

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680042

研究課題名(和文) 機能的細胞集団の活動と記憶の因果関係の解明

研究課題名(英文) Establishing the causality between memory and specific neuronal ensemble

研究代表者

松尾 直毅 (Matsuo, Naoki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10508956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：学習時に活動した神経細胞集団を標識し、後にこれらの細胞集団を選択的に再活動させることが可能な遺伝子改変マウスの作製を行った。このマウスを用いることにより、ヒトのPTSDの暴露療法モデルである消去訓練により消去された恐怖記憶が、恐怖条件付け学習刺激により標識された細胞集団の人工的な再活性化により再生することを示した。つまり、学習時に活動した細胞集団が恐怖記憶の構成要素(痕跡)であることの因果十分性を示すと同時に、見かけ上はいったん消去された様に見えるトラウマ記憶が実際には脳内から消し去られたわけではなく、その痕跡が脳内に残存していることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Memories are changed dynamically over the course of time and by our daily experiences. To examine whether the original memory trace remains despite the disappearance of the behavioral expression of the memory, we performed pharmacogenetic neuronal activation using transgenic mice expressing hm3Dq DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) under the control of the activity-dependent c-fos gene promoter. Neuronal ensembles activated during fear-conditioned learning were tagged with hm3Dq and subsequently reactivated after extinction training. The mice exhibited significant freezing, even when the memory is no longer triggered by external conditioned stimuli. The results suggest that some of the original fear memory trace are resistant to extinction, and such residual plasticity might reflect the persistent memory trace that is sufficient to evoke fear memory recall.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 マウス

1. 研究開始当初の背景

記憶の実体を理解するために、世界中の多様な分野の研究者がしのぎを削って研究を行っているが、未だ多くの基本的な重要問題が謎に包まれている。これら記憶学習を含む高次脳機能の解明を困難にしている要因の一つは、脳という構造体の複雑さにある。哺乳類の脳内では千億個もの神経細胞が複雑精緻なネットワークを形成しており、その組み合わせは無限大である。記憶情報は、常に特定領域の特定神経細胞集団に局在しているのではなく、むしろ脳内でまばらに散らばる神経細胞間の機能的ネットワークとして存在すると考えられているため、生きた動物内でそれらを同定することや、その神経活動を制御することは極めて困難である。

この困難な重要問題に取り組む為に、代表者らは世界に先駆けて任意の時期に任意の行動刺激により活動した細胞集団のみに、任意の遺伝子操作を行うことが可能なトランスジェニックマウスの開発を行った (Matsuo et al., *Science* 2008; Reijmers, Perkins, Matsuo, Mayford, *Science* 2007)。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の制御下で tTA (tetracycline-regulated transactivator) を発現するマウスと、tetO プロモーターの制御下で任意の遺伝子を発現するマウスの2種類を掛け合わせるにより得られる。tTA の転写活性はドキシサイクリン(Dox)の有無により制御されるので、tetO プロモーター下流遺伝子の発現を神経活動依存的・可逆的に制御することが出来る。

上記のように代表者らは世界に先駆けて単一シナプス・単一細胞レベルでの記憶痕跡の可視化という画期的な研究に挑戦し、成果を挙げてきた。可視化は記憶痕跡の場を明らかにする上で極めて有効的な手段ではあるが、これらの可視化によりあぶり出されてきた神経細胞集団が本当に記憶の実体であるのかどうかを明らかにするには、これらの神経細胞集団の活動を操作し、実際にその記憶に影響を与えるのかどうかの因果関係を示すことが必要である。そこで、代表者らが開発したマウスを活用して、従来の研究では間接的な相関しか示す事が出来なかった「記憶という実体の捉えがたい現象」と「機能的神経細胞集団の活動」の因果関係を個体レベルで検証する。

