

魚類の群れ行動・攻撃性・認知行動を制御する新規因子 Neu1 の

作用メカニズムの解明

塩崎 一弘・池田 麻美

鹿児島大学 水産学部 食品生命科学分野 水圏糖鎖生物学研究室

連絡先住所：〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20

TEL:099-286-4175

要旨

養殖の現場において、対象魚の情動を適切に保つことは、生残率や成長を向上させ、最終的には水揚げ量の増加に直結する。最近申請者は、脳で発現する Neu1 タンパク質が、魚類において群れ行動・攻撃性・認知などの情動行動を変化させる因子である事を見出した。すなわち、魚類 Neu1 タンパク質の作用機序を解明することで、安定生産技術の開発に繋がることが期待される。本課題では、Neu1 遺伝子を欠損したゼブラフィッシュを用いて脳内の分子プロファイルを解析した。Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳では、Sia α 2-3 結合糖鎖のシグナルが増加し、Lamp1a の増加が伴うことを見いだした。さらに、*gria1a*, *gria2a*, *gria3b* などの AMPA 型グルタミン酸受容体や小胞型グルタミン酸トランスポーターの遺伝子発現が抑制された。Neu1 欠損は、Gfap とリン酸化 ERK レベルの増加を伴うアストロサイトの過活性化を誘導するが、アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの mRNA レベルは低下していた。その際、シナプス可塑性のマーカである Sypb と Hc1b の遺伝子発現も抑制された。Neu1-KO ではミクログリアの異常活性化も明らかになり、iNOS や炎症性サイトカインである IL-1 β の発現が増加した。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、Fluor-Jade B 染色により、神経細胞の急激な変性が検出された。

1. 緒言

水槽や生簀という特殊環境下で魚を飼育する養殖の現場では、攻撃性の増加、遊泳行動異常による壁への激突死、また外因性ストレスによる摂餌量の低下といった問題が発生する。これらの情動異常に起因する異常行動は、生残率の低下に止まらず、肉質の劣化や耐病性の低下などの原因となる。一方、魚類の攻撃性や集団遊泳行動、外的刺激への認知行動などの情動を制御する因子については、一部のホルモンを除き、ほとんど知見が得られていない。

申請者らは最近、Neu1 と呼ばれるタンパク質が、魚類の情動行動を制御する因子である可能性を発見した (1)。Neu1 タンパク質は、脳で発現が高く認められる糖鎖分解酵素であり、その遺伝子は魚種を越えて高く保存されている (2,3)。この Neu1 タンパク質は、細胞内小器官であるリソソームに局在しており、通常は細胞内の糖タンパク質の分解に関与している。申請者らは、魚類への急性ストレス負荷に伴い Neu1 遺伝子の発現が著しく亢進することを見出した (1)。そこで、この Neu1 遺伝子を欠損する Neu1-KO ゼブラフィッシュをゲノム編集により作出し (4)、KO ゼブラフィッシュの行動解析試験を行った。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、群れ遊泳行動、攻撃性、興味探索行動、危険認知が変化していることが明らかとなった (1)。これは Neu1 が動物の情動行動を変化させる初めての報告である。

増養殖の現場において、対象魚の情動を適切に保つことは、生残率や成長を向上させ、最終的には水揚げ量の増加に直結する。すなわち、魚類 Neu1 タンパク質の作用機序を解明することで、増養殖の現場における優良種苗の作出や、安定生産技術の開発に繋がることが期待される。しかしその一方で、Neu1 タンパク質が魚類の情動行動を制御するメカニズムについては不明なままである。

一般に脊椎生物の情動行動は、脳内の様々な神経の相互作用により変化するとされ、グルタミン酸、GABA、セロトニンなどの作動性ニューロンが関与している。また、神経細胞を取り巻くグリア細胞(アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)も、神経細胞の機能制御に重要とされ、ヒトではグリア細胞の活性と不安・認知行動との関係が報告されている。また、情動を司る終脳、中脳でそれぞれ神経系の働きが異なっており、これらについて詳細に解析する必要がある。そこで本申請課題では、Neu1 が情動行動を変化させるメカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

2. 実験方法

2.1. 試験魚

Neu1-KO ゼブラフィッシュは、我々の以前の研究で CRISPR/Cas9 ゲノム編集により樹立したものを用いた (4)。ゼブラフィッシュ成魚 (6-7 ヶ月) は 3L 水槽で飼育し、市販の飼料を 14/10 時間の明暗サイクルで 1 日 2 回、試験に供するまで与えた。

2.2. 遺伝子発現解析

ゼブラフィッシュの脳由来 cDNA を用いて、各種遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

ゼブラフィッシュの脳は、0.1%トリカインで麻酔後に摘出した。Sepasol-RNA I Super G solution を用いて Total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、StepOne real-time PCR を用いて、KOD SYBR qPCR Master Mix 特異的プライマーで実施した。相対的なデータ定量化のための標準曲線は、cDNA の連続希釈から導出した。すべての遺伝子の発現レベルは、*actb* mRNA レベルで補正した。

2.3. タンパク質発現解析

ゼブラフィッシュ脳を、10 μ g/mL ロイペプチン、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、200 μ M PMSF を含む 1% Triton X-100/リン酸緩衝食塩水 (PBS) 200 μ L でホモジナイズした。得られたライセートを SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写した後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングした。Gfap、Lamp1、iNOS、ERK、phospho-ERK、および β -アクチンは各特異抗体と HRP 結合二次抗体で検出した。シグナルは EzWestLumi plus で検出し、ChemiDoc Touch および Image Lab Touch ソフトウェアを用いて解析した。

2.4. 免疫およびレクチン組織染色

ゼブラフィッシュの脳を 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、0.1M リン酸緩衝液中 10%、20%、30%のスクロースで連続的にインキュベートした。脳を 5%アガロースに包埋し、20 μ m にスライス後、ブロッキングした。その後、切片を各抗体、またはレクチンで反応させた。続いて蛍光標識二次抗体、またはアビジンでインキュベートした。脳切片の変性ニューロンの可視化は、Fluoro-Jade B を用いて行った。染色した切片はセクションング蛍光顕微鏡システム Apotome を用いて観察した。

3. 結果

3.1. Neu1-KO における Sia α 2-3 結合糖鎖の蓄積

ゼブラフィッシュの Neu1 は α 2-3 結合シアル酸を切断することから、糖鎖の非還元末端に結合した α 2-3 結合シアル酸を認識する MAM レクチンを用いて、ゼブラフィッシュ脳のレクチン組織染色を行った。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、MAM レクチンの強いシグナルが中脳全域に散見された (図 1)。また、Neu1-KO

ゼブラフィッシュでは、WT ゼブラフィッシュと比較して、脳梁の背側領域で強い MAM レクチンシグナルが検出された。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュの中脳と終脳の切片

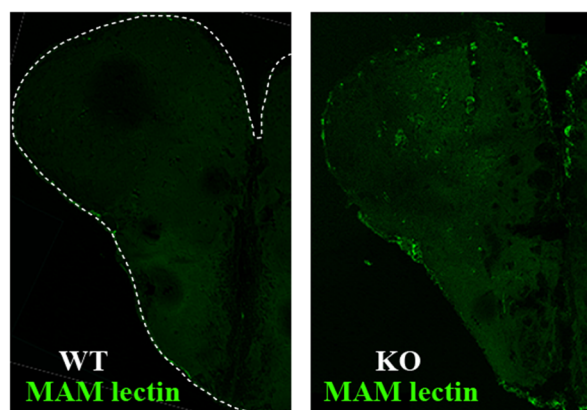


図 1 レクチン組織染色 (終脳)

における MAM 陽性細胞は、WT のそれよりも有意に多かった。これらの結果は、Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳では、Sia α -2-3 結合糖鎖が蓄積していることを示している。

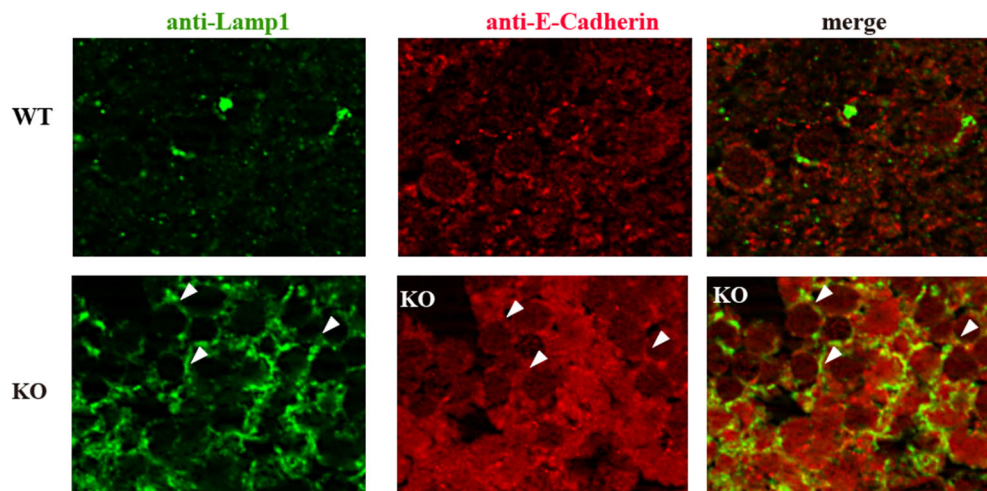


図 2 Lamp1 タンパク質組織染色（中脳）

3.2. Neu1-KO におけるリソソームエキソサイトーシスの亢進

Lamp1a のウェスタンブロッティングおよび免疫組織染色 (IHC) を実施した。Lamp1a は Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳において、WT よりも豊富に認められた。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、WT ゼブラフィッシュと比較して中脳全体に Lamp1a シグナルが強く検出され、特に視蓋の脳室周辺灰色帯で顕著に検出された。高倍率で観察したところ、WT ゼブラフィッシュでは Lamp1a シグナルは点状に検出されたが、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは細胞膜の E-カドヘリンと共局在することが確認された (図 2)。これらの結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュではリソソームのエキソサイトーシスが促進されていることが確認された。

3.3. Neu1-KO におけるグルタミン酸作動性ニューロンの活性低下

情動行動は様々なニューロンによって制御されていることから、Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳における神経活性ニューロンの遺伝子発現量をリアルタイム PCR で解析した。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュではいくつかの AMPA 型グルタミン酸受容体の遺伝子が著しく発現低下していることが示

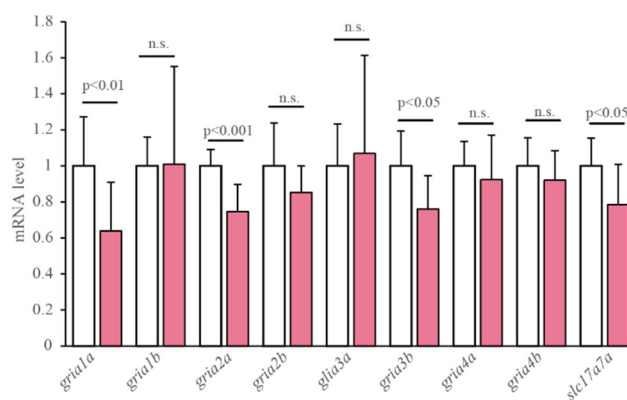


図 3 グルタミン酸作動性ニューロン遺伝子発現

された (図 3)。さらに、シナプス小胞の膜に結合し、グルタミン酸輸送を正に制御する小胞型グルタミン酸輸送体 (*slc17a7a* 遺伝子がコードするポリペプチド) の遺伝子発現も減少していた。一方で、ドーパミン作動性、セロトニン作動性、コリン作動性、GABA 作動性の神経細胞マーカーの遺伝子発現には、野生型との差は見られなかった。これらの結果は、AMPA 型グルタミン酸受容体が Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動行動に参与していることを示唆するものである。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、*sypb* と *holb* の遺伝子発現が有意に低下しており、シナプス可塑性の低下が推察された。

3.4. Neu1-KO におけるアストロサイトの活性化

3.3 より、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるグルタミン酸ニューロンの挙動の変化が示唆された。そこで、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーターの遺伝子発現を解析した。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、*eaat1a*、*eaat1c*、*eaat2* のレベルが抑制されていた。Glial fibrillary acidic protein (Gfap) はアストロサイトに高発現する中間径フィラメントタンパク質であり、その量はアストロサイトの活性化によって増加する。Neu1-KO ゼブラフィッシュは、野生型と比較して、脳内の *gfap* 遺伝子発現の上昇を示し、WT ゼブラフィッシュよりも Gfap タンパク質が多く認められた。Gfap の発現は ERK シグナルによって正に制御されていることから、ゼブラフィッシュの脳における ERK のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングで評価した。Neu1-KO ゼブラフィッシュは、WT ゼブラフィッシュと比較して ERK リン酸化が上昇し、IHC 解析では Neu1-KO ゼブラフィッシュの ERK リン酸化シグナルは Gfap シグナルと重なっていた。

3.5. Neu1-KO におけるミクログリアの活性化

近年、アストロサイトとミクログリアの相互作用は、グリア細胞の相互活性化という観点から議論されている。ミクログリア活性化のマーカーである L-plastin のシグナルは、WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの中脳および終脳において、複数の場所で散在したシグナルとして検出されたが、細胞の形態は互いに異なっていた。特に Neu1-KO のミクログリアはアメーバ状の形状を示した。この活性化したミクログリア細胞のシグナルは MAM 陽性細胞のシグナルと重なっており、ミクログリアにシアロ糖鎖が蓄積されていることが示された。そこで、M1 型ミクログリアの代表的なマーカー分子である iNOS と IL-1 β に着目し、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるそれら

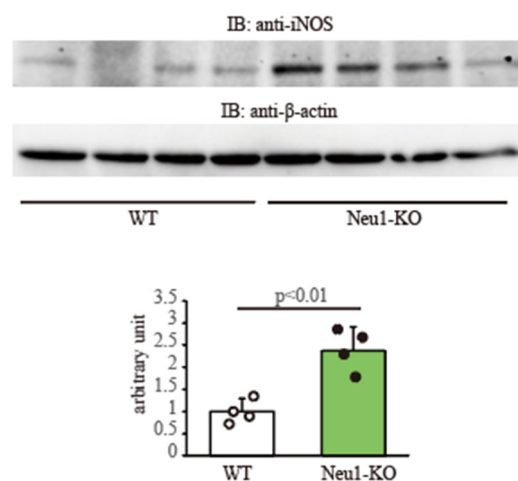


図 4 脳における iNOS タンパク質発現

Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるそれら

の発現レベルを評価した。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、iNOS のタンパク質レベルが WT ゼブラフィッシュと比較して有意に上昇した (図 4)。さらに、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、*il1b* の発現が上昇した。これらの結果は、Neu1-KO ゼブラフィッシュの M1 タイプのミクログリアが神経細胞の変性に関与している可能性を示している。

3.6. Neu1-KO における変性神経細胞の増加

アストロサイトとミクログリアの活性化は神経細胞の変性に大きく関与していることから、変性した神経細胞と反応する FJB 試薬を用いて Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳の神経細胞変性を解析した。その結果、中脳および終脳

の複数箇所で変性したニューロンが散乱したシグナルとして認められ (図 5)、Neu1-KO ゼブラフィッシュでニューロン変性が誘導されたことが示された。

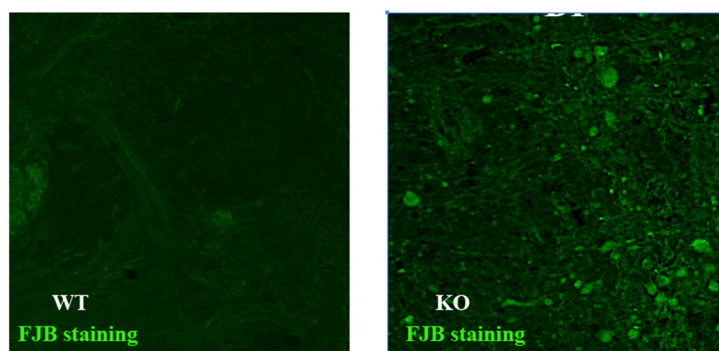


図 5 変性神経染色像 (中脳)

4. 考察

本研究では、Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞およびグリア細胞のプロファイルの変化を調べ、情動行動の変化の基礎となるメカニズムを考察した。その結果、Neu1 遺伝子の欠損により、Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞とグリア細胞のリソソームに変化が生じ、リソソームエキソサイトーシスが促進されて神経細胞の変性を伴うことが示された。神経細胞の変性は、リソソームのエキソサイトーシスの亢進だけでなく、グリア細胞の活性化によっても誘発されることが考えられた。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、グルタミン酸レベルの変化と神経細胞変性の結果、不安感受性の抑制と興味探索行動の亢進が起こることが推察された。Neu1 の酵素的性質は魚類間で保存されていることから、本研究の成果は、養殖の現場における、攻撃性の増加、遊泳行動異常による壁への激突死、また外因性ストレスによる摂餌量の低下、さらにこれらに起因する肉質の劣化や耐病性の低下などを抑制する技術開発への応用が期待できる。今後は、Neu1 タンパク質の活性を賦活化、または抑制する働きを持つ化合物や飼育方法の開発を進めて行く予定である。

5. 成果発表

本研究の成果は、以下で発表した。

Ikeda, A., Yamasaki, C., Kubo, Y., Doi, Y., Komamizu, M., Komatsu, M., Shiozaki, K.
Alteration of the neuronal and glial cell profiles in Neu1-deficient zebrafish.

6. 謝辞

本研究に助成していただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

7. 引用文献

1. Ikeda A, Komamizu M, Hayashi A, Yamasaki C, Okada K, Kawabe M, Komatsu M, Shiozaki K. Neu1 deficiency induces abnormal emotional behavior in zebrafish. *Sci Rep* (2021) 11:13477. doi: 10.1038/s41598-021-92778-9
2. Ryuzono S, Takase R, Oishi K, Ikeda A, Chigwechokha PK, Funahashi A, Komatsu M, Miyagi T, Shiozaki K. Lysosomal localization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Neu1 sialidase and its highly conserved enzymatic profiles with human. *Gene* (2016) 575:513–23. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.028
3. Honda A, Chigwechokha PK, Takase R, Hayasaka O, Fujimura K, Kotani T, Komatsu M, Shiozaki K. Novel Nile tilapia Neu1 sialidases: Molecular cloning and biochemical characterization of the sialidases Neu1a and Neu1b. *Gene* (2020) 742:144538. doi: 10.1016/j.gene.2020.144538
4. Okada K, Takase R, Hamaoka Y, Honda A, Ikeda A, Hokazono Y, Maeda Y, Hayasaka O, Kotani T, Komatsu M, et al. Establishment and characterization of Neu1-knockout zebrafish and its abnormal clinical phenotypes. *Biochem J* (2020) 477:2841–2857. doi: 10.1042/bcj20200348

Mechanism of action of Neu1, a novel factor regulating schooling behavior, aggression, and cognitive behavior in fish

Kazuhiro Shiozaki and Asami Ikeda

Laboratory of Aquatic Glycobiology, Department of Food and Life Science, Faculty of Fisheries, Kagoshima University

Address: 4-50-20 Shimo-arata, Kagoshima, 890-0056, Japan
TEL: 099-286-4175

Abstract: In aquaculture, maintaining the proper emotional state of target fish can improve survival and growth, and ultimately lead directly to increased landings. Recently, we found that Neu1 protein, which is expressed in the brain, is a novel factor that modulates emotional behaviors such as schooling, aggression, and cognition in fish. Therefore, elucidating the mechanism of action of fish Neu1 protein is expected to lead to the development of stable production technology.

In this study, we analyzed the molecular profiles in the brain of zebrafish lacking the Neu1 gene (Neu1-KO), and found that in the Neu1-KO zebrafish brain, the signal of Sia α 2-3-linked glycans was increased, accompanied by an increase in Lamp1a. Furthermore, gene expression of AMPA-type glutamate receptors such as *gria1a*, *gria2a*, and *gria3b*, as well as vesicular glutamate transporter 1, were suppressed. Neu1 deficiency induced astrocyte hyperactivation with increased Gfap and phosphorylated ERK levels, while mRNA levels of astrocyte glutamate transporter were decreased. *Sypb* and *Ho1b* mRNA levels, markers of synaptic plasticity, were also

suppressed by Neu1 deficiency. Aberrant activation of microglia was also evident, with increased expression of iNOS and the proinflammatory cytokine IL-1 β . In addition, drastic neuronal degeneration was detected in Neu1-KO zebrafish by Fluor-Jade B staining. Since the enzymatic properties of Neu1 are conserved among fish species, elucidation of the mechanism of Neu1 in zebrafish is expected to be applied to the development of new technologies to control increased aggression, death by crashing into walls due to abnormal swimming behavior, reduced food intake due to extrinsic stress, and deterioration of meat quality and disease resistance caused by these emotional abnormalities in the aquaculture field.