

博士論文

海馬ニューロンにおける  
シナプス入力の時空間解析

石川 智愛

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 1. 要旨 .....  | 3  |
| 2. 緒言 .....  | 4  |
| 3. 方法 .....  | 6  |
| 3-1. 研究倫理および実験動物.....                                      | 6  |
| 3-2. 薬物の調整.....  | 6  |
| 3-3. 海馬培養スライスの作成.....                                      | 6  |
| 3-4. Local field potential (LFP) の記録と解析.....               | 6  |
| 3-5. 大規模スパインカルシウムイメージング .....                              | 7  |
| 3-6. スパインおよび樹状突起におけるカルシウム上昇イベントの検出.....                    | 8  |
| 3-7. シークエンス入力の検出.....                                      | 8  |
| 3-8. Geometric Energy の算出 .....                            | 9  |
| 3-9. Entropy の算出 .....                                     | 9  |
| 3-10. シークエンスの方向性.....                                      | 10 |
| 3-11. データ解析.....   | 10 |
| 4. 結果 .....  | 11 |
| 4-1. SW に参加する海馬 CA1 野の細胞は SW 時に多数のシナプス入力を受ける .....         | 11 |
| 4-2. SW に参加する細胞は SW 時にシークエンス入力を受ける .....                   | 12 |
| 4-3. シークエンス入力は近接したスパインに収束する.....                           | 13 |
| 4-4. 近傍のスパインが受けるシークエンス入力は方向性を持つ.....                       | 14 |
| 5. 図.....  | 16 |
| Fig.1 海馬培養スライスでは自発的に SW が発生する .....                        | 16 |
| Fig.2 SW に参加する海馬 CA1 野の細胞は SW 時に空間的に近接した入力を受ける .....       | 17 |
| Fig.3 SW participant では SW 時に様々なパターンのシークエンス入力が繰り返される ..... | 19 |
| Fig.4 シークエンス入力は樹状突起上の一部に収束する .....                         | 21 |
| Fig.5 局所のスパインに収束するシークエンス入力は方向性を有する .....                   | 22 |
| Fig.6 SW 時には局所に収束するシークエンス入力が複数の樹状突起上で観察される .....           | 23 |
| Supplemental Fig.1 海馬 CA1 野の一部のニューロンが SW に参加する .....       | 24 |

|                     |  |    |
|---------------------|--|----|
| Supplemental Fig.2  | SW が観察されるスライスにおいて海馬 CA1 野ニューロンのスパインでは自発的なカルシウム活動が観察される ..... | 25 |
| Supplemental Fig.3  | SW に参加する細胞は SW 時に空間的に近接したシナプス入力を受ける .....                    | 26 |
| Supplemental Fig.4  | シーケンス入力はチャンスレベルと比較して有意に高頻度に生じる.....                          | 27 |
| Supplemental Fig.5  | シーケンス入力は 129 ms 持続し、各スパイン間の時間幅は 30 ms である .....              | 28 |
| Supplemental Fig.6  | 各スパインのシーケンスへの参加頻度は入力頻度に依存しない .....                           | 29 |
| Supplemental Fig.7  | シーケンス入力は SW を伴うか否かに関わらず近傍のスパインに収束する .....                    | 30 |
| Supplemental Fig.8  | シーケンス入力に含まれるスパインは樹状突起上の一部に収束する.....                          | 31 |
| Supplemental Fig.9  | 局所のスパインに収束するシーケンス入力は方向性を有する (ノンパラメトリック回帰分析による検証) .....       | 33 |
| Supplemental Fig.10 | シーケンス入力は近傍の樹状突起シャフトでも大きなカルシウム流入を引き起こす.....                   | 34 |
| 6.                  | 考察 .....   | 35 |
| 6-1.                | SW に参加する細胞としない細胞への入力の量的および質的な差.....                          | 35 |
| 6-2.                | シーケンス発火時に下流のニューロンで観察されるシナプス入力の時空間パターン.....                   | 35 |
| 6-3.                | シーケンス入力の空間分布が情報演算に及ぼす影響 .....                                | 36 |
| 6-4.                | 樹状突起の演算システムによる膜電位変動の変化.....                                  | 37 |
| 6-5.                | 海馬培養スライスで生じる神経回路の再編成とシーケンス入力.....                            | 37 |
| 6-6.                | 樹状突起コンパートメントの存在がニューロンの演算容量を増加させる .....                       | 38 |
| 7.                  | 総括 .....   | 39 |
| 8.                  | 参考文献 .....   | 40 |
| 9.                  | 謝辞 .....   | 45 |

## 1. 要旨

記憶に関わるニューロンのシークエンス発火、すなわち記憶の再生は、sharp wave ripple (SW) という特徴的な脳波の発生時に海馬で観察される。記憶の再生は認知プロセスにも深く関わることが知られ、その制御機構の解明は記憶の回路基盤を理解する上で重要な課題の 1 つである。しかし、シークエンス発火を下流のニューロンがどのような情報として受け取るのか、シナプスレベルで調べた知見は存在しない。本研究では、海馬培養スライスのネットワークにおいて CA1 野のニューロンが受けるシナプス入力を大規模に可視化し、SW 時に近接したスパインが細胞体に向かうもしくは離れるというように方向性を持ったシークエンス入力を受け取ることを発見した。また、単一のシークエンス入力は複数の SW イベントにおいて繰り返し観察され、一回の SW イベントにおいて複数のシークエンス入力が観察されることもあった。これらの結果から、記憶再生を始めとしたニューロン集団のシークエンス発火は、その時間パターンを保持したまま、下流のニューロンの一部の樹状突起上の近接したスパインに収束することが示唆される。

## 2. 緒言

神経回路では、複数のニューロンが互いに結合し、このニューロン集団（「セルアセンブリ」）の発火パターンにより情報をコードする（1-7）。この時、セルアセンブリは特定の順番で発火（シーケンス発火）することで情報を出力すると考えられている。シーケンス発火は運動皮質や前頭皮質など様々な脳領域で観察され、とりわけ多く観察される脳領域の一つとして海馬が挙げられる。海馬は空間・認知機能を担う領域である。マウスが新たな環境を探索すると、海馬ではそれぞれの場所に応じたシーケンス発火が観察され、この発火パターンはその後の睡眠時や安静時に sharp-wave ripple (SW) と呼ばれる脳波を伴い、自発的に繰り返される（4-7）。この現象は「記憶の再生」として知られ、記憶の長期的な保存に必要であると考えられている。

海馬は CA3 野、CA2 野、CA1 野などの亜領域に分けられ、CA3 野のニューロンは CA1 野のニューロンに軸索を伸ばしシナプスを形成する。解剖学的な知見により、CA3 から CA1 へのシナプスはランダムに形成されるわけではなく、局所的な偏りを持つことが示されている（8）。また、視覚皮質では共通の機能を持つ細胞同士が結合し、それらが局所にクラスターしたシナプス結合を形成することが報告されている（9）。それゆえ、上流のセルアセンブリは下流のニューロンに空間的に近接したシナプス入力を送ると推察される。実際、自発的な回路の活動下において近傍のシナプスが同期した入力を受けることを発見している（10、11）。しかし、上流のニューロン集団の発火が下流のニューロンにどのように伝達されるのか、シナプスレベルで捉えた知見は存在しない。

樹状突起スパインで受け取ったシナプス入力は、そのケーブルとしての特性とイオンチャネルの分布に依存し、樹状突起上で足し合わされる（12-14）。樹状突起上の近接したスパインを順番に刺激すると、非線形演算を誘導し、分散したスパインを刺激するよりも大きな膜電位変動が誘導される（15、16）。しかし、樹状突起の演算システムを調べた多くの研究は、人工的にスパインを刺激したものである。さらに、これまでに報告されているスパインのイメージングは撮影速度が十分でなく、シナプス入力のシーケンス構造を捉えることは不可能であった。そのため、自発的な活動下の神経回路において、シーケンス発火がどのように下流のニューロンの樹状突起に表象されるのかに関しては全く明らかになっていなかった。

本研究では、大規模スパインイメージング法を用いて、海馬 CA1 野のニューロンが SW 時にどのようなシナプス入力を受けるのか検証した。SW は記憶の固定（17）やシナプスの恒常性維持（18）に深く関わり、SW 時には記憶の再生が頻繁に観察される。実験標本には、組織の透明性により光の散乱を押さえることができる培養スライスを使用した。培養スライスを用い

ることで、レーザー強度を抑えた撮影が可能になり、数百スパインへのシナプス入力を 100 Hz という大規模かつ高速な撮影を実現した (11)。海馬培養スライスの神経ネットワークでは自発的な活動が観察される。この活動パターンは、生体マウスで観察される活動パターンに類似しており (19)、SW や発火シーケンスの繰り返しも観察される (20、21)。本研究では、海馬培養スライスに高速撮影に適した光学システムを組み合わせ、SW 時に同期して発火するニューロンが SW 時に同期入力を受けることを発見した。この同期入力の内部構造を調べると、様々なパターンのシーケンス入力により構成されていた。さらに、シーケンス入力は空間的に近接したスパインに収束し、樹状突起上を細胞体に向かうもしくは細胞体から離れるというように方向性を有していた。これらの結果は、海馬で観察される記憶の再生が、下流のニューロンの特定の樹状突起に存在する近接したスパインに方向性を持ったシーケンス入力として伝達されることを示唆するものである。

### 3. 方法

#### 3-1. 研究倫理および実験動物

以下のすべての実験では、東京大学の動物実験実施マニュアルに従い、実験動物への苦痛を最小限に抑えるよう配慮した（承認番号：P29-2, P29-3）。Wistar/ST ラット（SLC, Shizuoka, Japan）は、12 時間ごとに明暗サイクルが変わる環境において、水および餌への制限のない実験ケージにて飼育した。

#### 3-2. 薬物の調整

カルバコールは二段蒸留水に 10 mM の濃度となるように溶解し、4°C で保存した。実験の直前に artificial cerebrospinal fluid (aCSF) を用いて最終濃度 10  $\mu$ M まで希釈した。aCSF の組成は、127 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.5 mM KCl, 1.24 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 0.4 mM Trolox である。

#### 3-3. 海馬培養スライスの作成

生後 7 日齢の Wistar/ST ラットを氷冷およびイソフルランにより麻酔した後に、断頭し全脳を摘出した。氷冷した GBSS (Gey's balanced salt solution) 中に脳を設置し、ヴィブラトーム (DTK-1500, Dosaka, Kyoto, Japan) を用いて、厚さ 300  $\mu$ m の水平断切片を作製した。GBSS の組成は、120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.57 mM MgSO<sub>4</sub>, 27 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36 mM D-glucose である。また実験中は 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> ガスで GBSS を常に通気した。次に、この切片より海馬体切片（海馬、歯状回、嗅内皮質を含む）を実体顕微鏡下で切り出した（以下では、単に「海馬切片」と記す）。切り出された海馬切片を直径 30 mm の多孔質メンブレン (Millicell-CM, Millipore, Bedford, MA) 上に配置し、それを 6 穴プレートに収めた (38)。6 穴プレートの各ウェルには、1 ml の培地 (50% minimal essential medium (Invitrogen, Gaithersburg, MD), 25% horse serum (Cell Culture Lab, Cleveland, OH), and 25% HBSS) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターの内で培養した。培地は 3.5 日毎に交換した。実験には、9-18 日間培養した切片を使用した。

#### 3-4. Local field potential (LFP) の記録と解析

海馬切片を記録用チャンバー内に移し、32-33°C に温めた aCSF を 1.5-3 ml/min の速度で還流した。この時 aCSF は 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> ガスで飽和した。LFP は aCSF を満たしたハウ

ケイ酸ガラスキャピラリー (1-2 M $\Omega$ ) を海馬 CA1 野の錐体細胞層に置くことで記録した。この時、電極はイメージングのためのパッチクランプ用電極の 50  $\mu\text{m}$  以内に置いた。シグナルは 2 kHz のローパスフィルタにかけ、20 kHz で取得した。得られたトレースは Okada filter によるノイズ処理を行い (39)、2-30 Hz のバンドパスフィルタをかけた後に SW イベントを検出した。SW イベントはノイズの 7 $\times$ SD を閾値として検出し、イベント中の極大値をピークタイミング、その直前に存在する変曲点を SW イベントのオンセットと定義した。検出された SW はすべて目視にて確認を行い、二重検出などの不適切なイベントは除外した。

検出された SW イベント時の LFP の時間周波数成分を調べるため、LFP トレースに対し Morlet ウェーブレットファミリーを用いて畳み込み積分を行った。次に、Current Source Density (CSD) 分析を行うため、一本の電極は細胞体層に、もう一本を網状分子層、放線状層、もしくは透明層に置き、LFP の同時記録を行った。細胞体層、網状分子層、放線状層、透明層それぞれに対し、ランダムに抽出した 20 個の SW 時の LFP トレースを重ね合わせ、細胞体層の SW オンセットでトリガードアベレージした。この 4 本のトレースに対し cubic spline 法 (40) により 150  $\mu\text{m}$  ステップで CSD 解析を行い、 $\sigma = 2$  のガウシアンフィルタにより平滑化した。

カルバコールが SW のイベント頻度に与える影響の検証においては、カルバコール処置前の細胞体層の LFP と、カルバコール処置 10 分後からの細胞体層の LFP をそれぞれ 10 分ずつ記録した。

### 3-5. 大規模スパインカルシウムイメージング

浅層の海馬 CA1 野の細胞にセシウムベースの内液を充填したホウケイ酸ガラスキャピラリー (3.5-6 M $\Omega$ ) を密着させ、1-2 分間セルアタッチ記録を行った。セシウムベースの内液の組成は 47.7 mM CsMeSO<sub>4</sub>, 92.3 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM creatine phosphate, 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na<sub>2</sub>-GTP, 0.2 mM Fluo-4 である。セルアタッチ記録の後、電極に陰圧をかけ、ホールセルモードに移行した。本手法で観察されるスパインでのカルシウム流入は NMDA 受容体を主に介したものであるため (11, 23)、膜電位を -30 mV に固定した。ホールセルモード移行 15 分後から、187  $\mu\text{m}$   $\times$  137  $\mu\text{m}$  の視野内に存在するスパインで生じるカルシウム流入を 100 Hz で撮影した。本実験でのイメージングシステムとして、水浸レンズ (60 $\times$ , 1.0 numerical aperture, Nikon)、ニポウ板型共焦点レーザーキャナ (CSU-22; CSU-X1, Yokogawa Electric, Tokyo, Japan)、CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0 V2, Hamamatsu Photonics) が配備された正立顕微鏡 (ECLIPSE FN1, Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。画



像取得には、専用のソフト（HSR、Hamamatsu Photonic）を用いた。蛍光色素は 488 nm のレーザーを用いて励起し、500 nm のロングパス emission フィルタを通して記録した。スペースタンプによる問題を防ぐため、細胞体から 200  $\mu\text{m}$  以内のスパインのみを撮影の対象とした。実験の最後には、スパインの位置および樹状突起の形態を再構築するため、1 Hz で 1  $\mu\text{m}$  おきに Z スタック画像を撮影した。

### 3-6. スパインおよび樹状突起におけるカルシウム上昇イベントの検出

Microsoft Visual Basic により作成したソフトウェア (2) を用いて、焦点面上で観察されたすべてのスパインに対し、注目領域 (ROI) を置いた。各 ROI の半径は焦点面上に観察されたスパインの大きさである。樹状突起に対する ROI は、ローカルシーケンスに含まれる各スパインの根元に手動で設定した。各 ROI 内のすべてのピクセル輝度の平均値を算出し、その時間変化から蛍光強度変化 ( $\Delta F/F$ ) を算出した。時系列に沿った蛍光変化  $\Delta F/F$  の算出には、以下の式を用いた。

$$\Delta F/F = (F_t - F_0)/F_0$$

ここで、 $F$  は任意の点の蛍光強度、 $F_t$  は  $t$  番目のフレームの蛍光強度、 $F_0$  はその前後 5 秒間の蛍光強度の平均値とした。トレース内のショットノイズは Okada filter をかけることで除去した後に (39)、カルシウム濃度の上昇は機械学習を用いたプログラムを使用して検出した (41)。検出されたカルシウム濃度の上昇 (カルシウム活動) において、最も高い値を取るタイミングをピークタイミングとし、その直前に存在する変曲点をカルシウム活動のオンセットと定義した。

SW オンセットの前後 20 ms 以内の発火を SW と同期する発火、SW のオンセット 300 ms 前からオンセットまでのシナプス入力を SW と同期するシナプス入力と定義した。SW に参加するニューロンか否かの判定は、各ニューロンの発火頻度に応じた 10000 個のサロゲートデータと実データを比較し、有意に SW と同期して発火する細胞を SW に参加するニューロンと定義した。サロゲートデータは Poisson point process により作成した。

### 3-7. シークエンス入力の検出

全  $C$  スパインの  $N_{all}$  フレームのカルシウム活動の時空間パターンは、 $C \times N_{all}$  の行列で表すことができる。この時、活動が観察されないフレームを 0、活動が観察されたフレームは 1 とした。行列内において 1 であらわされる各活動はガウシアンフィルタ ( $\sigma = 4, 40 \text{ ms}$ ) によりスムージングをかけた後、30 フレームごとの行列に分割した。この行列は記録開始から 1 フ

レームステップにずらして作成した。作成したすべての行列ペアに対し、アダマール積を算出した (26)。この条件下では、2 つのスパインが完全に同じパターンで入力を受けた場合、アダマール積が 14.1795 になる。そこで、アダマール積 14.175 以上となる行列ペアに含まれる共通したスパインへの入力をシーケンス入力と定義した。この定義ではシーケンス入力は 3 つ以上のスパインを含み、2 回以上繰り返される。

### 3-8. Geometric Energy の算出

樹状突起の三次元構造から同期入力もしくはシーケンス入力を受けたすべてのスパインペアに対し、スパイン間の道のり距離を算出した。得られた道のり距離の逆数の和により Geometric Energy を算出した (25)。サロゲートデータとして、同期に組み込まれるスパインをランダムに配置したデータを 10000 個作成し、それぞれのデータに対し Geometric Energy を算出した。得られたデータからサロゲートデータの 95% 信頼区間を算出し、実データと比較した。

スパインの分布の空間的な偏りに関して、裏付けを行うため、同期入力もしくはシーケンス入力を受けたスパインの中でスパイン間距離が 10  $\mu\text{m}$  以内の数を数え、ヒストグラムで表した。サロゲートデータとしては、同期に組み込まれるスパインをランダムに再配置したデータを 10000 個作成した。得られたデータからサロゲートデータの 95% 信頼区間を算出し、実データと比較した。

### 3-9. Entropy の算出

シーケンス入力に含まれるスパインの樹状突起上の空間分布を評価するため、各スパインのシーケンスへの参加率からシャノンエントロピーを算出した。シャノンエントロピーは樹状突起の各分岐ポイントにおいて以下の式を用いて算出した。

$$H = \sum \{(n_i/N) \log(n_i/N)\}$$

ここで、 $n_i$  は分枝点よりも細胞体から離れた位置に存在するスパインの数で、 $N$  はその細胞で観察されたすべてのスパインが組み込まれたシーケンスの数である。実験で得られたシャノンエントロピーは、サロゲートデータの 95% 信頼区間と比較した。サロゲートデータは、シーケンスに含まれるスパインを記録したスパインの中でランダムに配置しなおすことで作成した。エントロピーは分布の均一性を示す値であるため、低い値をとるほど、シーケンスに参加するスパインが一部の樹状突起に偏っていることを意味している。

### 3-10. シークエンスの方向性

シークエンス入力の中で、スパイン間距離が  $10\ \mu\text{m}$  以内のスパインで構成される部分をローカルシークエンスと定義した。ローカルシークエンスが方向性を有するのか調べるため、線形回帰分析とノンパラメトリック回帰分析を行った。線形回帰分析では、入力タイミングを横軸、樹状突起上の位置を縦軸に座標平面上にプロットした。この時、入力タイミングと樹状突起上の位置の重心を原点としてプロットした。ローカルシークエンスの繰り返シイベントをすべて同じ座標平面上にプロットした後に、最小二乗法を用いて、回帰直線 ( $\text{location} = b_0 + b_1t$ ) から決定係数 ( $R^2$ ) と傾き ( $b_1$ ) を算出した。ノンパラメトリック回帰分析では、入力の順番と細胞体からの位置を平面上にプロットし、すべてのイベントを重ね合わせた後に最小二乗法を用いて、回帰直線 ( $\text{location} = b_0 + b_1t$ ) から決定係数 ( $R^2$ ) と傾き ( $b_1$ ) を算出した。チャンスレベルを示すサロゲートデータとして、時間成分は固定したまま位置のみに関してブーツストラップ法によるリサンプリングを 10000 回行った。傾き ( $b_1$ ) が負のローカルシークエンスを細胞体に向かう (IN) 方向、正のローカルシークエンスを細胞体から離れる (OUT) 方向のローカルシークエンスと定義した。

### 3-11. データ解析

データは平均値  $\pm$  SD もしくは箱ひげ図で示した。また、 $P < 0.05$  を統計的に有意であるとした。

## 4. 結果

### 4-1. SW に参加する海馬 CA1 野の細胞は SW 時に多数のシナプス入力を受ける

海馬培養スライスにおける SW のイベント頻度は 1 分間に  $67 \pm 44$  回 (27 スライスの平均  $\pm$  SD) であった。CA1 野で得られた SW 時の LFP トレースに対し、周波数解析を行うと、SW は 125-250 Hz の高周波成分と 80 Hz 以下の低周波成分により構成されていることがわかった (Fig. 1, A and B)。電流源密度推定法 (CSD 解析) を行うと、SW 時には放線状層、分子層に電流の吸い込み (sink) が存在していた (Fig. 1C)。さらに、SW はアセチルコリン受容体のアゴニストであるカルバコールの処置により消失した (Fig. 1, D and E;  $P = 0.015$ ,  $t_1 = 4.1$ , paired  $t$  test.)。これらの特徴はこれまでに生体動物の海馬において観察されてきた SW の特徴と一致する (22)。

本研究では、①記録する対象となる細胞が SW に参加するか否かの判定、②シナプス入力の可視化という 2 つのステップにより実験を進めた。始めに、SW に参加するか否かを判定するため、セルアタッチ記録を行った (Fig. 2A and fig. S1;  $n = 21$  slices)。その結果、記録した全 21 細胞の中で 12 細胞 (57%) が SW と有意に同期して発火していた (Fig. 2, B and C)。そこで本研究では、この 12 細胞を SW に参加する細胞 (Fig. 2D, SW participant)、残りの 9 細胞を SW に参加しない細胞 (Fig. 2E, nonparticipant) と定義し、区別して解析を行った。

次に、電極に陰圧をかけ、細胞体にカルシウム蛍光指示薬である Fluo-4 を充填した (Fig. 2F)。本研究では、光学システムの組み合わせを工夫し、平均  $233 \pm 72$  スパイン (mean  $\pm$  SD of 23 videos taken from 21 cells) へのシナプス入力を 100 Hz で記録した (Fig. S2)。この時、シナプス入力によるカルシウム活動を確実に捉えるため、細胞体は  $-30$  mV に固定した。この条件下において、個々のスパインでは自発的なカルシウム濃度の上昇が観察された (Fig. 2G)。このカルシウム濃度の上昇は、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の拮抗薬である、d-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5,  $50 \mu\text{M}$ ) の処置により消失することから、興奮性のシナプス入力によって生じるものであると推察される (23)。SW に参加する細胞では、SW のオンセット 400 ms 程度前からシナプス入力が増加し、SW 時にピークとなった一方で (Fig. 2H)、SW に参加しない細胞でも 400 ms 程度前に入力頻度は上昇するものの、SW オンセットでのピークは観察されなかった (Fig. 2I)。この時間幅は生体マウスで観察された膜電位変動とも一致する (24)。両者を比較すると、SW に参加する細胞はしない細胞に比べ、SW オンセットの 300 ms 程度前から有意に多くのシナプス入力を受け取ることが明らかになった (Fig. 2J)。

SW 直前に観察されるシナプス入力空間分布を調べるため、Geometric Energy を算出した。Geometric Energy は 20 ms の時間幅に同期入力を受けたスパイン間の道のり距離から算出し、高い値をとるほど、空間的に近接したスパインが同期入力を受けることを意味する (25)。SW に参加する細胞では SW 時に Geometric Energy が上昇するのに対し (Fig. 2K)、参加しない細胞ではこのような上昇は認められなかった (Fig. 2L)。この結果から、SW に参加する細胞は SW 時に増加するシナプス入力を近接したスパインで受け取っていることが示唆される。Geometric Energy は外れ値に対し脆弱な一面があることから、SW 時に 10  $\mu\text{m}$  以内のスパインペアが同期入力を受ける頻度に関しても比較した。その結果、SW に参加する細胞は SW 時に 10  $\mu\text{m}$  以内のスパインで入力を受ける頻度が上昇するのに対し、参加しない細胞ではそのような上昇は認められなかった (fig. S3)。また、こうした空間的に近接したスパインへの入力は、1 本の軸索が複数のシナプスを形成することによって生じるわけではないことは確認済みである (11)。

#### 4-2. SW に参加する細胞は SW 時にシーケンス入力を受ける

SW 時には記憶に関わる細胞のシーケンス発火が観察されることから (4-7)、シナプス入力にもシーケンス構造が存在するのか調べた。カルシウムイベントが観察されたフレームを 1、それ以外を 0 で埋めた行列を、300 ms の窓を 10 ms ずつずらして分割し、作成した行列を基にアダマール積を算出した。すべての行列の組み合わせに対し、アダマール積を算出し、行列 (入力パターン) の類似度として使用した (26)。アダマール積が、14.1795 よりも大きい行列ペアにおいて、共通したスパインへの入力をシーケンス入力と定義した。この定義では、シーケンス入力は 3 個以上のスパインを含み、2 回以上繰り返される。観察した 24 本の動画を調べたところ、様々なパターンのシーケンス入力が多数観察された (Fig. 3A and fig. S4A)。SW に参加する細胞では、サロゲートデータと比較して有意に多くのシーケンス入力が観察されたのに対し、参加しない細胞ではサロゲートデータと同程度であった (fig. S4, B and C)。シーケンス入力は、シナプス入力の頻度が上昇することで増加すると推察される。実際、ランダムな分布を仮定したサロゲートデータでも正の相関を示すことを確認している (fig. S4D、グレー)。しかし、実データではサロゲートデータの回帰直線の傾きよりも高い値を取っていたことから、シーケンス入力は入力頻度の上昇によって受動的に形成されるのではなく、積極的に生み出すシステムが存在するものと推察される。また、シナプス入力頻度は先端樹状突起よりも基底樹状突起において高頻度に観察されたものの ( $P=0.006$ ,  $U=5$ , Mann-Whitney'  $U$  test)、シーケンス入力の頻度は両者で差が認められなかった ( $P=0.056$ ,  $t_{12}=2.1$ , Welch's  $t$  test)。

21 細胞から記録した 23 本の動画において、313 種類のシーケンス入力が見察された。平均して、単一のシーケンス入力は  $5.0 \pm 1.9$  個のスパイン (mean  $\pm$  SD of 313 sequences, ranging from 3 to 14 spines) を含み、 $2.4 \pm 1.0$  回 (2–9 回の間) 繰り返された。また、持続時間の中央値は 129 ms (fig. S5A)、各スパインへの入力の時間幅の中央値は 30ms であった (fig.S5B)。近傍のスパインへの 0 - 40 ms 以内の時間幅で生じる同期入力は非線形演算を誘導することが報告されている (27)。これを踏まえると、今回観測された中で 59.5% の同期入力がこの時間幅に含まれていた (fig. S5B)。活動頻度の高いスパインが必ずしもシーケンスに組み込まれるわけではないことから (fig. S6)、シーケンスに参加するスパインは活動頻度に依存せずに選ばれることがわかる。

SW に参加する細胞は参加しない細胞に比べ、高頻度にシーケンス入力を受け取っていた (Fig. 3B;  $P = 0.001$ ,  $U = 13$ , Mann-Whitney's  $U$  test)。さらに、シーケンス入力は特に SW 時に多く観測された (Fig. 3C)。上述の通り、SW 時に観測されるシーケンス入力の増加は単純なシナプス入力頻度の上昇だけでは説明できない (fig. S4D)。この結果はシーケンス入力が SW 時に選択的に生じている可能性を示唆するものである。SW に参加する細胞において観測された 307 種類のシーケンス入力は、繰り返しイベントを含めると合計 726 回観測され、そのうちの 498 回 (68.6%) が SW 時と同期して生じていた。平均すると、1 回の SW イベントにおいて  $0.93 \pm 2.6$  個のシーケンス (mean  $\pm$  SD of 1190 SWs ranging from 0 to 30 sequences) が観測された。各 SW のイベントごとに観測されたシーケンス入力の種類の組み合わせをマトリックス上に示し、ウォード法を用いた樹形図で示した (Fig. 3D)。この結果、各シーケンス入力は複数の SW で繰り返し観測されていることが分かった。また、複数のシーケンス入力が 1 回の SW イベント時に観測されることもあり、この時の組み合わせは常に一定とは限らずイベントごとに柔軟に変化していた。

#### 4-3. シーケンス入力は近接したスパインに収束する

シーケンス入力を受けるスパインの空間分布を調べるため、シーケンス入力に含まれるすべてのスパインペアの道のり距離から Geometric Energy を算出した。算出した Geometric Energy の分布をランダムな分布を仮定して作成した 10000 個のサロゲートデータと比較すると、実データのほうが有意に高い値を取った。すなわち、シーケンス入力には空間的に近接したスパインが多く含まれることが示唆される。また、スパインペアの道のり距離のヒストグラムを作成すると、10  $\mu$ m 以内のスパインがシーケンス入力を受ける頻度が有意に高いことが分かった (fig. S7)。この傾向はシーケンス入力が SW を伴うか否かに関わらず、共通して

観察された (fig. S7)。

シーケンス入力は樹状突起上に一様に分布するわけではなく、一部の分枝上に偏っているように見受けられる (Fig. 4, A and C, left)。そこで、シーケンスを受けやすい分枝が存在するのか検証するため、シャノンエントロピーを算出した (Fig. 4C, right)。シャノンエントロピーは低い値をとるほど、シーケンスに含まれるスパインが一様に分布するわけではなく一部に偏っていることを意味している。SW に参加する細胞から記録した 12 本の動画のうち、83.3% においてエントロピーが少なくとも一部でサロゲートデータよりも有意に低い値をとっていた (fig. S8)。この結果から、樹状突起は一様なケーブルではなく分枝ごとに異なるコンパートメントとして働く可能性が示唆される。樹状突起ごとに異なる結合様式を示唆するこの結果は、ニューロンが形態学および機能的に偏りのあるシナプス結合を形成することを示した既報とも一致する (8, 28, 29)。

#### 4-4. 近傍のスパインが受けるシーケンス入力は方向性を持つ

近傍のスパインが入力を受ける場合、細胞体に向かうもしくは離れるという入力の方向性によって細胞体の膜電位応答に差が生じることが報告されている (16)。そこで、シーケンス入力も方向性を有するのか検証した。シーケンス入力の中でもスパイン間距離が  $10\ \mu\text{m}$  以内に収束した部分のみをローカルシーケンスと定義し、以降はローカルシーケンスに関して解析を行った。ローカルシーケンスは少なくとも 2 つのスパインを含み、350 種類観察された。ローカルシーケンスの方向性の有無を調べるため、横軸を入力のタイミング、縦軸を樹状突起上の位置として座標平面上にプロットした (Fig. 5A and fig. S9A)。ローカルシーケンスは二回繰り返されることから、ローカルシーケンスの重心を原点になる様にそろえて重ね、最小二乗法を用いて回帰直線を算出した。回帰直線の決定係数は位置をランダムに再配置して作成した 10000 個のサロゲートデータと比較して有意に高い値をとった (Fig. 5B)。この結果は、入力タイミングと樹状突起の位置による線形回帰分析ではなく、ノンパラメトリック回帰分析を用いても同様であった (fig. S9B)。このことから、ローカルシーケンスが方向性を持つという現象はロバストであることが確認できる。

回帰直線の傾き ( $b_I$ ) が正もしくは負の値をとる割合がサロゲートデータに比べ有意に多かった。350 種類のローカルシーケンスのうち、188 種類 (53.7%) では  $b_I$  が負の値、すなわち細胞体に向かう (IN) 方向であることが分かった (Fig. 5C)。残りの 157 種類 (44.9%) は細胞体から離れる (OUT) 方向の入力であった。SW 前後のローカルシーケンスのイベント頻度を IN 方向と OUT 方向に分けてプロットすると、ベースラインのイベント頻度はほぼ一致

しているのに対し、SW 時には OUT 方向に比べ IN 方向の入力が選択的に増加していた (Fig. 5D)。

最後に、樹状突起のシャフトのカルシウム濃度変化に着目した。スパインへのカルシウム流入時に根元のシャフトの蛍光強度変化を定量したところ、シーケンス入力の一部であるときの方がシーケンス入力を伴わない場合に比べより大きな蛍光強度変化が観察された (fig. S10A)。このことから、シーケンス入力の存在により、非線形演算につながっている可能性が示唆される。一方で、シャフトの蛍光強度変化は入力の方向性による差は認められなかった (fig. S10B)。



5. 図

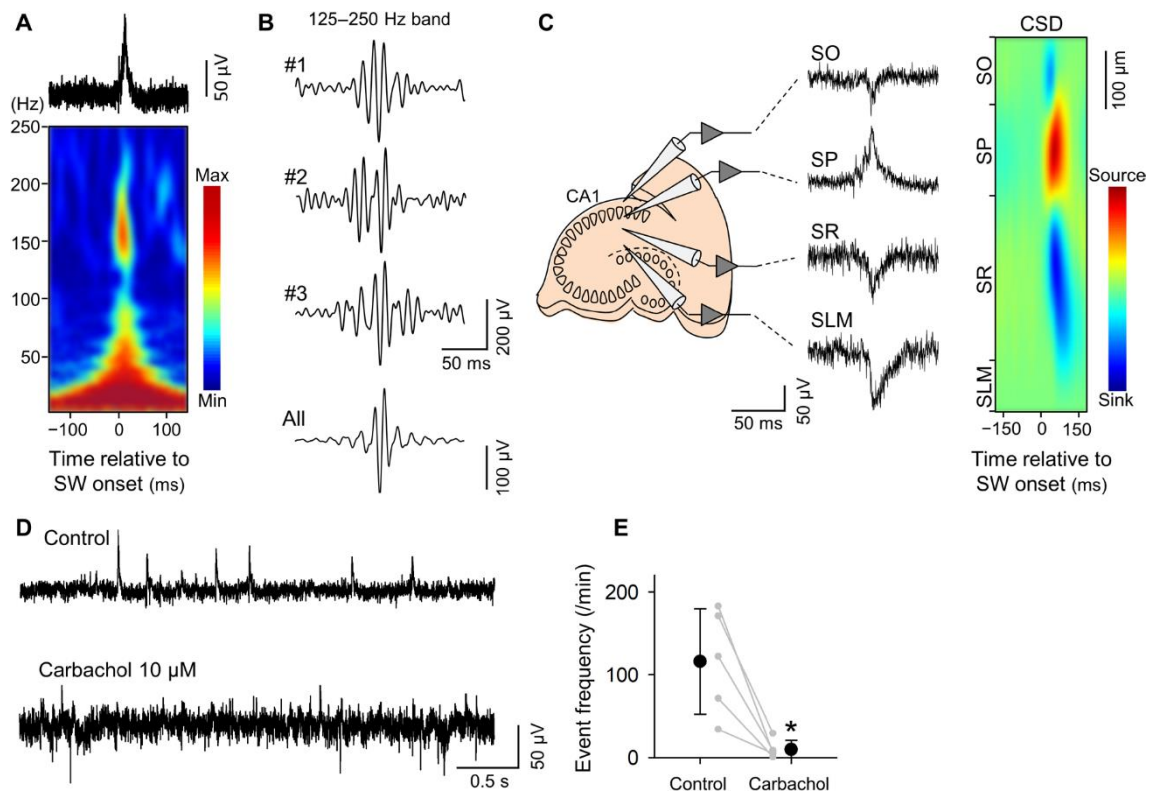


Fig.1 海馬培養スライスでは自発的に SW が発生する

- (A) 海馬 CA1 野で記録された SW 時の LFP トレース (上) とそのウェーブレット解析の結果 (下)。
- (B) 代表的な 3 個の SW トレースに 125-250 Hz のバンドパスフィルタをかけた結果 (上、#1, #2, #3) と、1 スライスから観察された全 1048 イベントの平均値 (下、all)。
- (C) 左：海馬 CA1 野の上昇層 (SO)、細胞体層 (SP)、放線状層 (SR)、網状分子層 (SLM) から記録された SW イベントの例。右：ランダムに抽出した 20 イベントのトレースから算出した CSD 解析の結果。
- (D) カルバコール処置 (10  $\mu$ M) 前および処置後の代表的な LFP トレース。
- (E) カルバコール処置前後の SW イベント頻度の比較。カルバコール処置 10 分後には、SW イベントは減少した ( $n = 5$  slices;  $*P = 0.015$ ,  $t_4 = 4.1$ , paired  $t$  test)。

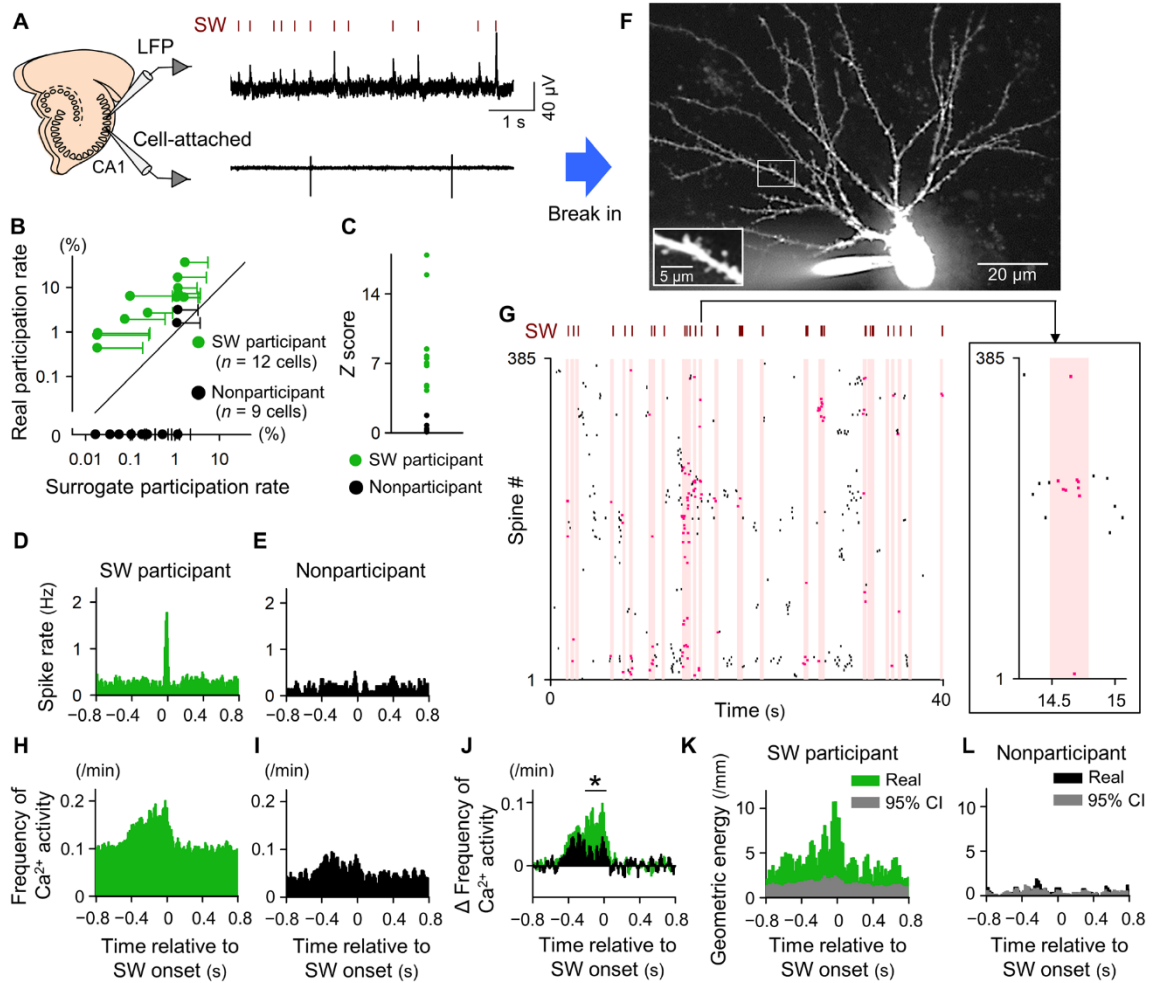


Fig.2 SW に参加する海馬 CA1 野の細胞は SW 時に空間的に近接した入力を受ける

- (A) 同時記録した LFP トレースとセルアタッチのトレースの代表例。LFP は海馬 CA1 野の錐体細胞層から記録し、セルアタッチは海馬 CA1 野の錐体細胞から記録した。
- (B) 記録した各ニューロンに対し、SW との同期率すなわち SW への参加率を算出し、ランダムな分布を仮定して作成したサロゲートデータを横軸に、実データを縦軸にとり比較。各丸は平均値を、エラーバーはサロゲートデータの 95% 信頼区間を示す。サロゲートデータよりも有意に SW に同期するニューロンを SW に参加する細胞 (SW participant、緑)、それ以外のニューロンを参加しない細胞 (nonparticipant、黒) と定義した。
- (C) 各細胞の SW との同期率を示す Z スコア。緑の丸は SW に参加する細胞の結果を、黒の丸は参加しない細胞の結果を示している。
- (D, E) SW に参加する細胞 ( $n = 12$  cells、D) としない細胞 ( $n = 9$  cells、E) の SW 前後

の平均発火頻度を示すヒストグラム。

(F) 海馬 CA1 野の基底樹状突起の形態。

(G) 全 385 スパインから観察されたカルシウム活動のラスタープロット。個々の点がカルシウム活動を示す。LFP から抽出した SW のタイミングを赤い tick で、SW オンセットから 300 ms 以内 (赤い背景) に生じたカルシウム活動を赤い点で示している。

(H, I) SW に参加する細胞 ( $n = 14$  videos from 12 cells、H) としない細胞 ( $n = 9$  videos from 9 cells、I) の SW 前後の平均カルシウム活動のイベント頻度を示すヒストグラム。

(J) SW 前後のベースラインからのシナプス入力頻度の変化量を示したヒストグラム。SW に参加する細胞の結果を緑で、しない細胞の結果を黒のバーで示している。SW に参加する細胞としない細胞において上昇量に有意な差があるフレームをアスタリスク (\*) で示している。

(K, L) SW に参加する細胞 ( $n = 14$  videos from 12 cells、K) としない細胞 ( $n = 9$  videos from 9 cells、L) の SW 前後の Geometric Energy (局所性) を示すヒストグラム。ランダムな分布を仮定して作成した 10000 個のサロゲートデータの 95% 信頼区間をグレーで示している。

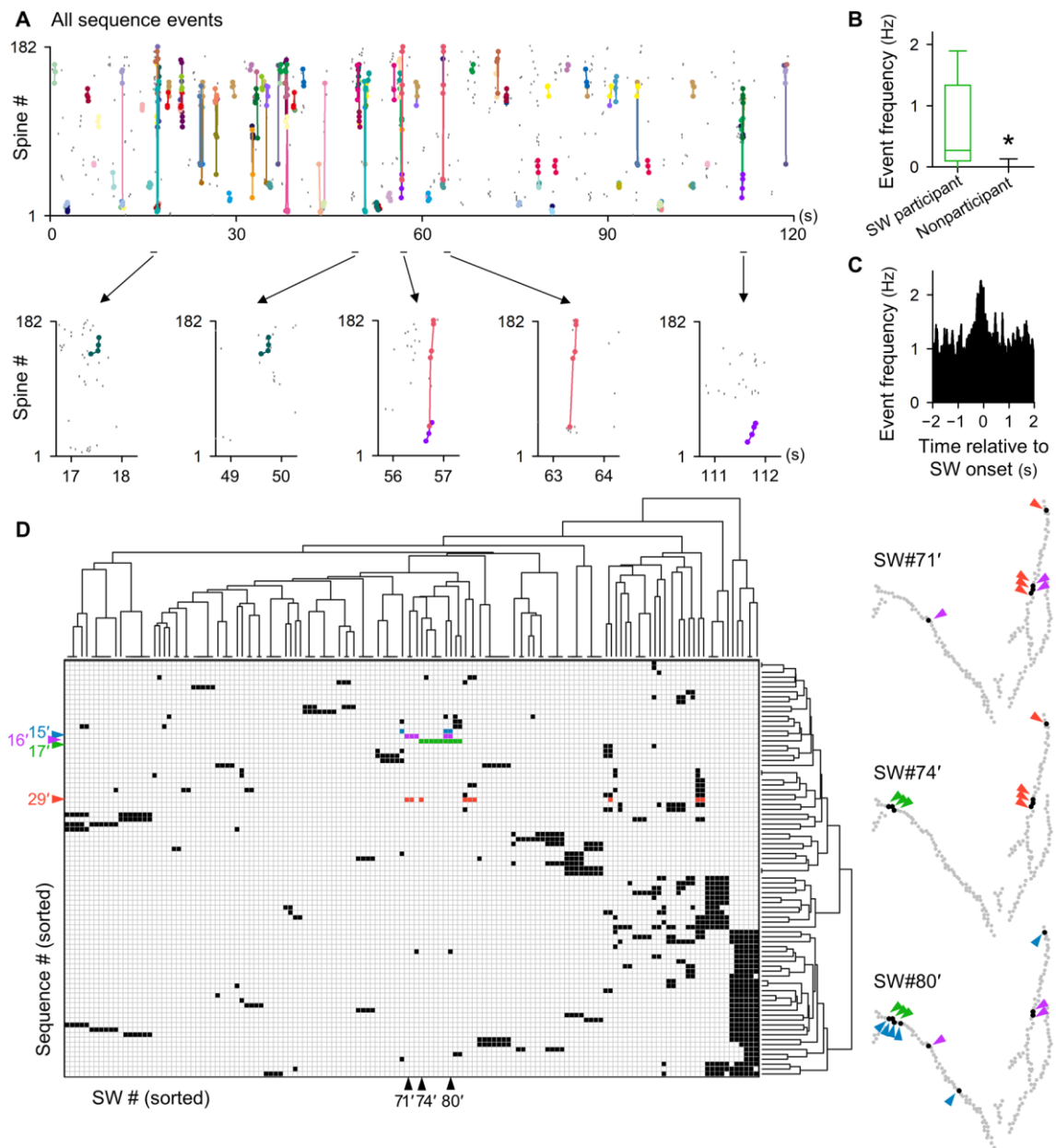


Fig.3 SW participant では SW 時に様々なパターンのシーケンス入力 that 繰り返される

- (A) 単一のニューロンから記録されたシナプス入力の時空間パターンと検出された全てのシーケンス入力 (上) と 3 種類のシーケンス入力の拡大図 (下)。異なる種類のシーケンス入力をそれぞれ異なる色で示している。
- (B) SW に参加する細胞と参加しない細胞が受けるシーケンス入力の頻度 ( $n = 14$  videos from 12 SW participants and  $n = 9$  videos from 9 nonparticipants;  $*P = 0.0015$ ,  $U = 14$ , Mann-Whitney  $U$  test)。

- (C) SW 前後に SW participant において観察されたシーケンス入力のイベント頻度を示すヒストグラム。
- (D) 各 SW イベント時に観察されるシーケンス入力の代表的な組み合わせ (左)。シーケンス入力および SW イベントはワード法により作成したデンドログラムに従って並び替えた ( $n = 143$  SW events and  $n = 85$  sequences)。SW イベント #71'、#74'、#80'に観察されたシーケンス入力 #15' (青)、#16' (紫)、#17' (緑)、#29' (赤) の空間分布 (右)。

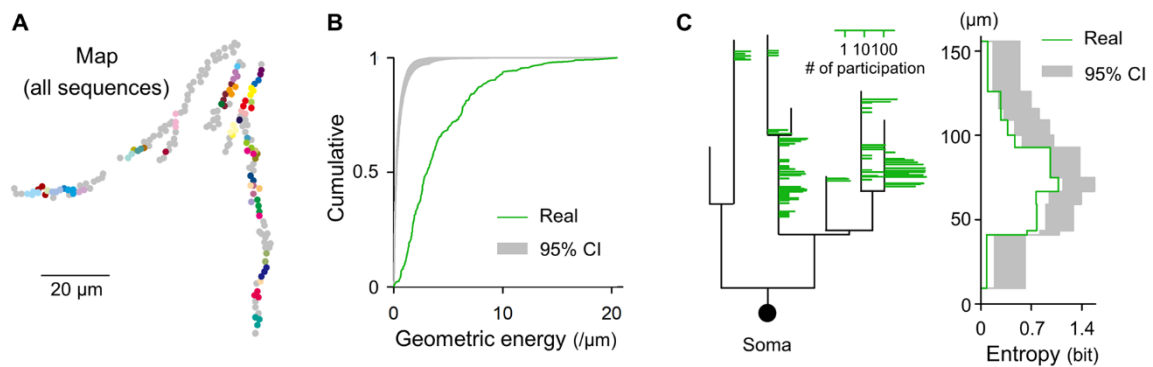


Fig.4 シークエンス入力は樹状突起上の一部に収束する

- (A) 単一細胞から観察された 76 シークエンス入力に含まれたスパインの空間マップ。異なるシークエンスをそれぞれ異なる色で示している。
- (B) 観察された 313 個のシークエンス入力に対して算出した Geometric Energy の累積度数分布 (緑) とランダムな分布を仮定して再配置したスパインの空間分布により作成したサロゲートデータの 95% 信頼区間 (グレー)。
- (C) 樹状突起の形態を模した樹形図上にプロットした各スパインが含まれるシークエンス入力の数 (左) と、これを基に算出したエントロピー (右)。樹形図において、縦軸は細胞体からの距離を意味している。右の図では、実データ (緑) とランダムな分布を仮定して作成した 10000 個のサロゲートデータの 95% 信頼区間 (グレー) を比較している。

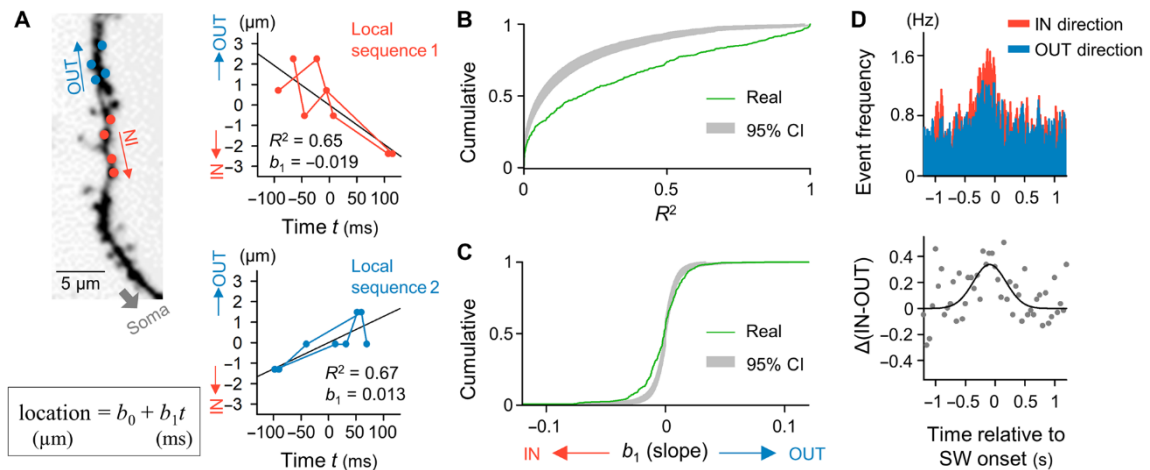


Fig.5 局所のスパインに収束するシークエンス入力は方向性を有する

- (A) 異なる方向性を持つローカルシークエンスの例。細胞体に向かう方向のローカルシークエンスを IN (inbound、赤)、細胞体から離れる方向のローカルシークエンスを OUT (outbound、青) で表している。ローカルシークエンスが樹状突起上において方向性を有するのかわかるため、座標平面上に入力タイミング ( $t$ , 横軸) と樹状突起上の位置 (location, 縦軸) をプロットした。観察されたすべてのイベントを同じ平面上にプロットした後に、最小二乗法を用いて決定係数 ( $R^2$ )、回帰直線 (黒線) と回帰直線の傾き ( $b_1$ ) を算出した。
- (B) 観察された 350 個のローカルシークエンスの決定係数 ( $R^2$ ) に関する累積度数分布 (緑) とブートストラップ法により作成したサロゲートデータの 95% 信頼区間 (グレー)。
- (C) 観察された 350 個のローカルシークエンスの決定係数 ( $b_1$ ) に関する累積度数分布 (緑) とブートストラップ法により作成したサロゲートデータの 95% 信頼区間 (グレー)。
- (D) SW 前後の IN (赤) もしくは OUT (青) のローカルシークエンスのイベント頻度のヒストグラム (上) と IN と OUT のイベント頻度の差 (下)。

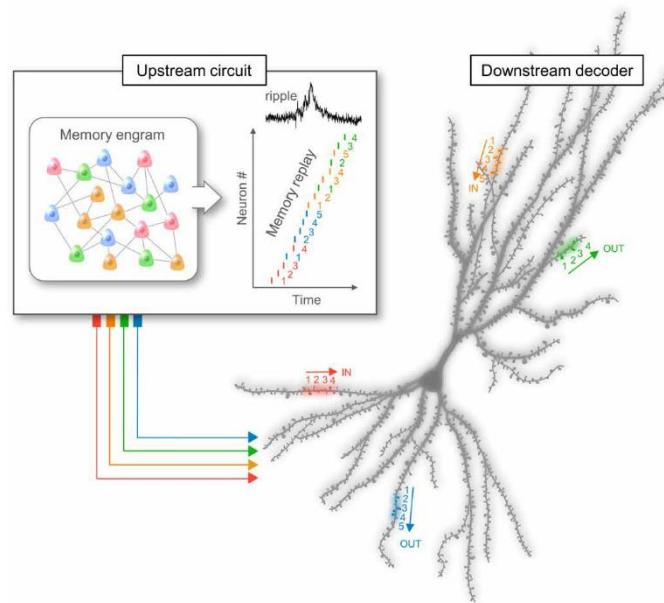
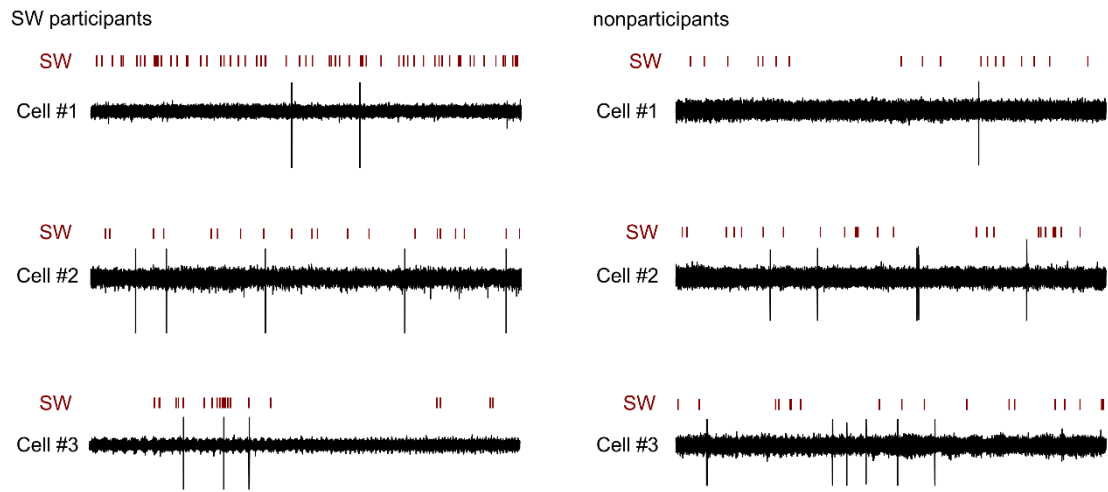


Fig.6 SW 時には局所に収束するシーケンス入力複数の樹状突起上で観察される

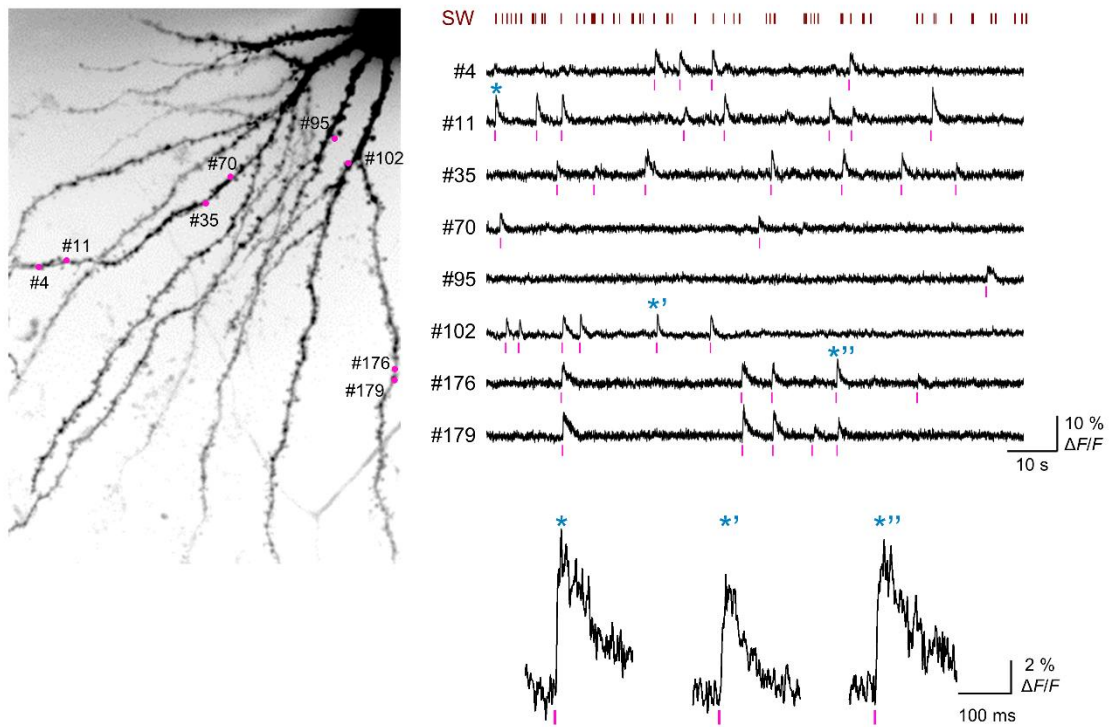
SW 発生中は SW に参加する細胞が選択的に上流のニューロンからシーケンス入力を受け取っている。このシーケンス入力は近接したスパインに収束し、樹状突起上の一部の分枝で高頻度に観察される。さらに、シーケンス入力は細胞体に向かう、もしくは離れるといったように方向性を有する。これらの結果から、上流のニューロン集団のシーケンス発火が時間パターンを保持したまま下流のニューロンの近接したスパインに入力を送ることで、非線形演算を引き起こし、下流のニューロンの発火タイミングを精密に制御していると推察される。





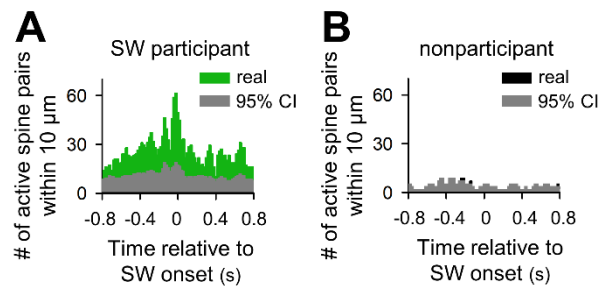
Supplemental Fig.1 海馬 CA1 野の一部のニューロンが SW に参加する

SW に参加する 3 細胞（左）と参加しない 3 細胞（右）から記録したセルアタッチ記録のトレース。赤い tick は LFP トレースから抽出した SW のタイミングを示す。



