

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640026

研究課題名(和文)扁桃体海馬野の生理的意義の解明

研究課題名(英文)Clarification of the physiological role of amygdalohippocampal area

研究代表者

有賀 純 (ARUGA, Jun)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：10232076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃体海馬野は扁桃体の最尾側に位置しており、扁桃体皮質核と海馬に挟まれた領域である。我々はZic2タンパク質が強く限局して扁桃体海馬野に分布することを見いだした。一方、Zic2発現低下変異マウスは攻撃性が減弱していることが居住者侵入者試験や社会優位性試験などで示されている。Zic2の扁桃体海馬野の機能を解明することを目的として、Zic2外套条件変異ホモ個体を作製し、解析を行った。この個体群では扁桃体海馬野で顕著な細胞数減少があり、文脈依存的な恐怖記憶が低下する傾向が認められた。また、Zic2を分解するE3ユビキチンリガーゼ Rinesを欠損するマウスでは、攻撃行動が減弱する傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Amygdalohippocampal area (AHA) is located caudally to the amygdalar nuclei, between the amygdala and hippocampus. We found that Zic2 protein is strongly distributed in AHA. We previously showed that Zic2-hypomorphic mutant mice exhibit decreased aggressive behaviors in resident-intruder test and social predominance test. To clarify the role of Zic2 in AHA, we generated Zic2 conditional knockout mice lacking Zic2 in pallium. The mice showed a marked decrement of cell numbers in AHA and an impaired contextual fear memory. We also found that the mice-deficient in Rines, an E3 ubiquitin ligase that degrades Zic2, show reduced aggressive behavior.

研究分野：神経生物学

キーワード：扁桃体海馬野 Zic2 遺伝子変異マウス 攻撃行動 恐怖記憶

1. 研究開始当初の背景

(1) 扁桃体海馬野 (Amygdalohippocampal area) は扁桃体の最尾側に位置しており、扁桃体皮質核と海馬に挟まれた領域である。この領域は組織学的に明瞭な区画を形成しているが、他の扁桃体の領域と違い、その領域の生理的役割についての理解が進んでおらず、どのような神経回路網に組み込まれるのかについての理解も不十分である。限られた文献の中では、けいれん刺激のあとに扁桃体海馬野と海馬歯状回での樹状突起形成が増加するというものや、片側性の耳鳴患者の対側の扁桃体海馬野の機能を麻痺させるように麻酔薬を投与すると耳鳴の症状が軽減するというものなどが注目されるが、マウス遺伝学を駆使した研究は未だ表れていない。これは他の扁桃体核と同様に領域特異的に発現する優れた分子マーカーが存在しなかったためではないかと考える。

(2)我々は Zinc フィンガー型転写因子 Zic2 の発現低下変異マウスの解析を行っている、Zic2 タンパク質が強く限局して扁桃体海馬野に分布することを見いだした。ZIC2 は、全前脳症という左右の脳室が融合してしまうタイプの脳の先天奇形の原因遺伝子である。マウスでは Zic2 遺伝子発現量を約 20% にまで発現を減らすことで生じるが、60%程度の低下 (Zic2 発現低下変異マウス) では一目でわかるような強い奇形は生じない。しかし、Zic2 発現低下変異マウスでは扁桃体海馬野のサイズが減少することが明らかになった (下図)。このことは Zic2 が扁桃体海馬野の発生に重要な役割を持つことを示しており、同様の異常は最近作製された Zic2 条件変異マウスでも確認され、扁桃体海馬野のサイズと Zic2 の発現レベルが相関することが示唆された。一方、Zic2 発現低下変異マウスは攻撃性が減弱していることが明らかになった。このことは居住者侵入者試験や社会優位性試験などで示された。

2. 研究の目的

本研究課題では Zic2 の扁桃体海馬野の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Zic2 条件変異マウスを用いた扁桃体海馬野を欠損するマウスの攻撃行動の解析。  
大脳皮質、海馬、扁桃体の一部で Zic2 を欠く個体 (Zic2 外套条件変異ホモ個体) を作成し、その表現型を検討する。この条件変異ホモ個体とヘテロ個体の攻撃行動といくつかの基本行動を解析する。これらの解析により、Zic2 条件変異ホモ個体が攻撃性障害のモデルとなるかどうかの判断をする。

