

令和元年6月14日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05129

研究課題名(和文) ストレス回避学習による海馬シナプスの多様化と情報量解析

研究課題名(英文) Diversity of CA1 synapses and the self-entropy analysis after contextual learning

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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：雄ラットを用いた海馬CA1シナプス多様化の数理解析により、回避学習による情報拡大領域を解析し、左右両側の背側海馬に情報拡大領域を特定した。また、回避学習直後、1分以内にまずGABAA受容体を介する抑制性シナプスが多様化し、5分後にはAMPA受容体を介する興奮性シナプスが多様化するという、急性的な経時変化も明らかにした。さらに、情動性、社会性、新奇性のそれぞれ異なるエピソードを体験させると、誘起されるCA1シナプスの多様化とリップル様自発発火活動は、エピソード経験特異的である事をはじめて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬はエピソード記憶の形成に必要不可欠の領域であるが、情報処理のルールは全く不明であった。本研究ではじめて、経験エピソード特異的なシナプス多様化と、その結果多ニューロンで再現されるリップル様発火活動を明らかにした。今後は、抽出されたリップル様発火活動の数千パラメータをAI機械学習により網羅解析し、「どのパラメータが何の経験に対応し、何を意味するか」「経験内容を読解可能か」など具体的な符号化ルール解明を目指す。現時点で脳内の符号化ルールは全く不明の未踏領域であるが、脳情報の解読は、医学・生理学に今世紀ブレークスルーをもたらす最重要課題の1つであるに違いない。

研究成果の概要(英文)：First, we examined contextual learning-induced synaptic diversity onto CA1 pyramidal neurons. By analyzing self-entropy of synaptic diversity in the neurons, we specified central region of contextual learning in both hemisphere of dorsal CA1. As to the temporal dynamics, learning rapidly induced postsynaptic plasticity at GABAA receptor-mediated inhibitory synapses within 1 min, and AMPA receptor-mediated excitatory synapses were followed within 5 min after the training.

Next, we used 4 different type of episodes to examine whether the synaptic plasticity or in vivo multiple-unit firings was episode-specific. Here we found episode-specific features of plasticity at excitatory and inhibitory synapses and in vivo ripple-like firings of CA1 neurons.

研究分野：環境生理学、神経科学

キーワード：learning and memory GABAA receptor AMPA receptor GABA glutamate synaptic plasticity information theory self-entropy

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

回避学習は海馬依存性で、海馬CA1で長期増強(LTP)を発生させる(Whitlockら Science 2006)。分子メカニズムは不明であったが、研究代表者は、IAによる回避学習が海馬CA1ニューロンのAMPA受容体を興奮性シナプスへ移行させることをはじめて報告した。また、両側海馬CA1に移行を阻止する変異体を発現させると学習を阻害することから、AMPA受容体のシナプス移行が学習成立に必要であることも証明した(Mitsushimaら, PNAS 2011)。

回避学習が成立したラットから急性脳スライスを作製し、単一シナプス小胞当たりのminiature EPSC (mEPSC)とminiature IPSC (mIPSC)を同一のCA1ニューロンで確認した。AMPA受容体を介するmEPSCの振幅増強が見られる一方、GABA_A受容体を介するmIPSCの振幅も多様化される結果、個々のCA1ニューロンが回避学習依存的に多様なシナプス入力を保持することが判明した(図1A Mitsushimaら, Nature Commun 2013)。この研究で研究代表者は回避学習による抑制性シナプスの長期増強をはじめて示した。

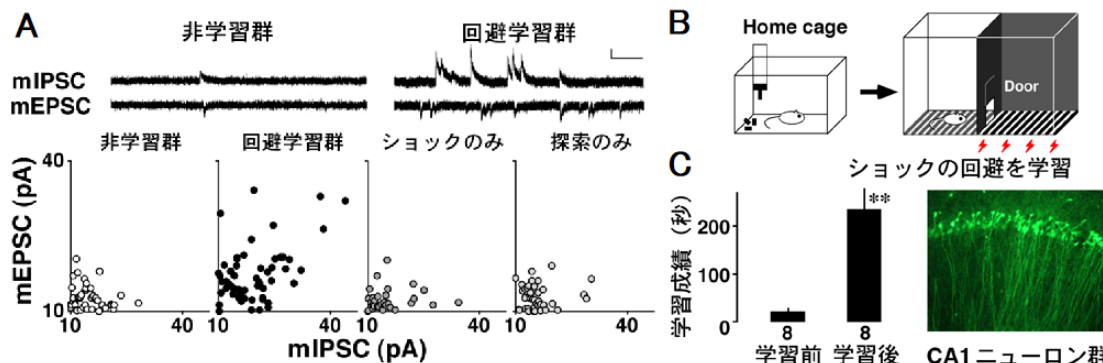


図1 A 興奮性シナプス反応(縦軸)と抑制性シナプス反応(横軸)。各点は各ニューロンにおける平均シナプス入力強度(pA)を示す。B 回避学習の模式図。C 回避学習成績とCA1ニューロン群

2. 研究の目的

急性ストレスは、海馬内に強いエピソード記憶を形成し、個体は回避行動に役立っている(図1B, C)。ラットを用いて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のみならず、抑制性シナプスの可塑性も高まる結果、多様な入力特性が保持されることを発見した(図1A)。この多様性を数理解析し、シナプスでの情報量(エントロピー)拡大を求めると、全CA1領域で最大 5.6×10^6 bit に及ぶことが判明した。本研究では、従来のシナプス・分子レベル解析に加えて情報理論に基づく数理解析も導入し、「エピソード何分後に、CA1のどの領域で、記録される情報量は何bitか」回避学習の全体像を解明する。

3. 研究の方法

「CA1のどの領域で、エピソード何分後に、情報量は何bitか」回避学習の全体像を解明する。CA1は背側から腹側まで広範な領域を持ち、左右でCA1の回路や機能が若干異なる。そこでCA1を左背側、右背側、左腹側、右腹側の4領域に分けて回避学習の影響を見る。パッチクランプ法ではmEPSCとmIPSCの二次元解析(図1A)を進め、エントロピー(情報量)の拡大がどの領域に特異的か解析する。さらにウェスタンブロット法でCA1を特異的に切り出し、GABA_A β_3 subunitのSer⁴⁰⁸-Ser⁴⁰⁹リン酸化蛋白が発現する領域と時間を特定する。パッチクランプ法では、エピソード直前、0分後、5分後、10分後、20分後、30分後、60分後に急性スライスを作成し、mEPSCとmIPSCの二次元プロット(図1A)を進め、発生するエントロピーを解析する。また、*in vivo*多ニューロン発火活動記録法では、自由行動状態のラットを用い、エピソード前から30分後までCA1の多ニューロン発火活動を連続的に記録する。リップル波の発生数、周波数(frequency)、長さ(duration)などの変化動態を捉えタイミングを特定する。

4. 研究成果

回避学習によるシナプス多様化領域の特定 CA1を左右背側、左右腹側の4領域に分け、回避学習によるシナプス多様化の影響を見た(図2)。回避学習後、左右背側の海馬CA1ニューロンで興奮性と抑制性のシナプス入力が共に多様化した。2-way ANOVAではmEPSCの平均振幅、頻度、mIPSCの平均振幅と頻度の4パラメータすべて有意に増加し、左右差は認められなかった。一方、左右両側の腹側海馬CA1ニューロンでは、mEPSCの平均振幅・頻度、mIPSCの平均振幅・頻度の4パラメータすべて学習による有意な変化は見られず、学習の影響に左右差は認められなかった。数理解析により、単一CA1ニューロンが保持する情報量(自己エントロピー)がニューロン毎に異なること、回避学習による情報拡大量をCA1で具体的に定量した。

