

神経回路制御と計算論から食塩嗜好性の脳内基盤を探る

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。

前年度に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、通常時に高濃度の食塩を嫌う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できなかった。その理由としてリッキング行動を行わない点にあった。そこで、水、低濃度の食塩水、高濃度の食塩水をランダムに提示する行動課題を確立し、通常時および減塩条件下でのリッキング行動と側坐核のドーパミンとカルシウムの変化量を調べた。

側坐核のドーパミンイメージングでは、水制限条件では、食塩水によって側坐核ドーパミンは減少し、塩制限条件では側坐核ドーパミンは上昇した。間接路のカルシウム変化量はドーパミン変化量とは逆に動き、水制限条件では、食塩水によってカルシウムは上昇し、塩制限条件ではカルシウムは減少した。

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直接路/間接路の神経活動の関係を、側坐核のドーパミンとカルシウムの同時イメージングにより明らかにしていく。さらにドーパミン細胞、直接路、間接路の神経活動がどのように食塩の濃度依存的な嗜好性を制御しているかを光遺伝学的手法あるいは化学遺伝学的手法を用いて、目的の神経細胞特異的な活動制御を行うことで明らかにしていく。また、恒常性機械学習を用いた数理モデルによる解析を進め、食塩の濃度依存的な嗜好性の理論的再構成を目指す。

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カルシウムイメージングの同時取得を試みた。

前年度に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、通常時に高濃度の食塩を嫌う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できなかった。その理由としてリッキング行動を行わない点にあった。そこで、水、低濃度の食塩水、高濃度の食塩水をランダムに提示する行動課題を確立し、通常時および減塩条件下でのリッキング行動と側坐核のドーパミンとカルシウムの変化量を調べた。

2. 研究方法

2.1 リッキング行動課題

C57BL/6J 系統のオスマウス(10 週齢)を使用した。4 日間、飲水を1時間に制限した。その後、マウスを行動観察装置に入れ、スパウトをリッキングすることで飲水することを訓練した。次の日に、一定時間(20 秒)経過後のリッキングによって、MilliQ 水、低濃度の食塩水(NaCl 300 mM)、あるいは高濃度の食塩水(NaCl 750 mM)のいずれかが与えられるリッキング行動課題を行った(Water depleted)。それぞれの水あるいは各濃度の食塩水に対して各 20 トライアル行い、リッキング回数を記録した。次に水制限と同時に、エサを NaCl フリー飼料(オリエンタル酵母)に、水は MilliQ 水に置き換える塩摂取制限を行った。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)で腹腔内投与した³⁾。その後、リッキング行動課題を行った(Water and salt

depleted)。さらに、塩摂取制限を継続した状態で水制限を解除し、同様にリッキング行動課題を行った(Salt depleted)。

2.2 側坐核におけるドーパミンとカルシウムの同時イメージング

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(D2-Cre トランスジェニックマウス)を用いた。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)と赤色蛍光ドーパミンセンサー GRABrDA⁴⁾の遺伝子配列を含むウイルスベクター(AAV9-hSyn1-GRABrDA)を注入し、同時にイメージングファイバーも埋め込んだ。手術後 2 週間経ったマウスに対して、水制限を開始した。その後、マウスを行動観察装置に入れ、飲水訓練を行った。水制限時および減塩時の、MilliQ 水、低濃度の食塩水(NaCl 300 mM)、あるいは高濃度の食塩水(NaCl 750 mM)のいずれかが与えられるリッキング行動課題をおこない、リッキング回数、側坐核のドーパミン変化量、カルシウム変化量を同時記録した。側坐核のドーパミンおよびカルシウムの変化量はそれぞれのセンサーの MilliQ 水、低濃度あるいは高濃度の食塩水提示後の蛍光強度の変化率 DF/F (%) で示した。

なお、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 リッキング行動課題の確立

水制限時に、MilliQ 水、300 mM の食塩水、あるいは 750 mM の食塩水を 20 秒ごとにランダムに与えると、MilliQ 水、300 mM 食塩水、750 mM 食塩水の順にリッキング回数が多かった(Fig. 1A, D)。次に、水制限に減塩条件を加えると、750 mM 食塩水、300 mM 食塩水、MilliQ 水の順にリッキング回数が多くなった(Fig. 1B, D)。最後に、水制限のみ解除し減塩条件のみとすると、750 mM 食塩水、300 mM 食塩水、MilliQ 水の順にリッキング回数も多く、その差は大きくなった(Fig. 1C, D)。これらの結果は、体内環境に応じた濃度依存的な食塩嗜好性変化を示しており、リッキング行動課題が確立された。

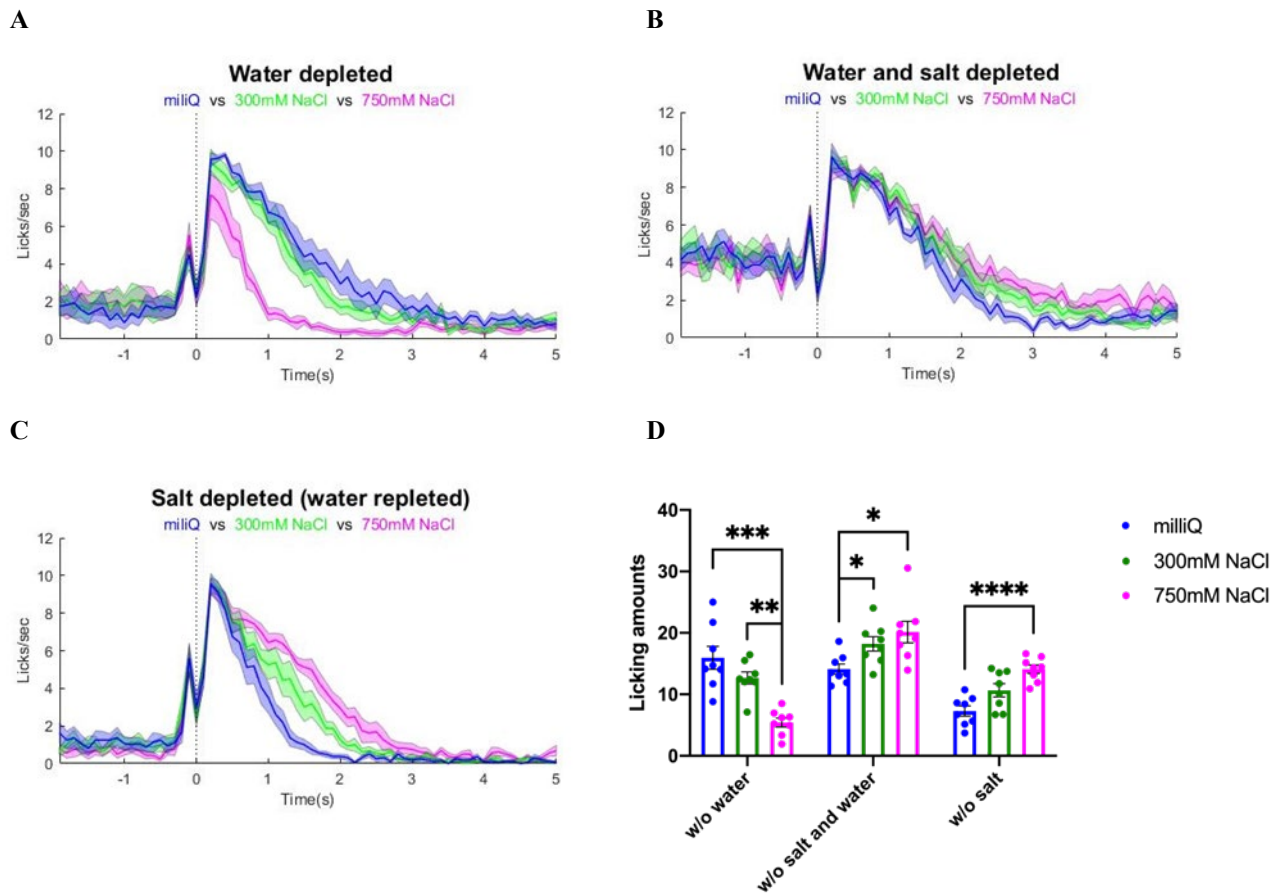


Fig. 1. Licking rates (A-C) and amounts (D) of water and/or salt depleted mice after random presentation of MilliQ (blue), 300 mM NaCl (green), or 750 mM NaCl (magenta) in the licking operant task. (D) n=8 each. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, Bonferroni correction.

3. 2 側坐核におけるドーパミンとカルシウムの同時イメージング

ドーパミンセンサーとカルシウムセンサーを側坐核に発現させたマウスは、水制限時のリッキング行動課題において、MilliQ 水, 300 mM 食塩水, 750 mM 食塩水の順にリッキング回数が多かった (**Fig. 2A**)。この時のドーパミン変化量を測定すると、MilliQ 水ではドーパミン増加が見られるのに対して、750 mM 食塩水ではドーパミン減少が確認された (**Fig. 2B**)。この時のカルシウム変化量は逆に 750mM 食塩水で増加し、MilliQ 水では減少した (**Fig. 2C**)。

一方、減塩条件下では 750 mM 食塩水, 300 mM 食塩水, MilliQ 水の順にリッキング回数が多くなり (**Fig. 3A**)、750 mM 食塩水ではドーパミン増加が確認された (**Fig. 3B**)。この時のカルシウム変化量は 750 mM 食塩水で減少した (**Fig. 3C**)。

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トリー法により、側坐核のドーパミンイメージングとカルシウムイメージングを行った。

これまでの食塩水摂取測定課題では、塩制限下のマウスにおいて、塩味の持つ報酬性を測定するためには有効であった。しかし、通常状態のマウスにおいて認められる高濃度食塩水の嫌悪性を測定することは、マウスが高濃度食塩水に対する希求行動を示さないため困難であった。この問題を解決するため、本研究では、通常水と食塩水がランダムに提示される課題を用いて、食塩水の嫌悪性と報酬性を測定することを試みた。その結果、水制限において、高濃度食塩水に対するリッキング回数は MilliQ 水と比較して減少した一方、塩制限下では、高濃度食塩水に対するリッキングが MilliQ 水と比較して増加した。この

ことから、本課題を用いることで、食塩の持つ嫌悪性と報酬性の両方が測定可能なことが示された。

次に、カルシウムセンサーと赤色ドーパミンセンサーを組み合わせて利用することで、食塩水摂取中のマウス側坐核におけるカルシウム変化量とドーパミン変化量の同時測定を行った。その結果、水制限条件では、食塩水によって側坐核ドーパミンは減少し、塩制限条件では側坐核ドーパミンは上昇した。これまでの研究で、ドーパミンの上昇は快情動、減少は不快情動と関連していることが報告されており²⁾、本研究で観察されたドーパミンの変動はこれらの結果と一致している。

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。今回の実験では、間接路のカルシウム変化量をドーパミン変化量と同時に記録した。間接路のカルシウム変化量はドーパミン変化量とは逆に動き、水制限条件では、食塩水によってカルシウムは上昇し、塩制限条件ではカルシウムは減少した。間接路におけるカルシウム変化量は間接路を構成する D2 神経細胞の神経活動を表している。間接路は嫌悪学習に関与することが示されており¹⁾、本研究で観察された間接路におけるカルシウムの変動はこれらの結果と一致している。

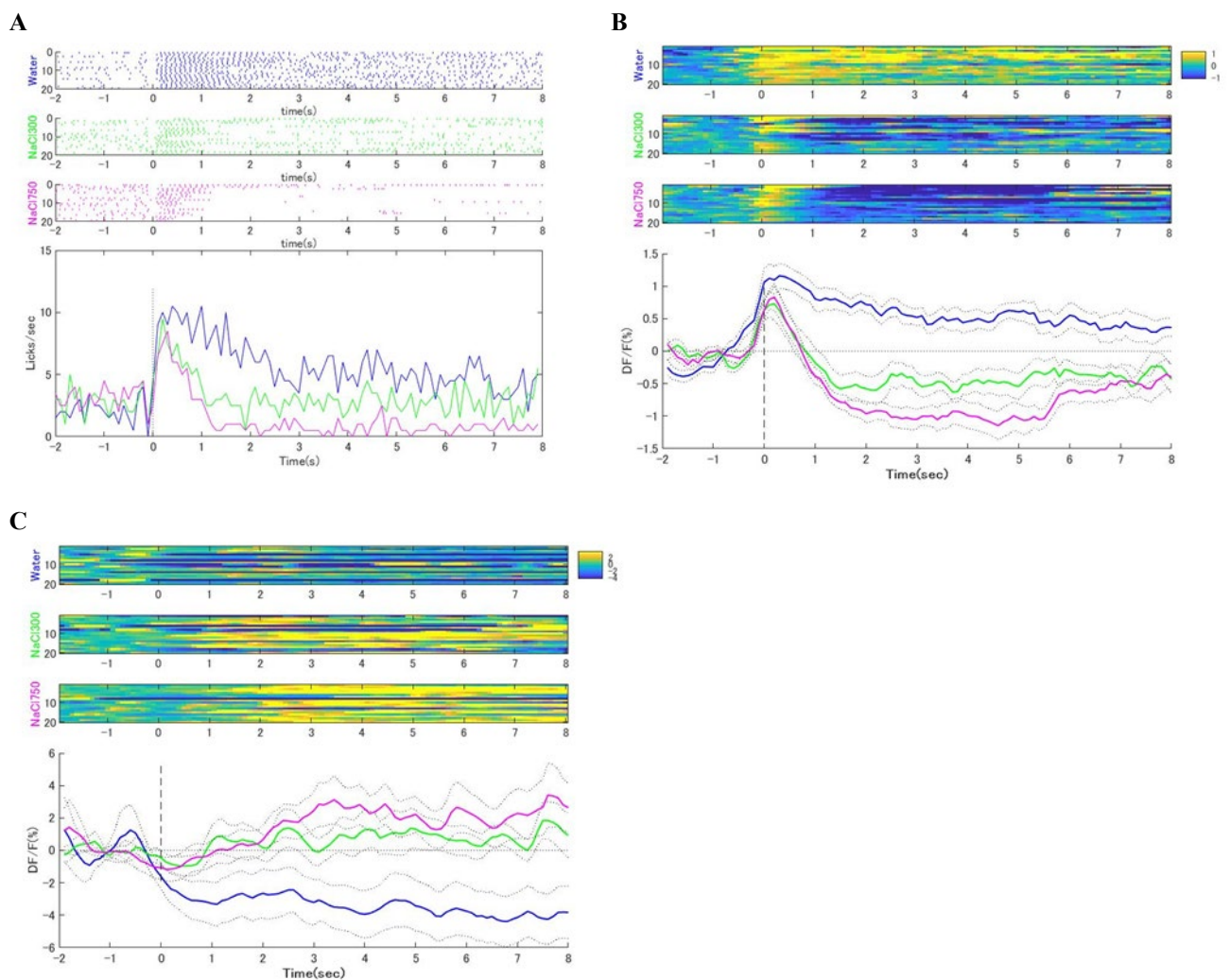


Fig. 2. Licking rate (A), dopamine change (B) and calcium change (C) in the nucleus accumbens of a water-depleted mouse after random presentation of MilliQ water (blue), 300 mM NaCl (green), or 900 mM NaCl (magenta) in the licking operant task.

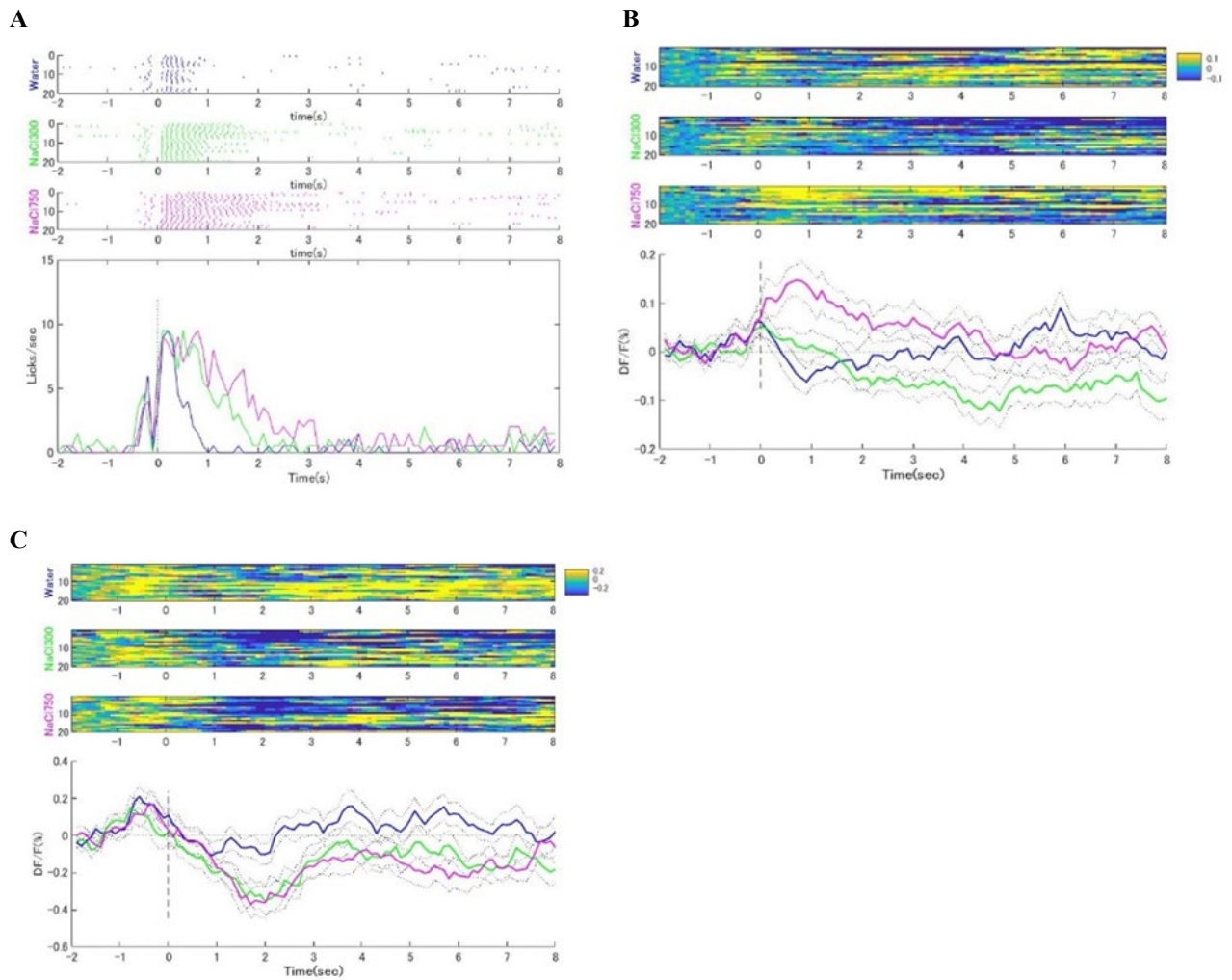


Fig. 3. Licking rate (A), dopamine change (B) and calcium change (C) in the nucleus accumbens of a water-depleted mouse after random presentation of MilliQ water (blue), 300 mM NaCl (green), or 900 mM NaCl (magenta) in the licking operant task.

5. 今後の課題

今回、食塩の濃度依存的な嗜好性に側坐核のドーパミン変動と間接路の神経活動が関与していることを示した。今後、D1-Creトランスジェニックマウスを用いて、直接路の神経活動を調べていく。これにより、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直接路/間接路の神経活動の関係を、側坐核のドーパミンとカルシウムの同時イメージングにより明らかにしていきたい。

さらにドーパミン細胞、直接路、間接路の神経活動がどのように食塩の濃度依存的な嗜好性を制御しているかを光遺伝学的手法あるいは化学遺伝学的手法を用いて、

目的の神経細胞特異的な活動制御を行うことで明らかにしていく。

食塩の濃度依存的な嗜好性は体内環境によって変化することを示した。このことは体内環境を一定に保とうとする恒常性機構として捉えられる。そこで、恒常性機械学習を用いた数理モデルによる解析を進めており⁵⁾、食塩の濃度依存的な嗜好性の理論的再構成を目指す。

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. Lundy, R. F., Blair, M., Horvath, N. & Norgren, R. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. *Physiol. Behav.* 78, 449–458 (2003).
 4. 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).
 5. Uchida Y, Hikida T, Yamashita Y. Computational mechanisms of osmoregulation: a reinforcement learning model for sodium appetite. *bioRxiv* (2021)

Exploring the Neural Basis of Salt Preference from Neural Circuit Control and Computational Theory

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 established the licking operant task for mice and attempted dopamine and calcium imaging of the NAc 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 and decreased under the salt-depleted condition and the water-depleted condition, respectively. In contrast, the amount of calcium change in the NAc indirect pathway neurons was found to be decreased and increased under the salt-depleted condition and the water-depleted condition, respectively.

In the future, we would like to clarify the relationship between salt concentration-dependent preference and dopamine changes in the NAc and neural activities in the direct and indirect pathways during normal, low-salt, and high-salt conditions using dopamine and calcium imaging in the NAc. In addition, we will clarify how the dopaminergic neurons and the direct and indirect pathways control in the salt concentration-dependent preference by target-specific control of neural activity using optogenetics and chemogenetics. We also try computational analysis using a homeostatic machine learning model for salt concentration-dependent preference.