

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19500320
 研究課題名 (和文) 神経損傷時におけるグリア細胞由来神経栄養因子遺伝子の発現様式の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression during nerve injury
 研究代表者
 木内 一壽 (KAZUTOSHI KIUCHI)
 岐阜大学・工学部・教授
 研究者番号：30135339

研究成果の概要：

LPS 刺激による炎症条件下では、GDNF 遺伝子は従来の神経栄養因子として分泌されるタンパク質をコードしている mRNA の他に、新規の単一エクソン型 GDNF mRNA が誘導され、その翻訳物は細胞内において神経栄養因子とは別の役割を演じている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：神経損傷の再生・修復、神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) は黒質ドーパミンニューロンの生存維持因子として発見されて以来、多くの研究が進められている。近年、脳の機械的な損傷や虚血などの低酸素傷害時に、GDNF がマクロファージやミクログリアなどの免疫系の細胞にて急速に誘導されることが報告されており、その誘導メカニズムに興味を持たれている。一方、中枢神経系において神経変性が生ずる際、小胞体ストレスが引き金となり、転写調節因子 NF- κ B の活性化に伴う多様な炎症性あるいは抗炎症性因子の発現誘導が知られている。しかしながら、神経損傷時での GDNF 遺伝子の発現誘導に NF- κ B が関与している

ことを示す報告はない。そこで、NF- κ B の活性化に係わる炎症性因子の一つであるリポポリサッカライド (LPS) を用いて、マクロファージ系培養細胞株 RAW264.7 を刺激したところ、新規の GDNF mRNA が誘導されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では次の二点に的を絞り、実験を行った。

- (1) LPS 刺激で誘導される GDNF 遺伝子の発現メカニズムを解析する。
- (2) LPS 誘導性の新規 GDNF mRNA の翻訳産物の性状を解析する。

3. 研究の方法

(1) LPS 刺激した RAW264.7 細胞より total RNA を調製し、SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作製し、この新規 GDNF (Ex4 GDNF) mRNA の構造を決定するために 5'-RACE を行う。

(2) GDNF 遺伝子の intron 3 を制限酵素 (*Bam*H I, *Eco*R I) で切り出し、ルシフェラーゼレポーターベクター pGL3-Basic にサブクローニングする。得られたコンストラクトを RAW274.7 細胞に導入し、LPS 刺激によるルシフェラーゼ活性の変化を分析する。

(3) ミクログリア系の不死化細胞株 MG5 細胞や膠芽細胞腫 C6 細胞を LPS 刺激することにより誘導される GDNF mRNA を、各種プライマーペアを用いて、RT-PCR 法により解析する。

(4) 中枢神経系および免疫系の培養細胞およびマウス脳における新規 GDNF mRNA の発現量を、RT-PCR 法により解析する。

(5) NF- κ B 阻害剤、各種プロテインキナーゼ阻害剤を用い、LPS 刺激により誘導された GDNF mRNA の発現量へ及ぼす影響について、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により解析する。

(6) GDNF exon 4 の最初の in-flame ATG の直前に Kozak 配列を導入した発現ベクターを作製し、ラット C6 グリオーマ細胞に導入し、GDNF 蛋白質の細胞内蓄積及び培地中への分泌を Western blot により分析する。また、既知の GDNF cDNA 用いて同様のコンストラクトを対照群として比較する。

(7) エキソン 3 とエキソン 4 より前駆体型として産生される既知の GDNF について、各種変異 GDNF 発現コンストラクトを作製し、GDNF タンパク質の翻訳後修飾および細胞内輸送過程について、ウエスタンブロット法を用いて解析する。

(8) C6 細胞を用いて恒常的 GDNF 高発現細胞株を作製し、翻訳後修飾から分泌までの過程について解析する。

4. 研究成果

(1) RAW264.7 細胞を LPS 刺激して得られた total RNA をもとに、完全長 cDNA ライブラリーを作製し、5'-RACE を行ったところ、既知のエキソン 4 の上流に隣接した 683 bp の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) の存在を確認することができた。Ex4 GDNF mRNA には、従来のエキソン 4 内の最初の ATG コドンより 48 bp

上流にインフレームのストップコドンが存在するので、単一エクソン遺伝子の可能性があり、Ex4 GDNF mRNA より翻訳されたタンパク質は従来のものとは異なる性質を有することが示唆された。

```
5' -CCGAAATGATCATTGTTGTC
      TCACTTGACATTTCTGTTTT
      GTTGGACAGCCAATATGCCT-3'
```

