

香りの記憶形成・固定化メカニズムの解明

同志社大学研究開発推進機構

眞部 寛之

It is known that the odor memories are associated with not only what the odor is but also the episode that experienced when we smelled the odor. However, the neural mechanism of association between an odor and the episode is still unclear. The piriform cortex, a major part of the olfactory cortex, is known as an association cortex integrating incoming olfactory sensory information from the olfactory bulb with top-down input from higher regions such as the orbitofrontal cortex. To reveal the neural mechanisms of association memory between an odor and the episode when the odor was experienced, we recorded the neural activities in the anterior piriform cortex (aPC) of freely moving rats performing an odor-guided go/no-go task and its reversal learning task. To reveal memory consolidation mechanisms of the aPC, we recorded the neural activities during the pre- and post-task sleep.

We found that many aPC neurons fired during the odor presentation period and the specific behavioral scene during the odor-induced behavioral go/no-go events, such as the moving to the reward port scene, the consumption of rewards scene, and so on. Such the odor-scene responsive aPC neurons were tuned to a smaller scale scene within each behavioral scene. After rats learned the reversal task, many aPC neurons respond to the reversed odor-scene combinations. We also found that the odor-scene responsive neurons reactivated associated with the olfactory cortex sharp-waves.

These results suggest that the odor-scene responsive aPC neurons have an important role in the memory formation and the consolidation between the odor inputs and the top-down scene signals related to the odor-guided learned behaviors.

1. 緒言

匂いの記憶は、単にその匂いがどのような匂いであるかだけでなく、そのときに経験したエピソードも含めて想起されることは我々の日常生活においてもよく経験することである。この匂いと連合した経験によって、例えば、特定の香水に対する愛着などがおこると考えられる。匂いによって過去の経験が想起される心理現象は、「ブルースト効果」と呼ばれている¹⁾。この名前は、フランスの小説家、マルセル・ブルーストの著書『失われた時を求めて』の中に、主人公が紅茶に浸したマドレーヌを口にした時、幼少期の体験が鮮明に思い出されるという有名な一節がもとなっている²⁾。小説では、主人公がマドレーヌの芳醇な香りによって過去の経験(エピソード)を思い出すが、このたった一度の経験でも起こりうる、匂いとエピソードとの連合学習と想起システムの脳内機構は全く不明である。

1991年に嗅覚受容体が発見され³⁾、嗅覚系の研究は急速に発展し、嗅覚受容体を発現する嗅上皮や1次中枢である嗅球での情報処理の基本ロジックは明らかとなってきた。しかし、嗅球からの情報が統合される嗅覚2次中枢の嗅皮

質が持つ機能は未だほとんど解明されていない。本研究の第一の目的は、匂いとエピソードを繋ぐ連合記憶の神経回路機構を明らかにすることである。我々は嗅皮質の中でも、嗅球からの嗅覚情報と、高次領域からのトップダウン入力を受ける梨状皮質に着目した。匂いを手掛かりとした行動学習課題遂行中のラット梨状皮質からリアルタイムに神経活動をモニターすることで、匂いとエピソードの連合学習における梨状皮質の役割を検討した。

記憶の固定化研究は海馬で進んでおり、海馬においては、経験時の活動パターンがその後の睡眠時(オフライン時)に、鋭波と呼ばれる特徴的な脳波に伴って繰り返し再現される(再活性化される)ことで記憶が固定化されると考えられている⁴⁾。

我々は近年、徐波睡眠時のラット嗅皮質において、海馬とよく似た特徴を持つ鋭波が観察されることを発見し、嗅皮質鋭波と名付けた⁵⁾。嗅皮質鋭波の出現と同時に、特定の嗅皮質ニューロン群が発火活動を起こすことから、海馬と同様に、嗅皮質鋭波上で睡眠直前に経験した神経活動パターンが再活性化されている可能性がある。本研究の第二の目的は、徐波睡眠時の嗅皮質鋭波上で再現される情報とその様式を明らかにすることで、匂いとエピソードの長期固定化機構を明らかにすることである。匂いを手掛かりとした行動学習課題遂行後の睡眠中、梨状皮質で匂いとエピソードの記憶に関わるニューロンが、再活性化するかどうかを検討した。



Neural mechanisms of odor memory formation and consolidation

Hiroyuki Manabe

Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University

2. 方法

2.1. 匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題と逆転学習、課題前後の睡眠

本実験のすべては、同志社大学動物実験等の実施に関する規定に従い、同志社大学動物実験委員会の審査を受け、学長の承認を得た上で実施したものである。

実験には、雄の Long-Evans Rat (清水実験材料) 成獣を用いた。匂いが出る匂いポートと、水報酬が出る水ポートが壁に設置されているオペラントボックス(自作)にラットを入れた。ラットが匂いポートに鼻を入れると、0.5 秒間匂いを提示し、匂いの内容に応じて 2 種類の行動を学習させた(図 1A)。

- ・ go 行動：匂い A の提示後、2 秒以内に水ポートに鼻を入れて水報酬を得る。
- ・ no-go 行動：匂い B の提示後、水ポートに鼻を入れず 2 秒間待つ。

go 行動では、2 秒以内に水ポートに鼻を入れられなかった場合、no-go 行動では 2 秒間待てなかった場合、次試行に移行するまでに 2 秒間の遅延罰を与えた。go 試行と no-go 試行はランダムに提示し、1 日に 1 セッション、数百試行を行わせた。タスクの制御はコンピューター制御で自動化して行った (Bpod, Sanworks)。匂いの制御は自作オルファクトメーターを用いて行った。オルファクトメーターはタスク制御装置によってコンピューター制御できるようにした。使用する匂い分子は様々な化合物またはその混合物を使用し、実験ごとに変えた。

逆転学習は、上記の匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習成立後、刺激-報酬の連合関係を、セッションの途中で、匂い A → no-go 行動、匂い B → go 行動の関係に突然入れ替えることによって行った。

徐波睡眠中のニューロン活動をモニターするために、行動学習課題の前後にラットをオペラントボックスに入れたまま 1-2 時間放置し、ラット睡眠中(前睡眠、後睡眠)の前梨状皮質ニューロンの活動を記録した。

2.2. 電気生理とデータ解析

ケタミン(67.5mg/kg)およびメドミジン(0.5mg/kg)にて麻酔したラットの前梨状皮質に 15 本のテトロード電極を挿入する手術を行った。テトロードは直径 12.5 μ m のタンダステンワイヤー (California Fine Wire) を 4 本束ねたものを使用した。テトロードは自作マイクロドライブに取り付け、マイクロドライブ上のケーブル接続用基盤に接続した。マイクロドライブは、ネジを動かすことで電極の深度を変えられる装置であり、日々深度を変えることで、多くのニューロンの活動を記録できる。これをラット頭部に設置でき、ラットの行動を制限しないサイズに設計した。

ラット頭蓋骨に穴をあけ、テトロードを真っ直ぐに下ろして前梨状皮質に到達させた。マイクロドライブは接着剤を用いて頭蓋骨に固定した。グラウンドトリファレンスのために、小脳上の骨にビス電極を埋め込んだ。

1 週間以上回復期間を設け、その後、匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題と逆転学習を遂行中、またその前後の睡眠中、前梨状皮質のニューロン活動を記録した。記録は、多チャンネル記録システム (Neuralynx または OpenEphys) を用いて行った。ユニットレコーディング用のサンプリングレートは 32kHz (Neuralynx) または 30kHz (OpenEphys) であり、取得したシグナルはバンドパスフィルター (600-6000Hz) をかけた。セッション終了後、テトロード電極を 40 μ m または 75 μ m 下すことで、日々新たなニューロン集団から記録した。

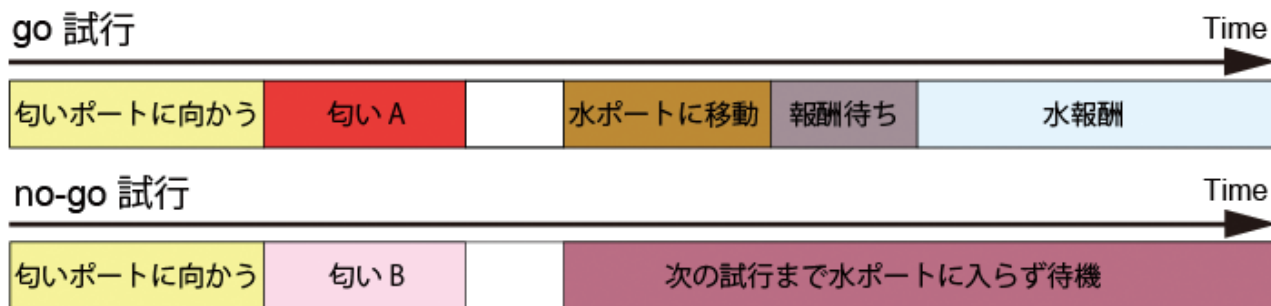
データは全て Matlab (Mathworks) を用いて解析した。記録したマルチユニットをオフラインにてスパイクソーティングすることで、シングルユニットとして解析した。

3. 結果

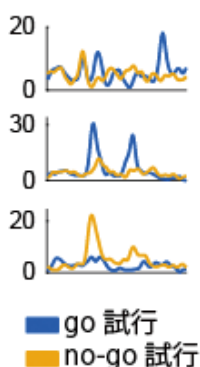
3.1. 匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題遂行中の前梨状皮質ニューロン活動の解析

学習が成立したラットは、匂い A が提示されれば、隣の水ポートに行き水報酬を獲得する行動を行い、匂い B が提示されれば、水ポートには行かず待つ行動を獲得した。この、go/no-go 行動学習課題遂行中の前梨状皮質から多数のニューロン活動を記録した。前梨状皮質ニューロンは、行動時の様々な場面で応答した。その中で、記録した 251 個のニューロンのうち、138 個のニューロンが、匂い提示区間と、その後の特定の行動状態(シーン)の 2 か所で応答することが分かった。図 1B は匂い提示シーンとその他シーンの 2 か所に応答するニューロンの例(3 例)である。匂い提示後のどのシーンに対して応答するかはニューロンごとに異なっていた。図 1C は、匂い提示時に応答したニューロンが、その後のどのシーンで応答するかを示した図である。正解した試行のみを用い、各行がそれぞれのニューロンの活動パターンを示し、応答のピークが黄色になるようにカラーマップで示した。ニューロンを、応答のピークの順番に並べると、匂い提示後のすべてのシーンをカバーするように応答することが分かった(匂いが出るシーンの後、黄色い線が、ニューロン間で連続して続いているように見える)。また、匂い B に応答するニューロンは、水ポートに行かず待機するシーンのすべてをカバーするように応答することが分かった。すなわち、これらのニューロンは、匂い刺激と、特定のシーンとを連合するニューロンであると考えられた。

A



B



C

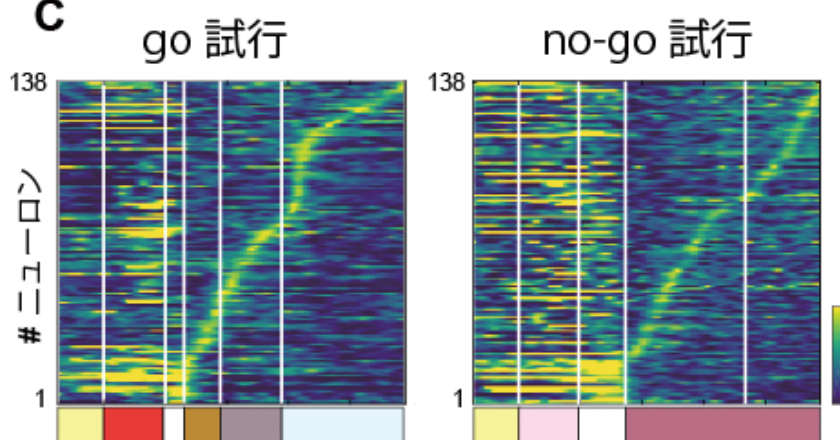


図1 学習課題と aPC ニューロンの応答

- A: 匂いを手掛かりとした go/no-go 行動課題
- B: 課題遂行中の aPC ニューロンで見られた、匂い提示区間とその後のシーンの両方に応答するニューロンの例
- C: 匂いとその後シーンの両方に応答するニューロンを、シーン応答のピーク順に並べたもの

3. 2. go/no-go 行動学習課題の逆転学習時の前梨状皮質ニューロンの解析

匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題を十分に学習したラットを用いた。ある日のセッション中、刺激-報酬の連合関係を、匂い A → no-go 行動、匂い B → go 行動の関係に突然入れ替える逆転学習を行わせ、その際の前梨状皮質ニューロンの活動を継続的に記録した (図 2A)。刺激-報酬の連合関係を逆転されると、逆転直後には、それまでの学習で得られた行動を行うため正答率は落ちるが、ラットが新しいルールを学習すると共に正答率が上昇した。図 2B に、ある日の正答率を示す。安定した正答率 (80% 以上) が得られた段階で、匂いと行動との関係を逆転した (図 2B 赤線)。一旦正答率は落ちるが、数十試行後には高い正答率に達した (図 2B グレー線)。前梨状皮質の応答は、逆転学習前には、匂い A とその後の go 行動時の特定のシ

ーンの両方に応答するニューロンが記録されたが (図 2C 左上、ここでは、匂いが出たあとのシーンのみを示している)、逆転学習成立後には、匂い A とその後の no-go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されるようになった (図 2C 左下)。また、逆転学習前には、匂い B とその後の no-go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されたが (図 2C 右上)、逆転学習成立後には、匂い B とその後の go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されるようになった (図 2C 右下)。すなわち、逆転学習によって匂いと行動の新しいルールを学習すると、梨状皮質ニューロンの発火パターンも新しい刺激-行動の連合関係を構築することを意味しており、匂いとそれに紐づくシーンの両方に応答するニューロンの応答特性は、学習によって形成されると考えられる。

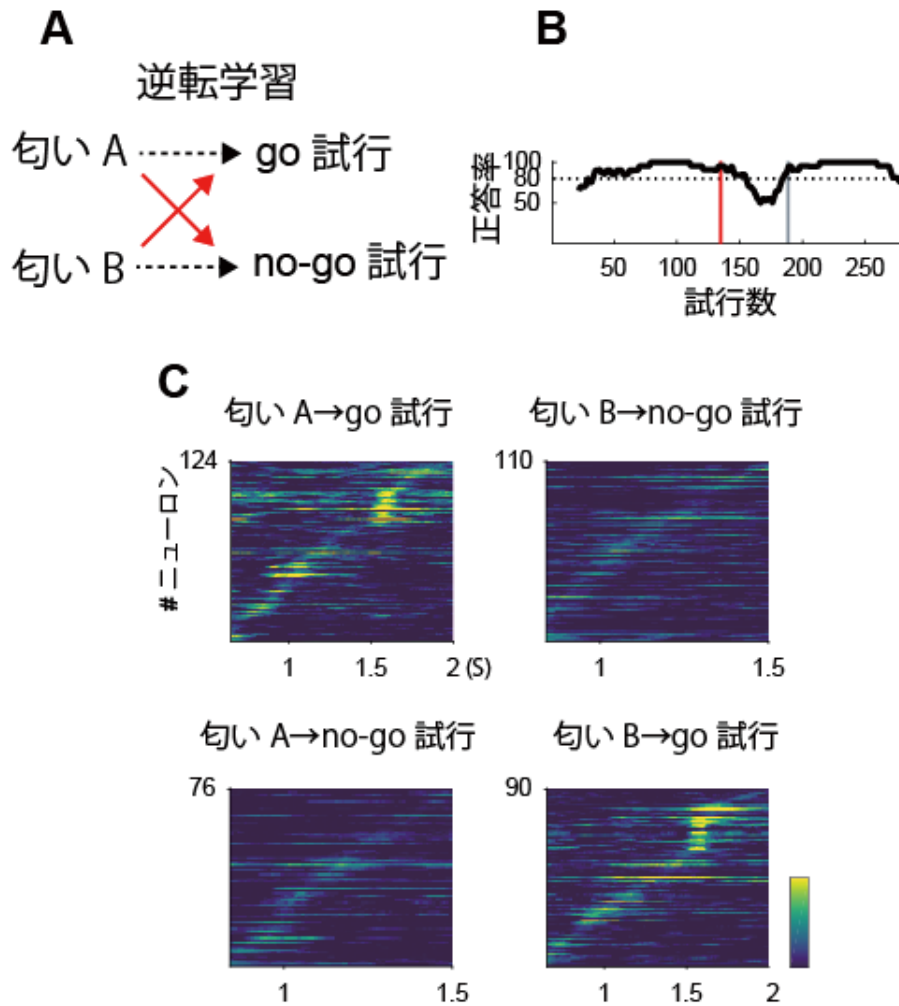


図2 逆転学習と逆転学習による aPC ニューロンの応答変化

A: 逆転学習 試行途中から赤矢印の関係に突然変化する
 B: 逆転学習時の正答率の変化
 C: 逆転学習前後における、シーンに対する応答変化 上段; 逆転学習前、下段; 逆転学習後