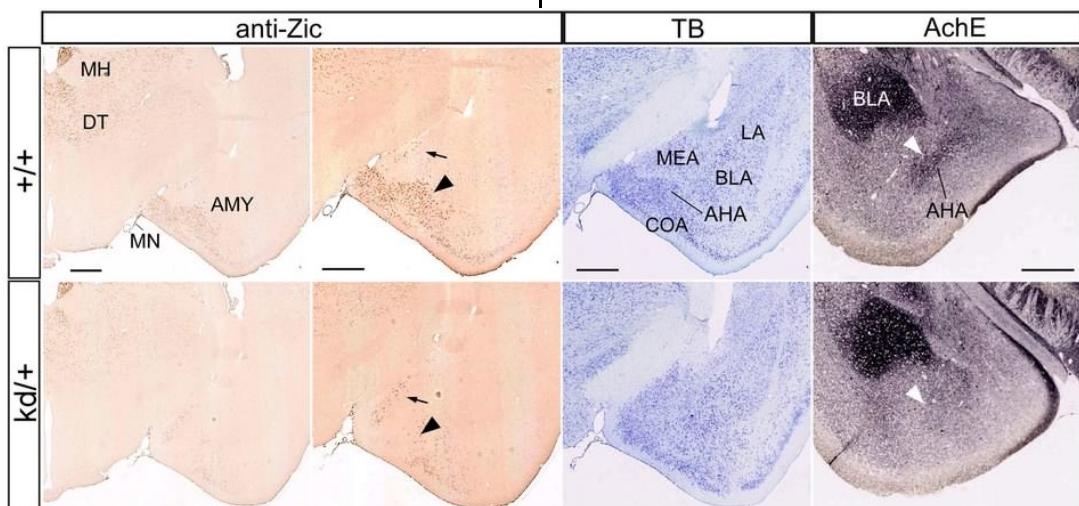
(2) Rines 変異マウスにおける扁桃体表現型の解析。

以前に Zic2 を分解する E3 コピキチンリガーゼ Rines を同定した。そこで、Rines 欠損マウスについて解析を行い、Rines が情動行動の制御に重要な役割を持つことを明らかにした。Rines 変異マウスの攻撃に関係した表現型と、Rines 変異マウスにおける Zic2 陽性細胞の性状について検討する。

4. 研究成果

(1) Zic2 条件変異マウスを用いた解析。  
Zic2 外套条件変異ホモ個体の大脳皮質では、Zic2 はその発現レベルが後期胎児期以降低いことを反映してほとんど組織構築の異常が見出されない。一方、扁桃体海馬野では顕著な細胞数減少が観察されている。

大脳皮質、海馬、扁桃体の一部で Zic2 を欠く個体 (Zic2 外套条件変異ホモ個体) の恐怖条件付け行動試験を行った。その結果、雌の文脈依存的な恐怖記憶が低下する傾向が認められた。同時にこれらの個体を用いて、扁桃体海馬野の Zic 陽性細胞に関する組織学的解析、分子マーカー解析を行った。その結果、扁桃体海馬野に有意な形態の変化が観察さ



野生型(+/+), Zic2 低発現変異マウス(kd/+)の抗 Zic 抗体染色、Toluidine blue 染色(TB)、Acetylcholine esterase 染色(AChE)を示す。扁桃体海馬野(AHA)領域には Zic 陽性細胞が多数存在する。

