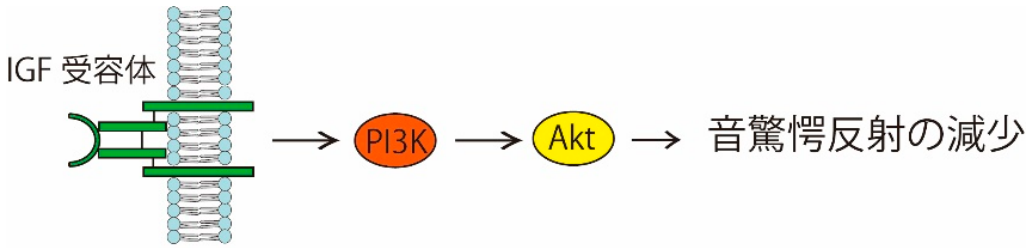
121　グリシン作動性シナプスを増強するシグナル経路の同定	荻野　一豊

【目的】不意に大きな音が鳴ると、動物は驚愕反射を示す。魚類においてはマウスナー細胞が聴覚神経からの入力を受けて興奮することが音への驚愕反射の引き金となる。一方で、音刺激を繰返し与えると音刺激に慣れて驚愕反射が起きにくくなる。これはマウスナー細胞へのグリシン作動性抑制性シナプス伝達が増強されたことでマウスナー細胞の興奮性が低下したためであると考えられている。この現象は 1998 年に報告されたが、どのようにしてグリシン作動性シナプス伝達が増強されるのかは明らかにされてこなかった。これまでの研究で研究代表者は、音刺激が繰り返し与えられると、マウスナー細胞においてカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II（CaMKII）が活性化し、この活性に依存して抑制性シナプスの足場タンパク質である gephyrin がリン酸化されること、このリン酸化によって gephyrin とグリシン受容体の結合が強化されることでシナプス部位のグリシン受容体が増加すること、これによってマウスナー細胞の興奮性が低下し音驚愕反射が減少することを明らかにしている。Wolman らによって PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路の活性化が繰返し音刺激による音驚愕反射減少に関与することが報告されたが、音驚愕反射減少の基盤となる分子機構は明らかにされていなかった。研究代表者は、このシグナル経路の活性化と研究代表者が見出したグリシン受容体集合促進機構との関連性を検討することで、グリシン作動性シナプス可塑性を制御する機構の解明を進めようとした。

【方法】Wolman らによって提唱されたモデルでは、IGF1 受容体-PI3K-Akt シグナル経路が PAPPAA によって活性化された IGF によって活性化されることが繰返し音刺激後の音驚愕反射の減少に必要であるとされていた（図 1）。この経路と研究代表者が見出したグリシン受容体増加による音驚愕反射の減少の関連性を検討するため、IGF1 受容体の阻害剤である BMS-754807 と Akt の活性化剤である SC-79 を投与した状態で、繰返し音刺激後の音驚愕反射とグリシン受容体集積の変化をゼブラフィッシュ稚魚を用いて解析した。

【結果】ゼブラフィッシュは *pappaa* と *pappab* の 2 つの *pappaa* 遺伝子を持っている。*pappab* 遺伝子をノックアウトした稚魚では野生型と同様に繰返し音刺激による驚愕反射の減少が起きたが、*pappaa* 遺伝子をノックアウトした稚魚では繰返し音刺激による驚愕反射の減少が起きなかった。また、BMS-754807 を用いて IGF1 受容体を阻害すると、音刺激を繰返し与えても音驚愕反射減少が起きなくなり、グリシン受容体のシナプスへの集合促進が起きなくなった。これらの結果は、PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路が、マウスナー細胞でのグリシン受容体集合促進と音驚愕反射の減少に関与していることを示唆する。PAPPAA-IGF1 受容体経路と CaMKII がどのように関連しているのかを検討するため、Akt キナーゼの活性化剤である SC-79 を投与し音驚愕反射とグリシン受容体集合状態を観察した。SC-79 の投与では音驚愕反射減少もグリシン受容体集合も誘導されなかった。この結果は、PAPPAA-IGF1 受容体経路の活性化は音驚愕反射減少もグリシン受容体集合を誘導するために必要であるが、それだけでは十分でないことを示している。すなわち、繰返し音刺激が与えられることで、PAPPAA-IGF1 受容体経路と CaMKII の両方が活性化されることが、グリシン受容体集合と音驚愕反射の減少を誘導するためには必要なのかもしれない。

