

도파민 뉴런들의 광유전학적 활성화가 변별 공포 기억에 미치는 영향*

조 용 상^{1),2)}

최 준 식^{1)*}

¹⁾고려대학교 심리학과

²⁾Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, University of Washington, Seattle

강화학습에 중요한 역할을 한다고 알려진 중뇌의 도파민 뉴런들이 전기충격과 같은 혐오자극을 이용한 학습에도 기여한다고 보고되었다. 특히 도파민 뉴런들은 혐오자극과 연합된 자극이 제시되었을 때 억제되거나 활성화되는 상이한 반응을 보인다고 알려졌다. 유전자 조작을 통해 이 두 가지 도파민 반응 중에서 혐오연합자극에 대한 활성화 반응만 선택적으로 저하시킨 동물들을 공포스러운 경험에 노출시키면, 이후 일반화된 불안행동이 유발된다고 보고되었다. 따라서 역으로 혐오연합자극을 제시하는 동안 다수의 도파민 뉴런들을 인위적으로 활성화시켜 현저성 표상을 높이면 변별 공포조건화의 학습을 향상시킬 가능성이 있다. 본 연구에서는 이 가설을 검증해 보기위해서 특정 조건자극(CS+)과 전기충격을 연합시키고 다른 자극(CS-)과는 연합시키지 않는 공포학습을 진행하는 동안 두 CS중 하나의 CS를 선택하여 해당 CS를 제시할 때 광유전학적으로 도파민 뉴런들을 활성화시켰다. 이후, CS+와 CS-만을 번갈아 제시하는 기억검사를 실시하면서 공포반응을 측정하였다. 도파민 뉴런들을 활성화시키지 않았던 통제집단은 두 CS에 동등한 수준의 동결반응을 보였으나, 도파민을 활성화시켰던 동물들은 CS-에 비해 CS+에 유의미하게 높은 공포반응을 보였다. 이러한 변별력 향상은 도파민 뉴런들이 공포 조건화 과제동안 자극 일반화에 기여함을 시사한다.

주제어 : 도파민, 공포조건화, 광유전학

* 이 논문은 BK21 플러스 사업 및 한국연구재단을 통해 미래창조과학부의 뇌과학원천기술개발사업으로부터 지원받아 수행되었음(NRF-2015M3C7A031395).

† 교신저자 : 최준식, 고려대학교 심리학과, (02841) 서울특별시 성북구 안암로 145

Email : j-schoi@korea.ac.kr

‘자라보고 놀란 가슴 솥뚜껑 보고 놀란다’라는 속담에서 보듯이, 놀람 또는 공포와 같은 정서반응은 실제 혐오자극뿐만 아니라 이와 유사성을 가지는 다른 자극에 의해서도 유발될 수 있다고 익히 알려져 있다. 이러한 자극 일반화는 혐오자극 또는 위협한 상황에 직접 노출되지 않고도 적응적인 방어반응을 수행할 수 있게 해준다는 점에서 개체에게 유익하다. 그러나 과잉 일반화는 중성적 자극에도 비정상적으로 지나친 공포반응을 보이는 불안장애, 공황장애, 그리고 외상 후 스트레스 장애 등을 초래할 수 있다(Kheirbek, Klemenhagen, Sahay, & Hen, 2012; Lissek et al., 2014). 기존의 연구결과에 따르면 자극 일반화 현상은 공포반응의 중추적인 역할을 하는 편도체(amygdala)와 감각신호를 전달하는 기관들 사이의 흥분성 시냅스 연결 강도가 증가하여, 혐오자극과 유사한 자극들에 편도체가 쉽게 활성화 되어 일어나는 것으로 알려졌다(Han et al., 2008; Shaban et al., 2006). 이외에도 중뇌의 도파민 시스템이 자극 일반화에 기여하고 있다는 결과가 보고되었다(Zweifel et al., 2011). 그러나 도파민 뉴런들이 공포조건화시 자극 변별이나 일반화에 어떤 역할을 하는지 이해하기 위한 후속연구가 필요한 상황이다.

중뇌의 도파민 뉴런들은 뇌 보상회로의 핵심적 역할을 한다고 널리 알려져 있다(Berridge & Robinson, 1998; Fields, Hjelmstad, Margolis, & Nicola, 2007; Wise, 2004). 소리와 같은 감각자극과 보상물을 짝지어 제시하는 파블로프 조건화 과제시 이 뉴런들 우선 보상물에만 활성화되는 반응을 보인다(Clark et al., 2010; Day, Roitman, Wightman, & Carelli, 2007; Schultz,

Dayan, & Montague, 1997). 이후 두 자극들 간의 연합 학습이 충분히 이루어지면 동일한 뉴런들은 더 이상 보상물에 반응하지 않고 이 보상과 연합된 감각자극에 활성화 된다. 만약 이 감각자극에 의해 예측된 보상의 가치보다 실제로 받은 보상의 가치가 높을 시 도파민 뉴런들은 보상물에 다시 활성화되고, 반대로 실제로 받은 보상의 가치가 낮을 시 보상물에 일시적으로 억제되는 반응을 보인다. 이러한 도파민 뉴런들의 반응패턴은 기계 학습 분야에서 학습신호로 쓰인다고 알려진 보상예측오류(reward prediction error)와 동일하다고 알려졌다(Montague, Dayan, & Sejnowski, 1996; Sutton & Barto, 1981). 따라서 도파민 뉴런들은 예측오류를 다른 뇌 구조물들에 전파하여 강화학습을 일으킨다고 여겨진다.

이런 도파민 뉴런들이 혐오자극을 이용한 조건화 과제동안 어떻게 발화하는지 관찰해보면, 예측에 비해서 실제로 경험한 혐오자극의 강도가 크면 억제되고 강도가 작으면 활성화되는 등 예측오류를 지속적으로 표상하였다(Cohen, Haesler, Vong, Lowell, & Uchida, 2012; Matsumoto & Hikosaka, 2009). 그러나 강화물과 연합된 감각자극에 일관되게 활성화되는 반응을 보이는 도파민 뉴런들이 혐오자극과 연합된 감각자극에 대해서는 어떤 뉴런들은 억제되고 또 다른 뉴런들은 활성화되는 두 가지 상이한 반응패턴이 밝혀졌다(Brischoux, Chakraborty, Brierley, & Ungless, 2009; Matsumoto & Hikosaka, 2009). 이러한 결과를 토대로 보상 연합자극에 활성화되고 반대로 혐오연합자극에 억제되는 도파민 뉴런들은 발화 방향성을 통해 연합자극의 정적 또는 부정적 가치를 표

상하고, 반면 보상연합자극과 혐오연합자극에 동일하게 활성화되는 도파민 뉴런들은 가치와 상관없이 생물학적으로 중요한 사건들을 예측하는 감각자극에 흥분성 반응을 보임으로써 이 예측자극에 부여된 주의 및 각성 수준을 나타내는 현저성(salience)을 표상한다고 제안되었다(Bromberg-Martin, Matsumoto, & Hikosaka, 2010). 이 두 부류의 뉴런들은 중뇌 도파민 시스템에 서로 공존하며 가치와 현저성을 동시에 다른 뇌 구조물에 전달하여 연합학습에 기여하는 것으로 여겨진다.

도파민 뉴런들의 두 가지 표상 중 현저성 표상이 저하되면 일반화된 공포반응을 보인다는 결과가 보고되었다(Zweifel et al., 2011). 구체적으로 유전자 변형을 통하여 도파민 뉴런들에서 NMDA 수용체를 선택적으로 발현하지 못하도록 하면, 혐오자극에 대한 억제성 도파민 반응은 정상적으로 유지되지만 흥분성 활성화 반응은 감소되었다. 이 동물들이 공포 조건화를 경험하게 되면 자극 일반화가 일어나 무분별한 불안반응을 보이는데, 이는 공포 조건화시 사용된 예측자극의 현저성 표상이 저하되어 혐오자극과 연합된 감각자극과 그렇지 않은 감각자극을 변별하지 못해 초래된 것으로 판단된다. 따라서 혐오연합자극이 제시될 때 도파민 뉴런들을 인위적으로 활성화시켜 현저성 표상을 증가시키면, 이 사전자극에 대한 주의 및 각성 수준이 높아져 앞으로 나올 혐오자극과의 연합을 촉진시킬 가능성이 있다. 이 가설을 검증하기 위하여 본 연구에서는 발바닥 전기충격과 연합된 청각 조건자극(CS+)와 연합되지 않은 청각자극(CS-)을 이용한 공포 조건화 훈련시 특정 CS가 제시되는

동안 광유전학적으로 복측 피개 영역(ventral tegmental area, VTA)의 도파민 뉴런들을 활성화시켰다. 정상 동물들이 CS+와 CS-를 구분하지 못하고 일반화된 공포반응을 보인다고 알려진 전기충격 강도를 사용하여(Laxmi, Stork, & Pape, 2003), 과연 도파민 뉴런의 활성화가 두 CS에 대한 구별을 향상시켜 변별화된 공포 반응을 일으킬 수 있는지 여부를 확인하였다.

방 법

피험동물 도파민 수송체(dopamine transporter, DAT)의 유전자 발현시 Cre 재조합효소(recombinase) 또한 발현될 수 있도록 고안된 DAT-Cre 마우스(C57BL/6J 계통; 와싱턴대학교 Larry Zweifel 교수 연구실)를 사용하였다. 이 Cre는 도파민 뉴런들에서만 발현되며, 뉴런들이 기능하는데 해를 끼치지 않는다고 알려졌다(Pfeifer, Brandon, Kootstra, Gage, & Verma, 2001; Zhuang, Masson, Gingrich, Rayport, & Hen, 2005). 총 14마리의 암수 마우스들을 온도와 습도가 일정하게 유지되는 환경에서 한 케이지당 3-5마리씩 집단으로 사육하였다.

