

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06778

研究課題名(和文) SNAP-25のリン酸化とストレス障害の関係性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the relationship between SNAP-25 phosphorylation and stress disorder

研究代表者

山森 早織 (Yamamori, Saori)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30464803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスに対する反応および適応における分子制御機構については不明な点が多い。本研究ではSNAP-25のリン酸化の役割に着目して解析し、ある種のストレス刺激によって脳内の辺縁系を中心とした領域でSNAP-25がリン酸化されること、リン酸化が上昇する領域ではこのストレス刺激によりあるモノアミンの放出が増加すること、SNAP-25のリン酸化を受けないように改変した遺伝子変異マウスには、ストレス環境下での摂食意欲の低下を示す個体が出現することを見出した。以上より、脳内のSNAP-25のリン酸化が、ストレスによるモノアミン放出の増加、ならびに摂食意欲を亢進する機構に関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスはうつ病などの精神疾患の発症との関連が指摘されており、ストレスに対する適応機構の解明は医学的、社会的に喫緊の問題となっている。本研究では、脳内のSNAP-25のリン酸化が、ストレス刺激によるモノアミンの放出の増加に関わる可能性、摂食意欲の亢進に関与する可能性を見出した。これらの発見は、ストレスに対する反応および適応における分子制御機構の解明の一助になると考えられる。さらに、うつ病などの精神疾患の治療薬の開発のための基盤を提供する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the molecular mechanisms in the brain, underlining stress adaptation. In this study, we aimed to elucidate the roles of SNAP-25 phosphorylation in this process. We found that: 1) SNAP-25 phosphorylation was elevated in the limbic system by stress stimulation; 2) in the areas where the SNAP-25 phosphorylation was elevated, monoamine release was increased; and 3) the SNAP-25 mutant mice in which Ser187 phosphorylation of SNAP-25 was specifically abolished exhibited reduced appetite under environmental stress conditions. These results suggest that the SNAP-25 phosphorylation in the brain induces stress adaptation and increases monoamine release and appetite.

研究分野：神経科学

キーワード：リン酸化 シナプス ストレス SNAP-25 開口放出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過度のストレスに晒されると心身に支障を来すストレス障害を発症することがある。ストレス障害の予防法や治療法の開発のためには、ストレスに対する脳と全身の反応と反応の機構を明らかにすることが必須である。本課題では特に SNAP-25 のリン酸化に着目し解析を行った。SNAP-25 はシナプスの神経伝達物質の放出に必須な SNARE タンパク質の一種であり、脳全域に広く発現している。培養細胞を用いた研究により、PKC により SNAP-25 の 187 番目の Ser (Ser¹⁸⁷) がリン酸化され、モノアミンの放出が促進的に制御されることが明らかにされている (Iwasaki *et al.*, 2000)。申請者らは、ある種のストレス刺激によりマウスの脳内で SNAP-25 がリン酸化されること (Yamamori *et al.*, 2014)、SNAP-25 のリン酸化を受ける Ser¹⁸⁷ に変異を導入してリン酸化を受けなくさせた SNAP-25^{S187A/S187A} 変異マウス (Kataoka *et al.*, 2011) はストレスに脆弱性を示す可能性 (未発表) を見出ししていた。

2. 研究の目的

本研究では、ストレスに対する反応および適応機構における SNAP-25 や他のタンパク質のリン酸化の役割を明らかにすることを目的として、以下の 3 つの目標を設定した。

ストレス刺激の種類による、タンパク質のリン酸化やストレス反応の違いを明らかにする。
ストレス刺激により生じる SNAP-25 のリン酸化が、神経伝達物質放出を変化させる可能性について検討する。

SNAP-25^{S187A/S187A} 変異マウスが示す、拒食の誘発に関連する環境要因の影響を明らかにする

3. 研究の方法

(1) マウス

主に 7 週齢以降の成獣マウスを使用した。野生型マウスのみを使うストレスの影響の解析には、C57BL/6N マウスを使用した。SNAP-25^{S187A/S187A} 変異マウス (Kataoka *et al.*, 2011) と同腹の野生型マウスは、C57BL/6N マウスとの 13 世代のバッククロスを経たヘテロ接合体 SNAP-25^{+/S187A} マウスを用いて作成した。すべての動物実験の方法は NIH のガイドラインに従い、北里大学医学部の動物実験倫理委員会の承認の下に行った。

(2) ストレス刺激とサンプルの解析

・慢性ストレス刺激としては、個別飼育、異なる床材での飼育、チューブ拘束 (小さな穴を開けた 50 ml プラスチック遠沈管にマウスを閉じ込める)、社会的敗北 (他のマウスに攻撃を受ける) などを使用した。

・急性ストレス刺激としては、チューブ拘束、冷水拘束浸水 (チューブ拘束を行って肩まで冷水につける)、社会的敗北、テープ拘束、恐怖条件付け (フットショックによる恐怖体験、およびその数日後の恐怖の想起) などを使用した

上記のストレス刺激に晒したマウスの脳や副腎の組織および体躯の血液を、組織のホモジネートのイムノプロット、組織の固定標本の免疫組織化学、血中ホルモン量の測定に用いた。

(3) マイクロダイアリシス

麻醉下でマウスの脳の各領域に微小透析プローブを挿入し、頭蓋骨に固定した。術後回復後覚醒下のマウスにて、マイクロダイアリシス測定システムを使用して、微小透析プローブより回収した細胞外液中のモノアミンの定量を行い、ストレス前後の放出量の変化を解析した。

