

単一神経細胞による記憶 (Single-cell memory) を世界で初めて発見 — 記憶メカニズムの定説を書き換え —

名古屋大学大学院理学研究科（研究科長：松本 邦弘）の森 郁恵（もり いくえ）教授と貝淵 弘三（かいぶち こうぞう）教授（同大学院医学系研究科）らの共同研究チームは、線虫をモデル系とする大規模リン酸化プロテオミクス解析を、世界に先駆けて成功させることにより、新規の記憶メカニズムを同定することに成功しました。

古くから記憶・学習の成立機構には様々な仮説が提案されてきましたが、現在のところシナプス説が最も有力です。シナプス説とは、記憶や学習が多細胞間の相互作用によって支えられており、特に神経回路網内でのシナプス伝達効率が増加する「シナプスの可塑的変化」によって成り立つとする説です。現在までこの説は多くの実験的、理論的な支持を得ています。

今回の研究チームの解析から、神経細胞の中には、シナプス結合による他の細胞との相互作用を断絶した状態でも、単一細胞として記憶を形成できる能力を持つものが存在することが示されました。この研究成果は、神経細胞間の相互作用を基盤とする神経回路レベルでの記憶以外にも、単独の神経細胞レベルでの記憶（単一神経細胞記憶）が存在することを実証するものです。

本研究により発見された単一神経細胞記憶は、従来の定説とは異なる、新規の記憶メカニズムです。また、本研究で開発された実験系は、単一神経細胞記憶を解析することができる世界で初の実験系です。この新技法を用いることで、未だ謎の多い記憶・学習の分子メカニズムの解明に新たな道が拓けるものと期待されます。

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）「脳科学研究戦略推進プログラム」（平成27年度より文科省より移管）、新学術領域研究「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」計画研究、CREST・JST「生命システムの動作原理と技術基盤」と日本学術振興会「特別研究員奨励費」の支援を受けて行ったもので、国際科学誌「*Cell Reports*」に2015年12月24日 12:00pm（アメリカ東部標準時）付けで発表されました。

【ポイント】

- ・ 従来の定説とは異なる新規の記憶メカニズムを発見
- ・ リン酸化プロテオミクス解析により、単一神経細胞記憶に重要な分子経路を同定
- ・ 記憶メカニズムの完全解明や精神神経疾患の治療への貢献が期待される

【背景】

共同研究チームは、これまでに線虫 *C. elegans*（シーエレガンス）¹⁾ の温度走性行動をモデル系として、記憶・学習のメカニズムおよびその破綻による精神・神経疾患の発症機序の解明を目指して、研究を実施してきました。温度走性行動とは、一定の温度で、餌の存在する条件下で飼育された個体が、餌のない温度勾配上で、過去に体験した飼育温度へ移動する行動です。この行動をつかさどる神経回路が同定されており、その回路の最も上流に位置するのが、温度受容細胞である AFD ニューロンです²⁾。興味深いことに、15°C

で飼育した線虫の AFD ニューロンは、15°C 付近の環境に線虫がいるとき応答し、また 25°C で飼育した線虫の AFD ニューロンは、25°C 付近の環境に線虫がいるとき応答します。このことから、AFD ニューロンは温度を感知するだけでなく、感知した温度を自身で記憶している温度記憶細胞である可能性が示唆されていました。さらに、細胞体から切り離された AFD ニューロンの神経末端や、AFD とシナプス結合する AWA や AIY ニューロンが欠損する変異体においても、この飼育温度に依存した温度応答は観察することができ、AFD ニューロンは単独で温度記憶を成立させている可能性が高いと考えられました。しかしながら、AFD ニューロンは、AWA や AIY ニューロン以外にも神経接続する細胞をもつこと、また、神経内分泌因子が記憶の成立に寄与する可能性を排除できないことから、既存の実験系では神経細胞単独での記憶形成を検証することができませんでした。