またエピソード記憶のような記憶の情報は常に一定の場所に保存されているのではなく、時間経過と共に海馬から大脳皮質へと移動することが示唆されている (Frankland & Bontempi, *Nat Rev Neurosci.* 2005)。一方で、記憶の獲得時に既に大脳皮質において記憶痕跡が残されているという報告もある (Lesburguères et al., *Science* 2011)。そこで、記憶情報の保存場所と移動に関する問題

にも取り組む。これら機能的神経細胞集団の性質の解析を通じて、個々の記憶情報の脳内表現の仕組みの理解を目指す。

2. 研究の目的

一般に、記憶情報は協調的に活動する一部の神経細胞間の機能的ネットワークとして存在すると想像されているが、その実証は極めて困難で、それに付随した多くの疑問も残されている。その最大の要因のひとつは、これらの脳内でまばらに散らばる機能的細胞集団を同定し、選択的に操作を加えることが極めて困難であることにある。そこで代表者らが開発した“任意の時期に活動した神経細胞集団に選択的に任意の遺伝子操作を行うことが可能なトランスジェニックマウス”を活用することにより、記憶の獲得時に活動した神経細胞集団の時間・領域依存的な人為的再活動を行い、その記憶との因果関係を行動実験によって個体レベルで直接検証・解析する。

3. 研究の方法

(1) cfos-tTA x tetO-ChR2(ポジティブフィードバックループ発現システム付き)マウスの作製

ChR2(チャネルロドプシン)は、特定波長の光により活性化して陽イオンを透過し、発現神経細胞の脱分極を引き起こす膜タンパク質である。ChR2は様々なタイプのものが存在するため、その特性が本研究課題の目的に合致するものの検討を行い、H134R型変異を持つものを使用した。また、通常の tetO プロモーターでは、誘導された ChR2 の作動期間は ChR2 タンパク質の半減期に依存する一時的なものである。そこで、記憶獲得時に活動した神経細胞集団において ChR2 を長期的に発現させるために、Dox 非依存的な変異型 tTA(H100Y)を利用したポジティブフィードバックループ発現システムを導入する(代表者らが既に *Science* 2007 において利用)。更に、蛍光顕微鏡下において発現細胞を可視化し、電気生理学的解析などを行うことができるように ChR2 に蛍光タンパク質 Venus を付加したベクターDNAを用いることによりトランスジェニックマウスの作成を行った。

(2) cfos-tTA x tetO-DREADD マウスの作製

DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug)は変異型の G タンパク質共役型受容体で、内在性のリガンドでは活性化せず特定の合成リガンドにより活性化する。Gq 型の DREADD は合成リガンドが結合した時のみ活性化し、発現神経細胞の脱分極を引き起こす。そこで、学習時に活動した細胞集団に DREADD の発現誘導を行い、後に人為的再活動を行うために、cfos-tTA Tg マウスと tetO-DREADD Tg マウスを交配することにより、cfos-tTA x tetO-DREADD ダブル Tg マウスを作製した。

4. 研究成果

(1) cfos-tTA x tet0-ChR2 (ポジティブフィードバックループ発現システム付き) マウスに関して、作製したベクターの精製 DNA 断片を C57BL/6J の受精卵に注入し、4 匹のファウンダーマウスを得た。適切な発現を示す系統の選択を行うために、各ファウンダーマウスを cfos-tTA Tg マウスと交配し、その産仔を用いて発現解析を行った。Dox 依存性および神経活動依存性の 2 つの観点から解析を行った。非常に残念ながら 3 系統に関しては ChR2-Venus の発現がほとんど確認できなかった。1 系統においては、Dox 依存的に脳内の特定領域に強い発現が確認されたものの、神経活動依存的な発現が確認されなかった。

(2) cfos-tTA x tet0-DREADD マウスに関しても cfos-tTA x tet0-ChR2 と同様に発現解析を行った。その結果、Dox 依存性かつ神経活動依存性な DREADD の発現が確認できた。また、恐怖条件付け学習課題により誘導される DREADD 発現細胞のほとんどが CaMKII α 陽性細胞と共染色されることから、興奮性細胞であることを示した。また、DREADD の特異的合成リガンドである clozapine-N-oxide (CNO) を腹腔内投与することによって、脳内に存在する DREADD 発現細胞が活性化することを最初期遺伝子の発現との共染色により確認した。

Dox 除去期間中に cfos-tTA x tet0-DREADD マウスを用いて恐怖条件付け学習課題を行うことにより、課題時に活動した特定の神経アンサンブルを DREDD により標識を行った。課題後は Dox 入りの餌を再び与えることにより、その後の学習課題とは無関係な神経活動により DREADD が発現することを抑制した。学習課題の翌日に、恐怖記憶の消去訓練を行い、無条件反応 (UR) のひとつであるすくみ反応が減衰することを確認した。条件付けにより獲得された恐怖記憶は、動物を非条件刺激 (US) 無しに繰り返し、条件刺激 (CS) に暴露することで恐怖記憶の表出を抑えることができる。

このように CS によりマウスが、もはや恐怖反応を示さない状態で CNO の腹腔内投与を行い、学習課題時に活動した神経アンサンブルの人為的な再活動を行った。その結果、コントロール群 (CNO 投与を行わなかった Tg マウス、CNO 投与を行った野生型マウス、CNO 投与を行わなかった野生型マウス) に比べて有意に高いすくみ反応を示すことを見いだした (Yoshii, Hosokawa & Matsuo, 論文リバイス中)。この結果は、学習時に活動した脳内の一部の特定の神経細胞集団の再活動が、その記憶の想起を誘導するのに十分であるという因果十分性を示すものである。また、消去訓練はヒトの心的外傷後ストレス障害

(Post Traumatic Stress Disorder : PTSD) 治療法の一つである暴露療法モデルと考えられているが、本研究の結果は、見かけ上はいったん消去された様に見える恐怖記憶が実際には脳内から消し去られたわけではなく、その痕跡が脳内に残存していることを示唆する。

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 3 件)

Matsuo, N.

Irreplaceability of neuronal ensembles after memory allocation.
Cell Reports 11, 351-357 (2015) 査読有

北西卓磨、松尾直毅

海馬体-嗅内皮質における空間認知システム
ライフサイエンス領域融合レビュー 4, e001
(2015)

松尾直毅

記憶痕跡の可視化と操作
生体の科学 64, 36-40 (2013)

[学会発表] (計 9 件)

松尾直毅

第 92 回日本生理学会大会 シンポジウム
「Visualization of Neural Representations of Memory」
平成 27 年 3 月 22 日、神戸市

松尾直毅

第 88 回日本薬理学会年会 シンポジウム
「Dynamic Changes in Hippocampal Ensemble Activities Associated with Contextual Fear Memory Generalization」
平成 27 年 3 月 19 日、名古屋市

松尾直毅

第 37 回日本神経科学大会 シンポジウム
「Manipulation of Memory Engram Using Chemical Genetics」
平成 26 年 9 月 12 日、横浜市

松尾直毅

生理学研究所 研究会「情動研究会」
「情動記憶の脳内表現と表出の制御」
平成 25 年 9 月 3 日、岡崎市

松尾直毅

第 36 回日本神経科学大会 シンポジウム
「Approach for Understanding the Mechanism Linking Multimodal Information to Emotional Behavior」
平成 25 年 6 月 20 日、京都市

松尾直毅

第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ

「神経活動操作による人為的記憶想起」

平成24年12月11日、福岡市

研究者番号：

松尾直毅

生理学研究所 研究会「記憶回路研究会」

「記憶痕跡の探究」

平成24年11月21日、岡崎市

〔図書〕(計1件)

松尾直毅

記憶痕跡の可視化と操作より探る記憶情報の脳内表現

ブレインサイエンスレビュー2014 233-250 (2014)

クバプロ

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mbn.med.osaka-u.ac.jp/mbn/Home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 直毅 (MATSUO, Naoki)

大阪大学・大学院医学系研究科・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

()