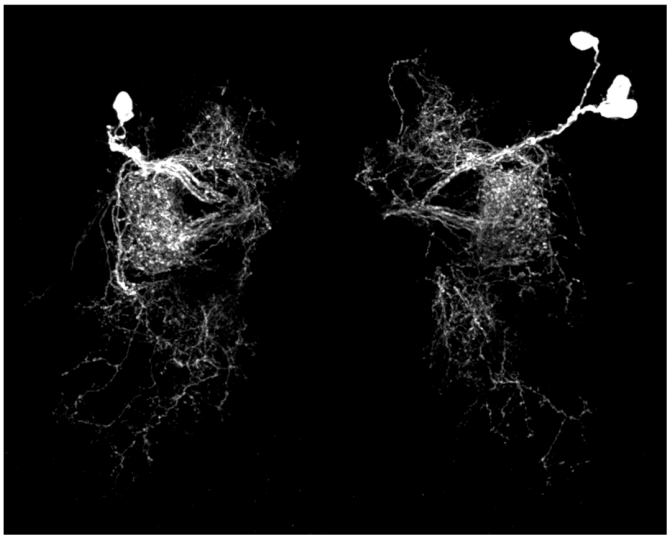
51　適正な「価値判断」を制御する神経回路	谷本　拓

【目的】物事の価値を的確に評価し判断することは、将来の行動を決定するのに重要な脳機能であり、その破綻は現実離れした「楽観・悲観主義」に繋がる。食欲や睡眠欲など、さまざまな欲求が満たされるとき、私たちヒトを含むさまざまな動物種の脳内では、ドーパミンと呼ばれる神経伝達物質が細胞外に放出される。すなわち、特定の脳部位でのドーパミン量の増加が脳内の報酬を伝達する。ドーパミン神経の活動を調節する回路メカニズムを同定することは、報酬量の適切な制御メカニズムを明らかにする上で重要である。

【方法】GAL4 /UAS システムを用いて、報酬情報を伝達する PAM クラスターと呼ばれるドーパミン神経細胞群に存在する標的細胞を人工的に活性化・不活性化することで、匂い学習での影響を測定した。また、その細胞種にカルシウムセンサーを発現し、神経活動のライブイメージングを行った。

【結果】本研究では、刺激の無い状態でも自発的に活動しているドーパミン神経を同定し、その活動の一過的な減少が報酬シグナルとなることを突き止めた。さらにこの神経細胞の活動が、ハエの空腹が満たされた時や「満腹感」に関係するホルモンによって、一過的に抑制されることを見出した。本成果は、報酬伝達におけるドーパミンの役割の多様性と、ドーパミン神経の「定常状態」の機能的意義を明らかとし、価値判断を制御する細胞生物学的機構の一端に貢献した。

自発活動の抑制によりドーパミンの定常放出が減少し報酬を伝達する神経細胞



51. 適正な「価値判断」を制御する神経回路

谷本　拓

東北大学 大学院生命科学研究科

Key words：神経科学，ショウジョウバエ，遺伝学，連合学習，報酬系

緒　言

物事の価値を的確に評価し判断することは、将来の行動を決定するために重要な脳機能であり、その破綻は現実離れした「楽観・悲観主義」に繋がる。食欲や睡眠欲など、さまざまな欲求が満たされるとき、私たちヒトを含むさまざまな動物種の脳内では、ドーパミンと呼ばれる神経伝達物質が細胞外に放出される。すなわち、特定の脳部位でのドーパミン量の増加が脳内の報酬を伝達する。ドーパミン神経の活動を調節する回路メカニズムを同定することは、報酬量の適切な制御メカニズムを明らかにする上で重要である。

ドーパミンの報酬伝達における機能はショウジョウバエの脳でも類似している。しかし、10 万を超える細胞をもつショウジョウバエの脳の中でドーパミンを産生する細胞は約 300 個と少数であり、単一ドーパミン細胞の神経投射と機能は多様である。これまで我々のグループは、ショウジョウバエ脳において報酬を伝達する特定のドーパミン作動性神経を発見し、その機能を解析してきた［1〜4］。また、PAM クラスターと呼ばれる一群のドーパミン神経が報酬を伝達することを明らかにしてきた［4］。PAM クラスターには約 100 個の細胞が存在し、その機能には多様性があるため［2］、報酬量の適切な制御メカニズムを明らかにするためには、単一細胞種レベルの機能解析と活性制御機構を理解することが必須である。

我々は今回、刺激の無い状態でも自発的に活動しているドーパミン神経を同定し、その活動の一過的な減少が報酬シグナルとなることを突き止めた。さらにこの神経細胞の活動が、ハエの空腹が満たされた時や「満腹感」に関係するホルモンによって、一過的に抑制されることを見出した。本成果は、報酬伝達におけるドーパミンの役割の多様性と、ドーパミン神経の「定常状態」の機能的意義を明らかとし、価値判断を制御する細胞生物学的機構の一端に貢献した。

方法および結果

1. ドーパミン作動性 PAM-γ3 神経の抑制は報酬情報を伝達する

我々が行っているショウジョウバエの報酬学習では、匂いと砂糖を同時に提示することでその匂いの価値を正に修飾し、訓練した匂いに対する誘引性を変化させることができる。また、砂糖報酬の代わりに電気ショックを用いて罰学習を行うことが可能であり、同じ装置を使って正・負の相反する価値情報を伝達する神経回路を解析するうえで優れたモデルである。

ショウジョウバエでは様々な遺伝学的技術が応用可能であるが、とりわけ本研究では酵母の転写因子 GAL4 とその結合配列である UAS を持つハエを組み合わせることによる、標的遺伝子発現システムを多用した。例えば、UAS の下流に温度感受性陽イオンチャネル（dTrpA1）を導入し任意の GAL4 系統と交配することで、次の世代の個体の GAL4 発現神経を温度依存的に活性化させることができる。またダイナミン GTPase の温度感受性優性変異体（Shibire^{ts1}）を発現させることで、シナプス小胞のリサイクルを温度依存的（32℃程度で抑制）に一過的に抑制することができる。

PAM クラスターに存在する神経細胞の機能の多様性を解析するために、様々なドーパミン細胞種に特異的に dTrpA1・Shibire^{ts1} を発現させ、匂い学習における標的細胞の人工活性化・不活性化の影響を測定した。PAM クラスター全体を活性化したときとは異なり、活性化によって罰記憶を、また不活化によって報酬記憶を誘導するような特異的な細胞種（PAM-γ3）が存在することを見出した（図 1A）。

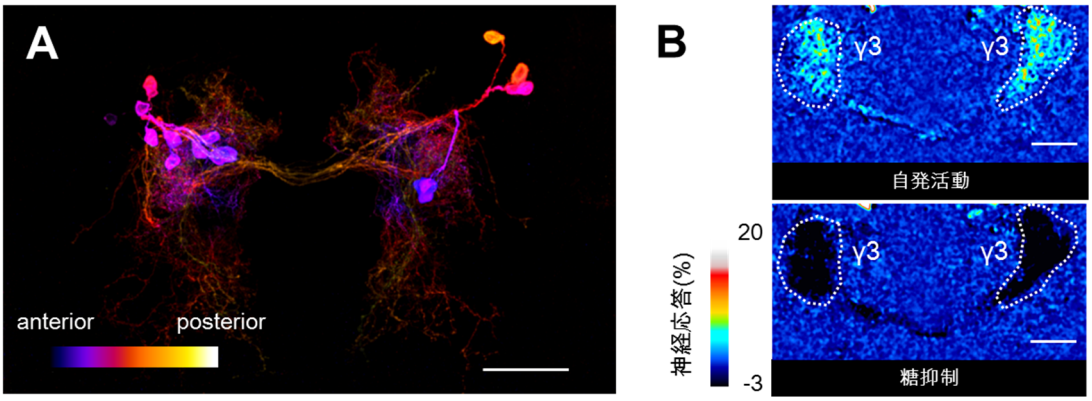


図 1. ドーパミン作動性 PAM-γ3 神経は糖報酬により自発活動が抑制される
(A) PAM-γ3 神経の形態と (B) 糖報酬によるその自発活動の抑制。スケールバーは 20μm。

2. PAM-γ3 神経は糖報酬により自発活動が抑制される

我々は以前 PAM クラスター細胞が砂糖水の摂取により大きく活性化することを見出している［4］。今回同定した PAM-γ3 は活動抑制により報酬を伝達するため、報酬の入力に対して神経活動が抑制されるのではないかという予測をたてた。そこで PAM-γ3 に特異的な GAL4 ドライバー系統を用いて、カルシウムセンサーGCaMP を発現させ神経活動のライブイメージングを行ったところ、刺激の無い状態でもカルシウムレベルが上下していることを見出した。さらに砂糖水の摂取によって、その活動は一過的に抑制されることを明らかにした（図 1B）。

3. 摂食抑制ペプチド AstA が PAM-γ3 の活動を負に制御する

これまで様々な動物種において、神経ペプチドがドーパミンシグナルを修飾することで学習や摂食行動を制御していることが明らかにされてきた。そこで砂糖報酬の摂取に応答し、PAM-γ3 に抑制的に作用する神経ペプチドを探索することを試みた。我々はこれまでに、神経ペプチドを発現する細胞を遺伝学的に標識する 44 の GAL4 ドライバー系統の脳での発現を共焦点レーザー顕微鏡で可視化した［2］。本研究では、この中で PAM-γ3 の樹状突起部分に神経線維を持つペプチドを探索した。

神経群の分布や形態学的な特徴を比較するためには、異なる 3 次元顕微鏡画像を同座標系で比較することが必要である。そこでサンプル間の「個体差」をコンピューター上で補正し、標準脳にサンプル画像を重ね合わせる「レジストレーション」を用いた［5］。上記の網羅的な神経ペプチド系統をスクリーニングしたところ、PAM 細胞群の樹状突起に投射する報酬修飾因子の候補を数個同定した。我々はその中でも AstA というペプチドに注目した。AstA は満腹時に機能する神経ペプチドで、摂食を抑制する働きが報告されている［6］。

実際に *AstA* 遺伝子の発現細胞を dTrpA1 を用いて匂い提示時に活性化すると、砂糖なしで報酬記憶の形成を誘導できることを見出した。さらに生化学の知見より AstA の受容体は抑制性の G タンパク Gi と共役していることが知られているため、砂糖の摂食により放出された AstA が、PAM-γ3 の自発活動を抑制した結果が報酬シグナルとして働いていることを示唆している。

神経ペプチド AstA の報酬価値の修飾を証明するためには、AstA 受容体が PAM-γ3 に発現し、砂糖の摂取依存的に PAM-γ3 の自発活動を抑制することを示すことが必要である。そこで我々は、CRISPR/Cas9 法を用い AstA 受容体をコードする *DAR-1* 遺伝子に GAL4 レポーターを挿入し、その発現を可視化した。すると、予想通り PAM-γ3 に強く発現していることが確認された（図 2）。そこで、細胞種特異的な RNAi 法を用い PAM-γ3 特異的に *DAR-1* 遺伝子の発現を抑制した。我々は、このハエの PAM-γ3 では自発活動が観察されるものの、砂糖摂取によるカルシウムレベルの低下が見られなくなったことを確認した（図 2）。さらに、PAM-γ3 での *DAR-1* の発現を抑制したハエは正常な報酬記憶を形成することができないことを見出したため、AstA は砂糖報酬の摂取に応答して PAM-γ3 の自発活動を抑制することが明らかになった［7］。

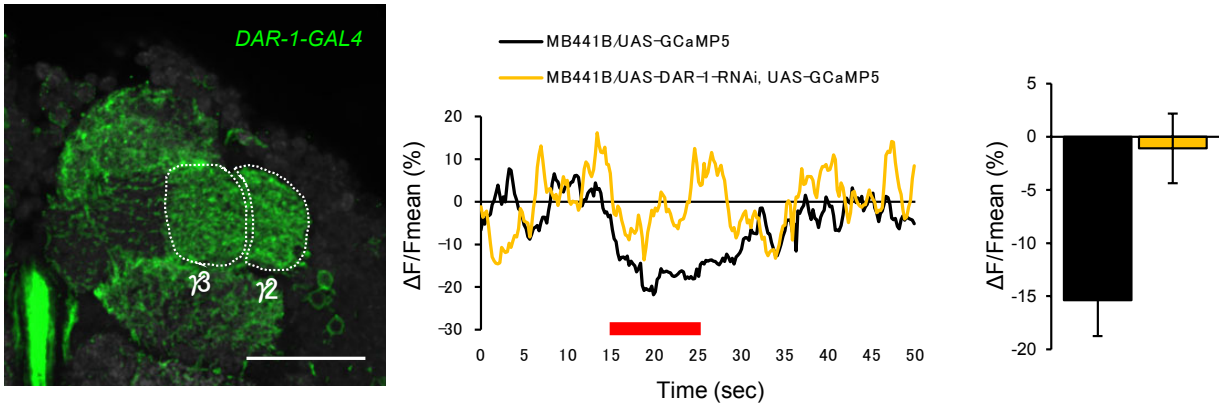


図 2. 満腹を表現する神経ペプチド AstA は PAM-γ3 の自発活動を抑制する

AstA 受容体をコードする *DAR-1* 遺伝子に GAL4 レポーターを挿入した系統は PAM-γ3 神経を標識する。RNAi 法を用い PAM-γ3 特異的に *DAR-1* 遺伝子の発現を抑制すると、砂糖摂取によるカルシウムレベルの低下が見られない。これらから、報酬の摂取により放出された満腹ペプチド AstA は DAR-1 受容体を通して PAM-γ3 の自発活動を抑制する。スケールバーは 20 μm。

考　察

ドーパミンは神経系を持つ動物に広く存在し、報酬、罰、覚醒レベル、食欲、性欲など様々な機能を制御する神経修飾物質である。刺激依存的な強い興奮による一過的なドーパミンの放出が、これら多様な生理機能の調節に重要であることは疑う余地が無い。一方でドーパミン神経には、外部からの刺激がないにもかかわらず持続的に上下する自発活動があることが、生理学的実験により古くから知られている。このため、刺激非依存的な持続性のドーパミンシグナルは動物の内部状態を反映していると考えられてきたが、持続性のドーパミンシグナルと行動状態との因果関係を検証する実験はほとんどなされてこなかった［8］。

本研究は、PAM-γ3 という特定のドーパミン神経細胞の機能を解析することで、この細胞種からのドーパミン放出の減少と上昇がそれぞれ報酬と罰を伝達することを明らかにした。特に、PAM-γ3 の持続的な活動を人工的に抑制することで報酬記憶が誘導されることは、ドーパミンの自発活動と行動状態の因果関係を直接的に示すものである。さらに本研究は、AstA/DAR-1 神経ペプチドシグナルがこの自発活動の重要な調節因子であることも明らかとし、適正な価値判断を司る分子・細胞基盤の一端の理解につながった。

共同研究者・謝辞

本研究に最も大きく貢献した共同研究者は、東北大学生命科学研究科の山方恒宏准教授である。また本研究に用いたトランスジェニック系統の作製、実験データの取得、カルシウムイメージングは、国立遺伝学研究所の近藤周博士、東北大学生命科学研究科の阿部綾子氏、東京大学分子細胞生物学研究所の多羽田哲也教授、廣井誠助教との共同研究によるものである。米ハワード・ヒューズ医学研究所/ジャネリア研究所の麻生能功博士、Gerald M. Rubin 博士には、トランスジェニックショウジョウバエの提供を頂いた。

文 献

1) Ichinose T, Aso Y, Yamagata N, Abe A, Rubin GM, Tanimoto H. Reward signal in a recurrent circuit drives appetitive long-term memory formation. Elife. 2015 Nov 17;4:e10719. PMID: 26573957. doi:10.7554/eLife.10719.

2) Yamagata N, Ichinose T, Aso Y, Plaçais PY, Friedrich AB, Sima RJ, Preat T, Rubin GM, Tanimoto H. Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 13;112(2):578-83. Epub 2014 Dec 29. PMID:25548178. doi:10.1073/pnas.1421930112.

3) Vogt K, Schnaitmann C, Dylla KV, Knapek S, Aso Y, Rubin GM, Tanimoto H. Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. Elife. 2014 Aug 19;3:e02395. PMID:25139953. doi: 10.7554/eLife.02395.

4) Liu C, Plaçais PY, Yamagata N, Pfeiffer BD, Aso Y, Friedrich AB, Siwanowicz I, Rubin GM, Preat T, Tanimoto H. A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. Nature. 2012 Aug 23;488(7412):512-6. doi:10.1038/nature11304. PMID:22810589.

5) Hergarden AC, Tayler TD, Anderson DJ. Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Mar 6;109(10):3967-72. Epub 2012 Feb 15. doi: 10.1073/pnas.1200778109. PMID:22345563.

6) Peng H, Chung P, Long F, Qu L, Jenett A, Seeds AM, Myers EW, Simpson JH. BrainAligner: 3D registration atlases of *Drosophila* brains. Nat Methods. 2011 Jun;8(6):493-500. Epub 2011 May 1. doi: 10.1038/nmeth.1602. PMID:21532582.

7) Yamagata N, Hiroi M, Kondo S, Abe A, Tanimoto H. Suppression of Dopamine Neurons Mediates Reward. PLoS Biol. 2016 Dec 20;14(12):e1002586. PMID:27997541. doi:10.1371/journal.pbio.1002586.

8) Ichinose T, Tanimoto H, Yamagata N. Behavioral Modulation by Spontaneous Activity of Dopamine Neurons. Front Syst Neurosci. 2017 Dec 11;11:88. PMID:29321731. doi:10.3389/fnsys.2017.00088.