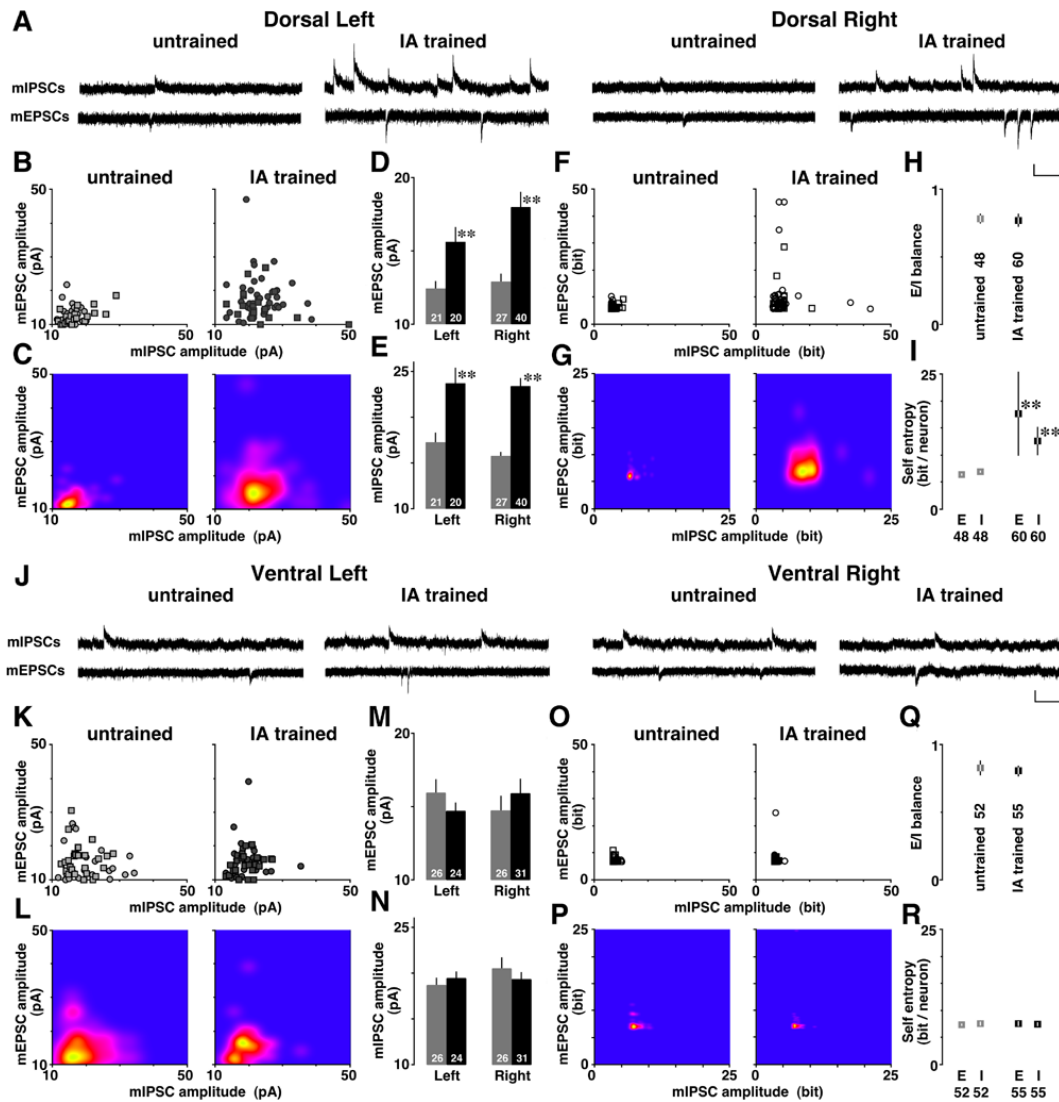


図2 A 背側海馬 CA1 ニューロンにおける mEPSC と mIPSC。B 各点は1つの CA1 ニューロンを示し、単一シナプス小胞あたりの平均興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を縦軸に、平均抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を横軸にプロットした。興奮と抑制のシナプス電流の強さは CA1 ニューロンごとに異なるが、回避学習はシナプス入力にさらに多様化した。●は右側、■は左側の CA1 ニューロンを示す。C Kernel 密度解析による分布領域の Heat Map。D mEPSC 平均振幅の解析結果。E mIPSC 平均振幅の解析結果。F 非学習群の分散を元に、各ニューロンの出現確率を算出し、bit で表記した。G Kernel 密度解析結果。学習群で顕著な情報拡大がみられた。H E(興奮性電流)/I(抑制性電流)バランスの解析結果。I 単一ニューロン当たりの情報量(自己エントロピー)。J 腹側海馬 CA1 ニューロンにおける mEPSC と mIPSC。K mEPSC(縦軸)と mIPSC(横軸)。L Kernel 密度解析結果。M mEPSC 平均振幅の解析結果。N mIPSC 平均振幅の解析結果。O 非学習群の分散を元に、各ニューロンの出現確率を算出し、bit で表記した。P Kernel 密度解析結果。非学習群と比較して学習群での情報拡大はみられない。Q E(興奮性電流)/I(抑制性電流)バランス。R 単一ニューロン当たりの情報量。Cerebral Cortex, 2019 より

