

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25290014

研究課題名(和文)5-HT2C受容体のRNA編集によるストレス・情動調節機構の機能形態学的研究

研究課題名(英文)Involvement of RNA editing of 5HT2C receptor in emotion and stress: functional and morphological study

研究代表者

田中 雅樹 (TANAKA, Masaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80264753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニン2C(5-HT2C)受容体は神経系に発現していて情動、ストレス、依存などに関与するが、RNA編集酵素により様々なアイソフォームを生じることが知られるタンパク質で、エピジェネティックな多様化を生じる。研究費の交付期間に、動物実験で慢性アルコール暴露後の飲酒量増加が5-HT2C受容体のRNA編集率増加に伴って起きることを明らかにし、またRNA編集の起こらない遺伝子改変マウスはうつ様行動を示し、前脳側坐核のNPYニューロンが関与することを報告した。このように5-HT2C受容体のRNA編集がアルコール嗜好性や情動に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Serotonin 2C (5-HT2C) receptor is expressed in the nervous system and involved in the emotion, stress and addiction. It is also known to undergo mRNA editing by adenosine deaminase acting on RNA type1 (ADAR1) and ADAR2 and make up to 24 isoforms and show the variety of epigenetic modification. During the period of receiving grants, we revealed that RNA editing of 5-HT2C receptor determines the alcohol preference in mice after chronic alcohol exposure using genetically modified mice. We also clarified that mice exclusively expressing non-edited type of 5-HT2C receptor isoform (INI type) showed desperate behavior and NPY neurons in the nucleus accumbens in the forebrain are involved in that behavior. Thus, we demonstrated that RNA editing of 5-HT2C receptor is related to alcohol preference and emotional behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：5-HT2C RNA編集 アルコール嗜好性 情動 側坐核

1. 研究開始当初の背景

セロトニン_{2C}受容体(5-HT_{2C}R)は5-HT受容体の1つとしてストレスや情動との関わりが指摘されてきた。例えばストレス応答の主軸である視床下部-下垂体-副腎系(HPA-axis)のセロトニンによる賦活は5-HT_{2C}R刺激を介して起きていることやストレス後の不安表現に扁桃体の5-HT_{2C}Rが関与することが報告され、ヒトでも5-HT_{2C}Rのミスセンス変異が情動障害を起し易いことが指摘されている。5-HT_{2C}RはRNA編集酵素により、アミノ酸配列が一部変化するタンパク質の一つでもあり、RNA編集とは転写後修飾によりゲノムからの遺伝情報とは異なったRNA配列を生じることが指し、エピジェネティックな多様化を生じさせる一因となっている。編集は二重鎖RNAの部分でアデノシン(A)がイノシン(I)に変換される(A→I型)、この変換を行う酵素をADAR(adenosine deaminase acting on RNA)と呼び、哺乳類ではADAR1とADAR2のみ確認されている。アデノシンからアミノ基が外れたイノシンはグアノシン(G)のように振る舞って結果としてアミノ酸配列が変化する。5-HT_{2C}RのRNA編集は第2細胞内ループをコードする(A-E部位)の5か所で起きて、3か所のアミノ酸が置換され、そのアイソフォームはRNA編集を全く受けないINI型から全て編集を受けたVGV型まで多様なアミノ酸配列が生じ得るが、脳の部位や、マウスでは系統によって編集程度が異なる。5-HT_{2C}R機能についてはRNAの編集部位が多くなるにつれ、アゴニストやGタンパク質の結合、細胞内シグナル伝達の低下が起り、全体としてRNA編集が起こることでセロトニンの5-HT_{2C}Rへの作用が減弱すると考えられる。うつ病自殺患者では5-HT_{2C}Rの部位による編集の変化などが報告されている。しかし5-HT_{2C}RのRNA編集がストレス・情動にどのように影響するかについて、詳しいメ

