

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06470

研究課題名(和文) 非類似の先行学習および抗不安薬が後続学習を成立させ記憶に残すメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism by which prior dissimilar learning and anxiolytic drug affect the enhancement of subsequent fear learning

研究代表者

田村 英紀 (Tamura, Hideki)

星薬科大学・先端生命科学研究所・准教授

研究者番号：80437516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エピソード記憶の強度は、過去の経験に依存する。実際、先行学習がそれと類似した後続のエピソード記憶を強化することは自明であるが、非類似の経験が後続の学習に与える影響は明らかではない。我々は、先行学習として数分間、マウスに迷路学習をさせると、それとは全く関係なく、且つ通常では学習困難な後続学習を成立させ、そのエピソードを記憶するというこれまで見出されてこなかった現象を明らかとした。この先行学習の効果は、NMDA 受容体依存的であるが、新規タンパク質合成には依存しなかった。また、先行学習は、記憶の連合に関わる記憶痕跡に影響を与えることで、後続学習に対する記憶を増強させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、非類似の先行学習が後続の学習効率を増大させることが明らかとなった。現段階では、実験動物の学習機能とヒトの認知活動を関連づけて論ずることはできないが、予習以外でも何らかの課題を授業前に遂行することで、その後の授業に対する学習効率が增大することが期待される。また今回の結果は、過去の経験が、後の物事の結び付きを容易にすることを示している。近年、アルツハイマー病患者において、記憶の連合が特に障害されていることが明らかとなり、本研究によって、簡単な事前学習を伴う脳のリハビリが疾患治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Episodic memory is affected by past experiences. Although prior learning enhances subsequent similar learning, the effect of prior learning on dissimilar learning remains elusive. We found that prior Y-maze learning enhanced subsequent fear-associated memory, which was dependent on the NMDA receptor activity but not on new protein synthesis. An increase in cellular ensemble that was responsible for fear memory association was observed in the amygdala of mice submitted to prior maze exploration.

研究分野：神経科学

キーワード：エピソード記憶 先行学習 記憶痕跡 連合記憶 シナプス可塑性 セルアンサンブル 海馬 扁桃体

## 1. 研究開始当初の背景

動物が特定のエピソードを体験すると、その時の環境や心理状態などの文脈的要素の記憶痕跡と、それら各要素の連合に関する記憶痕跡が形成される。このエピソード記憶は、過去の経験や既存知識の影響を強く受けることが知られている (Tse et al., *Science*, 2007)。例えば、動物を予め新奇な環境に曝すと、後に、通常であれば短期記憶しか形成されないような学習を行わせたときでさえ、長期記憶が形成される (Moncada and Viola, *J Neurosci.*, 2007)。これらの実験の多くは、特徴的な場所 (Conditioned stimulus: CS) と嫌悪刺激 (Unconditioned stimulus: US) を連合学習させる文脈的恐怖条件づけを用いている。この学習試験では、動物に CS を再度提示することで誘導される恐怖反応(すくみ反応)の程度を測定することによって、記憶の連合性 (CS-US) を評価することが可能である。しかしながら、動物は、CS-US といった連合に関する記憶痕跡に加えて、CS および US の各要素に対してもそれぞれ独立した記憶痕跡を形成し、CS の要素のみが強化されても CS-US が促進されるため (Rudy et al., *Behav Neurosci.*, 2002)、過去の経験が、どの記憶痕跡に影響を与え得るのか? という問いに答えを出すには至っていない。

近年、個々の記憶は、学習時に活動した特定の神経細胞集団として符号化され、その細胞集団が再活性化することで記憶が想起されることから (Han et al., *Science*, 2009; Liu et al., *Nature*, 2012)、このような活性化神経細胞集団が記憶痕跡であると考えられている。また、学習時に比較的興奮性の高い神経細胞が優先的に記憶痕跡に組み込まれる (Han et al., *Science*, 2007, Zhou et al., *Nat Neurosci.*, 2009)。すなわち、活動が高い神経細胞集団は、記憶痕跡の形成を容易にする。実際、学習の前に、光遺伝学的手法を用いて人工的に細胞の興奮性を増大させると、これら活動細胞が記憶痕跡細胞となり、また記憶形成が促進される (Yiu et al., *Neuron*, 2014)。一方、細胞の興奮性は、学習自体によっても増大する (Daoudal and Debanne, *Learn Mem.*, 2003)。いくつかの動物種において、学習は、カリウムチャネル電流の減少によって神経細胞の興奮性を増大させることが報告されている (Alkon et al., *Science*, 1982, Moyer et al., *J Neurosci.*, 1996)。したがって、先行学習による神経細胞の活動上昇は、後の課題学習に対する記憶痕跡の形成を容易にすると考えられる。しかしながら、先行学習がそれと類似した後続のエピソード記憶を強化することは自明であるが、非類似の経験が後続の学習に与える影響は明らかではない。

## 2. 研究の目的

一般に、動物を実験箱に入れた直後に足底に電気ショックを与えても (即時電気刺激) 恐怖条件づけは成立しない。しかしながら、予め同一の実験箱に十分な時間曝された経験があると、動物は即時電気刺激でも箱と電気ショックの関係性を理解する (Frankland et al., *Hippocampus*, 2004)。こうした測定法は、最初の文脈学習 (CS) と後の嫌悪刺激 (US) による連合学習 (CS-US) の期間が隔てられているため、先行する学習が CS に対する記憶痕跡あるいは CS-US に対する記憶痕跡のどちらに影響を与えるのか否かを検討する上で非常に有用である。またマウスは、予め訪れた場所の記憶を保持した状態で、再度同じ場所に曝されると探索行動が減少するため、マウスの行動量を指標とすることで、場所記憶 (CS) の程度を評価することが可能である (Kitamura et al., *Mol Brain*, 2012)。そこで本研究では、上記の方法論 (図 1) を用いて、先行した Y 字迷路学習が、後の別課題で形成される CS や CS-US の記憶痕跡に与える影響を検討した。

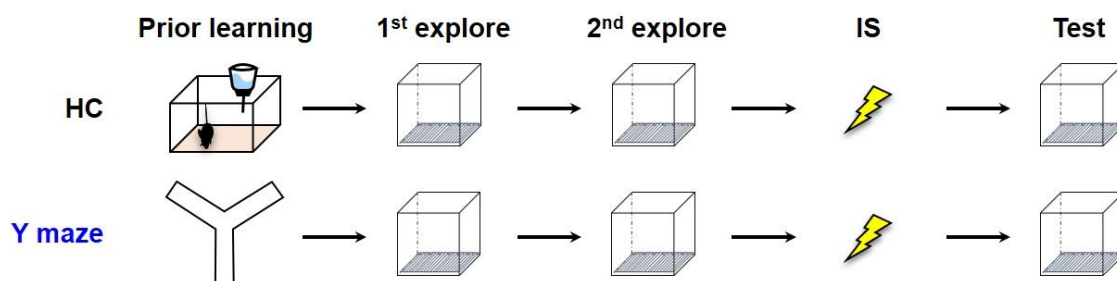


図 1. 実験スケジュール。Y 字迷路の先行学習 (Prior learning) を実施したマウス (Y maze) と実施していないマウス (HC: home cage) をそれぞれ 3 分間テストチャンパー内を探索させた (1st explore)。次の日、マウスを同一チャンパー内で再度探索させた後に (2nd explore)、即時電気刺激 (IS: immediate shock) を与えた。その翌日、テストチャンパー内におけるマウスのすくみ反応を測定することで連合記憶の程度を評価した (Test)。

