

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640033

研究課題名(和文) マイクロRNAによる情動制御の生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of miRNA-mediated regulation of emotional behaviors

## 研究代表者

中澤 敬信 (Nakazawa, Takanobu)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：00447335

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)：マイクロRNAは成熟脳に豊富に発現しているが、その機能に関する知見は極めて限定的である。本研究はコカインによって誘導されるマイクロRNAによる情動制御の分子基盤をマウス個体レベルで明らかにすることを目的とした。当該マイクロRNAの欠損マウスに、報酬系以外にも、情動系や鬱様行動の異常が見られることを明らかにした。その分子基盤の1つとしてRhoキナーゼが関与することを見いだした。またマイクロRNA自身の発現制御にSrc型チロシンキナーゼやインテグリン受容体シグナルが関与することを見いだした。本研究によって、未知な部分が多いマイクロRNAによる情動制御の分子機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：miRNAs are highly expressed in the central nervous system, however, their roles in higher brain functions remain unclear. In this study, using the cocaine-induced microRNA knockout mice, I examined the function of the miRNA in emotional behaviors and its associated molecular mechanisms. In addition to reward system, I found that the knockout mice exhibited abnormal emotional behaviors in the elevated plus maze test and forced swim test. Using microarray methods, I also found that the miRNA-mediated regulation of Rho-kinase was involved in these behavioral abnormalities. Interestingly, Src kinase and integrin-mediated pathway regulated the expression of the miRNA. Taken together, Rho-kinase and Src-kinase/integrin-mediated signaling pathways are important for the cocaine-induced miRNA-mediated regulation of emotional behaviors. In addition, female infertility was found in the miRNA knockout mice.

研究分野：分子神経科学

キーワード：マイクロRNA 報酬系 情動 薬物依存 モデルマウス シグナル伝達 不妊 遺伝子欠損マウス

## 1. 研究開始当初の背景

小分子非コード RNA の一つであるマイクロ RNA が、様々な標的遺伝子の発現制御等を通して、発生・代謝等の多様な生物学的機能を緻密にコントロールしていることが明らかになってきている。中枢神経系においては、その発達期における役割が徐々に明らかになりつつある。マイクロ RNA は「成熟した」中枢神経系にも豊富に発現しているが、複雑な脳高次機能発現における生理機能は miR-212 による線条体機能制御 (*Nature* 2010) や miR-132/miR-219 による概日リズムの制御 (*Neuron* 2007) 等の極めて少数の報告しかなく、未だ不明な部分がほとんどであった。

## 2. 研究の目的

マイクロ RNA による情動、特に報酬系の制御の分子基盤を、特に、コカインによって発現が誘導されるマイクロ RNA に注目し、マウス個体レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) コカインによって誘導されるマイクロ RNA の誘導メカニズムの解析のため、培養神経細胞を用いて種々のシグナル伝達分子の関与を阻害剤を用いて検討した。さらにマイクロ RNA の生合成に関与する分子群との相関の解析も行った。

(2) コカインによって誘導されるマイクロ RNA の遺伝子欠損マウスを用いて elevated plus maze test や forced swim test といった情動系の行動実験を行った。また、行動に関与する分子基盤の解析を行った。

(3) マイクロ RNA 欠損マウスと野生型マウスの様々な脳領域から RNA を抽出し、マイクロアレイの系を用いて、コカインによって誘導されるマイクロ RNA の標的遺伝子群の探索を行った。

(4) コカインによって誘導されるマイクロ RNA の欠損マウスの表現型を主に組織学的手法を用いて全身にわたって調べた。

## 4. 研究成果

(1) コカインによって誘導されるマイクロ RNA の誘導メカニズムの1つとして Src 型チロシンキナーゼが関与していることが明らかになった。Src 型チロシンキナーゼが関与するシグナル伝達機構をさらに検討した結果、細胞外の基質やインテグリン受容体によってマイクロ RNA の発現自体が誘導されることを明らかにした。また、RISC 複合体の構成因子群が Src 型チロシンキナーゼによってチロシンリン酸化されることを明らかにした。

(2) 当該マイクロ RNA の欠損マウスの行動実験 (高架十字式迷路、強制水泳試験、尾懸垂試験等) を推進し、報酬系以外にも、情動系や鬱様行動の制御にも関与していることを明らかにした。その分子機構の1つとして Rho キナーゼの関与を見いだした。

(3) マイクロアレイの系を用いて当該マイクロ RNA の標的遺伝子群を調べた結果、Rho キナーゼを含む脳の高次機能に関するキナーゼ群が多く同定された。

(4) 当該マイクロ RNA の欠損マウスは脳機能異常のみならず雌性不妊になることを見いだした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Higashi S, Katagi K, Shintani N, Ikeda K, Sugimoto Y, Inoue N, Tanaka S, Koumoto M, Kasai A, Nakazawa T, Hayata-Takano A, Hamagami K, Tomimoto S, Yoshida T, Ohkubo T, Nagayasu K, Ago Y, Onaka Y, Hashimoto R, Ichikawa A, Baba A,

Hashimoto H. p13 overexpression in pancreatic  $\beta$ -cells exerts multiple protective effects against type 2 diabetes in high-fat-fed mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press 査読有り URL: <http://www.journals.elsevier.com/biochemical-and-biophysical-research-communications/>

Shibasaki Y\*, Hayata-Takano A\*, Hazama K\*, Nakazawa T\*, Shintani N, Kasai A, Nagayasu K, Hashimoto R, Tanida M, Katayama T, Matsuzaki S, Yamada K, Taniike M, Onaka Y, Ago Y, Waschek JA, Köves K, Reglodi D, Tamas A, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H. Atomoxetine reverses locomotor hyperactivity, impaired novel object recognition, and prepulse inhibition impairment in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). (\* equal 1<sup>st</sup> author) *Neuroscience* 297:95-104 (2015). 査読有り DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.062.

Schulze W, Hayata-Takano A, Kamo T, Nakazawa T<sup>CA</sup>, Nagayasu K, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Ago Y, Farfan C, Hashimoto R, Baba A, Hashimoto H<sup>CA</sup>. Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking. (<sup>CA</sup> equal corresponding author) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459:81-86 (2015). 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.073.

Onaka Y\*, Shintani N\*, Nakazawa T\*, Haba R\*, Ago Y, Wang H, Kanoh T, Hayata-Takano A, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Hashimoto R, Matsuda T, Waschek JA, Kasai A, Nagayasu K,

Baba A, Hashimoto H. CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice. (\* equal 1<sup>st</sup> author) *Behav. Brain Res.* 284:131-137 (2015). 査読有り DOI: 10.1016/j.bbr.2015.02.013.

Ogata K, Shintani N, Hayata-Takano A, Kamo T, Higashi S, Seiriki K, Momosaki H, Vaudry D, Vaudry H, Galas L, Kasai A, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto R, Ago Y, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H. PACAP enhances axon and neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons to a comparable extent as BDNF. *PLoS ONE* 10:e0120526 (2015). 査読有り DOI: 10.1371/journal.pone.0120526.

Yamasaki A, Kasai A, Toi A, Kurita M, Kimoto S, Hayata-Takano A, Nakazawa T, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Ito A, Meltzer HY, Ago Y, Waschek JA, Onaka Y, Matsuda M, Baba A, Hashimoto H. Identification of the role of BMP and TGF- $\beta$  signaling in the trajectory of serotonergic differentiation in a rapid assay in mouse embryonic stem cells *in vitro*. *J. Neurochem.* 132:418-428 (2015). 査読有り DOI: 10.1111/jnc.12999.

Shintani N, Onaka Y, Hashimoto R, Takamura H, Nagata T, Umeda-Yano S, Mouri A, Mamiya T, Haba R, Matsuzaki S, Katayama T, Yamamori H, Nakazawa T, Nagayasu K, Ago Y, Yagasaki Y, Nabeshima T, Takeda M, Hashimoto H. Behavioral characterization of mice overexpressing human dysbindin-1. *Mol. Brain* 7:74 (2014). 査読有り DOI: 10.1186/s13041-014-0074-x

Knox R, Brennan AM, Lu F, Yang D,

Nakazawa T, Yamamoto T, Swanson RA, Jiang X. NR2B phosphorylation at Tyrosine 1472 contributes to brain injury in a rodent model of neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* 45: 3040-3047 (2014). 査読有り DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006170.

David O, Barrera I, Chinnakkaruppan A, Kapjzan H, Nakazawa T, Yamamoto T, Rosenblum K. Dopamine-induced tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) is essential for ERK1/2 activation and processing of novel taste information. *Frontier Mol. Neurosci.* 7:66 (2014). 査読有り DOI: 10.3389/fnmol.2014.00066.

Dhar M, Zhu M, Impey S, Lambert TJ, Karatsoreos IN, Nakazawa T, Appleyard SM, Wayman GA. Leptin induces hippocampal synaptogenesis via CREB-regulated microRNA-132 suppression of p250GAP. *Mol. Endocrinol.* 28: 1073-1087 (2014). 査読有り DOI: 10.1210/me.2013-1332.

Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai H, Aiba A, Watanabe M, Kano M. Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. *Science* 344: 1020-1023 (2014). 査読有り DOI: 10.1126/science.1252514.

Inoue T, Hoshina N, Nakazawa T, Kiyama Y, Kobayashi S, Abe T, Yamamoto T, Manabe T, Yamamoto T. LMTK3 deficiency causes pronounced locomotor hyperactivity and impairs endocytic trafficking. *J Neurosci.* 34: 5927-5937 (2014). 査読有り DOI:

10.1523/JNEUROSCI.1621-13.2014.

Hazama K, Hayata-Takano A, Uetsuki K, Kasai A, Encho N, Shintani N, Nagayasu K, Hashimoto R, Reglodi D, Miyakawa T, Nakazawa T, Baba A, Hashimoto H. Increased behavioral and neuronal responses to a hallucinogenic drug in PACAP heterozygous mutant mice. *PLoS ONE* 9: e89153 (2014). 査読有り DOI: 10.1371/journal.pone.0089153.

Haba R, Shintani N, Onaka Y, Kanoh T, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Kasai A, Hashimoto R, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto H, Baba A. Central CRTH2, a second prostaglandin D<sub>2</sub> receptor, mediates emotional impairment in the lipopolysaccharide and tumor-induced sickness behavior model. *J. Neurosci.* 34: 2514-2523 (2014). 査読有り DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1407-13.2014.

Hoshina N, Tanimura A, Yamasaki M, Inoue T, Fukabori R, Kuroda T, Yokoyama K, Tezuka T, Sagara H, Hirano S, Kiyonari H, Takada M, Kobayashi K, Watanabe M, Kano M, Nakazawa T, Yamamoto T. Protocadherin 17 regulates presynaptic assembly in topographic corticobasal ganglia circuits. *Neuron* 78: 839-854 (2013). 査読有り DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.031.

〔学会発表〕(計 14 件)

Nakazawa T, Hashimoto R, Tanimura A, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T,

Takeda M, Kano M 題名: Brain-enriched sorting nexin family proteins regulate spine morphogenesis and are associated with risk for schizophrenia 学会名: 53<sup>rd</sup> Annual Meeting, ACNP 場所: Phoenix アメリカ 年月: 2014年12月07日~12月11日

松村憲佑、永安一樹、中澤敬信、安田由華、山森英長、梅田知美、大井一高、橋本亮太、武田雅俊、橋本均 題名: 自閉症の疾患特異的候補遺伝子の機能的スクリーニング系の確立 学会名: 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会 合同年会 場所: 愛知県 名古屋市 名古屋国際会議場 年月: 2014年11月20日~11月22日

中澤敬信、橋本亮太、永安一樹、安田由華、山森英長、梅田知美、藤本美智子、大井一高、石川充、赤松和土、岡野栄之、武田雅俊、橋本均 題名: iPS細胞関連技術を用いた統合失調症研究 学会名: 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会 合同年会 場所: 愛知県 名古屋市 名古屋国際会議場 年月: 2014年11月20日~11月22日

橋本均、新谷紀人、早田敦子、笠井淳司、永安一樹、中澤敬信 題名: 神経ペプチド PACAP による精神機能調節: 創薬への展望 学会名: 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会合同年会 場所: 奈良県 奈良市 奈良文化会館 年月: 2014年9月29日~10月01日

勢力薫、笠井淳司、丹生光咲、永安一樹、早田敦子、中澤敬信、新谷紀人、橋本岳、橋本均 題名: 精神・神経疾患モデル動物の病態解析のための三次元全脳形態計測法の構築 学会名: 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会合同年会 場所: 奈良県 奈良市 奈良文化会館 年月: 2014年9月29日~10月01日

上阪直史、内ヶ島基政、三國貴康、中澤敬信、中尾晴美、平井宏和、饗場篤、渡辺雅彦、狩野方伸 題名: Sema3A と Sema7A による逆行性シグナルがシナプス刈り込みを制御している 学会名: 第37回日本神経科学学会大会 (Neuro2014) 場所: 神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜 年月: 2014年9月11日~9月13日

橋本均、新谷紀人、早田敦子、笠井淳司、永安一樹、中澤敬信 題名: 神経ペプチド PACAP による精神機能調節: 創薬への展望 学会名: 第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会 合同年会 場所: 奈良県 奈良市 文化会館 年月: 2014年9月29日~10月01日

橋本均、新谷紀人、早田敦子、笠井淳司、永安一樹、中澤敬信 題名: 精神疾患マウスモデルを用いた発症脆弱性因子および創薬標的分子の探索 学会名: 第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会 合同年会 場所: 沖縄県 宜野湾市 沖縄コンベンションセンター 年月: 2013年10月24-26日

中澤敬信 題名: 神経細胞の形態形成と統合失調症 学会名: 第36回日本神経科学学会大会 (Neuro2013) 公開シンポジウム 場所: 京都府 京都市 国立京都国際会館 年月: 2013年6月20-23日

Lai ESK, Nakayama H, Nakazawa T, Tabuchi K, Hashimoto K, Kano M 題名: An autism-linked mutation in neuroligin-3 affects development of climbing fiber to Purkinje cell synapse in the cerebellum. 学会名: 第36回日本神経科学学会大会 (Neuro2013) 場所: 京都府京都市 国立京都国際会館 年月: 2013年6月20-23日

〔その他〕  
ホームページ: <http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

中澤 敬信 (NAKAZAWA TAKANOBU)  
大阪大学大学院薬学研究科・特任准教授  
研究者番号：00447335

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし