

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500415

研究課題名(和文)代謝型グルタミン酸受容体7型を介した行動調節の分子機構の解明

研究課題名(英文)Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis is Essential for Aggression

研究代表者

時田 美和子(馬杉美和子)(Miwako, Masugi-Tokita)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10420712

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文): シナプス前膜の伝達物質放出部位近傍に存在するmGluR7に注目し、ノックアウトマウス(KO)を用いた解析を行った。mGluR7 KOでは攻撃行動が低下していた。そこで雄の尿、あるいは生食を含ませた脱脂綿を提示したところ、野生型マウスでは雄の尿の臭いをかく時間が長かったが、mGluR7 KOにはそのようなpreferenceは認められなかった。尿によって誘導されるc-fos発現を解析したところmGluR7 KOの分界条床核におけるc-fos発現が低下していた。さらに、mGluR7の選択的アンタゴニストであるMMPiPを脳の各部位に局所投与したところ、分界条床核への投与によって攻撃行動が低下した。

研究成果の概要(英文): Metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGluR7) is a member of group III mGluRs, which locates in the presynaptic active zones. Using a resident-intruder paradigm, we found a severe impairment of aggression in mGluR7 knockout (KO) mice. Since olfaction is known to be a critical component for aggressive behavior, we further employed an olfaction test and found altered urine preference in mGluR7 KO mice. Then, to clarify the olfactory processing, we analyzed c-Fos-immunoreactivity after exposure to urine, and found a remarkable reduction of neuronal activity in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) of mGluR7 KO mice. Finally, intra-BNST administration of the mGluR7-selective antagonist 6-(4-methoxyphenyl)-5-methyl-3-pyridin-4-ylisoxazolo[4,5-c]pyridin-4(5H)-one (MMPiP) also impaired aggression. These results indicate that mGluR7 works as an enhancer of excitation in the BNST and is essential to evoke olfaction-based aggressive behavior.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：分子神経生物学 攻撃行動 性行動 グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。本研究では中枢神経系に広く発現し、主にシナプス前膜の伝達物質放出部位近傍に存在する代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 7 (mGluR7) に注目した。mGluR7 は数種類の細胞に対して出力する神経細胞において、特定の細胞への出力部位にのみ局在する、標的細胞特異的な発現を示し (Shigemoto et al., Nature. 1996)、また可塑性の方向性を決めるスイッチであることが示唆されるなど (Pelkey et al., Neuron. 2005, 2006, 2008) 近年注目されているが、その生体内での役割は不明な点が多い。

研究代表者は mGluR7 遺伝子欠損マウス (mGluR7 KO) において恐怖反応 (すくみ反応) の低下、及び味覚嫌悪学習の障害という二つの異なる扁桃体依存性行動の異常を見だし (Masugi et al., J Neurosci. 1999)、さらに性行動、攻撃行動の異常についても解析をはじめた。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの研究から mGluR7 KO において、性行動、攻撃行動などの社会的行動、および恐怖反応の異常があることを見いだしている。これらの行動の異常をおこすメカニズムを多角的に解析することにより、本能行動、社会的行動に必要な神経回路、シナプスの調節機構の理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物

12-19 週齢の野性型マウスおよび mGluR7 KO の雄を使用した。すべてのマウスは個別飼いにし、明期 12 時間 (午後 10 時 ~ 午前 10 時)、暗期 12 時間 (午前 10 時 ~ 午後 10 時) の光条件下で飼育した。すべての行動実験は暗期に赤色光の下で行った。

(2) 攻撃行動

Resident-intruder パラダイムにより 15 分間の攻撃行動を一週間おきに 6 回観察した。すなわち、個別飼いした野性型あるいは mGluR7 KO (resident) のホームケージに、新規侵入者 (intruder) を入れて行動を観察する。intruder として嗅球除去により攻撃行動を抑制した ICR の雄を使用した。攻撃行動は以下のカテゴリーに区分した

Intense aggression: かみつく, 格闘

Mild aggression: 追尾, マウンティング

Sexual behavior: マウンティングして相手の体幹を前肢を用いてこする (本来雌マウスのロルドーシスを誘発するために行う性行動である)

(3) その他の社会的行動

攻撃行動の観察と同時に、以下の行動もカウ

ントした。

肛門生殖器付近をかぐ

首筋、背中など他の部分をかぐ

相手の毛繕い

(4) 嗅覚嗜好性

尿、あるいは生食を含ませた脱脂綿を同時に提示し、脱脂綿のにおいを嗅ぐ時間を計測した。

(5) 尿のにおい刺激による c-Fos の発現

尿、あるいは生食を鼻部に投与したマウスを 90 分後に灌流固定し、c-Fos の免疫組織化学を行った。野生型マウスと mGluR7 KO における副嗅球、内側扁桃核、分界条床核について発現の比較を行った。

(6) アンタゴニストの局所投与

mGluR7 特異的アンタゴニスト MMPIP の局所投与を行い、Resident-intruder パラダイムにより攻撃行動を解析した。分界条床核、内側扁桃核、側脳室にガイドカニューレ (Pastics One) を留置し、本実験の前に攻撃行動をおこすようになるまでトレーニングを行った。脳実質には 0.25 μ L、脳室には 0.25 あるいは 0.75 μ L の 5 μ g/ μ L MMPIP、コントロールには DMSO を投与した。

4. 研究成果

(1) Resident-intruder パラダイムにより攻撃行動を観察した。野性型マウスは、新規な侵入者に対して激しい攻撃行動を示したのに対し、mGluR7 KO は攻撃行動を殆ど示さなかった。また、mGluR7 KO は本来雌に対して行う性行動である、マウンティングして相手の体幹を前肢を用いてこするような行動を、侵入者の雄に対して頻繁に行った。一日目を除いて追尾やマウンティング行動には大きな違いはなかった (図 1)。

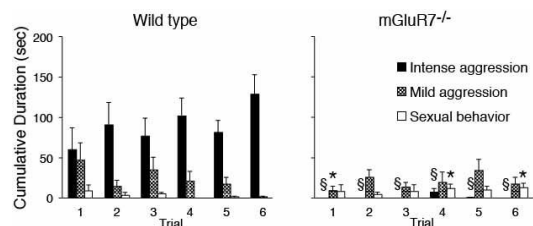


図 1 攻撃行動の観察

N = 10, *P < 0.05 vs wild types, [§]p < 0.01 vs wild types on each individual trial. Error bars indicate SEM.

(2) Resident-intruder パラダイムによる攻撃行動の観察と同時に、攻撃行動以外の社会行動についても観察した。野性型マウスは侵入者の肛門生殖器付近のにおいを頻繁にかぐのに対し、mGluR7 KO は肛門生殖器以外の首筋や背中などのにおいを頻繁にかいだ。また mGluR7 KO は侵入者の毛繕いを頻繁に行うことが観察された (図 2)。

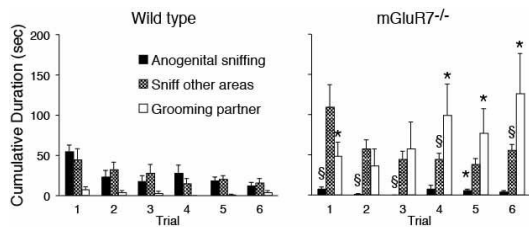


図 2 社会行動の観察

N = 10, *P < 0.05 vs wild types, §p < 0.01 vs wild types on each individual trial. Error bars indicate SEM.

(3) 尿、あるいは生食を含ませた脱脂綿を同時に提示して嗅覚嗜好性を解析した。まず、雌の尿と雄の尿を提示したところ、野性型マウスは雌の尿をかぐ時間が長いのに対し、mGluR7 KO ではその傾向が低く、嗅ぎ行動全体の時間も短かった。次に生食と雄の尿を提示したところ野性型マウスは雄の尿を嗅ぐ時間が長いのに対し、mGluR7 KO にはそのような嗜好性は認められなかった(図 3)。

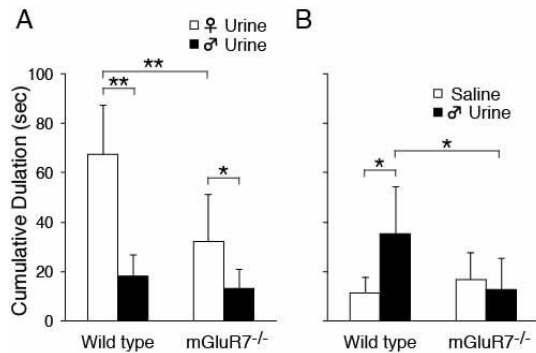


図 3 嗅覚嗜好性

N = 8 for (A), N = 7 for (B), *P < 0.05, **p < 0.01. Error bars indicate SEM.

(4) 嗅覚系では、生得的に異性や敵に対して反応する経路が決まっており、異性や敵のにおいを提示すると、それぞれに特定の脳の領域で c-Fos など最初期遺伝子が発現する(Choi et al., Neuron, 2005)。尿のにおいにより脳内の各領域で誘導される c-Fos 発現を解析した。その結果、野生型マウスと比較して、mGluR7 KO では分界条床核における c-Fos 発現が低下していた。一方、尿中に存在するフェロモンを受容する鋤鼻器から直接入力を受ける副嗅球や、副嗅球からの情報を受け取る内側扁桃体においては c-Fos の変化は観察されなかった(図 4、5)。

(5) c-Fos の発現の解析の結果をもとに、行動異常の責任部位を特定するため、mGluR7 特異的アンタゴニスト MMPIP (Suzuki et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007) の局所投与を行い、Resident-intruder パラダイムにより攻撃行動および社会行動を解析した。分界条床核に 0.25μL の 5μg/μL MMPIP を投与したところ、攻撃行動および肛門生殖器付近の嗅ぎ行動が有意に低下した。さらに、マウンテ

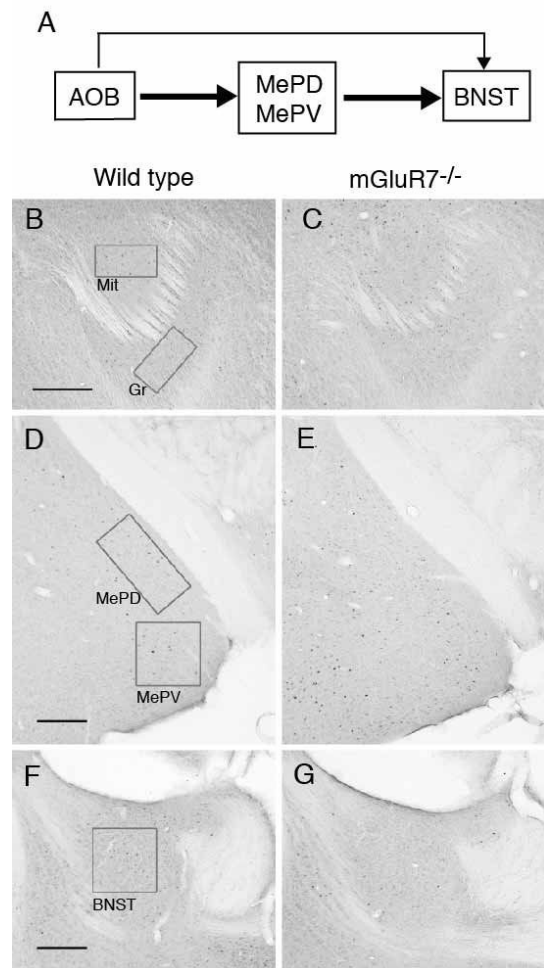


図 4 雄の尿の刺激による c-Fos の発現

(A) Schematic illustration of the flow of pheromonal information in the rodent brain. (B, C) Mitral cell layer (Mit) and Granule cell layer (Gr) of the accessory olfactory bulb (AOB). (D, E) The dorsal (MePD) and ventral (MePV) subnuclei of the posterior region of the medial amygdala. (F, G) The bed nucleus of the stria terminalis (BNST). The scale bars indicate 200 μm

イングして相手の体幹を前肢を用いてこするような行動や、侵入者に対する毛繕いなどが増加傾向にあるなど、mGluR7 KO のフェノタイプと同様の行動が観察された。内側扁桃体への投与については、カニューレの処置により攻撃行動がやや低下したが、MMPIP 投与群は DMSO 投与群とすべてのパラメータにおいて変化は観察されなかった。側脳室への 0.25μL の MMPIP の投与は、行動に影響はなかったが、0.75μL に投与量を増やしたところ、攻撃行動の低下が観察された(図 6)。

(6) mGluR7 KO における攻撃行動の異常の発見は、これまで知られていなかった mGluR7 の重要な役割を見いだしたものであり、その意義は大きい。攻撃行動は嗅覚に依存することが知られ、mGluR7 KO では尿のにおいに対する嗜好性が変化しており、尿

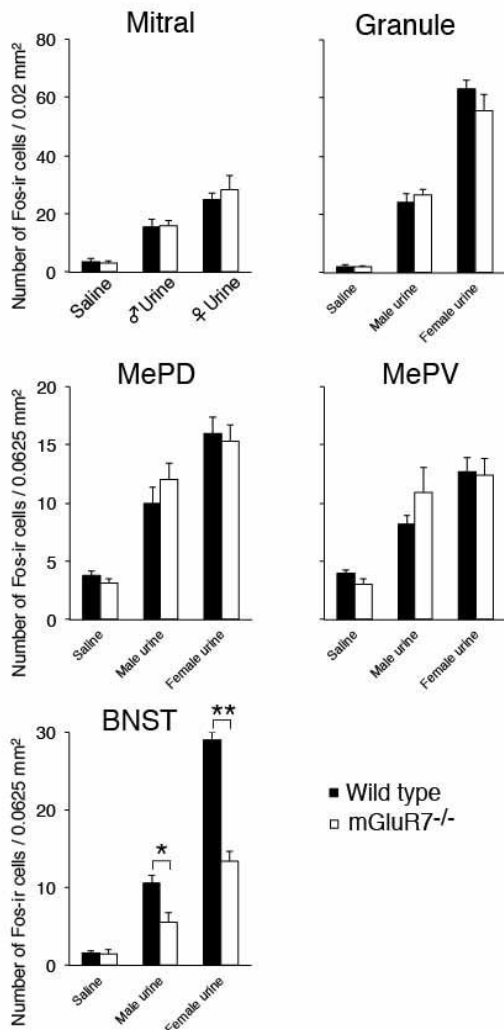


図5 尿刺激後の c-Fos 発現の変化
*P < 0.05, **p < 0.01. Error bars indicate SEM.

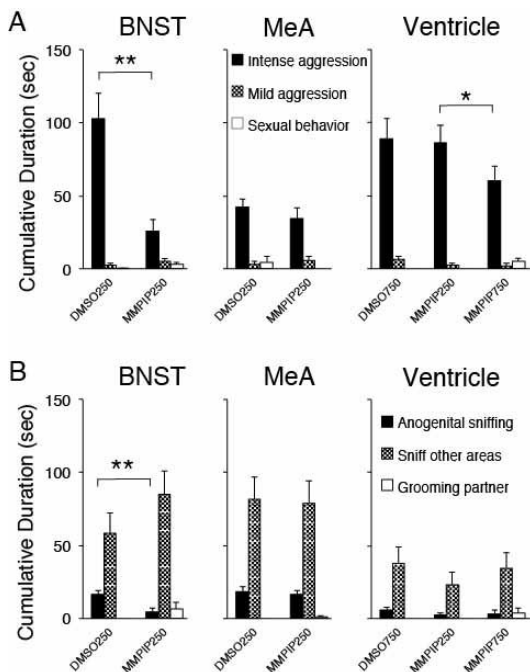


図6 アンタゴニストの影響
N = 10 for BNST, N = 7 for MeA, N = 5 for lateral ventricle; *P < 0.05, **p < 0.01. Error bars indicate SEM.

刺激による脳の各部位の c-Fos 発現が分界条床核において低下していた。これらの結果は、mGluR7 KO において尿のにおい刺激の情報伝達が分界条床核まで正しく伝わっていないことを示すものである。さらに、分界条床核における c-Fos 発現の低下と攻撃行動の低下の関係を直接示すために、分界条床核への MMPIP の局所投与を行った。MMPIP 投与による攻撃行動の低下は、分界条床核における mGluR7 がにおい刺激の情報処理にかかわっており、mGluR7 KO ではこれが障害されるために攻撃行動が低下すると考えられた。

攻撃行動は生きるために重要な行動であり、その調節メカニズムの解明には大きな意義があるが、それ以上に mGluR7 による神経回路の調節機構の解明は、神経の調節メカニズムの新しい原理の解明に結びつく可能性がある。今後は、分界条床核における mGluR7 が、攻撃行動だけでなく不安にも関与するか否か、また性行動の異常についても解析をすすめ、mGluR7 の神経回路内での役割とそのメカニズムを明らかにしたい。

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)

Wang W, Nakadate K, Masugi-Tokita M (W.W., K.N., M.M.-T., and F.S. contributed equally to this work), Shutoh F, Aziz W, Tarusawa E, Lorincz A, Molnár E, Kesaf S, Li YQ, Fukazawa Y, Nagao S, Shigemoto R. Distinct cerebellar engrams in short-term and long-term motor learning. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 111(1), 2014, E188-93. doi: 10.1073/pnas.1315541111.

Li M, Masugi-Tokita M, Takanami K, Yamada S, Kawata M. Testosterone has sublayer-specific effects on dendritic spine maturation mediated by BDNF and PSD-95 in pyramidal neurons in the hippocampus CA1 area. Brain Res. (査読有)1484, 2012, 76-84. doi: 10.1016/j.brainres.2012.09.028.

〔学会発表〕(計8件)

馬杉(時田)美和子
分界条床核における代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ7の役割
第119回 日本解剖学会総会, 2014年3月27-29日, 栃木

馬杉(時田)美和子

Regulation of aggressive behavior by metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGluR7) 「mGluR7 を介した攻撃行動発現

調節のメカニズムの解明」
第 36 回 日本神経科学大会, 2013 年 6 月
20-23 日, 京都

馬杉(時田)美和子
mGluR7 ノックアウトマウスにおける攻撃
行動の異常
第 118 回 日本解剖学会総会, 2013 年 3 月
28-30 日, 香川

馬杉(時田)美和子
Abnormal aggressive behavior and
olfactory preference in metabotropic
glutamate receptor subtype 7 knockout
mice「mGluR7 ノックアウトマウスにおける
攻撃行動と嗅覚の異常」
第 35 回 日本神経科学大会, 2012 年 9 月
18-21 日, 名古屋

馬杉(時田)美和子
Metabotropic Glutamate Receptor Subtype
7 (mGluR7)ノックアウトマウスにおける社
会的行動の異常
第 17 回 行動神経内分泌研究会, 2012 年 8
月 30-9 月 1 日, 京都

Meihua Li
Testosterone regulates hippocampal
dendritic spine morphology by enhancing
brain-derived neurotrophic factor (BDNF) -
expression level
14th International Congress of
Histochemistry and Cytochemistry, August
26-29, 2012, Kyoto

馬杉(時田)美和子
mGluR7 ノックアウトマウスにおける攻撃
行動異常の分子機構
第 117 回 日本解剖学会総会, 2012 年 3 月
26-28 日, 山梨

李美花
海馬 CA1 の錐体細胞に対するテストステロ
ンの作用: スパイン形態の変化に注目して
第 117 回 日本解剖学会総会, 2012 年 3 月
26-28 日, 山梨

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

時田 美和子(馬杉 美和子)
(TOKITA MIWAKO (MASUGI MIWAKO))
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 10420712

(2)研究分担者

坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)

岡山大学大学院・自然科学研究科・准教授
研究者番号: 20363971