

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16194

研究課題名（和文）ドーパミン放出の可塑的变化から明らかにする記憶想起の神経機構

研究課題名（英文）Neuronal mechanisms underlying memory retrieval regulated by plastic changes in dopamine release

研究代表者

長野 慎太郎（NAGANO, Shintaro）

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・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）：連合学習においてドーパミン（DA）は、条件刺激と条件反応の結びつきを強化する生理的役割を担うことが知られている。ショウジョウバエ（以下、ハエ）の連合学習でも、DAの必要性が行動実験で示されているが、その詳細は依然として不明な点が多い。本研究では、DA神経の活動とDA放出をハエの *in vivo* で調べ、また、行動実験も行った。その結果、記憶想起にDA放出が必要なこと、そして、記憶想起時に記憶中枢の特定領域にだけDAが放出されることを見出し、記憶形成によって生じるDA放出の可塑的变化が記憶想起に必要となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人の脳に存在するDA神経は非常に多く、また倫理的な問題も付随するため、その機能解析は困難を伴う。一方、ハエのDA神経は全体でも数百個と少なく、優れた遺伝学的手法は1細胞単位での解析を可能とする。この利点を活用し、本研究は、数個のDA神経によるDA放出が記憶想起を制御する因果関係を明らかにした学術的意義をもつ。パーキンソン病は人の中脳の黒質ドーパミン神経細胞が減少して起こる。病気が進行すると学習記憶をはじめとする認知機能にも影響を与えることが知られ、本研究で明らかにしたDA神経が記憶想起を制御するという基礎生物学的知見はパーキンソン病における認知機能研究に貢献する社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：In associative learning, dopamine (DA) is known to play a physiological role in reinforcing the association between a conditioned stimulus and a conditioned response. The necessity of DA in associative learning in fruit flies has been demonstrated through behavioral experiments. However, many details regarding this process still remain unclear. In this study, I investigated the activity and release of DA neurons *in vivo* in fruit flies and conducted behavioral experiments. As a result, I found that DA release is necessary for memory retrieval and that DA is specifically released in certain regions of the memory center during memory retrieval. These findings revealed that the plastic changes in DA release caused by memory formation are crucial for memory retrieval.

研究分野：神経科学

キーワード：dopamine memory recall Drosophila

1. 研究開始当初の背景

学習記憶研究のモデル生物であるショウジョウバエ(ハエ)でもドーパミン(DA)が連合学習に必要なことが知られている。ハエの匂い連合学習では、条件刺激 (Conditional Stimulus: CS) に匂い物質を、無条件刺激 (Unconditional Stimulus: US) に侵害刺激として電気ショックを用いる。通常、CS と US を対呈示して条件付けを行うと、記憶想起時、ハエは呈示された CS を忌避する条件反応 (Conditioned Response: CR) を示す。

キノコ体と呼ばれる匂い連合学習の記憶中枢は、複数の DA 神経の投射を受けている。これら DA 神経は US の呈示で活性化し、DA を放出することが神経生理学実験で明らかになっている(文献 2, 3)。そして、行動実験では、この DA が記憶形成に必要となること、以前より示唆されてきた(文献 1)

ところが最近の研究で、US のみならず、CS の呈示でも DA 神経は活性化し、キノコ体へ DA を放出することが示された(文献 3, 4)。しかし、CS、US の区別なく DA 神経が活性化し、記憶中枢へ DA を放出するなら、DA は CS と CR の結びつきをどの様に強化するのか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、条件付けによって生じる DA 放出の可塑的变化が記憶想起を制御し、CS と CR の結びつきを強めるという仮説を立てた。本研究は、記憶形成によって生じる DA 放出の可塑的变化、及び、記憶想起における DA の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

この研究目的を達成するために以下の実験を行った。

(1) 熱行動遺伝学的手法を用いて神経伝達物質の放出を各組織で抑制し、ハエの記憶想起を制御する DA 神経の同定を行った。

(2) 連合学習時、及び、記憶想起時の DA 神経の活動、DA 放出動態を生きたハエを顕微鏡下に固定し、匂い条件付けを行う *in vivo imaging* 法(図 1)や組織染色法を用いて検証・同定した。

4. 研究成果

研究代表者は研究期間内に以下の成果を見出した

(1) 嫌悪性匂い条件付けは忌避記憶と安全記憶という 2 種類の異なる記憶成分を同時に作り、忌避記憶の想起だけ記憶中枢の出力が必要となる。

(2) 忌避記憶の想起に関わる DA 神経を見出した。

(3) この DA 神経は、記憶想起時にだけ顕著な DA 放出を行う。

以下、詳細について記す。

(1) 行動熱遺伝学実験を行い、神経伝達物質の放出を各組織で抑制し、ハエの連合学習を制御する DA 神経の同定を行った。

ショウジョウバエ(ハエ)の匂い連合学習では、2 種類の匂いを使って条件付けを行う。このうち、1 種類の匂い(CS+)は電気ショックと連合する一方、もう 1 種類の匂い(CS-)は電気ショックを与えた後に与える。この時、電気ショックと連合した CS+ をハエは忌避するが(忌避記憶)、電気ショックの後に与えられた CS- を積極的に選択する(安全記憶)ことを見出した。この行動の可塑性には、記憶中枢の DA 受容体が発見されることを見出した。忌避記憶の形成は記憶中枢の DA 受容体が必要十分である一方、安全記憶の形成には、記憶中枢に加えて、記憶中枢外にある触覚葉の DA 受容体も必要であることを見出した。

ハエは哺乳類と異なり変温動物であり、環境温度依存的に神経伝達物質の放出を可逆的に抑制する熱遺伝学的手法が存在する(*shibire^{ts1}*, 文献 5)。この手法を用いて、記憶想起時に記憶中枢の出力を止めて学習スコアを調べたところ、忌避記憶の想起が阻害され、記憶中枢の出力が

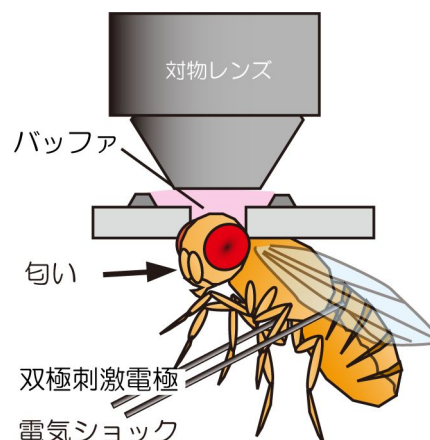


図 1 *in vivo imaging* の概要

必要であった一方、安全記憶の想起は正常で、記憶中枢の出力が不要であることを見出した(図2)。

これらの結果から、条件付けによって、同時に2種類の異なる記憶を形成され、よく知られた記憶中枢外にも記憶を保持する能力を持つことを明らかにした。この結果をまとめて、神経分野の国際専門誌に筆頭責任著者として論文を発表した。(文献6)

このことを踏まえ、その後の実験では、1種類の匂いと電気ショックだけを用いて条件付けを行い、忌避記憶だけを形成して解析を行なった。

(2) 忌避記憶が形成される記憶中枢へ投射するDA神経のうち、どのDA神経が忌避記憶に関与するのか、shibire^{ts1}を発現し、熱遺伝学的手法と行動実験を組み合わせ検証した。ハエの脳内には約200個のDA神経が存在する。ハエの遺伝学的手法(split-GAL4 system 文献7)は、近年、1細胞単位で遺伝子発現の制御を可能とする。この手法を用いて、DA神経からのDA放出を抑制しスクリーニングを行ったところ、記憶中枢に投射するたった2個のDA神経が忌避記憶の想起に必要なことを見出した(図3)

(3) (2)で見出したDA神経の活動やDA放出動態といった神経生理機能を主にDA放出の生体内イメージング法で解析した。

記憶中枢領域にDAプローブのGRAB-DA(文献3)を発現した遺伝子組換えバエを作製し、記憶想起時のDA放出動態を検証した。前述の2個のDA神経はCS+や電気ショック刺激に反応してDAを放出する。しかし、条件付けの前後でCS+によるDA放出量に顕著な違いは見られなかった。一方、GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP 文献8)を用いて、この2細胞からの神経伝達物質放出を調べると、条件付け前には、匂い刺激を与えてもGRASPシグナルは生じなかったが、条件付け後にはCS+依存的に記憶中枢領域でGRASPシグナルが生じることを見出した。この結果は、記憶想起時に顕著なDA放出が起こることを強く示唆し、DA放出に可塑的な変化が起こることを示す。

このDA神経が投射する記憶中枢領域では、出力神経が直下にある。カルシウムイメージングを用いてこの出力神経の神経活動を調べた。匂い刺激で出力神経の神経活動は上昇するが、条件付け後には、CS+に対する神経活動の上昇が顕著に増加し、可塑的な変化が起こることを見出した(図4)。この出力神経はDA神経からのDA放出を受け取っており、DA依存的な可塑的な変化が起こる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Aso Y, et al., Curr Biol. 2010 Aug 24;20(16):1445-51.
2. Cohn R, et al., Cell. 2015 Dec 17;163(7):1742-55.
3. Sun F, et al., Cell. 2018 Jul 12;174(2):481-496.
4. Hattori D, et al., Cell. 2017 May 18;169(5):956-969.
5. Kitamoto T. J Neurobiol. 2001 May;47(2):81-92.
6. Naganos S et al., Eur J Neurosci. 2022 Sep;56(5):4558-4571.
7. Luan H, et al., Front Neural Circuits. 2020 Nov 9;14:603397.
8. Feinberg EH, et al., Neuron. 2008 Feb 7;57(3):353-63.

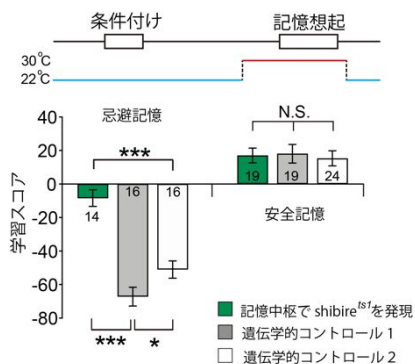


図2 記憶中枢の出力は忌避記憶の想起にだけ必要となる

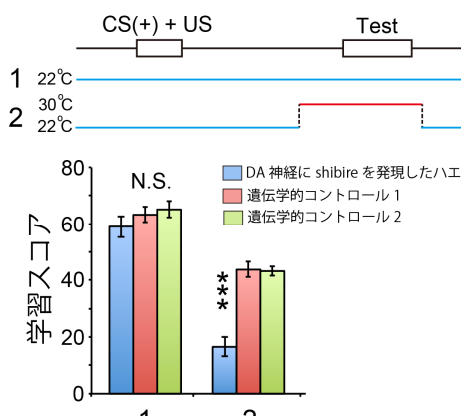


図3 記憶想起時にはDA放出が必要

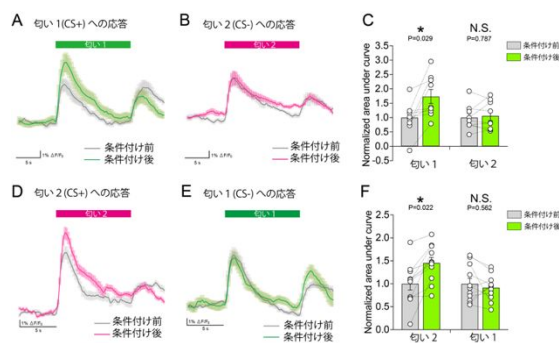


図4 出力神経の匂いに対する興奮性は条件付けで変化する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naganos Shintaro, Ueno Kohei, Horiuchi Junjiro, Saitoe Minoru	4. 巻 56
2. 論文標題 Dopamine activity in projection neurons regulates short lasting olfactory approach memory in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4558 ~ 4571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minoru Saitoe, Shintaro Naganos, Tomoyuki Miyashita, Motomi Matsuno, Kohei Ueno	4. 巻 178
2. 論文標題 A non-canonical on-demand dopaminergic transmission underlying olfactory aversive learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長野 慎太郎、齊藤 実
2. 発表標題 匂い記憶保持に必要な条件付後のドーパミン放出を制御する神経機構
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長野 慎太郎、齊藤 実
2. 発表標題 キノコ体出力神経の活性が記憶形成に必要なドーパミン放出を制御する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下 知之、菊池 絵美、長野 慎太郎、齊藤 実
2. 発表標題 NMDA受容体のMg ²⁺ blockは、匂い嫌悪条件付けで刺激の順序検出器として働く
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 耕平、長野 慎太郎、齊藤 実
2. 発表標題 匂い記憶形成における学習には連合刺激後のドーパミン放出が重要である
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野慎太郎
2. 発表標題 連合後ドーパミン放出による嫌悪性匂い連合学習の強化と想起
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野慎太郎
2. 発表標題 記憶強化と想起は異なるドーパミン神経が担う - ドーパミンプローブを用いた解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクト
<https://www.igakuken.or.jp/memory/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------