

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：22303  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26430073  
研究課題名(和文) 連合性長期記憶の検証とその分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) The analysis of late associativity.

## 研究代表者

石川 保幸 (Ishikawa, Yasuyuki)

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：90346320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス可塑性は、学習・記憶の細胞基盤である。我々は、可塑性関連の細胞外プロテアーゼであるニューロプシンがシナプスタグ形成に関与していることを見出している。本研究では、ニューロプシンが個体レベルで連合性長期記憶の行動タグ形成に関与しているかどうかを検討した。短期記憶課題である受動的回避課題または空間的物体認識課題において、マウスを新奇環境に1時間前に暴露することによって連合性長期記憶が誘導されるかどうかを検討した。その結果、我々は、ニューロプシン欠損マウスは受動的回避課題による連合性長期記憶の誘導障害を引き起こし、また空間的物体認識課題による連合性長期記憶は正常であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Synaptic plasticity is widely accepted to provide a cellular basis for learning and memory. An attractive hypothesis for synapse specificity of long-term memory (LTM) is synaptic tagging: synaptic activity generates a tag, which captures the plasticity-related proteins derived outside of synapses. Previously we have been reported that neuropsin, a plasticity-related extracellular protease, was involved in synaptic tag setting. In the present study, we tested the hypothesis that neuropsin was engaged in behavioral tagging for LTM in vivo. Behaviorally, weak training inhibitory passive avoidance task (IA) or spatial object recognition task (SOR), which induces short-term memory (STM) but not LTM, can be consolidated into LTM by exposing animals to novel but not familiar environment 1 h before training. We found that neuropsin deficient mouse impaired such transformation short-term into long-term memory. These results suggest neuropsin as a molecule of behavioral tag setting in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：連合性長期記憶 シナプスタグ 長期記憶 短期記憶 ニューロプシン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1997年 Frey と Morris は連合性長期記憶のモデルともいえるシナプス・タグ仮説を提唱した (Frey U, Morris RG. (1997) Nature. 385)。かれらは海馬急性スライスをを用い、2つの独立したシナプス入力に強刺激と弱刺激を与え、互いに影響し合うかどうかを検討した。ここでの強刺激はタンパク質合成を必要とする長期にわたりシナプス伝達効率が持続する late-LTP を誘導し、弱刺激はタンパク質合成に依存しない短期的なシナプス伝達効率の変化

(early-LTP) を誘導する。この、刺激強度の異なる刺激を独立したシナプスに入力すると、本来、短期間で伝達効率が減衰する弱刺激を入力したシナプスが、長期間シナプス伝達効率を維持するようになる事、つまり early-LTP から late-LTP に変換される事が報告された。この変換された長期にわたる伝達効率の維持は驚くべき事にタンパク質合成に依存せず、強刺激によって誘導される既に合成された可塑性タンパク質に依存する。つまり強刺激によって誘導された可塑性タンパク質(plasticity related proteins; PRPs)と弱刺激によって形成されたシナプス活動の目印である“シナプス・タグ”との機能的相互作用が長期伝達効率の維持を引き起こすと考えられた。この仮説が提唱された後、複数の研究によってシナプス・タグ分子の性質が予測された。シナプス・タグ分子は(1)ある一定の時間内でのみ機能する、(2)一つだけでなく複数存在する可能性がある、といったことが報告された (Barco A. et al. (2008) Neurosci Biobehav Rev. 32)。これまで、私はシナプス・タグの存在を示唆するデータを得ることができ連合性長期可塑性にセリンプロテアーゼ・ニューロプシンが関与している事を見だし、ニューロプシン依存的・非依存的シナプス・タグ形成機構があること (Ishikawa et al. (2008) J. Neurosci. 28)、そしてニューロプシン依存的シナプス・タグ形成機構は LTP 特異的であることを明らかにした (Ishikawa et al. (2011) J. Physiology. 589)。このように急性スライスをを用いた連合性長期可塑性、シナプス・タグ形成機構の研究は進んでいる。

長期可塑性とある種の長期記憶は、いくつかの特徴を共有していると考えられている。例えば、連合性、持続性やタンパク質合成が関与する事などの特徴があげられる。実際、タンパク質合成阻害により長期可塑性や長期記憶が障害される。同様に連合性長期可塑性と連合性長期記憶もまたいくつかのメカニズムを共有しているようである。例えば、Moncada らは短期記憶課題と新奇環境刺激を組み合わせる事により連合性長期記憶が起きることを報告しており、急性スライスをを用いた連合性長期可塑性と同様に新規タンパク質合成が関与していること、

また行動学的なタグの形成が起きていることを示唆している (Moncada et al. (2007) J Neurosci. 27)。しかしながら個体レベルでの連合性長期記憶の知見は少なく、シナプス・タグ形成とその記憶や学習行動とのあいだに、どのような関連性があるのかを明らかにする事は急務であった。

そこで急性スライスおよび個体レベルでの検証を同時に行うことで、より深く記憶のメカニズムを理解する事が可能になる。本研究課題は特に行動学的な連合性長期記憶の機構の解明に焦点をあて研究を進めた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、連合性長期記憶において行動学的・タグ形成およびシナプス・タグ形成における分子機構の解明を目的とする。また、ニューロプシンが LTP 特異的なシナプス・タグ形成に関わることを見いだしていることから (Ishikawa et al. (2011) J. Physiology. 589)、連合性長期記憶におけるニューロプシンの働きについて検討する。

### 3. 研究の方法

短期記憶を誘導するために弱いフットショックによる抑制性回避 (Inhibitory Avoidance: IA) 学習課題を実験で用いる。電気ショック後、高所からの回避時間 (Latency) を測定することにより記憶の程度を評価する。この場合、回避時間が長いほど、よく嫌悪刺激を記憶している事になる。弱いフットショックは、短期抑制性回避記憶 (Inhibitory Avoidance STM: IA-STM) を、強いフットショックは、長期抑制性回避記憶 (Inhibitory Avoidance LTM: IA-LTM) を誘導する。次に弱いフットショックによる短期記憶形成の前後に新奇環境刺激 (Open Field stimulation: OF) を加えることで記憶の変化を評価する。新奇環境刺激により、海馬における新規タンパク質合成依存的に弱いフットショックによる短期記憶が長期記憶に変化する、すなわち連合性長期記憶が成立する (Moncada et al. (2007) J Neurosci. 27)。新奇環境刺激による短期記憶の長期記憶への変換がシナプス・タグと同様、タンパク質合成が関与しているかカニューレをもちいて両側海馬内にタンパク質合成阻害剤アノソマイシンを注入することで連合性長期記憶への影響を検討する。直接海馬内に注入する事により局所的薬剤効果が見られる事が期待できる。これまで、わたしは急性スライスをもちいた実験によりニューロプシンがシナプス・タグ形成に深く関わっている事を報告した (Ishikawa et al. (2008) J. Neurosci. 28, Ishikawa et al. (2011) J. Physiology. 589)。本研究課題において個体レベルで行動学的・タグ形成にニューロプシンが関与をしているかどうかを、すでに作成済みであるニューロプ

シン欠損マウスをもちいて明らかにしていく。同時に、昆虫培養細胞から精製した組み換えニューロプシン蛋白質を海馬内に注入することでニューロプシン欠損による連合性長期記憶の障害が回復するかどうかを検討する。これまでの研究で得られている、急性スライスを用いたシナプスレベルでの知見と比較しながら、個体レベルでの連合性長期記憶がどのように形成されているかを検討する。フットショックだけでなく空間物質認識記憶課題など組み合わせることにより、網羅的な記憶学習における連合性長期記憶の解明を試みる。

#### 4. 研究成果

本研究課題ではニューロプシン依存的・非依存的連合性長期記憶のメカニズムが存在することを明らかにすることができた。フットショックによる連合性長期抑制性回避記憶はニューロプシン依存的であった。また、物質空間認識記憶による連合性長期記憶の形成にはニューロプシン非依存的であった。双方の課題とも海馬が関わるのが以前の報告で明らかではあるがなぜ、ニューロプシンの依存性に違いがあるのか本研究結果からは導き出すことは困難であった。これまでの報告から連合性長期抑制性回避記憶は海馬のみならず扁桃核も関わることから、脳領域間(海馬-扁桃核間)でのネットワークにおいてニューロプシンが機能しているのかもしれない。

#### 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6件)

Role of neuropsin in parvalbumin immunoreactivity changes in hippocampal basket terminals of mice reared in various environments. Suzuki H, Kanagawa D, Nakazawa H, Tawara-Hirata Y, Kogure Y, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Ishikawa Y, Shiosaka S. *Front Cell Neurosci*. 2014 Dec 10;8:420. doi: 10.3389/fncel.2014.00420. eCollection 2014.

BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S, Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki K, Saarma M, Kojima M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jun 9;112(23):E3067-74. doi:10.1073/pnas.1422336112. Epub 2015 May 26.

Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: Multi-ligand model of growth factor signaling. Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Kojima M. *Pharmacol Res*. 2016 Mar;105:93-8. doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.019. Epub 2015 Dec 30. Review.

"Optical communication with brain cells by means of an implanted duplex micro-device with optogenetics and Ca(2+) fluoroimaging". Kobayashi T, Haruta M, Sasagawa K, Matsumata M, Eizumi K, Kitsumoto C, Motoyama M, Maezawa Y, Ohta Y, Noda T, Tokuda T, Ishikawa Y, Ohta J. *Sci Rep*. 2016 Feb 16;6:21247. doi: 10.1038/srep21247.

BDNF Binds Its Pro-Peptide with High Affinity and the Common Val66Met Polymorphism Attenuates the Interaction. Uegaki K, Kumanogoh H, Mizui T, Hirokawa T, Ishikawa Y, Kojima M. *Int J Mol Sci*. 2017 May 12;18(5). pii: E1042. doi: 10.3390/ijms18051042.

Implantable optogenetic device with CMOS IC technology for simultaneous optical measurement and stimulation Makito Haruta, Naoya Kamiyama, Shun Nakajima, Mayumi Motoyama, Mamiko Kawahara, Yasumi Ohta, Atsushi Yamasaki, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Yasuyuki Ishikawa, Takashi Tokuda, Hitoshi Hashimoto and Jun Ohta. *Japanese Journal of Applied Physics* Volume 56, Number 5

##### [学会発表] (計5件)

第57回日本神経化学学会大会 (2014/9/29-10/1:奈良) 連合性長期記憶への多角的アプローチ 石川保幸  
第58回日本神経化学学会大会 (2015/9/11-9/13:大宮) Neuropsin dependent synaptic tagging in vivo 石川保幸  
第93回日本生理学会大会 (2016/3/22-3/24:札幌) Neuropsin 依存的行動タギング 石川保幸  
第59回日本神経化学学会大会 (2016/9/8-9/10:福岡) Late

associative memory--- from synapse  
to behavior 石川保幸(シンポジウム)  
第 94 回日本生理学会大会  
(2017/3/28-3/30:浜松)ニューロプシ  
ン依存的行動タグ形成 依田祐也,  
鈴木結花, 石川保幸

〔図書〕(計 1 件)

Late associative memory--- from synapse  
to behavior 石川保幸 日本生物学的精神  
医学会誌 2017 vol28

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 保幸 (ISHIKAWA, Yasuyuki)  
前橋工科大学・システム生体工学科・准教  
授

研究者番号：90346320

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )