

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18382

研究課題名(和文) グリシン作動性シナプス可塑性の動作原理の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular basis of synaptic plasticity in glycinergic synapse

研究代表者

荻野 一豊 (Ogino, Kazutoyo)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：20551964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：音刺激を繰り返し与えることで魚類の後脳にあるマウスナー細胞上のグリシン作動性シナプス伝達は増強されるが、その仕組みは解明されていない。本研究では、蛍光タンパク質で標識したグリシン受容体(GlyR)をマウスナー細胞に発現させることでGlyR集合の変化を蛍光強度の変化として可視化できる実験系を用いて、繰り返し音刺激がGlyRのシナプス部位への集合を促進すること、この促進はマウスナー細胞で活性化したCaMKIIに依存してグリシン作動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起こることを明らかにした。この現象はグリシン作動性シナプス増強の分子基盤のひとつであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glycinergic synaptic transmissions on a Mauthner cell (M-cell) are potentiated following repetitive exposure to acoustic stimuli. However, the molecular basis has not been elucidated. In this study, I used fluorescent protein tagged glycine receptor (Venus-GlyR) expressing M-cells of larval zebrafish as model cells to reveal the molecular basis. The M-cells enable to visualize synaptic accumulation of Venus-GlyR as a change in the fluorescent intensity. The present study revealed that synaptic GlyR clusters on a M-cells enlarge following persistent acoustic stimuli. Further efforts uncovered that CaMKII-dependent phosphorylation of gephyrin, scaffolding protein of inhibitory synapse, increases the binding affinity between gephyrin and GlyR. Our findings suggest that GlyR clustering enhancement driven by the gephyrin phosphorylation is a key mechanism of potentiation of glycinergic synaptic transmissions on a M-cell that was induced by the repetitive acoustic stimulation.

研究分野：神経科学

キーワード：グリシン受容体 シナプス可塑性 CaMKII ゼブラフィッシュ マウスナー細胞

1. 研究開始当初の背景

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。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 -アミノ酪酸(GABA)とグリシンによって担われている。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。記憶形成の中核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。

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古くから知られている。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と関連することや、大脳側坐核のグリシン受容体がアルコールやニコチンに対する依存性の形成に関与することが報告された。また、脳幹や脊髄に加えて、視床、小脳、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することが明らかになってきており、中枢神経系の動作原理を理解するためにはGABA作動性シナプスだけでなく、グリシン作動性シナプスの働きや可塑性についての理解を深めることも重要であるが、その解明は進んでいない。

申請者はマウスナー細胞をモデルとしてグリシン作動性シナプス可塑性を制御する分子基盤を明らかにすることを旨とした。マウスナー細胞では細胞内カルシウム濃度の上昇に依存してグリシン作動性シナプス伝達が増強されることが先行研究で示されている(Oda et al., Science 1998)。一方で、グルタミン酸作動性シナプスの可塑性では、細胞内カルシウム濃度の上昇はCaMKIIの活性化を介して長期増強を誘導する。

以上のことから、申請者はCaMKIIがグリシン作動性シナプスの可塑性に関与している可能性を考え、その検討を目

的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

- (1) CaMKII活性化がグリシン作動性シナプス増強に関与していることを明らかにする。
- (2) CaMKIIがリン酸化する分子を同定する。

3. 研究の方法

(1)グリシン受容体集合の可視化

シナプス部位に神経伝達物質受容体が集合することで、シナプス伝達効率は向上する。申請者はグリシン作動性シナプス可塑性の仕組みを明らかにするため、ゼブラフィッシュ稚魚の後脳にあるマウスナー細胞に蛍光タンパク質で標識されたグリシン受容体(Venus-GlyR)を発現させることで、グリシン作動性シナプス増強を定量的にin vivoで観察できる実験系を構築した。Venus-GlyRがシナプス部位に集合することは、Venus-GlyRが抑制性シナプス部位の足場タンパク質であるGephyrinと共存することを免疫染色法で観察することで確認した。

(2)グリシン受容体集合の誘導

マウスナー細胞でのグリシン受容体のシナプス部位への集合は、先行研究で示されたように驚愕反射を誘導しない弱い音刺激を5分間繰り返し与えることで誘導した。刺激の前後でマウスナー細胞上のVenus-GlyRをコンフォーカルレーザー顕微鏡(SP5, Leica)で撮影し、ImageJで蛍光強度を定量化した。

(3)マウスナー細胞でのCaMKII活性の制御

マウスナー細胞においてCaMKII活性を制御するために、常時活性化型CaMKII(CaMKII-CA)またはドミナントネガティブ変異型CaMKII(CaMKII-DN)をマウスナー細胞特異的に発現させた。

(4)CaMKII依存的にリン酸化されるタンパク質の同定とその意義の解明

グリシン受容体はシナプス部位での足場タンパク質であるGephyrinと結合することでシナプス部位に集合する。CaMKIIがこれらのうちどちらをリン酸化するのかを明らかにするために、HEK293細胞でグリシン受容体とGephyrinを常時活性化型CaMKIIと共発現させ質量分析法によりいずれのタンパク質がリン酸化されるかを調べた。

CaMKIIによるリン酸化が、Gephyrinとグリシン受容体の結合を強めることを示すために、HEK293細胞で発現させたタンパク質を用いた免疫沈降解析を行った。

