

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19445

研究課題名(和文)神経活動の動態観察と光操作に基づく、記憶想起を担う回路基盤の解明

研究課題名(英文)Understanding the mechanism for memory retrieval based on the neural dynamics and manipulation

研究代表者

野本 真順(Nomoto, Masanori)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：20636253

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文): 本申請では、海馬CA3-CA1経路が想起直後の早い想起を担う回路であるという仮説を立て、カルシウムイメージングにより海馬における神経細胞のダイナミズムを可視化し、さらに、光操作により記憶プロセスにおける各脳領域の機能を検証し、記憶の想起を担う回路基盤の解明を目指した。光遺伝学的手法を用いた記憶想起時の海馬CA3不活性化は、記憶想起障害を導くことを明らかにした。また、CA3 NR1-KOマウスは想起時における記憶痕跡細胞の活動性と条件刺激との相関性および連合学習後の海馬における反響的細胞活動がコントロールマウスに比べて有意に低下しており、海馬CA3が学習および想起に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬は学習・記憶に重要であることが知られている。しかし、連合記憶の学習および想起時に海馬がどのように活動しているかはあまり明らかになっていない。本申請では、海馬の中でも記憶の連合に重要である海馬CA1とその上流の海馬CA3に注目した。

本研究は、海馬CA3の反回路の神経可塑性が消失した場合に、連合記憶の学習および想起時に海馬のダイナミズムを明らかにし、これまで仮説状態であった海馬CA3の反響作用を実験的に初めて示した。本研究結果は、記憶連合における海馬CA3およびCA1の重要性が明らかとなり、PTSDおよび記憶障害の新規治療法開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文): Mathematical simulation models suggest that CA3 recurrent circuit, upstream of CA1, where input information reverberate, is involved in the associative memory processing.

However, the role of CA3 in the associative memory processing is still obscure.

We found that the mutant mice specifically lacking the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor gene in CA3 (CA3-NR1 KO) mice showed the impairments of long-term cued-fear memory retrieval, and optogenetic silencing of CA3 during memory retrieval impaired long-term memory retrieval. Calcium imaging analysis showed that CA3-NR1 KO impaired the rapid reverberation after the aversive experience in both CA3 and CA1 regions during the inter-trial interval of learning session. These behavioral and calcium imaging results suggest that deficit of CA3 NMDA receptor that leads to a deficit of CA3 recurrent plasticity, impairs the associative memory processing.

研究分野：学習記憶

キーワード：連合記憶 海馬 反回路 カルシウムイメージング オプトジェネティクス CA3 CA1 記憶想起

## 1. 研究開始当初の背景

記憶を元に食物や天敵を察知し、初動に移る速さは生存競争において重要である。従来の記憶研究は単純に記憶が想起できたかのみを研究対象としており、記憶の想起開始から終了までに回路レベルでどのような活動制御が生じて記憶想起が実現しているか明らかにした研究はない。申請者はこれまでに、記憶の相互作用が生じる際のニューロンの活動履歴を解析し、情報同士が相互作用して長期記憶が形成される場合には EC および CA3 領域の出力先である海馬 CA1 領域が特有の表現を示すことを新たに発見してきた(Nomoto et al. Nat Commun. (2016) 7:12319)。しかし、CA1 領域の上流で感覚入力がどのように制御された結果、CA1 領域で特有の表現が生じたか、原因の特定には至らなかった。

そこでこの原因を解明するため、申請者はカルシウムセンサータンパク質 G-CaMP を発現する変異マウス(Thy1-G-CaMP マウス)の CA1 および CA3 領域に超小型内視顕微鏡(nVista)を挿入し、海馬機能が必要な光恐怖条件付け課題中にライブイメージングを行った。その結果、イベント依存的(光提示、電気ショック、光提示による想起)およびイベント非依的に活動する細胞集団の存在が CA1 および CA3 の両領域において認められ、海馬の CA1 および CA3 領域は光、電気ショック(恐怖体験)および想起時のイベント情報を異なる細胞集団の活動として表現することが明らかとなった。

さらに、各イベント中に細胞が活動するタイミングを調べたところ、興味深いことに、記憶の想起時に、想起を惹起する光提示直後に鋭敏に活動するセルアンサンブルが海馬 CA3 領域で出現してくることを発見した。

CA3 領域の機能に障害が認められる変異マウスは想起開始直後のみ想起障害を示すという過去の知見と合わせると(Cravens et al., Eur J Neurosci. (2006) 24:1771-80)、海馬 CA1 領域の上流領域である海馬 CA3 領域が想起直後の早い想起を担う回路として記憶想起において重要な役割を果たすことが示唆された。

## 2. 研究の目的

従って、申請者の先行研究を立脚点として、記憶形成ならびに記憶想起時の各脳領域における神経活動を可視化し、さらに光遺伝学により海馬 CA1 上流の経路の活性を制御することで、各回路の記憶想起に対する役割を明らかにできると考え、本研究の着想に至った。

具体的には、海馬 CA3-CA1 経路が想起直後の早い想起を担う回路であるという仮説を立て、カルシウムイメージングにより海馬の学習～休息～想起における情報伝播のダイナミズムを可視化し、さらに、光操作により記憶プロセスにおける各脳領域の機能を検証し、記憶の想起を担う回路基盤の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

CA3 反回回路の記憶想起における役割を検討するため、CA3 特異的に NMDA 受容体サブユニット NR1 を欠損した変異マウス(CA3-NR1 KO マウス)を光恐怖条件付け課題および音恐怖条件付け課題に供した。

CA3 の記憶想起における役割を検討するため、カイニン酸受容体プロモーター制御下で Cre リコンビネースを発現する変異マウス(KA1-Cre マウス)に、Cre 依存的に光依存性抑制性オプシン ArchT を発現する AAV ベクターを海馬 CA3 へ導入し、CA3 特異的に発現させたマウスを光恐怖条件付け課題および音恐怖条件付け課題に供した。

海馬の学習～休息～想起における海馬のダイナミズムを可視化するため、CA3 反回回路の神経可塑性が欠損した CA3 NR1-KO マウスの海馬 CA3 および CA1 に興奮性ニューロン特異的プロモーター活性を示す CaMKII プロモーター制御下でカルシウムインジケータ G-CaMP を発現する AAV ベクターを導入し、光恐怖条件付け課題遂行中のカルシウムイメージングデータを取得し、大規模データの解析を行った。

## 4. 研究成果

CA3 反回回路の神経可塑性に障害が観察される CA3-NR1 KO マウスは光恐怖条件付け課題および音恐怖条件付け課題において想起に障害を示し、連合記憶の想起における海馬 CA3 の NMDA 受容体の重要性が示唆された。

記憶想起時に CA3 活性が抑制された光照射群は、光恐怖条件付け課題および音恐怖条件付け課題において非光照射群に比べて有意に低い恐怖反応を示し、CA3 の活性が連合記憶の想起に重要であることが示唆された。

CA3 NR1-KO マウスは海馬 CA3 および CA1 における学習時の神経活動と、想起時の記憶痕跡細胞の活動性と条件刺激との相関性がコントロールマウスに比べて有意に低下しており、CA3 の NMDA 受容体が海馬における神経活動に影響を与え、学習および想起に関わることが示唆された。以上の結果より、海馬 CA3 の記憶想起における役割が明らかとなった。

今後は、カルシウムイメージングで際の観察されたタイミングで、光遺伝学的操作により CA3 の活性を制御し学習および想起パフォーマンスに対する影響を解析し、因果関係を明らかにし

て論文として投稿する。本発見は、記憶連合における海馬 CA3 および CA1 の重要性が明らかとなり、PTSD および記憶障害の新規治療法開発の一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naoya Oishi, Masanori Nomoto, Noriaki Ohkawa, Yoshito Saitoh, Yoshitake Sano, Shuhei Tsujimura, Hirofumi Nishizono, Mina Matsuo, Shin-ichi Muramatsu, Kaoru Inokuchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Artificial association of memory events by optogenetic stimulation of hippocampal CA3 cell ensembles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 12-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1186/s13041-018-0424-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomoto Masanori, Inokuchi Kaoru	4. 巻 18
2. 論文標題 Behavioral, cellular, and synaptic tagging frameworks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurobiology of Learning and Memory	6. 最初と最後の頁 30065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.nlm.2018.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokose J, Okubo-Suzuki R, Nomoto M, Ohkawa N, Nishizono H, Suzuki A, Matsuo M, Tsujimura S, Takahashi Y, Nagase M, Watabe AM, Sasahara M, Kato F, and Inokuchi K	4. 巻 355
2. 論文標題 Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 398-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1126/science.aal2690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野本真順、村山絵美、芳賀 達也、大川宜昭、村松慎一、深井 朋樹、井ノ口馨
2. 発表標題 海馬CA3反回回路は学習後の固定化・想起プロセスに関わる
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野本真順、村山絵美、芳賀 達也、村松慎一、深井 朋樹、井ノ口馨
2. 発表標題 海馬CA3 NMDA受容体の 嫌忌経験後の急速情報反響における役割
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野本真順、村山絵美、大川宜昭、西園啓文、松尾美奈、村松慎一、井ノ口馨
2. 発表標題 海馬CA3は学習誘導性の高頻度活動を介して連合学習プロセスに関わる
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 野本 真順、井ノ口 馨	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 13
3. 書名 『記憶は人為的に書き換えられる』記憶と忘却に関わる脳のしくみー分子機構から健忘の症候まで	

1. 著者名 野本真順、井ノ口馨	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本生化学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 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．	

1. 著者名 大川 宜昭、野本 真順、井ノ口 馨	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日本神経科学学会	5. 総ページ数 -
3. 書名 脳科学辞典（記憶固定化）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----