

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名	脳科学研究戦略推進プログラム	
研究開発課題名	情動の制御機構を解明するための神経情報基盤の構築（モデル実験動物を用いた情動制御機構の分析）	
機関名	国立大学法人東京大学	
研究開発 担当者	所属 役職	分子細胞生物学研究所 准教授
	氏名	伊藤 啓

2. 研究開発成果の内容

①モノアミン性神経のコネクティクス解析

- 3次元連続断層画像のつながり合わせやノイズフィルタリングのアルゴリズムを改良し、全モノアミン神経の線維投射と入力/出力シナプスの分布を脳全域にわたって詳細に記録したデータを整備した。さらに、これら異なる条件間での各神経のシナプス数の定量的比較を行った。以上によって当初目的を達成した。
- コンピューテーショングループと連携して、画像圧縮技術と分割技術を組み合わせて大容量の三次元画像情報を閲覧するデータベースシステムVersatile Volume Data (VVD)を開発した。さらに各国の脳画像データベースの運営者と連携し、世界中で公開されているすべてのショウジョウバエ脳画像データについて同システムを通じて提供する枠組みを確立した。

②行動解析実験装置の開発とモデル系での解析

- 報酬の快情報を連合学習中枢に伝達する経路を解析し、従来より知られていた嗅覚受容器から嗅覚一次中枢を介して連合学習中枢に至る嗅覚情報伝達経路に加えて、その情報に快/不快の価値づけを行う情動情報伝達経路が2種類のモノアミン神経群によって構成されていることが分かった。これによって長期記憶を特異的に誘導する記憶システムが明確に規定された特定の神経回路で構成されるという生物学的意義が明らかになったことにより、当初目的を達成した。
- プロテオミクスグループと連携してドーパミン神経からの信号を受容するキノコ体内部神経でリン酸化を受ける候補タンパクをスクリーニングし、これらタンパク遺伝子のRNAiコンストラクトを発現させる特異的遺伝子機能阻害系を構築して各タンパクの学習異常への寄与を解析し、当初目的を達成した。

③側坐核中型有棘細胞におけるスパイン形態可塑性の2光子解析

- ドーパミン神経軸索の刺激によるスパイン収縮条件の決定
海馬での刺激条件を参考に、D2R-MSNのスパイン収縮条件を検討した。しかし、スパイン収縮条件は容易には見いだせず、2)以下において画期的な成果が期待されたためPS、POとの相談の上、2)以下に注力する方針とした。
- ドーパミン神経軸索の抑制系の確立

脳スライス上で生体での罰信号を模倣するドーパミン信号制御方法を開発した。具体的にはドーパミン神経にチャンネルロドプシンを遺伝子導入し、側坐核脳スライス上でアンペロメトリーによりドーパミンを計測しながら生体でのドーパミン定常的濃度を安定的に模倣するドーパミン神経の光刺激条件を見出し、当初の目的を達成した。

- ドーパミン神経軸索の抑制によるスパイン増大条件の決定
PENKプロモーターによりD2R-MSNを標識した。この細胞から全細胞記録を行い、グルタミン酸2光子刺激と細胞発火を組み合わせる単一スパインに可塑性刺激を与えた。様々な時間枠でドーパミン罰信号を与えることで、ドーパミン神経軸索の抑制は2秒程度の時間枠の中にあることが必要であることが分かり、当初目的を達成した。
- 連合学習が成立する条件刺激と非条件刺激の時間枠の決定
頭部固定下のマウスに強制的に報酬（水、US）を音（CS）に対して様々な時間枠で与え連合学習の効率を調査した。得られた連合学習は翌日までのその記憶が保持されていた。CS-USを様々な時間枠で与えて学習効率を計測したところ、D1R-MSNにおいてドーパミンがシナプスを増強する時間枠に対応したCS-US連合の成立する時間枠を見出し、当初目標を達成した。
- 学習の側坐核D1R-MSNの可塑性依存性の決定
側坐核にりん酸化酵素阻害ペプチドをウィルスにより遺伝子導入した。その結果、1日のうちに生じる連合学習がほぼ消失した。このことから側坐核の可塑性が連合学習において中心的な役割を果たしていることがわかり、当初目標を達成した。

④ ショウジョウバエ嗅覚嗜好性行動を規定するモノアミン作動性神経回路の解明

- 嗅覚嗜好性制御に関わるモノアミン作動性ニューロン間の構造的相互作用の解明
各モノアミン作動性ニューロンおよび嗅覚二次ニューロンをそれぞれmCherryとGFPで標識し、デコンボリューション法を含む位置関係解析を行ったところ、ドーパミン作動性ニューロン軸索が嗅覚二次ニューロンの近傍に位置することが明らかになった。さらにGRASP法をもちいて嗅覚二次ニューロンとドーパミン作動性ニューロンがシナプス結合を形成する（もしくは非常に近い空間配置にある）ことを示した。一方、オクトパミン作動性ニューロンと嗅覚二次ニューロンとの間にはGRASPシグナルが検出できないことから直接の相互作用はないと考えられた。これらの成果により当初目的を達成した。
- Caイメージングおよび光遺伝学的手法による機能的相互作用の解明
GCaMP6によりドーパミン作動性ニューロンとオクトパミン作動性ニューロンのカルシウム動態を解析したところ、特定嗅覚物質に対して忌避行動を示すようになる時期に発火頻度が上表する事が明らかになった。さらにドーパミン作動性ニューロンに赤色反応性チャンネルロドプシンCsChrimsonを発現させて赤色光（610nm）照射により活性化させると、本来は嗜好性を示す嗅覚物質に対して部分的な忌避性を示すようになった。従って、ドーパミン入力とは嗅覚入力に対して負の価値付加を行う可能性が示唆された。これによって、嗅覚二次ニューロン群であるドーパミン作動性ニューロンとオクトパミン作動性ニューロンが拮抗的に作用する相互作用様式を決定し、当初目的を達成した。

⑤ ドーパミン受容体下流で働くリン酸化シグナル経路の同定

- DCLKシグナル経路の同定
シナプス構造が観察しやすい運動ニューロンにおいてDCLKもしくはMAP7D1のRNAiノック

ダウンを行うと、シナプス（NMJ）の構造が肥大し、逆にシナプス数が減少することから、シナプスの形成・維持過程に関与する可能性が示唆された。これらの成果により当初目的を達成した。

- DCLK によるマウス情動制御機構の解明

DCLK ノックアウトマウスの行動テストバッテリー解析から、不安様行動の低下と、衝動性行動の亢進が特異的に検出された。さらに、並行して、腹側被蓋野から前頭前野へのドーパミン作動性ニューロンの投射が、DCLK ノックアウトマウスでは現弱していることが明らかになった。これらの成果により当初目的を達成した。