

博士論文番号:

# ニューロプシン遺伝子欠損マウスの行動学的解析

堀井 陽一郎

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座  
(塩坂 貞夫教授)

平成19年12月25日提出

# 目次

要旨	<u>3</u>
1. 序論	<u>5</u>
2. 材料と方法	<u>7</u>
2.1. 行動試験計画	
2.2. 身体的特徴と感覚運動試験	
2.3. 記憶に関連する行動試験	
2.4. 情動に関連する行動試験	
2.5. 社会行動試験	
2.6. 解析	
3. 結果	<u>14</u>
3.1. 身体的特徴と感覚運動機能	
3.2. 作業記憶試験	
3.3. 参照記憶試験	
3.4. 恐怖条件づけ試験	
3.5. 不安様行動試験	
3.6. うつ様行動試験	
3.7. 社会行動試験	
4. 考察	<u>38</u>
5. 参考文献	<u>43</u>
6. 謝辞	<u>48</u>

所属 (主指導教員)	細胞構造学講座 (塩坂 貞夫)		
氏名	堀井 陽一郎	提出	平成19年12月25日
題目	ニューロプシン遺伝子欠損マウスの行動学的解析		

#### 【研究背景】

ニューロプシン (*Neuropsin; NP*) は、カリクレインファミリーに属するセリンプロテアーゼ (*Klk8*) であり、その mRNA は海馬、扁桃体、嗅球及び前頭葉皮質に強く発現している。ニューロプシンの機能をさらに解明するために平田らによりニューロプシン遺伝子欠損マウスが作成された。ニューロプシン欠損マウスの脳を形態学的に解析すると、海馬錐体細胞が大型になり、未成熟シナプスが増加することが報告されている。また、電気生理学的解析により、ニューロプシンを低濃度培養液に加えると、海馬シェーファー側枝において長期増強 (LTP) がより強くなり、高濃度では LTP が減弱することが報告されている。更にまた、ニューロプシン欠損マウスを用いて Y 字型迷路とモリス水迷路による記憶行動実験を行うと、野生型マウスと比べて作業記憶が低下した。これらのことより、ニューロプシンはその機能の1つとして神経可塑性や記憶学習に重要な役割をはたしていることが示唆されるが、その詳細はまだ明らかとなっていない。

#### 【目的と方法】

ニューロプシンの多様な神経機能をより詳細に明らかにするために、本研究では、ニューロプシン欠損マウスを *C57/BL6* にバッククロスして遺伝的背景をできる限り同一にして、遺伝子の欠損による影響を解析した。また、マウスの個体差や実験者による影響、実験環境の差異によるデータの分散をできるだけ抑えるために、同じ実験環境において多角的に以下に述べる行動試験を行った。

#### 【結果】

第一に、ニューロプシン欠損マウスの基本的な身体的特徴と感覚運動機能には、野生型マウスと比べて顕著な異常が認められなかった。第二に、作業記憶と参照記憶におけるニューロプシンの機能を解析するために、単純な

空間知覚を要する Y 字型迷路と複雑な空間知覚を要する八方向放射状迷路とバーンズ迷路を用いて解析した。この作業記憶と参照記憶試験において、ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスと比べて記憶の記銘に障害を示した。一度強固に記憶を獲得するとその保持と想起には障害を示さなかった。第三に、記憶と情動の相互作用を解析するため、音刺激と電気刺激の条件づけによる、場所手がかり恐怖記憶試験と音刺激手がかり恐怖記憶試験を行った。その結果、ニューロプシン欠損マウスは強い情動をともなう恐怖記憶の記銘と消去に障害を示すが、一度強固に獲得した恐怖記憶の保持と想起には障害を示さなかった。第四に、不安反応におけるニューロプシンの関与を調べるために、高所による不安を課す高架式十字迷路を行った。ニューロプシン欠損マウスはオープンアームにおける滞在時間と進入回数が低下し、不安様行動の上昇を示した。さらに、うつ様症状におけるニューロプシンの機能を調べるために、尾懸垂試験を用いて高所で吊るされた時の恐怖に対する無動反応時間を測定した。その結果、ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスに比べて無動時間が増加し、不安や恐怖に対する感受性がより亢進した。第五に、社会行動試験を行うと、ニューロプシン欠損マウスは個体間の接触総時間と接触回数が有意に低下した。

#### 【考察】

ニューロプシン欠損マウスの行動解析により、ニューロプシンが記憶と情動、社会行動に重要な役割をはたしていることが明らかとなった。このことは、ニューロプシン mRNA が記憶の記銘に重要な役割をはたしている海馬、情動に中心的な役割を持つ扁桃体、社会行動に強く関与する前頭葉皮質に発現していることと整合する。また、作業記憶の記銘の障害に関しては、海馬において弱い刺激に対する初期 LTP が低下することと整合する。

本研究ではさらに、記憶と情動及びその相互作用に関し、ニューロプシン欠損マウスが強い情動を伴う恐怖記憶の記銘と消去において障害を示し、ニューロプシンが海馬のみならず扁桃体においても重要な役割をはたしていることを明らかとした。また、ニューロプシン欠損マウスは不安と恐怖に対する感受性が増大し、社会行動の低下を示すことを明らかとした。記憶と情動、社会行動におけるニューロプシンの機能の詳細をより明らかにするためには、海馬と扁桃体、前頭葉皮質においてニューロプシンの神経線維連絡を同定し、その分子機構を明らかにすることが必要であり、今後の課題として残されている。

# 1. 序論

## 1.1. 研究背景

ニューロプシン (*Neuropsin; NP*) は、カリクレインファミリーに属するセリンプロテアーゼ (*Klk8*) であり、このファミリーの相同性を用いてマウス脳 cDNA ライブラリーから塩坂らによりクローニングされた (Chen et al., 1995)。ニューロプシン遺伝子はマウスでは7番染色体、ヒトでは19番染色体上に位置する。その mRNA は海馬、扁桃核、嗅球と前頭葉皮質にとりわけ強く発現している (Chen et al., 1995)。ニューロプシン蛋白は、260 アミノ酸残基からなるプレプロニューロプシンとして翻訳され、N 末端の 28 残基が切断されプロニューロプシンとなり、さらに N 末端の 4 残基が切断され、活性型ニューロプシンとして細胞外に分泌されることが明らかとなっている (Shimizu et al., 1998)。しかしニューロプシン蛋白の詳細な局在は明らかとなっていない。ニューロプシンの基質はその分布から複数存在すると推定されるが、すくなくとも細胞接着分子 L1 を切断することが分かっている (Matsumoto-Miyai et al., 2003)。

ニューロプシンの機能をさらに解明するためにニューロプシン遺伝子欠損マウスが作成された (Hirata et al., 2001)。ニューロプシン欠損マウスの脳を光学顕微鏡で観察すると、野生型マウスと比べて海馬錐体細胞の数に顕著な差は認められないが、パルブアルブミン陽性細胞の数が錐体細胞層と上昇層において増加していた (Hirata et al., 2001)。また、海馬錐体細胞の細胞体は形態学的に細長く大きくなるが、樹状突起の分岐やスパイン密度において変化は認められなかった (Hirata et al., 2001)。電子顕微鏡による解析では、海馬シェーファー側枝が投射する放線層において非対称シナプスの減少が認められた (Hirata et al., 2001)。更にまた、CA1領域において L1 陽性の未成熟シナプス数が増加することが明らかとなった (Nakamura et al., 2006)。

野生型マウス海馬スライスを用いて電気生理学的な解析が行われた。ニューロプシンを低濃度培養液に加えると、海馬シェーファー側枝において長期増強 (LTP) がより強くなり、高濃度では LTP が減弱することが明らかとなった (Komai et al., 2000)。低濃度ニューロプシンによる LTP の増強効果は、刺激後 20 分内の初期過程においてより顕著に認められ、後期過程においては認められなかった (Komai et al., 2000; Ishikawa et al., 2008)。

次に、Y 字型迷路とモリス水迷路による記憶行動実験を行うと、ニューロプ

シン欠損マウスで作業記憶の低下が認められた(Tamura et al., 2006)。以上の結果より、ニューロプシンはその機能の1つとして神経可塑性や記憶学習に重要な役割をはたしていることが示唆される。

## 1.2. 研究の目的と意義

記憶は学習だけでなく、感情や情動、また社会行動においても重要な役割をはたしていると推察される。これらの機能や行動においてこれまでに動物実験や臨床研究において数多くの研究が行われて来た(Deutsch et al., 1962; Eichenbaum., 2000; Pawlak et al., 2005; Kalueff et al., 2006)。記憶と情動が関与する脳神経機能には多数の遺伝子や分子が関わっており、解析することは困難である。本研究では、単一の分子が記憶や情動に与える影響を調べるために、ニューロプシン欠損マウスと C57/BL6J(B6)をバッククロスして B6 を遺伝的背景にもつニューロプシン欠損マウスを作成し、単一遺伝子の欠損による影響を調べた。また、マウスの個体差や実験者による影響、実験環境の差異によるデータの分散をできるだけ抑えるために、同じ実験環境において、できる限り多くの行動試験を用いて多角的な解析を試みた。

ニューロプシンの多様な神経機能をより詳細に明らかにするために、第一に予備実験として、ニューロプシン欠損マウスの基本的な身体的特徴と感覚運動機能を測定した。第二に、作業記憶と参照記憶におけるニューロプシンの機能を解析するために、単純な空間知覚を要する Y 字型迷路と複雑な空間知覚を要する八方向放射状迷路とバーンズ迷路を用いて解析した。第三に、記憶と情動の相互作用を解析するため、単純な空間や環境を手がかりとして恐怖記憶を想起する場所手がかり恐怖記憶試験と音刺激のみから記憶を想起する音刺激手がかり恐怖記憶試験を行った。第四に、不安におけるニューロプシンの役割を調べるために、高所による不安を課す高架式十字迷路を行った。さらに、うつ様症状におけるニューロプシンの機能を調べるために、強制水泳試験を課し無動反応を示す時間を測定した。また、尾懸垂試験を用いて高所で吊るされた時の無動反応を測定した。第五に、マウス二個体間の社会行動試験を行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 行動試験計画

#### 2.1.1. 実験動物

ニューロプシン遺伝子欠損マウスは平田らが作成したものを使用し、バッククロス(N>13)には *C57BL/6J Jms Slc(B6)* (SLC, Inc., Japan)を用いた(Hirata et al., 2001)。すべての実験は同腹のニューロプシン遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いた。マウスは12時間の明暗サイクル下で自由に摂食及び摂水できる環境で飼育した。飼育は奈良先端科学技術大学院大学動物舎ガイドライン及び京都大学医学部動物施設ガイドラインに沿って行った。

#### 2.1.2. 行動試験環境

本研究では、全部で40匹の9週齢から15週齢の同腹雄マウス(20匹のニューロプシン遺伝子欠損マウス、20匹の野生型マウス)を用いた。行動実験は午前9:00から午後6:00までの間に行った。それぞれの試験後、装置は弱酸性次亜塩素酸水もしくは70%エタノールを用いて匂い手がかりを除いた。マウスの身体的特徴と感覚運動反応測定後にオープンフィールド試験、明暗箱試験、平衡感覚試験、痛覚試験、聴覚性驚愕反射試験、バーンズ迷路試験、八方向放射状迷路試験、場所手がかり恐怖記憶試験、音刺激手がかり恐怖記憶試験、高架式十字迷路、強制水泳試験、社会行動試験を京都大学動物実験施設において行った(Miyakawa et al., 2001, 2003; Arron et al., 2006; Takao et al., 2006; Ihara et al., 2007)。Y字型迷路、豊かな環境飼育、尾懸垂試験は奈良先端科学技術大学院大学動物舎において行った。

### 2.2. 身体的特徴と感覚運動試験

#### 2.2.1. 身体的特徴と感覚運動反応

まず行動試験における要因の交互作用の有無を確かめるためにニューロプシン欠損マウス及び野生型マウスの体重、直腸温、ひげの状態、基本的な身体的特徴と感覚運動反応を測定した。マウスの体毛の状態、ひげの状態

を2人の実験者が肉眼で確認し健康状態を調べた。前足の握力は(O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用い測定した。四肢握力は、マウスを金網に置きゆっくりと逆さにした後にマウスが金網から落ちるまでの時間を測定し60秒を超えたものを正常とした。耳の触覚は清潔な綿棒を用いて耳に触れた際のマウスの首の動きの有無を測定した。ひげの触覚はマウスの尻尾を固定し、尻尾の方向から綿棒でひげに触れたときの首の動きの有無を測定した。運動機能としては立ち直り反射を測定した。視力はマウスの尻尾をつまんで空中から机に近づけ、前足を伸ばす反応の有無を測定した。聴力はマウスの耳の近くで金属音を聞かせマウスの反応の有無を測定した。

#### 2.2.2. オープンフィールド試験

マウスをオープンフィールド(40 x 40 x 30 cm; Accuscan Instruments, Columbus, OH)の中央に置き120分間観察した。総移動距離、立ち上がり行動回数、フィールド中央に滞在する時間、ステレオタイプ行動を測定した。これらは活動性・探索駆動・不安様行動の指標として用いた。

