

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：34521

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860196

研究課題名(和文) 分子シャペロン プレフォルディンはシナプス可塑性に必要な分子なのか？

研究課題名(英文) Time-dependent Changes of PFDN5 Expression during a Long-term Potentiation-like Facilitation in Adult Mouse Hippocampus Induced by Nicotine Application

研究代表者

松浦 健二 (Matsuura, Kenji)

姫路獨協大学・薬学部・助手

研究者番号：20452641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ニコチンによるシナプス可塑性発現における分子シャペロンPrefoldin subunit 5 (PFDN5) の関与を明らかにすることを目的とする。シナプス可塑性発現時の海馬において、PFDN5 遺伝子および蛋白質の発現は時間依存性に变化し、mRNAは24時間後に、蛋白質は8、24時間後に最大となり、その後元の発現レベルに戻った。PFDN5蛋白質の発現はメカミラミンの前処置によって阻害されたが、完全ではなかった。さらに、ユビキチン化PFDN5蛋白質の発現が24時間後に増加した。このPFDN5蛋白質の増加にはPFDN5の合成系の促進とユビキチン依存性の蛋白質分解系の抑制の関与が示された。

研究成果の概要(英文)：Long-lasting synaptic plasticity requires changes of protein expression, although the mechanisms remain unclear. We previously reported that nicotine expressed a long-term potentiation-like facilitation, that is synaptic plasticity, in mouse hippocampus. In this study, we conducted to clarify the involvement of Prefoldin subunit 5 (PFDN5) in synaptic plasticity. After nicotine treatment (3 mg/kg, i.p.), mRNA and protein expression of PFDN5 in hippocampus increased gradually during 2-24-hr period. This enhanced expression of PFDN5 protein at 24-hr was not completely inhibited by pretreatment of mecamylamine (0.5 mg/kg, i.p.), a nonselective nicotinic ACh receptor (nAChR) antagonist. Ubiquitinated PFDN5 increased during synaptic plasticity after nicotine treatment. These findings demonstrated that PFDN5 protein was enhanced during synaptic plasticity through coordinated regulation of gene expression and protein degradation.

研究分野：神経薬理学

キーワード：シナプス可塑性 プレフォルディン ニコチン

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、ニコチンのマウス腹腔内投与により、海馬歯状回にシナプス可塑性として長期増強様作用が発現すること、そして、アルツハイマー病モデルマウスの変異 APP 発現マウスではシナプス可塑性が障害されていることを明らかにしてきた。さらに、アルツハイマー病モデル動物における学習記憶機能障害がニコチンにより回復することが報告されている。また、シナプス可塑性においては新規蛋白質の合成、シナプスの形態変化等が知られており、新規蛋白質の解析はシナプス可塑性の分子メカニズムの解明につながるものと考えられる。さらに、アルツハイマー病の学習記憶機能障害等の症状に関与する蛋白質の同定につながる可能性のあるものと考えられる。

2. 研究の目的

分子シャペロン Prefoldin subunit 5 (PFDN5) は subunit 1~6 からなるヘテロ 6 量体を形成する分子シャペロンである。合成直後のアクチン及びチューブリンのポリペプチドを捕えて安定化し、シャペロニンに受け渡すことでこれらのフォールディングを促進している。また、PFDN5 はアミロイドの凝集を抑制し低毒性の可溶性オリゴマーを形成させることが知られている。よって、PFDN5 はシナプス可塑性において何らかの機能を担っていると考えられる。ニコチンのマウス腹腔内投与による海馬におけるシナプス可塑性発現下のプロテオーム解析を行い、今回、我々は発現変化する蛋白質の一つである PFDN5 に着目した。成体マウス海馬における PFDN5 の蛋白質の発現および局在を、また、マウス腹腔内へのニコチン投与による海馬におけるシナプス可塑性下での PFDN5 の発現を経時的に解析することで、ニコチン投与によるシナプス可塑性における PFDN5 の寄与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学

ペントバルビタールの深麻酔下で、マウス左心室から氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入して脱血後、固定液 (4% paraformaldehyde in PBS) を注入して灌流固定を行い、摘出した全脳を固定液に一晩浸透させた。固定した脳組織から、海馬切片 (厚さ 15 μm) を作製し、抗体を処置して PFDN5 蛋白質の発現を DAB 染色により視覚化した。DAB 染色では、海馬切片を 0.3% H_2O_2 で 30 分間処置した後、ブロッキング液 (5% goat serum and 0.1% Triton X-100 in PBS) でブロッキングし、PFDN5 蛋白質を抗 PFDN5 抗体 (Abcam 製) で検出し、アビジン-ビオチンシステム (ABC 法) で増感後、ペルオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体で可視化した。

(2) ニコチン投与によるシナプス可塑性発現マウスの作製

C57BL/6 マウス (約 25~30 g) の腹腔内に、生理食塩水に溶解したニコチン (3 mg/kg) を投与した。ニコチンを投与して数時間から数日間の一定期間 (2、4、8、24、48、72 時間) 生存させた後、ペントバルビタールの深麻酔下で海馬を摘出した。生理的食塩水のみを腹腔内投与したマウスをコントロール群とした。また、ニコチン受容体遮断薬のメカミラミン (0.5 mg/kg) 投与 10 分後に、同様にニコチンを投与して 24 時間後に海馬を摘出した。

(3) マウス海馬サンプルの調製

ニコチン処置群およびコントロール群より摘出したマウス海馬から、mRNA および蛋白質サンプルを調製した (各 7 匹)。mRNA は、SV Total RNA Isolation System (Promega 製) を用いて抽出し、調製したサンプルを PCR 法および定量的 RT-PCR 法で解析した。蛋白質は、マウス海馬を細胞溶解液 (20 mM Tris-HCl pH7.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 6 M urea, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) 中で、30 秒間超音波処理し、溶解したサンプル溶液を遠心分離 (15,000 x g, 30 min) により調製した (上清)。

(4) PFDN5 の遺伝子発現の解析

cDNA の合成は、Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics 製) を用いて、(3) で調製した mRNA (5 μg) に oligo (dT)₁₈ プライマーを反応 (55 °C for 30 min after denaturation at 65 °C for 10 min) させて行った。cDNA 合成後、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 製) と PFDN5 遺伝子に特異的な以下のプライマーを用いて、定量的 RT-PCR 法で遺伝子発現量を定量した。その際、内部標準である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子発現量も定量した。

PFDN5 (Forward):

5' - CCACTGACGAGTTCTATGTACGTC -3'

PFDN5 (Reverse):

5' - CCATCTGTTTGGTGAGGAAGTCTA -3'

GAPDH (Forward):

5' - CGTGTTCCTACCCCAATGT -3'

GAPDH (Reverse):

5' - TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT -3'

定量的 RT-PCR 法により得られたデータは、comparative CT 法により解析した。

(5) PFDN5 の蛋白質発現の解析

(3) で調製した蛋白質 (5 μg) を 15% SDS-PAGE で分離し、PDVF 膜上に電氣的に転写した。PDVF 膜をスキムミルクでブロッキングした後、PFDN5 蛋白質を抗 PFDN5 抗体 (Abcam 製) (1000 倍希釈) で検出、ペルオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体および ECL Plus ウエスタ

ンプロットティング検出キット(GE Healthcare 製) で可視化しデンストメトリーを用いて定量化した。

(6) ユビキチン化 PFDN5 の発現の解析

ニコチン処置群およびコントロール群より摘出したマウス海馬から、蛋白質サンプルを調製した(各 4 匹)。ユビキチン化 PFDN5 蛋白質の免疫沈降は Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo 製) により行い、ウエスタンブロット法により検出した。

4 . 研究成果

(1) 成体マウス海馬における PFDN5 蛋白質の発現

成体マウス海馬における PFDN5 の蛋白質の発現を免疫組織化学法により確認した結果、PFDN5 蛋白質は海馬の広範囲に発現していた(図 1)。

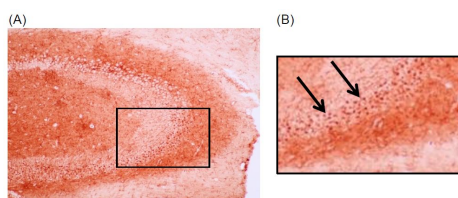


図 1 成体マウス海馬における、PFDN5 の蛋白質発現の検出(免疫組織化学)

- (A) PFDN5 蛋白質の発現(弱拡大)
- (B) PFDN5蛋白質の発現(強拡大)

(2) ニコチン誘発シナプス可塑性発現下における PFDN5 の発現変動

マウス海馬におけるニコチン誘発シナプス可塑性下(マウス腹腔内へのニコチン投与 2、4、8、24、48、72 時間後)の PFDN5 の遺伝子および蛋白質発現の経時的变化を解析した結果、PFDN5 mRNA はニコチン投与 2~24 時間後まで、時間依存性に発現レベルが増加し、その後減少した(図 2 A)。一方、PFDN5 蛋白質はニコチン投与 4~8 時間後まで時間依存性に発現レベルが増加し、24~72 時間後に減少し、72 時間後で発現量はコントロールのレベルにまで戻った(図 2 B)。

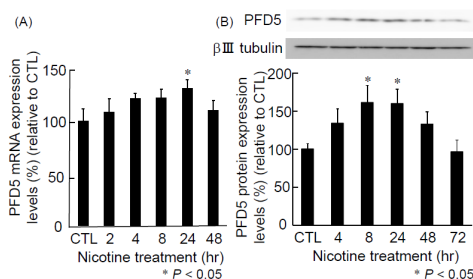


図 2 ニコチン投与によるシナプス可塑性発現下における PFDN5 遺伝子および蛋白質の経時的变化

(A) PFDN5 mRNA の発現レベルの経時的变化

(B) PFDN5 蛋白質の発現レベルの経時的变化

(3) ニコチン誘発シナプス可塑性阻害下における PFDN5 蛋白質の発現抑制

ニコチン受容体遮断薬であるメカミラミン前処置により、ニコチン投与によるシナプス可塑性の長期増強様作用の発現は阻害されることを報告している。ニコチン誘発シナプス可塑性阻害下における、PFDN5 蛋白質の発現を確認したところ、ニコチン投与 24 時間後の PFDN5 蛋白質の発現は減少したが、完全には抑制されなかった(図 3)。

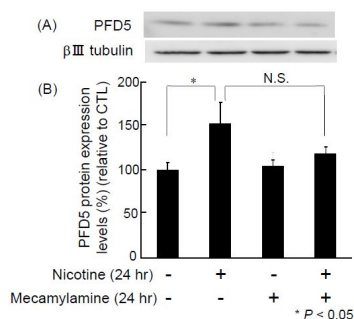


図 3 シナプス可塑性阻害下における PFDN5 蛋白質の発現抑制

(A) PFDN5 蛋白質のイメージ(ウエスタンブロット法)

(B) PFDN5 蛋白質の発現レベルの定量値

(4) PFDN5 の分解におけるユビキチン依存性蛋白質分解系の関与についての検討

ニコチン投与 24 時間後の PFDN5 蛋白質のユビキチン化を検討するため、抗 PFDN5 抗体で免疫沈降した後、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロット法を行った。その結果、ニコチン投与 24 時間後において、ユビキチン化 PFDN5 蛋白質が増加した(図 4)。

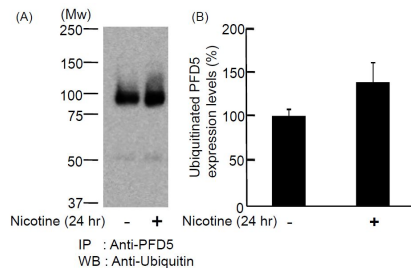


図4 ユビキチン化 PFDN5 の検出

(A) ユビキチン化 PFDN5 蛋白質のイメージ (ウエスタンブロット法)

(B) ユビキチン化 PFDN5 蛋白質の発現レベルの定量値

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)

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. The influence of chronic nicotine treatment on proteins expressed in the mouse hippocampus and cortex. *Eur J Pharmacol.* 780, 16-25, 2016, 査読有, DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.03.025.

Kadoyama K, Matsuura K, Nakamura-Hirota T, Takano M, Otani M, Matsuyama S. Changes in the Expression of Collapsin Response Mediator Protein-2 during Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus. *J Neurosci Res.*, 93, 1684-1692, 2015, 査読有, DOI: 10.1002/jnr.23626.

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. The influence of chronic ibuprofen treatment on proteins expressed in the mouse hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 752, 61-68, 2015, 査読有, DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.047.

[学会発表](計 2件)

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. Proteomic analysis of the hippocampus and cerebral cortex of streptozotocin-treated mice showing cognitive dysfunction, 第89回日本薬理学会, 2016年3月11日, パシフィコ横浜(横浜市)

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. The influence of chronic nicotine treatment on proteins expressed in the mouse hippocampus and cortex 国際神経化学会, 2015年8月26日, 27日, ケアンズ(オーストラリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 健二 (MATSUURA Kenji)

姫路獨協大学・薬学部・助手

研究者番号: 20452641