

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700307
 研究課題名（和文） 神経細胞特異的発現ニューログロビン遺伝子の転写調節機構に関する研究
 研究課題名（英文） Transcriptional regulation of the neuroglobin gene expression in neural cells
 研究代表者
 田原 強（Tahara Tsuyoshi）
 独立行政法人理化学研究所・分子プローブ機能評価研究チーム・研究員
 研究者番号：20419708

研究成果の概要：

本研究において、マウスおよびラットNeuroglobin遺伝子プロモーターおよそ2kbpをクローニングすることができ、さらに、このプロモーターが転写活性能を有していることを明らかにした。

一方、neuroglobinのヘム依存的発現について調べたところ、マウス神経芽細胞 Neuro2a 細胞内のヘム含量の低下に伴って、neuroglobin遺伝子およびたんぱく質の発現量が低下することが明らかになった。すなわちNeuroglobinの発現は、細胞内ヘム含量に依存す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	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ヘム、neuroglobin、転写

1. 研究開始当初の背景

近年、脳および神経組織特異的に発現する新規グロビタンパク質-Neuroglobin (Ngb)が発見され、神経細胞への酸素運搬、さらには低酸素時においてmRNAが誘導され低酸素に対する細胞保護機能を有す

ることが報告された。さらにNgbが虚血・再灌流（酸化ストレス）時に立体構造を大きく変え、シグナル伝達蛋白質と相互作用し、シグナル伝達経路を制御することにより、神経細胞死を防ぐという分子機構が明らかにされた。これにより、グロビタンパク質は酸素結合蛋白質としてだけ働く

という従来の固定観念がくつがえされ、酸化ストレス応答性のシグナル伝達センサー蛋白質として機能するという全く新たな概念が打ち立てられた。しかしながら、その機能の研究とは違い、Ngbの発現制御調節機構に関する研究はほとんど行われておらず、そのメカニズムについては、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、Ngb遺伝子の転写調節機構を解明することを目的として、ヘムにおける転写誘導機構について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

神経系培養細胞であるマウス Neuro2a およびラット PC12 細胞は、10%FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む DMEM培地を用いて、37°C、5% CO₂条件において培養した。細胞内のヘム含量を変化させるために、特異的ヘム合成阻害剤サクシニルアセトン(SA; 終濃度 1 mM)およびヘミン(終濃度 50 μM)を培地に添加し、細胞を 16 時間後回収し、PBSを用いて洗浄を行った。

レポーター解析を行うための遺伝子導入は、Lipofectamine 2000 のプロトコールに従って行った。

(2) プラスミドの構築

マウスおよびラット neuroglobin プロモーター領域を PCR 法によって増幅し、pGEM T-easy vector に組み込み、DNA シークエンサーを用いて、配列の確認を行った。目的の配列がクローニングできたことを確認した後、EcoRI-XhoI 部位を用いて、レポーターベクターである pGL4 ベクターに挿入しサブクローニングを行い、レポーターアッセイ用ベクターを作製を行った(pGL-mNg & pGL-rNg)。

(3) RT-PCR

トータル RNA は、グアニジンイソチオシアネート・フェノールクロロホルム抽出法を用いて細胞から調製し、oligo dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA に変換した。マウス neuroglobin 遺伝子内に設計したプラ

イマー(表 1)と cDNA を用いて PCR を行った。増幅後、PCR 産物は、6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。内部コントロールとして GAPDH 遺伝子を増幅した。

表1 RT-PCRに用いたプライマーペア

Neuroglobin gene	
5'- GAAGCATCGGGCAGTG	- 3'
5'- AGGCACTTCTCCAGCATGTAGAG	- 3'
GAPDH gene	
5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC	- 3'
5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA	- 3'

(4) ウェスタンブロット解析

1 mM SA 処理を行った細胞を回収し、PBSを用いて洗浄した後、SDS-PAGE 用サンプルを調製した。たんぱく質濃度は、ブラッドフォード法によって決定した。サンプルを SDS-PAGE 電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した後、スキムミルクを用いてブロッキングを行った。一次抗体は、抗 neuroglobin 抗体と抗 α -actin 抗体を使用した。二次抗体には、HRP 標識された抗 IgG 抗体を用い、化学発光シグナルを LAS-3000 を用いて検出を行った。

(5) レポーター解析

pGL-mNg、pGL-rNg および pRL ベクターを Neuro2a 細胞にトランスフェクションし、16 時間培養した細胞を PBS を用いて洗浄後、Passive Lysis Buffer を加え細胞を溶解した。続いて遠心分離し、上清を酵素液とした。Photinus Luciferase および Renilla Luciferase の活性測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System のプロトコールに従って行った。まず、酵素液と LAR II を混和し、Photinus Luciferase による発光をルミノメーターを用いて測定した。続いて Stop&Glo Reagent を添加して、Renilla Luciferase による発光を計測した。トランスフェクションの効率、内部コントロールとして Renilla Luciferase の活性により補正した。全ての実験は、それぞれ独立した実験を 3 回以上行った平均を求め、標準偏差を用いてグラフ化した。

(6) 細胞内ヘム含量の測定

細胞内のヘム含量を測定するために、培養細胞に 1 mM サクシニルアセトン (SA) を添加し、16 時間培養した。培養後、細胞を回収後し、PBS を用いて 2 回洗浄を行った後、細胞に 2M シュウ酸を加え、120°C、20 分間の条件で加熱し、分光蛍光光度計を用いて励

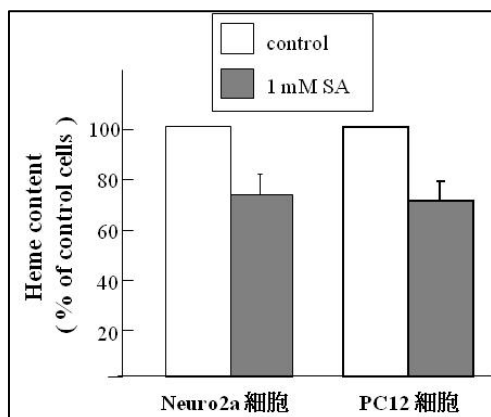
起波長 400 nm、蛍光波長 550-700 nm の条件で蛍光スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞内ヘム含量の変化

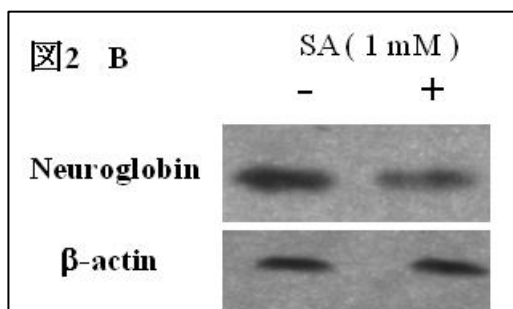
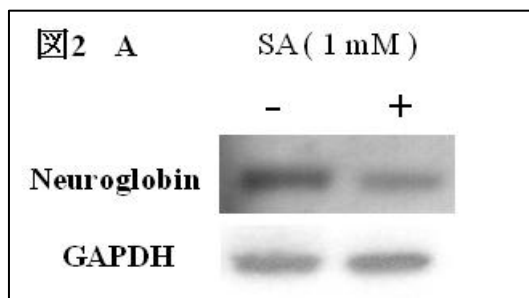
SA は、基質競合型ヘム合成阻害剤である。そこで、細胞内ヘム含量を低下させるために、PC12 および Neuro2a 細胞は、1 mM SA を添加して培養した。SA 処理を行った両細胞において、ヘム含量はコントロールのおよそ 3 割減少した(図 1)。すなわち SA 処理によって細胞内ヘム含量が低下していることが示された。

図 1. 細胞内ヘム含量



(2) 細胞内ヘム含量に伴う Neuroglobin 遺伝子およびたんぱく質の発現変化

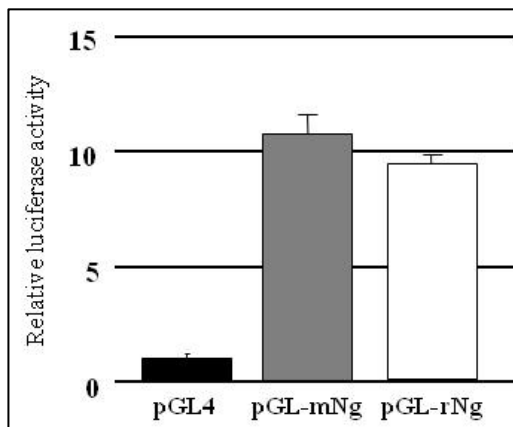
SA 処理を行った Neuro2a 細胞から RNA およびたんぱく質を調製し、RT-PCR と western blot analysis を行い、それぞれの発現を調べた。その結果、遺伝子(図 2A)およびたんぱく質(図 2B)いずれにおいても、細胞内ヘム含量の低下に伴って発現の低下がみられた。



(3) Ngb プロモーターを用いた Reporter assay

本実験においてマウスとラットのおよそ Neuroglobin 遺伝子の 2Kbp 上流までのプロモーター領域をクローニングすることに成功した。そこで、クローニングできた領域が転写活性を有しているかどうかを調べるために、reporter assay を行った。その結果、図 3 に示すように、いずれのプロモーター領域において活性を示し、これら領域がプロモーターとして機能していることが示唆された。

図 3 Reporter assay



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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 田原 強ほか 5 名、疲労モデルラットにおけるデルタアミノレブリン酸の増加とその機構、第 4 回日本疲労学会、平成 20 年 2 月 16 日、熊本県

〔図書〕（計1件）

- ① 田原 強、社団法人日本薬学会、ファルマシア、2007年、1007-1008頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 強 (Tahara Tsuyoshi)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ

機能評価研究チーム・研究員

研究者番号：20419708