

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700338

研究課題名（和文） 時期特異的・部位特異的遺伝子破壊法を用いた Shn2 遺伝子の行動学的機能解析

研究課題名（英文） Behavioral and functional analysis of Shn2 gene using site- and time- specific gene targeting technique

研究代表者

高雄 啓三 (TAKAO KEIZO)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・特任准教授

研究者番号：80420397

研究成果の概要（和文）：Shn2 の exon 領域の配列を loxP 配列で挟んだ Shn2 floxed マウスに各部位特異的に Cre リコンビナーゼを発現させる Cre マウスと掛け合わせることで領域特異的 Shn2 欠損マウスを得ることが出来る。loxP 配列で挟んだ Shn2 の exon 領域の配列が Cre リコンビナーゼによって欠損させられたときに Shn2 KO マウスと同様の表現型が得られるかどうかを未成熟歯状回の指標となる遺伝子群を RT-PCR によって定量して確認した。Shn2 floxed マウスと telencephalin Cre マウスを交配することによって Shn2 Δ/Δ マウスを得た。このマウスの海馬を用いて未成熟歯状回の指標となる遺伝子について RT-PCR を行ったところ、ドーパミン受容体 1A の発現が増加し、デスマプラキン、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼの発現が減少しており、Shn2 Δ/Δ マウスが未成熟歯状回を持っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Site specific Shn2 gene knockout mice can be obtained by crossing floxed Shn2 mice with mice expressing Cre recombinase site-specifically. Mice with Shn2 deletion (Shn2 Δ/Δ mice) were obtained by crossing Shn2 floxed mice and telencephalin Cre mice. To confirm the deletion of the exon have the effect similar to Shn2 global knockout, we assessed maturity of the dentate gyrus of Shn2 Δ/Δ mice. RT-PCR was conducted to measure the expression of genes that are indices of the maturation of the dentate gyrus using the hippocampus of the mice. Dopamine receptor 1A was increased, desmoplakin and tryptophan 2,3-dioxygenase were decreased in Shn2 Δ/Δ mice. These results suggest that Shn2 Δ/Δ mice have immature dentate gyrus in their adult brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般・行動神経科学

キーワード：網羅的行動解析・歯状回・統合失調症

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、「脳で発現する遺伝子の機能の最終アウトプットレベルは行動である」という発想から、多くの遺伝子改変マウスの系統について「網羅的行動テストバッテリー」を行うことで遺伝子の機能探索を行ってきた (Takao et. al. *Neurosci Res*, 2007; Takao & Miyakawa, *Annals NYAS*, 2006)。また、申請者らの研究室では、2003 年の発足以来、国内外 60 以上の研究室との共同研究で、90 以上の異なる系統のマウスに対して既に一通りの網羅的行動テストバッテリーの支援を行っており、遺伝子改変マウスの行動の網羅的解析について国内で突出した最大の拠点となっている。その中でも、最も顕著な精神疾患様の行動異常を示す系統のひとつが Schnurri-2 欠損マウス (Shn2 KO マウス) である。Shn2 はもともと免疫の研究で見出されてきた分子 (Takagi et al. 2001) であるので、脳における機能は詳細が不明のままであった。申請者が同様に Shn2 KO マウスについて網羅的行動テストバッテリーによる解析を行ったところ、このマウスは、活動量の亢進、作業記憶に顕著な障害、不安様行動の低下、プレパルス抑制の障害、うつ様行動の低下など一連の顕著な精神疾患様の行動異常を示した。これらの行動異常は一部異なる点もあるが申請者らが精神疾患モデルマウスとして発表した CaMKII α HKO マウス (Yamasaki et. al. *Mol Brain*, 2008) が示したものと非常によく似ていた。CaMKII α HKO マウスの脳では海馬で 2,000 以上の遺伝子で顕著に発現量が増加しており、海馬歯状回での神経新生は顕著に亢進していたが (約 1.8 倍)、ほぼすべての神経細胞のステージが成熟神経細胞まで達していない (未成熟な歯状回 = "Immature Dentate Gyrus") という驚くべき現象が起きていることが判明した。この性質については形態的・電気生理学的にも確認済みであり、これらのデータは、顆粒細胞層の細胞のステージ・形態・機能が all or none 的に変化してしまっていることを示している。この未成熟な歯状回は精神疾患に関連した行動異常を示す複数のマウス系統で見られており、精神疾患様行動異常に共通する中間表現型である可能性が示唆される。

2. 研究の目的

Shn2 KO マウスの脳でジーンチップ解析を行ったところ、驚くべきことにこのマウスの海馬での遺伝子発現は CaMKII α HKO マウスと非常に酷似したものであった。特に未成熟な歯状回を特徴付ける遺伝子の発現はその fold change まで非常によく一致しており、未成熟な歯状回という現象は精神疾患様の

行動異常に関わる一般的な中間表現型である可能性が示唆された。しかし、これまでに用いられてきた Shn2 KO マウスでは単純ノックアウトであり、全ての細胞で Shn2 がノックアウトされてしまっていた。このため Shn2 KO マウスでは脳だけでなく全ての細胞で Shn2 が欠損しており、脳のどの部分におけるどの時期の Shn2 の欠損がこれらの多様な行動学的・心理学的な異常をもたらしているのかを知ることは出来ない。この疑問に答えるため、時期特異的・領域特異的 Shn2 欠損マウスを用いて、Shn2 KO マウスで見られた各種の行動学的・心理学的な異常が脳のどの部位のどの時期の Shn2 の欠損に対応しているのかを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

Shn2 KO マウスは多様でかつ顕著な精神疾患様の行動異常を示しているが Shn2 KO マウスは全ての細胞で遺伝子が欠損しているグローバルノックアウトであるため脳の全体で Shn2 が欠損しており、様々な行動異常が脳のどの部位のどの時期の Shn2 の欠損に対応するのか不明である。部位特異的、あるいは時期特異的に Shn2 を欠損させたマウスは、Shn2 の exon 領域の配列を loxP 配列で挟んだ Shn2 floxed マウスと、各部位・各時期に特異的に Cre リコンビナーゼを発現させる Cre マウスとを掛け合わせることで得ることが出来る。本研究ではまず loxP 配列で挟んだ exon 領域が欠失することで Shn2 KO マウスと同様の効果が得られるかどうかを検証した。Shn2 floxed マウスと telencephalin Cre マウスとを掛け合わせることで Shn2 Δ/Δ マウスを得た。海馬歯状回の成熟度を調べるため、得られたマウスから海馬をサンプリングし、RT-PCR によって海馬歯状回の成熟度の指標となる遺伝子 (ドーパミン受容体 1A、デスモプラキン、トリプトファン-2,3-ジオキシングナーゼ) の発現を調べた。

4. 研究成果

Shn2 KO マウスは、精神疾患様の行動異常とともに、精神疾患の新たな中間表現型の候補である未成熟歯状回を示している。この未成熟歯状回は Shn2 KO マウスのほかに、Shn2 KO マウスと非常によく似た行動異常を示す alpha-CaMKII ヘテロ KO マウスのなど精神疾患様行動異常を示す 5 系統のマウスで確認されている。領域特異的 Shn2 欠損マウスの作成のため、Shn2 の exon 領域の配列を loxP 配列で挟んだ Shn2 floxed マウスを繁殖させた。このマウスと各部位特異的に Cre リコンビナーゼを発現させる

Cre マウスとを掛け合わせるにより領域特異的 Shn2 欠損マウスを得ることが出来る。loxP 配列で挟んだ Shn2 の exon 領域の配列が Cre リコンビナーゼによって欠損させられたときに Shn2 KO マウスと同様の表現型が得られるかどうかを未成熟歯状回の指標となる遺伝子群を RT-PCR によって定量して確認した。Shn2 floxed マウスと telencephalin Cre マウスを交配することによって Shn2 Δ/Δ マウスを得た。このマウスの海馬を用いて未成熟歯状回の指標となる遺伝子について RT-PCR を行ったところ、ドーパミン受容体 1A の発現が増加し、デスマプラキン、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼの発現が減少しており、Shn2 Δ/Δ マウスが未成熟歯状回を持っていることが明らかとなった。

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 17 件)

- ① Suzuki K, Zhou J, Sato T, Takao K, Miyakawa T, Oyake M, Yamada M, Takahashi H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, DRPLA transgenic mouse substrains carrying single copy of full-length mutant human DRPLA gene with variable sizes of expanded CAG repeats exhibit CAG repeat length- and age-dependent changes in behavioral abnormalities and gene expression profiles. *Neurobiology of Disease*, Vol.46, 336-350, 2012, 査読有
- ② Shoji H, Hagihara H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, T-maze Forced Alternation and Left-right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, Vol.60, e3300, 2012, 査読有
- ③ Koshimizu H, Fukui Y, Takao K, Ohira K, Tanda K, Nakanishi K, Toyama K, Oshima M, Mark Taketo, Miyakawa T, Adenomatous polyposis coli heterozygous knockout mice display hypoactivity and age-dependent working memory deficits. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5:85, 2011, 査読有
- ④ Asrar S, Kaneko K, Takao K, Negandhi J, Matsui M, Shibasaki K, Miyakawa T, Harrison RV, Jia Z, Salter MW, Tominaga M, Fukumi-Tominaga T, DIP/WISH Deficiency Enhances Synaptic Function and Performance in the Barnes Maze. *Molecular Brain*, 4:39, 2011, 査読有
- ⑤ Watanabe Y, Tsujimura A, Takao K, Nishi K, Ito Y, Yasuhara Y, Nakatomi Y, Yokoyama C, Fukui K, Miyakawa T, Tanaka M. Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5:50 2011, 査読有
- ⑥ Takeuchi H, Iba M, Inoue H, Higuchi M, Takao K, Tsukita K, Karatsu Y, Iwamoto Y, Miyakawa T, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM, Takahashi R. P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One*. Vol.6, e21050, 2011, 査読有
- ⑦ Kaitsuka T, Li ST, Nakamura K, Takao K, Miyakawa T, Matsushita M. Forebrain-specific constitutively active CaMKK α transgenic mice show deficits in hippocampus-dependent long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol.96, 238-247,2011, 査読有
- ⑧ Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M. Synaptic E3 Ligase SCRAPPER in Contextual Fear Conditioning: Extensive Behavioral Phenotyping of Scrapper Heterozygote and Overexpressing Mutant Mice. *PLoS One*, Vol.6, e17317, 2011, 査読有
- ⑨ Yamada M, Ihara M, Okamoto Y, Maki T, Washida K, Kitamura A, Hase Y, Ito H, Takao K, Miyakawa T, Kalaria RN, Tomimoto H, Takahashi R, The influence of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function and amyloid β metabolism in APP overexpressing mice. *PLoS One*, Vol.6, e16567, 2011, 査読有
- ⑩ Yamanaka Y, Kitano A, Takao K, Prasansuklab A, Mushiroda T, Yamazaki K, Kumada T, Shibata M, Takaoka Y, Awaya T, Kato T, Abe T, Iwata N, Miyakawa T, Nakamura Y, Nakahata T, Heike T, Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, Vol.46, 200-212, 2011, 査読有
- ⑪ Tamada K, Tomonaga S, Hatanaka F,

- Nakai N, Takao K, Miyakawa T, Nakatani J, Takumi T. Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. PLoS One, Vol.5, e15126, 2010, 査読有
- ⑫ Sagata N, Iwaki A, Aramaki T, Takao K, Kura S, Tsuzuki T, Kawakami R, Ito I, Kitamura T, Sugiyama H, Miyakawa T, Fukumaki Y, Comprehensive behavioural study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. Genes, Brain and Behavior, Vol.9, 899-909, 2010, 査読有
- ⑬ Ohira K, Hagihara H, Toyama K, Takao K, Kanai M, Funakoshi H, Nakamura T, Miyakawa T, Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in mature granule cells of the adult mouse dentate gyrus. Molecular brain, Vol.3, 1:26, 2010, 査読有
- ⑭ 高雄啓三、宮川剛、精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回, 日本神経精神薬理学雑誌, 30 巻, 115-122, 2010, 査読有
- ⑮ Ohnishi H, Murata T, Kusakari S, Hayashi Y, Takao K, Maruyama T, Ago Y, Koda K, Jin FJ, Okawa K, Oldenburg PA, Okazawa H, Murata Y, Furuya N, Matsuda T, Miyakawa T, Matozaki T. Stress-evoked tyrosine phosphorylation of signal regulatory protein alpha regulates behavioral immobility in the forced swim test. The Journal of Neuroscience, Vol.30, 10472-10483, 2010, 査読有
- ⑯ Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Miyakawa T, Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. Frontiers in Behavioral Neuroscience, Vol.4, 29, 2010, 査読有
- ⑰ Tanaka N, Waki K, Kaneda H, Suzuki T, Yamada I, Furuse T, Kobayashi K, Motegi H, Toki H, Inoue M, Minowa O, Noda T, Takao K, Miyakawa T, Takahashi A, Koide T, Wakana S, Masuya H, SDOP-DB: a comparative standardized-protocol database for mouse phenotypic analyses. Bioinformatics, Vol.26, 1133-1134, 2010, 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Takao K, Hagihara H, Ohira K, Toyama K, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T, Mice lacking Schnurri-2 displayed cortical abnormalities related to schizophrenia. Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 12-16 日, Washington Convention Center, U.S.A.
- ② Takeuchi H, Iba M, Inoue H, Higuchi M, Takao K, Tsukiya K, Karatsu Y, Iwamoto Y, Miyakawa T, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM, Takahashi R, P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 12-16 日, Washington Convention Center, U.S.A.
- ③ Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M. Synaptic E3 ligase SCRAPER is crucial for hippocampus-dependent fear memory formation. Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 12-16 日, Washington Convention Center, U.S.A.
- ④ Takao K, Deficiency of Schnurri-2 confers schizophrenia-related phenotypes and inflammatory-like phenomenon in the brain. KSBNS-MCCS-Asia Conference, 2011 年 9 月 19-20 日, ソウル大学, Korea
- ⑤ Takao K, Hagihara H, Kobayashi K, Ohira K, Toyama K, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T, Mice lacking Schnurri-2 displayed cortical abnormalities related to schizophrenia. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14-17 日, パシフィコ横浜, 横浜市
- ⑥ Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Toyama K, Shoji H, Nakamura H, Furuya S, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T, Mice lacking Schnurri-2 show schizophrenia-related phenotypes and inflammatory-like responses in the brain. The 6th International Conference of Neurons and Brain Disease, 2011 年 8 月 3-5 日, 富山 ANA クラウンプラザ, 富山市
- ⑦ 辻川 幸, 谷口 幸雄, 高雄 啓三, 宮川 剛, 前川 真吾, 小林 茂夫, 二宮 治明, 眞崎 知生, 垣塚 彰, 細川 浩, MAGI-1 modulates anxiety-like behavior in mice. BMB2010, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸国際会議場, 神戸市
- ⑧ Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Nakamura H, Yamasaki N, Toyama K, Komada M, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T, Deletion of Schnurri-2

causes abnormal behaviors related to schizophrenia and failure in the maturation of the dentate granule cells in mice. Neuroscience 2010, 2010年11月13-17日, San Diego, U.S.A.

- ⑨ Hagihara H, Takao K, Toyama K, Nakamura M, Takasaki A, Hashimoto K, Hayashi N, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T, Proteomic analysis of the hippocampus of animal models of psychiatric disorders. Neuroscience 2010, 2010年11月13-17日, San Diego, U.S.A.
- ⑩ Hagihara H, Kobayashi K, Ohira K, Toyama K, Takagi T, Isabella AG, Ishii S, Suzuki H, Gerald RC, Takao K, Miyakawa T, Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders. Molecular Cellular Cognition Society, 2010年11月11-12日, San Diego, U.S.A.
- ⑪ 尾之内高慶, 高雄啓三, 宮川剛, 千田隆夫, APC1638T マウスにみられる空間記憶障害. コ・メディカル形態機能学会第9回学術集会, 2010年9月11日, 新潟大学, 新潟市
- ⑫ 高雄 啓三, 松尾 直毅, 中西 和男, 山崎 信幸, 短田 浩一, 宮川剛, Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. Neuro2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場, 神戸市
- ⑬ Ohira K, Hagihara H, Toyama K, Takao K, Kanai M, Funakoshi H, Nakamura T, Miyakawa T, Expression of Tryptophan 2,3-Dioxygenase in Mature Granule Cells of the Adult Mouse Dentate Gyrus. Neuro2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場, 神戸市
- ⑭ Hagihara H, Takao K, Toyama K, Nakamura M, Takasaki A, Hashimoto K, Hayashi N, Miyakawa T, Proteome analysis of the hippocampus of animal models of psychiatric disorders. Neuro2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場, 神戸市
- ⑮ Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M, Behavioral analysis of knockout mice for F-box protein. Neuro2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場, 神戸市
- ⑯ Tanaka K, Yamazaki Y, Lee H.U, Furuya K, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K, Increase in ATP release from astrocytes results in increase in the excitability of the hippocampus.

Neuro2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場, 神戸市

- ⑰ Takao K, Nakanishi K, Miyakawa T, A brain-behavior phenotype database consisting of data derived from comprehensive behavioral analyses of genetically engineered. Neuroinformatics 2010 3rd INCF Congress of Neuroinformatics, 2010年8月30-9月1日, 神戸国際会議場, 神戸市
- ⑱ Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Toyama K, Takagi T, Graef IA, Suzuki H, Crabtree GR, Miyakawa T. Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders. 4th European Molecular and Cellular Cognition Society (EMCCS) Satellite Meeting at FENS, 4th European Molecular and Cellular Cognition Society (EMCCS) Satellite Meeting at FENS, 2010年7月1-2日, アムステルダム, オランダ
- ⑲ Takao K, Hagihara H, Ohira K, Matsuo N, Kobayashi K, Toyama K, Takagi T, Ishii S, Suzuki H, Miyakawa T, Immature dentate gyrus as a potential endophenotype for psychiatric disorders. 日本分子生物学会, 第12回春季シンポジウム, 2010年6月7-8日, 松島, 宮城県宮城郡
- ⑳ Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Matsuo N, Miyakawa T, Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. Society-Genes, Brain & Behavior 12th Annual Meeting, 2010年5月12-16日, Dalhousie University, Halifax, Canada

〔図書〕(計 1件)

- ① 高雄啓三, 服部聡子, 宮川剛, 第2章 A-10 マウスの行動解析と遺伝子, 神庭重信, 加藤忠史 編, 「専門医のための精神科臨床リユミエール 16、脳科学エッセンシャル-精神疾患の生物学的理解のために」, 中山書店, 2010, 164-166

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高雄 啓三 (TAKAO KEIZO)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・特任准教授

研究者番号: 80420397