC(CRTC-CA)を発現させると、学習5日目の忘却トレーニングにより長期記憶は消失する。

注：学習では匂いを電気刺激と連合学習させ、テストでは匂いからの逃避行動(記憶)をPerformance indexとして測定した。忘却トレーニングでは学習に用いた匂いを、連続的に15回与えた。

ニングが必須であったことから、CREB/CRTCは記憶の不安定化状態を作り出し、そこに忘却トレーニング時の神経活動が加わった結果、記憶の消失が誘導されると考えられる (図2)。そこで、2:長期記憶の不安定化を誘導する神経基盤を詳細に検討することで、記憶の不安定化における基本概念を提示したいと考え、研究を遂行した。

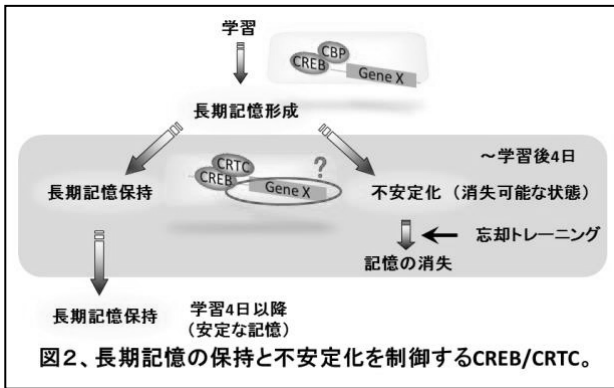


図2、長期記憶の保持と不安定化を制御するCREB/CRTC。

<得られた研究成果>

1) 長期記憶の不安定化に関わるCREB/CRTCの標的遺伝子の同定

CREB/CRTCは代謝組織でも機能することが知られており、標的遺伝子は組織により異なることが予想される。長期記憶の不安定化には記憶中枢であるキノコ体のCREB/CRTCが重要であるため、キノコ体に焦点を絞る必要がある。そこで私の確立したキノコ体細胞核を単離する手法を用い、キノコ体における学習後のCREB/CRTC結合遺伝子座を、ChIP-seq法を用いた網羅的解析を行った (図3 A、B)。さらに同様にして回収したキノコ体の細胞核から、核内RNAを解析することにより、記憶とともに発現変動する、CREB/CRTC標的遺伝子を絞り込んだ。

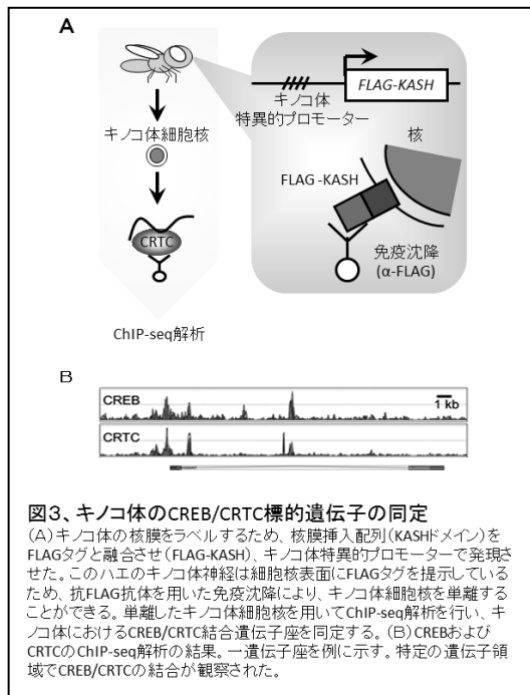


図3、キノコ体のCREB/CRTC標的遺伝子の同定

(A)キノコ体の核膜をラベルするため、核膜挿入配列(KASHドメイン)をFLAGタグと融合させ(FLAG-KASH)、キノコ体特異的のプロモーターで発現させた。このハエのキノコ体神経は細胞核表面にFLAGタグを提示しているため、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降により、キノコ体細胞核を単離することができる。単離したキノコ体細胞核を用いてChIP-seq解析を行い、キノコ体におけるCREB/CRTC結合遺伝子座を同定する。(B) CREBおよびCRTCのChIP-seq解析の結果。一遺伝子座を例に示す。特定の遺伝子領域でCREB/CRTCの結合が観察された。

記憶の不安定化に関わる遺伝子を忘却トレーニング時にノックダウンすれば、記憶の消失は起きないはずだ。CREB/CRTC標的遺伝子をキノコ体のみで、学習後に一過的にノックダウンさせ、

忘却トレーニングを行ったところ、記憶の消失を抑制する遺伝子を同定することに成功した (β -spec)。このようにキノコ体の細胞核を回収し、ChIP-seq解析を行うことを経て、長期記憶の不安定化に関わるCREB/CRTC標的遺伝子の一つを明らかにした。

CREB/CRTCは長期記憶の保持にも重要であることから、CREB/CRTC標的には長期記憶の不安定化ではなく、長期記憶保持に重要な遺伝子も含まれると考えられる。このような遺伝子は、ノックダウンすると忘却トレーニングなしでも長期記憶が消失されると考えられた。これについても解析を進め、CREB/CRTC標的遺伝子から記憶保持に重要な遺伝子 (Smr、Bx) を明らかにした。

2) 長期記憶の各過程に関わるエピジェネティック因子の同定

CREB/CRTCを含めた転写因子の機能は、クロマチン上のエピジェネティックな修飾により大きく影響を受ける。CREB/CRTCの記憶保持、および忘却における機能をさらに追及するため、ハエの記憶中枢であるキノコ体神経で約50のエピジェネティック因子すべてをそれぞれキノコ体で一過的にノックダウンし、記憶に関連のあるエピジェネティック因子を探索した。結果として、長期記憶形成、早期記憶保持、後期記憶保持に寄与するエピジェネティック因子を同定した。さらに、キノコ体神経で特異的に変化するクロマチン制御を捉えるため、図3Aの手法を用いてキノコ体細胞核を回収し、エピジェネティック解析を行った。これにより、キノコ体で変動するエピジェネティック制御を網羅的に同定した。これらより、クロマチン状態と記憶の相関・因果関係が明らかになった。

	~1 day	~4 days	~7 days
	長期記憶形成	早期記憶保持	後期記憶保持
CREB-related	CREB/CBP	CREB/CRTC	
Histone acetylation	CREB/CBP	GCN5	
	Rpd3	Tip60	Tip60
Histone methylation	Trx	Ash1	
	Lid		
	X		
	Y		長期記憶の必要因子
	Z		長期記憶の抑制因子
egg			
Histone ubiquitination	Scny	UbcD6	

図4、記憶に関わるエピジェネティクス関連因子学習からの経過時間に従い、異なる転写因子、およびエピジェネティクス因子群が記憶形成、記憶保持に寄与する。

以上の結果を、2016年Nature Communicationsにて報告した。

2) 長期記憶の不安定化を誘導する神経基盤

記憶の消失はCREB/CRTCの活性化のみでは誘導されず、忘却トレーニングが必要であった (図1 D)。この結果は、忘却トレーニング時の神経活動が、キノコ体の記憶の不安定化に必須であることを示唆している。忘却トレーニングが記憶の消失を誘導する機序として、A:キノコ体神経の興奮、B:キノコ体に投射する神経の興奮、あるいはC:それらの同期、を想定した。

記憶消失を誘導する神経を抑制すれば、忘却トレーニングによる記憶消失が阻害されるはずだ。そこで、特定の神経を抑制するため、カリウムチャンネルKir2.1をGAL4-UASシステムを用いて発現させた。このとき、温度依存的にGAL4活性を制御するGal80tsを導入することで、忘却トレーニング時のみKir2.1を発現させた。

このように、忘却トレーニング時にのみ活動を抑制することで、記憶消失を阻害するような神経を探索した。しかしながら、現在までに忘却を阻害するような神経群は同定されておらず、今後さらに探索を続ける必要がある。

<国内外での成果の位置づけ>

過去の研究から記憶の基盤となる神経回路や分子メカニズムが明らかにされつつある一方、固定化された記憶の不安定化を解明する研究は立ち遅れていた。本研究では、これまで不明であった記憶の不安定性を司る分子メカニズムを提案することができた点で、先駆的研究となったと考えている。さらに記憶形成時ではなく、形成された記憶が保持されるために寄与する能動的な遺伝子発現制御にも焦点を当て、明らかにしたことは新規性が高いと考えられる (2016, Nature Communications)。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

項目2の長期記憶の不安定化を誘導する神経基盤について、現在までにその詳細に迫ることができていない。アプローチとして kir2.1 を用いた恒常的な神経抑制を行ったことが問題として挙げられる。この手法を用いて明瞭な結果が得られなかったことから、恒常的ではなく、一過的に神経を抑制するための手法、例えば光遺伝学的な手法をとることで改善され、目的の神経基盤の同定に到達することが期待されるだろう。

<今後の課題、展望>

本研究から、記憶不安定化および形成された記憶の保持に必要な遺伝子発現制御因子を同定することができた。さらに詳細なメカニズムを明らかにするため、各制御因子の標的遺伝子に着目し、その神経生理作用を明らかにする必要がある。今後は標的遺伝子群の可視化等を通じ、その分子動態、作用機序に迫っていく。

記憶の不安定化に関わる神経基盤の同定については、上述のとおり光遺伝学的な手法を確立し、特異的な神経を一過的に操作する手法をとる。これにより不安定化の神経基盤を同定することを目指す。

Cellular environment-dependent RNA methylation at synapse during learning and memory

研究代表者：王 丹

京都大学・高等研究院 物質-細胞統合システム拠点

<研究の目的と進め方>

記憶の創造-消滅のダイナミクスを可能にする脳内分子メカニズムとは一体何か？学習や記憶を形成するための基本的神経機能であるシナプス可塑性に注目し、シナプスでの遺伝子情報発現の変化を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることによって、冒頭の問題を解くことを研究目的とした。局在したトランスクリプトームの複雑さに対する理解は、遺伝子発現依存的なシナプス可塑性、神経回路構築の可塑性のさらなる理解に寄与すると考えている。その中で、遺伝子情報の基礎となるDNA配列の完全性を損なうことなく動的なRNA修飾によって「記憶動態」を調節することができる新規メカニズムを探索することにした。

そのために、ほ乳類動物における動的なRNA修飾の中で最も存在量が多く、脳にも豊富に存在し、ドーパミン報酬系の制御やストレス応答に関連すると報告があるN6-メチルアデノシンを対象として研究を進めた。

<研究計画>

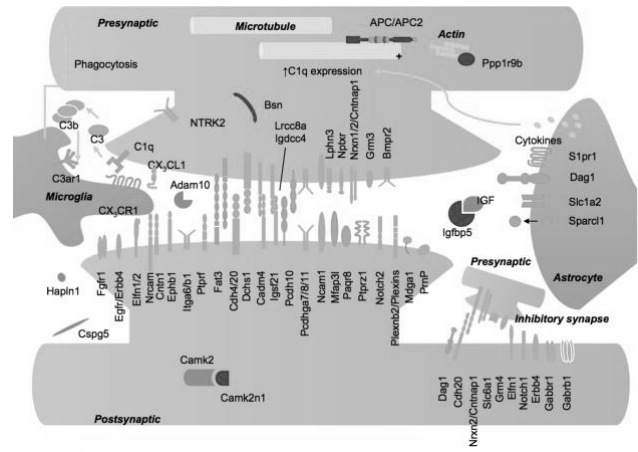
- 1) 微量のRNAを対象にしたゲノムワイドスケールのm⁶A-seq法を確立する。合成修飾RNAを用いて方法の有用性を確認する。
- 2) 健常の成体マウスの前脳シナプスを分離した上で、RNAを回収して、m⁶A-seq法を用いて網羅的に解析し、組織内にあるRNAを対象に結果を解釈する。
- 3) 学習に際してのRNAメチル化の役割を遺伝子改変マウスの作成などで明らかにする。

<得られた研究成果>

- 1) 従来のm⁶A-seq法では、250µgのRNAをインプットとして必要とした。本研究では、シナプスに含まれる微量のRNAの解析を可能にする新規m⁶A-seq法を開発した。この方法で必要とされるRNA量は10 µgであり、従来の方法の25分の1である。解析した結果は従来の方法と比較して、検出感度と正確さにおいて遜色がない。
- 2) シナプスへ局在するメチル部位を4,469箇所およびそれらを有する2,921個の遺伝子を発見した。
- 3) シナプスにおいて高いメチル率を持つ遺伝子1,266個を同定した。
- 4) メチル化修飾の認識を阻害した場合に、スパイン形成やシナプス伝達に障害がおきる現象を示し、メチル化修飾の機能を明らかにした。

本研究で明らかにした三者シナプスにおけるメチル化RNAが

コードする機能タンパク質の一部抜粋(下)。シナプス機能への



調節機構として有力であることを示唆する。

<国内外での成果の位置づけ>

シナプスへのRNA局在は神経細胞の中で選択的に行われることや、局所翻訳はシナプス可塑性および長期記憶に必要不可欠であることがこれまで知られていた。しかし、エピジェネティクス研究で明らかになったDNAやヒストンタンパク質への化学修飾と同様なRNA修飾のシナプスへの局在は未知であった。本研究は、独自のRNA修飾の同定方法を開発し、世界初の神経シナプスへ局在するm⁶A修飾をもつRNA群を同定し、機能的であることを証明した。

Merkurjev D, Hong WT, Iida K, Goldie BJ, Yamaguti H, Oomoto I, Ohara T, Kawaguchi S, Hirano T, Martin KC, Pellegrini M, Wang DO*. Synaptic N6 methyladenosine (m⁶A) reveals functional partitioning of localized transcripts. Nature Neuroscience, 21, 1004-1014 (2018). *責任著者

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

シナプスへ局在するメチル化RNAの詳細な機能解析や多様な刺激に対する応答性の全貌解析はまだ達成できていない。それは、本研究結果より、化学修飾をうけるRNA種は予想していたものよりもはるかに多かったことが理由である。そして、遺伝子改変マウスでの解析もまだ達成できていない。

<今後の課題、展望>

本研究は、空間情報と修飾情報を組み合わせた新たな遺伝子情報発現の制御メカニズムを提案した。シナプスに局在するエピトランスクリプトームを明らかにするために、m⁶A修飾のみならず、ほかの修飾塩基の機能性と制御メカニズムの詳細解析が今後の課題である。

記憶ダイナミズムをもたらす局所回路形成メカニズムの解析

研究代表者：八木 健

大阪大学・生命機能研究所

<研究の目的と進め方>

記憶ダイナミズムは、脳における神経細胞の集団的活動によりもたらされている。この集団的活動の基盤には、個々の神経細胞がつくる複雑なネットワークの性質が関与することが示唆されている。本研究では、神経細胞で異なる組み合わせ発現をするクラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) 遺伝子群に注目し、神経回路の構築と機能形成メカニズムの解析を行った。本研究では、対立遺伝子間での Cre/loxP 組み換えを利用して cPcdh 遺伝子クラスターを様々な組み合わせで欠損させたマウスを作製する。全ての cPcdh 遺伝子欠損マウスでは、脳幹網様体や脊髄の介在ニューロンの神経細胞死、機能的神経回路異常、海馬神経細胞での自発的神経活動パターンを解析する。また、cPcdh 遺伝子欠損マウスから iPS 細胞を樹立して、神経回路形成と cPcdh との関わりを解析するとともに、cPcdh のランダムな組み合わせ発現によるネットワークモデル (Gene Matched Network モデル) を検証した。

<研究計画>

1) cPcdh 遺伝子クラスターを様々な組み合わせで欠損させたマウスを作製した。全ての cPcdh 遺伝子欠損マウスでは、脳幹網様体や脊髄の介在ニューロンの神経細胞死、機能的神経回路異常、海馬神経細胞での自発的神経活動パターンを解析した。

2) 全 cPcdh 遺伝子クラスター欠損マウスと iPS 細胞を用いたキメラマウス作製により、大脳皮質における個々の神経細胞の神経回路特性を、パッチクランプ法により解析する。

3) cPcdh 遺伝子群のランダムな組み合わせ発現を利用した新たな神経ネットワークモデル (Gene Matched Network モデル) の情報処理能力を検証した。

<得られた研究成果>

1) 様々な cPcdh 欠損マウスの作製と解析

cPcdh $\alpha \beta \gamma$ 遺伝子クラスター欠損マウスに TAF7 をレスキューすることにより、cPcdh 遺伝子クラスターを様々な組み合わせで欠損させたマウスを作製し、cPcdh 全欠損マウスの作製にも成功した (図1) (Hasegawa et al., Front. Mol. Neurosci. 2016)。このマウスは誕生直後に殆ど動けず呼吸ができずに死亡した。このマウスを解析したところ中脳、橋、延髄にある脳幹網様体の神経細胞が細胞死を起していることが明らかとなった (図2)

(Hasegawa et al., Front. Mol. Neurosci. 2017)。これらの細胞死は胎生 15 日以降に起こるものであり、それまでは脳幹網様体の神経細胞は正常に分化・発生していた。また、この細胞死は Bax 遺伝子欠損により無くなることより、Bax 依存的細胞死であることが明らかになった。しかし、この cPcdh/Bax 2 重欠損マウス

では神経細胞死が認められないものの、左右の神経活動リズムが失われており、生後直後に呼吸の障害により死亡した。これらの

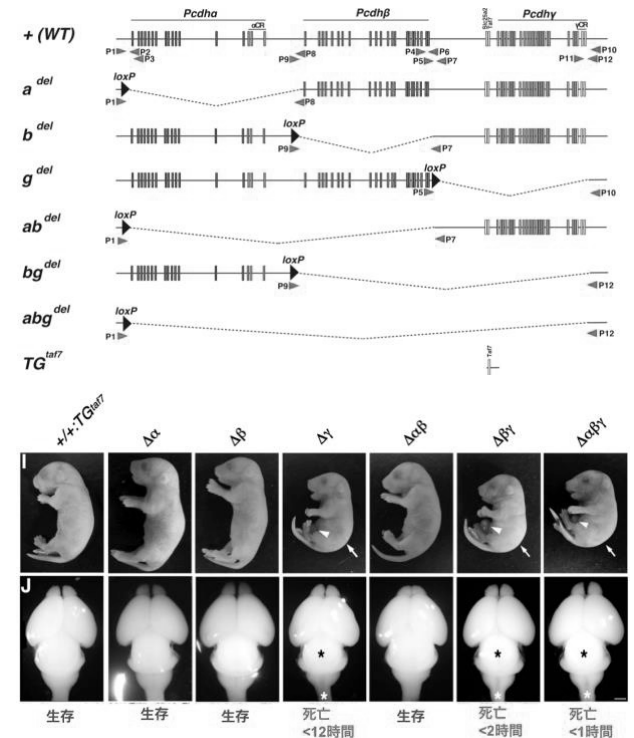


図1 Pcdh 遺伝子クラスター欠損マウスの作製と解析。Pcdh α 、 β 、 γ クラスターを単独 ($\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, $\Delta\gamma$)、2重 ($\Delta\alpha\beta$, $\Delta\beta\gamma$)、3重 ($\Delta\alpha\beta\gamma$) に欠損したマウスを作製した。Taf7 欠損により胎性致死となるため $\Delta\beta\gamma$, $\Delta\alpha\beta\gamma$ については、Taf7 発現マウスと掛け合わせるにより、初めて表現型の解析をすることができた。各 Pcdh クラスター機能の特殊性と冗長性が明らかとなった。

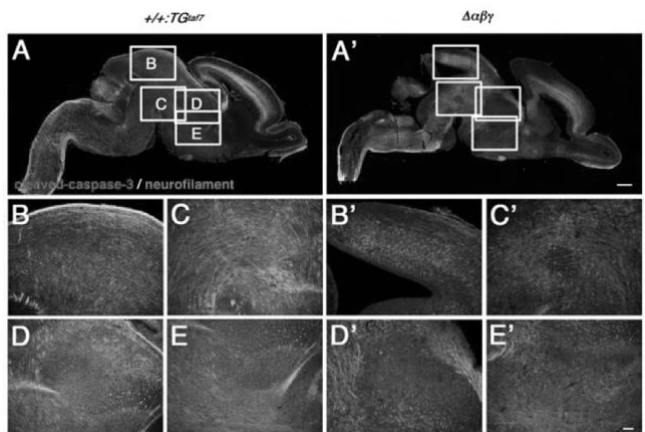


図2 cPcdh 全欠損マウスでは脳幹網様体における介在神経細胞が細胞死する。E18.5 のマウス脳切片、細胞死マーカー (active caspase-3, 赤) と軸索 (neurofilament, 緑) の染色。コントロール (A, B, C, D) では細胞死がほとんど認められないが、cPcdh 全欠損マウス ($\Delta\alpha\beta\gamma$) では中脳 (B', C') で神経細胞死が行われている。橋、延髄、脊髄の介在神経細胞は消失している。

結果より、cPcdh 遺伝子が正常な脳幹網様体の神経回路形成と機能発現に関与することが示唆された。

2) cPcdh 全欠損 iPS 細胞の樹立とキメラマウス作製による解析

cPcdh 全欠損 iPS 細胞を樹立し、正常マウス胚にインジェクションすることによりキメラマウスを作製してモザイク解析を行った (図 3)。その結果、生後 21 日齢のキメラマウスの脳幹網様体や脊髄において cPcdh 全欠損 iPS 細胞由来の介在神経細胞は存在しなかった。しかし、嗅球、皮質、海馬、基底核、視床、小脳の神経細胞は cPcdh 全欠損 iPS 細胞由来のものが存在した。これらの結果より、介在神経細胞で発現する cPcdh 遺伝子が生存に必要であることが明らかとなった。また、このキメラマウス中の cPcdh 全欠損小脳プルキンエ細胞では、樹状突起形成の異常が認められ、cPcdh 遺伝子が正常な自己交差回避に関与していることが示された。この樹状突起形成の異常は、Dnmt3b 欠損プルキンエ細胞と同様であった。更に、このキメラマウスのバレル野 4 層の星状細胞ペアから同時ホールセル記録を行い、cPcdh 遺伝子が細胞系譜依存的な双方向性回路形成に関わることが明らかとなった。また、同様の異常が Dnmt3b 欠損星状細胞ペアにも認められた (以下の項目参照) (Hasegawa et al., Front. Mol. Neurosci. 2017)。

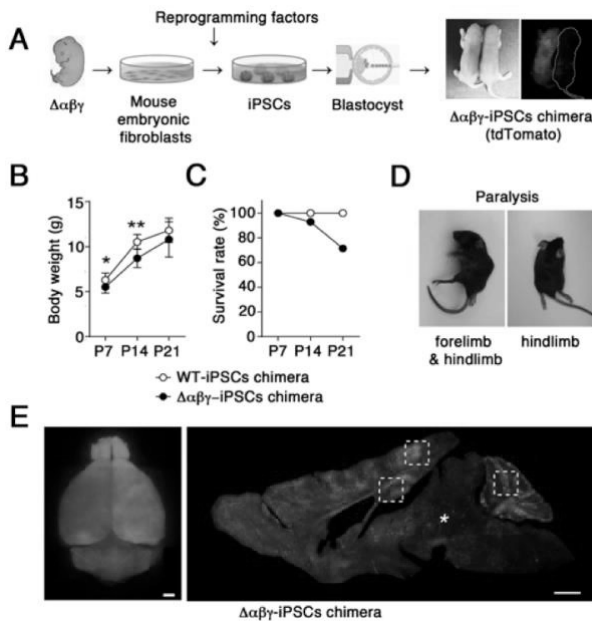


図 3 cPcdh 全欠損 iPS 細胞を用いたキメラマウスによる解析。cPcdh 全欠損 ($\Delta\alpha\beta\gamma$) マウスの線維芽細胞より tdTomato マーカーを発現させた iPS 細胞株を樹立し、正常マウス胚に移植する (A)。B は体重の変化。得られたキメラマウスは誕生するが高いキメラ率のマウスは運動失調となり死亡する (C, D)。E 生後 21 日齢のキメラマウス脳における cPcdh 全欠損細胞 (赤色) の分布。キメラマウスにおいて、嗅球、大脳皮質、海馬、視床、小脳の神経細胞は正常に分化し、生存する。一方、脳幹網様体にある介在神経細胞はほとんどが消失した。

3) cPcdh 全欠損の海馬神経細胞を用いた解析

cPcdh 全欠損マウスの海馬から初代培養を行い、cPcdh 全欠損神経細胞に特異的 cPcdh アイソフォームを強制発現させる系を確立して、cPcdh アイソフォームの違いによる細胞間相互作用の解析を行った。その結果、同一 cPcdh アイソフォームにおける特異的な細胞間相互作用が観察された。このタンパク質間相互作用は正常神経細胞に強制発現させた時には認められず、内在的 cPcdh タンパク質による阻害が確認できた。よって、単一神経細胞でランダムな組み合わせ発現している cPcdh タンパク質は、ヘテロタンパク質複合体となり、神経細胞上に分布して限局した細胞接着点をつくっていることが示された (図 4)。

また、培養した海馬神経細胞の自発的神経活動を解析した結果、正常では散在的で多様化した活動パターンが、cPcdh 全欠損神経細胞では規則的な同期パターンとなっていた。この結果は、cPcdh 分子群が散在的で多様化した活動パターンの形成に関わることを示唆しており、個々の神経細胞でのランダムな組み合わせ発現と回路形成を捉える上で興味深い結果である (Hasegawa et al.,

Front. Mol. Neurosci. 2017)。

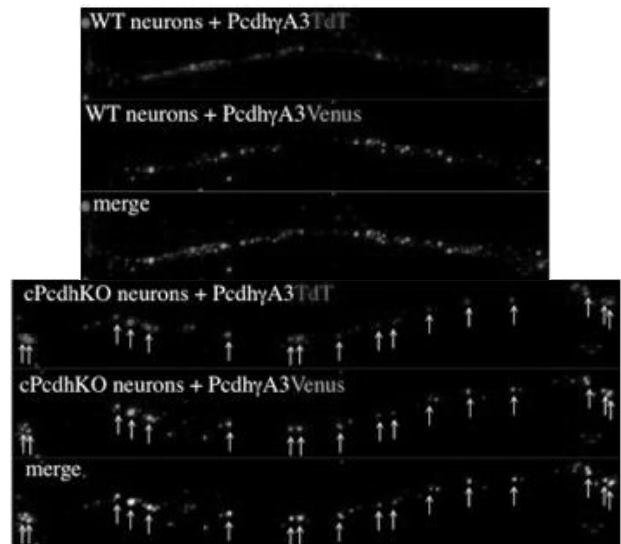


図 4 γ A3 強制発現による海馬の培養神経細胞における細胞間相互作用。 γ A3-tdTomato (赤) と γ A3-Venus (緑) を別々の正常 (WT) 神経細胞で強制発現させ、それぞれの神経突起が重なっているところを観察した。その結果、 γ A3-tdTomato (赤) と γ A3-Venus (緑) のホモフィリックな接着はほとんど認められなかった (上図、merge)。cPcdh 全欠損神経細胞を用いて同様の実験を行うと、 γ A3-tdTomato (赤) と γ A3-Venus (緑) のホモフィリックな接着が多く観察された (下図、merge)。これらの結果により、神経細胞に内在する cPcdh タンパク質が強制発現させた γ A3 のホモフィリックな接着活性を阻害していることが明らかとなった。この結果は、神経細胞でランダムな組み合わせ発現している cPcdh タンパク質がヘテロ多様体となり、細胞間におけるホモフィリックな接着を阻害していることを示唆している。

4) 大脳皮質局所回路形成における細胞系譜と cPcdh の役割

本研究において野生型キメラマウスを用いて、バレル皮質 4 層の星状細胞間から同時ホールセル記録を行い、細胞系譜の異なる神経細胞間 (non-clonal cell pair) に比べて同じ細胞系譜の神経細胞間 (clonal cell pair) には高い確率で双方向性結合が形成されていることを初めて見出した (図 5)。この細胞系譜依存的な特異的な双方向性結合は、発達前期のシナプス結合の増加と発達後期の一方方向性結合の減少を伴って形成されることも明らかにした。このような発達に伴う結合様式の変化は細胞系譜が異なる細胞ペアには見られなかった。我々は、この細胞系譜依存的な特異的な双方向性結合に cPcdh が関与するかどうかを検証するために、cPcdh-KO キメラマウスを用いて同様の解析を行った。その結果、野生型キメラマウスとは大きく異なる発達過程と結合様式を示した (図 5)。野生型のクローン細胞ペアではまだ結合確率が低い生後 9-11 日齢において、cPcdh を欠損したクローン細胞ペアでは、すでに非常に高い確率で双方向性結合が観察された。また、発達後期、野生型クローン細胞ペアで観察された一方方向性結合の減少が見られず、むしろ双方向性結合が減少したことにより、結果的に生後 18-20 日齢においても細胞系譜依存的な双方向性結合は形成されなかった。しかし、シナプス結合ペアの割合は野生型 (40%) よりも高い (50%) ことから、cPcdh-KO 細胞は野生型細胞より多くの神経細胞からシナプス入力を受けており、レーザースキャン光刺激法で得られた結果と一致していた。一方で、cPcdh-KO 細胞の電気的膜特性や樹状突起形態、シナプス応答には異常は見られなかった。以上の結果より、大脳皮質における細胞系譜依存的な特異的なシナプス結合に cPcdh が関与することが初めて示された。

次に、個々の神経細胞に発現する cPcdh アイソフォーム発現パターンが細胞系譜依存的な双方向性結合に重要であるかを調べるために、cPcdh の発現種を制御する Dnmt3b に着目した。Dnmt3b を欠損した小脳プルキンエ細胞では、野生型に比べて多くの種類の cPcdh アイソフォームが発現することが明らかにされている (Toyoda et al., Neuron 2014)。したがって、大脳皮質においても、Dnmt3b 欠損細胞は多種類の cPcdh アイソフォームを発現

していると考えられる。そこで、Dnmt3b-KO キメラマウスから作製したスライス標本を用いて神経結合解析を行い、細胞系譜依存的な双方向性結合の有無を検証した。発達前期のシナプス結合様式は野生型キメラマウスと非常によく似ていたが、発達後期の一方方向性シナプス結合の減少が見られず、細胞系譜依存的な双方向性結合は有意に減少していた。一方、Dnmt3b-KO 神経細胞の電気的膜特性や樹状突起形態、シナプス応答には異常は見られなかった。以上の結果より、大脳皮質における細胞系譜依存的なシナプス結合に、cPcdh の発現のみならず、個々の神経細胞における cPcdh アイソフォームの発現様式が関与する可能性が示唆された (Tarusawa et al., BMC Biol. 2016)。

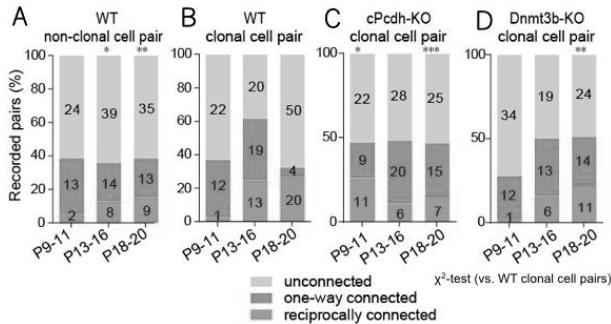


図5 バレル皮質4層星状細胞間結合様式。A-B: 野生型キメラマウス (ノンクローナル細胞ペア(A)、クローナル細胞ペア(B))、C-D: cPcdh-KO キメラマウス (クローナル細胞ペア(C)) および Dnmt3b-KO キメラマウス (クローナル細胞ペア(D))。* (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001)。野生型キメラマウス、クローナル細胞ペアの各年齢との χ^2 -test による比較検定。グラフ内数値: 記録ペア数。

5) Gene Matched Network モデルの解析

Gene Matched Network モデルでは、ランダムな回路形成因子の組み合わせ発現により、高いクラスター性と、全てのノード間が短い距離となるスモールワールドネットワークが形成できることが明らかになった (図6)。また、この特性を持った回路で層構造をつくり情報の流れを解析したところ、ランダムな回路では認められない高い情報保持能力があること、各層での閾値を設定することにより情報変換を行えることが明らかとなった。これらの結果は、Gene Matched Network が並列分散の情報処理に極めて有効なものであることを明らかにした。

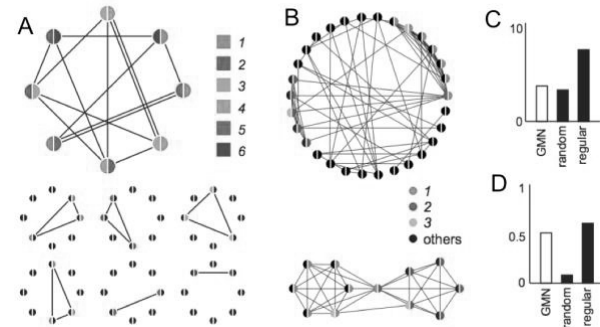


図6 Gene Matched Network モデル。ランダムな組み合わせ発現をする遺伝子によるネットワーク。同じ遺伝子が発現しているノードに回路ができる (A)。 (B) Gene Matched Network 例。GMN (Gene Matched Network)、ランダムネットワーク (random)、規則的ネットワーク (regular) におけるノード間距離 (C) クラスター性 (D)。GMN は短いノード間距離と高いクラスター性を併せ持つスモールワールドネットワークの性質を持つ。

<国内外での成果の位置づけ>

神経細胞の個性化を分子メカニズムとして捉え、個々の神経細胞がつくる回路特性との関連性、セルアセンブリ、脳機能との関連性を捉える研究は、これまで例のない独創性の高い研究である。その為、これまで我々の研究に対して、個々の神経細胞に個性が必要か?などの疑問があった。しかし、生理学的に単一神経細胞レベルで回路特性が明らかとなる中で、経験依存的でない発生プログラムの重要性、集団性の高い回路特性などが明らかとな

る中で、本研究の成果は、クラスター型プロトコドヘリンが発生プログラムにおいて神経細胞の個性化に関わる遺伝子群であること、同一細胞系譜での双方向性の回路特性に関わることを明らかにした画期的なものとなった。また、光遺伝学の進歩により、記憶などの神経情報がセルアセンブリであることが他のグループから報告され、セルアセンブリ形成メカニズムについての議論があり、発生プログラムの重要性が示唆されている。その中で、海馬の場所ニューロンの神経活動が経験以前に準備されていること、特徴抽出ニューロンが神経活動非依存的に形成されていることが報告され、本研究による cPcdh 遺伝子による神経細胞の個性化と回路形成とセルアセンブリとの成果について関心が高まってきている。更に、本研究において cPcdh 遺伝子が皮質における神経情報の統合やワーキングメモリーに関わることが示めされ、セルアセンブリによる神経情報の統合や保持のメカニズム解明への大きな足がかりが得られた。本研究成果より、発生プログラムによる個々の神経細胞での cPcdh 遺伝子のランダムな組み合わせ発現と回路形成が、複雑な神経ネットワーク中の予備的なセルアセンブリとなり、経験やシナプス可塑性により機能的なセルアセンブリとなる仮説を提唱している。このメカニズムは、発生プログラムによるランダムな遺伝子組み換えにより準備される免疫系の獲得免疫と免疫記憶のメカニズムと類似している (図7)。

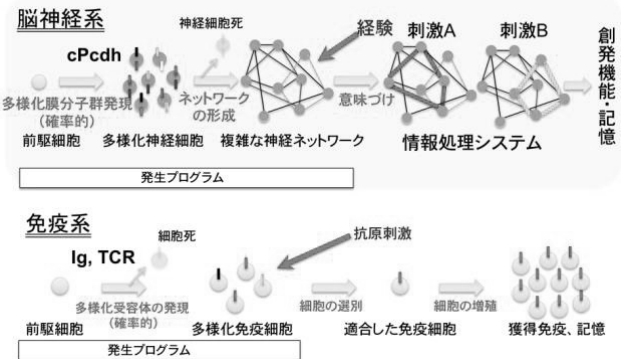


図7 免疫系と脳神経系における多様化遺伝子群のランダム発現によるシステム形成メカニズムの概略。本研究により脳神経系において多様化 cPcdh 遺伝子のランダムな組み合わせ発現による複雑な神経ネットワーク形成への関与が示唆された。今後、この複雑な神経ネットワークとセルアセンブリ、記憶、神経情報の統合への関与を明らかにすることにより、ヒト脳における莫大で高度な情報処理ができる生物学的基盤が解明され、脳研究における革新的発見や技術となることが期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

cPcdh 遺伝子群を欠損させたマウスを用いたセルアセンブリの解析が共同研究体制の確立が遅延した為、十分な成果を出すことができなかった。

<今後の課題、展望>

コンディショナルノックアウトマウス作製により、cPcdh 遺伝子群とセルアセンブリとの関係、記憶ダイナミズムとの関連性を明らかにする予定である。また、cPcdh α 欠損マウスでは、短期記憶、ワーキングメモリーの異常が認められた (Yamagishi et al., Sci. Rep. 2018)。更に、エピジェネティック制御による cPcdh 遺伝子群の発現制御機構 (Jiang Y et al., Nature Genetics 2017)、ヒト統合失調症と cPcdh 遺伝子との関連性が明らかになり (Shao Z et al., Nature Neurosci. 2019)、今後、自閉症を含め精神神経疾患の発症メカニズムの理解と治療法開発に発展してゆくことが期待できる。

エピソード学習で動的に変化する海馬発火活動とCA1シナプスの多様な可塑性

研究代表者：美津島 大 分担研究者：木田 裕之、石川 淳子、崎本 裕也

山口大学大学院医学系研究科・神経生理学講座

<研究の目的と進め方>

海馬は「いつ、どこで、何があったか」というエピソード記憶の形成に中心的な役割を持つ。海馬には時間情報 (Mitsushima et al, J Neurosci 2009) や空間情報 (Wills et al, Science 2010) が入るが、記憶の符号化ルールは未だ不明である。申請者は回避学習が海馬CA1ニューロンのAMPA受容体を興奮性シナプスへ移行させ、これを阻止すると回避学習が成立しないことから、AMPA受容体のシナプス移行が学習成立に必要なことを証明した (Mitsushima et al, Proc Natl Acad Sci USA 2011)。

さらに、回避学習はAMPA受容体を介する興奮性シナプスの可塑性だけでなく、GABA受容体を介した抑制性シナプスの可塑性も高める結果、個々のCA1ニューロンが複雑かつ多様なシナプス入力を持することも発見した。興奮性シナプスの多様性や抑制性シナプスの多様性を失わせると、どちらの場合も学習が成立しないため、学習がもたらす多様なシナプス可塑性がCA1ニューロンの記憶痕跡であると考えられた (Mitsushima et al, Nature Commun. 2013)。

本研究では、回避学習のみならず文脈の異なる様々なエピソード学習を行い、海馬発火活動に及ぼす影響を、自由行動動物を用いて解析する。平成26年度は文脈の異なるエピソード学習の過程を、それぞれin vivo単一ニューロン発火活動として捉え、リアルタイムで記憶形成過程を明らかにする。平成27年度は、遺伝子導入動物に文脈の異なるエピソード学習を負荷し、パッチクランプ法で多様なシナプス可塑性として残された記憶痕跡を明らかにする。さらに組織的手法により、興奮性シナプスと抑制性シナプスに刻み込まれた、記憶痕跡も明らかにする。エピソード記憶の符号化ルールを総合的に導き出し、メカニズムの全容が明らかになれば、トラウマ記憶の消去や、認知症に対する作用点を明示し、新たな創薬開発の突破口を開くはずである。

<研究計画>

【平成26年度】SD系雄ラットを用い、深度可変タングステン電極をCA1直上部に刺入しておく (図1c)。実験当日、CA1錐体細胞層に刺入し、Spike 2を取得システムとして、ホームケージ内の自由行動状態でリアルタイム記録を開始する。複数のユニット活動はソフトウェア上で単一ニューロンの活動として分離可能である (図1d)。

十分馴らしたホームケージ内でin vivo発火活動の記録を開始した。15分以上記録した後、10分間のエピソードを経験させ、ホームケージ内でさらに30分以上発火活動を記録した (図1a)。以下4種類いずれかのエピソード経験をさせた。①ストレス学習群、②♀ラット提示群、③♂ラット提示群、④新奇物体提示群にエピソードを学習させることにより、異なるエピソードがCA1ニューロン発火活動に及ぼす影響と差異を解析する。さらに文脈を再提示して、想起中の発火活動の変化と記憶強度の確認も行う。

【平成27年度】上記エピソード学習が、海馬CA1に残すシナプスレベルでの記憶痕跡を、スライスパッチクランプ法で解析する。回避学習群では興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性が複雑に高まる結果、個々のCA1ニューロンが多様なシナプス入力を保持することが判明した (Mitsushima et al, Nature Commun,

2013)。本研究では、異なるエピソード学習が、多様なシナプス可塑性に及ぼす影響と差異をパッチクランプ法で明らかにする。In vivo発火活動、シナプス可塑性、形態的記憶痕跡の3者を総合的に捉えることにより、記憶情報の海馬CA1シナプスへの「符号化ルール」を明らかにする。

<得られた研究成果>

多ニューロン発火活動

行動実験の結果、前述の①～④のエピソード全てで行動を指標とする学習が成立した (図1b)。

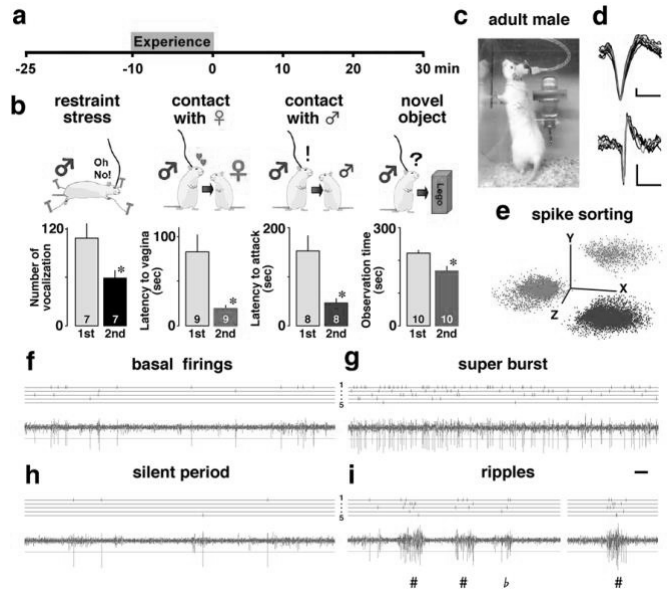


図1 a:いずれかのエピソードを10分間経験させ、さらに30分間自発発火活動の記録を続けた。b:翌日、同じエピソードを再経験させて行動変化を記録した。c:成熟雄性ラットを用い、海馬CA1での多ニューロン発火活動を記録した。d:各スパイクの特徴を抽出し、e:ソーティングを行なった。f:basal firings. g:super burst. h: silent period. i:リップル様発火活動の例。

エピソード経験前はbasal firings (図1f) を中心とする散発的な発火活動が見られたが、10分間の拘束ストレスにより、CA1ニューロン活動が顕著に増加し、数百msec～数十秒に渡る高頻度自発発火活動(super burst: 図1g)が見られた。Super burstはエピソード提示前15分間の発火活動と比較して標準偏差の3倍(+3SD)以上自発発火活動が増加した状態と定義して抽出した (図2)。♀ラットの提示によっても、数百msec～2秒のsuper burstがepisodicに発生し、さらに♀を除いた後にも散発的に発生が見られた。♂ラットの提示中でもsuper burstは増加し、リップル波も見られたが、♂を除いた後のsuper burstは短く、不明瞭であった。新規物体の提示でも学習は成立し、super burstを示す個体もいたが、リップル様発火活動のpeak数は減少した。

最初のSuper burstの数分後からリップル様の短期高頻度自発発火活動 (~50msec: 図1i) とsilent period (図1h) の反復挿入が始まった。Silent periodは+3SD以上のinter spike interval

と定義して抽出した。さらに、海馬脳波との同時計測から、このリップル波は海馬 θ 波の頂点位相 (0° もしくは 180°) に一致する事が多かった。リップル波は次第に強化され、実験期間中維持された。

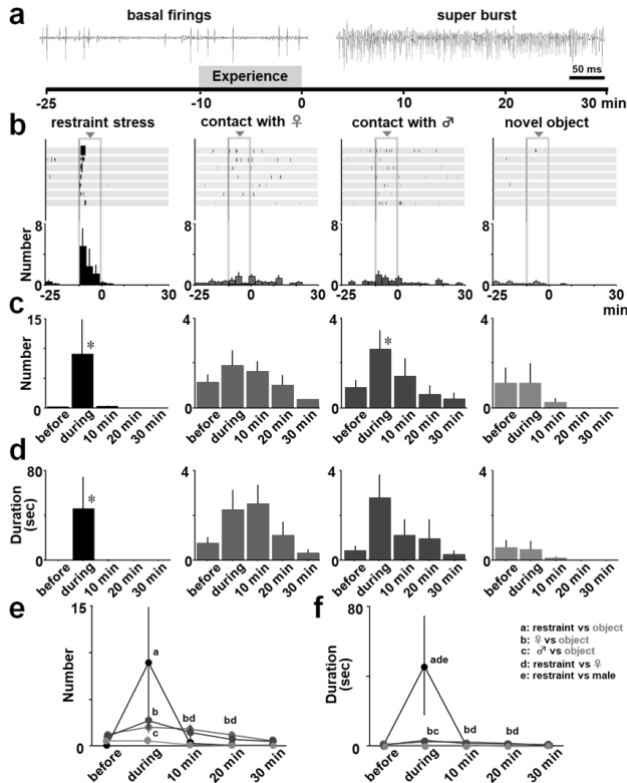


図2 a: 実験スケジュールと basal firings, super burst の例。b: super burst の発生時間をプロットした。エピソード中とエピソード後に super burst が散発した。c: 各時間における super burst の発現数。d: 各時間における super burst の積算時間。e: super burst 発現数の群間比較。f: super burst 積算時間の群間比較。Nonparametric test で $P < 0.05$ を有意差ありとした。

リップル様発火活動はエピソード経験前のホームケージでも散見されたが、特に拘束ストレスや♀との接触など、情動性の強いエピソード経験で多様化は特に顕著であった。個別のリップル様発火活動について peak 数、amplitude、duration、arc length など4パラメータ (図3B) を抽出した所、経験前後にリップル様発火活動が有意に強化され、多様化した状態が維持された。さらに、社会性経験や物体観察など異なるエピソード経験間では有意にリップル様発火活動の波形が異なることも確認した (図3C)。

MANOVA を用いて数千個のリップル様発火活動を全体解析すると、エピソード前後だけでなく、エピソード間に有意差が認められた。以上より、①エピソード学習は海馬 CA1 の多ニューロン発火活動の形状を有意に変化させること、②経験したエピソード内容によってリップル様発火活動は形状が異なることが判明した。

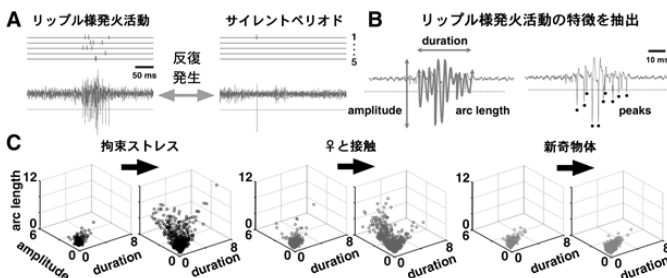


図3 A: 複数のニューロンによる協調的な発火活動によりリップル波が形成され、サイレントペリオドとリップル波は反復発生

した。B: リップル波の amplitude, duration, arc length, peak 数を、経験前後や異経験間で比較した。C: 各点は一つのリップル様発火活動を示す。リップル様発火活動は経験後に多様化し、様々な特徴が経験間で異なった。紙面の都合で、♂と接触群の結果は割愛したが、多群とは異なる特徴分布が見られた。

興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性

Super burst が内因性の自発性高頻度刺激となり、結果、エピソードごとに CA1 ニューロン群に異なるシナプス可塑性が誘発され、最終的に学習依存的なリップル様発火活動の変化をもたらされ学習が成立するのではないか? という仮説を立て、研究を進めた。エピソード学習30分後のCA1シナプス電流をスライスパッチクランプ法で解析した。

興奮性シナプスの単一シナプス小胞は約 2000 分子の glutamate を含み、抑制性シナプスの単一シナプス小胞は約 2500 分子の GABA を含む事が知られている。背側海馬 CA1 錐体細胞にパッチクランプを行い、各 CA1 ニューロン毎に単一シナプス小胞あたりの興奮性シナプス後電流 (mEPSC) と抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を解析した。非学習群とエピソード学習群を比較する事で、学習依存的なシナプス可塑性が判定できる。4つのエピソード経験全てでシナプス可塑性が認められ、興奮性と抑制性のシナプス多様化は経験内容で異なる事が判明した (図4)。

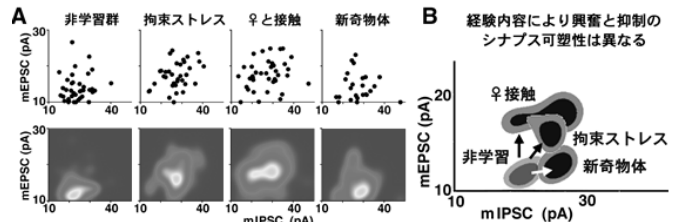


図4 A: 各点は1つのCA1ニューロンを示し、単一シナプス小胞あたりの平均興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を縦軸に、平均抑制性シナプス後電流を横軸にプロットした。興奮と抑制のシナプス電流の強さはCA1ニューロンごとに異なるが、エピソード学習はシナプス可塑性を誘発し、シナプス入力をさらに多様化した。下図は Kernel 密度解析による分布領域の Heat Map を示す。B: 各エピソード経験後の上位 10% と 20% 領域を示す。エピソード経験は興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性を高めるが、シナプス可塑性の強さと特徴は経験内容で異なる事が判明した。紙面の都合により、♂と接触群の結果は割愛した。

以上、情動性、社会性、新奇性の各エピソード経験が海馬 CA1 の多ニューロン発火活動とシナプス可塑性に及ぼす影響を検討したが、次に、同じく海馬依存性学習である回避学習課題を用いて、海馬 CA1 における AMPA 受容体 Na^+ チャネル数、GABA_A 受容体 Cl^- チャネル数の単一チャンネル電流とチャンネル数の変化を分子レベルで解析した。

AMPA 受容体と GABA_A 受容体の open channel 数

Nonstationary Fluctuation Analysis 法で、回避学習はシナプス下膜の単一チャンネル電流を変化させずに、AMPA 受容体や GABA_A 受容体の open channel 数を増加させることが判明した (図5)。

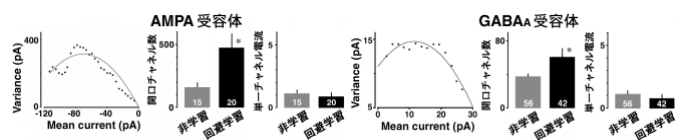


図5 回避学習は CA1 neuron の AMPA 受容体チャンネル数 (左) と GABA_A 受容体チャンネル数 (右) を共に増加させた。各受容体の単一チャンネル電流 (pA) には影響しなかった。 $P > 0.05$ vs 非学習群。

GABA_A 受容体 β_3 subunit Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹ のリン酸化

GABA_A 受容体 β_3 subunit の cytoplasmic loop に存在する

Ser408-409 は PKC、PKA、CaMKII によるリン酸化修飾を受け、活動依存的な GABA_A 受容体の抑制性シナプスへの移行に強く関わる (Luscher ら Neuron 2011)。そこで背側 CA1 領域を切り出して GABA_A 受容体のリン酸化を解析し、回避学習直後における $\beta 3$ subunit の Ser408-409 リン酸化を確認した。これまでの研究で、回避学習は GABA_A 受容体 $\beta 3$ subunit の intracellular loop にある Ser408-409 を急性的にリン酸化させる事が判明した (図 6)。Ser408-409 のリン酸化は膜上の GABA_A 受容体の internalization に関わる蛋白との結合を阻止し、ポストシナプスにおける GABA_A 受容体を増加させる事が判明している。

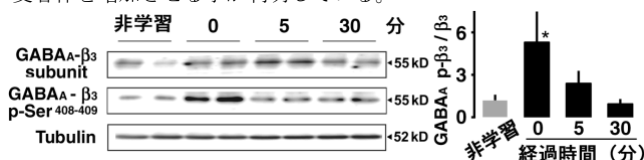


図 6 回避学習直後、GABA_A 受容体 $\beta 3$ subunit の Ser408-409 リン酸化がはじめて確認された。P < 0.05 vs 非学習群。N=8
スパインの形態変化

シナプス多様化は回避学習 10 分後が最大で、減衰しながら多様性が維持された。ゴルジ銀染色を行うと、GABA_A 受容体を介する抑制性シナプスが約 94% を占める細胞体領域で、filopodia 型スパインの急性的かつ有意な増加が確認された (図 7)。また basal dendrite と apical dendrite においても filopodia 型、long thin 型、thin 型、stubby 型、mushroom 型にスパインを分類し、回避学習依存的なスパインの形状変化を詳細に確認した。

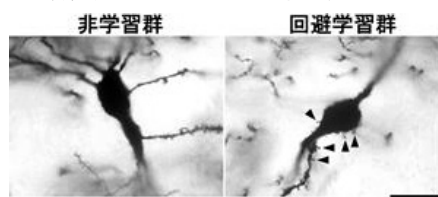


図 7 CA1 pyramidal neuron の多焦点画像 回避学習 10 分後、細胞体周辺に filopodia 型スパイン数の有意な増加が確認された (▲)。ゴルジ染色 x1000, bar = 20 μ m。

<国内外での成果の位置づけ>

シナプス連続電気刺激による長期増強現象 (LTP) は海馬で発見され (Lomo 1966)、記憶のシナプスモデルと考えられた。脳に連続刺激電極は存在しないが、申請者は、海馬スライスにアセチルコリン (ACh) を処置すると、LTP が誘発される事実に着目し (Auerbach ら 1996)、独自に海馬 ACh について研究を進展させてきた (Mitsushima ら 2003, 2008, 2009, 2013 など)。

海馬 ACh 分泌はエピソード記憶の形成に不可欠であり (Gold, 2004)、Alzheimer 型認知症では減少が著しい。日本で開発された ACh 分解酵素阻害薬 (アリセプト®) の有効性は、海馬 ACh のヒト臨床における重要性を示し (Petersen ら New Eng J Med 2005, Winblad ら Lancet 2006)、下流システムの解明は、アリセプトに代わる新しい創薬ポイントの抽出に必要不可欠である。申請者は海馬 ACh が学習依存的なシナプス多様化の引き金であることを初めて報告した (Mitsushima ら Nat Commun 2013)。

興奮性シナプスと比べ、抑制性シナプス可塑性の歴史は極めて浅い。Cui らは、空間学習が CA1 における GABA 分泌を高めるシナプス前細胞側の可塑性を 2006 年 Cell に初めて報告した。また、GABA_A 受容体ポストシナプスの可塑性は、申請者らが回避学習を使って 2013 年に報告した。この研究で、AMPA 受容体を介する興奮性シナプスも抑制性シナプスと共に多様化されるため、各ニューロンのシナプス入力強度が多様化する事実を突き止めた。その後、光遺伝学を用いた他グループの研究で、GABA 介在ニューロンを抑制すると学習が獲得できない為、GABA ニューロンは学習に必要であることが判明した (Lovett-Baron ら Science 2014)。

GABA_A 受容体の $\beta 3$ subunit Ser408-409 は PKA, PKC, CaMKII

依存的にリン酸化修飾を受け、リン酸化は AP5 との結合を阻止して、受容体の細胞内取り込みが抑制される。2018 年申請者らは初めて、実際の学習で GABA_A 受容体 $\beta 3$ subunit-Ser408-409 のリン酸化を捉え、その Temporal dynamics も明らかにした (図 6)。次にリン酸化を阻止することで、学習依存的なシナプス可塑性や学習との因果関係を立証する必要がある。

近年、Shannon の情報理論がスパイン形態の多様性やリップル波の発生解析など神経科学分野にも応用され始めた (Maltinez-Bellver ら J Physiol 2017; Bromer ら PNAS 2018)。リップル波を電気刺激や光遺伝学的に除去すると学習が損なわれるため、経験情報を符号化すると考えられるが (Girardeau ら Nat Neurosci 2009, Norimoto ら Science 2018)、符号化ルールは全く不明である。異なる経験によるシナプス多様化とリップル波の違いは我々が初めて捉えた現象である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

エピソード経験中から直後にかけて、super burst が複数回発生し、興奮性シナプスと抑制性シナプスが可塑的に変化して多様化し、海馬 CA1 ニューロンは多種多様なリップル様発火活動を示した。リップル波は amplitude, duration, arc length, peak 数など複数のパラメータで多様性が有意に増し、リップル波が内含する情報は明らかに増加している事が判明した。ただ、上記 super burst、シナプス多様化、リップル様発火活動の多様化、エピソード学習成立の 4 者の因果関係の証明は今後の課題である。さらにリップル波に内含されている「情報の意味」を抽出するまでには至っていない。

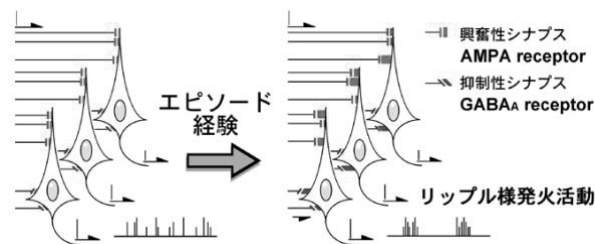


図 8 エピソード学習の仮説。経験したエピソード特異的に super burst が複数回発生し、CA1 pyramidal neuron における興奮性シナプスと抑制性シナプスが多様化し、結果的にエピソード特異的なリップル様発火活動が形成され、学習が成立する。

<今後の課題、展望>

共同研究者の山口大学理学部物理・情報科学科の西井らは脳波や筋電図などについて、Python をプログラミング言語とする AI 機械学習によるデータ解析を行ってきた (Nishii ら 2016)。今後は、抽出されたリップル様発火活動の数千パラメータを機械学習により比較解析し「どのパラメータが何の経験に対応し、何を意味するか」「経験内容を読解可能か」など具体的な符号化ルール解明を目指す。機械学習による網羅解析と符号化ルールの解明は、比類なき独創的な試みである。

現時点で脳内の符号化ルールは全く不明の未踏領域であるが、脳情報の解読は、医学・生理学に今世紀ブレークスルーをもたらす最重要課題の 1 つであるに違いない。

記憶のダイナミクスの時空間的解析

研究代表者：高橋 琢哉

横浜市立大学・医学部

<研究の目的と進め方>

本研究は脳可塑性において中心的な役割を果たしている AMPA 受容体(グルタミン酸受容体)の PET(ポジトロン断層撮影)プローブを世界に先駆けて作製し、脳全体のイメージングを行うことにより記憶形成のメカニズムを、特に脳領域の時空間的連携に絞って解析することを目的としている。申請者は生体内における AMPA 受容体(グルタミン酸受容体)シナプス移行が、記憶学習をはじめとした様々な高次脳機能の可塑的現象の分子細胞メカニズムであることを明らかにしてきた。申請者はこれまで、げっ歯類を用いて、電気生理学的手法、二光子顕微鏡による in vivo イメージングを駆使して AMPA 受容体シナプス移行の in vivo 評価系を構築してきたが(図)、これらの方法では、脳全体の活動を同時に観察することができない。本研究で開発を目指す AMPA 受容体標識 PET プローブによりこれが可能になり、記憶形成のメカニズムを長期間にわたって脳全体で解析することができる。

<研究計画>

AMPA 受容体のシナプス移行は細胞表面に提示されている AMPA 受容体の量と相関があると考えられている。したがって、シナプス機能を反映した PET プローブであるためには細胞表面提示された AMPA 受容体を認識する PET プローブである必要がある。

本課題遂行において申請者は以下のような予備的な未発表研究結果を得ている。

1) 文脈恐怖条件付けの一つである inhibitory avoidance テスト(IA テスト：下記)において、海馬における AMPA 受容体の細胞表面提示量が増えている。

2) この動物実験系を用いて、様々な既知の AMPA 受容体結合化合物をスクリーニングした。IA テストを受けた動物に、様々な AMPA 受容体結合化合物を injection し、その動物の海馬を採取し、質量分析器にかけた。IA テストによっては海馬における AMPA 受容体の総量は変化がない。したがって、検出した AMPA 受容体の量が増えているということは、細胞表面提示された AMPA 受容体の量を反映していることになる。この系を用いて、IA テストをかけた動物の海馬において検出量が増加している化合物 A をすでに特定している。

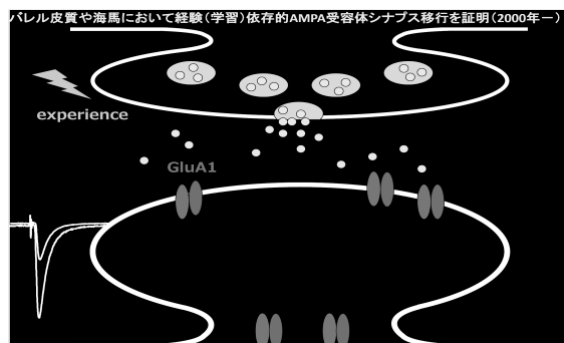
これに基づいて以下の研究計画を予定している。

1. ラットに既知の AMPA 受容体化合物を投与し、IA テストによって海馬での化合物濃度が上昇するかを検討する。
2. IA テストにて海馬で濃度が上昇した化合物に対して、C-11 で放射線標識を行った化合物を合成し、IA ラットを用いて長期間にわたって PET 撮像を行う。
3. IA 記憶のみではなくその他の記憶形成過程においても PET 撮像解析を行う。

<得られた研究成果>

1) 本研究はグルタミン酸受容体である AMPA 受容体を認識する PET (ポジトロン断層撮影) プローブを開発し、脳全体のイメージングを長期間にわたって行い、記憶のメカニズムを時空間的に解明していくことを目的としている。AMPA 受容体のシナプスへの移行はシナプス可塑性のメカニズムの一つとして広く認識されている。AMPA 受容体シナプス移行は細胞表面の AMPA 受容体の提示量と密接に関係していることが知られている。本研究では AMPA 受容体の細胞表面提示を反映する PET Probe の作製を目指している。文脈恐怖条件付けの一つである inhibitory avoidance test (IA test: 暗い部屋と明るい部屋を隣接して作製し、ねずみが両者を自由に行き来できるようにする。ねずみは通常暗いボックスに入ろうとするが、暗いボックスに入ったときに電気ショックを与え、入らないように条件付けする海馬依存的学习)において、海馬における AMPA 受容体の細胞表面提示量が増えていることは見出している。この系を用いて、既存の AMPA 受容体結合化合物をラットに injection し、質量分析器を用いて海馬における化合物の量が増えている化合物をスクリーニングした。その結果、compound A が IA において海馬組織における含有量が増加していることが明らかになった。その化合物を放射性ラベルし、ラットにおいて撮像したところ、顕著なシグナルが海馬、線条体に見られた。さらにこの結合が特異的であることを示すため、同じ化合物の過剰量の cold 体と放射性ラベルされた化合物を同時に injection して撮像したところ、シグナルの intensity が顕著に下がった。このことは compound A によるシグナルが特異的であることを示している。

2) AMPA 受容体の PET Probe を開発することは記憶のメカニズムを解明する上で非常に大きな技術開発であり、その候補化合物を同定し、特異的シグナルが撮像できたことは予想を上回る進展であると考えられる。既知の AMPA 受容体結合化合物のスクリーニングは 20 種類近くにおよび、IA を用いたスクリーニング系の確立と合わせると非常に大きな労力になる。その中で有望な候補化合物を絞り込めたことは大きな成果であると信じている。



<国内外での成果の位置づけ>

AMPA 受容体を標識する PET probe は存在しなかった。それを開発したのは世界初である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

PET を用いたラットの画像解析は解像度が低く困難であった。

<今後の課題、展望>

動物が新しいことを経験し学習や適応をする際に、脳に変化が起きる。この変化のことを可塑性と呼ぶ。グルタミン酸シナプスは脳内シナプスの約9割を占めており、精神神経活動において中心的な役割を果たしている。グルタミン酸受容体の中ではAMPA型受容体とNMDA型受容体が主に研究が進んでいる。グルタミン酸受容体の一つであるAMPA受容体はグルタミン酸シナプスの機能を中心的に担っており、従って精神神経機能発現の主役とも言える分子である。AMPA受容体にはGluA1-GluA4の4つのサブタイプが存在し、この中の組み合わせで4量体を形成している。申請者らは様々な行動/環境における経験依存的AMPA受容体シナプス移行について研究を展開してきた。今回AMPA受容体を標識するPET probeの開発に成功した。今後はsubunit特異的なAMPA受容体PET probeの開発を進めていきたい。

運動に関わる局所神経回路の流動性が担う機能

研究代表者：木村 梨絵

生理学研究所・視覚情報処理研究部門

<研究の目的と進め方>

動物は、学習によって、外界の様々な刺激を知覚・認知し、その情報に基づいて運動行動するようになる。見慣れた物体であれば、判別が多少困難であっても特定の行動出力が可能である。この学習の過程で、脳内の神経活動に生じる変化の全体像はあまり理解されていない。学習に関する、これまでの多くの研究では、動物に繰り返し同じ課題を行わせた時の、神経活動の試行平均を解析しており、神経活動の試行間ばらつき（流動性）の機能的意義については解明されていない。

古くから、試行間ばらつきに代表される揺らぎは、情報コーディングに対してマイナスの意味を持つと考えられ、“ノイズ”と表現されてきた。例えば、生体が入力情報を受けて、何らかの行動出力をする際は、試行平均でなく、単一試行で、瞬時に正確に情報処理を行う必要があるにも関わらず、毎回異なる神経活動を示すというのは、一見、矛盾している。最近になって、一次視覚野の神経活動を多次元で評価することによって、この矛盾に挑んだ研究が発表された (Montijn et al. 2016)。低次元では、試行間ばらつきがあって不安定な情報コーディングが、試行間ばらつきを、視覚刺激の特徴をコードしていない軸に制限することで、多次元では安定になり、また、周りの細胞の神経活動から、特定の細胞の単一試行の神経活動を推定することもできるとの報告がなされた。したがって、試行間ばらつきは、ランダムなノイズではなく、覚醒度などの不安定な情報をコードしていると考えられた。しかしながら、依然として、試行間ばらつきは機能的意義について、未だに実験的にははっきりとは明らかにされていない。

本研究では、学習後に視覚弁別誘発性の運動課題を遂行するラットの、大脳皮質の入力にあたる一次視覚野と、トップダウン入力を与える高次運動野（二次運動野、M2）の発火活動を、多チャンネル電極を用いて、一斉に多細胞同時記録（マルチユニット記録）した。マルチユニット記録は、各チャンネルから記録されるスパイク波形の特徴から、スパイクソーティングによって、単一の細胞由来の活動に分離でき、さらに、スパイクの幅によって、主に興奮性の Wide-spiking (WS) 細胞と、主に抑制性の Narrow-spiking (NS) 細胞に分類して解析した。試行ごとの行動と神経活動を対応させ、また、学習前の覚醒状態、あるいは、学習後に麻酔状態にして受動的に視覚刺激を提示した時の神経活動との比較を行うことで、学習過程で起きる記憶ダイナミズムを、試行間ばらつきに着目して明らかにすることを目指した。

<研究計画>

1) 頭部を固定したラット個体動物に、コントラスト100%でラットに見えやすい視覚刺激を用いて、縦縞が提示された時に、レバーを押し、横縞では、レバーを引くという、視覚弁別誘発性の運動課題を学習させる。その学習完了後に、コントラスト100%の刺激を用いて弁別を行わせるだけでなく、コントラストを低下させて、40%、20%の見えにくい刺激も提示する (Task群)。これによって、不正解の試行も生じるようにして、行動の正答率を

変化させる。

2) 学習後に、(1)の行動課題を遂行するラットの一次視覚野と、二次運動野から同時に多細胞の発火活動をマルチユニット記録し、局所電場電位 (Local field potential; LFP) も合わせて記録する。

3) (2)で記録された発火活動は、提示した視覚刺激のコントラストに応じて、どのように変化するかを解析し、特徴的神経活動を明らかにする。

4) (2)で記録された発火活動を、単一試行で、行動課題の正誤と対応付けて解析する。

5) 学習前の個体動物を覚醒状態 (Passive群) で用いて、視覚刺激を報酬とは無関係に受動的に提示する。あるいは、学習後の個体動物を麻酔状態 (麻酔群) で用いて、視覚刺激を受動的に提示する。

6) (5)のラットの一次視覚野と、二次運動野から同時に多細胞の発火活動をマルチユニット記録し、局所電場電位 (LFP) も合わせて記録する。

7) (3)で明らかになった、視覚刺激のコントラストに応じた特徴的神経活動は、学習前のPassive群、学習後の麻酔群において(6)で記録された神経活動から、どのようになるかを調べる。

8) (2)と(6)で記録された、一次視覚野の多細胞の発火活動は、単一試行において、どの程度正確に情報をコードしているかを、デコーディングの解析を行うことで明らかにする。Task群、Passive群、麻酔群の間での比較を行う。

9) Task群において、(8)で算出された、情報コーディングの精度は、(3)で観察されたコントラストに応じた特徴的神経活動を示す細胞を除いた場合にどのように変化するかを調べる。

10) (2)と(6)で記録されたLFPを解析し、視覚刺激のコントラストに応じて、どのように変化するかを調べる。Task群とPassive群の間での比較を行う。

11) (10)で解析されたLFPに関して、一次視覚野と二次運動野の関係を調べる。

12) (2)と(6)で記録された、一次視覚野の発火活動において、数ミリ秒以内の高い時間精度における同期的な発火活動を解析し、提示する視覚刺激のコントラストに応じて、どのように変化するかを調べる。Task群とPassive群の間での比較を行う。

<得られた研究成果>

縦縞の視覚刺激が提示された時にレバーを押し、横縞ではレバーを引くという視覚弁別誘発性の運動課題 (図) を、コントラスト100%で、高コントラスト刺激を用いてラットに学習させた。多くのラットで、学習し、85%以上の正答率で課題遂行した。学習後、視覚刺激のコントラストを40%、20%に下げ、弁別が困難な課題についても実施した。弁別の難易度を上げることで、不正解の試行も生じるようにし、チャンスレベル (50%) より高い

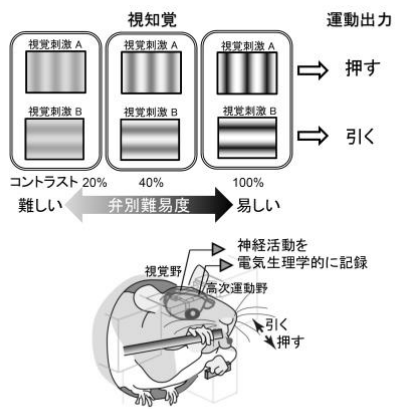


図 視覚弁別誘発性の運動課題

確率の65-90%程度の様々な正答率にふることに成功した。この課題遂行中に一次視覚野深層にある多数の神経細胞から、多チャンネル電極を用いて発火活動を記録し、各チャンネルから記録

されたスパイク波形の特徴から単一細胞由来の活動に分離した。スパイクの幅によって、主に興奮性細胞と考えられるWS細胞と、抑制性細胞と考えられるNS細胞に分類して解析を行った。

これまでの多くの研究により、一次視覚野の神経細胞は刺激コントラストが上昇するにつれて発火頻度が上昇することが報告されている。課題遂行中の視覚応答を解析したところ、多くのWS細胞、NS細胞が高コントラスト刺激に有意に強く応答したが、同時に、多くのWS細胞、NS細胞では、高コントラスト刺激よりも、むしろ、低コントラスト刺激に有意に強く応答することを見出した。このような低コントラスト優位な細胞は、課題の正解時に強く活動する傾向があった。

また、この学習後のラットを麻酔して（麻酔群）、視覚応答を記録したところ、弁別課題遂行中（Task群）に見られた、低コントラスト優位な細胞は見られなかった。さらに、学習していないラットに受動的に視覚刺激を提示した場合（Passive群）にも、低コントラスト優位な細胞は稀であった。

次に、低コントラスト優位な細胞の発火活動が表現する情報を調べるために、各試行で、提示した視覚刺激が縦縞か横縞かを、課題遂行時に記録した細胞集団の応答からデコーディングできるかを調べた。その結果、高コントラスト優位な細胞よりも低コントラスト優位な細胞を含めてデコーディングをすると、その精度が良くなり、特に、低コントラスト刺激を提示した時のデコーディングの精度が有意に上昇した。また、学習後の麻酔時、あるいは、学習前の受動的に刺激を提示した時の神経活動から作製したデコーダーは、課題遂行時の神経活動を用いた場合に比べて、デコーディングの精度が低かった。以上の結果は、課題遂行時に特異的に見られる低コントラスト優位な細胞は、見分けにくい低コントラスト刺激の弁別に関与すると考えられる。

ここで、通常、試行間ばらつきが低くなるほど、情報の精度は高くなると考えられる。しかしながら、高い情報の精度を示した学習後の課題遂行時の神経活動の試行間ばらつきは、提示した視覚刺激のいずれのコントラストにおいても、麻酔時に比べて、2倍程度の高い値を示した。さらに、同じく、いずれのコントラストにおいても、学習前に比べて若干、試行間ばらつきは小さくなったものの、ほぼ同程度の大きさを示した。

さらに、個々の細胞レベルで縦縞と横縞をどの程度区別して表現しているかについて、エフェクトサイズ（dプライム）を算出して評価した。この指標は、縦縞あるいは横縞を提示した時の発火頻度の試行平均の差分を、縦縞と横縞の各試行の応答の標準偏差の重み付け平均（併合標準偏差）で割ることによって計算する。つまり、試行間ばらつきの情報も含まれたインデックスということになる。このdプライムは、いずれのコントラストにおいても、細胞集団のデコーディング精度と同様に、学習後の課題遂行時に高く、学習後の麻酔時、あるいは学習前の受動的な刺激提示時で

は、低い値を示した。学習後も依然として残る、大きな試行間ばらつきを上回る、縦縞、横縞の発火頻度の違いがあると考えられる。実際、細胞集団のデコーディングにおいても、縦縞・横縞を提示した時の試行平均応答の細胞集団ベクトル（重心）間の距離は、学習後の課題遂行時に、学習後の麻酔時や学習前の受動的な視覚刺激提示時に比べて、大きな値を示した。

以上から、提示した視覚刺激のいずれのコントラストにおいても、個々の細胞や細胞集団の神経活動は、学習前後で大きな試行間ばらつきを維持しているものの、学習後においては、提示した視覚刺激の特徴をより強く分離して表現するようになるため、精度高く情報を保有することが可能になっていると示唆された。この縦縞・横縞の分離した情報表現を、低コントラストにおいても実現するのに寄与しているのが、先ほど述べた、低コントラスト優位な反応であると考えられる。

さて、この低コントラスト優位な反応は、どのようにして生じるのだろうか。

まず、低コントラスト優位な細胞は、高コントラスト優位な細胞に比べて、自発的な活動、最適コントラストの視覚応答のいずれにおいても、高い発火頻度を示した。つまり、興奮性の上昇が示唆された。次に、刺激コントラストに依存した、神経細胞集団の総体としての活動を評価するために、一次視覚野の局所電場電位（LFP）を解析した。解析した全ての課題遂行中のラットにおいて、コントラストの上昇に伴い、視覚誘発電位（Visually evoked potentials; VEPs）の振幅は増大した。したがって、同期したボトムアップ入力に直接的に関係していると考えられるVEPは、高コントラスト優位な細胞の活動を直接的に説明すると考えられた。さらに、学習によって、低コントラスト刺激によるVEPが、増大することを確認した。これは、低コントラスト優位な細胞の成因になっていると考えられた。

次に、視覚刺激によって、どのような周波数帯域の神経活動が惹起されるかを解析したところ、高コントラスト刺激の提示時に、 β （18-30 Hz）帯域のオシレーションが強く生じることがわかった。さらに、この帯域の位相にロックして発火活動が生じ、特に抑制性のNS細胞は、興奮性のWS細胞に比べて、より位相がそろった神経活動を示した。これらは、いずれも、学習後に増大した。低コントラスト刺激では、顕著なオシレーションは観察されなかった。

最後に、同時に記録したスパイク活動に相互相関解析を適用し、2細胞間の高い時間精度（5ミリ秒以内）における同期的な発火活動を評価した。この結果、学習前に受動的に刺激を見せた場合には、興奮性のWS細胞同士のペアのみ、高コントラスト刺激で、低コントラスト刺激に比べて、強い同期的な発火を示したが、学習後の課題遂行中には、抑制性のNS細胞も含めた細胞ペアにおいても、高コントラスト刺激で、低コントラスト刺激に比べて、強い同期的な発火を示すような傾向が観察された。上記の結果は、学習後の高コントラスト刺激による弁別課題遂行時には、抑制性神経回路が強く駆動されることを示唆する。

以上をまとめると、学習後に見られる低コントラスト優位な視覚反応性は、細胞の興奮性の上昇やボトムアップ応答の増大と、局所回路内の興奮と抑制のバランスの変化によって作られることが示唆された。したがって、すでに一次視覚野のレベルで、判別が困難な低コントラスト刺激に対して強く応答するような細胞が機能することで、その方位情報を高次視覚野に出力するメカニズムが存在すると考えられる。また、麻酔下では低コントラスト優位な反応は見られなかったことから、低コントラスト優位な反応性の創出にはトップダウンの入力も関与していると考えられた。

そこで、多領域間の連携に注目した解析を行った。二次運動野

は、運動機能を直接的に担うだけでなく、報酬に基づく行動選択 (Sul et al., 2011) など、高次の認知機能に関与していることが知られている。運動と知覚・認知を結びつける脳領域として、この二次運動野に注目して、二次運動野と一次視覚野との関係を調べた。まず、学習後のラットが課題を遂行する時、二次運動野のLFPと一次視覚野のLFPのCoherenceを調べたところ、20Hz以下の帯域において、Cue刺激提示の時にCoherenceが減少するが、その後、課題に関係する縞刺激提示の時に再び上昇する傾向が観察された。この学習後のラットのCoherenceの大きさは、学習前に比べて大きいこともわかった。次に、シグナル伝達の方向性を踏まえて解析するために、グランジャー因果を計算した。二次運動野から一次視覚野へのトップダウンのグランジャー因果は、 α (6-16 Hz) 帯域において、Cue刺激で、学習の有無に関わらずに上昇し、その後、減衰する傾向があった。さらに、課題に関係する縞刺激の間に、学習後のラットでは、再びグランジャー因果が上昇した。この縞刺激提示期間中に上昇する因果は、低コントラスト刺激の時ほど大きい傾向もあった。一方、一次視覚野から二次運動野へのボトムアップのグランジャー因果は、低頻度の周波数帯域において、Cue刺激提示の時に低下して、学習前のラットでは、その後も低い値を維持したままであった。学習後のラットは、特に低コントラストの縞刺激が提示された時に、因果の上昇が観察された。

以上の結果は、学習に伴い、低コントラスト刺激提示中には、一次視覚野と二次運動野の間で、双方向性の因果が見られることを示唆しており、ボトムアップ入力の多寡によって、多領域間の連携が変化することが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、低コントラストの視覚刺激提示時でも高い精度で情報を保有するのに寄与すると考えられる、低コントラスト優位な細胞 (低コントラストで強い応答を示す細胞) に、国内外で初めて着目した。これまでの、視覚野の多くの研究は、麻酔下で行われることが多く、また、覚醒下であっても、能動的に視覚弁別している時の神経活動を解析した例はあまりなかったことが原因で、着目されることはなかったのではないかと考えている。

最近、一次視覚野でも、外界を忠実に表現するだけでなく、認知に関わる情報が加えられているとの報告 (Lamme et al., 2000; Montijn et al., 2015; Ress and Heeger, 2003) がなされている。さらには、注意 (Sommers et al., 1999)、報酬 (Chubykin et al., 2013; Shuler and Bear, 2014)、歩行 (Ayaz et al., 2013; Niell and Stryker, 2010)、期待 (Gavornik and Bear, 2014; Keller et al., 2012)、行動タイミング (Nambodiri et al., 2015) などの感覚とは異なる情報を表現しているとの報告がなされている。本研究で、一次視覚野内に発見した低コントラスト優位な細胞は、これらの一連の研究の流れと同様に、一次視覚野内においても、神経活動は、多様に修飾されているということが示された結果と考えている。この修飾作用の結果として、低コントラストであっても、試行間ばらつきを上回る大きな応答を生じる細胞が存在することで、視覚刺激の特徴を区別して安定に情報を表現することが可能になっていることを新たに示唆した。

さらに、一次視覚野内の神経ネットワークは、学習によって、活動依存的に可塑的に変化するということが多くの研究で報告されている (Fontanini and Katz, 2008; Frenkel et al., 2006; Gavornik and Bear, 2014; Karni and Sagi, 1991; Khan et al., 2018; Li et al., 2008; Makino and Komiyama, 2015; Poort et al., 2015)。この可塑性は、神経回路に生じる持続的な変化で、課題の遂行とは独立な成分であるだけでなく、課題の遂行に依存

した成分で、トップダウン入力やネットワーク状態によって影響を受けるものが含まれる (Makino and Komiyama, 2015; Poort et al., 2015)。実際、本研究においても、学習によって、神経ネットワークが変化することがVEPやLFPの解析によって確認されており、M2によるトップダウン入力による影響も変化することが示唆された。そして、この学習による変化が、低コントラスト優位な反応性を生み出しているということが考えられた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究は、もともとは、試行間ばらつきの機能を明らかにすることを目指したものであった。実際、視覚野の特定の神経細胞群にチャンネルロドプシン2を発現させ、人為的に発火させて、発火の試行間ばらつきを小さくすることで、流動性の低下が視覚弁別にどのような影響をもたらすのかを因果的に検討したかったが、チャンネルロドプシン2による人為的な発火を起こす実験の立ち上げを行ったのみで、試行間ばらつきの影響を検討するところまでは行うことができなかった。

行動実験系の立ち上げから、1カ月程かかる行動トレーニング、神経活動計測、多様な神経活動の解析と予想外に時間が必要だった。さらに、研究開始時に研究室の異動も重なって、時間がかかってしまった。

また、視覚弁別誘発性の運動課題を遂行するラットの一次視覚野、および二次運動野から多細胞の神経活動を記録していくうちに、一次視覚野において、低コントラスト優位な反応という非常に興味深い結果を得た。この反応性を示す細胞が存在することで、神経細胞集団として、低コントラストの状況下でも、大きな試行間ばらつきがあるにも関わらず、視覚刺激の特徴を強く分離して表現して、見分けにくい低コントラスト刺激の弁別に関与することが示唆された。このような低コントラスト優位な反応がどのようにして生じるのかなどについて調べる必要があると考え、その解析にも時間がかかってしまった。だが、これによって、新規の重要な知見を得ることができたと考えている。

<今後の課題、展望>

本研究では、当初の目的であった、試行間ばらつき (流動性) の機能を因果的に明らかにするということが、時間の都合上できなかった。しかしながら、視覚弁別誘発性の運動課題を遂行するラットの一次視覚野の神経活動を調べた、現在までの研究において、学習過程における試行間ばらつきの性質を明らかにすることができた。学習の前後いずれにおいても、試行間ばらつきは高い値を維持しているが、学習後には、情報を強く分離して表現することで、神経細胞が担う情報の精度は高いということが明らかになった。さらに、これは、視覚刺激のコントラストという、入力の多寡によって、あまり影響を受けないということがわかった。この際、特に、低コントラストの視覚刺激を提示した時には、低コントラスト優位な神経活動が重要な役割を担っているということが示唆された。この低コントラスト優位な応答は、学習によって生み出されるということもわかった。したがって、これらの結果を踏まえた上で、上記の試行間ばらつきの機能についての検討を、すでに実施できる状態になっている、光遺伝学的な特定の神経細胞の活動操作によって、因果的に明らかにしたいと考えている。

学習記憶能力を賦与するホルモンの作用メカニズムの解明

研究代表者：本間 光一

帝京大学・薬学部

<研究の目的と進め方>

刻印付け（刷り込み）は、孵化直後の鳥類ヒナが親鳥を記憶し追従する早期学習の典型例であり、臨界期を有する記憶のメカニズムを解析するモデルとなっているが、臨界期を決定する因子は不明であった。研究代表者らは、ニワトリヒナを用いた実験系において刻印付けトレーニングを開始すると甲状腺ホルモン (T_3) が脳内へ急速流入し、臨界期を開く決定因子となること、そして T_3 が一過的に作用すると、その後行う他の強化学習の習得効率が顕著に向上すること (MP:メモリープライミングと命名)、さらに T_3 を脳内に局所的に注入することで、一度閉じた臨界期を再び開けることも可能であることを示した (図1)。本研究では、記憶を、定量的かつ個体レベルで解析できるという利点を生かし、『学習記憶能力を賦与するホルモンの脳内作用メカニズムを解明すること』を研究目的とした。

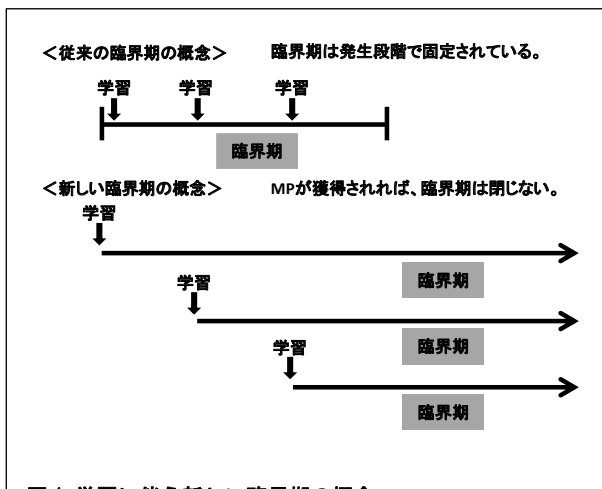


図1 学習に伴う新しい臨界期の概念

従来の学習臨界期の概念では、臨界期は個体発生の過程で固定されており、その期間内に学習すれば習得されるが、期間外であれば習得されない。研究代表者らが提唱する新しい学習臨界期の概念では、内分泌系（ホルモン）によって開始される学習臨界期の開閉は可変的であり、メモリープライミング (MP) を獲得すれば、臨界期は閉じなくなる。

<研究計画>

本研究計画では、定量性に優れ、簡便に刻印付け学習を行なうことが可能なニワトリヒナの学習系を利用する。本研究計画では、以下の3点を研究計画とした。

- 1) メモリープライミングの分子的な実体を解明する。
- 2) 神経細胞棘突起内のアクチンの重合状態の変化を定量的に検出する系を確立する。
- 3) 刻印付けの臨界期を開くホルモンとして同定した甲状腺ホルモン (T_3) が作用する結果起こる薬理学的および生理学的変化を解析する。

<得られた研究成果>

- 1) メモリープライミングの分子的な実体の解明

メモリープライミングの分子的な実体の解明を目指し、メモリープライミングに関与する分子の検索を行った。その結果、刻印付けのプライミングには、Rho GTPaseシグナルに関わる物質群が重要であり、 T_3 が神経細胞に作用するとその細胞内受容体 T_3 と結合したのち、Nucleotide kinase2のリン酸化の亢進、Rho kinaseのリン酸化抑制を経て、神経棘突起のactin骨格の一過的な再編成が起こることがわかった。actin骨格が、学習能力を賦与する T_3 によって変動することは、学習能力を得るための特異的な反応が神経微細構造内で起こることを示唆する。このような神経微細構造の内部改編が記憶成立の構造的な基盤となっていることが考えられる。

- 2) 神経細胞棘突起内のアクチンの重合状態の変化を定量的に検出する系の確立

これまでメモリープライミングを引き起こす T_3 の下流には、神経細胞棘突起内のアクチンの重合状態の変化があることを見出していたが、この変化を定量的に検出する系を確立した。この技術を確立することによって、記憶と神経微細構造の細胞骨格の変化を定量的かつ継続的に調べることが可能になると期待される。方法は、繊維状アクチンと特異的に結合するペプチドを脳内神経細胞にウイルスを用いて遺伝子導入して発現させ、刷り込み学習によって、棘突起内の繊維状アクチン量がどのように変動するかを解析した。この系を利用した結果、刷り込み学習のトレーニングによる繊維状アクチンの増加と T_3 による減少効果が拮抗することを明らかにした (図2)。すなわち刷り込みが起こる際には、アクチン重合と脱重合が一過的に激しくなり、記憶が成立すると元の定常状態に戻るということが明らかになった。この一過的なアクチン重合の変化の間で、記憶成立に重要な生化学的反応が起

こっていることが考えられる。T₃の受容体は細胞内に存在し、T₃と結合すると他の遺伝子発現に関与するとともに、非遺伝子的な作用によって刷り込み記憶の成立に必要な反応をもたらす、神経微細構造内のアクチン骨格に変化をもたらすと考えられる。これまで学習記憶依存のアクチン骨格の変動の報告はいくつかあるが、本研究のように学習能力を与えるホルモンの作用と、学習トレーニングとを組み合わせた解析は初めてであり意義深い。

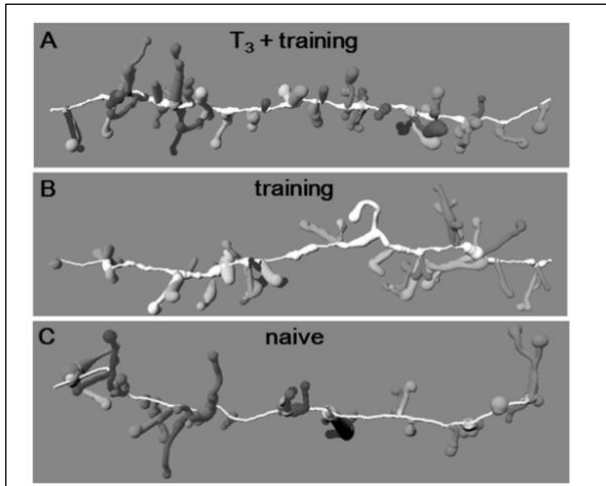


図2 学習に伴う棘突起アクチン骨格の改編

蛍光蛋白で標識したアクチン繊維結合ペプチドを遺伝子導入により棘突起で発現させ、重合アクチンを検出した。学習トレーニング(B)によって IMM 領域の神経細胞の棘突起のアクチンの重合が無処理(C)と比べ過剰に亢進するが、T₃による作用(A)が加わると抑制される。白色が強い棘突起ほどアクチンの重合度が高く、黒色が強い棘突起ほどアクチンの重合度が低い。

3) 刻印付けの臨界期を開くホルモンとして同定した甲状腺ホルモン (T₃) が作用する結果起こる薬理学的および生理学的変化の解析

刻印付けの臨界期を開くホルモンとして同定した甲状腺ホルモン (T₃) が作用する結果起こる薬理学的および生理学的変化を解析した。その結果、GABA_A(γ -amino-butyrac acid)受容体が T₃の下流で働く受容体であることを見出した(図3)。すなわちイオンチャンネル型 GABA_A受容体のアゴニスト (muscimol) を IMM 領域に作用させると T₃ 依存の刻印付けが起こらなくなり、逆に T₃ を投与しなくても GABA_Aアンタゴニスト (bicuculline) を作用させれば刻印付けが起こる。これまでイオンチャンネル型である GABA_A 受容体は、GABA が結合する膜電位変化が起こる (Sivilottiet et al. Prog.Neurobiol. 36, 35-92(1991)) ことが知られている。そこでニワトリ脳の IMM 領域から調製した急性スライスに対する T₃ の効果を電場電位測定法によって調べた。その結果、T₃ の投与によって P 波が増強されることがわかった。また、ホールセル記録を行い、IPSC (抑制性シナプス後電流) が T₃ によって減少することを示唆した。この結果は、GABA_A 受容体を介した Cl⁻電流が T₃ によって減弱されることを示す。以上の結果は、甲状腺ホルモン (T₃) が引き起こす生理学的変化に GABA_A 受容体が関与することを示唆する。

さらに GABA_A 受容体の場合とは反対に、GABA_B アンタゴニスト

(CGP52432)を脳領域に作用させると T₃ 依存の刻印付けが起こらなくなり、逆に T₃ を投与しなくても GABA_B のアゴニスト (baclofen) を作用させるだけで刻印付けが起こることを見出した。

以上の解析から、GABA_A と GABA_B の機能的な役割分担と T₃ シグナリングとの協調的な作用様式を明らかにした (図4)。孵化後1日目のニワトリヒナの脳内では、GABA_A 受容体 < GABA_B 受容体であるのに対して、孵化後4日目には、その量比が逆転して GABA_A 受容体 > GABA_B 受容体となる。孵化後1日目では、シナプス前膜に存在する GABA_B 受容体は GABA の放出を抑え、シナプス後膜に存在する GABA_B 受容体は GABA_A 受容体電位を弱めることによって、投射ニューロンは刻印付けの情報が出力できるようになり、学習が成立する。一方、臨界期が閉じた孵化後4日目では、優勢となったシナプス後膜の GABA_A 受容体は、投射ニューロンの神経活動を減弱させるため、投射ニューロンは刻印付けの情報を出力できなくなる。

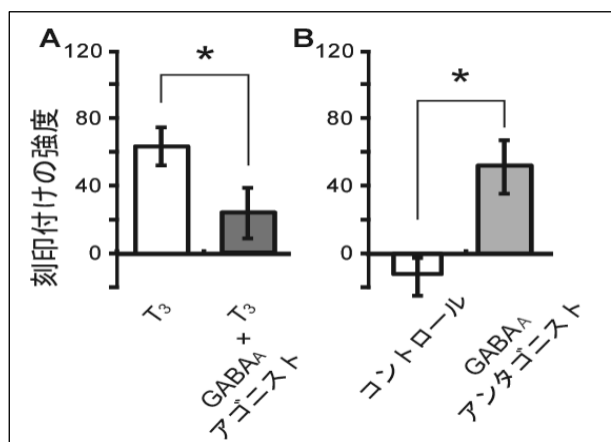


図3 T₃シグナルの下流で働く GABA_A 受容体

GABA_Aアゴニストを IMM 領域に作用させると T₃ 依存の刻印付けが起こらない(A)。逆に GABA_A アンタゴニストを作用させれば T₃ を投与せずとも刻印付けが起こる。これらの結果は、GABA_A 受容体が T₃ シグナルの下流にあり、刻印付け学習に対して抑制的に働く受容体であることを示す。

一方、GABA_B 受容体の場合、このアッセイ系においてアンタゴニストが刻印付け強度を減少させ、アゴニストは刻印付け強度を上昇させることから、GABA_B 受容体は、刻印付け学習に対して促進的に働く受容体であると考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

刻印付けは、ローレンツによる論文(1935)が有名だが、その現象の発見はスバルディングによる 1872 年の報告とされている。その問題提起以来 140 年以上不明であった臨界期を開始させる決定因子としての甲状腺ホルモンの発見、早期の学習記憶のブライマー (導火薬) として働きの解明など、学術的にも高い独創性を含有する。本研究は、早期の学習記憶 (刻印付け) を出発点として、脳内の生化学的、生理学的変化に結びつけていこうとする点に特色がある。臨界期という発生プログラムが脳の学習記憶を制御する分子メカニズムや学習記憶の階層性のダイナミズムを明らかにできる点で、当該領域の推進に資すると考えられる。臨界期を有する記憶を、報酬を必要としない簡便なテストによって研究室内で定量的に評価できることから、記憶関連遺伝子の同定や連合性の高い脳領域での高次機能を生化学的な視点から解析

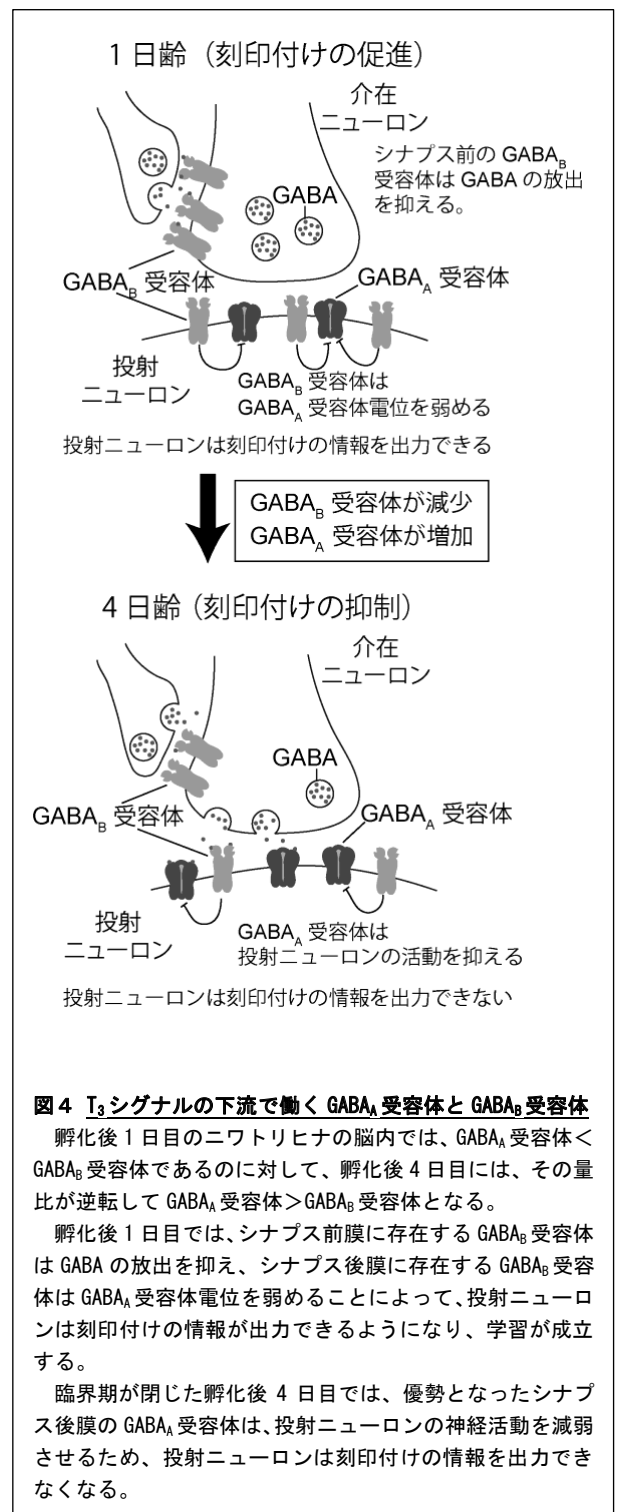
できる。本研究で用いる3つの方法(遺伝子導入による *in vivo* RNAi、遺伝子発現変化の *in vivo* イメージング、神経微細構造の *in vivo* イメージング)は、いずれも鳥類の刻印付け研究のために独自に確立したものであり、独創的な研究展開が期待できる。遺伝子発現と神経細胞の微細構造を生きた個体内でイメージングする方法は、世界的に見てもまだ発展途上の段階といえる。臨界期を有する学習は、言語、絶対音感、社会性の発達などヒトにおいても知られており、本研究の成果を当該領域の他研究グループの研究情報やイメージング技術に応用することも可能である。本研究が進展すれば、学習の臨界期を制御する新たな創薬分野の創出も考えられ、その意義は大きい。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

刻印付けは、ヒナが孵化直後に行う最初の記憶学習である。本研究課題で取り上げた学習感受性期を制御する内分泌系の関与は、研究代表者らが網羅的な遺伝子解析を端緒として、生化学的、薬理的、行動学的な検証の積み重ねから明らかにしてきた新しい概念である。我々の研究の結果から新たにわかったこととして、刻印付けはただ単に親を記憶するための学習ではなく、その後の個体発身に必要とされる様々な学習のプライマーとしての働きを有することがわかってきたことがあげられる。この作用は、学術的に極めて興味深く、そのメカニズムを明らかにすることは大変重要であると考えているが、本研究期間では、時間的に十分ではなく、その全容を明らかにするには至らなかった。今後の研究達成課題としたい。

<今後の課題、展望>

特殊な記憶と考えられていた刻印付けが、 T_3 を介して後の学習をプライミングするという考えは、これまで報告のない新しい概念の提唱である。臨界期は学習自身(刻印付け)によって開始され、さらに次の学習の臨界期の扉を開いていくという学習記憶の階層性が予想される。刻印付けに関与する分子群を利用することで、幼児期の臨界期を過ぎた学習能力の回復、脳の発達障害や記憶障害の治療、加齢による脳機能の回復を目指す研究にも新たな視点を与えることができると考えられる。



情動記憶ダイナミズムの解明

研究代表者：渡部 文子

東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経科学研究部
(現：東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・臨床医学研究所)

<研究の目的と進め方>

侵害受容信号による負情動を手がかりとした記憶は、ショウジョウバエや線虫からヒトまで広く保存された現象であり、侵害受容に関連する感覚情報を記憶することが個体の生存にとって必須であることがうかがえる。しかしながら、痛みシグナルがどのようにして負情動記憶を制御するのかについては不明な点が多い。特に、負情動記憶そのものも慢性疼痛やストレス、恐怖体験などの感覚情報や内的情報によって流動的に変化することが知られているが、そのメカニズムはほとんど分かっていない。本研究ではこのような情動記憶のダイナミズムの基盤となる神経回路制御機構を明らかにすることを目的とした。

<研究計画>

情動の座である扁桃体の中でも中心核には、橋の腕傍核から痛みシグナルが直接入力することが知られる。これまでの研究により、恐怖記憶形成には腕傍核の活動が重要な役割を担うことが知られている。さらに、腕傍核から扁桃体中心核への直接経路は、様々な慢性疼痛モデル動物においてシナプス増強を示すことが報告されている。そこで、本研究ではこれらの知見を進展させ、情動記憶ダイナミズム制御における扁桃体中心核の役割を、特に以下の点を中心に検討した。

- 1) 痛みシグナルと感覚シグナルとの連合の座としての扁桃体中心核の役割の検討。
- 2) 痛みシグナルと感覚シグナルが扁桃体中心核においてどのように連合し、外的環境によって制御されるのかの電気生理学的な解析。

<得られた研究成果>

1) 直接経路の起始核である腕傍核を薬理的に抑制したところ、その後の恐怖記憶形成に障害が出ることを見出した。さらに、腕傍核にチャンネルロドプシンを発現させ、扁桃体のプレシナプス特異的光刺激を行ったところ、まるであたかも「痛み」を受けたかのように、ジャンプ、発声、走り回るという逃避行動を誘導することに成功した。さらに、この光刺激と音を連合させると、後日、音刺激だけですくみ行動が誘導され、「痛み」刺激無しで人工的な恐怖記憶を作ること成功した。これらの研究結果は直接経路の刺激が痛み信号となりうることを示唆するものである。これらの結果から、従来着目されてきた視床・皮質を介した経路による恐怖記憶制御に加えて、新たに、腕傍核を起始核とする直接経路による恐怖記憶の制御機構を明らかにした。

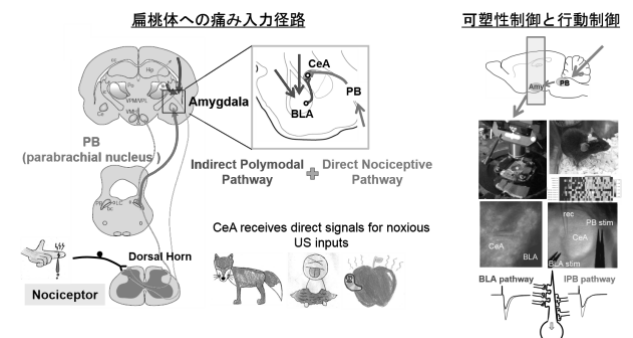
2) 一方、腕傍核には痛みペプチドとして知られるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 発現陽性細胞と陰性細胞があることが知られる。今回、CGRP 陽性細胞のみを光遺伝学的に刺激すると、上記 1) の逃避行動とは正反対に不動行動が誘導され

た。動物は、危険に暴露された際、飛びのいて逃避行動を取るか、あるいは敵に見つからないよう不動行動を取るか、行動の選択を迫られる。腕傍核の一部の細胞群がこの行動スイッチングに重要な鍵を握る可能性が示唆された。

3) 恐怖記憶成立後に、直接経路、および扁桃体外側核・基底外側核を介して扁桃体中心核に入力する間接経路、共にシナプス増強を示すことを見出した。また、このシナプス可塑性が連合依存的に誘導され、プレシナプスからの神経伝達物質の小胞放出確率の亢進を伴うことも明らかとなった。さらに、このシナプス増強には痛みペプチドである CGRP が関与することも見出した。

<国内外での成果の位置づけ>

従来の研究では、恐怖記憶形成における視床・皮質を介した間



接経路の役割が注目されて板だ、我々の研究成果によりこれとは全く異なる経路である直接経路の役割が初めて明らかとなった。このような原始感覚中継核の負情動制御における役割を世界に先駆けて明らかにした研究として注目され、ゴードンリサーチカンファレンスにおいて最優秀ポスター賞、Hot Topics 賞などを受賞した。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

光遺伝学的手法を駆使して個体レベルおよびシナプスレベルにおいて直接経路の人工的操作に成功した。しかしながら当初目標とした人工的可塑性誘導による疾患モデル動物の作成には至らなかった。技術的困難として、光遺伝学的手法による可塑性誘導プロトコルの確立が挙げられる。刺激頻度やパターンなどの最適化を試みたが、今後は、行動操作とのタイミングや神経修飾物質とのペアリング、オプシンとの組み合わせなど多角的検討を行う。

<今後の課題、展望>

これらの研究成果により、腕傍核から扁桃体への直接経路が痛み負情動を担う経路として恐怖記憶の制御に関与することが示

された。今後は、視床・皮質を介した間接経路との生理的意義や制御機構の相違点、および二経路の統合メカニズムとその生理的意義の解明などが課題であろう。様々な慢性疾患においてうつや不安障害などの疾患罹患率が高いことが知られており、このような直接経路の可塑性メカニズムの解明により新たな治療法開発に向けた基礎的知見に繋がることも期待される。

記憶を操作するケミカルプローブの開発

研究代表者：古田 寿昭

東邦大学・理学部

<研究の目的と進め方>

光で記憶を操作可能にする新規ケミカルプローブを、以下の二つのアプローチで開発する。研究項目1では、狙った細胞種選択的に光活性化できるケージド化合物を新たに開発し、モデル生物個体脳において、任意の細胞内シグナル伝達経路を自在に制御する新手法開発に展開する。研究項目2では、高効率で2光子励起できる新規ケージドRNAを設計・合成して、脳スライスサンプル中の任意の神経細胞内の局所照射により、神経細胞における局所タンパク質合成を人工的に制御する手法に応用する。研究項目3では、領域内共同研究として、狙った細胞種選択的に活性化できる新規化学プローブ分子を合成し、モデル生物個体の行動を自在に制御する手法に展開する。

ケージド化合物とは、光分解性保護基を導入した生理活性分子のことで、照射によってその活性をオン（またはオフ）にできる。我々のグループも含めた国内外の複数のグループの研究で、優れた性質を持つケージド化合物が開発されてきた。我々のグループでも、1光子および2光子励起の感受性が他のどれよりも高い(6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl (Bhc) ケージド化合物を開発し、細胞内のごく一部を刺激する局所刺激を効果的に活用して、T細胞が抗原提示細胞を認識する際の、細胞内シグナル伝達の詳細な機構解明に応用できることを示した。また、精子細胞の運動性には全く摂動を与えずに、照射によって瞬時に、特定の細胞内シグナル伝達経路を活性化できることも示してきた。

モデル生物個体の脳機能解明にケージド化合物を用いる利点としては、(1) 低分子量であること、(2) 光応答速度が速いこと(マイクロ秒以下)、(3) 制御できる生理現象が多様なことが挙げられる。また、(4) 任意のタイミングで必要量だけ加えられることから、ある領域のすべての神経細胞が生まれつき光感受性になってしまう異常性を回避することもできる。しかし、既存のケージド化合物を生物個体に利用した例は限られている。その主な理由として、動く個体の特定の細胞に狙いを付けて照射できないことが挙げられる。そこで、ケージド化合物の利点を維持したままで個体に適用可能にするため、特定の酵素を発現する細胞内だけで光活性化できる新規ケージド化合物を開発し、各種低分子量シグナル分子のケージド化合物合成に利用することを着想した。

領域内の研究グループとの共同研究として、遺伝学的に目印を付けた細胞内だけで各種酵素の阻害剤や活性化剤を非侵襲的に働かせる手法の開発を進めた。ここでは、Lavisらのグループが報告した豚肝臓エステラーゼ (PLE) と特異的に反応する人工基質、MCPCM化合物を利用する。特定の神経細胞にPLEを発現するよう改変したモデル生物個体に、各種生理活性分子のMCPCM体を導入することで、ショウジョウバエ、マウス、さらにマーモセット等のモデル生物個体の記憶や学習を人工的に制御可能になると期待される。

<研究計画>

1) 狙った細胞内だけで光活性化されるケージドセカンドメッセンジャーの開発を目指す。β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 発現細胞内でのみ光活性化能を獲得すると期待されるGal-Bhcケージド化合物を設計する。コンセプトを証明する実験として、ケージド環状ヌクレオチド類を合成し、光化学的性質を精査した後、β-Galを一過的に発現した哺乳動物培養細胞を用いて、405 nm照射によって環状ヌクレオチドが放出されること、それに続く細胞応答が観察されることを確認する。

2) 各種シグナル伝達に関わる酵素類の選択的阻害剤を細胞種選択的に光活性化できるケージド化合物に変換する。ターゲットとして、CaMKII, CaMKK, およびERKの選択的阻害剤を選ぶ。合成したR-Bhc-ケージド化合物は、pH 7の緩衝溶液中での安定性、対応する第一の鍵を開く酵素 (PLE) との反応性、405 nm照射による光反応性を明らかにする。このうち、期待する化学的性質を示すものについては、培養細胞を用いるアッセイ系を構築した上で、鍵を開く酵素発現細胞内のみで405 nm照射により阻害活性を発揮できることを実証する。

3) 細胞種選択的に光機能性を獲得するlock-and-key型ケージンググループを開発し、複数のキナーゼカスケードに関わる酵素類の阻害剤、アポトーシス、オートファジー、さらに、タンパク質合成を止める分子の新規ケージド化合物の合成に応用する。

<得られた研究成果>

1) ケージド化合物は遺伝子でコードされていないため、動く生物個体内の狙った細胞に応用することは困難だった。そこで、狙った細胞内だけで光活性化されるケージド化合物として、特定の酵素存在下でのみ光感受性を獲得するケージド化合物を設計した。

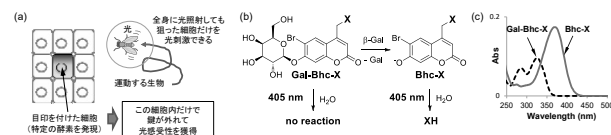


Fig. 1 β-Gal 存在下で光活性化能を獲得するケージド化合物

β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 存在下でのみ光活性化されるケージドセカンドメッセンジャーとして、Gal-Bhc-cAMPとGal-Bhc-cGMPを合成することに成功した。いずれの化合物とも405 nm照射ではcNMPを放出しないこと、β-Gal 存在下ではBhc-cNMPに変換されて405 nm照射によりcNMPを定量的に生成することも確認した。同様の目的で、豚肝臓エステラーゼ (PLE) 存在下でのみ光感受性を獲得するMCPCM-Bhc基を設計し、MCPCM-Bhc-cNMPの合成に応用した。

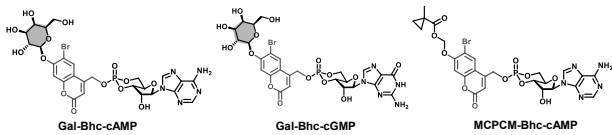


Fig. 2 合成したケージド cNMP の構造

β -Gal を一過的に発現した哺乳動物培養細胞溶解液存在下で Gal-Bhc-cNMP は Bhc-cNMP に変換されること、引き続き 405 nm 光照射で cNMP を生成することを確認した。また、PLE を過剰発現する HEK293T 細胞に MCPCM-Bhc-cAMP を加えて 405 nm 光を照射すると、高効率で細胞内 cAMP 濃度が上昇することも明らかにした。さらに、細胞膜透過性の向上を目指した誘導体を合理的な化学修飾により複数合成して、哺乳動物培養細胞を用いてその効果を検証した。その結果、Gal-Bhc 基に芳香環を導入することで細胞膜透過性が向上することを見出した。

2) 標的細胞選択的にエピジェネティクス関連酵素の働きを制御する実験手法を開発するため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として知られる SAHA (ボリノスタット) を修飾して、標的細胞選択的にその阻害活性を制御できる分子を設計・合成し、その化学系性質を検証した。MCPC-SAHA, Bhc-SAHA, MCPCM-Bhc-SAHA の合成を行った。精製 PLE や PLE 発現細胞溶解液との反応では、MCPC-SAHA および MCPCM-Bhc-SAHA は PLE の基質になって保護基が脱保護されることを確認した。405 nm 光照射については、Bhc-SAHA では Bhc 基の脱保護がみられ、MCPCM-Bhc-SAHA では光分解が生じないことを確かめた。核抽出液を用いた HDAC の阻害実験において SAHA の IC_{50} は 36.7 nM であった。それに対し MCPC-SAHA では IC_{50} が 5.57 μ M, Bhc-SAHA では 18.5 μ M, MCPCM-Bhc-SAHA は 27 μ M 以上と、保護基を導入したことで HDAC 阻害活性の抑制が観察された。さらに Bhc-SAHA に関しては、405 nm 光照射時間依存的に HDACi 作用の回復が見られるようになった。

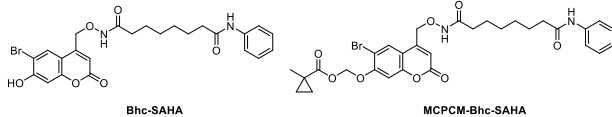


Fig. 3 合成したケージド SAHA の構造

HEK293T 細胞の内在性 HDAC への影響評価では、Bhc-SAHA では核抽出液での結果と同様に、光照射を行うことで HDACi 作用の回復が確認できた。MCPCM-Bhc-SAHA では、PLE 発現細胞かつ光照射有りの条件下で強力な HDACi 作用が見られた。

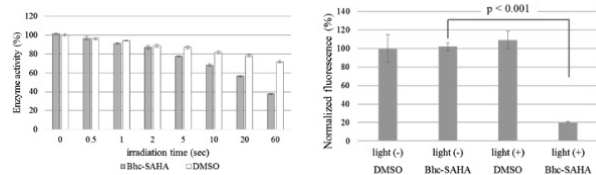


Fig. 4 ケージド SAHA を用いた HDAC 活性の光制御

3) (6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)-methyl 基(Bhc 基)は、生理的条件下 (pH 7) では 7 位のヒドロキシ基がイオン化することで、吸収極大が 370 nm 付近となる。一方で、Bhc 基の 7 位のヒドロキシ基に置換基を導入した化合物の吸収極大は、短波長の 330 nm 付近にシフトする。この性質を利用して、Bhc 基の 7 位のヒドロキシ基に酵素認識部位 (R) を導入した光分解性保

護基 (R-Bhc 基) を開発した。R-Bhc 基は、Bhc 基に比べて吸収極大が短波長シフトするため、光分解に用いる 405 nm 光では光活性化されないことを期待した。さらに、特定の酵素発現細胞では R 部位が認識・切断され、Bhc 基へと変換されることによって 405 nm 光による光活性化能を獲得し、生理活性分子 (X) を放出することを期待した。生理活性分子には、4-アミノピリジン (4AP) および、ジアシルグリセロール (diC8) を選択した。

R-Bhc 基として、esterase from porcine liver (PLE) の基質である MCPCM 基を導入した MCPCM-Bhc 基、および、ガラクトースのヒドロキシ基を Ac 基で保護している Ac4Gal を導入した Ac4Gal-Bhc 基の開発を行った。また、MCPCM-Bhc 化合物として MCPCM-Bhemoc-4AP、および、MCPCM-Bhemoc-diC8 を、Ac4Gal-Bhc 基として Ac4Gal-Bhemoc-diC8 を合成することに成功した。

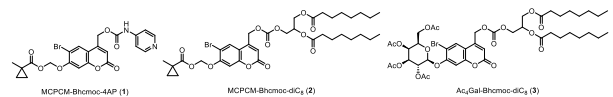


Fig. 5 合成したケージド化合物の構造

MCPCM-Bhemoc-4AP は吸収極大が 326 nm に存在するため、405 nm 光の照射には不活性だった。また、PLE によって Bhemoc-4AP へと変換されることで、吸収極大が 370 nm にシフトし、405 nm 光の照射により光活性化能を獲得することが分かった。さらに、PLE を発現した HeLa 細胞のライセート存在下でも、同様に Bhemoc-4AP へと変換されることが確認できたため、今後は、生細胞を用いたアッセイ系を樹立することで、MCPCM-Bhemoc-4AP の有用性を示すことができると考えている。

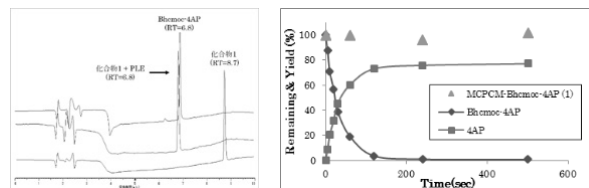


Fig. 6 MCPCM-Bhc-4AP の光反応性

4) 光分解性保護基で生理活性分子を保護したケージド化合物は、細胞の生理機能の時空間動態をリアルタイムで制御する強力な方法になりうる。一方で、個体内に導入すると全体に広がるため、動く生物個体での高い空間分解能が望めないという課題もある。その解決策として、本研究では特定の細胞表面にケージド化合物が結合できる目印を発現させ、目的細胞だけに集積するケージド化合物を設計し、細胞種選択的に生理活性分子が作用するようなケージド化合物の開発を目指した。光分解性保護基である Bhc 基の 8 位にアルキンを導入した機能性ケージド化合物は、生理活性分子とアジド基をもつ機能性分子の導入が可能である。まず、細胞表面の標識が可能かを確認するために蛍光性分子と Halo Tag ligand を導入した Halo Tag Ligand-Bhemoc-FITC (1) を合成した。

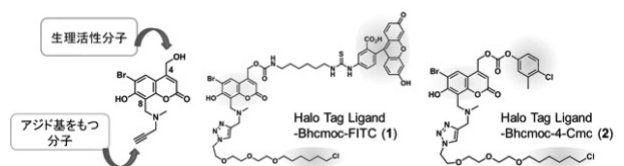


Fig. 7 多機能性ケージド化合物

細胞表面に発現する Halo Tag タンパク質融合 EGF 受容体を

一過的に発現した哺乳動物培養細胞に化合物 1 を加えたところ、標識細胞選択的に集積することを確認した。次に、生理活性分子部分にリアノジン受容体のアゴニストであり細胞内 Ca^{2+} ストアから細胞内に Ca^{2+} を放出させる 4-Chloro-m-cresol (4-Cmc) を導入した Halo Tag Ligand-Bhcmoc-4-Cmc (2) を合成した。化合物 2 に pH 7 の生理的条件模倣緩衝液中で 350 nm 光を照射すると光分解され、4-Cmc が放出されることを確認した。

クリック反応でターゲティング能等の機能を導入できる多機能ケージド化合物を抗がん剤であるパクリタキセルのケージド化合物合成に利用した。アジド含有機能性モジュールを導入できるプラットフォーム型のケージドパクリタキセル (2'-paBhcmoc-PTX) を設計・合成した。アジド化グルコースを導入して水溶性を向上したケージドパクリタキセル 2'-Glc-paBhcmoc-PTX は、従来型のケージド化合物である 2'-Bhcmoc-PTX に比べて水溶性が 10 倍、光反応性は 3 倍向上することがわかった。

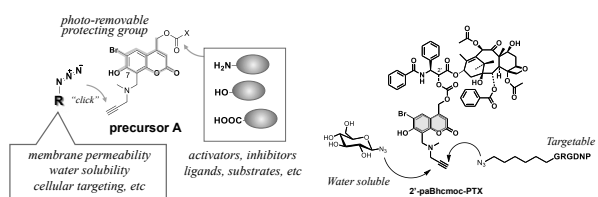


Fig. 8 クリック反応で機能を導入できるケージド PTX

合成したケージド PTX は、チューブリン重合活性は完全に消失していること、350 nm 光を照射すると同濃度の PTX と同程度の活性を示すことも明らかにした。

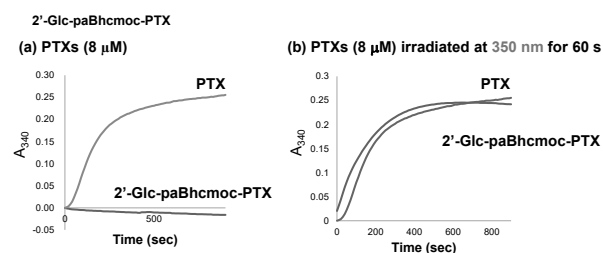


Fig. 9 2'-Glc-paBhcmoc-PTX のチューブリン重合アッセイ

<国内外での成果の位置づけ>

任意の神経細胞の機能制御を目指して、細胞内シグナル伝達に関与する酵素類の阻害剤、および、いくつかのセカンドメッセンジャー類の新規ケージド化合物を設計・合成した。さらに細胞種選択性を付与するため、任意の酵素存在下で光感受性を獲得する修飾を施した。合成した酵素作動性ケージド化合物の光物理学的および化学的性質を検証した後、選択した酵素存在下で光感受性を獲得することを組換え体の酵素を用いる実験、目的酵素を一過的に発現した哺乳動物細胞溶解液中、および、生細胞を用いる実験で実証した。以上の結果を基にして、目的酵素発現細胞内のみ光感受性を獲得するケージドリアノジンレセプターアゴニスト、および、ケージド cAMP の合成に応用した。

ケージド化合物を用いる光制御は、光感受性タンパク質を用いる Optogenetics では制御できない生理機能を光制御できる可能性を秘めている。しかし、小分子性有機化合物であるケージド化合物は遺伝子でコードされていないことから、目的の組織や細胞にターゲティングできない欠点を有していた。これがモデル生物個体での利用を妨げる主要因と考えられた。

本研究では、従来型のケージド化合物の欠点を克服するために、任意の酵素存在下で光感受性を獲得する新規ケージド化合物の開発と化合物レパートリーの拡充を目指して研究を行った。その

結果、当初の予定通り細胞内シグナル伝達に関与する酵素類の阻害剤、および、いくつかのセカンドメッセンジャー類の新規ケージド化合物を設計・合成して、目的の化学プローブのレパートリーを増やすことができた。細胞種選択性を付与するために導入した酵素応答性は、試験管内での検討のみならず、哺乳動物培養細胞内でもある程度期待通り働くことを実証することができた。さらに、光感受性を獲得する鍵になる酵素として、ペーダーガラクトシダーゼ、豚肝臓エステラーゼ、および、ニトロリダクターゼの使用が可能であることを明らかにし、酵素と化学プローブペアの選択肢が拡充することも確認した。これにより、たとえば、同一モデル細胞個体を用いて、複数の生理機能を選択的に制御する実験系構築の端緒が開かれたと考えている。また、この過程で、合成した化学プローブの生細胞内への導入を容易にする分子設計の指針も確立することができた。

ケージド化合物にターゲティング能を付与する試みはごく限られた例しか報告されていない。また、本研究で示したような細胞種を選択できる機能を付与したケージド化合物の例は報告されていない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

合成した各種ケージド化合物は、主に培養細胞で機能評価してコンセプトの正しさを証明する実験を行った。しかし、当初計画していたようにモデル生物個体でその機能を実証することはできなかった。細胞種選択的に光感受性を獲得することが期待されるケージド cNMP 類の機能をショウジョウバエ単離脳を用いて検証する実験を行ったところ、次のような問題点が明らかになった。合成した化合物の細胞膜透過性が低く十分な細胞内濃度を実現できない可能性があること、ケージ解除に用いる光の波長、および、細胞応答の測定に用いる蛍光インジケーターの励起および発光波長の選択を最適化する必要があること、などである。

PLE/MCPCM 基の組み合わせを用いて細胞種選択的に小分子を活性化する実験系の構築もモデル生物個体で効果を実証するには至らなかった。合成した化合物の機能を哺乳動物培養細胞で検証したところ、いくつかの細胞では内在性のエステラーゼによって MCPCM 基が脱保護されることを確認した。たとえば、MCPCM-Bhc-SAHA を用いて、HEK293T 細胞の内在性 HDAC 活性の光制御を試みる実験では、PLE を導入した細胞では 405 nm 光照射によって 95% 程度の阻害効果が見られた一方で、PLE を導入していない細胞群でも 60% 程度の阻害効果が検出されることが明らかになった。

合成した化合物について修飾による機能喪失と機能回復の有無を検証したところ、化学修飾しても機能が失われないもの、また、PLE 存在下でも機能回復しないものがあることが明らかになった。合成する化合物の構造の多様性を確保して、トライアンドエラーで検証する必要があると考えられる。

<今後の課題、展望>

本研究で開発したケージド化合物とその他の小分子性ケミカルプローブのいくつかは、哺乳動物培養細胞を用いる実験では、設計通りの機能を持つことを実証した。しかし、研究期間内では単離脳やモデル生物個体に適用するには至らなかった。細胞種を選択するための目印タンパク質 (b-Gal, PLE, NTR など) の内在性活性の問題、小分子性ケミカルの細胞内導入の問題、さらに、ケージド化合物の励起波長の問題等を克服する必要があることも明らかになった。酵素/基質ペアの選択、合理的な分子修飾による性質の変更、アップコンバージョンによる近赤外光励起の利用等により上記の問題点は解決可能と考えられる。ケージド化合物を用いて、モデル生物個体で記憶を光操作することも可能になると考えている。

神経と多臓器間で制御される温度メモリの解析

研究代表者：久原 篤

甲南大学・理工学部

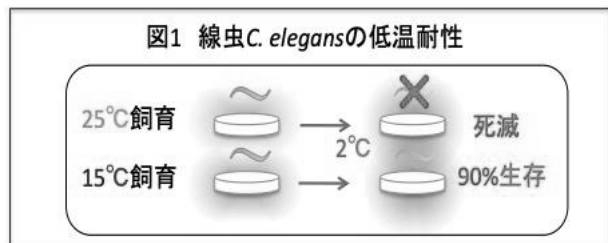
<研究の目的と進め方>

本研究は、動物の温度適応に関わるメモリの解明に向け、シンプルな実験動物である線虫 *C. elegans* を実験系とし、神経系を含む多臓器間のメモリネットワークを分子レベルで理解するものである。具体的には、新しく見つけた *C. elegans* の温度適応の記憶現象に関して、従来の分子遺伝学と最新の光技術駆使して、関連遺伝子の同定と神経活動の定量化から、メモリの基本原理の解明をめざした。

申請時において、動物の温度感知と記憶学習の機構を解き明かすために、線虫の温度行動をモデルとして、「量体Gタンパク質を介した温度受容やインスリンを介した記憶学習の解析を行ってきた (Kuhara et al., *Science*, 2008; Kuhara & Mori., *J. Neurosci*, 2006など)。また、申請当時において最新の光技術 (光駆動性チャネル等) を利用し、シナプス伝達の新概念が得られてきた (Kuhara et al., *Nature commun.*, 2011; Ohnishi, Kuhara et al., *EMBO J.*, 2011)。このように、温度応答の神経回路の情報処理を解析してきたが、動物が温度環境の変化に、どのように適応するのか、そしてそのメモリの機構に関してはブラックボックスであった。その理由は、個体の温度適応には、神経系を含む複数の組織が必要であり、さらに、高等動物であるほど細胞数が増加し、解析に時間を要するためである。そこで本研究では、わずか959個の細胞で構成される線虫をつかい、温度適応に関わる組織間ネットワークと、その分子機構の解明をめざすに至った。

<研究計画>

これまでに、線虫は耐性幼虫になることで、高温に耐性をもつことが知られていた。一方、低温に関しては、耐性幼虫にならないため解析されていなかった。しかし、本申請者らは、通常形態における低温適応を見つけた。具体的には、25°Cで飼育された線虫は2°Cに置かれると死滅するのに対して、15°C飼育個体は2°Cでも生存できる現象である (図1)。興味深いことに、25°C飼育個体



を、わずか3時間だけ15°Cに置くことで、2°Cで生存できるようになった。つまり、わずか3時間で体内の、ある種の「温度メモリ」が変化したと考えられる。

そこで、この低温適応に関わる組織や遺伝子を同定するに着想した。この低温適応現象には、神経系とその下流の組織が重要な働きを担っていることが見つかったことから、広く神経系と下流組織からなる組織ネットワークによるメモリの解析系として利用できると考えられたため、解析をすすめた。

<得られた研究成果>

線虫の低温適応の成立に必要な温度経験が何時間で置き換わるかを検証したところ、25°Cで飼育した個体を成虫期に3時間だけ15°Cに置くことで、2°Cで生存できるようになった。逆に、15°C飼育個体を3時間、25°Cに置くと2°Cで死滅するようになった。つまり、低温刺激をうける直前約3時間に経験した温度に依存して、低温適応が制御されていることが示唆された。

C. elegans の低温適応を制御する組織を同定するために変異体をもちいた解析を行った。運動に必須な背腹体壁筋のミオシンの変異体 (*unc-54*) や、表皮のコラーゲンの変異体 (*rol-6*)、神経軸索の分子輸送に必須なキネシンの変異体 (*unc-104*) などについての低温適応を測定したところ、神経系のキネシンの変異体のみ、20°C飼育後に2°Cで生存できる異常が観察された。この結果から、神経系が低温適応を負に制御することが示唆された。

302個のニューロンのうち、どの細胞が低温適応に関わるかを調べるために、はじめに、既知の温度走性行動の神経回路の機能や発生に関わる変異体に関して解析したが、既知の温度受容ニューロンAFDやAWC、その下流の介在ニューロンAIYやRIAの発生や機能の変異体は、低温適応に顕著な異常を示さなかった。つまり、既知の温度走性行動に関わる神経回路は、低温適応の成立には必須でないと考えられる。一方で、感覚ニューロンにおける感覚末端構造の構成因子であるIFT (Intraflagellar transport complex) タンパク質に異常を持つ様々な変異体においても、低温適応の異常が見られたことから、感覚神経系が低温適応に関与する可能性が考えられた。

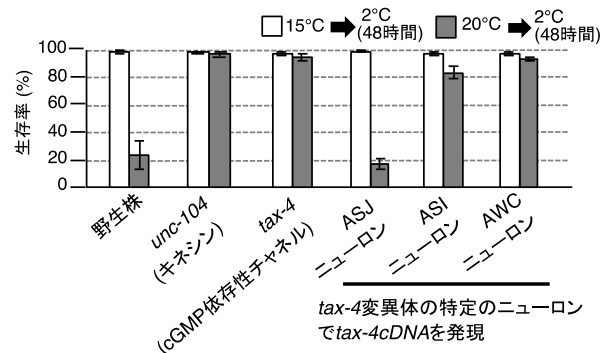


図2 ASJ感覚ニューロンにおける *tax-4* が低温適応に関与

低温適応に関わる特定の感覚ニューロンを同定するために、少数の感覚ニューロンに異常をもつ変異体の解析を行ったところ、匂いや光などの感覚情報伝達に必須であるcGMP依存性チャネルTAX-4とTAX-2の変異体において、低温適応の異常が観察された。*tax-4* 遺伝子は、およそ10対の感覚ニューロンでのみ発現していることから、これらのニューロンのいずれかが低温適応の制御に重要であると考えられた。そこで、*tax-4* 変異体の特定の感覚ニューロンで *tax-4cDNA* を発現させる細胞特異的レスキュー実験

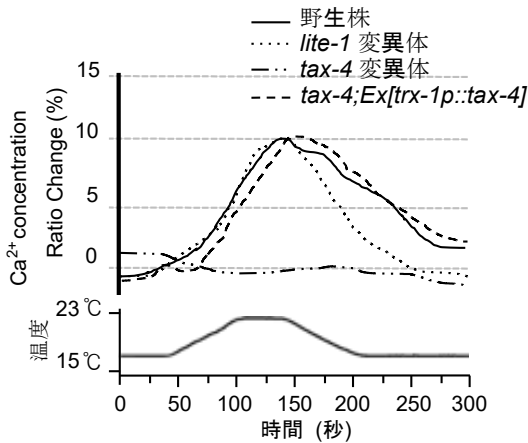
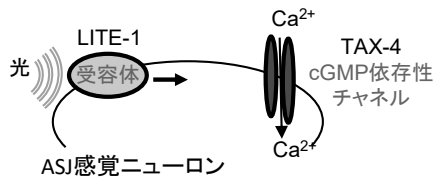
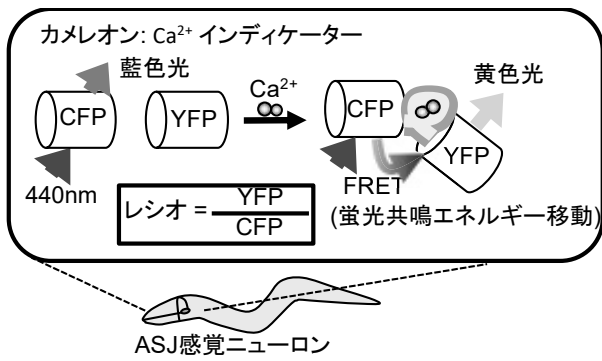


図3 ASJ感覚ニューロンは温度に応答

を行ったところ、ASJと呼ばれる左右に1対存在する感覚ニューロンで *tax-4cDNA* を発現させた系統でのみ、低温適応の異常が回復していた。さらに、ASJ感覚ニューロンを色素レーザーで破壊した野生株は、*tax-4* 変異体と同様の低温適応の異常を示した。これらの結果から、ASJ感覚ニューロンが低温適応を制御することが示唆された (図2)。

ASJ感覚ニューロンは、これまでに光やフェロモンを感知する感覚ニューロンとして知られていた。そこで、ASJ感覚ニューロンが温度も受容しているかを調べるために、近年発展の目覚ましい神経活動の *in vivo* 光学イメージングによる神経生理学的な解析であるカルシウムイメージング法をもちいた。カルシウムイメージングには、遺伝子によってコードされるカルシウムインディケーターであるカメレオン (*yc3.60*) をもちいた。カルシウムイメージング解析の結果から、野生株のASJ感覚ニューロン内のカルシウム濃度は、温度刺激に応じて変化することが示唆された (図3)。

ASJニューロンの温度応答は、ASJニューロンにおいて低温適応に関与するcGMP依存性チャネルTAX-4の変異体において顕著に低下していた。さらに、この *tax-4* 変異体における温度応答性の低下は、ASJニューロン特異的に *tax-4cDNA* を発現させることで回

復した。これらの結果から、ASJ感覚ニューロンは、cGMP依存性チャネルTAX-4を介して温度情報を伝達していると考えられる (図3)。

ASJ感覚ニューロンにおける温度情報伝達に関わる分子として、cGMP依存性チャネルTAX-4を同定したが、TAX-4はASJニューロンにおける光情報伝達にも関与することが知られていたため¹⁶、光情報伝達に関わる他の分子も温度情報伝達に関与するかを解析した。ASJにおいて、光情報は光受容体であるLITE-1で受容され、その情報は3量体Gタンパク質アルファサブユニット (GPA-1, GPA-3, GOA-1) に伝達され、グアニリル酸シクラーゼ (ODR-1, DAF-11) を活性化することで、細胞内のcGMP濃度を上昇させ、cGMP依存性チャネルTAX-4を開口させる。また、ホスホジエステラーゼ (PDE-1, PDE-2, PDE-5) はcGMP濃度を低下させ、TAX-4の開口頻度を低下させる。これらの変異体について、低温適応を測定したところ、3量体Gタンパク質とグアニリル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼの変異体において *tax-4* 変異体と同様の異常が観察された。ところが、光受容体LITE-1の変異体では、低温適応の異常は見られなかった。さらに、*lite-1* 変異体のASJニューロンの温度応答性を、カルシウムイメージングにより測定したところ、温度刺激によるASJニューロンの細胞内カルシウム濃度の変化値は野生株と同様であった。以上の結果から、温度と光は別々の受容体によって受容され、受容された情報は、共通のGタンパク質、グアニリル酸シクラーゼなどによって伝達されることが示唆された (図4)。

これまでにASJ感覚ニューロンは、線虫の耐性幼虫形成に関与することが報告されており、特に耐性幼虫から通常形態への復帰にASJニューロンから分泌されるインスリンが重要であることが報告されている。また、これまでに、インスリンがニューロペプチドとして、神経の可塑性に関わるニューロン間の情報伝達に重要であることが明らかになってきていた。そこで、ASJ感覚ニューロンから分泌されるインスリンに着目し解析を進めた。ASJ感覚ニューロンで発現しているインスリンとして、INS-6とDAF-28が報告されていたため⁷、それらの変異体の低温適応を測定したところ、低温適応の異常が観察された。さらに、*ins-6; daf-28* 二重変異体では、低温適応異常が増強した。これらのことから、DAF-28とINS-6は低温適応において加算的に関与していると考えられる (図4)。

DAF-28の発現細胞は、ASJ感覚ニューロンとASIと呼ばれる1対の感覚ニューロンでのみであり、DAF-28をASJ感覚ニューロンで発現させることで、*daf-28* 変異体の低温適応異常が回復した。また、DAF-28のASJ感覚ニューロン内における局在を蛍光タンパク質をもちいて解析したところ、DAF-28はシナプスに局在していた²⁰。以上の結果から、ASJ感覚ニューロンのシナプスから分泌されたインスリンが低温適応を制御していると考えられる (図4)。

インスリンが低温適応に関与していることが分かったため、次の疑問は、インスリンがどの組織で受容されているかであった。線虫 *C. elegans* のゲノム中において、インスリン受容体をコードする遺伝子は *daf-2* 遺伝子のみであるため、*daf-2* 変異体の低温適応を測定したところ、*daf-2* 変異体では20°Cや25°C飼育後に2°Cでも生存できる異常が観察された。この異常がどの組織におけるDAF-2の欠損が原因であるかを調べるために、*daf-2* 変異体の特定の組織で *daf-2cDNA* を発現させる組織特異的なレスキュー実験を行った。具体的には、体壁筋や神経系、もしくは腸で *daf-2cDNA* を発現させた *daf-2* 変異体系統を作成し、低温適応の異常が回復するかを調べた。その結果、神経系もしくは腸で *daf-2cDNA* を発現させた場合に、低温適応異常が部分的に回復したが、筋肉で *daf-2cDNA* を発現させた場合には回復が見られなかった。さらに、神経系と腸で *daf-2cDNA* を同時に発現させた場合に、25°C飼育後に2°Cで死滅するようになり、*daf-2* 変異体の低

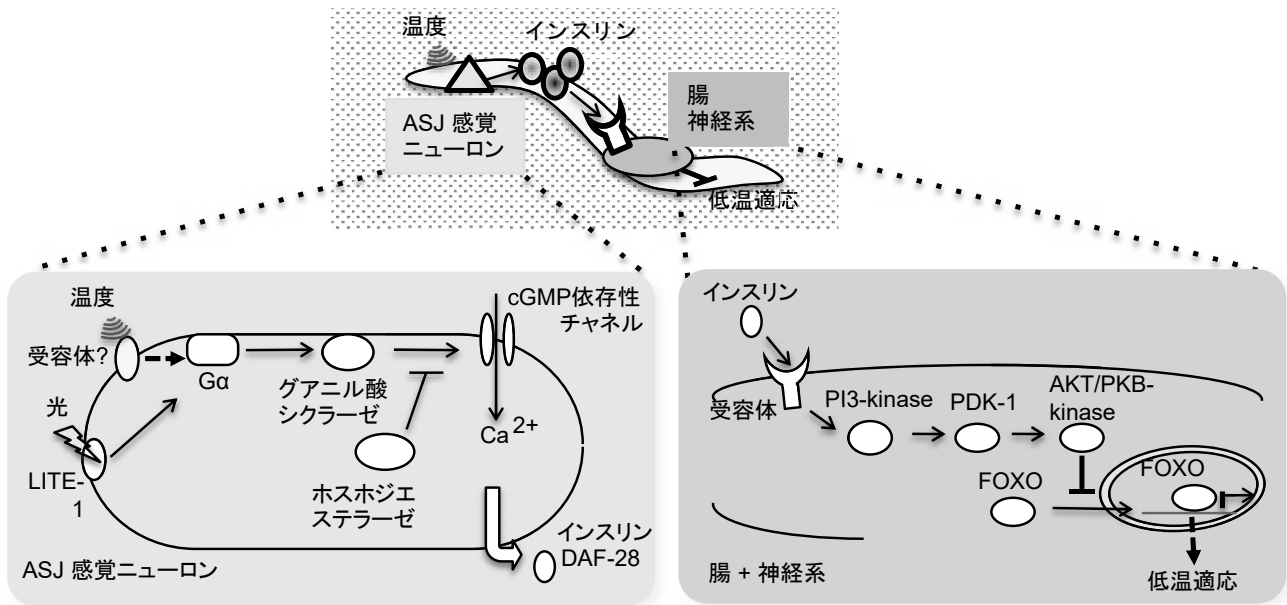


図4 低温適応の分子組織ネットワーク

温適応の異常が強く回復した。以上の結果から、インスリン受容体DAF-2は、神経系と腸において低温適応を制御していることが示唆された（図4）。

線虫の寿命やストレス応答において、インスリン受容体DAF-2の下流で機能する分子情報伝達経路が明らかになっている。例えば、耐性幼虫（ダワー）の形成に関わる経路としては、インスリン受容体DAF-2の下流でホスホイノシチド3キナーゼ（PI3K）であるAGE-1が機能し、その下流でホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1（PDK-1）を活性化し、セリン/スレオニンキナーゼAKT/PKBであるAKT-1、2が機能する。AKT-1は、FOXO型転写因子であるDAF-16を抑制することで遺伝子発現を制御する。そこで、これらの分子が低温適応の情報伝達にも関わっているかを調べたところ、*age-1*、*pdk-1*、*akt-1*の各変異体において、*daf-2*変異体と同様に低温適応が上昇する異常が観察された。さらに、*daf-16*変異体では低温耐性の低下が観察され、*daf-16*遺伝子を野生株に過剰発現させることで、低温適応が上昇した。遺伝学的優位解析から、*daf-2*変異体が示す低温適応の上昇の異常は*daf-16*変異により抑圧された。これらの結果から、耐性幼虫形成と同様に、インスリン受容体からFOXO型転写因子までの分子情報伝達経路が低温適応にも関与することが示唆された。

以上の線虫 *C. elegans* を実験モデルとした分子生理学的解析から、線虫の低温適応の制御に関わる分子と組織のネットワークのモデルが考えられる（図2）。温度は、ASJ感覚ニューロンにおける3量体Gタンパク質経路を介して伝達され、ASJからインスリンが分泌され、インスリンが腸や神経系でインスリン受容体により受容され、最終的にFOXO型の転写因子（DAF-16）を抑制することで、低温適応は負に制御されると考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究から得られた線虫 *C. elegans* の低温適応の実験系はハイスループットに動物の温度適応を解析できることから、国内外でも注目されており、近年参加した UCLA で行われた *C. elegans* の国際学会においても、この実験系がハイスループットに動物の温度応答を解析できることが注目され、海外のラボが研究に参入してきている状況である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

神経系と腸で *daf-2* DNA を同時に発現させた *daf-2* 変異体は、20°C 飼育後に 2°C では死滅しなかった。この結果から考えられることとして2つの可能性が考えられる、(1)インスリン受容体DAF-2は他の組織においても低温適応を制御している可能性、(2) *daf-2* 遺伝子には3つの選択的スプライシング アイソフォームがあり、細胞内局在様式が異なるため、他のアイソフォームが20°C 飼育後の低温適応に関与している可能性である。特に、最近同定された、軸索に局在するタイプのDAF-2が、ASJニューロンと接続する下流のニューロンのシナプス部位において、インスリンを受容している可能性を考えており、その可能性を解析中である。

<今後の課題、展望>

線虫 *C. elegans* の腸において6回膜貫通型の温度受容体であるTRPチャネル（TRPA-1）が低温を感知し、プロテインキナーゼC（PKC-2）を介してインスリン情報伝達経路と相互作用することで、個体の寿命を制御していることが報告された。そこで、TRPA-1やPKC-2の機能欠損変異体や、TRPA-1を野生株の腸で過剰発現させた系統の低温適応を測定したが、顕著な異常は観察されなかった。この結果から、ASJで受容された温度情報はインスリンを介して腸に作用するが、腸内でTRPA-1により直接受容される寿命に関わる低温情報とは区別されている可能性が考えられる。神経系の下流で機能する腸内で、複数の情報が区別される仕組みは興味深い。

注意レベルによって制御される聴覚記憶形成のための神経メカニズムの解明

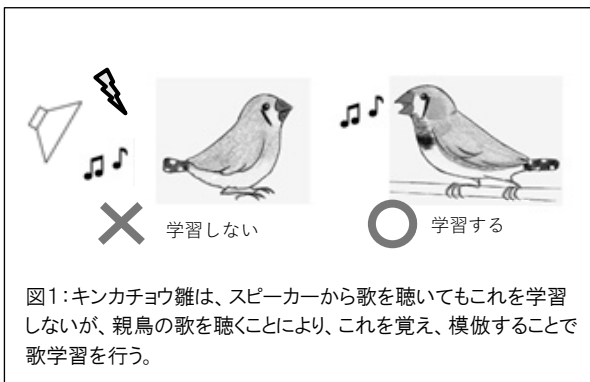
研究代表者：矢崎-杉山 陽子

沖縄科学技術大学院大学 臨界期の神経メカニズム研究ユニット

<研究の目的と進め方>

私達は日々、様々な感覚刺激に晒されているが、その中でも特定の感覚刺激に意図的に注意を払うことで、特定の感覚刺激に対してのみ記憶を形成することが出来る。例えばテレビの音が流れる中で聴く他人の言葉も、その人に注意することで強く認識され、その人の言葉を記憶することが出来る。つまり複数の物理的に同じ大きさの音刺激が、注意といった内的要因が入ることにより特定の人の声のみ意味のある音情報として‘知覚’され、その結果その言葉の記憶が形成されると考えられる。また、ヒトの赤ちゃんではDVDなどから流れる声を聴いても言語発達が行われないが、言葉を発する大人と社会的相互作用があることで言語発達がなされることが知られている (Kuhl, 2010)。これは物理的には同じ音刺激が耳から入って来るにも拘らず、他者との社会的相互作用により、注意といった内的要因が入ることにより特定の音のみが‘知覚’され、言語発達が促進されている、と考えられている。

ヒトの言語発達と同様にソングバードと呼ばれる鳴禽類のトリは生後に成鳥の歌を聴くことで、複雑な音響構造を持つ‘歌’を学習する。その代表的なモデル動物であるキンカチョウでは生後の感覚学習期に親の歌を聴いて覚え、続く運動学習期に記憶した歌を模倣することで歌を学習し、この歌を一生唄う。この面白いことに、キンカチョウのヒナはスピーカーなどから聴こえるトリの歌からは歌を学習せず、親鳥との社会的相互作用の中で歌を聴くことのみ歌を学習する (図1)。つまり、ヒトの言語発達度同様に親鳥の歌の記憶の形成、学習は、親鳥との社会的相互作用によるヒナの注意といった内的要因の変化により制御されていることが考えられる。そこで、本研究はキンカチョウをモデル動物として用い、「注意・覚醒といった個体の内的要因に依存した聴覚記憶形成のメカニズム」を明らかにすることを目的とした。



本研究においては電気生理学的手法、行動学的手法を組み合わせ用い、キンカチョウ、終脳高次聴覚野に注目し、さらに、その聴覚応答の歌学習に伴う変化を明らかにすることを試みることで聴覚記憶形成のメカニズムを明らかにすることを試みた。ま

たさらに、この聴覚応答が親鳥との社会的相互作用によりどの様に変化するのか、この聴覚応答の変化はどの様に制御されているのかを明らかにすることで、記憶形成がキンカチョウヒナの注意といった内的要因によりどの様に制御されているのか明らかにすることを試みた。これらを統合的に考察することで、キンカチョウの歌学習における注意レベルによる記憶形成の制御神経メカニズムを明らかにすることを試みた。

<研究計画>

1) 終脳聴覚野における記憶形成メカニズムの解明

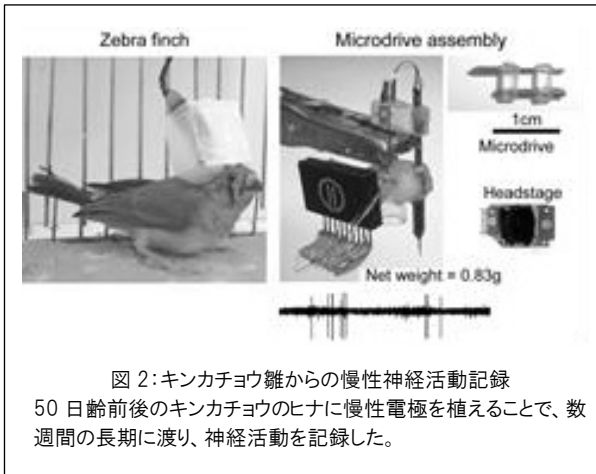
これまでの様々な研究から、歌学習における親鳥の歌の聴覚記憶はキンカチョウヒナの終脳高次聴覚野に形成されることが、示唆されて来ている。しかしその一方で、これを直接支持するような、電気生理学的研究はない。そこで、本研究ではキンカチョウヒナの終脳高次聴覚野に慢性電極を植え込み、歌学習の前後にわたり、親鳥の歌を含む様々な歌に対する聴覚応答がどの様に変化するのか、聴覚応答の歌学習に伴う経時的な変化を明らかにすることで、終脳聴覚野における記憶形成メカニズムの解明を試みた。

2) 記憶形成における内的要因の制御メカニズムの解明

注意・覚醒といった個体の内的要因に関わる神経伝達物質としてノルアドレナリン (NA) が知られている。キンカチョウの終脳高次聴覚野もNA作動性神経細胞の投射を受けていること (Mello et al 1998)、NA阻害剤を投与することで通常高次聴覚野で親の歌の聴覚刺激に対して見られるZENKの発現が見られなくなるが明らかになっている (Lynch & Ball, 2008)。また、キンカチョウは成鳥から直接歌を聴くことにより歌学習を行うが、スピーカーから受動的に流れる歌からは歌学習を行わない。つまり社会的相互作用の依存した学習であることが知られており、社会的相互作用による、ヒナの注意レベルの変化が終脳聴覚野での記憶形成を制御していると考え、NAによる記憶形成制御のメカニズムの解明を試みた。高次聴覚野へのNA選択的神経毒素DSP-4の投与といった薬理学的操作、薬理遺伝学的手法を用いたNA作動性神経核、青斑核キンカチョウヒナの終脳高次聴覚野の歌特異的聴覚応答の発達が阻害されるか明らかにすることで、個体の内的要因に依存した記憶形成の神経メカニズムを解明することを試みた。

<得られた研究成果>

1) キンカチョウヒナの終脳高次聴覚野に慢性を植え、自由運動下でこの領域の神経細胞から電気生理学的に神経活動を経時的に記録し、歌を学習する前後に渡り、様々な他個体の歌に対する聴覚応答を調べた (図2)。



その結果、高次聴覚野には神経活動の頻度、発火パターンの異なる、少なくとも二種類の神経細胞が存在することを見出した。また、その中でも発火頻度が低い神経細胞群では、親の歌を聴く前（学習前）には歌に対する聴覚応答を示すものの、そのほとんどの神経細胞において、聴覚応答は非選択的であったが、親の歌を学習し始めて数日後には、一部の細胞群が覚えた親の歌のみ選択的に反応するようになることを明らかにした。これらの親の歌のみ選択的に応答する神経細胞は、親の歌を聴かず、学習を行わなかった個体では見出されなかったことから、親の歌を聴いた聴覚経験の記憶が高次聴覚野に形成されることを見出した（図3）（Yanagihara & Yazaki-Sugiyama, Nat Commun, 2016）。

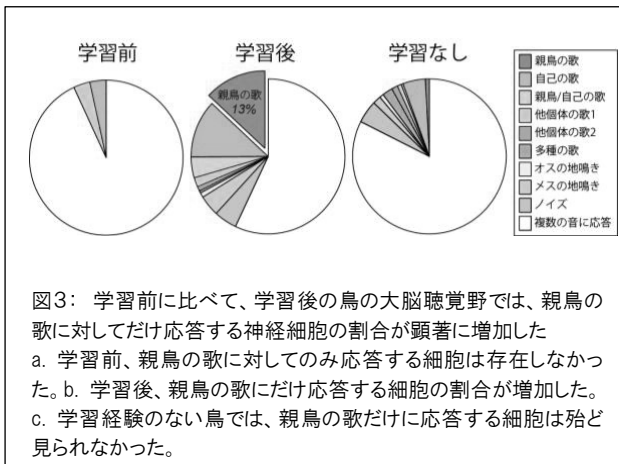


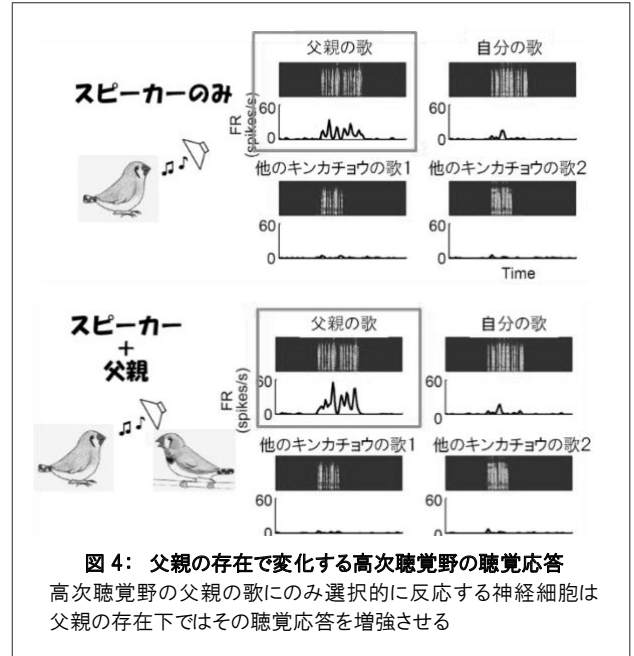
図3: 学習前に比べて、学習後の鳥の脳聴覚野では、親鳥の歌に対してだけ応答する神経細胞の割合が顕著に増加した
a. 学習前、親鳥の歌に対してのみ応答する細胞は存在しなかった。
b. 学習後、親鳥の歌にだけ応答する細胞の割合が増加した。
c. 学習経験のない鳥では、親鳥の歌だけに応答する細胞は殆ど見られなかった。

2) さらに、この高次聴覚野の神経細胞群の聴覚応答が親鳥との社会的相互作用により、どの様に変化するのかわかるため、ヒナが親鳥と社会的なコンタクトがあるかどうかにより、親の歌に対する聴覚応答がどの様に変化するのかわ調べた。その結果、高次聴覚野の神経細胞のスピーカーから再生される歌に対する聴覚応答は、親の存在により増強されることを明らかにした（図4）。更に面白いことに、この親の存在による聴覚応答の増強は、特異的な聴覚応答を示す神経細胞でのみ見られ、非特異的な聴覚応答を示す神経細胞の応答は、親の存在下でも変化しないことが明らかになった（Yanagihara & Yazaki-Sugiyama, Behav Proc, 2018）。

3) 高次聴覚野の神経細胞の聴覚応答が親鳥の存在下において増強される、という現象がどのような神経メカニズムに因るものなのか明らかにする研究を行った。前述のように、高次聴覚野は、NA 作動性神経核である青斑核から NA 作動性の投射を受けている。そこで、この青斑核からの NA 作動性入力の活動により高次聴覚野の神経活動が制御されることにより、記憶形成が制御され

ると仮定し、これを明らかにするための研究を行った（論文未発表）。

まず、高次聴覚野に NA を投与し、聴覚応答の変化をしらべたところ、NA の局所投与により、聴覚応答の増強が見られたが、この応答の増強は高次聴覚野の神経細胞、全てで見られるわけではなかった。



さらに、親鳥との社会的相互作用により NA 作動性神経核、青斑核の活動がどの様に変化するのかわかるため、キンカチョウヒナの青斑核の神経活動を歌学習の前後に渡り記録を行った。青斑核の神経細胞は様々な歌刺激に対して聴覚応答を示したが、非特異的な聴覚応答であった。しかし、青斑核の神経細胞は親鳥が社会的相互作用の中で歌を唱える際にはスピーカーから流れる歌よりも強い聴覚応答を示した。またさらに、青斑核の神経細胞は親が歌を唱えた時にのみ、特異的にオフ応答を示し、この応答は他の鳥の歌を聴いても見られないことを見出し始めている。

これらの研究から総合的に、キンカチョウの発達期における歌学習は、親の歌を聴くという聴覚経験の記憶が、高次聴覚野の特定の神経細胞群に形成されることが明らかになった。また、親との社会的相互作用により、この高次聴覚野の神経活動が変化することにより、状況や動物の状態による記憶形成の制御されていることが示唆された。

参考文献

Yanagihara S. and *Yazaki-Sugiyama Y. (2018) Social interaction with a tutor modulates responsiveness of specific auditory neurons in juvenile zebra finches. Behav Proc, doi: 10.1016/j.beproc.2018.04.003
Yanagihara S. and *Yazaki-Sugiyama Y. (2016) Auditory experience dependent cortical circuit shaping for memory formation in bird song learning. Nat. Commun, doi: 10.1038/NCOMMS11946. (Featured article)

<国内外での成果の位置づけ>

本研究の結果は論文2本に纏め、発表を行った。これらの結果は国内外から高い評価を受けている。特に親鳥の歌の聴覚経験の

記憶が高次聴覚野に形成されるという結果については、国内外を通じて初めてキンカチョウの歌学習において、聴覚経験の記憶が形成される領域を電気生理学的に同定し、また特定の神経細胞にのみ特異的な聴覚応答が見出されるようになることを始めて報告したため、大きな注目を集めた。掲載紙においても Featured Article に選ばれ、多くの引用を受けている。

また更に、論文にまとめられていない研究成果についても、学会などで発表を行っており、研究代表者のフィールドにおいて注目集め、海外との国際共同研究への足掛かりとなった。研究結果の一部は国際共同研究として、海外の研究者と共同でポスター発表も行っている。今後も、この国際共同研究は続けられる予定である。

これらのことから分かるように本研究結果は、結果として評価を受けているだけでなく、多くの新たな研究の礎として評価されている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究の計画においては、注意・覚醒といった個体の内的要因に関わる神経伝達物質、NA の高次聴覚野における聴覚応答への作用、歌学習への影響を明らかにする予定であったが、高次聴覚野における受容体の種類が明らかになっていない、投射先の具体的な局所が明らかになっていないなどの問題があり、幾つかの予備実験が必要になった。実際に NA を高次聴覚野に局所投与し、その聴覚応答の変化を明らかにする実験では、NA の聴覚応答による影響は細胞の種類に因らず一定していなかった。そこで、本研究においては NA 作動性神経核であり、高次聴覚野に NA 作動性の投射をしている青斑核の歌学習における神経活動を明らかにする研究を優先させたため、高次聴覚野における NA の神経修飾作用については、明らかにできていない。

<今後の課題、展望>

一方で、本研究において新たな研究が開始されたことにより、キンカチョウヒナの歌学習時における青斑核の神経活動が明らかになり始めている。さらに今後の展望として、この青斑核の神経活動により、実際に NA が高次聴覚野でどの様に放出され、高次聴覚野の聴覚応答をどの様に変化させるのか、さらにキンカチョウの歌学習をどの様に制御するのか、その神経メカニズムが統合的に明らかになることが期待されている。本研究の成果により、その後続く新たな研究課題（新学術領域、ウィルダイナミクスなど）へ発展し、社会的相互作用、注意・覚醒といった動物の内的要因によって、我々の記憶形成がどの様に制御されているのか、その神経メカニズムが統合的に明らかになるよう発展している。

状況特異的な報酬学習記憶の高次制御機構

研究代表者：小川 正晃

京都大学・医学研究科

<研究の目的と進め方>

我々ヒトを含めた動物がより豊かに生きるためには、時々刻々変化する外界・内的状況に応じて、報酬に関連する重要な情報を学習記憶し、後の行動に、素早く柔軟に活かす必要がある。このような「状況特異的な報酬学習記憶の高次制御機構」を担う脳領域の第一候補は、前頭前野の一領域である眼窩前頭皮質 (Orbitofrontal cortex, OFC) である。OFCは、嗅覚、味覚、視覚、体性感覚などほとんど全ての高次感覚野からの入力を受け、情動反応を処理する扁桃体、および情動-運動間のインタフェースを担う腹側線条体などと神経連絡を持つ。これらの解剖に加えて、条件刺激と報酬の有無の間の関係に反応するOFC神経細胞の発火様式、および非選択的、非可逆的な領域損傷実験によって推定される因果的役割は、げっ歯類と霊長類間で酷似する。よって、げっ歯類のOFCは、霊長類とも共通しうる、基本的かつ根本的な報酬学習記憶の制御機構を問う上で優れたモデルシステムである。OFCの機能研究には、ここ15年の間に、神経生理学、神経経済学、動物心理学、計算神経科学など様々なバックグラウンドを持った国内外の数多くの研究者が参入し、理解が進んできた。しかしながら、OFC機能についてより生物学な視点からの研究は、従来の技術的な限界のために、極端に遅れている。

特に、OFC神経細胞が、学習記憶の高次制御が必要とされる状況においてどう活動するのかについては多くの研究があるが、そのような状況特異的な活動が、実際に直接どのような行動に影響を与えるのか、すなわちその因果的役割については、その多くが未解明のままである。

そこで本研究は、げっ歯類において、状況特異的なOFCの因果的役割を問う目的に適した、報酬に基づく条件刺激と報酬有無の間の連合学習課題を開発する。その行動課題において、光遺伝学法を用いてOFCおよびその神経回路活動を状況特異的に抑制し、報酬学習記憶制御におけるOFC神経回路の因果的役割を明らかにする。特に、複数の状況毎の行動制御においてOFCが不可欠であるか否かを問い、それらの結果を比較することで、OFCの基本的かつ本質的役割について考察する。

<研究計画>

1) 状況特異的な報酬学習記憶の制御にOFCが果たす役割を調べる目的に適した、条件刺激と報酬の有無の間の関係が逆転する逆転学習課題（逆転前：条件刺激A→報酬有り、条件刺激B→報酬無し、逆転後：条件刺激A→報酬無し、条件刺激B→報酬有り）を確立する。

2) 1)で確立した行動課題の、逆転が初めて起こる状況に着目し、その状況において、光遺伝学法によってOFCを秒単位の時間で可逆的に抑制し、OFCの因果的役割について明らかにする。また異なる状況の役割についても検証する。

3) OFCを成す一部の神経回路が果たす役割について明らかにする。2)の結果と合わせて、状況特異的、OFC神経回路特異的な役

割の違いを比較することで、OFCの基本的かつ本質的な役割について考察する。

<得られた研究成果>

1) 条件刺激と報酬の有無の間の逆転学習課題の確立

遺伝子改変に最もよく用いられるC57BL/6系統のマウスのOFC領域の全層に、抑制性オプシンであるJaws-GFPあるいは、その統制となるGFPのみを、ウイルスベクターによって発現した。さらにOFCの直上に、Jawsを活性化させその結果神経活動を抑制するための赤色光を導入する光ファイバーを挿入した。このマウスに対し、まず、2つの異なる音刺激（条件刺激：Conditioned stimulus (CS) と、報酬であるフードペレット提示の有無を、それぞれ条件づけた (図1上「1. Training」)。Block1では、CS1と報酬の条件づけ、Block2ではCS2と無報酬を、1日に8試行ずつ条件づけた。CS1は10秒間提示し、報酬はCS1開始から7秒後に提示した。Trainingが進むと、CS1提示開始から報酬が提示されるまでの7秒間に、マウスが報酬提示口の前に居る時間が、CS2提示時と比べて有意に増えた。この時間を、条件反応として用いた。

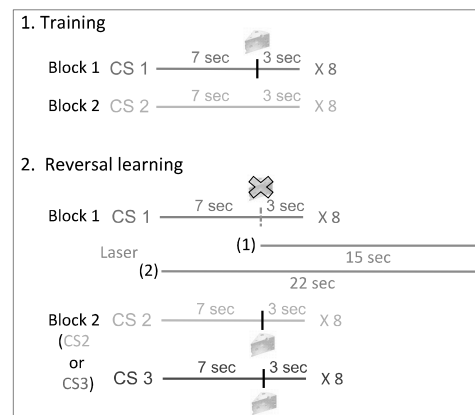


図1 逆転学習課題とOFC抑制のタイミングの関

Trainingを十分行った後に、CSと報酬の有無の関係を逆転した (図1下「2. Reversal learning (逆転学習)」)。すなわち、CS1提示後に、Training時には提示されていた報酬を提示せず、逆にCS2の後に報酬を提示した。重要なことに、マウスはこのような関係の変化を経験するのは初めてである。従来のOFCの神経活動計測の研究から、OFCは、CS1提示開始から7秒後以降に、これまで提示されていた報酬が提示されない状況における行動制御に重要であることが予想される。しかしながら、従来、このような秒単位の状況特異的な因果的役割は解明されていない。そこで、このCS1開始後7秒後から15秒間 (図1「Laser」(1)のタイミング) に着目してOFCを抑制し、行動への影響について検討することにした。

まず、目的とする実験の統制群となる、OFCにGFPのみを発現するマウスについて、あらかじめ挿入した光ファイバーを介して赤色光を導入し、行動を検討した。すると、逆転学習時におけるCS1に対する条件反応は、試行を重ねる毎に、素早く低下した。反対

に、CS2に対する条件反応は、試行毎に、素早く上昇した。これらの反応行動の制御速度は、単に（過去の経験とは無関係に）その場の無報酬・報酬に反応して行動しているのではなく、過去に学習したCS1→報酬、CS2→無報酬の関係を適切に活かした結果であることが、推察された。

2) 逆転学習課題における OFC の因果的役割の解明

次に、Jaws-GFP を発現するマウスにおいて、同じ実験を行った。すると、第一に、逆転前には報酬が提示されていたCS1提示に対する条件反応の減少が、統制群と比べて遅くなった（図2上から1段目「Reversal」欄の青色上向き矢印）。第二に、さらに興味深いことに、逆転前には報酬が提示されなかったCS2提示に対する条件反応の増加も、統制群と比べて遅くなった（図2上から1段目、「All layers」欄の青色下向き矢印）。これらの結果は、逆転した初日のみに認められ、翌日以降には認められなかった。

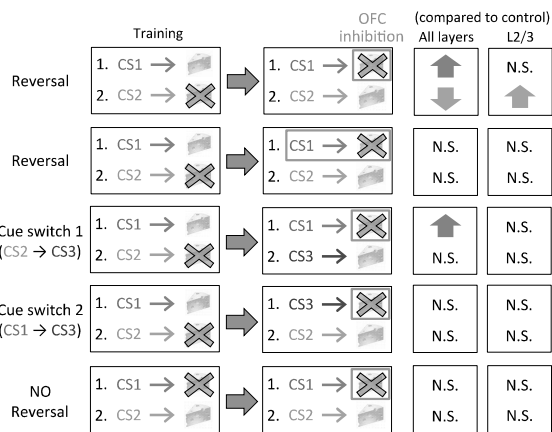


図2 状況および秒単位のタイミング特異的な OFC の因果的役割

しかし依然として、この実験結果のみでは、果たして OFC がどのような制御機能に関わるためにこのような行動に対する影響が認められたのかが、明快でない。そこで、異なるマウスを用いて、以下の4つの実験を行った。

第一に、OFC を抑制するタイミングを変更した。すなわち、CS1の開始時から22秒間（図1「Laser」(2)のタイミング）OFCを抑制した。すると、CS1およびCS2に対する反応行動は統制群と変わらなかった（図2上から2段目「Reversal」欄の N.S. : Not Significant）。この結果から、この行動課題においてはCS1提示開始後に、これから提示されるはずの報酬予測のタイミングの OFC 活動と、実際に「期待される報酬が無い」ことをマウスが知るタイミングの OFC 活動バランスが重要であることが推測された。

第二に、逆転時のCS2を、過去に条件づけされていない新しい音刺激CS3に入れ替え、報酬提示と条件づけした。すると、CS1に対する条件反応量の増加については再現できたが、CS3に対する反応行動は統制群と差がなかった（図2上から3段目「Cue switch 1」）。この結果から、逆転学習時のCS1提示時の OFC 活動がCS2に対する条件反応制御に果たす役割は、過去に無報酬と条件づけされたCS2に特異的であり、条件刺激とは無関係に、報酬を得られた結果それに先行する条件刺激に反応行動を上昇させることではないことが明らかになった。

第三に、逆転時のCS1を、過去に条件づけされていない新しい音刺激CS3に入れ替え、無報酬と条件づけした（図2上から4段目「Cue switch 2」）。すると、CS3や、その後のCS2提示に対する反応行動は統制群と比べて差がなかった。この結果から、OFCは過去に報酬と条件づけされたCS1に対する反応行動制御に重

要であり、特定の刺激と報酬の関係の学習記憶とは無関係に、単に報酬が無い場合の行動制御に重要なわけではない、ことが明らかになった。

最後に、Training時からCS1と無報酬、CS2と報酬を条件づけし、その関係を逆転しないで OFC を抑制した（図2上から5段目「NO Reversal」）。すると、CS1、CS2に対する反応行動は、いずれも統制群と差がなかった。この結果から、OFCは、刺激と報酬の有無の関係が変化したときに重要であり、単にCS1→無報酬、CS2→報酬の関係の維持に重要なわけではない、ことが明らかになった。

以上の結果をまとめると、次のような OFC 機能の仮説が考えられた。そもそもマウスは、はじめにCS1→報酬、CS2→無報酬の関係を学習記憶する。その後CS1→無報酬という状況変化を経験し、さらにCS2→報酬を1-2回経験すると、その後の試行においてCS2提示後に報酬提示が引き続くのではないかと、というCS2刺激に特異的な推論（図3上「CS2-specific inference」）によって、CS2に対する条件反応を促進しているのではないかと。この推論は、CS1提示後の無報酬時に OFC が正常に機能することによって、働くのではないかと。この仮説は、CS2やCS1の代わりにCS3を用いた場合には OFC 抑制の影響が無かったことから支持される。例えば、CS2の代わりにCS3提示の場合、CS1提示後の OFC 抑制によって、その後のCS2に関する推論は影響を受けるものの、過去の経験のないCS3には一般化されず、CS3に対する行動は影響を受けない（図3下）。

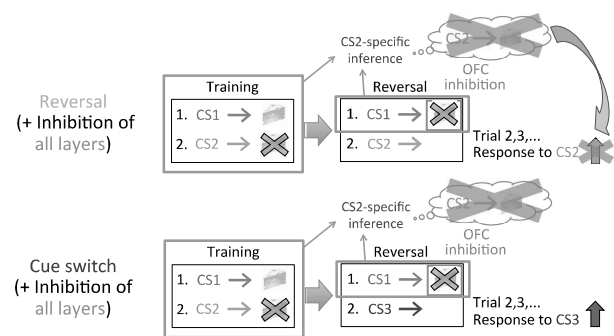


図3 本研究結果による OFC の機能仮説

3) 逆転学習課題における OFC 神経回路の因果的役割の解明

以上の結果は、OFCの全層を抑制した結果であり、OFCを構成する神経回路の役割は不明である。そこで、OFCの2/3層の細胞の役割に着目した。大脳皮質2/3層特異的にCre組換え酵素を発現する、全層抑制と同じC57BL/6系統の遺伝子改変マウスとウイルスベクターの局所注入法を組み合わせ、OFCの2/3層特異的にJawsを発現し、全層抑制と同様の行動実験を行った（結果は、図2右「L2/3」の欄）。驚くべきことに、逆転学習時においてCS2に対する反応行動は、統制群と比べて有意に増加した（図2上から1段目、「L2/3」欄の青色上向き矢印）。大変興味深いことにこの影響は、他の行動実験タイプでは認められず（図2上から2~5段目、「L2/3」欄の N.S.）、この点は全層抑制と共通していた。

これらの結果は、OFCは、過去の学習記憶を基にして状況変化に対する行動変化を促進する方向のみの役割ではなく、逆に、行動変化を抑制する役割をも有していることを意味する。過去の学習記憶の活用が低下すれば、変化した現状への対応が遅れる一方、過去の学習記憶に合う行動を必要以上に早く切り替えてしまうと、例えば、変化した状況がすぐに元に戻った場合など元の行動が依然として有利な場合、不利益につながる。つまり、OFCは、過去の学習記憶を基に、状況特異的に、「適切に」行動を切り替える機能を持つことが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

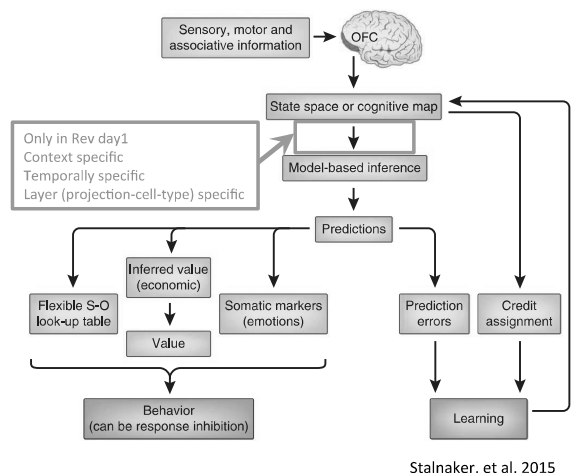


図 3 従来の OFC 機能仮説に対する本研究成果の位置づけ (マゼンダ部)

