

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500328

研究課題名（和文） 情動記憶の分子機構に関わるmicroRNAの同定とその機能解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of microRNAs involved in molecular mechanism of emotional memory

研究代表者

児島 伸彦 (KOJIMA NOBUHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80215251

研究成果の概要（和文）：動記憶の分子機構の解明は、脳科学研究の中でも大きな課題であるばかりでなく、昨今社会問題にもなっている心的外傷後ストレス障害（PTSD）の病態を理解する上でも重要である。情動記憶の過程では、その長期記憶の形成と維持を支える遺伝子発現変化が脳内でダイナミックに起こっていることが示されている。本研究ではその過程におけるmicroRNAの役割を明らかにすることを目的として、恐怖条件づけに際して扁桃体で発現変化するmicroRNAを網羅的に検索した。その結果、13種類のmicroRNAが同定された（3種は増加、10種は減少）。これらの脳内のはたらきを解析すれば、情動記憶長期保持の機構を支える核-シナプス間の新しい情報伝達様式を見いだすことが出来ると考えている。

研究成果の概要（英文）：Exploring the molecular mechanism underlying emotional memory is important for understanding not only how the brain works, but also how psychiatric disorder such as PTSD occurs. It has been known that expression of genes involved in the formation and maintenance of long-term fear memory is dynamically changed during the processes of emotional memory. In this study to know the contribution of microRNA in the processes of fear memory formation, genome-wide screening of microRNAs whose expression is altered in the amygdala after fear conditioning using microRNA microarray. As a result, 13 microRNAs were identified: 3 were increased and 10 were decreased. Investigation of the role of these microRNAs will allow us a better understanding of the new aspects of communication between the synapse and the nucleus underlying the long-term retention of emotional memory.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：恐怖条件づけ/microRNA/扁桃体/遺伝子発現/マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

強い情動を伴う記憶は非常に強固であり、いったん形成されるとなかなか消し去ることができない。「恐怖条件づけ」は音などの本来中性な条件刺激 (CS) と電気ショックという無条件刺激 (US) を組み合わせて提示することによって獲得される恐怖記憶であり、一度獲得された恐怖記憶は非常に長く保持される。恐怖条件づけによる恐怖記憶の固定化やその後の再固定化および消去の過程では扁桃体や海馬などの脳部位においてダイナミックな転写調節による新たな蛋白質合成が起こり、それによってシナプスの構造変化を伴う永続的な可塑性変化を引き起こされることが知られているが、現時点で恐怖記憶の過程に関わる扁桃体ニューロンの細胞核—シナプス間の情報伝達経路の全貌はまだほとんど明らかになっていない。今後、情動記憶の分子機構を理解する上で、情動記憶の過程で扁桃体などにおいて発現量が変化し、情動記憶の長期保持に関わる遺伝子産物を明らかにすることが必要である。脳内蛋白質増減に関わる遺伝子の発現調節においては、転写因子による転写レベルでの制御が重要であるという従来の考え方がある一方で、最近になってゲノム配列の大半を占める非翻訳領域から産生される microRNA (以下 miRNA) が遺伝子発現を翻訳レベルで制御する機構がある。神経系においても多くの miRNA が発現していることがわかってきているので、学習記憶を支えるシナプス可塑性においても miRNA の調節系が関わっていることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では恐怖条件づけによって脳内で発現量の変化する miRNA を同定することを目的とする。miRNA の塩基配列情報は Sanger 研究所の運営する miRBase データベースに保管されており、この情報をもとに作成された miRNA マイクロアレイを用いて、蛋白質合成依存的な恐怖記憶の固定化の過程において、扁桃体で発現量の変化する miRNA を網羅的に解析し、その発現プロファイルと情動記憶との関連を調べる。

ついで、同定した miRNA の標的遺伝子をコンピュータ標的予測プログラムによって見だし、miRNA 発現変動が、条件づけに際して起こっているであろうシナプス可塑性における役割について考察する。

3. 研究の方法

(1) 恐怖条件づけおよび試料作成

10 週齢マウス (C57BL/6N、日本クレア) 20 匹を恐怖条件づけ群と対照群の 2 群に分けた。恐怖条件づけ群 (10 匹) を 1 匹ずつショック箱に入れ、以下の条件で条件づけした。60 秒後に CS として 60dB のホワイトノイズを 10

秒間提示し、終了 1 秒前に 0.5 mA の電流を床のグリッドに流して US とした。この CS と US の対刺激を 20 秒おきに 3 回繰り返した。動物は最後の対刺激終了後 50 秒 (ショック箱に入れてから 3 分後) にホームケージに戻した。対照群にはショック箱に入れた後、US 提示を除く同様の CS 提示を行った。条件づけの 3 時間後に麻酔下で頸椎脱臼により屠殺後速やかに脳を摘出し、氷上で Brain Matrix を用いて扁桃体を含む 1 mm 厚の切片を作成し RNA 保護液 (RNAlater) に浸し 4°C で保存した。各切片より実体顕微鏡下で 1 mm 径のステンレスパイプを用いて扁桃体をくり抜き、5 匹分を 1 本のテストチューブに集め (4 切片/匹 x 5 匹 = 20 切片)、恐怖条件づけ群 F1 および F2、対照群 C1、C2 の 4 試料とした。これらは解析まで -80°C で保存した。

(2) RNA 抽出とマイクロアレイ解析

試料を Lysis buffer (QIAzol) 存在下でホモジェナイズし miRNeasy mini kit (QIAGEN) のマニュアルに従い RNA を精製した。DNase I 処理後、C1、C2、F1、F2 の計 4 試料を miRNA マイクロアレイ解析 (Mouse miRNA Microarray V2 8x15K_miRBase release 12.0、北海道システムサイエンス) に供した。

(3) RT-PCR による定量解析

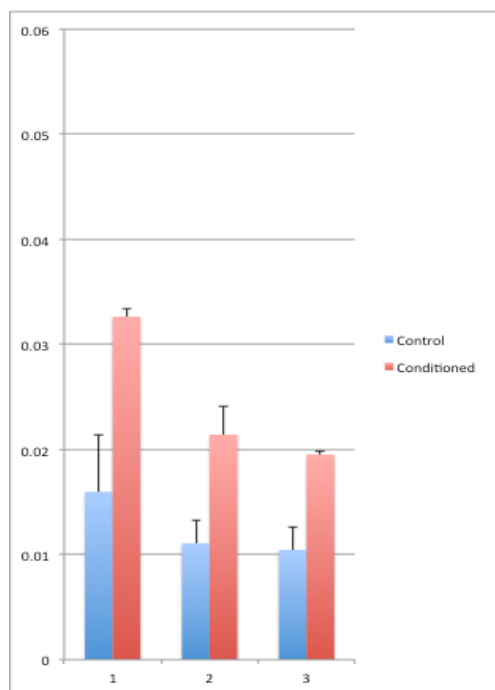
上述した方法で CS と US の対刺激によって恐怖条件づけした動物 (n=4) と CS 提示のみの対照群 (n=3) について、個体ごとに前頭前野、海馬、扁桃体の各脳部位より RNA を抽出した。RNA は DNase I 処理後、Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (Clontech) により cDNA に転換し、目的の miRNA に特異的なプライマー配列により、7500Fast システム (Applied Biosystems) を用いた定量 PCR を行った。解析は内標として U6 RNA の qPCR との比較定量法で行った。また、恐怖条件づけマウスと平行して、シナプス形成と可塑性に関わり、海馬依存的な恐怖記憶にも重要であることがわかっているアクチン結合タンパク drebrinA のノックアウト (DAKO) マウス

(Kojima et al. Neuroscience 165:138, 2010) の海馬 (n=3) においても同様の方法で miRNA の定量を行い、野生型 (n=3) と比較した。

4. 研究成果

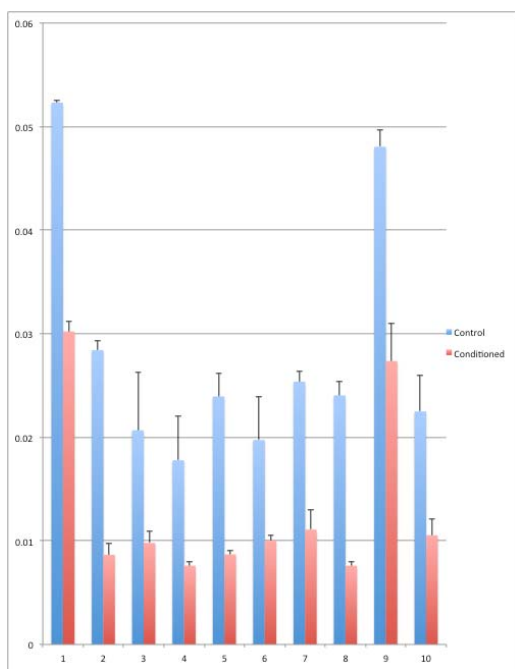
(1) microRNA マイクロアレイ解析による同定恐怖条件づけ群 F1 および F2、対照群 C1、C2 の 4 試料の miRNA マイクロアレイ解析の結果を C1 vs. F1、C1 vs. F2、C2 vs. F1、C2 vs. F2 の 4 通りの比較解析を行い、対照群に比べ恐怖条件づけ群で 2 倍以上増加した miRNA、0.6 倍以下に減少した miRNA を抽出した。

① 2 倍以上増加した miRNA (特許申請および論文作成まで仮称にて表記させていただく) 1: miR-I1 (対照の 2.8 倍)、2: miR-I2 (2.1



倍)、3: miR-I3 (2.1 倍)

② 0.6 倍以下に減少した miRNA



1: miR-D1 (0.58 倍)、2: miR-D2 (0.31 倍)、
3: miR-D3 (0.57 倍)、4: miR-D4 (0.50 倍)、
5: miR-D5 (0.38 倍)、6: miR-D6 (0.57 倍)、
7: miR-D6 (0.44 倍)、8: miR-D7 (0.32 倍)、
9: miR-D8 (0.58 倍)、10: miR-D9 (0.50 倍)

(2) 定量 RT-PCR による miRNA 発現量の解析
上述のマイクロアレイにより恐怖条件づけ群で変動するものとして抽出された miRNA13 種のうち、特に再現性の高かった 4 種類について特異的プライマーをデザインし、定量 RT-PCR を実施した。また、これに加えてすでにシナプス内分子の発現制御に関わり、in

vitro 系でノックダウンあるいは過剰発現すると樹状突起スパインの形態変化が誘導されることが報告されている 5 種の miRNA も定量した。結果を表に示す。

| | | amygdala | hippocampus | frontal cortex | wt | dako |
|----------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| miR-I1 | naive | - | 1.00 ± 0.03 | - | 1.00 ± 0.09 | 1.03 ± 0.09 |
| | conditioned | - | 0.67 ± 0.06 | - | - | - |
| miR-D1 | naive | 1.00 ± 0.07 | 0.61 ± 0.05 | 0.83 ± 0.03 | 1.00 ± 0.03 | 0.99 ± 0.00 |
| | conditioned | 0.62 ± 0.06 | 0.52 ± 0.01 | 0.83 ± 0.04 | - | - |
| miR-D2 | naive | 1.00 ± 0.10 | 1.32 ± 0.02 | 0.90 ± 0.06 | 1.00 ± 0.04 | 1.21 ± 0.01 |
| | conditioned | 0.67 ± 0.06 | 0.98 ± 0.08 | 0.78 ± 0.02 | - | - |
| miR-D9 | naive | 1.00 ± 0.08 | 1.52 ± 0.08 | 2.37 ± 0.73 | 1.00 ± 0.17 | 1.45 ± 1.15 |
| | conditioned | 1.00 ± 0.14 | 1.07 ± 0.14 | 3.07 ± 0.45 | - | - |
| miR-124 | naive | - | 1.00 ± 0.05 | - | 1.00 ± 0.03 | 1.17 ± 0.08 |
| | conditioned | - | 0.95 ± 0.15 | - | - | - |
| miR-125b | naive | - | 1.00 ± 0.01 | - | 1.00 ± 0.06 | 0.94 ± 0.07 |
| | conditioned | - | 0.84 ± 0.10 | - | - | - |
| miR-132 | naive | - | 1.00 ± 0.12 | - | 1.00 ± 0.03 | 0.99 ± 0.15 |
| | conditioned | - | 0.92 ± 0.09 | - | - | - |
| miR-137 | naive | - | 1.00 ± 0.03 | - | 1.00 ± 0.43 | 0.98 ± 0.27 |
| | conditioned | - | 0.85 ± 0.08 | - | - | - |
| miR-138 | naive | - | 1.00 ± 0.34 | - | 1.00 ± 0.06 | 0.93 ± 0.04 |
| | conditioned | - | 1.15 ± 0.10 | - | - | - |

まず、恐怖条件づけ後に扁桃体で増加する miR-I1 について海馬では減少することがわかった。miR-D1 は扁桃体および海馬で条件づけによって減少したが、前頭前野では変化がなかった。また、miR-D2 は調べた 3 部位でいずれも減少していた。一方、miR-D9 は海馬でのみ減少が認められた。以上の結果は、恐怖条件づけによって引き起こされる miRNA の発現制御は脳部位によって異なっていることが示された。条件づけ後の遺伝子発現調節とそれによって引き起こされる応答が脳部位によって顕著に異なる事を示唆する。

これらマイクロアレイによって見出された miRNA に対し、スパインの形態変化を引き起こす事が海馬の初代培養系で報告されている miRNA 各種について RT-PCR 定量したが、恐怖条件づけした海馬での発現量変化は認められなかった。おもしろいことに、海馬依存的な恐怖記憶に異常の認められる老齢 DAKO マウスの海馬では、野生型と比較して miR-D2 および D9 の増加がみられた。したがって、本来条件づけに際して発現抑制される miR-D2 および D9 が過剰に発現していることが、DAKO マウスにおける恐怖記憶の形成の障害に関わる可能性がある。

(3) miRNA の標的遺伝子予測

miR-D1 は miR-134 であり、恐怖条件づけ後前頭前野で増加する miRNA であることが報告されており、海馬培養ニューロンで樹状突起スパインの形態変化に関わっていることが示されている (Schratt et al. Nature 439:289, 2006, Gao et al. Nature 466:1105, 2010)。miRbase の予測プログラムによれば、標的遺伝子には CaM キナーゼ IV や CREB が含まれている。miR-D2 に関してはまだ脳内でのはたらしについての報告はなく、標的遺伝子も知られていないが、同様に標的遺伝子予測を行ったところ、シナプス機能に関わることが知られている RhoGAP、P21-activated kinase、MEK

(MAP kinase kinase) および MEK kinase (MAP kinase kinase kinase)、Shc adaptor protein などが標的となりうるものが複数のプログラムサーチにより共通して抽出された。また、機能は未同定であるがノックアウトマウスで不安情動に関わることが報告されている Lsamp (limbic system-associated membrane protein) も標的候補として上がった。これらが実際に恐怖条件づけ時に海馬や、扁桃体で miR-D2 によって発現抑制を受けているかについて今後検証が必要である。

本研究によって、恐怖条件づけ学習に際しての遺伝子発現調節には従来考えられていた転写調節以外に miRNA による転写後の mRNA の翻訳抑制という新たな調節系も関わっていることを示すことが出来た。

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 2 件)

Han W, Takamatsu Y, Yamamoto H, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda K. “Inhibitory role of inducible cAMP early repressor (ICER) in methamphetamine-induced locomotor sensitization” PLoS ONE 6: e21637 (2011) 査読あり

Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Ikeda T, Itoharu S, Shirao T. “Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood” Neuroscience 165: 138-150 (2010) 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

N Koganezawa, A Puspitasari, N Kojima, T Shirao “Time-dependent effect of X-irradiation on fear conditioning and its underlying cellular mechanism.” In the Symposium “Effect on the neural cells and plasticity of the central nervous system.”, Third Conference of International Society of Radiation Neurobiology, 2013, Naha, Okinawa, Jan 26. (invited)

A Puspitasari, N Koganezawa, N Kojima, T Shirao “Acute effect of X-irradiation on adult mouse brain” Third Conference of International Society of Radiation Neurobiology, 2013, Naha, Okinawa, Jan 26. Nobuhiko Kojima, Hiroki Yasuda, Kenji

Hanamura and Tomoaki Shirao. “Isoform-specific distribution and function of drebrin in adult mouse brain.” 第 35 回日本神経科学大会、名古屋、2012 年 9 月 18 日～21 日

児島伸彦、安田浩樹、花村健次、白尾智明 “Isoform conversion of drebrin is required for hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity in the elderly.” 第 84 回日本薬理学会年会、誌上開催

Kojima N, Hanamura K, Shirao T. “Acute effect of X-irradiation on conditioned fear memory” First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.

Kojima N, Yasuda H, Hanamura K, Shirao T. “Neuron-specific drebrin isoform is necessary for hippocampus-dependent learning in adulthood but not in young age of mice” Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2010 San Diego, USA, November 13-17

児島伸彦、安田浩樹、花村健次、白尾智明 「Age-dependent impairments of hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning in drebrin A-specific knockout mice」 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro 2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児島 伸彦 (KOJIMA NOBUHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80215251

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし