

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6月4日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21530771

研究課題名（和文） 記憶の概日リズムに関する生理心理学的研究

研究課題名（英文） Psychological and physiological studies on circadian rhythm in the memory system

研究代表者

岡田 隆（OKADA TAKASHI）

上智大学・総合人間科学部・教授

研究者番号：00242082

研究成果の概要（和文）：記憶の生理学的基礎である海馬長期増強は、分泌が概日リズムを示すメラトニンにより抑制される。本研究では、メラトニンが長期増強を抑制する機序について電気生理学的手法により検討した。一酸化窒素合成酵素抑制剤およびメラトニンによる長期増強抑制は共通の機序を介し、また一酸化窒素供与体により長期増強抑制がなくなったことから、メラトニンによる長期増強抑制が一酸化窒素信号経路を介したものであることが示された。

研究成果の概要（英文）：Hippocampal long-term potentiation (LTP), which is thought of as a candidate for the physiological basis of memory, is reportedly reduced in the presence of melatonin, whose pattern of secretion shows a circadian rhythm. In this study, I electrophysiologically examined the mechanisms of inhibition of hippocampal LTP by melatonin. The inhibitory effects of an inhibitor of NO synthase and melatonin were occluded by each other, and an NO donor disrupted the inhibition of LTP, which leads to the idea that the target of melatonin for LTP inhibition is the NO pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：海馬、長期増強、メラトニン、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

海馬シナプス応答の長期増強は、学習・記憶の生物学的基礎の有力な候補である。海馬の長期増強は概日リズムを示し（Harris & Teyler, 1982; Raghavan et al., 1999; Chaudhury et al., 2005）、海馬依存性の学習成績も概日リズムを示す（Cain et al., 2004; Ralph et al., 2002）。学習成績の日内変動メカニズムを解明するためには、日内変動をも

って長期増強や学習を調節するような内在性物質を同定する必要がある。

そのような可能性のある物質の一つがメラトニンである。メラトニンは主に松果体から分泌されるホルモンであり、その分泌パターンは概日リズムを示す。すなわち、昼行性動物でも夜行性動物でも、夜間に分泌が多く日中に分泌が少ない（Pandi-Perumal et al., 2008）。メラトニンが作用する受容体 MT1

と MT2 はいずれも海馬に発現しており (Mazzucchelli et al., 1996; Musshoff et al., 2002; Savaskan et al., 2005)、メラトニンは膜を透過し細胞内物質にも直接作用しうる (Shida et al., 1994; Costa et al., 1995)。先行研究によるとメラトニンは海馬やその他の領域で長期増強を抑制するが (Collins & Davies, 1997; Soto-Moyano et al., 2006; Wang et al., 2005)、行動レベルの研究からは、ゼブラフィッシュでメラトニンが記憶形成を阻害し (Rawashdeh et al., 2007) ラットでメラトニン合成阻害薬が空間記憶課題を低下させる (Zhu et al., 2004) といったように、メラトニンの効果に関する結果は一致していない。記憶の概日リズムに及ぼすメラトニンの影響を解明するためには、メラトニンの標的分子を同定することが肝要である。

2. 研究の目的

メラトニンによる海馬長期増強抑制のメカニズムの一つとして提唱されていたのはアデニル酸シクラーゼ (AC)・A キナーゼ (PKA) 信号経路であり、MT2 メラトニン受容体を介する抑制とされている (Wang et al., 2005)。本研究では、それとは別のメラトニンの標的である一酸化窒素 (NO) / 環状 GMP (cGMP) 信号経路に着目する。この経路も、海馬の長期増強に重要であることが知られている (Böhme et al., 1991; Schuman & Madison, 1991; Arancio et al., 1996; Doyle et al., 1996; Son et al., 1996; Bon & Garthwaite, 2003; Hopper & Garthwaite, 2006)。テタヌス刺激後に、シナプス後部の Ca^{2+} 濃度が上昇すると、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 活性化により一酸化窒素が合成され、それが細胞外に拡散して可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylyl cyclase (sGC)) に結合する。その結果、cGMP の合成、G キナーゼ (PKG) の活性化が生じ、長期増強が誘導される。メラトニンおよびその代謝産物がフリーラジカルを消すという報告があり (Pandi-Perumal et al., 2006; Tamura et al., 2006; León et al., 2006)、脳の他の領域や細胞組織でメラトニンが NOS の活性化を抑えるという報告もある (León et al., 2006; Tamura et al., 2006)。本研究は、メラトニンによる長期増強抑制が一酸化窒素信号経路の抑制を介したものであるかどうかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) スライス標本

3 週齢のオスの Wistar 系ラットを購入後、少なくとも 1 週間、同一の明暗サイクルで飼育した。明暗サイクルは明期 12 時間 (午前 7 時開始)、暗期 12 時間 (午後 7 時開始) から成り、午前 7 時が ZT 00:00 となる。実

験の際、被験体をペントバルビタール深麻酔し (ZT 01:30-02:00 の期間)、冷却した細胞外液のもとで脳を取り出した。細胞外液の組成は、125 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 2 mM $CaCl_2$; 1 mM $MgCl_2$; 26 mM $NaHCO_3$; 1.25 mM NaH_2PO_4 , and 10 mM D-グルコース、95% O_2 および 5% CO_2 にて飽和、pH は 7.4)。海馬スライス (400 μm 厚) 作製後、少なくとも 1 時間、32°C 保温下で保存した。

(2) 電気生理学的記録

ナイロン糸を張った U 型プラチナを用いて各スライスを記録チャンバーに設置し、分速 1.5~2.0 mL で灌流液を与えた。細胞外液の温度は、インラインヒーターを用いて 31~33°C に保った。CA3 から CA1 に投射するシナプス前線維を刺激するため、同心タングステン双極電極をシャフター側枝上に配置した。細胞外集合興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) を記録するため、細胞外液を詰めたガラス微小電極を、CA1 放線層に配置した。テスト刺激は、最大応答の半分を引き起こす強度に調節し、0.1 Hz の頻度、100 μsec の持続時間で与えた。安定したシナプス応答を少なくとも 15 分間記録した後、高頻度刺激 (high frequency stimulation, HFS) を 1 秒間、100 pulses を 100 Hz の頻度で与えた。その後、テスト刺激に対するシナプス応答を再度記録し、60 分間続けた。

ペアパルス促進 (paired-pulse facilitation, PPF) を記録するためには、安定した fEPSP を少なくとも 15 分間記録した後で、ペアパルス刺激 (刺激間隔: 50 ms) を同強度・同持続時間で 5 回与えた。5 分間 fEPSP を記録した後、高頻度刺激 (100 pulses, 100 Hz) を与え、続いてテスト刺激への応答を 60 分間記録した後に、ペアパルスを再度同じプロトコルで与え、PPF 比を高頻度刺激前と長期増強誘導後とで比較した。

fEPSP の増幅はパッチクランプ用増幅器 (CEZ-2300) の電流固定モードで行った。データの記録と解析には、Axon 社の pClamp system (Version 8) を用いた。本報告書中の fEPSP 相対値は、平均土標準誤差で示してある。有意水準は 5% とした。

(3) 材料

L-NAME、L-NMMA、DEA/NO、H-89、DMSO は SIGMA のものを使用した。メラトニンは、DMSO に溶かした 100 μM ストック液を細胞外液に加えることにより最終濃度 100 nM (0.1% DMSO) とするか、10 mM ストック液を細胞外液に加えることにより最終濃度 10 μM (0.1% DMSO) とした。H-89 は、DMSO に溶かした 10 mM ストック液を細胞外液に加えることにより最終濃度 10

μM (0.1% DMSO) とした。メラトニンを含む溶液は実験前に毎日新しいものを作成した。メラトニンを含む液を入れた瓶はアルミホイルで遮光した。DEA/NO は水に溶かして 30 mM ストック液 (冷凍保存) とし、海馬スライスへの投与の直前に細胞外液に加えて使用した (最終濃度 3 μM)。これ以外の試薬は和光純薬のものを使用した。

