

## 論 文 要 旨

**Aralar-deficient mice:  
Biochemical and behavioral studies****〔 Aralar 欠損マウスの生化学的行動学的研究 〕**

松 元 泰 英

**【序論】**

aralar はミトコンドリア内膜に局在するカルシウム依存性アスパラギン酸-グルタミン酸輸送体のアイソフォームの一つである。aralar は、ミトコンドリアから細胞質へのアスパラギン酸の供給や malate-aspartate shuttle の一員として細胞質の NADH 還元当量をミトコンドリアに輸送することが知られている。また、aralar は、脳や骨格筋、心臓等に多く発現することが判明している。さらに、脳内における aralar は、神経細胞の髄鞘形成に関与していることが報告されている。

過去の教室の研究において、aralar 遺伝子のヘテロ型マウス（以下、ヘテロ型マウス）では、野生型マウスに比べて、脳内における aralar 発現量が約半分に低下していることを報告している。

そこで、脳内における aralar 発現量の低下による特異的な行動様式を調べるために、今回の研究では、ヘテロ型マウスと野生型マウスとにおける行動様式を、不安様行動解析等の研究に広く使用されている三つの行動学的実験方法（高架式十字迷路試験法、明暗試験法、オープンフィールド試験法）で比較検討した。また、不安様行動と脳内セロトニンとの関連性を示唆する研究結果が数多く報告されていることから、ヘテロ型マウスの行動様式の特徴とセロトニンとの関連性を検討するために、脳内におけるセロトニン合成の鍵酵素であるトリプトファン水酸化酵素をウェスタンブロット法で調べた。

**【材料および方法】****〈行動学的実験方法〉**

生後9カ月の同胞の雄のヘテロ型マウスと野生型マウスを用い、一つの実験につき、それぞれに3匹ずつ、毎日一回、合計3回、延べ9回実施した。

**・高架式十字迷路試験法**

今回の実験に使用した高架式十字迷路装置は、中央部の四角部分（5cm×5cm）や二本のオープンアーム（25cm×5cm）と二本のクローズドアーム（25cm×5cm×15cm）から構成され、床からの高さは50cmになっている。実験マウスは、一匹ずつ、オープンアームの一つに頭を向けて中央の四角部分に置かれ、5分間に、それぞれのアームに入った回数と、オープンアームとクローズドアームに滞在した時間とを計測した。

**・明暗試験法**

今回の明暗試験法で使用した装置は、黒い仕切りで分けられた2つの区画（15cm×15cm×15cm）があり、その仕切りには、床の高さと同じ位置に小さな穴（5cm×10cm）が作られ、マウスが明暗の区画を自由に往来できるようになっている。測定する実験マウスを明るい区画に置き、10分間での2つの区画間の移動の回数と、明るい区画に滞在した総時間とを計測した。

## ・オープンフィールド試験法

今回のオープンフィールド試験法で使った装置は、直径が 60cm の円形の床を有し、周囲に高さ 40cm の壁があるものです。測定する実験マウスを円形の中央部（直径 40cm）に置き、5 分間、実験装置内を自由に探検させ、中央部に滞在した時間や中央部に入った回数、動いた距離、動いた速度などを計測した。

## ・統計分析

すべての行動学的実験結果については、平均値に標準誤差 (S.E.M) を加えて示した。統計処理は、不対称 t 検定を使い、 $P < 0.05$  以下の場合に有意差があると判断した。

## 〈ウェスタンプロット法〉

生後 9 カ月から生後 12 カ月のヘテロ型雄マウス（4 匹使用）と野生型雄マウス（4 匹使用）から脳幹と大脳半球とを取り出し、トリプトファン水酸化酵素をウェスタンプロット法で解析した。内部コントロールとして  $\beta$ -アクチンを使い、バンドの密度は NIH Image J Gel Analyzer を使って計測した。

## 【結果】

高架式十字迷路試験法では、野生型マウスに比べてヘテロ型マウスでは、オープンアームでの滞在時間が約 3.5 倍に増え ( $p < 0.01$ )、進入回数についても約 2.4 倍の増加が見られた ( $p < 0.01$ )。また、明暗実験法においても、ヘテロ型マウスが、野生型マウスに比べて明室での滞在時間が約 1.4 倍に増加した ( $p < 0.01$ )。一方、オープンフィールド試験法では、ヘテロ型マウスと野生型マウスとの間では、中央部に滞在した時間や、中央部に侵入した回数、動いた距離、動いた速度などのいずれにおいても有意差を認めなかった。

一方、ウェスタンプロット法の結果では、ヘテロ型マウスは、野生型マウスと比較し、大脳半球と脳幹とにおいてトリプトファン水酸化酵素の量が約 20% 減少していた ( $p < 0.05$ )。

## 【考察】

高架式十字迷路試験法による実験結果では、ヘテロ型マウスは、野生型マウスと比較し、オープンアームへの滞在時間及び進入回数に有意な増加が見られた。また、明暗試験法では、ヘテロ型マウスは、野生型マウスと比較し、明るい区画において滞在時間の増加が有意に見られた。一方、抗不安薬の投与の影響によって、高架式十字迷路試験法では、オープンアームでの滞在時間ならびに進入回数が増加することがすでに報告されている。さらに、明暗試験においても、抗不安薬の投与の影響で、明るい区画における滞在時間の増加が生じることがすでに報告されている。このように、高架式十字迷路試験法および明暗実験法における今回の研究結果は、抗不安薬投与の影響によって生じた行動様式と類似の行動様式、すなわち、不安様行動の低下をヘテロ型マウスが示すことを示唆した。一方、オープンフィールド試験法で、ヘテロ型マウスと野生型マウスとの間における自発的運動量や活動性の相違を示唆する研究結果が得られなかったことから、ヘテロ型マウスが示した行動様式の特徴は、行動量の低下に起因する可能性を除外できることを示している。以上のような行動学的解析の結果を鑑みれば、ヘテロ型マウスは、野生型マウスと比べて、不安様行動の低下を示すことが示唆された。

一方、ウェスタンプロット法では、セロトニン合成における鍵酵素であるトリプトファン水酸化酵素のタンパク質量が、大脳半球および脳幹とも、ヘテロ型マウスでは、野生型マウスに比べて減少するとの結果を得た。このことは、ヘテロ型マウスの脳内においてセロトニン合成能が低下していることを示唆している。一方、低酸素状態やダイオキシシン暴露などの異常な環境下では、脳内におけるトリプトファン水酸化酵素の発現が減少することがすでに報告されていることなどを考慮すれば、今回の実験では、*aralar* 発現量の低下が、細胞質からミトコンドリアへの NADH 還元当量の減少を引き起こし、そのことによりトリプトファン水酸化酵素の発現が低下した可能性を示している。

これらの実験結果を鑑み、ヘテロ型マウスでは、野生型マウスに比べてセロトニン合成が低下したことによって、不安様行動の低下が生じたことが窺える。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 159 号	学位申請者	松元 泰英
審査委員	主査	亀山 正樹	学位
	副査	植村 正憲	副査
	副査	原田 秀逸	副査
			博士 (医学)
			浅川 明弘
			矢沢 和人

**Aralar-deficient mice: Biochemical and behavioral studies**

## (アララ欠損マウスの生化学的行動学的研究)

aralar は、ミトコンドリア内膜に局在するカルシウム依存性アスパラギン酸-グルタミン酸輸送体のアイソフォームの一つで、脳や骨格筋、心臓等に多く発現することが知られている。さらに、脳内における aralar は神経細胞の髄鞘形成に関与していることが報告されている。また、aralar 遺伝子のヘテロ型マウスでは、野生型に比べて、脳内における aralar 発現量が約半分に低下していることがすでに報告されている。

そこで、今回の研究では、脳内における aralar 発現量の低下による特異的な行動様式を調べるために、不安様行動の解析等に広く使用されている三つの行動学的実験方法（高架式十字迷路試験法、明暗試験法、オープンフィールド試験法）を使い、野生型マウスおよびヘテロ型マウスで比較検討している。また、不安様行動と脳内セロトニンとの関連性を検討するために、野生型マウスおよびヘテロ型マウスの脳内におけるセロトニン合成の鍵酵素であるトリプトファン水酸化酵素をウェスタンブロット法で調べている。

その結果、本研究においては下記のことが明らかになった。

- 1) 高架式十字迷路試験法では、野生型に比べてヘテロ型マウスでは、オープンアームでの滞在時間が約 3.5 倍に増え ( $p < 0.01$ )、進入回数についても約 2.4 倍の増加が見られた ( $p < 0.01$ )。
- 2) 明暗実験法においても、ヘテロ型マウスが、野生型に比べて、明室での滞在時間が約 1.4 倍に増加した ( $p < 0.01$ )。
- 3) オープンフィールド試験法では、野生型とヘテロ型マウスとの間では、中央部に滞在した時間や、中央部に侵入した回数、動いた距離、動いた速度などのいずれにおいても有意差を認めなかった。
- 4) ウェスタンブロット法の結果では、ヘテロ型マウスは、野生型マウスと比較し、大脳半球と脳幹とにおいて共にトリプトファン水酸化酵素の量が約 20% 減少していた ( $p < 0.05$ )。

三つの行動学的研究結果は、抗不安薬を投与したマウスと同様の結果を示し、ヘテロ型マウスでは不安様行動の低下が生じたことを示唆している。

以上のことから、本研究では、脳内 aralar タンパク質の形成不全に因って脳内でのセロトニン合成能が減少し、不安様行動の低下が生じることを、ヘテロ型マウスで明らかにしたものである。

ヒトにおける aralar 欠損患者が報告されていることを鑑みると、本研究は、aralar 欠損による新たな病態を示唆するもので、学術的価値が高く、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 159 号	学位申請者	松元 泰英
審査委員	主査	亀山 正樹	学位
	副査	植村 正憲	副査
	副査	原田 秀逸	副査
			博士 (医学)
			浅川 明弘
			矢沢 和人

主査および副査の5名は、平成24年1月6日、学位申請者 松元 泰英 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Aralar ノックアウトマウス(Aralar<sup>-/-</sup>)では、なぜ検索しなかったのか。

(回答) Aralar ノックアウトマウス(Aralar<sup>-/-</sup>)は、生後20日前後で死亡するために、行動学的研究は実施できないので、今回、検索しなかった。

質問2) ヒトでの脳内におけるセロトニンの効果は気分を高揚させるので、セロトニンが減少すると不安様行動は増加するのではないか。

(回答) 最近の研究成果により、気分の高揚と抑鬱に関する脳内機構と、不安を生じる脳内機構とが異なっていると考えている。少なくともげっ歯類では、抗不安薬の効果として、中隔海馬や辺縁系におけるセロトニン受容体1A型に結合し、セロトニンの作用を弱め、不安を減少させているとの論文があることから、セロトニンの減少が不安様行動を低下させたと考えている。

質問3) NADH 還元当量をミトコンドリアに輸送する aralar が減少するので、alaral ヘテロマウス(Aralar<sup>+/-</sup>)では、運動量が減少するのではないか。

(回答) オープンフィールドでは自発的運動量や活動性を調べたもので、この観点から野生型(Aralar<sup>+/+</sup>)とヘテロ型(Aralar<sup>+/-</sup>)との間に、有意差を認めることができないと報告した。ヘテロ型(Aralar<sup>+/-</sup>)では、骨格筋におけるミオグロビン含有量が同月齢の野生型に比べて有意に減少しているとの所見を得ているので、持続的な筋力が低下している可能性はある。

質問4) マウス脳の髄鞘染色標本において、野生型(Aralar<sup>+/+</sup>)とヘテロ型(Aralar<sup>+/-</sup>)とで脳幹の髄鞘形成において相違が認められたか。

(回答) 野生型(Aralar<sup>+/+</sup>)とヘテロ型(Aralar<sup>+/-</sup>)との間における脳内での髄鞘形成においては、有意な相違を認めることができなかった。

質問5) 脳内のセロトニンの供給には、腸管で産生されたセロトニンが貢献するが、これらのマウスにおいて腸管内で産生されるセロトニンについて調べたか。

(回答) 今回の研究では、腸管におけるクローム親和細胞の動態については検索していない。

質問6) 野生型マウス(Aralar<sup>+/+</sup>)とヘテロ型マウス(Aralar<sup>+/-</sup>)との間において寿命の差はないのか。

(回答) 現時点の飼育では、野生型(Aralar<sup>+/+</sup>)とヘテロ型(Aralar<sup>+/-</sup>)との間で有意な寿命差を認めていない。

質問7) aralar をコードする遺伝子は、ミトコンドリア DNA なのか。

(回答) aralar をコードする遺伝子は、核内の染色質に存在する DNA です。

質問 8) オープンフィールドの実験で、中央部に侵入する意味はなにか。

(回答) 通常、マウスは、オープンフィールドでは壁に近い部位を移動するが、不安様状態が低下すると、中央部に侵入すると考えられている。

質問 9) 先ほどの髄鞘染色の標本で、*aralar* ノックアウトマウス(*Aralar*<sup>-/-</sup>)の中脳水道が拡張しているように見えたが、これは人為的なものか。

(回答) 過去の論文で報告しているように、*aralar* ノックアウトマウス(*Aralar*<sup>-/-</sup>)では、脳室が拡張する傾向があり、中脳水道も野生型に比べて拡張していると考えられる。

質問 10) 行動学的実験で使用した部屋の明るさが、2300ルクスでは明るすぎないか。

(回答) 部屋が暗い状態であると、明暗区画の差が少なく、マウスの不安様行動に対する嫌悪状態がはっきりしない。また、以前の論文で、明るい区画を 2300ルクスにしている論文もあったので、この明るさで実施した。

質問 11) ノイズ対策として、恒温室を使ったか。

(回答) 恒温室を使用してもノイズは入る。そのため、なるべく騒音の少ない時期に恒温室で実験を実施した。

質問 12) ウェスタンブロットの使用した脳を摘出する動物は、予め絶食状態にしていたか。

(回答) 今回の研究では、絶食によるストレスを回避するために、非絶食の状態で脳標本を採取した。

質問 13) 今回の実験において血液中のコルチコイドの量を測定したか。

(回答) 今回の研究では、血中コルチコイドを測定していないが、今後、検討すべき課題と考える。

質問 14) *aralar* 欠損が記憶に与える影響を調べたか。

(回答) *aralar* 欠損が記憶に与える影響を調べることは、興味深いテーマであると考えたが、複雑で高度な研究手技が必要なために、今回は検討しなかった。

質問 15) 高架式十字迷路実験においてオープンアームでの滞在時間が長いことは行動量が増えたことを意味していないか。

(回答) オープンアーム上では、歩き回るという様子は見られず、不安様行動が強くゆっくりと慎重に探索する活動が見られたので、時間が長くても、行動量が大きく増えたとは考えにくい。

質問 16) セロトニン受容体 1A型とセロトニン受容体 2A型とでは働きが異なり、*aralar* 産生量の低下が 1A型に作用している可能性を示唆しているが、2A型に作用している可能性はないのか。

(回答) もちろん、2A型に作用していることも考えられる。しかし、2A型が血管平滑筋や血小板、肺、消化管、中枢神経系などに分布し、血管収縮と血小板凝固に主に関与していることを考慮し、さらに、他の関連した研究の論文の結果を参考にすれば、今回の実験での行動様式の変化には 1A型を中心に考える方が妥当だと考えた。

質問 17) マウスの姿勢について検討したか。

(回答) 検討していない。マウスが、立ち上がり行動、すくみ行動、洗顔行動、毛づくろい行動などいろいろな姿勢をとることは分かっていたが、明確に区別できるほど、行動実験に習熟していないことや、一方、探索行動量では、不安様行動を数値化しやすいなどの利点があるので、今回の行動実験では姿勢について考慮しなかった。

質問 18) オープンフィールドにおける中心部の設定について直径が 40cm 以外で検討しなかったか。

(回答) 予備実験として、直径 30cm も行ったが、壁に触れ装置内の周辺部を好んで歩行する接触走性を考えた場合、直径の幅を広くし、壁からある程度離れた場所(中央部)を探索する場合は、不安様行動が減少していると捉え、直径は 40cm と広めに設定した。

質問 19) ミトコンドリア内膜に局在するカルシウム依存性アスパラギン酸・グルタミン酸輸送体が、二つのアイソフォームを有する意味についてどう考えるか。

(回答) 二つのアイソフォームは、体内において発現部位に異なる特異性があること。また、発育過程で発現の時期にも相違が見られる。そのため、二つのアイソフォームの微妙な相違が機能の上で重要な役割を果たしていると考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。