

令和元年6月11日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04653

研究課題名(和文) 記憶痕跡細胞の出現・選択原理の解明

研究課題名(英文) Identification of rule for expression and selection of engram cells

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、記憶を符号化している記憶痕跡細胞が、新奇空間学習時に複数のサブ・アンサンブルを構成し、それぞれが時間的にずれた活動によって個別の記憶構成成分の情報を符号化しながら、エピソード記憶の全体像を表現していることを見出した。そして記憶痕跡サブ・アンサンブルの約4割が、睡眠中に自発的に再活動するとともに、記憶の想起時に再び優先的に活動していることを明らかにした。この結果は、エピソード体験の記憶の全体像は、複数のサブ・アンサンブル活動の協奏的な脳内での表出によって形作られていること、そして、睡眠中のサブ・アンサンブル活動の再現によって、記憶を脳内に定着させていることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日々の生活で経験するエピソードの記憶について、脳内の神経細胞がどのような様式で集団で活動し記憶情報を符号化しているのかを明らかにしたとともに、経験に応じて形成された記憶が睡眠中に定着する様子を観察し明らかにした。これらの知見は、記憶の科学的かつ本質的な理解に貢献するものであり、脳内に表出した情報の解読法の提案や、効率の良い記憶学習法、認知症などの記憶障害の早期診断法への応用につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The brain stores and recalls memories through a set of neurons, termed engram cells. We established a unique imaging system that combines Ca<sup>2+</sup> imaging and engram identification to extract the characteristics of engram activity by visualizing and discriminating between engram and non-engram cells. Here, we show that engram cells detected in the hippocampus display higher repetitive activity than non-engram cells during novel context learning. The total activity pattern of the engram cells during learning is stable across post-learning memory processing. Within a single engram population, we detected several sub-ensembles composed of neurons collectively activated during learning. Some sub-ensembles preferentially reappear during post-learning sleep, and these replayed sub-ensembles are more likely to be reactivated during retrieval. These results indicate that sub-ensembles represent distinct pieces of information, which are then orchestrated to constitute an entire memory.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 エピソード 学習 記憶痕跡 カルシウムイメージング 海馬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

記憶は学習時の感覚入力にตอบสนองし活性化した神経細胞群にコードされることが明らかとなった。これらの細胞は記憶痕跡細胞と呼ばれる。記憶痕跡細胞は、学習時の神経活動依存的に誘導する遺伝子発現機構を利用し同定されたが、なぜ海馬内の全細胞中の一部の細胞群だけが学習依存的な遺伝子発現を誘導し記憶痕跡となるのか、そしてどのように記憶が記憶痕跡細胞に定着するのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本課題では、我々が構築した個々の神経細胞の活動と、記憶痕跡形成に必要な学習後の遺伝子発現を同一個体内で共に観察できる新規技術を用いて、新奇空間学習時や学習後の記憶痕跡細胞に特有の活動様式を抽出することによって、新奇エピソード記憶に対応する記憶痕跡細胞の出現と記憶の定着の原理を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

神経細胞活動の観察に適した  $Ca^{2+}$  イメージングを行うため、 $Ca^{2+}$  指示タンパク質である G-CaMP7 を海馬で発現する Thy1-G-CaMP7 マウスと、記憶痕跡細胞群の標的化で有用性が確立されている c-fos-tTA マウスを繁殖させることで、Thy1-G-CaMP7 x c-fos-tTA ダブルトランスジェニックマウスを作出した。このダブルトランスジェニックマウスでは、G-CaMP が海馬神経細胞に恒常的に発現していることから個々の神経細胞活動の  $Ca^{2+}$  イメージングが可能であるとともに、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することで、学習で出現した記憶痕跡細胞群の KikGR の蛍光標識による同定が可能である。このマウスの海馬を標的として GRIN レンズを設置し、海馬内の蛍光を超小型蛍光顕微鏡 nVista で検鏡することにより自由行動下のマウス海馬内の  $Ca^{2+}$  イメージングと記憶痕跡細胞の同定を両立できるシステムを確立した。このシステムを用いて、学習時、学習後休息時、そして想起時の  $Ca^{2+}$  イメー

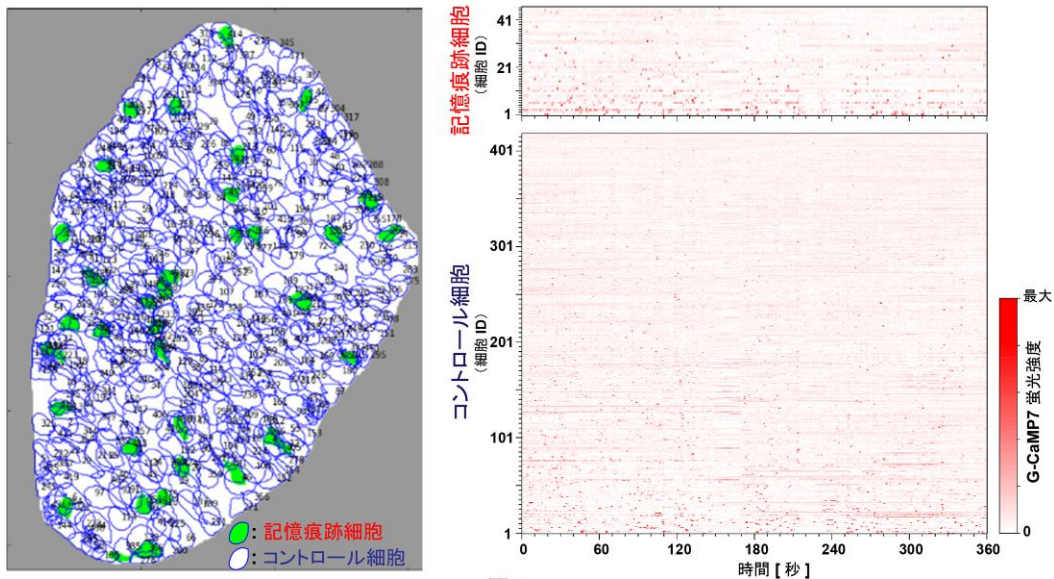


図 1

ジングと記憶痕跡細胞同定のデータから、記憶痕跡細胞とそれ以外のコントロール細胞に分けて数百個の神経細胞の活動を海馬から取得することに成功し (図 1) 記憶痕跡となる細胞群に特有の神経活動パターンの抽出を試みた。

### 4. 研究成果

上述のように取得したデータを取得して、相関行列解析 (Correlation Matrix Analysis) を用いた解析によって、新奇空間学習時の記憶痕跡細胞群の集団活動の特徴をコントロール細胞群のものと比較し抽出することにした。相関行列解析は、基準にしたタイミングの集団活

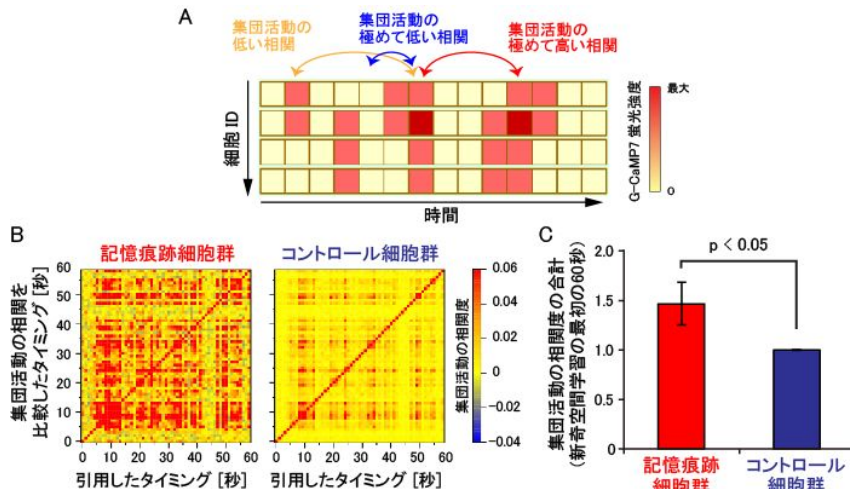


図 2

動とそれ以外のタイミングの集団活動パターンの類似性を比較検討する解析である (図 2A)。

この解析の結果、コントロール細胞群と比べて記憶痕跡細胞群では、新奇空間学習中に類似した集団活動を頻繁に繰り返していることが明らかとなった (図 2B・C)。

次に、エピソード記憶処理過程の一連のセッションでの集団活動を検討することを目的として、エピソード経験中 (セッション ①) その後の NREM (セッション ②) と REM (セッション ③) 睡眠時、同じ空間への再暴露による記憶想起時 (セッション ④) そして全く新しい空間への曝露時 (セッション ⑤) の、一連のセッションで覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠の判定のための脳波及び筋電図の取得とともに  $Ca^{2+}$  イメージングによるデータ収集を行った (図 3)。

