

平成 23 年度 修士論文
中枢神経系における核小体タンパク質
B23 の機能に関する研究

三重大学大学院 生物資源学研究科
資源循環学専攻 栄養機能工学
510M110 向井 工智

目次

第1章 緒論	1-4
第2章 実験材料と方法	5-16
第1節 <i>in vitro</i> における B23 生理機能	
第1項 試薬及び細胞	
第2項 細胞保存等	
第3項 神経分化誘導と形態観察	
第4項 増殖抑制試験	
第5項 細胞染色	
第6項 Western Blotting	
第7項 B23-antisense-DNA 処理	
第8項 NMDA 刺激による B23 抑制の影響	
第2節 <i>in vivo</i> における B23 生理機能	
第1項 動物	
第2項 試薬及び調整	
第3項 薬物脳内投与方法	
第4項 切片作製	
第5項 組織染色	
第6項 Western Blotting	
第3章 結果と考察	17-22
第1節 <i>in vitro</i> における B23 生理機能	
第1項 神経モデル細胞の神経分化誘導による B23 と 198 番目の Thr 残基のリン酸化 B23 の局在	
第2項 PC-12 での B23 のタンパク質抑制による NMDA 刺激 に及ぼす影響	
第2節 <i>in vivo</i> における B23 生理機能	
第1項 ラットおよびマウス海馬における B23 の機能について	
第2項 海馬への QA 刺激に対する HA-1077 神経保護効果 と B23 の機能について	
第4章 総合考察	23-24
略語一覧	25-26
図表	27-48
要約	49
参考文献	50-53
謝辞	54

第1章 緒論

神経系の正常な機能は、神経系の分子的・細胞的基盤を解明することが重要である。また、脳は細胞間で複雑なネットワークを形成しており、組織評価と合わさることで疾患への新たな治療法開発に繋げることができる。疾患には、ニューロン産生・前ニューロン遊走の異常・不適切なシナプス形成・髄鞘規制不全など神経系の発生異常から生じる先天的疾患と、ニューロンの機能が薬剤やウイルスなど外因的要因、もしくはホルモンなどの内因的要因によってニューロンの生理学的機能が変わる後天的疾患がある。

神経疾患である認知症は、患者数が増加しつつあり、2015年には250万人、2025年には323万人の患者が予測されている¹⁾。認知症の増加要因としては、高齢化人口の増加および生活習慣病が考えられる。認知症の生じる原因には2種類あり、1つは、脳梗塞などの脳血管性認知症、もう一つは神経が萎縮変性していく変性性認知症である。脳梗塞の脳や、神経変性認知症の一つであるハンチントン病の脳では、キノリン酸濃度が上昇することから、キノリン酸(QA)が原因の一つとする説が考えられている。神経細胞(ニューロン)は、ニューロンとグリアで構成される。ニューロンは、樹状突起などによる情報の受信処理と、軸索の神経末端において信号の発信処理を行い、神経細胞同士で情報伝達を行っており、方向性を持っている。グリアは、神経系の支持細胞であり、神経細胞間の間隔を埋めていることとニューロンに栄養因子を与えている。

ニューロンは、神経前駆体の増殖、遊走、分化によって発生するとされ、軸索突起を伸ばし先端の成長円錐で他のニューロンとシナプスを形成する。ニューロン間の情報伝達は主にシナプスを介して行われている。シナプスには伝達物質をグルタミン酸で行う興奮性とγ-アミノ酪酸で行う抑制性がある²⁾。後シナプス神経細胞の興奮性を直接決定しているのはグルタミン酸受容体であり、Table 1に示すように複数種存在し、流入イオンが異なる³⁾。NMDA受容体は刺激を受けるとNa⁺、K⁺、Ca²⁺を細胞内に流入させる。NMDA受容体はヘテロマーであり、2つのNR1と2つのNR2からなっており、NR2にはNR2A-Dの4つの種類が存在する。NR1は中枢神経(グルタミン酸刺激ニューロン)に一樣に発現し、NR2A-Bは脳と海馬に、NR2Cは小脳に、NR2Dは脳幹に存在している⁴⁾。Ca²⁺を流入することがNMDA受容体の特徴であり、過剰刺激により多量の脱分極を起こし、細胞死を起こしていくことが知られている。

Table 1 NMDA receptor

Neural transmitter substance	Receptor	Subunit	Ion permeability
Glutamic acid	AMPA receptor	GluR1-4	Na ⁺ ,K ⁺
	Kinetic acid receptor	GluR5-4,KA1.2	Na ⁺ ,K ⁺
	NMDA receptor	NR1,NR2A-D	Na ⁺ ,K ⁺ ,Ca ²⁺

海馬は、長期記憶を司る脳組織である。シナプスの回路が単純であり、電気生理的にシナプスの可逆的変化が誘導しやすいことから、脳の中でもよく研究される部分である。海馬体は大きく分けて歯状回 (DG)・CA1・CA2・CA3 の4つの部分から構成されている。海馬への情報伝達は嗅内皮質から受けた情報を DG 顆粒細胞・CA3 錐体細胞・CA1 (CA2) 錐体細胞・嗅内皮質へと興奮性のシナプスを介して伝達されている (Fig.1)³⁾。海馬は、フリーラジカル消去剤及び抗酸化酵素が少ないことからダメージを受けやすい組織である。QA に対する損傷において海馬は最も損傷を受ける部分とされている⁵⁾。

成体ラット海馬での B23 報告は CA3 の錐体細胞で主に核小体に B23 局在が生じていることが報告されている⁶⁾。また、転写制御因子の TIF-1A のノックアウトマウスにおいて、胎児の基底核隆起部分で B23 が核小体から核質に移行することが報告されている⁷⁾。

キノリン酸は、Fig.2 に示すような構造を持っており、N-メチル-D-アスパラギン酸(以後 NMDA)と似ている構造を持っている。そのため、NMDA 受容体のアゴニストとして作用する⁸⁾。キノリン酸は脳内でトリプトファン-NAD⁺回路の中間産物として働いているため、脳内に必要物質であるが、過剰の QA は神経毒性を示し、QA の神経障害はフリーラジカルの増加と脂質酸化によるもの、あるいは Na⁺流入による浸透圧変化による細胞破裂とされている⁹⁻¹¹⁾。QA はハンチントン病¹²⁾、虚血、免疫不全において脳内で高濃度に検出されることが知られている。脳内の QA はグリア細胞から高濃度の QA 合成と放出がされると報告されている¹³⁾。例えばハンチントン病の QA 上昇は Fig.3 に示す流れで起きていると報告されている。

HA-1077 (Fasudil) は、脳梗塞(脳虚血)における臨床試薬として血液内に投与される薬剤である。血管内皮細胞に Rho キナーゼ阻害剤として働き、筋収縮作用を起こすことで、脳内の微小血管の血流改善に効果が認められている¹⁴⁾。しかし、血液内投与は脳に薬物が到達するにあたり、血液-脳関門等があるため脳内に分布しにくいいため、生体内の神経細胞ではメカニズムが明らかとなっていない。PC-12 細胞の神経分化誘導や軸索形成などにも働き、Rho キナーゼをはじめとして、Protein kinase の阻害剤としての作用を有している¹⁵⁾ (Table2)。

Table 2 Ki values of HA-1077 for Ser/Thr protein kinase¹⁶⁾

Protein kinase	Rho kinase	PKA	PKC	MLCK
HA-1077 (μM)	0.33	1	9.3	55

真核細胞の核は、核膜、核質、核小体の大きく 3 つの部分からなっている。分裂期の細胞を見ると、核中に小さな粒状のものあり、これが核小体である。核小体は、膜で囲まれておらず核内で認められる最も明確な構造体である。核小体の数や大きさは生

物や細胞によっても違い、また同細胞でも細胞周期によっても異なる。核小体を電子顕微鏡で観察すると多くの微細構造が見える。核小体は主に核に散在、周辺の一部に集まっている顆粒状成分、核小体全体に広がる繊維状成分や染色体成分がある。この繊維状と顆粒状成分は RNA とリボ核酸タンパク質からなる。核小体の周辺部には凝集クロマチンが付随しており、rRNA を含んだクロマチンが核小体構造の中へ侵入した形になっている。核小体はリボソームの合成、蓄積される場である。核小体中で rDNA から rRNA に転写され、リボソーム構成タンパク質や核小体タンパク質が複合的に関与しているとされる¹⁷⁾。

核小体タンパク質 B23 は、1973 年、Orrick らは、Novikoff 腹水がん細胞やラット肝細胞から核小体を単離して核小体タンパクを抽出し、2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、タンパクのスポットを分子量の小さい順に A,B,C の 3 つの領域に分け、順に番号を付け、比較的多く存在し銀で染色される 2 種類のタンパクを B23 (nucleophosmin, NPM, numatrin, NO38)と C23 (nucleolin)とした¹⁸⁾。B23 は B 領域の 23 番目のスポットとして発見され、現在までにラット、マウス、ヒト、ニワトリ、アフリカツメガエルで B23 の一次構造が報告されている¹⁹⁻²³⁾。ヒト、ラット、マウスでは少なくとも 2 種類以上のイソ型が存在することが明らかとなっており、B23.1 と B23.2 とされている²⁴⁾。B23 の一次構造の特徴は、分子中央部の 120~132、158~187 残基にグルタミン酸とアスパラギン酸からなる酸性ドメインが存在し、このような酸性ドメインは C23 にも見出されている。この酸性ドメイン中の Ser125 が Casein kinaseII (CKII)によってリン酸化を受け、その C 末端側に cdc2 kinase によってリン酸化を受ける部分が 3 か所報告されている²⁵⁻²⁷⁾。また、Thr198 が cdk2/cyclinE によってリン酸化を受けることが分かっている²⁸⁾。核小体は核内に存在するため、核小体タンパクは細胞質で合成された後、核内へ移行するシグナル配列が必要となり、B23 は、酸性ドメインに隣接する 2 つの核局在配列 (NLS)が存在する²⁹⁾。B23 は、核と細胞質を往復するシャトルタンパク質でもあり、核膜にある PKC の基質となることが明らかとなっている³⁰⁾。B23 の細胞内局在は、核小体中の顆粒状領域に存在すると考えられていたが³¹⁾、Binniogera らが B23 は濃繊維状領域にも存在することを示し、プロセッシングへの関与の可能性が示唆された³²⁾。また、B23 は細胞周期 S 期に核小体から核質に局在することや、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D で処理により、B23 が核小体から核質に移行することが報告されていることから、B23 の核小体局在が rRNA の存在に関与していることが示唆された^{33,34)}。ラットの B23.1 は核小体に、B23.2 は細胞骨格に存在することが報告されている³⁵⁾。B23.1 の核内局在には C 末端の 286 番目と 288 番目のトリプトファンが核小体局在に重要であることが明らかとなっている³⁶⁾。

B23 は腫瘍細胞や増殖期の細胞に多く発現している。ヒト急性前骨髄白血病細胞 HL-60 において、B23 の発現を抑制した腫瘍細胞ではアポトーシス誘導剤の影響を受けやすくなり、B23 を過剰発現させるとアポトーシスへの抵抗性が高まるという報告があ

る³⁷⁾。また、マウス皮膚上皮細胞においては、B23 の過剰発現は p53 の局在を変化させ、アポトーシスを阻害することが報告されている³⁸⁾。

非増殖細胞での報告もなされており、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC-12 において、B23 と ATP が結合することが B23 の局在を維持し、Caspase3 による B23 分解を抑制すること³⁹⁾、B23 と CAD の相互作用によりアポトーシス阻害や、PI(3,4,5)P₃ と B23 の lysine263 と特異的結合で DNA 断片化抑制をしていることが報告されている⁴⁰⁾。よって、B23 は細胞増殖だけではなく、アポトーシスのような細胞の生死に関わる重要な働きを持つタンパク質であると考えられている²⁾。

第2章 実験材料と方法

第1節 *In vitro* における B23 生理機能

マウス神経芽細胞腫(NB2a)とラット副腎髄質由来褐色細胞腫(PC12)の分化誘導による B23 と B23/Thr¹⁹⁸ の局在, NMDA 刺激処理による PC-12 の細胞死誘導と B23 の機能について検討した。

第1項 試薬及び細胞

NB2a (Riken Cell Bank), バンバンカー(日本ジェネティクス), palmyteylcarnitin (SIGMA), HA-1077 (旭化成ファーマ), MEM (ニッスイ), CO₂ incubator (SANYO), Anti-B23 polyclonal antibody (当研究室作製), Anti-B23/Thr199 polyclonal antibody (abcam), プロテインアッセイ(BIO-RAD), Anti-rabbit IgG antibody (peroxidase-conjugated, ICN), FITC (Invitrogen), TRITC (SIGMA), ECL (GE Healthcare Bioscience), X 線フィルム (CL-XPosure Film, Thermo), PC-12 (Riken Cell Bank), mRNA Neuro Growth Factor (Promega), FBS (Biowest), Trypsin-EDTA (GIBCO), Low-Glucose DMEM (SIGMA), DeadEndTM Fluorometric TUNEL System (Promega), NMDA (SIGMA), Cell Counting Kit-8[®] (DoJinDo), Oligo-DNA (Rodent-B23-sense: 5'-TCCATCGAGTCTTCCATGAG-3', Rodent-B23-antisense: 5'-CTCATGGAAGACTCTCGATGGA-3', RIKAKEN), ウマ血清 (Biowest), Lipofectamine (Invitrogen)

その他の試薬は, 国内外試薬の特級(一級)を用いた。

第2項 細胞保存等

1) NB2a 細胞の保存と培養

NB2a は 10% FBS 含有 MEM を使用して, CO₂ インキュベーター(5% CO₂, 37°C) で培養した。

細胞保存は, 細胞を遠心分離 (190×g, 5min, 4°C) し, 上清を除去した後, 沈殿に 1 mL バンバンカーを加え懸濁, セラムチューブにて-80°C超低温層にて保存した。

細胞を起こす際は, セラムチューブを 37°Cの恒温槽で約 80%解凍し, 懸濁液を 9 mL medium に混合。混合液を遠心分離 (190×g, 5min, 4°C) し, 上清を除去した。沈殿に 10 mL medium を加え懸濁後, 100 mm dish にて培養した。

継代操作は, 細胞がセミコンフルエンス状態に行った。細胞を遠心分離 (190×g, 5min, 4°C) し, 上清を除去後, 沈殿を medium にて懸濁 (8×) し, 100 mm dish で培養した。培養条件は 5% CO₂, 37°C で, 3 日に 1 度継代を行った。

2) PC-12 細胞の保存と培養

PC-12 は 10% FBS+10% HS 含有 Low-glucose DMEM を用いて, CO₂ インキュベーター (5%CO₂, 37°C) で培養した。

細胞保存と細胞を起こす際は, 第 2 章 第 1 節 第 2 項 1) と同様の方法で行った。継代は, 細胞がセミコンフルエンスの状態のときに行った。細胞は壁着性の細胞を上清除去し, 0.05% Trypsin-EDTA により剥がした。Trypsin-EDTA と同量の medium を加え, 遠心分離 (190×g, 5min, 4°C) した。沈殿に medium (3×) で加え, 100 mm dish で CO₂ インキュベーター (5%CO₂, 37°C) にて培養した。継代頻度は 3 日に 1 度継代を行った。

第 3 項 神経分化誘導と形態観察

1) NB2a における Palmytocylcarnitine 神経分化誘導

1-1) Palmytocylcarnitin-BSA 溶液 (PC-BSA) の調整

神経誘導試薬の PC はウシ血清アルブミン (BSA) と結合させて使用した。調整方法は HEPES buffer Ringer's solution (Table3) に 0.5 mM BSA を加え, 45°C にて完全に溶解させた。一方, 50% EtOH に 1 mM PC となるように溶解した。BSA 溶液と PC 溶液を 45°C 中にて 5 min かけて混合し, 誘導濃度の 10 倍の PC-BSA (10×) を作成した。これを 1 mL ずつ分注して, -20°C で保存した。

1-2) PC-BSA 処理 (24 hr) における NB2a の形態観察

NB2a の神経分化誘導はカバーガラス上で行った。カバーガラスはコーティングを取り除くため, 濃硫酸に 3 日つけた後, 滅菌水で洗浄したものを使用した。まず, NB2a を回収し, 5% FCS MEM にて懸濁後, 2.5×10^4 cell/mL に調整した。PC-BSA (10×) を 100 μM になるように加え, カバーガラス 1 枚につき 100 μL の割合で播種し 24hr CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で培養した。その後, 光学顕微鏡で観察した。

2) NB2a における HA-1077 神経分化誘導

Rho-キナーゼ阻害剤である HA-1077 を生理食塩水で 1 mM に調整して使用した。

NB2a の神経分化誘導は第 2 章 第 1 節 第 3 項 1-2) と同様にカバーガラス上に細胞を播いた。その後, 30 μM となるように HA-1077 を加え, 24hr CO₂ インキュベーター (5%CO₂, 37°C) で培養した。その後, 光学顕微鏡で観察した。

3) mNGF 処理 (24hr) における PC-12 の形態観察

3-1) mNGF の調整

mNGF (凍結乾燥)を滅菌水にて, 1 mg/mL の濃度にして-80°Cに凍結保存。使用時には1 mg/mL mNGFを10% FBS+10% HS Low-glucose DMEMで100倍希釈したmNGF (100×)を作製した。

3-2) PC-12 における mNGF 神経分化誘導と形態観察

PC-12 の分化誘導は第2章 第1節 第3項 1-2)と同様にカバーガラス上で行った。PC-12をTrypsin-EDTAで剥がし, 同量の10% FBS+10% HS Low-glucose DMEMを加え遠心分離(190×g, 5min)を行った。上清を除き, 10×10^4 cell/mLとなるよう10% FBS+10% HS Low-glucose DMEMを加え懸濁した。mNGF (100×)を100 ng/mLになるように添加した。カバーガラス1枚につき100 μLの割合で播種して, 48hr CO₂ インキュベーター(5%CO₂, 37°C)で培養した。その後, 光学顕微鏡で観察した。

第4項 増殖抑制試験

NB2aを96 well plateに5,000 cell/wellで播き, さらに100 μM PCになるように加えた。24時間または48時間CO₂ インキュベーター(5%CO₂, 37°C)で培養後, Cell Counting kit-8[®]を添加, 3時間後の吸光度(450 nm)を測定した。

第5項 細胞染色

1) NB2a 神経分化(PC-BSA)における B23 と B23/Thr198 の局在

第2章 第1節 第1項 1-2)のsampleをPBSで希釈した4% パラホルムアルデヒドをのせて4°Cで一晩固定した。その後, PBSにて洗浄し, 0.1% TritonX-100を添加, 室温(RT)で10min透徹処理を施した。PBSで洗浄し, 10% 牛血清/PBS (CS)をRTで1hr, Blockingを行った。CSを拭き取り, Anti-B23 polyclonal antibodyを(PBS, 500×)を乗せて, RTで1hr反応させた。PBSで15minを洗浄を3回で繰り返し行った。続いて, Anti-rabbit IgG antibody (FITC)を乗せて, 45min, RTで反応させた。PBSで15min洗浄を4回繰り返し, マウント剤(Gold antifade reagent, Invitrogen)で封入した。その後, 観察は蛍光顕微鏡を用いた。ただし, B23/Thr198にはPBSの代わりにTBSを使用した。

2) NB2a 神経分化 (HA-1077)における B23 と B23/Thr198 の局在

第2章 第1節 第1項 2-2)のsampleを第2章 第1節 第5項 1)と同様の方法で染色した。

3) PC-12 神経分化 (mNGF) における B23 と B23/Thr198 の局在

第2章 第1節 第1項 3-2)の sample を第2章 第1節 第5項 1)と同様の方法で染色した。

第6項 Western Blotting

Western Blotting は電気泳動により分子量別に分離したタンパクをメンブレンに転写し、目的とするタンパクの抗体を用いて目的タンパクの検出を行う方法である。

1) タンパク溶液の作成

NB2a を 5.0×10^4 cell/mL となるように 5%FBS MEM で調整し、35 mm dish に 800 μ L 播種した。200 μ L の PC-BSA (10 \times) を加え、CO₂ インキュベーター (5%CO₂, 37°C) で 72hr 培養した。

その後、上清を除き PBS を 2 mL 加えた。同様の操作を 3 回繰り返し洗浄した後、液体窒素にて凍結し -80°C 保存した。

dish あたり 50 μ L Ripa buffer (Table 3) を加え、セルスクレーパーで回収した。得られた試料を氷上で超音波処理により細胞を破碎して抽出溶液とした。

2) タンパク定量

試料のタンパク濃度は Bradford 法により測定した。Bradford 法は、タンパクが Coomassie Brilliant Blue G-250 と結合することで、最大吸光度 465-595 nm に移動することを応用した定量法である。

3) タンパク濃度測定

BSA を標準タンパク質として、蒸留水で 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL の濃度に調整して標準溶液を作成した。試料は吸光度が 1.0 を超えないまで蒸留水で希釈して定量に用いた。希釈した試料と各濃度の標準溶液を 5 μ L ずつ 96 well plate に入れ、続いて 5 倍希釈した Bradford 溶液を 250 μ L ずつ添加した。RT で 5min , RT で反応させた後、マイクロプレートリーダーで 588 nm の波長で測定した。BSA 標準溶液の検量線をもとに、試料のタンパク濃度を算出した。

4) SDS-PAGE

Lower gel を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで調整し、厚さ 0.75 mm のスペーサーに流し込む。上に、飽和イソブタノール水をのせ、ゲルが固まるまで放置した。その後、飽和イソブタノールを除き、Upper gel を流し込んでコームをセットした。Upper gel が固まり次第、電気泳動層にセットした。

Apply する sample は、第 2 章 第 6 節 3) で算出したタンパク濃度から 20 μg となる sample の溶液量と、sample buffer (5 \times) を混合し、100 $^{\circ}\text{C}$ 、5min 加熱させた。電気泳動は、30 mA、1hr で running buffer 中にて行った。

また、control として *E.coli* (PQE-JM-109-HIS-B23.1) で発現させ、His-tag B23.1 を 0.05 μg で用いた。

5) Western Blotting

ゲルと同じ大きさの PVDF 膜と濾紙を準備した。PVDF 膜はメタノールに 10 秒浸した後、Blotting buffer (Table 3) に数分浸水させた。濾紙はメタノールに浸さず、blotting buffer に浸水させた。転写装置はウェット式 (BIO-RAD) を用い、濾紙 2 枚、PVDF 膜、SDS-PAGE、濾紙 2 枚を重ねたものを Blotting buffer 中で 100 mA、90min で転写した。転写後、PVDF 膜を Blocking buffer に浸し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩 Blocking を行った。

Anti-B23 polyclonal antibody を TBS で 2,000 倍に希釈したものを PVDF 膜とともに RT で 1hr shake した。その後、T-TBS で 15min 洗浄を 4 回繰り返した。PVDF 膜と Anti-rabbit IgG antibody (peroxidase-conjugated goat antibody to rabbit) を 2,000 倍に希釈したものと同時にパックして、RT で 45min 間インキュベーションし、T-TBS で 15min 洗浄を 4 回繰り返した。検出は ECL を用いて、露光時間を 20 秒で現像した。

第 7 項 B23-antisense DNA 処理

1) B23-antisense DNA の調整

B23-antisense DNA (Oligo DNA) の保存は、B23-antisense DNA (凍結乾燥) を滅菌水にて溶解し、1 mM に調整した状態で、-80 $^{\circ}\text{C}$ にて遮光保存した。使用時は、滅菌水で 100 μM に希釈した状態にしてから使用した。

100 μM B23-antisense DNA (Oligo DNA) 1 μL に対して、Low-glucose DMEM (serum free) 25 μL を混合した①。Lipofectamine 5 μL と Low-glucose DMEM (serum free) 25 μL を混合した②、①と②を混合して、RT で 45min 反応させた。これに 150 μL の Low-glucose DMEM (serum free) を加え、これを B23-antisense DNA とした。

2) B23-antisense DNA 処理における B23 発現抑制

PC-12をTrypsin-EDTAで剥がし、同量の10% FBS+10% HS Low-glucose DMEMを加え遠心分離(190×g, 5min)を行った。上清を除き、 10×10^4 cell/mLとなるよう10% FBS+10% HS Low-glucose DMEMを加え懸濁した。8 well チャンバーに400 μ L/wellで24hr CO₂インキュベーター(5%CO₂, 37°C)で培養した。続いて、上清を200 μ LずつLow-glucose DMEM (serum free)と6回取り換えた。そして、上清133 μ Lずつ残した状態で、同量のB23-antisense DNAを添加した。5時間後、20%FCS+20%HS Low-glucose DMEMを266 μ Lずつ添加し、CO₂インキュベーター(5%CO₂, 37°C)で24時間または72時間培養した。

3) 細胞染色

第2章 第1節 第5節 1)同様に行った。ただし、Anti-rabbit IgG antibody (FITC)をAnti-rabbit IgG antibody (TRITC)に変更して行った。

第8項 NMDA 刺激による B23 抑制の影響

1) 細胞調整と NMDA 刺激

PC-12 を Trypsin-EDTA で剥がし、同量の 10% FBS+10% HS Low-glucose DMEM を加え遠心分離(190×g, 5min)を行った。上清を除き、 10×10^4 cell/mL に 10% FBS+10% HS Low-glucose DMEM を加え調整した。カーバーガラスに 99 μ L で細胞溶液をのせ、B23-antisense DNAを同量添加した。18hr CO₂インキュベーター(5%CO₂, 37°C)で培養した。その後 mNGF を 100 ng/mL で加え、さらに 48hr CO₂ インキュベーター(5% CO₂, 37°C)で培養した。神経分化誘導後、medium で希釈した NMDA を 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM となるように添加し、24hr CO₂ インキュベーター(5% CO₂, 37°C)で培養した。

2) B23-antisense DNA と NMDA 刺激におけるアポトーシス検出試験

TUNEL 法は DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega)の手順に従った。

NMDA 刺激を行った細胞を 4% パラホルムアルデヒドを 200 μ l/sample のせ 15min 組織の固定を行った。PBS に 5min×2 回浸し洗浄し、Proteinase K (20 μ g/mL)を 100 μ l/sample のせ 10min 組織の浸透化を行った。PBS で 15min 洗浄し、4% パラホルムアルデヒドを 100 μ l/sample のせ 5min 組織の再固定を行った。PBS で 15min 洗浄し、Equilibration Buffer を 100 μ l/sample のせ 10min 組織の平衡化を行った。水分をよく拭き取り、rTdT 溶液 (Equilibration Buffer 22.5 μ l, Nucleotide Mix 2.5 μ l, rTdT Enzyme 0.5 μ l)を 25 μ l/sample のせ、遮光下の湿式チェンバーに入れて、37°Cで 1hr インキュベートを行った。遮光下で 2×SSC を 100 μ l/sample のせ室温で 15min 反応の停止を行い、PBS に 15min×3 回浸し洗浄し、取り込まれなかった fluorescein

12-dUTPを除去した。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の propidium iodide を 100 $\mu\text{l}/\text{sample}$ のせ染色を行い、脱イオン水に 15min \times 3 回浸し洗浄した。Anti-Fade solution (Invitrogen) を 1 滴落とし、スライドガラスをマウントし蛍光顕微鏡で観察した。

第2節 *In vivo*におけるB23生理機能

ラットおよびマウス海馬におけるQA刺激に対するHA-1077神経保護効果とB23の機能について検討した。

第1項 動物

Wister系雄性ラット(6週齢, 日本SLC)とSD系雄性ラット(日本SLC), ddY系雄性マウス(5週齢, 日本SLC)を購入した。ラット, マウスともに1週間予備飼育を温度 $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 明暗12時間(8:00~20:00点灯), 自由摂取で行った。以後通常飼育と略す。

第2項 試薬および調整

Quinolinic acid (QA, Wako), OTC compound (SAKURA), その他第1節と同様の試薬を用いた。

また, QAは0.9 mLの0.2 M NaOHに溶解後, PBS(10 \times)を0.1 mL加え調整した。HA-1077は生理食塩水で1 mMに調整した。

第3項 薬物脳内投与方法

1) マウス海馬へのB23-antisense DNA脳内投与

マウスへの脳内投与は, 脳定位固定装置を用いて, 麻酔下で行った。麻酔はペントバルビタールを体重あたり50 mg/kgを頸椎皮下投与した。脳定位固定装置にマウスの頭部を両外耳道と口で固定した。その後, 頭皮を切開, ドリルで頭蓋骨に穴をあけて(-2.8 mm posterior from bregma, 2.7 mm from the midline)脳を露出させた。26G針付ハミルトンシリンジにて海馬(2.0 mm from the brain surface)に2.5 μg /2.5 μL のB23-antisense DNAを1minかけて投与し, 1min維持した。その後, 針を抜き, 頭皮を縫合して2週間通常飼育した^[42]。

2) マウス海馬へのQA投与

右脳海馬に50 nmolの1 μM QAを, 左脳海馬にcontrolとして1 μL PBS(pH 7.4)を第2章第2節第2項2)と同様の方法で投与した。その後, 縫合して1日または7日間通常飼育を行った。

3) ラット海馬へのQA投与

ラット海馬へのQA投与は, 第2章第2節第3項1)と同様に行った。ただし, 海馬の位置(-4.8 mm posterior from bregma, 3.0 mm from the midline, 2.7 mm from the brain surface)を変更した。

4) ラット側脳室へのHA-1077投与

ラット側脳室への HA-1077 投与は、第 2 章 第 2 節 第 3 項 1)と同様にラット頭部を固定した後、頭蓋骨に穴をあけ脳を露出させた。その後、-0.9 mm posterior from bregma, 1.5 mm from the midline の位置で 26G のハミルトンシリンジにて 1 mM HA-1077 を 10 μ L 右脳室に 1min かけて投与(3.5 mm from the brain surface)して、1 min 維持した。続いて左脳室にも同量投与した。一方、control として生理食塩水を用いた。投与後、縫合して 1 日間通常飼育した。

5) ラット側脳室への HA-1077 投与と海馬への QA 同時投与

ラット側脳室へ第 2 章 第 2 節 第 2 項 4)の方法で HA1077 を投与し、続いて海馬に第 2 章 第 2 節 第 2 項 3)の方法で QA を投与した。その後、1 日間通常飼育した。

第 4 項 切片作製

1) 凍結切片作製

ラット及びマウスはペントバルビタールを体重あたり 50 mg/kg を首元に皮下投与で麻酔をかけ、解剖を行った。麻酔後、胸部を切開し、左心室に翼付 26G 針を挿入し、右心針を切除した。生理食塩水を 5 mL 灌流後、脳を摘出した。脳は、液体窒素内にイソペンタン槽を作り、OTC compound を用いて凍結させた。

凍結サンプルは MICROM 社製で HM505 E を使用して、厚さ 14 μ m で切片を作製してスライドガラスに張り付けた。その後、一晩室温で乾燥させた。

2) パラフィン切片作製

麻酔後、胸部を切開し、左心室に翼付 26G 針を挿入し、右心針を切除した。生理食塩水を 5 mL 灌流後、4% パラホルムアルデヒド/PB を 5 mL 灌流固定した。脳を摘出し、4% パラホルムアルデヒド/PB に 4°C で一晩固定した。翌日、10 mL PB に 20min 浸し、さらに、同量の PB を交換して 20min 浸して洗浄した。続いて、脱水処理に移行した。EtOH (50%, 70%, 80%, 90%, 99%, 100%, 100%: 各 1 時間)に浸して、新たな 100% EtOH で 4°C 一晩浸した。次に 100% EtOH に 2 時間浸した後、キシレン 1 時間浸し、メスを用いて海馬周辺をトリミングした。包埋カセットに脳組織を入れ、新たなキシレンに交換して 30min 浸し、次にパラフィンに 62°C で 2 時間浸した。その後、包埋処理を施した。作成パラフィンブロックは 4°C にて保存した。

切片はマイクロームを用いて行った。切片の厚さは 14 μ m で作製し、恒温槽 67°C, 0.01% 酢酸で伸展させた。その後、スライドガラスに張り付け、37°C の乾燥機内で乾燥させた。

第5項 組織染色

1) 脱パラフィン

切片をキシレンに 15min, 続いて EtOH に 100%, 100%, 90%, 80%, 70%の順に各 5min 浸した。TBS に 5min 浸して, さらに新たな TBS を 5min 浸し, 脱パラフィンを行った。

2) 抗 B23 染色

マウス凍結切片を用い, 脳切片の湿潤を行うために PBS に 15min 浸した。次に, T-PBS (0.1% Tween20)を切片に 20min のせた後, PBS に 5min 浸すことを 3 回行って洗浄した。さらに, ブロッキング溶液 (ABC kit Blokking solution 3 滴/10 mL)を 1.5hr のせた。その後, 抗 B23 ポリクローナル抗体(250 倍/2% BSA 含有 PBS)をのせ 1hr, 室温で反応させた。PBS で 5min 浸すことを 3 回行って洗浄した後, 二次抗体 (ABC kit ビオチン標識抗体 1 滴/10 mL PBS)をのせ, 30min, 室温で反応させた。次に, 同様に PBS で洗浄を行い, 前もって調整したアビジン-ビオチン溶液 (ABC reagent) をのせ同じく 30min 室温で反応させた。PBS で洗浄後, DAB 溶液 (3 mg DAB, 0.5 mM Tris-HCl (pH7.4))をのせ, 適度な発色が観察されたら PBS で洗浄し, 脱水処理後 マリノールにて封入した。この時の脱水処理は 70%, 80%, 90%, 99%, 100% EtOH の順に 5min ずつ浸し, 最後にキシレンに 5min つけて置換した。

3) 蛍光染色

凍結切片は湿潤を PBS で 15min, パラフィン切片は脱パラフィンを行った後, 蛍光染色を行った。その後, sample を PBS で希釈した 4% パラホルムアルデヒドをのせて 4°Cで一晩固定した。PBS にて洗浄し, 0.1% TritonX-100 を添加, 室温 (RT) で 10min 透徹処理を施した。PBS で洗浄し, 2% BSA/PBS を RT で 1hr, Blocking を行った。BSA/PBS を拭き取り, Anti-B23 polyclonal antibody を (PBS, 500×)を乗せて, RT で 1hr 反応させた。PBS で 15min の洗浄を 3 回で繰り返し行った。続いて, Anti-rabbit IgG antibody (FITC)を乗せて, 45min, RT で反応させた。PBS で 15min 洗浄を 4 回繰り返した。そして, 核染色のため 1 mg/mL の Hoechst33258 をのせて 30min 反応させ後, PBS で 15min の洗浄を 4 回繰り返した。最後に, Anti-Fade solution (Invitrogen) を 1 滴落とし, スライドガラスをマウントし蛍光顕微鏡で観察した。ただし, B23/Thr198 には PBS の代わりに TBS を使用した。

4) Nissl 染色

脳切片の脱脂を行うため, PBS に 5min 浸した。そして, Cresyl violet 溶液に 15min 染色後, 95% EtOH に数秒×3 回浸し, 目視にて脱色具合を確認後キシレンに浸した。その後, マリノールにて封入した。

5) TUNEL 法

脳切片をキシレンに 5min×2 回浸して脱パラフィンを行った。次に 100% エタノール溶液に 5min 浸し, 95%, 85%, 70%, 50% EtOH 溶液に 3min ずつ浸しサンプルを再水和させた。生理食塩水に 15min 浸し, 十分に水をきってホワイトマーカーでサンプルの周りを囲った。PBS (pH7.4)に 15min 浸し, 4% パラホルムアルデヒドを 20 μ L/sample のせ 15min 組織の固定を行った。PBS に 15min×2 回浸し洗浄し, Proteinase K (20 μ g/mL)を 20 μ L/sample のせ 10min 間組織の浸透化を行った。PBS で 5min 洗浄し, 4% パラホルムアルデヒドを 20 μ L/sample のせ 15min 組織の再固定を行った。PBS で 5min 洗浄し, Equilibration Buffer を 20 μ L/sample のせ 10min 組織の平衡化を行い, rTdT 溶液 (Equilibration Buffer 22.5 μ L, Nucleotide Mix 2.5 μ L, rTdT Enzyme 0.5 μ L) を 25 μ L/sample のせ, 遮光下の湿式チェンバーに入れ 37°C, 1hr インキュベートを行った。遮光下で 2×SSC を 20 μ L/sample のせ室温で 15min 反応の停止を行い, PBS に 15min×3 回浸し洗浄し, 取り込まれなかった fluorescein 12-dUTP を除去した。1 μ g/mL の propidium iodide を 20 μ L/sample のせ染色を行い, 脱イオン水に 15 min×3 回浸し洗浄した。Anti-Fade solution (Invitrogen)を 1 滴落とし, スライドガラスをマウントし蛍光顕微鏡で観察した。

第 6 項 Western Blotting

1) マウス海馬の Western Blotting (ECL)

マラット及びマウスはペントバルビタールを体重あたり 50 mg/kg を首元に皮下投与で麻酔をかけ, 解剖を行った。麻酔後, 胸部を切開し, 左心室に翼付 26G 針を挿入し, 右心針を切除した。生理食塩水を 5 mL 灌流後, 脳を摘出した。脳を中心線で左右にわけ, それぞれから海馬を摘出した。摘出した海馬 (17.1 mg)を 100 μ L sample buffer (×1) 中でソニケーションをかけた。これを, 4°C で 13,000 rpm×15min の遠心を行い, この上清を 2 μ L と 18 μ L sample buffer (2×) 混合し, 加熱して sample とした。ポジティブコントロールとして His-B23 を 0.05 μ g 使用した。その後, 第 2 章 第 1 節 第 6 節 同様に SDS-PAGE と Western Blotting を行った。

2) ラット海馬の Western Blotting (ECL)

SD ラットを第 2 章 第 2 節 第 6 項 1)と同様の方法で海馬を摘出し, 抽出溶液を得た。その後, Bradford 法によりタンパク定量を行い, 37 μ g になるように調整した。Sample buffer (5×)と混合して, 100°C, 5min で加熱した。その後, 第 2 章 第 1 節 第 6 項同様に SDS-PAGE と Western Blotting を行った。

Table.3 Component of each solution (final concentration)

Sample buffer (5×)	156 mM Tris-HCl (pH6.8) 50% Glycerol 620 mM DTT (Dithiodhreitol) 12.5% SDS 0.05% BPB (Bromophenol blue)
Lower gel buffer	1.5 M Tris-HCl (pH8.8) 0.4% SDS
Upper gel buffer	0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 0.4% SDS
Lower gel	6% Acrylamide-Bis 25% Lower gel buffer 0.1% APS (Ammonium peroxodisulfate) 0.01% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyle-enediamine)
Upper gel buffer	4.5% Acrylamide-Bis 25% Lower gel buffer 0.1% APS 0.01% TEMED
Running buffer	50 mM Tris 370 mM Glycine 0.1% SDS
Blotting buffer	25 mM Tris 190 mM Glycine 10% Methanol
T-TBS	0.1% Tween20 with TBS
Blocking buffer	5% Skim milk with T-TBS
RIPA buffer	50 mM Tris-HCl (pH7.4) 0.5 mM EDTA (pH8.0) 0.1% TritonX-100 50 mM NaF 10 µg/mL Aprotinin 10 µg/mL Leupeptin 1 mM Na ₃ VO ₄ 0.1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride)

第3章 結果と考察

第1節 *In vitro* における B23 生理機能

<目的>

生体の脳における神経細胞の発生はごくわずかであり、発生部位の SGZ (海馬歯状回顆粒細胞下層) と SVZ (側脳室前方上衣下層) の 2 領域で起こると報告されている^[43, 44]。神経細胞は、SGZ と SVZ において未分化細胞が増殖し、脳の各部に遊走されたのち、神経分化して定着する。この神経分化前後における B23 の機能については、明らかとされていない。また、神経分化後に NMDA 刺激による細胞死が起こる時の B23 の機能について明らかとなっていない。そこで、神経細胞モデルを用いて、神経分化前後における B23 の機能について検討した。

今回の用いた神経モデル細胞は NB2a と PC-12 の 2 種類を使用した。細胞に分化誘導剤 (NB2a: PC, PC-12: mNGF) を用いることで細胞増殖を止め、軸索形成が生じさせて使用した。

第1項 神経モデル細胞の神経分化誘導による B23 と 198 番目の Thr 残基のリン酸化 B23 の局在

1) NB2a 神経分化の PC 誘導と B23 と Thr198 残基のリン酸化 B23 の局在

1-1) NB2a 神経分化誘導 (24 hr) による形態変化及び増殖抑制

NB2a を PC 処理で神経分化誘導が起きているか確かめるために、形態観察と細胞増殖抑制試験を行った^[45]。

NB2a は PC 処理 24 時間後の形態変化を光学顕微鏡で観察した結果、PC 処理で軸索形成が確認できた (Fig.4A)。神経細胞の特徴として軸索を有していることから、十分な誘導が起きていた。また、この時 NB2a が増殖していないか確かめるため、Cell Counting Kit-8[®]を用いて、細胞増殖抑制試験を行った。NB2a を PC 処理した 24 時間後、48 時間後において Control 100% に対して $88 \pm 3\%^{**}$, $59 \pm 1\%^{**}$ (平均 \pm S.E., $p^{**} < 0.01$, *t-test*) に有意に増殖抑制が生じた (Fig.4B)。この結果より、NB2a の神経誘導処理が確かであることが確認できた。また、軸索形成と細胞増殖抑制から NB2a 処理により非増殖細胞として扱うことが可能であることが確認できた。

しかし、NB2a の doubling time は 24-30hr であることと、細胞周期が細胞によって異なることから、24hr の PC 神経分化誘導では細胞全てで増殖が抑制されていないことが考えられた。そのため、今後の観察において軸索伸長が確認できた細胞のみで評価を行うこととした。

1-2) NB2a 神経分化誘導(PC 処理)による B23 発現量の増加

NB2aをPC処理によって神経分化することが確認できたため、B23の発現量の変化を検討した。NB2aにPC処理(24hr)を行った後、細胞を破碎・抽出して20 µgあたりのB23発現量をECLで検出した(Fig5A)。この結果、ControlではB23の発現量が 5.25 ± 0.25 ng/ µgであったのに対して、PC誘導24hr後では 6.8 ± 0.2 ng/ µgに増加した(Fig.5B)。

AhnらによってPC-12にNGF処理を施すと核内でPIP₃と複合体を形成することで、CAD(Caspase Activated DNase)によるDNA断片化を妨げ、抗アポトーシス作用を示すこと報告があり、NB2aの神経分化において同様に抗アポトーシス作用が機能したため、B23の発現量が増加したと考えられる。

1-3) NB2a 神経分化誘導(PC 処理)による B23 と Thr198 残基のリン酸化

B23の局在

神経分化によるB23発現量が明らかとなったため、次にNB2aのB23の機能を神経分化前後でB23蛍光染色を行い、局在変化を検討した。その結果、B23はNB2aの神経分化の前後で核小体および核質に局在が確認された。また、B23にあるリン酸化部位のうち、Thr198残基について検討した。蛍光染色を行った結果、核小体に特異的に存在していたことが確認できた。しかし、Thr198残基のリン酸化B23は神経分化による変化は確認できなかった(Fig.6)。また、Thr198残基のリン酸化は細胞増殖に関与せずにリン酸化されることが明らかとなった。Thr198残基のリン酸化B23は、細胞周期G₁初期にCDK2によりリン酸化を受けて、ROCKIIに結合し中心体複製を行うことが報告されている^[46]。今回は神経細胞になった非増殖細胞で、かつ核小体にThr198残基のリン酸化B23が生じていることから、Thr198残基のリン酸化B23は非増殖細胞において、増殖以外の機能に関わることが考えられた。これは増殖細胞において、細胞成長と増殖にThr198残基のリン酸化B23が関わらないというBradyらの報告と酷似するものである^[34]。

おそらくThr198残基のリン酸化B23は、rRNA合成や分子シャペロンとしての機能が核小体で行っていると考えられる。現在、増殖細胞において、Thr198残基のリン酸化B23は脱リン酸化によりDNA修復を行うこと^[47]、及びリン酸化によってpre-mRNAプロセッシングに関わると報告されている^[48]。そのため、神経細胞においても同様に機能していることが考えられる。

2) NB2a 神経分化誘導 (HA-1077 処理)による B23 と Thr198 残基のリン酸化 B23

局在

当研究室でNB2aにおいて30 µM HA-1077で軸索伸長が確認されている^[49]ため、30 µM HA-1077におけるB23とThr198残基のリン酸化B23の局在について検討した。

30 μ M HA-1077 を NB2a に 24hr 作用させ、蛍光免疫染色を行った。その結果、軸索伸長が確認でき、核小体および核質に B23 の局在が確認された。しかし、神経分化による B23 の局在変化は確認できず、Thr198 残基のリン酸化 B23 も分化による局在変化は確認できなかった (Fig.7)。

これより ROCK 下流において、Thr198 残基のリン酸化 B23 が機能していないことが示唆された。

3) PC-12 神経分化誘導 (mNGF 処理)による B23 と Thr198 残基のリン酸化 B23 の局在

神経細胞モデルとして一般的な PC-12 細胞における形態変化と B23 の局在変化の検討を行った。

PC-12 に mNGF 添加して、48hr 神経分化を誘導させた。その結果、軸索伸長が確認できたため、Greene らの報告と合わせ、非増殖細胞になったと判断した (Fig.8) [50, 51]。

続いて、PC-12 の神経分化前後での B23 蛍光染色を行った結果、B23 も Thr198 残基のリン酸化 B23 もともに神経分化による局在変化は確認できなかった (Fig.9)。PC-12 の神経分化機構は NGF が細胞膜の TrkA 受容体に結合し、細胞質で ERK がリン酸化を受け、核内の CREB をリン酸化することで、神経分化が生じる。そのため、NGF/ERK/CREB カスケードは B23 局在変化に影響しないことが考えられた^[52]。

第2項 PC-12 での B23 のタンパク質抑制による NMDA 刺激に及ぼす影響

神経細胞における B23 の機能を調べるため、PC-12 に B23-antisense-DNA を導入し、B23 タンパク質を抑制させ、NMDA 刺激でアポトーシスを誘発した。その後、TUNEL 法でアポトーシス率を評価した。

1) B23-antisense DNA による B23 タンパク質発現抑制

PC-12 に B23-antisense DNA の導入と、導入による B23 タンパク質発現抑制が起きているのか確認するため、B23 蛍光染色を行った。細胞内に B23-anti-sense DNA または B23-sense DNA に付けてある蛍光 (green) が確認できたため、B23-antisense DNA の導入されていることが確認できた。同細胞において B23 を TRITC 共染色した結果、Control (B23-sense DNA) と比較して、Control > 導入 18 時間後 >> 導入 24 時間後 > 導入 72 時間後のように減少していることが見てとれた (Fig.10)。これにより 18-72 時間で B23-antisense DNA 導入と B23 の発現抑制が確認できた。また、蛍光強度の差が、0 時間 vs 18 時間の差より 0 時間 vs 24 時間の差で見られたことは、B23 の半減期が 18-20 時間であるためと考えられる。

2) B23-antisense DNA 条件下での NMDA 刺激による影響

B23-antisense DNA によるタンパク質発現抑制が確かめられた。続いて NMDA を 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM 添加して刺激を与え, TUNEL 法によるアポトーシス率を検討した。その結果, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM で Control に対して TUNEL 陽性細胞/PI 陽性細胞の割合が, $21.38 \pm 5.70\%^{**}$, $6.30 \pm 3.66\%^*$, $8.62 \pm 4.06\%^*$, $12.49 \pm 6.24\%$ (平均 \pm S.E., $^{**}p < 0.01$, $^*p < 0.05$, *t-test*) 上昇する有意な差が確認された (Fig.11)。0.1, 0.5 mM NMDA 低濃度でアポトーシス割合が多かったことから, NMDA 刺激に対して B23 が抵抗性を示すことが示唆された。また, 5 mM NMDA 濃度では Control との割合が接近することから, 一定以上の NMDA 受容体刺激には他の制御因子が関与していることが考えられた。0.1 mM から 0.5 mM で apoptosis が減少した理由として, NMDA による細胞内 Ca^{2+} 濃度が CaMKII など抗アポトーシス作用をする濃度となったためと思われるが, 今後の検討が必要である。

第2節 *In vivo* における B23 生理機能

<目的>

海馬における B23 局在は, CA3 および小脳プルキンエ細胞の核小体に局在している報告はあり, 共に増殖しない領域である^[7]。しかし, 同じく増殖しない CA1 領域の B23 動態は明らかとなっていない。また, 海馬では NMDA 受容体刺激によってアポトーシスが生じるが, B23 との関連性について報告されているものはない。そこで, ラット及びマウス海馬における B23 動態について検討した。

また, 脳虚血等の脳疾患の損傷要因となる QA に対して, HA-1077 が神経細胞に作用して脳保護を行うか検証するとともに, B23 の関与についても検討した。

第1項 ラットおよびマウス海馬における B23 の機能について

1) ラット及びマウス海馬における B23 発現

ラット及びマウス海馬において B23 発現の確認を行うとともに, B23 は 2 つのアイソフォームが存在するため, 海馬で B23.1, B23.2 が発現しているのか検証した。

ラット及びマウスの脳から海馬 (DG, CA1, CA3 全領域を含む) を摘出して, 抽出溶液を得た。これを B23 の Western Blotting により, B23 発現確認を行った。その結果, 38kDa 付近に一本のバンドが確認できた (Fig.12A, 14A)。海馬における B23 の発現があること, 及び, 1 つのバンドが強く発現していることから, B23.1 または B23.2 が強く発現している可能性が示唆された。

2) ラット及びマウス海馬における B23 局在

B23 は細胞内局在を示すタンパクであることから, 海馬における B23 局在を免疫組織染色で確認した。ラットは蛍光染色, マウスは DAB 染色による免疫染色法を用いた。

ラット及びマウスにおける B23 局在は CA1 錐体細胞の核小体部位に局在していることが確認できた (Fig.12B, 13, 14B)。また, マウスで CA1 のみではなく, DG 顆粒状細胞, CA3 錐体細胞, 小脳プルキンエ細胞の核小体にも B23 局在が確認できた (Fig.14B)。

CA3 及びプルキンエ細胞の局在は Bouffant らと一致した。当研究室における西村らの報告では, 核小体に局在する B23.1 であることから, 海馬の錐体細胞層および顆粒状細胞層において B23.1 が多く発現していることが示唆された。

3) B23-antisense DNA 投与によるマウス海馬への影響

海馬で恒常的に発現している B23 を抑制した場合, 神経細胞の生存に対する影響を検討した。B23-antisense DNA を海馬に投与した後, 脳切片を TUNEL 法で染色した。その結果, アポトーシス細胞は見られなかった (Fig.15)。海馬に恒常的に発現している B23 は細胞生存に必須ではない可能性が考えられた。

第2項 海馬への QA 刺激に対する HA-1077 神経保護効果と B23 の機能について

1) ラット及びマウス海馬への QA 刺激における影響と B23 局在変化

海馬は NMDA アゴニストである QA 投与で損傷与えられることが報告されている^[53]。海馬 CA1 の損傷を QA 投与による差を検討した。マウス海馬に QA 投与による CA1 領域のアポトーシスを, Nissl 染色, ラット海馬の切片は TUNEL 法を用いて評価した。Nissl 染色において, PBS 投与海馬に対して投与 1 日目と 7 日目は染色が悪く, 海馬 CA1 領域に最も損傷が生じていることが確認できた (Fig.16)。また, ラット切片では, アポトーシスの細胞割合 (TUNEL 陽性細胞/PI) が PBS 投与で $0 \pm 0\%$ であったのに対して, $80.6 \pm 3.24\%$ となった (Fig.17)。これらより, ラット及びマウス海馬 CA1 領域に 50 nmol QA 投与によって CA1 領域で海馬の損傷が大きく生じることが確認できた。

次に, 損傷海馬における B23 の動態を検討するため, 海馬 CA1 領域に QA を投与し, その後切片を作製し B23 免疫染色を行った。マウスは QA を海馬内投与して 1 日目と 7 日後の DAB 染色, ラットは QA を海馬内投与して 1 日目の蛍光染色で評価した。どちらもともに, B23 の局在が核小体から細胞質に移行した (Fig.18A,19)。マウスにおいて, QA 海馬内投与 7 日後の切片では, 核小体にある細胞数をカウントした結果, 35.2 cells/40 cells から 6.8 cells/40 cells に減少した (Fig.18B)。これらのことから, QA 海馬内投与におけるアポトーシスに対して, B23 は初期に細胞質に移行して機能することが示唆された。

2) QA 海馬内投与における HA-1077 の持つ保護効果と 198 番目の Thr 残基のリン酸化 B23 の脱リン酸化

QA の海馬内投与と HA-1077 の側脳室投与による神経保護効果について検討した。また神経細胞に対する HA-1077 と B23 の関与について検討した。

側脳室に HA-1077 を投与し, 直後に海馬内に QA を投与したラット海馬において TUNEL 法を用い, アポトーシスの割合を調べた。その結果, HA-1077 投与により $53.8 \pm 3.30\%$ まで減少し, HA-1077 直接投与による神経保護が明らかとなった (Fig.20A, B)。

続いて, HA-1077 における B23 の関与の検討を行うため, HA-1077 のみを投与した脳切片を作製し, B23 及び Thr198 残基のリン酸化 B23 の蛍光染色を行った。その結果, B23 の局在変化は見られなかったが, Thr198 残基のリン酸化 B23 の脱リン酸化が生じることが明らかとなった。これらより, HA-1077 の QA 刺激における神経保護効果は Thr198 残基のリン酸化 B23 の脱リン酸化が関与していることが示唆された (Fig.21)。

第4章 総合考察

今回神経細胞における B23 の神経機能について *in vitro* と *in vivo* からアプローチをかけた。神経細胞モデルとして NB2a を用いた場合、PC-BSA を添加してから 24 hr 後に軸索形成が見られた。また、増殖抑制試験を行うと増殖抑制が生じていることが確認できた。この時、B23 の発現量は増加し、神経分化に B23 が関与することが示唆された。さらに、神経分化細胞においても B23 が核小体と核質に局在していることと、198 番目の Thr 残基のリン酸化が核小体で生じていることが明らかとなった。PC-12 において、NGF で神経分化を引き起こすと、B23 の 263 番目の Lysin 残基と PIP₃ が複合体を形成し、CAD (Caspase Activated DNase) による DNA 断片化を防いでいることが報告されている^[54]。今回用いた PC-BSA は PKC 阻害剤であるため、NB2a では PKC の下流以外で B23 が関与していることが考えられた。

神経細胞は細胞周期の G₁ 期中に G₀ 期に入り、静止期の状態になる。現在 B23 は細胞周期の G₁/S 期において、198 番目の Thr が cdk2 からリン酸基を受け取り、ROCK II と相互作用して B23 は中心体から解離して、中心体の複製に関与するとされる^[46]。また、B23 の 198 番目の Thr の機能で、DNA 修復、pre-mRNA のプロセッシングに関与することが増殖細胞の HeLa 及び NIH3T3 細胞で報告されており、そのため非増殖細胞の NB2a においても、B23 の 198 番目の Thr リン酸化は、同等の機能に関わっていると考えられる。

さらに、Rho-キナーゼ阻害剤である HA-1077 による作用で軸索伸長が見られる濃度 (30 μM) において、B23 の 198 番目の Thr については局在変化が確認できなかったことから、ROCK II より下流で B23 の 198 番目の Thr は機能していないことと示唆された。つまり、神経細胞で B23 は Rho-キナーゼよりも上流あるいは、無関係に B23 は 198 番目の Thr リン酸化反応が寄与していることが考えられた。

PC-12 (神経細胞) を用いて B23 の機能について検討するため、B23-anitsense を使用して、mNGF による神経分化後に B23 の抑制を行った。その後 NMDA 刺激を与えて、アポトーシス率を検討した。その結果、B23 の抑制によってアポトーシス率が増加した。これより、B23 は NMDA 刺激によるアポトーシスから細胞を保護する機能を有していることが示唆された。NMDA 刺激によるアポトーシスは Ca²⁺ の増加によるもので、細胞内の酸化ストレスを増加させることで引き起こされることが知られている。また、上述したように PC-12 は CAD による DNA 断片化を防ぐことが報告されており、NMDA 刺激によるアポトーシスに対して、酸化ストレス抑制による細胞生存に機能することが考えられた。

In vitro (細胞) は *in vivo* (海馬) よりも B23 の核局在が確認でき、細胞では、核小体のみに局在がある B23 の 198 番目の Thr リン酸化以外で機能していることが考えられる。NB2a において B23 の Western Blotting の結果、メインバンドが 2 本確認できた

(Fig.5)。一本は核小体局在から、B23.1 と推測でき、もう一本は核質局在から B23.2 の可能性が考えられる。がん細胞などでは B23.2 の発現が高まることや、当研究室では DNA 複製の際に B23.1, B23.2 の順に発現量が増加し、DNA ポリメラーゼ活性が増加するとされる(Nisimura)。そのため、神経分化以前の NB2a と PC-12 は増殖細胞であるため、核質の B23.2 が見られたのかもしれない。

今後、H₂O₂ など異なる酸化ストレスを用いることや、B23 の上流で PIP₃ や ERK などが機能するのか検討していくことで B23 の機能が明確となると思われる。さらに、B23.2 のシーケンスを行い、B23.1 または B23.2 の発現を明確にする必要がある。

海馬 CA1・CA3・DG の神経細胞(ニューロン)において、B23 は恒常的に核小体及び核質に発現していることが確認できた。海馬の核質に局在する B23 は核膜周辺に沿って存在していたため、核内輸送タンパクとして機能していることが推察できる。核内輸送には核膜の PKC と B23 が関わると報告があるため、PKC と B23 の関与は成体海馬においても機能していることが考えられる。また、海馬の核小体局在の B23 は DNA 修復や rRNA の合成に関与していると思われる。しかし、B23 の発現抑制した場合、アポトーシスが検出されなかった。*In vitro* の実験より、NMDA 刺激に対して抵抗性を示したことを踏まえると、生体内は細胞死を起こすほど NMDA 刺激が強くなく、B23 は細胞生存に必須ではないと考えられる。あるいは生体では B23 抑制によるアポトーシス進行が、グリア細胞など脳内環境でブロックされるのかもしれない。今後、Actinomycin D などの DNA 損傷薬剤を使用した試験を行い、機能を明確にしていけると考える。

QA 損傷海馬による B23 の関与は、アポトーシスを起こす際に B23 が細胞質に移行して機能することが示唆された。NMDA 刺激によるアポトーシスは NF- κ B の核移行が生じ、p53 の発現を増加させる報告がある^[55]。また、B23 はミトコンドリアの p53 局在を減少させることで細胞保護を行う報告がある^[39]。これらより、B23 が核小体から細胞質に移行し、p53 のミトコンドリア局在を抑制することでアポトーシスを抑制していると考えられる。一方、HA-1077 による神経保護作用は、B23 の 198 番目の Thr の脱リン酸化が影響していると考えられた。HeLa 細胞で DNA 損傷により、protein phosphatase1B (PP1B) が脱リン酸化することで、B23 の 198 番目の Thr の脱リン酸化を生じさせる。これにより、DNA 修復が行われるという報告がある。また、RhoA は PP1 を不活性化していることが分かっている^[56]。そのため、HA-1077 の脱リン酸化は QA による酸化ストレスに対して、速やかに DNA 修復を行うことが可能となったため神経保護作用が生じたと考えられる。また、海馬には神経細胞以外にグリア細胞も存在する。HA-1077 はグリア細胞に対して G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) 産生を促進し、神経保護に関わる報告がある^[57]ため、今後は HA-1077 の神経に対する影響が、グリア細胞を介して生じているのか検討していく必要がある。

以上のことから、B23 は中枢神経において神経保護に機能することが示唆された。

略語一覧

略語	正式名称
APS	Ammonium peroxodisulfate
B23/Thr198	Thr ¹⁹⁸ 残基がリン酸化した状態の B23
BPB	Bromophenol blue
CAD	Caspase-activated DNase
CaMK II	Calmodulin kinase II
cdk2/cyclinE	K-Cyclin-dependent kinase II
CK II	Casein kinase II
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiodreitol
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
MEM	Minimum Essential Medium
MLCK	Myosin light-chain kinase
NB2a	マウス神経芽細胞腫
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
PC	palmitoylcarnitine
PC-12	ラット副腎髄質由来褐色細胞腫
PI	Propidium iodide
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PP1B	Protein phosphatase1B
PVDF	Poly Vinylidene Di-Fluoride
QA	キノリン酸
ROCK	Rho kinase
RT	Room air temperature
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase

略語	正式名称
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyle-enediamine
TIF-IA	Transcription initiation factor IA
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate
TrkA	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1

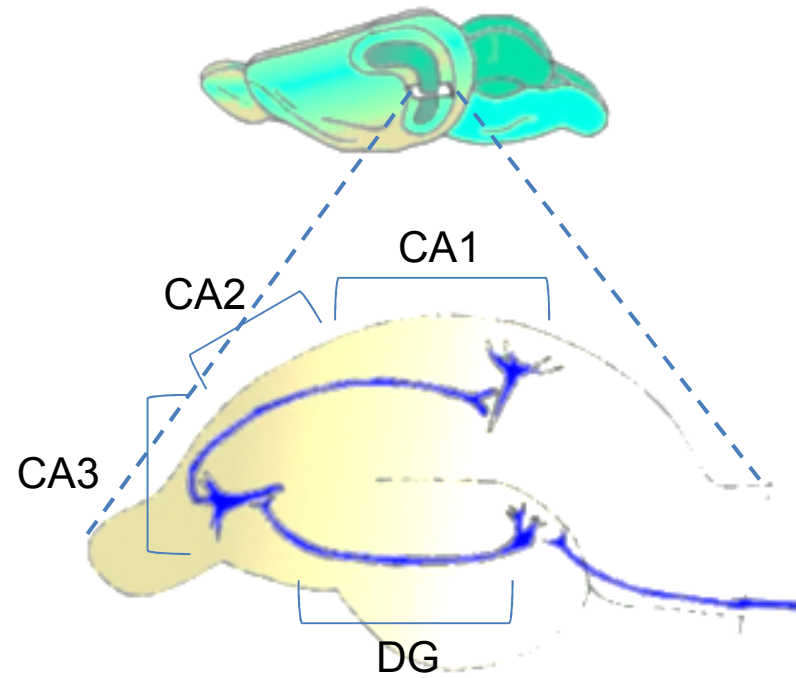
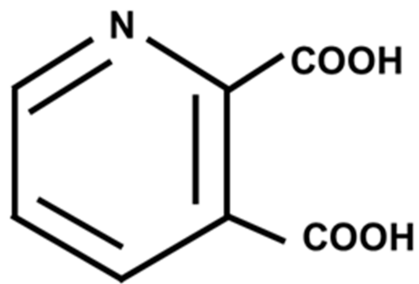


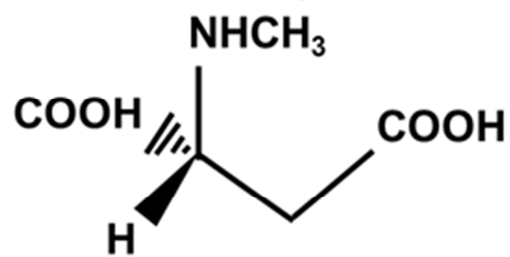
Fig.1 Pattern diagram of mouse Hippocampus

Top is mouse brain. Bottom is hippocampus. Hippocampus is divided main 4 parts that DG, CA3, CA2, CA1 are. And the blue line shows cell layer.

QA



NMDA



Glutamic acid

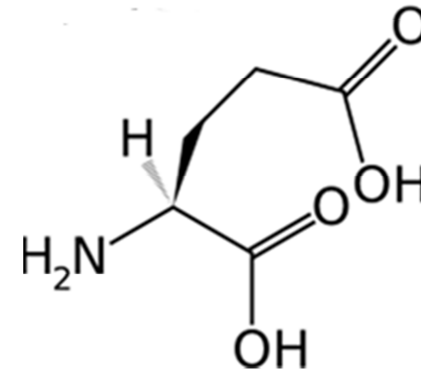


Fig.2 Structural formula of QA, NMDA , and Glutamic acid

QA and NMDA are agonist of Glutamic acid, the structural formula of QA and NMDA look like Glutamic acid. These have dicarboxylic.

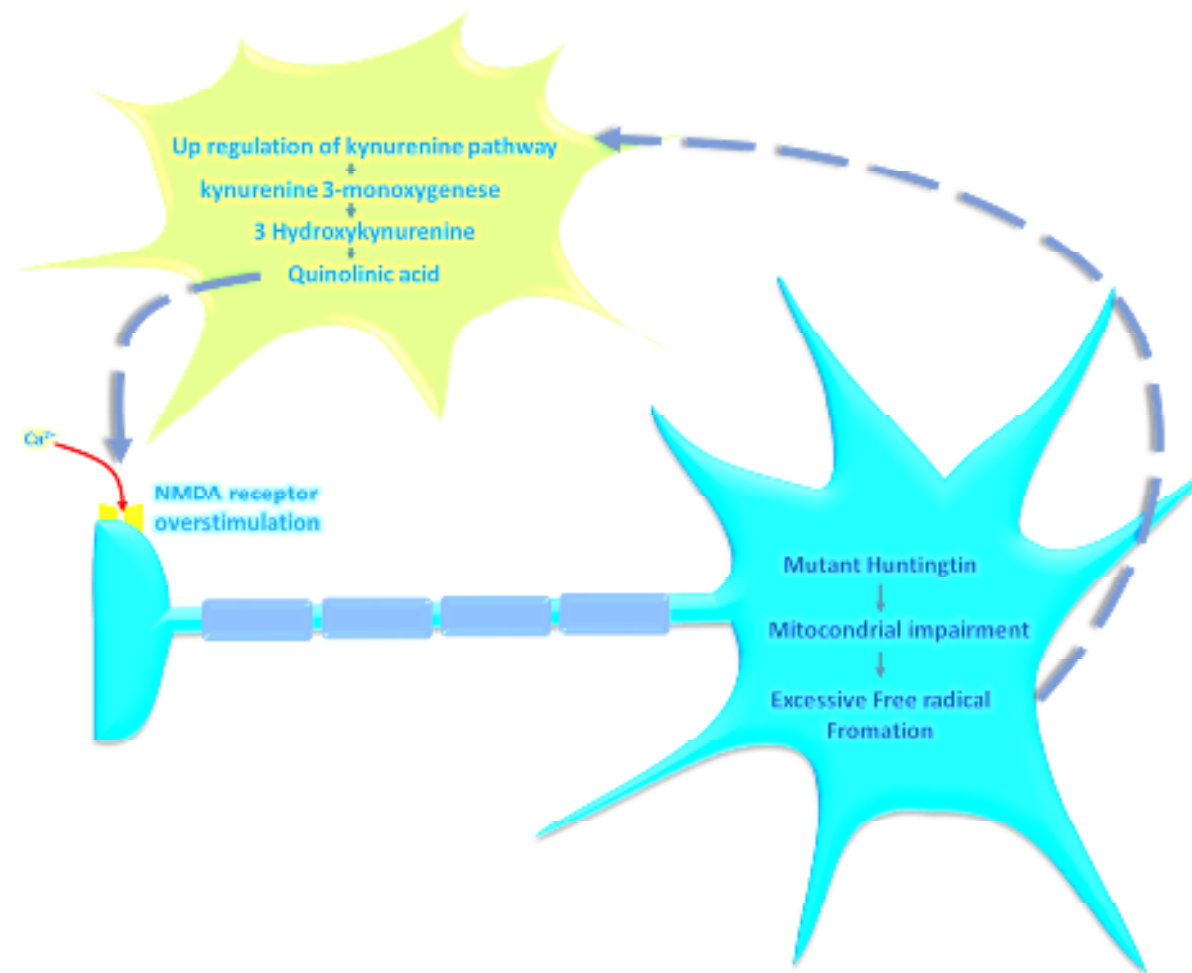


Fig.3 Schematic representation of non-cell-autonomous neurodegeneration in Huntington's disease

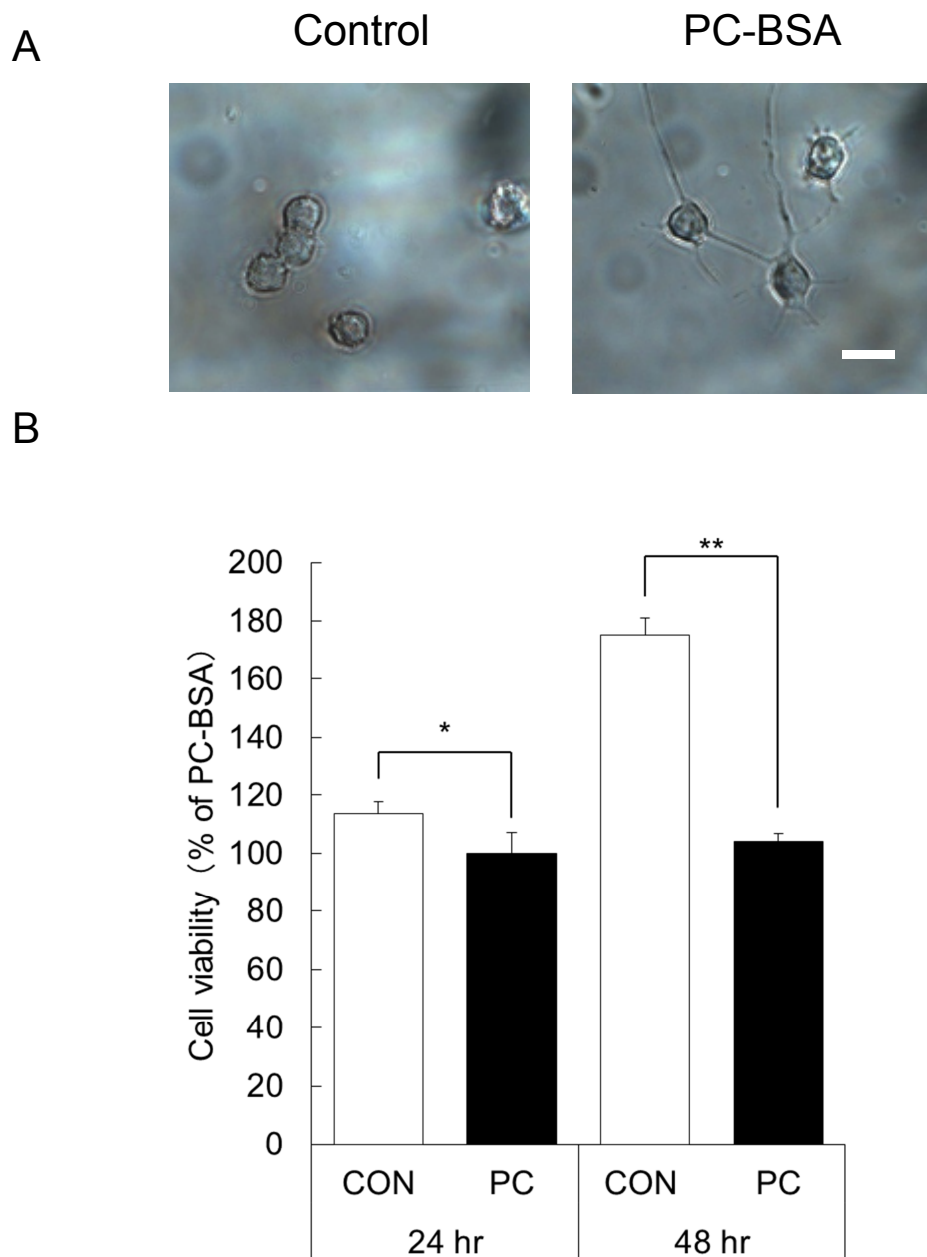


Fig.4 Effect of palmitoylcarnitine on proliferation of neuroblastoma

A, Neurite elongation of NB2a after treatment with PC-BSA (right) or without (left).
 B, NB-2a cells were deprived of serum for 24 h and subsequently grown for the indicated time in the presence of 5% FBS either supplemented without or with 100 μ M palmitoylcarnitine, as described in the Methods section. The amount of cells after the indicated time was estimated by absorbance of 450 nm. The results are means \pm S.E., n=3, *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with CON vs PC at 24hr or 48hr. Scale bar is 20 μ m.

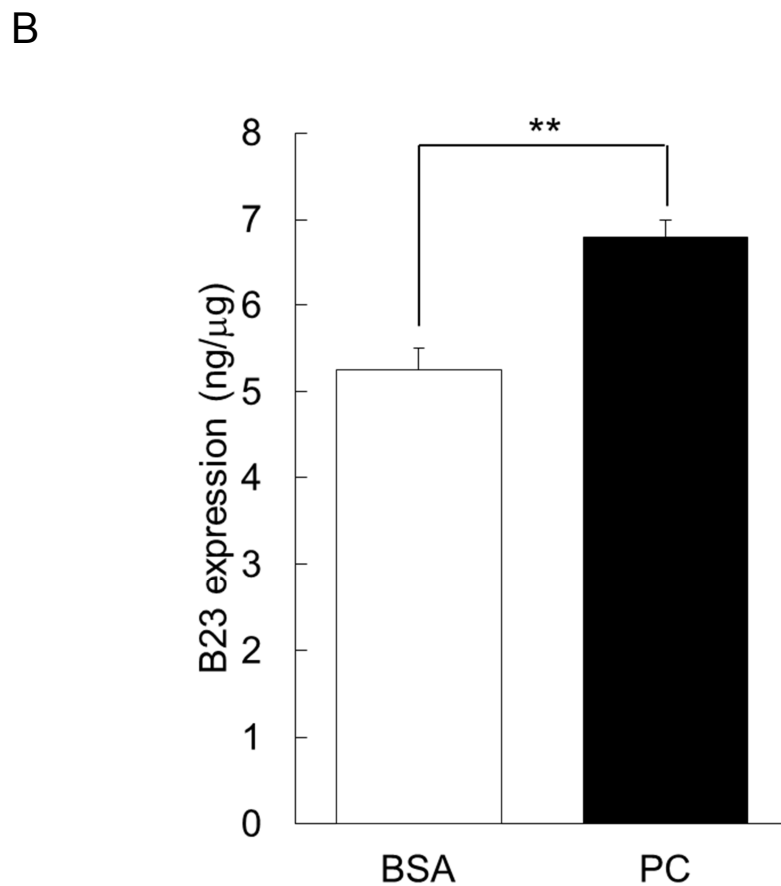
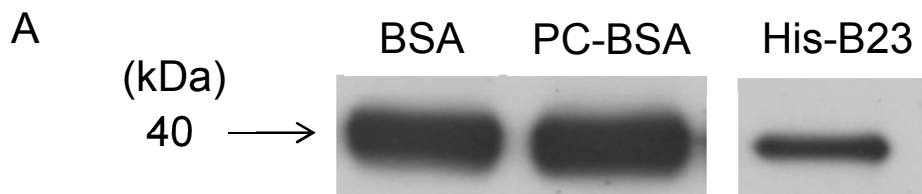


Fig.5 Protein expression of B23 is effected by palmitoylcarnitine at NB2a

A, NB2a is cultured with 5% FBS MEM and 100 μ M palmitoylcarnitine for 72 hr. After incubation the cell is lysed by Ripa buffer. The solution applied is 20 μ g. B23 protein of the solution was detected by Western blotting.

B, Protein bands measured by NIH image. The results are means \pm S.E. n=3, *t*-test.

**p*<0.05, compared with BSA (CON) vs PC at 72 hr.

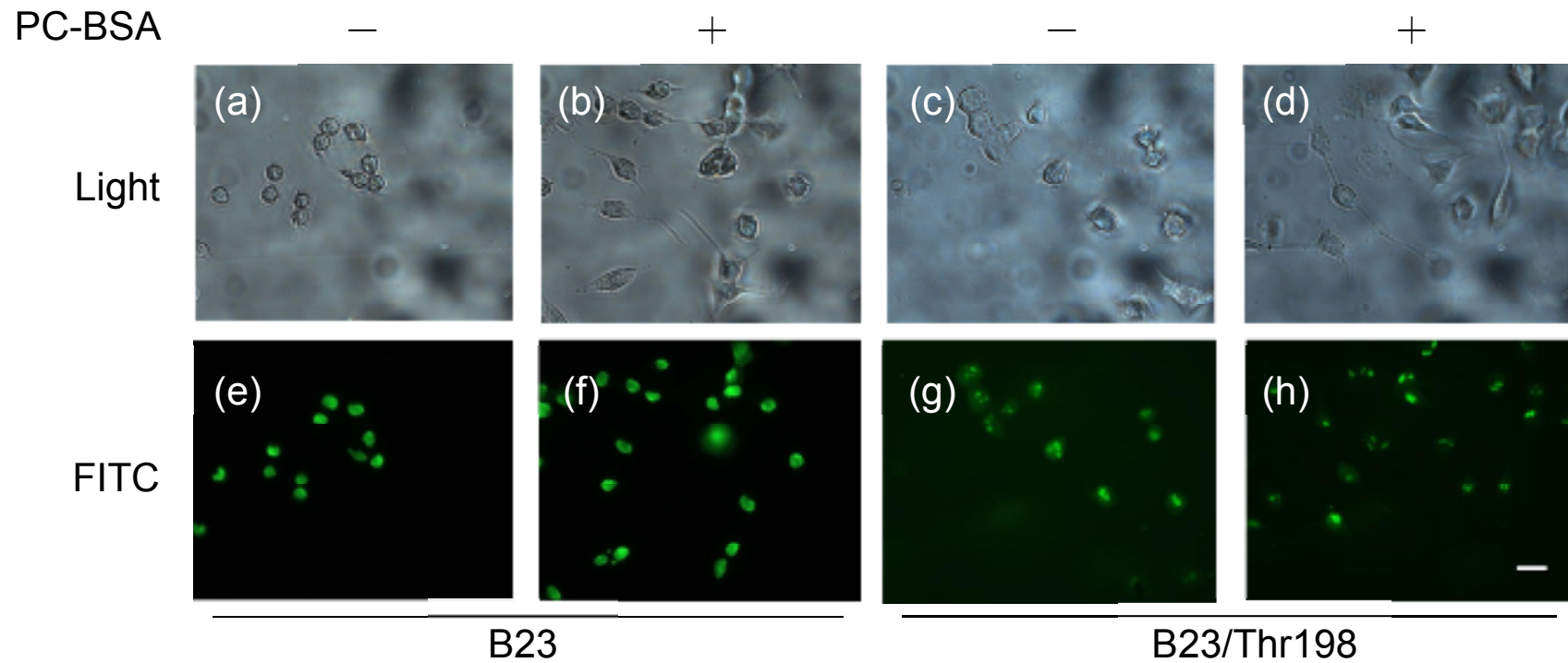


Fig.6 Localization of B23 and B23/Thr198 in nucleoli and nuclei of NB2a cells with or without palmitoylcarnitine.

Immunohistochemistry shows the immunolabeling with anti-B23 polyclonal antibodies (green) done on B23 and Anti-B23/Thr198 polyclonal antibodies on B23/Thr198 of NB2a (e-h). Without palmitoylcarnitine is (a, c, e, g), with it is (b, d, f, h). B23 is stained (e, f) and B23/Thr198 is stained (g, h). B23 is localization in nucleoli and nuclei, while B23/Thr198 is only localization in nucleoli. And, B23 and B23/Thr198 don't altered localization between with or without palmitoylcarnitine. Scale bar is 20 μ m.

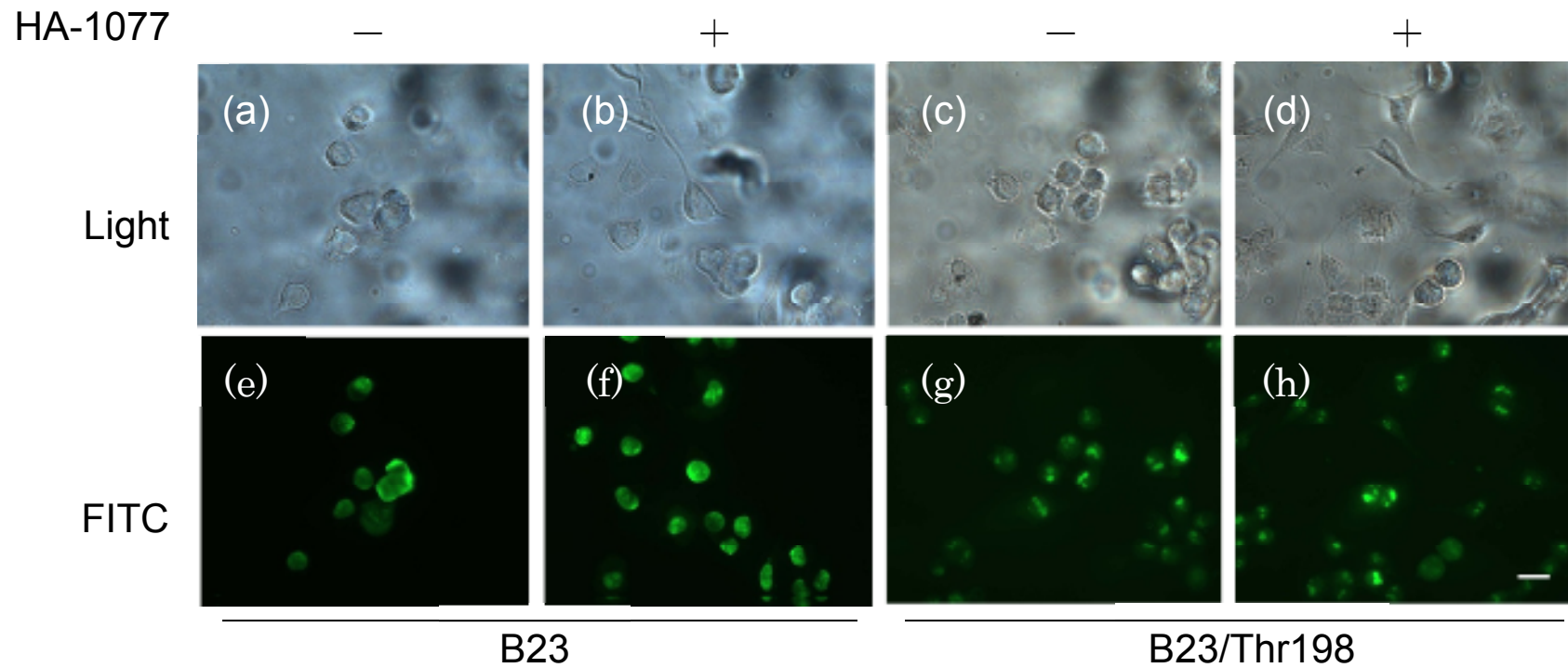
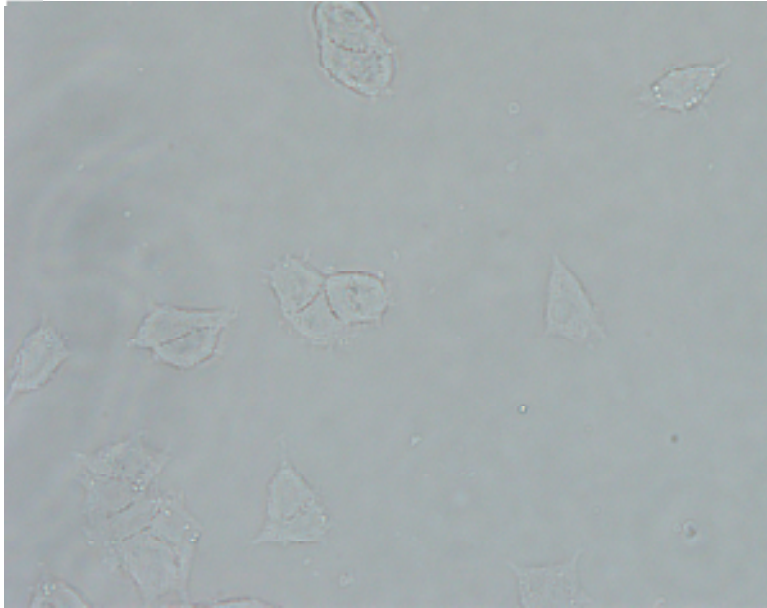


Fig.7 Localization of B23 and B23/Thr¹⁹⁸ in nucleoli and nuclei of NB2a cells with or without HA-1077.

Immunohistochemistry shows the immunolabeling with Anti-B23 polyclonal antibodies (green) done on B23 and anti-B23/Thr198 polyclonal antibodies on B23/Thr198 of NB2a (e-h). NB2a was treated without HA-1077 (a, c, e, g), with HA-1077 (b, d, f, h). B23 is stained (e, f) and B23/Thr198 is stained (g, h). B23 is localization in nucleoli and nuclei, while B23/Thr198 is only localization in nucleoli. And, B23 and B23/Thr198 don't altered localization between with or without HA-1077. Scale bar is 20 μ m.

mNGF

—



+

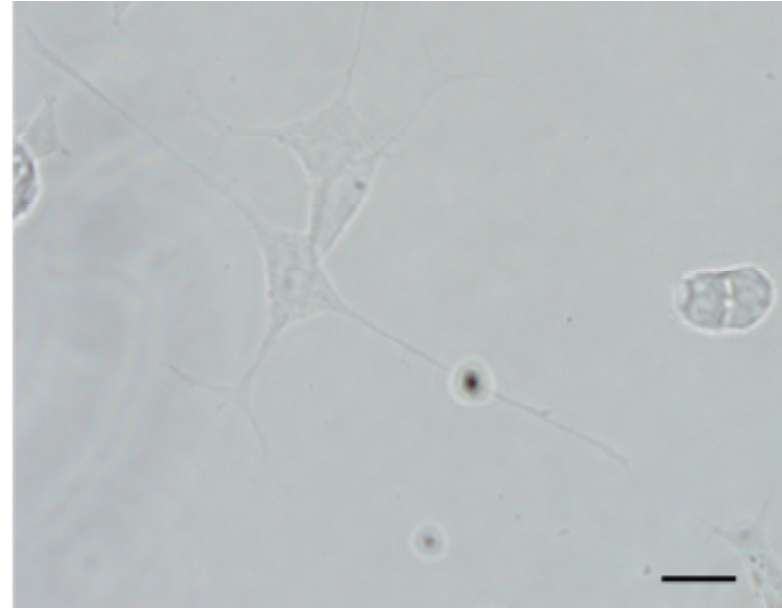


Fig.8 Effect of mNGF on axon elongation of PC-12 cells

Morphology of neurite elongation of PC-12 cells. The Cell is cultured with 10% FBS+10% HS Low-Glucose DMEM and 100 ng mNGF for 48 hr. Thr cells is cultured without mNGF, and with mNGF.The cells included mNGF is done neurite elongation. Scale bar is 20 μ m.

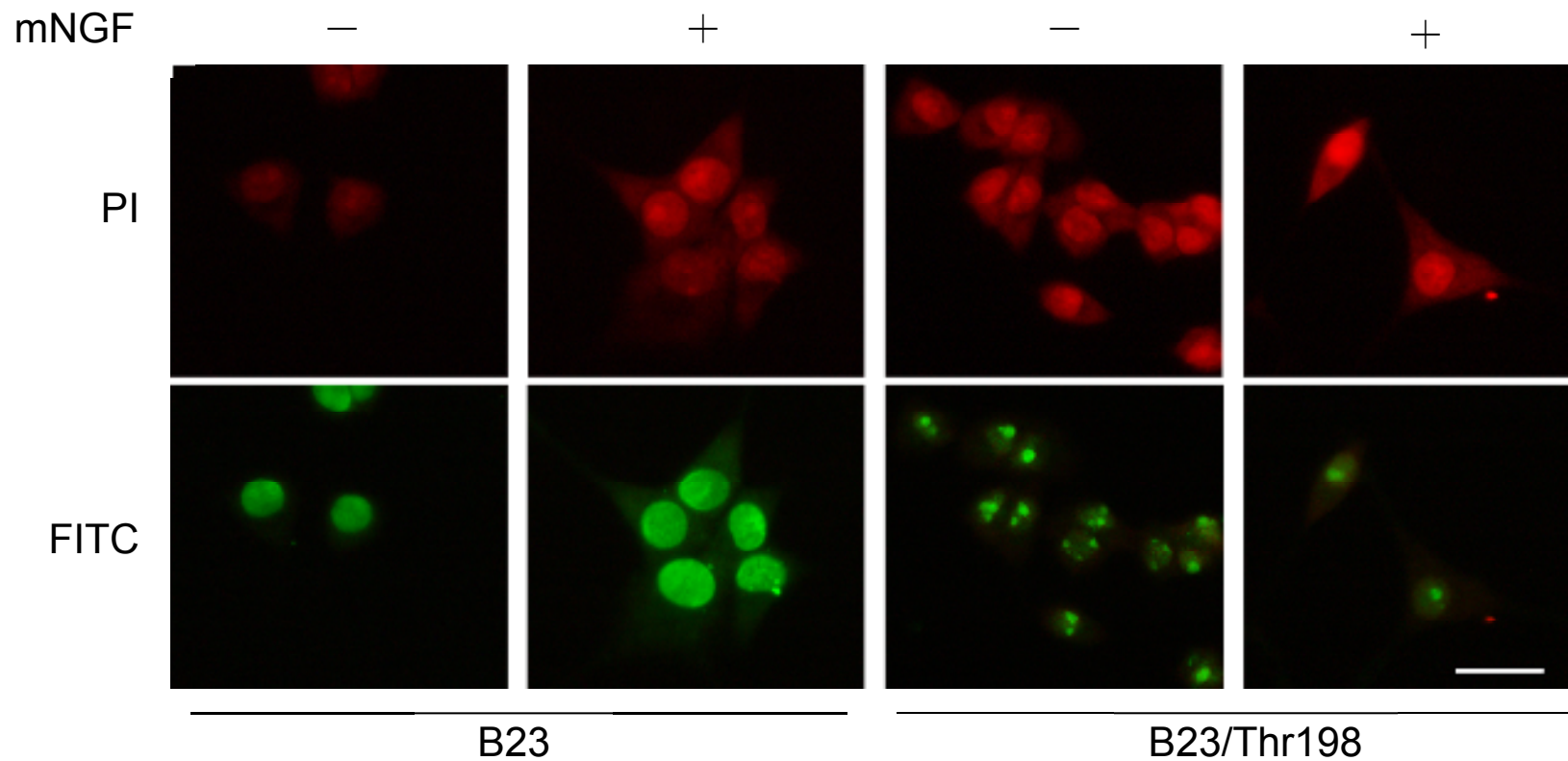


Fig.9 Localization of B23 in nucleoli and nuclei of PC-12 cells with or without mNGF.

Immunohistochemistry shows the double immunolabeling with anti-B23 polyclonal antibodies (green) done on B23 and anti-B23/Thr198 polyclonal antibodies on B23/Thr198 of PC-12. Nuclei were stained with propidium iodide (red). PC-12 is treated without mNGF or with mNGF. Scale bar is 20 μ m.

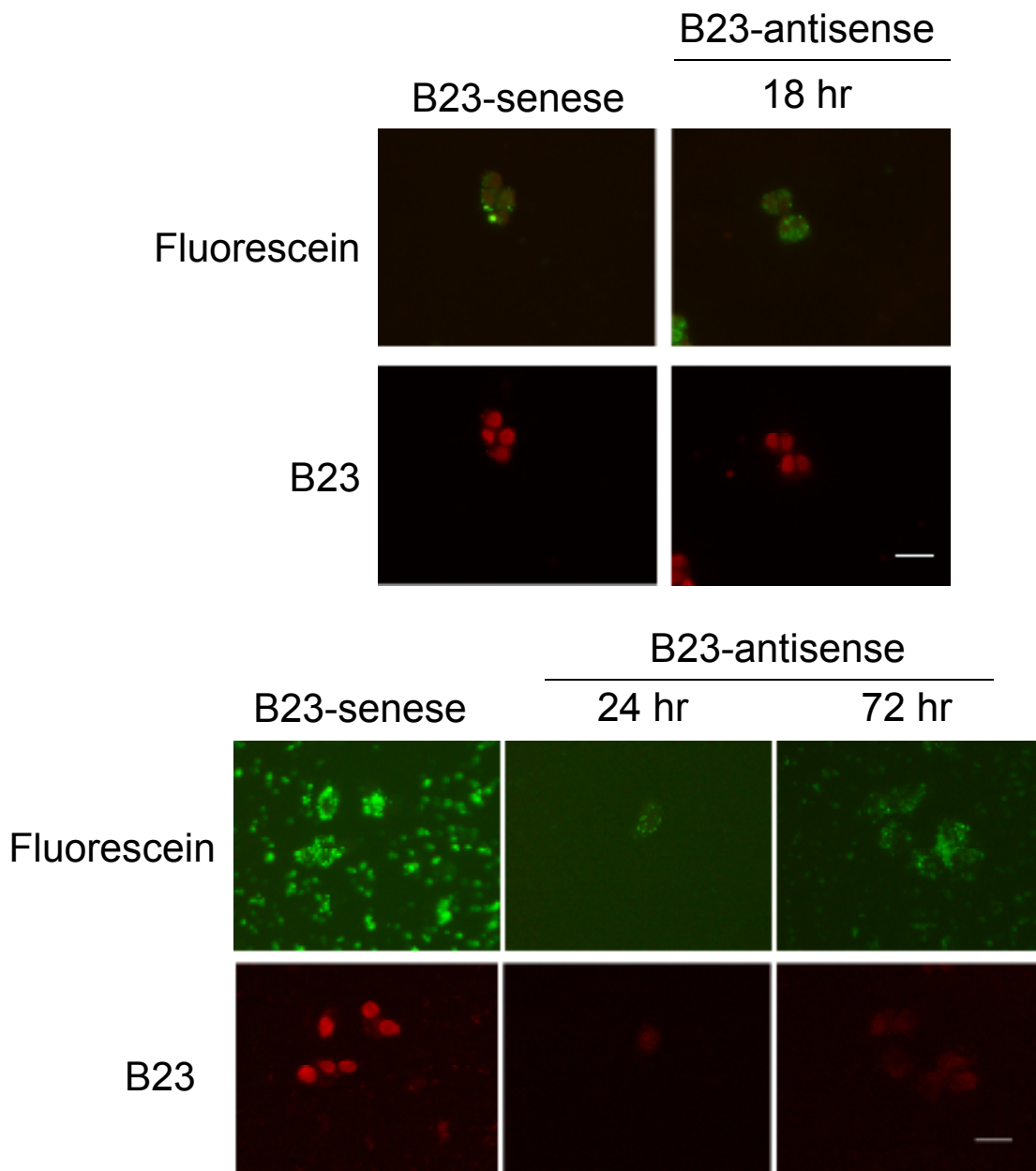


Fig.10 Suppression of B23 expression by B23-antisense DNA

PC-12 is treated with B23-antisense DNA or B23-sense DNA for 18, 24, 72 hr. After incubation immunohistochemistry shows the immunolabeling with anti-B23 (red) protein antibodies done on PC-12 cells. Oligo-DNA is linked Fluorescein (green). The Strength of immunolabelling is weaker the cells treated with B23-antisense DNA than with B23-sense DNA. Scale bar is 20 μ m.

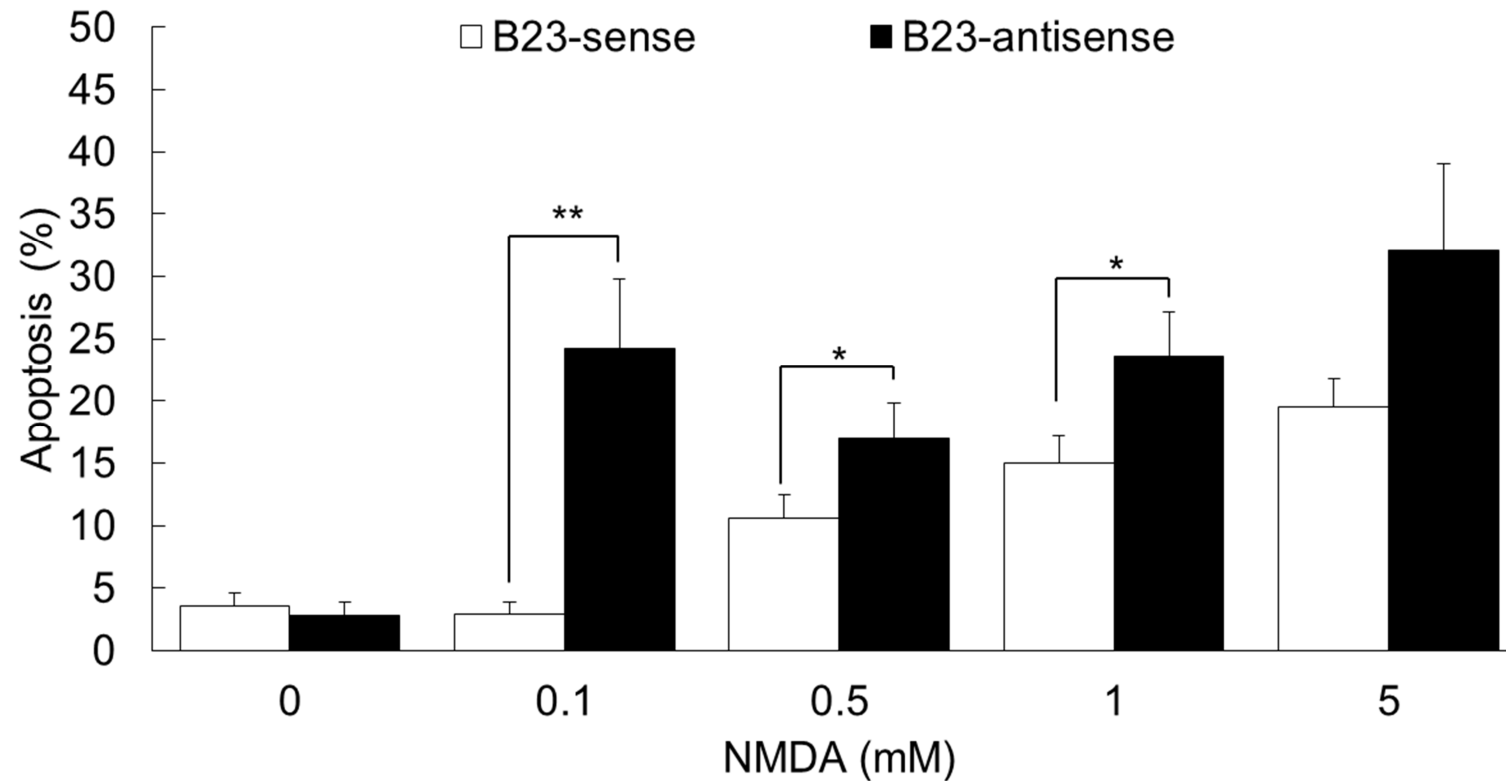


Fig.11 Survival ration of PC-12 stimulated by NMDA is reduction by B23-antisense DNA treated

PC-12 cells is treated with B23-antisense DNA for 18hr before neuronal differentiation. The cells is treated with mNGF for 48hr, and after differentiation NMDA stimulation (0, 0.1, 0.5, 1, 5 mM) was done for 24hr. The cells was stained by DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System . The ration of counting TUNEL positive cells PI positive cell was increased by B23-antisense DNA. The results are means ± S.E. from 3 independent estimation. *t*-test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared with B23-sense DNA (CON) vs B23-antisense DNA.

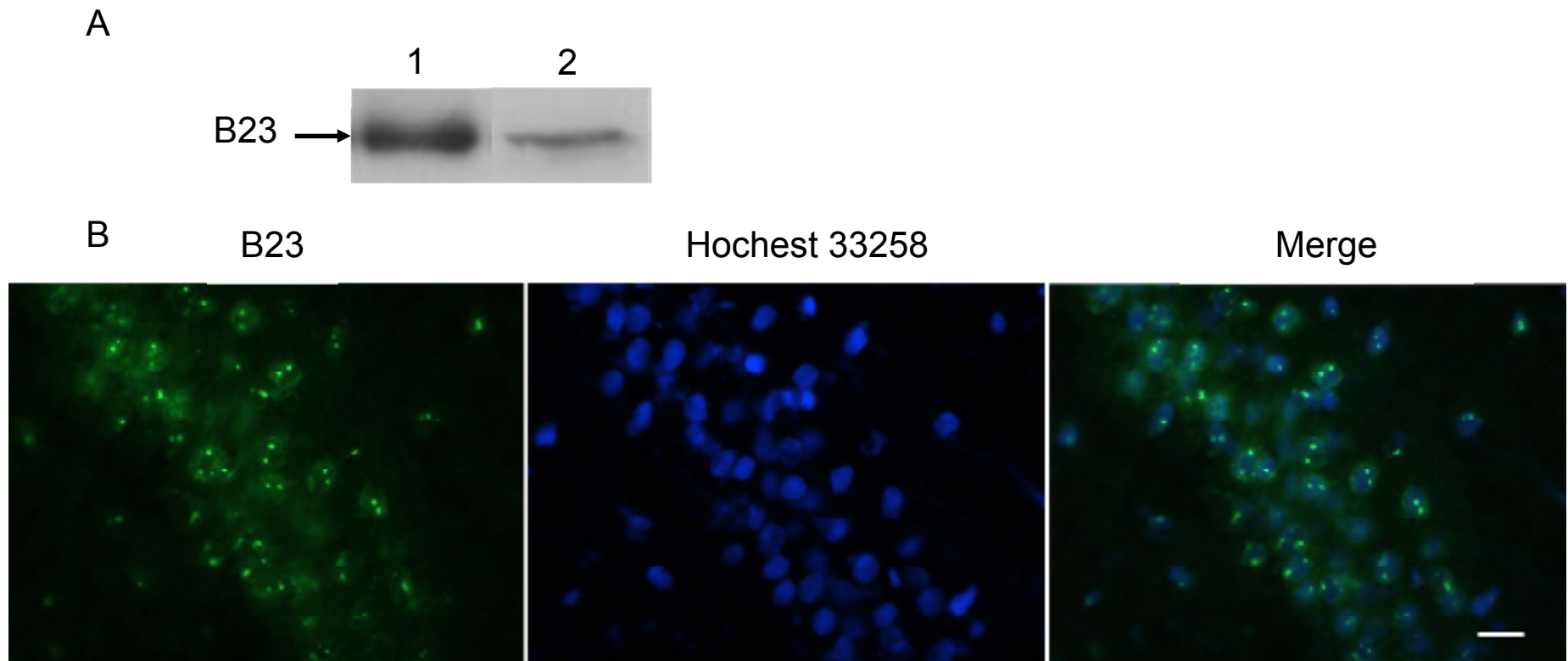


Fig.12 The protein expression of B23 in mouse or rat hippocampus

A, Hippocampus removed of mouse or rat is lysed in RIPA buffer. B23 protein of the solution was detected by Western Blotting (lane1: His-B23 0.05 μ g, lane2: 37 μ g total protein amount of rat hippocampus).

B, Immunohistochemistry shows the double immunolabeling with anti-B23 protein antibodies done on pyramidal cell of CA1 in rat brain. Nuclei were stained blue with Hoechst reagent. Scale bar is 20 μ m.

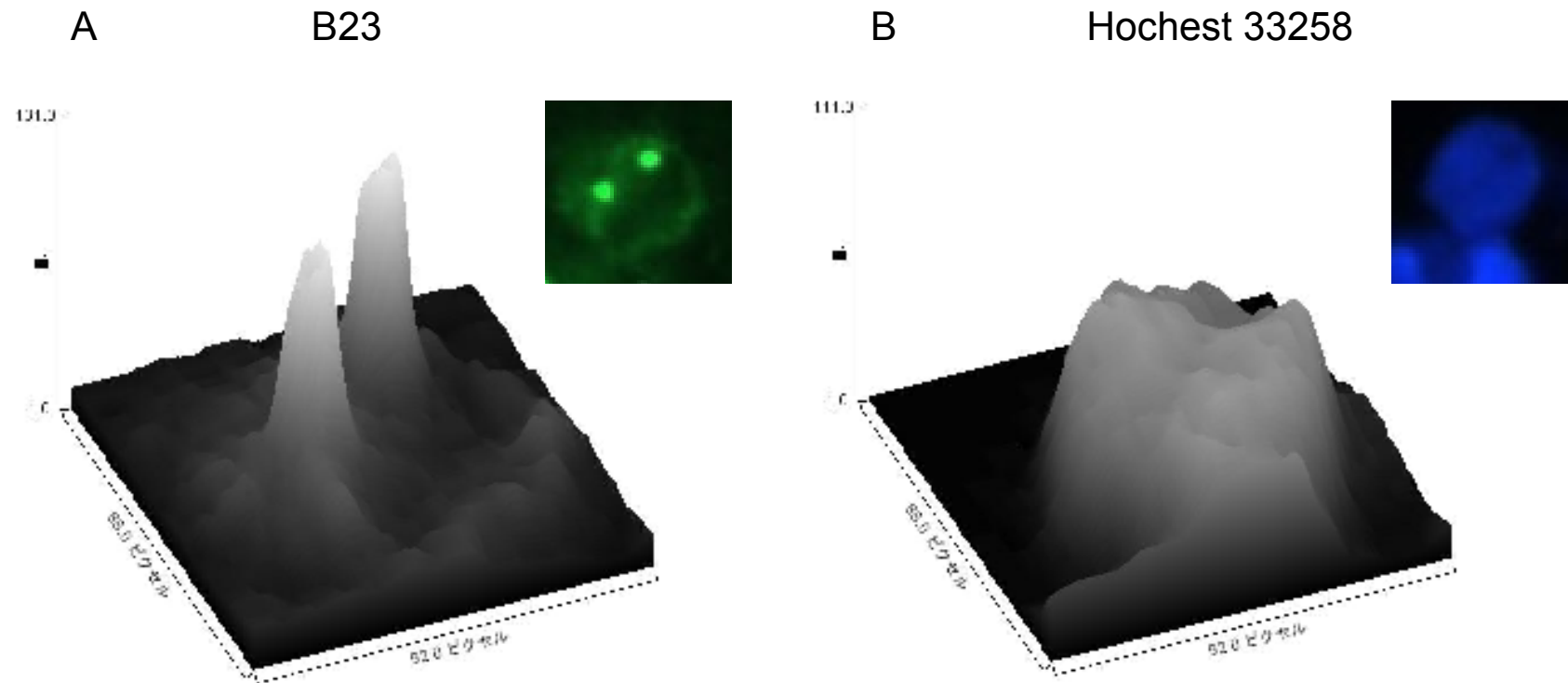


Fig.13 Imaging pixel of B23 localization

A and B were macrophotograph and imaging by the same cell of Fig 12

A.B23of Fig 12 was imaging by Image J.B23 was localization on nucleolar and

B.Hoechst 33258 was imaging by Image J.

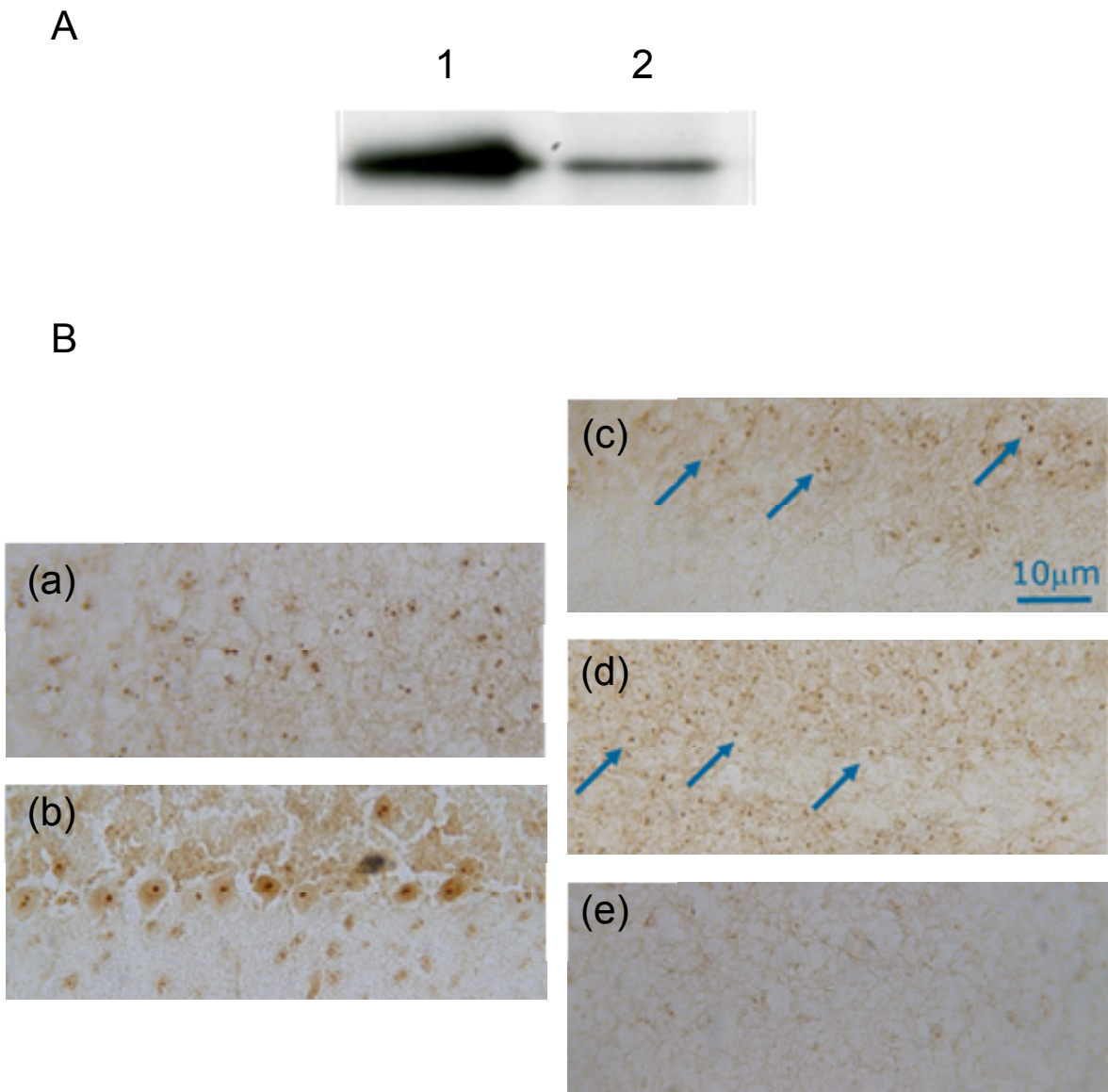


Fig.14 Expression and localization of B23 in brain cortex, cerebellar Purkinje cell, hippocampus of mouse

A, Hippocampus removed of mouse is lysed in Ripa buffer. B23 protein of the solution was detected by Western Blotting. (lane1: His-B23 0.1 μ g, lane2: 150 μ g weight of mouse hippocampus)

B, Immunostaining show anti-B23 by ABC kit. B23 protein is found in CA3 (a) and cerebellar Purkinje cell (b).the result assented Bouffant's result. And B23 protein is frequently found in nuclear of pyramidal cell in CA1 (c) and granular cell in DG (d), of neuron of cortex (e) Scale bar is 10 μ m. Arrows were shown B23 localization on nucleolar.

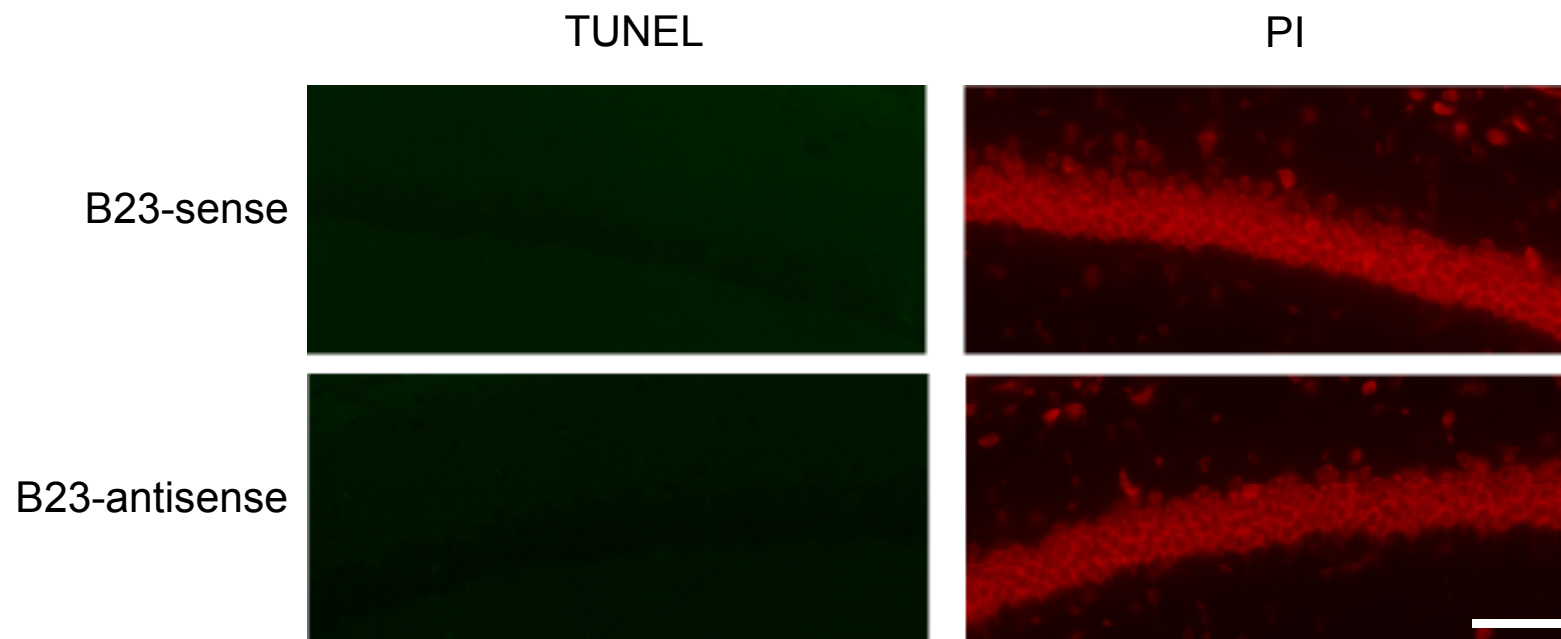


Fig.15 No effect survival of pyramidal cell by B23-antisense

Immunohistochemistry shows the double immunolabeling with TUNEL positive cells on pyramidal cell of CA1 in mouse brain. Nuclei were stained red with Propidium Iodide (PI).

B23-antisense DNA or B23-sense DNA is injected at intrahippocampus of mouse. Scale bar is 80 μm .

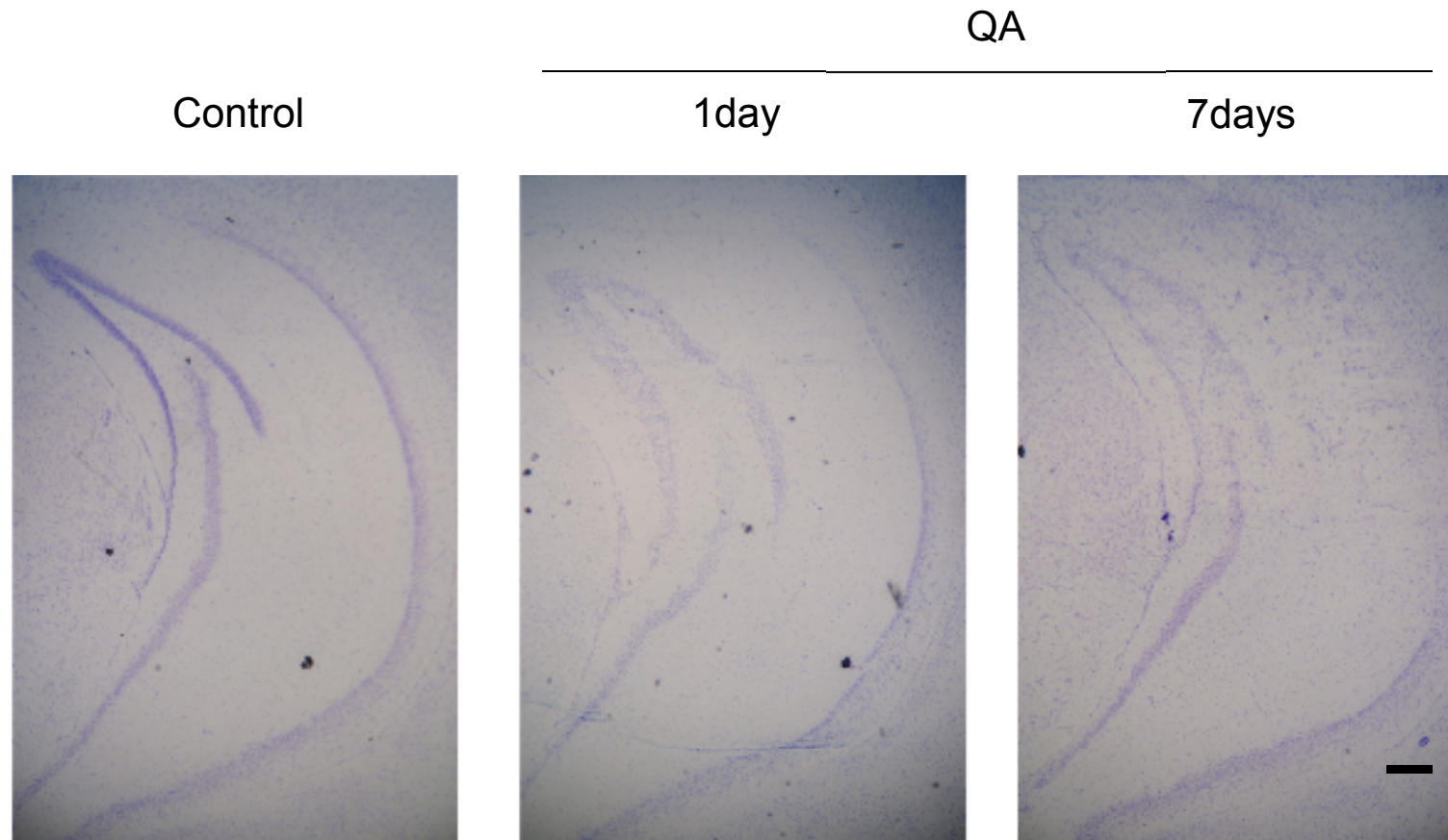


Fig.16 Mouse hippocampus injected QA of Nissl stain

Photomicrographs illustrating the effects of quinolinic acid (QA) on the hippocampus show there. control (left), after 1 day from 50 nmol of QA (middle), and 7days 50 nmol of QA (right), were injected into the hippocampus. Brain slices (14- μ m) were stained with cresyl violet. Scale bar is 100 μ m.

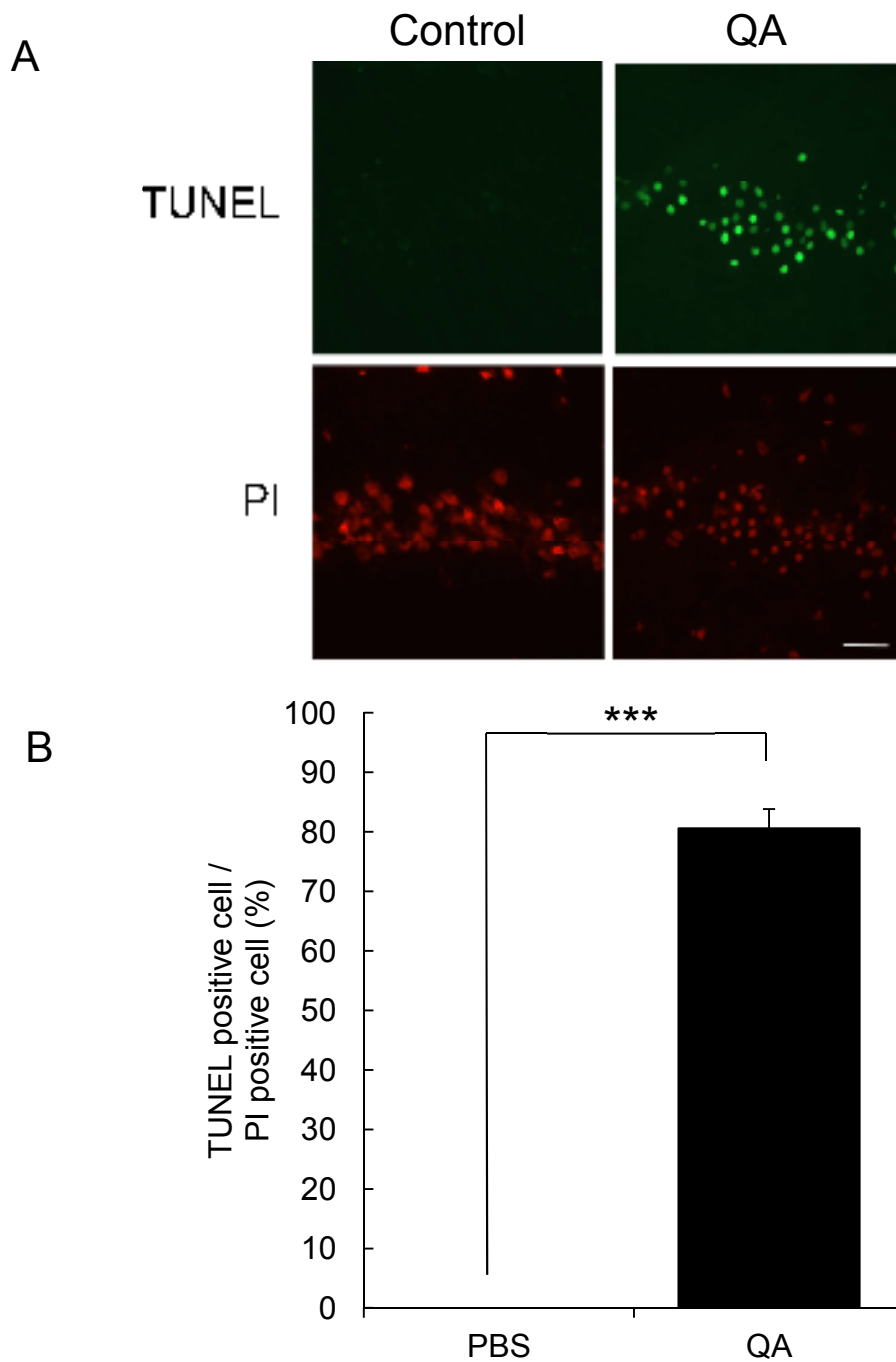
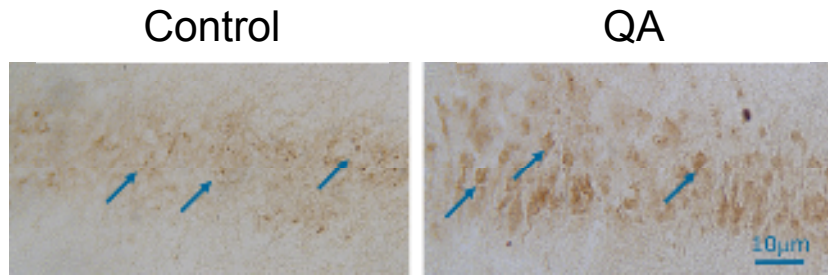


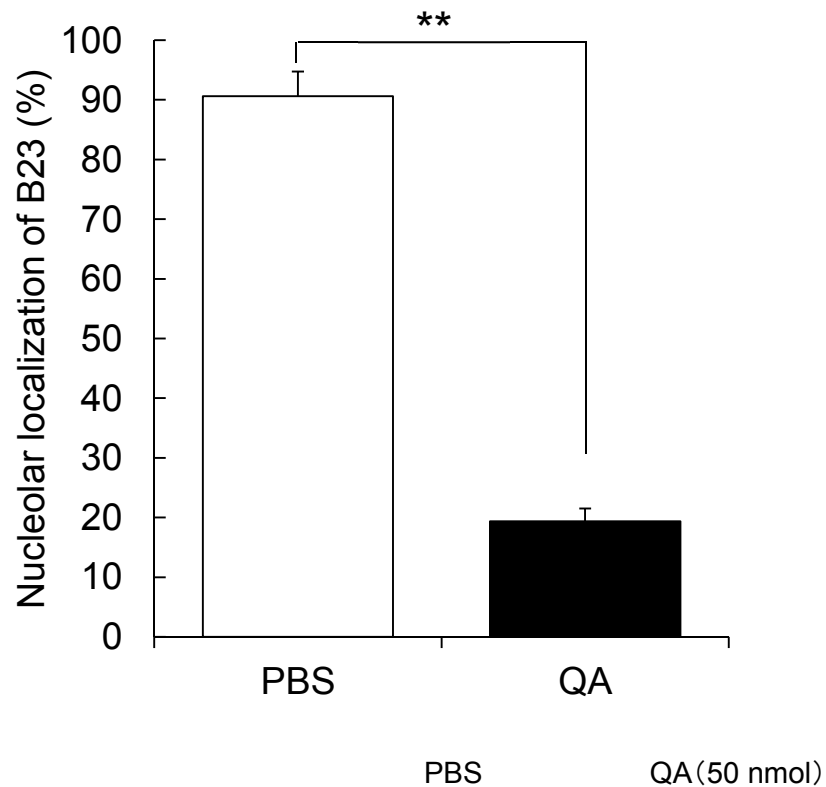
Fig.17 Increased TUNEL-positive neurons in the CA1 region of the QA treated hippocampus.

A, In the controls rat, no TUNEL-positive cells were observed. TUNEL-positive cells were seen in the pyramidal layers of the QA-treated hippocampus. B, TUNEL positive cell/PI positive cell was shown. The results are means \pm S.E., n=4. ***<0.001, compared with vs without QA. *t*-test. Scale bar is 50 μ m.

A



B



	PBS	QA (50 nmol)
nucleolar localization cell/ 40 cells	36.25±0.85	7.75±1.65
% of nucleolar localization of B23	90%	19%

Fig.18 Mouse hippocampus injected QA of B23 immunostaining by ABC kit

Photomicrographs illustrating the effects of quinolinic acid (QA) on the hippocampus. control (left), 50 nmol (right) of QA were injected into the hippocampus. Each animal was decapitated 7 days after treatment. B23 translocated from nucleolus into cytosol at 50 nmol QA. B, The ration of B23 localization at nucleour was shown. The results are means ± S.E., n=3. ** p<0.01, compared with vs without QA. *t*-test. Scale bar is 10 μm. Arrows were shown B23 localization.

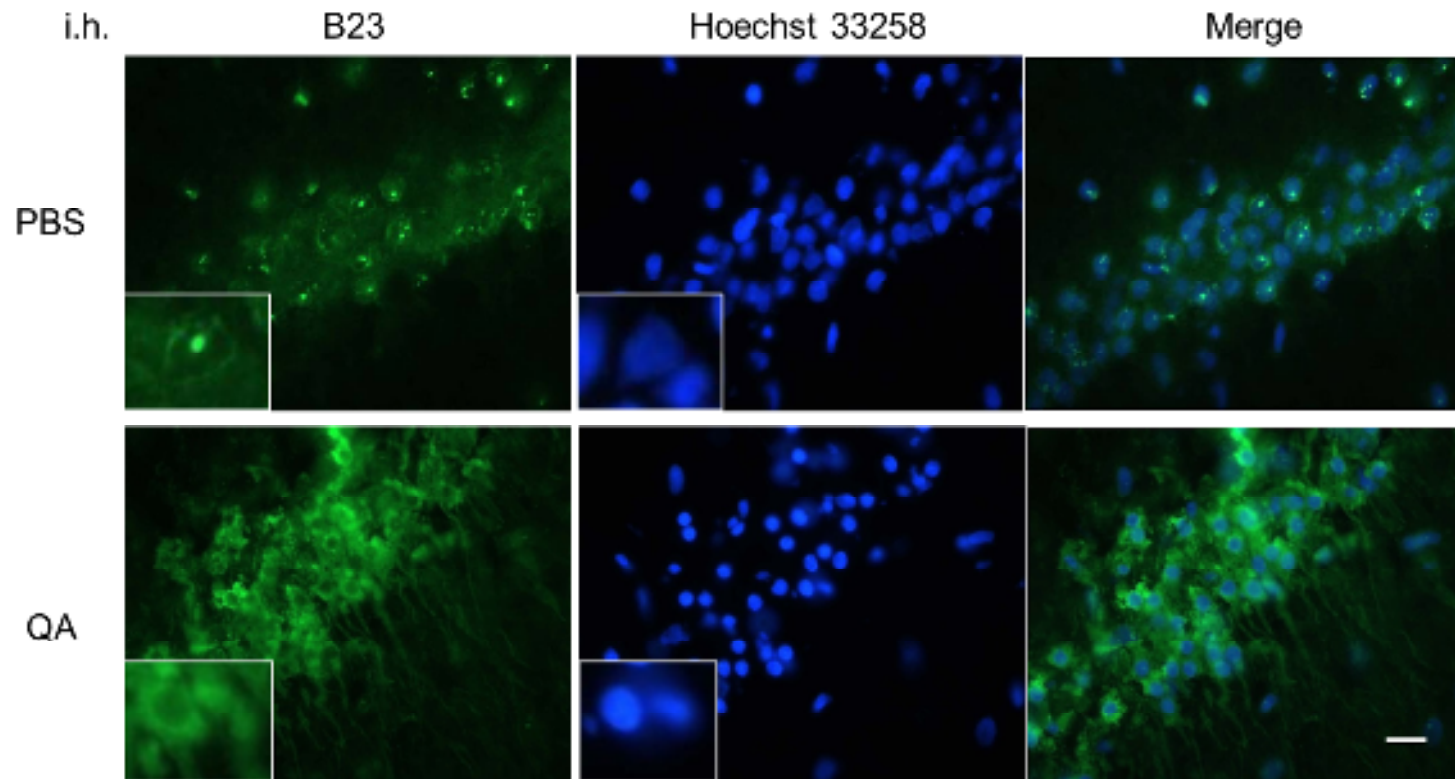


Fig.19 The localization change of B23 in rat hippocampus by QA

50 nmol/ 1 μ L QA was injected in right hippocampus of rat brain. Control (1 μ L PBS pH7.4) was injected in left hippocampus of same brain. After operation the rats were housed in the same environment for 24 hr. And the brain was removed from the rats.

Immunohistochemistry shows the double immunolabeling with anti-B23 protein antibodies done on pyramidal cell of CA1 in rat brain.

Nuclei were stained blue with Hoechst reagent. B23 was transitioned from nucleoli or nuclei to cytosol at QA injected hippocampus.

Scale bar is 20 μ m.

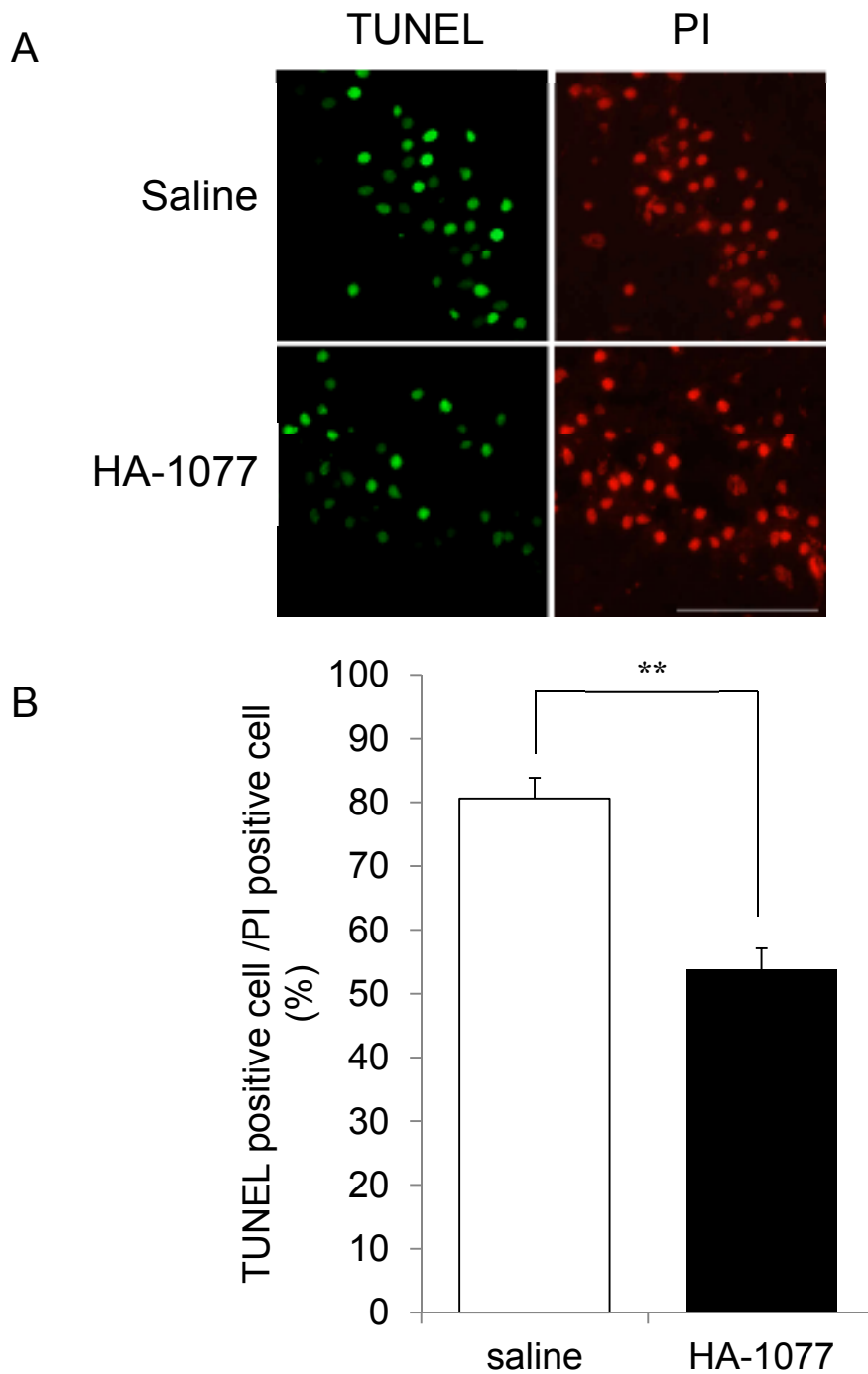


Fig.20 Protection from QA damage by HA-1077 in the CA1 region.

A, TUNEL positive cells were observed less with HA-1077 than without HA-1077 in lateral cerebral ventricle. TUNEL positive cells were seen in the pyramidal layers of the QA-treated hippocampus. B, TUNEL positive cell/PI positive cell (red) was shown. The results are means \pm S.E, n=3. * $p < 0.05$, compared with vs without QA. *t*-test. Scale bar is 50 μ m.

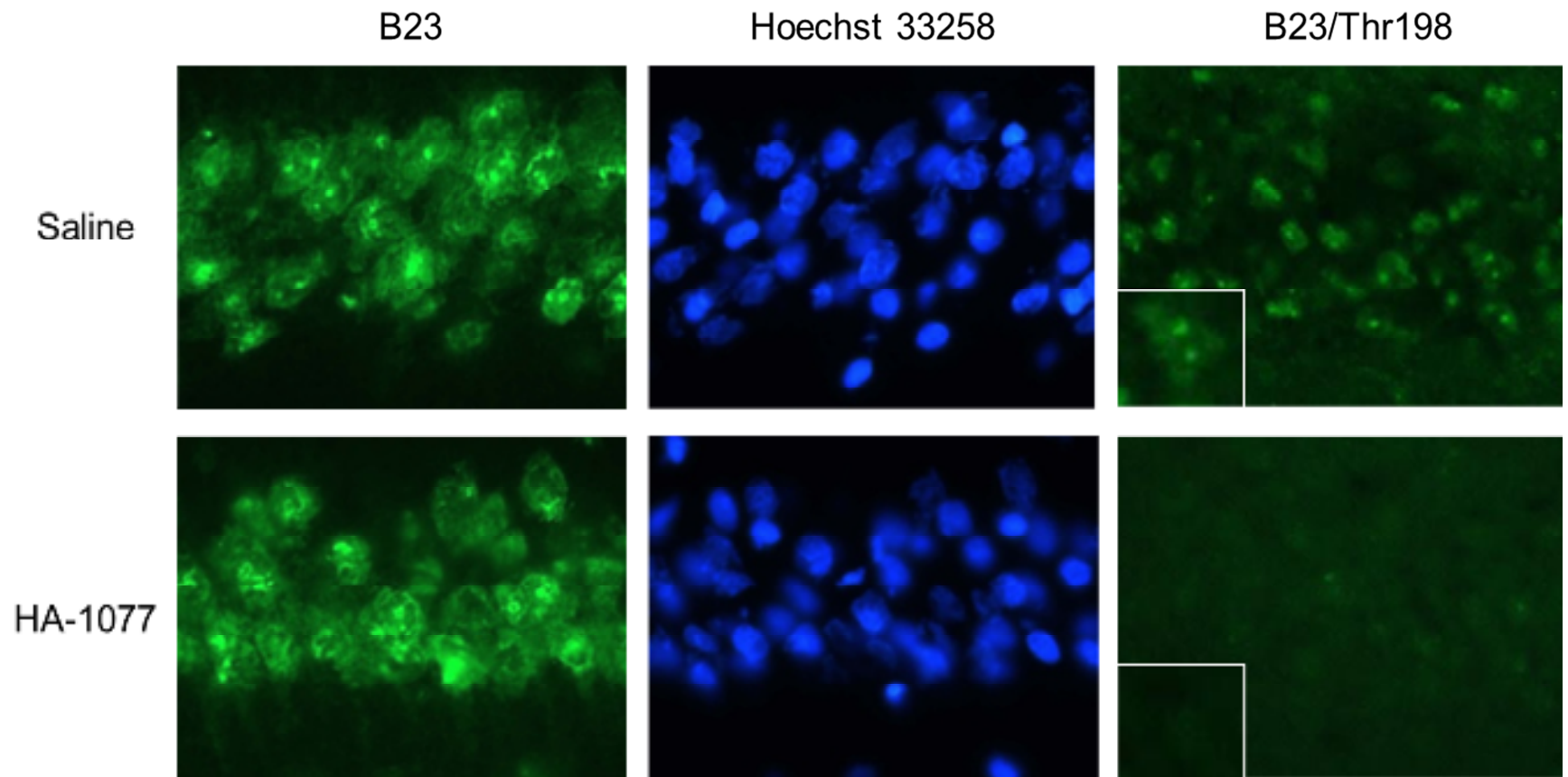


Fig.21 Dephosphorylation of B23/Thr198 by HA-1077 in CA1 region

Immunohistochemistry shows the double immunolabeling with anti-B23 (left green) protein antibodies done on pyramidal cell of CA1 in rat brain. Nuclei were stained blue with Hoechst reagent. B23/Thr198 is immunolabeled with anti B23/Thr198 (right green) protein antibodies on pyramidal cell of CA1 in rat brain. Scale bar is 20 μ m.

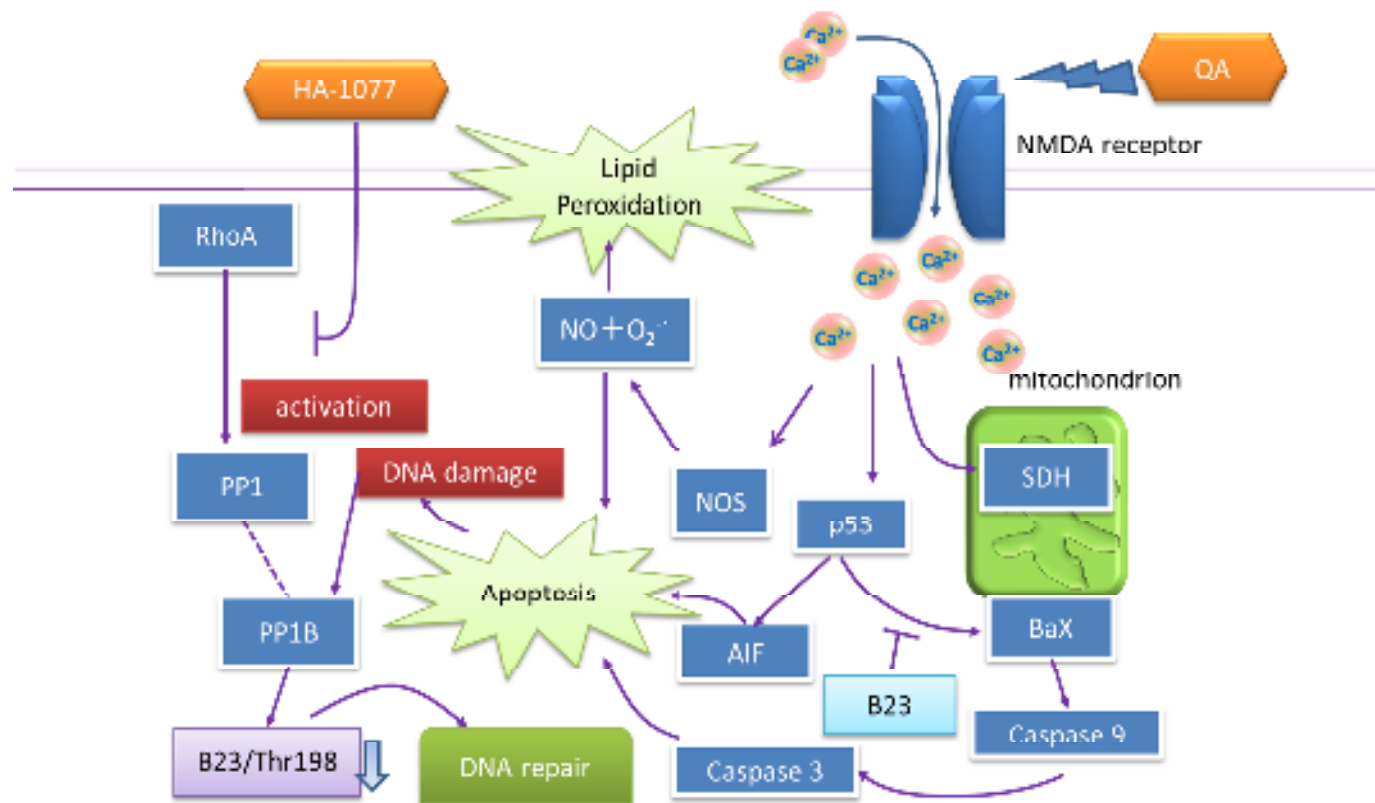


Fig.22 Representation of the mechanisms of the protection from QA-induced damage by HA-1077-induced dephosphorylation of Thr198

QA overstimulated NMDA receptor, Ca^{2+} inflow to intracellular. p53, SDH, NOS are affected by Ca^{2+} . The result raises apoptosis, lipid peroxidation, and DNA damage. However we guess that HA-1077 prevents DNA repair by dephosphorylation of RhoA/ ROCK/ PP1B/ B23/Thr198.

要約

【背景・目的】

B23は多機能性のリン酸化タンパク質で、Thr198のリン酸化(B23/Thr¹⁹⁸)は細胞増殖に関与するとされている。しかし、非増殖細胞、特に中枢神経系でのB23の役割はいまだ不明である。そこで、ニューロンモデル(非増殖細胞)のマウス神経芽細胞腫(NB2a)とラット副腎髄質由来褐色細胞腫(PC-12)、及びマウス・ラットの海馬でB23の役割を検討した。海馬の錐体細胞はニューロン(非増殖細胞)で、神経毒のキノリン酸(QA)に脆弱性を示す。QAは脳梗塞で脳内上昇が認められ、傷害の一因とされるNMDA受容体アゴニストである。現在、脳梗塞治療でRho-キナーゼ阻害剤(HA-1077)投与が用いられており、血管に作用して血管拡張等の脳循環改善が行われる。しかし、ニューロンに対する影響は明らかではない。今回、マウス・ラット海馬にQAを投与したQA損傷モデルを作製し、脳室内HA-1077を投与によるニューロン保護効果とB23の動態について検討した。

【方法・結果及び考察】

《*In vitro*におけるB23の生理機能》

NB2aはpalmitoylcarnitine、PC-12はmNGFで神経分化を起こし、増殖細胞から非増殖細胞にさせた後、神経分化前後のB23とB23/Thr¹⁹⁸の染色を行った。神経分化に関わらずB23は核小体および核質に局在し、B23/Thr¹⁹⁸は核小体に局在していた。さらに、神経分化前後のNB2aでWestern blottingを行ったところ、神経分化後にB23発現量が増加したため、神経分化にB23の発現が必要と考えられた。PC-12を神経分化後に一本鎖B23-antisense DNAを投与してB23発現を抑制し、NMDA刺激を行った。その結果、B23発現を抑制したらアポトーシス割合が増加したため、B23はNMDA刺激によるアポトーシスの抑制に関与することが示唆された。

《*In vivo*におけるB23の生理機能》

マウス・ラット海馬でB23発現と局在を調べるためB23の染色を行った。その結果、海馬(CA1領域)の錐体細胞(ニューロン)でB23は核小体に局在することが明らかとなった。また、海馬にB23-antisenseを投与したところ、アポトーシス割合は増加しなかったため、錐体細胞生存にB23は直接関与しないと考えられた。次に、海馬にQAを、脳室にHA-1077を投与し、海馬損傷を評価した。その結果、HA-1077によって海馬のアポトーシス割合が減少し、HA-1077がニューロンに作用することが明らかとなった。また、HA-1077の単独脳室投与を行ったところ、B23の局在に変化はなかったが、B23/Thr¹⁹⁸の脱リン酸化が生じた。HA-1077のニューロン保護にはB23/Thr¹⁹⁸脱リン酸化が関与していると考えられた。

以上のことから、B23は中枢神経系においてニューロン保護を演じていることが示唆された。

参考文献

1. 厚生労働省老健局, 2015年の高齢者介護. 高齢者介護研究会報告書, 2003/6.
2. 篠原良章, シナプスレベルから見た海馬の左右非対称性. 生化学. 第81巻 第9号.
3. 古市貞一, 分子・細胞・シナプスからみる脳. 2008. シリーズ脳科学 5.
4. Chen, Q., et al., *Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis*. J Neurosci, 2007. **27**(3): p. 542-52.
5. Maharaj, H., D.S. Maharaj, and S. Daya, *Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity*. Metab Brain Dis, 2006. **21**(2-3): p. 189-99.
6. Schwarcz, R. and C. Kohler, *Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid*. Neurosci Lett, 1983. **38**(1): p. 85-90.
7. Le Bouffant, F., et al., *Multiple subcellular localizations of PCTAIRE-1 in brain*. Mol Cell Neurosci, 2000. **16**(4): p. 388-95.
8. Parlato, R., et al., *Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12759-64.
9. Stone, T.W., *Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids*. Pharmacol Rev, 1993. **45**(3): p. 309-79.
10. Ganzella, M., et al., *Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice*. Neurosci Res, 2006. **55**(4): p. 397-402.
11. Schwarcz, R., et al., *Excitotoxic models for neurodegenerative disorders*. Life Sci, 1984. **35**(1): p. 19-32.
12. Lisy, V. and F. Stastny, *Nitric oxide synthase inhibition and glutamate binding in quinolinate-lesioned rat hippocampus*. Physiol Res, 2002. **51**(3): p. 299-307.
13. 福岡伸一, トリプトファン-ニコチンアミド経路の鍵物質であるキノリン酸に関する研究. 総合研究報告書, 平成 16-18 年度.
14. Schwarcz, R., et al., *Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease*. Prog Neurobiol, 2010. **90**(2): p. 230-45.
15. 旭化成ファーマ, エリル®点滴静注射 30 mg. 総合製品情報概要.
16. Gopalakrishnan, S.M., et al., *Role of Rho kinase pathway in chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells*. J Neurosci Res, 2008. **86**(10): p. 2214-26.
17. Sasaki, Y., M. Suzuki, and H. Hidaka, *The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a*

- probing molecule for Rho-kinase-involved pathway*. Pharmacol Ther, 2002. **93**(2-3): p. 225-32.
18. 糸川嘉則, 公衆衛生学. 光生館, 1995.
 19. Orrick, L.R., M.O. Olson, and H. Busch, *Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(5): p. 1316-20.
 20. Chang, J.H., T.S. Dumbbar, and M.O. Olson, *cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences*. J Biol Chem, 1988. **263**(26): p. 12824-7.
 21. Schmidt-Zachmann, M.S. and W.W. Franke, *DNA cloning and amino acid sequence determination of a major constituent protein of mammalian nucleoli. Correspondence of the nucleoplasmin-related protein NO38 to mammalian protein B23*. Chromosoma, 1988. **96**(6): p. 417-26.
 22. Chan, W.Y., et al., *Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth*. Biochemistry, 1989. **28**(3): p. 1033-9.
 23. Maridor, G., W. Krek, and E.A. Nigg, *Structure and developmental expression of chicken nucleolin and NO38: coordinate expression of two abundant non-ribosomal nucleolar proteins*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1049**(2): p. 126-33.
 24. Schmidt-Zachmann, M.S., B. Hugle-Dorr, and W.W. Franke, *A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family*. EMBO J, 1987. **6**(7): p. 1881-90.
 25. Chang, J.H. and M.O. Olson, *A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA*. J Biol Chem, 1989. **264**(20): p. 11732-7.
 26. Lapeyre, B., H. Bourbon, and F. Amalric, *Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(6): p. 1472-6.
 27. Pfaff, M. and F.A. Anderer, *Casein kinase II accumulation in the nucleolus and its role in nucleolar phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 1988. **969**(1): p. 100-9.
 28. Peter, M., et al., *Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase*. Cell, 1990. **60**(5): p. 791-801.
 29. Tokuyama, Y., et al., *Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21529-37.

30. Robbins, J., et al., *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence*. Cell, 1991. **64**(3): p. 615-23.
31. Beckmann, R., et al., *Nuclear substrates of protein kinase C*. Eur J Biochem, 1992. **210**(1): p. 45-51.
32. Spector, D.L., R.L. Ochs, and H. Busch, *Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23*. Chromosoma, 1984. **90**(2): p. 139-48.
33. Biggiogera, M., et al., *Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus*. J Histochem Cytochem, 1989. **37**(9): p. 1371-4.
34. Brady, S.N., et al., *Nucleophosmin protein expression level, but not threonine 198 phosphorylation, is essential in growth and proliferation*. Oncogene, 2009. **28**(36): p. 3209-20.
35. Yung, B.Y., et al., *Effects of actinomycin D analogs on nucleolar phosphoprotein B23 (37,000 daltons/pI 5.1)*. Biochem Pharmacol, 1985. **34**(22): p. 4059-63.
36. Wang, D., H. Umekawa, and M.O. Olson, *Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells*. Cell Mol Biol Res, 1993. **39**(1): p. 33-42.
37. Nishimura, Y., et al., *Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(10): p. 2239-42.
38. Liu, W.H., C.Y. Hsu, and B.Y. Yung, *Nucleophosmin/B23 regulates the susceptibility of human leukemia HL-60 cells to sodium butyrate-induced apoptosis and inhibition of telomerase activity*. Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 765-71.
39. Dhar, S.K. and D.K. St Clair, *Nucleophosmin blocks mitochondrial localization of p53 and apoptosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(24): p. 16409-18.
40. Choi, J.W., et al., *Lysine 263 residue of NPM/B23 is essential for regulating ATP binding and B23 stability*. FEBS Lett, 2008. **582**(7): p. 1073-80.
41. Ahn, J.Y., et al., *Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD*. Mol Cell, 2005. **18**(4): p. 435-45.
42. Nishio, M., Y. Kuroki, and Y. Watanabe, *Role of hippocampal α 2A-adrenergic receptor in methamphetamine-induced hyperlocomotion in the mouse*. Neuroscience Letters, 2003. **341**(2): p. 156-160.

43. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science, 1999. **286** (5439): p. 548-52.
44. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
45. K A Nalecz, J.E.M., U Berent, M J Nalecz, <Effect of palmitoylcarnitine on the.pdf>. nalqczacta neurobiol, 1997. **57**: p. 263-274.
46. Ma, Z., et al., *Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(23): p. 9016-34.
47. Tran, R.T., et al., *Synthesis and characterization of a biodegradable elastomer featuring a dual crosslinking mechanism*. Soft Matter, 2010. **6**(11): p. 2449-2461.
48. Tarapore, P., et al., *Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing*. FEBS Lett, 2006. **580**(2): p. 399-409.
49. 真梨子, 濱., マウス神経芽細胞腫及び血管平滑筋細胞における細胞増殖機構に関する研究. 平成 22 年度 修士論文, 2011.
50. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
51. Greene, L.A. and E.M. Shooter, *The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action*. Annu Rev Neurosci, 1980. **3**: p. 353-402.
52. Lai, H.C., et al., *Neurotrophic effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone: promotion of neurite outgrowth via cAMP/PKA/CREB pathway in PC12 cells*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e28280.
53. Kuroki, Y., et al., *Neuroprotection by estrogen via extracellular signal-regulated kinase against quinolinic acid-induced cell death in the rat hippocampus*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(3): p. 472-6.
54. Ye, K., *PIKE/nuclear PI 3-kinase signaling in preventing programmed cell death*. J Cell Biochem, 2005. **96**(3): p. 463-72.
55. Wang, Y., et al., *p53 induction contributes to excitotoxic neuronal death in rat striatum through apoptotic and autophagic mechanisms*. Eur J Neurosci, 2009. **30** (12): p. 2258-70.
56. Essler, M., et al., *Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21867-74.
57. Ding, J., et al., *Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(8): p. 1083-8.

謝辞

本研究を行うにあたり,終始適切なお指導を賜りました,三重大学生物資源学部栄養機能工学研究室の西尾昌洋講師に心よりお礼申し上げます。同時に,研究全般にわたり,暖かいご助言をいただきました,同研究室教授の梅川逸人先生に深く感謝いたします。

最後に本研究を温かく見守り,協力いただきました,栄養機能工学研究室の皆様に深く感謝いたします。