

平成 30 年度

修士論文

神経細胞死における核小体タンパク質

B23 の役割に関する研究

三重大学

大学院生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻

栄養化学教育研究分野

517M305 鬼頭 健斗

目次

第1章 緒言.....1-9

- 第1項 アルツハイマー型認知症
- 第2項 脳における神経伝達
- 第3項 NMDA 受容体
- 第4項 核小体タンパク B23
- 第5項 B23 とリン酸化
- 第6項 B23 とアポトーシス
- 第7項 MAP キナーゼカスケード
- 第8項 p38 MAP キナーゼ
- 第9項 p38 とアポトーシス

第2章 目的と材料と方法.....10-14

第1節 *In vivo* での NMDA 受容体を介した神経細胞死における B23 の機能

- 第1項 目的
- 第2項 動物・試薬
- 第3項 薬物脳内投与
- 第4項 切片作製
- 第5項 Nissl 染色
- 第6項 TUNEL 染色
- 第7項 蛍光免疫染色

第2節 *In vitro* での NMDA 受容体を介した神経細胞死における B23 の機能

- 第1項 目的
- 第2項 細胞・試薬
- 第3項 細胞培養
- 第4項 神経分化誘導
- 第5項 QA 処理
- 第6項 アンチセンス法
- 第7項 アミノ酸点変異
- 第8項 細胞分画
- 第9項 Western blotting
- 第10項 統計処理

第3章	結果と考察	15-21
第1節	<i>In vivo</i> でのNMDA受容体を介した神経細胞死におけるB23の機能	
第1項	海馬へのQA投与による細胞死の確認	
第2項	海馬へのQA投与によるアポトーシスの確認	
第3項	海馬へのQA投与によるB23の局在変化の確認	
第2節	<i>In vitro</i> でのNMDA受容体を介した神経細胞死におけるB23の機能	
第1項	SH-SY5YのRA処理における神経分化の確認	
第2項	SH-SY5YのQA処理におけるアポトーシス関連タンパク質の発現量確認	
第3項	アンチセンス法を用いたB23発現抑制によるアポトーシス関連タンパク質の発現量確認	
第4項	B23のアミノ酸点変異によるアポトーシス関連タンパク質の発現量確認	
第5項	SH-SY5YのQA処理によるB23の局在変化の確認	
第4章	総合考察	22-24
	図表	25-35
	参考文献	36-40
	謝辞	41

略語一覽

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropinoic acid
APS	Ammonium persulfate
AS	antisense
CAD	Caspase-Activated DNase
CREB	cAMP Response Element Binding protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EMEM	Eagle's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein
GS	Goat Serum
LTP	Long-Term Potentiation
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDM2	Murine Double Minute 2
NaF	Sodium Fluoride
Na ₃ VO ₄	Sodium Orthovanadate
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NoLS	Nucleolus Localization Signal
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	Poly Vinylidene DiFluoride
PP2A	Protein phosphatase 2A
QA	Quinolinic Acid
RA	Retinoic Acid
RT	Room Temperature
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRITC	5/6-Tetramethyl-rhodamine isothiocyanate
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling

第1章 緒言

神経細胞で多く発現している NMDA 受容体は学習・記憶の形成に重要な役割を果たしている。一方で、NMDA 受容体の過剰刺激は、細胞内 Ca^{2+} 濃度を過剰に上昇させ、急性および慢性的な神経細胞死(アポトーシス)を引き起こすことが報告されている。近年、この NMDA 受容体を介したアポトーシスが認知症の一種であるアルツハイマー病の原因の一つであると考えられている。

タンパク質 B23 は、腫瘍細胞などの増殖細胞に多く存在しており、リボソーム生合成・中心体複製・mRNA のプロセッシング・アポトーシス制御などに関与している。また、B23 は核質と細胞質をシャトルし、複数のリン酸化部位を有することから、B23 の局在変化やリン酸化はその機能と密接に関係しているとも言われている。しかし、神経細胞のような非増殖細胞における B23 の機能についてはほとんど報告がない。そこで、本研究では NMDA 受容体を介したアポトーシスにおける B23 の役割の解明を目的とした。

第1項 アルツハイマー型認知症

脳は、私たちのほとんどあらゆる活動をコントロールしている司令塔であり、それがうまく働かなければ、精神活動も身体活動もスムーズに運ばなくなる。厚生労働省の定義では、「認知症は生後いったん正常に発達した種々の精神機能が慢性的に減退・消失することで、日常生活・社会生活を営めない状態」であるとされている¹⁾。認知症の病型で1番多いのがアルツハイマー型認知症で、脳神経が変性して脳の一部が萎縮していく過程でおきる認知症である。年齢、女性、糖尿病が認知症有病率と有意な正の関連を示すことが報告され、将来の性・年齢階級別にみた認知症有病率が算出されている。その報告によると、各年齢層の認知症有病率が2012年以降一定であると仮定した場合、推定認知症患者数は2025年675万人、2040年802万人、2060年850万人であり、時代とともにその数は増加するとされている。さらに、将来認知症の頻度が2012年から2060年までに20%上昇すると仮定した場合、将来の認知症患者数は2025年730万人、2040年953万人、2060年1154万人と推定された。また、認知症の病型別にみるとアルツハイマー病の患者数は、各年齢層の認知症有病率が一定と仮定した場合は2025年466万人、上昇すると仮定した場合は504万人であるとされている。さらに、その患者数は2040年に約550-650万人、2060年に約600-800万人となり、血管性認知症やその他の認知症の患者数に比べ顕著に増加することが報告されている²⁾。

アルツハイマーの原因においては様々な説が述べられているが、近年、カルシウムの過負荷による神経変性や神経細胞死(アポトーシス)が原因の1つであると考えられている³⁾。これらの神経細胞の減少は、シナプス間隙でのグルタミン酸レベルの超過による、N-methyl-D-

aspartate (NMDA)受容体の過剰刺激の結果, 起こるとされている⁴⁾。

第2項 脳における神経伝達

人間の脳で記憶を司っているのは海馬である。海馬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(Fig. 1)⁵⁾。その中でもCA1領域は, NMDA受容体の発現が確認されており, 学習・記憶の形成の根底にあるとされている長期増強 Long-Term Potentiation (LTP)に深く関与しているとされている⁶⁾。

哺乳類の脳における神経伝達は, 主にグルタミン酸がイオンチャンネル型のグルタミン酸受容体を活性化することで行われている。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は, リガンド開口型イオンチャンネルで, 薬理学的特性によってさらに, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)型, カイニン酸型, NMDA型に分類される⁷⁾。

第3項 NMDA受容体

NMDA受容体は学習・記憶の基礎的現象であるシナプスの可塑性の発現に中心的役割を果たしている⁸⁾。また, グルタミン酸の結合により, non-NMDA型受容体は Na^+ や K^+ に高い透過性を示す一方で, NMDA型受容体は Na^+ や K^+ の他に Ca^{2+} に対して高い透過性を示すことが知られている。通常の神経伝達では, 前シナプスからグルタミン酸が放出されシナプス間隙を通して, 後シナプスのAMPA受容体とNMDA受容体に結合する。AMPA受容体の応答は速く, 細胞内に素早く Na^+ を流入させることで神経伝達を行う。一方, NMDA受容体はチャンネル孔が Mg^{2+} により遮断されており, 通常の神経伝達時においてはイオンの透過性を示さない^{9,10)}。この Mg^{2+} による遮断は膜電位依存的であるため, 脱分極状態ではこの遮断は解除される¹¹⁾。つまり記憶形成時におけるNMDA受容体の活性化は, AMPA受容体の持続的な活性化によって Na^+ の細胞内流入が亢進することによる脱分極が必須であると言える。

NMDA受容体は2つのGluN1および2つのGluN2もしくはGluN3から成るヘテロ4量体である^{12,13)}。GluN1は中枢神経系に広く発現し, GluN2A・GluN2Bは成人の大脳皮質, 海馬に, GluN2Cは小脳に, GluN2Dは脳幹に多く発現している¹⁴⁾。Moriらによる同時発現実験の結果によると, 機能性NMDA受容体はチャンネル形成に必要な不可欠なGluN1および, 少なくとも1種のGluN2が必要であることが報告された¹⁵⁾。GluN1にはグリシン結合部位が存在し, グルタミン酸の他にグリシンがco-agonistとして働くことが, NMDA受容体活性化に必須であるとされている¹⁶⁾。

NMDA受容体の過剰刺激は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度を過剰に上昇させ, 急性および慢性的な神経変性を引き起こすことが報告されている¹⁷⁾。NMDA受容体を介したアポトーシスシグナ

ル経路においては、様々な研究がされている。その中でも、システインプロテアーゼである Calpain の増加、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)の増加、がん抑制遺伝子産物 p53 の増加、システインプロテアーゼファミリーである Caspase の増加などが多く報告されている。

NMDA 受容体のリガンドとして働く物質は、グルタミン酸の他にキノリン酸 (QA)などが存在する。QA はハンチントン病¹⁸⁾、虚血、免疫不全において脳内で高濃度に検出され、脳内の QA はグリア細胞において高濃度の合成と放出が行われていると報告されている¹⁹⁾。その他に、NMDA 受容体のアゴニストとして働く物質として NMDA があり、これらはグルタミン酸と非常によく似た構造を持っている(Fig. 2)。

第 4 項 核小体タンパク B23

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²⁰⁾。

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²¹⁻²⁵⁾。ヒト, ラット, マウスでは選択的スプライシングにより B23.1 と B23.2 の 2 種類のアイソフォームが存在することが明らかとなっている²⁶⁾。B23.1 は 294 残基のアミノ酸からなるタンパク質で, B23.1 と B23.2 は C 末端側の 35 のアミノ酸を除き, 同じアミノ酸配列を持っている。また, B23.1 は核質や核小体に発現していることが確認されているが, B23.2 は核質と細胞質のみで発現の確認がされており, B23.1 のみに存在する C 末端側の領域が核小体局在に必要不可欠であるとされている^{27,28)}。さらに, B23 は核質や核小体での発現のみならず, 細胞周期の間で核と細胞質をシャトルするタンパク質であることも報告されている²⁹⁾。B23 の一次構造の特徴は, 分子中央部の 120~132, 158~187 残基に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。さらに配列解析の結果, B23 は核輸送シグナル (NES), 核局在シグナル (NLS), 核小体移行性シグナル (NoLS) を持つことが示された²⁸⁾。先ほども述べたように, wild-type B23 は核小体での局在が確認されている。一方で, NES のミスセンス変異体と欠損変異体においてほとんどが核質にて観察された。これは NES の変異による細胞質への輸送能の欠損の結果, B23 が核内に過剰に蓄積することを意味している³⁰⁾。また, NLS の変異体では核質における B23 の局在が消失し, 細胞質と核小体において局在が確認され, NoLS の変異体では核小体での局在は確認されなかった³¹⁾。これらは NES, NLS, NoLS が B23 の細胞内での機能・局在に必要不可欠であることを示している。

第 5 項 B23 とリン酸化

タンパク質のリン酸化と脱リン酸化は, 翻訳後修飾の 1 種で, 多種多様な生理学的・病理学的プロセスの制御に関与している³²⁾。リン酸化が発生するアミノ酸残基はセリン, スレオニン, チロシンの 3 種類で, これ以外のアミノ酸では発生しない。B23 はリボソーム生合成³³⁾, 中心体の複製³⁴⁾, mRNA のプロセッシング³⁵⁾, アポトーシスの制御³⁶⁾などに関与する多機能タンパク質として知られているが, リン酸化タンパク質としても知られている。現在までに 9 ヶ所のリン酸化部位が報告されており, ヒト B23.1 では, Ser4, Ser125, Thr199, Thr219, Thr234, Thr237 の 6 ヶ所はすでにリン酸化を受けるキナーゼが特定されている³⁷⁾。

当研究室向井により B23 のアミノ酸配列のうち 198 番目の Thr のリン酸化が脳における神経保護作用に関与していることが明らかとなった³⁸⁾。なお、マウスとヒトでは配列が一つずれるためマウスでは Thr は 198 番目であるが、ヒトでは 199 番目となる。また、電離放射線による DNA の損傷後の修復にユビキチンと 199 番目の Thr がリン酸化された B23 との結合が関与しているという報告や放射線刺激により誘発されたアポトーシス細胞において B23 の 199 番目の Thr のリン酸化がアポトーシス因子 p53 に対し阻害的に働いているという報告がされている³⁹⁾。

第 6 項 B23 とアポトーシス

B23 はアポトーシスの制御において重要な役割を担っている。いくつかの増殖細胞において、B23 の発現低下が細胞のアポトーシスを増感させ、発現量の増加がアポトーシスに対する細胞保護作用を示すことが報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。それらに関連して、B23 と相互作用することや B23 の発現量を制御することで細胞生存に影響を与えるタンパク質がいくつか特定されている。腫瘍抑制因子の p14^{ARF} は B23 との相互作用によりタンパク質の分解を促進することで細胞死を誘導する⁴³⁾。しかし、B23 が p14^{ARF} の主要な細胞内リザーバーとして作用していることも報告されている。細胞が刺激を受けると、B23 が p14^{ARF} を遊離させ MDM2 との結合を可能にすることで、p53 のプロテアソーム分解を阻害する⁴⁴⁾。p53 は定常状態では、プロテアソームによって恒常的に分解され、細胞内での発現量は非常に低く保たれている。しかし DNA 傷害などの細胞ストレスに応じて p53 は安定化し、発現が増強する⁴⁵⁾。また、p53 に特異性が高く、安定性を制御する重要なリガーゼとして MDM2 が知られている。siRNA による B23 mRNA との結合しそのタンパク質発現が減少する結果、遊離 p14^{ARF} 量の増加が起こり、アポトーシスが亢進することが報告されている⁴⁴⁾。これに反して、B23 の発現増加は p14^{ARF} と拮抗し、p14^{ARF} 局在を保持することがアポトーシスの抑制につながることを示された⁴⁶⁾。また、その他の研究の報告では B23 が MDM2 と p14^{ARF} 非依存的に直接相互作用することが可能で、B23 は p53 と MDM2 の複合体の形成に対して阻害作用を示すことや⁴⁷⁾、B23 が p53 と直接会合することが報告されている⁴⁸⁾。一方で、B23 が p53 と直接相互作用を持たないという報告もあり⁴³⁾、B23 と p53 の相互作用はある一定の状況でのみ起こる可能性が示唆された。

内因性のアポトーシス応答において、p53 はミトコンドリアでのシトクロム C の放出を引き起こすことが知られている。B23 の過剰発現が、p53 の核からミトコンドリアへの移行を阻止する報告もあり、p53 のミトコンドリアでの発現を減少させることによりアポトーシスから細胞を保護する可能性が示唆された⁴⁹⁾。同様に、B23 が細胞質の caspase-6, caspase-8 のタンパク質分解能を直接阻害することによってアポトーシスを抑制することが報告されており⁵⁰⁾、B23 の細胞質の画分がアポトーシス経路の制御に必要であることが示唆された。

第7項 MAPK カスケード

MAPK カスケードは、Raf (MAPKKK)-MEK (MAPKK)-MAPK という3種類のリン酸化酵素(キナーゼ)によって構成されるシグナル伝達モジュールであり、出芽酵母からヒトに至る全ての真核生物に相同な分子が存在する細胞内情報伝達の根幹をなすシステムである。ヒトを代表とする哺乳類細胞には、主に増殖因子によって活性化され細胞増殖や分化を制御するERK 経路、ストレス応答 p38 経路および JNK 経路という3種類の MAP キナーゼカスケードが存在する。この中でも p38 および JNK 経路は紫外線や放射線、酸化、熱ショック、高浸透圧などの様々な環境ストレス刺激によって活性化され、ストレスを被った細胞に細胞死(アポトーシス)を誘導し、炎症性サイトカインや病原体の感染などによっても活性化され、免疫応答や炎症の制御に中心的な役割を果たしている。これら複数の MAPK 経路が正しく制御されることで、人体の恒常性が維持されており、MAPK 経路に何らかの制御異常が起こってしまうと、癌、アレルギーや自己免疫疾患(関節リウマチ、喘息等)、糖尿病や神経変性疾患(アルツハイマー病、パーキンソン病等)などの疾病になってしまうことが知られている⁵¹⁾。

現在、多くの製薬企業によってストレス応答 MAPK 経路の選択的阻害剤が開発され、臨床試験が開始されており、関節リウマチ、神経変性疾患や2型糖尿病などに対する新たな分子標的治療薬としての可能性が大きく注目されている。しかしながら、MAPK カスケードの活性制御機構や生理機能には、未だ不明な点が数多く残されており、また疾患における制御異常の詳細も明らかにされていない。これらの問題の解明は生物学的に極めて重要であるばかりでなく、癌、アレルギー・自己免疫疾患、神経変性疾患や糖尿病などを始めとする様々な難治性疾患の病因・病態の理解と、新たな分子標的治療薬開発の観点からも必要不可欠である。

第8項 p38 MAPK

p38 MAPK は、サイトカインおよびストレスに対する細胞応答を制御するシグナル伝達カスケードに参与する。哺乳動物には、p38 α (MAPK14)、 β (MAPK11)、 γ (MAPK12 / ERK6) および δ (MAPK13/SAPK4)の4つの p38 MAPK のアイソフォームが同定されている。SAPK/JNK 経路と同様に、p38MAPK は、浸透圧ショック、炎症性サイトカイン、リポ多糖(LPS)、紫外線、成長因子を含む様々なリガンドまたは細胞ストレスによって活性化される。さらに、酸化ストレスおよび GPCR 刺激は間接的に p38 を活性化する。p38MAPK は、いくつかのキナーゼ、転写因子およびサイトゾルタンパク質を含む下流標的を調節する。これらのキナーゼには、MAPKAPK2、MAPKAPK3、PRAK、MSK1 および MNK1/2 が含まれる。p38 にリン酸化されるいくつかの重要な転写因子には、腫瘍抑制タンパク質 p53、CHOP (C/EBP-相同タンパク質)、STAT1(転写-1 のシグナルトランスデューサーおよび活性化因

子), CREB(cAMP 応答配列結合タンパク)および Max/Myc 複合体等。p38MAPK 経路は、転写および翻訳レベルで炎症性サイトカインの生合成にとって重要な調節因子である。これにより、この経路の異なる成分が自己免疫疾患および炎症性疾患の治療の標的となる⁵²⁾。

第9項 p38 とアポトーシス

紫外線などの DNA 損傷によって、p53 依存的に発現誘導される PP2C 類似ホスファターゼ Wip1(PPM1D)が、p38 や p53 を脱リン酸化して、これらの分子の活性を阻害し、DNA 損傷後のアポトーシスを抑制することが報告されている⁵³⁾。

また、低酸素などの特定のストレス刺激によって一過性に形成される細胞質内構造体であるストレス顆粒が、MTK1 の活性化促進分子(RACK1)を顆粒内に取り込んでその機能を阻害し、MTK1-p38/JNK 経路を失活させて、DNA 損傷によるアポトーシスを強く抑制する事が報告されている⁵⁴⁾。

さらに近年、p38 経路の活性化が癌遺伝子の不活性化によって誘導される癌細胞特異的なアポトーシスに最も重要であり、癌遺伝子をターゲットとした分子標的治療において、癌細胞の排除に中心的な役割を果たすシグナル伝達システムであることなどが相次いで報告されている⁵⁵⁾。

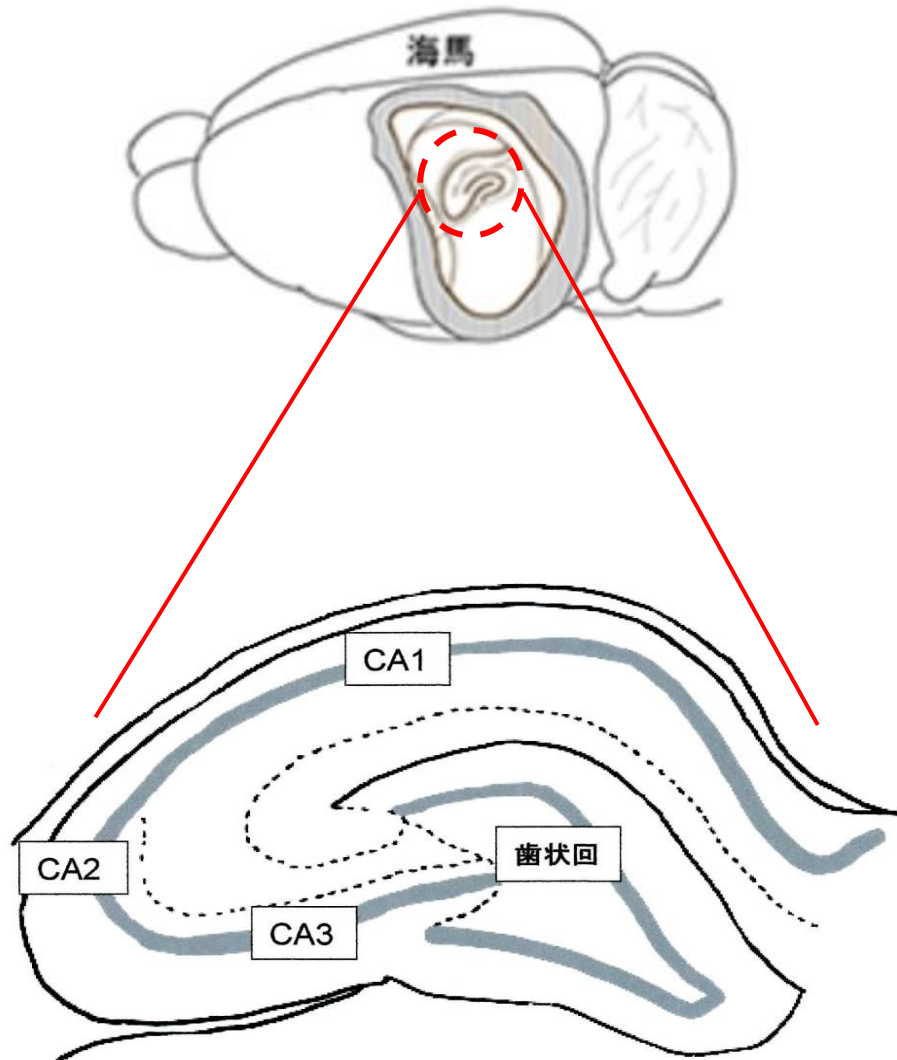
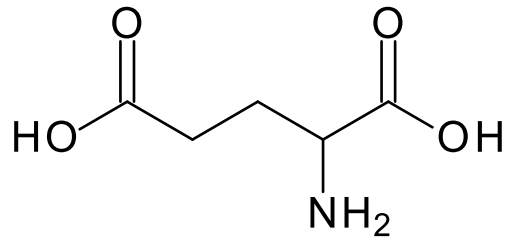
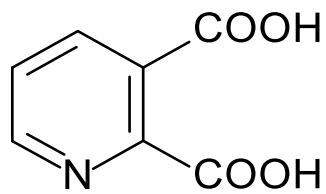


Fig. 1 海馬体における各領域

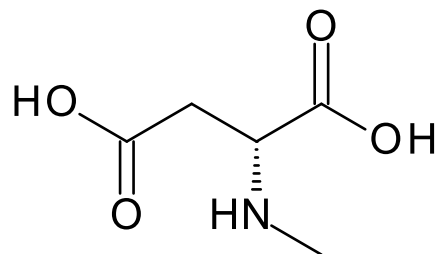
参考: http://www.riken.jp/~media/riken/pr/press/2013/20130404_1/note1.jpg



L-グルタミン酸



QA : キノリン酸



NMDA

Fig. 2 NMDA 受容体のリガンド・アゴニスト構造式

第2章 目的と材料と方法

第1節 *In vivo*での NMDA 受容体を介した神経細胞死における B23 の機能

第1項 目的

NMDA 受容体の過剰な活性化は、アルツハイマー型認知症の原因の 1 つであると考えられており、海馬の中でも CA1 領域は、NMDA 受容体および B23 の発現も確認されている⁵⁶⁾。そのため、本実験ではマウス海馬 CA1 領域への QA 投与によるアポトーシスに対する B23 の機能を明らかにすることを目的に実験を行った。

第2項 動物・試薬

ddY 系雄性マウス(6 週齢)(日本エスエルシー)を購入後、22°C±2°C、明暗 12 時間(7:00～19:00 点灯)、自由摂取で、1 週間予備飼育を行った。

イソフルラン(和光純薬)、マリノール(松浪硝子工業)、MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct(MBL)、Histo VT One(ナカライ)、GS(Equitech-Bio)、DAPI(同仁化学研究所)、SlowFade® Gold antifade reagent(Thermo Fisher)

第3項 薬物脳内投与

マウスへの薬物脳内投与は、脳定位固定装置を用いて、麻酔下で行った。麻酔は、イソフルランを Univentor 400 Anaesthesia Unit(Univentor)で気化させることによって行った。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脳を露出させた。26G 針付きハミルトンシリンジにて海馬(-2.8 mm posterior from bregma, -2.7 mm from midline, 2.0 mm from the brain surface)に QA(50 mM)を 1 µL、1 min かけて投与し、1 min 維持した。その後針を抜き、頭皮を縫合して 1 日通常飼育した。

第4項 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、右心耳を切除した。生理食塩水を 30 mL で灌流後、4%パラホルムアルデヒド/PBS 30 mL で灌流固定した。脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド/PBS 中にて 4°Cで一晩固定した。翌日、10 mL PBS に 30 min 浸し、同量の PB に交換したのち 30 min 浸して洗浄した。続いて、脱水処理に移行した。70% エタノールに 4°Cで一晩浸した。翌日、エタノール(80%, 90%, 99%, 100%, 100%:各 1 h)に浸した。次にキシレンに 15 min×3 浸し、透徹処理を行った。包埋カセットに脳組織を入れ、パラフィンに 62°Cで 45 min×2 浸した。その後、包埋処理を施した。

切片の作製はマイクロームを用いて行った。切片の厚さは 14 µm で作製し、恒温槽 42°Cで伸展させた。その後、スライドガラスに張り付け、37°Cの乾燥庫内で一晩乾燥させた。

切片をキシレンに 5 min×3, 続いてエタノールに 100%, 100%, 90%, 70%の順に各 3 min 浸し, 脱パラフィンを行った。その後, 超純水にて水洗いした。

第5項 Nissl 染色

脱パラフィン処理後, 0.1% Cresyl violet 溶液に 15 min 染色後, 95% エタノールに数秒×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。

第6項 TUNEL 染色

脱パラフィン処理後, PBSを組織に乗せ, 37°Cで 30 min 反応させた。PBSを取り払い, 100 µL の proteinase K solution を組織に乗せ, 37°Cで 30 min 反応させた。反応終了後, 超純水に 2 min×4 回浸し, 洗浄後, 50 µL の TdT buffer II を組織に乗せ, RT で 10 min 反応させた。TdT buffer II を取り払い, 50 µL の TdT solution を乗せ, 37°Cで 60 min 反応させた。TdT solution を取り払い, TB solution を 100 µL を組織に乗せ, RT で 15 min 反応させた。反応終了後, 超純水に 2 min×4 回浸し, 洗浄した。対比染色のために, 0.5 mg/mL の DAPI を 50 µL 組織に乗せ, 4°Cで 15 min 反応させた。反応終了後, PBSに 5 min 浸し, 洗浄した。最後に SlowFade® Gold antifade reagent を 1 滴落とし, カバーガラスをマウントし蛍光顕微鏡で観察した。

第7項 蛍光免疫染色

脱パラフィン処理後, Histo VT One に浸し 90°Cで 40 min 反応させた。室温除冷後, T-TBS で 5 min×3 回洗浄した。0.1% TritonX-100/TBS を添加, RT で 15 min 透過処理を行った。T-TBS で 5 min×3 回洗浄後, 2% GS/T-TBS でブロッキングを RT で 30 min 行った。2% GS/T-TBS を除去後, Anti-B23 polyclonal antibody(1/500)を乗せて, RT で 2 h 反応させた。T-TBS で 5 min×3 回洗浄後, Anti-rabbit IgG antibody(TRITC)(1/500)を乗せて, RT で 1 h 反応させた。T-TBS で 5 min×3 回洗浄後, 核染色のため 0.5 µg/mL の DAPI をのせて 3 min 反応させ後, T-TBS で 5 min×3 回で洗浄した。最後に SlowFade® Gold antifade reagent を 1 滴落とし, カバーガラスをマウントし蛍光顕微鏡で観察した。

第2節 *In vitro* での NMDA 受容体を介した神経細胞死における B23 の機能

第1項 目的

B23 は増殖細胞で発現が多く見られ、アポトーシスにおける B23 の研究が数多く報告されている。しかし、神経細胞などの非増殖細胞での B23 とアポトーシスの関係性の報告はほとんどされていない。

本実験では、*In vitro* での NMDA 受容体を介した神経細胞死における B23 の機能について検討した。実験には神経細胞モデルとして幅広く使用されているヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を使用した。

第2項 細胞・試薬

SH-SY5Y(RIKEN Cell Bank), EMEM(日水製薬), Ham's F-12(日水製薬), FCS (Biowest), L-Alanyl-L-Glutamine(ナカライ), NEAA(ナカライ), Trypsin/EDTA(ナカライ), Skim Milk(ナカライ), QA(Wako), PAS, RA(Wako), jetPRIME®(Polyplus), SlowFade® Gold antifade reagent(Invitrogen), PVDF Blotting Membrane(GE Healthcare Life science), Anti-β-Actin Rabbit pAb(MBL), Anti-Rabbit IgG (H+L chain)-HRP(MBL), Anti B23 Rabbit pAb(当研究室作製), p38 MAPK Rabbit mAb(SIGMA), Phospho-p38 MAPK (Thr180/Thr182) (D3F9)XP® Rabbit mAb(Cell Signaling Technology), NPM1 Monoclonal Antibody(当研究室作製), ECL Western Blotting Substrate(Thermo Fisher scientific)

第3項 細胞培養

SH-SY5Y は 15% FCS, 1% 非必須アミノ酸(NEAA), 2 mM L-Alanyl-L-Glutamine を含む EMEM/Ham's F-12 中で培養, 37 °C, 5%CO₂ インキュベーター内で維持した。

継代操作は、細胞がセミコンフルエントの状態で行った。細胞を PBS(Table 1) で洗浄後, Trypsin/EDTA で剥がした。細胞を遠心分離(1000 rpm, 5 min, 4 °C)し, 上清除去後, 沈殿を上記培地で懸濁し, 100 mm dish で培養した。

第4項 神経分化誘導

6 well dish に SH-SY5Y を 1×10^5 cells/dish で播種した。24 時間培養後, 2% FCS, 1% NEAA, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamine, 10 μM レチノイン酸 Retinoic Acid(RA)を含む EMEM/Ham's F-12 に培地交換した。培地交換は 48 時間おきに行い, 8 日間培養したのち実験に使用した。

第5項 QA 処理

分化誘導後の SH-SY5Y を Mg²⁺ Free Locke's buffer(Table 1) で 1 回洗浄した。その後,

Mg²⁺ Free Locke's buffer 中で QA は 100 μM となるよう加え, 3 h 反応させた。反応終了後, 上清を除き, 1 mL の cold PBS で 3 回洗浄した。Dish あたり 50 μL の Lysis buffer(Table 1)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砕してタンパク抽出溶液とした。抽出液のタンパク濃度は, Bradford 法により測定した。測定後, Sample buffer(5×)(Table 1)を加え, 100°C, 5 min で加熱したものをサンプルとして使用した。

第6項 アンチセンス法

アンチセンス法は jetPRIME®を用いて行った。

6 well Dish に SH-SY5Y を 1×10⁵ cells/dish で播種し, 24 時間培養した。2 μg のアンチセンス RNA を jetPRIME buffer 200μL に加え, ボルテックスし, スピンダウンした。jetPRIME 4 μL を加え, ボルテックスし, スピンダウンして, RT にて 10 min 反応させた。反応終了後, Dish あたり 200 μL のトランスフェクション混合液を加え, 72 時間培養した。

第7項 アミノ酸点変異

B23 アミノ酸配列の 199 番目の Thr を Ala に変異させ, pcDNA(Fig. 3)に組み込んだ B23 mutant in pcDNA は三重大学医学系研究科河野光雄先生の指導のもと作製した。B23 mutant との比較のために B23 のアミノ酸配列を変異させていない B23 intact in pcDNA も作製した(Fig. 4)。

以下に B23 のアミノ酸配列を示す(Fig. 5)。

第8項 トランスフェクション

トランスフェクションは jetPRIME®を用いて行った。

6 well dish に SH-SY5Y を 1×10⁵ cells/dish で播種し, 24 時間培養した。2 μg の DNA を jetPRIME buffer 200μL に加え, ボルテックスし, スピンダウンした。jetPRIME 4 μL を加え, ボルテックスし, スピンダウンし, RT にて 10 min 反応させた。反応終了後, Dish あたり 200 μL のトランスフェクション混合液を加え, 24 時間培養した。24 時間培養後, EMEM/Ham's F-12(2 mM L-AQ, 1% NEAA, 100 μg/ml G418)に培地交換して, 24 時間培養した。

第9項 細胞分画

分化誘導後の SH-SY5Y を Mg²⁺ Free Locke's buffer で 1 回洗浄した。その後, Mg²⁺ Free Locke's buffer 中で QA が 100 μM となるよう加え, 3 h 反応させた。反応終了後, 上清を除き, 1 mL の cold PBS で 3 回洗浄した。洗浄後, 細胞を Trypsin/EDTA で剥がし, 遠心分離 (1000 rpm, 5 min, 4 °C)した。沈殿を 40 μL の CSK buffer(Table 1)で懸濁し, ボルテックス 10 s, 5 min インキュベートを 2 回繰り返した。これを遠心分離(600 rcf, 5 min)し, 上清画分には Sample buffer(5×)10μL を加え, 沈殿画分には CSK buffer 40 μL および Sample buffer(5×)10μL を加え, それぞれボルテックスし, スピンダウンして, 100°C, 5 min で加熱した

ものをサンプルとして使用した⁵⁷⁾。

第10項 Western Blotting

10% ポリアクリルアミドゲルにタンパク量が 30 $\mu\text{g}/\text{well}$ となるようにサンプルをアプライした。電気泳動はゲル一枚につき 30 mA の定電流で行い、サンプルがゲルの端に来るまで Running buffer (Table1)中にて行った。泳動中にゲルと同じ大きさの PVDF 膜と濾紙を準備した。PVDF 膜はメタノールにて親水処理を行った後、Blotting buffer(Table 1)中で浸透させた。濾紙はメタノールに浸さず、Blotting buffer 中で浸透させた。泳動終了後、ウエット式転写装置(BIO-RAD)を用い、200 mA, 1.5 h で転写した。転写終了後、PVDF 膜を 1% Skim milk/T-TBS に浸し、RT, 1 h で Blocking を行った。Blocking 終了後、一次抗体反応(Anti β -Actin, 1/3000, Anti B23, 1/3000, Anti p38, 1/3000, Anti p-p38, 1/2000)を RT, 2 h で行った。T-TBS(Table 1)で 10 min \times 3 回洗浄後、二次抗体(Anti Rabbit IgG, 1/3000)と RT, 1 h 反応させた。T-TBS で 10 min \times 3 回洗浄後、ECL を用いて検出を行った。

第11項 統計処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差検定は 2 群間の比較は student-*t*-test, 3 群間の比較は Turkey-test によって評価し、*p* 値が 0.05 未満であるとき有意であると評価した。

第3章 結果と考察

第1節 *In vivo*でのNMDA受容体を介した神経細胞死におけるB23の機能

第1項 海馬へのQA投与による細胞死の確認

海馬CA1領域へのQA投与が細胞死を誘導するのか、Nissl染色により確認した。Nissl染色は、神経細胞に特有であり、タンパク合成に重要な役割を果たしているニッスル小体を染色する方法である。Nissl染色の結果、control群と比較してQA投与群でNissl染色陽性細胞の減少を確認した(Fig. 6)。

QA投与群でNissl染色陽性の細胞が減少したことから、QA投与により生細胞数が減少したと考えられ、QAによりCA1領域において細胞死が誘導されたと判断した。

第2項 海馬へのQA投与によるアポトーシスの確認

海馬CA1領域へのQA投与が細胞死を誘導することが確認できたため、その細胞死がアポトーシスによるものであるか、TUNEL染色により確認した。TUNEL染色は、アポトーシスの過程で損傷したDNAを検出する方法である。TUNEL染色の結果、control群と比較してQA投与群でTUNEL染色陽性細胞の増加を確認した(Fig. 7)。

QA投与群でTUNEL染色陽性の細胞が増加したことから、QAにより誘導される細胞死はアポトーシスによるものであると考えられ、QAによりCA1領域においてアポトーシスが誘導されたと判断した。

第3項 海馬へのQA投与によるB23の局在変化の確認

海馬へのQA投与時のB23の局在を蛍光免疫染色により確認した。染色の結果、CA1領域の錐体細胞層においてcontrol群ではB23の核での局在を確認した。一方で、QA投与群においては核以外の細胞質においてもB23の局在が確認できた(Fig. 8)。

B23は機能により局在変化するタンパク質として知られている。B23のアポトーシス制御機構に関しては、いくつかの報告があるが、細胞質への移行がアポトーシス制御に関与していることが報告されており⁵⁰⁾、今回の結果は、B23がアポトーシスに対する抵抗性を示す可能性を示唆する結果となった。

第 2 節 *In vitro* での NMDA 受容体を介した神経細胞死における B23 の機能

第 1 項 SH-SY5Y の RA 処理における神経分化の確認

SH-SY5Y は、神経分化により神経突起の伸長が起きることが報告されている⁵⁸⁾。そのため、細胞の形態観察を行った。形態観察の結果、神経細胞の特徴である神経突起の伸長が観察できたため、分化は正常に行われた(Fig. 9)。

第 2 項 SH-SY5Y の QA 処理におけるアポトーシス関連タンパク質の発現量確認

アポトーシスのシグナル伝達経路では、様々な分子の活性化が確認されている。活性化された分子は、自身の下流に存在する分子を活性化することで、アポトーシスシグナルの伝達に関与している。

本実験では、アポトーシス誘導時に発現量の増加が報告されている⁵⁹⁾リン酸化 p38 MAPK(p-p38)をアポトーシスの指標とし、Western blotting にて発現量の確認を行った。また、内部標準として p38 を使用した。実験の結果、分化誘導後の SH-SY5Y に対する QA 処理群において、control 群と比較して p-p38 の発現量の有意な増加を確認した(Fig. 10)。この結果は、QA 処理が SH-SY5Y のアポトーシスを誘導することにより、アポトーシスのシグナル経路を活性化したことによるものであると考えられる。

第 3 項 アンチセンス法を用いた B23 発現抑制によるアポトーシス関連タンパク質の発現量確認

アンチセンス法とは、標的とする mRNA の塩基配列がわかっている場合、それに相補的な DNA もしくは RNA を用いてタンパク質合成を阻害する手法のことである。

SH-SY5Y において、QA 処理による p-p38 の発現量増加を確認したため、次にアンチセンス法により B23 のタンパク質発現を抑制した SH-SY5Y への QA 処理による p-p38 の発現量を Western blotting にて確認した。また、内部標準として β actin および p38 を使用した。

まず初めに、アンチセンス法により B23 の発現抑制を行った。実験の結果、アンチセンス法により B23 の発現量の有意な減少を確認した(Fig. 11)。また、その時の p-p38 の発現量の有意な増加を確認した(Fig. 12)。これらの結果から、B23 が QA 処理による p38 のリン酸化を阻害していると考えられる。

第 4 項 B23 のアミノ酸点変異によるアポトーシス関連タンパク質の発現量確認

B23 の 199 番目の Thr のリン酸化は神経保護作用に関与していることが報告されており、199 番目の Thr のリン酸化が QA によるアポトーシスに抵抗性を示すか検討するために、B23 の野生型(intact)および 199 番目 Thr を Ala に変異させた変異型(mutant)を SH-SY5Y において発現させ、QA 処理による p-p38 の発現量を Western blotting にて確認した。また、内部標準として p38 を使用した。

まず初めに、B23 の intact および mutant が発現しているか確認を行った。実験の結果、B23 in pcDNA のトランスフェクションによる B23 の発現量の有意な増加を確認した(Fig. 13)。また、B23 mutant を発現させた群に対し、B23 intact を発現させた群において QA 処理による p-p38 の発現量が減少傾向を示した(Fig. 14)。これらの結果から、B23 の 199 番目の Thr のリン酸化はアポトーシスに対して抵抗性を示す可能性が示唆された。

第 5 項 SH-SY5Y の QA 処理による B23 の局在変化の確認

B23 は核質、細胞質をシャトルするタンパク質であり、その機能に応じて局在変化が起こることが報告されている⁶⁰⁾。本実験では、QA によるアポトーシス誘導時の B23 の局在変化を Western blotting にて確認した。また、内部標準として β actin を使用した。実験の結果、QA 処理群において、control 群と比較して B23 の発現量が細胞質では有意に増加し、核質では有意に減少した(Fig. 15)。この結果から、QA 処理によるアポトーシスが誘発した際、B23 は核質から細胞質に局在変化すると考えられる。

第 3 章,第 1 節,第 3 項でも述べたように B23 の核質から細胞質への移行がアポトーシス制御に関与していることが報告されており⁵⁰⁾、今回の結果は、B23 がアポトーシスに対する抵抗性を示す可能性を示唆する結果となった。

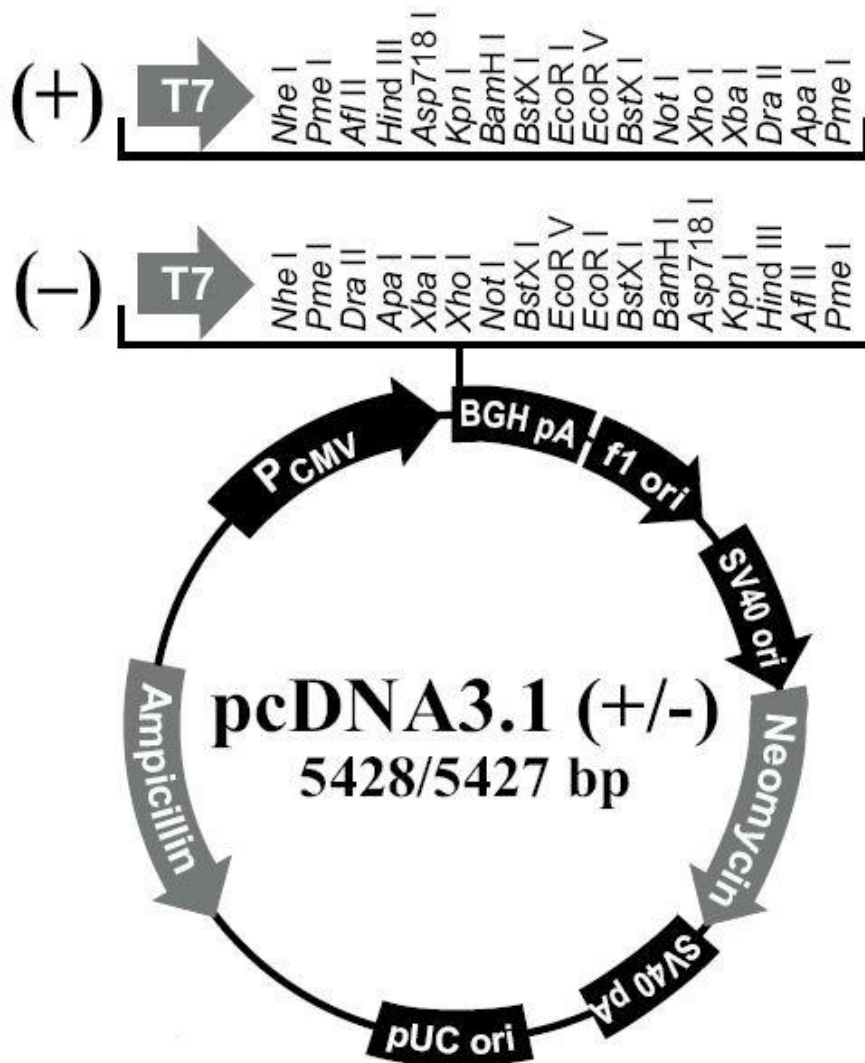


Fig. 3 pcDNA Vector



Fig. 4 B23 in pcDNA

(a: intact b: mutant)

MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSLRTV
SLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVTLATLKMSVQPTVSLGGFEITPP
VVLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAEESEDEDEEDVKLLGMSGKRSAP
GGGNKVPQKKVKLDEDDDEDEDEDEDEDDDDDDDFDEEETEEKVPV
KKSVRDTPAKNAQKSNQNGKDLKPSTPRSKGQESFKKQEKTPTPKGPSS
VEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLWQWRKSL

MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSLRTV
SLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVTLATLKMSVQPTVSLGGFEITPP
VVLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAEESEDEDEEDVKLLGMSGKRSAP
GGGNKVPQKKVKLDEDDDEDEDEDEDEDDDDDDDFDEEETEEKVPV
KKSVRDAPAKNAQKSNQNGKDLKPSTPRSKGQESFKKQEKTPTPKGPSS
VEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLWQWRKSL

Fig. 5 B23 のアミノ酸配列

(上: 変異前の配列 下: 変異後の配列)

Table 1. 試藥組成

PBS	138 mM NaCl 2.7 mM KCl 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1.47 mM KH ₂ PO ₄
Mg ²⁺ Free Locke's buffer (pH7.4)	154 mM NaCl 5.6 mM KCl 3.6 mM NaHCO ₃ 2.3 mM CaCl ₂ 5.6 mM glucose 10 mM HEPES 10 μM glycine
Lysis buffer	50 mM Tris-HCl (pH7.4) 150 mM NaCl 0.1% TritonX-100 0.1% Deoxycholic Acid 0.1% SDS 1 mM EDTA 10 μg/mL aprotinin 10 μg/mL leupeptin 1 mM PMSF 10 mM NaF 50 mM Na ₃ VO ₄
CSK buffer	10 mM PIPES (pH6.8) 100 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 0.5% TritonX-100 0.3 M sucrose 10 μg/mL aprotinin 10 μg/mL leupeptin 1 mM PMSF 10 mM NaF 50 mM Na ₃ VO ₄
Sample buffer (5x)	312.5 mM Tris-HCl (pH6.8) 42.3% Glycerol 12.5% SDS 0.05% Bromophenol blue 250 mM DTT
Running buffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 0.1% SDS
Blotting buffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 10% Methanol
TBS (pH7.4)	20 mM Tris 138 mM NaCl
T-TBS (pH7.4)	0.05% Tween20/TBS

第4章 総合考察

本実験では、NMDA 受容体を介した神経細胞死 (アポトーシス) に対する B23 の役割を *In vivo* 試験および *In vitro* 試験にて評価した。

In vivo 試験では、マウス海馬 CA1 領域への QA 投与によるアポトーシスに対する B23 の役割を検討するため実験を行った。

初めに、海馬 CA1 領域への QA 投与が細胞死を誘導するのか、Nissl 染色により確認した。Nissl 染色の結果、control 群と比較して QA 投与群で Nissl 染色陽性細胞の減少を確認した。QA 投与群で Nissl 染色陽性の細胞が減少したことから、QA 投与により生細胞数が減少したと考えられる。次に、海馬 CA1 領域への QA 投与がアポトーシスを誘導するのか、TUNEL 染色により確認した。TUNEL 染色の結果、control 群と比較して QA 投与群で TUNEL 染色陽性細胞の増加を確認した。QA 投与群で TUNEL 染色陽性の細胞が増加したことから、QA により誘導される細胞死はアポトーシスによるものであると考えられる。これらのことから QA により CA1 領域においてアポトーシスが誘導されたと判断した。

CA1 領域への QA の投与がアポトーシスを誘導することを確認できたため、QA 投与時の B23 の局在を免疫蛍光染色にて確認した。染色の結果、control 群では B23 の核での局在を確認した。一方で、QA 投与群においては核以外の細胞質においても B23 の局在が確認できた。B23 のアポトーシス制御機構に関しては、核質から細胞質への移行がアポトーシス制御に関与していることが報告されている。今回の結果においても B23 は QA によるアポトーシスを誘導した際、核質から細胞質に局在変化することでアポトーシスに対して抵抗性を示したと考えられる。

In vitro 試験では、SH-SY5Y を RA で分化誘導することにより、神経細胞モデルとして使用した。分化誘導後の SH-SY5Y を用いて QA 処理によるアポトーシス関連タンパク質の発現量を Western blotting により確認した。今回着目したタンパク質はリン酸化 p38 MAPK (p-p38) であり、これは NMDA 受容体の刺激によるアポトーシスを誘導させた際、発現量が増加することが報告されている⁵⁹⁾。QA 処理の結果、p-p38 の発現量の有意な増加を確認した。これは、QA が SH-SY5Y においてもアポトーシスを誘導することを示唆している。

QA 処理により SH-SY5Y でのアポトーシス関連タンパク質の発現量が増加したことから、アンチセンス法による B23 のタンパク質発現量の低下が QA 処理によるアポトーシスに対してどのような影響を示すかを Western blotting により確認した。まず、アンチセンス法により B23 の発現量が減少するかの確認を行った。実験の結果、B23 の発現量の有意な減少を確認できたことから、アンチセンス法により B23 の発現を抑制できたと判断した。次に、その時の p-p38 の発現量を確認したところ、有意に増加するという結果が得られた。これらの結

果から、B23 の発現を抑制することで p-p38 の発現量が増加したと考えられ、B23 が QA 処理によるアポトーシスに対して抵抗性を示すことが示唆された。

B23 の 199 番目の Thr のリン酸化は神経保護作用に関与していることが報告されており、B23 がアポトーシスに対し抵抗性を示す結果が得られたため、B23 の 199 番目の Thr のリン酸化が QA によるアポトーシスに抵抗性を示すか検討するために、B23 の野生型(intact)および 199 番目 Thr を Ala に変異させた変異型(mutant)を SH-SY5Y において発現させ、QA 処理による p-p38 の発現量を Western blotting にて確認した。まず初めに、B23 の intact および mutant が発現しているか確認を行った。実験の結果、B23 in pcDNA のトランスフェクションによる B23 の発現量の有意な増加を確認できたことから、B23 in pcDNA がトランスフェクションできたことと判断した。次に、その時の p-p38 の発現量を確認したところ、control 群と比較して B23 intact を発現させた群において有意に減少するという結果が得られた。これらの結果から、B23 の 199 番目の Thr のリン酸化は p38 のリン酸化を抑制していると考えられ、199 番目の Thr のリン酸化が QA 処理によるアポトーシスと何らかの関係性をもつことが示唆された。

B23 は核質、細胞質をシャトルするタンパク質であり、その機能に応じて局在変化が起こることが報告されている。本実験では、QA によるアポトーシス誘導時の B23 の局在変化を Western blotting にて確認した。実験の結果、QA 処理群において、control 群と比較して B23 の発現量が細胞質では有意に増加し、核質では有意に減少した。この結果から、QA 処理によるアポトーシスが誘発した際、B23 は核質から細胞質に局在変化すると考えられる。この結果は、B23 がアポトーシスに対して何らかの応答を示すことを示唆しており、上述のアポトーシス制御機構においても、B23 の細胞質での局在が確認されているため、B23 がアポトーシスに対する抵抗性を示すことを強く示唆する結果となった。さらにこの結果は、*In vivo* 試験の結果を支持するものとなった。

B23 は、第 1 章で述べたように p14^{ARF}/MDM2/p53 経路への相互作用によりアポトーシスの制御に関与していることが報告されている⁶⁴⁾。それ以外に、B23 が核内の PI(3,4,5)P₃との相互作用が、DNA の断片化などに関与する CAD の阻害効果を示す報告⁶⁵⁾や、B23 が細胞質の caspase-6、caspase-8 のタンパク質分解能を阻害する報告⁵⁰⁾などがある。

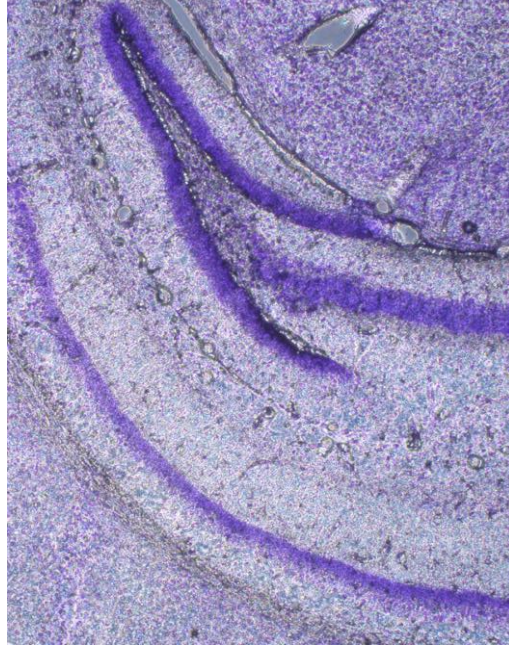
その中で、今回の結果を支持する報告として B23 が PP2A および p38 と複合体を形成し、p38 のリン酸化を阻害することで、アポトーシスに対して抵抗性を示すというものがある⁶⁶⁾。その報告をもとに本研究における B23 のアポトーシス抵抗メカニズムを考察した(Fig. 16)。通常時、199 番目の Thr がリン酸化された B23 は PP2A および p38 と複合体を形成しており、p38 は脱リン酸化されているため下流にシグナル伝達を行うことはない。ここに酸化ストレスが加わった際、PP2A が活性化され B23 の 199 番目の Thr を脱リン酸化させる。これに伴い、複合体が解離し、単独の p38 がリン酸化されることで下流にシグナル伝達し、アポトーシスが誘発される。

本研究において、QA を用いて NMDA 受容体を刺激した際も同様に、活性化 PP2A が B23 の 199 番目の Thr を脱リン酸化し、B23/PP2A/p38 複合体の解離によりフリーになった p38 がリン酸化されることでアポトーシスが誘発したと考えられる。

さらに、核質に存在する B23 の 199 番目の Thr がリン酸化され、B23 のコンフォメーションが変化し、核局在に必要なドメインである NES や NLS が折りたたみ構造の内側へ閉じ込められるため、細胞質へ局在変化したと考えられる。そして、細胞質に局在する 199 番目の Thr がリン酸化された B23 は PP2A, p-p38 と複合体を形成し、この際に p-p38 は脱リン酸化され MAP キナーゼカスケードが停止するため、アポトーシスが抑制されたと考えられる。

以上のことから、神経細胞において NMDA 受容体を介したアポトーシスを誘発させた際、核小体タンパクである B23 は 199 番目の Thr がリン酸化され、核質から細胞質に局在変化することでアポトーシスに対して抵抗性を示すと考えられる。

control



QA

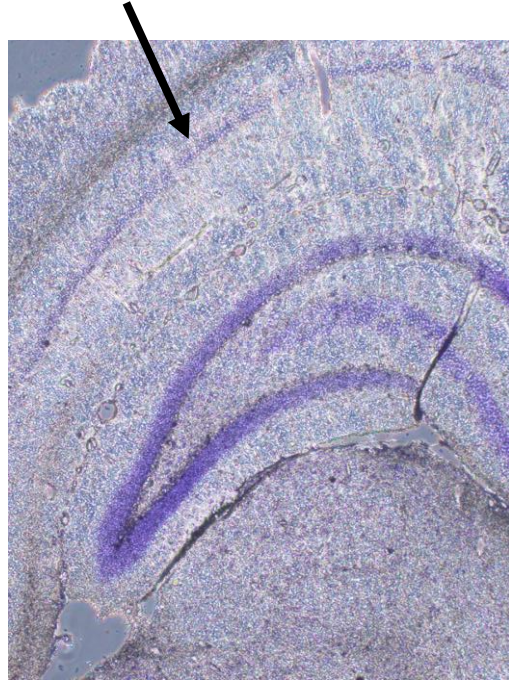


Fig. 6 マウス海馬 CA1 領域の Nissl 染色
(矢印は CA1 領域における神経細胞の減少を表す)

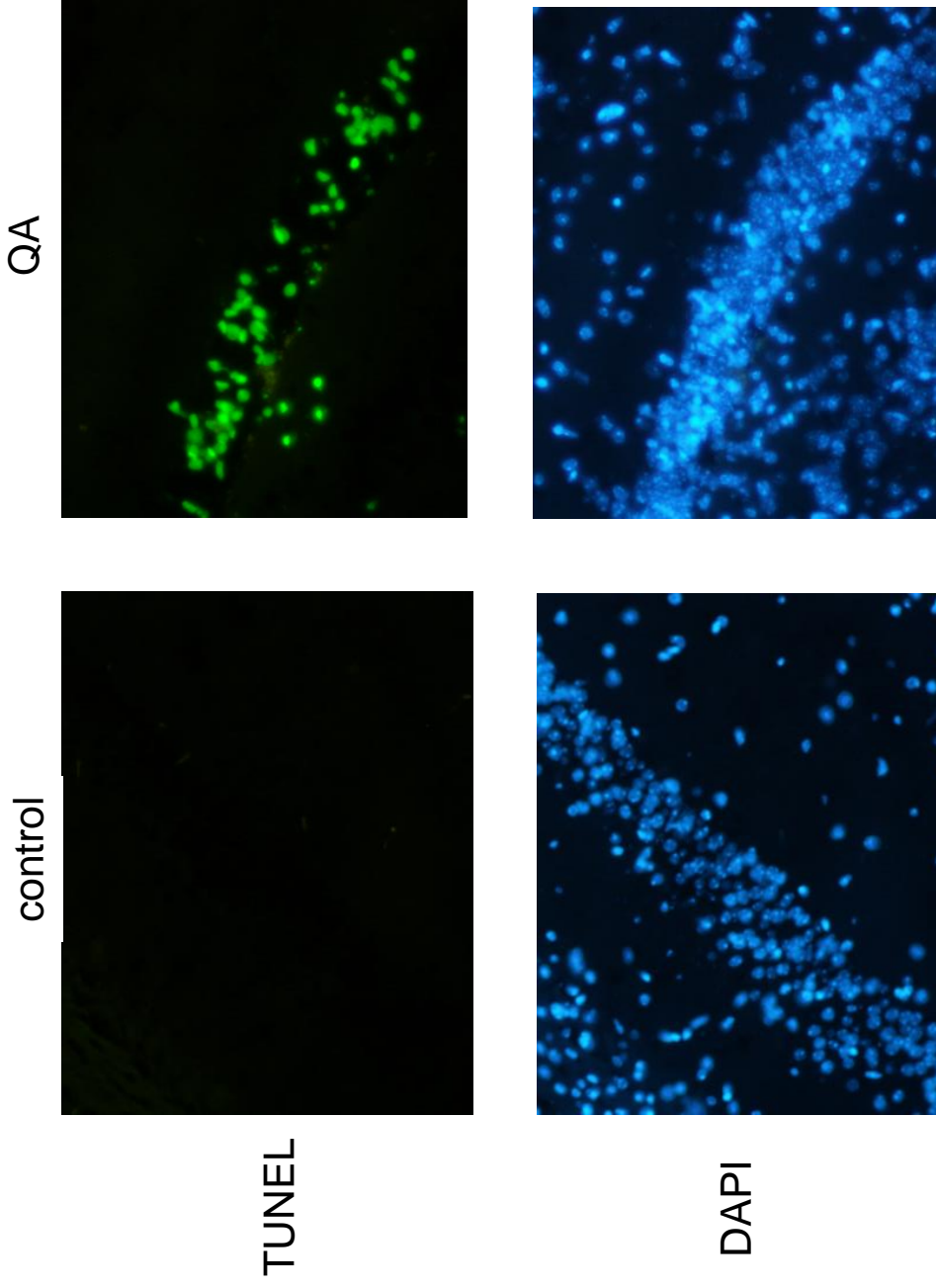


Fig. 7 マウス海馬 CA1 領域の TUNEL 染色

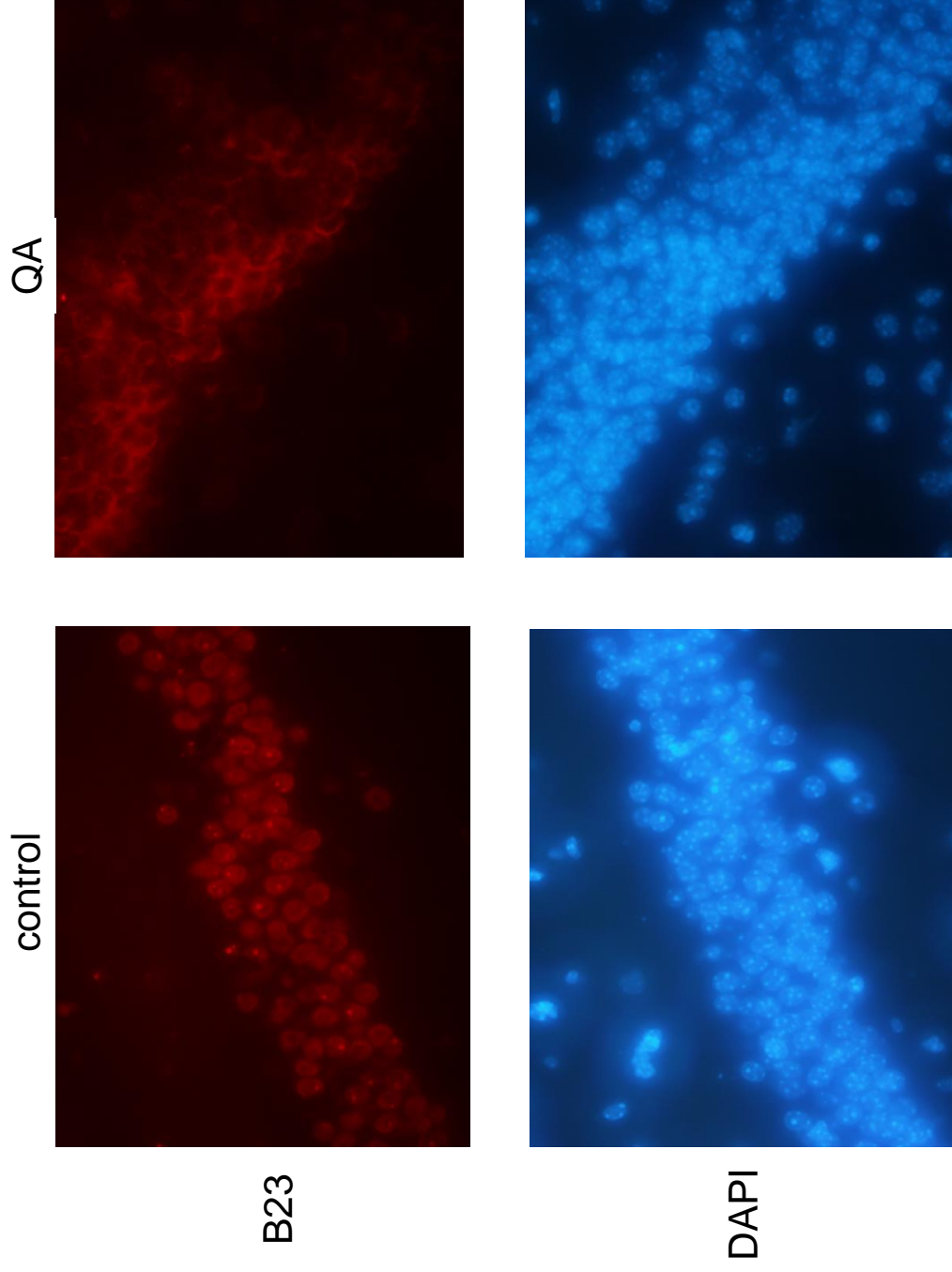
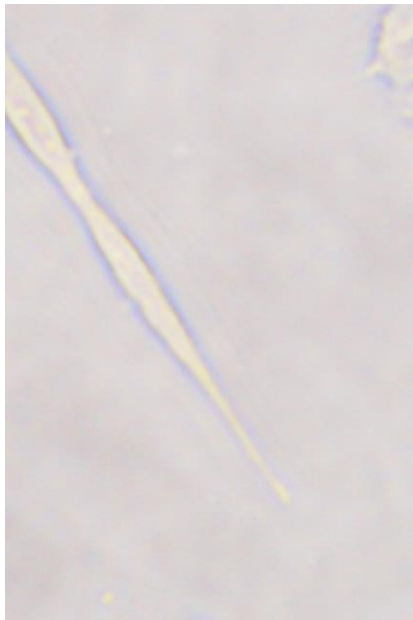


Fig. 8 マウス海馬 CA1 領域における B23 の蛍光免疫染

分化前



分化後



Fig. 9 SH-SY5Y の形態観察
(矢印は神経突起の伸長を表す)

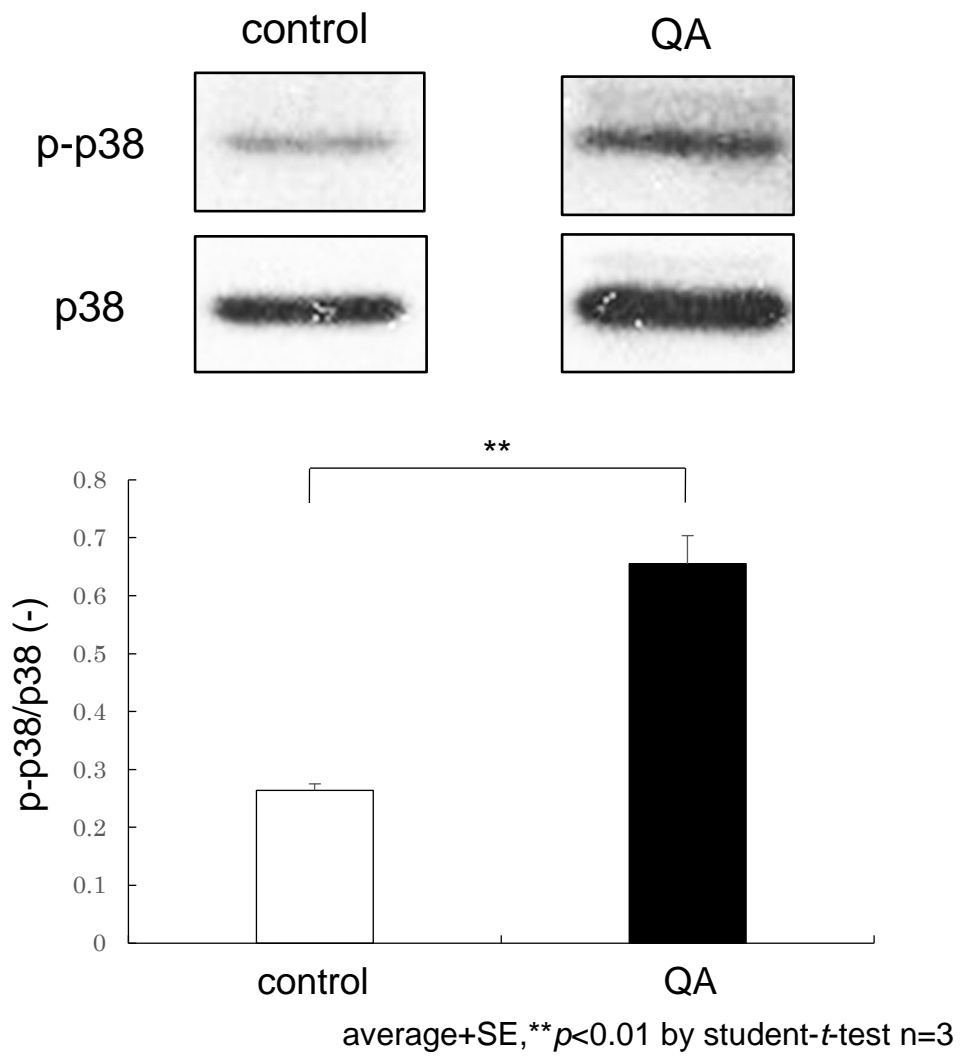


Fig. 10 QA 処理による p38 のリン酸化

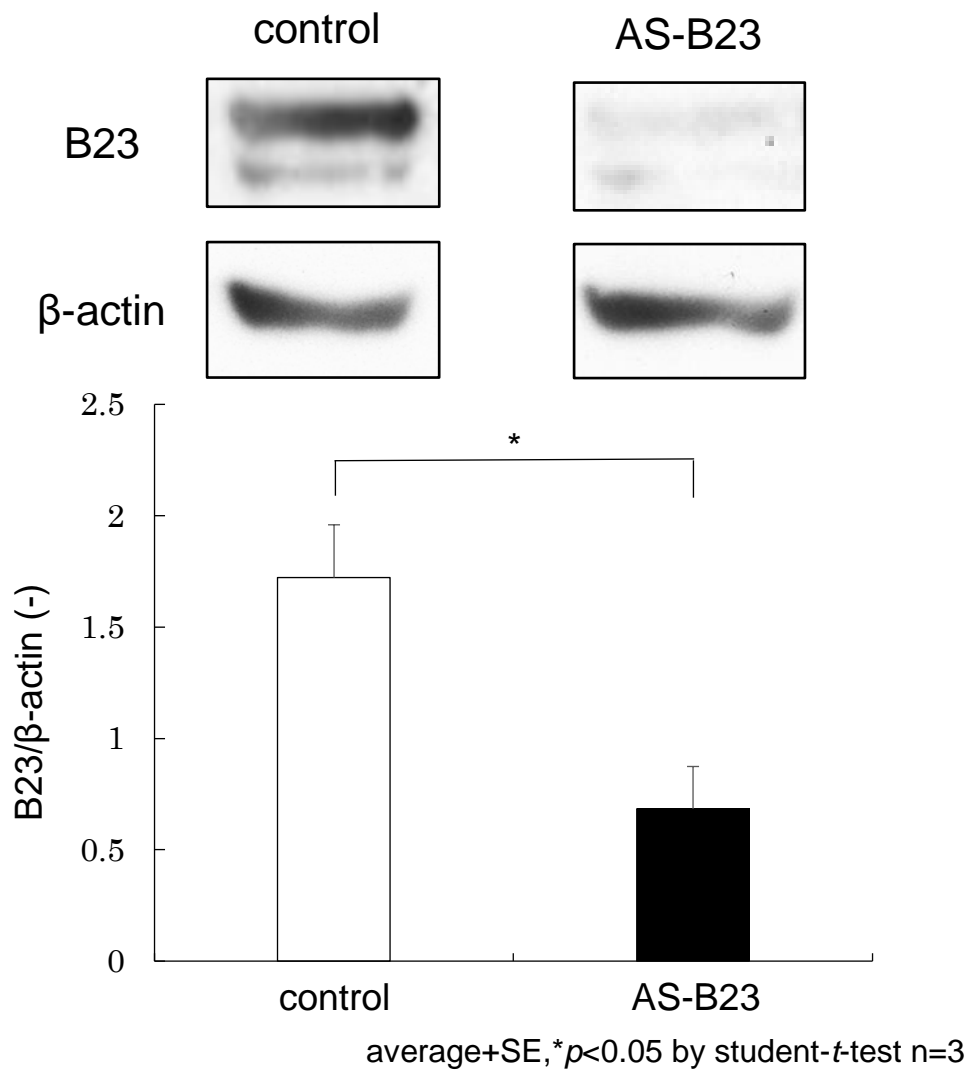


Fig. 11 アンチセンス法による B23 の発現抑制

アンチセンス-B23 mRNA を 2 μ g 入れて B23 発現量を検討

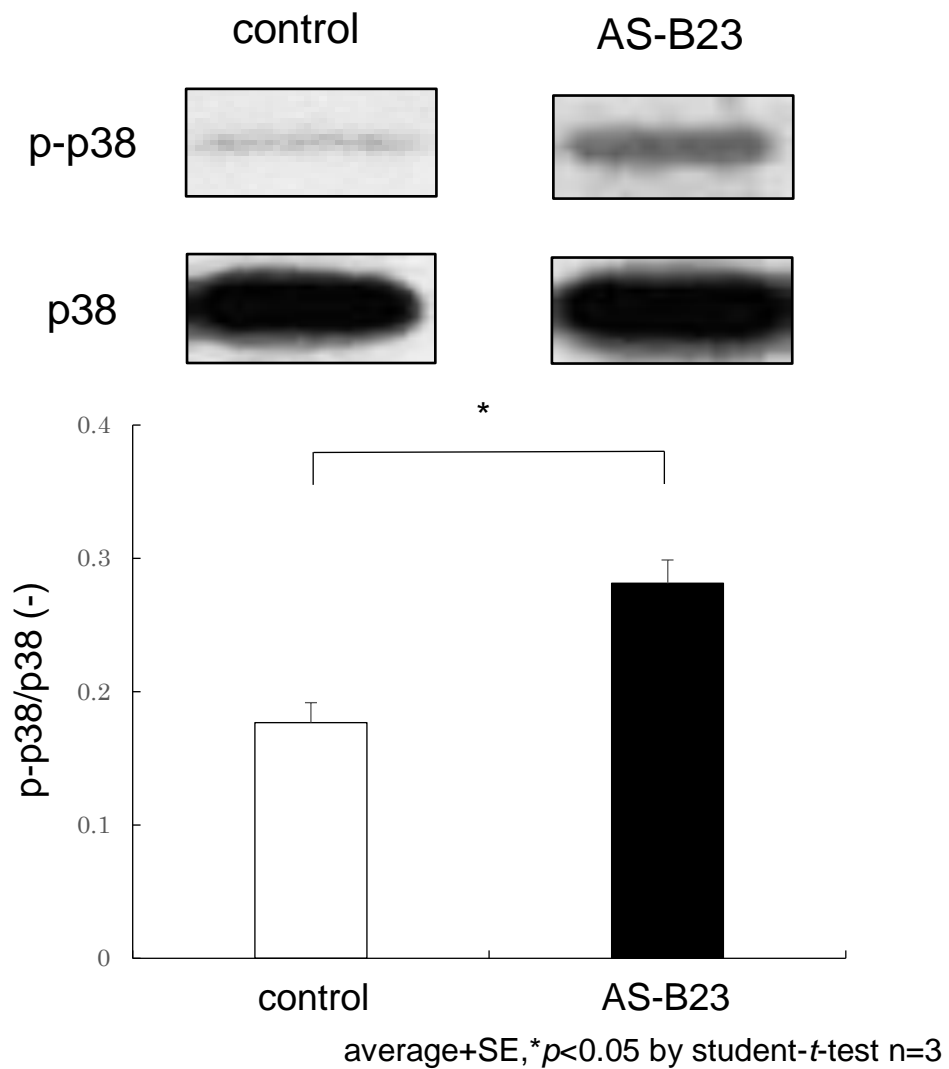


Fig. 12 B23 発現抑制による p38 のリン酸化割合の変化
 アンチセンス-B23 mRNA を 2 μ g 入れて B23 発現量を検討

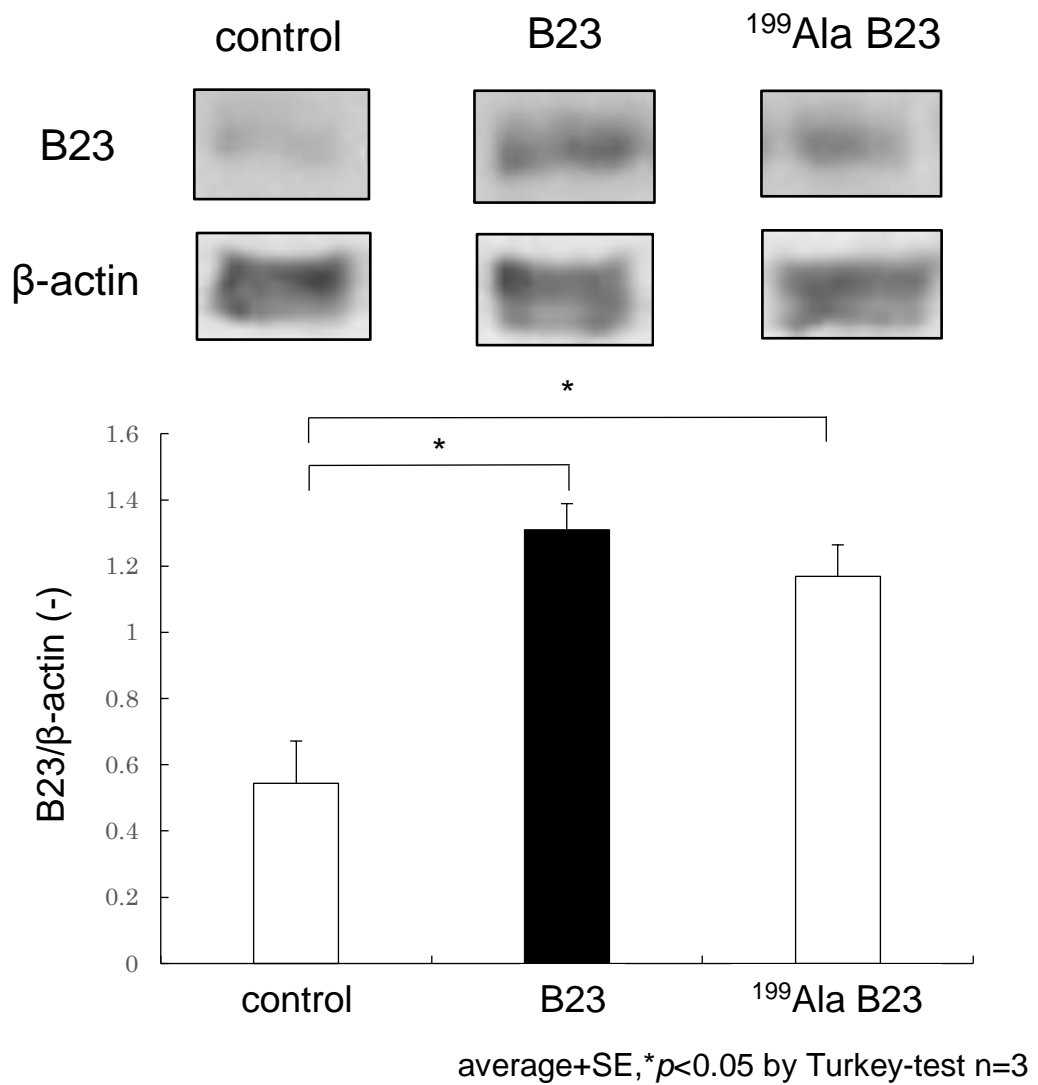


Fig. 13 B23 変異体の pcDNA による B23 の発現量変化
B23 および ^{199}Ala B23 を発現させ B23 発現量を検討

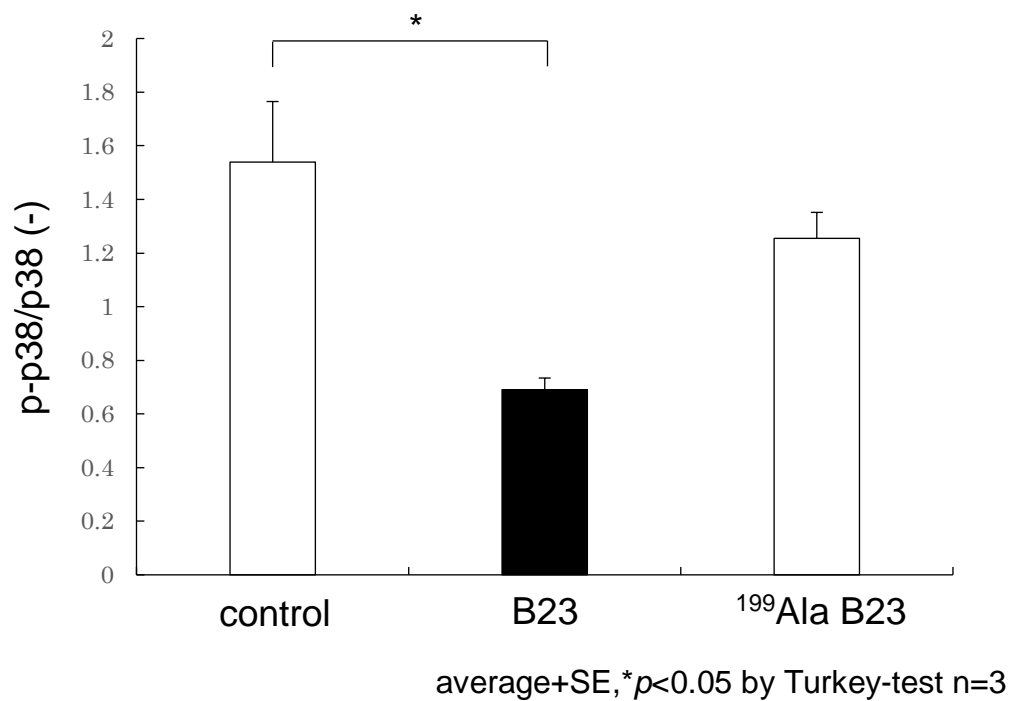
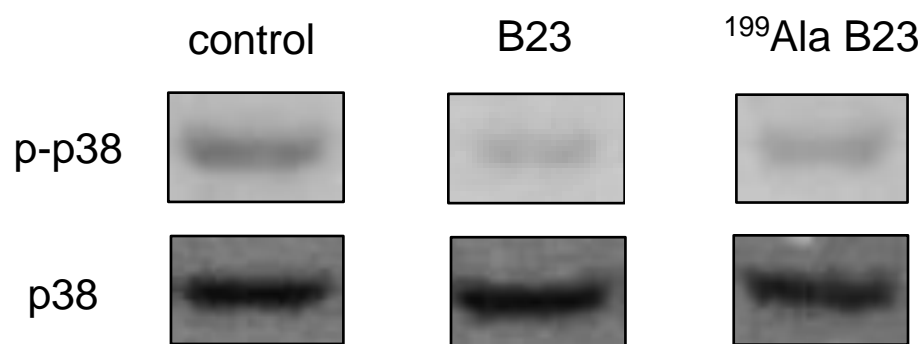


Fig. 14 B23 発現量変化に伴う p38 リン酸化割合の変化

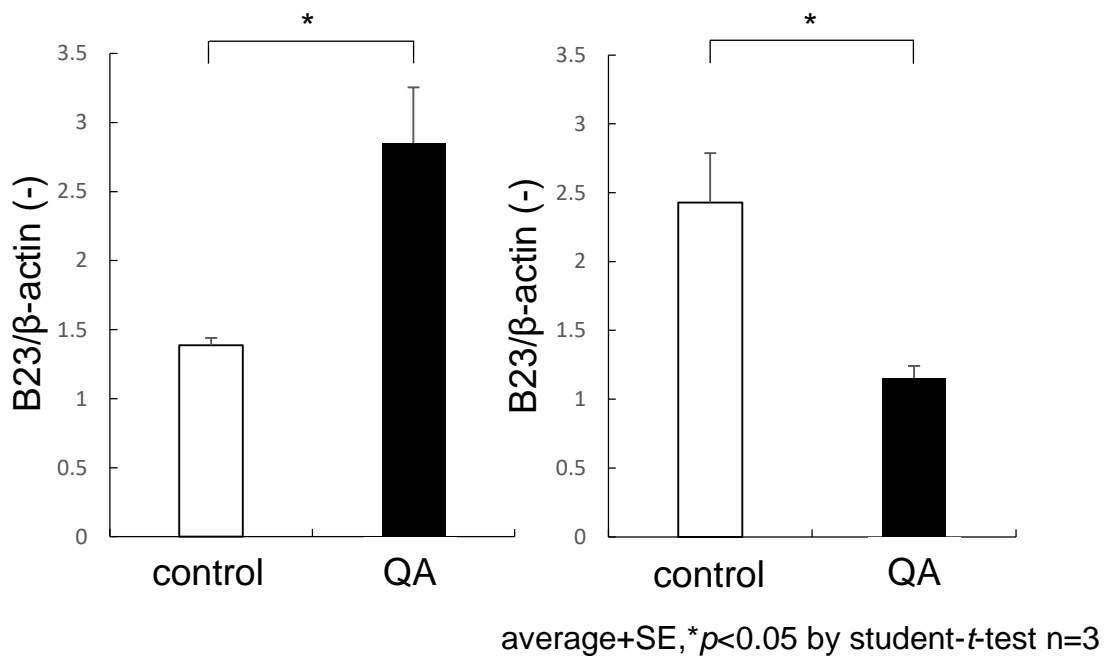
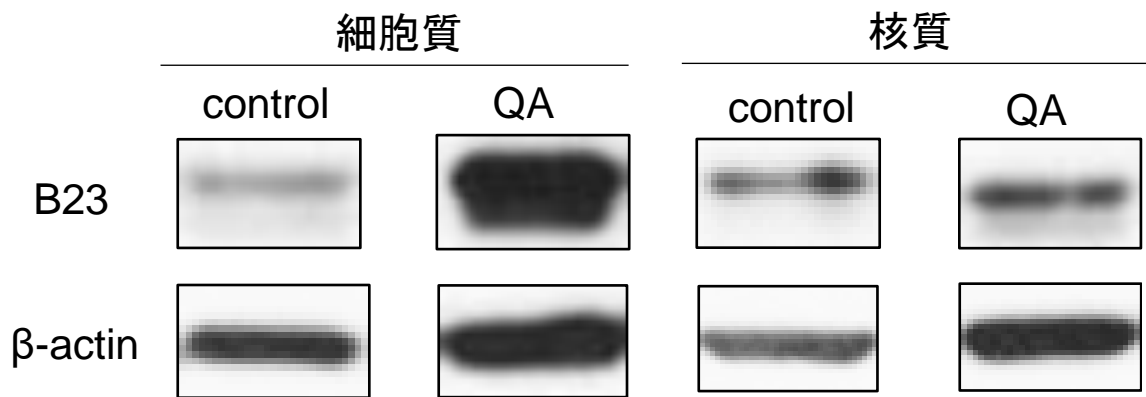


Fig. 15 QA 処理による B23 の局在変化
(左: 細胞質 右: 核質)

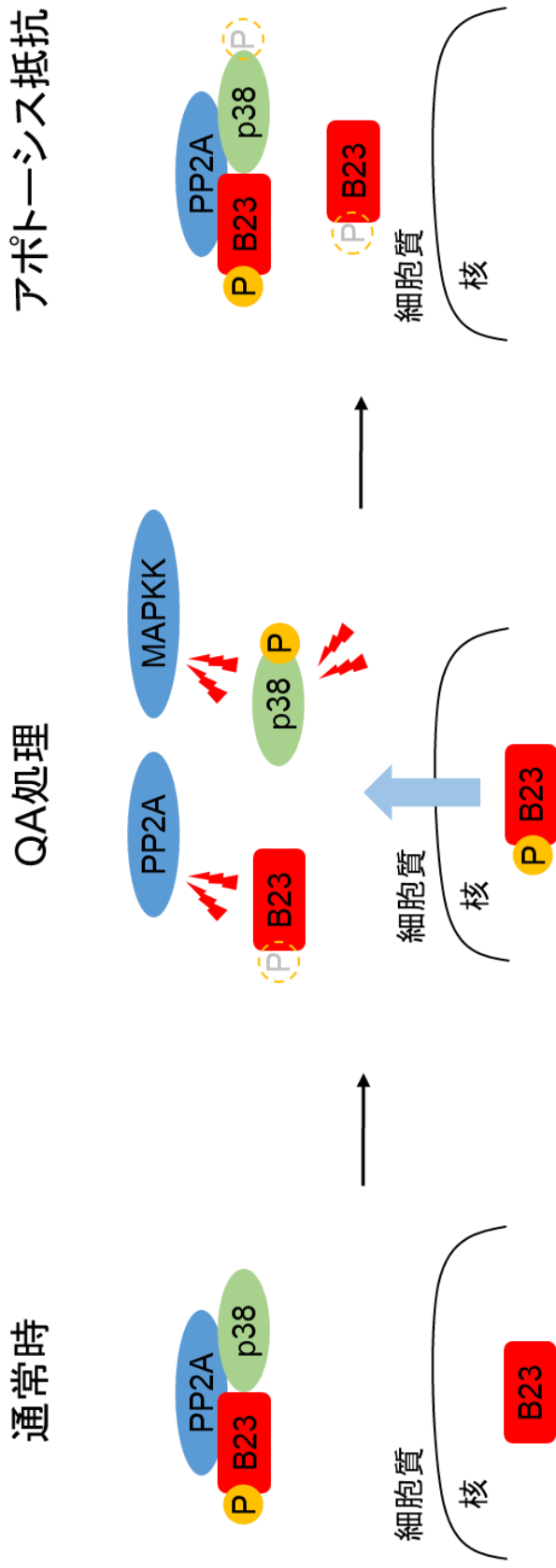


Fig. 16 B23のアポトーシス抵抗メカニズム

参考文献

1. 知ることからはじめようみんなのメンタルヘルス, 厚生労働省,
http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail_recog.html
2. 二宮 利治, / 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究. 総括研究報告書, 平成 26 年度
3. P. Zambrano et al. / *In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models*. Biochemical and Biophysical Research Communications (2016) 1-6
4. Robinson DM, Keating GM et al. / *Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease*. Drugs. 2006;66(11):1515-1534.
5. 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.
6. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. / *Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis*. Annu. Rev. Neurosci. 23, 2000 649– 711.
7. V. VYKLYCKYS et al. / *Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels*. Physiol. Res. 63 (Suppl. 1): S191-S203, 2014
8. 龍野徹, 田中祥裕 / 神経伝達物質グルタミン酸の受容体と神経細胞死. 化学と生物 Vol.31, No.11, 1993
9. Nowak L, et al. / *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones*. Nature 1984;307:462.
10. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. / *Voltage-dependent block by Mg of NMDA responses in spinal cord neurones*. Nature 1984;309:261
11. Johnson JW, Ascher P. / *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons*. Nature 1987;325:529.
12. MONYER H et al. / *Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes*. Science 256: 1217-1221, 1992.
13. ULBRICH MH, ISACOFF EY / *Rules of engagement for NMDA receptor subunits*. Proc Natl Acad Sci USA 105:14163-14168, 2008.
14. 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. 542-552.
15. Mori H, Mishina M. / *Structure and function of the NMDA receptor channel*. Neuropharmacology 1995;34:1219–1237
16. Zi-You Liu, Qin-Wen Zhong, Cheng-Nan Tian, Hou Mou Ma, Jun-Jian Yu, Shuo Hu / *NMDA receptor - driven calcium influx promotes ischemic human cardiomyocyte apoptosis through a p38 MAPK-mediated mechanism*

17. Z. Yang, X. Zhou, Q. Zhang / *Effectiveness and safety of memantine treatment for Alzheimer's disease*. J. Alzheimer's Dis. 36 (2013) 445-458
18. 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.
19. 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
20. 糸川嘉則, 公衆衛生学. 光生館, 1995.
21. 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. 1316-1320.
22. 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. 12824-12827.
23. 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. 417-426.
24. 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. 1033-1039.
25. 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. 126-133
26. 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. 1881-1890.
27. Mitsuru Okuwaki, / *The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein*. J. Biochem. 143, 441-448 (2008)
28. Wang D, Umekawa H, Olson MO. / *Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells*. Cell Mol Biol Res 1993;39:33-42.
29. Szebeni A, Herrera JE, Olson MO. / *Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals*. Biochemistry 1995;34:8037-8042.
30. Mi Jung Lim, Xin Wei Wang. / *Nucleophosmin and human cancer*. Cancer Detect Prev. 2006 ; 30(6): 481-490.
31. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang X. / *Temporal and spatial control of nucleophosmin by the RanCrm1 complex in centrosome duplication*. Nat.Cell Biol 2005;7:823-830

32. Krebs EG, Beavo JA. / *Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes*. Annu Rev Biochem 1979;48:923–959.
33. Yu Y, Maggi LB Jr, Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, Weber JD. / *Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export*. Mol Cell Biol. 2006;26(10):3798–3809
34. Okuda, M. / *The role of nucleophosmin in centrosome duplication*. Oncogene. 2002;21, 6170–6174.
35. Murano K, Okuwaki M, Hisaoka M, Nagata K. / *Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity*. Mol Cell Biol. 2008;28(10):3114–3126
36. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. / *Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone*. FEBS Lett. 2001;506(3):272–276.
37. Mitsuru Okuwaki, / *The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein*. J. Biochem. 143, 441–448 (2008)
38. 向井工智 “中枢神経における核小体タンパク質 B23 の機能に関する研究(2011)”
39. Honghong Chen, Rongfei Jia, Meijun Zhou, Aihong Xu, Yuxing Hu, Wenying Cheng / *The role of nucleophosmin/B23 in radiation-induced chromosomal instability in human lymphoblastoid cells of different p53 genotypes*
40. Ahn JY, Liu X, Cheng D, Peng J, Chan PK, Wade PA, Ye K. / *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):435–445.
41. Wu MH, Chang JH, Yung BY. / *Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression*. Carcinogenesis. 2002;23(1):93–100
42. Wu MH, Chang JH, Chou CC, Yung BY. / *Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation*. Int J Cancer. 2002;97(3):297–305
43. Itahana KBK, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, Zhang Y. / *Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation*. Mol Cell. 2003;12(5):1151–1164.
44. Qin FX, Shao HY, Chen XC, Tan S, Zhang HJ, Milao ZY, Wang L, Hui-Chen, Zhang L. / *Knockdown of NPM1 by RNA interference inhibits cells proliferation and induces apoptosis in leukemic cell line*. Int J Med Sci. 2011;8(4):287–294
45. 田中知明 / 転写因子 p53 の翻訳後修飾と転写活性化機構 生化学 第 82 巻 第 3 号, pp. 200-209, 2010
46. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW, Quelle DE. / *Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function*. Mol Cell Biol.

2005;25(4):1258–1271

47. Kurki SPK, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, Laiho M. / *Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation*. *Cancer Cell*. 2004;5(5):465–475
48. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. / *Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53*. *Nat Cell Biol*. 2002;4(7):529–533.
49. Dhar SKSCD. *Nucleophosmin blocks mitochondrial localization of p53 and apoptosis*. *J Biol Chem*. 2009;284(24):16409–16418.
50. Leong SM, Tan BX, Bte Ahmad B, Yan T, Chee LY, Ang ST, Tay KG, Koh LP, Yeoh AE, Mok YK, Lim TM. / *Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition*. *Blood*. 2010;116(17):3286–3296.
51. Arne A Ittner, Amadeus Gladbach, Josefine Bertz, Lisa S Suh, and Lars M Ittner / *p38 MAP kinase-mediated NMDA receptor-dependent suppression of hippocampal hypersynchronicity in a mouse model of Alzheimer's disease*
52. <https://jp.sinobiological.com/p38-mapk-signaling-pathway.html>
53. Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y and Imai K. / *p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation*. *EMBO J.*, 19, 6517-6526, (2000)
54. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, and Takekawa M. / *Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways*. *Nature Cell Biol*. 10, 1324-1332 (2008)
55. <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/naiyou-J.html>
56. Karina Hernandez-Ortega et al. / *Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome*. *Brain Pathology* 26 (2016) 593–605
57. Guixia Wang, Yunqian Pan, Kashif A. Ahmad, and Khalil Ahmed / *Protein B23/Nucleophosmin/Numatrin nuclear dynamics in Relation to Protein Kinase CK2 and Apoptotic Activity in Prostate Cells*
58. Jimmy Rodriguez Murilloa, Livia Goto-Silvab, Aniel Sánchezc,d, Fábio C.S. Nogueiraa, Gilberto B. Domonta, Magno Junqueiraa / *Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells*
59. Takayuki Tsutsumi. / *Potential Neuroprotective Effects of an LSD1 Inhibitor in Retinal Ganglion Cells via p38 MAPK Activity*. *IOVS j November 2016 j Vol. 57 j No. 14 j 6463*
60. Cordell J, Pulford K, Bigerna B, Roncador G, Banham A, Colombo E, Pelicci P, Mason D, Falini B. / *Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells*. *Blood*

1999;93:632–642

61. Jason A Pfister and Santosh R D'Mello. / *Insights into the regulation of neuronal viability by nucleophosmin/B23*. Experimental Biology and Medicine 2015; 240: 774–786
62. Ahn JY, Liu X, Cheng D, Peng J, Chan PK, Wade PA, Ye K./ *Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P3 receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD*. Mol Cell 2005;18:435–445
63. Maëva Guillonneau, François Paris, Soizic Dutoit, Hala Estephan, Elise Bénêteau, Jacques Huot, and Isabelle Corre / *Oxidative stress disassembles the p38/NPM/PP2A complex, which leads to modulation of nucleophosmin-mediated signaling to DNA damage response*

謝辞

本研究を行うにあたり、始終適切なご指導を賜りました、三重大学生物資源学研究科栄養化学研究室の西尾昌洋准教授に心よりお礼申し上げます。同時に、研究全般にわたり、ご助言いただきました当研究室の梅川逸人教授、栗谷健志助教に心よりお礼申し上げます。

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