【研究の内容】

本研究では、AFD ニューロンの初代培養系を確立し、AFD ニューロンを他の細胞から完全に隔離した条件下で、温度記憶が形成されるか検証を行いました。具体的には、まず、神経活動の指標である細胞内カルシウムイオン濃度の変化に応じて蛍光強度が変化する GCaMP3 分子³⁾ が AFD ニューロンで特異的に働く線虫系統を樹立し、その系統の個体群から胚細胞を単離して AFD ニューロンの初代培養系を確立しました。次に、初代培養 AFD ニューロンが、培養温度を記憶するかを、カルシウムイメージング⁴⁾ で検証したところ、培養温度依存的な温度応答が観察されました (図 1)。この結果は、AFD ニューロンにおける記憶形成は、他の細胞との相互作用を必要としないこと示しており、多数のニューロンが協調的に相互作用することで記憶・学習が成立するという、これまでの記憶・学習のパラダイムに全く新しい視点を与えるものです (図 2)。

次に研究チームは、この単一の神経細胞による記憶の分子レベルでの実体を解き明かすため、遺伝子変異体を用いた解析を実施しました。様々な遺伝子の変異体について解析を行った結果、*cmk-1* 遺伝子の機能欠損変異体において、この単一神経細胞の記憶に深刻な異常が観察されました。この *cmk-1* 遺伝子は生物種を超えて広く保存されたカルシウム-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ CaMKI/IV をコードします。CaMKI/IV はヒトを含む多くの動物種の脳でタンパク質をリン酸化する酵素として機能していることが知られていましたが、そのリン酸化の標的となる分子は不明でした。そこで我々は、線虫の全タンパク質に対して、ヒトの CaMKI タンパク質を用いたリン酸化プロテオミクス解析⁵⁾ を実施し、CaMKI/IV の標的分子の網羅的な探索を行いました。この解析により、ヒト CaMKI のリン酸化標的分子の候補として 38 の線虫タンパク質を同定し、さらにこれらのタンパク質の中に含まれていた Raf キナーゼの欠損が単一神経細胞の記憶に異常を引き起こすことを突き止めました。Raf は、線虫からヒトまで保存された Raf-MEK-ERK-MED23 という分子経路を形成していることが知られていましたが、神経細胞における機能は未知のままでした。そこで本研究では、CaMKI/IV や Raf だけでなく、MEK、ERK、MED23 についても、それらをコードする遺伝子の変異体について単一神経細胞記憶の解析を行い、CaMKI/IV-Raf-MEK-ERK-MED23 という分子経路が単一神経細胞記憶の成立に重要であることを見出しました。

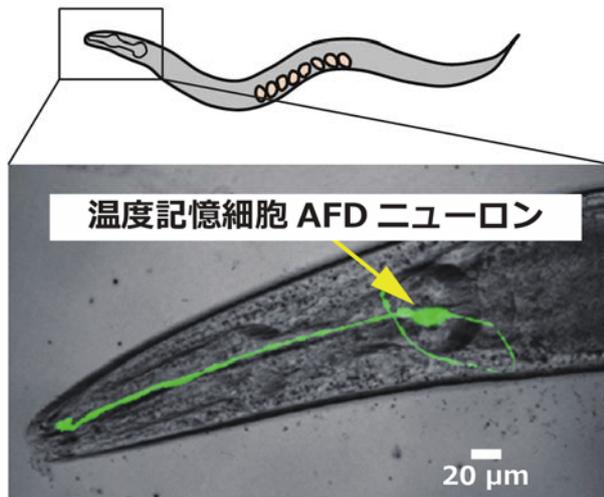
【成果の意義】

古くから“記憶の座”としてシナプスが注目され、複数の細胞が協調して機能することで記憶を蓄えると考えられてきました。しかしながら、本研究により、一部の神経細胞は、細胞単独で物事を記憶するということが初めて示されました。この研究成果は、将来の神経科学研究に対し、神経ネットワークだけでなく、個々の細胞 1 つ 1 つにも記憶が宿り得るという新概念を与えるものであり、長年にわたり生物学の課題とされてきた脳神経系における記憶メカニズムの完全解明に大きく寄与できるものと考えられます。また、リン酸

