

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248033

研究課題名(和文) マウスをモデルとした精神疾患へのアプローチ

研究課題名(英文) An approach to mental disorders using model mice

研究代表者

海老原 史樹文 (Ebihara, Shizufumi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50135331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円、(間接経費) 10,770,000円

研究成果の概要(和文)：抗うつ薬の評価法として用いられる尾懸垂試験における無動行動を制御する遺伝子Usp46を中心として、マウスの行動障害に関わる遺伝要因及び遺伝と環境との相互作用について分析し、その生理生化学的メカニズムを解明することを目的とした。その結果、Usp46は脳の様々な領域で発現し、GABA神経系を介して多様な行動に影響を及ぼすことが示された。また、Usp46変異マウスはストレスに対して脆弱であり、養育活動も低下するが、適正な養育活動を受けて成長すると、正常な養育行動が発現することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified ubiquitin specific peptidase 46 (Usp46) as one of the genes responsible for reductions in time spent immobile behavior in the tail suspension and forced swim test. This gene is involved in the regulation of not only immobility but also many other behavioral phenotypes. In this study, in order to understand physiological and biochemical mechanisms of behavioral disorders caused by Usp46 mutation, we studied Usp46 mutant mice from both genetic and environmental points of view. As a result, we found that Usp46 is expressed in a number of brain regions and regulates several behavioral phenotypes through GABAergic system. We also found that Usp46 mice are vulnerable to stress, and exhibit poor maternal behavior. Poor maternal behavior, however, can improve if adequate postpartum maternal care is given, even in these genetically vulnerable mice.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 / 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：マウス 遺伝 行動 脱ユビキチン化酵素 モデル動物 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

気分障害(うつ病や双極性障害など)や統合失調症は精神疾患のなかでも頻度が高く、特にうつ病は、成人の15人に1人が罹患し、年間3万人を越す自殺の原因の一つにもなっている。こうした精神疾患は高齢化の進行やリストラなどのストレス社会の中で益々増加する傾向にあり、早急に解決すべき社会問題となっている。精神疾患は、単一の遺伝子で決まる性質のものではなく、多数の“脆弱性”遺伝子と環境との相互作用により発症するため、遺伝子を特定することは容易なことではない。そのため、モデル動物を用いたアプローチが有効な手法の一つとして活用されている。

我々は、抗うつ薬の反応性を調べる強制水泳や尾懸垂テストにおいて無動行動をほとんど示さないCSマウスを発見し、遺伝学的手法により、絶望行動を制御する量的形質遺伝子 *Usp46* を特定することに成功した (*Nature Genetics*, 41: 688, 2009)。この遺伝子は、脱ユビキチン化酵素をコードしており、抑制性神経伝達物質である GABA の働きに影響を与える。一方、ストレス環境が行動や生理に及ぼす影響についてもよく知られており、遺伝的に均一であってもストレス負荷により行動表現型が異なってくる。そこで、本研究では、これらを踏まえ、*Usp46* 遺伝子を中心として、マウスの行動障害に関わる遺伝要因及び遺伝と環境との相互作用について分析し、その分子メカニズムを解明することを目指した。

2. 研究の目的

【遺伝要因に関する研究】

(1) *Usp46* の作用メカニズムの解明

生化学的研究

USP46 タンパク質の基質を特定する。

組織学的研究

USP46 タンパク質の発現部位を免疫組織学により特定する。

行動・薬理学的研究

Usp46 変異マウスなどを用いて各種行動試験を行い、*Usp46* の行動表現型に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 絶望行動を制御する新規量的形質遺伝子(QTG)の同定

【遺伝と環境要因の相互作用に関する研究】

(3) 発育過程における環境変化の影響

母子分離・社会的分離ストレスの影響

Usp46 変異マウスのストレス脆弱性について検討する。

里親環境の影響

Usp46 変異マウスの養育行動形成における里親の影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) *Usp46* の作用メカニズムの解明

生化学的研究

USP46 の基質を特定するために、ex vivo

の細胞培養系を構築し、USP46 が相互作用する分子群と USP46 の発現量に依存して量的に変動する細胞内タンパク質群を解析した。

組織学的研究

可変型遺伝子トラップ法により作製された *Usp46* ノックアウト(KO)マウス(レポーター遺伝子として LacZ 遺伝子が組み込まれており、-GALACTOSIDASE をコードする)を利用して *Usp46* の発現部位を特定した。

行動・薬理学的研究

脱ユビキチン化酵素 USP46 における 92 番目のリジンが欠損した MT マウス及び KO マウスを用いて GABAA 受容体作動薬及び拮抗薬などを用いて行動薬理学的試験を行なった。また、GABA 神経系が関与すると思われる行動を中心に行動解析を行なった。

(2) 絶望行動を制御する新規量的形質遺伝子(QTG)の同定

第4番染色体上の責任遺伝子を同定するため、多数のコンジェニックマウスを育成し、それらの表現型(強制水泳における無動時間)と遺伝子型の対比による責任遺伝子座の絞り込みを行なった。

(3) 発育過程における環境変化の影響

母子分離及び社会的分離ストレスの影響

Usp46 変異マウスと野生型マウスに母子分離または離乳後の社会的分離(隔離飼育)によるストレスを与え、生育後に不安様行動や社会性行動、営巣行動、養育行動、うつ様行動など様々な行動を観察した。

里親環境の影響

C57BL/6J(以下B6)と *Usp46* 変異マウスをそれぞれ同時期に交配にかけ、生まれた仔に対して里親交換処置を施した。その後、8週齢に達したマウスについて、養育行動や尾懸垂テストなどの行動実験を行い、里親飼育環境の影響の検討を行った。実験群として、そのまま本来の親に育てられた control 群、異なる *Usp46* の遺伝子型を持つ里親に育てられた Cross-Foster 群、さらに親交換処理の影響を検討するために、同じ *Usp46* の遺伝子型を持つ里親に育てられた In-Foster 群を用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1) *Usp46* の作用メカニズムの解明

生化学的研究

まず標的分子の検索に適う細胞培養系の構築に着手した。エピソーム発現ベクター pEBMulti-Hyg にヒト野生型 USP46 または変異型 USP46 (K92) の各遺伝子を組み込み、続いてそれらの上流に FLAG 遺伝子を挿入した。各 FLAG-USP46 遺伝子発現ベクターは、非リポソーム型のトランスフェクション試薬を用いてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に導入した。その後、ハイグロマイシン B での選択培養を継続したところ、FLAG ペプチドと融合した野生型または K92 型 USP46 を安定的に発現する2種類の細胞株が得られた。対数増殖期のこれら培養細胞を回収して抽出液を

調製後、抗 FLAG 抗体結合アガロースを用いた免疫沈降に供した。沈降産物を LC-MS/MS で解析したところ、両細胞株から USP46 自身と USP46 の相互作用分子として既に知られている WDR48 と DMWD が同定された。また、これら以外に複数種類の細胞内タンパク質が見出された。

組織学的研究

-GALACTOSIDASE 発現を指標とした免疫組織化学の結果、嗅球、大脳皮質、外側中隔、分界条、外側嗅索、視床下部室傍、扁桃体、海馬、海馬台、小脳に発現が認められた。

行動・薬理学的研究

尾懸垂試験(TST)における無動時間を制御する神経機構を明らかにするため、脱コピキチン化酵素 USP46 における 92 番目のリジンが欠損した MT マウス及び KO マウスを用いて行動薬理学的試験を行なった。まず、KO マウスを作製して TST を行なったところ、KO マウスは MT マウスと同様に無動時間の短縮を示した。次に、GABAA 受容体作動薬及び拮抗薬が誘起する TST における無動時間の変化を検討した。その結果、GABAA 受容体作動薬を投与すると、MT マウスと KO マウスのいずれにおいても無動時間は正常マウス (C57BL/6J) 程度まで延長した。さらに、GABAA 受容体作動薬及び拮抗薬を同時に投与すると、いずれのマウスにおいても無動時間の延長が阻害された。これらの結果から、MT 及び KO マウスにおいて、TST における無動時間の短縮は GABA 神経系による制御を受けていることが明らかとなった。

次に、MT 及び KO マウスを用いて GABA 神経系が関与すると思われる行動を中心に解析を行なった。実施したのはアルコール(GABAA 受容体作動薬)嗜好性及び正向反射試験、スクロース嗜好性及び反応性試験、Novelty-suppressed feeding(NSF)試験、新奇物体認知試験などである。その結果、アルコール嗜好性及び正向反射試験において、*Usp46* 変異は GABA 神経系の反応性低下を、スクロース嗜好性及び反応性試験、NSF 試験において、うつ様または無快楽症様行動を、また、新奇物体認知試験では、認知または記憶の低下をもたらすことが明らかとなった。以上の結果は、*Usp46* が GABA 神経系を介して様々な行動に影響することを示唆した。

(2) 絶望行動を制御する新規量の形質遺伝子(QTG)の同定

責任遺伝子の存在を示すピークが検出された領域付近のみが CS マウス由来の染色体に置き換わったコンジェニックマウスを 7 系統作出した。そのうち、無動時間が短縮する系統が 2 系統得られた。遺伝型判定により両系統は 139.3~154Mb が CS 由来の染色体に置き換わっていたため、その約 15Mb 内に責任遺伝子の存在が示唆された。両系統のうち、CS マウス由来の染色体領域が短い系統のマウスと B6 マウスを交配させ、さらに短い CS 由来の染色体領域を持つサブコンジェニック

マウスを 13 系統作出した。これらの系統について無動時間を検討したが、無動時間が有意に短縮する系統は確認できなかった。この結果から、第 4 番染色体領域の 139.3~154Mb 間に存在する遺伝的効果の弱い複数の責任遺伝子が無動時間を短縮させる可能性が考えられた。また、次世代シーケンサーを用いて 139.3~154Mb 間の塩基配列を CS と B6 マウスで比較し、*Gm13178* と *Nmnat1* を候補遺伝子として挙げた。次に、FST における無動時間が短縮する 2 系統のコンジェニックマウスの行動特性を明らかにするため、オープンフィールド試験を行なった。その結果、両系統とも新規環境下における活動量が増加した。この結果から、第 4 番染色体の 139.3~154Mb 間に、ストレス刺激により誘発される活動変化に関連する責任遺伝子が存在することが示唆された。

(3) 発育過程における環境変化の影響

母子分離・隔離飼育の影響

社会的分離ストレスを与えた *Usp46* 突然変異マウスでは、高架式十字迷路試験において不安様行動の減少と自発的活動量の増加が見られた。また、社会性相互作用試験において他個体への攻撃行動や逃避行動の増加、営巣試験において営巣能力の低下が見られた。このことから変異型 *Usp46* は、社会的分離ストレスに対する脆弱性をもたらす可能性が示唆された。

里親環境の影響

親から受ける養育環境が成長後の仔の養育能力の形成に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、正常な養育行動を示す B6 マウスに育てられた *Usp46* 変異マウスでは、仔を温めている時間、舐める時間などが B6 マウス並みに回復した。反対に、養育活動が低下している *Usp46* 変異マウスに育てられた B6 マウスは、仔を温めている時間の減少、立ち上がり回数の増加など、養育能力の低下が見られた。以上の結果から、遺伝的に脆弱なマウスも、適正な養育環境下で育てられた場合、行動異常が発現することはなく、逆に遺伝的に正常なマウスでも、劣悪な環境下で育てられた場合には、養育能力形成に問題が生じるということが示された。

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 11 件)

(1) Imai S, Kano M, Nonoyama K, Ebihara S. Behavioral characteristics of ubiquitin-specific peptidase 46-deficient mice. *PLoS One*.2013;8(3): e58566. doi:10.1371/journal.pone.0058566. (査読有)

(2) Imai S, Mamiya T, Tsukada A, Sakai Y, Mouri A, Nabeshima T, Ebihara S. Ubiquitin-Specific Peptidase 46 (*Usp46*)

Regulates Mouse Immobile Behavior in the Tail Suspension Test through the GABAergic System. *PLoS One*. 2012;7(6):e39084. doi:10.1371/journal.pone.0039084. (査読有)
(3) Niwa M, Matsumoto Y, Mouri A, Ozaki N, Nabeshima T. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(4):459-77. doi: 10.1017/S1461145710001239. (査読有)
(4) 海老原史樹文. マウスの絶望行動を制御する遺伝子 *Usp46* 分子精神医学 10(1):66-67 (2010) (査読無)
(5) 海老原史樹文、富田滋. マウスの“行動的絶望”を制御する遺伝子の特定 *日本神経精神薬理学雑誌* 29:19-22 (2010) (査読無)

〔学会発表〕(計28件)

(1) 今井早希、海老原史樹文、*Usp46* 変異がマウスの行動及び GABA 神経系に及ぼす影響、日本畜産学会第 116 回大会 2013.3.28-30 安田女子大学キャンパス
(2) 梅村翔也、今井早希、海老原史樹文、*Usp46* 突然変異マウスを用いた養育行動に関する研究、日本畜産学会第 116 回大会 2013.3.28-30 安田女子大学キャンパス
(3) 青木勝彦、宮野千草、梅村翔也、朝倉正、吉田清嗣、海老原史樹文、高田耕司、絶望行動を制御する脱ユビキチン化酵素 *USP46* と相互作用するタンパク質の検索、第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡国際会議場
(4) 今井早希、海老原史樹文、リズム異常を示す *CS* マウスから同定した *Usp46* 変異マウスの行動解析、第 19 回日本時間生物学会学術大会 2012.9.16-17 北海道大学学術交流会館
(5) Saki Imai, Shizufumi Ebihara, Behavioral phenotypes of ubiquitin-specific peptidase 46 (*Usp46*) knockout mice, 第 35 回日本神経科学大会 2012.9.19 名古屋国際会議場
(6) 梅村翔也、今井早希、鹿野真、海老原史樹文、マウスにおける里親交換が仔の養育行動へ及ぼす影響-*Usp46* 突然変異マウスを用いた実験-(続報) 日本畜産学会第 115 回大会 2012.3.27-30 名古屋大学東山キャンパス
(7) 三村彩有実、梅村翔也、大島裕大、今井早希、海老原史樹文、マウスの養育活動に関する行動生理学的解析、日本畜産学会第 115 回大会 2012.3.27-30 名古屋大学東山キャンパス
(8) 大島裕大、今井早希、鹿野真、海老原史樹文、マウスの行動に及ぼす発達期ストレス環境の影響、日本畜産学会第 115 回大会 2012.3.27-30 名古屋大学東山キャンパス
(9) 海老原史樹文、マウスをモデルとした児童虐待に対する生物学的アプローチ、本間

さと教授退職記念講演会・シンポジウム「時刻と時間の生理学」 2012.3.9-10 京王プラザホテル札幌

(10) 海老原史樹文、*Deubiquitination and behavior*、日本睡眠学会第 36 回定期学術集会 2011.10.15-16 worldsleep2011 2011.10.15-20 国立京都国際会館
(11) 今井早希、間宮隆吉、鍋島俊隆、海老原史樹文、*Usp46* 突然変異マウスが示す尾懸垂行動時間の短縮は GABA 系を介する、Animal2011 日本動物心理学会(第 71 回)日本動物行動学会(第 30 回)応用動物行動学会/日本家畜管理学会(2011 年度)合同大会 2011.9.8-11 慶応義塾大学三田キャンパス西校舎

(12) 海老原史樹文、マウスの“行動的絶望”を制御する量的形質遺伝子、脱ユビキチン化酵素をコードする *Usp46*、第 50 回日本先天異常学会学術集会 2010.7.8-10 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

(13) 海老原史樹文、マウスの“行動的絶望”を制御する遺伝子 *Usp46* の特定、日本睡眠学会第 35 回定期学術集会「学ぼう睡眠学 広げよう睡眠医療」2010.7.1 名古屋国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~rhythm/6> . 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 史樹文 (Ebihara Shizufumi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：50135331

(2) 研究分担者

鍋島 俊隆 (Nabeshima Toshitaka)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：70076751

高田 耕司 (Takada Koji)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：30179452

(3) 連携研究者

阿部 訓也 (Abe kuniya)
独立行政法人理化学研究所・チームリーダー
研究者番号：40240915

間宮 隆吉 (Mamiya Takayoshi)

名城大学・薬学部・助教
研究者番号：70340297