

令和元年6月4日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15261

研究課題名(和文) 感受性非依存的にアルコール摂取行動を調節する新規Src 改変マウスモデルペアの解析

研究課題名(英文) Studies of alcohol drinking behavior using novel Src knock-in mice having its sensitivity similar to wild-type mice

研究代表者

加藤 梧郎 (KATO, Goro)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：60177441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： Srcのセリン75リン酸化の阻害変異(SA)を導入した遺伝子改変マウスを用いて、エタノールの二瓶選択試験を行ったところ、SAマウスは対照の野生型マウスと比較して、エタノールの消費量および嗜好性が統計学的に有意に上昇した。また、細胞内でSrcの働きを受け継ぐタンパク質の一つとして知られるRhoキナーゼの活性が、SAマウスの脳線条体では、野生型マウスよりも有意に低下し、更に、Rhoキナーゼに影響を受けるAktキナーゼのセリン473のリン酸化が亢進した。これらの成果は、アルコール依存症の発症機序の解明や予防法開発の手がかりになる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Srcタンパク質は、Src型チロシンリン酸化酵素群(SFK)の一つであり、薬物嗜癖などの脳の高次機能に関与していることが予想される。しかし、生体レベルで、Srcの機能を検証する遺伝子改変マウスは得られていなかった。本研究は、Srcのユニーク領域に点変異を導入したセリン75改変マウスを用いることにより、エタノール摂取行動に果たすSrcの機能を初めて生体レベルで明らかにした。アルコール依存症は目下医学社会的に重大な課題の一つであり、肉体的にも精神的にも大きな苦痛をもたらすが、その有効な薬理的治療の選択肢が十分でない。本研究成果はそうした状況を突破する可能性を有している。

研究成果の概要(英文)： Ethanol consumption and preference were studied in mice harboring nonphosphorylatable Src Ser75Ala (SA) mutant via a two-bottle choice test. SA mutant mice consumed and preferred significantly more ethanol than their wild-type (WT) counterparts. In SA mice, the activity of Rho-associated kinase, a downstream effector of Src phosphorylated at Ser 75, in the striatum was significantly lower and Ser 473 phosphorylation of Akt, a downstream effector of Rho-associated kinase was significantly higher than in WT mice. These results suggest that these mutant mice may be a useful mouse model system for finding clues to clarify the pathogenetic mechanism of alcoholism and for investigating putative targets that reduce ethanol intake or promote abstinence.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Src アルコール マウスモデル タンパク質リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

Src タンパク質は、分子量 60kDa の膜結合型のチロシンキナーゼファミリー (SFK) の一つであり、多くの組織で発現している、細胞外の情報を細胞内部へ伝える中継基地として働く。Src は、細胞の増殖、細胞周期の調節に関与する一方で、既に増殖を停止した脳神経系の細胞で学習記憶行動などに重要な働きをしていると考えられている。SFK の Fyn は、Fyn 遺伝子改変動物の研究から、エタノールの感受性の制御に関与することが明らかになっているが、他の SFK のメンバーでは、エタノール摂取行動に関する報告はほとんどない[ ]。既に作製された Src 遺伝子破壊マウスは、他の SFK による機能相補を免れず、また大理石病に似た病態を示し、短命であることから、行動解析実験を行えなかった[ ]。申請者は、Src のユニーク領域中の Cdk5・p35 (活性化サブユニット) でリン酸化されるセリン 75 部位に、リン酸化の擬似変異 (SD) 及び阻害変異 (SA) を導入した新規の SD 変異マウスと SA 変異マウスを開発した。その結果、同じ SFK の Fyn 改変マウスとは異なり、エタノール感受性には変化がないが、その摂取/嗜好性が SA 変異マウスでは亢進することが推測され、これらのマウスがエタノール嗜癖や節制の分子機序の解明に非常に有用なマウスモデルペアである可能性が示された。また、*in vitro* 系の研究から Src と Cdk5・p35 はフィードバック調節ループを形成していることが提起されていた[ ]。

## 2. 研究の目的

SA 変異及び SD 変異マウスを用いて、Src のセリン 75 リン酸化のエタノール嗜好性や摂取行動に及ぼす効果を明確にし、またその分子機序を明らかにするため、脳組織内の Src のセリン 75 リン酸化のシグナルを受け継ぐ Rho キナーゼ (ROCK) の活性の変動を明らかにする。更に、Src と Cdk5・p35 の相反的な活性制御が、エタノール嗜好性調節に関与しているか否かを SA 変異マウスと p35 ノックアウトマウスとの掛け合わせによるダブル遺伝子改変マウスを作出し、検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

SA 及び SD 変異マウスは、C57BL/6NCrSlc と 6 回戻し交配を行った。マウスは SD 系及び SA 系ともそれぞれヘテロ接合体同士の掛け合わせにより得られた雄の野生型及びホモ接合体を実験に用いた。12 時間の明暗サイクルのもと、23±2℃、湿度 50±10% で通常飼育した。マウスの遺伝子型は、尾 DNA の点変異導入部位を含む領域を PCR で増幅後、アレル特異的のプロープによるドットプロットハイブリダイゼーションを行い決定した。p35 ヘテロ欠損 (+/-) マウス (早稲田大学大島登志男博士より譲渡) を SA 変異ホモ接合体マウスと交配させ、p35 (+/-)・Src (WT/SA) のダブルヘテロ接合体変異マウスを得た。このダブルヘテロ接合体変異マウスの掛け合わせにより、p35 (+/-)・Src (SA/SA) マウスを得、これらの掛け合わせにより p35 (-/-)/Src (SA/SA) ダブルホモ接合体変異マウスの雄マウスを作出した。

### (2) 二瓶選択試験

9-17 週齢のマウスを一匹飼いで 5 日間馴化後、5%または 10% (v/v) エタノール及び純水を入れた給水ビンを与え、3 週間エタノールの消費量を定期的に (3 日また 4 日ごと 6 回) 測定した。液体の蒸発及び漏れの補正を行い、給水ビンの左右の位置もバイアスがかからないように定期的に入れ替えた。消費量はグラムエタノール/kg 体重/日で、嗜好性はエタノール消費容積/全液体消費容積でそれぞれ算出した。統計解析は SD マウスの 10% (v/v) エタノール消費量の場合 (Mann-Whitney  $U$  test) を除いて、全て unpaired two-tailed Welch's  $t$  test で行った。 $p < 0.05$  の場合を統計的に有意とした。

### (3) ROCK 活性の測定

9-17 週齢の雄マウスの脳より低温下で線条体を摘出した。線条体の組織ホモジネート液を調製後、同量の 2% Triton X-100 を含むトリス緩衝液 (pH 7.4) で可溶化した。3  $\mu$ g タンパク質を含む可溶化液を用い、酵素抗体法 (Cyclex) により Rho-キナーゼ II (Cyclex) を標準として定量測定した。ROCK 阻害剤 Y-27632 存在下 (10  $\mu$ M) の値で補正した。

ROCK タンパク質のレベルを定量するため、10  $\mu$ g タンパク質を含む可溶化液を 4-15% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、PVDF 膜へ転写し、一次抗体としてウサギ抗 ROCK-1/2 ポリクローナル抗体、二次抗体として HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体を用い、LAS4000 イメージアナライザーで検出・定量した。定量値は、直線性の得られる範囲内の値を採用した。ROCK タンパク質のレベルは、同じ可溶化液中の  $\alpha$ -チューブリンレベルで補正した。

### (4) リン酸化 Akt の定量

線条体の組織ホモジネート液を調製後、2% Triton X-100、2% デオキシコール酸、0.2% SDS、300 mM 塩化ナトリウムを含むトリス緩衝液 (pH 7.2) で可溶化した。15  $\mu$ g タンパク質を含む可溶化液を上記の「ROCK 活性の測定」と同様にして PVDF 膜へ転写後、一次抗体としてウサギ抗 Akt (リン酸化セリン 473) 抗体を用いて、セリン 473 がリン酸化された Akt タンパク質のレベルを定量した。次に、この PVDF 膜を 100mM 2-メルカプトエタノールと 2% SDS を含むトリス緩衝液 (pH 6.8) で処理し、結合した抗体を除去後、一次抗体としてマウス抗 Akt モノクローナル抗体、二次抗体として HRP 結合抗マウス IgG 抗体を用い、Akt タンパク質のレベルを定量した。リン酸化 Akt のレベルは、全 Akt レベルに対するリン酸化 Akt レベルの比として表した。

## 4. 研究成果

### (1) SA/SA マウスのエタノール消費量と嗜好性

先行研究では 10% エタノールのみ SD/SD マウスで二瓶選択試験を行ったが、今回は 5% 及び 10% エタノールに関して見直した実験方法に統一して、SA/SA マウスと SD/SD マウスのエタノール消費量と嗜好性を検討した。SA/SA マウスは、5% エタノールでも 10% エタノールでも野生型マウスよりも有意に多く摂取した (図 1A ; 5%;  $p=0.0226$ ; 10%;  $p=0.0184$ )。この結果に一致して、エタノール嗜好性も 5% と 10% とともに野生型マウスよりも上昇した (図 1B ; 5%;  $p=0.0179$ ;

10%;  $p=0.0080$  )。一方、SD/SD マウスは、5%と 10%ともにエタノール消費量と嗜好性とも野生型マウスと有意な差がなかった ( 図 1A 及び 1B )。なお、総液体消費量 ( 純水 + エタノール ) は、両マウスとも、また何れの濃度のエタノールでも野生型マウスと差がなかった。

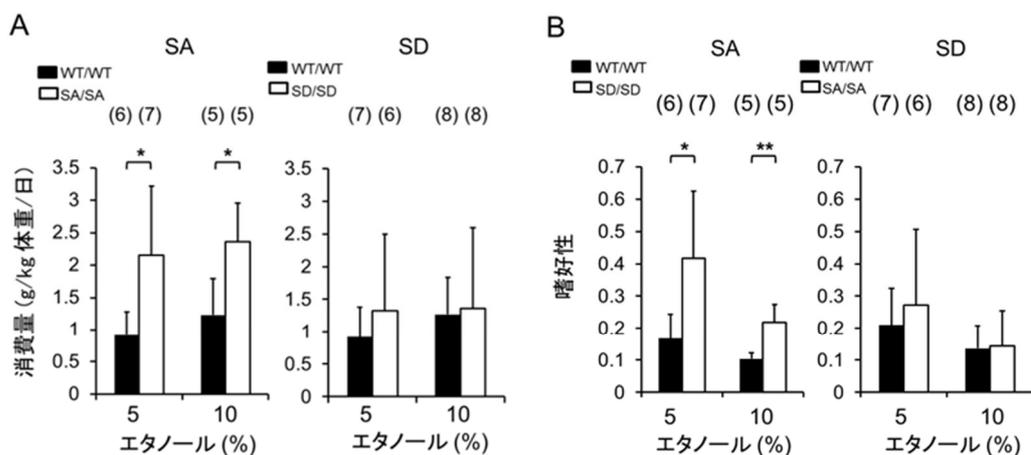


図1. SA/SAマウスのエタノール消費量の増加

(A) エタノール消費量(1日当たりの平均値) (B) エタノール嗜好性(エタノール消費容量と総液体消費容量の比)。

黒;野生型、白;SA/SAまたはSD/SD。括弧内の数字はマウスの検体数。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ 。

## ( 2 ) ROCK 活性とリン酸化 Akt レベル

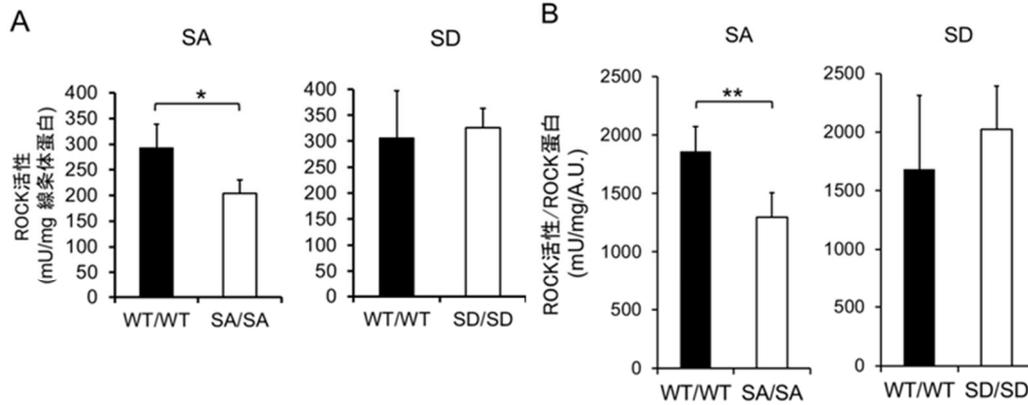
SD/SD マウスは網膜中の ROCK 活性が上昇するので[ ]、Src のセリン 75 のリン酸化は Src の下流のエフェクターとして ROCK を制御していることが示唆される。そこで、エタノール摂取や離脱症状などに関係する脳の領域部位の一つである線条体の ROCK 活性を測定すると、SA/SA マウスは野生型よりも有意に 30%減少したが ( $p=0.0228$  ) SD/SD マウスは変わらなかった ( 図 2A )。一方、線条体可溶化液中の ROCK 蛋白のレベルはどのマウスでも同様であり、その結果 ROCK 蛋白当たりの ROCK 活性は、SA/SA マウスは野生型よりも有意に 30%減少したが ( $p=0.0096$  ) SD/SD マウスは変わらなかった ( 図 2B )。

活性化した ROCK は PTEN ホスファターゼ活性を上昇させ、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ /Akt を下方制御するので、Akt の活性化の指標であるセリン 473 のリン酸化のレベルを測定した。その結果、SA/SA マウスは、野生型よりもリン酸化のレベルが有意に高く ( 64%、 $p=0.025$  ) SA/SA 変異は線条体 Akt を活性化した ( 図 3 )。

## ( 3 ) Src と Cdk5・p35 の相反的な活性制御

SA/SA 変異による Cdk5・p35 の活性化がエタノール消費・嗜好性亢進に寄与するのか否かを明らかにするため、p35(-/-)/Src(SA/SA)の雄マウスと p35(+/-)/Src(SA/SA)の雄マウスのエタノール消費量と嗜好性を測った。両者に有意な差はなく、Cdk5・p35 活性は SA/SA マウスのエタ

ノール消費亢進に必要なことが明らかになった(図4)。



(A) 総線糸体蛋白当たりのROCK活性

(B) ROCK蛋白当たりのROCK活性

\*p<0.05, n=4; \*\* p<0.01.

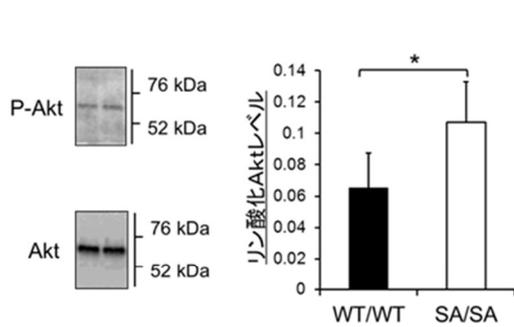


図3. SA/SAマウスはリン酸化Aktが増加する

(左) セリン473リン酸化Akt (P-Akt) 及び全Akt (Akt) のウエスタンブロット (右) リン酸化Aktレベル (P-Aktレベル/Aktレベル) n=4; \*p<0.05.

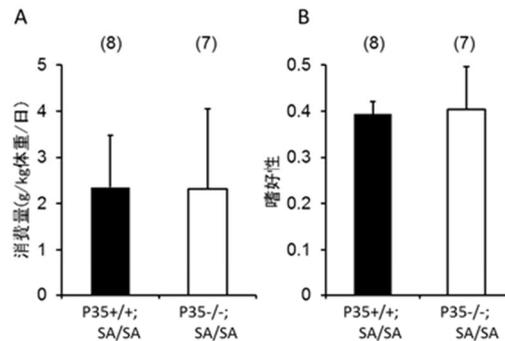


図4. P35(-/-)・SA/SAダブル変異マウスのエタノール消費量が変わらない

(A) エタノール消費量(1日当たりの平均値)

(B) エタノール嗜好性(エタノール消費容量と総液体消費容量の比) 括弧内はマウスの検体数。

#### (4) 考察

Srcをはじめ SFK は、成体マウス脳で高い発現が見られ、神経伝達物質の受容体経路のシグナル伝達の調節を担い、記憶行動などの脳の高次機能の調節に関与していると見られる。しかし、アルコール嗜癖については、Fynを除いてはほとんど実験的証明がなされていない。Srcセリン75リン酸化改変マウスは、行動試験実施における Src ノックアウトマウスの障害を取り除き、初めて、Src がエタノール摂取行動の調節に関わることを明らかにした。申請者らはこの改変マウスは、味覚物質の消費、嗜好性に差が無いこと、エタノール代謝に差が無いこと、また、Fyn と異なり、正立反射消失時間にも差が無く、エタノール感受性に変化が見られないことを既に明らかにしている。Fyn は、脳の NMDA 受容体のリン酸化を介して、エタノール摂取後の急性のエ

タノール耐性発現を誘起する。Src も同受容体のリン酸化を Fyn と同様に惹起するにも拘らず、エタノール感受性に影響しないことから、Src によるエタノール摂取行動の制御機構は Fyn とは異なると予想される。本研究で示したように、ROCK/Akt シグナル経路の関与の可能性は、このマウスが従来のエタノール摂取行動の調節機構とは異なる新しい機構を有することを示唆している。

アルコール依存症は、アルコールに対する感受性が低い(アルコールに強い)ヒトほどそのリスクが高いとされるが、感受性が中程度、或いは高いヒトでも起こりうる。この点から SA/SA マウスの知見は、アルコール依存症の病態解明、治療薬ターゲットの解明、節制法の開発に大いに資する可能性がある。そのため今後、行動面でのアルコールの効果の評価を正立反射だけでなく、運動協調性障害など他の方法でアルコールの低レベルから高レベルにわたる障害を示すこと、また、Src が細胞内シグナル分子として多面的機能を有することから、ROCK 以外の分子と線条体以外の脳内領域についての分子レベルの解明が必要である。更に、アルコール依存症のモデルとしては、アルコール摂取後の血中濃度の上昇に関しての知見が今後求められるが、通常の二瓶選択試験では解析できないことが分かっているので、その方法の検討も重要である。

#### < 引用文献 >

- Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Matozaki T (2011) Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci* 34:629-637.
- Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64:693-702.
- Pan Q, Qiao F, Gao C, Norman B, Optican L, Zelenka PS (2011) Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src(S75). *Cell Mol Life Sci* 68:3425-3436.
- Kashiwagi K, Ito S, Maeda S, Kato G (2017) A Ser75-to-Asp phospho-mimicking mutation in Src accelerates ageing-related loss of retinal ganglion cells in mice. *Sci Rep* 7:16779.

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Goro Kato “Nonphosphorylatable Src Ser75 Mutation Increases Ethanol Preference and Consumption in Mice” *eNeuro*. 2019 Apr 5;6(2). doi:10.1523/ENEURO.0418-18.2019 査読有。

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者