

体内環境による食塩嗜好性変化の神経基盤をイメージングと理論から探る

疋田 貴俊

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。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。特に、中脳の腹側被蓋野にあるドーパミン細胞は価値情報をコーディングすることが知られており、投射先の側坐核にドーパミンを放出する。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、マウス腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムイメージングによる神経活動記録と側坐核のドーパミンイメージングを行った。

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ることで、これまで困難であった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通常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通常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。

食塩水摂取中のマウス腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウム変化量と側坐核のドーパミン変化量の測定の結果、水制限条件では、食塩水によって腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムと側坐核ドーパミンはともに減少し、塩制限条件では腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムと側坐核ドーパミンはともに上昇した。このことから腹側被蓋野ドーパミン神経細胞が側坐核に放出するドーパミンの変動は体内環境依存的な食塩嗜好性変化に関連することが示された。

本研究結果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。そこで今後は、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。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⁾。特に、中脳の腹側被蓋野にあるドーパミン細胞は価値情報をコーディングすることが知られており、投射先の側坐核にドーパミンを放出する⁽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、マウス腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムイメージングによる神経活動記録と側坐核のドーパミンイメージングを行った。

2. 研究方法

2.1 研究対象

ドーパミントランスポーター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(DAT-Cre マウス, 8~12 週齢) 16 匹(オス 9 匹, メス 7 匹)および C57BL/6J 系統のオスマウス(8 週齢)を用いた。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。

2.2 リッキング行動課題

2 日間, 飲水を制限した後に, 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(Fig. 1a)。次の日に, 変動するインターバル時間(平均 20 秒)経過後のリッキングによって, スクロース(300 mM)あるいはキニーネ(1 mM)のいずれかが与えられるリッキング行動課題を行い, リッキング回数を記録した(実験 1, Fig. 1b, d)。次に 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い, リッキング回数を記録した(実験 2 および実験 3, Fig. 2a, c, 3b)。次にエサを 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。さらに, 塩摂取制限を解除し, 再度水制限下でのリッキング行動課題を行った(Fig. 2a)。

2.3 腹側被蓋野ドーパミン細胞のカルシウムイメージング

DAT-Cre マウスの腹側被蓋野に Cre 依存的に蛍光カルシウムセンサー GCaMP8s を発現させるウイルスベクター(AAV9-hSyn-FLEX-jGCaMP8s)を注入し, 同時にイメージングファイバーを埋め込んだ(実験 1 および 2, Fig. 1b, 2b)。手術後 2 週間経ったマウスに対して, リッキング行動課題を行い, 蛍光強度の変化率を Z-score で示した。

2.4 側坐核におけるドーパミンイメージング

C57BL/6J マウスの側坐核に蛍光ドーパミンセンサー GRABDA2m⁽⁴⁾の遺伝子配列を含むウイルスベクター(AAV9-hSyn-GRABDA2m)を注入し, 同時にイメージングファイバーも埋め込んだ(実験 3, Fig. 3a)。手術後 2 週間経ったマウスに対して, リッキング行動課題を行い, 蛍光強度の変化率を Z-score で示した。

2.5 ENaC 阻害実験

ENaC (epithelial sodium channel) のリッキング行動課題への効果を調べるために, ENaC アンタゴニストである amiloride hydroride (東京化成, 0.1 mM) を, MilliQ 水, 低濃度の食塩水(NaCl 300 mM), 高濃度の食塩水(NaCl 750 mM)のそれぞれに混入し, リッキング行動課題を行なった。

3. 研究結果

3.1 リッキング行動課題の確立(実験 1)

まず本研究で用いるリッキング行動課題が嗜好性行動を反映しているかを調べるために, スクロースあるいはキニーネをランダムに提示して, リッキング行動を測定した(実験 1, Fig. 1)。水制限時に, スクロースあるいはキニーネを平均 20 秒ごとにランダムに与え, 提示後のリッキング回数を測定した(Fig. 1a, c, d)。スクロース提示後には継続的なリッキング行動が観察された(Fig. 1e 青線)。それに対して, キニーネ提示後は速やかにリッキング行動の抑制が観察された(Fig. 1e 赤線)。この時の腹側被蓋野ドーパミン細胞のカルシウムイメージングを行った(Fig. 1b)。スクロース提示後にはカルシウム濃度上昇が見られるのに対して, キニーネ提示後にはカルシウム濃度低下が観察された(Fig. 1f)。これらの結果はリッキング行動により味覚による嗜好性行動を定量化することができ, また定量化した嗜好性行動は腹側被蓋野ドーパミン細胞の神経活動と相関していることから, 嗜好性行動を定量化するリッキング行動課題の確立を確認した。

