

博士論文  
樹状突起による神経情報の選定

小林 千晃

# 目次

略語一覧	3
要旨	4
緒言	5
実験方法・使用薬物	7
海馬切片培養標本の作製	7
海馬急性切片標本の作製	7
<i>In vitro</i> ホールセルパッチクランプ記録	8
<i>In vivo</i> ホールセルパッチクランプ記録	9
スパインの $\text{Ca}^{2+}$ イメージング	9
超解像イメージング	10
シミュレーション	11
affinity propagation を用いたスパインのクラスタリング	12
ロジスティック回帰分析	12
スパイン活動の非線形加算と線形加算の比較	13
データ解析と表示	14
結果	15
シナプス入力の大規模高速イメージング	15

一部のシナプス入力は細胞体に伝わらない	16
抑制性シナプス入力が興奮性シナプス入力を無効化している	17
特定のスパイン集団へのシナプス入力 that 細胞体に伝わる	19
図	21
図 1	21
図 2	23
図 3	24
図 4	26
図 5	28
図 6	30
補足図 1	31
補足図 2	32
補足図 3	33
補足図 4	34
補足図 5	35
考察	36
参考文献	42
謝辞	47

## 略語一覽

EPSC : Excitatory Postsynaptic Current

GABA :  $\gamma$ -amino butyric acid

GBSS : Gey's balanced salt solution

HBSS : Hanks' balanced salt solution

ACSF : artificial cerebrospinal fluid

NMDA : N-methyl-D-aspartate

AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

EPSP : Excitatory postsynaptic potential

$V_h$  : holding membrane potential

$E_{Cl^-}$  : equilibrium potential for chloride ion

BIC : Bayesian information criterion

CNQX : 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

AP5 : D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid

## 要旨

ニューロンは、樹状突起を用いて周囲の細胞から情報を受け取っている。樹状突起は情報をシナプス入力として受容し、脱分極応答として細胞体へ伝えている。複数のシナプス入力は樹状突起を伝わる過程で加算され、細胞体をより大きく脱分極させる。このとき、ニューロンは発火閾値に達するほど脱分極されると活動電位を発生させ、さらに下流の細胞へと情報を出力する。

本研究において私は、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法を改良し、最大 428 個のスパインからミリ秒単位の時間精度で  $\text{Ca}^{2+}$ 活動を捉えることを可能にした。本手法とホールセルパッチクランプ記録法を組み合わせ、樹状突起と細胞体からシナプス入力に対する応答を記録した。その結果、およそ半数の興奮性シナプス入力が細胞体で興奮性シナプス後電流 (EPSC) として記録されなかった。これは、樹状突起が受け取った情報の一部は細胞体に伝わらず無効化されていることを意味している。さらに私は、抑制性シナプス入力が興奮性シナプス入力を無効化していることを見出した。また、このシナプス入力の無効化は、樹状突起の局所で行われていることもわかった。そして、樹状突起は特定のスパイン集団への同期シナプス入力だけを細胞体に伝えていることも明らかにした。つまり、樹状突起は抑制性シナプス入力を用いて細胞体へ伝える情報を選定していると考えられる。こうした樹状突起による情報選定機構は、外界から得られる情報の変化に対し、神経回路が迅速に対応する柔軟性の基盤となっていると推察される。

## 緒言

ニューロンは細胞体から樹状突起と呼ばれる線維構造を伸ばしている。樹状突起は周囲の細胞から情報として興奮性シナプス入力を受け取っている。複数の細胞からのシナプス入力は細胞体へ伝わる過程で統合され、細胞体を脱分極させる (Eccles, 1964)。この際、ニューロンは発火閾値に達するほど脱分極されると活動電位を発生させ、さらに下流の細胞へと情報を出力することができる。

樹状突起による興奮性シナプス入力の統合は非線形に行われる。樹状突起上には、様々な種類の受容体やチャネルが発現している (Migliore and Shepherd, 2002)。また、樹状突起は複雑に枝分かれをしている (Mainen and Sejnowski, 1996)。その結果、シナプス入力は受け取られる樹状突起の部位やタイミングによって細胞体に与える影響が異なる (Mainen and Sejnowski, 1996; Reyes, 2001)。そのため、樹状突起は興奮性シナプス入力を、その時空間パターンに基づいて非線形に統合している。つまり、樹状突起は興奮性シナプス入力の時空間パターンを読み取ることで、ニューロンの活動動態を多様化することができる (London and Hausser, 2005; Major et al., 2013; Spruston, 2008)。そして、こうした樹状突起によるシナプス入力の情報演算は、様々な脳領域の機能に関与することが示唆されている (Lavzin et al., 2012; Sheffield et al., 2015)。

ニューロンは興奮性シナプス入力に加えて抑制性シナプス入力も受け取っている。抑制性シナプス入力は、GABA 受容体を活性化することで、膜コンダクタンスの上昇や膜電位の過分極を惹起する。抑制性入力は、細胞体、樹状突起、スパイン、あるいは軸索など、興奮性入力とは異なり、ニューロンのあらゆる部位でシナプスを形成している。そして、これらの部位の GABA 受容体を活性化させることで、ニューロンの発火頻度、タイミング、またはシナプス可塑性

など、ニューロンの興奮性を調節している (Eichler and Meier, 2008; Lovett-Barron et al., 2012; Mizunuma et al., 2014; Royer et al., 2012)。つまり、樹状突起による情報演算は、興奮性シナプス入力の時空間パターンに加えて、興奮・抑制の interaction によって行われていると言える。

興奮・抑制の interaction が樹状突起による情報演算に担う重要性が認識される一方で、個々の興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力とのような interaction しているのかについては十分な知見がない。これまでの興奮・抑制間の interaction に関する研究では、抑制性ニューロンを人工的に一斉に活性化する手法が採られている。また、そうした人為的な操作によらない手法を用いた研究においては、細胞体からの電気的な記録を行うに留まっている。そのため、個々の興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力によって樹状突起上で受ける制御機構については全く理解が進んでいない。

本研究で私は、数百に及ぶスパインの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動をミリ秒単位の時間精度で捉える手法を開発した。本手法とホールセルパッチクランプ記録法を組み合わせることで、自発活動下の神経回路において興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力から細胞体へ伝わる様子を観察した。そして、個々の興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力によって細胞体へ伝わる過程で受ける制御機構に迫った。

## 実験方法・使用薬物

実験は東京大学の動物実験実施マニュアルに従い、動物への苦痛を最小限に抑えるよう配慮した。

### 海馬培養切片標本の作成

ラット（SLC、7日齢）を氷冷とイソフルランにより麻酔した後断頭し、全脳を摘出した。脳は、氷冷した GBSS（Gey's balanced salt solution、25 mM になるように glucose を添加）中で、ビブラトーム（DTK-1500、Dosaka）を用いて水平断切片（300  $\mu\text{m}$ ）を作製した。作製した切片から海馬（嗅内皮質を含む）をマイクロナイフで切り出し、多孔質膜（JHWP02500、Millipore）上に静置した。GBSS を 95%  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  ガスでバブリングした状態で切片を作製した。切片には 1ml の培地を添加し、5%  $\text{CO}_2$ 、35  $^\circ\text{C}$  で培養した。培地の組成は、50% minimal essential medium（Invitrogen）、25% Hanks' balanced salt solution, 25% horse serum（Gibco）とし、3.5 日ごとに培地を交換した。培地は抗生物質（ペニシリン・ストレプトマイシン）を添加して使用した。実験には、11-19 日間培養したスライスを用いた。実験時にはスライスを記録チャンバーに移動し、人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid、以下 ACSF）を還流した（1.5-3 ml/min）。実験中、ACSF を 95%  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  ガスでバブリングした。ACSF の組成は（mM）、127 NaCl, 26  $\text{NaHCO}_3$ , 3.5 KCl, 1.24  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.3  $\text{MgSO}_4$ , 2.4  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucose, 0.4 Trolox とした。一部の実験では、50  $\mu\text{M}$  CNQX と 50  $\mu\text{M}$  AP5 を ACSF 中に添加して行った。

### 海馬急性切片標本の作製

C57BL/6J マウス（SLC、4-6 週齢）をイソフルランで麻酔した後断頭した。全脳を摘出した後、氷冷した modified ACSF 中に静置した。modified ACSF の組成は

(mM)、222.1 sucrose, 27 NaHCO<sub>3</sub>, 1.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 ascorbic acid とした。95%O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ガスでバブリングした modified ACSF 中で、ビブラトーム (VT1200S、Leica) を用いて海馬を含む水平断切片 (400 μm) を作製した。スライスは室温で 1.5 時間回復させた後、記録チャンバーに移して実験に使用した。記録チャンバーには、95%O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ガスでバブリングした ACSF を還流した (1.5-3 ml/min)。ACSF の組成は (mM)、127 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.6 KCl, 1.24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose とした。

#### *In vitro* ホールセルパッチクランプ記録

記録は 32-33 °C で行った。海馬 CA3 錐体細胞より二細胞 (100 μm 以内) から同時パッチクランプ記録を行った。記録は、MultiClamp 700B amplifier と Digidata 1550 digitizer で行い、pCLAMP10.5 software (Molecular Devices) で制御した。ガラス電極 (3-6 MΩ) は、細胞内液を充填して使用した。細胞内液の組成は (mM)、130 CsMeSO<sub>4</sub>, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, 10 QX-314 とした。また、一方の電極には picrotoxin (200 μM) を含む細胞内液を充填した。細胞内液に 100 μM の Alexa Fluor 488 hydrazide、あるいは Alexa Fluor 568 hydrazide を加えて記録細胞を可視化した。撮影は、ニポウ型共焦点顕微鏡 (CSUX-1、Yokogawa Electric)、CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0 V2、Hamamatsu Photonics)、水浸レンズ (16×、0.80 numerical aperture、Nikon) で行った。画像取得には、専用のソフト (HSR、Hamamatsu Photonic) を使用した。液面電位は補正しなかった。シグナルはノイズを最小限に抑えるために、5-10 倍増幅し、1 kHz の low-pass フィルターにかけ、20 kHz で取得した。

### *In vivo* ホールセルパッチクランプ記録

C57BL/6J マウス (SLC、5-6 週齢) を ketamine (50 mg/kg, i.p.) と xylazine (10 mg/kg, i.p.) で麻酔した。肢の逃避、ヒゲの動き、瞬きの有無から麻酔がかかっていることを確認した。その後頭皮を取り除き、頭部固定プレートを装着した。二日間の回復期間を置き、マウスには、実験装置への順化トレーニングを受けさせた (1-3 時間/日)。順化後、マウスは ketamine と xylazine で麻酔した。Bregma から後方に 2.0 mm、sagittal suture より外側に 2.0 mm の位置を中心に、 $1 \times 1 \text{ mm}^2$  のサイズで頭骨を取り除いた。手術部位は、0.2% lidocaine で麻酔した状態にした。硬膜を外科的に取り除き、露出した皮質表層を 1.8% agar で 0.5 mm の厚さになるように覆った。実験中は、ヒートパッドで保温し、直腸体温が 37 °C になるようにした。麻酔から回復後、記録を開始した。ガラス電極 (3.3–5.8 M $\Omega$ ) は、細胞内液を充填して使用した。細胞内液の組成は (mM)、130 CsMeSO<sub>4</sub>, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, 3 QX-314, 0.05 Alexa Fluor 594, 0.2% biocytin とした。また、一方の電極には picrotoxin (200  $\mu\text{M}$ ) を含む細胞内液を充填した。軟膜から 150-350  $\mu\text{m}$  の深さで、L2/3 ニューロンから記録を行った。各ニューロンは、電流注入に対する発火特性を調べ、錐体細胞であると考えられる regular spiking ニューロンを解析に用いた。シグナルは、2.0 kHz の low-pass フィルターにかけ、20 kHz で取得した。記録部位は、実験後細胞内液に添加した Alexa Fluor 594 の蛍光により確認した。マウスへのストレスを最小限に抑えるため、記録は一時間以内で行うようにした。