4. 研究成果

ストレスの種類とタンパク質のリン酸化

野生型マウスに種々のストレスを急性あるいは慢性的に施した。冷水拘束浸水ストレスを含むいくつかの急性的なストレス刺激においてのみ、脳内の SNAP-25 の Ser¹⁸⁷ がリン酸化された。一方、血中コルチコステロンは全ての急性ストレス刺激を施したマウスにおいて上昇を示した。

これらの特定のストレス刺激により SNAP-25 の Ser¹⁸⁷ がリン酸化される領域を免疫組織化学と各脳領域のイムノプロットにより解析した。いずれのストレス刺激によっても無処理のマウスと比較して、辺縁系を中心とした脳の領域で強いシグナルが観察され、主として大脳辺縁系の神経回路で SNAP-25 がリン酸化されると考えられた。

また、ストレス刺激によりリン酸化状態が変化する他の分子を探索したところ、GSK-3 のリン酸化も SNAP-25 と同様の特定のストレス刺激により上昇することを見出した。これらの分子のリン酸化は異なるキナーゼによりリン酸化されるため、ストレス刺激によって複数のキナーゼが活性化していることが推察された。GSK-3 がリン酸化される脳内領域は、SNAP-25 と類似していたが一部では異なっていた。

一方、ストレスによってアドレナリン やコルチコステロンを分泌する副腎では、ストレス刺激による SNAP-25 のリン酸化の変化は検出されなかった。

神経伝達物質放出制御

ストレス刺激によって SNAP-25 がリン酸化される脳の領域と受けない領域において、自由行動下のマウスの脳のマイクロダイアリシスによって、上述の特定のストレス刺激による神経伝達物質のモノアミンの放出の変化を解析した。その結果、SNAP-25 がリン酸化される

領域の一つでは、ストレス刺激によってあるモノアミンの放出が増強されることを見出した。一方、SNAP-25 がリン酸化されない領域の一つでは、このモノアミンの放出の変化は検出されなかった。これらの結果から、ストレスによる SNAP-25 のリン酸化が、モノアミンの放出を促進している可能性が考えられた。各脳領域の神経細胞において、どのような分子機構を介してモノアミンの放出が制御されているかについてはさらなる検討が必要である。さらに、電気生理学と電顕解析によって、SNAP-25^{S187A/S187A} 変異マウスの海馬のプレシナプスで、放出確率が低下すること、シナプス小胞が蓄積することを明らかにしている (Katayama *et al.*, 2017)。この結果も SNAP-25 のリン酸化が神経伝達物質の放出を促進することを示唆している。

拒食の発症

一部の SNAP-25^{S187A/S187A} 変異マウスは、床材による環境ストレスによって拒食を示すことを見出した。飼育環境から受けるストレスによる摂食意欲の低下に関わる脳内機構については、さらなる検討が必要である。

< 引用文献 >

- Iwasaki S, Kataoka M, Sekiguchi M, Shimazaki Y, Sato K, Takahashi M. Two distinct mechanisms underlie the stimulation of neurotransmitter release by phorbol esters in clonal rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biochem*, 128 巻, 2000, 407-414
- Kataoka M*, **Yamamori S*** (These authors contributed equally to this work), Suzuki E, Watanabe S, Sato T, Miyaoka H, Azuma S, Ikegami S, Kuwahara R, Suzuki-Migishima R, Nakahara Y, Nihonmatsu I, Inokuchi K, Katoh-Fukui Y, Yokoyama M, Takahashi M. Epileptogenesis and epileptic maturation in phosphorylation site-specific SNAP-25 mutant mice. *PLoS One*, 6 巻, 2011, e25158
- Katayama N, **Yamamori S**, Fukaya M, Kobayashi S, Watanabe M, Takahashi M, Manabe T. SNAP-25 phosphorylation at Ser¹⁸⁷ regulates synaptic facilitation and short-term plasticity in an age-dependent manner. *Scientific Reports*, 11 巻, 2017, 7996

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Katayama N, **Yamamori S**, Fukaya M, Kobayashi S, Watanabe M, Takahashi M, Manabe T. SNAP-25 phosphorylation at Ser¹⁸⁷ regulates synaptic facilitation and short-term plasticity in an age-dependent manner. *Scientific Reports*, 査読有, 11 巻, 2017, 7996

Otsuka S, Ohkido T, Itakura M, Watanabe S, **Yamamori S**, Iida Y, Saito M, Miyaoka H, Takahashi M. Dual mechanisms of rapid expression of anxiety-related behavior in pilocarpine-treated epileptic mice. *Epilepsy Reserch*, 査読有, 123 巻, 2016, 55-67

Watanabe S*, **Yamamori S***, Otsuka S* (These three authors contributed equally to this work), Saito M, Suzuki E, Kataoka M, Miyaoka H, Takahashi M. Epileptogenesis and epileptic maturation in phosphorylation site-specific SNAP-25 mutant mice. *Epilepsy Reserch*, 査読有, 115 巻, 2015, 30-44

[学会発表] (計 2 件)

山森 早織、萬代 研二、ストレスによって誘導されるリン酸化タンパク質のマウス脳における局在、日本生化学会大会、2018

山森 早織、菅谷 津貴子、片岡 正和、Phosphorylation of SNAP-25 induced by anesthesia in mice brain、日本神経化学会大会、2017

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高橋 正身

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Masami

研究協力者氏名：小寺 義男

ローマ字氏名：KODERA, Yoshio

研究協力者氏名：飯田 諭直

ローマ字氏名：Iida, Yuuki

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、研究者個人に帰属されます。