

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300120

研究課題名(和文) 記憶想起後の記憶フェーズ決定機構の遺伝学的解明

研究課題名(英文) Mechanisms for phase shift of reactivated memory

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) 11,600,000円、(間接経費) 3,480,000円

研究成果の概要(和文)：記憶想起後には、記憶を維持あるいは強化する再固定化と、逆に、記憶を減弱させる消去の二つの相反するプロセスが誘導される。本課題では、想起後に再固定化から消去へと記憶フェーズが移行するメカニズムの解明を目指した。転写因子CREBのリン酸化、ERKのリン酸化、プロテオソーム依存的タンパク質分解などの活性化を指標にして、再固定化ニューロンと消去ニューロンを海馬、扁桃体、前頭前野皮質において同定した。さらに、消去が誘導されると、海馬では、再固定化ニューロンが不活性化され、ERKが活性化された消去ニューロンが現れることを発見し、海馬の活性制御が想起後の記憶フェーズシフトを行う鍵となると考察した。

研究成果の概要(英文)：Memory retrieval initiates two opposite processes; memory reconsolidation and extinction. Memory reconsolidation maintains or enhances fear memory, whereas memory extinction weakens fear memory. In this study, we tried to understand mechanisms by which the fate of memory is determined after retrieval by analyzing activation of transcription factor CREB, ERK and proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus, amygdala and mPFC. We identified reconsolidation neurons and extinction neurons that display distinct biochemical features in reconsolidation and extinction phases, respectively. More importantly, in the extinction phase, reconsolidation neurons were inactivated while extinction neurons activated ERK signaling pathway in the hippocampus. From these observations, we concluded that hippocampus plays key roles in the phase shift from reconsolidation to extinction following memory retrieval.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経生理学・神経科学一般

キーワード：神経科学 脳・神経 記憶再固定化 記憶消去 記憶想起 記憶固定化 海馬 扁桃体

1. 研究開始当初の背景

世界的にも、記憶研究は約 100 年前に提唱された「固定化仮説(Consolidation theory)」に基づき、初期情報の獲得による新規記憶形成機構を、分子・細胞・個体レベルの様々な角度から解析を進めたものが圧倒的多数を占める。一方、2000 年、げっ歯類を用いた実験心理学的解析から、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示された。この研究から、記憶は、「固定化仮説」で考えられていた程、静的なものではなく、変化しうる「動性」を秘めていることが示され、記憶想起後に動的な記憶制御基盤が存在することが示唆された。

恐怖記憶制御は動物に共通して存在しており、心的外傷後ストレス障害(PTSD)はこの恐怖記憶制御の破綻が原因であると考えられている。現在最も有効な PTSD 治療方法は恐怖記憶を想起させ続ける暴露療法であり、この認知行動療法は恐怖記憶消去を誘導しているものと捉えられている。そこで、想起後の再固定化や消去のプロセスを人為的に制御することにより、PTSD、さらには、や薬物依存の治療が可能になると考えられ、治療法開発が進められている。しかし、想起後の記憶制御機構の解析に関しては、北米を中心としたげっ歯類を用いた実験心理学的研究が大多数であり、分子生物学的観点からの研究は極めて少ない。その結果、再固定化や消去が誘導される過程で脳内に組織・細胞・分子レベルでどのような変化が起こっているのかも未だ不明である。しかも、作動原理が不明のまま、臨床応用研究が先行しているのが現状である。

2. 研究の目的

恐怖記憶再固定化と消去は共に想起後に誘導される。しかし、再固定化は恐怖記憶維持に働き、一方、消去は恐怖記憶の軽減に働くため、両者は恐怖記憶制御において対照的な役割を果たす。研究代表者は、げっ歯類の実験心理的行動実験系を用いて恐怖記憶想起後の制御機構の解明に取り組んできた。その過程で、想起後の記憶不安定化及び再固定化の分子機構を明らかにした。特に、恐怖記憶を再保存するか(再固定化)あるいは、恐怖記憶を消去するか(恐怖記憶を思い出しても怖がる必要がないことを記憶する)を決定する制御基盤こそが、動的に記憶回路を制御する作動原理解明に繋がると考え、再固定化と消去の制御機構の解析を進めてきた。

恐怖条件付け文脈学習課題では、電気ショックを受けた(恐怖体験した)箱にマウスを 30 分間戻すと、外見上は、すくみ反応(恐怖反応)が徐々に減少するに過ぎない。しかし、3 分で箱から出した場合には恐怖記憶を再貯蔵するために再固定化が誘導され、一方、30 分では恐怖記憶消去が獲得される。代表者は、行動学的解析に、組織学・生化学的解析を加

えることで、再固定化と消去は、行動レベルのみならず、組織・細胞・分子レベルで極めて対照的な性状を示すことを明らかにしてきた。以上の結果から、箱に戻した 30 分間の中で、脳内では組織・細胞・分子レベルの劇的な変化が起こり、恐怖記憶を再固定するか、あるいは、消去するかが厳格に決定されていることが明らかとなった。このように、記憶想起の過程で「再固定化」から「消去」へと記憶フェーズを移行させる制御基盤の存在が強く示唆されている。本研究では、この知見をベースにして、記憶想起後の再固定化と消去のフェーズ移行を決定する制御基盤を個体・回路・細胞・分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 再固定化ニューロンと消去ニューロンの同定

最近の解析から、扁桃体には恐怖反応の度合いを決定する fear neuron と extinction neuron が存在することが示されているが(Nature. 454, 600-6, 2008) 恐怖記憶あるいは消去記憶を貯蔵するニューロンは同定されていない。本研究では、蛍光免疫組織染色を用いて、CREB 及び ERK の活性化を指標にして、「再固定化ニューロン(reconsolidation neuron)」と「消去ニューロン(extinction neuron)」を生化学的に同定することを試みた。

フェーズ移行を制御する ERK を中心とした情報伝達経路の役割を薬理学的に解析し、記憶フェーズ移行制御機構を解析した。

(2) 記憶制御時の領野間相互作用及び想起制御に関わるニューロン群の同定と機能解析

本研究において、同定されたニューロン群を標的として、薬理学的あるいは遺伝学的手法を用いて介入操作を行うことで、想起後の記憶フェーズ決定に対するニューロン群の機能的役割を解析した。

(3) 想起後の記憶フェーズ移行を担う新規分子群の同定

記憶再固定化から消去へとフェーズが移行する際に海馬で劇的な生化学変化が生じることが示唆されているため、想起後の記憶フェーズを制御する新規分子群の同定を試みた。

(4) 記憶制御時の領野間相互作用及び想起制御に関わる分子群の機能解析

想起後の記憶制御に関わることを示唆された分子群の役割を、遺伝学的、薬理学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

研究代表者によって、転写調節因子 cAMP-responsive element-binding protein (CREB) による遺伝子発現活性化が記憶再固定化と消去に必須であることが明らかにされている。一方、MAP キナーゼである extracellular signal-regulated kinase (ERK) は

CREB を活性化する上流キナーゼとして知られている。そこで、受動的回避反応課題を用いて、蛍光二重免疫染色法を用いて CREB 及びの活性化マーカーとなるリン酸化を検出することで、海馬、扁桃体、前頭前野皮質の脳領域において再固定化及び消去を制御し、生化学的に差異を示すニューロン集団の同定を進めた。その結果、再固定化フェーズでは海馬、扁桃体、前頭前野において CREB のリン酸化のみが誘導されたニューロン集団 (pCREB+/pERK-) が出現することが明らかとなった。一方、興味深いことに、消去フェーズでは、前頭前野皮質では、CREB あるいは Erk の一方のみのリン酸化が検出されるニューロン (pCREB+/pERK- あるいは pCREB-/pERK+) と、両者のリン酸化が共に検出されるニューロン (pCREB+/pERK+) の計 3 種類のニューロン集団が出現した。扁桃体では、pCREB+/pERK- ニューロンと pCREB+/pERK+ ニューロンの計 2 種類のニューロン集団が出現し、海馬では、pCREB-/pERK+ ニューロン集団のみの出現が観察された。

続いて、ERK リン酸化の経時的変化を解析した。その結果、再固定化フェーズでは ERK の活性化は記憶想起直後に海馬、扁桃体、前頭前野皮質において一過的に観察されることが明らかとなった。一方、消去フェーズでは、再固定化フェーズと同様に、記憶想起直後に海馬、扁桃体、前頭前野皮質において ERK は活性化され、この活性は一度低下するものの、その後再度 ERK の活性化が観察されることが明らかとなった。以上のように、この解析においても、再固定化と消去では、ERK の活性化に共通性と特異性が観察され、再固定化と消去時の脳内の分子制御機構には特徴的な差異が観察されることが明らかとなった。特に、消去時には ERK 活性化に二つのピークが観察され、このような ERK の活性化制御が再固定化と消去フェーズの区別、すなわち、記憶フェーズ移行の鍵となることが強く示唆された。さらに、ERK 阻害剤を用いた解析から、観察された ERK 活性化が再固定化及び消去の進行にそれぞれ不可欠であることが行動レベルでも明らかにされた。以上のように、ERK の活性制御が再固定化と消去を区別する、すなわち、フェーズ移行の鍵を握ることが示された。

以上までで、恐怖記憶再固定化に対する海馬、扁桃体、前頭前野皮質の重要性が明らかとなった。そこで、これらの 3 つの領域の階層性をリドカインの局所注入後の初期応答遺伝子の発現誘導を指標にして解析した。その結果、扁桃体と前頭前野皮質が相互作用し、さらに、扁桃体と前頭前野皮質が海馬の上位に位置することが明らかとなった。

さらに、プロテオソーム依存的なタンパク質分解を測定して、再固定化と消去の解析を行った。その結果、再固定化と消去時に CREB による遺伝子発現が誘導されるニューロン

において、タンパク質分解も誘導されることが明らかとなり、これらのニューロンが再固定化と消去をそれぞれ制御する責任ニューロン(再固定化ニューロンと消去ニューロン)であることが強く示唆された。特に、タンパク質分解と遺伝子発現は同時進行することも示され、想起後にダイナミックな生化学的变化が誘導されていることが示唆された。一方、消去が誘導されると、海馬において、再固定化時に観察された遺伝子発現とタンパク質分解が起こるニューロンが観察されなくなることから、この海馬ニューロンの生化学的な活性変動が再固定化から消去への記憶フェーズシフトと強く相関することが示された。

同様に、社会的認知記憶及び新規物体認知記憶課題においても、連続して同一のマウスや物体に再エクスポージャーすると、固定化時に観察されていた海馬における遺伝子発現が誘導されなくなった。従って、海馬の活性制御が想起後の記憶制御、すなわち、フェーズシフトの鍵となっていることが明らかとなった。海馬の上流には扁桃体及び前頭前野皮質が存在するため、扁桃体と前頭前野皮質が海馬の活性・機能を制御することで想起後の記憶フェーズシフトを誘導する作動原理が存在するものと考察した。

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 15 件)

- (1) Fukushima, H., Zhang, Y., Archbol, G., Ishikawa, R., Nader, K. Kida, S., Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation, *eLife*, 査読有, in press
- (2) Kida, S. & Serita, T. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory, *Brain Research Bulletin*, 査読有, in press DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.04.011.
- (3) 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*, 査読有, in press DOI: 10.1002/hipo.22270.
- (4) Kato, K., Iwamoto, T. & Kida, S., Interactions between α CaMKII and calmodulin in living cells: conformational changes arising from CaM -dependent and -independent relationships, *Mol. Brain*, 査読有, 6, 2013, 37 DOI: 10.1186/1756-6606-6-37.
- (5) 喜田聡、記憶形成とアップデートのメカニズム、*化学と生物*、査読有、51、2013、81-89
- (6) 喜田聡、レチノイン酸受容体、*分子精神医学*、査読無、13、2013、307-309

- (7) Descalzi G, Fukushima H, Suzuki A, Kida S, Zhuo M., Genetic enhancement of neuropathic and inflammatory pain by forebrain upregulation of CREB-mediated transcription, **Mol. Pain**, 査読有, 8, 2012, 90
DOI: 10.1186/1744-8069-8-90.
DOI: 10.5607/en.2012.21.4.136.
- (8) Wang, H., Morishita, Y., Miura, D., Naranjo, J.R., Kida S. & Zhuo, M., Roles of CREB in the regulation of FMRP by group I metabotropic glutamate receptors in cingulate cortex, **Mol. Brain**, 査読有, 5, 2012, 27
DOI: 10.1186/1756-6606-5-27.
- (9) Nomoto, M., Takeda, Y., Uchida, S., Mitsuda, K., Enomoto, H., Saito, K., Choi, T., Watabe, A.M., Kobayashi, S., Masushige, S., Manabe, T. & Kida S., Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity, **Mol. Brain**, 査読有, 5, 2012, 8
DOI: 10.1186/1756-6606-5-8.
- (10) Kitamura, T., Okubo-Suzuki, R., Takashima, N., Murayama, A., Hino, T., Nishizono, H., Kida S. & Inokuchi, K., Hippocampal function is not required for the precision of remote place memory, **Mol. Brain**, 査読有, 5, 2012, 5
DOI: 10.1186/1756-6606-5-5
- (11) Hosoda, H., Tamura, H., Kida S. & Nagaoka, I., Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264.7 macrophage-like cells, **Life Sci.**, 査読有, 89, 2011, 115-122
DOI: 10.1016/j.lfs.2011.05.007
- (12) Suzuki, A., Fukushima, H., Takuya Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L-J., Zhao, M-G, Hui Xu, H., Shang, Y., Endoh, K., Iwamoto, Mamiya, N., Okano, E., Hasegawa, H., Mercaldo, V., Yue Zhang, Y., Maeda, R., Ohta, M., Josselyn, S.A., Zhuo, M. & Kida S., Up-regulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory, **J. Neurosci.**, 査読有, 31, 2011, 8786-8802
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3257-10.2011
- (13) Hosoda, H., Miyao, T., Uchida, S., Sakai, S. & Kida S., Development of tightly regulated tetracycline-dependent transcriptional activator and repressor co-expression system for the strong induction of transgene expression, **Cytotechnology**, 査読有, 63, 2011, 211-216
DOI: 10.1007/s10616-011-9335-z
- (14) 喜田聡, 想起後の記憶制御のダイナミズム, **細胞工学**, 査読無, 30, 2011, 475-481
- (15) 喜田聡, 核内受容体による学習記憶制御, **生体の化学**, 査読無, 62, 2011, 486-488
- バージョン シンポジウム、2014年3月6日-7日、東京
- (2) 福島穂高、張悦、金亮、喜田聡、カルシニューリンを起点とした想起後の受動回避記憶の増強、平成25年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ、2013年8月29日-9月1日、名古屋
- (3) Kida S., Role of Calcineurin in Enhancement of Fear Memory after Retrieval, The 8th International Conference for Neurons and Brain Diseases, 2013年7月2-4日, National University of Singapore, Singapore
- (4) Kida S., Neural circuits and cellular and molecular mechanisms underlying fear learning, 11th World Congress of Biological Psychiatry (“Perspectives in neurobiology of PTSD and disaster-related psychiatric disorders”), 2013年6月25日, Kyoto
- (5) Kida S., Dynamic regulation of fear memory after retrieval: Therapeutic targets for the treatment of PTSD, WFSBP Neuro Joint Symposium (“Neurocircuit for physiological and pathophysiological brain”), 2013年6月23日, Kyoto
- (6) 張悦、福島穂高、喜田聡、リン酸化CREBとErkの発現レベルを指標とした恐怖記憶強化と消去制御に関わるニューロン集団の同定、第36回日本神経科学大会、2013年6月20-23日、京都
- (7) Kida S., Enhancement of fear memory after retrieval, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Symposium (“Molecular, Cellular and Circuit Mechanisms underlying Cognition”), 2013年6月19日, Kyoto
- (8) Yue ZHANG, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA, Distinct time-dependent roles of Erk activation in the reconsolidation and extinction memory phases, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Conference, 2013年6月19日, 京都
- (9) Kida S., Dynamic regulation of fear memory after retrieval, Meeting México-Japan (Memory Traces & Tags), 2013年4月25-26日, Centro Académico Cultural UNAMx, Mexico
- (10) Kida S., Enhancement of fear memory after retrieval, ISN-ASN 2013 (Mechanisms of memory enhancement of erasure), 2013年4月20-24日, Cancun, Mexico.
- (11) 喜田聡, 想起後の恐怖記憶制御のダイナミクス、自然科学研究機構国際拠点形成プロジェクト「脳の階層的研究」報告会&シンポジウム、2013年3月5日、岡崎
- (12) Kida S., Dynamic regulation of fear memory after retrieval, MCCS-Australia (Asia-pacific), 2013年2月2日, Melbourne, Australia
- (13) 喜田聡, Enhancement of fear memory after retrieval through protein degradation and synthesis, 第35回日本分子生物学会ワークショップ「遺伝子発現とタンパク質分解によって産み出される記憶制御のダ

【学会発表】(計 32 件)

