

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640008

研究課題名(和文) 学習時を境として時間的両方向性に記憶痕跡細胞の活性と変遷を追う新規技術の構築

研究課題名(英文) Establishment of a new technique for time lapse imaging of activity pattern of engram cells from pre- to post-learning phase

研究代表者

大川 宜昭(OHKAWA, Noriaki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・講師

研究者番号：80416651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、学習時と学習前・後の神経細胞活動の経時的観察と、学習後に活動依存的な遺伝子発現を示し記憶を獲得した細胞(記憶痕跡細胞)の同定を、同一個体内で両立できる新規技術の構築を目的とした。

。内視鏡用GRINレンズの慢性設置による超小型蛍光顕微鏡での海馬神経細胞の蛍光イメージング法を確立し、遺伝子改変マウスにおいて、～400個の神経細胞のCa²⁺動態を指標とした活動様式の観察と、蛍光タンパク質を発現誘導した記憶痕跡細胞の同定を自由行動下で両立することに成功した。

この独自技術は、記憶痕跡細胞に特有の学習前・学習時・学習後の活動様式の特性や変化を、それ以外の細胞と比較検討することを可能にする。

研究成果の概要(英文)：To identify rules for expression of engram, we proposed to establish a new technique to observe activity pattern of engram cells from pre- to post-learning phase.

We installed a GRIN lens on hippocampal CA1, and a miniature microscope detected fluorescence signals in the CA1 through the GRIN lens. Then we applied the microscopy on transgenic mice in which hippocampal neurons express G-CaMP and engram cells express a fluorescence protein, KikGR. The G-CaMP is a calcium indicator and shows fluorescence when neural activity induces calcium influx into the CA1 neurons. We have succeeded to observe both of engram cells expressing the KikGR and activity-mediated G-CaMP fluorescence of ~400 neurons from freely moving mice with the miniature microscope.

The new technique will allow to investigate comparisons of activity pattern between engram cells and others during memory processing.

研究分野：分子細胞神経科学

キーワード：Ca²⁺イメージング 学習 記憶 記憶痕跡細胞 神経活動 遺伝子発現 レンチウイルス

1. 研究開始当初の背景

記憶は、学習イベント時の感覚入力に応答し活性化することで新規遺伝子発現を誘導した神経細胞群にコードされることが実証され(図1)、世界的に見て一部の研究室では、

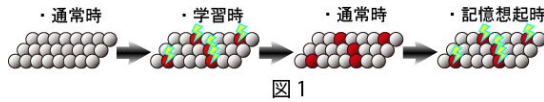


図1

光遺伝学と融合することで“記憶の操作”をすることも可能になってきている。我々も、2つの異なる情報をコードする記憶痕跡細胞群の光遺伝学による人為的同期活性化によって、これらの情報が連合した新たな人工記憶の誘導に成功している(雑誌論文)。一方で、全神経細胞中の一部の細胞群だけがどのようなルールや感覚入力のパターンにตอบสนองし記憶をコードするのか? また、記憶がどのような機構で固定化され長期的に維持される状態になるのか? という根本的な疑問が残されたままである。

記憶はまた、人為的に興奮性を上昇させた一部の神経細胞群に優先的に割り付けられるとともに、神経細胞群でのイベント体験時に出現するシーケンスを持った活動がイベント前の休息・睡眠時に事前にプリプレイという形で出現することが報告されてきているが、生理的な記憶の割り付け(記憶のアロケーション)のルールやプリプレイの記憶獲得に対する意義は未だに明らかになっていない。それどころか、プリプレイの存在は未だ賛否の議論がなされている段階である。

さらに、神経細胞群における学習イベント時の活動シーケンスが、学習後の休息・睡眠時に再出現するリプレイも報告されている。学習直後のREM睡眠やNon-REM睡眠中での異なる様式のリプレイが報告され、最近では、REM睡眠やNon-REM睡眠のかく乱が記憶の固定化を阻害することも示されてきている。しかし、リプレイと記憶の固定化との直接的な関連性は全く不明なままである。このような状況は、学習時を境に学習前から学習後まで一連の時間の流れの中で記憶痕跡細胞とそれ以外の細胞を区別して記憶痕跡細胞特有の活動パターンを検討する技術が確立されておらず、検証が不可能であったことが原因であった。

2. 研究の目的

上記の技術的障壁を越え、記憶痕跡細胞特有の活動パターンを検討可能にすることが新たな記憶研究へのブレイクスルーに繋がると考え、本課題では、学習中や学習前・後の活動パターンと学習後の記憶痕跡マーカー遺伝子の発現を、~数百個単位の海馬神経細胞から経時的イメージングにより同一個体内で観察できる新規技術を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本課題では、空間情報の記憶に関わる海馬

細胞群の個々の活動パターンの観察と記憶獲得を担った記憶痕跡細胞の同定を両立できる新規技術の確立を試みた。

c-fos 遺伝子プロモーターは、神経活動依存的に遺伝子発現を誘導する。tTA は、ドキシサイクリン非存在下(OFF Dox)でTRE配列依存的に遺伝子発現を誘導する転写活性化因子である。これらを組み合わせた

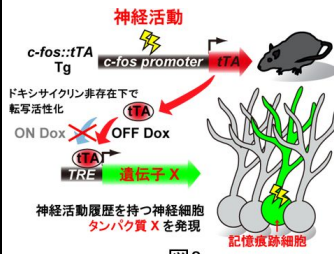


図2

c-fos-tTA トランスジェニックマウスでは、記憶成立時にTRE配列下流に組み込んだ遺伝子の発現を誘導できる(図2)。このシステムで標的

化された細胞が記憶痕跡であることが海馬CA1でも示されており、空間情報の学習でCA1に出現した記憶痕跡細胞に蛍光タンパク質を発現させることで自由行動下でのマウス脳内の記憶痕跡細胞を同定できる。

また、G-CaMPは、GFPの構造の間にカルモジュリンのCa²⁺結合領域の構造を挟み込んだ蛍光タンパク質であり、Ca²⁺濃度に応じカルモジュリン領域の構造が変化することで蛍光強度が変化するCa²⁺指示タンパク質である。

上記、c-fos-tTA トランスジェニックマウスとG-CaMPを海馬の神経細胞に発現するトランスジェニックマウスを交配し、

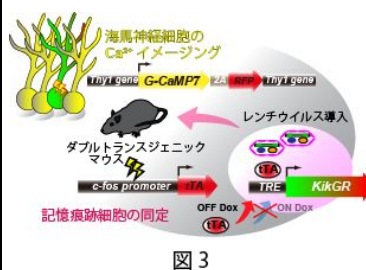


図3

c-fos-tTA x Thy1-G-CaMP7 ダブルトランスジェニックマウスを作出し、TRE-KikGR トランスジェニック遺伝子

導入法で海馬へ導入した(図3)。KikGRは、サンゴの蛍光タンパク質で紫(外)光(360-410 nm)の照射によって、緑色(B励起)から赤色(G励起)へ蛍光特性を変化させる。このマウスに、新規空間曝露による空間学習を行わせ、その間の神経細胞の活動をG-CaMPの蛍光で、また、記憶痕跡細胞をKikGRの蛍光でそれぞれ観察できるシステムの確立を試みた。

4. 研究成果

海馬の神経細胞レベルの解像度での蛍光観察には、超小型蛍光顕微鏡nVistaを導入した。nVistaは、~2グラムの超小型蛍光顕微鏡で、LED光源、CMOSイメージセンサー、B励起に対応する蛍光フィルターセットが統合されており、G-CaMPとKikGR両方の緑蛍光の検出が可能である。脳の神経細胞にG-CaMP7を発現するThy1-G-CaMP7マウスは、理研BSI・林康紀博士らより供与を受け、内視鏡としてGRINレンズをCA1を標的として

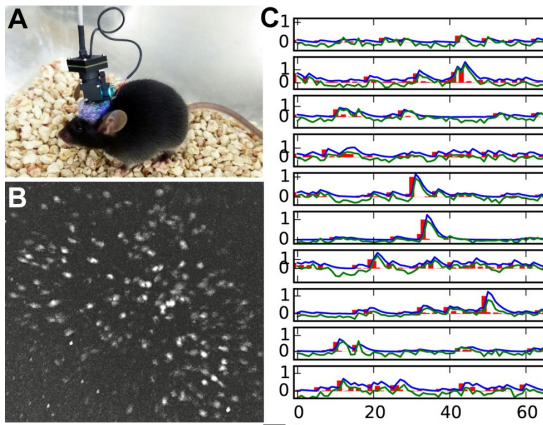


図4

慢性設置し、焦点をCA1神経細胞層に合わせnVistaを設置することにより、自由行動下で海馬CA1から~400個の神経細胞由来のCa²⁺動態を観察できるようになった(図4A・nVistaを設置したG-CaMP7マウス; 図4B・30秒間の自由行動マウスのCA1で観察された全てのCa²⁺イベントの重ね合わせ像=Ca²⁺イベントを起こした全細胞)とともに、個々の細胞のCa²⁺イベントの数値化も可能となった(図4C, 13秒間の自由行動下マウスCA1の10個の細胞内でのCa²⁺イベント、縦軸: G-CaMP7 蛍光の変化率, 横軸: 秒)

続いて、c-fos-tTAマウスに、TRE-KikGRトランスジーンをレンチウイルス遺伝子導入法で海馬へ導入しGRINレンズを留置した後、新規空間曝露による空間情報を含む文脈学習を行わせた。我々は、CA1から、学習時に活性化した記憶痕跡細胞群でのKikGRの緑蛍光をnVistaで同定するとともに、KikGR緑蛍光を365nm光のGRINレンズからの照射でnVistaの検出範囲外の赤蛍光に変えることにも成功した。これにより、同定後の記憶痕