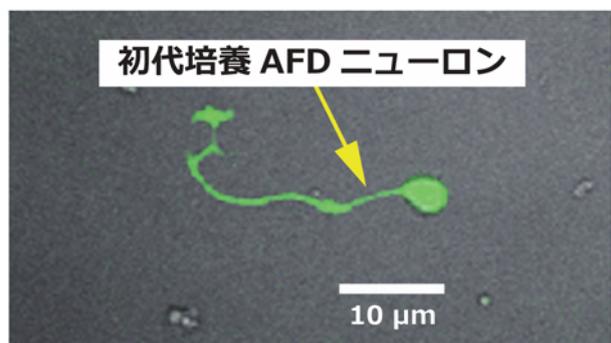
化プロテオミクス解析により、単一神経細胞記憶の分子実体として、CaMKI/IV-Raf-MEK-ERK-MED23 という分子経路が明らかになりました。これらの記憶制御分子を治療ターゲットとすることで、神経疾患や精神疾患に対して、新たな創薬開発に展開させることが、将来的に可能となるかもしれません。

図 1

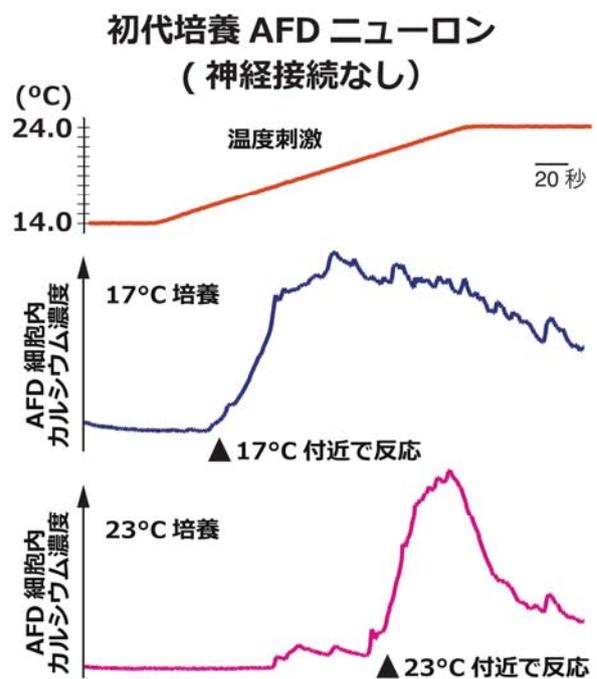
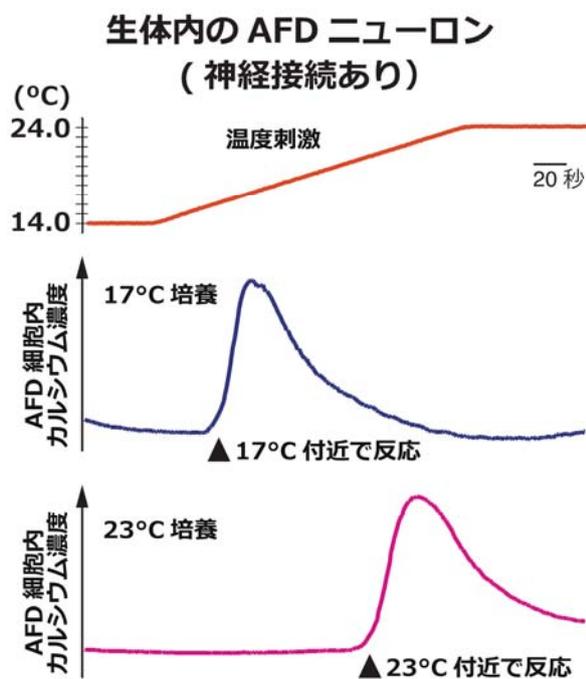
線虫 *C. elegans*



線虫頭部に存在する AFD ニューロンの蛍光顕微鏡画像。AFD ニューロンを緑色蛍光タンパク質にて可視化。

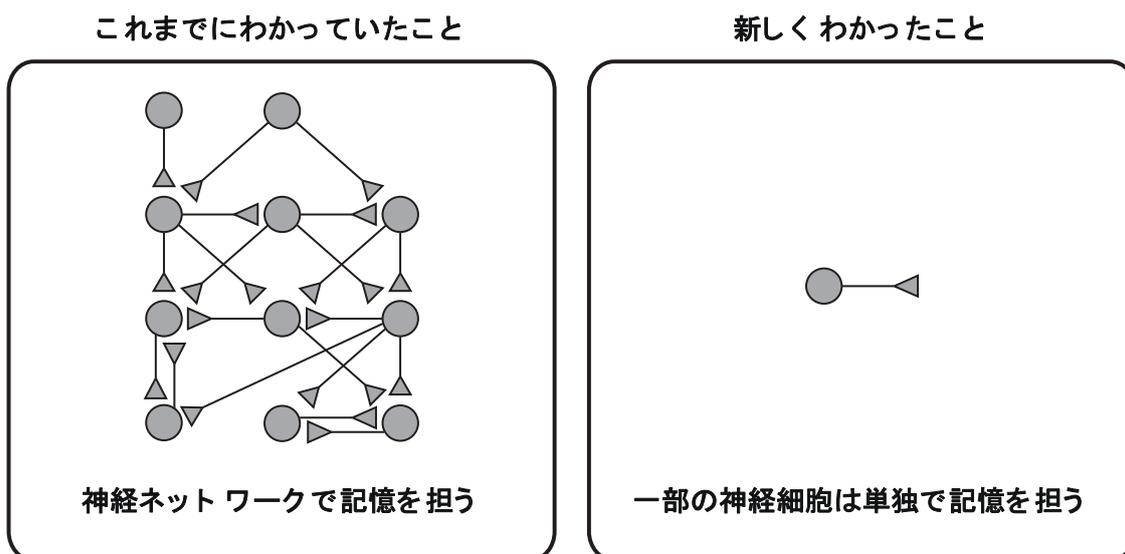


初代培養 AFD ニューロン。他の細胞との神経接続が完全に断絶されている。



神経接続がなくとも、細胞が単独で温度を記憶

図 2



【用語説明】

- 1) 線虫 *C. elegans* (シーエレガンス、学名 *Caenorhabditis elegans*) :
世界中で広く研究に利用されている実験動物。体長約 1mm で透明な体を持ち、自然界では土の中に生息。線虫の神経系で機能する多数の分子は、ヒトでも同じ働きをすることが知られている。
- 2) AFD ニューロン (AFD 神経細胞) :
線虫 *C. elegans* の頭部に存在する温度受容細胞。本研究により、温度の受容だけでなく、受容した温度の記憶も担う細胞であることが判明した。線虫 *C. elegans* には 302 個の神経細胞があり、そのすべてにアルファベット 3 文字表記による名前がついている。AFD ニューロンとシナプス接続する神経細胞として AWA ニューロン、AIY ニューロンなどがある。
- 3) GCaMP3 分子 :
カルシウムイオン濃度によって蛍光の明るさが変化するカルシウムセンサー分子。緑色蛍光タンパク質 (GFP) をもとに開発され、カルシウムイオン濃度が低いと弱い蛍光を発し、カルシウムイオン濃度が高いと強い蛍光を発する。これを利用し、生体内のカルシウムイオン濃度の変化を GCaMP3 分子が発する蛍光の明るさの変化としてモニターすることができる。
- 4) カルシウムイメージング :
細胞内のカルシウムイオン濃度変化を観測する実験手法。本研究では、カルシウムイオン濃度に応じて蛍光強度が変化する GCaMP3 分子を用いて、AFD ニューロン内のカルシウムイオン濃度変化を測定した。
- 5) リン酸化プロテオミクス解析 :
あるリン酸化酵素の標的基質を網羅的に同定する実験手法。本研究では、ヒト CaMKI タンパク質のリン酸化修飾を受ける分子として、線虫の全タンパク質の中から 38 のタンパク質を同定した。

【論文名】

Single-cell memory regulates a neural circuit for sensory behavior

DOI : 10.1016/j.celrep.2015.11.064