

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26780419

研究課題名(和文) 負の記憶の符号化における海馬 波とシナプス可塑性の動的変化

研究課題名(英文) Dynamic change of hippocampal theta activity and synaptic plasticity with the memory encoding for negative episode

研究代表者

崎本 裕也 (SAKIMOTO, Yuya)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40634390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：回避学習課題を用い、動物にとって好ましくない負のエピソード(電気ショック)を提示後のシナプス可塑性を検討した。0分(エピソード提示直後)、5分、10分、20分、30分時点のラット海馬CA1ニューロンの微小興奮性シナプス後電流、微小抑制性シナプス後電流を測定した。結果はエピソード提示後5分時点から、微小興奮性シナプス後電流、微小抑制性シナプス後電流が増加した。これらのシナプス後電流の増加はシナプス移行によってspine上のAMPA受容体とGABAA受容体の数が増加したことを示唆している。このことから、負のエピソード記憶の符号化が5分以内の早い海馬CA1シナプス可塑性を引き起こすことを提案する。

研究成果の概要(英文)：This project examined the synaptic plasticity after presentation negative episode (foot shock) by using Inhibitory avoidance task. We recorded mEPSCs (excitatory postsynaptic currents) and mIPSCs (miniature inhibitory postsynaptic currents) at the 0, 5, 10, 20, 30 min after presentation of episode. The results showed the increase of mEPSCs and mIPSCs from 5 min after presentation of episode. These increase of mEPSCs and mIPSCs showed an increasing numbers of AMPA and GABAA receptors on hippocampal CA1 spine. Thus, we propose that the encoding of negative episode memory induced the synaptic plasticity in hippocampal CA1 neuron within 5 min.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬CA1 エピソード記憶 patch clamp

1. 研究開始当初の背景

海馬は不快や嫌悪が伴う事象の記憶，負の記憶の形成に中心的に関わる(Chan ら，Behav. Brain Res. 2001; Davidson ら，Neurosci. Biobehav. Rev. 2004)。近年，申請者は *in vivo* 海馬脳波(海馬 θ 波)を記録し，負の記憶課題中の海馬 θ 波のパワーの動向を観察し(Sakimoto ら，Behav. Brain Res. 2013, Exp. Brain Res. 2013) 課題獲得に伴う海馬 θ 波のパワーの変化を明らかにした(PLoS One 2013; 図 1)。初めて記憶課題を訓練した時点を獲得初期，記憶課題をほぼ完全に習得した時点を獲得後期，初期と後期の間を獲得中期とし，海馬 θ 波のパワーが獲得後期に比べて獲得初期で顕著に増加した。獲得初期で海馬 θ 波のパワーの増加が見られたことは，海馬 CA1 領域が負の記憶の符号化に重要な役割を担っていることを示す(Sakimoto ら，PLoS One 2013)。先行研究において海馬 θ 波が長期増強などシナプス可塑性を促進することが知られているが(Larson ら，Science 1986, Hyman ら，J. Neurosci. 2003) ,その分子メカニズムについては明らかにされていなかった。当研究室では記憶の形成と海馬 CA1 領域のシナプス可塑性の関係に着眼しており，負の記憶課題の獲得後に海馬 CA1 シナプスで AMPA 受容体と GABA_A 受容体のシナプス移行が見られ，その結果海馬 CA1 領域でシナプス間の伝達効率が高まることを近年明らかにした(Mitsushima ら，Nature Communications in press, Proc Natl Acad Sci USA 2011)。しかし，記憶課題の獲得初期からこのようなシナプス可塑性が生じる動的

変化は明らかではない。

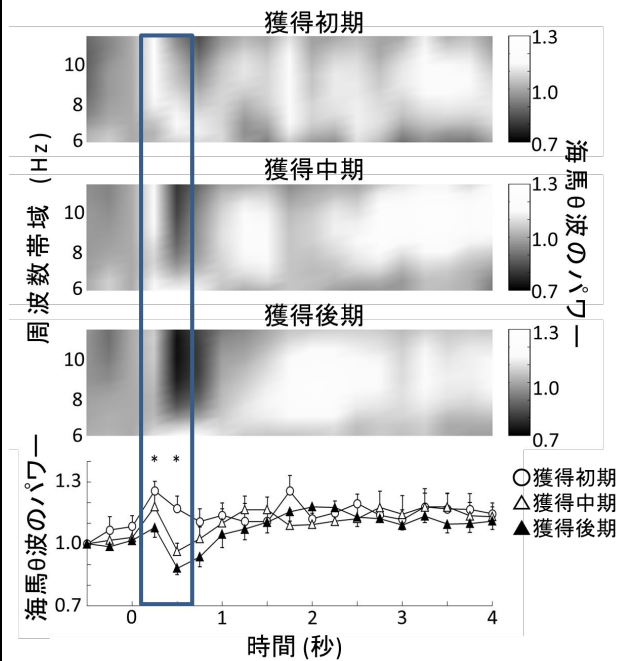


図 1 課題獲得に伴う海馬 θ 波のパワーの変化。枠内の区間で有意差が見られた (*: $p < .05$)。Sakimoto ら，PLoS ONE 2013 より一部抜粋。

2. 研究の目的

そこで，本プロジェクトでは回避学習課題を用い，課題の獲得初期(符号化)における海馬 θ 波の活動の増加，また，海馬シナプス可塑性(AMPA 受容体や GABA_A 受容体由来のシナプス電位活動の変化や，AMPA 受容体や GABA_A 受容体のシナプス移行)を明らかにし，符号化過程における海馬の神経メカニズムを解明する。負の記憶課題の獲得初期に海馬 θ 波のパワーが増加したことから(Sakimoto ら，PLoS One 2013)，海馬シナプス可塑性が記憶課題の獲得初期から生じるとの仮説を立てた。

3. 研究の方法

平成26年度は「課題の獲得初期(符号化)時

に海馬 θ 波の活動が増加するか」を明らかにするため、回避学習課題中のラットの*in vivo*海馬 θ 波活動を記録し、課題の獲得に伴う海馬 θ 波の活動の変化や課題後の海馬 θ 波のパワーの増加の持続時間を解析する。さらに、「AMPA受容体やGABA_A受容体が海馬シナプス電流に与える影響」を明らかにするため、パッチクランプ法を用い、課題の獲得初期におけるAMPA受容体由来の微小興奮性シナプス電流、GABA_A受容体由来の微小抑制性シナプス電流や学習依存的な静止膜電位、活動電位の波形を測定する。平成27年度では「可視化したAMPA受容体やGABA_A受容体の場所と分布」を示すため、共焦点レーザー顕微鏡を用い、海馬CA1シナプスのspine上に点在するAMPA受容体とGABA_A受容体を可視化し、課題の獲得初期におけるこれらの受容体の量的変化と分布を明らかにする。

(1) 「課題の獲得初期(符号化)時に海馬 θ 波の活動が増加するか」

申請者はオペラント条件づけを用いた負の記憶課題において獲得初期に海馬 θ 波のパワーが増加し、課題の獲得に伴って徐々に減少することを示した(PLoS One 2013)。このことから、回避学習課題(図2)においても課題の獲得初期に海馬 θ 波のパワーが増加し、獲得に伴って海馬 θ 波のパワーが減少すると考えられる。本実験では回避学習群、統制群として新規環境のexploringのみの群、shockのみの3群を設け、課題前に海馬CA1領域に記録電極を植え込んでおく。課題前後や課題中の海馬 θ 波の活動を記録する。同時にFreezing行動や回避行動等も

ビデオモニターし、これらの行動と海馬 θ 波の関係を明らかにする。予備実験から回避学習課題の習得には数試行かかることが明らかである。そのため、初めて回避学習課題を行う試行から完全に課題を獲得する試行まで試行中の海馬 θ 波の活動を記録し、課題の獲得に伴って海馬 θ 波の活動がどのように変化するか解析する。

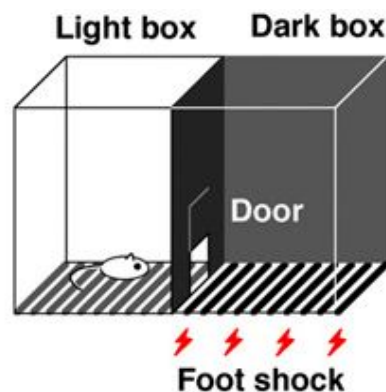


図2 回避学習課題。ラットを明室に入れ試行を開始する。試行開始から5分以内に暗室に移動すると、獲得失敗とし電気ショックを与える。5分経過しても暗室に移動しなければ課題獲得とする。獲得失敗後はホームケージに戻し30分後に再度試行を行う。課題を獲得するまでこの手続きを繰り返す。

(2) 「AMPA受容体やGABA_A受容体が海馬シナプス電流に与える影響」

課題の獲得度合いに応じて3つの群に分け(回避学習課題を1セッションだけ行った獲得初期群、完全に課題を獲得した獲得後期群、課題を行わなかった非獲得群)、群間のシナプス電位の違いを明らかにする。併せて課題後10分、20分、30分時点のシナプス電位を測定し、課題後のシナプス電位の動的変化を明らかにする。申請者は課題後30分時点の微小興奮性シナプス後電流(mEPSC: miniature excitatory postsynaptic

current), 微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC: miniature inhibitory postsynaptic current)を測定し, 非獲得群に比べて, 獲得初期, 獲得後期群で興奮・抑制性シナプス後電流が増加することを明らかにした。興奮性シナプス後電流は AMPA 受容体由来, 抑制性シナプス後電流は GABA_A 受容体由来であることから, これらのシナプス後電流の増加はシナプス移行によって spine 上の AMPA 受容体と GABA_A 受容体の数が増加する可能性がある(平成 27 年度にこれらの受容体数の増加を組織学的に証明する)。

(3) 「可視化した AMPA 受容体や GABA_A 受容体の場所と分布」

パッチクランプ法と同様に 3 つの群に分け, 群間で CA1 錐体細胞の spine 上に点在する AMPA 受容体や GABA_A 受容体の量や分布の違いを明らかにする。また, 課題後の経過時間(課題後 10 分, 20 分, 30 分)に伴う動的变化も併せて検討する。CA1 錐体細胞を可視化するため, エレクトロポレーション法を用い, 予め CA1 に GFP を発現させた動物に回避学習を訓練する。興奮性シナプスに関しては postsynaptic な AMPA 受容体のシナプス移行と GluA1 陽性 spine 増加を見る。N 端側の抗 GluA1 抗体を反応させ, シナプスに挿入された AMPA 受容体と結合させる。固定した後, Alexa594(赤)でラベルした二次抗体を用いて spine を標識する。一方, 抑制性シナプスに関しては, GABA_A 受容体のシナプス移行を見る。抗 GABA_A 受容体 β 2/3 subunit 抗体を脳スライスに反応させ, 固定の後, Alexa594 でラベルした二次抗体を用いて標識する。作製し

た切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。Ikegaya らは興奮性のシナプス電位の増加に興奮性シナプスの尖端樹状突起上の spine 群(クラスター)が関係することを示した(Science 2012)。学習依存的な変化は全く不明だが, 海馬 CA1 興奮性シナプスの尖端樹状突起上のクラスターに AMPA 受容体が多く発現することが予想できる。抑制に関する知見は得られていないが, 抑制性シナプスが多い細胞体付近のクラスターに GABA_A 受容体が多く発現する可能性も考えられる。以上, 本実験により AMPA 受容体や GABA_A 受容体のシナプス移行に対する組織学的証拠が得られ, また, どの CA1 ニューロンのどの部分の spine に符号情報が構築されているか解明できる。

4. 研究成果

本実験では回避学習課題を用い, エピソード提示(電気ショック)直後(0 分), 10 分, 20 分, 30 分時点のラット海馬シナプス電位を測定し, エピソード提示後の時間経過に伴うシナプス電位の動的变化を明らかにする。申請者はエピソード提示後 5 分時点から, 微小興奮性シナプス後電流(mEPSC: miniature excitatory postsynaptic current), 微小抑制性シナプス後電流(mIPSC: miniature inhibitory postsynaptic current)がエピソード非提示群に比べて増加することを明らかにした(図 3)。この研究成果は 2014 年の日本心理学会大会, 日本生理学会大会, ワシントン(USA)で開催された Society for Neuroscience で発表を行った。

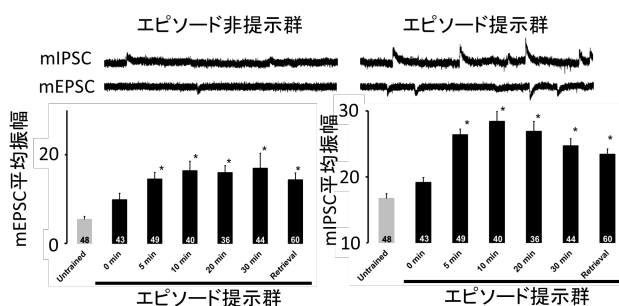


図3 エピソード提示後の時間経過に伴う mEPSC と mIPSC の動態。mEPSC (左) と mIPSC (右)はエピソード非提示群 (untrained; $n=48$)と比べてエピソード提示群ではエピソード提示後 5 分から有意に増加した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Sakimoto Y., Sakata S. (2015) The transient decline in hippocampal theta power during response inhibition in a positive patterning task. *NeuroReport*, 26, 833-837. Doi: 10.1097/WNR.0000000000000432. URL: http://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2015/10010/The_transient_decline_in_hippocampal_theta_power.6.aspx (査読有)

Sakimoto Y., Sakata S. (2015) Behavioral inhibition during a conflict state elicits a transient decline in hippocampal theta power. *Behavioural Brain Research*, 290, 70-76. Doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.060. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815002259> (査読有)

Sakimoto Y., Sakata S. (2015) Change in hippocampal theta activity during behavioral inhibition for a stimulus having an overlapping element. *Behavioural Brain Research*, 282, 111-116. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.12.041. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814008444> (査読有)

Sakimoto Y., Sakata S. (2014) Hippocampal theta activity during behavioral inhibition for conflicting stimuli. *Behavioural Brain Research*, 275, 183-190. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.063. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814005828> (査読有)

Sakimoto Y., Sakata S. (2014). Change in hippocampal theta activity with transfer from simple discrimination tasks to a simultaneous feature-negative tasks. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 159. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00159. eCollection 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042157/> (査読有)

10.1016/j.bbr.2014.12.041. URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814008444> (査読有)

Sakimoto, Y., Sakata S. (2014)

Hippocampal theta activity during behavioral inhibition for conflicting stimuli. *Behavioural Brain Research*, 275, 183-190. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.063. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814005828> (査読有)

Sakimoto, Y., Sakata, S. (2014). Change in hippocampal theta activity with transfer from simple discrimination tasks to a simultaneous feature-negative tasks. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 159. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00159. eCollection 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042157/> (査読有)

Takase, K., Sakimoto, Y., Kimura, F., Mitsushima, D. (2014). Developmental trajectory of contextual learning and 24-h acetylcholine release in the hippocampus. *Scientific Reports*, 4, 3738. Doi: 10.1038/srep03738. URL: https://www.researchgate.net/publication/259770530_Developmental_trajectory_of_contextual_learning_and_24-h_acetylcholine_release_in_the_hippocampus (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

[学会発表] (計 5 件)

Yuya Sakimoto, Dai Mitsuhima

Contextual memory encoding induces a quick change of postsynaptic current in hippocampal CA1 neurons. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21-23日 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

Daiki Yoshiura, Yuya Sakimoto, Dai Mitsushima Developmental changes in synaptic plasticity of the hippocampal CA1 neurons by contextual memory. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21-23日 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

Yuya Sakimoto, Dai Mitsushima Learning-dependent synaptic diversity in hippocampal CA1 neurons: Encoding of context plasticity at excitatory and inhibitory synapses. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington (USA) (2014.11.14-2014.11.19)

Junzou Mizuno, Yuya Sakimoto, Dai Mitsushima. (2014). Learning-dependent synaptic diversity in hippocampal CA1 neurons: Laterality and a possible location on contextual memory in the hippocampus. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington (USA) (2014.11.14-2014.11.19)

崎本裕也 動物の生理心理学は終わったのか? 日本心理学会 第78回大会 2014年9月10-12日 同志社大学(京都府・京都市) (シンポジウム)

[図書](計 1件)

Hattori, M., Sakimoto, Y., Okada, K. and Sakata, S. (2014). The Role of the Rat Anterior Cingulate Cortex in Signal Detection - An Event-Related Potential Study: In Horizons in Neuroscience Research Volume 13 (Eds.) Andres, C. &

Eugenio, V; NOVA Science Publishers, New York, pp.213 (139-150).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

崎本 裕也 (SAKIMOTO, Yuya)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40634390