総説

記憶固定の in vitro 再現

長期記憶の細胞基盤解明をめざして： 繰り返し依存的なシナプス新生

富永(吉野) 恵子, 小倉 明彦

要約：海馬で獲得された記憶情報は、時間とともに海馬から皮質に転送され、安定な長期記憶となるとされる。記憶の獲得は、海馬を含む回路内のシナプスで、直ちに伝達効率が変化することで起こると考えられている。これに対応する細胞レベルの現象が、長期増強現象 (LTP) である。しかし、LTP と長期記憶をつなぐ固定の過程については未解明の点が多く、細胞レベルの研究と行動レベルの研究にギャップがある。私たちはそのギャップを埋めるため、独自の実験系を立ち上げた。げっ歯類新生仔脳から海馬切片を作り培養下で成熟させると、生体脳と等価な神経回路をガラス器内に再現できる。この系に LTP を繰り返し誘発すると、伝達強度がゆっくりと増大し、増強状態が数週間以上持続する。RISE と名づけたこの現象は、既存シナプスでの伝達効率調節現象である LTP とは異なり、シナプス自体の増加を伴う構造可塑性現象であった。その様子を追跡すると、初期には樹上突起棘の発出と退縮の両者が高まり、その後退縮が先に収まって、結果的に増加がおこるという経過をとった。また、RISE の成立には、BDNF や幼若型 AMPA 受容体 (Ca^{2+} 透過型受容体) が、原因として関与している。現段階では RISE が行動上記憶の固定過程のガラス器内再現だと断定はできないが、少なくとも海馬を含む皮質ニューロンに、こうした構造可塑性を起こす能力が備わっていることが示された。即時的变化とは別の、ゆっくり発達する構造可塑性現象 RISE は、細胞レベルと行動レベルのギャップを埋める実験系となる可能性がある。

1. はじめに

側頭葉の内側にある海馬が、記憶に重要な部位であるといわれて久しい。両内側側頭葉切除手術を受けた

故 H.M. (Henry Gustav Molaison) 氏の症状についての臨床心理学的研究や、動物行動を観察するマクロな研究で、海馬の損傷で二つの障害が起こることがわかっている。一つは損傷後に新しい記憶、中でも陳述記憶が形成できなくなること (順行性健忘)、もう一つは、損傷前に形成された記憶のうち新しいものが失われることである (時間制限的逆行性健忘) (1, 2)。これらの事実から、海馬は記憶の獲得過程 (acquisition) と、獲得された情報を長期化する過程 (固定過程: consolidation) の両方に重要な役割を持つと考えられている。

記憶の機構を細胞・分子レベルで解明しようとするミクロな研究は、海馬長期増強現象 (LTP) の発見以降、これをモデル実験系として急速に進んだ (3, 4)。LTP は高頻度活動によってシナプス伝達効率が変化する現象で、即時的に成立する性質から記憶の獲得過程に対応する細胞現象だと考えられている。実際、LTP の成立に関わる分子に修飾を加えると、行動上の記憶獲得にも大きな影響が表われる。ミクロな研究の見解とマクロな研究の見解が、幸福に一致しているといえる。

しかし、記憶の固定過程については、両者の見解が一致しているとはいえない。LTP は、高頻度活動の 30 分後くらいから、高伝達効率の維持が新規タンパク質合成に依存する相 (後期 LTP) に移行する。このとき、シナプス後構造である樹状突起棘が、広がったり太くなったりする形態変化が伴う。多くのミクロ研究者は、この後期 LTP を固定過程に対応する細胞現象だと考えている。シナプスレベルの記憶固定という言い方もされる。だが、多くのマクロ研究者は、記憶の固定は、もっとゆっくりとした時間経過で海馬に依存す

キーワード：器官保存的切片培養, 海馬, シナプス新生, 構造可塑性, 記憶固定
大阪大学 生命機能研究科 神経可塑性生理学研究室 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3)

E-mail: tomyk@fbs.osaka-u.ac.jp 原稿受領日: 2013 年 5 月 31 日, 依頼原稿

Title: Toward unraveling cellular mechanisms of long-term memory: structural plasticity reproduced in vitro

Author: Keiko Tominaga-Yoshino, Akihiko Ogura

る段階から海馬に依存しない段階へ移行する過程であり、シナプス自体の新生や廃止を伴う回路の調節だと考えている（システムレベルの記憶固定）(5, 6)。

両者とも正しいならば、「シナプスレベルの記憶固定」と「システムレベルの記憶固定」とをつなぐ未知の過程があることになる。この稿では、この過程を捉えて解析する試みについて紹介したい。

2. LTP は記憶の固定過程を説明できるか

記憶の獲得は瞬時に起こる。タンパク質を新規合成して輸送し、位置につけるような時間的余裕はない。LTPはこの性質を満たす。高頻度入力によってNMDA型グルタミン酸受容体が活性化して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、 Ca^{2+} -カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼの活性化を通じてAMPA型グルタミン酸受容体が表在化し、伝達効率が増大する。この過程は、既存のシナプスで既存の分子装置の翻訳後修飾だけで起こる即時的な変化である。

LTPは変化率も大きく、再現性にすぐれた現象で、しかも動物（ラット、マウス、モルモットなど）脳から摘出した切片でも起こせる(3, 4)。こうした合理性と利便性から、これまで（現在も）「記憶の細胞生物学的研究」といえば、「LTPの研究」とほぼ同義だった。しかし、摘出切片が生体内での活性状態を保つのは、6時間程度が限度である。LTPはその間維持されるが、それ以降はわからない。

だが、LTPには上記の初期相のあとに、環状AMP依存性タンパク質キナーゼの活性化を通じて遺伝子の発現・新規タンパク質の合成を伴う後期相がある(7, 8)。また、LTPでは、棘頭部の拡大や棘頸部の短縮など、伝達の強化と結びつく形態変化も観測されている(9, 10)。したがって、実測は数時間が限度であるにしても、おそらくその後も強化状態は長期に維持されるはずだという期待が持てるため、記憶の獲得から固定まで、LTPで一本道で進むとする考えがミクロ的には広く支持されている。

一方、マクロ的には、海馬依存的な記憶固定はげっ歯類では数週間、ヒトでは数年かかるとされている(11)。また、記憶獲得時にタンパク質合成を阻害して一時的な記憶障害を起こしても、阻害が解けると記憶が回復するという報告もある(12)。したがって、記憶の獲得→固定が、LTPの初期相から後期相への一本道で説明しきれないかは、疑問の余地が残っている。

記憶獲得後には、睡眠時や覚醒時に、海馬でそのエピソードが繰り返しリプレイされているという報告がある(11, 13)。睡眠を妨害すると、記憶固定ができな

いという事実も知られている(13)。したがって、海馬を含む神経回路で、同じ情報経路が繰り返し活動することが記憶の固定、あるいは皮質への情報転送に必要な、という考えも行われている(11)。

ミクロとマクロの微妙なギャップは、これまであまり注目されてこなかった。ミクロ研究者は、摘出切片では数時間しか観測できないにしても、動物脳でLTPを起こせば高伝達効率状態が数日～数週間維持されることはわかっているから、やはりLTPで十分だとする。しかし、マクロ研究者は、それは動物がLTP体験を自発的に繰り返して、LTPとは別の過程を進めているかもしれない、と考える。

3. RISE という現象

こうした状況で、私たちは実験者が誘発した1回のLTPがどれほど持続するかを確認する目的で、器官保存的切片培養（organotypic slice culture）という方法を用いることにした(14, 15)。ニューロンが軸索・樹状突起を伸展させる以前で、薄切しても損傷の少ない新生仔段階の脳から切片をつくって培養すると、シャーレの中で回路が構築され、約10～14日で安定して、LTPの成立を含めて成体脳から作った切片が示す性質をほとんどすべて示すようになる。LTP誘発後、培養を維持すれば、その後の変化を追跡できるはずである。この系には、生理学、薬理学、形態学、イメージング、外来遺伝子導入、生化学分析なども適用できる。

安定培養下の海馬切片のCA3→CA1経路にLTPを誘発すると、もちろん立派に成立して数時間維持されるが、意外にも24時間以内に消失してしまった。ところが、LTPを3回繰り返して誘発すると、3回目のLTPも1回目・2回目と同様に消失するが、その後何もしないのに再び伝達強度が増大し始め、約1週間で最大に達したあと、増強状態が2週間以上持続した(図1)(16, 17)。この遅い増強は、LTPのような個々の既存シナプスでの伝達強化とは違い、シナプス数（密度）の増加によるもので、いわゆる構造可塑性現象だった(18)。私たちはこれをRISE（Repetitive LTP-Induced Synaptic Enhancement）とよぶ。RISEはLTPとは別の現象であるが、LTPと独立な現象というわけではない。今のところ、LTPをバイパスしてRISEだけ起こすことはできない。私たちは、LTP自体は記憶獲得の細胞基盤であり、このRISEこそが記憶固定（または獲得と固定をつなぐ過程）の細胞基盤ではないかと期待している。

RISEが発達しつつある間、電子顕微鏡でシナプスのサイズを計測すると、平均値はいったん小さくなり、

図1 繰り返しLTP誘発後の長期可塑性 (RISE)

(A) LTPを薬理的(グルタミン酸投与)に3回(24時間間隔)繰り返すと、3回目のLTPがいったん減衰した後に、第二の伝達増強が起こり、その増強状態が3週間以上持続する。(B左) RISEは構造可塑性である。繰り返しLTP誘発2週間後のRISE誘発群(3xGlu)と同時期の対照群(3xCon)の電子顕微鏡像。白矢印はプレ・ポストとも揃ったシナプス。(B右) RISE誘発群のシナプス数は統計的に有意に増加していた。(文献17より改変引用、有意差は省略)

その後元に戻る。また、「シナプスが拡大し、その後分裂する過渡的状态」と見る説が有力な有孔シナプス(perforated synapse)の数は、RISE誘導刺激後に確かに増えるが、シナプス増加が飽和した後もしばらく減らない(18)。これらの事実は、RISEに伴うシナプス増加が、既存シナプスの拡大→分裂によるのではなく、樹状突起幹からの新規発芽と軸索末端の新規枝分かれによる新生であることを示唆する。

シナプスの構造変化としては、脳発達期にゆっくり進行する構造可塑性が、以前からよく研究されている。たとえば、外側膝状体から一次視覚野への軸索投射が左右均等に並ぶ眼優位性カラムでは、臨界期前に単眼閉鎖を行うと、開眼側投射が閉眼側から入力を受けるはずだった領域を乗っ取ってしまう劇的な構造可塑性を示す(19)。RISEも発達期視覚野で観察される構造可塑性のように、ゆっくりとしか進行しない。一方、海馬LTP誘発直後から起こるシナプス構造変化はすばやく起きる(9, 10, 20)。この点はRISEを成熟脳での記憶固定過程になぞらえる上での不利点ではある。しかし、成熟脳の構造可塑性が単一の過程だと考える必要はない。たとえば後期LTPでみられるような瞬時のシナプス変形と、RISEでみられるようなゆっくりとしたシナプス新生の2段階であってもよく、しかも後者は成熟脳と発達期脳の構造可塑性で機構的に共通な部分があるという魅力的な考えにつながる。

4. RISEの細胞機構

LTPをRISEに変換する繰り返し回数は、3回が必要十分だった。2回では、小規模なRISEが起こるのではなく(たとえそれが強いLTPであっても)何も起きな

い。4回以上やっても、規模が増すわけではない。このことは、繰り返しが細胞に同じ現象を積み上げているのではなく、異なる現象を引き起こしていることを示唆する。また、RISEを起こす繰り返しには、適切な間隔がある。1時間おきの3回では効果がなく、36時間空けたら効果がない。3時間以上24時間以内が条件で、これは、何らかのタンパク質が合成されて有効濃度に達し、分解されて有効濃度を下回るまでに次の信号が入る「時間枠」の存在を反映していると見られる。

RISE成立にはタンパク質の新規合成が必要だが、そのタンパク質とは何だろう。とくに、繰り返し2回は無効で3回で有効なら、2回目と3回目で発現に差のある遺伝子をDNAマイクロアレイで比較すれば見つかるだろう。という期待で、青山学院大田代研との共同研究で行ったところ、1000種以上の膨大な数の遺伝子が上下していた(21)。考えてみれば、ゆっくりと構造が変化する現象であるからには、原因側と結果側を合わせて、膨大な種類のタンパク質が関与していて当然ではある。これらを網羅的に検討することは不可能なので、原因側と考えられるいくつかのタンパク質に注目することにした。

そのうちの一つは、脳由来神経栄養因子(BDNF)である。BDNFを外因的に投与すると軸索の伸展や樹状突起の発達が促されるとする論文は、星の数ほどある。しかしRISE刺激で内因的なBDNFの合成・分泌が起きている保証はない。そこで定量的RT-PCRやイムノプロット法で調べると、LTPの回を増すごとに合成が増すことが確認された(21)。また、RISE刺激時にBDNFの捕捉剤を投与すると、RISE成立が阻止さ

れた。さらに、BDNFの高親和性受容体であるTrkBを機能阻害性抗体でマスクすると、RISE成立は阻止された。

次に細胞骨格の制御因子が注目される。樹状突起棘を支える骨格タンパク質はアクチンだから、アクチンの重合/脱重合を重合側に傾ける因子の関与が予想される。私たちが注目したのはアクチン付随タンパク質cofilinの動態である。Cofilinは、脱リン酸化状態でアクチンの脱重合を促し、リン酸化状態でその機能が阻害されアクチンを重合側に傾ける。Cofilinの合成量は2回目のLTP後に著増するが、3回目後はさほどでもない。Cofilinの脱リン酸化を促すslingshot-1も2回目後に増して3回目後に減る。また、cofilinのリン酸化を促すLIM-kinase-1などは2回目後にも増すが、3回目後にはさらに増す。つまり、cofilinの総量とリン酸化率を合わせて考えると、2回目後には脱リン酸化型優位（つまり脱重合促進）、3回目後にはリン酸化型優位（つまり重合促進）ということになる（図2）。この経過は、後述の棘の動態と見比べたとき、きわめて示唆的である。

もう一つはAMPA型グルタミン酸受容体（AMPA）である。AMPAは四量体で、サブユニット構成がGluR1ホモ四量体のとき Ca^{2+} 透過性を持ち、四量体中GluR2を含むとき Ca^{2+} 非透過性になる。前者は幼若型で、後者は成熟型である（22-24）。さて3回目の刺激後、GluR1の合成が選択的に増す。これは、 Ca^{2+} 透過性の幼若型AMPAが形成されることを意味する。

シナプス新生が起こる以上、AMPAの合成が増えるのは結果として当然という見方もできるが、なぜ Ca^{2+} 透過型でなくてはならないのだろう。結果側というより原因側なのではないかと予想して、 Ca^{2+} 透過型AMPAの特異的阻害薬であるジョログモ毒素をRISE発達期に投与したところ、予想通りRISE成立は阻止された。つまり、幼若型AMPAの発現（と、おそらくそれを通る Ca^{2+} ）は、棘新生の原因の一部になっているらしいのである。

5. RISEと樹上突起棘の「ゆらぎ」

シナプスが増えていく現場を目で見たい。そこで、ゲノムに蛍光タンパク質遺伝子を組み込み、それが海馬ニューロンの一部で発現するマウス（Thy1-YFP Tg-mouse H-line）を用いて観察したところ、興味深い事実が見つかった。3回目のLTP誘発後、見かけ上何も起きない「潜伏期」だと思っていた時期に、実は形態が激変していたのである（25）。樹状突起棘は通常時から一定の割合で発出・退縮を繰り返す動的平衡の状態にあるのだが、RISE刺激直後から発出と退縮が激増するのである。しかし、両者が均衡して増大するため、総数としては変化は表れない。やがて退縮の方が先に刺激前レベルに戻る。その結果、増加が起こる。いいかえると、まずゆらぎが増し、次いでバイアスが変化する。この経過は、前述のcofilinの動態を思い出させる。まずcofilinの総量が増し、次いでリン酸化が増す状況は、ゆらぎの増加とその後のバイアス変化に

図2 構造可塑性 RISE の細胞内機構

5つのアクチン動態制御因子についての定量的PCRの結果（模式図）。（左）2回LTP誘発後には全ての遺伝子の発現が上昇していた（楕円の線が太いほど発現量が高い）。この時はアクチンの重合、脱重合が盛んに回転している（全体としては少しアクチンの脱重合に傾いている）、回路の再編成（ゆらぎ）が盛んに起こっていると考えられる。（右）3回LTP誘発後には、cofilin、ssh1の発現は元に戻るが、pak4、yw haz、limk1の発現はさらに上昇しており、アクチンの重合に大きく傾いていると考えられる。（文献21より改変引用）

よく符合する。

経時観察で得られたもう一つの重要な発見は、このゆらぎ増大／バイアス変化が、既存の棘密度に相関していたことである。既存棘密度が低い樹状突起のセグメントでは、ゆらぎ増大／バイアス変化／棘増加が起こるが、高いセグメントではゆらぎ増加がそもそも小さく、棘増加も起きないのである。既存棘密度の高いセグメントとは、過去に新生を行ったセグメントということだから、棘新生には履歴が反映することになる。また、棘密度には上限があることにもなる。

最近、シナプスは樹状突起上でまとまって増えるという知見が示され、集団的シナプス新生 (clustered synaptogenesis) とよばれて注目されている (26, 27)。その機構として「同質の入力線維は樹状突起上の近接した部位にシナプスをつくっており、樹状突起はセグメントごとに情報処理を行っていることの反映だ」とする議論がなされている。それは脳機能を考える上で興味深い議論ではあるが、もしかするとごく単純に、シナプスを増やせるセグメントと増やせないセグメントがあるということに過ぎないかもしれない。

6. 展望

このように RISE は、記憶の固定過程の少なくとも一部、海馬で記憶が獲得されたあと、皮質に移すまでの過程をガラス器内に再現している可能性がある。行動研究では、記憶が海馬依存の状態から非依存の状態に変化していく過程で、意識的であれ無意識的であれ (あるいは睡眠中にでも) 海馬でその情報が繰り返し読まれているという報告がある (11, 13)。RISE をモデル系として解析することにより、そうした繰り返しによるマクロ的な (= 行動レベルの) 記憶の固定過程をミクロ的に (= 細胞・分子レベルで) 機構解明できるかもしれない。ここまでの研究は海馬のみの系で行ってきたが、記憶が海馬非依存的になるまでの過程を追うには、投射先の皮質をもった系が必要だろう。現在、培養を皮質まで拡大してその過程の再現を試みている。

海馬では、既存シナプスでのもう一つの即時的な可塑性現象として、中頻度活動後に伝達効率が低下する長期抑圧現象 (LTD) も知られている。培養切片で LTD を再現することもできるが、この LTD も 1 回では 24 時間以内に消失してしまう。ところが、LTD をやはり 3 回繰り返して誘発すると、シナプス密度の低下を伴う EPSP の減弱が起こる (28-30)。私たちはこの現象を LOSS (LTD-repetition-Operated Synaptic Suppression) とよんでいる。LOSS は、RISE のちょう

図3 RISE と LOSS の鏡像性 (概念図)

繰り返した LTP/LTD の減衰後に、別個の強化／弱化が起動し、長期間持続する

ど裏返しに見える (図 3)。

この LOSS は、行動レベルのどんな過程に対応するのだろうか。「RISE が記憶なら LOSS は忘却」という考えは、素朴すぎるだろう。LTD も LOSS も、疲労や減衰ではなく、ニューロンの能動的な応答なのだから。前述のように、もし RISE で増やせるシナプス密度に上限があるなら、密度を下げる機構も必要だろう。それが LOSS かもしれない。あるいは、RISE と LOSS の成立条件や時間経過が鏡像的な点に着目して、脳内では両者がひと組で起き、情報のハイライティング (際立たせ) を行っているとする仮説も立てられる。あるいは、シナプス均衡 (スケーリング: 一つのニューロンに入る入力総和が一定に保たれる現象) に関与しているかもしれない。

RISE に、発達期可塑性に関わる BDNF や幼若型 AMPAR の発現が関与している事実から、記憶の固定は発達期脳のシナプス形成機構の「再利用」ではないかという考えが浮かぶ。神経発生学では、発達期可塑性と成熟後可塑性は区別して考えるのがふつうだが、実は機構的には共通かもしれない。生命維持に必要な不可欠で可塑性をもたない (むしろない方がよい) 脳幹などのシナプスは、胎児期に完成して以降可塑性を捨てるのに対し、海馬を含めた皮質は、生命維持には不可欠でない代り、生後にも完成せず、可塑性を捨てない脳領域なのかもしれない。既存棘密度の低い樹状突起セグメントに限って棘新生が起こるのを観察していると、赤ん坊脳といういわばブランク HD に情報を書き込んでいく過程を見ているような印象にとらわれる。

謝辞: この研究は、研究室に在籍してきた多くのメンバーとともになされたものである。また、DNA アレイの解析は、青山学院大学田代朋子先生、河合克宏博士 (現・理研) との共同実験である。BDNF 関連の実験では産業技術総合研究所小島正己先生にご指導をいただいた。先生方に謝意を表したい。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Scoville WB, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1957;20:11-21.
- 2) Milner B, et al. Neuron. 1998;2:445-468.
- 3) Bliss TVP, et al. Nature. 1993;361:31-39.
- 4) Malenka RC, et al. Science. 1999;285:1870-1874.
- 5) Dudai Y. Annu Rev Psychol. 2004;55:51-86.
- 6) Medina JH, et al. Behav Brain Rev. 2008;192:61-69.
- 7) Frey U, et al. Trends Neurosci. 1998;21:181-188.
- 8) Frey U, et al. Science. 1993;260:1661-1664.
- 9) Harvey CD, et al. Nature. 2007;450:1195-1200.
- 10) Matsuzaki M, et al. Nature. 2004;429:761-766.
- 11) Frankland PW, et al. Nat Rev Neurosci. 2005;6:119-130.
- 12) Squire LR, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1972;69:1416-1420.
- 13) Stickgold R, et al. Trends Neurosci. 2005;28:408-415.
- 14) Gahwiler BH, et al. Trends Neurosci. 1997;20:471-477.
- 15) Tominaga-Yoshino K, et al. Circadian Rhythms: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). Humana Press Inc; 2007. p. 481-492.
- 16) Tominaga-Yoshino K, et al. Neurosci Res. 2002;44:357-367.
- 17) Tominaga-Yoshino K, et al. Hippocampus. 2008;18:281-293.
- 18) Urakubo T, et al. Neurosci Lett. 2006;407:1-5.
- 19) Hubel DH, et al. J Physiol. 1970;206:419-436.
- 20) Yuste R, et al. Annu Rev Neurosci. 2001;24:1071-1089.
- 21) Kawaai K, et al. J Neurosci Res. 2010;88:2911-2922.
- 22) Ogura A, et al. Neurosci Res. 1992;12:606-616.
- 23) Pickard L, et al. J Neurosci. 2000;20:7922-7931.
- 24) Kumar SS, et al. J Neurosci. 2002;22:3005-3015.
- 25) Oe Y, et al. Sci Rep. 2013 (accepted).
- 26) Govindarajan A, et al. Nat Rev Neurosci. 2006;7:575-583.
- 27) Fu M, et al. Nature. 2012;483:92-95.
- 28) Shinoda Y, et al. Brain Res. 2005;1042:99-107.
- 29) Kamikubo Y, et al. Eur J Neurosci. 2006;24:1606-1616.
- 30) Egashira Y, et al. J Neurosci Res. 2010;88:3233-3446.