### スパインの Ca<sup>2+</sup>イメージング

記録は、32-33 °C で、海馬 CA3 錐体細胞より行った。記録は、MultiClamp 700B amplifier と Digidata 1550 digitizer で行い、pCLAMP10.5 software (Molecular Devices)

で制御した。ガラス電極 (3-6 M $\Omega$ ) は、細胞内液を充填して使用した。細胞内液の組成は (mM) 、47.7 CsMeSO<sub>4</sub>, 92.3 CsCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, 10 QX-314, 0.2 fluo-4 とした。一部の実験では、電極には picrotoxin (200  $\mu$ M) を含む細胞内液を充填した。記録は、NMDA 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>流入を増強するため、-30mV に細胞を固定して行った (Takahashi et al., 2012) 。固定電位-30mV で EPSC を記録するために、細胞内液の塩化物イオン濃度を  $E_{Cl^-} = -10$  mV となるように調整した (補足図 1) 。シグナルはノイズを最小限に抑えるために、5-10 倍増幅し、1 kHz の low-pass フィルターにかけ、20 kHz で取得した。撮影は、一秒当たり 100-333 frame/s で、ニポウ型共焦点顕微鏡 (CSUX-1、Yokogawa Electric) 、CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0 V2、Hamamatsu Photonics)、水浸レンズ (60 $\times$ 、1.0 numerical aperture、Nikon) で行った。画像取得には、専用のソフト (HSR、Hamamatsu Photonic) を使用した。蛍光色素は、argon-krypton laser (641-YB-A01; Melles Griot) を用いて、488 nm (0.2–0.4 mW) で励起し、500 nm long-pass emission フィルターで可視化した。蛍光変化率  $\Delta F/F$  は、 $(F_t - F_0)/F_0$  として計算した。 $F_t$  は、時間  $t$  における蛍光強度を、 $F_0$  はベースの蛍光強度を意味している。スパインの蛍光強度上昇の onset は半自動的に検出した (Szymanska et al., 2015) 。

### 超解像イメージング

スパイン形態を観察するために、ガラス電極に 100  $\mu$ M Alexa Fluor 568 hydrazide を加えて、Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。Ca<sup>2+</sup>イメージング後、電極を記録細胞から慎重に外し、速やかに、室温で 4% PFA に 12 時間以上静置して固定した後、PBS で三回洗浄した。超解像画像の取得は、FV-OSR を搭載した共焦点顕微鏡 (FV 1200、Olympus) 、油浸レンズ (100 $\times$ 、1.4 numerical aperture、Olympus) を用い、

Fluoview image acquisition software (Olympus)で制御して行った。Alexa Fluor 594 は、559 nm で励起した。Ca<sup>2+</sup>イメージング時に観察したスパインは、超解像画像と Ca<sup>2+</sup>イメージング画像を照らし合わせて検出した。スパインの head volume は、スパインの head の直径  $\phi$  を用い、 $4\pi(\phi/2)^3/3$  として推定した。スパインの直径  $\phi$  は、Z-step (0.5–1  $\mu\text{m}$  steps) した画像から得られるスパインの最大直径から計測した。スパインの neck length は、スパインの head の重心からスパインが位置する樹状突起までの距離を計測した。

#### シミュレーション

海馬 CA3 錐体細胞における短絡抑制を NEURON v7.3 を用いてシミュレーションした (Hines and Carnevale, 1997)。1,213 個のコンパートメント ( $C_m = 1.41 \mu\text{F cm}^{-2}$ ;  $R_m = 25.37 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ ;  $R_a = 50 \Omega \text{ cm}$  (軸索)、あるいは  $150 \Omega \text{ cm}$  (その他)) からなる CA3 錐体細胞をモデルに使用した (Safiulina et al., 2010)。モデルには、2 種類の Na<sup>+</sup>電流、5 種類の K<sup>+</sup>電流 (delayed rectifier, K<sub>v</sub>7, A-type, calcium-activated, afterhyperpolarization)、3 種類の Ca<sup>2+</sup>電流 (L-type, N-type, T-type)、非特異的 I<sub>h</sub> 電流を組み込んだ。静止膜電位は -70mV とした。glutamate に対する応答には、AMPA 受容体と NMDA 受容体を介した電流を用いた (Baker et al., 2011)。AMPA 受容体と NMDA 受容体の最大コンダクタンスは、それぞれ最大 1.0 nS と 0.2 nS に設定した。glutamate を細胞体から 406  $\mu\text{m}$  の位置で与えたときに、細胞体では、0.226 mV の EPSP、あるいは -9.7 pA の EPSC ( $V_h = -70 \text{ mV}$ ) として記録された。GABA 性電流は、二重指数関数を用いてモデルに組み込んだ (rise time constant = 1.4 ms, decay time constant = 12.5 ms)。GABA 性電流の逆転電位は、-70mV とし、最大コンダクタンスは特に記載がない限り 10 nS に設定した。減衰時定数は 20ms とし実験上得られる値と一致させた (Liu, 2004)。GABA 性電流は、細胞体から

406  $\mu\text{m}$  の位置で与えたときに 5.7 pA の抑制性シナプス後電流 (inhibitory post synaptic current, IPSC、 $V_h = 0 \text{ mV}$ ) として細胞体で記録された。EPSC と IPSC の比は積分値から計算した。

#### affinity propagation を用いたスパインのクラスタリング

各細胞について、affinity propagation を用いてスパインをクラスタリングした (Frey and Dueck, 2007; Takahashi et al., 2010)。クラスタリングには、スパインペア間の同期活動数を用いた。affinity propagation では、グループ数が 5 になるように、'preference' を設定した。'preference' とは、ここでは各スパインのクラスター中心への選ばれやすさを示す尺度である。また、一部の細胞では、グループ数が 5 にならなかった。そこで、5 グループに一番近い 4-8 グループに分類される preference を使用した。

#### ロジスティック回帰分析

スパイン活動が細胞体に及ぼす影響力をロジスティック回帰分析により推定した。120 s 間の記録時間を 30 ms の bin に分割し、 $t = 1, \dots, T$  の番号を付けた。 $x_{t,i}^n$  は、グループ  $n$  に属するスパイン  $i$  に関して、時間  $t$  で活動があれば 1 を、活動がなければ 0 を示す。時間  $t$  における EPSC の発生確率 ( $\pi_t$ ) モデルをロジスティック回帰分析で推定した。

$$\log \frac{\pi_t}{1 - \pi_t} = \alpha + \sum_n \left[ \beta_n \sum_i x_{t,i}^n \right]. \quad \text{--- (1)}$$

$\alpha$  は、観察視野外のスパイン活動が  $\pi_t$  に及ぼす効果を示している。 $\beta_n$  は、スパイングループ  $n$  へのシナプス入力  $x_{t,i}^n$  が  $\pi_t$  に及ぼす影響力を示している。 $y_t$  は、時間  $t$  で EPSC が記録されていれば 1 を、記録されていなければ 0 を示す。各時間にお

ける EPSC 発生確率は、ベルヌーイ分布に従うとして、対数尤度関数を以下に示す。

$$\log p(\{y_t\}|\alpha, \beta_n) = \sum_t y_t \log \pi_t + (1 - y_t) \log(1 - \pi_t). \quad \text{--- (2)}$$

$\beta_n$  の事前分布は、平均が 0 であるガウス分布とした。

$$p(\beta_n) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\beta_n^2/2\sigma^2}, \quad \text{--- (3)}$$

標準偏差  $\sigma$  は、全スパイングループで同一にした。対数事後確率分布の最大化によりパラメータを推定した。

$$L(\alpha, \beta_n) = - \sum_t y_t \log \pi_t + (1 - y_t) \log(1 - \pi_t) + \frac{1}{2\sigma^2} \sum_n \beta_n^2. \quad \text{--- (4)}$$

$\sigma$  は、クロスバリデーションを 5 回繰り返し、one standard error rule により決定した (Hastie et al., 2009)。

スパイン活動の非線形加算と線形加算の比較

同期スパイン活動が EPSC 発生確率に対し非線形に影響する可能性を検証した。EPSC 発生確率を、スパイン活動の線形加算のみを考慮したモデル (式(1)) に加え、同期スパイン活動の非線形加算を加えたモデルを推定した。

$$\log \frac{\pi_t}{1-\pi_t} = \alpha + \sum_n [\beta_n \sum_j x_{t,i}^n] + \sum_n [\gamma_n \sum_{i<j} x_{t,i}^n x_{t,j}^n], \quad \text{--- (5)}$$

$\gamma_n$  は、グループ  $n$  内のスパインが同期した時に、EPSC 発生確率に及ぼす影響力を示している。モデルの比較にはベイズ情報量基準を (Bayesian information criterion (BIC)) 用いた。あるモデル  $\mathcal{M}$  の BIC は以下の式に従う。

$$\text{BIC} = -2 \log p(\{y_t\}|\hat{\theta}, \mathcal{M}) + k \log T, \quad \text{--- (6)}$$

$\hat{\theta}$  は、パラメータの推定値を、 $k$  はパラメータの数を、 $T$  は bin の数を示している。BIC が小さいほどデータを良く記述できていることを意味している (Hastie et al., 2009)。

## データの解析と表示

データ解析には、matlab、ImageJ、NEURON で自作したアルゴリズムを使用した。データは特に記載がない限り、 $\text{mean} \pm \text{SD}$  で示した。

## 結果

### シナプス入力の大規模高速イメージング

自発活動下の神経回路では、ニューロンは多数のシナプス入力を絶えず受け取っている。そのため、細胞体では絶えず EPSC が記録された (図 1B)。従来の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングがもつ数十ミリ秒の時間精度分では、個々のスパインへのシナプス入力と EPSC を対応付けることは困難であった。そこで本研究では、光学系の改良と実験手技の改善をもって、ミリ秒単位の時間精度で、数百におよぶスパインから大規模にシナプス入力を可視化した (図 1A)。本研究では、培養海馬切片を使用した。培養海馬切片は、急性脳スライスや生体脳に比べ組織が比較的透明であり、光の散乱が少なく高速イメージングに適している。 $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 fluo-4 (200  $\mu\text{M}$ ) は、ホールセルパッチクランプ法により CA3 錐体細胞に負荷した。また、細胞を -30 mV に固定することで、シナプス入力時の NMDA 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を増強した。本手法を用いることで、一細胞当たり  $220 \pm 78$  個のスパインから 100-333 frames/s で  $\text{Ca}^{2+}$  活動を記録することができた (mean  $\pm$  SD of 24 videos from 24 neurons, 128-428 spines)。記録 (180-300 s) した全 5,279 スパイン中、4,457 スパインが自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  活動を示した ( $2.2 \pm 1.2$  per minute)。スパインの  $\text{Ca}^{2+}$  活動は、NMDA 受容体阻害薬で観察されなくなることから (Takahashi et al., 2012)、興奮性シナプス入力によって生じると考えられる。また、シナプス入力時には別のスパインの活動頻度が増大したことから (図 1B)、樹状突起は同期シナプス入力を受け取っていると推察される。