3. 3. 課題後のニューロン再活性化の解析

匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題に加え、その前後の睡眠中の前梨状皮質ニューロンの活動も記録し、覚醒中の課題遂行時に活動したニューロンが、その後の徐波睡眠時に、嗅皮質鋭波に伴って再活性化するかどうかを検証した (図3)。匂いを手掛かりとした go/no-go 行動課題中に、匂いと其の後のシーンの両方に応答したニューロン2例を示す (図3 真ん中のヒストグラム)。左右のヒストグラムは、それぞれのニューロンが課題前後の睡眠中、嗅皮質鋭波に同期して発火したかどうかを示すグラフである。0を嗅皮質鋭波のトラフとして、鋭波のトラフ前後に発火したかどうかを多数の嗅皮質鋭波イベントの加算で表した。ピンクのラインを越えれば、統計的に有意に発火したといえる。これらのニューロンは、前睡眠中、嗅皮質鋭波出現時に同期した発火はほぼ見られなかったが、後睡眠では嗅

皮質鋭波に同期して発火するようになった。すなわち、行動課題で発火した匂い区間とシーンの両方に応答するニューロンが、課題後の徐波睡眠中、ニューロン発火活動の再活性化を起こしたと考えられる。

4. 考察

本研究で見つかった、匂いとそれに紐づくシーンの両方に応答するニューロンは、匂いとシーンを連合する役割をもつニューロンであると考えられる。また、逆転学習の結果から、匂いとシーンの連合関係は学習依存的であると考えられる。各々の前梨状皮質ニューロンが異なるシーンに対して応答することから、前梨状皮質のニューロン集団で見ると、匂いとそれに紐づくシーンの集合である、エピソードを表象すると考えられる。すなわち前梨状皮質は、匂い情報とエピソードの連合学習の場である可能性がある。

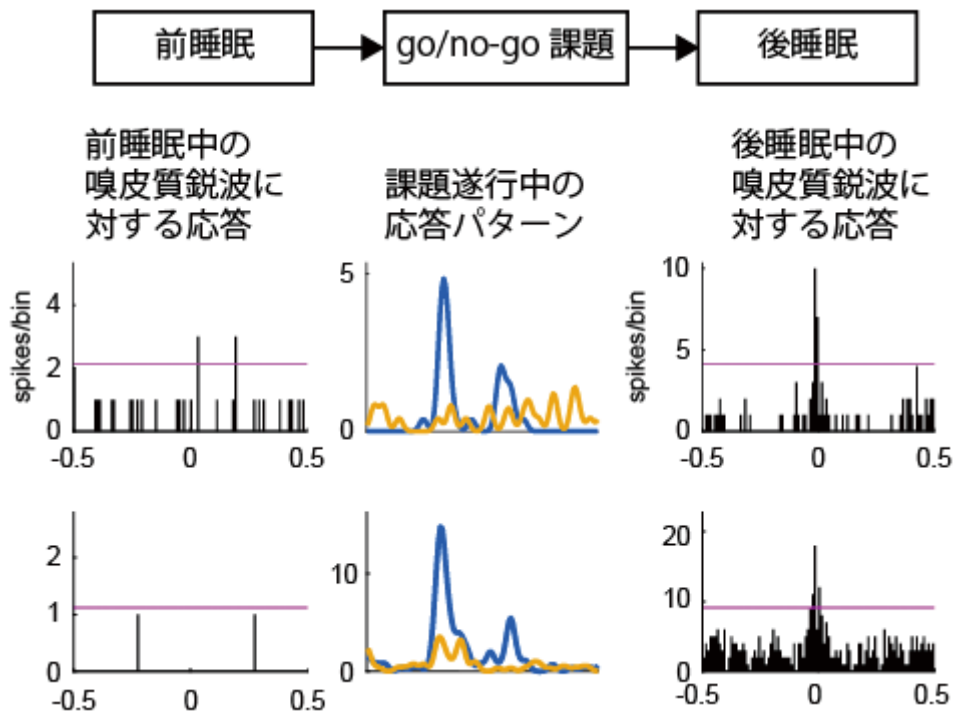


図3 課題前後の睡眠時における、匂いとその後のシーンの両方に応答する aPC ニューロンの再活性化

前梨状皮質は、嗅球から直接入力を受ける。また、嗅皮質亜領域同士が密に連絡しており、嗅覚情報は嗅球から直接、または他の嗅皮質亜領域経由で入力されるので、匂い提示区間での応答は、これらの経路からの入力であると考えられる。一方、シーン情報はどこから来るのか？最近我々は、内側前頭前野から直接入力を受ける ventral tenia tecta (VTT) と呼ばれる嗅皮質亜領域のニューロンが、様々なシーンに特異的に応答することを発見した⁶⁾。前梨状皮質で見られたように、シーンに応答する VTT ニューロンを集めると、行動中のすべてのシーンに対応することが分かった。すなわち、VTT ではエピソードを表象することが分かった。前梨状皮質は VTT から直接入力を受けるため、シーンの情報は VTT から入力される可能性がある。また、前梨状皮質は眼窩前頭皮質からの直接入力を受ける。内側前頭前野と眼窩前頭皮質も密に連絡があり、シーン情報は眼窩前頭皮質から入力される可能性もある。

匂いとそれに紐づくシーンの両方に応答する前梨状皮質ニューロンは、課題後の徐波睡眠時、嗅皮質鋭波に伴って再活性化することから、嗅皮質鋭波は覚醒時の記憶の固定化に寄与している可能性がある。

5. 総括

これまでの嗅覚研究は、匂い情報をどのように獲得し、匂いがどのように脳で表現されるかについての研究が主で

あり、匂いがどのように記憶や行動に結びつくのかについてはほとんど不明であった。しかし近年、嗅球の基本的な回路機構が解明され、嗅球の次の高次領域である嗅皮質の機能に注目が集まってきた。嗅皮質は、嗅球からの匂い情報を統合するだけでなく、高次野からのトップダウン入力を受ける領野であり、匂い情報とトップダウン情報の連合の場であると考えられてきた。

本研究は、匂い情報とそれに紐づくエピソードとが前梨状皮質で連合するという新しい仮説を提唱するものであり、本研究を足掛かりとすることで匂い記憶の研究の発展に寄与したいと考えている。また、本研究は、これまで心理学的な考察しかされてこなかったプルースト効果を、神経科学的に解明する糸口になる可能性があり、今後の研究の発展が期待できる。今後は、オプトジェネティクスなどを導入し、匂いとシーンとの連合を阻害したときにどのような行動変化が起こるのかを明らかにしたい。

エピソードの想起は、単に起こったことを思い出すだけでなく、そのときの心理的な状況（楽しかったや悲しかったなど）も想起される。すなわち、エピソードには、情動や感情などの情報も内包されると考えられる。匂いの印象は大抵、何らかの情動や感情が伴うことが多い。本研究は匂いとシーンの連合に着目したが、匂いとそれによって起こる情動や感情などの連合も梨状皮質上で起こっている可能性があり、本研究を発展させることで、我々が嗅いだ匂

いに抱く印象がどのようにして起こるのか、その神経回路機構を明らかにできるかもしれない。

徐波睡眠時に起こる、嗅皮質鋭波での再活性化は、成立した記憶の固定化の場としての機能を持つと考えられ、この再活性化の阻害による記憶定着の阻害実験などを行いたいと考えている。また、今回の研究では、前睡眠→課題→後睡眠を通じて記録できたニューロンの数が少なく、再活性化のルールや、逆転学習後の再活性化様式などは不明のままであり、今後の研究で明らかにしたいと考えている。

今後、今回発見した匂いとエピソードの両方をコードするニューロンの連合学習様式と再活性化様式をさらに解明していくことで、匂い記憶とその固定化の神経機構の基本ロジックを明らかにしたい。

(引用文献)

- 1) Ernst A. The Proust Effect: The Senses as Doorways to Lost Memories. *Perception*. 43: 1404-1406, 2014.
- 2) 鈴木道彦. 『プルーストを読む—『失われた時を求めて』の世界』集英社新書. 2002 ISBN 978-4087201758.
- 3) Back L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65 (1) : 175-187, 1991.
- 4) Wilson MA, McNaughton BL. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*. 265: 676-679, 1994.
- 5) Manabe H, Kusumoto-Yoshida I, Ota H, Mori K. Olfactory Cortex Generates Synchronized Top-Down Inputs to the Olfactory Bulb during Slow-Wave Sleep. *The Journal of Neuroscience*. 31 (22) : 8123-8133, 2011.
- 6) Shiotani K, Manabe H, Tanisumi Y, Murata K, Junya H, Sakurai Y, Mori K. Tuning of ventral tenia tecta neurons of the olfactory cortex to distinct scenes of feeding behavior. *BioRxiv*. doi: 10.1101/455089.