

トピック

ユビキチンリガーゼRinesによる,モノアミンオキシダーゼ(MAO-A)蛋白質分解制御を介した情動行動制御機構 ～情動や社会性に関する行動を制御する因子をマウスで発見～

樺 山 実 幸

日本獣医生命科学大学 獣医解剖学教室

日獣生大研報 62, 25-30, 2013.

は じ め に

私達は、神経系に発現するタンパク質の分解を制御するユビキチンリガーゼ, RINESが、抗うつ薬や抗不安薬の標的とされている酵素「モノアミンオキシダーゼ(MAO-A)」の分解を促して、正常な情動行動を制御していることを発見した。

ノルアドレナリン、セロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質は、情動行動、記憶学習、ストレス反応、依存症等の様々な行動の制御に重要な役割がある。注意や衝動性に関わるノルアドレナリンや、精神を安定させる働きをするセロトニンはMAO-Aなどにより代謝分解される。したがって、MAO-Aはモノアミン量の迅速で適切な調節と、それによる脳高次機能発現制御に必須であり、その破綻は様々な脳神経疾患を誘発するため、特に注目されている^{1,2)}。このような理由で、MAO-A阻害薬は、脳内のノルアドレナリン、セロトニン量を増加させることにより、うつ病などの治療に長年使用されており、さらにPTSDやパニック障害などの不安障害の治療にも有用であることが知られている³⁻⁵⁾。また、ヒトMAO-A 遺伝子変異が、反社会的行動や攻撃的行動の原因である可能性が示唆されており⁶⁾、一方で、MAO-A蛋白質量の上昇が、臨床的に情動障害と関わる事が報告されている⁷⁻¹⁰⁾。このように、MAO-A蛋白質量自身の迅速かつ厳密な制御が、脳高次機能発現に重要であることが示されているが、MAO蛋白質量の分子制御機構、特に、ユビキチン-プロテアソーム系による分解機構についての報告はこれまでになかった。

ユビキチン・プロテアソーム系蛋白質分解機構は、様々な細胞制御過程に関わる蛋白質を特異的に分解し、適切な量に制御する機構である^{11,12)}。神経系においてもこの機構は、神経発生、シナプス可塑性および記憶形成などに関わる蛋白質量を制御し、適切な神経機能の発現に重要な役割がある^{13,14)}。この分解機構の中でも、E3ユビキチンリガーゼは、基質を特異的に認識し、ユビキチン化とその後の分

解を時間、空間的に制御する分子であり、中心的役割を果たす(図8)。我々はこれまで、主に神経系に発現する新規の小胞体膜結合のRing finger蛋白質RINESを発見し、これがE3ユビキチンリガーゼであることを報告していた¹⁵⁾。

本研究では、このユビキチンリガーゼRINES欠損マウスの解析により、RINES欠損マウスが、不安やストレスに対する応答および社会性に関連した行動に異常があることを見いだした。さらに、RINES欠損マウスでは、脳内でのMAO-A量が増加し、その活性も増加していることが明らかになった。また、培養細胞と脳サンプルを用いた解析により、RINESがMAO-Aに結合し、ユビキチン化とその後のプロテアソームによる分解を促進していることを発見した。

さらに、MAO阻害剤投与による、Rines変異マウスの情動反応性が、野生型とは異なり、MAO阻害剤投与により、複数の情動行動異常が改善した。

このような結果から、RinesがMAO-A蛋白質のプロテアソームによる分解制御を行い、モノアミン動態の調節と

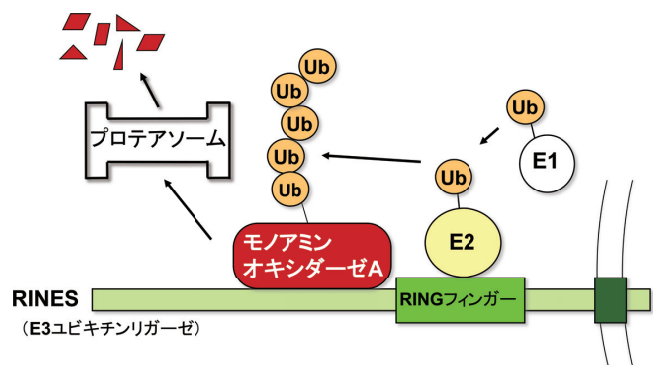


図8. RINESはMAO-Aタンパク質を標的とするユビキチンリガーゼとして働き、MAO-Aのユビキチン化とプロテアソームによる分解を促進する。

情動行動発現に必須の役割があることを初めて証明した。本研究成果は、米国の科学雑誌『*The Journal of Neuroscience*』に掲載された（原著論文）。

今回の発見により、社会性や情動に関連した行動の制御機構の一端をマウスで明らかにすることができた。今後、RINESが情動障害および社会性障害を伴う神経疾患における創薬の、新たな標的になる可能性があることを期待している。

1. 背景

脳には数多くの神経伝達物質が存在しており、細胞間で情報のやりとりを行っている。神経伝達物質のうち、モノアミンと呼ばれるグループにはノルアドレナリンやセロトニンが含まれており、広範囲の脳の機能を調節するうえで重要な役割を果たしている。脳内におけるノルアドレナリンやセロトニンの量が適切に調整されることで、気分や情緒、社会行動が正常に保たれている。ノルアドレナリンやセロトニンを分解し、その量の調節を行っている酵素の1つが、モノアミンオキシダーゼ A (MAO-A) である。もし、MAO-Aが過剰にノルアドレナリンやセロトニンを分解すると、うつ病や不安障害を引き起こす^{1,2)}。そのため、MAO-A阻害薬が、うつ病や不安障害などの治療に長年用いられてきた³⁻⁵⁾。

一方、MAO-Aは薬の標的になるだけでなく、脳内における量が社会性や情緒に関わる行動と関連性があることが、ヒトや実験動物による研究から示されている。例えば、MAO-A量が少ないヒトではBrunner症候群のように、攻撃性が高くなり^{16,17)}、マウスでは社会的な接触が低下する傾向がある^{18,19)}。逆に、MAO-A量が多いと抑うつ、不安の傾向が高くなる⁷⁻¹⁰⁾ (図9)。このように、MAO-A量が社会性や情緒に重要な役割があり、その分子制御機構についての理解が求められてきた。しかし、MAO-A量を制御する分子機構は不明の点が多く、さらに、分解機構については未だに知られていなかった。

多くの細胞内タンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム系による分解制御を受ける。このユビキチン・プロテアソーム系では、E3ユビキチンリガーゼと呼ばれるタンパク質が分解の標的となるタンパク質に目印となるユビキチンを結合させ、その目印を持ったタンパク質が細胞内の分解工場の1つであるプロテアソームに運ばれて、分解される。したがって、このシステムではE3ユビキチンリガーゼが標的タンパク質の認識に重要な役割を果たす^{11,12)} (図8)。2008年に私達は、脳で見いだされたRINESが小胞体膜上に存在し、E3ユビキチンリガーゼとしての活性を示すことを報告した¹⁵⁾。このRINESの役割を明らかにするため、RINES欠損マウスを作製し解析を行っていた所、外見上は正常マウス（同腹の野生型マウス）と全く同じだが、その行動に異常があることを見いだした。

2. 研究手法、成果と今後の期待

私達は、RINES欠損マウスと野生型マウスに対して、いくつかの行動実験を行った。その結果、マウスを広い空間や高い場所などの新規環境においた時に、RINES欠損マウスでは、野生型に比べて不安感が高くなっていることが分かった (図1)。さらに、不快感をもたらす電気刺激や強制的な水泳などのストレスに対する反応性が、野生型に比べて低下することも見いだし (図2)、情動反応の異常を示すことが明らかになった。さらに、侵入者として今まで会ったことのないマウスと一緒にすると、野生型マウスよりも長く相手に接触（社会的な接触、親和性の増加）

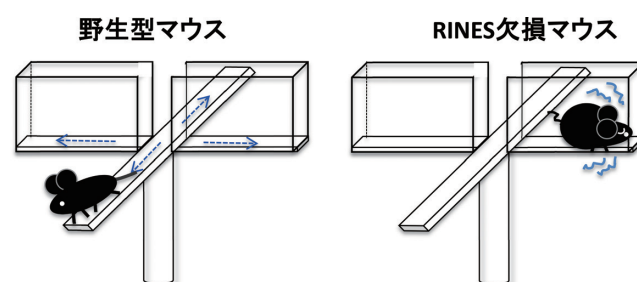


図1. RINES欠損マウスは新規環境で不安を感じやすい。高架式十字迷路において、野生型マウスは壁に囲われていないアームにも頻繁に出てくるが、RINES欠損マウスは囲われた場所に多くいる。

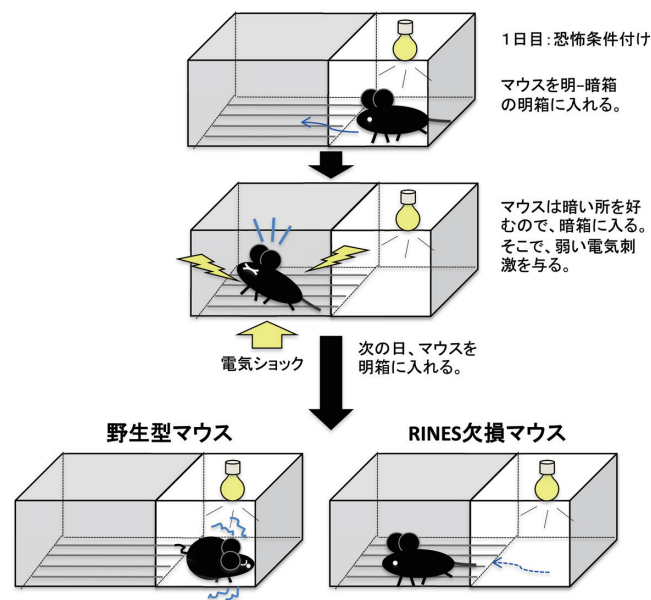


図2. RINES欠損マウスは恐怖記憶やストレスに対する反応性の低下を示す。

受動的回避試験において、1日目に受けた電気ショックにより、次の日、明箱に入れられた野生型マウスは暗箱になかなか入ろうとしないが、RINES欠損マウスはすぐに暗箱に入ってしまう。

することが分かった (図3)。

これらの情動異常の結果をふまえて、私達はRINES欠損マウスの脳の各部位で、安静時と不快な刺激後にモノアミン量を検討した。その結果、不快な刺激後、ノルアドレ

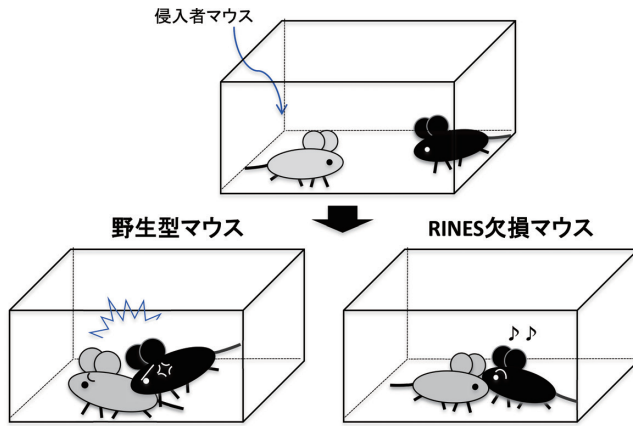


図3. RINES欠損マウスは社会的な接触性が増える。

野生型マウスおよびRINES欠損マウスのホームケージに、侵入者として新たなマウスを入れたら、野生型マウスは、侵入者に攻撃したり、離れていることが多いが、RINES欠損マウスは、侵入者に接触したり、においを嗅いだりと、社会的な接触が亢進している。

ナリンとセロトニンの両方の量が、青斑核という部位で正常マウスより低くなることが分かった (図4)。青斑核ではMAO-Aの酵素活性が特に高いことが知られていることから、青斑核のMAO-Aの定量を行った。その結果、青斑核でMAO-Aの酵素活性が高く、その量も増えていることが明らかになった (図5)。一方で、MAO-AのメッセンジャーRNA量の定量には差は認められず、MAO-Aの産生が増えているわけではないことが明らかになった。これらのことから、RINES欠損マウスでは、MAO-Aの分解が低下している可能性が考えられた。

したがって私達は、実際にRINESが直接MAO-Aの分解に関与するのかどうかを検討した。その結果、培養細胞内においてRINESは、MAO-Aに結合し、ユビキチン化とプロテアソームによるタンパク質分解を促進することが分かった (図6, 7)。また、RINES欠損マウスの青斑核から抽出したMAO-Aでは、ユビキチン化の程度が減少していた (図7)。以上から、RINESがMAO-Aを標的として、その分解を促進することが明らかになった (図8)。

さらに、RINES欠損マウスに表れた行動異常がMAO-Aの変化を反映しているのかどうかを検討するために、MAO-A阻害剤をRINES欠損マウスに投与して、その影響を情動行動異常において評価した。その結果、RINES欠損マウスは正常マウスと異なった反応を示し、複数の検査項目で異常行動が改善した。このことから、モノアミンオキシダーゼの量的な変化が行動異常に関係していることが

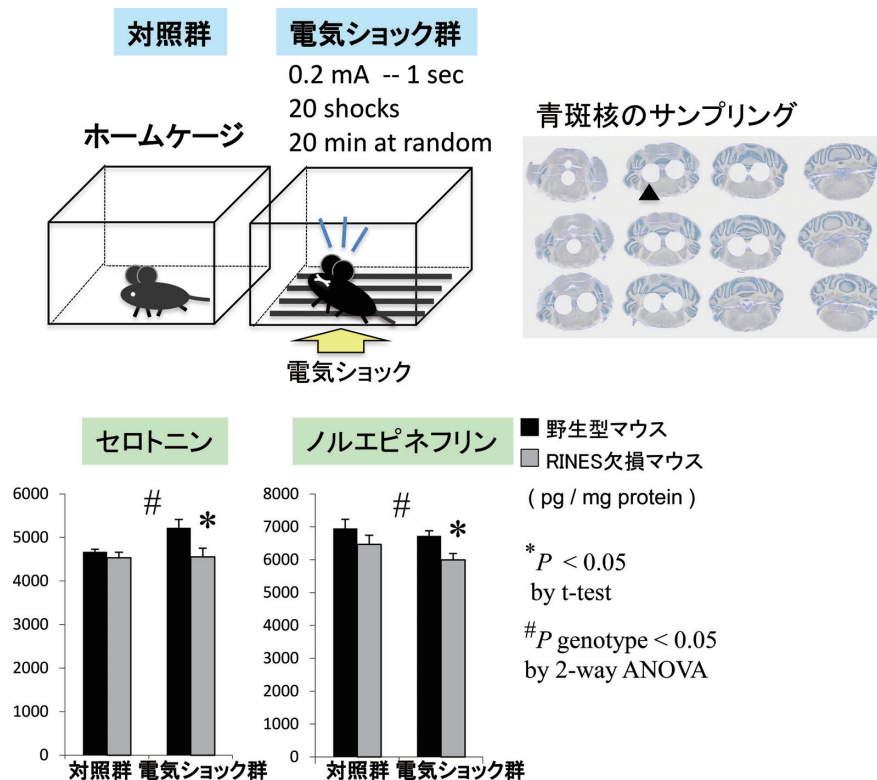


図4. 電気ショックを与えると、青斑核において、野生型に比べてRINES欠損マウスのセロトニン、ノルエピネフリン量が減少する。

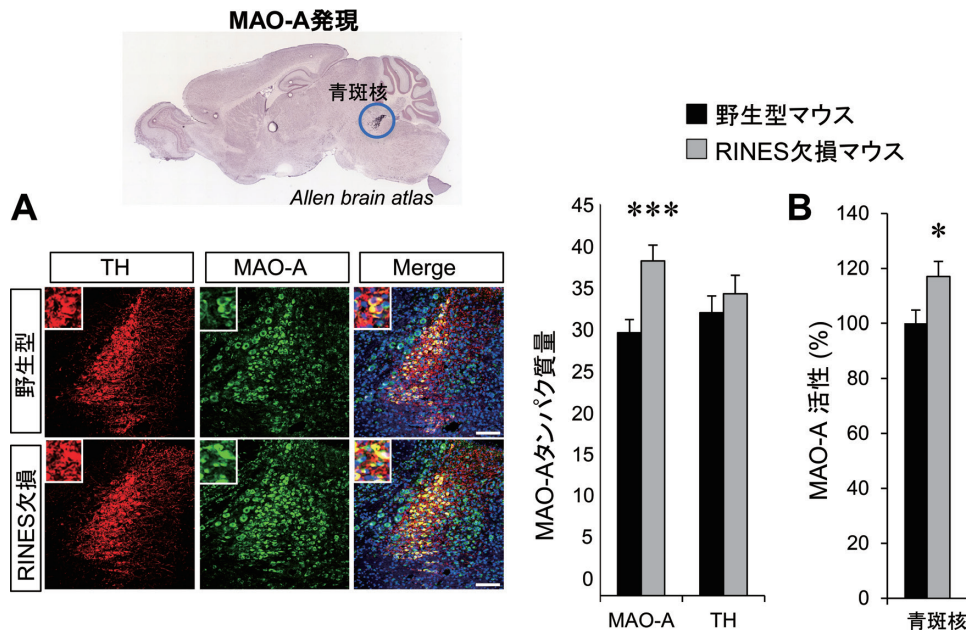


図 5. RINES欠損マウスの青斑核において、MAO-Aタンパク質量とMAO-Aの活性が亢進している。

A, 野生型マウスおよびRINES欠損マウスの青斑核において、MAO-AとTH（カテコラミン合成酵素）のタンパク質量を定量的免疫組織化学により検討した。その結果、RINES欠損マウスのMAO-Aタンパク質量が有意に増加していた。

B, 野生型マウスおよびRINES欠損マウスの青斑核におけるMAO-A活性を測定した結果、RINES欠損マウスのMAO-A活性が有意に増加していた。

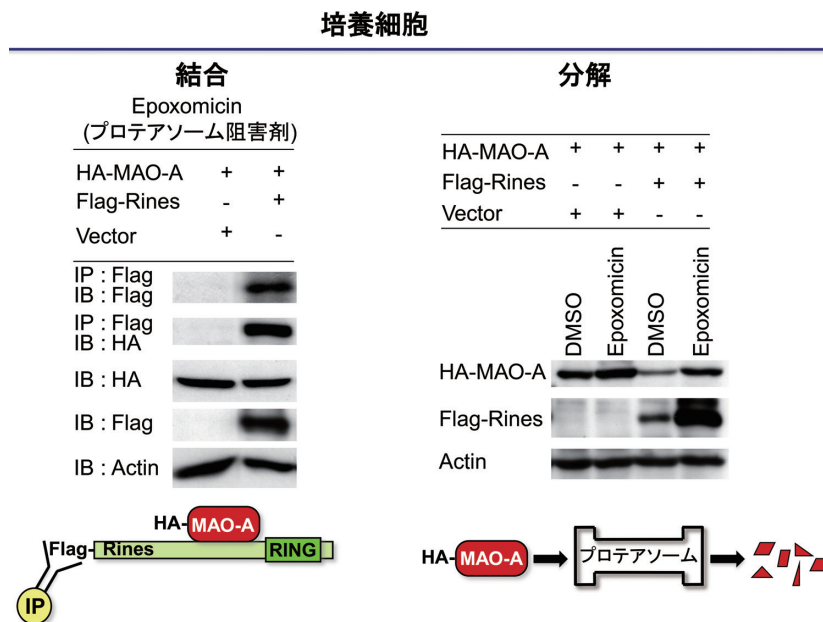


図 6. 培養細胞において、RINESはMAO-Aと結合し、MAO-Aタンパク質をプロテアソーム系で分解する。

確かめられた。

興味深いことにRINES欠損マウスで観察された不安の増強や社会的な接触の増加といった行動異常は、MAO-A量の低下に関連した症状（ヒトBrunner症候群など）と逆になっている（図9）。一方で、MAO-A過剰に関連した

症状（不安症状）とは類似している。これまで、MAO-A量の制御機構を知ることは、情動障害や社会性障害の理解のために必須であると考えられてきた。今回の発見は、MAO-A量の制御機構の新たな一面を明らかにしたものであり、情動障害や社会性行為障害の発症機構の理解に貢献

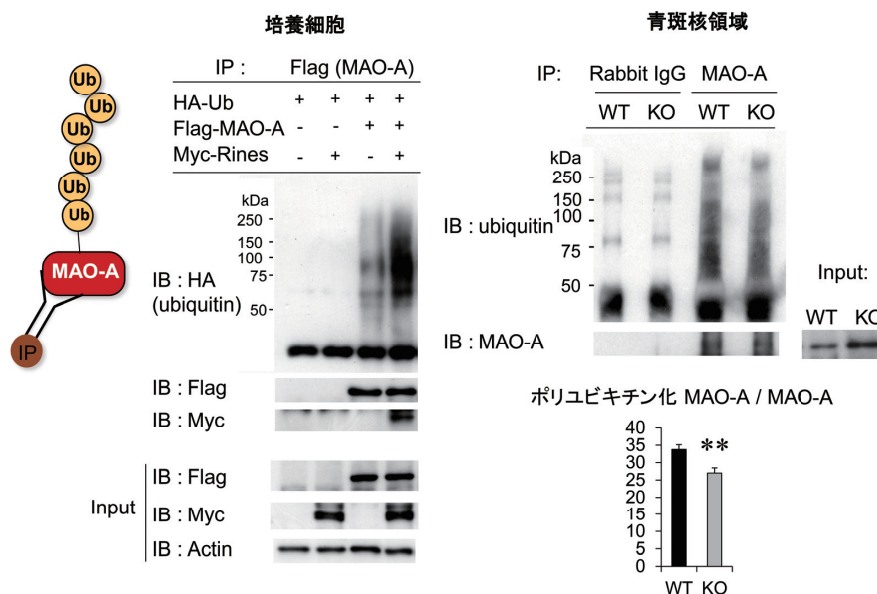


図7. 培養細胞および、脳の青斑核において、RINESはMAO-Aタンパク質のユビキチン化を促進する。

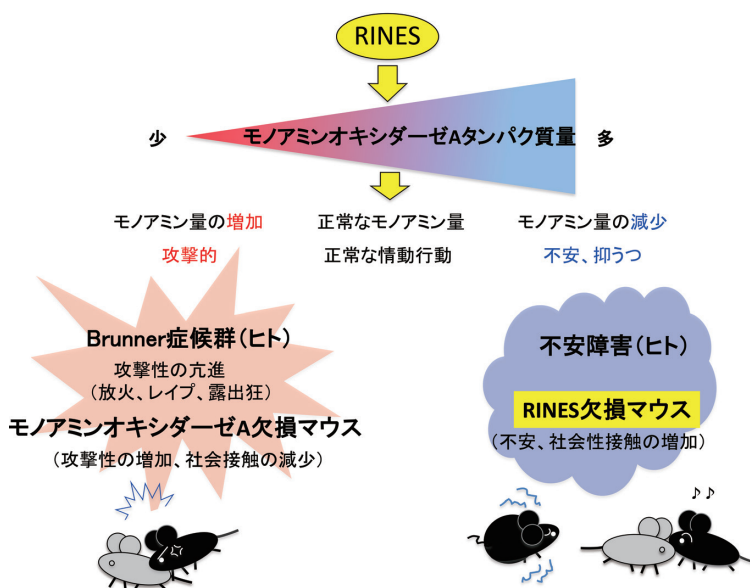


図9. MAO-Aタンパク質量と、情動および社会性行動障害の関連性を示した。

RINESにより、MAO-Aタンパク質量は正常に保たれ、正常な情動行動が行われる。

することが期待できる。

さらに、MAO-A量低下で見られる攻撃性は、幼児期の虐待などにより、その症状が顕著に出ることも明らかになっているため、今後はRINES欠損マウスの若齢期における異常についても検討していく。また、ヒトにおけるRINESの変異が不安または攻撃性などの社会性行動の多寡と関連があるかどうかを検討することも重要である。これらの点が解明されると、RINESを標的とした抗不安薬などの創薬および行為障害など発症基盤の理解および治療においても重要な知見になると期待できる。

原著論文

- 1) KABAYAMA, M., SAKOORI, K., YAMADA, K., ORNTHANALAI, V.G., OTA, M., MORIMURA, N., KATAYAMA, K., MURPHY, N.P., ARUGA, J.: Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. *Journal of Neuroscience*. 2013; 33(32): 12940-12953.

参 考 文 献

- 1) SHIH JC, CHEN K, RIDD MJ. Monoamine oxidase : from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 1999 ; **22** : 197-217.
- 2) BORTOLATO M, CHEN K, SHIH JC. Monoamine oxidase inactivation : from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 ; **60** : 1527-1533.
- 3) RAVINDRAN LN, STEIN MB. The pharmacologic treatment of anxiety disorders : a review of progress. *J Clin psychiatry* 2010 ; **71** : 839-854.
- 4) MILLAN MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology* 2003 ; **70** : 83-244.
- 5) KOEN N, STEIN DJ. Pharmacotherapy of anxiety disorders : a critical review. *Dialogues in clinical neuroscience* 2011 ; **13** : 423-437.
- 6) BRUNNER HG, NELEN M, BREAKEYFIELD XO, et al. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 1993 ; **262** : 578-580.
- 7) DECKERT J, CATALANO M, SYGAILLO YV, et al. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 1999 ; **8** : 621-624.
- 8) SCHULZE TG, MULLER DJ, KRAUSS H, et al. Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder. *American journal of medical genetics* 2000 ; **96** : 801-803.
- 9) YU YW, TSAI SJ, HONG CJ, et al. Association study of a monoamine oxidase a gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology: official publication of the american college of neuropsychopharmacology* 2005 ; **30** : 1719-1723.
- 10) SAMOCHOWIEC J, HAJDUK A, SAMOCHOWIEC A, et al. Association studies of MAO-A, COMT, and 5-HTT genes polymorphisms in patients with anxiety disorders of the phobic spectrum. *Psychiatry research* 2004 ; **128** : 21-26.
- 11) HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998 ; **67** : 425-479.
- 12) PICKART CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001 ; **70** : 503-533.
- 13) ALAM SM, KARIM MM, LEE SH, et al. Development of a sensitive flow-injection-chemiluminescence detection method for the determination of levodopa. *Luminescence : The journal of biological and chemical luminescence* 2008 ; **23** : 327-332.
- 14) YAO I, TAKAGI H, AGETA H, et al. SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. *Cell* 2007 ; **130** : 943-957.
- 15) OGAWA M, MIZUGISHI K, ISHIGURO A, et al. Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *Genes Cells* 2008 ; **13** : 397-409.
- 16) HUNTER P. The psycho gene. *EMBO reports* 2010 ; **11** : 667-669.
- 17) BRUNNER HG, JANSEN G, NILLESEN W, et al. Brief report : reverse mutation in myotonic dystrophy. *The new england journal of medicine* 1993 ; **328** : 476-480.
- 18) CASES O, SEIF I, GRIMSBY J, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 1995 ; **268** : 1763-1766.
- 19) SCOTT AL, BORTOLATO M, CHEN K, et al. Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport* 2008 ; **19** : 739-743.