

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03349

研究課題名(和文) 線条体中型有棘ニューロンにおけるドーパミン伝達の時空間的統合過程の理解

研究課題名(英文) Interrogation of the spatiotemporal integration of dopaminergic signaling in striatal medium spiny neurons

研究代表者

内ヶ島 基政 (Uchigashima, Motokazu)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：10614662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパミンは私達の脳機能に必要不可欠であり、その伝達異常はパーキンソン病や統合失調症の原因とされている。しかし、ドーパミンが脳組織中にどこから放出され、どこまで広がり、どのように作用するのかは未だ十分理解されていない。本研究は、その理解に役立つ技術として、独自のゲノム編集技術による分子標識技術を介してドーパミン放出部位を標識した上で、その標識ニューロンの可視化および操作を可能にする新たな技術プラットフォームを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて確立した新たな技術は、中脳ドーパミンニューロンへの応用を通じて、これまで不十分であった脳組織中におけるドーパミン伝達の多元的かつ高精度な理解が可能となる。この結果、正常な脳の機能する仕組みの理解が深まるだけでなく、多数の罹患者が存在する多様な脳機能疾患におけるドーパミン伝達異常の高精度な理解が可能となることで、そこから生み出される新たな治療アプローチの創出にも結びつくと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Dopaminergic transmission is essential for our normal brain function, and its dysfunction causes many brain disorders such as Parkinson's disease and schizophrenia. However, our current knowledge is not sufficient about where dopamine is released from and what it targets to, and how it functions on its target cells. To address these questions, we newly developed a genome editing-based platform to visualize molecularly-defined dopamine release sites and simultaneously introduce Cre recombinase for neuronal labeling or manipulation in the same neurons in mammalian brains.

研究分野：神経科学

キーワード：ドーパミン 線条体 グルタミン酸 スパイン ゲノム編集 分子標識

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む動物は、より多くの報酬を得るためにどのような感覚情報や行動が報酬に結びつくのかを学習する(報酬学習)。線条体の投射型ニューロンである中型有棘ニューロン(MSN)は、感覚や運動に関する情報を大脳皮質からのグルタミン酸入力を介して受け、報酬に関する情報を中脳(黒質緻密部、腹側被蓋野)からのドーパミン(DA)入力を介して受け取る。従って、MSNにおけるグルタミン酸とDAのシグナル統合の理解が報酬学習の細胞基盤の理解に重要である。

グルタミン酸は、放出部位と受容体が向かい合うため、時空間的選択性の高いシナプス伝達を担う。一方のDAは、受容体が限局せず広く分布するため、時空間的選択性に乏しいボリューム伝達を担うと説明されてきた(Fuxe and Dahlstrom, *Prog Neurobiol* 2010)。しかし、研究代表者らは以前、DAの放出部位がスパインや樹状突起に分布するDAシナプスに集約され、DA受容体はその周囲に近接して分布することを発見した(Uchigashima et al., *PNAS* 2016)。さらに、DAニューロンは短い時間枠の発火頻度の上昇または停止で報酬予測誤差を正確にコードしており(Schultz, *J Neurophysiol* 1998)。線条体でも0.3-2秒の狭い時間枠でのDAの作用がMSNの発火タイミング依存的なスパイン体積の増大に貢献することが知られる(Yagishita et al., *Science* 2014)。従って、DAは、従来の説明にあるような時空間的選択性を欠いたボリューム伝達だけでなく、グルタミン酸と同様の高い時空間的選択性を備えたシナプス様の伝達も行うと予想される。しかし、脳組織中の線条体MSNの樹状突起上において、DAが時空間的にどのように広がり、グルタミン酸シグナルとどのように統合されるのかはほとんどわかっていない。この最大の理由は、DAがDA軸索のどこから放出されるのかという、DA伝達を考える上で基本的な知見を欠いているからである。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは、DA伝達の脳組織中における時空間的な広がりを可視化するため、CRISPR-Cas9によるゲノム編集を用いた分子標識技術であるSLENDR/vSLENDR法に着目した(Mikuni et al., *Cell* 2016; Nishiyama et al., *Neuron* 2017)。SLENDR/vSLENDR法は、相同組換えによる内在の遺伝子修復機構を介して、マウス脳のあらゆる時期・場所で、様々な種類のタンパク質のハイスループットかつ正確なタグ配列による標識を可能とする。この技術によって、DAの放出部位の分子形態学的なラベリングと遺伝子組み換え酵素のノックインを同時に行い、DA放出部位の標識と光遺伝学的な操作が可能になれば、脳組織中におけるDA伝達の時空間的な広がりのみならず、報酬学習の基盤となるグルタミン酸とDAの2つの神経伝達の細胞内統合過程を高精度に理解できるようになると考えた。

そこで、本研究は、線条体MSNの樹状突起におけるDAシグナルとグルタミン酸シグナルの統合過程を時空間的に高い分解能で理解することで、報酬学習を支配する細胞内原理の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

子宮内電気穿孔法(IUE)にICRマウスを用いた。スライスカルチャーには、SpCas9発現マウスとCre組換え酵素依存的に赤色蛍光タンパク質tdTomatoを発現するレポーターマウスを掛け合わせたCas9-tdTマウス、あるいはC57BL/6マウスを用いた。

#### (2) プラスミドベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターの準備

プレシナプスに局在するシナプス小胞関連タンパク質であるシナプトフィジンとSNAREタンパク質SNAP25のC末端とN末端のそれぞれに蛍光タグをノックインするためのgRNA配列とドナーテンプレートを設計し、プラスミドベクターへのクローニングを行った。カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素CaMKII $\alpha$ のN末端に該当するゲノム部位に、Cre組換え酵素と自己ペプチド切断配列2A、蛍光タグの直列配列を挿入するためのアデノ随伴ウイルスベクターAAV1-HDR-Cre-2A-CT-Camk2aを設計し、HEK293T細胞を用いてその作製と濃縮を行った。

#### (3) 海馬または黒質線条体スライスカルチャーの作製

海馬スライスは、生後5-6日齢のマウスから取り出された海馬を組織チョッパーにて325 $\mu$ m厚にスライスすることで準備した。一方、黒質線条体スライスは、生後0日のマウスから取り出された脳をピプラトームにてDAニューロンを豊富に含んだ黒質と線条体を同時に含むよう、350 $\mu$ m厚にスライスすることで準備した。各スライスはミリセル上にて37°C、CO<sub>2</sub>5%の条件下で培養され、培養14-21日に組織解析またはライブセルイメージング解析に使用された。

#### (4) ゲノム編集

プレシナプスタンパク質を標識するため、SLENDR法に基づいて、IUEを用いて、胎生15日齢のICRマウスの大脳皮質2/3層ニューロンにgRNA、SpCas9、ドナーテンプレートを導入した。vSLENDR法に基づいて同一ニューロンにて分子標識とCre組換え酵素発現を同時に行うため、培養2日目のCas9-tdTマウス海馬スライスカルチャーにAAV1-HDR-Cre-2A-CT-

Camk2a を感染させた。

#### (5) 固定脳組織解析

IUE を行ったマウスから還流固定後に脳を取り出し、脳切片を作製した。スライスカルチャーの固定は 30-60 分間の浸漬固定にて行った。脳切片に対して必要に応じて免疫染色を行った上で、共焦点顕微鏡での観察を行った。

#### (6) ライブセルイメージング

DA イメージング: スライスカルチャーに遺伝子銃を用いて DA センサー、GRABDA2m (Sun et al., *Nat Methods* 2020) を導入し、レゾナントスキャナーを搭載した 2 光子顕微鏡を用いて観察した。励起波長には 920 nm を用いた。

蛍光寿命イメージング: スライスカルチャーに遺伝子銃を用いて CaMKII $\alpha$  活性プローブ (Takeo et al., *J Neurosci* 2005) と cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKA) 活性プローブ (Tang & Yasuda, *Neuron* 2017) を導入し、2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いて観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経伝達物質の放出部位を標識・操作するための技術基盤を確立

まず、ゲノム編集による分子標識技術を用いて神経伝達物質の放出部位を可視化する方法を確立するため、マウス大脳皮質 2/3 層ニューロンにて、神経伝達物質放出に参与するシナプス小胞関連タンパク質であるシナプトフィジンと SNARE 関連タンパク質である SNAP25 に蛍光タグを SLENDR 法を通じてノックインした。内在性のシナプトフィジンあるいは SNAP25 の局在を反映して、脳スライスにて蛍光タグシグナルが神経終末に局限することを確認した (図 1)。次に、分子標識が行われたニューロンのみを可視化あるいは操作する方法を確立する目的で、vSLENDR 法によって標的遺伝子に対する蛍光タグ配列と自己ペプチド切断配列 2A、Cre 組換え酵素の同時ノックインを試みた。

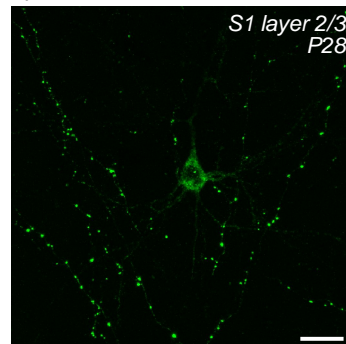


図 1 ゲノム編集による内在シナプトフィジンタンパク質の標識

この際、Cre 組換え酵素のノックインを評価するため、Cre 依存的にレポーター蛍光タンパク質を発現する Cas9-tdT マウスから作製された海馬スライスカルチャーを用いた。また、効率的な条件検討のため、対象遺伝子にゲノム編集による高効率の分子標識が確立された CaMKII $\alpha$  を用いた。結果、蛍光タグによって分子標識されたニューロンにレポーター蛍光タンパク質を同時に発現させることに成功した一方、蛍光タグによって分子標識されていないニューロンにおいてもレポーター蛍光タンパク質発現を認めた。これは、ゲノム編集に用いたドナーテンプレートからの Cre 組換え酵素のリーク発現と考えられた。そこでドナーテンプレートの遺伝子配列を工夫することで、リーク発現を抑えることに成功した (図 2)。これと同時に、研究代表者は Cre 依存的にシナプス機能を制御する方法を確立した (Uchigashima et al., *Elife* 2020)。これらを組み合わせることで、ゲノム編集で狙ったニューロンのシナプスの性質を操作することも可能になった。

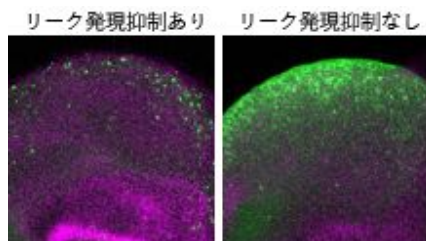


図 2 ドナーテンプレートからのリーク発現抑制 (左あり、右なし)

#### (2) 黒質線条体 DA ニューロン軸索の形態的・機能的多様性の検討

vSLENDR 法による分子標識と免疫染色を組み合わせることによって、中脳 DA ニューロン軸索内のシナプス小胞と DA シナプスの同時標識を行った。DA 軸索終末は DA シナプスの分布とよく一致したが、一部の終末は DA シナプスと一致しなかった。これは単一軸索内における DA ニューロン軸索終末の形態的多様性を示唆する。次に、この多様性を機能面から追求するため、項目 (1) にて開発した同一ニューロンにて内在タンパク質の標識と Cre 組換え酵素遺伝子の導入を同時に行う技術を用いて、単一 DA ニューロン軸索で内在プレシナプスタンパク質標識と DA 放出刺激を試みた。実験効率の向上を図るため、ここでは皮質線条体黒質スライスカルチャーを用いた。この系では中脳 DA ニューロンの軸索が線条体に投射していたことから、単一 DA ニューロン軸索の機能解析に使用できると判断した。現在、単一 DA ニューロン軸索刺激により放出された DA の検出を試みながら、DA ニューロン軸索終末の形態学的多様性と DA 放出強度の関係を解析している。

#### (3) 線条体 MSN スパインにおける分子活性のリアルタイム計測

新たに 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡をセットアップし、スライスカルチャーを用いてグルタミン酸アンケイジングによって誘導されたスパイン構造可塑性に伴う CaMKII $\alpha$  活性プローブの蛍光寿命を計測した。過去の報告通り、刺激後のスパインは速やかな CaMKII $\alpha$  の活性化と肥大化を示した。現在、DA 受容体 D1 と D2 の発現によって分類される 2 種類の MSN を区別しながら CaMKII $\alpha$  と PKA の活性をモニターするため、D1 または D2 プロモーター下で分子活性プローブを発現させることを試みている。これに項目 (2) の技術を組み合わせることで、最終的に線条体 MSN の樹状突起における DA シグナルとグルタミン酸シグナルの統合過程を高い時空間分解能で明らかにするべく解析を続ける予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uchigashima Motokazu, Cheung Amy, Futai Kensuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Neuroigin-3: A Circuit-Specific Synapse Organizer That Shapes Normal Function and Autism Spectrum Disorder-Associated Dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 749164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.749164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchigashima Motokazu, Konno Kohtarou, Demchak Emily, Cheung Amy, Watanabe Takuya, Keener David G, Abe Manabu, Le Timmy, Sakimura Kenji, Sasaoka Toshikuni, Uemura Takeshi, Imamura Kawasaki Yuka, Watanabe Masahiko, Futai Kensuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Specific Neuroigin3? Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e59545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukabori R, Iguchi Y, Kato S, Takahashi K, Eifuku S, Tsuji S, Hazama A, Uchigashima M, Watanabe M, Mizuma H, Cui Y, Onoe H, Hikishima K, Yasoshima Y, Osanai M, Inagaki R, Fukunaga K, Nishijo T, Momiyama T, Benton R, Kobayashi K	4. 巻 40
2. 論文標題 Enhanced Retrieval of Taste Associative Memory by Chemogenetic Activation of Locus Coeruleus Norepinephrine Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8367 ~ 8385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1720-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchigashima Motokazu, Leung Ming, Watanabe Takuya, Cheung Amy, Le Timmy, Pallat Sabine, Dinis Alexandre Luis Marques, Watanabe Masahiko, Kawasaki Yuka, Imamura, Futai Kensuke	4. 巻 295
2. 論文標題 Neuroigin3 splice isoforms shape inhibitory synaptic function in the mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8589 ~ 8595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.AC120.012571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mikuni Takayasu, Uchigashima Motokazu	4. 巻 54
2. 論文標題 Methodological approaches to understand the molecular mechanism of structural plasticity of dendritic spines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6902 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanaoka Kenjiro, Iwaki Shimpei, Yagi Kiyoshi, Myochin Takuya, Ikeno Takayuki, Ohno Hisashi, Sasaki Eita, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Uchigashima Motokazu, Mikuni Takayasu, Tainaka Kazuki, Tahara Shinya, Takeuchi Satoshi, Tahara Tahei, Uchiyama Masanobu, Nagano Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 144
2. 論文標題 General Design Strategy to Precisely Control the Emission of Fluorophores via a Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19778 ~ 19790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c06397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内ヶ島基政
2. 発表標題 シナプス構成タンパク質をハイスループットに可視化するための技術開発
3. 学会等名 第759回新潟医学会例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xinyi Liu, Motokazu Uchigashima, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Kazuki Tainaka, Takayasu Mikuni
2. 発表標題 SeeThrough - live neuronal imaging through cleared skull in mammalian brain
3. 学会等名 第11回 生理研 霊長研 脳研 合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uchigashima Motokazu, Konno Kohtarou, Demchak Emily, Cheung Amy, Watanabe Takuya, Keener David G, Abe Manabu, Le Timmy, Sakimura Kenji, Sasaoka Toshikuni, Uemura Takeshi, Imamura Kawasaki Yuka, Watanabe Masahiko, Futai Kensuke
2. 発表標題 Specific Neuroligin3- Neurexin1 Trans-synaptic Interaction Regulates GABAergic Synaptic Function in an Input Cell Type-Dependent Manner
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motokazu Uchigashima, Risa Iguchi, Kazuma Fujii, Pratik Kumar, Manabu Abe, Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi, Kenji Sakimura, Ryoma Bise, Luke D Lavis, and Takayasu Mikuni
2. 発表標題 Development of Single-Cell, Spatiotemporal, Quantitative Imaging Method for Endogenous Proteins in Mammalian Brains
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motokazu Uchigashima, Risa Iguchi, Xinyi Liu, Kazuma Fujii, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Ryoma Bise, Takayasu Mikuni
2. 発表標題 Quantitative, Spatiotemporal Profiling of Endogenous Proteins in Mammalian Brain Tissues via CRISPR/Cas9-Based Knock-in of Chemical Tags
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	マサチューセッツ州立大学医学部			