

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32511

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15088

研究課題名(和文)小胞体アミノペプチダーゼの双極性障害発症への関与 - モデル動物としての評価・確立 -

研究課題名(英文)Role of ERAP1 in the pathogenesis of mental disorders

研究代表者

辻本 雅文 (TSUJIMOTO, MASAFUMI)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00281668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体アミノペプチダーゼ(ERAP1)が精神疾患様の表現型を示すことから、その詳細の検討を目指した。各種の薬理学的測定法(尾懸垂試験、強制水泳、高架式十字迷路試験、社会的相互作用試験)を行った結果、ERAP1ノックアウトマウスはその野生型と比較して、顕著なストレス応答性の低下および不安レベルの亢進が認められた。その要因を探索するため、各種神経伝達物質の脳内量を測定した結果、セロトニン含量の増加が観察された。さらにその原因はセロトニン合成系の亢進であることが確認された。これらの結果はERAP1が特定の精神疾患の発症に関与していることを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：Role of ERAP1 in the pathogenesis of mental disorder was investigated using ERAP1 knock out mouse. All the pharmacological measurements tested including, tail suspension test, forced swim test, elevated plus maze test and three chamber test, showed a significant difference between ERAP1 knockout mouse and wild-type mouse and thus suggested that knockout mouse were suffering mental disorder. Measurement of neuronal signal molecules indicated an increase of serotonin in the brain via activation of serotonin synthetic pathway. Considering that ERAP1 can be secreted into outside of the cells by certain stimuli, these results strongly suggest that the enzyme plays a critical role in the pathogenesis of certain mental disorders via affecting gene expression of serotonin biosynthesis. Our data presented in this study might confirm new pathological functions of the enzyme and bring new insights into the pathogenesis of certain mental disorders.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体アミノペプチダーゼ ノックアウトマウス セロトニン

1. 研究開始当初の背景

小胞体アミノペプチダーゼ(ERAP) 1は亜鉛を含有する M1 アミノペプチダーゼファミリー酵素の一員として、世界に先駆け私たちが同定/クローニングしたペプチド分解酵素である。本酵素の最も重要な特徴は、通常の状態では発現細胞から分泌されるはずのアミノ酸配列であるにも関わらず、小胞体に貯留され、そこに留まっていることである。その後の検討において、本酵素は小胞体内腔において、癌細胞やウイルス感染細胞の除去に際して発動される MHC クラス I を介した細胞傷害性 T 細胞の活性化に必要なペプチド抗原の最終プロセッシング酵素であることが判明し、生体防御において重要な役割を果たしていることが、私たちの研究成果を含めて明らかになっている。

一方遺伝子多型の検討により、本酵素には数多くの変異体が存在し、それらの一部は、高血圧症や強直性脊椎炎・乾癬症等の自己免疫疾患など各種病態にリンクしていることが示されている。これらの結果は本酵素が幅広い病態の発現に関与していることを示すものとして注目を集めており、多くの研究成果が発表されるに至っている。

最近私たちは本酵素が特定の刺激によりマクロファージから分泌され、その活性化に寄与することを見出した。これらの知見をさらに検証するため、本酵素遺伝子を欠損するマウスを作製したところ、ERAP1 遺伝子欠損マウスは精神疾患様の表現型を示すという予期せぬ現象を見出したことから、その詳細を検討するため本提案課題をスタートさせた。

2. 研究の目的

ERAP1 は小胞体内腔における抗原ペプチドの最終プロセッシング酵素として、強直性脊椎炎などの自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たしていることが想定されている。

一方私たちは本酵素が特定の刺激により小

胞体外へ分泌され、新たな機能を発揮することを見出した。本研究においてはその過程で作成した ERAP1 遺伝子欠損マウスが示す興味深い表現型を検証することで、本酵素の生理的/病理的機能のさらなる発掘に資することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウスと ERAP1 遺伝子欠損マウスを種々の薬理的測定法により比較することで、ERAP1 欠損に伴うマウスの行動様式の変化を比較した。

4. 研究成果

(1) ERAP1 による一酸化窒素の産生亢進
私たちはこれまでの細胞レベルの検討において分泌された ERAP1 が一酸化窒素(NO)の産生を誘導することを見出していた。今回 ERAP1 遺伝子欠損マウスを作製したことから個体レベルでの検討をおこなった。野生型マウス個体を LPS で処理すると血中に存在する ERAP1 の量が増加した。したがって LPS 刺激により ERAP1 の分泌が誘導されたものと考えられる。この時血中の NO 濃度は同様に処理したノックアウトマウスと比較して有意に増加していた。これらの結果は特定の刺激により血中に分泌された ERAP1 により NO の産生が増大することを示唆している。NO には血圧降下作用があるとされていることから ERAP1 の分泌を介した血圧調節機構の存在が想定される。今後は ERAP1 が分泌される特定の状況(感染時等)における血圧の変動をモニターすることで、ERAP1 の生体防御における新たな機能の同定に繋げていきたいと考えている。

(2) ERAP1 遺伝子欠損マウスの表現型の検討

各種薬理的試験を ERAP1 遺伝子のホモ欠損型(ERAP1 -/-)、ヘテロ欠損型(ERAP1 +/-)および野生型(ERAP1 +/+)で比較した。尾懸垂試験では ERAP1 +/- マウスの無動時

間は ERAP1+/+ マウスのそれと同程度であったのに対し、ERAP1-/- マウスでは 20% 程度の低下が認められた。一方強制水泳試験では ERAP1+/+ マウスに比べ、ERAP1+/- マウスでは約 25%、ERAP1-/- マウスでは約 50%の無動時間の増加が観察された。これらの結果は ERAP1 遺伝子欠損マウスが、活動量およびストレス応答性の低下をきたしていることを示している。

さらに高架式十字迷路試験を行った結果、ERAP1-/- マウスのオープンアーム滞在時間は ERAP1+/+ マウスに比べ 40%程度低下していたことから、ERAP1 欠損マウスは不安レベルを亢進させていることが示唆された。また欠損マウスの社会性を他のマウスをいれた檻といれない檻への滞在時間の差で検討した結果、ERAP1-/- マウスのマウス部屋滞在時間は ERAP1+/+ マウスに比べて有意に減少していた。したがって ERAP1-/- マウスの社会性は低下しているものと考えられた。

(3) ERAP1-/- マウスにおけるセロトニン合成系の異常

一部の不安障害やセロトニン過剰症で見られるようにセロトニン過剰は不安や興奮、混乱などを引き起こす。そこで ERAP1-/- マウスの脳内神経伝達物質量（モノアミン、アミノ酸、BDNF）を ERAP1+/+ マウスと比較したところ、セロトニン量が約 2 倍に上昇していることが観察された。

セロトニン過剰の分子機構を明らかにすべく、全脳由来 cDNA を用いた、Real Time-PCR により、原因遺伝子を探索した。その結果 ERAP1-/- マウスでは ERAP1+/+ マウスより高いレベルでセロトニン合成酵素である THP2（約 2 倍）DDC（約 1.3 倍）の発現上昇が見られた。一方その他の代謝遺伝子 TPH1, MAOA, AA-NAT やセロトニン輸送体、受容体(1a, 1b, 2a, 7)の発現には変化がなかった。これらの結果は、ERAP1

遺伝子の欠損により、脳内セロトニン合成系が亢進し、セロトニン過剰が誘導されることを示唆している。

以上の結果は ERAP1-/- マウスが精神疾患様の表現型を示すという私たちの仮説を支持するものである。今後より詳細な検討を行っていきたいと考えている。

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 1 件)

Goto, Y., Ogawa, K., Nakamura, T.J.,

Hattori, A. and Tsujimoto, M.

“Substrate-dependent nitric oxide synthesis by secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in macrophages” J. Biochem.157(6), 439-449, 2015, 査読有
DOI:10.1093/jb/mvv001

〔学会発表〕(計 2 件)

後藤芳邦、小川健司、中村孝博、服部 明、辻本雅文：小胞体アミノペプチダーゼはエンドトキシンショック時に惹起される一酸化窒素合成を亢進する；第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター（宮城県仙台市）2016 年 9 月 26 日

後藤芳邦、小川健司、中村孝博、青嶋瑞樹、荒俣晃貴、高田 慧、町田綾乃、吉野僚太、服部 明、辻本雅文：細菌感染に伴い血中に分泌された ERAP1 は血中アミノ酸や一酸化窒素濃度を調節する；第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会（BMB2015）、神戸国際展示場（兵庫県神戸市）2015 年 12 月 3 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辻本 雅文 (TSUJIMOTO, Masafumi)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00281668

(2)研究分担者

服部 明 (HATTORI, Akira)

京都大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：50300893

後藤 芳邦 (GOTO, Yoshikuni)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：90455345