

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500318

研究課題名（和文） Spacing effect の分子メカニズム

研究課題名（英文） The molecular mechanisms of spacing effect

研究代表者

宮下 知之 (MIYASHITA TOMOYUKI)

財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野 主任研究員

研究者番号：70270668

研究成果の概要（和文）：

長期記憶の形成は、training を複数回、間隔 (inter trial interval, ITI) を空けて繰り返す spaced training で促進され、間隔を空けずに繰り返す massed training では阻害される。これまでの研究から ITI で MAPK が活性化されることが示されているが、MAPK の役割には不明な点が多。我々は長期記憶形成に必須の転写因子 CREB と c-fos 間の転写サイクルが spaced training で形成されること、この転写サイクルが長期記憶形成に必須であること、さらに ITI での MAPK 活性化はこの転写サイクルの開始と維持に必要なことを見出した。spaced training において MAPK は ITI により活性化される一方、training により不活性化される。従って ITI の無い、連続した training で構成される massed training では MAPK の活性化が抑制される。長期記憶の形成は MAPK の不活性化も含む MAPK 活性の周期的な変化が重要とする説があるが、training 中でも MAPK の活性が抑制されない変異体では、massed training でも CREB- c-fos の転写サイクルが活性化し長期記憶が形成されることを見出した。これらの結果は spaced training 中の MAPK 活性の周期的な変化ではなく、活性の総量が長期記憶の量を決定していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Memory formed after spaced training, repeated training with rest intervals between each training, is more stable than memory formed after massed training, repeated training without rest intervals. This “spacing effect” on memory was reported more than 100 yrs ago. However, it is still not clear why rest intervals strengthen memory. In *Drosophila*, spaced training produces CREB-dependent long-term memory (LTM) whereas, massed training suppresses LTM. Therefore, we examined spacing effect on expressions of CREB and c-fos, an upstream transcription factor of CREB. We found significant increase in expressions of CREB and c-fos during spaced training but not massed training. Transcriptional activity of c-fos is activated by ERK, which is activated by MEK-dependent phosphorylation. We also found significant increase in phosphorylation of ERK during spaced training. Interestingly, however, ERK phosphorylation was increased during each rest intervals and decreased during each training period. MEK inhibitors exclusively impaired LTM formation. These results suggest that rest intervals of spaced training is required for activation of ERK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：Spacing effect, MAPK, CREB
c-fos, drosophila

1. 研究開始当初の背景

正確で長時間の記憶の形成には繰り返しの学習が必要である。さらに学習は時間間隔が短い繰り返しよりも、長い時間をあけて繰り返したほうが有効であることも一般的によく知られている。100年以上前に心理学者の Hermann Ebbinghaus はこれを実験的に明らかにし、spacing effect として報告した。同じ内容の学習を同じ回数くり返したとしても、学習の間に任意の時間をおく spaced training で形成される記憶は、間隔をおかずに学習をする massed training で形成される記憶にくらべて強く、長期にわたって保持される記憶となる。しかし Ebbinghaus の報告以来 100 年年以上、spaced または massed training で作られる記憶成分や、その分子メカニズムについての研究はなく、spacing effect の生理的意義は全く明らかにならなかった。1994年に Tully らは、ショウジョウバエを用いた研究ではじめて spaced training や massed training によって形成される記憶成分を明らかにした。massed training (1分間隔で10回 training) を行い 24時間後に観察される記憶は、転写またはタンパク合成の阻害剤に影響を受けない、遺伝子発現やタンパク合成に非依存的な記憶成分(麻酔耐性記憶)であり、training 後約4日で消失する記憶であった。一方 spaced training (15分間隔で10回 training) を行い 24時間後に観察される記憶は、転写やタンパク合成に依存的な記憶成分(長期記憶)と麻酔耐性記憶が合わさった記憶で、1週間保持される記憶であった。この研究により、学習と学習の「間隔」、すなわち spacing effect により、長期記憶が作られること、間隔をな

くすと長期記憶が抑制されることが明らかとなった。しかし、spacing effect が何故長期記憶を作り出すのか？その分子メカニズムは全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、長期記憶形成がおこる spaced training と長期記憶形成が抑制される massed training では何が異なるために長期記憶形成に違いがおこるのか？を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