図 1 Ex4 GDNF cDNA の塩基配列
下線部は exon 4、太字は各々、
終止コドンと開始コドンを示す。

(2) Intron 3 領域のプロモーター活性は低く、LPS 刺激には応答しないことが明らかとなり、応答配列の探索は今後の課題とする。

(3) 上記 5'-UTR 内のセンスプライマーを用い、MG5 細胞および C6 細胞を 1 μ g/ml LPS で 36 時間処理した後、RT-PCR 法にて分析したところ、いずれの細胞でも Ex4 GDNF mRNA 発現の上昇を確認することができた。

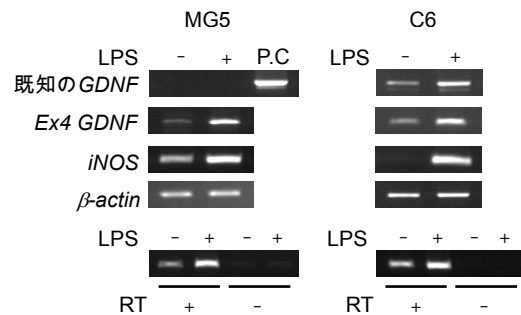


図 2 MG5 細胞および C6 細胞における LPS 刺激による Ex4 GDNF mRNA の発現誘導

また、ラット初代培養マクロファージ、ミクログリア、アストロサイトにおいても同様に Ex4 GDNF mRNA は誘導され、中枢神経系の損傷時においても発現することが示唆された。

(4) ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y から調製した total RNA 中にも同様に新規の GDNF mRNA が存在していることが分かったので、

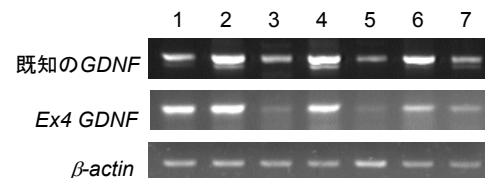


図 3 マウス脳における Ex4 GDNF mRNA の発現量

1: 小脳、2: 嗅球、3: 大脳皮質、4: 線条体
5: 海馬、6: 中脳、7: 延髄

マウス脳を 7 つの部位に分けて RT-PCR 法により Ex4 GDNF mRNA の発現量を分析した。

その結果、いずれの部位でも発現が確認され、特に嗅球と線条体での発現量は高いことが明らかとなった。

(5) 初代培養アストロサイトおよびマイクログリアにおいて、NF- κ B 阻害剤 MG132 および Bay11-7082 は LPS 刺激による iNOS mRNA の発現誘導を抑えたものの、GDNF mRNA の発現量には影響を及ぼさないことから、新規 GDNF mRNA の遺伝子発現は NF- κ B 非依存性であることが示唆された。

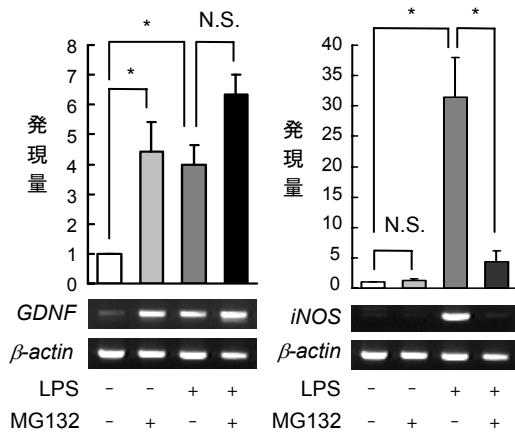


図4 初代培養マイクログリアにおける LPS 誘導性 GDNF および iNOS mRNA 発現に及ぼす MG132 の影響

各種プロテインキナーゼ阻害剤を用いた解析から、少なくとも初代培養マイクログリアでは JNK リン酸化カスケードが LPS 誘導性の GDNF 遺伝子発現に関与していることが明らかとなった。

(6) Ex4 GDNF 発現コンストラクトを C6 細胞に一過性に遺伝子導入して、翻訳後修飾および各種刺激による GDNF の培地中への分泌について解析したところ、Ex4 GDNF mRNA 由来のタンパク分子は糖鎖付加されないこと、刺激の有無にかかわらず細胞外に分泌されないことが明らかとなった。

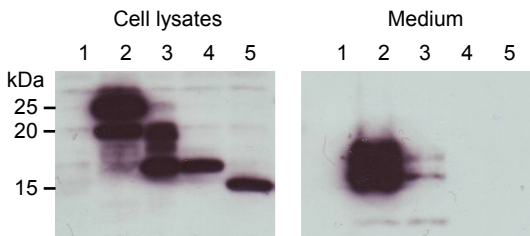


図5 C6 細胞に一過性に導入した各種 GDNF 発現コンストラクトの翻訳産物の動態

1: mock、2: 野生型、3: 前駆体一部欠失型、4: Ex4 GDNF、5: 成熟型

(7) 既知の GDNF は furin 様プロテアーゼのプロセッシングにより取除かれるプロドメイ

ンおよび C 末端の 2 つの Cys 残基が GDNF の分泌に重要な役割を果たしていること、furin 様プロテアーゼプロセッシング配列に変異を入れると前駆体 GDNF が分泌されることが明らかとなった。また、野生型 GDNF では、細胞中には前駆体型 GDNF が大勢を占めること、培地中には 3 種類分子量の異なる分泌型 GDNF が存在することから、分泌過程あるいは分泌後に furin 依存・非依存的にプロセッシングされることが示唆された。

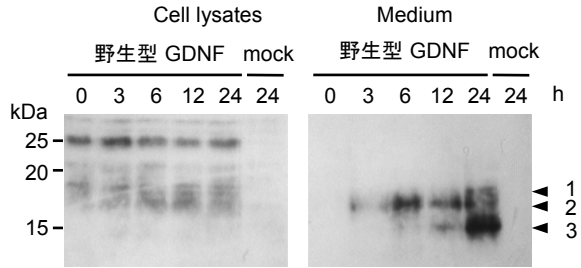


図6 GDNF を恒常的に高発現させた C6 細胞からの GDNF 分泌の経時変化

(8) GDNF 高発現 C6 細胞株を用いて小胞体・ゴルジ体間の輸送過程について解析した結果、GDNF の N-glycosylation は細胞内輸送過程に必須であること、GDNF の分泌には細胞内 Ca^{2+} の上昇、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

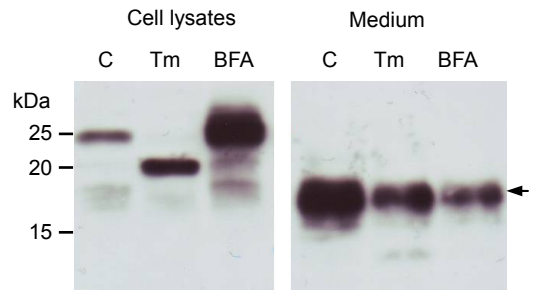


図7 GDNF を恒常的に高発現させた C6 細胞からの GDNF 分泌に及ぼす糖鎖修飾阻害剤ツニカマイシン (Tm) とゴルジ体輸送阻害剤 BFA の影響

C: 対照、 \leftarrow : 成熟 GDNF

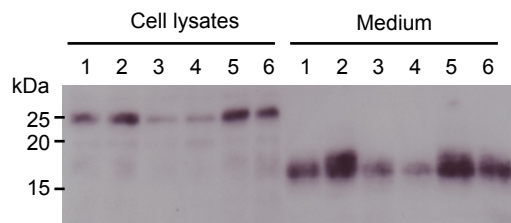


図8 GDNF を恒常的に高発現させた C6 細胞からの GDNF 分泌に及ぼす各種薬剤の影響

1: 対照、2: KCl、3: A23187、4: タブシガルギン、5: LPS、6: PMA \leftarrow : 成熟 GDNF

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 3 件)

(1)Oh-hashK., Ito M., Tanaka T., Hirara Y. and Kiuchi K., Biosynthesis, processing, and secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor in astroglial cells, Mol. Cell. Biochem., 323(1-2), 1-7 (2009) 査読有り

(2)Tanaka T., Oh-hashK., Ito M., Shitara H., Hirata Y. and Kiuchi K., Identification of a novel GDNF mRNA induced by LPS in immune cell lines, Neurosci. Res., 61(1), 11-17 (2008) 査読有り

(3)Tanaka T., Oh-hashK., Shitara H., Hirata Y. and Kiuchi K., NF- κ B independent signaling pathway is responsible for LPS-induced GDNF gene expression in primary rat glial cultures, Neurosci. Lett., 431(3), 262-267 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

(1)田中達英、大橋憲太郎、松山幸弘、設楽裕信、平田洋子、木内一壽、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) 遺伝子の発現誘導メカニズムの解析、神経組織の成長・再生・移植研究会 第 23 回学術集会、平成 20 年 5 月 17 日、千葉

(2)設楽裕信、田中達英、大橋憲太郎、平田洋子、木内一壽、ラット初代培養グリア細胞における LPS 誘導性 GDNF 遺伝子発現機構の解析、第 80 回日本生化学大会、平成 19 年 12 月 14 日、横浜

(3)田中達英、大橋憲太郎、設楽 裕信、平田洋子、木内一壽、初代培養グリア細胞における LPS 誘導性 GDNF 遺伝子発現機構の解析、第 30 回日本神経科学大会、平成 19 年 9 月 11 日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

木内 一壽 (KIUCHI KAZUTOSHI)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：30135339

(2)研究分担者

大橋 憲太郎 (OH-HASHI KENTARO)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：50332953

(3)連携研究者