4. 研究成果

(1) メラトニンによる長期増強抑制

メラトニン (100 nM) がラットの海馬スライスにおいて CA1 の長期増強を抑制するかどうかをまず確認した。メラトニンのない統制条件では、高頻度刺激 (100 Hz, 1 sec) によって fEPSP が増強し、高頻度刺激から 55~60 分後、ベースラインよりも有意に大きかった ($n = 14, 1.45 \pm 0.07, t(13) = 6.32, P < 0.001$) (図 1B の白丸)。つまり、この実験手続きによって長期増強が有意に生じた。100 nM メラトニン存在下でも長期増強は誘導されたが ($n = 11, 1.21 \pm 0.07, t(10) = 2.72, P = 0.022$) (図 1B の灰丸)、この場合の長期増強の程度はメラトニンがない場合に比べて有意に小さかった ($t(23) = 2.41, P = 0.024$)。つまり、100 nM メラトニンは、海馬 CA1 シナプスの長期増強の大きさを抑制することがわかった。

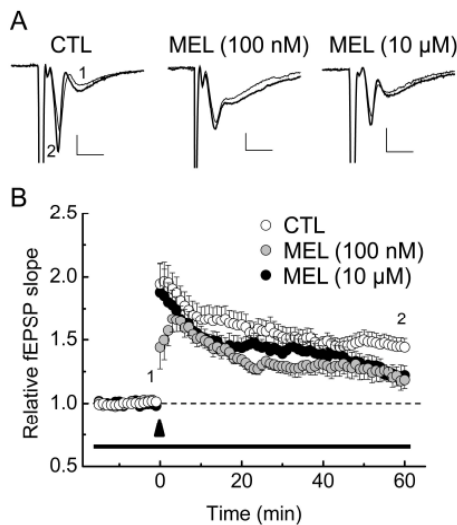


図 1 メラトニンによる海馬長期増強の抑制

ここで用いた 100 nM という濃度が、長期増強抑制を最大に引き起こしうる濃度なのかを確認するため、より高い濃度のメラトニン (10 μM) を投与し同様の実験を行った。10 μM のメラトニン存在下で長期増強は生じ ($n = 11, 1.22 \pm 0.07, t(10) = 3.01, P = 0.013$) (図 1B、黒丸)、また長期増強の程度はメラトニンがない場合よりも有意に小さかった ($t(23) = 2.29, P = 0.032$)。そして、

その抑制の程度は、メラトニン 100 nM の場合と 10 μM の場合との間に有意差はなかった ($t(20) = 0.12, n.s.$)。本研究の実験条件下では、100 nM 濃度のメラトニンが長期増強抑制を最大に引き起こしうるということがわかったので、以下の実験においてもメラトニンは 100 nM 濃度を使用することにした。

(2) メラトニンによる一酸化窒素経路抑制

長期増強に対するメラトニンの抑制効果に一酸化窒素経路が含まれているかどうかを検討した。可逆性の一酸化窒素合成酵素抑制剤 (L-NAME, 100 μM) を灌流投与すると、高頻度刺激によって有意な長期増強が誘導されたが ($n = 8, 1.16 \pm 0.03, t(7) = 5.17, P = 0.001$) (図 2B、灰丸)、長期増強の程度は統制群よりも小さかった ($t(20) = 3.06, P = 0.006$)。同様に、非可逆性の一酸化窒素合成酵素抑制剤 (L-NMMA, 100 μM) をスライスのインキュベーション中に 1 時間以上投与した場合にも、高頻度刺激によって有意な長期増強が誘導されたが ($n = 9, 1.22 \pm 0.08, t(8) = 3.15, P = 0.014$) (図 2B、黒丸)、長期増強の程度は統制群よりも小さかった ($t(21) = 2.19, P = 0.040$)。この結果は、統制群条件下での高頻度刺激誘導性長期増強に一酸化窒素が (少なくとも部分的には) 含まれていることを示している。

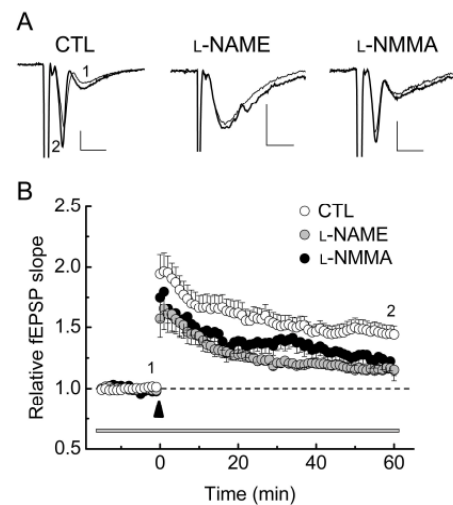


図 2 一酸化窒素合成酵素抑制剤の効果

もしメラトニンが一酸化窒素信号経路を介して長期増強を減少させるのであれば、一酸化窒素合成酵素抑制剤とメラトニンそれぞれによる抑制効果は加算的でないと思われる (互いの効果が遮蔽されるため)。L-NAME とメラトニンを同時に投与した場合、高頻度刺激誘導性の長期増強が有意に生じ ($n = 9, 1.15 \pm 0.05, t(8) = 2.98, P = 0.018$) (図 3B、黒丸)、長期増強の大きさは統制群よりも小さかったが ($t(21) = 3.18, P$

= 0.004)、同時投与の際の長期増強の大きさは、メラトニン (100 nM) 単独投与の場合と有意差はなく、L-NAME 単独投与の場合とも有意差がなかった ($t(15) = 0.22, n.s.$)。これらの結果は、メラトニンが長期増強抑制の際に一酸化窒素信号経路に作用しているという仮説を支持する。

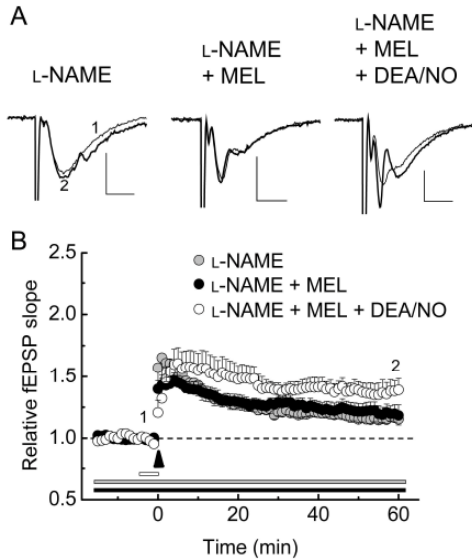


図3 一酸化窒素合成酵素抑制剤の効果

この結果をさらに確認するため、L-NAME とメラトニンによる長期増強抑制が、外来性の一酸化窒素投与によって元に戻るかどうか (抑制がなくなるか) を調べた。一酸化窒素の供与体として、DEA/NO (3 μM) を高頻度刺激直前の5分間に投与し、海馬スライスを一酸化窒素が豊富にある状況下にした。DEA/NO のみが投与された場合にはその60分後の fEPSP に変化はなく (図 4B、黒丸、 $n = 4, 0.94 \pm 0.08$)、高頻度刺激を与えた場合には fEPSP は有意に増強し (図 4B、灰丸、 $n = 6, 1.54 \pm 0.09; t(5) = 6.10, P = 0.002$)、長期増強の程度は統制群と有意差はなかった ($t(18) = 0.71, n.s.$)。次に、L-NAME およびメラトニン投与による長期増強抑制が DEA/NO 投与によってなくなるかを調べたところ、これら3つの物質の存在下では長期増強が誘導され ($n = 10, 1.38 \pm 0.09, t(9) = 4.26, P = 0.002$) (図 3B、白丸)、長期増強の程度は、L-NAME とメラトニン存在下のものより有意に大きかった ($t(17) = 2.13, P = 0.049$)。L-NAME とメラトニンと DEA/NO が存在している際の長期増強の程度はわずかに統制群よりも小さかったが、有意な差ではなかった ($t(22) = 0.66, n.s.$)。

以上の結果より、メラトニンによって生じた長期増強抑制には、一酸化窒素信号経路をメラトニンが抑制するという過程が含まれていることがわかった。

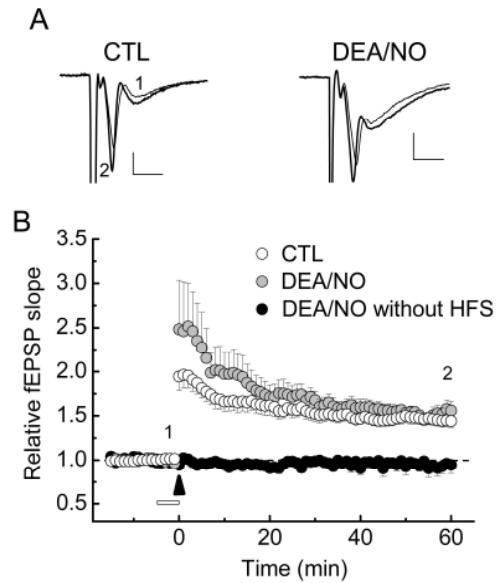


図4 DEA/NO がシナプス応答と長期増強に及ぼす影響

(3) ペアパルス促進に及ぼす L-NAME 投与の効果

一酸化窒素合成酵素抑制剤によって影響を受ける部位について、ペアパルス促進法を用いて検討した。ペアパルス促進の程度の増加はシナプス前終末部における神経伝達物質放出確率の低下を示す指標となる。一酸化窒素合成酵素抑制剤の作用部位がシナプス前部かどうかを検討するため、ペアパルス刺激を高頻度刺激前および長期増強誘導後に与えるという実験を、L-NAME 存在下および非存在下にて行った。統制条件下では ($n = 10$) ペアパルス促進の割合は 1.49 ± 0.08 (高頻度刺激前) および 1.51 ± 0.09 (長期増強誘導後) であり、L-NAME 投与下では ($n = 7$)、ペアパルス促進の割合は 1.63 ± 0.10 (高頻度刺激前) および 1.64 ± 0.09 (長期増強誘導後) であった (図 5)。ペアパルス刺激自体が高頻度刺激によるシナプス応答増大に影響を及ぼすことはなかった (図 2、統制群: $t(22) = 0.99, n.s.$ 、L-NAME 条件: $t(13) = 0.81, n.s.$)。2 要因の分散分析 (高頻度刺激要因: 高頻度刺激の前か長期増強誘導後か、L-NAME 要因: 非存在下か存在下か) の結果、どちらの要因にも主効果はみられず (高頻度刺激要因: $F(1,15) = 0.069, n.s.$; L-NAME 要因: $F(1,15) = 1.680, n.s.$)、交互作用も有意でなかった ($F(1,15) = 0.004, n.s.$)。これらの結果から、今回の研究の実験条件下では、伝達物質の放出確率は高頻度刺激誘導性の長期増強によって変化せず、また L-NAME 投与によってシナプス前部の伝達物質放出への影響は見られなかった。

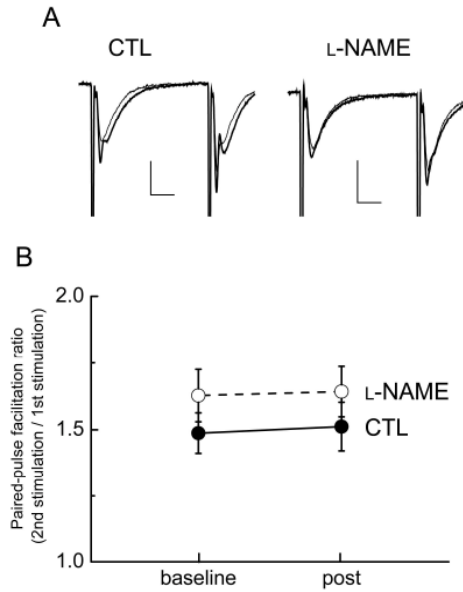


図5 高頻度刺激によるペアパルス促進の変化の有無

(4) NO-cGMP 信号経路と AC-PKA 信号経路との相互作用

メラトニンがアデニル酸シクラーゼ-A キナーゼ (AC-PKA) 経路を介して長期増強を抑制するという知見があるので (Wang et al., 2005)、メラトニンによって生じる長期増強抑制において NO-cGMP 系と AC-PKA 系との間に相互作用のある可能性について検討した。PKA 抑制剤である H-89 (10 μ M) を含んだ液にスライス標本を 1~2 時間浸した場合、有意な長期増強が高頻度刺激によって誘導されたが ($n = 9, 1.17 \pm 0.07, t(8) = 2.45, P = 0.040$) (図 6B, 白丸)、長期増強の程度は統制群よりも小さかった ($t(21) = 2.72, P = 0.013$)。このことから、AC-PKA 信号経路が長期増強誘導に関与していることがわかる。メラトニンによる長期増強抑制に関して NO-cGMP 系と AC-PKA 系との間に相互作用のある可能性を検討するため、メラトニン + L-NAME 投与下での長期増強の大きさ (図 3B) を、メラトニン + L-NAME + H-89 投与下での長期増強の大きさと比較した。H-89 (10 μ M) を含む液に 1~2 時間スライス標本を浸した後、メラトニンと L-NAME 存在下で高頻度刺激により有意な長期増強が誘導され ($n = 10, 1.34 \pm 0.10, t(9) = 3.58, P = 0.006$) (図 6B, 黒丸)、長期増強の大きさに関して、H-89 なしのメラトニン + L-NAME 投与の場合との間に有意差はなかった ($t(17) = 1.51, n.s.$)。これらの知見は、NO-cGMP 系と AC-PKA 系との間の相互作用がメラトニンによる長期増強抑制の際に存在するという可能性を支持するものである。

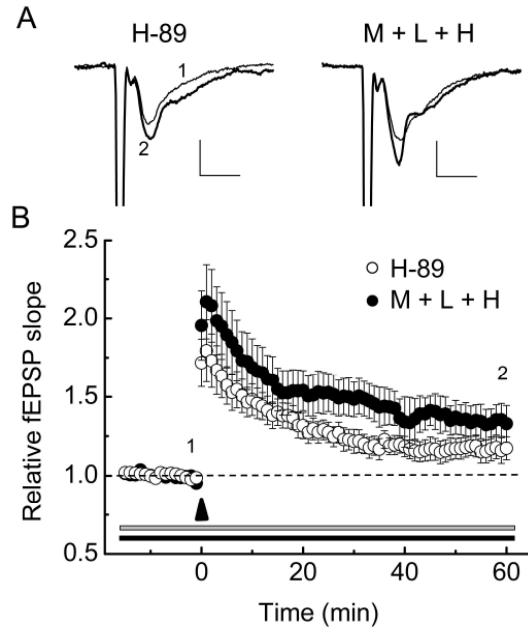


図6 AC-PKA 系と NO-cGMP 系との相互作用

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 5 件)

- ① Suzuki, E. & Okada, T. Stratum oriens stimulation-evoked modulation of hippocampal long-term potentiation involves the activation of muscarinic acetylcholine receptors and the inhibition of Kv7/M potassium ion channels. *European Journal of Neuroscience*, in press, 査読有、DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08127.x
- ② Suzuki, E., Sato, M., Takezawa, R., Usuki, T. & Okada, T. The facilitative effects of bilobalide, a unique constituent of *Ginkgo biloba*, on synaptic transmission and plasticity in hippocampal subfields. *Journal of Physiological Sciences*, 61, 421-427, 2011, 査読有、DOI: 10.1007/s12576-011-0159-6
- ③ Takahashi, Y. & Okada, T. Involvement of the nitric oxide cascade in melatonin-induced inhibition of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Neuroscience Research*, 69, 1-7, 2011, 査読有、DOI: 10.1016/j.neures.2010.09.004
- ④ Suzuki, E. & Okada, T. Group I metabotropic glutamate receptors are involved in TEA-induced long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses in the rat hippocampus. *Brain Research*,

1313, 45-52, 2010、査読有、

DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.059

- ⑤ 岡田隆、海馬シナプス機能を下位領域間で比較する—非侵襲的測定研究の可能性—、基礎心理学研究、28、17-22、2009、査読有、<http://ci.nii.ac.jp/naid/110007482448>

[学会発表] (計20件)

- ① 鈴木江津子・岡田隆、アセチルコリン受容体活性化による海馬長期増強促進における膜電位依存性 Ca²⁺チャネルの関与、日本基礎心理学会第30回大会、2011.12.3、横浜。
- ② 高橋良幸・澤幸祐・岡田隆、ラットの位置再認識成績にみられる日内変動、日本基礎心理学会第30回大会、2011.12.3、横浜。
- ③ 鈴木江津子・岡田隆、海馬 CA1 長期増強の上昇層刺激誘導性促進における刺激強度依存性、第34回日本神経科学大会、2011.9.15、横浜。
- ④ 高橋良幸・澤幸祐・岡田隆、ラットの物体再認識成績にみられる日内変動、日本動物心理学会第71回大会 (Animal2011)、2011.9.9、東京。
- ⑤ 鈴木江津子・岡田隆、アセチルコリン受容体活性化によるラット海馬 CA1 長期増強促進における Kv7/M カリウムイオンチャネルの関与、日本動物心理学会第71回大会 (Animal2011)、2011.9.8、東京。
- ⑥ Suzuki, E. & Okada, T. Modulation of hippocampal long-term potentiation by activation of the muscarinic acetylcholine receptors involves the inhibition of Kv7/M potassium channels. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011.7.16, Florence (Italy).
- ⑦ 高橋良幸・岡田隆、メラトニンによる海馬長期増強減弱効果における一酸化窒素経路と PKA 経路の相互作用、日本基礎心理学会第29回大会、2010.11.27、西宮。
- ⑧ 鈴木江津子・佐藤麻希子・臼杵豊展・岡田隆、イチョウ葉特有成分ピロバライドが海馬神経伝達および可塑性に与える影響、海馬と高次脳機能学会第19回大会、2010.11.20、金沢。
- ⑨ Suzuki, E. & Okada, T. The involvement of Group I mGluR in tetraethylammonium-induced long-term potentiation at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. 第33回日本神経科学大会、2010.9.4、神戸。
- ⑩ Takahashi, Y. & Okada, T. Melatonin inhibits hippocampal LTP via nitric oxide signaling pathway. 第33回日本神経科学大会、2010.9.3、神戸。
- ⑪ 高橋良幸・岡田隆、メラトニンはシナプス後部の一酸化窒素信号経路を介して海馬長期増強を減弱させる、日本動物心理学会第70回大会、2010.8.29、東京。
- ⑫ 鈴木江津子・佐藤麻希子・臼杵豊展・岡田隆、イチョウ葉特有成分ピロバライドがラット海馬神経伝達に与える影響、日本動物心理学会第70回大会、2010.8.29、東京。
- ⑬ Suzuki, E. & Okada, T. The characteristics of tetraethylammonium-induced long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses in the rat hippocampus. 7th FENS forum of European neuroscience, 2010.7.4, Amsterdam (Netherlands).
- ⑭ Takahashi, Y. & Okada, T. Melatonin inhibits long-term hippocampal potentiation via the nitric oxide signaling pathway. 7th FENS forum of European neuroscience, 2010.7.4, Amsterdam (Netherlands).
- ⑮ 高橋良幸・岡田隆、メラトニンによる海馬長期増強の減弱効果は一酸化窒素信号経路を介する、日本基礎心理学会第28回大会、2009.12.5、東京。
- ⑯ 鈴木江津子・岡田隆、海馬苔状線維—CA3シナプス長期増強誘導におけるシナプス後部の関与、日本基礎心理学会第28回大会、2009.12.5、東京。
- ⑰ 鈴木江津子・岡田隆、ラット海馬 CA3 シナプス可塑性における代謝型グルタミン酸受容体の関与、日本動物心理学会第69回大会、2009.9.27、岐阜。
- ⑱ 高橋良幸・岡田隆、ラット海馬長期増強を減弱させるメラトニンの作用機序、日本動物心理学会第69回大会、2009.9.27、岐阜。
- ⑲ Suzuki, E. & Okada, T. Tetraethylammonium-induced long-term plasticity at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009.7.28, Kyoto.
- ⑳ Takahashi, Y. & Okada, T. Melatonin attenuates long-term potentiation via inhibition of nitric oxide signaling pathway in rat hippocampus. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009.7.28, Kyoto.

[図書] (計1件)

- ① 道又 爾・岡田 隆 「認知神経科学」 放送大学教育振興会、2012、1-44、116-153、223-276.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 隆 (OKADA TAKASHI)

上智大学・総合人間科学部・教授

研究者番号：00242082