

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500453

研究課題名(和文)細胞質脱アセチル化酵素の活性消失がもたらす情動障害とその分子メカニズムの探求

研究課題名(英文)Emotional arousal in deacetylase-deficient mice and its underlining mechanism

研究代表者

川口 禎晴(kawaguchi, yoshiharu)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・主任研究員

研究者番号：00450833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はうつ病などの情動障害の原因を解明するために、ヒトの情動障害とよく似た行動を示すHDAC6遺伝子欠損マウスを用いて研究を行った。その結果、HDAC6の働きがなくなると脳内のセロトニン神経の働きが悪くなり、同時にドーパミン神経の働きも不全となることが判った。この原因の一つとしてHDAC6が失われると神経細胞の中でエネルギー代謝が異常となり神経の働きに影響を及ぼすことが考えられた。これらのことからHDAC6の働きを正常に保つことが神経細胞の正しい機能発揮に重要であり、その乱れが精神疾患を引き起こす原因となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our major goal is to provide a new aspect of understanding psychiatric diseases. To address this issue, we focus HDAC6 knockout mice that show hyperactivity, less anxiety, and antidepressant-like behavior. In this study, we found the disturbance of neuronal activity in both serotonergic and dopaminergic neurons in HDAC6 KO mouse brain by evaluating the amount of monoamines, tryptophan hydroxylase, and dopamine D2 receptor. We also found that loss of deacetylase activity induces the accumulation of pyruvate accompanied by the reduction in ATP in raphe and PC12 cells, suggesting energy disability in serotonergic neurons in HDAC6 KO mice. Our findings demonstrate that deacetylase activity of HDAC6 might contribute to maintain the proper function in energy metabolism in serotonergic neurons, and its disturbance affects neuronal activity, leading to emotional arousal in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：HDAC6 セロトニン 抗うつ 脱アセチル化 ピルビン酸

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) HDAC6 について

HDAC6 (ヒストン脱アセチル化酵素 6) は細胞質に局在しチュープリンの脱アセチル化酵素として働くタンパク質である。近年、チュープリン以外にも Hsp90 や cortactin など基質となることが明らかとなり、HDAC6 は細胞質で働く多機能な脱アセチル化酵素であることが判ってきた。

### (2) これまでの研究成果

我々は HDAC6 が脳に多く発現していることを見出し、特に脳の発達期で増加することから脳機能の発揮に重要な役割を担うと考えた。HDAC6 のノックアウトマウスを解析したところ、「新奇環境下で活動量の増加」、「不安の軽減」、「抗うつ様行動」を観察した。さらに我々は HDAC6 が背側縫線核のセロトニン神経細胞の多く発現していることや脳における HDAC6 の新たな基質候補として CaMK2 と PDC1 を見出した。これらのことから、HDAC6 ノックアウトマウスではセロトニン神経系の機能不全が予想され、その背景にある分子メカニズムとして CaMK2 や PDC1 の脱アセチル化不全による機能異常の関与が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は HDAC6 欠損による上記行動異常の分子メカニズムを解明することで、分子の脱アセチル化制御が正常な神経機能の発揮に重要であること、さらにはこの現象をターゲットとした精神疾患の病態解明や新規治療戦略の研究基盤を確立することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) HDAC6 ノックアウトマウスにおける縫線核セロトニン神経系の機能不全の検証

HDAC6 ノックアウトマウスの脳内で起こっている異常を病理学的解析や生化学的解析などでより詳細に調べた。実際にはセロトニン合成酵素である Tph2 の特異的抗体を用いた免疫染色法による形態観察やウエスタンブロット法による定量、脳各部位におけるモノアミンの HPLC 法による定量、各種モノアミン受容体の特異的抗体を用いた定量を実施した。

また、さらなる行動解析としてハロペリドールやメタンフェタミンなどの向精神薬を使った行動薬理学実験を実施した。

(2) CaMK2 及び PDC1 の HDAC6 による脱アセチル化制御とその神経細胞機能との関連を探る。

候補分子として見出された CaMK2 と PDC1 が実際に神経細胞でアセチル化されるかどうかをまず各分子の発現プラスミドを用いて PC12 細胞に遺伝子導入し、抗アセチルリジン抗体を用いてウエスタンブロット法により検証した。

PDC1 の機能異常から予想される現象とし

てピルビン酸や ATP の量的異常が考えられたため、マウスの脳の縫線核、皮質、血漿を用いてピルビン酸の量を ELISA 法で測定した。また ATP の測定はルシフェラーゼ法により行った。

## 4. 研究成果

### (1) HDAC6 ノックアウトマウスにおける縫線核セロトニン神経系の機能不全の検証

#### HDAC6 ノックアウトマウスにおけるセロトニン合成酵素 Tph2 の量的異常

HDAC6 欠損によるセロトニン神経細胞の機能異常を調べるために Tph2 の発現レベルに着目して縫線核の神経細胞やその投射先である黒質・腹側被蓋野に対して免疫染色を行い野生型マウスと比較検証した。しかしながら形態観察では野生型マウスと比べても Tph2 の発現部位やその量に明瞭な差は見出せなかった。続いて各部位をパンチでくり抜きホモジェネートを作成して生化学的に調べたところ、細胞体のある縫線核部位では野生型マウスと比べても量的な差は見られなかったが、軸索末端のある黒質・腹側被蓋野では HDAC6 ノックアウトマウスでは Tph2 の量が有意に減少していた (図 1)

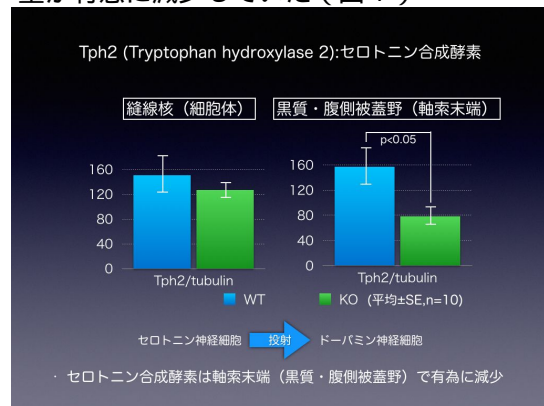


図 1、Tph 2 の量的比較

この結果から、HDAC6 ノックアウトマウスの黒質・腹側被蓋野ではセロトニン神経細胞からのセロトニンの分泌が低下していることが考えられた。そこで実際にそのセロトニン量を同様に採取した脳各部位のサンプルを用いて HPLC 法で測定したところ、細胞体のある縫線核では差は見られなかったが、軸索末端のある黒質・腹側被蓋野では野生型マウスと比べて減少していた。これらの結果は HDAC6 ノックアウトマウスではセロトニン神経伝達の不全が起きていることを示すものであり、その投射先の一つである黒質・腹側被蓋野にあるドーパミン神経系の働きに影響を及ぼしていることが推察された。

### HDAC6 ノックアウトマウスにおけるドーパミン神経系の異常

続いて我々はドーパミン神経系への影響を調べるために、まず黒質・腹側被蓋野のドーパミン神経細胞をトリプトファン脱水素

酵素 TH の抗体を用いて組織切片による形態観察を行い野生型マウスと比較した。この部位に含まれる TH 陽性ドーパミン神経細胞の密度や細胞形態に明瞭な差は見られなかった。また投射先の線条体においても TH 陽性の軸索末端の密度に差は見られなかった。続いて脳各部位におけるドーパミン量を調べたところ、黒質・腹側被蓋野とその投射先である扁桃体では野生型マウスと比べて差は見られなかったが、前頭前野と側坐核では減少する傾向が見られた。

さらに我々は黒質・腹側被蓋野と各投射先に存在するドーパミン D2 受容体の量をウエスタンブロット法で調べたところ、黒質・腹側被蓋野では野生型マウスと比べて差は見られなかったが線条体では有意に増加していた(図2)。

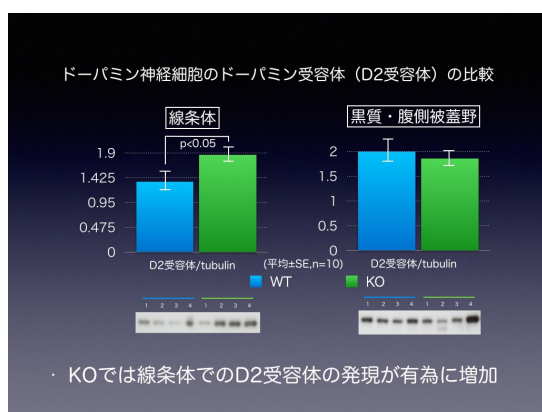


図2、D2受容体量の比較

これらのことから HDAC6 ノックアウトマウスの脳ではドーパミン神経系においてもかなりの異常があることが考えられた。

HDAC6 ノックアウトマウスにおけるドーパミン神経系と関連した行動異常

我々は HDAC6 ノックアウトマウスのドーパミン神経系と関連した行動異常を調べるためにハロペリドール(D2受容体の遮断薬)とメタンフェタミン(シナプス間隙でモノアミンの濃度を上昇させる)を用いて各種行動実験を実施した。

ハロペリドールを用いたマウス尾懸垂試験では野生型と比べてハロペリドールの濃度依存的な反応性が異なる結果を得た。また、メタンフェタミンを用いたオープンフィールド試験では野生型マウスと比べて活動の持続性が亢進した。これらの結果は HDAC6 ノックアウトマウスがドーパミン神経系においても異常があることを意味するものである。

(2)CaMK2 及び PDC1 の HDAC6 による脱アセチル化制御とその神経細胞機能との関連を調べる。

PDC1 が関与するエネルギー代謝の異常と HDAC6 の欠損との関連

PDC1 はピルビン酸をアセチルCoA に変換して TCA サイクルに供給することでミトコンドリアにおける ATP の産生に寄与している。したがって PDC1 の働きに異常を来たす場合、結果としてピルビン酸の量が変動する。我々は HDAC6 ノックアウトマウスの縫線核、皮質、及び血漿についてピルビン酸の濃度を測定し野生型マウスと比較した。

その結果、HDAC6 ノックアウトマウスの縫線核においてピルビン酸濃度の上昇を見出した(図3)

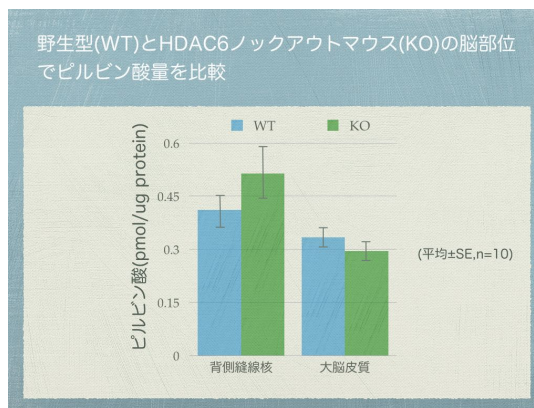


図3、ピルビン酸濃度の比較

次に我々は HDAC6 欠損によるエネルギー代謝の異常を検証するために、PC12 細胞を用いて HDAC6 ノックダウン細胞を作製しピルビン酸と ATP の濃度を測定した。その結果、マウスの縫線核で見られたように HDAC6 ノックダウン PC12 細胞においてもピルビン酸の濃度が上昇し、一方で ATP 濃度が低下した。またこのことは HDAC6 の活性阻害剤で細胞を処理しても観察された。

これらの結果は、HDAC6 の活性が失われると PDC1 の働きを低下させ、その神経細胞をエネルギー代謝不全に陥らせることを意味している。

HDAC6 の活性消失がもたらす PDC1 への影響 HDAC6 の活性消失が PDC1 の働きにどう影響したかを明らかにするためにまず分子の発現量への影響を調べた。マウスの縫線核、皮質、黒質・腹側被蓋野等のサンプルを用いて抗 PDC1 抗体を用いたウエスタンブロット法により定量したところ、いずれの部位においても野生型と比べて明らかな差は見出せなかった。PDC1 分子は他の PDC 構成分子と複合体を形成することでピルビン酸の脱水素反応を担うため、複合体を形成する能力に異常があるかどうかを検証した。脳部位のサンプルに対して抗 PDC1 抗体を用いて免疫沈降を行い、そのサンプルに対して抗 PDC-E2 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。しかしながら複合体形成においても野生型マウスと比べ差は見出せなかった。

これらの結果から HDAC6 の活性消失下であっても PDC1 の発現量や複合体形成能には影響

響を及ぼさないことが判った。

したがって PDC1 の酵素活性そのものに影響を及ぼす可能性が考えられ、現在その活性を測定中である。

#### CaMK2 及び PDC1 のアセチル化の検証

実際に内在性の CaMK2 及び PDC1 分子のアセチル化を検出するために、HDAC6 ノックアウトマウスの脳ホモジェネートを作製しそれぞれに対する特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、抗アセチル化リジン抗体を用いてウエスタンブロットで検出を試みている。また並行して、CaMK2 及び PDC1 の発現プラスミドを入手し PC12 細胞や HEK293 細胞に発現させてタンパク質分子を回収し、抗アセチル化抗体による検出を実施している。しかしながら現時点ではアセチル化の検出には至っておらず、用いる抗体の反応性や検出方法の改善が期待される。

以上本研究により、1) HDAC6 ノックアウトマウスではセロトニン合成酵素とセロトニン量の減少を伴うセロトニン神経系の異常、2) この投射先である黒質・腹側被蓋野のドーパミン量の減少と線条体神経細胞のドーパミン D2 受容体の増加を伴うドーパミン神経系の異常が起こっていることが考えられた。また、この原因の一つには PDC1 が関与するエネルギー代謝経路の不全が明らかとなり、このことが神経細胞の機能に影響を及ぼしセロトニン神経細胞の働きが不全となると考えられた。

本研究は細胞質脱アセチル化酵素の活性不全が脳機能障害をもたらすことを初めて明らかにしたものであり、今後の精神疾患の病態解明や新規治療戦略のターゲットとして期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

川口禎晴：抗うつ様行動を示す HDAC6 ノックアウトマウスの脳セロトニン神経細胞におけるミトコンドリア機能異常・包括型脳科学研究推進支援ネットワークワークショップ(名古屋) 2013.8.31

川口禎晴、深田齊秀、竹島京子、中山敦雄：抗うつ様行動を示す HDAC6 ノックアウトマウスの脳セロトニン神経細胞におけるエネルギー代謝異常. 第 37 回日本神経科学大会(横浜) 2014.9.12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[www.inst-hsc.jp](http://www.inst-hsc.jp)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川口禎晴(Kawaguchi, Yoshiharu)  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・主任研究員  
研究者番号：00450833

##### (2) 研究協力者

竹島京子(Takeshima, Kyoko)  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・実験補助  
研究者番号：なし