

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03402

研究課題名(和文) ストレス経験により記録される海馬内経験情報の可視化と符号化ルールの解明

研究課題名(英文) Learning-promoted synaptic diversity and a possible encoding rule of CA1 pyramidal neurons

研究代表者

美津島 大 (Mitsushima, Dai)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70264603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：雄ラットをケージに馴化させ、拘束ストレス、雌との社会性接触、雄との社会性接触、新奇物体との接触など、いずれかのエピソードを10分間経験させ、前後の海馬CA1ニューロン群における多ニューロン発火活動を自由行動状態で記録した。経験40分後に興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性をスライスパッチクランプ法で解析した。経験前には散発的なbasal発火活動が中心であるが、経験中と直後にbasal発火の3SDを超える自発性高頻度発火が何度も発生し、続いて約50msの発火クラスター(リップル発火)が無数に発生した。自発性高頻度発火、リップル発火、シナプス多様化はいずれも直近のエピソード経験に特異的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記録過程を明らかにできれば、認知症など高次機能疾患モデルと比較し、病態生理の解明や診断法の確立に生かせる。実際、Amyloid beta1-42 oligomerの海馬内投与は、エピソード学習を阻害し、閾値低下による異常発火やCA1シナプスにおけるGABAA受容体単一チャネル電流の低下など様々な病態変化を示した。どの段階でシナプスや発火活動に情報破綻が生じるのか疾患独自の障害発生源を特定し、薬物を用いた治療戦略に活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We acclimated male rats to home cage and allowed them to experience one of the following episodes for 10 min: restraint stress, social contact with a female, social contact with a male, or contact with a novel object, and recorded multiple unit firing activity in the hippocampal CA1 neurons before and after in a freely moving condition. Forty minutes after the experience, the plasticity at excitatory and inhibitory synapses was analyzed using slice patch clamp technique. Although sporadic basal firings were mainly observed before the experience, spontaneous high-frequency firing over 3SD of basal firings occurred many times during and immediately after the experience, followed by numerous firing clusters (ripple firings, approx 50 msec duration). By analyzing the diversity, we found the diversity of spontaneous high-frequency firings, ripple firings, and synaptic diversification were specific to the most recent episodic experience.

研究分野：神経生理学

キーワード：エピソード学習 AMPA受容体 GABAA受容体 super burst ripple firings synaptic diversity memory encoding entropy

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体情報の解読は生物学を根底から変革し、その操作と応用は医学を飛躍的に進歩させた。遺伝子の符号化ルールは1960年代にNirenbergらによって明らかにされ、2004年に、ヒトゲノムDNAの情報解読が完了した。ただ、ATGCの4進法で記銘された31億塩基対のヒトゲノムの情報量は、2進法では62億ビット(=0.76ギガバイト)に過ぎず、映画1時間分の情報量に満たない。

我々の脳には、1日でこれを遥かに上回る情報が入り、一部が記憶として残されるが、海馬はどのように経験情報を符号化しているのだろうか? Hebb則が発表された1949年、抑制性ニューロンは認知されておらず、長期増強現象(LTP)は興奮性シナプスで発見された(Lømo 1966)。申請者は海馬CA1ニューロンに着目し、AMPA受容体の興奮性シナプスへの移行が、シナプスの強化と学習成立に必要であることを初めて立証し(Mitsushima et al. *PNAS* 2011)、GABA_A受容体を介する抑制性シナプスも学習依存的に強化される事実を初めて掴んだ(図1 Mitsushima et al. *Nat Commun*, 2013)。この結果を踏まえ、興奮性と抑制性のシナプス可塑性を包括的に組み込んだ、新たな学習仮説を提案した(図2 日本生理学会 *Science topics* 88、日本神経科学学会 *Topics* 2014)。

仮説を前提に研究を進めた結果、シナプス可塑性とその多様化は、経験したエピソード内容によって違いが生じること、経験前後に何百何千と繰り返し発生するリップル発火の波形は、経験したエピソード内容によって有意に異なることを発見した。CA3→CA1活動に起因する学習後のリップル発火を阻害すると学習成立が損なわれるため(Girardeau et al. *Nat Neurosci* 2009, Norimoto et al. *Science* 2018)、経験情報を符号化していると考えられる。

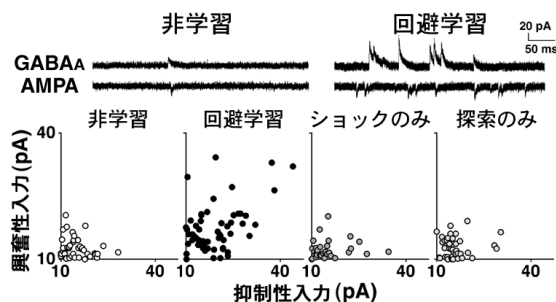


図1 点は各CA1ニューロンの入力強度を示す。興奮性シナプス電流と抑制性シナプス電流は回避学習で多様化し維持される。ACh blockerにより多様化を阻止すると学習は成立しない。

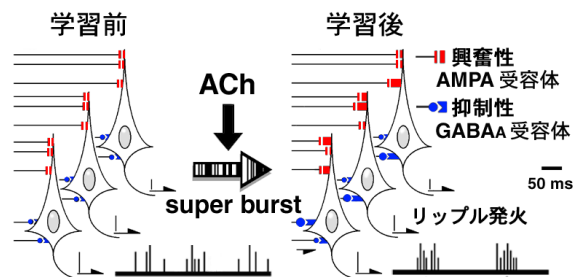


図2 CA1ニューロンにおける記銘過程の仮説 super bursts, シナプス多様性, リップル発火の多様性は経験エピソードに特異的であり、体験情報をコードしていると予想される。

2. 研究の目的

ストレスを伴う様々なエピソード経験は海馬内に強い記憶を形成し、個体は回避行動などに役立っている。ラットを用いストレス回避学習を行うと、海馬CA1ニューロンに対する興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性が高まり、多様な入力特性が保持されること(図1)、CA1ニューロン群により多様なリップル様同期発火活動(リップル発火)が維持されることを発見した(図2)。本研究では、GABA_A受容体β₃ subunitのSer⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹リン酸化阻止実験を行い、シナプス・分子レベルの影響を解析し、学習との因果関係を引き続き立証する。さらに、*in vivo*多ニューロン発火活動解析ではエピソード経験前後や異経験間の違いをAI機械学習プログラムにより比較分析する事で、学習の符号化ルール解明を目指す。

3. 研究の方法

ストレス回避学習による海馬CA1のGABA_A受容体β₃ subunitのSer⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹リン酸化を阻止し、単一チャネルレベルでのシナプス多様化や学習成立との因果関係を立証する。また、自由行動状態の動物を使って、学習前後の海馬CA1ニューロン群の多ニューロン発火活動を解析する。機械学習を用いて経験前後や異なる経験間の違いを網羅的に比較分析し、経験情報の符号化ルール解明を目指す。

4. 研究成果

ストレス回避学習直後にGABA_A受容体のβ₃ subunitのintracellular loopに存在する408と409番目のSerineがリン酸化される事実を特定し、学習依存的なGABA_Aシナプスの強化と、GABA_A受容体open channel分子数の増加を確認した。HIV由来の細胞透過性tagペプチドを利用して両側CA1特異的にGABA_A受容体β₃ subunit Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹のリン酸化を阻止すると学習成績が低下したため因果関係も確認された。Tatタグにβ₃ subunit Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹を含むintracellular loopアミノ酸配列を重合し(Tat pep

