

側坐核の *Sulf1* 発現ニューロンの化学遺伝学的活性化がマウスの自発運動量に及ぼす影響

菊池 美里 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 榎 正幸 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

側坐核は、前脳の左右に存在するニューロンの集団で、知覚・情動・報酬情報の統合と、それに基づく行動決定の機能を担っている。側坐核に存在する多くのニューロンは、ドーパミン受容体である D1 受容体 (*Drd1*) あるいは D2 受容体 (*Drd2*) を発現している。ドーパミンニューロンからの入力によって、*Drd1* 発現細胞は興奮し、*Drd2* 発現細胞は抑制され、これらが下流のターゲットにシグナルを伝達することで、必要な運動を惹起し、不必要な運動を抑制する。最近、細胞外に存在するヘパラン硫酸糖鎖の脱硫酸化酵素である *Sulfatase 1* (*Sulf1*) が、側坐核において D1 あるいは D2 受容体と共発現していることが明らかにされた (参考文献 1)。ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、HS とコアタンパク質により構成される分子群であり、細胞外シグナル分子と結合して機能する (参考文献 2)。*Sulf1* は HS を脱硫酸化することで、細胞外シグナルを調節する。

Sulf1 が側坐核においてどのように機能するかはほとんど明らかになっていない。そこで、まずは *Sulf1* 発現ニューロンが自発行動にどのような影響を与えるかを調べることにした。ウイルスベクターを用いて、外因性のリガンドにのみ反応する人工受容体 DREADDs の 1 つである *hM3Dq* を側坐核において発現させ、*Sulf1* 発現ニューロンの神経活動のみを選択的に活性化した場合、自発運動量にどのような変化が見られるかを調べた。

【方法】

1. 定位脳手術

Sulf1 遺伝子内に Cre をノックイン (KI) した *Sulf1*-Cre KI (745) 系統のヘテロノックインマウス、*Drd1* あるいは *Drd2* プロモーター下流で Cre を発現する *Drd1*-Cre、*Drd2*-Cre マウスを実験に用いた。3 種混合麻酔 (塩酸メドミジン 0.75 mg/kg, ミダゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg) を腹腔内投与し、脳定位固定装置に保定した。用いたウイルスベクターは AAV5-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (ウイルス力価; 8.3×10^{12} viral genome/ml) であり、左右両側の側坐核の shell 領域 (Bregma から AP +2.2 mm, ML 0.6 mm, DV -4.6 mm) をターゲットとして 0.5 μ l を注入した。導入遺伝子が十分に発現するまで 2 週間待った後、行動実験を行った。

2. 脳切片の作製

側坐核において導入遺伝子が発現しており、かつ DREADD アゴニストである C21 によって当該領域が活性化されることを確認するため、行動実験後に脳切片を作製した。マウスに C21 あるいは生理食塩水を投与してから約 1 時間後、ペントバルビタールの腹腔内投与により深麻酔状態にし、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流後、4%パラホルムアルデヒド/PBS で灌流固定した。脳を取り出し、同固定液中で 4°C にて一晩浸漬固定した。翌日 PBS で 3 回洗浄した後、凍結保護のため 30% スクロース/PBS 中に 4°C で一晩浸漬し、O.C.T. compound で包埋した。凍結した脳はクリオスタットを用いて厚さ 50 μ m の凍結切片にした後、PBS に浮遊させ、3 回洗浄した。

3. 免疫組織化学

ウイルスベクター由来の赤色蛍光タンパク質である mCherry、および神経活動活性化の指標である cFos タンパク質の免疫蛍光二重染色に用いた抗体と希釈倍率は下表の通りである。染色後、切片を MAS コートスライドガラスに張り付けて封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

表 1 免疫蛍光二重染色に用いた抗体とその希釈率

マーカー	1 次抗体	2 次抗体
mCherry	抗 mCherry 抗体 (ニワトリ, 1000 倍)	Cy3 標識抗ニワトリ IgY 抗体 (ロバ, 500 倍)
cFos	抗 cFos 抗体 (ウサギ, 5000 倍)	Alexa488+ 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ, 1000 倍)

4. オープンフィールドテスト

マウスの自発運動量を調べるため、テスト開始直前に C21 (1 mg/kg) あるいは生理食塩水を腹腔内投与し、30.5 cm 四方のフィールドでマウスを約 1 時間自由に行動させ、その様子をフィールド中央の直上およそ 30 cm の地点から定点録画した。行動実験解析には、ImageJ Fiji のプラグインである Mouse Behavioral Analysis Toolbox を利用し、実験開始から 57 分間の移動距離を算出した。

【結果】

免疫蛍光染色の結果、ウイルスを注入した側坐核で mCherry が発現しており、C21 で活性化したマウスでは、mCherry 非発現領域と比較すると、mCherry 発現領域に一致して多数の cFos 陽性細胞が観察された。

オープンフィールドテストに関して、同一のマウスにおいて C21 投与時と生理食塩水投与時を比較すると、*Drd1*-Cre 群では C21 投与時の総移動距離の方が長く、*Drd2*-Cre マウスでは C21 投与時の総移動距離の方が短い傾向があった。これは、先行研究のデータとも一致する (参考文献 3)。

これを踏まえて、同様の実験操作を *Sulf1*-Cre KI 群に対して行った。C21 投与時と生理食塩水投与時を比較すると、C21 投与時の総移動距離の方が長い傾向があった。今後、より詳細な解析を行うため、サンプル数を増やして行動実験を行う。

【参考文献】

- Miya, K. *et al.* Expression of Heparan Sulfate Endosulfatases in the Adult Mouse Brain: Co-expression of *Sulf1* and Dopamine D1/D2 Receptors. *Front. Neuroanat.*, 15 (2021).
- Perrimon, N. & Bernfield, M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404, 725-728 (2000).
- Zhu, X. *et al.* Activity of D1/2 Receptor Expressing Neurons in the Nucleus Accumbens Regulates Running, Locomotion, and Food Intake. *Front. Behav. Neurosci.*, 10 (2016).