Wolman らによるモデル



121. グリシン作動性シナプスを増強するシグナル経路の同定

荻野　一豊

青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科

Key words：グリシン作動性シナプス，抑制性シナプス，シナプス可塑性，ゼブラフィッシュ，マウスナー細胞

緒　言

神経細胞間の主要な情報伝達手段であるシナプス伝達は、神経細胞の活動を高める興奮性伝達と、活動を抑える抑制性伝達に大別される。中枢神経系において、興奮性シナプス伝達は主にグルタミン酸によって、抑制性伝達はγ-アミノ酪酸（GABA）とグリシンによって担われる。シナプス伝達効率の変化（増強または抑制）はシナプス可塑性とよばれ、記憶形成や学習の実体であると考えられている。記憶形成の中枢である海馬において、グルタミン酸と GABA が主要なシナプス伝達物質であることから、シナプス可塑性の分子機構に関する研究はこれらのシナプスに重点をおいて行われてきた。一方で、グリシン作動性シナプスの可塑性についての研究はあまり進んでいない。

グリシン作動性シナプスは脳幹や脊髄において呼吸や歩行などリズムを持つ運動の制御や、驚愕反射の抑制に関与することが知られていたが、近年、脊髄背角におけるグリシン作動性シナプスの可塑性が痛覚過敏や異痛症といった痛覚異常の発症に関与することが報告された。また、大脳新皮質、扁桃体、海馬、網膜など様々な中枢神経領域にグリシン受容体が存在し神経回路の興奮性を調節していることや、大脳側坐核のグリシン受容体がアルコールやニコチンへの依存性形成に関与することなどから、これまでに考えられてきたよりも、中枢神経系の働きにとってグリシン作動性シナプス伝達が重要であることが分かってきた［1］。

突発的な音刺激は魚類のマウスナー細胞を興奮させることで音驚愕反射を引き起こす。マウスナー細胞の興奮性はマウスナー細胞体へのグリシン作動性抑制性シナプス伝達の強さによって決まるため、グリシン作動性シナプス伝達が強まればマウスナー細胞が興奮しにくくなり音驚愕反射が起きにくくなる［2］。このようにマウスナー細胞でのグリシン作動性シナプス可塑性は動物行動の変化として観察されるため、マウスナー細胞と音驚愕反射はグリシン作動性シナプス可塑性の分子機構を研究するためのモデルとして優れている。研究代表者は、蛍光タンパク質で標識されたグリシン受容体（Venus-GlyR）をゼブラフィッシュ稚魚の後脳にあるマウスナー細胞に発現させることで、シナプスへのグリシン受容体集合促進を蛍光強度の増加として可視化し、繰り返し音刺激がカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼⅡ（CaMKII）活性化を介してシナプスへのグリシン受容体の集合を促進することを示した。この集合促進によってマウスナー細胞へのグリシン作動性抑制性シナプス伝達が増強されることで、マウスナー細胞の興奮性が低下すると考えられる。この仮説を支持するように、繰返し音刺激と CaMKII 活性化に依存して音への驚愕反射が減少した。しかし、繰り返し音刺激がどのようにして CaMKII を活性化するのかは明らかになっていない。ゼブラフィッシュ後脳で発現する pappalysin 1a（PAPPAA）が IGF1 シグナル経路を介して繰り返し音刺激による音驚愕反射の減少に関与すること［3］が報告されていることから、IGF1 シグナル経路が繰り返し音刺激と CaMKII 活性化を繋ぐ経路である可能性を考えている。PAPPAA 変異ゼブラフィッシュを用いて、これらの遺伝子と、繰り返し音刺激、CaMKII の関連性を検証することを目標とした。

方 法

1. ゼブラフィッシュ稚魚の飼育

ゼブラフィッシュ成魚は水温 28.5℃の水槽中で飼育した。水槽がある部屋の照明は 14 時間点灯、10 時間消灯することで昼夜サイクルを作った。交配によって採取した受精卵は、10 個/ml 以下の濃度で 9 cm プラスチックシャーレに入れ、28.5℃のインキュベーター中で受精後 5 日目まで発生させた。受精後 1 日目以降は色素の発生を防ぐために 0.2 mM 1-phenyl 2-thiourea（PTU）を含む飼育水中で発生させた。受精後 1 日目から 5 日目の間には確立された基準に従って発生ステージを確認した［4］。ゼブラフィッシュの飼育と実験は青山学院大学内の規則に従って行った。

2. IGF1 受容体の阻害

1% DMSO を含むゼブラフィッシュ稚魚飼育水に BMS-754807 を 30 μM の濃度で添加して 30 分間作用させてから、実験に用いた［3］。対照群は 1 % DMSO を含むゼブラフィッシュ稚魚飼育水中に 30 分置いてから、実験に用いた。

3. Akt の活性化

1% DMSO を含むゼブラフィッシュ稚魚飼育水に SC-79 を 1 μM の濃度で添加して 18 時間作用させてから、実験に用いた［3］。対照群は 1 % DMSO を含むゼブラフィッシュ稚魚飼育水中に 18 時間置いてから、実験に用いた。

4. 音驚愕反射の解析

6 ウェルプレートに受精後 5 日齢の稚魚を入れ、BT-301 ソレノイド（MSA Factory Co.）を用いて音振動刺激を 5 秒間に 1 回与えることで、音驚愕反射を誘導した。音驚愕反射はハイスピードカメラ HAS-220（ディテクト）を用いて撮影した。音驚愕反射を誘導しない強度のホワイトノイズを 10 秒間に 1 回のペースで 5 分間繰返し聞かせることで、繰返し音刺激とした。

5. グリシン受容体集合の解析

マウスナー細胞で蛍光タンパク質標識グリシン受容体を発現している受精後 5 日目の稚魚を 0.02%の tricaine methanesulfonate を含む飼育水に入れて麻酔した。麻酔後のゼブラフィッシュ稚魚をレーザー共焦点顕微鏡 TCSSP5（ライカ）を用いて観察し、写真を撮影した。撮影された画像を imageJ（NIH）を用いて解析し、蛍光強度を定量化した。

6. *pappaa* 遺伝子と *pappab* 遺伝子のジェノタイピング

以下のプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることで *pappaa* 遺伝子と *pappab* 遺伝子中の欠失の有無を検出した。

pappaa 遺伝子　5’-TCAGCTGGGAGTTGACCG-3’、 5’-AGCCGGTTGTACAACGAGG-3’

pappab 遺伝子　5’-CGGCCTCTTCATGAAGCTC-3’、 5’- ATCAGCACCTTGCATTTTTTG-3’

結果 および 考察

1. *pappaa* 遺伝子ノックアウト系統と *pappab* 遺伝子ノックアウト系統の樹立

CRISPR/Cas9 法によって *pappaa* 遺伝子に 5 bp の欠失、*pappab* 遺伝子に 23bp の欠失を導入した。PAPPAA は 1,629 アミノ酸で構成されるタンパク質であるが、この欠失がもたらしたフレームシフトにより 391 番目のアミノ酸以降が変異し 406 番目のコドンが終始コドンに変異した。PAPPAB は 1,624 アミノ酸で構成されるタンパク質であるが、pappab 遺伝子に導入された欠失がもたらしたフレームシフトにより 210 番目のアミノ酸以降が変異し 251 番目のコドンが終始コドンに変異した。PAPPAA と PAPPAB はメタロプロテーアゼとして IGF 結合タンパク質を分解することで、IGF が IGF 受容体へ結合できるようにする。上記のいずれの変異体においてもメタロプロテアーゼドメインは失われているため、どちらの変異体もメタロプロテアーゼ活性を失っていると考えられる。

2. *pappaa* 遺伝子ノックアウトによって音驚愕反射低減少が阻害された

音刺激の受容によってマウスナー細胞が興奮することで誘導される音驚愕反射は、音刺激から 16 msec 以内に起こるが、この 16 msec 以内の音驚愕反射は繰返し音刺激によって減少する［5］。BT-301 ソレノイドの音振動刺激によって誘導された音驚愕反射の大部分は音刺激後 20 msec 以内に起きており、繰返し音刺激を与えた後によって、この音驚愕反射が大きく減少していた。一方で、音刺激後 20 msec～100 msec の間に起きたマイナーな音驚愕反射は繰返し音刺激後も減少しなかった。*pappab* 遺伝子ノックアウトの稚魚では野生型と同様に繰返し音刺激によって驚愕反射の減少が誘導されたが、*pappaa* 遺伝子ノックアウトの稚魚では繰返し音刺激による驚愕反射の減少が起きなかった（図 1）。

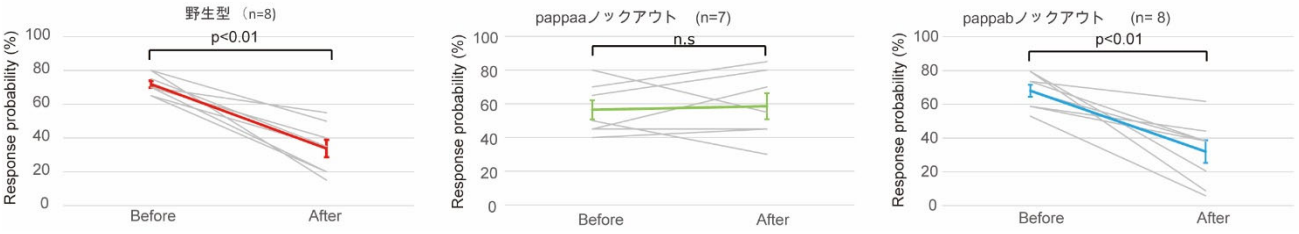


図 1. *pappaa* 遺伝子ノックアウトと *pappab* 遺伝子ノックアウトが、繰返し音刺激による音驚愕反射減少に与える影響
各グラフの灰色の線は 1 匹のデータ、色付き線は各グループでの平均を示す。エラーバーは標準誤差を示す。各グループでの音驚愕反射減少の有意差は t-test によって検定した。野生型と *pappab* 遺伝子ノックアウト稚魚では $p < 0.01$ で有意な減少が見られた。*pappaa* 遺伝子ノックアウト稚魚では有意な減少が見られなかった。

3. PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路の阻害は音驚愕反射減少とグリシン受容体集合促進を阻害した

PAPPAA は IGF1 受容体シグナル経路の活性化を介して、繰返し音刺激による音驚愕反射減少に関与することが報告されているが［3］、どのような分子機構によって音驚愕反射の減少が起こるのかは明らかになっていなかった。Wolman らが用いた IGF1 受容体阻害剤である BMS-754807 を用いて IGF1 受容体を阻害すると、音刺激を繰返し与えても音驚愕反射減少が起きなかった（図 2）。同様に、BMS-754807 による IGF1 受容体阻害は、繰返し音刺激によるグリシン受容体集合促進を阻害した（図 3）。この結果は、PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路の活性化が、繰返し音刺激によるマウスナー細胞でのグリシン受容体集合の促進に必要であり、マウスナー細胞へのグリシン作動性シナプス伝達の増強を介して音驚愕反射の減少に関与している可能性を示唆している。

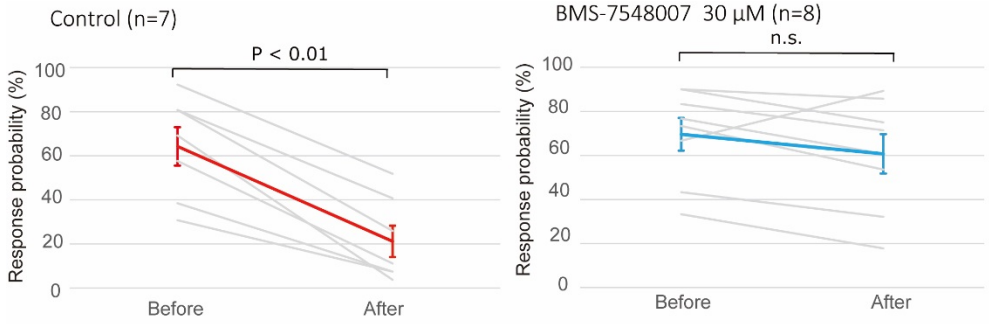


図 2. IGF 1 受容体阻害は繰返し音刺激による音驚愕反射の減少を阻害した
各グラフの灰色の線は 1 匹のデータ、色付き線は各グループでの平均を示す。エラーバーは標準誤差を示す。各グループでの音驚愕反射減少の有意差は t-test によって検定した。

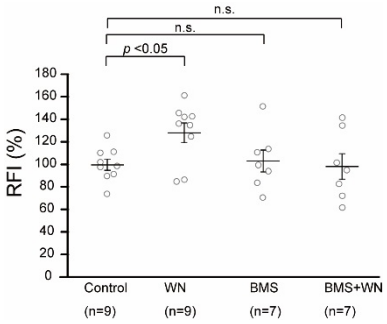


図 3. IGF1 受容体の阻害は繰返し音刺激によるグリシン受容体集合促進を阻害した

マウスナー細胞上のグリシン受容体クラスターの蛍光強度を定量化し、マウスナー細胞ごとに平均値を算出した。このマウスナー細胞ごとの平均値を灰色の○で示す。各グループでの平均値と標準誤差を横棒とエラーバーで示す。定量化された蛍光強度は、繰返し音刺激を与える前の対照群マウスナー細胞（Control）での蛍光強度の平均を 100%とした。WN は繰返し音刺激を与えたグループ、BMS は IGF1 受容体阻害を行ったが繰返し音刺激を与えなかったグループ、BMS＋WN は IGF1 受容体を阻害した上で繰返し音刺激を与えたグループ。対照群との有意差は t-test で有意差を検定した。

4. PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路の活性化だけでは音驚愕反射減少とグリシン受容体集合促進は起きなかった

研究代表者のこれまでの研究によって、繰返し音刺激を与えることでマウスナー細胞において CaMKII が活性化し、この活性に依存して抑制性シナプスの足場タンパク質である gephyrin がリン酸化されることでグリシン受容体と gephyrin の結合が強まり、シナプス部位へのグリシン受容体の集合が促進されるというモデルが提唱されている。もし、PAPPAA-IGF1 受容体経路の活性化が CaMKII の活性化に繋がるのであれば、PAPPAA-IGF1 受容体経路を活性化することで、音刺激を与えなくとも、CaMKII が活性化されグリシン受容体集合促進と音驚愕反射減少が起きると予想できる。Wolman らによって提唱されたモデルでは、PAPPAA-IGF1 受容体経路は Akt キナーゼを活性化させることで繰返し音刺激による音驚愕反射減少に関与していた。PAPPAA-IGF1 受容体経路が CaMKII 活性化の上流に位置するかどうかを検証するために、Wolman らが用いた Akt キナーゼ活性化剤である SC-79 を投与し、音驚愕反射とグリシン受容体集合状態を観察した。しかし、予想に反して SC-79 の投与では音驚愕反射減少もグリシン受容体集合も誘導されなかった（図 4）。この結果と BMS-754807 による IGF1 受容体阻害実験の結果は、PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路の活性化は CaMKII 活性化と gephyrin のリン酸化の間に作用している可能性を示唆している。

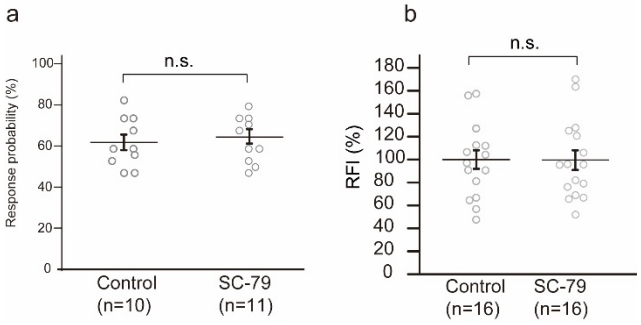


図 4. Akt 活性化は音驚愕反射減少とグリシン受容体集合促進を誘導しない

a）Akt の活性化による音驚愕反射応答率の変化。灰色の○は個体ごとの音驚愕反射応答率を示す。各グループの平均値と標準誤差を横棒とエラーバーで示す。 b）Akt 活性化によるグリシン受容体クラスター蛍光強度の変化マウスナー細胞上のグリシン受容体クラスターの蛍光強度を定量化し、マウスナー細胞ごとに平均値を算出した。このマウスナー細胞ごとの平均値を灰色の○で示す。各グループでの平均値と標準誤差を横棒とエラーバーで示す。定量化された蛍光強度は、繰対照群マウスナー細胞（Control）での蛍光強度の平均を 100%とした。対照群との有意差は t-test によって検定した。

文　献

1) Ogino K, Hirata H. Defects of the glycinergic synapse in zebrafish. Frontiers in molecular neuroscience. 2016;9:50. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00050.

2) Oda Y, Kawasaki K, Morita M, Korn H, Matsui H. Inhibitory long-term potentiation underlies auditory conditioning of goldfish escape behaviour. Nature. 1998;394(6689):182-5. DOI: 10.1038/28172.

3) Wolman MA, Jain RA, Marsden KC, Bell H, Skinner J, Hayer KE, et al. A genome-wide screen identifies PAPP-AA-mediated IGFR signaling as a novel regulator of habituation learning. Neuron. 2015;85(6):1200-11. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.025. PubMed PMID: 25754827; PubMed Central PMCID: PMCPMC4368495.

4) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental dynamics. 1995;203(3):253-310. DOI: 10.1002/aja.1002030302.

5) Takahashi M, Inoue M, Tanimoto M, Kohashi T, Oda Y. Short-term desensitization of fast escape behavior associated with suppression of Mauthner cell activity in larval zebrafish. Neuroscience research. 2017. DOI: 10.1016/j.neures.2017.03.008.