回避学習によるシナプス多様化の経時変化 回避学習の記録1分以内(0分)~60分後に背側海馬のスライスを作成し、シナプス多様化への影響を解析した。回避学習直後、1分以内にまず GABA_A受容体を介する抑制性シナプス入力が多様化した。続いて5分後には AMPA 受容体を介する興奮性シナプス入力が多様化した。本研究により、回避学習に伴うシナプス多様化の急性的変化のみならず、単一ニューロン当たりの情報拡大量と Temporal dynamics も明らかにした。

AMPA 受容体と GABA_A 受容体の open channel 数 Non-stationary Fluctuation Analysis による開口チャネル数、単一チャネル電流の解析を行った。回避学習は背側海馬 CA1 pyramidal neuron において、シナプス下膜の単一チャネル電流を変化させずに、AMPA 受容体や GABA_A 受容体の open channel 数を増加させた。一方、腹側海馬では回避学習による変化は認められなかった。また、背側 CA1 と腹側 CA1 の heterogeneity も単一チャネルレベルで明らかにした。

GABA_A 受容体 β_3 subunit Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹ のリン酸化 Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹ は PKC、PKA、CaMKII によるリン酸化修飾を受け、活動依存的な GABA_A 受容体の抑制性シナプスへの移行に強く関わる(Luscherら Neuron 2011)。背側 CA1 領域を切り出して GABA_A 受容体のリン酸化を解析し、回避学習直後における β_3 subunit の Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹ リン酸化を確認した。さらに Ser⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹ リン酸化阻害ペプチド(細胞内輸送ペプチド-pep β_3)の両側 CA1 投与は、学習依存的な mIPSC の強化を阻止すると学習成立を阻害する事から、両者の因果関係も確認した。

エピソード経験特異的な興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性 海馬はエピソード学習の成立と維持に必要不可欠である。そこで、十分に馴化したホームケージで飼育している成熟雄性ラットを用い、情動性、社会性、新奇性の以下4種の異なるエピソードのいずれかを経験させ、30分後にスライスを作成して経験特異的なシナプス可塑性をさらに解析した。(1)四肢をガーゼ紐で10分間拘束する。(2)ホームケージ内に♀ラットを10分間入れる。(3)ホームケージ内に♂ラットを10分間入れる。(4)ホームケージ内に黄色いレゴブロックを10分間入れる。

各 CA1 ニューロン毎に単一シナプス小胞あたりの興奮性シナプス後電流(mEPSC)と抑制性シナプス後電流(mIPSC)を解析した。馴化したホームケージ内の非学習群と比べ、4つのエピソード経験全てでシナプス可塑性が認められたが、その強化様態は経験内容で異なった。実験では各 CA1 ニューロンから mEPSC の amplitude と frequency、mIPSC の amplitude と frequency の4パラメータを取得し、多変量分散分析(MANOVA)の結果、興奮性と抑制性のシナプス多様化は経験内容に特異的である事が判明した(図3)。

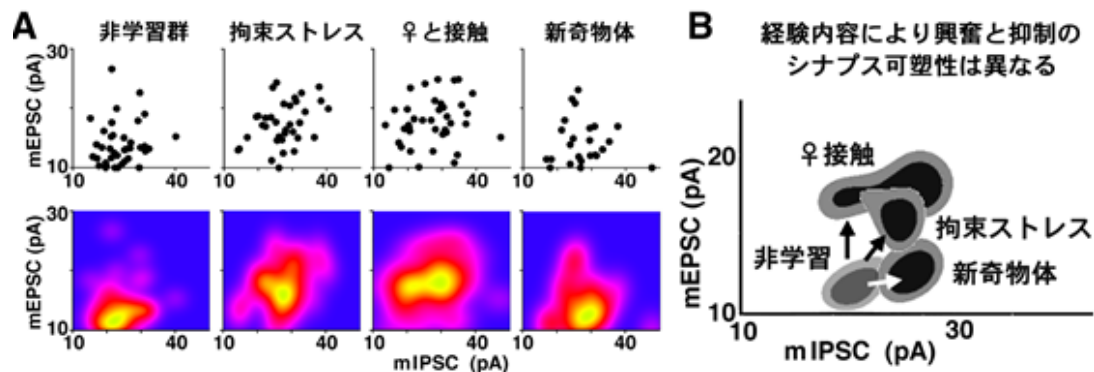


図3 A 成熟雄性ラットを用い情動性、社会性、新奇性の異なるエピソードを10分間経験させた。各点は1つのCA1ニューロンを示し、単一シナプス小胞あたりの平均興奮性シナプス後電流(mEPSC)を縦軸に、平均抑制性シナプス後電流を横軸にプロットした。興奮と抑制のシナプス電流の強さは CA1 ニューロンごとに異なるが、エピソード学習はシナプス可塑性を誘発し、シナプス入力をさらに多様化した。下図は Kernel 密度解析による2次元上の分布領域を示す。**B**: 2次元 Kernel 密度解析による各エピソード経験後の上位10%と20%領域を示す。MANOVA ではさらに mEPSC 頻度と mIPSC 頻度を加えた4次元分布領域の違いを判定した。エピソード経験は興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性を高めるが、シナプス可塑性の特徴を示す4次元分布領域は経験内容で異なる事が判明した。紙面の都合により、♂と接触群の結果は割愛した。(美津島ら)

In vivo 多ニューロン発火活動 行動実験により、前述の(1)~(4)のエピソード全てで行動を指標とする学習が成立する(図4b)。そこで自由行動状態の成熟雄性ラットを用いて(図4c)背側海馬CA1直上部に多ニューロン記録電極を植え込んだ(図4d)。ホームケージ内で回復期間の後、CA1 pyramidal layerに電極を刺入して記録を開始し、文脈の異なるいずれかのエピソードを10分間経験させ、学習の過程を多ニューロン発火活動として捉えた。

エピソード経験前はbasal firings(図4f)を中心とする散発的発火活動が中心で、10分間の拘束ストレスにより、数百msec~数十秒に渡る高頻度自発発火活動(super burst: 図4g)が何度も発生した。Super burstの定義はエピソード提示前15分間のfiringと比較して標準偏差の3倍(+3SD)以上の発火活動と定義した。♀ラットとの接触でも、数百msec~2秒のsuper burstがepisodicに発生し、♀を除いた後にも散発的に発生が見られた。♂ラットとの接触でもsuper burstは増加し、リップル波も見られたが、♂を除いた後のsuper burstは短く、不明瞭であった。新規物体の提示でも学習は成立し、super burstを示す個体もいたが、リップル様発火活動のpeak数は減少した。

最初のSuper burstの数分後からリップル様の短期高頻度自発発火活動(~50msec: 図4i)とsilent period(図4h)の反復挿入が始まった(図5A)。

リップル様発火活動はエピソード経験前のホームケージでも散見されたが、特に拘束ストレスや♀との接触など、情動性の強いエピソード経験で多様化は特に顕著であった。個別のリップル様発火活動について peak 数、amplitude、duration、arc length など4パラメータ(図5B)を抽出した所、経験前後にリップル様発火活動が有意に強化され、多様化した状態が維持された。さらに、社会性経験や物体観察など異なるエピソード経験間では有意にリップル様発火活動の波形が異なることも確認した(図5C)。MANOVA を用いて数千個のリップル様発火活動を全体解析すると、経験前後だけでなく、異なるエピソード経験間で有意差が認められた。以上より、(1)エピソード学習は海馬 CA1 の多ニューロン発火活動を動的に変化させること、(2)エピソード内容に特異的な特徴をもつリップル様発火活動が頻回発生することが判明した。