従来の研究により、OFC は、行動抑制、情動、報酬価値、報酬の不確実性などから、より広い概念であるモデルベースの推論 (Model-based inference)、さらには状態空間 (State space) や認知地図 (Cognitive map) の表象に関わる可能性が示唆されている (図 3、Stalnaker et al, 2015 より引用)。状態空間とは強化学習モデルで提唱されている概念であり、特にある行動課題 (Task) の中で、自らの状況を定義する内部状態や外界刺激など全ての関連する情報の表象を Task state と呼ぶ。最近 OFC は、task state を形作り維持する認知地図の役割を果たすと提唱されている (Wilson, et al, 2014 など)。しかしながら、これらの機能仮説を、実際に検証する研究は、未だ、国内はもとより国際的にも全く進んでいない。その結果、OFC の正確な機能は、突き止められていない。

本研究は、これまで実験的な証拠がなかった、認知地図とモデルベースの推論の中間に位置づけされる OFC 機能を明らかにした。具体的には、1. 逆転する初めの日に限定した機能、2. 状況特異的かつ秒単位のタイミング特異的な機能、3. 層構造特異的な機能を、一連の複数の行動条件を用いて明快に示した点で意義深い (図 3 マゼンダ色の四角で囲まれた黒矢印)。

期待される報酬が提示されない場合に過去の経験に基づいて行動を変えることは、動物種を問わず重要であり、本研究で明らかになった機能は、げっ歯類のみならず霊長類など OFC 領域を持つ種において、共通して重要であることが推測される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

従来の研究により、ラットでは OFC の因果的役割の知見があったものの遺伝学的手法の導入がほぼなされていないこと、マウスではごく少数の先行研究しかないことが原因となり、マウスにおいて遺伝学的手法を用いて新規 OFC 機能を発見するには、多種の予備実験を要した。また本行動実験にはかなりの時間がかかること、各個体を一つの行動条件にのみ使用する必要があるから、予想していたよりも結果をまとめるために多くの時間を要した。しかしそれが故に、国際的に見ても他に例のない角度から、これまでに解明されていない OFC の基本的かつ本質的機能を見いだすことができた、と自負している。

また、マウス OFC と強い神経連絡を持つ腹側線条体などへの他の領域への投射神経経路の役割などの検討に発展させることも想定していたが、上記のような時間的、労力的な制約から、達成できなかった。

<今後の課題、展望>

OFC から腹側線条体など、他の領域への投射神経経路の役割の検討が今後の課題として残されている。例えば、この経路を抑制することによって、行動がどう変化するかのみならず、この経路や線条体の活動も検討することで、OFC 機能に対する理解を深めることができるだろう。

また今後、我々が新規に行動への影響を見出した OFC の 2/3 層の活動を計測し、その神経ネットワークを検討することで、全層と 2/3 層を抑制した場合で異なる行動への影響の原因について解明できるだろう。

また本知見を生かして、より定量性のある異なる行動課題を別途開発し、その課題における、OFC や OFC から他の領域への投射神経経路の役割の理解に、発展させることができるであろう。

幼児性健忘における歯状回成熟度の意義の解明

研究代表者：高雄 啓三

富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター

<研究の目的と進め方>

感覚器官などからの入力により形成される多くの記憶情報は、記憶の最初の保管場所である海馬に新しい機能的ニューロンネットワークとしてまず書き込まれる。これらの記憶は一定の期間の後、徐々に大脳皮質内の領域へ転送され、遠隔記憶として貯蔵されると考えられている (Wiltgen & Silva, Learning & Memory, 2007; Flankland & Bontempi, Nature Reviews Neuroscience, 2005)。遠隔記憶の転送・固定は、長期的で永続的な記憶の形成に必須のプロセスであり、人が人としての自己同一性を保ち、社会生活を営んでいくことを可能にする脳の働きの本質的な部分を占めると考えられる。しかし、この遠隔記憶の転送・固定に関わる分子にどのようなものがあるのか、その神経メカニズムや回路がどのようになっているかについては、いまだによく分かっていない。本研究では遠隔記憶が欠落するモデルのひとつである幼児性健忘 (infant amnesia) (Rubin, Memory, 2000) の原因を探ることで遠隔記憶のメカニズムの解明を目指す。ヒトの幼児は短期的には記憶を保つことができるが、その後成長して大人になると3歳頃までのエピソードを思い出すことができない。これは「幼児性健忘 (infant amnesia)」と呼ばれ古くから知られているが、なぜ幼児期の記憶が失われてしまうのかについてはその詳細は明らかになっていない。幼児期でも短期的には記憶を保つことができるため、幼児性健忘が起こる要因は近接記憶から遠隔記憶への変換にあると考えられる。幼児性健忘に対応する現象はげっ歯類でもみられる (Campbell et al., Neurobehavioral Toxicology and Teratology, 1984)。成熟マウスで恐怖条件づけを行うと1ヶ月後でもよく覚えており条件付けた場所ではフリージング反応を示すが、条件付けを幼若期に行くと1ヶ月後にはほとんどフリージングを示さない (図1)。一方で、遠隔記憶は精神・神経疾患でも障害されることがある。申請者らはこれまでに160系統の遺伝子改変マウスについて網羅的行動テストバッテリーを用いてその表現型を解析

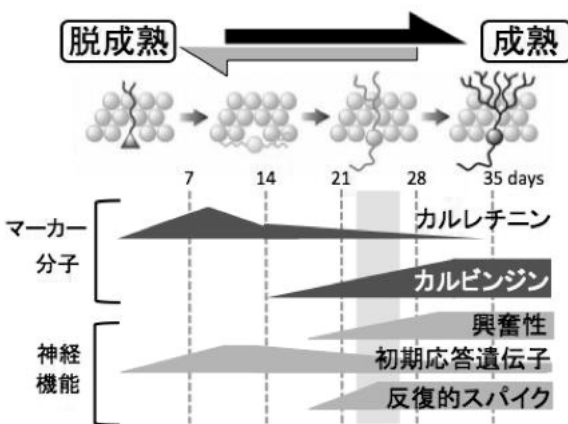


図1 歯状回神経細胞の成熟度変化
歯状回の神経細胞は、幼若時と成熟時ではその特性が顕著に異なる。抗うつ薬投与や電気けいれん刺激等により成熟細胞が疑似的な非成熟状態へ戻ることがある (脱成熟) (Kobayashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010 など)。

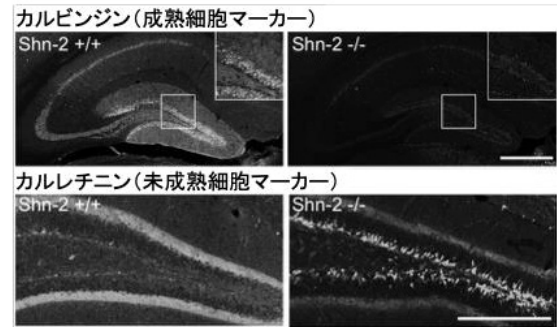


図2 Shn2 KO マウスで見られた未成熟歯状回
長期記憶に障害を持つ Shn2 KO マウスの海馬歯状回では成熟細胞のマーカーであるカルビンジンの発現が低下し (上)、逆に未成熟細胞のマーカーであるカルレチニンが増加 (下) しており、全体として未成熟な歯状回となっていた (Takao et al, Neuropsychopharmacology, 2013)。

し、多くの精神・神経疾患のモデルマウスを同定してきた。その中で、ある共通した脳内の特徴をもつマウス系統では今のところ例外なく遠隔記憶の障害が見られることを見出している。その特徴とは、海馬歯状回の細胞が未成熟な状態という「非成熟歯状回」である (図2)。これまでに 前脳特異的カルシニューリン KOマウス (CN cKOマウス) や Shn2 KO マウスなど数系統の遺伝子改変マウスの他、電気けいれん刺激を行ったマウス、セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) であるフルオキセチンを慢性投与したマウスでもこの特徴が見つかっている。また、マーカー分子の発現だけでなく、トランスクリプトームを比較しても共通して変化している遺伝子が非常に多く、非成熟歯状回は幼若期の歯状回と酷似していることがわかっている (図3)。これら非成熟歯状回を持つマウスではいずれも遠隔記憶の障害が見られている。歯状回は近接記憶が遠隔記憶として転送・固定される際に重要な役割

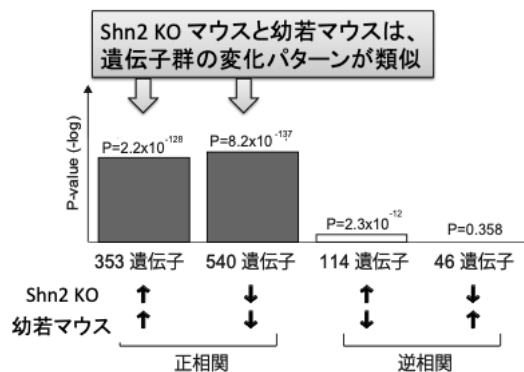


図3 非成熟歯状回と幼若歯状回
非成熟歯状回を持つマウス (ここでは例として Shn2 KO マウスを示す) の海馬歯状回における遺伝子発現変化は幼若期のマウスの遺伝子発現変化に似ている。

を果たしている部位であり、特に歯状回で起こる神経新生は遠隔記憶の転送・固定に重要な役割を果たしていることが知られている (Kitamura et al., Cell, 2009)。

本研究では非成熟歯状回マウスにおける遠隔記憶の障害と幼児性健忘との間の共通性に着目し、幼児性健忘のマウスモデルにおける歯状回成熟度の役割を明らかにすることで遠隔記憶のメカニズムを探る(図3)。

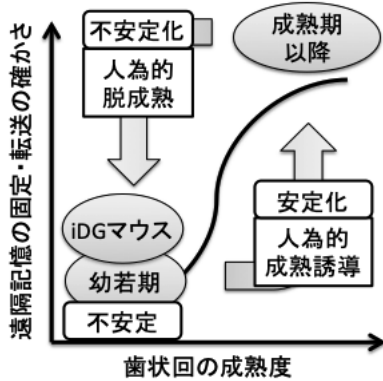


図3 海馬歯状回の成熟度と記憶の安定性

海馬歯状回が幼若であれば記憶は不安定であり、成熟すると安定化している。本研究ではこれらを人為的な方法で操作することを試みた。

<研究計画>

歯状回顆粒細胞の選択的興奮性操作が脳成熟度に及ぼす効果の解析

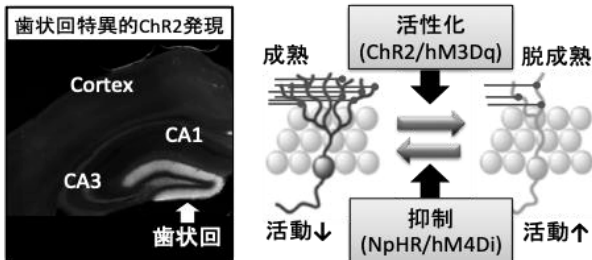


図4 歯状回の選択的活動制御による成熟度操作

(左) ChR2 配列の前に STOP 配列を flox ではさんだ fxChR2 マウスと Pomc-Cre マウスを掛け合わせることで ChR2 を歯状回特異的に発現させるマウスを得ることができた。

(右) 人為的な神経活動の制御によりホメオスタティックな可塑性が起こり、神経細胞の成熟度を双方向性に変化させることができると考えられる。

薬物投与によって海馬歯状回の細胞が脱成熟したマウスや、Shn2 KO マウス、CN cKOマウスなどのように「非成熟歯状回」を持つマウスでは、ほぼ例外なく遠隔記憶の障害が見られている。また、Shn2 KO マウスや CN cKOマウスのように近接記憶には異常がなく、遠隔記憶が選択的に阻害されているものもあり (図4)、歯状回の神経細胞の成熟度は近接記憶から遠隔記憶への移行に重要な役割を持っていると考えられる。歯状回神経細胞は成熟度に応じた分子マーカーをもち、それぞれのステージで異なる特徴を持っている (図2)。脱成熟した歯状回で多く見られる未成熟な神経細胞は成熟神経細胞に比べ、発火の閾値が低く、静止膜電位は浅く、ドーパミンやセロトニンによる促進をうけやすい興奮性が高い状態になっている (Takao et al., Neuropsychopharmacology, 2013; Yamasaki et al., Molecular Brain,

2008 など)。神経細胞には活動の強弱によりシナプス強度や神経細胞そのものの興奮性が変化する「ホメオスタティック可塑性」という現象がある (Pozo & Goda, Neuron, 2010)。実際に、電気はいれん刺激 (ECS) により極度の興奮状態を人工的に与えることで歯状回の神経細胞は脱成熟を起こす (未発表)。したがって、同様の現象を光遺伝学やDREADDシステムによる歯状回神経細胞の興奮性操作によっても実現できる可能性が高い (図4)。本研究では、近年開発された光感受性タンパク質 (チャンネルロドプシン2: ChR2 (Boyden et al., Nature Neuroscience, 2005); ハロロドプシン: NpHR (Han & Boyden, PLoS ONE, 2007)) あるいはDREADDシステムによるデザイナー受容体 (hM3Dq および hM4Di, Armbruster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007) を歯状回に発現させたマウスで、歯状回の神経細胞の活動を選択的に促進・抑制する。光感受性タンパク質およびデザイナー受容体の発現には遺伝子改変マウスあるいはアデノ随伴ウイルスベクターを活用し、歯状回特異的な発現制御にはPomc-Cre マウスを用いる (図4左)。歯状回神経細胞の興奮性操作の行動レベルでの影響を検討しつつ、歯状回の成熟度を双方向性に変化させるのに必要十分な条件を決定する (図4右)。歯状回の成熟化・脱成熟化については申請者が見出した歯状回の成熟度の指標となる分子群 (Calb, DIAR, Dsp, TDO2等) について定量的PCRを行うことで評価し、成熟度に変化が見られればその他のターゲット分子についての抗体染色など組織学的解析を行う。歯状回の成熟度が変化することで遠隔記憶の固定・転送の確かさが強くなったり弱くなったりするという仮説に基づき実験を行う。遠隔記憶の評価にはバーンズ迷路や恐怖条件づけなどの課題を用いる (図5)。

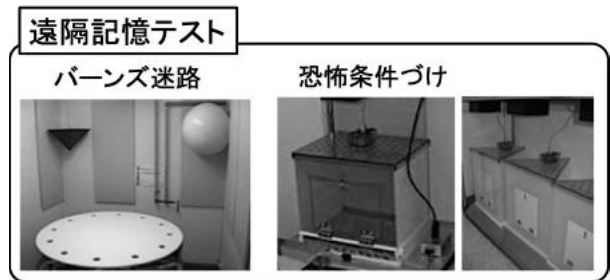


図5 遠隔記憶を評価する行動テスト

(左) バーンズ迷路では逃避箱が設置された穴の位置を記憶させる。(右) 恐怖条件づけでは電気ショックを与えた文脈を記憶させる。

<得られた研究成果>

海馬歯状回に特異的に Cre を発現する Pomc-Cre マウスとCre 依存的にチャンネルロドプシン (ChR2)を発現するマウスを交配することで歯状回特異的に ChR2 を得られたマウスを得ることができた。ChR2 を発現する細胞を青色光で刺激することで活性化できるが、自由行動下での刺激にはテレオプトを用いた。テレ

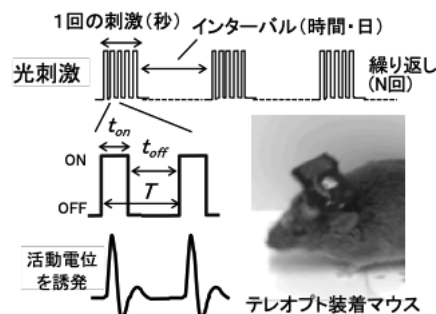


図6 ChR2 を発現したマウスへの光刺激パラメータ

オプトはLED と光ファイバーカニューレ、そして受信機とバッテリーが一体化したもので、テレオプトを装着したマウスは自由に行動することができ、またリモート操作により任意のタイミングで光刺激を行うことができる (図6)。歯状回に ChR2 を発現したマウスにテレオプトによって持続的に光刺激を行うとてんかん発作を起こすことが分かった (未発表)。そのため光刺激を行うに当たってはパルス刺激を行うこととし、パルス幅、刺激周波数、持続時間、回数、インターバルなど様々なパラメータを調節し、痙攣発作を起こさない範囲で行動を変容させる刺激パラダイムを探索した。オープンフィールドで自由に探索行動を行っているマウスに青色光でごく短時間の刺激を行うと一過性に活動性の亢進が見られた (図7)。日を変えて光刺激を繰り返してもこの

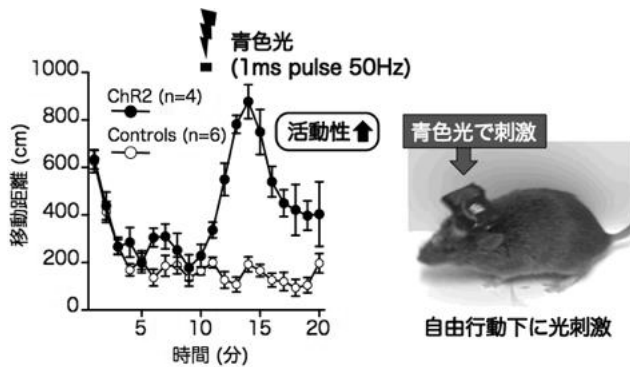


図7 歯状回特異的光刺激による一過性の過活動
自由行動下のマウスにワイヤレスで光刺激を与える子システムをセットアップした(右)。このシステムを活用して歯状回特異的光刺激を行うと一過性に活動性が亢進した (申請者ら、未発表)。

活動性の亢進は引き起こされることを確認している。

光刺激を繰り返し行ったマウスでは一過性の活動性の亢進のみだけでなく、自発的な活動量の増加も認められた。この自発的な活動量の増加は遠隔記憶の障害を示す統合失調症モデル (Miyakawa T, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003); Yamasaki N, et al. Molecular Brain (2008); Takao K, et al. Neuropsychopharmacology (2013); Ohira, K. et al. Molecular Brain (2013); Kobayashi, K. et al. Molecular Brain (2011); David DJ, et al. Neuron (2009); Shanahan NA, et al. Biological Psychiatry (2009); Anjaneyulu M, et al. European Journal of Pharmacology (2004) 他) の多くと共通した傾向であった。さらにこのように刺激を行ったマウスで空間学習課題を行ったところ、短期的な記憶のテストではコントロール群と明らかな差はなかったが、長期的な記憶のテストではコントロール群と比較して統計的に有意に成績が低下していた。これらの結果から光遺伝学によって海馬歯状回を過度に活性化させたことにより、遠隔記憶が障害されたことが示唆される。また、光刺激を繰り返し受けた海馬歯状回の細胞では幼若な海馬歯状回で見られるような性質も見られた。すなわち、海馬歯状回は光刺激によって脱成熟化が起こったと考えられる。本研究によって海馬歯状回の幼若化と遠隔記憶障害との関連が示唆され、歯状回の成熟度合いが幼児期健忘のメカニズムのひとつである可能性が示された。

<国内外での成果の位置づけ>

幼児性健忘のメカニズムについては世界的にも注目されている。最近ではカナダトロント大学 Frankland PW らのグループが若齢のマウスに記憶させ、その記憶に関わる神経細胞を再度刺激して活性化させることで幼児性健忘現象を防ぐことに成功している (Guskjolen A et al., Current Biology, 2018)。しかしながら海馬歯状回の成熟度と幼児性健忘を対応させた研究はまだ報告されておらず、世界的に見てもユニークな研究と言える。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

成熟したマウスで海馬歯状回を特異的に光刺激し、脱成熟させることで遠隔記憶の不安定を再現することができたが、逆に幼若な海馬歯状回の活動を抑制して幼若細胞を成熟化させることはできなかった。理由としては本研究期間中に代表者が異動となり、研究室のセットアップをしなければならなかったことが挙げられる。

<今後の課題、展望>

本研究ではさまざまな原因から引き起こされる非成熟歯状回、そして正常マウスで起こる幼児性健忘という全く異なる動物モデルから遠隔記憶にアプローチを行った。海馬歯状回の成熟度を操作することで記憶固定の強さを変化させることができれば、記憶障害の治療や、逆に忘却を意図的に促進させることで心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の治療などにも応用することが期待できる。

海馬における動的な記憶情報表現の可視化とそのメカニズムの解明

研究代表者：佐藤 正晃

理化学研究所・脳科学総合研究センター（現 埼玉大学・脳末梢科学研究センター）

<研究の目的と進め方>

脳で記憶の形成に中心的役割をもつ海馬の錐体細胞は、動物が空間内のある場所に存在するときのみ発火する「場所細胞 (place cell)」としての活動を示すことが知られている。過去の電気生理学的研究では、動物にある空間を探索させると、覚醒時にみられた海馬の神経活動の時間的パターンが、その後の睡眠時に再現される「リプレイ (replay)」と呼ばれる現象が起こることが報告されている。このことは、動物の覚醒時の経験が、海馬において、複数の細胞からなる「細胞集成体」様の回路の活動パターンとして記録されることを示している。哺乳類の記憶に重要な役割を果たす海馬のCA1神経回路は、CA3野からの三シナプスループ経路と嗅内皮質第3層からの直接経路の2つの異なる入力を受けることから、海馬内で処理された内的情報と皮質から送られる外界情報との比較器として機能すると考えられている。本研究は、このような海馬CA1野の神経細胞集団における記憶情報の動的表現とそのメカニズムを、仮想現実（バーチャルリアリティ、VR）環境下で空間学習するマウスの海馬CA1野の場所細胞地図をin vivoカルシウムイメージングで可視化する実験で明らかにすることを目的とした。

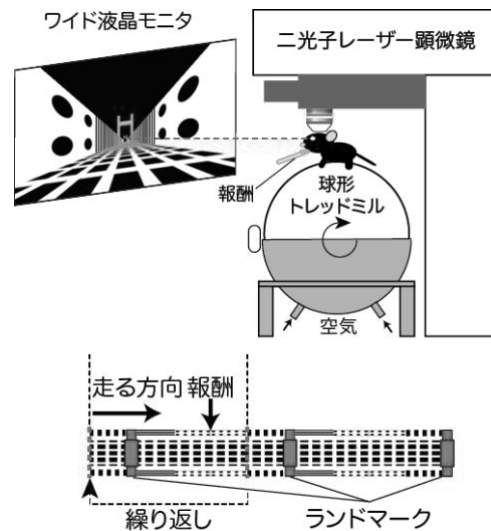


図1：実験に用いた二光子レーザー顕微鏡とバーチャルリアリティシステムの概略（上）。ランドマークと報酬地点を異なる場所に配置したバーチャル直線路課題（下）。

<研究計画>

1) 「目標1:海馬の記憶情報地図の動的表現の解析」では、VR空間行動課題を遂行中の海馬CA1野の神経回路活動を、in vivoカルシウムイメージング実験で明らかにする。実験では、同一個体の同一細胞群の活動を繰り返しイメージングすることで、訓練により引き起こされる可塑性を観察する。解析では、報酬細胞の増加のタイムコースやそれらの分布などを明らかにする。

2) 「目標2:海馬の記憶情報地図の動的表現の分子メカニズムの解析」では、報酬細胞の増加に対するNMDA型グルタミン酸受容体およびドーパミン神経系の関与を調べる。

3) 「目標3:海馬の記憶情報地図の動的表現の回路メカニズムの解析」では、マウスがVR空間学習課題を行っているときのCA1野の抑制性介在細胞活動のイメージングを行う。

<得られた研究成果>

海馬の錐体細胞に蛍光カルシウムセンサータンパク質G-CaMP7発現するトランスジェニックマウス (Sato et al., PLoS One, 2015)、ウインドウ埋込による海馬in vivoイメージング手技、マウス用VRシステム、および大規模イメージングデータの自動解析プログラムなどの技術を総合的に用いて、空間行動中のマウスの海馬CA1野における場所細胞活動をイメージングした。VR空間内の異なる2つの場所にランドマーク（緑色のゲート）と報酬（水）地点を設定した直線路を繰り返し連続して一方向に走る行動課題で、マウスを訓練した（図1）。訓練は1回あたり10分間のセッションを1日1～2回、合計15セッション行った。この訓練中のCA1野場所細胞地図をイメージングすると、訓練に伴い場所細胞の割合が増加すること、および訓練の初期には変化しやすい場所細胞

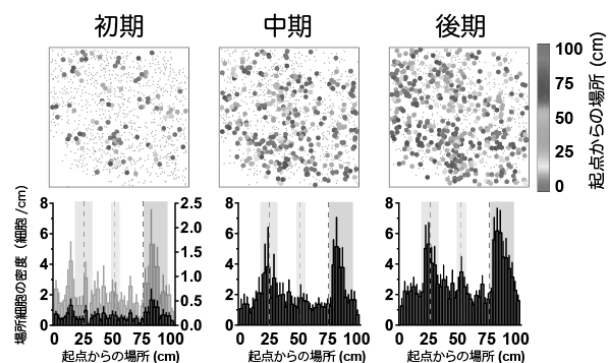


図2：訓練の初期、中期、後期でイメージングされる場所細胞地図（上）と、直線路上の場所に対して場所細胞の密度を表したヒストグラム（下）。ヒストグラムの緑色の点線(25 cm)はランドマークの位置を、赤色の点線(75 cm)は報酬の位置を示す。

地図が、訓練の繰り返しにより次第に安定化されることを見いだした（図2）。さらに、ランドマークまたは報酬が存在する場所で活動する場所細胞の数が他の場所に比べて増加すること、およびこのような行動上重要な (behaviorally relevant) 場所の過剰表現 (over-representation) が、これらの場所に対する場所受容野の選択的な安定化で起こることを明らかにした (Sato et al., bioRxiv, 2018)。この知見は、行動上重要な場所の情報、より

持続的に海馬の神経回路に表現されていることを示唆するものである。

上記の課題では、マウスが訓練を通じて特定の場所を学習しているかどうかははっきりしない。そこで次に、頭部固定したマウスがVR空間内の目的地に一定時間留まると報酬が得られる新しい空間学習課題を考案した(図3)(Sato et al., eNeuro, 2017)。マウスはVR空間内の直線路の始点を出発すると、途中で壁と床に緑のパネルの目印の付いた目的地において報酬の水が得ることができる。直線路の外には、山、タワー、建物などを模した手がかりが置かれている。マウスは直線路の終点に到達すると、再び出発点に戻されて次の試行を行う。マウスははじめに、目的地を通過しただけで報酬が得られる非遅延課題で訓練された後に、目的地内で一定時間(1~1.5秒)留まったときだけに報酬が得られる遅延課題で訓練された。

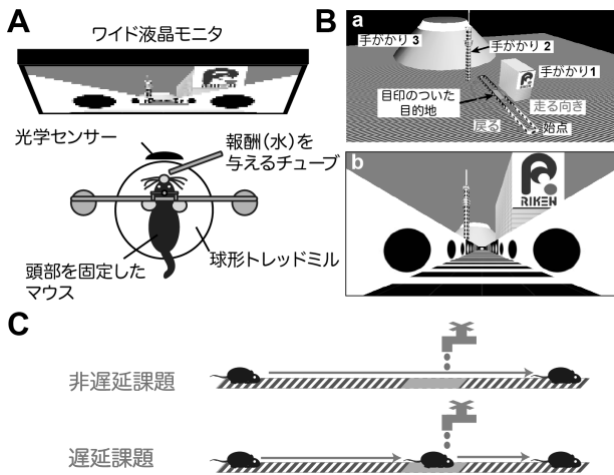


図3: 新規バーチャル空間学習課題。A: 実験系の概要。B: 直線路内の目的地の壁と床には目印として緑のパネルが設定され、直線路外には山、タワー、建物などを模した手がかりが設定される。C: マウスはまず目的地を通過しただけで報酬が得られる「非遅延課題」で訓練されたあと、目標地点で一定時間の間停止した後に報酬が得られる「遅延課題」で訓練される。

我々はまず、直線路の内外の視覚的な特徴を操作することにより、目的地近傍の目印が、マウスの目的地の認識に重要であることを明らかにした。遅延課題であらかじめ訓練して目的地で立ち止まることを学習したマウスを用い、直線路の外の手がかりを除いた条件で課題を行わせたと、目的地の滞在時間と成功トライアルの割合は、手がかりを除外した対照条件から変化しなかった。しかし、目的地の目印を除いた条件では、滞在時間と成功トライアルの割合は、目印を除外した対照条件から有意に減少した。

次に、海馬の活動がこの目的地の認識に関わっているかどうかを調べるために、AMPA/カニン酸型グルタミン酸受容体の阻害薬であるCNQXを海馬に微量注入した。遅延課題であらかじめ訓練したマウスの海馬CA1野にCNQXを注入した直後に課題を行わせると、目的地の滞在時間と成功トライアルの割合は著しく低下したが、注入後1~3日たった回復後では、これらの指標は注入前のレベルに戻った。対照として生理食塩水を注入した条件では、このような変化はみられなかった(図4)。

最後に、この学習の分子メカニズムを明らかにするために、Shank2欠損マウスを用いて実験を行った。Shank2は興奮性シナプス肥厚部に存在する足場タンパク質の一つであり、ヒト自閉症

スペクトラム障害でその変異の存在が報告されている。野生型マウスとShank2欠損マウスを、非遅延課題に続いて遅延課題で訓練すると、非遅延課題では目的地の滞在時間に差はみられなかったが、遅延課題ではShank2欠損マウスにおいて滞在時間の有意な低下が認められた。また目的地で立ち止まることをあらかじめ学習させた後に、目的地を直線路の始点に近い方に移動させた実験では、野生型マウスは新しい目的地に留まることを速やかに再学習したが、Shank2欠損マウスでは移動後の新しい目的地に留まる時間も正常マウスに比べて短かった。

以上の結果は、マウスにおけるVR空間の認識には、海馬に依存したメカニズムが働いていること、また、その学習には興奮性シナプス後部の足場タンパク質であるShank2が必要であることを示している。

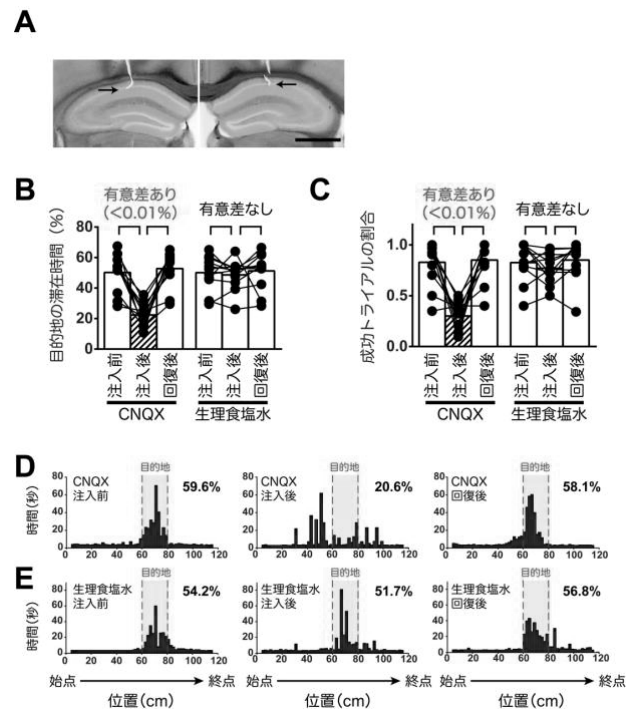


図4: 海馬抑制の効果。両側海馬CA1野にCNQXを微量注入した(A, 矢印)。スケールバー=1mm。CNQX注入直後は、目的地の滞在時間(B, D)と成功トライアルの割合(C)が著明に低下したが、注入後1~3日たった回復後では、これらの指標は注入前のレベルに戻った。生理食塩水を注入した対照では、この低下はみられなかった(B, C, E)

<国内外での成果の位置づけ>

頭部固定下の二光子カルシウムイメージングやヘッドマウント型の小型顕微鏡による自由行動下のカルシウムイメージングなどにより、海馬の錐体細胞の場所細胞活動は、従来考えられていたほど安定したものではなく、むしろ動的に変化していることが明らかになってきている。個体をとりにくく環境に配置された報酬や視覚的手がかりなどの顕著な特徴によって場所細胞の安定性が調節されることを明らかにした本研究は、海馬における記憶情報表現に新しい概念をもたらすものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2年間の研究期間では、場所細胞地図形成の分子メカニズム

と回路メカニズムを明らかにするという最終目標まで到達することは難しかった。

<今後の課題、展望>

今後は、遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験や、薬理学、光遺伝学、化学遺伝学を用いて特定の神経の活動を制御する実験などで、本研究が明らかにした場所細胞地図の形成のメカニズムを明らかにする研究へ発展させたい。

活性酸素種が担うマウス運動記憶の分散効果

研究代表者：遠藤 昌吾

東京都健康長寿医療センター研究所 老化脳神経科学研究チーム

<研究の目的と進め方>

目的

運動モデルと小脳機能・小脳可塑性

運動や運動機能リハビリテーションには様々な脳部位が関わる。その中で、小脳は運動の正確さや滑らかさそして素早さの記憶を担当する(1)。小脳依存性の運動のモデルとして、本研究では視覚性眼球応答(OKR, optokinetic response)を用いた。

OKRは、歩行などと比較すると単純な運動記憶モデルである。外界が動いたとき同じ様に眼球が動き景色がぶれずに見える。この現象はOKRと呼ばれる(1)。OKR適応では、マウスに左右に往復振動するスクリーンを見せることで増加する眼球運動を解析する。スクリーンの動きの視覚情報は平行線維を介して、スクリーンと実際の目の動きとのずれは登上線維を介して、小脳プルキンエ細胞へと伝えられる(1)。

この運動学習中に登上線維と平行線維から同時に小脳プルキンエ細胞に入力があった時に、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスの神経伝達が長期間減弱する現象は小脳長期抑圧(LTD, long-term depression)と呼ばれ、この可塑性が小脳依存性運動記憶の基盤であると考えられている(1)。LTDにはNO(一酸化窒素)系が必須であり、また、OKR適応にはNOが関与する(1)。

また、NOはリハビリテーションおよびそれを担う運動記憶を維持する上でも重要である(2-4)。NO合成酵素の補酵素テトラヒドロピオブテリン投与が運動障害を改善し(5)、本研究で用いるOKR適応を促進すること(6)、一方でNOを消去すると歩行の外乱適応が阻害されること(2)等が明らかにされている(4)。本研究では、詳細な解析が可能なモデルとして関与する神経回路が同定されているOKRを用いて、NO-ROSの相互作用により生成される新しいシグナル分子が記憶に関与するという側面に着目した。

ROS(活性酸素種)、NOと8-ニトロ-cGMP系

ROSは、酸化ストレスとして強力な“悪役”とされている。しかし、ROSは生体においてシグナル伝達系を担うことが最近明らかにされてきた(7-11)。

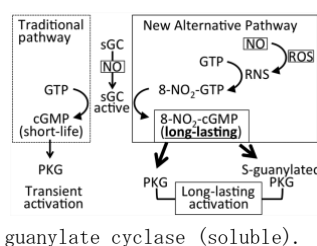


図1 8-ニトロ-cGMPを含む新しい情報伝達系とこれまでのcGMP系情報伝達系。NO, nitric oxide; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive nitrogen species; sGC, guanylate cyclase (soluble).

運動学習に必要なNOは細胞内cGMPを介してその作用を發揮する。小脳におけるcGMPの生理作用の解析では、生体には存在しない8-Br-cGMPなどの分解抵抗性cGMP誘導体を用いられてきた(総説12)。8-Br-cGMPは、生体内で生成される8-ニトロ-cGMPの作

用を模倣する(図1;7,8)。これまで8-Br-cGMPを用いて得られてきた結果は、細胞内で実際に生成される8-ニトロ-cGMPが重要であることを示唆している(図1)。

8-ニトロ-cGMPはホスホジエステラーゼによる分解抵抗性を有しPKG(cGMP-dependent protein kinase)を長時間にわたり活性化する。さらに、8-ニトロ-cGMPはPKGのCys残基をグアニル化する。グアニル化PKGはcGMP非存在下でも活性化状態を維持する(図1;7,8)。これらの性質により、8-ニトロ-cGMPはcGMPよりも長い時間神経機能に影響を及ぼすことが予想される(7-11)。

sGCの基質8-ニトロ-GTPの産生にはROS、NO、GTPが必要である(図1)。ROSの産生は運動終了後45分後にピークに達する(13)。トレーニングやリハビリテーションにおいて、15分より短い休憩や1時間を越える長い休憩後に活動を再開すると、十分なROSが存在しないため、8-ニトロ-GTPが減少する事が予想される。NOとROSの生成の消長はトレーニングやリハビリテーションにおける活動-休憩の長さやトレーニング間隔の重要性を示唆している。

長期記憶を担う分子機構

小脳依存性の長期運動記憶は、神経構造の変化(シナプス数の減少)を伴うが(14,15)、このような変化を伴う長期記憶には遺伝子の発現とタンパク質の合成が必要であることを我々は示した(16)。

8-ニトロ-cGMPにより長期間活性化されるPKG系は、ヒストンやERK(Extracellular signal-regulated kinase)1/2のリン酸化(17)を維持する。このリン酸化維持は、PKGによりリン酸化されるG-substrate(18,19)を介したプロテインホスファターゼ(PP)1/2の阻害によると考えられる。このようなリン酸化が遺伝子発現を新状態へ遷移させることが長期記憶を支える機構であると考えられる(12)。

遺伝子発現を制御するエピジェネティックな分子機構には、ヒストンやDNAの修飾がある。本研究の延長上にはROS-8-ニトロ-cGMPによるこのようなエピジェネティックな遺伝子制御と記憶の関係を探る事が考えられる。

研究の進め方

小脳におけるROS(活性酸素種)の制御、ROS-NO(一酸化窒素)相互作用、そして、ROS-NOから産生される8-ニトロ-cGMPやグアニル化タンパク質の生成機構は不明である。これらの機構を詳細に解析し、本研究では、ROS-8-ニトロ-cGMP系が運動記憶の基盤として働くことを以下の研究を通して検証した；

- 1) 8-ニトロ-cGMPおよびS-グアニル化タンパク質の小脳における分布解析
- 2) ROSや8-ニトロ-cGMPが、四肢協調性、長期運動記憶、小脳神経可塑性に関与することを8-ニトロ-cGMP阻害剤、ROS吸収剤などを用いて解析した。

<研究計画>

ROS、8-ニトロ-cGMP及びS-グアニル化PKGのOKR長期記憶及び小脳神経可塑性への関与の解析

ROSや8-ニトロ-cGMPが果たす役割を、小脳依存性長期記憶（視規性眼球応答の長期順応）と四肢の協調性（ローターロッド）という行動化学的側面から、そして、小脳長期抑圧（LTD）という電気生理学的側面から、解析した。本項で用いる試薬類の作用点を図2に示した。

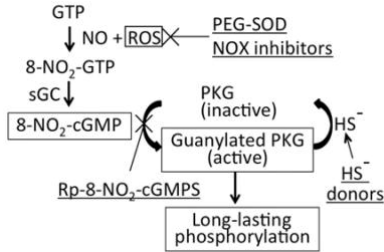


図2 NO-ROS-8-ニトロ-cGMP- PKG系とROS、8-ニトロ-cGMP、HS⁻ 関連試薬の作用点。HS⁻, hydrogen sulfide ion; NOX, NADPH oxidase; PEG-SOD, polyethylene glycol conjugated-superoxide dismutase.

<得られた研究成果>

1) 8-ニトロ-cGMPおよびS-グアニル化タンパク質の脳内分布

8-ニトロ-cGMP (図3) およびS-グアニル化タンパク質 (図4) に対する抗体を用いて、マウス小脳切片の免疫染色を行った。

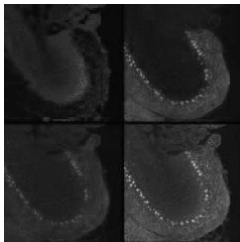


図3 小脳片葉における8-ニトロ-cGMPの分布。
左上 DAPI
左下 8-ニトロ-cGMP
右上 G-substrate
(小脳プルキンエ細胞)
右下 重ね合わせ

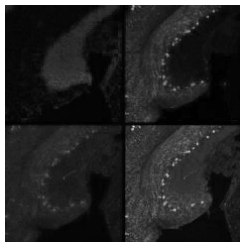


図4 小脳片葉におけるS-グアニル化タンパク質の分布。
左上 DAPI
左下 S-グアニル化タンパク質
右上 カルビンジン
(小脳プルキンエ細胞)
右下 重ね合わせ

8-ニトロ-cGMPおよびS-グアニル化タンパク質は、小脳に存在し、特に、小脳プルキンエ細胞に高濃度で存在することを明らかにした。

2) ROSスカベンジャー投与による四肢協調性の障害

ビタミンC及びVEは、生体内で重要なROSスカベンジャーとして働き、ROSによるタンパク質、脂質、核酸の傷害を防ぎこれらの分子や細胞を保護するために重要である。そこで生体内のROS濃度を低下させるために、通常餌の約2倍量のビタミンC及びVEを含む餌をマウスと与え、通常餌を与えたマウスとローターロッドテストにより四肢協調性を比較した。4-40rpm/5minの条件下で行った。通常餌のマウスに比べて、ビタミンCとEを過剰投与したマウスで

は、ローターロッドに乗っていられる時間が短く、四肢

協調性が劣ることが明らかとなった (図5)。

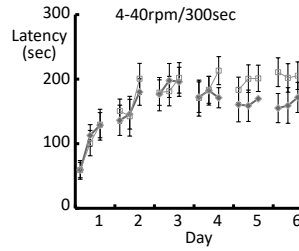


図5 ビタミンCとEの過剰投与によるマウスの四肢協調性障害。通常餌とビタミン過剰餌を8週間与えたのちに、ローターロッド試験で解析した。

3) ROSスカベンジャー投与による小脳依存性長期記憶の障害

2) のビタミンC/E過剰投与マウスについて、小脳依存性記憶である視性眼球応答順応を解析した。短期順応（記憶）に影響は与えないが、訓練24時間後に解析した長期順応（記憶）は、ビタミンC/Eの過剰投与によって障害された (図6)。小脳依存性の記憶、特に、長期記憶にROSが関与する可能性を示唆している。

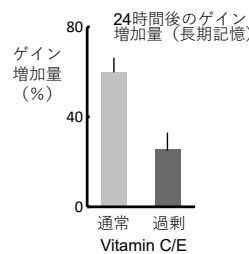


図6 ビタミンCとEの過剰投与マウスの小脳依存性記憶障害。通常餌とビタミン過剰餌を8週間与えたのちに、視規性眼球順応を解析した。

4) ROSスカベンジャー及び8-ニトロ-cGMP阻害剤投与による小脳依存性長期記憶の障害

ROSスカベンジャー (SOD、カタラーゼ) あるいは、8-ニトロ-cGMPの阻害剤である8-ニトロ-cGMPSを小脳片葉に直接注入して、視性眼球応答順応を解析した。短期順応（記憶）に影響は与えないが、訓練24時間後に解析した長期順応（記憶）は、両者の投与により障害された (図7)。

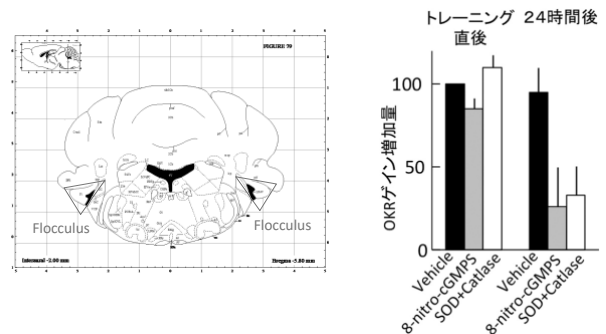


図7 ROSスカベンジャー及び8-ニトロ-cGMP阻害剤投与が視性眼球応答順応に与える影響。ROSスカベンジャーあるいは8-ニトロ-cGMP阻害剤を片葉 (Flocculus) 投与したマウスの視規性眼球応答順応を訓練直後 (短期記憶) と24時間後 (長期記憶) を解析した。

以上の結果から、ROSが小脳依存性長期記憶である視規性眼球応答順応、小脳が重要な役割を果たす四肢協調性に必要であると考えられる。小脳依存性の記憶や行動調節にROSが重要であるとい

うことを初めて見出した。

5) ROSスカベンジャーによる小脳LTDの阻害

小脳プルキンエ細胞におけるROSの消去を目的に、記録電極液中にSODとCatalaseを加えて小脳切片のプルキンエ細胞内へ導入した。平行線維への刺激とプルキンエ細胞の脱分極を組み合わせた刺激(CJS, conjunctive stimulation)を用いて、LTDを惹起した。白丸で示したコントロールではCJS後に平行線維からプルキンエ細胞への神経伝達効率の低下、LTDが観察された。一方、黒丸で示したSOD/Catalase投与では、LTDの惹起は観察されなかった。むしろ、SOD/Catalase投与は神経伝達効率を増強される方向に導いた。ROSは小脳LTDを解除する役割を果たす可能性を示唆している。ROSが小脳における神経可塑性を制御するという現象を初めて見出した。

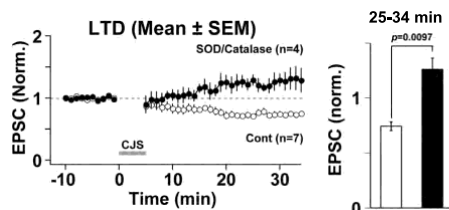


図8 ROSスカベンジャー (SODとCatalase) が小脳LTDに与える影響。1Hz、5分間の平行線維への刺激とプルキンエ細胞の脱分極を組み合わせた刺激(CJS, conjunctive stimulation)を用いて、LTDを惹起した。

6) その他の研究成果

・NADPH oxidaseの阻害剤であるapocyninの投与により小脳LTDが阻害されることを見出した。神経活動依存的に活性化されたNADPH oxidaseがROSの発生源として小脳LTDに必要であると考えられる。

・8-ニトロ-cGMP投与が小脳LTPを惹起することを見出した。8-ニトロ-cGMPは小脳LTDを解除する機構に関与している可能性を示唆している。

・8-ニトロ-cGMPがホスホジエステラーゼ(PDE)3, 4, 7を特異的に阻害する事を見出した。8-ニトロ-cGMPが細胞内でのcAMP, cGMPの制御に関わる可能性を見出した。8-ニトロ-cGMPによるPDEの阻害により長期にわたりサイクリックスクレオチド濃度が維持されると、引き続いて惹起される遺伝子発現等にも影響を与える可能性が考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

生物の活動に伴い発生する過剰な活性酸素種(ROS)は、タンパク質やDNAを損傷し、タンパク質の機能異常、遺伝子変異、そして、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の機能低下を引き起こす。このような異常は生物に細胞死、ガン化、老化等をもたらすとされている。

細胞や生物にとって“悪役”であるROSの排除はビタミンCやE等の内在性抗酸化物質、そして、カタラーゼやSOD(スーパーオキシドディスムターゼ)等が担うが、進化の過程で悪役ROSを完全に排除する機構は生物に備えられなかった。それゆえ、ROSは何らかの生理的機能を有する事が考えられてきた。本研究のようにROSを“シグナル分子”と考えた研究は少なく、さらに、ROS-NOから産生される8-ニトロ-cGMPに着目した記憶の研究は存在しない。特に、神経伝達や神経可塑性、記憶にROSの役割に着目した本研究のような研究は国内外で全く存在しない極めてユニークな研究であり、ROSについて、毒性物質から本来は生理活

性物質であるということへパラダイムシフトを引き起こす。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

8-ニトロ-cGMPのターゲットとしてcGMP-dependent protein kinase (PKG)を仮定して、小脳PKGを単離して、トレーニングや長期記憶に伴うPKGの変化を解析することを計画していたが、解析までたどり着くことができなかった。

小脳において、PKGはプルキンエ細胞にのみ存在し、また、図3, 4に見られるようにプルキンエ細胞(G-substrate陽性、カルベジン陽性細胞)はごく少ない。解析に用いるPKGが十分な量得られず、研究を進展させることができなかった。小脳プルキンエ細胞からのPKGの単離、濃縮の方法をさらに検討して、8-ニトロ-cGMPの標的分子としてのPKGの生理的役割を明らかにする必要がある。

<今後の課題、展望>

これまで細胞や生体の機能を良好に保つためにROSを体内から排除することが様々な形で試みられてきたが、一方で、図5-8に見られるように小脳機能にROSは重要な生理機能を有している。ROSを排除することが必ずしも生理機能にとって有利ではないことは、今後ROSの役割について考えるときに重要である。

NO系は運動記憶を基盤とする歩行等の運動機能リハビリテーションに重要な役割を果たしている(3-5)。本研究で明らかにされる長期記憶の分子機構は、運動機能リハビリテーションの効率化やそのための薬物開発のための分子ターゲットを与える。

高齢化社会において、身体機能の維持・改善は高いQOLを維持するために極めて重要であり、小脳は身体リハビリテーションに重要な役割を果たしている(1-3)。本研究の延長上には身体的リハビリの効率化などの臨床応用が考えられる。

引用文献

1. Ito, The cerebellum (FT Press), 2011.
2. Yanagihara and Kondo. PNAS 93, 13292-7, 1996.
3. Reisman et al, Neurorehabil Neural Repair 27, 460-468, 2013.
4. Contestalile, Cerebellum 11, 50-61, 2012.
5. Sakai, Rinsho Shinkeikagaku 36, 1324-1325, 1996.
6. Nagao et al, Neurosci. Lett. 231, 41-44, 1997.
7. Nishida et al, Nat Chem Biol. 8, 714-724, 2012.
8. Sawa et al, Nat Chem Biol. 3, 727-735, 2007.
9. Takahashi et al, Nat Chem Biol. 7, 701-711, 2011.
10. Sawa et al, Bioconjug Chem., 21, 1121-1129, 2010.
11. Satoh and Lipton, Trends Neurosci 30, 37-45, 2007.
12. Endo, Prog Mol Biol Trans Sci, 106, 381-416, 2012.
13. Sasaki et al, Brain Res 1077 161-169, 2006.
14. Aziz et al, PNAS, 111, E194-202, 2014.
15. Wang et al, PNAS, 111, E188-93, 2014.
16. Okamoto et al, J. Neurosci. 31, 8958-8966, 2011.
17. Endo and Launey, Neurosci Lett 350, 122-126, 2003.
18. Endo et al, PNAS 106, 3525-3530, 2009.
19. Endo et al, PNAS 96, 2467-2472, 1999.

脳内エピジェネティクス変化による運動パターン学習と維持メカニズムの解明

研究代表者：和多 和宏

北海道大学・大学院理学研究院・生物科学部門

<研究の目的と進め方>

学習・記憶形成には、受動的に刺激を一方的に受けるのではなく、自らが「自発的に活動を起こすこと」が重要な要素である。多くの学習・記憶形成は一回性の経験によって獲得されるものではなく、訓練の繰り返しを要し、またその維持にも復習過程を要する。そのため、個体発達のどの時期に、どれだけの時間を学習活動に費やしたのか、それをどのような頻度で行ったのか、さらにどれだけの目標を達成できたのか、これらの「学習活動の質と量」を脳内に留めておく神経メカニズムが存在すると考えられる。本研究では、鳴禽類ソングバードの発声学習を学習行動モデルとして、「自ら声を出す」という自発的行動が、その学習臨界期中の脳内遺伝子発現動態にどのような影響を与え、発声学習発達を駆動させるのか、行動依存のエピジェネティクス制御の観点から研究を行った。

<研究計画>

自発的な行動によって制御を受ける脳内エピジェネティクス動態が、個体発達過程における発声学習とその発声パターン維持にいかに関わっているのかを検証すべく、以下の2つ研究をおこなった。

- 1) 行動神経学的手法による検証：発声学習臨界期中に自発的に生成される発声練習を人為的に阻害し、発声パターン発達、発声学習臨界期における学習可塑性、脳内遺伝子発現動態、神経細胞形態変化を明らかにする。
- 2) *In vivo*ウイルス発現実験系による検証：音声発声学習・生成に関わるソングシステム神経回路内の投射ニューロン限定的なエピジェネティクス改変技術の確立を目指した。これにより、エピジェネティクス動態（特にゲノムDNAメチル化状態）を人為的に改変し、エピジェネティクス制御を介した感覚運動学習とその維持機構との関連性を明らかにする。

<得られた研究成果>

1) 「自発的発声行動阻害による発声学習臨界期間の延長誘導」

ソングバードの一種zebra finch（キンカチョウ）では、学習臨界期中に一日に平均約1,000回以上の自発的な発声練習を行い、自らの発声パターンを学習獲得していく(Ohgushi et al., 2015)。今回、発声行動時の体勢位置を人為的に操作することで、ソングバードの発声行動を持続的に阻害する方法を独自開発し、学習臨界期間中の自発的発声行動をほぼ完全に阻害することに成功した。この阻害によって、正常個体における発声行動量の約1%に相当する発声経験しか得ることができない個体を作出することができた。この発声経験阻害実験によって、正常個体が発声パターンを固定化する孵化後100日前後においても、幼鳥が生成するサブソングのような未成熟な非定型的な発声パターンを生成することが明らかになった[図1]。さらに、この発声経験阻害個体は、正常発達個体では学習臨界期が終了し、発声学習能がなく

なる成鳥時になっても発声学習能を維持していた[図2]。

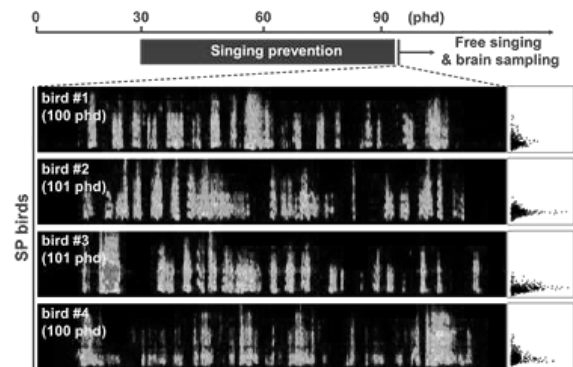


図 1: 発声学習臨界期中に発声経験阻害を受けた個体 (n = 4 個体)の成鳥時での発声パターン。

幼鳥時の学習臨界期初期の歌に酷似しており、定型的な発声パターンが観察されない。

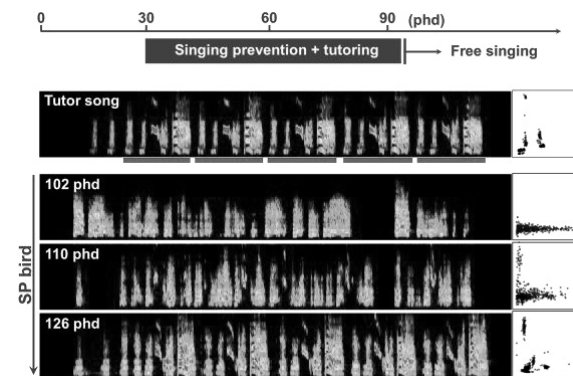


図 2: 発声経験阻害個体の成鳥時からの発声学習能。

正常個体では発声学習臨界期の終了により発声パターンの変化が起こらない成鳥時[post-hatching day(phd)100]からでも発声学習が成立する。

これらの結果は、学習臨界期中の発声行動学習の可塑性変化はage(日齢)に依存するのではなく、自発的な発声行動量に依存することを意味する。

2) 「発声練習経験の蓄積によって制御を受ける遺伝子群の同定」

(1)の結果を踏まえ、自発的な発声行動量に相関する遺伝子群のゲノムワイドな探索を行った。学習臨界期間中・後、及び発声行動阻害個体の発声運動回路内に存在する歌神経核 HVC, RA をレーザーマイクロダイセクション法により選択的にサンプリングし、RNA-seq を施行した。このサンプリングをもとに実施した RNA-seq データをもとに共発現解析法を行ったところ、歌神経核 RA において 119 個の遺伝子群(RA Cluster I genes)が自発的な発声行動量に相関し、age によって制御を受けない遺伝子群と

して同定した[図 3]。

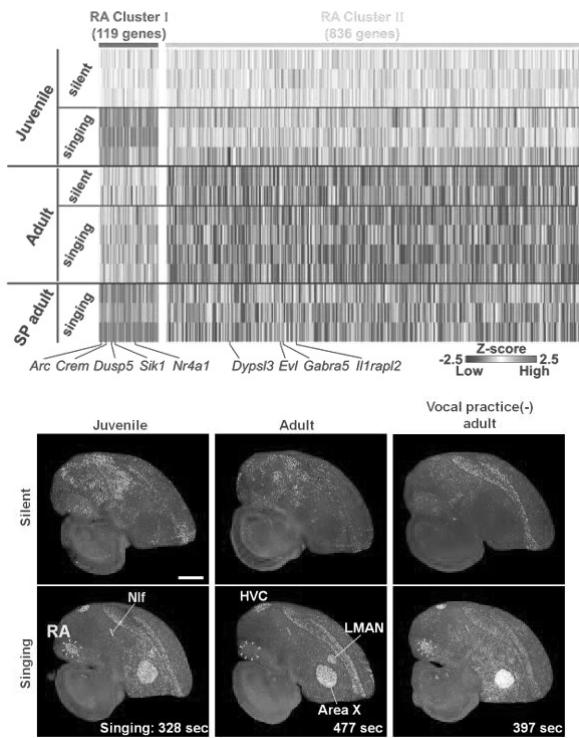


図 3: 発声練習経験の蓄積によって制御を受ける遺伝子群。
 (上) Song nucleus RA Cluster I genes(119 個)は、age ではなく、発声練習経験の蓄積によって発現変化を示す遺伝子群。これらの遺伝子群は、日内の発声行動によって神経活動依存的に発現誘導される。これに対して、RA Cluster II genes は age に依存して発現量が減少する。
 (下) RA Cluster I gene のうちの一つ *Arc* mRNA の発現パターン。

3) 「発声練習経験蓄積による神経細胞形態変化」

Song nucleus RA Cluster I genes は、舌下神経核へと投射するグルタミン酸作動性興奮神経細胞に特異的に発現制御を受けていた [図 4]。

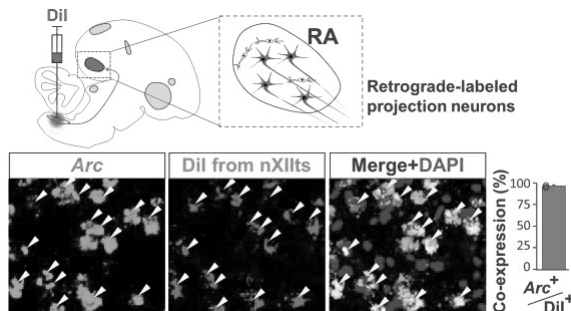


図 4: RA 投射ニューロン特異的な発現誘導制御を受ける Cluster I gene, *Arc*.

