

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500877

研究課題名(和文) 認知機能や情動行動に及ぼす酸化ストレスの影響

研究課題名(英文) Effects of oxidative stress on brain function

研究代表者

鈴木 敬一郎 (Suzuki, Keiichiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達障害における酸化ストレスの影響は不明な点が多い。銅亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)は活性酸素を低減させる抗酸化酵素である。本研究では、SOD1をノックアウトしたマウス(SOD1KOマウス)と野生型マウスを用いて、学習能力や情動行動に対する酸化ストレスの影響を調べた。SOD1KOマウスでは野生型マウスに比べて、能動的回避学習の獲得に遅れがみられた。また、SOD1KOマウスでは、脳内モノアミンであるドーパミンとセロトニンの量が増加していた。これらの結果から、酸化ストレスは脳内モノアミンの代謝や神経伝達に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are generated by a multitude of biochemical reactions and cellular functions in all cells. The excess reactive oxygen species (ROS) could lead to damage to DNA, proteins and lipid, and this damage accumulates over time. Oxidative stress caused by accumulated ROS is thought to cause neurotransmitter disorders associated with those diseases may induce learning disabilities, memory deficits and depression. However, little is known whether oxidative stress induces neurotransmitter disorders. Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) is an anti-oxidative enzyme and protects cells against oxidative stress. The effects of SOD1 deficiency on brain functions and tissue contents of monoamines were tested. We found that SOD1 KO mice exhibited some abnormal behaviors in shuttle box learning tests and alterations in brain monoamine metabolism compared with wild-type mice. These data suggest that oxidative stress affects monoamine metabolism and neurotransmission.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス SOD1 神経伝達 行動学 モノアミン

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳重量は体重の 2%程度にすぎないが、脳の酸素消費量は全身の約 20%を占める。脳を構成する神経細胞の機能を保持するためには、大量のエネルギーが必要であり、それはミトコンドリアでの酸素呼吸によって賄われている。このミトコンドリアでの酸素呼吸は、反応性の高い活性酸素種 (ROS) の発生を伴ってしまう。ROS はタンパク質や脂質、核酸などの生体分子を傷害して、多くの疾患・病態の原因や進行に関与することが知られている。一般的に、神経細胞は分裂能を失っていると考えられ、ROS による傷害の蓄積 (=酸化ストレス) は、神経細胞の不可逆的な機能不全や変性脱落の原因となる。そのため細胞内には過剰な ROS を消去する抗酸化酵素や抗酸化物質が多数存在し、細胞を酸化ストレスから防御している。なかでも銅亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn-SOD、SOD1) は、酸素呼吸によって最初に生成される ROS であるスーパーオキシドアニオンラジカル (スーパーオキシド) をより反応性の弱い過酸化水素と酸素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る重要な役割を果たしている。スーパーオキシド自体の酸化力はそれほど強くないが、細胞内の遷移金属と反応すると、反応性が高い ROS であるヒドロキシラジカルを発生させる。そのために、ROS の最上流にあるスーパーオキシドを消去する SOD の役割は大きい。この SOD1 をノックアウト (KO) したマウスは、骨格筋の萎縮や骨粗鬆症、難聴、加齢黄斑変性症などの老化現象に似た症状を呈する。従って、脳内でも SOD1 が欠損することで、酸化ストレスの強い環境に曝されていると考えられる。加齢に伴う種々の神経変性疾患や認知症には酸化ストレスの関与が疑われているが、その詳細はまだ明らかではない。

## 2. 研究の目的

本申請研究ではスーパーオキシドを解毒できない SOD1KO マウスを用いて、酸化ストレスが脳機能にどのような影響を及ぼすのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 行動学実験: SOD1KO マウスと野生型マウスを用いて、基本的な自発的活動量がわ

かるオープンフィールドテスト、空間認知・記憶学習能力が測れる水迷路試験、短期記憶による学習能力が測れるシャトルボックステスト (能動的 / 受動的回避学習試験)、スリーチャンバーテスト (社交性試験) を行った。行動学試験には 12 週齢の雄性マウスを使用した。

(2) 脳内モノアミン量の測定: 行動学試験を実施したマウスから脳を採取し、0.1N 過塩素酸でモノアミンを抽出した。得られたサンプル中のモノアミンは、高速液体クロマトグラフィーで分離した後に、電気化学検出器を用いて定量を行った。

(3) モノアミン代謝や情報伝達に関与する生体分子 (モノアミン合成酵素、モノアミン分解酵素、モノアミントランスポーターおよび受容体) の発現量を RT-PCR およびウエスタンブロット法で解析した。また、モノアミン酸化酵素 (Monoamine oxidase: MAO) およびドパミン水酸化酵素 (Dopamine beta hydroxylase: DBH) については酵素活性も測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 行動学試験

オープンフィールドテストと水迷路試験で、SOD1KO マウスと野生型マウスに自発的活動量や空間認知力の差はみられないことを見いだした。

次に SOD1KO マウスで学習能力が低下しているのかどうかを明らかにするために、シャトルボックスを用いた能動的回避試験を行った。この試験では、マウスを二部屋に仕切ったシャトルボックスに入れ、暫く馴化させたのちに条件刺激としてブザーまたはライトで刺激を提示する。条件刺激の提示は 5 秒間で、その後は無条件刺激として電気刺激を与える。電気刺激を受けたマウスは、刺激からの回避のために、別の部屋へと移動する。試行を繰り返すと、マウスは無条件刺激を避けるために、条件刺激が提示されると速やかに別の部屋へと移動するようになる。条件刺激の提示後 5 秒以内に部屋の移動を行った場合を「受動的回避」としてカウントする。我々は先ず、条件刺激にブザー (音刺激) を用いて 2 日間 (1 日 50 試行) 試行を行い、続けて条件刺激をライトの点灯 (光刺激) を用いて 3 日間の試行を行った。我々の行った試験に

においては、野生型マウスは順調に受動的回避学習を獲得し、音刺激の場合では2日間でほぼ全てのマウスが無条件刺激を受けなくなり、光刺激の場合でも3日間で無条件刺激の回避率が50%程度であった。しかし、SOD1KOマウスでは、野生型マウスと比べて明らかな受動的回避学習の獲得の遅延がみられた。音刺激では、SOD1KOマウスは2日間の試行でも無条件刺激の50%程度しか回避できず、光刺激の場合では、3日間の試行でも無条件刺激の回避率は10~20%程度であった。次に、SOD1KOマウスでは社会性や情動行動に変化がみられるのかを調べるために、社会性行動試験を行った。社会性の評価は3つの部屋に仕切ったスリーチャンバーを用いて行った(スリーチャンバー試験)。この試験では3つの部屋のうち1つには試験に供するマウス(雄)を入れ、別の部屋には試験マウス(雄)が出会ったことのないマウス(新奇マウス)を入れて、残りの一部屋は空室とする。試験マウスは部屋に入れて馴化させ、3部屋の出入りが自由にできる状態にして、マウスの行動を観察する。社会性が高く新規のモノに興味を持つマウスは、新奇マウスのいる部屋への侵入回数が多くなり、新奇マウスへの接触も増える。本試験において、SOD1KOマウスは野生型マウスに比べて新奇マウスへの接触回数が少なくなっていることが分かった。これらの結果から、SOD1KOマウスでは、学習・認知能力および社会性が低下していることが示唆された。

## (2) 脳内モノアミン量

SOD1KOマウス的大脑では、ドパミン(DA)およびセロトニン(5-HT)が増加していることが分かった。さらにDAおよび5-HTの代謝物の定量的に行ったところ、SOD1KOマウスではDAの代謝物である3-methoxytyramine(3-MT)やNorepinephrine(NE)が減少しておりDAの代謝回転が遅延している可能性があることが分かった。さらに、セロトニンの代謝物である5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)量が増加しており、SOD1KOマウス的大脑では5-HTの代謝回転が亢進していると考えられる。

## (3) モノアミン代謝関連分子の発現および酵素活性

SOD1KOマウスにおける脳モノアミン量の変化の原因を明らかにするために、DAおよび5-HTの合成酵素と分解酵素の発現や酵素活性を野生型マウスと比較した。しかしながら、SOD1KOマウスと野生型マウスとの間で、発現量や活性に差のある分子は見つけることができなかった。一方で、DAや5-HTのシグナルを調節する分子(受容体や輸送体など)には、SOD1KOマウスと野生型マウスとの間で発現量に差があるものを見つめることができ、現在はその分子の詳しい解析を進めている。

本研究によって、老化により蓄積するとされている酸化ストレスが神経伝達物質の代謝やシグナルに影響を与えている可能性があることが分かった。引き続き、酸化ストレスが脳機能に影響を及ぼす分子の同定と解析を進めていきたい。

## 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5件)

1. Nagano S, Takahashi Y, Yamamoto K, Masutani H, Fujiwara N, Urushitani M, Araki T: A cysteine residue affects the conformational state and neuronal toxicity of mutant SOD1 in mice: relevance to the pathogenesis of ALS. **Hum. Mol. Genet.** 24, 3427-3439, 2015, doi: 10.1093/hmg/ddv093 (査読有)
2. Hanashima S, Fujiwara N, Matsumoto K, Iwasaki N, Zheng G-Q, Torigoe H, Suzuki K, Taniguchi N, Yamaguchi Y: Solution <sup>17</sup>O-NMR approach for observing an oxidized cysteine residue in Cu,Zn-superoxide dismutase. **Chem. Commun.** 49, 1449-1451, 2013, doi: 10.1039/c2cc36918d. (査読有)
3. Ihara K#, Fujiwara N, Yamaguchi Y., Torigoe H., Wakatsuki S., Taniguchi N., Suzuki K.: Structural switching of Cu,Zn-superoxide dismutases at loop VI: Insights from the crystal structure of 2-mercaptoethanol modified enzyme. **Biosci. Rep.** 38, 539-548, 2012, doi: 10.1042/BSR20120029. (査読有)
4. Yoshihara D, Fujiwara N, Kato S, Sakiyama H, Eguchi H, Suzuki K: Alterations in renal iron metabolism caused by a copper/zinc-superoxide dismutase deficiency. **Free Rad. Res.** 46, 750-757, 2012, doi: 10.3109/10715762.2012.673223. (査読有)
5. Chen X, Shang H, Qiu X, Fujiwara N, Cui L,

Li X-M, Gao T-M, Kong J: Oxidative Modification of Cysteine 111 Promotes Disulfide Bond-Independent Aggregation of SOD1. *Neurochem. Res.* 37, 835-845, 2012, doi: 10.1007/s11064-011-0679-8. (査読有)

[学会発表](計 17 件)

1. 吉原大作, 藤原範子, 崎山晴彦, 江口裕伸, 鈴木敬一郎 (2014) SOD1 欠損が脳内モノアミン代謝に与える影響, 第 87 回日本生化学会大会, 2014. 10. 15-18, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
2. 米岡由佳, 崎山晴彦, 藤原範子, 江口裕伸, 吉原大作, 鈴木敬一郎 (2014) SOD1 KO マウスに発症する肝障害への糖・脂質代謝の関与の検討, 第 87 回日本生化学会大会, 2014. 10. 15-18, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
3. 崎山晴彦, 江口裕伸, 吉原大作, 米岡由佳, 藤原範子, 鈴木敬一郎 (2014) SOD1 KO マウスの肝疾患における糖・脂質代謝異常の寄与の検討, 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2014. 9. 4-5, 同志社大学 (京都府・京都市)
4. 吉原大作, 藤原範子, 加藤信介, 崎山晴彦, 江口裕伸, 鈴木敬一郎 (2013) 酸化ストレス亢進が鉄代謝調節機構に与える影響, 第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2014. 6. 13, ウィンク愛知 (愛知県・名古屋市)
5. Noriko Fujiwara, Makoto Urushitani, Daisaku Yoshihara, Toshifumi Morimura, Haruhiko Sakiyama, Hironobu Eguchi, Keiichiro Suzuki: Immunotherapy targeting loop VI in Cu,Zn-superoxide dismutase exacerbates ALS pathogenesis, SFRR12014, 2014. 3. 24, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
6. Daisaku Yoshihara, Noriko Fujiwara, Haruhiko Sakiyama, Hironobu Eguchi, Keiichiro Suzuki: Alteration in renal iron metabolism by SOD1 deficiency, SFRR12014, 2014. 3. 24, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
7. 藤原範子 (2013) SOD1 の酸化修飾および構造解析---ALS 病態への関与---: レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会、第 6 回夏の委員会, 2013. 8. 23, 弘前大学 (青森県・弘前市)
8. 吉原大作, 藤原範子, 崎山晴彦, 江口裕伸, 鈴木敬一郎 (2013) SOD1 欠損が脳機能に与える影響, 第 87 回日本生化学会大会, 2013. 9. 11, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
9. 崎山晴彦, 江口裕伸, 吉原大作, 米岡由佳, 藤原範子, 鈴木敬一郎 (2013) SOD1 KO マウスの肝臓における糖および脂質代謝

- の検討, 第 87 回日本生化学会大会, 2013. 9. 11, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
10. 米岡由佳, 崎山晴彦, 藤原範子, 江口裕伸, 吉原大作, 鈴木敬一郎 (2013) SOD1 KO マウスの肝臓における糖および脂質代謝の検討, 第 60 回生化学会近畿支部例会, 2013. 5. 18, 大阪大学 (大阪府・吹田市)
  11. Daisaku Yoshihara, Noriko Fujiwara, Hiroyuki Iso, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Hironobu Eguchi, Haruhiko Sakiyama, Keiichiro Suzuki (2013) Neurobiological behavioral changes in SOD1 knock out mice, Neuro2013, 2013. 6. 21, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

[図書](計 5 件)

1. Hironobu Eguchi, Haruhiko Sakiyama, Daisaku Yoshihara, Noriko Fujiwara, Keiichiro Suzuki: Anti-oxidant use in humans: successes and failures, Systems biology of free radicals and anti-oxidants, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, 3967-3985, 2014
2. 崎山晴彦, 鈴木敬一郎: アンチエイジングのための 100 の質問 (太田博明監修, 山岸昌一編集) 22-25, メディカルレビュー社, 2014
3. 吉原大作, 藤原範子, 鈴木敬一郎: スーパーオキシドディスムターゼ, 酸化ストレスの医学 (吉川敏和編) 改訂第 2 版 21-29 診断と治療社, 2014
4. 藤原範子: 活性酸素の生成・消去は日常茶飯事, 活性酸素の本当の姿 (鈴木敬一郎編) 14-34, 有限会社 ナップ, 2014
5. 崎山晴彦, 鈴木敬一郎: AGEs 化反応の生化学, chapter 1 AGEs 化反応の基礎, AGEs と老化 (太田博明監修, 山岸昌一編集) 47-53, メディカルレビュー社, 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 敬一郎 (SUZUKI, KEIICHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70221322

### (2) 研究分担者

藤原 範子 (FUJIWARA, NORIKO)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10368532

### (3) 研究協力者

吉原大作 (YOSHIHARA, DAISAKU)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00567266