

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292186

研究課題名(和文) 養育行動の分子基盤～Usp46変異マウスを活用して～

研究課題名(英文) Molecular basis of maternal behavior-using Usp46 mutant mice～

研究代表者

海老原 史樹文 (Ebihara, Shizufumi)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：50135331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：児童虐待に関する研究は、心理学や教育学などの社会科学や精神医学などの臨床医学で扱われており、動物をモデルとしてその発生機序や生理学的影響について、生物学的観点から踏み込んだ研究はこれまでにほとんど行われていない。そこで、本研究では、営巣活動や養育行動の低下を示すUsp46変異マウスをモデル動物として活用し、Usp46の細胞内機能、中枢機序及び行動発現への影響などについて検討した。その結果、仔の養育能力の形成には、親から受ける養育環境の違いが大きく影響することが明らかとなった。また、Usp46は、GABA神経系を介して様々な行動に影響を及ぼすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Biological investigation (such as using animal models) of generating mechanisms of child abuse has not been well performed although this has been treated in a field of social science (psychology and education) and clinical science (psychiatry). In this study, therefore, we examined the role of Usp46 on cellular and nervous system using Usp46 mutant mice which display poor maternal behavior. As a result, we found that the level of maternal care is transmitted to their pups and proper maternal behaviors can be shaped if adequate postpartum maternal care is given, even in genetically vulnerable mice. In addition, it is suggested that Usp46 affects several behavioral phenotypes through GABAergic system.

研究分野：動物行動生理学

キーワード：マウス 養育行動 脱ユビキチン化酵素

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、養育行動は子の生後発達のために極めて重要であり、養育行動が阻害されると成長後に様々な肉体的、精神的障害が生じることはよく知られている。ラットやマウスでは、養育期に慢性的ストレスにさらされると成長後に様々な行動異常が現れる。ヒトにおいても同様で、最近深刻な社会問題となっている児童虐待は、一時的に子供に影響を与えるだけでなく、子供が成長した後の将来にわたって継続的に影響を及ぼし、虐待が虐待を生む世代間連鎖や、虐待を受けた児童の成長後の犯罪率の高さ、うつ病などの精神疾患発症率の増加など極めて重大な影響を児童に与える。しかし、児童虐待に関する研究は、心理学や教育学などの社会科学や精神医学などの臨床医学で扱われており、動物をモデルとしてその発生機序や生理学的影響について、生物学的観点から踏み込んだ研究はこれまでにほとんど行われていない。そのため、児童虐待の発症原因の究明、予防・治療法の開発、創薬などについては未解決のままである。

2. 研究の目的

我々は、抗うつ薬の反応性を調べる強制水泳や尾懸垂テストにおいて無動化しない(絶望しない)CSマウスを発見し、遺伝学的手法により、無動行動を制御する量的形質遺伝子、*Usp46* を特定することに成功した(*Nature Genetics*, 41:688-695, 2009)。この遺伝子は、脱ユビキチン化酵素をコードしており、抑制性神経伝達物質である GABA の働きに影響を与える。そのため、無動行動だけでなく多くの行動に影響を受ける。なかでも営巣活動や養育行動への影響が顕著で、*Usp46* 突然変異マウスは巣造りがほとんど出来ず、頻繁に幼児期のマウスを傷つけたり殺したりする。しかし、この変異遺伝子(92番目のリシン(K)を欠く K92型 USP46をコードしている)は、QTL(Quantitative trait locus)解析により同定された量的形質遺伝子のため、ノックアウトマウスのような遺伝子機能の欠損効果が極端に現れる場合とは異なり、表現型への影響が比較的マイルドである。すなわち、子マウスへの殺傷行動は、*Usp46* 変異を持つ親個体の全てに見られるわけではなく、何らかのストレスが加わった親マウスに限って現れる。児童虐待は、通常は問題なく育児を行うことが出来る親が、度重なるストレスなどの劣悪環境に曝されることにより生じる(ストレス脆弱性)。この点において、*Usp46* 変異マウスは児童虐待をする親に類似している。また、*Usp46* 変異マウスの子マウスに対する殺傷行動は、繰り返して起こることが分かってきた。殺傷行動を起こした親マウスは、次に出産した子マウス対しても同じように殺傷行動を起こすことがほとんどである。しかし、殺傷行動を起こしたことがない親が次の出産で殺傷行動に至ることはまれである。こ

れは、児童虐待と極めて類似しており、ヒトの場合でも虐待は反復・継続的になされることが一般的である(虐待の継続性)。さらに、*Usp46* 変異マウスを育ての親に持つと、育てられた子マウスは遺伝的には正常にもかかわらず成長後の養育活動が有意に低下すること明らかになってきた(虐待の世代間連鎖)。そこで、本研究では、*Usp46* 変異マウスを養育行動解明のモデルとして活用し、生物学的視点から研究を行った。

3. 研究の方法

Usp46 の変異による養育行動の異常を理解するために、遺伝子から行動表現までのプロセス、すなわち(1)細胞内機能、(2)脳内中枢機能、(3)行動表現型について検討した。(1)細胞内機能：脱ユビキチン化酵素は、基質分子(標的タンパク質)の脱ユビキチン化によりその分子の安定化(分解抑制)や機能修飾を引き起こす。USP46の基質分子は不明で、それを特定することは細胞内機能解明において重要である。そこで、まず基質分子の特定に取り組んだ。(2)脳内中枢機能：USP46の変異が脳のどの領域に影響して養育行動の異常をもたらすかについて検討した。そのために、可変型遺伝子トラップ法により作製された *Usp46* ノックアウト(K0)マウス(レポーター遺伝子として LacZ 遺伝子が組み込まれている)を利用して *Usp46* の発現部位を特定するとともに、養育行動の制御中枢として知られている内側視索前野(MPOA)について養育刺激による c-Fos タンパク質発現を検討した。また、*Usp46*K0マウスの脳各部位における GABAA 受容体サブユニットの発現などについて検討した。(3)行動表現型：*Usp46* は GABA 系に影響することが分かっている。そこで、養育行動に加えて、GABA 系に関連する行動を含め、様々なテストを行い *Usp46* 変異マウスの行動特性を調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞内機能

USP46 欠損マウスの GABAA 受容体サブユニットを調べたところ、いくつかのサブユニットの mRNA 及びタンパク質の発現量がコントロールと異なっていた。特に GABAA 受容体 2 (Gabra2) では、発現が有意に上昇していた。そこで、脱ユビキチン化酵素である USP46 が Gabra2 遺伝子座プロモーター領域のヒストンユビキチン化を制御している可能性を ChIP assay にて検証したところ、ユビキチン化レベルの減少傾向が認められ、USP46 が Gabra2 遺伝子座プロモーター領域のヒストンユビキチン化を正に制御している可能性が示唆された。USP46 の脱ユビキチン化活性には WDR48, WDR20 との結合が必要であるが、USP46-WDR 複合体の細胞内局在は不明であった。そこで、BiFC assay を用いてこれを検証し、USP46-WDR 複合体は主

に細胞質に局在することを突き止めた。これまで不明であった USP46 の相互作用因子の探索を行うため、BioID assay の確立を行った。発現ベクターを作成し、USP46-ビオチン化酵素融合タンパクによる、近位タンパクのビオチン化を確認できたため、現在、質量分析による解析を進めている。

(2) 脳内中枢機能

Usp46 の発現は様々な脳部位に認められた。例えば、主嗅球系の外網状層の房飾細胞体と軸索、僧帽細胞層の僧帽細胞、内網状層の房飾細胞、顆粒細胞層の顆粒細胞、副嗅球系の僧帽細胞、大脳皮質の第4層、第5層、第6層に存在する各細胞、外側中隔の外側中隔核、分界条の分界条床核、外側嗅索の外側嗅索核、視床下部室傍の室傍核、扁桃体の扁桃体基底外側核、海馬の CA1 領域の錐体細胞層、上昇層、放射状層、網状分子層、海馬の CA2、CA3、DG 領域の錐体細胞、海馬台の海馬台神経核、小脳の顆粒細胞層にある顆粒細胞とゴルジ細胞、分子細胞層にある籠細胞、分子細胞層を上向する籠細胞と顆粒細胞の軸索などに認められた。また、養育刺激による c-Fos タンパク質の発現について検討したが、K0 マウスと野生型とで差は認められなかった。さらに、*Usp46* の GABA 神経系への影響を明らかにするために、GABA の合成系及び GABAA 受容体を構成するサブユニットについて調べた。GABA 合成系においては HPLC 及び免疫染色法を用いて GABA、GABA の前駆体であるグルタミン酸、GABA 合成酵素 (GAD67)、GABA 神経細胞のマーカー分子パルプアルブミン (PV) の発現量を解析した。その結果、いずれのマウスにおいても、各物質の発現量に変化は認められなかった。従って、*Usp46* は GABA 合成系および PV 陽性 GABA 神経細胞に対して影響を及ぼさないと考えられた。GABAA 受容体の解析においては、まず、K0 マウスの行動試験結果と各サブユニットの K0 マウスが示す行動試験結果の報告を基に比較を行い、最も *Usp46* の影響を受ける可能性が高いものを推定した。GABAA 受容体サブユニットのなかでも、2 サブユニットの発現量をウェスタンブロッティング法により解析したところ、*Usp46*K0 マウスの嗅球、大脳皮質、海馬において 2 サブユニットが有意に増加していることが明らかになった。また、4 サブユニットを定量したところ、K0 マウスの嗅球及び海馬において増加が認められた。ユビキチン化された基質タンパク質はプロテアソームによる分解を受けるが、逆に、脱ユビキチン化反応は分子の安定化 (分解抑制) を引き起こす。従って、K0 マウスでは基質タンパク質が過剰分解されると予想されるが、2 及び 4 サブユニットの発現量は予想に反して増加していた。以上の結果から、脱ユビキチン化酵素 USP46 の基質は 2 及び 4 サブユニットではなく、それらを抑制的に制御する分子である可能性が考えられた。

(3) 行動表現型

Usp46 は GABA 神経系に影響することが推定されるため、GABA 神経系が関与すると思われる行動を中心に行動解析を行なった。実施したのはアルコール (GABAA 受容体作動薬) 嗜好性及び正向反射試験、スクロース嗜好性及び反応性試験、Novelty-suppressed feeding (NSF) 試験、新奇物体認知試験などである。その結果、アルコール嗜好性及び正向反射試験において、*Usp46* 変異は GABA 神経系の反応性低下を、スクロース嗜好性及び反応性試験、NSF 試験において、うつ様または無快楽様行動を、また、新奇物体認知試験では、認知または記憶の低下をもたらすことが明らかとなった。以上の結果から、*Usp46* が GABA 神経系を介して様々な行動に影響することが示唆された。*Usp46* 変異マウスの養育能力の低下に個体差があることに着目し、養育能力の形成に遺伝要因、環境要因がどの程度寄与しているのかを検討した。これまでの養育行動の研究では、主として環境要因の違いに着目しており、遺伝要因と環境要因、及びそれらの相互作用が仔の養育能力に及ぼす影響を評価した研究はほとんど行われていない。このような養育行動の低下の原因究明は、遺伝的脆弱性と発育過程での環境要因を考慮して行われるべきであり、この点において、*Usp46* 変異マウスを用いた研究は有用なモデルとなり得る。従って、本研究では、B6 マウスと *Usp46* 変異マウスの間で里親交換処置を行い、次に C57BL/6J (B6) マウスと *Usp46* 変異マウスを正逆交配させ得られた F1 を用いた実験により、環境要因についての検討を詳細に行った。養育行動テストの結果からは、親から受ける養育環境の違いが、仔の養育能力の形成に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。B6 マウスに育てられた *Usp46* 変異マウスは、仔を温めている時間、舐める時間などが B6 マウス並みに回復した。反対に、*Usp46* 変異マウスに育てられた B6 マウスは、仔を温めている時間の減少、立ち上がり回数の増加など、養育能力の低下が確認された。これは遺伝的に脆弱なマウスも、適正な養育環境下で育てられた場合には行動異常が発現することはなく、逆に遺伝的に正常なマウスでも、劣悪な環境下で育てられた場合には、養育能力形成に問題が生じるということを示唆している。*Usp46*K0 マウスを用いて概日リズムに関する実験を行った。すなわち、*Usp46* が及ぼす概日周期、明暗サイクルを前後にずらした場合のリズムの再同調、光パルスによる位相反応及び食事同調について検討した。その結果、K0 マウスの概日周期は有意に長く、明暗サイクルへの再同調も有意に日数がかかった。また、光による位相変量は有意に小さかった。食事サイクルに対する同調では多くの K0 マウスで同調が見られた。以上の結果から、*Usp46* が概日リズムに影響を与えていることが明らかになった。

<引用文献>

1. Tomida S, et al. *Usp46* is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. *Nat Genet.*41: 688-695,2009.

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 5件)

1. Umemura S, Imai S, Mimura A, Fujiwara M, Ebihara S. Impaired maternal behavior in *Usp46* mutant mice: a model for trans-generational transmission of maternal care. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136016> (査読あり)
2. Imai S, Kano M, Nonoyama K, Ebihara S. Behavioral characteristics of ubiquitin-specific peptidase 46-deficient mice. *PLoS One.*2013;8(3):e58566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058566> (査読あり)

[学会発表](計 6件)

1. 房田郁子、繁田あずさ、今井早希、海老原史樹文. *Usp46* 突然変異が及ぼすマウス概日リズムへの影響、日本時間生物学会、2014年11月8日・9日、九州大学(福岡県・福岡市)
2. 今井早希、海老原史樹文. マウスにおける *Usp46* 変異が GABA 受容体サブユニットに及ぼす影響、Neuro2013、2013年6月20~23日、国立京都国際会館(京都府・京都)

[その他]

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~ebihara/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

海老原 史樹文 (EBIHARA, Shizufumi)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：50135331

(2)研究分担者

高田 耕司 (TAKADA, Koji)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：30179452

(3)連携研究者

加藤 尚志 (KATO, Takashi)
早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授
研究者番号：80350388