学習、記憶の分子メカニズムを調べるにあたり、近年よく使われるようになったショウジョウバエを用いて行動学的、分子生物学的、さらに生化学的な手法を用いて実験を行う。ショウジョウバエに15分間隔で trial を行う spaced training と、間隔の無い massed training を行い、長期記憶形成に必要な遺伝子発現や遺伝子発現をコントロールしている酵素群の活性化を QPCR や、Western blotting で調べる。遺伝学的や薬理的に遺伝子発現や酵素の活性化を変化させる。

4. 研究成果

(1) 長期記憶形成に重要な CREB の直接の下流である c-fos の発現変化を spaced training と massed training で比較すると、spaced training 中のみ c-fos の発現上昇が見られた。

(2) CREB 自身の発現も spaced training で上

昇するが、massed training では変化しなかった。

(3) c-fos は c-jun と共に AP-1 を形成し、CREB の発現を調節していることから、c-fos と CREB がお互いを転写する、転写サイクルが spaced training 中におこることで、CREB が増加していることが明らかになった。

(4) CREB や AP-1 の転写活性を上げる MAPK の活性は、spaced training で高く、massed training では低くなっていた。

(5) MAPK の活性化は trial がきっかけとなるが、trial 自身が MAPK の活性を抑制していた。このため MAPK は spaced training の trial と trial の間 (ITI) のみで活性化していることが明らかになった。trial と trial の間に間隔を持たない massed training では MAPK が活性化できないために長期記憶形成が抑制されていた。通常行われている 15 分の ITI に比べ短い 5 分の ITI にすると、MAPK が十分に活性化できず、長期記憶成分も少なくなった。

(6) MAPK の活性化を負に制御している遺伝子の変異体では、MAPK の活性化が、Massed training でもおこる。この時、これらの変異体では massed training でも長期記憶形成がおこることが明らかになった。

(7) CREB と c-fos の転写サイクルは MAPK の活性化がエンジンとなっておこっており、この結果、長期記憶が形成、強化されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Tomoyuki Miyashita, Yoshiaki Oda, Junjiro Horiuchi, Jerry C. P. Yin, Takako Morimoto and Minoru Saitoe., Mg²⁺ block of Drosophila NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression., *Neuron.*, in press. 査読 有り

② Hirano Y, Kuriyama Y, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M., Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in

Drosophila., *Genes Brain Behav.*, 2012 Feb;11(1):79-86. 査読 有り

③ Daisuke Yamazaki, Junjiro Horiuchi, Tomoyuki Miyashita, and Minoru Saitoe., Acute Inhibition of PKA Activity at Old Ages Ameliorates Age-Related Memory Impairment in *Drosophila.*, *J. Neurosci.* 2010 30: 15573-15577. 査読 有り

④ Tamura T, Horiuchi D, Chen YC, Sone M, Miyashita T, Saitoe M, Yoshimura N, Chiang AS, Okazawa H. *Drosophila* PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning., *J Neurosci.*, 2010 Oct 20;30(42): 14091-101. 査読 有り

[学会発表] (計 5 件)

① 宮下知之、齊藤実 MAPK依存性に形成される c-Fos/CREB 間転写サイクルが長期記憶を形成する 新学術領域：神経系の動作原理を明らかにあるためのシステム分子行動学 班会議 2011年8月20日～22日 神戸国際会議場

② 宮下知之 脳の老化とメラトニン 第11回 公開学会総会 2011年5月27日～29日 京都国際会議場

③ 宮下知之、齊藤実 長期記憶形成に何故「間」が必要なのか? 第33回 日本分子生物学会年会 2010年12月6日～10日 神戸国際会議場

④ 宮下知之、齊藤実 長期記憶形成に何故「間」が必要なのか? 新学術領域：神経系の動作原理を明らかにあるためのシステム分子行動学 班会議 2009年11月18日～20日 ヤマハリゾート掛川

⑤ 宮下知之、齊藤実 Why rest interval required for long term memory. 第32回 日本神経科学大会 2009年9月16～18日 名古屋国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/memory/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 知之 (MIYASHITA TOMOYUKI)
財団法人東京都医学総合研究所・運動・感
覚システム研究分野 主任研究員
研究者番号：70270668

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし