

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」
（主任研究者：米田幸雄）

分担研究課題：「グルタメイトシグナルを介するミトコンドリア遺伝子の転写制御」
分担研究者：荻田喜代一（摂南大学 薬学部助教授）

研究要旨 グルタメイトシグナルを介するミトコンドリア内転写因子の変動について解析した。未処理動物の海馬および大脳皮質のミトコンドリア抽出液中には、AP-1 DNA 結合能はほとんど認められなかった。しかしながら、カイニン酸を投与すると、両脳内部位において 1-6 時間後には著明な AP-1DNA 結合能の上昇が見られた。本結合能上昇は少なくとも投与後 3 日まで持続した。カイニン酸投与により発現したミトコンドリア内 AP-1 は、少なくとも c-Fos、Fos-B および Jun-B 蛋白質により構成されることが明らかとなった。c-Fos 蛋白質は、カイニン酸投与動物の海馬 CA1 錐体細胞および歯状回顆粒細胞で著明に発現するが、その c-Fos 蛋白質は細胞核内ばかりでなく、細胞質およびミトコンドリア内でも観察されることが免疫電子顕微鏡法により明らかとなった。ミトコンドリア DNA 転写領域の AP-1 類似配列への DNA 結合能がカイニン酸処理により増強された。以上の結果より、カイニン酸シグナルにより発現した AP-1 は、ミトコンドリア内に移行してミトコンドリア DNA の転写調節を行う可能性が示唆される。

A. 研究目的

神経細胞において、細胞外グルタメイトシグナルは、細胞膜上のイオノトロピック型およびメタボトロピック型レセプターにより細胞内シグナルに変換され、持続的な細胞機能変化を誘発することは周知の事実である。イオノトロピック型レセプターの活性化は、一過性の細胞膜イオン透過性の変化により持続的・永続的細胞機能変化をもたらすことから、レセプター活性化に続く細胞内シグナルの変化が注目されてきた。たとえば、発達脳および成熟脳における神経ネットワーク構築などの可塑性形成プロセスや神経細胞死（アポトーシス）プロセ

スにグルタメイトシグナルが関与することが示されている。近年、グルタメイトシグナルによる持続的細胞機能変化が、細胞核内転写因子の発現による特定遺伝子の発現が関与することが示され、多くの解析が行われている。一方、グルタメイトシグナルはミトコンドリアの膜電位変化や蛋白質のミトコンドリア膜透過性変化などのミトコンドリア機能変化を惹起してアポトーシスなどを誘発することが示される。また、グルタメイトシグナルによる活性酸素ラジカルの発生がミトコンドリア機能変化によることも知られる。このように、グルタメイトシグナルにおいてミトコンドリアが重要な役割を演じていることは論を待たない。

しかしながら、ミトコンドリア内遺伝子の転写調節におけるグルタメイトシグナルの関与については現在のところ全く不明である。したがって当該研究では、グルタメイトシグナルによる細胞機能変化をミトコンドリア遺伝子の転写制御の観点から追究しようとするものであり、グルタメイトシグナルを介するミトコンドリア遺伝子転写調節メカニズムの解明を第一の目的とする。

前初期遺伝子産物である Fos/Jun ファミリー蛋白質は細胞核内に移行して細胞核内の転写制御因子 activator protein-1 (AP-1) として働くことは周知の事実である。海馬神経細胞の細胞核内 AP-1 の DNA 結合能はグルタミン酸アゴニストの一つであるカイニン酸により著明に増強されることおよびカイニン酸シグナルが細胞核内特定遺伝子の転写調節を行う可能性が示唆されている。

本研究では、グルタミン酸シグナルによるミトコンドリア内遺伝子の転写制御の可能性を検討する目的で、カイニン酸投与マウス脳におけるミトコンドリア内 AP-1 の変化を解析した。

B. 研究方法

1. サンプル調製

ddY 系雄性マウスにカイニン酸 (30 mg/kg) を腹腔内投与し、一定時間経過後に海馬および大脳皮質から細胞核抽出液およびミトコンドリア抽出液を次のように調製した。

1) 細胞核抽出液
組織をホモジナイズ用緩衝液*でホモジナ

イズする。(1 mL: 大脳皮質、海馬、中脳、橋・延髄、小脳、0.5 mL: 線条体、視床下部)

↓

遠心分離 (3,300 rpm, 10 min)

→上清 (S₁画分)

↓

沈殿 (P₁画分) に同量の同緩衝液を加えてボルテックスにより懸濁する。

↓

NP-40 (52 μL/1 mL ホモジネイト) を添加して

素早く混和する。

↓

5分間氷中放置

↓

遠心分離 (3,300 rpm, 10 min)

↓

沈殿に抽出用緩衝液** (400 μL/1 mL ホモジネイト) を添加してボルテックスで均一に懸濁する。

30分間氷中放置

↓

遠心分離 (15,000 rpm, 5 min)

↓

上清を細胞核抽出液として-80度で保存する。

2) ミトコンドリアおよびサイトゾール
S₁画分

↓

遠心分離 (11,000 rpm, 10 min)

↓

沈殿 (P₂画分) を 3% Ficoll 溶液*** (0.2 mL) でピペティングにより懸濁する。

↓

チューブに 6% Ficoll 溶液*** (1 mL) を入れておき、その上に P₂画分懸濁液を重層

する。

↓

遠心分離 (11,000 rpm, 30 min)

↓

上清をアスピレーターで除く。

↓

ホモジナイズ用緩衝液 (1 mL) を添加して、軽いボルテックスにより沈殿を洗浄する。

↓

遠心分離 (15,000 rpm, 5 min)

↓

沈殿に抽出用緩衝液 (150 μ L) を添加して、ハンディーマイクロチューブホモジナイザーで懸濁する。

↓

30分間水中放置

↓

遠心分離 (15,000 rpm, 5 min)

↓

上清をミトコンドリア抽出液として-80度で保存する。

*ホモジナイズ用緩衝液

10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM each of phosphatase inhibitors (NaF and sodium β -glycerophosphate), and 1 μ g/ml each of protease inhibitors [(p-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride, benzamidine, leupeptin, and antipain]

**抽出用緩衝液

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10% glycerol, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM each of phosphatase inhibitors (NaF and sodium β -glycerophosphate), and 1 μ g/ml each of protease inhibitors [(p-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride, benzamidine, leupeptin, and antipain]

***Ficoll 溶液

各濃度になるようにホモジナイズ用緩衝液

で調製した。

2. ゲル移動度シフト法

細胞核抽出液あるいはミトコンドリア抽出液中の AP-1 DNA 結合能を測定するために、二本鎖 DNA プローブ (5'-CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC-3') を用いた。また、ミトコンドリア DNA 非翻訳領域の AP-1 類似部位の中で MT-3 (5'-AGTTTATGACTGTATGGTG-3') および MT-9 (5'-AAAATATGACTTATATTTT-3') をミトコンドリア DNA 結合能の検出のプローブとして用いた。プローブの標識は、 $[^{32}\text{P}]$ deoxy-ATP、deoxy-GTP、deoxy-CTP および deoxy-TTP を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液中で DNA polymerase I を用いて行なわれた。電気泳動は、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、1.5 時間、11V/cm の定電圧で 50 mM Tris、0.38 M glycine および 2 mM EDTA を含む緩衝液 (pH8.5) 中で行おこなわれた。ゲルを固定・乾燥後、オートラジオグラフィにより放射活性を測定した。オートラジオグラフィの定量化は densitograph AE-9600(アトー社)により行った。

スーパーシフト分析は、DNA 結合反応の前にサンプルと抗体を、4 度で一夜反応させて行った。

3. イムノブロット法

細胞核抽出液およびミトコンドリア抽出液を 2%SDS、5%2-mercapto-ethanol、10%グリセリンおよび 0.01% bromophenol blue の存在下で 5 分間煮沸されたのちに凍結保存した。c-Fos 蛋白検出のためには

7.5%ポリアクリルアミドゲル、ヒルトン H1 とチトクロム c の検出のためには 15% ゲルが用いられた。電気泳動後、蛋白質を PVDF 膜 (Immobilon-P) に転写し、次いで PVDF 膜を 5%スキムミルクで処理した。一次抗体を 4 度で一夜反応させた後に、パーオキシダーゼ標識二次抗体と反応させた。抗体陽性蛋白質の検出は ECL 試薬を用いて行った。

4. 免疫組織化学法

マウスを pentobarbital 麻酔下で (250mg/kg, i.p.)、4%paraformaldehyde/0.1 M リン酸緩衝液で灌流固定した。脳を摘出後 4 度で一夜 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) /30%サッカロースによって平衡化された。連続冠状切片 (30mm) をクライオスタットにより作成した。抗体陽性蛋白質の検出は、アビジン-ビオチン-パーオキシダーゼ法により行った

5. 電子顕微鏡法

マウスを pentobarbital 麻酔下で 0.1 M リン酸緩衝液と 5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde で灌流固定した。海馬ブロック (1 mm³) を直ちに作成して、一夜、4 度で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4)/8% サッカロースによって平衡化した。海馬ブロックは 1%オスミウムによって後固定された。その後、サンプルはエタノールで脱水されて、LR ホワイトに包埋後に超薄切片を作成した。抗体陽性蛋白質の検出には金標識二次抗体を用いた。

6. 倫理面への配慮

動物実験はすべて、日本薬理学会動物実験指針に従い、摂南大学動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 薬物投与およびミトコンドリア抽出液の調製

カイニン酸の腹腔内投与 (30mg/kg) は、50 匹マウスの中の 38 匹以上が 30 分以内に前肢震えおよび顔のけいれんを示した。他の動物は激しいけいれんを示した。ニッスル染色法による解析により、カイニン酸投与 3 日後には海馬のいずれの部位においても神経細胞死が認められなかったが、投与後 10 日では CA1 および CA3 錐体細胞に細胞死が認められた。

細胞核とミトコンドリア抽出液の純度を解析する目的で、ヒストン H1 とチトクロム c に対する抗体を用いたイムノプロット法を行った。海馬および大脳皮質の両脳部位において、ヒストン H1 抗体陽性反応がミトコンドリア抽出液では認められず、細胞核にのみ検出された。一方、チトクロム c 抗体陽性反応は、ミトコンドリア抽出液に強く見られた。電子顕微鏡解析により、ミトコンドリア抽出液には核以外の細胞小器官およびミトコンドリアの存在が観察された。

2. カイニン酸と NMDA 投与によるミトコンドリア AP-1DNA の増強

NMDA とカイニン酸の投与は、2 時間後にいずれも海馬の細胞核抽出液中の AP-1DNA 結合能を著明に増強した。海馬細胞核における結合の増強は、大脳皮質の

場合に比べて強力であった。NMDA およびカイニン酸は、海馬および大脳皮質のミトコンドリア抽出液中の AP-1DNA 結合も顕著に増強した。しかしながら、小脳の細胞核およびミトコンドリア抽出液中の AP-1DNA 結合は、NMDA とカイニン酸投与により著変を受けなかった。Table 1 は、カイニン酸投与によるミトコンドリア AP-1DNA 結合能の経時変化を示している。カイニン酸投与は、大脳皮質および海馬において投与後 1 時間で有意なミトコンドリア AP-1DNA 結合の増強を誘発し、その増強は投与後 3 日まで持続した。しかしながら、投与後 7 日では基礎レベルにまで減少することが判明した。

Table 1. Time course of AP-1 DNA binding in mitochondrial extracts of hippocampus after kainate treatment.

Animals were given kainate and decapitated various times after administration for preparation of mitochondrial extracts from hippocampus. An aliquot (10 μ g of protein) was incubated with the radiolabeled probe for AP-1 and then subjected to the electrophoretic mobility shift assay. Values are the mean \pm S.E. from 4-8 separate animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from each control value obtained in untreated animals (time = 0).

Time	AP-1 DNA binding (arbitrary unit)
0	110 \pm 20
1 h	500 \pm 90 *
2 h	730 \pm 265 *
4 h	953 \pm 293 *
6 h	856 \pm 125 *
1 day	689 \pm 326 *
2 days	1000 \pm 95 **
3 days	782 \pm 103 **
7 days	169 \pm 53

ミトコンドリア AP-1 DNA 結合の選択性を解析するために、非放射性 AP-1 プローブと c-Myc プローブの添加競合実験を行った (Table 2)。カイニン酸処理動物の海馬および大脳皮質のミトコンドリア AP-1 DNA 結合は、10 倍量の非放射性 AP-1 プローブに添加によりほぼ完全に消失したが、c-Myc プローブではいずれの濃度においても著変を示さなかった。

Table 2. Competition for mitochondrial AP-1 DNA binding.

Animals were given kainate and decapitated 4 h after administration for preparation of mitochondrial extracts from hippocampus. An aliquot (10 μ g of protein) of mitochondrial extracts was incubated with the radiolabeled probe for AP-1 in either the absence or presence of various concentrations of an unlabeled double-stranded probe with the consensus element for AP-1 or Myc at molar concentration ratios of 1 to 100 as a competitor. Unlabeled double-stranded competitors were prepared by annealing the single-stranded oligonucleotide indicated at the bottom with the respective complementary single-stranded oligonucleotide.

Competitor (Molar Ratio)	AP-1 DNA binding (% of control)
AP-1	
X1	60
X5	15
X10	0
X50	0
X100	0
c-Myc	
X1	96
X5	105
X10	92
X50	86
X100	89

3. Fos ファミリー蛋白質のミトコンドリア局在性

カイニン酸投与動物の大脳皮質と海馬から調製されたミトコンドリア抽出液において、AP-1DNA 結合に対する Fos/Jun ファミリー蛋白質抗体の添加の効果を解析した。c-Fos および Fos-B 蛋白質に対する抗体は、いずれの部位のミトコンドリア抽出液でも結合の抑制が見られた。また、抗 Jun-B 抗体はゲル中の DNA/蛋白質複合体の移動度を上方にシフトさせた。しかしながら、Fra-1、Fra-2、c-Jun および Jun-D 蛋白質に対する抗体では、いずれも結合に著変を与えなかった。次に、カイニン酸投与後の種々の時間でのミトコンドリア抽出液中の発現蛋白質イムノブロット法により解析した。未処置動物の大脳皮質および海馬のミトコンドリア抽出液には、Jun-B 蛋白質は検出されたが、c-Fos と Fos-B 蛋白質は検出されなかった。カイニン酸投与は、海馬および大脳皮質のミトコンドリア内 c-Fos 蛋白質レベルの著明に増加させた。また、Fos-B 蛋白質レベルはカイニン酸投与により増加したが、その増加速度は c-Fos 蛋白質の場合と比べて遅かった。一方、Jun-B 蛋白質はカイニン酸投与により著変は認められなかった。

