

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20673

研究課題名（和文）Investigating the role of individual dopaminergic reward neurons for locomotion

研究課題名（英文）Investigating the role of individual dopaminergic reward neurons for locomotion

研究代表者

Schleyer Michael (SCHLEYER, Michael)

北海道大学・高等教育推進機構・助教

研究者番号：30960827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、キイロショウジョウバエの幼虫において、同一のドーパミン作動性ニューロンが「学習時の報酬、嫌悪情報の伝達」「運動の制御」の両方の機能を担っていることを明らかにした。具体的には、報酬系ドーパミンニューロンは体の屈曲を減らしてスピードを増加させ、反対に罰系ドーパミンニューロンは屈曲を増加させスピードを減少させる機能を持つことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやその他の動物において、ドーパミン作動性ニューロンは報酬の伝達と運動の制御の2つの役割を担っていることが知られている。しかし一般的には、これら2つの機能はそれぞれ異なるドーパミン作動性ニューロン群が関与していると考えられてきた。

本研究は、ショウジョウバエの幼虫においては、同一のニューロンが両方の機能を担うことを明らかにした。ドーパミン系はヒトを含めあらゆる動物でよく似た機構を共有していることから、本研究が将来的にはヒトの脳を理解するための足掛かりとなることが期待される。ドーパミン系は、パーキンソン病や依存症などの解明のための鍵となるシステムである。

研究成果の概要（英文）：Across the animal kingdom, dopamine neurons are well known for signalling reward during associative learning, and for modulating movement. In this project, we studied the role of individual dopamine neurons for modulating locomotion in the larva of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. In particular, we were investigating whether the very same dopamine neurons are responsible for signalling reward and for modulating locomotion. Indeed, we found that a group of dopamine neurons known for their reward-signalling function decreased bending and increased velocity in larvae. In contrast, dopamine neurons signalling punishments increased bending and decreased velocity. By feeding a dopamine-synthesis inhibitor we confirmed that these effects are indeed dependent on dopamine signalling.

研究分野：Neuroscience

キーワード：Locomotion Dopamine Drosophila

## 1. 研究開始当初の背景

ドーパミンは、睡眠や意思決定など、脳内において様々な機能を担っている。動物界全体に及び2つのもっとも重要な役割は、連合学習において「教師」(報酬や罰)信号を伝達することと、運動や運動の開始を制御することだろう [1-3]。この2つの機能は、ヒトやその他哺乳類において古くから知られており、その破綻はパーキンソン病や依存症といった深刻な結果をもたらすことがわかっている [4-6]。この分野はここ数十年の間に大きな進歩があったが、それでも個々のニューロンの役割に関する詳細な理解はまだ不十分であり、それは哺乳類の脳の圧倒的な複雑さを考えれば、驚くにはあたらない。したがって、これらの疑問に関する研究を、より単純なモデル動物で補完することは理にかなっていると言えよう。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の幼虫のように単純な動物でさえ、ドーパミン系は学習と運動の両方に関与している。ショウジョウバエ幼虫の脳は約 10,000 という少ないニューロンで構成され、またすべての化学シナプスを網羅した EM ベースのコネクトームが完成しており、さらに豊富な遺伝学的ツールが使えることから、幼虫を使って個々のドーパミンニューロンの学習における役割を詳細に解析する研究が盛んに行われている(図1) [7-12]。一方で、

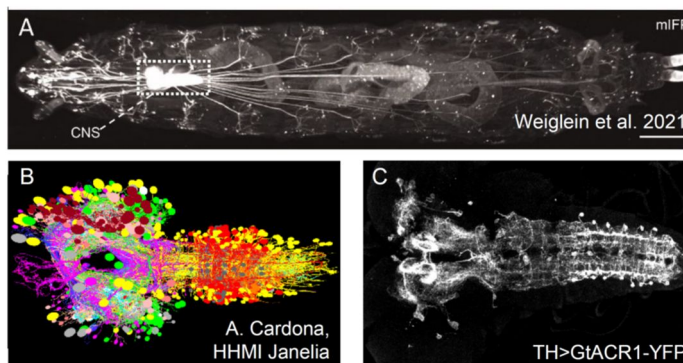


図1 ショウジョウバエ幼虫の神経系。(A)透明化した3歳幼虫の全神経系。点線枠内:中枢神経系(CNS)。 (B)幼虫のCNSのEMベースの再構成。(C)中枢神経系のほとんどのドーパミンニューロンを網羅するTH-Gal4株の発現パターン。

ショウジョウバエの幼虫の運動に対するドーパミンの役割については、ごくわずかしが知られていない。そこでこのギャップを埋めたいと考えた。

哺乳類では一般的に、学習と運動の制御は、それぞれ中辺縁系と黒質系の経路をたどり、異なるドーパミン作動性ニューロンの集団によってもたらされると考えられている。しかし、黒質の“運動経路”も、教師信号を伝達する役割を担っているという証拠が近年次々と示されてきている [13]。ショウジョウバエでは、学習における役割で知られるドーパミンニューロンが運動も制御している可能性が、最近の2つの研究で示唆されているが、その詳細や神経回路はまだ解明されていない [14-15]。

従って、本研究課題のポイントは、同一のドーパミン作動性ニューロンが、教師信号の伝達と運動の調節の両方を担っているかどうか、という点であった。

## 2. 研究の目的

私のこれまでの研究から、個々のドーパミン作動性ニューロンが、様々な異なる機能を果たしていることがわかってきた。そこで私は、ショウジョウバエの利点である遺伝学的ツールを使うことにより、複雑な哺乳類の脳ではほとんど不可能な、個々のドーパミン作動性ニューロンの機能を明らかにする実験を計画した。より具体的には、ドーパミンの最も顕著な2つの機能である「教師信号を伝えること」と「運動を制御すること」が、少なくとも部分的には、単一のニューロンによって果たされているのかを調べることにした。

過去に、私は個々の幼虫の行動を高解像度で解析するソフトウェアを開発している [16-17]。最新のバージョンでは、グループ内の複数の個体の同一性を保持したまま行動解析することが可能になっており、さらに機械学習を用いて詳細に解析することができる [18]。少ない実験労力で長期間にわたって複数の個体の詳細な行動を追跡することができ、個体群内の個体差だけでなく個体群間のわずかな表現型の違いも特定できるため、運動を解析する上で非常に強力な

ツールである。最近、私はこのソフトウェアと、光遺伝学的を用いて特定のニューロンを活性化する方法を組み合わせ、ドーパミン作動性ニューロン群の活性化により幼虫が前進運動を止め、強い屈曲を見せることを発見した。この手法が確立できたことにより、ドーパミン作動性ニューロンが運動に及ぼす複雑な行動学的効果に簡単にアプローチできるようになったと言える。単一ニューロンを操作するための利用可能な遺伝学的ツールと相まって、様々なドーパミン作動性ニューロン、様々なドーパミン受容体が運動にどのような影響を及ぼすかを正確に調べることが可能になった。動物界全体におけるドーパミン系の類似性の高さを考えると、本研究は、まずは単純な動物におけるドーパミン、学習、運動量の特異的な関連を理解することにより、今後この知識をより複雑な動物に応用するためのステップとなるはずである。

### 3. 研究の方法

本研究では、ドーパミン作動性ニューロンの光遺伝学的操作と、ショウジョウバエ幼虫の自由行動の高解像度解析を組み合わせた。具体的には、寒天を敷いたシャーレの上で、約8匹の幼虫のグループをビデオ録画した。幼虫が自由に表面を這っている間に、光源を下から30秒間当てることにより(図2)ドーパミン作動性ニューロンを活性化させた(下記参照)。個々の幼虫の行動をビデオ解析ソフトウェア[18]で解析し、光だけを照射してニューロンを活性化しなかったコントロールと比較して、ニューロンの活性化によって個々の幼虫の行動がどのように変化したかに注目した。

まず、観察された効果の神経回路基盤を調べた(図2)。私は、記憶学習の中核であるキノコ体に投射するドーパミン作動性ニューロンに注目した。そのうち2つは報酬シグナルを、3つは罰シグナルを伝達することがわかっており、残りの3つの機能はまだわかっていない[10,12]。それぞれの場合において、私はそれぞれのドーパミン作動性ニューロンを強力に改変されたチャンネルロドプシン(ChR2-XXL)で活性化した。学習に対する既知の機能と比較することで、それぞれのドーパミン作動性ニューロンが学習と運動に対してどのような影響を及ぼすのかマッピングした。

次に、ドーパミンシグナル伝達の分子基盤に注目した。本研究で活性化したニューロンがドーパミン作動性であることはわかっていたが、幼虫のドーパミン作動性ニューロンにはその他の神経伝達物質も放出するものがあることが知られている[9]。そこで、観察された効果が本当にドーパミン依存であるか確認することとした。この目的を達成するために、ドーパミン合成を阻害する2つのアプローチを用いた。特定の神経細胞において、RNA干渉によってチラミン水酸化酵素(TH)の発現をノックダウンするか、もしくはTH阻害剤3IYを摂食させる手法である[19]

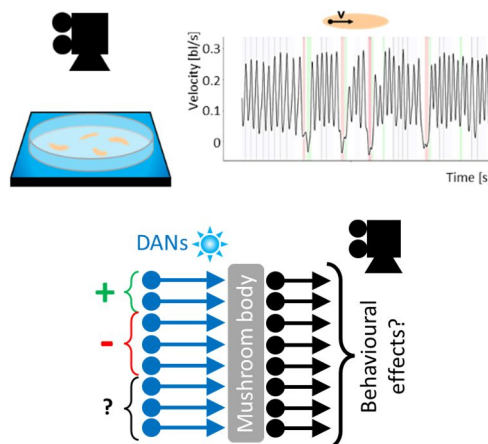


図2 上：ドーパミンニューロンを光遺伝学的に活性化すると共に、個々の幼虫個体を追跡し、90以上の行動属性(一例を右に示す)を解析できる。下：個々のドーパミンニューロン(DAN)を光遺伝学的に活性化し(星印)行動効果を詳細に評価する。これらは、報酬(+)または罰(-)のシグナル伝達における各DANの既知の役割と関連づけられる。

### 4. 研究成果

本研究での最初の成果は、「Individual maggot behavioural analyser (IMBA)」と名付けた追跡・分析ソフトウェアの完成だった。グループ内の個々の幼虫の行動を詳細に解析できるこのソフトウェアは、2023年にOpen Biology誌に科学論文とともに発表した[18]。この論文では、TH-Gal4系統でラベルされるドーパミン作動性ニューロン群を活性化すると、幼虫の体の屈曲が増加し、速度が低下するという、私たちの最初の観察結果を発表した(図3)。

次のステップとして、キノコ体に投射し、連合学習において報酬や罰の情報を伝達する役割を果たすことで知られるドーパミン作動性ニューロンをカバーする、より特異的な Gal4 系統を使用した。その結果、3つの罰信号ニューロンのうち2つが、TH-Gal4系統のニューロンと同様の運動効果を引き起こすことがわかった。一方、報酬信号を発するドーパミン作動性ニューロンを活性化すると、幼虫が屈伸を減らし速度を上げるという、正反対の行動が誘発された。つまり、学習において正反対の効果(それぞれ罰と報酬を知らせる)を持つニューロン群を活性化すると、運動制御においても正反対の効果が見られたのである。

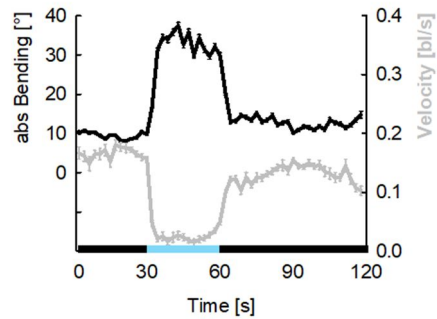


図3 大部分のドーパミン作動性ニューロンを30秒間活性化した場合の行動学的効果。幼虫は前進運動を止め(灰色)強く屈曲する(黒色)[19]。

最後に、上述した2つの方法を用いて、観察された効果が本当にドーパミン依存적であるかどうかを調べた。RNA干渉を用いると、幼虫の行動のベースラインに違いが生じたため結果の解釈が困難であった。これは発達の影響による可能性が考えられる。しかし、TH阻害剤31Yを実験の直前に与えることで、その効果が実際にドーパミン依存적であることが明らかになった。

現在この成果は、学習におけるドーパミンニューロンの役割に関する新たな発見として論文発表予定(Toshima et al. in prep.)である。

今後は、中枢系において単一のドーパミン作動性ニューロンが、学習における報酬と罰のシグナル伝達から生得的な運動の制御まで、どのような神経メカニズムでそのように多様な機能を発揮するのか明らかにすることを目指している。

**References:** [1] Schultz W. 2015. *Physiol Rev* 95: 853-951. [2] Ryczko D & Dubuc R. 2017. *Front Neurosci* 11: 295. [3] Perez-Fernandez J et al. 2021. *Int J Mol Sci* 22: 11284. [4] Meder D et al. 2019. *NeuroImage* 190: 79-93. [5] Klein MO et al. 2019. *Cell Mol Neurobiol* 39: 31-59. [6] Latif S et al. 2021. *Clin Chim Acta* 522: 114-126. [7] Schroll C et al. 2006. *Curr Biol* 16: 1741-1747. [8] Rohwedder A et al. 2016. *Curr Biol* 26: 661-669. [9] Eichler K et al. 2017. *Nature* 548: 175-182. [10] Saumweber T et al. 2018. *Nat Commun* 9: 1104. [11] Schleyer M et al. 2020. *J Neurosci* 40: 5990-6006. [12] Eschbach C et al. 2020. *Nat Neurosci* 23: 544-555. [13] Wise RA 2009. *Trends Neurosci* 32: 517-524. [14] Silva B et al. 2020. *PLoS one* 15: e0229671. [15] Zolin A et al. 2021. *Nat Neurosci* 24: 1555-1566. [16] Paisios E et al. 2017. *Learn Mem* 24: 191-198. [17] Thane M et al. 2019. *PLoS one* 14: e0224154. [18] Thane M et al. 2023. *Open Biol* 13: 220308. [19] Thoener J et al. 2022. *J Exp Biol* 255: jeb244565.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Michael Thane, Emmanouil Paisios, Torsten Stoeter, Anna-Rosa Krueger, Sebastian Glaess, Anne-Kristin Dahse, Nicole Scholz, Bertram Gerber, Dirk J. Lehmann, Michael Schleyer	4. 巻 13
2. 論文標題 High-resolution analysis of individual <i>D. melanogaster</i> larvae uncovers individual variability in the neurogenetic modulation of locomotion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.220308	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Michael Schleyer
2. 発表標題 How dopamine neurons direct the search for food and safety in <i>Drosophila</i> larvae
3. 学会等名 15th Japan <i>Drosophila</i> Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michael Schleyer
2. 発表標題 ショウジョウバエ幼虫の運動とその個体間バリエーションの高精度解析
3. 学会等名 94th Congress of the Zoological Society of Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Michael Schleyer
2. 発表標題 Modulation of locomotion and learned olfactory behaviour through dopaminergic neurons
3. 学会等名 18th European Symposium on Insect Taste and Olfaction (ESITO), Italy
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Michael Schleyer
2. 発表標題 Modulation of learning and locomotion through dopaminergic neurons
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Github repository of our new tracking software  <a href="https://github.com/mthane/IMBA/">https://github.com/mthane/IMBA/</a>  Page to describe our new tracking software  <a href="https://www.schleyerlab.com/individual-maggot-behaviour-analysis">https://www.schleyerlab.com/individual-maggot-behaviour-analysis</a></p>
---

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