

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16265

研究課題名(和文) 経験が報酬刺激物質に対する嗜好性を変化させる機構の解明

研究課題名(英文) Experience-dependent preference for reward-stimulating substances

研究代表者

市之瀬 敏晴 (Ichinose, Toshiharu)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：20774748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエはアルコールをよく好み、アルコールの摂取量が日に日に増大することが知られている。本研究ではそのメカニズムの解明を試みた。脳内のD1ドーパミン受容体を可視化したところ、アルコールの繰り返し摂取によりD1ドーパミン受容体が増大することが判明した。また、D1ドーパミン受容体遺伝子の破壊によりアルコール摂取量の増大が阻害されること、人工的なD1ドーパミン受容体の量を増大により、通常のバエに比べて異常にアルコールを摂取するようになることが観察された。以上、アルコールの反復摂取によりD1ドーパミン受容体が増大し、経験依存的なアルコール摂取の増大を引き起こすメカニズムが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの哺乳類にとってアルコールは毒であるが、我々ヒトは例外的にアルコールが好きな種といえる。自然界においてアルコールは主に発酵した果実に存在し、人類の酒好きは果実食とともに進化したと言われている。遺伝学モデルとして有名なショウジョウバエは果実を主食とし、昆虫の中では例外的にアルコールをよく好む。ショウジョウバエのアルコール依存モデルにおけるドーパミンの役割を示した本研究により、アルコールを好む幅広い種で保存された共通メカニズムを探ることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Dysregulated motivation to consume alcohol leads to addictive behaviors that often result in serious health consequences. The fruit fly *Drosophila melanogaster* offers a unique opportunity to approach this problem with a battery of sophisticated neurogenetic tools available, but how they consume these drugs remains largely unknown. Here, we examined alcohol self-administration behavior of *Drosophila* and the underlying neuronal mechanisms. Long-term escalation of ethanol preference required the dopamine receptor Dop1R1 in the mushroom body. The protein level of Dop1R1 increased after repeated intake of ethanol, which correlates with the acquired preference. Genetic overexpression of Dop1R1 enhanced ethanol preference. These results reveal the role of dopamine signaling and its plastic changes in controlling voluntary intake of drugs.

研究分野：神経行動学

キーワード：アルコール依存 遺伝学 ドーパミン D1受容体 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトは、哺乳類の中では際立って飲酒を好む動物種である。一方で、多くの哺乳類にとってエタノールは毒であり、好んでエタノールを摂取する種は多くない。ヒトの酒好きは、果実食と共に進化したと言われている。自然界に存在するエタノールの多くは発酵した果実由来であり、特に熟したヤシの実には **10%** 近いエタノールが含まれる。果実を好んで食すゴリラ、チンパンジー、ボノボ、ヒトの四種はエタノール分解能が高く、自発的にエタノールを飲む<sup>1</sup>。飲酒のメカニズムを探るためには、同様の進化的バックグラウンドをもつモデル生物を使うことが有効と考えられる。

遺伝学のモデルとして有名なキロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は英語で **Fruit fly** と呼ばれ、果実を主食として繁殖する。また、「ショウジョウ」は古典書物に登場する酒好きの架空の動物である猩猩(しょうじょう)に由来し、このバエが酒に誘引される様子から名付けられたと考えられる。実際、キロショウジョウバエは近縁種の中で際立って強いエタノール分解能を示す<sup>2</sup>。ショウジョウバエにエタノールを与えると一時的に活動レベルが上がり、その後、気絶する様子は、まるで飲み会の騒ぎのようである<sup>3</sup>。また、このバエにエタノールを繰り返し与えると、少々のエタノールでは気絶しなくなる「耐性」の獲得が起こる<sup>4</sup>。さらに、ショウジョウバエもその小さな脳で記憶学習を行うが、エタノールを含む培地で数日間飼育されたバエは、エタノール無しでは正常な学習ができなくなる「離脱症状」を示す<sup>5</sup>。興味深いことに、ショウジョウバエにエタノールが含まれる餌を与えると、エタノール消費量が日を追うごとに増加する<sup>6</sup>。これはアルコール依存症の動物モデルとしてはうってつけである。

