

令和 4 年 4 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15901

研究課題名（和文）offline LTPの記憶固定への寄与の解明

研究課題名（英文）Revealing the function of offline LTP in memory consolidation

研究代表者

後藤 明弘（Goto, Akihiro）

京都大学・医学研究科・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）：学習直後だけでなく、その後のofflineの状態でも LTP（記憶の細胞レベルの現象）が誘導されているか、されているとすれば記憶の形成にどのように寄与しているかを検討した。そのために、LTPを光で解除する技術を用いた。光を照射して記憶が消去されれば、その時間枠においてLTPが誘導されていることがわかる。その結果、学習後と同日の海馬と翌日の睡眠中の前帯状皮質でoffline LTPが誘導されることで記憶の固定化が起きていることを明らかにし、本課題の目的であるoffline LTPの記憶固定化における寄与を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、記憶が長期的に保存されるための細胞レベルでのメカニズムを解明することができた。学習後に睡眠をとることで、学習当日は海馬でoffline LTPが誘導され、その翌日には前帯状皮質でoffline LTPが誘導され、それにより記憶が長期的に保存されることを明らかにした。記憶を長期的に保存するという社会的意義の高い生命現象のメカニズムを解明したことで、今後臨床なども含めた社会還元につながる研究成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether LTP (a cellular-level phenomenon of memory) is induced not only immediately after learning but also in the offline state afterward, and if so, how it contributes to memory formation. To this end, we used a technique in which LTP is canceled by light. If memory is erased by light irradiation, then LTP is induced in that time frame. We found that offline LTP was induced in the hippocampus on the same day as after learning and in the anterior cingulate cortex during sleep on the following day, indicating that offline LTP contributes to memory consolidation, which is the goal of this project.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 LTP 固定化

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。学習直後の LTP を online LTP と呼ばれるのに対して、学習後しばらくしてから (おそらく睡眠中に) おきる LTP を offline LTP と呼ばれる。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学習後の offline LTP が記憶の固定化に関与していることを示唆する。これを証明するためには、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

Offline LTP が記憶固定化にどのような役割を担うかを検討するため、申請者が近年開発した、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 がアクチンと相互作用することにより、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) を用い、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 を高い時間空間分解能、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 (特に睡眠中) に大脳皮質の様々な領域でシナプス可塑性の変化を解除することで、offline LTP が記憶固定化に重要であるかを検討する。

### 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) を用い、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

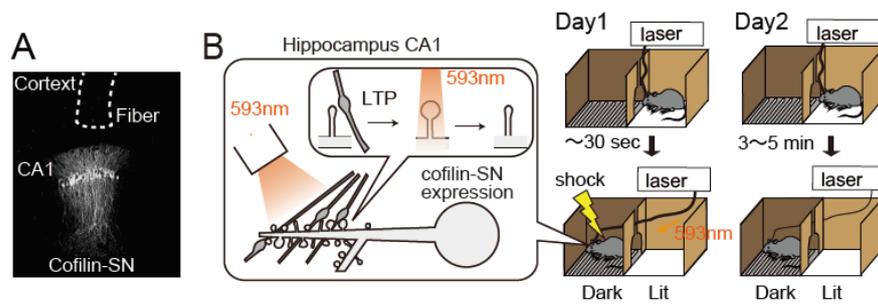


図 1. 光照射による LTP の解除. A. 脳スライス. CA1 神経細胞に Cofilin-SN の発現と、皮質にファイバー跡 (破線) が見られる. B. in vivo での光による LTP 解除

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、offline LTP が記憶に必要であるかを検討する。

#### 4. 研究成果

学習直後の睡眠中に offline LTP が海馬で起きる可能性について検討した。そのために、睡眠中、あるいは覚醒中にのみ光を照射するシステムを確立した (図 2)。脳波と筋電図を測定することでマウスの睡眠状態を自動的に検出し、20 分間睡眠あるいは覚醒状態が続いた時にのみ海馬に光照射した。光照射によって 20 分以内に誘導された LTP を解除できるため、これにより睡眠中あるいは覚醒状態におきた LTP のみを解除することができる。IA test の電気刺激と同日の睡眠中に CALI を行なった場合、翌日に記憶成績の低下が見られた。一方、覚醒中の CALI では効果がなかった。また、IA test の電気刺激の翌日に CALI をしても効果はなかった。この結果は、学習直後に加えて、その後の睡眠中にも海馬で LTP (offline LTP) が誘導されていることを示している。以上から、学習直後の online LTP と同日の睡眠中の offline LTP に 2 段階の LTP が海馬で起きることで、記憶が形成されることが明らかとなった。

次に、記憶が皮質に移行する時間と脳領域を検討した。我々は大脳皮質の前帯状皮質という領域に注目した。この領域は、古い記憶 (マウス実験の場合は数週間) を想起する時に活性化され、さらに局所麻酔薬で不活性化すると想起できなくなることが知られている。一方新しい記憶 (前日) の想起には必要なかった。そこで我々は前帯状皮質 AAV を用いて前帯状皮質の興奮性神経細胞にのみ CFL-SN を発現させ、同様に CALI を行った (図 3)。海馬とは異なり、学習直後また同日の睡眠に光を照射しても記憶成績に影響はなかった。しかし学習の翌日の睡眠中に CALI を行った場合、記憶は消去された。さらに学習と CALI の間の間隔を伸ばしたところ、25 日目には効果がなくなった。これは次の日の睡眠中に前帯状皮質にて LTP が誘導されることが記憶の形成に重要である

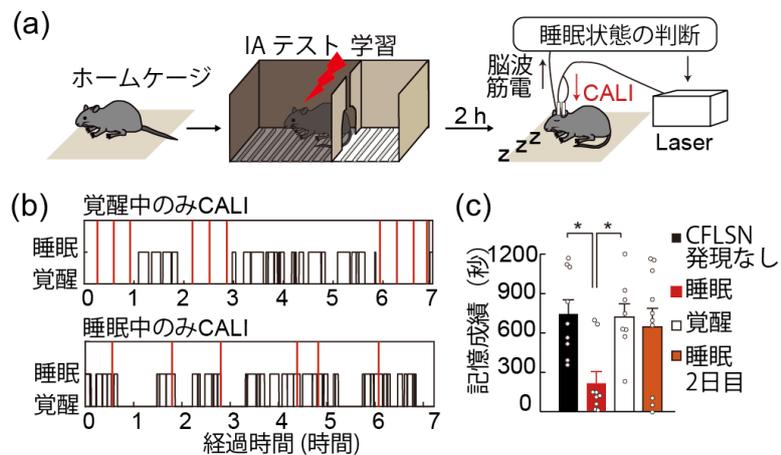


図 2. (a) 学習後の睡眠中での光照射実験。 (b) 実験例。黒線が睡眠状態を、赤色が光を照射したタイムポイントを示している。覚醒中のみ (上) と睡眠中のみ (下) 光照射した例を示す。 (c) 学習同日と翌日 (2 日目) に光照射した後の記憶成績。

。一方新しい記憶 (前日) の想起には必要なかった。そこで我々は前帯状皮質 AAV を用いて前帯状皮質の興奮性神経細胞にのみ CFL-SN を発現させ、同様に CALI を行った (図 3)。海馬とは異なり、学習直後また同日の睡眠に光を照射しても記憶成績に影響はなかった。しかし学習の翌日の睡眠中に CALI を行った場合、記憶は消去された。さらに学習と CALI の間の間隔を伸ばしたところ、25 日目には効果がなくなった。これは次の日の睡眠中に前帯状皮質にて LTP が誘導されることが記憶の形成に重要である

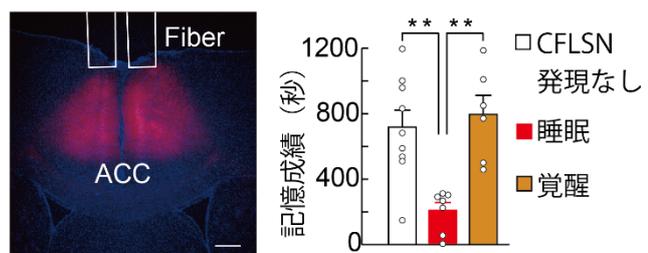


図 3. (左) 前帯状皮質組織画像。前帯状皮質に赤色 (CFL-SN 発現) が、その直上に光 fiber 跡が見える。スケールバー 300 μm。 (右) 学習翌日の睡眠中あるいは覚醒中にのみ CALI をした場合の記憶成績。

とを示している。つまり、前帯状皮質では学習の翌日の睡眠中に、offline LTP によって記憶内容が皮質に移行し初めていることを示している。

以上の結果から、本研究によって、学習後と同日の海馬と翌日の睡眠中の前帯状皮質で offline LTP が誘導されることで記憶の固定化が起きていることを明らかにし、本課題の目的である offline LTP の記憶固定化における寄与を証明することができた。以上の成果はアメリカの国際学術誌の Science で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Goto Akihiro, Bota Ayaka, Miya Ken, Wang Jingbo, Tsukamoto Suzune, Jiang Xinzhi, Hirai Daichi, Murayama Masanori, Matsuda Tomoki, McHugh Thomas J., Nagai Takeharu, Hayashi Yasunori	4. 巻 374
2. 論文標題 Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 857 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abj9195	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------