

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月13日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18577

研究課題名(和文)ドーパミン作動性神経が調節する匂い嗜好変化の神経生理学的解析

研究課題名(英文)Neurophysiological analysis of dopamine dependent odor preference changes

研究代表者

長野 慎太郎 (NAGANOS, Shintaro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主任研究員

研究者番号：30631965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：経験依存的な嗜好の変化は人間から昆虫まで共通してみられる行動の可塑的变化であるが、その分子・細胞機構については依然として不明な点が多い。本研究はショウジョウバエの匂い連合学習をモデルに、経験依存的な匂い嗜好の変化に神経伝達物質のドーパミン、及び、ドーパミン神経がどの様に関わるか検証した。実験では、電気化学的手法を用いて、生体内のドーパミン放出を直接検出すると共に、カルシウムイメージング法を用いて神経活動を計測した。その結果、脳部位特異的なドーパミン放出様式の違いを検出し、これが経験依存的な匂い嗜好の変化に必要なことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Experience-dependent preference changes are found in various animals from mammals to insects. However, the detail of its molecular and cellular mechanism is still unclear. In this study, we employed olfactory associations in *Drosophila melanogaster* and investigated neurophysiological processes of experience dependent odor preference changes. We found that monoamine neurotransmitter, dopamine, and dopaminergic neurons were required for preference behavioral plasticity. Then, we employed electrochemical method and calcium imaging to detect dopamine release and neural activities of dopaminergic neuron, respectively. As results, we have identified that each brain regions, which regulate odor preference behavior, have unique dopamine release manners.

研究分野：神経生理学

キーワード：ドーパミン 行動の可塑性 学習記憶 電気化学

## 1. 研究開始当初の背景

嗜好の変化は経験に依存して生じる事が多々ある。つまり、嗜好の変化を担う神経生理機構の一端は、学習記憶を担う神経生理機構と共通していることが想像できるが、その分子・細胞機構がどのようなものであるか、依然として不明な点が多い。

学習記憶のモデル生物であるショウジョウバエ(以下、ハエ)は匂い連合学習法によって匂い嗜好の変化が起こることが知られている(Tanimoto et al. *Nature* 2004)。我々はこのハエを用いた予備実験で、経験依存的な匂い嗜好の変化にドーパミン受容体が必要であることを見出した。先行研究では、ドーパミン(DA)は非条件刺激を記憶中枢に伝える役割を担っていることが示唆されている(Aso et al. 2010 *Current Biol.*)。しかしながら、DAシグナルが、経験依存的な匂い嗜好の変化にどの様に寄与するのか、その神経生理学的な知見は依然として存在しない。そこで本研究は、ドーパミン神経(DA神経)の活動、及び、DA放出動態がどの様に匂い嗜好の変化を制御しているのか、注目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ハエの匂い連合学習によって生じる匂い嗜好の変化の神経生理機構の一端を DA に注目して解明することを目的とした。そのために、匂い嗜好の変化を制御する DA 神経の同定、匂い嗜好の変化を制御する DA 神経活動の同定、匂い嗜好の変化を制御する脳内 DA 放出動態の同定、以上 3 点を明らかにするための実験をおこなった。

## 3. 研究の方法

2 で示した研究目的を達成するために以

下の 3 点の実験を行った。

(1) 熱行動遺伝学的手法を用いてハエの匂い嗜好の変化を制御する DA 神経の検証と同定を行った。

(2) ハエの匂い嗜好の変化を制御する DA 神経の活動を *ex vivo imaging* 法、及び、*in vivo imaging* 法(図 1)を用いて検証・同定した。

(3) 電気化学的手法(Fast-scan cyclic voltammetry: FSCV)を用いて、ハエの匂い嗜好の変化を制御する DA 放出動態を生体内で検証・同定した(*in vivo FSCV* 法 図 1)。

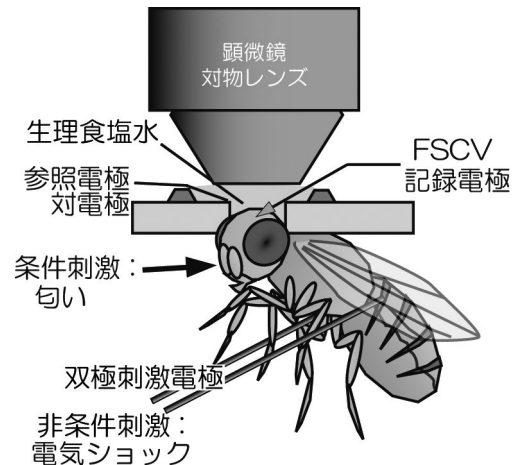


図 1 *in vivo imaging* と *in vivo FSCV*

## 4. 研究成果

(1) 行動熱遺伝学的手法を用いてハエの匂い嗜好の変化を制御する DA 神経を検証した。

ハエは哺乳類と異なり変温動物である。これに着目し、外気温の温度を変化させ神経活動をコントロールする熱遺伝学的手法が存在するが、その一つに神経伝達物質の放出を可逆的に抑制する手法が存在する (Kitamoto (2001) *J Neurobiol.*)。この手法を DA 神経に適用し、どの DA 神経が匂い嗜好の変化に関与するのか、行動実験で検証した。ハエの脳内には約 200 個の DA 神経が存在するが、実験の結果、たった数個の DA 神経が匂い嗜好の変化

を制御することを同定した。そこで、これら DA 神経に着目し、DA 神経の活動や DA 放出動態といった神経生理機能を解析していくことにした。

(2) ハエの匂い嗜好の変化を制御する DA 神経の活動を *ex vivo* imaging 法、及び、*in vivo* imaging 法を用いて検証した。

ハエの脳の神経でカルシウムセンサーの 1 種である GCaMP を発現したハエを作成し、Imaging 法を用いて匂い嗜好の変化にともなう神経活動を検証した。最初に、*ex vivo* imaging 法を用いて神経活動を検証した。この手法では、生きたハエから脳を取り出し培養する。この脳に直接、匂い連合学習の条件刺激 (CS) である匂い物質を嗅がせることはできない。そこで、匂いを嗅がせる代わりに、ハエの 1 次匂い中枢であるアンテナローブ (AL) を電極で刺激する。同様に、非条件刺激 (US) である電気ショックの情報を中枢に伝える上向性神経繊維 (AFV) も電極で刺激する。それぞれを単独で刺激した場合、及び、連合刺激した場合の両方で GCaMP の蛍光強度の変化をモニターすると、神経活動を定量的に調べることができる。様々な神経種で GCaMP を発現し、その神経活動を調べたところ、AL 刺激、AFV 刺激のそれぞれに应答して、ハエの匂い記憶中枢であるキノコ体 (MB) や DA 神経で神経活動が起こることを見出した。また、AL と AFV の同時刺激によって、MB、DA 神経で神経活動の可塑的变化が起こることを見出した。この神経活動の可塑的变化は匂い嗜好の変化を担う神経生理機構であることを示唆する。これら結果の一部は、雑誌論文 にまとめた。

*ex vivo* imaging 法は神経生理機構を調べるに当たって優れた実験系であるが、

人為的な刺激を脳へ直接、与えているため、生体内で同様の神経活動が起こるのか、わからないデメリットが存在する。そこで、*ex vivo* imaging 法で同定した神経活動が生体内でも見られるか、*in vivo* imaging 法 (図 1) をセットアップし、検証した。(1) で同定した匂い嗜好の変化を制御する DA 神経の活動を GCaMP で調べると、匂い刺激、連合刺激に伴い活動することを見出した (図 2)。

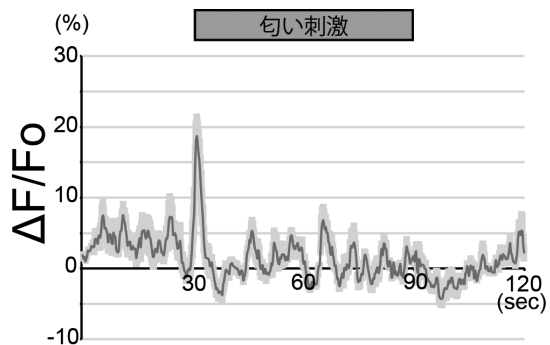


図 2 匂い刺激にともなう DA 神経の活動

しかし、*ex vivo* imaging で見出した神経活動の可塑的变化を DA 神経で捉えることはできなかった。このことは、DA 神経以外で生じる神経の可塑的变化が匂い嗜好の変化を担っていることを示唆する。