시술 Isoflurane을 이용하여 흡입마취후 입체 뇌수술장비(Model 1900, Kopf Instruments)에 동물의 뇌를 고정시켰다. 두피를 절개하고 목포 부위의 두개골 표면에 구멍을 만들었다. 브레그마에서 후측으로 3.25mm, 좌측으로 0.5mm, 그리고 복측으로 4.5mm에 위치한 VTA에 0.5 μ l의 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus; AAV)를 정밀 주사기(7105KH, Hamilton Company)를 통해 주입하였다(그림 1A). 7마리

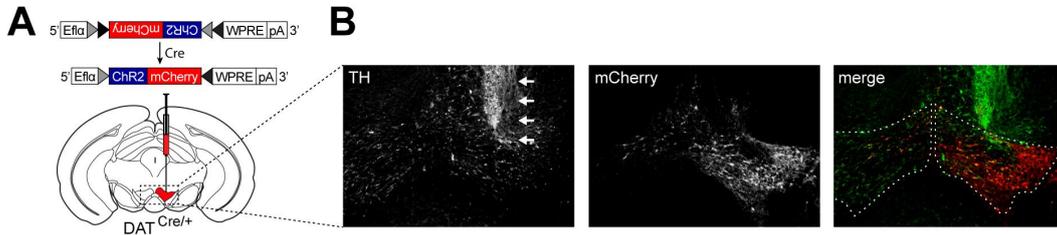


그림 1. 도파민 뉴런들의 ChR2 발현. A, ChR2와 mCherry유전자를 담고 있는 AAV를 DAT-Cre 마우스의 왼쪽 VTA에 주입. Cre를 발현하는 VTA 뉴런들은 재조합 반응을 거쳐 ChR2와 mCherry를 발현하게 된다. B, VTA의 도파민 뉴런들(TH)과 ChR2-mCherry를 발현하는 뉴런들을 면역조직화학 기법으로 염색. 화살표는 AAV투여용 주사기 또는 광섬유에 의해 생긴 손상부위를 보여준다. 오른쪽 사진의 하얀색 점선은 VTA영역을 표시한다.

의 마우스들에게는 파란 빛에 반응하는 흥분성 수용체(channelrhodopsin, ChR2)와 적색 형광 단백질(mCherry)을 발현시키기 위한 유전자를 함유한 AAV를, 다른 7마리의 마우스들에게는 ChR2없이 mCherry유전자만을 가진 AAV를 넣었다. 바이러스들이 널리 확산되도록 투여시간으로부터 10분간 주사기를 움직이지 않고 기다린 다음 주사기를 제거하였다. 투여지점보다 0.5mm 위에 광섬유를 위치시키고 2개의 지지용 나사와 치과용 시멘트로 고정시켰다. 시술 후 ChR2와 mCherry가 충분히 발현될 수 있도록 2주간의 회복시간을 부여하였다.

실시간 장소선호 과제 동일한 크기(30 × 30 × 30cm)의 두 구역으로 이루어진 흰색 아크릴 상자를 사용하여 이 과제를 수행하였다. 동물들이 두 구역을 잘 식별하도록 서로 상이한 시각자극들로 꾸며 놓았다. 473nm 파란색 레이저 빛과 연합시킬 구역을 무작위로 선택한 다음, 마우스를 빛 자극을 제시하지 않는 장소에 내려놓고 20분간 자유롭게 두 구역을 탐색하도록 두었다(그림 2B). 동물의 네 발이 빛

과 연합된 방 안에 들어가면 20Hz의 파란 빛(10ms 펄스, ~30mW/mm² 강도)을 VTA에 지속적으로 비추어 주었다(그림 2A). 동물의 행동을 비디오카메라로 기록하였고, 두 장소에서 머문 시간과 움직인 경로를 영상 추적 소프트웨어(Ethovision, Noldus Information Technology)로 분석하였다.

변별 공포조건화 실시간 장소선호 과제를 마치고 3일 후 변별 공포조건화 실험을 투명한 아크릴 상자(21.6 × 17.8 × 12.7cm, ENV-307W, Med Associates)에서 진행하였다. 이 상자의 바닥에는 0.8cm 간격으로 스테인리스 스틸 그리드를 배열하여 US로 사용될 전기자극을 제시할 수 있도록 마련하였다. 상자의 한쪽 벽면에는 CS용 청각 자극들을 들려 줄 스피커를 설치하였다. 또한 상자의 위에는 비디오카메라를 부착하여 마우스의 움직임을 기록할 수 있도록 하였다. 실험 첫째 날은 마우스들이 실험 장비에 적응하도록 개별적으로 상자에 넣고 60분 동안 탐색하는 시간을 주었다. 그 다음날 도파민 뉴런들을 광유전학적으로 활성화

