

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02543

研究課題名(和文) 記憶痕跡細胞集団の分子・活動特性の解明

研究課題名(英文) Molecular and activity characterization of memory engram cells

研究代表者

松尾 直毅 (Matsuo, Naoki)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10508956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変マウスを用いた最近の活動操作実験により、学習時に活動した脳内の一部の神経細胞集団(記憶痕跡細胞)の活動が記憶の実体であることの因果関係が実証されつつある。次に取り組むべき最重要問題のひとつは、肝心の記憶痕跡細胞がどのような仕組みで選ばれ、また周囲の他の細胞と比べて何が異なるのかという基本的な記憶痕跡細胞の性質を理解することである。そこで、文脈依存的恐怖条件付け記憶における記憶痕跡細胞の活動の記録を行い、その活動特性の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、学習により脳内の神経細胞の活動状態がどのように変化するか？記憶は脳内でどのような状態で存在するか？という哺乳類の記憶に関する細胞レベルでの本質的な問いそのものに直接的なアプローチを行い、その答えの一端に答えることができたことは学術的に非常に意義が高い。また、これらの理解はPTSDや認知疾患の原因解明や治療の基盤にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent activity manipulation experiments using genetically engineered mice have begun to demonstrate that the activity of a subset of neuronal populations in the brain active during learning (memory engram cells) is the causal factor that is the memory entity. One of the most important issues to be addressed next is to understand the basic properties of memory engram cells: how they are selected and what makes them different from other neighboring cells. To this end, we recorded the activity of memory engram cells in contextual fear-conditioned memory and analyzed the characteristics of their activity.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶

1. 研究開始当初の背景

記憶は生体内の一体どこでどの様な形で蓄えられているのか？という素朴な疑問は古代より多くの哲学者や科学者を魅了してきた。記憶情報は協調的に活動する一部の神経細胞集団の機能的な活動ネットワークとして存在するという“cell assembly”仮説を Hebb は 1949 年に提唱したが、その実証は成されない状態が長年続いた。これらは千億もの数の神経細胞から構成される脳組織内でまばらに散在しているごく一部の細胞群と考えられるため、同定することさえ極めて困難であった。

このような状況下で、研究代表者らは世界に先駆けて、マウスの分子遺伝学的手法を活用して、学習時に活動した脳内の神経細胞集団を選択的に標識、活動操作が可能なトランスジェニックマウスの開発に成功した (*Science* 2007, 2008)。この画期的なマウスのシステムは一躍世界中の脚光を浴び、このマウスを利用した記憶痕跡に関する研究成果が一流の学術雑誌に多数掲載され続けている。また、類似したマウスのシステム開発も後を絶たない。この事実からも、このマウスを用いることによって初めて成し遂げることが可能となった記憶の実体の研究が、学術的に極めて意義が高く、世界中で注目を浴び続けていることが十分に覗える。

この研究代表者らが開発した画期的な遺伝子改変マウスを用いた最近の活動操作実験により、学習時に活動した脳内の一部の神経細胞集団(記憶痕跡細胞)の活動が記憶の実体であることの因果関係が実証されつつある。次に取り組むべき最重要問題のひとつは、肝心の記憶痕跡細胞がどのような仕組みで選ばれ、また周囲の他の細胞と較べて何が異なるのかという基本的な記憶痕跡細胞の性質を理解することである。そこで、記憶痕跡細胞の活動状態をその形成前から学習後の様々な過程に至るまで経時的に追い、その集団活動や分子特性を解明する本研究は、記憶・学習の本質的理解の推進に大きく寄与するものと考えた。

複数の神経細胞の活動パターン・変化の解析については、最近の 2 光子レーザー顕微鏡とカルシウムイメージングの併用により、数百個の神経細胞の活動の解析が可能となったが、マウス個体を顕微鏡下に固定する必要があるため、実施可能な行動課題に制約がある。本研究で利用する超小型の内視型蛍光顕微鏡は、自由行動下でのマウス脳内の数百個の神経細胞の活動をカルシウムイメージングにより繰り返し長期間にわたり計測可能なシステム (Ziv et al., *Nat Neurosci* 2013) であり、従来の手法に較べて多くの利点がある。このシステムを用いた、手がかり恐怖条件付け学習によるマウス扁桃体外側部での神経細胞集団の活動変化の解析結果が、最近に報告された (Grewe et al., *Nature* 2017)。しかし、この研究を含めて、組織内の細胞のうち僅か数パーセント程度と考えられる記憶痕跡(候補)細胞集団と、周囲のそれ以外の細胞集団を区別した解析は、本研究開始当初は行われていなかった。したがって、本研究で提案している両者を区別した解析は、従来の解析では見いだせなかった新たな法則・特性を浮き彫りにすることが期待できる。

