

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02455

研究課題名(和文) 記憶形成、固定化と想起において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 during memory formation, consolidation and recall

研究代表者

林 康紀 (Hayashi, Yasunori)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90466037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：記憶の固定化に伴い、どのシナプスがいつ可塑的な変化を示すかを調べるため、動物個体でNMDA受容体依存的な可塑性を解除することを試みた。このため、シナプス可塑性にシナプスに集積して細胞骨格を安定化すると考えられるコフィリンを、光にて不活化する技術確立した。この方法を用いることにより、シナプス可塑性が起こっておよそ30分以内のシナプスのみ特異的に可塑性が解除できた。動物個体で海馬シナプス可塑性がいつ生じているかを検討したところ、睡眠中に起こっていることがわかった。睡眠中に海馬の神経細胞が再活性化され、それによってシナプス可塑性が生じ、それが記憶の固定化を引き起こしていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術を用いれば、記憶固定化の過程に重要なLTPを解除することが可能であり、記憶学習の固定化のメカニズムを解明するための画期的なツールとなると期待される。またそればかりではなく、記憶が異常に亢進している疾患、例えば外傷後ストレス症候群(PTSD)や薬物依存症の治療にも有用ではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to study when and where synaptic plasticity occurs during memory consolidation, we established a system that allows erasure of NMDA-receptor mediated synaptic memory. For this purpose, we established a method to optically inactivate cofilin, a protein that accumulates at the synapse after the induction of synaptic plasticity and stabilizes actin cytoskeleton. By using this method, we can optically erase synaptic potentiation within 30 min after induction. When we tested when synaptic plasticity occurs in an intact animal, we found that it occurs while an animal is at asleep. This indicates that reactivation of hippocampal neurons during sleep induces synaptic plasticity, which is required for memory consolidation.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 記憶・学習 コフィリン スパイン 記憶固定化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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。一つの可能性として、動物実験からは動物が静止している時や睡眠中に覚醒時に生じたのと同じような神経活動のパターンが起こる replay と呼ばれる現象がそれを説明するのではないかとされている。例えばげっ歯類を円形走行路で繰り返し走らせると場所細胞が順に発火するが、同じパターンの発火が、動物が走行路で静止している時や睡眠中にも観察される。これは、ヒトでは夢として表出されるのかもしれない。記憶の固定化には 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可塑的变化が生じ、新たなネットワークが形成されるという仮説が考えられている (図1)。

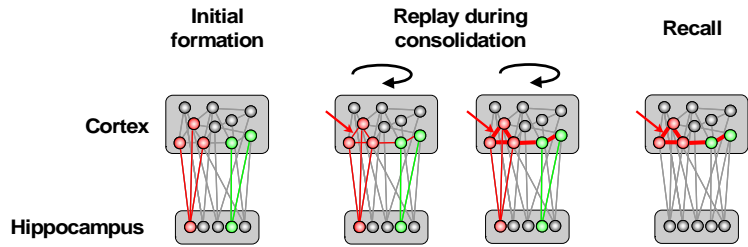


図1 Replayによる記憶固定化

記憶形成時に発火した神経細胞が睡眠中に再度活性化され、それが繰り返される事で投射先のシナプス可塑性を引き起こし、最終的には投射先のみ記憶痕跡が移行する。

この実験的証拠として replay と同時に海馬に電気刺激を与えると記憶が阻害される事が報告されている。また、学習後、NMDA 受容体発現を CA1 特異的に動物個体がホームケージにいる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局所での 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、最初期遺伝子である Zif268 と c-fos を用いて、系統的に記憶後の脳のどの領域で再活性化が起こっているかを検討したところ、海馬では学習直後に Zif268 と c-fos の発現が上昇する一方、前帯状回ではすぐには上昇せず、36日後の記憶想起の時に上昇してくる事が見出された。局所麻酔薬を用いいつ前帯状回が必要な時期を検討したところ、学習直後に前帯状回を不活化した時には記憶想起には影響はないが、学習36日後では記憶想起ができる事が見出された。

この実験的証拠として replay と同時に海馬に電気刺激を与えると記憶が阻害される事が報告されている。また、学習後、NMDA 受容体発現を CA1 特異的に動物個体がホームケージにいる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局所での 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、最初期遺伝子である Zif268 と c-fos を用いて、系統的に記憶後の脳のどの領域で再活性化が起こっているかを検討したところ、海馬では学習直後に Zif268 と c-fos の発現が上昇する一方、前帯状回ではすぐには上昇せず、36日後の記憶想起の時に上昇してくる事が見出された。局所麻酔薬を用いいつ前帯状回が必要な時期を検討したところ、学習直後に前帯状回を不活化した時には記憶想起には影響はないが、学習36日後では記憶想起ができる事が見出された。

2. 研究の目的

これらの実験結果は replay とそれによって引き起こされるシナプスの可塑的变化が記憶の固定化に関与していることは矛盾はしないが、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 と、すべての神経細胞を数時間にわたって持続的に抑制してしまう薬物実験で議論することは非常に無理がある。もっと、時間ならびに空間分解能が高い、特異的な操作が必要である。本研究では新規技術を開発することで、動物個体で海馬並びに分子機構を同じとする大脳皮質での NMDA 型グルタミン酸受容体依存的な可塑性を解除することを試みる。それにより、いつ、どの脳部位でのシナプス可塑性が必要であるか、またどの細胞種でのシナプス可塑性が必要なのかを解明する。

SA1: コフィリンの光不活化で一旦成立した LTP を解除できるか

これまでの我々の NMDA 受容体依存性 LTP のメカニズムに関する研究からアクチン制御タンパク質であるコフィリンが、スパインに長期的に集積しアクチンを安定化することを見出した。まずこのタンパク質を光にて不活化することを試み、それが LTP を解除することができるかを検討する。

SA2: 記憶形成、固定化と想起のどの段階に海馬シナプス可塑性が必要か

SA1 で開発する方法を用い、まず海馬で LTP が記憶の必要に時間範囲を検証する。まず学習直後に LTP を解除した場合、記憶想起が悪くなると予想され、それが SA2 以降の実験の陽性対照実験となる。

SA3: 記憶形成、固定化と想起のどの段階に大脳皮質シナプス可塑性が必要か

大脳皮質で LTP が起こる時間と部位を検討する。海馬と双方向性の結合がある嗅内野や脳梁膨大後部皮質、また c-fos mapping より記憶固定化への関与が示唆されている前帯状回を対象とする。海馬とは異なり、学習直後には LTP は必要ないが、固定化の過程で必要でないかと考えられる。そのため、動物が睡眠中に replay が起こっている時に起こる LTP を解除することで、記憶の固定化が阻害されると期待される。

SA4: 記憶固定化に必要な大脳皮質シナプス可塑性が起こるシナプスは大脳局所でどこに存在するか

どの神経細胞のシナプス可塑性が記憶に関与しているかを検討する。神経細胞種特異的な Cre マウス系統を用い、CALI 構築を発現する。どのシナプスがどの時点で可塑性を起こしているのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) コフィリンの光不活化による LTP の解除

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作成し、生後 2 週目マウス海馬に頭位固定下注入し感染させた。生後 4-5 週でマウスから海馬スライスを作成した。局所場電位を記録し EPSP 反応が安定した段階で、テタヌ刺激により LTP を誘導する。一方、レーザーから光ファイバーで 593 nm 光を照射し、CALI を誘導した。コントロールには SN のみ発現するウイルスを用いた。

(2) 海馬におけるコフィリンの光不活化による記憶解除

SA1 と同様、AAV vector を用いコフィリン-SN をマウス両側海馬に発現させた。コントロールには SN のみ発現するウイルスを用いた。生後 4-5 週に海馬直上にガイドカニューレを埋め込んだ。1 週間後、ガイドカニューレを介し光ファイバーを挿入した。IA test は常法に従い、マウスを明箱におき、暗箱に入って 3 分後に電気ショックを与えた。CALI を誘導するため、明箱に入れる直前、または電気ショック 2 分、5 分後、10 分後、20 分後、1 時間後、2 時間後に 593nm 光を照射した。記憶が成立されたかを調べるため、24 時間後、明箱にマウスを入れ、暗箱に入るまでの時間を計測した。コントロール群の個体では、記憶が成立したため、暗箱へ入る時間が著明に遅延していた。また、特に睡眠との関係を検討するため、脳波ならびに筋電図により、覚醒時、また REM、non-REM 睡眠を自動的に区別するためのプログラムを作成した。

4. 研究成果

本研究では、特に海馬にて興味深い知見が蓄積されたため、大脳皮質ではなく、海馬でのより詳細な検討を行った。そのため、S.A.1 と 2 について詳細に示す。S.A.3 と 4 に記述した、大脳皮質の解析は今後行っていく。

(1) コフィリンの光不活化による LTP の解除

研究期間において、chromophore-assisted light inactivation (CALI) を用い、光にてコフィリンを不活化する

ことで、海馬長期増強(LTP)を起こしたシナプスを特異的に解除する技術を確認した。まず、高効率で CALI が誘導可能な SuperNova (SN) と Cofilin の融合蛋白質(Cofilin-SN)をスライス培養海馬神経細胞の spine に発現させた。sLTP の誘導後 10-40 分に spine と樹状突起に光を照射して Cofilin を不活化すると、スパインが縮小し sLTP が解除された(図 2)。sLTP を誘導していない spine 形態には影響がないため、LTP 特異的に誘導から 40 分以内で解除できると考えられる。電気生理の手法によっても、光で cofilin を不活化することで LTP が解除されることを確認した。

(2) 海馬におけるコフィリンの光不活化による記憶解除

In vivo で LTP の抑制を行うために、

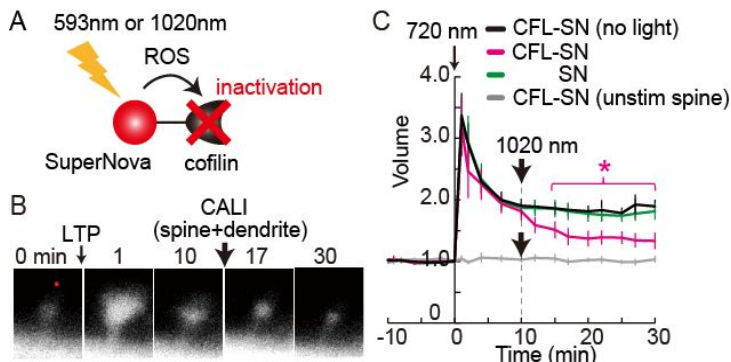


図2. CALIによる構造LTPの解除 A. CALIによるコフィリン不活化。B. 構造LTP誘導後10分でCALIを誘導した例。C. CALIの効果はcofilin-SNを発現する細胞でのみ特異的に観察され、SNのみを発現するシナプスや、sLTPを誘導していないシナプスには効果が無い

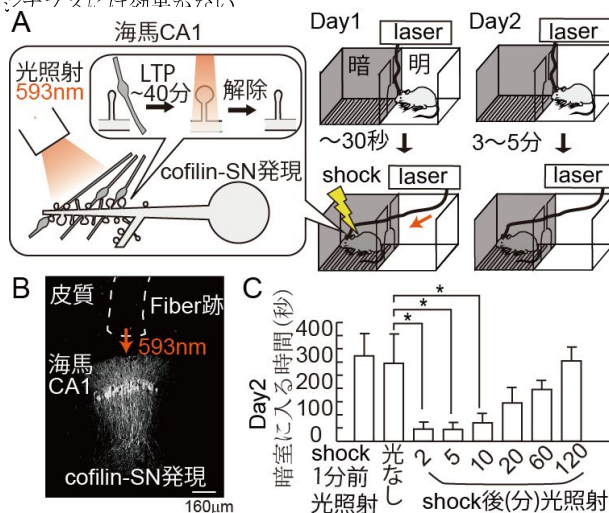


図3 光照射 LTP 解除と記憶の消去

A. IA タスクと LTP 解除の模式図 B. 脳スライス。CA1 神経細胞に Cofilin-SN の発現。皮質にファイバー跡(破線)。C. IA test 2 日目。電気刺激 1 分前と 2-120 分後に光照射。

AAVにより海馬 CA1 神経細胞で Cofilin-SN を発現させ、光ファイバーを通じて海馬に光照射した。記憶は Inhibitory Avoidance (IA) test により検討した (図 3A, B)。記憶が形成されたと想定される電気ショックの 2-20 分後に CALI を行うと Day2 での遅滞時間が解消した (図 3C)。一方で電気ショック 60 分以降、または電気ショック 1 分前に CALI を行っても記憶に影響はなかった。これは spine の sLTP の結果と一致しており、電気ショックによる LTP 誘導 40 分後までに光照射で LTP が解除された結果、記憶が消去されたと考えられる。以上から、光照射により Cofilin を不活化する本手法は、LTP を特異的に解除可能な新たな光操作技術であり、vivo で LTP を解除することによって記憶を消去する手法を確立した。次に睡眠中の可塑性を同様に抑制したところ、記憶が減弱した。このことから、睡眠中に海馬で起こるシナプス可塑性が記憶の形成に重要であることがわかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Saneyoshi T, Matsuno H, Suzuki A, Murakoshi H, Hedrick NG, Agnello E, O'Connell RO, Stratton M, Yasuda R, Hayashi Y (In press) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP. **Neuron**. (査読あり)
- (2) Kim K, Suzuki A, Kojima H, Kawamura M, Miya K, Abe M, Yamada I, Furuse T, Wakana S, Sakimura K, Hayashi Y (2019) Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKIIbeta is required for fear learning. **Neurobiol Learn Mem** 157:86-95. (査読あり)
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/c/c1/Kim_Neurobiol_Learn_Mem.pdf
- (3) Kashino Y, Obara Y, Okamoto Y, Saneyoshi T, Hayashi Y, Ishii K (2018) ERK5 Phosphorylates Kv4.2 and Inhibits Inactivation of the A-Type Current in PC12 Cells. **Int J Mol Sci** 19. (査読あり)
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/3/3c/Kashino_Int_J_Mol_Sci.pdf
- (4) Sato M, Kawano M, Mizuta K, Islam T, Lee MG, Hayashi Y (2017) Hippocampus-Dependent Goal Localization by Head-Fixed Mice in Virtual Reality. **eNeuro** 4.
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/02/Sato_eNeuro.pdf
- (5) Hallin EI, Eriksen MS, Baryshnikov S, Nikolaienko O, Grodem S, Hosokawa T, Hayashi Y, Bramham CR, Kursula P (2018) Structure of monomeric full-length ARC sheds light on molecular flexibility, protein interactions, and functional modalities. **J Neurochem** 147:323-343. (査読あり)
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/05/Hallin_J_Neurochem.pdf
- (6) Bosch M, Castro J, Sur M, Hayashi Y (2017) Photomarking Relocalization Technique for Correlated Two-Photon and Electron Microcopy Imaging of Single Stimulated Synapses. **Methods Mol Biol** 1538:185-214. (査読あり)
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/9/91/Bosch_Methods_Mol_Biol.pdf
- (7) Sato M, Kawano M, Yanagawa Y, Hayashi Y (2016) In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice. **Neurobiol Learn Mem** 135:146-151. (査読あり)
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/06/Sato_Neurobiol_Learn_Mem.pdf
- (8) Kim K, Saneyoshi T, Hosokawa T, Okamoto K, Hayashi Y (2016) Interplay of enzymatic and structural functions of CaMKII in long-term potentiation. **J Neurochem** 139:959-972. (査読あり)
http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/a/ae/Kim_J_Neurochem.pdf

[学会発表] (計約 30 件 最新 10 件のみ示す)

1. Hayashi Y. (2019) Why is CaMKII so abundant at synapse? OIST (Okinawa, Japan)
2. Hayashi Y. (2019) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying LTP (Niigata, Japan)
3. Hayashi Y. (2018) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying LTP

- (University of Washington, Seattle, USA)
4. Hayashi Y. (2018) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying LTP (Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Macau)
 5. Hayashi Y. (2018) A positive feedback mechanism supporting persistent signaling during hippocampal LTP (Max Planck Institute for Biochemistry (München, Germany)
 6. Hayashi Y. (2018) A positive feedback mechanism supporting persistent signaling during hippocampal LTP (Max Planck Institute for Biochemistry (University of Bordeaux, France)
 7. Hayashi Y. (2017) A positive feedback mechanism supporting hippocampal LTP. Hong Kong University of Science and Technology (Hong Kong)
 8. Hayashi Y. (2017) A positive feedback mechanism supporting hippocampal LTP. Molecular and Cellular Cognition Society (Singapore)
 9. Hayashi Y. (2017) A positive feedback mechanism supporting hippocampal LTP. Korea Brain Challenge Meeting (Seoul, South Korea)
 10. Hayashi Y. (2017) Roles of cytoskeleton in hippocampal synaptic plasticity. 3rd Neuroscience Meeting in Pakistan (Karachi, Pakistan – online presentation)

{ その他 }

<http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。