

シアリダーゼ Neu1 遺伝子欠損ゼブラフィッシュの
情動行動異常メカニズムの解明と精神疾患モデルとしての可能性
(Elucidation of the mechanism of abnormal emotional behavior in Neu1-knockout
zebrafish and its potential as a model of psychiatric disorders)

鹿児島大学大学院連合農学研究科

応用生命科学専攻

池田 麻美

2023

Abstract

Psychiatric disorders exhibit emotional abnormal symptoms such as depression, bipolar disorder, and schizophrenia. Recently, it has been reported that intracellular sialoglycoconjugate remodeling and the activity of the lysosomal autophagy system are dramatically altered in emotional abnormalities, but the details of these mechanisms are still unknown. Sialidase Neu1 is a glycosidase that is highly expressed in the brain and is responsible for the catabolic degradation of sialo-glycans in lysosomes. It is expected that the involvement of Neu1 in the remodeling of sialoglycoconjugates in emotional abnormalities, but the evaluation of the function regulatory by Neu1 in emotional abnormalities has not been conducted. In this study, we aimed to elucidate the alteration of emotional behavior by Neu1 deficiency and its mechanism by using Neu1-knockout zebrafish (Neu1-KO).

In normal behavioral tests, Neu1-KO had suppressed shoaling and aggression, suggesting reduced sociality. In the 3-Chambers test, Neu1-KO showed strong interest toward different fish species, whereas the wild type showed avoidance behavior. These changes in emotional behavior were consistent with down-regulated the mineralocorticoid receptor (*mr*), neuropeptide Y (*npv*), and isotocin (human oxytocin homolog, *ist*) genes in Neu1-KO. We then analyzed neuronal and glial cells properties to elucidate the mechanism of the abnormal emotional behavior in Neu1-KO. In microglia, accumulation of α 2-3 sialo-oligosaccharides and enhancement of lysosomal exocytosis induced by sialylation of Lamp1a were observed in the Neu1-KO brain. The microglia of Neu1-KO were transformed to a neuropathic (M1) action accompanied by the secretion of inflammatory cytokines, resulting in neuronal degeneration occurred based on the necroptosis. Furthermore, the astrocyte was also activated in Neu1-KO, but the expression of their glutamate transporter-related genes was down-regulated. The expression of glutamate receptor genes in postsynaptic cells and downstream neuroplasticity-related genes were also decreased, suggesting reduced glutamatergic neuronal activity in Neu1-KO.

Our results suggest that abnormal microglial activation would trigger neuronal and glial cells alterations in Neu1-KO, resulting in reduced sociality and anxiety due to suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal system. In addition, the observed emotional behavior and alterations of neuronal and glial cells in Neu1-KO were quite similar to human psychiatric disorders such as autism spectrum disorder. We suggest the potential of Neu1-KO as a model of human psychiatric disorders.

要旨

精神疾患とは、うつ病や双極性障害、統合失調症など情動異常を伴う疾病である。最近、情動異常に伴い、細胞内シアロ複合糖質のリモデリングおよびリソソーム・オートファジー系の活性が劇的に変化することが明らかになってきたが、その詳細は不明である。シアリダーゼ Neu1 は脳で高く発現し、リソソームで糖鎖の異化分解を担っている糖鎖分解酵素である。Neu1 の情動異常におけるシアロ複合糖質の糖鎖リモデリングへの関与が推測される一方で、Neu1 の情動制御機能についての評価は行われていない。そこで本研究では、Neu1 発現変化に伴う情動行動の変容およびそのメカニズムを解明することを目的とし、Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュ (Neu1-KO) を用いた解析を行った。

通常行動解析の結果、Neu1-KO は群れ形成能や攻撃性が抑制されており、社会性の低下が示唆された。3-Chambers 試験において異魚種への反応を観察したところ、野生型が忌避行動を示すのに対し、Neu1-KO では異魚種への接近行動が増加した。また、黑白選好試験において、Neu1-KO は本来不安を感じる白側領域での遊泳時間が顕著に増加し、不安感受性の低下が明らかとなった。これら情動行動の変化は、Neu1-KO の鉍質コルチコイド受容体(*mr*)、神経ペプチド Y (*npy*)、およびイソトシン (ヒトオキシトシンホモログ、*ist*) 遺伝子の発現低下と一致した。

次に、Neu1-KO の情動行動異常のメカニズムを明らかにするため、神経細胞およびグリア細胞の性状解析を行った。Neu1-KO では、脳全体で α 2-3 シアロオリゴ糖の蓄積、および Lamp1a のシアリル化によるリソソームエキソサイトーシスの亢進が認められ、それらは主にミクログリアに由来していた。Neu1-KO のミクログリアは炎症性サイトカインの分泌を伴う傷害性の M1 型へと変化しており、ネクロプトーシスによる神経細胞変性が明らかとなった。さらに Neu1-KO ではアストロサイトも活性化していたが、そのグルタミン酸トランスポーター関連遺伝子群の発現は低下していた。シナプス後細胞におけるグルタミン酸受容体遺伝子、さらにその下流の神経可塑性関連遺伝子発現も低下していたことから、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が示唆された。

本研究の結果より、Neu1-KO ではミクログリア異常活性化を起点として神経細胞およびグリア細胞の変容が引き起こされ、その結果、視床下部-下垂体-副腎系の抑制による社会性および不安感受性の低下が生じることが示唆された。また、Neu1-KO の情動行動や神経およびグリア細胞の変容が、自閉症スペクトラムなどヒト精神疾患の特徴と非常に類似することから、Neu1-KO のヒト精神疾患モデルとしての可能性が期待された。

目次

| | |
|--|----|
| 緒言 | 1 |
| 第一章 Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動行動および関連遺伝子群発現解析 | 7 |
| 1-1 背景および目的 | 8 |
| 1-2 実験方法 | 11 |
| 1-2-1 使用魚種 | 11 |
| 1-2-2 ゼブラフィッシュの遊泳能力試験 | 11 |
| 1-2-3 群れ行動試験 | 12 |
| 1-2-4 攻撃性試験 | 12 |
| 1-2-5 鏡行動試験 | 13 |
| 1-2-6 3-Chambers 試験 | 13 |
| 1-2-7 黑白選好試験 | 14 |
| 1-2-8 Real-time PCR | 14 |
| 1-2-9 レクチンブロッキングおよびウエスタンブロッキング | 15 |
| 1-2-10 薄層クロマトグラフィー (TLC) | 16 |
| 1-2-11 警報フェロモン曝露実験 | 16 |
| 1-2-12 データ解析 | 17 |
| 1-3 実験結果 | 18 |
| 1-3-1 ゼブラフィッシュの遊泳能力解析 | 18 |
| 1-3-2 群れ行動解析 | 18 |
| 1-3-3 攻撃性解析 | 19 |
| 1-3-4 「見慣れない」ゼブラフィッシュに対する行動解析 (鏡行動試験) | 20 |
| 1-3-5 ゼブラフィッシュ集団に対する行動解析 (3-Chambers 試験) | 21 |
| 1-3-6 異魚種に対する行動解析 (3-Chambers 試験) | 22 |
| 1-3-7 黑白選好解析 | 24 |
| 1-3-8 情動関連遺伝子群の real-time PCR 解析 | 25 |
| 1-3-9 シアロ糖タンパク質解析 | 26 |
| 1-3-10 スフィンゴ糖脂質解析 | 27 |
| 1-3-11 リソソーム関連遺伝子群の real-time PCR 解析 | 28 |
| 1-3-12 警報フェロモン曝露ゼブラフィッシュの脳内遺伝子解析 | 29 |
| 1-4 考察 | 31 |

| | |
|--|-----|
| 第二章 Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞およびグリア細胞の性状解析 | 86 |
| 2-1 背景および目的 | 87 |
| 2-2 実験方法 | 90 |
| 2-2-1 Real-time PCR 解析 | 90 |
| 2-2-2 ウェスタンブロッティング | 91 |
| 2-2-3 免疫組織染色 (Immunohistochemistry : IHC) | 91 |
| 2-2-4 統計解析 | 92 |
| 2-3 結果 | 93 |
| 2-3-1 脳内シアロ複合糖質の免疫組織染色 | 93 |
| 2-3-2 脳内リソソーム関連タンパク質解析 | 94 |
| 2-3-3 作動性ニューロン関連遺伝子の発現解析 | 95 |
| 2-3-4 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 関連遺伝子発現解析 | 96 |
| 2-3-5 ミクログリアの性状解析 | 97 |
| 2-3-6 神経細胞変性解析 | 99 |
| 2-4 考察 | 101 |
| 総合考察 | 138 |
| 謝辞 | 148 |
| 参考文献 | 149 |

緒言

シアル酸は 9 つの炭素から構成される糖であり、カルボン酸を有し 5 位アミノ基の修飾の違いにより、主に *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、およびデアミノノイラミン酸 (KDN) などが知られている。酸性糖であるシアル酸は細胞表面などに存在する糖タンパク質や糖脂質など複合糖質の糖鎖末端に結合している。シアル酸が結合したシアロ複合糖質は、シアル酸の脱離によってその構造や機能を変化させることにより、細胞分化、胚発生、発がん、および細菌感染などに関与している¹⁻⁴。

近年、精神疾患の罹患者数は上昇を続けており（厚生労働省 第 13 回 地域で安心して暮らせる精神保健医療福祉体制の実現に向けた検討会資料、2022、<https://www.mhlw.go.jp/content/12200000/000940708.pdf>）、その中でも情動異常を伴う精神疾患としては、うつ病や双極性障害、統合失調症、自閉症などが知られている。これら精神疾患は脳機能に障害をきたすことにより発症し、ヒトの社会生活に深刻な影響をもたらす。しかしながら、その発症要因は遺伝や生活環境に起因する過剰なストレスなど様々であり、治療法の確立や創薬研究は容易ではない。最近、この情動異常に細胞内のシアロ複合糖質やリソソーム・オートファジー系が関与することが報告されている⁵⁻⁷。例えば、シアロ複合糖質の一つである NCAM タンパク質に結合したポリシアル酸 (PSA) は、脳内の

神経栄養因子や神経伝達物質と特異的に結合することで神経機能を制御しており、統合失調症などの精神疾患への関与が報告されている⁵。また、細胞内の自己タンパク質を分解するリソソームのオートファジー機能の低下は自閉症様行動を誘導することや⁶、細胞内にシアロオリゴ糖を蓄積させることなども報告されている⁷。これらはシアロ複合糖質の構造変化や異常な蓄積によるものであり、このシアロ複合糖質の機能変化が情動異常に関与していることが推測される。シアロ複合糖質は、タンパク質や脂質に糖鎖が結合した構造であり、この糖鎖末端にはシアル酸が結合している。このシアル酸は、脊椎動物では遊離型で存在することはほとんどなく、シアロ複合糖質からの遊離によりその構造や機能が変化することが知られている⁸。わずかに存在する遊離型シアル酸の大半が、シアル酸結合部位を認識して脱シアリル化を行う糖鎖分解酵素シアリダーゼにより遊離されたものである⁸。

シアリダーゼ (EC 3.2.1.18) は、シアロ複合糖質からシアル酸を遊離させるグリコシダーゼの一種であり、シアル酸の遊離を通じて糖鎖分子の立体構造や受容体の認識機構などを変化させることにより、様々な生命現象に関与している⁹。例えば、インフルエンザ A 型ウイルスは宿主細胞の糖鎖末端のシアル酸に結合することで宿主細胞へ侵入・増殖した後、ウイルス自身のシアリダーゼによる脱シアリル化で感染細胞から遊離し感染を拡大することが知られている¹⁰。また、新たな神経回路形成時においてシナプスが作られる際に、神経接着因子である NCAM に結合している PSA が除去される必要があり、シアリダーゼ

は PSA の脱シアリル化によってシナプス形成に関与している¹¹。

このように様々な生命現象に関与しているシアリダーゼは、脊椎動物において Neu1、Neu2、Neu3、および Neu4 の 4 つのアイソザイムが存在しており、酵素学的性状や細胞内局在がそれぞれ異なることが知られている⁸。この中でも、Neu1 は最も多く存在するアイソザイムであり、脳で高発現していることが知られている。Neu1 は、主にリソソームに局在する代表的な酵素の一つであり、オリゴ糖や糖タンパク質などシアロ複合糖質の糖鎖末端からシアル酸を遊離させる¹²。リソソームでは Neu1 によるシアロ複合糖質の脱シアリル化が、糖鎖異化分解の初発反応を制御する上で重要であり、さらにリソソームエキソサイトシスを制御することが知られている。また、哺乳類では Neu1 の一部は細胞膜に局在し、細胞接着やインスリンシグナル、エラスチン結合を制御しており¹³⁻¹⁵、Neu1 の酵素活性はカテプシン A によって活性化/安定化されることが知られている¹⁶。

リソソーム内には、Neu1 を含め様々な酵素が存在するが、これらの欠損はリソソーム病と呼ばれる先天性代謝異常症を発症し、情動異常を伴うことが知られている¹⁷。リソソーム病は、リソソーム酵素の欠損などにより発症する疾病であり、100,000~200,000 人に 1 人が罹患する希少性の高い難病である¹⁷。これまでに約 70 種類のリソソーム病が報告されており、そのほとんどが異化分解酵素などのリソソーム関連タンパク質の遺伝子変異によって引き起こされることが明らかとなっている¹⁷。リソソーム病は、リソソーム酵素の機能不全により分解されない基質が蓄積し、リソソーム機能が低下することがそのメカニズ

ムとして知られている¹⁸。このリソソーム病患者における種々の症状の中で、精神疾患の症状がいくつか挙げられている。例えば、リソソーム酵素である α -ガラクトシダーゼが欠損もしくは活性低下することにより発症するファブリー病の患者では、不安やうつ様症状などの気分障害を発症する¹⁹。また、ニーマン・ピック病 C 型患者では幻覚、妄想、認知機能の低下、うつ病、双極性障害などの精神症状のほか、破壊的、攻撃的な行動が見られることが知られている²⁰。また、 α -マンノシドーシス、ムコ多糖症、テイ-サックス病の患者などにおいても気分障害を示すことが報告されている²¹。

このようにリソソーム病はその多くで情動障害が認められるが、その一方で Neu1 欠損症であるシアリドーシス (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) #256550)¹⁴では情動異常に関する報告はほとんど知られていない。シアリドーシスは、NEU1 (染色体位置 6p21.3) のゲノム DNA 変異に起因する先天性遺伝病であり 250,000~2,000,000 人に 1 人の割合で罹患することが報告されている^{22,23}。この疾患は難治性のリソソーム病であり、その病態は I 型 (軽症) と II 型 (重症) の 2 つに分類され、さらに、先天性、乳児期、若年性の 3 形態に細分化される^{22,23}。シアリドーシス患者の症状は、ミオクロヌス、脊髄奇形、チェリーレッド斑点、内耳難聴、肝脾腫、および視力障害などが挙げられる^{24,25}。また、シアリドーシス患者には、精神運動発達遅延、低 IQ などの神経変性疾患様症状が見られ^{22,26}、リソソーム機能の異常により大量のシアロ複合糖質が尿中に排泄されることが報告されている¹⁵。シアリドーシスの研究には、SM/J マウスおよび Neu1-KO マウスの両

方が用いられ、ヒトシアリドースと同様の症状が報告されているが^{27,28}、モデル動物においても情動異常の報告例はない。シアリドースは希少疾患であり、現時点でその治療法は確立されておらず、これまでの Neu1 研究はシアリドースの主な症状である骨や筋肉の形成異常や治療法に関するものがほとんどであった。しかしながら、シアロ複合糖質の蓄積を伴うリソソーム病では中枢神経の異常による情動異常が報告されており²¹、また、ヒトシアリドース患者においても中枢神経異常が認められている^{22,23}。このことから本研究ではシアロ複合糖質の脱シアリル化や蓄積の実行分子である Neu1 が、シアロ複合糖質の変化を介して情動異常に関与している可能性があるという着想に至った。

Neu1 の情動異常への関与を解明するためには培養細胞など *in vitro* による解析手法ではなく、情動行動解析が難しいマウスやラット以外の脊椎動物実験モデルを選定し、さらに Neu1 遺伝子を欠損させたノックアウト動物の作出が必要不可欠である。Neu1 遺伝子は、魚から哺乳類まで脊椎動物全般に共通して保存されており⁹、これまでに魚類（メダカ、ゼブラフィッシュ、ティラピア、メキシカンテトラ）において生理機能の解析が行われてきた²⁹⁻³²。Neu1 はヒト同様に魚類でもリソソームに局在し、シアロオリゴ糖を基質とするなど、その酵素学的性質（至適 pH、基質特異性など）も保存されていることが明らかになっている⁹。また魚類には哺乳類の情動関連遺伝子群が高く保存されており^{33,34}、これらの理由から Neu1 研究に魚類を用いることが有効であると考えられる。

このような状況を踏まえ、本研究では、脊椎動物のモデル動物として、ゼブラフィッシュ

ユ (*Danio rerio*) に着目した。ゼブラフィッシュはインド原産の体長約 5 cm の小型熱帯魚である。ゼブラフィッシュは全ゲノム解読が完了しており、ゲノム編集による変異体の作出が容易であるため、その多くの系統がヒト疾患モデルとして確立している³⁵。鹿児島大学水産学部水圏糖鎖生物学研究室では、既に、Neu1 遺伝子を欠損させた Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュ (Neu1-KO) 系統を樹立しており²⁹、in vivo による行動試験、遺伝子解析、および免疫染色などが可能である。また、ゼブラフィッシュはマウスやラットに比べて生活史が短く、飼育に必要なスペースやコストもマウスなどの哺乳類に比べて格段に小さいため、研究に供するにあたり利点が多い。

以上のような背景から、本研究では Neu1 遺伝子を欠損させた Neu1-KO ゼブラフィッシュを用いてその情動行動、遺伝子発現、および脳内性状の解析を行い、Neu1 の情動異常との関係性を明らかにすることを目的とした。情動異常を伴う精神疾患は発症要因が様々であり、治癒しても再発を繰り返すなど完治が容易でないことや、治療薬の副作用なども多く報告されている³⁶。本研究において Neu1 と情動異常の関連性が明らかになることで、精神疾患の治療方法や創薬研究の基礎的知見を得ることが可能となる。

第一章

Neu1-KO ゼブラフィッシュの 情動行動および関連遺伝子群発現解析

1-1 背景および目的

うつ病や双極性障害、統合失調症など、情動異常を伴う精神疾患はヒトの社会生活に深刻な影響をもたらす重篤な疾患であるが、一方で、その要因は様々であることから、治療法の確立や創薬開発は容易ではないのが現状である。最近、この情動異常に細胞内シアロ複合糖質やリソソーム・オートファジー系が関与していることが報告されている⁵⁻⁷。例えば、シアロ複合糖質の一つである NCAM タンパク質に結合したポリシアル酸は、脳内の神経栄養因子や神経伝達物質と特異的に結合することで神経機能を制御しており、統合失調症などの神経疾患への関与が報告されている⁵。また、オートファジー機能の低下は、自閉症様行動を誘導し、細胞内にシアロオリゴ糖を蓄積させることが報告されている^{6,7}。不要になったシアロ複合糖質はリソソームで異化分解され、遊離した糖は再び糖鎖合成に用いられる。また、オートファジーは不要なタンパク質やオルガネラなどをオートファゴソームへ取り込みリソソームで分解する。これらは、情動異常で観察されるシアロ複合糖質やオートファジーの変化が、細胞内の「分解工場」の役割を持つリソソームの状態変化と関係していることを示唆しているが、その関連性についての報告はこれまでにない。

シアロ複合糖質はタンパク質や脂質に糖鎖が結合した分子であり、この糖鎖は、核酸やタンパク質に続き「第三の生命鎖」と呼ばれ、複合糖質の形成により多岐に渡る生命機能の調節や維持に関与していることが明らかにされている。この複合糖質の糖鎖を異化分解

するのが糖鎖分解酵素である。リソソーム酵素であるシアリダーゼ Neu1 は、シアロ複合糖質の糖鎖を異化分解することで糖鎖分解の初発反応を司る糖鎖分解酵素であり、この Neu1 の異化分解のターゲットとなる糖鎖結合型のシアル酸は脳内に多く存在することが知られている³⁷。

また、リソソーム酵素の欠損は、難病であるリソソーム病を引き起こすことが知られており、Neu1 が欠損するとシアリドーシスを発症する^{14,17,18}。リソソーム病では、その多くでオートファジー異常が報告されており、このことはリソソーム酵素とオートファジーの機能に関連性があることを示唆している。

このような背景を踏まえ、Neu1 はシアロ複合糖質やオートファジーに関与することで情動の制御に関わっている可能性が推測されるが、これまで、Neu1 欠損による感情や社会的相互作用など情動行動への関与について報告はない。

本研究では、Neu1 の情動への関与を明らかにするため、実験動物としてゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュは、ヒトと同様に集団形成や攻撃性、社会的相互作用を有しており、魚類における行動解析の方法論も既に確立されていることから^{33,34}、情動行動解析に優れた実験動物であるといえる。また、ヒトと魚類において、その遺伝子の約 70% が保存されており、Neu1 や情動関連遺伝子群も保存されていることから、ゼブラフィッシュの情動変化が遺伝子レベルで解析できる。加えて、ゼブラフィッシュは全ゲノム情報の解読が完了しているため、特定の遺伝子を欠損させたノックアウト動物の作出も可能であ

る。鹿児島大学水産学部水圏糖鎖生物学研究室では、これまでに CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュ (Neu1-KO) 系統を樹立した²⁹。この Neu1-KO ゼブラフィッシュは、第 1 エキソンに 5 塩基の欠失を有し、フレームシフトを引き起こした結果、Neu1 ポリペプチドの翻訳が中断されたものである²⁹。

本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュを用いて、基本的な情動である攻撃性、不安、興味探索、および高次の情動である社会性などの変化について行動試験により解析した。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子の発現解析により、Neu1 欠損が情動行動とその関連遺伝子群の発現変化にどのような影響を与えるのかについて検討した。

1-2 実験方法

1-2-1 使用魚種

Neu1-KO ゼブラフィッシュは、理化学研究所の RIKEN-WT (RW) 株を CRISPR / Cas9 ゲノム編集で Neu1 を欠損させた系統を用いた²⁹。ゼブラフィッシュは、14 / 10 時間の明暗周期で飼育し、水温 28 °C、水質 pH 6.8-7.5、硝酸塩 < 12.5 mg L⁻¹、亜硝酸塩 < 0.3 mg L⁻¹、塩素 < 0.1 mg L⁻¹ の条件を維持した。ゼブラフィッシュの仔魚は 0.5 L 水槽で飼育し、ゾウリンシを与えた。ゼブラフィッシュの仔魚および成魚は 3 L 水槽で飼育し、ブラインシユリンプと市販飼料（おとひめ B2、丸紅日清飼料株式会社）で 1 日 2 回の給餌を行った。Neu1-KO ゼブラフィッシュは老齢期（11 ヶ月以上）に脊椎湾曲による遊泳能力の低下が見られるため²⁹、本研究では脊椎湾曲の症状のない若年成体（6 ヶ月未満）のゼブラフィッシュを用いた。ケーブフィッシュ (*Astyanax mexicanus*) はペットショップで購入し、ゼブラフィッシュと同じ明暗・摂餌条件で飼育した。環境変化がゼブラフィッシュの情動行動に与える影響を最小限に抑えるため、行動試験はゼブラフィッシュの飼育水槽が設置された部屋で実施した。

1-2-2 ゼブラフィッシュの遊泳能力試験

20 × 18.5 × 6 cm（長さ×幅×高さ）の実験水槽の中央にゼブラフィッシュを 1 尾投入

した。5 分間の馴致後、ビデオカメラ（HDR-CX430、SONY）を用いて 5 分間の遊泳行動を撮影した。ビデオカメラは水槽直上から撮影するように固定した。撮影後、Move-tr / 2D ソフトウェア（Library）を用いて、動画データから遊泳軌跡、速度、総遊泳距離を求めた。

1-2-3 群れ行動試験

28 × 17.5 × 14 cm の透明な水槽にゼブラフィッシュを雌雄の区別無く 5 尾投入し、馴致時間無しで 5 分間遊泳行動をビデオカメラで撮影した。その後、25 分経過時に再び 5 分間行動を撮影した。ビデオカメラは水槽の側面から撮影した。ゼブラフィッシュ各個体の目と目の距離を個体間距離と定義し、撮影開始後 30 秒毎の静止画像を用いて個体間距離を計測した。

1-2-4 攻撃性試験

オスのゼブラフィッシュ 2 尾を透明な水槽（24.5 × 7.9 × 10 cm）に投入し、その遊泳行動をビデオカメラで 10 分間撮影した。ビデオカメラは水槽の側面から撮影できるように固定した。Move-tr / 2D ソフトウェアを用いて、撮影開始後 1 分間の遊泳行動データから、遊泳加速度、遊泳距離、遊泳速度、移動軌跡を求めた。遊泳軌跡は 10 分間すべてのデータを解析した。ゼブラフィッシュが相手に向かって加速しながら追尾する行動を攻撃行動と定義した。

1-2-5 鏡行動試験

24 × 10 × 5 cm の水槽の片側壁面に鏡を設置し、水槽の中央部にゼブラフィッシュを投入した (図 1-4 a)。遊泳行動はビデオカメラで 15 分間撮影し、その後、Move-tr / 2D ソフトウェアで解析した。ビデオカメラは水槽直上に固定した。鏡から 5 cm の範囲をアプローチエリアとした。アプローチエリアへの侵入頻度と総時間、遊泳距離、移動軌跡、鏡の中の相手を追尾する総時間数を求めた。

1-2-6 3-Chambers 試験

実験水槽 (26.8 × 19.5 × 5.5 cm) の片側に 2 つの小水槽 (9.1 × 5.3 × 5.5 cm) を配置し、2 つの小水槽エリアと 1 つの実験エリアを設けた (図 1-5 a)。この 2 つの小水槽の片方に雌雄 2 尾ずつのゼブラフィッシュ、またはケープフィッシュを投入し、もう 1 つの小水槽は飼育水のみとした。各小水槽前から 1 cm 以内の範囲をアプローチエリアと定義した。実験に供するゼブラフィッシュは、実験エリアの中央に投入した。5 分間の馴致後、ビデオカメラを用いて供試魚が、ゼブラフィッシュの集団に対する遊泳行動を 5 分間撮影した。ビデオカメラは水槽直上に固定した。アプローチエリアでの滞在時間、アプローチエリアへの侵入回数、総遊泳距離、遊泳軌跡を Move-tr / 2D ソフトウェアで解析した。

1-2-7 黒白選好試験

黒色と白色領域から成る実験水槽（23 × 13 × 6 cm）の中央部に脱着可能な仕切り板を設置し、黒色領域にゼブラフィッシュ 1 尾を投入した（図 1-7 a）。馴致時間は設けず、投入直後に仕切り板を外し、遊泳行動をビデオカメラで 5 分間撮影した。ビデオカメラは水槽直上に固定した。撮影終了後、Move-tr / 2D ソフトウェアを用いて、黒色、白色領域それぞれの総滞在時間、各領域への侵入回数、速度、遊泳軌跡について解析した。

1-2-8 Real-time PCR

Neu1-KO および WT ゼブラフィッシュを氷水で安楽死させた後、脳を摘出した。Sepasol-RNA I Super G solution（ナカライテスク）を用いてゼブラフィッシュ脳から total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO）を用いて cDNA を合成した。

イソトシン (*ist*)、ミネラルコルチコイド受容体 (*mr*)、メラニン凝集ホルモン (*mch*)、アルギニンバソトシン (*avt*)、神経ペプチド Y (*npy*)、オレキシン (*orx*)、チロシンヒドロキシラーゼ 1 および 2 (*th1* および *th2*)、リソソームエキソサイトーシス関連膜タンパク質 1a および 1b (*lamp1a* および *lamp1b*)、カテプシン A (*ctsa*)、β-ガラクトシダーゼ 1 (*glb1*)、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ (*galns*)、および転写因子 EB (*tfeb*) 各遺伝子を KOD SYBR qPCR Master Mix（TOYOBO）を用いて、StepOne real-time PCR（Thermo

Fisher Scientific) にて解析した。定量は、cDNA の連続希釈から得られた検量線を用いて行った (Pffafli 法)。各サンプルの RNA 量や質の補正には、内部標準遺伝子として *actb* の遺伝子発現量を用いた。プライマーの配列は表 1 に示した。

1-2-9 レクチンブロッキングおよびウエスタンブロッキング

ゼブラフィッシュ脳を前項 1-2-8 と同様の方法で抽出し、BioMasher (Nippi) を用いて 300 μ L の Lysis Buffer (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 フェニルメタンスルホニルフルオリドを含む 1% Triton X-100 / リン酸緩衝塩 (PBS) でホモジナイズし、13,200 \times g で 4°C、15 分間遠心分離した後にライセートを得た。このライセートを SDS-PAGE に供し、続いて PVDF 膜に転写した後、1% 牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングを行った。糖タンパク質の検出には、ビオチン標識した MAM (*Maackia amurensis* lectin、1 / 500 diluted、J-CHEMICAL) と SSA レクチン (*Sambucus Sieboldiana* Lectin、1 / 500 diluted、J-CHEMICAL) を用い、HRP-Streptavidin で検出した。ポリシアル酸、Lamp1、および β -アクチンは、anti-ポリシアル酸モノクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、クローン 735、Abnova)、anti-Lamp1 ポリクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、ab24170、Abcam)、および anti- β -アクチンモノクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、66009-1-g、Proteintech) をそれぞれ用い、その後 HRP 標識二次抗体と反応させた。各バンドのシグナルは、EzWestLumi plus 化学発光試薬 (ATTO) を用いて ChemiDoc Touch (Bio-

Rad) で検出した。定量解析は、Image Lab Touch ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて行った。

1-2-10 薄層クロマトグラフィー (TLC)

クロロホルム：メタノール (1 : 2、1 : 1、2 : 1、v/v) を用いて、ゼブラフィッシュ脳から全脂質を抽出した。全脂質は DEAE-Sephadex A-25 (酢酸型、Sigma-Aldrich) を用いて酸性画分と中性画分に分画した。各画分をメタノール中 0.2 N NaOH でけん化し、Sep-Pak C18 cartridge (GL Sciences) で脱塩した。得られた脂質は薄層クロマトグラフィー (TLC) に供し、酸性糖脂質はクロロホルム/メタノール/0.2 % CaCl₂ (55 : 45 : 10、v/v/v)、中性糖脂質はクロロホルム/メタノール/H₂O (60 : 25 : 4、v/v/v) を溶媒として分離した。分離された糖脂質は、オルシノール-H₂SO₄ で検出した。定量解析は、Quantity One ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて実施した。

1-2-11 警報フェロモン曝露実験

メスで削ぎ落したゼブラフィッシュの鱗を、4°C に冷却した PBS 中でホモジナイズし、4°C、5 分間 12,000 × g で遠心分離した上清を警報物質として使用した。0.06 尾分の警報物質を含む飼育水を満たした 2 L 水槽にゼブラフィッシュを 15 分間曝露した。1-2-9 と同様の方法で、曝露したゼブラフィッシュの *neul*、*npv*、および *lamp1a* 遺伝子を解析した。

1-2-12 データ解析

本研究で得られた結果は、SPSS 統計ソフトウェア (IBM) を使用し、結果は平均値±標準偏差で表した。2 群間の差は、t 検定を用いて統計処理を行った。

1-3 実験結果

1-3-1 ゼブラフィッシュの遊泳能力解析

情動行動試験に先立ち、Neu1-KO ゼブラフィッシュと野生型 (WT) ゼブラフィッシュの遊泳能力に差が無いことを確認するため、通常水槽における遊泳行動を観察した。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュと WT の遊泳軌跡に顕著な差は観察されなかった。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュは遊泳距離や平均遊泳速度が WT ゼブラフィッシュと同程度であり、水槽壁面に沿いながらの遊泳やフリージングなどの異常な遊泳行動は見られなかった (図 1-1 a-c)。この試験結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュと WT の遊泳能力は同等であることが明らかとなった。

1-3-2 群れ行動解析

群れ行動は、集団行動による社会性の構築、効率的な採餌、外敵に対する防御など、魚類の生存に有利となる行動であり、不安や社会性などの情動に起因する生存本能の一つである³⁸。本実験では、Neu1-KO ゼブラフィッシュおよび WT ゼブラフィッシュを用いて群れ行動試験を行った。ゼブラフィッシュの個体間距離は群れ形成の指標となることが知られている³⁸。実験結果から、WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ共に実験水槽投入直後の新奇環境下では個体間距離に有意な差がなく、群れの形成が観察された。しかし、240

