

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24530922

研究課題名(和文) 記憶機能の日内変動に関する認知学習心理学的研究

研究課題名(英文) Cognitive and learning psychological studies on circadian rhythm in the memory system

研究代表者

岡田 隆 (Okada, Takashi)

上智大学・総合人間科学部・教授

研究者番号：00242082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：海馬依存性学習の成績の日内変動と、この日内変動へのメラトニンの影響について検討した。課題遂行時間帯に基づいてラットを4群に分け、新奇物体再認課題または新奇位置再認課題を行ったところ、暗期のほうが好成績であった。新奇位置再認課題成績の日内変動へのメラトニン投与の影響は、明期では促進的、暗期では抑制的であったことから、学習を促進させるメラトニン濃度の範囲の存在が示唆された。海馬CA1領域の長期抑圧(LTD)に対するメラトニンの効果をスライス標本によって検討したところ、メラトニンはNMDA受容体依存的LTDには促進的に作用したが、代謝型グルタミン酸受容体依存的LTDには調節的作用を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：The diurnal variation of performance in hippocampus-dependent learning tasks in rats and the effect of the pineal hormone melatonin on such performance were examined. Rats were subjected to the novel object recognition (NOR) task or the novel location recognition (NLR) task at either of four time zones of the day; the results showed that the performance was higher at night than during the daytime. When melatonin was injected into rats before the training phase of the NLR task, they showed improvement of performance in the daytime, but impairment at night, suggesting that melatonin within a certain concentration range may act to promote memory performance. Using rat hippocampal slice preparations, the effects of melatonin on the long-term depression (LTD) of CA1 synaptic responses were examined; the results showed that NMDA receptor-dependent LTD was promoted by melatonin, but metabotropic glutamate receptor-dependent LTD was not regulated by it.

研究分野：生理心理学

キーワード：海馬 ラット メラトニン 新奇物体再認課題 新奇位置再認課題 概日リズム 長期抑圧 グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

海馬シナプス応答の長期増強は、海馬シナプス前線維への高頻度刺激によってシナプス伝達効率が長期的に増大する現象である。記憶の座として重要視される海馬でみられる長期的シナプス可塑性の一種であることから、記憶痕跡(エングラム)の有力な候補として、これまで精力的に研究されてきた。私たちの研究室において、記憶の概日リズムを担う神経機構について明らかにする目的で生理心理学実験を行った結果、松果体からの放出量が夜間に多いという日内変動を示すホルモンすなわちメラトニンが海馬 CA1 領域の長期増強を抑制すること、およびその抑制性調節は一酸化窒素カスケードに対する抑制によってなされていることが明らかになった (Takahashi & Okada, 2011)。

しかし、これまでの多くの長期増強実験が示しているように、海馬の長期増強の生じやすさが記憶課題成績と正の相関があると仮定すると、メラトニンによる長期増強抑制作用(夜間に抑制が大)と、動物実験による記憶課題成績の日内変動を調べた後述の研究結果(夜間の成績が良好)とは矛盾する。すなわち、ラットを用いた水迷路課題や嫌悪刺激による文脈条件づけ課題において McDonald et al. (2002) は課題成績に昼夜の差を見だしていない。また、マウスの恐怖条件づけを用いた Chaudhury and Colwell (2002) は昼間よりも夜間のほうが高い課題成績をおさめたことを報告している。メラトニンは、夜行性動物・昼行性動物を問わず夜間に多く分泌されるのであり、長期増強がメラトニンによって抑制される夜間に記憶課題成績が違って良い、という不一致の原因は不明であった。

2. 研究の目的

(1) 海馬依存性の記憶機能の日内変動をより正確に測定するため、実験課題と手続きを改良した上で、メラトニン濃度上昇による海馬長期増強の抑制時間帯と記憶成績の低下時間帯とが一致するか否かについて再検討すること。これまでの記憶課題成績の日内変動を調べた先行研究においては、いずれも情動反応が関与するような課題が使用されていた。つまり、先行研究では海馬だけでなく扁桃体や帯状回といった、海馬以外の大脳辺縁系の関与が大きい課題を使って検討していたのであり、海馬の長期増強との関連性を調べるといった観点に合致すると言えない。そこで、情動反応を伴わず海馬依存性の高い課題として、本研究では、新奇物体再認課題および新奇位置再認課題を使用することとした。

(2) メラトニンが記憶の日内変動に関与しているとするならば、被験体にメラトニンを投与することによって昼間にも夜間に相当する効果が海馬にもたらされるはずである。

薬物の存在下での記憶成績の変化について調べることにより、メラトニン系の操作による記憶機能の改善・低下が生じるかどうかを明らかにすることを第二の目的とした。

(3) 海馬シナプス可塑性には長期増強の他に、長期的にシナプス応答が減少したままになる長期抑圧という現象も知られている。この長期抑圧に対するメラトニンの影響について、海馬スライス標本を用いて電気生理学的手法により明らかにすることを第三の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験体

上智大学実験動物委員会の承認を得て実験を行った。学習実験(実験1~3)は、6週齢の時点で購入した Wistar 系ラット(オス)を 12 時間明/12 時間暗の周期で飼育した。明期の開始時刻である午前7時をツァイトゲバー0 (ZT0)、暗期の開始時刻である午後7時を ZT12 と定義した。生理実験(実験4)には、4~5 週齢の Wistar 系ラット(オス)を用いた。

(2) 実験装置

学習実験では、プラスチック製の黒い箱(底面 50 cm×44 cm、高さ 50 cm、天井なし)を実験装置として用いた。ラットに探索させる物体は Lego® 社製ブロックによって作成した(底面 6.4 cm×6.4 cm、高さ 8 cm) (図1)。

生理実験では、海馬スライス標本を正立生物顕微鏡下で観察し、同心電極をシャフアー側枝上に置き電気刺激装置を用いて刺激を与え、ガラス管電極を CA1 領域に置いてパッチクランプ増幅器(カレントクランプモード)を用いて細胞外電位記録した。

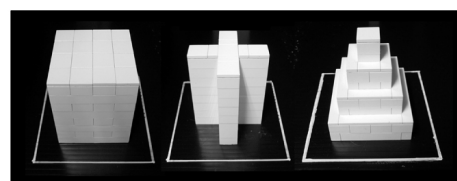


図1 学習課題に用いた物体

(3) 実験手続き

① 実験1: 新奇物体再認課題 (NOR 課題)

内在性メラトニン分泌の日内変動パターンを考慮に入れ、実験は被験体毎に、4つの時間帯のいずれかで行った(ZT2, ZT8, ZT14, ZT20)。装置への馴致試行を行った約24時間後、NOR 課題の獲得試行(2つの同一物体が装置内に隣接して置かれた中をラットが10分間探索する)を行った。続いて、その1時間後にテスト試行(短期記憶課題)を行った。テスト試行では、2つの物体は獲得試行と同じ位置に置かれているが、そのうちの1つの物体が別の形状のもの(新奇物体)に変えられた。ラットはこの新奇物体と既知物体とが

置かれた装置内を 5 分間探索した。さらにその 23 時間後にテスト試行（長期記憶課題）を行い、その際にはさらに別の新奇物体が装置内に導入された。なお各試行後にはその都度、装置と物体を 15%エタノール液を用いて拭いた。物体の形状と位置はカウンターバランスした。

データ記録は、装置上に設置した赤外線ビデオカメラによってラットの行動を録画した。本研究では、ラットの物体への嗅ぎ行動（sniffing）を各物体への探索行動と定義し、オフラインで各物体への探索行動の長さをストップウォッチを用いて計測した。学習成績の測度として弁別指標（discrimination index, DI）、すなわち、新奇物体（または新奇位置）への探索時間を、全探索時間（2 つの物体への探索時間の和）で除したものをを用いた。実験 2、実験 3 も同様とした。

②実験 2：新奇位置再認課題（NLR 課題）

NLR 課題においても、被験体毎に 4 つの時間帯のいずれか（ZT2, ZT8, ZT14, ZT20）で実験を行った。実験スケジュールは実験 1 と同様であるが、この NLR 課題では獲得試行において互いに異なる 2 つの形状の物体が、装置内の対角線上に置かれた。テスト試行では、片方の物体のみを移動させた配置とした。

③実験 3：新奇位置再認課題におけるメラトニンの効果（NLR 課題）

NLR 課題におけるメラトニン投与の影響を調べるため、獲得試行の 30 分前、もしくは獲得試行終了直後のいずれかに、メラトニン溶液もしくは生理食塩液をラットに腹腔内投与した。メラトニンを 0.9%生理食塩水に 10 mg/mL となるように溶かし、10 mL/kg の量を投与した。課題遂行時間帯は ZT8 または ZT20 のいずれかとした。

④実験 4：海馬スライス標本 CA1 領域の長期抑圧に対するメラトニンの効果

シャファー側副枝へのテスト刺激（0.1 Hz）に対するシナプス応答を CA1 領域から細胞外記録した。安定したシナプス応答を確認後、NMDA 型グルタミン酸受容体依存的な長期抑圧を誘導しうる低頻度刺激（1 Hz、15 分間）を与え、その後 60 分間テスト刺激（0.1 Hz）に対するシナプス応答を記録した。実験開始時から終了までメラトニン（100 nM）を投与し続けるメラトニン群、およびメラトニンを投与しない統制群を設け、シナプス応答の減少の程度を比較した。

代謝型グルタミン酸受容体依存的に生じる長期抑圧への影響を調べる実験では、当該受容体の作用薬である DHPG（40 μM）を 10 分間投与して長期抑圧を誘導した際の抑圧の程度を、メラトニンの有無で比較した。

4. 研究成果

(1) 実験 1：NOR 課題における記憶成績

の日内変動

獲得試行における全探索時間が ZT 別に異なるかどうかをチェックしたところ、群間差は見られなかった。一方、テスト試行（短期記憶）においては群間差が見られ、下位検定の結果、ZT8 の探索時間が ZT20 よりも有意に長かった。テスト試行（長期記憶）においても群間差があり、ZT8 群と ZT14 群が ZT20 群よりも探索時間が長かった。

各群の弁別指標（DI）を算出したところ、短期記憶（STM）のテスト試行では、全ての群でチャンスレベルよりも長く新奇物体を探索しており、長期記憶（LTM）のテスト試行では ZT8 群と ZT20 群においてチャンスレベルよりも多く新奇物体を探索していた（図 2）。これらの結果より、物体の形状に関する情報はすべての ZT 群において符号化されていたが、より長い期間の情報保持は明期、暗期それぞれの後半の時間帯（ZT8 と ZT20）でのみ行われていたことがわかる。

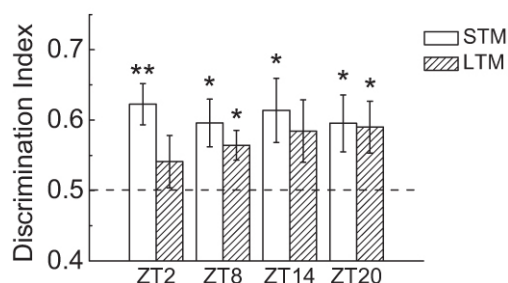


図 2 新奇物体再認課題における成績

(2) 実験 2：NLR 課題における記憶成績の日内変動

実験 1 で用いた NOR 課題よりも、新奇位置再認課題（NLR 課題）のほうが海馬依存性の程度が大きいとされている。そこで、NLR 課題の成績の日内変動について検討した。

