

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700339

研究課題名(和文) 光刺激技術を応用した報酬・忌避行動における行動選択のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanisms of aversive behavior caused by optogenetic inactivation of dopamine neurons

研究代表者

檀上 輝子 (Danjou, Teruko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：60613247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ドーパミン神経の忌避反応における機能を調べるために、オプトジェネティクスを用いてマウスの腹側被蓋野のドーパミン神経の発火を抑制した。その結果、光刺激を受けた場所に対する忌避反応が生じ、ドーパミン神経の発火抑制のみによって忌避記憶が生じることが示された。

さらに、この忌避反応が直接路/間接路のいずれを介しているかを解析するために、D1R、D2Rをノックダウンしてこれらの神経回路を選択的に抑制した。D1Rノックダウン群ではコントロール群と同様であったが、D2Rノックダウン群では忌避記憶が消失した。この結果から、忌避記憶が側坐核のドーパミンD2受容体(間接路)を介していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Dopamine (DA) neurons in the ventral tegmental area (VTA) react to aversive stimuli mostly by transient silencing. It remains unclear whether this reaction directly induces aversive responses in behaving mice. We examined this question by optogenetically controlling DA neurons in the VTA and found that the inactivation of DA neurons resulted in aversive response and learning. The nucleus accumbens (NAc), the major output nuclei of VTA DA neurons, was considered to be responsible for this response, so we examined which of the fundamental pathways in the NAc was critical to this behavior by using knock-down of D1 or D2 receptor, and found that the D2 receptor-specific pathway was crucial for this behavior.

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：神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 腹側被蓋野のドーパミン神経は、報酬刺激に際して発火頻度を上昇させ、忌避刺激に対して発火頻度を減少させることが知られている。

(2) 腹側被蓋野のドーパミン神経を光刺激によって発火頻度を上昇させた個体では、光刺激を受けた場所に対して、報酬行動を示すようになることが知られている。

(3) 忌避刺激に対して腹側被蓋野のドーパミン神経の発火が減少するが、この反応が忌避反応/忌避行動に直接関係しているかは、研究開始当初、未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 腹側被蓋野のドーパミン神経の発火を光刺激によって減少させ、これによりその個体に忌避反応が生じうるかを明らかにする。

(2) (1)の光刺激により忌避反応が確認された場合、それがどのような神経回路によって生じるのか、メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ドーパミン神経を特異的に光刺激するため、ドーパミン神経に発現している酵素、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)の下流に Cre を発現するマウス(TH-Cre マウス)を用いて、腹側被蓋野に Cre 依存的にハロドブシンを発現するアデノ随伴ウイルスを感染させることによって、腹側被蓋野のドーパミン神経特異的にハロドブシンを発現させた。光ファイバーも腹側被蓋野の上方に挿入し、これを通して光刺激を行った。

(2) (1)の操作を行ったマウスに光刺激をする際にドーパミン神経の発火が実際に抑制されているか、電気生理学的試験を行った。

(3) (1)の操作を行ったマウスに光刺激をする際に、側坐核のドーパミン濃度が変化するか調べるために、ボルタメトリーを用いて側坐核のドーパミン濃度を測定した。

(4) (1)の操作を行ったマウスに、条件付け場所忌避性試験(CPA test)を行った。この行動試験は二つの部屋が一つの廊下でつながった実験装置を用いて行い、実験中、マウスはこの装置の中を自由に動き回ることができる。この実験では、マウスが一つの部屋の中にいるときのみ光刺激を加え、ドーパミン神経の発火を抑制させ、この刺激に対するマウスの反応を調べた。

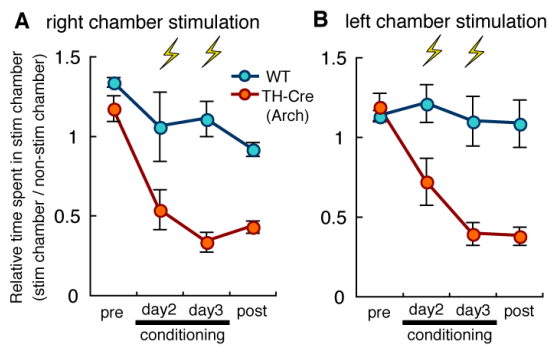
(5) (4)の実験によって得られた反応がどのような神経回路によって生じているかを調べるために、側坐核のドーパミン神経を受容体特異的に阻害した。これは、ドーパミン受容体の発現を特異的に抑制させるショートヘアピピン RNA を発現するレンチウイルスを側坐核に感染させることにより行った。

4. 研究成果

(1) CPA test において、野生型のコントロール群では何ら反応を示さなかったのに対して、TH-Cre マウスでは、光刺激を行った部屋に滞在する時間が光刺激を行わなかった部屋に滞在する時間に比べて減少し、光刺激を行った部屋に対する忌避反応を示した。2 日間光刺激を行った翌日、光刺激を行わずに行動を観察したところ(post test)、前日まで光刺激を

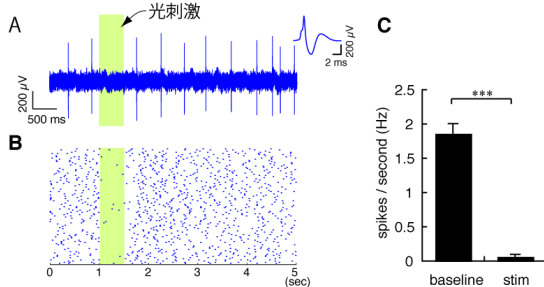
行っていた部屋に対する忌避反応が持続した (図 1)。この実験により、光刺激によるドーパミン神経の発火抑制が、マウスの忌避反応/忌避記憶に直接関与していることが示された。

図 1 光刺激による場所忌避性試験



(2) 次に、ドーパミン神経に光刺激を行う際に実際に腹側被蓋野のドーパミン神経の発火が抑制されているか、麻酔下の電気生理実験を行い調べた。図 2 に示すように、光刺激によりドーパミン神経の発火が抑制されることが確認された。

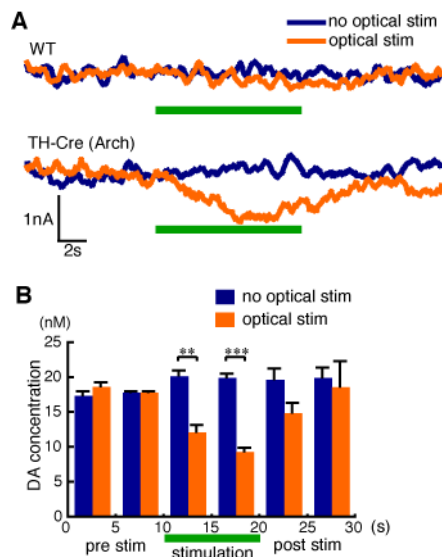
図 2 光刺激によるドーパミン神経の発火抑制



さらに、腹側被蓋野のドーパミン神経が主として側坐核に投射しているため、光刺激によって側坐核のドーパミン濃度が減少するか調べた。その結果、図 3 に示すように、光刺激を行っている間、側坐核のドーパミン濃度が一過性に減少することが明らかになった。

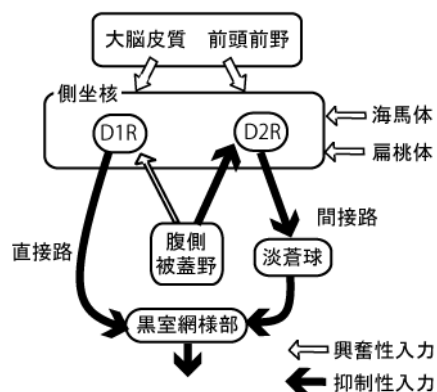
(3) 次に、結果(1)で示した光刺激による忌避反応を引き起す際に機能している神経回路を解析した。腹側被蓋野のドーパミン神経は主

図 3 腹側被蓋野の光刺激による側坐核ドーパミン濃度の減少



として側坐核に投射しており、側坐核の中型有棘神経細胞は、主にドーパミン D1 受容体 (D1R)あるいはドーパミン D2 受容体(D2R)を発現する二種類に分類され、それぞれが主として、黒質網様部へ直接投射する直接路と、淡蒼球を介して間接的に投射する間接路を形成している (図 4)。

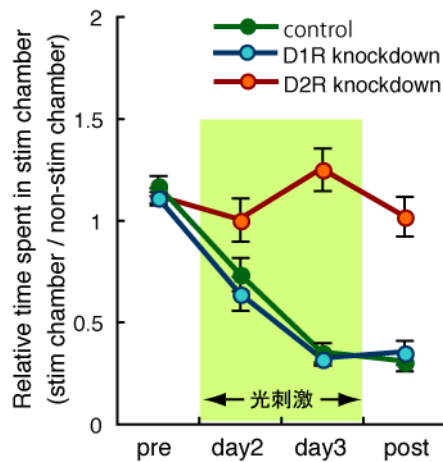
図 4



本研究ではさらに、上述の光刺激による忌避反応が直接路/間接路のいずれを介して生じているかを解析するために、D1R、D2R をそれぞれノックダウンすることにより、これらの神経回路を選択的に抑制した。D1R ノックダウン群では、コントロール群と同様に、腹

側被蓋野のドーパミン神経発火抑制による忌避記憶が観察されたが、D2R ノックダウン群では、コントロール群で観測された忌避記憶が消失した(図5)。この結果から、腹側被蓋野のドーパミン神経の発火抑制によって生じる忌避反応/忌避記憶が側坐核のドーパミンD2受容体(間接路)を介していることが示された。以上の結果をまとめて、成果発表を行った(発表論文)。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Danjo T, Yoshimi K, Funabiki K, Yawata S, Nakanishi S. Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 in press (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檀上 輝子(Danjou Teruko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合