

博士論文

海馬における自発的シナプス抑圧の誘導とその役割

氏名 乗本 裕明

目次

要旨	・・・・・・・・・・	2
方法	・・・・・・・・・・	3

第1部

海馬における自発的シナプス抑圧の誘導

背景	・・・・・・・・・・	10
結果	・・・・・・・・・・	13
考察	・・・・・・・・・・	22

第2部

海馬における自発的シナプス抑圧の役割

背景	・・・・・・・・・・	28
結果	・・・・・・・・・・	29
考察	・・・・・・・・・・	34
参考文献	・・・・・・・・・・	35

謝辞	・・・・・・・・・・	42
----	------------	----

【要旨】

海馬長期増強 (long-term potentiation, LTP) は記憶の素子である。その一方で、記憶は海馬に長期間保持されない。これは、LTP を消去する自発的なプロセスが海馬内に存在することを示唆している。LTP を消去する機構として、長期抑圧 (long-term depression, LTD) や脱増強 (depotential) といったシナプス抑圧が挙げられるが、これらがどのようにして自発的に誘導されるのか、根源的な問いであるにも関わらず明らかになっていない。

私は、海馬 sharp wave (SW) が記憶の固定化に寄与する一方で、シナプスに LTD を誘導するという二重の役割を担っていることを報告する。スパインの形態観察から、SW の発生時には LTD が誘導されていることが明らかになった。また、この LTD が誘導されることによって、「記憶再生」の精度が上昇することが明らかになった。このような自発的なプロセスにより海馬から大脳皮質へ送られる情報のシグナル-ノイズ比が上昇することで、精度の高い情報処理が実現されていることが示唆される。

【方法】

実験動物

東京大学大学院薬学系研究科および理化学研究所のガイドラインに従い、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力の下、*in vitro* 実験には生後 3 週齢の *Arc-dVenus* トランスジェニックマウス（以下 *Arc-dVenus* マウス）、*Thy1* トランスジェニックマウス、および C57BL/6 マウスを、*in vivo* 実験には半年齢の C57BL/6J マウスを、それぞれ用いた。これらのマウスは、自由摂食・摂水下、午前 7 時から午後 7 時まで点灯の条件で飼育し、実験に用いた。

Arc-dVenus トランスジェニックマウスは岐阜大学医学系研究科山口瞬先生にご提供いただいた (Eguchi and Yamaguchi, 2009)。このマウスのトランスジェニックコンストラクトは、マウスのゲノム DNA から得られた 7.1 kbp の *Arc* プロモーター領域と、改変型 GFP である Venus (Nagai et al., 2002) に不安定領域を付加した destabilized Venus を結合させた DNA 配列である。dVenus は Venus 遺伝子に、タンパク質の分解シグナルである CL1 と PEST を含む pGL3 と、mRNA の分解シグナルである AU-rich 配列を付加している。Venus の mRNA、タンパク質の分解性を高めることで、Venus タンパク質の発現時間の特異性を高めている。このマウスは C57BL/6 と DBA/2 の血統の交配により作成されたが、その後 8 代以上日本 SLC より購入した C57BL/6 と交配させた後、遺伝的に *Arc-dVenus* 遺伝子をホモに持つマウスを作成した。実験には、作成されたホモ、もしくは WT との交配によって生まれたヘテロトランスジェニックマウスを用いた。

In vitro 実験において、動物に新奇環境を探索させた。実験の 3 日前からホームケージで飼育を開始し、実験当日にマウスを新奇環境チャンバー（幅 280 mm、高さ 600 mm、長さ 250 mm 大）に暴露した。チャンバー内には回し車、トンネル、おもちゃを配置した。マウスは 30 分間自由に環境探索させた後ホームケージに戻した。120 分後、海馬脳切片を作成し実験に用いた。イメージング実験においては新奇環境を探索させた 120 分後に再度同環境を探索させ、探索直後に断頭し、切片を作成した。

In vivo 局所場電位記録

実験中は理化学研究所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に配慮した。生後半年齢の C57BL/6J マウス (SLC, Shizuoka, Japan) をイソフルランで麻酔し、頭皮を除去した後、頭蓋骨を削り、海馬領域にホールを作成し、シリコンプローブを 1 mm の深さまで刺入した。その後は、海馬錐体細胞層の位置まで数日間かけて下ろした。シリコンプローブは 4 本のシャンクから成り、1 本あたり 8 か所の記録部位がある (1-3 M Ω インピーダンス)。

このマウスに新奇環境を 60 分間探索させた。その前後の局所場電位を記録した。32 チャネルの中から、海馬錐体細胞層の中心あたりに位置するチャンネルを選択し、解析に使用した。また、マウスの頭部に LED ライトを装着した。ビデオカメラで撮影し (40 Hz)、このライトの動きをトラックすることにより動物の覚醒を判定した。

徐波睡眠・REM 睡眠の判定はシータ帯域 (5-12 Hz) およびデルタ帯域 (1-4 Hz) の比をもとに算出した(Fujisawa and Buzsáki, 2011)。

海馬急性スライス標本の作製

実験中は東京大学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に配慮した。生後 3 週齢の C57/BL/6J マウス (SLC, Shizuoka, Japan) をジエチルエーテル、またはイソフルランで麻酔し、断頭後にすばやく全脳を摘出した。摘出した全脳はあらかじめ 95% O₂/5% CO₂ ガスで飽和させた氷冷下の ACSF (artificial cerebrospinal fluid (mM): 127 NaCl, 26 NaHCO₃, 3.5 KCl, 1.24 KH₂PO₄, 1.4 MgSO₄, 1.2 CaCl₂, 10 glucose, 0-0.0001 kainic acid) 中に静置した。氷冷することにより酸素需要量を低下させた脳の小脳部分と吻側の一部をカミソリ刃 (Feather, Osaka, Japan) で取り除き、再び ACSF 中に数分放置した。瞬間接着剤 (Toagosei, Tokyo, Japan) を用いて 12.7° の角度をつけてステージに固定し、sucrose-based ACSF ((mM): 222.1 sucrose, 27 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.4 NaH₂PO₄, 7.0 MgSO₄, 1.0 CaCl₂, 0.5 ascorbic

acid) 中で、ビブラトーム 3000 (Vibratome, St. Louis, MO) を用いて、400 μm の海馬切片標本を作成した (Norimoto et al., 2013, 2012; Sun et al., 2012)。作成した標本は、95% O_2 /5% CO_2 ガスで飽和した 35°C の ACSF 中で 1.5 時間の回復時間をおいてから、実験に用いた。

高速多ニューロン Ca^{2+} 画像法 (functional Multineuron Calcium Imaging; fMCI)

海馬急性切片を、ACSF を灌流する記録用チャンバー内に移した。灌流液は 34~36°C に温め、6~10 ml/min の速度で流した。染色液は、使用直前にミリポアフィルタ (孔径 0.45 μm) を通じてガラス電極に充填した。染色液は 95% O_2 /5% CO_2 ガスで飽和した ACSF 中に、200 μM Fura-2 AM (Invitrogen)、0.25% Pluronic F-127 (Invitrogen)、2.5% DMSO を含む。ガラス電極には外径 1.5 mm の芯入りガラスキャピラリーを使用し、プラー (SUTTER) により電極抵抗を 1-3 $\text{M}\Omega$ とした。ガラス電極を CA1 野錐体細胞層に近づけ、陽圧をかけることでニューロンへの染色液の負荷を行った。染色液負荷後 5 分以上 ACSF を灌流してからイメージングを行った。イメージングの対象は海馬 CA1 野とし、同領野でのニューロン集団の自発活動をカルシウム蛍光強度変化として記録した (Mizunuma et al., 2014)。本実験でのイメージングシステムとして、ニポウ板型共焦点レーザースキャナ (CSU-10、CSU-X1, Yokogawa, Tokyo, Japan)、冷却 CCD カメラ (iXon DU860, Andor, Northern Ireland, UK) が配備された正立顕微鏡 (ECLIPSE FN1, Nikon, Tokyo, Japan) を使用した (Takahashi et al., 2010)。16 \times , 0.8 NA (Nikon) の水浸対物レンズを実験に使用した。共焦点像は 405 nm のレーザーダイオードで励起し、507 nm のバンドパスフィルタを通してカルシウム蛍光を観察した。レーザーの出力強度は 10-20 mW 程度とし、実験ごとに調整を行った。画像は 128 \times 128 ピクセルの 16 ビット強度で、50 Hz のフレーム速度で撮影した。

カルシウムシグナルからの発火活動の抽出

記録されたイメージング画像よりニューロンの位置を同定し、それぞれの細胞からカルシウム蛍光強度の時系列シグナルを抽出した。次に蛍光強度変化 $\Delta F/F$ を算出した。算出法を

以下に記す。

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

F は任意の時点における蛍光強度を、 F_0 はその前後 2 s の蛍光強度の平均値を、それぞれ表している。得られたトレースに対してローパスフィルタおよびガウスフィルタをかけることによりシグナルの平滑化を行った。平滑化処理されたトレースより一過性の蛍光変化上昇 ($\Delta F/F > 3\%$) を抽出し、立ち上がりの位置をスパイク活動の発生時刻として発火活動パターンの再構築を行った。

細胞外記録

ガラス電極には外径 1.5 mm の芯入りガラスキャピラリーを使用し、プラー (SUTTER) により電極抵抗を 0.2-2 M Ω とした。ACSF を使用直前にミリポアフィルタ (孔径 0.45 μm) を通じてガラス電極に充填した。ガラス電極を海馬切片の CA1 野錐体細胞層または CA1 野放線層に設置し、10 kHz で LFP (local field potential) を記録した。

スパインイメージング

上述した方法で海馬スライス標本から SW を記録しながら、FV1000 二光子レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて Thy1-GFP マウス (Feng et al., 2000) の樹状突起層を 20 分おきに撮影した。二光子レーザー顕微鏡は光源として、100 fs のパルス幅、80 MHz の周波数でモード同期発振するチタンサファイアレーザー (Maitai, Spectra Physics, Mountain View, CA) を搭載している。900 nm で励起し、水浸対物レンズ (25 \times , 1.05 NA, Olympus) を用いて Z 軸に沿って 2 μm ごとに画像を取得した。スパインの体積は撮影したスパインの面積から半径を計算し、スパインを球と仮定して算出した。解析には、NIH ImageJ (US National Institutes of Health,

Bethesda, MD, USA) を用いた。

SW の検出 (in vitro)

SW 活動を抽出するために、細胞外記録のデータは 2-30 Hz の帯域通過フィルタで処理した (Sakatani et al., 2007)。SW 活動は、フィルタ処理したデータから、振動強度により自動で検出した (Norimoto et al., 2012; Sun et al., 2012)。検出閾値はベースラインノイズの 4 SD (標準偏差) とした。

Ripple の検出 (in vivo)

Ripple 活動を抽出するために、細胞外記録のデータは 140-200 Hz の帯域通過フィルタで処理した (Sakatani et al., 2007)。リップル波活動は、フィルタ処理したデータから、振動強度と持続時間により自動で検出した。検出閾値は 4SD- 5SD とした。

免疫組織化学染色

マウスにイソフルラン麻酔を施し、灌流固定後脳を摘出し、後固定を 8 時間おこなった。その後、20 % スクロース / PBS 溶液に一晩、30 % スクロース / PBS 溶液に一晩浸漬させた (PBS の組成: 1.47×10^{-3} M KH_2PO_4 , 8.10×10^{-3} M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.68×10^{-3} M KCl , 1.37×10^{-1} M NaCl)。脳をドライアイスで急速凍結させ、 -80 °C で保存した。クリオスタットを用いて 40 μm 厚の切片 (Bregma -1.8 mm 付近) を作製し、PBS に浮遊させ免疫染色をおこなった。固定された切片を PBS で洗浄し、10% Goat serum および 0.3% Triton-X100 (in PBS) で 60 分間ブロッキングした後に、抗 NeuN 抗体 (1:1000; #MAB377, Millipore, Bedford, MA, USA) および抗 Arc 抗体 (1:1000; #156002, Synaptic Systems, Goettingen, Germany) と 4 °C で 16 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体と

して Alexa fluor 405 標識二次抗体 (1:500; #A31553, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)、ビオチン標識二次抗体 (1:500; #BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を室温にて 4 時間反応させた。Arc の蛍光シグナルの増感のため、VECTASTAIN ABC Kit (#PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) および TSA-Cyanine 3 Kit (#NEL744001KT, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用した。PBS で十分に洗浄した後に切片をスライドに貼り付け、Permafluor (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) で封入した後、蛍光像の観察を行った。観察には、CV-1000 を使用し、青色光、緑色光、赤色光でそれぞれ、NeuN、dVenus、Arc の蛍光シグナルを観察した。Z 軸に沿って 2 μ m ごとに画像を取得した。画像の解析には、NIH ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて Arc 陽性、および dVenus 陽性細胞数をカウントした。

データ解析

解析には Microsoft Visual Basic (Seattle, WA), Matlab (Mathworks, Natick, MA)で作成したプログラムを用いた。特に断りのない限り、すべての解析結果は平均 \pm 標準誤差で表記した。

薬物

D-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5)は精製水にそれぞれ 50 mM の濃度で溶解させ 4°Cで保存し、実験直前に最終濃度になるように ACSF で希釈した。(+)-MK-801 hydrogen maleate は 0.9 %生理食塩水に溶解させてから、マウスに腹腔内投与した。投与濃度は 0.2 mg/kg である。

第 1 部

海馬における自発的シナプス抑圧の誘導

【背景】

海馬と長期増強

海馬のシナプスの多くは、様々なタイプの活動依存的な可塑性を示す。中でも LTP (Long-term Potentiation, 長期増強) は記憶の素子であると考えられている (Bliss and Collingridge, 1993; Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Nabavi et al., 2014)。薬理的検討や遺伝子改変マウスを用いたアプローチにより学習と LTP の必要十分性も示されており、LTP の研究を行う意義は大きい。

LTP は 100 Hz 前後の高頻度の連発刺激を、シャッフアー側枝や苔状線維などのシナプス経路に与えることで誘導されるが、短い頻度の繰り返し刺激でも誘導可能である。シータ波という、空間探索時に発生する脳波を模倣した、5-10 Hz のリズムでシナプスを繰り返し刺激すると、LTP が誘導される (Larson et al., 1986; Selbach et al., 2010, 2004)。シータ波は動物の覚醒時に観察される脳波である。実際に、覚醒下の動物からシナプス電位応答を記録すると、シータ波発生時には LTP が生じることが示されており、これらの知見からシータ波と LTP の関係については疑いようがないものとなっている (Buzsáki, 2002)。

記憶が成立するうえで LTP は不可欠なものであると考えられているが、人工的な刺激により生体マウスの海馬に LTP を誘導し続けると、記憶の機能が飽和することが報告されている (Castro et al., 1989; Moser et al., 1998)。この事実は、生じた LTP が他の何らかの機構により弱められていることを示唆している。

シナプス抑圧

シナプスの結合を弱める機構に LTD (Long-term depression, 長期抑圧) や脱増強 (depotentiation) などのシナプス抑圧現象がある (Bear and Abraham, 1996; Dudek and Bear, 1992; Goda and Stevens, 1996; Mulkey and Malenka, 1992)。一般的に、LTD はシナプス応答が長期的に抑圧される現象を指し、脱増強は LTP による増強分を元に戻す作用を指して用い

られる。シナプス抑圧は 1 Hz 前後の低頻度の刺激を繰り返すと誘導される。また、多くの数理研究モデルにおいて、効率よく LTP を誘導するための説明として LTD が用いられるなど、抑圧様の現象はなくてはならないものとなっている。

このように、LTD 現象の存在を示唆する知見が無数にあるにも関わらず、海馬 LTD を誘導する自発的プロセスは未だに不明である。その原因として、1 Hz 前後でシナプスに摂動を加えるような、秩序だった自発活動が見つかっていないことが挙げられる。

シナプススケーリング仮説

「Synaptic homeostasis theory」という理論が Giulio Tononi らによって提唱されている (Stickgold et al., 2011; Tononi and Cirelli, 2014, 2006)。この理論は、覚醒時に LTP 側へと偏ったシナプス強度は睡眠によって元の状態に戻される、というものである。実際に、この著者らによって睡眠時に LTD が海馬や大脳皮質において自発的に誘導されることが示されている (Maret et al., 2011; Vyazovskiy et al., 2008)。これらの知見から、睡眠時に生じる自発活動が LTD を誘導していると考えられる。

海馬 Sharp wave

哺乳類の海馬では徐波睡眠時に sharp wave-ripple (SW) が観察される (Buzsaki, 1989)。SW は 20 Hz 前後の sharp wave 成分と 150-250 Hz の ripple 成分が重なっている特徴をもつ。SW はてんかん波を除けば海馬で最も振幅の大きい脳波の一つであり、その発生時には約 10% の細胞集団が発火する (Ylinen et al., 1995)。SW の発生頻度は約 0.5 - 0.6 Hz であるが、学習をさせた後の徐波睡眠中には一過的に頻度が上昇することが報告されている (Eschenko et al., 2008)。

以上のような背景から私は、学習に伴い SW 頻度が上昇することにより、LTD 誘導刺激様の影響が生じるのではないかと仮説を立てた。そこで、*in vivo* および *in vitro* 電気生理学的手法、および光学的手法を組み合わせることにより本仮説を検証した。

【結果】

1. SW の発生頻度変化とシナプス可塑性の関与

まず、生体マウスの海馬 CA1 野にシリコンプローブを埋め込み、局所場電位を記録した。マウスに新奇環境を探索させ、その前後の睡眠中に発生した SW を記録した (図 1A)。覚醒時、および REM 睡眠時は解析から外し、徐波睡眠時のデータのみを用いた。SW の頻度及び強度について解析したところ、ともに上昇し、時間とともに元の状態へと戻る傾向にあった (図 1B)。また、この減弱作用は NMDA 受容体阻害薬である MK801 (i.p., 0.2 mg/kg) によって阻害されたことから、徐波睡眠時に海馬でシナプス可塑性が生じており、SW はこのシナプス可塑性の影響を受けていることがわかった。

次に、この減弱作用が海馬外からの投射により誘導されるものなのか、それとも海馬内における自発的な可塑性であるのかを調べるために、海馬 *in vitro* 標本を用いた検証を行った。スライス標本であっても新奇環境探索を行わせたマウスから海馬急性スライス標本作成し、局所場電位記録を行った (図 2A)。スライス間で SW 頻度変化のタイムコースが異なるため、記録開始から 60 分間の間に、頻度が最大となった時間を 0 分として、時間を揃えた。上昇した発生頻度はピーク点以降徐々に減弱する傾向にあった (図 2B)。この作用は NMDA 受容体阻害薬である D-AP5 によって阻害された。本結果から、SW の発生頻度は、海馬内で自発的に生じる可塑性によって調節されていることが明らかになった。

また、この現象が、神経伝達物質などの適用により人工的に誘導された場合にも観察されるかどうかを確かめるために、アドレナリン β 受容体作動薬であるイソプロテレノールを適用した。 β 受容体の活性化は SW の頻度を上昇させることが報告されている (Ul Haq et al., 2012)。イソプロテレノールを適用すると、すぐに SW の頻度は 1 Hz 前後まで上昇した。この作用は一過的で、すぐに低下し、ベースラインまで低下した (図 3A, B)。この現象も D-AP5 によって阻害されたことから、薬理的に誘導された SW も同様自発的な可

塑性の影響を受けて減弱することが示唆された。

2. 探索直後に発生する SW のパターンがシナプス可塑性に与える影響

in vivo で発生する SW が LTD を誘導する可能性を検証するために、in vivo SW のイベント間隔 (IEI) でシャプファー側枝を電気刺激し、興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) を記録した (図 4A)。まず、新奇環境探索直後の徐波睡眠中の SW の IEI で 15 分間シナプスを刺激したところ、fEPSP の傾きはベースラインよりも大きく低下した。この変化は NMDA 受容体の阻害薬である D-AP5 により阻害されたことから、LTD が誘導されたことによる減弱であることがわかった (図 4B)。

同様の検討を、新奇環境を探索させる前の徐波睡眠時に記録した SW の IEI を用いて行ったところ、LTD は誘導されなかった (図 5)。以上の結果から、新奇環境探索により上方調節を受けた SW の発生タイミングは LTD を誘導するのに十分であることが示唆された。

3. SW を発生する in vitro 標本におけるシナプス抑圧の誘導

SW が LTD を誘導するかどうかを検証した。先行研究から、シナプスに LTD が誘導されるとスパイン (棘突起) が退縮することが報告されている (Zhou et al. 2004)。そこで、SW を発生する状態においてスパインの体積がどのように変化するかを観察した (図 6A)。そのために、Thy1 遺伝子を発現する一部のニューロンにのみ GFP を発現する Thy1-GFP トランスジェニックマウスを使用した (Feng et al., 2000)。これにより、スパインの形態を明瞭に可視化することができる (図 6B)。新奇環境を探索させた Thy1-GFP トランスジェニックマウスから海馬急性スライス標本を作成し、SW を記録しながら CA1 近位樹状突起を撮影した。その結果を図 6C に示す。時間は図 2B と対応するように SW の頻度が最大となる点を 0 として揃えた。退縮するスパイン、増大するスパインの両方がそれぞれ存

在したが、平均すると有意な退縮が認められた（図 6C）。また、この現象は NMDA 受容体の拮抗薬の適用により阻害されたことから、この全体の体積の減少にはシナプス抑圧が関与していることが示唆された（図 6D）。

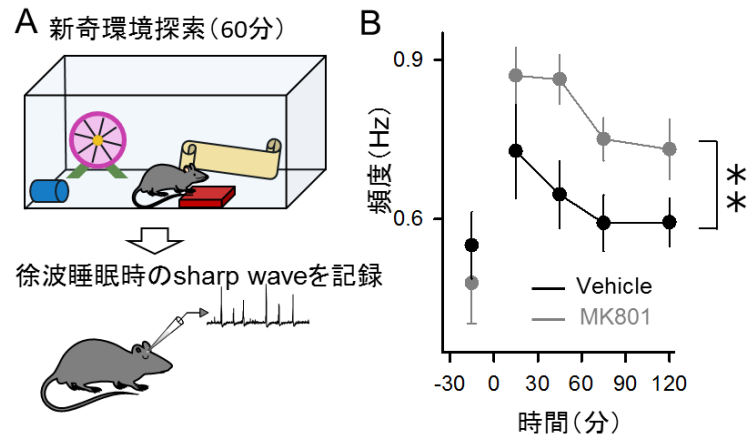


図1 シナプス可塑性による sharp wave の調節 (*in vivo*)

A. 徐波睡眠時に発生する sharp wave を、新奇環境を探索させる前後に記録した。B. 新奇環境探索により、sharp wave の発生頻度が上昇し、その後徐々に減少した。この現象は MK801 (0.2 mg/kg) によって阻害された。** $P < 0.01$, two-way ANOVA, $N = 6$ trials from 2 mice each.

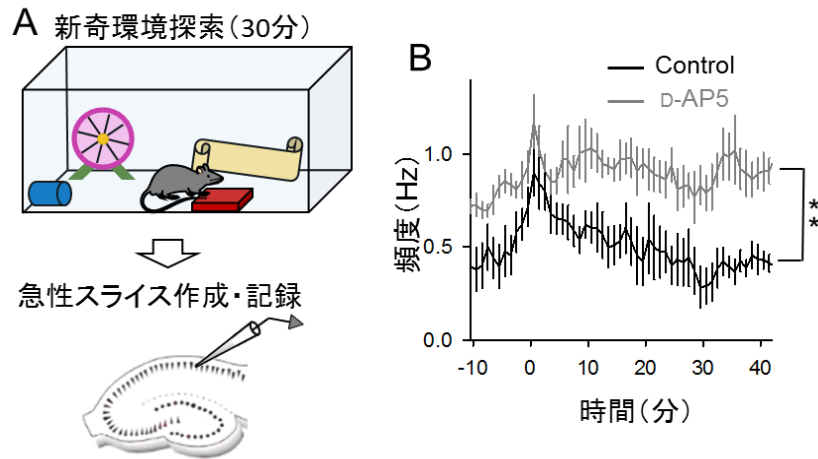


図2 シナプス可塑性による sharp wave の調節 (*in vitro*)

A. 新奇環境探索後、海馬スライス標本を作成した。B. スライス標本から記録した sharp wave の頻度変化。生体マウスからの記録と同様に、徐々に減少する傾向にあった。この現象は D-AP5 (50 μ M) により阻害された。 $N=7$ slices from 7 mice for vehicle and 5 slices from 5 mice for D-AP5.

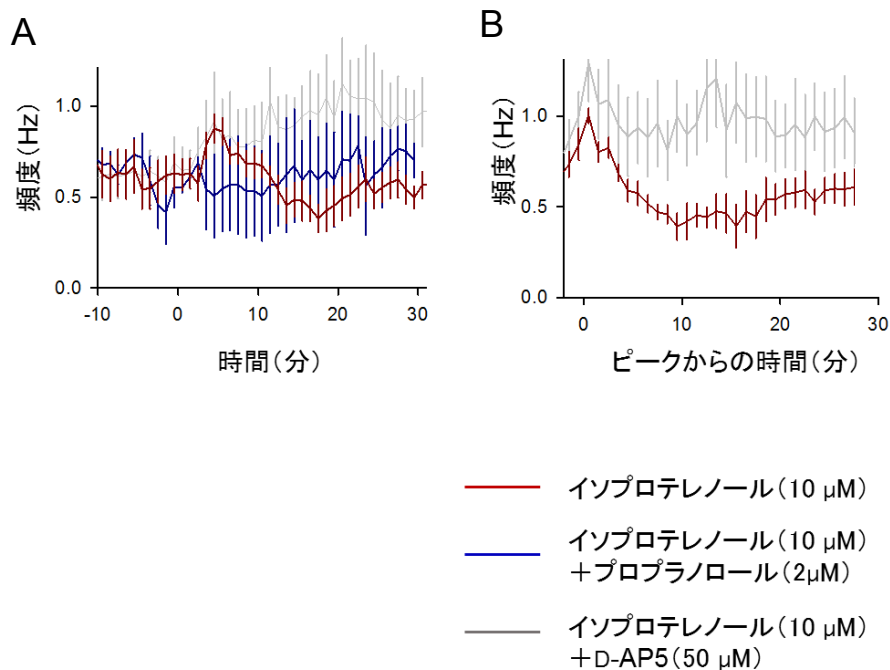


図3 ノルアドレナリンによる SW 頻度の調節

C57BL/6J マウスから急性スライス標本を作成し、局所場電位を記録した。探索は行わせていない。A. 0分からイソプロテレノール (2 μ M) を適用した。プロプラノロール (1 μ M) は-5分から適用した。(イソプロテレノール : $N=7$ 、イソプロテレノール+プロプラノロール : $N=3$ 、イソプロテレノール+D-AP5 : $N=7$) B. 頻度の最も大きかった時間を 0分として揃えたもの。 $P < 0.01$, two-way ANOVA.

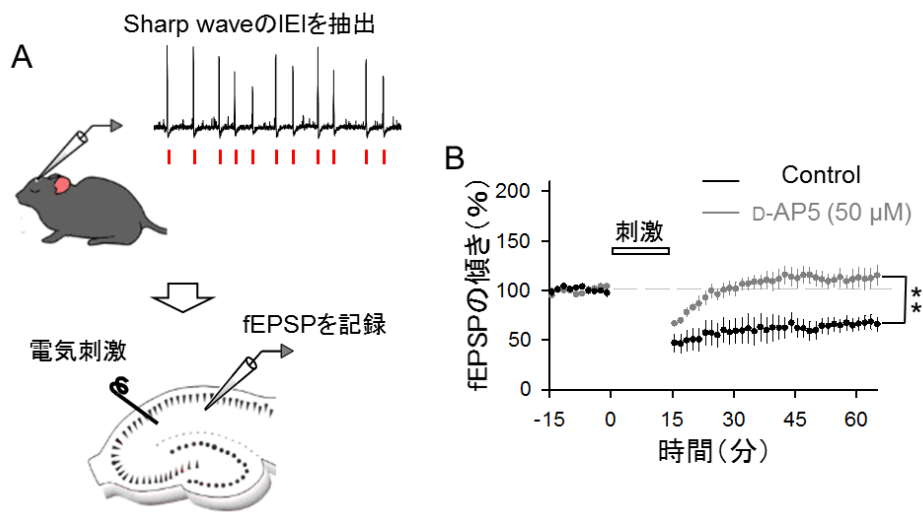


図 4 新奇環境探索後の sharp wave の発生頻度は LTD を誘導するのに十分

A. 生体マウスの徐波睡眠中に記録した sharp wave からイベント間隔の時間 (IEI) を抽出し、そのタイミングに合わせてシナプスを刺激した。B. 新奇環境探索直後の徐波睡眠時に発生する sharp wave の IEI でシナプスを刺激したときの興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) の傾きの変化。LTD が誘導された。** $P < 0.01$, two-way ANOVA, $N = 6$ slices each.

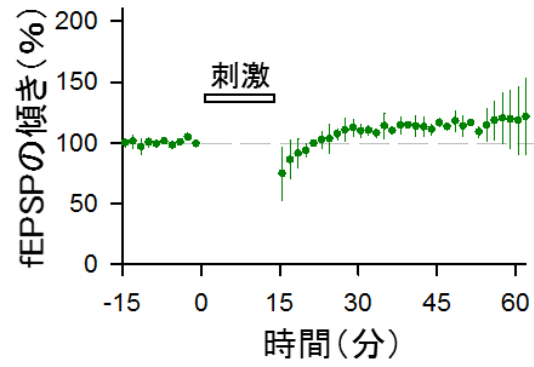


図 5 新奇環境探索前の sharp wave 頻度は LTD を誘導するのに十分ではない

新奇環境探索前の徐波睡眠時に発生する sharp wave の IEI でシナプスを刺激したときの fEPSP の傾きの変化。N=4 slices.

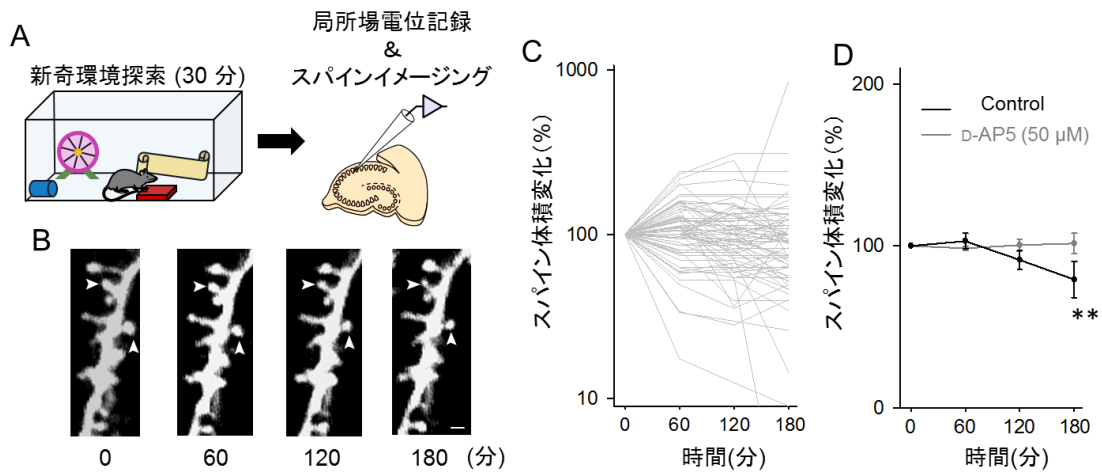


図 6 シナプス可塑性によりスパインが退縮する

A. 新奇環境探索を行わせた Thy1-GFP マウスから急性スライス標本を作成し、二光子顕微鏡を用いて sharp wave を記録しながら CA1 スパインの形態を観察した。B. 3 時間にわたりタイムラプスイメージングを行った。矢じりは退縮したスパインを示している。Scale bar= 1 μm. C. 全スパインの体積の変化を灰色の線で表している。退縮するスパイン、増大するスパインの両方がそれぞれ存在していた。N=78 spines. D. 全スパインの体積の平均値。**P < 0.01, Z-test for a proportion, N=78 spines for control and 32 spines for D-AP5 (50 μM).

【考察】

SW の自発的な発生頻度変化

近年の研究から、学習後に SW の発生頻度が上方調節を受けることが報告されている (Eschenko et al., 2008)。これらは、SW の発生がシナプス可塑性により上方調節されることを示唆している。本研究では、いったん上昇した後の SW がベース状態に戻るメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、NMDA 受容体を介したシナプス抑圧により減弱を受けることが明らかとなった。先行研究から、回路に人工的に LTD を誘導すると SW の発生が抑制されることが報告されている (Behrens et al., 2005)。また、種々の神経伝達物質と SW の下方調節についても調べられているが、薬理的な誘導や人工的な刺激を行わずに SW の頻度低下を記述した知見は本研究が初めてである。

さらに、本研究ではシナプス可塑性と SW の頻度低下の関係により詳細に迫るために、SW の *in vitro* 系を用いた。内側中隔核や腹側被蓋野、青斑核等の外部神経投射が切断されているにも関わらず、SW の自発的な減弱を確認することができた。また、この作用が NMDA 受容体依存的であることも確認できた。これは、SW が海馬神経回路にシナプス抑圧を誘導することを示唆するものである。その後、SW 頻度は再び時間をかけて上昇した。これは、SW の sharp wave 成分と重なって発生する ripple 成分によるものであると考えられる。ripple 中で同期するニューロン同士には STDP (スパイクタイミング依存可塑性) が生じ、LTP が誘導されることが報告されている。これにより、抑圧されたシナプスが徐々に LTP 側へ偏っていくことにより、SW の発生が上方調節を受けたものと考えられる。このようにして、sharp wave によるシナプス抑圧の誘導と、ripple による LTP の誘導のバランスにより、sharp wave の発生が調節を受けていることが示唆される。

本研究では、ノルアドレナリンにより上方調節を受けた SW も自発的に、かつ NMDA 受容体依存的に減弱した。しかしこのデータは、いったん試薬を適用すると上昇し続けるとい

う知見と、一見矛盾しているように見える (Miyawaki et al., 2014; Ul Haq et al., 2012)。この原因として、過去の知見は SW のベースの頻度が低いスライスを用いていることが挙げられる。薬を適用してから 1 Hz に到達するまでに長い時間を要するため、継続的に上昇し続けているように見えているのであろう。また、過去の研究から、青斑核を刺激すると海馬でシナプス抑圧が生じることが報告されている (Hansen and Manahan-Vaughan, 2014)。これらのデータから考察すると、青斑核が活性化することにより、海馬においてノルアドレナリンの濃度が上昇し、SW の頻度が増える。その結果回路にシナプス抑圧が誘導されるというメカニズムが予想できる。さらに、ノルアドレナリンの適用により可塑性誘導のルールが緩和される知見もあることから (Clem and Haganir, 2013; Selbach et al., 2004)、SW の頻度が 1 Hz に満たない状態でも神経伝達物質等の濃度により、抑圧現象の誘導が調節されていることが示唆される。

今後は、SW 自体がその発生パターンを制御することを直接的に確かめることが求められる。たとえば、光遺伝学を利用して、SW が発生するタイミングに合わせて回路の活動を抑制する手法を用いれば、SW が自己抑制することを示す証拠となるであろう。

探索直後に発生する SW のパターンがシナプス可塑性に与える影響

1990 年代の研究を中心に、脳波の発生周期でシナプスを刺激し、可塑性が誘導されるか調べられてきた。それにより、シータリズムでシナプスを刺激すると LTP が誘導されることが報告されている。また、アセチルコリンの存在下において、場所細胞の発火パターンでシナプスを刺激すると回路に LTP が誘導されることも知られている (Isaac et al., 2009)。このように、海馬自発活動と LTP の誘導パターンについては調べられているが、自発活動と海馬 LTD の関係に迫った知見はほとんどない。実際に、ホームケージで徐波睡眠をしている時の SW の発生パターンでシナプスを刺激しても LTD は誘導されなかったが、学習後の徐波睡眠時に発生する SW のパターンで刺激をしたら LTD が誘導された。このように、LTP によってシナプスが強められ、全体の興奮性レベルがある一定以上の状態になったと

きに初めて回路に LTD を誘導する機構が走るようなシステムが、海馬内に備わっていると考えられる。その媒体が SW なのであろう。

てんかん時に発生する SW も例外ではない。てんかん時の SW は回路の興奮性が異常に上昇した時に誘導されるが、これは回路の異常興奮を鎮めるために生じている可能性がある。しかし、てんかん時は PV (+) インターニューロンが発火できないため、強めるべきシナプスの選択ができない (Karlocai et al., 2014; Mizunuma et al., 2014)。これにより、すべてのシナプスが興奮性に傾いてしまうため、より症状が悪化してしまうものと推察される。対策として、PV (+) インターニューロンなど、抑制性のインターニューロンの活動操作を行うことにより、回路全体の秩序を正常状態へと戻せるかどうか検証することが求められる。

SW 発生状態におけるスパインの構造可塑性

SW の発生とスパインの構造可塑性の関係を検証した。その結果、増大したままのスパインおよび退縮したままのスパインの両方が認められた。これは、SW の発生時には LTP、LTD の両方が回路に誘導されていることを示唆するものである。前述の通り、sharp wave により回路全体にシナプス抑圧が誘導されるが、ripple 中で発火したニューロン集団には LTP が誘導されるため、このような現象が誘導されるのであろう。

今後は、SW により強められるシナプスと弱められるシナプス、それぞれの特性を調べる事が求められるであろう。例えば、増大するスパイン、退縮するスパインのそれぞれが、直前の学習に関与したニューロンのものであるかどうかは、今後の研究課題として残される。またそれだけでなく、SW の発生に同期したスパインであるかどうかも検討すべき課題の一つである。私は学習時に活動しなかったニューロンの、SW に同期するスパインが退縮するのではないかと仮説を立てている。このようにして、スパインの「活動」に着目することも重要であるが、未だ SW 発生時のシナプス活動を捉えた知見は存在しないため今後の技術の発達が望まれる。

SW の減弱とスパインの退縮までの時間に数十分オーダーの差が見られた。スパインの退縮は、カルシニューリンが活性化された後、コフィリンが活性化され、アクチンフィラメントが脱重合を受けることにより誘導されると考えられている(Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004)。一方で、電気的な LTD は、カルシニューリンが活性化された後、CaMKII が不活性化型になることにより誘導される。このように、電気的な LTD の誘導とスパインの形態変化が異なるシグナル経路によって調節されていることが、この時間差が生まれる理由として挙げられる。

ここまで一連の考察を述べたが、本実験結果が、LTD ではなく海馬シナプスの自発的なターンオーバーの一過程を切り取ったものを見ているにすぎないという可能性を完全に拭き切ることにはできない (Attardo et al., 2015)。そのため、電気生理学的、分子生物学的手法を用いた更なるアプローチが求められる。

SW と大脳皮質の同期活動について

本研究はすべて海馬局所回路に着目して行ったが、大脳皮質にも当てはまる可能性が高い。SW 発生時には、大脳皮質においてスピンドル（棘波）が発生し、これらのタイミングは同期することが知られている (Hahn et al., 2006; Ji and Wilson, 2007; Siapas and Wilson, 1998)。つまり、大脳皮質のダウンスケーリングの起点は海馬である可能性が高い。海馬の興奮性が高まり SW の頻度が上昇すると、大脳皮質では棘波の発生頻度が上昇し、海馬—大脳皮質全体にシナプス抑圧が誘導される。これにより、生じた LTP がダウンスケーリングされ、不要な記憶が消去されるのではないだろうか（このシナプス抑圧の誘導が「不要な」記憶の消去であるかどうかについては次の章で述べる）。

また、SW と棘波の同期は徐波 (slow wave) によって誘導されると考えられている。近年、Konnerth らにより、徐波の位相の同期に不具合が生じることがアルツハイマー病の原因であることが示された (Busche et al., 2015)。もしこの仮説が正しいならば、海馬を開始点とする自発的シナプス抑圧が、大脳皮質ではうまく誘導できなくなっているため、記憶の機能が飽

和し、記憶障害を発現するのではないだろうか。今後、大脳皮質の可塑性や病態を絡めた研究が増えることを期待する。

第2部

海馬における自発的シナプス抑圧の役割

【背景】

第一章で述べたように、SW の発生状態では海馬の局所回路にシナプス抑圧が誘導される。シナプス抑圧が誘導されることにより、海馬の情報処理にどのような利点が生まれるのであろうか。むしろ、興奮に傾いた回路状態をクールダウンすること自体、意義があるといえるが、はたしてそれだけなのであろうか。

海馬の重要な役割の一つに、SW による記憶の再生がある(Lee and Wilson, 2002; Mehta et al., 2002; Wilson and McNaughton, 1993)。学習時に活動したニューロン集団の活動は、徐波睡眠時に SW 中で再生される。その再生時間は短くなり、行動時の約 20 倍で圧縮再生されることが知られている。また、大脳皮質においても記憶の再生は観察される (Euston et al., 2007; Ji and Wilson, 2007)。これらの知見から、記憶再生により海馬から大脳皮質へと情報が転写され、記憶が固定されると考えられている (Jadhav and Frank, 2009)。また、SW の発生をオンラインで阻害すると、空間記憶の定着が阻害されるという報告もあり (Ego-Stengel and Wilson, 2009; Girardeau et al., 2009)、SW による記憶の再生と空間記憶は密接に関わっていることは明らかである。

私は、SW の発生が単に回路全体を抑制するのではなく、記憶に関与していない「不要なニューロン」間にのみシナプス抑圧を誘導しているのではないかと仮説を立てた。すなわち、記憶再生の「ノイズ除去」を自発的に行っているというものである。

これを検証するために、活性化履歴を蛍光タンパク質 dVenus で標識することのできる Arc-dVenus マウスを用いた (Eguchi and Yamaguchi, 2009)。本マウスにカルシウムイメージングを適用することにより、記憶に関わったニューロンをそうでないニューロンと分けて、SW 中での振る舞いを記録した。

【結果】

まず、*Arc-dVenus* マウスを用いて行動時に活動レベルの高かったニューロンを蛍光タンパク質 *dVenus* でラベルすることを試みた。このマウスはニューロンが活動してから約 5 時間後に *dVenus* タンパクを発現するため、図 2 のような探索直後の SW を記録することができない。そこで、マウスに探索をさせた二時間後に、再び同一の環境を探索させた。これにより、探索時に活動したニューロンの可塑性状態が興奮側へ偏った状態のまま、それらのニューロンをラベルすることができる。なお、一度目の探索と二度目の探索で、80%を超えるニューロン集団がオーバーラップすることはすでに確認している（補足図 1）。

探索をさせたマウスからスライス標本を作成し、海馬 CA1 野から SW の発生を記録しながらカルシウムイメージングを適用した（図 7A-C）。*dVenus* (+) 群と *dVenus* (-) ニューロンのうち何%が SW 中で発火するか、その参加率を求めた。1 分間に 0.33 回以上 SW 中で発火したニューロンを参加ニューロンと定義した。参加率が時間とともにどう遷移するかを検証した。0 分は SW の頻度が最大となる点とした。*dVenus* (+) 群の参加率は 0 分、40 分の間で差が認められなかったのに対し、*dVenus* (-) は両タイムポイントの間で有意な低下が確認された（図 8A）。この現象は D-AP5 の適用によりブロックされたことからシナプス可塑性によって誘導されたものであると考えられる（図 8B）。しかし、NMDA 受容体拮抗薬で阻害されたとはいえ、SW の発生頻度自体が低下したことによる影響が完全には拭えない。そこで、個々のニューロンが、全 SW 中何%に参加したかを算出した。その結果、*dVenus* (-) 群の SW 中での発火率が有意に減少した（図 9A）。その一方で、*dVenus* (+) 群の発火は維持されたままであった。この現象も、NMDA 受容体の拮抗薬によって阻害された（図 9B）。

以上の結果から、シナプス抑圧により、行動時に活動しなかったニューロンの SW への参加が優先的に抑制されることが示唆された。

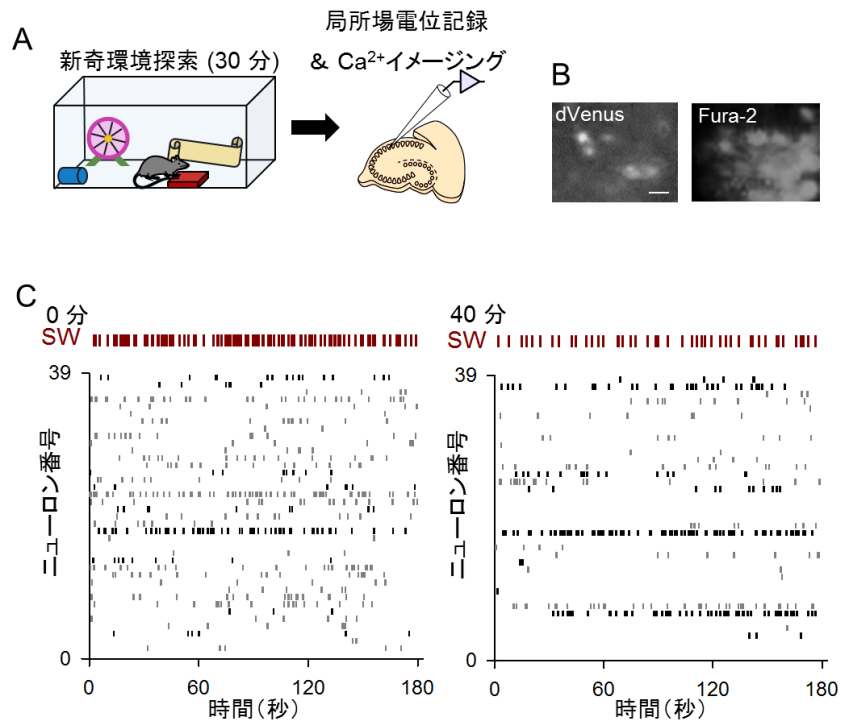


図 7 sharp wave 構成成分の時間経過による影響

A. 慣れた環境で Arc-dVenus マウスを 2 回探索させ、2 回目の探索直後に急性スライス標本を作成した。1 回目の探索から 5 時間後に記録を開始した。B. dVenus の蛍光画像 (左)、および Fura-2 蛍光画像 (右) Scale bar = 20 μm. (右) C. ラスタープロット。dVenus (+)ニューロンの発火を黒色で、dVenus (-)ニューロンの点を灰色で、それぞれ表している。上の濃赤色の点は、SW が発生したタイミング。

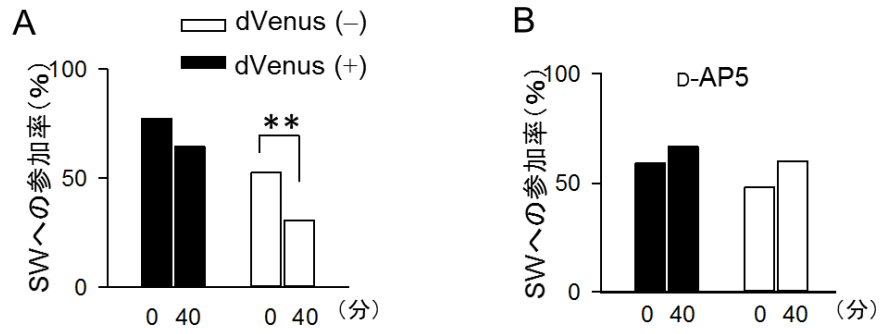


図 8 行動時に活動性が低かったニューロンはシナプス可塑性により sharp wave 構成成分から除かれる

A. sharp wave への参加率。Sharp wave への参加は、Venus (-) 群において有意に低下した。
 ** $P < 0.01$, Fisher's exact probability test, $n = 192$ dVenus(-) and 31 dVenus(+) cells. B. A の現象は NMDA 受容体拮抗薬である D-AP5 ($50 \mu\text{M}$) によって阻害された。 $N = 145$ dVenus (-) and 39 dVenus (+) cells.

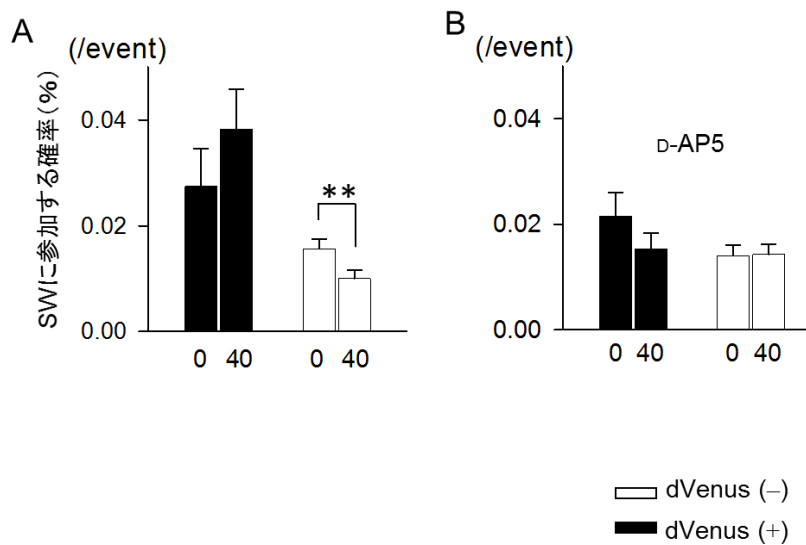
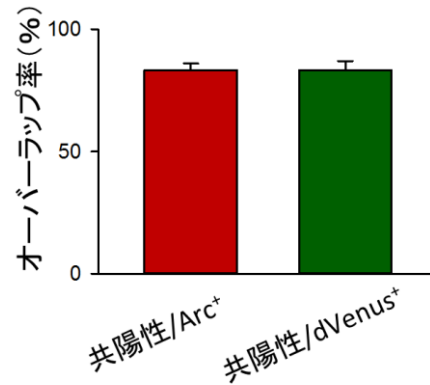


図9 行動時に活動性が低かったニューロンはシナプス可塑性により sharp wave 構成成分から除かれる

A. 個々のニューロンの sharp wave への参加率。縦軸は、(sharp wave 中で発火した回数) / (全 sharp wave)。Sharp wave への参加は、Venus (-) 群において有意に低下した。** $P < 0.01$, paired t -test, $N = 192$ dVenus(-) and 31 dVenus(+) cells. B. A の現象は NMDA 受容体拮抗薬である D-AP5 (50 μ M) の適用により阻害された。 $N = 145$ dVenus (-) and 39 dVenus (+) cells.



補足図 1 同じ環境を探索させたときの Arc 発現のオーバーラップ率

Arc-dVenus マウスに空間探索を行わせた 3 時間後に、再び同じ環境を探索させた。その直後に還流固定を行い、免疫染色を行った。これにより、一回目の探索時の Arc 発現を dVenus で、二回目の探索時の Arc 発現を免疫染色により、それぞれラベルした。赤色の棒グラフのオーバーラップ率は $(\text{Arc,dVenus 共陽性細胞数}) / \text{Arc 陽性細胞数}$ を、緑色の棒グラフは $(\text{Arc,dVenus 共陽性細胞数}) / \text{dVenus 陽性細胞数}$ を、それぞれ表している。

【考察】

本研究では、SW の発生により誘導される自発的なシナプス抑圧が、記憶再生の構成成分に与える影響を検証した。その結果、直前の行動時に活動しなかったニューロン集団の SW への参加が選択的に抑制された。このような自発的プロセスにより、記憶再生のシグナルノイズ比が上昇することで、精度高く、記憶が再生されていることが示唆される。

このような選択的可塑性の誘導メカニズムとして、次のように考察する。SW の発生により、回路全体に一様にシナプス抑圧が誘導されるが、強く LTP が生じているシナプスでは相殺される、または、結果的に LTP に傾いた状態で残る、というものである。先行研究から、LTP が誘導されたシナプスは、しばらくの間グルタミン酸への感受性が低下することにより「保護」されることが報告されている (Youssef et al., 2000, 2006, 2001)。これは、LTP が誘導されたばかりのシナプスは、他の可塑性誘導刺激に対して頑強であることを意味している。実際に、このようなメカニズムにより、記憶に関わったニューロン集団は自発的なシナプス抑圧の影響を受けずに「残った」ようにみえるのではないだろうか。

今回はすべて発火のみに着目した現象を捉えたものであるが、今後は閾値下膜電位などを記録することで、プレシナプスとの間に生じるシナプス可塑性の変化をより詳細にとらえることにより、新たなルールが見出されるのではないかと考える。

【参考文献】

- Attardo, A., Fitzgerald, J.E., Schnitzer, M.J., 2015. Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. *Nature* 523, 592–596. doi:10.1038/nature14467
- Bear, M.F., Abraham, W.C., 1996. Long-term depression in hippocampus [review]. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 437–462. doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.002253
- Behrens, C.J., van den Boom, L.P., de Hoz, L., Friedman, A., Heinemann, U., 2005. Induction of sharp wave-ripple complexes in vitro and reorganization of hippocampal networks. *Nat. Neurosci.* 8, 1560–1567. doi:10.1038/nn1571
- Bliss, T. V, Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. doi:10.1038/361031a0
- Bliss, T. V, Gardner-Medwin, a R., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 357–374. doi:4727084
- Busche, M.A., Kekuš, M., Adelsberger, H., Noda, T., Förstl, H., Nelken, I., Konnerth, A., 2015. Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer’s disease models. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/nn.4137
- Buzsaki, G., 1989. Two-stage model of memory trace formation: A role for “noisy” brain states. *Neuroscience* 31, 551–570. doi:10.1016/0306-4522(89)90423-5
- Buzsáki, G., 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, 325–340. doi:10.1016/S0896-6273(02)00586-X
- Castro, C. a, Silbert, L.H., McNaughton, B.L., Barnes, C. a, 1989. Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. *Nature*

342, 545–548. doi:10.1038/342545a0

Clem, R.L., Haganir, R.L., 2013. Norepinephrine Enhances a Discrete Form of Long-Term Depression during Fear Memory Storage. *J. Neurosci.* 33, 11825–11832.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3317-12.2013

Dudek, S.M., Bear, M.F., 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4363–4367. doi:10.1073/pnas.89.10.4363

Ego-Stengel, V., Wilson, M.A., 2009. Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* 10, NA–NA. doi:10.1002/hipo.20707

Eguchi, M., Yamaguchi, S., 2009. In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. *Neuroimage* 44, 1274–1283.
doi:10.1016/j.neuroimage.2008.10.046

Eschenko, O., Ramadan, W., Mölle, M., Born, J., Sara, S.J., 2008. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn. Mem.* 15, 222–228.
doi:10.1101/lm.726008

Euston, D.R., Tatsuno, M., McNaughton, B.L., 2007. Fast-Forward Playback of Recent Memory Sequences in Prefrontal Cortex During Sleep. *Science* (80-.). 318, 1147–1150.
doi:10.1126/science.1148979

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R., 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51. doi:10.1016/S0896-6273(00)00084-2

Fujisawa, S., Buzsáki, G., 2011. Supplemental Information A 4 Hz Oscillation Adaptively

Synchronizes Shigeyoshi Fujisawa and György Buzsáki. *Neuron* 72, 153–65.

doi:10.1016/j.neuron.2011.08.018

Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., Zugaro, M.B., 2009. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat. Neurosci.* 12, 1222–1223.

doi:10.1038/nn.2384

Goda, Y., Stevens, C.F., 1996. Long-term depression properties in a simple system. *Neuron* 16, 103–11. doi:10.1016/S0896-6273(00)80027-6

Hahn, T.T.G., Sakmann, B., Mehta, M.R., 2006. Phase-locking of hippocampal interneurons' membrane potential to neocortical up-down states. *Nat. Neurosci.* 9, 1359–61.

doi:10.1038/nn1788

Hansen, N., Manahan-Vaughan, D., 2014. Locus Coeruleus Stimulation Facilitates Long-Term Depression in the Dentate Gyrus That Requires Activation of β -Adrenergic Receptors. *Cereb. Cortex* bht429–. doi:10.1093/cercor/bht429

Isaac, J.T.R., Buchanan, K. a, Muller, R.U., Mellor, J.R., 2009. Hippocampal place cell firing patterns can induce long-term synaptic plasticity in vitro. *J. Neurosci.* 29, 6840–6850.

doi:10.1523/JNEUROSCI.0731-09.2009

Jadhav, S.P., Frank, L.M., 2009. Reactivating Memories for Consolidation. *Neuron* 62, 745–746.

doi:10.1016/j.neuron.2009.06.002

Ji, D., Wilson, M.A., 2007. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nat. Neurosci.* 10, 100–7. doi:10.1038/nn1825

Karlocai, M.R., Kohus, Z., Kali, S., Ulbert, I., Szabo, G., Mate, Z., Freund, T.F., Gulyas, A.I., 2014.

Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what's the difference? *Brain* 137,

463–485. doi:10.1093/brain/awt348

Larson, J., Wong, D., Lynch, G., 1986. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 368, 347–350. doi:10.1016/0006-8993(86)90579-2

Lee, A.K., Wilson, M.A., 2002. Memory of Sequential Experience in the Hippocampus during Slow Wave Sleep 36, 1183–1194.

Maret, S., Faraguna, U., Nelson, A.B., Cirelli, C., Tononi, G., 2011. Sleep and waking modulate spine turnover in the adolescent mouse cortex. *Nat. Neurosci.* 14, 1418–1420. doi:10.1038/nn.2934

Mehta, M.R., Lee, A.K., Wilson, M.A., 2002. Role of experience and oscillations in transforming a rate code into a temporal code 8–11. doi:10.1038/nature00808.1.

Miyawaki, T., Norimoto, H., Ishikawa, T., Watanabe, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2014. Dopamine receptor activation reorganizes neuronal ensembles during hippocampal sharp waves in vitro. *PLoS One* 9.

Mizunuma, M., Norimoto, H., Tao, K., Egawa, T., Hanaoka, K., Sakaguchi, T., Hioki, H., Kaneko, T., Yamaguchi, S., Nagano, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2014. Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. *Nat. Neurosci.* 17, 503–5.

Moser, E.I., Krobort, K. a, Moser, M.B., Morris, R.G., 1998. Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281, 2038–2042. doi:10.1126/science.281.5385.2038

Mulkey, R.M., Malenka, R.C., 1992. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9, 967–975. doi:10.1016/0896-

6273(92)90248-C

- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., Lin, J.Y., Tsien, R.Y., Malinow, R., 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511, 348–352. doi:10.1038/nature13294
- Nagai, T., Iбата, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87–90. doi:10.1038/nbt0102-87
- Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., Bonhoeffer, T., 2004. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44, 759–67. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.016
- Norimoto, H., Matsumoto, N., Miyawaki, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2013. Subicular activation preceding hippocampal ripples in vitro. *Sci. Rep.* 3, 2696.
- Norimoto, H., Mizunuma, M., Ishikawa, D., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2012. Muscarinic receptor activation disrupts hippocampal sharp wave-ripples. *Brain Res.* 1461, 1–9.
- Sakatani, S., Seto-Ohshima, A., Itohara, S., Hirase, H., 2007. Impact of S100B on local field potential patterns in anesthetized and kainic acid-induced seizure conditions in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1144–54. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05337.x
- Selbach, O., Bohla, C., Barbara, A. et al., 2010. Orexins/hypocretins control bistability of hippocampal long-term synaptic plasticity through co-activation of multiple kinases. *Acta Physiol.* 198, 277–285. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02021.x
- Selbach, O., Doreulee, N., Bohla, C., Eriksson, K.S., Sergeeva, O. a, Poelchen, W., Brown, R.E., Haas, H.L., 2004. Orexins/hypocretins cause sharp wave- and theta-related synaptic plasticity in the hippocampus via glutamatergic, gabaergic, noradrenergic, and cholinergic signaling.

Neuroscience 127, 519–28. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.012

Siapas, A.G., Wilson, M.A., 1998. Coordinated Interactions between Hippocampal Ripples and Cortical Spindles during Slow-Wave Sleep. *Neuron* 21, 1123–1128. doi:10.1016/S0896-6273(00)80629-7

Stickgold, R.J., Alsop, D., Gaab, N., Schlaug, G., Born, J., Cirelli, C., Greenspan, R.J., Tononi, G., Armstrong, J.D., Shaw, P.J., Winther, M.E., Acebes, A., Ramanan, N., Gutierrez, C.M., Heller, E. a, Pack, I., Abel, T., Robinson, D.F., Suzuki, Y., Vine, L., Gottschalk, L., Donlea, J.M., Hall, J.C., Jackson, F.R., Siegel, R.W., 2011. Sleep and Synaptic Homeostasis : *Science* (80-). 1576–1581.

Sun, Y., Norimoto, H., Pu, X.-P., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2012. Cannabinoid Receptor Activation Disrupts the Internal Structure of Hippocampal Sharp Wave–Ripple Complexes. *J. Pharmacol. Sci.*

Takahashi, N., Sasaki, T., Matsumoto, W., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2010. Circuit topology for synchronizing neurons in spontaneously active networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10244–10249. doi:10.1073/pnas.0914594107

Tononi, G., Cirelli, C., 2014. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron* 81, 12–34. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.025

Tononi, G., Cirelli, C., 2006. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 10, 49–62. doi:10.1016/j.smr.2005.05.002

Ul Haq, R., Liotta, A., Kovacs, R., Rösler, A., Jarosch, M.J., Heinemann, U., Behrens, C.J., 2012. Adrenergic modulation of sharp wave-ripple activity in rat hippocampal slices. *Hippocampus* 22, 516–33. doi:10.1002/hipo.20918

- Vyazovskiy, V. V, Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U., Tononi, G., 2008. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat. Neurosci.* 11, 200–208. doi:10.1038/nn2035
- Wilson, M. a, McNaughton, B.L., 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261, 1055–1058. doi:10.1126/science.8351520
- Ylinen, a, Bragin, a, Nádasdy, Z., Jandó, G., Szabó, I., Sik, a, Buzsáki, G., 1995. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J. Neurosci.* 15, 30–46.
- Youssef, F., Stone, T.W., Addae, J.I., 2000. Interactions of glutamate receptor agonists with long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Eur. J. Pharmacol.* 398, 349–359.
- Youssef, F.F., Addae, J.I., McRae, a, Stone, T.W., 2001. Long-term potentiation protects rat hippocampal slices from the effects of acute hypoxia. *Brain Res* 907, 144–150.
- Youssef, F.F., Addae, J.I., Stone, T.W., 2006. NMDA-induced preconditioning attenuates synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1073-1074, 183–9. doi:10.1016/j.brainres.2005.12.008
- Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M.M., 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749–757. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.011

【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜り、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二 教授に心よりお礼申し上げます。ダメ人間だった私を博士発表ができるくらいにまで育て上げてくださった池谷先生は生涯の恩師です。自由にのびのびと研究できる環境の提供から、細かい実験・解析手法の指導に至るまで、常に有益なご指導、ご助言を賜りました。また、様々な障害から常に守ってくださいました。先生の温かい励ましがなければ、5年間最後まで走りきることができませんでした。先生のスキルを習得するのに5年間では全然足りませんでした。先生は、今後は今まで学んだことを生かし、少しでも恩返しができるかと考えております。

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、本研究に対する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申し上げます。先生がセミナー等でくださるコメントはいつも新しい洞察に満ちていて、多くの刺激と励ましをいただきました。

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 佐々木拓哉 助教に心よりお礼申し上げます。先生の発言の一つ一つがクリティカルで、スペックの差を痛感しました。身近に模範となる研究者がいてくださったおかげで、常に緊張感をもって研究に励むことができました。

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 竹内春樹 薬学研究員に心よりお礼申し上げます。先生の研究に対する姿勢から瞬時に他者の研究の本質をとらえる頭の良さを本当に尊敬します。これからも目標にさせてください。

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 助教に心よりお礼申し上げます。先生は、成功するためには決して努

力を惜しんではならないということ、行動で示してくださいました。

本研究を遂行するにあたり、*in vivo* 実験において技術的な御協力および解析の御指導をいただきました 理化学研究所 システム神経生理学チーム 藤澤茂義 ユニットリーダーにこころより感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、*Arc-dVenus* トランスジェニックマウスを用いた実験において技術的な御協力をいただきました岐阜大学 医学系研究科 山口瞬 教授にこころより感謝いたします。

本研究における実験手技、データ解析、研究に対する心構えなど研究のあらゆる場面において博士課程をともにすごした同教室 小林千晃、中山大輔、舟山健太、松本信圭、三浦友樹 各氏に心より感謝いたします。皆と同期で本当に良かった。一人一人が、僕がどんなに努力しても手に入れることのできない異色の才能を持っていて、そんな皆と過ごせた5年間は本当に刺激的でした。皆、振り切れた異常さをもっているくせに自分が一番普通だと思っている姿は滑稽そのものでした。僕のような普通の人間がいるからまとまりを保てたと思っています。礼には及びません。今後も、それぞれの個性を生かして大活躍してください。皆さんの輝かしい将来をととても楽しみにしています。

本実験を様々な面からサポートしていただきました同教室 池谷グループのみなさま（坂口哲也氏、阿部麗実氏、石川智愛氏、宮脇健行氏、岩寄諭嗣氏、上村成章氏、岡田真実氏、岡本和樹氏、牧野健一氏、高木夕貴氏、渡邊裕亮氏、高夢璇氏）に心よりお礼申し上げます。とくに石川さんはいつも雑談の相手をしてくださいましたし、牧野くんは美しい免疫染色を行ってくださいました。上村君は面白くない話をしても笑ってくださいましたし、岡本君は書物の提供をしてくださいました。高木さんは後輩を的確に「叱る」ための練習台になってくださいました。感謝しています。

皆さんと一緒に研究ができて楽しかったです。研究室の良き伝統を今後の後輩たちへと引き継いでください。

研究生を送る中で、楽しく、暖かいご支援、ご協力を頂きました研究室内外の先輩、後輩、同輩の皆様、そしていつも温かく見守ってくれた家族に心より感謝いたします。