

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23220009

研究課題名(和文)記憶アップデートの分子・細胞メカニズム

研究課題名(英文)Molecular and cellular mechanisms underlying memory update system

研究代表者

井ノ口 馨(Inokuchi, Kaoru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：20318827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,700,000円

研究成果の概要(和文)：「記憶のアップデート機構」は知識の形成を通じて精神活動の基盤となる。記憶のアップデートは記憶同士の連合により行われるが、そのセルアセンブリレベルのメカニズムは不明であった。本研究では、二つの記憶情報が連合する回路レベルのメカニズムを明らかにするために、(1)CS-US連合(2)行動タグ(3)高次の連合のそれぞれについて、記憶が連合(相互作用)するセルアセンブリレベルのメカニズムを解析した。その結果、記憶が連合(相互作用)する際には、それぞれの記憶の対応する神経細胞集団の同期活動によるオーバーラップが重要な役割を担っていることが示され、記憶がアップデートされる脳内メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, memory update mechanisms were investigated in cell assembly level. We found that, when two distinct units of information interact to generate a new memory, cellular ensembles corresponding to individual memories overlap. Suppressing the overlap neurons inhibits the association between two memories without affecting the initial memories. In addition, optogenetical co-activation of these ensembles creates an artificial memory. These results indicate that overlap in cellular ensembles plays a critical role in memory association.

研究分野：脳科学

キーワード：記憶アップデート 神経科学 セルアセンブリ 連合記憶 光遺伝学 海馬 扁桃体 シナプスタグ

## 1. 研究開始当初の背景

新しい情報が入ってきたときに脳は古い記憶情報と照合し、必要に応じて古い記憶と新しい記憶を連合して書き換える(記憶のアップデート)。「アップデート機構」は外的変化に対する柔軟な適応に必要であり、知識の形成を通じて精神活動の基盤となる。記憶のアップデートは記憶同士の連合により行われるが、そのセルアセンブリレベルのメカニズムは不明であった。

(1) 秒～分 (CS-US 連合): 短い間隔で条件刺激(CS)と無条件刺激(US)が提示されると両者の間に連合が生じ、連合記憶が形成される。連合の基礎となるセルアセンブリレベルのメカニズムには不明の点が多い。

(2) 分～時間 (シナプスタグと行動タグ): この時間間隔で起こる記憶の連合に関しては、その細胞レベルのメカニズムに関するシナプスタグ仮説が Frey と Morris により提唱されていたが (*Nature*, 385, 533, 1997)、研究代表者の井ノ口と研究分担者の岡田は Ves1-1S (Homer-1a) タンパク質のニューロン内局在の解析を行い、この仮説を世界で初めて実証した (*Science* 324, 904, 2009)。その研究で我々は、樹状突起からスパイン内へのシナプスタンパク質の進入を制御する機構がシナプスタグであることを示した。行動レベルでは、「短期記憶成立の前後に、長期記憶を引き起こす経験をすると、短期記憶が長期記憶化する」という「行動タグ」現象が知られているが、その細胞レベルのメカニズムとしてシナプスタグ機構を使用しているか否かは不明である。

(3) 日～月 (高次の連合): この時間間隔で起きる記憶アップデート機構に関しては、時間的に離れて記録された異なる独立した記憶があとで連続的に想起されることで、互いに関連付けられて新規の意味を持つ記憶になるケースがある(高次の連合)が、そのセルアセンブリメカニズムは不明である。

## 2. 研究の目的

(1) CS-US 連合によるアップデート: CS-US 連合の形成に関わる細胞集団のセット(セルアセンブリ)がどのようなものであるかを明らかにするとともに、連合を制御する回路メカニズムを明らかにする。

(2) シナプスタグと行動タグによるアップデート: シナプスタグの分子実体を明らかにする。また、行動タグ現象のセルアセンブリ

メカニズムを明らかにする。

(3) 高次連合によるアップデート: 高次連合のセルアセンブリメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) CS-US 連合によるアップデート

CS-US 連合のセルアセンブリメカニズム  
文脈性恐怖条件付けの一変法である CPFE 課題において、CS と US の連合が生じるケースと生じないケースで、CS 提示時、US 提示時に活動する神経細胞集団(セルアンサンブル)を CatFISH 法で解析した。さらに、光遺伝学的手法を用いて、生理的には CS と US の連合が起きない条件下で、CS および US のそれぞれに対応するセルアンサンブルを人為的に同期発火させることで、CS と US の間に人為的な連合を形成させることができるか否かを解析した。

### CS-US 連合の制御メカニズム

CS 記憶と US 記憶、さらに CS-US 記憶を分けて評価する新規行動実験系(CPFE 課題)を確立し、生化学的手法を用いて、連合を制御する脳領域の検索を行った。さらに、特定遺伝子の発現を制御することが可能な Tet-system と ChR2 や ArchT を用いた光遺伝学的手法を組み合わせ、特定脳領域の活動を人為的に活性化(ChR2)または不活性化(ArchT)することで記憶連合を制御できるか否かを検討した。

### (2) シナプスタグと行動タグ

#### シナプスタグ

シナプス活動による樹状突起からスパインへの輸送調節はシナプスタグの一つである。以前の手法で測定されたスパイン蛍光変化には輸送以外の影響が考えられたので、刺激応答性の輸送だけを測定する手法として FRAP 法を開発し、Homer-1a と EGFP の融合タンパク質(HE)を発現したラット初代培養海馬神経細胞の単一スパインに適用した。また培養細胞から回収したタンパク質を生化学的手法で解析した。

#### 行動タグ

新規物体探索課題(NOR)と新規環境暴露を用いて、行動タグが誘導される新規行動実験系を確立し、生化学的手法を用いて行動タグ成立に関与する脳領域の検索を行った。続いて、ArchT を用いた光遺伝学的手法によって特定のイベントにおいて活動した細胞集団を抑制し、行動タグにより形成された長期記憶に対する2つのイベントに重複して活動するセルアセンブリの役割を解析した。



光遺伝学と tet-tag system を用いた新規環境暴露に対応する海馬 CA1 領域のセルアセンブリの抑制は、行動タグにより形成された NOR 長期記憶の想起を阻害することを見出した。以上の結果より、行動タグの成立には、海馬 CA1 における各イベントをコードするセルアセンブリの重複が重要であることが示唆された。

### (3) 高次連合によるアップデート

CTA と AFC それぞれの CS の連続同調想起により、本来独立して獲得した記憶同士が連合した。この連合は想起直後のタンパク質合成阻害により損なわれた。また、誘導後には CTA 記憶と AFC 記憶の責任領域である扁桃体において、各記憶に対応したセルアセンブリの有意なオーバーラップ増加が認められた。更に、オーバーラップしたセルアセンブリ活動のみを想起時に光遺伝学的に抑制すると、連合誘導の結果生じるフリージング反応が一過的に低減した(図 3、TEST3)。一方で、CTA および AFC それぞれの記憶想起には影響しなかった。以上より、両記憶間の高次連合は、繰返し同調想起過程を経て、扁桃体で生じるセルアセンブリの活動が一因となり引き起こされていることが明らかとなった。

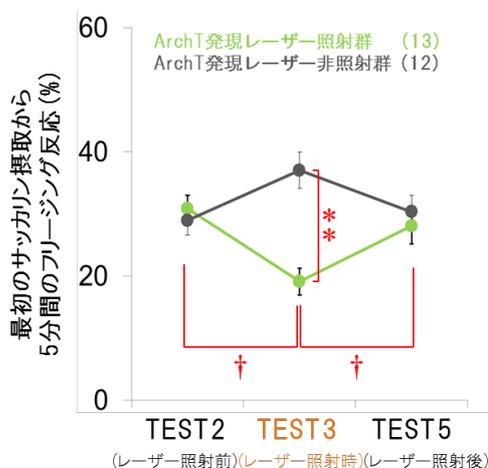


図3: CTA-AFC両想起時重複活動セルアンサンブルに対する光抑制によるフリージング反応(%)

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計12件)

Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Yokose J., Suzuki A., Matsuo M., Tsujimura S., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A., Kato F., and Inokuchi K. Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioral tagging. Nature Comm., 2016, in press. 査読有 Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., Shehata M., Zhao Q., Enomoto H., and Inokuchi K. (2016) Frequency-specific stimulations induce reconsolidation

of long-term potentiation in freely moving rats. Molecular Brain, 9:36. 査読有

DOI:10.1186/s13041-016-0216-4

Omura Y., Carvalho M., Inokuchi K. and Fukai T. (2015) A lognormal recurrent network model for burst generation during hippocampal sharp waves. J. Neurosci., 35(43), 14585-14601. 査読有

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4944-14.2015

Nihonmatsu I., Ohkawa N., Saitoh Y. and Inokuchi K. (2015) Targeting of ribosomal protein S6 to dendritic spines by in vivo high frequency stimulation to induce long-term potentiation in the dentate gyrus. Biology Open, 4, 1387-1394. 査読有

DOI: 10.1242/bio.013243

Ohkawa N., Saitoh Y., Suzuki A., Tsujimura S., Murayama E., Kosugi S., Nishizono H., Matsuo M., Takahashi Y., Nagase M., Sugimura Y.K., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. (2015) Artificial Association of Pre-stored Information to Generate a

Qualitatively New Memory. Cell Reports, 11(2), 261-269. 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.017

Tsubota T., Okubo-Suzuki R., Ohashi Y., Tamura K., Ogata K., Yaguchi M., Matsuyama M., Inokuchi K., and Miyashita Y. (2015) Cofilin1 Controls Transcolumnar Plasticity in Dendritic Spines in Adult Barrel Cortex. PLoS. Biol., 13(2), e1002070. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pbio.1002070

Shehata M. and Inokuchi K. (2014) Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? Reviews in the

Neurosciences, 25, 543-557. 査読有

DOI:10.1016/j.celrep.2015.03.017

Kitamura T. and Inokuchi K. (2014) Role of the Adult Neurogenesis in Hippocampal-Cortical Memory Consolidation. Molecular Brain, 7, 13. 査読有

DOI:10.1186/1756-6606-7-13

Ohkawa N., Saitoh Y., Tokunaga E., Nihonmatsu I., Ozawa F., Murayama A., Shibata F., Kitamura T. and Inokuchi K. (2012) Spine formation pattern of adult-born neurons is differentially modulated by the induction timing and location of hippocampal plasticity. PLoS ONE, 7, e45270. 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0045270

Shehata M., Matsumura H., Okubo-Suzuki R., Ohkawa N. and Inokuchi K. (2012) Neuronal-stimulation induces

autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical LTD. *Journal of Neuroscience*, 32, 10413-10422. 査読有  
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4533-11.  
Kitamura T., Okubo-Suzuki R., Takashima N., Murayama A., Hino T., Nishizono H., Kida S., and Inokuchi K. (2012) Hippocampal function is not required for the precision of remote place memory. *Mol Brain*, 5, 5. 査読有  
DOI:10.1186/1756-6606-5-5  
Inokuchi K. (2011) Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function. *Curr Opin Neurobiol* 21, 360-364. 査読有  
DOI:10.1016/j.conb.2011.02.006

[学会発表](計70件)

Suzuki A., Kosugi-Ushijima S., Ohkawa N., Matsuo M., Nishizono H., and Inokuchi K. : Generating an artificial CS-US associative memory by manipulation of parietal association cortex. *Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2015. 10. 17-21, Chicago., USA.  
Shehata M., Zhao Q., Abdou K., Okubo-Suzuki R., Saitoh Y., Kitamura T., Nishizono H., Matsuo M., Ohkawa N., and Inokuchi K. : Enhancing memory destabilization through protein degradation induction. *Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2015. 10. 17-21, Chicago., USA.  
Nomoto M., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Yokose J., Takahashi Y., Nagase M., Suzuki A., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. : Overlapping in two cellular ensembles in the hippocampal CA1 region is important for behavioral tagging. *Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2015. 10. 17-21, Chicago., USA.  
Yokose J., Nomoto M., Okubo-Suzuki R., Ohkawa N., Nishizono H., Matsuo M., Suzuki A., Takahashi Y., Nagase M., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. : Synergistic activity during retrieval of neuronal ensembles between two distinct memory traces generates cross-modal linkage. *Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2015. 10. 17-21, Chicago., USA.  
Alam M., Kitamura T., Saitoh Y., Ohkawa N., Kondo T., and Inokuchi K. : Adult

neurogenesis modulates the hippocampal learning capacity. *Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2015. 10. 17-21, Chicago., USA.

Inokuchi K. : Cell ensemble mechanisms underlying the association of two independent memories. *The 10th International Conference of Neurons and Brain Diseases*, 2015. 6. 22-24, Xian, China.

Ohkawa N., Saitoh Y., Suzuki A., Tsujimura S., Murayama E., Nishizono H., Matsuo M., Takahashi Y., Nagase M., Sugimura Y.K., Watabe A.M., Kato F., and Inokuchi K. : Artificial association of information residing in hippocampus and amygdala. *Neuroscience 2014, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2014. 11. 19, Washington, D.C., USA.

Okada D., "Synaptic tag: Molecular mechanisms and implications in memory consolidation". *2014 KAIST-KUGSMS Biomedical Joint Symposium*. Daejeon, Korea. Nov 11, 2014. (Invited)

Inokuchi K. : Artificial Association of Pre-Stored Information. *The 9th International Conference of Neurons and Brain Diseases*, 2014. 7. 16, Madrid, Spain.

Inokuchi K. : Optical stimulation of distinct cell assemblies generates a new artificial associative-memory. *International Frontier Symposium for Neuroscience*, 2014. 3. 10, Xian, China. (Invited lecture)

Inokuchi K. : Synaptic reconsolidation. *The 8th International Conference of Neurons and Brain Diseases in Singapore*, 2013. 7. 2-4, Singapore.

Shehata M., Matsumura H., Okubo-Suzuki R., Ohkawa N., and Inokuchi K. : Neuronal-stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical LTD. *Neuroscience 2012, Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 2012.10.15, New Orleans, USA.

Inokuchi K. : Modulation of fear memory formation, *BioValley Science Day: Basel Toyama Symposium*, 2012. 9. 25, Basel, Switzerland. (Invited lecture)

Inokuchi K. : Spine formation pattern of adult born neurons is differentially modulated by the induction timing and location of hippocampal plasticity. *The 7th International Conference of Neurons*

and Brain Diseases in Montreal, 2012. 6. 26-28, Montreal, Canada.  
Inokuchi K. : Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function . Frontier International symposium for Neuron and Disease, 2012. 3. 23, Xian, China. (Invited lecture)  
Inokuchi K. : Regulation of fear memory formation .THE 32nd NAITO CONFERENCE ON Biological basis of mental functions and disorders , 2011. 10. 18-21 , Yamanashi·Hokuto . (Invited lecture)  
Inokuchi K.: Precision of remote place memory is supported by extra-hippocampal region. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases in Toyama, 2011. 8. 3-5, Toyama·Toyama.

〔図書〕(計20件)

佐野良威、大川 宜昭、鈴木 章円、井ノ口 馨、医学書院、記憶痕跡とメモリアロケーション、生体の科学・特集 記憶ふたたび、67、2016、97(22-26)  
大川 宜昭、井ノ口 馨、羊土社、オプトジェネティクスによる記憶の操作、実験医学 33、2015、153(3065-3069)  
井ノ口 馨、角川書店、記憶をあやつる、角川選書、2015、200  
Okada, D. and Inokuchi, K.: Activity-Dependent Protein Transport as a Synaptic Tag , in Synaptic Tagging and Capture (Sajikumar, S. ed.), Chapter 6, 79-98, Springer, New York (2015)  
DOI:10.1007/978-1-4939-1761 -7  
井ノ口 馨、日本不安障害学会、恐怖記憶研究鳥瞰 - 最近の知見と展望 -、不安障害研究 5、2013、60(3-21)  
井ノ口 馨、岩波書店、記憶をコントロールする - 分子脳科学の挑戦 -、岩波科学ライブラリー、2013、130  
井ノ口 馨、記憶形成のダイナミクス、クバプロ、NPO 法人 脳の世紀推進会議編、脳を知る・創る・守る・育む 13、2012、202(59-88)

〔その他〕

ホームページ等

富山大学大学院 医学薬学研究部(医学) 生化学講座  
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/bmb/index-j.html>  
NHK Eテレ・サイエンス ZERO  
<http://www.nhk.or.jp/zero/contents/dsp536.html>  
Nature  
<http://www.nature.com/nature/journal/v520/n7546/full/520135a.html>  
EurekaAlert

[http://www.eurekaalert.org/pub\\_releases/2015-04/cp-rca032615.php](http://www.eurekaalert.org/pub_releases/2015-04/cp-rca032615.php)  
SciGuru Science News  
<http://www.sciguru.org/newsitem/18834/researchers-create-artificial-link-between-unrelated-memories>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井ノ口 馨 (INOKUCHI, Kaoru)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授  
研究者番号： 20318827

(2)研究分担者

岡田 大助 (OKADA, Daisuke)  
北里大学・医学部・准教授  
研究者番号： 10211806

(3)連携研究者

大川 宜昭 (OHKAWA, Noriaki)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・講師  
研究者番号： 80416651

鈴木 章円 (SUZUKI, Akinobu)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教  
研究者番号： 40424684

Shehata Mohammad  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教  
研究者番号： 60444197

鈴木 玲子 (SUZUKI, Reiko)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・特命助教  
研究者番号： 50532404

西園 啓文 (NISOZONO, Hirofumi)  
富山大学・研究推進機構研究推進総合支援センター・助教  
研究者番号： 10502289

(4)研究協力者

野本 真順 (NOMOTO, Masanori)

横瀬 淳 (YOKOSE, Jun)

村山 絵美 (MURAYAMA, Emi)

趙 琦 (ZHAO, Qi)

北村 貴司 (KITAMURA, Takashi)