

# 博士論文

論文題目 学習における前頭連合野による情報の統合

氏名 中山 大輔

## 目次

要旨	3
諸言	6
実験手法	8
結果	14
図	20
考察	31
参考文献	32
謝辞	35

## 要旨

記憶は日々の生活を適応的に行動するために必要不可欠であるとともに、人格形成にも大きく影響する。中でも、2つの異なる情報の関連性を記憶する連合学習は日常の様々な場面でみられ、その機構解明は神経科学における最重要課題の一つである。

前頭連合野は高次な脳機能との関連が示唆されており、認知症患者で前頭連合野の異常な活動がみられるなど、記憶学習への関与が推測される。これまでに、前頭連合野が連合学習に寄与すること、音などの感覚刺激によって前頭連合野シナプスの構造的変化が生じることが報告されている。しかし、前頭連合野が連合学習に寄与する細胞・神経回路機構は未だ不明である。本研究は、学習における前頭連合野の役割解明を目的とし、細胞・神経回路レベルでの検討を行った。

連合学習のモデルとして、文脈的恐怖条件づけを用いた。この課題においてマウスは、「環境」と「電気ショック」の関連性を学習し、その環境を恐怖の対象として記憶する。マウスは再び実験環境に提示することで、電気ショックのない状態でもすくみ反応を示す。このすくみ反応時間を測定することで記憶の程度を定量できる。

文脈的恐怖学習に前頭連合野が寄与するかを確認するため、NMDA 受容体阻害薬またはタンパク質合成阻害薬（アニソマイシン）を前頭連合野内に局所投与した。NMDA 受容体阻害薬またはアニソマイシンの投与により学習が障害されたことから、文脈的恐怖学習に前頭連合野が寄与することが示唆された。

前頭連合野が環境と電気ショックのうち、どちらの情報処理に寄与するかを検討するため、文脈的恐怖学習を改変し、環境と電気ショックの提示を1日間空けることで分離した。まず、環境提示直後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与することで環境の情報処理に与える影響を検討した。アニソマイシンの投与によって、テスト時のすくみ反応時間が低下した。前頭連合野は環境の情報処理に寄与すると考えられる。次に、電気ショック提示直後にアニソマイシンを投与することで電気ショックの情報処理に与える影響を検討した。

環境提示直後と同様に、アニソマイシン投与によって、テスト時のすくみ反応時間が低下した。これらの結果から、前頭連合野は環境と電気ショック両方の情報処理に寄与することが示唆された。

前頭連合野が環境と電気ショック両方の情報処理に寄与する。このことから、学習時に前頭連合野の同一神経細胞が異なる 2 つの情報を受け取ることで、情報が統合されるのではないかと考えた。環境と電気ショックに対する神経細胞の活動をそれぞれ独立して検出し、比較するためには、時間的に離れた 2 点の活動を区別して検出する必要がある。そのため、*Arc catFISH* 法を用いた。*Arc mRNA* は神経活動 5 分後に核内に、神経活動 30 分後に細胞質にのみ局在する特徴を有しており、*Arc* の細胞内局在に着目することで個々の細胞の活動履歴を捉えられる。

*Arc catFISH* 法により環境と電気ショックに対する前頭連合野の活動を解析するため、環境と電気ショックを 25 分の間隔を空けて提示した。環境提示 30 分後に細胞質に、電気ショック提示 5 分後に核内に *Arc* を発現することを確認するため、それぞれ環境群、電気ショック群を設けた。その結果、環境群では、細胞質陽性細胞数の増加がみられたが、核陽性細胞数は対照群と同程度であった。電気ショック群では、細胞質陽性細胞数は対照群と同程度であったが、核陽性細胞数の増加がみられた。そして学習群では、細胞質陽性・核陽性細胞数ともに増加した。これらの結果から、環境と電気ショックそれぞれに対して前頭連合野の神経細胞が活動することが示唆された。更に、核・細胞質両方に *Arc* を発現している細胞数の割合を解析した結果、学習群でのみ核・細胞質共陽性細胞の割合が多かった。核・細胞質共陽性細胞の割合は、偶然核・細胞質両方に *Arc* を発現しうる割合であるチャンス値よりも高い値を示した。以上のことから、前頭連合野の一部の同一神経細胞が学習時に環境と電気ショック両方の情報を受け取っていると考えられる。

最後に、前頭連合野に環境と電気ショックの情報を送っている脳領域を検討した。神経トレーサーであるコレラトキシンサブユニット B (CTB) を前頭連合野内に局所投与し、

その逆行性シグナルを全脳で解析することで前頭連合野に投射を送る領域を同定した。文脈的恐怖学習との関連が示されている脳領域の中でも、特に鼻周囲皮質と島皮質において逆行性シグナルが多くみられた。そこで、環境・電気ショックの情報処理における鼻周囲皮質→前頭連合野・島皮質→前頭連合野経路の機能を検討した。

まず、前頭連合野内に CTB を局所投与することで、前頭連合野に投射を送る神経細胞を標識した。そして、環境または電気ショックを提示後に脳を摘出した。神経活動依存的に発現する c-Fos タンパク質の免疫染色により、神経活動を可視化した。その結果、鼻周囲皮質では環境提示によって c-Fos 陽性細胞数が増加したが、電気ショック提示時には対照群と同程度であった。一方で、島皮質では電気ショックの提示によって c-Fos 陽性細胞数が増加したが、環境提示時には対照群と同程度であった。この結果から、前頭連合野に投射を送る鼻周囲皮質神経細胞が環境提示時に、島皮質神経細胞が電気ショック提示時にそれぞれ活動することが示唆された。更に、鼻周囲皮質の活動を Na チャネル阻害薬で阻害した場合、前頭連合野の環境に対する Arc 発現が抑制された。島皮質の活動を阻害した場合、前頭連合野の電気ショックに対する Arc 発現が抑制された。以上の結果から、鼻周囲皮質が環境の情報を、島皮質が電気ショックの情報を前頭連合野に送ると考えられる。

本研究により、連合学習における前頭連合野の細胞・神経回路機構が明らかとなった。前頭連合野は、環境・電気ショック両方の情報処理に寄与する。そして、鼻周囲皮質・島皮質を介して送られてくる環境・電気ショックの情報が、前頭連合野内の同一神経細胞内に収斂する。別々の神経回路を介して送られてくる異なる情報が前頭連合野内の同一細胞内で統合されることで連合学習が形成されると考えられる。

## 諸言

記憶は日々の生活を適応的に行動するために必要不可欠であるとともに、人格形成にも大きく影響する。中でも、2つの異なる情報の関連性を記憶する連合学習は日常の様々な場面でみられる。視覚の情報は視覚皮質をはじめとした視覚系の神経回路を、痛みの情報は脊髄をはじめとした痛覚系の神経回路を介して、それぞれ独立して知覚される。連合学習時には、別々の回路を介して知覚される情報が脳内で統合されることで、質的に全く異なる情報どうしが関連付けられる。その統合機構解明は神経科学における最重要課題の一つである。

マウスを対象とした連合学習のモデルとして古典的恐怖条件づけが広く用いられてきた。これは、音や環境などといった中立的な刺激と電気ショックなどの嫌悪性刺激との関連性を学習する課題である。恐怖条件づけには扁桃体が中心的役割を担うとされ、扁桃体内で情報の統合がおこなわれると考えられている(Frankland et al., 2004; Hashikawa et al., 2013; Johansen et al., 2011; Malin and McGaugh, 2006; Maren, 2001)。しかし、扁桃体を損傷しても学習条件次第では連合学習が成立するなど、扁桃体外での神経回路による寄与の存在が推測される(Gale et al., 2004)。

前頭連合野は高次な脳機能との関連が示唆されており(Hebb, 1945)、認知症患者で前頭連合野の異常な活動がみられるなど(Chase et al., 1984; Cutler et al., 1985; Foster et al., 1984)、記憶学習への関与が推測される。これまでに、前頭連合野が連合学習に寄与することが報告されている(Lai et al., 2012; Li et al., 2008; Sacchetti et al., 2003)。更に近年、音などの感覚刺激に付随して前頭連合野シナプスの構造的変化が生じることが報告されている(Lai et al., 2012)。これは前頭連合野が複数の感覚情報を受け取る領域であることを示唆している。このことから、学習時において前頭連合野が複数の感覚情報を受け取り、それらの情報を統合することで記憶・学習に寄与することが推測される。しかし、前頭連合野が連合学習に寄与する細胞・神経回路機構は未だ不明である。本研究は、学習における前

頭連合野の役割解明を目的とし、細胞・神経回路レベルでの検討を行った。

# 実験手法

## 実験動物

8~13 週齢、体重 20~30g の♂の C57BL/6J マウス（日本 SLC）を用いた。マウスは 1 ケージに 2~4 匹、12 時間の明暗サイクル（明期, 7:00-19:00）、自由摂食・節水下で飼育した。実験開始 7 日前からハンドリングを行い、行動試験開始 2 日前から個飼いした。行動試験は全て 8:00~11:00 の間に行った。

## 文脈的恐怖学習

文脈的恐怖学習は、アクリルチャンバー（幅：18 cm、長さ：25 cm、高さ：27 cm）とステンレス格子の床から構成される環境で行った。実験環境は、毎回 70% エタノールで掃除した。

### 実験 1

実験 1 では文脈的恐怖学習における前頭連合野の必要性を確認した。行動試験 1 日目に文脈的恐怖学習をおこなった。実験環境提示 130 秒後に床のステンレス格子から電気ショック（1mA, 2 秒）をマウスに与えた。更に、その 100 秒・200 秒後にも電気ショックを与え、合計 3 回の電気ショックを与えた。最後の電気ショックから 50 秒後にマウスを実験環境から飼育ケージに戻した。合計 380 秒のこのプロトコルを“標準型”文脈的恐怖学習とした。D-AP5 またはアニソマイシンを両側の前頭連合野内に局所投与することで、前頭連合野の必要性を検討した。D-AP5 は文脈的恐怖学習 30 分前に、アニソマイシンは文脈的恐怖学習直後に投与した。コントロール群では、それぞれの溶媒を投与した。記憶成績は学習翌日に評価した。

### 実験 2

薬物投与の局所性を確認するため、前頭連合野に隣接する領域である腹内側前頭前皮質内にアニソマイシンを投与した。行動試験 1 日目に標準型文脈的恐怖学習おこない、その



直後にアニソマイシンを投与した。記憶成績は学習翌日に評価した。

### 実験 3

環境と電気ショックの情報処理における前頭連合野の必要性を検討するため、“改変型”文脈的恐怖学習を用いた。行動試験 1 日目にマウスを実験環境に 600 秒、電気ショックを与えずに提示した。2 日目に実験環境提示直後に電気ショック (1mA, 6 秒) を与え、すぐに飼育ケージに戻した。3 日目に記憶成績を評価した。アニソマイシンを 1 日目の環境提示直後または 6 時間後、または電気ショック提示直後に投与した。

### 実験 4

前頭連合野ニューロンにおける *Arc* 発現のタイムコースを検討した。コントロール群では、飼育ケージにいるマウスの脳をすぐに摘出した。0 分群では、5 分間の環境提示後すぐに脳を摘出した。30 分群では 5 分間の環境提示後すぐに脳を摘出した。

### 実験 5

25 分の間隔で環境と電気ショックを分離した場合でも、連合学習が成立することを確認した。環境群と学習群では、行動試験 1 日目にマウスを 10 分間環境に提示することで、実験環境を学習させた。環境群は 2 日目に 5 分間環境に提示した。電気ショック群は、環境提示直後に電気ショック (1mA, 6 秒) を与え、すぐに飼育ケージに戻した。学習群は 2 日目に 5 分間環境に提示し、一旦飼育ケージに戻した。その 25 分後に実験環境提示直後に電気ショック (1mA, 6 秒) を与え、すぐに飼育ケージに戻した。記憶成績は 3 日目に評価した。

### 実験 6

環境と電気ショックに対する前頭連合野の *Arc* 発現を検討した。コントロール群では、飼育ケージにいるマウスの脳をすぐに摘出した。環境群と学習群では、行動試験 1 日目にマウスを 10 分間環境に提示することで、実験環境を学習させた。環境群は 2 日目に 5 分間環境に提示し、30 分後に脳を摘出した。電気ショック群は環境提示直後に電気ショック

(1mA, 6 秒) を与え、すぐに飼育ケージに戻した。そしてその 5 分後に脳を摘出した。学習群は 2 日目に 5 分間環境に提示し、一旦飼育ケージに戻した。その 25 分後に実験環境提示直後に電気ショック (1mA, 6 秒) を与え、すぐに飼育ケージに戻し、5 分後に脳を摘出した。

#### 実験 7

電気ショックに対する *Arc* 発現が環境の提示に由来するものである可能性を確認した。環境群ではマウスを 35 分間環境に提示し、すぐに脳を摘出した。環境+電気ショック群では 30 分間環境に提示し、電気ショック (1mA, 6 秒) を与え、そのまま 5 分間環境に提示した後、脳を摘出した。

#### 実験 8

鼻周囲皮質、島皮質の活動が文脈的恐怖学習に必要であることを確認した。標準型文脈的恐怖学習 90 分前にテトロドトキシンを鼻周囲皮質または島皮質内に投与し、翌日の記憶成績を評価した。

#### 実験 9

前頭連合野に投射を送るニューロンが環境または電気ショックに対して活動するかを検討した。行動試験開始 7 日前にコレラトキシンサブユニット B (CTB) を前頭連合野内に投与した。コントロール群では飼育ケージにいるマウスの脳を摘出した。環境群は 10 分間環境に提示し、その 90 分後に脳を摘出した。電気ショック群は電気ショック (1mA, 6 秒) を与え、その 90 分後に脳を摘出した。

#### 実験 10

鼻周囲皮質の抑制が前頭連合野の環境に対する *Arc* 発現に影響する可能性を検討した。両側の鼻周囲皮質内にテトロドトキシンを投与し、90 分後に 10 分間環境に提示した。その 90 分後に脳を摘出した。

## 実験 11

島皮質の抑制が前頭連合野の電気ショックに対する Arc 発現に影響する可能性を検討した。両側の島皮質内にテトロドトキシンを投与し、90 分後に電気ショックに提示した。その 90 分後に脳を摘出した。

記憶成績の評価は電気ショックのない状態で実験環境に 4 分間提示時、その間にマウスが示したすくみ反応時間を測定した。すくみ反応時間は ImageJ により (Nomura and Matsuki, 2008) と同様に算出した。

### 局所投与用手術

ペントバルビタール (2.5mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) を腹腔内投与することで、マウスに麻酔し、ステンレス製のガイドカニューレ (Plastics One) をマウス脳内に埋め込んだ。前頭連合野への局所投与はブレグマから 3.0 mm 前側、1.7 mm 外側、1.2 mm 腹側へ、腹内側前頭前皮質への投与はブレグマから 2.8 mm 前側、0.3 mm 外側、1.4 mm 腹側へ、鼻周囲皮質への投与はブレグマから 2.0 mm 後側、4.0 mm 外側、4.0 mm 腹側へ、島皮質への投与はブレグマから 1.7 mm 前側、2.6 mm 外側、3.0 mm 腹側へと投与した。ガイドカニューレは歯科用セメントで頭蓋骨と固定した。手術後最低 7 日以上の回復期間において行動試験をおこなった。

### 薬物投与

D-AP5 (2.5 µg, TOCRIS)、アニソマイシン (62.5 µg, Sigma)、テトロドトキシン (0.5 ng, TOCRIS)、CTB (Alexa Fluor 488 conjugate of cholera toxin subunit B, 5%, Life Technologies) の全ての薬物は片側につき 0.5 µL の溶媒中に溶解させて投与した。D-AP5、テトロドトキシン、CTB はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を溶媒とした。アニソマイシンは塩化水素に溶解させ、水酸化ナトリウムで pH7.4 に調整した後に PBS で希釈した。局

所投与は流速 0.25 $\mu$ L/min で 2 分間かけて投与した。

### Arc catFISH (in situ hybridization)、解析

脳は摘出後、染色をおこなうまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。クリオスタットにより 20  $\mu$ m 厚の脳切片を作成し、スライドガラス上で染色をおこなった。これまでに当研究室がおこなってきたプロトコールを参考におこなった(Nomura et al., 2012)。

染色画像は共焦点顕微鏡 (CV1000、YOKOGAWA、油浸 40 倍レンズ) によって取得した。得られた画像は、MATLAB プログラムにより解析した。1 つから 2 つの特徴的なシグナルが核内でみられた細胞を“核陽性”と判断した。核の周辺または細胞質にシグナルがみられた細胞を“細胞質陽性”と判断した。その両方が観察された細胞を“核・細胞質共陽性”と判断した。チャンス値は次のように算出した。チャンス値 = (全細胞質 Arc 陽性細胞の割合)  $\times$  (全核 Arc 陽性細胞の割合)  $\div$  100。

### 免疫組織化学染色

ジエチルエーテルによる安楽死後、PBS で還流し、4%PFA で固定した。摘出した脳は 6-9 時間 4%パラホルムアルデヒド (PFA) により後固定し、12 時間 30%スクロース置換をおこなった。クリオスタットで 40  $\mu$ m 厚の浮遊切片を作成した。c-Fos タンパク質は anti-c-Fos 抗体 (1:1000, sc-52, Santa Cruz, 4 $^{\circ}$ C, O.N.)、ビオチン化 anti-rabbit 二次抗体 (1:500, BA-1000, Vector Laboratories, 室温, 3 時間)、VECRASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, 室温, 90 分)、TSA-Cyanine 3 (1:1000, SAT704A001EA, Perkin-Elmer, 室温, 60 分) により染色した。Arc タンパク質は anti-Arc/Arg3.1 抗体 (1:1000, 156 003, Synaptic Systems, 4 $^{\circ}$ C, O.N.)、ビオチン化 anti-rabbit 二次抗体 (1:500, BA-1000, Vector Laboratories, 室温, 3 時間)、VECRASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, 室温, 90 分)、TSA-Cyanine 3 (1:1000, SAT704A001EA, Perkin-Elmer, 室温, 60 分) により染色した。