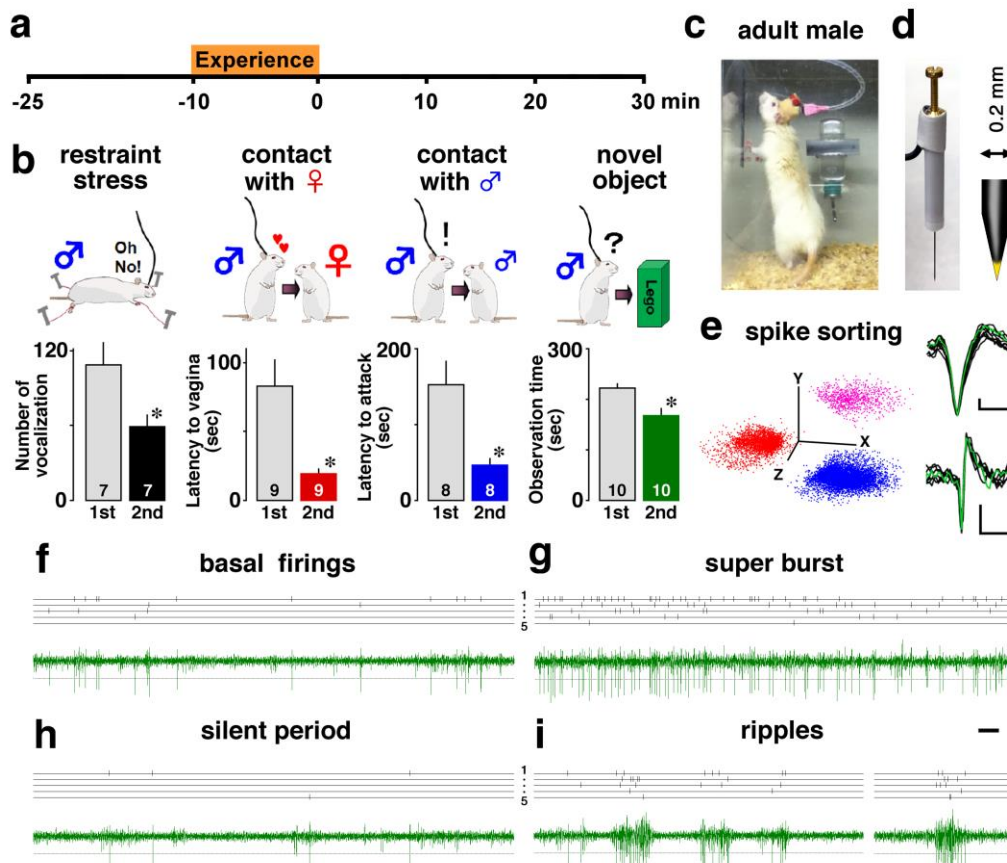


図4 a 成熟雄性ラットを用い、十分に馴化したホームケージで記録を開始した。(1)拘束ストレス(2)♀ラットとの接触(3)♂ラットとの接触(4)新奇物体との接触、いずれかのエピソードを10分間経験させ、さらに30分間自発発火活動の記録をホームケージ内で続けた。b 翌日、同じエピソードを再経験させて行動変化を記録した。c 成熟雄性ラットを用い、海馬CA1での多ニューロン発火活動を記録した。d 多ニューロン記録電極 e 各スパイクの特徴を抽出し、ソーティングを行った。f basal firingsの例。g super burstの例 h silent periodの例 i リップル様発火活動の例。(石川ら)

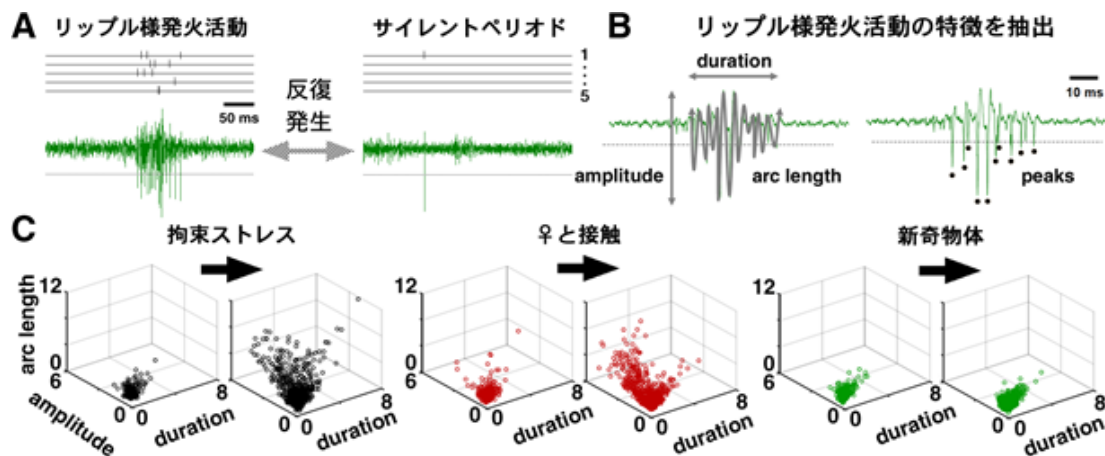


図5 A 複数のニューロンが協調的に発火してリップル波が形成され、サイレントペリオドと反復発生した。B リップル波のamplitude, duration, arc length, peak 数を、経験前後や異経験間で比較した。C 各点は一つのリップル様発火活動を示す。リップル様発火活動は経験後に多様化し、様々な特徴が経験間で異なった。みと接触群の結果は割愛した。(石川ら)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

①Sakimoto Y, Mizuno J, Kida H, Kamiya Y, Ono Y, Mitsushima D. Learning promotes subfield-specific synaptic diversity in hippocampal CA1 neurons. *Cerebral Cortex*, 29(5): 2183-2195, 2019. doi:10.1093/cercor/bhz022 査読有

②Yamamoto Y, Kida H, Kagawa Y, Yasumoto Y, Miyazaki H, Islam A, Ogata M, Yanagawa Y, Mitsushima D, Fukunaga K, Owada Y. FABP3 in the anterior cingulate cortex modulates the methylation status of the glutamic acid decarboxylase67 promoter region. *J Neurosci*, 38: 10411-10423, 2018. doi:10.1523/JNEUROSCI.1285-18.2018 査読有

③Nomura S, Kida H, Hirayama Y, Imoto H, Inoue T, Moriyama H, Mitsushima D, Suzuki M. Reduction of spike generation frequency by cooling in brain slices from rats and patients with epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, Epub ahead of print, 2018. doi:10.1177/0271678X18795365 査読有

- ④ [Kida H](#), [Mitsushima D](#). Mechanisms of motor learning mediated by synaptic plasticity in rat primary motor cortex. **Neurosci Res**, 128:14-18,2017. doi:10.1016/j.neures.2017.09.008. 査読有
- ⑤ [Kida H](#), [Sakimoto Y](#), [Mitsushima D](#). Slice patch-clamp technique for analyzing learning-induced plasticity. **J Vis Exp**, 129: e55876,2017. doi:10.3791/55876. invited from editor. 査読有
- ⑥ [Mitsushima D](#). Synaptic diversity and quantification of intra-hippocampal contextual memory. **Neurol Neurother** 2(2): 000113, 2017. doi:10.23880/NNOAJ-16000113. invited review. 査読有
- ⑦ [Mitsushima D](#). Learning-induced synaptic diversity and quantification of intra-hippocampal entropy. **J Psychol Clin Psychiatry**, 8(1): 00471,2017. doi: 10.15406/jpcpy.2017.08.00471. invited review. 査読有
- ⑧ [Sakimoto Y](#), [Mitsushima D](#). Examination of configural association theory and conflict resolution model through hippocampal theta activity. **Neurotransmitter**, 3: e1478, 2016. doi:10.14800/nt.1478 査読有
- ⑨ [Kida H](#), Tsuda Y, Ito N, Yamamoto Y, Owada Y, Kamiya Y, [Mitsushima D](#). Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III pyramidal neurons in the primary motor cortex. **Cerebral Cortex**, 26:3494-3507, 2016. doi: 10.1093/cercor/bhw134 査読有
- ⑩ [Ebrahimi M](#), Yamamoto Y, Sharifi K, [Kida H](#), Kagawa Y, Yasumoto Y, Islam A, Miyazaki H, Shimamoto C, Maekawa M, [Mitsushima D](#), Yoshikawa T, Owada Y. Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. **Glia**, 64(1):48-62, 2016. doi:10.1002/glia.22902 査読有

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木田 裕之

ローマ字氏名：KIDA, Hiroyuki

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：70432739

研究分担者氏名：石川 淳子

ローマ字氏名：ISHIKAWA, Junko

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：30570808

研究分担者氏名：崎本 裕也

ローマ字氏名：SAKIMOTO, Yuya

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：40634390

(2) 研究協力者

なし

※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、研究者個人に帰属されます。