

シナプスの演算ルールを可視化することに成功！ ナノレベルの記憶形成機構解明

1. 発表者：

尾藤 晴彦（東京大学 大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生化学分野 教授）

2. 発表のポイント：

- 生きた神経細胞・シナプスで、記憶を制御する酵素による神経情報演算過程を解明
- 複雑な生命システムの情報処理を動画で「見て」解読する新たな技術 dFOMA 法を開発
- ナノレベルでの記憶形成機構の理解により、将来的にはアルツハイマー病など高次脳機能障害の解明に役立つことが期待される。

3. 発表概要：

東京大学 大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生化学分野の尾藤 晴彦教授と藤井哉特任助教らは、シナプス可塑性（注1、2）が起こる過程を顕微鏡で観察し、シナプス酵素が行う情報処理を明らかにしました。

これまで、外界の情報は神経入力（注3）となってシナプスの様々な酵素を活性化して可塑性を引き起こし、記憶につながると考えられていました。しかし、シナプスの酵素がどのように神経入力を読み解くのか、またこれをシナプスがどのような演算ルールとして活用するのは全く分かっていませんでした。それは従来の方法では1フェムトリッター（注4）以下の容量のシナプスを分離して生化学的な分析することができないためでした。

本研究グループは、複数の酵素の活性化を直接顕微鏡で動画として記録する方法（dFOMA法、注5）を開発しました。この方法を用いて、シナプスの酵素が神経入力の情報を読み解く様子を、世界で初めてリアルタイムで観察することに成功しました。また、これまで単に遺伝子の実態として捉えられてきた酵素について、実はそれぞれ固有の情報処理を行う素子であるという新しい機能を明らかにしました。

今回の結果は、記憶の分子メカニズムという複雑なシステムを理解する上で重要な知見であり、将来的にはアルツハイマー病など高次脳機能障害の解明に役立つことが期待されます。また、今回開発した dFOMA 法は広く生物学一般への応用が可能であり、様々な生命現象の原理を、まるで動画を見るように理解することができるようになることが期待されます。

4. 発表内容：

<研究の背景と経緯>

お昼にたまたまおいしいお店を見つけたとき、また来られるようにその場所を憶えないといけません。このとき、私たちの脳の中でどのようにして記憶が作られているのでしょうか？

神経科学では、20世紀半ばから永らくこの問題に取り組み、神経入力の頻度と回数に応じて伝達効率が変わるシナプス可塑性によって学習が行われると考えられています（図1、図2左）。また、分子生物学では、人為的に遺伝子を欠損・変異させた動物を用いて、シナプス可塑性にかかわる分子経路を同定してきました。特に、CaMKII α （注6）とカルシニューリン

(注7) という Ca^{2+} によって活性化される酵素は学習と可塑性に関わる重要な酵素として知られています(図2、右)。

しかし、この2つの領域をつなぐ知見、すなわち、どのようにして神経入力の高頻度と回数的情報を酵素が読み解き、シナプス可塑性という変化につながるのかは分かっていませんでした。これはシナプスという、わずか1マイクロメートルの幅以下、容積にすると1フェムトリッター以下、の微小な部分に神経刺激を入れ、分離して化学分析することが技術的にできなかったためです。このため、1980年代後半からさまざまな研究者によって試験管の中での再構成や、コンピューターシミュレーションといった代替手法によって研究が行われてきました。しかし、こうした間接的・仮想的な知見が蓄積されるにつれ、全く手付かずであった直接的な観察による分子メカニズムの理解が渴望されてきました。

<研究の内容>

本研究グループでは、シナプスにおいて酵素がどのように入力の情報を読み解いているのかを直接解明することを目標に研究を行い、世界に先駆けて以下の成果を得ました。

①、シナプス酵素である $\text{CaMKII}\alpha$ とカルシニューリンが行う情報処理機構を解明した

革新的なイメージング手法 dFOMA 法(下記詳述)を用いて、人為的に神経入力の高頻度と回数を変化させ、生きた神経細胞・シナプス内部の $\text{CaMKII}\alpha$ とカルシニューリンの活性化を計測しました(図2、図3)。この結果、 $\text{CaMKII}\alpha$ は入力の高頻度と回数の両方の情報を読み解き、カルシニューリンは回数の情報を読み解くことが明らかになりました(図4)。こうしてそれぞれの酵素が独自の非線形的な情報処理素子として働く結果、神経可塑性の周波数特性を産み出すことを世界で初めて実証しました。

②、生きたシナプスで複数の酵素活性を計測する技術を開発した

これは、近年開発された様々な色の蛍光タンパク質、高感度の EM-CCD カメラといった様々な最先端技術をうまく融合し、顕微鏡の光学系の改良や200種類以上もの蛍光プローブを試行錯誤した結果、1フェムトリッター以下のシナプス空間に局限した神経伝達物質投与(ケイジドグルタミン酸の光融解:注8)と、2つの酵素の活性化をプローブの蛍光スペクトルの変化として観察する2重化蛍光測定法を組み合わせた dFOMA 法を開発しました。

今回の結果は、記憶ができるときのシナプスでの酵素による情報処理機構という長らく多くの研究者が知りたかった問題に対して回答を与えました。

また、これまで遺伝子の実態として捉えられてきた酵素に、非線形的な情報処理素子としての機能があるという新たな概念を生きた神経細胞で実証したものであり、シナプスでの現象をこれまでより一段と深いレベルで理解することができました。

<今後の展開>

今回の結果は、記憶のメカニズムを理解するうえで重要な知見となります。また最近では、 $\text{CaMKII}\alpha$ およびカルシニューリンはアルツハイマー病や高次脳機能障害との関連も示唆されており、今回開発した方法や結果を応用することで病理を解明につながることを期待されます。

これまで、生命現象は分子の経路として捉えられてきましたが、今回の研究で開発した dFOMA 法によってその経路の時間的・空間的なダイナミクスが理解できるようになりました。これは、たとえるなら、単なる静的な路線図を見ていたところから、その路線を走るさまざま

まな列車の運行や乗客の乗り降りが見られるようになるようなもので、今後、dFOMA法を応用して生命現象をより深いレベルで理解することができると期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Cell Reports」（オンライン速報版：4月18日 発表）

論文タイトル：“Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII α and Calcineurin”

（日本語タイトル：CaMKII α とカルシニューリンによる神経入力情報の非線形的脱符号化および非対称的表現）

著者：Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H.

藤井哉、井上昌俊、奥野浩行、佐野慶和、竹本-木村さやか、喜多村和郎、狩野方伸、尾藤晴彦

DOI 番号：10.1016/j.celrep.2013.03.033

6. 問い合わせ先：

尾藤 晴彦（ビトウ ハルヒコ）

東京大学 大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生化学分野 教授

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Tel : 03-5841-3560 Fax : 03-3814-8154

E-mail : hbito@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

注1) シナプス

神経細胞同士がつながっている部分。神経細胞はシナプス間隙という20ナノメートル程度の間を隔てて接している。前シナプスの末端では活動電位の到来に伴って神経伝達物質（グルタミン酸など）が放出され、シナプス間隙を拡散し、神経入力として後シナプスの受容体によって受け取られることで伝達される。

注2) シナプス可塑性

神経入力の頻度と回数に依存して、神経細胞間の伝達効率が変化すること。神経伝達物質の放出確率の変化や受容体の数の変化による。

注3) 神経入力

前シナプス末端で活動電位の到達に伴って神経伝達物質が放出され、後シナプスの受容体によって受け取られて神経入力となる。神経伝達物質はシナプス小胞から放出されるため、その個数に応じて整量子化された応答を引き起こす。

注4) フェムトリッター (femtoliter)

1ミリリッター (1 cc) の1兆分の1の容積。神経細胞同士の接点であるシナプスは、それぞれ1フェムトリッター以下の容積を占める。

注5) dFOMA法

dual FRET with Optical Manipulation の略。本研究により開発された、2つの FRET プローブを同時に計測しながら、紫外光による光刺激を可能にした顕微鏡イメージング手法。

注6) CaMKII α

カルモジュリン依存的キナーゼIIの α サブタイプ。Ca²⁺/カルモジュリンにより活性化され、リン酸化を行う酵素である。これまで遺伝子改変動物や薬理的な実験から、学習およびシナプス可塑性における重要性が示されている。

注7) カルシニューリン

プロテインフォスファターゼ2Bとしても知られる。Ca²⁺/カルモジュリンにより活性化され、脱リン酸化を行う酵素である。これまで遺伝子改変動物や薬理的な実験から、学習およびシナプス可塑性における重要性が示されている。

注8) ケイジドグルタミン酸の光融解

ケイジドグルタミン酸はグルタミン酸に保護基が付加されたもので、通常では生理的な活性を持たないが、紫外光が当たることで保護基が脱離し、グルタミン酸となって活性をもつようになる。光を照射した部分だけでグルタミン酸が生成するため、単一シナプスなど非常に限局した場所だけで神経細胞を刺激することができる。

8. 添付資料：

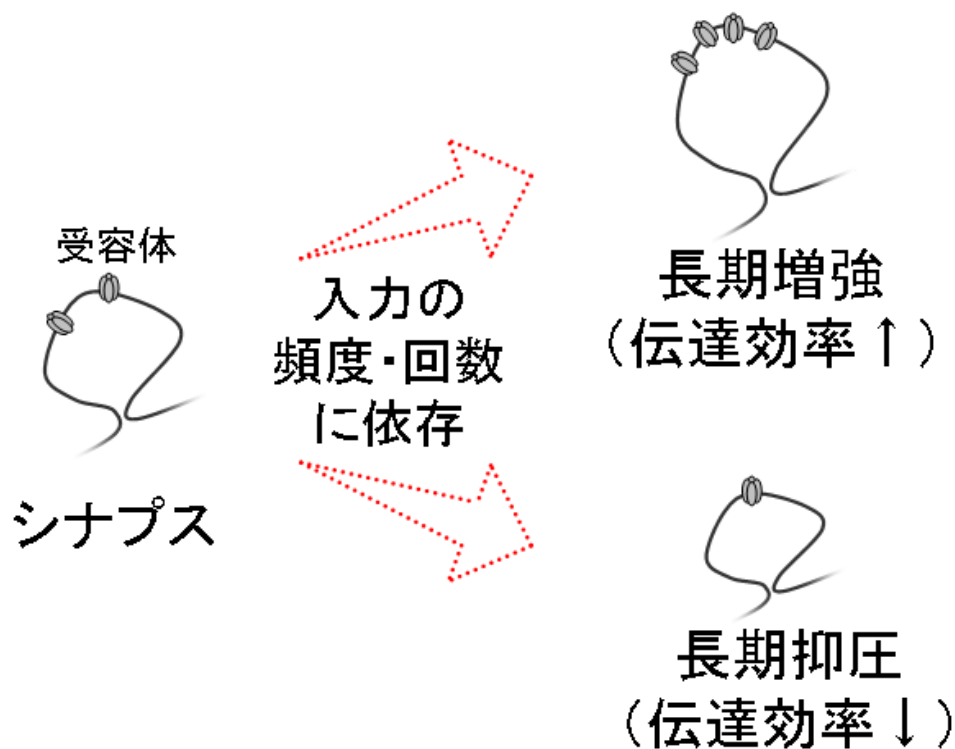
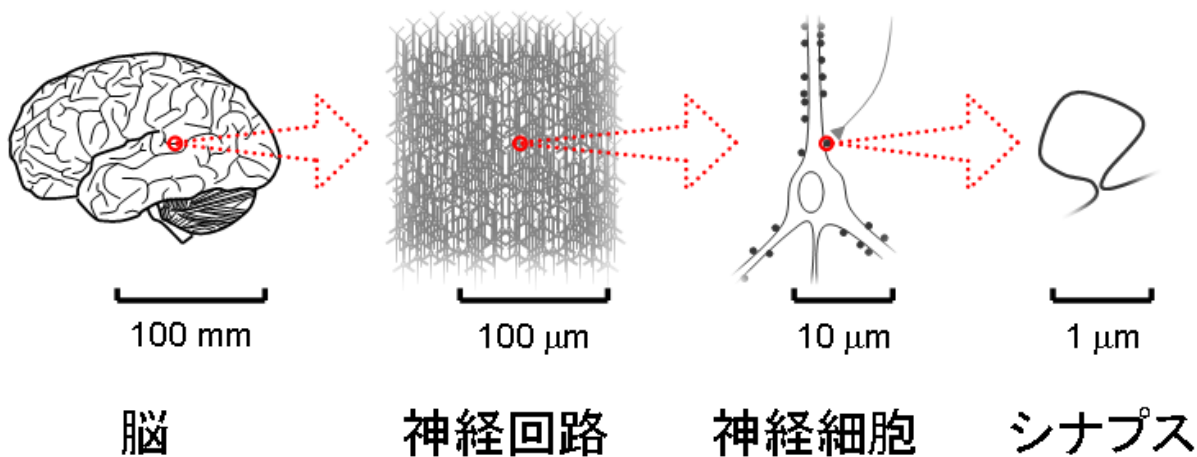


図1、脳のスケールとシナプス可塑性

上段：脳は神経回路が集合して出来上がり、神経回路は神経細胞同士がつながってできており、神経細胞同士はシナプスでつながっている。

下段：シナプスには神経の入力の頻度と回数に応じて伝達効率を変化させるシナプス可塑性という性質があり、記憶や学習の基盤となっていると考えられている。この場合は例として長期的な受容体の増減による長期増強と長期抑圧を示している。また、このシナプス可塑性に伴ってシナプスの構造（大きさ）が変化することが知られている。

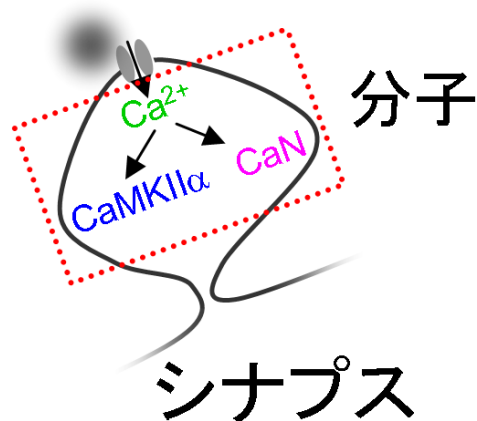
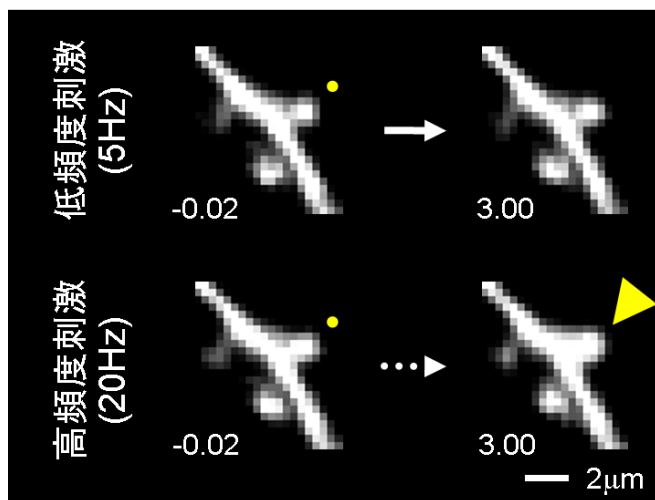


図2、シナプスは入力の種類に依存した構造の可塑性を示す

左：ラット海馬培養神経細胞のシナプスにケイジドグルタミン酸の光融解による刺激を100回、2種類の頻度（上段：5Hz、下段：20Hz）で行った。5Hzではシナプスの大きさに変化はなかったが、20Hzではシナプスが大きくなった（黄色の矢頭）。この構造変化は刺激したシナプス（黄色の点）のみで起こり、入力特異的にシナプス可塑性が誘導されたことを示している。