#### 2.2.3. 明暗箱試験

暗箱をマウスが好む傾向を利用する明暗箱試験を行った。明暗箱装置は小原医科産業製のものをを用いた。装置は明るい箱(21×42×25 cm)と同じ大きさの暗い箱で構成され、2つの箱はドアで区切られている。実験開始前に明箱は390ルクス、暗箱は2ルクスに明るさを調整した。最初にマウスを暗い箱に入れ、10分間自由に2つの箱を行き来させ、総移動距離、明箱滞在時間、明箱と暗箱への進入回数、明箱への進入までの時間を測定した。

#### 2.2.4. 平衡能力試験

平衡能力をロータロッド(UGO Basile Accelerating Rotarod, Italy)を用いて測定した。ロータロッド試験においてはマウスを直径3cmの回転式ドラムに乗せ、回転しているドラム上から落下するまでの時間を測定した。ロータロッドの回転速度は5分間で4rpmから40rpmまで上昇させた。

#### 2.2.5. 痛覚試験

痛覚試験にはホットプレート(Columbus Instruments, USA)(55.0°C(±0.3))を用いた。マウスをホットプレートの中央に置き、マウスが初めに足上げ行動を行うまでの時間を測定した。



## 2.2.6. 聴覚性驚愕反射試験

マウスに大きな音を聞かせると驚愕反応が起こる。大きな音の前に少し大きな音を聞かせると驚愕反応が抑制される。これをプレパルス抑制といい、本研究では感覚運動統合制御と注意力を測定するために小原医科産業制装置を用いて行った。マウスをプラスチック製のシリンダーに10分間入れた後に、初期音(110 dBと120dB)のみを聞かせる2試験と初期音(74dBと78dB)とそれに続く音(110dBと120dB)をそれぞれ組み合わせた4試験を行った。初期音刺激とそれに続く音刺激の間は100秒間に設定し、音にはホワイトノイズ(40ms)を全てのテストに用いた。聴覚性驚愕反射量は140分間(1秒毎)測定した。

## 2.3. 記憶に関連する行動試験

### 2.3.1. Y字型迷路

作業記憶を測定する試験として、空間知覚の単純なY字型迷路の空間作業記憶測定課題を用いた。Y字型迷路は白いプラスチックの中央プラットフォームと3本のアーム(A, B, C)(幅10cm×高さ10cm)で構成されたものを用いた。実験ではマウスを1つのアームの端に置き8分間自由に行動させそれぞれのアームの選択を記録した。空間作業記憶は、3回の選択で全て異なるアーム(A, B または C)を選択した3アーム選択行動で表した(ACBABAB=2)。自発的交替行動率は次の式を用いて算出した。

$$\text{自発的交替行動率(\%)} = [(\text{自発的交替行動}) / (\text{総進入回数} - 2)] \times 100$$

Y字型迷路は、同一の装置を用いて作業記憶と参照記憶を測定することができる。参照記憶の測定は、2本のアームのみを探索させた後に同一の装置で3本のアームを自由に行動させ、新規アームへの訪問率を参照記憶として用いた(Dellu et al., 1997; Melikova et al., 2006)。近年の研究においてマウスはテスト最初の2分間にもっとも新しいアームに興味を示すことが報告されているため、新規アームへの訪問率はテスト3の最初の2分間で行った。

### 豊かな環境でのマウス飼育

実験に用いたマウスはC57BL/6Jを(SLC, Inc., Japan)より購入した。豊かな環境はマウスをプラスチックケージ(28 x 33 x 17 cm)に入れ、玩具(ランニン

グホイール、プラスチックトンネル、プラスチックボール)を毎日異なる組み合わせで入れることで作成した。玩具の数と組み合わせは出産後に増やした。この環境で飼育した雌マウスより生まれた5週齢の雄マウスをY字型迷路に用いた。

#### マウス海馬へのNP STOPの注入

実験には8週齢の雄のC57BL/6J (SLC, Inc., Japan)を用いた。10% etylcarbamate (Wako, Japan)/0.85%NaCl (1.86g/kg, i.p.)を用いて麻酔したマウスを、脳固定台 (Narishige, Tokyo, Japan) に固定しガイドカニューレ (Plastics One Inc., USA)を海馬CA1領域(ブレグマから0.22mm 尾側、1.0mm右側、脳表より2.3mm腹側)に埋め込んだ。埋め込み手術の10日後、シリンジポンプ(CFV-2100; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)を用いてニューロプシン特異的阻害剤であるNP STOP (Taisho Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)を流速  $0.5 \mu\text{l}/\text{min}$  で10分間、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で注入した。その5分後にY字型迷路において自発的交替行動率を測定した。

#### 2.3.2. 八方向放射状迷路の作業記憶試験

餌を報酬として用いマウスの学習意欲を高めた状態でより複雑な空間知覚を要する八方向放射状迷路を行った。八方向放射状迷路 (O'Hara & Co., Tokyo, Japan)は、白のプラスチックの床と8本のアーム(9 x 40 cm)と壁(高さ25cm)で構成し、アームは中央のプラットフォームに接続し、餌取得の確認センサーをアームの隅(深さ1.4cm、直径1.4cm)に設置した。このセンサーによりマウスのペレット摂取を自動的に記録した。迷路は床から75cmの高さに設置した。八方向放射状迷路は3種のトレーニング期間と作業記憶試験で構成した。餌の取得トレーニングの効率化のためにトレーニング前7日間でマウスの体重を通常80%から85%に減少させた。8日目以降から餌の摂取の学習のために順に3種のトレーニングを行った。1段階目のトレーニングにおいて、マウスは中央のプラットフォームからスタートさせて各アームとプラットフォームに置かれた餌を30分間(1セッション)自由に摂取させた。2段階目のトレーニングはアームの先端に餌があることを学習させるために、各アームの先端にそれぞれ置かれている餌を取る試行を全てのアームにおいて行った。このトレーニング終了後、3段階目のトレーニングを行った。8本のアームにそれぞれ餌を置き、マウスを最初に中央のプラットフォームからスタートさせ各アームに置いた8個の餌を取得させた。試験はマウスが8個の餌を全て取得するか、

試験開始後 25 分が過ぎた時点で終了した。マウスはそれぞれのアームを選択した後、中央のプラットフォームに 5 秒間滞在させた。これらのトレーニング終了後、作業記憶試験を行った。マウスが各アームに 1 個ずつ置かれた餌を 4 個取得した後、中央のプラットフォームに 1 日目 30 秒、2 日目 120 秒、3 日目 300 秒間滞在させ、残り 4 個の餌の取得について、最初の 8 回の進入で異なるアームを選択する回数と 1 度訪問したアームを再び訪問する回数を測定した。解析には Image RM software (O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いた。

### 2.3.3. バーンズ迷路

複雑な空間知覚を要する参照記憶を測定する試験としてバーンズ迷路 (O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いた。装置は 12 個の穴が等間隔に開いた白い円盤 (直径 1.0m) を床から 75cm の高さに設定し、黒のプラスチックボックス (17 x 13 x 7 cm) をひとつの穴 (ターゲット) に設置した。匂い手がかりを除くために、ターゲットの位置をそれぞれのマウスについてランダムに変更し、迷路を毎日回転させた。試験前にはターゲット位置を記憶させるトレーニングを 1 日 3 回 5 日間続けた。トレーニング開始後 7 日目にマウスが部屋の視覚手がかりからターゲットの位置を記憶していることを確認するための試験を黒のプラスチックボックスを取り外した状態で行った。確認試験の 7 日後に記憶想起試験を行いターゲットまでの到達時間とターゲットまでの移動距離、ターゲットを間違えた回数、各穴での滞在時間を測定した。

## 2.4. 情動に関連する行動試験

### 2.4.1. 恐怖条件づけ試験

ニューロプシンの記憶と情動における機能を調べるために、場所手がかり恐怖試験と音刺激手がかり恐怖記憶試験を用いた。恐怖条件づけ装置は小原医科産業製のものを用いた。それぞれのマウスを電気刺激用の鉄の棒を敷いたテストチャンバー (26 x 34 x 29 cm) に入れ 2 分間自由に探索させた後、3 回の条件づけ刺激 (CS) と無条件刺激 (US) のペアリング刺激を 2 分間隔で行った。CS には 60dB のホワイトノイズを 30 秒間提示し、US として 2 秒間 0.5mA の電気刺激を与えた。条件づけの 24 時間後に場所手がかり恐怖試験を条件づけと同一のチャンバーで行った。音刺激手がかり恐怖記憶試験を条件づけの 30 時間後と 45 日後に条件づけと異なる部屋及びチャンパー (35 x 35 x 40 cm) を用いて行った。それぞれの試験は Image FZ ソフト

(O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いて解析した。マウス行動画像データ取得は1秒毎に行われ1秒毎に1フレームで解析を行った。それぞれのフレームについてマウスの動いた面積を測定した。

#### 2.4.3. 高架式十字迷路

高架式十字迷路を不安様行動の測定に用いた(Pellow et al., 1985)。高架式十字迷路(O'Hara & Co., Tokyo, Japan)は高い開けた場所でマウスが不安を感じることを利用する試験で、2つのオープンアーム(25 x 5 cm)と同じサイズの2つのクローズドアーム(高さ15cm)から構成される。装置は白のプラスチックで、床から55cmの高さに設定した。マウスが装置から転落することを防ぐために低い壁(高さ3cm)をオープンアームの周囲に設置した。クローズドアームとオープンアームはそれぞれ同タイプのアームの反対側に設置した。実験開始時にマウスを中央エリア(5 x 5 cm)にクローズドアームに向き合うように入れた。10分間のマウスの各アームへの進入回数、オープンアームとクローズドアームにおけるそれぞれ滞在時間を記録した。解析には Image EP software (O'Hara & Co., Tokyo, Japan) を用いた。

#### 2.4.5. 強制水泳試験

強制水泳試験をうつ様行動の測定に用いた(Cryan et al., 2005b)。強制水泳装置(O'Hara & Co., Tokyo, Japan)はプラスチックのシリンダー(高さ20cm×直径10cm)を用いた。実験中のシリンダーには23℃の水を高さ7.5cmまで入れた。2日の間に2回マウスをシリンダーに入れそれぞれ10分間の無動時間と移動距離を測定した。データの解析には Image PS software (O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いた。

#### 2.4.6. 尾懸垂試験

尾懸垂試験をうつ様行動の測定に用いた(Cryan et al., 2005a)。マウスの顔が床面から10cmの高さになるように吊り下げて尻尾を固定し、5分間の無動時間を測定した。解析には Image J をベースに開発したソフトを用いた。

### 2.5. 社会行動試験

社会行動試験として、新規環境下での社会的行動試験を用いた(Miyakawa et al., 2001; File, et al., 2003)。異なるケージで飼育した2匹のマウスを新規ケージ(40 x 40 x 30 cm)に入れ10分間自由に行動させた。2

匹のマウスの接触総時間、接触回数、1回あたりの接触時間、動きながら接触した時間、総移動距離を測定した。「動きながら」の定義はマウスがお互いに接触しながら5cm長の距離を移動した場合とした。

## 2.6. 解析

### 2.6.1. 画像解析

画像解析に用いたソフトウェアは宮川らにより NIH Image をベースに開発されたものを用いた。

### 2.6.2. 統計解析

行動学実験の解析には StatView (SAS Institute, Cary, NC) を用いた。得られたデータは2要因の分散分析もしくは反復測定2元配置分散分析を用いた。グラフの値は平均 ± 標準誤差で表した。

## 3. 結果

### 3.1. 身体的特徴と感覚運動試験

#### 3.1.1. 身体的特徴と感覚運動反応

ニューロプシン遺伝子欠損マウスは同腹の野生型マウスに比べわずかに体重が増加した(図 1A;  $F_{(1, 38)} = 4.60$ ,  $p = 0.039$ )。ひげの状態、体毛の状態、ひげの触覚、耳の触覚、立ち直り反射について顕著な異常は見られなかった(表 1)。視覚試験、聴力試験(表 1)についても差は見られなかった。直腸温(図 1B;  $F_{(1, 38)} = 0.92$ ,  $p = 0.344$ )、握力(図 1C;  $F_{(1, 38)} = 0.10$ ,  $p = 0.753$ )、四肢握力(図 1D;  $F_{(1, 38)} = 0.06$ ,  $p = 0.803$ )についても差は見られなかった。

#### 3.1.2. オープンフィールド試験

新規環境下 2 時間の総移動距離、立ち上がり行動回数、フィールド中央滞在時間、ステレオタイプ行動量を測定した(図 2A;  $F_{(1, 38)} = 0.88$ ,  $p = 0.355$ ; 図 2B;  $F_{(1, 38)} = 0.027$ ,  $p = 0.87$ ; 図 2C;  $F_{(1, 38)} = 0.18$ ,  $p = 0.674$ ; 図 2D;  $F_{(1, 38)} = 3.94E-05$ ,  $p = 0.995$ )。全ての評価項目において、ニューロプシン欠損マウスと野生型マウスの間に有意な差はなく、活動性や探索行動への影響は認められなかった。

#### 3.1.3. 明暗箱試験

総移動距離、明箱での滞在時間、初めて明箱に入るまでの時間には影響は認められなかったが(図 3A(明箱):  $F_{(1, 36)} = 0.33$ ,  $p = 0.569$ ; 図 3A(暗箱):  $F_{(1, 36)} = 1.08$ ,  $p = 0.305$ ; 図 3B:  $F_{(1, 36)} = 0.009$ ,  $p = 0.925$ ; 図 3D:  $F_{(1, 36)} = 0.016$ ,  $p = 0.899$ )、明箱と暗箱への進入回数は増加した(図 3C:  $F_{(1, 36)} = 1.22$ ,  $p = 0.276$ )。

#### 3.1.4. 平衡感覚試験

平衡感覚試験としてロータロッド試験を行った(図 4A;  $F_{(1, 38)} = 3.08$ ,  $p = 0.087$ )。試験において有意差は検出できなかったが、ニューロプシン欠損マウスはトライアル 4 回目と 5 回目において落下するまでの時間が野生型マウスに比べて上昇した。

### 3.1.5. 痛覚試験

痛覚試験としてホットプレート試験を行った(図 5B;  $F_{(1, 38)} = 1.11$ ,  $p = 0.30$ )。マウスが足をホットプレートから離すまでの時間を測定した。ニューロプシン欠損マウスと野生型マウス間に有意差はなく、ニューロプシン欠損の影響は認められなかった。

### 3.1.6. 聴覚性驚愕反射試験

初期音のみにおける聴覚性驚愕反射量に有意差は認められなかった(図 5A;  $F_{(1, 38)} = 1.31$ ,  $p = 0.259$ )。プレパルス抑制についても有意な差は認められず、影響は認められなかった(図 5B(110dB);  $F_{(1, 38)} = 0.18$ ,  $p = 0.675$ ; 図 5B(120dB);  $F_{(1, 38)} = 1.49$ ,  $p = 0.230$ )。

以上をまとめると、ニューロプシン欠損マウスは身体的特徴と感覚運動反応において野生型マウスと比較して顕著な異常は認められなかった。

表 1. 身体的特徴と感覚運動反応

		野生型マウス	NP遺伝子欠損マウス
健康状態	視力	正常	正常
	聴力	正常	正常
	ひげ	正常	正常
	体毛	正常	正常
感覚運動反応	立ち直り反射	正常	正常
	耳の触覚	正常	正常
	ひげの触覚	正常	正常

野生型マウスとNP遺伝子欠損マウス各20匹を比較した。



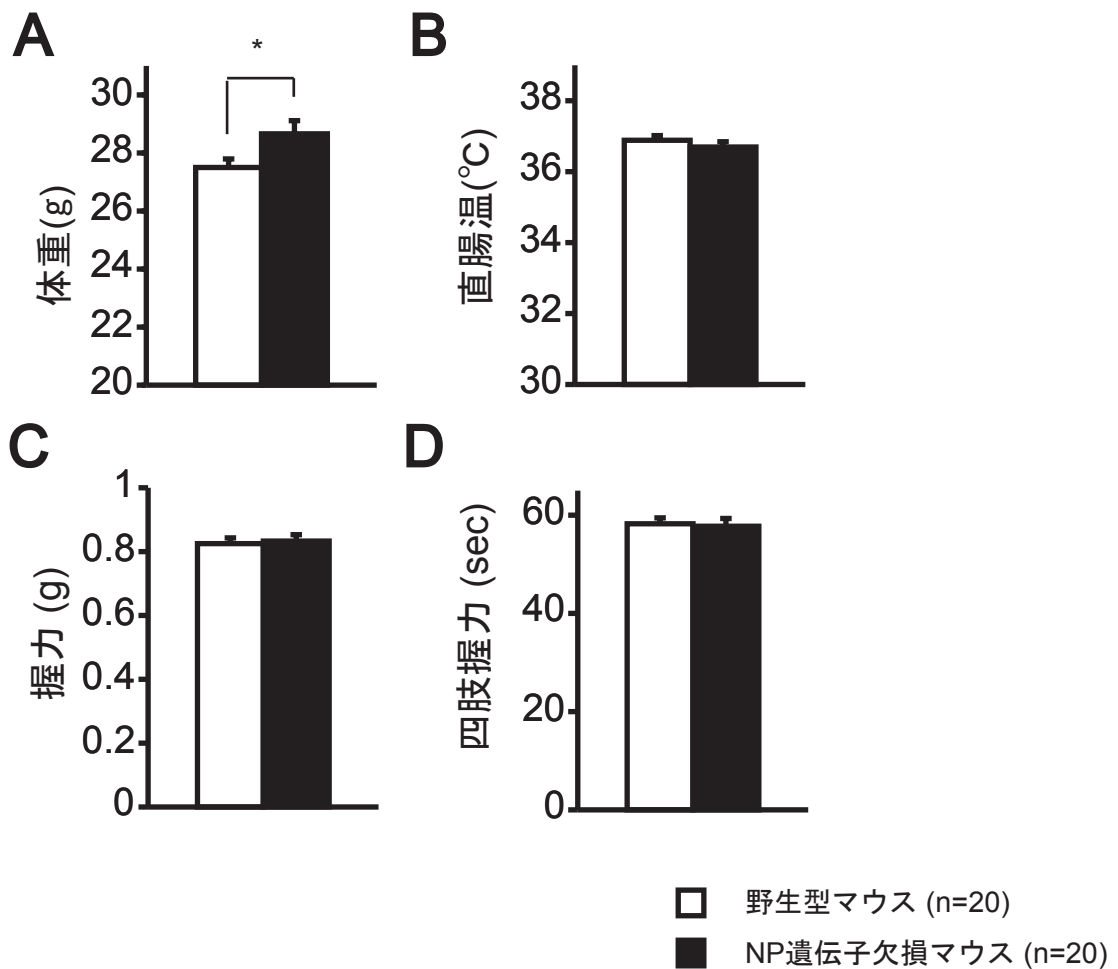
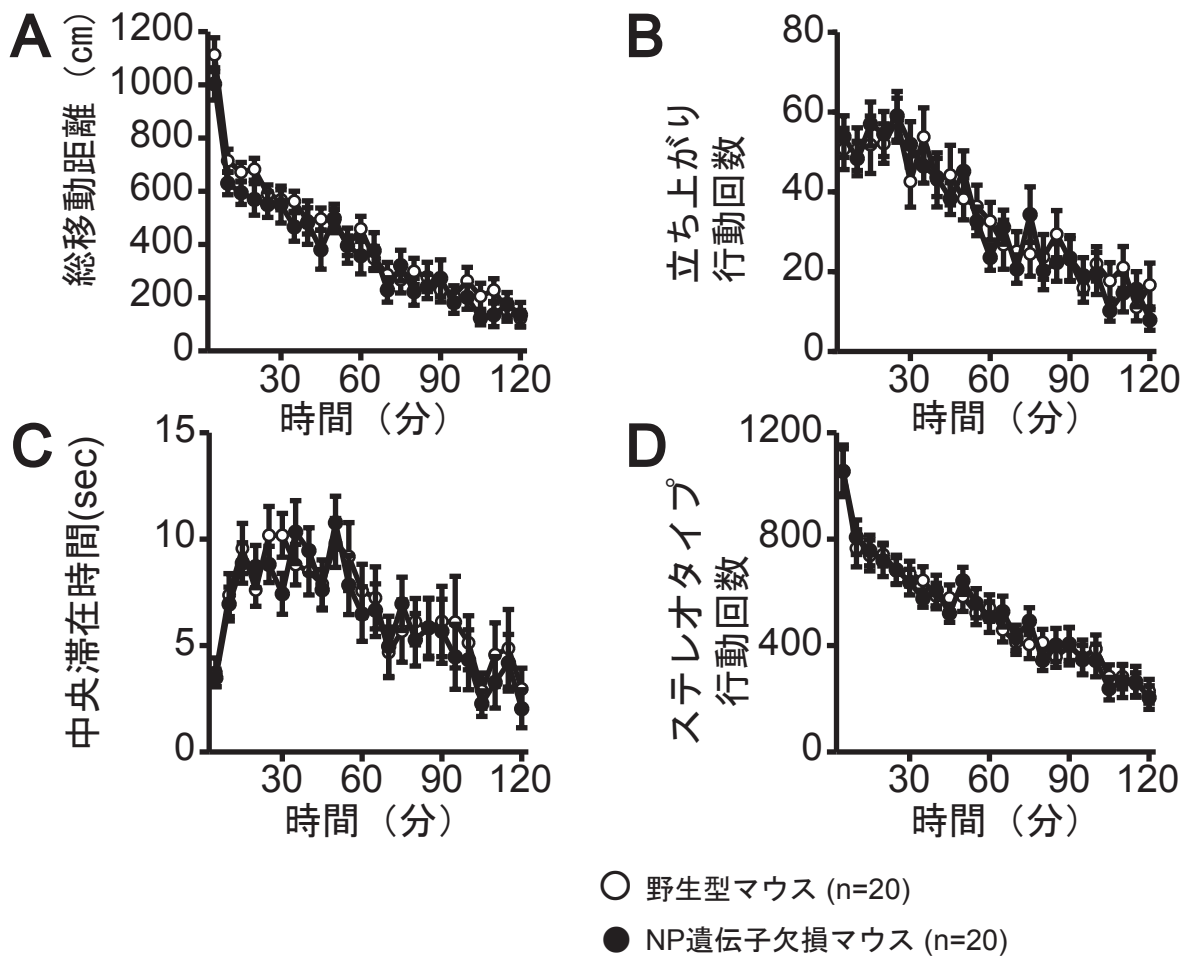


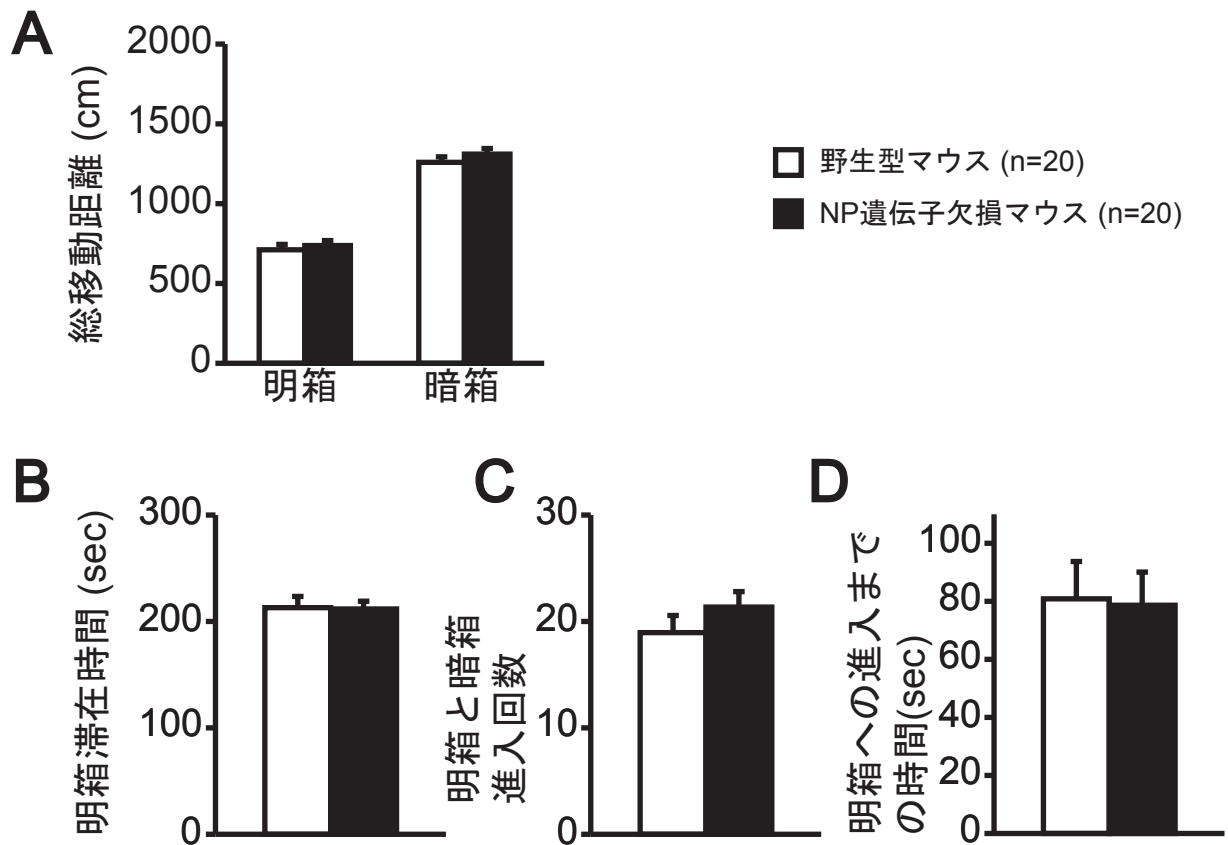
図1. 身体的特徴と感覚運動反応

- (A) 体重。体重はNP遺伝子欠損マウスにおいて有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。
- (B) 直腸温。NP欠損の影響は認められなかった。
- (C) 前足の握力。NP欠損の影響は認められなかった。
- (D) 四肢握力。逆さにした金網からの落下時間を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。



