

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18333

研究課題名(和文)条件付け学習においてシナプス可塑性が行動変化に至る神経回路の解明

研究課題名(英文)Synaptic basis of conditioned learning

研究代表者

柳下 祥(Yagishita, Sho)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：50721940

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)：側坐核の単一シナプスは0.3-2秒の時間枠でドーパミンにより強化される。このシナプス機構の学習における役割をマウス頭部固定下のパブロフ条件づけ系で検証した。その結果、音と水の報酬の連合はシナプスと同等の時間枠でのみ成立し、この学習は側坐核の可塑性分子に依存적であった。さらに側坐核へのシナプス入力を光遺伝学により直接刺激しても同等の時間枠が見られた。この連合学習を通して中立的なシナプス入力が報酬作用を持つようになることが分かった。本研究により、側坐核スパイン形態可塑性のドーパミン作用時間枠はパブロフ条件づけの報酬時間枠を決めると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Dopamine reinforces single synapses within the time window of 0.3-2s in the nucleus accumbens. We examined the role of this synaptic mechanism in a behaving mouse operating Pavlovian conditioning with head-fixed condition. The results showed the association of tone and reward was formed within a time windows similar to that of synapses. This learning was dependent on the plasticity related molecule in the nucleus accumbens. A similar time window was also observed even when synaptic inputs onto nucleus accumbens was directly stimulated using optogenetics. After the conditioning, the synaptic inputs, which were previously neutral acquired positive valence. Thus, the current research revealed that the time window of synaptic plasticity determined the time window of Pavlovian conditioning.

研究分野：神経科学

キーワード：条件づけ学習 側坐核 ドーパミン 光遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

報酬による学習には側坐核・線条体系に投射するドーパミン神経の役割が注目されてきた(図1B)。ドーパミン神経は予期しないUSに応じて一過性発火し、学習のトリガー信号(報酬予測誤差信号)として作用する(Schultz et al., Science, 1997)。このことは近年の光遺伝学を使った研究において確かめられてきた。一方、このドーパミンの一過性発火がどのように投射先に作用して学習のトリガー作用を持つことができるのかは長年不明であった。申請者はマウス脳スライスにおいて2光子アンケージングによるグルタミン酸と光遺伝学によるドーパミンを独立操作する実験系を用いて、単一の後シナプス構造(スパイン)が報酬学習の基盤となりうる特性を持つことを示した(Yagishita et al., Science, 2014)。

このように個体の学習基盤となりうる単一スパインのドーパミンの時間枠依存的な可塑性を申請者は発見した。実際の動物行動における役割については未解明であるが、予備的な古典的条件づけ学習課題(詳細は研究計画・方法)において、シナプス可塑性におけるドーパミン時間枠と極めて類似したCSとUSが連合する時間枠を確認した(図2A)。この実験条件では側坐核のドーパミンの時間枠依存的な可塑性が中心的な役割を担うと予想される。そこで、具体的にどのような神経回路において可塑性が生じ、行動変化が生じるのかを明らかにすることでシナプスレベルから構成的な学習の理解が可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、条件刺激を表す情報がD1R-MSN入力し、この入力ドーパミンの時間枠依存的なシナプス可塑性を通して変化し、条件反応に関わる情報の出力が入力と連合される、という仮説モデルを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

条件づけ学習課題として側坐核が学習の主座と考えられている古典的条件づけ課題を用い、スライス実験において見出されたドーパミンの時間枠依存的なシナプス可塑性に対応した学習時間枠を検出できる実験系を構築した。具体的にはマウス頭部を固定した状態で、非条件刺激(US)の報酬である水を強制的に飲水させ、さらにマウスの応答(Lick)を検出した(図1)。これにより条件刺激(CS)の音とUSを与えるタイミングを自由にコントロールでき、またマウスに探索行動などの時間のロスなく即座に安定的に反応を観察することができた。

この実験系において学習前ではCSのみではLickは誘発されないが、USである水を与えるとLick反応が見られる。次にCSとUSを

様々な時間枠での提示を繰り返すことで条件づけをした。その後、テストとしてCSのみを提示すると、条件づけ時にCSの直後にUSが与えられた場合にのみCRとしてLickが観察された。



図1 頭部固定下の実験の模式図

この実験系を用いて具体的には下記の調査を行った。

- i) 自然刺激をCSとした時の連合の時間枠の調査
- ii) 側坐核の可塑性と学習の関係の調査
- ii) 光遺伝学を用いた条件づけ系での時間枠の調査

### 4. 研究成果

CSの提示の1秒後にUSを提示することを繰り返すと40 - 50回ほどの連合でマウスはCSの提示のみで予測的なLickをするようになった。この予測的なリックは翌日まで維持されていた。

(図2)

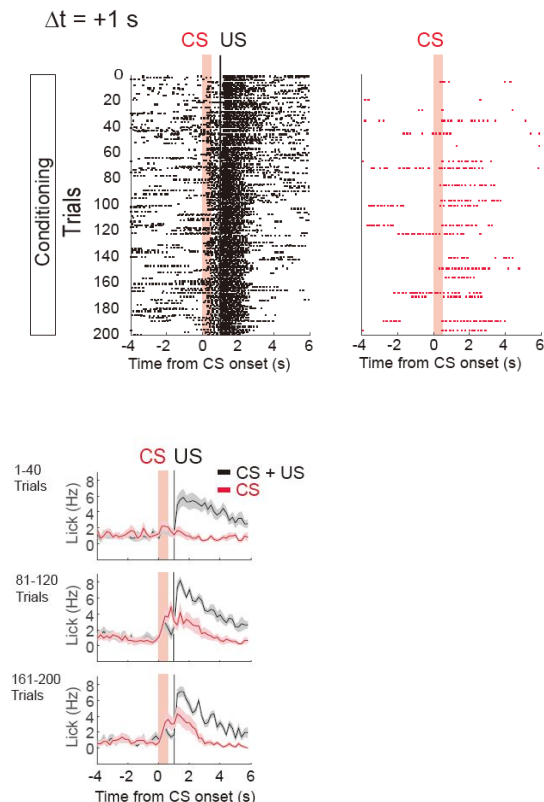


図2 CSの1秒後にUSを提示した条件づけ

次に、様々な時間枠で CS と US を提示したところ 0.5 秒から 1 秒は学習するが、それ以外では学習しないことが分かった。この時間枠は側坐核スパインがドーパミンにより可塑性修飾をうける時間枠と類似であった ( 図 3 )

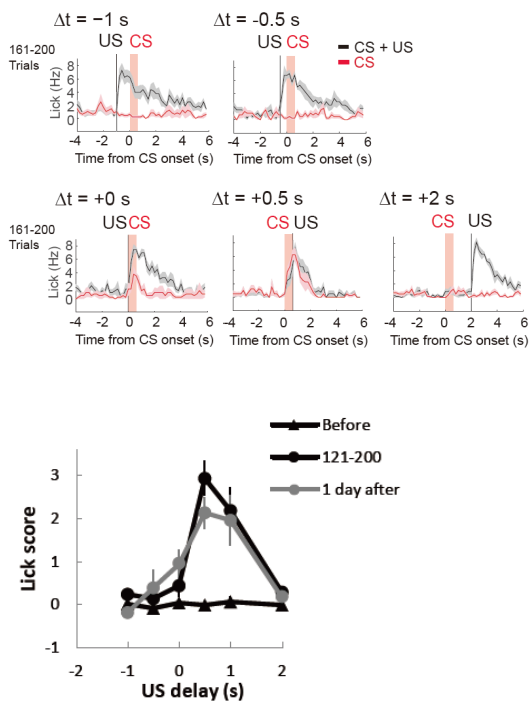


図 3 条件づけ学習の時間枠

次に、この時間枠に対するドーパミンの関わりを検証するため、条件づけ前にドーパミン受容体阻害剤を腹腔内投与した。ドーパミン受容体阻害剤の投与により学習が抑制されたことから、この学習にドーパミンが必要であることが分かった。

さらに側坐核の可塑性の関与を検証するため、側坐核に CaMK 阻害ペプチドである AIP を AAV で発現させた。まず、この AIP が脳急性スライスにおいて側坐核 MSN 細胞のスパイン増大を抑制することを確認した。このペプチドを両側側坐核に発現させると学習が阻害されたことから、側坐核の可塑性が学習に関わることが示された ( 図 4 )

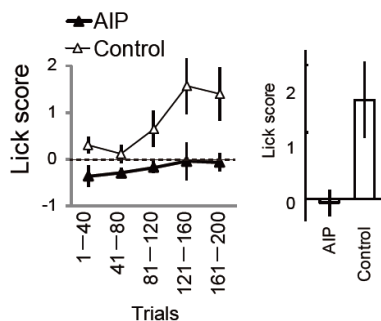


図 4 側坐核の AIP 発現による学習の阻害

さらに側坐核のシナプス可塑性の関与を明らかにするため、光刺激を条件刺激として条件づけする系を開発した。扁桃体に ChR2 を AAV で発現させ、扁桃体から来る軸索を側坐核で刺激することで条件刺激を人口的に脳内に作り、報酬との条件づけをさせた。その結果、音による条件づけとほぼ同様の学習時間枠であった ( 図 5 )。さらに学習はドーパミン受容体阻害剤により抑制されることが明らかになった。このことから、報酬時間枠は側坐核のシナプス可塑性の関与が強く示唆された。

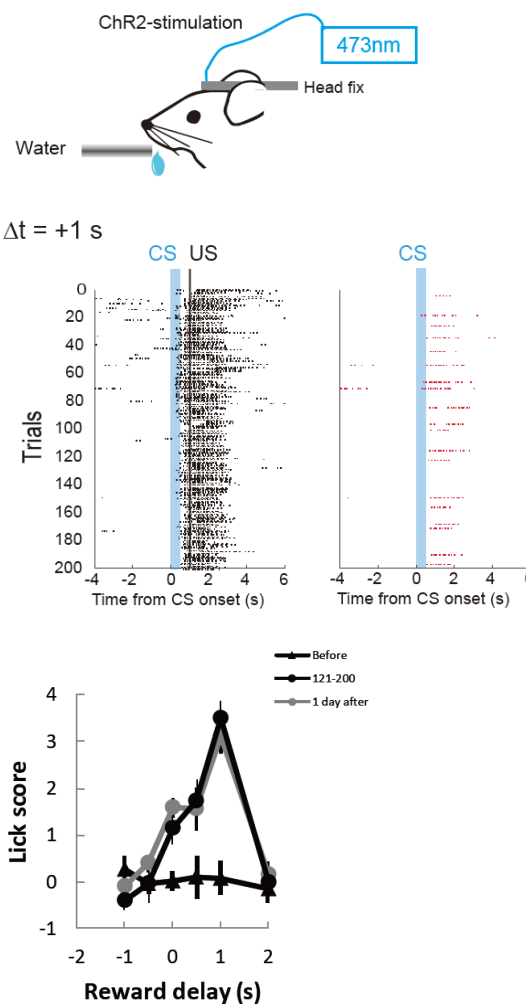


図 5 側坐核へのシナプス入力を光遺伝学により刺激することを条件刺激とした条件づけ系と学習の時間枠

本研究により、側坐核スパイン形態可塑性のドーパミン作用時間枠は古典的条件づけの報酬時間枠を決めると考えられた。本研究内容は論文投稿準備中である。

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5件)

Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Nakamura M, Shirai F, Wu YI, Loshbaugh AL, Kuhlman B, Hahn KM, Kasai H (2015) Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. Nature 525: 333-338. doi: 10.1038/nature15257

Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Watanabe S, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H, Kasai H (2015) Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and beta cells. Nat Commun 6: 8531. doi: 10.1038/ncomms9531

Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H (2016) Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. Scientific Reports 6. doi:10.1038/srep26651

Noguchi J, Hayama T, Watanabe S, Ucar H, Yagishita S, Takahashi N, Kasai H (2016) State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. Scientific Reports 6. doi:10.1038/srep32897

Dagliyan O, Karginov AV, Yagishita S, Gale ME, Wang H, DerMardirossian C, Wells CM, Dokholyan NV, Kasai H, Hahn KM (2017) Engineering Pak1 allosteric switches. ACS Synthetic Biology. doi:10.1021/acssynbio.6b00359

〔学会発表〕(計2件)

柳下 祥, 脳機能の構成的理解に基づく統合失調症研究の可能性, 統合失調症学会、2016/3/26, ペイシア文化ホール, 群馬県前橋市

柳下 祥, モノアミン作用の機能的理解を起点とした基礎から臨床研究への発展の道筋、2016/9/8, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下 祥 (YAGISHITA, Sho)  
東京大学・大学院医学系研究科 助教  
研究者番号: 50721940

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

前田 義智 (MAEDA, Yoshitomo)  
東京大学・大学院医学系研究科 特任研究員

中里 亮介 (NAKAZATO, Ryosuke)  
東京大学・大学院医学系研究科 大学院生