秒経過後、Neu1-KO ゼブラフィッシュの個体間距離は WT に比べ約 3.0 倍増加した ($p < 0.01$ 、図 1-2 a)。続いて、通常環境時の社会性相互作用を評価するために、実験水槽内でゼブラフィッシュを 30 分間馴致させた後に個体間距離を解析した。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、馴致後においても WT に比べて有意に長い個体間距離が観察された ($p < 0.01$ 、図 1-2 b)。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、最も遠距離の個体との距離が WT ゼブラフィッシュに比べ約 3.5 倍長くなったが ($p < 0.0001$ 、図 1-2 c)、最も近接した個体との距離には変化が見られなかった (図 1-2 d)。本試験の結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは個体間距離が長くなり、群れ形成能が低下していることが示唆された。

1-3-3 攻撃性解析

Neu1-KO ゼブラフィッシュの攻撃性は生存本能の一つであり、オス同士のゼブラフィッシュは餌や縄張り、およびパートナーなどを獲得するために攻撃行動を示す³⁹。攻撃性試験の結果、WT ゼブラフィッシュは、お互いが遊泳速度を加速させながら水槽の底部において継続的に追尾行動をとるため、2 尾のゼブラフィッシュの遊泳軌跡はその大部分が重なっていた (図 1-3 a)。一方、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、相手に対しほとんど無関心であるような遊泳行動を示し、2 尾の遊泳軌跡はその大部分が重ならなかった (図 1-3 a)。実際に攻撃行動を示した時間を測定したところ、WT ゼブラフィッシュはその時間が平均 175 秒であるのに対し、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは平均 10 秒と有意に低下していた

($p < 0.05$ 、図 1-3 e)。Neu1-KO ゼブラフィッシュは追尾行動をほとんど示さないことから、急加速が少なく遊泳速度も遅くなり、その結果、遊泳距離は短くなった (図 1-3 b-d)。これらの結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュは WT ゼブラフィッシュに比べ攻撃性が低下していることが明らかとなった。

1-3-4 「見慣れない」ゼブラフィッシュに対する行動解析 (鏡行動試験)

鏡行動試験は、実験魚の社交性、攻撃性、興味探索行動などを評価するために用いられる (図 1-4 a)³⁴。ゼブラフィッシュは鏡に映った自分自身を「見慣れない」初見のゼブラフィッシュと認識するため、初見の同種に対する反応 (社交性、興味・探索、攻撃性) の評価が可能である。実験の結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、WT ゼブラフィッシュとは明らかに異なる鏡への接近行動を示した。実験開始直後は、WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ共に鏡中の初見のゼブラフィッシュに興味を示した (図 1-4 b, f)。一方、約 5 分経過後では WT は鏡像への興味・関心行動が減少し、これに伴い鏡前領域での滞在時間が減少した (図 1-4 b, f)。その一方で、Neu1-KO では、約 10 分経過後も鏡像への興味探索行動は持続し、鏡前領域での滞在時間は WT に比べ長くなった (図 1-4 b, f)。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、鏡前領域での総遊泳時間も WT の約 2.4 倍増加した ($p < 0.01$ 、図 1-4 d)。加えて、Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡前領域への総進入回数は WT よりも少なかった ($p < 0.01$ 、図 1-4 e)。このことから WT ゼブラフィッシュと比較して、

Neu1-KO ゼブラフィッシュは一回の侵入でより長い時間鏡前領域に滞在していることが明らかとなった。

Neu1-KO および WT は、総遊泳距離が同程度であったため (図 1-4 c)、Neu1-KO ゼブラフィッシュの興味探索行動の持続は社会的相互作用の増加に起因している可能性が示唆された。また、試験開始後 10 分間、Neu1-KO ゼブラフィッシュは WT ゼブラフィッシュよりも長く鏡前領域に滞在するが、10 分経過以降は WT とほぼ同等であった (図 1-4 f)。

Neu1-KO ゼブラフィッシュは前項 1-3-3 の結果に示されたようにその攻撃性が低下していることから、WT に比べ鏡に映った相手への関心が高くなりこれは社交性、または興味関心の亢進に由来することが示唆された。

1-3-5 ゼブラフィッシュ集団に対する行動解析 (3-Chambers 試験)

Neu1-KO ゼブラフィッシュの社交性や興味探索についての解析として、複数尾の集団に対するゼブラフィッシュの行動を評価する 3-Chambers 試験を行った⁴⁰。この試験では、実験水槽内に小水槽を 2 つ設置し、1 つを空水槽、もう 1 つの水槽には試験魚とは別の水槽で飼育されていたゼブラフィッシュ 4 尾を投入し、この 2 つの水槽に対するゼブラフィッシュの反応を評価した (図 1-5 a)。5 分間の試験の間、WT ゼブラフィッシュは実験水槽内のどちらの小水槽にも興味を示したが、特にゼブラフィッシュ集団の水槽に対して強い興味を示した (図 1-5 b)。この際 WT ゼブラフィッシュは、ゼブラフィッシュ集団水槽前面

に沿いながら遊泳した。また、WT ゼブラフィッシュは、2つの小水槽前領域以外の領域での遊泳行動も多く示した。一方、Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡は、ゼブラフィッシュ水槽前領域に集中しており、水槽前面に沿いながらその前を何度も往復する遊泳行動が観察された（図 1-5 b）。WT と Neu1-KO ゼブラフィッシュは同程度の総遊泳距離を示したが（図 1-5 c）、Neu1-KO ゼブラフィッシュは WT に比べゼブラフィッシュ水槽前領域での滞在時間は約 4.0 倍長かった ($p < 0.01$ 、図 1-5 d)。また、ゼブラフィッシュ水槽前領域に出入りする頻度は WT と Neu1-KO ゼブラフィッシュの間で差がなく、これは Neu1-KO ゼブラフィッシュの水槽前領域への 1 回あたりの滞在時間が長く、WT は水槽前領域以外での滞在時間が長いことを示している（図 1-5 e）。一方で、空水槽に対する遊泳行動は WT と Neu1-KO ゼブラフィッシュで差は無かった（図 1-5 f, g）。このことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、初見のゼブラフィッシュに対して強い興味関心があるため、その水槽前領域に長く留まることが明らかとなった。本試験結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、WT に比べゼブラフィッシュ集団に強い興味関心を示し、社交性または興味関心が亢進していることが確認された。

1-3-6 異魚種に対する行動解析（3-Chambers 試験）

ゼブラフィッシュ集団に対する 3-Chambers 試験において、Neu1-KO ゼブラフィッシュの社交性や興味探索行動の亢進が明らかとなった。そこで次に異魚種に対する興味関心行動

を解析するため、前項で行った 3-Chambers 試験の小水槽ゼブラフィッシュ集団を、4 尾のケーブフィッシュ（図 1-6 a）に置き換え、その行動を評価した。ケーブフィッシュは、ゼブラフィッシュよりやや大型の赤い体色を示す魚種であり、明らかにゼブラフィッシュとは形態が異なる。このケーブフィッシュは目の退化により視力を有していないため、ケーブフィッシュからはゼブラフィッシュの遊泳行動が見えず、そのためケーブフィッシュの遊泳行動がゼブラフィッシュに与える影響については無視することが可能である。まず、初めに WT ゼブラフィッシュのケーブフィッシュに対する行動を評価したところ、異魚種に対して警戒心や不安感を示し、小水槽から遠く離れた場所を遊泳する行動を示した。また、興味探索のためケーブフィッシュ水槽前領域への侵入がみられたが、速やかに水槽前領域から脱出した（図 1-6 b）。一方、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、試験開始時にはわずかに警戒行動を示すものの、その後はケーブフィッシュ水槽前領域に長く滞在するようになり、ケーブフィッシュ水槽前領域での滞在時間が WT ゼブラフィッシュの約 15 倍に増加していた（図 1-6 f）。さらにケーブフィッシュ水槽前面に沿って遊泳する興味関心行動を示した（図 1-6 b）。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、ケーブフィッシュ水槽前領域への総進入回数は WT と変わらないことから（図 1-6 e）、1 回当たりの侵入時間が長くなっていることが分かった ($p < 0.01$ 、図 1-6 f)。一方、WT と Neu1-KO のゼブラフィッシュは、空水槽に対しては同様の反応を示した（図 1-6 g、h）。また、WT ゼブラフィッシュと比較して、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは遊泳距離が短く平均速度が遅いことが明らかと

なったが ($p < 0.01$ 、図 1-6 c、d)、これは、WT に比べて Neu1-KO のゼブラフィッシュでは不安が低くなり、忌避行動が低下したと一致する。ケープフィッシュに対する Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳行動は、異魚種にも関わらずゼブラフィッシュ集団に対するそれと非常に類似しており、このことから 3-Chambers 試験での Neu1-KO ゼブラフィッシュの行動は社交性ではなく、興味関心行動に由来することが示唆された。

1-3-7 黒白選好解析

黒白選好試験は、黒色と白色を有する水槽に実験魚を投入し、その遊泳行動の観察により、不安や興味探索行動を評価する実験系である (図 1-7 a)。一般に、ゼブラフィッシュは黒色を好むことが知られているが³⁴、これは身を守る生存本能から捕食者に見つかりやすい白色よりも危険性が低い黒色を選ぶためである。本試験においても、WT ゼブラフィッシュは白色領域よりも黒色領域に長く留まることが確認された (図 1-7 b)。その一方で、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、黒色領域よりも白色領域に長く滞在することが明らかとなった (図 1-7 b)。Neu1-KO ゼブラフィッシュが白色領域に滞在する時間は WT と比較して約 4.6 倍増加し ($p < 0.01$ 、図 1-7 c)、一方で Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域への総進入回数は WT より約 2.8 倍減少したことから ($p < 0.01$ 、図 1-7 d)、Neu1-KO ゼブラフィッシュは 1 回の進入で白色領域に長く滞在することが明らかとなった。また、白色領域において、WT ゼブラフィッシュは、水槽壁面に沿って泳ぎ、不規則な動き (ジグザク遊

泳) を伴う不安行動を示したが、Neu1-KO ゼブラフィッシュではこのような遊泳行動は明らかに減少していた。さらに、WT ゼブラフィッシュでは、Neu1-KO ゼブラフィッシュに比べ、遊泳速度が有意に速くなることが認められた (図 1-7 e、f)。これは、本来、不安を感じるはずの白色領域で、Neu1-KO ゼブラフィッシュは興味探索行動が亢進したことを示している。以上の結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける不安感受性が低下していることが推測された。

1-3-8 情動関連遺伝子群の real-time PCR 解析

次に、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける情動の変化を遺伝子レベルで明らかにするため、WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳における不安関連遺伝子群の遺伝子発現量を解析した。ゼブラフィッシュにも保存されているストレス応答系の視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸において、ミネラルコルチコイド受容体 (*mr*) はその活性を制御することが知られている^{34,41}。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、*mr* の mRNA 量が WT と比較して約 2.6 倍減少していた ($p < 0.05$ 、図 1-8 a)。神経ペプチド Y (*npv*) は *mr* の下流に位置する分子であり、ゼブラフィッシュの青斑核において発現している不安緩和ペプチドホルモンである^{34,42}。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、*mr* の発現低下に伴い *npv* の発現も有意に低下した ($p < 0.05$ 、図 1-8 b)。オレキシン (*orx*) とメラニン凝集ホルモン (*mch*) は共に HPA 軸の刺激による不安誘発因子であるが、Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳では WT と比較し

て *mch* のみ発現が低下していた ($p < 0.05$ 、図 1-8 c、d)。さらに交感神経-副腎-髄質 (SAM 系) 軸は、脊椎動物においてカテコールアミンのレベルの上昇を通じ不安行動を制御することが報告されている⁴³。本研究では、チロシンをドーパミンとノルアドレナリンの前駆体であるジヒドロキシ-フェニルアラニンに変換するチロシンヒドロキシラーゼ (*th*) の遺伝子発現を評価した。ゼブラフィッシュでは 2 つのアイソフォーム (*th1* と *th2*) を持つことが知られている⁴³。Neu1-KO ゼブラフィッシュの *th1* および *th2* の遺伝子発現は WT と比較して差が認められず (図 1-8 e、f)、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、SAM 系ではなく HPA 軸関連遺伝子群の発現が低下していた。また、不安の制御因子としては、オキシトシン / バソプレシンが知られている。魚類において、イソトシン (*ist*: オキシトシンのホモログ) は社交性を正に制御する因子として知られている一方で、バソトシン (*avt*: バソプレシンのホモログ) はゼブラフィッシュの攻撃性を加速させることが報告されている^{44,45}。Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳における *ist* の発現は WT と比較して有意に低下していたが ($p < 0.05$ 、図 1-8 g)、*avt* および *cck* は Neu1-KO と WT ゼブラフィッシュで差はなかった (図 1-8 h、i)。これらの結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュは HPA 軸関連の遺伝子群の発現が低下し、その結果、不安感受性が低下していることが示唆された。

1-3-9 シアロ糖タンパク質解析

Neu1 は、シアロ複合糖質の糖鎖をリソソームで異化分解することから、Neu1 欠損によ

るシアロ複合糖質の変化を検討した。ゼブラフィッシュの Neu1 は、in vitro ではオリゴ糖や糖タンパク質の糖鎖末端のシアル酸の α 2-3 および α 2-6 結合の両方を認識する⁴⁶。そこでまず、Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳におけるシアロ糖タンパク質の変化を、MAM (Sia α 2-3 結合特異的) および SSA (Sia α 2-6 結合特異的) レクチンを用いたレクチンブロッキングにより評価した。その結果、Neu1-KO と WT ゼブラフィッシュのシアロ糖タンパク質の糖鎖パターンに明確な違いは認められなかった (図 1-9 a, b)。次に α 2-8 結合のシアル酸のポリマーであるポリシアル酸 (PSA) の変化について検討した。ゼブラフィッシュ Neu1 は in vitro で PSA を脱シアル化することが知られており、マウスではニューロトロフィンの制御や新たに発生した海馬顆粒細胞のラミネーションにおける PSA のターンオーバーと Neu1 の関係性が注目されている^{47,48}。しかし、Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳における PSA 量は WT と差がなかった (図 1-9 c)。以上の結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内ではシアロ糖タンパク質や PSA の組成は劇的に変化しないことが明らかとなった。

1-3-10 スフィンゴ糖脂質解析

前項に続いて、本項では Neu1 欠損によるスフィンゴ糖脂質 (GSL) の変化を TLC で解析した。ゼブラフィッシュ Neu1 は in vitro において ganglioside を基質としないことが知られている²⁹。しかしながら、Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳では GSL の蓄積が観察された²⁹。中性糖脂質画分では、Neu1-KO ゼブラフィッシュで LacCer と Gb4 が蓄積していた

が、WT ではこれら 2 つの GSL はほとんど検出されなかった (各 $p<0.05$ 、図 1-10 a)。さらに、酸性糖脂質画分では、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいて GM3 と GM1 が増加したが、WT ではこれら 2 つの GSL はほとんど検出されなかった (各 $p<0.05$ 、図 1-10 b)。

1-3-11 リソソーム関連遺伝子群の real-time PCR 解析

リソソーム酵素が欠損した細胞において、リソソームの肥大を原因とするリソソーム機能の変化が報告されている¹⁷。このことから、リソソーム酵素である Neu1 の欠損は、リソソーム機能に影響を及ぼしていることが推測されたため、Neu1 欠損によるリソソーム関連遺伝子の発現を解析した。Neu1 はカテプシン A (*ctsa*)、 β -ガラクトシダーゼ 1 (*glb1*)、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ (*galns*) と複合体を形成することが知られていることから⁴⁹、まずこれら遺伝子群の発現を解析した。*neu1* の欠損により Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳では *ctsa* と *galns* の mRNA レベルが WT と比較して有意に増加していたが (*ctsa* : $p<0.01$ 、*galns* : $p<0.05$)、*glb1* については差がなかった (図 1-11 a-c)。転写因子 TFEB (*tfeb*) は、*neu1* や *ctsa* を含む哺乳類のリソソーム遺伝子のマスターレギュレーターとして知られている⁵⁰。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、WT に比べ *tfeb* の遺伝子発現量が高く ($p<0.05$ 、図 1-11 d)、それに伴い *lamp1a* の発現が上昇したが ($p<0.01$ 、図 1-11 e)、一方で *lamp1b* の発現は上昇しなかった (図 1-11 f)。これは既に報告されている Neu1-KO ゼブラフィッシュ筋肉の結果と同様であった²⁹。哺乳類では、Tfeb はリソソーム酵素の細

胞膜への転位を活性化することが知られており、哺乳類 Neu1 は Lamp1 の脱シアルル化を介し、リソソームエキソサイトーシスを負に制御することが知られている^{46,51}。ウエスタンブロットの結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは Lamp1a タンパク質量が WT に比べ増加し、*lamp1a* の遺伝子発現の傾向と一致していた ($p < 0.01$ 、図 1-11 g)。さらに、Neu1-KO ゼブラフィッシュで観察された Lamp1 の分子量は WT のそれよりも増加していた。これは Neu1-KO マウスと同様に、タンパク質の脱シアルル化抑制による Lamp1a の糖鎖付加の促進が原因であることが示唆された (図 1-11 g)。これらの結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、リソソームエキソサイトーシスが亢進していることが予測された。

1-3-12 警報フェロモン曝露ゼブラフィッシュの脳内遺伝子解析

Neu1 と不安などの情動行動との関連を明らかにするため、不安行動を誘発する警報フェロモンに WT ゼブラフィッシュを曝露し⁵²、その脳内の *neu1* 遺伝子発現を解析した。その結果、WT ゼブラフィッシュはフリージングなどの不安行動を示し、脳内の *npv* 遺伝子発現が上昇したことから、不安の誘導が確認された ($p < 0.01$ 、図 1-12 b)。そこで *neu1* 遺伝子の発現量を解析したところ、非曝露のゼブラフィッシュと比較して曝露ゼブラフィッシュではその遺伝子発現が有意に上昇した ($p < 0.01$ 、図 1-12 a)。さらに、警報フェロモン曝露ゼブラフィッシュの Lamp1a タンパク質発現量は、非曝露のゼブラフィッシュと比較して 42 %減少した ($p < 0.05$ 、図 1-12 c)。これらの結果から、ゼブラフィッシュは不安を感

じると *neu1* 遺伝子発現が上昇し、リソソームのエキソサイトーシスが抑制され、Neu1-KO
ゼブラフィッシュにおいて観察される不安感受性の低下とは逆の現象を示すことが推測さ
れた。

1-4 考察

本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュが不安関連遺伝子の発現低下を伴い、様々な行動試験において過剰な興味・探索行動を示すことを見出した。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるリソソームエキソサイトーシスの亢進やスフィンゴ糖脂質の蓄積が生じていることが推測された。

本来、ゼブラフィッシュは、捕食者からの攻撃を避けることや、仲間との社会的相互作用を維持するため群れを形成することが知られており、この群れの形成は、基本的な情動である不安を緩和させる作用がある³⁹。本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュの群れ形成能の低下が明らかとなり、これは Neu1-KO ゼブラフィッシュの不安および社会性の低下に起因する可能性が示された。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュは攻撃性が低下していたが、攻撃性が生存本能の一つであることや、情動の中でも特に不安に起因する行動であることから、攻撃性の低下は不安減少に由来する可能性が推察された³⁸。この Neu1-KO ゼブラフィッシュは、鏡に映った自分自身に接近し、また 3-Chambers 試験では集団のゼブラフィッシュと異魚種ケープフィッシュに接近する行動を示した。ゼブラフィッシュは、通常、同種の見慣れぬ個体群や異魚種に対し、警戒から生ずる忌避反応を示す⁵³。忌避反応は生命に危険のある状況下において不安を感じるにより生じる、生存の可能性を上げるための行動である。鏡試験や 3-Chambers 試験の結果は、Neu1-KO ゼブラフィッシュの不安が

明らかに低下していることを示している。これは、黑白選好試験において、*Neu1-KO* ゼブラフィッシュが白色領域での行動が増加することからも、不安感受性の低下に伴う危険認知度の脆弱化が確認された。一般に興味探索行動の増加は、運動機能の上昇による運動量の増加、または不安の低下が理由である⁵⁴。本章の行動試験において、*Neu1-KO* ゼブラフィッシュの運動量は増加しておらず、このことから不安の低下が *Neu1-KO* ゼブラフィッシュの興味関心を促進していることが示唆された。また、本章では *WT* ゼブラフィッシュは不安増加とともに *Neu1* 遺伝子発現が亢進することを明らかにしたが、この傾向は、ラット海馬における神経細胞の興奮に反応したシアリダーゼの活性上昇⁵⁵、恐怖条件下におけるシアル酸の放出⁵⁵、といった哺乳類の報告と一致していた。

Neu1-KO ゼブラフィッシュの不安の低下は、情動関連遺伝子群の発現解析の結果からも裏付けられた。一般に、HPA 軸の低下は低不安状態であることを示すが、*Neu1-KO* ゼブラフィッシュは、HPA 軸の *mr* や *npy* の遺伝子発現が大きく低下していた⁵⁶。加えて、HPA 軸の刺激による不安誘発因子である *mch* や、社会的攻撃性と消極的攻撃性を正に制御する因子である *ist* の発現も低下していた。一方で、情動への関連が知られているドーパミン/ノルアドレナリンニューロン³⁴、バソトシン、およびコレストキニンは *Neu1-KO* ゼブラフィッシュにおいて変化が認められなかった。*Neu1-KO* ゼブラフィッシュは、HPA 軸関連遺伝子群の低下により不安が減少し、その結果、過剰な興味・探索活動が増加した可能性が示唆された。遺伝子発現解析の結果からも、*Neu1* の欠損がゼブラフィッシュの群れ形成能や

攻撃性の低下を引き起こすことが確認された。

WT ゼブラフィッシュは、急性ストレス負荷時に Lamp1 減少を伴う Neu1 の発現上昇を示すのに対し、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、Neu1 欠損により Lamp1 タンパク質が増加した。Neu1-KO マウスでは、神経細胞において、Lamp1 の増加を伴う過剰なリソソームエキソサイトーシスを示すことが報告されている⁴⁶。Lamp1 は脊椎動物で高く保存されていることから、ゼブラフィッシュにおいても Neu1 がリソソームエキソサイトーシスを介し、過剰な興味関心や探索活動を抑制している可能性を示している。最近、海馬において神経細胞樹状突起の長期構造可塑性が、カテプシン B の活性上昇を伴うリソソームエキソサイトーシスによって制御されることが報告された⁵⁷。カテプシン B はリソソーム酵素の一つであり、リソソームエキソサイトーシスにより細胞外へ排出されると、中性 pH 環境下で活性化することで細胞外マトリックスのリモデリングを誘導し、細胞間相互作用に影響を及ぼすことが報告されている⁴⁶。本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるカテプシン B の変化については検討していないが、カテプシン B が情動変化に関与している可能性が考えられる。さらに、Neu1-KO マウスでは、海馬の CA3 領域にアミロイドベータ ($A\beta$) が蓄積し、リソソームエキソサイトーシスが亢進していることが報告されている⁵⁸。 $A\beta$ の蓄積は、アルツハイマー病の発症に関与しており、認知機能障害は同疾患の主要な症状の一つである。さらに Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内にはガングリオシド GM1 が異常に蓄積していたが、GM1 は $A\beta$ の蓄積を促進することが知られている⁵⁹。このことから、

Neu1-KO ゼブラフィッシュの群れ行動試験における社会性や不安の低下、異魚種への過剰な興味関心には、アルツハイマー病様の記憶機能や情動制御の不全が関与している可能性も考えられた⁶⁰。この Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける一部のスフィンゴ糖脂質 (GM1、GM3、Gb4、および LacCer) の蓄積について、ゼブラフィッシュ Neu1 はガングリオシドを基質としないことから²⁹、Neu1 酵素活性の欠失はスフィンゴ糖脂質蓄積の直接的な原因ではなく、他の糖鎖分解酵素や糖転移酵素の変化が関与することが予想された。興味深いことに、他のリソソーム病のモデルマウスの脳でも、間接的なガングリオシド蓄積が認められている⁶¹。例えば、ゴーシェ病では、GM1、GM2、GM3、GD3 が蓄積する。また最近、Neu3 / Neu4^{-/-}ダブルノックアウトマウスでは、脳内の GM1 および GM3 の蓄積に伴い、短時間記憶の障害を示すことが報告された⁶²。さらに、このダブルノックアウトマウスの脳では、主にミクログリアや脳周皮細胞のリソソームに GM3 が蓄積していることが明らかになった⁶²。Neu3 および Neu4 はガングリオシドを基質とすることから⁶²、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるガングリオシド蓄積とこれら Neu3 および Neu4 シアリダーゼの関与が考えられるが、Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の Neu3s (*neu3.1*, *neu3.2*, *neu3.3*, *neu3.4*, および *neu3.5*) と Neu4 の遺伝子発現は WT と差がないことが報告されている²⁹。また、興味深いことに、Neu1-KO マウスやシアリドーシス患者の脳にはガングリオシドが蓄積していない^{63,64}。また、マウス脳内では GM1 が豊富に検出され、LacCer と GM3 がほとんど検出されなかった^{64,65}。本研究で認められた Neu1 欠損ゼブラフィッシュにおけるガングリオ

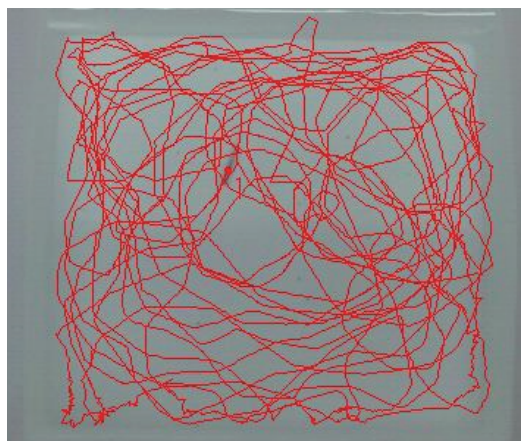
シド蓄積は、動物種間での代謝・合成系の差に起因する可能性も推察された。

ポリシアル酸 (PSA) は神経発生および記憶を制御することが知られており、PSA の質的・量的変化は自閉症スペクトラムや双極性障害を誘発することが報告されている³⁷。哺乳類や魚類の Neu1 は *in vitro* で PSA を脱シアリル化するが³⁰、Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における PSA 発現は WT と差が認められなかった。また、ゼブラフィッシュ Neu1 は *in vitro* で糖タンパク質を基質とするが、MAM や SSA レクチンブロットではシアロ糖タンパク質の組成に差が見られなかった。一方、Neu1 の至適基質であるシアロオリゴ糖については、レクチンブロット等で検出できないために、その蓄積については本章では確認できていない。ただし、ヒトシアリドーシスや Neu1-KO マウスではシアロオリゴ糖の蓄積が報告されていることから、Neu1-KO ゼブラフィッシュについても同様の蓄積が生じている可能性は高い。

本章では、Neu1 欠損により、ゼブラフィッシュの興味探索行動や社会的選好性などの情動行動が変化し、それが不安感受性の変化に起因することを明らかにした。この現象に関連する分子として、Neu1 機能不全により蓄積した基質分子、リソソームエキソサイトーシスを亢進させる Lamp1 および GM1 などのガングリオシドが推測された。一方で、本章における遺伝子やタンパク質の解析は、脳全体の分子の挙動変化を見ているに過ぎず、詳細なメカニズムの解明には変化のある脳内の細胞種や部位を特定する必要がある。そこで第二章では、ヒトの情動制御を司る大脳や中脳に相当するゼブラフィッシュの中脳や終脳に

着目し、その神経細胞やグリア細胞の変化を解析することで Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動異常のメカニズムの解明を試みる。

WT



KO

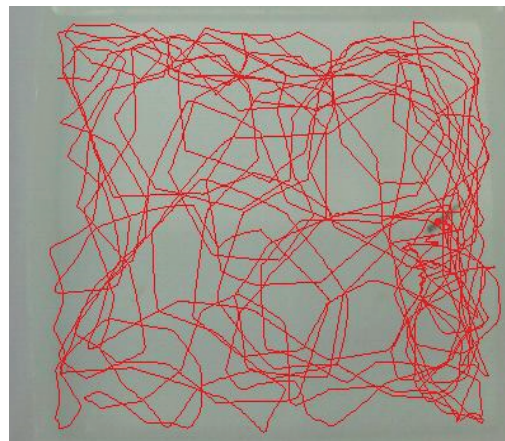


図 1-1 a 野生型 (WT) および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡

野生型 (WT) および Neu1-KO とも 6 カ月齢のゼブラフィッシュを試験に供した。赤線は野生型 (WT) および Neu1-KO ゼブラフィッシュの 5 分間の遊泳軌跡を示す (n=7)。

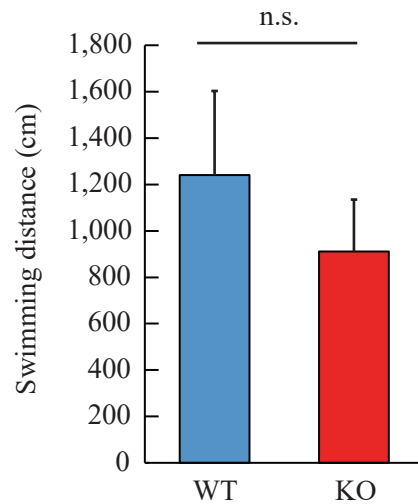


図 1-1 b 通常遊泳時における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳距離

6 ヶ月齢の WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの通常遊泳時の遊泳距離を解析した (n=7)。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す。

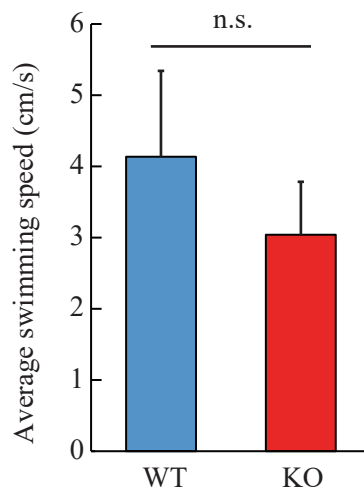


図 1-1 c 通常遊泳時における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均遊泳速度

6 ヶ月齢の WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの通常遊泳時の平均遊泳速度を解析した (n=7)。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す。

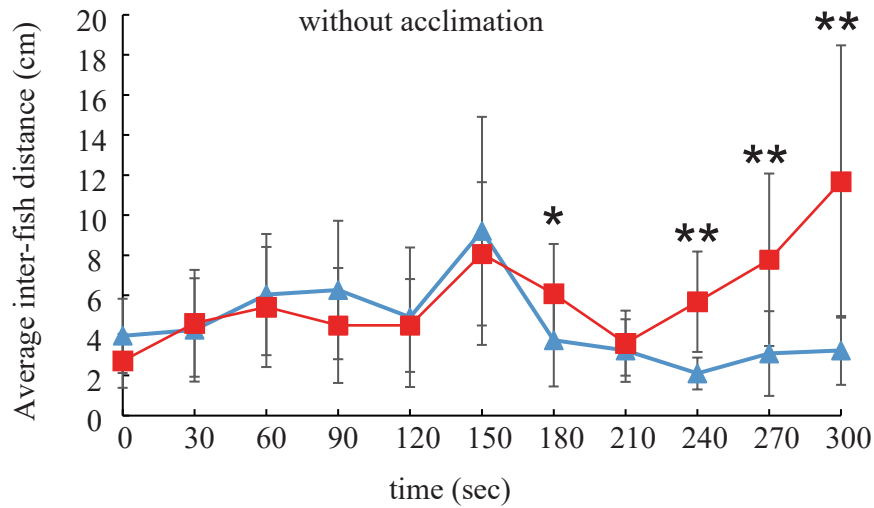


図 1-2 a 群れ行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均
個体間距離の解析（試験水槽投入直後）

5尾のゼブラフィッシュを試験水槽に投入し、30秒毎に各個体間距離を計測した。青線は WT ゼブラフィッシュ、赤線は Neu1-KO ゼブラフィッシュを示す。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「*」は統計学的有意差 $p < 0.05$ 、「**」は $p < 0.01$ を示す。

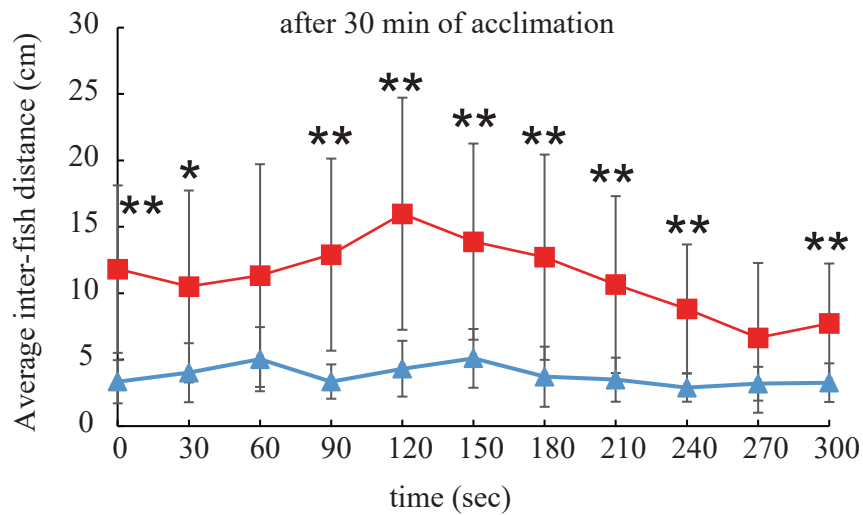


図 1-2 b 群れ行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均個体間距離の解析（馴致時間有り）

5尾のゼブラフィッシュを試験水槽に投入後、馴致時間30分を経た後、30秒毎に各個体間距離を計測した。青線はWTゼブラフィッシュ、赤線はNeu1-KOゼブラフィッシュを示す。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t検定を使用した。「*」は統計学的有意差 $p < 0.05$ 、「**」は $p < 0.01$ を示す。

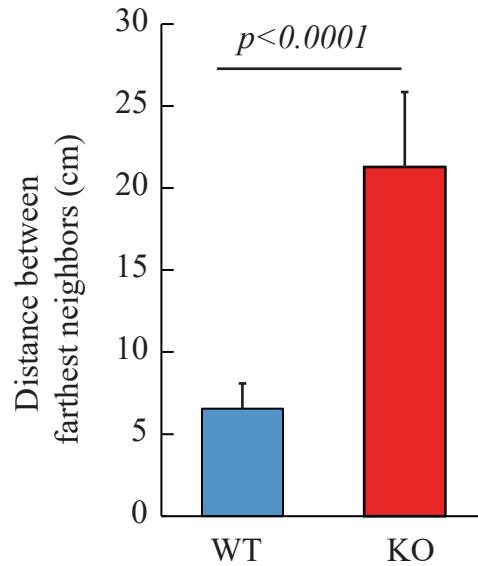


図 1-2 c 群れ行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの最も遠くに位置する個体との距離解析

群れの中で最も遠くに位置する個体との距離を計測した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

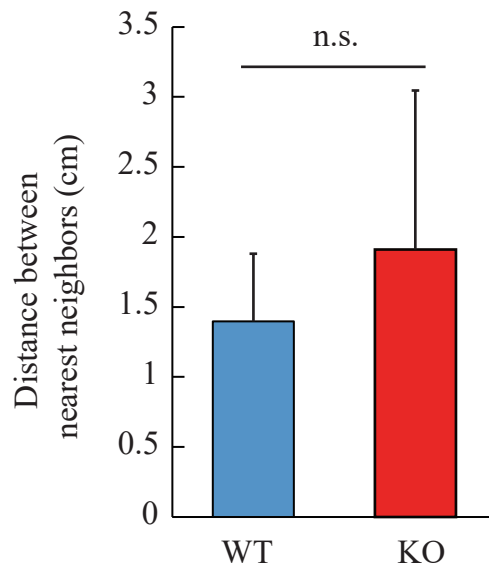
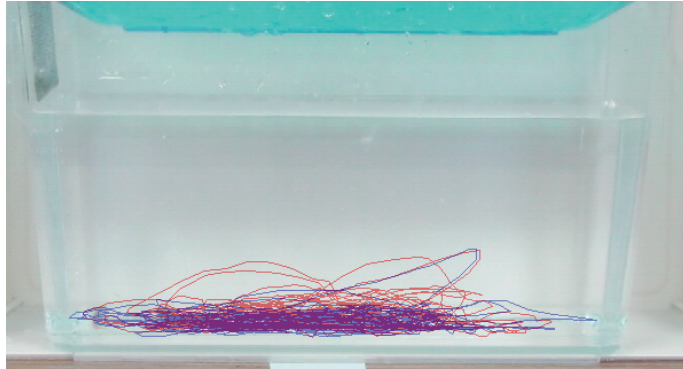


図 1-2 d 群れ行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの最も近くに位置する個体との距離解析

群れの中で最も近くに位置する個体との距離を計測した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す。

WT



KO

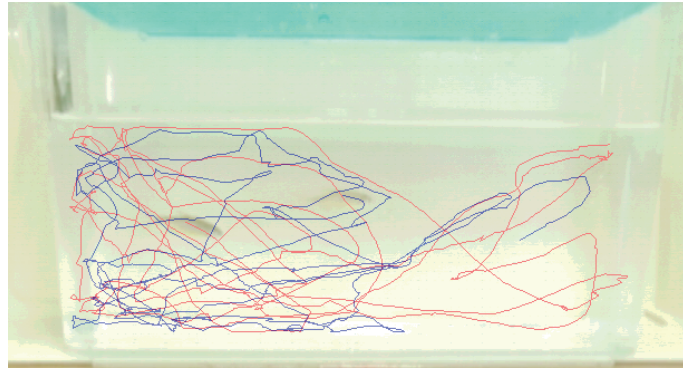


図 1-3 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの攻撃性試験

2尾のゼブラフィッシュを試験水槽に投入し、その攻撃行動を解析した。
青線・赤線は、2尾それぞれの遊泳軌跡を示す (n=6)。

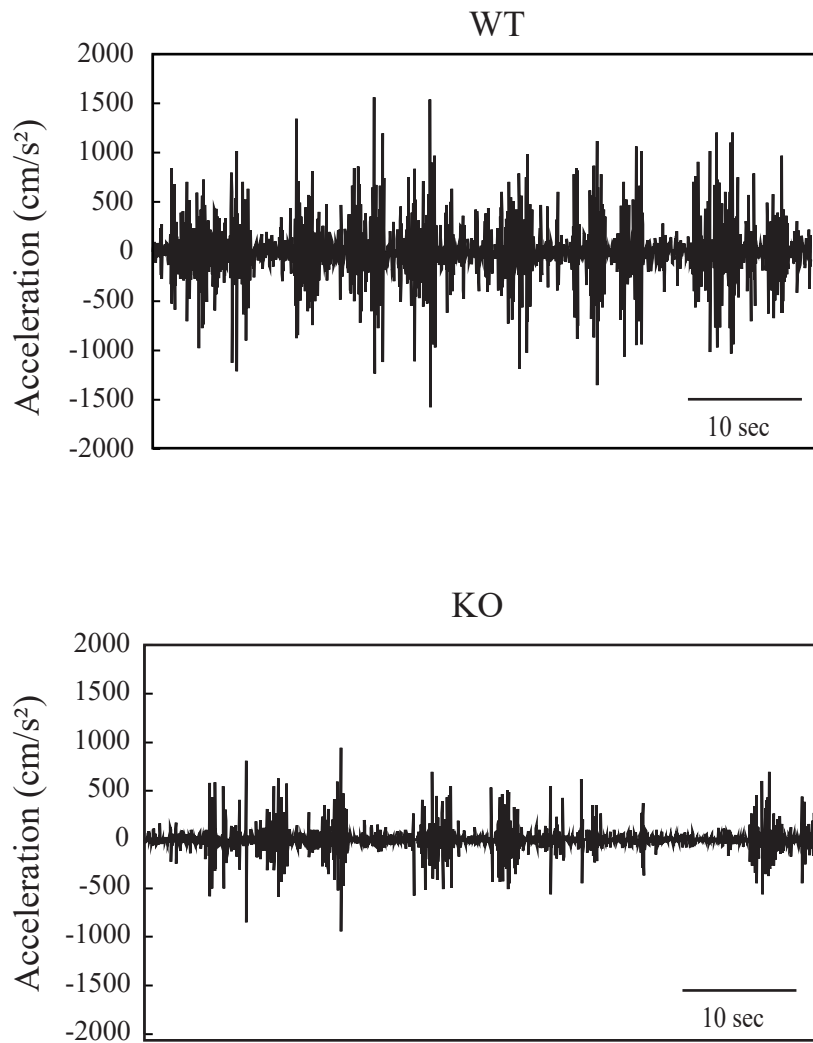


図 1-3 b 攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの
加速度

攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの追尾行動中の加速度を解析した。加速度の上下振れ幅が大きいほど追尾行動の特徴である急加速が発生していることを示す (n=6)。

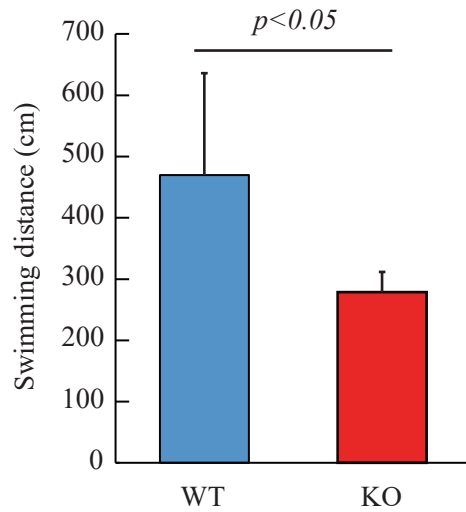


図 1-3 c 攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの総遊泳距離

攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの総遊泳距離を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

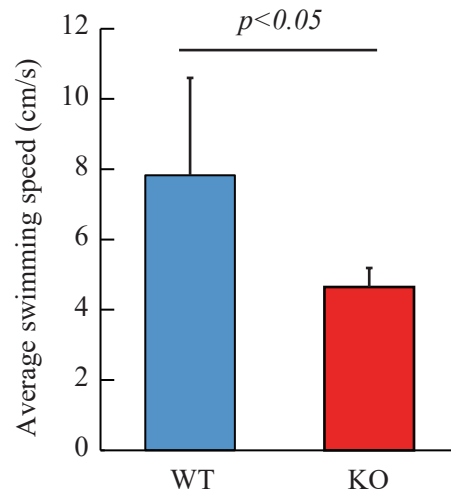


図 1-3 d 攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均遊泳速度

攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均遊泳速度を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

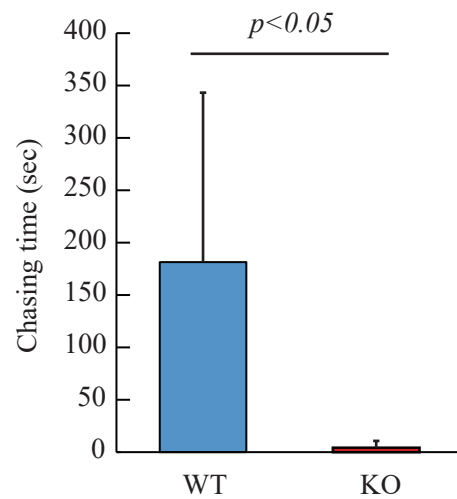


図 1-3 e 攻撃性試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの追尾時間

攻撃性試験において、WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュがもう一方の個体を追尾した時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

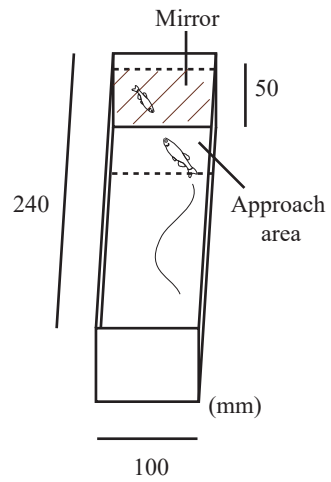


図 1-4 a 鏡行動試験の試験水槽図

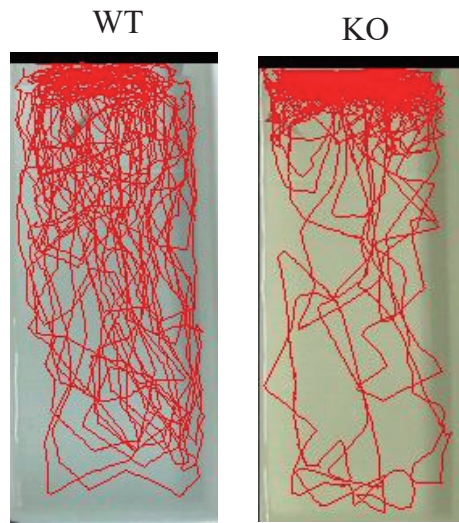


図 1-4 b 鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡

試験水槽に設置した鏡（図上部）に対する WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡を解析した。赤線は WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュそれぞれの試験開始後 5 分間の遊泳軌跡を示す (n=10)。

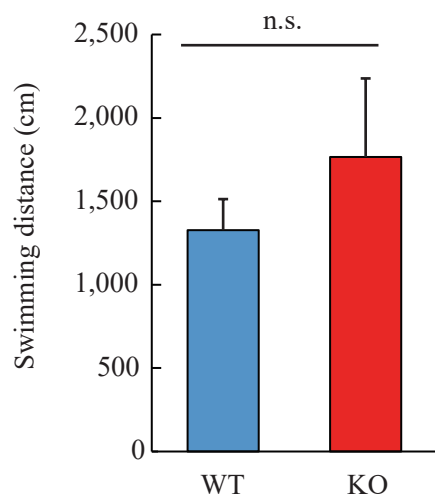


図 1-4 c 鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの総遊泳距離

鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳距離を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=10)。

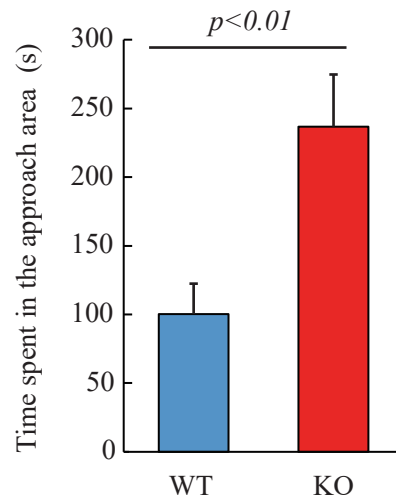


図 1-4 d 鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡前領域での総滞在時間

鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡前領域での総滞在時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=10)。

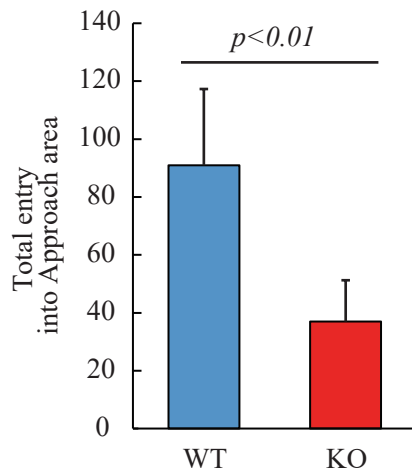


図 1-4 e 鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡前領域への進入回数

鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡前領域への進入回数を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=10)。

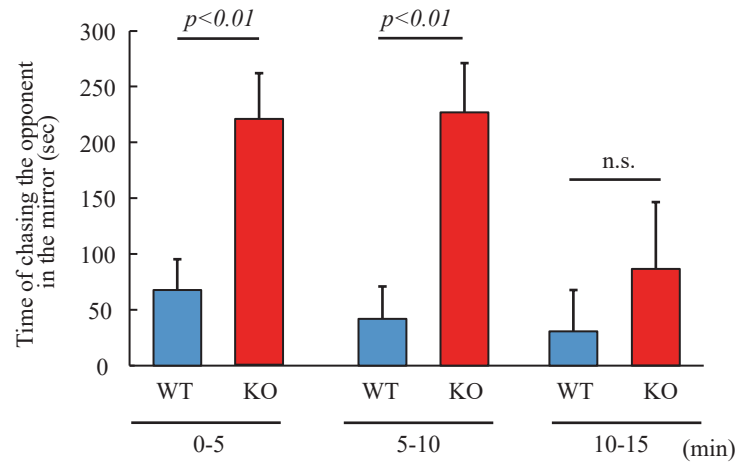


図 1-4 f 鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡像のゼブラフィッシュの追尾時間

鏡行動試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの鏡像のゼブラフィッシュの追尾時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=10)。

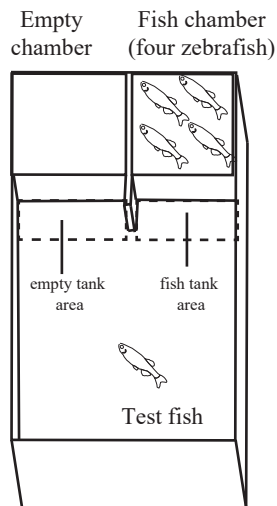


図 1-5 a 3-Chambers 試験水槽 (ゼブラフィッシュ)

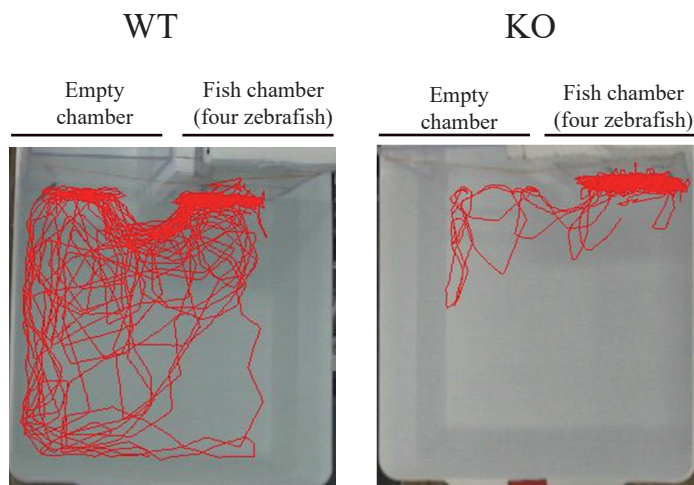


図 1-5 b 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡

3-Chambers 試験における魚水槽 (ゼブラフィッシュ) と空水槽に対する WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳行動を解析した。赤線は、WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの試験開始後 5 分間の遊泳軌跡を示す (n=8)。

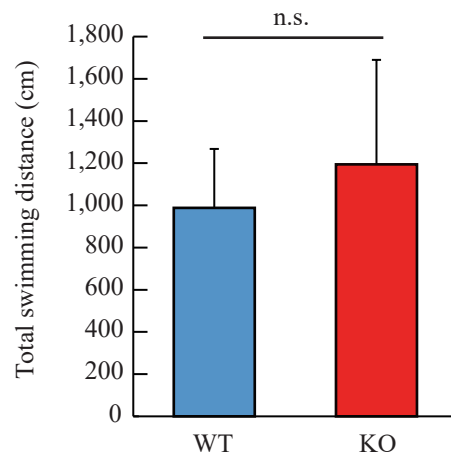


図 1-5 c 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの総遊泳距離

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳距離を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=8)。

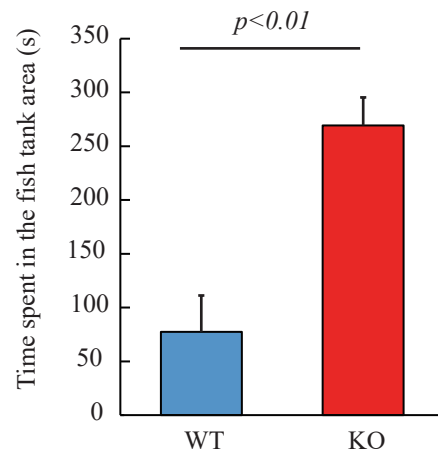


図 1-5 d 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ゼブラフィッシュ）前領域での総滞在時間

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ゼブラフィッシュ）前領域での総滞在時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=8)。

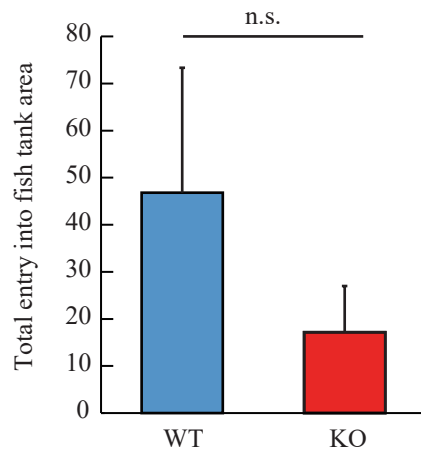


図 1-5 e 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ゼブラフィッシュ）前領域への進入回数

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ゼブラフィッシュ）前領域への進入回数を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=8)。

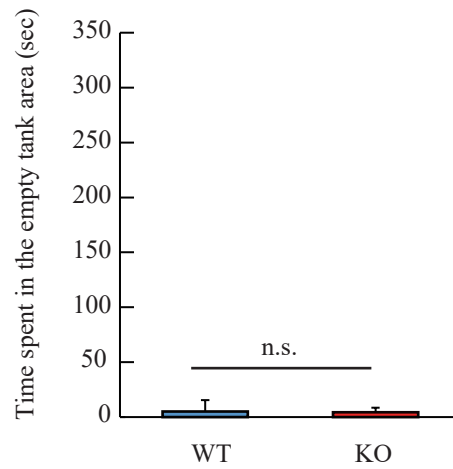


図 1-5 f 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域での総滞在時間

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域での総滞在時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=8)。

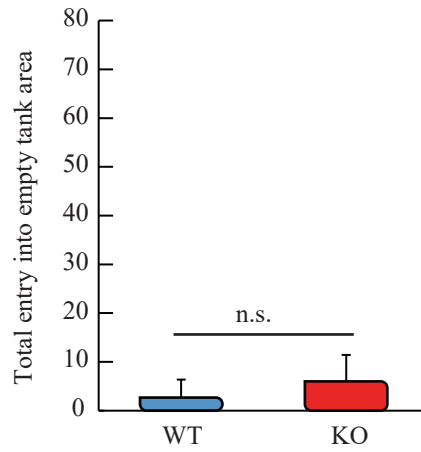


図 1-5 g 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域への進入回数

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域への進入回数を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=8)。

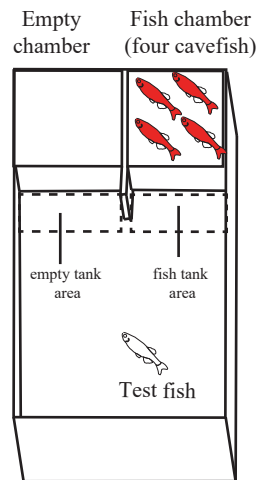


図 1-6 a 3-Chambers 試験水槽 (ケーブフィッシュ)

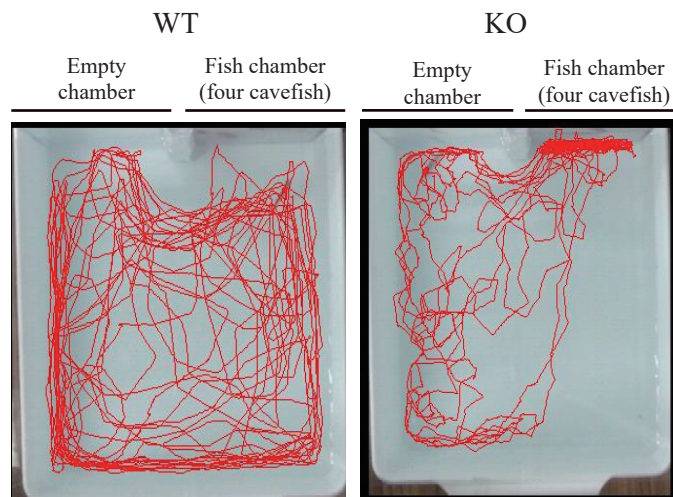


図 1-6 b 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡

3-Chambers 試験における魚水槽 (ケーブフィッシュ) と空水槽に対する WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳行動を解析した。赤線は WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの試験開始後 5 分間の遊泳軌跡を示す (n=10)。

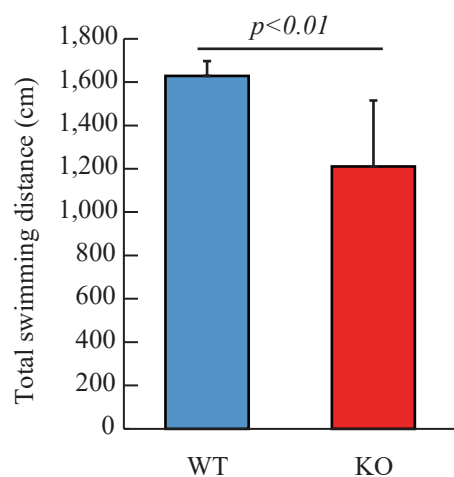


図 1-6 c 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの総遊泳距離

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳距離を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=10)。

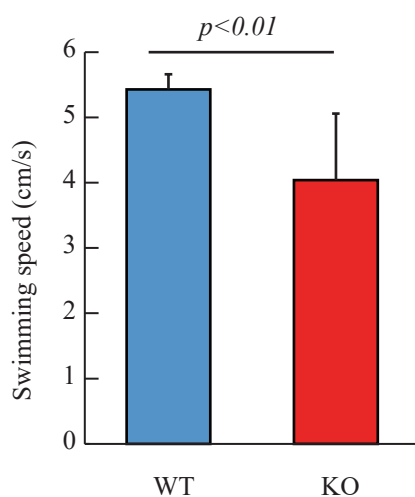


図 1-6 d 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均遊泳速度

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの平均遊泳速度を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=10)。

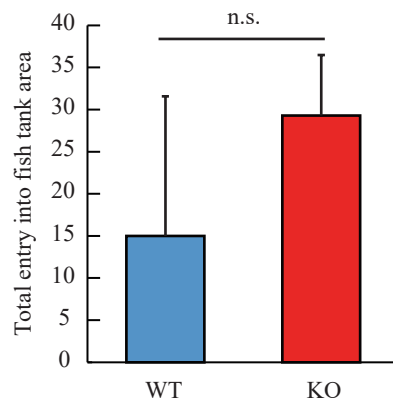


図 1-6 e 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ケープフィッシュ）前領域への進入回数

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ケープフィッシュ）前領域への進入回数を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=10)。

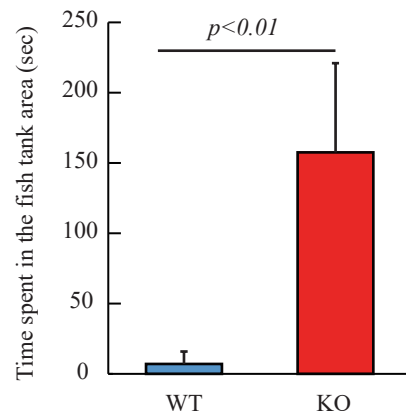


図 1-6 f 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ケープフィッシュ）前領域での総滞在時間

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの魚水槽（ケープフィッシュ）前領域での総滞在時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=10)。

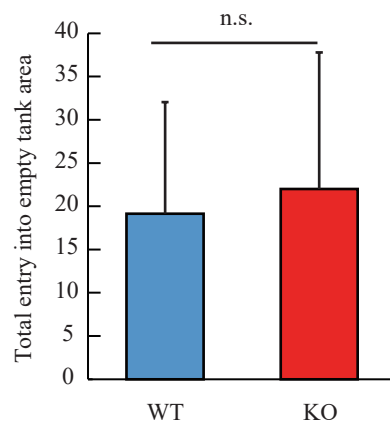


図 1-6 g 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域への進入回数

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域への進入回数を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s」は統計学的有意差が無いことを示す (n=10)。

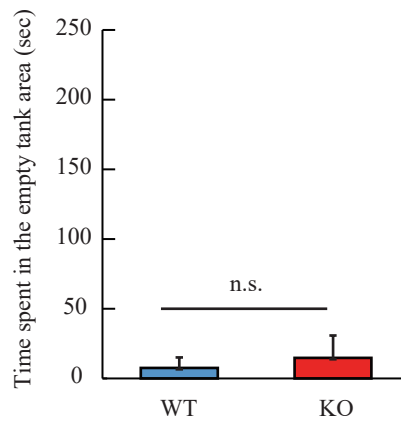


図 1-6 h 3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域での総滞在時間

3-Chambers 試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの空水槽前領域での総滞在時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=10)。

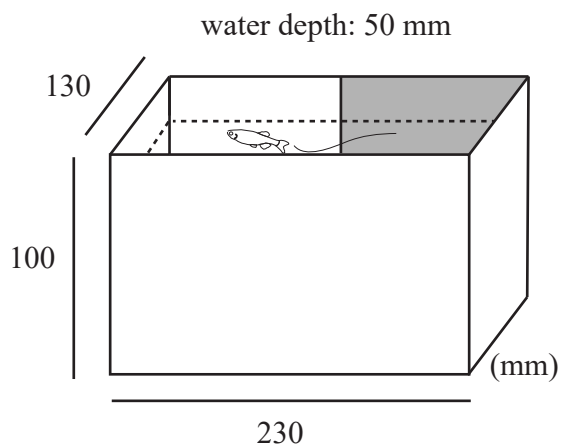


図 1-7 a 黒白選好試験水槽



図 1-7 b 黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳軌跡

黒色および白色領域に対する WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遊泳行動を解析した。赤線は WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの試験開始後 5 分間の遊泳軌跡を示す (n=5)。

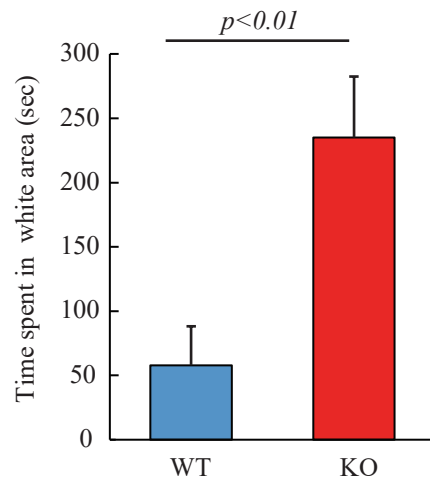


図 1-7 c 黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域での総滞在時間

黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域での総滞在時間を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

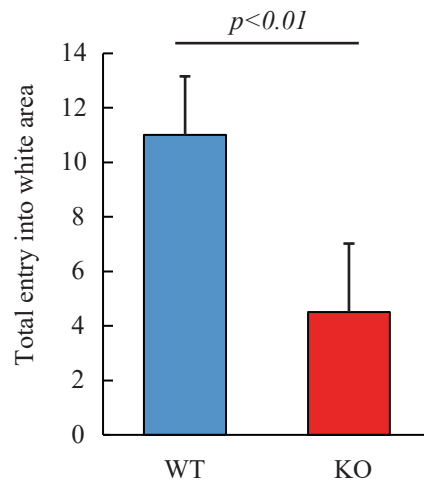


図 1-7 d 黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域への進入回数

黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域への進入回数を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

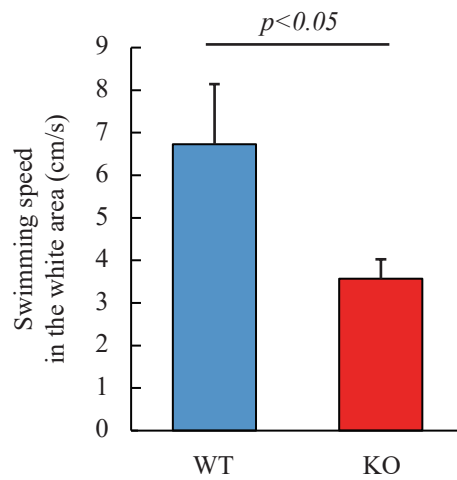


図 1-7 e 黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域における平均遊泳速度

黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの白色領域における平均遊泳速度を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

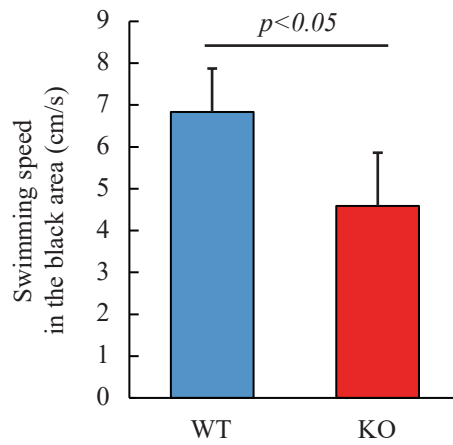


図 1-7 f 黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの黒色領域における平均遊泳速度

黒白選好試験における WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの黒色領域における平均遊泳速度を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

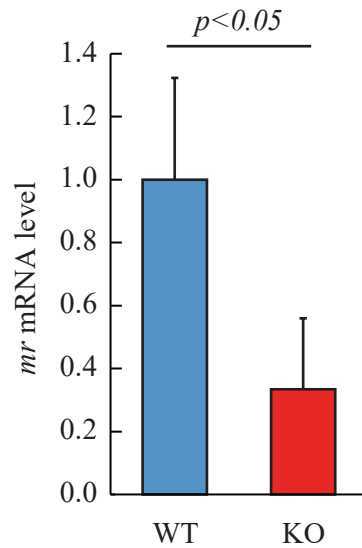


図 1-8 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*mr*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *mr* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

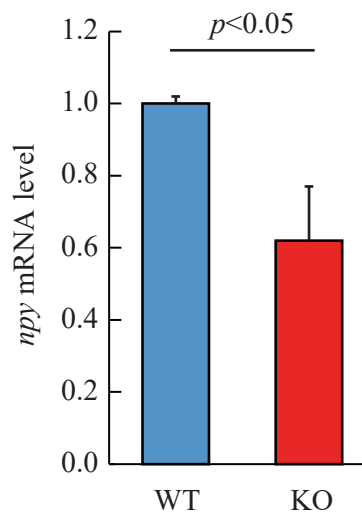


図 1-8 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*npy*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *npy* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

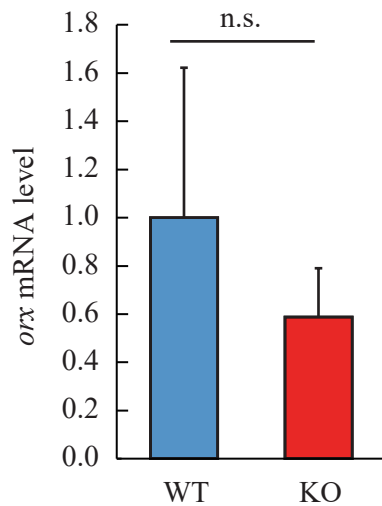


図 1-8 c WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*orx*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *orx* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=5)。

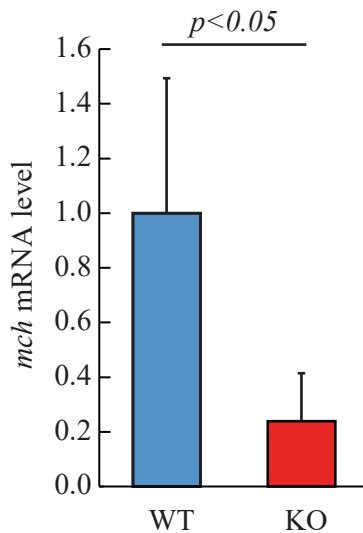


図 1-8 d WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*mch*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *mch* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

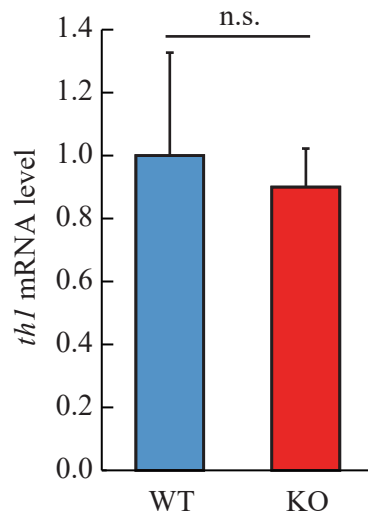


図 1-8 e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*th1*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *th1* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=5)。

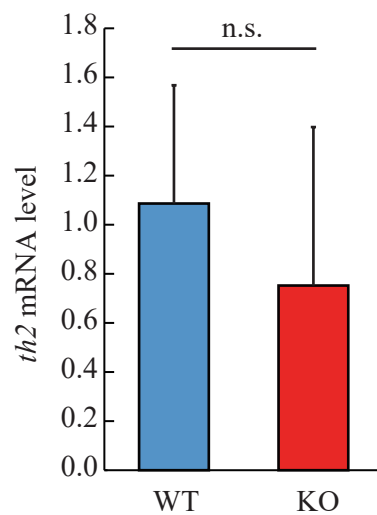


図 1-8 f WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*th2*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *th2* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=5)。

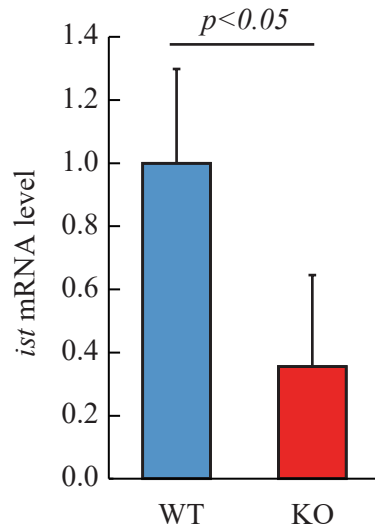


図 1-8 g WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*ist*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *ist* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=5)。

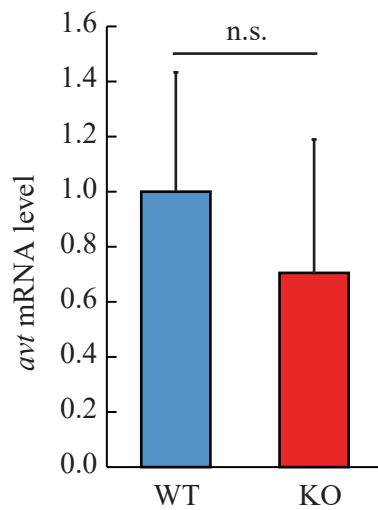


図 1-8 h WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*avt*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *avt* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=5)。

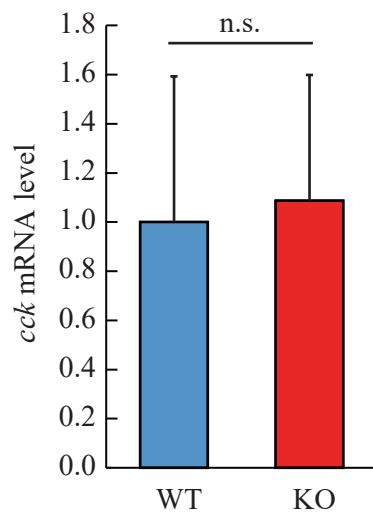


図 1-8 i WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの遺伝子発現 (*cck*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *cck* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=5)。

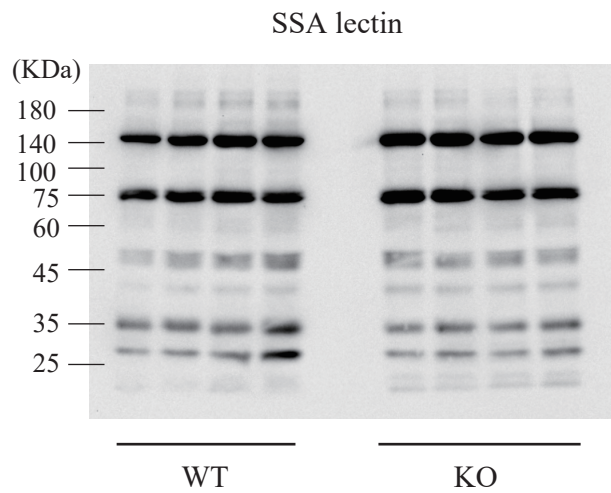


図 1-9 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳の SSA レクチンブロット

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内 α 2-6 シアロ糖タンパク質を解析した。

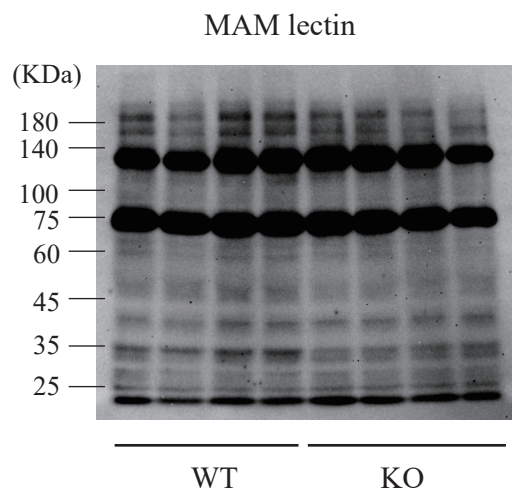


図 1-9 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳の MAM レクチンブロット

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内 α 2-3 シアロ糖タンパク質を解析した。

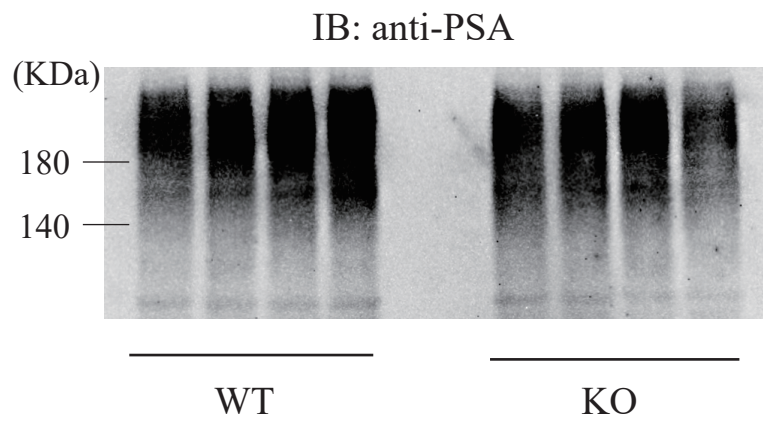


図 1-9 c WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の PSA のウエスタンブロット

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内 PSA (α 2-8 シアロ糖タンパク質) を解析した。

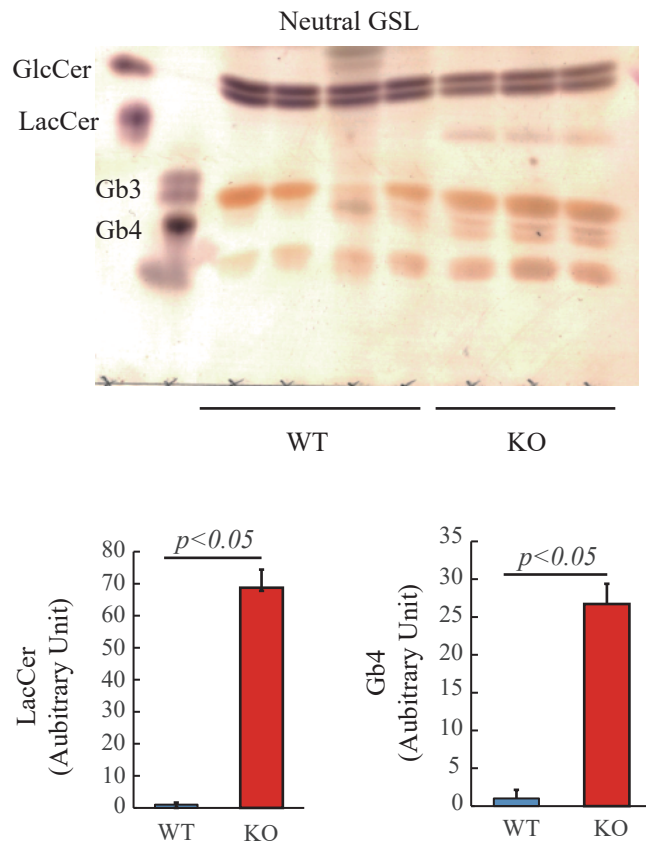


図 1-10 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における中性糖脂質の解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの中性糖脂質を解析した。WT と Neu1-KO で差が観察された LacCer および Gb4 については、解析結果を数値化した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

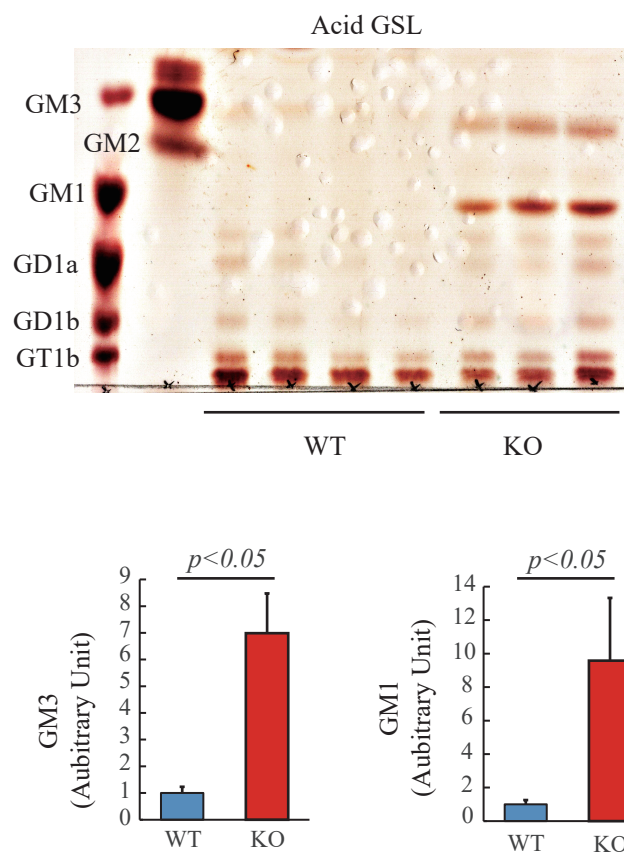


図 1-10 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳における酸性糖脂質の解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの酸性糖脂質を解析した。WT と Neu1-KO で差が観察された GM1 および GM3 については、解析結果を数値化した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

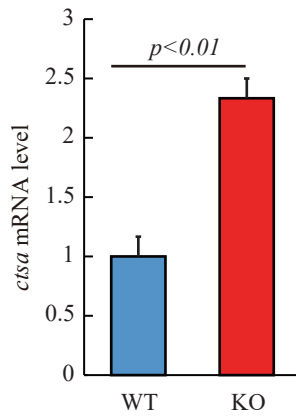


図 1-11 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム酵素遺伝子発現 (*ctsA*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *ctsA* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

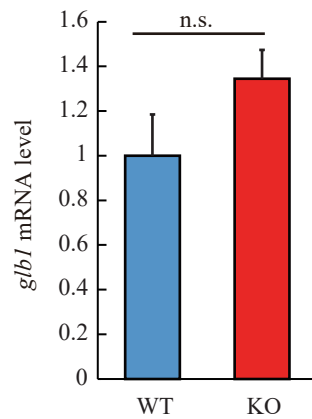


図 1-11 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム酵素遺伝子発現 (*glb1*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *glb1* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=7)。

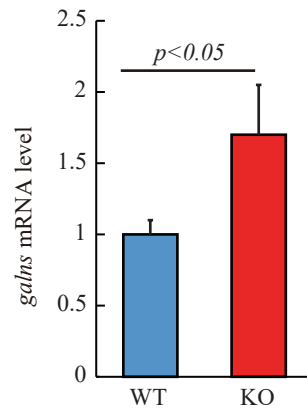


図 1-11 c WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム酵素遺伝子発現 (*galns*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *galns* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

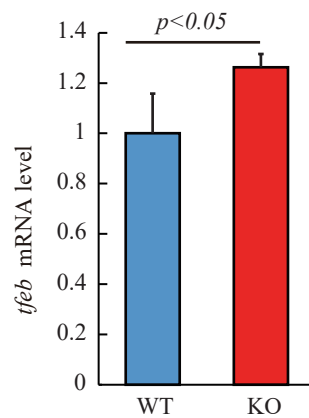


図 1-11 d WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム酵素遺伝子発現 (*tfeb*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *tfeb* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

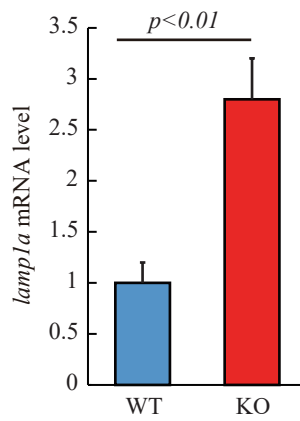


図 1-11 e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム酵素遺伝子発現 (*lamp1a*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *lamp1a* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

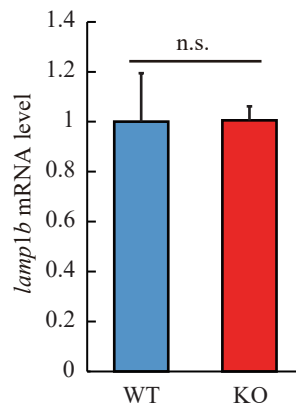


図 1-11 f WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム酵素遺伝子発現 (*lamp1b*)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの *lamp1b* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=7)。

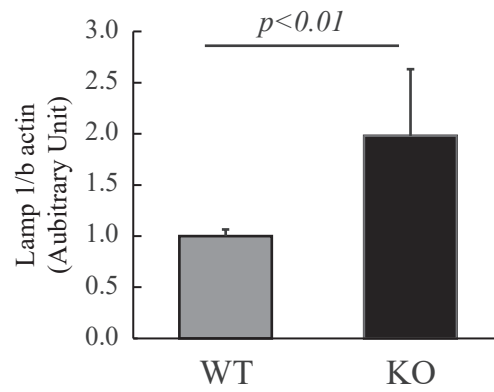
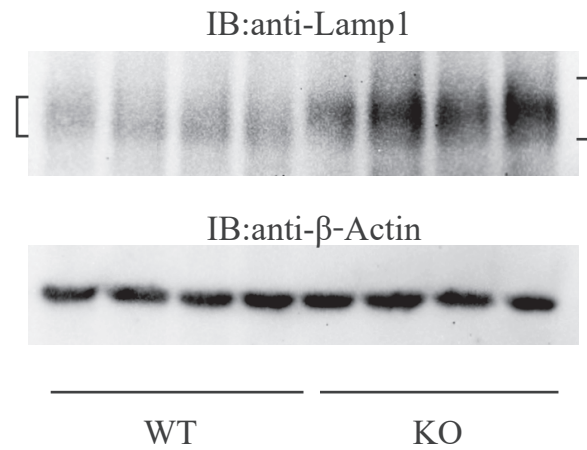


図 1-11 g WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内 Lamp1 タンパク質の解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの Lamp1 タンパク質を解析した。測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、t 検定を使用した。

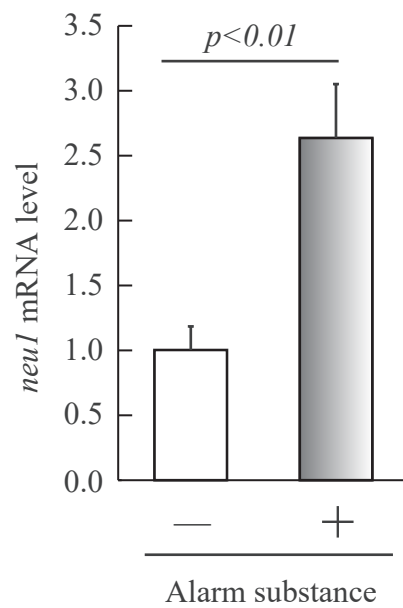


図 1-12 a WT ゼブラフィッシュの警報フェロモン曝露時の遺伝子発現 (*neu1*)

WT ゼブラフィッシュを警報フェロモンに曝露し、その *neu1* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

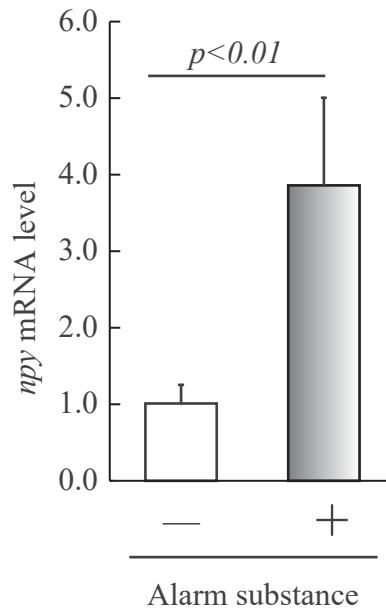


図 1-12 b WT ゼブラフィッシュの警報フェロモン曝露時の遺伝子発現 (*npy*)

WT ゼブラフィッシュを警報フェロモンに曝露し、その *npy* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

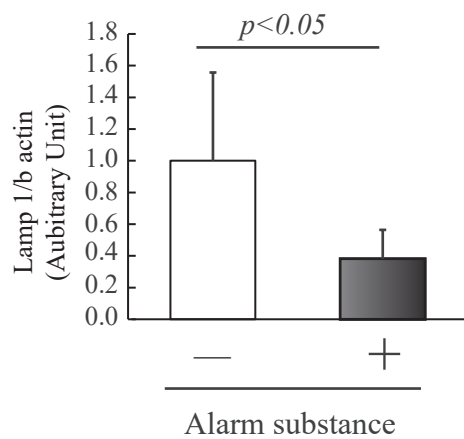
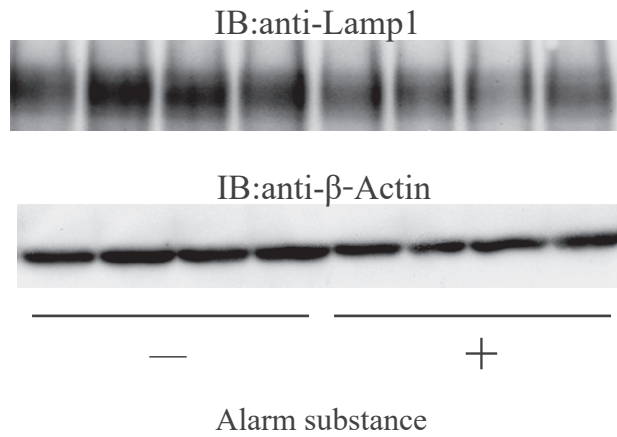


図 1-12 c WT ゼブラフィッシュの警報フェロモン曝露時の脳内 Lamp1 タンパク質の解析

WT ゼブラフィッシュを警報フェロモンに曝露し、Lamp1 タンパク質を解析した。測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=6)。

表 1 real-time PCR 解析用プライマー

| Gene name | Primers | |
|---------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>actb</i> | 5'-CGCCATACAGAGCAGAAGCCA-3' | 5'-AGCACCCCTGTGCTGCTCACT-3' |
| <i>mch</i> | 5'-AGGGAAACCTCGCCTTTTCG-3' | 5'-AAGATCAAGGGATGGCTGGG-3' |
| <i>npy</i> | 5'-AAGATGTGGATGAGCTGGGC-3' | 5'-TGAATAATACTTGGCGAGCTCCT-3' |
| <i>avt</i> | 5'-CGCTCTCGTCTGCCTGCTAC-3' | 5'-TCTTAAGTCCCGCGCTGCTG-3' |
| <i>orx</i> | 5'-TTCATGGCGCTGCTAGCTCA-3' | 5'-AATTTAGCGGGCTCCTCCAGC-3' |
| <i>ist</i> | 5'-TCTGGAAAGGCCTGCGGTTA-3' | 5'-GCTGTTGGCCGGTTGATTGA-3' |
| <i>cck</i> | 5'-AGCGTCAACCACCGGATAAA-3' | 5'-AGAGGACAGACGGAAACACG-3' |
| <i>th1</i> | 5'-TACATACGGCACGCTTCCTC-3' | 5'-GAACCGCACAGAAAACGGTC-3' |
| <i>th2</i> | 5'-AAAGGCTTATGGGGCTGGAC-3' | 5'-GCTGCAAGTGTAGGGGTCAT-3' |
| <i>gr</i> | 5'-CCCATTGAGGACCAAATCAC-3' | 5'-AGTAGAGCATTGGGCGTTG-3' |
| <i>galns</i> | 5'-AACTGCCATTTTGGCCCCTA-3' | 5'-TTTGGATGCCCAGACTGACC-3' |
| <i>lamp1a</i> | 5'-AACCTGAGCGATGGAGACATCT-3' | 5'-CTGAGGTTTGCCTGCTCATGTA-3' |
| <i>lamp1b</i> | 5'-CAATGTCACCAATGCCAATGAT-3' | 5'-CAGCGTTCCCACCAAGTAGTT-3' |
| <i>glb1</i> | 5'-GCAAATGTAACCGCTGCGTT-3' | 5'-AACCCAAACGCCTGATTCATT-3' |
| <i>ctsa</i> | 5'-ATGGAAGACAGCAGCATCAATT-3' | 5'-GATGGTTGATGAAATGGTGTCC-3' |
| <i>tfeb</i> | 5'-CCAACGACCTGGATGTACGCT-3' | 5'-GCTTTCTTGCTTGATGAAGGG-3' |
| <i>neu1</i> | 5'-GGTTCTGCTGAGGACAACAA-3' | 5'-AGTGCATAGTACAGACCCGA-3' |

第二章

Neu1-KO ゼブラフィッシュの 神経細胞およびグリア細胞の 性状解析

2-1 背景および目的

第一章において、Neu1-KO ゼブラフィッシュは野生型ゼブラフィッシュと比較して、社会性や不安感受性が低下していることが明らかとなった。さらに、Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内でのリソソームエキソサイトーシスの亢進および基質分子の蓄積が予想され、さらにそれらの情動行動異常の関連が推察されたが、その詳細については不明なままである。また、なぜ HPA 軸が Neu1 欠損によって変化するのか、脳内のどの部位や細胞種で分子変化が生じているのかなどの情報も得られていない。

脳内は、神経細胞とその間を埋めるように存在しているグリア細胞で構成されている。神経細胞は、脳や脊髄などの中枢神経系を構成しており、樹状突起の先端のシナプスから神経伝達物質を介して情報伝達を行っている。情動はこの中枢神経系の制御を受けており、最近の研究において、神経細胞のグルタミン酸作動性ニューロン、セロトニン作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンが不安や社会的行動の制御に関与していることが報告されている^{66,67}。たとえば、グルタミン酸作動性ニューロンは、中枢神経系において興奮性伝達を司っており、神経伝達物質であるグルタミン酸を介し、情報伝達を行う⁶⁷。また、このグルタミン酸作動性ニューロンのシナプス上に存在する NMDA 受容体の阻害により不安の増加や社会性の低下などの統合失調様の症状を引き起こすことが報告されている⁶⁸。セロトニン作動性ニューロンは、体温調節や睡眠など体内の基礎的な機能を司っており、

セロトニンを介し情報伝達を行う⁶⁶。このセロトニン作動性ニューロンは、セロトニンの再取り込みを阻害することで不安や意欲の低下などのうつ症状が改善することが報告されている⁶⁶。GABA 作動性ニューロンは、抑制性の神経伝達物質で抗不安作用や催眠作用があることが報告されている⁶⁷。自閉症や統合失調症などの精神疾患において社会性や情動の異常を引き起こす神経細胞機能障害は、神経系での GABA 作動性ニューロンなどの抑制性と興奮性活動のバランスが崩れることで起こることが報告されている⁶⁷。

また、グリア細胞は神経細胞の修復・除去を担うミクログリア、神経細胞への栄養供給を担うアストロサイト、および神経伝達速度に関与しているミエリン鞘を形成するオリゴデンドロサイトで構成されており、神経細胞の活動をサポートするために脳内環境の維持や代謝支援を行っている。ミクログリアは、通常は「静止型」の状態であるが、刺激により「活性型」へと変化する⁶⁹。活性化したミクログリアは、変性した神経細胞を除去する働きを示す「傷害性 (M1)」と傷ついた神経細胞を保護する「保護性 (M2)」の 2 極性を有している。ミクログリアが傷害性 (M1) になると、炎症性サイトカインなどの神経傷害因子の産生により神経炎症を引き起こし、神経細胞傷害に関与していることが知られている⁶⁹。一方で、保護性 (M2) では神経保護因子を産生するなど、極性の違いにより相反する機能を示す⁶⁹。また、統合失調症やアルツハイマーなどの精神疾患では、ミクログリアが活性化されることが報告されている⁶⁹。アストロサイトは、長期シナプス抑制などのシナプス可塑性に関与しており⁷⁰、また、うつ病の分子病態がアストロサイトの ATP 放出能

低下に起因することが報告されている⁷⁰。アストロサイトにもミクログリア同様に中枢神経系の損傷に対し、活性型となることが知られており、炎症性（A1）と抗炎症性（A2）の2つの形態が存在している⁷¹。オリゴデンドロサイトは、神経回路のミエリン鞘の修復に関与しており、ミエリン鞘が脱落するとオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化が誘導されミエリン鞘は修復されることが報告されている⁷²。このようにグリア細胞の活性変化は、情動行動の異常や障害につながる事が多数報告されている⁷³。

以上のような背景から、Neu1-KO ゼブラフィッシュの行動変化のメカニズム解明のためには神経細胞およびグリア細胞の性状解析が必須である。特に、ゼブラフィッシュ脳の組織学的解析は必須であり、脳内神経細胞の性状や他の細胞との相互作用について明らかにする必要がある。そこで本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞およびグリア細胞に着目し、特にヒトの認知や情動を司る大脳や中脳に相当する領域であるゼブラフィッシュの中脳および終脳における状態について解析した。

2-2 実験方法

2-2-1 Real-time PCR 解析

1-2-8 と同様の方法で、グルタミン酸作動性ニューロンマーカー遺伝子（AMPA 型グルタミン酸受容体 (*gria1a*, *gria1b*, *gria2a*, *gria2b*, *gria3a*, *gria3b*, *gria4a*, および *gria4b*) および小胞型グルタミン酸トランスポーターGLUT1 (*slc17a7a*)), ドーパミン作動性ニューロンマーカー遺伝子（チロシン水酸化酵素 (*th1*) およびドーパミントランスポーター (*dat*)), GABA 作動性ニューロンマーカー遺伝子（グルタミン酸デカルボキシラーゼ (*gad1b* および *gad2*)), セロトニン作動性ニューロンマーカー遺伝子（トリプトファンヒドロキシラーゼ (*tph1a*, *tph1b*, および *tph2*)), コリン作動性ニューロンマーカー遺伝子（コリンアセチルトランスフェラーゼ a (*chata*)), シナプス可塑性関連遺伝子（シナプトファイジン b (*sypb*) および Homer-1 (*ho1b*)), アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターマーカー遺伝子 (*eaat1a*, *eaat1b*, *eaat1c*, および *eaat2*), アストロサイトマーカー遺伝子（グリア線維性酸性タンパク質 (*gfap*)), オリゴデンドロサイトマーカー遺伝子（ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (*mogb*) およびミエリン関連糖タンパク質 (*mag*)), 保護性サイトカイン関連遺伝子（インターロイキン IL4 (*il4*) およびトランスフォーミング増殖因子- β (*tgfb1a*)), 炎症性サイトカイン関連遺伝子（インターロイキン IL1 β (*illb*)) の発現解析を行った。プライマーの配列は表 2 に示した。

2-2-2 ウェスタンブロッティング

1-2-9 と同様の方法で、Neu1-KO および WT ゼブラフィッシュ脳からライセートを作製し、SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜に転写し、1 %牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングを行った。Gfap、Lamp1、iNOS、Erk、リン酸化 Erk、および β -アクチン検出のため、抗 Gfap モノクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、GTX128741、GeneTex)、抗 Lamp1 ポリクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、AB24170、Abcam)、抗 iNOS モノクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、Clone 6 / iNOS / NOS、BD Transduction Laboratories)、抗 Lamp1 モノクローナル抗体、抗 Erk モノクローナル抗体 (1 / 2000 希釈、# 4695、Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 Erk モノクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、# 9106、Cell Signaling Technology)、および抗 β -アクチンモノクローナル抗体 (1 / 1000 希釈、66009-1g、Proteintech) をそれぞれ用い、HRP 結合した二次抗体と反応させた。各バンドのシグナル検出には、EzWestLumi plus 化学発光試薬 (ATTO) を用い、ChemiDoc Touch (Bio-Rad) で検出した。定量解析は、ImageLab Touch ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて行った。

2-2-3 免疫組織染色 (Immunohistochemistry : IHC)

ゼブラフィッシュ脳を 4 %パラホルムアルデヒドで一晩固定し、10 %、20 %、30 % ショ糖 (0.1 M リン酸バッファー) で順次置換した。脳は 5 %アガロース (Agarose XP、NIPPON GENE) に包埋し、ドライアイスを投入したヘキサン (-60 °C) に投入し、瞬間凍

結させた。これをクライオスタットミクロトーム（クリオスターNX50、PHC）を使用して 20 μm にスライスし、凍結切片を作製した。次に凍結切片をブロッキングワンヒスト（免疫染色用、ナカライテスク）またはアビジン / ビオチンブロッキングキット（レクチン染色用、DAKO）でブロッキングした。続いて、切片を、anti-Gfap（1 / 1000 希釈）、anti-L-Plastin（1 / 1000 希釈、GTX124420、GeneTex）、anti-Lamp1 ポリクローナル抗体（1 / 250 希釈）、anti-リン酸化 Erk（1 / 500 希釈）、anti-Eカドヘリンモノクローナル抗体（1 / 100 希釈、GTX124440、clone 36 / E-cadherin、Transduction Laboratories）、またはビオチン化 *Maackia amurensis*（MAM）レクチン（10 μg / mL、J-Chemical）を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。その後、蛍光標識二次抗体またはアビジンを使用し、25 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした。また、脳切片中の神経細胞変性を可視化するために、Fluoro-Jade B（FJB、Biosensis）を用いて、免疫組織染色を行った。染色した切片は、蛍光顕微鏡システム（Apotome、Carl-Zeiss）を用いて顕鏡した。

2-2-4 統計解析

2 群間の平均の差の検定は、t 検定を使用した。

2-3 実験結果

2-3-1 脳内シアロ複合糖質の免疫組織染色

Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内におけるシアロ糖鎖の分布を解析した。ゼブラフィッシュの Neu1 は *in vitro* で α 2-3 結合シアル酸を切断することから²⁹、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を免疫組織染色 (IHC) により解析した。この染色では、 α 2-3 結合のシアル酸を持つ糖タンパク質、またはオリゴ糖が検出される。ヒトでは大脳および中脳が情動や認知を司っていることから、本研究では、ヒトの大脳と中脳に相当するゼブラフィッシュの中脳と終脳に着目した (図 2-1 a)^{74,75}。免疫組織染色の結果、WT ゼブラフィッシュでは、中脳と終脳全体に弱い MAM シグナルが検出された (図 2-1 b、c)。一方、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは中脳において強い MAM シグナルが観察され (図 2-1 d、e)、終脳では終脳背側で強いシグナルが観察された (図 2-1 f、g)。Neu1-KO ゼブラフィッシュの中脳および終脳とも MAM レクチンシグナルを有する細胞数は、WT のそれよりも有意に増加した ($p < 0.01$ 、図 2-1 h、i)。一方、SSA レクチンや PSA 抗体の IHC では WT と Neu1-KO ゼブラフィッシュに差が認められなかった (data not shown)。これらの結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳では、Neu1 の欠損により、 α 2-3 結合シアロ複合糖質が蓄積していることが示唆された。

2-3-2 脳内リソソーム関連タンパク質解析

Neu1 はリソソームに局在する糖鎖分解酵素であり、哺乳類ではリソソームエキソサイトーシス制御因子である Lamp1 の結合糖鎖を脱シアリル化することによって、リソソームエキソサイトーシス制御に関与している。ゼブラフィッシュでは、ヒトのホモログとして、*Lamp1a* および *Lamp1b* 遺伝子が存在しており²⁹、第一章では、*Lamp1a* 遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。このため、ウェスタンブロットにて Lamp1 タンパク質を解析したところ、Neu1-KO ゼブラフィッシュで WT に比べ、Lamp1 の蓄積が観察された ($p < 0.01$ 、図 2-2 a)。IHC において、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは WT と比較して中脳全域で強い Lamp1 シグナルが検出され、特に菱脳室 (RV)、半円堤 (TSc) の中心核周辺、および視蓋の脳室周囲灰白帯 (PGZ) において観察された (図 2-2 b-d)。さらに、終脳では、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいて Lamp1 が高密度で観察され、終脳背部の外側領域と視蓋前核 (PPa) の前側領域で特に強いシグナルが観察された (図 2-2 e-g)。高倍率条件下では、WT ゼブラフィッシュにおいて Lamp1 シグナルは点状に観察されたが、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは細胞構造のようなシグナルが観察され、さらに Lamp1 シグナルと E-カドヘリンシグナルとの共局在が確認された (図 2-2 h)。E-カドヘリンは細胞膜のマーカータンパク質であることから、Neu1-KO では Lamp1 の細胞膜への局在変化が認められた。以上の結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、Neu1-KO マウスやシアリドーシス患者の線維芽細胞と同様に^{58,76}、リソソームエキソサイトーシスの亢進が示唆された。

2-3-3 作動性ニューロン関連遺伝子の発現解析

情動行動はグルタミン酸作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、セロトニン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンによって制御されていることから、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける各神経作動性ニューロンの遺伝子発現を解析した。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、グルタミン酸作動性ニューロン関連遺伝子である *gria1a* ($p<0.01$)、*gria2a* ($p<0.001$)、*gria3b* ($p<0.05$) など、AMPA 型 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid)グルタミン酸受容体の遺伝子発現量が有意に減少していた (図 2-3 a)。次に、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グルタミン酸トランスポーター (*slc17a7a*) の遺伝子発現を解析したところ⁷⁷、Neu1-KO において *slc17a7a* 遺伝子の発現が低下していた ($p<0.05$ 、図 2-3 a)。一方で、ドーパミン作動性ニューロン、セロトニン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンでは、Neu1-KO ゼブラフィッシュと WT でそのマーカー遺伝子発現に変化はなかった (図 2-3 b-e)。これらの結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動異常にはグルタミン酸作動性ニューロンが関与している可能性が推測された。また、AMPA 型グルタミン酸受容体は、興奮性神経伝達を介したシナプス可塑性への関与が知られている⁷⁸。シナプス可塑性は記憶の形成などに関与していることに加え、情動異常を伴う精神疾患などではシナプス可塑性の低下が報告されている⁷⁹。そこで、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける神経可塑性マーカー遺伝子 *sypb* と *holb* の発現を解析したところ⁸⁰、Neu1-KO ゼブ

ラフィッシュでは、*sypb* と *ho1b* の発現が有意に減少した (各 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、図 2-3 f)。

この結果より、Neu1-KO ゼブラフィッシュではシナプス可塑性が低下している可能性が示唆された。

2-3-4 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関連遺伝子発現解析

近年、アストロサイトは、興奮性ニューロンやシナプス伝達を制御することで情動に関与する神経回路の調節を行うことが報告されている⁷⁰。アストロサイトのマーカータンパク質である GFAP は、高発現する中間径フィラメントタンパク質で、その量はアストロサイトの活性化によって増加する⁸¹。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 *gfap* 遺伝子の発現が上昇し ($p < 0.001$ 、図 2-4 b)、それに伴い Gfap タンパク質の発現も増加した ($p < 0.001$ 、図 2-4 c)。IHC により Gfap タンパク質の脳内分布を解析したところ (図 2-4 d-i)、Neu1-KO のゼブラフィッシュでは、中脳と終脳に強い Gfap シグナルが観察された (図 2-4 f、i)。中脳では視蓋 (TeO)、視蓋脳室 (TeV) 周辺、血管空隙 (Vas)、視床下部尾部 (Hc) (図 2-4 f)、終脳では脳背部、脚内核 (ENV) 腹部 (図 2-4 i) において特に強いシグナルが観察された。Gfap は Erk によって正に制御されることから⁸²、ゼブラフィッシュ脳におけるリン酸化 Erk をウエスタンブロットにより解析した。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、リン酸化 Erk が増加した ($p < 0.05$ 、図 2-4 j)。IHC では、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいてリン酸化 Erk シグナルが Gfap シグナルと共局在

を示したことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュではアストロサイトの活性化が亢進していることが示唆された (図 2-4 k)。

グルタミン酸は、興奮性神経伝達物質であり、グルタミン酸を介したシナプスの神経伝達は情動に関与することが報告されている⁶⁷。また、アストロサイトはグルタミン酸トランスポーターにおけるグルタミン酸の再取込の調節を介し興奮性ニューロンの制御に関与していることから⁶⁸、Neu1-KO ゼブラフィッシュのグルタミン酸とアストロサイトの関連性について明らかにするため解析を行った。アストロサイトのグルタミン酸トランスポーター (*eaat1a*、*eaat1b*、*eaat1c*、および *eaat2*) 遺伝子の発現解析結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは WT に比べ、*eaat1a*、*eaat1c*、および *eaat2* が低下していた ($p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、図 2-4 a)。*eaat1b* については Neu1-KO ゼブラフィッシュと WT で差はなかった。

2-3-5 ミクログリアの性状解析

ミクログリアは、脳内の免疫細胞であり、損傷した神経細胞を炎症性因子の産生や貪食により除去するなど食作用と炎症作用機能を有している。一方で、保護性因子の産生により神経保護の機能も有しており、正常な脳では、これら相反する機能が平衡状態を保っていることが知られている⁶⁹。また、近年、アストロサイトとミクログリアは、相互に活性化することが報告されている^{70,81}。また、脳内の神経細胞の損傷などの異常が起こると、

ミクログリアはアストロサイトに先行して活性化し、その情報を受け取ったアストロサイトも活性化することが報告されていることから⁷⁰、アストロサイトの変化はミクログリアの変化を伴っている可能性が高い。IHCの結果、WTおよび Neu1-KO ゼブラフィッシュの中脳および終脳におけるミクログリアマーカー（L-Plastin）のシグナルが複数の部位に散在して確認されたが、細胞の形態は互いに異なっていた（図 2-5 a-h）。WTのミクログリアは、樹状突起が伸びているラミファイド型を示すのに対し、その一方で、Neu1-KO ではアメボイド状の形態であるアメボイド型を示した（図 2-5 d, e）。一般にミクログリアは、静止状態でラミファイド型、活性状態でアメボイド型を示す⁶⁹。このことから、Neu1 欠損により Neu1-KO ではミクログリアが活性化していることが示唆された。ミクログリアは活性状態において、神経傷害性作用（M1 型）と神経保護性作用（M2 型）の極性転換を行い、神経細胞のストレス、障害、炎症、劣化に応じてその形態を変化させる⁶⁹。そこで、傷害性因子である炎症性サイトカインの代表的なマーカー分子 iNOS と IL-1 β を解析したところ、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、iNOS タンパク質の発現量が WT ゼブラフィッシュと比較して有意に増加した（ $p < 0.01$ 、図 2-5 i）。さらに、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは *illb* の遺伝子発現が上昇した（ $p < 0.01$ 、図 2-5 j）。一方で、保護性因子マーカーである *il4* と *tgfb1a* の遺伝子発現は Neu1-KO ゼブラフィッシュと WT で差がなかった（図 2-5 k, l）。このことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュのミクログリアは傷害性（M1 型）であり、周辺細胞の損傷や機能変化が予想された。一方、オリゴデンドロサイトもミクログリアの活性

化に伴い産生された炎症性サイトカインの調節不全により機能喪失することが報告されている⁸³。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、オリゴデンドロサイトマーカーである *mogb* や *mag* 遺伝子の発現が低下していた (図 2-5 o)。これはオリゴデンドロサイトの機能低下が Neu1-KO ゼブラフィッシュで生じている可能性を示している。

また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、L-Plastin シグナルが MAM シグナルと共局在を示したことから (図 2-5 m)、ミクログリアにおけるシアロオリゴ糖の蓄積が明らかとなった。さらに、Lamp1 シグナルと MAM シグナルも共局在を示したことから (図 2-5 n)、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、ミクログリアにおいてシアロオリゴ糖が蓄積し、リソソームエキソサイトーシスが亢進している可能性が示唆された。

2-3-6 神経細胞変性解析

前項において、Neu1-KO ゼブラフィッシュのミクログリアが傷害性 (M1) を示すことが明らかとなった。傷害性ミクログリアにより産生された炎症性サイトカインは神経細胞除去作用を有することから、ミクログリアの活性化は神経細胞変性との関与が考えられる。このことから、壊死、アポトーシス、および変性を起こした神経細胞に反応する FJB 試薬を用いて Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞の性状を解析した (図 2-6 a-h)。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは中脳 (図 2-6 d、e) および終脳 (図 2-6 h) に複数の神経細胞変性シグナルが観察された。一方で、WT ゼブラフィッシュでは、中脳 (図 2-6 b、c)

と終脳（図 2-6 g）において神経細胞変性シグナルは観察されなかった。この結果より、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは神経細胞変性が誘導されている可能性が示唆された。神経細胞は、主にアポトーシス、ネクロトーシス、およびパイロトーシスを経て、神経細胞死に至る⁸⁴。特にネクロトーシスは、神経細胞変性疾患への関与が報告されていることから⁸⁵、Neu1-KO 脳におけるネクロトーシス関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、ネクロトーシス促進遺伝子である *rip1k*、*rip3k*、*trif* の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった（図 2-6 i）。このことから Neu1-KO ではネクロトーシス亢進による神経細胞変性の誘導が示唆された。

2-4 考察

第一章において、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、不安感受性の低下や興味探索行動の亢進など情動異常を示すことが明らかとなった。そこで本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動行動異常のメカニズムを解明することを目的とした。

Lamp1 は、リソソームに局在するリソソームエキソサイトーシス制御因子である⁸⁶。マウス Neu1 は、Lamp1 の糖鎖からシアル酸を遊離し、リソソームエキソサイトーシスを負に制御することが報告されている⁴⁶。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは α 2-3 シアロオリゴ糖の蓄積と Lamp1 の増加を示したが、これは Neu1 欠損による Lamp1 の脱シアリル化抑制に起因することが示唆された。さらに、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、Lamp1 シグナルが細胞膜マーカーの E-カドヘリンシグナルと共局在を示した。通常、リソソーム内酵素である Lamp1 は、リソソームに局在を示すが、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは細胞膜においてその局在が観察された。これは、通常はリソソームに局在している Lamp1 がリソソームエキソサイトーシスによって細胞膜へ移行したことを示している。この結果から、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、Neu1-KO マウスと同様にリソソームエキソサイトーシスが亢進していることが示唆された。リソソームエキソサイトーシスは、神経突起の伸長、シナプスの再編成、分泌されたリソソーム酵素による細胞外マトリックスの分解、長期にわたるシナプス構造の変化の制御などの神経細胞機能に関与している^{57,87}。また、アストロサイト

ではリソソームエキソサイトーシスが病態や炎症反応に関与する細胞表面受容体を制御していることなども報告されている⁸⁸。このことから、リソソームエキソサイトーシスの亢進は Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動異常に関与している可能性が予測された。

本章では、ミクログリアマーカーである L-Plastin 抗体と MAM レクチンを用いた IHC により、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおけるシアロオリゴ糖の蓄積を伴うミクログリアの活性化が観察された。また、MAM レクチンと Lamp1 の共局在から、Neu1-KO ゼブラフィッシュのミクログリアでは、その活性化に伴いシアロオリゴ糖の蓄積およびリソソームエキソサイトーシスの亢進が示唆された。ミクログリアは中枢神経系の免疫細胞で、細長い突起でシナプスや軸索に接触し、神経機能を監視し調節している⁶⁹。通常、ミクログリアは静止型である樹状の長い突起を有したラミファイド型の形態をとる。これに対し、病態ではアメボイド型に活性化し、損傷細胞や細胞外タンパク質の貪食、IL-4 や IL-10 などの液性因子の産生（保護性・M2 型）により脳機能を維持する役割を担っている⁶⁹。一方で、ミクログリアは $\text{INF}\gamma$ や $\text{TNF}\alpha$ などの炎症性サイトカインを分泌して炎症を引き起こし、脳機能を損傷させる（傷害性・M1 型）ことも知られており、2つの極性を有している。本研究では、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいて傷害性因子である iNOS と IL-1 β が増加していた。このことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュのミクログリアは活性状態であり、且つ、その極性は、傷害性（M1 型）であることが示された。また、炎症性サイトカインの産生は周辺細胞に傷害をもたらす⁶⁹。Neu1-KO ゼブラフィッシュではオリゴデンドロサイ

トの遺伝子発現が低下しているが、これは炎症性サイトカインの影響による可能性が推測された。

サンドホフ病などのリソソーム病では、神経細胞変性、ミクログリアの活性化、および Erk の活性化を伴いアストロサイトが活性化を示すことが報告されている⁸⁹。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、アストロサイトマーカーである Gfap も増加していた。また、IHC の結果から、アストロサイトではリン酸化 Erk の発現も上昇することが明らかになった。これは、アストロサイトが過活性の状態である可能性を示している。すなわち、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、ミクログリアの活性化によりアストロサイトが賦活化されている可能性が推測された。

アストロサイトはグルタミン酸作動性ニューロンを取り巻くような形態で存在しており、グルタミン酸を介したアストロサイトとシナプス間の情報伝達を調節する役割を担っている⁹⁰。Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、AMPA 型グルタミン酸受容体遺伝子である *gria1a*、*gria2a*、*gria3b* の発現が低下していた。さらに、アストロサイトのグルタミン酸量を調節するグルタミン酸トランスポーター (*eaat1a*、*eaat1c*、および *eaat2*) の発現も低下しており、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、グルタミン酸関連遺伝子群の発現低下が明らかとなった。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、シナプス可塑性のマーカーである *sypb* と *holb* の遺伝子発現も低下していたことから⁸⁰、シナプス可塑性が低下している可能性が示唆された。AMPA 型グルタミン酸受容体の機能は、シナプス可塑性、学習、記憶の変化な

どに関与していることが知られている⁹¹。マウスでは、攻撃性と不安感受性の変化は、AMPA 受容体のシグナル伝達とシナプス可塑性を低下させることによって制御される⁹²。加えて、シアリダーゼ阻害剤である 2, 3-ジデヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸は海馬のシナプス可塑性を制御することも報告されている⁹³。一方で、シアリドーシス患者から作製した iPSC 神経細胞において、Ca²⁺過剰を伴う AMPA 受容体の遺伝子発現の増加が最近報告された。これは本研究結果とは異なる結果であり⁹⁴、in vitro ではアストロサイトが近傍に存在しないことが原因である可能性が考えられる。このグルタミン酸ニューロンの減弱とシナプスの可塑性の低下は統合失調症で認められる性状であり、グルタミン酸量の低下を伴うことが報告されている⁹⁰。このことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュで観察されたグルタミン酸ニューロンの減弱とシナプスの可塑性の低下は、グルタミン酸量の動態変化に関与していることが推測され、情動行動異常との関連性が推測された。

また Neu1-KO ゼブラフィッシュでは神経細胞変性も観察されており、ネクロプトーシス促進遺伝子である *rip1k*、*rip3k*、および *trif* の発現が上昇していることから、神経細胞変性はネクロプトーシスに起因することが示唆された。先にも述べたとおり、ミクログリア活性化による炎症性サイトカインの産生は周辺細胞に損傷をもたらすことから、これが Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞変性の要因である可能性が推測された。神経細胞変性やグルタミン酸量の動態変化は多くの精神疾患で認められる性状の一つであり、HPA 系の機能低下を伴っている⁹⁵。また、Oakley ら (2021) は、HPA 神経伝達経路のグルココル

チコイドとミネラルコルチコイド受容体のノックアウトマウスで神経細胞の変性が見られることを報告しており⁹⁶、Neu1-KO ゼブラフィッシュの不安感受性の低下と神経細胞変性の関係が示唆された。Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける神経細胞変性と HPA 関連遺伝子の低下は、不安感受性の低下や異常な興味関心に関与している可能性が示唆された。

本章では、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいて、アストロサイトやミクログリアが過剰に活性化され、神経細胞が変性していることが明らかになった。Neu1 欠損により、リソソームエキソサイトーシスがミクログリアで亢進し、ミクログリアの活性化によって傷害性ミクログリアから炎症性サイトカインなどの液性因子が過剰に産生されたと推測される。過剰な炎症性サイトカインは周辺細胞を損傷し、ネクロプトーシス亢進による神経細胞変性が起こった可能性が推測される。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュは、グルタミン酸量の変化と神経細胞の変性により、HPA 系の機能が低下し、その結果不安感受性の抑制と過剰な興味関心の亢進が起こったと考えられる。

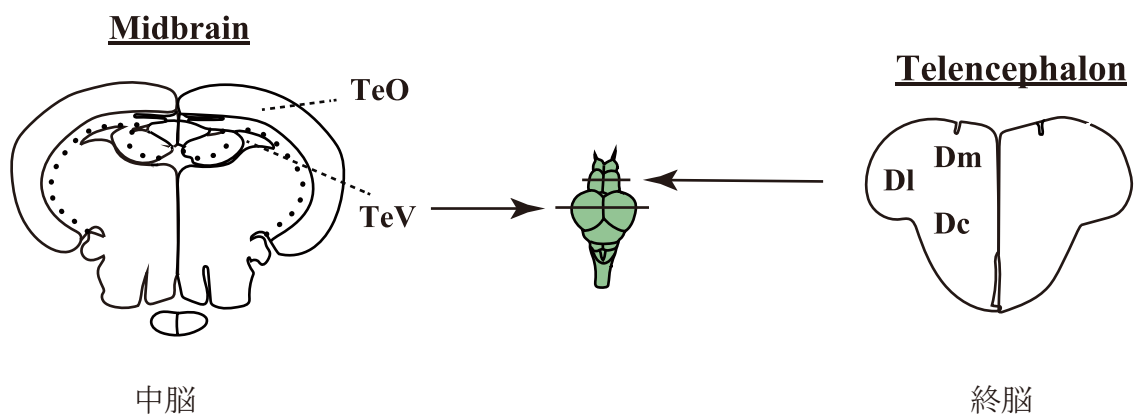


図 2-1 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における中脳および終脳部位

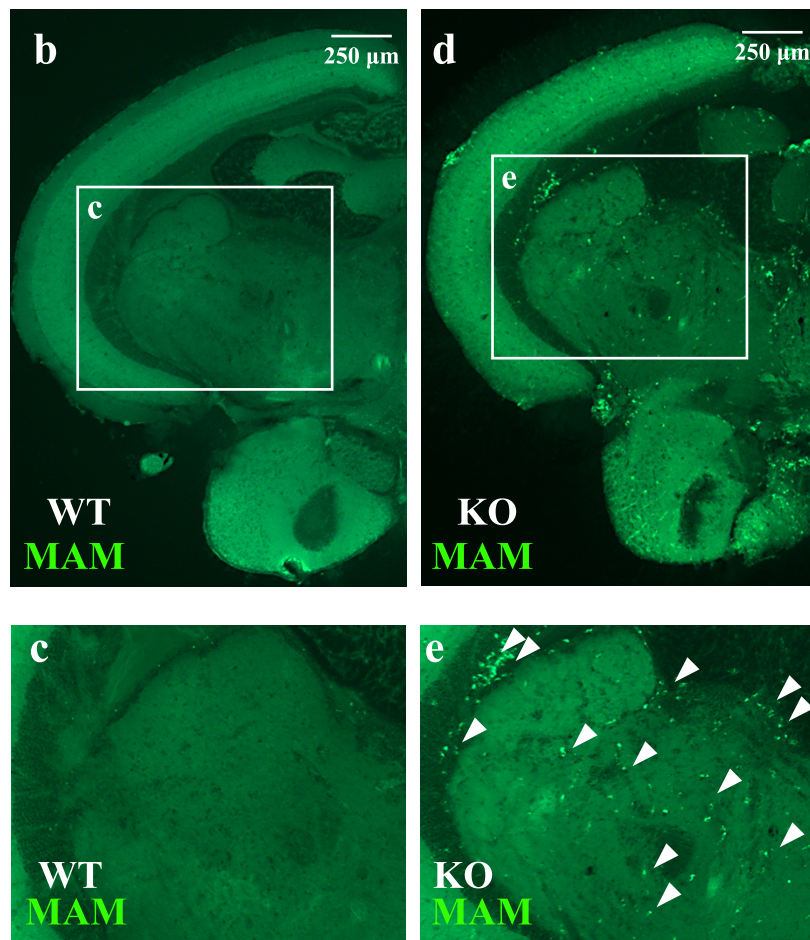


図 2-1 b-e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における α 2-3 シアロオリゴ糖の局在解析（中脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を解剖により摘出し、作製した中脳部位の凍結切片を用いて、 α 2-3 シアロオリゴ糖の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

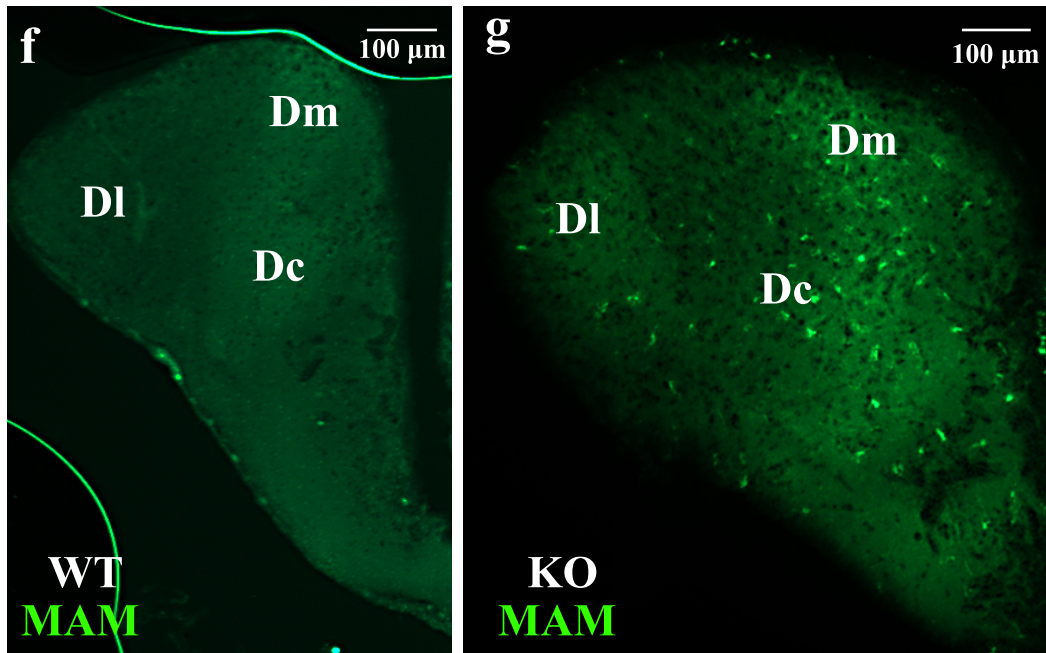


図 2-1 f, g WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における α 2-3 シアロオリゴ糖の局在解析 (終脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した終脳凍結切片を用いて、 α 2-3 シアロオリゴ糖の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

Midbrain

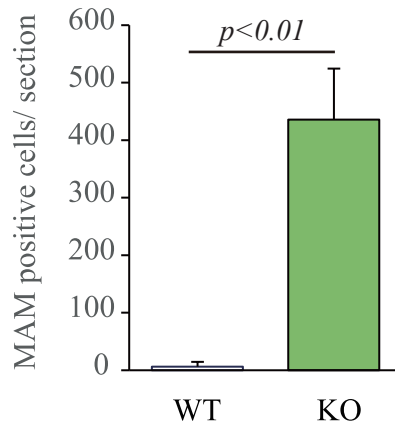


図 2-1 h WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の α 2-3 シアロオリゴ糖蓄積細胞数解析（中脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内中脳における α 2-3 シアロオリゴ糖を免疫組織染色法により蛍光発色させ、蛍光シグナルを発する細胞数の計測を行った。測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=3)。

Telencephalon

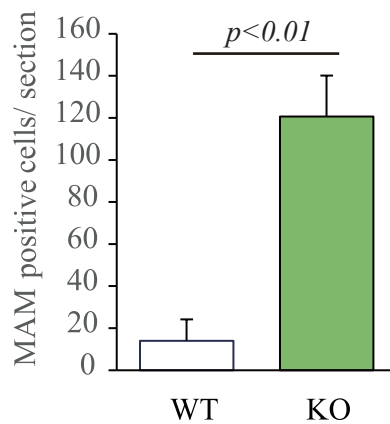


図 2-1 i WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の α 2-3 シアロオリゴ糖蓄積細胞数解析（終脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内終脳における α 2-3 シアロオリゴ糖を免疫組織染色法により蛍光発色させ、蛍光シグナルを発する細胞数の計測を行った。測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=3)。

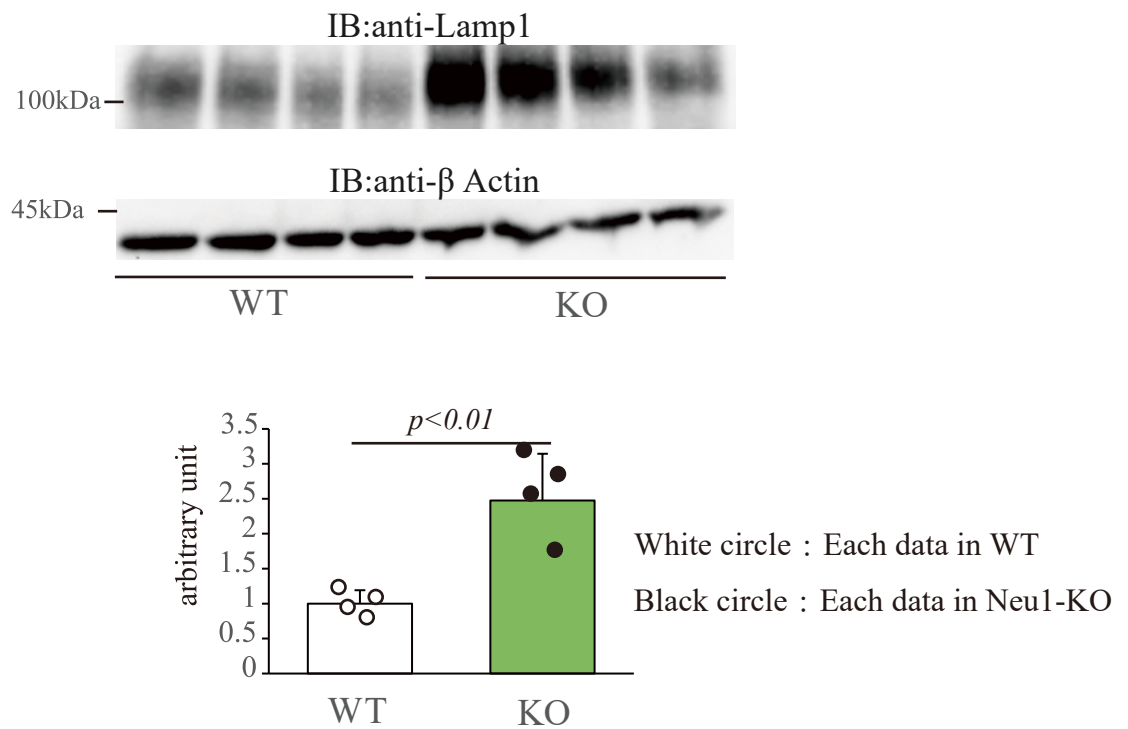


図 2-2 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのウエスタンブロットによる Lamp1 タンパク質の定量解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を解剖により摘出し、ホモジネートを作製した後、ウエスタンブロットにより脳内 Lamp1 タンパク質を定量解析した (n=4)。

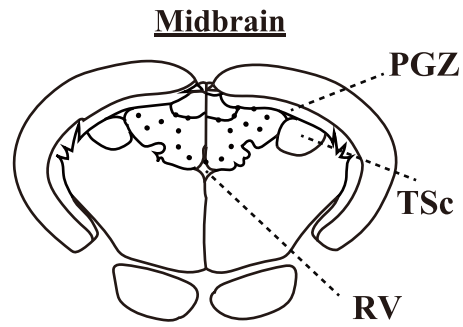


図 2-2 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における中脳部位

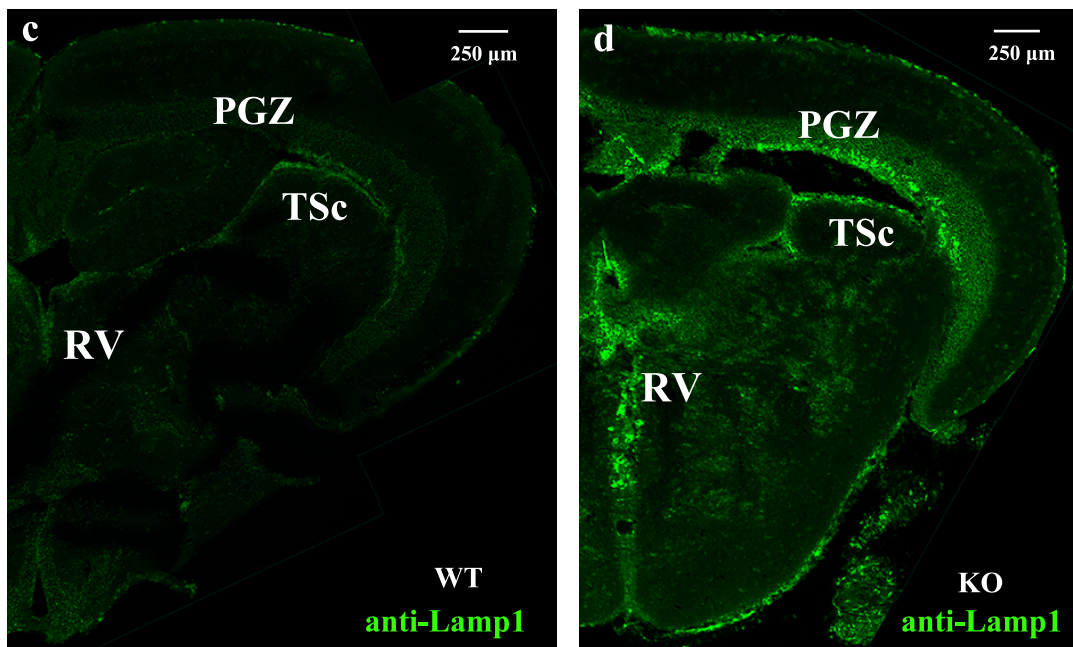


図 2-2 c, d WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における Lamp1 タンパク質の免疫組織染色法による局在解析 (中脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、リソソームエキソサイトーシスマーカー Lamp1 タンパク質の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

Telencephalon

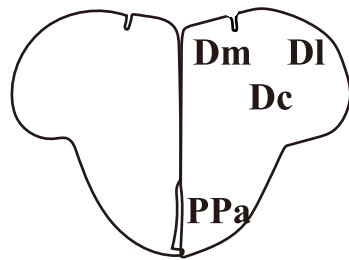


図 2-2 e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における終脳部位

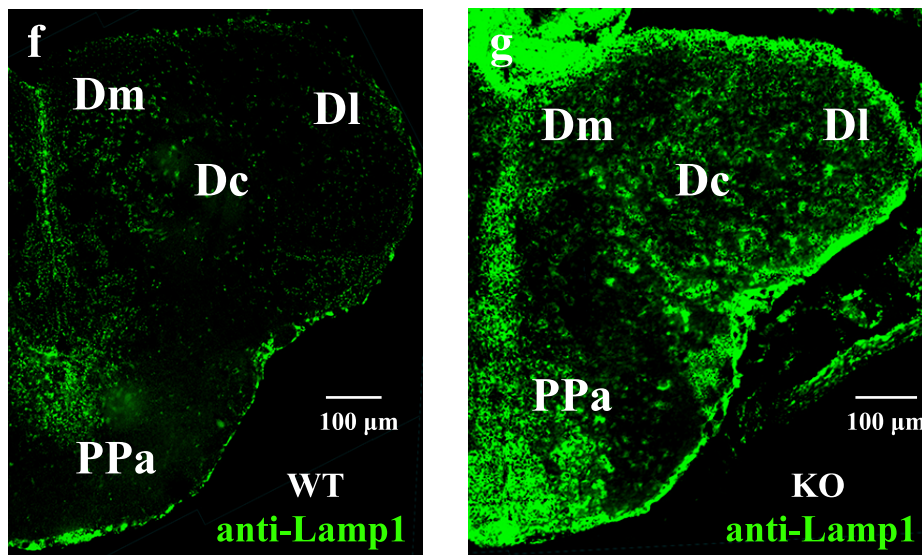


図 2-2 f, g WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における Lamp1 タンパク質の免疫組織染色法による局在解析（終脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した終脳凍結切片を用いて、リソソームエキソサイトーシスマーカー Lamp1 タンパク質の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

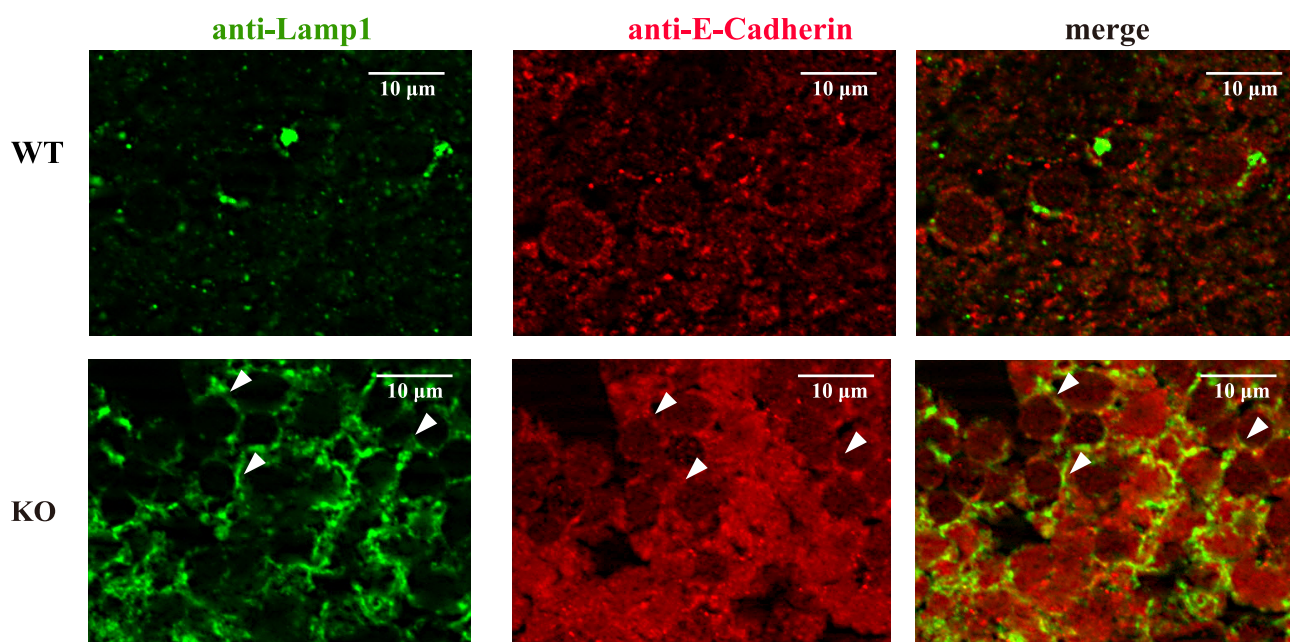


図 2-2 h WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における Lamp1 および E-カドヘリンタンパク質の免疫組織染色法による局在解析（中脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、Lamp1 および E-カドヘリンタンパク質を免疫組織染色法により解析した。

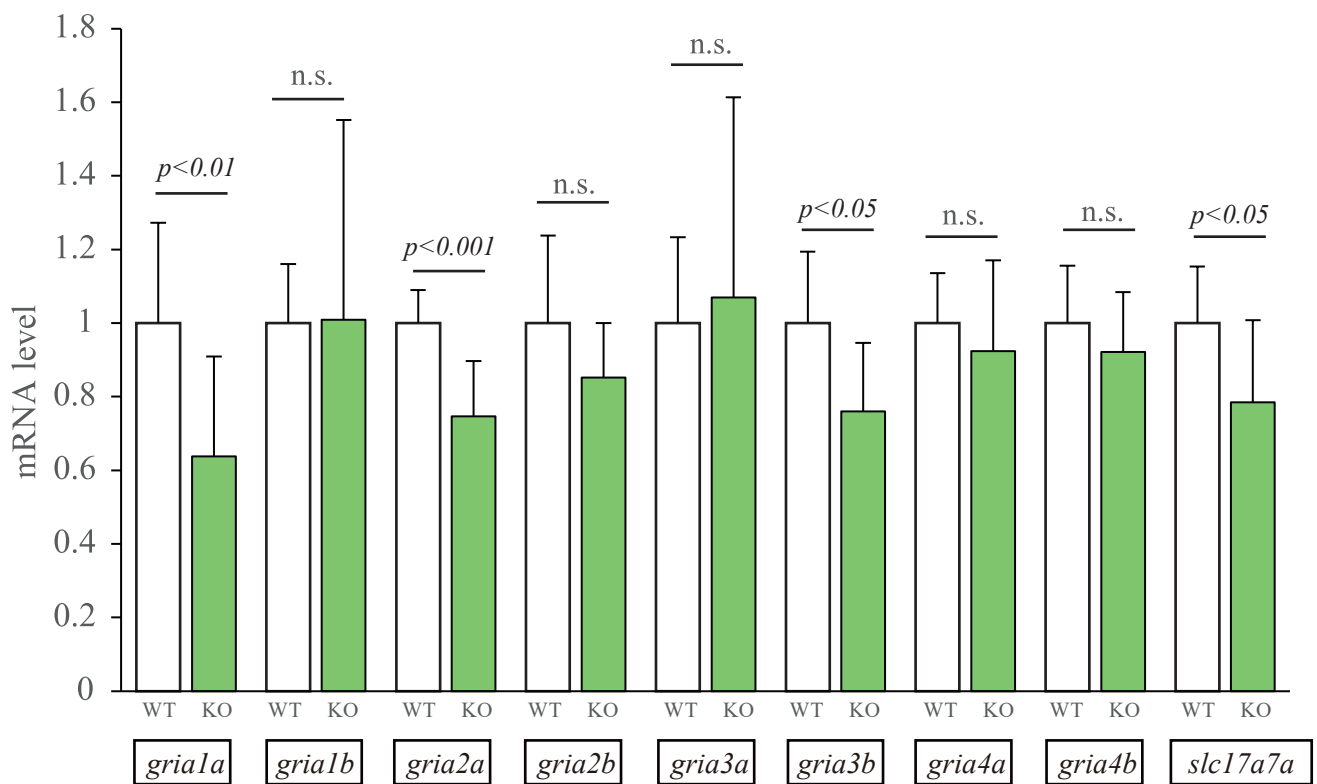


図 2-3 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のグルタミン酸作動性ニューロン関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*gria1a*、*gria1b*、*gria2a*、*gria2b*、*gria3a*、*gria3b*、*gria4a*、*gria4b*、*slc17a7a* の遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

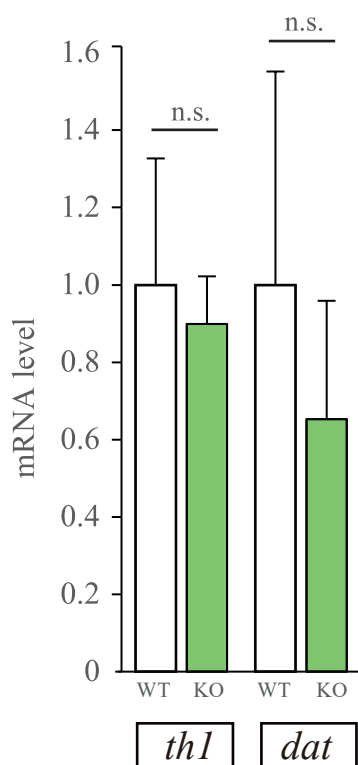


図 2-3 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のドーパミン作動性ニューロン
関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*th1*、*dat* の遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

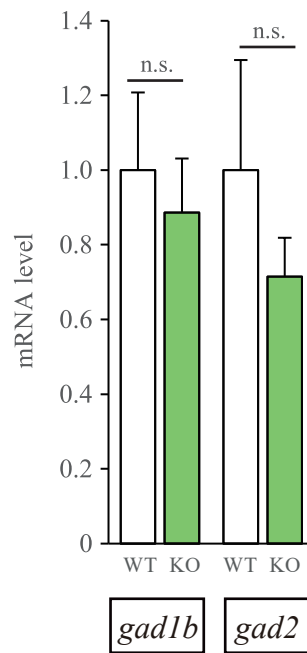


図 2-3 c WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の GABA 作動性ニューロン
関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*gad1b*、*gad2* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

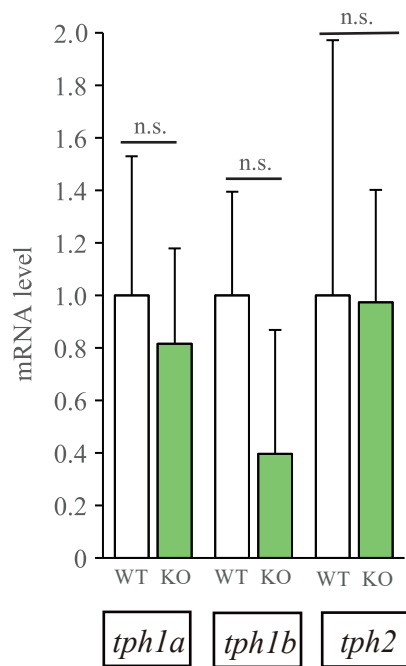


図 2-3 d WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のセロトニン作動性ニューロン
関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*tph1a*、*tph1b*、*tph2* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

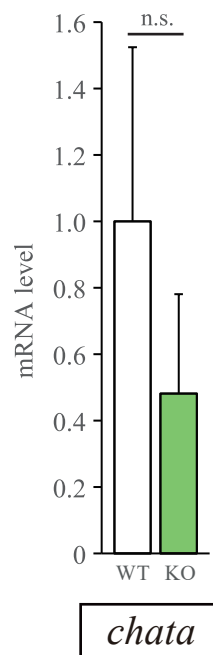


図 2-3 e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のコリン作動性ニューロン
関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*chata* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

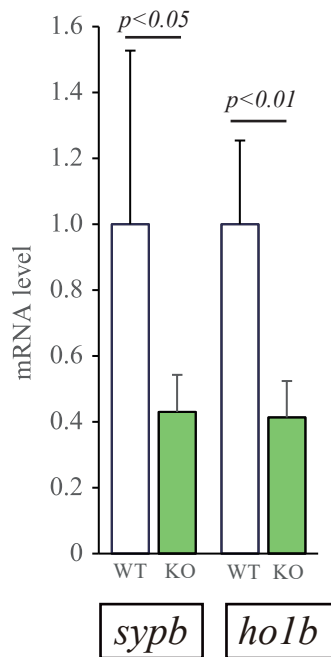


図 2-3 f WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のシナプス可塑性
関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*sypb*、*holb* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=12)。

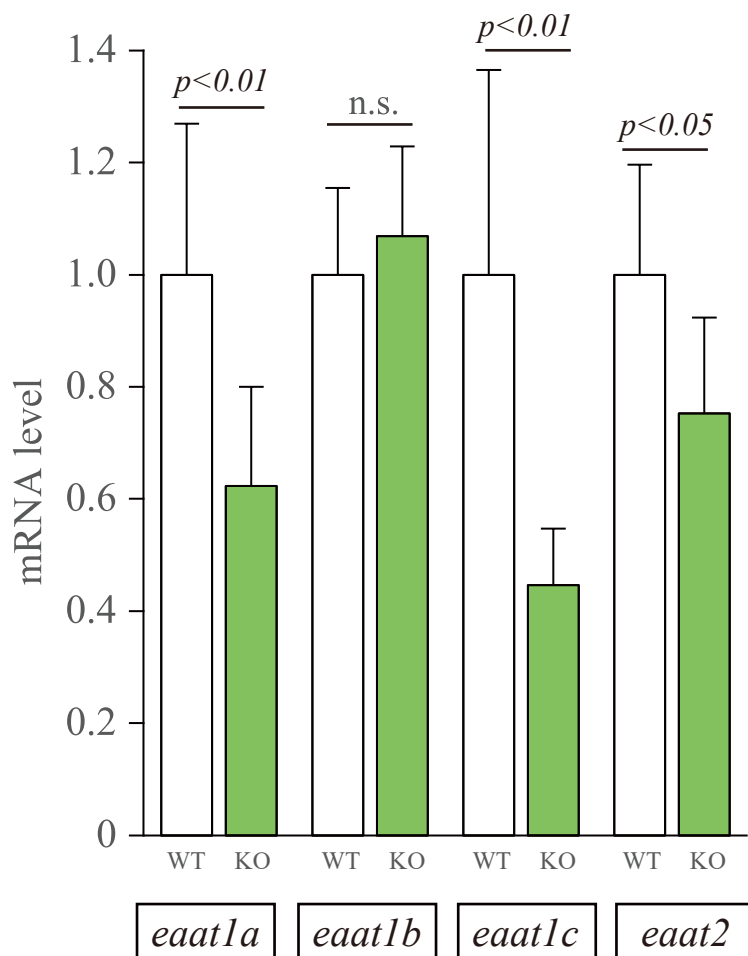


図 2-4 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のアストロサイトグルタミン酸トランスポーター関連遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*eaat1a*、*eaat1b*、*eaat1c*、*eaat2* の遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

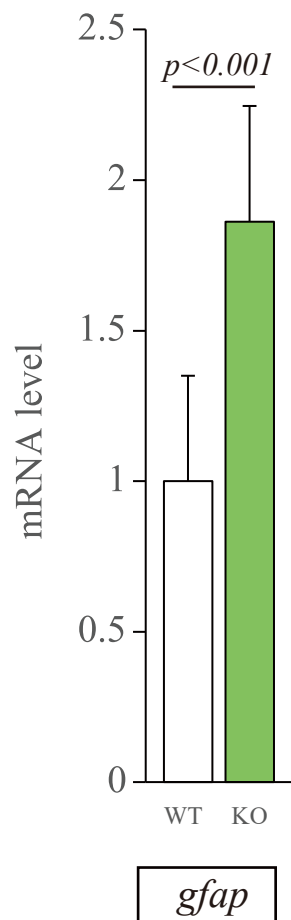


図 2-4 b WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のアストロサイトマーカー遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*gfap* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=12)。

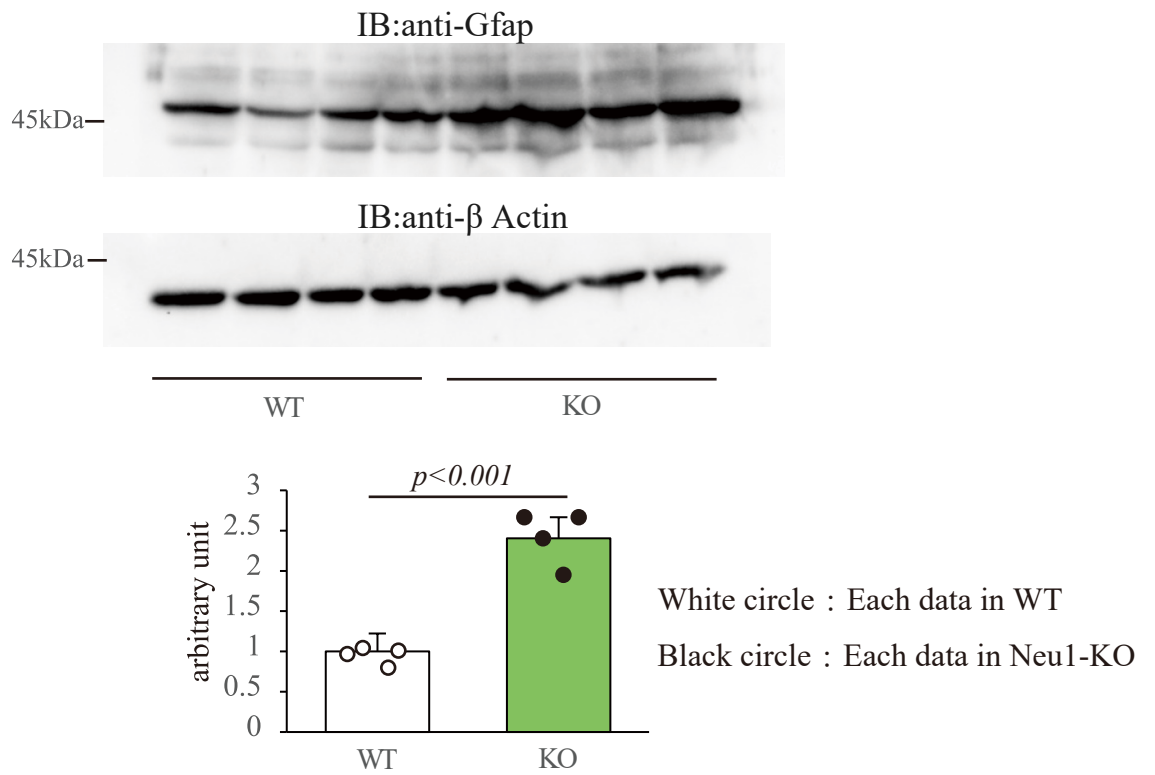


図 2-4 c ウェスタンブロットによる WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの Gfap タンパク質解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、ホモジネートを作製後、ウェスタンブロットにより脳内の Gfap タンパク質を定量解析した。

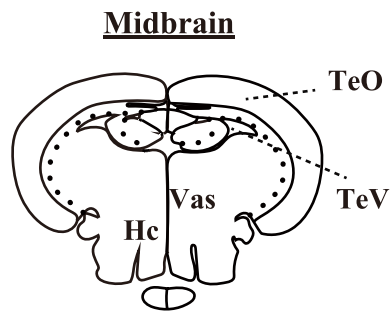


図 2-4 d WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における中脳部位

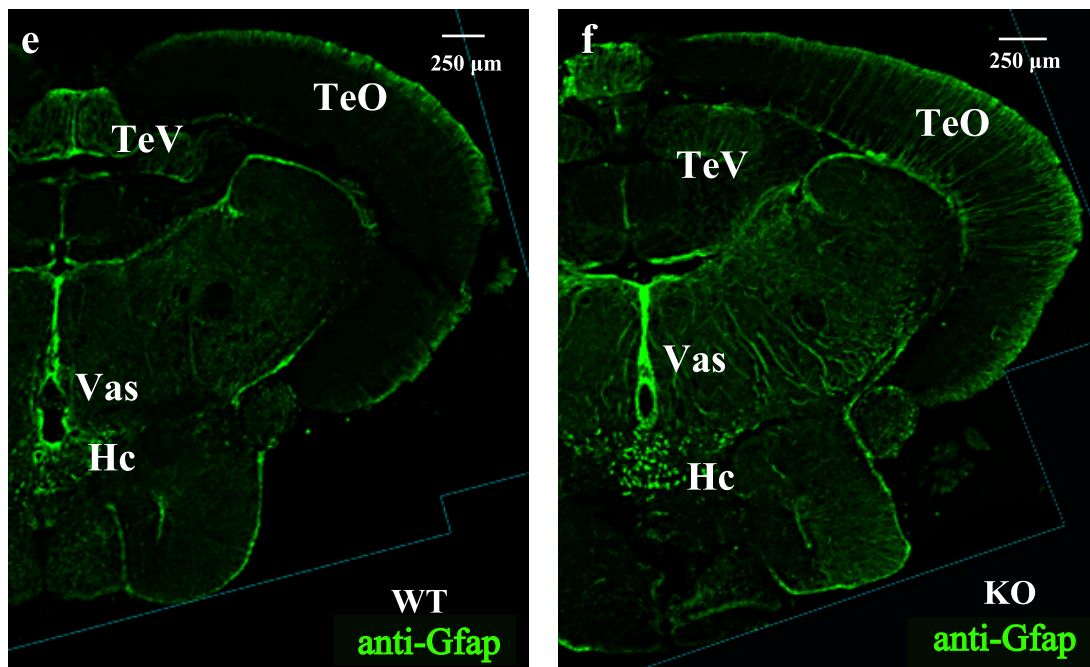


図 2-4 e, f WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における Gfap タンパク質の免疫組織染色法による局在解析 (中脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、アストロサイトマーカー Gfap タンパク質の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

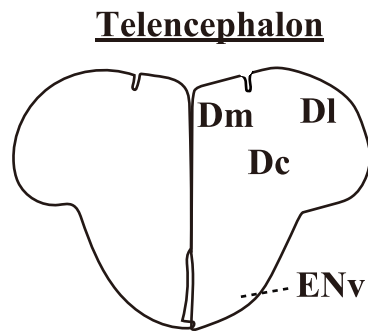


図 2-4 g WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における終脳部位

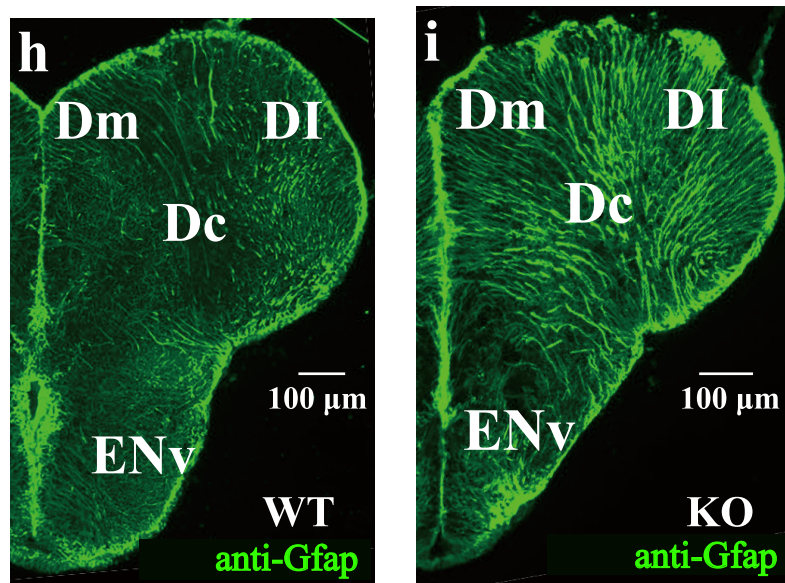


図 2-4 h, i WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における Gfap タンパク質の免疫組織染色法による局在解析（終脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した終脳凍結切片を用いて、アストロサイトマーカー Gfap タンパク質の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

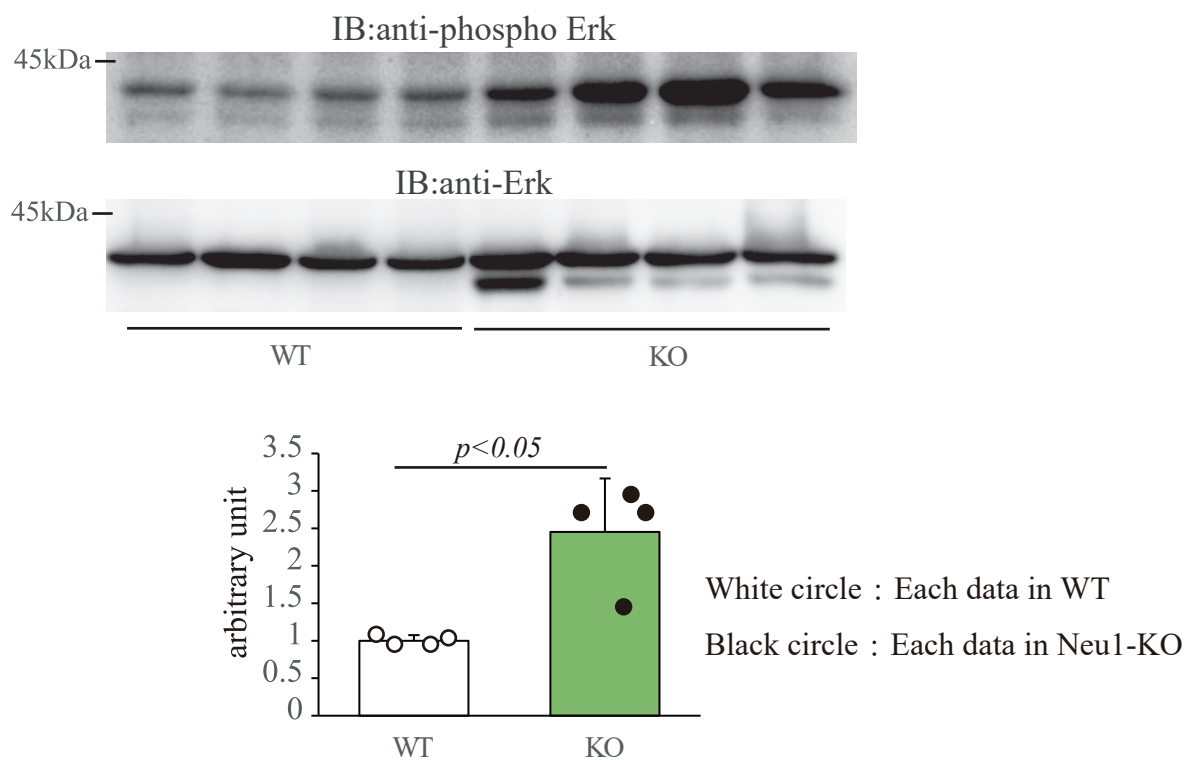


図 2-4 j WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュのウエスタンブロットによる脳のリン酸化 Erk および Erk タンパク質の定量解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、ホモジネート作製後、ウエスタンブロットによりリン酸化 Erk および Erk タンパク質を定量解析した。

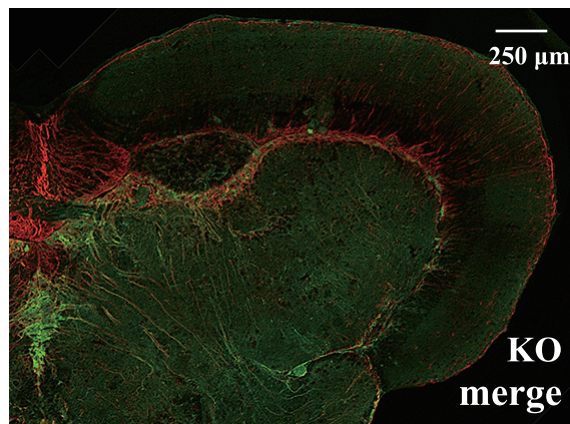
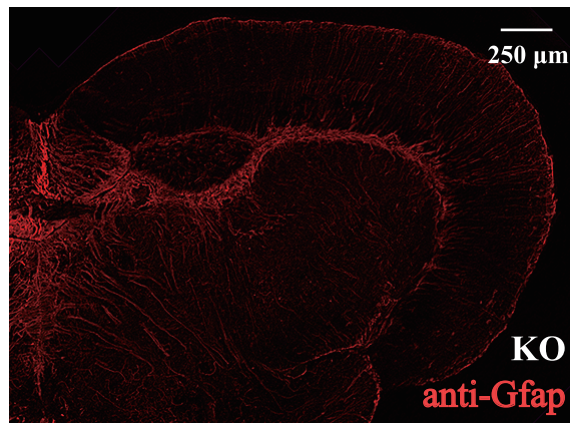
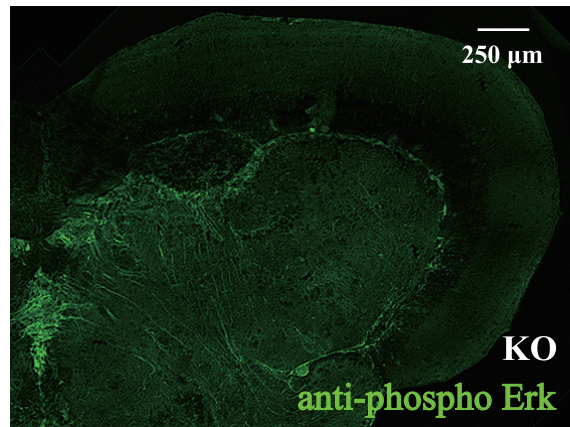


図 2-4 k WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における Gfap とリン酸化 Erk タンパク質の免疫組織染色法による局在解析（中脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、アストロサイトマーカー Gfap とリン酸化 Erk タンパク質を免疫組織染色法により共染色し、脳内局在を解析した。

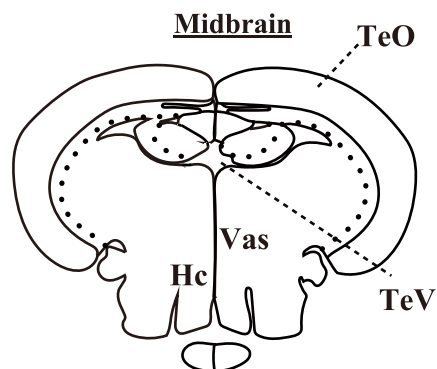


図 2-5 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における中脳部位

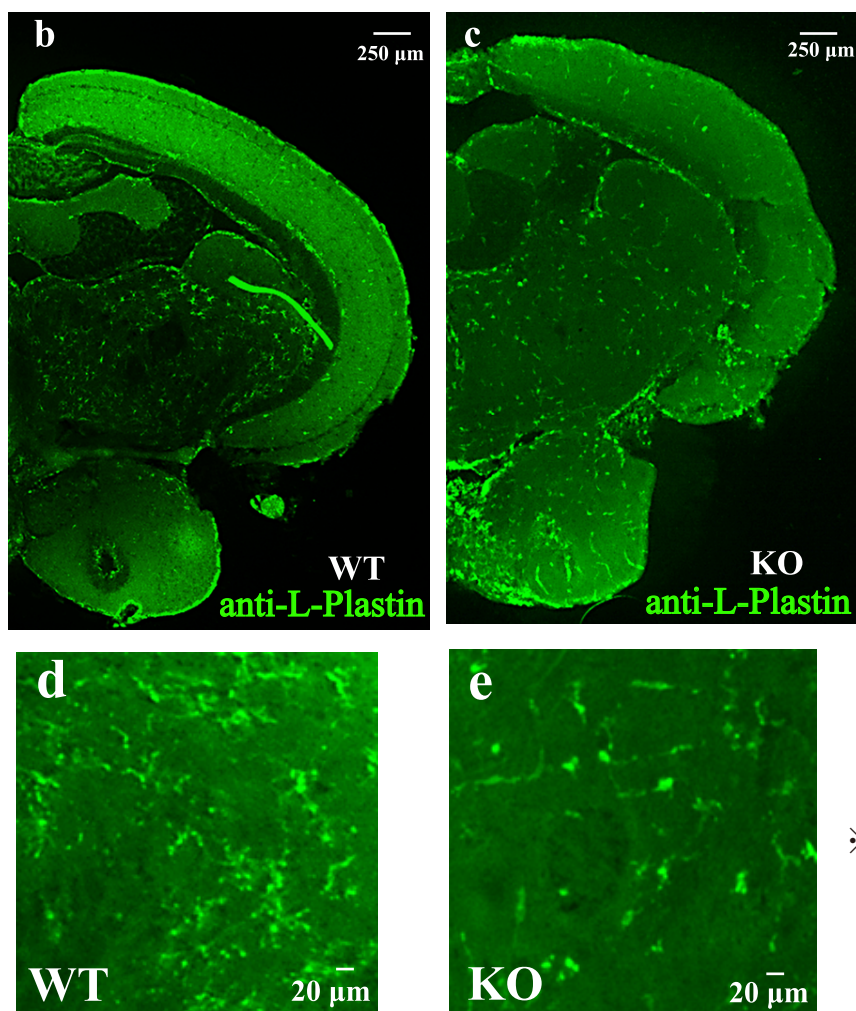


図 2-5 b-e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における L-Plastin タンパク質の免疫組織染色法による局在解析 (中脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、ミクログリアマーカー L-Plastin タンパク質の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

Telencephalon

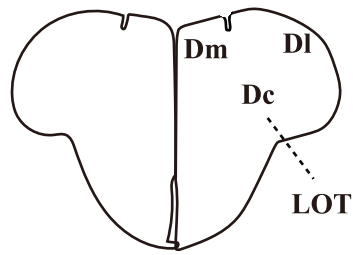


図 2-5 f WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における終脳部位

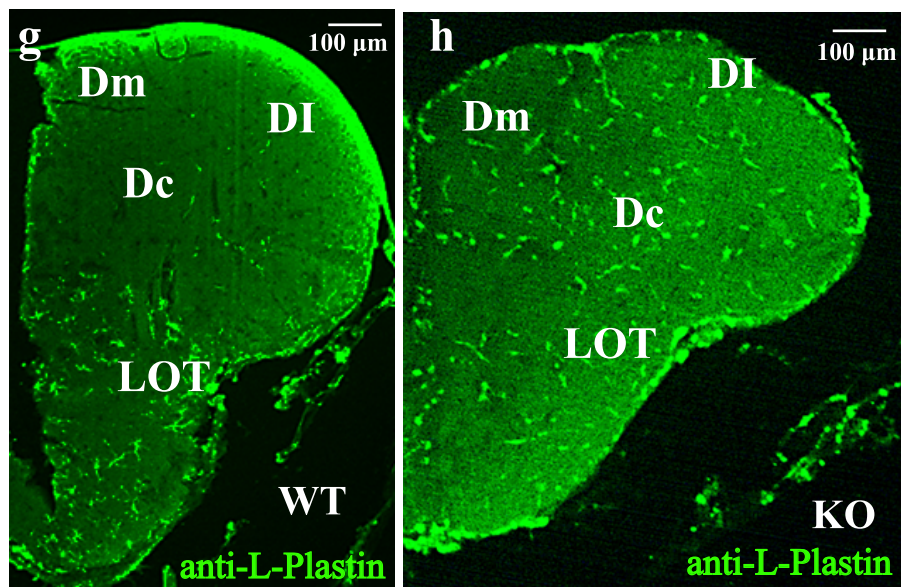


図 2-5 g, h WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における L-Plastin タンパク質の免疫組織染色法による局在解析 (終脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した終脳凍結切片を用いて、ミクログリアマーカー L-Plastin タンパク質の脳内局在を免疫組織染色法により解析した。

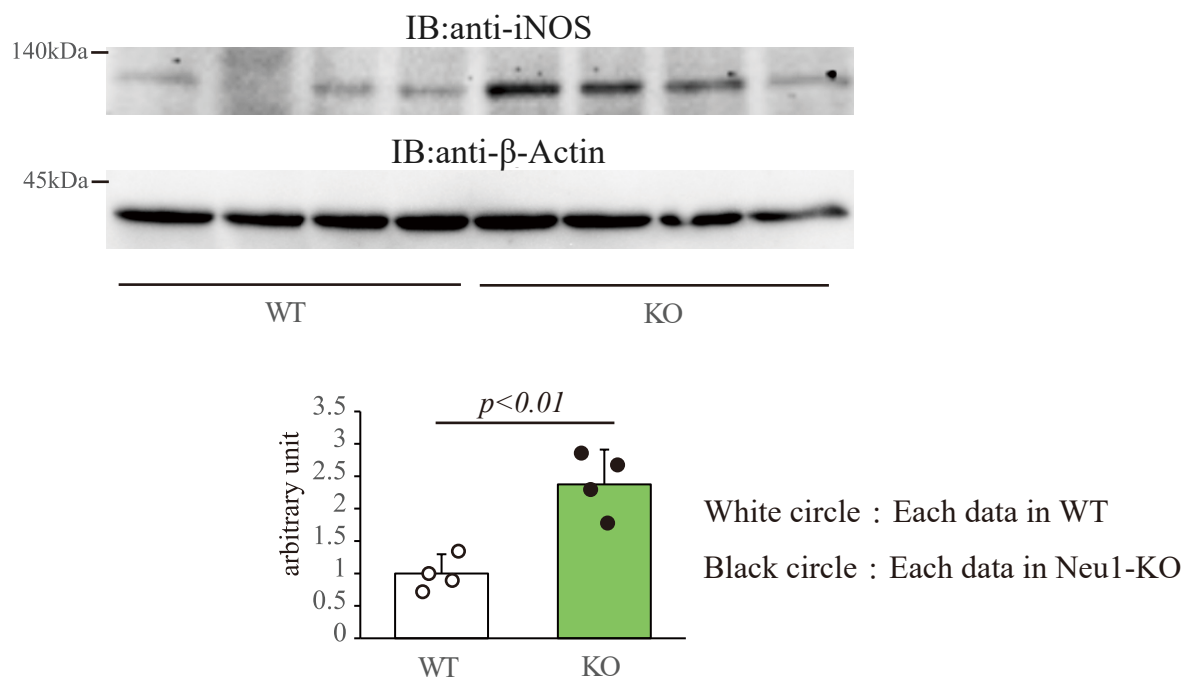


図 2-5 i ウェスタンブロットによる WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュの iNOS タンパク質の定量解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、ホモジネートを作製後、ウェスタンブロットにより脳内の iNOS タンパク質を定量解析した。

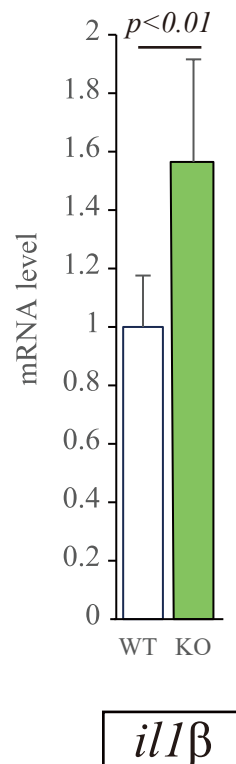


図 2-5 j WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の炎症性サイトカイン
遺伝子発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*il1b* 遺伝子
発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した
(n=12)。

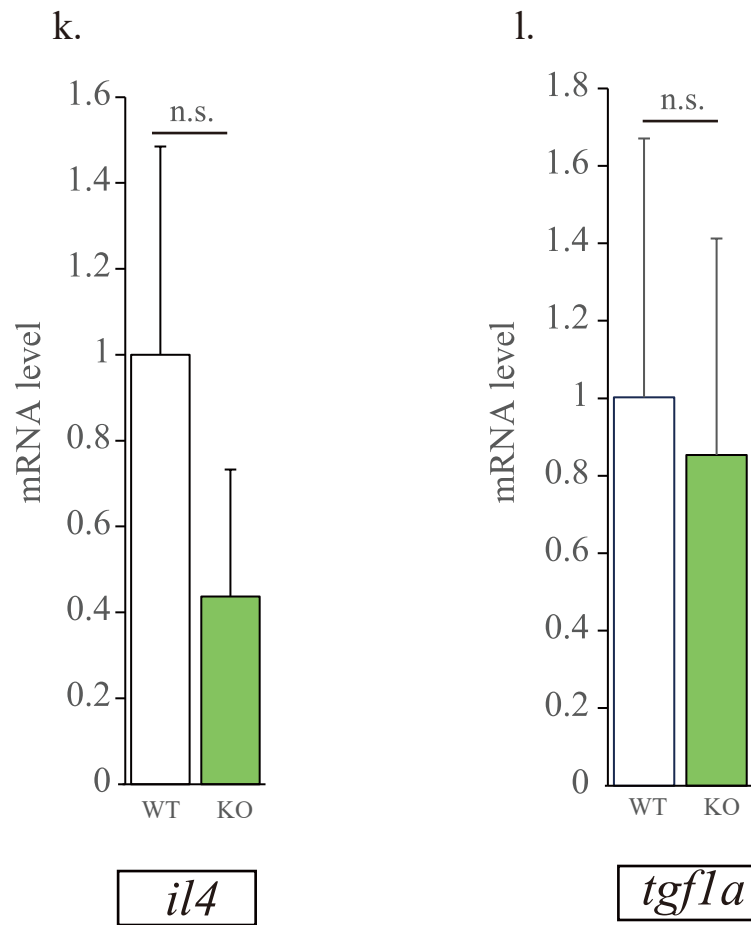


図 2-5 k, l WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の保護性サイトカイン遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*il4*、*tgfla* 遺伝子発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した。「n.s.」は統計学的有意差が無いことを示す (n=12)。

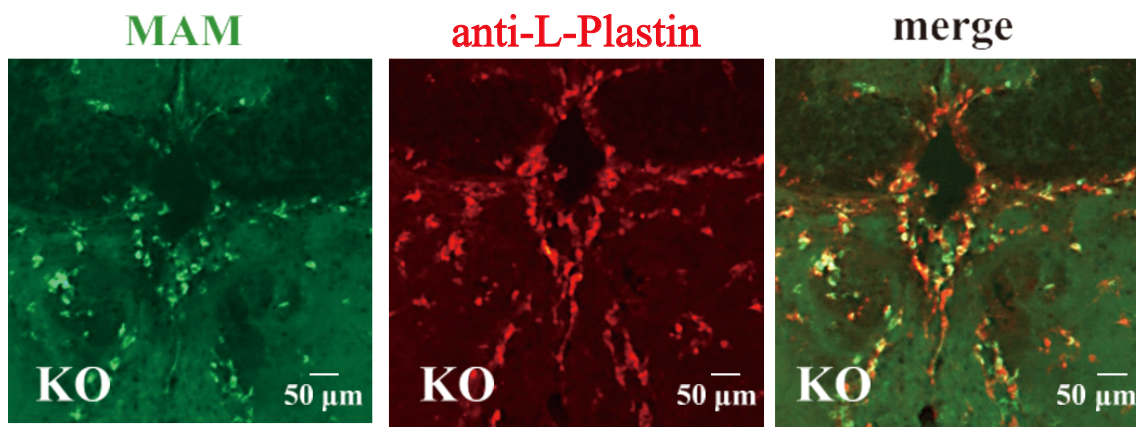


図 2-5 m WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における MAM および L-Plastin タンパク質の免疫組織染色法による局在解析（中脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、MAM および L-Plastin タンパク質を免疫組織染色法により共染色し、脳内での局在を解析した。

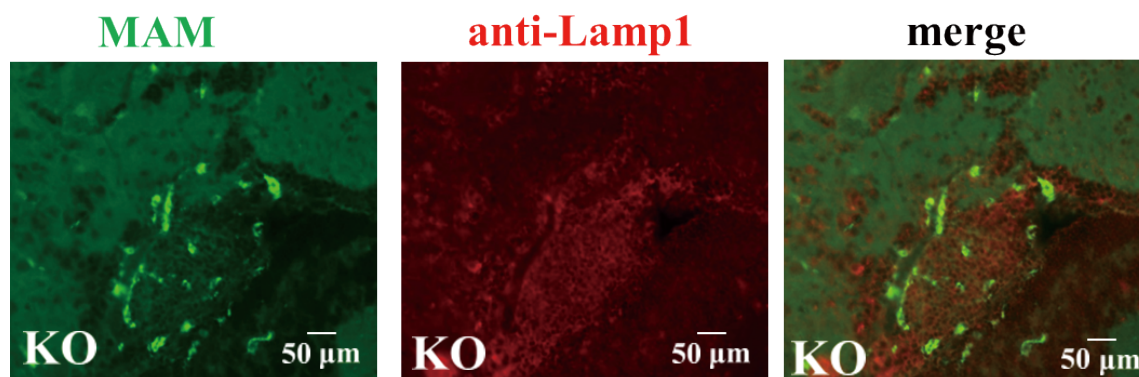


図 2-5 n WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における MAM および Lamp1 タンパク質の免疫組織染色法による局在解析（中脳）

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、MAM および Lamp1 タンパク質を免疫組織染色法により共染色し、脳内での局在を解析した。

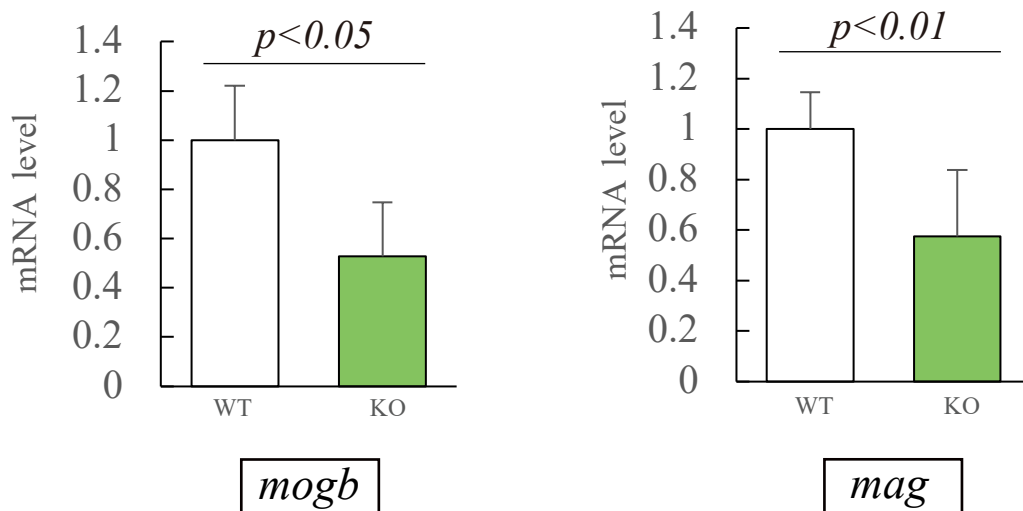


図 2-5 o WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内の *mogb* および *mag* 遺伝子群発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、オリゴデンドロサイトマーカー *mogb*、*mag* 遺伝子の発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=12)。

Midbrain

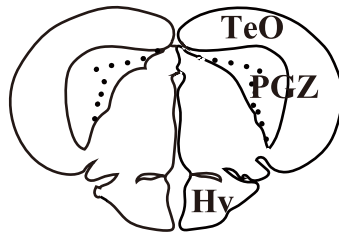


図 2-6 a WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における中脳部位

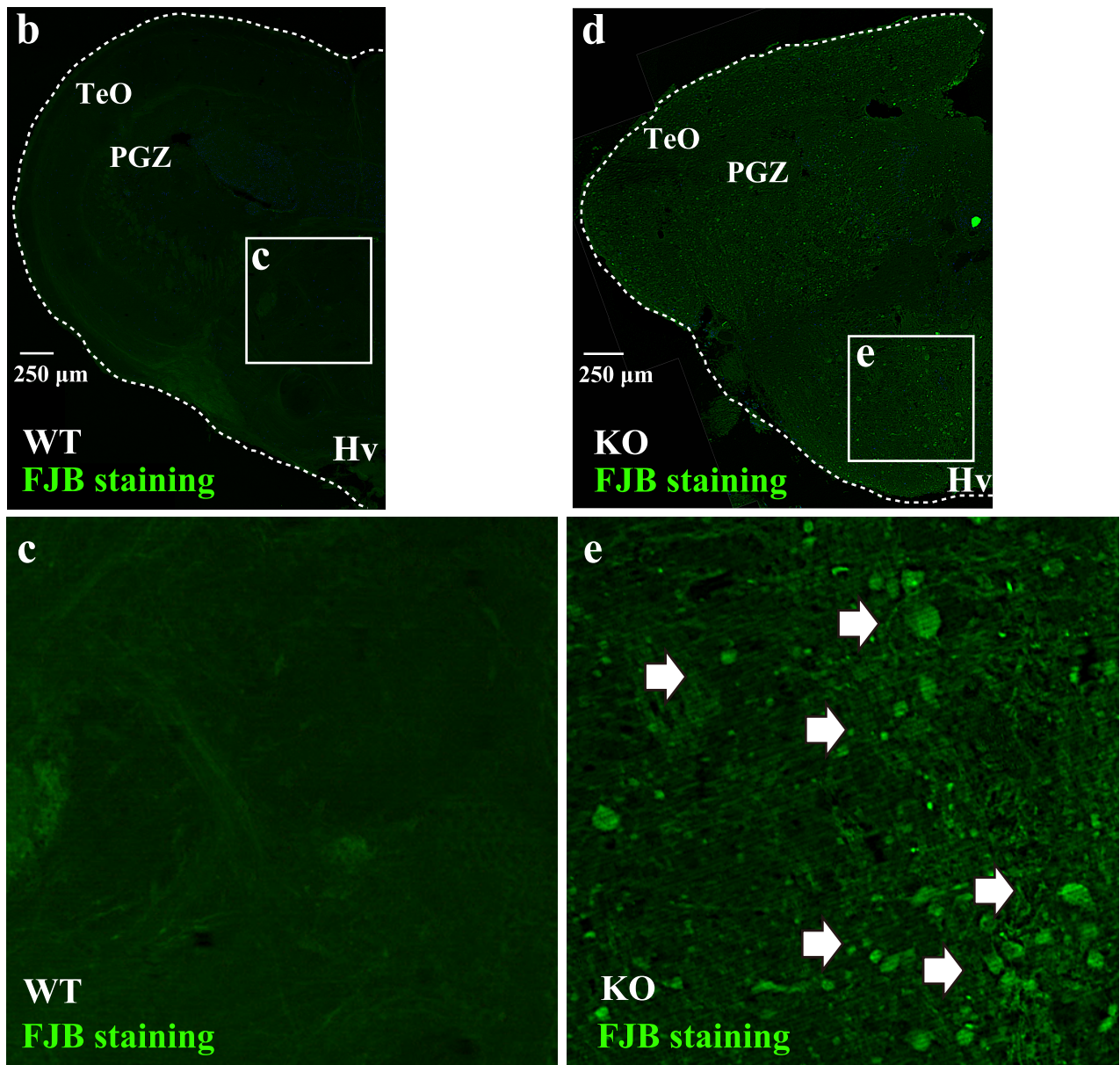


図 2-6 b-e WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における神経細胞変性解析 (中脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した中脳凍結切片を用いて、神経細胞変性マーカー FJB の脳内局在を組織染色法により解析した。

Telencephalon

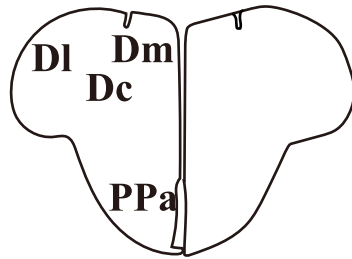


図 2-6 f WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳における終脳部位

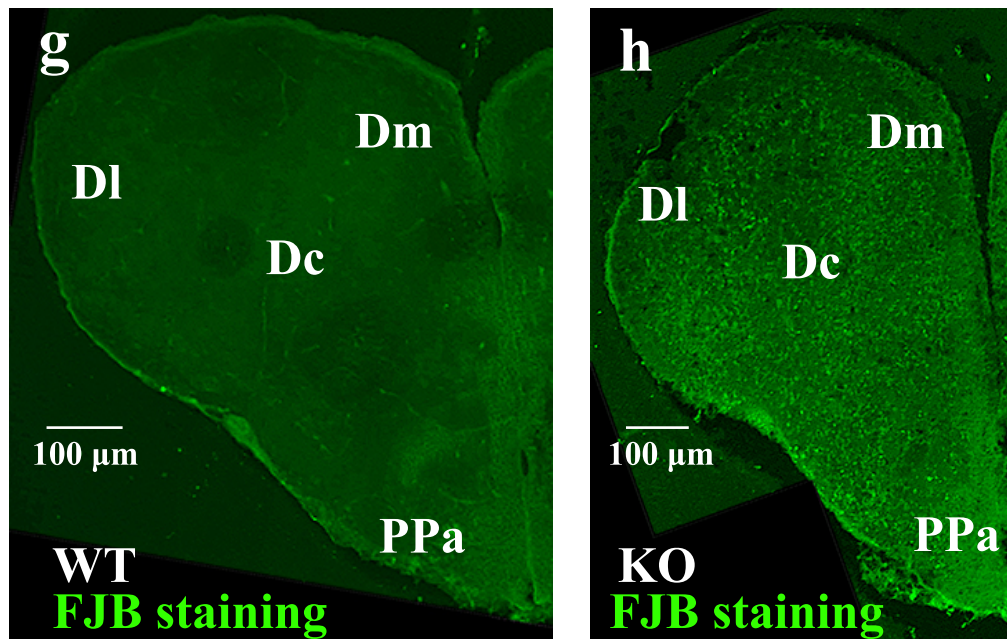


図 2-6 g, h WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内における神経細胞変性解析 (終脳)

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳を摘出し、作製した終脳凍結切片を用いて、神経細胞変性マーカー FJB の脳内局在を組織染色法により解析した。

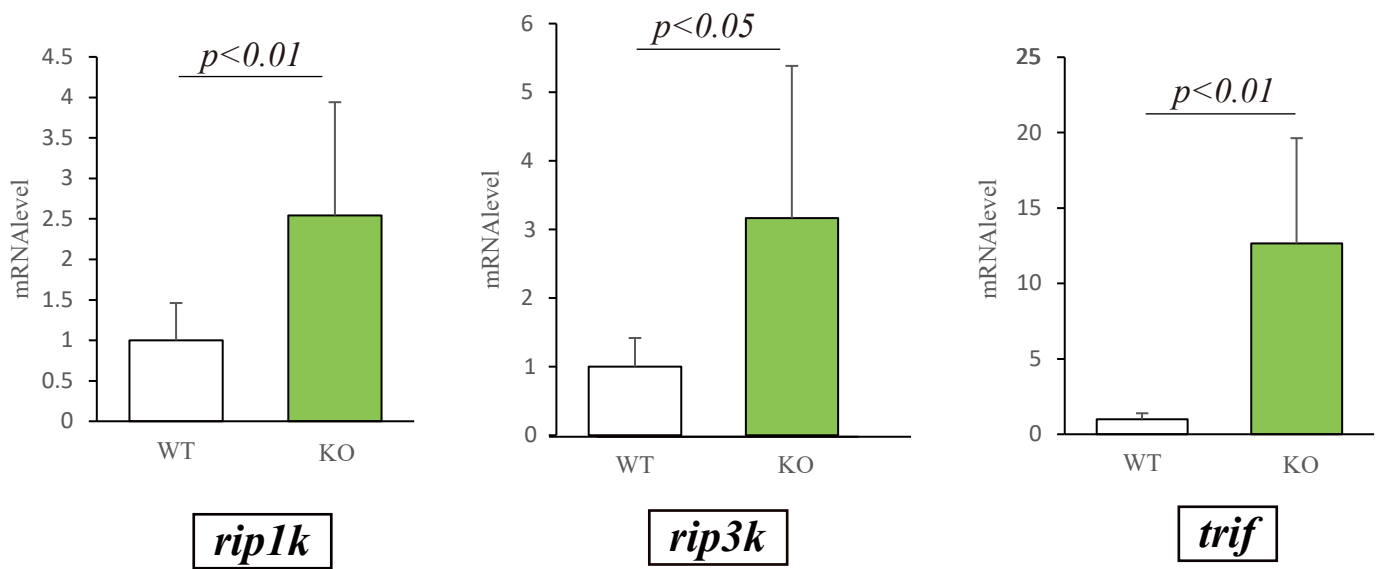


図 2-6 i WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳内のネクロトーシス促進遺伝子群
発現解析

WT および Neu1-KO ゼブラフィッシュ脳から cDNA を調製し、*rip1k*、*rip3k*、*trif* 遺伝子
発現を解析した。測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、t 検定を使用した (n=12)。

表 2 real-time PCR 解析用プライマー

| Gene name | Primers | |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>actb</i> | 5'-CGCCATACAGAGCAGAAGCCA-3' | 5'-AGCACCCCTGTGCTGCTCACT-3' |
| <i>gria1a</i> | 5'-AAGGGAGAGTGTGGCAGCGG-3' | 5'-GTGAACGGGAGGTCCGTGCG-3' |
| <i>gria1b</i> | 5'-TTGTCCACAAATCCCTCCGA-3' | 5'-CGCCATGGGTATGCCAGTAA-3' |
| <i>gria2a</i> | 5'-AACGCGGTAAACCTTGCAGTGCT-3' | 5'-AGAGCCTGAGTCTTGGCAACCT-3' |
| <i>gria2b</i> | 5'-CCAAGGACTCTGGAAGTAAGGAG-3' | 5'-TTCTGCGAGGAAGTGGGATT-3' |
| <i>gria3a</i> | 5'-TGGCCATGACTGTGGCTCTGG-3' | 5'-TGTGCAGTGGATGGAGGGGCT-3' |
| <i>gria3b</i> | 5'-TGGTTGGTGGACTAGGGCTTGC-3' | 5'-TTGGCTGGTGGTGGCTGGCTT-3' |
| <i>gria4a</i> | 5'-ACACGGAACAGCGCAAGCCC-3' | 5'-CAGGTTTACCGGCGTTCCCAGC-3' |
| <i>gria4b</i> | 5'-CGGAGGAGGTGGTGAGAAGGACAA-3' | 5'-CCGCTTCACCCTCAGAGGCAT-3' |
| <i>slc17a7a</i> | 5'-GGCCACGTCCACACTGAATA-3' | 5'-GACCATGATCACACACCCGT-3' |
| <i>th1</i> | 5'-TACATACGGCACGCTTCCTC-3' | 5'-GAACCGCACAGAAAACGGTC-3' |
| <i>dat</i> | 5'-GCAGAACTTGTAGAAGGCGT-3' | 5'-TAGCTTCGCCACCTTCAATC-3' |
| <i>gad1b</i> | 5'-GCTACCAACCACAGGGAGAC-3' | 5'-CACAACGTCGAAACATAGCCG-3' |
| <i>gad2</i> | 5'-AACTTACCGCACCAAAACCT-3' | 5'-CCCACAACGACGCTACAATA-3' |
| <i>tph1a</i> | 5'-CGAGTAAAAGCGACGGGCCA-3' | 5'-TTCTTCGGGAACCACGGCAC-3' |
| <i>tph1b</i> | 5'-CTAAGAGCATAACGGGGCTGG-3' | 5'-ACACCGAGGTGTGTGCTAAG-3' |
| <i>tph2</i> | 5'-CCTTGCATCCTCCATGCTCC-3' | 5'-CCCATCTGGCAATCCACCCA-3' |
| <i>chat</i> | 5'-GTGCATCAATACGCCGCTTT-3' | 5'-ATGGCAGTCCAGAGCAACTC-3' |
| <i>sypb</i> | 5'-CCATCGGCGTCTTCTCCTTCCT-3' | 5'-CATCAGGGTTCGGTGGCTCTCTT-3' |
| <i>holb</i> | 5'-AGGCAGCGGCTCGTTATTCAC-3' | 5'-TCTGGATGCGGTTCGGTCACA-3' |
| <i>eaat1a</i> | 5'-ATGCCAAGATCCCTGACAGC-3' | 5'-GCTCGGACTTCACACATTTGG-3' |
| <i>eaat1b</i> | 5'-GGCCTCATGATACACGGCATA-3' | 5'-ATGGTGGCTCCAACAGGAAG-3' |
| <i>eaat1c</i> | 5'-AGAAGAGCTGCTGCGAAATGTT-3' | 5'-TGATGCCGCCCATCTTTCTC-3' |
| <i>eaat2</i> | 5'-GACACCCGAGCACAGCG-3' | 5'-TTTCGTGCATCCGTACCTCC-3' |
| <i>gfap</i> | 5'-AGATGTGGATGAAGCGGCTC-3' | 5'-AGCGGTCAAGTCTGGCTTAG-3' |
| <i>il4</i> | 5'-GCAGGAATGGCTTTGAAGGGTAAA-3' | 5'-AAACTCCTTCATTGTGCATTCCCC-3' |
| <i>tgfb1a</i> | 5'-AGCAGAATTGCGTCTTCGGA-3' | 5'-TCAAATGAGAGCCAGCGGTT-3' |
| <i>il1b</i> | 5'-GCATGTCCACATATGCGTCG-3' | 5'-GCTGGTTCGTATCCGTTTGG-3' |
| <i>mogb</i> | 5'-ACATCCGCCAACTGGAGAAG-3' | 5'-CATCCAAGTCAGCAGGTGGT-3' |
| <i>mag</i> | 5'-CATCCTAGAGGAAGGCACGG-3' | 5'-GCCCTCCTGAAAACCTCCCTC-3' |

総合考察

情動行動は脊椎動物の生存に必須な本能であるが、その制御メカニズムには未だ不明な点が多く残されている。また、情動の異常は種々の精神疾患の原因や症状として知られており、情動研究は、ヒト精神疾患治療の点からも重要であると考えられる。本研究では、糖鎖分解酵素シアリダーゼ Neu1 に着目し、Neu1 遺伝子を欠損させた Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動行動を解析し、情動行動に与える Neu1 の影響およびそのメカニズムの解明、さらにヒト精神疾患との関連性を明らかにすることを目的とした。その結果、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは、攻撃性、社会性の低下、および不安感受性が低下し情動行動に異常が生じていることが明らかとなった。また、Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内では、ミクログリアの活性化によりアストロサイトが賦活化することで、神経シナプス間のグルタミン酸量の動態変化や神経可塑性低下を引き起こしていることが示唆された。

第二章の結果より、Neu1-KO ゼブラフィッシュではミクログリアでリソソームエキソサイトーシスが亢進し、その活性化により傷害性因子である炎症性サイトカインが産生されていた。これによりネクロプトーシスが亢進し、その結果、神経細胞変性が誘導される可能性が推測された。それに加え、アストロサイトの賦活化やシナプス可塑性の低下により、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸量の動態が変化し、これらが神経細胞機能を低下させている経路も予想された。In vitro ではミクログリアの活性化により Neu1 が産生され、

神経シナプスのグルタミン酸受容体（NMDA 型）糖鎖の脱シアリル化が起こり、神経可塑性を調節することが報告されている⁵⁵。また、神経シナプス可塑性機能の異常は情動異常を伴う精神疾患において多く報告されている⁹⁷。グルタミン酸作動性ニューロンなどの興奮性神経細胞のシナプスにはグルタミン酸受容体があり、イオンチャネル型と代謝型が存在していることが知られている⁸⁴。イオンチャネル型グルタミン酸受容体はリガンド誘導型イオンチャネルであり、中枢神経系の神経伝達を担いシナプス可塑性などへ深く関与する⁹⁷。この受容体の機能障害はグルタミン酸量の動態変化を引き起こし、神経細胞の損傷や神経変性疾患の原因となることが報告されている⁹⁸。このイオンチャネル型グルタミン酸受容体は、AMPA 型、NMDA 型、カイニン酸型があり⁹⁹、本研究では Neu1-KO ゼブラフィッシュの中枢神経系での興奮性神経伝達の大部分を占める AMPA 型遺伝子群の発現が低下し、併せて神経可塑性遺伝子群発現も低下していることが明らかとなった。神経可塑性の低下は HPA 系の機能低下を誘導することから¹⁰⁰、Neu1-KO ゼブラフィッシュでは Neu1 欠損により、グルタミン酸量の動態変化を介してシナプス可塑性が低下することで神経細胞機能が低下し、これに伴い HPA 系機能不全による不安感受性の低下を引き起こしたことが推測された。一方、マウスではシアリダーゼがグルタミン酸の放出を抑制することでシナプス可塑性機能に関与している報告があり¹⁰¹、これは本研究とは逆の結果を示す。この報告ではシアリダーゼの分子種は同定されておらず、Neu1 以外のシアリダーゼもグルタミン酸量の制御に関与している可能性も考えられる。

本研究では、情動行動異常がグリア細胞の中でも特にミクログリアの活性化を起点にし、その後、アストロサイトの活性化や神経細胞変性に至ることを提唱した。一方、Neu1-KO ゼブラフィッシュでグリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトの活性が低下することを遺伝子レベルで示したが、情動行動異常への寄与について十分な根拠を得られていない。オリゴデンドロサイトは情報伝導速度などを司るミエリン鞘の形成に関わっており、統合失調症などに関与することが報告されている¹⁰²。また、ミエリン鞘ではその形成にガングリオシドが関与しており、軸索においてミエリン形成細胞に結合することでミエリン形態維持などの機能を果たしている¹⁰³。本研究では Neu1-KO ゼブラフィッシュで、ガングリオシド (GM1、GM3、Gb4、および LacCer) の蓄積が明らかとなり、この蓄積がオリゴデンドロサイトの遺伝子発現低下を介して情動異常に関与している可能性が推測された。また、オリゴデンドロサイトは炎症性サイトカインの調節不全により機能喪失することが報告されている⁸³。また、多発性硬化症などの病態においては、肥大化したアストロサイトによるミエリン鞘の貪食によってその後の病変形成に影響を及ぼすことが報告されており¹⁰⁴、アストロサイトはオリゴデンドロサイト機能変化に関与していることが示唆されている。このことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいても、オリゴデンドロサイトはミクログリア活性化により産生された炎症性サイトカインや賦活化したアストロサイトの影響を受け、機能障害を生じている可能性が推測された。

また、Neu1-KO ゼブラフィッシュで蓄積していたガングリオシドの中でも、GM1 はアル

ツハイマーに関与しており、脳内では GM1 と結合することで A β が蓄積することが報告されている¹⁰⁵。アルツハイマーモデルマウスにおいては、Neu1 の関与が報告されていることから⁵⁸、Neu1-KO ゼブラフィッシュの Neu1 欠損とガングリオシドの蓄積および情動異常の関係性が予想された。しかしながら、認知や記憶を評価する Y 字迷路試験では Neu1-KO ゼブラフィッシュと WT に差は認められないことが既に明らかとなっている（土井、未発表データ）。このことから、Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動行動異常は、認知や記憶障害を示すアルツハイマー病とは異なる可能性が示唆された。

本研究では、Neu1-KO ゼブラフィッシュのミクログリアにおいて、 α 2-3 結合シアロオリゴ糖の蓄積およびリソソームエキソサイトーシスが亢進していることが明らかとなった。しかし、なぜ Neu1-KO ゼブラフィッシュのリソソーム内で α 2-3 結合シアロオリゴ糖のみが蓄積するのかは明らかになっていない。In vitro において、Neu1 は α 2-3、 α 2-6、および α 2-8 結合シアロオリゴ糖を脱シアリル化することが報告されているが²⁹、本研究では α 2-6 および α 2-8 結合シアロオリゴ糖の蓄積は認められなかった。このことは、Neu1 欠損によって Neu1 以外のシアリダーゼが活性化し α 2-6 および α 2-8 結合シアロオリゴ糖を脱シアリル化していることも推測されたが、Neu1-KO ゼブラフィッシュの Neu3.1、Neu3.2、Neu3.3、Neu3.4、Neu3.5、および Neu4 の遺伝子発現は WT と差がないことが報告されている²⁹。元来、魚類脳内では α 2-6 および α 2-8 結合シアロ複合糖質の量は α 2-3 結合のそれに比べ少ないことも理由の 1 つと考えられる。大変興味深いことに、情動異常を伴う ASD の患者血中

では α 2-3 結合シアロ糖タンパク質が蓄積していることが報告されている¹⁰⁶。このメカニズムについては不明であり、今後さらなる解析が必要であるが、同じ情動異常を示す ASD 患者と Neu1-KO ゼブラフィッシュに共通して α 2-3 シアロ複合糖質の蓄積が見られることから、そのメカニズムには関連性がある可能性が高い。

Neu1 は通常、リソソーム内で不要になった糖鎖の異化分解を担っているが、Lamp1 などの糖タンパク質の一部も基質とする。Neu1 と同じくリソソーム内酵素の一つである Lamp1 はリソソームエキソサイトーシスの制御因子である。ゼブラフィッシュにおいてもマウスと同様に、Neu1 は Lamp1 の脱シアリル化により、リソソームエキソサイトーシスの制御に関与していることが本研究で示された。WT ゼブラフィッシュでは、ストレス負荷による Neu1 遺伝子発現の上昇と Lamp1 遺伝子の発現低下が同時に起こっていることから、情動行動の変化とリソソームエキソサイトーシスとの関連が強く示唆された。リソソームエキソサイトーシスの亢進は、細胞内分泌物を細胞外へ排出する役割を果たしており、同時にリソソーム内の様々な酵素も分泌されている。例えば、カテプシン B はリソソーム酵素の一つであるが、その至適 pH は中性に近く、リソソームエキソサイトーシスによりカテプシン B が細胞外へ排出されると、中性環境である細胞外においてその活性が上昇することが報告されている⁵⁷。活性化したカテプシン B はマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9) の活性上昇を介して細胞外マトリックス (ECM) をリモデリングし、ECM の変性は精神疾患の原因となることが報告されている⁵⁷。このことから、Neu1-KO ゼブラフ

イッシュの情動異常のメカニズムにはリソソームエキソサイトーシスを介した ECM のリモデリングが関与している可能性も推測された。

Neu1-KO ゼブラフィッシュでは情動行動異常に伴いその脳内性状が変化していたが、これらの変化はヒト疾病と類似している点も多い。Neu1-KO ゼブラフィッシュの脳内では、ミクログリアが活性化したが、これはうつ病や統合失調症など多くの精神疾患で確認されている性状である¹⁰⁷。また、アストロサイトは、気分障害でその活性が低下することが報告されているが、これは、慢性ストレス状態におけるアストロサイトの密度低下によるものであり⁷⁹、本研究において、Neu1-KO ゼブラフィッシュでのアストロサイト活性化により不安が低下していることと逆の現象であった。特に本研究では Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経細胞やグリア細胞の性状は、自閉症スペクトラム (ASD)、学習障害 (LD)、および注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの発達障害と類似していることが明らかとなった¹⁰⁸。加えて、ASD 患者の血中における α 2-3 結合シアロ複合糖質の増加が報告されている¹⁰⁶。ASD 患者の特徴として、社会的行動やコミュニケーションを阻害する行動特性、反復行動、特定のものへの執着、外部刺激に対する過敏性や無感覚などが挙げられる¹⁰⁹。ASD 患者ではアストロサイトの細胞密度の増加¹¹⁰、活性化したミクログリアの細胞密度増加¹¹¹、および興奮性シナプス伝達の減少が報告されている¹¹²。しかし、これらの発達障害を引き起こす要因やメカニズムはまだ解明されていない。ASD モデル動物ではミクログリア活性化と炎症性サイトカインの発現量が増加していることが報告されている¹¹³。また、マウスでは

アストロサイトは Ca^{2+} シグナル異常を介して行動を変化させることが報告されている¹¹⁴。

加えて、グルタミン酸量の動態異常による神経伝達の低下と ASD との関連性が報告されている¹¹⁵。本研究で明らかとなった Neu1-KO ゼブラフィッシュの社会性、不安の低下、および過剰な興味関心行動は、これら ASD の特徴と類似していた。他の知見と合わせると、Neu1-KO ゼブラフィッシュは種々の精神疾患の中でも特に ASD 様の情動異常や脳内性状に最も近いことが明らかとなった。これまで臨床における Neu1 と ASD の関係性は知られていなかったが、最近、Zang ら(2022)は、ASD 患者の抹消血中の Neu1 遺伝子発現量と ASD の情動異常に正の相関があり、Neu1 遺伝子発現の ASD の指標としての可能性について報告している¹¹⁶。一方、先にも述べたとおり ASD 患者の血中に α 2-3 結合シアロ糖タンパク質が蓄積していることが報告されている¹⁰⁶。これらの ASD 患者の報告は、一見すると相反する結果のように考えられる。末梢血で MAM レクチンのシグナルが実際に増加していることから、Neu1 の遺伝子発現亢進は生体内の状態を一定に保つホメオスタシスによるものと推測される。しかし、脳内と末梢血における Neu1 の発現変動の関係性は全く分かっておらず、さらなる検討が必要である。

ヒトで NEU1 が欠損するとシアリドーシスを発症し、その症状として視力低下、ミオクローヌス発作、低 IQ、神経運動発達遅延、粗な顔貌、難聴、肝脾腫などが挙げられる¹⁴。

これまで、シアリドーシスでは情動異常が報告されておらず、Neu1-KO マウスにおいても、体重減少、シアロオリゴ糖の蓄積、および尿中への排出などシアリドーシスと類似した症

状が認められる一方で、情動行動異常は報告されていない^{27,28}。興味深いことに、本研究において Neu1-KO ゼブラフィッシュの情動異常が観察され、これまでヒトやマウスで報告されなかった Neu1 欠損による表現型を示すことが明らかになった。Neu1 は、ヒトから魚類まで遺伝子およびその酵素学的性状も保存されている一方で²⁹、これまでヒトや Neu1-KO マウスで情動行動異常が報告されていない理由として、シアリドーシスは希少疾患であるため症例数が少なく、その症状の 1 つに低 IQ が認められることから¹⁴、高度な本能活動である情動行動の評価が行われてこなかったためと考えられる。ヒトのシアリドーシスの診断において、眼底のチェリー・レッド斑、骨格変形、および尿中のオリゴ糖増加などが指標として用いられ¹⁴、シアリダーゼ活性測定や遺伝子検査により確定となるが、その一方で情動評価の項目はない。また、これまで Neu1-NO マウスにおいても情動行動を評価した報告はなく、ヒトやマウスの Neu1 欠損症において情動異常を示さないと断定することは難しい。また情動の評価は、適正な評価・判断手法や行動解析法を用いて行われる。例えば、発達障害の一つである ASD は情動異常を伴う疾患であり、その評価方法として ADOS-2（自閉症診断観察スケジュール第 2 版）が設けられている¹¹⁶。このようにヒト精神疾患においては、詳細な情動行動を評価することで情動異常有無の判断に至る。Neu1-KO ゼブラフィッシュにおいても通常の飼育環境下での観察のみから情動異常を見出すことは不可能であり、行動試験による評価手法を用いることで情動異常が明らかとなった。このことから、今後は適切な情動行動評価手法を用いてシアリドーシスおよび Neu1-NO マ

ウスの情動行動異常の評価をすることで新たな症例の発見に繋がり、今後のシアリドーシス治療法や創薬研究の一助となる可能性も期待される。

しかしながら、Neu1-KO ゼブラフィッシュをヒト疾病モデルとして利用するにあたり、以下の点について今後明らかにする必要がある。i) Neu1 シアリダーゼは脊椎動物に保存されていることから、Neu1-KO ゼブラフィッシュで観察された表現型は、ヒトでも起こりうる可能性が高い。しかしながら、魚類と哺乳類の脳機能の差がどの程度影響を与えているのかを考慮する必要がある。例えば、不安関連ペプチドホルモンは脊椎動物で高度に保存されているが、その発現パターンやパラログ遺伝子の数は魚類と哺乳類で一致してしない。ii) 魚類におけるシアロ糖鎖とその関連酵素の分布と構造は、ヒトとは一部異なる部分がある⁹。またヒトは4つのシアリダーゼ (Neu1、Neu2、Neu3、および Neu4) を持っているが、ゼブラフィッシュは7つのシアリダーゼ (Neu1、Neu3.1、Neu3.2、Neu3.3、Neu3.4、Neu3.5、および Neu4) を持っている。哺乳類ではいくつかのシアリダーゼが連動して機能することが知られており⁶²、これら動物種による違いを明らかにするためにも、Neu1-KO ゼブラフィッシュにおける異常行動のメカニズムをさらに詳細に解明する必要がある。

本研究では、糖鎖分解酵素シアリダーゼ Neu1 がミクログリアの活性変化を介して、脊椎動物の情動行動を制御することを明らかにした。Neu1 シアリダーゼは脊椎動物で高く保存されているタンパク質であり、その Neu1 が単なるリソソームでの異化分解の役割のみに留まらず、生物の生存に重要な情動に関与していることは非常に興味深い。最近、オー

トファジーと精神疾患の関係が注目されているが、本研究の結果は、単なるオートファゴソーム / オートリソソームの機能変化ということではなく、リソソームに含まれる個々のタンパク質がそれぞれ精神疾患の症状に影響を与えている可能性を示している。リソソーム病における精神疾患の報告はあるものの、その作用機作については不明な点が多く、また Neu1 に関しても臨床的な知見は ASD のみに限られている。本研究の成果が、今後の精神疾患研究の一助をなることを祈ってやまない。Neu1-KO ゼブラフィッシュの神経疾患モデルとしての可能性についてさらなる検討を重ねるべく、Neu1 のより詳細なメカニズム解明に取り組む所存である。

謝辞

社会人学生としての博士課程進学や本研究の遂行にあたり貴重なご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学水産学部の塩崎一弘准教授に心から感謝の意を表しますと共に厚く御礼申し上げます。

実験遂行のご協力ならびに貴重なご助言をいただきました鹿児島大学水産学部小松正治教授、小谷知也教授、鹿児島大学農学部吉崎由美子准教授、藤田清貴准教授、鹿児島大学理学部池永隆徳准教授、東京大学大学院理学系研究科神田真司准教授、水産学部技術職員二神裕子さん、久保友理奈さんに厚く御礼申し上げます。

最後に本研究を行う上でご協力頂いた塩崎研究室の皆様、児玉正二さん、博士課程進学にあたり応援してくださった鹿児島大学学生部学生生活課の皆様、研究生生活をサポートしてくれた家族に深く感謝します。

参考文献

1. Tringali, C. *et al.* Modification of sialidase levels and sialoglycoconjugate pattern during erythroid and erytroleukemic cell differentiation. *Glycoconj. J.* **24**, 67–79 (2006).
2. Ryuzono, S. *et al.* Suppression of Neu1 sialidase delays the absorption of yolk sac in medaka (*Oryzias latipes*) accompanied with the accumulation of α 2-3 sialo-glycoproteins. *Biochimie* **135**, 63–71 (2017).
3. Creek, K. E. *et al.* Sialoglycoconjugate changes during 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **793**, 133–140 (1984).
4. Takahashi, Y., Yajima, A., Cisar, J. O. & Konishi, K. Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. *Infect. Immun.* **72**, 3876–3882 (2004).
5. Sato, C. Releasing mechanism of neurotrophic factors via polysialic acid. **104**, 89–112 (2017)
6. Kim, H. J. *et al.* Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol. Psychiatry* **22**, 1576–1584 (2017).
7. Settembre, C. *et al.* A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 119–129 (2008).

8. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K. & Hata, K. Sialidase and malignancy: a minireview. *Glycoconj. J.* **20**, 189–198 (2003).
9. Shiozaki, K., Oishi, K. & Honda, A. Functional characterization of fish sialidases and their diversity among different orders. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **31**, E7–E13 (2019).
10. 高橋 忠伸. インフルエンザウイルスが結合する糖鎖分子の機能解明. ウイルス **66**, 101–116 (2016).
11. 佐藤 ちひろ *et al.* ポリシアル酸の新機能と神経形成維持機構. 生化学 **83**, 189–196 (2011).
12. Uemura, T. *et al.* Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin β 4. *Oncogene* **28**, 1218–1229 (2009).
13. Seyrantepe, V. *et al.* Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis. *Hum. Mutat.* **22**, 343–352 (2003).
14. Khan, A. & Sergi, C. Sialidosis: a review of morphology and molecular biology of a rare pediatric disorder. *Diagnostics* **8**, 29 (2018).
15. Wang, D., Bonten, E. J., Yogalingam, G., Mann, L. & d’Azzo, A. Short-term, high dose enzyme replacement therapy in sialidosis mice. *Mol. Genet. Metab.* **85**, 181–189 (2005).
16. Arora, V. *et al.* Sialidosis type II: expansion of phenotypic spectrum and identification of a common mutation in seven patients. *Mol. Genet. Metab. Rep.* **22**, 100561 (2020).
17. Platt, F. M., d’Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F. & Tiffit, C. J. Lysosomal storage diseases.

- Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 27 (2018).
18. Ferreira, C. R. & Gahl, W. A. Lysosomal storage diseases. *Transl. Sci. Rare Dis.* **2**, 1–71 (2017).
 19. Sigmundsdottir, L. *et al.* Cognitive and psychological functioning in Fabry disease. *Arch. Clin. Neuropsychol.* **29**, 642–650 (2014).
 20. Sun, A. Lysosomal storage disease overview. *Ann. Transl. Med.* **6**, 476 (2018).
 21. Staretz-Chacham, O., Choi, J. H., Wakabayashi, K., Lopez, G. & Sidransky, E. Psychiatric and behavioral manifestations of lysosomal storage disorders. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **153**, 1253–1265 (2010).
 22. Caciotti, A. *et al.* Type I sialidosis, a normosomatic lysosomal disease, in the differential diagnosis of late-onset ataxia and myoclonus: an overview. *Mol. Genet. Metab.* **129**, 47–58 (2020).
 23. Caciotti, A. *et al.* Type II sialidosis: review of the clinical spectrum and identification of a new splicing defect with chitotriosidase assessment in two patients. *J. Neurol.* **256**, 1911–1915 (2009).
 24. Spranger, J. & Cantz, M. Mucopolipidosis I, the cherry red-spot myoclonus syndrome and neuraminidase deficiency. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **14**, 105–112 (1978).
 25. Paschke, E. *et al.* Infantile type of sialic acid storage disease with sialuria. *Clin. Genet.* **29**, 417–424 (1986).
 26. Mitsiakos, G., Gialamprinou, D., Chouchou, P., Chatziioannidis, I. & Karagianni, P.

- Identification of a homozygous deletion of the *NEU1* gene in a patient with type II sialidosis presenting isolated fetal ascites and central nervous system hypoplasia. *Hippokratia* **23**, 169–171 (2019).
27. Rottier, R. J., Bonten, E. & d’Azzo, A. A point mutation in the *neu-1* locus causes the neuraminidase defect in the SM/J mouse. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 313–321 (1998).
28. de Geest, N. *et al.* Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal disorders sialidosis and galactosialidosis in mice. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1455–1464 (2002).
29. Okada, K. *et al.* Establishment and characterization of Neu1-knockout zebrafish and its abnormal clinical phenotypes. *Biochem. J.* **477**, 2841–2857 (2020).
30. Ryuzono, S. *et al.* Lysosomal localization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Neu1 sialidase and its highly conserved enzymatic profiles with human. *Gene* **575**, 513–23 (2016).
31. Honda, A. *et al.* Novel Nile tilapia Neu1 sialidases: molecular cloning and biochemical characterization of the sialidases Neu1a and Neu1b. *Gene* **742**, 144538 (2020).
32. Shiozaki, K. *et al.* Identification of novel fish sialidase genes responsible for KDN-cleaving activity. *Glycoconj. J.* **37**, 745–753 (2020).
33. Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A. R. & Wilson, S. W. Development of social behavior in young zebrafish. *Front. Neural Circuits* **9**, 39 (2015).
34. Shiozaki, K. *et al.* Neuropeptide Y deficiency induces anxiety-like behaviours in zebrafish (*Danio*

- erio*). *Sci. Rep.* **10**, 5913 (2020).
35. Patton, E. E., Zon, L. I. & Langenau, D. M. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 611–628 (2021).
 36. Calvi, A. *et al.* Antidepressant drugs effects on blood pressure. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 704281 (2021).
 37. Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R. & Hildebrandt, H. Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* **94**, 461–518 (2014).
 38. Buske, C. & Gerlai, R. Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* **33**, 698–707 (2011).
 39. Colman, J. R., Baldwin, D., Johnson, L. L. & Scholz, N. L. Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **91**, 346–354 (2009).
 40. Ribeiro, D. *et al.* Oxytocin receptor signalling modulates novelty recognition but not social preference in zebrafish. *J. Neuroendocrinol.* **32**, e12834 (2020).
 41. Laryea, G., Schütz, G. & Muglia, L. J. Disrupting hypothalamic glucocorticoid receptors causes HPA axis hyperactivity and excess adiposity. *Mol. Endocrinol.* **27**, 1655–1665 (2013).
 42. Winkler, Z. *et al.* Hypoglycemia-activated hypothalamic microglia impairs glucose

- counterregulatory responses. *Sci. Rep.* **9**, 6224 (2019).
43. Chen, Y. C., Priyadarshini, M. & Panula, P. Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem. Cell Biol.* **132**, 375–381 (2009).
44. Zimmermann, F. F., Gaspary, K. V., Siebel, A. M. & Bonan, C. D. Oxytocin reversed MK-801-induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. *Behav. Brain Res.* **311**, 368–374 (2016).
45. Larson, E. T., O'Malley, D. M. & Melloni, R. H. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* **167**, 94–102 (2006).
46. Yogalingam, G. *et al.* Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev. Cell* **15**, 74–86 (2008).
47. Sumida, M. *et al.* Rapid trimming of cell surface polysialic acid (PolySia) by exovesicular sialidase triggers release of preexisting surface neurotrophin. *J. Biol. Chem.* **290**, 13202–13214 (2015).
48. Sajo, M. *et al.* Neuraminidase-dependent degradation of polysialic acid is required for the lamination of newly generated neurons. *PLoS One* **11**, e0146398 (2016).
49. Bonten, E. J., Annunziata, I. & d'Azzo, A. Lysosomal multienzyme complex: pros and cons of working together. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2017–2032 (2014).
50. Annunziata, I. *et al.* MYC competes with MiT/TFE in regulating lysosomal biogenesis and

- autophagy through an epigenetic rheostat. *Nat. Commun.* **10**, 3623 (2019).
51. Magini, A. *et al.* TFEB activation promotes the recruitment of lysosomal glycohydrolases β -hexosaminidase and β -galactosidase to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 251–257 (2013).
52. Quadros, V. A. *et al.* Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav. Processes* **122**, 1–11 (2016).
53. Stewart, W. J., Cardenas, G. S. & McHenry, M. J. Zebrafish larvae evade predators by sensing water flow. *J. Exp. Biol.* **216**, 388–398 (2013).
54. Burton, B. K. & Giugliani, R. Diagnosing hunter syndrome in pediatric practice: practical considerations and common pitfalls. *Eur. J. Pediatr.* **171**, 631–639 (2012).
55. Minami, A. *et al.* Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus. *J. Biol. Chem.* **292**, 5645–5654 (2017).
56. Du, W., Chen, X., Shi, M., Bian, F. & Zhao, Z. Ethanol affects behavior and HPA axis activity during development in zebrafish larvae. *Sci. Rep.* **10**, 21402 (2020).
57. Padamsey, Z. *et al.* Activity-dependent exocytosis of lysosomes regulates the structural plasticity of dendritic spines. *Neuron* **93**, 132–146 (2017).
58. Annunziata, I. *et al.* Lysosomal NEU1 deficiency affects amyloid precursor protein levels and

- amyloid- β secretion via deregulated lysosomal exocytosis. *Nat. Commun.* **4**, 2734 (2013).
59. Cebecauer, M., Hof, M. & Amaro, M. Impact of GM1 on membrane-mediated aggregation/oligomerization of β -amyloid: unifying view. *Biophys. J.* **113**, 1194–1199 (2017).
60. Lai, Y. H. *et al.* Duplicated *dnmt3aa* and *dnmt3ab* DNA methyltransferase genes play essential and non-overlapped functions on modulating behavioral control in zebrafish. *Genes (Basel)*. **11**, 1322 (2020).
61. Walkley, S. U. Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 433–444 (2004).
62. Pan, X. *et al.* Neuraminidases 3 and 4 regulate neuronal function by catabolizing brain gangliosides. *FASEB J.* **31**, 3467–3483 (2017).
63. Ulrich-Bott, B., Klem, B., Kaiser, R., Spanger, J. & Cantz, M. Lysosomal sialidase deficiency: increased ganglioside content in autopsy tissues of a sialidosis patient. *Enzyme* **38**, 262–266 (1987).
64. Timur, Z. K., Akyildiz Demir, S., Marsching, C., Sandhoff, R. & Seyrantepe, V. Neuraminidase-1 contributes significantly to the degradation of neuronal B-series gangliosides but not to the bypass of the catabolic block in Tay-Sachs mouse models. *Mol. Genet. Metab. Rep.* **4**, 72–82 (2015).
65. Viljetić, B., Labak, I., Majić, S., Štambuk, A. & Heffer, M. Distribution of mono-, di- and trisialo gangliosides in the brain of Actinopterygian fishes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**,

- 1437–1443 (2012).
66. Rosa, S. G., Quines, C. B., Stangherlin, E. C. & Nogueira, C. W. Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters. *Physiol. Behav.* **155**, 1–8 (2016).
67. Pollack, M. H., Jensen, J. E., Simon, N. M., Kaufman, R. E. & Renshaw, P. F. High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: response to treatment with levetiracetam. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **32**, 739–743 (2008).
68. Gerhard, D. M., Wohleb, E. S. & Duman, R. S. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov. Today* **21**, 454–464 (2016).
69. Tang, Y. & Le, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **53**, 1181–1194 (2016).
70. Kyrkanides, S., Olschowka, J. A., Williams, J. P., Hansen, J. T. & O'Banion, M. K. TNF α and IL-1 β mediate intercellular adhesion molecule-1 induction via microglia–astrocyte interaction in CNS radiation injury. *J. Neuroimmunol.* **95**, 95–106 (1999).
71. Kwon, H. S. & Koh, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl. Neurodegener.* **9**, 42 (2020).
72. Simons, M. & Nave, K. A. Oligodendrocytes: myelination and axonal support. *Cold Spring Harb.*

- Perspect. Biol.* **8**, a020479 (2016).
73. Sild, M., Ruthazer, E. S. & Booij, L. Major depressive disorder and anxiety disorders from the glial perspective: etiological mechanisms, intervention and monitoring. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **83**, 474–488 (2017).
74. Brandão, M. L., Troncoso, A. C., de Souza Silva, M. A. & Huston, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur. J. Pharmacol.* **463**, 225–233 (2003).
75. Tsubokawa, T. *et al.* Pharmacological effects on mirror approaching behavior and neurochemical aspects of the telencephalon in the fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Soc. Neurosci.* **4**, 276–286 (2009).
76. Oheda, Y. *et al.* Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement. *Glycobiology* **16**, 271–280 (2006).
77. Daniels, R. W. *et al.* A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* **49**, 11–16 (2006).
78. Song, I. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **25**, 578–588 (2002).
79. Ménard, C., Hodes, G. E. & Russo, S. J. Pathogenesis of depression: Insights from human and

- rodent studies. *Neuroscience* **321**, 138–162 (2016).
80. Gao, L. *et al.* CRISPR/Cas9-induced *nos2b* mutant zebrafish display behavioral abnormalities. *Genes, Brain Behav.* **20**, e12716 (2021).
81. Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E. & Godbout, J. P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* **64**, 300–316 (2016).
82. Li, D. *et al.* Regulation and role of ERK phosphorylation in glial cells following a nigrostriatal pathway injury. *Brain Res.* **1648**, 90–100 (2016).
83. Kirby, L. *et al.* Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nat. Commun.* **10**, 3887 (2019).
84. Das C, Lucia MS, H. K. and T. J. *et al.* RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
85. Arrázola, M. S. *et al.* Axonal degeneration is mediated by necroptosis activation. *J. Neurosci.* **39**, 3832–3844 (2019).
86. Cheng, X. *et al.* Characterization of LAMP1-labeled nondegradative lysosomal and endocytic compartments in neurons. *J. Cell Biol.* **217**, 3127–3139 (2018).
87. Arantes, R. M. E. & Andrews, N. W. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **26**, 4630–4637

- (2006).
88. Kreher, C., Favret, J., Maulik, M. & Shin, D. Lysosomal functions in glia associated with neurodegeneration. *Biomolecules* **11**, 400 (2021).
 89. Kawashima, N., Tsuji, D., Okuda, T., Itoh, K. & Nakayama, K. Mechanism of abnormal growth in astrocytes derived from a mouse model of GM2 gangliosidosis. *J. Neurochem.* **111**, 1031–1041 (2009).
 90. O’Donovan, S. M., Sullivan, C. R. & McCullumsmith, R. E. The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *NPJ Schizophr.* **3**, e0149034 (2017).
 91. Frischknecht, R. *et al.* Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **12**, 897–904 (2009).
 92. Nordman, J. C. Anger management: mechanisms of glutamate receptor-mediated synaptic plasticity underlying animal aggression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **142**, 106120 (2022).
 93. Savotchenko, A. *et al.* Neuraminidase inhibition primes short-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in the rat hippocampus. *Neural Plast.* **2015**, 908190 (2015).
 94. Odaka, H. *et al.* An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca²⁺ dynamics. *Neurobiol. Dis.* **152**, 105279 (2021).

95. Licznarski, P. & Duman, R. S. Remodeling of axo-spinous synapses in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience* **251**, 33–50 (2013).
96. Oakley, R. H. *et al.* Combinatorial actions of glucocorticoid and mineralocorticoid stress hormone receptors are required for preventing neurodegeneration of the mouse hippocampus. *Neurobiol. Stress* **15**, 100369 (2021).
97. Price, R. B., Duman, R. & Haven, N. Depression : an integrative model. *Mol. Psychiatry* **25**, 530–543 (2020).
98. Iovino, L., Tremblay, M. E. & Civiero, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson’s disease: the role of glial cells. *J. Pharmacol. Sci.* **144**, 151–164 (2020).
99. Zhu, S. & Gouaux, E. Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **112**, 11–15 (2017).
100. Kim, E. J., Pellman, B. & Kim, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn. Mem.* **22**, 411–416 (2015).
101. Minami, A. *et al.* Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase. *J. Biochem.* **163**, 273–280 (2018).
102. Gouvêa-Junqueira, D. *et al.* Novel treatment strategies targeting myelin and oligodendrocyte dysfunction in Schizophrenia. *Front. Psychiatry* **11**, 379 (2020).
103. Schnaar, R. L. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett.* **584**,

- 1741–1747 (2010).
104. Ponath, G. *et al.* Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain* **140**, 399–413 (2017).
 105. Yanagisawa, K. Role of gangliosides in Alzheimer’s disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 1943–1951 (2007).
 106. Qin, Y. *et al.* Serum glycopattern and *Maackia amurensis* lectin-II binding glycoproteins in autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* **7**, 46041 (2017).
 107. Wang, H. *et al.* Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *J. Neuroinflammation* **19**, 132 (2022).
 108. N., Kim, Y. S., Choi, J. & Yoon, B. Neuron-Glia Interactions in disorders. *Cells.* **9**, 2176 (2020).
 109. Kim, H., Lim, C. & Kaang, B. Neuronal mechanisms and circuits underlying repetitive behaviors in mouse models of autism spectrum disorder. *Behav. Brain Funct.* **12**, 3 (2016).
 110. Vakilzadeh, G. *et al.* Decreased number and increased activation state of astrocytes in gray and white matter of the prefrontal cortex in autism. *Cereb. Cortex* **32**, 4902–4912 (2022)
 111. Xiao, L. *et al.* Critical role of TLR4 on the microglia activation induced by maternal LPS exposure leading to ASD-like behavior of offspring. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 634837 (2021).
 112. Trobiani, L. *et al.* The neuroligins and the synaptic pathway in Autism Spectrum Disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **119**, 37–51 (2020).

113. Bilbo, S. D., Block, C. L., Bolton, J. L., Hanamsagar, R. & Tran, P. K. Beyond infection-maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Exp. Neurol.* **299**, 241–251 (2018).
114. Wang, Q. *et al.* Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice. *Nat. Commun.* **12**, 3321 (2021).
115. Marotta, R. *et al.* The neurochemistry of autism. *Brain Sci.* **10**, 163 (2020).
116. Zhang, H. *et al.* Correlation between sialidase NEU1 mRNA expression changes in Autism Spectrum Disorder. *Front. Psychiatry* **13**, 870374 (2022).