

令和元年6月26日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16648

研究課題名(和文)複数のエピジェネティクス解析を用いたコカイン感受性亢進責任遺伝子の同定

研究課題名(英文) System construction to identify the cause of cocaine sensitization using epigenetics analysis

研究代表者

大西 陽子(Ohnishi, Yoko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70727586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は側坐核でdeltaFosBを過剰発現することで、抗うつ的に働き、ストレス後のコカイン依存を増加させ、コカイン感受性自体も増加させていることを報告してきました。そこで、我々はYeast two hybrid法により、deltaFosBの結合パートナーを探索し、いくつかの候補を見つけました。その中で、プロテアソーム機構の一つであるPsmc5に焦点を当てて調べてみたところ、Psmc5は、コカイン投与で側坐核に誘導され、deltaFosB発現を増強し、コカイン感受性を増強させましたが、Psmc5のdeltaFosB結合ドメインの欠失型はそのような効果を示しませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

依存症やうつ病における脳内の分子的变化と行動に対する影響を明らかにすることで、生物学的に脳の順応反応のメカニズムを明らかにできることが学術的に意義があります。さらに社会的には、アルコール中毒、たばこ中毒、薬物依存、うつ病といった病気の発症メカニズムを明らかにすることで今後の治療方針、治療薬の開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：We have reported overexpression of deltaFosB in nucleus accumbens worked as anti-depressants, enhanced cocaine addiction after stress, and elevated cocaine sensitization. We tried to find binding partners of deltaFosB by Yeast two hybrid methods, and found several candidates including c-Jun and JunD, which are already known binding partners. We focused on Psmc5 as deltaFosB binding partner, which is one of proteasome machinery. Psmc5 enhanced deltaFosB expression and was induced by cocaine administration. Overexpression of Psmc5 in nucleus accumbens enhanced cocaine sensitization, but deletion form of deltaFosB binding domain of Psmc5 didn't have such effects.

研究分野：脳神経科学

キーワード：うつ病 依存症 転写因子 エピジェネティクス 行動実験 コカイン AP-1 プロテアソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cocaine sensitization は日本語でコカインの逆耐性と呼ばれることもありますが、感受性亢進と表現した方が直感的でわかりやすいでしょう。薬物に対する感受性が増えて、同じ量の薬物であっても連続投与によってその効果が増大する、もしくは、投与する薬物の量を減らしても、それまでと同様の効果があるといった形で捉えることが出来ます。薬物としてのコカインは米国においてもっとも多用されている依存性のある違法薬物であり、それゆえに研究成果が多数あり、比較や参考にしやすいため薬物の対象として使用しています。マウスの行動実験としては依存性をみるために Cocaine conditioned place preference (Cocaine CPP, コカインの場所嗜好性試験)としてコカインをうたれた直後に入った場所をどれだけ好きになっているかで調べるのですが、同時にもしくは別途に Cocaine sensitization を測定することが出来て、条件付けとして同じ量のコカインを連日連続投与しているとき、うった直後の行動量増加が徐々に増えていく形でわかります。近年、遺伝子ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、コンディショナル遺伝子ノックアウトマウス、遺伝子ノックインマウス、ウイルスベクターを用いた部位特異的な遺伝子改変や神経細胞の活性化・不活性化などにより Sensitization に関わる脳の部位や分子が少しずつ分かってきていますが、その中でもコカインの連続投与に比例するように側坐核に蓄積する転写因子である Δ FosB に私が所属してきたグループは注目していました。 Δ FosB の発現量とコカインに反応する行動量が比例すること、 Δ FosB が転写因子であることから Sensitization のマスターキー遺伝子であることが期待されていたのです (Nestler, 1999)。その後、確度の高いデータとしては、HSV を使った側坐核における Δ FosB の過剰発現で Cocaine sensitization が増加し、S27 のリン酸化を阻止した S27A Δ FosB の過剰発現では増加しなかったというデータが報告されました (Ulery-Reynolds, 2009)。それとは別にコカイン刺激で PKA シグナルを介して Δ FosB が側坐核や線条体の D1 神経に発現し、D2 神経では D2 アンタゴニストを介して PKA シグナルが活性化し、 Δ FosB が誘導されることがわかっていました。このことから、コカイン投与により、D1 神経に Δ FosB が蓄積し、Cocaine sensitization が起こることがわかっていました。

<引用文献>

Nestler EJ, Kelz MB, Chen J.: DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res.* 1999 Jul 17;835(1):10-7.

Ulery-Reynolds PG, Castillo MA, Vialou V, Russo SJ, Nestler EJ.: Phosphorylation of DeltaFosB mediates its stability in vivo. *Neuroscience.* 2009 Jan 23;158(2):369-72.

Nestler EJ: Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur J Pharmacol.* 2015 Apr 15;753:66-72.

2. 研究の目的

薬物依存症は、精神の不安定化、労働意欲の低下、暴力行為の誘発、過剰摂取による死亡、気分障害およびそれによる自殺など個人だけでなく、社会にも不利益をもたらす問題です。私たちは依存性薬物として、コカインを使用していますが、動物実験モデルで最もはっきりとわかる薬物の反応として、投与後の行動量の上昇が挙げられます。とく 2 連日投与により、徐々に行動量が増えていく反応が見られ、それは感受性更新 (Sensitization) として理解されており、凶暴化などに関連すると考えられていますが、その分子メカニズムはまだ未解明の部分があります。また、昨今問題とされる脱法ハーブ (危険ドラッグ) においても同様のメカニズムが働いていると考えられ、統合失調症の陽性症状の分子メカニズムも共通部分があるとも考えられています。その意味で、その分子制御メカニズムを知ることは、治療および予防において重要

な知見になり得ると考えられます。

3. 研究の方法

まず、最初に私たちは Δ FosB に結合する蛋白質を Yeast two hybrid 法にて探索しました。Yeast two hybrid 法は酵母の転写活性を利用して、2つの蛋白質の結合性を評価するため、自身に転写活性がある蛋白質は使いにくいという制約があります。実際、実験してみると、 Δ FosB は転写因子であるため、偽陽性が多数出たため、N 末端の転写活性化ドメインを欠失し、同じ mRNA から翻訳開始部位が異なり、内在性にも発現しうる $\Delta 2\Delta$ FosB に結合する蛋白質を探索しました。その結果、Psmc5、Atf4、Optineurin、Pscd2、Yeats4、Ninein、Cep250、Ankrd35、Lrrfip2、c-Jun、JunDなどを同定しました。c-Jun と JunD は FosB/ Δ FosB とヘテロダイマーを作って、AP-1 サイトに結合することが知られているため、この結果の確度が高いことが証明されたこともあり、次のステップに移りました。

これらの新しくみつかった結合パートナーの機能解析と、今後の研究を進展させるためのシステム作りに専念した。

4. 研究成果

Psmc5 は Δ FosB の発現量を上昇させる

Psmc5 はプロテアソーム複合体のひとつであることから、FosB がプロテアソーム依存的に分解されることから、FosB が、Psmc5 を介してプロテアソームにより分解促進される可能性を考えました。細胞を使って Psmc5 の過剰発現、または Psmc5 shRNA による発現抑制条件下での、内因性の FosB/ Δ FosB の発現量を調べてみたところ、意外なことに Psmc5 過剰発現で Δ FosB の発現量は上がり、shRNA 投与により、FosB/ Δ FosB は低下しました。また、Psmc5 自身はコカイン連続投与によりその発現量が上がることがわかりました。つまり、コカイン連続投与で、 Δ FosB も Psmc5 も発現量が上がり、Psmc5 の発現上昇は Δ FosB の誘導量も上昇させることがわかりました。

Δ FosB は HAT 活性を持つ CBP/p300 と Psmc5 を介して結合する

近年、プロテアソームマシンナリーは細胞質内だけでなく、核内にも存在することが知られており、転写調節に関わっている可能性が指摘されています。また、転写を促進するヒストンアセチル化を促進する CBP のヘテロノックアウトマウスが、コカイン感受性亢進の低下を認めることから、 Δ FosB - Psmc5 複合体が CBP と関わって、転写を促進する可能性を免疫沈降法を用いて検討しました。

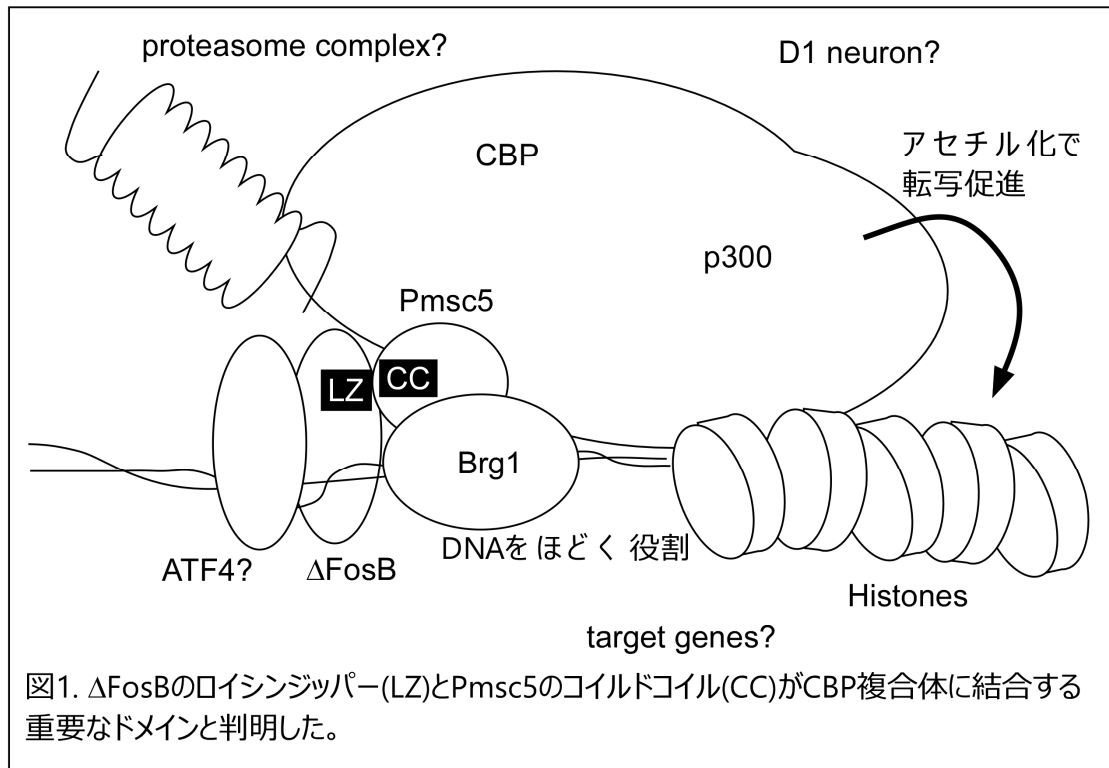
その結果、 Δ FosB - Psmc5 複合体がヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を持つ CBP だけでなく、p300 と結合し、さらに DNA 鎖をほどくヘリケース活性を持つ Brg1 と結合することを同定しました。また、ロイシンジッパー変異の Δ FosB は CBP/p300 とは結合しませんでした。

つまり、コカイン連続投与により、 Δ FosB、Psmc5 の発現量が上昇し、CBP/p300 と Brg1 と Δ FosB のロイシンジッパーを介して複合体を形成することがわかりました。

Psmc5 も過剰発現でコカイン感受性亢進を誘導するが、 Δ FosB 結合部位を欠損させるとその効果は認められない

Psmc5 と Psmc5 変異体を側坐核で AAV を介して過剰発現させ、コカインを連続投与したところ、Psmc5 の過剰発現で、コカイン感受性の亢進が認められました。また、 Δ FosB との結合部

位であるコイルドコイルドメインを欠損させた Psmc5 にはその効果は認められませんでした。また、コカイン条件づけ場所嗜好性試験では特に差を認めませんでした。以上のことから下記のような全体像を予測しました。



ΔFosB 免疫沈降システムの構築

当初の予定では、ATF4 などの関連蛋白質の発現変化やΔFosB と Psmc5 の Re-ChIP 解析およびその標的遺伝子と遺伝子発現の変化の比較を予定していましたが、ATF4 の Western blotting が上手くいかず、また、ΔFosB の ChIP が転写因子であるため上手くいかないため、Psmc5 の ChIP の条件を探りつつ、新しいシステム構築に計画を移行しました。

一つ目は HA-fosB マウスの樹立で、FosB/ΔFosB の N 末端に HA tag が付いているため、免疫沈降がしやすいマウスとなります。マウスの構築はベクター作成から早くて 2-3 年かかることと、予算不足からベクター構築まで終わり、先端モデル動物支援プラットフォームを介して樹立することを目指しています。

二つ目は dCAS9 を使った転写調節因子の探索システムです。Cre 発現マウスと掛け合わせて、細胞のタイプ特異的に gRNA と dCAS9 を発現することで、HA-fosB を使って同定した標的遺伝子の発現調節機構を明らかにするシステムになります。Add gene から dCAS9、ROSA26 のベクターを購入してベクター構築に取り組んでいます。

HA-fosB マウスに関しては、アメリカの Nestler ラボも取り組んでいましたが、トランスジェニックマウスであったためか上手くいっていないため、ノックインマウスである本計画によってそれが改善されることが期待されます。

ΔFosB の標的遺伝子はいくつか報告はされていますが、ストレス耐性やストレス後のコカイン依存性上昇、そして、コカイン感受性上昇に直接かかわる遺伝子はほとんど報告されておらず、これらのシステムによっては今後、上流から下流までかかわる蛋白質が同定できることが期待できます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Ohnishi YH, Ohnishi YN, Nakamura T, Ohno M, Kennedy PJ, Ohkawa Y, Nishi A, Neve R, Tsuzuki T, Nestler EJ.: PSMC5, a 19S proteasomal ATPase, regulates cocaine action in the nucleus accumbens. PLoS One. 2015 Jun 25;10(6):e0131263 (査読あり)

Ohnishi YN, Eagle AL, Ohnishi YH, Cahill ME, Wirtz AJ, Robison AJ, *Nestler EJ: Generation and validation of a floxed FosB mouse line. BioRxiv 179309 2017 Aug (査読なし)

[学会発表] (計7件)

Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH, Neve RL, Nestler EJ, Nishi A: Nrf exacerbates cocaine addiction after social defeat stress. Neuroscience 2016 11.12-16 (San Diego, USA)

大西克典、河原幸江、大西陽子、Neve RL、Nestler EJ、西昭徳：社会的敗北ストレス後のコカイン依存症悪化は側坐核における酸化ストレス反応による 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日～12月2日(神奈川)

大西克典、河原幸江、大西陽子、Neve RL、Vialou VF、Nestler EJ、西昭徳：長期間の抗酸化食物摂取は社会的ストレス後のコカイン依存症を抑制する 第90回日本薬理学会年会 2017年3月15-17日(長崎)

Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH, Nishi A: Is it possible that non-attractive male mouse could get female mind? Neuroscience 2017 11.11-15 (Washington DC, USA)

大西克典、河原幸江、大西陽子、西昭徳：モテモテ大作戦！女の子にモテる方法、モテなくなる方法 第28回マイクロダイアリシス研究会 2017年12月16日(東京)

Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH, Nishi A: Is it possible that non-attractive male mouse can get attractive mind set? Neuroscience 2018 11.3-7 (San Diego, USA)

大西克典、河原幸江、大西陽子、西昭徳：モテるオスにはどうしたらなれるのか？ 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日～11月30日(神奈川)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pharm/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。