本研究では、NMDA 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を増強するために細胞を -30 mV に固定して行った。通常、-30 mV 固定化では抑制性シナプス後電流 (Inhibitory post synaptic current, IPSC) が記録されるため、電極内液の塩化物イオン濃度を調節して EPSC を記録した (補足図 1)。この記録条件下でスパインの活動と

EPSC を記録したところ、全体としてはスパイン活動時に EPSC 頻度が増加していた (図 1B)。このことから、本実験系でシナプス入力を EPSC として記録できていることが伺える。

一部のシナプス入力は細胞体に伝わらない

本手法を用いて、個々のスパインへのシナプス入力と EPSC のタイミングを比較したところ、一部のシナプス入力は細胞体で EPSC として記録されなかった (補足図 2)。観察した全シナプス活動中 (15229 inputs from 4457 spines of 15 neurons)、48.6% (7394 inputs) は、細胞体の EPSC と同時に記録されなかった。また、同一のスパインの活動であっても EPSC が記録される時と記録されない時があった (図 1C)。そこで、各スパインへのシナプス入力が EPSC として記録された確率 (EPSC probability) を計算した。EPSC probability は、5 回以上活動を示したスパインについてのみ計算した。EPSC probability はスパインごとに様々な値を示した ( $52.0 \pm 19.5\%$  of 1,282 spines from 15 control videos、図 1D-E)。

EPSC probability はスパインのシナプス入力頻度やスパインの細胞体からの距離と相関しなかった (シナプス入力頻度:  $r = 3.5 \times 10^{-2}$ 、細胞体からの距離:  $r = 5.1 \times 10^{-4}$ 、図 2A-B)。また、全スパインペア間の EPSC probability の差は、スパイン間距離と相関しなかった ( $r = 0.013$ 、図 2C)。スパインは形態によって電気的性質が異なる。そこで、スパインの形態上の特徴と EPSC probability との関係を調べるために、超解像イメージングによってスパイン形態を捉えた (図 2D)。Alexa fluor 568 hydrazide を充填したパッチ内液 (fluo-4 を含む) を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った後、PFA で固定し超解像顕微鏡で観察した。そして、超解像画像と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング画像を照合し、スパイン head volume や neck length と EPSC probability との関係を調べた。その結果、EPSC probability はスパイン head volume

や neck length と相関しなかった (volume:  $r = 4.7 \times 10^{-2}$ ,  $P = 0.68$ 、図 2D、neck length:  $r = 7.3 \times 10^{-2}$ ,  $P = 0.58$ 、図 2E)。これらの結果は、スパインの位置や形態では、シナプス入力 of 細胞体への伝わりやすさを説明できないことを意味している。

AMPA 受容体は、興奮性シナプスの伝達物質 glutamate の主要な受容体である。AMPA 受容体は、glutamate を受容すると一過的に脱感作することが知られている (Trussell et al., 1993)。このことから、スパインはシナプス入力を受け取ると発現している AMPA 受容体が脱感作し、直後のシナプス入力に対して電気応答を起こせなくなる可能性が考えられる。AMPA 受容体の脱感作が本現象のメカニズムであるとするれば、細胞体の EPSC と同時に起きる有効なシナプス活動後に一過的に有効なシナプス活動頻度が低下すると予想される。しかし、脱感作に起因すると考えられる有効なシナプス活動頻度の低下は観察されなかった (補足図 3)。つまり、AMPA 受容体の脱感作は本現象との関連がないと推察される。

最後に、有効なシナプス活動と無効なシナプス活動で  $\text{Ca}^{2+}$  流入量 ( $\% \Delta F/F$ ) を比較したところ、有効なシナプス活動の方が大きかった ( $P = 9.4 \times 10^{-27}$ ,  $t_{719} = 11.2$ , paired *t*-test、図 2F)。 $\text{Ca}^{2+}$  流入量は、伝達物質の放出量、受容体の発現量、または抑制性シナプス入力の有無などによって異なる。抑制性シナプス入力は脳内の情報伝達を制御する重要な因子である。近年、抑制性シナプス入力 that スパインへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を制御していることが示唆されている (Chiu et al., 2013; Mullner et al., 2015)。そこで、樹状突起への抑制性シナプス入力 (Liu, 2004) が興奮性シナプス入力を無効化していると考えた。

抑制性シナプス入力が興奮性シナプス入力を無効化する

本現象への抑制性シナプス入力の関与を検証するために、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬 picrotoxin を細胞内適用した (Inomata et al., 1988; Nelson et al., 1994)。その結

果、EPSC probability の分布はコントロールに比べ、高確率側にシフトした( $P = 2.4 \times 10^{-32}$ ,  $D_{1883} = 0.30$ , コントロール:  $n = 1283$  spines, picrotoxin:  $n = 602$  spines、図 3A-B)。つまり、抑制性シナプス入力 that シナプス活動の有効性を決定していると考えられる。picrotoxin の細胞内適用がスパインの入力頻度に影響しないことは確認している (補足図 4)。

もし抑制性シナプス入力 that 興奮性シナプス入力を無効化しているのであれば、picrotoxin の適用により EPSC の頻度が増加すると予想される。そこで、二細胞から同時にパッチクランプ記録を行うことで picrotoxin の影響を調べた。その結果、picrotoxin 適用によって EPSC 頻度が増加することがわかった ( $P = 0.02$ ,  $t_{10} = 2.75$ , paired  $t$ -test,  $n = 11$  pairs、図 3C-D)。同様の結果は、海馬急性スライスを用いた CA3 錐体細胞からの二細胞同時記録でも確認しできた (図 3E)。また、*in vivo* マウスの視覚野 L2/3 錐体細胞においては、picrotoxin が EPSC の charge を増加させた (図 3F)。以上より、抑制性シナプス入力 that シナプス活動の有効性を決定していると考えられる。

抑制性シナプス入力による興奮性シナプス入力の無効化が樹状突起のどこで行われているのかを NEURON を用いて検証した (図 4)。電位固定モードで、樹状突起へ興奮性シナプス入力 (1.2 nS, 405  $\mu$ m from soma) を与え、それと同時に抑制性シナプス入力を様々な位置で与えた (図 4A)。その結果、興奮性シナプス入力部位への抑制性シナプス入力 that 最も効率よく EPSC を減弱させることができた (図 4A-B)。次に、抑制性シナプス入力部位を興奮性シナプス入力部位に固定し、タイミングと強度を調節した。すると、抑制性シナプス入力を同じタイミングで与えたとき、最も効率よく EPSC を減弱させることができた (図 4C)。また、抑制性シナプス入力の強度が強いほど、減弱効果が得られる時間枠は広がった (図 4D)。同様の結果は電流固定モードでも得られた (補足図 5)。

以上の結果から、個々のスパインへの興奮性シナプス入力、抑制性シナプス入力が同時に近傍に受け取られることで無効化されていると考えられる。

特定のスパイン集団へのシナプス入力が細胞体に伝わる

神経回路内では、様々な細胞集団がしばしば同期した活動を示している (Takahashi et al., 2010)。そこで、同期シナプス入力と細胞体における EPSC の発生との関係に注目した。同期シナプス入力数が多いほど EPSC は大きく、probability も高くなるが、80%付近で飽和した (図 5A)。この結果は、一部の同期シナプス入力が細胞体に到達していないことを意味している。また、同期シナプス入力を受け取るスパインペアによって EPSC probability が異なっていた (図 5B)。この結果から私は、細胞体に EPSC を発生させるには、同期シナプス入力を受け取るスパインの組み合わせが重要であると考えた。

そこでスパインの組み合わせとシナプス入力の細胞体への伝わりやすさの関係をロジスティック回帰分析で統計的に検証した。まず、EPSC を発生させるスパインの組み合わせを調べるために、スパイン間の同期数に基づいて、affinity propagation でスパインを5つの集団に分類した (Frey and Dueck, 2007; Takahashi et al., 2010)。そして、各スパイン集団へのシナプス入力と EPSC の発生確率の関係をロジスティック回帰分析でモデル推定した。ここでは、同期シナプス入力を線形にのみ加算するモデル ( $\alpha+\beta$ ) と同期シナプス入力の非線形な加算を考慮したモデル ( $\alpha+\beta+\gamma$ ) を用意した (図 5C)。各グループには、シナプス入力が EPSC の発生に寄与する線形係数  $\beta_n$  と非線形係数  $\gamma_n$  を推定した。ベイズ情報量基準は  $\alpha+\beta$  モデルの方が、 $\alpha+\beta+\gamma$  モデルより低かった。つまり、スパインの同期活動による非線形効果を考慮しない  $\alpha+\beta$  モデルの方が EPSC の発生確率を良く記述できることがわかった ( $P = 4.2 \times 10^{-8}$ ,  $t_{13} = 11.3$ , paired  $t$ -test, 図 5C)。同時に、こ

の結果は樹状突起がシナプス入力を線形に加算していることを示唆している (Cash and Yuste, 1999)。

全スパイン集団から推定した線形性  $\beta$  の分布は二峰性混合ガウス分布を示した (fig. 11e#1 ピーク:  $0.02 \pm 0.05$ , #2 ピーク:  $0.22 \pm 0.14$ , 図 5D)。これは、スパイン集団を、シナプス入力に EPSC の発生に寄与するスパイン集団と寄与しないスパイン集団に分類できることを意味している。そこで、帰無仮説  $\beta = 0$  に対する統計的有意性に基づいて、スパイン集団を有意であるグループ ( $\beta > 0$ ) と有意でないグループ ( $\beta \approx 0$ ) に分けた (図 5E)。すると、平均で、一細胞当たり  $62 \pm 11\%$  のスパイングループが  $\beta > 0$  であり、 $38 \pm 11\%$  のスパイングループが  $\beta \approx 0$  であることがわかった (mean  $\pm$  SEM of 14 neurons)。これら二つのグループ間に細胞体からの距離に差はなかった ( $P = 0.26$ ,  $U = 607$ , Mann-Whitney  $U$ -test,  $\beta > 0$ :  $n = 29$  sets,  $\beta \approx 0$ :  $n = 15$  sets, 図 5F)。また、先行研究により樹状突起は、局所に同期したシナプス入力を受け取る *assemblet* と呼ばれるスパイン群があることがわかっている (Takahashi et al., 2012)。しかし、 $\beta > 0$  と  $\beta \approx 0$  の間に *assemblet* の数に差はなかった ( $P = 0.24$ ,  $U = 700$ , 図 5G)。これらの結果は、シナプス入力が細胞体に伝わる成否がスパイン集団の樹状突起上の分布に依存しないことを示唆している。

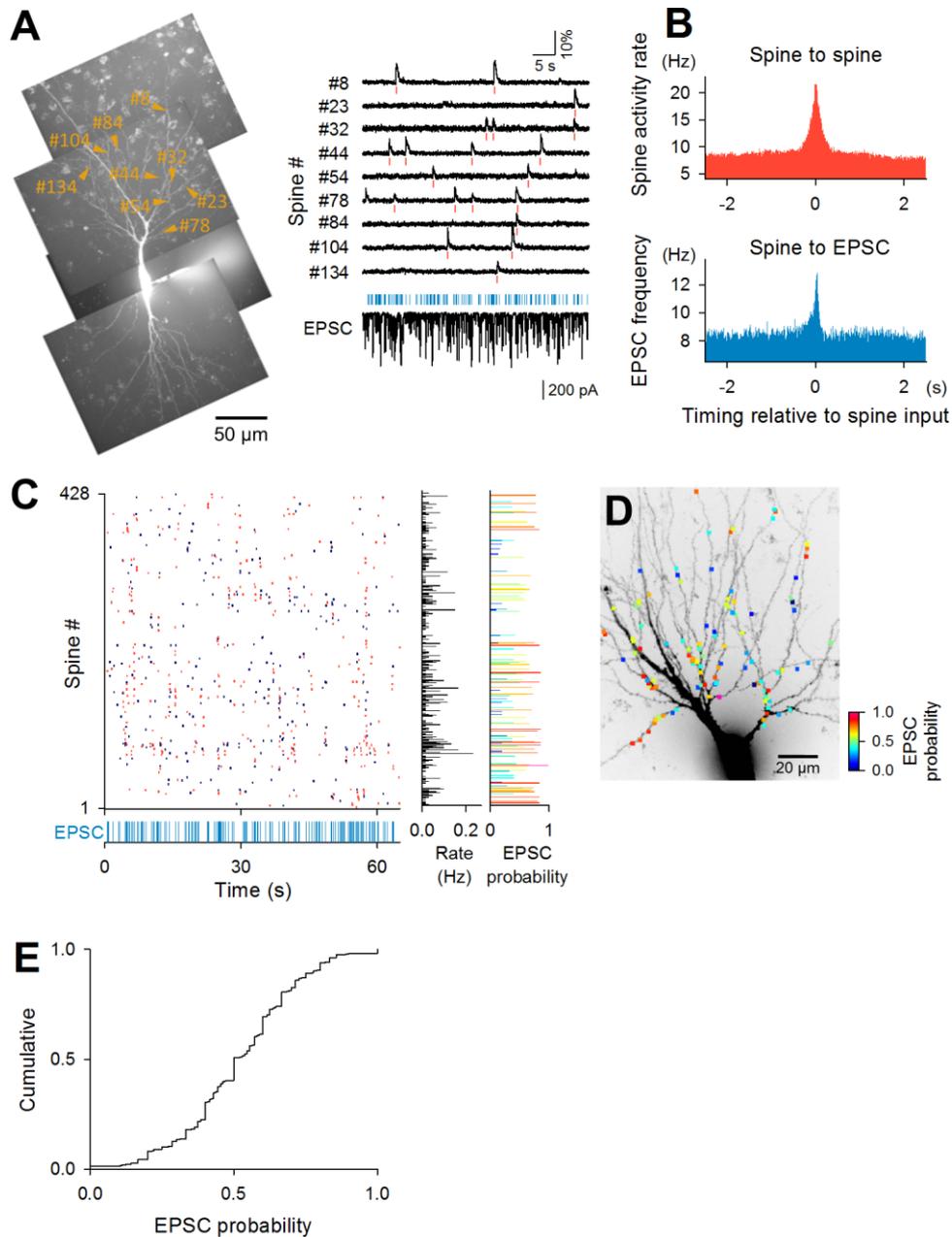


図 1 | およそ半数のシナプス入力は細胞体に伝わらない

(A) 海馬 CA3 錐体細胞の蛍光画像 (left)。ガラス電極に充填した  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 fluo-4 を、ホールセルパッチクランプ記録法により細胞に負荷した。代表的な 9 個のスパインの自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  活動のトレース (upper right) と同時に細胞体で記録された EPSC (lower right、 $V_h = -30 \text{ mV}$ )。spine# は蛍光画像と対応している

る。撮影は、333 frame/s (露光時間 = 3 ms) で行った。各トレースの下に示した赤と青のバーは、それぞれ  $\text{Ca}^{2+}$ 活動と EPSC の発生タイミングを示している。

(B)  $\text{Ca}^{2+}$ 活動前後にその他のスパインで  $\text{Ca}^{2+}$ 活動が観察される頻度 (*top*) と細胞体で記録された EPSC の頻度 (*bottom*)。  $n = 14585$  calcium events in 2811 spines from 15 neurons. (C) 全428スパインの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動のラスタプロット (*top*) と EPSC の発生タイミング (*bottom*)。赤点と黒点はそれぞれ、EPSC が同時に記録された  $\text{Ca}^{2+}$ 活動と EPSC が記録されなかった  $\text{Ca}^{2+}$ 活動を示している。右の二つの inset はそれぞれ、各スパインの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動頻度と  $\text{Ca}^{2+}$ 活動が EPSC 同時に記録された確率を示している。 (D) EPSC probability の擬似カラーマップ。 (E) EPSC probability の累積度数分布 ( $n = 1,282$  spines from 15 neurons)。

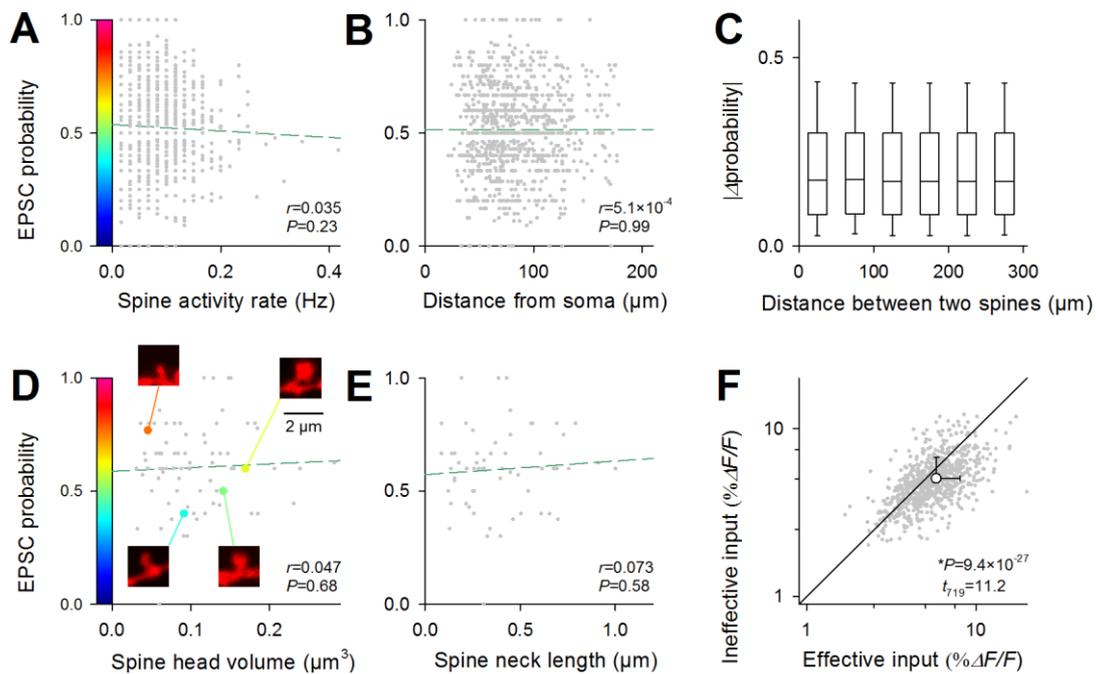


図 2 | 有効なシナプス入力は無効なシナプス入力よりも  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が多い

(A) EPSC probability はスパインの活動頻度と相関しなかった ( $n = 1,135$  spines in 15 neurons)。各点は単一スパインについて示している。緑破線は最小二乗法で推定した回帰直線。(B) EPSC probability はスパインの細胞体からの道のり距離と相関しなかった ( $n = 1,001$  spines in 9 neurons)。(C) 全スパインペア間の EPSC probability の差とスパイン間の道のり距離は相関しなかった ( $r = 0.013$ ,  $n = 68,005$  pairs in 9 neurons)。(D-E) EPSC probability はスパインの head volume や neck の長さとは相関しなかった ( $n = 61-79$  spines that could be identified *post hoc* in 8 super-resolution images)。代表的なスパインの蛍光画像を inset に示した。(F) スパインは無効なシナプス入力を受け取る時よりも、有効なシナプス入力を受け取る時の方が大きな蛍光強度変化を示した (mean  $\pm$  SD of 720 spines from 15 neurons, paired  $t$ -test)。

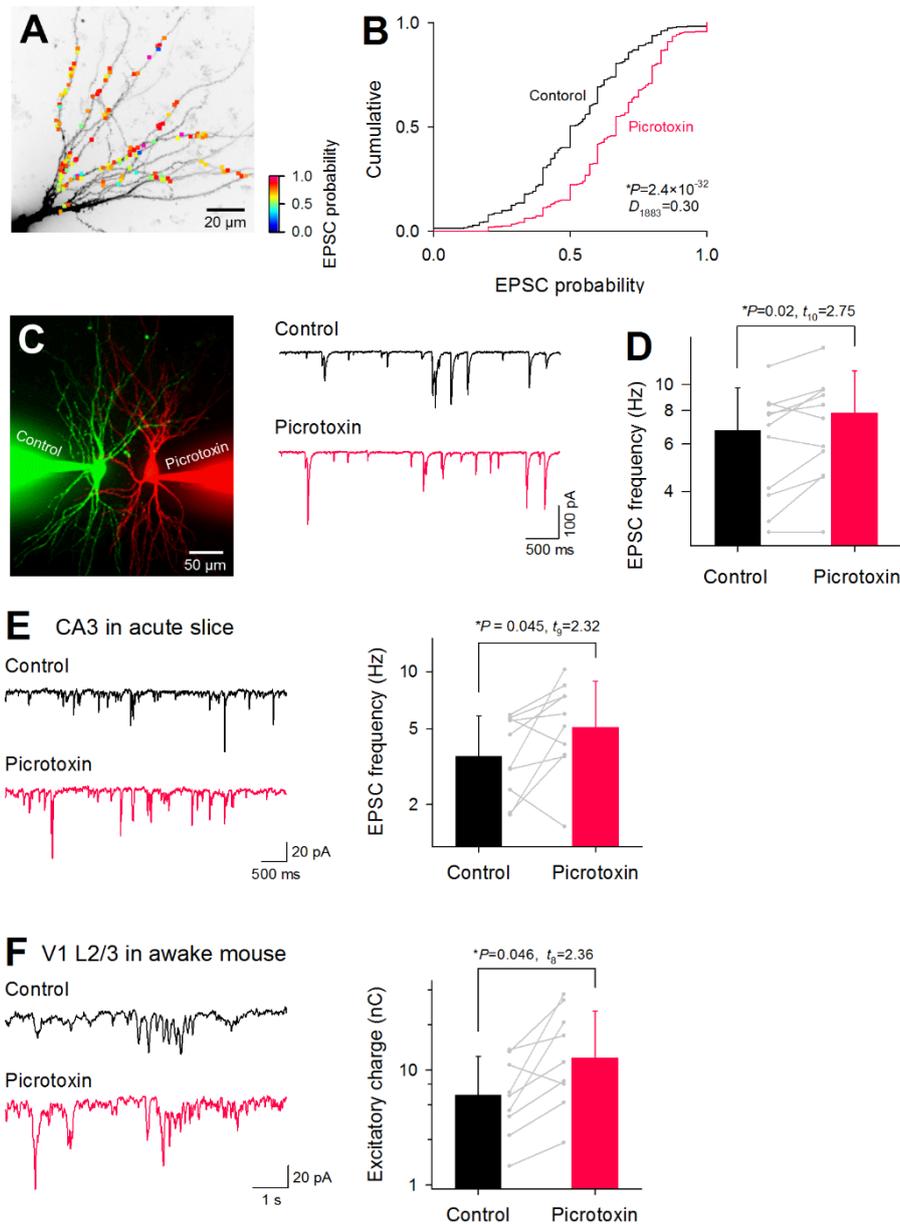


図 3 | 抑制性シナプス入力が興奮性シナプス入力を無効化する

(A) picrotoxin (200  $\mu\text{M}$ ) を細胞内適用されたニューロンの EPSC probability のマップ。(B) EPSC probability の累積度数分布 ( $n = 1,282$  spines from 15 control neurons, 602 spines from 9 picrotoxin-perfused neurons, Kolmogorov-Smirnov test)。(C) 二細胞同時ホールセルパッチクランプ記録を行った際の CA3 錐体細胞の蛍光画像 (left) と EPSC (right)。片方の細胞には (赤) picrotoxin (200  $\mu\text{M}$ ) を適用した。記録は細胞を -70 mV に固定した状態で行った。(D) picrotoxin 適用細胞の方が