4. 免疫組織化学的解析

生理食塩水投与マウスでは、海馬のいずれの部位においても c-Fos 免疫反応性は認められなかったが、カイニン酸投与動物においては海馬 CA1 から CA3 の錐体細胞層および歯状回の顆粒細胞層に c-Fos 免疫反応性が観察された。免疫電子顕微鏡法により、歯状回と CA1 領域の c-Fos 蛋白質の局

在性を解析した。生理食塩水投与動物において、c-Fos 蛋白質はいずれのミトコンドリアにも存在しないが、細胞質および細胞核に少量見出された。カイニン酸投与は、歯状回の細胞核と細胞質の c-Fos 蛋白質を増加させるとともに、ミトコンドリア内 c-Fos 蛋白質も有意に増加させた。

5. ミトコンドリア DNA における AP-1 結合部位の検索

ミトコンドリア DNA の非翻訳領域における AP-1 結合部位を検索した。AP-1 認識コア配列 (TGAC/GTCA) ミトコンドリア DNA に見出せなかった。しかしながら、ミトコンドリア DNA の非翻訳領域の D ループに 10 種類の AP-1 類似配列が見出された (Table 3)。AP-1 類似部位のうちの 1 つは、cAMP-responsive element と類似していた (MT-10)。ミトコンドリア AP-1 類似配列部位は、TGAG (CTCA) が 5 つ、TGAC (GTCA) および TGACT (AGTCA) を持つものがそれぞれ 3 つおよび 2 つであった。

ミトコンドリア AP-1 の AP-1 類似配列部位への選択性を評価するために、AP-1 類似配列を持つ二本鎖オリゴヌクレオチド (MT-1 から MT-10 まで) の添加実験を行った。Table 4 に示すように、カイニン酸処理動物の海馬ミトコンドリア AP-1DNA 結合は TGACT (AGTCA) を持つオリゴヌクレオチド (MT-3、MT-4、および MT-9) の添加により著明に阻害された。また、TGAC (GTCA) を持つ MT-6 と MT-7 も結合を有意に阻害した。しかしながら、他のオリゴヌクレオチドの添加は結合に著変を示さなかった。さらに、MT-3、MT-4、MT-6、MT-7、および MT-9 のコア配列を変異させたオリゴヌクレオチドでは、い

れもミトコンドリア AP-1DNA 結合に影響を与えなかった。

Table 3. Sequence of AP-1-like sites in the non-coding region of mouse mitochondrial DNA.

MT-1	15508	atggttcaggtcataaaat	15526
MT-2	15606	gttatctgacatacaccat	15624
MT-3	15619	caccatacagtcataaact	15637
MT-4	15645	tccatatgactatcccctt	15663
MT-5	15813	cgttatcgctcatacgtt	15831
MT-6	15871	agcccatgaccaacataac	15899
MT-7	15887	aactgtggtgtcatgcatt	15905
MT-8	16052	taaatgctactcaatacca	16070
MT-9	16195	aaaatatgacttatatttt	16213
MT-10	15936	caacatagccgtcaaggca	15954

カイニン酸により発現した AP-1 がミトコンドリア DNA の非翻訳領域に結合するか否かを解析する目的で、MT-3 および MT-9 を放射性プローブとしたゲル移動度シフトアッセイを行った。未処理動物のミトコンドリア抽出液では、いずれのプローブを用いても結合は検出されなかったが、カイニン酸投与動物の場合には著明な結合が検出された。

Table 4. Competition for mitochondrial AP-1 DNA binding with synthesized nucleotides containing sequences similar to AP-1 sites in the non-coding region of mitochondrial DNA. Animals were given kainate and decapitated 4 h after administration for preparation of mitochondrial extracts from hippocampus. An aliquot (10 μ g of protein) of mitochondrial extracts was incubated with the radiolabeled probe for AP-1 in either the absence or presence of unlabeled double-stranded oligonucleotides at a molar concentration ratio of 100. Effects of oligonucleotides (MT-1 to MT-10) with similarity to AP-1 site on mitochondrial AP-1 DNA binding. Typical autoradiograms are shown in the left panel, while quantitative densitometric data are shown in the right panel where each value is the mean \pm S.E. from 3 independent experiments. **P<0.01, significantly different from the

control value obtained in the absence of any competitors.

Competitors	AP-1 DNA binding (% of control)
MT-1	80 \pm 5
MT-2	100 \pm 10
MT-3	16 \pm 5 **
MT-4	17 \pm 3 **
MT-5	82 \pm 19
MT-6	26 \pm 6 **
MT-7	23 \pm 4 **
MT-8	93 \pm 8
MT-9	10 \pm 2 **
MT-10	97 \pm 8

D. 考察

現在の発見の重要性は、カイニン酸投与が Fos/Jun ファミリー蛋白質のミトコンドリアへの移行を介して AP-1DNA 結合を増強させることである。これは、カイニン酸シグナルにより発現した AP-1 が細胞核だけでなくミトコンドリアにも局在することの最初の直接的な証拠である。トリプシン処理の実験は、ミトコンドリア AP-1 結合がミトコンドリア外膜への AP-1 の粘着によるものではないことを示している。すなわち、AP-1 は本当にミトコンドリア内に存在するようである。また、変異実験はカイニン酸処理により増加したミトコンドリア AP-1 がミトコンドリア DNA 非翻訳領域の AP-1 類似部位を選択的に認識することも示している。

AP-1 は、細胞核におけるストレス応答遺伝子の転写調節を行うと考えられる。すなわち、AP-1 は cytokines、成長因子、神経伝達物質などの生理活性物質により発現す

るストレス応答遺伝子の転写を調節することも知られる。中でも、カイニン酸とNMDAが海馬細胞核内のAP-1を発現することも良く知られている。本研究では、カイニン酸シグナルが細胞核の遺伝子発現だけでなく、ミトコンドリアに移行してミトコンドリア遺伝子の発現をも調節することを示している。

真核細胞のミトコンドリアでは、2つの異なったコンパートメントによる遺伝子発現調整が知られる。(1)ミトコンドリア機能に関連するほとんどの蛋白質は、細胞質において細胞核ゲノムの転写調節を通して発現する。(2)ミトコンドリア電子伝達系の必須蛋白質のいくつかは、ミトコンドリア内ゲノムの転写により発現調節される。カイニン酸シグナルがミトコンドリア内にAP-1を移行させてミトコンドリアDNAの転写領域である非翻訳部位に結合させるという事実は、グルタメイトシグナルが細胞核DNAだけではなくミトコンドリアDNAの転写を介してミトコンドリア機能を調節する可能性を示唆するものである。すなわち、AP-1がミトコンドリア転写領域のAP-1類似配列に結合することにより、ミトコンドリア遺伝子の発現調節に重要な役割を演じていると考えられる。AP-1のミトコンドリア遺伝子の発現調節作用がグルタミン酸毒性の引き金の一つかもしれない。事実、グルタメイト受容体の過剰刺激によりCA1錐体細胞障害を起こすことが知られる一過性脳虚血では、海馬CA1錐体細胞においてミトコンドリアでのチトクロムc酸化酵素mRNAの発現が抑制されている。

E. 結論

カイニン酸シグナルにより発現した

AP-1は、細胞核のみならずミトコンドリアに移行してミトコンドリアDNAの非翻訳領域に結合する可能性が示された。したがって、グルタメイトシグナルはミトコンドリアゲノムの転写制御に影響を与えることによりミトコンドリア機能を変化させる可能性が考えられる。今後、AP-1のミトコンドリアへの移行機構およびAP-1によるミトコンドリアゲノムの転写制御機構について解析が急がれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Eiichi Hinoi, Kiyokazu Ogita, Yutaka Takeuchi, Hiroshi Ohashi, Takaharu Maruyama and Yukio Yoneda. Characterization with [³H]quisqualate of group I metabotropic glutamate receptor subtype in rat central and peripheral excitable tissues. *Neurochem. Int.*, **38**, 277-285 (2001).
2. Yukio Yoneda, Noritaka Nakamichi, Takayuki Manabe and Kiyokazu Ogita. Differential in vitro degradation of particular Fos family members expressed by kainic acid in nuclear and cytosolic fractions of murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.*, **64**, 34-42 (2001).
3. Kiyokazu Ogita, Koji Hirata, David G. Bole, Sumiko Yoshida, Yutaka Tamura, Anne Marie Leckenby and Tetsufumi Ueda. Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal. *J. Neurochem.*, **77**, 34-42 (2001).
4. Kiyokazu Ogita, Tomoya Kitayama, Hiroaki Okuda and Yukio Yoneda. Effects of glutathione deplete by 2-cyclohexen-1-one on excitatory amino acids-induced enhancement of activator protein-1 DNA binding in murine hippocampus. *J. Neurochem.*, **76**, 1905-1915 (2001).
5. Kiyokazu Ogita, Rie Takagi, Noriko Oyama, Hiroaki Okuda, Fumiaki Ito, Michiyo Okui,

- Nobuyoshi Shimizu and Yukio Yoneda. Decrease in level of APG-2, a member of the heat shock protein 110 family, in murine brain following systemic administration of kainic acid. *Neuropharmacology*, 41, 285-293 (2001).
6. Kiyokazu Ogita, Yoshiaki Fujinami, Michiyo Okui and Fumiaki Ito. High-Molecular-Weight Heat Shock Protein Family in the Central Nervous System. *Recent Res. Develop. in Neurochem.*, 4, 105-115 (2001).
 7. Kiyokazu Ogita, Hiroaki Okuda, Masahiro Kitano, Yoshiaki Fujinami, Kiyokazu Ozaki and Yukio Yoneda. Localization of activator protein-1 complex with DNA binding activity in mitochondria of murine brain following *in vivo* treatment with kainate. *J. Neurosci.*, In press (2002).
 8. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura, Vladimir J. Balcar, Keita Kubo, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda. Constitutive expression of heterologous N-methyl-D-aspartate receptor subunits in rat adrenal medulla. *J. Neurosci. Res.*, In press (2002).
2. 学会発表
1. Takeshi Matsunobu, Kiyokazu Ogita and Jochen Schacht. Modulation of cellular AP-1 DNA binding activity by acoustic overstimulation in the guinea pig cochlea. The 24th Annual ARO Midwinter Meeting (Florida, U.S.A.), 2001, Feb. 6.
 2. Kiyokazu Ogita, Hiroaki Okuda, Yoshiaki Fujinami, Fumiaki Ito, Michiyo Okui, Nobuyoshi Shimizu and Yukio Yoneda. Decreased level of APG-2, a member of the heat shock protein 110 family, in murine brain after kainate administration. The 7th International Congress on Amino Acids and Proteins (Vienna, Austria), 2001, Aug. 10.
 3. 荻田喜代一, Tetsufumi Ueda : シナプス小胞へのグルタミン酸取り込みの新規阻害剤 Rose Bengal によるグルタミン酸放出の抑制. 日本薬理学会年会 (横浜), 2001年3月22日.
 4. 荻田喜代一, 松延毅, 小川郁, Jochen Schacht : 音響外傷による蝸牛内転写制御因子の誘導. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001年3月29日.
 5. 荻田喜代一, 奥田洋明, 北野雅大, 尾崎清和, 小井田雅夫, 米田幸雄 : カイニン酸による Activator protein-1 のミトコンドリア移行. 第 99 回日本薬理学会近畿部会 (広島), 2001年6月22日.
 6. 荻田喜代一, Tetsufumi Ueda : Rose Bengal によるグルタミン酸シナプス伝達の抑制. 第 44 回日本神経化学会 (京都), 2001年9月28日.
 7. 奥田洋明, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : カイニン酸による海馬内神経細胞死に対する NMDA の保護効果. 第 44 回日本神経化学会 (京都), 2001年9月28日.
 8. 北野雅大, 奥田洋明, 尾崎清和, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : 興奮性アミノ酸によるミトコンドリア AP-1 の発現. 第 44 回日本神経化学会 (京都), 2001年9月28日.
 9. 藤波義明, 奥田洋明, 伊藤文昭, 奥井理予, 清水信義, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : カイニン酸による熱ショック蛋白質 APG-2 レベルの減少. 第 44 回日本神経化学会 (京都), 2001年9月28日.
 10. 荻田喜代一, 奥田洋明, 藤波義明, 伊藤文昭, 奥井理予, 清水信義, 小井田雅夫, 米田幸雄 : カイニン酸処理による APG-2 蛋白の一過性減少. 第 31 回日本神経精神薬理学会年会 (広島), 2001年10月5日.
 11. 奥田洋明, 山本泰弘, 小井田雅夫, 荻田喜代一 : カイニン酸誘発性海馬内神経細胞死に対する NMDA の効果. 第 31 回日本神経精神薬理学会年会 (広島), 2001年10月5日.
 12. 荻田喜代一, Tetsufumi Ueda : グルタミン酸シナプス伝達に対する Rose Bengal の抑制効果. 第 74 回日本生化学会大会 (京都), 2001年10月28日.
 13. 北野雅大, 奥田洋明, 尾崎清和, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : ミトコン

- ドリア cAMP-responsive element 結合のグルタミン酸レセプター活性化による増強. 第 74 回日本生化学会大会 (京都), 2001 年 10 月 28 日.
14. 奥田洋明, 山本泰弘, 小井田雅夫, 荻田喜代一 : カイニン酸神経毒性に対する NMDA 前処置の効果. 第 74 回 日本生化学会大会 (京都), 2001 年 10 月 28 日.
 15. 奥田洋明, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : カイニン酸誘発性神経細胞死に対する NMDA の防御効果. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
 16. 奥田洋明, 北野雅大, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : カイニン酸処理によるミトコンドリア cAMP-responsive element 結合の増強. 第 75 回日本薬理学会総会 (熊本), 2002 年 3 月 13-15 日.
 17. 荻田喜代一, 奥田洋明, 北野雅大, 尾崎清和, 小井田雅夫, 米田幸雄 : グルタミン酸シグナルを介した転写因子 AP-1 のミトコンドリア移行. 日本薬学会第 122 年会 (千葉), 2002 年 3 月 26-28 日.
 18. 奥田洋明, 山本泰弘, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : トリメチルスズによるマウス海馬歯状回顆粒細胞障害. 日本薬学会第 122 年会 (千葉), 2002 年 3 月 26-28 日.
 19. 藤波義明, 伊藤文昭, 小井田雅夫, 米田幸雄, 荻田喜代一 : グルタミン酸シグナルを介する高分子熱ショック蛋白の発現変化. 日本薬学会第 122 年会 (千葉), 2002 年 3 月 26-28 日.

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)

分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」

(主任研究者：米田幸雄)

分担研究課題「細胞密度制御モデルとしての細胞性粘菌の研究」

分担研究者：倉本展行（金沢大学薬学部・助手）

研究要旨：高等生物の細胞の分化を研究する単純なモデル細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) を用いて、多細胞組織の細胞密度制御および関連する転写機構の解明を試みた。粘菌の多細胞体制は細胞外分泌性の細胞密度制御因子、countin の3つのホモログによって調節されていることが判明し、このシグナル伝達は粘菌細胞膜上に存在する 37kDa 付近の機能蛋白質の脱リン酸化を介して行われる可能性が示唆された。この介在蛋白質が SOD である可能性が示され、同機能蛋白質の新規機能を解明できるかもしれない。さらに、核内受容体タイプの転写制御因子が XRE 配列を介して粘菌多細胞体制構築に必要な遺伝子発現を制御することが明らかとなった。

A. 研究目的

細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*: 以下粘菌) は、栄養存在条件ではアメーバ様の単細胞体として増殖するが、飢餓状態に曝されると多細胞体を形成し、さらに分化して子実体を形成する真核生物である。粘菌多細胞体は孢子細胞と柄細胞というたった二つのタイプの分化した細胞によって構成されることから、高等生物の細胞の分化を研究する単純なモデルとして扱われる。

粘菌多細胞体の構築及び分化もまた様々な機能蛋白質をコードする特定の遺伝子発現によって執り行われる。近年同定された機能蛋白質 countin は、粘菌集

合体の細胞密度制御を担う粘菌が分泌する蛋白質であるが、高等生物に保存されていれば、特定の組織の細胞密度を感知して細胞増殖促進・抑制の司令塔として役割を果たしている可能性が高い。一方、機能蛋白質の *de novo* 合成は転写調節に依存する場合が多い。しかしながら粘菌の転写因子は STAT や Myb など高等生物の細胞分化に関わる転写因子存在は明らかであるが、未だその数は少ない。

本研究では骨密度などのように組織構成する細胞密度の制御機構を、単純なモデル生物を用いて解析する目的で、粘菌の細胞密度制御機構と、転写制御機構について解析した。

B. 研究方法

1. 細胞性粘菌の培養 *Dictyostelium discoideum* Ax2 株および Ax4 株を HL5 栄養培地で増殖培養した。変異株は抗生物質ブラストサイジン又はジェネティシンにより選択培養した。
2. 遺伝子破壊株および遺伝子強制発現株の構築 遺伝子破壊株はブラストサイジン耐性遺伝子を発現するために必要なすべての配列を含んだ DNA 断片(ブラストサイジンカセット)を、破壊遺伝子の間に導入することで行った。一方、遺伝子強制発現株はジェネティシン耐性遺伝子とアクチン 6 プロモーターを含む遺伝子強制発現ベクター-pDNeo2 を用いて粘菌ゲノムに導入した。また、遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用いた。
3. 細胞性粘菌の分化誘導と形態観察 飢餓状態は粘菌をリン酸緩衝液で一度洗浄し、同緩衝液を含む寒天培地にまくことで誘導した。飢餓処理後、各時間の形態変化を観察し画像として保存した。
4. 核酸試料の調製とノーザンブロッティング 増殖期と飢餓処理後 4 時間ごとの粘菌細胞から Total RNA を調製し、これらを泳動、ニトロセルロース膜に転写し、countin またはそのホモログ遺伝子の全長 ORF を用いたプローブによりそれぞれの遺伝子の発現を検出した。
5. 細胞の分画と蛋白質試料の調製 増殖期と飢餓処理後 4 時間ごとの粘菌細胞を回収し、NP-40 可溶性画分(細胞質画分)および、NP-40 不溶性画分中の細胞核から高濃度の塩によって抽出された細胞核抽出液を調製した。また増殖期と飢餓処理後 8 時間ごとの粘菌細胞を回収し、スクロース密度勾配遠心法で細胞膜画分を調製した。
6. ウェスタンブロッティング法によるリン酸化チロシン蛋白質の解析 上記 5. で調製した細胞膜画分中に含まれる蛋白質成分について、SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、これを抗リン酸化チロシン抗体によって検出した。
7. ゲルシフトアッセイ法による XRE 結合因子の検出 上記 5. で調製した細胞質画分および細胞核抽出液は、プローブとしての XRE 配列 CACGCNA を含む放射標識した 30 bp の二本鎖オリゴヌクレオチド(表 1)と反応させ、結合に用いられなかったプローブと蛋白質が結合したプローブとを 6%アガロースゲル上で泳動分離し、XRE 配列結合蛋白質の含量をオートラジオグラフィにより検出した。

5' -GATCTGGCTCTTCTCAGGCAACTCGGATC-3'
3' -CTAGACCGAGAAGAGTGCGTTGAGGCCTAG-5'

表 1. ゲルシフトアッセイ法に用いた XRE プローブの配列

C. 研究結果

1. 細胞密度制御因子とそのホモログ

粘菌の全ゲノム配列解析で公開されている contig14301 の 15 番目から 1023 番目の塩基を ORF とする遺伝子が相同性 39% の *countin* ホモログであった。さらに別の contig、c-JC2e65f09 の 19477 番目から 20257 番目の塩基を ORF とする遺伝子も相同性 45% の *countin* ホモログであった。これら遺伝子をそれぞれ *countin2* および *countin3* と命名し、既に発見されている *countin* を今後 *countin1* と呼ぶことにした。これら 3 つの遺伝子はそれぞれ N 末側にシグナルペプチドと呼ばれる細胞外分泌シグナルをもつほか、サポシン配列と呼ばれる 6 つのシステイン繰り返しおよび、数個のグリコシル化部位を持ち、共通の能力を有する機能蛋白質であることが示唆された。

2. 粘菌細胞の分化誘導と *countin* 遺伝子発現の変動

countin1 と 2 つのホモログについて、それぞれの ORF 全長をプローブとしてノーザンブロット法で mRNA の発現を解析した。*countin1* の mRNA は 1000b 付近の単一の放射性バンドとして検出された。その発現は増殖期に多く、分化誘導とともに減弱した。*countin2* の mRNA は 1500b、800b 及び 600b 付近の 3 つ放射性バンドとして検出された。このうち 800b の mRNA の発現は分化誘導 4 時間後から 8 時間後付近をピークに一度増強しその後減弱した。他の長さの mRNA 発現は増殖期に多く、分化誘導とともに減弱した。*countin3* の mRNA は 800b 付近の単一のバンドとして検出された。その発現は増殖期に多く、分化誘導に伴い減弱した。

Countin 1	1	MNKLFSLILALFLVNSAVVSSLDS--CSICVDFVGNLNDLLNIILNSGVIGTCGDLCSA	58
Countin 2	1	MIKYITIAIL-FIASLVKA-DLQFSLCPTCVDIFINNDMGDLEKIIISG-GIATSCGAVCSL	57
Countin 3	1	MNKILSLFLITILLISKVMSSEE--CKLCTDFMYDSLNELIEIANGGVIGSGALCNK	58
		* * * * * * * * * *	
Countin 1	59	VPGGQIVDTVCDLLCDYVGVDEFIKLISDVDP--DPIYICEKISVCKTNDNAASLDLV-	115
Countin 2	58	LPNN-IEGGACNLLCDIVGIDEFLKVFNNIGEDADPVWICEELTVCPKNQNSNATV-LTS	115
Countin 3	59	LGIAPLCMV-CAIACDAVGINGFMDLLQDVFPD--PIYICESVKMCQYNDKANATITEVV	115
	 * * * * *	
Countin 1	116	QINPQNGTVGGTFTLSIAYVTNTIATGQLAFNIIDPTGNA-FGDAVLLVQQSPEQYTQQ	174
Countin 2	116	DVSPASGPHGTTFTIGVAYKVESTLGTGEVAVMVDPTGSNGFGDAQLIVNTQPGQYSTS	175
Countin 3	116	IN-PMSGNVGDTFKIGVSFNVNTIATGEILWNVVDPRGFQ-FGETEVIDAAPS IYGAA	173
		* . * . * * * * * * * * *	
Countin 1	175	FQFQATPSEQESFPNGLYTVQALVCEGSCGSPHPNTYTFANGTTFTISGADSSS--MSG	232
Countin 2	176	FSFAATPSEDEQFPAGVYQQLMICEGSCGAKHSVTFNSVY--ANFTVTSGPSVTGQMTG	233
Countin 3	174	FSFQATPSEQEEFPPGEYQLQMQICEGTGSPHPSYILSNQYLNFTI -----	222
		* . * . * * * * . * * * * . * * * * *	
Countin 1	233	AGSFGSSQSQTGA---ASGSGSGFALF	258
Countin 2	234	TGSGSGSGSGSSGAAYLRY-----	253
Countin 3	222	-----	222

図 1. *Countin 1*、*Countin 2* 及び *Countin 3* のアライメント
countin 1 は 258 個、*countin 2* は 253 個、*countin 3* は 222 個のアミノ酸残基をコードしている。これら 3 つの遺伝子のアミノ酸配列を比較すると相同性は *countin 1* と 2 の間には 39%、*countin 1* と 3 の間には 45%、*countin 2* と 3 の間には 35% であり、62 個のアミノ酸が保存されていた(図中アスタリスク:*)。Countin 1、2 及び 3 は膜や分泌タンパクに見られるシグナル配列(下線)を有し、Amoebapore super family に共通のシステイン 6 回繰り返しを完全に保存していた(囲い)。また、これら 3 つの遺伝子は 2 ないし 3 個のグリコシル化サイト(N-X-T)も有していた。

3. 変異株の構築とその多細胞体の形態
 countin1、2 及び 3 の各遺伝子破壊株を作製し、その株を飢餓処理することにより形成される子実体の形態を野生株と比較検討したところ、countin1 遺伝子破壊株の子実体の方が野生株のものに比べ大きかった。countin2 遺伝子破壊株の子実体は野生株との違いはほとんど認められなかった。countin3 遺伝子破壊株でも野生株との子実体形成に変化がなかった。一方、countin1、2 および 3 遺伝子強制発現株を作製しその株を飢餓処理することにより形成される子実体の形態を野生株と比較検討したところ、countin1 及び countin2 の遺伝子強制発現株では野生株に比べ子実体が著明に小さくなったが、countin3 遺伝子強制発現株では著明な変化は認められなかった。

4. 膜蛋白質のチロシン脱リン酸化

野生株及び変異株より細胞膜画分を調製し、ウェスタンブロッティング法によりチロシンリン酸化蛋白質を解析した結

果、野生株では飢餓処理後 8 時間までに 37kDa 付近の蛋白質（以下 p37）のバンドの消失が観察されたが、countin1 および countin2 遺伝子破壊株ではこの消失が観察されず、飢餓状態においても p37 のリン酸化チロシン残基が検出された。細胞膜画分を SDS-PAGE 後、CBB 染色すると、p37 と思われるバンドが認められたためこれを直接切り出し、gel から蛋白質を抽出、この試料について抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降法を行い、p37 を精製した。精製した p37 を V8 Protease により限定分解した後、アミノ酸シーケンスを行った結果、10 残基が解読できた。この配列の相同性を FASTA、BLAST により検索したところ、SOD に高い相同性が見られ、中でも *Staphylococcus* 由来の SOD に 100 % という特に高い相同性が見られた。一方、その分子量等から予想される p38 MAP kinase とは 10 残基中 5 残基が一致した。

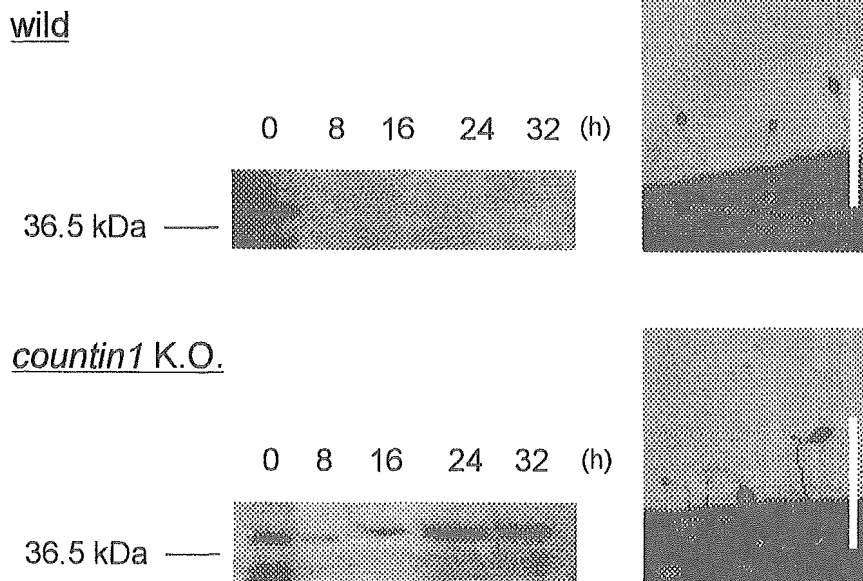


図 2.野生株及び *countin1* 遺伝子変異株の分化に伴う細胞膜蛋白質の脱リン酸化の解析

countin1 遺伝子破壊株は野生株に比べ、大きな集合体を形成し、子実体では特に胞子塊が顕著に大きかった。各分化段階の細胞から調製した細胞膜画分において、野生株では栄養条件下で分子量約 37 kDa のチロシンリン酸化蛋白質 (p37) が検出されたが、非栄養条件下では検出されなかった。一方、遺伝子破壊株では非栄養条件下でもリン酸化 p37 が検出された。

5. XRE 結合能の解析

5.1. 特異的 XRE 結合能の検出 分裂増殖中 (vegetative) の細胞性粘菌を回収して細胞質画分および細胞核抽出液を調製し、各画分に含まれる蛋白質の XRE コア配列に対する結合能を測定した。その結果、XRE 結合能は両画分において 2 本の放射性バンドとして検出され、それぞれ蛋白質量依存的に増加した。以降は直線性が見られた蛋白質量 3 μ g をアッセイに用いることにした。次に非特異性結合を防ぐ DNA、poly(dI-dC) を取り除いた場合、細胞質画分中の XRE 結合には複数の放射性バンドが存在することが判明した。一方で核抽出液中には 2 本の放射性バンドのみ検出された。これら複数のバンドのうち、核抽出液に検出されたバンド以外は poly(dI-dC) により完全に阻害された。そこで 1 μ g poly(dI-dC) を非特異的結合阻害剤として用いることにした (図 3. a)。さらに XRE 結合能はともに非放射標識 XRE プローブにより競合的に阻害された。この阻害効果は XRE コア配列に変異を入れたオリゴヌクレオチドによる阻害効果よりも強かった (図 3. b)。この

特異的結合について以下の検討をした。

5.2. XRE 結合因子の性質 分裂増殖中の粘菌野生株から異なる pH の緩衝液で調製した細胞質画分および核抽出液を 30 $^{\circ}$ C の水浴中で各時間インキュベートした後、XRE 結合能を測定した (図 3. c) 結果、細胞質画分の XRE 結合能はインキュベート 24 時間以内に消失したが、この消失までの時間は塩基性 pH 依存的に促進された。一方、核抽出液の XRE 結合能は pH 7.5 の緩衝液中でもっとも安定で、その他酸性側あるいは塩基性側の pH ではインキュベートによる XRE 結合能の消失は pH 7.5 にくらべ早かった。次に UV 照射で放射標識 XRE プローブと XRE 結合蛋白質との間に共有結合を導入した後、SDS-PAGE により分子量に従って分離した。蛋白質と結合していないフリープローブによる放射性バンドは理論的な分子量の位置、18.9 kDa 付近に示された。また、蛋白質結合を示す放射性バンドのうち、分子量約 100 kDa 付近のバンドは非放射標識 XRE プローブによって特異的に阻害された (図 3. d)。

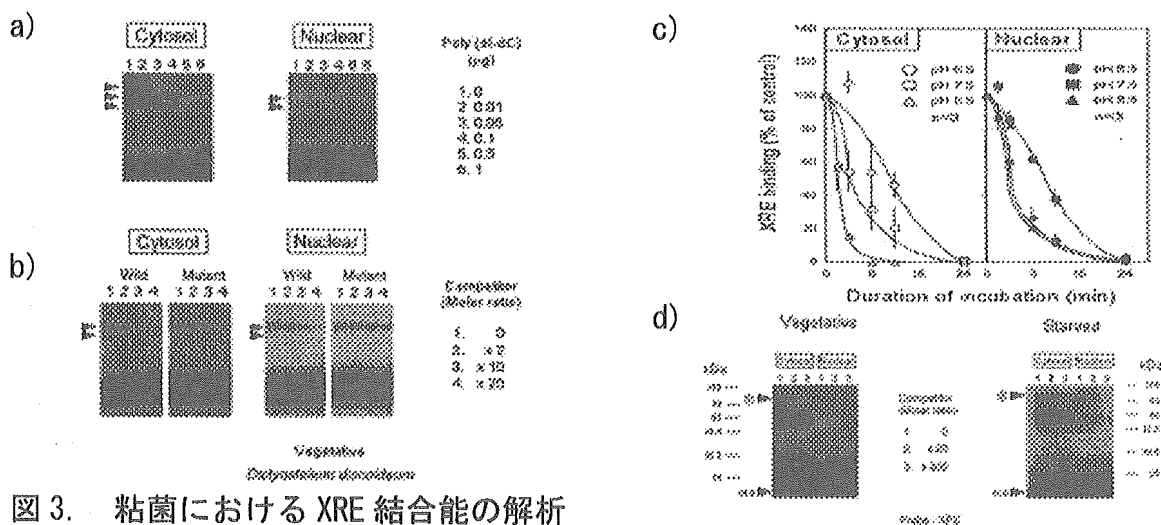


図 3. 粘菌における XRE 結合能の解析

5.3. 粘菌の分化と XRE 結合能の変動

粘菌を非栄養状態に曝し、分化を誘導した。分化開始 8 時間までに集合体を形成し、種々の形態を経て 24 時間後までに子実体を完成させた (図 4. a)。分化誘導前後を通して、細胞質画分の XRE 結合能は核抽出液中より強く検出された。細胞質画分の XRE 結合能は、分化開始後 24 時間まで次第に減弱し、36 時間後にはほとんど消失した。一方細胞核抽出液中の XRE 結合能は、はじめ弱く、12 時間後から 16 時間後に一過性に上昇し、その後再び消失した (図 4. b)。分化誘導前後の細胞性粘菌の細胞質および細胞核の各画分中の蛋白質から、AhR、HSP90、Arnt1 および Arnt2 の抗体による検出を試みた。AhR 抗体による検出では分化誘導後に、分子量約 80kDa の特異的なバンドが検出された。一方他の抗体でも分化誘導後に多数のバンドが検出されたが、特異的なバンドは見られなかった。また、これら抗体を用いたスーパーシフトの解析では、XRE 結合能に対して明確なスーパーシフトは観察されなかった。

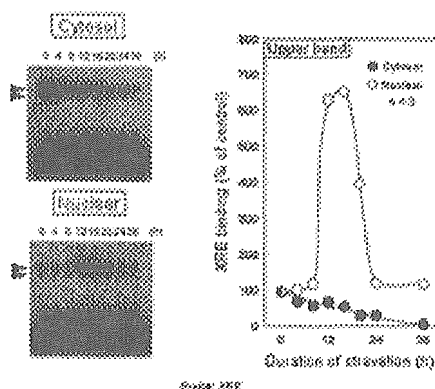


図 4. 粘菌の分化と XRE 結合能の変動
D. 考察

高等生物における個々の組織の大きさ、あるいは細胞密度は、例えばヒトの骨格をみても小さな関節の骨から頭骨や座骨のような大きな骨格までその大きさが異なり用途によって異なる強度、すなわち骨密度に厳密に制御されている。細胞密度の制御とは細胞の増殖および成長による細胞密度の増加、あるいは細胞死による細胞密度の減少がその成分であり、両者のバランスが細胞密度を決定している。骨組織においても骨芽細胞による骨密度の増加と、破骨細胞の働きによる骨密度の減少がこれにあたる。この一見当然の制御も分子レベルで制御されているはずであるが、その機構は高等生物の細胞では複雑であり、本研究では単純なモデル生物を用いることで細胞密度制御機構を太古の必要性から迫ることにした。

粘菌での多細胞体形成時の細胞密度制御機構は Countin 遺伝子群によって制御されていることはほぼ間違いないであろう。特に Countin1 については次のようなモデル図を提唱することができる (図 4)。Countin1 は分化の集合段階で分泌されるが、その分泌制御を行うのは粘菌の飢餓状態に特有な cAMP シグナルである。分泌された Countin1 は CF の一員として複合体を形成、細胞膜上に存在する受容体に結合し、このシグナルは膜上蛋白質である p37 のチロシン残基脱リン酸化の促進に働きかけると考えられる。Countin1 シグナルが gp24 の発現抑制に働くという過去の報告から、p37 はリン酸化状態で、種々のシグナルを経て gp24 の発現を促進し、また、Countin1 シグナルによる脱リン酸化の促進が gp24 の発現抑制に

働くと考えられる。本研究の結果から、予想される p37 の候補としては SOD が挙げられたがその正体は依然不明である。そもそも SOD は酵素活性中心としての重金属イオンの存在がラジカルスカベンジャーとしての SOD の働きに重要であるが、本研究結果では SOD のアミノ酸残基のリン酸化が、細胞密度制御という全く新しい SOD の機能発現に重要である可能性が示されたことになる。SOD は高等生物にも広く保存されているため SOD の骨密度を含む細胞密度制御機構もまた保存されている可能性は高い。

これとは別に、細胞性粘菌には分化誘導後に細胞核内に移行し、遺伝子発現制御を通じて細胞性粘菌の形態変化を調節する分子量約 80kDa の XRE 結合蛋白質が存在する可能性が示唆される。この XRE 結合蛋白質には少なくとも一部は AhR 関

連遺伝子が含まれている可能性が示された。したがって、XRE は多細胞体の発達を制御するため、細胞性粘菌から高等生物にわたって保存された役割を果たしている可能性が示唆される。