質量分析法により同定されたリン酸化部位をアスパラギンに変異させることで

リン酸化状態を擬似的に再現した常時リン酸化型変異体をマウスナー細胞に発現させることでグリシン受容体の集合とそれが驚愕反射に与える影響を検討した。

(5) 驚愕反射の比較

マウスナー細胞は魚類の後脳に2個だけ存在する巨大神経細胞であり、この神経細胞が外部からの刺激により興奮すると驚愕反射が誘導される。このことから、申請者が構築した実験系を用いることで、グリシン作動性シナプスの増強に加えて、それがマウスナー細胞の興奮性に与える影響を驚愕反射の起こりやすさという行動の変化として観察することが出来る。弱い音刺激を5分間に渡って繰り返し与える前後で、同一強度の音刺激をソレノイドハンマー(BT-301, MSA factory)によるタッピングで与えることで驚愕反射を誘導し、その頻度を比較した。

4. 研究成果

弱い音刺激をゼブラフィッシュ稚魚に繰り返し与えることでマウスナー細胞上のシナプス部位にCグリシン受容体が集合することを明らかにした(図1)。CaMKII-CAの発現により繰り返し音刺激なしにグリシン受容体集合が促進されたこと(図1)、CaMKII-DNによるCaMKIIの活性化阻害が繰り返し音刺激集合促進を抑制したこと(図1)から、繰り返し音刺激によるグリシン受容体集合はCaMKII活性に依存することが示された。

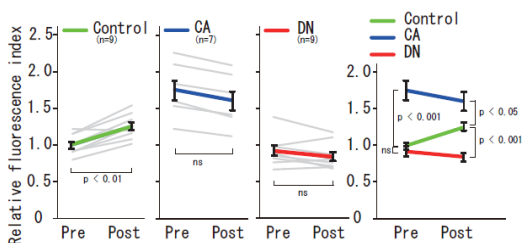


図1 繰り返し音刺激によるグリシン受容体の集合促進

抑制性シナプスの足場タンパク質である Gephyrin の特定のセリン残基が CaMKII 依存的にリン酸化されることにより Gephyrin とグリシン受容体の結合が強まること、グリシン受容体集合の分子基盤であることを、免疫共沈降法によって示した。アミノ酸変異により擬似的リン酸化状態した Gephyrin をマウスナー細胞に発現させることで、シナプス部位へのグリシン受容体集合を促進できたことも、この仮説を支持する。マウスナー細胞へのグリシン作動性シナプス伝達はマウスナー細胞の興奮性を調節していることが知られているので、グリシン受容体集合の促進によってマウスナー細胞へのグリシン作動性シ

ナプス伝達が増強されれば、マウスナー細胞の興奮性が低下することが期待される。この変化はマウスナー細胞の興奮性によって引き起こされる驚愕反射の減少として現れると考えられる。この予想通り、繰り返し音刺激後には驚愕反射は減少した(図2)。

また、CaMKII-CA の発現により繰り返し音刺激なしに驚愕反射が減少し(図2)、CaMKII-DNによるCaMKIIの活性化阻害が驚愕反射の減少を抑制したこと(図2)から、グリシン受容体の集合促進と同様に、繰り返し音刺激による驚愕反射の減少はCaMKII活性に依存することが示された。擬似リン酸化変異ゲフィリンをマウスナー細胞に発現させることでも驚愕反射の減少を誘導することができた。

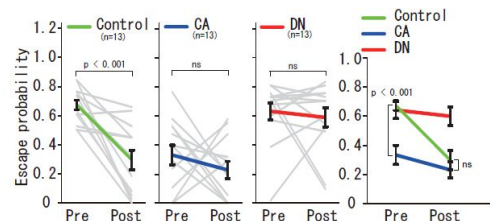


図2 繰り返し音刺激による驚愕反射の減少

聴覚神経はマウスナー細胞にグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達を与えるとともに、抑制性介在神経を介してグリシン作動性の抑制性シナプス伝達を与える。繰り返し音刺激によるグリシン受容体集合促進はグリシン作動性シナプス伝達の阻害と NMDA 受容体活性化の阻害によって抑制されることを示す結果を得た。これらの結果は、聴覚神経からマウスナー細胞への興奮性と抑制性のシナプス伝達の両方が、グリシン受容体集合促進に必要であることを示している。

本研究で得られた成果は、グリシン作動性シナプス可塑性の分子基盤の一端を明らかにする世界でも初めての成果であり、受容体集合促進という分子レベルでの変化が、マウスナー細胞の興奮性の変化を介して、驚愕反射の減少という行動レベルでの変化に繋がることを示した。近年、驚愕反射の減少が起きない変異体の解析から、PAPPAA 遺伝子がこの過程に関与するという報告がなされた。本研究で明らかにされた分子機構と PAPPAA がどのように関連しているのかは不明である。申請者が確立した実験系を用いて、PAPPAA との繋がりを明らかにすることはグリシン作動性シナプス可塑性の分子機構の解明をすすめる上で重要であると考えている。また、驚愕反射の減少が起きない変異体は PAPPAA 遺伝子以外にも複数系統報告されているので、それらの遺伝子との関連性も同様に調べることで、グリシン作動性シナプス可塑性の仕組みの理解をさらに進むことが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Kazutoyo Ogino, Hiromi Hirata
Defects of the Glycinergic Synapse in Zebrafish
査読有
Frontiers in Molecular Neuroscience
2015年 9巻
10.3389/fnmol.2016.00050

[学会発表](計2件)

1. 荻野一豊、平田普三
Sound stimulation regulates glycinergic synapse and escape behavior in zebrafish larvae
第21回小型魚類研究会
2015年9月19日
大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)

2. 荻野一豊

Auditory-stimulation strengthen the association between glycine receptor and gephyrin via activation of CaMKII
第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学大会合同大会(招待講演)
2015年12月2日
神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

荻野 一豊(Kazutoyo Ogino)
青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科
助教

研究者番号：20551964

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()