

研究報告書

「記憶の具現化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 杉 拓磨

1. 研究のねらい

これまで、記憶に関わる多くの分子が同定されてきたが、「記憶の分子実体は何か？」という問いに明確な解答は得られていない。過去の多くの研究から、長期記憶の形成には多数の遺伝子の発現調節が関わっていることが示されてきた。これらの遺伝子の中から、対象とする遺伝子やその挙動が、真の記憶実体であることを証明する最も直接的な方法は、記憶を担う神経細胞を同定し、その細胞そのもので、対象とする遺伝子の発現を操作し、人為的に記憶を創ることである。しかし、実際には、記憶を担う神経細胞は、膨大な数の神経細胞のネットワーク内に存在するため、*In vivo* で記憶を担う神経細胞の位置情報・形態情報を得ることは容易ではない。また、その位置情報・形態情報を保存(標識)しながら、記憶を担う神経細胞のみを遺伝子発現操作することはさらに困難を極める。これらの技術的障壁が、記憶の実体を捉えることを妨げていると考えた。

本研究では、線虫 *C. elegans* が示す、機械刺激に対する馴化学習・記憶現象に着目した。*C. elegans* は他のモデル動物にさきがけ、神経細胞間のコネクトームが電子顕微鏡レベルで明らかにされ、その結果得られる位置情報・形態情報を頼りに、非侵襲に *In vivo* で特定の神経細胞の分子操作が可能なモデル生物である。本研究では、このような *C. elegans* の利点を活かし、その神経回路内の記憶細胞を同定し、それを分子操作することで人工的に記憶を構築し、記憶の実体に迫ることを目的とした。さらに、構築の指標として、記憶過程の分子状態および神経活動状態の非侵襲な定量化法を開発し、構築原理を模索することとした。そして、このような記憶の再構築の試みは、同時に、多細胞生物への構成的アプローチの試金石になりうると考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、線虫 *C. elegans* のシンプルな神経回路をもとに、その分子遺伝学的手法の利点を最大限に活かし、記憶を操作・再構築することを目的とする。そのため、神経回路が完全に明らかにされている *C. elegans* の機械刺激に対する馴化学習・記憶現象に着目し、3つの研究テーマのもとに解析を進めた。

[研究テーマ A] 記憶を担う細胞の同定とその操作による記憶の人為的構築では、まず、本研究提案の準備段階から取り組んでいた *C. elegans* の記憶の定量化装置の開発に成功した(図 1)。そして、同装置を用い、記憶を担う神経細胞として、*C. elegans* の後ずさりを指令する介在神経細胞 AVA と AVD を同定した (Sugi* et al. *PNAS*, 2014)。現在、これらの結果をもとに、次に記載の[研究テーマ B]と[研究テーマ C]の結果を合わせ、記憶状態の分子操作と再構築を図っている。

[研究テーマ B] 記憶過程の神経活動状態の定量化では、まず、自由行動中の *C. elegans* の神経活動を非侵襲に長時間計測するためのシステムの構築を試みた。神経活動をモニターする蛍光プローブとしてカルシウムインディケーターG-CaMP を *C. elegans* の記憶細胞である AVA 神経細胞に導入した *C. elegans* を準備した。そして、自由行動中の神経活動を長時間にわたり定量化するための装置の開発に成功した。現在、この装置を用い、記憶過程の神経活動状態の解析を行っている。

[研究テーマ C] 記憶過程の分子状態の同定・定量化とその操作ツールの確立では、まず、*C. elegans* の馴化学習・記憶に関わる分子の同定を試み、その結果、記憶細胞である AVA と AVD 神経細胞において、興奮性神経伝達を促進する AMPA 受容体と MAP キナーゼ p38 の間にフィードバック制御が存在し、これが馴化学習・記憶の成立を導く可能性を得た。さらに、その操作を細胞特異的に行うため、最新の遺伝子発現制御技術であるゲノム編集技術を導入し、標的とする AMPA 受容体のゲノム・エピゲノムを、細胞特異的に操作する方法の確立を行った。

以上の 3 つの研究テーマによる成果をまとめると、本研究では、記憶細胞の同定と様々なツールの開発に成功した。また、その記憶細胞において記憶の実体を担う分子の時間情報も得た。今後は、これらの集大成としての、記憶の操作・再構成をさらに推進する。