総探索時間については、獲得試行においてもテスト試行においても、ZT 群間に差はなかった。弁別指標を群間比較すると、短期記憶のテスト試行では ZT20 群でのみチャンスレベルよりも高く、長期記憶のテスト試行では ZT14 群と ZT20 群においてチャンスレベルよりも高かった。つまり、明期よりも暗期のほうが好成績であった（図 3）。

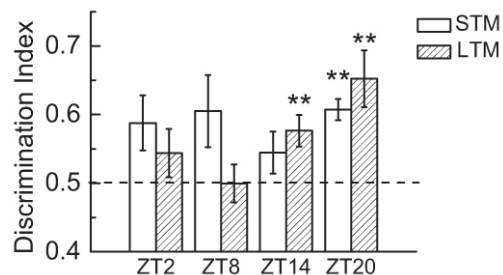


図 3 新奇位置再認課題における成績

(3) 実験 3：NLR 課題成績におけるメラトニンの効果

メラトニンは分泌パターンが概日リズム

を示すため（夜間のほうが多い）、記憶成績の日内変動にメラトニン濃度の変化が影響する可能性について検討した。

メラトニンまたは生理食塩水を獲得試行開始の30分前に腹腔内投与した。獲得試行およびテスト試行の総探索時間については、ZT群間、薬物群間いずれも差は無く、交互作用も無かった。

弁別指標については、短期記憶のテスト試行において、メラトニン・ZT8群と生理食塩水・ZT20群でチャンスレベルよりも大きかった。長期記憶のテスト試行においてはいずれの群もチャンスレベルより有意に高い弁別指標を示さなかった。この結果より、NLR課題の成績へのメラトニンの影響は時間帯によって異なっており、明期においては短期記憶成績を向上させ、暗期においては逆に低下させた（図4）。つまり、新奇位置再認課題を遂行する際に適したメラトニン濃度の幅が存在することが示唆される。一方、メラトニンを獲得試行の直後に投与した場合には、いずれの条件においても学習は成立しなかった。

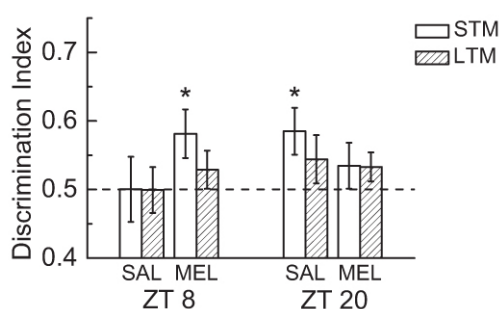


図4 新奇位置再認課題成績に対するメラトニンの影響

(4) 実験4：海馬スライス標本 CA1 領域の長期抑圧に対するメラトニンの効果

NMDA型グルタミン酸受容体依存的な長期抑圧を誘導する低頻度刺激を与えた場合、実験開始時から終了までメラトニン(100 nM)を投与し続けるメラトニン群、およびメラトニンを投与しない統制群のシナプス応答を比較したところ、長期抑圧はメラトニン群でのみ生じたことから、メラトニンによって海馬長期抑圧の誘導が促進されることが明らかになった。

代謝型グルタミン酸受容体依存的に生じる長期抑圧への影響を調べるため、当該受容体の作用薬であるDHPG(40 μM)を10分間投与して長期抑圧を誘導した際の抑圧の程度をメラトニンの有無で比較したところ、この誘導条件下ではメラトニンの有無にかかわらず同程度の長期抑圧が誘導された。

今回の実験により、NMDA受容体依存的に長期抑圧を誘導する経路にはメラトニンが促進的に関与するが、代謝型グルタミン酸受容体依存的な長期抑圧に対してはメラトニンが調節的作用を及ぼさないことが示唆された。

<引用文献>

① Chaudhury, D. & Colwell, C. S. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural Brain Research*, 133, 95-108, 2002.

② McDonald, R. J., Hong, N. S., Ray, C., & Ralph, M. R. No time of day modulation or time stamp on multiple memory tasks in rats. *Learning and Motivation*, 33, 230-252, 2002.

③ Takahashi, Y. & Okada, T. Involvement of the nitric oxide cascade in melatonin-induced inhibition of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Neuroscience Research*, 69, 1-7, 2011.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

① 岡田隆、海馬標本におけるフィールド電位記録、基礎心理学研究、査読有、33, 104-108, 2014.
DOI: 10.14947/psychono.33.20

② 鈴木江津子、岡田隆、海馬の神経伝達・シナプス可塑性・記憶機能におけるグルタミン酸とアセチルコリンのクロストーク。査読有、心理学評論, 56, 310-319, 2013.

③ Takahashi, Y., Sawa, K., & Okada, T. The diurnal variation of performance of the novel location recognition task in male rats. *Behavioural Brain Research*, 査読有、256, 488-493, 2013.
DOI: 10.1016/j.bbr.2013.08.040

④ Suzuki, E. & Okada, T. Stratum oriens stimulation-evoked modulation of hippocampal long-term potentiation involves the activation of muscarinic acetylcholine receptors and the inhibition of Kv7/M potassium ion channels. *European Journal of Neuroscience*, 査読有、36, 2012, 1984-1992.
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08127.x

[学会発表] (計8件)

① Takahashi, Y., Sawa, K., & Okada, T. The performance of novel location recognition task in rats is higher during nighttime than daytime. 9th FENS forum of European neuroscience, 2014.7.5-9, Milano (Italy).

② 高橋良幸、岡田隆、ラット海馬長期抑圧の

誘導に対する松果体ホルモンの調節作用、
日本基礎心理学会第 32 回大会、
2013.12.7-8、金沢市文化ホール（石川県・
金沢市）。

- ③高橋良幸、岡田隆、メラトニン存在下での
ラット海馬長期抑圧の誘導、日本動物心理
学会第 73 回大会、2013.9.14-16、筑波大
学（茨城県・つくば市）。
- ④高橋良幸、澤幸祐、岡田隆、ラットの新奇
位置再認課題成績の日内変動に対するメ
ラトニン腹腔内投与の効果、日本基礎心理
学会第 31 回大会、2012.11.3-4、九州大学
（福岡県・福岡市）。
- ⑤ Suzuki, E. & Okada, T. The
enhancement of long-term potentiation
by intrinsic acetylcholine release
involves phospholipase C and
voltage-dependent Ca^{2+} channel
activation at hippocampal CA1. 8th
FENS forum of European neuroscience,
2012.7.14-18, Barcelona (Spain).
- ⑥鈴木江津子、岡田隆、アセチルコリン受容
体活性化によるラット海馬 CA1 長期増強
促進における phospholipase C の関与、
日本動物心理学会第 72 回大会、
2012.5.12-13、関西学院大学（兵庫県・西
宮市）。
- ⑦菅田雄介、岡田隆、長期ストレスおよび豊
環境飼育がラットの前頭葉依存性認知課
題成績に及ぼす影響、日本動物心理学会第
72 回大会、2012.5.12-13、関西学院大学
（兵庫県・西宮市）。
- ⑧高橋良幸、澤幸祐、岡田隆、ラットの位置
再認課題におけるメラトニン腹腔内投与
の効果、日本動物心理学会第 72 回大会、
2012.5.12-13、関西学院大学（兵庫県・西
宮市）。

〔図書〕（計 1 件）

- ①岡田隆、廣中直行、宮森孝史、コンパクト
新心理学ライブラリ 14・生理心理学 第 2
版、サイエンス社、2015. 総ページ数 306
ページのうち 1-80 を担当

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 隆 (OKADA, Takashi)

上智大学・総合人間科学部・教授

研究者番号：00242082