EPSC 頻度は高かった (paired *t*-test, mean  $\pm$  SD of 11 pairs)。 (E) 急性スライス CA3 錐体細胞からの二細胞同時記録の EPSC (*left*) とその頻度 (*right*)。片方の細胞には (赤) picrotoxin (200  $\mu$ M) を適用した。picrotoxin 適用細胞の方が EPSC 頻度は高かった (means  $\pm$  SDs of 10 pairs from 10 slices of 9 mice, paired *t*-test)。 (F) *in vivo* マウス視覚野 L2/3 錐体細胞からの EPSC のペア記録 (*left*) と EPSC の charge (*right*)。片方の細胞には (赤) picrotoxin (200  $\mu$ M) を適用した。picrotoxin 適用細胞の方が EPSC の charge が大きかった (means  $\pm$  SDs of 9 pairs from 9 mice, paired *t*-test)。

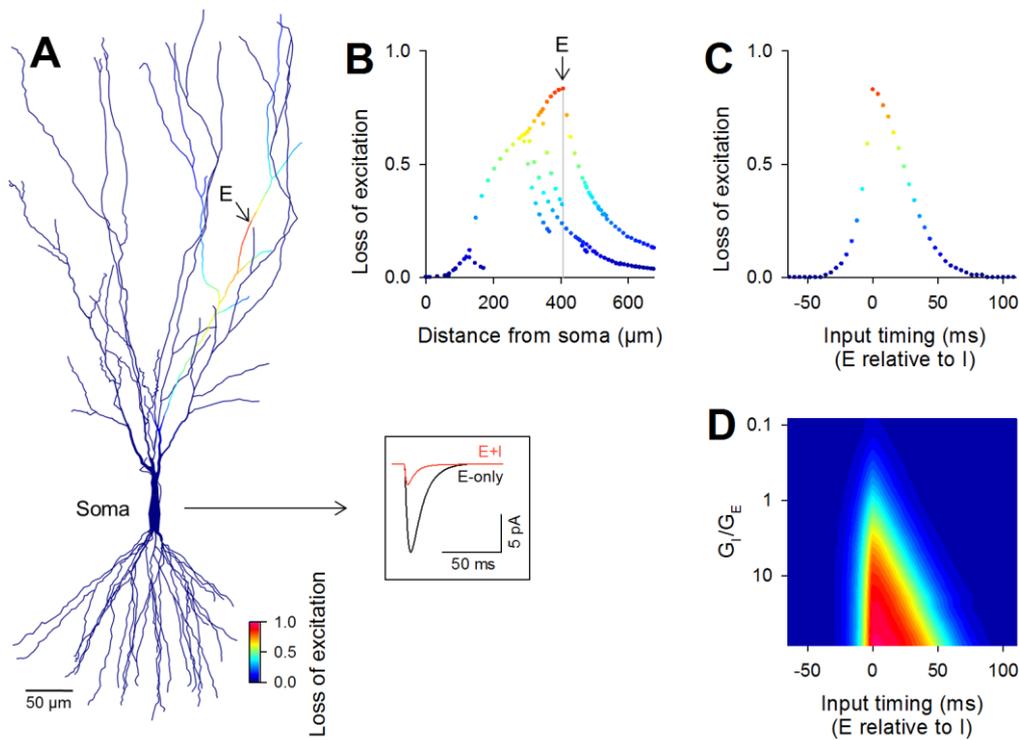


図 4 | 興奮性シナプス入力とは樹状突起上の近傍に同期した抑制性シナプス入力によって無効化される

(A) NEURON を用いて、抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力に与える影響をシミュレーションした。興奮性シナプス入力 (E) を細胞体から 405  $\mu\text{m}$  離れた位置で与えた。抑制性シナプス入力は細胞のあらゆる位置で、興奮性シナプス入力と同時に与えた。抑制性シナプス入力を与えた際の EPSC が、抑制性シナプス入力を与えなかったときの EPSC に対してどれだけ減弱したかを擬似カラーで示した。抑制があるとき (E+I) と抑制がないとき (E-only) の代表的な EPSC のトレースを inset に示した。(B) (A) と同じ結果を横軸に抑制性シナプス入力を与えた位置から細胞体までの距離をとりプロットした。(C) 抑制性シナプス入力を与えるタイミングを変えた際の EPSC の減弱度合い。抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力は細胞体から 405  $\mu\text{m}$  の位置で与えた。(D) 興奮と抑制

のコンダクタンス比と入力タイミングに対する EPSC の減弱度合いを二次元プロットした。擬似カラーのスケールは(A-D)と同じ。

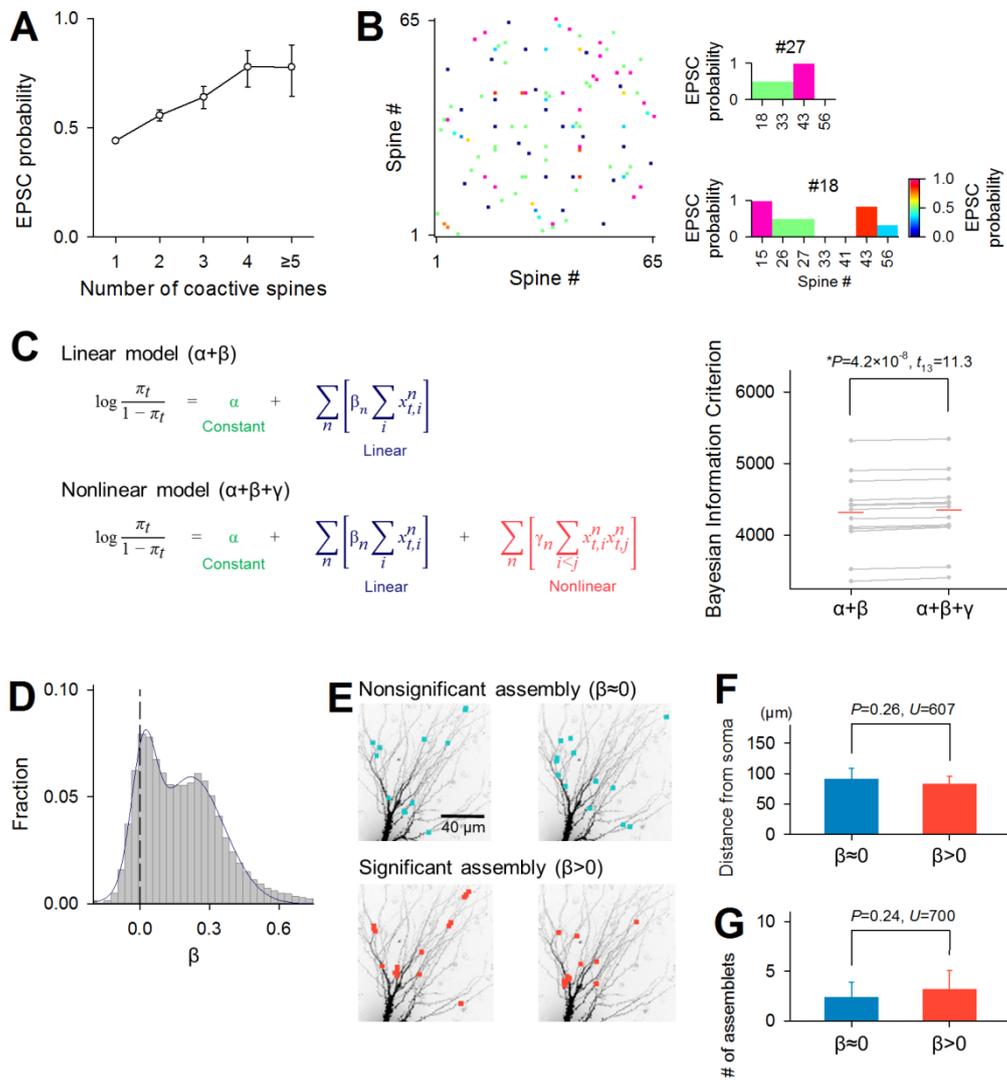


図 5 | 樹状突起は特定の細胞集団からの情報を細胞体へ伝える

(A) 同期シナプス入力数と EPSC probability の関係 ( $n = 10,253$  events from 15 neurons)。30 ms 以内にスパインが活動すれば同期とみなした。エラーバーは、95%信頼区間を示している。95%信頼区間は最尤推定法により求めた。(B) 全スパインペアについて同期シナプス入力の EPSC probability を擬似カラーで示した。同期シナプス入力を示さなかったペアは白で示した。右の inset は#18 と#27 を代表例として抽出して示した。(C) EPSC probability のロジスティック回帰分析に用いた二つのモデル(left,  $\alpha+\beta$  と  $\alpha+\beta+\gamma$ )。  $x_{t,i}^n$  は、スパイン集団# $n$  のスパイン# $i$  について、時間  $t$  におけるシナプス入力の有無 (入力有り = 1、入力無し = 0)。係数  $\beta_n$  と  $\gamma_n$  はそれぞれ、シナプス入力 EPSC probability ( $\pi_t$ )

に当たる線形効果と非線形効果を示している。 $\alpha$  は定数を示している。Bayesian information criteria (ベイズ情報量基準)を用いて、 $\alpha+\beta$  と  $\alpha+\beta+\gamma$  モデルのデータへの当てはまりの良さを比較した (*right*、paired *t*-test, mean  $\pm$  SD of 14 neurons)。 (D)  $\alpha+\beta$  における  $\beta_n$  の分布。個々のスパイン集団の  $\beta_n$  は、各ニューロンについて affinity propagation を 1000 回繰り返しロジスティック回帰分析により推定した ( $n = 14$  neurons)。 (E) 代表的な  $\beta$  が 0 より大きいスパイン集団 ( $\beta > 0$ ) と  $\beta$  が 0 より大きくないスパイン集団 ( $\beta \approx 0$ )。1000 回の affinity propagation で同じクラスターに分類されたスパインのみを表示している。 (F)  $\beta \approx 0$  と  $\beta > 0$  のスパイン集団の細胞体からの道のり距離 (Mann-Whitney *U*-test, mean  $\pm$  SD of 9 neurons)。 (G)  $\beta \approx 0$  と  $\beta > 0$  がもつ assembllet の数 (10  $\mu\text{m}$  以内で生じる同期シナプス入力、Mann-Whitney *U*-test, mean  $\pm$  SD of 9 neurons)。

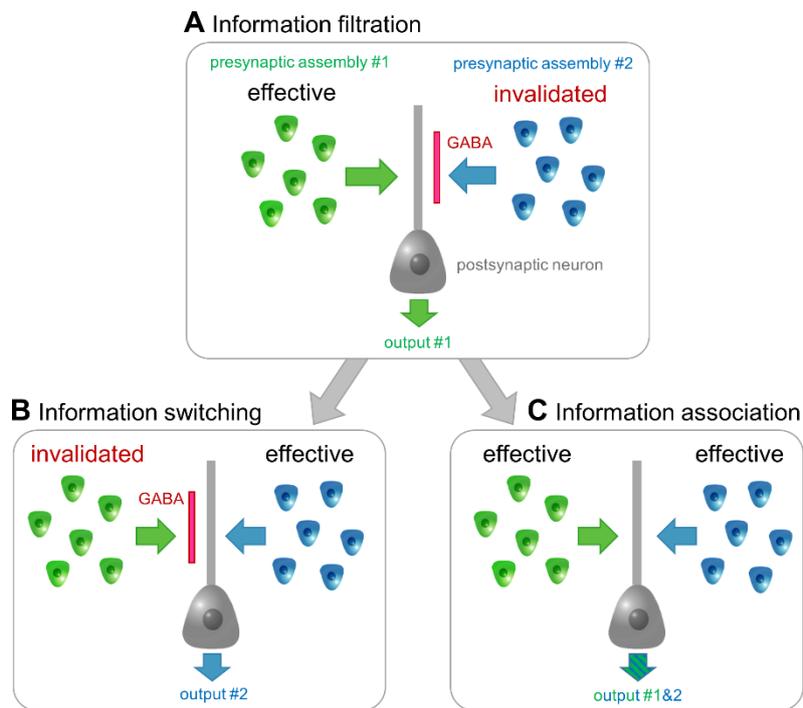
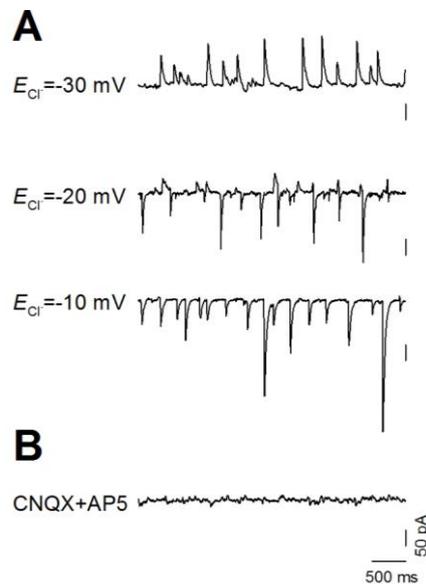


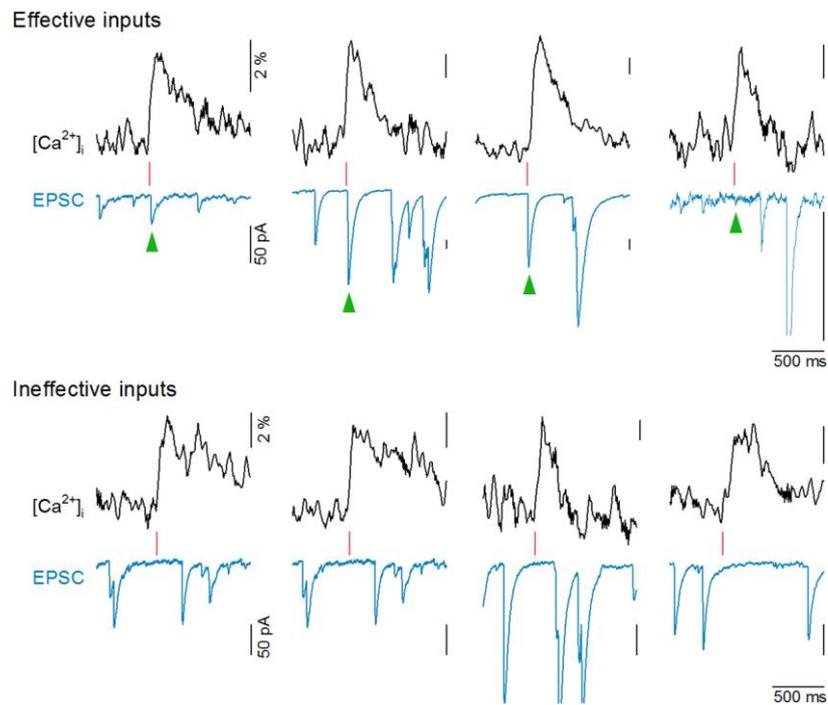
図 6 | 樹状突起は細胞体へ伝えるべき情報を選定している

(A) #1 の細胞集団からのシナプス入力にはポストシナプス細胞を活動させるが、#2 の細胞集団からのシナプス入力は、抑制性シナプス入力によってポストシナプス細胞の出力情報に影響を与えることができない。(B) (A)と同じだが、抑制性シナプス入力は#1 の細胞集団からのシナプス入力を無効化している。そのため、ポストシナプス細胞は#2 の細胞集団から伝えられた情報を出力する。(C) 抑制性シナプス入力の効果が消失すると、両方の細胞集団からの情報が混合される。本機構を用いることで、ニューロン間のシナプス結合を書き換えることなく、樹状突起は情報の流路を瞬時に切り替えたり(B)、異なる情報を統合することができる(C)と考えられる。



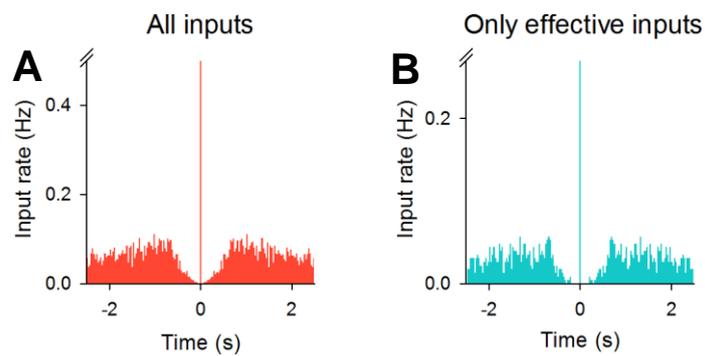
**補足図 1 | 細胞内塩化物イオン濃度を上昇させることで-30 mV でも EPSC を記録することができる**

(A) 電位固定化モードでの CA3 錐体細胞からのシナプス後電流の記録。塩化物イオンの平衡電位 ( $E_{Cl^-}$ ) を -30、-20、-10 mV になるように細胞内液を調節した。それぞれの細胞内液の液面電位は、2.8、1.0、0.24 mV であった。 $E_{Cl^-} = -30$  や -20 mV では上向き電流が残っていたが、 $E_{Cl^-} = -10$  mV では上向き電流は記録されなかった。(B)  $V_h = -30$  mV かつ  $E_{Cl^-} = -10$  mV でのポストシナプス電流は、50  $\mu$ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) と 50  $\mu$ M D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) 存在下では消失した。すなわち、同条件下で記録される電流は EPSC を反映していると考えられる。塩化物イオンの平衡電位と、実験上の抑制性シナプス後電流の反転電位が異なるのは、space clamp problem や GABA 受容体を介した炭酸イオンの流出入が影響しているのではないかと考えられる。



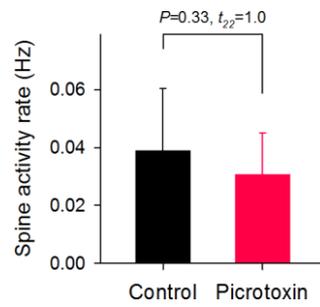
## 補足図 2 | シナプス入力はいしばしば細胞体に伝わらない (代表例)

EPSC が同時に記録される有効なシナプス入力 (effective inputs) と EPSC が同時に記録されない無効なシナプス入力 (ineffective inputs) の代表的なトレース。青線は EPSC を、黒線はスパインの蛍光トレースを示している。赤線は、蛍光強度上昇タイミングを示している。緑のやじりは、シナプス入力と同時に記録された EPSC を示している。Ineffective input の内、左の二つのイベントは同じフレームで生じていた。すなわち、これらは同期シナプス入力である一方で、細胞体に到達しなかったと推察される。



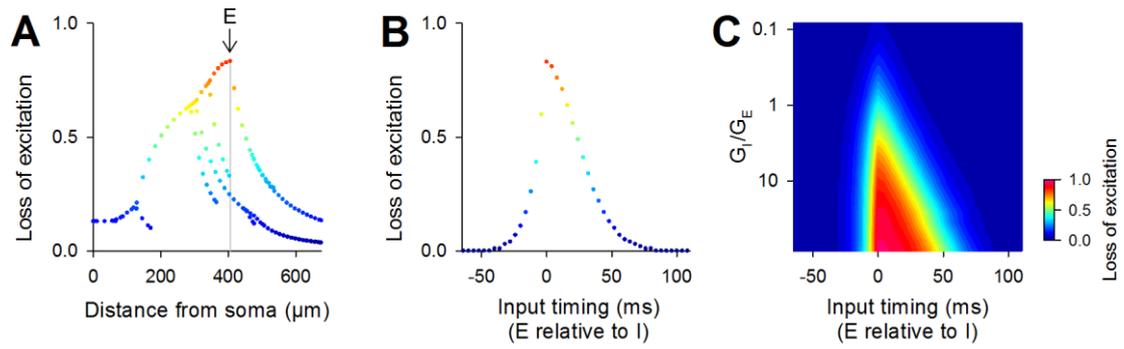
**補足図 3 | EPSC probability は直前のスパインの活動の影響を受けない**

(A) シナプス活動の自己相関。あるスパインが活動した前後に活動する頻度を計算した ( $n = 2,914$  spines)。 (B) (A)と同じだが、EPSC が同時に発生したスパイン活動についてのみ計算した。



補足図 4 | picrotoxin の細胞内適用はシナプス入力頻度を増加させない

Picrotoxin 細胞内適用 (200  $\mu$ M) ニューロンとコントロールでは、スパインの活動頻度は変わらなかった (mean  $\pm$  SD of 15 control and 9 picrotoxin-injected neurons, Student's *t*-test)。



補足図 5 | 電流固定モードでも樹状突起の局所に同期した抑制性シナプス入力  
が興奮性シナプス入力を無効化する

図 4B-D と同じだが、電流固定モードでシミュレーションした。

## 考察

本研究では、全てのシナプス入力細胞体に伝わるわけではなく、特定の細胞集団に由来したシナプス入力だけが細胞体に伝わることを明らかにした。このことから、ニューロン間の解剖学的な結合関係だけでは、ニューロン間の機能的な結合関係を知ることができないと考えられる。また本研究では、抑制性シナプス入力スパインと細胞体との連絡を遮断していることも見出した。抑制性シナプス入力の効果の変調は、情報の流路の切り替えや異なる情報の統合を起こすことが予想される (図 6)。つまり、抑制性シナプス入力による情報の選定機構は、シナプス可塑性などの神経回路構造を書き換えることなく、迅速かつ柔軟な情報処理を可能にしていると予想される。

樹状突起による情報演算に関する知見の多くは、電気刺激や光遺伝学的手法、グルタミン酸アンケーシングなどを用いて人為的に神経活動を惹起することで明らかにされてきた。その一方で、生理的条件に近い自発活動下の神経回路における樹状突起に注目した研究は少ない。これには以下二つの理由がある。一つ目に、従来のイメージング手法では同時に捉えることができるスパイン数が十分でないことが挙げられる。そのため、樹状突起のいたるところで生じるシナプス入力を捉えることが困難であった。二つ目は、既存の手法では時間分解能が低いためである。自発活動下の神経回路では、ニューロンは絶え間なくシナプス入力を受け取っている。従来の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法は 10-30 frames/s での撮影が限界であり、高頻度で生じるシナプス入力に対し、樹状突起と細胞体の応答を一对一で対応付けることが不可能であった。そこで私は、光学系の改良と実験技術の改善を行い、数百に上るスパインへのシナプス入力を同時にミリ秒単位の時間精度で可視化する技術を開発した。この技術の確立によって初めて、自発活動下における樹状突起による情報演算機構の解明が可能になった。

本研究では主に培養海馬切片を用いた。急性切片や生体は組織中の光の散乱が激しく、スパインの微細な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変動を可視化することが難しい。高速撮影を行う際には、組織内の光の散乱は S/N の低下を招くため重大な障害となる。また、急性切片は神経線維が切片作製時に大半が切断されており、自発的な神経活動が著しく低下している。特に、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを可能な切片表面はその影響が大きく、今回行ったようなシナプス入力に対するスパインと細胞体の応答を大規模かつ高い時間精度で比較することはできなかった。一方で、培養切片は組織が透明であり、高速撮影に耐えうる光量を得ることができる。培養切片は、培養過程で神経線維が回復し、神経回路が再編成されている。そのため、自発的な神経活動は回復し、多数のスパインから同時にシナプス入力を観察することができる。もちろん、再編成された神経回路は生体内と同等であるとは言えないが、培養海馬切片が示す神経活動は生体の神経活動と類似することがわかっている (Okamoto et al., 2014; Takahashi et al., 2012; Takahashi et al., 2010)。そのため、培養切片には神経回路の基本的な作動原理が保存されていると推察される。

通常、シナプス入力は細胞体を脱分極させると考えられている。これは、電気刺激やグルタミン酸アンケーシングを用いてシナプス入力を惹起した研究において確認することができる。しかし本研究において、自発的な神経活動下の樹状突起に注目したところ、一部のシナプス入力は EPSC として記録されなかった。すなわち、今回発見したシナプス入力の無効化は神経回路内の相互作用の結果生じるものであると同時に、自発活動下の樹状突起演算に注目することで初めて発見できたものである。

一度活性化した AMPA 受容体は一過的に脱感作する (Trussell et al., 1993)。本現象が AMPA 受容体の脱感作によるものだとすれば、スパインは EPSC とし

て記録されるシナプス入力を連続して受け取らないと考えられる。しかし、AMPA 受容体の脱感作に起因すると考えられる有効なシナプス入力頻度の低下は観察されなかった。そのため、AMPA 受容体の脱感作はシナプス入力の無効化を引き起こしているとは考えにくい。また、AMPA 受容体の脱感作によって応答を失うスパインは、AMPA 受容体の発現量が少ない弱いシナプスであると考えられる。先行研究により、AMPA 受容体の発現量はスパインの大きさと相関することがわかっている (Matsuzaki et al., 2001)。つまり、AMPA 受容体の脱感作がシナプス入力の無効化に関与するとすれば、小さいスパインほど EPSC probability は低くなると考えられる。しかし、スパインの head volume やスパインの neck length と EPSC probability は相関しなかった。このことから、AMPA 受容体の脱感作は本現象の要因でないと推察される。

シナプス入力をもつ電氣的な興奮性は膜の受動的特性に従って樹状突起から細胞体へ伝わる過程で減衰すると予測されている (Rall, 1959)。そのため、細胞体から遠いスパインほどシナプス入力はしばしば細胞体に到達できないことが想定される。しかし、スパインの細胞体からの距離と EPSC probability は相関しなかった。また、細胞体への伝播過程でシナプス入力が減衰し消失するのであれば、弱いシナプスほど伝播過程での減衰による影響を受けやすいと考えられる。しかし、スパイン形態と EPSC probability とは相関しなかった。以上から、シナプス入力ケーブル特性に従い伝播過程で減衰したとは考えにくい。

樹状突起はシナプス入力を線形に加算しているのか、あるいは非線形に加算しているのか議論が行われてきた。少なくとも、樹状突起の局所への同期シナプス入力は非線形に統合されると考えられている (Losonczy and Magee, 2006; Takahashi et al., 2012)。つまり、個々の樹状突起の枝が情報演算の単位として働いている可能性がある (Branco and Hausser, 2010)。そこで、局所同期シナプス

入力を選択的に細胞体へ伝わっているのではないかと考えた。しかし、距離の近いスパインが似た EPSC probability を示す傾向にはなかった。これは、一部の branch へのシナプス入力を選択的に細胞体へ伝えられているわけではないことを意味している。また、ロジスティック回帰分析を用いて EPSC 発生モデルを推定したところ、シナプス入力の同期による非線形性を考慮しないほうがモデルとして優れていた。以上から、シナプス入力の細胞体への到達の成否はシナプス入力の非線形加算に依存しないと考えられる。同時に今回の結果は、樹状突起がシナプス入力を線形に加算していることを示唆している。しかし、本結果は EPSC の発生に関するものであり、脱分極強度を見たものではない。そのため、樹状突起によるシナプス入力の非線形加算を否定するものではない。

Picrotoxin の細胞内適用により EPSC probability の分布は高確率側にシフトした。また、picrotoxin の細胞内適用は EPSC 頻度も増加させた。そのため、抑制性シナプス入力が増加していると考えられる。ただし、picrotoxin 適用下においても EPSC probability が 100% になることはなかった。これには、電位依存性  $K^+$  チャンネルなどその他のチャンネルが関与している可能性がある (Hu et al., 2007)。

興奮性シナプス入力の無効化が抑制性シナプス入力によって行われているとすれば、ニューロンのどの部位への抑制性シナプス入力が増加しているのだろうか。ニューロンは、細胞体や樹状突起、スパインなど様々な部位で抑制性シナプス入力を受け取っている。これまでに、抑制性シナプス入力の 80% 以上を樹状突起が受け取ることが示唆されている (Liu, 2004)。また近年、抑制性シナプス入力は、樹状突起上で興奮性シナプス入力を調節していることが明らかにされている (Hayama et al., 2013; Liu, 2004; Muller et al., 2012)。今回、Computational modelling を用いることで、抑制性シナプス入力は興奮性シナプス入力部位の局

所で同期したとき最も効率よつ EPSC を減弱させることがわかった。一方で、細胞体や別の枝への抑制性シナプス入力では十分に EPSC を減弱させることができなかった。そのため、興奮性シナプス入力は樹状突起の局所で、抑制性シナプス入力によって無効化されていると推察される。これは、EPSC を起こす有効なシナプス入力は無効なシナプス入力より  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が多いことから想像できる。スパインへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、興奮性シナプス入力の近傍に受け取られた抑制性シナプス入力によって調節されることがわかっている (Chiu et al., 2013; Mullner et al., 2015)。つまり、 $\text{Ca}^{2+}$  流入量の差はスパインが同時に抑制性シナプス入力を受け取ったことを示唆している。

確かに、先行研究によって樹状突起の局所での抑制の存在が明らかになり (Liu, 2004)、それがスパインへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を減少させ (Chiu et al., 2013; Mullner et al., 2015)、シナプス可塑性を制御することが示唆されている (Hayama et al., 2013)。しかし、これらの研究では抑制がスパイン内  $\text{Ca}^{2+}$  動態に果たす役割に注目しており、樹状突起への抑制が情報処理に果たす役割についてはわかっていない。樹状突起への抑制が樹状突起におけるシナプス入力統合に与える影響は、in slice (Gidon and Segev, 2012; Hao et al., 2009) や人為的にシナプス入力を惹起することで行われてきた (Liu, 2004; Muller et al., 2012)。つまり、自発活動下の神経回路において局所の抑制が樹状突起による情報処理にどのように関与しているかを調べた研究はない。本研究において私は、自発活動下の神経回路において、樹状突起は抑制を介して一部の同期シナプス入力だけを細胞体へ伝えていることを発見した。

神経回路内では複数の細胞集団が同期的な発火活動を示している。そして、こうした細胞集団の同期活動によって情報はコードされていると考えられている (Harris, 2005; Hebb, 1949; Takahashi et al., 2010)。本研究では、樹状突起が複

数の同期シナプス入力集団を持つことを示した。これは、単一細胞が異なる細胞集団からシナプス入力を受け取っていることを示唆している。また、一部のスパイン集団が受け取るシナプス入力だけが細胞体での EPSC の発生に寄与することを示した。これは、樹状突起が受け取った情報の内、細胞体へ伝える情報を抑制性シナプス入力を用いて選定していることを意味している。単一ニューロンは複数の情報を受け取っている。その一方でニューロンの発火応答は選択的である。今回示した樹状突起による情報の選定は、ニューロンが特定の細胞集団からの情報に選択的に活動するために働いていると考えられる。

また、EPSC 発生に寄与するスパイン集団と寄与しないスパイン集団との間に、*assembled* の数や細胞体からの距離など時空間分布に違いはなかった。すなわち、二群間でシナプス入力 が細胞体に伝播した際の応答は同等であると考えられる。つまり、樹状突起が無効化する対象を変えるだけで、ニューロンが出力する情報を瞬時に変更できる (図 6A-B)。また、目的の細胞集団だけ無効化を解除することができれば二つの情報を統合することも可能である (図 6C)。従来、神経回路内の情報経路はシナプス可塑性によって変化すると考えられている。今回発見した抑制による情報の選定は、タンパク合成などを要するシナプス可塑性より早く情報経路を変更可能である。そのため、樹状突起抑制による情報の選定は、脳が外界からの情報の変化に対し、迅速に対応する柔軟性の基盤となっているのかもしれない。

近年、神経回路の興奮・抑制バランスの失調が精神疾患やアルツハイマー病などの原因である可能性が報告されている (Bakker et al., 2012; Eichler and Meier, 2008, Nelson and Valakh, 2015; Verret et al., 2012; Yizhar et al., 2011)。しかしながら、興奮・抑制バランスの失調が脳内の情報処理に及ぼす影響については理解が進んでいない。今回発見した樹状突起による情報選定機構は、抑制性シナプ

ス入力が必要な役割を果たしている。すなわち、興奮・抑制バランスの失調は樹状突起による情報選定機構の破綻を意味する。つまり、樹状突起による情報処理機構の破綻が興奮・抑制バランスの失調が報告される様々な疾患の原因となっているのかもしれない。

## 参考文献

- Baker, J.L., Perez-Rosello, T., Migliore, M., Barrionuevo, G., and Ascoli, G.A. (2011). A computer model of unitary responses from associational/commissural and perforant path synapses in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Comput Neurosci* *31*, 137-158.
- Bakker, A., Krauss, G.L., Albert, M.S., Speck, C.L., Jones, L.R., Stark, C.E., Yassa, M.A., Bassett, S.S., Shelton, A.L., and Gallagher, M. (2012). Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* *74*, 467-474.
- Branco, T., and Hausser, M. (2010). The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* *20*, 494-502.
- Cash, S., and Yuste, R. (1999). Linear summation of excitatory inputs by CA1 pyramidal neurons. *Neuron* *22*, 383-394.
- Chiu, C.Q., Lur, G., Morse, T.M., Carnevale, N.T., Ellis-Davies, G.C., and Higley, M.J. (2013). Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science* *340*, 759-762.
- Eccles, J.C. (1964). *The Physiology of Synapses* (Berlin: Springer-Verlag).
- Eichler, S.A., and Meier, J.C. (2008). E-I balance and human diseases - from molecules to networking. *Frontiers in molecular neuroscience* *1*, 2.
- Frey, B.J., and Dueck, D. (2007). Clustering by passing messages between data points. *Science* *315*, 972-976.
- Gidon, A. & Segev, I. (2012). Principles governing the operation of synaptic inhibition in dendrites. *Neuron* **75**, 330-341.
- Hao, J., Wang, X.D., Dan, Y., Poo, M.M. & Zhang, X.H. (2009). An arithmetic rule for

- spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21906-21911.
- Harris, K.D. (2005). Neural signatures of cell assembly organization. *Nat Rev Neurosci* 6, 399-407.
- Hastie, T., Tibshirani, R., and Friedman, J.H. (2009). *The elements of statistical learning : data mining, inference, and prediction*, 2nd edn (New York: Springer).
- Hayama, T., Noguchi, J., Watanabe, S., Takahashi, N., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C., Matsuzaki, M., and Kasai, H. (2013). GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca<sup>2+</sup> signaling. *Nat Neurosci* 16, 1409-1416.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory* (New York,: Wiley).
- Hines, M.L., and Carnevale, N.T. (1997). The NEURON simulation environment. *Neural Comput* 9, 1179-1209.
- Hu, H., Vervaeke, K., and Storm, J.F. (2007). M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region. *J Neurosci* 27, 1853-1867.
- Inomata, N., Tokutomi, N., Oyama, Y., and Akaike, N. (1988). Intracellular picrotoxin blocks pentobarbital-gated Cl<sup>-</sup> conductance. *Neurosci Res* 6, 72-75.
- Lavzin M., Rapoport, S., Polsky, A., Garion, L., Schiller, J. (2012). Nonlinear dendritic processing determines angular tuning of barrel cortex neurons *in vivo*. *Nature* 490, 397-401
- Liu, G. (2004). Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat Neurosci* 7, 373-379.

- London, M., and Hausser, M. (2005). Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci* 28, 503-532.
- Losonczy, A., and Magee, J.C. (2006). Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 50, 291-307.
- Lovett-Barron, M., Turi, G.F., Kaifosh, P., Lee, P.H., Bolze, F., Sun, X.H., Nicoud, J.F., Zemelman, B.V., Sternson, S.M., and Losonczy, A. (2012). Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* 15, 423-430, S421-423.
- Mainen, Z.F., and Sejnowski, T.J. (1996). Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382, 363-366.
- Major, G., Larkum, M.E., and Schiller, J. (2013). Active properties of neocortical pyramidal neuron dendrites. *Annu Rev Neurosci* 36, 1-24.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4, 1086-1092.
- Migliore, M., and Shepherd, G.M. (2002). Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci* 3, 362-370.
- Mizunuma, M., Norimoto, H., Tao, K., Egawa, T., Hanaoka, K., Sakaguchi, T., Hioki, H., Kaneko, T., Yamaguchi, S., Nagano, T., *et al.* (2014). Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. *Nat Neurosci* 17, 503-505.
- Muller, C., Beck, H., Coulter, D., and Remy, S. (2012). Inhibitory control of linear and supralinear dendritic excitation in CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 75, 851-864.
- Mullner, F.E., Wierenga, C.J., and Bonhoeffer, T. (2015). Precision of Inhibition:

- Dendritic Inhibition by Individual GABAergic Synapses on Hippocampal Pyramidal Cells Is Confined in Space and Time. *Neuron* 87, 576-589.
- Nelson, S., Toth, L., Sheth, B., and Sur, M. (1994). Orientation selectivity of cortical neurons during intracellular blockade of inhibition. *Science* 265, 774-777.
- Nelson, S.B., and Valakh, V. (2015). Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87, 684-698.
- Okamoto, K., Ishikawa, T., Abe, R., Ishikawa, D., Kobayashi, C., Mizunuma, M., Norimoto, H., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2014). Ex vivo cultured neuronal networks emit in vivo-like spontaneous activity. *J Physiol Sci* 64, 421-431.
- Rall, W. (1959). Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Exp Neurol* 1, 491-527.
- Reyes, A. (2001). Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci* 24, 653-675.
- Royer, S., Zemelman, B.V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J.C., and Buzsaki, G. (2012). Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nat Neurosci* 15, 769-775.
- Safiulina, V.F., Caiati, M.D., Sivakumaran, S., Bisson, G., Migliore, M., and Cherubini, E. (2010). Control of GABA Release at Mossy Fiber-CA3 Connections in the Developing Hippocampus. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2, 1.
- Sheffield, M., Dombeck, A.D. (2015). Calcium transient prevalence across the dendritic arbour predicts place field properties. *Nature* 517, 200-204
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9, 206-221.
- Szymanska, A.F., Kobayashi, C., Norimoto, H., Ishikawa, T., Ikegaya, Y., and Nenadic,

- Z. Accurate detection of low signal-to-noise ratio neuronal calcium transient waves using a matched filter. *J Neurosci Meth*, in press.
- Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2012). Locally synchronized synaptic inputs. *Science* 335, 353-356.
- Takahashi, N., Sasaki, T., Matsumoto, W., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2010). Circuit topology for synchronizing neurons in spontaneously active networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10244-10249.
- Trussell, L.O., Zhang, S., and Raman, I.M. (1993). Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release. *Neuron* 10, 1185-1196.
- Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., Barth, A.M., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A.C., Mody, I., *et al.* (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149, 708-721.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., *et al.* (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171-178.

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、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 教授に心より感謝申し上げます。同期の学生の中で一番不出来な私を見放すことなく、研究者として、また、人として成長するよう指導して頂きました。先生と研究を投稿論文に仕上げていく過程は、大学院生活で一番充実した日々でした。途中何度もお叱りを頂き、ご迷惑をお掛けしました。しかし、その度に内容が輝きを増していき、心から研究を楽しく存じていました。研究の楽しさを教えて頂いた池谷先生に重ねて感謝申し上げます。

本研究を行なうにあたり、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 小山隆太 准教授に心より感謝申し上げます。折に触れて励ましの言葉を頂き、ここまで研究を続けることができました。特に、私が自分の実験系に自信を失った際に頂いた言葉は、研究で壁にぶつかる度に私を奮い立たせてくれました。

本研究室で研究を始めてから今に至るまで、研究姿勢や実験手技など親身なご指導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 佐々木拓哉 助教に心より感謝申し上げます。一緒に研究をさせて頂いた中で学んだ佐々木先生の研究姿勢や実験のノウハウは、私が研究者を志す上での基礎となっています。

本研究を行なうにあたり、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 松木則夫 名誉教授に心より感謝申し上げます。薬品作用学教室で研究を始める際に頂いたお言葉を今でも胸に抱いて研究に励んでいます。また、退官後も研究室にいらした際には声をかけて頂き、様々なお言葉を賜りました。

本研究を行うにあたり、多くのご助言とご協力を賜りました京都大学大学院情報学研究科システム科学専攻システム情報論講座論理生命学研究室 石井信教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くのご助言とご協力を賜りました京都大学大学院理学研究科非線形動力学研究室 篠本滋 准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くのご助言とご協力を賜りました京都大学大学院情報学研究科システム科学専攻システム情報論講座論理生命学研究室 浦久保秀俊 助教に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くのご助言とご協力を賜りました京都大学大学院理学研究科非線形動力学研究室 望月泰博 氏に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、そのきっかけと親身なご指導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 高橋直矢 元助教に心より感謝申し上げます。留学中も学会でお会いした際には親身に議論してくださり、様々な有益なコメントを頂きました。

研究室でのセミナーを始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東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 野村洋 前助教に心より感謝申し上げます。

研究を行うにあたり、多くのご助言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 竹内春樹 さきがけ研究員に心より感謝申し上げます。今まで見てきた中で誰よりも研究を楽しむ竹内さんの姿を手本にして、研究を行ってまいりました。

研究を行うにあたり、多くのご助言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 中嶋藍 助教に心より感謝申し上げます。ディスカッションでは、私では思いつかない角度からのご助言を頂き、研究を進める大きな助けとなりました。

同研究グループとして本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言を頂きました東京大学薬学系研究科薬品作用学教室 宇佐美篤、水沼未雅、南澤玄樹、石川大介、宇治田早紀子、岡田沙織、松本光樹、坂口哲也、宮嶋晃輔、浅田晶子、阿部麗美、石川智愛、宮脇健行、渡邊裕亮、岩寄論嗣、岡田真実、岡本和樹、上村成章、牧野健一、高木夕貴、高夢旋 各氏に心より感謝申し上げます。

日々の研究生生活を送る中で、温かいご支援をいただきました薬品作用学教室の先輩、後輩、そして同輩の皆さまに心より感謝申し上げます。

これまで共に研究生活を奮闘し、切磋琢磨してきた同期の中山大輔、乗本裕明、舟山健太、松本信圭、三浦友樹 各氏に心より感謝申し上げます。このメンバーでなければこれほど頑張ることはできなかつたです。このメンバーで本当に良かったと思います。ありがとう。

亡き両祖父、妹 もも に感謝の意を表します。何が最後になるのかわかりません。人事を尽くすこと、他者を思いやること、そうした当たり前を大切に思います。

最も身近で支え続けてくれた兄 小林宏紀 、姉 小林夕記 、両祖母、そして婚約者の 浅田晶子 に感謝の意を表します。常に理解を示してくれ、ときに叱咤してくれたことで困難に打ち勝つ勇気をもらいました。ありがとう。

最後に、私をここまで育ててくださり、今に至るまでの長い学生生活を支えてくださりました父 小林英雄 、母 小林美笑子 に感謝の意を表します。父の「常に困難な道を選べ」という言葉が私をここまで導いてくれました。母の深い優しさによって挫けずここまで辿り着けました。本当にありがとうございます。

本研究は、様々な方のご指導やご支援のもと行ってまいりました。最後に今一度、お力添え頂いた全ての方へ深く感謝申し上げます、本論文の結びとさせていただきます。

小林 千晃