

研究報告書

「グリシン作動性シナプスの活動依存的形成と臨界期の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 平田 普三

1. 研究のねらい

神経細胞はシナプスとよばれる細胞間領域に神経伝達物質を放出して情報伝達を行う。シナプスは活動、すなわちシナプス伝達により、その形態、受容体密度、伝達特性が変化することが知られている。シナプスの活動依存的変化はシナプス可塑性とよばれ、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスで精力的に解析され、長期増強や長期抑制といったシナプス可塑性現象の分子基盤や生理的意義が明らかにされてきた。抑制性の GABA 作動性シナプスやグリシン作動性シナプスにおいても、脱分極依存的増強や長期増強といったシナプス可塑性現象が報告されているが、その分子メカニズムや生理的意義には不明の点が多い。これら GABA 作動性シナプスとグリシン作動性シナプスは、神経伝達物質として使うアミノ酸が異なるだけで、構造や制御は似ていると考えられることが多かったが、近年の報告から、GABA 作動性シナプスとグリシン作動性シナプスでは脱分極に対する応答や制御機構が本質的に異なることも示唆されている。しかし、GABA 作動性シナプスやグリシン作動性シナプスを構成する分子の知見は未だに乏しく、興奮性シナプスに比べ、抑制性シナプスの理解は遅れている。私たちはゼブラフィッシュをモデルとして、運動の研究を行い、グリシン作動性シナプス伝達による抑制が運動に重要であることを報告してきた。また、グリシン作動性シナプスは遺伝的プログラムだけで形成されるのではなく、シナプス形成にグリシン作動性シナプス伝達そのものが必要であるという予備的知見を得た。これはグリシン作動性シナプスが活動依存的に形成される、つまり発生期のグリシン作動性シナプスに可塑性があることを示唆するものである。また、シナプス形成におけるグリシン作動性シナプス伝達の重要性は特に胚期や稚魚期で高く、臨界期が存在する可能性も示唆された。ゼブラフィッシュは発生が早く、胚期は体が透明なためライブイメージングに優れる脊椎動物であり、発生期のシナプス可塑性の研究に有用である。本研究で私たちは、グリシン作動性シナプスを構成、あるいは制御する分子を同定し、グリシン作動性シナプスの活動依存的変化の分子基盤の解明を目指す。また、グリシン作動性シナプスの可視化系を確立し、シナプス可塑性を生体内イメージングして、シナプス可塑性の操作にも挑戦する。さらに、グリシン作動性シナプスに可塑性があることの生理的意義の解明も目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

グリシン作動性シナプスを構成・制御する分子を探索し、足場タンパク Gephyrin の神経細胞特異的アイソフォームを同定し、それがグリシン受容体のシナプス凝集に必要であることを確認した。また、Dhx37 という DEAH-box 型 RNA ヘリカーゼがグリシン受容体 α サブユニットのスプライシングを調節することを見出し、RNA 制御の観点からグリシン作動性シナプスの制

御メカニズムを解明し、シナプスを操作する実験系を確立した。グリシン作動性シナプス伝達がグリシン作動性シナプスの形成に必要であることをゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 解析で発見し、このシナプス可塑性の動作原理として、グリシン放出→グリシン受容体活性化→ポストシナプスにおける CaMKII 活性化→Gephyrinリン酸化→グリシン受容体凝集増加が起きていることを明らかにした。さらに、グリシン作動性シナプス部位とグリシン受容体凝集を同時にゼブラフィッシュで生体内イメージングする実験系を構築し、ゼブラフィッシュに雨の音を聞かせてグリシン作動性シナプス可塑性が誘導される時に、グリシン受容体がシナプス部位に凝集する過程を可視化することに成功した。これはグリシン作動性シナプス可塑性を生体内可視化した初めての例である。グリシン作動性シナプス可塑性によりゼブラフィッシュは逃避行動を低下させるが、その生理的意義として本研究から、魚は通常上空の鳥の襲撃に晒されているが、雨の日には鳥が襲ってこないで逃避行動を低下させるという、環境適応仮説が提唱された。