## 2. 研究の目的

本研究では遺伝子操作をしたショウジョウバエのエタノール消費量を継続的に測定することにより、飲酒量が増大する神経メカニズムの一端を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエは体長約 **2** ミリの比較的小さな昆虫であり、一日に摂取する餌の量は **1** マイクロリットル程度である。この微量な摂餌量を正確に測定するため、**CAFE** (**Capillary Feeding**) アッセイと呼ばれる手法を採用した<sup>7</sup>。CAFE アッセイでは、食紅などの色素を含んだ液体餌を細いガラス管に通し、自由行動下のショウジョウバエの摂餌による液面低下を測定する(図1)。CAFE アッセイにより、ナノリットル単位での摂餌量の測定が可能となった。ショウジョウバエに **15%** のエタノールを含む餌とエタノールを含まない餌を提示したところ、ショウジョウバエはエタノールを含む餌をより好み、その消費量は日を追って増大した。ショウジョウバエの一日あたりのエタノールの摂取量は約 **100** ナノリットルであった(体重 **60kg** の人に換算すると、日本酒約 **40** リットル分となる)。また、覚醒剤など、他の依存性薬物もショウジョウバエは好んで摂取することが明らかになった<sup>8</sup>。

## 4. 研究成果

ハエの飲酒の神経メカニズムを探るため、様々な神経伝達物質の受容体の変異体をテストした。すると、ドーパミンの **D1** 型受容体の変異体ではエタノール摂取の増加が観察されないことが判明した。つまり、飲酒量の増加には **D1** 受容体の働きが必須であるということである。そこで、ドーパミン **D1** 受容体の脳内分布が飲酒の前後で変化しているのではないかと仮説を立てた。ドーパミン **D1** 受容体を脳内で可視化するため、ゲノム編集技術を用いて内在性の **D1** 受容体に蛍光タンパク質である **GFP** をタグした系統を作製した。エタノールを三日間自由に飲んだショウジョウバエと、与えられなかったショウジョウバエの脳を比較したところ、三日間のエタノール摂取によってドーパミン **D1** 受容体の量がキノコ体という領域で異常に増えることが観察された（図2）。それでは、ドーパミン **D1** 受容体を人工的に増加させると、飲酒量も増大するのであろうか？ 遺伝子操作を用いてドーパミン **D1** 受容体を過剰発現させたところ、通常のショウジョウバエに比べてエタノール摂取量が有意に増大した。以上の観察から、エタノールの繰り返し摂取によるドーパミン **D1** 受容体の増大が、経験依存的なエタノール摂取の増大を引き起こす因果関係が明らかになった<sup>8</sup>。

ドーパミンは、脳内で報酬シグナルを伝える物質として有名である。ショウジョウバエでもこれは同様で、特定のドーパミン神経細胞からキノコ体に放出されるドーパミンが砂糖による報酬記憶を形成する<sup>9</sup>。今回、三日間の飲酒によって、ドーパミン **D1** 受容体はまさにこのキノコ体で増大していた<sup>8</sup>。また、砂糖報酬を伝達するドーパミン神経細胞を阻害することで、飲酒量の増大も阻害されていた<sup>8</sup>。このことは、エタノールが脳の報酬回路を乗っ取る「ハイジャック説」とよく一致する。キノコ体の構造と機能は、近年一細胞レベルで解明されつつあり<sup>10</sup>、今後さらに詳細な理解が得られると期待される。また、エタノールをあまり好まない他の近縁種では、キイロショウジョウバエと比べてエタノールによるドーパミン報酬回路の活性化が弱いことが予想される。実際にそうであるのか、そうであるならば、どのように報酬回路の性質が進化してきたのか、今後の研究課題として挙げられる。

今回の研究の新規性は、報酬を受け取る受容体の量が飲酒によって増大し、これが飲酒量の増大を引き起こすことを証明した点である。これを基盤として、今後は継続的な飲酒がどのようなメカニズムで受容体量を変化させたのか、遺伝子発現やタンパク質分解といった視点から解明していく予定である。ヒトのアルコール依存症患者でも、健常者と比べてドーパミン受容体の脳内分布が変化していることが知られており、種を超えた神経メカニズムの保存が示唆される。現在、アルコール依存症の治療はカウンセリングや自助会など、行動療法が中心である。断続的な飲酒による脳の性質変化とそのメカニズムを分子のレベルで明らかにすることで、効果的な治療薬の開発につながることを期待される。

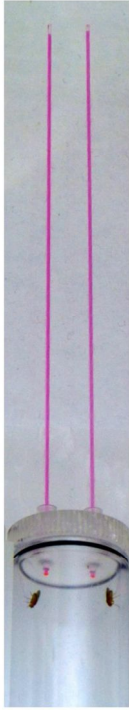


図1. CAFEアッセイによる摂食量の測定

通常餌（左のガラス管）とエタノールを含む餌（右のガラス管）をハエが自由に飲むことができる。飲んだ量を液面低下として測定する。

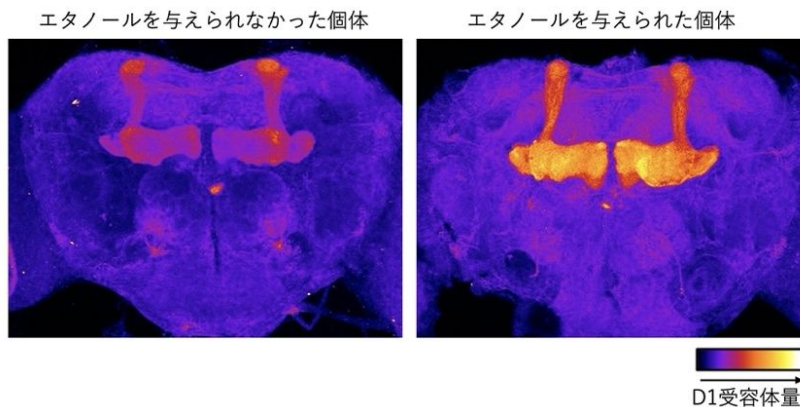


図2. ドーパミンD1受容体の飲酒による変化

ゲノム編集技術を使って内在性のD1受容体に緑色蛍光タンパク質（GFP）をタグし、脳内で可視化した。三日間エタノールを自由に摂取した個体ではD1受容体が有意に増加することが確かめられた。

#### 参考文献

1. Carrigan MA et al., Hominids adapted to metabolize ethanol long before human-directed fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jan 13;112(2):458-63.
2. Merçot H et al., Alcohol tolerance, adh activity, and ecological niche of *Drosophila* species. *Evolution.* 1994 Jun;48(3):746-757.

- 3. Moore MS et al., Ethanol intoxication in Drosophila: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. Cell. 1998 Jun 12;93(6):997-1007.**
- 4. Scholz H et al., Functional ethanol tolerance in Drosophila. Neuron. 2000 Oct;28(1):261-71.**
- 5. Robinson BG et al., Neural adaptation leads to cognitive ethanol dependence. Curr Biol. 2012 Dec 18;22(24):2338-41.**
- 6. Devineni AV et al., Preferential ethanol consumption in Drosophila models features of addiction. Curr Biol. 2009 Dec 29;19(24):2126-32.**
- 7. Ja WW et al., Prandiology of Drosophila and the CAFE assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 15;104(20):8253-6.**
- 8. Kanno M,, Ichinose T. Voluntary intake of psychoactive substances is regulated by the dopamine receptor Dop1R1 in Drosophila. Sci Rep. 2021 Feb 9;11(1):3432.**
- 9. Liu C et al., A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in Drosophila. Nature. 2012 Aug 23;488(7412):512-6.**
- 10. Ichinose T et al., Mushroom body output differentiates memory processes and distinct memory-guided behaviors. Curr Biol. 2021 Mar 22;31(6):1294-1302.e4.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanno Mai, Hiramatsu Shun, Kondo Shu, Tanimoto Hiromu, Ichinose Toshiharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Voluntary intake of psychoactive substances is regulated by the dopamine receptor Dop1R1 in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3432-3440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82813-0	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 Ichinose Toshiharu, Kanno Mai, Wu Hongyang, Yamagata Nobuhiro, Sun Huan, Abe Ayako, Tanimoto Hiromu	4. 巻 31
2. 論文標題 Mushroom body output differentiates memory processes and distinct memory-guided behaviors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.12.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sun Huan, Nishioka Tomoki, Hiramatsu Shun, Kondo Shu, Amano Mutsuki, Kaibuchi Kozo, Ichinose Toshiharu, Tanimoto Hiromu	4. 巻 40
2. 論文標題 Dopamine Receptor Dop1R2 Stabilizes Appetitive Olfactory Memory through the Raf/MAPK Pathway in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2935 ~ 2942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1572-19.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshiharu Ichinose
2. 発表標題 Decoding distinct memories in the mushroom body of the fly brain
3. 学会等名 Neurobiology of <i>Drosophila</i> , Cold Spring Harbor Laboratory, USA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiharu Ichinose
2. 発表標題 Chronic poor condition enhances preference for rewarding substances through dopamine system
3. 学会等名 The 42th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市之瀬敏晴
2. 発表標題 多様な記憶の形成・固定化・読み出しメカニズム
3. 学会等名 生理学研究所研究会2021 記憶・学習の多角的理解に向けたアプローチ (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------