

長期記憶の分子基盤

1. はじめに

ギリシャ神話において芸術の9女神が記憶の女神から誕生したように、記憶はあらゆる精神活動の基盤であるように思える。私たちは日常生活でごく当たり前のように、経験を通じて学習し、それを記憶として脳内に貯え、必要に応じて引き出すという操作を行っているが、これは実に驚異的な能力である。現代神経科学において、この能力は“経験（神経活動）依存的な神経回路の変化（可塑性）”によるものであると考えられている。そこで「具体的に、どの神経回路でいかなる変化が起きているのか？」を解明することが最も重要な課題の一つである。

脳は千億もの神経細胞が千兆ものシナプスを介して互いに連絡を取り合っている複雑精緻な回路を持つシステムであると同時に、巧妙な仕掛けを持つ分子機械でもある。従って、その働きを理解するには、動物個体を用いたシステムレベルと分子レベルでの複合研究が不可欠である。近年の遺伝子改変動物やイメージング技術の発展に伴い、分子や回路と行動をつなぐ行動遺伝学、神経回路遺伝学といった新しいアプローチが出現してきた。本稿では誌面の都合上、遺伝子改変マウスを用いた筆者らの最新の研究^{1,2)}を紹介し、長期記憶の分子基盤のごく限られた側面と展望について概説する。

2. 短期記憶と長期記憶

記憶には、しばらくすると忘れてしまう短期記憶と、生涯忘れないような長期記憶の2種類が少なくとも存在することを誰もが経験的にご存知であろう。では一体、短期記憶が長期記憶に変わる引き金は何なのであろうか。これまでに転写阻害剤、タンパク質合成阻害剤の投与、そしてCREB (cAMP response element binding protein), PKA (protein kinase A) などの遺伝子の働きが抑制されたマウスを用いた研究から、長期記憶の形成には新たな遺伝子発現とタンパク質合成が必要であることが明らかになっている³⁾。つまり、短期記憶がシナプスの一時的な変化（既存のシナプスタンパク質の修飾や局在変化など）によるのに対して、長期記憶は新たなタンパク質の合成を伴う安定的な変化によるものであると考えられている。

3. 活動依存的な AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス移行とシナプス可塑性、記憶形成

記憶の形成には、特定神経回路の伝達効率が増える必要があると考えられている。哺乳類の中枢神経系では、主にグルタミン酸が興奮性の神経伝達物質として働いているが、伝達効率を上げる一つの方法は、そのシナプスにおける受容体の数を増やすことである。イオン作動性のグルタミン酸受容体には *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) 型、カニン酸型があるが、AMPA 型受容体 (AMPA-R) がほとんどの速いシナプス伝達を担っている。AMPA-R には GluR1~4 の四つのサブユニットが存在するが、特に GluR1 を含む AMPA-R が神経活動依存的にシナプスに移行することが、2光子顕微鏡を用いた海馬スライス標本での観察

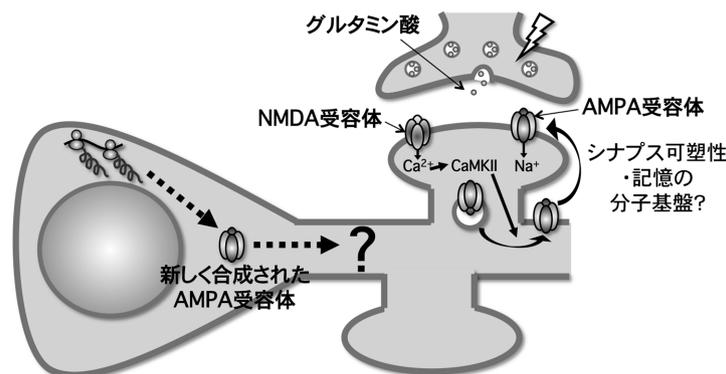


図1 神経活動依存的な AMPA 受容体のシナプス移行と新しく合成された AMPA 受容体の挙動

や、電気生理学的な実験により示されている⁴⁾。こういった状況から、活動依存的な AMPA-R のシナプス移行がシナプス可塑性、ひいては記憶の主要な分子基盤の一つであると想像される(図 1)。しかし、この活動依存的な AMPA-R のシナプス移行は分単位で見られる速い現象で、シナプス近傍に既に存在する AMPA-R が動員された結果であると考えられる。つまり、タンパク質の新規合成を必要としない現象である。では、新たなタンパク質合成を要する late-phase long-term potentiation (L-LTP) や長期記憶の維持にはどのようなメカニズムが働いているのであろうか。

4. シナプスタグ仮説

海馬スライス標本を用いた実験で、LTP 誘導 3 時間後に AMPA-R の合成が亢進しているという報告⁵⁾があることから、新しく合成された AMPA-R が LTP や長期記憶の維持に関与している可能性が示唆される。しかし、AMPA-R を含めてシナプス可塑性に関与する多くのタンパク質の合成は主にシナプスから遠く離れた細胞体で行われる。また、各シナプスは基本的に独立した入力特異性を持つ。そこで一つの素朴な疑問が生じる。それは「神経活動刺激により細胞体で新しく合成されたタンパク質が、どのようにして任意の記憶に関与する特定のシナプスに選択的に運ばれるのか?」というものである。この重要な問題を解決する一つの可能性として、Frey と Morris は「synaptic tag 仮説」を提唱した⁶⁾。この仮説では、活性化したシナプスにはタグ(標識)が形成され、細胞体から運ばれてきたタンパク質はタグが存在するシナプスに遭遇するとそこに取り込まれる。但し、この仮説は海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析の結果から得られたものであり、タグの実体はおろか、タグによって取り込まれる具体的なタンパク質、実際に動物が長期記憶を形成する際にも同様のメカニズムが働いているのかどうかさえ不明である。そこで筆者らは green fluorescent protein (GFP) 融合 GluR1 タンパク質 (GFP-GluR1) を発現する遺伝子改変マウスを利用した研究を行った¹⁾。

5. 遺伝子改変マウスの利用

分子と行動を繋ぐ研究のために、遺伝子改変マウスが導入され始めてからおよそ 15 年が経つ。当初は単純な遺伝子ノックアウトであったのが、現在では遺伝子発現を脳領域・細胞種特異的や誘導的に操作する様々な方法が開発されている。誘導系で頻繁に用いられるのはテトラサイクリン系であるが、この系では任意のプロモーターの下流で

tTA (tetracycline-regulated transactivator) と呼ばれる人工的な転写因子を発現するトランスジーンと、tetO プロモーターの下流で目的の遺伝子が発現するトランスジーンの種類を必要とする。これらのトランスジーンを持つ二重トランスジェニック (Tg) マウスにおいて、ドキシサイクリン (Dox) の非存在下で tTA は tetO プロモーターに結合することができるので、目的遺伝子の発現が誘導される。一方、Dox の存在下では tTA の働きが阻害されるので、目的遺伝子の発現は抑制される。このように、この系を用いることによりプロモーター次第で任意の領域・時期に、任意の遺伝子操作を動物個体で誘導的に行うことが可能となる⁷⁾。

筆者らはこの系を利用して、任意の行動刺激によって活動した神経細胞集団選択的に遺伝子操作を行うために、immediate-early genes (最初期遺伝子群) の一つ *c-fos* 遺伝子のプロモーター制御下で tTA を発現する Tg マウスを開発した²⁾。更に、このマウスと tetO プロモーター下で GFP-GluR1 を発現する Tg マウスを掛け合わせた二重 Tg マウスを得 (GFP-GluR1^{c-fos} マウス)¹⁾、学習時に細胞体で新しく合成された GFP-GluR1 の挙動を、時間経過を追って観察することを試みた (図 2, 3)。

6. 恐怖条件付け学習に伴い新しく合成された AMPA-R のスパイン形態選択的な取り込み

Dox 入り餌の飼育下では、GFP-GluR1^{c-fos} マウスの海馬において GFP-GluR1 の発現はほとんど検出されなかった(図 2B)。次に Dox 抜き餌飼育 4 日後に、海馬と扁桃体依存的である文脈の恐怖条件付け学習を行った。マウスを条件付け装置に入れ、数分間の自由探索後に弱い電気刺激を装置の床に与えると、動物はその装置内の環境(文脈)と電気刺激とを関連づけた連合学習を行う。動物を再び同じ装置内に戻すと、電気刺激が無くても恐怖(すくみ)反応を示すことから、文脈的恐怖記憶が形成・維持されていることが容易に確認できる。この条件付け学習により長期記憶を形成させると同時に、新しい GFP-GluR1 の合成を活性化した神経細胞内で誘導し、6 時間後には海馬 CA1 錐体細胞において樹状突起末端まで輸送されていることを確認した。

恐怖条件付けの 24 時間後と 72 時間後に脳スライスを作製・固定し、学習刺激により新しく合成された GFP-GluR1 の海馬 CA1 錐体細胞での局在の観察を共焦点顕微鏡を用いて行った(図 3)。樹状突起やスパインの可視化には、脂溶性蛍光色素 DiI を用いた。樹状突起表面に存在するス

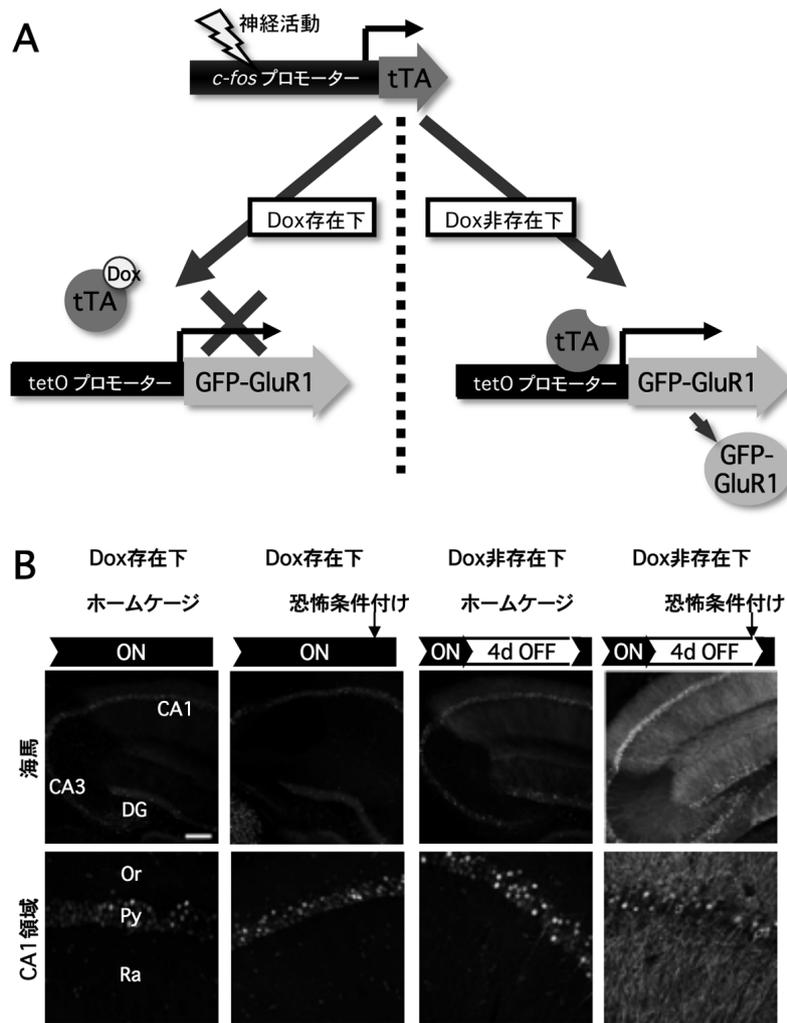


図 2 誘導的かつ神経活動依存的な GFP-GluR1 の発現

(A) テトラサイクリン誘導系と神経活動依存的に活性化する *c-fos* プロモーターを利用した GFP-GluR1 の発現系の模式図。(B) Dox 餌飼育下では、脳内での GFP-GluR1 の発現は抑制されている。一方、Dox 抜き餌飼育 4 日後に恐怖条件付けを行い 24 時間後に観察すると、約 25% の海馬 CA1 錐体細胞に GFP-GluR1 の発現が検出される。DG, dentate gyrus; Or, stratum oriens; Py, stratum pyramidale; Ra, stratum radiatum

パインはアクチン線維に富んだ動的な微小棘状構造体で、興奮性の後シナプスを構成する。その形態は極めて多様であり“thin (細長) 型”“stubby (切り株) 型”“mushroom (きのこ) 型”に大別されるが (図 3B), 機能的意義については議論的である⁸⁾。

筆者らは GFP-GluR1 シグナルが検出されるスパインの割合を計測し、各形態ごとに解析を行った (図 3C)。その結果、学習群マウスの mushroom 型スパインでは非学習群のものと比較して GFP-GluR1 陽性スパインの割合が顕著

に高いことが明らかになった。一方 thin 型, stubby 型では有意差は見られなかった。72 時間後の mushroom 型では有意差は認められなかった。

これらの結果は少なくとも二つの重要な意義を示唆している。まず、新しく細胞体で合成された GFP-GluR1 が 24 時間後に学習履歴依存的にシナプ스에動員されていたことは (図 3D), “synaptic tag 仮説”と矛盾しない結果である。つまり、*in vivo* においても “synaptic tag” のようなメカニズムが存在し、長期記憶の形成・維持に貢献していること

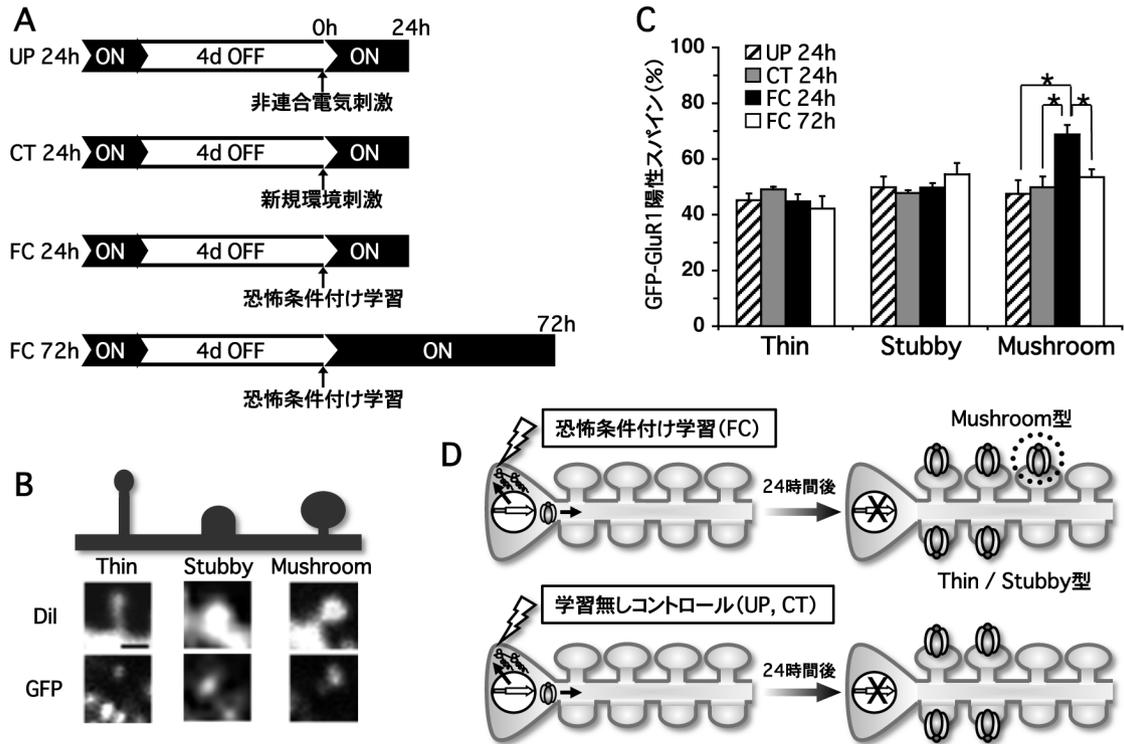


図3 恐怖条件付け学習に伴い新しく合成された AMPA 受容体のスパイン形態選択的な取り込み
 (A) 実験プロトコル。UP, unpaired (非連合電気刺激群)；CT, context exposure (新規環境刺激群)；FC, fear conditioned (恐怖条件付け学習群)。(B) Dii によるスパイン形態の可視化と GFP-GluR1 の局在。(C) 海馬 CA1 錐体細胞の先端樹状突起における GFP-GluR1 陽性スパインの割合。(D) 実験結果のモデル図。細胞体で新しく合成された AMPA 受容体を 24 時間経過後も取り込み維持する synaptic tag の形成のような何らかの持続的な変化が、恐怖条件付け学習時に一部のシナプスにおいて生じることが示唆される。

が示唆される。二つ目は、学習依存的な GFP-GluR1 のシナプス動員がスパイン形態選択的であることの示唆である。GFP-GluR1 が最初から mushroom 型に動員されるのか、GFP-GluR1 が取り込まれたスパインが最終的に mushroom 型に変化するのか？など、そのメカニズムや意義に関しては更なる研究が必要であるが、多様なスパイン形態に *in vivo* での機能的差異があることが示された。

7. おわりに

記憶学習を研究する多くの者にとって「特定の神経回路の電氣的活動がどのようにして「記憶」として表現されるのか？」という基本動作原理の解明が最終目標の一つであろう。そこに辿り着くには遙かな道程があるが、ある特定の分子に着目した研究のみならず、システムレベルでの研究が不可欠なのは明白である。例えば、筆者らは Tg マウスを用いて、記憶の記録と想起に関与する神経細胞集団をそれぞれ標識することにより、両過程で共に活動する神経

細胞集団の可視化同定を可能にし、記憶痕跡の所在を示唆する研究を行った²⁾。また、チャンネルロドプシン⁹⁾のような新しい分子ツールの開発は大きな可能性を与えてくれる。分子遺伝学、蛍光タンパク質、イメージング技術などの技術的發展が遺伝子改変マウスを用いた研究に更なる有用性をもたらし、記憶学習のメカニズム解明に大きく貢献できると信じている。

- 1) Matsuo, N., Reijmers, L., & Mayford, M. (2008) *Science*, 319, 1104–1110.
- 2) Reijmers, L.G., Perkins, B.L., Matsuo, N., & Mayford, M. (2007) *Science*, 317, 1230–1233.
- 3) Dudai, Y. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12, 211–216.
- 4) Malinow, R. & Malenka, R.C. (2002) *Annu. Rev. Neurosci.*, 25, 103–126.
- 5) Nayak, A., Zastrow, D.J., Lickteig, R., Zahniser, N.R., & Browning, M.D. (1998) *Nature*, 394, 680–683.
- 6) Frey, U. & Morris, R.G. (1997) *Nature*, 385, 533–536.
- 7) Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R. D., & Kandel, E.R. (1996) *Science*, 274, 1678–1683.

- 8) Bourne, J. & Harris, K.M. (2007) *Curr. Opin. Neurobiol.*, 17, 381–386.
 9) Zhang, F., Aravanis, A.M., Adamantidis, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 577–581.

松尾 直毅

(藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
システム医科学研究部門)

Molecular basis of long-term memory

Naoki Matsuo (Division of Systems Medical Science, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan)

廃用性筋萎縮の治療ターゲットとしての ユビキチンリガーゼ

1. はじめに

高齢者社会を迎えている我が国では、寝たきりなど筋肉を使用しないことによる筋萎縮（廃用性筋萎縮）が、大きな社会問題の一つになっている。近年、なぜ廃用性筋萎縮が起こるのか（なぜ筋肉は使用しないと萎縮するのか？）が、明らかになりつつある。本稿では、そのメカニズムとそれに基づいた廃用性筋萎縮に対する治療について概説したい。

2. 廃用性筋萎縮の分子メカニズム

骨格筋は、運動器の活動状態（機械的ストレス）の影響を最も受けやすい器官であり、身体活動の程度によりそれらの量を変化しうる。例えば、宇宙フライトや寝たきりにより筋量が著明に減少する一方、運動トレーニングによりそれらの量を増大できる。廃用性筋萎縮は、宇宙のような無重力環境で最も起こりやすい。たしかに、地上においてもギプス固定や実験動物の後肢懸垂などでも廃用性筋萎縮は発症するが、萎縮の速度や程度はともに3倍ほど強い。そこで、私はJAXA（宇宙航空研究開発機構）と共同で、宇宙に約2週間滞在した宇宙ラットの骨格筋を用い、萎縮した骨格筋にどのような変化が起こっているのかを調べた。

骨格筋の構成タンパク質を分解する経路には、カテプシン群のリソソーム経路、カルパインによるカルシウム依存

性経路、ユビキチン化タンパク質を分解するプロテアソーム経路がある。宇宙フライトで萎縮した骨格筋では、ユビキチン化したタンパク質の集積、プロテアソーム活性の上昇、ユビキチン発現の亢進などがみられ、ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解経路が最も重要な働きをしていることが示唆された¹⁾。

ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解経路について簡単に説明する。この経路はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) とユビキチンリガーゼ (E3) の酵素群からなるユビキチン化システム（分解すべきタンパク質にポリユビキチンを連結する）と、ポリユビキチンを認識して分解する 26S プロテアソームの二つの系からなる。基質の特異性を決定するユビキチンリガーゼの発現がこのシステムの律速段階であると考えられている。宇宙ラットの萎縮した骨格筋で発現の上昇しているユビキチンリガーゼを網羅的に解析したところ、*Cbl-b*、*MuRF-1*、*Siah-1A* と *MAFbx-1/atrogin-1*（この遺伝子だけは、当時我々の用いた Chip にはまだ載っていなかった。論文が発表された後に、解析すると約 20 倍の発現上昇が見られた。残念!!）であった²⁾。

MuRF-1 と *MAFbx-1/atrogin-1* など筋萎縮原因遺伝子 (atrogenes) が³⁾、21 世紀に入り DNA マイクロアレイ法により相次いで発見された^{3,4)}。これらは、坐骨神経を切除すると発現が上昇する骨格筋および心筋に特異的なユビキチンリガーゼ群である。さらに、それぞれの遺伝子をノックアウトしたマウスが坐骨神経切除による筋萎縮に抵抗性を示すことより、筋萎縮原因遺伝子であると証明された。その後の研究により、運動による筋肥大と廃用性筋萎縮は、**図 1** に示すような機構により誘導されていると考えられている。筋細胞の最も強力な栄養因子は、IGF-1 (insulin-like growth factor-1) であるが、筋萎縮環境に無い場合は、そのシグナルが十分に活性化され、筋タンパク質合成は亢進し筋タンパク質分解は抑制される⁵⁾。しかしながら、筋萎縮環境にある場合では IGF-1 のシグナルが減弱し、Akt-1/PKB (protein kinase B) の活性化 (リン酸化) が傷害される。その結果、筋タンパク質合成が低下し、逆に筋タンパク質分解は亢進する。興味深いのは、筋タンパク質分解である。先に示した atrogenes の発現はともに、Akt-1/PKB の下流にある FOXO (forkhead box O) 転写因子により制御されている。つまり、Akt-1/PKB の活性化が低下するとリン酸化しなかった FOXO 転写因子が核内に移行し、atrogenes の転写を高めると考えられている。これら atrogenes の生化学的特性については以下に詳しく述べる。