この RA 投射ニューロンは、ソングシステム回路において、発声運動経路と大脳-基底核-視床経路の 2 つの神経回路が融合し、それらの入力情報を統合し、発声運動パターンを出力する。今回明らかになった Song nucleus RA Cluster I 遺伝子群に多くのシナプス可塑性関連分子が多く含まれていたことから、発声練習経験蓄積による神経細胞形態への影響をみるべくゴルジ染色を施行した。その結果、歌神経核 RA の投射ニューロン特異的に樹状突起スパインの刈り込みが、age ではなく、発声経験の蓄積に依存して起こることが明らかになった。近傍の非歌神経核脳領域内に存在する神経細胞群(archopallium neurons)では、そのような発声経験の蓄積に依存した樹状突起パインの刈り込みは観察されな

かった[図 5]。

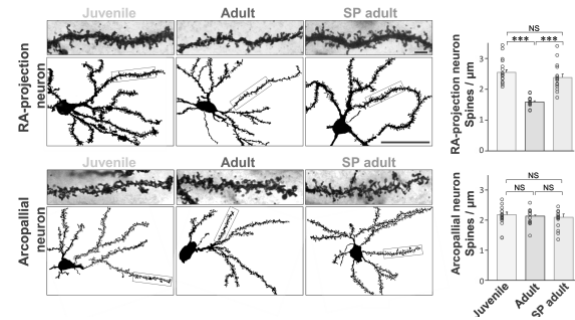


図 5: 歌神経核 RA 投射ニューロン特異的に誘導される発声練習経験蓄積依存性の樹状突起パインの刈り込み。

これらの結果は、発声学習臨界期中の自発的な発声練習量が、脳内の遺伝子発現動態変化、及び細胞形態変化にまで影響を与え、発声学習発達を駆動していることを示唆している。

4) 投射ニューロン特異的なエピジェネティクス改変による発声学習可塑性制御の検証

発声経験の蓄積によって制御を受ける遺伝子群中にエピジェネティクス制御関連遺伝子群(*Fam60B*, *Gadd45b*, *H3.3b* 等)が含まれていることが分かった。この知見をもとにゲノム DNA の脱メチル化を促進する TET 触媒部位の人為的過剰発現を誘導するためアデノ随伴ウイルスによる投射ニューロンへの特異的な発現制御を可能にする実験系の確立を目指した。

アデノ随伴ウイルス AAV serotype9(AAV9)がソングバード脳内で高効率にインジェクション部位から軸索逆行性に投射ニューロンに感染することが明らかにし[図 6]、さらにこの逆行性 AAV システムとジフテリア毒素 *dtA* を Cre-loxP システムを組み合わせることで歌神経核 HVC 内に存在する大脳皮質-基底核投射ニューロンを選択的に genetic ablation することに成功した [図 7]。

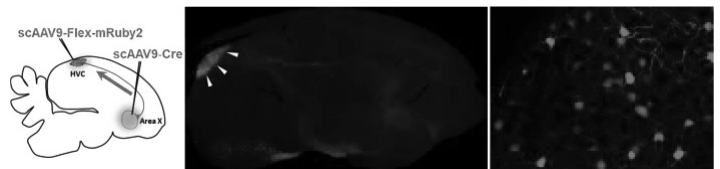


図 6: 歌神経核内の投射ニューロン特異的な遺伝子発現。

AAV9-Cre を大脳基底核の歌神経核 Area X にインジェクションし、軸索逆行性に歌神経核 HVC 内の投射神経に感染させ、別途 AAV-Flex-mRuby2 を HVC にインジェクションすることで HVC 内大脳皮質-基底核投射ニューロンに選択的に赤色蛍光タンパク質 mRuby2(赤色)を発現誘導させた。

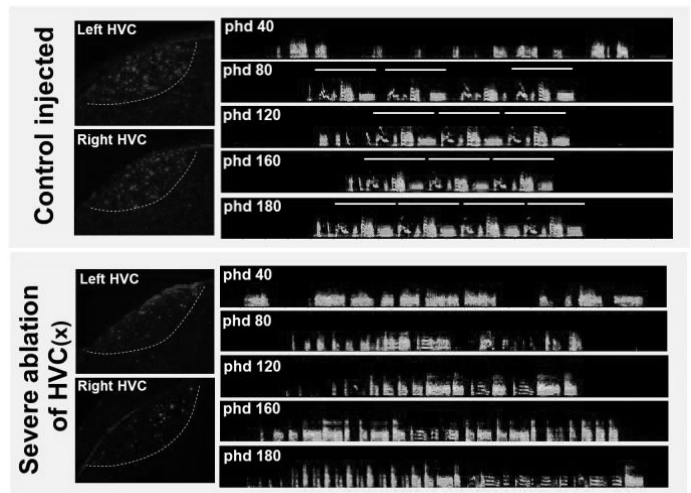


図 7: 歌神経核 HVC 内の大脳皮質-基底核投射ニューロン選択的な細胞除去。

投射神経特異的エピジェネティクス操作の前段階実験として、発声学習臨界期開始前に大脳皮質-基底核投射ニューロン選択的な神経細胞除去を施行し、その後の発声学習発達をみた。その結果、70%以上の投射ニューロンが除去された個体を作成することができた。これらの個体は、顕著な発声学習異常、及び非定型的な時系列列列構造をもつ歌パターンを発達させた。

現在、当初予定の RA 投射ニューロン特異的に TET 触媒部位の過剰発現による人為的ゲノム DNA 脱メチル化促進を誘導すべくアデノ随伴ウイルスによる発現実験を開始している。

以上、本研究では、これら行動依存のエピジェネティクス要因によって、発声学習臨界期中の遺伝子発現や神経細胞形態変化が起こることを明らかにした。これらの結果は、遺伝要因と環境要因のみならず、行動要因の視点から、自発的な学習活動そのものが、個体行動の学習発達に与えること示唆する。

<国内外での成果の位置づけ>

行動神経学的手法による検証実験によって、得られた成果 (i) 自発的発声行動阻害による発声学習臨界期間の延長誘導、(ii) 発声練習経験の蓄積によって制御を受ける遺伝子群の同定、及び (iii) 神経細胞形態変化の発見に関しては、2018 年 9 月に PLoS Biology 誌に報告した。この際、reviewer からは、本研究で実施した発声練習阻害実験によって、発声学習のみならず感覚運動学習一般において、学習臨界期間の学習可塑性を自発的な行動制御によってコントロールできることを示した初めての知見として、高く評価できるとのコメントを受けた。事実、論文発表後には、多数の海外研究者から発声阻害実験の実施方法の詳細を問う連絡を受けている。感覚運動学習の神経メカニズムを問う新しい行動実験系としても関心を寄せられている。

逆行性 AAV システムとジフテリア毒素 dtA を Cre-loxP システムを組み合わせた投射ニューロン選択的な遺伝子操作実験に関しては、2018 年 11 月の北米神経科学学会年会で発表し、その発現効率の高さに従来の研究報告よりも高く、今後の発声行動表現型に着目した行動解析を含めた研究の進展が期待されている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

AAV ウイルス系を用いた投射ニューロン特異的な改変実験の実施を、当初予定では実際よりも早い時期に開始できると考えていた。しかし、脳内 *in vivo* 神経細胞に十分な感染誘導ができる高タイター AAV の作製、また多点かつ微小脳部位へのウイルス液の正確なインジェクション技術の実験者の習得経験の蓄積が現実として、研究推進において大きなボトルネックとなった。ポスドク・技術補佐員不在で、学生主体の研究室にあって、学生の卒業に伴う実験技術・経験の蓄積の断絶は研究実施上、大きなストレスになっている。

<今後の課題、展望>

投射ニューロンを含めた、細胞タイプ特異的な内在性遺伝子の発現改変実験はソングバードを用いた研究では世界的にまだ十分に進んでいない。本研究で実施してきた AAV ウイルス系を用いた投射ニューロン特異的な遺伝子改変法は、感覚運動学習の神経行動学的研究をさらに強力に推進する力となる。

発声行動阻害実験により明らかになった RA cluster I 遺伝子群をはじめとする発声学習臨界期中にダイナミックな遺伝子発現変動を確認した遺伝子群のプロモーター、エンハンサー領域のエピジェネティクス変化を直接的かつ、ゲノムワイドに明らかにすることが今後の研究を進めるうえで重要になる。歌神経核は

5,000~20,000 個の細胞集団で構成されており、その試料規模では、従来法のバイサルファイトシーケンス、ChIP-seq 法の適応外となってしまう。そのため、現在、オープンクロマチン領域を微量細胞サイズでも検出可能な ATAC-seq や single-cell RNA-seq による細胞タイプ別の発現情報を基に、どのようなエピジェネティクス変化がいつ、どの細胞、どのような学習行動と相関して制御を受けるのかを明らかにすべく実験を進めている。

多重解像度カルシウムイメージングデータの解析手法の確立とその応用

研究代表者：青西 亨

東京工業大学・情報理工学院

<研究の目的と進め方>

神経科学の分野において、カルシウムイメージングは、神経活動を計測する重要な手法の一つである。カルシウムインジケータや計測装置の急激な進歩により、広視野から多細胞活動を計測することが可能となった。Stirmanらは、広視野-二領域二光子システムを開発し、広視野の一領域や離れた二領域から同時に1000個の細胞を計測することに成功した。Sofroniewらは、ランダムアクセスの手法により、直径5mm深さ1mmの円筒状の3次元領域から数十万個の細胞を計測できるシステムを開発した。理化学研究所脳科学総合研究センターの村山正宜チームリーダーらは、Sofroniewらに比べて高い時間分解能で、同程度の広さの領域から数万個の細胞を計測できる超広視野二光子顕微鏡を開発している。このような超広視野多光子励起顕微鏡の出現により、脳皮質の広領域から数万細胞の活動が同時計測可能となった。

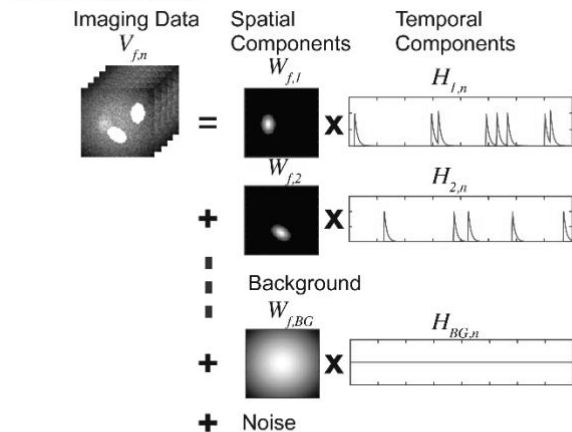
このように測定装置の進歩に伴い、取得できるデータ量が飛躍的に増大している。近年、巨大になるイメージングデータを如何に解析するかが問題になっており、機械学習によるデータ解析手法の必要性が認識されつつある(Chenouard et al., 2014)。複数の研究グループにおいて、巨大なイメージングデータから細胞を自動検出するための機械学習アルゴリズムが開発されている。近年発表された、静的な形態情報でなく、動的な情報から細胞検出を行う手法は、その多くが非負値行列因子分解(Non-negative matrix factorization, NMF)に基づいている。Mukamelらは独立成分分析(Independent component analysis, ICA)、我々はバックグラウンド拘束付きNMF(Background constrained NMF: BCNMF)、Pnevmatikakisらはカルシウム動態を反映した構造を因子行列に導入した拘束付きNMF(Constrained NMF: CNMF)を提案している。また、PachitariuらはNMFに神経線維網に関するモデルを組み入れたSuite2Pと呼ばれる手法を提案している。ICAを除き、多くがNMFによる細胞検出である。

本研究課題では、理化学研究所脳科学総合研究センターの村山正宜チームリーダーらと共同で、同チームで開発中の超広視野二光子顕微鏡から取得される巨大データより、細胞を自動検出する手法を開発することを目標とする。深層学習などで近年注目を集めている多重解像度技術を用いた新型の細胞検出方法や、巨大データから実用的な時間で細胞検出ができる手法を開発する。

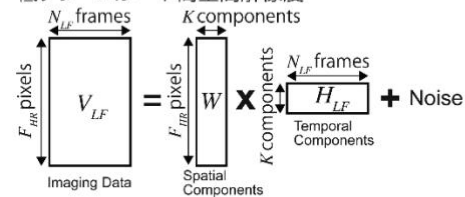
<研究計画>

- 1) アルゴリズム1：非負値行列因子分解(NMF)を多重解像度に拡張することにより、従来手法より細胞検出能力が高いアルゴリズムを開発する。具体的には、高空間解像度のカルシウムイメージングと、この高解像度データをビンニングよりダウンコンバートして生成される低空間解像度データを処理対象とする。この測定が同じだが解像度が異なる多重

非負値行列因子分解



低フレームレート高空間解像度



高フレームレート低空間解像度

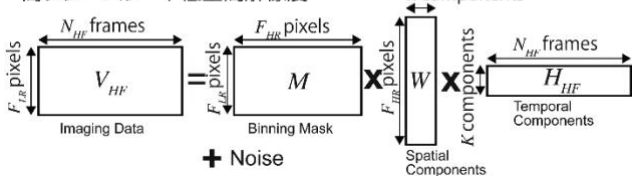


図1：多重解像度 NMF の模式図

解像度データから、細胞検出を実現する多重解像度NMFを開発する。低空間解像度データより大域的情報、高空間解像度データから局所詳細情報が得られるので、これらを統合することにより、ローカルミニマム問題が低減され、細胞検出能力の向上が期待される。

- 2) アルゴリズム2：村山チームが開発している新型顕微鏡では、同一箇所から2試行の測定により同一箇所から「高フレームレート低空間解像度データ」と「低フレームレート高空間解像度データ」を取得することができる。このような試行が異なる同一箇所の多重解像度データから、高解像度の空間情報(形態)と高解像度の時間情報(活動)を抽出することができる超解像アルゴリズムを開発する。これにより、走査速度の制約により、空間と時間の解像度を同時に上げることができない顕微鏡の「ジレンマ」の解消を目指す。

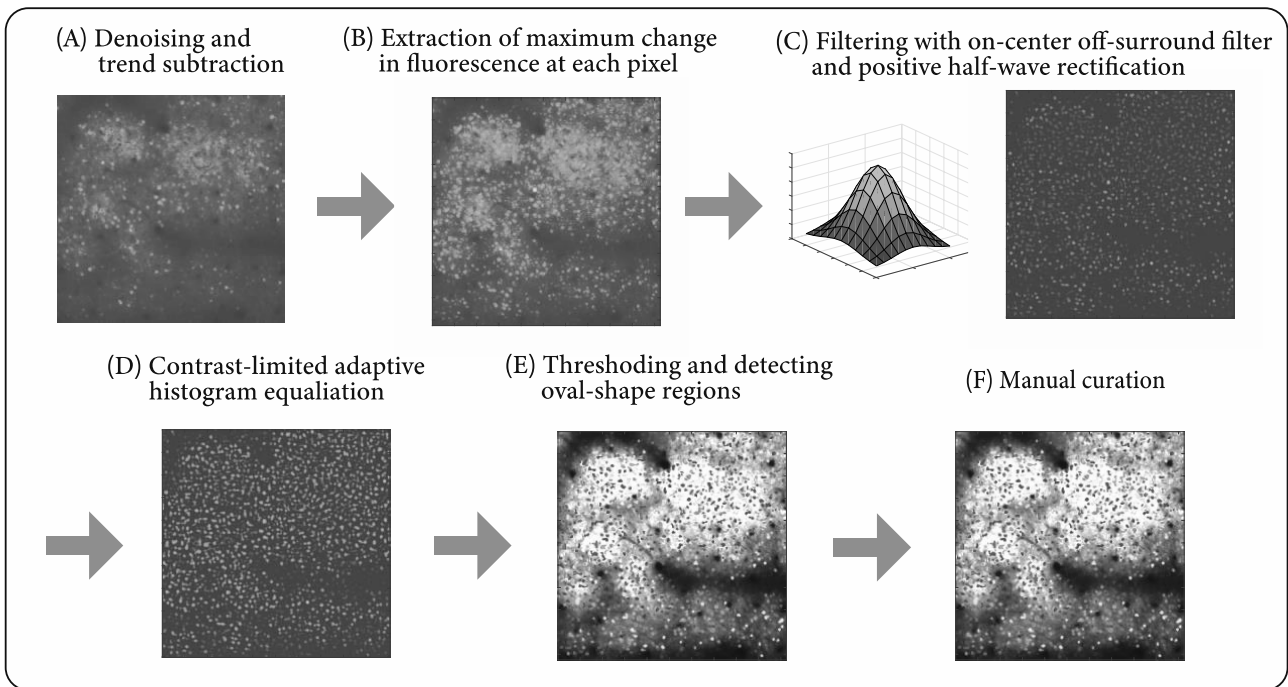


図 2: LCCD の概要

3) アルゴリズム 3 : 上記の緻密な機械学習アルゴリズムと異なる、巨大データから実用的な時間で細胞検出ができる実用的な手法である低計算コスト細胞検出 (LCCD) 法を開発する。LCCDは、主にフィルタ処理と閾値処理からなる単純な手法により細胞検出を実現する。この手法では、先行手法のような大規模な最適化問題を解く必要がないので、計算コストが低く、巨大イメージングデータの解析に適している。村山チームとの共同研究を通して、LCCDの開発が必要となり、当初計画を変更してこの課題を追加した。

<得られた研究成果>

1) アルゴリズム 1 : 非負値行列因子分解 (NMF) を多重解像度に拡張することにより、従来手法より細胞検出能力が高いアルゴリズムを実現することに成功した。前述のように、高空間解像度のカルシウムイメージングと、この高解像度データをビンニングよりダウンコンバートして生成される低空間解像度データを処理対象とした。同時最適化の技法を駆使して、多重解像度データを共通の空間行列 W と時間行列 H に分解するアルゴリズムを構築した (図 1)。測定は同じだが解像度が異なる多重解像度データを用いることにより、低解像度データから大域的情報、高解像度データから局所詳細情報を得ることができ、これらを結合することによりローカルミニマム問題が低減され、細胞検出能力の向上を実現することができた。CNMFとSuite2Pと比べて、MNMFは高い細胞検出性能を有することが確認できた。現在英文論文の執筆をしている。

2) アルゴリズム 2 : 同一箇所からの 2 試行の測定により取得される「高フレームレート低空間解像度データ」と「低フレームレート高空間解像度データ」を解析対象とする、アルゴリズム 1 と異なる多重解像度 NMF のアルゴリズムの構築に成功した。図 1 に示す生成モデルに対して同時最適化の技法を駆使し、試行が異なる同一箇所の多重解像度データを用いることにより、「高フレームレート低空間解像度データ」の空間解像度を復元することができ、高解像度の空間情報 (形態) と時間情報 (活動) を同時に得ることが原理的に可能になった。人工合成データを用いて、アル

ゴリズム 2 の性能評価を行い、上記の解像度復元が実現できることを確認した。また、人工データを用いて、先行研究の手法の CNMF と ICA と比較して、アルゴリズム 2 の細胞検出性能が上回ることを確認した。

3) アルゴリズム 3 : 理化学研究所脳科学総合研究センター村山チームで開発されている超広視野二光子顕微鏡で取得される 160GB のビッグデータから、実用的な時間で細胞検出が行える低計算コスト細胞検出アルゴリズム (Low-computational cost cell detection (LCCD) algorithm) の開発に成功した。図 2 に LCCD の処理過程の概要を示す。主にフィルタ処理と閾値処理からなる単純な処理で構成されている。この手法では、先行手法のような大規模な最適化問題を解く必要がない。160GB のビッグデータから、計算時間約 10 分で 10,000 個以上の細胞の自動検出を実現した。このような大規模データに対して、CNMF と Suite2P は動作しなかった。また、512x512 ピクセル 5000 フレームの in-vivo イメージングデータにおいて、CNMF と Suite2P と細胞検出性能を比較すると、LCCD はこれら手法とほぼ同等の性能を有することが確認できた。この研究成果は、査読付き英文論文誌 Neural Networks に投稿中である。

LCCD の問題点は、高速化を実現するため各ピクセルの最大蛍光時間変化の空間マップから細胞検出を行なっているため、時間情報を犠牲にしていることにある。これにより、LCCD は空間的に近接して部分的に重なった細胞どうしを、分離することは困難である。この問題を解決するため、我々は ex-LCCD を開発した。データを数百フレーム毎に分けて、分割したフレーム毎に LCCD の処理で ROI を求め、時間的に異なるフレーム毎に求めた ROI を空間相関に基づき統合した。LCCD より ex-LCCD は検出細胞数が大幅に増加した。また、ex-LCCD の細胞検出性能も大幅に上昇し、F 値 63% で CNMF と同じ要素の検出に成功した (CNMF が動作する 256x256 ピクセル 2000 フレームのデータによる評価)。したがって、LCCD と ex-LCCD の知見により、超広視野二光子顕微鏡で取得される巨大データから、ex-LCCD は他の State-of-Art の手法と同精度で細胞検出できていることが期待できる。また、前述の CNMF と Suite2P が動作しなかった大規模イメージング

データから、計算時間約5時間で10,000個以上の細胞の自動検出を可能にした。この研究成果と村山チームの新型顕微鏡の成果を盛り込んだ論文を執筆中であり、査読付き英文論文誌*cell*に投稿する予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

研究の目的と進め方で述べたように、複数の研究グループより続々と超広視野二光子励起顕微鏡が発表されており、脳皮質の数ミリ角の広視野から数万細胞の活動が同時計測可能となりつつある。このような測定装置の進歩に伴い、取得できるデータ量が飛躍的に増大し、機械学習によるデータ解析手法の必要性が認識されつつある。したがって、このような研究動向を鑑みると、本成果の重要性が日々増しつつあると、我々は考える。特に、最新の超広視野二光子励起顕微鏡で取得される巨大データに対して動作するアルゴリズムは、現時点ではアルゴリズム3のLCCDだけであり、当該研究分野において大きな反響があることが期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

アルゴリズム2において、実データでの評価ができなかった。村山チームが開発している新型顕微鏡は、2つの測定モード：「高フレームレート低空間解像度」と「低フレームレート高空間解像度」を有しており、アルゴリズム2が前提としているデータの取得が可能である。当初の研究計画では、この2つの測定モードを有する優位性を示すことに注力する予定であった。しかし、この顕微鏡の最大の魅力である広視野高解像度を最優先に評価する必要があり、我々の研究資源をこちらに集中させたため、アルゴリズム2の実データでの評価に至らなかった。アルゴリズム3のLCCDの開発も、この目的を達成するために研究課題に追加した。

<今後の課題、展望>

広領域皮質イメージングでは、ニューロピルの大域的時空間動態も同時に観測される。このニューロピル活動に近年注目が集まりつつある。機械学習によって広領域イメージングデータから細胞を自動検出する場合、ニューロピル活動はバックグラウンドの大域的蛍光変化をもたらす、細胞検出を妨げる主要因となる。今後の課題としては、ニューロピルの大域的時空間動態をモデリングし、非負値行列因子分解などの自動細胞検出器に組み込む必要がある。これにより、従来法と比べて高い精度での自動細胞検出の実現が見込まれる。

視床下部神経による積極的記憶消去のメカニズム解明

研究代表者：山中 章弘

名古屋大学・環境医学研究所

<研究の目的と進め方>

一生消えない記憶もあれば、何時しか失われていく記憶もある。しかし、この違いがどのようにして生じているのかよく分かっていない。今回我々は、脳が積極的に記憶を消去している証拠を初めて見いだした。視床下部のメラニン凝集ホルモン (MCH) 産生神経は、レム睡眠中に活性化される神経であり、この神経を特異的に脱落させたマウスは記憶が良くなることを見いだした。本研究では、この積極的記憶消去の脳内メカニズムに迫ることを目的としている。メラニン凝集ホルモン(MCH)は、元々魚類において同定された神経ペプチドであり、皮膚にあるメラニン産生細胞を凝集させることによって体色を白色に変化させる作用をもつことから命名された。ほ乳類では体色変化には関与していないが、MCH 遺伝子は種を超えて大変良く保存されている。このことは MCH が重要な生理機能に関与していることを示唆しているものの、未だに生理的役割が解明されていない。MCH 受容体は G タンパク質共役型の MCH1R と MCH2R が知られており、マウスには MCH1R のみが存在する。MCH 神経は、視床下部外側野だけに少数が存在し、マウスでは約 8,000 個の細胞体が疎らに分布する。しかし、そこから脳内のほとんどの領域に幅広く軸索を投射している。これまでに合成した MCH ペプチドを脳室内に投与すると摂食行動を強力に惹起すること (Qu et al., Nature 1996)、MCH 遺伝子の欠損マウスでは摂食量の減少と体重減少が認められることなどから (Shimada et al., Nature 1998)、長らく MCH は摂食行動を調節する因子と考えられてきた。しかしながら、近年の研究から睡眠覚醒調節における作用に注目が集まってきている。MCH 欠損マウスのノンレム睡眠が減少していること (Willie et al., Neuroscience 2008)、また、MCH 神経細胞がレム睡眠時に活動が上昇することが相次いで報告された (Hassani et al., PNAS 2009)。光遺伝学を用いた 2014 年の研究から、MCH 神経を活性化させると、ノンレム睡眠からレム睡眠に移行することが明らかになった。しかし、光遺伝学を用いた MCH 神経活動の抑制や、MCH 神経だけを時期特異的に脱落させたマウスではレム睡眠時間は全く変化しなかったことから、MCH 神経はレム睡眠調節自体ではなく、レム睡眠に関連した機能に関わっている可能性が示唆された (Tsunematsu et al., J Neurosci 2014)。そこで、改めて MCH 神経の投射パターンと、MCH 受容体の発現を組織化学的に解析したところ、海馬において MCH 神経軸索終末が密に観察されること、MCH 受容体 MCH1R が海馬において強い発現が認められることから、海馬における作用について解析を行った。MCH 神経特異的脱落マウスを用いて記憶を評価する新奇物体認識試験を行ったところ、MCH 神経脱落マウスの記憶が非脱落マウスと比較して有意に向上しているという大変興味深い結果を見いだした。これらの結果から、MCH 神経が脳に存在し、レム睡眠中に MCH 神経が活動すると、記憶の形成を阻害していることを示しており、脳には積極的な記憶の消去メカニズムが存在する可能性を強く示唆している。

<研究計画>

<1> MCH神経特異的脱落マウスを用いた記憶形成における MCH神経の役割について

Tet-Offシステムを用いてMCH神経の時期特異的運命制御によってMCH神経特異的脱落マウスを作成する。MCH神経特異的にテトラサイクリントランスアクティベーター (tTA) を発現する遺伝子改変マウス (MCH-tTAマウス) と、tTA依存的にジフテリア毒素A断片 (DTA) を発現する遺伝子改変マウス (TetO DTAマウス) を交配させてパイジェニックマウス (MCH-tTA;TetO DTAマウス) を作成すると、ドキシサイクリン (DOX) の有無においてMCH神経の運命を制御することが可能になる。DOXは餌に含有させており、DOX含有餌 (100 mg/kg) を食べている間は、DTAが発現しないためMCH神経が正常であるが、DOX不含餌 (DOX (-)) に代えるとMCH神経においてDTAが発現して細胞死を引き起こすために、MCH神経特異的かつ時期特異的脱落を引き起こすことができる。これまでの検討でDOX (-) 後約4週間で97%のMCH神経を脱落させることができることを確認している (Tsunematsu et al., J Neurosci 2014)。このMCH神経特異的脱落マウスでは、新奇物体認識試験において、MCH神経非脱落マウスと比較して有意に記憶力が上昇していることを見いだしている。そこで、他の記憶を評価するテストにおいても同様に記憶が良くなっているのかについて検討する。恐怖条件付け-フリーズテストによって恐怖記憶への影響、モリス水迷路において空間学習記憶など様々な記憶への影響について詳細に検討する。

<2> 光遺伝学、薬理遺伝学を用いたMCH神経の特異的活性化

MCH神経特異的にCreリコンビナーゼを発現するMCH-Creマウスを既に導入している。Cre依存的にチャンネルロドプシン2 (ChR2) や改変型Gタンパク質共役型受容体 (hM3Dq) を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-CMV-FLEX-ChR2もしくはAAV-CMV-FLEX-hM3Dq) をMCH-Creマウスの視床下部外側野に局所感染させると、Cre依存的に外来遺伝子を発現させることができる。つまり、Creを発現するMCH神経だけで遺伝子を発現させることが可能である。MCH神経特異的にChR2を発現させたマウスの視床下部両側に光ファイバーを留置し、青色光 (470 nm, 4 mW) を照射することでMCH神経の活性化を行う。新奇物体認識試験において、MCH神経を活性化させると記憶がどのように変化するかについて明らかにする。記憶に変化が見られた場合には、<1>にて用いた、恐怖記憶、空間学習記憶などを評価するテストを行う。また、薬理遺伝学を用いたMCH神経活動操作が記憶に与える影響の評価も同時に行う。この実験では、MCH神経特異的にhM3Dqを発現させ、hM3Dqの特異的リガンドであるクロザピンNオキサイド (CNO) を腹腔内投与 (1mg/kg) して、MCH神経を薬理遺伝学を用いて持続的に活性化さ

せ、記憶の評価を行う。

<3>ファイバーフォトメトリーを用いた意識下自由行動中マウスのMCH神経活動記録

意識下において自由行動するマウスにおいて、独自に開発したファイバーフォトメトリーを用いることでMCH神経活動を記録する。活動記録にはカルシウムインジケータタンパク質(GCaMP6)を用いる。MCH-Creマウスを用いて、Cre依存的にGCaMP6を発現するAAV(AAV-CMV-FLEX-GCaMP6 1×10^{12} particle/ml, AAVは既に作製済)を視床下部領域に感染させて、MCH神経特異的にGCaMP6を発現させる。光ファイバーを視床下部領域に刺入し、青色の励起光(470 nm, 0.2 mW)を照射すると共に、GCaMP6からの緑色蛍光(540 nm)を導出する。GCaMP6の蛍光はCa²⁺存在下において増加することから、MCH神経活動の上昇を蛍光強度の増加として記録することができる。既に視床下部のオレキシン神経細胞を対象にファイバーフォトメトリー記録を行い、熱や機械的な痛み刺激によってオレキシン神経の活動が上昇することを確認し、同システムが正しく神経活動を記録できることを確認している。この時、睡眠覚醒状態を記録するために、脳波筋電図記録を同時に行う。MCH神経活動が睡眠覚醒状態変化に応じてどのように変化するか、また、覚醒時にどのタイミングにおいて活動をするのかを明らかにする。

<得られた研究成果>

1) MCH神経特異的脱落マウスでは、新奇物体認識試験において、MCH神経非脱落マウスと比較して有意に記憶力が上昇していることを見いだしている。そこで、他の記憶を評価するテストにおいても同様に記憶が良くなっているのかについて検討した。記憶テストとして、恐怖条件付け-フリーズテストによって恐怖記憶への影響、モリス水迷路において空間学習記憶など様々な記憶への影響について詳細に検討した。その結果、MCH神経脱落マウスは、いずれの記憶テストにおいても記憶が向上していることが明らかになった。そこで、次に薬理遺伝学や光遺伝学を用いてMCH神経特異的な活性化を行い、記憶への影響を検討した。MCH神経特異的にCreリコンビナーゼを発現するMCH-Creマウスを用いて、Cre依存的にチャンネルロドプシン2(ChR2)や改変型Gタンパク質共役型受容体(hM3Dq)を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV-CMV-FLEX-ChR2もしくはAAV-CMV-FLEX-hM3Dq)をMCH-Creマウスの視床下部外側野に局所感染させると、Cre依存的に外来遺

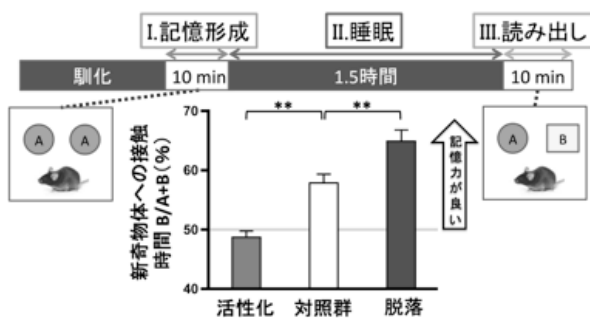


図1 新奇物体認識試験においてMCH神経脱落マウスは記憶が良く(青)、MCH神経活性化マウスは記憶が悪い(赤)

伝子を発現させることができる。MCH神経特異的にChR2を発現させたマウスの視床下部両側に光ファイバーを留置し、青色光(470 nm, 4 mW)を照射することでMCH神経の活性化を行った。新奇物体認識試験において、MCH神経を活性化させると記憶が抑制されることを見いだした。また、海馬上方まで光ファイバーを刺入してMCH神経軸索末端だけに光を照射して、海馬に投射するMCH神経軸索末端を活性化させても記憶が抑制されることを確認した。さらに、薬理遺伝学を用いたMCH神経活動操作が記憶に与える影響の評価も同時に行った。MCH神経特異的にhM3Dqを発現させ、hM3Dqの特異的リガンドであるクロザピンオキサイド(CNO)を腹腔内投与(1mg/kg)して、MCH神経を薬理遺伝学を用いて持続的に活性化させ、記憶の評価を行ったところ、光遺伝学と同様に記憶が抑制されることを確認した。

2) 自由行動するマウスにおいて、MCH神経活動がどのように変化するかについて明らかにするために、ファイバーフォトメトリーを用いた記録と脳波筋電図記録による睡眠覚醒状態解析を同時に行った。MCH神経特異的にカルシウムインジケータであるGCaMP6を発現させ、光ファイバーを視床下部に刺入し、励起光を照射し、蛍光強度を計測した。その結果、MCH神経の活動が、レム睡眠時に高くなることを見いだした。

<国内外での成果の位置づけ>

MCH神経は、古くから摂食中枢として知られる視床下部外側野に細胞体が局在していることから、摂食行動との関係が主に研究されてきた。合成したMCHペプチドを脳室内に投与すると強力に摂食行動を惹起すること(Qu et al., Nature 1996)、プレプロMCH遺伝子の欠損では摂食量の減少と体重減少が認められている(Shimada et al., Nature 1998)。しかし、近年になって睡眠覚醒調節との関係が指摘されている。2008年にMCH欠損マウスのノンレム睡眠が減少していること(Willie et al., Neurosci 2008)、また2009年にMCH神経細胞がレム睡眠時に活動が上昇することが相次いで報告された(Hassani et al., PNAS 2009)。また、2013年、2014年に申請者らと他のグループが光遺伝学によってMCH神経を活性化し、レム睡眠との関連について報告している(J Neurosci 2014)。しかし、未だにMCH神経がレム睡眠中の記憶消去について関わっているという報告はなく、我々が数年に渡って独自に研究成果を積み上げてきている。記憶の形成過程には、消去と固定化の二つの側面がある。現在多くの研究が固定化に焦点を当てて研究が進んでいるが、これだけでは、記憶の形成過程の全てを理解することは難しい。本研究提案では、記憶の消去という全く異なる方向からアプローチすることによって、記憶形成過程の理解を促すだけでなく、積極的に記憶を消去する手法を確立することによって、心的外傷後ストレス障害(PTSD)など、現在ほとんど有効な治療法がない症状を改善する新たな治療法開発に道を開く可能性がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

研究計画は、ほぼ達成できた。MCH神経を活性化させるとノンレム睡眠がレム睡眠に移行することが知られている。MCH神経の脱落によって、睡眠覚醒パターンが変化してしまうため、MCH神経細胞の脱落と記憶の制御が、睡眠パターンの変化によるものか、MCH神経脱落によるものかを分けることが難しかった。

<今後の課題、展望>

MCH神経の活動記録からレム睡眠中に活動していることが明らかになった。MCH神経活動を活性化すると、記憶が消去されることから、レム睡眠中のMCH神経活動は、記憶を抑制していることが明らかになった。このことは、睡眠中の記憶の制御におけるレム睡眠の役割について重要な示唆を与えている。今後は、これがどのような生理的な意義をもっているのかについて明らかにすると共に、細胞レベル、分子レベルにおけるメカニズムについても明らかにする。MCH神経から遊離されて記憶を抑制する分子が明らかになれば、それを標的とした創薬が可能となる。記憶を消去する手法が確立できれば、心的外傷後ストレス障害(PTSD)など、現在ほとんど有効な治療法がない症状を改善する新たな治療法開発に道を開く可能性がある。

線虫の温度走性を行動モデルとする記憶・学習の制御機構

研究代表者：森 郁恵

名古屋大学・理学研究科

<研究の目的と進め方>

本研究は記憶に基づいた過去の情報と現在の環境情報を比較・照合し、意思決定を行うメカニズムの解明を目的とした。このために、線虫 *C. elegans* が過去に餌の報酬があった飼育温度に滞在し続けるか、過去の温度記憶をリセットして新たな探索行動を開始するかという行動を、意思決定のモデル系として、分子行動遺伝学的解析を行った。

記憶は、動物の生存戦略にとって極めて重要な神経機能である。過去に経験した環境情報の記憶を頼りに行動選択を行うことは、動物の生存・繁殖にしばしば有利に働く。しかしながら、過去に経験した記憶に過度に依存すれば、刻々と変化する環境下においては、逆に不利となる状況が生じる。このような場合、環境からの新たな情報と過去に記憶した情報を天秤にかけ、いずれの情報にもとづいて行動を選択するかという意思決定が行われる。線虫を用いた意思決定の分子行動遺伝学的研究が国内外で行われている (de Bono and Maricq, Annu. Rev. Neurosci., 2005; Sasakura and Mori, Curr. Opin. Neurobiol., 2013)。例えば、大腸菌の餌場に滞在し続けるか離れるかの意思決定にチラミンレセプターが関与すること (Bendesky et al., Nature, 2011)、通常餌である大腸菌 OP-50 株で飼育後に病原性 PA14 株が提示された場合、PA14 株から逃げるか留まるかの意思決定に、ニューロペプチド Y とユビキチンリガーゼが関与すること (Reddy et al., Science 2009; Chang et al., Nature, 2011)、忌避物質である銅イオンのバリアーの向こう側に誘引性匂い物質を提示された場合、バリアーを超えて匂い源に向かうか撤退するかの行動選択に、LDL 様分泌タンパク質が必須であることが示されている (Ishihara et al., Cell, 2002)。

我々は、線虫が飼育温度を記憶し、温度勾配上で、その温度を探索する行動(温度走性行動、**図1**)の分子・細胞・回路基盤の研究を行ってきた (Mori and Ohshima, Nature 1995; Kuhara, Mori et al., Science 2008)。これまでに温度を感知する感覚神経細胞 AFD が温度情報の記憶素子としても機能していること (Kimura, Mori et al., Curr. Biol. 2004; Nishida, Mori et al., EMBO reports 2011; Kobayashi, Mori et al., Cell Reports 2016)、AFD で記憶された温度と餌との連合学習が下流の介在神経細胞 AIY、AIZ および RIA で行われていることを示してきた (**図2**, Kodama, Mori et al., Gene Dev. 2006)。最近になり、意思決定のメカニズムの解明にとって、環境入力から行動までをシンプルな神経回路によって説明可能な温度走性の経過

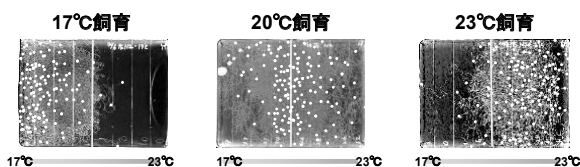


図1 線虫 *C. elegans* の温度走性行動

17°C、20°Cあるいは23°Cで飼育した線虫を、餌のない温度勾配上に置き、1時間自由に行動させた。

を解析することが、極めて有用であると着想した。特に、野生型線虫を、餌である大腸菌とともに17°Cまたは23°Cで飼育した後、餌のない温度勾配上に置いて、1時間経過すると、過去の飼育温度付近に移動するが、4時間経過すると、餌とともに飼育されていた過去の温度域から離れ、勾配上を分散することを見出した。そこで、本研究課題では、この現象を行動実験系に用いることで、1時間から4時間へと時間が経過する中で、過去に餌の報酬があった飼育温度に滞在し続けるか、記憶している温度を頼らずに新たな温度を探索行動を開始するか、という選択肢のどちらかを選ぶ「意思決定過程」を顕在化できると考えた。

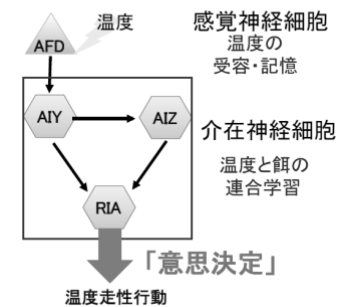


図2 線虫の温度走性行動を制御する神経回路

<研究計画>

- 1) 温度勾配上で4時間自由行動させた際に、勾配上を分散せずに飼育温度域に留まるような変異株を単離する。*C. elegans*を用いると、ハイスループットな順遺伝学的スクリーニングを、比較的少ない労力的・空間的コストで実現可能である。
- 2) 変異株の異常な表現型の原因となる遺伝子変異をポジショナルクローニングと全ゲノム配列解析によって同定する。*C. elegans*のゲノムは1億塩基対ほどなので、比較的容易に全ゲノム解析が行える。
- 3) 同定された遺伝子がどのような細胞で機能するかを調べるために、変異株に対して細胞種特異的に遺伝子を発現し、変異株の異常な表現型が回復するか調べる。*C. elegans*では細胞種特異的に遺伝子発現を誘導できるプロモーターが多数同定されている。
- 4) 野生株と変異株で神経活動を比較し、行動の異常に関連する神経活動の異常を抽出する。*C. elegans*は透明なので、カルシウムインディケイターを細胞種特異的に発現してイメージングすることで、非侵襲的に神経活動を計測できる。

<得られた研究成果>

変異導入した線虫を温度勾配上で4時間自由行動させ、飼育温度に留まった変異株を単離した。この順遺伝学的スクリーニングの結果、17°C、23°Cいずれの温度で飼育した場合でも、餌のない

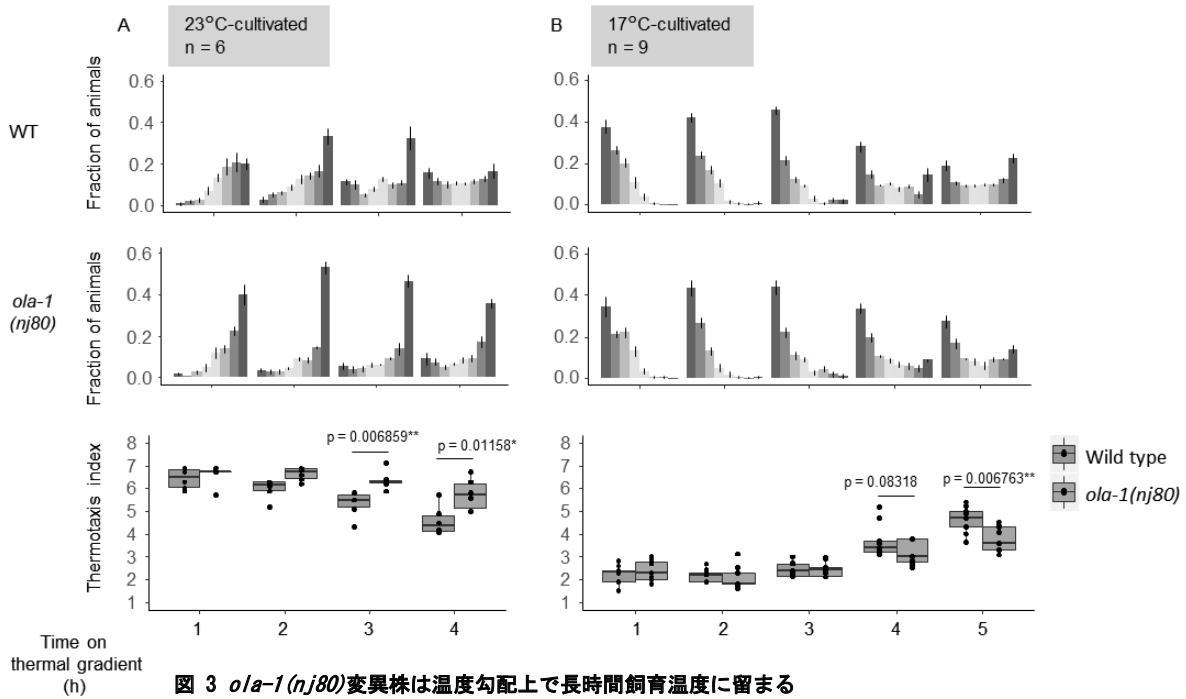


図 3 *ola-1(nj80)*変異株は温度勾配上で長時間飼育温度に留まる

野生株および *ola-1(nj80)*変異株を 23°Cで 3 日間 (A) あるいは 17°Cで 5 日間 (B) 飼育した後に温度勾配上を 1 ~5 時間自由に行動させた。温度勾配の各画分にいる個体の割合をヒストグラムで示した(上)。また、各個体の画分番号の平均値を Thermotaxis index として算出した(下)。

い温度勾配上で、4 時間経過しても過去の飼育温度域に留まる *nj80* 変異体が単離された (図 3)。 *nj80* 変異株を温度勾配上で 1 時間行動させた際の温度走性は正常であったことから、 *nj80* 変異株には温度受容などの機能には異常がなく、意思決定の過程のみに異常があると示唆された。 *nj80* 変異の原因遺伝子を同定したところ、TRAFAC class に属する P-loop GTPase をコードする *ola-1* 遺伝子と判明した。

*ola-1*遺伝子は、全身で発現が認められた。そこで、 *ola-1*が意思決定の過程で機能する細胞を同定するために、細胞特異的なレスキュー実験を試みたところ、 *ola-1*遺伝子の機能細胞は複数存在することが明らかとなり、また *ola-1*遺伝子は飼育温度の違いによって異なる神経細胞で機能することが明らかとなった。23°Cで飼育された個体の意思決定の際には、 *ola-1*はAFD温度受容

ニューロンで機能するのに対し(図4)、低温飼育後の意思決定の際には、AVK、RMG、BAGなどのこれまでに温度走性行動に関与することが知られていなかった神経細胞で機能することが明らかとなった(図5)。以上の結果から、本研究によって意思決定を制御する進化的に高度に保存された因子OLA-1が同定され、また、OLA-1は、過去の経験に応じて、異なる神経細胞で機能することにより意思決定を司ることが明らかとなった。

23°Cで飼育された個体が温度勾配上で飼育温度から離れる際には、 *ola-1*はAFD温度受容ニューロンで機能していたことから、 *ola-1*が意思決定の際に制御する細胞内プロセスを明らかにするために、AFDの神経活動を野生型と *ola-1*変異株で比較した。AFDでは飼育温度付近からの温度上昇に応じてカルシウム濃度が増

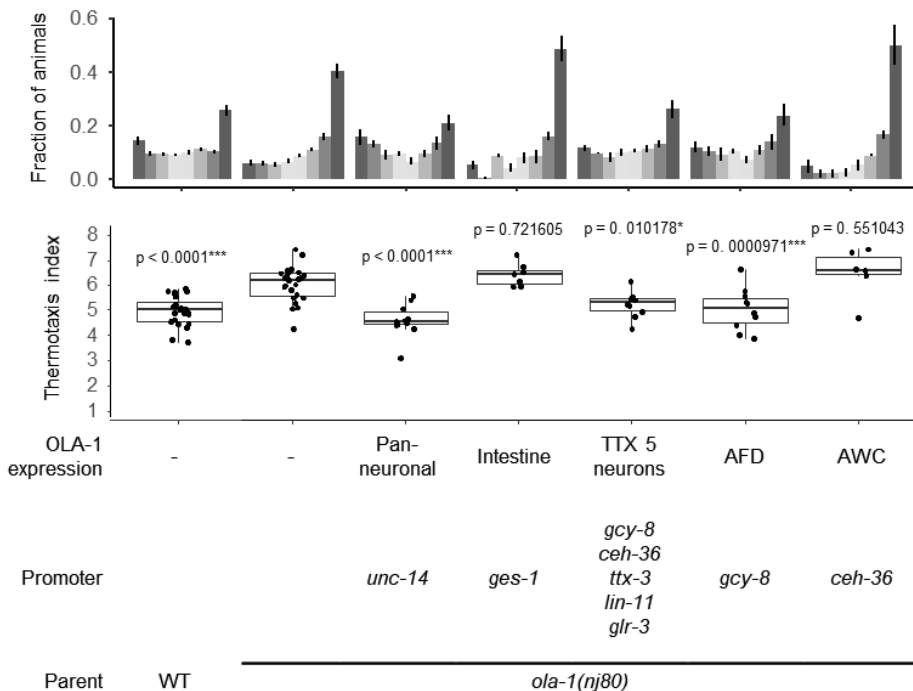


図 4 23°Cで飼育した線虫が飼育温度から離れる際には、OLA-1はAFDで機能する

野生株、 *ola-1(nj80)*株、および *ola-1(nj80)*株の表示された細胞でOLA-1を発現した株を23°Cで飼育し、温度勾配上を 4 時間自由に行動させた。

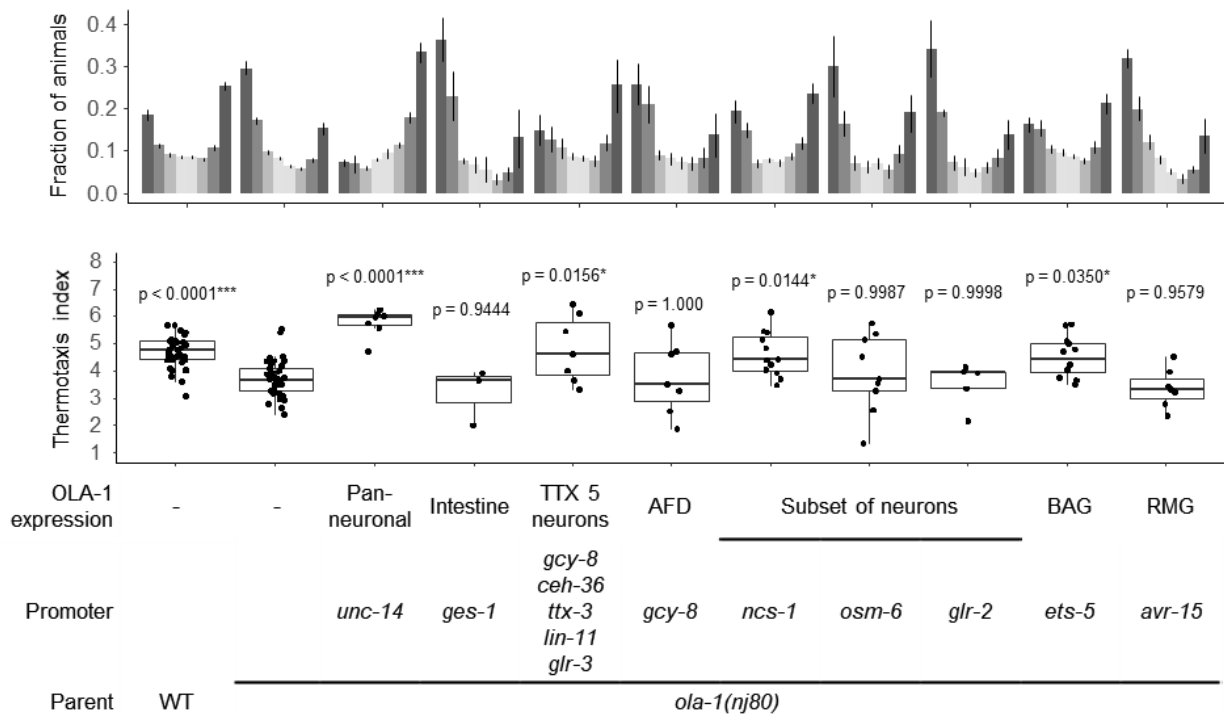


図 5 17°Cで飼育した線虫が飼育温度から離れる際には、OLA-1 は AFD 以外の細胞でも機能する
 野生株、*ola-1(nj80)*株、および *ola-1(nj80)*株の表示された細胞で OLA-1 を発現した株を 17°Cで飼育し、温度勾配上を 5 時間自由に行動させた。

加する(Kimura et al., 2004; Kobayashi et al. 2016, 図6)。カルシウムインディケーターであるGCaMP3をAFD特異的に発現した線虫株を23°Cで飼育し、温度勾配上で2時間行動させた後に、23°C付近にいた個体を回収し、イメージングを行った。温度刺激に対するAFDのカルシウム応答には野生株と*ola-1*変異株で差が見られなかった(図6)。この結果は、OLA-1がAFDへのカルシウム流入の下流で機能することで、飼育温度からの離散を促進する可能性を示唆する。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究では、意思決定による行動選択のメカニズムを解明するために順遺伝学を用いたので、既存の知見からは予想できない分子メカニズムを明らかにすることができた。

行動選択に伴う意思決定のメカニズムの解明は、脳科学の問題

に解答を与えるだけでなく、これらの破綻が原因となる精神疾患の発症機構を理解する上でも有用となる可能性がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究の期間内には意思決定と関連する神経活動の違いを見出せなかった。野生株と *ola-1(nj80)*株の神経活動の違いは、AFD よりも下流の神経回路で見られる可能性がある。

<今後の課題、展望>

AFD下流のインターニューロンの活動や、AFDからの伝達物質の放出を計測すれば、意思決定と関連する神経活動を捕捉できる可能性がある。また、OLA-1と機能的に相互作用する因子を同定すれば、意思決定のメカニズムにさらに迫れる可能性がある。

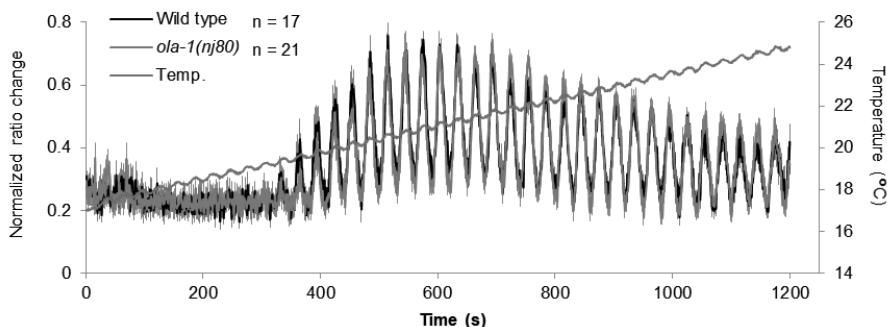
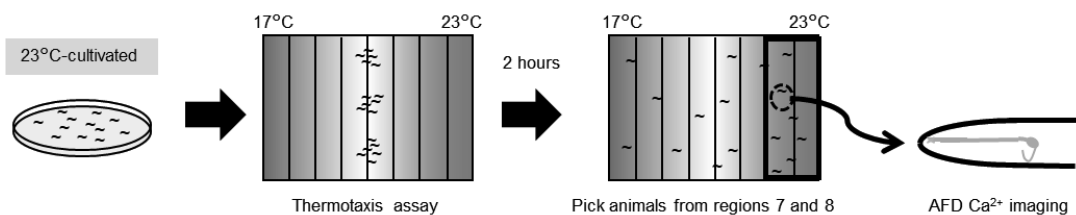


図 6 AFDのカルシウム応答

AFD に GCaMP3 と TagRFP を発現させた野生株および *ola-1(nj80)*株を 23°Cで飼育した後、温度勾配上で 2 時間自由に行動させた。23°C付近の個体を回収し、水色で示した温度刺激を与えてカルシウムイメージングを行った。

AMPA型グルタミン酸受容体の糖鎖修飾による新たなシナプス可塑性の動作原理

研究代表者：高宮 考悟

宮崎大学医学部

<研究の目的と進め方>

グルタミン酸は、中枢神経系において主な興奮性神経伝達物質であり、そのシナプス後部におけるグルタミン酸受容体は、記憶などを含む多くの神経活動で重要な役割を果たしている。そのなかでも AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) は、主たる興奮性神経伝達物質の受容体としてだけでなく、シナプス可塑性の発現においても中心的役割を果たしている。これまでに AMPA-R と細胞内や膜上で結合する分子群が発見され、それらがシナプス可塑性の制御を行っていることが多数報告されてきた。しかしながら AMPA-R の細胞外からの制御機構に関しては、未知の部分が多い。本研究では、この AMPA-R の細胞外の N 型糖鎖修飾に着目し、受容体タンパク質の糖鎖修飾による神経伝達とシナプス可塑性への制御機構を明らかにする。これまでの研究で、AMPA-R の GluA1 サブユニットは 401 番目のアスパラギン (N401) が N 型糖鎖修飾を受けて脱感作現象を制御する結果を得た。この結果を踏まえて本申請では N401 の糖鎖修飾の欠如により脂質ラフトに局在し、脱感作現象が消失しチャンネル活性が大きく変化する。さらに脂質ラフト陽性のシナプスと陰性のシナプスが存在し、糖鎖修飾を受けていない AMPA-R の局在によりシナプス強度が変化しシナプス可塑性が制御されているのではないかという仮説を示唆する結果を得ている。そこで本研究では、この仮説を検証するとともに、さらに糖鎖修飾による他のグルタミン酸受容体のチャンネル活性やシナプス可塑性の制御を解析する。