バッファーとして PBS を使用したが、anti-Arc/Arg3.1 抗体を使用する場合のみ、Can Get Signal solutionA (TOYOBO) をバッファーとして用いた。核は Hoechst dye (1:1000, Life Technologies, 室温, 10 分) により染色した。

### 免疫組織化学染色画像撮影

共焦点顕微鏡 (CV1000、油浸 40 倍レンズ) により前頭連合野ニューロン (ブレグマより 3.0–2.6 mm 前側の範囲から 1 個体につき 4-6 枚)、鼻周囲皮質ニューロン (ブレグマより 1.6–2.2 mm 後側の範囲から 1 個体につき 3-6 枚)、島皮質ニューロン (ブレグマより 2.2–0.0 mm 前方、0.0–1.0 mm 後側の範囲から 1 個体につき 4-9 枚)、前帯状皮質ニューロン (ブレグマより 1.9–0.5 mm 前側の範囲から 1 個体につき 1-3 枚)、脳梁膨大後部皮質ニューロン (ブレグマより 1.0–2.0 mm 後側の範囲から 1 個体につき 1-3 枚)、嗅内皮質ニューロン (ブレグマより 2.4–3.4 mm 後側の範囲から 1 個体につき 1-3 枚)、海馬ニューロン (ブレグマより 1.3–2.0 mm 後側の範囲から 1 個体につき 1, 2 枚)、中脳水道周囲灰白質ニューロン (ブレグマより 3.4–3.8 mm 後側の範囲から 1 個体につき 1, 2 枚)、posterior 視床髄板内核ニューロン (ブレグマより 3.0–3.4 mm 後側の範囲から 1 個体につき 1, 2 枚) を撮影した。z 方向に 1.6 $\mu$ m 毎の画像を得た。得られた画像は Image J により解析した。鼻周囲皮質、島皮質は 2-6 層のニューロンを解析対象とした。Hoechst dye により核が染色されているものを解析対象とし、核の形状からニューロンとグリアを区別した。

488 nm で励起されたシグナルが核の周辺を覆うように認められた場合を “CTB 陽性” と判断した。594 nm で励起されたシグナルが核全体に認められた場合を “c-Fos 陽性” と判断した。594 nm で励起されたシグナルが核の周辺を覆うように認められた場合を “Arc 陽性” と判断した。これらの解析はすべてブラインドでおこなった。

## 結果

### 前頭連合野が文脈的恐怖学習の形成に必要である

連合学習のモデルとして、“環境”と“電気ショック”の関連性を学習する課題である文脈的恐怖学習を用いた。前頭連合野が文脈的恐怖学習に必要であることを確認するために、NMDA 受容体阻害薬である D-AP5 (D-amino-5-phosphonovaleric acid)、タンパク質合成阻害薬であるアニソマイシンを前頭連合野内に局所投与した。NMDA 受容体の活性化またはタンパク質合成が記憶・学習の基盤であるシナプス可塑性に必須であることが知られている(Frankland et al., 2004; Gal-Ben-Ari et al., 2012; Nicoll and Malenka, 1999; Rebola et al., 2010; Schafe et al., 1999)。D-AP5 を文脈的恐怖学習 30 分前に、アニソマイシンを文脈的恐怖学習直後に前頭連合野内に投与した (Figure 1A, C、実験 1)。マウスを実験環境に再び提示し、その際のすくみ反応時間を測定することで記憶成績を評価した。D-AP5、アニソマイシンの投与によってテスト時のすくみ反応時間が減少した (Figure 1B, D)。

薬物投与の局所性を確認するため、学習直後に前頭連合野に隣接する脳領域である腹内側前頭前皮質内にアニソマイシンを投与した (Figure 1E、実験 2)。腹内側前頭前皮質へアニソマイシンを投与した場合、テスト時のすくみ反応時間はコントロールと同程度であった (Figure 1F)。以上のことから、前頭連合野が文脈的恐怖学習の形成に必要であることが示唆された。

### 前頭連合野における蛋白質合成が環境と電気ショック両方の情報処理に必要である

文脈的恐怖学習における前頭連合野の役割として 3 つの可能性が考えられる。①前頭連合野が環境の情報処理にのみ寄与する可能性、②電気ショックの情報処理に寄与する可能性、③環境と電気ショック両方の情報処理に寄与する可能性である。これらの可能性を検討するため、学習課題を改変し、環境と電気ショックの提示を時間的に分離した。この改変型文脈的恐怖学習では、1 日目にマウスを電気ショックのない状態で 10 分間環境に提示

する。2 日目に環境提示直後に電気ショックを与えた。そして 3 日目に記憶成績を評価した (実験 3)。

まず、環境提示直後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与することで、環境の情報処理に与える影響を検討した (Figure 2A)。アニソマイシンの投与によってテスト時のすくみ反応時間がコントロールよりも低い値を示した (Figure 2B)。環境提示 6 時間後にアニソマイシンを投与した場合 (Figure 2C)、テスト時のすくみ反応時間はコントロールと同程度であった (Figure 2D)。記憶・学習には、学習 6 時間後までのタンパク質発現が重要であり (McGaugh, 2000)、Figure 2B の記憶成績の低下は、環境の情報処理に必要なタンパク質発現を阻害した結果であると考えられる。このことから、前頭連合野が環境の情報処理に寄与することが示唆された。

次に、電気ショック提示直後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与した (Figure 2E)。アニソマイシンの投与によってテスト時のすくみ反応時間がコントロールよりも低い値を示した (Figure 2F)。このことから、前頭連合野は電気ショックの情報処理にも寄与することが示唆された。以上の結果から、前頭連合野は環境と電気ショック両方の情報処理に寄与すると考えられる。

### 環境と電気ショックの情報が前頭連合野内の一部の同一ニューロンに収斂する

前頭連合野が環境と電気ショック両方の情報処理に寄与することから、前頭連合野内の同一ニューロンが環境と電気ショックの情報を受け取るのではないかと考えた。前頭連合野内での情報の収斂を可視化するため、*Arc* catFISH 法と呼ばれる手法を用いることで *Arc* の細胞内局在に注目した。*Arc* は神経活動により一過的に発現する遺伝子であり、シナプス可塑性に必要である (Guzowski et al., 2000; Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Plath et al., 2006)。学習などに対応した神経活動の 5 分後、転写された *Arc* mRNA は核内に局在する。そして 30 分後、*Arc* は核から移行し、細胞質に局在する (Guzowski et al., 1999)。

このように *Arc* の細胞内局在に注目することで、2 点の行動課題に対して活動したニューロンを同時に検出できる。

前頭連合野における *Arc* 発現動態が先行研究で報告されている扁桃体・海馬といった領域と同様のタイムコースであるかを確認した。マウスを 5 分間環境に提示し、その直後または 30 分後に脳を摘出し、*Arc* catFISH 法をおこなった (Figure 3A、実験 4)。その結果、環境提示直後 (0 分群) において核陽性 *Arc* の割合が増加し、環境提示 30 分後 (30 分群) において細胞質陽性 *Arc* の割合が増加した (Figure 3B, C)。このことから、先行研究で示されている扁桃体・海馬同様に、前頭連合野においても *Arc* は神経活動 5 分後に核内に、30 分後に細胞質に局在することが示唆された。

環境と電気ショックに対する神経活動をそれぞれ独立して検出するため、環境と電気ショックの提示を 25 分の間隔で分離した。まず、この改変型課題でも連合学習が成立するかを確認した。5 分間環境に提示した後、飼育ケージに戻した。その 25 分後に再び環境に提示し、すぐに電気ショックを与え、飼育ケージに戻した。そして 1 日後に記憶成績を評価した (Figure 4A、学習群、実験 5)。コントロールとして、環境のみを提示した群 (環境群) と電気ショックのみを提示した群 (電気ショック群) とのすくみ反応時間を比較した。その結果、環境群・電気ショック群と比較して、学習群は高いすくみ反応時間を示した (Figure 4B)。このことから、25 分の間隔で分離したプロトコールにおいても連合学習が成立することが示された。

環境や電気ショックに対する前頭連合野の *Arc* 発現を検討した。マウスを 5 分間環境に提示した後、飼育ケージに戻した。その 25 分後に再び環境に提示し、すぐに電気ショックを与え、飼育ケージに戻した。そして 5 分後に脳を摘出した (Figure 4C、学習群、実験 6)。環境も電気ショックも提示しない群をコントロール群、5 分間の環境提示 30 分後に脳を摘出した群を環境群、電気ショック提示 5 分後に脳を摘出した群を電気ショック群とした。*Arc* catFISH 法により核、細胞質における *Arc* を観察した結果 (Figure 4D)、環境群にお



いて細胞質陽性 *Arc* が、電気ショック群において核陽性 *Arc* の割合が増加した (Figure 4E)。学習群では、細胞質陽性 *Arc*、核陽性 *Arc* 共に割合が増加した。これらの結果は、環境と電気ショックそれぞれに対して、前頭連合野ニューロンが活動したことを示唆する。次に、核と細胞質両方に *Arc* を発現している細胞、つまり環境と電気ショック両方に対して活動したニューロンに注目した。核と細胞質両方に *Arc* を発現している細胞の割合は、偶然に核と細胞質両方に *Arc* を発現しうる割合であるチャンス値よりも高い割合を示した (Figure 4F)。これは、連合学習時において、環境と電気ショックの情報が前頭連語野内の一部の同一ニューロンに収斂していることを示唆する。

上記の実験では、電気ショックを提示する際に 6 秒間環境に提示しており、電気ショック提示ではなく、環境提示に対する *Arc* 発現である可能性がある。この可能性を排除するため、次の実験をおこなった。マウスを 30 分間環境に提示し、電気ショックを与え、環境に提示したまま 5 分後に脳を摘出した (Figure 5A、環境+電気ショック、実験 7)。コントロールとして、マウスを 35 分間環境に提示し、脳を摘出した (環境群)。その結果、環境群において、細胞質陽性 *Arc* は高い割合を示したが、核陽性 *Arc* は低い割合を示した (Figure 5B)。環境+電気ショック群では、細胞質陽性 *Arc*、核陽性 *Arc* 共に高い割合を示した。このことから、前頭連合野は電気ショックに対して *Arc* を発現していることが示唆された。以上の結果から、連合学習において環境と電気ショックという異なる情報が前頭連合野内の同一ニューロンに優先的に収斂していることが示唆された。

### 環境の情報は鼻周囲皮質を、電気ショックの情報は島皮質をそれぞれ介して前頭連合野に送られる

前頭連合野が環境と電気ショックの提示に対して活動することから、環境・電気ショックの情報処理に寄与する脳領域から投射を受け取っていると推測される。前頭連合野に投射する領域を同定するため、神経トレーサーである蛍光標識されたコレラトキシンサブユ

ニット B (CTB) (Conte et al., 2009) を前頭連合野内に投与した (Figure 6A)。CTB は神経終末から細胞体へと逆行性に輸送される性質をもっており、CTB の逆行性シグナルをみることで前頭連合野に投射を送るニューロンを標識できる。環境や電気ショックの情報処理に關与するとされる複数の領域での CTB 陽性細胞数を測定した結果、島皮質・鼻周囲皮質において多くの CTB 陽性細胞数がみられた (Figure 6B)。このことから、環境や電気ショックと關連する多くの脳領域の中でも島皮質・鼻周囲皮質が前頭連合野に投射を送ることが示された。

まず、鼻周囲皮質・島皮質が文脈的恐怖学習に必要であることを確認した。学習前に鼻周囲皮質内に電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬であるテトロドトキシンを鼻周囲皮質内に投与することで、鼻周囲皮質の活動を抑制した。そして翌日の記憶成績を評価した (Figure 7A、実験 8)。テトロドトキシンの投与によって、テスト時のすくみ反応時間がコントロールよりも低い値を示した (Figure 7B)。このことから、鼻周囲皮質の活動が文脈的恐怖学習に必要であることが示唆された。次に、学習前に島皮質内にテトロドトキシンを投与することで、島皮質の活動を抑制した (Figure 7C)。テトロドトキシンの投与によって、テスト時のすくみ反応時間がコントロールよりも低い値を示した (Figure 7D)。このことから、島皮質の活動が文脈的恐怖学習に必要であることが示された。

鼻周囲皮質・島皮質の活動が文脈的恐怖学習に必要であることから、鼻周囲皮質・島皮質が前頭連合野に環境・電気ショックの情報を送っているのではないかと考え、これを検討した。前頭連合野内に CTB を投与することで前頭連合野に投射するニューロンを標識した。そして、10 分間の環境提示 90 分後 (環境群)、または電気ショックの提示 90 分後に脳を摘出した (電気ショック群)。環境・電気ショックを提示しない群をコントロール群とした (Figure 8A、実験 9)。鼻周囲皮質・島皮質ニューロンの活動を可視化するため、神経活動の分子マーカーとして用いられる c-Fos タンパク質 (Herrera and Robertson, 1996) の免疫染色をおこなった (Figure 8B)。その結果、鼻周囲皮質における c-Fos 陽性/CTB 陽

性細胞の割合は、環境の提示によって増加したが、電気ショックの提示ではコントロールと同程度であった (Figure 8C)。その一方で、島皮質における c-Fos 陽性/CTB 陽性細胞の割合は、電気ショックの提示によって増加したが、環境の提示ではコントロールと同程度であった (Figure 8D)。これらの結果は、前頭連合野に投射を送る鼻周囲皮質ニューロンが環境の提示時に、島皮質ニューロンが電気ショックの提示時にそれぞれ活動することが示唆された。

鼻周囲皮質が環境の情報を、島皮質が電気ショックの情報をそれぞれ前頭連合野に送っていることが推測される。そこで、鼻周囲皮質・島皮質の活動が環境・電気ショックに対する前頭連合野の活動に必要であるかを検討した。環境の提示前に鼻周囲皮質内にテトロドトキシンを投与することで鼻周囲皮質の活動を抑制し、環境に対する前頭連合野の活動に与える影響を検討した (Figure 8A、実験 10)。前頭連合野の活動は Arc タンパク質の免疫染色により検出した (Figure 8B)。テトロドトキシンの投与によって、Arc 陽性細胞数の割合がコントロールよりも低い値を示した (Figure 8C)。これは、環境に対する前頭連合野の活動には鼻周囲皮質の活動が必要であることを示唆している。次に、島皮質内にテトロドトキシンを投与することで島皮質の活動を抑制し、電気ショックに対する前頭連合野の活動に与える影響を検討した (Figure 8D、実験 11)。テトロドトキシンの投与によって、Arc 陽性細胞数の割合がコントロールよりも低い値を示した (Figure 8F)。これは、電気ショックに対する前頭連合野の活動には島皮質の活動が必要であることを示唆している。以上の結果から、環境の情報は鼻周囲皮質を、電気ショックの情報は島皮質をそれぞれ介して前頭連合野に送られてくると考えられる。

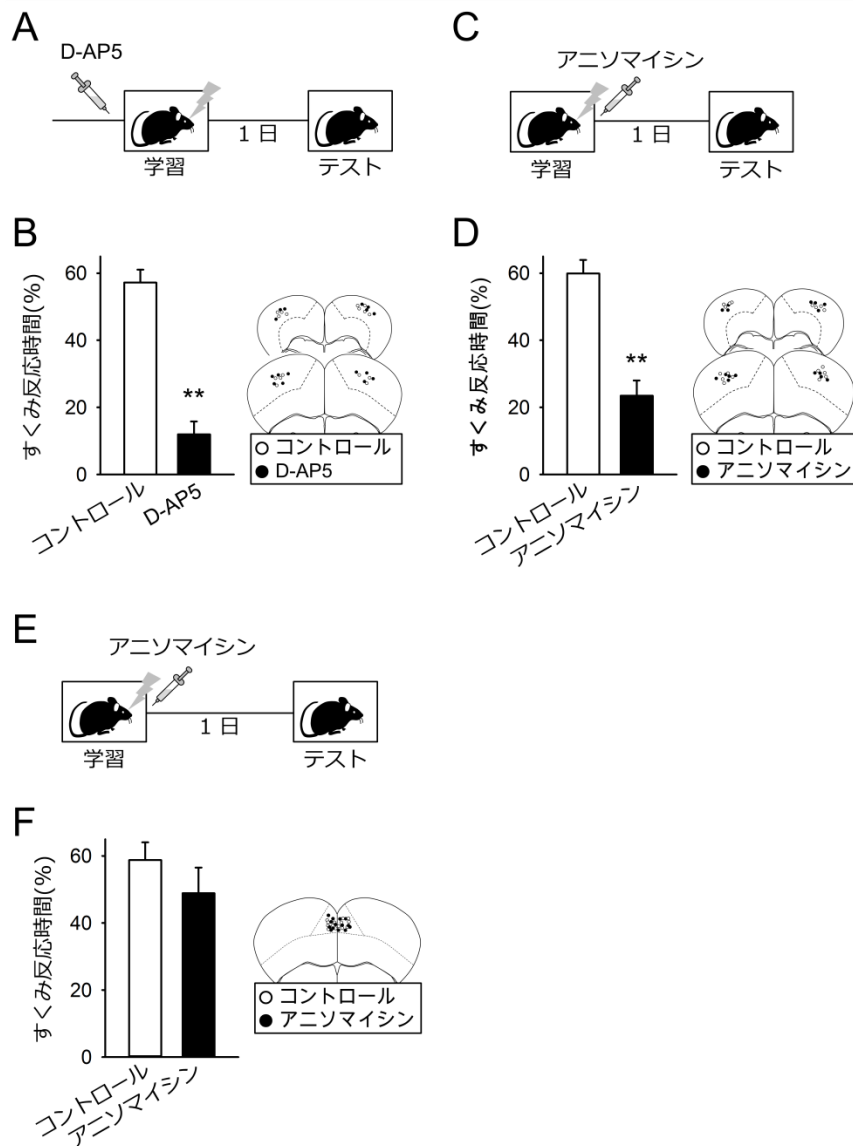


Figure 1

(A) 実験手順。文脈的恐怖学習前に前頭連合野内に D-AP5 を投与し、翌日の記憶成績を評価した。(B) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 8、Student's *t*-test、\*\* $p < 0.01$ 。(C) 実験手順。文脈的恐怖学習前に前頭連合野内にアニソマイシンを投与し、翌日の記憶成績を評価した。(D) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 8、9。Student's *t*-test。\*\* $p < 0.01$ 。(E) 実験手順。文脈的恐怖学習前に腹内側前頭前皮質内にアニソマイシンを投与し、翌日の記憶成績を評価した。(F) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 7。Student's *t*-test。  $p > 0.05$ 。

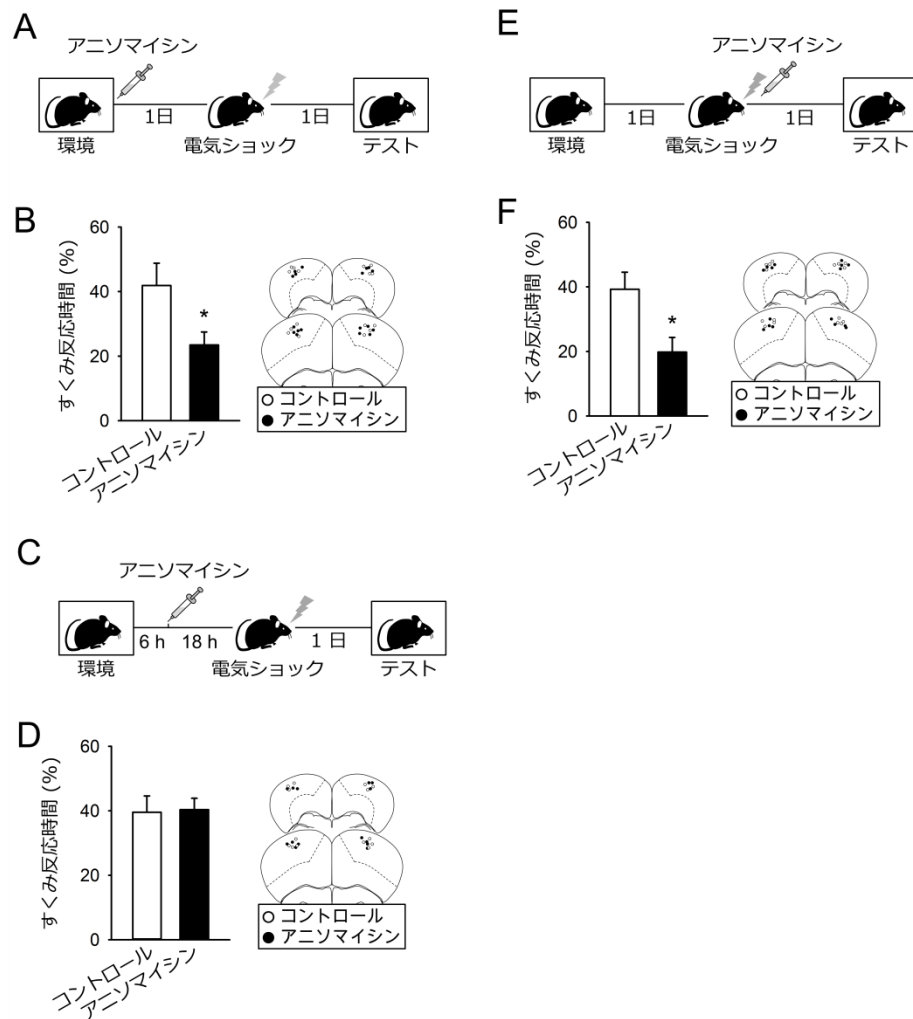


Figure 2

(A) 実験手順。1 日目に環境提示直後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与した。2 日目に環境提示直後に電気ショックを提示した。3 日目に記憶成績を評価した。(B) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 9。Student's *t*-test。\**p* < 0.05。(C) 実験手順。1 日目に環境提示 6 時間後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与した。2 日目に環境提示直後に電気ショックを提示した。3 日目に記憶成績を評価した。(D) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 7。Student's *t*-test。*p* > 0.05。(E) 実験手順。1 日目に環境に提示した。2 日目に電気ショック提示直後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与した。3 日目に記憶成績を評価した。(F) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 8。Student's *t*-test。\**p* < 0.05。

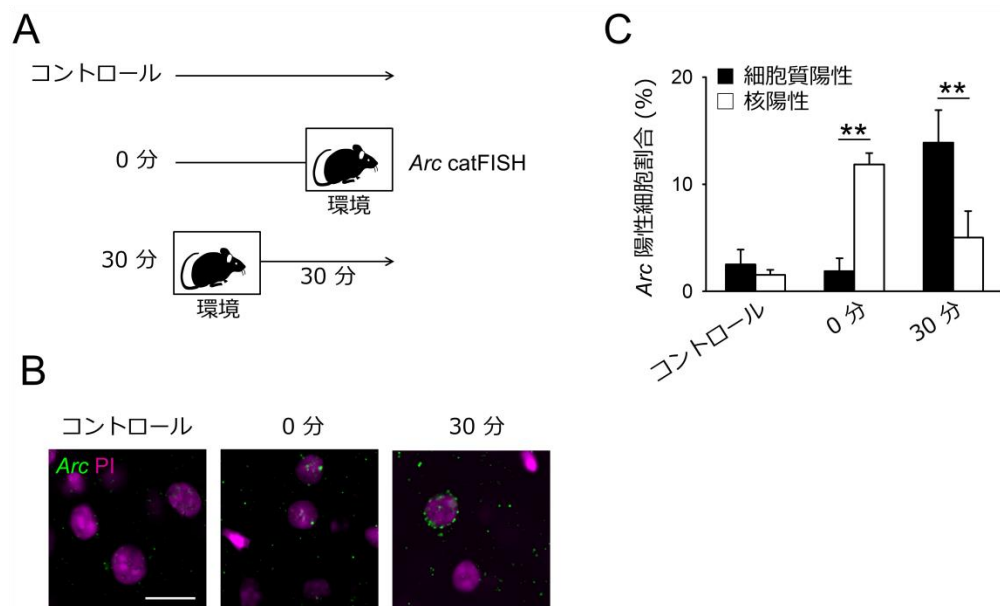


Figure 3

(A) 実験手順。5 分間の環境提示 30 分後に脳を摘出した群を 30 分群、環境提示 0 分後に脳を摘出した群を 0 分群とした。環境に提示しない群をコントロール群とした。(B) 各群の Arc mRNA 染色画像。スケールバー: 20  $\mu$ m。(C) 各群の細胞質陽性 Arc、核陽性 Arc の割合。Tukey's test after ANOVA. \*\* $p < 0.01$ 。

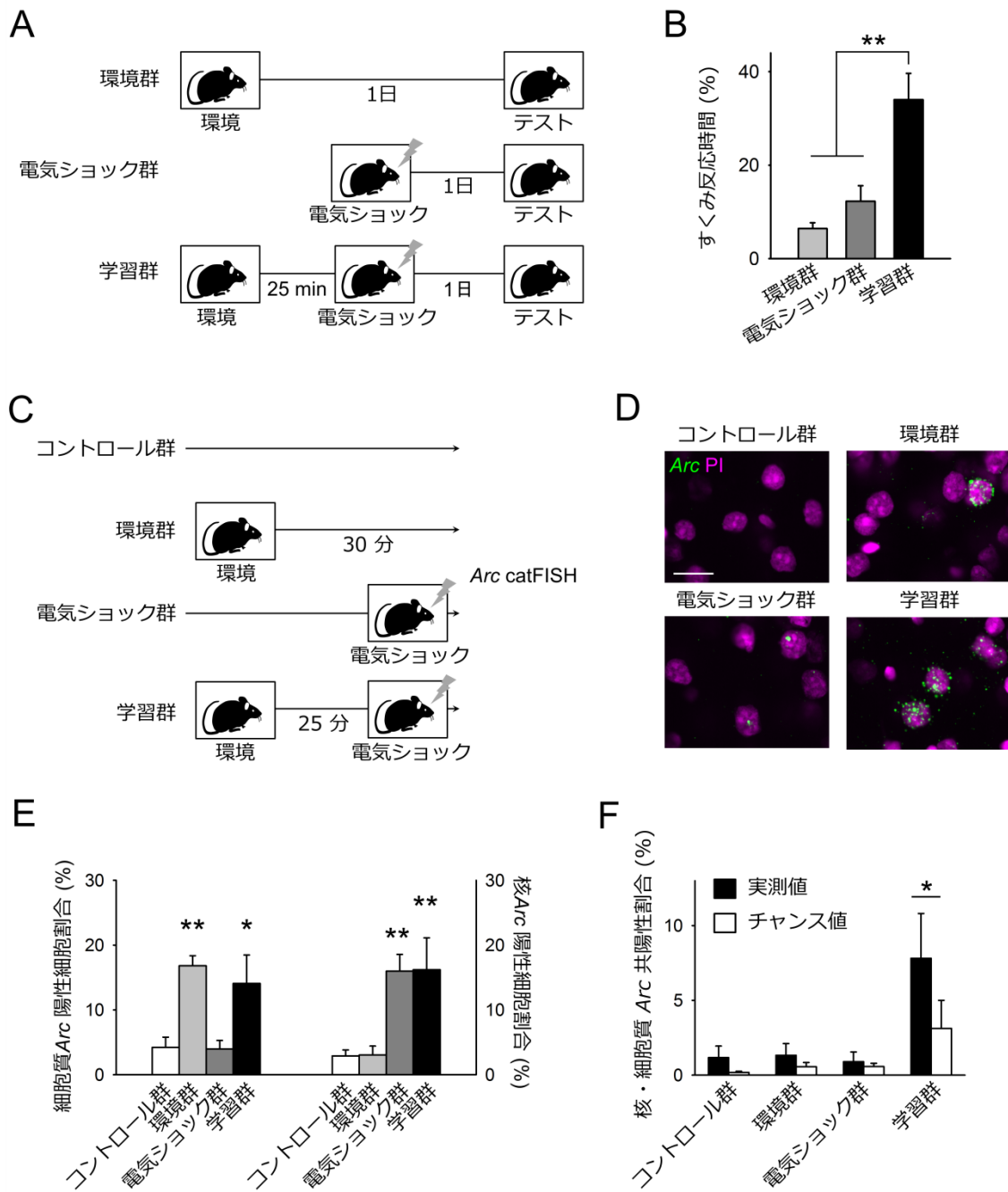


Figure 4

(A) 実験手順。環境群と学習群では、1日目に10分間環境を提示した。環境群は2日目に5分間環境に提示した。電気ショック群は、環境提示直後に電気ショックを与え、すぐに飼育ケージに戻した。学習群は2日目に5分間環境に提示し、一旦飼育ケージに戻した。その25分後に実験環境提示直後に電気ショックを与え、すぐに飼育ケージに戻した。記憶成績は3日目に評価した。(B) テスト時のすくみ反応時間。n = 6, 7. Tukey's test after ANOVA.

**\*\* $p < 0.01$ .** (C) 実験手順。コントロール群では、飼育ケージにいるマウスの脳をすぐに摘出した。環境群と学習群では、1日目にマウスを10分間環境に提示した。環境群は2日目に5分間環境に提示し、30分後に脳を摘出した。電気ショック群は環境提示直後に電気ショックを与え、すぐに飼育ケージに戻した。そしてその5分後に脳を摘出した。学習群は2日目に5分間環境に提示し、一旦飼育ケージに戻した。その25分後に実験環境提示直後に電気ショックを与え、すぐに飼育ケージに戻し、5分後に脳を摘出した。(D) 各群の *Arc* mRNA 染色画像。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ 。(E) 各群の細胞質陽性 *Arc*、核陽性 *Arc* の割合。Tukey's test after ANOVA. \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。(F) 各群の核・細胞質 *Arc* 共陽性細胞の割合。paired *t*-test after repeated ANOVA. \* $p < 0.05$ 。



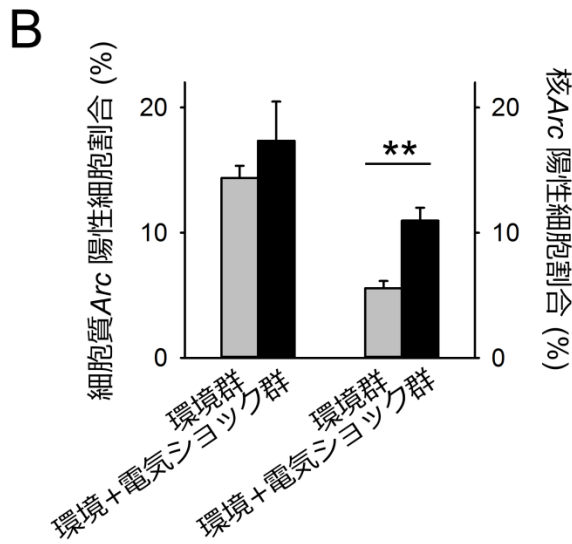
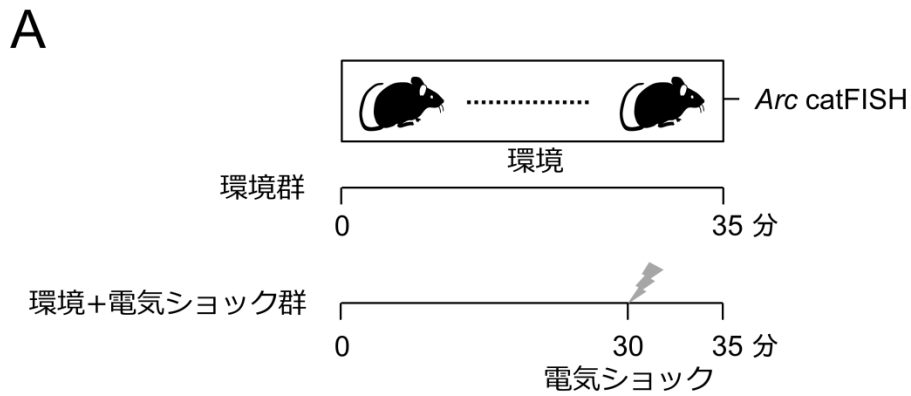


Figure 5

(A) 実験手順。環境群ではマウスを 35 分間環境に提示し、すぐに脳を摘出した。環境+電気ショック群では 30 分間環境に提示し、電気ショックを与え、そのまま 5 分間環境に提示した後、脳を摘出した。(B) 各群の細胞質陽性 Arc、核陽性 Arc の割合。Tukey's test after ANOVA. \*\* $p < 0.01$ 。

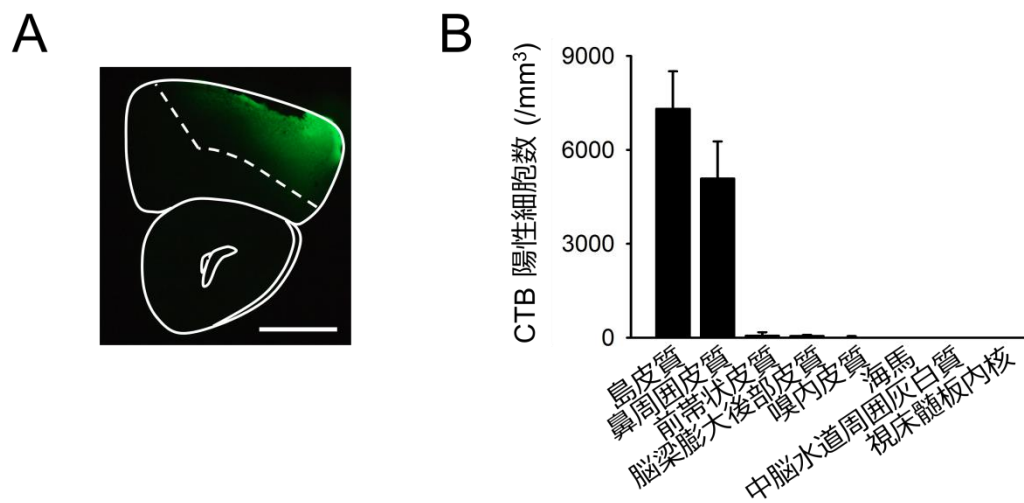


Figure 6

(A) 前頭連合野に投与した CTB の拡散の代表画像。スケールバー：1 mm。

(B) 各脳領域における CTB 陽性細胞数の密度。

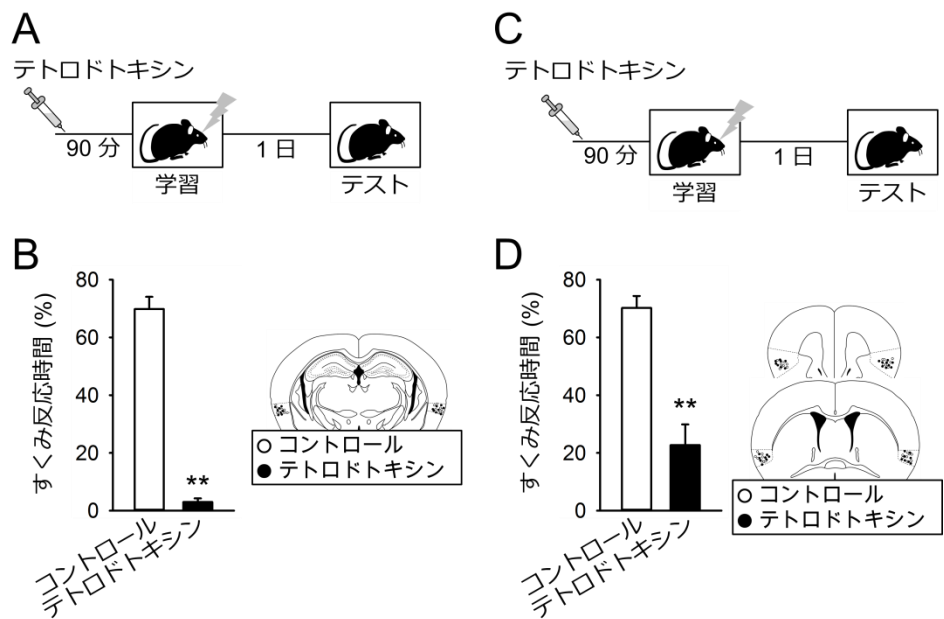


Figure 7

(A) 実験手順。文脈的恐怖学習 90 分前にテトロドトキシシンを鼻周囲皮質内に投与し、翌日の記憶成績を評価した。(B) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 8。Student's *t*-test. \*\* $p < 0.01$ 。(C) 実験手順。文脈的恐怖学習 90 分前にテトロドトキシシンを島皮質内に投与し、翌日の記憶成績を評価した。(D) テスト時のすくみ反応時間 (左)。薬物の投与部位 (右)。n = 8。Student's *t*-test. \*\* $p < 0.01$ 。

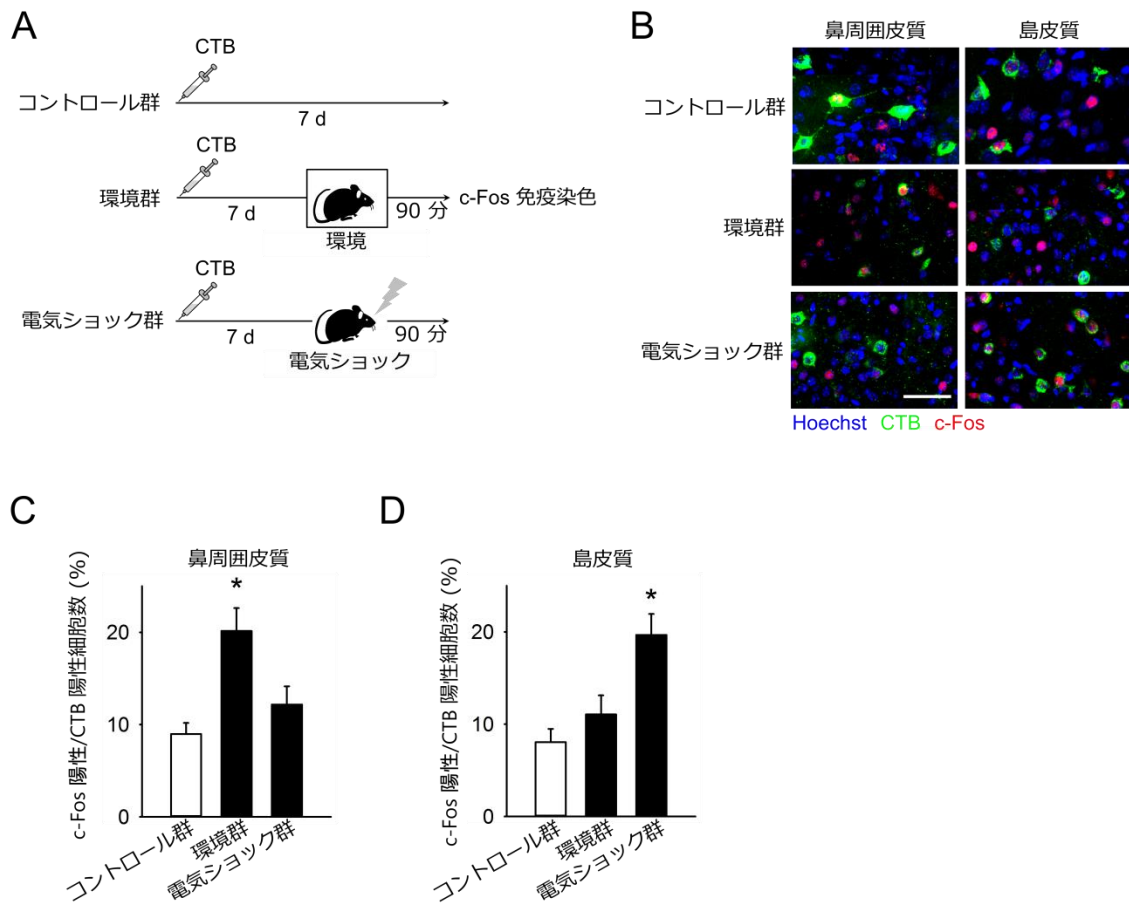


Figure 8

(A) 実験手順。行動試験開始 7 日前に CTB を前頭連合野内に投与した。コントロール群では飼育ケージにいるマウスの脳を摘出した。環境群は 10 分間環境に提示し、その 90 分後に脳を摘出した。電気ショック群は電気ショックを与え、その 90 分後に脳を摘出した。(B) 各群の c-Fos 免疫染色画像。スケールバー：50  $\mu$ m。(C) 鼻周囲皮質における c-Fos/CTB 陽性細胞数の割合。Tukey's test after ANOVA。\* $p < 0.05$ 。(D) 島皮質における c-Fos/CTB 陽性細胞数の割合。Tukey's test after ANOVA。\* $p < 0.05$ 。

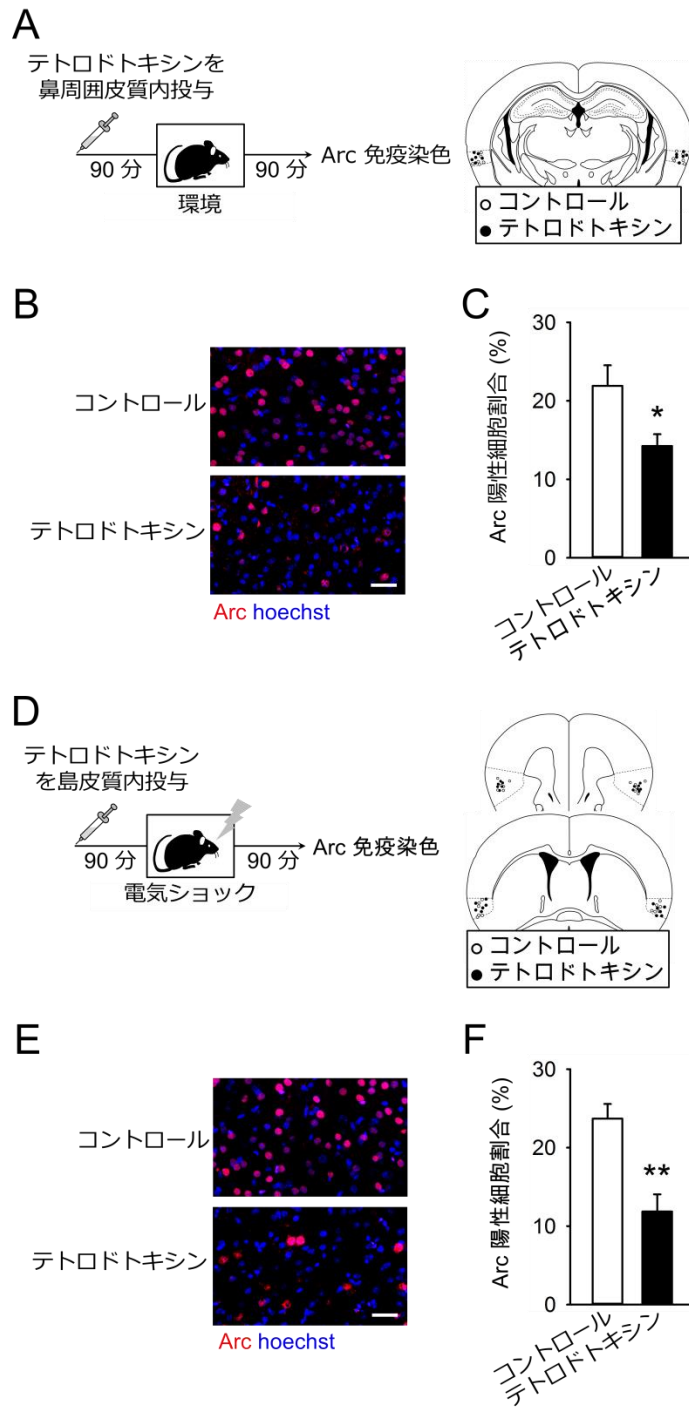


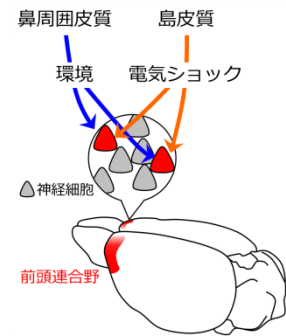
Figure 9

(A) 実験手順。鼻周囲皮質内にテトロドトキシンを投与し、90分後に10分間環境に提示した。その90分後に脳を摘出し、前頭連合野における Arc 免疫染色をおこなった。(B) Arc 免疫染色画像。スケールバー：50  $\mu$ m。(C) 前頭連合野における Arc 陽性細胞数の割合。

Student's *t*-test. \* $p < 0.05$ . **(D)** 実験手順。島皮質内にテトロドトキシンを投与し、90分後に10分間環境に提示した。その90分後に脳を摘出し、前頭連合野におけるArc免疫染色をおこなった。**(E)** Arc免疫染色画像。スケールバー：50  $\mu\text{m}$ 。**(F)** 前頭連合野におけるArc陽性細胞数の割合。Student's *t*-test. \*\* $p < 0.01$ 。

## 考察

本研究により、連合学習における前頭連合野の細胞・神経回路機構が明らかとなった。前頭連合野は、環境・電気ショック両方の情報処理に寄与する。そして、鼻周囲皮質・島皮質を介して送られてくる環境・電気ショックの情報が、前頭連合野内の同一神経細胞内に収斂する（右図）。別々の神経回路を介して送られてくる異なる情報が前頭連合野内の同一細胞内で統合されることで連合学習が形成されると考えられる。



前頭連合野は鼻周囲皮質から環境の情報を受け取ると考えられる。鼻周囲皮質は視覚皮質、聴覚皮質、梨状皮質（嗅覚系）などから投射を受け取っており、環境の情報処理において中心的役割を担うとされる海馬とも相互の投射関係にある (Kealy and Commins, 2011)。これらの神経回路を介して鼻周囲皮質は環境の情報処理をおこなっていると考えられている。実際に、鼻周囲皮質の活動を抑制すると文脈的恐怖学習が障害される (Figure 7, (Sacchetti et al., 1999))。本研究では、前頭連合野に投射を送る鼻周囲皮質ニューロンが環境提示時に活動すること、環境に対する前頭連合野の Arc 発現に鼻周囲皮質の活動が必要であることを示した。これらの結果は、鼻周囲皮質から前頭連合野へ環境の情報が送られている可能性を示唆する。

前頭連合野は島皮質から電気ショックの情報を受け取ると考えられる。島皮質は体性感覚皮質、視床髄板内核や中脳傍小脳脚核といった痛みなどの不快情報に関与する領域から投射を受け取る (LeDoux, 2000; Shi and Davis, 1999)。島皮質の活動を抑制すると文脈的恐怖学習が抑制される (Figure 7)。本研究では、前頭連合野に投射を送る島皮質ニューロンが電気ショック提示時に活動すること、電気ショックに対する前頭連合野の Arc 発現に島皮質の活動が必要であることを示した。これらの結果は、島皮質から前頭連合野へ電気ショックの情報が送られている可能性を示唆する。

一部の前頭連合野ニューロンが複数の感覚情報を鼻周囲皮質・島皮質を介して受け取っていると考えられる。連合学習時、前頭連合野の一部の同一ニューロンが環境と電気ショックに対して活動することから、特定のニューロン集団が収斂した情報を受け取ると考えられる。このように同一ニューロン内で情報が収斂することで、質的に異なる情報が統合されると考えられる。

本研究は、連合学習に寄与する新奇の情報統合機構の一端を明らかとした。学習後、前頭連合野でのシナプス構造の変化が起こり (Lai et al., 2012)、記憶の形成に寄与すると考えられる。前頭連合野は複雑な行動の計画・遂行に関与すると考えられており (Fuster, 2006; Sasaki et al., 1994)、これらの機能発揮に連合学習時に前頭連合野内で生じた変化が寄与すると推測される。

## 参考文献

- Chase, T.N., Foster, N.L., Fedio, P., Brooks, R., Mansi, L., and Di Chiro, G. (1984). Regional cortical dysfunction in Alzheimer's disease as determined by positron emission tomography. *Ann Neurol* *15 Suppl*, S170-174.
- Conte, W.L., Kamishina, H., and Reep, R.L. (2009). Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nat Protoc* *4*, 1157-1166.
- Frankland, P.W., Josselyn, S.A., Anagnostaras, S.G., Kogan, J.H., Takahashi, E., and Silva, A.J. (2004). Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* *14*, 557-569.
- Fuster, J.M. (2006). The cognit: a network model of cortical representation. *Int J Psychophysiol* *60*, 125-132.
- Gal-Ben-Ari, S., Kenney, J.W., Ounalla-Saad, H., Taha, E., David, O., Levitan, D., Gildish, I., Panja, D., Pai, B., Wibrand, K., *et al.* (2012). Consolidation and translation regulation. *Learn Mem* *19*, 410-422.
- Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., Godsil, B.P., Mitchell, S., Nozawa, T., Sage, J.R., Wiltgen, B., and Fanselow, M.S. (2004). Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J Neurosci* *24*, 3810-3815.
- Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., McGaugh, J.L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* *20*, 3993-4001.
- Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., and Worley, P.F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* *2*, 1120-1124.
- Hashikawa, K., Naka, M., Nakayama, D., Matsumoto, N., Neve, R., and Matsuki, N. (2013). Blockade of stimulus convergence in amygdala neurons disrupts taste associative learning. *J Neurosci* *33*, 4958-4963.
- Herrera, D.G., and Robertson, H.A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* *50*, 83-107.
- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., and LeDoux, J.E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* *147*, 509-524.
- Kealy, J., and Commins, S. (2011). The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol* *93*, 522-548.
- Lai, C.S., Franke, T.F., and Gan, W.B. (2012). Opposite effects of fear conditioning and



extinction on dendritic spine remodelling. *Nature* *483*, 87-91.

LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* *23*, 155-184.

Li, T., Yan, C.X., Hou, Y., Cao, W., Chen, T., Zhu, B.F., and Li, S.B. (2008). Cue-elicited drug craving represses ERK activation in mice prefrontal association cortex. *Neurosci Lett* *448*, 99-104.

Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., and Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5734-5738.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., and Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* *14*, 433-445.

Malin, E.L., and McGaugh, J.L. (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1959-1963.

Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* *24*, 897-931.

McGaugh, J.L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* *287*, 248-251.

Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1999). Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann NY Acad Sci* *868*, 515-525.

Nomura, H., and Matsuki, N. (2008). Ethanol enhances reactivated fear memories. *Neuropsychopharmacology* *33*, 2912-2921.

Nomura, H., Nonaka, A., Imamura, N., Hashikawa, K., and Matsuki, N. (2012). Memory coding in plastic neuronal subpopulations within the amygdala. *Neuroimage* *60*, 153-161.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., *et al.* (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* *52*, 437-444.

Rebola, N., Srikumar, B.N., and Mulle, C. (2010). Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* *588*, 93-99.

Sacchetti, B., Baldi, E., Lorenzini, C.A., and Bucherelli, C. (2003). Role of the neocortex in consolidation of fear conditioning memories in rats. *Exp Brain Res* *152*, 323-328.

Sacchetti, B., Lorenzini, C.A., Baldi, E., Tassoni, G., and Bucherelli, C. (1999). Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J Neurosci* *19*, 9570-9578.

Sasaki, K., Tsujimoto, T., Nambu, A., Matsuzaki, R., and Kyuhou, S. (1994). Dynamic

activities of the frontal association cortex in calculating and thinking. *Neurosci Res* 19, 229-233.

Schafe, G.E., Nadel, N.V., Sullivan, G.M., Harris, A., and LeDoux, J.E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 6, 97-110.

Shi, C., and Davis, M. (1999). Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesion studies. *J Neurosci* 19, 420-430.

## 謝辞

研究生生活においてご指導いただいた、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室教授の池谷裕二先生に、心よりお礼申し上げます。

研究に関する様々な助言をいただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室准教授の小山隆太先生、助教の野村洋先生、佐々木拓哉先生に心より感謝いたします。