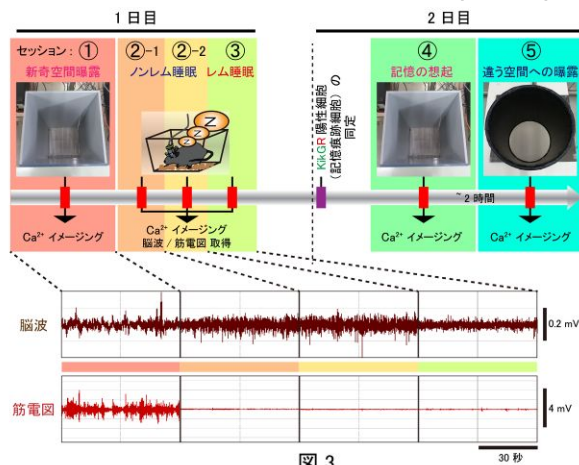


図 3

同期して活動する神経細胞群が、同じ情報の符号化に寄与していることが予測されており、この様式による情報の符号化は“アンサンプル・コーディング”と呼ばれる。また上記の相関行列解析の結果から、記憶痕跡細胞集団では、類似の集団活動、つまり同期活動を繰り返す傾向が明らかとなった。このことから、記憶痕跡細胞集団がアンサンプル・コーディングの様式によって記憶情報を符号化していることが想像された。そこで続いて、同期活動で構成されるアンサンプルの抽出を目的として、非負値行列因子分解 (NMF) 解析を試みた。NMF 解析は、ある 1 つの行列を、2 つの小さな行列に分解する解析であり、本研究では、複数の細胞が縦軸 (列) に、それぞれの細胞の神経活動の値が時間によって横軸 (行) に並んでいる元の行列データから、複数のサブ・アンサンプル (亜集団) とこれらのサブ・アンサンプルが作る同期活動の強度を抽出に利用した。この解析の結果、記憶痕跡とコントロール細胞群ともに、多数のサブ・アンサンプル活動が各セッション中に多数出現することが分かった。そして、各サブ・アンサンプルに注目すると、例えば、同じ個体で同じセッション で出現した記憶痕跡細胞で構成される個々のサブ・アンサンプル間では、その細胞構成と同期活動のタイミングはばらばらなことが明らかとなった。つまり、1 つの個体内で新奇空間学習中に出現する記憶痕跡細胞で構築されるサブ・アンサンプルであっても、それぞれが異なる情報を符号化していることが示唆された。

最後に、セッション ① で出現したそれぞれのサブ・アンサンプルが NREM 睡眠時 (セッション ②) から記憶想起時 (セッション ④) まで連続して類似のサブ・アンサンプルを持つかを調べた。すると、記憶痕跡サブ・アンサンプルの約 40% が一貫して再活動していることが明らかとなった (図 4A)。しかしこれらの一貫して再活動したサブ・アンサンプル活動も、同じ実験室に設置したにもかかわらず違う空間への曝露 (セッション ⑤) によってその半分は消失した (図 4B)。一方、セッション ① で出現したコントロール細胞のサブ・アンサンプルの約 80% はその

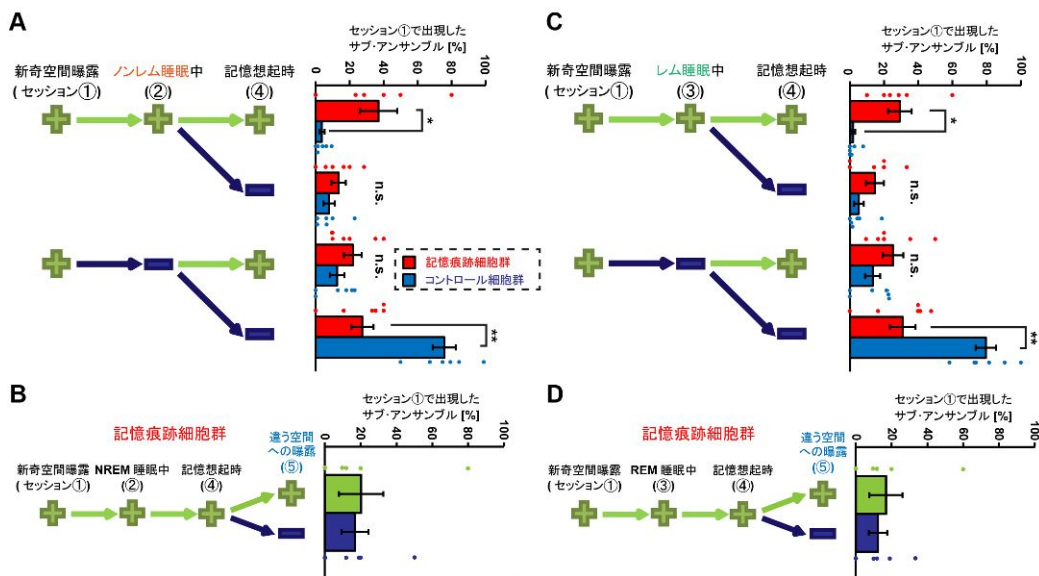


図 4

後一切再活動しないことが明らかとなった (図 4A)。同様の結果は、REM 睡眠 (セッション ③) からセッション ④ や ⑤ までの解析でも確認された (図 4C・D)。

以上の結果から、記憶痕跡細胞は新奇空間学習時に複数のサブ・アンサンプルを構成し、それぞれが時間的にずれた活動によって個別の記憶構成成分の情報を符号化しながら、エピソード記憶の全体像を表現していることが明らかとなった。そして記憶痕跡サブ・アンサンプルの約 4 割が、睡眠中に自発的に再活動するとともに、記憶の想起時に再び優先的に活動している

という結果が得られた(図5)。この結果は、エピソード体験の記憶の全体像は、複数のサブ・アンサンブル活動の協奏的な脳内での表出によって形作られていること、そして、睡眠中のサブ・アンサンブル活動の再現によって、記憶を脳内に定着させていることを強く示唆している。

本研究成果では、日々の生活で経験するエピソードの記憶

について、脳内の神経細胞がどのような様式で集団で活動し記憶情報を符号化しているのかを明らかにしたとともに、経験に応じて形成された記憶が睡眠中に定着する様子を観察し明らかにした。これらの知見は、記憶の科学的かつ本質的な理解に貢献するものであり、脳内に表出した情報の解釈法の提案や、効率の良い記憶学習法、認知症などの記憶障害の早期診断法への応用につながる事が期待される。

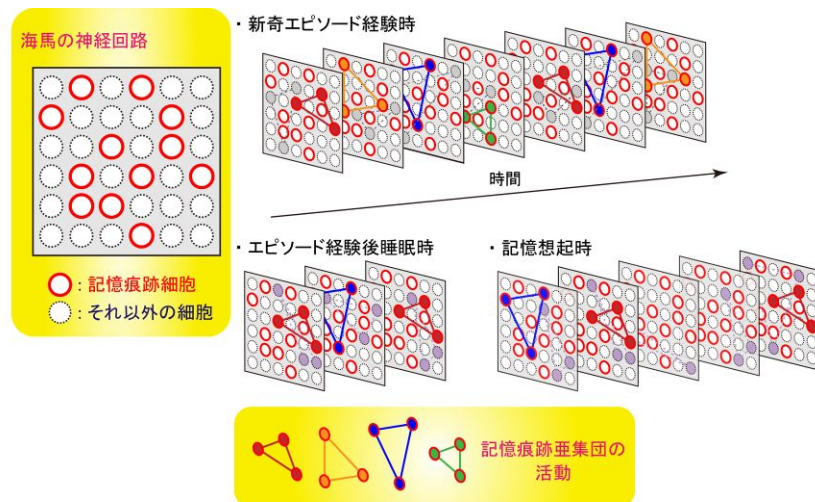


図5

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Ghandour K. #, **Ohkawa N.** #,\*, Fung C. C. A. #, Asai H., Saitoh Y., Takekawa T., Okubo-Suzuki R., Soya S., Nishizono H., Matsuo M., Sato M., Ohkura M., Nakai J., Hayashi Y., Sakurai T., Osanai M., Kitamura T., Fukai T., Inokuchi K.\*

Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.

# Equally contributed

\* Co-corresponding authors

*Nature Communications*, In press (2019).

Đặng T.C., Ishii Y., Nguyen V., Yamamoto S., Hamashima T., Okuno N., Nguyen Q.L., Sang Y., **Ohkawa N.**, Saitoh Y., Shehata M., Takakura N., Fujimori T., Inokuchi K., Mori H., Andrae J., Betsholtz C., Sasahara M.

Powerful homeostatic control of oligodendroglial lineage by PDGFR $\alpha$  in adult brain.

*Cell Reports*, 27: 1073-1089.e5 (2019).

DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.084

Oishi N., Nomoto M., **Ohkawa N.**, Saitoh Y., Sano Y., Tsujimura S., Nishizono H., Matsuo M., Muramatsu S., Inokuchi K.

Artificial association of memory events by optogenetic stimulation of hippocampal CA3 cell ensembles.

*Molecular Brain*, 12: 2 (2019).

DOI: 10.1186/s13041-018-0424-1

Alam M. J., Kitamura T., Saitoh Y., **Ohkawa N.**, Kondo T., Inokuchi K.

Adult neurogenesis conserves the hippocampal memory capacity.

*Journal of Neuroscience*, 38: 6854-6863 (2018).

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2976-17.2018

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., Inokuchi K.

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

*Science*, 355: 398-403 (2017).

DOI: 10.1126/science.aal2690

Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Yokose J., Suzuki A., Matsuo M., Tsujimura S., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A. M., Kato F., Inokuchi K.  
Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioral tagging.  
*Nature Communications*, 7: 12319 (2016).  
DOI: 10.1038/ncomms12319

〔学会発表〕(計3件)  
シンポジウムでの口頭発表のみ記載

大川 宜昭, 井ノ口 馨  
海馬記憶痕跡細胞による文脈記憶のアンサンブル表現  
Ensemble representation of contextual memory in hippocampal engram cells  
第41回日本神経科学大会・シンポジウム：最先端光イメージングによる深部脳観察へのアプローチ (Seeing the invisible: the art of deep brain imaging), 神戸, 2018年7月27日

Ohkawa N.  
Optogenetic approaches to reveal association and consolidation of memories in engram cell ensembles.  
9th Optogenetics Research Society Japan International Symposium, Sendai, October 21, 2017  
-Invited speaker-

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,  
金沢, 2017年11月25日

〔図書〕(計3件)

大川 宜昭, 井ノ口 馨  
記憶痕跡セル・アンサンブルを利用した人工連合記憶の創出  
-Creation of artificial associative memory through engram cell ensembles-  
日本認知症学会紙、Dementia Japan, Vol. 33, No. 1: 2-9 (2019).

大川 宜昭, 横瀬 淳, 井ノ口 馨  
記憶の操作  
中外医学社、『Clinical Neuroscience』・特集：光が開く神経科学の未来 - オプトジェネティクスと光イメージング, Vol. 36, No. 8: 916-920 (2018).

大川 宜昭, 野本 真順, 井ノ口 馨  
脳科学辞典 [脳科学辞典編集委員会 (日本神経科学学会常設委員会) 編集委員長：林 康紀、担当編集員：定藤 規弘]  
記憶の固定化  
DOI: 10.14931/bsd.7435, (2017).

〔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  
[https://researchmap.jp/ohkawa\\_noriaki/](https://researchmap.jp/ohkawa_noriaki/)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者  
なし

(2)研究協力者

(連携研究者)

研究協力者氏名：井ノ口 馨

ローマ字氏名：INOKUCHI, kaoru

研究協力者氏名：深井 朋樹

ローマ字氏名：FUKAI, tomoki

研究協力者氏名：ファング チーチュン

ローマ字氏名：FUNG, chi chung

研究協力者氏名：竹川 高志

ローマ字氏名：TAKEKAWA, takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。