右：本研究ではCa²⁺により活性化されるCaMKIIαとカルシニューリンがどのように入力の情報（頻度と回数）を読み解いているのかを検討した。

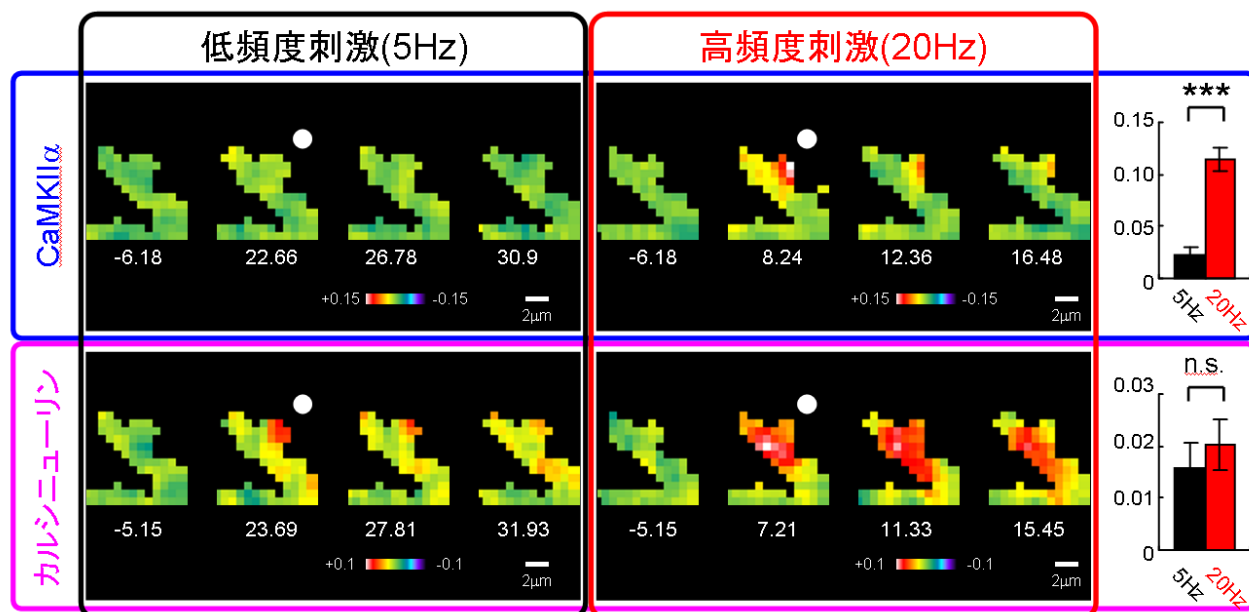


図3、単一シナプスでのCaMKIIαとカルシニューリンの活性化のリアルタイム観察

海馬神経細胞のシナプスにおけるCaMKIIαの活性化（青色横長囲み）およびカルシニューリンの活性化（ピンク横長囲み）を5Hz（黒縦長囲み）および20Hz（赤縦長囲み）のケイジドグルタミン酸の光融解刺激に対して計測した。それぞれの時刻（秒）における酵素活性化の空間的な広がりを色マップで示している。右に5Hzおよび20Hzに対する酵素活性化の振幅を定量し棒グラフで示している。

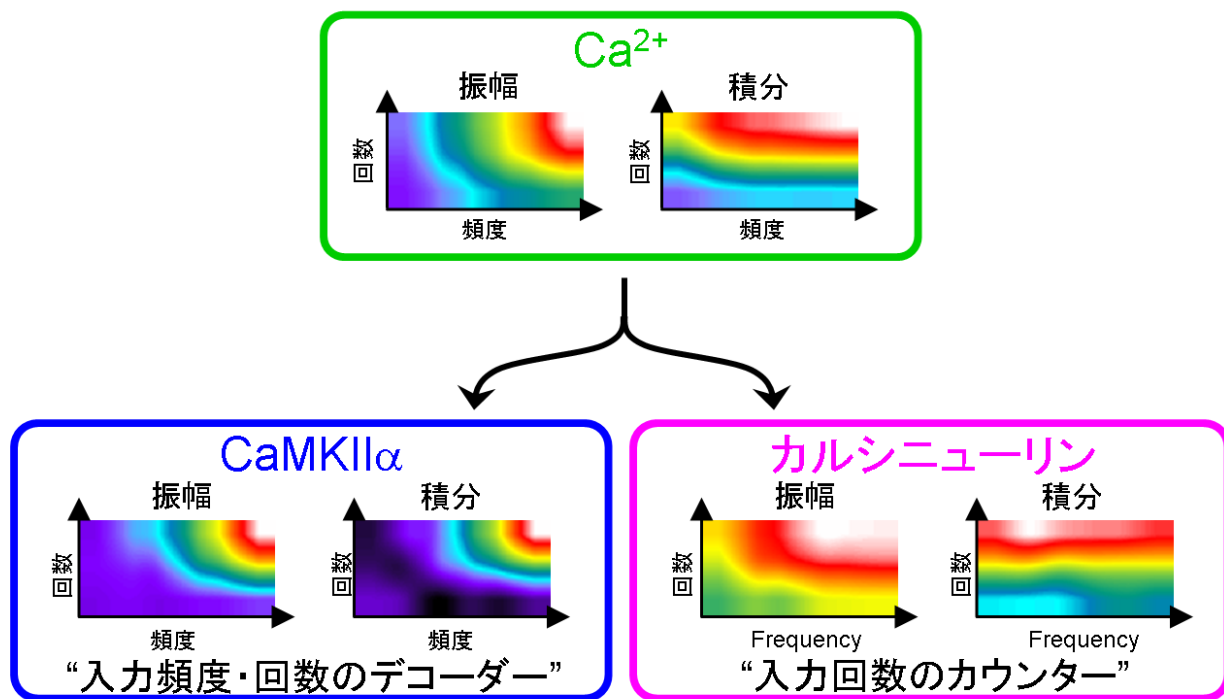


図4、 $\text{CaMKII}\alpha$ およびカルシニューリンが担う情報処理機能

Ca^{2+} 、 $\text{CaMKII}\alpha$ 、カルシニューリンのそれぞれ囲みの中の2つの色マップは刺激の頻度と回数を変化させたときの活性化の振幅および積分を示している。この結果から、 $\text{CaMKII}\alpha$ の活性化は頻度および回数に依存し、入力頻度・回数デコーダーとして機能することが分かる。一方でカルシニューリンの活性化は入力頻度への依存性は低く、回数に大きく依存するため、入力回数のカウンターとして機能する。