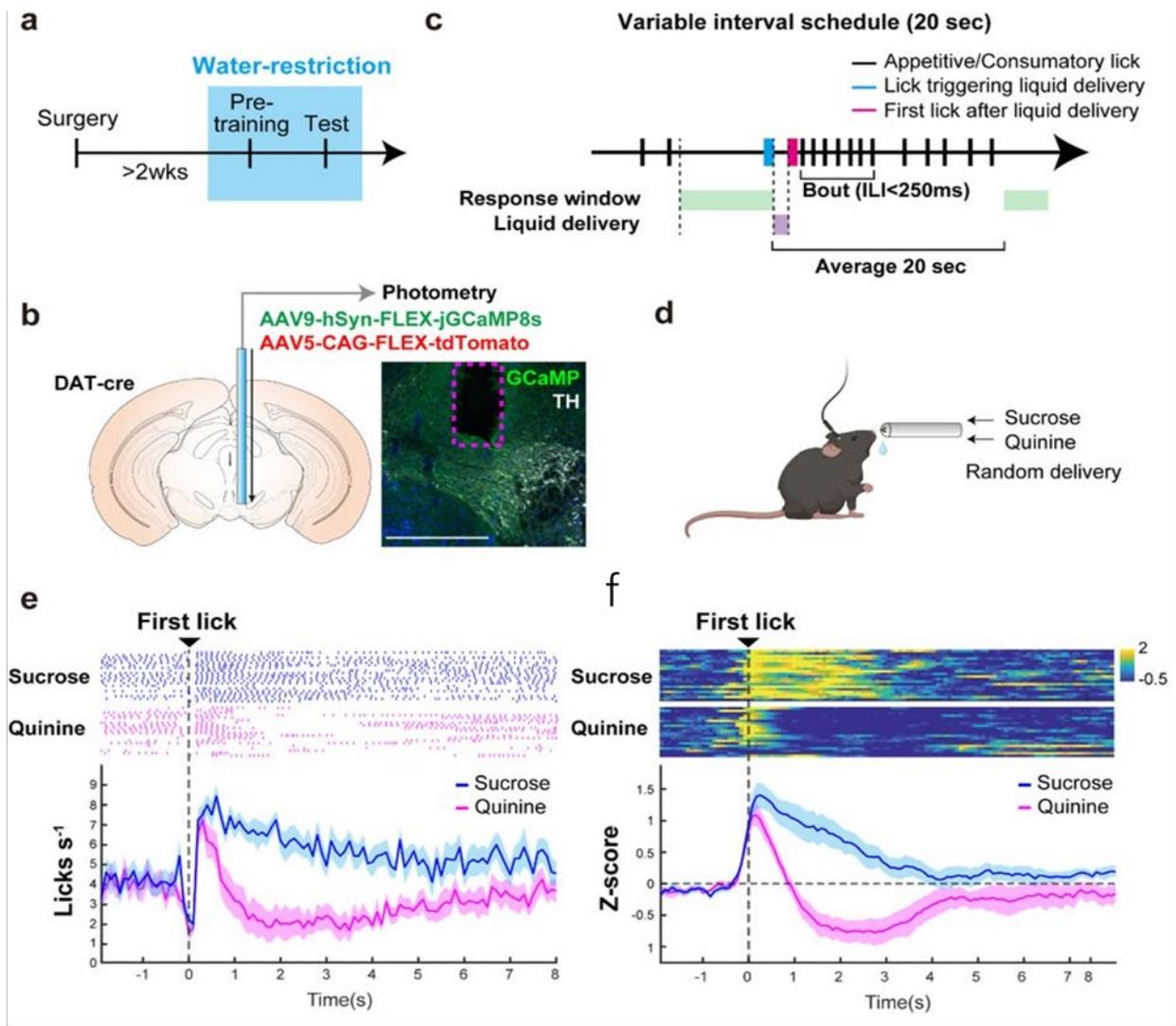


Figure 1. Licking response and neural response of midbrain dopamine neuron to sweet and bitter tastants. a. Schedule of training and testing in a single-drop brief access test. b. Fiber photometry recording of calcium activity in the VTA dopamine neurons. c. Structure of our single-drop brief access test with VI20 schedule. The first lick in the response window was followed by liquid (sucrose or quinine) delivery. d. In-vivo fiber photometry recording of neural response in dopamine neurons evoked by liquid ingestion in free-moving mice. e. Peri-event time histograms (PETHs) of averaged licking behavior and the raster plots of licking exhibited by an example animal. f. PETHs of averaged z-score of dopamine neuron activity. Heatmaps show the activity of dopamine neuron in an example animal.

3. 2 体内環境による食塩嗜好性変化と腹側被蓋野ドーパミン細胞の神経活動(実験 2)

次にマウスに水制限あるいは塩摂取制限を行い、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(実験 2, Fig. 2a, c)。同時に腹側被蓋野ドーパミン細胞のカルシウムイメージングを行った(Fig. 2b)。水制限時では、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. 2d, f)。この時の腹側被蓋野ドーパミン細胞のカルシウム変化量を測定すると、MilliQ水ではカルシウム濃度上昇が継続するのに対して、750 mM食塩水ではカルシウム濃度減少が確認された(Fig. 2g, i)。一方、塩摂取制限下では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. 2e)、750 mM食塩水ではカルシウム濃度上昇が継続するのに対して、MilliQ水ではカルシウム濃度減少が確認された(Fig. 2h)。

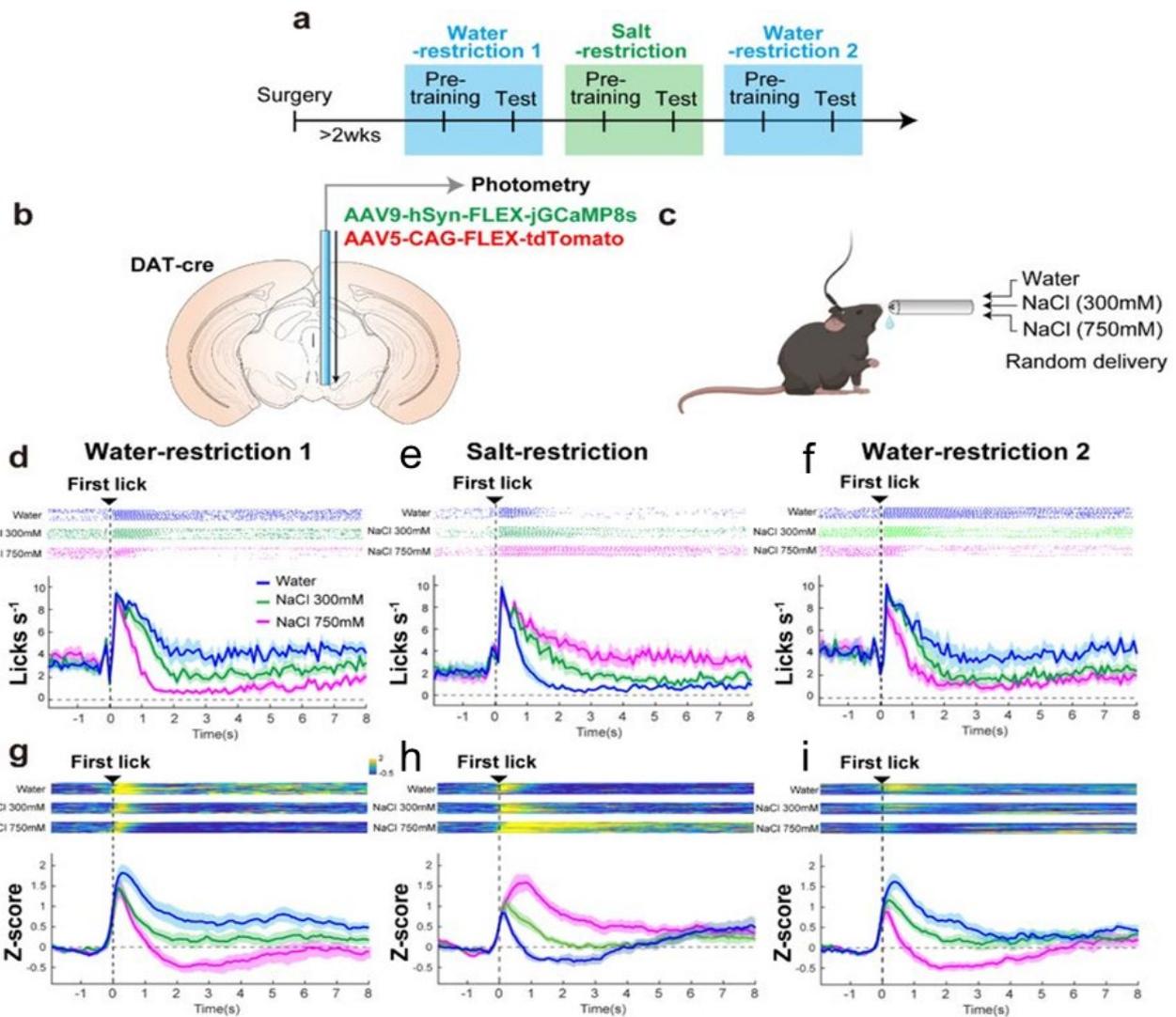


Figure 2. State-dependent preference/aversion and bidirectional response of midbrain dopamine neurons to water or salt intake. a. Schedule of training and testing for state-dependent preference and aversion to water or salt. b. Fiber photometry recording of calcium activity in the VTA dopamine neurons. c. In-vivo fiber photometry recording of neural response in dopamine neurons evoked by liquid ingestion in free-moving mice. d-f. PETHs of averaged licking behavior and raster plots of licking exhibited by an example animal. g-i PETHs of averaged z-score of dopamine neuron activity with the heatmaps of an example animal.

3. 3 体内環境による食塩嗜好性変化と側坐核におけるドーパミンイメージング(実験 3)

ドーパミン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(実験 3, Fig. 3a, b, c, e)。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. 3f, h)。

一方、塩摂取制限下では 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. 3d), 750 mM 食塩水ではドーパミン増加が確認された(Fig. 3g)。

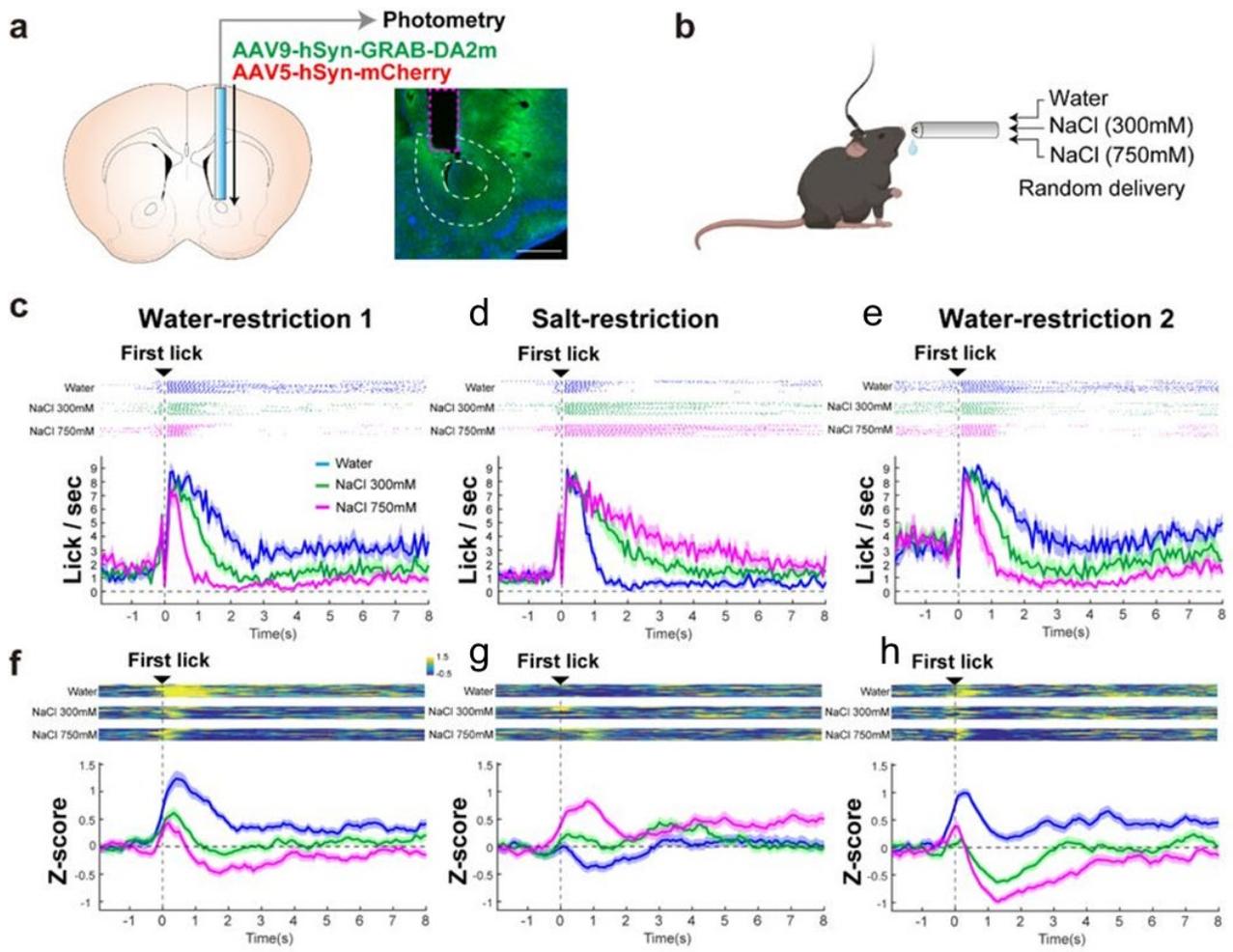


Figure 3. State-dependent bidirectional change of dopaminergic response to water or salt ingestion in the NAc. a. Fiber photometry recording of dopamine change in the NAc. b. In-vivo fiber photometry recording in free-moving mice. c-e. PETHs of averaged licking behavior and raster plots of licking exhibited by an example animal. f-h. PETHs of averaged z-score of the dopamine change with the heatmaps of an example animal.

3. 4. 体内環境による食塩嗜好性変化への ENaC 阻害による効果(実験 4)

食塩報酬に舌の味蕾細胞における ENaC 経路の Na イオン流入が必須であることが知られている⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾。そこで、本研究で行なったリッキング行動課題における体内環境による食塩嗜好性変化への ENaC 阻害による効果を調べた(実験 4, Fig. 4)。ENaC アンタゴニストである

Amiloride を投与すると、塩摂取制限下での食塩嗜好行動が消失し、MilliQ と同等のリッキング回数となった (Fig. 4d)。それに対して、水制限時のリッキング行動課題において、高濃度の食塩水に対するリッキング回数減少に対しては、Amiloride 投与の影響は見られなかった (Fig. 4b)。

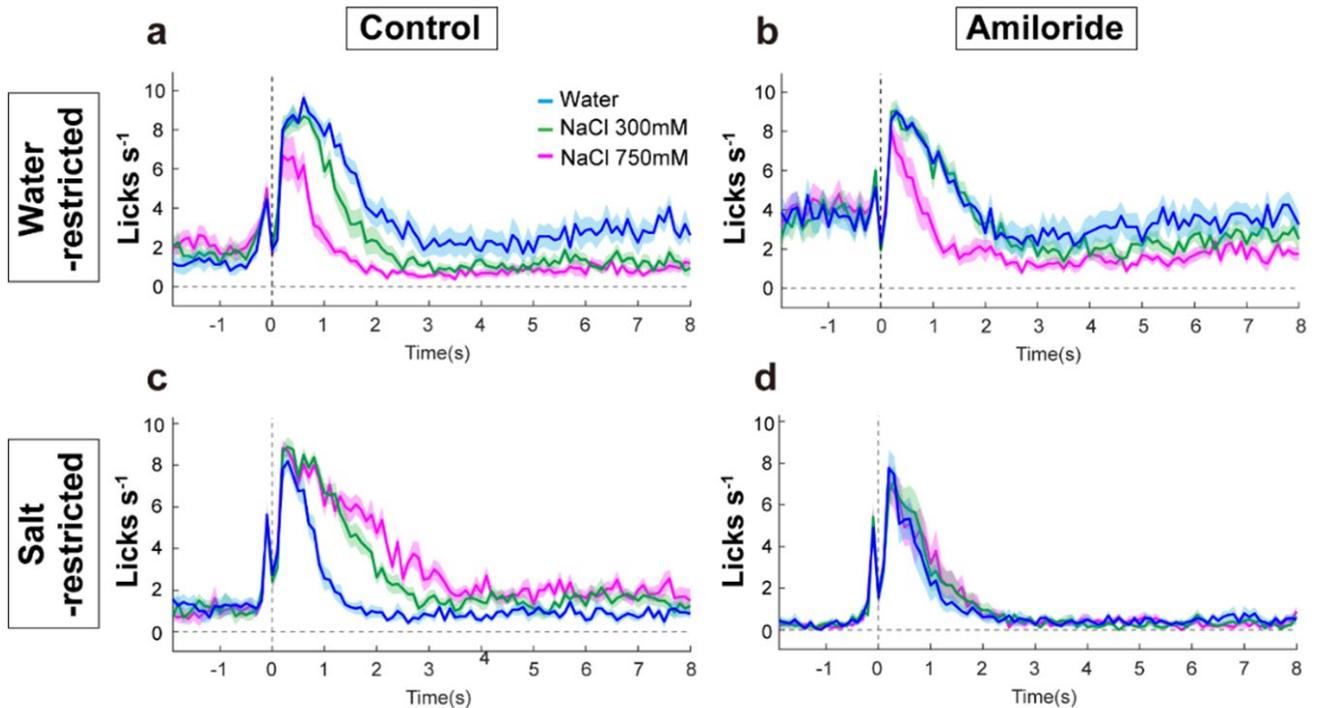


Figure 4. The effect of amiloride on water and salt intake.

Amiloride greatly reduced rewarding salt intake but the effect on salt-aversion was limited. a-d. PETH of licking responses with or without amiloride under water- or salt-restriction.

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、マウス腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムイメージングによる神経活動記録と側坐核のドーパミンイメージングを行った。

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ることで、これまで困難であった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。

食塩水摂取中のマウス腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウム変化量と側坐核のドーパミン変化量の測定の結果、水制限条件では、食塩水によって腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムと側坐核ドーパミンはともに減少し、塩制限条件では腹側被蓋野ドーパミン神経細胞のカルシウムと側坐核ドーパミンはともに上昇した。これ

までの研究で、腹側被蓋野ドーパミン神経細胞の神経活動と側坐核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腹側被蓋野ドーパミン神経細胞の神経活動と側坐核ドーパミンの変動はこれらの結果と一致している。このことから腹側被蓋野ドーパミン神経細胞が側坐核に放出するドーパミンの変動は体内環境依存的な食塩嗜好性変化に関連することが示された。

食塩報酬に舌の味蕾細胞における ENaC 経路の Na⁺ イオン流入が必須である^{(5) (6)}。本研究においても、ENaC アンタゴニストである Amiloride の投与により、塩摂取制限下での食塩嗜好行動が消失した。それに対して、水制限下での高濃度の食塩水に対する嫌悪行動に対しては、ENaC 阻害の効果は見られなかった。食塩に対する嫌悪に関しては、苦味受容体や塩素チャネルの関与が指摘されており^{(7) (8)}、ENaC 以外の分子機構が考えられる。

5. 今後の課題

今回、食塩の濃度依存的な嗜好性に腹側被蓋野ドーパミン神経細胞の神経活動と側坐核ドーパミンの変動が関与していることを示した。側坐核にはドーパミン D1 受容

体を発現する直接路とドーパミン D2 受容体を発現する間接路の大きく 2 つの神経回路があり, ドーパミンが 2 つの回路の切り替えを行なっている⁽²⁾。今後, 食塩の濃度依存的な嗜好性変化と側坐核の直接路/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⁽⁹⁾、⁽¹⁰⁾、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. Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 101–118, 2020.
2. Wang X, Zhang X, Dong X, Samie M, Li X, Cheng X, Goschka A, Shen D, Zhou Y, Harlow J et al. TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell* 151: 372–383, 2018.
3. Chauhan S, Kumar S, Jain A, Ponpuak M, Mudd MH, Kimura T, Choi SW, Peters R, Mandell MA, Bruun JA et al. TRIMs and Galectins globally cooperate and TRIM16 and Galectin-3 co-direct autophagy in endomembrane damage homeostasis. *Dev Cell* 39: 13–27, 2016.
4. Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y et al. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J* 32: 2336–2347, 2013.
5. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325: 473–477, 2009.
6. Radulovic M, Schink KO, Wenzel EM, Nähse V, Bongiovanni A, Lafont F, Stenmark H. ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J* 37: e99753, 2018.
7. Uchimoto T, Odake S, Ueno T, Kitoh K, Tadano K, Yamashita T. A novel lysosomotropic agent, L-leucyl-L-leucine methyl ester, induces apoptosis of macrophages via a lysosomal rupture-dependent pathway. *Immunology* 98: 175–182, 1999.
8. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141: 1146–1158, 2020.
9. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* 79: 701–732, 2010.
10. Tamaskovic R, Bichsel SJ, Hemmings BA. NDR family of AGC kinases--essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS Lett* 546: 73–80, 2003.
11. Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 25–42, 2020.
12. Brummer T, Larance M, Herrera Abreu MT, Timpson P, Emmerich CH, Drew K, Wiede F, Grewal T, Pearson RB, Tiganis T et al. Phosphorylation-dependent interaction between STK38 and DOK1 coordinates the lysosomal response to membrane damage. *Mol Cell Biol* 30: 2206–2219, 2010.
13. Boyle KB, Hawkins RE, Alan JK, Timpson P, Schofield CJ, Parkes D, Green DR. TECPR1 is an ATG8 E3-like ligase involved in noncanonical lipidation. *Nat Cell Biol* 25: 73–84, 2023.
14. Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, Wang TW, Sugiura Y, Matsumoto M, Suzuki N, Yamashita S, Kimura A, Nagao K et al. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* 371: 265–270, 2021.

Exploring the Neural Basis of Internal Environment Dependent Salt Preference from Imaging and Theory

Takatoshi Hikida

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. In particular, dopamine cells in the ventral tegmental area of the midbrain are known to code value information and release dopamine into the nucleus accumbens, the projection target. In the present study, to investigate the brain basis of concentration-dependent preference for salt, we recorded neuronal activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of mice by calcium imaging and dopamine imaging of the nucleus accumbens using fiber photometry.

In this study, we attempted to measure the aversive and rewarding effects of saline solution, which has been difficult to measure, by using a task in which normal water and saline solution are presented randomly. The results showed that under water restriction, the number of licking reactions to the high-concentration saline solution decreased compared to that to the normal water, while under salt restriction, licking reactions to the high-concentration saline solution increased compared to that to the normal water. This result indicates that both aversive and rewarding effects of salt can be measured using this task.

Fiber photometry recordings revealed that dopamine neurons in the ventral tegmental area and the dopamine release in the nucleus accumbens flexibly showed bidirectional excitatory and inhibitory response to water and salt intake in a state-dependent manner. These results indicate that fluctuations in dopamine released by dopaminergic neurons in the ventral tegmental area to the nucleus accumbens are associated with changes in salt preference that are dependent on the environment in the body.

The present results can be regarded as a homeostatic mechanism that attempts to maintain a constant internal environment. In the future, we will analyze the results using a mathematical model based on homeostatic machine learning and aim to theoretically reconstruct the concentration-dependent preference for salt.