

## 学習・記憶の細胞基盤：シナプス・アンサンブル

小尾 紀翔<sup>1</sup>，白井 福寿<sup>1</sup>，林（高木） 朗子<sup>1,2</sup>

### 1. はじめに

我々の個性を形作るものは何かといえば、記憶であるといっても過言ではないだろう。なぜならば、記憶とは我々が生まれてから今日までに誰と何をして、何を学んできたかという情報や知識の蓄積であり、これらを失ったならば、我々の個性は大きく変容するからである。この記憶はどこに保存されているのか、神経科学者は数十年にもわたり膨大な実験を繰り返してきた。その結果、比較的広範囲の脳領域における特定の神経細胞群（セル・アンサンブル）がある一定のパターンで発火することにより、記憶が想起できると考えられてきたが、学習・記憶の過程でどのように特定のセル・アンサンブルが選択され、記憶として定着するのかは多くの部分が未解明であった。しかし、昨今の目覚ましい最先端技法により、新規のセル・アンサンブル形成のためには、特定のシナプス群の可塑的变化（シナプス・アンサンブル）による大規模な神経回路改編が必要であり、このようなシナプス・アンサンブルを光学的に破壊すると記憶の想起が障害されることが明らかになってきた。本稿では、学習や記憶の基盤となる細胞レベルでのメカニズムについてのエビデンスを概説し、我々が提唱するシナプス・アンサンブルについて考察する。

### 2. セル・アンサンブル：細胞レベルにおける記憶基盤となるか？

学習や記憶がシナプス強度の変化に由来するという説は20世紀初頭の巨星 Ramón y Cajal によって初めて提唱された。当時、脳は神経細胞が網目状に連続的につながった一体であるという網状説が支持されていたが、Cajal は神

経細胞と神経細胞はシナプスと呼ばれる間隙によって隔てられ、ここで連続性が失われていると主張した<sup>1)</sup>。この仮説はニューロン説と呼ばれ、現代神経科学の基本的原理となっているが、発表された当時は大きな論争を呼び、最終的にニューロン説の正しさが証明されたのは電子顕微鏡の発明によってシナプス間隙が記載された1955年のことであった。Cajal は半世紀以上前にシナプスの存在を予見しただけではなく、情報伝達は軸索からシナプスを介して樹状突起へと伝えられ、もし脳に可塑的变化が起こるとしたら、それはシナプス接続の強度変化（シナプス可塑性）によるものだろうと、明確に予見していた。その後、Cajal のシナプス可塑性に対する仮説は、科学史に名を残す偉大な神経心理学者である Donald Hebb によってニューラルネットワーク研究として発展した<sup>2)</sup>。当時、心理学では行動主義学派が浸透してきた時代で、行動はある刺激に対する反射か、もしくは報酬（快の刺激を得られる正の強化子）や罰（不快な刺激を与える負の強化子）による個々の経験が行動の発現・形成を条件づけするというのが、彼らの考え方であった。一方で同時期、ゲシュタルト心理学・場の理論というまったく異なる理論も台頭しており、この理論によると、行動や心理現象は細かな要素の単なる合計として説明するにはあまりにも多様かつ複雑で、全体として一つの間を形成し、その内部は電気的活動の伝達や相互作用で力動的に関与しあっているものであるとした。1949年、Hebb はラットやヒト患者の行動の観察結果から、上記の二つの異なる理論を調和させた Hebb 則を提唱した。*“When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.”* これは Lowel と Singer によって *“neurons that fire together, wire together”* と頻繁に目にする謳い文句として表現されることとなる。さらに、Hebb は *“a diffuse structure comprising cells in the cortex and diencephalon, capable of acting briefly as a closed system, delivering facilitation to other such systems. Depending on functional requirements, individual cells could participate in different cell assemblies and be involved in multiple computations.”* と定義される「セル・アンサンブル」という概念を提唱した。Hebb がこの原理を発表した当時はまだシナプス自体が可視化されておらず、それにも関わらず

<sup>1</sup>群馬大学・生体調節研究所・脳病態制御分野（〒371-8512 群馬県前橋市昭和町3-39-15）

<sup>2</sup>JST・さががけ

**Synaptic ensemble underlying learning and memory**  
Kisho Obi<sup>1</sup>, Fukutoshi Shirai<sup>1</sup> and Akiko Hayashi-Takagi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Lab of Medical Neuroscience, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi city, Gunma 371-8512, Japan, <sup>2</sup>JST-Presto)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890546

© 2017 公益社団法人日本生化学会

Hebb則で得られる推測や特性は神経科学界にとって大きな衝撃を与えた。しかし、この仮説を証明する上での障壁は、行動下の動物で単一シナプスの活性を直接測定することが困難なことにあったが、多くの研究者がさまざまな電気刺激や学習の前後でのシナプス伝達効率の変化を検証した。そうした研究の中でHebb則の条件を最も満たすものとして注目された現象は、Lomoらによって見いだされた長期増強 (long-term potentiation : LTP) であった。当時、軸索を高頻度で刺激すると、シナプス後細胞の発火頻度が増加する頻度増強作用という現象が知られており、Lomoは高頻度刺激でシナプス後細胞にどのような変化がみられるかを麻酔下のウサギの海馬歯状回を用いて検証していた。彼にも予想外なことに、高頻度刺激によってシナプス後細胞集団の単一パルス刺激に対する応答が長期にわたって向上することを発見した。1966年に初めて発表された彼の仕事は彼の大学院生時代の仕事であった<sup>3)</sup>。しかし、この大発見も当時はEccles (1963年にノーベル医学生理学賞受賞) らに、“*the most unsatisfactory feature of the attempt to explain the phenomena of learning and conditioning by the demonstrated changes in synaptic efficacy is that long periods of excess use or disuse are required in order to produce detectable synaptic change*”と批評され、学習・記憶のメカニズムとは認識されなかった。一方で、LTPは高頻度の電気刺激に続いて生じる長期的なシナプス伝達効率の増強と定義され、さまざまな脳領域でHebb則に従うLTPが続々と観察された。そして、記憶形成には海馬でのLTPと強い相関があるため、LTPおよび他のシナプス可塑性が学習や記憶の基盤にあるのではないかと考えられるようになったが、これらの新しい知見はさらなる問題を研究者たちに突きつけることとなった。その問いとは、学習時の感覚情報はどのように処理されて神経回路におけるシナプス可塑性として統合され、どのように最終的な行動へ影響するのかということであった。Kandelらは徹底した還元主義的思想に則り、単純なモデル動物であるアメフラシを使用することで、シナプス可塑性から行動まで一元的に解明することに挑戦した。アメフラシは神経系が非常に単純であり、各神経細胞は目視できるほど大きいので、分子的・薬理的介入下で電気生理的な解析が精力的に行われ、さまざまなシナプス可塑性が、馴化や感作、古典的条件づけに関連することが明らかにされた<sup>4)</sup>。さらに、近年の光学イメージングの進歩によってげっ歯類や霊長類においても神経活動とさまざまな行動変化とを対応させた研究が可能になった。たとえば、細胞内カルシウムセンサーと *in vivo* 2光子イメージングを組み合わせることで、行動中の動物での神経活動の空間的分布を経時的に追跡し、運動野での運動学習時の神経活動変化を可視化できるようになった。一方で、多くの優れた研究によってセル・アンサンブルの形成と学習の

相関関係が示されたものの、両者の因果関係を示すことは依然として困難であった。しかし、光遺伝学や薬理遺伝学のような最先端の細胞操作技術によって、Cajalに始まる約1世紀にもわたる問い、シナプス可塑性によるセル・アンサンブルの変化は学習や記憶の基盤となるか? という問いに対する決定的な解答を得る機会がもたらされた。

### 3. セル・アンサンブル操作のための最先端技術

光遺伝学は、光学と遺伝工学の利点を活用し開発された強力なツールである<sup>5)</sup>。光照射により陽イオンを細胞内へ流入させて脱分極を誘導する channelrhodopsin-2 (ChR2) や、反対に archaerhodopsin-3 (Arch) のように過分極を誘導する膜タンパク質が次々と創出され、光による神経活動の活性化や抑制、同調状態の制御が可能になって初めて、神経ネットワークと学習・記憶との因果関係に関するエビデンスが報告されるようになった。これまで非常に多くのすばらしい研究が報告されており、すべてを網羅することは紙面の関係で不可能であるため、恐怖記憶に関するいくつかの代表的な研究に焦点を当てる。