カニズムはこれまで不明であった。

研究代表者は以前より、生体の恒常性維持の中枢である脳視床下部の機能形態学的研究を行ってきた。なかでもストレスを制御する視床下部-下垂体系について、拘束ストレス、慢性高浸透圧刺激、腸炎ストレスなどのモデル動物を用いて研究を行ってきた。

最近慢性的なアルコール暴露により、アルコール嗜好性を示すマウス(C57BL/6J)を作製し、5-HT受容体のサブタイプ発現を網羅的に検索すると前脳側坐核における5-HT_{2C}Rの発現が有意に増加していて、アンタゴニスト投与実験等から、5-HT_{2C}Rがアルコール嗜好性に強く影響することを明らかにした(Yoshimoto K et al, Eur J Neurosci 2012)。

2. 研究の目的

そこで本研究申請では5-HT_{2C}RとそのRNA編集がストレス・情動調節にいかに関与するかを明らかにしようとした。特に既に側坐核の5-HT_{2C}Rの発現増加がアルコール嗜好性と関係する結果を得たことから、5-HT_{2C}Rの編集率の変化とアルコール嗜好性の変化について研究を進めた。慢性アルコール暴露後の嗜好性はマウスの系統差があることが以前より知られていて、まずそれとRNA編集との関係を調べた。さらに5-HT_{2C}Rの編集率が変化しない遺伝子改変マウス(INIマウス)を用いて検索を行った。このINIマウスは野生型に比べて情動に異常を示すことから、さらに脳内モノアミンの定量と抗うつ剤(Desipramine)投与による検索を行い、このマウスの行動異常の原因を探った。そして次にRNA編集酵素を側坐核特異的にノックアウトして編集率を下げるとアルコール嗜好性が影響を受けるかについても検討を行った。

3. 研究の方法

5-HT_{2C}Rの編集率はマウス脳の急性スライ

スを作製して目的領域組織をパンチして total RNA を抽出し cDNA を作製した。そして 5-HT_{2c}R の特異的なプライマーで PCR を行い、サブクローン化したコロニーから直接シーケンスして各アイソフォームの割合から、編集率を算出した。慢性アルコール暴露は 10%エタノール蒸気に毎日 4 時間 20 日間暴露させて作製した。その他リアルタイム PCR による mRNA 発現を定量化、ウエスタンブロッティング、行動解析（強制水泳、尾懸垂、オープンフィールド、高架式十字迷路、明暗試験等）、免疫組織化学解析、アデノ随伴ウイルスベクター注入による脳局所遺伝子導入、マイクロダイアリシス等種々の実験手法を組み合わせ解析を行った。

4. 研究成果

以下に示す 5-HT_{2c}R の RNA 編集に関する、大きく分けて 4 つの研究を行った。

1) 5-HT_{2c}R マウスのアルコールに対する嗜好性は系統差があることが知られており、C57BL/6J (C57) はアルコール暴露後飲酒量が増加するが、C3H/HeJ (C3H)や DBA/2J (DBA)は増加しない。そこでこれら C3H や DBA マウスにも慢性アルコール暴露して、側坐核での 5-HT_{2c}R 発現を調べると C57 では増加したが、C3H, DBA では増加が見られず、側坐核の 5-HT_{2c}R がマウスアルコール嗜好性の系統差に関与していることが疑われた。同時に 5-HT_{2c}R mRNA の編集率を調べると、C57 では側坐核で編集を受けたアイソ

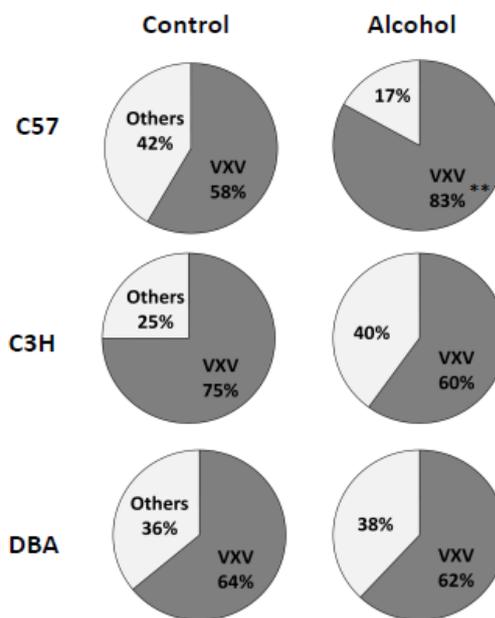
表 1

Isoforms	Acb of C57BL/6J	
	Control (N=58)	Alcohol (N=58)
INI	2 (3%)	2 (3%)
ISI	0 (0%)	0 (0%)
INV	3 (5%)	0 (0%)
IGV	0 (0%)	0 (0%)
VGI	1 (2%)	1 (2%)
VNI	12 (21%)	4 (7%)
VSI	6 (10%)	3 (5%)
VDI	0 (0%)	0 (0%)
VGV	1 (2%)	1 (2%)
VNV	23 (40%)	36 (62%) ^a
VSV	9 (16%)	6 (10%)
VDV	1 (2%)	5 (9%)
	VXV 34 (59%)	VXV 48 (83%) ^{**} P<0.01

フォームの増加が見られたが、海馬では変化はなかった (表 1)。

特に 3 つのアミノ酸の最初と最後がバリン (V)に置換したアイソフォーム (VG, VV, VSV, VDV)、まとめると VXV というタイプの発現において C57 では有意に増加が見られたが、C3H, DBA の系統では編集された VXV 型のアイソフォームの増加が見られなかった (図 1)。

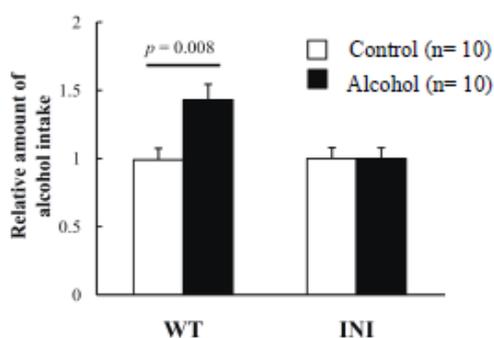
図 1



RNA 編集酵素、ADAR1, ADAR2 の発現も C57 の側坐核では増加していたが、C3H, DBA では増加が見られなかった。以上の結果はアルコール嗜好性のある C57 では 5-HT_{2c}R mRNA の編集頻度の増加が慢性アルコール暴露によって生じるが、嗜好性が見られない C3H, DBA 系統では RNA 編集頻度に変化ないという結果になった。この結果については、5-HT_{2c}R の RNA 編集頻度が増加することが、アルコール嗜好性を生むのか、もしくは慢性的なアルコール暴露の結果として C57 マウスでは編集頻度が増加したのかという 2 通りの解釈ができる。そのどちらであるのかを確かめるために、C57 の遺伝的背景を持つが、5-HT_{2c}R の RNA 編集を起こさない、ノックインマウス (INI マウス)を用いて慢性アルコール暴露後の飲酒量を測定

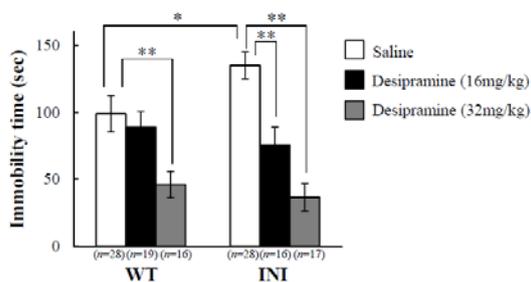
した。ADAR は RNA の 2 重鎖構造を認識して編集を起こす。5-HT_{2c}R の exon5 は intron5 と 2 重鎖を作っており、INI マウスは編集部位 5 カ所を含む領域に相対する intron5 の部分を削除した C57 の遺伝的背景を持つ遺伝子改変マウスである。結果は、野生型は飲酒量が増加したが、INI マウスは変化が見られず、側坐核における 5-HT_{2c}R の発現増加もなかった (図 2)。これは 5-HT_{2c}R mRNA の編集頻度の変化がマウスの慢性アルコール暴露後のアルコール嗜好性を決定していることを示している。(発表論文②、⑩)

図 2



2) この INI マウスは強制水泳試験で絶望様行動やうつ様行動を示し、抗うつ薬 desipramine に感受性が高まっていた (図 3)。

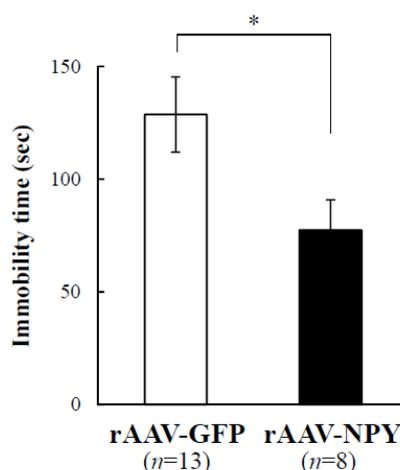
図 3



その原因を探っていくと、側坐核の NPY 遺伝子の発現が低下していた。組織学的解析では 5-HT_{2c}R は NPY ニューロンに発現せず、GABA 陽性ニューロンに発現し間接的に NPY ニューロンを抑制していることが示唆された。逆に AAV による側坐核での NPY の強制発現は無動時間を低下させ (図 4)、5-HT_{2c}R の RNA 編集は側坐核

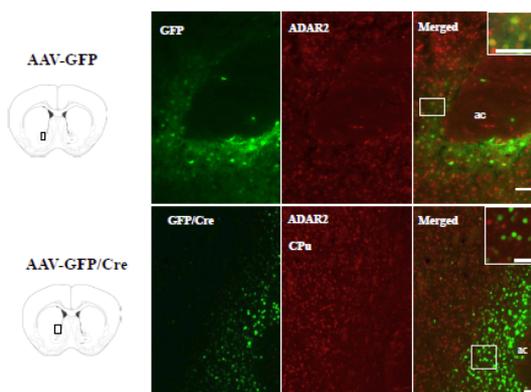
NPY ニューロンを介して調節されていることが示唆された。(発表論文⑤)

図 4



3) 実験 1) で慢性アルコール暴露によるアルコール嗜好性の増加は 5-HT_{2c}R の RNA 編集に制御されていることが遺伝子改変マウスを用いた実験で判明した。編集率が上昇したのは ADAR2 特異的な編集 site D で、次の実験として側坐核の RNA 編集が影響しているのかを側坐核のみの ADAR2 発現を局所ノックアウトさせて慢性暴露下の飲酒量がどうなるか測定した。C57 の遺伝子背景を持つ ADAR2 flox マウスの側坐核のみに AAV ベクターで Cre を発現させて、局所的に ADAR2 をノックアウトすると (図 5)、5-HT_{2c}R やグルタミン酸受容体 type2 (Glut2) の RNA 編集率が有意に低下した。

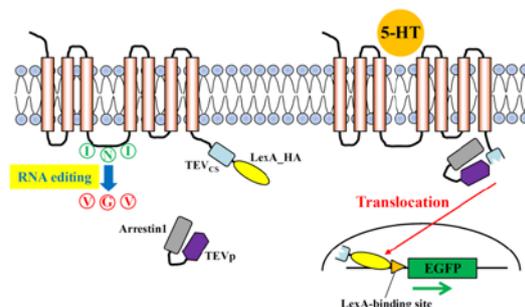
図 5



飲酒量については野性型では増加するが、側坐核の ADAR2 ノックアウト群では飲酒量の増加が見られなかった。このことから側坐核の RNA 編集は飲酒量などアルコール依存に関与することが示唆された (論文投稿中)。

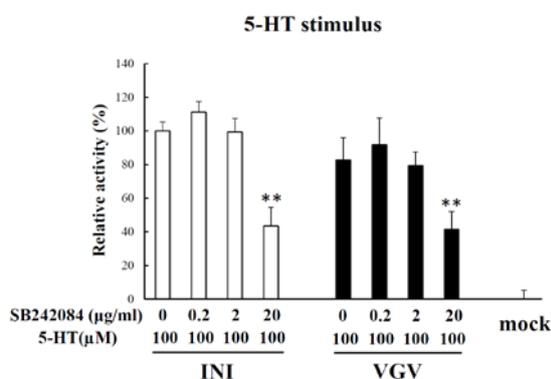
4) 5-HT_{2C}R 活性を簡便に測定できるシステムを開発するために、Tango と呼ばれる Arrestin の G タンパク質共役型受容体への結合を利用した系を構築した。まず Tango ベクターに 5-HT_{2C}R を挿入した pEF1-5-HT_{2C}R-Tango プラスミドを構築し、2 種類の RNA 未編集型 (INI) と完全編集型 (VGV) アイソフォームを使用した。次に 5-HT_{2C}R から遊離した LexA の量に依存する EGFP によるレポータープラスミドを構築した。

図 6



そして安定発現細胞株を作製し、INI, VGV 型の活性を比較し、このアッセイ系が有効に作動していることも確認した。(発表論文⑥)

図 7



<引用文献>

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Kimura M. Serotonin_{2C} receptors in the nucleus accumbens are involved in enhanced alcohol-drinking behavior. *Eur J Neurosci* 35: 1368-1380, 2012.

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 10 件)

- ① Balabanov IE, Matsuda KI, Mori H, Yamada S, Kitagawa K, Yamamoto Y, Tsukahara S, Tanaka M. Neuronal activity in the sagittalis nucleus of the hypothalamus after ovarian steroid hormone manipulation and sexual behavior in female rat. *Neurosci Lett* 671: 25-28, 2018, 査読有.
DOI: 10.1016/j.neulet.2018.02.008.
- ② 田中雅樹. セロトニン 2C 受容体と RNA 編集—飲酒行動への関与について—*京都府立医科大学雑誌* 126: 461-472, 2017, 査読無.
- ③ Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M. HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. *Autophagy* 13: 133-148, 2017, 査読有.
DOI: 10.1080/15548627.2016.1248018.
- ④ Yoshii T, Oishi N, Ikoma K, Nishimura I, Sakai Y, Matsuda KI, Yamada S, Tanaka M, Kawata M, Narumoto J, Fukui K. Brain atrophy in the visual cortex and thalamus induced by severe stress in animal model. *Sci Rep* 7: 12731, 2017, 査読有.
DOI: 10.1038/s41598-017-12917-z.
- ⑤ Aoki M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Tsujimura A, Yamamoto T, Kanamura N, Tanaka M. Involvement of serotonin 2C receptor RNA editing in accumbal neuropeptide Y expression and behavioural despair. *Eur J Neurosci* 43: 1219-1228, 2016, 査読有.
DOI: 10.1111/ejn.13233.
- ⑥ Watanabe Y, Tsujimura A, Aoki M, Taguchi K, Tanaka M. Development of the 5HT_{2C}R-Tango System Combined with an EGFP Reporter Gene. *J Mol Neurosci* 58: 162-169, 2016, 査読有.
DOI: 10.1007/s12031-015-0650-2.
- ⑦ Shirahase T, Aoki M, Watanabe R, Watanabe Y, Tanaka M. Increased alcohol consumption in relaxin-3 deficient male mice. *Neurosci Lett* 612: 155-160, 2016, 査読有.
DOI: 10.1016/j.neulet.2015.12.014.
- ⑧ Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neurol* 524: 1236-1258, 査読有.
DOI: 10.1002/cne.23901.

- ⑨ Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous α -synuclein fibrils. *Neurobiol Dis* 73: 244-253, 2015, 査読有.
DOI: 10.1016/j.nbd.2014.10.011.
- ⑩ Watanabe Y, Yoshimoto K, Tatebe H, Kita M, Nishikura K, Kimura M, Tanaka M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 739-751, 2014, 査読有.
DOI: 10.1017/S1461145713001545.

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 白波瀬崇平, 渡邊義久, 辻村敦, 青木美空, 山本俊郎, 金村成智, 郭伸, 田中雅樹: RNA 編集酵素/ADAR2 の側坐核特異的ノックアウトマウスの行動解析. 第93回日本解剖学会近畿支部学術集会, 大津市 2017.
- ② 白波瀬崇平, 渡邊義久, 辻村敦, 青木美空, 山本俊郎, 金村成智, 郭伸, 田中雅樹: RNA 編集酵素/ADAR2 の側坐核特異的ノックアウトマウスの行動解析. 第40回日本神経科学大会, 千葉 2017.
- ③ Tanaka M, Aoki M, Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y: Non-edited isoform of 5-HT_{2c} receptor affects NPY expression in the nucleus accumbens and behavioral despair in mice. *Neuroscience* 2016, SanDiego, 2016.
- ④ 田中雅樹: 「大脳辺縁系と関わる行動の神経基盤研究のトピックス」側坐核 RNA 編集と情動・飲酒行動. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 2017.
- ⑤ 渡邊義久, 青木美空, 吉本寛司, 辻村敦, 田中雅樹: セロトニン 2C 受容体の RNA 編集は側坐核 NPY 発現と絶望行動の制御に関与する. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.
- ⑥ 青木美空, 渡邊義久, 吉本寛司, 田中雅樹. Influence of 5HT_{2c}R RNA editing on accumbal NPY expression and behavioral despair. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.
- ⑦ 田中雅樹, 青木美空, 渡邊義久, 辻村敦. 5-HT_{2c} 受容体の RNA 編集と情動行動. 第13回 GPCR 研究会, 東京, 2016.
- ⑧ 青木美空, 渡邊義久, 吉本寛司, 田中雅樹. 側坐核の NPY 発現とうつ様行動への 5-HT_{2c} 受容体 RNA 編集の関与. 日本解剖学会・近畿支部会, 京都, 2015.
- ⑨ Tanaka M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Nishikura K, Kimura M. RNA editing of serotonin 2C receptor is involved in alcohol intake. 20th International Symposium on Regulatory Peptides, Kyoto 2014.
- ⑩ Watanabe Y, Yoshimoto K, Tanaka M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. FEBS EMBO, Paris, 2014.
- ⑪ Watanabe Y, Tsujimura A, Aoki M, Taguchi K, Tanaka M. Development of Tango system for the monitoring of 5-HT_{2c}R activity. *Neuroscience* 2014, Washington DC, 2014.
- ⑫ 青木美空, 渡邊義久, 吉本寛司, 田中雅樹. 5-HT_{2c} 受容体 RNA 編集の脳高次機能への役割 ~RNA 未編集マウスの行動解析~. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014.
- ⑬ 渡邊義久, 辻村敦, 青木美空, 田口勝敏, 田中雅樹. Tango を利用した 5-HT_{2c} 受容体活性のモニタリングシステム開発. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014.
- ⑭ 渡邊義久, 吉本寛司, 木村實, 田中雅樹. 5-HT_{2c} 受容体 RNA 編集のアルコール嗜好性への関与. 日本行動神経内分泌研究会, 京都, 2014.
- ⑮ Watanabe Y, Yoshimoto K, Tatebe H, Nishikura K, Kimura M, Tanaka M. Involvement of 5-HT_{2c}R RNA-editing in alcohol preference. *Neuroscience* 2013, San Diego, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anatomy1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 雅樹 (TANAKA, Masaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80264753

(2) 研究分担者

田口 勝敏 (TAGUCHI, Katsutoshi)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 60462701

(3) 連携研究者

渡邊 義久 (WATANABE, Yoshihisa)

京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 50363990