

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14818

研究課題名（和文）記憶形成と固定化においてNMDA受容体依存性LTPがおこる時間枠の探索

研究課題名（英文）Time window of NMDA receptor-dependent LTP in memory formation and consolidation

研究代表者

後藤 明弘 (Goto, Akihiro)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：10741332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：NMDA受容体依存性LTPは記憶形成の細胞レベルの現象である。しかしこれまでの技術では記憶形成時にLTPが脳のどの部位に、どの時間枠で誘導されているかを検討することは困難であった。したがって本研究では新たにCALIの技術を開発することで、記憶形成時のLTP誘導の時間枠を検討した。その結果、記憶形成直後に海馬でLTPが誘導されていること、さらにその2時間後以降の睡眠中で再びLTPが誘導されていることを明らかにした。この成果は、記憶形成の細胞レベルのメカニズム解明に大きく寄与すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LTPは記憶に重要であることが知られているが、記憶形成の過程で実際にいつどこでLTPが誘導されているかはわかっていなかった。したがって、LTPの時間枠を検討できる本研究は記憶研究において画期的なツールとなる。記憶の形成過程において、記憶がどのように長期的に定着するかは多くの人々の関心事であり、本研究の見解は認知症の予防・治療の基盤に繋がる可能性も秘めており社会に大きく貢献できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：NMDA receptor dependent LTP is a phenomenon of memory formation at cell level. However, it is difficult for previous technique to examine when and where LTP takes place during memory formation in a brain. Therefore, we developed CALI technique to examine time window of LTP during memory formation. We found that LTP was induced in hippocampus right after memory formation. Furthermore, LTP was induced again during sleep and 2 hours after memory formation. This finding is expected to contribute to understanding mechanisms of memory formation at cell level.

研究分野：神経科学

キーワード：LTP CALI 記憶の形成 cofilin

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんの治療のために海馬を切除された HM 氏は新しいことを思い出すことは全くできなかったが、少年時の頃の事は思い出すことができた。この症例からもわかる通り、記憶の中でも陳述記憶は初め海馬でコードされるが、時間が経つにつれ、大脳皮質など海馬以外の領域に移行していくと考えられている。しかし、その移行のメカニズムは明らかではない。そのメカニズムのモデルとして、動物の睡眠中に見られる、覚醒時に生じたのと同じような神経活動のパターンである replay が考えられる。例えばげっ歯類を円形走行路で繰り返し走らせると海馬の細胞が順に発火するが、同じパターンの発火が睡眠中に観察される。この海馬の replay の繰り返しにより、大脳皮質など標的部位のシナプスに長期増強 (LTP) が生じ、新たなネットワークが形成され、記憶が固定化されるという仮説が考えられる。学習後、海馬の NMDA 受容体発現を 1 週間持続的に抑制すると記憶成績が悪化したことから、記憶の固定化には海馬での NMDA 受容体の再活性化が必要であることが示唆された。また、海馬では学習直後に最初期遺伝子 Zif268 と c-fos の発現が上昇する一方、前帯状皮質ではすぐには上昇せず、36 日後の記憶想起時に上昇してくるが見出された。これらの実験結果は replay とそれによって引き起こされる NMDA 受容体依存的な LTP が記憶の固定化に関与していることを示唆する。しかし 1 秒以下の時間単位で限定した神経細胞のみで生じる replay を、全ての神経細胞を数時間にわたって持続的に抑制する薬物実験で議論することは無理がある。したがって、さらに高い時間分解能、空間分解能ならびに特異性を有する可塑性の操作技術が必要である。

2. 研究の目的

上記の replay 仮説を検討するために、申請者が独自に開発した、LTP を光によって局所的に解除する手法を用いる。申請者の所属研究室では構造的 LTP (sLTP) を起こしたシナプスでは Cofilin がアクチンと相互することにより、F-アクチンを安定化させていることを見出した (Bosch et al., Neuron, 2014)。したがって Cofilin が LTP の維持に重要だと考えられる。この結果に基づき、申請者は chromophore-assisted light inactivation (CALI) を使い、光によって Cofilin を不活化することを試みた。高効率で CALI を起こす SuperNova (SN) と Cofilin の融合タンパク質 (Cofilin-SN) を導入し、光によって Cofilin の不活化と sLTP の解除を試みた。現在までに、光によって sLTP 誘導後のスパイン内のアクチンのターンオーバーが早くなり、その結果としてスパインが縮小し、sLTP が特異的に解除されることを見出している。sLTP を起こしていないシナプスや sLTP 後 50 分以上経過したシナプスには影響はなかった。この段階ではその他のタンパク質 (PSD-95 や Homer など) がシナプスの安定性に関わっているものと考えられる。また sLTP 誘導前に CALI を起こしても sLTP は阻害されなかった。すなわち、本方法を用いることによって、LTP 誘導 50 分後以内にあるシナプスでのみ LTP を解除可能である。薬物や破壊実験、遺伝子破壊動物では、このような実験ができないため、記憶メカニズムを解明するためのユニークな実験をデザインすることが可能であると期待される。海馬と大脳皮質は共通の NMDA 型グルタミン酸受容体依存的な可塑性をもつため、本技術を用いて、海馬と大脳皮質のそれぞれの LTP を高い時空間分解能、特異性で解除することができる。さらに大脳皮質のどの領域でシナプス可塑性がいつの段階で生じるかを検討することで、記憶が海馬から大脳皮質のどこに、いつ移行するかを明らかにする。特に、学習後の睡眠中 (replay 中) に大脳皮質の様々な領域でシナプス可塑的变化を解除することで、記憶が解除される皮質領域が明らかにし、replay 仮説を検証する。

3. 研究の方法

海馬の LTP が記憶に必要な時間範囲を検証するために、自由運動マウスの海馬に光を照射し、LTP を解除する。受動的回避学習試験 (Inhibitory avoidance test, IA test) を使い、学習成立後の様々なタイミングで海馬にて光照射による LTP 解除を行い、学習が阻害されるかを検討する。IA test は海馬依存的学習であることが確立していること、学習直後に実際に LTP 様のシナプス反応の亢進が観察され、またそれに伴い LTP と同様に AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプスへの挿入が報告されているため選択した。光を照射し、学習直後に LTP を解除することで記憶形成が阻害されることが期待される。また、1 回の試行により再現性よく学習させることができ、記憶が長期にわたって持続するという特徴も重要である。実験には Cofilin-SN を flox で発現制御可能な AAV vector を用いて CaMKII-Cre マウス両側海馬 CA1 の錐体細胞に発現させる (図

1)。593 nm ダイオードレーザーから光ファイバーを用いて CALI に必要な光量を導入する。これまでに電気ショック1分後に CALI を行い、暗箱へ入るまでの遅延の抑制、つまり記憶

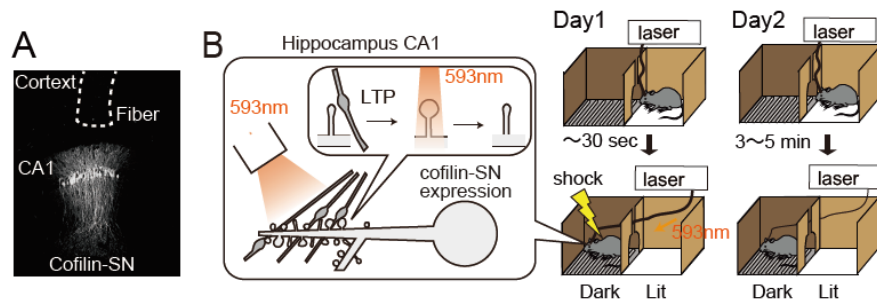


図 1. 光照射による LTP の解除. A. 脳スライス. CA1 神経細胞に Cofilin-SN の発現と、皮質にファイバー跡 (破線) が見られる. B. in vivo での光による LTP 解除

の消去に成功している。またカスパーゼ活性を指標にして、CALI によって細胞死が起きていないことも確認している。今後は CALI のタイミングを学習 1 時間後、2 時間後～24 時間、さらに長期と変化させ、特に replay が起こることが知られている睡眠中に海馬局所で LTP が生じることが必要であるかを観察する。脳波により、REM、non-REM 睡眠も区別する。

4. 研究成果

海馬において LTP が誘導される時間枠を検討するために、記憶タスク (IA テスト) 後、様々な時間において海馬に光を照射した。その結果、IA テスト 2 分～20 分後に光を照射することで記憶が消去された (図 2)。一方、IA テスト後 120 分後に光を照射しても記憶に影響がなかった。この結果から、記憶学習直後に LTP が誘導されることで記憶が形成されることが示された。

さらに IA テスト 2 時間後から、睡眠中にのみ光を照射した (図 3)。その結果、睡眠中にのみ光を照射した時にのみ、記憶が消去された。一方、覚醒時にのみ光を消去

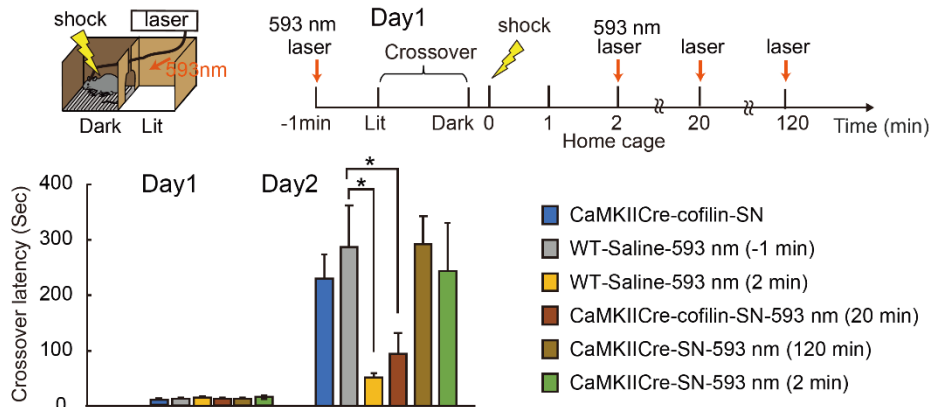


図 2. IA テスト後、様々なタイムポイントにおける光照射。Day1 で光照射をした場合の Day2 における記憶成績。IA テスト後 2～20 分後の光照射で記憶が消去される。

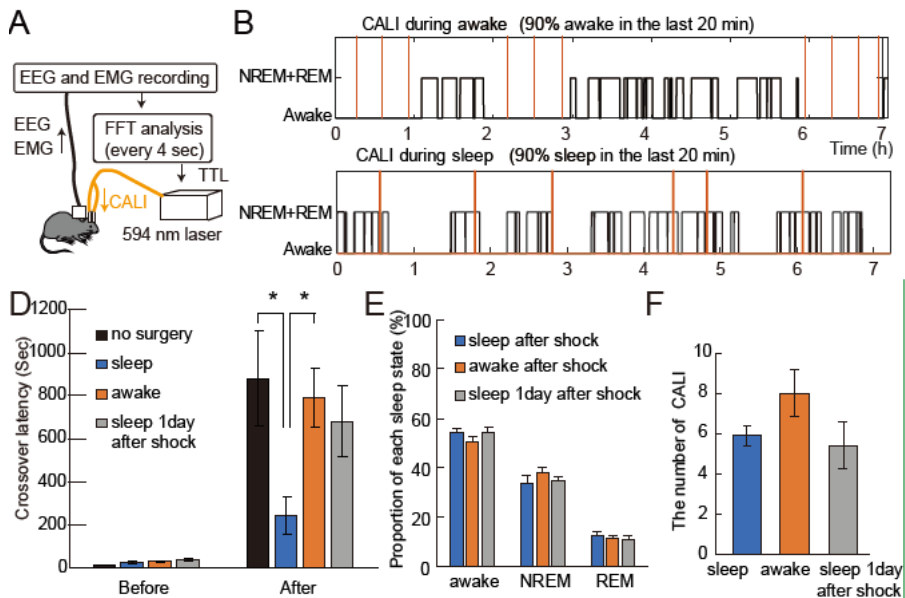


図 3 A,B 睡眠中および覚醒中にのみ光を照射する実験系。D 光照射後の記憶成績。E,睡眠状態 F,光照射回数

しても記憶に影響は見られなかった。光照射による睡眠への影響は見られず、また光照射回数に

違いは見られなかった。以上の結果から、記憶タスクの2時間後以降の睡眠中に、LTPが再び誘導されており、そのLTPも記憶の形成に重要であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 後藤明弘
2. 発表標題 海馬シナプス可塑性の時間枠を同定する新規光学技術
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----