β_3 -SS)、 β_3 Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹リン酸化を阻害できる(Smith et al. *J Neurosci* 2012)。対照群にはSer⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹をalanineに置換したTat pep β_3 -AAを用いた。28日齢の雄ラット海馬CA1にガイドカニューレを埋め込み、ストレス回避学習課題の1時間前に片側海馬CA1にTat pep β_3 -SSかTat pep β_3 -AAを投与した。片側投与では成績に影響しないが、スライスパッチクランプ法を用いて課題5分後における単一シナプス小胞あたりのCl⁻チャンネル電流(mIPSC)を測定した結果、Tat pep β_3 -AA、非投与と比べてTat pep β_3 -SS投与においてmIPSCが有意に減少した。このことからGABA_A受容体の β_3 subunitのSer⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹リン酸化阻止により抑制性シナプス多様化が阻害できた(Sakimoto et al.)。

また、自由行動状態で海馬CA1内の多ニューロン発火活動を記録し、拘束ストレスを含む様々なエピソード経験による変化を記録した。情動性の強いエピソード経験中には自発性高頻度発火活動(super burst)が何度も頻発し、経験後にはリップル発火が何百何千と繰り返し記録された。Super burstsは0.2~10秒以上継続して、エピソード経験前のbasal firingsの3~20倍に達する発火頻度を示し、エピソード内容に特異的な多様性を示した。Super burstsやリップル発火の個別形状を解析すると、super burstsとリップル発火の多様性は直近のエピソード経験に特異的である事が判明した。さらに、Dynamic Time Warping (DTW)法を使って、任意の2リップル発火間の類似性解析を行なった(図3: Euclid距離が短いほどリップル発火が似ている)。AIによる6万6千ペアのリップル発火解析の結果、Euclid距離が0のものは存在せず、形状は全て異なる事が判明した。さらに各ペアのEuclid距離をプロットした所、エピソード経験前後でリップル発火群のEuclid距離が有意に変化する事が判明した。重要なことに、Euclid距離の分布は直近に経験したエピソードに特異的であった($P < 0.01$ by two-way ANOVA)。ニューロンは、全か無の法則に則り二進法で情報処理するため、多ニューロン発火記録のsuper burstsやリップル発火からbinary情報を読み取り、AI解析をさらに進めて、痛み、求愛、新奇性に特異的な発火パターンを解析中である。(Ishikawa et al. *BioRxiv* 2019; Kuremoto et al. *Internal Medicine Rev* 2021; Sakimoto et al. *Scientific Reports* 2022, Han-Thiri-Zin et al. *BYMS* 2022)。

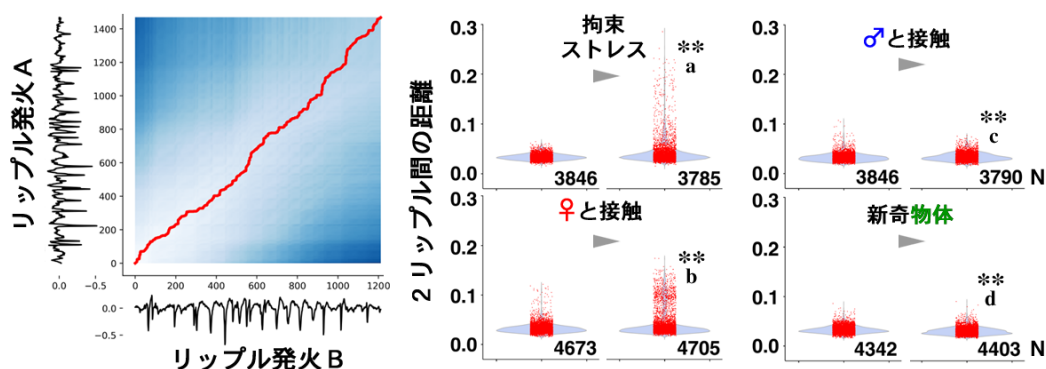


図3 リップル発火群のAI解析例。66,000ペアの2リップル発火間のEuclid距離を網羅的に定量した(赤点)。同一リップル発火は皆無であり、常に多様性を示しつつエピソード経験前後でダイナミックに変化した。リップル発火間距離は経験前後で有意に変化し(**)、かつその多様性分布はエピソード内容に特異的(a~d)であった($P < 0.01$, Mitsushima et al. 日本生理学会 2021)。

また、個別のリップル発火からbinary情報を抽出し、binary化した発火パターンでEuclid距離をプロットしても、多様性分布はエピソード内容に特異的である事が判明した($P < 0.01$, Kunimoto et al. 日本生理学会 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kuremoto T, Sasaki T, Ishikawa J, Mabu S, Mitsushima D.	4. 巻 7
2. 論文標題 Hippocampal memory recognition using deep learning method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine Review	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18103/imr.v7i1.915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Islam MN, Sakimoto Y, Jahan MR, Miyasato E, Tarif AMM, Nozaki K, Matsumoto K, Yanai A, Mitsushima D, Shinoda K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Androgen affects the inhibitory avoidance memory by primarily acting on androgen receptor in the brain in adolescent male rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci11020239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Islam MN, Sakimoto Y, Jahan MR, Ishida M, Tarif AMM, Nozaki K, Matsumoto K, Yanai A, Mitsushima D, Shinoda K.	4. 巻 440
2. 論文標題 Androgen affects the dynamics of intrinsic plasticity of pyramidal neurons in the CA1 hippocampal subfield in adolescent male rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 15-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Paw-Min-Thein-Oo, Sakimoto Y, Kida H, Mitsushima D.	4. 巻 437
2. 論文標題 Proximodistal heterogeneity in learning-promoted pathway-specific plasticity at dorsal CA1 synapses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 184-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Paw-Min-Thein-Oo, Sakimoto Y, Kida H, Mitsushima D.	4. 巻 437
2. 論文標題 Proximodistal heterogeneity in learning-promoted pathway-specific plasticity at dorsal CA1 synapses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 184-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Islam MN, Sakimoto Y, Jahan MR, Ishida M, Tarif AMM, Nozaki K, Matsumoto K, Yanai A, Mitsushima D, Shinoda K.	4. 巻 440
2. 論文標題 Androgen affects the dynamics of intrinsic plasticity of pyramidal neurons in the CA1 hippocampal subfield in adolescent male rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 15-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishikawa J, Sakurai Y, Ishikawa A, Mitsushima D.	4. 巻 237
2. 論文標題 Contribution of the prefrontal cortex and basolateral amygdala to behavioral decision-making under reward/punishment conflict.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 639-654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00213-019-05398-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa J, Tomokage T, Mitsushima D.	4. 巻 12(30)
2. 論文標題 A possible coding for experience: ripple-like events and synaptic diversity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 891259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2019.12.30.891259	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakimoto Y, Kida H, Mitsushima D.	4. 巻 33
2. 論文標題 Temporal dynamics of learning-promoted synaptic diversity in CA1 pyramidal neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 14382-14393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801893RRR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 美津島 大	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 30-34
3. 書名 月刊 細胞	

1. 著者名 美津島 大	4. 発行年 2022年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 82-88
3. 書名 アグリバイオ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>海馬エピソード記憶の記録過程 (仮説) https://www.youtube.com/watch?v=rDqxQfDn4As A hypothesis of early encoding process in CA1 https://www.youtube.com/watch?v=ltq8nX8dmnA</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西井 淳 (Nishii Jun) (00242040)	山口大学・大学院創成科学研究科・教授 (15501)	
研究分担者	村井 礼 (Murai Hiroshi) (30279111)	山口大学・国際総合科学部・准教授 (15501)	
研究分担者	石川 淳子 (Ishikawa Junko) (30570808)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	
研究分担者	呉本 堯 (Kuremoto Takashi) (40294657)	日本工業大学・先進工学部・教授 (32407)	
研究分担者	崎本 裕也 (Sakimoto Yuya) (40634390)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	木田 裕之 (Kida Hiroyuki) (70432739)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関