恐怖記憶が扁桃体で制御されていることはヒト患者研究や動物モデルによりよく知られているが、発生学的にも機能的にも異なる複数の神経核の集合である扁桃体の、どの神経核によるどの神経回路が情動記憶に関与するかは明らかではなかった<sup>6)</sup>。神経回路特異的に光操作することは光遺伝学の利点であり、扁桃体基底外側核から中心核への神経回路 (BLA-CeA 経路) や、基底外側核から側坐核への神経回路 (BLA-NAc 経路) を ChR2 により特異的に刺激することによって、BLA-CeA 経路が恐怖記憶学習を、BLA-NAc 経路が報酬記憶を制御し、扁桃体内の特定の神経回路におけるシナプス可塑性が、恐怖や報酬に関連する異なる行動の根底にあることを示した<sup>7)</sup>。同様に、海馬は恐怖文脈条件づけと呼ばれる恐怖記憶の形成に必須とされており、利根川らは神経活動依存的な発現プロモーターを用いて条件づけのときに活動した海馬のセル・アンサンブルだけを ChR2 で活性化させた<sup>8)</sup>。言い換えれば、この光操作によって、条件づけ時に活性化した特定のセル・アンサンブルが記憶の想起に十分であることを直接検証できることを意味しており、実際に、これらの光操作は恐怖記憶を反映するすくみ反応を誘導し、条件づけで活性化したセル・アンサンブルが記憶に寄与するという因果関係を示した。しかし、利根川らは、この知見だけでは満足しなかった。なぜなら、この研究を含む従来の記憶研究は、実験者が記憶を測定できるのは行動としての表現型であるということ、つまり、動物が記憶障害を呈した場合、記憶の記録、保持、想起のどの過程が影響されたかを示すことは困難であるという点である。そこで、同グループは、低用

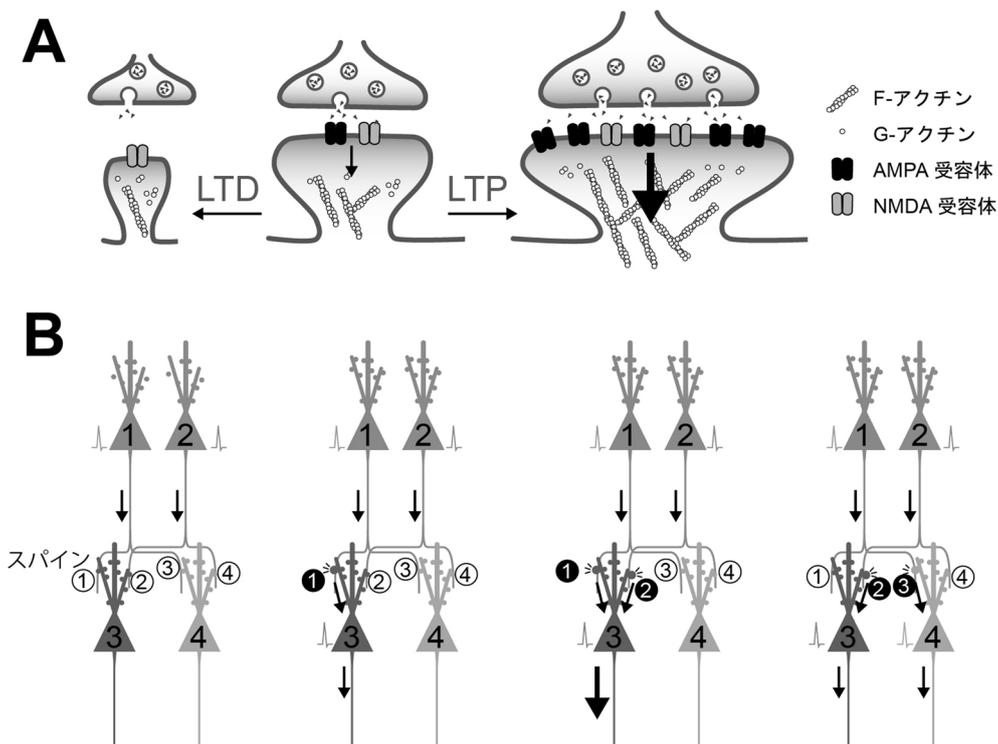


図1 シナプス可塑性

(A)長期増強 (LTP) と長期抑圧 (LTD)。さまざまな刺激により樹状突起スパインは形態可塑性を示し、それとともにアクチンの脱重合やシナプス表面のAMPA受容体が増減する。(B)増強(脱増強)によって規定されるシナプスの重みづけは図に示すような回路のスカラール量, 上流で活性化されるセル・アンサンブルに応じて規定される。スパイン①が増強されたとき, 神経細胞#3の発火確率は増加し, 加えてスパイン②が増強され神経細胞#1, 2, 3が同じセル・アンサンブルに組み込まれると, 神経細胞#3はより発火しやすい状態となる。スパイン③が増強され, 神経細胞#4はセル・アンサンブルに組み込まれる確率が上がる。