E. 結論

1. 粘菌の多細胞体制の細胞密度を制御する遺伝子 countin にはさらに 2 つのホモログ countin2 及び countin3 が存在し、countin と同様の機能を有することが推測された。
2. Countin1 は粘菌細胞膜上に存在する 37kDa 付近の機能蛋白質の脱リン酸化を介して細胞密度制御を行う。候補として SOD があげられる。
3. 核内受容体タイプの転写制御因子が XRE 配列を介して粘菌多細胞体制構築に必要な遺伝子発現を制御する。

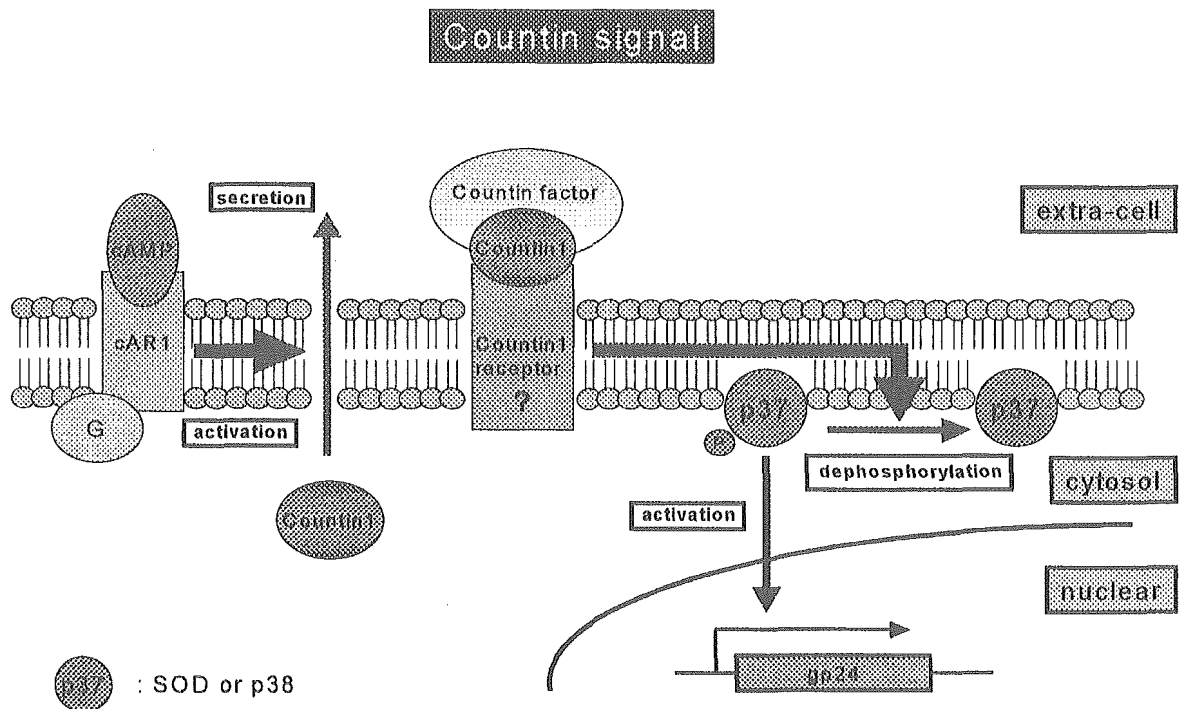


図 5. countin シグナル伝達予想モデル

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takayuki Manabe, Nobuyuki Kuramoto, Noritaka Nakamichi, Katsuhide Aramachi, Katsuhiro Baba, Takao Hirai, Masanori Yoneyama and Yukio Yoneda. Degradation of c-Fos protein expressed by N-methyl-D-aspartic acid in nuclear fractions of murine hippocampus. *Brain Res.*, **905**, 34-43 (2001).
2. Yukio Yoneda, Nobuyuki Kuramoto, Tomoya Kitayama and Eiichi Hinoi. Consolidation of transient ionotropic glutamate signals through nuclear transcription factors in the brain. *Prog. Neurobiol.*, **63**, 697-719 (2001).
3. Noritaka Nakamichi, Hiroshi Ohno, Nobuyuki Kuramoto and Yukio Yoneda. Dual mechanisms of Ca^{2+} increases elicited by N-Methyl-D-Aspartate in immature and mature cultured cortical neurons. *J. Neurosci. Res.*, **67**, 275-283 (2002).
4. Takao Hirai, Nobuyuki Kuramoto, Hiroko Maruyama, V.J. Balcar, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Potentiation of nuclear activator protein-1 DNA binding following brief exposure to N-methyl-D-aspartate in immature cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, **67**, 523-532 (2002)

2. 学会発表

1. 中道範隆、大野博司、倉本展行、高柳雅子、中村洋一、米田幸雄：NMDA 受容体活性化による細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度増加に対する二価鉄イオンの阻害効果。第 74 回日本薬理学会年会（横浜），2001 年 3 月 23 日。
2. 倉本展行，五十嵐元，安川洋生，正宗行人：細胞性粘菌の分化に關与する新規機構存在の可能性。第 121 回日本薬学会年会（札幌），2001 年 3 月 29 日。
3. 平居貴生，倉本展行，中村洋一，米田幸雄：NMDA 暴露による AP1 DNA 結合上昇機構の解析。第 121 回日本薬学会年会（札幌），2001 年 3 月 29 日。
4. 中道範隆，大野博司，倉本展行，高柳雅子，中村洋一，米田幸雄：NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度変化の觀察。第 121 回日本薬学会年会（札幌），2001 年 3 月 29 日。
5. 倉本展行，後藤恵美，正宗行人：細胞性粘菌における XRE 結合能を介した分化制御の可能性。第 74 回日本生化学会大会（京都），2001 年 10 月 25 日。
6. 倉本展行，後藤恵美，正宗行人：細胞性粘菌の分化に伴う XRE 結合能の変動。日本分子生物学会第 24 回年会（横浜），2001 年 12 月 10 日。
7. 五十嵐元，倉本展行，正宗行人：細胞性粘菌の細胞密度制御に対する脱リン酸化機構關与の可能性。日本分子生物学会第 24 回年会（横浜），2001 年 12 月 10 日。
8. 倉本展行，後藤恵美，米田幸雄，正宗行人：細胞性粘菌に存在する核内受容体による細胞分化制御の可能性。第 4 回粘菌研究会（東京），2002 年 3 月 7-8 日。
9. 倉本展行，五十嵐元，尾田千春，正宗行人：細胞膜上に存在するリン酸化蛋白質による細胞性粘菌の集合体細胞密度制御の可能性。第 4 回粘菌研究

会（東京），2002年3月7-8日。

10. 倉本展行，後藤恵美，正宗行人：細胞性粘菌の核内受容体による細胞分化制御の可能性。第122回日本薬学会年会（千葉），2002年3月28日。
11. 五十嵐元，山下千佳子，倉本展行，正宗行人：細胞性粘菌の機能蛋白質の脱リン酸化に伴う細胞密度制御の可能性。第122回日本薬学会年会（千葉），2002年3月28日。
12. 尾田千春，倉本展行，五十嵐元，山下

千佳子，Issaeva Marina，正宗行人：細胞性粘菌における多細胞体形成時の新規細胞密度制御遺伝子の解析。第122回日本薬学会年会（千葉），2002年3月28日。

13. 田淵克則，倉本展行，五十嵐元，尾田千春，Issaeva Marina，正宗行人：細胞性粘菌の分泌性蛋白質がになう細胞分化制御機構の解明。第122回日本薬学会年会（千葉），2002年3月28日。