

記憶を形成している神経細胞同士はつながっているのか？

@12ashk

2018 年 12 月 9 日

はじめまして。普段は線虫の神経細胞の研究をしています。今回は記憶に関連する論文を紹介します。本来は別の論文 [1] を紹介する予定だったのですが、プレスリリースが出ていたので、別の論文を紹介することに決めました¹。そこで、今回は Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation という論文 [2] を紹介することにします。Science 誌は著作権的に図表を引用することが許されていないので、基本的に自作の図になってしまうことをご了承ください²。また、わかりやすさのために論文中のいくつかの説明を省略、簡略化して説明させて頂くことをご了承願います。

1 おおまかな背景

ところで、記憶というのはどのように保存されているのでしょうか？ 基本的には神経細胞になんらかの変化が起こり、それによって神経回路が組み変わり記憶されるのだと予想されます。具体的には結合する神経細胞を変化させたり、神経細胞の間のシナプス強度が変化することで記憶や学習がなされます (図 1)。特に、シナプス前細胞の神経伝達物質放出量の変化やシナプス後細胞の応答性の変化が重要です。

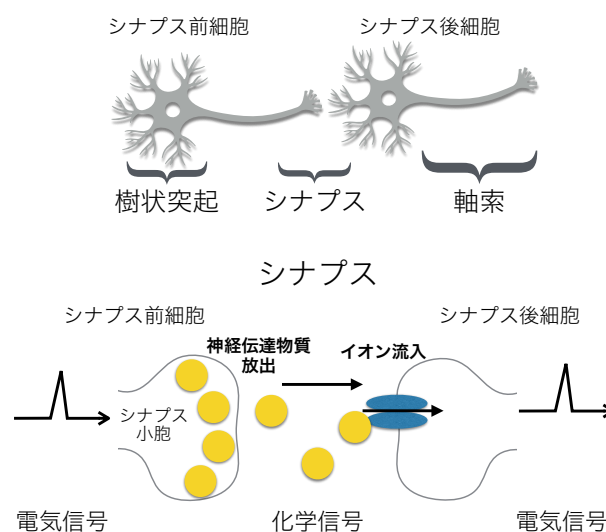


図 1 神経細胞間の情報伝達。シナプスが結合強度を決めています。電気信号から化学信号、化学信号から電気信号の間の変換が学習において変化します。

また、近年の実験によってエンGRAM細胞 (Engram Cell) という存在も明らかになってきました。これは、記憶の貯蔵と想起に重要な役割を持つ細胞で

- 記憶に関連する行動中に活性化することで生化学反応をおこす
- 活性化することで記憶を思い出し、不活性化することで記憶を思い出せなくなる

¹ こちらの論文も面白いので、是非プレスリリースを覗いてみてください。

² 絵心は基本的にはないので...

という特性をもっています [3]. エングラム細胞をラベルしておき、後ほどその細胞だけを特異的に活性化させることで、記憶の想起を誘導することに成功したという報告によってエングラム細胞に関する研究は大きく発展しました [4]³. こういったエングラム細胞は神経細胞間の結合が変化するシナプス可塑性によっておこると考えられています. また、シナプス可塑性は Hebb 則とよばれる、シナプス前細胞とシナプス後細胞が同時に活性化することで、その間の結合が強まることによっておこると考えられてきました [5]. しかしながら、本当に記憶が形成によってエングラム細胞間の結合が強化されるのかはよくわかっていませんでした. この論文はその疑問に答えるものとなっています.

2 特定のシナプス結合のラベリング

マウスに記憶させる方法として、本論文では文脈的恐怖条件付けを用いています. これは、心理学でよく用いられる実験手法で、Pavlov の犬で有名な Pavlov 条件付の一種です. 視覚・聴覚刺激の恐怖とは無関係の刺激 (conditioned stimulus; CS) と電気ショックなどの恐怖を与える刺激 (unconditioned stimulus; US) を組み合わせることで、恐怖とは無関係な刺激に対して恐怖反応を示すようになる、というものです. 今回の実験では“四角い鉄格子を敷いたショック箱にいれること”を恐怖とは無関係な刺激として用い、“電気ショック”を恐怖刺激として用いています. また、海馬の CA3 という領域から CA1 という領域への投射がこの記憶の獲得や想起において重要であることがわかっています [6]. そこで、この 2 領域間の結合性を確認しました. そのために、GRASP (green fluorescent protein reconstitution across synaptic partners) という手法を用いました [7]. これは、シナプス前細胞とシナプス後細胞にそれぞれ緑色蛍光タンパク質の一部を発現させることで、その 2 つの神経細胞がシナプス結合したときだけ蛍光タンパク質が完成し、緑色蛍光を発するというものです (図 2)⁴.

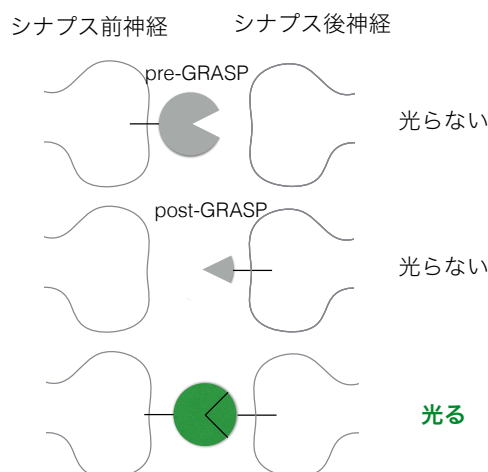


図 2 GRASP の仕組み. シナプス前後どちらの神経もそれぞれ pre, post-GRASP を発現しているときだけ蛍光が見られます.

筆者らはこれを青色と黄色の 2 バージョンを新たに作製しました. これによって、CA1, 3 間のエングラム細胞と非エングラム細胞の結合を区別することに成功しました. 具体的には、図 3 のようになります.

CA3 の神経細胞特異的なプロモータによって青色の pre-GRASP を発現させておきます⁵. この発現は基本的には疎であるため、エングラム細胞より圧倒的に多い非エングラム細胞が pre-GRASP を発現し、非エングラム細胞のシナプスは青色 GRASP でラベルされることになります⁶. c-fos という最初期遺伝子のプロモータ下流にリバーステトラサイクリン調整性トランス活性化因子 (rtTA) をぶら下げます. c-fos は活性化した神経細胞特異的

³ この研究をおこなったのはノーベル賞も受賞した利根川進教授です.

⁴ 構造的には、 β バレルを構成している 11 本の β ストランドの内、1-10 を pre, 11 を post に組み込むことで、近くにそれぞれが存在すると結合するようです.

⁵ 対象部位に対してアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated Virus; AAV) を注射することで、発現させています.

⁶ 本当は、CaMKII の下に Cre を発現させ、すべての細胞が発現する EF1 α の下流に lox に挟まれた逆転している pre-GRASP を発現させています. これによって、疎に神経細胞に発現させています.

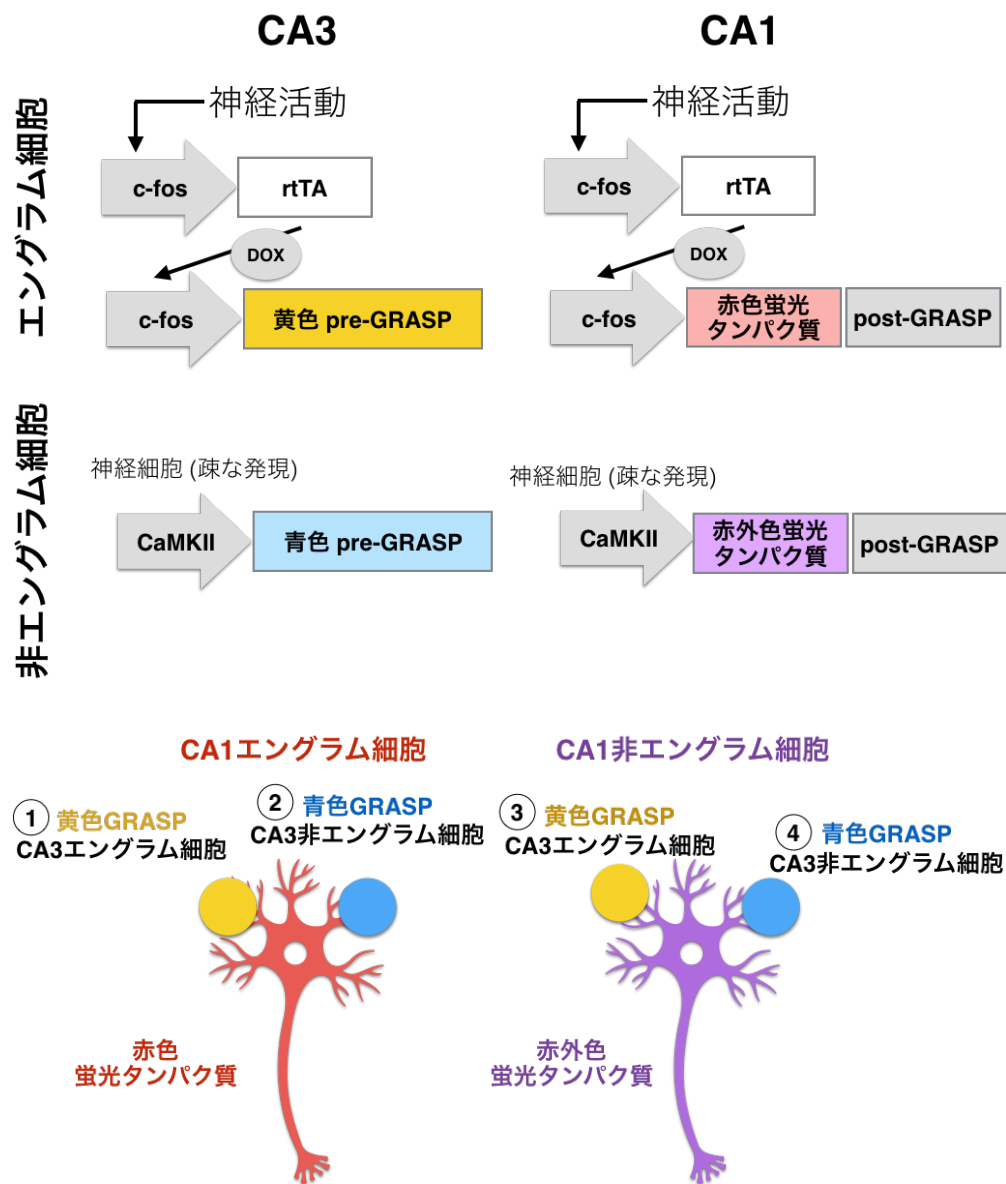


図3 CA1, 3に発現させている遺伝子。エンングラム細胞と非エンングラム細胞をそれぞれ色によって区別することができます。

に発現するため、rtTAは活性化した神経細胞のみで発現します。rtTAはドキシサイクリン (doxycycline; DOX) とともにテトラサイクリン応答因子 (TRE) に結合することで、その下流遺伝子である、黄色の pre-GRASP が発現します。つまり、恐怖条件付けの前にドキシサイクリンを与えておくことで、恐怖条件付けの際に活性化した神経細胞 (=エンングラム細胞) のシナプスを黄色 GRASP でラベルすることができます (図3上)⁷。一方、CA1の神経細胞特異的なプロモータによって post-GRASP と iRFP (赤外色蛍光タンパク質) を発現させておきます。よって、CA1の非エンングラム細胞は赤外色蛍光タンパク質でラベルすることができます。また、CA1にも c-fos, ドキシサイクリン依存的に発現するように post-GRASP と赤色タンパク質を発現させます。これによって、CA1のエンングラム細胞は赤色タンパク質でラベルすることができます。組み合わせると

1. 赤色神経細胞上の黄色シナプス = CA3 エンングラム細胞 → CA1 エンングラム細胞
2. 赤色神経細胞上の青色シナプス = CA3“非” エンングラム細胞 → CA1 エンングラム細胞
3. 赤外色神経細胞上の黄色シナプス = CA3 エンングラム細胞 → CA1“非” エンングラム細胞

⁷ エンングラム細胞は少なく、非エンングラム細胞も疎にしかラベルされないのが、基本的にエンングラム細胞が2つの蛍光タンパク質を発現することはないようです。

4. 赤外色神経細胞上の黄色シナプス = CA3“非” エングラム細胞 → CA1“非” エングラム細胞

の4種類が区別できることになります(図3下).

3 エングラム細胞間の結合は多くて強い

図3で導入したシステムを用いて、恐怖条件付けの際の4つの組み合わせのシナプス結合を調べました。その結果、樹状突起単位長さあたりのシナプスの結合数(シナプス結合の密度)が、**CA3 エングラム細胞 → CA1 エングラム細胞**のペアだけ、他の組み合わせと比べ高いことがわかりました(図4)。また、シナプスの大きさ⁸をGRASP 蛍光の直径と体積によって測定すると、やはり **CA3 エングラム細胞 → CA1 エングラム細胞**のペアは他の組み合わせと比べ高いことがわかりました。つまり、少なくとも解剖学的、構造的にはエングラム細胞間の結合は実際に多く、強いことがわかりました。

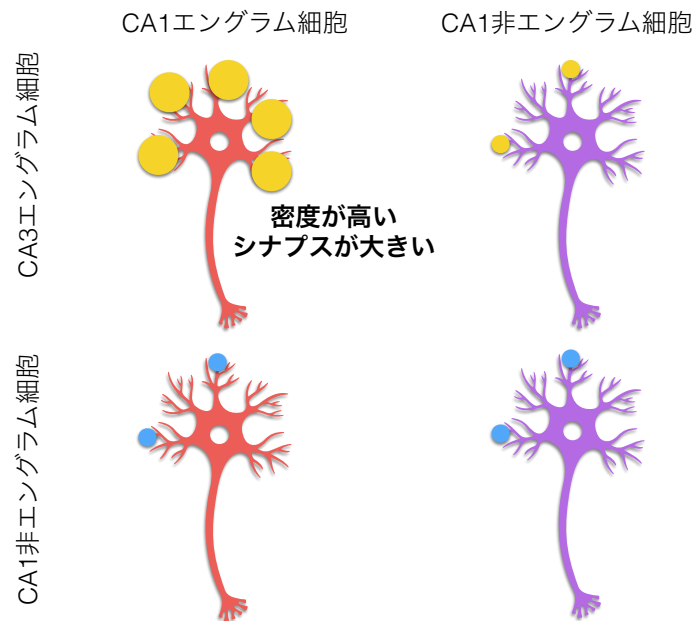


図4 各ペアのシナプス密度と大きさ。エングラム細胞間の結合だけ多くて大きい。

4 エングラム細胞の結合は記憶の強度依存的

次に、筆者らはエングラム細胞間の結合性の強さが記憶の結合性の強さを決めているのではないかと考えました。そこで、電気刺激の強さを1. なし, 2. 弱い, 3. 強い の3種類用意し、それぞれ条件下で結合性を確認しました(図5)。まず同じ部屋に入れたときの恐怖の度合い(マウスが固まるかどうか)は強度依存的に変化しました。また、その時のシナプスの大きさと密度は **CA3 エングラム細胞 → CA1 エングラム細胞**のペアだけ、強度依存的に大きく、高くなっていて、他のペアでは変化ありませんでした(図5)。このことから、解剖学的、構造的なエングラム細胞間の結合の強さは記憶の強さと関連があることが示されました。

5 エングラム細胞間の結合は機能的にも強い

解剖的な、構造的な接続はエングラム細胞間特異的に強くなっていることがわかりました。しかし、これらは本当に機能的にも強くなっているのでしょうか？ それに答えるために、筆者らは光遺伝学と電気生理学を組み合わせました(図6)。CA3 の非エングラム細胞は Chronos という青色光で活性化する陽イオンチャネル [8] を、エング

⁸ 正確には、シナプスを形成しているスパインの大きさです。

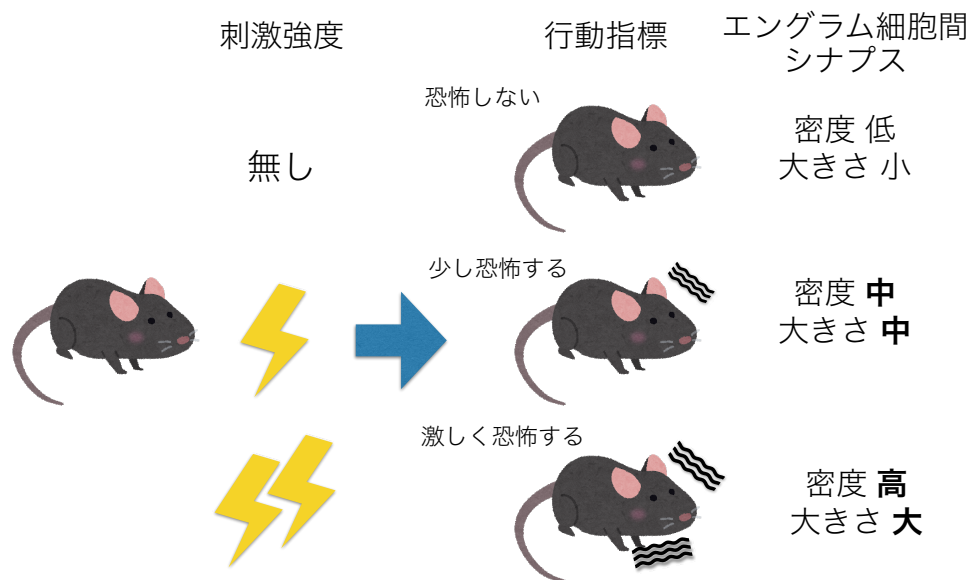


図5 エンGRAM細胞間の結合の強度は記憶の強さに対応している。

ラム細胞は Chrimson という赤色光で活性化する陽イオンチャネル [8] を発現するようにしました。これによって、CA3 エンGRAM細胞、非エンGRAM細胞を光によって、特異的に活性化することができます。一方、CA1 の細胞はエンGRAM細胞を緑色でラベルすることで、エンGRAM細胞と非エンGRAM細胞を区別しました。その細胞に対して電極を刺すことで、CA1 エンGRAM細胞、非エンGRAM細胞の応答を測定することができます。これを組み合わせ、CA3 の細胞を刺激したときに、CA1 の細胞がどれだけ応答するかを測定することができます。

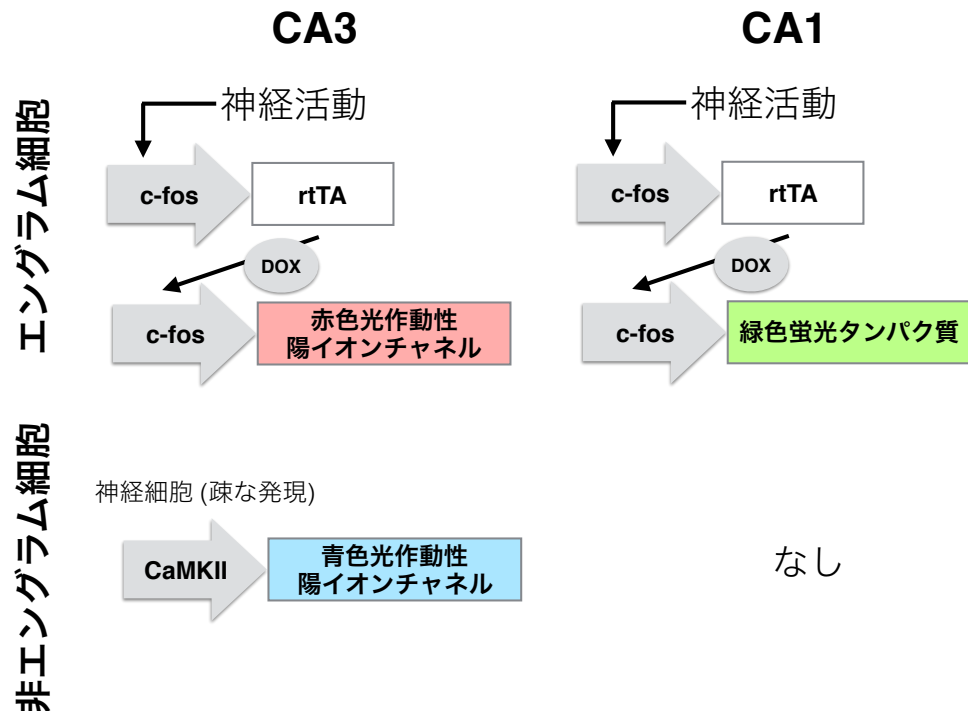


図6 CA1, 3 に発現させている遺伝子。CA3 のエンGRAM細胞と非エンGRAM細胞をそれぞれ刺激光を変えらることで、区別して刺激することができます。また、CA1 エンGRAM細胞は緑色光を発現しているため、非エンGRAM細胞と区別することができます。

すると、CA1 細胞がエンGRAM細胞であるかどうかに関わらず、赤色光の刺激時のみ、つまり CA3 エンGRAM細胞との結合の場合のみ、2 回刺激したときの 1 回目と 2 回目のシナプス後細胞で記憶される応答の大きさの比

(paired-pulse ratio; PPR) が減少していました (図 7). これは, 1 回目にほとんど神経伝達物質を放出してしまったために, 2 回目に放出することができなかった, つまりシナプス前細胞 (=CA3 細胞) による結合強化がエンGRAM細胞でおこっている, ということを意味しています⁹.

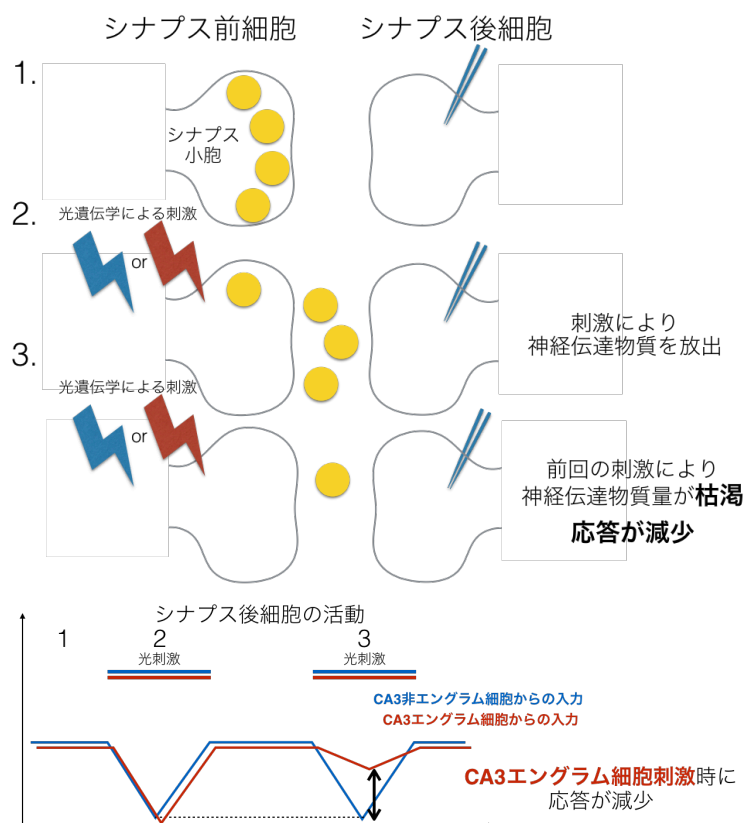


図 7 シナプス前細胞の結合強度の測定. 1 回目と 2 回目の応答を比べることで, 1 回目にどれだけシナプス小胞が放出されたかが推定できます. それによって, CA3 エンGRAM細胞の出力が強化されていることがわかりました.

次に, シナプス後細胞の変化をみるために, 細胞外液の Ca^{2+} を Sr^{2+} に置き換えるました (図 8). これによって, 神経伝達物質放出を散発的に放出することができ, 光刺激後しばらくすると, 小胞一つに対する応答を測定することができます. その結果, 刺激光の色に関わらず, シナプス後細胞がエンGRAM細胞の場合のみに応答が大きくなっていることがわかりました. これは, シナプス後細胞 (=CA1 細胞) による結合強化がエンGRAM細胞でおこっていることを意味しています¹⁰. これらの結果から, エンGRAM細胞では, シナプス前・後細胞ともに機能的結合の強化がおこっている, すなわちエンGRAM細胞間の機能的結合も強いということが明らかになりました.

6 結論および考察

本論文では, GRASP の開発によって, 解剖学的にエンGRAM細胞間特異的なシナプス結合の強化が見られることがわかりました. また, 光遺伝学と電気生理学を組み合わせることで, そのシナプス結合は機能的にも強化されていることがわかりました. これらの結果は, 本当に記憶が形成によってエンGRAM細胞間の結合が強化されるのか?という疑問に対し, **yes** という結論を得た, ということになります¹¹. ここで見られたような, エンGRAM細胞間のシナプス特異的な結合の変化は, 記憶の関連性を保持する一方で, 記憶の識別にも重要であることもわかってきました [1]. また, 近年, 神経細胞を単一ユニットとみるのではなく, シナプス単位や樹状突起の一部などといっ

⁹ 1 回目の神経伝達物質放出量が多かった, つまりシナプス前細胞がシナプス後細胞に対して与える影響が強い, ということです.

¹⁰ CA3 がエンGRAM細胞であるかどうかの影響していないことから, 小胞 1 つが含む神経伝達物質量は変わらない, と考えられます. このことから, この応答の変化はシナプス後細胞由来のものだと考えることができます.

¹¹ 少なくとも, 海馬の神経細胞に関して言えば, ということにはなりますが.

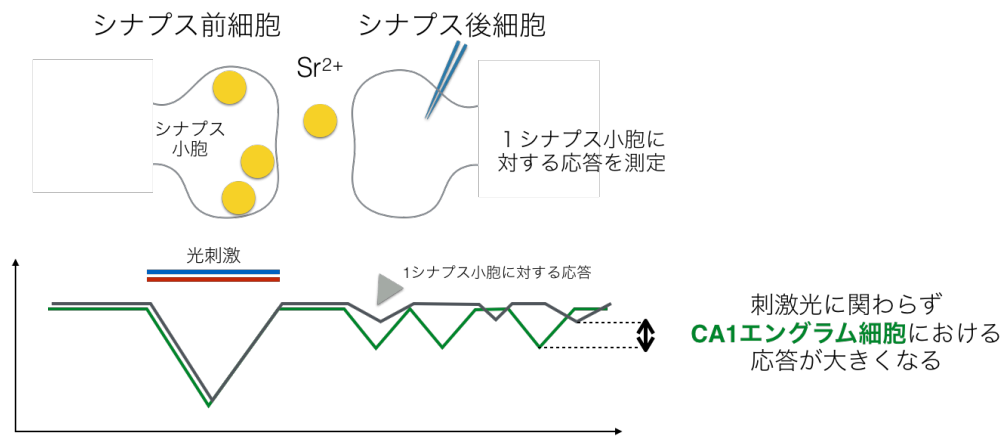


図8 シナプス後細胞の結合強度の測定. Sr^{2+} を加えることで, 1 シナプス小胞に対する応答が測定できます. それによって, CA1 エングラム細胞の応答性が強化されていることがわかりました.

たローカルな計算が重要であることが盛んにいわれています [9]. このようなローカルな計算というのは神経科学だけでなく, 細胞においても相分離などによる, 膜によらないコンパートメントなど, 生物学全般にわたって流行ってきています [10]¹². 個人的にこういう話が大好きなので, 今回の論文紹介を通じて, 皆さんにも興味をもって頂ければ幸いと存じます.

参考文献

- [1] K. Abdou, M. Shehata, K. Choko, H. Nishizono, M. Matsuo, S. I. Muramatsu, and K. Inokuchi. Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. *Science*, Vol. 360, No. 6394, pp. 1227–1231, 06 2018.
- [2] J. H. Choi, S. E. Sim, J. I. Kim, D. I. Choi, J. Oh, S. Ye, J. Lee, T. Kim, H. G. Ko, C. S. Lim, and B. K. Kaang. Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science*, Vol. 360, No. 6387, pp. 430–435, 04 2018.
- [3] S. Tonegawa, M. D. Morrissey, and T. Kitamura. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol. 19, No. 8, pp. 485–498, Aug 2018.
- [4] X. Liu, S. Ramirez, P. T. Pang, C. B. Puryear, A. Govindarajan, K. Deisseroth, and S. Tonegawa. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, Vol. 484, No. 7394, pp. 381–385, Mar 2012.
- [5] Donald O. Hebb. *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. Wiley, New York, 1949.
- [6] P. Tovote, J. P. Fadok, and A. Luthi. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol. 16, No. 6, pp. 317–331, Jun 2015.
- [7] Evan Feinberg, VanHoven, Miri, Andres Bendesky, George Wang, Richard Fetter, Kang Shen, and Cornelia Bargmann. GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron*, Vol. 57, No. 3, pp. 353–363, 2008.
- [8] N. C. Klapoetke, Y. Murata, S. S. Kim, S. R. Pulver, A. Birdsey-Benson, Y. K. Cho, T. K. Morimoto, A. S. Chuong, E. J. Carpenter, Z. Tian, J. Wang, Y. Xie, Z. Yan, Y. Zhang, B. Y. Chow, B. Surek, M. Melkonian, V. Jayaraman, M. Constantine-Paton, G. K. Wong, and E. S. Boyden. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat. Methods*, Vol. 11, No. 3, pp. 338–346, Mar 2014.
- [9] T. Branco and M. Hausser. The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, Vol. 20, No. 4, pp. 494–502, Aug 2010.

¹² 私感ですが, 多分...

- [10] S. Boeynaems, S. Alberti, N. L. Fawzi, T. Mittag, M. Polymenidou, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J. Shorter, B. Wolozin, L. Van Den Bosch, P. Tompa, and M. Fuxreiter. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.*, Vol. 28, No. 6, pp. 420–435, Jun 2018.