

細胞タグ機構：行動タグのための記憶アロケーションの空間的重複

野本 真順^{1,2}, 井ノ口 馨^{1,2}

1. はじめに

旅の情景は往々にして鮮明である。旅先でどんな場所に行き、何を見たか、何を食べたか等、日常であれば忘れてしまうような些細なことまでよく覚えている。旅の思い出に限らず、大きな興奮や感動あるいは恐怖を伴っていた場合、その体験とともに、前後で経験した些細な出来事までが強く我々の脳に記憶されていることは誰も経験があるだろう。これは、一つの記憶イベントが他の記憶イベントと相互作用し、記憶の獲得様式に影響を与えているからである。この現象は「行動タグ」と呼ばれ、動物に備わる記憶固定化の変法であると考えられている。野生の世界においては、危険なイベントあるいは効率よく食べ物が見つけれられるイベントに遭遇した場合、その前後で体験した些細な出来事も記憶できる個体は、似た状況に再び遭遇した際に、生存競争に有利な行動を選択できることは容易に想像できるだろう。

一方、神経科学の分野では、記憶はシナプス伝達効率の変化を介して経験依存的に活動したニューロン（セルアンサンプル）に保存され、そのセルアンサンプルの再活動が記憶の想起に必要であることが報告されている。また、近年の生化学的手法を用いた研究から、異なる情報は異なるセルアンサンプルに保存されることが明らかとなっている。そうであるならば、行動タグのように、時間的に近接した情報どうしが相互作用する場合、それぞれの情報に対応するセルアンサンプルは空間的に制限された脳内でどのように活動し、記憶情報を固定化しているのだろうか？ 本稿では、行動タグの発見から薬理学的手法を用いてわかってきた特徴と記憶情報がセルアンサンプルに割り

つけられるメカニズム（記憶アロケーション）について概説し、続いて、我々が発見した行動タグ時のネットワークレベルでのセルアンサンプルの動態とセルアンサンプルが重複する機能的意義について考察する。

2. 長期増強はセルアンサンプルを作る学習・記憶の素過程である

記憶は、その保持される時間によって二つに大別される。学習成立後から数時間ほど続く短期記憶と、1日から場合によっては生涯保持される長期記憶である。感覚情報は記憶の場で統合され、記憶情報へと変換し、数分から数時間持続する不安定な短期記憶から新規遺伝子発現のプロセスを経て、安定的な長期記憶に変換され、脳内に長期間保存される。短期記憶の形成には、神経伝達に関与する神経伝達物質のイオンチャネル型受容体の修飾を伴う“一過的な”活性の変化が重要であることが示されている。一方、短期から長期記憶への固定化には、学習後に脳内で誘導される新規遺伝子発現依存的タンパク質合成が必要となる。このとき、脳内では情報の変換・保存のため、さまざまな組み合わせのニューロンが活動しているが、それらニューロンのシナプスにおいてシナプス伝達効率の長期増強（long-term potentiation：LTP）が生じていることがわかっている。

記憶形成の起点となるような強い刺激がニューロンに与えられると、学習時に活動したニューロン間のシナプスにおいてLTPが生じる（図1A）。このLTP発生時に新規タンパク質合成阻害剤を添加すると、誘導されたLTPは持続せず、一過的なものになることが示されている。つまり、LTPの維持には記憶固定化のプロセスと類似して、新規タンパク質合成が必要であることを意味している¹⁾。また、遺伝学的手法により遺伝子を欠損した変異マウスがLTPに障害を示す場合、記憶課題においても障害を示すことが報告され、LTPは記憶のシナプスレベルでの素過程であると考えられている。これらのことより、記憶はシナプス伝達効率の変化を介して経験依存的に活動したニューロン（セルアンサンプル）に保存され、記憶の想起は、シナプス伝達が増強したセルアンサンプルが再活動することにより行われると仮定されている（図1B）。したがって、LTPはセルアンサンプルを作る学習・記憶の素過程であるといえる。

¹ 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）生化学講座（〒930-0194 富山県富山市杉谷2630）

² JST・CREST

Cellular tagging framework: The spatial overlapping of ensemble allocation for behavioral tagging

Masanori Nomoto^{1,2} and Kaoru Inokuchi^{1,2} (¹Department of Biochemistry, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan, ²JST・CREST)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900084

© 2018 公益社団法人日本生化学会

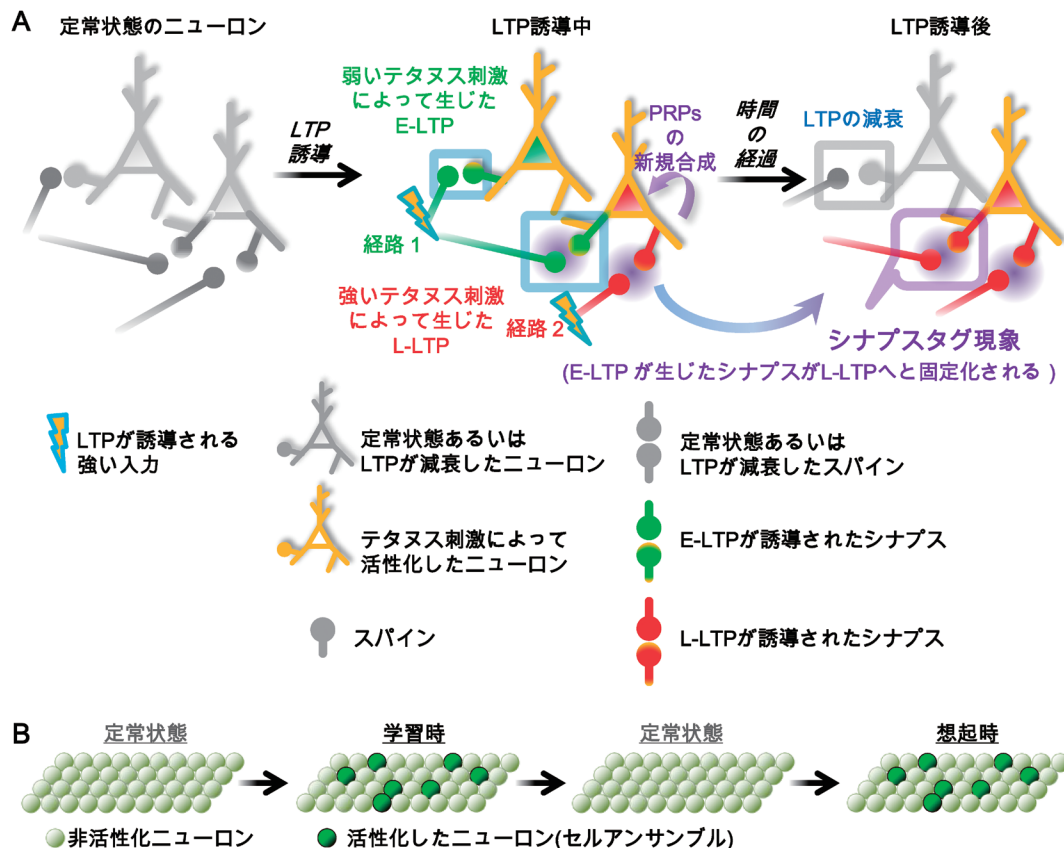


図1 LTPおよび急性海馬スライスを用いた2経路実験の概要とシナプスタグの説明

(A) LTPが誘導されるような強い刺激がニューロンに入力されるとLTPが生じる。2経路実験において、海馬CA1領域の独立した二つのシェーファー側枝(経路1および経路2)を刺激した場合、両者の入力とは「異なる神経細胞の異なるシナプス」を刺激する場合もあれば、「同一の神経細胞の異なるシナプス」を刺激する場合もある。同一神経細胞の異なるシナプスに短い時間間隔でE-LTPとL-LTPがそれぞれ誘導された場合、E-LTPがL-LTPへと変換(固定化)される。この変換には神経可塑性関連遺伝子群(plasticity-related proteins: PRPs)の新規タンパク質合成が必要とされる。(B)セルアンサンブル仮説の説明。この仮説では、学習中に活動した脳内のニューロン集団が記憶の物理的実体であり、記憶の想起はこのニューロン集団の再活動により実現していると考えられている。

3. シナプスタグ：シナプスレベルでの弱いLTPと強いLTPの相互作用

行動タグについて説明する前に、行動タグの名前の由来となった、同一ニューロンの異なるシナプスにおいて弱い入力と強い入力それぞれが生じると、遺伝子発現を伴う細胞内情報伝達系を介して入力どうしが相互作用し、弱い入力強い入力と同じ振る舞いを示すようになる“シナプスタグ”と呼ばれる現象について説明したい(図1A)。1997年、FreyとMorrisは急性海馬スライスを用いて、CA1領域の独立した二つのシェーファー側枝を刺激する2経路実験によって、独立した二つの入力と同じ神経細胞の異なるシナプスに収束した場合の各経路に誘導されたLTPに対する効果を検討した²⁾。彼らは、弱いテタヌス刺激によって誘導され数時間で減退するearly-phase LTP (E-LTP)は、異なる経路から同じ神経細胞集団に短い時間間隔(1時間以

内)でlate-phase LTP (L-LTP)を誘導する強い入力が入ることで、新規タンパク質合成依存的に数時間から1日以上持続するL-LTPに固定化されることを示した(この現象は記憶固定化のプロセスと類似している)。この結果から、弱いテタヌス刺激によって、タグがセッティングされたシナプスは、時間限定的かつ新規タンパク質合成依存的な神経可塑性関連遺伝子群(plasticity-related proteins: PRPs)のリクルート(ハイジャック)を経て安定化するという「シナプスタグ仮説」が提唱された。言い換えると、弱いLTPが強いLTPと相互作用して強いLTPへと変換・固定化されたということである。シナプスタグ機構は、L-LTPの入力特異性を保証するとともに、記憶を正確に脳内に保存する仕組みであると考えられている²⁾。この発見以降、同様の手法と阻害剤を用いた薬理学的手法とを組み合わせた実験により、多くの分子や神経可塑性に関連する受容体がシナプスタグの成立に関わることを、これら分子は記憶形成

にも重要であることがこれまでにわかっている^{3,4)}。これらの知見より、LTPは記憶のシナプスレベルでの基盤となるだけでなく、その変法としてシナプスタグが存在することが示唆された。

4. 行動タグはシナプスタグ仮説を行動レベルで模倣する

行動タグでは、本来忘却される短期記憶の前後の短い時間内に生じた別の新規体験によって、些細な経験（短期記憶）が長期記憶に変換される（図2A, B）。つまり、条件刺激（conditioned stimulus：CS）と無条件刺激（unconditioned stimulus：US）が同時に生じるパブロフ型条件づけ学習と行動タグとは、イベントが生じる時間スケールが数秒～数時間のオーダーで異なる。2007年、Violaのグループは、ラットを用いてシナプスタグ機構を行動レベルで模倣する現象の存在を探索した⁵⁾。まず彼らは、長期記憶を形成せず短期記憶のみが形成される弱いトレーニング強度の学習と新規環境提示が前後1時間以内の時間窓で生じた場合、短期記憶が長期記憶へと変換されることを示した。さらに、阻害剤を海馬へ局所注入する薬理学的手法と組み合わせ、新規環境提示によって生じる短期記憶の長期記憶への変換には、海馬における新規タンパク質合成が必要であることを示した。すなわち、彼らの結果は、シナプスタグと類似して、新規環境提示が短期記憶を安定化するためのPRPsを提供することを示しており、FreyとMorrisによって提唱されたシナプスタグ仮説を行動レベルで模倣する行動タグの存在を示唆するものであった。また、行動タグは新規環境提示との組み合わせにより、抑制性回避学

習課題の他にも海馬依存性課題である恐怖条件づけ文脈記憶課題、新奇物体認知記憶課題、新奇物体位置課題においても観察されている^{6,7)}。異なる脳領域に依存する学習課題どうしの間では行動タグは成立しない⁶⁾。また、行動タグはヒトにおいても観察されている⁸⁾。以上の結果から、行動タグは些細な記憶が長期記憶に固定化される動物に備わる普遍的な機構であること、各課題の記憶責任領域と新規体験によって活性化する脳領域が重複していないと成立しないことが示された。つまり、その生化学特徴および時間窓の類似性より、行動タグ成立時には脳内でシナプスタグ機構が利用されていることが強く示唆される。

5. 細胞レベルでの記憶アロケーション

行動タグ成立時には、脳内では何が起きているのであろうか？ 行動タグのメカニズムは常にシナプスタグ機構に置き換えて説明される。確かに、Freyらの2経路実験の結果²⁾を含め、各課題の記憶責任領域と新規体験によって活性化する脳領域が重複していないと行動タグが成立しないことから⁶⁾、脳内でシナプスタグ機構が利用されていることが強く示唆される。しかしながら、過去の知見は、生化学的および時間的類似性に基づき脳内表象を推察するのみで、感覚情報がその多彩な情報ごとに異なる経路を介して処理・保存されることを考慮すると、シナプスタグの時空間的に制限された2経路実験のように、行動タグ成立時にセルアンサンブルどうしが重複し、その重複領域でシナプスタグが生じていると結論づけることは難しかった。記憶情報はどのようなメカニズムで細胞に割りつけられるのだろうか？ これまでにわかってきたことについて、アロケーションに関する論文を紹介しながら論じたい。

アロケーションのメカニズムに関する仕事は主に場所と電気ショックを組み合わせる恐怖条件づけ文脈学習課題を用いてよく研究されてきた。Richard Semonにより唱えられた“記憶痕跡（エングラム）の物理的実体は、脳内にある符号化された特定のニューロン集団である”という傍証は、記憶の形成時に活性化したニューロン群（セルアンサンブル）が、記憶想起時において再活性化し、その再活性化したニューロンの数は想起された記憶の強さと相関しているという発見によって支持された⁹⁾（図1B）。

これらの符号化されたセルアンサンブルの記憶貯蔵における役割は、記憶痕跡の抑制と再活性化によって証明された。2007年、Josselynのグループは、遺伝学的手法を用いて、cAMP response element-binding protein（CREB）過剰発現ニューロンが記憶想起時に選択的に再活性化することを発見した¹⁰⁾。JosselynとSilvaのグループは、この発見を利用して、これらのCREB過剰発現ニューロン集団の選択的除去あるいは不活性化は恐怖記憶の想起の障害を導くこと

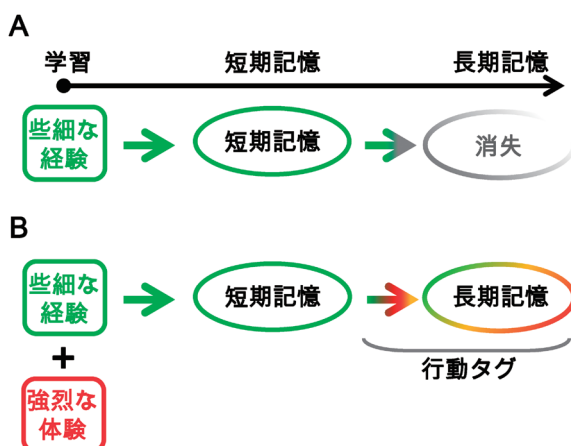


図2 行動タグの概念説明

(A) 些細な経験は数分から数時間持続する短期記憶は形成されるものの、長期記憶として脳内に保存されず、消失してしまうためそれ以降は思い出せない。(B) 些細な経験と短い時間間隔で強烈な体験が生じた場合、些細な経験は新規タンパク質合成依存のプロセスを経て、長期記憶へと変換・固定化される。この現象は行動タグと呼ばれる。

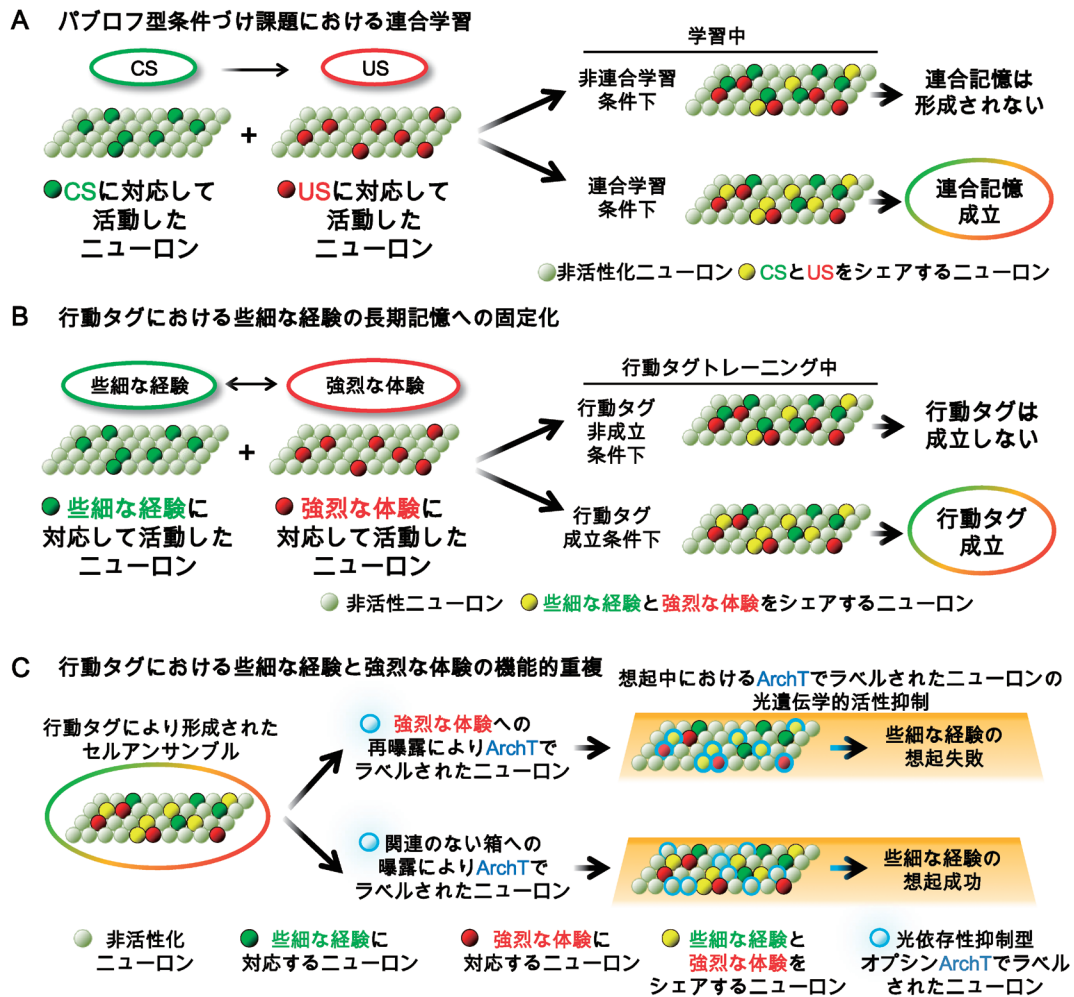


図3 パブロフ型連合学習および行動タグにおけるセルアンサンブルの重複の模式図
 (A)パブロフ型連合学習中のセルアンサンブルの動態を示す。パブロフ型条件づけ課題では、連合記憶成立条件下において、条件刺激 (CS) および無条件刺激 (US) にそれぞれ重複して対応するニューロン、すなわちCSとUSをシェアするニューロンの数が非連合学習条件下に比べて増加する。(B)行動タグトレーニング中におけるセルアンサンブルの動態を示す。行動タグ成立条件下においては、些細な経験と強烈な体験にそれぞれ重複して対応するニューロンの数が、行動タグ非成立条件下に比べて増加する。(C)行動タグにおける些細な経験と強烈な体験の機能的重複を示す。行動タグ成立後において、強烈な体験に対応するセルアンサンブルのオプトジェネティクスによる抑制は行動タグにより長期記憶となった些細な経験の想起を抑制する。一方、関連のない箱への曝露により標識されたセルアンサンブルの抑制は想起に影響を与えない。この結果は、行動タグの成立には強烈な体験と些細な経験の両イベントに重複して対応する細胞集団が必要であることを示唆している。

を発見した。一方、2012年、利根川のグループは、藻類由来の光感受性イオンポンプを細胞に導入し活性を制御するオプトジェネティクス法を用いて、学習時に活性化したセルアンサンブルを再活動させると記憶想起が誘導されることを示し、記憶が学習時に活性化した特定のニューロン群 (セルアンサンブル) に割りつけられて符号化されていることを示した¹¹⁾。これらの結果は、学習時に活性化される一部のニューロン群から構成されるニューロンネットワークが各記憶イベントに対応する記憶痕跡の物理的な実体であることを示した。また、JosselynとSilvaのグループは、記憶痕跡は学習のタイミングで細胞興奮性が高まって

いる細胞に優先的に割りつけられることを明らかにし、記憶情報は細胞興奮性の高い細胞に割りつけられ、そして記憶痕跡になりやすいことを示した。

6. 行動タグにおけるセルアンサンブルの重複の機能的意義とは

脳内に入力された感覚情報が共通の細胞集団に重複して入力されることの重要性は、2008年、Bernsteinのグループによって示唆された¹²⁾。彼らのグループは、神経活性化マーカー遺伝子である activity-regulated cytoskeleton-

associated protein (*Arc*) RNAの局在を指標にニューロンの活動履歴を調べるcatFISH解析を用いて、パプロフ型連合学習 (CS-US連合学習) が成立する場合は、連合学習が成立しない場合に比べて、CSとUSのそれぞれに応じて重複して活動する細胞数が増加することを発見した。また、連合学習成立と重複活動細胞数の間の関連性は我々の研究室でも確認されている¹³⁾。以上の結果は、CS-US情報をシェアする活性化された細胞集団はCS-US情報間の連合に重要であることを示した (図3A)。

記憶の固定化様式が異なる行動タグでは、些細な経験と新規イベント (強烈な体験) によってセルアンサンプルはどのように活動するのだろうか? 2016年、我々は行動タグ時のセルアンサンプルを観察、操作することで、セルアンサンプルのダイナミクスと機能的意義を明らかにした⁷⁾。はじめに、我々は、些細な経験として弱いトレーニング条件で行う新奇物体認知記憶課題と、強烈な体験として新規環境提示とを組み合わせ、行動タグ実験系の確立を行った。確立された実験系は過去の知見と同様に、行動タグが成立するイベント間の時間窓が1時間程度であることがわかった。また、新規環境提示に使用する箱に対してマウスを順化させると行動タグが成立しないことも確認した。続いて、行動タグ成立時の神経活動の動態を先述したcatFISH法により解析し、行動タグが成立する条件では、箱に対する順化が行われ行動タグが成立しない条件に比べて、強烈な体験と些細な経験の記憶セルアンサンプルの重なりが広いことを発見した (図3B)。さらに、任意の時期に活動した細胞を標識可能なTet-tag systemとオプトジェネティクスを組み合わせ、海馬CA1において強烈な体験により活性化した細胞を光依存的抑制型オプシンArchTで標識し、想起時に強烈な体験のセルアンサンプルの活動を人為的に抑制した場合の些細な経験への影響を調べた。重要なことに、この抑制によって行動タグが成立していた些細な経験は思い出せなくなった。一方で、関連のない箱に曝露された体験により標識された細胞を抑制した場合には、些細な記憶は思い出せることから、些細な経験と強烈な体験のセルアンサンプルが重複することで、行動タグが成立することを示した (図3C)。つまり、行動タグ成立時には、重複したセルアンサンプルが保持され、その重複したセルアンサンプルは行動タグにより形成された記憶の発現に重要であることが示唆された。本研究により、類似性に基づき脳内表象が推察されていた行動タグの回路メカニズム (細胞タグ機構) が初めて明らかになり、行動タグ成立時には重複した細胞集団においてシナプスタグ機構が使われていることが強く示唆された。さらに、我々は近年、セルアンサンプルの重複は行動タグだけでなく、二つの異なる記憶をリンク (連合) させる役割を果たすことも発見している¹⁴⁾。

行動タグ成立時にセルアンサンプルが重複することは、記憶情報がトレーニングのタイミングで活性化された細胞に優先的に割りつけられること¹⁵⁾、また、学習によって神経活動が一時的に増加することで説明できる。行動タグ時には、最初の些細な経験あるいは強烈な体験によって活性化した細胞は、次のイベントで再活動しやすくなっていることで、重複した細胞の増加を導いている (細胞タグ機構) が考えられた。一方、行動タグが成立しないときには、環境に対して事前によく経験しているために、環境に対応するセルアンサンプルがすでに強固に割りつけられているため、行動タグが制限されていると考察できる。

