

187. 逆シナプスタギングの分子基盤に基づく長期記憶操作

尾藤 晴彦

東京大学 大学院医学系研究科 神経生化学分野

Key words : CREB, Arc, CaMK, 長期可塑性, 長期記憶

緒言

記憶は、神経細胞のシナプスでの情報伝達効率の変化により保存されると考えられているが、その変化は通常、数分から数時間で消失する（短期記憶）。しかしながら、強烈な経験や何度も同じ経験をする、情報伝達効率の変化は数日以上長期にわたり維持され、長期記憶が形成される。これは神経細胞が、外部からの刺激に応じて神経細胞間の特殊接合装置であるシナプスの性質を長期的に変化させるためであり、こうした仕組みが脳の柔軟性や記憶の形成・保持に必要であると考えられてきた。これまでの研究により、シナプスの長期変化には、興奮したシナプスから神経細胞の細胞体へシグナルが到達し、転写活性化を引き起こし、新規遺伝子の発現誘導を引き起こす必要性が明らかとなっている。しかし、そのシグナルの実体やシナプス活動が制御する転写複合体の実体や、誘導された遺伝子産物が細胞のどの部位で、どのような方法で神経細胞の性質を調節し変化させているのかについては、これまで未解明であった。

神経特異的前初期遺伝子 *Arc* は、海馬や大脳新皮質において生理的認知活動により速やかに発現誘導される性質をもち、現在知られている中で最も感度の高い神経活動の遺伝子マーカーの一つである。我々はこれまで、この *Arc* の活動依存的発現の分子機構を解析し、シナプスから核へ伝わるシグナル機構を明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。また、ラット・マウス長期記憶の課題として有名な Morris 水迷路を開発したエジンバラ大学 Morris 研究室との共同で、*Arc* 発現が定型的記憶形成における大脳皮質の有効な標識となることを示した⁵⁾。これら研究に並行し、我々は *Arc* transcript がシナプス活動によって誘導された後、*Arc* タンパク質が細胞体からシナプスへ至る動態を世界で初めて解析した。その結果、*Arc* タンパク質は従来考えられていたように活動性の高いシナプスへではなく、逆に活動性の低いシナプスへ運ばれる逆シナプスタギングのルールを明らかにした。*Arc* のシナプス集積は別のシナプスタンパク質である *CaMKIIβ* によって担われ、*Arc* の不活性シナプスへの集積度は、主要な興奮性伝達に関わる AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス発現量と逆相関した。つまり、増強されたシナプスは *Arc* タンパク質の影響を受けずに強化されたまま残り、一方、活動性の低いシナプスでは意図しないシナプス増強などを防ぐことができる。このように、逆シナプスタギング機構により、シナプス間でメリハリをつけて、特定の記憶だけが長期化可能となることを証明した⁶⁾。

本研究では、神経ネットワークが保持する可塑性メカニズムである逆シナプスタギング機構のメカニズムの一端を明らかにし、これを改変し、長期記憶を修飾する実験システムの構築を実現した。これにより、長期シナプス可塑性を人為的に操作・誘導し、長期記憶をマウス個体で操作・破綻・向上させる実験パラダイムを確立した。

方法および結果

逆シナプスタギング（図 1）を可能にしている 2 つのメカニズム、すなわち長期記憶形成における「CREB 依存的転写制御」⁷⁾ と、活動の弱いシナプスを規定する細胞生物学的基盤についてそれぞれ探索する方法論を樹立した。これに引き続き、逆シナプスタギングの操作を実現し、脳高次機能への影響を精査した。

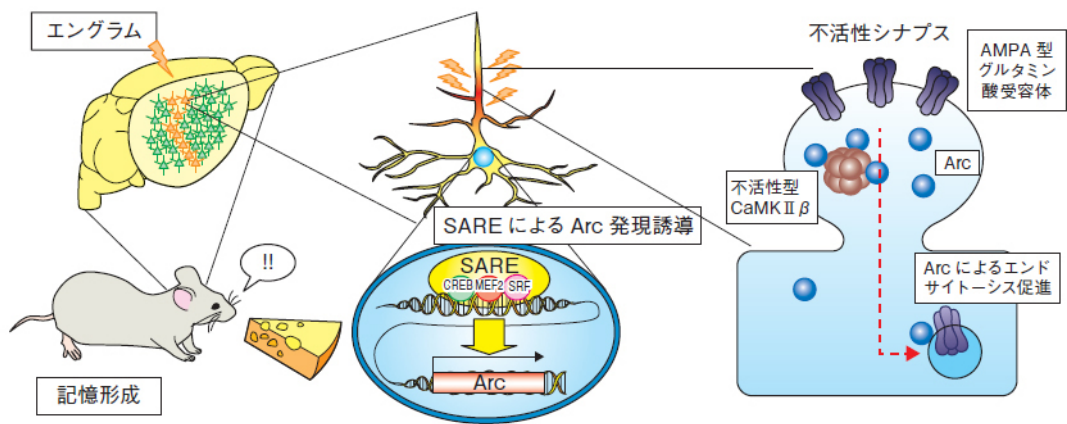


図1. 逆シナプスタギングによる Arc 捕捉の意義

記憶エングラムを構成する活性化細胞集団において、Arc の SARE エンハンサーに位置する CREB-MEF2-SRF 結合部位を介して、Arc の活動依存的誘導を引き起こす。誘導された Arc タンパクは、不活性シナプスの不活性型 CaMKIIb へ結合し、AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを促進する。

具体的には、まず CREB の転写補助因子である CRTCI に着目し、このタンパク質のニューロンにおける制御機構および転写の増強の作用機序について調べた⁸⁾。

すなわち、マウスの個体の脳において CRTCI-CREB シグナル伝達経路が脳領域に特異的にはたらくことを見出した。海馬および扁桃体が必要とされる文脈依存的な恐怖条件づけという長期記憶の学習課題において、扁桃体においては学習に応じた CRTCI の活性化がみられたが、海馬においてはみられなかった。これと一致して、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた脳領域に特異的なシグナル伝達操作手法を開発⁹⁾し、RNA 干渉法により CRTCI の発現を抑制したところ、扁桃体においては CRTCI の寄与が大きかったのに対し、海馬においては小さいことがわかった (図 2)。このような脳領域に特異的な転写補助因子の動態により、脳の全域に普遍的に存在する CREB という転写因子が脳領域に特異的に遺伝子発現を制御することを可能にしていることが示唆された⁸⁾。

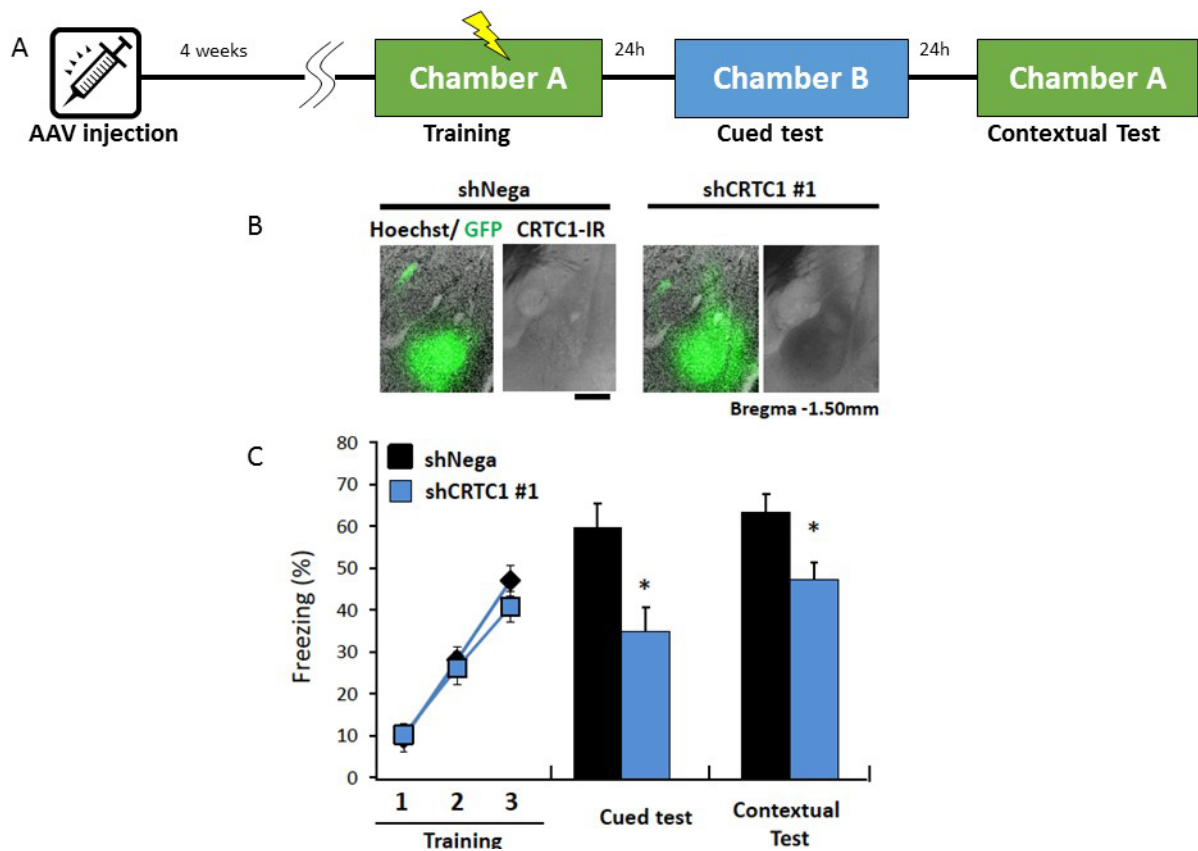


図2. CRTCI は扁桃体恐怖記憶形成に不可欠な役割を果たす

(A) 実験のスキーム。

(B) AAV ウィルスベクターを用いた RNA 干渉法により、CRTCI 発現が有意に低下する。

(C) 扁桃体における CRTCI 発現低下に伴い、恐怖条件付け記憶が有意に低下する。Cued test、ANOVA $p = 0.010$ (shNega versus sh#1) ; Contextual test、ANOVA $p = 0.037$ (shNega versus sh#1)。

本図は文献 8 より該当するデータを抽出し、図として再作成した。

CREB 活性化の下流で、*Arc* 遺伝子発現が誘導される。*Arc* は不活性型 CaMKII β と相互作用することにより不活性シナプスに選択的に集積しグルタミン酸受容体の制御を行うことが示されている^{6,7)}。長期記憶形成時に活動依存的に標識された神経細胞では、記憶に関わる強化されたシナプスが存在するにも関わらず、一方では、強化されないシナプスの長期的な抑制が起こることが示されており、この結果も我々の提唱する逆シナプスタギングと合致する。これらの結果は、長期的なシナプス可塑性においては、シナプスタギングと逆シナプスタギングの両機構が共存することによって、強化されるべきシナプスと強化されないシナプスの対比を安定かつ厳密に保っていることが示唆される。このようなメカニズムを正確に理解するには、*in vivo* の樹状突起スパインにおけるシナプス伝達、シナプス可塑性の強弱を鋭敏に示すインディケーターの開発が重要であると考えられた。

そこで、 Ca^{2+} との結合領域に従来使われてきた骨格筋 MLCK 由来の M13 ペプチド配列でなく、神経細胞 CaMKK 由来の Ca^{2+} /CaM 結合領域の配列を変異させることにより、 Ca^{2+} に対する結合能を上げ、高頻度の神経発火の計測が可能な、超高感度かつ超高速の赤色シナプス伝達センサー “R-CaMP2” を開発し、*in vivo* 樹状突起スパインのシナプス活動を計測することに成功した¹⁰⁾ (図 3)。

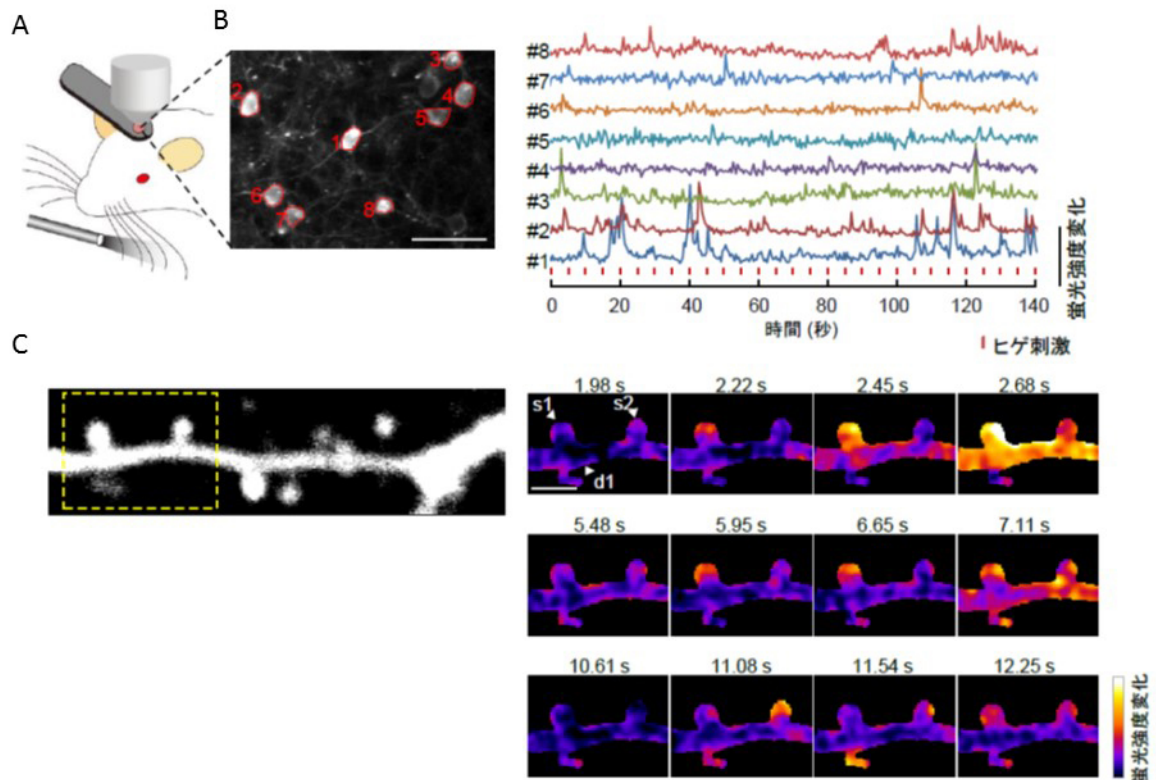


図3. 生きた動物個体における大脳皮質神経細胞の Ca^{2+} イメージング

(A) ひげ刺激による Ca^{2+} 変動を記録するための実験装置の模式図。右半球のバレル野の神経細胞の活動を記録しながら、短時間の刺激を左側のヒゲに与えた。

(B) 生きた動物個体において、R-CaMP2 は感覚誘発性 Ca^{2+} 応答を記録できる。左図：ヒゲ刺激が繰り返し行われる際の神経細胞内の蛍光変化を画像化した。右図：左図から8つの興味領域（#1-#8）の Ca^{2+} 応答の代表的なトレース。縦線（赤）がヒゲ刺激の時点を示している。

(C) R-CaMP2 は個々の樹状突起スパインにおけるシナプス Ca^{2+} 応答を検出することができる。左図：R-CaMP2 を発現している第2 / 3層の樹状突起の代表画像。右図：左図のボックスで囲った領域の時系列データ。 Ca^{2+} がスパインに局限して上昇していることがわかる。

本図は文献10より改変した。

さらにその応用として、R-CaMP2 と従来の緑色 Ca^{2+} センサーとを組み合わせることにより、マウスの大脳皮質における興奮性と抑制性の2つの異なる種のニューロンの神経活動を同時に計測することに成功した。さらに、自由行動している線虫において、光遺伝学的な手法との組合せも可能であることが示された。今後、神経回路ネットワークの動作原理の解明が飛躍的に進むことが期待される。

考 察

本研究は、長期記憶が長期シナプス可塑性として神経回路内にいかにして長期的に固定されるかという機構の一端に迫るものである。本研究を通じて得られた知見は、認知機能の維持・向上・破綻防止のためのメカニズム解明にとって最も重要な実験パラダイムを新たに開拓する端緒になると期待される。

神経細胞においては、刻一刻と発生する神経情報は、ニューロン毎に数千個のシナプス後膜において受容され、シナプスとそれに隣接するスパイン構造にて電気的シグナルと化学的な細胞内シグナルに振り分けられる。電気的シグナ

ルと化学シグナルが並列的に数多くのシナプス内で起こり、これら数千個のシナプス情報が統合されてニューロン毎に一義的なニューロン出力が演算・決定されている。そのようなプロセスの総和として、人間の精神・認知・神経活動が起こると考えられている。これらシグナルネットワークによる情報処理機構を解明し、そのメカニズムの理解に基づき、個別の素過程を人為的に操作し、脳機能の改変・向上・破綻防止遅延を実現することは脳医学の究極の夢の一つである、本計画はそれに近づく研究プロジェクトの一つといっても過言でない。

近年、遺伝性要因の強い弧発例の精神神経疾患や精神遅滞の症例において、我々がこれまで明らかにしてきた Arc 発現制御機構や、Arc のシナプス局在に関わる分子機構に CNV や SNV が有意に集中していることを示唆する報告が相次いでいる。これらの意義を明らかにしていくためにも、今後とも、我々の研究アプローチを継続していく必要があるだろう。

共同研究者

本研究は、東京大学大学院医学系研究科神経生化学分野内での緊密な協働によって実施された。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 6;106(1):316-21. doi: 10.1073/pnas.0806518106. PubMed PMID: 19116276
- 2) Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. 2010 May 13;465(7295):182-7. doi: 10.1038/nature09033. PubMed PMID: 20393465
- 3) Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H. Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII α and calcineurin. *Cell Rep*. 2013 Apr 25;3(4):978-87. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.033. PubMed PMID: 23602566
- 4) Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Okuno H, Ohki K, Bito H. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nature Methods*. 2013 Sep;10(9):889-95. doi: 10.1038/nmeth.2559. PubMed PMID: 23852453
- 5) Tse D, Takeuchi T, Takeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RG. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science*. 2011 Aug 12;333(6044):891-5. doi: 10.1126/science.1205274. PubMed PMID: 21737703
- 6) Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell*. 2012 May 11;149(4):886-98. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.062. PubMed PMID: 22579289
- 7) Kawashima T, Okuno H, Bito H. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Front Neural Circuits*. 2014 Apr 23;8:37. doi: 10.3389/fncir.2014.00037. PubMed PMID: 24795570
- 8) Nonaka M, Kim R, Fukushima H, Sasaki K, Suzuki K, Okamura M, Ishii Y, Kawashima T, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Kida S, Bito H. Region-specific activation of CRTCI-CREB signaling mediates long-term fear memory. *Neuron*. 2014 ;84(1):92-106. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.049. PubMed PMID: 25277455
- 9) Nonaka M, Kim R, Sharry S, Matsushima A, Takemoto-Kimura S, Bito H. Towards a better understanding of cognitive behaviors regulated by gene expression downstream of activity-dependent transcription factors. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 Nov;115:21-9. doi: 10.1016/j.nlm.2014.08.010. PubMed PMID: 25173698
- 10) Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nature Methods*. 2015 Jan;12(1):64-70. doi: 10.1038/nmeth.3185. PubMed PMID: 25419959