

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659368
 研究課題名（和文） c-Src と脳機能障害：新規生体機能モニターマウスによる解析
 研究課題名（英文） c-Src and brain dysfunction: Analysis of ethanol-related behaviors with novel Src knock-in mice
 研究代表者
 加藤 梧郎 (KATO GORO)
 山梨大学・医学工学総合研究部・助教
 研究者番号：60177441

研究成果の概要（和文）：脳神経系で機能調節に重要な働きをすると予想される c-Src の機能を生体レベルで検証するため、新たに c-Src のリン酸化部位遺伝子改変マウスを作製し、これらのマウスがエタノールの脳機能障害のモデルとなり得るのか検討した。変異マウスはエタノール消費量が野生型より少なく、エタノール嗜好性も弱かった。これらの結果から、c-Src がエタノール欲求行動に関与することが明らかになり、アルコール依存症の治療創薬や節制予防法の手掛かりとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：c-Src is thought to be an important molecule involved in regulation of neural activities in brain. To clarify the role of c-Src, we have established novel knock-in mice carrying a point mutation at Ser75, which is phosphorylated in neurons. We investigated the role of Ser75 phosphorylation in ethanol appetitive behaviors using the novel mutant mouse model. The mutant mice consumed and preferred ethanol less than wild-type mice significantly. These results suggest that c-Src may play a role for ethanol appetitive behaviors and as a possible therapeutic drug target, and give a hint for abstinence development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	87,0000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：Src、アルコール、マウスモデル、タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

エタノールの脳機能障害は現代の医学的社会的に重大な課題の一つである。エタノールの脳神経系に及ぼす影響は、多様な神経伝達物質系への作用の結果生体行動

レベルに表れると考えられる。近年、学習記憶に深く関わる脳のアスパラギン酸受容体 (NMDAR) がエタノールにより脱制御されるという研究が数多く報告されている。

c-Src は Src 型チロシンリン酸化酵素群の

一つであり、NMDAR の重要な制御因子であると示唆される。しかし、生体レベルで c-Src のみの機能を検証できる遺伝子改変動物が得られていない。c-Src 完全欠損（ノックアウト）マウスでは、類縁酵素による機能相補によって脳神経系に異常が表れないと考えられる。一方、研究代表者らは、c-Src のユニーク領域（類縁酵素にはない）内のセリン 75 が神経細胞でリン酸化されること及び、このリン酸化は、活性化型 c-Src の分解を調節する c-Src 独自の機能であることを見出した。そこで、これらの成果を踏まえ、セリン 75 にリン酸化の阻害変異 (SA) 及び擬似変異 (SD) を各々導入した新規の c-Src 生体機能モニターマウスを作製した。

2. 研究の目的

本研究では、これらの新規 c-Src 生体機能モニターマウスを用いてこれらのマウスが生体行動に対するエタノールの効果の生体モデルとなり得るのかを検討する。

c-Src のセリン 75 リン酸化のエタノール行動に関する役割を明らかにし、これらのマウスが c-Src の脳 NMDAR の制御機構の解明に、ひいては脳機能障害の成因解明と治療薬開発にとって有用であることを示す。

3. 研究の方法

(1) マウス

マウスは SD 系及び SA 系ともそれぞれヘテロ接合体同士の掛け合わせにより得られた野生型、ヘテロ接合体及びホモ接合体を実験に用いた。

(2) two-bottle 選択試験

試験体験の無いマウス（約 3 か月齢）を一ケージに一匹ずつ飼い 5 日間馴化後、10% (v/v) エタノール及び純水を入れた給水ビンを与え、3 週間エタノールの消費量を定期的に測定した。液体の蒸発及び漏れの補正

を行い、給水ビンの左右の位置もバイアスがかからないように定期的に入れ替えた。消費量はグラムエタノール/kg 体重/日で、嗜好性はエタノール消費容積/全液体消費容積でそれぞれ算出した。統計解析は Student's *t*-test で行った。

(3) 正立反射消失時間の測定

測定体験の無い 10-12 週齢のオスの野生型、ヘテロ、及びホモ接合体マウス株に、g 体重当たり 3mg の 20% (v/v) エタノール（生理食塩水液）をそれぞれ腹腔内注射した。注射後、歩行失調状態になったマウスを V 型の測定槽に仰向けに置いた。通常すぐに起き上がるが、酩酊状態になると起き上がれなくなるので（正立反射の消失）、この消失時間を記録した。正立反射の回復の判断基準は、測定槽に仰向けにマウスを置き、5 回連続して 30 秒以内にマウス自身で起き上がるようになったら回復したとした。統計解析は一元配置分散分析と事後多重比較試験で行った。

(4) エタノール長期投与及び中断による影響の評価

エタノール/スキムミルク及び対照マウスにはエタノールの代わりに等カロリーのスクロースを含むスキムミルクを投与し、6 日目にエタノールの除かれたスキムミルクと交換する。その後 3, 6, 9, 12, 48 時間ごとに、エタノール依存度を示す身体上の兆候を Ritzmann and Tabakoff の評価基準で観察する。

4. 研究成果

(1) エタノールの消費量と嗜好性

SD/SD ホモ接合体マウスはエタノール消費量が野生型より有意に少なく（野生型の 41%, $P < 0.05$, $n=8$ ）、エタノール嗜好性も有意に弱かった（野生型の 39%, $P < 0.01$, $n=8$ ）（図 1 及び図 2；値は平均値±標準偏差）。なお、総液体消費量は両者で有意な差はなかった

(図3; 値は平均値±標準偏差)。一方、SA/SAマウスは調べた限りにおいて、エタノール消費量が野生型より多く、エタノール嗜好性も強かった。

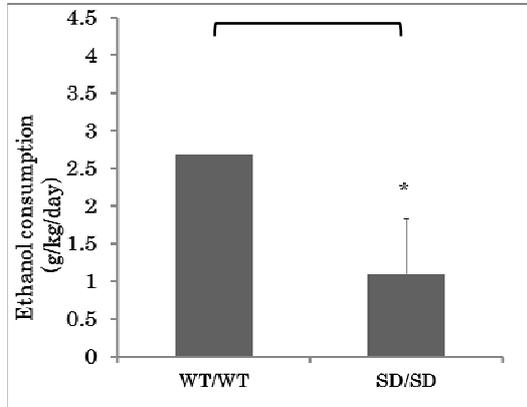


図1. エタノール消費 * $P < 0.05$

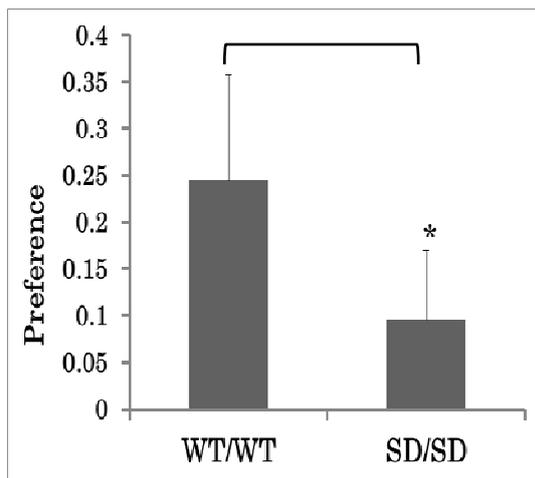


図2. エタノール嗜好性 * $P < 0.01$

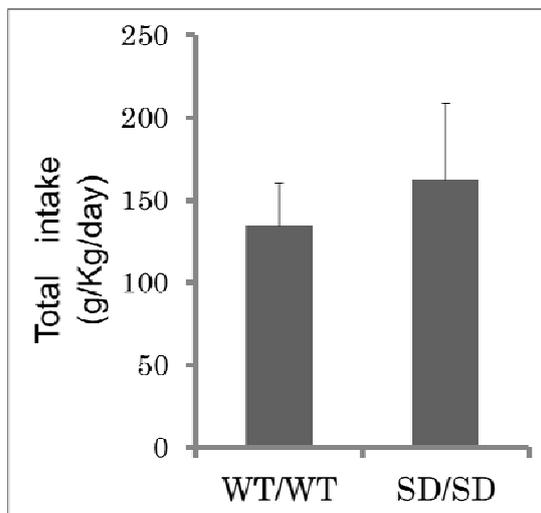


図3. 総液体消費量

(2) エタノール感受性

正立反射消失時間はSD変異型、SA変異型とも野生型、ヘテロ変異型及びホモ変異型との間に有意な差が認められなかった(SD変異マウスは $P=0.3204$; SA変異マウスは $P=0.1594$) (図4A及び4B; 値は平均値±標準誤差)。

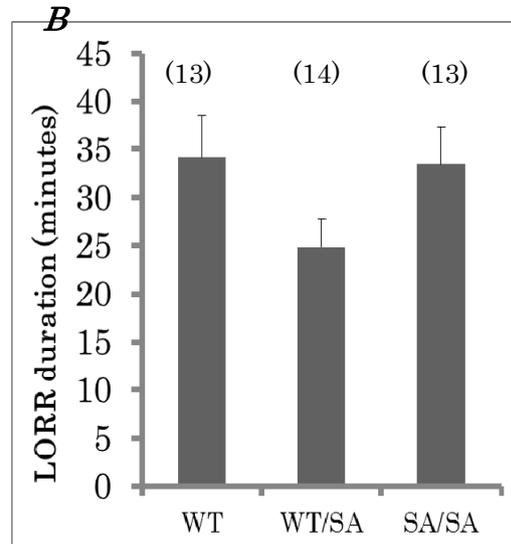
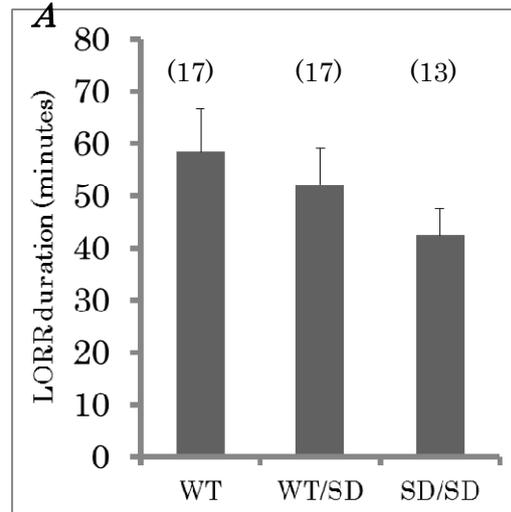


図4. 正立反射消失(LORR)時間

A, SD変異マウス; B, SA変異マウス
括弧内の数字はn.

(3) エタノールの長期投与(慢性的摂取)の中断による行動レベルへの影響

Ritzmann and Tabakoff の評価には差がなかった。離脱兆候を示す尺度はいずれも最下位のレベルで、Src のエタノール長期投与後の離脱による効果の有無についてはなお再評価の必要がある。

これらの結果から、c-Src がエタノール欲求行動に関与することが明らかになり、アルコール依存症の治療創薬や節制予防法の開発の手掛かりとなる可能性が示された。

Src 型チロシンキナーゼ Fyn の欠失マウスの正立反射消失時間が延長していることが明らかになり、Fyn がエタノールの感受性を制御していることが明らかになっている。Fyn 以外の Src 型チロシンキナーゼがアルコール行動反応に関与するという報告はなく本研究が初めての成果である。

本研究では、Src の当該変異はエタノールの消費量の増加や嗜好性の強度には影響を与えるが、Fyn とは異なりエタノールの感受性には関連がないことを示している。更に、ニューロペプチドYを生成できないマウスでは、エタノールの消費量が増加し嗜好性も強まることが報告されているが、これらのマウスは正立反射消失時間の短縮が見られエタノールの感受性が低下（エタノール耐性が増加）している。このように Src の当該変異の効果が、エタノールに強いか弱いかに関係なく、その消費や嗜好性に及ぶということはアルコール依存症の予防や治療の観点からも非常に興味を持たれる結果である。

なお、SA 変異型マウスにおいては標本数を増やして、SD 変異型との相異を明らかにする。また、Src の当該変異の効果がエタノール代謝の変動によるものではないことや味覚の好みによるものではないことを確認する必要がある。

今後、Src が分子レベルでアルコール依存にいかに関わるのかを明らかにし、Src の当

該変異がエタノール消費を減らす分子機構を解明することによって、アルコールの飲酒の抑制をもたらす治療創薬の分子標的としての可能性を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

加藤 梧郎・エタノールによる脳障害と c-Src・アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会・2012 年 9 月 7 日・札幌コンベンションセンター (札幌市)

[その他]

ホームページ等

山梨大学医学部生化学第一教室

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 梧郎 (KATO GORO)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：60177441

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし