

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 橋川浩一

記憶は日々の生活での確に行動するために必須であると共に、人を人たらしめる人格の形成にも関与する。そのため、記憶形成メカニズムの解明は神経科学で最も重要な課題の一つである。中でも連合記憶は、人を含め多くの動物が環境で適応的に行動するために、普遍的に備えている認知機能である。動物モデルを用いた先行研究により、連合記憶に関与する脳領域、神経伝達様式の変化、神経構造の変化、分子機構などが明らかにされてきた。さらに近年、記憶が特定の神経細胞集団 “neural ensemble” により表象されることを支持する知見が蓄積してきた。しかし、「学習時に、どの神経細胞集団がどのように活動して、記憶に関わる細胞が選択されるのか」は分かっていない。本研究の目的は、連合記憶形成に関与する、神経細胞集団の活動を明らかにすることである。

神経活動の“観察”と“制御”という相補的なアプローチを組み合わせ、上記の課題に取り組んだ。神経活動を観察するだけでは、観察された活動と記憶形成が無関係な並行現象の可能性があるため、特定の神経活動を選択的に制御することで記憶形成への役割を調べた。

1. 味覚嫌悪学習時に生じる神経活動

本研究では味覚嫌悪条件づけを連合学習課題として用いた。マウスは味覚と内臓不快感の二つの異なる刺激の関係を学習する。嫌悪記憶が形成されるとマウスは条件づけで用いた味覚刺激を避けるようになる。味覚と内臓不快感刺激を数分から数時間の時間間隔を設けて提示しても学習が成立するため、二つの刺激に対応した神経活動を明確に区別できる。味覚嫌悪学習時の扁桃体基底外側核 (BLA)における神経活動を *Arc catFISH* 法により大規模にイメージングした。*Arc* は神経活動に依存して一過性に発現が誘導される *Immediate early gene (IEG)* の1つで、神経活動マーカーとして用いられる。*Arc* の細胞内局在が時間的に厳密に制御されていることを利用して、数百個の神経細胞の活動を複数のタイムポイントで観察することを可能とする。

味覚刺激と内臓不快感刺激によってそれぞれ $10.1 \pm 2.0 \%$ 、 $9.2 \pm 0.6 \%$ の細胞が活動した (数値は平均値 \pm SEM。以下同様)。また、味覚刺激と内臓不快感刺激の両方で活動した細胞は $4.2 \pm 0.3 \%$ もあった (もし独立であれば、両方で活動する細胞の割合は $0.95 \pm 0.23 \%$ と算出される。味覚刺激と内臓不快感刺激で活動した細胞集団の重なり (類似度) は $44 \pm 0.1 \%$ であった。味覚刺激を提示した時に活動した細胞の半数近くの細胞が内臓不快感刺激でも活動したことを意味する。本結果を受け、「扁桃体の神経細胞 (亜神経細胞集団) が味覚刺激と内臓不快感刺激の両方で活動することで記憶が形成される」という仮説を立てた。仮

説を検証するためには、味覚刺激で活性化した細胞のみを選択的に、内臓不快感刺激提示時に不活性化しなければならない。CREB-Allatostatin システムを用いて、これを達成した。CREB と Allatostatin 受容体の両方の遺伝子を搭載した単純ヘルペスウイルス(CREB-*AlstR* HSV; HSV-CREB)を使用することで、両遺伝子を一部の細胞にのみ発現させた ($19 \pm 1.8\%$)。転写因子の一つである、CREB を過剰発現した細胞は細胞の興奮性が上昇する。Allatostatin 受容体はショウジョウバエ由来の G タンパク共役型受容体であり、リガンドの Allatostatin が結合すると細胞は過分極し活動が可逆的に抑制される。

2. CREB による味覚刺激時に活動する細胞の選択

まず CREB が味覚刺激提示時の細胞の活動に与える影響を調べた。ウイルス感染細胞 (GFP 陽性細胞) と非感染細胞 (GFP 陰性細胞) を分けて解析したところウイルス感染細胞が優先的に活性化していた。GFP 陽性細胞のうち $63 \pm 3.3\%$ が味覚刺激提示時に活性化したのに対し、GFP 陰性細胞のうち $3.4 \pm 1.4\%$ が活性化した。一方でコントロールウイルスとして、CREB を LacZ に置換した LacZ-*AlstR* HSV (HSV-LacZ)を用いた場合は、GFP 陽性・陰性細胞ともに同程度活動した ($10.9 \pm 3.2\%$ vs $11.6 \pm 1.2\%$)。これらの結果は、扁桃体において神経細胞に CREB を導入することで、それらの細胞が味覚刺激提示時に優先的に活性化することを示している。

3. 味覚刺激と内臓不快感刺激の収斂を阻害すると記憶形成が障害される

味覚刺激で活動した細胞が内臓不快感刺激でも活動することが記憶形成に関与するかを調べた。HSV-CREB を BLA の神経細胞 (~20%) に感染させ、味覚刺激提示後に Allatostatin を投与した。これにより、味覚刺激で活性化した細胞を高い選択性で内臓不快感刺激時に不活性化した。Allatostatin 投与により記憶形成が障害された。しかし、ランダムに BLA の 20% 程度の細胞を内臓不快感刺激時に不活性化した場合にも同様に記憶形成が障害されるかもしれない。この可能性を HSV-LacZ を用いて検証した。HSV-LacZ を感染させた場合は、Allatostatin を投与しても記憶成績に影響はなかった。

もし、味覚刺激と内臓不快感刺激の亜細胞集団における収斂が連合記憶形成に関与するならば、HSV-CREB に感染した細胞 (味覚刺激で優先的に活性化する細胞) を味覚刺激時にのみ抑制しても記憶形成が障害されるはずである。

HSV-CREB 感染細胞を味覚刺激時にのみ不活性化するために、味覚刺激と内臓不快感刺激の間隔を 2.5 時間設け、味覚刺激の 30 分前に allatostatin を投与した (予備実験において、allatostatin の効果が 30 分以上 3 時間以内であることをすでに確認している)。Allatostatin 投与により、記憶形成が障害された。さらに、HSV-CREB に感染した細胞を内臓不快感刺激時に不活性化した場合も記憶形成が障害された。

以上のように、味覚刺激と内臓不快感刺激の一部の細胞における収斂を阻害するために、HSV-CREB 感染細胞を味覚刺激または内臓不快感刺激時に不活性化すると、いずれの場合も連合記憶形成が障害された。本研究結果は「扁桃体の亜神経細胞集団が味覚刺激と内臓

不快感刺激の両方で活動することで記憶が形成される」という仮説を支持している。

4. 異なる感覚刺激を用いた連合記憶は特定の条件で干渉する

上記の研究に加えて異なる感覚刺激を用いた連合記憶が干渉しうるかを調べた。学習課題として文脈的恐怖条件づけと味覚嫌悪条件づけを用いた。両学習課題ともに扁桃体が連合性獲得の中核と考えられており、干渉が生じると予測した。両課題を様々な時間間隔 (0.5 hr ~ 5 hr) で行ったところ、文脈的恐怖条件づけの2時間後に味覚嫌悪条件づけを行った時にのみ味覚嫌悪記憶形成が顕著に障害された。また、味覚嫌悪記憶形成障害は長期記憶において観察され、短期記憶への影響は認められなかった。文脈的恐怖条件づけにより、味覚嫌悪記憶の固定化が障害されたことが示唆された。

本研究では、連合記憶形成と連合記憶の干渉に関して以下の点を明らかにした。連合記憶形成時の扁桃体細胞集団の神経活動を IEG を用いたイメージング法により観察し、薬理遺伝学的手法により制御することで、一部の細胞 (亜神経細胞集団) における刺激の収斂が連合記憶形成に関与することを示唆した。HSV は投与部位の神経細胞にランダムに感染することから、扁桃体では記憶に関わる細胞の選択に、神経投射などの hard-wired な要素のみが関与するわけではなく、細胞の状態 (細胞の興奮性、遺伝子発現など) の周りの細胞との相対的な差異も関与していると推察される。

異なる感覚入力を用いた記憶が干渉しうることを示した。従来、記憶の干渉は類似の学習課題を用いたときに顕著に生じ、異なった感覚入力を用いた場合は干渉が生じにくいとされてきた。その点で本研究成果は大変興味深い。どのような神経生理学的基盤が記憶の干渉の原因となっているのかはほとんどわかっていない。両学習課題が扁桃体の一部の神経細胞に担われていること、味覚嫌悪記憶の長期記憶が影響されたことを合わせて考えると、両学習課題時に重複した神経細胞集団が活性化し、重複した細胞内で遺伝子発現に影響・発現した遺伝子産物の競合的搾取などが生じることで、記憶が干渉したのではと推察する。数時間離れた課題に対応した神経活動を検出するなどのさらに高度な実験手法がこれからの研究に必要である。

本研究は、連合記憶の形成と連合記憶の干渉の機構について、全く新しい手法で解析したものであり、博士(薬学)の学位授与に値すると判断した。