

# 審査の結果の要旨

## 海馬ニューロンにおけるシナプス入力の時空間解析

氏名 石川 智愛

海馬神経回路では、記憶に関わるニューロン集団が特定の順番で再活性化されるシークエンス発火(記憶の再生)が観察される。この自発的なシークエンス発火は sharp wave ripple (SW) と呼ばれる 125-250 Hz の脳波を伴って生じ、記憶の固定に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、シークエンス発火が下流のニューロンにどのようにして伝達されるのかに関して、シナプスレベルで調べた知見は存在しなかった。本研究では、海馬 CA1 野の錐体細胞が上流の CA3 野から受けるシナプス入力の時空間パターンを高速かつ大規模に可視化し、シークエンス入力の存在を発見した。さらに、シークエンス入力の特徴を詳細に解析することで、海馬神経回路が有する精密な結合様式とその演算機構に迫った。

博士論文は主に以下の4部により構成されていた。

### 1. SW 時に発火する海馬 CA1 野のニューロンは SW 時に多数のシナプス入力を受ける

海馬神経回路では一部のニューロンが SW 時に発火する。そこで、シナプス入力の時空間パターンを観察する前に、対象としたニューロンが SW に参加するか否か調べた。海馬培養スライス CA1 野のニューロンに電極を接着させ、セルアタッチモードで記録し、発火タイミングを捉えた。同時に、細胞体の 50  $\mu\text{m}$  以内から LFP も記録することで、発火タイミングが SW と一致するのか、すなわち SW に参加するのか否か検証した。その結果、記録した 21 細胞中、12 細胞 (57%) が有意に高い同期率を示す SW に参加する細胞であった。

次に、シナプス入力の時空間パターンを捉えるため、ホールセルモードに移行し、カルシウム蛍光指示薬を細胞内に充填した。15 分程度ホールセルモードを維持することで、個々のスパインまで蛍光指示薬が充填される。その後、各スパインへのカルシウム入力を捉えたところ、SW に参加するニューロンは SW の 400 ms 前から高頻度にシナプス入力を受けることを発見した。SW 直前のシナプス入力の増加は SW に参加する細胞のみで観察され、SW に参加しない細胞では生じていなかった。また、SW 直前に上昇したシナプス入力は樹状突起上に一様に分布するわけではなく、空間的に近接したスパインが受け取っていた。これらの結果は、SW 発生時には海馬 CA1 野の一部のニューロンが CA3 野から高頻度に局所的なシナプス入力を受け取ることを示唆するものだ。

### 2. SW に参加するニューロンは SW 発生時にシークエンス入力を受け取る

SW 発生時には記憶に関わるニューロンのシークエンス発火が報告されていることから、シナプス入力レベルでも特定のパターンが繰り返されるのか検証した。入力の有無を 1 もしくは 0 で表記し、時間幅 300 ms (= 30 frame) に切り分けた行列を記録開始時から記録終了まで 10 ms (= 1 frame) ずつずらして作成した。それぞれに  $\sigma = 40$  ms のガウシアンフィルタをかけた後、全ての行列ペアに対しアダマール積を算出した。本研究では、アダマール積が 14.1795 以上の行列ペアにおいて、共通したスパインへの入力をシークエンス入力と定義した。この定義では、シークエンス入力は 3 個以上のスパインを含み、2 回以上繰り返される。

全ての動画に対し上述の解析を行ったところ、自発活動中には多数のシークエンス入力が存在することを発見した。各シークエンス入力は  $5.0 \pm 1.9$  個 (全 313 シークエンスの平均値  $\pm$ SD) のスパインにより構成され、 $2.4 \pm 1.0$  回反復されていた。また、持続時間の中央値は 129 ms であった。シークエンス入力は SW に参加しない細胞に比べ、参加する細胞において高頻度に観察され、特に SW 発生時に頻度が上昇した。また、各 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り、その組み合わせはイベントごとに異なることも見出した。シークエンス入力の存在は、上流のニューロンの発火パターンが保たれたまま下流のニューロンの樹状突起に伝達されることを示唆しており、海馬神経回路が精密な投射パターンを保持していることが推察される。

SW に参加しない細胞ではごく少数のシークエンス入力しか観察されなかったことから、これ以降 SW に参加する細胞への入力パターンのみ解析した。

### 3. シークエンス入力は樹上突起上の近接したスパインに収束する

シナプス入力の数だけでなく空間分布も細胞体の興奮レベルに影響を与えることが、人為的にスパインを刺激した実験により示されている。そこで、シークエンス入力を受けるスパインの空間分布に局所的な偏りが存在するか検証した。各シークエンスに含まれるスパイン間の道のり距離からジオメトリックエナジーを算出した。ジオメトリックエナジーが高いほど近接したスパインがシークエンスに含まれることを意味する。実データにより得られた分布とランダムな配置を仮定して作成したサロゲートデータを比較すると、実データの方がより高い値にシフトしていた。この結果から、シークエンス入力を受けるスパインはランダムに配置されるわけではなく、樹状突起上の近接した位置に存在することが示唆される。次に、シークエンス入力を受けやすい分枝が存在するのかが検証するため、樹状突起の各分岐点に対してシャノンエントロピーを算出した。この値は小さいほど分布に偏りがあることを意味している。記録した 12 個の動画のうち、83.3% で少なくとも一部シャッフルデータに比べ低いシャノンエントロピーを示していた。つまり、樹状突起は各分枝が一様ではなく、一部の分枝において高頻度にシークエンス入力を受け取ることが示唆されている。これらのデータから、シークエンス入力は樹状突起上の一部の分枝上に存在する近傍のスパインに収束することが示唆される。この結果は海馬の神経回路が一様に結合を形成しているわけではなく、一部の分枝に偏りをもってシナプスを形成するという形態学的知見を示した先行研究とも一致する。

#### 4. 局所的なシークエンス入力は方向性を有する

最後に、局所的なシークエンス入力（ローカルシークエンス）にも方向性があるか否かが検証した。これは、近接したスパインを刺激する際に、細胞体から離れる（OUT）方向よりも細胞体に向かう（IN）方向に刺激した方が効率よく細胞体を脱分極させることが報告されているためである。ローカルシークエンスに含まれるシナプス入力のタイミングを横軸、樹状突起上の位置を縦軸に取り座標平面上にプロットした後、最小二乗モデルによって線形回帰分析を行った。その結果、ローカルシークエンスの決定係数（ $R^2$ ）はシャッフルデータと比較して高く、ローカルシークエンスは方向性を有することが分かった。さらに、IN と OUT の発生頻度を比較すると、SW 時には OUT に比べ IN のローカルシークエンスが高頻度に発生していた。IN 方向の入力は OUT 方向の入力に比べ、非線形演算を引き起こしやすいことから、SW 時には IN 方向の入力が増えることで、シナプス入力の演算効率が増える可能性がある。

本研究では、SW 発生時のシナプス入力を大規模に可視化することで、特定のスパインが繰り返し類似した順番で入力を受けるシークエンス入力の存在を初めて明らかにした。このシークエンス入力は、樹状突起の一部の分枝上の近傍のスパインに収束し、方向性を有することも示した。局所にクラスターした入力は細胞体を効率よく脱分極させ、また、方向性によっても演算効率は変化することが知られている。こうした知見を踏まえると、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。

本研究の結果は、上流のシークエンス発火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を示唆している。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。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。