(2) 詳細

研究テーマ「グリシン作動性シナプス可塑性の動作原理」

グリシン作動性シナプスを構成・制御する分子を探索し、多くの候補を得て Gephyrin、Dhx37 を詳細に解析した。Gephyrin は GABA 作動性シナプスとグリシン作動性シナプスの足場タンパクとして知られるが、本研究で Gephyrin のパラログ遺伝子 (Gephyrin a, Gephyrin b) や新規のスプライシングアイソフォーム (Gephyrin a 4 種類, Gephyrin b 3 種類) が単離され、神経細胞だけで発現する Gephyrin アイソフォームが同定された。私たちは Gephyrin のこれらアイソフォームがグリシン受容体のシナプス凝集を制御し、運動制御に必要であることを確認した (Ogino et al., 2011)。Dhx37 は DHAH-box 型 RNA ヘリカーゼとして命名されただけで、これまで機能解析はされてこなかった RNA 結合タンパクである。私たちは Dhx37 を欠くゼブラフィッシュ個体がグリシン作動性シナプスの機能欠如で特徴的に見られる、左右の筋を同時に収縮させて背側に反る異常運動をすることに注目し、Dhx37 とグリシン作動性シナプスの関連を解析した。Dhx37 を欠くゼブラフィッシュ個体ではグリシン受容体 α サブユニットが RNA レベル、タンパクレベルで減少し、グリシン作動性シナプス伝達が顕著に低下していた。その作用機序として、Dhx37 はグリシン受容体 α サブユニットの転写産物に結合し、RNA スプライシングを制御することが分かった。この研究は RNA 制御の観点からグリシン作動性シナプスの制御機構を解明した研究であると同時に、Dhx37 を発現制御することで、グリシン作動性シナプス伝達レベルの操作を可能にする実験手法として、その後の研究に生かされた (Hirata et al., 2013)。

ゼブラフィッシュ個体にグリシン受容体の特異的阻害剤であるストリキニーネを作用させるとグリシン作動性シナプスが形成されなくなることから、グリシン作動性シナプス伝達がグリシン作動性シナプスの形成に必要であることがゼブラフィッシュ個体を用いた *in vivo* 解析で示唆された (Hirata et al., 2011)。その動作原理解明を目指して、グリシン放出→受容体活性化→ポストシナプスでのシグナル伝達→受容体凝集という仮説を立て、その分子メカニズムを解析した。第一に、CRISPR/Cas9 というゲノム改変技術を用いて、プレシナプスに存在する2種のグリシンのトランスポーターを遺伝子破壊すると、グリシンの放出を阻害することができ、その個体ではポストシナプスにおけるグリシン受容体の凝集が見られなかった。このことから、

グリシンの放出がグリシン作動性シナプスの形成に必要であると言える。第二にストリキニーネを用いて受容体活性化を阻害すると、やはり受容体凝集は阻害されることが確認され、受容体活性化がグリシン作動性シナプスの形成に必要であると分かった。第三にポストシナプスでのシグナルに関わる分子を探索する目的で、種々の化合物をゼブラフィッシュに作用させて運動異常を引き起こす化合物を探索した。約1,000種の化合物のうち、20種でグリシン作動性シナプスの異常に見られる運動異常とやや類似した運動異常が観察された。これらの個体におけるグリシン作動性シナプスを解析し、NifedipineとKN93がグリシン作動性シナプス形成を阻害することを見出した。これら化合物はそれぞれL型カルシウムチャネルとCaMKII(カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素)の阻害剤であり、ポストシナプスにおけるカルシウム→CaMKIIというシグナル経路がグリシン受容体凝集に関与することが示唆された(Yamanaka et al., 2013)。第四にCaMKIIによる受容体凝集の分子メカニズムを解析するため、HEK293細胞を用いたグリシン受容体とGephyrinの結合実験を行い、両者の結合はCaMKIIにより強化されることを見出した。さらに、質量分析からCaMKIIがGephyrinをリン酸化し、このリン酸化によりグリシン受容体との親和性が高まることが確認された。以上の結果から、グリシン作動性シナプス伝達により、ポストシナプスでCaMKIIが活性化し、CaMKIIがGephyrinをリン酸化し、Gephyrinと受容体との結合が強まることからグリシン受容体がシナプス部位に凝集することが明らかにされた。本研究からグリシン作動性シナプスの可塑性の分子基盤について、その最重要部分が解明されたと言える。

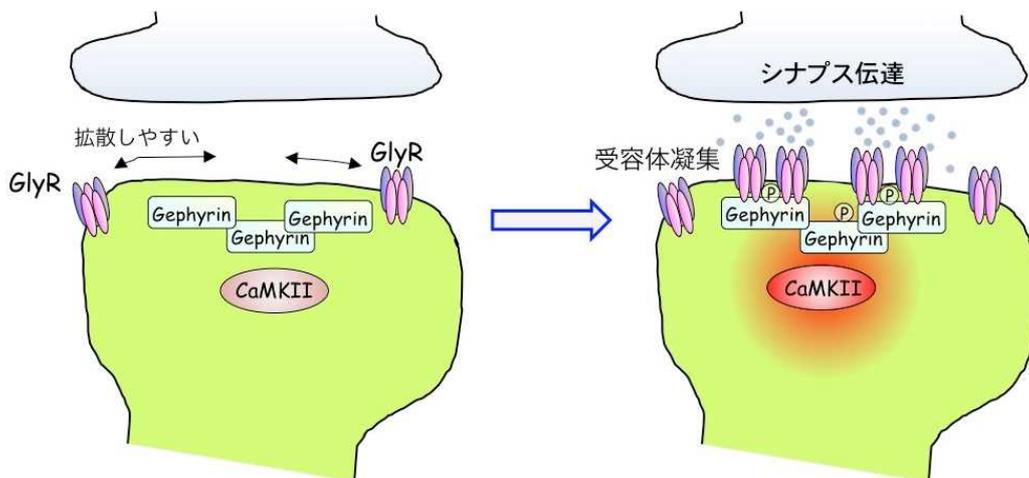


図 グリシン受容体はもともと細胞膜上を拡散しているが、シナプス伝達の反復により、ポストシナプスでCaMKIIが活性化し、シナプスの足場タンパクGephyrinをリン酸化する。このリン酸化により、グリシン受容体とGephyrinの親和性が高くなり、受容体はシナプス部位に凝集する。

研究テーマ「グリシン作動性シナプスの生体内可視化と可塑性の生理的意義」

名古屋大学の小田洋一教授らはキンギョに単一波長の音を聞かせると、グリシン作動性シナプスの増強が起きることを報告したが(Oda et al., 1998)、その続報はなく、分子メカニズムや生理的意義には多くの謎が残されている。私たちは遺伝子操作や薬理操作が容易なゼブラフィッシュ稚魚でこれを再現し、可塑性の操作と生理的意義の解明を目指した。まず、Venusタグしたグリシン受容体やRFPタグしたGephyrinをゼブラフィッシュに発現させ、グリシン受容体動態やシナプス部位を動物の脳内で非侵襲的に可視化することに成功した。ゼブラ

フィッシュに音を聞かせると逃避行動が低下するが、種々の音の中でもホワイトノイズ(多くの波長の混ざった音で、サーツという音として聞こえる雨の音と同じもの)を聞かせると逃避行動が顕著に低下することを見出した。グリシン作動性シナプスのライブイメージング系を用いて同一個体のシナプスを経時観察すると、ホワイトノイズを聞かせることで、シナプス部位でのグリシン受容体凝集が高まることが分かった。これはグリシン作動性シナプスの可塑性を可視化することに成功したものであり、この実験系はその後の研究に生かされた。遺伝子操作により、単一の神経細胞でCaMKII活性を上げたり、下げたりすると、その細胞におけるグリシン受容体凝集を増加させたり、低下させたりすることが可能で、それに合わせてゼブラフィッシュの逃避行動も変化することが確認された。これは単一の神経細胞でCaMKII活性を操作することで動物の行動を操作できることを示しており、私たちが解明したグリシン作動性シナプスの可塑性原理が生理的条件下でも使用されていることを示すものである。私たちはホワイトノイズを聞かせるとグリシン受容体凝集が増加して逃避行動が低下することについて、以下の「雨天適応」仮説を提唱するに至った。天気の良い日は鳥は上空から魚を見ており、魚は常に鳥の襲撃にさらされている。鳥が水中の魚を捕まえる時、水にダイブするが、魚は実際の襲撃よりも僅か前に鳥が水面に衝突する音(ポチャンという音)を聞くことになる。魚がこの音を聞いてすぐに体をひねれば、くちばし1つ分でも鳥の襲撃をよけることが可能で、魚は鳥の襲撃をかわすために耳をすましていると考えられる。しかし、雨の日には鳥は水面下の魚を見ることができないので水にダイブして魚を捕獲することはしない。魚は雨の日には音で逃避行動をとる必要はなく、雨の音を聞いてグリシン受容体凝集を増加させることで、不必要な逃避を低下させていると考えられる。本研究から提唱された、この「雨天適応」仮説は動物の行動変化を分子レベル(Gephyrinリン酸化)、シナプスレベル(グリシン受容体凝集増加によるシナプス増強)、行動レベル(逃避行動の低下)で説明する新しい環境適応仮説である。

3. 今後の展開

CaMKIIによるGephyrinリン酸化が明らかになったことで、グリシン作動性シナプス可塑性の動作原理の最重要部分は解明されたと考えている。しかし、CaMKII活性化に必要なポストシナプスでのカルシウムのソースなど、動作原理の完全理解に必要な課題は残っており、これらを解明して、シナプス可塑性の全容を解明したい。本研究から、グリシン作動性シナプス可塑性に臨界期があることも示唆されているが、その分子基盤の解明には至っていない。本研究ではグリシン作動性シナプス関連分子が多く単離されており、それらの解析を継続して臨界期のメカニズムにも迫りたい。

グリシン作動性シナプス可塑性の生理的意義として雨天に適応するという環境適応仮説を提唱したが、現段階ではこれは仮説に過ぎず、実験でこれを証明する必要がある。グリシン作動性シナプスを操作した個体を鳥に襲撃させる実験やもともと鳥の襲撃に備えていない深海魚を用いたシナプス可塑性や逃避行動の実験を計画している。これらの研究から、動物の環境適応仮説を検証できると期待される。本研究で得られた知見を応用すれば、野生の魚の行動を音で操作することも可能で、魚の捕獲という観点から漁業に貢献する研究になることも期待される。漁業の効率が高まれば、魚の単価は安くなり、日本の経済発展や食文化にも大きな影響を与えることになるだろう

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究者は名古屋大学助教から国立遺伝学研究所准教授に異動して、新設の研究室を主宰することになった少し後にさきがけに採択され、キャリア形成の最も重要な時期にさきがけ研究に従事することができたと言える。本研究を遂行するためにはシナプス可塑性のライブイメージングをする必要があり、高感度の共焦点レーザー顕微鏡が不可欠だったが、これをさきがけの研究費で購入できたことが本研究の成功に大きく寄与したことは間違いない。また、シナプス可視化やシナプス操作に必要なトランスジェニックゼブラフィッシュ系統をたくさん樹立して飼育する必要があったが、さきがけの研究費で研究補助者を雇用して、実験動物の飼育や研究データの収集・解析を補助してもらえたので、効率よく研究を進めることができた。

本研究でグリシン作動性シナプス可塑性の可視化や分子基盤解明に成功しており、当初の研究目的は既に達成している。また、本研究でグリシン作動性シナプスに可塑性があることについての生理的意義として雨天への環境適応仮説が提唱されており、今後はその証明が期待される。ゼブラフィッシュをモデル動物として神経科学の基礎研究であるが、深海魚の研究を含めた動物学的視点もあり、魚の行動を操作することによる魚の捕獲効率向上など、実験室にとどまらない漁業への産業応用への展開も秘めている。

さきがけ研究の研究成果は10報の査読付き原著論文(うち7報で筆頭著者あるいは責任著者)と1報の査読付き英文総説(責任著者)に発表されており、他に3報の論文(いずれも筆頭共著者あるいは責任著者)を投稿している。また、招待講演(国内13件、海外4件)を行い、海外の学会では座長を務め、研究会やシンポジウムを3件主催するなどした。隔年で開催される、研究室主宰者だけが参加できる国際学会(PI Meeting)に参加しているが、2013年に参加者による投票で Planning Committee に選出されるなど、分野の若手リーダとしての国際的評価を受けつつある。研究活動を一般向けに宣伝する活動にも力を入れており、市民公開講座での講演、未来館(東京都お台場)での小学生向けワークショップ、ゼブラフィッシュ研究の展示、新聞の科学欄でのコメントなど数多くのアウトリーチ活動を行ってきた。これら一連の研究活動は所属学会や文部科学省からも評価され、2011年の日本生化学会奨励賞、2012年文部科学大臣表彰(科学技術分野)若手科学者賞を受賞した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

平田研究者は先にグリシン受容体のアンタゴニストであるストリキニンの作用下ではゼブラフィッシュのグリシン作動性シナプスが形成されないことを発見したことに基づき、本研究においてさらにこの可塑性の分子基盤の解明に挑んだものである。グリシン受容体に作用する候補分子を絞り込み Gephyrin(さらにはの神経特異的アイソフォーム)と Dhx37 を同定してそれらの作用を精力的に解析することにより、「グリシン放出→グリシン受容体活性化→ポストシナプスにおける CaMKII 活性化→Gephyrin リン酸化→グリシン受容体凝集増加」という図式を見出したことは大きい成果であり、課題を達成したものである。これらの成果は多数の論文として発表しており、国際的評価も受けつつある。今後は本研究から得られた他のグリシン作動性シナプス

関連分子なども活用して、臨界期も含めたグリシン作動性シナプスの生理的意義などの解明が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ogino, K., Ramsden, S. L., Keib, N., Schwarz, G., Harvey, R. J. and Hirata, H. (2011) Duplicated gephyrin genes showing distinct tissue distribution and alternative splicing patterns mediate Moco biosynthesis, glycine receptor clustering and escape behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 286: 806-817.
2. Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S. E., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K. and Kuwada, J. Y. (2012) Connexin39.9 is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 287: 1080-1089.
3. Hirata, H., Ogino, K., Yamada, K., Leacock, S. and Harvey, R. J. (2013) Defective escape behavior in DEAH-box RNA helicase mutants improved by restoring glycine receptor expression. *J. Neurosci.* 33: 14638-14644.
4. Hirata, H., Nanda, I., van Riesen, A., McMichael, G., Hu, H., Hambrock, M., Papon, M.-A., Fischer, U., Marouillat, S., Ding, C., Alirol, S., Bienek, M., Preisler-Adams, S., Grimme, A., Seelow, D., Webster, R., Haan, E., MacLennan, A., Stenzel, W., Yap, T. Y., Gardner, A., Nguyen, L. S., Shaw, M., Lebrun, N., Haas, S. A., Kress, W., Haaf, T., Schellenberger, E., Chelly, J., Viot, G., Shaffer, L. G., Rosenfeld, J. A., Kramer, N., Falk, R., El-Khechen, D., Escobar, L. F., Hennekam, R., Wieacker, P., Hübner, C., Ropers, H.-H., Gecz, J., Schuelke, M., Laumonnier, F. and Kalscheuer, V. M. (2013) Mutations of ZC4H2 are associated with arthrogryposis multiplex congenita and intellectual disability and through impairment of central and peripheral synaptic plasticity. *Am. J. Hum. Genet.* 92: 681-695.
5. Horstick, E. J., Linsley, J. W., Dowling, J. J., Hauser, M. A., McDonald, K. K., Ashley-Koch, A., Saint-Amant, L., Satish, A., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Stamm, D. S., Powell, C. M., Speer, M. C., Franzini-Armstrong, C., Hirata, H.* and Kuwada, J. Y.* (2013) Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nature Commun.* 4: 1952. (*Corresponding authors)
6. Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y. and Hirata, H. (2013) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells* 18: 211-224.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

日本生化学会奨励賞(2011年10月)

文部科学大臣表彰(科学技術分野)若手科学者賞(2012年4月)