

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640014

研究課題名(和文) 組織レベルの固定化の意義の再検証～古い記憶制御に対する海馬の役割の解析～

研究課題名(英文) Re-thinking roles of hippocampus in systems consolidation

## 研究代表者

喜田 聡 (KIDA, SATOSHI)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80301547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：記憶固定化の意義として、「組織レベルの固定化 = 海馬非依存的記憶への変化」と考えられている。本課題では、我々が開発した恐怖条件付け文脈課題をベースにした解析系を用いて、他グループの知見を再現しつつ、「古い記憶」の性状を解析し、「組織レベルの固定化」の意義を再考し、「古い記憶」制御に対する海馬の役割を再検証した。その結果、古い恐怖記憶を長く想起させると海馬が活性化され、より正確な記憶が想起され、海馬依存性が高まることが強く示唆された。以上より、組織レベルの固定化が完了した古い記憶の場合、短い想起時間では海馬は活性化されず、海馬が活性化され、正確な記憶が想起されるまでに時間を要すると考察した。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have suggested that the hippocampus-dependent memory becomes hippocampus-independent with time through systems consolidation. In this study, we investigated roles of hippocampus in regulation of remote contextual fear memory by comparing previous findings. We found that long, but not short time recall of remote memory activates gene expression in the hippocampus and induces hippocampus-dependent reconsolidation and that remote memory retrieval becomes hippocampus-dependent after the long time recall. We also suggest that the long time recall enables to discriminate differences of context even when memory is remote. These findings suggest that remote fear memory returns to a hippocampus dependent state after long time recall through reactivation of hippocampus.

研究分野：分子神経科学

キーワード：脳・神経 神経科学 記憶制御 海馬 記憶固定化 記憶再固定化

### 1. 研究開始当初の背景

現在の記憶研究は、約 100 年前に提唱された「固定化仮説 (Consolidation theory)」に基づいている。固定化は、記憶を新たに形成して保存するプロセスであり、二段階のプロセスから成ると考えられている。一段階目は、情報獲得直後の「細胞レベルの固定化 (cellular consolidation)」であり、長期増強の解析を含め、記憶研究の圧倒的多数はこのレベルの固定化を対象としている。続いて起こる「組織レベルの固定化 (systems consolidation)」は、(げっ歯類では記憶形成後の 1 ヶ月程度の) 時間経過と共に、想起に対する海馬の必要性が失われる現象である。「組織レベルの固定化」は行動・組織レベルでその存在が示唆されているに過ぎず、この過程で記憶が質的变化するのかわかり不明であり、その意義とメカニズムの解明もほとんど進展していない。しかし、現在の記憶研究では、「組織レベルの固定化」までもが、生物学におけるセントラルドグマのような位置づけで捉えられている。一方、2000 年、想起後に記憶を再保存するために「再固定化」が必要となることが明らかにされた。この再固定化の発見は、記憶は変化しない静的なものではなく、変化し得る「動性」秘めていることを示し、さらに、記憶保存形態の運命が形成時に決定するとしている「固定化仮説」に少なくとも例外が存在することを示唆していた。申請者は、国内では珍しく、想起後の記憶制御機構を解析するための行動パラダイムを独自に開発し、再固定化と消去の制御機構を解析し、世界的な成果を発表してきた (*Nat. Neurosci.*, 2002; *J. Neurosci.* 2004, 2008, 2009, 2011)。この過程で、獲得後時間が経過した「古い記憶」であっても、必ずしも海馬依存性が失われていないことを示唆する実験結果を得た (次ページ参照)。そこで、以上までの背景から、「組織レベルの固定化 = 海馬非依存的記憶への変化」と唱えられている「固定化仮説」に異議を唱え、固定化、すなわち、記憶貯蔵機構を再検証する契機とするために本課題の申請に至った。

### 2. 研究の目的

「記憶してから時間が経つと、詳細を思い出すまでに時間がかかる」ことは誰もが経験する。記憶形成後の時間経過と共に、その想起に海馬が必要ではなくなることは、ヒトとげっ歯類で確認されていることから、記憶保存のための「固定化」には記憶回路を再編成する組織レベルのプロセスが存在すると説明されている。しかし、海馬に損傷を受けたヒトは部分的にしか記憶を思い出していない可能性もあり、想起時の海馬必要性の変化で定義されている「組織レベルの固定化」の実体は未だ不明である。一方、申請者は、想起後の記憶制御プロセスを解析する過程で、記憶が古くなるうとも、必ずしも海馬非依存性になるわけではないことを示唆する予備的

データを得ている。そこで、本課題では、申請者が開発した恐怖条件付け文脈課題をベースにした行動解析系を用いて、他グループの知見を再現しつつ、「古い記憶」の性状を解析し、「組織レベルの固定化」の意義とその役割を再考し、「固定化のメカニズム」に新しい概念を加えることを目的とする。

我々の実験系においても、従来の研究と同様の実験条件 (3 分間の想起時間) では、形成後一ヶ月経過した「古い恐怖条件付け文脈記憶」の想起は、一見、海馬非依存的であり、従来の実験結果と同様の現象が観察される。本課題では、この実験系をベースにして、想起時間を操作することで、「古い記憶」であっても、その想起に海馬が重要であることを明らかにする。実際には、海馬活性操作の影響の行動学的解析、免疫組織染色を用いた生化学的解析などを通して、「長い時間想起させた古い恐怖記憶」の性状を行動・組織・細胞レベルで解析する。以上より、「古い記憶」では、新規記憶と同様な状態まで想起するのに時間を要するだけで、その想起に海馬機能を必要とすることを示し、「組織レベルの固定化」の意義と役割を再検証する。

### 3. 研究の方法

恐怖条件付け文脈学習課題を用いて、形成直後の「新しい記憶」と形成後 1 ヶ月経過した「古い記憶」との性状を比較する。申請者の研究成果に基づき、マウスを電気ショックチャンバーに戻す時間を 3 あるいは 10 分間に設定することで、想起時間の違いの影響を詳細に解析する。

#### 行動レベルの解析；古い記憶想起に対する海馬と前帯状皮質の役割の解析

条件付け 1 日あるいは 1 ヶ月後にマウスを 3 分間あるいは 10 分間電気ショックチャンバーに戻してすみ反応を測定する。この際に、海馬あるいは前帯状皮質にナトリウムチャンネル阻害剤であるリドカインを微量注入した影響を解析して、記憶想起に対するこれら領域の役割を解析する。

#### 行動レベルの解析；古い記憶の再固定化に対する海馬の役割の解析

我々は 2004 年に、古い記憶でも 10 分間想起させると再固定化が誘導されることを発表している (*Suzuki et al. J. Neurosci.* 2004)。そこで、腹腔内投与による実験結果に基づき、海馬あるいは前帯状皮質にタンパク質合成阻害剤アノマイシンを微量注入することで、恐怖記憶が破壊されるか、すなわち、海馬依存的な再固定化が誘導されるかを解析する。さらに、「古い記憶」の想起に必要な前帯状皮質のタンパク質合成阻害の影響も解析し、それぞれの脳領域の「古い記憶」制御に対する役割を比較する。

#### 行動レベルの解析；記憶の一般化 (Contextual generalization) を指標とした古い記憶の性状解析

我々が確立した「記憶の一般化」解析系 (*J.*

Neurosci. 31, 8786-802.2011) を用いて、電気ショックチャンバー (Context A) あるいは類似した箱 (Context B) に 3 分間あるいは 10 分間戻した場合のすくみ反応の推移を解析する。

#### 細胞・分子レベルの解析；古い記憶想起時の海馬活性化状態の解析

恐怖文脈条件付け 1 日後あるいは 1 ヶ月後に 3 分間あるいは 10 分間電気ショックチャンバー (Context A) あるいは類似した箱 (Context B) に戻した 4 群、さらに、条件付け時に電気ショックを与えずに同じ操作を施した 4 群の計 8 群を用いて生化学的解析を実施する。まず、想起 90 分後における初期応答遺伝子群 (c-fos、Arc、Zif268) の発現誘導を指標にして海馬及び前帯状皮質の活性化状態を解析する。一方、我々は想起後に記憶が不安定化される際にプロテオソーム依存的タンパク質分解が活性化されることを免疫組織染色で明らかにしているため、この活性化マーカーとなるポリユピキチンを認識する抗体を用いて、海馬及び前帯状皮質におけるタンパク質分解の活性化を解析する。

#### 4. 研究成果

##### 行動レベルの解析；古い記憶想起に対する海馬と前帯状皮質の役割の解析

恐怖条件付け文脈学習課題を用いて、形成直後の「新しい記憶」と形成後 1 ヶ月経過した「古い記憶」との性状を比較した。恐怖条件付け 8 週間後に、電気ショックを与えたチャンバーにマウスを 3 あるいは 10 分間戻して、恐怖記憶を想起させた。この 24 時間後に、マウスを再びチャンバーに戻して、リドカインを海馬に局所注入することで、恐怖記憶想起に対する海馬不活性化の影響を解析した。その結果、マウスをチャンバーに 10 分間戻した場合にのみ、リドカイン投与後に恐怖記憶想起の障害が観察された。従って、10 分間チャンバーに戻して、長時間想起させることで恐怖記憶の海馬依存性が復活することが強く示唆された。

##### 行動レベルの解析；古い記憶の再固定化に対する海馬の役割の解析

恐怖文脈条件付け 1 日後あるいは 1 ヶ月後に 3 分間あるいは 10 分間電気ショックチャンバーに戻し、海馬にタンパク質合成阻害剤アニソマイシンを注入してその効果を解析した。恐怖条件付けから 1 日後にチャンバーに戻した場合には、チャンバーに戻した時間が 3 分間あるいは 10 分間であろうとも、遺伝子発現阻害による恐怖記憶の破壊が認められた。従って、形成直後の恐怖記憶では想起後に海馬依存的な再固定化が誘導されることが示された。一方、8 週間経過した古い記憶では、3 分間チャンバーに戻した場合には、遺伝子発現阻害による恐怖記憶の破壊は観察されなかったのに対して、10 分間チャンバーに戻すと、恐怖記憶が破壊されることが明らかとなった。従って、10 分間チャンバー

に戻して、長時間想起させることで海馬依存的な再固定化が誘導されることが示された。

##### 行動レベルの解析；記憶の一般化 (Contextual generalization) を指標とした古い記憶の性状解析

恐怖文脈条件付け 1 日後に 3 分間あるいは 10 分間電気ショックチャンバー (Context A) あるいは類似した箱 (Context B) に戻した場合、Context A において、高い恐怖反応が観察され、電気ショックを受けたチャンバーを正確に記憶していることが示された。一方、恐怖条件付け 1 ヶ月後に 3 分間箱に戻した場合には、Context A と Context B において同レベルの恐怖反応を示し、二つの context を区別できていないことが示唆された。しかし、10 分間箱に戻した場合には、Context A における恐怖反応がより顕著に現れるようになることが示され、電気ショックを受けたチャンバーを認識していることが示唆された。従って、古い記憶では、より長く記憶を想起させることで、Context A と B を区別することが可能になること、すなわち、正確な記憶が思い出されることが強く示唆された。従って、古い記憶をより鮮明に思い出すには、より長時間の記憶想起が必要であることが示唆された。