量のタンパク質合成阻害剤はシナプス増強を阻害する一方で, 神経活動依存的なセル・アンサンブルは標識できることを利用して, 上述の問いに対して重要な示唆を与えた。低用量のタンパク質合成阻害剤によりマウスは恐怖学習を想起することができないが, 学習時にChR2で標識されたセル・アンサンブルを光で直接活性化させるとすくみ反応を誘発した<sup>9)</sup>。これは適切なセル・アンサンブルを光操作できる場合には, シナプス増強は必須ではないものの, 生理的な状況下では学習に伴うシナプス増強が関連するセル・アンサンブルの活性化に必要な機構となっていることを意味している。もしそうであるならば, シナプス可塑性は, 記憶の記録, 保持, 想起に関与するといえる。実際に, シナプス伝達の増強・抑圧は神経回路内の接続強度を変化させ(図1A), 脳内に分布する膨大な数の神経細胞の中より特定のセル・アンサンブルを選択・強化することも言い換えることができ, そしてこれこそがシナプスが記憶の基本素子だと考えられる理由の一つである(図1B)。

#### 4. セル・アンサンブルを規定するシナプス・アンサンブル

先述のとおり, Cajalは1世紀も前に, 記憶形成はシナプス伝達強度の変化によると予見した。哺乳類の大脳新皮質では, 興奮性シナプスの約80%は樹状突起スパインと呼ばれる樹状突起上の構造物上に形成される<sup>10, 11)</sup>。グルタミン酸アンケーシング法による単一スパイン刺激と電気生理記録を組み合わせた実験によって, スパインヘッドの大きさはシナプス後膜肥厚(PSD)領域やAMPA受容体を介した興奮性シナプス後電流(EPSC)の大きさと強い正の相関を持つことが明らかにされたこともあり<sup>12)</sup>。スパインの形態可塑性はシナプスの機能と密接に関係していることが示唆されている(図1A)。また実際に2光子励起イメージング法を用いることで, 生体内のスパインの形態可塑性を同一個体で経時的に観察できるようになり, 感覚刺激や学習・記憶の過程といったLTPを誘導するような刺激に応じてスパインは急速に増大もしくは新生され, 対照的に長期抑圧(long-term depression: LTD)を誘導するような刺激はスパインヘッドの縮小やスパインの喪失を促進す

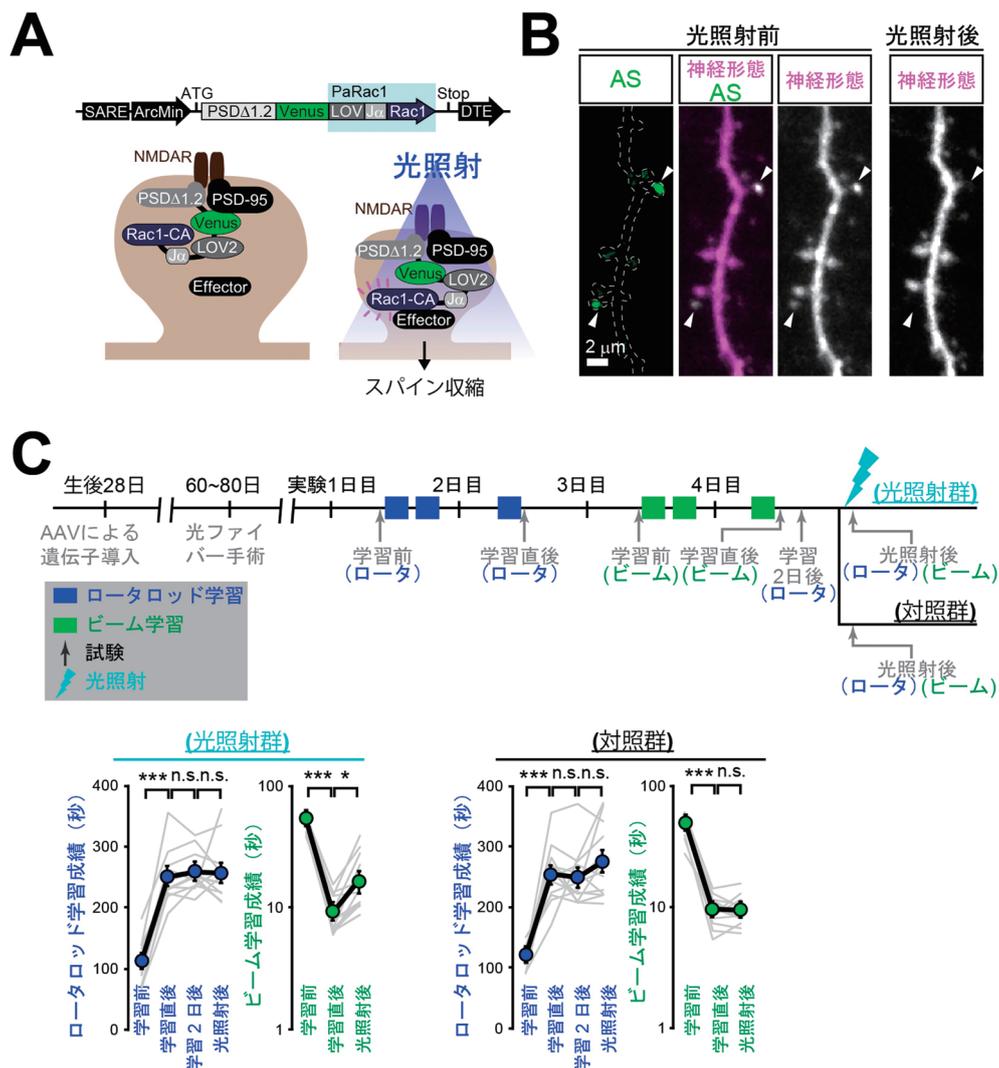


図2 AS-PaRac1によるシナプスの選択的標識と収縮

(A) AS-PaRac1ベクターの概要図。SAREとArc minimal promoterによって転写制御される。LOV2ドメインは恒常的活性化型Rac1 (Rac1-CA)のN末端側に付加され、光照射によってJ $\alpha$ ヘリックス構造が解消されるまで、Rac1とエフェクター (Effector) の結合を阻害し、機能を抑制する。(B)光照射によるAS-PaRac1陽性スパイン (AS)の収縮 (矢頭)。海馬スライスカルチャー (DIV11)にAS-PaRac1と形態マーカーを導入した。AS-PaRac1陽性スパインは光照射により収縮したが、周囲のAS-PaRac1陰性スパインは影響を受けなかった。(C)光照射によるシナプス・アンサンブルの破壊と学習。ロータロッド学習とビーム学習を連続で負荷する。AS-PaRac1の標識効果は約1日であることより、実験4日目の光照射はビーム学習で標識されたシナプス・アンサンブルを特異的に破壊する。光照射はビーム学習成績だけを障害し、ロータロッド成績には影響を与えなかった。\*\*\*P<0.002, 一元配置反復測定分散分析後、ボンフェローニ検定。

ることも明らかになってきた<sup>13)</sup>。しかしながら、スパイン形成の程度と学習の到達度・維持とが関連しているということが示された一方で、生きた動物の脳内において特定のスパイン群を大規模に操作することが不可能であったため、シナプスの可塑性が本当に学習・記憶の細胞基盤であるかは直接的に証明することはできなかった。この問題を克服するため、我々はAS-PaRac1 (Activated Synapse targeting PhotoActivatable Rac1) という新たなシナプスオプトプローブを開発した<sup>14)</sup> (図2A)。AS-PaRac1はPSD-

95, Venus, PaRac1<sup>15)</sup>、Arc遺伝子の5'と3'末端の非翻訳領域 (UTR) からなる融合タンパク質である。このAS-PaRac1は、約1日以内に増強 (増大もしくは新規形成) されたスパインに特異的に集積する性質を持つため、AS-PaRac1の蛍光を頼りに *in vivo* 脳において増強したシナプス群が可視化できる。実際に、第一次運動野にAS-PaRac1を遺伝子導入したマウスにロータロッド運動学習を負荷し、第一次運動野において増強したスパインをマッピングした。その結果、II/III層では $2.3 \pm 0.13\%$ のスパインがAS-PaRac1で標識

されていた。神経細胞ごとにAS-PaRac1の標識の違いを検証したところ、少数(16.4±2.8%)の神経細胞のスパインが比較的大規模に(14.7±2.0%)増強していることが明らかになった。これはこの学習負荷課題においては、シナプス増強は多くの神経細胞に少量ずつ惹起されているのではなく、比較的少数の神経細胞が大規模に改変されていることを示している。このようにAS-PaRac1はシナプス増強の大規模な可視化を可能としたことに加えて、可視化されたスパインに青色光を照射することでそのスパインを特異的に収縮させる特徴(図2B)を持つ。つまり、1日以内に増強されたスパインのみを選択的に収縮し、その結果、行動にいかなる変化が誘発されるかを定量的に計測できるわけである。実際に、運動学習によって向上したロータロッド試験成績は光操作により有意に低下した。そして特筆すべきは、同じ皮質領域におけるロータロッド学習とは別の運動学習課題であるビーム学習で標識されたシナプス・アンサンブルを光操作してもロータロッド試験成績は変わらなかった(図2C)。ロータロッド学習とビーム学習をさせたときのシナプス・アンサンブルを*in vivo* 2光子イメージングによりマッピングしたところ、ビーム学習で増強されたスパインは、事前に学習させたロータロッド学習とは関連のない新しい増強スパインが有意に多く、一方で同じ運動学習を再度学習させた場合には、同じシナプス・アンサンブルが増強されることがわかった。これらのイメージングと行動実験の結果を合わせて考えると、学習・記憶の過程では、各々の学習に対応するシナプス・アンサンブルが強化され、その結果、新しいセル・アンサンブルが形成されることを示唆している。このようなシナプス感受性光プローブは、脳透明化技術や全脳レベルのビッグデータ画像

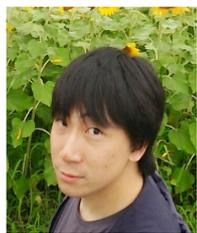
解析を併用することにより、生理的条件におけるシナプス可塑性だけではなく、さまざまな疾患モデル動物における可塑性異常を大規模にマッピングすることを可能にするだろう。

## 文 献

- 1) Cajal, S.R. (1894) *Proc. R. Soc. Lond.*, **55**, 444–468.
- 2) Brown, R.E. & Milner, P.M. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 1013–1019.
- 3) Lomo, T. (1966) *Acta Physiol. Scand.*, **68**(Suppl. 277), 128.
- 4) Kandel, E.R. (2001) *Science*, **294**, 1030–1038.
- 5) Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005) *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263–1268.
- 6) Herry, C. & Johansen, J.P. (2014) *Nat. Neurosci.*, **17**, 1644–1654.
- 7) Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoun, G.G., Halbert, S.A., Wichmann, R., Holden, S.S., Mertens, K.L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A.C., Wickersham, I.R., Gray, J.M., & Tye, K.M. (2015) *Nature*, **520**, 675–678.
- 8) Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012) *Nature*, **484**, 381–385.
- 9) Ryan, T.J., Roy, D.S., Pignatelli, M., Arons, A., & Tonegawa, S. (2015) *Science*, **348**, 1007–1013.
- 10) Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010) *Trends Neurosci.*, **33**, 121–129.
- 11) Yuste, R. & Bonhoeffer, T. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 1071–1089.
- 12) Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., & Kasai, H. (2004) *Nature*, **429**, 761–766.
- 13) Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M.M. (2004) *Neuron*, **44**, 749–757.
- 14) Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y.I., Loshbaugh, A.L., Kuhlman, B., Hahn, K.M., & Kasai, H. (2015) *Nature*, **525**, 333–338.
- 15) Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., & Hahn, K.M. (2009) *Nature*, **461**, 104–108.

## 著者寸描

### ●小尾 紀翔 (おび きしょう)



群馬大学大学院医学系研究科生体調節研究所脳病態制御分野大学院生(博士課程1年)、学士(医学)。

■略歴 1991年秋田県に生まれた後、関東圏に移住する。2017年群馬大学医学部医学科を卒業し、同年4月より現職。

■研究テーマと抱負 *in vivo* 2光子励起イメージングを用いて、次世代光感受性プローブの開発、そして脳神経回路を大

規模に可視化し操作する新技術の創出に挑戦しています。医師としての視点を日々の研究に持ち込めればと思っています。

■ウェブサイト <http://medical-neuro.imcr.gunma-u.ac.jp/>

■趣味 合気道。