

PSMC5, a 19S Proteasomal ATPase, Regulates Cocaine Action in the Nucleus Accumbens

大西, 陽子

<https://hdl.handle.net/2324/1807145>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（医学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名：大西陽子

論 文 名：PSMC5, a 19S Proteasomal ATPase, Regulates Cocaine Action in the Nucleus Accumbens

(19S Proteasomal ATPase である PSMC5 は側坐核においてコカイン誘発性行動を制御する)

区 分：乙

論 文 内 容 の 要 旨

現在、米国において薬物汚染が蔓延しており、中でもコカインは生涯使用率が約 15%と高く、深刻な社会問題となっている。コカイン依存症メカニズムの解明はその他の薬物依存症治療も含めて重要なテーマとなっている。コカインはドーパミン神経終末において、ドーパミントランスポーターによるドーパミンの再取り込みを阻害することにより、シナプス間隙のドーパミン濃度を上昇させる。その結果アデニレートシクラーゼ活性が上昇し、プロテインキナーゼ A が活性化され、核内に存在する CREB (cAMP response element binding protein)をリン酸化する。これにより CREB が様々な遺伝子の転写を活性化するが、このターゲット遺伝子の一つに FosB 遺伝子がある。FosB は AP-1 転写因子群の Fos ファミリーの一つであり、alternative splicing により二種類の mRNA、fosB と Δ fosB を生じる。4 つのエクソンから構成される FosB に対して、 Δ FosB はエクソン 4 の中のエクソニックイントロンにおけるスプライシングにより、新たにストップコドンを形成し、C 末端 101 アミノ酸を欠損している構造になる。FosB を含む Fos ファミリータンパク質はコカイン等の薬物の急性投与により発現が一過性に上昇するが、 Δ FosB は薬物の繰り返し投与により、側坐核など主にドーパミン刺激を受ける細胞に蓄積していく。 Δ FosB を側坐核に過剰発現させるとコカインにより誘発される自発運動が増加することが報告されている。しかしながらどのような分子メカニズムで働いているかは分かっていない。そこで本研究では、yeast two hybrid screening により Δ FosB の新規結合分子を同定し、そのタンパク質がコカインによる自発運動にどのように関わっているかを調べた。Yeast two hybrid screening の結果、 Δ FosB に結合するタンパク質の候補として 11 種類を同定した。11 種の中でもプロテアソーム構成分子である PSMC5 のクローンが大半を占めていたため、 Δ FosB と PSMC5 の相互作用を解析した。

まず始めに、Neuro2A 細胞に Δ FosB と PSMC5 を過剰発現し免疫沈降実験を行い、 Δ FosB と PSMC5 が細胞の中で相互作用していることを確認した。また、PSMC5 の各種変異体を用いた免疫沈降実験により、PSMC5 の coiled-coil ドメインが Δ FosB との結合に必須であることが分かった。また Δ FosB のロイシンジッパードメインに変異を入れると PSMC5 と結合できなかったことから、 Δ FosB のロイシンジッパードメインが PSMC5 との結合に必須であることが分かった。

次にコカイン投与によりマウスの側坐核における PSMC5 発現が変化するか western blotting で検討したところ、細胞質での発現に変化は認められないものの、核において発現が二倍に上昇していた。また、免疫染色後の共焦点顕微鏡観察により側坐核において Δ FosB と PSMC5 が同一の細胞に発現していることが分かった。また、側坐核の核分画を用いた免疫沈降実験により、PSMC5 が Δ FosB と結

合していることが確認できた。

次に PSMC5 が Δ FosB タンパク質の分解に関わっているかについて検討した。PSMC5 を Rat 1A 細胞に過剰発現させると、血清飢餓時の FosB/ Δ FosB の発現量は変化しないが、血清刺激 3 時間後において、コントロールと比較して Δ FosB の発現が有意に増加していた。また、PSMC5 を siRNA によりノックダウンすると血清飢餓時の FosB/ Δ FosB の発現量は変化しないが、血清刺激 3 時間後の FosB/ Δ FosB の発現量はコントロールと比較して有意に減少していた。この結果 PSMC5 は Δ FosB タンパク質の安定化に関わっている可能性が示唆された。

PSMC5- Δ FosB 複合体が他のタンパクと結合する可能性について検討したところ、ヒストンアセチル化酵素である CBP(CREB binding protein)/p300 と結合することが分かった。さらにこの結合には Δ FosB のロイシンジッパードメインが重要であることが分かった。また SWI/SNF 複合体のサブユニットである Brg1 とも結合していることが分かり、PSMC5- Δ FosB 複合体は CBP/p300 及び Brg1 と結合し、転写を活性化する可能性が示唆された。

側坐核に発現している PSMC5 がコカインにより誘発される自発運動に影響を与えるか調べるため、単純ヘルペスウイルスベクターを用いて、PSMC5 を側坐核に過剰発現させた。その結果、PSMC5 を過剰発現させたマウスではコカインにより誘発される自発運動がコントロールと比較して有意に増加していた。また、PSMC5 の ATPase 活性を持たない変異体でも、同様の活性がみられたが、coiled-coil ドメインを欠損した変異体ではこの活性は認められなかったことから、PSMC5 と Δ FosB との結合がコカインにより誘発される自発運動の増加に重要であることが示唆された。

本研究の結果より、 Δ FosB は PSMC5、CBP/p300、Brg1 と結合し、標的遺伝子の転写を活性化させ、コカインにより誘発される自発運動を活性化する可能性が示唆された。



