

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月 2日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21680027

研究課題名（和文）記憶学習に関与する神経回路の可視化とシナプスにおける変化の解析

研究課題名（英文）Analysis of neural circuit and synapse involved in learning and memory

研究代表者

松尾 直毅 (MATSUO NAOKI)

京都大学・次世代研究者育成センター・准教授

研究者番号：10508956

研究成果の概要（和文）：研究代表者らが開発した誘導系 GFP-GluR1 トランスジェニックマウスを主に用いて、高次脳機能に中心的役割を果たすと考えられている AMPA 型グルタミン酸受容体の記憶学習時における動態を指標に、学習によるニューロン、シナプスの分子・細胞変化の解析を行った。また、記憶学習に異常が認められるいくつかの遺伝子改変マウスにおける、分子・細胞・回路・行動レベルでの変化を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：I have analyzed the molecular and cellular changes induced by learning. For this aim, I have mainly focused on behaviorally activated neurons and synapses induced with learning by using transgenic mice which express GFP-GluR1 in response to behavioral stimuli in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：分子・細胞神経科学

キーワード：シナプス・遺伝子改変マウス・記憶

## 1. 研究開始当初の背景

記憶するという事は経験により脳内に生じた“何らかの変化”が維持されることである。この“何らかの変化”は特定の神経回路内に起きると考えられているので、その特定の回路を同定し、そのつなぎ目であるシナプスの分子・細胞変化を明らかにすることが極めて重要な課題である。しかし、これら *in vivo* レベルでの研究は驚く程進んでいない。その最大の原因の一つは、脳内にある  $10^{11}$  個のニューロン、 $10^{15}$  個ものシナプスのうち、どれが任意の記憶に関与しているか従来の方法

では同定することが極めて困難であるからである。

AMPA 型グルタミン酸受容体は、哺乳類の脳において主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸によるシナプス伝達の大部分を担っている。更に近年、記憶学習などの基盤と考えられているシナプス可塑性に、AMPA 受容体のシナプス移行が中心的な役割を果たすことが、主にスライス標本を用いた *in vitro* の解析により示唆されている。また AMPA 受容体シグナル経路の異常が多く、の精神・神経疾患に深く関与することも示唆

されている。こういった理由から、AMPA 受容体の性質・役割の研究は国内外を問わず、非常に精力的かつ競争的に行われている状況である。しかし残念なことに、従来のほとんどの研究は培養細胞、脳スライス標本を用いた *in vitro* の系で行われたものであり、“実際の生きた動物の脳内で何が起きているのか？”という *in vivo* での知見は極めて乏しい。

そこで AMPA 受容体の *in vivo* での動態を解析するために、研究代表者らは AMPA 受容体のサブユニットである GluR1 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質 (GFP-GluR1) を発現するトランスジェニックマウスを開発した (Matsuo et al., Science, 2008)。このマウスでは、GFP-GluR1 の発現は神経活動依存的に活動する最初期遺伝子群のひとつ *c-fos* 遺伝子プロモーター及び、テトラサイクリン誘導系の制御を受けている。つまり、任意の時期に外界 (神経活動) 刺激によって新たに合成された AMPA 受容体 (GFP-GluR1) の発現と動態を脳内で可視化することができる仕組みになっている。既に申請者らはこのマウスを用いて、恐怖条件付け学習課題を行った 24 時間後に、成体マウス海馬 CA1 ニューロンで、新しく合成された AMPA 受容体が学習と関連してスパイン (ポストシナプスを構成する微小棘構造体) に動員されることを見いだした。特に、mushroom 型、thin 型、stubby 型と多様な形態を持つスパインのうち、mushroom 型スパインへと有意に動員されていることを見出し、新規タンパク質合成を要する長期記憶の分子メカニズム解明に貢献した。また上記研究は、学習刺激により新しく合成された GFP-GluR1 のシナプス局在が学習により活性化したシナプスの指標となり得ることも示唆する。

このように研究代表者らが開発したマウスは、神経活動依存的な AMPA 受容体とのシナプス動態変化を研究する上で極めて有用な tool であることから、記憶学習のメカニズムを分子・シナプス・回路レベルで解明するために、本研究課題を提案した。

