

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25年 6月 3日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500301

研究課題名（和文） 扁桃体依存性学習・記憶のメカニズムにおけるカルモジュリンキナーゼ II の役割

研究課題名（英文） The role of calmodulin-kinase II in the mechanism of amygdala-dependent learning and memory.

研究代表者

山肩 葉子 (YAMAGATA YOKO)

生理学研究所・生体情報研究系・助教

研究者番号：20210338

研究成果の概要（和文）：扁桃体依存性の学習・記憶のメカニズムを探るために、キナーゼ活性を欠損させたカルモジュリンキナーゼ II 遺伝子改変マウスを用いて、各種解析を行った。その結果、カルモジュリンキナーゼ II のキナーゼ活性が扁桃体依存性学習・記憶の成立メカニズムに重要な役割を果たすこと、しかしながら、海馬依存性学習・記憶とは、そのメカニズムへの関与の度合いが異なることが明らかとなった。このことは、脳部位によって学習・記憶を成立させる分子の組み合わせが異なることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：To examine the role of calmodulin-kinase II in the mechanism of amygdala-dependent learning and memory, we analyzed genetically-engineered mice with a mutation that rendered the kinase inactive. We found that kinase activity of calmodulin-kinase II plays a major role in the mechanism of amygdala-dependent learning and memory, while the extent of its contribution was different from that to the mechanism of hippocampus-dependent learning and memory. These results indicate that combination of different types of molecules seems to be involved in the formation of brain region-specific types of learning and memory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

恐怖条件付けに代表される扁桃体依存性の学習・記憶は、哺乳動物が身の回りの危険を察知し、回避するという、生存して行く上で非常に重要な学習機能である。また、この学習機能の異常がヒトの心的外傷後ストレス障害 (PTSD) と関係することから、そのメ

カニズムの解明は、今日の神経科学における重要な課題の一つである。これまで研究が進んでいる海馬依存性の学習・記憶に比べて、そのメカニズムの解明は非常に遅れており、新たな方法、特に、遺伝子改変マウスを用いた分子・行動といった多角的レベルの検討を進めることにより、飛躍的な展開が望める状

況にある。

2. 研究の目的

本申請者らは、これまで、脳内において重要な情報伝達を担うと考えられる蛋白分子、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α (CaMKII α) について、その機能解析を含めた様々な研究を進めて来た。中でも、CaMKII α の蛋白としての主要な機能であるキナーゼ活性を完全になくした遺伝子改変マウス「CaMKII α -KI」を作製し、その解析を進めて来ている。このノックイン型の遺伝子改変マウスは、従来の蛋白自体をなくしてしまうようなノックアウトと異なり、蛋白の特定の機能に絞った解析ができる点に特徴がある。このマウスでは、高次脳機能を担う脳部位のひとつである海馬におけるシナプス可塑性と、海馬依存性の学習・記憶に高度の障害があることが判明し、その結果、CaMKII α による蛋白質リン酸化、すなわちキナーゼ活性が、これらのメカニズムに重要な役割を果たすことが明らかとなっている。本研究の目的は、このマウスの解析をさらに扁桃体へと発展させることにより、CaMKII α のキナーゼ活性が扁桃体依存性の学習・記憶に果たす役割を明らかにし、その分子メカニズムに迫ることにある。

3. 研究の方法

(1) 恐怖条件付け学習

扁桃体依存性の学習テストの中でも、「音などの感覚刺激とフットショックとの条件付け (cued conditioning)」については、扁桃体の破壊によって条件付けが起こらなくなるのが、古くから知られている。一方、「場所情報とフットショックとの条件付け (contextual conditioning)」については、扁桃体の破壊のみならず、海馬の破壊によっても条件付けが起こらなくなることがわかっている。従って、これら二種類の条件付け学習を調べることにより、扁桃体と海馬についての機能評価が可能となる。そこで、前述の遺伝子改変マウス「CaMKII α -KI」と、その比較対象となる野生型マウスを用いて、1回あるいは複数回の条件付け刺激で学習・記憶が成立するかどうかを評価する。学習効果が観察された場合には、さらに期間を置いての評価を行い、記憶の長期持続性を評価する。

(2) 受動的回避反応学習

夜行性のげっ歯類には暗いところを好む性質があり、その性質を利用して、「暗い部屋に入るとフットショックを受ける」ということを学習する条件付けテストである。「場所情報とフットショック」を関連づけるという点では、「contextual conditioning」と似ているが、マウスが自ら行動した結果の出来

事である点、また、その評価として、「暗い部屋に入るまでの時間」というマウス自らの行動に基づいて判断する点が、恐怖条件付け学習とは異なる。情動を伴う、より強い条件付けとなり、正常な動物の場合、一度の条件付け刺激によって、二度と同じ部屋に入らなくなり、しかもその記憶が長期間持続することが知られている。この学習テストについても、「CaMKII α -KI」マウスと野生型マウスとで、条件を揃えて、比較検討を行う。

(3) 生化学的検討

海馬および扁桃体には、CaMKIIが多く発現しているが、中でも海馬は脳内で最も高発現する部位とされている。そこで、「CaMKII α -KI」マウスと野生型マウスを用いて、その海馬と扁桃体に含まれるカルモジュリンキナーゼ II活性と、CaMKII α ともうひとつのサブタイプである CaMKII β の蛋白量を、脳部位毎のホモジネートを用いて測定し、比較する。

4. 研究成果

(1) 恐怖条件付け学習

野生型マウスでは、1回の条件付け刺激で、「contextual learning」、「cued learning」共に、明らかに認められたのに対し、「CaMKII α -KI」マウスでは、「contextual learning」は全く成立せず、一方、「cued learning」は、野生型に比べると少ないながらも、一定程度認められた。4週間後に再度テストを行ったところ、記憶の程度は漸減するものの、野生型、「CaMKII α -KI」マウス共に、初期に認められた記憶は保持されていた。

次に別グループのマウスを用いて、複数回の条件付け刺激を行ったところ、野生型マウスでは、「contextual learning」、「cued learning」共に、より強度の学習効果が認められたのに対し、「CaMKII α -KI」マウスでは、むしろ恐怖反応の全般化が認められた。すなわち、指標となる恐怖反応自体は増大するが、場所に依存せず、フットショックを受けなかったチェンバー内でも恐怖反応の亢進が認められた。4週間後に再度テストを行ったところ、恐怖反応の全般化自体は消失し、その結果顕在化した現象として、「contextual learning」は全く認められず、「cued learning」は野生型マウスより劣るものの、一定程度観察された。

これらの結果から、「CaMKII α -KI」マウスでは、場所記憶に関する海馬依存性の学習・記憶障害が非常に顕著であるのに対し、扁桃体依存性の学習・記憶障害は中等度にとどまることが示された。

(2) 受動的回避反応学習

野生型マウスでは、テストしたすべてのマウスにおいて、1回の条件付け刺激で、フットショックを受けた暗い部屋を回避する学習が成立し、1週間後、4週間後のテストでもその記憶が保持さ

れていた。一方、「CaMKII α -KI」マウスは、1回の条件付け刺激の直後でも再びフットショックを受けた部屋に入ってしまうなど、まったく学習が成立しなかった。

そこで、別グループのマウスを用いて、複数回の条件付け刺激を行ったところ、「CaMKII α -KI」マウスでは、刺激直後にはすべてのマウスにおいて回避反応が観察されたが、24時間後には一部のマウスで回避反応が消失し、一部で残存していた。これらの回避反応が場所認識に基づく学習の成立によるものかどうかを確認するために、これらマウスを全く異なる環境下において観察したところ、恐怖反応の増大を示した。一方、野生型マウスでは、複数回刺激を行った後、異なる環境下に置いた場合でも、恐怖反応の増大は認められなかった。さらに、異なる環境下で恐怖反応を示した「CaMKII α -KI」マウスを、その環境下に繰り返し暴露させたところ、この環境下における恐怖反応は消失した。

これらの結果から、「CaMKII α -KI」マウスでは、フットショックが起こった場所に関する海馬依存性の学習・記憶に強い障害があると同時に、強い刺激を受けると場所特異性を持たない恐怖記憶が形成され、恐怖反応の全般化が起こること、しかしながら、その全般化は消去しうるものであることを示している。また、場所記憶を伴わないものの強い刺激によって恐怖記憶が形成され、持続することから、扁桃体依存性の学習・記憶はある程度保持されていると考えられた。

(3) 生化学的検討

「CaMKII α -KI」マウスでは、上記のように、野生型マウスと比べて、海馬依存性の学習・記憶に顕著な障害があるものの、扁桃体依存性の学習・記憶には部分的な障害しか認められないことがわかってきた。そこで、これらの違いが、そもそも海馬と扁桃体に含まれるカルモジュリンキナーゼIIの含量や活性に違いがあるためなのかどうかを明らかにするために、「CaMKII α -KI」マウスと野生型マウスの脳より、海馬と扁桃体をそれぞれ分離、抽出し、そのホモジネート中に含まれるカルモジュリンキナーゼII活性とカルモジュリンキナーゼIIサブタイプの蛋白量の測定を行った。その結果、CaMKII α の失活を反映する「CaMKII α -KI」マウスでのキナーゼ活性の減少の程度は、海馬と扁桃体のいずれにおいても、ほぼ同じであった。また、CaMKII β サブタイプの蛋白量には増減がなく、また、CaMKII α サブタイプの蛋白量は野生型に比較して若干減少しているものの、その減少の割合にも違いがないことが明らかとなった。

これらの結果は、「CaMKII α -KI」マウスにおける海馬依存性と扁桃体依存性の学習・記憶の障害の程度の違いが、単にそれら脳部位におけるカルモジュリンキナーゼIIの含量の違いによるものではなく、関与する分子自体に違いがあることを示している。すなわち、海馬依存性の学習・

記憶の形成には、CaMKII α のキナーゼ活性が不可欠であるのに対し、扁桃体依存性の学習・記憶の形成には、CaMKII α のキナーゼ活性が重要であるものの、これ以外にも主要な役割を果たす分子が存在することを示唆している。

(4) 研究の意義、今後の展望

海馬依存性の学習・記憶は高次脳機能のひとつとして重要であり、ヒトの認知症初期に出現するいわゆる「物忘れ」においては、この機能が特に障害される一方で、恐怖反応といった情動に関わる学習・記憶は比較的保たれている。すなわち、「物忘れ」は日常生活に支障を来すものの、生きていく上では必ずしも問題とはならない。

一方、扁桃体依存性の学習・記憶は、生物として危険を回避し、生存を維持するためになくしてはならない機能と言える。このように生存に直接関わるような基本的な学習・記憶のメカニズムには、複数の蛋白分子が相補的に関与し、その機能を支えていると考えることができる。

他方で、生物が進化してより高等な生物となってから現れるような高次脳機能については、それぞれに特化した特定の分子がその機能を支えていると想定できる。本研究課題で取り上げたCaMKII α は、こういった分子のひとつで、海馬機能に特化した機能分子と言えるのかもしれない。

さらに、本研究課題で用いた「CaMKII α -KI」マウスは、海馬に特異的な機能障害を示すことから、認知症初期の「物忘れ」のモデルマウスとして、また、強い刺激に対して恐怖反応の全般化を示し、しかも、その全般化が軽減・消失可能であることから、PTSDのメカニズムの究明や治療法の開発にも役立つモデルマウスとして、今後の応用が期待できる。

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2件)

① Yamagata, Y., Kaneko, K., Kase, D., Ishihara, H., Nairn, A.C., Obata, K., Imoto, K. (2013) Regulation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by NMDA-receptor-induced seizure activity in cortical slices. *Brain Res.* 1507: 1-10.

(査読有)

② 山肩葉子, 井本敬二. (2011) 長期記憶の分子機構. *Clinical Neuroscience* 29: 777-781. (査読無)

[学会発表] (計10件)

- ① Yamagata, Y., Kaneko, K., Kase, D., Ishihara, H., Nairn, A.C., Obata, K., Imoto, K. (2012.11.16) Regulation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by NMDA-receptor-induced seizure activity in cortical slices. 名古屋大学グローバルCOEプログラム 第4回国際シンポジウム(名古屋) .
- ② Yamagata, Y., Kaneko, K., Nairn, A.C., Obata, K., Imoto, K. (2012.9.19) Distinct activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase in NMDA-receptor-induced seizure activity in cortical slices. 第35回日本神経科学大会 (名古屋) .
- ③ Yamagata, Y., Kaneko, K., Nairn, A.C., Obata, K., Imoto, K. (2012.7.15) Distinct activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase in a cortical slice model of seizure activity. FENS (The Federation of European Neuroscience Societies) Forum 2012 (Barcelona, Spain).
- ④ Yamagata, Y., Yanagawa, Y., Imoto, K. (2011.9.15) Contribution of kinase activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α to hippocampus- and amygdala-dependent memory formation. 第34回日本神経科学大会 (横浜) .
- ⑤ 山肩葉子, 井本敬二. (2011.8.20) Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α は海馬依存性学習のみならず扁桃体依存性学習にも必要か? 第2回名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム (名古屋) .
- ⑥ Yamagata, Y. (2011.5.14) The role of kinase activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α in hippocampus- and amygdala-dependent memory. The 13th Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society (IBANGS) (Rome, Italy).
- ⑦ Yamagata, Y., Yanagawa, Y. and Imoto, K. (2010.12) Kinase activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α is indispensable for hippocampus-dependent memory but not for amygdala-dependent memory. SOKENDAI/NIPS symposium 2010 (Okazaki, Japan) .
- ⑧ Yamagata, Y., Yanagawa, Y. and Imoto, K. (2010.11) How important is the kinase activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α in hippocampus- and amygdala-dependent memory. 40th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Neuroscience 2010 (San Diego, CA).
- ⑨ Karcher, S. C., Kondo, S., Ebihara, S., Yamagata, Y. and Okabe, S. (2010.9) Role of calcium/calmodulin-dependent protein

kinase II α (CaMKII α) activity in spine formation and dendritic arborization during development. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 合同大会 Neuro2010 (神戸) .

⑩ Yamagata, Y., Yanagawa, Y. and Imoto, K. (2010.9) Role of kinase activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α in hippocampus- and amygdala-dependent memory. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 合同大会 Neuro2010 (神戸) .

[その他]
ホームページ等
http://www.nips.ac.jp/huinfo/research/n_s_Res05.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山肩 葉子 (YAMAGATA YOKO)
生理学研究所・生体情報研究系・助教
研究者番号：20210338

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

井本 敬二 (IMOTO KEIJI)
生理学研究所・生体情報研究系・教授
研究者番号：00176512
阪上 洋行 (SAKAGAMI HIROYUKI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：90261528
柳川 右千夫 (YANAGAWA YUCHIO)
群馬大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90202366