

氏 名  ごうらngo  たるだー  
**Gourango Talukdar**

学位の種類  博 士 (医学)

学位記番号  富生命博甲第 93 号

学位授与年月日  平成 29 年 9 月 28 日

専 攻 名  認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件  富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目  Impairment in extinction of auditory fear memory in  
syntenin-1 knockout mice  
(シンテニン-1 ノックアウトマウスにおける音恐怖条件付  
け記憶の消去障害 )

論文審査委員

  (主査)  教 授  井ノ口  馨

  (副査)  教 授  鈴木  道雄

  (副査)  教 授  中辻  裕司

  (副査)  教 授  高雄  啓三

指 導 教 員  教 授  森  寿

## Objective

Syntenin-1 (Syndecan-binding protein, Sdcbp) is a PDZ domain-containing intracellular scaffold protein for various receptor proteins involved in exosome production, synapse formation, and synaptic plasticity. Since syntenin-1 has the ability to interact with all four ionotropic  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)-type GluR subunits (AMPA receptors GluA1-4), we speculated that syntenin-1 may have the role to regulate learning and memory through effects on synaptic plasticity *in vivo*.

## Materials and Methods

- 1) **Animals:** Syntenin-1 knockout (KO) and wild type (WT) mice were produced by breeding homozygous parents and housed in a temperature-controlled environment under a 12 h light/dark cycle as previously described. Animal care and experimental protocols were approved by the Animal Experiment Committee of the University of Toyama (Authorization No. A2012MED-35 and A2015MED-25).
- 2) **Western blot and immunohistochemical analyses:** The protein samples extracted from amygdala of the mouse brain were separated by SDS-PAGE and blotted on PVDF membranes. The membranes were incubated with the primary antibodies and then with HRP-conjugated secondary antibodies. Protein bands were detected using a LAS4000 mini-digital imager (GE Healthcare). The WT and syntenin-1 KO mice were deeply anesthetized and perfused transcardially with ice-cold PBS followed by 4% paraformaldehyde. Brains were removed, post-fixed, and transferred into a 30% sucrose/PBS solution. Brains were frozen and cut into 30- $\mu$ m thick coronal sections using a freezing microtome (LEICA CM 1850). Free-floating brain sections were incubated with the primary antibodies, then with the secondary antibodies. Images were obtained using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5 II).
- 3) **Behavioral tests:** The open field test was performed to measure locomotor activity and basal anxiety in WT and KO mice using SCANET MV-40 (MELQUEST Co.). Auditory fear conditioning was conducted in a conditioning chamber (17  $\times$  15  $\times$  13 cm (CL-M3, O'Hara & Co.)). Mice were placed in the conditioning chamber for 60 s and then presented with a tone of 65 dB for 30 s.

At the end of the tone presentation, the mice were given a footshock (0.75 mA, 2 s). The conditioning protocol consists of three tone–shock pairings at 1 min intervals. Extinction training was conducted 24 h after fear conditioning. Animals received 18 tone presentations (30 s) at random intervals in the same chamber used for the auditory-cued test. Contextual fear memory and auditory-cued fear memory were evaluated as the percent freezing.

### **Results and Discussion**

- 1) Syntenin-1 is expressed in amygdala, medial prefrontal cortex, hippocampus, cerebral cortex, thalamus, and hypothalamus.
- 2) Genetic disruption of syntenin-1 had little effect on contextual and auditory fear conditioning. In addition, no changes in locomotion and anxiety level were observed in syntenin-1 KO mice in open-field test.
- 3) The WT and syntenin-1 KO mice showed the similar level of freezing in fear conditioning and in extinction training. However, the syntenin-1 KO mice showed the higher levels of freezing than the WT mice during the auditory cued test after the extinction, which suggest the selective impairment in extinction of auditory fear memory in syntenin-1 KO mice.
- 4) This extinction deficit was associated with reduced c-Fos-positive neuron number in the BLA and IL after the extinction training and increased c-Fos-positive neuron number in BLA after the cued test in syntenin-1 KO mice compared with WT mice.
- 5) The expression levels of phospho-GluA1 at serine-831, phospho-GluA1 at serine-845 and total GluA1 in the amygdala were comparable between WT and syntenin-1 KO mice at basal state, after fear conditioning, and after extinction training.

### **Conclusion**

Selective impairment of cued fear memory extinction in syntenin-1 KO mice is associated with decreased activation of c-Fos neurons of BLA and IL after extinction training.

## 【論文審査の結果の要旨】

### [目的]

シンテニン-1 (Syntenin-1) は、多様な細胞表面受容体分子と相互作用する PDZ 領域を有する細胞内足場タンパク質の 1 つである。これまでの研究から、シンテニン-1 はエクソソーム産生、シナプス形成、シナプス可塑性等に関わる分子と相互作用し、これらの制御に関与することが示唆されていたが、個体レベルでの機能は充分には明らかにされていない。シンテニン-1 が、シナプス可塑性に関わる AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット (GluA1-4) と直接相互作用することが *in vitro* の実験で示されていることから、Talukdar 君はシンテニン-1 がシナプス可塑性に関わり、記憶・学習の制御に関わる可能性があると考え、本研究を行った。

### [方法]

- 1) 動物系統：シンテニン-1 遺伝子ノックアウト (KO) マウスと対照の野生型 (WT) マウス系統は、分子神経科学講座で作製され (Tamura et al., 2015)、温度と明暗条件を制御した環境下での飼育繁殖と実験に用いた。動物実験は、本学動物実験委員会での審査承認 (承認番号：A2012MED-35 と A2015MED-25) のもと実施した。
- 2) ウェスタンブロット解析および組織免疫染色：安楽死させたマウスの扁桃体より抽出したタンパク質は、SDS-PAGE 後に PVDF 膜上に移し、1 次抗体と反応した後 HRP ラベルした 2 次抗体と反応し、目的タンパク質のバンドを LAS4000 イメージング装置で検出した。また、組織免疫染色では、マウスに深麻酔下で経心腔的に PBS を灌流し、次いで 4% PFA-PBS の灌流を行った。脳を摘出し後固定を行った後、30% Sucrose-PBS 内に保存した。脳標本を凍結した後、30  $\mu$ m 厚の冠状断切片を凍結ミクロトーム (LEICA CM 1850) を用いて作製した。脳切片は、浮遊法を用いて 1 次抗体、次いで 2 次抗体と反応させ、蛍光共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5 II) を用いて撮像した。
- 3) 行動解析：オープンフィールドテストでは、SCANET MV - 40 装置を用い、行動量と不安レベルを評価した。音恐怖条件付けでは、条件付け箱 (17x15 × 13 cm, CL-M3) にマウスを 60 秒間滞在させた後、30 秒間 65 dB の音刺激を提示し、音の終了とともに軽微な電気ショック (0.75 mA, 2 秒間) を与え、この音-電気ショックの組み合わせを 3 回繰り返した。
- 4) 消去学習では、音恐怖条件付けの 24 時間後に、マウスを再び音条件付け箱に入れ、30 秒間の音刺激のみを不定期な間隔で 18 回提示した。文脈記憶と音手がかり記憶は、テスト時のすくみ反応時間の割合として評価した。

### [結果と考察]

- 1) シンテニン-1 は、扁桃体、内側前頭皮質、海馬、大脳皮質、視床、視床下部等に広く分布して発現しており、シンテニン-1 KO マウスではこれらの領域での発現が消失していた。

- 2) シンテニン-1 遺伝子の欠損は、文脈学習や音手がかり学習には影響を与えなかった。また、運動能力や不安レベルにも影響を与えなかった。
- 3) シンテニン-1 KO マウスは、WT マウスと恐怖条件付けと消去学習で同程度のすくみ反応を示した。しかしながら、シンテニン-1 KO マウスは、消去学習後のすくみ反応の割合が WT マウスに比べて有意に高く、消去学習に特異的に障害があった。
- 4) シンテニン-1 KO マウスの消去学習障害は、扁桃体基底外側核 (BLA) と下辺縁皮質 (IL) での c-Fos 陽性神経細胞数の減少と関連していた。また、手がかり学習テスト後の BLA での c-Fos 陽性神経細胞数の増加と関連していた。
- 5) シナプス可塑性に関わる GluA1 サブユニットの発現量、GluA1 の 831 番目および 845 番目のセリンのリン酸化は、通常状態、恐怖条件付け後、消去学習後のいずれにおいても、シンテニン-1 KO マウスと WT マウス間に差はなかった。

#### [総括]

本研究で Talukdar 君は、シンテニン-1 遺伝子の欠損が、文脈学習や音手がかり学習、さらには音恐怖条件付けには影響を与えないものの、音恐怖記憶の消去学習に特異的に関わることを初めて明らかにした。また、シンテニン-1 遺伝子が消去学習後の BLA と IL の神経活動に関わることを示し、消去学習におけるシンテニン-1 遺伝子の神経回路レベルでの機能を示唆した。

本研究は新規性が高く、また、医学における学術的重要性に富むものであり、本審査委員会は本論文を価値の高いものであると評価し、博士（医学）の学位に十分値するものと判定した。