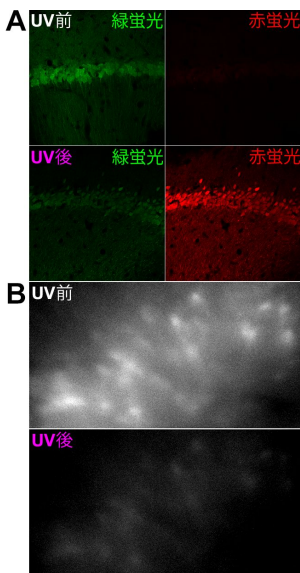


図5

KikGRの観察とUVによる消光の例)

上記のように、我々はnVistaを介して、自由行動下G-CaMPマウスのCA1神経細胞の活動パターン観察と、c-fos-tTAマウスのCA1

跡細胞群でのKikGRに邪魔されることがなく、その後の次の学習時や記憶想起時にG-CaMPの緑蛍光によってCa²⁺イメージングを再開できることが保証された(図5A, CA1錐体細胞に発現したKikGRを365nm光(UV)によって蛍光特性を変えた例; 図5B, nVistaで撮影した記憶痕跡に発現した

に出現した記憶痕跡細胞の同定に成功した。さらに我々は、現在までに、TRE-KikGRトランスジーンをレンチウイルス遺伝子導入法で海馬へ導入したc-fos-tTA x Thy1-G-CaMP7ダブルトランスジェニックマウスを出し、同じ個体のCA1から学習時のCa²⁺イメージングとその後出現するKikGRの観察にも成功した。これは、本研究計画で当初目的とした、記憶研究へのブレイクスルーに繋がるような、学習中や学習前・後の活動パターンと学習後の記憶痕跡マーカー遺伝子の発現を、~数百個単位の海馬神経細胞から経時的イメージングにより同一個体内で観察できる新規技術を確立ができたことを意味する。現在、このシステムで継続的に記憶痕跡細胞に特有の学習時の活動パターンの抽出を行っている(図6, 学習前のKikGR観察, 学習時のCa²⁺イメージング, 学習後のKikGR観察, で同定した細胞とそれ以外の細胞の学習時での活動様式を比較する)。

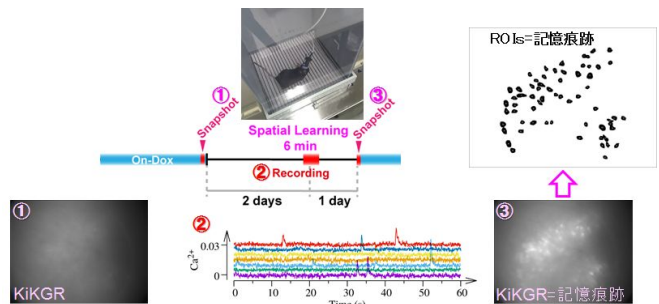


図6

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

*Nihonmatsu I., *Ohkawa N., Saitoh Y., Inokuchi K.

Targeting of ribosomal protein S6 to dendritic spines by in vivo high frequency stimulation to induce long-term potentiation in the dentate gyrus.

*Equally contributed

Biology Open, Vol. 4, pp1387-1394 (2015). DOI: 10.1242/bio.013243

査読有

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., Inokuchi K.

Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory.

Cell Reports, Vol. 11, pp261-269 (2015). DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.017

査読有

〔学会発表〕(計4件)

Ohkawa N., Inokuchi K. et al.,
Artificial association of pre-stored
information in hippocampus and amygdala.
第38回日本神経科学大会, 2015. 7. 28-31,
神戸.

Ohkawa N., Inokuchi K. et al.,
Artificial association of information
residing in hippocampus and amygdala.
Neuroscience 2014, Annual Meeting of
Society for Neuroscience, 2014. 11. 19,
Washington, D.C., USA.

Ohkawa N., Inokuchi K. et al.,
Artificial association of information
residing in hippocampus and amygdala.
13th Annual MCCS meeting in Washington,
D.C., 2014. 11. 13, Washington, D.C., USA.

大川 宜昭, 井ノ口 馨 他,
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. 9.
11-13, 横浜.

〔図書〕(計4件)

佐野良威、大川 宜昭、鈴木章円、井ノ口
馨
記憶痕跡とメモリアロケーション
医学書院、**生体の科学**・特集：記憶ふたたび、
Vol. 67, No. 1, pp22-26 (2016).

大川 宜昭、井ノ口 馨
オプトジェネティクスによる記憶の操作
羊土社、**実験医学** 2015年12月号・特集：オ
プトジェネティクス・細胞・組織・個体を光
で操作する, Vol.33, No.19, pp3065-3069
(2015).

大川 宜昭、浦川 将
記憶のダイナミクスとそのメカニズム
メジカルビュー社、**リハビリテーションのた
めのニューロサイエンス** 脳科学からみる
機能回復, pp89-104 (2015).

鈴木章円、大川 宜昭、野本 真順、井ノ
口 馨
記憶痕跡
脳科学辞典, DOI : 10.14931/bsd.3737,
(2014).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)生化学講座ホームページ
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/bmb/index-j.html>

プレスリリース・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(雑誌論文)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150403/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大川 宜昭(OHKAWA, Noriaki)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
講師
研究者番号：80416651

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

井ノ口 馨(INOKUCHI, Kaoru)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授
研究者番号：20318827