- (1) 喜田聡, 記憶制御に対するビタミンAの役割、第7回レドックス・ライフイノ

- イナミクス」、2012年12月11日、福岡
- (14) 喜田聡、タンパク質分解を起点とした想起後の記憶制御、生理学研究所シンポジウム「記憶回路研究」個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解、2012年11月20-21日、岡崎
 - (15) Yue ZHANG、Hotaka FUKUSHIMA、Satoshi KIDA、Distinct neuron populations in the enhancement/reconsolidation and extinction phases of reactivated inhibitory avoidance memory in the hippocampus, amygdala and mPFC, The 42nd annual meeting of Society for neuroscience, 2012年10月13-17日、New Orleans
 - (16) 喜田聡、特異的ニューロン集団が産み出す想起後の記憶制御のダイナミクス、第35回日本神経科学大会シンポジウム「個々の神経細胞の働きを俯瞰して見る脳機能」、2012年9月19日、名古屋
 - (17) 張悦、福島穂高、喜田聡、CREBとERKのリン酸化を指標とした恐怖記憶強化と消去制御に関わるニューロン集団の同定、第35回日本神経科学大会、2012年9月18-21日、名古屋
 - (18) 喜田聡、Dynamic regulation of fear memory after retrieval by distinct neural circuits, National Institute for Physiological Sciences International Workshop 2012 Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link, 2012年9月15日、Okazaki, Japan
 - (19) 喜田聡、Circadian regulation of memory retrieval by BMAL1, EMCCS--FENS 5th annual meeting, 2012年7月13日、Barcelona, Spain
 - (20) 喜田聡、Dynamic regulation of fear memory after retrieval, Bio-X 2012 International Symposium on Molecular Cognition and Translational Research on Neuropsychiatric Disorders, 2012年4月29日、Shanghai, China
 - (21) 喜田聡、恐怖記憶制御のダイナミクス、第153回日本獣医学会学術集会シンポジウム 本能・情動行動の統合・調節メカニズム「神経生理学研究の挑戦：動物の情動行動の謎を解く」、2012年3月27日、大宮
 - (22) 喜田聡、Dynamic regulation of memory after retrieval, 1st frontier international symposium for neurons and disease, 2012年3月22-25日、Xian, China
 - (23) 張悦、福島穂高、喜田聡、CREBとErkの活性化を指標とした恐怖記憶強化及び消去を制御するニューロン集団の同定、第56回日本農芸化学学会大会、2012年3月23日、京都
 - (24) 芹田龍郎、福島穂高、喜田聡、CREB情報伝達系活性化が学習能力に与える影響の解析、第56回日本農芸化学学会大会、2012年3月23日、京都
 - (25) 福島穂高、張悦、喜田聡、タンパク質合成と分解を介した想起後の受動回避記憶の強化、日本分子生物学会、2011年12月13日、横浜
 - (26) 張悦、福島穂高、喜田聡、CREBとErk

- のリン酸化を指標とした恐怖記憶再固定化及び消去制御に関わるニューロン集団の同定、日本分子生物学会、2011年12月13日、横浜
- (27) Hotaka FUKUSHIMA, Yue ZHANG, Satoshi KIDA, Mechanisms of enhancement and reconsolidation of reactivated inhibitory avoidance memory, Naito Conference on "Biological Basis of Mental Functions and Disorder", 2011年10月18日、山梨
 - (28) 喜田聡、福島穂高、張悦、想起後の記憶制御のダイナミクス、日本神経科学会シンポジウム「記憶形成のダイナミクス」、2011年9月17日、横浜
 - (29) 福島穂高、張悦、喜田聡、想起後の受動回避記憶強化誘導時の脳領野間相互作用機構の解析、日本神経科学会、2011年9月17日、横浜
 - (30) 張悦、福島穂高、喜田聡、免疫染色法を用いた受動的回避記憶の固定化に関与する脳領域の同定及び役割の解析、日本神経科学会、2011年9月16日、横浜
 - (31) 喜田聡、Distinct regulations of reconsolidation and extinction phases of fear memory at the behavioral and molecular levels, International Summer Conference of Neurons and Brain Diseases, 2011年8月4日、富山
 - (32) 喜田聡、Enhancement of fear memory after retrieval, Fifth Annual Canadian Neuroscience Meeting, 2011年6月1日、Quebec, Canada

〔図書〕(計4件)

- (1) 喜田聡、シーエムシー出版、精神疾患のマイクロエンドフェノタイプ、メンタル医療(糸川昌成監修) 2013年10月25日刊 221ページ中の99-105ページ
- (2) Kida, S, Elsevier社, Memory reconsolidation versus extinction, 「Memory reconsolidation」(Cristina Alberini編集), 2013年4月刊, 336ページ中の119-137ページ
- (3) 喜田聡、World Scientific社, Memory reconsolidation and extinction, 「Memory Mechanisms on Health and Disease」(Karl Peter Giese編集), 2012年刊 444ページ中20ページ分
- (4) 喜田聡、株式会社エル・アイ・シー編集委員・三品昌美、「CREB変異マウス」モデル動物利用マニュアル「疾患モデルの作製と利用;脳・神経疾患、2011年刊、310ページ

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