

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860920

研究課題名(和文) タンパク質合成系への作用からみたN-アセチルシステインの抗精神病作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of the effects of N-acetyl cysteine on animal models of mental disorders

研究代表者

西川 宏美(Nishikawa, Hiromi)

金沢大学・大学病院・研究員

研究者番号：70534155

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)：コカイン依存症動物モデルで予想される側坐核での細胞内システインの欠乏からtRNAのチオール化抑制を予測し、それを触媒するMOCS3の発現量についてウエスタン法で検討したが、発現確認できなかった。またシステインを合成の律速段階とするグルタチオンの量はコカインの影響を受けていなかった。メチオニンからのシステイン供給に關与する酵素についても活性をに有意な差を認めなかった。従って、慢性コカイン投与でシスチン-グルタミン酸交換体の機能障害が起きて、細胞内システインの供給は代償されていると考えられた。一方、N-アセチルシステインの急性投与は慢性コカイン動物でのシナプス構成タンパク質の分解を促進した。

研究成果の概要(英文)：It was predicted that protein synthesis would be attenuated in the nucleus accumbent (NAc) of chronic cocaine-treated rats due to intracellular cysteine shortage -induced attenuation of thiolation of tRNA which resulted from dysfunction of cystine-glutamate anti porter (xCT). However, the existence of MOCS3, which is supposed to catalyze tRNA thiolation, was not confirmed. In addition, the amount of total glutathione, which demands cysteine for its synthesis, was not affected by cocaine. Another intracellular cysteine supplying pathway from methionine owing to the enzymatic activity of cystathionine beta synthase was also less likely, because its activity was not altered by cocaine. Thus, it is concluded that intracellular cysteine was supplied by unknown pathway besides via xCT, and the basal levels of protein synthesis was not affected in the NAc by repeated cocaine treatment. On the other hand, N-acetyl-cysteine robustly promoted protein degradation in chronic cocaine-treated rats.

研究分野：神経薬理学

 キーワード：精神疾患 細胞内システイン シスチン-グルタミン酸交換体 タンパク質翻訳系 タンパク質分解系
 依存症 神経可塑性

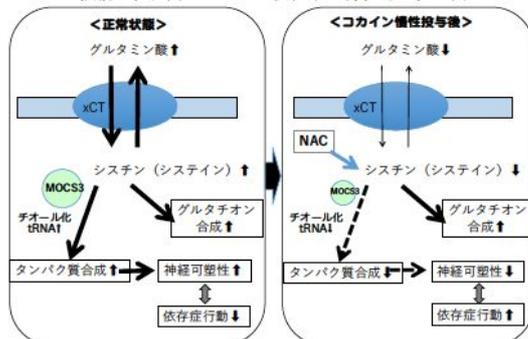
1. 研究開始当初の背景

アルコールや薬物依存症の治療薬として現在注目されているのが、システインの前駆体 N-アセチルシステイン (N-acetylcystine : NAC) である。NAC の有効性はコカイン依存動物モデルで最初に確認され、その後、気分障害や自閉症など様々な精神疾患に対しても治験が行われ概ねポジティブな結果が得られている。しかし強い酸化ストレス負荷が投与時点で存在しない限り、NAC は高濃度でも総グルタチオン量を増やすことはなく、NAC が神経可塑性を回復させる作用機序は十分解明されていない。

2. 研究の目的

側坐核を含む線条体の細胞外グルタミン酸はアストログリアに存在するシスチン-グルタミン酸交換体 (=xCT) によって制御されている。xCT は細胞外からグリア細胞内にシスチンを輸送する際、それと交換に細胞外へグルタミン酸を放出する。コカイン慢性投与後の側坐核では xCT の機能が低下し、その結果として細胞外グルタミン酸が低下するが、システインの前駆体 NAC を投与すると、見かけ上 xCT の機能が回復するため細胞外グルタミン酸が正常化し、同時に動物のコカイン要求行動も抑制され、さらに長期増強現象などの神経可塑性も正常化する。コカイン慢性投与後のラット側坐核では、xCT の機能低下によりアストログリア内へのシステイン供給が不足する。しかし細胞は酸化ストレスに対するレドックス制御を優先せざるを得ないため、システインを必要とするタンパク質合成をある程度犠牲にする。従ってシステインの供給が不足すると、結果として新規タンパク質合成を必須とする神経可塑性に大きな障害が生じる。レドックス制御をアストログリアに依存する神経細胞でも同じような状況が生じる。NAC は細胞内システイン濃度を回復させることで、神経細胞内のタンパク質合成 (= 神経可塑性) を正常化する」と仮説 (図 1) をたて、これを動物実験で証

図1 仮説：細胞内システイン供給系と神経可塑性の関係



→ コカイン慢性投与によって影響を受け、NAC で正常化すると予想される細胞内経路を明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内でシステインが欠乏すると、酵母では Uba4 というタンパク質の転写が抑制

される。Uba4 (ほ乳類のホモログは MOCS3) は tRNA のチオール化を触媒しているが、tRNA のチオール化はタンパク質合成に不可欠である。そこでコカイン慢性投与が側坐核内でシステインによる tRNA のチオール化及びチオール化誘導タンパク質 MOCS3 の発現量に与える変化についてウエスタン法及び生化学的手法で検証する。

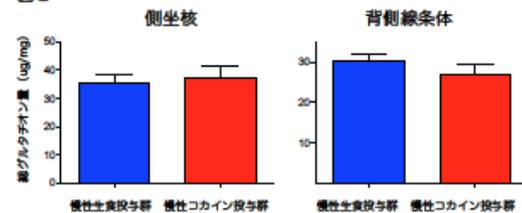
(2) コカイン慢性投与あるいは MOCS3 発現量の操作がタンパク質合成効率に与える変化についてウエスタン法及び生化学的手法で検証する。

(3) タンパク質の合成系ではなく、分解系に異常がある可能性を検討するため、オートファジー系の関与についても検討を行う。

4. 研究成果

MOCS3 の発現量に関して、生食投与群とコカイン慢性投与群の側坐核及び背側線条体でウエスタン法によりタンパク質発現量を比較した。しかしいずれの領域においても MOCS3 の発現は確認されなかった。また、細胞内システインが減少した場合に予想されるグルタチオン量の減少についてもコカイン投与群で認めなかった (図 2)。

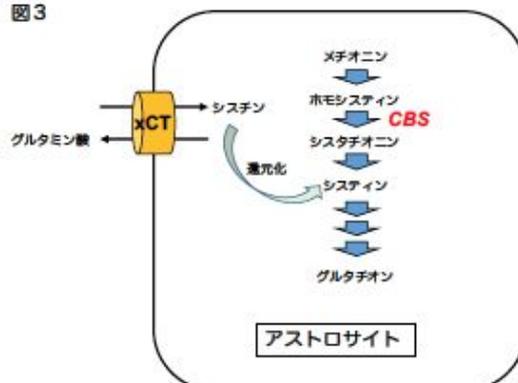
図 2



結果から、グルタミン酸との交換以外にも、細胞内にシステインを供給する未知のシステムが存在していることが示唆された。このため当初予定していたチオール化 tRNA の測定は行わなかった。

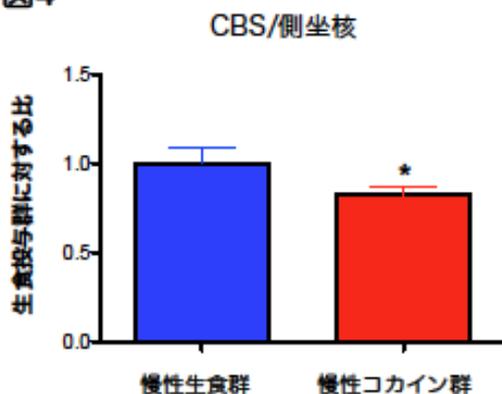
グルタチオンはアストロサイトで主に産生され、システインとグリシン、グルタミン酸の3つから合成される。このうち、律速段階となるシステインは酸化型二量体のシスチンの形で細胞外から主に供給され、その主な供給源が xCT による細胞内グルタミン酸との非ナトリウム依存性の交換である (図 3)。

図 3



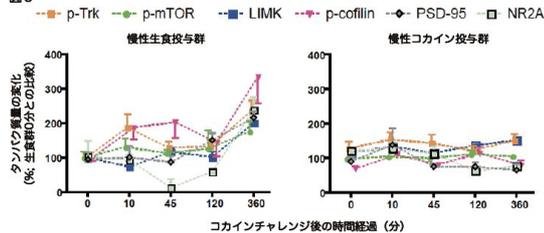
最近、xCT が細胞内のシスタチオンと交換して細胞外グルタミン酸を細胞内に取り込むシステムの存在が明らかにされた (Kobayashi et al, JBC, 2015)。これによれば、細胞内のシスタチオンが増加すると細胞外へのグルタミン酸放出は低下し、コカイン依存症様のグルタミン酸代謝を呈することになる。細胞内シスタチオンの合成は、メチオニンから通常 cystathionine beta synthase (CBS) という酵素の触媒で生成される。そして cystathionine-gamma-lyase によってシステインとなり、グルタチオン合成に利用される。そこで CBS タンパク質の発現量に関して同様にウエスタン法で検討を行ったところ、予想に反して側坐核で对照群に比べ 20%の発現量低下を認めた(図4)。一方、

図4



背側線条体では変化を認めなかった。しかし CBS のタンパク質量は必ずしもその活性と相関するとは限らない。そこで CBS の活性制御に重要な glutathionylation 化について免疫沈降法で对照群とコカイン群の間で比較を行ったが、いずれの群でも glutathionylation 化した CBS は確認されなかった。以上の結果より、コカイン投与群側坐核におけるシステイン代謝は xCT の機能が障害されていても未知の機序によって代償性に供給されており、定常状態でのタンパク質合成系に直接影響を与えることで依存症行動の発現を制御している可能性は低いと結論された。他方、神経活動依存性の蛋白合成系に関しては、慢性生食投与群と慢性コカイン投与群のラットを用意し、それぞれに急性コカイン投与を行った後の 0, 15, 45, 120, 360 分後に脳を取り出して同機序に必須である BDNF シグナル伝達系の下流に存在する複数の分子に関してウエスタン法を行い、タンパク質発現量あるいはリン酸化レベルについて検討したところ、p-Trk と p-mTOR の発現レベルにおいて生食群で認められたコカインチャレンジ誘導性のリン酸化が慢性コカイン群では有意に抑制されていた。また同シグナル伝達系によって翻訳が誘導される

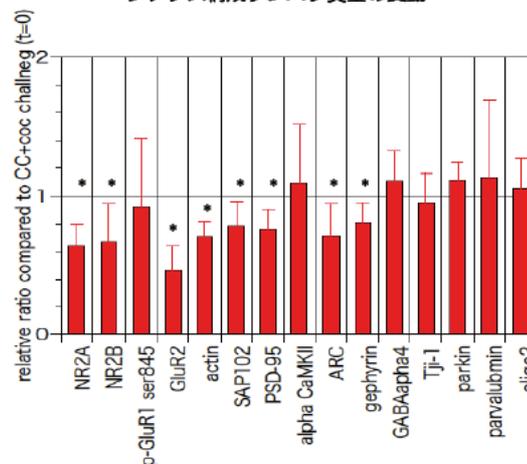
LIMK1 や PSD-95 にも同様のパターンを認めた (図5)。従って、コカイン投与群のタンパク質合成系は、定常状態では对照群と変わらないが、神経活動が活性化された



状態 (= 神経可塑性の誘導を要求された状態) を支えるに十分機能していないと推察された。

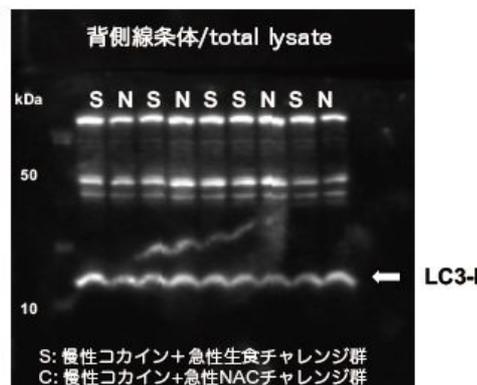
一方、タンパク質合成系と対応する関係にある同分解系に関しては、以前の検討から、コカイン投与群の側坐核で特異的に急性 NAC 投与の 2.5 時間後に、特に後シナプス膜分画に存在するタンパク質に特異的に誘導されるデータを得ていた (Kosugi ら、未発表; 図6)。また、本研究グループは慢性コカイン

図6 急性NAC投与2.5時間後の側坐核におけるシナプス構成タンパク質量の変動



投与や NAC がユビキチン化促進やプロテオソーム活性には影響を与えないことを既に確認、発表していたので (Shen et al, JNS, 2007) オートファジー系の関与を疑い、慢性

図7



コカイン投与動物を急性生食投与群と急性 NAC 投与群の 2 群に分け、同現象のマーカーである LC3-I と LC3-II の発現量比に関して

幾つかの条件下で検討を試みた。しかし、以前から指摘されているように脳ではLC3-Iのシグナルが圧倒的に強く、その直下に現れるはずのLC3-IIのシグナルを分離して検出することができなかった(前頁図7)。LC3-Iは特に細胞質画分に豊富とされるため、膜画分のみを精製して再度検討を行う予定であり、現時点ではまだ最終結論に至っていない。

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 2 件)

Iguchi Y, Kosugi S, Lin Z, Nishikawa H, Minabe Y, Toda S.
Pre-stress performance in an instrumental training predicts post-stress behavioral alterations in chronically stressed rats. **Frontiers in Behave Neurosci**, 2015, 9:119.
(査読有)
doi: 10.3389/fnbeh.2015.00119.

Iguchi Y, Kosugi S, Nishikawa H, Lin Z, Minabe Y, Toda S.
Repeated exposure of adult rats to transient oxidative stress induces various long-lasting alterations in cognitive and behavioral functions. **PLoS One**, 9, e114024, 2014 (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0114024.

[学会発表](計 2 件)

Shigenobu Toda, Lin Ziquao, Hiromi Nishikawa, Yoshio Iguchi, Bruce T Hope, and Yoshio Minabe. Identification of the learning process and neuronal circuits for instrumental learning in rats
International Symposium on Prediction and Decision Making, H27.10.30、東京大学(東京、文京区)

Shigenobu Toda, Lin Ziquao, Hiromi Nishikawa, Yoshio Iguchi, Bruce T Hope, and Yoshio Minabe. c-fos expression may be transiently involved in the transition from goal-directed action to habit in striatal medium spiny neurons while more ubiquitously expressed in striatal astrocytes probably representing goal-directed stage. H27.12.17、包括脳冬のシンポジウム、一橋講堂(東京、文京区)

[図書](計 1 件)

Usio N, Saito R, Akanuma H, Watanabe R. effectiveness of wildlife-friendly farming on aquatic macroinvertebrate diversity on Sado Island in Japan. Springer Japan, 2015. 119

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 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://psychiatry.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 宏美(NISHIKAWA,Hiromi)
金沢大学・附属病院・研究員
研究者番号：70534155

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：