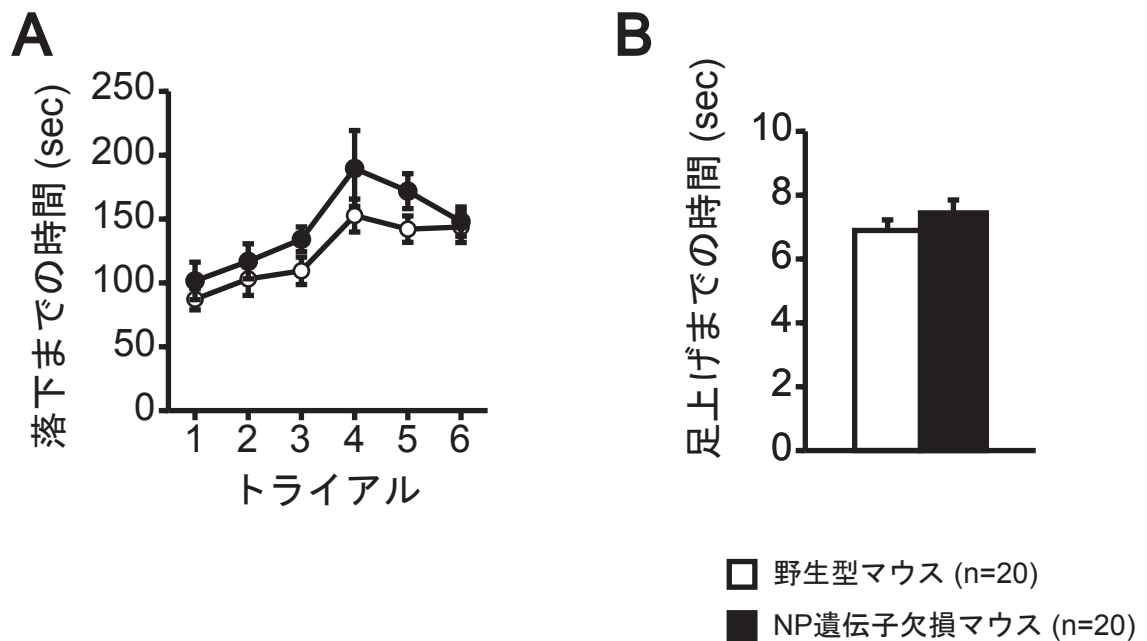
## 図2. オープンフィールド試験

- (A) 総移動距離。NP欠損の影響は認められなかった。  
 (B) 立ち上がり行動回数。不安様行動時に増加する立ち上がり行動回数に有意な差は検出できず、NP欠損の影響は認められなかった。  
 (C) フィールド中央滞在時間。不安様行動時に増加するケージ中央滞在時間に有意な差は検出できず、NP欠損の影響は認められなかった。  
 (D) ステレオタイプ行動回数。ステレオタイプ行動回数に有意な差は検出できず、NP欠損の影響は認められなかった。



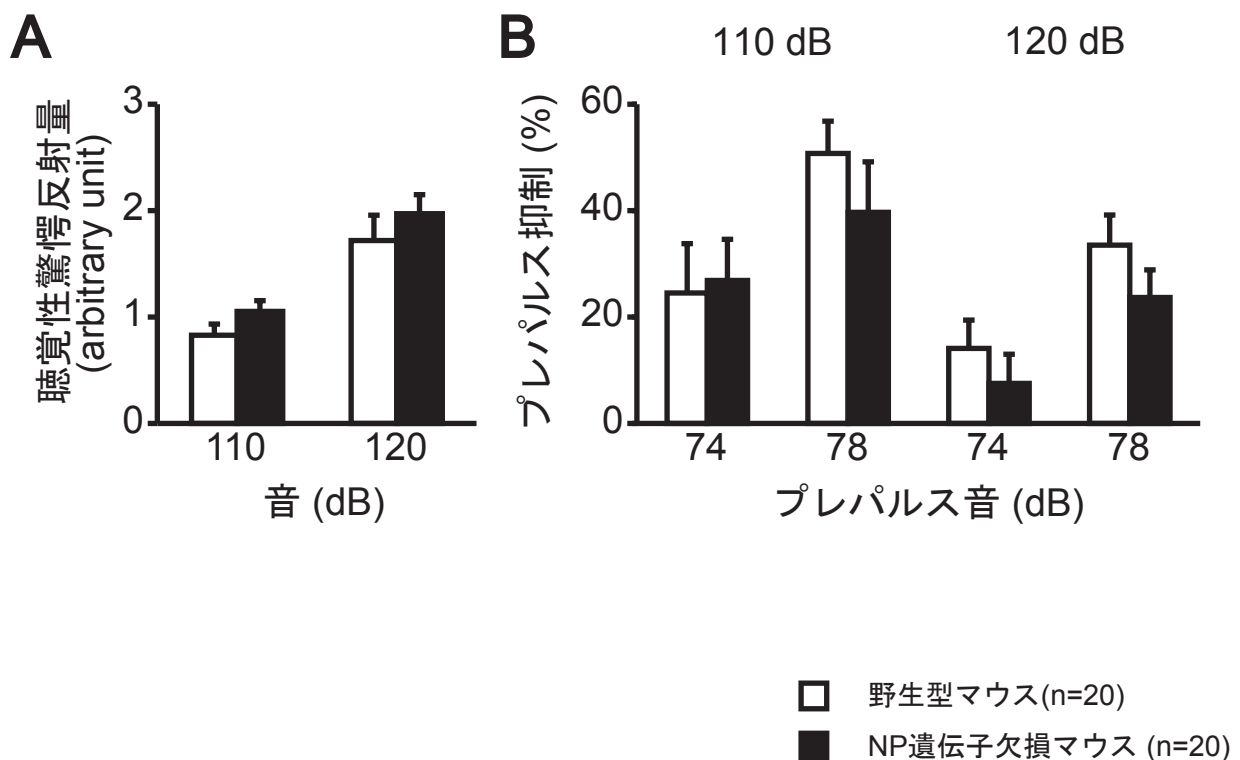
### 図3. 明暗箱試験

- (A) 総移動距離。NP欠損の影響は認められなかった。
- (B) 明箱滞在時間。NP欠損の影響は認められなかった。
- (C) 明箱と暗箱に進入する回数。有意な差は検出できなかったが、NP遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて上昇した。
- (D) 初めて暗箱から明箱に進入するまでの時間。NP欠損の影響は認められなかった。



#### 図4. 平衡感覚試験と痛覚試験

- (A) 平衡感覚試験としてロータロッド試験を用いた。回転するローターからマウスが落下するまでの時間を測定した。有意な差は認められなかったが、トライアル4と5においてNP遺伝子欠損マウスでは落下までの時間が上昇した。
- (B) 痛覚試験としてホットプレート試験を用いた。マウスが足をホットプレートから離すまでの時間を測定した。ニューロプシン欠損による影響は認められなかった。



**図5. 聴覚性驚愕反射試験**

- (A) 聴覚性驚愕反射量。110dBと120dBの音を聞かせ聴覚性驚愕反射量を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。
- (B) プレパルス抑制。74-110dB, 78-110dB, 74-120dB, 78-120dBの組み合わせで音を聞かせプレパルス抑制の値を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。

## 3.2. 作業記憶試験

### 3.2.1. Y字型迷路

ニューロプシンの作業記憶への影響を調べるために、単純な空間知覚を要するY字型迷路を行った。ニューロプシン遺伝子欠損マウスは有意に作業記憶の障害を示した(図 6A:  $F_{(1, 18)} = 7.03$ ,  $p = 0.0044$ )。アームへの総進入回数には差は認められず、作業記憶への運動量の影響は認められなかった(図 6B:  $F_{(1, 18)} = 1.36$ ,  $p = 0.542$ )。

### 3.2.2. 八方向放射状迷路

餌を報酬として用いマウスの学習意欲を高めた状態でより複雑な空間知覚を要する八方向放射状迷路を行った。八方向放射状迷路はトレーニング期間と作業記憶試験で構成した。トレーニング期間と作業記憶試験において最初の8回における異なるアームの選択回数、1度餌をとったアームに再び訪問する回数を測定したが有意な差は検出されず、ニューロプシン欠損の影響は認められなかった[図 7A(トレーニング):  $F_{(1, 38)} = 0.73$ ,  $p = 0.398$ ; 図 7A(作業記憶試験):  $F_{(1, 38)} = 0.062$ ,  $p = 0.804$ ; 図 7B(トレーニング):  $F_{(1, 38)} = 0.69$ ,  $p = 0.413$ ; 図 7B(作業記憶試験):  $F_{(1, 38)} = 1.31$ ,  $p = 0.260$ ]。

### 3.2.3. 豊かな環境

マウスを豊かな環境において飼育するとニューロプシン mRNA が扁桃体、海馬、皮質において発現上昇する(Hayashi, unpublished data)。豊かな環境飼育後のマウスと通常飼育したニューロプシン欠損マウスにおいてY字型迷路を用いて作業記憶を比較すると、豊かな環境飼育後マウスで有意に作業記憶が改善した(図 8A:  $F_{(1, 10)} = 1.09$ ,  $p = 0.02$ )。ニューロプシン欠損マウス及び野生型マウスは、各アームへの進入回数は豊かな環境での飼育後において共に低下した(図 8B: Rich+/+ vs Control,  $p = 0.018$ ; Rich-/- vs Control,  $F_{(1, 10)} = 1.87$ ,  $p = 0.041$ )。

### 3.2.4. 海馬 CA1 領域への NP STOP の注入

海馬 CA1 領域へのニューロプシン特異的阻害剤 NP STOP の投与により、Y

字型迷路における自発的交替行動率は有意に低下した(図 9A:  $F_{(1, 10)} = 0.86$ ,  $p = 0.017$ )。各アームへの総進入回数には有意な差は検出されなかった(図 9B:  $F_{(1, 10)} = 1.55$ ,  $p = 0.79$ )。

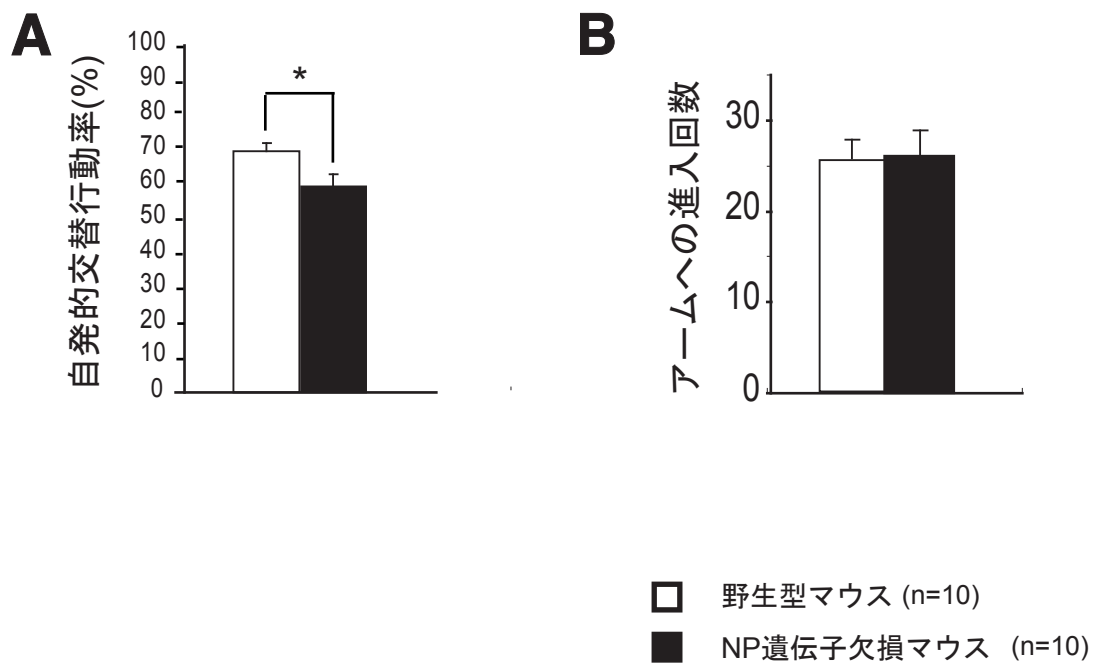


図6. Y字型迷路の作業記憶試験

- (A) 自発的交替行動率。NP遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に自発的交替行動率が低下した。(\* $p < 0.01$ )。
- (B) アームへの総進入回数。NP欠損の影響は認められなかった。



