145　記憶学習における時間薬理学の開拓	田中　和正

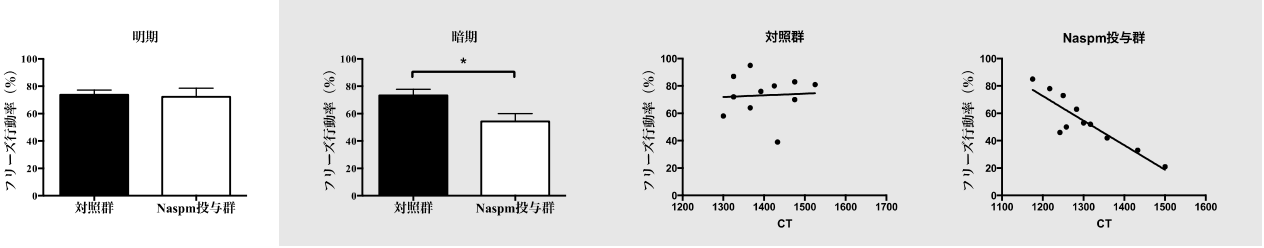
【目的】現象の中に普遍的な法則を見いだす事が科学の真髄であるが、例外の発見がこれまでには思いもよらなかった、より普遍性の高い法則の発見へとつながることがある。私は全くの偶然で、海馬における記憶の分子メカニズム、具体的にはカルシウム透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体（CP-AMPAR）の記憶想起への関与に概日リズムが存在することを見出した（未発表データ）。本研究の目的は、このリズムの詳細と意義を明らかにし、海馬機能を支える分子メカニズムのより包括的な理解を目指すと同時に、様々な精神疾患に伴う記憶障害の治療に時間薬理学の概念を導入することである。これが実現すれば、投与タイミングを調整することで既存の認知症薬の効果を高めることができるのみならず、この海馬概日リズムを生かした革新的な新規認知症薬の開発をも期待できる。

【方法】本研究では、1. 海馬への薬理学的操作と行動実験、および 2. 自由行動下マウス海馬でのテトロード記録という二つのアプローチを用いて、CP-AMPAR の記憶想起への関与とその機序に迫った。

1. CP-AMPAR が文脈記憶の想起に関与する程度が概日によって異なるのかを決定するため、文脈恐怖条件づけを行ったマウスの海馬へ CP-AMPAR 選択的阻害剤 Naspm を記憶テスト直前に注入し、記憶テスト時の文脈フリーズレベルを評価した。この時、半分のマウスは明期に、残り半分のマウスは暗期に薬剤投与およびテストを行った。2. 海馬の記憶エングラムが概日時間や動物の状態によって異なる活動パターンを示すのかどうかを解析した。具体的には、c-Fos-tTA マウスを用いて文脈恐怖条件づけ時に海馬 CA1 に形成された記憶エングラムを光感受性ナトリウムチャネル（Channelrhodopsin、ChR2）で標識し、青色光（473 nm）への応答性からテトロード電極を通して同定した。同定した記憶エングラムが概日時間や動物の状態によって活動パターンを変えるのかどうかを解析し、概知の CP-AMPAR の作用機序からこの分子の関与を検証した。

【結果】1. Naspm 投与下で文脈記憶テストを行ったところ、記憶テストが明期に行われた場合には対照群との差が見られなかったのに対し、テストが暗期に行われた場合には記憶想起が阻害された（図 1）。そして、Naspm 注入とテストが暗期に行われたマウスでは、記憶パフォーマンス（%フリーズ）とテストを行った概日時間（CT）との間に有意な相関関係が認められた。以上の結果は、文脈記憶想起に対する CP-AMPAR の関与の程度が概日時間とともに変動することを示している。2. 同定された海馬 CA1 記憶エングラムの活動を、明期／暗期、および馴化環境での静止中と新規環境の探索中それぞれで解析したところ、最大発火率や平均発火率といった基本的な活動量に概日時間による影響は認められなかった。しかしながら、記憶エングラムと近傍の抑制性介在ニューロンとの活動相関に概日時間と状態の相互作用が示唆された。

文脈記憶想起に対する CP-AMPAR 薬理学的阻害の影響は概日リズムを示す



145. 記憶学習における時間薬理学の開拓

田中　和正

*理化学研究所 脳科学研究センター 神経回路・行動生理学研究チーム

Key words：CP-AMPAR，概日リズム，海馬，文脈記憶，記憶エングラム

緒　言

現象の中に普遍的な法則を見いだす事が科学の真髄であるが、例外の発見がこれまでには思いもよらなかった、より普遍性の高い法則の発見へとつながることがある。私は全くの偶然で、海馬における記憶の分子メカニズムに概日リズムが存在することを見出した（未発表データ）。本研究の目的は、このリズムの詳細と意義を明らかにし、海馬機能を支える分子メカニズムのより包括的な理解を目指すと同時に、様々な精神疾患に伴う記憶障害の治療に時間薬理学の概念を導入することである。これが実現すれば、投与タイミングを調整することで既存の認知症薬の効果を高めることができるのみならず、この海馬概日リズムを生かした革新的な新規認知症薬の開発をも期待できる。

概日リズムは動物の体内で時間を刻み、1 日の中で様々に変化する環境に対する適切な生理的反応や行動を可能にする。これは動物にとって重要な認知機能である学習や記憶も例外ではなく、記憶学習のパフォーマンスは 1 日の中で変動する。例えば、齧歯類は活動期である暗期により高い学習能力を示すことがよく知られている。このようなよく知られた概日リズムとは対照的に、私は記憶のパフォーマンスではなく、その分子メカニズムに日内変動を見出した。この概日リズムは、カルシウム透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体（CP-AMPAR）が 1 日のうち夜間（齧歯類にとっての活動期）だけ海馬依存性の記憶想起に関与する、というものである。中枢神経系で CP-AMPAR を発現する細胞群は限られており、通常海馬ではほとんど発現していない。その理由の一つは、別のカルシウム透過性グルタミン酸受容体である NMDAR とは異なり、そのカルシウム透過性がマグネシウムイオンによる制御を受けておらず、細胞内に過剰なカルシウムイオンを流入しうるためだと考えられている。実際、CP-AMPAR の発現上昇により神経細胞死が誘導されることは数多くの先行研究が示しており、海馬への血流不全や運動神経系での筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患で CP-AMPAR の異常な発現向上が認められている。

そこで本研究では、CP-AMPAR が海馬で文脈記憶想起に概日リズムをもって関与するその機序の解明を目的とする。

方　法

1. 薬理学的操作と行動実験

実験の 1 週間前にマウス海馬 CA1 へのカニューレ挿入手術を行った。1 週間の回復期間後、マウスは文脈恐怖条件づけのプロトコルで条件づけし（0.5 mA、3 shocks）、その 2 日後に 5 分間の記憶想起テストを行った。テストでは、マウスのフリーズ行動を文脈恐怖記憶の指標とした。この記憶想起テストの 20 分前に埋め込んだカニューレを通して CP-AMPAR 選択的阻害剤（Naspm：1-naphthyl acetyl spermine、10 mM）を海馬 CA1 へと注入し（500μℓ total、100 μℓ/min）、CP-AMPAR 阻害が文脈記憶想起に及ぼす影響を評価した。対照群には Naspm の代わりに溶媒である PBS を注入した。CP-AMPAR が文脈記憶想起に概日リズムをもって関与するのかどうかを決定するため、明期にテストを行う群と暗期に行う群の二つに分けた。

2. 記憶エングラムのパッチクランプ

海馬記憶エングラムの標識には、c-Fos-tTA/TRE-H2B-GFP ダブルトランスジェニックマウスを用いた。このマウスを、ドキシサイクリンを含む特殊飼料（40 mg/kg）で飼育して（ON DOX）、実験の 2 日前からドキシサイクリンを含まない通常飼料に切り替えた（OFF DOX）。実験では、OFF DOX 中に文脈恐怖条件づけを用いて文脈記憶を記

*現在の所属：理化学研究所 脳神経科学研究センター 神経回路・行動生理学研究チーム

銘させ、その際に c-Fos 陽性となる細胞群を H2B-GFP で標識した。条件づけ直後から再び ON DOX に戻して標識を停止させた。24 時間後このマウスから急性脳スライスを作成し、GFP 標識された細胞を対象にパッチクランプ法により－70 から＋40 mV までの保持電位で Schaffer collaterals 刺激時のシナプス後電流値を記録した（n = 3）。対照として、標識されていない細胞も同様に記録した（n = 3）。このとき、rectification index を CP-AMPAR 発現量の相対的な指標として用いた。本実験は、バージニア大学 Dr. Kapur との共同実験として行われた（未発表）。

3. 記憶エングラムのテトロード記録

海馬記憶エングラムの標識には、c-Fos-tTA トランスジェニックマウスを用いた。このマウスの海馬 CA1 へと AAV-TRE-ChR2-EYFP を定位固定注入した。このとき、光ファイバーとテトロード電極を搭載したマイクロドライブを同位置へと埋め込んだ。電極位置の微調整後、パッチクランプ実験と同様に、新規文脈の探索時に文脈記憶の記憶エングラムを ChR2-EYFP で標識した。このマウスが明期および暗期に再度同じ文脈を探索する際の、海馬 CA1 錐体細胞のスパイク活動を記録した。最後に、光ファイバーを通して青色光で CA1 を刺激し（473 nm、10 mW、0.5 Hz, 15 ms pulses）、光応答性のスパイク活動を示したものをこの文脈の記憶エングラムとして同定した。

結　果

1. 薬理学的操作と行動実験

昼間に記憶想起テストを行った群では、対照群と Naspm 投与群との間にフリーズ行動率の有意な差はみられなかった（対照群 73.75±3.425 vs Naspm 投与群 72.25±6.169；p = 0.8387、unpaired t-test）。その一方で、暗期に記憶想起テストを行った群では、Naspm 投与群に有意なフリーズ行動率の低下が認められた（図 1a；対照群 73.18±4.645 vs Naspm 投与群 54.18±5.829；p = 0.0191、unpaired t-test）。さらに、暗期の群では Naspm 投与群にフリーズ行動率と概日時間（CT）との間に有意な相関関係が認められた（図 1b；R square = 0.7914、p = 0.0002）。この相関関係は対照群にはみられなかった（R square = 0.0003、p = 0.8675）。

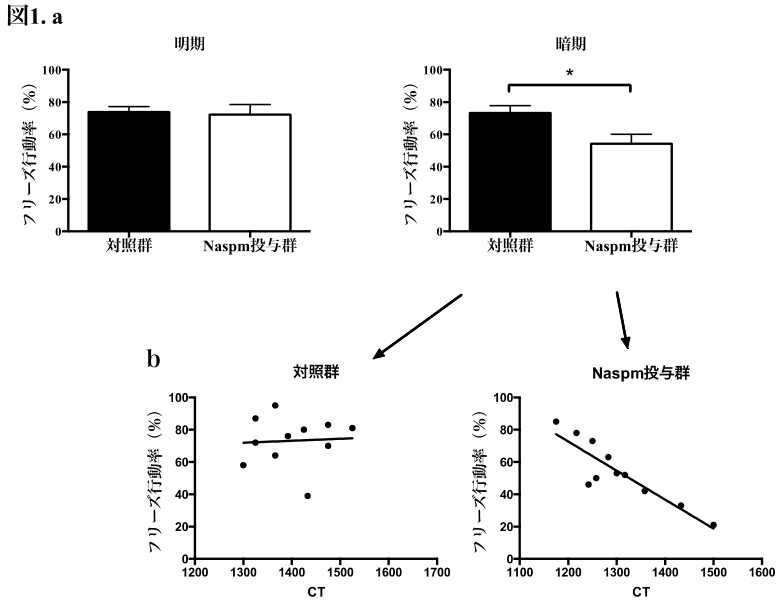


図 1. 文脈恐怖記憶想起に対する Naspm 投与の影響

a）想起テスト前に Naspm または PBS を海馬 CA1 へと投与されたマウスのフリーズ行動率。左：明期、右：暗期。平均±SEM。b）暗期に Naspm または PBS を投与し記憶想起テストを実施されたマウスの概日時間との関係。

2. 記憶エングラムのパッチクランプ

海馬の文脈記憶想起は記銘時の c-Fos 発現で定義される記憶エングラムによって担われるとされている(例: [1, 2])。そこで本実験では、記憶エングラムにおいて CP-AMPAR の発現が向上しているかどうかをパッチクランプ法により検証した。

c-Fos-tTA/TRE-H2B-GFP マウスを OFF DOX 下で文脈恐怖条件づけしたところ、およそ 20%の海馬 CA1 錐体細胞が H2B-GFP により標識された (図 2a)。急性切片でこれら細胞をパッチし、rectification index (+40 mV および−40 mV 保持電位での eEPSC 比) を計測した。CP-AMPAR を含まない神経細胞ではこの値が 1 に近いことが知られているため、これを CP-AMPAR 発現の指標として用いた [3]。これまでのところ、2/3 の標識錐体細胞で顕著な内向き整流性、低い rectification index が観察されている (図 2b)。

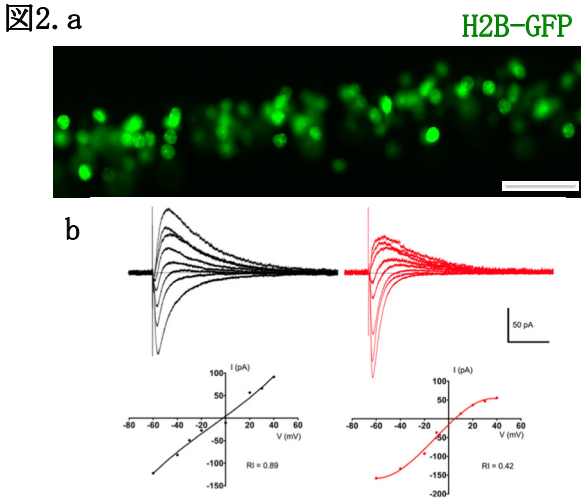


図 2. 海馬記憶エングラムの rectification index

a) 文脈恐怖条件づけ時に H2B-GFP 標識された海馬 CA1 における c-Fos 陽性細胞核。スケールバー、100 μm。

b) 代表的な c-Fos 陽性細胞(赤)および陰性細胞(黒)の eEPSC トレース(上段)と各保持電位での eEPSC 値。

3. 記憶エングラムのテトロード記録

光遺伝学的同定法により、およそ 20%の海馬 CA1 錐体細胞が c-Fos 陽性、すなわち記憶エングラムとして同定された (図 3a)。マウスが標識に使われた環境を明期または暗期に探索する際の、これら標識細胞の場所細胞としての発火特性を調べたところ、その平均発火率や最大発火率に有意な差は認められなかった (図 3b ; 平均発火率、明期 1.43 Hz vs 暗期 1.25 Hz、W = 318、p-value = 0.2469、Wilcoxon rank sum test ; 最大発火率、明期 6.99 Hz vs 暗期 7.84 Hz、W = 246、p-value = 0.6953)。

CP-AMPAR がカルシウムイオンを透過させるためには、シナプス後細胞が過分極する必要があり、抑制性介在ニューロンの関与が必要と考えられる (図 4a)。そこで、記録した記憶エングラムの近傍に位置し、同じテトロード電極から記録された抑制性介在ニューロンの記録エングラムへの入力頻度の変動を明期および暗期で検証することで、CP-AMPAR が機能的となる条件の検証を行った。明期にマウスが環境探索セッション中に静止している際、記憶エングラムの発火は近傍介在ニューロンの発火と強く同期していた (図 4b 左)。しかしながら、暗期には同じ記憶エングラムの発火が、近傍介在ニューロンの発火直前に上昇し、介在ニューロンの発火直後に抑制されていた (図 4b 右)。

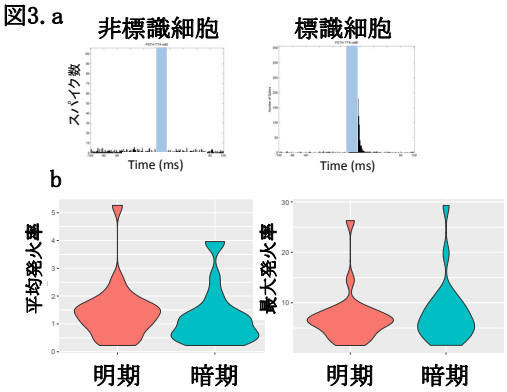


図 3.　自由行動下マウスにおける海馬記憶エングラムの明期／暗期活動量

a）光遺伝学的同定法。光刺激前後時間ヒストグラムにより、非標識細胞(左)と標識細胞(右)とを分類することができる。

b）明期または暗期に標識文脈を探索するマウスにおける標識細胞の平均発火率(左)と最大発火率(右)。

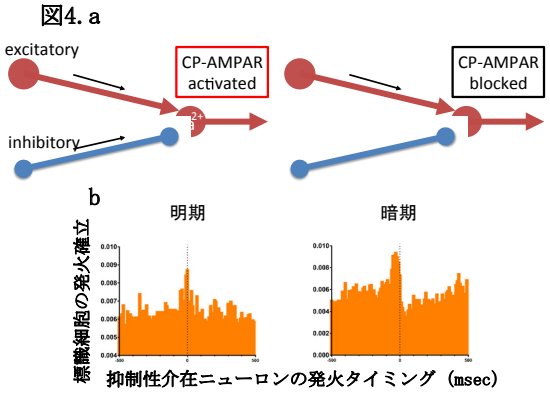


図 4.　海馬記憶エングラムと抑制性介在ニューロンの明期／暗期活動相関

a）CP-AMPAR 作用機序の模式図。CP-AMPAR がカルシウム透過性を示すためには、シナプス後細胞の膜電位が過分極する必要があり、抑制性入力の同期的関与が必須と考えられる。

b）明期（左）または暗期（右）に静止状態にあるマウスにおける標識細胞と抑制性介在ニューロンの相互相関ヒストグラム。

考　察

概日リズムは動物の体内で時間を刻み、1日の中で様々に変化する環境に対する適切な生理的反応や行動を可能にする。これは動物にとって重要な認知機能である学習や記憶も例外ではなく、記憶学習のパフォーマンスは1日の中で変動する。例えば、齧歯類は活動期である暗期により高い学習能力を示すことがよく知られている。このようなよく知られた概日リズムとは対照的に、本研究では記憶のパフォーマンスではなく、その分子メカニズムに日内変動を見出した。

文脈恐怖条件づけをしたマウスの想起テスト直前に、CP-AMPAR選択的阻害剤であるNaspmを海馬CA1へと直接投与したところ、明期に薬剤投与および想起テストを行った場合には薬剤の影響がみられなかったのに対して、暗期に行った場合には文脈記憶の想起が薬剤投与によって有意に損なわれていた。これは、記憶の想起に対するCP-AMPARの関与が概日時間によって異なることを示している。

本研究ではさらに、このCP-AMPARの記憶想起への概日リズムを伴った関与の機序解明を目指した。文脈記憶の想起は、記銘時にc-Fosを発現した海馬細胞群、いわゆる記憶エングラムによって担われると考えられている［4，5］。そこで、文脈記憶記銘後に記憶エングラムにおけるCP-AMPAR発現が向上しているかどうかを、パッチクランプ法により検証した。c-Fos-tTA/H2B-GFPマウスを用いて標識した記憶エングラムを急性スライス標本でパッチしたところ、これら細胞に低い rectification index、すなわちCP-AMPARの発現の傾向が認められた。今後は、サンプル数を増やすとともに明期および暗期のマウスから得られるスライスを用いて同様の記録を行い、記憶エングラムにおいてCP-AMPARの発現量に概日的な変動がみられるのかどうかを検証していく。

最後に、これら記憶エングラムを含む神経ネットワークの振る舞いがどのように概日リズムとともに変動するのかを調べた。自由行動下マウスからのテトロード記録と光遺伝学的同定法を用いて記憶エングラムの活動を解析したところ、明期と暗期とでその平均／最大活動量に有意な差はみられなかった。そこで、記憶エングラムとその近傍にある抑制性介在ニューロンの相関的な活動を調べたところ、暗期においてのみ抑制性介在ニューロンの発火直後に記憶エングラムの発火が抑制されていた。これは、暗期において記憶エングラムに発現したCP-AMPARがカルシウムイオンを透過するための十分条件を満たしていることを示唆している。今後は、より多くの記憶エングラムー抑制性介在ニューロンペアの活動を記録し、この可能性を検証していく。実際に動き回るマウスでのこれら活動の概日変化を解析することで、記憶想起の分子メカニズムに概日リズムを有する生理学的な意義の解明を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、University of Virginia、School of Medicine の Jaideep Kapur である。

文　献

1) Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, et al. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. Nature. 2012 Apr 19;484(7394):381–5. DOI: 10.1038/nature11028.

2) Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, Wiltgen BJ. Cortical Representations Are Reinstated by the Hippocampus during Memory Retrieval. Neuron. 2014 Oct 8;84(2):347–54. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.09.037.

3) Clem RL, Barth A. Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. Neuron. 2006 Mar 2;49(5):663–70. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.01.019.

4) Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, Redondo R. Memory Engram Cells Have Come of Age. Neuron. 2015 Sep 2;87(5):918–31. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.002.

5) Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW. Finding the engram. 2015 Aug 20;16(9):521–34. DOI: 10.1038/nrn4000.