

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830007

研究課題名(和文) 記憶過程におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文) The role of autophagy in the memory process

研究代表者

Shehata Mohammad (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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 先行研究によりタンパク質分解系がメモリの不安定化プロセスに関与することが報告されている。しかし、タンパク質分解系の誘導は、メモリ不安定化を増強するか不明である。我々は以前に、NMDA受容体依存的な神経細胞の活性化によりオートファジー系が誘導されること、またLTD誘導後のAMPA受容体の分解にオートファジー系が関与することを発見し、オートファジー系がシナプス可塑性や記憶学習などの脳機能に関与することが示唆された。

本研究では電気生理学に加え行動学的解析を駆使し、オートファジーの誘導により記憶の不安定化を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： It has been reported that protein degradation is necessary for the memory destabilization process; however, it is unknown whether the induction of protein degradation would enhance memory destabilization. To examine this, we induced autophagic protein degradation that we previously reported its contribution to AMPA receptors degradation after chemical LTD, suggesting its involvement in synaptic plasticity and the memory process.

In the present study, we elucidated the role of autophagy system in vivo, on both the synaptic and behavioral levels, and we provide evidence that autophagy induction enhances memory destabilization.

研究分野：神経生理学・神経科学一般

キーワード：オートファジー メモリ

## 1. 研究開始当初の背景

恐ろしい出来事の想起は、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などの多くの心理的な疾患の原因である誇張反応を引き起こす。

固定化された記憶の正常な想起はその記憶自体の不安定化を誘導し、その後、不安定化された記憶の再安定化のため、タンパク質合成依存的な再固定化のプロセスが必要であることがよく知られている。恐怖記憶の消去を強化するため、近年、再固定化プロセスの阻害を利用した多くの研究が報告されている。しかし、通常の想起では恐怖記憶を不安定化にするためには不十分であるケースが多い。この問題は不安定化阻害を用いたヒトを対象とする臨床応用の効率を制限している。従って、通常の想起後の記憶不安定化を促進する方法を見つけることが重要である。

## 2. 研究の目的

これまでの先行研究によりユビキチン-プロテアソーム系やエンドソーム-リソソーム系などのタンパク質分解系がメモリの不安定化プロセスに関与することが報告されている。しかし、タンパク質分解系の誘導は、メモリ不安定化を増強するかどうかは不明である。我々は、以前に海馬培養細胞を用いて NMDA 受容体依存的な神経細胞の活性化によりオートファジー系が誘導されること、また LTD 誘導後の AMPA 受容体の分解にオートファジー系が関与することを発見し、オートファジー系が NMDA 受容体依存的なシナプス可塑性や記憶学習などの脳機能に関与することが示唆された。

本研究では *in vivo* におけるオートファジー系の役割を解明するため、行動学的解析を駆使し、オートファジー系とメモリ不安定化プロセスの関係を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 生体内のオートファジーの誘導: *in vivo* における神経活動の後にオートファジー活性を計測するため、我々は、GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用い、LC3 をオートファジーのマーカーとして、免疫方法と免疫組織を使用し、検討した。

(2) 記憶再固定化モデル: メモリ不安定化にオートファジーの効果を検討するために、我々は2種類の再固定モデルを使用した。

(I) シナプス再固定モデル: 自由行動ラットにおける *in vivo* LTP モデルを使用した。高い頻度 Tetanus による LTP を誘導し、低頻度の 8 Hz による再活性化した。

(II) 行動再固定モデル: マウスにおける文脈的恐怖条件付けテストを用いて検討した。恐怖条件付け課題では、マウスは新しい文脈の経験 (無条件刺激; unconditioned stimulus; US) を学習し、その後、不快な経験 (条件刺激; conditioned stimulus; CS) を与えられる。その結果、マウスはその文脈と

恐怖を関連づけ (CS-US 記憶) フリージング (すくみ行動) を示す。記憶の形成過程は、いくつかの過程に分けて説明することができる。新しい記憶の学習の後、その記憶はしばらく不安定であるが、時間とともに脳内で安定化する。これを記憶の固定化過程と呼ぶ。動物は同じ文脈に再び晒されると、記憶は想起される (想起過程)。想起した後、固定化された記憶は一旦不安定化する (不安定化過程)。その後、再び記憶は再固定化過程を経て長期間安定化する。この実験計画では、我々はこの記憶の4つの過程 (固定化、想起、不安定化、再固定化) におけるオートファジー修飾因子の影響を調べる。

薬物投与 (1) 溶媒群 Phosphate buffered Saline (PBS)、(2) 再固定化抑制薬剤群: アニソマイシン Anisomycin (ANI)、(3) オートファジー活性化薬剤群: (i) trifluoperazine or (ii) tat-beclin peptide (tBC)、(4) アニソマイシン + オートファジー活性化薬剤 (Ani+tBC)。

## 4. 研究成果

(1) 電気けいれん刺激の2時間後では、マウスの海馬においてオートファジーが誘導されることを示した。

また、GFP-LC3 トランスジェニックマウスにおいて、抑制性入力を受けることが知られている扁桃体外側基底核外側核および中心核の GFP-LC3 シグナルは恐怖記憶に反応して *c-fos* の発現が観察される扁桃体内側基底核外側核に比べて高いことを示した。

これらのデータは生体内で神経活動が何らかの形でオートファジーにより調節されることを示唆している。(図1)

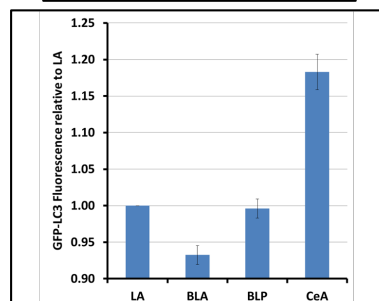
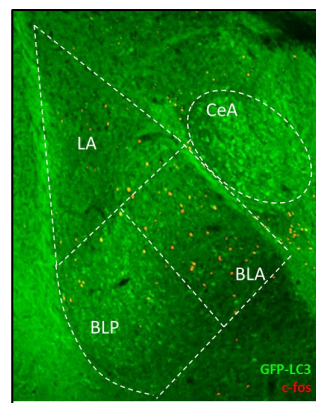
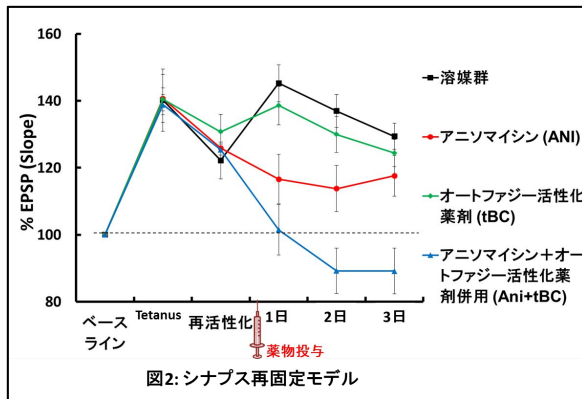


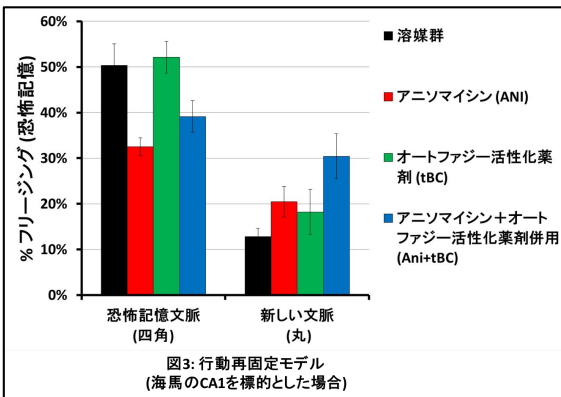
図1: GFP-LC3トランスジェニックマウスの扁桃体

(2) シナプス再固定化モデルでは、LTP の再活性化後に、アニソマイシンと tBC 併用投与によって強化されたシナプスの強度が通常のレベルに戻ることを示した。

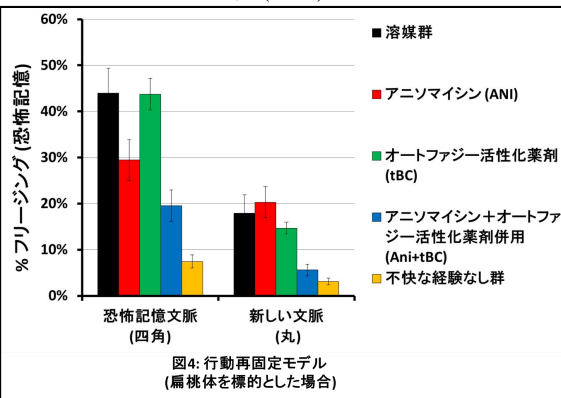
これらのデータはオートファジーの促進が再活動後のシナプスレベルでの不安定化を強化したことを示唆している。(図 2)



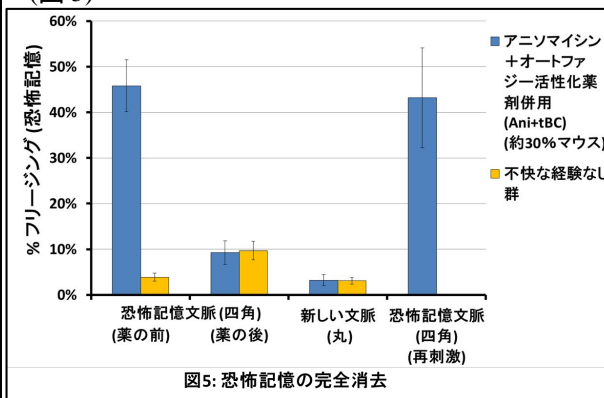
(3) 薬物の投与：文脈記憶と関与する海馬の CA1 領域に薬剤を注入した場合、アニソマイシンとオートファジー誘導因子の併用投与群は文脈識別能力の顕著な低下が見られた。興味深いことに、アニソマイシン単独投与群では文脈識別能力の低下傾向が見られた。(図 3)



(4) 薬剤注入は、恐怖などの感情的な記憶をコードすることが知られている扁桃体を標的とした場合、我々はアニソマイシンと組み合わせたオートファジー誘導因子 (tBC) 併用投与は恐怖記憶の除去を増強することを示した。(図 4)



(5) アニソマイシンと tBC の併用投与群において、その群のうちの約 30% マウスはフットショックを受けていないような極めて低い恐怖反応を示した。実験時に扁桃体が破壊されたことが原因で恐怖反応を示さなくなった可能性を検討するため、この極めて低い恐怖反応を示したマウスに再度、恐怖記憶を再学習させた。その結果、このマウスは再び通常の恐怖反応を示したため、併用投与群で観察された恐怖記憶の消失は、扁桃体機能の破壊によるものではないことが示された。(図 5)



< 引用文献 >

- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 2000; 406, 722-726.
- Besnard, A., Caboche, J., Laroche, S. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog Neurobiol.* 2012; Oct;99(1):61-80.
- Roger K. Pitman. Will Reconsolidation Blockade Offer a Novel Treatment for Posttraumatic Stress Disorder? *Front Behav Neurosci.* 2011; 5: 11.
- Shehata, M., Matsumura, H., Okubo-Suzuki, R, Ohkawa, N, Inokuchi, K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci.* 2012 Jul 25;32(30):10413-22.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci*, 2004; 24, 4787-4795

## 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1件)

Mohammad Shehata and Kaoru Inokuchi  
Does autophagy work in synaptic plasticity and memory?、Reviews in the Neurosciences、2014、25、543-557.  
doi:10.1016/j.celrep.2015.03.017

〔学会発表〕(計2件)

Mohammad Shehata, Hirofumi Nishizono, Kaoru Inokuchi  
Enhancing memory destabilization through protein degradation induction  
第38回日本神経科学大会大会、2015.7.28-31、神戸。

Mohammad Shehata, Qi Zhao, Kareem Abdou, Reiko Okubo-Suzuki, Yoshito Saitoh, Takashi Kitamura, Hirofumi Nishizono, Mina Matsuo, Noriaki Ohkawa, Kaoru Inokuchi  
Enhancing memory destabilization through protein degradation induction  
Neuroscience 2015, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015.10.17-21, Chicago, IL, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

シハタ モハマド (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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：