##### 細胞・分子レベルの解析；古い記憶想起時の海馬活性化状態の解析

恐怖条件付け後 1 日あるいは 8 週間後に、電気ショックを与えたチャンバーにマウスを 3 あるいは 10 分間戻して、恐怖記憶を想起させ、c-fos 発現を指標にして海馬の活性化状態を解析した。その結果、1 日後に戻した場合にはチャンバーに戻した時間に関わりなく、海馬 CA1 と CA3 領域における c-fos 発現誘導が認められた。これに対して、8 週間後に戻した場合には、他グループの結果に一致して、3 分間チャンバーに戻して、短時間記憶を想起させただけでは、c-fos 発現誘導は認められなかった。一方、長時間 (10 分間) 戻した場合には、c-fos 発現が誘導されることが初めて明らかとなった。一方、対象として解析した帯状皮質では、他グループの結果に一致して、8 週間後にチャンバーに戻した場合に、チャンバーに戻した時間に関わりなく、c-fos 発現が誘導されたことから、本研究における 8 週間後の記憶は「古い」記憶の性状を満たすことが示唆された。従って、海馬依存性を失った古い恐怖記憶であっても、想起時間を長くすることで、海馬が活性化されることが示され、記憶の海馬依存性が復活することが強く示唆された。

また、in vivo ユニット記録、脳搭載型小型蛍光顕微鏡を用いてカルシウムライブイメージングの解析を試みた。

以上の結果から、「古い記憶」であろうとも、長い時間想起させることで、海馬依存性が復活することが強く示唆された。また、海馬依存性が復活することによって、より正確な記憶を想起していることも示唆された。このように、これまで、教科書的にも、古い記

憶には海馬は必要ではないと考えられてきたが、本研究により、古い恐怖記憶を長く想起させると海馬が活性化され、海馬依存的な記憶に戻ることが強く示唆された。さらに、この意義として、短い想起時間で古い記憶を想起させた場合には、海馬は活性化されず、海馬は必要でないと考えられてきたものの、古い記憶の場合、海馬が活性化されて、正確な記憶が想起されるまでに時間を要すること、すなわち、古い記憶であろうとも海馬はその想起に貢献していると結論した。

以上までの成果に基づき、今後、古い記憶の長い時間の想起後に海馬依存性が復活する分子メカニズムの解明が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- (1) Inaba, H., Kai D., Kida, S. N-glycosylation in the hippocampus is required for the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory *Neurobiology of Learning and Memory*, in press, 査読あり
- (2) 石川 理絵、稲葉 洋芳、喜田 聡「メマンチンによる恐怖条件づけ記憶忘却の生化学的性状の解析」日本健康医学雑誌、in press (掲載確定) 査読あり
- (3) Morishita, Y., Miura, D., Kida, S. PI3K Regulates BMAL1/CLOCK-mediated Circadian Transcription from the *Dbp* Promoter, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80** : 1131-1140. 2016 査読有 doi: 10.1080/09168451.2015.1136885.
- (4) Inaba, H., Tsukagoshi, A., Kida, S. PARP-1 activity is required for the reconsolidation and extinction of contextual fear memory *Mol. Brain* **8**:63, 2015 査読有 doi: 10.1186/s13041-015-0153-7.
- (5) Kida, S., Sawa, A., Ikeda, K. Elucidating mechanisms for mental disorders: from specific molecules to pathology. *Current Molecular Medicine*. **15**:191-2. 2015 査読なし, doi: 10.2174/1566524015666150330142548
- (6) Kida, S. & Kato, T. Microendophenotypes of psychiatric disorders -Phenotypes of psychiatric disorders at the level of molecular dynamics, synapses, neurons, and neural circuits-. *Current Molecular Medicine*. **15**:111-118, 2015, 査読あり、doi: 10.2174/1566524015666150303002128
- (7) Sawa, A., Kida, S., Ikeda, K. Microphenotypes of mental disorders: a systematic approach to study disease mechanisms. *Current Molecular Medicine*. **15**:109-110, 2015 査読なし doi: 10.2174/1566524015666150303001535
- (8) 喜田 聡「恐怖記憶の制御基盤とその制御に対する海馬の役割-トラウマ記憶を原因とする PTSD 治療への応用を考える-」*トラウマティック・ストレス* **13** , 37-47. 2015, 査読なし
- (9) Nonaka, M., Kim, R., Fukushima, H., Sasaki, K., Suzuki, K., Okamura, M., Ishii, Y., Kawashima, T., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Okuno, H., Kida, S., Bito, H. Region-Specific Activation of CRTCL-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory. *Neuron*. **84**, 92-106. 2014、査読あり doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.049.
- (10) Fukushima, H., Zhang, Y., Archbol, G., Ishikawa, R., Nader, K. Kida, S. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *eLife*, **3**, e02736, 2014 査読あり doi: 10.7554/eLife.02736.
- (11) Kida, S. & Serita, T. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Research Bulletin*. 105, 17-24. 2014, 査読あり doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.04.011.
- (12) Ishikawa, R., Kim, R., Namba, T., Kohsaka, S., Uchino, S. & Kida, S. Time-dependent enhancement of hippocampus-dependent memory after treatment with memantine: implications for enhanced hippocampal adult neurogenesis. *Hippocampus*. **24**, 784-93. 2014, 査読あり, doi: 10.1002/hipo.22270.
- (13) 喜田 聡; 恐怖条件付けと恐怖記憶制御のメカニズム 日本神経精神薬理学雑誌 **34**, pp117-125, 2014, 査読なし
- (14) 喜田 聡、石川理絵 MEM による神経新生亢進を介する海馬依存性記憶制御 アミノ酸研究 **8** pp83-90, 2014, 査読なし

〔学会発表〕(計 29 件)

- (1) 芹田龍郎、福島穂高、喜田聡、“転写因子 CREB 恒常的活性化による海馬ニューロンスパイン密度と樹状突起分枝数の増加”日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌
- (2) 堺大樹、喜田聡、“恐怖記憶形成に対する断眠処置の影響の解析”日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌
- (3) 宮原瑞希、長谷川俊介、喜田 聡、日本農芸化学会 2016 年度大会、“時計遺伝子 BMAL1 による海馬 CA1 ニューロンの樹状突起スパイン形態の制御” 2016 年 3 月 27-30 日、札幌
- (4) Rie ISHIKAWA, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA, " Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis with Memantine" The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸
- (5) 喜田 聡「脳機能に対する栄養素の役割」第 23 回 植物油栄養懇話会、2015 年 11 月 13 日、東京
- (6) 喜田 聡「海馬時計機能による記憶想起制御」記憶回路研究会「異なる動物種間での記憶回路制御機構の統合的理解による記憶回路原理の解明」2015 年 10 月 8-9 日、生理学研究所、岡崎
- (7) S. KIDA "Active Transition of Memory

- Phases from Fear to Safety, Symposium on Memory and Mind, Tohoku Forum for Creativity Thematic Program” 2015 (9月28-29日、仙台)
- (8) S. KIDA “Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis”. (The 7<sup>th</sup> meeting of MCCS-Asia Sep 19-20, 2015, Wuzhen, China)
- (9) S. KIDA Erasure of Recent and Remote Fear Memory by Enhancing Forgetting (Symposium “Synaptic Plasticity in Healthy and Disease” 2015 Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences (KSBNS), Korea, Daegu on Sep 11~12, 2015.)
- (10) 喜田 聡 「Regulation of memory retrieval by forebrain circadian clock」(シンポジウム 生物の適応能を飛躍的に高めたりズム制御分子と高次中枢システムの世界、第58回日本神経化学会大会 理事会企画シンポジウム、平成27年9月11日大宮)
- (11) 喜田 聡 「前脳時計機能による記憶想起のサーカディアン制御機構の解析」(シンポジウム「記憶貯蔵と想起制御研究の最前線」第38回日本神経科学大会、平成27年7月28日(火)~31日(金)29日、神戸)
- (12) 石川理絵、喜田 聡、“恐怖記憶想起後の Reconsolidation update 制御機構の解析”第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (13) 稲葉洋芳、櫻井雅弘、甲斐大輔、喜田聡、第38回日本神経科学大会、“海馬依存性記憶形成に対する N-及び O-結合型糖鎖修飾の役割” 2015年7月28-31日、神戸
- (14) 芹田龍郎、天野翔次郎、喜田聡、“記憶制御におけるヒストン修飾ダイナミクスの役割”第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (15) S. KIDA Erasure of recent and remote fear memory by enhancing adult hippocampal neurogenesis(10th International Conference for Neurons and Brain Disease, Xian, China, June 22-24, 2015)
- (16) S. KIDA Erasure of recent and remote fear memory by enhancing forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis (Symposium “New insights into classical memory issues”. 9th Annual Canadian Neuroscience Meeting - May 24 -27, 2015, Vancouver)
- (17) 石川理絵、喜田 聡、“Reconsolidation-update による恐怖記憶制御の組織学的解析”第59回日本農芸化学大会、2015年3月26-29日、岡山
- (18) Shojiro AMANO, Satoshi KIDA, "Roles of Histone modifications in the hippocampus in formation of contextual fear memory", The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2014年11月25-27日、横浜
- (19) Rie ISHIKAWA, Paul W. FRANKLAND, Satoshi KIDA "Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis" Neuroscience 2014, 2014年11月15-19日、Washington D.C.
- (20) Hiroyoshi INABA, Akinori TSUKAGOSHI, Satoshi KIDA, "Poly ADP-ribosylation is required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory", Neuroscience 2014 2014年11月15-19日、Washington, D.C.
- (21) 喜田 聡、石川理絵 “NMDA型グルタミン酸受容体を介した海馬神経新生操作による記憶制御” 日本アミノ酸学会 第8回学術大会 平成26年11月8-9日、東京
- (22) 喜田 聡 「恐怖記憶制御と PTSD」第36回日本生物学的精神医学会第57回日本神経化学会大会 合同年会(奈良) マイクロエンドフェノタイプから考える精神疾患研究 平成26年9月30日、奈良
- (23) 喜田 聡 「恐怖記憶再固定化と消去を制御する記憶痕跡」日本神経科学会 neuroscience 2014 (平成26年9月11-13日)、横浜
- (24) 福島穂高、張悦、金亮、喜田 聡 “古い恐怖条件付け文脈記憶の安定性制御機構の解析” 第37回日本神経科学大会 2014年9月11-13日、横浜
- (25) 石川理絵、Paul W. Frankland、喜田 聡、“メマンチン投与による神経新生促進が海馬依存性恐怖記憶を忘却させる” 第37回日本神経科学大会 2014年9月11-13日、横浜
- (26) 稲葉洋芳、塚越昭紀、喜田 聡、“恐怖条件付け文脈記憶再固定化及び消去に対するポリ ADP リボシル化の役割” 第37回日本神経科学大会 2014年9月11-13日、横浜
- (27) 天野翔次郎、喜田 聡、“恐怖記憶固定化に対するヒストン修飾の役割” 第37回日本神経科学大会 2014年9月11-13日、横浜
- (28) 櫻井雅弘、甲斐大輔、稲葉洋芳、喜田 聡、“恐怖条件付け文脈記憶形成に対する海馬 O-結合型糖鎖修飾の役割” 第37回日本神経科学大会“ 2014年9月11-13日、横浜
- (29) S. KIDA “Regulation of memory retrieval by forebrain circadian clock” 9th International Conference for Neurons and Brain Disease, 平成26年7月14-16日、スペイン

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称:「PTSD の治療薬のスクリーニング方法」  
発明者:喜田聡  
権利者:東京農業大学  
種類:特願

番号：2014 225209  
出願年月日：平成 26 年 11 月 5 日  
国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

喜田 聡 ( KIDA, Satoshi )  
東京大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：80301547