

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月24日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500364

研究課題名（和文）非ヒストンタンパク質の可逆的アセチル化不全と不安障害

研究課題名（英文） Involvement of defective reversible-acetylation of non-histone proteins in mood disorders.

## 研究代表者

川口 禎晴（KAWAGUCHI YOSHIHARU）

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・主任研究員

研究者番号：00450833

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱アセチル化酵素6（HDAC6）と不安障害との関連について HDAC6 遺伝子欠損マウスを用いて調べたところ、1）HDAC6 はセロトニン神経細胞に多く含まれる、2）HDAC6 の活性抑制はマウスに抗うつ作用をもたらす、3）HDAC6 の欠損は縫線核セロトニン神経系のエネルギー代謝に異常を来すことを見出した。以上より HDAC6 による可逆的アセチル化制御はセロトニン神経系の機能発揮に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our previous findings demonstrate that HDAC6-mediated reversible acetylation associates with the mood disorders. To further study and clarify the molecular mechanism how loss of HDAC6 causes emotional arousal, we performed behavioral tests and searched the hyper-acetylated protein(s) in HDAC6 knockout mouse brain. HDAC6 knockout mice showed hyperactivity, less-anxiety, and antidepressant-like behavior. Injection of specific inhibitor of HDAC6 to wild-type mice also induced antidepressant-like behavior, indicating that loss of deacetylase activity of HDAC6 causes abnormal behavior in mice. In HDAC6 knockout mice, the pyruvate dehydrogenase complex was found as a hyper-acetylated protein in brain, and the pyruvate increased in raphe nuclei. Taken together the findings that HDAC6 is well co-localized to serotonergic neurons in raphe nuclei, loss of deacetylase activity of HDAC6 might affect the function of pyruvate dehydrogenase complex, leading to disturb the activity of serotonergic neurons, which in turn, result in emotional arousal in mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経薬理学

キーワード：精神疾患、不安障害、抗うつ、脱アセチル化酵素、HDAC6、ノックアウトマウス、セロトニン神経細胞

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアセチル化はリン酸化と並

んで重要なタンパク質分子の翻訳後修飾のひとつであり、その可逆的アセチル化制御は分子の機能調節に関わると考えられていた。当初はヒストンの可逆的アセチル化制御について盛んに研究されていたが、近年ヒストン以外のタンパク質分子においてもアセチル化されることが発見されつつあり、可逆的アセチル化制御はヒストンによる遺伝発現の調節以外にも重要な生理的意義を有することが予想された。その中で我々は細胞質に存在する脱アセチル化酵素 HDAC6 (ヒストン脱アセチル化酵素 6) に注目しその細胞における働きについて研究を進めてきた。その結果、HDAC6 はチューブリンを脱アセチル化する酵素として働き細胞骨格の動的安定性や不要になったタンパク質凝集体のクリアランスに重要であることがわかった。このように我々は HDAC6 の研究を通して HDAC6 による可逆的アセチル化制御の細胞における役割を明らかにしてきたが、一方で生体ではどのような生理的意義を持つのかについては謎であった。

## 2. 研究の目的

そこで我々は HDAC6 による可逆的アセチル化制御の生体における意義を明らかにするために、HDAC6 遺伝子欠損マウスで何が起っているのかを調べたところ、このマウスにヒトの不安障害とよく似た行動異常を観察した。この事実をもとに本研究では HDAC6 の欠失がどのようにマウスの行動異常を引き起こすのかについて、その実態を明らかにするとともに分子メカニズムを探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

HDAC6 遺伝子欠損マウスの行動異常についてその詳細を調べるために行動解析実験としてオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、尾懸垂試験を実施した。一方、脳内の形態学的な異常を調べるために脳各部位の病理組織標本を作製して野生型マウスの脳と比較した。

また、HDAC6 のマウス脳内の局在を調べるために、野生型マウスの脳各部位の組織標本に対して HDAC6 に対する抗体を用いた免疫染色を実施した。同様にその他関連分子の検出においても各分子の抗体を用いて免疫染色を行った。また分子の発現量はウエスタンブロット法により調べた。

分子メカニズムを探るために脳の中で HDAC6 により脱アセチル化を受ける分子 (HDAC6 の脳内標的分子) の探索を以下の方法で実施した。HDAC6 遺伝子欠損マウスの脳組織及び HDAC6 の発現を著しく低下させた神経系培養細胞を用い、これらのサンプルでアセチル化の亢進した分子のみを抗ア

セチル化抗体を使った免疫沈降法により抽出し、質量分析装置により分子を同定した。

## 4. 研究成果

### HDAC6 の活性抑制はマウスに情動障害様行動異常をもたらす

HDAC6 遺伝子欠損マウスに見られた不安障害様行動異常についてさらに詳細に調べるために各種行動試験を実施した。その結果、HDAC6 遺伝子欠損マウスはオープンフィールド試験では「新奇環境における活動量の亢進」、高架式十字迷路試験では「不安や恐れを感じにくい」、尾懸垂試験では「抗うつ薬を投与されたかのような行動 (抗うつ様行動)」を示した (図 1)。これらの結果から HDAC6 遺伝子欠損マウスでは情動に基づく行動に異常を来していることが分かった。

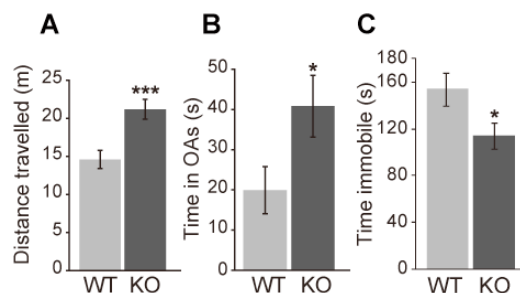
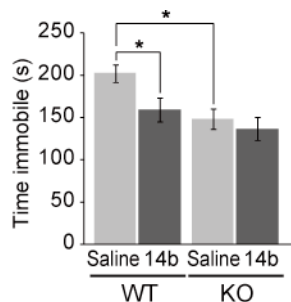


図 1. HDAC6 遺伝子欠損異常の情動障害様行動異常 A.オープンフィールド試験、B.高架式十字迷路試験、C.尾懸垂試験。HDAC6 遺伝子欠損マウスは、新奇環境下で活動量の増加(A)、不安の軽減(B)、抗うつ薬を投与されたかの行動異常 (抗うつ様行動)(C)が観察された。

続いてこれら情動障害様行動異常が HDAC6 の脱アセチル化活性の消失に起因するのか、または分子そのものの欠失によるものなのかを調べるために HDAC6 の脱アセチル化活性を特異的に阻害する化合物 (HDAC6 阻害剤) を使って検証した。野生型マウスの腹腔内に HDAC6 阻害剤を投与して尾懸垂試験で調べたところ、このマウスは HDAC6 遺伝子欠損マウスと同様の行動異常を示した (図 2)。この結果から、HDAC6 遺伝子欠損マウスに見られた行動異常は HDAC6 の脱アセチル化活性の消失によるものであることが分かった。同時に、HDAC6 の働きを抑制することは抗うつにつながることを示され新規抗うつ薬の開発につながることを考えられたため、本研究で用いた HDAC6 阻害剤とともに特許出願を行った。

なお、病理学的観点から HDAC6 遺伝子欠損マウスの脳の状態を調べたところ野生型マウスと比べて形態的に明瞭な差は見られなかった。このことから HDAC6 遺伝子欠損マウスの脳内では何らかの機能的な異常が

起こっていると推察された。

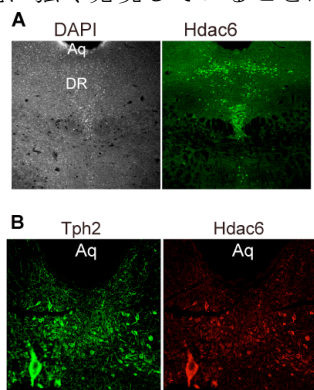


**図 2. HDAC6 阻害剤の投与はマウスに抗うつ様行動を誘発する**

野生型マウス (WT) に阻害剤 (14b) を投与すると HDAC6 遺伝子欠損マウス (KO, Saline) とほぼ同程度の抗うつ様行動を誘発できた。

*HDAC6* は中脳縫線核のセロトニン神経細胞に強く発現している

HDAC6 が生体内では脳に特に多く含まれていることは知られていた。我々は脳のどの部分に多く発現しているかを調べるために脳の各部位の組織標本を作製して HDAC6 の抗体を用いて調べた。その結果、中脳の縫線核を構成する神経細胞に HDAC6 が多く発現していることが明らかとなり (図 3 A)、さらにその発現パターンはセロトニン神経細胞のマーカー (Tph2) に陽性な細胞とよく一致した (図 3 B)。この結果から、HDAC6 はマウスの脳内では中脳縫線核のセロトニン神経細胞に強く発現していることが分かった。



*HDAC6* の脳における標的分子

HDAC6 遺伝子欠損マウスで観察された情

**図 3. HDAC6 は縫線核のセロトニン神経細胞に多く発現している**

HDAC6 陽性細胞 (A 右図、緑) は中脳の縫線核 (DR) に多い。

HDAC6 陽性細胞 (B 右図、赤) は Tph2 陽性セロトニン神経細胞 (B 左図、緑) と一致している。

動障害様行動異常の分子メカニズムを探る

ために、脳内で HDAC6 により脱アセチル化を受ける分子 (HDAC6 標的分子) の探索を行った。HDAC6 非存在下でアセチル化のこうした分子を探索したところ、今回新たにピルビン酸脱水素酵素複合体を構成する分子が見出された。この分子はミトコンドリアに存在しエネルギー代謝に重要な役割を担っている。この分子が HDAC6 依存の脱アセチル化により機能調節を受けているかどうかを調べるために、ピルビン酸の蓄積量を指標にして HDAC6 遺伝子欠損マウスの縫線核部位等を検証した。その結果、皮質や血液では野生型マウスと差は見られなかったものの縫線核では HDAC6 遺伝子欠損マウスにおいてピルビン酸量の増加が見られた。このことから HDAC6 遺伝子欠損マウスの縫線核ではピルビン酸脱水素酵素複合体の機能不全が起きていると考えられた。

以上より、HDAC6 は脳の情動行動と深く関連するタンパク質分子であり、その脱アセチル化活性の欠失は情動障害様行動異常を誘発することが明らかとなった。またその分子メカニズムとしてミトコンドリアのピルビン酸脱水素酵素複合体の機能不全が考えられ、縫線核のセロトニン神経細胞でエネルギー代謝の異常が起こることが示唆された。

#### 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 1 件)

①. Fukada M, Hanai A, Nakayama A, Suzuki T, Miyata N, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Yao T-P, Kawaguchi Y. Loss of deacetylase activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS ONE* 7(2):e30924, (2012)  
doi:10.1371/journal.pone.0030924 (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

①. 第 34 回日本神経科学大会 (2011/9/16、横浜) 深田齊秀、花井敦子、竹島京子、中山敦雄、川口禎晴 「HDAC6 脱アセチル化抑制はマウスの抗うつ行動を誘発する」

②. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011/3/22、横浜) 深田齊秀、花井敦子、竹島京子、中山敦雄、川口禎晴 「HDAC6 脱アセチル化抑制はマウスの抗うつ行動を誘発する」

③. 第 33 回日本神経科学大会 (2010/9/3、神戸) 深田齊秀、花井敦子、竹島京子、中山敦雄、川口禎晴 「Hdac6 遺伝子欠損マウスは情動障害様行動異常を呈する」

④. 第 83 回日本薬理学会年会 (2010/3/16、大阪) 深田齊秀、花井敦子、竹島京子、中山敦雄、川口禎晴 「Hdac6 遺伝子欠損マウスは

情動障害様行動異常を呈する」

⑤. 第32回日本神経科学大会(2009/9/17、名古屋) 深田斉秀、花井敦子、竹島京子、中山敦雄、川口禎晴「不安様行動を呈する Hdac6 遺伝子欠損マウスの解析」

⑥. グローバルCOE国際シンポジウム(2009/11/26、名古屋) Yoshiharu Kawaguchi, Masahide Fukada, Atsuko Hanai, Kyoko Takeshima, Atsuo Nakayama, Anxiety-related behavior in Hdac6 deficient mice

⑦. 第32回日本分子生物学会年会(2009/12/10、横浜) 深田斉秀、花井敦子、竹島京子、中山敦雄、川口禎晴「不安様行動を呈する Hdac6 遺伝子欠損マウスの解析」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 抗うつ薬及びその用途

発明者: 川口禎晴、深田斉秀、宮田直樹、鈴木孝禎

権利者: 愛知県、名古屋市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-196993 号

出願年月日: 平成 22.9.2

国内外の別: 国内

○取得状況(計0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

<http://www.inst-hsc.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 禎晴 (KAWAGUCHI YOSHIHARU)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・主任研究員

研究者番号: 00450833

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

竹島 京子 (TAKESHIMA KYOKO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・アルバイト

研究者番号: なし