

長期記憶をインビトロで再現する



研究ノート

冨永(吉野) 恵子*

Reproducing brain's long-lasting memory in vitro

Key Words : brain, plasticity, memory, synapse formation, culture

1. はじめに

記憶の仕組みを解明することは、神経科学の大目標の一つである。また、アルツハイマー病や脳血管性痴呆による記憶障害の予防や治療は、科学の問題以上に社会的要請でもある。近年、記憶の基本機構は大筋で解明されたといわれる。これは、1973年、神経細胞と神経細胞が情報を授受する部位(シナプス)で、いったん強い活動(=高頻度入力刺激)があると、それ以降情報の伝達効率が強化される現象(LTPと呼ばれる; 何の略かは後述)が記憶形成に深く関わる海馬(大脳皮質の一部)で見つかり、これを実験系として使った研究が多くの研究者によって行われた結果、1990年頃までにその成立機構がほぼ解明されたことを指している。要点をいうと、脳内で使われている興奮性伝達物質グルタミン酸の受容体の一種NMDA受容体は、通常の伝達では機能しないが、強い活動があると機能し、細胞内にカルシウムイオンを流入させる。するとカルシウム依存性の連鎖反応が始まり、以後のグルタミン酸感受性が高まる、というのがその機構である(LTP初期相)。したがってNMDA受容体を大量発現させたマウスは記憶力が上がり、カルシウム以降の経路を阻止すると記憶力が下がる。さらにLTPの誘発刺激がより強い時には、蛋白合成を伴うLTP後期相が引き続いて起こり、シナプス部位(樹状突起棘や軸索末

端)の形態が変化する。

私たちが日頃経験する記憶には、聴きとった電話番号を一時憶えておくような短期的な情報維持(短期記憶)と、数日以上、場合によっては一生続くような長期の記憶がある。前述のLTPという可塑性現象を照らし合わせてみると、数時間しか持続しない伝達効率の変化(LTP初期相)は短期記憶に対応する現象で、LTP後期相で見られるシナプスの形態変化が長期記憶に対応する現象だろう、と多くの神経科学者たちは考えている。

シナプス膜に表出するグルタミン酸受容体が増加するといった、既存の蛋白質の変化で起こる伝達効率の増大が、より安定した長期的な情報維持に転化するには、シナプス新生などの形態変化が関わっているだろうことは、すでに何十年も前から想像されてきた。したがって、LTP誘発に伴って形態変化が観察されたときには、これこそが長期記憶である、と多くの注目を集めた。ところが、1回のLTP誘発で見られる形態変化が長期記憶を説明できるほど長期間維持されるのか。実は、この点については誰も注目していなかった。本記事では、この疑問に答えるべく開始した実験から、新たに見つかった長期記憶のモデル現象を紹介する。

2. 脳切片培養系で見た真の長期的シナプス新生

長期記憶の機構解明というからには、少なくとも数週間の観察が必要だろう。私は、学生時代概日リズムの研究を行うのに、ラット脳の薄切切片の長期培養標本を用いる実験系を立ち上げた経験¹⁾から、長期記憶の研究にもこの培養脳切片が適していると考え、この標本で刺激後の長期的なシナプスの性質変化を追跡してきた。もちろん、これまでも長期記憶の解析系としては、たとえばトリの雛が孵化して最初に見た動く物体を親と見なすようになる「刷

* Keiko TOMINAGA-YOSHINO
1964年3月生
1993年九州大学大学院薬学研究科
博士課程修了
現在、大阪大学・大学院生命機能
研究科・脳神経工学講座、助教授、
薬学博士、神経生物学
TEL 06-6850-5428
FAX 06-6850-5441
E-Mail tomyk@fbs.osaka-u.ac.jp



り込み」現象などが提唱されている。しかし、細胞レベルや分子レベルで解析するには、現象が生きた動物の脳内で実験者の目と手の届かないところで進行するのではなく、実験者が神経細胞内外の条件を随意に操作でき、進行中の過程を長期に観察できる系であることが望ましい。脳切片培養系は、まさにその目的にかなった系である。

脳、とくに海馬の切片培養には、生後1週齢程度のラットが適している。細胞は分裂をおえて終位置に着いているが、まだ突起を伸ばしきっておらず、切片を作る際に受ける細胞損傷が少ないためだろう。この切片を多孔質のフッ素樹脂膜(PTFE)上におき、上では空気(湿度100%で乾燥はしない)、下では培

養培地と接する状態にして2-3週間培養すると、細胞は薄層化するが、本来の脳内回路を維持したままの、いわばミニ脳が再現される(図1)。そこで入力繊維を電気刺激すると、脳内と同様なシナプス反応が起こる。高頻度入力刺激があるとLTPも起こる。電気刺激でなくグルタミン酸ほかの薬剤で強く刺激しても、生体脳と同様にLTPが起こる。このようにして、海馬切片培養標本に1回のLTPを誘発させると、伝達強化状態は数時間までは持続した。しかし、24時間は持続しなかった²⁾。後期相LTPを1回誘発させると、いかにも意味ありげな細胞形態の変化をするのだが、それも24時間後には元に戻ってしまった³⁾。ところが、LTP誘発を24時間間隔で3回繰り返すと(それでも24時間以内にLTPは消えてしまうのだが)、何かのスイッチが入り、やがてゆっくりと伝達効率が再び増していった²⁾。そしてこのゆっくりとした伝達効率増大と平行して、組織染色や電子顕微鏡で見られるシナプス構造の数が増加した(図2)。この新生したシナプスは数週間以上維持した。私たちはこの現象を、LTPと区別して繰り返し依存性シナプス強化(Repetition-Induced Synaptic Enhancement, RISE)と呼んでいる。

ここで一時伏せておいたLTPの原義を説明しておこう。LTPとはLong-Term Potentiationの略で「長期増強」の意味である。1973年の最初の報告では、ウサギ脳に電極を埋め込み、伝達強化状態が2週間以上持続しているのを確認した。それはたしかに長期といえる。しかし、その後の実験は摘出脳で行われ、たいていは1時間、長くて3時間程度しか持続を見ずに(見られずに)、長期と呼び習わしてきた。しかし、動物内の脳と摘出脳とでは条件が違ふ。前者では刺激のあと何度同じ回路を活動させるか(何度思い出すか)は動物の勝手である。おそらく自発的に繰り返し活動し、その結果RISEが起こったのではないだろうか。

RISE成立に必要な繰り返しは2回では無効で、4回以上は3回と同程度の効果しかなかった。面白いことに、その繰り返しは、続けざまに3回では無効で、3時間以上空けて初めて有効になる。といって24時間を超えたら、やはり無効になった。ここから導かれる仮説は、1回目のLTP誘発で何かしらの蛋白質Aが作られ、そのAの寿命は24時間程度で、それがあろうちに2回目が来れば、Aが活性化され

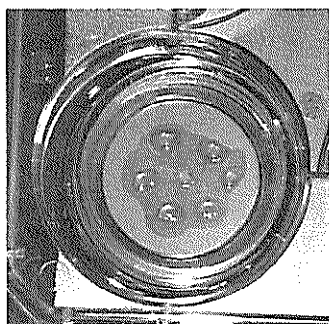


図1 フィルターカップ上で培養中の海馬切片培養週に2回の培地交換で、2ヶ月以上の培養が可能である。



図2 海馬切片培養のシナプスの電顕写真
RISEを起こした培養切片では、樹状突起棘(スパイン)上に形成されるシナプス(黒矢印)だけでなく、シナプス後膜の緻密層(PSD)が分断したシナプス(白矢印)も増加する。
スケール、1 μ m

て次の蛋白質Bが作られ、そのBがあるうちに3回目に来れば、蛋白質Cが作られて長期的シナプス新生機構のスイッチが入る、という3段階信号仮説だろう。

この仮説では、1回目の刺激がいくら強くても(Aがたくさん作られても)それだけでは無効だろうし、4回やっても3回と同じだろう。しかし、蛋白質ABCが別物なら、寿命は同じでなくてもいい。実は1回目と2回目の間は24時間以内でなくてはならないが、2回目と3回目の間は24時間以上でもよかった。また、ABCを活性化する信号系は3回とも同じでなくてもいいわけだが、実際、MAPキナーゼという信号系の阻害剤は1回目に投与しても抑制効果はないが、3回目に投与すると抑制効果を示した。ABCの実体が何かは、今のところはわからない。

3. 長期的シナプス廃止

私たちは最近さらに興味深いことを見出している。LTPはシナプス伝達が増強される方向への変化だが、LTD(Long-Term Depression, 長期抑圧)といって、LTPにはならないほどの中程度の活動(低頻度入力刺激)を行うと、逆に伝達効率が低下してそれが持続するという弱化方向への変化がある。これは忘却なのか別種の記憶なのか、生理的な意義はわかっていない。このLTDも、私たちの培養脳切片標本で起こすことができる。しかし、これも24時間以上は持続しなかった。では、RISEと同じように3回繰り返し誘発するとどうなるか。答えは、3回後も24時間で元に戻るが、その後あらためて数週間かけてゆっくりと伝達効率の弱化が進み、そのときシナプス構造は減少する、というものであった。つまり、RISEとちょうど鏡像的な、繰り返し依存的で真に長期的なシナプス弱化が起こったのである⁴⁾。

長期弱化はまだ発見したての現象で、適切な間隔はどれほどかとか、どんな方法でLTDを起こしても同じ長期シナプス弱化が起きるかとか、検討しなくてはならない課題が目白押しだが、この鏡像性が何を意味するのかを考えると、LTDの意義についてもヒントがえられるのではないだろうか。LTDやシナプス弱化がもし忘却なら、なぜ3回繰り返す必要があるのだろう。憶え込むのに繰り返しが必要

なのは、繰り返し入ってくるような重要な情報を選んで残す、という意味で合理的である。しかし、忘れるのに繰り返す必要があるだろうか。最近、1つのシナプスが高頻度活動してLTPを起こすと、グルタミン酸が溢れだして周囲のシナプスを弱く活動させLTDが起こる、という現象が報告されている。似た種類の入力の中から一つを際立たせる強調化(ハイライティング)という。あくまで想像だが、1つの神経回路にLTPが3回起こってシナプス新生が起こるなら、周囲の神経回路にLTDが3回起こるだろう。そしてシナプス廃止が起こる。これは回路としての情報の強調・チューニング過程ではないだろうか。

4. おわりに

現在、LTPやLTD成立と伴に起こるシナプス新生やシナプス廃止に関しては、盛んに研究が行われている。しかし、これまで述べてきたように、これらの即時的な形態変化は1日以上は持続しない。私たちが見出したLTP・LTDの繰り返しによって起こる長期的シナプス新生やシナプス廃止は、これらの現象とは異なる機構によって成立する現象であると考えられる。だとすれば、やはりこの現象をモデル系として機構解析することが、長期記憶の形成機構解明の近道ではないか。これらの現象は発見されてまだ数年で、今のところ取り組んでいるのは当研究室だけであるが、この記事を読まれてご興味をもたれた方から、共同研究や研究助成等のご支援をいただけたら幸いである。

文 献

- 1) Tominaga, K., Inouye, S.I.T. and Okamura, H., *Neuroscience*, 59, 1025-1042 (1994)
- 2) Tominaga-Yoshino, K., Kondo, S., Tamotsu, S. and Ogura, A., *Neurosci. Res.*, 44, 357-367 (2002)
- 3) Yamamoto, M., Urakubo, T., Tominaga-Yoshino, K. and Ogura, A., *Brain Res.*, 1042, 6-16 (2005)
- 4) Shinoda, Y., Kamikubo, Y., Egashira, Y., Tominaga-Yoshino, K. and Ogura, A., *Brain Res.*, 1042, 99-107 (2005)