

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 6月 6日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700405

研究課題名（和文） 記憶ニューロンに対するドーパミン作用機序の蛍光イメージング解析

研究課題名（英文） Imaging study of the physiological relationship between dopaminergic neurons and memory central

研究代表者

上野 耕平（UENO KOHEI）

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主席研究員

研究者番号：40332556

研究成果の概要（和文）：記憶の形成や保持の基盤となっているのは神経細胞間にあるシナプスの可塑的变化である。近年、ドーパミンがこのシナプス可塑性に重要な働きをしていることが示唆されているが、その生理的な機序は不明な点が多い。匂いと電気ショックで形成されるハエの匂い嫌悪学習においてもドーパミンは重要である。ドーパミンの作用機序を明らかにするため、研究代表者が以前に開発した、単離脳における匂い記憶中枢キノコ体でのシナプス可塑性を用いてドーパミンの生理的な役割を解析した。その結果、ドーパミンはキノコ体が匂いとショックの入力経路によって活性化したときに放出され、それによってキノコ体のドーパミン受容体が活性化するとそれだけでキノコ体の可塑的变化を引き起こすには十分であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The plastic change in the synaptic transmission is underlying learning and memory formation. Recent studies have suggested that dopamine is important for the plasticity, while the physiological mechanisms is unclear. In Drosophila, dopamine signaling is also required for olfactory aversive memory that is induced by odor and electrical shock. Previously, I have reported that simultaneous stimulation of odor and shock inputs induced plastic change in the mushroom body, olfactory memory center, in isolated brain via dopamine signaling. Here, I examined the relationship between dopamine signaling and neural plasticity in mushroom body, and found that dopamine release is occurred when mushroom body is activated by simultaneous inputs from odor and shock.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

学習によって形成される記憶は、シナプス伝達効率の変化がその細胞学的基盤となっている。この伝達の可塑的变化に重要な働きをすると考えられている神経伝達物質の1つがドーパミンである。しかし、ドーパミンは一般的な神経伝達物質とは大きく異なる点が多い。例えば、その受容体は七回膜貫通型であり代謝経路を経由して膜電位などに変化を及ぼすが、多くの神経伝達物質受容体はチャネル共役型であり直接膜電位変化を引き起こす。すなわち、ドーパミンの反応性は他の神経伝達物質に比べて遅いと考えられる。また、ドーパミン神経細胞は特に刺激を受けなくても自発的に高い興奮性を示すことが多い一方、ドーパミン神経細胞の興奮性とドーパミンの放出そのものには相関性が見られない例がある。さらに、ドーパミン神経細胞の数は少ないが、その神経終末は極めて大きく、多数の神経細胞に投射している。このような特異的な点から、ドーパミンの放出とそれによる受容細胞への効果は、一般的な神経伝達物質であるグルタミン酸やGABAなどとは大きく異なると考えられるが、その詳細は不明である。

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*、以下ハエ) の匂い記憶形成にもドーパミンは重要であり、多数の知見が蓄積している。特に重要なことは、ドーパミン受容体はハエの匂い記憶中枢であるキノコ体でのみ発現していれば匂い記憶形成や保持には十分であることと、ドーパミン神経細胞からのドーパミン放出を記憶形成時特異的に遮断すると、記憶形成が完全に阻害されることが挙げられる。すなわち、ドーパミン

情報経路が必要な場所とタイミングが明らかにされている。さらに、遺伝学を組み合わせた行動実験から、匂いと電気ショックによる匂い嫌悪学習は、電気ショックの代わりにドーパミン神経細胞を興奮させるだけでも十分に引き起こせられることが報告されている。以上の知見から、ドーパミンは匂い記憶形成時に、電気ショックをキノコ体に伝達するために放出され、この放出されたドーパミンによるシグナルと匂い情報がキノコ体で統合されることがキノコ体シナプスの可塑的变化を引き起こすと示唆されている。

