

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14314

研究課題名（和文）記憶を担う神経アンサンブルの領域間相互作用の解析

研究課題名（英文）Analyses of neuronal ensemble interactions

研究代表者

松尾 直毅（Matsuo, Naoki）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10508956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：代表者らが以前に開発した遺伝子改変マウスのシステムを活用することにより、学習時に活動した神経細胞集団に選択的なチャンネルロドプシン（ChR2）もしくはhM3Dq型のDesigner Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD)の発現を誘導できるトランスジェニックマウスの作製を行った。これらのマウスを用いて、一部の脳領域の活性化による、他領域の記憶痕跡細胞の活動の観察・解析を行った。

研究成果の概要（英文）：By taking advantage of a transgenic system that we have previously developed, we generated transgenic mice expressing ChR2 or hM3Dq DREADD specifically in neurons that were activated during learning. By utilizing the transgenic mice, we artificially reactivated engram cells in the hippocampus and then examined the reactivation of engram cells in different brain areas.

研究分野：分子神経科学

キーワード：記憶 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

記憶情報は協調的に活動する一部の神経アンサンブル間の機能的ネットワークとして存在すると想像されているが (cell assembly 仮説) その実証は極めて困難で、それに付随した基本的な疑問も数多く残されている。その最大の要因のひとつは、これらの機能的細胞集団 (アンサンブル) が脳内でまばらに存在していると考えられるため、それを同定し、さらには選択的に操作を加えることが極めて困難であることにある。そこで、この問題を克服するために、研究代表者らは immediate-early genes のひとつである *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た独自の遺伝子改変マウスを開発することにより、世界に先駆けて単一シナプス・単一細胞レベルでの記憶痕跡の可視化という先駆的な研究に挑戦し、成果を挙げてきた (*Science* 2007, 2008, 2012)。

一方で、研究代表者らが開発したマウスを利用することにより、MIT の利根川らは、恐怖条件付け課題時に活動した海馬歯状回の一部の細胞集団を再活動させると恐怖記憶が想起されることを示した (*Nature* 2012)。この重要な結果は“なぜ一部の脳領域の一部の細胞集団を再活動させるだけで、記憶全体が呼び起こされるのか?”という素朴な疑問を新たに提起する。そこで本研究課題では、独自の遺伝子改変マウスと特定の神経アンサンブル活動操作法を組み合わせることにより、この問題に取り組むことにした。

### 2. 研究の目的

複数の脳領域にまたがる神経アンサンブル同士の機能的連携・相互作用の存在を明らかにすることにより、一部の脳領域の一部の細胞集団を人為的に再活動させるだけで、なぜ記憶全体が呼び起こされるのか?”という素朴な疑問に答える。このような相互・連携作用の存在を示すことができれば、個々の記憶情報の脳内表現とその発現の仕組みの理解のための更なる研究の重要な糸口となることが期待できる。

### 3. 研究の方法

海馬の記憶痕跡細胞の再活動により記憶が人為的に想起される最適条件を確立する。研究課題の実現可能性を高めるために、光活動操作と DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) というメカニズムの異なる 2 種類の神経活動操作のシステムを併用する。

本研究では主に文脈依存的恐怖条件付け (contextual fear conditioning) を学習課題として用いる。この課題ではまず動物を条件付け箱に入れ数分間の自由探索を行わせる。その後、条件付け箱の床に弱い電気ショックを与えると、動物は電気ショックという嫌な怖い出来事と、それが生じた箱内の環

境・文脈とを関連づけた連合学習を行う。課題終了の翌日や 1 ヶ月後に動物を再び同じ環境・文脈の箱に入れると、電気ショックが無くとも freezing (すくみ反応) などの恐怖反応を示すことから、文脈依存的恐怖記憶が形成・保持・想起されていることを容易に観測できる。

#### (1) *cfos-tTA x tet0-ChR2* マウスを用いたアプローチ

ChR2 (チャネルロドプシン) は、特定波長の光により活性化して陽イオンを透過し、発現神経細胞の脱分極を引き起こす膜タンパク質である。マウスの作製を行うと同時に、学習時に活動した海馬の各領域の記憶痕跡細胞に対する光照射により記憶想起を効率的に誘導できる最適条件の検討 (脳定位装置による正確な照射位置、ドキシサイクリン濃度と除去期間、光照射装置による適切な光の強さ・周波数など) を行うことにより、系を確立する。

#### (2) *cfos-tTA x tet0-hM3Dq DREADD* マウスを用いたアプローチ

DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) は変異型の G タンパク質共役型受容体で、内在性のリガンドでは活性化せず特定の合成リガンドにより活性化する。Gq 型の DREADD は hM3Dq と呼ばれ、特異的合成リガンド (clozapine-N-oxide; CNO) が結合した時のみ活性化し、発現神経細胞の脱分極を引き起こす (Alexander et al., *Neuron* 2009)。そこで、*cfos-tTA x tet0-hM3Dq* ダブル Tg マウスを用いて、学習時に活動した細胞集団に選択的な hM3Dq の発現誘導を行い、CNO を脳内の任意の領域に注入することにより、限定した脳領域の機能的細胞集団を人為的に活性化することが可能である。CNO の海馬内局所投与により記憶想起を誘導できる最適条件の検討 (脳定位装置による正確な投与位置、CNO の至適濃度、ドキシサイクリン濃度と除去期間など) を行うことにより、系を確立する。

*cfos-tTA x tet0-ChR2* および *cfos-tTA x tet0-hM3Dq* マウスを用いて、Dox 投与中止期間中に恐怖条件付け学習課題を行うことにより、学習刺激により活動した神経細胞集団に選択的な ChR2 もしくは hM3Dq の誘導発現を行う。学習課題終了後には再び Dox 投与を続行することによって、課題終了後の神経活動による ChR2 や hM3Dq の新規合成を抑制する。24 時間後に、本来ならば恐怖記憶を想起しない箱、つまり条件付け学習を行ったのとは全く異なる環境・文脈に入れて、海馬の一領域に対して光照射 (hM3Dq の場合は CNO 注入) を行い、人為的な恐怖記憶の想起 (freezing) を誘導する。

90 分後に脳を取り出し、c-Fos、ZIF268、

Arc などの IEG の免疫組織化学染色により活動脳部位の発現解析を全脳に対して行う。連合学習を行わなかった対照群のマウスの脳と比較して IEG の発現が上昇している脳領域の同定を行う。行動実験終了後には個体ごとにカニューレの挿入部位を正確に同定し、海馬の歯状回、CA3、CA1、海馬台のサブ領域ごとに、表出行動との相関の解析を行う。得られた結果より、脳内の一部の刺激部位(海馬)から活動神経ネットワークが広がる様子、脳領域間の機能的ネットワーク連携・相互作用を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) cfos-tTA x tet0-ChR2 マウスを用いたアプローチ

tet0 プロモーターの制御下で ChR2-EYFP を発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。C57Bl/6J 受精卵への核インジェクションを行い、4 系統のファウンダーマウスを得た。各系統マウスと cfos-tTA トランスジェニックマウスの交配によるダブルトランスジェニックマウスの作製を行い、その発現解析を行った。しかし非常に残念ながら、全く発現が誘導されない、極々限られた脳領域にのみ発現が誘導、ドキシサイクリン投与により発現が抑制されないなどポジショナル効果のため、研究目的に利用できるマウスを得ることはできなかった。そこで、他研究者より供与頂いた tet0-ChR2(C128S)-EYFP マウスとのダブルトランスジェニックマウスも作製し、発現解析を行ったが、高濃度ドキシサイクリン投与でさえも発現が抑制されないことが明らかとなり、利用を断念した。

##### (2) cfos-tTA x tet0-hM3Dq DREADD マウスを用いたアプローチ

cfos-tTA x tet0-hM3Dq ダブル Tg マウスの作製を行い、恐怖条件付け学習時に活動した神経アンサンプルに hM3Dq の発現誘導を行い、CNO の腹腔投与による活動痕跡細胞の人為的活性化を行った。その結果、記憶想起の指標となるすくみ反応 (freezing) が誘導されることを明らかにした (Yoshii, Hosokawa & Matsuo, *Neuropharmacology* 2017)。また、海馬や大脳新皮質領域への CNO の局所投与を行い、行動解析を行った。その後、hM3Dq 発現細胞を HA タグに対する免疫組織化学染色により同定し、同一切片上で c-Fos もしくは ZIF に対する免疫組織化学染色を同時に行った。共焦点顕微鏡による観察の結果、両陽性細胞を海馬、大脳新皮質、扁桃体などにおいて確認し、その割合の計測を行った。対照群でも同様の解析を行った。詳細は引き続き、解析中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計5件)

Kitanishi T, Matsuo N. Organization of the claustrum-to-entorhinal cortical connection in mice. *J. Neurosci.* 37, 269-280 (2017) 査読有り  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1360-16.2017

Yoshii T, Hosokawa H, Matsuo N\*. Pharmacogenetic reactivation of the original engram evokes an extinguished fear memory. *Neuropharmacology* 113, 1-9 (2017) 査読有り  
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.09.012

Yokoyama M, Matsuo N\*. Loss of ensemble segregation in dentate gyrus, but not in somatosensory cortex, during contextual fear memory generalization. *Front. Behav. Neurosci.* 10: 218 (2016) 査読有り  
DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00218

Hattori T, Osakada T, Matsumoto A, Matsuo N, Haga-Yamanaka S, Nishida T, Mori Y, Mogi K, Touhara K, Kikusui T. Self-exposure to the male pheromone ESP1 enhances male aggressiveness in mice. *Current Biology* 26, 1229-1234 (2016) 査読有り  
DOI: 10.1016/j.cub.2016.03.029

松尾直毅、恐怖記憶の弁別と汎化に伴う海馬歯状回神経アンサンプル活動、日本薬理学雑誌 148, 185-189 (2016)  
DOI: 10.1254/fpj.148.185

#### [学会発表](計15件)

松尾直毅、Observation and Manipulation of Memory Engram、第94回日本生理学会大会 シンポジウム、平成29年3月28日、浜松市

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、平成29年2月9日、草津市

Naoki Matsuo, Visualization and manipulation of memory engram、NIPS International Workshop 「Towards elucidation of memory engram」、平成28年12月5日、岡崎市

Naoki Matsuo, Visualization and manipulation of memory engram、The 47th NIPS International Symposium

「Decoding Synapses」, 平成28年10月26日、岡崎市

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、平成28年9月10日、吹田市

松尾直毅、恐怖記憶の汎化に伴う活動神経アンサンプルの変化、第5回大阪大学神経難病フォーラム、平成28年8月20日、吹田市

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、平成28年6月16日、岡崎市

Naoki Matsuo, Genetic Manipulation of Memory Engram、遺伝研研究会「Circuit construction in the mammalian brain」, 平成27年12月6日、三島市

Naoki Matsuo, Visualization of Memory Dynamism in Mice、Memory Dynamism International Symposium、平成27年11月6日、京都市

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、平成27年9月30日、吹田市

松尾直毅、記憶の汎化に伴う活動神経アンサンプルの変化、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、平成27年9月26日、江戸川区

Naoki Matsuo, Genetic Manipulation of Memory Engram、第58回日本神経化学会大会 シンポジウム、平成27年9月13日、さいたま市

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、平成27年9月4日、豊中市

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、平成27年7月25日、吹田市

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」, 記憶の脳内表現の可視化と操作、平成27年6月24日、豊中市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.mbn.med.osaka-u.ac.jp/mbn/Home.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
松尾 直毅 (MATSUO, Naoki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10508956

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )