

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700342

研究課題名(和文)新規脳内モノアミン調節因子の機能異常による情動障害発症機構の解明

研究課題名(英文)Emotional disorder caused by dysfunction of a novel monoamine modulator.

研究代表者

樺山 実幸 (Kabayama, Miyuki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：70415115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミンオキシダーゼ(MAO)による迅速なモノアミンの代謝分解が、脳高次機能発現に必須であり、その破綻は様々な脳神経疾患を誘発する。しかし、MAO自身の蛋白質分解機構は不明であった。本研究は、ユビキチンリガーゼRinesがMAO蛋白質のユビキチン化と分解を促進し、マウス脳におけるMAO蛋白質量を抑制し、モノアミン量を制御することで、正常な情動と社会性行動を制御していることを世界で初めて報告した。実際にRines欠損マウスは、ストレスに対する、情動および社会性行動とモノアミン反応性の異常を示す。この成果は、情動障害および行為障害などの新規の分子発症機序の解明に貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Monoamine oxidase A (MAO-A), the catabolic enzyme of norepinephrine and serotonin, plays a critical role in emotional and social behavior. However, the control and impact of endogenous MAO-A levels in the brain remains unknown. Here we show that the RING finger-type E3 ubiquitin ligase Rines/NF180 regulates brain MAO-A subset, monoamine levels, and emotional behavior. Rines interacted with MAO-A and promoted its ubiquitination and degradation. Rines knock-out mice displayed impaired emotional and social behavior. Monoamine levels were altered in some brain regions, and MAO-A enzymatic activity was enhanced in the locus ceruleus in Rines knock-out mice. Treatment of Rines knock-out mice with MAO inhibitors showed genotype-specific effects on some of the abnormal affective behaviors. These findings verify that Rines is a critical regulator of the monoaminergic system and emotional behavior and identify a promising candidate drug target for treating diseases associated with emotion.

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：分子細胞神経科学

キーワード：脳高次機能障害 ユビキチンリガーゼ モノアミン

1. 研究開始当初の背景

ノルアドレナリン(NE)、セロトニン(5-HT)、ドーパミン(DA)などのモノアミン系神経伝達物質は、情動および社会性行動、ストレス反応等の様々な行動の制御に重要な役割がある。

モノアミンオキシダーゼ(MAO)は、モノアミンの代謝分解を促進し、モノアミン量の迅速で適切な調節と、それによる適切な脳高次機能発現制御を行うため特に注目されている。また、MAO-A阻害薬は、うつ病などの治療に長年使用されており、PTSDやパニック障害の患者にも有用である。

MAO-A欠損マウスでは、各種脳部位のモノアミン量が増加し、情動記憶の亢進、攻撃性の増加などの情動異常が見られる(*Annu. Rev. Neurosci.* 1999. 22, 197-)。ヒトにおいてもMAO-A遺伝子変異患者が、Brunner症候群と呼ばれる反社会的行動や攻撃性を示す(*Science.* 2002. 297, 851-)。

逆にMAO-A量が多いと、抑うつ、不安の傾向が高くなる。実際にMAO-A蛋白質量の34%の上昇が、臨床的に情動障害と関わる事が報告され(*Archives of general psychiatry* 2006. 63, 1209-)、MAO蛋白質量の迅速かつ厳密な制御が、脳高次機能発現に重要であることが示されている。しかし、MAO蛋白質がどのような機構によって分解されるのかは明らかになっていなかった。これまでに、ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解機構を介したMAO蛋白質の分解系の関与が示唆されていたが、MAO蛋白質を基質としたユビキチン化と分解を促進するユビキチンリガーゼは報告されていなかった。

2. 研究の目的

我々は、新規脳内ユビキチンリガーゼRinesがMAO蛋白質のユビキチン化と分解を促進することを培養細胞系を用いて発見していた。さらにRines欠損マウスは、情動障害等の脳高次機能障害を呈する。したがって本研究では、脳高次機能発現における、マウス脳内でのRinesによるMAO蛋白質の分解機序とそれに伴うモノアミン動態の制御を解明することを目的とした。これにより、情動障害などの新規の分子発症機序の解明に貢献する。

3. 研究の方法

1. 行動学的解析

Rines欠損マウスの行動異常を、情動行動、ストレス反応性、記憶学習、社会性、運動機能などを検査する一連の行動学的解析を行い、検討した。行動解析項目として、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、受動的回避試験、強制水泳試験、モーリス水迷

路試験、ロータロッド試験、ホットプレート、テイルフリック痛覚試験、聴覚試験、社会性試験(社会相互試験、居住者-侵入者試験)などを行った。

2. HPLCを用いたモノアミン量の測定
行動学的解析から、Rines欠損マウスが、ストレス時に情動異常が生じることが明らかになったため、Rines欠損マウスの脳の各部位で、安静時と不快な刺激後(foot shock)におけるモノアミン量を検討した。測定脳部位(前頭前野、扁桃核、黒質、青斑核、縫線核)は、脳の凍結切片から生検パンチャーを用いて、1-2マイクロメートルの円形組織として、切り出した。

3. MAO-A活性の測定

青斑核ではMAO-Aの酵素活性が特に高いことが知られていることから、青斑核領域およびその他のモノアミン測定脳部位において、MAO-Aの酵素活性を測定した。

4. MAO-A蛋白質量の測定

Rines欠損マウスにおいて、青斑核でのMAO-Aの酵素活性が高いことが明らかになったため、青斑核におけるMAO-A蛋白質量を免疫組織化学的およびイムノブロットにより測定した。その結果、Rines欠損マウスにおいて、青斑核でのMAO-Aの蛋白質量も増加していることが明らかになった。一方で、MAO-AのメッセンジャーRNA量をリアルタイムRT-PCR法により測定したところ、差が認められず、MAO-Aの産生は増加していないことを明らかにした。

5. RinesによるMAO-A蛋白質のユビキチン化と分解促進解析

RinesとMAO-A蛋白質過剰発現による培養細胞系、および野生型とRines欠損マウスの青斑核から抽出した内在性のMAO-A蛋白質において、それぞれ生化学的にユビキチン化と分解の検討を行った。

6. MAO阻害剤投与実験

さらに、Rines欠損マウスに表れた行動異常が、MAO-A量の増加によるものかを検討するために、MAO-A阻害剤をRines欠損マウスに投与して、その影響を情動行動異常において評価した。

4. 研究成果

本研究は、新規脳内ユビキチンリガーゼRinesが脳内モノアミン調節因子として働き、情動および社会性行動発現に必須の役割があることを証明した。この成果は学術誌および学会に報告した。

Rines欠損マウスは一見、野生型と変化がないが、行動学的解析から、1)新規環境での不安の亢進、不快刺激に対する嫌悪記憶やストレス反応性の低下、新規マウスに対する親和性の亢進など、ストレスに対する、情動、

社会性反応の異常を示す。さらに、2) 前頭前野や青斑核などにおける、モノアミン量の低下と、不快ストレスに対するモノアミン反応性の異常を示す。また、3) 培養細胞において Rines は、MAO-A に結合し、ユビキチン化とプロテアソームによるタンパク質分解を促進することが分かった。さらに、Rines 欠損マウスの青斑核から抽出した MAO-A では、ユビキチン化の程度が減少していた。以上から、Rines が MAO-A を標的として、その分解をユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解系を介して促進することが明らかになった。4) 実際に、Rines 欠損マウスでは、MAO-A 活性の有意な上昇と MAO-A 蛋白質の有意な増加が、MAO-A 活性の高い青斑核において観察された。5) さらに Rines 欠損マウスは、MAO 阻害剤に対して、野生型とは異なる情動行動反応を示し、複数の異常行動が改善した。これらは、Rines 欠損マウスの情動異常が MAO を介していることを示す。

これらの Rines 欠損マウスで見られる変化は、ヒトおよびマウスの MAO-A 欠損と反対の表現型であり、MAO-A 過剰の表現型とは一致する。

これまで、モノアミンオキシダーゼ (MAO) による迅速なモノアミンの代謝分解が、脳高次発現に必須であり、その破綻は様々な脳神経疾患を誘発することが知られてきた。しかし、MAO 自身の蛋白質分解機構は不明であった。本研究はユビキチンリガーゼ Rines が、マウス脳における MAO 蛋白質量を制御することを始めて報告したものであり、情動障害などの新規の分子発症機序の解明に貢献するものと考えている。

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)

Kabayama M, Sakoori K, Yamada K, Ornthanalai VG, Ota M, Morimura N, Katayama K, Murphy NP, Aruga J

Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses.

The Journal of Neuroscience,

33(32):12940-53 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- 1、招待講演者：樺山実幸
情動行動発現の分子メカニズム
予防動物医学研究会
2013 年度 総会・シンポジウム

(2013年6月16日 東京)

- 2、招待講演者：樺山実幸
情動および社会性行動の新たな分子制御メカニズム

第28回日本獣医生命科学大学学術交流会
(2013年11月9日東京)

- 3、樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純
ユビキチンリガーゼ Rines による前頭前野のモノアミン動態調節を介した情動行動制御機構

Rines E3 ubiquitin ligase regulates emotional behaviors by altering the monoamine dynamics in prefrontal cortex
第36回日本神経科学大会

第56回日本神経化学会

第23回日本神経回路学会大会

(2013年6月20-23日 国立京都国際会館)

- 4、樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純

ユビキチンリガーゼ Rines によるモノアミンオキシダーゼ (MAO-A) 分解を介した情動行動制御機構

第156回 日本獣医学会学術集会

(2013年9月20-22日 岐阜大学)

- 5、M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, M. Ota, N. Morimura, K.-I. Katayama, N.P. Murphy, J. Aruga

Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. Neuroscience 2013, the Society for Neuroscience 43th Annual Meeting

(San Diego, CA, November 9-13, 2013)

- 6、樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純

ユビキチンリガーゼ Rines による、モノアミンオキシダーゼ (MAO-A) 蛋白質分解制御を介した情動行動制御機構

第36回日本分子生物学会

(2013年12月3-6日 神戸ポートアイランド)

[図書] (計 1 件)

日本獣医生命科学大学 研究報告トピック 62号

「ユビキチンリガーゼ Rines による、モノアミンオキシダーゼ (MAO-A) 蛋白質分解制御を介した情動行動制御機構：情動や社会性に関する行動を制御する因子をマウスで発見」

著者：樺山実幸

2013年発行 (p25-30, 6ページ)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

理研プレスリリース

「社会性や情動に関する行動を制御する因子をマウスで発見：不安障害や気分障害の発症メカニズム解明の手がかりに」

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130807_2/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊山 実幸 (KABAYAMA Miyuki)
日本獣医生命科学大学 獣医学部獣医学
科 基礎獣医学部門 形態機能学分野
助教
研究者番号：70415115

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：