

食塩嗜好性の脳内基盤と食塩過剰摂取・脱塩による神経活動変化の解析

疋田 貴俊, 小澤 貴明

大阪大学蛋白質研究所

概要 ヒトを含めて動物は、低濃度の食塩を含む食物を好み、高濃度の食塩を含む食物を嫌う。しかしながら、極端な減塩を行うと高濃度の食塩を好むようになることが知られている。一方、食塩の過剰摂取が継続した場合に、どのような食嗜好の変化が起きるかは定まっていない。これらの食塩の濃度依存的な嗜好性と、体内環境による嗜好性変化についての脳内基盤は明らかになっていない。

大脳基底核は運動のバランスの制御部位であるのみならず、好ましいものを求める報酬行動、不快なものを避ける忌避行動、報酬か忌避かを選択する意思決定を支配する必須の脳部位である。大脳基底核の主要な神経回路である線条体および側坐核から黒質への投射は、直接路と間接路の2つの伝達経路からなる。直接路は報酬行動及び薬物依存を支配する伝達経路であり、一方間接路は忌避行動及び行動柔軟性を支配する伝達経路である。また直接路と間接路のスイッチングがドーパミンシグナル伝達による可塑性変化によることが示されている。そこで本研究では、食塩の濃度依存的な嗜好性の脳内基盤を調べることを目的として、ファイバーフォトメトリー法により、マウス側坐核のドーパミンイメージングと直接路と間接路のカルシウムイメージングを試みた。

側坐核のドーパミンイメージングでは、減塩条件下での 75 mM と 300 mM の NaCl 溶液に対するリッキング課題において、よりリッキング回数の多い 300 mM の NaCl 溶液摂取時に側坐核ドーパミン変化量がより増大していることが確認された。これは減塩条件下での食塩の濃度依存的な嗜好性に側坐核のドーパミンが関与していることを示唆している。

側坐核のドーパミンは直接路の D1 ドーパミン受容体と間接路の D2 ドーパミン受容体に結合するため、直接路と間接路のカルシウムイメージングを新規に立ち上げた。まずはこれまで側坐核の直接路と間接路での機能分離が知られている報酬・忌避学習課題でのカルシウム変化を確認した。スクロース報酬学習課題では直接路でのカルシウム変化量の増大を観察した。一方、忌避学習課題では学習成立後に間接路で特異的にカルシウム変化量の増大を観察した。側坐核の直接路と間接路の機能分離が示されていることから、直接路と間接路に特異的なカルシウムイメージングを確立したと考えている。

今後の課題として、通常時、減塩時、食塩過剰時での食塩の濃度依存的な嗜好性と側坐核のドーパミン変化量との関係を、ドーパミンイメージングにより明らかにしていきたい。また、食塩の濃度依存的な嗜好性に側坐核の直接路と間接路がどのように関与しているかを、カルシウムイメージングにより明らかにしていく。

1. 研究目的

ヒトを含めて動物は、低濃度の食塩を含む食物を好み、高濃度の食塩を含む食物を嫌う。しかしながら、極端な減塩を行うと高濃度の食塩を好むようになることが知られている。一方、食塩の過剰摂取が継続した場合に、どのよう

な食嗜好の変化が起きるかは定まっていない。これらの食塩の濃度依存的な嗜好性と、体内環境による嗜好性変化についての脳内基盤は明らかになっていない。

大脳基底核は運動のバランスの制御部位であるのみならず、好ましいものを求める報酬行動、不快なものを避け

る忌避行動、報酬か忌避かを選択する意思決定を支配する必須の脳部位である⁽¹⁾。大脳基底核の神経回路網は大脳皮質-線条体および側坐核-黒質網様部-視床の神経経路で形成され、さらに海馬体や扁桃体から記憶や情動の情報入力を受ける。大脳基底核の主要な神経回路である線条体および側坐核から黒質への投射は、直接路と間接路の2つの伝達経路からなる。直接路は報酬行動及び薬物依存を支配する伝達経路であり、一方間接路は忌避行動及び行動柔軟性を支配する伝達経路である⁽¹⁾。また直接路と間接路のスイッチングがドーパミンシグナル伝達による可塑性変化によることが示されている⁽²⁾。そこで本研究では、食塩の濃度依存的な嗜好性の脳内基盤を調べることを目的として、ファイバーフォトメトリー法により、マウス側坐核のドーパミンイメージングと直接路と間接路のカルシウムイメージングを試みた。

2. 研究方法

2.1 側坐核におけるドーパミンイメージング

2.1.1 動物

C57BL/6J 系統のオスマウス(10 週齢)4 個体を使用した。

2.1.2 手術

蛍光ドーパミンセンサーである GRAB-DA はドーパミンが結合すると下流に位置する蛍光蛋白 cpGFP の構造が変化し、蛍光強度が増加する遺伝子改変ドーパミン D2 受容体である⁽³⁾。本研究では麻酔下の動物に対して GRAB-DA の遺伝子配列を含むウイルスベクター(AAV9-hSyn1-GRABDA)を側坐核内に注入することにより GRAB-DA を発現させた。またイメージングファイバーも同時に埋め込んだ。

2.1.3 塩摂取制限

手術後 3 週間の回復期間をおいた後、3 日間エサを NaCl フリー飼料(オリエンタル酵母)に、水は Milli-Q 水に置き換える塩摂取制限を行った。

2.1.4 利尿剤処置

体内の塩分濃度を低下させるために利尿剤であるフロセミドを 5 mg/kg の用量(10 ml/kg)で塩水訓練および各テスト日の前日に腹腔内投与した⁽⁴⁾。

2.1.5 塩水訓練

行動実験装置内で 5 日間の塩水訓練を行った。マウスは、一定回数のチューブ舐め行動(リッキング)を行うと報

酬として 5 μ l の NaCl 溶液(75 mM)がチューブの先端から与えられた。報酬の獲得に必要なリッキングの回数は訓練 1 日目が 3 回(FR3)、訓練 2 日目以降は 10 回(FR10)であった。各訓練日における 1 回の訓練は報酬を 30 回獲得するか、30 分間が経過すると終了した。

2.1.6 テスト課題と側坐核ドーパミンイメージング

その後、一定時間(15 秒)経過後のリッキングによって、NaCl 75 mM あるいは 300 mM のいずれかの報酬が与えられるテスト課題を行い、ファイバーフォトメトリー法を用いて、報酬摂取中の側坐核におけるドーパミン変化量を測定した。

2.2 直接路と間接路のカルシウムイメージング

2.2.1 動物

直接路には D1 ドーパミン受容体が、間接路には D2 ドーパミン受容体が特異的に発現する⁽²⁾ため、D1 または D2 ドーパミン受容体のプロモーター領域と Cre リコンビナーゼをコードする配列を組み合わせた遺伝子が導入された遺伝子組み換えマウス(D1-Cre, D2-Creトランスジェニックマウス)各 3 個体を用いた。

2.2.2 手術

直接路と間接路のカルシウムイメージングのために、それぞれ D1-Cre, D2-Cre トランスジェニックマウスの側坐核に Cre 依存的に蛍光カルシウムセンサー GCaMP7f を発現させるウイルスベクター(AAV9-Syn-Flex-jGCaMP7f-WPRE)を注入し、同時にイメージングファイバーも埋め込んだ。

2.2.3 スクローズ報酬学習課題と直接路と間接路のカルシウムイメージング

70 dB, 2.9 kHz のトーンピップ(100 ms)を 5 Hz の頻度で断続的に鳴らす音を CS、口腔内カニューラを介した 10%スクローズ溶液の口腔内投与を US として条件づけを行った。マウスは平均 120 秒ごとに、2 秒間の CS が与えられた後、直後に 8 秒間の US が与えられた。これを 1 つのトライアルとして、1 回のセッションで 20 トライアルが実施された。このセッションを 1 日 1 回、2 日間行った。報酬課題中の側坐核の直接路および間接路におけるカルシウム変化量を、ファイバーフォトメトリー法を用いて測定した。スクローズ報酬課題後に 5 mM キニーネ溶液を 10 秒間摂取させ、同様に側坐核の直接路および間接路におけるカルシウム変化量を、ファイバーフォトメトリー法を用いて測定した。

2. 2. 4 忌避学習課題と直接路と間接路のカルシウムイメージング

70 dB, 2.9 kHz のトーンピップ (100 ms) を 5 Hz の頻度で断続的に鳴らす音を CS, 0.3 mA の電気ショックを US として条件づけを行った。マウスは平均 120 秒ごとに、20 秒間の CS が与えられた後、直後に 2 秒間の US が与えられた。これを 1 つのトライアルとして、1 回のセッションで 20 トライアルが実施された。このセッションを 1 日 1 回, 2 日間行った。電気ショック課題中の側坐核の直接路および間接路におけるカルシウム変化量を, ファイバーフォトメトリ法を用いて測定した。

2. 3 本研究は, 大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認と, 大阪大学蛋白質研究所動物実験委員会の承認を受けて行った。

3. 研究結果

3. 1 側坐核におけるドーパミンイメージング

本研究で用いた C57BL/6J 系統のオスマウスは, リッキングテスト課題において 75 mM の NaCl 溶液よりも 300 mM の NaCl 溶液に対して有意に多くのリッキング行動を示した (分散分析, $p < 0.05$) (Fig. 1A)。そこで, 75 mM と 300 mM のそれぞれの NaCl 溶液に対するリッキングテスト課題中の側坐核ドーパミンイメージングを行なった。75 mM の NaCl 溶液に対するリッキング行動時にドーパミン, 変化量の増大が観察された (Fig. 1B 青線) が, それに対して, 300 mM の NaCl 溶液に対するリッキング行動直後に, 有意に大きなドーパミン変化量の増大が見られた (Fig. 1B 赤線) (分散分析, $p < 0.05$)。

3. 2 直接路と間接路のカルシウムイメージング

側坐核で放出されたドーパミンは直接路の D1 ドーパミン受容体と間接路の D2 ドーパミン受容体に結合することで, 異なる神経回路に情報伝達が行なわれる⁽¹⁾。そのため, D1-cre および D2-cre トランスジェニックマウスを用いて, それぞれ直接路と間接路のカルシウムイメージングを行った。まずは側坐核の直接路と間接路の関与が神経伝達操作によって明らかになっている報酬・忌避学習課題における直接路と間接路のカルシウムイメージングを行った。スクロースを用いた報酬学習課題を行ったところ, 直接路において, CS とスクロース US の両方のタイミングでカルシウム変化量の増大が観察された (Fig. 2A)。これに対して, マウスにとって忌避であるキニーネを摂取させても直接路にカルシウム変化は見られなかった (Fig. 2B)。一方, 間接路においてはスクロース報酬課題およびキニーネ摂取に対するカルシウムイメージングにおいて, 基線の変動により, 十分なカルシウム変化を検出することができなかった。

次に電気ショックを US とした忌避学習課題を行った。直接路において, 課題第 1 日目および第 2 日目共に, US でのカルシウム変化量の増大が見られたが, CS ではカルシウム変化は観察されなかった (Fig. 3)。一方, 間接路では, 課題第 1 日目では直接路 D1 ニューロンと同様に, US でカルシウム変化量の増大が見られたが, CS ではカルシウム変化は観察されなかったのに対して, 課題 2 日目では CS においてもカルシウム変化量の増大が観察された (Fig. 4)。

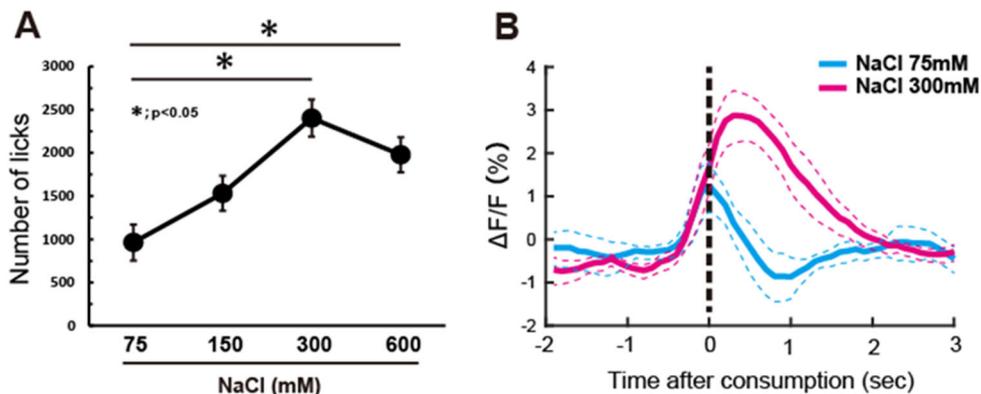


Fig. 1. Salt seeking behavior and dopamine release evoked by salt reward consumption. A. The increase of NaCl concentration facilitates operant licking to reward spout under the NaCl depleted condition. B. Changes of dopamine release after salty reward consumption in nucleus accumbens. Vertical broken line shows the time of first licking after salty reward delivery

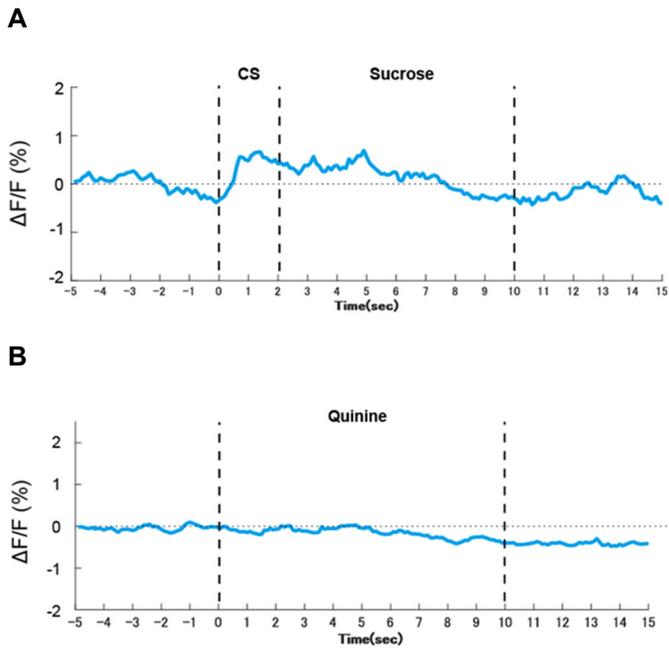


Fig. 2. Calcium changes of the direct pathway neurons in the sucrose reward task (A) and after oral intake of quinine

4. 考察

本研究では、食塩の濃度依存的な嗜好性の脳内基盤を調べることを目的として、ファイバーフォトメリー法により、側坐核のドーパミンイメージングと直接路と間接路のカル

シウムイメージングを行った。

側坐核のドーパミンイメージングでは、減塩条件下での75 mMと300 mMのNaCl溶液に対するリッキング課題において、よりリッキング回数の多い300 mMのNaCl溶液摂取時に側坐核ドーパミン変化量がより増大していることが確認された。これは減塩条件下での食塩の濃度依存的な嗜好性に側坐核のドーパミンが関与していることを示唆している。

側坐核のドーパミンは直接路のD1ドーパミン受容体と間接路のD2ドーパミン受容体に結合するため、側坐核の直接路と間接路のカルシウムイメージングを行った。本研究で側坐核の直接路と間接路のカルシウムイメージングを新規に立ち上げたため、まずはこれまで側坐核の直接路と間接路での機能分離が知られている報酬・忌避学習課題でのカルシウム変化を確認した。スクロース報酬学習課題では直接路でのカルシウム変化量の増大を観察した。このことは側坐核の直接路に対するドーパミン入力報酬学習に関与していることと一致している^(1, 2)。一方、忌避学習課題では学習成立後の2日目のCS時に間接路で特異的にカルシウム変化量の増大を観察した。このことは忌避学習に側坐核の間接路が特異的に関与していることと一致している⁽¹⁾。これから、側坐核の直接路と間接路の

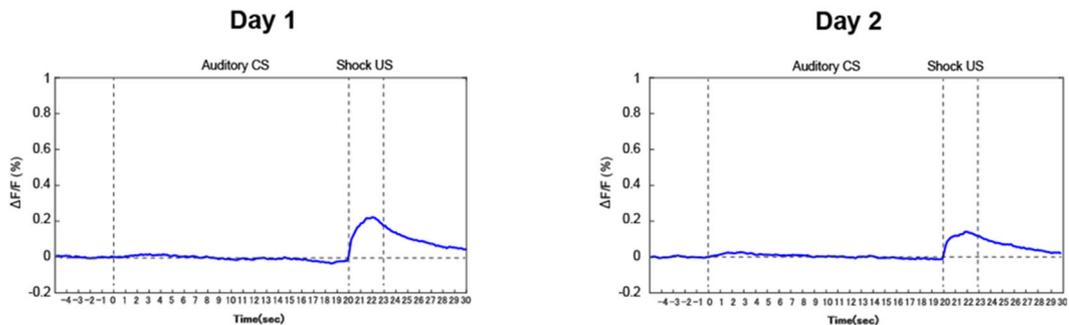


Fig. 3. Calcium changes of the direct pathway neurons in the auditory fear conditioning task

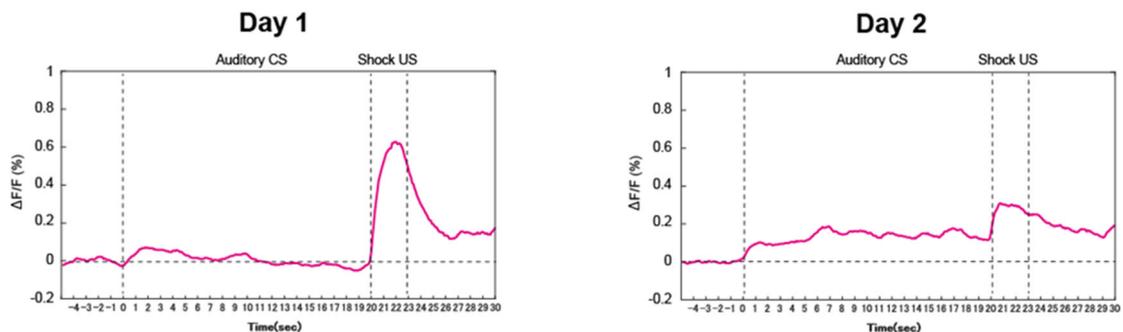


Fig. 4. Calcium changes of the indirect pathway neurons in the auditory fear conditioning task

報酬・忌避学習における機能分離が示されており、本研究により直接路と間接路に特異的なカルシウムイメージングを確立したと考えられる。

5. 今後の課題

減塩条件下での食塩の濃度依存的な嗜好性に側坐核のドーパミンが関与していることを示したが、高濃度の食塩を嫌う場合や食塩の過剰摂取が継続した場合にどのように側坐核のドーパミンが変化するかは明らかになっていない。通常時、減塩時、食塩過剰時での食塩の濃度依存的な嗜好性と側坐核のドーパミン変化量との関係を、ドーパミンイメージングにより明らかにしていきたい。

側坐核の直接路と間接路のカルシウムイメージングについては、報酬・忌避学習課題を通じて、直接路と間接路のそれぞれ特異的なカルシウム変化を観察することができることを確認した。しかしながら、その変化は顕著なものではなく、イメージングファイバーの留置位置などの実験条件に留意しながら検討を続ける必要がある。今後は、食塩の濃度依存的な嗜好性に側坐核の直接路と間接路が

どのように関与しているかを、カルシウムイメージングにより明らかにしていく。

6. 文献

- (1) Hikida T. et al. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66, 896-907 (2010).
- (2) Hikida, T. et al. Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 342-347 (2013).
- (3) Sun, F. et al. A genetically-encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* 174, 332528 (2018).
- (4) Lundy, R. F., Blair, M., Horvath, N. & Norgren, R. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. *Physiol. Behav.* 78, 449-458 (2003).

Neural Basis of Salt Preference and Salt Overdose/Desalination

Takatoshi Hikida, Takaaki Ozawa

Institute for Protein Research, Osaka University

Summary

Animals prefer low concentrations of salt and dislike high concentrations of salt. However, it is known that extreme salt reduction leads to a preference for high salt concentrations. The brain basis for these salt concentration-dependent changes in preference has not been clarified.

The basal ganglia control not only motor balance but also reward and aversive behavior, and decision-making. The projection from the striatum and the nucleus accumbens (NAc) to the substantia nigra consists of two main pathways, the direct and the indirect pathway, in the basal ganglia circuit. The direct pathway controls reward behavior, while the indirect pathway controls aversive behavior. In addition, it has been shown that switching between the direct and indirect pathways is due to plasticity induced by dopamine signaling. In the present study, we attempted dopamine imaging of the NAc and calcium imaging of the direct and indirect pathways by fiber photometry to investigate the brain basis of the concentration-dependent preference for salt.

In the dopamine imaging of the NAc, the amount of dopamine change was found to be increased after salty reward consumption under the NaCl depleted condition. This suggests that dopamine in the NAc is involved in the concentration-dependent preference for salt under low-salt conditions.

Since dopamine binds to D1 dopamine receptors in the direct pathway neurons and D2 dopamine receptors in the indirect pathway neurons in the NAc, we newly established calcium imaging of the direct and indirect pathway neurons. First, we confirmed calcium changes in the reward and aversive learning task, in which functional separation between the direct and indirect pathways has been known. In the sucrose reward learning task, we observed an increase in the amount of calcium change in the direct pathway neurons. On the other hand, in the aversive learning task, we observed an increase in calcium changes specifically in the indirect pathway neurons. The functional separation of the direct and indirect pathways indicates that we have established calcium imaging specific to the direct and indirect pathway neurons.

In the future, we would like to clarify the relationship between salt concentration-dependent preference and dopamine changes in the NAc during normal, low-salt, and high-salt conditions using dopamine imaging. In addition, we will clarify how the direct and indirect pathways are involved in the salt concentration-dependent preference by calcium imaging.