화시키면서 변별 공포 조건화를 진행하였다 (그림 3A). 10kHz와 20kHz의 소리자극을 무작위로 CS+ 또는 CS-로 배정하고, 마우스당 어떤 CS를 먼저 제시할지 임의로 선정하였다. 이후 각 CS당 10번씩 총 20번을 일정한 간격(90초)을 두고 번갈아 제시하였다. 두 CS는 10초간 지속되었으며, 이 중 CS+가 끝날 때에만 0.5mA의 강도로 0.5초간 발바닥 전기 충격을 가하였다. 또한 동일 집단내에서 대략 절반의 동물은 CS+를 다른 절반은 CS-를 제시하는 기간 동안 20 Hz의 파란 레이저 빛을 VTA에 비추어 주어 도파민 뉴런들을 활성화시켰다. 셋째 날은 우선 동물들이 두 CS에 대하여 변별화된 혹은 일반화된 공포반응을 보이는지 여부를 측정하기 위한 테스트를 새로운 배경에서 진행하였다. 그리드가 없는 새로운 흰색 플라스틱 공간(20 × 16 × 12cm)에서 CS+와 CS-를 각 3번씩 총 6번 순차적으로 제시하면서 동물들의 행동을 기록하였다. 테스트를 마치고 1시간가량이 지난 다음 두 번째 변별 공포조건화를 실시하였다. 그리고 그 다음 날 두 CS에 대한 변별 공포 반응을 최종적으로 테스트하였다. 공포반응의 측정치로서 마우스들이 두 CS가 제시되는 10초 동안 보인 동결 행동(freezing)을 사후분석하였다. 이를 위하여 Ethovision으로 동물들의 몸이 움직인 속도를 계산하였고, 이 속도가 0.5cm/sec미만으로 1초 이상 지속되면 동결반응으로 간주하였다.

면역조직화학 염색 모든 실험이 끝난 후 도파민 뉴런들의 ChR2발현 여부를 확인하기 위해서 조직검사를 실시하였다. 동물들에게 pentobarbital sodium를 복강주사 후 생리식염수

와 4% 포르말린 용액을 심장을 통해 환류하였다. 뇌를 꺼내 동일 포르말린 용액과 30% 설탕물에 2~4일씩 차례로 담근 후, 미세절편기를 이용하여 30 μ m 두께의 관상단면으로 잘랐다. 이후 면역염색기법으로 VTA의 도파민 뉴런들과 mCherry발현 도파민 뉴런들을 이중 염색하였다(그림 1B). 도파민 신경전달물질을 만드는 효소인 tyrosine hydroxylase의 일차항체(마우스 단일클론성 TH, 1:2000, Clontech)를 처리하여 도파민 뉴런들을 표지하였고, mCherry 염색을 위해서는 DsRed 항체(토끼 다중클론성, 1:2000, Millipore)를 사용하였다. DyLight488과 CY3 형광물질이 결합된 당나귀 항-마우스와 항-토끼를 이차항체를 사용하여 염색을 마무리하였다. 염색된 뇌절편들은 형광 현미경(Eclipse E600, Nikon)을 통해 관찰하였다.

결 과

광유전학적으로 VTA 도파민 뉴런들만 선택적으로 활성화시키기 위하여 도파민 수송체의 유전자 발현시 Cre 재조합효소가 발현되도록 고안된 DATCre/+ 마우스들(ChR2집단; n=7; 3 수컷, 4 암컷)의 VTA영역에 ChR2와 mCherry 유전정보가 두개의 lox유전자들 사이에 역방향으로 담긴 AAV를 주입하였다(그림 1A). AAV는 뉴런의 종류와 상관없이 투여장소 인근에 위치한 세포들을 감염시킬 수 있지만, 오직 Cre를 발현하고 있는 도파민 뉴런들만 Cre-lox 재조합 반응을 통해 ChR2와 mCherry 유전정보를 정방향으로 배열시켜 두 유전자의 단백질을 안정적으로 발현하게 된다. 이 마우스들의 도파민 뉴런들이 ChR2를 발현하는지 여부를

면역조직화학적 기법을 통하여 확인해 본 결과, mCherry 형광 단백질을 발현하고 있는 뉴런들의 위치와 TH면역염색에 양성반응을 보이는 뉴런들의 위치가 동일함을 확인하였다 (그림 1B). 이 결과는 ChR2이 VTA 도파민 뉴런들에서 선택적으로 발현하고 있음을 보여 준다.

도파민 뉴런들의 광유전학적 활성화는 강화 효과를 일으킨다고 알려져 있다(Adamantidis et al., 2011; Tsai et al., 2009). 따라서 본 실험에서 ChR2을 발현하는 도파민 뉴런들이 473nm 파란색 광선에 의해서 활성화되는지 여부를 실시간 장소선호 과제를 통해 검증해 보았다 (그림 2A, 2B). 동물들을 두 지역으로 나뉜 상자에 넣고 20분간 자유롭게 탐색하도록 하였다. 이때 동물의 네 발이 임의로 선택한 한 구역에 들어가면 20Hz의 레이저 빛을 VTA 영역에 지속적으로 비추어 주었다. ChR2이 제대로 작동한다면 파란 빛과 연합된 장소에서 강화효과로 인하여 마우스들이 오랜 시간 머물

것이라 예측되었다. 실제로 ChR2을 발현하고 있는 동물들은 대부분의 시간(평균 85%)을 빛과 연합된 장소에서 탐색하는데 할애하였다 (그림 2C). 통제집단으로서 동일한 시술 절차를 거쳤지만 ChR2없이 오직 mCherry만을 발현하도록 처치받은 동물들(mCherry집단; n=7; 4 수컷, 3 암컷)은 ChR2그룹과 달리 특정 지역에 대한 선호없이 두 지역을 거의 동등한 시간 (평균 45%)동안 탐색하였다. 두 집단의 행동결과를 t-검정을 통해 비교해 본 결과 ChR2 동물들이 빛과 연합된 장소에 유의미하게 높은 선호도를 보였다($t(12) = 11.16, p < 0.001$). 따라서 이 과제를 통해 도파민 뉴런들의 광유전학적 활성화가 효과적으로 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

실시간 장소선호 과제를 마치고 3일간의 휴식을 부여한 후 동일한 마우스들을 대상으로 변별 공포 조건화 실험을 진행하였다. VTA의 일부 도파민 뉴런들은 강화물이나 혐오자극과 연합된 CS이 제시되었을 때 이들의 가치와는

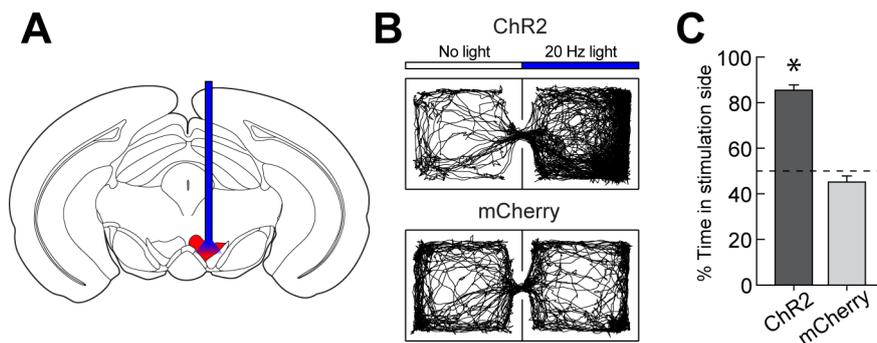


그림 2. 도파민 뉴런들의 광유전학적 활성화 효과 검증. A, AAV를 주입한 VTA에 20Hz의 파란 광선을 제시함. 광섬유에서 나온 빛은 부채꼴 모양으로 투사된다. B, 실시간 장소선호 과제동안 ChR2(n=7)와 mCherry집단(n=7)의 대표 동물들이 움직인 경로. 상자의 두 구역 중 오른쪽 지역에 마우스의 네발이 모두 들어가면 VTA에 파란 빛을 비추어 주었다. C, 총 20분 동안 빛이 비추어진 장소에 머문 시간 비율 (* $p < 0.001$).

상관없이 동일하게 활성화되는 반응을 보임으로써, 자극들이 주의나 각성을 불러일으키는 정도인 현저성을 표상한다고 보고되었다 (Matsumoto & Hikosaka, 2009; Bromberg-Martin et al., 2010). 만약 변별 공포조건화시 인위적으로 도파민 뉴런을 활성화시켜 특정 CS에 대한 현저성 표상을 증가시키면 변별 공포반응을 향상시킬 수 있을 것이라 가정하였다. 이러한 가설을 검증하기 위하여 전기자극과 연합된 청각 CS+와 그렇지 않은 다른 청각 CS-를 이용한 공포 조건화를 진행하는 동안 하나의 CS가 제시될 때마다 도파민 뉴런들을 광유전학적으로 활성화시켰다(그림 3A). 전기자극의 강도에 따라 변별화된 공포반응과 일반화된 공포반응을 유발시킬 수 있다는 이전 실험 결과를 참조하여(Laxmi et al., 2003), 본 실험에

서는 정상 마우스들이 일반화된 공포반응을 보이기 시작한다고 알려진 강도(0.5mA)를 사용하였다. 2일간의 변별 학습을 진행하는 동안 ChR2와 mCherry집단 모두 점차 높은 동결 반응을 보였으나(그림 3B; 반복측정변량분석; ChR2, $F(9,54) = 2.46, p = 0.02$; mCherry, $F(9,54) = 2.47, p = 0.02$), CS+와 CS-에 대해서 유의미하게 다른 공포반응을 보이지 않았다(ChR2, $F(1,6) = 0.09, p = 0.76$; mCherry, $F(1,6) = 0.21, p = 0.66$). 또한 대체적으로 낮은 수준의 동결반응을 보였는데, 이는 그림3B의 삽입된 도표에서도 나타나듯이 20Hz로 깜박이는 파란 레이저 빛과 함께 제시된 CS에 대해 대부분의 동물들이 동결반응을 전혀 보이지 않았기 때문이었다. 따라서 이러한 빛이나 조건화 환경 등이 동결행동에 미치는 영향

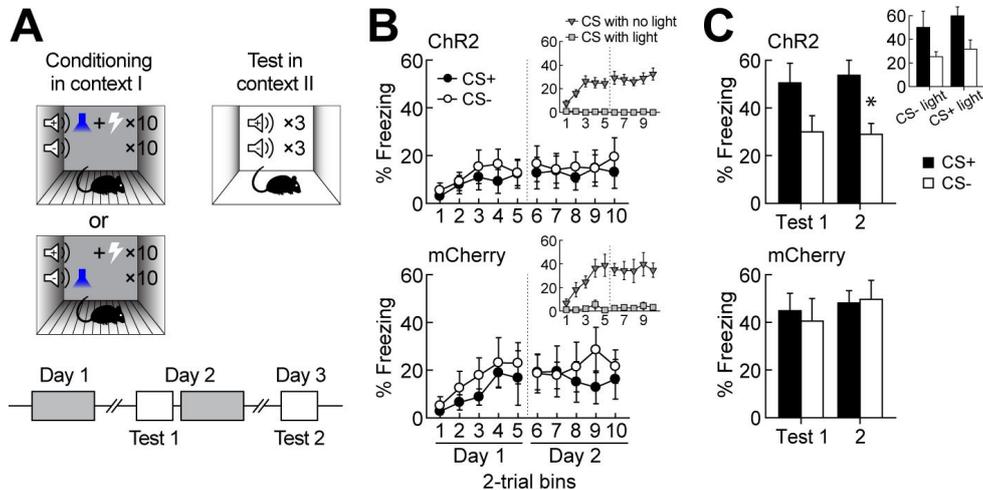


그림 3. 도파민 활성화가 변별 공포조건화에 미치는 영향. A, 변별 조건화 실험 절차. 각 집단내에서 CS+ 또는 CS-를 균등하게 선택하여 해당 CS를 20Hz 빛 자극과 함께 제시하는 변별 공포조건화를 2일간 환경I에서 진행하였다. 각 조건화를 마치고 다음 날 새로운 환경II에서 CS+와 CS-를 제시하며 공포반응을 측정하는 기억검사를 실시하였다. B, 변별 공포조건화시 CS에 대한 동결반응. 삽입된 그래프는 CS가 도파민 활성화와 같이 제시되었는지 아닌지 여부에 따른 동결반응을 보여준다. C, 기억검사동안 측정된 동결행동(* $p < 0.01$). 삽입 막대 그래프는 ChR2그룹 내에서 빛 자극과 함께 제시된 CS의 종류에 따라서 동결반응을 나누어 그렸다.

을 배제하고 두 CS에 대한 공포반응을 측정하기 위하여 매 변별 학습을 마친 다음 날 동물들을 새로운 환경에 위치시키고 3번씩 CS+와 CS-를 제시하는 기억검사를 실시하였다(그림 3C). 첫 번째 기억 검사에서 ChR2 집단은 대체로 CS+에 높은 공포반응을 그리고 CS-에 낮은 동결반응을 보이긴 하였지만, 대응표본 t-검정으로 분석한 결과, 통계적으로 유의미한 수준에 미치지 못하였다($t(6) = 2.05, p = 0.086$). 그러나 두 번째 기억검사에서는 CS+에 비해서 CS-에 대한 동결반응이 유의미하게 낮았다($t(6) = 4.7, p = 0.003$). 반면 mCherry 집단은 두 기억검사에서 CS+와 CS-에 동등한 수준의 동결행동을 보이며 변별화된 공포반응을 습득하는데 실패하였다($t(6) < 0.45, p > 0.67$). 이러한 결과들은 혐오자극과 연합된 CS가 어떤 것인지 구분하는 과제에서 도파민 뉴런들의 일시적 활성화가 변별 공포반응을 형성하는데 기여할 수 있음을 보여준다.

논 의

본 연구에서는 변별 공포조건화동안 인위적으로 도파민 뉴런들 활성화시키면 변별 수행 능력에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 도파민 뉴런들의 활성화는 광유전학적 방법을 채용하였고, 이를 위해 DAT-Cre 마우스의 VTA에 ChR2를 함유한 AAV를 주입하여 도파민 뉴런들만 선택적으로 ChR2를 발현하도록 만들었다. 동물들이 특정지역을 방문할 때마다 파란 빛을 도파민 뉴런들에 비추어주면 강화효과가 일어나 해당 지역을 선호하는 행동을 확인하여, 도파민 뉴런들의 광유전학적 활

성화가 잘 이루어짐을 검증하였다. 이후 동일 동물들이 변별 공포조건화를 수행하는 동안 CS+와 CS- 중 하나의 CS가 제시될 때 광유전학적으로 도파민 뉴런들을 활성화시키면서 동결반응을 관찰하였다. 예기치 않게 파란 빛과 함께 제시되는 CS에 대부분의 동물들이 동결반응을 보이지 않았다(그림 2B, 삽입). 비디오 카메라로 기록된 영상을 자세히 살펴본 결과 파란 레이저 빛과 CS가 제시되자 마우스들은 머리를 좌우로 움직이거나 몸 전체를 움직여 다른 장소로 이동하는 행동을 보였다. 이는 머리에 고정되어있는 광섬유와 광원에서 나온 케이블사이의 연결 틈새로 새어 나온 파란 빛이 동물들의 움직임을 유발한 것으로 판단된다. 파란 빛에 의해 도파민 뉴런들이 활성화되어 강화효과 때문에 몸을 움직였을 가능성도 있다. 그러나 도파민 뉴런들의 활성화와 상관없이 ChR2이나 mCherry그룹 모두에서 동결행동이 감소하였기 때문에 빛과 함께 제시된 CS에 대한 동물들의 움직임은 순수 파란 시각자극에 의해서 유발된 것으로 보인다. 따라서 광유전학을 이용한 연구시 새어 나오는 레이저 빛이 행동에 미칠 영향을 감안해야 하며, 동결행동을 관찰하는 등 움직임에 민감한 실험을 진행할 시 레이저 빛을 철저히 통제하는 것에 주의가 필요하다.

변별 공포조건화를 진행한 후 CS+와 CS-만을 제시하는 기억검사를 실시하여 학습성과를 평가하였다. 마우스에서 대략 0.5mA의 발바닥 전기충격은 일반화된 공포반응을 일으킨다는 선행 논문들과 일치하게(Baldi, Lorenzini, & Bucherelli, 2004; Laxmi et al., 2003), 통제집단인 mCherry그룹은 연합학습을 진행하는 동안 두

CS간에 변별화된 공포반응을 보이는데 실패하였다. 반면 ChR2그룹은 이틀간의 공포 조건화를 마치고 CS-보다 CS+에 유의미하게 높은 동결반응을 보였다. 또한 ChR2그룹 내에서 도파민 뉴런들의 활성화가 CS+와 짝지어지든 CS-와 짝지어지든 상관없이 CS+에 높은 공포 반응을 관찰하였다(그림 3C, 삽입). 이러한 결과는 도파민 뉴런들이 혐오연합자극에 의해 억제되어 표상하는 가치와 활성화되어 표상하는 현저성 중에서 CS에 대한 현저성 표상의 증가로 초래되었을 가능성이 있다(Bromberg-Martin et al., 2010). 특정 CS와 짝지워 도파민 뉴런들을 활성화시키면 해당 CS에 더 많은 주의 및 각성을 기울이게 되고 이 CS가 전기충격과 연합되었는지 혹은 연합되지 않는지 명확히 구분되어 변별력을 향상시켰을 것으로 추측된다. 이러한 가능성은 역으로 유전자 변형으로 도파민 뉴런들을 혐오자극에 흥분되지 못하도록 만들고 공포 조건화를 경험케 하면 일반화된 불안을 야기한다는 기존 연구결과에 의해서도 뒷받침된다(Zweifel et al., 2011).

한편 도파민 뉴런들의 활성화가 불안 및 공포와 같은 정서상태에 영향을 미쳐서 CS간의 변별학습에 도움을 주었을 가능성도 있다(Choi, Cain, & LeDoux, 2010). 공포 조건화 동안 도파민 뉴런들이 인위적으로 활성화되어 강화 효과가 일어나고, 이로 인해 전기충격에 대한 불안 및 공포반응이 억제되어 두 CS를 변별해 내는 학습을 향상시켰을 수 있다. 조건화와 기억검사를 진행하는 동안 ChR2와 mCherry집단은 CS+에 반응해서 대체적으로 비슷한 수준의 동결반응을 보였으므로 도파민 활성화가 공포반응 수준에 영향을 미치지 않았을 것

로 판단된다. 그러나 본 실험에서는 두 집단간의 불안수준에 차이가 있었는지 알 수 없기 때문에, 불안수준의 감소가 변별 공포학습을 향상시켰을 개연성은 여전히 존재한다. 따라서 후속 연구에서는 도파민 뉴런들을 CS나 US가 제시되지 않는 기간 동안 활성화시키는 등의 통제집단을 추가하여 변별 공포 조건화동안 강화효과가 미치는 영향을 관찰해 보아야 한다.

뇌의 보상회로로서 중뇌의 도파민 시스템은 강화학습 및 약물중독과 관련되어 수십 년간 많은 연구가 진행되어 왔지만(Fields et al., 2007; Schultz et al., 1997; Wise, 2004), 도파민 뉴런들이 공포학습에도 기여한다는 주장은 최근 수년 전부터 제기되기 시작하였다(Fadok, Dickerson, & Palmiter, 2009; Zweifel et al., 2011). 본 연구 또한 변별 공포학습에 도파민 뉴런들이 중요한 역할을 하고 있음을 보여주었다. 도파민 뉴런들의 활성화가 변별 공포학습에 기여한 원인이 CS에 대한 현저성을 높였기 때문인지 일반적 불안정서를 감소시켰기 때문인지 아직 명확하지 않으나, 도파민 뉴런들이 자극 일반화에 관여한다는 사실을 보여주었다. 보다 자세한 변별력 향상 기전을 이해하기 위해서는 어떤 하위 뇌구조물에서의 도파민 분비가 변별학습에 영향을 주는지 살펴보아야 할 것이다. 공포학습의 중추영역인 편도체와 변별 공포조건화에 관여한다고 알려진 전전두 피질(medial prefrontal cortex)이 가장 유력한 하위 구조물일 것으로 추측된다(Kim, Kim, Kim, & Choi, 2013; Maren, 2001). 도파민 뉴런들이 두 구조물에 직접 투사하므로(Sesack & Grace, 2010), 도파민 뉴런들의 축삭돌기(axon)를 활성

화시키는 방법으로 한 뇌영역에서만 선택적으로 도파민을 분비시켰을 때 변별 학습에 미치는 영향과 해당 부위의 뉴런들이 도파민 신경 전달물질 분비시 보이는 발화패턴 등을 연구한다면 변별력 향상 기전을 이해하는데 큰 도움을 줄 것이다.

참고문헌

- Adamantidis, A. R., Tsai, H. C., Boutrel, B., Zhang, F., Stuber, G. D., Budygin, E. A., Tourino, C., Bonci, A., Deisseroth, K., de Lecea, L. (2011). Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *Journal of neuroscience*, 31(30), 10829-10835.
- Baldi, E., Lorenzini, C. A., & Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of learning and memory*, 81(3), 162-166.
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research reviews*, 28(3), 309-369.
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D. I., & Ungless, M. A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(12), 4894-4899.
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815-834.
- Choi, J. S., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2010). The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. *Learning & memory*, 17(3), 139-147.
- Clark, J. J., Sandberg, S. G., Wanat, M. J., Gan, J. O., Horne, E. A., Hart, A. S., Akers C. A., Parker, J. G., Willuhn, I., Martinez, V., Evans, S. B., Stella, N., & Phillips, P. E. (2010). Chronic microsensors for longitudinal, subsecond dopamine detection in behaving animals. *Nature methods*, 7(2), 126-129.
- Cohen, J. Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B. B., & Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature*, 482(7383), 85-88.
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience*, 10(8), 1020-1028.
- Fadok, J. P., Dickerson, T. M., & Palmiter, R. D. (2009). Dopamine is necessary for cue-dependent fear conditioning. *Journal of neuroscience*, 29(36), 11089-11097.
- Fields, H. L., Hjelmstad, G. O., Margolis, E. B., & Nicola, S. M. (2007). Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annual review of neuroscience*, 30, 289-316.
- Han, J. H., Yiu, A. P., Cole, C. J., Hsiang, H. L., Neve, R. L., & Josselyn, S. A. (2008).

- Increasing CREB in the auditory thalamus enhances memory and generalization of auditory conditioned fear. *Learning & memory*, 15(6), 443-453.
- Kheirbek, M. A., Klemenhagen, K. C., Sahay, A., & Hen, R. (2012). Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nature neuroscience*, 15(12), 1613-1620.
- Laxmi, T. R., Stork, O., & Pape, H. C. (2003). Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behavioural brain research*, 145(1), 89-98.
- Lissek, S., Kaczkurkin, A. N., Rabin, S., Geraci, M., Pine, D. S., & Grillon, C. (2014). Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biological psychiatry*, 75(11), 909-915.
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, 459(7248), 837-841.
- Montague, P. R., Dayan, P., & Sejnowski, T. J. (1996). A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *Journal of neuroscience*, 16(5), 1936-1947.
- Pfeifer, A., Brandon, E. P., Kootstra, N., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2001). Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11450-11455.
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275(5306), 1593-1599.
- Sesack, S. R., & Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 27-47.
- Shaban, H., Humeau, Y., Herry, C., Cassasus, G., Shigemoto, R., Ciochi, S., Barbieri, S., van der Putten, H., Kaupmann, K., Bettler, B., Luthi, A. (2006). Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nature neuroscience*, 9(8), 1028-1035.
- Sutton, R. S., & Barto, A. G. (1981). Toward a modern theory of adaptive networks: expectation and prediction. *Psychological review*, 88(2), 135-170.
- Tsai, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, 324(5930), 1080-1084.
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews neuroscience*, 5(6), 483-494.
- Zhuang, X., Masson, J., Gingrich, J. A., Rayport, S., & Hen, R. (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *Journal of neuroscience methods*, 143(1), 27-32.
- Zweifel, L. S., Fadok, J. P., Argilli, E., Garelick, M. G., Jones, G. L., Dickerson, T. M., Allen, J. M., Mizumori, S. J., Bonci, A., Palmiter, R. W., & Koob, G. F. (2012). Dopamine D1 receptor signaling in the nucleus accumbens core is required for contextual fear extinction. *Journal of neuroscience*, 32(12), 4031-4041.

R. D. (2011). Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nature neuroscience*, 14(5), 620-626.

1 차원고접수 : 2015. 12. 16

수정원고접수 : 2016. 01. 18

최종게재결정 : 2016. 01. 25

Effects of optogenetic activation of dopamine neurons during discriminatory fear learning

Yong Sang Jo^{1),2)}

June-Seek Choi¹⁾

¹⁾Department of Psychology, Korea University

²⁾Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, University of Washington, Seattle

Midbrain dopamine neurons exhibit diverse responses to aversive stimuli, such as foot and tail shocks. Specifically one group of dopamine cells is phasically inhibited by the stimuli, whereas the other group is excited. A previous report indicated that mice whose dopamine neurons were genetically modified to disrupt the excited, but not inhibited, response to a shock exhibited generalized anxiety behavior after experiencing fearful events. Thus, it was hypothesized that an increase in dopaminergic excitation improved discriminatory fear learning. To test this idea, mice were trained in a discriminatory fear conditioning paradigm where one auditory conditioned stimulus (CS+) was paired with aversive footshock and the other tone (CS-) was not paired. Dopamine neurons in the ventral tegmental area were optogenetically stimulated during the presentation of one of the two CSs. The intensity of the footshock was strong enough for control mice to show generalized fear responses to both CSs. However, dopamine-stimulated mice was able to discriminate between two CSs, so that they froze more time in response to CS+ than to CS-. These results suggest that dopamine neurons contribute to fear discrimination.

Key words : dopamine, fear conditioning, optogenetics