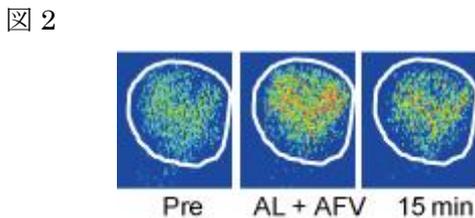
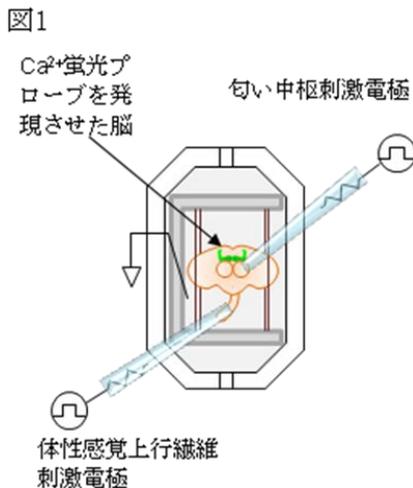
一方、生きたハエ頭部に穴を空け、そこからドーパミン神経細胞の興奮性を Ca^{2+} イメージング解析により測定した研究からは、確かにドーパミン神経細胞は電気ショックにより興奮性を示すが、匂いに対しても興奮性を示すことや、ほ乳類のドーパミン神経細胞のように自発的にかつ周期的に高い興奮性を示すことが報告された。生きているハエは、実験者による刺激だけでなく様々な環境因子、さらには拘束によるストレスを受けている状態にあり、観測された応答性が真に刺激だけによるものかを判断することが難しく、依然としてドーパミン神経細胞やそこから放出されるドーパミンの生理学的役割は明らかとは言えない状況であった。

2. 研究の目的

研究代表者は、若手研究 (B) (2009年度～2010年度) において、ハエ脳を単離し、匂い中枢 (antennal lobe、以下AL) と電気ショックを脳に伝える体性感覚上行繊維

(ascending fibers of ventral nerve cord、以下AFV) を同時に刺激すると (図1)、その

後AL刺激による記憶中枢でのCa²⁺応答が長期にわたって増強するという現象を見出した(図2)。具体的には、匂い中枢を刺激すると、匂い記憶中枢でのCa²⁺蛍光プローブの蛍光が上昇する(図2 Pre)。しかし、匂い中枢(antennal lobe、以下AL)と電気ショックを脳に伝える体性感覚上行繊維(ascending fibers of ventral nerve cord、以下AFV)を同時に繰り返し刺激し(図2、AL+AFV)、15分後に改めてALだけを刺激すると、蛍光変化が増強している(図2、15min)。この増強は、数時間に渡って維持され、また入力特異性や連合性などの生理学的特性が匂い嫌悪記憶と極めて高い類似性を示した。これらの点から、研究代表者はこの長期増強(long-term enhancement、以下LTE)は匂い嫌悪記憶の基盤となる可塑的变化であることを提唱している。



薬理的・遺伝学的な解析から、このLTE形成にもキノコ体上のドーパミンの受容体が、ALとAFVの同時刺激時に活性化することが必須であった。単離脳においては環境からの入力完全に遮断されており、純粋に匂い入力ないしは電気ショック入力の刺激に対する応答性そのものを測定することが可能である。この実験系を利用して、ドーパミンがどのように放出されるのか、そしてその放出されたドーパミンが記憶中枢キノコ体神経細胞の可塑的变化にどのような寄与をするのかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ドーパミン神経細胞は前述したように、その興奮性とドーパミン放出そのものの相関性が無い例が報告されている。従って、ドーパミン神経細胞の興奮性ではなく、synapto-pHluorin (spH) というシナプス放出を蛍光強度によって観測できるプローブを利用し(図3)、これをドーパミン神経細胞特異的に発現させることで、ドーパミン神経からのドーパミン放出を観測した。

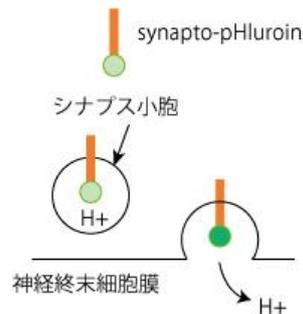


図3 シナプス小胞の内部はプロトンポンプによりpHが低い。神経伝達物質の放出時に小胞が細胞膜に融合するとH⁺が放出され、小胞内のpHが高くなる。synapto-pHluorinにはpH感受性のGFPが含まれており、これにより小胞内にあるときは蛍光が暗く、小胞が融合すると蛍光強度が高くなる。これにより、小胞からの放出を定量化することができる。

4. 研究成果

単離脳を用いた LTE 形成およびドーパミン神経細胞からのドーパミン放出の可視化により、以下の成果が得られた。

(1) ドーパミン神経細胞からのドーパミン放出は、AL 刺激および電気ショックを伝える AFV 刺激いずれにおいても観察されない。

(2) AFV 刺激はキノコ体の Ca^{2+} 応答を引き起こし、この応答性はグルタミン酸受容体の 1 つ、NMDA 受容体の阻害剤で遮断された。さらに、この遮断薬を投与した状態で、AL と AFV を同時刺激しても LTE 形成は観察されない。一方、AFV 刺激の代わりに、NMDA 受容体の agonist を投与した状態で同時に AL 刺激を行うと、AL と AFV 同時刺激と同様に LTE が形成された。

(3) ドーパミンシグナルは LTE に不要かというそのような事はなく、AL と AFV 同時刺激においてドーパミン受容体の阻害剤を投与しておくとも LTE は形成されない。同様の結果はドーパミン受容体の変異体でも観察され、この変異体においてキノコ体でのみドーパミン受容体発現を戻すと、LTE 形成が回復することが確認された。

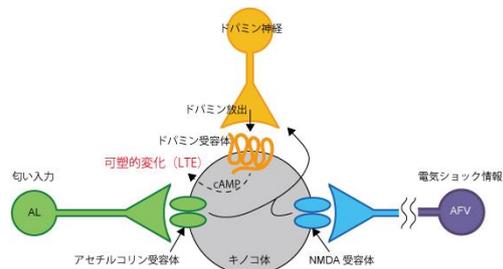
(4) ドーパミン受容体変異体において、およびキノコ体にのみドーパミン受容体を発現させた変異体において、AL 刺激と NMDA 受容体刺激を行うと、AL と AFV 同時刺激と同様に前者、ドーパミン受容体変異体では LTE が形成されず、後者のキノコ体でのみドーパミン受容体を発現させた変異体では LTE 形成が回復した。このことから、ドーパミン受容体の活性化は、AL と AFV 刺激の後に起きることが推測される。

(5) ドーパミンだけを投与し、他の刺激を全く行わない場合でも、LTE が形成された。さらに、このドーパミン誘導性 LTE は匂い記憶形成に必要な cAMP 情報伝達経路の変異体いずれにおいても阻害された。興味深いことに、NMDA 受容体の阻害剤による処理後や NMDA 受容体の変異体においても、このドーパミン誘導性の LTE は形成された。

(6) AL と NMDA 受容体を刺激するとドーパミンの放出が観察された。しかし、AL 刺激や NMDA 受容体刺激それぞれ単独の場合にはドーパミン放出は観察されなかった。

(7) 以上の成果から、本研究から全く新しいシナプス可塑性に必要なドーパミン放出の機構モデルが想定された (図 3)

図 3



すなわち、匂い情報と電気ショックの情報が、アセチルコリン受容体と NMDA 受容体によってそれぞれキノコ体へと伝えられる。これによりキノコ体神経細胞が興奮し、このことがさらにドーパミン神経細胞へと伝達され、ドーパミン放出を誘導する。放出されたドーパミンが近傍のキノコ体神経細胞の可塑的变化を cAMP 情報伝達経路によって引き起こすと考えられるという、神経可塑的变化における新規のドーパミン作用モデルが提唱することができたといえる。今後の課題および展望としては、このようなドーパミン神経およびド

ーパミンシグナルの挙動が実際の生きた動物で起きているのかという検証、また、匂いとショック情報によって活性化したキノコ体からドーパミン神経への情報伝達経路の同定、さらにはこのような機構がハエ独自ののか、それともほ乳類の脳でも起きているのか否かという研究が必要になるだろう。

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3件)

(1) Ueno K, Naganos S, Hirano Y, Horiuchi J, Saitoe M., Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured *Drosophila* brain., *J Physiol.*, 査読有, vol. 591(Pt 1), 2013, 287-302 DOI: 10.1113

(2) Kamimura K, Ueno K, Nakagawa J, Hamada R, Saitoe M, Maeda N., Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction., *J Cell Biol.*, 査読有, vol. 200(2), 2013, 219-233 DOI: 10.1083

(3) Hirano Y, Masuda T, Naganos S, Matsuno M, Ueno K, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M., Fasting launches CRTG to facilitate long-term memory formation in *Drosophila*., *Science*, 査読有, vol. 339(6118), 2013, 443-446, DOI: 10.1126

[学会発表] (計3件)

① 上野 耕平, Exploring neural

plasticity-related proteins by LC/MS/MS analysis in *Drosophila* mushroom body, 第35回日本神経科学大会, 2012年09月20日, 名古屋国際会議場

② 上野 耕平, in vitro imaging analysis of neural plasticity in mushroom body neurons, 第34回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2011年12月13日, パシフィコ横浜

③ 上野 耕平, Correlated Activation of Dopamine Receptors Is An Essential for Associative Synaptic Plasticity Relevant To Olfactory Aversive Memory. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 耕平 (UENO KOHEI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主席研究員
研究者番号：40332556