特定の記憶情報が割り当てられる細胞集団の選択 (memory allocation) の仕組みに関しては、個々の記憶の創成に関わる本質的で興味深い研究であるものの、研究手法の困難さのため余り研究は進んでいない。その中で、最近明らかにされた注目すべき知見は、光・薬理遺伝学によって学習直前に強制的に活動させられたランダムな神経細胞集団に記憶が割り当てられる確率が高いというものである (Yiu et al., *Neuron* 2014)。しかし、この結果は人為的な操作下のもので、実際に生理条件下で同様の法則によって記憶の割り当てが決定されているかどうかは未だ不明である。本研究は、この重要な問題に直接応えるものである。

2. 研究の目的

研究代表者の松尾らが開発した「任意の時期に活動した神経細胞集団を遺伝学的操作できる」遺伝子改変マウスを活用した最近の研究により、学習時に活動した脳内の一部の神経細胞集団(記憶痕跡細胞)の活動が記憶の実体であることの因果関係が実証されつつある。しかし、肝心の記憶痕跡細胞の性質に関する素朴な疑問は山積みである。例えば海馬内の一見ホモジニアスな神経細胞集団の中から、学習の瞬間に、どのような法則で一部の僅かな神経細胞だけが特定の記憶情報を担う記憶痕跡細胞として選択されるのか？また、脳組織中に散在するこれらの一部の記憶痕跡(候補)細胞が周囲の他の細胞と何がどのように異なるのか？

本研究ではこれらの疑問に答えることにより、学習により脳内の神経細胞の活動状態がどのように変化するのか？記憶は脳内でどのような状態で存在するのか？という本質的な問いそのものに挑むことを研究の目的とする。

3. 研究の方法

学習の際に活動した脳内の一部の神経細胞集団(記憶痕跡細胞集団)の標識を行うために、研究代表者らが以前に開発した独自のトランスジェニックマウス(*cfos-tTA* マウス)が世界中で広く利用されている。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たシステムである(Matsuo et al., *Science* 2008)。本研究では、この手法で標識される記憶痕跡細胞と周囲のそれ以外の細胞との活動を区別して記録する。自由行動下のマウスの脳内の神経活動の経時的記録のために、inscopix 社製の超小型内視蛍光顕微鏡によるカルシウムイメージングを行う。これは革新的な技術であるが、制約もある。その一つは、画像取得が特定の蛍光波長に限定されていることである。したがって、GCaMP をカルシウムセンサーとして用いると、着目したい細胞集団を赤色蛍光蛋白質で標識しても同定できない。かといって、GFP で標識すると、GCaMP の蛍光波長と被るため、カルシウムイメージングデータの取得を妨害するという致命的な問題が生じる。

この問題を克服するために、本研究では、誘導型 Cre やテトラサイクリン誘導系などを組み合わせて、カルシウムイメージングを行いながら特定の細胞の同定が可能な新規システムの確立を行い、文脈依存的な恐怖条件付け時の記憶痕跡細胞特有の活動動態の解析を行う。

4. 研究成果

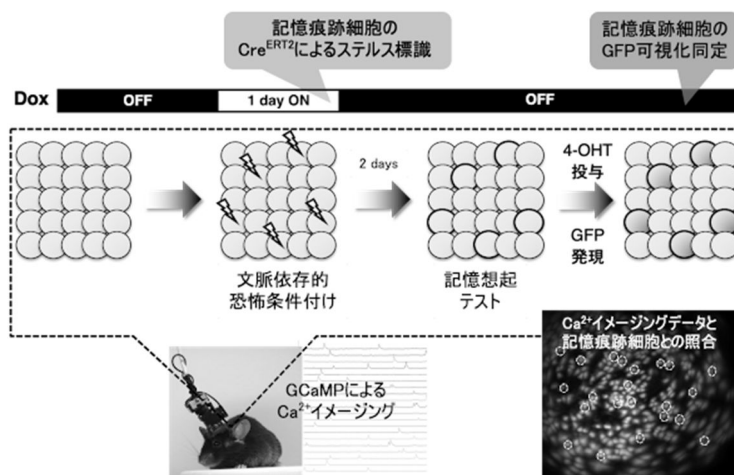
カルシウムイメージングデータ取得の完了後に、初めて記憶痕跡細胞が GFP で標識可視化される新規のマウス遺伝学的システムの構築を行った。まず、以下の3種類のアデノ随伴ウイルス(AAV)を野生型マウス(C57BL6/J)の背側海馬 CA1 領域にインジェクションして感染させた。一つは *c-fos* 遺伝子のプロモーターの制御下で tetracycline-dependent reverse transactivator、tetO プロモーターの制御下で組み替え酵素 Flp を発現する AAV。二つ目は Flp による DNA 組み替えによりタモキシフェン誘導型 Cre を CaMKII α プロモーターの制御下で恒常発現する AAV。三つ目は Cre による DNA 組み替えにより CaMKII α プロモーター制御下の GFP が恒常発現する AAV。

このマウスでは、ドキシサイクリン(Dox)存在下の時期に *c-fos* プロモーターが十分に活性化した興奮性神経細胞で Cre^{ERT2} の恒常発現が誘導される。その後、タモキシフェン誘導体である 4-OHT を投与することにより Cre^{ERT2} 陽性細胞が GFP を恒常的に発現する。まず、3種類の AAV の混合比率やタイター、また Dox や 4-OHT の投与期間、時期、濃度などの至適条件の検討を行い、システムの確立を行った。

さらに上記の3種類の AAV に加えて、カルシウムセンサーである GCaMP6f を興奮性神経細胞に選択的な CaMKII α プロモーターの制御下で AAV により背側海馬 CA1 に発現させた。inscopix 社製の超小型の内視蛍光顕微鏡を用いて、自由行動下における海馬の同視野内の神経細胞集団の連続的なカルシウムイメージングを行った。

Dox 存在期に海馬依存的である文脈依存的恐怖条件付け学習を行うことにより、海馬 CA1 内の記憶痕跡細胞に選択的な Cre^{ERT2} の恒常的発現を誘導した。記憶の想起過程を含む全てのカルシウムイメージングデータの取得終了後に 4-OHT をマウスに腹腔投与し、記憶痕跡細胞に選択的な GFP の恒常発現を誘導した。その後、再び内視蛍光顕微鏡下で蛍光画像取得を行い、蛍光強度が経時変化し点滅するシグナルは GCaMP 由来で、一定の蛍光を発し続けるシグナルは GFP による発現(つまり記憶痕跡細胞)と判断した。

最終的に、遡ってカルシウムイメージングデータにおける記憶痕跡細胞の照合とデータの抽出を CNMF-E (constrained nonnegative matrix factorization for microendoscopic data)などを用いて行ったところ、8匹のマウスから計 5155 個の神経細胞のカルシウム活動の時系列データを取得した。先述の遺伝学的方法による同定の結果、約 8% が記憶痕跡細胞であると判定された。研究分担者である寺前順之介准教授(京都大学大学院情報科学研究科先端数理科学専攻)の協力の下、記憶痕跡細胞の活動特性(活動強度・頻度・発火タイミングや細胞集団の構造抽出など)について周囲のその他の細胞との比較解析を行い、文脈依存的恐怖条件付け学習の前後およびホームページにおける記憶痕跡細胞の活動特性の抽出を行った。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松尾直毅	4. 巻 33
2. 論文標題 記憶にかかわる神経アンサンブルの可視化と人為的操作	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 10-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Naoki Matsuo
2. 発表標題 Robustness and Flexibility of Neuronal Ensembles in Memory
3. 学会等名 ILS 2019 (International Conference on Interdisciplinary Life Sciences) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Matsuo
2. 発表標題 Robustness and Flexibility of Neuronal Ensembles in Memory
3. 学会等名 The 10th IBRO (International Brain Research Organization) World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾直毅
2. 発表標題 記憶痕跡細胞から探る記憶の神経基盤
3. 学会等名 第32回 日本動物細胞工学会2019年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高蔵蓮, 小林暁吾, 松尾直毅, 寺前順之介
2. 発表標題 エンGRAMセルが表現するエピソード記憶のダイナミクス
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Matsuo
2. 発表標題 Robustness and Flexibility of Neuronal Ensembles in Memory
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾直毅
2. 発表標題 記憶の神経アンサンブルの安定性と柔軟性
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「高次脳機能の神経回路機構」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi K, Takakura R, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 neurons during contextual fear memory encoding, retrieval, and extinction
3. 学会等名 生理研研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi K, Takakura R, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 neurons during contextual fear memory encoding, retrieval, and extinction
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi K, Takakura R, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 engram cells during a contextual fear conditioning paradigm
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi K, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 neurons during contextual fear conditioning in freely behaving mice
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi K, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 neurons during contextual fear conditioning in freely behaving mice
3. 学会等名 生理研研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi K, Takakura R, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 neurons during contextual fear memory encoding, retrieval, and extinction
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of Molecular and Cellular Cognition Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi K, Takakura R, Teramae J, Matsuo N
2. 発表標題 Calcium imaging of hippocampal CA1 neurons during contextual fear memory encoding, retrieval, and extinction
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	寺前 順之介 (Teramae Jun-nosuke) (50384722)	京都大学・情報学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------