

氏名	平居 貴生
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第721号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	定常磁場曝露に応答する脳内遺伝子に関する分子薬理学的研究
論文審査委員(主査)	谷浦 秀夫(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	山田 清文(自然科学研究科・教授), 米田 幸雄(自然科学研究科・教授) 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授), 田熊 一徹(自然科学研究科・助教授)

## 学位論文要旨

To determine the possible expression of genes responsive to static magnetism in the brain, we have carried out differential display (DD) analysis in cultured rat hippocampal neurons exposed to static magnetic fields. Hippocampal neurons were cultured for 11 DIV and then exposed to static magnetic fields for 15 min at 100 mT, followed by incubation for 3 h and subsequent extraction of total RNA for DD analysis. A particular gene was upregulated in response to brief magnetism and identified as N-terminal asparagine amidase (NTAN1), encoded for N-terminal amidohydrolase, which is involved in the N-end rule pathway in the ubiquitin-proteasome system. Northern blot analysis revealed a significant increase in expression of mRNA for NTAN1 3 to 6 h after brief magnetism, while brief magnetism significantly decreased the expression of microtubule-associated protein-2 (MAP2) in a manner prevented by a proteasome inhibitor in cultured rat hippocampal neurons. Overexpression of NTAN1 gene led to a similarly significant decrease in MAP2 expression. These results suggest that brief magnetism may result in long-lasting alterations of cellular integrity and/or functionality through a molecular mechanism relevant to expression of NTAN1 gene and subsequent degradation of MAP2 by ubiquitin-proteasome in cultured rat hippocampal neurons.

Key words: static magnetic fields, differential display, NTAN1, N-end rule, MAP2

### 【緒言】

精神科領域で反復的経頭蓋磁気刺激法の有効性が示されているように、電磁誘導等磁気の物理的性質を考えると、磁場照射が神経細胞の機能に何らかの影響を与える可能性は高いと推察される。一方、遺伝子転写制御因子は、標的蛋白質発現の量的制御を行う核内蛋白質であるが、神経細胞では細胞内あるいは細胞外シグナルに応答して、一過性シグナル受容を長期的な機能変動

に変換する働きを持つと考えられる。その中でも特に、誘導型転写制御因子である **activator protein-1 (AP1)** 複合体が、短時間の磁場曝露後に誘導されることから、海馬神経細胞での磁場シグナル受容とその後の長期的機能変動の可能性が示唆される。したがって、本研究では一過性の低磁束密度定常磁場曝露に伴い誘導される遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ (**DD**) 法により探索することによって、神経細胞での磁場シグナル受容とその後の長期的機能変動の可能性を検討した。

## 【方法】

### 定常磁場曝露

ラット胎児脳より調製した海馬神経細胞に対して、磁束密度 **120** ミリテスラのフェライト磁石(二六製作所)を用いて、ウェル上に **100** ミリテスラ (**GAUSS METER model GM-1220, DENSHIJIKI INDUSTRY CO., LTD.**により測定) の一定磁場環境をつくり磁場曝露を行った。

### ディファレンシャルディスプレイ法

海馬神経細胞に対して、**15** 分間の磁場曝露を行ったのち **3** 時間目に細胞を回収した。培養海馬神経細胞を **PBS** で洗浄後、細胞を回収して **ISOGEN (NIPPON GENE)** を用いて **total RNA** を抽出した。その後、対照群と刺激群で発現量の異なる遺伝子を、**DD** 法 (**Fluorescence Differential Display Kit; Takara**) によって探索した。

### ノーザンブロットティング法

調製した **total RNA** を変性アガロースゲル上で電気泳動を行い、キャピラリーブロットティング法により **total RNA** をナイロンメンブレンにプロットした。そのメンブレンと放射標識した変性プローブを、**42°C** で **16** 時間反応させた。プローブは **Multiprime DNA labeling system (Amersham)** および  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  を用いて放射標識した。反応後、メンブレンを室温で **0.1% SDS** を含む **2 × SSC** で **10** 分間、**2** 回洗浄し、続いて **42°C** で **0.1% SDS** を含む **1 × SSC** で **20** 分間、**0.1% SDS** を含む **0.5 × SSC** で **20** 分間、それぞれ **1** 回ずつ洗浄した。洗浄後のメンブレンと **X** 線フィルムを用いてオートラジオグラフィを行った。

### 細胞生存率測定

細胞のミトコンドリア活性を測定することにより細胞生存率を評価した。海馬由来神経細胞を **PBS** で洗浄後、**0.5 mg/mL 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)** を **CO<sub>2</sub>** インキュベーター内で **1** 時間反応させた。**MTT** 溶液と等量の **0.04 M HCl/isopropanol** を加え溶解後、生成したホルマザン形成に伴う **550 nm** の吸光度増加をマイクロプレートリーダーで測定して、生細胞数を評価した。

### NTAN1 組換えアデノウイルスの作製

海馬神経細胞における **NTAN1** の機能と役割を解析する目的のために、組換えアデノウイルス構築システム (**Adeno-Quest<sup>TM</sup> system (Qblogene): pAdTrackCMV** シヤトル・プラスミド、**pAdEasy-1** ゲノム・プラスミドおよび大腸菌 **BJ5183**) を用いて、**NTAN1** 遺伝子を含む組換

えアデノウイルス DNA を作製した。N1E-115 神経細胞様株から total RNA を抽出後に、以下のプライマーを用いた RT-PCR 法を用いて完全長 NTAN1 を含む cDNA を獲得した。

#### Oligonucleotide primers

5' (ccggaattcATGCCACTGCTAGTGGACGGG)

5' (cgcggatccTTAGCTCCTGGAGAGGAGAT)

大量の組換えアデノウイルス粒子を得るために、NTAN1 組換えアデノウイルス DNA を、リポフェクトアミン(Life Technologies)を用いてヒト胎児腎細胞 293 に導入し、使用可能な力価の NTAN1 組換えアデノウイルス粒子の調製を行った。TCID50 (Tissue Culture Infectious Dose 50)法による測定の結果、得られたウイルス粒子の力価は、約  $1 \times 10^9$  pfu/mL であった。

#### イムノブロッティング法

培養した細胞をホモジナイズし、SDS 電気泳動後、各種抗体を 1 次抗体としてウエスタンブロット解析を行った。

#### 【結果・考察】

#### 磁場応答性遺伝子の探索

ラット胎児海馬由来神経細胞に対して 15 分間の磁場曝露 (100 ミリテスラ) を行ったのち、3 時間目に細胞を回収して total RNA を抽出した。その後、DD-PCR 法を行った結果、磁場曝露群で発現量の増加が観察されるフラグメントが検出された。この短時間磁場曝露によって発現増加が見られたフラグメントをゲルから回収し、これら DNA 断片をサブクロニング後、シークエンスを行ったところ、磁場曝露によって発現増加が観察された cDNA は、マウス N-terminal asparagine amidase 1 (NTAN1) に高い相同性を示すことが明らかとなった。このラット NTAN1 は、ユビキチンプロテアソーム系におけるタンパク質分解において提唱された法則<N 末端則>の構成因子である N 末端アミダーゼをコードする遺伝子である。さらに、この DNA 断片をプローブに用いたノーザンブロット解析の結果、15 分間の磁場曝露終了後 3 時間目において、約 3 倍の NTAN1 mRNA 発現量の増加が観察され、6 時間経過後でも 2 倍以上の発現増加が認められた。

#### 短時間磁場曝露による MAP2 発現への影響

N 末端則の N 末端認識酵素 (E3) である UBR1 の欠損出芽酵母が大きな表現型を示さないことから、現在まで N 末端則の生理的役割は大きくないと考えられている。事実、N 末端則分解系の基質蛋白質が同定された例は少ない。しかしながら、最近、真核生物においても N 末端則分解系の基質蛋白質が同定されている (RGS4,  $\gamma$  2 subunit of G protein heterodimer)。また、ショウジョウバエを用いた研究では、アポトーシスにおける Drosophila inhibitor of apoptosis 蛋白質分解が、N 末端則によって制御されることが明らかになるなど、N 末端則分解系が細胞レベルで機能的役割を果たす可能性は十分に高い。よって、N 末端則の標的蛋白質の同定は、磁場曝露の生理的機能解明に非常に重要であると

考えられる。一方、本研究において持続的あるいは短時間反復性磁場曝露条件下に神経細胞を培養した場合、MAP2 の発現が有意に減少することを明らかにした。したがって、次に MAP2 が短時間磁場曝露により発現する N 末端則ユビキチンプロテアソーム分解系の標的蛋白質である可能性を検討した。ラット初代培養海馬神経細胞に対して 15 分間の磁場曝露を行ったのち、24 時間目における MAP2 の発現を免疫ブロット法によって検出した。その結果、短時間磁場曝露によって MAP2 の有意な発現減少が確認された。また、磁場曝露後 24 時間目における細胞生存率の変化を MTT アッセイ法により測定したが、磁場曝露に伴う著明な変化は見られなかった。したがって、短時間の一過性の磁場曝露は細胞生存には影響することなく、MAP2 発現減少を誘発することが明らかとなった。さらに、短時間磁場曝露に伴う MAP2 発現減少がユビキチンプロテアソーム分解系の活性化によるものかどうかを検討するために、プロテアソーム阻害剤である MG-132 の影響について検討を加えた。磁場曝露前 30 分より海馬神経細胞に対して MG-132 を添加したのち、短時間磁場曝露後 24 時間目の MAP2 発現量をウエスタンブロット法により測定した。その結果、短時間磁場曝露後 24 時間目において著明な MAP2 の発現減少が確認されたが、MG-132 を添加すると、0.1  $\mu\text{M}$  から 1  $\mu\text{M}$  の濃度範囲において、MAP2 発現低下に対する MG-132 の濃度依存的な回復効果が観察された。したがって、短時間磁場曝露に伴う MAP2 発現低下は、ユビキチンプロテアソーム系による MAP2 の分解に基づく現象であることが示唆される。

#### MAP2 発現調節機構における N 末端則分解系の関与の可能性

293A 細胞による相同的組換え法により、NTAN1 遺伝子の組換えアデノウイルスベクターを作製し、初代培養海馬神経細胞に NTAN1 を強制的に過剰発現させ、NTAN1 の過剰発現が MAP2 の発現量に及ぼす影響について検討した。同様の方法で GFP を組み込んだ組換えアデノウイルスを対照群として用いた。半定量 RT-PCR 法によって NTAN1 mRNA の発現量を測定した結果、GFP 組換えアデノウイルス感染神経細胞と比較して、NTAN1 組み換えアデノウイルス感染神経細胞では、NTAN1 mRNA が十分に発現することが確認された。培養 11 日目の培養海馬神経細胞に対して、GFP あるいは NTAN1 組換えアデノウイルスを感染させ、その後 48 時間目における MAP2 発現量を免疫ブロット法により測定した。その結果、GFP 組換えアデノウイルス感染細胞に対して、NTAN1 組換えアデノウイルス感染細胞では、MAP2 発現量は有意に減少することが明らかとなった。よって、短時間磁場曝露に伴うユビキチンプロテアソーム分解系の亢進が、NTAN1 発現増加を介して制御される可能性が示唆される。すなわち、磁場曝露によって発現減少が確認された MAP2 は、N 末端則分解系の標的蛋白質のひとつである可能性が推察される。

#### 【結論】

本研究成績から、海馬神経細胞に対して短時間磁場曝露を行うと、その後、一過性の AP1 DNA 結合能上昇ののちに、NTAN1 mRNA 発現を介する長期的な機能変動が招来される可能性が考えられる。同時に、海馬神経細胞への磁場曝露

によって、**MAP2** の発現低下が観察されたが、この発現減少はユビキチンプロテアソーム分解系における **MAP2** の分解によること、さらにユビキチンプロテアソーム系による **MAP2** の分解は、**NTAN1** 発現増加を介する **N** 末端則経路によって制御される可能性が考えられる。すなわち、磁場刺激という特殊な条件下においては **N** 末端則分解系が活性化されて、神経細胞内で特定の機能的役割を果たすことが強く示唆される。一方、各種神経変性疾患や精神神経疾患の評価において、**MAP2** の発現が有用なマーカーであるという報告が数多く見受けられる。また、家族性パーキンソン病における原因遺伝子 **PARK2** がコードするタンパク質パーキンがユビキチンリガーゼであることが明らかにされるなど、各種神経変性疾患の発症機構がユビキチンプロテアソーム系の破綻に起因する可能性が指摘されている。したがって、磁場曝露による **NTAN1 mRNA** 発現調節機構の解明、さらには **MAP2** が **N** 末端則分解系によって分解されることが、生理学的あるいは病態生理学的にどのような意味を持つのかを明らかにすることが今後の大きな課題である。また、**N** 末端則分解系によって分解される **MAP2** 以外の基質蛋白質の同定をはじめとする磁場シグナル受容メカニズムの追求によって、各精神神経疾患や神経変性疾患の発症のメカニズム解明、ひいては治療応用につながる糸口となることが期待される。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究では、定常磁場曝露に伴い誘導される脳内遺伝子を、ティファレンシャルディスプレイ (DD) 法により探索することで、海馬神経細胞における磁場シグナル受容とその後の長期的機能変動の可能性を検討した。

ラット胎児由来海馬神経細胞に 15 分間の磁場曝露 (100 ミリテスラ) を行ったのち、3 時間目に細胞を回収して total RNA を抽出した。その後、DD-PCR 法を行った結果、磁場曝露群で発現量が増加するフラグメントを検出した。このフラグメントをゲルから回収し、その DNA 断片をサブクローニング後、シークエンスを行ったところ、この cDNA はマウス N-terminal asparagine amidase 1 (NTAN1) に高い相同性を示すことが明らかとなった。NTAN1 は、ユビキチンプロテアソーム系における法則 <N 末端則> の構成因子である N 末端アミダゼをコードする遺伝子である。この DNA 断片をプローブに用いたノーザンプロット解析の結果、15 分間の磁場曝露終了後 3 時間目において、約 3 倍の NTAN1 mRNA 発現量の増加が観察され、6 時間経過後でも 2 倍以上の発現増加が認められた。一方、培養海馬神経細胞に対して 15 分間の磁場曝露を行うと、24 時間後には MAP2 の有意な発現減少が確認されたが、この時には細胞生存率に著明な変化は見られなかった。プロテアソーム阻害剤 MG-132 を処理した細胞では、0.1  $\mu$  M から 1  $\mu$  M の濃度範囲において、磁場曝露に伴う MAP2 発現低下に対する阻止効果が観察された。293A 細胞による相同的組換え法により、NTAN1 遺伝子の組換えアデノウイルスベクターを作製し、海馬神経細胞に NTAN1 を強制的に過剰発現させたところ、GFP 組換えアデノウイルス感染細胞に対して、NTAN1 組換えアデノウイルス感染細胞では、感染後 48 時間目には MAP2 発現量が著明に低下した。したがって、海馬神経細胞に対して短時間磁場曝露を行うと、NTAN1 発現誘導を介する N 末端則ユビキチンプロテアソーム分解系亢進が招来されて、その結果 MAP2 分解が促進される可能性が推察される。

以上の研究成績は、定常磁場曝露に応答性を示す脳内遺伝子に関する先駆的報告であるのみならず、精神神経疾患や神経変性疾患の発症メカニズム解明、ひいては治療応用の糸口となることが期待される点で高く評価されるので、論文審査委員会は本論文が博士 (薬学) に値すると判断する。