

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12774

研究課題名(和文) シナプス構成蛋白質の欠損からとらえる育児放棄の分子メカニズム

研究課題名(英文) Absence of release machinery protein impaired maternal behavior

研究代表者

萩原 明 (HAGIWARA, Akari)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：70402849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞において伝達物質の放出を制御するCASTの欠損(KO)マウスにおいて母性行動の解析を行った。養育中のCAST KOマウスは巣の中をせわしなく移動し、仔マウスを哺育する時間が有意に低下する。まずCASTが発現する下垂体後葉から放出されるオキシトシンに着目したが、血漿内オキシトシン濃度に有意な差はみられなかった。次に、出産や養育によるストレス耐性をショ糖嗜好性試験により評価した。その結果、CAST KOマウスでは養育期間の飲水量が低下し妊娠中のスクロース嗜好性が高まる傾向にあることが分かった。これらのことから、神経調節因子の放出制御異常が不適切な養育行動に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neurotransmitters are released from presynaptic active zone, and the cytomatrix at the active zone (CAZ) proteins including CAST is thought to organize release machineries. From the nurturing analysis, we found less crouching time correlating with increased moving distance in the CAST KO female. Oxytocin is a neurosecretory hormone which coordinates the maternal behavior. While CAST is expressed in the posterior pituitary, where oxytocin is released, the concentration of oxytocin in plasma was not significantly different between WT and KO. Next, we evaluated the maternal stress by sucrose preference test. Intriguingly, the total amount of drinking water was significantly decreased but preference for sucrose was increased in CAST KO during pregnancy and nurturing. From these results we speculate that exposure of pregnant stress may affect the responsiveness to reward by impaired release regulatory machinery in CAST KO.

研究分野：神経科学

キーワード：養育行動 CAST アクティブゾーン 神経伝達物質 放出制御 オキシトシン ストレス

1. 研究開始当初の背景

様々な刺激情報を統合する神経回路はシナプスと呼ばれる接着構造を介して情報を伝達し、そのシナプス前終末には伝達物質放出に関与するアクティブゾーン構成蛋白質 (Cytomatrix at the active zone, CAZ) が局在している。個々の CAZ 蛋白質の機能は徐々に明らかになってきたものの、それらの機能不全が個体レベル、特に高次脳機能に与える影響は依然として不明な点が多い。

研究代表者らは、CAZ 蛋白質 CAST (Ohtsuka et al., 2002, *J. Cell Biol.*, [Hagiwara et al.](#), 2005, *J. Comp. Neurol.*) を欠損させたマウス (CAST KO) の網膜において、異所性シナプスの形成や視覚機能の低下を見出した (tom Dieck et al., 2012, *J. Neurosci.*)。一方、CAST KO の解析過程で、仔マウスがしばしば衰弱死して発見された。そこで離乳率の推移を数値化したところ、初産での離乳率が顕著に低下していることが認められた。このことから、研究代表者はシナプス関連蛋白質の欠損・機能異常が育児放棄の分子基盤の一つになりうると着想した。

2. 研究の目的

シナプス前終末に局在する CAZ 蛋白質は、神経伝達物質の放出に直接作用するものと、CAST のように調節機構を制御する機能を持つものがあることがわかってきたが、各シナプスにおける作用機序は未だよく分かっていない。当初、CAST KO マウスでは顕著な個体レベルの表現型が見出されなかったが、離乳率の低下という事実から養育行動に注視してみると、子育て中にもかかわらず落ち着きなくケージ内を徘徊し、不適切な養育行動 = ネグレクト様の行動を示すことが見出された。

(1) オキシトシン放出への関与

愛情ホルモンとして養育行動の中心的役割を担うオキシトシンは下垂体から血中へと放出される。CAST はこのオキシトシンが放出される下垂体後葉に強く発現していたことから、まずは CAST 欠損とオキシトシン放出の調節機構に着目し、育児放棄の原因解明を目指す。オキシトシンやその関連蛋白質の欠損動物からこれらが養育行動の中心的役割を担うことが明らかになってきたが、その放出機構に着眼をおいた本研究は、従来の研究と異なるアプローチである。

(2) 養育ストレスと神経調節因子の放出

ネグレクト様の行動様式として、特に初産では出産によるストレスが育児放棄の要因になると考えられている点に着目し、ストレス耐性に関連した神経回路と養育行動の関係を探る。このように感情・情動に関連する脳領域と出産に伴うストレスとの関係はほとんどわかっておらず、今後新しい分野の開拓につながることを期待できる。

3. 研究の方法

(1) 計画

本研究では養育本能を司るオキシトシンや、ストレス耐性に関連する神経因子が CAST KO マウスにおいて血中や脳組織内に適切に放出されているかを行動実験並びに生化学的実験を用い解析する。

(2) 方法

① 養育中の CAST WT と KO マウスの行動を定量的に評価し、離乳率の低下につながる養育行動を明らかにする。

② 非妊娠マウスにおいて、仔マウスと接触させた際の養育行動を WT と KO マウスで比較検討する。

③ 下垂体からのホルモン放出への影響を評価するため、血中に放出される各種神経因

子の濃度を ELISA 法で測定し比較する。

④ 脳内における神経伝達を調節する因子であるドーパミンやセロトニンの養育行動への影響を行動実験等により評価する。

4. 研究成果

(1) 出産後 P0-P3 の仔マウスを養育中の CAST WT 及び KO マウスにおいて、仔マウスを 1 時間隔離したのち再びケージに戻した時の行動を解析した。その結果、仔マウスへの興味は WT と KO マウスで有意な差はみられなかったが、KO マウスでは巣に連れ帰り哺育する時間が有意に低下していた。これらマウスの行動軌跡を解析したところ、KO マウスはケージ内をせわしなく移動するため、仔マウスの保温・授乳時間が顕著に低下し、その結果離乳率の低下につながることを示唆された。

(2) 未妊娠の CAST WT 及び KO マウスにおいて、(1) 同様の養育行動の解析を行った。その結果、KO マウスでは P0-3 の仔マウスに対する興味や哺育行動が WT に比べて低いことが分かった。

(3) 下垂体の免疫染色を行った結果、CAST はオキシトシン等が放出される下垂体後葉に強く発現していた。

(4) 養育行動中に血中に放出されるオキシトシン量を ELISA 法によって計測したが、WT と KO で有意な差はみられなかった。

(5) 出産・養育中のストレス耐性をショ糖嗜好性試験により評価したところ、CAST KO マウスでは養育期間の飲水量が低下し妊娠中のスクロース嗜好性が高まる傾向にあることが分かった。

これらのことから、神経調節因子であるドーパミンやセロトニンの放出制御異常が不適切な養育行動と関係することが示唆された。

<引用文献>

1. Ohtsuka, T., E. Takao-Rikitsu, E. Inoue, M. Inoue, M. Takeuchi, K. Matsubara, M. Deguchi-Tawarada, K. Satoh, K. Morimoto, H. Nakanishi, and Y. Takai. **2002**. CAST: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and Munc13-1. *J Cell Biol.* 158:577–590.
2. Hagiwara, A., Y. Fukazawa, M. Deguchi-Tawarada, T. Ohtsuka, and R. Shigemoto. **2005**. Differential distribution of release-related proteins in the hippocampal CA3 area as revealed by freeze-fracture replica labeling. *J Comp Neurol.* 489:195–216.
3. tom Dieck, S., D. Specht, N. Strenzke, Y. Hida, V. Krishnamoorthy, K.-F.F. Schmidt, E. Inoue, H. Ishizaki, M. Tanaka-Okamoto, J. Miyoshi, A. Hagiwara, J.H. Brandstätter, S. Löwel, T. Gollisch, T. Ohtsuka, T. Moser, **2012**. Deletion of the presynaptic scaffold CAST reduces active zone size in rod photoreceptors and impairs visual processing. *J. Neurosci.* 32:12192–12203.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

① Akari Hagiwara, Naoko Sugiyama, Tosihisa Ohtsuka、
養育行動に関連する神経伝達・作用機序の探索

Exploration of neural network involved in the

adequate maternal behavior

第 39 回日本神経科学大会

2016 年 7 月 20-22 日

パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[その他]

ホームページ等

山梨大学医学部 生化学講座第一教室

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 明 (HAGIWARA, Akari)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：70402849