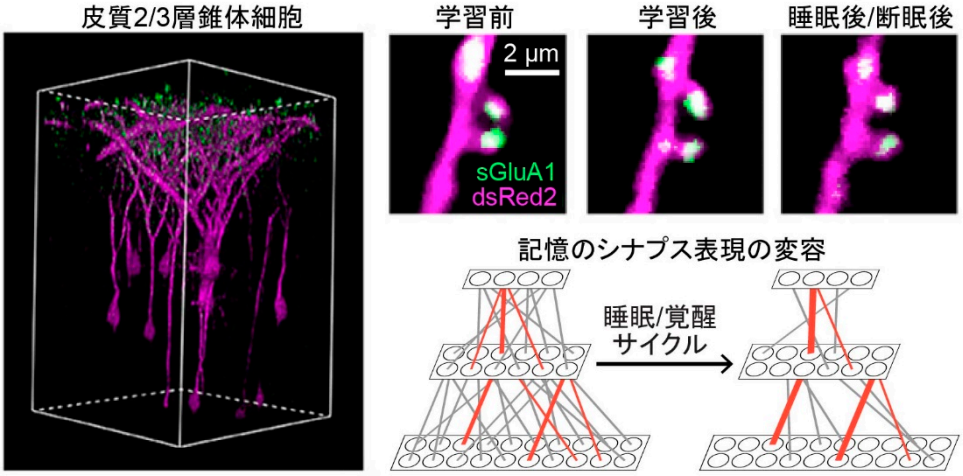
164　睡眠時のメモリーリプレイを担う樹状突起伝搬の解明	宮本　大祐

【目的】覚醒時の学習は脳の神経細胞を活性化して、興奮性シナプス伝達を担う樹状突起スパインにおいて、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体の量を増加させる。そして、睡眠時において、学習した情報を再生するメモリーリプレイが生じる。しかし、睡眠時のメモリーリプレイがシナプス回路をどの様に再編するのかはよく分かっていない。これまでに、睡眠によって記憶関連脳領域である大脳皮質や海馬のシナプスの大きさや AMPA 受容体の量が平均的に減少することが、電子顕微鏡による解剖学的手法やウェスタンブロッティングによる生化学的手法で解明されている。死後脳を扱う解剖学的・生化学的手法では、学習や睡眠による脳のダイナミクスを追跡することは困難であるため、本研究は樹状突起スパインの AMPA 受容体を生体マウスにおいてイメージングして、学習と睡眠を通じたシナプス動態を解析した。

【方法】AMPA 受容体の GluA1 サブユニットを蛍光可視化するために、SEP（Super Ecliptic pHluorin）-GluA1 を用いた。SEP は pH 依存的な緑色蛍光タンパク質であり、細胞外と細胞内の pH の違いを利用して、細胞膜上の機能的な受容体を選択的に蛍光可視化出来る。また、神経細胞の形態を蛍光可視化するために、赤色蛍光タンパク質の dsRed2 を用いた。SEP-GluA1 と dsRed2 の発現を誘導するために、E14.5 胚に子宮内電気穿孔法を適用した。その後、成体マウスにおいて、頭蓋骨にガラス窓を設置した。そして、二光子顕微鏡を用いて、一次運動皮質の 2/3 層錐体細胞が有する 1 層のタフト樹状突起において、運動学習と睡眠期間を通じて経時イメージングを行った。

【結果】記憶固定化に睡眠を必要とする運動学習試験として、Complex Wheel 試験を用いた。運動学習はスパインの AMPA 受容体量を平均的に増加させた。一方で、運動学習前及び運動学習後の睡眠は、スパインの AMPA 受容体量を平均的に減少させた。運動学習によって AMPA 受容体量が特に増加した一部のスパイン（Max スパイン）は、運動学習後の睡眠や断眠の影響を受けずに保護されていた。一方で、その他のスパインは運動学習後の睡眠時に AMPA 受容体量が減少し、この減少は断眠によって阻害された。そして、運動学習後の AMPA 受容体量の減少は、運動記憶成績と相関していた。これらより、運動学習後の睡眠は、大部分のシナプスをクールダウンさせて、運動記憶を担うシグナルを相対的に強化していると考えられる。

生体マウスにおける樹状突起スパインの AMPA 受容体のイメージング（宮本大祐、Medical Science Digest, 2021）



164. 睡眠時のメモリーリプレイを担う樹状突起伝搬の解明

宮本　大祐

富山大学 研究推進機構 アイドリング脳科学研究センター 睡眠脳ダイナミクス研究室

Key words：睡眠，記憶，樹状突起スパイン，AMPA 受容体，二光子イメージング

緒　言

電気生理学的な手法は神経活動を計測・操作するために広く使われてきたが、学習・記憶や睡眠といった長期に渡る脳機能を高精細に解明することは困難であった。そこで、本研究者は生体マウスに光操作や蛍光イメージングを適用して、メモリーリプレイを生じる睡眠時の脳動態の時空間構造を研究している［1〜5］。本研究は、*in vivo* 二光子イメージングを用いて、樹状突起スパインにおける興奮性シナプス伝達を担う AMPA 受容体を蛍光可視化して、高空間分解能で記憶を担う脳回路の動態を解明することを目的とした。本研究内容について、Nature Communications 誌［4］および Medical Science Digest 誌に報告している。

方　法

1. シナプス AMPA 受容体の可塑性の生体イメージング法

AMPA 受容体の GluA1 サブユニットを蛍光可視化するために、SEP（Super Ecliptic pHluorin）-GluA1 を用いた。SEP は pH 依存的な緑色蛍光タンパク質であり、細胞外と細胞内の pH の違いを利用して、細胞膜上の機能的な受容体を選択的に蛍光可視化出来る。また、神経細胞の形態を蛍光可視化するために、赤色蛍光タンパク質の dsRed2 を用いた。SEP-GluA1 と dsRed2 の発現を誘導するために、E14.5 胚に子宮内電気穿孔法を適用した。その後、成体マウスにおいて、頭蓋骨にガラス窓を設置した。そして、二光子顕微鏡を用いて、一次運動皮質の 2/3 層錐体細胞が有する 1 層のタフト樹状突起において、運動学習と睡眠期間を通じて経時イメージングを行った。

結果および考察

1. 運動学習と睡眠によるスパイン選択的な AMPA 受容体の可塑性

記憶固定化に睡眠を必要とする運動学習試験として、Complex Wheel 試験を用いた。運動学習はスパインの AMPA 受容体量を平均的に増加させた（図 1d〜f）。一方で、運動学習前（図 1a〜c）及び運動学習後（図 1g〜i）の睡眠は、スパインの AMPA 受容体量を平均的に減少させた。このスパインの AMPA 受容体量の減少は断眠によって阻害された（図 1j〜l）。図 1a、d、g、j は各マウスにおける AMPA 受容体量の増加／減少したスパイン数を定量している。図 1b、e、h、k は各樹状突起における AMPA 受容体量の増加／減少したスパイン数を定量している。図 1c、f、i、l は AMPA 受容体量を基にスパインを 5 分位にランク付けして、AMPA 受容体量とその変化の方向性の関係を解析している。各 5 分位は一貫して学習による AMPA 受容体量の増加と睡眠による AMPA 受容体量の減少が生じる傾向があったため、個々の AMPA 受容体の量はその変化の方向性に大きな影響を与えないと考えられる。

運動学習によって AMPA 受容体量が特に増加した一部のスパイン（Max スパイン）は、運動学習後の睡眠や断眠の影響を受けずに保護されていた（図 2a）。なお、学習後の 0〜7h の期間において、睡眠群と断眠群ともに Max スパインは AMPA 受容体量の減少が見られる。シミュレーションの結果、0〜7h における減少は統計的なバイアスである平均への回帰の影響を受けていると考えられる。一方で、その他のスパインは運動学習後の睡眠時に AMPA 受容体量が

減少し、この減少は断眠によって阻害された（図 2b)。Max スパインとその他のスパインにおける 0〜7h における AMPA 受容体量の変化は、睡眠群と断眠群で有意な差があった（図 2c)。そして、運動学習後の AMPA 受容体量の減少は、運動記憶成績と相関していた（図 2d)。これらより、運動学習後の睡眠は、大部分のシナプスをクールダウンさせて、運動記憶を担うシグナルを相対的に強化していると考えられる。

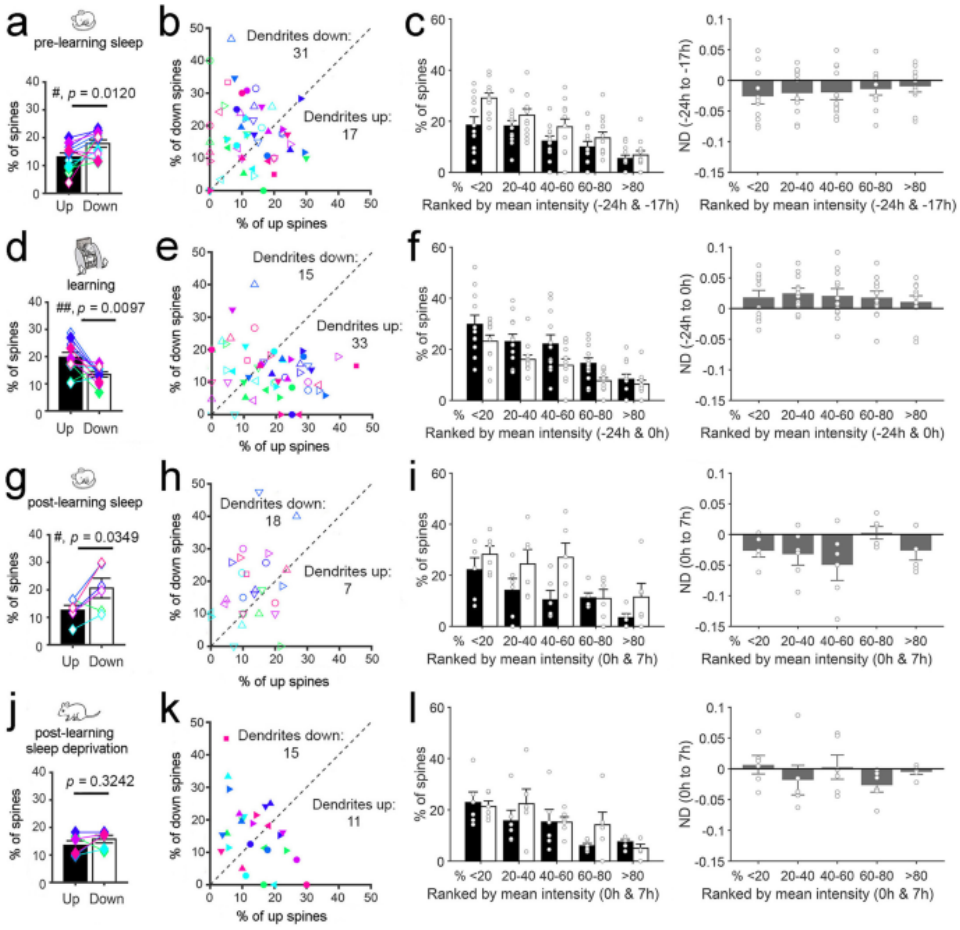


図 1. 学習や睡眠による SEP-GluA1 発現変化の単一スパイン解析

a, b） 学習前の睡眠時における Up（ND＞0.15）および Down（ND＜－0.15）スパインの割合（a）、アップおよびダウンスパインの割合（b）。

c） 左：各五分位群におけるスパインのアップ（黒棒）とダウン（白棒）の割合、右：各五分位群におけるスパイン SEP-GluA1 発現の ND（Normalized Difference：mean±SEM）。スパインは五分位に細分化し、x 軸に示した 2 つの時点の SEP-GluA1 発現量の平均値に基づいて強さをランク付けした（n=12 マウス）。

d〜f） 運動学習による変化（n=12 マウス）。

g〜i） 学習後の睡眠による変化（n=6）。

j〜l） 学習後の断眠による変化（n=6）。

a、d、g、j の p 値は、two-sided paired sample t test を用いて計算したものである。b、e、h、k では、各樹状突起枝におけるスパインの増加/減少／同調の割合は以下の通り（mean±SEM、単位：%）。学習前睡眠による変化（－24 時間→－17 時間）：Up 12.3±8.16、Same 70.3±12.2、Down 17.4±9.9、学習による変化（－24 時間→0 時間）：Up 17.0±9.9、Same 70.3±12.2、Down 17.9±9.9。Up 17.9±10.9、Same 68.7±11.9、Down 13.4±7.62。学習後の睡眠による変化（0 時間→7 時間）：Up 12.4±6.7、Same 68.7±15.4、Down 18.9±12.3、学習後の断眠による変化（0 時間→7 時間）：Up13.8±7.31、Same 70.5±9.7、Down15.7±10.4。

（［4］より翻訳）。

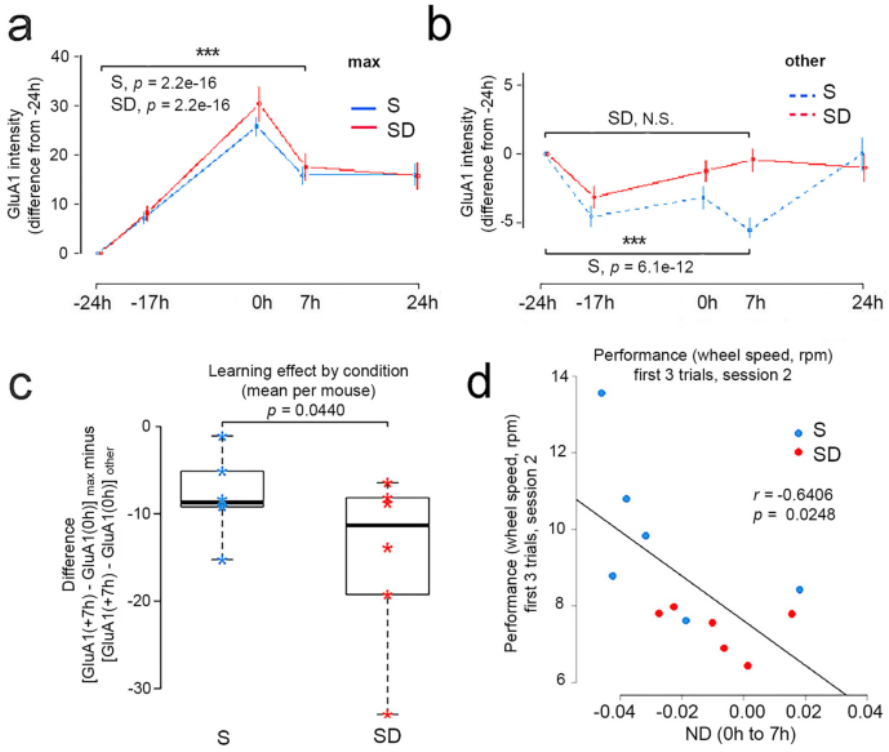


図 2. 運動学習後の max スパインとその他のスパインの変化

a) 全イメージングセッションにおける max スパインの SEP-GluA1 強度（−24 時間との差）（mean±SEM）。“max スパイン”は、−24 時間から 0 時間までで最大の増加を示したものと定義した。これらのスパインは、学習後に時間経過しても高い SEP-GluA1 レベルを維持した（7 時間 vs −24 時間：両群とも p=2.2e-16）。S：睡眠（n=6 マウス）、SD：断眠（n=6 マウス）。

b) 全イメージングセッションにおける“max スパイン”以外の“その他のスパイン”における SEP-GluA1 強度（−24 時間からの差）（mean±SEM）。最初のトレーニングセッション後 7 時間の間、S マウスの“その他のスパイン”は 7 時間対−24 時間で減少を示すが（p=6.1e-12）、SD マウスの“その他のスパイン”は減少しない（7 時間対−24 時間、N.S.）。a、b の統計解析は、セッションをカテゴリー的固定効果、スパイン、デンドライト、マウスをランダム効果として、線形混合効果モデルで行った。尤度比検定はセッションの効果を確認するために使用された。

c) “max スパイン”における 0 時間から 7 時間までの SEP-GluA1 の変化と、その他のスパインにおける 0 時間から 7 時間までの SEP-GluA1 の変化との差。群による有意な効果（S または SD；尤度比検定、p=0.0440）があり、SD 群に比べて S 群では“max スパイン”が“その他のスパイン”に対して相対的に強まることを示している。

d) 運動学習 2 日目の成績と、各マウスのスパイン SEP-GluA1 発現の 7 時間後（S または SD 後）と 0 時間後（学習直後）の ND（Normalized Difference：mean±SEM）の間には負の相関がある。

（［4］より翻訳）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Chiara Cirelli（Professor, University of Wisconsin-Madison, United States）、Dr. Giulio Tononi（Professor, University of Wisconsin-Madison, United States）及び Dr. William Marshall（Assistant Professor, Brock University, Canada）である。

文　献

1) Miyamoto D, Murayama M. The fiber-optic imaging and manipulation of neural activity during animal behavior. Neurosci Res. 2016 Feb;103:1-9. doi: 10.1016/j.neures.2015.09.004. Epub 2015 Sep 30. Review. PubMed PMID: 26427958.

2) Miyamoto D, Hirai D, Fung CC, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, Murayama M. Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. Science. 2016 Jun 10;352(6291):1315-8. doi: 10.1126/science.aaf0902. Epub 2016 May 26. PubMed PMID: 27229145.

3) Miyamoto D, Hirai D, Murayama M. The Roles of Cortical Slow Waves in Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. Front Neural Circuits. 2017;11:92. doi: 10.3389/fncir.2017.00092. eCollection 2017. PubMed PMID: 29213231; PubMed Central PMCID: PMC5703076.

4) Miyamoto D, Marshall W, Tononi G, Cirelli C. Net decrease in spine-surface GluA1-containing AMPA receptors after post-learning sleep in the adult mouse cortex. Nat Commun. 2021 May 17;12(1):2881. doi: 10.1038/s41467-021-23156-2. PubMed PMID: 34001888; PubMed Central PMCID: PMC8129120.

5) Miyamoto D, Optical imaging and manipulation of sleeping-brain dynamics in memory processing. Neurosci Res. *in press*