

研 究 報 告 書

「個々の記憶情報をコードする神経回路の解析と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研 究 者: 松尾 直毅

1. 研究のねらい

記憶学習は動物が厳しい自然環境下で生き延びていく上で不可欠な能力であるばかりか、ヒトにとって精神活動の基盤ともいえる重要な基本生命機能のひとつである。では、個々の記憶情報は脳内でどのように区別して記録され、必要に応じて適切に読み出されるのか？ この極めて素朴な疑問に対して、現代の神経科学で広く信じられている有力な説明は半世紀以上も昔に心理学者 Hebb 博士により提唱された“cell assembly 仮説”である。この仮説では、「記憶情報は協調的な活動により形成される複数の神経細胞の機能的な集団(cell assembly)により符号化されている」とされている。この仮説は脳動作原理の根幹を為すものの一つであるにもかかわらず、実証は未だ為されていない。なぜならば、これらの集団は常に特定領域の特定細胞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っていると考えられるため、従来の手法では、その同定さえ極めて困難であるからである。しかし、私たちが開発した“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”を用いれば、記憶の獲得(学習)時に活動した神経細胞集団の活動を選択的に操作することが可能であり、行動実験により直接その記憶との因果関係を個体レベルで検証することができる。このように、最先端のマウス遺伝学と行動心理学、イメージング等を組み合わせた融合的研究により、記憶情報が脳内のどこで、どのように区別して表現されているのか？という基本的重大問題の解明に取り組む。

2. 研究成果

(1)概要

任意の時期に活動した神経細胞集団に任意の遺伝子操作を行うことが可能な独自の遺伝子改変マウスを用いることにより、恐怖条件付け学習時に活動した特定の神経細胞集団の活動操作を行った。これらの神経細胞集団のシナプス伝達を遮断した状態で、文脈依存的恐怖記憶の想起テストを行ったところ、障害が見られた。一方、学習後に記憶消去訓練を行い、見かけ上の恐怖記憶が消えた状態で、学習時に活動した神経細胞集団の再活動を行ったところ、条件刺激無しの状態でも恐怖記憶が人為的に再生されることを見出した。これらの結果は、“記憶”と“学習時に活動した一部の特定神経細胞集団の活動”との間の因果関係(必要性と十分性)を示すもので、目に見えない記憶の実体を実験的に示すことができた。

(2)詳細

近年の最初期遺伝子の神経活動依存的な発現を利用した神経活動マッピングや、多電極同時記録による *in vivo* 電気生理学的研究から間接的に、その神経活動が記憶と相関を示す神経細胞集団が見出されつつある。しかし、これらの神経細胞集団が実際に記憶情報を表現

しているのかどうかを明らかにするためには、その活動を選択的に抑制(もしくは賦活化)することにより、実際の記憶の表出が抑制(もしくは再生)されるかどうかの因果関係を示す必要がある。しかし、従来の薬理的・組織傷害的手法では、標的の脳組織内に存在する全ての細胞・回路に影響を与えしまい、組織内に散在する一部の“記憶痕跡細胞集団”の活動を選択的に操作することは不可能である(図 1)。そこで、本研究課題では、神経活動依存的に活動する最初期遺伝子の一つ *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用いた独自の遺伝子改変マウスのシステム(図2: Matsuo et al., *Science* 2008; Reijmers et al., *Science* 2007)を活用した。

図1

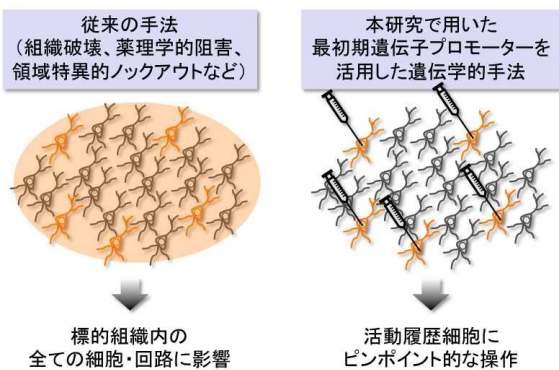
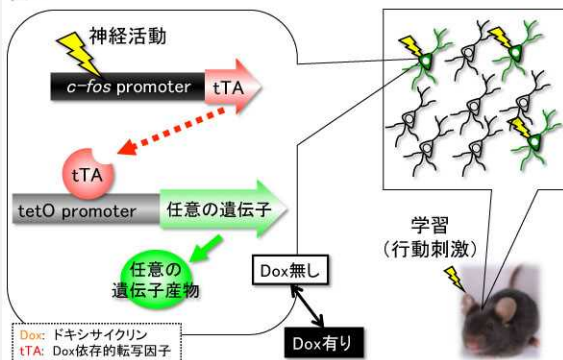


図2



①テタヌス毒素(TeNT)を用いた記憶痕跡細胞集団の活動遮断の解析

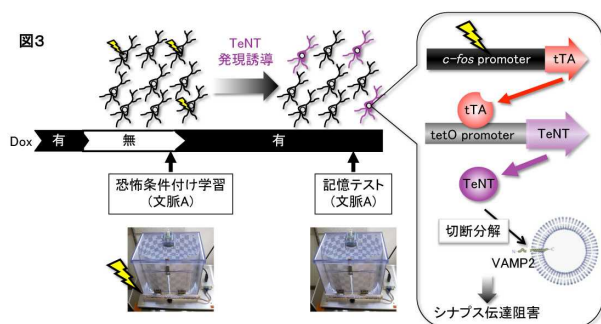
c-fos-tTA マウスと, tetO プロモーターの制御下で tetanus toxin light chain (TeNT) を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニック (Tg) マウスの作製を行った。TeNT は神経活動依存的な前シナプス末端からのシナプス伝達物質

放出に不可欠な VAMP2 (synaptobrevin) を切断不活化することが知られている。そこで、*c-fos*-tTA x tetO-TeNT-GFP マウスを用いることにより、恐怖条件付け学習時に活動した神経細胞集団のシナプス伝達を選択的かつ一時的に遮断し、その記憶の表出に与える影響を行動学的に解析した(図3)。具体的には、Doxycycline (Dox) を含まない餌を与え始めて 3 日目に恐怖条件付け学習訓練を行った。

TeNT mRNA に対する *in situ* hybridization および GFP に対する免疫組織化学染色の結果、海馬 CA1 領域、歯状回、大脳皮質、扁桃体外側核において、～5% の非常に疎らな発現が認められた。また、神経細胞マーカー NeuN や興奮性神経細胞マーカー CaMKII α と

の二重染色の結果、ほぼ100%の TeNT-GFP 陽性細胞が興奮性神経細胞であることを明らかにした。訓練とは無関係な神経活動による TeNT の発現誘導を防ぐために、訓練後は再び Dox を含む餌を与えた。そこで、学習訓練の24時間後に文脈依存的な恐怖記憶の想起テストを行ったところ、対照群のマウスに比べて有意に低い freezing (すくみ反応) を示すことを見出した。しかし、学習時に誘導された TeNT 蛋白質が既に分解された28日後に同様の想起テストを行ったところ、対照群のマウスと同程度の顕著な freezing を示した。これらの結果は、学

図3

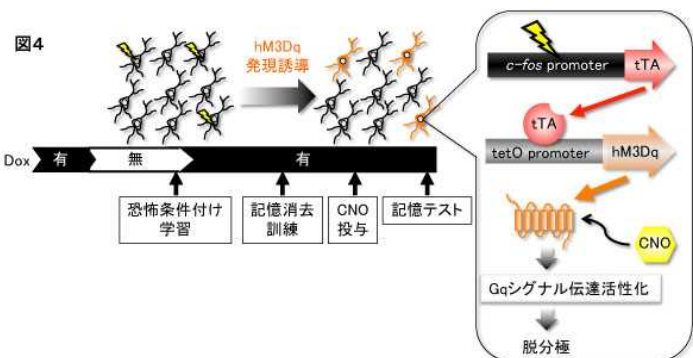


習時に活動した神経細胞集団の活動を選択的に遮断することにより、記憶の想起が障害されたことを示唆している。つまり、学習時に活動した神経細胞集団の活動が、その記憶の想起に必要であるという因果必然性を示した (Matsuo, submitted)。

さらに、学習時に活動した神経細胞群のシナプス伝達が TeNT により障害された状態で、再学習訓練を行った。対照群の野生型マウスでは再学習による記憶の強化 (freezing の増加) が認められたが、Tg マウスでは freezing の増加が認められなかった。学習障害の特異性を明らかにするために、異なる文脈に対する恐怖条件付け学習を行い、記憶想起テストを行ったところ、Tg マウスにおいても顕著な freezing を示したことから、特定の記憶情報を担う一部の神経細胞集団の活動を選択的に遮断していることが示唆された。これらの結果は、特定の記憶情報を担う神経細胞集団がいったん決定されて割り当てられると、その神経活動が障害されても代わりの細胞集団に記憶情報が割り当てられるという補償機構が生じないことを示唆する (Matsuo, submitted)。本研究により示唆される、同じ学習には優先的に同じ神経細胞集団が使われるという頑固な機構の存在は、繰り返し学習による記憶の強化を担保する重要なものであると考えられる。

②DREADD を用いた記憶痕跡細胞集団の人為的賦活化の解析

DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) システムを利用することにより、学習時に活動した神経細胞群の人為的な賦活化を行った。そのために、*cfos*-tTA マウスと *tetO*-hM3Dq マウスを掛け合わせたダブル Tg マウスを作製した。このマウスを用いて、Dox 除去期間中に恐怖条件付け学習訓練を行った。この時に活動した神経細胞集団を hM3Dq により標識した後、条件付けを行った環境にマウスを繰り返し暴露することにより記憶の消去訓練を行った。その後、CNO (clozapine-N-oxide) を投与することにより、hM3Dq 標識細胞集団の人為的な再活動を誘導した (図4)。その結果、対照群のマウスと比べて顕著なすくみ反応を示すことを見出した。つまり、恐怖条件付け学習時に活動した特定細胞集団を人為的に再活動させることにより、恐怖記憶を再生するのに十分であるという因果十分性を実証した (Yoshii, Hosokawa & Matsuo, submitted)。また、恐怖記憶の痕跡は、ヒトの PTSD (心的外傷後ストレス障害) の治療モデルと知られる消去訓練に耐性であり、忘れ去られたかに見える恐怖記憶が実際には脳内から消し去られた訳では無いことを示唆する。



3. 今後の展開

本研究により、記憶という実体の見えないものを自然科学の言葉で扱うことができる基盤を形成することができた。このことは、個々の記憶情報を担う細胞集団 (の一部) を脳内で可視化し、活動操作することが可能であることを意味する。今後は、これらの基盤に加えて、*in vivo* カルシ

ウムイメージング法なども組み合わせ、記憶痕跡細胞集団の特性を明らかにする研究を展開したい。例えば、無数に存在する神経細胞集団の中から、どのような仕組みによって、これらの一部の特定の細胞集団が学習過程において選択され、特定の記憶情報が割り当てられるのか？という問題。同一の脳領域内、もしくは複数の脳領域にまたがる cell assembly の相互作用の解析も重要な研究となる。また、記憶は時間経過や様々な経験により変化するが、これらの神経基盤と仕組みを明らかにしていきたい。記憶は私たちヒトの精神活動(心)の基盤とも言える重要な生命機能である。記憶メカニズムの理解は将来的に“心”というものの科学的・物質的基盤の理解の礎となることが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究により、申請時の目標であった、記憶という実体の曖昧な目に見えないものの物質的基盤が脳内の特定の神経細胞群の活動にあることの因果関係を動物個体レベルで示すことができた。更に、個々の記憶情報がどのように区別して脳内で表現されているのか？という本研究課題に密接に付随した問題に関しても、記憶の汎化現象に着目して、独自の活動履歴可視化マウスを活用した解析を行い、似た情報の想起の際に区別を行っている脳領域の同定を行うことができた(Yokoyama & Matsuo, *in revision*)。当初の研究目標は競争に敗れたものの、責任著者である論文3報を投稿中・リバイス中であり(2014年11月現在)、関連した共同研究論文1本を *Science* 誌に公表できたことから、ほぼ達成できたと考えている。独自の遺伝子改変マウスを利用した研究は、これまで進まなかった“個々の”記憶情報の操作、および動作原理の解明という革新的な研究領域の開拓・進展に大きく貢献してきたと考えている。実際に、私たちが開発したトランスジェニックマウスを利用した記憶痕跡や記憶操作に関する画期的な成果が海外の有力研究室から次々と公表されている(Garner et al., *Science* 2012; Liu et al., *Nature* 2012; Ramirez et al., *Science* 2013; Redondo et al., *Nature* 2014 など)。このことは同時に、国内外の有力研究グループとの厳しい競争となっていることを意味し、いかにして小規模のグループで太刀打ちするのかの戦略を再考させられることとなった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

先に開発した、任意の時期に活動した神経細胞集団に任意の遺伝子操作を行うことができる遺伝子改変マウスを活用して、「記憶情報は協調的な活動により形成される複数の散在神経細胞の機能的な集団により符号化されている」という cell assembly 仮説の実験的検証に意欲的に挑戦したものである。TetOプロモーターを利用してシナプス伝達を可逆的に遮断できる毒素を薬物投与により発現するよう仕組んだ遺伝子改変マウスを作出して、状況空間を記憶させる恐怖刺激を与えたのちシナプス遮断を行うと記憶の想起が障害されることが、遮断から回復する1ヵ月後に記憶想起も回復することを明らかにし、またその特異性も実証して、特定の記憶情報を担う一部の神経細胞集団が存在することを示し得たことは大きい成果であり、課題の根幹を達成したものである。世界的にも競争の激しいこの分野において小グループでこれを成し

遂げたことも注目される。今後は解剖学的解析も加えてこの記憶“痕跡”細胞集団の実体と特性を明らかにし、さらには複数の脳領域にまたがる記憶細胞集団の解析などから、記憶における各領域の機能とその制御の理解にも発展できればさらに大きな成果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Takahashi N, Kitamura, Matsuo N, Mayford M, Kano M, Matsuki N, Ikegaya Y.
Locally synchronized synaptic inputs.
Science 335, 353–356 (2012)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<学会招待講演>

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 21 日、神戸市

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

第 36 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

第 3 回大阪大学神経難病フォーラム

「情動記憶の脳内表現と制御」

平成 26 年 8 月 9 日、吹田市

生理学研究所「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

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

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

生理学研究所「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

東京大学大学院医学研究科 機能生物学セミナー

「遺伝子改変マウスを用いた記憶の実体の探究」

平成 24 年 10 月 29 日、文京区

The Second International Young Scientists Career Development Organization Symposium

「In Search of the Memory Engram Using Genetically Engineered Mice」

平成 24 年 2 月 1 日、京都市

<著作物>

北西卓磨、松尾直毅

「脳の空間認知システム」

ライフサイエンス領域統合レビュー

ライフサイエンス統合データベースセンター

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

松尾直毅

「記憶痕跡の可視化と操作」

生体の科学 64, 36-40 (2013)

医学書院