

## 審査の結果の要旨

氏名 鹿野 悠

本論文において鹿野は「エピソード（様）記憶」の形成に関わる脳領域である海馬に着目し、行動と神経発火の解析をおこなった。エピソード（様）記憶は「いつ・どこで」という時空間情報に基づく内容を含むものである。こうした記憶の神経機構の解明に向けて、単一細胞レベルでの海馬の神経発火パターン解析は従来盛んに行われてきた。特に、場所細胞の発見はノーベル賞の受賞にもつながった有名な例である。一方、エピソード（様）記憶を構成するもう一つの要素である時間情報の処理を担う神経基盤はほとんど明らかではなかった。そこで鹿野は、海馬の時空間情報処理に関わる神経基盤のうち、特に「時間情報」のエンコーディングの解明を目的に定めた。モデル動物として用いたラットでは、経過時間の長さ（どれくらい前の出来事であるのか）を認識できることが既に知られている。これを可能にする神経機構としては、時間軸上で離れた過去の状況の記憶と、現在の状況に関連付けて処理するような複雑な情報処理機構が必要であると考えられる。これまでに、様々な時間長のスケール（数ミリ秒、数秒、数分）のうち、数秒単位の時間経過において、時間選択的に発火する海馬の神経細胞が見出されてきている。一方でそれよりも長い時間、例えば分単位における神経発火と経過時間の相関は明らかになっていない。そこで鹿野は、ラットの神経発火を記録することでこの解明を試みた。本研究では、数分単位という長い時間長にわたる行動をとらせるのに適した行動課題を独自に構築し用いた。そして自由行動下の動物から多数の神経細胞の発火を同時記録する手法を確立して適用したことで、単一細胞の発火が数分単位の経過時間をエンコードしていることを示すに至った。

鹿野は初めに『5分待ち課題』と呼ぶ独自の行動課題を構築した。本課題でラットは5分おきに、特定のエサ場において提示されるエサを報酬として能動的に獲得するように訓練された。エサは25 cm 四方の狭い課題部屋の一角にあるエサ場から5分おきに3秒間だけ提示された。一定時間内に動物が報酬を獲得しなかった場合には、独自の回収機構によって報酬を没収した。独自開発の行動装置ならではの機能である回収機構の存在によって、動物が5分後の報酬提示を逃さないように意識的に待つという状況を作り出すことに成功したといえる。このような実験課題を「前向き時間計測」を応用した行動課題と呼ぶ。十分に訓練を施した個体を観察すると、エサ場をのぞき込む行動（エサ場確認行動）を頻繁に行った。この行動はエサの提示を期待して生じる行動であるため、動物の時間認知を推定する指標になりうると鹿野は考えた。そこで、時間情報量という指標を用いて、エサ場確認行動割合の時間変化量を定量的に評価することにした。その結果、エサ場確認行動は有意に経過時間に依存していることが示された。このことは、ラットが5分間の経過時間の情報をもとに、経過時間選択的に行動を変化させたことを示唆する。次に、エサ場確認行動に海馬の関与があるかを検証した。両側の海馬にムシモールを投与して、同様に5分待ち課題を行わせた。すると、経過時間選択的なエサ場確認行動は見られなくなり、時間情報量はコントロール群と比較して有意に低下した。したがって5分待ち課題で見られたエサ場確認行動の経過時間選択性に海馬が関与するネットワークが寄与していることが示唆された。

次に鹿野は、十分に訓練されたラットから自由行動下で神経細胞の発火を記録した。これを可能にするために記録電極（テトロード）を装填した電極セット（頭部固定型微小記録装置）を独自に設計・制作し、海馬と線条体にテトロードをそれぞれ8本ずつ刺入した。この技術を駆使し、ラット1匹あたりから、海馬から3-46細胞、線条体から2-16細胞に由来する神経発火を同時記録した。発火解析の結果、5分間の待ち時間中に、時間経過に伴って発火頻度が徐々に変化していく神経細胞が見られた。そこで時間情報量を計算して経過時間への選択性を定量的に評価したところ、海馬と線条体で共に有意に時間情報をエンコードする神経発火が観察された（海馬では記録細胞のうち17%、線条体では16%）。このような分単位の経過時間をエンコードしていると考えられるすべての細胞に着目したところ、個々の発火活動が最大となる時間帯は細胞ごとに異

なり、5分にわたって広く分布していた。すなわち個々の細胞が特定の時間に活動することでネットワークとして5分が表現されている可能性が考えられる。鹿野はこれを発火列と呼んでいる。この様な分単位の発火列は世界初の報告である。

ここで鹿野は次のような問いを立てて検証することにした。すなわち、分単位の時間経過のエンコードは、5分待ち課題を学習する前から存在するのか、それとも5分待ち課題を経験して、5分という時間長を繰り返し経験することで初めてエンコードされるようになるのか、という問いである。この疑問を検証するために、5分待ち課題に初めて取り組むラットから神経活動を記録した。5分待ち課題（新奇）と表現されているものである。しかしながら、単に初めて課題部屋に入れただけではラットはエサが提示されることを知らず、適切なエサ場確認行動をとることはしないだろうと考えた。そこで記録に先立って訓練を行った。その訓練ではエサを提示する待ち時間を4-20秒という極めて短い時間幅にランダムに設定した。こうすることで、5分という時間の長さを事前に経験することなしに、エサ場からエサを獲得することだけを学ばせることに成功した。そしてその個体から5分待ち課題（新奇）の記録を取った。この場合であっても、ラットは80%以上のエサ提示においてエサを獲得した。その結果、エサ場確認行動は時間選択的ではなかった。どの時間帯においても一定の割合でエサ場確認行動を行っていた。次に神経発火を解析した。ここで鹿野は、課題全体を前半と後半に大きく分けることを考え付き、それぞれに分類されたトライアルを別個に解析した。その結果、ある細胞においては、課題の前半では経過時間をエンコードしているような発火は見られず時間情報量もランダムレベルだったものの、課題の後半では3分以降に発火頻度が高くなるという発火様式に変化し、有意に経過時間をエンコードした細胞が見られた。このように、時間情報量が課題の後半に行くにしたがって徐々に増加していった細胞がほかにも見られた一方で、反対に課題の初期に経過時間をエンコードしているような細胞はほとんど見られなかった。すなわち、神経発火レベルにおいては5分待ち課題の途中から経過時間をエンコードするようにその発火様式を変化させていくと鹿野は考えた。したがって、5分待ち課題における分単位の経過時間のエンコードは、主に経験を通して形成されていくことを強く示唆した。

このように本論文で鹿野は、新規の行動課題「5分待ち課題」の構築と独自の大規模記録法の確立を通して、従来検証されてこなかった数分単位の経過時間をエンコードする神経発火を海馬と線条体で発見したことを報告した。その発火頻度の最大値をとる時間帯は細胞ごとに異なっており、5分の待ち時間中には多数の細胞がそれぞれに特有の時間に発火していくことで、数分単位という長い時間をネットワークとしてエンコードしていることが示唆された。さらに、5分待ち課題に初めて取り組んだ場合でも、数トライアルの経験をすることで一部の細胞は経過時間をエンコードするようになった。このような海馬の時間情報のエンコードによって、個体レベルでも経過時間に基づいた適応的な行動（エサ場確認行動）がもたらされていると考えられる。本論文は、外界の認識に不可欠な時間知覚の神経基盤に迫ったという点、そして記憶をつかさどる海馬が、数分単位の時間経過のエンコーディングに関与していることを示唆した点で神経科学研究に資する有意義なものである。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。