れ、Zic2がこの領域の発生に重要な役割を持つことが明らかになった。

(2) Rines 変異マウスにおける扁桃体表現型の解析。

Rines 変異マウスでは不安傾向が強く、攻撃行動が減弱する傾向が認められたため、情緒の変化が予想された。RINES 欠損マウスの脳の各部位で安静時と不快な刺激後にモノアミン量を調べたところ、不快な刺激後、ノルアドレナリンとセロトニンの両方の量が、青斑核で正常マウスより低くなることが分かった。青斑核では MAO-A の酵素活性が特に高いことが知られていることから、青斑核の MAO-A の定量を行った。その結果、青斑核で MAO-A の酵素活性が高く、その量も増えていた。一方で、MAO-A の産生過程について検討したが、その差は認められず、MAO-A 量の増加は、産生が増えているせいではないと考えられた。これらのことから、RINES 欠損マウスでは、MAO-A の分解が低下している可能性が考えられた。次に、実際に RINES が直接 MAO-A の分解に関与するのかどうかを検討したところ、培養細胞内で RINES は MAO-A に結合して、ユビキチン化とタンパク質分解を促進することが分かった。また、RINES 欠損マウスの青斑核から抽出した MAO-A では、ユビキチン化の程度が減少していた。以上から、RINES が MAO-A を標的としてその分解を促進することが明らかになった。

以上の結果を受け、Zic2 の発現する扁桃体海馬野の組織学的な検索を行った。その結果、組織構築にははっきりとした異常が認められないことが明らかになった。今後、抗 Zic 抗体による免疫染色による Zic 陽性細胞の定量的解析を行い、Rines 変異マウスの情動行動異常に Zic2 が何らかの形で関与するかについて、詳細に検討する。

(3) Zic 条件変異複合変異マウスの作製。

研究の進行過程で外套発生における Zic1 の役割も併行して解析した方が良いと考えられたので、Zic1/Zic2 条件変異の複合マウスを作製することを新たに計画し、目的の動物を得ることに成功した。この複合変異マウスと既存の変位マウスを用いて、外套発生における Zic ファミリー遺伝子の機能的な関連を明らかにする。

(4) 実験動物の管理と新たな解析系の確立。研究期間中に研究代表者の異動に伴う、実験動物繁殖群の縮小と再確立を行った。また、遺伝子の不活化が起きた細胞からの投射パターンを解析を行うために、新たな Cre-flox レポーターシステムを導入して、Zic2 条件変異マウスとの交配を進めた。flox 型条件変異ホモ個体の扁桃体に局所的に Cre 発現型組み換えウイルスを投与するための実験環境を整備した。

<引用文献>

- Kato et al., *Brain Res.* 901:381, 2001.  
De Ridder et al., *Acta Otolaryngol Suppl.* 556:50, 2006.  
Hatayama et al., *Scientific Reports*, 1:16, 2011.  
Ogawa et al., *Genes to Cells*, 13, 391-409, 2008.  
Kabayama M., et al., *J Neurosci.* 33:12940-12953, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- Tomioaka NH, Yasuda H, Miyamoto H, Hatayama M, Morimura N, Matsumoto Y, Suzuki T, Odagawa M, Odaka YS, Iwayama Y, Um JW, Ko J, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamakawa K, Aruga J: Efn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nature Commun.* 5:4501, 2014 (doi: 10.1038/ncomms5501) 査読有  
Kabayama M, Sakoori K, Yamada K, Ornthanalai VG, Ota M, Morimura N, Katayama K, Murphy NP, Aruga J. Rines E3 Ubiquitin Ligase Regulates MAO-A Levels and Emotional Responses. *J Neurosci.* 33:12940-12953. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5717-12.2013 (2013) 査読有

[学会発表](計 3 件)

- 畑山実、日高悠希、有賀純. 神経血管ユニットの発達過程における Zinc finger 型転写因子の役割 日本分子生物学会年会 横浜, パシフィコ横浜, 11 月 26 日 (2014)  
Kabayama M, Sakoori K, Yamada K, Odagawa M, Morimura N, Katayama K. Murphy NP, Aruga J. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, Nov.12 (2013)  
Kabayama M, Sakoori K, Yamada K, Odagawa M, Morimura N, Katayama K. Murphy NP, Aruga J. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional behaviors by altering the monoamine dynamics in prefrontal cortex. 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, Kyoto International Conference Center, Jun. 22 (2013)

[その他]

- <http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/ra-kbym2013.html>

6 . 研究組織

研究代表者

有賀 純 ( ARUGA, Jun )

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

教授

研究者番号：10232076