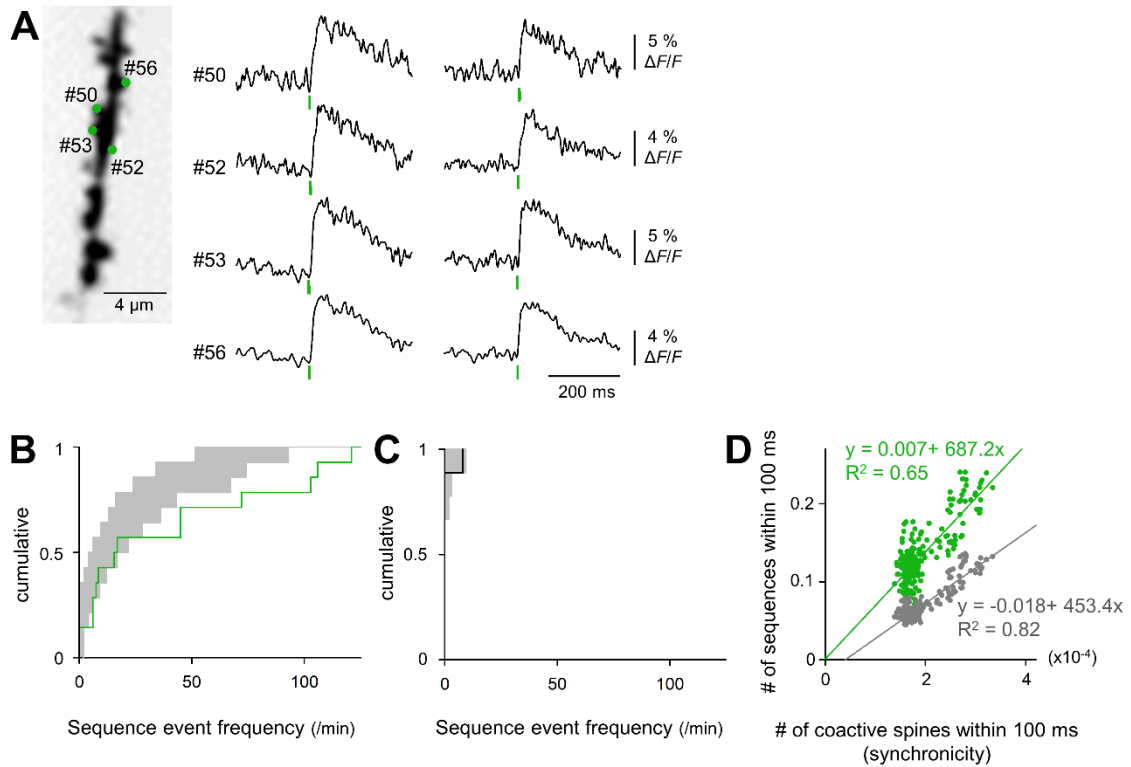
Supplemental Fig.2 SW が観察されるスライスにおいて海馬 CA1 野ニューロンのスパインでは自発的なカルシウム活動が観察される

Fluo-4 を充填した海馬 CA1 野の錐体細胞から記録した樹状突起スパインの代表的なカルシウム蛍光強度変化。赤い tick は SW タイミングを、マゼンタの tick はカルシウム蛍光強度の上昇のオンセットを示す。下段にはアスタリスクで示した 3 つのカルシウム活動例を拡大した。



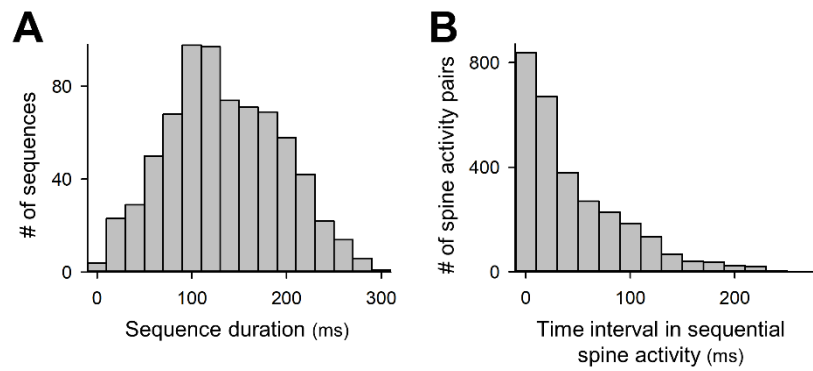
Supplemental Fig.3 SWに参加する細胞はSW時に空間的に近接したシナプス入力を受ける

(A, B) SW participant ( $n = 12$  cells, A) と nonparticipant ( $n = 9$  cells, B) が SW 前後に 10  $\mu\text{m}$  以内のスパインで同期入力を受けた数を示すヒストグラム。グレーのヒストグラムはスパインの位置をランダムにシャッフルすることで算出した 10000 回のシャッフルデータの 95% 信頼区間を示している。



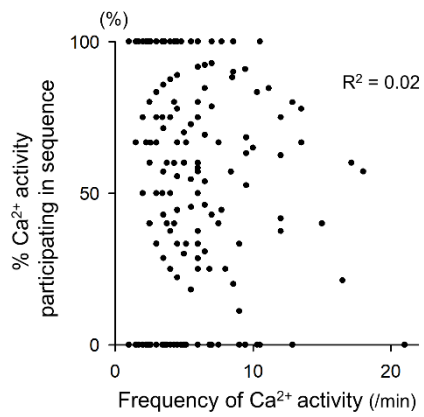
Supplemental Fig.4 シークエンス入力はチャンスレベルと比較して有意に高頻度に生じる

- (A) 4 個のスパインによって構成されるシークエンス入力のカルシウムトレース。
- (B, C) SW に参加する細胞 ( $n = 14$  movies from 12 cells、B) としない細胞 ( $n = 9$  movies from 9 cells、C) のシークエンス入力のイベント頻度の累積度数分布。100 個のサロゲートデータにより作成した 95% 信頼区間(グレー)と比較した。サロゲートデータの作成には、各スパインの活動数と各フレームの活動数は変化しないように活動タイミングを入れ替える *swapping* 法を用いた。
- (D) SW 時の同期入力の数とシークエンスの数の時間発展。実データ (緑) と 100 個のサロゲートデータの平均値 (グレー) を比較した。それぞれのデータに対し最小二乗法により作成した回帰直線を緑またはグレーのラインで示している。サロゲートデータの傾きに比べ、実データの傾きが大きいことから、シークエンスを能動的に生み出すシステムの存在が示唆される。



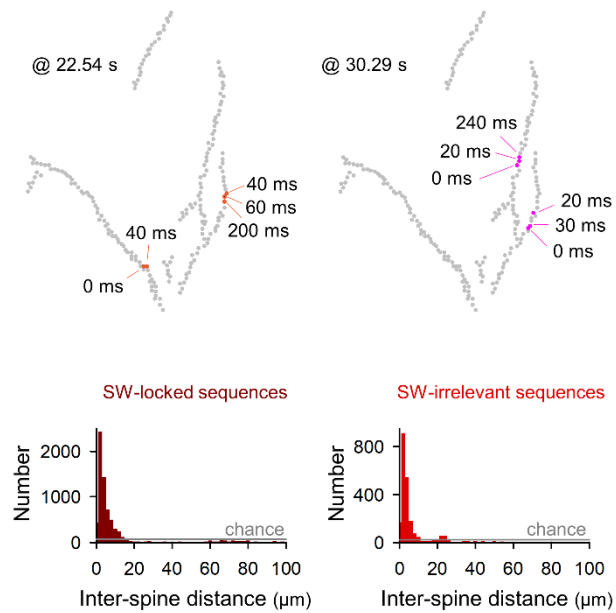
Supplemental Fig.5 シークエンス入力は 129 ms 持続し、各スパイン間の時間幅は 30 ms である

(A, B) シークエンス入力の持続時間の分布を示すヒストグラム ( $n = 738$  repetitions of 313 sequences、A) とシークエンス入力内において連続した入力間の時間幅の分布を示すヒストグラム ( $n = 2,898$  intervals from 738 events、B)。



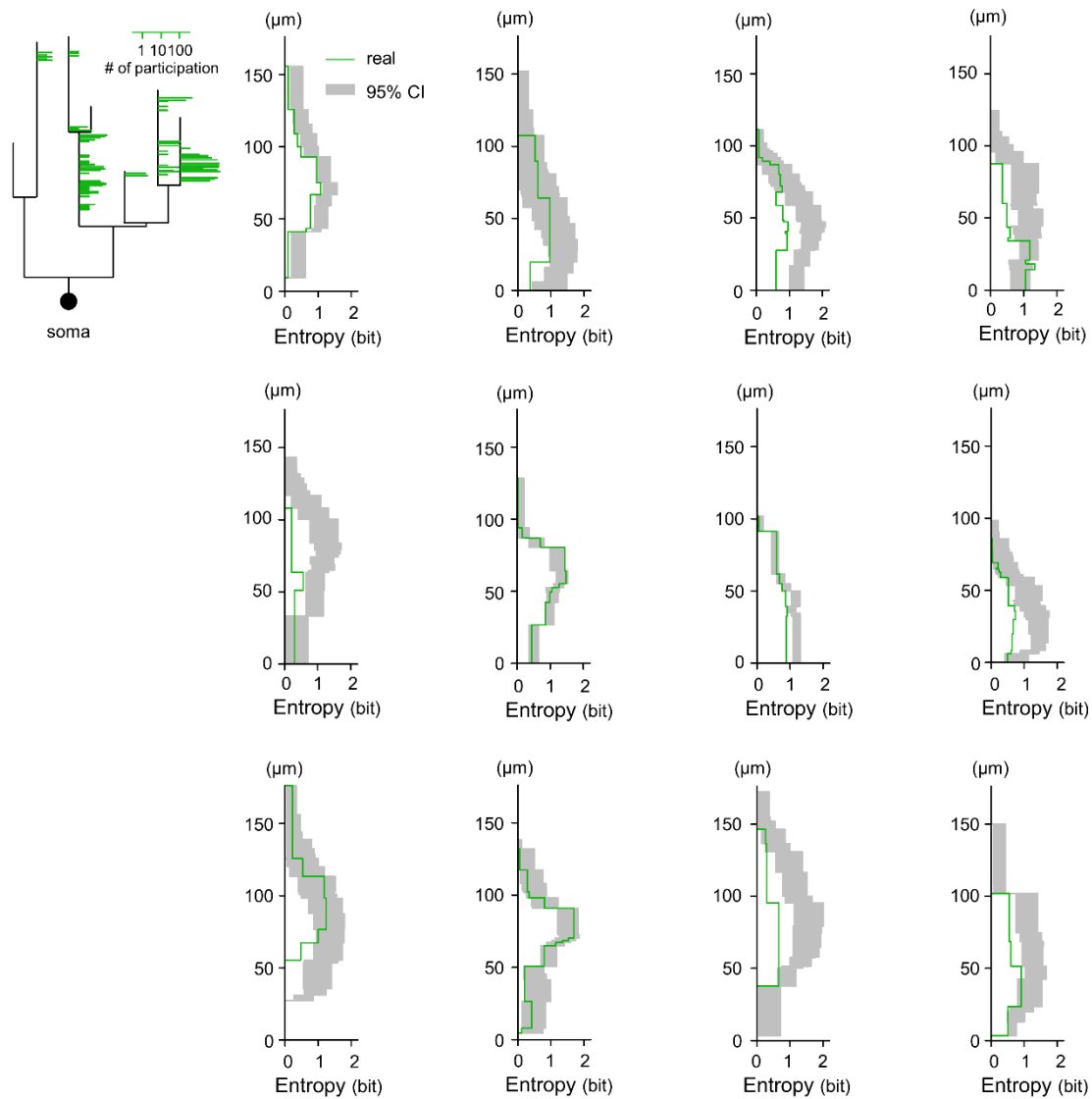
Supplemental Fig.6 各スパインのシーケンスへの参加頻度は入力頻度に依存しない

各スパインのカルシウム活動の頻度に対するシーケンス入力への参加率。活動頻度とシーケンスへの参加率は相関しない ( $n = 979$  spines from 12 movies)。各点が各スパインの値を示す。



Supplemental Fig.7 シークエンス入力は SW を伴うか否かに関わらず近傍のスパインに収束する

代表的なシークエンス入力に含まれるスパインの空間分布（上）とシークエンスに含まれるスパイン間の道のり距離の分布（下）。SW と同期して生じたシークエンス入力（ $n = 592$  repeats of 277 sequences、下左）と SW を伴わないシークエンス入力（ $n = 326$  repeats of 150 sequences、下右）の分布。グレーの線はスパインの位置をランダムに再配置することで求めた 10000 個のサロゲートデータから算出したチャンスレベル。

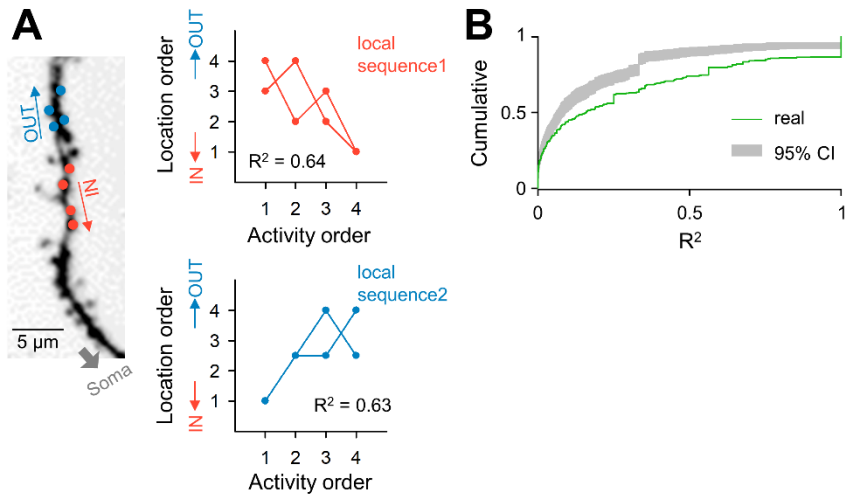


Supplemental Fig.8 シークエンス入力に含まれるスパインは樹状突起上の一部に収束する

樹状突起の形態を模した樹形図上にプロットした各スパインが含まれるシークエンス入力の数 (左) と、これを基に各樹状突起の分岐ポイントで計算したエントロピーの分布。樹形図、エントロピーの分布図において、縦軸は細胞体からの距離を意味している。右の図では、実データ (緑) とランダムな分布を仮定して作成した 10000 個のサロゲートデータの 95% 信頼区間 (グレー) を比較している。個々のパネルは 1 本の動画の結果を示しており、左上のパネルは Fig. 4C と同じデータである。観察した 12 本の動画のうち 83.3% において、サロゲートデータから算出

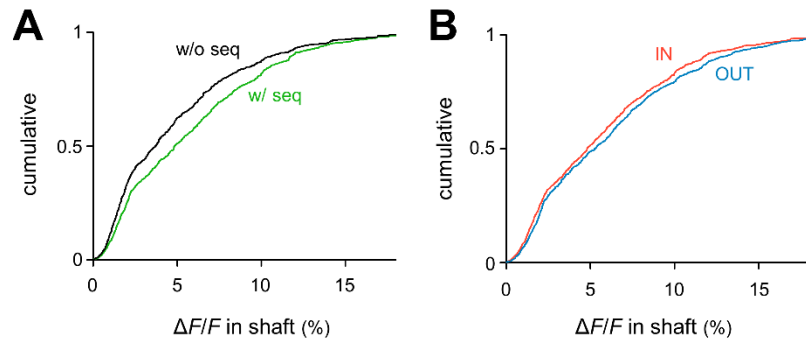


した 95% 信頼区間よりも実データが低い値をとっていたことから、シーケンス入力の一部の樹状突起の分枝上に多く観察されることが示唆される。



Supplemental Fig.9 局所のスパインに収束するシーケンス入力は方向性を有する（ノンパラメトリック回帰分析による検証）

- (A) 異なる方向性を持つローカルシーケンスの例。細胞体に向かう方向のローカルシーケンスを IN (inbound、赤)、細胞体から離れる方向のローカルシーケンスを OUT (outbound、青) で表している。それぞれのローカルシーケンスに対し、入力の順番（横軸）と樹状突起上の位置の順番（縦軸）を座標平面上にプロットした。観察されたすべてのイベントを同じ平面上にプロットした後に、最小二乗法を用いて決定係数 ( $R^2$ ) を算出した。
- (B) 観察された 350 個のローカルシーケンスの決定係数 ( $R^2$ ) に関する累積度数分布（緑）とブートストラップ法により作成したサロゲートデータの 95% 信頼区間（グレー）。



Supplemental Fig.10 シーケンス入力は近傍の樹状突起シャフトでも大きなカルシウム流入を引き起こす

- (A) シャフトで観察された蛍光強度上昇の大きさに関する累積度数分布。各スパインでシーケンスに含まれるカルシウム活動が観察された時 ( $n = 3,328$  events、緑 w/ seq) とシーケンスとは関係しないカルシウム活動の時 ( $n = 9,557$  events、黒 w/o seq) に根元のシャフトで観察された蛍光強度変化を定量した。
- (B) シャフトで観察された蛍光強度上昇の大きさに関する累積度数分布。IN 方向のローカルシーケンス時に観察されたシャフトの蛍光強度変化 ( $n = 1762$  events、赤) と OUT 方向のローカルシーケンス時観察されたシャフトの蛍光強度変化 ( $n = 1546$  events、青) を比較した。

## 6. 考察

本研究では、SW 時のシナプス入力を大規模かつ高速に可視化することで、SW に参加する細胞がしない細胞に比べ SW 時に多くのシナプス入力を受けることを発見した。この結果は、新規環境探索時に発火したニューロンがそうでない細胞に比べ SW 時に大きな脱分極を示すことを示した知見と一致するものである (30)。本研究の最も重要な発見は、この時のシナプス入力がシーケンス構造を持ち (Fig. 3)、さらに樹状突起上の局所のスパインに収束するということである (Fig. 4)。その結果として、SW 時に観察されるシナプス入力の空間的な局所性も上昇したと推察される (Fig. 2K、L)。局所のスパインへのクラスター入力は樹状突起スパイクなどを誘導し、非線形演算を誘導しやすいことが報告されている (15、31-33)。さらに、海馬 CA1 野の錐体細胞で生じる樹状突起スパイクは、場所受容野の形成にも関与することも示唆されている (34)。本研究の結果は、樹状突起スパイクの背景に存在するシナプス入力の時空間パターンを明らかにし、SW に参加する細胞選択的に生じる興奮/抑制の一時的な不均衡のメカニズムの一端を示唆したものである。

### 6-1. SW に参加する細胞としない細胞への入力の量的および質的な差

SW に参加する細胞しない細胞では SW オンセットの直前 300 ms 程度においてシナプス入力の頻度に有意な差が認められた (Fig.2J)。その一方で、SW オンセットの 400 ms 程度前には参加しない細胞へのシナプス入力頻度も上昇している (Fig.2I)。SW は海馬神経回路の興奮性が最も上がるタイミングの一つである。このことから、SW オンセットの 400 ms 前には SW に参加しない細胞への入力頻度も上昇したものと推察される、その後、抑制性細胞による活動抑制や樹状突起内の演算など、何らかの理由で入力頻度の上昇が妨げられた可能性がある。SW に参加しない細胞で観察されたシナプス入力の上昇ではジオメトリックエネルギーに変化は生じないという結果は (Fig.2L)、機能的な結合による入力頻度の上昇というよりも、ネットワークの興奮性が上昇したことによる副産物的な要因であるという考えと矛盾しない。こうした結果は、SW に参加する細胞としない細胞で SW 時のシナプス入力に量的な違いがあるだけでなく、質的な違いがあることを示唆するものである。

### 6-2. シーケンス発火時に下流のニューロンで観察されるシナプス入力の時空間パターン

ニューロン集団のシーケンス発火は海馬だけでなく、様々な脳領域で報告されている。しかし、こうしたシーケンス発火が下流のニューロンにどのようなシナプス入力として伝達される

のかは明らかになっていなかった。想定されるシナプス入力の時空間パターンとして以下の 3 つの可能性が考えられる。1) 異なるニューロン集団のシーケンス発火がそれぞれ異なるニューロンの樹状突起に投射する可能性、2) 異なるニューロン集団のシーケンス発火が単一ニューロンの樹状突起上に分散して投射する可能性、3) 異なるニューロン集団のシーケンス発火が単一ニューロンの一部の樹状突起上に収束する可能性である。本研究の結果は 3 つ目の可能性と一致する。すなわち、シーケンス発火は樹状突起上の近接した部分に収束するというものである。

さらに、局所に収束するシナプス入力はシーケンス構造を保持していた。先行研究において、単独の軸索を刺激してもクラスター入力は生じないことから、軸索が近傍のスパインと複数のシナプスを形成するわけではないことを確認している (11)。また、本研究で観察したカルシウム活動は NMDA 受容体を介したものである (23)。これらを踏まえると、本研究で観察された入力パターンは上流のニューロンの発火パターンを反映したものであると考えられる。つまり、海馬神経回路では上流のニューロン集団の発火パターンが保持されたまま、下流のニューロンの樹状突起上で再現されるということである。

### 6-3. シーケンス入力の空間分布が情報演算に及ぼす影響

シーケンス入力は近傍のスパインに収束していた。局所に収束したシナプス入力は、樹状突起上に分散した入力に比べ、効率よく細胞体を活性化させることが知られている。スパインの人為的な刺激では、空間的に近接した 5 個もしくは 6 個以上のスパインを刺激することで非線形演算が誘導されることが報告されている (15)。シーケンス入力を近傍のスパインへと収束させることによって、SW 時に SW に参加する細胞選択的に非線形演算を引き起こすことが可能であると推察される。

もう一つのシーケンス入力の特徴として、方向性の存在が挙げられる。グルタミン酸アンケージングによるスパインの人為的な刺激では、スパインを細胞体に向かう方向と細胞体から離れる方向に刺激した場合、細胞体の膜電位変動に差が生じることが報告されている (16)。つまり、樹状突起では入力の局所性だけでなく方向性によっても、細胞体の活性状態が変化するということである。海馬で観察される記憶再生には、行動時に観察された発火パターンそのものが再生されるだけでなく、行動時の発火パターンを逆様に再生する「逆再生」の存在も報告されている。このことから、上流のニューロン集団の発火パターンが再生されるのか、逆再生されるのかにより、下流のニューロンの発火パターンにも影響を与える可能性がある。

#### 6-4. 樹状突起の演算システムによる膜電位変動の変化

正常な脳機能の発揮には、特定のニューロンが特定のタイミングに情報の出力、すなわち発火することが不可欠である。個々のニューロンはシナプス入力による細胞体の脱分極が閾値に達することで発火する。この時、シナプス入力は単純に足し合わされるわけではなく、樹状突起の形態やイオンチャネルの分布など様々な影響を受け、樹状突起内での演算が行われる。これまでに、空間的に近接したスパインへの同期入力や、方向性を持った入力によって、非線形演算が誘導されることが報告されてきた (15, 16)。これらの結果は、スパインの刺激という人為的な実験環境下で観察されていたが、本研究において、自発的な神経回路の活動下でもこのような入力パターンが生じていることを発見した。

局所に生じる入力は、細胞体に向かう入力の方が細胞体から離れるよりも効率よく非線形演算を誘導する。その一方で、細胞体から離れる入力も単純な加算よりも効率よく膜電位を脱分極させる。つまり、ランダムな分布よりもクラスターした入力が、クラスターした入力の中では細胞体から離れる方向よりも細胞体に向かう方向が、より効率よく細胞体を脱分極させるということである。このように同じ数のシナプス入力を受けても、その時空間パターンによって細胞体の興奮性は自在に変化させることが可能であると推察される。

また、それぞれのニューロンは興奮性入力だけでなく抑制性入力も受容する。抑制性入力の存在は、一部のシナプス入力を無効化することが報告されており (23)、樹状突起では極めて複雑な情報演算が行われていることが予測される。単純な入力数の増減だけでなく、シナプス入力の時空間パターンや抑制性入力の存在により、単一ニューロンが処理できる情報量を格段に増やすことができる。このことから、シナプス入力の空間分布の理解は、神経回路で行われる情報演算システムを理解する上で重要な課題の一つといえる。

#### 6-5. 海馬培養スライスで生じる神経回路の再編成とシーケンス入力

本研究の結果を解釈する上で培養による影響を考慮する必要がある。なぜなら、培養の過程で切断された線維が修復し、一部再編成されるからである。CA1 野の錐体細胞は、近位樹状突起において CA3 野からの入力を、遠位樹状突起では嗅内皮質からの入力を受ける。本研究で用いた切断法では、CA3 から CA1 への投射関係は保持されている (30)。また、切片において CA3 から CA1 への投射を外科的に切断すると、SW が消失することから、切片上で観察される SW の発生源は CA3 野といえる。これらのことを踏まえ、本研究では、CA1 錐体細胞の細胞体から 200  $\mu\text{m}$  以内の樹状突起 (先端樹状突起および基底樹状突起を含む) のみからシナプス入力を可視化した。

また、生体マウスにおいて観察される CA1 野ニューロンと培養スライスのニューロンで観察されるニューロンでは、発達段階に応じた樹状突起の形態や分枝数、スパイン密度などが同等である (37)。このことから、培養スライスでは生体の条件を完全に再現することは不可能であるものの、CA3 野から CA1 野への基本的な回路構造は保たれていると推察される。そして、この回路構造こそがスライス培養でのシーケンス発火の回路基盤であると考えている。つまり、本研究の結果から、デフォルトモードの神経回路は外部からの入力を受けなくても内在的にシーケンス入力を生み出すようにできていることが示唆される。すなわち、ニューロン集団には、近傍のスパインに対しシーケンス入力を送るため、微細な回路構造を再編成するシステムが予め備わっている可能性がある。

#### 6-6. 樹状突起コンパートメントの存在がニューロンの演算容量を増加させる

一回の SW 時に複数のシーケンス入力が観察されることもあり、その組み合わせは常に一定とは限らず SW イベントごとに柔軟に変化していた。こうした複雑な組み合わせの存在は、単一ニューロンの演算容量を増加させる上で有用であると推察される。さらに、シーケンス入力が樹状突起の局所に収束するという結果は、各樹状突起の分枝が異なる情報を担うコンパートメントとして機能する可能性を示唆するものである。すなわち、上流の異なるニューロン集団の発火を異なる樹状突起の分枝で受容し、突起の組み合わせにより様々なバリエーションの情報を出力することが可能になるということである。

このように、海馬神経回路では、上流のニューロン集団のシーケンス発火がその時間パターンを保持したまま下流のニューロンの近傍のスパインに収束し、コンパートメントごとに情報の加重を調節することで、下流のニューロンの発火タイミングを精密に制御するものと推察される。

## 7. 総括

本研究では、海馬 CA1 野のニューロンが SW に参加するか否かを区別した上で、SW 時のシナプス入力を大規模に可視化することで、以下の点を明らかにした。

1. SW に参加する細胞は、SW 時に近接したシナプス入力を多数受ける
2. SW に参加する細胞は、SW 時にシーケンス入力を受ける
3. シーケンス入力は一部の樹状突起上の近傍のスパインに収束する
4. シーケンス入力は樹状突起上において方向性を有する

本研究の結果から、上流の発火シーケンスはその時空間パターンを保持した状態で、下流の細胞の樹状突起上に表象されることが示唆される。シナプス入力数の変化だけでなく、局所性や方向性に基づく樹状突起上の非線形演算も SW 時の精密な発火タイミングの制御に関わると推察される。さらに、人為的な刺激により報告されてきたシナプス入力の演算様式が、「SW 発生時に SW に参加する海馬 CA1 野の錐体細胞において自発的に使用されている」ことを示した点でも意義深い。

なお、当該研究は以下の媒体で参照可能である。

Ishikawa, T., Ikegaya, Y. Locally sequential synaptic reactivation during hippocampal ripples. *Sci. Adv.*, 6:eaaay1492, 2020.



## 8. 参考文献

1. A. J. Peters, S. X. Chen, T. Komiyama, Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning. *Nature* 510, 263-267 (2014).
2. Y. Ikegaya, G. Aaron, R. Cossart, D. Aronov, I. Lampl, D. Ferster, R. Yuste, Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304, 559-564 (2004).
3. C. D. Harvey, P. Coen, D. W. Tank, Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task. *Nature* 484, 62-68 (2012).
4. A. K. Lee, M. A. Wilson, Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron* 36, 1183-1194 (2002).
5. A. D. Grosmark, G. Buzsaki, Diversity in neural firing dynamics supports both rigid and learned hippocampal sequences. *Science* 351, 1440-1443 (2016).
6. A. Malvache, S. Reichinnek, V. Villette, C. Haimerl, R. Cossart, Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science* 353, 1280-1283 (2016).
7. B. E. Pfeiffer, D. J. Foster, Autoassociative dynamics in the generation of sequences of hippocampal place cells. *Science* 349, 180-183 (2015).
8. S. Druckmann, L. Feng, B. Lee, C. Yook, T. Zhao, J. C. Magee, J. Kim, Structured synaptic connectivity between hippocampal regions. *Neuron* 81, 629-640 (2014).
9. M. F. Iacaruso, I. T. Gasler, S. B. Hofer, Synaptic organization of visual space in primary visual cortex. *Nature* 547, 449-452 (2017).

10. T. Kleindienst, J. Winnubst, C. Roth-Alpermann, T. Bonhoeffer, C. Lohmann, Activity-dependent clustering of functional synaptic inputs on developing hippocampal dendrites. *Neuron* 72, 1012-1024 (2011).
11. N. Takahashi, K. Kitamura, N. Matsuo, M. Mayford, M. Kano, N. Matsuki, Y. Ikegaya, Locally synchronized synaptic inputs. *Science* 335, 353-356 (2012).
12. Z. F. Mainen, T. J. Sejnowski, Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382, 363-366 (1996).
13. M. Migliore, G. M. Shepherd, Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci* 3, 362-370 (2002).
14. A. Reyes, Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci* 24, 653-675 (2001).
15. A. Losonczy, J. C. Magee, Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 50, 291-307 (2006).
16. T. Branco, B. A. Clark, M. Hausser, Dendritic discrimination of temporal input sequences in cortical neurons. *Science* 329, 1671-1675 (2010).
17. G. Girardeau, K. Benchenane, S. I. Wiener, G. Buzsaki, M. B. Zugaro, Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat. Neurosci.* 12, 1222-1223 (2009).
18. H. Norimoto, K. Makino, M. Gao, Y. Shikano, K. Okamoto, T. Ishikawa, T. Sasaki, H. Hioki, S. Fujisawa, Y. Ikegaya, Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science* 359, 1524-1527 (2018).
19. K. Okamoto, T. Ishikawa, R. Abe, D. Ishikawa, C. Kobayashi, M. Mizunuma, H.

- Norimoto, N. Matsuki, Y. Ikegaya, Ex vivo cultured neuronal networks emit in vivo-like spontaneous activity. *J. Physiol. Sci.* 64, 421-431 (2014).
20. K. Matsumoto, T. Ishikawa, N. Matsuki, Y. Ikegaya, Multineuronal spike sequences repeat with millisecond precision. *Front. Neural. Circuits* 7, 112 (2013).
  21. N. Takahashi, T. Sasaki, W. Matsumoto, N. Matsuki, Y. Ikegaya, Circuit topology for synchronizing neurons in spontaneously active networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10244-10249 (2010).
  22. G. Buzsaki, Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25, 1073-1188 (2015).
  23. C. Kobayashi, K. Okamoto, Y. Mochizuki, H. Urakubo, K. Funayama, T. Ishikawa, T. Kashima, A. Ouchi, A. F. Szymanska, S. Ishii, Y. Ikegaya, GABAergic inhibition reduces the impact of synaptic excitation on somatic excitation. *Neurosci Res* (2018).
  24. B. K. Hulse, L. C. Moreaux, E. V. Lubenov, A. G. Siapas, Membrane potential dynamics of CA1 pyramidal neurons during hippocampal ripples in awake mice. *Neuron* 89, 800-813 (2016).
  25. K. Makino, K. Funayama, Y. Ikegaya, Spatial clusters of constitutively active neurons in mouse visual cortex. *Anat. Sci. Int.* 91, 188-195 (2016).
  26. K. Louie, M. A. Wilson, Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 29, 145-156 (2001).
  27. A. Polsky, B. W. Mel, J. Schiller, Computational subunits in thin dendrites of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 7, 621-627 (2004).
  28. G. Yang, C. S. Lai, J. Cichon, L. Ma, W. Li, W. B. Gan, Sleep promotes branch-specific

formation of dendritic spines after learning. *Science* 344, 1173-1178 (2014).

29. K. S. Lee, K. Vandemark, D. Mezey, N. Shultz, D. Fitzpatrick, Functional synaptic architecture of callosal inputs in mouse primary visual cortex. *Neuron* 101, 421-428 (2019).
30. M. Mizunuma, H. Norimoto, K. Tao, T. Egawa, K. Hanaoka, T. Sakaguchi, H. Hioki, T. Kaneko, S. Yamaguchi, T. Nagano, N. Matsuki, Y. Ikegaya, Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. *Nat Neurosci* 17, 503-505 (2014).
31. N. L. Golding, N. P. Staff, N. Spruston, Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. *Nature* 418, 326-331 (2002).
32. J. Schiller, G. Major, H. J. Koester, Y. Schiller, NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons. *Nature* 404, 285-289 (2000).
33. A. Losonczy, J. K. Makara, J. C. Magee, Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452, 436-441 (2008).
34. M. E. J. Sheffield, M. D. Adoff, D. A. Dombeck, Increased Prevalence of Calcium Transients across the Dendritic Arbor during Place Field Formation. *Neuron* 96, 490-504 e495 (2017).
35. D. J. Foster, M. A. Wilson, Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 440, 680-683 (2006).
36. K. Diba, G. Buzsaki, Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nat. Neurosci.* 10, 1241-1242 (2007).
37. A. De Simoni, C. B. Griesinger, F. A. Edwards, Development of rat CA1 neurones in

acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol* 550, 135-147 (2003).

38. R. Koyama, R. Muramatsu, T. Sasaki, R. Kimura, C. Ueyama, M. Tamura, N. Tamura, J. Ichikawa, N. Takahashi, A. Usami, M. K. Yamada, N. Matsuki, Y. Ikegaya, A low-cost method for brain slice cultures. *J. Pharmacol. Sci.* 104, 191-194 (2007).
39. M. Okada, T. Ishikawa, Y. Ikegaya, A Computationally Efficient Filter for Reducing Shot Noise in Low S/N Data. *PLoS One* 11, e0157595 (2016).
40. S. de Marie, J. H. Hoeijmakers, J. T. Poolman, H. C. Zanen, Filter radioimmunoassay, a method for large-scale serotyping of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 20, 255-258 (1984).
41. A. F. Szymanska, C. Kobayashi, H. Norimoto, T. Ishikawa, Y. Ikegaya, Z. Nenadic, Accurate detection of low signal-to-noise ratio neuronal calcium transient waves using a matched filter. *J. Neurosci. Methods* 259, 1-12 (2016).

## 9. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二 教授に心よりお礼を申し上げます。この研究が完成したのは、私が研究室を移ってからもうやりたいという意志を最大限に尊重し、ディスカッションの中でデータの質を一段も二段も高めてくださった池谷先生のおかげです。自由に研究に打ち込める環境を整えてくださっただけでなく、きめ細やかな心配りと、厳しくも温かな指導をいただいたことで、とても楽しく充実した研究生生活を送ることができました。

研究室でのセミナーを始めとする多くの場において、有益なご助言を賜りました同教室 小山隆太 准教授に心よりお礼を申し上げます。常に前向きで、ぶれない姿を近くで見せていただけたことはとても貴重な経験でした。先生からのご指摘はいつもの確で、幅広い視点からデータを見つめるきっかけを作ってくださいました。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬学専攻医療薬学講座 竹内春樹 特任准教授に心よりお礼申し上げます。物事の本質を捉える洞察力と一切妥協せずに「問い」の答えを追い続ける姿勢、とても尊敬しています。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、有益なご助言を賜りました同教室 佐々木拓哉 助教に心よりお礼申し上げます。イメージングの技術やデータ解析について豊富な経験を持つ佐々木先生には、重要なアドバイスをたくさんいただきました。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました同教室 中嶋藍 特任助教に心よりお礼申し上げます。先生の毎日の取り組みから、努力することの大切さを教えていただきました。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました同教室 松木則夫 名誉教授に心よりお礼を申し上げます。松木先生からご指導いただけたのは 2 年間という短い時間でしたが、研究やデータに対し真摯に向き合うことの重要性を教えていただきました。

本研究の遂行にあたり、技術的なサポートや解析のアドバイスをいただいた同教室卒業生の高橋直矢 博士に心よりお礼を申し上げます。実験やデータの解釈、解析など、的確なだけでなくいつも温かく前向きなコメントを下さったおかげで、論文を完成させることができました。ありがとうございました。

研究に対する心構え・楽しさを教えてくださった同教室卒業生の 乗本裕明 博士に心よりお礼申し上げます。様々な困難があってもめげずに研究を続けてこれたのは、乗本さんがいつも相談に乗ってくださったおかげです。これからも、よろしく申し上げます。

博士課程を共に過ごした同教室 阿部麗実、笠原由佳、宮脇健行 各氏に心より感謝いたします。自分の選んだ道を強い意志を持って進む姿、とても尊敬しています。今までありがとう。みんなの活躍を楽しみにしています。

本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言をいただきました同教室の先輩方、後輩、そして同期の皆様にお礼を申し上げます。

最後に、私を支え続けてくれた両親、親族をはじめお世話になった多くの皆様に心よりお礼を申し上げます。