

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650164

研究課題名(和文)異なる経験情報をコードする各神経細胞群を同一個体内で同定・活性制御する新技術開発

研究課題名(英文) Establishment of new technique to target and manipulate distinct engram cell assemblies by induction of preferred genes expression

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)・助教

研究者番号：80416651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、神経活動依存的にトリ肉腫ウイルス受容体を発現する遺伝子改変マウスと、この受容体特異的に感染する組み換えレンチウイルスを作製・利用することで、時間的に離れた各イベント時に活性化した神経細胞群に対し、好みのトランスジーンを繰り返し組み込み可能とする新規技術を確立した。この技術により、新規空間暴露と1週間後の即時フットショック時に活性化した細胞を、それぞれGFPとRFPで同一個体内の海馬と扁桃体で標的化することに成功した。

記憶は、学習時の感覚入力に応答し活性化した神経細胞群にコードされることが定説となっていることから、確立した本技術は記憶獲得細胞の標的化・人為的操作を可能にする。

研究成果の概要(英文)：It had been probed that memory is encoded by subgroup of neuronal cells (=cell assemblies) that responds to various sensory inputs and activates at memory acquisition. The c-fos-tTA x TRE-TVAG double Tg mice conceptually express a receptor of avian sarcoma virus (=TVA) in a neuronal activation-dependent manner. EnvA-pseudotyped LV can only infect to TVA expressing cells. For our purpose, we planned to target distinct cell assemblies with preferred genes, and we had established a combination system of the transgenic approach to reveal neural activated cells and LV-mediated preferred genes transferring. By using the new system, we could label two distinct cell assemblies with GFP and RFP. The new technique will allow us to target and manipulate distinct remote cell assemblies by preferred genes expression.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学 神経活動 レンチウイルス 記憶

1. 研究開始当初の背景

記憶は、様々な感覚入力にตอบสนองし活性化した神経細胞群にコードされることが定説となっている。ある種の記憶は、時間経過とともにその質を変えることが示唆されているが、その理由に1つとして記憶をコードする細胞群の再編が予測されている。一方、文脈性恐怖条件付け学習では、条件刺激 (CS) と無条件刺激 (US) という異なる感覚入力同期することで連合し記憶が形成されるが、CS のみ、もしくは、CS 中での即時 US のみの暴露では恐怖記憶は形成しない。これにもかかわらず、CS を以前に経験していると、同一 CS 中での即時 US で恐怖記憶が成立し、恐怖の想起は CS に特異性を示す。このように、複雑かつ多様な様式で成立している記憶に関する研究を今後進展させる上で、同一入力情報に対応して活性化する細胞群の時間変遷や、時間的に異なるイベントに対応して活性化した個々の細胞群を同一個体内で長期同定することは、極めて重要な課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本課題では、好みの遺伝子の導入・発現誘導が可能な組み換えウイルスの感染を、神経活動履歴を持つ細胞を標的とし、特異的に繰り返し行うことが可能な新規技術の確立を目的とした。このようなシステムを構築することは、異なる経験に対応し活性化した各細胞群を多様な蛍光タンパク質の発現で同定可能にするとともに、さらに、近年脚光浴びるチャンネルロドプシンの発現と光操作との組合せにより、イベント経験で活性化した細胞群の人為的活性・不活性化を可能とする。これにより、個々の経験で活性化した細胞群が、真に経験した記憶をコードしているか、また、時間変遷にともなう記憶の質的变化と関連するかどうかを検証可能となる。さらに、複数の経験で活性化した各細胞群の人為的同期活性化が、新たな連合記憶形成を導くかという革新的な記憶研究に着手するための基盤技術になると考える。

3. 研究の方法

c-fos-tTA マウスは、神経活動依存的に転写因子 tTA を発現誘導すること、TRE-TVA マウスは、tTA の発現依存的にドキシサイクリン非存在下でトリ肉腫ウイルス受容体 TVA を発現することが既に報告されているため、これらをかけ合わせて作製する新規 c-fos-tTA x TRE-TVA マウスでは、神経活動依存的にドキシサイクリン (Dox) 非存在下で TVA が発現誘導されることが予想された。EnvA をエンベロープに持つ組み換えレンチウイルスは、TVA 発現細胞に特異的に感染しトランスジーンを宿主細胞ゲノムに組み込む。

これを踏まえ、本課題では、神経活動を起こした細胞内に一過的に TVA を発現誘導可

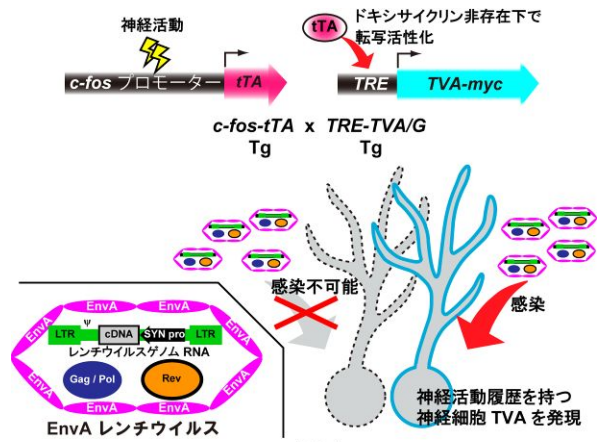


図1

能なトランスジェニックマウスと、このウイルス受容体を発現する細胞に特異的感染をする組み換えウイルスの構築を行う (図1)。このシステムを用いて、神経活動履歴を持つ細胞群特異的に、任意の回数好みのトランスジーンを組み込みを行うことが可能な新規技術の構築を行った (図2)。

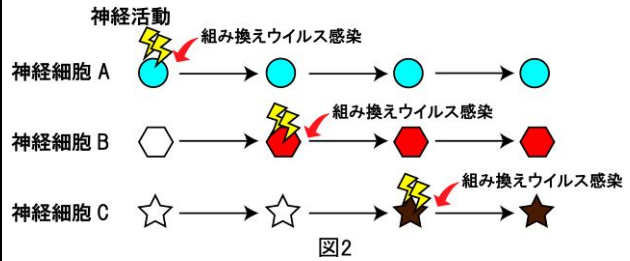


図2

4. 研究成果

(1) c-fos-tTA x TRE-TVA マウスの作出

本申請課題を実施するにあたり、c-fos-tTA マウスはマウスバンクである MMRRC より購入し、TRE-TVA マウスは作製した米国オレゴン大学 (当時)・Clifford Kentros 博士より、tTA 活性依存的に TVA の高発現が確認されているラインの供与を受けた。c-fos-tTA と TRE-TVA マウスの作出は、高度なマウス人工授精技術を有する連携研究者の、富山大学生命科学先端研究センター・動物実験施設の西園啓文助教に依頼し、供給効率の高い人工授精・胚移植法により行った。

(2) EnvA レンチウイルス調製の確立

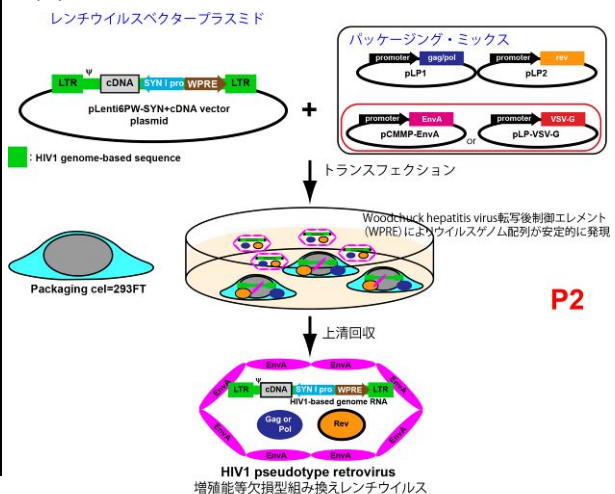


図3

レンチウイルスの調製は、ウイルスゲノムを発現するレンチウイルスベクタープラスミドとウイルスの必須構成タンパク質群の発現プラスミド（パッケージングミックス）を 293FT パッケージング細胞に導入することで行った（図 3）。通常の VSV-G エンベロープを持つウイルスの場合、VSV-G 発現プラスミドを使用するが、EnvA ウイルスを調製するにあたり EnvA 発現プラスミドである pCMMP-EnvA-IRES-GFP を米国プラスミドバンク・Addgene より購入し使用した。調製した EnvA タイプの EGFP レンチウイルスは、TVA を組み換えレトロウイルス感染により発現誘導した培養細胞でのみ感染を樹立し、EGFP を発現誘導することを確認した（図 4）。

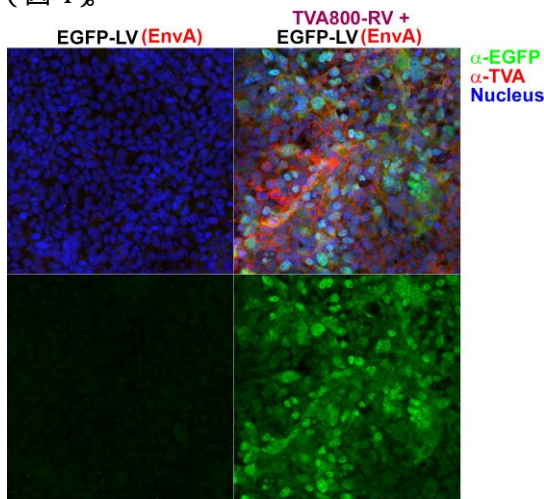


図4

(3) c-fos-tTA x TRE-TVA マウスでの神経活動依存的 TVA 発現誘導

Dox を継続的に投与した c-fos-tTA x TRE-TVA マウスを 2 日間 Dox 非存在下で維持し、新規環境に暴露することで神経活動を誘導したところ、海馬 CA1 と扁桃体 BLA 領域で TVA の発現誘導を観察した（図 5 下）。

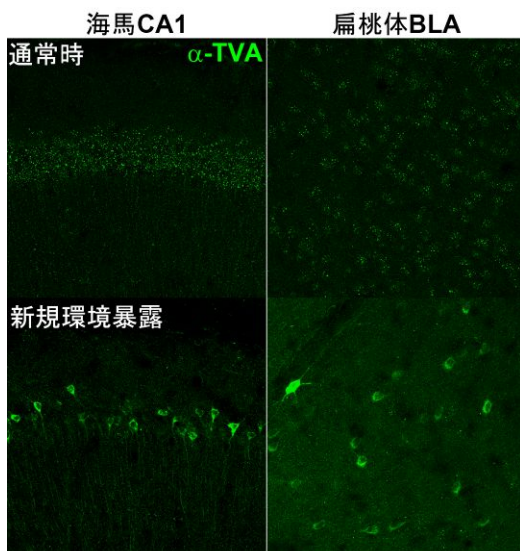


図5

一方、Dox 無しでホームケージにて維持した

c-fos-tTA x TRE-TVA マウスでは、TVA の発現誘導は観察されなかった（図 5 上）。古来より、c-fos-tTA x TRE-TVA マウスでの神経活動依存的 TVA 発現誘導法を確立した。

(4) c-fos-tTA x TRE-TVA マウスでの時間的に離れたイベント時に活性化した細胞への遺伝子導入

複数回の時間的に離れたイベント時に活性化した神経細胞へのレンチウイルス感染を行うための、TVA 発現制御法を確認した。これにより、各イベントに対応する TVA 発現動態を確認したことで、イベント毎に特異的に活動履歴を持つ細胞へのウイルス感染が可能となった（図 6）。

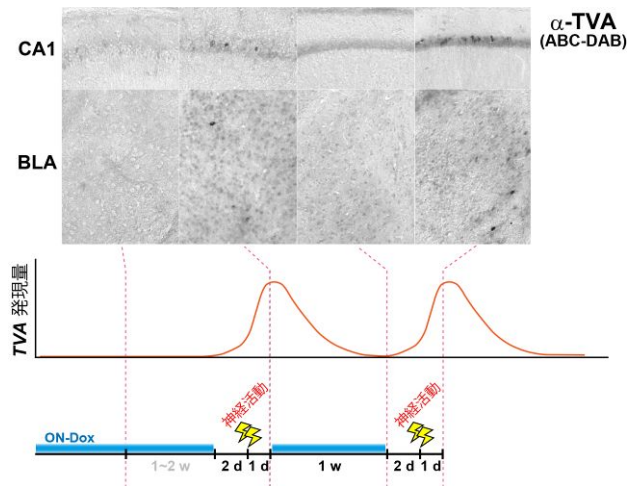


図6

これらを利用し、新規空間暴露と電気フットショックを 9 日間の間隔で c-fos-tTA x TRE-TVA マウスに施し、それぞれのイベント時に活性化した海馬と扁桃体の神経細胞を、EnvA タイプの EGFP と mCherry レンチウイルス感染で同一個体内でラベルできることを確認した（図 7）

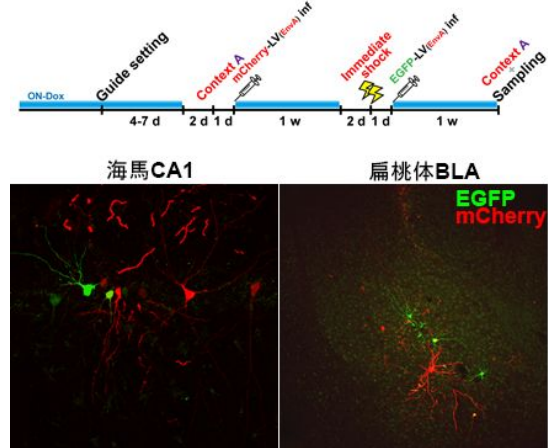


図7

レンチウイルスは、トランスジーン配列を宿主細胞のゲノムに組み込むことでトランスジーンを発現を長期維持することが可能である。上記から、当初の目的であった時間的に異なるイベントに対応して活性化した個々の細胞群を同一個体内で長期同定可

能な新規技術が確立できた。この技術と光遺伝学を組み合わせることで、今後、過去のイベント情報をコードする標細胞の長期的活性制御による記憶の時間経過にともなう変遷過程に関する研究が可能になると考える。

#### 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2件)

Shehata M., Matsumura H., Okubo-Suzuki R., Ohkawa N., Inokuchi K., Neuronal-stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical LTD, Journal of Neuroscience, 査読有, Vol. 32, 2012, pp. 10413-10422  
Doi: 10.1523/JNEUROSCI.4533-11.2012

Ohkawa N., Saitoh Y., Tokunaga E., Nihonmatsu I., Ozawa F., Murayama A., Shibata F., Kitamura T., Inokuchi K., Spine formation pattern of adult-born neurons is differentially modulated by the induction timing and location of hippocampal plasticity, PLoS One, 査読有, Vol. 7, 2012, e45270  
Doi:10.1371/journal.pone.0045270

##### [学会発表](計3件)

Inokuchi K. and Ohkawa N. *et al.*, Artificial activation of distinct cell assemblies makes new associative memory, 12th Annual MCCA meeting in San Diego, 2013. 11. 7, San Diego, USA.

大川宜昭 他, 異なるセルアセンブリの人為的活性化による人工連合記憶の創出, 第36回日本分子生物学会年会 2013. 12. 5, 神戸

大川宜昭, 井ノ口馨, 異なるセルアセンブリの光遺伝学的活性化による連合記憶の人工的創出, 平成 25 年度生理学研究所研究会・記憶回路研究会「個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解」, 2013. 12. 11, 岡崎

##### [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.med.u-toyama.ac.jp/bmb/index-j.html>

##### 6. 研究組織

###### (1)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)・助教

研究者番号: 80416651

###### (2)研究分担者

なし

###### (3)連携研究者

井ノ口 馨 (INOKUCHI Kaoru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 20318827

西園 啓文 (NISHIZONO Hirofumi)

富山大学・生命科学先端研究センター・助教

研究者番号: 10502289