<研究計画>

- 1) グルタミン酸受容体の N 型糖鎖修飾が再感作をおこすメカニズムの解明
脂質ラフトに存在する N 型糖鎖修飾されていない GluA1 がどのようなメカニズムで脱感作をおこさないようになるのかをリガンドとの結合実験と構造解析の 2 面から解析する。
- 2) その他のグルタミン酸受容体における糖鎖修飾によるチャンネル活性の制御の可能性の検討を行う。
- 3) GluA1 N401Q ノックインマウスの作成と解析
- 4) GluA1 のリンカー部分に結合する分子の解析
- 5) 生理的状态における非脱感作 AMPA-R の役割の解析
野生型のマウス海馬において、GluA1N401 が糖鎖修飾されたものと、されていないものの置換が行われてシナプス可塑性が制御されているのではないかと仮説の検証実験を行う。

<得られた研究成果>

- (1) AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) の糖鎖修飾による機能制御
初代神経細胞において糖タンパク質の N 型糖鎖を消化する PNGase F を用いて、培養神経細胞の AMPA-R の機能解析を行ったところ、再感作現象がみられた。

AMPA-R の GluA1 サブユニットの細胞外領域の N 型糖鎖修飾に注目し、6 カ所ある N 型糖鎖修飾部位に各々変異を加えてチャンネル活性を測定したところ一カ所のアミノ酸をアスパラギンからグルタミンに変換した変異体(N401Q)で再感作現象が認められた (図 1)。

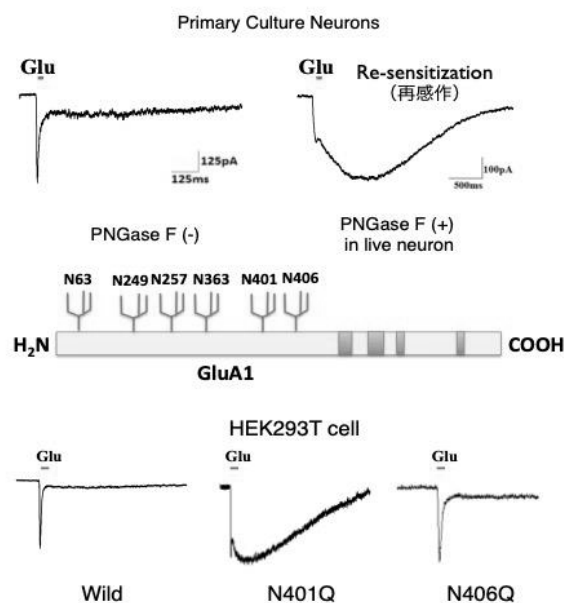


図 1 培養神経細胞の培養液中に PNGaseF を添加し N 型糖鎖修飾の消化を試みた。その後、神経細胞のパッチクランプを行いグルタミン酸 puff 投与による AMPA-R の電流を測定したところ、通常はチャンネルが開き、すぐに閉じ、その後の刺激に反応しない De-sensitization (脱感作) を生じる (上段左図)。ところが PNGaseF 処理した神経細胞は、閉じかけたチャンネルが再度開き、グルタミン酸刺激の間、開き続けるという Re-sensitization (再感作) 現象を示した (上段右図)。AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞外には 6 ヶ所の N 型糖鎖修飾を受ける可能性のある部位 (コンセンサスアミノ酸配列: N-X-S/T) が存在する (中段図)。N 型糖鎖修飾を受けうる個々のアスパラギンに変異を入れたマウス GluA1 cDNA を HEK293T 細胞に遺伝子導入してパッチクランプを行うと N401 に Q 変異を加えた GluA1 を発現させた場合に、再現性よく再感作現象が観察された (下段図)。

(2) 糖鎖修飾による細胞膜脂質ラフトへの局在の制御

糖鎖修飾されない AMPA-R は、脂質ラフトに局在していることが明らかとなった。また同一神経においても脂質ラフトが存在するシナプスと、しないものがあり、シナプスにおける脂質ラフトの形成が神経活動に依存して増加することがわかった。つまり

糖鎖の除去により脱感作現象が消失し AMPA-R のチャンネル活性が大きく変化する。さらに同一神経細胞に脂質ラフト陽性のシナプスと陰性のシナプスが存在することにより AMPA-R のシナプスにおける局在が制御されるのである。これらより“糖鎖修飾の有無によって AMPA-R の局在かがコントロールされ、個々のシナプス強度が変化する”という新たなメカニズムで神経伝達の各シナプスでの違いを生み出すという結果を得た。

(3) 糖鎖修飾によるシナプス可塑性の制御

さらに培養神経細胞を用いた実験においてシナプス可塑性を誘発する刺激を行うと糖鎖修飾をされていない AMPA-R が脂質ラフトを有するシナプスに集中することがわかった。またシナプス可塑性のモデルとして広く使われている海馬の急性スライスを用いた長期増強において、入力線維をテタヌス刺激をおこすと、糖鎖修飾されていない GluA1 がシナプスの脂質ラフトへ挿入・補足されて、細胞内へ Ca イオンを含むより多くのイオンの流入を促し神経伝達の促進に関与することがわかった。

このことにより、*in vivo* において AMPA-R の N401 において N 型糖鎖の有無により AMPA 型グルタミン酸受容体のチャンネル活性の調節が起こりシナプス可塑性そのものを直接制御している可能性が示唆された。(図 2)

これら実験結果に基づき GluA1 の該当 N 型糖鎖修飾を起こらなくしたノックインマウスを作成し、現在記憶・学習に関する行動実験を行っている。

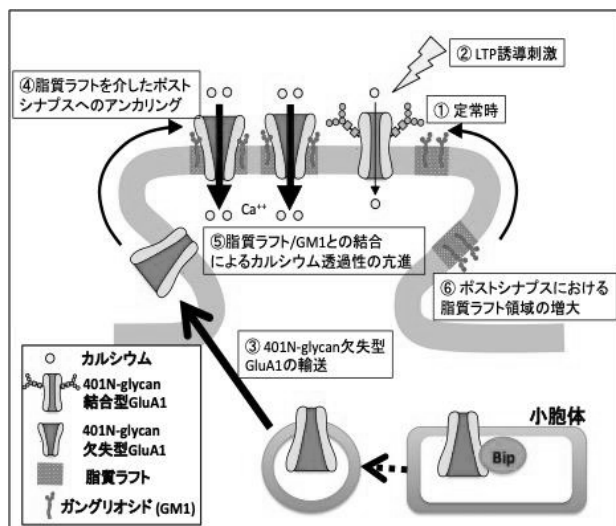


図 2 GluA1 N401 の糖鎖修飾の有無によるシナプス可塑性の

制御機構

①定常時：ポストシナプス上にはカルシウム透過性の低い糖鎖修飾されていない GluA1 N401 が分布する。②LTP が誘発されると、③細胞内にプールされている 401N-glycan 欠失型 GluA1 ホモマーがポストシナプスに輸送される。この糖鎖欠失型 GluA1 は、糖鎖修飾の場である ER における、Bip をはじめとする HSP70 ファミリータンパクの 401N 領域への結合を介した 401N 糖鎖修飾の拮抗的な阻害により産生されると考えられる。④ N401 糖鎖欠失型 GluA1 は、酸性糖脂質の GM1 との結合を介しポストシナプス上の脂質ラフトに局在する。⑤ この局在もしくは GM1 との結合により GluA1 ホモマーのチャンネル特性が変化し、より多くのカルシウムイオンを含む陽イオンが細胞内へ透過する。以下従来のメカニズムに従い、カルシウム透過増大にともなうシナプス伝達の亢進がおこる。⑥さらに、LTP 誘発より数時間経過後においては脂質ラフト自体がスパインに移行し、シナプスの可塑的変化を強化する。

<国内外での成果の位置づけ>

申請者は、グルタミン酸受容体のうち特に AMPA-R グルタミン酸受容体の細胞内タンパク質修飾や、その結合タンパク質がどのようにシナプス可塑性へ関与するかについて、それら遺伝子操作マウスを用いて電気生理学的、行動学的に解析してきた。これまでにこの AMPA-R グルタミン酸受容体のトラフィッキングを分子基盤としたシナプス可塑性の発現調節は、代表的なシナプス可塑性である海馬の CA1 錐体細胞における長期増強現象(LTP)、長期抑制現象(LTD)や小脳プルキンエ細胞における LTD において根本的な発現メカニズムであることが現在みとめられている。それにもかかわらず、学習や記憶の基本となる神経現象としてシナプス可塑性の *in vitro* としてのモデルである LTP, LTD の解明が進むと共に、LTP, LTD が *in vivo* における記憶とかならずしも一致しないという事実がわかってきた。また同時に AMPA-R のトラフィッキングのメカニズムの解明が他の受容体の研究や、他の神経機能や疾患との関連性が明らかとなり、広く神経研究に大きく貢献したという事実もある。その中で受容体の細胞外は、リガンド結合に関して構造解析を中心として解析されてきたが、膜タンパクとして糖鎖修飾を受ける事は古くよりわかっているものの、その複雑な構造と解析の困難さ故にほとんどその機能は明らかとなっていない。今回の研究では AMPA-R グルタミン酸受容体の細胞外の N 型糖鎖修飾の機能解析を行いそのチャンネル機能や神経機能への役割を明らかとすることで、その他のグルタミン酸受容体や、他の神経伝達物質受容体の研究の進歩にも寄与するものと思われる。

<達成できなかったこと、その理由>

今回の研究において、研究を進めていくにつれ AMPA-R の糖鎖修飾によるシナプス可塑性への関与が予想以上に大きかったことが明らかとなり、その生理学的意義に集中して研究した結果、再感作現象のメカニズムの解明や他の受容体の糖鎖修飾の機能解析にあまり労力を割くことができなかった。また、ノックインマウスの作成を含め全研究の完成までに多くの時間・労力を費やしたことが論文発表の遅れの点から反省する点と思われる。

<今後の課題、展望>

現在ノックインマウスの解析を行っているが、*in vitro* の結果を反映するものと思われる。今後、これまで得られた結果が動物の学習・記憶にどのような結果をもたらすのかを明らかとしていき本研究を完成させたい。

さらに、血液中の血小板でも AMPA-R が発現しており、その糖鎖修飾を今回作成した特異抗体を用いて解析することにより、各種精神疾患の新たな診断方法となり得るかを検討していきたい。

学習前の神経回路の操作を可能にする革新的光学技術の開発

研究代表者：竹本 研

横浜市立大学・医学部

<研究の目的と進め方>

学習記憶の分子システムを解明する場合、分子機能を可視化するだけでなく、因果関係を証明するための「操作する技術」が重要である。本研究では、世界に先駆けて「学習前の神経回路・神経活動は、その後の学習効率にどう影響するか？」をシナプスレベルで解明することを目指し、革新的な光学ツールを開発する。そのために本研究では、学習前からシナプスに存在する NMDA 受容体や AMPA 受容体 GluA2/3 を光で不活性化する方法の開発を行う。

LTP(長期増強)はシナプスに短い間連続刺激を与えたときに、数時間以上の長い時間シナプス応答効率が上昇することであり、記憶の基本メカニズムと考えられている。NMDA 受容体は定常状態では Mg イオンで機能をブロックされているが、LTP 刺激により Mg イオンはずれ、チャンネル活性を発現する。この反応により GluA1 を含む AMPA 受容体のシナプス移行が起こり、シナプス応答効率が長時間増強される。よって学習記憶には NMDA 受容体に加えて、ポストシナプス(スパイン)で起こる神経活動依存的な AMPA 受容体シナプス移行も重要である。海馬には GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3 という 3 種の AMPA 受容体が発現しており、GluA1/1 と GluA1/2 は活動依存的にシナプス移行し機能する(Mitsushima D et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011)。一方で、GluA2/3 は恒常的にシナプスに発現しており、定常状態のシナプス活動を担うと考えられる。(Takahashi T. et al. *Science* 2003 等)。以上から神経回路を学習前に操作する場合、学習前から存在する NMDA 受容体や AMPA 受容体 GluA2/3 をそのターゲットとすることが望ましい。さらに 1 シナプスレベルで機能操作する場合、光で操作できることが理想である。どうすればこれらの分子を光で操作できるだろうか？

CALI(Chromophore assisted light inactivation)は光照射依存的に活性酸素を放出する、光増感物質を用いるタンパク質機能不活化法である(Jay DG et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988)。我々の研究グループは、光増感物質にエオシンを利用した高効率 CALI 法(Takemoto K et al. *ACS.Chem.Biol.* 2011)の開発に成功している。エオシンが放出する一重項酸素の拡散半径は 3-4nm であるために(Beck S et al. *Proteomics* 2002)、標的タンパク質の特異的機能破壊が期待できる。例えば標的分子に対するモノクローナル抗体を光増感物質でラベル化後、標的分子に反応し光を照射すると、産生した活性酸素により近傍に存在する標的分子が酸化・立体構造破壊され、光による標的分子の不活性化が起こる。さらに我々の研究グループでは最近、この CALI 法を用いてシナプス移行した AMPA 受容体の一つである GluA1 ホモマーについて、光で acute かつ特異的に機能破壊する新技術の開発に成功した。さらに本技術を *in vivo* に適用し、学習に伴いシナプス表面に移行した海馬 CA1 領域の GluA1 ホモマーを機能破壊することで、海馬恐怖記憶を消去することに成功し、GluA1 ホモマーは学習初期の記憶を時期特異的にコードすることを発見した(Takemoto K et al. *Nat. Biotechnol.* 2017)。他方、本技術は活性化したシナプスを操作するもので、学習前のシナプスの操作を行うには新たな手法の開発が望まれていた。

本研究ではこの技術をさらに発展させることで、native な

NMDA 受容体や GluA2/3 の細胞外ドメインを認識する特異的なモノクローナル抗体を取得し、シナプスに発現する NMDA 受容体や GluA2/3 を CALI 法により acute かつ特異的に機能破壊する新技術を開発する。本研究で開発を進める革新技术は、「効率よく学習するために神経回路や神経活動をどのように準備する必要があるか？」の解明につながるものであり、将来的には神経疾患等における学習能力低下の予防や治療に対し、有効な知見を得ることが期待できる。

<研究計画>

1) NMDA CALI法の開発

本研究では成体で発現する NMDA 受容体である NR1A/NR2A 複合体の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を取得し、その中から CALI が可能な抗体のスクリーニングを行う。これによりシナプスに発現する NMDA 受容体を標的分子とする。NR1-1A の細胞外ドメインの立体構造(PDBID:3Q41)から、1A(295-345)は抗体がアクセスしやすい領域と期待でき、本領域のペプチドを合成し免疫源とする。抗体価が上昇したハイブリドーマ培養上精に関して NR1-1A/NR2A 発現 CHO 細胞の生細胞染色や FACS 等を行い、native なタンパクを認識する抗体を選択する。陽性ハイブリドーマに関してクローニングを行い、その培養上精を硫酸沈殿にて精製する。各クローンについてエオシンラベルを行い、NR1-1A/NR2A 発現 CHO 細胞において CALI が可能なクローンを同定する。ここではグルタミン酸を添加して観察される NMDA 電流に関し、光照射の前後で NMDA 電流が抑制されるクローンを選択する。最終的に得た陽性クローンを無血清培養に移行し、さらに培養上精を protein A カラムで大量に精製し、高純度のモノクローナル抗体を取得する。

2) NMDA CALI法の分子特異性の検討

CALI 実験の特異性の検討は、CHO 細胞や海馬初代培養細胞にて AMPA 電流を対照に行う。また NR1 や他のサブユニットのノックダウン実験による抗体特異性の実験も同時に行い、技術の分子特異性を検討する。

3) AMPA 受容体 GluA2/3 CALI法の開発

本研究では、定常状態で活動する(活動非依存的にシナプスに発現する) AMPA 受容体である GluA2/3 複合体の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を取得し、そのなかから CALI が可能な抗体のスクリーニングを行う。これによりシナプスに発現する GluA2/3 受容体を特異的に標的分子とする。抗体価が上昇したハイブリドーマ培養上精に関して GluA2/3 発現 CHO 細胞の生細胞染色や FACS 等を行い、native なタンパクを認識する抗体を選択する。陽性ハイブリドーマに関してクローニングを行い、その培養上精を硫酸沈殿にて精製する。各クローンについてエオシンラベルを行い、GluA2/3 発現 CHO 細胞において CALI が可能なクローンを同定する。ここではグルタミン酸を添加して観察される AMPA 電流に関し、光照射の前後で AMPA 電流が抑制されるクローンを

選択する。最終的に得た陽性クローンを無血清培養に移行し、さらに培養上清をprotein Aカラムで大量に精製し、高純度のモノクローナル抗体を取得する。

4) GluA2/3 CALI法の分子特異性の検討

CALI実験の特異性の検討は、CHO細胞や海馬初代培養細胞にてNMDA電流を対照に行う。またGluA3や他のサブユニットのノックダウン実験による抗体特異性の実験も同時に行い、技術の分子特異性を検討する。

<得られた研究成果>

1) NMDA CALI法の開発

NMDA受容体については、NR1Aサブユニットの細胞外ドメイン30アミノ酸をエピトープとし、ペプチド抗体を作製した。抗体価の上昇した40種のハイブリドーマの上精についてNR1A発現細胞に対する免疫染色によりスクリーニングしたところ、6種類についてNR1Aに対する特異性が認められた。これらのハイブリドーマをクローニング後、その培養上清からProteinAカラムを用いてモノクローナル抗体を精製し、各抗体についてエオシンラベルを行った。これらについてNMDA受容体発現CHO細胞に対してCALIを行ったところ、4種類のモノクローナル抗体でCALIが可能なことを見出した。これらの抗体を産生するハイブリドーマについて無血清培養に移行し、その培養上清から大量のモノクローナル抗体を精製することで、以後の解析に使用する高純度の抗体を取得した。

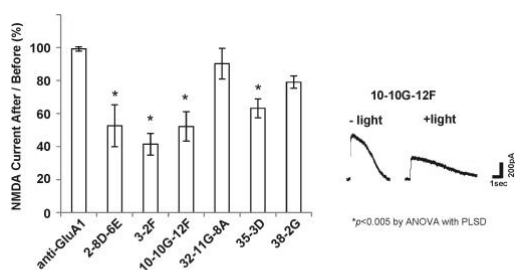


図1 NMDA受容体のCALIが可能な抗体のスクリーニング

IgG抗体の大きさから、シナプスクレフトに入らない場合も想定される。そこで本研究では続いてこれら陽性抗体に関し、海馬初代培養においてシナプス性のNMDA受容体に関してCALI効果があるかを解析した。ここではシナプス電流を発生するために、記録細胞の近傍に刺激電極を設置し、光照射前後のNMDA電流をホールセルパッチクランプで記録・比較した。これらのスクリーニングにより、最終的に1種類についてシナプス性のNMDA受容体を光不活化できることを見出した。

2) NMDA CALI法の分子特異性の検討

上記で最終的に見出した1抗体について、シナプスにおけるAMPA電流をコントロールにCALIの分子特異性を解析したところ、NMDA電流だけではなく、多少のAMPA電流も低下することがわかった。これはエオシンラベル化位置やラベル化数といったCALIの条件では特異性が低いことを示しており、現在はこれらの条件を検討することで特異性を得られるかを見極めたいと考えている。

3) AMPA受容体 GluA2/3 CALI法の開発

NMDA受容体ではペプチド抗体を作製したが、上記の通り

CALIが可能な抗体の取得の確率は非常に低かった。この点を改良することでより多くの陽性抗体を取得し、その中から特異性の高い抗体を選択する必要があると考えられた。そこで本研究では、CALIが可能な抗体を取得する確率を高めるべく、NMDA受容体で用いたペプチド抗体ではなくDNA免疫によるモノクローナル抗体の作製を取り入れた。Myc-GluA3の発現ベクターを免疫源とし、ジーンガンにて腹腔細胞に本発現ベクターを遺伝子導入し、抗体産生を確認後にハイブリドーマの取得を進めたところ、78種の抗体産生ハイブリドーマを取得した。さらにCell-ELISAおよびFCM解析により、78細胞中25細胞でnativeなGluA3に対する抗体を産生することが分かった。これは我々のグループが進めたペプチド抗体を用いた過去にプロジェクトと比較しても取得率が非常に高く、CALI用の抗体を取得するには最も良い手法であることが示唆された。これらをクローニング後、14種のクローンで抗体産生能が保持されており、GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3をそれぞれ発現するCHO細胞について生細胞染色を行ったところ、11種類のハイブリドーマクローンでGluA3に対する高い特異性が認められた。

次に、これら11種類のハイブリドーマについて無血清培地に移行できた9種類に関して、蛋白質成分のない上清から高純度抗体を大量に精製した。ここまでで得た抗体をエオシンでラベル化し、GluA2/3を発現するCHO細胞についてCALIを行い、ホールセルパッチクランプにより光照射前後のAMPA電流を比較解析することで、CALIの効果を定量したところ、4種類の抗体でCALIが可能なことを見出した。

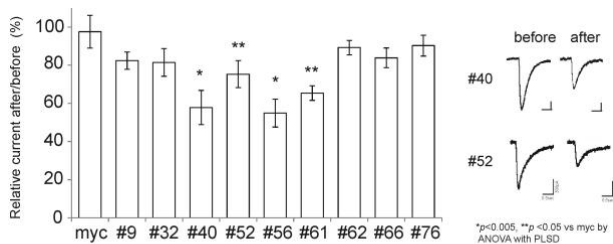


図2 GluA2/3のCALIが可能な抗体のスクリーニング

NMDA受容体のプロジェクトでも述べたとおり、IgG抗体の大きさから、シナプスクレフトに入らない場合も想定される。そこで本研究では続いてこれら陽性抗体に関し、海馬初代培養においてシナプス性のAMPA受容体に関してCALI効果があるかを解析したところ、いずれの抗体でも効果があることを見出した。

4) GluA2/3 CALI法の分子特異性の検討

上記のスクリーニングで得た4種類の抗体について、最もCALI効率の高い#40抗体を採用して分子特異性の検討を進めた。まず、GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3をそれぞれ発現するCHO細胞についてホールセルパッチクランプを行い、CALIの効果を同様に検討したところ、GluA2/3に対する高い特異性を持つことを見出した。さらにAMPA受容体と同くシナプスに発現するNMDA受容体をコントロールに海馬初代培養でCALIを行ったところ、NMDA電流を低下することなくAMPA電流を低下させることを見出し、本技術は高い分子特異性を持つことが示唆された。また同様に海馬初代培養において、miRNAによるGluA3のノックダウンを行ったところ、ノックダウン細胞ではCALIの効果が完全にならなくなることがわかり、シナプスにおけるGluA2/3に対する高い特異性を確認することができた。

<国内外での成果の位置づけ>

数万個の細胞をすり潰した試料を解析する生化学的方法は、数万個の細胞内で起こる現象の加算平均を明らかにすることには長けているが、個々の細胞が示す個性を見出すことは困難である。こうした視点から、分子機能をイメージングで可視化する研究が盛んに行われている。一方で特徴的なパターンをイメージングで見出したとしても、それがどのような生理的意味があるかについてはイメージング解析だけでは明らかにすることは困難である、そうした因果関係の解明を目指し、我々のグループでは神経活動に関わる様々な分子について、光で acute かつ局所的に分子機能を操作するための CALI 法の開発を進めている。

我々の研究グループではこれまでに、CALI 法を用いてシナプス移行した AMPA 受容体 GluA1 ホモマーについて、光で acute かつ特異的に機能破壊する技術の開発に成功している (Takemoto K et al. *Nat. Biotechnol.* 2017)。本技術は世界的に注目されており、本技術をきっかけに国内外 5 グループとの共同研究に発展している。さらにそのうちローザンヌ大学のグループとの共同研究では、我々の GluA1 CALI 法を提供することで、経路特異的な AMPA 受容体の新機能を見出され、最近 *Neuron* 誌に論文がアクセプトされた。これをきっかけに一層、神経機能分子の CALI 法が普及すると期待できる。さらに今回の研究では GluA2/3 の CALI 法の開発に成功したが、早急に publish できるように in vivo 実験を進め、GluA1 と同様に世界中の研究室との共同研究を展開したいと考えている。

一方で本研究は、CALI 崩壊初のための技術的蓄積にも繋がっており、CALI 用の抗体を取得するノウハウが確立されたと考えている。GluA2/3 の抗体の取得で初めて用いた DNA 免疫法は、native な蛋白質に対する抗体の取得率を大幅に改善することが分かった。現在進めている共同研究の一部は、新しい分子に対する CALI 法の開発研究も含まれており、我々のグループでもより多くの新分子に対する CALI 法の開発を予定しているため、こうしたノウハウは今後の研究に極めて有効になると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

NMDA 受容体の CALI 法ではペプチド抗体を採用したが、予想していたよりも native な分子を認識する抗体を多く得ることが難しく、その結果特異性の高いモノクローナル抗体の取得には至らなかったが、その後に DNA 免疫を採用することで大幅に改善した。これまでに合計 4 種類のモノクローナル抗体の取得法にチャレンジしたが、今回の研究を通じて CALI 用抗体の取得については DNA 免疫が最適であることがわかった。スクリーニングの手順についてもこれまで様々なトライ&エラーをしたが、FACS と生細胞染色を組み合わせる方法が最も信頼性が高いと分かったため、今後の研究に活かしたい。

<今後の課題、展望>

NMDA受容体のCALI法については、GluA2/3のプロジェクトを論文文化後に、DNA免疫を用いたモノクローナル抗体から再始動したいと考えている。今回の研究で確立したスクリーニング戦略を用いることで、早急にプロジェクトを進めていきたい。

GluA2/3についてはCALI法の開発に成功したため、今後はin vivoでの研究を進める計画である。本研究ではまず定常状態のシナプス活動をCALIで抑制することで、これらの生理機能を見出したい。またその後の学習効率に対する影響も非常に興味深いと考えている。これはシナプス活動をよりよく準備することで記憶機能の改善を目指すという視点で見ると、認知症などの記憶機能低下の予防や治療にも貢献できると考えている。本研究で得たGluA2/3のCALI法については論文文化後に様々な研究グループとの共同研究を展開していきたいと考えている。これらの取り組

みを通じて、光による分子操作技術の開発において世界をリードする研究を今後も進めていきたい。

我々のグループではこれまでのところ、興奮性シナプスで機能する分子を中心に研究を進めてきた。一方で記憶に代表される脳の高次機能の発現には、興奮性シナプスによるポストシナプス細胞の活性化に加え、抑制性シナプスによるシナプス単位の局所的な活性調節が重要と示唆されるが、その個体レベルへの寄与の程度など詳細は不明である。抑制性シナプスの異常は統合失調症など精神疾患の一因とも考えられ、抑制性シナプスを理解することは記憶や精神疾患のメカニズムを解明する上で非常に重要である。よってこうした抑制性シナプスの光造作技術を開発することも、今後の課題として研究を進めていきたいと考えている。

生後発達に伴う運動記憶ダイナミズムの解明と制御

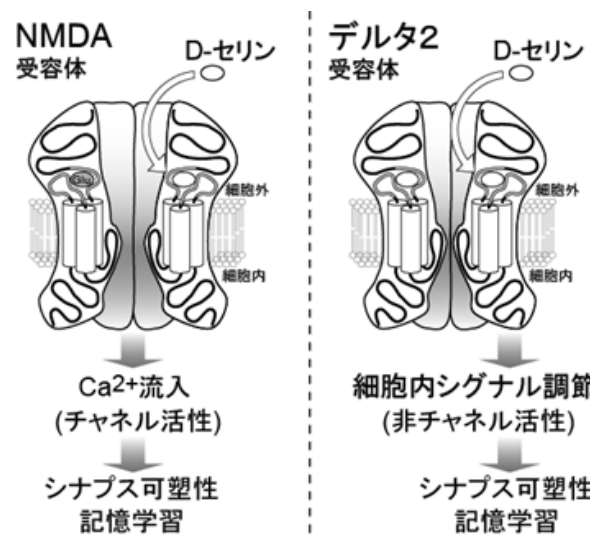
研究代表者：掛川 渉

慶應義塾大学・医学部

<研究の目的と進め方>

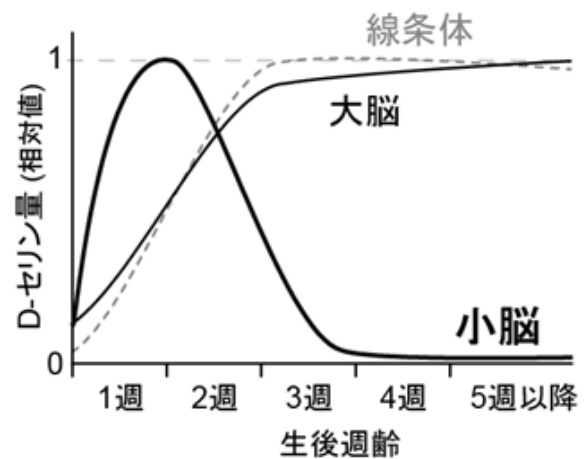
記憶や学習を担う分子機構は一生を通じて変化する。この生後発達に伴う記憶・学習機構の変化（記憶・学習ダイナミズム）は、ショウジョウバエや線虫をはじめとする小型モデル生物や、種々の遺伝子改変マウスを用いて精力的に研究されている。しかし、マウスなどの脊椎動物の場合、記憶・学習を担う神経回路が複雑で多岐にわたるため、その仕組みは十分に分かっていない。

運動にかかわる記憶・学習（運動記憶・学習）をささえる小脳は、少数の神経細胞をもとに比較的単純な神経回路を構築し、その異常が出力先である運動系に反映されることから、記憶・学習を分子・回路レベルで追究できる最適実験系である。これまで、マウスを用いた実験により、小脳回路の要衝を担う顆粒細胞軸索平行線維-プルキンエ細胞シナプス（以下、平行線維シナプス）での長期抑圧（long-term depression, LTD; シナプス応答の長期的低下を示すシナプス可塑性）は、小脳依存性運動学習の分子基盤とされ、ionotropic glutamate receptor (iGluR) メンバーであるAMPA受容体のエンドサイトーシスによって惹起されることが報告されている (Ito, *Physiol Rev*, '01)。申請者らは近年、このLTDや運動学習に関わるシグナル経路として、グリア細胞から放出されるD-セリンと、プルキンエ細胞選択的に発現するデルタ2型グルタミン酸受容体（デルタ2受容体）との結合を介する、新しいD-セリンシグナリングを見出した（D-セリン-デルタ2受容体シグナリング; Kakegawa et al., *Nat Neurosci*, '11; 図1）。従来、D-セリンは、NMDA型グルタミン酸受容体（NMDA受容体）のコアゴニストとして作用し、共役するチャンネルを介したCa²⁺流入を引き金に、シナプス可塑性や記憶・学習を制御することがよく知られている（図1左）。しかし、デルタ2受容体は、iGluRメンバーであるものの、チャンネル活性を示さず、細胞内の最C末端領域を介して機能するきわめてユニークな受容体である（図1右）。



(図1) シナプス可塑性および記憶・学習を担う D-セリン-iGluR シグナリング

興味深いことに、D-セリンは、あらゆる脳部位において恒常的に合成され、大脳や線条体などの多くの部位では生後発達依存的にその量が増加する一方、小脳では、合成されたD-セリンが生後発達に伴って発現増加するD-アミノ酸分解酵素（D-amino acid oxidase; DAO）により絶えず分解されてしまうために、4週齢以降に大幅に減少する (Wang & Zhu, *Acta Pharmacol Sin*, '03; 図2)。したがって、この小脳における劇的なD-セリン量変化は、生後発達に伴う運動記憶・学習ダイナミズムをささえる大きな要因のひとつであると推察される。



(図2) マウス各脳部位での D-セリン量の生後発達変化

また、D-セリン合成系や新規D-セリンシグナリングの駆動系は成熟期の小脳においても存在する。事実、成熟小脳急性切片にD-セリンを投与すると、デルタ2受容体依存的にAMPA受容体のエンドサイトーシスを伴うLTD様応答が観察される (Kakegawa et al., *Nat Neurosci*, '11)。そのため、成熟後に“作られては壊される” D-セリンは、ある環境や経験に応じたDAO活性調節により、成熟期でも新規D-セリンシグナリングを賦活化させ、記憶・学習を調節している可能性が示唆される。

そこで本計画では、

- ① 生後発達に伴う劇的なD-セリン量変化、
- ② デルタ2受容体を介する新規D-セリンシグナリング

の2つのユニークな特徴を有する小脳に着目し、運動記憶・学習ダイナミズムの詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。

<研究計画>

計画1) デルタ2受容体-D-セリンシグナリングを担う分子群および反応経路の同定 (1)。

D-セリンと同様、デルタ2受容体の内在性リガンドとして明らかにされている分泌性シナプスオーガナイザー-Cbl1n1 (Matsuda et al., *Science*, '10) が新規D-セリンシグナリングに及ぼす影響を

構造生物学、電気生理学、行動学実験により追究した。

計画2) デルタ2受容体-D-セリンシグナリングを担う分子群および反応経路の同定(2)。

デルタ2受容体の細胞内最C末端領域にはリン酸化・脱リン酸化酵素や足場タンパク質など、様々な細胞内分子が結合することが知られている(Yuzaki and Aricescu, *Trends Neurosci*, '18)。その中の1分子であるチロシン脱リン酸化酵素PEPMEGは小脳プルキンエ細胞に高発現し、平行線維シナプスの伝達機構に深く関与している可能性が示唆されている。そこで、PEPMEGの発現を欠くPEPMEG-KOマウスを用い、D-セリンシグナリングの活性化様式を解析した。

計画3) 成熟期小脳におけるごく微量のD-セリンによって活性化されるNMDA受容体のシナプス可塑性および運動記憶・学習への影響解析。

D-セリンの受容体として最もよく知られているNMDA受容体は小脳LTDおよび運動記憶・学習に必須な役割を果たしていることが薬理的に報告されているものの、その局在および機能様式については議論が続いている。そこで、小脳の各細胞選択的にNMDA受容体発現を欠くconditional KOマウス(cKOマウス)を作製し、LTDおよび運動学習実験を行った。

計画4) 成熟期におけるデルタ2受容体-D-セリンシグナリングの賦活化が小脳シナプス可塑性および運動学習に及ぼす影響の解析。

成熟小脳において発現が亢進しているDAOの活性を薬理学および遺伝子工学的に制御した際と同シグナリングへの影響を観察した。

計画5) デルタ2受容体-D-セリンシグナリングによってもたらされるAMPA受容体エンドサイトーシスおよびLTDの人為的制御技術の開発。

新規D-セリンシグナリングの生理機能における重要性を追究するために、平行線維シナプスで観察されるLTDの分子実体と考えられているAMPA受容体エンドサイトーシスを光でコントロールする新しい光遺伝学的技術を開発することにした。

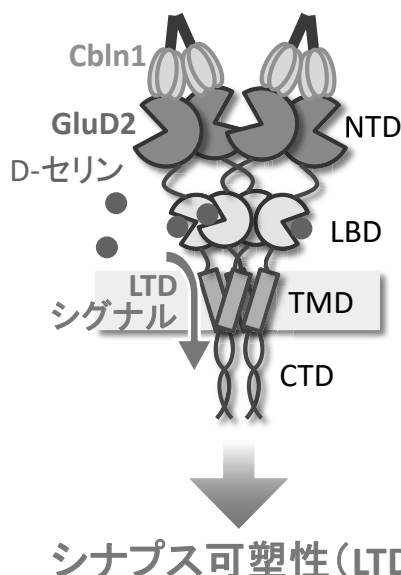
<得られた研究成果>

1) まず、D-セリンシグナリングを担う分子機構を理解するために、デルタ2受容体に着目した。デルタ2受容体には、D-セリンだけでなく、シナプス前細胞から放出される分泌性タンパク質のCbln1が選択的に結合することが知られている。そこで、D-セリンシグナリングにおけるデルタ2受容体-Cbln1結合の関与を調べるため、結晶構造学的手法により両者の結合部位を同定した。

次に、同定された結合部位に変異を加えCbln1結合能を欠失した変異デルタ2受容体を作製し、D-セリンシグナリングが活性化されるかを電気生理学的に観察したところ、上記シグナリングは駆動されなかった。

さらに、デルタ2受容体において、Cbln1が結合する構造ドメインとD-セリンが結合する構造ドメイン間のアロステリックな構造変化がD-セリンシグナリングの駆動に必須であることが示唆された(図3)。

尚、上記研究の成果は、英国オックスフォード大・Aricescu Radu博士らとの共同研究に得られたものである(Elegheert, Kakegawa et al., *Science*, '16)。



(図3) デルタ2受容体(GluD2)へのCbln1結合はD-セリンシグナリングに必須である。

NTD, 細胞外最N末端ドメイン; LBD, リガンド結合ドメイン; TMD, 膜貫通ドメイン; CTD, 細胞内C末端ドメイン

2) デルタ2受容体を介する新規D-セリンシグナリングの分子機構を明らかにすることを目的とし、まず、このシグナリングが細胞内のCa²⁺依存的に誘発されるかどうかを確認するため、Ca²⁺キレート剤存在下で実験を行うと、シグナリングは駆動されなかった。

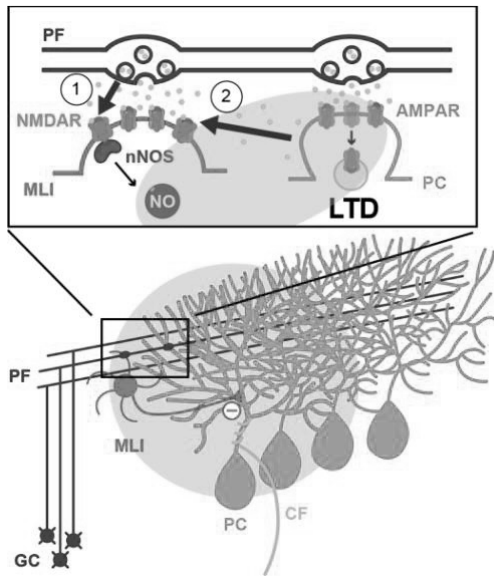
また、デルタ2受容体の細胞内最C末端領域に結合するチロシン脱リン酸化酵素PTPMEGの遺伝子欠損マウスを用いて同様に実験を行うと、同様にシグナリングは検出されなかった。

これらの結果から、デルタ2受容体を介するD-セリンシグナリングは、細胞内Ca²⁺とPTPMEGの活性化が必須であることが示唆された(論文投稿準備中)。

3) 最もよく知られているD-セリン結合型受容体のNMDA受容体は成熟期小脳でのシナプス可塑性に必須の役割を果たしているが、その局在様式は明確にされていない。そこで、小脳を構成する主要な神経細胞(プルキンエ細胞・顆粒細胞・分子層介在ニューロン)に発現するNMDA受容体をそれぞれ欠損させたNMDA受容体cKOマウスを作製し、小脳LTDおよび運動学習実験を行った。その結果、プルキンエ細胞あるいは顆粒細胞選択的にNMDA受容体cKOマウスでは、小脳LTDも運動学習もほぼ正常に観察されたのに対し、分子層介在ニューロンにおいてNMDA受容体を消失したマウスでは、LTDおよび運動学習ともに有意に障害されていた。

また、分子層介在ニューロンがどのように小脳LTDに関与しているかを薬理学的実験により追究したところ、NMDA受容体活性の下流経路で合成される一酸化窒素(nitric oxide; NO)が平行シナプス近傍に拡散されることでLTDおよび運動学習が制御されることが明らかにされた。

これらの結果から、分子層介在ニューロンは、従来の抑制性入力を介する制御様式のみならず、D-セリンによって活性化されたNMDA受容体→NO放出といった新たな経路を介して小脳機能を制御していることが示唆された(Kono, Kakegawa et al., *J Physiol*, in press; 図4)。



(図4) 小脳分子層介在ニューロンに発現するNMDA受容体は一酸化窒素(NO)を介してLTDを制御する。

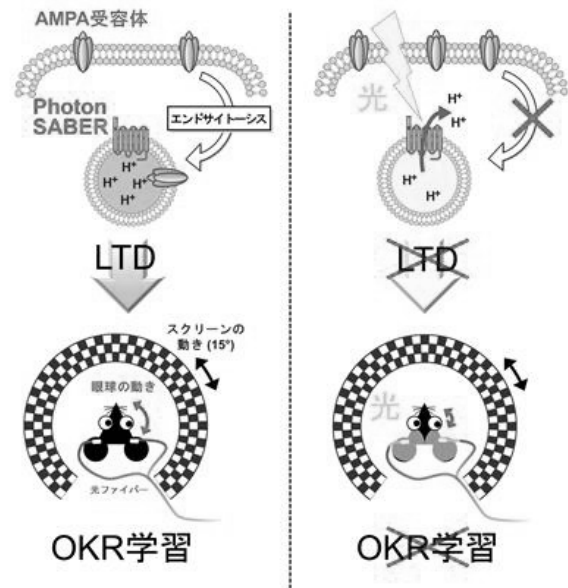
PC, プルキンエ細胞; GC, 顆粒細胞; MLI, 分子層介在ニューロン; PF, 平行線維; CF, 登上線維

4) 成熟小脳ではDAO活性が亢進していることからD-セリン量が激減している。そこで、成熟小脳にDAO阻害剤であるcompound-8を投与しシナプス可塑性を評価したところ、有意な亢進は認められなかった。次に、DAO発現を欠くKOマウス(DAO KOマウス)を作製し解析を行った。すると、成熟期においても生後発達期の小脳標本と同程度の豊富なD-セリン量が検出されるとともに、デルタ2受容体-D-セリンシグナリングを介するLTDの亢進も観察された。

5) デルタ2受容体-D-セリンシグナリングは、平行線維シナプス上に発現するAMPA受容体エンドサイトーシスを促進させることで小脳LTDを誘導させる。そこで、この新規D-セリンシグナリングの重要性を確認するために、AMPA受容体エンドサイトーシスを光でコントロールする新しい光遺伝学的技術(PhotonSABER)を開発した。

PhotonSABERをコードするcDNAをloxP配列に挟まれたstopコードと共に、ROSA26遺伝子座に導入したノックインマウスを、小脳プルキンエ細胞特異的にCre recombinaseを発現するマウスと交配することでプルキンエ細胞特異的PhotonSABERノックインマウスを作製した(PC-PhotonSABER KIマウス)。このマウスから作製した小脳急性切片を用いてLTDの誘導が光によって制御できるかを解析したところ、光を照射した条件では、小脳LTDの誘導が著しく阻害された(図5)。また、光を照射してLTD誘導を阻害した細胞でも、光照射を止めた後で、もう一度LTD誘導刺激を与えると正常にLTDが誘導された。これらの結果から、このマウス小脳への光照射はLTDを特異的かつ可逆的に阻害することが示唆された。

さらに、PC-PhotonSABER KIマウスを用いて、小脳依存性運動学習の1つである視運動性眼球反射(optokinetic response, OKR)学習課題(OKR学習課題)を行うと、マウス小脳へ光照射した個体においては、OKR学習が著しく低下した(図5)。一方で、光照射をしていない個体については、顕著なOKR学習の亢進が認められた(Kakegawa et al., *Neuron*, '18; 図5)。



(図5) AMPA受容体エンドサイトーシスおよび小脳依存性運動学習の光遺伝学的制御

<国内外での成果の位置づけ>

記憶・学習を担うD-セリンシグナリングは、脊椎動物だけでなく、ショウジョウバエなどのモデル生物においても観察される。また、新規D-セリンシグナリングを担うデルタ2受容体は、魚類、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類など多くの生物において進化的に高く保存されている。したがって、新規D-セリンシグナリングは、様々な動物種において普遍的に起こりうる事象である可能性が考えられ、今回得られた新たな知見をもとに、各生物での研究を進めることにより、「記憶・学習機構の共通原理」の理解に有益な情報を提供しうるものと期待している。

D-セリンは、記憶・学習過程に加え、統合失調症やアルツハイマー病などの病態発現にも関わることが最近報告されている。また、デルタ受容体も統合失調症・自閉症・双極性障害などの精神疾患や発達障害に関与する可能性が、近年のゲノム解析により示唆されつつある。そのため、この新しいシグナル経路を標的とした効率的な記憶・学習法の創製、あるいは、上記疾患に対する医療応用につながる可能性も今後十分に期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本計画で当初予定していた、成熟小脳におけるD-セリン量の亢進が運動学習に及ぼす影響については、時間的制約のために詳細な解析ができなかった。しかし、DAO KOマウスにおいて、新規D-セリンシグナリングの活性化に伴うシナプス可塑性の亢進が示唆されており、今後、DAO KOマウスを用いた個体行動レベルの解析を早急に進めていく予定である。

<今後の課題、展望>

新規D-セリンシグナリングを担うデルタ2受容体は、小脳プルキンエ細胞にほぼ選択的に発現しているものの、その類似分子であるデルタ1受容体は脳全域に広く分布している。このデルタ1受容体はデルタ2受容体と同様に、D-セリンと選択的に結合することが報告されていることから、今後は、デルタ1受容体へのD-セリン結合が各脳部位が担うシナプス機能および記憶・学習過程に及ぼす影響について検討していきたい。

連合記憶想起における側頭葉サブ領域間神経回路の研究

研究代表者：竹田 真己

順天堂大学・医学部（現 高知工科大学・脳コミュニケーション研究センター）

<研究の目的と進め方>

「我々はどうのようにして、ものを思い出すのだろうか」この問いは、古くから哲学者の関心を引いてきた問いであり、また、近年では複雑な情報処理を担う脳の作動原理に迫ろうとする神経科学研究者によって精力的に研究されてきた。これまで、記憶課題遂行中のサル脳の電気生理学的実験により、下部側頭葉のニューロン群が視覚性記憶想起に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、これらニューロン群がどのように回路を構成し他の脳領域と機能連絡しているのか、またこの回路の記憶想起に対する因果的役割についてはほとんどわかっていない。

本研究では、下部側頭葉を含む複数の記憶関連脳領域からニューロン活動を同時記録することで、脳領域間を連絡する記憶神経回路を同定することを主たる目的とする。また、ニューロン活動を各皮質層から行うことで、記憶神経回路の作動メカニズムを皮質層レベルで探索する。さらに、光遺伝学的手法や行動解析を応用することで、同定した神経回路の記憶に対する因果的役割を解明する。本研究は、記憶課題を遂行中のサルを被験体として用い、記憶課題遂行中の側頭葉ニューロン活動を電気生理学的手法や脳機能イメージングにより計測する。

<研究計画>

本研究は以下の研究項目を推進することで、脳内記憶神経回路を複数の空間スケールで探索し、その統合的理解を目指す。

1) 側頭葉のうち、36野に注目して記憶ニューロンの皮質層分布を検証する。脳深部に局在する側頭葉36野のニューロン位置を高精度に同定するために、高解像度MRIと組織学的手法を組み合わせたニューロン位置同定法を新規に開発し、対連合記憶学習中のサルより記録した記憶ニューロンの皮質層位置同定を試みる。

2) 側頭葉の各サブ領域より広範囲に神経活動を記録し、サブ領域間の記憶活動の違いや伝播過程を検証する。この目的を実現するために、ECoG電極を記憶課題遂行サルに留置し、課題遂行中の脳活動を広範囲に計測する。

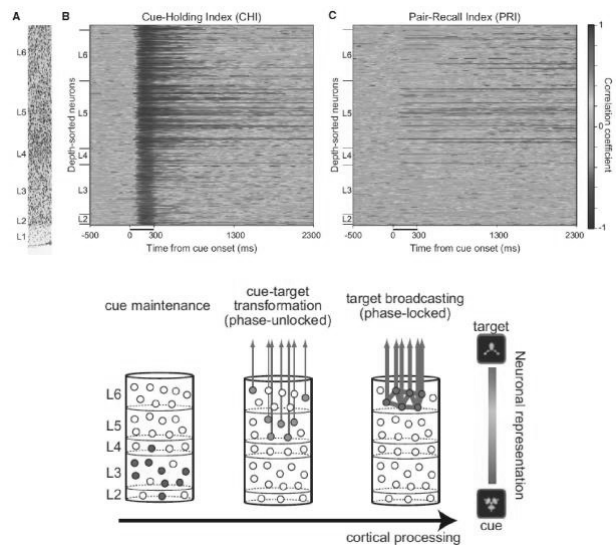
3) 全脳レベルの記憶回路を明らかにするために、高磁場MRIによる脳機能イメージングを記憶課題遂行中のサルに対して遂行する。記憶関連領域を同定したのちに、薬理的に記憶関連領域の脳活動を抑制し、領域の記憶に対する因果的役割を調べる。

4) 側頭葉36野ニューロンの再認記憶に対する因果的役割を検証するために、光遺伝学的手法を用いて36野ニューロンの活動を人為的に高め、記憶パフォーマンスの変化を検証する。

<得られた研究成果>

記憶の情報処理メカニズムに関して、皮質層レベルの情報処理（メゾスコピック）から関連視野間の情報処理（マクロスコピック）まで複数の空間スケールにおける情報処理に注目して研究を進めた。得られた研究成果をまとめて、以下の論文発表を行った。

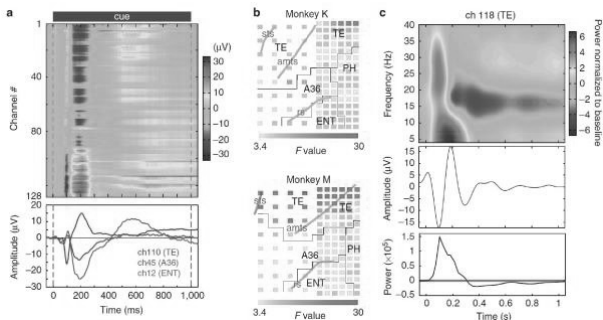
- 1) 脳深部に関連領域が存在する連合記憶などの高次脳機能については、方法論的な限界があったために、皮質層単位の機能的役割に関する研究があまり進んでこなかった。そのため、皮質層構造が果たす役割はほとんど解明されていなかった。そこで、対連合記憶課題を遂行するサルを被験体として、微小電極記録法、MRIと組織切片法を組み合わせることによって、記録ニューロンの皮質層分布の同定を試みた。実験の結果、側頭葉36野において、第5層に存在するニューロンが連合記憶を符号化する一方で、第6層のニューロンは想起された情報を出力することを明らかにした。これらの結果から、霊長類の脳皮質において第5層から6層へと情報が受け渡される中で想起対象へと情報が変換される新規の情報処理過程が明らかになった(Koyano et al, Neuron, 2016)。



図上段：36野各皮質層における記憶ニューロンの発火タイムコース。5層ニューロンは、対連合記憶で提示される手掛かり図形とそのペア図形の両方に反応するニューロンが多いのに対し、6層ニューロンは、ペア図形にのみ反応するニューロンが多かった。図下段：本研究結果から提唱された側頭葉36野の記憶回路。皮質表層、深層5層、深層6層が異なる機能的役割を担う。

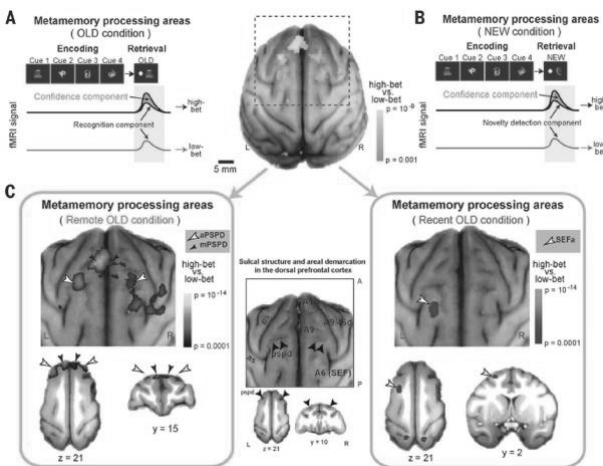
- 2) 次に、36野を含む側頭葉全体が記憶想起にどのような働きをしているのかについて調べた。新規に開発したECoG電極を用いて、側頭葉の各サブ領域から高密度皮質脳波を測

定し、対連合記憶課題遂行中のサルにおいてサブ領域間の記憶想起信号の伝播過程を調べた。実験の結果、側頭葉から海馬にわたってシータ波帯域の特徴的伝播信号を同定し、この伝播信号が記憶想起に必要であることを明らかにした (Nakahara et al, Nature Communications, 2016)。



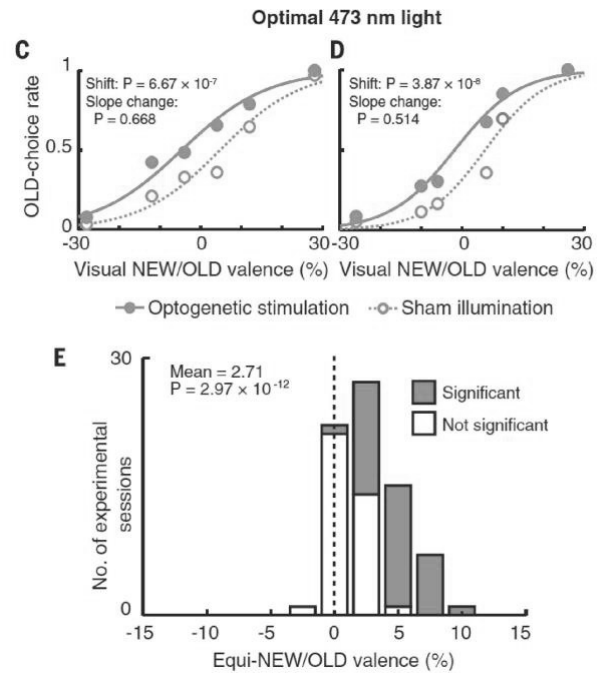
図：対連合記憶課題における、手掛かり図形提示による ECoG 電位 (a)。Theta activity の図形選択性は、側頭葉サブ領域によって異なっていた (b)。TE 野における代表的な cue-evoked response (c)。

3) さらに側頭葉を含む脳全体の記憶想起システムについても研究を行った。まず、動物モデルにおけるメタ記憶課題を新規に開発した。そして、メタ記憶課題遂行中のサルの fMRI イメージングを行い、関連脳領域を同定した (aSPD および SEFa)。これらの領域が、メタ記憶に因果的な役割を担っているかどうかを検証するために、同定した aSPD および SEFa にムシモルを微量注入して神経活動を抑えると、メタ記憶課題の正答率が減少することが明らかとなった。本研究により、メタ記憶には前頭葉の複数領域の活性が必須であることが明らかとなった (Miyamoto et al, Science, 2017)。



図：メタ記憶課題遂行中のサル脳機能イメージング結果。Remote memory に対するメタ記憶には aSPD を含む複数の前頭葉領域がかかわっていた (C 左)。一方、Recency memory に対するメタ記憶には、SEFa がかわっていた (C 右)。これらの結果は、記憶の内容によって、そのメタ記憶を処理する脳領域が異なることを示唆する。

4) 近年急速に発展しつつある光遺伝学による神経活動操作をサルに応用し、再認記憶における側頭葉ニューロン活動の因果的役割について研究を行った。AAV ウィルスベクターを用いて、サルの側頭葉 36 野にチャンネルロドプシンを発現させ、視覚性再認記憶課題遂行中に光照射をすることによって、36 野ニューロンの活動を人為的に高めた。その結果、サルの再認判断は、以前見たことのある視覚刺激でも以前見たことのない視覚刺激でも、いずれも“見たことがある”と判断するようにバイアスが生じた。この傾向は 36 野内のどの領域でも一貫して見られた。こうした結果を説明しうる、再認記憶における 36 野の機能的役割に関する新モデルを提唱した (Tamura et al, Science, 2017)。



図：側頭葉36野ニューロンにチャンネルロドプシンを発現させたサルに再認課題を課した。再認課題遂行中の36野ニューロンに青色光を照射すると、サルは提示された図形を“以前見たことがある”と答えるようになった。上段は、二つの代表的な行動実験の結果。下段は、実験全体での評価。光照射により36野記憶ニューロンの活動を人為的に高めると、提示図形を以前見たことがあると判断する確率が上がっていることを示している。

得られた研究成果は、学会や論文の形で研究者に向けて発表した。また、プレスリリースを積極的に行い、広く国民に向けて研究成果を発表した。

<国内外での成果の位置づけ>

上記の研究成果は、いずれも高く評価されており、Science (2 報)、Neuron、Nature Communications の各雑誌に掲載されている。上記 1) から 4) までの研究成果の位置づけを見ると、1) 36 野記憶ニューロンの皮質層分布を明らかにした成果は、これまで脳深部で皮質層レベルのニューロン活動の機能的局在の報告がほとんどないことから技術的な側面のインパクトが大きい。さらに、記憶回路の機能的理解を皮質層レベルで促進した面でも意

義は大きい。2) 高密度 ECoG 電極による側頭葉サブ領域間の信号伝播過程の同定に関しては、脳深部に ECoG 電極を留置する技術的な点が高く評価されている。また、計測した脳活動データを機能学習によってデコードし、活動がコードする記憶内容を同定したことも意義が大きい。3) fMRI によるメタ記憶の全脳イメージングについては、ヒト以外の動物種でメタ記憶の脳内メカニズムにアプローチし、新規の関連領域の因果的役割を明らかにした点が評価されている。4) 再認記憶に対する側頭葉ニューロンの因果的役割を光遺伝学的手法でアプローチした研究は、げっ歯類で多くの成果が報告されている光遺伝学的手法をサルに応用し、行動レベルで変化を検出した点に大きな意義がある。従来のサル光遺伝学的研究では、行動レベルでの変化がほとんど検出できていなかったが、行動変化を検出しやすい心理物理学的モデルに即した行動パラダイムの開発や、オプシン発現に *in vivo* 定量化などの組み合わせによって成し遂げた本研究は、関連分野に大きなインパクトを与えた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

上記のように本研究プロジェクトでは大きな成果を複数得ることができたが、一方、側頭葉 36 野と TE 野の間を伝達する信号が、対連合記憶課題において図形を見ているときと図形を思い出すときに柔軟にターゲットとなる皮質層を変化させるかどうか解明する研究項目は完遂しなかった。その理由としては、図形提示期間・図形想起期間における領野間・皮質層間の記憶信号の伝達を一度に検証するための手法がこれまで確立されておらず、新規に解析手法を開発する必要が生じ、このために時間がかかったことが一因にある。本研究プロジェクト終了後も、この研究項目は継続し、2018 年に論文として発表した (Takeda et al., *Nature Communications*, 2018)。

<今後の課題、展望>

本研究プロジェクトでは、サルを被験体として脳記憶神経回路の動作原理に複数の空間スケールでアプローチしてきた。今後の課題の一つとして、こうした回路がヒトにおいても備わっているか、またその動作はどのようなものかを検証することが挙げられる。ヒトを対象とした研究では、非侵襲的な実験アプローチがとりづらいなど、動物実験に比べて様々な制限があるが、その反面、ヒト特有の記憶機能に迫ることが可能になるメリットもある。ヒトを用いた研究を展開し、ヒト特有の記憶機能の脳内メカニズムの解明につなげていきたいと考える。

記憶の成立と移動を担う小脳神経回路の機能変化

研究代表者：川口 真也

京都大学・産官学連携本部

<研究の目的と進め方>

記憶・学習の基礎過程としてシナプス可塑性の重要性が示されてきたが、どのようなシナプス可塑性の集合体で記憶がコードされるかという神経回路レベルでの記憶の実像は未だによく分かっていない。神経細胞が有する可塑性の性質は、記憶・学習との相関が示されてきたシナプス後部の可塑性に限るものでなく、個々の神経細胞の電気的性質の柔軟な変化やシナプス前部での可塑性も起こる。しかし、こうした種々の素子レベルの可塑性と実際の記憶・学習の確立との関係を包括した理解は進んでいない。また、記憶の興味深い特徴として、海馬で形成された陳述記憶は大脳皮質に転送されて安定保持され、小脳皮質で形成される運動学習記憶は、短期記憶から長期記憶へ移行する際に小脳核へ移動する、といった記憶の安定化に伴う責任部位の変化が報告されている。つまり、学習が成立して長期安定化する過程において、記憶痕跡が移動すると考えられている。小脳が寄与する運動学習の場合、小脳皮質のプルキンエ細胞でのシナプス可塑性により運動学習が確立するが、その後数時間以上経過すると、獲得した運動学習を実行するのに小脳皮質の活動は必要なくなり、その出力先である小脳核の活動のみに依存するとの報告がある(Okamoto et al., *J. Neurosci.*, 2011)。しかし、こうした脳部位を超えた記憶移動を実現する神経細胞・回路の仕組みは、ほとんど全く分かっていない。こうした記憶がダイナミックに移動する仕組みを理解するには、情報処理の変化がいかに変遷するかをシナプス可塑性から神経ネットワークまで階層を超えて明確にする必要があり、現状では技術的な限界により困難な課題となっている。本研究では、これまでに申請者が蓄積してきた独自のイメージング技術と最高難度の電気生理学的手法を利用して、運動学習記憶を確立させるシナプス可塑性がいかに神経細胞の情報処理を変化させ、その影響が小脳核へ波及して安定に記憶が移動するかについて、細胞・回路レベルの基礎的なメカニズムを解明することを目指した。

<研究計画>

1) 樹状突起における入力統合の長期抑圧による時空間変化のイメージング

シナプス可塑性が、細胞の入力統合をどのように変化させるかの詳細を理解するために、可塑性の発現と細胞膜電位変化の記録の両方について、イメージングにより同時に時空間情報を得る実験系を構築することを計画した。

シナプス可塑性のイメージングには、PKCを改変して開発した長期抑圧プローブを用いる。これは、MAPKやPKCが構成するシグナル経路の正のポジティブフィードバックの駆動に反応するように設計したもので、長期抑圧を起こす刺激を与えた樹状突起部位で選択的かつ持続的に細胞膜周辺へプローブ分子が集積する。まずは、予備実験により示唆されていた、膜近傍へのプローブ分子の集積が、真に長期抑圧の発現を反映するか否かについて、薬理的検討や電気生理学の実験により確かめる。

細胞膜電位のイメージングに関しては、膜電位依存性脱リン酸化酵素の膜電位感受性部位と蛍光タンパク質を融合させたタンパク質 (St-Pierre et al., *Nat. Neurosci.*, 2014) を、申請者が独自に改良してきた。具体的には、改良したプローブ分子は、培養プルキンエ細胞で、細胞体、樹状突起の細胞膜上に非常に強い局在を示すとともに、1~2 μm 程の軸索やその終末にも豊富に局在する。そして、その微細な軸索終末からでも1ミリ秒以下の高速な活動電位を捕捉できる優良なプローブを創出できている。このプローブ分子の膜電位変化の追従の時間正確性と大きさに関して基礎データを取得して、その定量性を担保する。特に、細胞体や樹状突起、軸索など、異なる部位間で蛍光変化を比較検討することを可能にし、単一細胞内での膜電位変化を詳細に時空間解析できるようにする。

これら2種のプローブ分子を同時にプルキンエ細胞に発現させ、樹状突起でのグルタミン酸入力に応じた細胞膜電位変化を蛍光強度の変化として記録し、それが長期抑圧発現によりどのように変化して細胞体まで伝わるかを明らかにする。この2種の蛍光同時イメージングのために、長期抑圧プローブ分子の蛍光タンパク質を赤色蛍光タンパク質に変更する。

最初は、操作性の高い分散培養プルキンエ細胞を用いて、紫外光のスポット照射によるケージドグルタミン酸の局所活性化を行い、入力の空間分布と電位変化・伝播の空間特性の関係が、長期抑圧発現によりどのように変化するかについて基本ルールを抽出する。また、研究代表者が有する高度な細胞内微小部位からのパッチクランプ記録を適宜利用して、蛍光イメージングによる膜電位変化計測の妥当性を担保する。データ蓄積に応じて、標本をスライス培養へ移行して様々なパターンでの平行線維刺激を行い、プルキンエ細胞樹状突起での入力統合がシナプス可塑性の発現前後でどのように変化するかについて系統的にデータを集め、システムの理解を確立する。

2) 長期抑圧による軸索・終末からの出力動的变化と小脳核神経細胞の機能変化

運動学習の記憶が小脳皮質から小脳核へ移動して短期記憶から長期記憶に変化する過程は、少なくとも小脳皮質で学習後に新規にタンパク質が合成される必要がある。プルキンエ細胞でシナプス可塑性が起こった後に、新規遺伝子発現により軸索・終末に何らかの変化が起こり、それが小脳核での情報処理を修飾して運動記憶が移動すると考えられる。プルキンエ細胞の出力部である軸索終末から直接記録ができることを生かして (Kawaguchi and Sakaba, *Neuron*, 2015)、この記憶痕跡の移動の実体を明らかにする。作業仮説として、a) 新規合成タンパク質が軸索および終末での電気的活動を変化させ、それが小脳核の神経細胞に影響して情報処理機構を安定に変化させる可能性と、b) 軸索終末から新規タンパク質がシナプス間隙を超えて放出され、それが小脳核細胞に作用する可能性が考えられる。

まず、a) に関して、分散スライス培養のブルキンエ細胞に長期抑圧刺激を与え、軸索終末部の膜興奮性、伝達物質放出特性などが変化するかどうかを検討する。また、ブルキンエ細胞で可塑性が起こった後に、小脳核の神経細胞群の活動がどのように変化するかについても電気生理学と膜電位イメージングなどを駆使して解析する。このようにして、ブルキンエ細胞で記憶を生み出す情報処理変化が次第に小脳核へ波及する仕組みを神経回路レベルで明確にする。

b) に関しては、新規合成タンパク質が軸索終末から小脳核細胞へ放出されることが記憶移動の端緒となる場合、そのタンパク質はシナプス小胞より大型の分泌顆粒を介してシナプス間隙へ放出されると考えられる。a)の可能性の正否に応じて、質量分析などを用いて長期抑圧誘導により新規合成される分泌タンパク質の同定を試みるとともに、大型小胞の開口放出に関わると考えられるシナプトタグミン4の軸索終末での動態を蛍光イメージングで解析するなどして、この可能性を検証する。

<得られた研究成果>

1) 小脳ブルキンエ細胞における長期抑圧の発現部位に集積する蛍光タンパク質プローブを局所的なグルタミン酸活性化と組み合わせることで適用し、樹状突起における長期抑圧発現の最小空間ユニットを調べた。その結果、プローブのシナプス後膜への集積は、グルタミン酸刺激された2ミクロン程度の領域よりも広い領域に波及することが分かり、樹状突起の微小な一枝でまとまって長期抑圧が起こる傾向が認められた。これは、シナプス可塑性発現におけるシナプス選択性についての従来の考えとは異なり、可塑性発現が数十個のシナプスでまとまって起こる可能性を示唆するユニークな結果である。ブルキンエ細胞における可塑性発現の空間的運動性が、海馬や大脳皮質の錐体細胞などで見られるシナプス選択的な可塑性発現と異なるメカニズムは不明であるが、その発現が主に膜電位依存性Ca²⁺チャンネルにより惹起されるか、NMDA型グルタミン酸受容体により引き起こされるか、の違いに依拠する可能性があるかと推測している。

また、並行して開発してきた細胞膜電位感受性蛍光タンパク質プローブとグルタミン酸の局所活性化を組み合わせることで、シナプス後部の局所的グルタミン酸応答を蛍光変化として検出することが可能となった。また、繰り返し光刺激による強い連続的グルタミン酸刺激を行うことで長期抑圧を誘導し、その結果起こるシナプス後部応答の減弱についても蛍光変化の低下として長時間にわたって記録することができた。したがって、シナプス応答の局所記録と可塑性の誘導およびその発現すべてを光技術により惹起・記録できる実験系を確立することが出来た。これと、前述した長期抑圧検出の蛍光プローブを組み合わせることで、長期抑圧発現の時空間解析を飛躍的に進められるようになった。

2) 中枢神経系シナプスの多くは、1ミクロン程度の微小構造で高速情報伝達を行うため、直接機能解析することが難しく、不明な点が多く残っている。特に小脳の平行線維シナプスは、長期抑圧などシナプス前部・後部それぞれで様々な可塑性が起こり、それが運動学習の基礎となる。そこで、平行線維シナプスの基本的な機能設計と、その可塑的变化の基盤となるメカニズムを明らかにするため、分散培養した小脳顆粒細胞軸索のシナプス前部から直接パッチクランプ記録することに挑戦した。顆粒細胞軸索をEGFP標識することにより表面が露出したシナプス前部へ電極を狙い定めることが可能となり、シナプス前Ca²⁺電流や細胞膜容量変化とシナプス後細胞の応答を同時測定した。こうした実験から、顆粒細胞軸索のシナプス前部には、Ca²⁺チャンネルと緩く機能結合した約20個の即時放出可能なシナプス小胞があり、それ

らはエキソサイトーシス後に高速補充されること、また細胞内Ca²⁺緩衝により情報伝達強度やその可塑性が厳密に調節されることが分かった。こうした特性は、リソースに限られる微小シナプスの、高信頼性かつ柔軟な情報伝達を実現する洗練されたつくりを反映すると考えられる。この研究成果については、Cell Reports誌(Kawaguchi and Sakaba, 2017)に発表した。

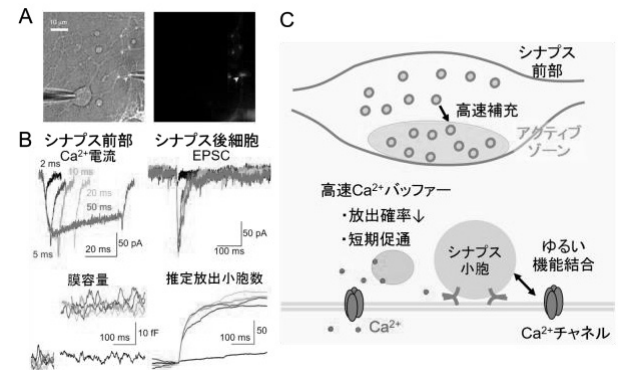


図 顆粒細胞シナプスの直接パッチクランプ記録による解析
A, 培養顆粒細胞軸索のシナプス前部（黄矢頭、EGFP 標識）とシナプス後細胞からの同時記録。B, シナプス前Ca²⁺電流と細胞膜容量増加、およびシナプス後電流と算出した膜融合した小胞数の時間経過。C, 顆粒細胞シナプス前部の機能設計の概要。

3) ブルキンエ細胞の軸索・終末は、小脳皮質から小脳核への長距離情報伝達を担っており、それは小脳皮質で生成された運動記憶を小脳核に伝える場といえる。そこで、このブルキンエ細胞の軸索終末部が、伝達してきた情報をもとにシナプス出力するのみの単純な機能構造か、あるいは周囲の状況に応じて機能修飾されるかを直接パッチクランプ記録を駆使して解析した。その結果、ブルキンエ細胞の軸索終末には、GABA_A受容体が局在しており、局所的な細胞内Cl⁻濃度が高いため、膜電位を上昇させる興奮性作用を及ぼすことが分かった。そして、終末部でのGABA_A受容体による膜電位上昇は、活動電位時の電位依存性Ca²⁺チャンネルの活性化を促進して、より多くの伝達物質放出を引き起こすことで、シナプス出力を強めることが明らかとなった。したがって、小脳皮質の情報を小脳核に伝えるブルキンエ細胞の軸索終末には、小脳核での局所状況に応じて、皮質からの情報の伝わり方を変化させる仕組みが備わっている可能性が示唆された。本研究成果については、Journal of Physiology誌に発表した(Zollila San Martin et al., 2017)。

4) 長期抑圧など運動学習を確立させる可塑性がブルキンエ細胞の樹状突起で起こった後に、どのような影響が軸索終末部に生じるかを解析した。具体的には、グルタミン酸を含む高濃度K⁺溶液でブルキンエ細胞を処理して長期抑圧を誘導し、その後、軸索終末の膜興奮性、局所的な伝達物質受容体の変化などが起こるかどうかを、細胞膜電位イメージングと局所パッチクランプ法を融合適用して検討した。その結果、長期抑圧の誘導後48時間以上にわたり、軸索終末部位の電気的な活動が亢進し、興奮性シナプス後電位様の脱分極が頻発するようになった。これは、軸索終末部位に局在するGABA_A受容体の活動が亢進するためであると考えられた。また、薬理的検討から、軸索終末部位の興奮性活動長期亢進は、樹状突起での長期抑圧に関わるシグナル経路や新規mRNA合成に依存して起こることも分かった。さらに、膜電位イメージングによる空間的活動解析から、長期抑圧の誘導後には、軸索終末ごとに部位選択的な発火が起こるようになることも示唆された。これらの結果から、運動学習を実現するシナプス可塑

性がブルキンエ細胞の樹状突起部位で起こると、軸索終末部位にまで波及して長時間の機能変化が起こり、局所的 GABA 放出状況に応じて独自出力を作り出すことで記憶の責任部位移動に寄与する可能性が示唆された。本研究結果について、現在論文公刊へ向けてデータを取りまとめている。

5) 中枢神経系の抑制性情報伝達を主に担う GABA 性シナプスにおいて、高頻度活動時に軸索終末部のシナプス小胞がどれだけ早く生産できるか、という点は脳の抑制レベルを保つために重要な要素となる。そこで小脳抑制性介在ニューロンシナプスで、エンドサイトシスにより細胞内へ取り込まれたのちのシナプス小胞への GABA 充填速度を計測する OIST 高橋智幸教授らによる共同研究に参画した。この研究から、GABA は約 40 秒の時定数でシナプス小胞に取り込まれることが分かった。さらに、高頻度刺激時にみられるシナプス小胞枯渇を原因とするシナプス伝達の短期抑圧からの回復は、遅い GABA 充填速度により規定されることが示唆され、抑制性シナプス伝達の可塑性の基盤となる新しい分子メカニズムが示された。この共同研究結果は、*Cell Reports* 誌(Yamashita et al., 2018)に論文公刊された。

6) 記憶・学習の基盤となる神経細胞の長期安定な可塑的变化は、神経活動による新規遺伝子発現に依存する。その発現の一部は、樹状突起などシナプス部で局所的に mRNA からタンパク質翻訳が起こることで実現する。そうしたシナプス部での局所的な遺伝子発現調節に、mRNA のメチル化などエピジェネティックな分子修飾がどのような役割を担うかに関して、京都大学の王丹准教授らによる共同研究に参画した。そして、シナプスに局在化する RNA 遺伝子のうち約 3000 個が N⁶-メチルアデノシン化されていること、その修飾阻害によりシナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体が減少して興奮性シナプス伝達が減弱することが分かった。したがって、シナプス部での局所的遺伝子発現制御に mRNA 分子のメチル化修飾が重要な役割を果たすことが明らかになった。この共同研究の結果は、*Nature Neuroscience* 誌(Meukurjev et al., 2018)に論文公刊された。

<国内外での成果の位置づけ>

ブルキンエ細胞における長期抑圧の可視化は、いまだに国内外で論文公刊されておらず、本研究で取り組んだ蛍光プローブ分子は、その初の例として論文公刊が待たれる画期的な成果である。

シナプス前部の直接記録による機能解析に挑戦することで、運動学習を形成する小脳皮質で、主要な可塑性の場である顆粒細胞の軸索終末の機能設計が精密に明らかになり、さらに可塑性のメカニズムを詳細に解析する方法が確立したことは意義がある。また、小脳皮質から小脳核へ情報を長距離伝達するブルキンエ細胞の軸索終末部が、局所的な GABA による機能調節を受け得ること、そしてその局所機能調節自体が活動依存的な長期可塑性を示すことを見出すことができ、神経系の動的な情報処理メカニズムに新しい視点を提示することに成功している。また、それを可能にした新規の細胞膜電位感受性プローブ分子の開発は、国際的に熾烈な競争下であり、急速に進展しているが、その中で本研究では軸索・終末部から効率的に膜電位を計測するための分子修飾の方法を確立しており、ユニークな成果を得ている。加えて国内の共同研究により、脳の抑制性情報伝達を主に担う GABA のシナプス小胞への充填速度とその機能的意義、シナプスにおける局所的遺伝子発現の調節をになう mRNA 分子修飾の影響の解析など、記憶・学習を実現するための神経細胞の基礎的な分子レベルのメカニズムを高いレベルで明らかにした研究成果と言える。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究の発展次第では、可能であればブルキンエ細胞の長期抑圧を検出する蛍光プローブ分子を発現する遺伝子改変マウスの作成を開始することを、当初構想していた。しかし、研究代表者の研究機関の異動があったため、動物飼育施設の利用可能状況に見通しが立たず、当初の理想的な構想を遅らせる結果となった。それと並行して、アデノ随伴ウイルスを用いてマウス・ラットの小脳ブルキンエ細胞に発現させることも計画していたが、プローブの DNA サイズが大きいため生きた動物脳で効果的に発現させるだけの高タイトーのウイルスを得ることが難しかった。こうした理由から、蛍光プローブを生きたマウスの多くのブルキンエ細胞で発現させる試みは、当初狙っていたほどには進展しなかった。

<今後の課題、展望>

長期抑圧の蛍光プローブを発現させる遺伝子改変マウス作成などを経て、動物個体におけるシナプス可塑性の可視化と行動実験を組み合わせた研究へ展開を図ることにより、記憶・学習を実現するシナプス集団の 3 次元分布パターンとその時間的変遷を明らかにする研究がすすむことが期待される。また、樹状突起での可塑性誘導が、細胞体・長距離軸索を超えて軸索終末部の長期機能変化を生み出すという、本研究で見出した新しい可塑性メカニズムは、記憶の責任部位が移動する 1 つの有望な仕組みになり得るもので、今後その可能性を検討する研究の進展が求められる。

新規分子活性操作法によるシナプスダイナミズムの意義の解明

研究代表者：村越 秀治

生理学研究所 脳機能計測・支援センター

<研究の目的と進め方>

記憶の最小単位と考えられるシナプスは、コンピューターのハードディスク（磁性体）によく例えられる。しかしながら、シナプスは生体分子集合体であるため、その反応性や状態が刻々とダイナミックに変化する点で磁性体とは大きく異なる。なぜ脳はこのような不安定な構造を記憶素子に選んだのだろうか？このような不安定さを、「シナプスの記憶ダイナミズム」と捉え、本研究では光応答性分子を独自に開発し、それを用いて、シナプスの状態を光操作することによって、シナプス反応性のメカニズムや状態変化の記憶にとっての意義を明らかにすることを目的とした。

近年、チャネルロドプシンが普及したことにより、細胞レベルの光操作が比較的簡単に行うことができるようになり、様々な知見が得られているが、個々のシナプスレベルでの光操作法については、ツールがない為、殆ど進んでいない。そこで本研究では植物タンパク質であるPhototropin1のLOV2ドメインを用いて、シナプスレベル(ミリ秒レベルの時間分解能とマイクロメートルの空間分解能)での光操作が可能な光応答性のシグナル分子と光応答性シグナル阻害分子の開発を進めた。また、開発した分子を個体マウスに適用することによって、シナプス集団を光操作し、記憶・学習とシナプス状態の関係を明らかにすることを目指した。

<研究計画>

1) CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II) は海馬や扁桃体神経細胞に豊富に存在しており、シナプスの可塑性にとって重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。この分子の特徴は12量体を形成することで自立的な長時間の活性化が可能な機構を有していることである。このことから、CaMKIIは記憶を長時間保持するためのメモリー分子として働いていると考えられてきた。しかしながら、CaMKIIが長時間活性化しているという報告がある一方で、短時間しか活性化していないという報告もあり、未だに決着には至っていない。そこで本研究では新規に高い時間分解能と特異性をもつ遺伝子コード型の光応答性CaMKII阻害ペプチドを開発し、これをマウスの扁桃体に適用することでCaMKII活性と記憶の関係を調べることにした。

2) 上記で光応答性阻害分子を作製する一方で、CaMKIIを遺伝子改変により、光応答性分子であるLOV2ドメインと融合することにより、2光子励起によって活性化させることができる光応答性分子（光応答性CaMKII）を開発することにした。さらに光応答性CaMKIIを海馬神経細胞のシナプス内で直接活性化することによって、CaMKII/PKC/PKAの機能を直接調べることにした。

<得られた研究成果>

1) 光応答性CaMKII阻害ペプチド (paAIP2: photo-activatable Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide 2) の開発

CaMKIIは、主にCaMKII α とCaMKII β の2つのサブユニットから成

る12量体を形成しており、Ca²⁺/CaMの結合により構造変化を起こしてキナーゼが活性化する。CaMKIIの活性を生きた細胞内で高い時空間分解能で活性を阻害できるようにするため、LOV2-J α ドメインを用いて遺伝子コード型の光応答性CaMKII阻害分子を開発することにした。LOV2-J α は植物タンパク質であるPhototropin1の光感受性ドメインであり、青色光照射によって、LOV2ドメインに結合していた α -ヘリックスが解離し、分子構造が可逆的に変化する。そこで本研究では、CaMKIIの阻害ペプチドであるAIP2 (Autocamtide2-Related Inhibitory Peptide、13アミノ酸から成る)にLOV2を遺伝子工学的に融合することによって、遺伝子コード型光応答性CaMKII阻害ペプチド (paAIP2)を開発した(図1)開発には、LOV2-J α とAIP2の間のリンカー配列を変えたものを多数作製し、CaMKIIのキナーゼ活性を光照射依存的に阻害するかどうかを生化学的に確認した。また、FRET計測により、paAIP2は光照射後に直ちに構造変化し、暗状態に戻すことで40秒程度で元に戻ることが分かった。

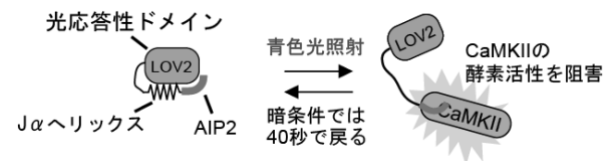


図1、光応答性 CaMKII 阻害ペプチド

青色光受容タンパク質であるの LOV2 ドメインに CaMKII の阻害ペプチドを遺伝子工学的に融合した。暗条件下では折りたたまれた構造をとっており、CaMKII に結合する。しかし、青色光照射により、AIP2 が LOV2 からリリースされると CaMKII のキナーゼドメインに結合し、その活性を阻害する。

2) paAIP2を用いたケイジドグルタミン酸刺激による長期増強誘起の阻害

次に、本研究で開発した paAIP2 を用いて、光照射による CaMKII 阻害がグルタミン酸刺激によるスパイン体積の可塑的な変化を阻害するかどうかを調べた。まず、海馬スライスの CA1 領域にある神経細胞に遺伝子銃を用いて mGFP (単量体緑色蛍光タンパク質)、mCherry (単量体赤色蛍光タンパク質)、paAIP2 を同時に発現させた(図2)。次に落射蛍光顕微鏡下で mCherry の赤色蛍光を発している細胞を同定し、その細胞を 2 光子顕微鏡下で mGFP の蛍光を観察した。刺激後のスパイン体積の変化は mGFP の蛍光強度によって定量した。ケイジドグルタミン酸による 2 光子単一スパイン刺激 (30 pulses at 0.5 Hz) を行ったところスパイン体積は一過的に 4 倍程度増大した後、収縮し、刺激前よりも 2 倍程度の体積の状態を 20 分以上持続していた(図1B)。一方、ケイジドグルタミン酸刺激と同時に青色光 (100 mW/cm²) により CaMKII の活性を 1 分間阻害したところ、一過的な体積変化が劇的に阻害され、さらに、持続的な体積変化が完全に阻害された(図1C)。このことは、初期の CaMKII の活性がスパイン体

積の変化にとって極めて重要であることを示している。

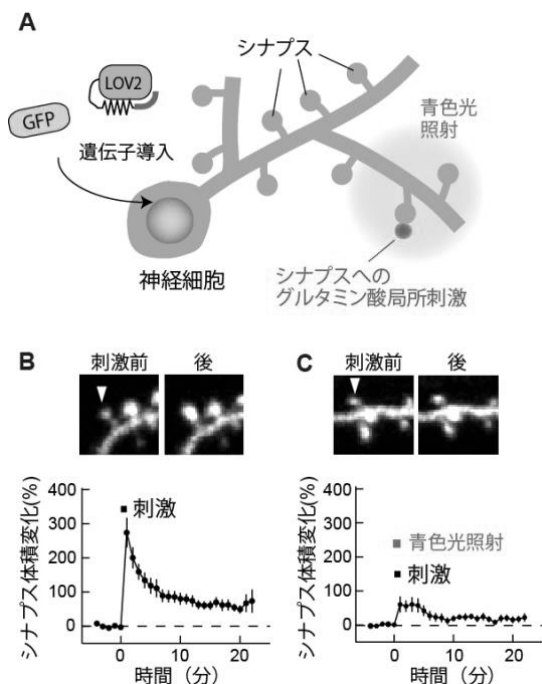


図2 A、光応答性ペプチドと緑色蛍光タンパク質 (GFP) を遺伝子銃で導入。2光子励起蛍光顕微鏡でGFPを導入した神経細胞を観察しながら、シナプスにグルタミン酸局所刺激を与える。青色光照射を行っている部分では光応答性ペプチドが活性化し、CaMKIIの酵素活性を阻害する。

図2 B、グルタミン酸刺激によってシナプス (スパイン) の体積が増大し、グルタミン酸受容体などの各種分子が多く集まってくる (シナプスの可塑的变化)。

図2 C、青色照射を行いながらグルタミン酸刺激をするとシナプスの体積変化は大きく抑制され、シナプス機能が阻害される。

3) 個体マウスにおける恐怖記憶と CaMKII 活性

paAIP2 の利点の一つは、遺伝子コードされている点である。細胞特異的なプロモーター遺伝子を利用することで、生きた個体動物の特定の細胞の特定の場所に導入することができる。そこで、paAIP2 を用いて、記憶と CaMKII 活性の関係を個体マウスで調べた。paAIP2 をマウスの扁桃体領域 (恐怖記憶を司る脳領域) の神経細胞へ導入するため、GFP を融合した paAIP2 をコードするアデノ随伴ウイルスを作製し、扁桃体へのインジェクションを行った。その後、このマウスを用いて、動的回避テスト (記憶テストの一種) を行った (図3)。明室と暗室の間にマウスが通れるくらいの出入口がついた箱にマウスをおく。マウスは暗い場所を好むため暗い部屋に入るが、この時、マウスが嫌う軽い電気ショックを与える。すなわち、暗い部屋に入ると電気ショックが来ることを記憶させる (恐怖記憶)。このトレーニングを行ったマウスを再び明るい部屋に入ると、暗い部屋にはなかなか入らなくなる (受動的回避テスト)。すなわち、明るい部屋に滞在する時間を計測することで、電気ショックの記憶を記憶しているかどうかを判別することができる。テストの結果、記憶トレーニングからテストの直前までの間、光照射によって CaMKII を阻害した動物は、比較的短い時間で暗い部屋に入った。すなわち、電気ショックがあることを記憶していなかった。一方で、トレーニング時に光照射を行わなかった動物では記憶は阻害されなかった。これらの結果から、記憶形成の瞬間に CaMKII 活性が必要であり、

保持には必要ないことを示唆するデータを得ることができた。

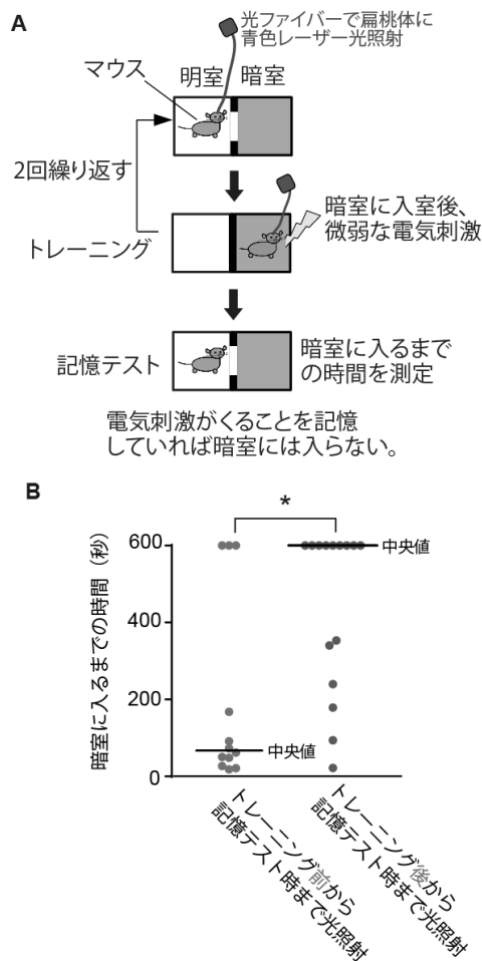


図3 A、光応答性阻害ペプチドをアデノ随伴ウイルスによってマウスの扁桃体神経細胞に導入する。また、青色レーザーを光ファイバーで扁桃体に照射する。受動的回避テストによって、記憶形成が光照射 (CaMKII活性) に依存するかどうかを調べる。

図3 B、トレーニング前からテスト時までで光照射を行ったマウス群 (青プロット) では12匹中9匹が200秒以内に暗室に入った。この結果から、このマウス群は暗室に入ると電気ショックがくることを覚えていないと考えられる。一方で、トレーニング後から光照射を行ったマウス群 (赤プロット) では200秒以内に暗室に入ったものは15匹中3匹で、計測時間中 (600秒) 一度も暗室に入らなかったものが9匹もいた。これらの結果からトレーニング時のCaMKII活性が記憶形成に重要であると考えられた。

4) 光応答性 CaMKII の開発

Phototropin1は植物の光受容タンパク質キナーゼであり、青色光照射によって、自身の持つLOV2ドメインに結合していた α ヘリックスが解離し、分子構造が可逆的に変化する。我々はLOV2ドメインを用いて、現在までにpaCaMKIIのプロトタイプの開発に成功しており、神経細胞において光照射によりスパイン体積の増大を惹起することに成功している。本研究では、生化学的なアッセイにより、paCaMKIIは内在性の配列のCaMKIIと比較して、光非存在下でのベース活性が3倍程度高く、細胞内のシグナル伝達系を乱してしまうことが分かってきた。そこで本研究では、paCaMKIIのキナーゼドメインのリンカーの長さや変異導入によるダイナミックレンジの最適化 (ベース活性を抑える) を行った。

最適化にはHeLa細胞を用いて、生化学アッセイと蛍光寿命イメージングで行った。これにより、リーク活性を4分の1に抑えることに成功し、さらにダイナミックレンジを2倍にすることに成功した。

また現在までに、ラット海馬のスライス中の神経細胞にこの分子を発現させて、シナプス（スパイン）内で2光子励起によりpaCaMKIIを活性化させることで、可塑的变化を誘起することに成功している（図4）。

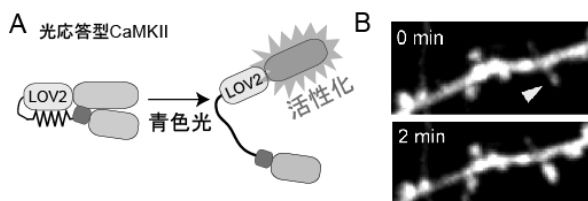


図4 A、光応答性CaMKIIの制御ドメインとキナーゼの間にLOV2ドメインを遺伝子改変により挿入した。

図4 B、光応答性CaMKIIを神経細胞に発現させ樹状突起上のスパインを2光子励起することで体積増大を誘起させることができる。

<国内外での成果の位置づけ>

現在の世界の光操作の潮流はチャンネルロドプシンによる細胞レベルの光操作であるが、私が開発した paCaMKII は個々のシナプスの情報を書き換えることができる点で画期的である。paCaMKII は、私が 800 以上の DNA コンストラクトをスクリーニングすることで初めて開発に成功したものである。この分子の特徴は、マイクロメートルの空間精度とミリ秒レベルの時間分解能をもち、その活性は可逆的であることである。また、光照射するだけで個々の狙ったシナプスやシナプス集団に長期増強を惹起することができる。光活性をもつ分子の開発は非常に難易度が高く、実際に分子の開発ができる研究室は世界中を見ても多くはない。すなわち、paCaMKII や光応答性 CaMKII 阻害ペプチド (Murakoshi et al. Neuron 2017) の開発に成功している我々は世界をリードしている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

現在までに我々は光応答性 CaMKII 阻害ペプチドの開発に成功し、生きた個体動物に応用することに成功した。一方で、光応答性 CaMKII については、分子開発と海馬スライスへの応用には成功したものの、研究期間が2年と短かったため個体動物への応用には届かなかった。今後は下記2つの項目について研究を進めていく予定である。

- 1) 個体マウスの学習時に活性化したシナプスに paCaMKII を標識するための技術 (Active Synapse Booster) を確立する。
- 2) Active Synapse Booster を用いて、シナプス集団を光操作する。これによって、学習後のマウスのシナプス情報を書き換える (長期増強を光照射によって亢進させる) ことでシナプスの記憶ダイナミズムの意義を明らかにする。

<今後の課題、展望>

本申請研究では、シナプス可塑性に重要であるCaMKIIを光照射依存的に阻害することが可能な光応答性CaMKII阻害ペプチド

の開発に成功した。また、分子を開発するのみならず、ラット海馬スライスにpaAIP2を導入し、シナプスの体積変化を阻害することに成功し、CaMKIIの短時間の活性が体積変化に重要であることを明らかにした。すなわち、シナプスの可塑性にとって、CaMKIIはメモリー分子ではなくトリガーに重要であることを明らかにした。また、paAIP2を利用して、個体マウスの記憶形成時の初期段階においてCaMKIIの活性が重要であることも明らかにした。現在までに様々な阻害ペプチドが利用できるが、LOV2ドメインと組み合わせることで、様々な光応答性阻害ペプチドが作製できると考えられる。今後、このような光操作分子を用いて、個体機能の基礎となる細胞内シグナルの分子メカニズムが詳細に明らかになると考えられる。

空間探索における海馬とワーキングメモリの相互作用の回路モデル

研究代表者：深井 朋樹

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター（現 脳神経科学研究センター）

<研究の目的と進め方>

脳の領野間コミュニケーションのメカニズムの解明は、記憶のみならず、脳全体の機能の理解にとってもきわめて重要な課題である。最近、ワーキングメモリを必要とする空間ナビゲーション課題（T字型迷路課題）において、嗅内野皮質（EC）と海馬CA1領域で形成されるループ回路が、一時的記憶の読み出しにとって重要なこと、その過程には速いガンマ振動が関与していることが示唆された。そこで本研究では、齧歯類の海馬とECの局所回路をモデル化して、海馬と大脳皮質間の情報伝達の機序を数理モデルで解明することを目指す。とくにワーキングメモリの読み出しに関わるECの局所回路メカニズムをモデル化することにより、脳のリズム活動が、記憶関連領野間でのコミュニケーションに果たす役割を解明する。またその結果をもとに、海馬と大脳皮質の動的コミュニケーションが、長期記憶の固定化のプロセスに於いて果たす役割とその回路メカニズムの解明を目指す。

<研究計画>

1) 興奮性細胞、PV抑制性細胞、SOM抑制性細胞によって構成されるECの局所回路モデル（EC2/3層+EC5層）を構築した。5層の持続発火性細胞（ワーキングメモリ細胞）のモデルは、Fransenらによる既存のモデルを採用した。またガンマ波とシータ波の結合状態を再現するために、神経解剖学及び電気生理学的知見を基に、SOM+抑制性細胞とPV+抑制性細胞を回路に取り込み、さらにアセチルコリンによる神経修飾を考慮した。

2) シミュレーションにより、実験で観察された神経活動パターンが出現するか確認する。正解試行の場合には、マウスが意思決定を求められるTジャンクションに近づくに連れて嗅内野（EC）3層でシータ波のコヒーレンスの緩やかな増大が見られ、不正解試行では見られない。この現象を再現可能なミニマルな神経回路モデルを構築し、再現性が高くなるようにモデルのパラメータを調節する。

3) 海馬と前頭皮質の神経回路間でワーキングメモリの書き込み、維持、読み出しの各フェーズが、機能するための条件を、回路モデルを数値シミュレーションによって予測する。また実験可能な予測を引き出す。

4) 単独の課題として、シナプスの構造可塑性が学習において果たす役割を検証する。そのために、シナプス入力確からしさ（スパイク発火への関連性）をベイズ推定によって学習する、単一神経細胞の計算論的モデルを構築する。

5) ヘテロシナプスのスパイクタイミング依存可塑性（STDP）の計算モデルを開発し、興奮性入力と抑制性入力とのバランスが可塑性において果たす役割を検討する。

<得られた研究成果>

1) マウスが意思決定を行うためにT字型迷路の分岐点に近づくと、嗅内野皮質（EC）3層にシータ波のコヒーレンスの緩やかな増大が見られる。EC2/3層+EC5層と海馬CA1の情報連絡を再現する局所回路モデルを構築し、行動依存のシータ波の変化の再現に成功した（図1）。

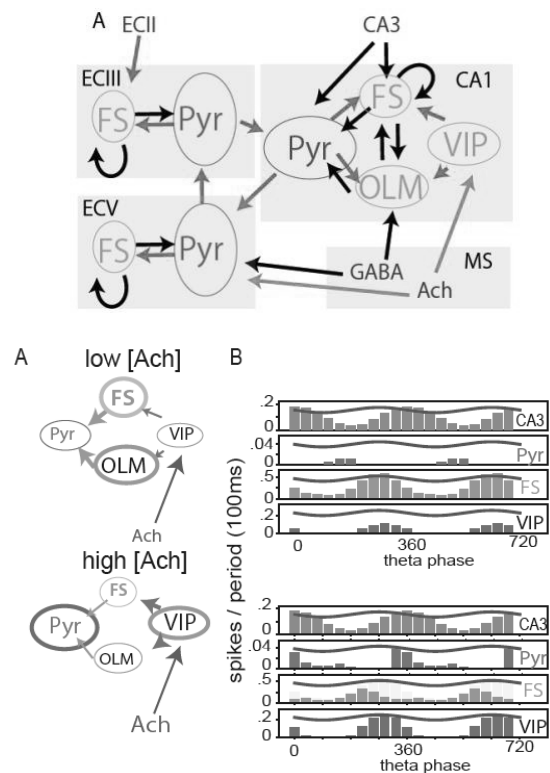


図1：神経回路モデルの概要（上）。

図2：発火位相の変化（下）。嗅内野の一時記憶が海馬に転送されると共に、CA1の錐体細胞の発火位相の分布が前向きにシフトする（水色→青色）。

2) 局所回路モデルから以下の予測を得た。1. ワーキングメモリの呼び出し時には、CA1の興奮性細胞と抑制性細胞にコリン作動性の活性化が起こる（図2A）。2. ワーキングメモリ回路が一時記憶を保持する場合としていない場合とでは、ECとCA1興奮性細胞のスパイク発火のシータ波に関する位相が、課題遂行中に動的に変化する（図2B）。3. 一時記憶の局所回路内での読み出しと転送に於いては、ガンマ波ではなくシータ波がより重要な役割を担う。シータ波の重要性は、実験では詳しく調べられておらず見落とされていた。4. ガンマ波は、回路外部からのワーキングメモリ情報の読み出しに有効である。

3) 山本-利根川らのグループから実験データを入手したり (Yamamoto et al., Cell 2014)、Collaborative Research in Computational Neuroscience (CRCNS.org) に公開されているデータ (Mizuseki et al., Neuron 2009) を用いたりして、モデルの予言の検証を行った。

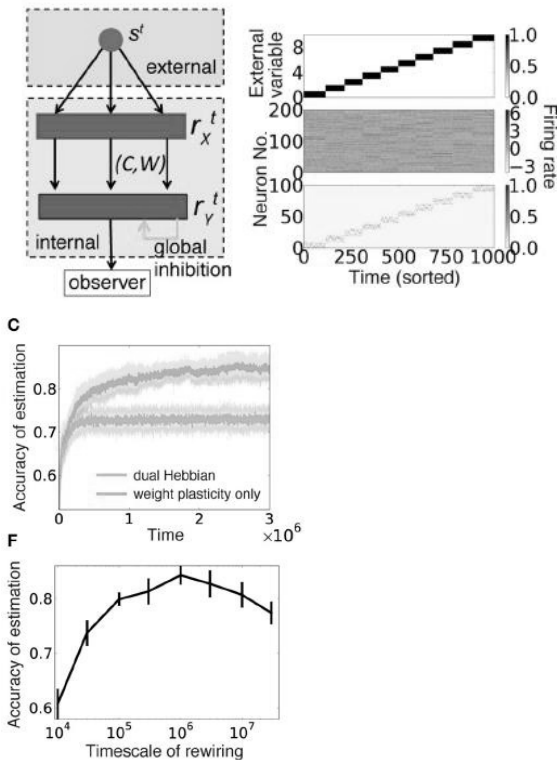


図3：構造可塑性を考慮した神経回路モデル（左上）。最終層（赤）の神経細胞は外部入力の状態 s を推定する（右上）、構造可塑性を仮定した場合としない場合の推定精度の評価（中）。シナプスの構造可塑性とシナプス荷重の可塑性の間には、精度を最適化する相対時間スケールが存在する。Hiratani and Fukai, Front Neural Circuits (2016) より改変。

4) シナプスの構造可塑性の神経細胞モデルの解析的及び数値シミュレーションの結果から、構造可塑性を考慮することで環境の変化による外部入力の事前分布の変化をより良くベイズ推定に反映させることが出来るようになり、その結果、推定能力が最大で20%程度向上することがわかった（図3）。さらにヘテロシナプスの可塑性モデルを構築して抑制性入力によって学習を制御することを試みた（図4A）。その結果、大脳皮質ニューロンの樹状突起では、枝分かれした分岐ごとに興奮性と抑制性の入力がバランスされることがわかった。それによって、樹状突起は分岐毎に独立したシナプス入力の学習が可能になることがわかった（図4B）。

<国内外での成果の位置づけ>

近年、タイプが異なる抑制性神経細胞が回路レベルの機能の出現や制御に於いて果たす役割が注目されており、さまざまな実験や回路モデルが報告されるようになってきた。しかしながら、これらの研究はまだ端緒に着いたばかりであり、海馬や大脳新皮質の局所回路の計算機能とメカニズムの解明は、今後の研究を待たねばならない。構築した回路モデルは複雑であるが、その生物学的

妥当性には不明な点も多く、またモデルでは完全に説明できない実験結果も残る。しかしながら当該モデルのように、複数の脳の部位を同時にモデル化し、さらに実験データを用いて検証を試みた例は、国際的に見てもごく少数である。また領野間連絡におけるシータ波活動の機能的役割については新規な結果や検証可能な予言を得ることができた。この点も、生物学的な神経回路をモデル化した他のモデルに比べて、本モデルの存在価値を一段高めている。また提案モデルはワーキングメモリのエンコーディングや読み出しにおいて、アセチルコリンによるVIP細胞や嗅内野錐体細胞の興奮性の調節が重要であるという、今まで知られていなかった局所回路の動態に対する修飾メカニズムを示唆した。またYamamotoらによる実験報告ではあまり注意が払われなかった、シータ波の同期発火のワーキングメモリに於ける重要性も予言したが、これは実験コミュニティに対してもインパクトをもつ予言である。局所回路は回路が複雑になると、パラメータ値の選択に対する自由度が増すため、生物学的に確からしい結果を得ることが困難になる。これらの状況を踏まえると、モデルから複数の予想外の結果が得られており、総合的には満足いく成果を出せたものと思う。

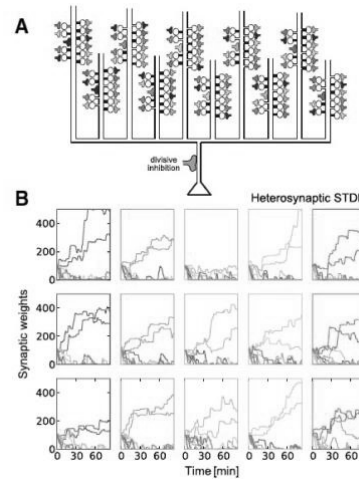


図4：(A) 分岐をもつヘテロシナプス可塑性モデル。(B) 抑制性シナプス入力による制御を受けると、分岐毎に独立した学習ユニットとして機能する (B)。Hiratani and Fukai, J Neurosci (2017) より改変。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

モデルはシータ波に対するスパイク発火の位相が、ECとCA1では異なること、またそれらはPV抑制性細胞の活性化により、課題遂行中に動的に変化することを予言した。シータ波に対する発火位相のシフトはモデルの最も顕著な予想であるが、Mizusekiらの実験データにおいては似たような傾向を見出した。しかしYamamoto からデータを手入して行った解析では、統計的に有意な結果を得ることが困難であった。この場合、Hilbert変換を用いて位相情報を抽出して予言が正しいかを検証した。もともときれいに多細胞のスパイク発火が記録できたマウスが少ない（5匹）こと、また全体的に実験ではスパイク発火が回路モデルに比べてスパースなことが、検証をより難しくしている。最終的にはさまざまに解析方法を工夫して、過半数のマウスでは予言どおりとみなせる活動変化が確認された。しかし残りのマウスでは肯定とも否定とも言えない結果が得られている。このように実験結果とモデルの予言に齟齬が生じた場合、すでに論文発表された実験データに基づいてモデルを構築している場合は、再実験が困難あるいは不可能なため、原

因を特定できないことが欠点である。またそれにより、論文発表も遅れている。

<今後の課題、展望>

上述した通り、本プロジェクトの主要な成果である、海馬と嗅内野皮質ワーキングメモリの相互作用回路モデルは、まだ論文に発表していない。本プロジェクトを遂行したポストドクは、2018年6月に関西医科大学の物理学教室に就職したが、現在、この成果を論文にまとめており、最近、ほぼ最終版の原稿が完成した。当面の課題は、この論文を神経科学分野のしかるべき雑誌に投稿し、発表することである。

しかし脳の回路機能の研究には、人工知能との関係をめぐり、以前は存在しなかった難しい面が出てきている。この数年で人工知能は飛躍的に進化を遂げ、課題に依っては人間並みかそれ以上のパフォーマンスを示すものが創出されている。中核を占める理論は80年代~90年代にかけて提案されたものであり、近年の脳研究の知見はあまり考慮されていない。それにもかかわらず、驚くべき性能を達成できたことで、脳の神経回路の働きに学ぶ必要性を声高に主張しても通らなくなってきていることは、否定できない事実であろう。過去20年間に脳の学習と計算に関してさまざまな発見があり、スパイク時間依存のシナプス可塑性による記憶学習モデルや、興奮性入力と抑制性入力のバランス状態が発見されたことによる、ゆらぎ駆動の神経計算メカニズムが提案されるなど、脳の神経回路理論には新しい方向性も見えてきている。

一方で、樹状突起が回路レベルの計算に於いて果たす役割など、ほとんど理解されていない脳の神経回路の特徴が存在する。樹状突起は本研究で取り扱ったような異なる領野間での情報伝達の制御に於いて特に重要である可能性が考えられるが、局所的計算の結果をシステム全体が行う計算の中に統合するメカニズムは、汎用的な人工知能の開発に於いても本質的に重要である。本研究で取り扱ったような領野間での情報伝達の回路メカニズムの解明は、神経回路研究が生物学を超えて波及効果を生み出す鍵になることが予想される。

自己と他者の空間情報記憶

研究代表者：檀上 輝子

理化学研究所 脳科学総合研究センター システム神経生理学研究チーム
(現 理化学研究所 脳神経科学研究センター 時空間認知神経生理学研究チーム)

<研究の目的と進め方>

ヒトを含めた動物が空間上を動き回るとき、空間上の各地点や自分の位置をどのように認識しているのだろうか？動物の空間ナビゲーションには海馬が深く関わることが知られている。海馬CA1領域の多くの細胞は、自己が空間上のある地点に存在するときに特異的に発火することが見出され、この種の細胞を「場所細胞」、また場所細胞が発火する場所領域は「場所受容野」と名付けられた。場所細胞の空間内での『自己の場所認識』に不可欠な役割を果たしており、場所細胞の集合によって脳内に空間認識地図が形成され、空間全体の認識が可能になると考えられている。

場所認識には「自己中心的な場所認知」と「認識地図に基づいた場所認知」の2種類の方法があると考えられている。「自己中心的な場所認知」は、自己が存在する場所を自らの動いた速度、時間、方向から割り出す方法で、これに関わる神経細胞の存在が数多く報告され、そのメカニズムの解明が進んでいる。一方、「認識地図に基づいた場所認知」は、ヒトが実際の地図を参照して目的地を確認し、そこに到達するのと同様の方法で脳内の認識地図を参照し場所を認識する方法であり、このような場所認知には、自らが『今、現在』存在するのは別の場所を認知することが必須と考えられる。言い換えれば、客観的な意味での『場所そのもの』を表象する細胞の存在が推測されるが、これまでのところ、そのような性質を持つ神経細胞は報告されていない。

本研究では、ラットが空間内で他のラットを観察するとき、そのラットの場所が脳内でどのように表現されているのかを電気生理学的に明らかにする。これにより、『他者の場所』が『自己の場所』記憶とどのように異なるのかを比較解析し、これを通して、主観的/客観的な『場所』に統一的な表現があるのかという疑問に答え、認識地図の表象機構の本質に迫る。

<研究計画>

1) はじめに2匹のラットを用いたT字迷路課題を構築する。この課題では、1匹目のラットの行動選択によって2匹目のラットの正解が変化するため、2匹目のラット（自己ラット）が1匹目のラット（他者ラット）の行動を観察し、その場所を認知することが必要となる。この課題をラットに学習させ、行動課題中の他者の行動を観察する自己ラットの海馬から大規模神経活動記録を行い、他者ラットの場所認知（他者の場所細胞）に関わる神経活動を探索する。

他者行動観察課題は2つのセッションで構成される。

セッション1 同一方向選択課題

- i) 「他者」がスタートし右または左を選択する。
- ii) それを追いかける「自己」が「他者」と同じ方向を選択すると報酬として水が得られる。

セッション2 反対方向選択課題（右図）

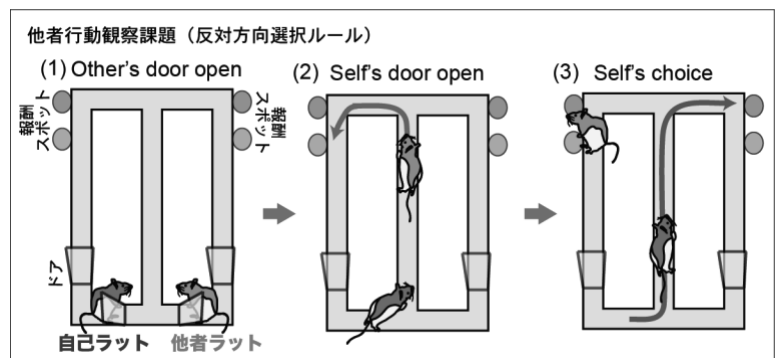
- i) セッション①と同様、「他者」がまずスタートし右または左を選択する。

- ii) それを追いかける「自己」が「他者」と反対方向を選択すると報酬が得られる。

2) 本研究では、行動課題中のラットの海馬と前頭前野から同時に神経活動を記録することを計画している。異なる二つの脳領域の神経活動の相関関係を定量的に解析するためには同時に多数の神経細胞の活動を記録することが必須である。研究代表者の所属する研究室では高密度・多チャンネルのシリコンプローブを用いて大規模細胞外記録を実用化しており (Fujisawa et al., 2011 Neuron)、この手法を用いて、複数の脳領域に200チャンネル以上の記録電極を留置し、自由活动中のラットから長期間にわたって安定した細胞外記録を取ることが可能となっている。今後、神経活動記録中であってもラットに過度な負担をかけず行動実験に集中できる環境を検討し、より良質なノイズの少ない神経活動の記録を目指す。

3) 海馬から神経活動記録を行う際には、ある特定の神経細胞の発火活動と個体の場所に関連性があるか否かを解析することが必須である。本研究では、これまで一般に行われてきた行動実験と異なり、2匹の個体が同時に同じフィールド上を動き回る。そのため、ビデオ画像を用いて2匹を識別した上でそれぞれの存在場所を解析するという、より高度な解析技術が必要となる。また行動解析に時間あるいは空間上の誤差が生じると、解析結果が不明瞭なものとなる恐れがある。そのため、Labviewと行動解析ソフトを組み合わせた行動解析法を計画している。具体的には、ビデオフレームごとに電気信号を生じさせ、その信号を神経活動記録と同様に記録する。これにより、それぞれのビデオフレームの記録時間を個別に確定し、またビデオ画像から2匹のラットの存在場所を確定し、時間データと場所データを最後に統合することにより、誤差とロスのない行動記録系が開発できる。試行実験の段階では効果的な行動記録が可能となっており、さらに今後、この行動記録を用いて神経活動との関連を解析するシステムの開発を行う。

- 4) 順調に研究が進んだ場合、現在開発中の遺伝子改変ラットやウィルスベクターを用いて神経種あるいは神経回路特異的な機能制御機構の解明に取り組む。具体的には、例えば、海馬に錐体

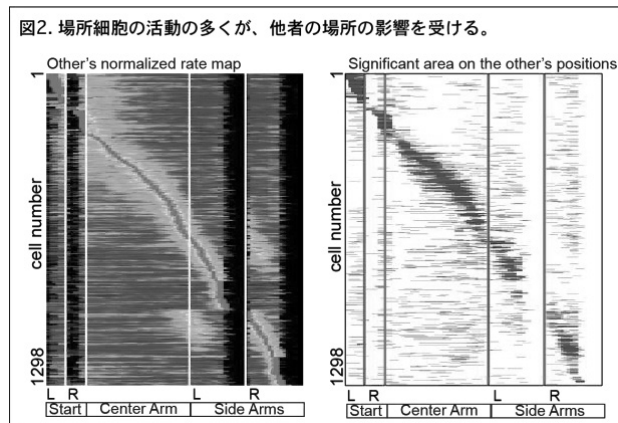
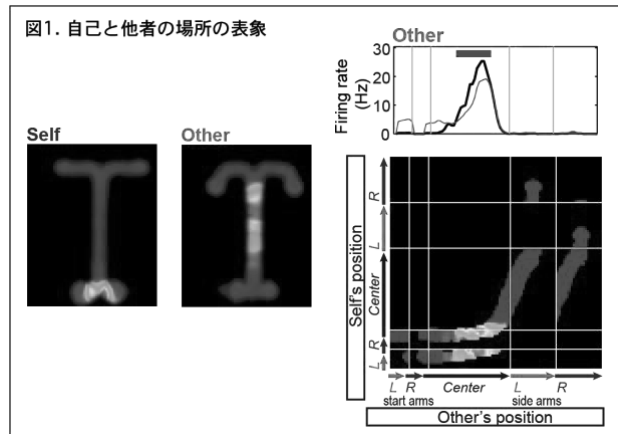


細胞特異的に感染するウィルスベクターを注入し、光遺伝学的手法を用いて海馬から直接入力を受ける前頭前野の神経細胞を同定した上で、その細胞の発火特性を解析し、適応行動への関与、海馬-前頭前野間の神経回路の機能を明らかにする。さらに、前頭前野から海馬への情報入力は、視床や嗅内皮質を通して間接的に行われているので、例えば前頭前野から嗅内皮質への投射を特異的に標識し、光遺伝学的手法や神経伝達阻害法によってこの投射繊維を特異的に抑制し、本課題の成績の変化から適応行動に対するこの神経投射の機能を明らかにする。

...

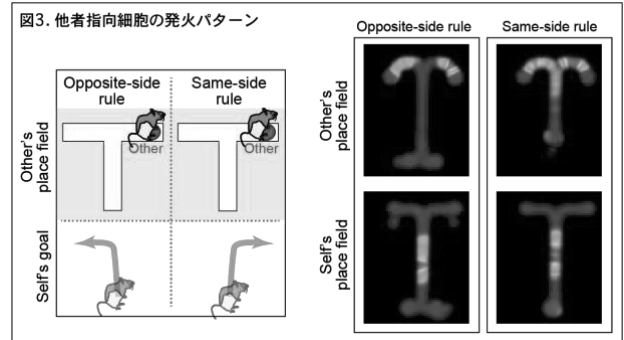
<得られた研究成果>

1) はじめに、個々のシングルユニットの発火活動が自己ラット、他者ラットの位置と相関しているか、場所細胞マップを用いて解析した。その結果、すでに知られているように、海馬CA1領域の場所細胞が表象する場所(場所受容野, place field)はT字迷路を網羅的に分布しており、さらに今回新たに、同じ場所細胞群が他者の場所をも網羅的に表象していることが明らかになった。次に自己と他者の場所と発火活動を同時に示すためにジョイント場所細胞マップ(図1右)を作成し解析すると、他者の場所の表象は、自己の場所のみに基づく発火ではなく、他者の場所に影響を受けた発火であることが統計学的に明らかになった(図2)。自己の場所表象では、ラットが場所受容野を進行するにつれてシータ波の位相が進むシータ波位相前進(theta phase precession)が報告されているが、他者の場所の表象においても同様の現象を認めた。



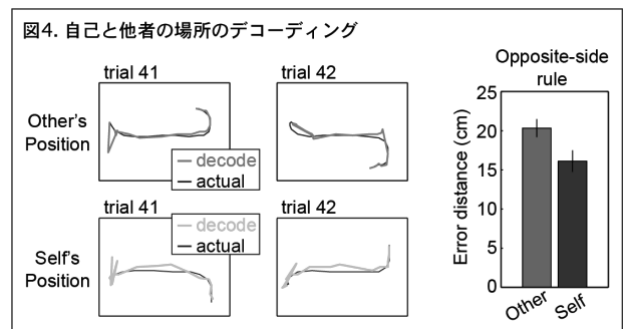
2) 次に、2種類の行動課題での場所細胞の発火パターンを比較することによって、自己のゴール(目的地)と他者の場所をそれぞれ特異的に表象する細胞の存在を解析した。これまで報告され

てきたように、自己のゴールが右か左かに依存した発火活動を示す場所細胞(目的地指向細胞)を確認したほか、行動課題の種類に関わらず、他者が例えば右のサイドアームにいるとき(従って自己のゴール方向は行動課題によって反対方向となる時)に発火する細胞(他者指向細胞)を認めた(図3)。いずれの細胞群においても、解析を行ったサイドアーム部位を網羅的に他者の場所受容野が分布しており、また、目的地指向細胞は全体の57%、他者指向細胞は15%の割合を占め、一定の割合の細胞群において「自己のゴール」、「他者の場所」がそれぞれ独立に表象されていることが明らかになった。



3) 5%程度の場所細胞では、自己、他者のいずれかが特定の場所に存在するときに発火することが確認され、「共通場所細胞」と名付けた。この種の場所細胞では、他者がある場所にいるときに自己がそれを観察して発火し、また自己がその場所にいるときにも同様の発火活動をするものであり、場所細胞における自己と他者のミラー性を示唆するものである。この種の細胞の共通場所受容野も、T字迷路上に普遍的に存在することが明らかになった。

4) 以上の結果を踏まえ、場所細胞の発火活動から自己の場所、他者の場所が再構築できるかを解析した。はじめに、ベイジアンアルゴリズムを用いて自己の場所を再構築したところ、平均15cm程度の誤差で自己の場所を再構築できることを確認した。次に、同一の場所細胞群の発火活動と解析手法を用いて他者の場所を再構築すると、平均20cmほどの誤差で効率よくデコーディングできることが明らかになった(図4)。この結果から、場所細胞の発火活動が、ポピュレーションレベルでも、自己の場所のみでなく他者の場所をも表象していることが明らかになった。



最後に、デコーディング解析を用いて、場所細胞による他者の場所の表象が、行動課題時における自己と他者の位置関係よりも正確に他者の場所を表象しているか、解析を行った。2種類の行動課題での発火活動を区別せずに自己、他者の場所をデコーディングすると、種類ごとにデコーディングした場合と比べて誤差は大きくなるが、他者の場所のデコーディングでは、自己と他者の位置関係から割り出した他者の場所よりも少ない誤差であり、こ

の結果から、場所細胞が他者の場所情報を能動的に表象していることが再確認された。

...

<国内外での成果の位置づけ>

電気生理学的手法による海馬の神経細胞の活動性に関する研究は、1978年にJohn O'Keefeらによって認識地図仮説が提唱されて以降、盛んに行われてきた。海馬のCA1、CA3領域の神経細胞には、ある特定の場所に対して特異的に発火するものがあり、場所細胞と命名された。嗅内皮質では頭位方向細胞やグリッド細胞が見出され、自己の場所認知は、これらの細胞の活動性から自己が向いている方向や移動スピードなどの情報を得て、自己の場所の変化を追跡することによって可能であると考えられてきた。一方で、認識地図はこれとは異なり、自己の存在場所とは無関係に、地図上の場所のように客観的に個々の場所を認識する方法であり、これによってランドマークの位置や、動き回る物体の場所の認識が可能と考えられる。しかしながら、客観的な場所が海馬内でどのように表象されるかはこれまで明らかにされておらず、今回初めて、場所細胞が主体の存在位置のみならず、他者(客体)の場所をも表象することが明らかになった。さらに様々な解析手法を駆使することにより、他者の場所表象は自己の場所表象と同様にシータ波位相前進などの性質を有しており、自己の場所表象とは独立に他者の場所を表象していることが明らかになった。この研究は、認識地図に基づいた位置情報の具体的な表象様式が明らかにされた点で意義があり、共通の細胞集団が主体の場所と客体の場所という複数次元の場所を表象するという事は想定されていなかったため、衝撃的であった。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

行動課題中の神経活動記録は、海馬CA1領域と前頭前野から行ったが、シリコンプローブを計画通りの位置に挿入することが容易ではなく、結果的に前頭前野から多くの活動を記録できた例はわずかであった。

神経種や神経回路特異的な活動記録には、遺伝子改変ラットの作成や、ウィルスベクターの感染が不可欠であり、より多くの個体を用いることが必要となるが、本研究では行動課題の学習が非常に長期にわたるため、多くの個体を用いることが困難であり、有意義なデータを得るには至らなかった。

<今後の課題、展望>

今回、多くの場所細胞の神経活動を同時に記録することにより、場所細胞アセンブリが自己の場所、他者の場所を同時に表象することが明らかになった。これは、1つの細胞集団が同時に2つの独立した事象を表象する好例であるが、その背後にある情報処理メカニズムや、個体の認知形成との因果関係は一切不明である。仮説的なメカニズムとして、行動課題のルールや他者に関する情報が他の脳部位から海馬に集約することによって、他者の場所が海馬で明確に表象されている可能性が考えられる。今後、情報伝達の流れを明らかにすることにより、以下の疑問に取り組みたい。

1. どのような神経回路を介して他者の場所情報が海馬に伝達されるのか?
2. 他者の場所情報の表象は、主体の行動選択に決定的に関わるか?
3. 他者の場所表象は、下流の神経回路にどのような影響を与えるか?

海馬の神経生理学研究はこれまで主に、何を表象するかを中心

に行われてきたが、光操作技術の発展に伴い研究の応用可能性が広がっており、上記のような疑問に対して、光操作技術や閉回路ループを用いた介入実験を行い、海馬と他の領域を結ぶ神経回路ダイナミクス、海馬内の情報処理機構、さらには認知の形成メカニズムの理解が深まることが期待される。

海馬のCA1領域は、CA3と嗅内皮質第3層から入力を受けており、CA3はより安定的に自己の場所を表象することが報告されている。従って、嗅内皮質が他者の情報に関わる可能性が高いと考えられるが、嗅内皮質が他の脳部位からどのような情報を受けているのかは不明点が多く残っており、これを解析し認知行動における海馬の神経回路網の全貌を明らかにしたい。

Noradrenergic regulation of fear and extinction learning

研究代表者：Joshua Johansen

RIKEN Center for Brain Science

<研究の目的と進め方>

Our goals for this project were to understand how neuromodulatory systems control the balance between emotional responding and flexible behavior. Specifically, we were interested in how noradrenaline from the brainstem locus coeruleus controlled the balance between fear learning and the reduction of fear responses through extinction learning.

<研究計画>

Specific Aim 1: We aimed to examine whether distinct populations of LC-NA neurons serve specific functions for behavior. Based on our preliminary data we hypothesize that different populations of LC noradrenaline neurons will project to the amygdala and mPFC. Furthermore, we predict that the amygdala projecting neurons will be important in learning to fear and that mPFC projecting neurons will participate in behavioral flexibility and fear extinction.

Specific Aim 2: Using advanced viral based anatomical approaches we focused on determining the global efferent and afferent connectivity of amygdala and mPFC projecting LC-NA neurons. We hypothesize that each cell population receives afferent input from partially distinct brain regions. Furthermore we predict that these cells will project to distinct regions to control the unique functional roles they serve, but have a broad, partially overlapping efferent connectivity profile to allow for differential, context specific regulation of behavior.

Specific Aim 3: We wanted to use in-vivo physiology and optogenetic identification of single neurons to determine whether these different LC cell populations encode information differentially during fear and extinction learning. We hypothesize that amygdala projecting LC neurons will respond to aversive shocks during fear learning. In contrast, we predict that during fear extinction learning, auditory CS-evoked responses will increase specifically in the mPFC projecting cell populations.

<得られた研究成果>

In work related to this grant we discovered how the locus coeruleus noradrenaline system controls the balance between aversive emotional responding and behavioral flexibility. Noradrenaline supply to the forebrain arises from a small collection of neurons in the brainstem locus coeruleus (LC), but

it is unclear how this small population of cells coordinates these opposing functions. Using a comprehensive technical approach we found that distinct populations of LC-noradrenaline neurons innervate the amygdala and medial prefrontal cortex (mPFC) (Fig.1). Amygdala projecting cells facilitate emotional fear learning, while mPFC projecting cells extinguished aversive emotional responses to promote flexible behaviors. LC neurons exhibited context dependent response properties, with moderate discrete activation of specific cell populations by fear or safety cues and strong, global recruitment by strong aversive stimuli. This was reflected in the activation patterns of projection defined cells as amygdala projecting LC neurons were more strongly activated during high fear states while mPFC projecting cells were preferentially engaged during extinction of fear responses. These results reveal a modular organization in the LC-noradrenaline system in which context dependent activation modes are coordinated with anatomically and functionally defined cell populations allowing for the adaptive tuning of emotional responding and behavioral flexibility. This work was published in the journal Nature Neuroscience in 2017.

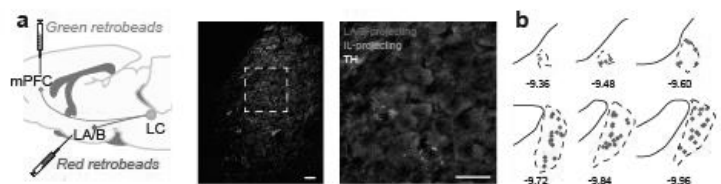


Fig. 1: Distinct populations of LC noradrenaline neurons project to mPFC and amygdala (LA/B). **(a)** schematic showing retrograde tracer injections right, coronal section showing mPFC projecting (green) and amygdala projecting (red) cells in LC, right. **(b)** reconstruction of intermixed mPFC and amygdala cell organization in LC

Related to neuromodulatory control of extinction learning we also published a paper in the journal Nature Communications in 2018 on the role of the dopamine system in fear extinction learning. During fear extinction, the omission of an expected aversive event produces a switch from fear responding to normal behavior. We found that the dopamine system which signals reward is necessary during this shock omission period

for fear extinction learning through a specific projection to the medial shell region of the nucleus accumbens.

<国内外での成果の位置づけ>

The noradrenaline findings have generated a great deal of excitement as they show for the first time that this important neuromodulatory system does not operate homogeneously, but can modulate distinct behavioral functions through specific efferent connectivity with other brain structures. Both the noradrenaline and dopamine systems are potential targets for the treatment of anxiety and mood disorders and the findings that specific cells can reduce or enhance emotional responding has direct clinical importance in the development of drug or viral therapies for these conditions.

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Developing tools to manipulate and trace the anatomical connectivity of specific cell populations was challenging. Also, viral expression of transgenes in the locus coeruleus noradrenaline neurons was surprisingly difficult and we had to experiment with different viral serotypes and promoters to optimize this.

<今後の課題、展望>

Because of the heterogeneity of the cells in the locus coeruleus that we found related to specific clinical features of psychiatric disorders it will be important in future work to identify specific genetic markers for these cells and to determine how stress and anxiety disorder models change the connectivity and gene transcription of these subnetworks.. Furthermore, understanding how the the amygdala and mPFC projecting LC neurons are differentially controlled and how distinct coding modes arise through the afferent connectivity of these cell populations is critical to understand.

記憶形成、固定、想起における海馬背側 CA1 セルアセンブリの長期可視化

研究代表者：林 康紀

京都大学大学院医学研究科

共同研究者：佐藤正晃、水田光太郎、タンビル・イスラム、河野真子、竹川高志、ダニエル・ゴメツ=ドミンゲツ、山川 宏、大倉正道、深井朋樹、中井淳一

<研究の目的と進め方>

空間記憶は、空間探索行動、例えば採餌、帰巢、危険回避といった行動に必須である。特に海馬には、動物が空間の特定の部分にいる時のみ発火する「場所細胞」と呼ばれる神経細胞があることが知られ、他者中心的認知地図を提供することで、空間認知の過程に重要な役割を果たすと考えられている。これらの場所細胞が空間記憶を担っているかは議論あるところではあるが、いくつかの証拠からこの考えが支持されている。その1つに、場所細胞の発火が、数分から数日さらには数週間に及ぶ時間尺度で文脈や過去の経験に従って動的な変化を示すという知見がある。動物の周囲の環境は海馬認知地図では均一にコードされているわけではなく、報酬、危険、あるいは空間を区切る壁や壁の縁が存在する場所など、何らかの注意を引く顕著な特徴がある場所に多数の場所細胞が観察される。この事実は、認知地図内で、場所細胞の密度は空間の顕著性によって強く影響される。言い換えれば、場所細胞の数の増加が顕著性の存在をコードすることを意味している。これをここでは「顕著性マップ」と名付ける。空間記憶や文脈記憶だけでなく、空間上のランドマークを指標に特定の標的に向かう行動においても、そのような顕著性マップは重要な役割があると考えられる。顕著性マップが存在により、標的やランドマークに近づく、神経細胞の活動は高まる一方、遠ざかるにつれ活動性が下がることから、標的やランドマークへの距離や方向の指標として機能すると考えられる。

場所細胞は、新しい環境に最初に曝露されてから数分以内に形成されることが知られている一方、顕著性マップがどのように確立され、さらに経験によって更新されるのかについては、これまでほとんど知られていない。殊に、神経細胞集団の経時的計測に基づいたその形成過程に関する考察は乏しい。我々は、顕著性マップの形成に関しては、少なくとも3つの異なった、相互に排他的ではないスキームがあると考えた。第1のモデルでは、場所細胞は、空間認知地図の形成初期から、標的やランドマークなどの特徴がある場所を優先的にコードする（以下、「直接形成モデル」と呼ぶ）（図1A）。このモデルでは場所細胞の形成確率が顕著な特徴がある場所より高いと仮定する。第2のモデルでは、場所細胞は、最初はすべての場所ですべてに形成されるが、その後、顕著な特徴がない場所をコードする場所細胞が次第に顕著な特徴がある場所に移動することで特徴がある部位に対する場所細胞が増加する（「側方移動モデル」図1B）。このモデルでは場所細胞の形成確率はすべての場所にわたって一様であるが、特徴がない場所をコードする場所細胞が、特徴がある場所をコードするようになる確率が、特徴がない場所をコードし続ける確率よりも高いと仮定する。第三に、すべての場所細胞の場所特異性がターンオーバーするが、顕著な特徴がある場所をコードする場所細胞は、そうでない場所を

コードする場所細胞よりも安定している。その結果、顕著な特徴がある場所をコードする場所細胞が累積される（「選択的安定化モデル」図1C）。

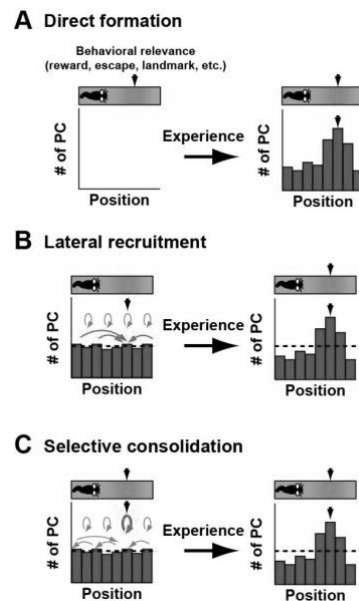


図1. 顕著性マップ形成の3様式

本研究計画では、海馬における顕著性マップの形成過程を解明するため、我々は仮想現実空間中行動動物の海馬のCA1領域内における約1000個の錐体細胞集団の神経活動を単一神経細胞レベルでイメージングを行い、海馬認知地図の形成とその変化を経時的に観察した。仮想空間中は、線形の走行路とし、その中に報酬と視覚的ランドマークを異なる場所に配置した。このシステムを用い、海馬のCA1領域内における錐体細胞の神経活動および解剖学的位置を数日間にわたって追跡することが可能になり、場所細胞のコーディングを経時的に調べた。

<研究計画>

- 1) G-CaMP7トランスジェニックマウス系統におけるCA1深層錐体細胞の観察

Thy-1プロモーターを用い、マウスにカルシウム感受性蛋白質G-CaMP7を発現させた。頭蓋骨と大脳皮質の一部を取り除き背側海馬を露出し、光学窓を設けた。マウスが回復後、二光子顕微鏡に頭部を固定し、海馬神経活動パターンを観察した(図2)。マウスを下から空気圧で浮上させた発泡スチロールの球上に保持し、その歩行をモニタし、仮想現実空間と同期させた。仮想現実空間は、3つの異なった壁のパターンと緑のゲートがあり、特定の

場所に到達する度に、報酬（水）を与えた(図3)。そこを超えると再び新しいラップが始まるが、マウスの視点からは終わりが無い空間がいつまでも続いているように見える。これを1セッション15分の間繰り返し、一日2回、15セッションまで記録した。

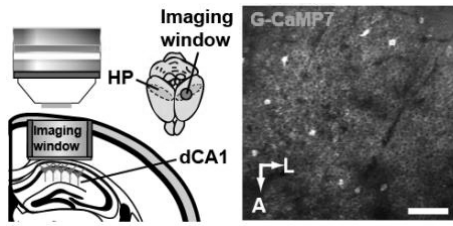


図2. 行動動物の背側海馬からのカルシウム反応観察

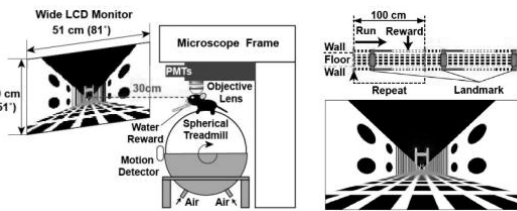


図3. 仮想現実空間でのマウス行動観察

2) Non-negative matrix factorizationによる画像の自動解析

約1000個の神経細胞が記録されるので、カルシウム反応を検出するために画像にROIを描いていくことは非現実的である。そこで、non-negative matrix factorizationによる自動解析を行った。抽出されたCa²⁺反応から、活動電位を推測し解析に用いた(図4)。異なった日の記録は、撮像時に血管パターンを1日目の画像と比較することで、場所を合わせることで、さらに検出されたROIの空間分布を自動的にマッチングすることで、同じ細胞を検出するプログラムを作成した。

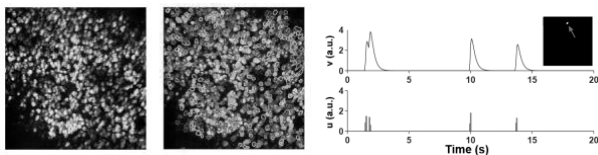


図4. カルシウム反応の自動検出とスパイクの推定 元画像(左)、自動的に検出されたROI(中)、カルシウム反応(右上)、推定された発火を示す(右下)

<得られた研究成果>

1) Thy-1 G-CaMP7動物の作成

カルシウム蛍光タンパク質 G-CaMP7 を Thy-1 プロモーターで発現するトランスジェニックマウスを作成した。複数のラインを得て、海馬で G-CaMP7 を高発現するラインを選択した。海馬での G-CaMP7 を発現を詳細に解析するため、錐体細胞浅層に発現するカルビンディン、抑制性神経細胞に発現するグルタミン酸脱炭酸酵素との二重染色をした(図5)。その結果、G-CaMP7 はこれらのマーカータンパク質とはとは共発現せず、CA1 錐体細胞のうち、深層細胞に特異的に高発現していた。

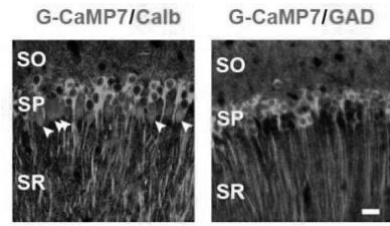


図5. Thy-1 G-CaMP7動物におけるG-CaMP7の発現 浅層CA1錐体細胞特異的のマーカーであるカルビンディン(マゼンタ、左)、GABA抑制性神経細胞特異的のマーカーであるグルタミン酸脱炭酸酵素との二重染色。

2) 顕著性マップの形成

この動物を仮想現実空間上の走行路で行動させ、海馬 CA1 深層錐体細胞のカルシウム反応を記録した。発火が観察された動物のトラック上の位置と重ね合わせたところ、特定の場所で再現性よく発火する細胞が検出された(図6)。これはこれまで電気生理学的に観察されてきた場所細胞を検出しているものと考えられた。発火するすべての細胞に対して検出される場所細胞の率はセッションを重ねるごとに増加した(図7左)。

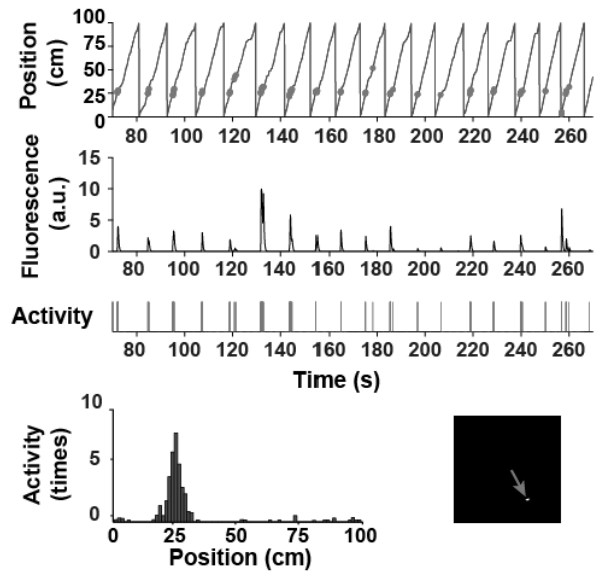


図6. 場所細胞の例 上から、動物個体の位置(青線)と発火場所(赤印)、カルシウム反応(黒線)、推定された発火位置(赤線)、発火した位置の分布、検出された細胞の位置。

これらの場所細胞がどこで発火するかを検したところ、視覚ランドマークである緑のゲート(25 cm)および報酬場所(75 cm)で特に増加が認められ(図7右)、このタスク下、顕著性マップが形成されていることが確認された。これらの場所細胞をここでは特にゲート細胞、並びに報酬細胞と称する。ゲート細胞は、ゲートの存在位置丁度にピークが存在したが、報酬細胞の分布は報酬が出る位置から約10 cm程度ピーク位置が走行方向側にずれた。これは、ゲートがゲートの手前から見えているのに対し、報酬の位置は印されていないため、報酬が出る手がかりとなっていることが示唆される。

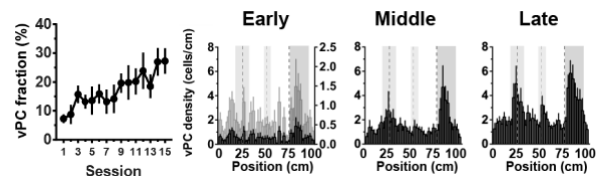


図7. ゲート細胞と報酬細胞 左: 場所細胞の数の増加 右: 場所細胞のうち、ゲート(緑)と報酬(赤)の場所に場所選択性を持つものを特にゲート細胞、報酬細胞とする。初期(session

1-5)、中期 (session 6-10)、後期 (session 11-15) を示す。

3) 顕著性マップ形成機構

本タスクで確認された顕著性マップが、図1で示された3つのモデルのうちどれで形成されるかを次に検討した。その目的のため、2つの連続したセッション間で、個々の場所細胞の場所選択性を比較した。その結果、初期、後期のセッションでもゲート及び報酬の部位では共通した場所細胞が多く観察される一方、それ以外の領域では安定した細胞は少ないことが観察された(図8)。これを確認するため、あるセッションで、ゲート細胞あるいは報酬細胞とされた細胞が、次のセッションでどのように分布するかを検討した。その結果、一旦ゲート細胞あるいは報酬細胞として検出されると、安定してその性質を保つことが判った(図9)。一方、その他の場所に選択性を持つ場所細胞は安定性が低かった。このことから、ゲートや報酬に対する場所細胞は選択的に安定性が高いことが次第に増加していくことに繋がり、最終的には顕著性マップの形成に結びつくことが考えられた。すなわち、「選択的安定化モデル」が顕著性マップの形成を最も説明できることが判った。

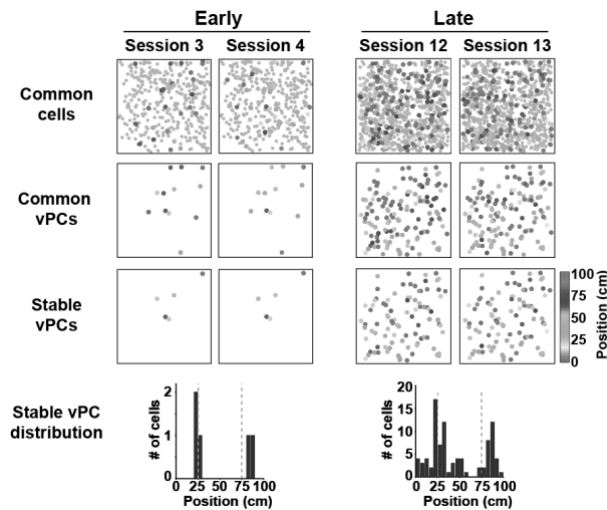


図8. 安定した場所細胞はゲートと報酬部位で観察されやすい

連続したセッション間で、安定した場所細胞がどこで検出されるかについてプロットすると、ゲート並びに報酬場所で検出された。上から、初期のセッションと後期のセッションで共通して検出された細胞 (Common cells)、共通して検出された場所細胞 (Common virtual place cells)、そのうち場所選択性が共通な場所細胞 (Stable virtual place cells) のマップを示す。その分布をヒストグラムとして示す。

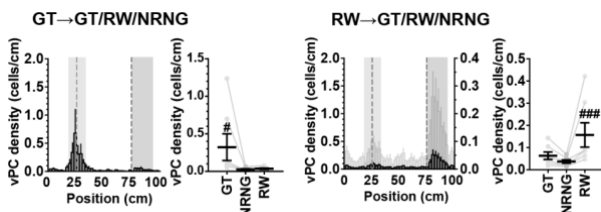


図9. ゲート細胞と報酬細胞は安定して発火することで数が増加する

ゲート細胞並びに報酬細胞が次のセッションでどこで発火するかを検出したところ、それらの細胞は次のセッションでもゲート細胞あるいは報酬細胞として検出された。

<国内外での成果の位置づけ>

特定の顕著性がある場所に対して場所細胞が増えることは知られていたが、それがどのように形成されるかは判っていなかった。これはこれまでの電気生理学的手法では長期的に場所細胞を観察することが出来なかったためである。本研究ではイメージングを用いることで、実質上際限がない長期的な海馬CA1錐体細胞活動の検出を可能とした。場所細胞が数時間から数日の単位で次第にリマップすることは他の研究でも知られていたが、本研究では、その安定性が局所的な顕著性に調整されることが顕著性マップの形成に大きな役割を果たしていることを明らかにしたのはじめてのものである。

<今後の課題、展望>

今後は、顕著性がいかに場所細胞の安定性を調節しているかについての研究を行っていく。海馬三シナプス回路の内、CA1細胞のコーディングはある程度のターンオーバーすることが知られている一方、より上流の歯状回の細胞はより安定なコーディングを示すことが知られている。そのため、顕著性は歯状回からCA1領域への情報入力を何らかの形でゲートしている可能性が考えられる。この可能性について光遺伝学的アプローチを用いることで解析を進めていきたい。

<参考文献>

Sato M, Mizuta K, Islam T, Kawano M, Takekawa T, Gomez-Dominguez D, Kim K, Yamakawa H, Ohkura M, Fukai T, Nakai J, Hayashi Y (2018) Dynamic embedding of salience coding in hippocampal spatial maps. [bioRxiv:266767](https://doi.org/10.1101/266767)

霊長類の作業記憶を制御する神経回路と神経活動の解明

研究代表者：肥後 剛康

国立研究開発法人理化学研究所 脳科学総合研究センター (現 京都大学 医学研究科)

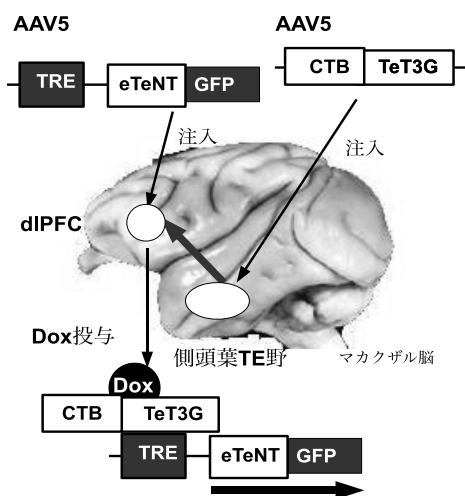
<研究の目的と進め方>

本研究の目的は、霊長類で発達した**作業記憶を制御する神経回路と神経活動の解明**である。作業記憶は、認知活動に必要な記憶情報の想起、保持、忘却をダイナミックに制御する過程であり、ヒトを含む**霊長類**で顕著に発達した**前頭前野**によって制御される。しかし、細胞や回路レベルでのメカニズムは不明な点が多く、その停滞要因として、霊長類神経回路操作技術の未開発が挙げられる。

申請者は、この問題解決のため、マカク属サル前頭前野の**神経回路を遮断**するためのタンパク質発現系を開発中である。本研究では、この技術の完成を第1の目標とする。次に、この発現系を作業記憶課題を訓練したサルへ導入し、電気生理学的、行動学的解析を駆使することで、作業記憶制御の神経回路と神経活動の同定に繋げる。加えて、領域内において有機的連携を行うことで、他のモデル生物との比較を行い、霊長類特異的もしくは生物普遍的な記憶制御メカニズムの解明に貢献する。

<研究計画>

まず、申請者開発中のタンパク質発現系の説明から始める。この系は、回路選択的かつ可逆的に標的タンパク質を発現させるアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた長期発現システムである。具体的には、本研究のメインターゲットである背外側前頭前野 (dIPFC)と側頭葉TE野にそれぞれ異なる発現ベクターを搭載した AAV を注入する。各 AAV には、TRE-eTeNT-GFP と CTB-TeT3G をそれぞれコードした発現ベクターがされている



神経回路選択的、可逆的に遺伝子発現する Tet-On システム最適化の条件検討の結果、AAV の血清 5 型(AAV5)を採用決定。

(TRE:TeT3G 応答配列、eTeNT: 改良型テタヌストキシン、GFP: 緑色蛍光タンパク質、CTB: コレラトキシン Bサブユニット、TeT3G: 最新型 Tet-On 活性化因子)。側頭葉 TE 野において CTB-TeT3G タンパク質が合成された後、dIPFC に逆行輸送される。その後 Dox が投与されると CTB-TeT3G が TRE に結合可能となり下流の eTeNT-GFP の発現が誘導される (左下図、AAV-CTB 法)。Dox 投与/非投与は繰返し可能である。

(計画 1) dIPFC と図形情報の記憶に特化した側頭葉 TE 野へ上記の発現系を導入するため、外科的 AAV 注入を行う。8 週後、Dox を 1 週間程度経口投与し、灌流固定を行う。摘出した大脳から凍結切片を作製し、免疫組織化学的手法によって、eTeNT-GFP 発現誘導の程度を評価する。同時に、側頭葉 TE 野から dIPFC へ逆行性輸送される CTB-TeT3G の検証も行う。同様の実験を、Dox 非投与のサルについてもを行い、AAV-CTB 法の有効性の評価を行う。

(計画 2) 上記の免疫組織化学的検証の後、実際に eTeNT-GFP の発現によって、dIPFC と側頭葉 TE 野間の情報伝達が遮断されたかを確認するため、電気生理学的検証へ移行する。計画 1 同様、外科的 AAV 注入を行い、Dox 投与直前に dIPFC に刺激電極を挿入する。その後、電気刺激によって神経情報を発生させ、側頭葉 TE に設置した微小記録電極において dIPFC から下降した神経活動を記録する。記録は、現時点で時空間解像度が最高である多層からの局所場電位(LFP)と単一細胞同時記録である。この実験を Dox 投与前後で行い比較検討することで、遮断が可逆的に行われているかを確認する。

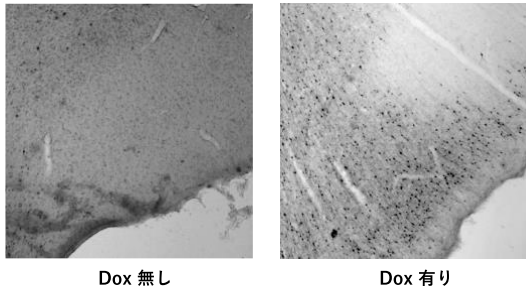
(計画 3) 8 種の形と色の図形を用いた作業記憶課題を訓練したサルに、この回路遮断技術を外科的導入後、dIPFC と側頭葉 TE に微小記録電極を設置し、課題遂行中に単一神経細胞活動及び複数ユニット活動、LFP の同時記録を行う。データ解析は、単一ニューロンの発火タイミングや LFP の周波数帯域の同期性に着目した時間周波数解析と PFC-TE 間における電極間の情報の流れに着目した因果関係推定解析を行う。

(計画 4) 電気生理実験に前後して行動実験を行い、正答率や反応時間を記録する。作業記憶の想起と保持の時間帯における神経活動と行動(想起と保持)成績との関連(例えば、高周波ガンマ波の同期が記憶保持に関連するなど)、更に dIPFC-側頭葉 TE 野の情報伝達阻害の影響を評価することで、神経回路と神経活動を同定する。

<得られた研究成果>

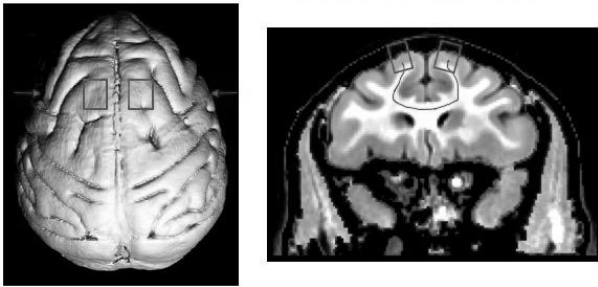
1) 免疫組織化学実験によって、dlPFCでのDox投与と依存的なeTeNT-GFP発現が確認できた(下図)。

前頭前野でのeTeNT-GFPの発現



次の電気生理学的実験では、dlPFCに刺激電極、TE野には記録電極を設置し、電気記録を試みた。しかし、AAV注入手術のTE皮質へのダメージが予想以上に大きく、安定的なECoG記録が困難であることが判明した。そこで、より大脳皮質への手術負担の少ないことが予想される両側運動前野(正確には、運動前野背側部F7)に標的を変更した(下図)。領野の大部分が脳表面に出ており手術が容易なことに加え、前頭前野の領野間投射に特徴的な分散的な特徴を持ち、強い交連投射を有するため、操作技術開発に最適な領野と判断した。

テスト系として左右の運動前野間の交連投射を使用



2) 今後の電気生理学、行動学的解析による成果を考えた場合、ある程度の高い遺伝子発現の実現が必須であると考え、F7における発現強度の最適化を試みた。これまでの研究より、高タイターAAVは、DoxによるeTeNT発現を高める一方、dox非投与下でのeTeNT発現(リーク発現)を誘導する傾向があることが知られている。そこで、リーク発現を抑えつつ、dox依存的な高発現を実現するタイター濃度の選定を同一個体内で試みた。右半球の前方の6ミリ四方に高タイター(1x10¹³ gc/ml)のTRE-eTeNTを、その後方の6ミリ四方に低タイター(1x10¹² gc/ml)のTRE-eTeNTを注入し、ふたつの注入部位に対照な領域を合わせた左半球の6ミリx12ミリの領域にCTB-Tet3Gを注入した(いずれも注入部位の間隔は1.2mm、注入の深さは表面から1.3mm)。2頭のサルで同じ注入を行い、1頭にはDoxを8日間投与して直後に灌流固定し、他の1頭ではDoxを投与せずに灌流固定した。

eTeNTに融合したGFPに対する免疫染色を行なった結果、低タイターでは、Dox誘導による発現レベルが低く、リーク発現が起らないことが分かった。一方、高タイターでは、Dox誘導の発現が高いが、リーク発現もある程度検出された。マカク属サルには遺伝的背景が同一の個体(近交系)が存在しないため、個体間のばらつきの可能性を考えると、詳細なタイター濃度の最適化は現実的ではないと判断した。

そこで、eTeNTの高発現とリーク抑制を同時に実現する改良版

AAV-CTB法の開発を試みた。具体的には、TRE-eTeNTの下流にサイレンサーを融合したウイルスベクターを考案した。サイレンサーはTet-Off活性化因子のVP16 activation domainをKRAB silencing domainで置き換えたものである。Dox非存在下では一度のリーク発現によって、TeNT-2A-Silencerが誘導され、2A切断により遊離したサイレンサーがTREに結合し遺伝子発現を抑制する(リークの抑制)。Dox存在下ではDoxがテトラサイクリンプレッサーに結合することでTREから遊離し抑制作用を失うが、そこへ拮抗する形でTeT3GがTREに結合しTeNTを誘導する。今回のTREは、Doxに高い感受性を示す第3世代TRE3Gを用いることで、全体の遺伝子発現量を高く維持することを企図している。

これまでと同様にCTB-TeT3GとTRE-eTeNTの組み合わせで注入し、TeT3Gに付与したHA、およびeTeNTに付与したFLAGに対する2重蛍光免疫染色を行なった。その結果、Dox非投与のサルではFLAG陽性細胞は検出されず、リーク発現の抑制に成功した。一方、Doxを投与したサルのTRE-eTeNT注入側では、FLAG陽性細胞が存在し、これらの大半はHA陽性でもあり、FLAG発現がHA依存的に誘導されることが示された。

他の方法(AAV-retro)との比較

マウスで強い逆行性感染能を持つAAV-retroの開発が論文報告されたため、我々のAAV-CTB法との優位性の比較検証を免疫組織化学的に行なった。結果、AAV-CTBが優位と考え、当面はAAV-CTBに集中することとした。

<国内外での成果の位置づけ>

霊長類高次脳機能の回路制御メカニズムの理解は、ヒトの理解のみならず、神経疾患の発症メカニズムの理解や臨床的応用へ繋がるため、一般社会への影響も大きい。しかし、領野の相互作用(神経投射)を直接操作する技術が未開発なため、研究は国際的に停滞している。本研究の成果である運動前野でのサイレンサーを用いたAAV-CTB法の開発は、国際的に停滞していた霊長類脳機能研究にブレークスルーをもたらし、神経科学分野の研究を特に回路や細胞レベルで発展させることが大いに期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初の目標の第1は、dlPFC-TE間の神経投射を遮断する技術の開発であったが、TE野へのAAV注入手術のダメージが予想外に大きく、安定かつ長期的な電気生理記録が困難であることが判明したため、標的神経投射の変更を余儀なくされた。変更したF7での条件検討に時間を要したため、第2の目的である作業記憶の回路同定研究へ進むことができなかった。

<今後の課題、展望>

現在、両側F7間でのeTeNTの投射特異的、可逆的、長期的発現を確認し、予備的ではあるが、両側F7間の情報伝達遮断をECoG記録により確認しており、大脳皮質神経回路の操作技術完成が間近である。完成後は、この発現系を作業記憶課題を訓練したサルへ導入し、電気生理学的、行動学的解析を駆使することで、作業記憶制御の神経回路と神経活動の同定に繋げたい。

また、特定の投射を遮断することで作製された高次脳機能障害サルは、神経疾患のモデルサルとして有用であり、疾患解明のための基礎研究推進の助けになると考えられる。予防や治療のための創薬研究や早期診断方開発などの臨床研究のための研究に資する重要なツールとなることが期待される。

神経活動の可塑性と記憶におけるレム睡眠の役割

研究代表者：水関 健司

大阪市立大学・大学院医学研究科

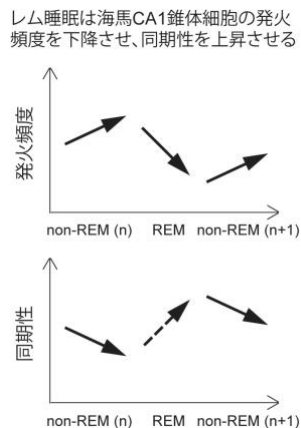
<研究の目的と進め方>

哺乳類動物の睡眠は、交互に訪れるレム睡眠とノンレム睡眠から成る。ノンレム睡眠が記憶の定着に必要なことを支持する研究は多い。一方で、レム睡眠の機能についてはほとんど分かっていない。

レム睡眠中、脳波は覚醒時とよく似ており、大脳皮質では比較的平坦な脳波が、海馬では5-10Hzのシータ波がみられる。大脳皮質・海馬ともに、ノンレム睡眠中と比較すると、覚醒時と同じくレム睡眠時の神経活動の同期性は低い(Mizuseki and Buzsaki, 2014)。しかし、レム睡眠と覚醒時の神経活動を詳しく調べると違いがあることもわかってきた。例えば、レム睡眠時と覚醒時では、海馬CA1錐体細胞がシータ波の反対の位相で発火する(Mizuseki et al., 2011)。さらに、レム睡眠時にはほぼ特異的に脳幹のアセチルコリン作動性神経が作るPGO波(げっ歯類ではP波と呼ばれる)が見られ(Callaway et al., 1987; Datta, 1997; Steriade et al., 1990)、おそらくレム睡眠の機能と関連していると予測されている。PGO波は脳橋(pons)で見られる100ミリ秒くらいの脳波上の揺れであり、レム睡眠のときには毎秒1~2回観察される。脳橋(pons)から外側膝状体(geniculate)、後頭葉(occipital cortex)に伝わるためPGO波と呼ばれるが、脳橋から他の大脳皮質や大脳辺縁系にも伝わっていく。

動物に学習課題を行わせると学習量が増えるにしたがってレム睡眠の割合が増えることや、レム睡眠を阻害すると記憶が低下することから、レム睡眠は記憶の固定に重要であると考えられている(Diekemann & Born, 2010; Rasch & Born, 2013; Stickgold et al., 2001)。レム睡眠が記憶に関与するメカニズムは全く不明であるが、レム睡眠はreverse learningに必要なものであるという仮説がある(Crick and Mitchison, 1983)。すなわち、「覚醒時に多くの情報が重複したパターンで蓄えられると脳が過負荷になり情報処理を阻害するので、不必要な情報を消す必要がある。レム睡眠中には外界と脳の相互作用が遮断され、外界からの刺激ではなく脳幹部から発生するPGO波によりランダムに神経の活動が活性化されることで不必要な情報が消されて情報処理能力を上げる」という仮説である。

一方、ノンレム睡眠はシナプスのホメオスタシスに重要であり、覚醒時に増強されたシナプスがノンレム睡眠中に減弱してホメオスタシスが保たれるという仮説がある(Tononi and Cirelli, 2006)。この仮説を支持する研究として、ラットの体性感覚野の発火頻度は覚醒時に上昇し、睡眠時に少しずつ減少することが報告されている(Vyazovskiy et al., 2009)。研究代表者らも、ラット海馬CA1の神経細胞の発火頻度はノンレム-レム-ノンレム睡眠のサイクルを繰り返すうち



に減少し、神経発火の同期性は上昇することを見出した(図, Grossmark et al., 2012)。しかし、個々のノンレム睡眠のエピソード中には発火頻度が上昇する一方で、レム睡眠中には発火頻度が下がる。そのため、レム睡眠の前後のノンレム睡眠を比較すると、神経発火の減少が見られる。発火同期性では全く逆の変化がみられる。さらに、ノンレム-レム-ノンレム睡眠のサイクルを繰り返すことによっておこる発火頻度の減少と同期性の上昇は、レム睡眠中のシータ波の振幅と正の相関がある。すなわち、レム睡眠は海馬CA1錐体細胞の発火頻度を下げ、同期性を上げるはたらきがあることが明らかとなった(図, Grossmark et al., 2012)。しかし、このレム睡眠の役割が海馬CA1に特異的なのか、他の記憶構造でも同じなのかは不明である。さらに、レム睡眠によって神経細胞の発火率が制御された結果として、情報コードや記憶がどのように変わるのかもよく分かっていない。また、PGO波はレム睡眠に特異的に見られる脳波であり、記憶に大切であると予想されるが、PGO波が記憶に関わるメカニズムは不明である。

そこで本研究では、レム睡眠が海馬以外の脳領域でも神経細胞の発火頻度の減少と同期性の上昇を引き起こすかを調べる。さらに、レム睡眠による発火頻度や同期性の変化と記憶や情報処理の関係を明らかにすることで、神経活動の可塑性と記憶におけるレム睡眠の役割を解明することを目指す。加えて、PGO波と神経細胞発火のタイミングの相関と、発火頻度の変化や場所細胞の安定性・可塑性などに相関があるかどうかを調べる。さらに光遺伝学的に脳幹のアセチルコリン作動性神経の活動を操作してPGO波・レム睡眠の量を制御して、レム睡眠と記憶の関係、特にPGO波と記憶の相関について調べ、PGO派がどのように神経活動の可塑性と記憶を制御するのかを明らかにすることを目標とした。

<研究計画>

1) ラットが場所課題を行なっている時に海馬CA1野から研究代表者が大規模記録を行なったデータを解析し、レム睡眠によって海馬CA1野の神経細胞の活動相関性や情報表現がどのように変化するかを調べる。特に、錐体細胞の場所の表現がどのようにレム睡眠によって変化するかに着目して調べる。さらに、レム睡眠によって神経細胞間の活動の相関が下がり、情報のコーディングがよりスパースになることで情報処理能力が上昇するという仮説を海馬の場所細胞で検証する。Reverse learning仮説によると、それほど重要でない情報が選択的にレム睡眠中に消去されるはずである。そこで覚醒時に重要なイベントによって発火した細胞と重要でないイベントによって発火した神経細胞の発火頻度や同期性がレム睡眠中にどのように変化するかを調べる。

2) 海馬と非常に関連が深い記憶構造でレム睡眠が発火頻度や発火同期性などの可塑性に対してどのような役割があるのかを明らかにする。この目的のためにまず、解剖学的に海馬体の出力層にあたる海馬台と呼ばれる領域の投射神経細胞に対して、レム睡眠による発火頻度や同期性の調節が投射先依存的である可能性を調べる。そのために、自由行動中の動物に大規模電気生理学と

光遺伝学的手法を組み合わせることで、記録している海馬台の投射神経細胞を投射先により分類する手法を確立する。この方法を用いて、場所記憶課題中とその前後の睡眠の記録をとり、それぞれの脳領域へ投射している海馬台の神経細胞が行動中にどのような場所情報や記憶情報を表現し、その活動性がレム睡眠によってどのように制御されているかを網羅的に調べる。

3) 海馬以外の記憶構造でレム睡眠が発火頻度や発火同期性などの可塑性に対してどのような役割があるのかを明らかにする。恐怖記憶の形成と消去には、扁桃体、腹側海馬、前頭前野など複数の領域が関わることを示唆されている。そこで、多脳領域同時・大規模電気生理学計測を使って、扁桃体、腹側海馬、前頭前野からそれぞれ約100個の神経細胞の活動を恐怖記憶の形成前から消去後まで、記憶定着に必要な睡眠まで含めて連続して記録する。恐怖記憶の形成・固定・消去の過程で、腹側海馬・前頭前野・扁桃体の各領域において、レム睡眠による個々の神経細胞の発火頻度や同期性の調節がどのように記憶と関わっているのかを調べる。

<得られた研究成果>

1) レム睡眠の前後で、海馬の場所細胞どうしの相関関数に変化すること、その相関関数の変化とそれぞれの場所細胞の発火頻度との間にも相関があること、相関関数の変化と場所細胞の場所野の安定性にも相関があることを見出した。

2) 解剖学的に海馬体の出力層にあたる海馬台と呼ばれる領域の投射神経細胞に対して、レム睡眠による発火頻度や同期性の調節が投射先依存性である可能性を調べるため、自由行動中の動物に大規模電気生理学と光遺伝学的手法を組み合わせることで、記録している海馬台の投射神経細胞を投射先により分類する手法を確立した(図)。この方法を用いて、場所記憶課題中とその前後の睡眠の記録をとり、それぞれの脳領域へ投射している海馬台の神経細胞が行動中にどのような場所情報や記憶情報を表現し、その活動性がレム睡眠によってどのように制御されているかを網羅的に調べる系を立ち上げた。

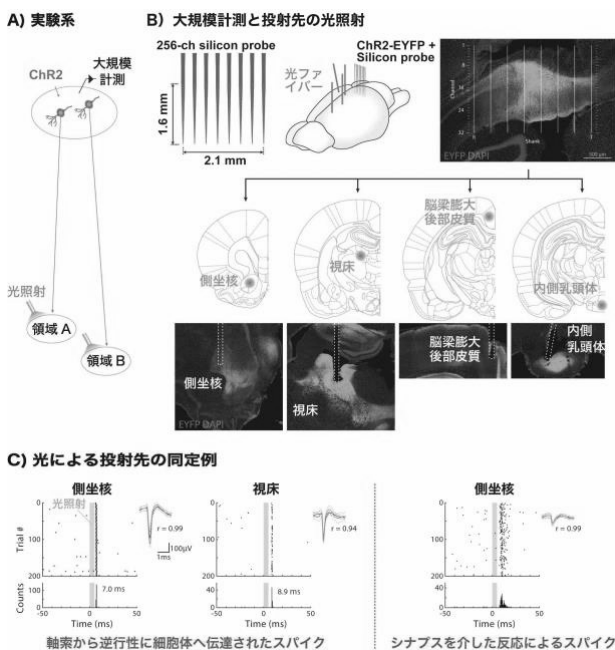


図 (A) 海馬台にチャンネルロドプシンと多点電極を挿入し、投射先

の脳領域に光ファイバーを挿入する。(B)チャンネルロドプシン(緑色)と256点からなる電極を海馬台に導入し、4か所の投射先領域には光ファイバーを挿入した。(C)光ファイバーを介した光照射により逆行性のスパイクを検出することを指標として海馬台細胞の投射先を同定する。左側は光照射により短い潜時(7.0 msと8.9 ms)と短いジッター(1 ms)で逆行性に細胞体に伝搬した活動電位を検出することで、海馬台から側坐核と視床に直接投射している投射細胞を検出できた例。一方、右はジッターが大きく(>10 ms)、軸索で生じた活動電位が直接海馬台へ伝搬されたのではなく、シナプスを介して海馬台の神経細胞の発火が引き起こされたことがわかる。

3) 記憶の形成・固定・想起・消去の過程で、腹側海馬・前頭前野・扁桃体の各領域において、個々の神経細胞の行動中における情報表現とレム睡眠による活動性の相関を調べる系を立ち上げた。この研究のためには多点電極シリコンプローブを使って脳の3箇所から同時記録することが必要であるため、3Dプリンタなどを用いてシリコンプローブを高密度に装着する方法を確立した。レム睡眠の後に行われる記憶の固定のテストや記憶消去の固定のテストなどの結果と、レム睡眠による発火頻度や同期性の変化との相関を調べることで、レム睡眠による発火頻度や同期性の調節がどのように記憶と関わっているのかを直接的に判定できる系を立ち上げた。

<国内外での成果の位置づけ>

レム睡眠は記憶に重要であると考えられているが、レム睡眠が記憶に関与するメカニズムは全く不明である。本研究でレム睡眠によって海馬の神経細胞の活動相関性や情報表現がどのように変化するかを調べたことは、レム睡眠の記憶に関するメカニズムの理解に繋がることを期待される。さらに、本研究の成果として、海馬の出力層に当たる海馬台の投射細胞の投射先を同定した上で大規模記録する技術は、今後、レム睡眠による発火頻度や同期性の調節が投射先依存性である可能性を調べることを可能にし、レム睡眠の役割を明らかにする基盤となりうる。本研究の成果として、記憶の形成・固定・想起・消去の過程で、腹側海馬・前頭前野・扁桃体の各領域において、個々の神経細胞の行動中における情報表現とレム睡眠による活動性の相関を調べる系を立ち上げることができた。今後、海馬以外の脳領域でのレム睡眠による発火頻度や同期性の調節、記憶への関与を調べる基盤ができた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究を軌道に乗せるまでに時間がかかりすぎたことが最大の予想外の困難であり、誤算であった。研究代表者は2015年4月に米国から帰国した。帰国した時点では、研究資金・研究備品ともに皆無の状態であり、全くゼロから研究室を立ち上げた。本公募研究に応募した時点(2015年11月)では、2016年度の7月ごろには研究に必要な主な設備備品等の購入を全て終えて研究室のセットアップは完了し、本研究を全速力で推進することが可能であると研究代表者は予想していた。しかし現実には、基本的な設備備品を購入するための資金集めに予想以上の時間がかかった。大変ありがたいことに、複数の民間財団から助成金をいただくことができ、研究室を立ち上げるための最低限の資金を帰国から1年半ほどでようやく集めることができた。次の問題は、高額の研究備品を購入する際に所属機関内での手続きに研究代表者の予想よりもはるかに時間がかかってしまったことである。さらには私の実力不足により、一緒に研究を推進する大学院生・学部生のリクルートに予想以上に時間がかかってしまった。以上3点の困難を引き起こした最大の理由は、適

応能力の低い研究代表者が海外で 11 年間研究を行なった後に帰国したため、新しい環境に適応するまでに時間がかかりすぎてしまったことである。

以上の困難のため、計画をしていたが達成できなかったことが 2 点ある。Reverse learning 仮説では PGO 波が不必要な情報を消すのに重要であると提唱されているが、詳細は不明である。そこで第一に、PGO 波を電気生理学的に記録しながら海馬の神経細胞から記録をとり、レム睡眠の時に PGO 波と高い相関を持って発火した細胞では、発火頻度が低くなる、場所野が消える、場所野の安定性が下がるなどの現象が起こり、情報が消去されるのか調べる予定であった。第二に、光遺伝学的に脳橋のアセチルコリン作動性神経の活動を操作して PGO 波のイベントを人為的に増減させることによって、レム睡眠時におこる PGO 波が神経活動の可塑性や記憶に対してどのような役割があるかを調べる予定であった。すなわち光遺伝学的手法を用いて PGO 波を操作し、発火頻度や細胞同士の発火の相関性がどのように変化するかを調べ、さらに PGO 波を操作し、記憶に対する影響を場所課題行動実験により調べる計画を立てていた。

以上の 2 点は達成できなかったが、〈得られた研究成果〉の 2) に述べたように、大規模同時記録と光遺伝学を融合させた技術を本研究で立ち上げることができたので、この技術を使って上記の達成できなかった点についても今後実行していきたいと考えている。

<今後の課題、展望>

レム睡眠の前後で、海馬の場所細胞どうしの相関関数に変化すること、その相関関数の変化とそれぞれの場所細胞の発火頻度との間にも相関があること、相関関数の変化と場所細胞の場所野の安定性にも相関があることを見出した。今後は、レム睡眠の前後におけるそれらの変化と、ノンレム睡眠中の脳活動との相関を調べることにより、睡眠によってどのように神経細胞の活動相関や情報表現が変化するかをさらに詳細に明らかにしていきたい。

さらに、本研究の成果である光遺伝学と大規模記録を融合させた技術をさらに発展させて、今後は光遺伝学的に脳橋のアセチルコリン作動性神経の活動を操作して PGO 波のイベントを人為的に増減させることによって、レム睡眠時におこる PGO 波が神経活動の可塑性や記憶に対してどのような役割があるかを調べる。脳幹部に薬剤 (carbachol) を注入し PGO 波のイベント数を制御した実験は報告されているが (Datta, 2004; Datta et al., 2013)、薬剤投与では時間解像度・空間解像度ともに悪くレム睡眠の時のみ PGO 波を変化させることは難しいため、記憶に対するレム睡眠中の PGO 波の機能を見ることは手技的に困難であった。しかし近年、光遺伝学的に脳橋のアセチルコリン作動性神経を活動させると PGO 波が増え、レム睡眠も増えることがわかってきた (Van Dort et al., 2015)。大規模同時記録と光遺伝学を融合させた技術を本研究で立ち上げることができたので、この技術を使って脳橋のアセチルコリン作動性神経の活動を操作して PGO 波のイベントを人為的に増減させることによって、レム睡眠時におこる PGO 波が神経活動の可塑性や記憶に対してどのような役割があるかを調べたいと考えている。