7. おわりに

脳に蓄えられているさまざまな記憶情報を関連づけることで、一つ一つの記憶から知識や概念が形成されると考えられている。異なる記憶エングラムが相互作用する仕組みに関する今回の研究成果は、トラウマ記憶と関連性が薄いニュートラルな他の記憶 (状況) との間で不必要な結びつきが起きる心的外傷後ストレス症候群 (PTSD) などの精神疾患の治療法につながることが期待される。今後は、*in vivo* イメージングとオプトジェネティクスを併用し、行動タグ成立時にスパインにおいてシナプスタグが実際に起きているかどうかを検証する研究の登場が望まれる。

謝辞

本稿で紹介した筆者が携わった研究は、富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 生化学講座において行われました。共同研究者の方々に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., & Matthies, H. (1988) *Brain Res.*, **452**, 57–65.
- 2) Frey, U. & Morris, R.G. (1997) *Nature*, **385**, 533–536.
- 3) Okada, D. & Inokuchi, K. (2015) in *Synaptic Tagging and Capture* (Sajikumar, S. ed.), pp. 79–98, Springer, New York.
- 4) Okada, D., Ozawa, F., & Inokuchi, K. (2009) *Science*, **324**, 904–909.
- 5) Moncada, D. & Viola, H. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 7476–7481.
- 6) Ballarini, F., Moncada, D., Martínez, M.C., Alen, N., & Viola, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14599–14604.
- 7) Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Yokose, J., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A.M., Kato, F., & Inokuchi, K. (2016) *Nat. Commun.*, **7**, 12319.
- 8) Ballarini, F., Martínez, M.C., Díaz Perez, M., Moncada, D., & Viola, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14599–14604.
- 9) Reijmers, L.G., Perkins, B.L., Matsuo, N., & Mayford, M. (2007) *Science*, **317**, 1230–1233.
- 10) Han, J.H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Cole, C.J., Matynia, A., Brown, R.A., Neve, R.L., Guzowski, J.F., Silva, A.J., & Josselyn,

- S.A. (2007) *Science*, **316**, 457–460.
- 11) Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012) *Nature*, **484**, 381–385.
 - 12) Barot, S.K., Kyono, Y., Clark, E.W., & Bernstein, I.L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20959–20963.
 - 13) Ohkawa, N., Saitoh, Y., Suzuki, A., Tsujimura, S., Murayama, E., Kosugi, S., Nishizono, H., Matsuo, M., Takahashi, Y., Nagase, M., Sugimura, Y.K., Watabe, A.M., Kato, F., & Inokuchi, K. (2015) *Cell Reports*, **11**, 261–269.
 - 14) Yokose, J., Okubo-Suzuki, R., Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A.M., Sasahara, M., Kato, F., & Inokuchi, K. (2017) *Science*, **355**, 369–403.
 - 15) Moyer, J.R. Jr., Thompson, L.T., & Disterhoft, J.F. (1996) *J. Neurosci.*, **16**, 5536–5546.

著者寸描

●野本 真順 (のもと まさのり)



富山大学大学院医学薬学研究部（医学）生化学講座助教。バイオサイエンス（博士）。

■略歴 1984年群馬県に生る。2007年東京農業大学応用生物科学部修了。12年同大学大学院農学研究科バイオサイエンス専攻博士後期課程終了。16年より現職。

■研究テーマと抱負 大規模イメージングと光操作を用いた、脳高次機能における

脳回路の役割の解析。

■ウェブサイト <http://www.med.u-toyama.ac.jp/bmb/index-j.html>

■趣味 スキー，ルアー釣り。

●井ノ口 馨 (いのくち かおる)

富山大学大学院医学薬学研究部（医学）生化学講座教授。専門は分子脳科学。

■略歴 名古屋大学農学部を卒業後，同大学大学院農学研究科で博士号を1984年に取得。米コロンビア大学医学部，三菱化成生命科学研究所などを経て，2009年より現職。分子生物学・生化学から細胞生物学・組織化学・電気生理学・光遺伝学・行動薬理学までの幅広い手法を用いて，記憶形成メカニズムを研究している。