(3) 匂い嗜好の変化を制御する DA 放出動態を *in vivo* FSCV 法を用いて検証した。

当初、exocytosis センサーである synaptopHluorin (SpH, Miesenböck et al. (1998) *Nature*) を DA 神経で発現し、*ex vivo* imaging、及び、*in vivo* imaging で DA 放出動態を検証・同定する予定であった。しかし、先行研究では DA 神経が DA 以外にグルタミン酸や GABA も放出することが報告されており (Sulzer et al. (1998) *J. Neurosci*, Maher and Westbrook. (2008) *J. Neurophysiol*), SpH では本当に DA が放出されているのか検証することができないことがわかった。そこで、FSCV を用いて DA 放出動態を同定す

る手法へ変更した。この手法は、直径 7 $\mu$ m の炭素電極に電圧をかけ、電極周りに存在するモノアミン神経伝達物質を酸化・還元させる。この時に生じる電流を計測することで、高空間・高時間分解能で DA 放出を検出することを可能とする。(1) で同定した DA 神経の投射先で DA 放出を調べたところ、匂い刺激、連合刺激に伴い DA が放出されることを同定した(図 3)。

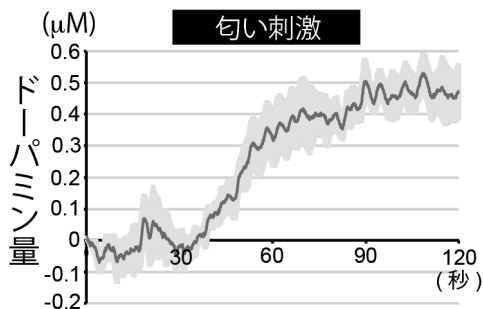


図 3 匂い刺激にともなう DA 放出

この結果は、DA 放出が匂い嗜好の変化に DA 放出が関わることを示す。また、脳の領域毎に放出される DA 量、及び放出動態が異なることを見出した。

これら実験結果により、匂い嗜好の変化にともなう DA 神経の活動、及び、DA 放出動態を明らかにし、その神経生理機構の一端を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Naganos S, Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M.

Learning defects in *Drosophila* growth restricted *chico* mutants are caused by attenuated adenylyl cyclase activity.

**Mol. Brain.** 2016 Apr 6;9:37.

doi: 10.1186/s13041-016-0217-3. 査読有

[学会発表](計 5 件)

長野慎太郎、他、

電気化学的手法を用いた匂い連合学習を担う単一ドーパミン神経機能の解明  
次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム 2017 2017 (若手優秀発表賞 受賞)

長野 慎太郎

電気化学的手法を用いた匂い連合学習を担う単一ドーパミン神経機能の解明

第 40 回日本分子生物科学会例会 2017  
(招待講演)

Shintaro Naganos、他

Real-time quantification of monoamine neurotransmitters using in vivo fast scan cyclic voltammetry in *Drosophila*  
第 40 回日本神経科学大会 2017

Shinatro Naganos、他

Fasting enhances olfactory learning in *Drosophila* by increasing dopamine signaling.

第 39 回日本神経科学大会 2016

Shintaro Naganos、他

Dopamine receptor activities regulate learning-dependent odor preference changes in *Drosophila*.

北米神経科学大会 2015

[図書](計 1 件)

長野慎太郎、他、

ショウジョウバエだからわかる学習記憶のメカニズム **生体の科学** 2016 Vol67. No.1. 13-16

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクト HP  
<http://www.igakuken.or.jp/memory/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長野 慎太郎 (NAGANOS, Shintaro)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・  
認知症・高次脳機能研究分野・  
主任研究員  
研究者番号：30631965

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし