

Title	生体内神経前駆細胞におけるp27Kip1の核内移行メカニズムに関する研究
Sub Title	Analysis on mechanism that translocates p27Kip1 into nuclei in neuronal progenitor cells in vivo
Author	三橋, 隆行(Mitsuhashi, Takayuki)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
Abstract	細胞周期調節遺伝子p27Kip1は神経前駆細胞が神経細胞に分化する際重要な役割を果たす。本研究はp27Kip1の神経前駆細胞核内存在量を調節するメカニズムを特定することを目的に実施した。マウス胎仔神経前駆細胞から細胞核成分を調整し、抗p27Kip1抗体、抗AhR抗体、抗Jab-1抗体を用い免疫沈降実験を行った。核抽出の条件設定を試み、異なる抗体を用いて実験したが、相互作用する蛋白質の同定には至らなかった。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2012 課題番号：22791001 研究分野：神経発生学、小児神経 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22791001seika

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791001

研究課題名（和文） 生体内神経前駆細胞における p27Kip1 の核内移行メカニズムに関する研究

研究課題名（英文） Analysis on mechanism that translocates p27Kip1 into nuclei in neuronal progenitor cells in vivo

研究代表者

三橋 隆行 (MITSUHASHI TAKAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80338110

研究成果の概要（和文）：

細胞周期調節遺伝子 p27Kip1 は神経前駆細胞が神経細胞に分化する際重要な役割を果たす。本研究は p27Kip1 の神経前駆細胞核内存在量を調節するメカニズムを特定することを目的に実施した。マウス胎仔神経前駆細胞から細胞核成分を調整し、抗 p27Kip1 抗体、抗 AhR 抗体、抗 Jab-1 抗体を使い免疫沈降実験を行った。核抽出の条件設定を試み、異なる抗体を用いて実験したが、相互作用する蛋白質の同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

p27Kip1, one of the cell cycle regulatory genes, play a critical role in differentiation of neuronal progenitor cells (NPCs). A purpose of this research was to elucidate the mechanism controlling nuclear accumulation of p27Kip1 proteins. We conducted immunoprecipitation assay using anti-p27Kip1, anti-AhR, and anti-Jab-1 antibodies to detect interacting protein against those proteins in the nuclei of NPCs. However, we were unable to detect interacting molecules in the nuclei of the NPCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経発生学、小児神経

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：神経発生、細胞周期、プロモータ、神経幹細胞、大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の獲得はヒト中枢神経系の発達の中でも最重要項目である。高次脳機能が障害されると、知能発達の遅れ、自閉症、注意欠陥・多動症候群、学習障害など多彩な病態を呈すると予想されるが、それらの原因の多くは未解明である。高次脳機能の中核である大脳新皮質の正常発生メカニズムを解明し、さらにその発生障害の原因となる因子について定量的に検討することは、高次脳機能障害の病態解明、治療法開発には不可欠であり社会的意義が大きいと考える。

神経細胞のもととなる神経前駆細胞から大脳新皮質の投射神経細胞が作られる過程は、神経細胞数・組織構造を決定する重要な段階である。神経前駆細胞の増殖・分化誘導における制御因子は、①細胞周期 G1 期の長さ、②分化開始の確率 (Q 値) の二者であることが、これまでの研究で予想されている (Takahashi T, et. al., 1993, 1995, 1996)。これらの二つの因子が共通の細胞内分子機構、特に細胞周期の調節メカニズムによって緻密に制御されていると考えられている。

マウスにおいては、大脳新皮質の投射神経細胞を産生する神経前駆細胞は胎生 11 日から 17 日にかけて合計 11 回分裂し (CC1-CC11: 神経細胞産生)、分裂回数が進むにつれて細胞周期の長さが G1 期の増加に伴い延長し、分化開始の確率 (Q 値) が 0 から 1.0 へと増加することが判明している (Takahashi T, et. al., 1993, 1995, 1996)。さらに、分化の開始が早い細胞は大脳皮質の深い層、遅い細胞は大脳皮質の浅い層に移動することがわかっている (Takahashi T, et. al., 1999)。以上より、完成された大脳皮質の層構造の異常から、神経前駆細胞の細胞分裂動態の異常を類推することができる。

これまでの研究で、胎児発生への影響が社会問題となっている環境汚染物質ダイオキ

シン (2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) をマウス胎児に胎内曝露すると、①神経前駆細胞内の細胞周期調節遺伝子 p27Kip1 蛋白質の核内量が增加、②大脳皮質発生早期に神経前駆細胞の G1 期が延長、③大脳皮質発生早期に神経前駆細胞の分化誘導の確率 (Q 値) が増加、④最終的に形成される大脳皮質深層の投射ニューロン数が減少し菲薄化すること、の四点が明らかとなった (Mitsuhashi T, et. al., 2010, 業績参照)。これらの結果は、p27Kip1 遺伝子を欠失したノックアウトマウス (p27^{-/-}, Nakayama K, et. al., 1996) を用いた TCDD 胎内曝露実験において、TCDD 胎内曝露群 (p27^{-/-}) の大脳皮質の厚さ、皮質各層の投射神経細胞数および密度と、TCDD 非投与群 (p27^{-/-}) のそれらとに統計学的有意差を認めなかったことにより、TCDD 胎内曝露による大脳皮質発生障害に p27Kip1 が中心的な役割を持つことを明らかにした。

p27Kip1 の細胞核内量は、細胞質内のリボソームにおける産生量、核内移行量、核外移行・分解量のバランスにより維持されると想定される。p27Kip1 核外移行メカニズムやユビキチン化による分解メカニズムは明らかとなってきたが (Pagano M, et. al., 1995)、核内に移行するメカニズムについては報告がなく十分解明されていなかった。われわれの先行研究により、TCDD 胎内曝露が神経前駆細胞の p27Kip1 細胞核内量を増加させることが判明したことから、TCDD が作用する aromatic hydrocarbon 受容体 (AhR) を介したメカニズムを通して、p27Kip1 が核内に移行するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、生体内の神経前駆細胞において p27Kip1 蛋白質の核内移行メカニズムを解明することを目的に実施した。先行研究で

TCDD 胎内曝露が神経前駆細胞の p27Kip1 蛋白質核内量を増加させたことから、p27Kip1 蛋白質およびダイオキシンが結合する AhR 蛋白質の免疫沈降実験を行い、両者に相互結合する蛋白質を同定すること、さらにそれらの相互作用を類推することを目的に実験を行った。

3. 研究の方法

まず大脳皮質発生各段階の神経前駆細胞の細胞核および細胞質抽出液を以下の方法で準備した。CD-1 マウスを交配し膈栓の存在で受胎を確認、胎生 0 日とした。妊娠 7 日目に AhR アゴニストであるダイオキシン (TCDD)・3-methylcholanthrene またはコントロールを母マウスに経口投与した。その後、妊娠 10-16 日目の母マウスにペントバルビタールを腹注、胎仔を摘出し、実体顕微鏡下で胎児前脳の頭頂部を眼科用剪刀で切断、神経前駆細胞が存在する脳室帯を分離した。以上の操作は氷上で実施した。

分離した組織をピペッターを用いて機械的に破砕し、組織内の細胞を一様に分離させた。ノイバウエル血球計算盤で細胞数を計測し、両群の細胞数が同数になるよう調整した。遠心分離した細胞を PBS で洗浄後、界面活性剤を含まない lysis buffer A (10 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail)を加え、ペレットペッスルで機械的に緩徐に細胞膜を破壊した。その際細胞核を破壊しないよう、細胞核を染色可能なクレシルバイオレット染色液によりサンプルの一部を染色、顕微鏡下で細胞核成分が破壊されていないことを確認した。核成分と細胞質成分両者から p27Kip1 および AhR と相互作用する蛋白質を同定することを目的に、サンプルを遠心分離し (1) 核成分を用いて p27Kip1 に対する免疫沈降実験、(2) 細胞質成分を用いて AhR に対する免疫沈降実験を行った。

4. 研究成果

(1) 抗 p27Kip1 抗体を用いた免疫沈降実験
まず Santa Cruz 社の抗 p27Kip1 抗体 (p27 (F-8): カタログ番号 sc-1641) を用いて核抽出物を用いた p27Kip1 に対する免疫沈降実験を行ったが沈降物が得ることができず、反応バッファーの組成を変更し対応したが沈降されなかった。そこで別の抗体 (Santa Cruz 社 p27 (C-19): カタログ番号 sc-528、BD Pharmingen 社 Kip1/p27 マウスモノクローナル抗体: カタログ番号 610241) を購入して同実験を実施した。しかし p27Kip1 は沈降するも供結合する蛋白質を沈降することができなかった。原因として、抗体の抗原結合能が不十分であることや目的蛋白質量の不足が考えられた。

(2) AhR に対する免疫沈降実験

AhR と相互作用する蛋白質を同定するため、抗 AhR 抗体 (Santa Cruz 社 Ah receptor (N-19): カタログ番号 sc-8088) を用いて免疫沈降実験を実施した。p27Kip1 に対する免疫沈降がうまくいかなかったため、核抽出の段階で市販の核抽出キット (Panomics 社 Nuclear Extraction Kit) も併用したが、うまく免疫沈降できなかった。原因として、1) 抗体の抗原結合能が不十分、2) 抗体の抗原認識部位が p27Kip1、AhR とそれぞれ相互作用する蛋白質結合部位と一致している可能性、3) 核成分と細胞質成分を分離する際に使用したバッファー組成の問題、などが考えられた。

(3) p27Kip1 核外移行蛋白質に対する免疫沈降実験

p27Kip1 蛋白質の核外移行に重要な Jab-1 蛋白質を対象に免疫沈降実験を行った。具体的には、神経前駆細胞の細胞核および細胞質抽出液を準備し、Jab-1 に対する抗体 (Genetex 社 Anti-Jab-1: カタログ番号

MS-JAB13-PX1) を使って免疫沈降実験を実施した。しかし、AhR、Jab-1 と相互作用する蛋白質の同定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 107 巻, 2010, 16331-16335.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. The 41st annual meeting for Society for Neuroscience, 2011 年 11 月 14 日, Washington, D.C., USA
- ② 三橋隆行、高橋孝雄、胎内でのダイオキシン曝露は脳皮質深層の投射ニューロン産生を障害し皮質を菲薄化させる、第 53 回日本小児神経学会、2011 年 5 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 三橋隆行、ダイオキシン胎内曝露による p27Kip1 を介した脳皮質構築異常：数学モデルを用いた解析、第 41 回慶應ニューロサイエンス研究会、2010 年 11 月 6 日、東京

[図書] (計 1 件)

- ① 三橋隆行、吉井聡、高橋孝雄、東京大学出版会、発達科学入門 2 胎児期～児童期、2012、3-19

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.keio.ac.jp/rdb/med/view.php?i=32>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 隆行 (MITSUHASHI TAKAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 80338110