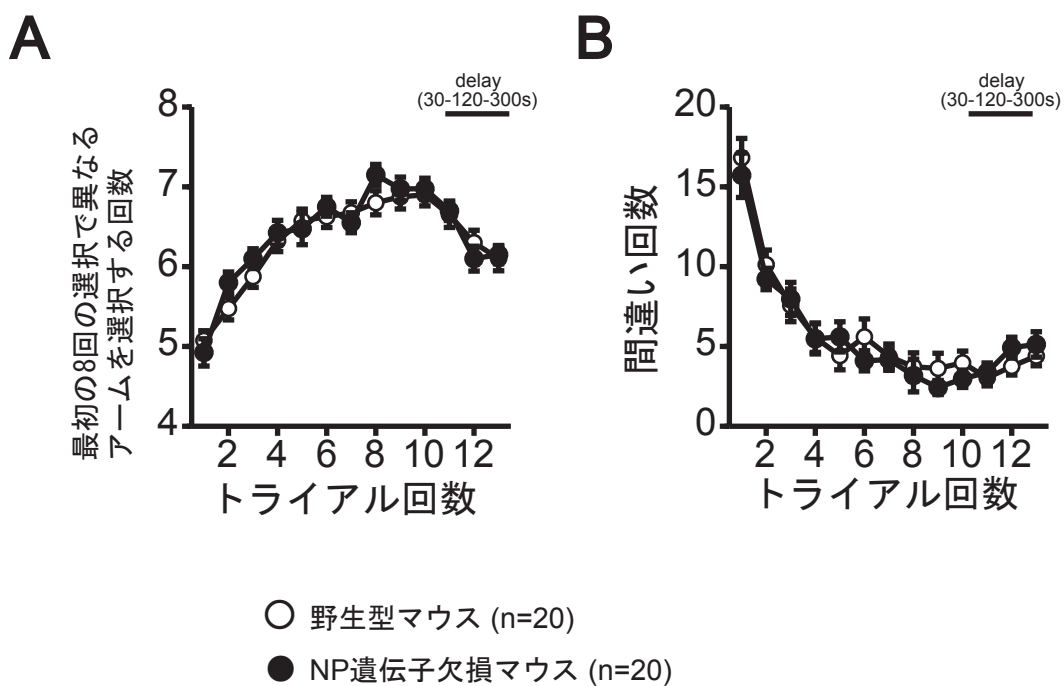
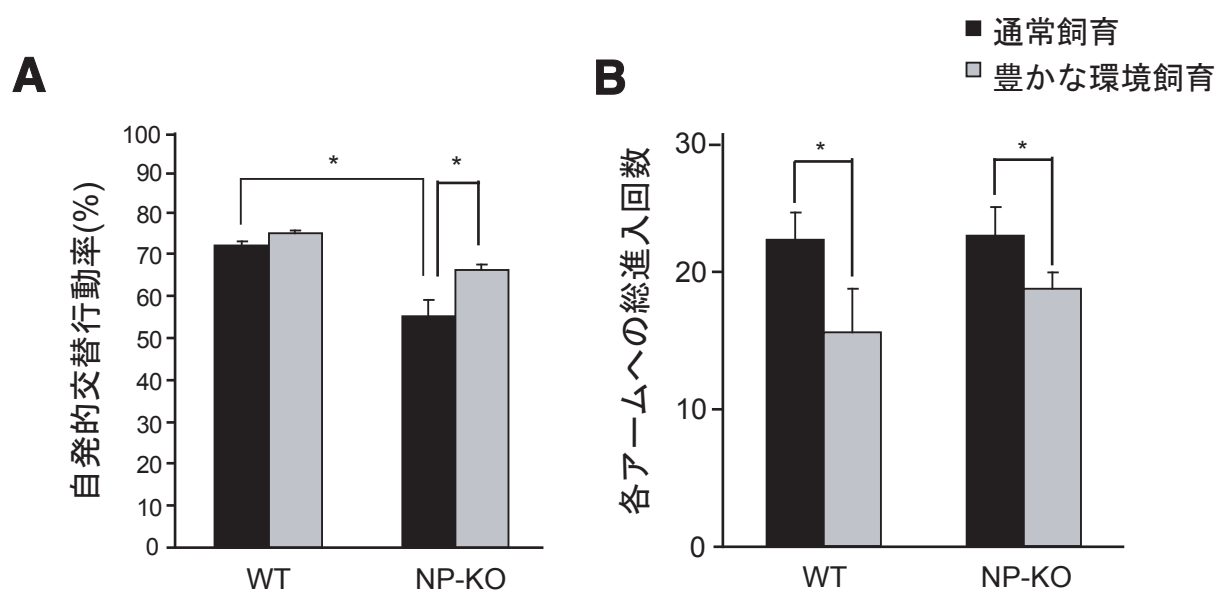


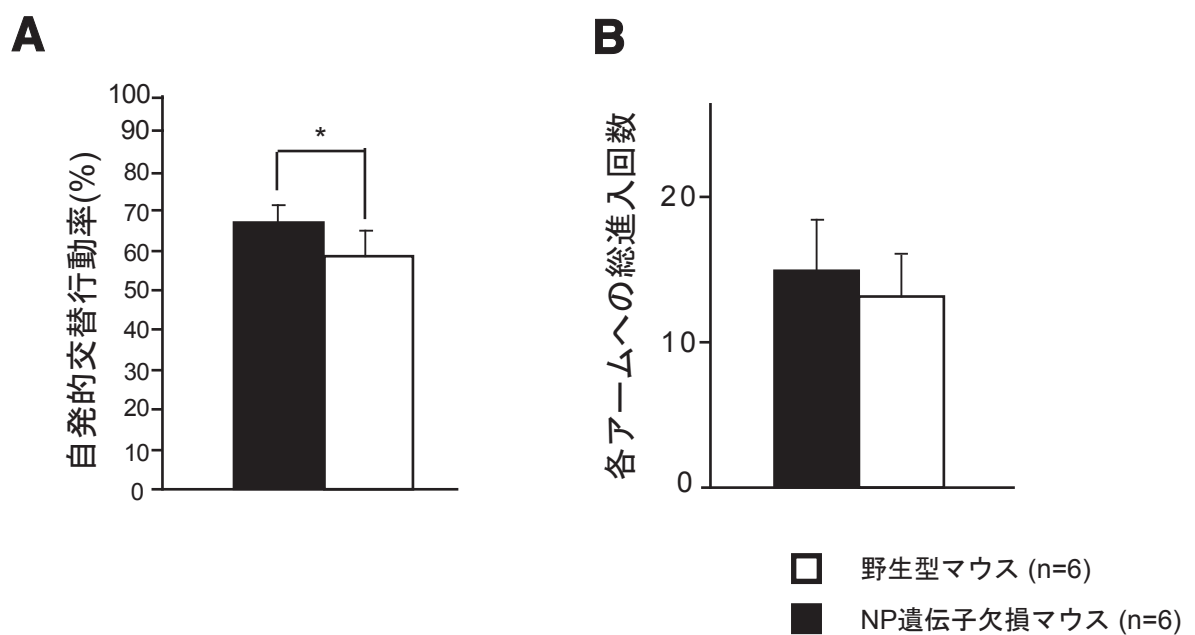
図7. 八方向放射状迷路

- (A) 課題開始後8回の選択中に異なるアームを選択する回数。トライアル間（1-10トライアル）と作業記憶課題期間（11-13トライアル）について測定した。NP欠損の影響は認められなかった。
- (B) 1度訪れたアームを再び訪問した回数。トライアル間（1-10トライアル）と作業記憶課題期間（11-13トライアル）について測定した。NP欠損の影響は認められなかった。



### 図8. 豊かな環境飼育後のY字型迷路

- (A) 自発的交替行動率。豊かな環境及び通常のケージで飼育したマウスを用い、Y字型迷路において自発的交替行動率を測定した。NP遺伝子欠損マウスは作業記憶が向上した（野生型マウス n=6, NP遺伝子欠損マウス n=6, \* $p < 0.05$ ）。
- (B) 各アームへの総進入回数。豊かな環境及び通常のケージで飼育したマウスにおいてのY字型迷路の各アームへの総進入回数を測定した。豊かな環境で飼育したマウスでは低下した（野生型マウス n=6, NP遺伝子欠損マウス n=6, \* $p < 0.05$ ）。



### 図9. 海馬CA1領域へのNP STOPの注入

- (A) 自発的交替行動率。海馬CA1領域へのNPSTOP投与後、Y字型迷路で自発的交替行動率を測定した。ニューロプシン遺伝子欠損マウスにおいて有意に低下した (\* $p < 0.05$ )。
- (B) 各アームへの総進入回数。NP欠損の影響は認められなかった。

### 3.3. 参照記憶試験

#### 3.3.1. Y字型迷路

単純な空間知覚を要する参照記憶試験として Y 字型迷路を用いた。ニューロプシン欠損マウスでは野生型マウスと比べて、新規アームへの訪問率とアームへの侵入回数に有意な差は認められなかった(図 10A:  $F_{(1, 18)} = 0.94$ ,  $p = 0.618$ ;  $F_{(1, 18)} = 1.36$ ,  $p = 0.542$ )。

#### 3.3.2. バーンズ迷路

ニューロプシンの参照記憶への影響を調べるためにより複雑な空間知覚を要するバーンズ迷路を行った。確認テストにおけるターゲット周辺での滞在時間、トレーニング期間におけるターゲットへの到達時間、トレーニング期間におけるターゲットの間違い回数を測定したが有意な差は検出できなかった(図 11A:  $F_{(1, 38)} = 0.17$ ,  $p = 0.685$ ; 図 11B:  $F_{(1, 38)} = 0.002$ ,  $p = 0.961$ ; 図 11C:  $F_{(1, 38)} = 1.38$ ,  $p = 0.248$ )。トレーニング終了の7日後に参照記憶を測定したが有意な差は検出できず、ニューロプシン欠損の影響は認められなかった(図 11D:  $F_{(1, 38)} = 0.057$ ,  $p = 0.812$ )。

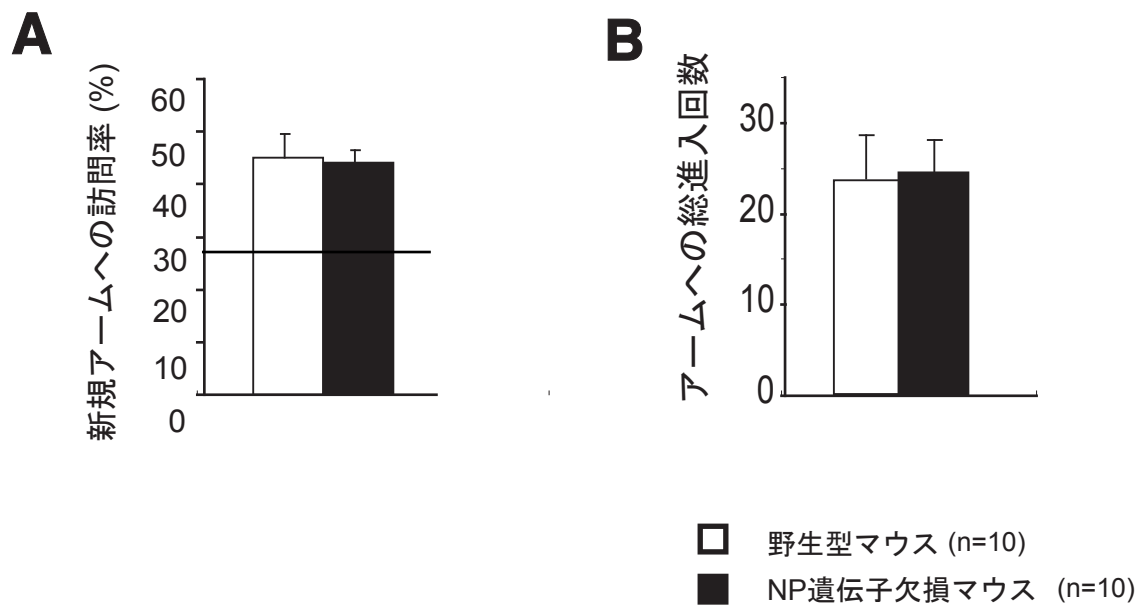


図10. Y字型迷路の参照記憶試験

- (A) 新規アームへの選択率。参照記憶を測定する指標として用いた約33%のチャンスレベルに対して2系統とも上昇し有意な差は認められなかった。(野生型マウス, n=10; NP遺伝子欠損マウス, n=10)。
- (B) 総進入回数。NP欠損の影響は認められなかった。

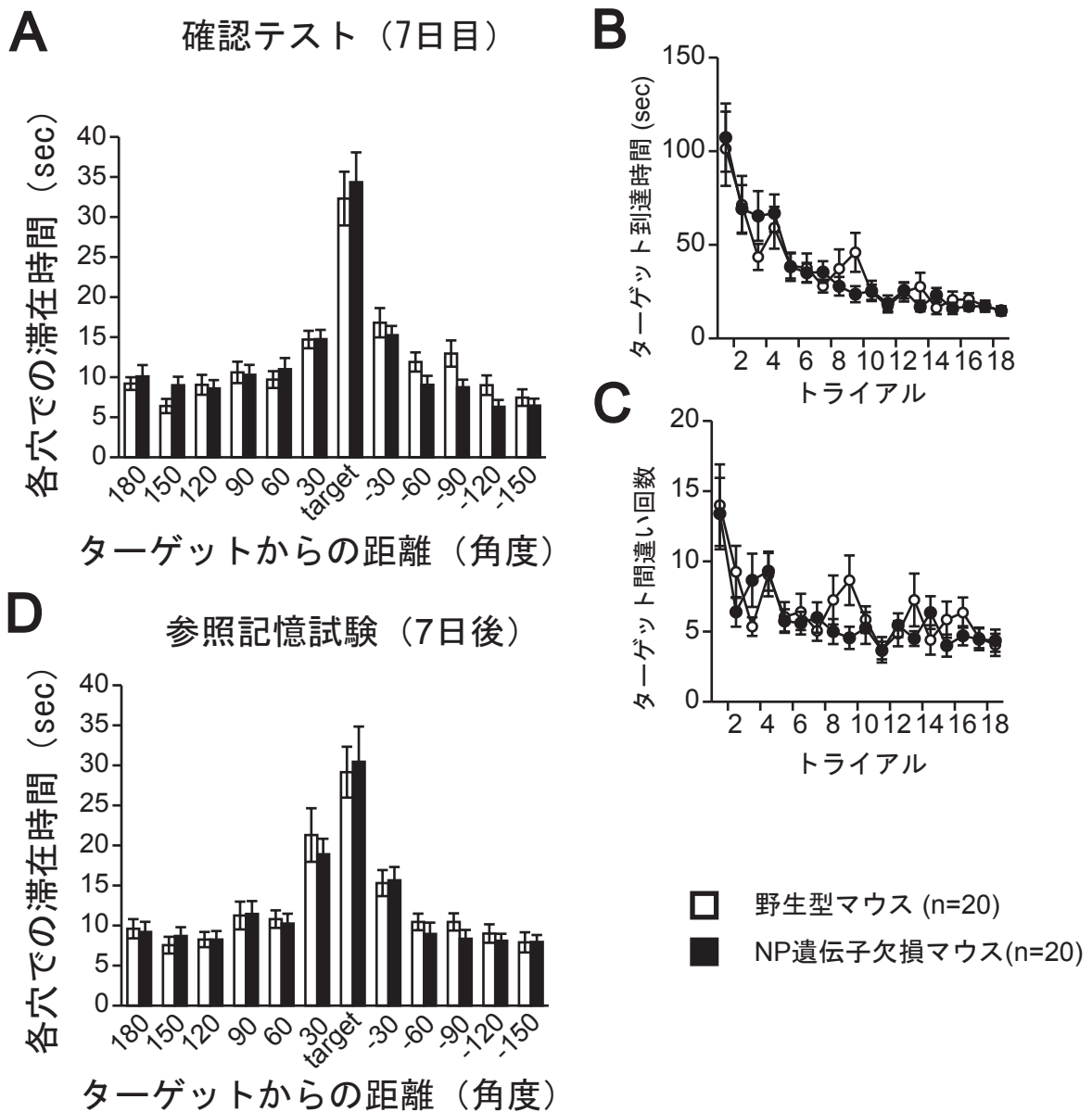


図11. バーンズ迷路

- (A) 確認テスト。18回のターゲット位置記憶の確認テストで各目標に周辺で滞在した時間を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。
- (B) ターゲット到達時間。トライアル間の正しいターゲットへの到達時間を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。
- (C) ターゲット間違い回数。トライアル間の初回のターゲット選択の間違い回数を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。
- (D) 参照記憶試験。確認テスト7日後に正しいターゲット位置の記憶について各目標に周辺で滞在した時間を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。

### 3.4. 恐怖条件づけ試験

#### 3.4.1. 恐怖条件づけ

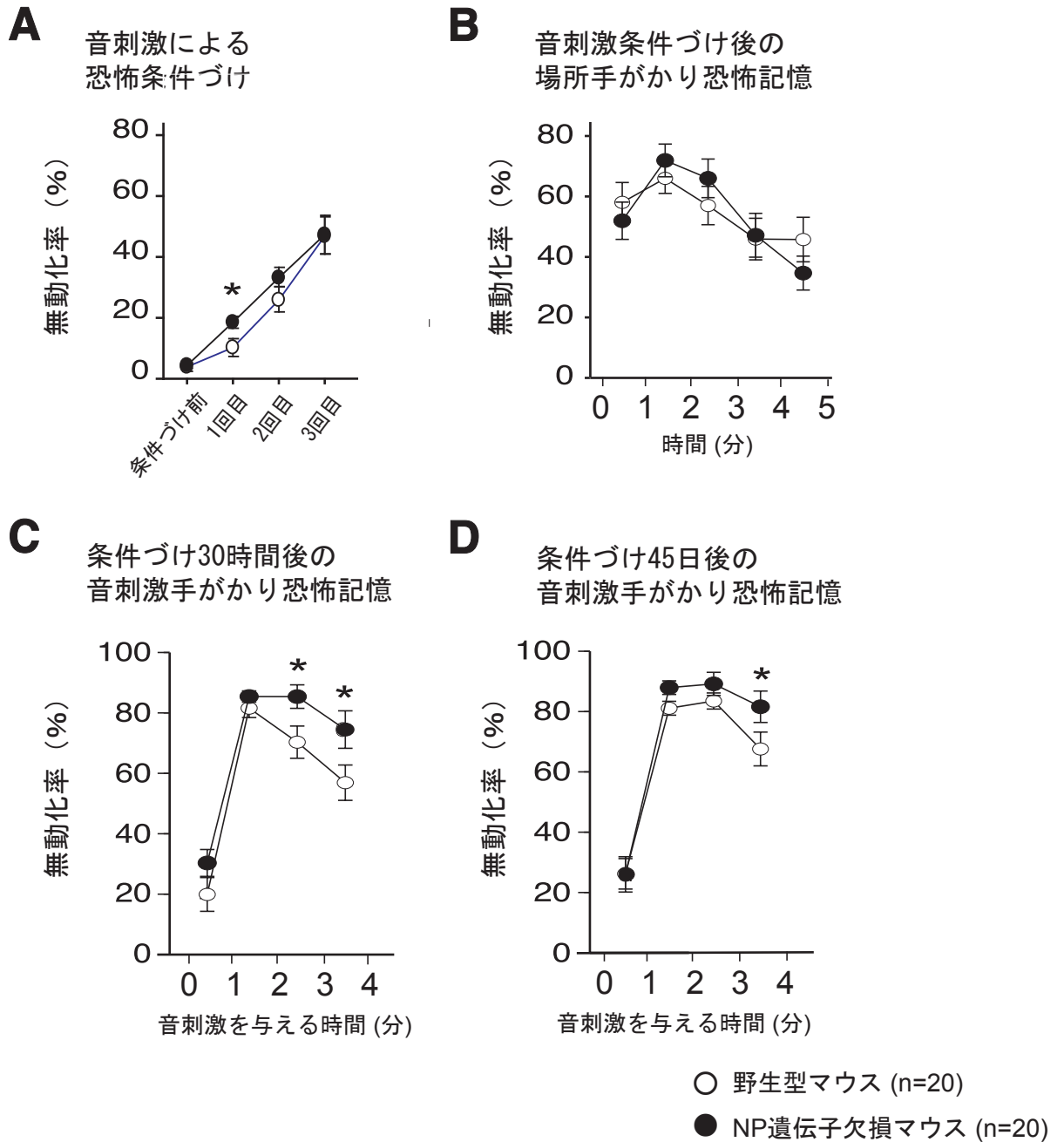
ニューロプシンは海馬と扁桃体に特徴的に強く発現していることから、記憶と情動の交互作用について調べるために恐怖条件づけ試験を行った。30秒間音を聞かせた後、床に電気刺激(0.5mA、2秒間)を与えるペアリング刺激を3回用い単位時間あたりの無動化率を測定した。条件づけ1回目の後にニューロプシン欠損マウスは野生型マウスと比べて無動化率の低下が認められた(図12A(1回目):  $F_{(1, 38)} = 4.88, p = 0.028$ )。2回目でその差は小さくなり、最終的に3回目では条件学習に差は認められなかった(図12A(2回目):  $F_{(1, 38)} = 1.29, p = 0.164$ ; 図12A(3回目):  $F_{(1, 38)} = 0.23, p = 0.955$ )。

#### 3.4.2. 場所手がかり恐怖記憶試験

恐怖条件づけの24時間後、同じケージマウスを入れ、場所を手がかりに恐怖記憶を想起するかを検査した。この試験において、ニューロプシン欠損マウスと野生型マウスの間で無動化率に有意な検出されず、場所から想起される恐怖記憶に差は認められなかった(図12B:  $F_{(1, 38)} = 0.001, p = 0.976$ )。

#### 3.4.3. 音刺激手がかり恐怖記憶試験

一方、条件づけ30時間後と45日後に条件づけに用いたものと異なるケージと実験部屋で、音のみから恐怖記憶を想起させる音刺激手がかり恐怖記憶試験を行った。30時間後においてニューロプシン欠損マウスでは野生型マウスに比べて音を聞かせた1分後の無動化率に差は認められなかったが、野生型マウスがそれ以降の無動化率が低下するのに対して、ニューロプシン欠損マウスでは無動化率の低下が遅くなった(図12C:  $F_{(1, 38)} = 5.19, p = 0.028$ )。この傾向は45日後においても認められた(図12D:  $F_{(1, 38)} = 3.51, p = 0.069$ )。



**図12. 音刺激と電気刺激による恐怖記憶試験**

- (A) 音刺激と電気刺激による恐怖条件付け。30秒間音を聞かせた後に2秒間の電気刺激を与えるペアリング刺激を3回与えた。条件づけ1回目においてNP遺伝子欠損マウスでは無動化率の低下が認められた(\*  $p < 0.05$ )。二回目は差が小さくなり、最終的には同一レベルの条件づけがなされた。
- (B) 音刺激後1分毎に電気刺激を与えた場所により想起する恐怖記憶。条件づけから24時間後に同じケージで無動化率を測定した。NP欠損の影響は認められなかった。
- (C) 音刺激のみから想起する恐怖記憶。条件づけから30時間後に測定した。NP欠損マウスにおいて有意に無動化率の低下が遅くなった(\*  $p < 0.05$ )。
- (D) 音刺激のみから想起する恐怖記憶。条件付け試験から45日後に測定した。NP欠損マウスにおいて無動化率の低下が遅れる傾向が認められた。(\*  $p < 0.05$ )。



### 3.5. 不安様行動試験とうつ様行動試験

#### 3.5.1. 高架式十字迷路

ニューロプシンと不安の関連を明らかにするために、高架式十字迷路を用いて高所と開けた場所に対する不安様行動試験を行った。ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスに比べて、オープンアームでの滞在時間が有意に低下した(図 13A:  $F_{(1, 36)} = 4.61, p = 0.039$ )。オープンアームへの侵入回数についてもニューロプシン欠損マウスにおいて進入回数の増加が認められたが、有意な差は検出されなかった(図 13B:  $F_{(1, 36)} = 1.67, p = 0.204$ )。アームへの総進入回数と総移動距離には有意な差は認められず、両群で差は認められなかった(図 13C:  $F_{(1, 36)} = 1.24, p = 0.272$ ; 図 13D:  $F_{(1, 36)} = 1.51, p = 0.228$ )。

#### 3.5.2. 強制水泳試験

不安や恐怖に対するニューロプシン欠損の影響が認められたことから、マウスにとって比較的弱い恐怖を与える強制水泳試験を用いて、ニューロプシン欠損マウスのうつ様行動について検査した。この試験において、2日間2回の試験での無動時間、総移動距離を測定したが野生型マウスと比べて有意な差は検出されず、影響は認められなかった(図 14A(1日目):  $F_{(1, 38)} = 0.04, p = 0.839$ ; 図 14A(2日目):  $F_{(1, 38)} = 2.82E-04, p = 0.987$ ; 図 14B(1日目):  $F_{(1, 38)} = 0.082, p = 0.777$ ; 図 14B(2日目):  $F_{(1, 38)} = 0.10, p = 0.750$ )。

#### 3.5.3. 尾懸垂試験

より強い恐怖をマウスに与える尾懸垂試験を用いてマウスを高所で吊るして強い恐怖を与えた。ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスに比べて無動時間が有意に上昇した(図 14C:  $F_{(1, 38)} = 0.04, p = 0.228$ )。強制水泳試験と尾懸垂試験の2種のうつ様試験はそれぞれ抗うつ薬やマウスの系統により症状の変動があることが報告されている(Cryan et al., 2005a, 2005b)。

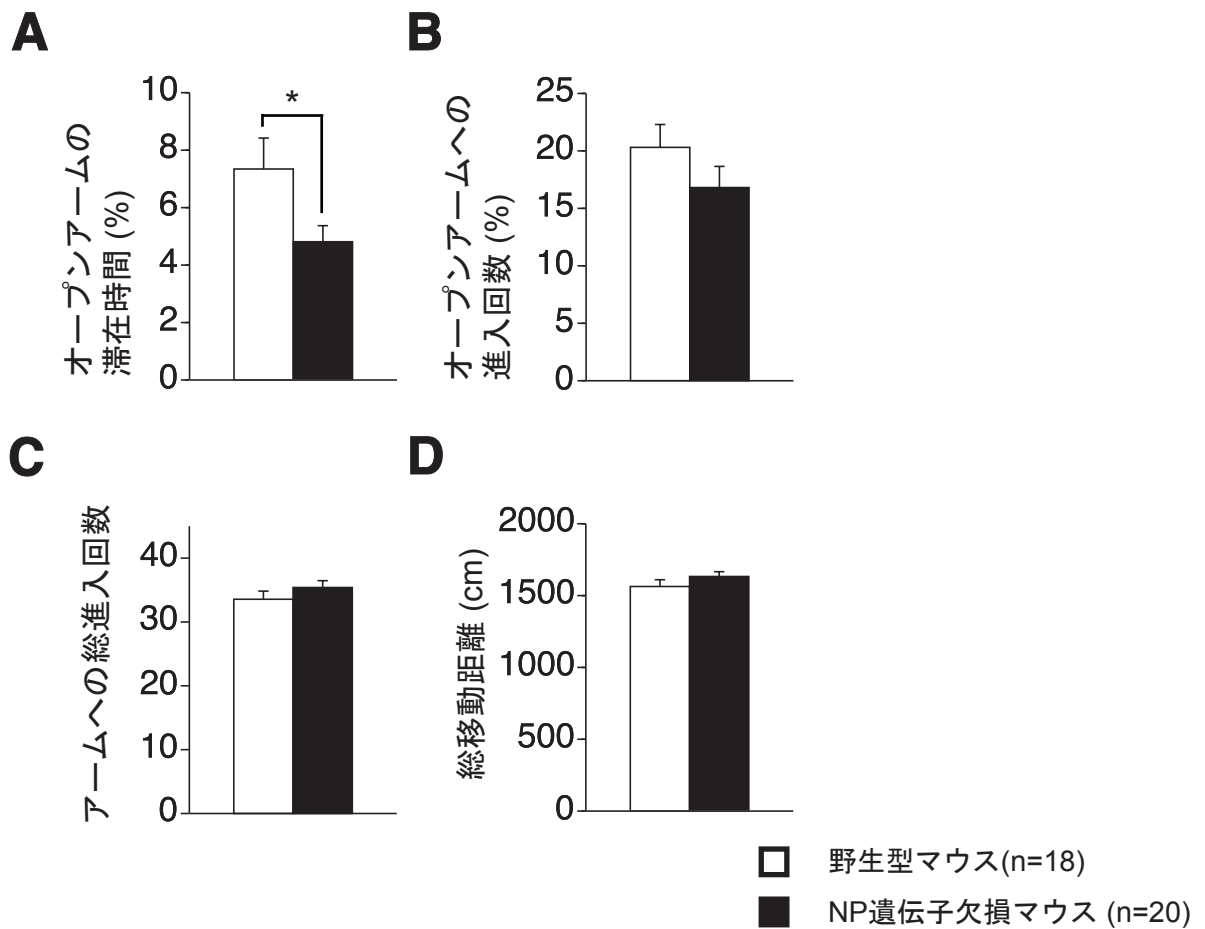


図13. 高架式十字迷路

- (A) オープンアームでの滞在時間。NP遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて滞在時間が有意に減少した (\* $p < 0.05$ )。
- (B) オープンアームへの進入回数。有意な差は検出できなかったが、NP遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて減少した。
- (C) 各アームへの総進入回数。NP欠損の影響は認められなかった。
- (D) 総移動距離。NP欠損の影響は認められなかった。

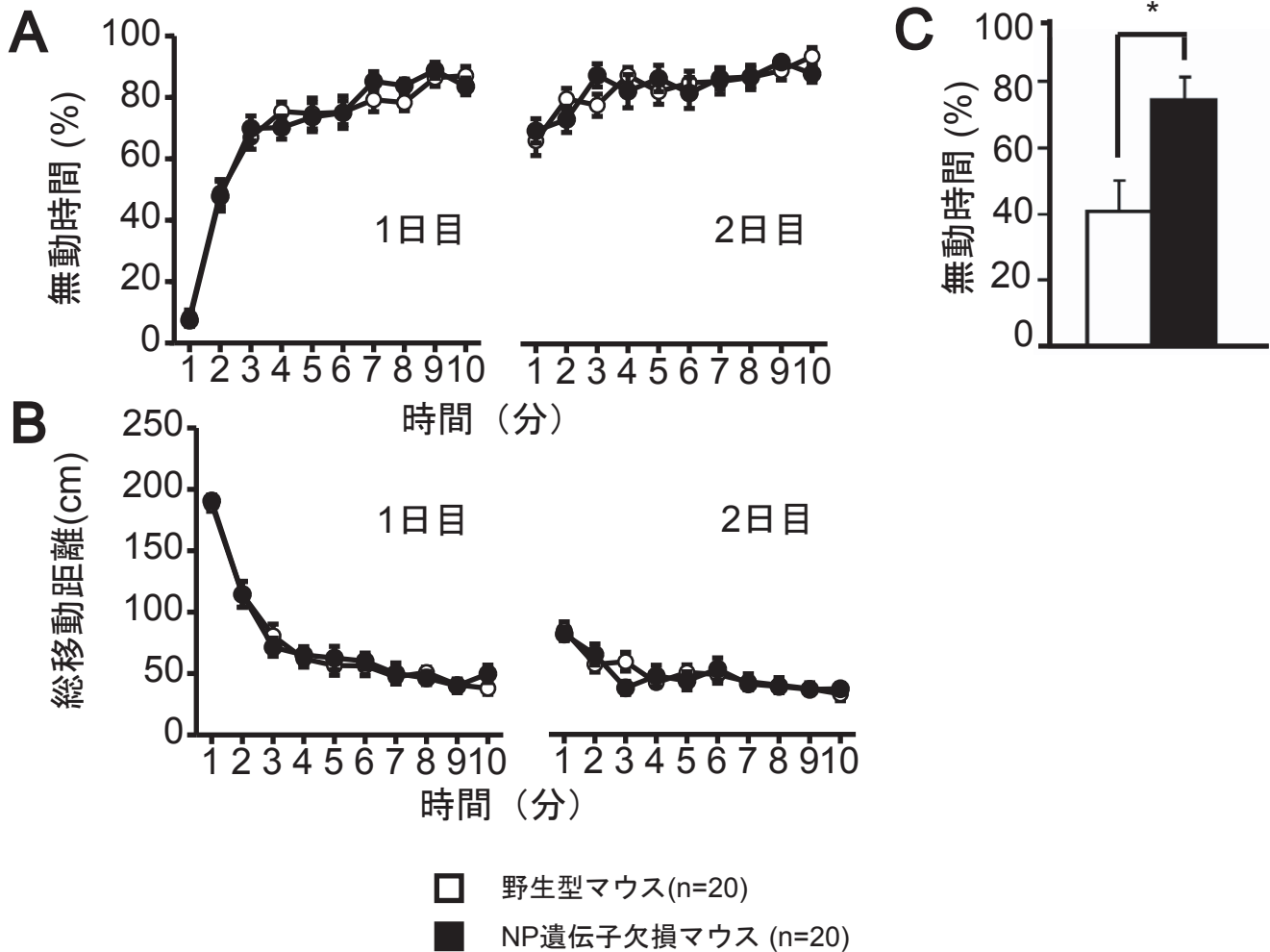


図14. 強制水泳試験と尾懸垂試験

- (A) 移動距離。強制水泳試験における移動距離。NP欠損の影響は認められなかった。  
 (B) 無動時間。強制水泳試験における無動時間。NP欠損の影響は認められなかった。  
 (C) 無動時間。尾懸垂試験における無動時間。うつ様行動時に増加する。NP遺伝子欠損マウスにおいて有意に無動時間が上昇した(野生型マウス n = 9, NP遺伝子欠損マウス n = 8, \*p < 0.05)。

### 3.6. 社会行動試験

ニューロプシン欠損マウスにおいて新規環境中でこれまでに接したことのない2匹のマウスの社会行動を測定した。接触総時間が減少し、1回あたりの接触時間が有意に減少した(図 15A:  $F_{(1, 18)} = 6.87, p = 0.017$ )。接触回数と動きながらの接触回数において有意な差は検出されず、ニューロプシン欠損の影響は見られなかった(図 15A:  $F_{(1, 18)} = 2.80, p = 0.116$ ; 図 15B:  $F_{(1, 18)} = 0.94, p = 0.345$ )。総移動距離については上昇が認められた(図 15C:  $F_{(1, 18)} = 3.08, p = 0.096$ )。これらのことから、ニューロプシンはマウスの社会的行動に関与することが示唆された。

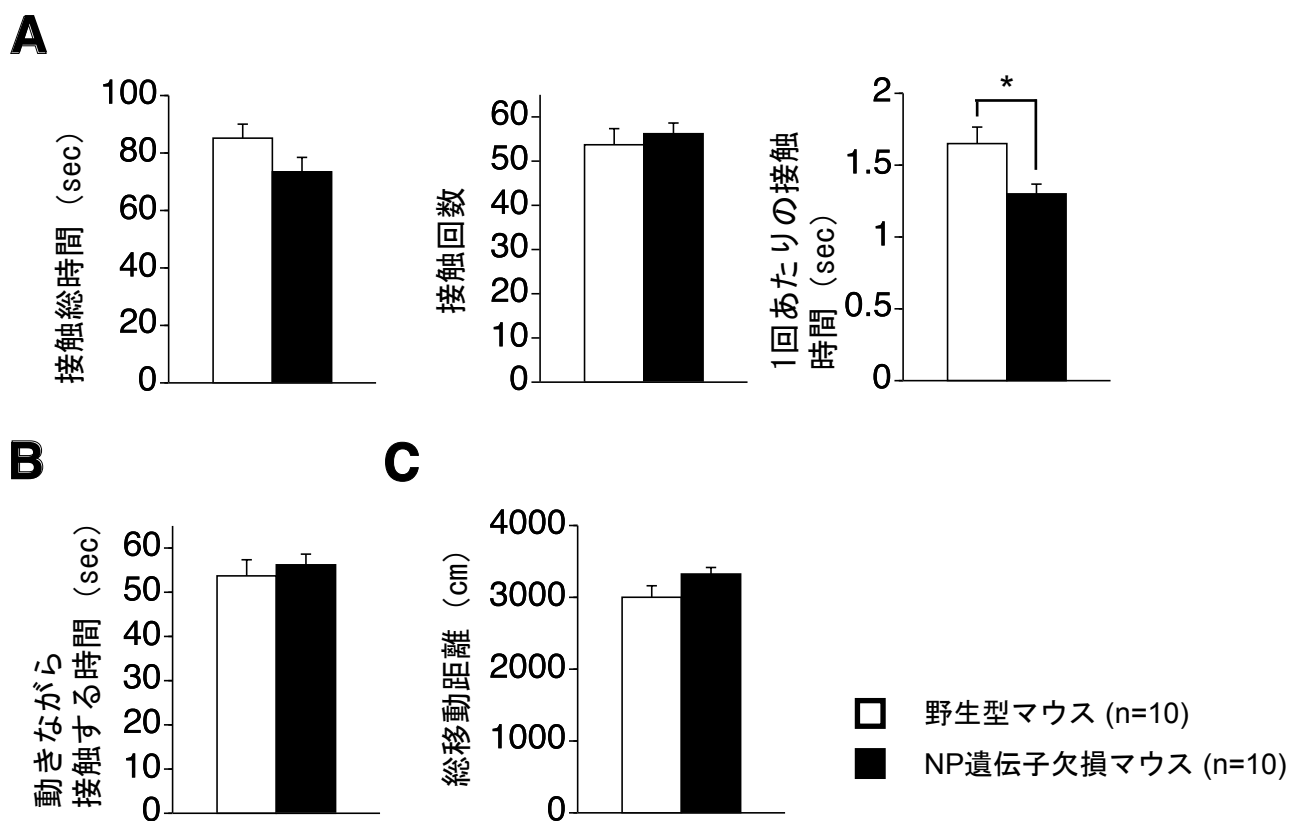


図15. 社会行動試験

- (A) 2匹のマウスの接触総時間、接触回数、1回あたりの接触時間。NP遺伝子欠損マウスにおいて接触総時間が低下し、接触1回あたりの時間が有意に低下した (\*  $p < 0.05$ )。接触回数にNP欠損の影響は認められなかった。
- (B) 動きながら接触する総時間。NP欠損の影響は見られなかった。
- (C) 総移動距離。有意な差は検出できなかったが、NP遺伝子欠損マウスにおいて上昇した。

## 4. 考察

### 4.1. 作業記憶と参照記憶におけるニューロブシン欠損の影響

ニューロブシン遺伝子欠損マウスと野生型マウスにおいて、Y字型迷路、八方向放射状迷路、バーンズ迷路により作業記憶と参照記憶に関する行動試験を行った結果、興味深い結果が得られたので考察する。

#### 4.1.1. 作業記憶へのニューロブシン欠損の影響

作業記憶とは作業中に一時的に保持される容量制限的な記憶である。本研究では、まず単純な空間知覚を要する Y字型迷路を用いて作業記憶試験を行った。マウスは8分間の試験期間で選択したアームの位置を一時的に記憶し、異なるアームを選択できるかを試験した。その結果、ニューロブシン欠損マウスは野生型マウスに比較して Y字型迷路において有意に作業記憶が低下した。この結果は、田村らの研究結果と一致する (Tamura et al., 2006)。

次に、より複雑な空間知覚を要する八方向放射状迷路を用いて作業記憶を試験した。マウスを空腹状態にして餌報酬により学習意欲を高めた後、4箇所餌を取得させ、その位置を記憶させた。その後、30秒、120秒、300秒後において既に進入したアームを避けて効率よく残りのアームの餌を取得できるかを試験した。この試験ではニューロブシン欠損マウスと野生型マウスにおいて差は認められなかった。

以上によりニューロブシン欠損マウスは、より単純な空間知覚を要する Y字型迷路において作業記憶の低下が認められたが、八方向放射状迷路においては複雑な空間知覚を要するにも関わらず記憶の低下は認められなかった。その原因として、八方向放射状迷路においては、より複雑な空間知覚を要するが餌による報酬により空間記憶がより強く記銘され、その保持には障害を持たないことが推察される。この結果は、ニューロブシン欠損マウスの海馬スライス実験において、弱い刺激に対しては LTP が初期過程で選択的に低下するが、強い刺激に対しては LTP が野生型マウスと差が認められないことと一致する (Komai et al., 2000; Tamura et al., 2006; Ishikawa et al., 2008)。従って、一時的な報酬を伴わない作業記憶の記銘と保持には、そのメカニズムの1つとしてニューロブシン依存性の初期 LTP が役割をはたしていることが推察される。

#### 4.1.2. 参照記憶へのニューロブシン欠損の影響

参照記憶とは学習し長期間保持してきた情報を想起して参照する記憶である。本研究では、参照記憶の行動試験としてはじめに単純な Y 字型迷路を用いた。まず、マウスに Y 字型のアームの1つを選択させ、10–20 分後にその記憶を参照して、別のアームを選択できるか否かを検査した。その結果、ニューロブシン欠損マウスは野生型マウスに比べて参照記憶に差は認められなかった。

次に、より複雑な空間知覚を要するバーンズ迷路を用いて参照記憶試験を行った。明るく照らされた広い円盤の中に 12 個の穴があり、その穴の 1 つに報酬として暗箱を設置し、7 日間その位置を学習させ、その 7 日後に位置を想起できるかを検査した。その結果、ニューロブシン欠損マウスと野生型マウスに有意な差は検出されなかった。

以上をまとめると、ニューロブシン欠損マウスは Y 字型迷路とバーンズ迷路いずれにおいても参照記憶の低下は認められなかった。これらの結果は、報酬が無い場合には一時的な作業記憶が低下するが、報酬がある場合には参照記憶が強固に記銘され、保持と想起において障害をもたないことが推察される。

#### 4.2. 情動行動へのニューロブシン欠損の影響

ニューロブシン mRNA は海馬と扁桃体に強く発現していることから、ニューロブシンは記憶のみならず情動においても重要な役割を持つことが推察される。そこで、本研究では記憶と情動及びその相互作用におけるニューロブシンの機能を明らかにするために恐怖記憶と不安様行動またうつ様行動の行動試験を行った。

##### 4.2.1. 恐怖記憶へのニューロブシン欠損の影響

音刺激による恐怖条件づけにより、恐怖記憶の記銘、保持、想起、消去過程を解析し、次の結果を得た。

まず恐怖条件づけでは、3 回の音刺激と電気刺激のペアリング刺激を行い恐怖と音の関連を学習させた。ニューロブシン欠損マウスは野生型マウスに比べて 1 回目の条件づけ後に無動化率の低下が認められ、2 回目ではその差が小さくなり、3 回目では野生型マウスと同一レベルとなった。このことから、

ニューロプシン欠損マウスは、恐怖記憶の記銘の過程に障害をもち学習が遅延するが、最終的には恐怖記憶が野生型マウスと同一レベルに獲得されたものと推察される。

次に、恐怖記憶の保持と想起について学習後 30 時間と 45 日において、音刺激のみを提示して恐怖記憶を想起するか否かを試験した。ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスと差がないことから、一度獲得した恐怖記憶の保持と想起には障害が無いことが推察される。

さらに、学習後 30 時間と 45 日後において、電気刺激なしで音のみを持続的に提示し、恐怖記憶の消去過程を解析した。ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスに比べて恐怖記憶の消去が減弱し遅れる傾向が認められた。

以上の結果から、ニューロプシン欠損マウスは恐怖記憶の記銘と消去の過程で障害を持つが、一度形成された強固な恐怖記憶の保持と想起においては障害を持たないことが推察される。このことは作業記憶と参照記憶において、ニューロプシン欠損マウスは作業記憶の初期過程に障害を示すが、一度獲得した記憶の保持と想起において障害を示さないことと一致し、この障害は同様な分子機構により起きている可能性が示唆される。

#### 4.2.2. 不安様行動とうつ様行動へのニューロプシン欠損の影響

ニューロプシンと不安の関連を明らかにするために、高架式十字迷路を用いて高所と開けた場所に対する不安様行動試験を行った。その結果、ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスと比べて、オープンアームにおける滞在時間が有意に減少し、進入回数の低下が認められた。このことから、ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスに比べて不安に対する感受性が亢進していると推察される。

次に、より高度の不安と恐怖を与える強制水泳試験と尾懸垂試験を用いて、ニューロプシン欠損マウスがうつ様行動を示すか否かを解析した。

まず、マウスにとって比較的弱い恐怖を与える強制水泳試験を行うと、無動反応時間にニューロプシン欠損マウスと野生型マウスに差は認められなかった。

次に、尾懸垂試験においてマウスを高所で吊るして強い恐怖を与えると、ニューロプシン欠損マウスは、野生型マウスと比べて無動反応が有意に増加することから、より強い恐怖を感じていることが示唆された。

この結果と関連して、ヒトの精神疾患患者のニューロプシン遺伝子の解析から、最近興味深い single nucleotide polymorphism (SNPs) が躁うつ病患



者に同定された(Izumi et al., 2008, in press)。これまでのところ、この SNPs は統合失調症とうつ病患者ではまだ同定されていない。ニューロプシン欠損マウスは、不安や恐怖の感受性が高まり、恐怖記憶の消去に障害をもつことと合わせて考えると、ヒトにおいてもニューロプシンの機能異常により躁うつ病を含む精神疾患が発症する可能性が示唆される。

#### 4.3. 社会的行動へのニューロプシン欠損の影響

次に社会行動におけるニューロプシンの機能を調べるために、オープンフィールドを用いて 2 匹のマウスの接触総時間と接触回数を測定した。その結果、ニューロプシン欠損マウスは野生型マウスに比べて1回あたりの接触時間と接触総時間に減少が認められた。このことから、ニューロプシンが記憶と情動に加えてより複雑な社会行動においても重要な役割をはたしていることが推察される。この社会行動の異常に記憶と情動の異常がどのように作用しているかに関しては明らかではなく今後の課題として残されている。

#### 4.4. 記憶、情動及びその相互作用におけるニューロプシンの役割

以上、本研究結果をまとめると、第一にニューロプシン欠損マウスは記憶の記録に障害を示したが、一度強固に記憶を獲得した後は、その保持と想起には障害を示さなかった。第二に、ニューロプシン欠損マウスは強い情動をとまう恐怖記憶において、記憶の記録と消去に障害を示すが、一度強固に獲得した恐怖記憶の保持と想起には障害を示さなかった。第三に、ニューロプシン欠損マウスは、不安や恐怖の感受性がより亢進し、強度の恐怖に対して無動反応が増強した。第四に、社会行動において個体間の接触総時間と接触回数が有意に低下した。これらの結果より、ニューロプシンが記憶、情動、社会行動に重要な役割をはたしていることが示唆される。

以上の結果は、ニューロプシン mRNA が、記憶の記録に重要な機能をはたしている海馬、情動に中心的な役割を持つ扁桃体、社会行動に強く関与する前頭葉皮質に発現していることと整合する。また、ニューロプシン欠損マウスは脳スライスの電気生理学的実験により解析すると、弱い刺激に対する初期 LTP が低下するが、強度の刺激に対する LTP には障害を示さないことと整合する。すなわち、これまでの形態学的研究と電気生理学的研究により示されてきた異常と極めてよく整合している。さらにまた、この結果はニューロプシンの異常が、社会行動の異常やうつ病などの精神疾患の原因の1つとなりうるこ

とを示すものである。

記憶や情動、社会行動という高度に複雑な現象には多数の遺伝子や分子が相互に共働して関与している。複雑な行動の基礎となる分子機構を明らかにすることは極めて困難であるが、遺伝子改変マウスを用いた研究により、部分的ではあるがその詳細が明らかとなってきた。ニューロプシン欠損マウスの行動の解析により、ニューロプシンは海馬、扁桃体、前頭葉皮質を含む脳の各部位で重要な働きを持つことが明らかとなった。ニューロプシンがこのネットワークの中でどの神経線維連絡に発現し、シナプス結合しているのか、詳細はまだ明らかではない。これらの線維連絡を同定し、ニューロプシンが関与する分子機構を解析し、記憶や情動、社会行動における役割を明らかにすることは今後の課題として残されている。

## 5. 参考文献

- Arron, JR.** (2006). NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*, 441(7093), 595-600.
- Chen, Z., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., & Kiyama, H.** (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci*, 15(7 Pt 2), 5088-5097.
- Cryan, JF., Mombereau, C., & Vassout, A.** (2005a). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4), 571-625.
- Cryan, JF., Valentino, RJ., & Lucki, I.** (2005b). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(5), 547-69.
- Dellu, F., Fauchey, V., Le Moal, M., & Simon, H.** (1997). Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiol Learn Mem*, 67(2), 112-20.
- Deutsch, J.** (1962). Higher nervous function: the physiological bases of memory. *Annu Rev Physiol*, 24, 259-286.
- Eichenbaum, H.** (2000). A cortical-hippocampal system for declarative

memory. *Nat Rev Neurosci*, 1(1), 41-50.

**File, S.E., & Seth, P.** (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3), 35-53.

**Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., & Shiosaka, S.** (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci*, 17(3), 600-610.

**Ihara, M., Yamasaki, N., Hagiwara, A., Tanigaki, A., Kitano, A., Hikawa, R., Tomimoto, H., Noda, M., Takanashi, M., Mori, H., Hattori, N., Miyakawa, T., & Kinoshita, M.** (2007). Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron*, 53(4), 519-533.

**Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., & Shiosaka, S.** (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the mouse schaffer-collateral pathway. *J Neurosci*, 28(4), 843-849.

**Izumi, A., Iijima, Y., Noguchi, H., Numakawa, T., Okada, T., Hori, H., Kato, T., Tatsumi, M., Kosuga, A., Kamijima, K., Asada, T., Arima, K., Saito, O., Shiosaka, S., & Kunugi, K.** (2008). In press. Genetic variations of the human neuropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions. *Neuropsychopharmacology*.

- Kalueff, A., Avgustinovich, D., Kudryavtseva, N., & Murphy, D.** (2006). BDNF in anxiety and depression. *Science*, *312*(5780), 1598-1599; author reply 1598-1599.
- Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S., & Shiosaka, S.** (2000). Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci*, *12*(4), 1479-1486.
- Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., & Shiosaka, S.** (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci*, *23*(21), 7727-7736.
- Melnikova, T., Savonenko, A., Wang, Q., Liang, X., Hand, T., Wu, L., Kaufmann, WE., Vehmas, A., & Andreasson, KI.** (2006). Cyclooxygenase-2 activity promotes cognitive deficits but not increased amyloid burden in a model of Alzheimer's disease in a sex-dimorphic pattern. *Neuroscience*. *141*(3). 1149-62.
- Miyakawa, T., Leiter, L., Gerber, D., Gainetdinov, R., Sotnikova, T., Zeng, H., Caron, M., & Tonegawa, S.** (2003). Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(15), 8987-8992.
- Miyakawa, T., Yamada, M., Duttaroy, A., & Wess, J.** (2001).

Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci*, 21(14), 5239-5250.

**Nakamura, Y, Tamura, H, Horinouchi K., & Shiosaka, S.** (2006). Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1camimmunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci* 119:1341–1349.

**Pawlak, R., Rao, B., Melchor, J., Chattarji, S., McEwen, B., & Strickland, S.** (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50), 18201-18206.

**Pellow, S., Chopin, P., File, SE., & Briley, M.** (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3), 149-67.

**Shiosaka, S.** (2004). Serine proteases regulating synaptic plasticity. *Anat Sci Int.* 79(3), 137-44.

**Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., & Shiosaka, S.** (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem*, 273(18), 11189-11196.

**Takao, K., & Miyakawa, T.** (2006). Investigating gene-to-behavior

pathways in psychiatric disorders: the use of a comprehensive behavioral test battery on genetically engineered mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1086, 144-159.

**Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., & Shiosaka, S.** (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J Physiol*, 570(Pt 3), 541-551.

## 6. 謝辞

素晴らしい環境と研究する機会を与えてくださった奈良先端科学技術大学院大学塩坂貞夫教授に心より深く感謝致します。公私にわたり様々な助言を頂きました奈良先端科学技術大学院大学石川保幸助教、駒井章治助教、田村英紀助教、原嘉信先生に心から感謝致します。

共同研究者として本研究に関わってくださった京都大学宮川剛教授、山崎信幸先生に感謝申し上げます。

最後に父と母そして、妻に最大限の感謝を奉げます。