

## 論文の内容の要旨

論文題目 記憶痕跡に関わる神経細胞集団の決定様式

氏名 野中 綾子

### 【序論】

脳は、全ての記憶に対して一様に全体が活動するわけではない。空間記憶は海馬、恐怖記憶は扁桃体というように、記憶の種類によって関与する脳部位が異なることが知られている。さらに、その特定の脳部位の中でも、個々の記憶を想起するときに活動する神経細胞はごく一部である。この時活動する細胞集団は記憶痕跡と関わりと考えられている。過去の研究でも、想起時に優先的に活動するようになった細胞集団のみを脱落させると、記憶が障害されることが示されている。しかし、こうした過去の知見は記憶痕跡に関わる細胞集団を人工的な操作で決めている。そもそも記憶痕跡に関わる細胞集団がどのように編成されるかという本質に迫っていない。

本研究は、記憶形成前、記憶形成時、想起時の個々の神経細胞の活動を同一個体内で比較することにより、記憶痕跡がどのように決定されるのか明らかとすることを目的とする。

### 【方法】

C57BL/6J 雄性マウスに、実験環境と電気ショックを関連づける恐怖条件づけを行った。恐怖条件づけは、一回の学習で安定な記憶が形成されるため、記憶痕跡に関わる細胞集団がいつ編成されたのかを判断しやすいという利点がある。マウスに対する一連の行動試験は、3つの Session から構成される。恐怖記憶を形成する Fear Conditioned (FC) 群は、Session1 で実験環境を 5 分間探索させ、36 分後の Session2 で同じ実験環境内で恐怖条件

づけを行い、さらに 20 分後の Session3 で実験環境に 5 分間曝露して記憶を想起させた。コントロールとしては、恐怖記憶を形成しない Immediate Shock (IS) 群を用意した。IS 群は Session1 で FC 群と同様に実験環境を探索させ、Session2 では実験環境に入れた直後に電気ショックを受ける immediate shock を与えた。Immediate shock では実験環境と電気ショックの関連づけができず、恐怖記憶が形成されない。Session3 で FC 群と同様に記憶のテストを行った (図 1A)。Session3 の freezing time (恐怖記憶の指標) は FC 群が有意に高く、条件づけにより恐怖記憶が形成されたことが確認された (図 1B)。

各 Session において活動した神経細胞は、神経活動依存的に発現する immediate early genes である *Arc* および *Homer1a* の mRNA を検出することにより同定した。*Arc* は神経活動直後に核内、神経活動 30 分後には細胞質に現れ、*Homer1a* は神経活動 70 分後に細胞質に現れる。そのため、両遺伝子の mRNA を in situ hybridization で検出し、その細胞内局在を解析することで、観察している神経細胞がどの Session で活動したのかを推察することができる。観察部位は恐怖記憶に深く関わる脳部位である扁桃体基底核 (BA) および外側核 (LA) とした。

## 【結果】

### 記憶形成によって一部の神経細胞が記憶痕跡に関わるようになる

BA および LA の全神経細胞における各 Session で活動した神経細胞の割合は、BA の Session2 を除き、いずれの Session でも FC 群と IS 群に有意な差は見られなかった。特に Session3 で活動する神経細胞の割合に差がないことから、恐怖記憶の想起は活動する神経細胞の割合に影響しないと考えられる。しかし、Session1 で活動した細胞集団と Session3 で活動した細胞集団を同一個体内で比較すると、両方の Session で活動した神経細胞の割合は、FC 群で 30% に満たなかった。同じ実験環境に曝露しているにも関わらず、Session1 と Session3 で 70% 以上の神経細胞が活動を変化させたことになる。その理由として、恐怖記憶形成・想起の有無が考えられるため、IS 群でも同様の解析を行ったところ、Session1 と Session3 それぞれで活動した細胞集団の類似性は、FC 群より有意に高かった (図 1C, D)。

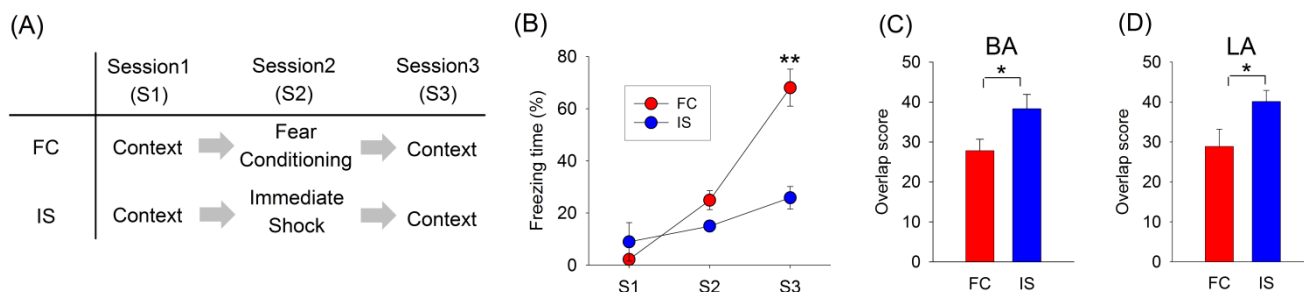


図 1. 記憶形成によって一部の神経細胞が記憶痕跡に関わるようになる

(A) 行動試験パラダイム。(B) Session3 の freezing time (恐怖記憶の指標) は FC 群が有意に高い値を示した。n = 8 mice, \*\*P < 0.01, Student's *t*-test. (C)(D) Session1 で活動した細胞集団と Session3 で活動した細胞集団の類似性。BA (C), LA (D)ともに、FC 群は IS 群に比べて活動した細胞集団の類似性が低い。218-520 neurons/mouse, \*P < 0.05, Student's *t*-test

想起時に活動する細胞集団、すなわち記憶痕跡に関わる細胞集団は、もともと実験環境に対して活動する細胞集団の一部に、記憶形成前は活動しなかった細胞集団の一部が新たに組み込まれることで造られると考えられる。

### 記憶形成時に活動した神経細胞は記憶痕跡に関わる細胞集団に組み込まれる

当研究室の過去の研究によって、記憶形成時に活動した BA および LA の神経細胞では神経伝達効率が高くなっていることが明らかとなっている。したがって、Session2 での神経活動が、Session1 から Session3 への細胞集団の変化に関わっているのではないかと考えられる。FC 群において、Session1 で活動せず Session3 で活動するように変化した神経細胞は、その 51.3 % (BA), 57.7 % (LA) が Session2 で活動していた。この値は

チャンスレベルである 22.1 % (BA), 10.7 % (LA) より有意に高い。IS 群ではチャンスレベルとの有意な差はなかった。さらなる評価のため、Session1 では活動せず Session3 で活動するようになった神経細胞の割合を算出し、recruiting score とした。Session2 で活動した神経細胞の recruiting score は BA, LA とともに FC 群が IS 群に比べて有意に高かった (図 2A, C)。記憶形成時に活動した神経細胞が、記憶痕跡に関わる細胞集団に組み込まれることが示唆された。また、BA, LA とともに FC 群の recruiting score は恐怖記憶の強さと有意な正の相関があり、この神経活動の変化が恐怖記憶を担っていると考えられる (図 2B, D)。

### 記憶形成時に活動しなかった細胞は記憶痕跡に関わる細胞集団から外される

Session1 から Session3 への細胞集団の活動の変化には、Session3 で活動するようになった神経細胞だけでなく、Session3 で活動しなくなった神経細胞も寄与している。過去の知見でも、記憶痕跡に関わる神経細胞が競合的に決められることが示唆されている。そこで、Session1 で活動していたが Session3 で活動しなくなった神経細胞についても同様の解析を行った。Session1 では活動し Session3 で活動しなくなった神経細胞の割合を exclusion score とした。BA, LA とともに Session2 で活動しなかった神経細胞の exclusion

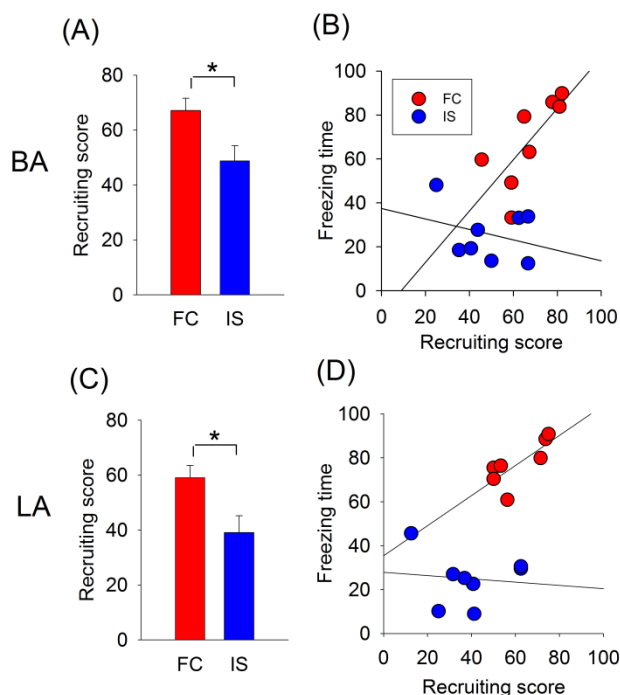


図 2. 記憶形成時に活動した神経細胞は記憶痕跡に関わるようになる

(A) (C) Session2 で活動した神経細胞の recruiting score は、BA (A), LA (C) とともに FC 群が有意に高い。\* $P < 0.05$ , Student's  $t$  test.

(B) (D) FC 群の recruiting score は BA (B), LA (D) とともに freezing time と有意な相関がある。BA; FC,  $R = 0.738$ , IS,  $R = -0.301$ ; LA; FC,  $R = 0.761$ , IS,  $R = -0.109$ .

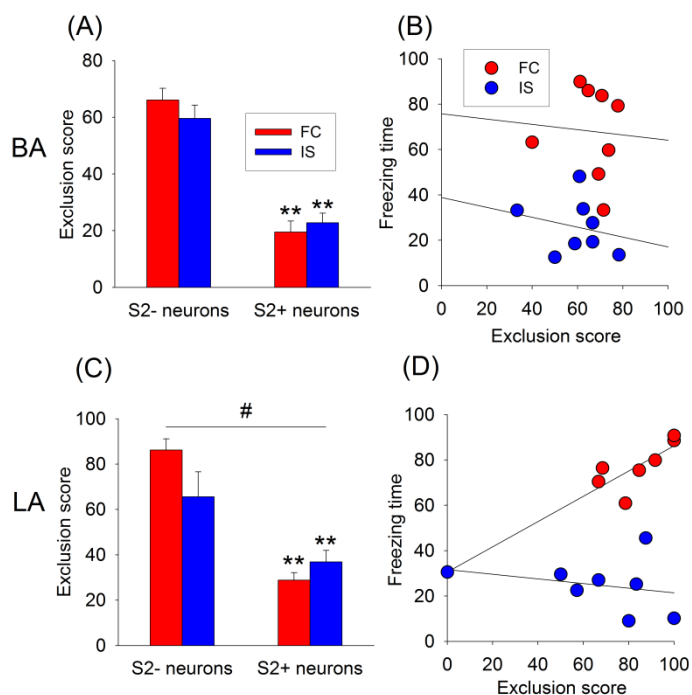


図 3. 記憶形成時に活動しなかった細胞は記憶痕跡と関わらなくなる

(A) (C) Session2 で活動しなかった神経細胞の exclusion score は BA (A), LA (C) ともに、Session2 で活動していた神経細胞より有意に高い。また、LA では group × S2 activity に有意な交互相関があった。\*\* $P < 0.01$  vs. S2+ neurons, # $P < 0.05$ , a significant group × S2 activity interaction.

(B) (D) FC 群の exclusion score は LA (D) において freezing time と有意な相関がある。BA (B) では有意な相関は見られなかった。BA; FC,  $R = -0.068$ , IS,  $R = -0.238$ ; LA; FC,  $R = 0.746$ , IS,  $R = -0.273$ .

条件づけ時に活動した神経細胞が記憶痕跡に関わる細胞集団に組み込まれる場合については、条件づけ前には神経細胞を活動させるのに十分な強度でなかった実験環境の入力が、条件づけ時に電気ショックの強い入力と同時に同じ神経細胞に入力することで強化され、想起時には実験環境の情報のみで神経細胞が活動するようになると考えられる。条件づけ時に活動しなかった神経細胞が記憶痕跡に関わる細胞集団から外された場合については、さらに扁桃体内の抑制性回路の関与が考えられる。実験環境の情報と電気ショックの情報が統合された興奮性細胞が投射先の抑制性細胞を活性化し、さらにその抑制性細胞が投射先の興奮性細胞を抑制するようになる。この回路が、条件づけ後は実験環境の情報のみで活性化するのだと考えられる。

これらの知見は、個々の神経細胞の活動を記憶形成前から想起時まで可視化・比較することで初めて得られたものであり、記憶研究の進展の一助となることが期待される。

score は、Session2 で活動した神経細胞に比べて有意に高かった。また、LA においては group × Session2 activity で有意な交互作用があった (図 3A, C)。記憶形成時に活動しなかった神経細胞が記憶痕跡に関わる細胞集団から外され、想起時にも活動しなくなることが示唆された。さらに、FC 群の LA における exclusion score は恐怖記憶の強さと有意な正の相関があり、この神経活動の変化も前述の変化と同様、恐怖記憶を担っていると考えられる (図 3B, D)。

#### 【総括】

以上の結果から、条件づけ時の活動の有無によって、その神経細胞が記憶痕跡に関わる細胞集団に組み込まれるか否かが決定されることが示唆された。そのメカニズムとして次のようなものが考えられる。