

研究報告書

「記憶獲得維持の分子システムの解明～記憶の消去は可能か？」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 竹本 研

1. 研究のねらい

動物が学習記憶するメカニズム、例えば 2 つの記憶が混じり合うことなく獲得・維持されるメカニズムはどのような分子システムだろうか？ BMI に代表されるリアルタイムフィードバック技術は、脳機能を解析するうえで重要な研究手法である。PET や fMRI においても解像度が数 mm であるが、様々な制御技術を併用し多彩な脳機能の解析が可能である。しかしながら従来の脳機能解析技術は相関に頼る解析が行われ、得られたデータの因果関係を立証することは困難であった。さらに脳情報の解読では、情報伝達の最小単位であるシナプスレベルで行うのが重要であるが、従来の技術では極めて困難であった。本研究ではこれを可能にする新技術を開発する。学習記憶に重要な AMPA 受容体は、シナプスに提示されることで機能を発揮する膜蛋白質である。本研究ではシナプス提示された GluA1 AMPA 受容体を光で acute に機能破壊する革新技術を開発し、「記憶の消去」を指標にした行動学的解析によって、「記憶獲得・維持のメカニズム」をシナプスレベルにおいて世界で初めて解読することを目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では2光子顕微鏡イメージングと同時に、AMPA 受容体 GluA1 を光で機能破壊する新技術の開発を行うことを目指した。CALI (Chromophore assisted-light inactivation)法は光照射依存的に活性酸素(一重項酸素)を放出する光増感剤を用いるタンパク質機能破壊法である。一重項酸素が標的タンパク質を酸化・立体構造破壊し、光照射でタンパク質の機能破壊が可能になるという技術である。放出した一重項酸素の拡散半径は数 nm であるため、目的分子の特異的な機能破壊が期待できる。申請者は、エオシンを用いた高効率に CALI を行い基盤技術の開発に成功している。本研究では、光増感物質にエオシンを採用することで、本技術の開発を進めた。

さきがけ研究期間前半では、二光子イメージングを行うために外来性に発現する GFP(SEP)-GluA1 の光操作を行うプランを進めた。そのために当初は CALI が可能な抗 GFP 抗体を見出し研究を進めたが、内在性 GluA1 は機能破壊できないことから、記憶消去効率が低くなる可能性が示唆され、外来性 GFP(SEP)-GluA1 も内在性 GluA1 も両方機能破壊できる抗体(抗 GluA1 抗体)を開発することが必要と考えた。そこで CALI 法でこれらの GluA を機能破壊するために、マウス GluA1 の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を開発した。これらモノクロー抗体を光増感剤エオシンでラベル化し、その中から CALI が可能なモノクロー抗体をスクリーニングにより見出した。私が開発した新技術は、同じシナプス局在を示す NMDA 受容体を機能破壊せず GluR1 ホモマーだけを壊す高い特異性を有し、なおかつ機能中和活性は持たない。また海馬 CA1 にラベル化抗体を注入し in vivo CALI を行い、恐怖記

憶の消去に成功した。

(2) 詳細

1. GluA1 細胞外ドメインを認識するモノクロ抗体の開発

GluA1 の細胞外ドメインをエピトープに対するモノクロ抗体を、バキュロディスプレイ法を用いて取得した(東大・浜窪教授との共同研究)。抗体価が上昇したクローンの培養上清について、まず一次スクリーニングとして、ウエスタンブロットにて海馬の内在性マウス GluA1 を認識する抗体を選択したところ、陽性クローンとして 9 クローンがヒットした。CALI で重要なことは、native(非変性)の GluA1 を生きた細胞のまま認識することである。そのために、二次スクリーニングとして、CHO 細胞に発現した GluA1 を生きたまま染色出来る抗体があるかを調べたところ、5 個の抗体が陽性であった。

2. CALI が可能なモノクロ抗体のスクリーニング

上記で得たモノクロ抗体を硫酸沈殿にて粗精製し、光増感剤エオシン(Takemoto et al. ACS.Chem.Biol. 2011)でラベル化した。CHO 細胞に GluA1 を発現しラベル化抗体を反応させ、CALI が可能な抗体をスクリーニングしたところ、一つの抗体で顕著な CALI 効果を得た。本抗体について in vivo 等での機能解析のために、ProteinA カラムで大量精製を行った。

3. 取得した抗体の in vitro における基本特性の解析

抗体の中には、標的タンパクと結合しただけでその活性を抑制する「機能中和抗体」の存在が知られている。本抗体についてその可能性を検討したが、抗体添加のみで GluA1 の活性には影響しないことがわかったため、機能中和抗体ではないことがわかった。また、海馬初代培養ニューロンにおいてシナプス性 AMPA 電流を光照射依存的に機能破壊できることがわかった。その分子特異性は、シナプス性 NMDA 電流を機能破壊しないことで確認した。さらに、CHO 細胞に GluA1-GluA3 を各種組み合わせで発現させ CALI を行ったところ、GluA1 ホモマー特異的に機能破壊できることがわかった。これは海馬初代培養ニューロンにおいても、NASPM 存在下で CALI を行った場合、その効果が観察出来ないことから、シナプスでも GluA1 ホモマー特異的に機能破壊することが分かった。GluA1 ホモマーは LTP の最初期にシナプス移行するタイプのサブユニットで、GluA2 を含む他の受容体とは異なりカルシウム透過性をもつ AMPA 受容体として知られる。また in vivo においても、様々な生理機能を持つことが分かっている。

4. in vivo CALI による恐怖記憶の消去

これまでに開発した技術を、in vivo に適用し、一度得た記憶を消去できるかを検討した。文脈的恐怖条件付け学習は、海馬の CA3-CA1 シナプスの AMPA 受容体依存的に起こる学習である。実際に GluA1 ホモマーも学習後 0.5-2hr でシナプス移行することを見出した。なお、学習成績の定量化は、明箱から暗箱に入るまでの時間の長さで行う事が出来る。マウス海馬 CA1 領域にラベル化抗体を脳定位手術で注入し、先端が CA1 直上にくるように光照射カメラを挿入し、セメントで頭蓋骨に固定した。手術後マウスを静置し恐怖学習後、各時間に光照射

を行い、翌日に記憶が消去されたかを行動学的に解析した。学習後 0.5-2hr で光照射すると、効果的に記憶が消去できることを見出した。また、学習後 24hr では記憶は消去できなかった。これはホモマーのシナプス移行が 24hr では起こっていないことと一致する。よって in vivo においても、GluA1 ホモマー特異的に機能破壊できると示唆された。

重要なことに、学習前に光照射をしても、その後の学習には影響しないことから、新たにシナプスに運ばれる GluA1 を機能破壊することで記憶は消去されている、すなわち新しくシナプスに運ばれる GluA1 ホモマーが記憶をコードすることを見出した。また、学習後一時間で光照射後、急性スライスを作製し、光照射で GluA1 ホモマーが機能破壊されていることも確認した。ここまでの実験ではすべて光照射の翌日に行動テストを行い定量しているが、光照射直後にはもっと記憶の消去が行われている可能性がある。そこで行動テストを光照射の直後と翌日で比較したところ、両方で差は認められなかった。すなわち時間が経っても一度消えた記憶は回復しないことから、GluA1 ホモマー機能破壊による記憶消去は不可逆的に起こることが示唆された。

5. GFP(SEP)-GluA1 を用いたシナプス活性の定量化イメージング

大挑戦型研究として研究期間延長と研究費増額を援助していただけたため、現在は開発した CALI 技術を用いて、究極的にはどのシナプスに記憶がコードされているかを特定する基礎技術として発展させることを進めている。これは個々のシナプスの状態を二光子顕微鏡でモニターしつつ、光操作を行い、どのような時空間的情報を持つシナプスが記憶をコードするのか(獲得維持に働くのか)を同定する、究極の脳情報解読手法である。そのために GluA1 のシナプス移行をより安定的にモニタを行う事を計画した。ここでは pH 依存性 GFP(SEP)を GluA1 に融合し、それをニューロンに発現する実験系を導入した。AAV ウイルスでは発現がやや少なくイメージを取得しにくかったが、エレクトロポレーションで遺伝子導入し、タモキシフェンで発現誘導することで二光子イメージングに十分な量を発現できた。その基礎実験として、臨界期のマウスバレル皮質のイメージングを行い、ある遺伝子変異(未発表データのため詳細は伏せる)を持つマウスでは、臨界期が大幅に延長し、adult マウスでも GluA1 がシナプス移行をし続けることを明らかにでき、実験系の立ち上げに成功した。現在はこの実験系をマウス海馬に導入することを目指している。すなわち海馬直上の大脳皮質を除去し、脳深部におけるシナプス機能の定量的イメージングを進めている。

3. 今後の展開

まず第一に、記憶の獲得維持におけるシナプス応答の時空間構造変化を SEP-GluR1 の in vivo イメージングで解明したい。さらに開発した光照射による GluA1 の機能破壊技術と二光子顕微鏡によるイメージングを同時に行う系を確立し、上記で観察されたさまざまな時空間情報が記憶獲得維持にどのような役割を持つのか、その因果関係に迫る研究を進めたい。シナプス新生は分散型とクラスター型が知られるが、学習記憶においてはその生理的意味が注目されている。これまでの技術限界を突破しうる本研究の成果を用いれば、学習記憶に重要な神経構造の同定に、世界で初めて成功すると期待している。また、本技術を元にして他のシナプス表面分子を光で機能破壊する技術の確立にも力を入れたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究はおおむね研究の狙い通りに進んだと考えているが、全体の研究のスピード自体は当初の考えほどあがらなかった。というのも、どの程度の性能を持つ抗体が要求されるかも含めて、in vivo で CALI を行うのに参考となる研究は世の中にはなく、前人未踏の研究であり、手探りでコツコツ研究を進める必要があったためである。そのため「大挑戦型」にぴったりの研究であると自負している。その過程で、挑戦的な研究をいかにリスクを減らしつつ確実に進めていくか？どうマネジメントするか？について5年半で多くのことを学べたと考えている。本研究は、川人先生を初め多くの研究者からアドバイスをいただき、さらに総括裁量による研究期間延長を認めて頂けたため、大挑戦的研究であっても焦ることなくじっくり研究に打ち込むことができた。また領域会議等で時間をかけて議論していただける環境は、大挑戦型の私には特に重要な時間であり、こうした研究にも多くのサポートをいただき大変感謝している。本研究は現在投稿中であるが、できるだけ速く世の中に発表し、多くの研究者が使用する技術に育てていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

研究の進捗状況は良好であり、研究目標はほぼ達成された。大挑戦型の研究として、非常に挑戦的な、いわばハイリスク・ハイインパクトな課題に挑んだが、研究に精進して成果をあげ、2年間の期間延長の間にさらに研究が加速され、in vivo での研究目標を達成したことは高く評価できる。脳活動の基礎は学習により獲得された記憶である。脳内での情報伝達・記憶の最小単位はシナプスレベルにある。本研究では、記憶に関する機構をシナプスレベルで解明し、これに操作を加え、記憶を変容させる新技術開発に系統的に挑戦し、in vivo での測定を可能とした点に大きな価値がある。2光子顕微鏡と組み合わせることで、この新技術は、記憶の分子機構の解明に寄与することが期待される。学習・記憶の過程で AMPA 受容体 GluR1 は極めて重要な役割を担う。この GluR1 を光で機能破壊するため、CALI 法を用いた。この方法は光照射依存的に活性酸素を放出する光増感剤を用いるタンパク質機能破壊法である。活性酸素の拡散半径は数 nm であるため、目的分子の特異的な機能破壊が期待できる。受容体と光増感剤は特異的抗体で結合される。この新技術は、同じ細胞内局在を示す NMDA 受容体を機能破壊せず、外来性・内因性の GluR1 だけを壊す高い特異性を持つ。これらの抗体の開発は培養株細胞、初代培養神経細胞、in vivo と段階を追って改良が続けられ、in vivo で実用となる抗体の開発に成功した。なお、特許を1件出願している。

In vivo でシナプス変容を行動課題で確認する手段として、文脈的恐怖条件付け学習を用いた。この学習は、海馬の CA3-CA1 シナプスの AMPA 受容体依存的に起こる。学習成績は明箱から暗箱に入るまでの時間の長さで定量化できる。学習後 0.5-2hr で光照射すると、効果的に記憶が消去できることを見出した。また、学習後 24hr では記憶は消去できなかった。これは GluA1 ホモマーのシナプス移行が学習後 0.5-2hr で起こり、24hr では起こっていないことと一致する。学習前の光照射は、その後の学習には影響しないことから、新たにシナプスに運ばれる GluA1 を機能

破壊することで記憶は消去されることがしめされた。また、学習後1時間で光照射後、急性スライスを作製し、光照射で GluA1 ホモマーが実際に機能破壊されたことも確認した。なお、光照射直後と翌日での行動テスト結果には差がみられず、GluA1 ホモマー機能破壊による記憶消去は不可逆的であることが示唆された。

さらに開発した CALI 技術を、記憶がコードされているシナプスを特定する基礎技術として発展させる方向に歩を進めている。個々のシナプスの状態を二光子顕微鏡でモニタしつつ、光操作を行い、シナプスの持つ時空間的情報と記憶コードの関係を探索する。GluA1 のシナプス移行をより安定的にモニタするため、pH 依存性 GFP(SEP)を GluA1 に融合し、それをニューロンに発現する実験系を導入した。臨界期のマウスバレル皮質のイメージングを行い、特定の遺伝子変異を持つマウスでは、臨界期が大幅に延長し、adult マウスでも GluA1 がシナプス移行をし続けることを明らかにできた。現在はこの実験系をマウス海馬に導入することを目指している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takemoto K, Matsuda T, Sakai N, Fu D, Noda M, Uchiyama S, Kotera I, Arai Y, Horiuchi M, Fukui K, Ayabe T, Inagaki F, Suzuki H, Nagai T. "SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation" **Sci.Rep.**, 2013 3, 2629
2. Takemoto K, Matsuda T, McDougall M, Klaubert D, Hasegawa A, Los G, Wood K, Miyawaki A, Nagai T "Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag fusion proteins labeled with eosin in living cells." **ACS Chem. Biol.**, 2011, 6(5):401-406
3. Jitsuki S, Takemoto K, Kawasaki T, Tada T, Takahashi A, Becamel C, Sano A, Yuzaki M, Zukin RS, Ziff EB, Kessels HW, and Takahashi T. "Serotonin mediates cross-modal reorganization of cortical circuits." **Neuron**, 2011 69(4):780-92

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. Takemoto K, Nagai T, Takahashi T

Light induced inactivation of AMPA receptors toward an artificial memory erasure
(第 90 回日本生理学会 日本神経科学学会連携シンポジウム 2013)

2. Takemoto K, Nagai T, Takahashi T "Light induced loss of function technology for AMPA receptors toward an artificial memory erasure" (International symposium, 20th Annual Meeting of Bioimaging Society, Chitose, Japan 2011)

ポスター発表

1. Optical inactivation of AMPA receptors for artificial memory erasure

Kiwamu Takemoto, Hiroko Iwanari, Takeharu Nagai, Takao Hamakubo and Takuya Takahashi (Neuro 2014, Yokohama, 2014, Sep)