## 2. 研究の目的

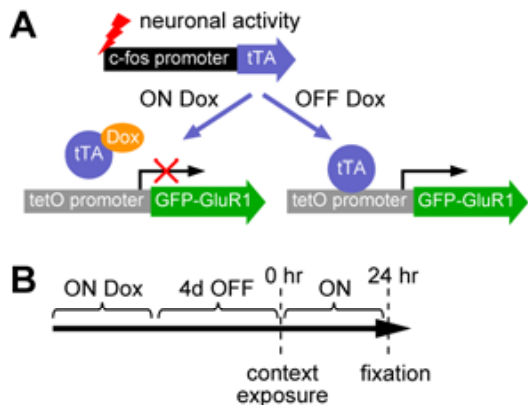
記憶するという事は経験により脳内に生じた“何らかの変化”が維持されることである。この“何らかの変化”は特定の神経回路内に起きると考えられているので、その特定の回路を同定し、そのつなぎ目であるシナプスの分子・細胞変化を明らかにすることが極めて重要な課題である。そこで本研究では、研究代表者らが開発した誘導系 GFP-GluR1 トランスジェニックマウスを主に用いて、高次脳機能に中心的役割を果たすと考えられている AMPA 型グルタミン酸受容体の記憶学習時における動態の解析と、シナプスの変化

の解析を行う事を目的とした。

また、記憶学習に異常が認められるいくつかの遺伝子改変マウスにおける、分子・細胞・回路・行動レベルでの変化を明らかにすることを目的とした。

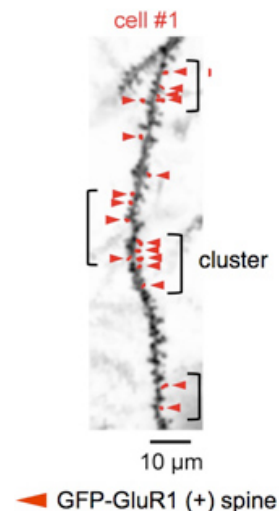
## 3. 研究の方法

研究代表者らが開発した「任意の行動刺激により活動した神経細胞において AMPA 型グルタミン酸受容体 (GFP-GluR1) の挙動を観察することが可能なトランスジェニックマウス」を利用することにより、*in vivo* におけるシナプス入力・可塑性のパターンの空間的な解析を行った。ドキシサイクリン (Dox) 入りの餌で飼育していたトランスジェニックマウスを Dox 無し餌で 4 日間の飼育を行った。これらのマウスを新規環境に 500 秒間提示した。この際に活動した神経細胞選択的に GFP-GluR1 の細胞体における *de novo* 合成誘導を行った (下図参照)。24 時間後に脳スライスを作製、固定後、樹状突起および樹



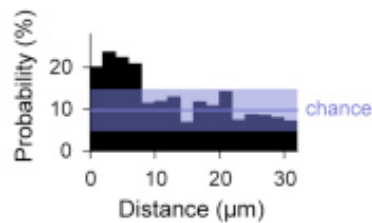
状突起スパインを可視化するために背側海馬 CA1 細胞体領域に DiI 蛍光色素の注入を行った。その後、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、GFP-GluR1 の局在の可視化を行い、そのシナプス (スパイン) 局在を共焦点顕微鏡を用いて観察し、3次元画像データの取り込みを行った。得られた画像データを用いて東京大学薬学

研究科 池谷博士らとの共同研究により、GFP-GluR1 陽性スパインの樹状突起上における空間的パターンの解析を行った (右図参照)。



#### 4. 研究成果

画像解析の結果、背側海馬 CA1 領域の錐体細胞の樹状突起上では GFP-GluR1 陽性のシナプスが 8  $\mu\text{m}$  の範囲内で有意にクラスターを形成していることが明らかとなった ( $|Z| \geq 4.02$ ,  $p \leq 5.7 \times 10^{-5}$ , 下図参照)。つまりシナプス可塑性が空間的に近傍のシナプスの間で生じやすいことを示唆している。



記憶学習を含む高次脳機能は神経細胞同士のつながりにより支えられている。したがって、

そのシグナル情報伝達の場合であるシナプスの *in vivo* での知見は、高次脳機能を理解するうえで極めて重要な手がかりとなるが、技術的制限などの問題により解析困難であるのが現状である。その解析困難な問題の一つにシナプス入力・可塑性の空間的パターンがある。入力および可塑性を受ける樹状突起上のシナプス配置の空間的パターンには、少なくとも二つの可能性がある。一つは同期入力特定箇所集中し、クラスターを形成しているという可能性。二つ目は樹状突起全体に分散しているという可能性である。本研究では、独自の遺伝子改変マウスを巧妙に活用することにより技術的困難を克服し、背側海馬 CA1 領域において可塑性を受けたシナプスがクラスターを形成していることを強く示唆する結果を得ることができた。本研究により見いだされた現象は樹状突起における入力の非線形的な加算に大きく影響すると考えられ、実際の脳内で働いている神経細胞の演算方法の理解に大きく貢献するものである。上記の結果は、東京大学薬学研究科などとの共同研究により、*Science* 誌において公表した。

#### 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)

- ① Takahashi N, Kitamura K, Matsuo N, Mayford M, Kano M, Matsuki N, Ikegaya Y. Locally synchronized synaptic inputs. *Science* 335, 353-356 (2012). 査読有り DOI:10.1126/science.1210362
- ② Matsuo, N., Takao, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Tanda, K., Miyakawa, T. Behavioral profiles of three C57BL/6

substrains.

*Front. Behav. Neurosci.* 4:29 (2010). 査読有り  
DOI: 10.3389/fnbeh.2010.00029

- ③ Matsuo, N., Yamasaki, N., Ohira, K., Takao, K., Toyama, K., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Miyakawa, T. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. *Front. Behav. Neurosci.* 3:20 (2009). 査読有り  
DOI: 10.3389/neuro.08.020.2009
- ④ Matsuo, N., Tanda, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Toyama, K., Takao, K., Takeshima, H., Miyakawa, T. Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type3 (RyR3) knockout mice: Decreased social contact duration in two social interaction tests. *Front. Behav. Neurosci.* 3:3 (2009). 査読有り  
DOI: 10.3389/neuro.08.003.2009

[学会発表] (計 7 件)

- ① 松尾直毅、第 8 2 回日本動物学会シンポジウム「遺伝子改変マウスを用いた記憶痕跡の探究」平成 23 年 9 月 21 日、旭川市
  - ② 松尾直毅、自然科学研究機構シンポジウム「脳神経情報の階層的研究」 「記憶痕跡の探究」平成 23 年 2 月 23 日、岡崎市
  - ③ 松尾直毅、第 3 3 回日本分子生物学会年會シンポジウム「Genetic Manipulation of Memory Circuits in Mice」平成 22 年 12 月 8 日、神戸市
  - ④ 松尾直毅、日本睡眠学会 第 1 5 回 睡眠科学研究講座「記憶と学習の遺伝子研究」平成 22 年 7 月 3 日、名古屋市
  - ⑤ 松尾直毅、第 3 2 回日本神経科学大会シンポジウム「Genetic Visualization of Memory in Mice」平成 21 年 9 月 18 日、名古屋市
- [図書] (計 3 件)
- ① 松尾直毅、「記憶の獲得と想起：記憶痕跡の解明に向けたアプローチ」細胞工学 30, 470-474 (2011)
  - ② 松尾直毅、「長期記憶の分子基盤」

生化学 81, 610-614 (2009)

③ 駒田致和、高雄啓三、松尾直毅、宮川剛、  
LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER  
安全性薬理試験マニュアル「第2項 試験法  
と結果の評価」  
2009年、P54-63

〔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.cp.kyoto-u.ac.jp/Matsuo/Matsuo\\_Lab/Home.html](http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Matsuo/Matsuo_Lab/Home.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 直毅 (MATSUO NAOKI)  
京都大学・次世代研究者育成センター・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：