(2) 詳細

[研究テーマ A] 記憶を担う細胞の同定とその操作による記憶の人為的構築

C. elegans は通常、振動や接触などの物理刺激に対し、後ずさりの逃避行動を示す (図 1 上段左)。一方、約 6 時間定期的に物理刺激によるトレーニングを経験すると、刺激に馴れて記憶し、24 時間後に再び刺激を受容しても、後ずさり距離の減少・消失が見られる (図 1 上段中央)。つまりトレーニングの有無における後ずさり距離を計測することにより、行動の可塑的変化 (記憶) を定量化することが可能という、馴化学習・記憶のパラダイムが知られていた (Bozorgmehr et al. *Front Physiol*, 2013)。一方、この行動パラダイムは 20 年以上前から知られていたが、本さきがけ研究を開始する時点において、ほとんど研究が進んでいなかった。その理由は、特定の時間間隔で振動刺激を精度よく加え、またその後ずさり距離をハイスループットに定量化する手法が確立されていないことに起因すると考えられた。そこで、本研究では、この実験系の整備から着手した。まず、シリンダーのピストン運動を利用し、9 つの線虫飼育プレートに同時に振動刺激を加えられるように設計し (図 1 下段左)、振動刺激のタイミングも自動化し、任意のプロトコル (図 1 下段右) で *C. elegans* のトレーニングを行えるようにした。そして、後ずさりを記録・定量化するソフトウェアも開

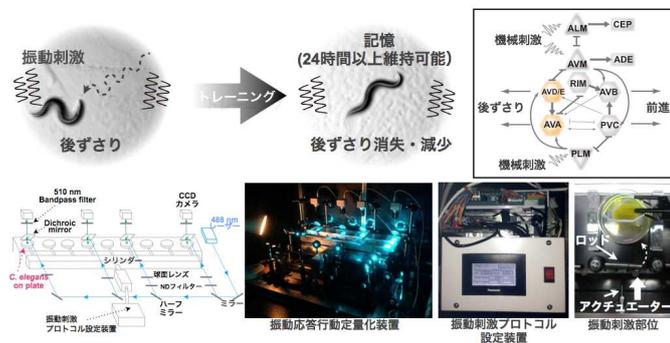


図 1. (上段) 機械刺激に対する行動の可塑的変化の系と神経回路。 (下段) 機械刺激応答行動のハイスループット定量化装置。振動刺激プロトコル設定装置により、振動刺激のタイミング (トレーニングのプロトコル) を設定し、自動で *C. elegans* へ刺激供与。

発した。そして、後ずさりを記録・定量化するソフトウェアも開

発した。動物の行動は、一般的に非常に個体差も大きく、恣意性を排除し、慎重に実験を進めることが要求されることから、本装置開発では、ほぼ全ての実験過程を自動化した。以上の装置開発により、再現よくハイスループットに *C. elegans* の馴化学習・記憶を定量化する実験系の整備に成功した。

次に、哺乳類の記憶形成の目印とも言える転写因子 CREB のリン酸化を指標に、振動刺激の記憶が刻まれた神経細胞を同定することを試みた。図 1 上段右に示すように、*C. elegans* の振動刺激への応答行動を支配する神経回路は既に明らかにされていたことから、この神経回路内の各細胞に特異的に CREB のリン酸化を阻害する遺伝子を発現させ、それぞれのトランスジェニック線虫株の記憶を、開発した装置により定量化した。その結果、後ずさりを指令する介在神経細胞 AVA と AVD の CREB のリン酸化を同時に阻害した場合に、記憶に異常が見られた (図 2)。この結果から、AVA と AVD が記憶を担う神経細胞であるという結論を得た (Sugi* et al. *PNAS*, 2014)。

記憶を担う神経細胞の実体が得られたことから、次に、その神経細胞における分子レベルの記憶の実体を捉える必要がある。研究テーマ C に詳細に記載するように、分子実体と予想される結果が得られつつあり、現在、記憶の操作・再構築を進めている。

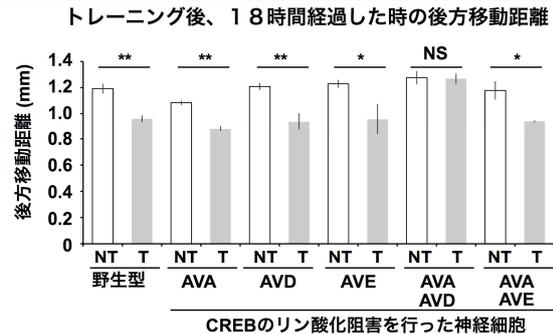


図 2. CREB のリン酸化阻害による記憶を担う神経細胞の同定

[研究テーマ B] 記憶過程の神経活動状態の定量化

まず、カルシウムインディケーター G-CaMP を AVA や AVD を含む少数の神経細胞のみに特異的に発現させた *C. elegans* 株を準備した。記憶過程という 5 時間以上の長時間にわたり、G-CaMP の蛍光シグナルを定量化するためには、(1) その蛍光の褪色を避けるため、一定時間間隔でシグナルを取得し、さらに(2) 個体の動いている状態を維持した非侵襲的な計測が必要となる。そこで、まず、(1) と(2) の条件を満たす装置の開発を行った。原理としては、電動ステージ上に *C. elegans* 個体を飼育したプレートに精置し、取得した画像を LabVIEW により処理しながら、個体の蛍光輝点を常にカメラの視野中央に配置するように電動ステージが動作するためのプログラムを作成した。この装置を用いて、AVA 神経細胞の神経活動を定量化した結果、後ずさり行動に伴い、AVA 神経細胞が活性化の様子が定量化された(図 3)。さらに、この装置に、2 波長の蛍光輝点の同時計測を行うための W-View システムを搭載し、G-CaMP 由来の 509 nm の蛍光の計測と、同じ細胞にレファレンスとして発現させた TagRFP 由来の 583 nm の蛍光の計測を同時に行えるように装置を改良した。現在、この装置を用いて、記憶過程における細胞特異的な長時間の神経活動定量化を行っている。

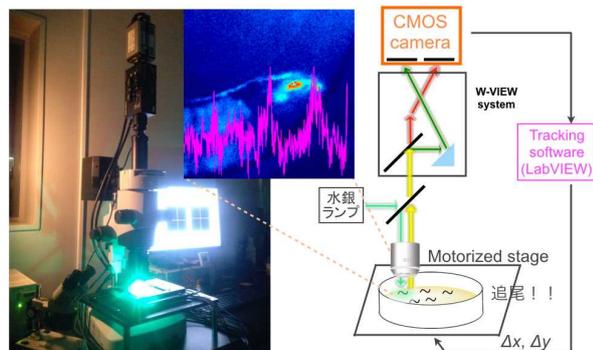


図 3. 自由行動中の神経活動計測装置の開発。中央写真は、後ずさりに伴い、AVA が活性化の様子を定量化。

[研究テーマ C] 記憶過程の分子状態の同定および定量化とその操作ツールの確立

記憶を担う神経細胞として同定した AVA と AVD には、興奮性神経伝達を担う AMPA 受容体が高発現しており、*C. elegans* のトレーニング過程で、その発現量が減少することが知られていた(Bozorgmehr et al. *Front Physiol*, 2013)。そこで、本研究では、まず、この AMPA 受容体のプロモーター解析とその制御因子の同定を行った。その結果、AMPA 受容体と、MAP キナーゼの1つである p38 の間にフィードバック機構が存在する可能性が示された。具体的には、生化学的に p38 のリン酸化を確認した結果、振動刺激によるトレーニングによりリン酸化が減弱し、AMPA 受容体の遺伝子発現を減少させる変異を導入すると、p38 のリン酸化量はトレーニングの有無に関係なく低下が見られた。下流の AMPA 受容体に変異を導入して、上流の p38 のリン酸化に影響が及んでいることから、この制御機構はフィードバックの関係にあると考えた。

この結果をもとに、記憶を担う神経細胞 AVA と AVD を特異的に、AMPA 受容体の遺伝子発現量を人為的に操作すれば、p38 のリン酸化状態と記憶状態を同時に操作することが可能と考えた。そこで、本研究では、広島大学の山本卓教授の研究室と共同で、最新の遺伝子発現操作技術であるゲノム編集技術を

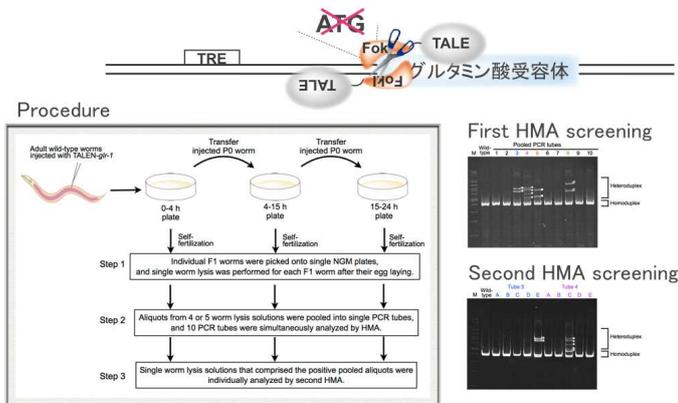


図 4. AMPA 受容体遺伝子座に結合する TALE を用いた遺伝子破壊

導入した。*C. elegans* では細胞特異的な遺伝学的手法を利用できるため、これにゲノム編集技術を融合することにより、新たな技術として、細胞特異的な標的遺伝子座の発現制御法の確立を目指した。まず、パイロット実験として、AMPA 受容体のプロモーター領域に結合し、ゲノム配列特異的な変異を導入するための TALEN を作製し、*C. elegans* に導入した。その結果、6.5%の確率で、変異体を得ることに成功した(図 4; Sugi* et al. *Dev Growth Differ*, 2014)。次に AMPA 受容体のプロモーターに結合する TALE 型 DNA 結合ドメインに、転写活性化因子 VP64 を連結した cDNA を作製し、*C. elegans* の少数の神経細胞にのみ導入した。その結果、通常、AMPA 受容体の発現の見られないグリア細胞 AMsh 細胞において、AMPA 受容体のレポーター DsRed を人為的に異所発現誘導することに成功した。今後、このようなツールの種類をさらに拡げ、さらには、Koner mann et al. 2013 の報告をもとに、光刺激により、記憶を担う細胞 AVA と AVD 特異的に遺伝子発現操作を行う予定である。

3. 今後の展開

今後は、細胞特異的な AMPA 受容体の遺伝子発現操作ツールの光刺激誘導型化と拡充とともに、それらを用いた人為的な記憶状態の創出・消去を実現することが急務である。具体的には、記憶形成を促す振動刺激トレーニングの代わりに、光刺激により、あたかも振動刺激を経験したような記憶状態を導くことや、またそれに伴う p38 のリン酸化の減弱が観察されるかどうかを検証する。一方、振動刺激によるトレーニングを行った直後の *C. elegans* に対し、人為的なエビ

ゲノムの消去から、記憶を忘却へと導くことも目指す。いずれの研究においても、重要なことは、p38 と AMPA 受容体からなるフィードバック制御機構が記憶の本体である可能性を検証することである。また、効率的な操作・再構築には、神経活動状態の指標にした光刺激のタイミングの検証が必要不可欠であることから、研究テーマBで開発した装置により、記憶形成過程から忘却過程に至るまでの神経活動状態の定量化を優先的に進める予定である。これらの時系列データを利用し、最終的に、記憶の実体と考える一般法則を提案したい。

4. 評価

(1) 自己評価

多くのモデル生物の中でも、驚くほどシンプルな神経回路を持つ線虫 *C. elegans* においては、記憶の実験・解析系はそれほど多く確立されておらず、その実験系を確立できたことは、今後、オリジナルな研究を行うための重要な下地となった。また、その実験系を利用し、細胞レベルにおける記憶の痕跡として AVA と AVD 神経細胞を明らかにした。そして、従来の分子遺伝学的手法のみならず、これまで *C. elegans* の行動遺伝学の分野であまり多用されなかった生化学的手法と生物物理学的手法を積極的に導入したことにより、記憶の媒体と期待される分子機構も見えてきた。一方、このような分子機構は、現時点ではこれまで神経科学分野で同定されてきた多くの分子機構の中の1つに過ぎない。本さきがけ研究の「記憶の実体を捉える」という目的を達成するためには、同定した記憶細胞その場で分子機構を人為的に操作・再構築することが必要不可欠であるが、これまで得た知見・ツールをもとに、今後、目的を達成することは十分可能であると考えている。

(2) 研究総括評価

C. elegans の記憶を定量化する装置を独自に開発し、その装置を用いて、*C. elegans* の後ずさを指令する介在神経細胞 AVA と AVD を、記憶を担う細胞として同定した。さらに、神経活動をモニターする蛍光プローブを *C. elegans* の記憶細胞である AVA 神経細胞に導入した *C. elegans* を作製して、自由行動中の神経活動を長時間にわたり定量化するための装置の開発にも成功している。このように独自の解析ツールを次々に開発して、記憶操作に向けて着実な進展がみられ、大いに評価します。

今後、記憶形成過程から忘却過程に至るまでの神経活動状態の定量化を優先的に進め、これらの時系列データを利用し、最終的に、記憶の実体と考える一般法則の提案を期待しています。

これらの成果により、招待講演も多く、活躍の幅を広げている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugi T*, Ohtani Y, Kumiya Y, Igarashi R, Shirakawa M (2014) High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals neurons encoding memory in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 17236–17241.
2. Sugi T*, Ohtani Y (2014) Simplified method for cell-specific gene expression analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 330–334

3. Sugi T*, Sakuma T, Ohtani Y, Yamamoto T (2014) Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ* 56, 78–85

(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)

原著論文

1) Yoshinari Y, Mori S, Igarashi R, Sugi T, Yokota H, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M

Optically detected magnetic resonance of nanodiamonds *in vivo*; Implementation of selective imaging and fast sampling

J Nanosci Nanotechnol Vol. 15 No.1, 1014–1021, 2015

2) Igarashi R, Yoshinari Y, Yokota H, Sugi T, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M

Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds *in vivo*
Nano Letters Vol. 12 No.11, 5726–5732, 2012

学会発表

1) Takuma Sugi

Neural circuit encoding mechanosensory habituation in *C. elegans*

5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology 2015, Nanjing, China, 2015

(招待講演)

2) 杉 拓磨

「生物学的アプローチによる記憶の実体解明への挑戦」

京都府立医科大学 2015 年 4 月 (招待講演)

3) Takuma Sugi

Transcription activator like effector nuclease-mediated knockout mutants in *C. elegans* to study neural circuits

International Single Molecule & Genome Engineering/Editing Europe, University of Cambridge, UK, 2014 (招待講演)

4) 杉 拓磨

「線虫の記憶を刻むリズムとエピジェネティクス」

理化学研究所、和光、2014 年 (招待講演)

5) 杉 拓磨

「線虫 *C. elegans* のゲノム編集による個体機能の再構成への試み」

第 3 回ゲノム編集研究会、広島大学、2013 年 (招待講演)

受賞

なし

総説

1) 杉 拓磨

メカニカルな刺激の馴化学習・記憶現象の実験系確立とその神経基盤
細胞工学 Vol. 34, No. 4, 1-4, 2015

2) 杉 拓磨

私の学会聞き歩き (The First Annual Winter q-bio Meeting) : 構成 (合成) 生物学の
最前線にて
細胞工学 Vol. 32, No. 6, 727-728, 2013

著書

1) Takuma Sugi (分担執筆)

Book Title: Targeted Genome Editing Using Site-specific Nucleases: ZFNs, TALENs,
and the CRISPR/Cas9 System

Chapter 4: Genome editing in nematode

Springer 71-80, 2015 (担当ページ 71-80 ページ/全ページ数 205 ページ)

2) 杉 拓磨 (分担執筆)

今すぐ始めるゲノム編集 (TALEN を用いた線虫の遺伝子改変法)

実験医学別冊 122-129, 2014 (担当ページ数 122-129 ページ/全ページ数 205 ページ)

プレスリリース

1) Sugi T*, Ohtani Y, Kumiya Y, Igarashi R, Shirakawa M

High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals
neurons encoding memory in *Caenorhabditis elegans*

Proc Natl Acad Sci USA Vol. 111 No. 48, 17236-17241, 2014

JST と京都大学の共同プレスリリース「嫌いな刺激に馴れる仕組みを線虫で発見」

活動

1) 2016 年 2 月 マックスプランク研究所より PhD コース学生のインターンシップ (2 週
間) の受け入れ