### 3. 研究の方法

#### Y 字迷路による自発的交替行動試験

同じ大きさの 3 つのアームを 120 度間隔で連結したアクリル製の Y 字迷路を用いた。マウスを Y 字迷路のいずれかのアームの端に入れ、6 分間自由に探索させた。自発的交替行動数は、連続して異なる 3 つのアームを選択した組み合わせの数より算出した。NMDA 受容体拮抗薬である MK801 またはタンパク質合成阻害剤である anisomycin は、Y 字迷路試験の 30 分前あるいは終了直後にそれぞれ腹腔内に投与した。

#### 場所記憶の評価および記憶の連合性の評価

実験スケジュールを図 1 に示す。マウスを透明のアクリル箱で床に電線を敷いたテストチャンパー内に入れ、3 分間自由に探索させた。翌日、同一のテストチャンパー内で、再度マウスを 3 分間自由に探索させた。一日目および二日目のマウスの探索行動量を画像解析プログラムによって算出し、場所記憶の程度を評価した。

場所記憶形成後、同一のテストチャンパーにマウスを入れ、10 秒後に電気ショック (0.7 mA、2 秒間) を 1 回与えた。電気ショックに対するマウスの反応性は (shock reactivity)、電気ショック中のマウスの行動量 (pixel/sec) で評価した。その翌日に、マウスを同一のテストチャンパーに入れ、3 分間のすくみ反応レベルを測定し、場所記憶と恐怖体験の連合性を評価した。マウスの行動はテストチャンパー上部に設置した CCD カメラによって撮影した。すくみ反応は、呼吸動作を除き 2 秒間動きが停止した状態とし、画像解析プログラムで解析した。

#### catFISH (cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence *in situ* hybridization)

*c-fos* 遺伝子は、神経活動依存的に速やかに転写され、その RNA は、刺激後 2 - 15 分間、核内に存在する。引き続き、スプライシングを受けた成熟 mRNA は、細胞質に集積し、20 - 45 分の間検出される。核内の FISH シグナル (*c-fos* RNA exon と intron) は、細胞質のシグナル (*c-fos* RNA exon) と区別できるため、各シグナルの出現時間から個々の神経細胞が活性化したタイミングを推定できる。

マウスをテストチャンパー (CS) 内で探索させた 30 分後に電気ショック (US) を行い、その後、マウスを灌流固定し、脳スライスを作製した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した *c-fos* exon プロブおよび digoxigenin (DIG) 標識した *c-fos* intron プロブを用いて、CS に対して活性化した細胞 (FITC-*c-fos* exon 陽性) および US で活性化した細胞 (DIG-*c-fos* intron 陽性) をそれぞれ同定した。また、CS-US の連合を符号化する記憶痕跡は、CS および US 共活性化細胞 (FITC-*c-fos* exon および DIG-*c-fos* intron 共陽性) として評価した。

### 4. 研究成果

本研究では、Y 字迷路学習から 5 時間後に、マウスをテストチャンパーに入れ、3 分間自由に探索させた。翌日、同一のテストチャンパーに再度入れ、Y 字迷路学習が、場所記憶に与える影響を検討した。ホームケージ群および Y 字迷路群共に、1 日目と比べて、2 日目のテストチャンパー内での行動量が低下したが、その変化レベルは両群間で有意な差は認められなかった (図 2, left)。

二日目、テストチャンパー内の探索後に即時電気刺激をマウスに与え、その翌日に CS 提示に対する恐怖記憶の程度を解析した。本研究では、マウスをチャンパーに短時間 (3 分間) しか曝さないため、通常では、事前の CS 提示にも関わらず恐怖条件づけは成立しないが (No CS vs. HS,  $p = 0.7788$ )、Y 字迷路群は、3 日目のテストセッションにおいて、すくみ反応レベルが HC 群に比べて有意に高く、記憶の連合性が成立した (図 2, right)。また、即時電気刺激に対する反応性は、全群間で有意な差は認められなかった。以上のことから、Y 字迷路を用いた先行学習は、個々の記憶の要素には影響を与えず、記憶の連合性を強化することが明らかとなった。

Y 字迷路学習が後の記憶の連合性を強化するメカニズムを明らかにするために、NMDA 受容体拮抗薬の MK801 およびタンパク質合成阻害薬の anisomycin の効果をそれぞれ検討した。Y 字迷路学習の 30 分前に MK801 を投与した結果、自発的交替行動数が溶媒投与群と比較して有意に低下した。アームへの総進入回数は、両群間で有意な差は認められなかったことから、MK801 による自発的交替行動数の減少は運動障害によるものではない。また、MK801 群のテストチャンパーに対する場所記憶のレベルは、溶媒投与群とほぼ同程度であった。しかしながら、

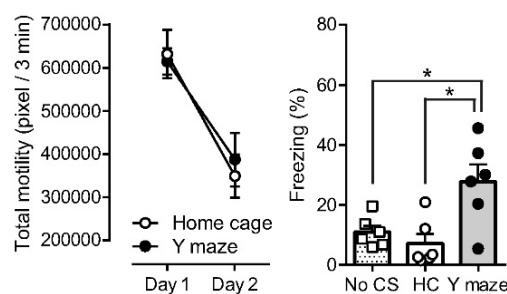


図 2. Y 字迷路群および HC 群の探索行動量の変化 (left) とすくみ反応レベル (right)。HC 群は IS のみ (No CS) 群と同程度のすくみ反応で連合記憶が成立しないが、Y 字迷路群ではすくみ反応レベルが有意に高い ( $p < 0.05$ )。

即時電気刺激から 24 時間後において、MK801 群は、溶媒投与群と比較して、テストチャンパー内で有意に低いすくみ反応を示した。また、即時電気刺激に対する反応性は、両群間で有意な差は認められなかった。次に、Y 字迷路学習直後に anisomycin を投与したところ、テストチャンパーに対する場所記憶および即時電気刺激による記憶の連合性において、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。以上のことから、記憶の連合の強化には、先行する NMDA 受容体依存的な学習が必要であるが、新規タンパク質合成を介した長期可塑性は必要ないことが明らかとなった。

次に、先行学習が記憶の連合に関わる記憶痕跡に与える影響を明らかにするために、文脈的要素(場所)に対する記憶痕跡 (CS) と電気ショックに伴う恐怖に関する記憶痕跡 (US) の重なりを catFISH によって調べた(研究方法参照)。その結果、Y 字迷路群において、各要素に対する神経活動 (*c-fos* で標識) の重複レベルが、ホームケージ群と比較して有意に増大した。以上のことから、先行学習は、記憶の連合に関わる記憶痕跡に影響を与えることで、後続学習に対する記憶を増強させることが明らかとなった。

強烈な体験をすると、その前後の出来事に対する記憶が長期化することが知られており、この現象は、「行動タグ」と呼ばれている (Dunsmoor et al., *Nature*, 2015)。シナプスレベルにおいても、強い入力の前後数時間の間に、弱い入力と同じ神経細胞上の別のシナプスに入ると、強いシナプス増強を示す (Martin and Kosik, *Nat Rev Neurosci*, 2002; Rogerson et al., *Nat Rev Neurosci*, 2014)。このようなシナプスレベルでのタグと行動タグとの因果関係はまだ明らかではないが、両者とも誘導に対して共通する時間枠が存在する。すなわち、強烈な体験の少なくとも 1 時間前後の出来事の記憶しか増強されない (Nomoto et al., *Nat Commun*, 2016)。そのため、Y 字迷路学習後の記憶の連合の増強現象は、行動タグ仮説では説明できない。この考えと一致して、今回、行動タグ形成に必須な新規タンパク質合成を阻害しても、後の記憶の連合が強化された。

以上、本研究によって、NMDA 受容体依存的な先行学習によって、後に異なる課題学習を別々に行うことで形成される海馬の記憶痕跡 (CS) と、扁桃体の記憶痕跡 (US) との繋がりが強化されることが明らかとなった。異なる記憶痕跡細胞群同士を繋ぐメカニズムは明らかではないが、本研究で、先行学習が後の場所記憶の形成には影響を与えずに、場所情報と嫌悪刺激の情報との連合を選択的に強化したことから、CS に対する記憶痕跡と CS-US といった記憶の連合に対する記憶痕跡は異なるメカニズムによって修飾される可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

- Alkon DL, Lederhendler I, Shoukimas JJ (1982) Primary changes of membrane currents during retention of associative learning. *Science* 215:693-695.
- Daoudal G, Debanne D (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10:456-465.
- Frankland PW, Josselyn SA, Anagnostaras SG, Kogan JH, Takahashi E, Silva AJ (2004) Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* 14:557-569.
- Dunsmoor JE, Murty VP, Davachi L, Phelps EA (2015) Emotional learning selectively and retroactively strengthens memories for related events. *Nature* 520:345-348.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA (2009) Selective erasure of a fear memory. *Science* 323:1492-1496.
- Kitamura T, Okubo-Suzuki R, Takashima N, Murayama A, Hino T, Nishizono H, Kida S, Inokuchi K (2012) Hippocampal function is not required for the precision of remote place memory. *Mol Brain* 5:5.
- Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S (2012) Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484:381-385.
- Martin KC, Kosik KS (2002) Synaptic tagging -- who's it? *Nat Rev Neurosci* 3:813-820.
- Moncada D, Viola H (2007) Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J Neurosci* 27:7476-7481.
- Moyer JR, Jr., Thompson LT, Disterhoft JF (1996) Trace eyeblink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J Neurosci* 16:5536-5546.
- Nomoto M, Ohkawa N, Nishizono H, Yokose J, Suzuki A, Matsuo M, Tsujimura S, Takahashi Y, Nagase M, Watabe AM, Kato F, Inokuchi K (2016) Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioural tagging. *Nat Commun* 7:12319.
- Rogerson T, Cai DJ, Frank A, Sano Y, Shobe J, Lopez-Aranda MF, Silva AJ (2014) Synaptic tagging during memory allocation. *Nat Rev Neurosci* 15:157-169.
- Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC (2002) Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci* 116:530-538.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG

(2007) Schemas and memory consolidation. **Science** 316:76-82.

Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, Richards B, Rashid AJ, Hsiang HL, Pressey J, Mahadevan V, Tran MM, Kushner SA, Woodin MA, Frankland PW, Josselyn SA (2014) Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. **Neuron** 83:722-735.

Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, Neve R, Poirazi P, Silva AJ (2009) CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. **Nat Neurosci** 12:1438-1443.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasawa Chizuru, Narita Minoru, Tamura Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Regional and temporal regulation and role of somatostatin receptor subtypes in the mouse brain following systemic kainate-induced acute seizures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ideta-Otsuka Maky, Miyai Misato, Yamamoto Naoki, Tsuchimoto Ayaka, Tamura Hideki, Tanemura Kentaro, Shibutani Makoto, Igarashi Katsuhide	4. 巻 46
2. 論文標題 Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 83～90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.46.83	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田村 英紀、宮崎 晶子、川村 高史、成田 年
2. 発表標題 幼少期の社会的孤立に伴う認知および情動障害に対する大豆ペプチドの“緩和効果”
3. 学会等名 第13回日本緩和医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Tamura
2. 発表標題 KLK8 signaling under physiological conditions and its upregulation in Alzheimer's disease
3. 学会等名 18th Conference of Peace through Mind/Brain Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 英紀、森川 勝太
2. 発表標題 興奮性神経細胞におけるペリニューロナルネットの情動記憶制御機構
3. 学会等名 第 124 回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------