

行っていると推測される高速・並列型の情報処理、記憶を代表とする情報の蓄積、その他の統合的機能の分子機構を解明したとはいえない、などの点から、統合失調症の分子機構を理解するためには、未知の作動原理に従う脳内システムや病的過程を検出する可能性をもつ戦略も有用であると考えている²⁾。本稿では、この可能性を考慮した仮説に基づいて筆者らが行った統合失調症関連候補分子の探索と、その結果見出された新規遺伝子 *mrtl1* を中心に紹介する。



統合失調症状の発達薬理学的仮説

筆者は、既知であるか未知であるかを問わずに、統合失調症に関連した脳の情報処理システムを構築する分子を見出すため、統合失調症やそのモデルとなる薬物誘発性の異常が一定の発達段階以降に出現することに注目し、そのシステムの特徴を推定した(図1)。これは「発達薬理学的仮説」(図1)と呼ぶことができるが、いわゆる「神経発達異常仮説」³⁾とは異なり、必ずしも「神経発達異常」それ自体を前提としていない。

1. 統合失調症状の発達依存性

統合失調症様の症状を引き起こす薬物としては、覚醒剤 [amphetamine, methamphetamine (MAP) など] や cocaine に代表されるドーパミン (dopamine; DA) 作動薬と、phencyclidine (PCP) や ketamine をはじめとする N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体遮断薬が知られている⁴⁾。前者により、統合失調症と区別しにくい幻覚・妄想などの陽性症状を中心とした精神病状態がみられ、後者では陽性・陰性双方の統合失調症様症状が出現する。興味深いことに、統合失調症が主に思春期以降に発症するのに類似して、双方の薬物ともに、精神機能への影響が発達に従って変化し、小児期までは統合失調症様精神病状態を誘発しにくいことが報告されている^{5,6)}。

2. 発達からみた統合失調症状に関与する神経情報処理システム⁷⁾

ヒトの行動の発達過程において、精神機能を支える情報処理システムにはさまざまなサブセットがあり、構造的・機能的に胎生期から生後にかけて次第に発達して、それぞれが特定の発達時期に機能的に成熟することが示唆されている。このうち統合失調症で特異的に障害され

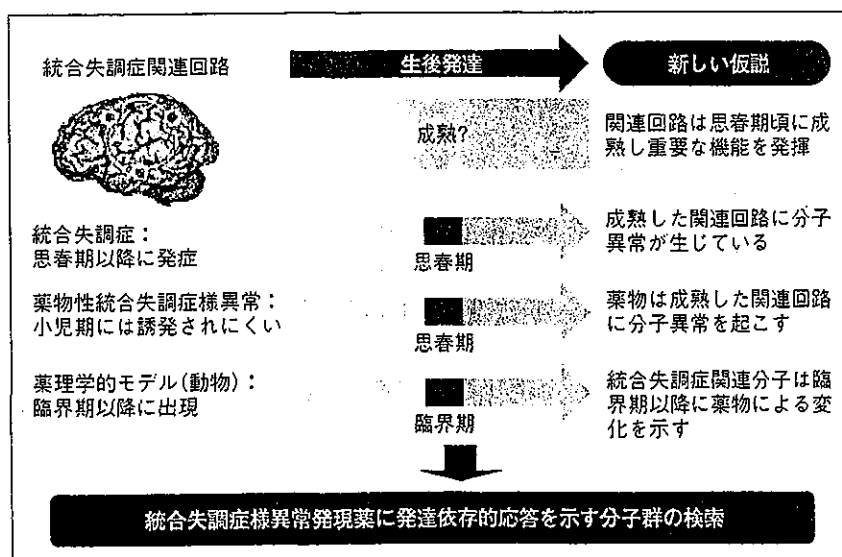


図1. 統合失調症の病態に関する発達薬理学的仮説

統合失調症および薬物性の統合失調症様異常とその動物モデルの発症について生後発達からみた相互関係を示す。

るシステムについては、①思春期頃に機能的成熟を遂げ、②それまでは生理的機能をほとんどもたないか個体の精神活動に大きく影響するような機能は発揮していないが、③機能的成熟後には精神機能の調節に不可欠で重要な役割を果たすこと、などが仮定できれば、統合失調症と薬物性の統合失調症様精神病状態が小児期には発症しにくい事実が説明可能である(図1)。すなわち、発達過程や成熟を規定する因子に障害があっても、思春期までは精神機能の制御に主要な役割を果たしていないので、行動の異常は目立たずに神経機能や性格の特有な傾向がみられる程度に留まるであろう(図1)。しかし、思春期以降になるとこのシステムの誤作動は精神機能に重大な障害をもたらす、特有の多彩な精神症状となって顕在化すると考えることができる。統合失調症は原因が異なる複数の疾患の総称と推測されていることから、本症に関連するシステムも複数存在すると予想される(図1)。

統合失調症と酷似した精神病状態を引き起こす薬物は、直接的もしくは間接的に、ある種の統合失調症で障害されるシステムに異常をきたすはずである。したがって、これらのシステムが完成していない思春期以前には、統合失調症様異常発現薬を使用しても、精神機能の調節障害に結びつく標的がないため、統合失調症様の精神症状は出現しないことになる。つまり、統合失調症で障害されるシステムあるいは神経回路には、思春期前後でDA作動薬やNMDA受容体遮断薬に対して反応性、または基礎的発現が変化する分子が存在する可能性が高い。ただし、こうした分子は必ずしもDAあるいはグルタミン酸伝達系の構成因子に限定されない。

3. 薬物を用いた統合失調症関連候補遺伝子の探索

以上に述べた発達薬理学的仮説は、発達に伴う統合失調症様異常発現薬に対する反応の差異を指標に、本症に関連する新たな候補分子を探索できることを示しているが、動物実験が必要となる。動物を用いて探索を進めることの合理性は、以下の諸点から支持される。(1)成熟した動物に統合失調症様異常発現薬を投与すると、ヒトでみられる統合失調症と同様の薬理学的反応をもつ異常行動が認められ、統合失調症治療薬のスクリーニングに用いられてきたことから、実験動物の脳にもある種の統合失調症で障害される情報処理システムと基本的な部分

では類似したシステムが存在すると推測される²⁷⁾、(2)実験動物においても、統合失調症モデルと考えられているDA作動薬によって引き起こされる逆耐性現象やNMDA受容体遮断薬誘発性の異常行動は、一定の発達時期以降に出現する²⁸⁾。

そこで筆者らは、MAPまたはPCPを投与した種々の発達段階のラットで、統合失調症に関連する神経回路または脳部位と候補分子を検索中である。次項では、逆耐性現象をモデルとしたMAP応答性の統合失調症関連候補遺伝子の研究について概説する。

2 逆耐性現象による統合失調症 関連候補遺伝子へのアプローチ

1. 逆耐性現象の生後発達

逆耐性現象は、ヒトや実験動物において、覚醒剤、cocaineなどを単回または反復投与すると、幻覚・妄想あるいは異常行動(移所運動:場所を変えて歩き回る行動、常同行動:たとえば首を左右に振るといった、単純で無目的な行動を繰り返す)が薬物やストレスによって誘発されやすくなる状態が長期間持続する現象を指し、行動感作とも呼ばれる²⁹⁾。統合失調症患者においては、健常者では異常を引き起こさない少量のDA作動薬が幻覚・妄想状態を容易に増悪・再燃させることから、DA作動薬による精神病状態ばかりでなく、統合失調症における幻覚・妄想状態の発症あるいは再燃のモデルと考えられている¹⁰⁾。

逆耐性現象は、齧歯類では生後21~25日以降に形成される(臨界期:これ以前でも移所運動量増加については誘導されることがあるが長期持続性はないと報告されている)³⁰⁾。発達薬理学的仮説に従えば、本現象の成立にはある種の可塑性に関与する情報処理システムの成熟が必要であり、臨界期前後でMAPへの応答性を変える逆耐性現象特異的因子の存在が予想され、陽性症状を中心とする一群の統合失調症の分子異常の手がかりとなる可能性がある(図1)。

2. 逆耐性現象と関連する脳部位

逆耐性現象が形成されない幼若期のラットでも、成熟期との差異はあるもののMAP投与直後の移所運動量増

加や常同行動が出現する^{10,13,17}。これは、覚醒剤による行動変化が、発達様式の異なる少なくとも2種類の情報処理システムを介して発現し、異常行動発現に直接関係するシステムは出生後早期からすでに機能しており、発達による変化は小さいが逆耐性現象に関与するシステムはそれを変調させる役割をもち、生後遅れて発達することを示唆している²。

この仮定は、*c-fos* 遺伝子産物である c-Fos の発現をマーカーとした実験によって支持された(*c-fos* 遺伝子は基礎的発現がきわめて少なく、さまざまな刺激にตอบสนองして一過性に発現するため、脳の活動性のマッピングに広く応用されている¹⁸)。つまり、逆耐性現象が成立しない幼若期と確実に形成される成熟期では、MAP 急性投与誘導性の c-Fos の分布が脳新皮質や線条体では著しく異なり、梨状葉皮質、嗅結節、中隔などでは目立たないことがわかった^{19,20}。さらに、MAP 誘導性 c-Fos の発現パターンは、逆耐性現象が成立しはじめる生後21~25日頃からほぼ一定となり、成熟期と同じパターンを示した。同様の c-Fos 発現の生後変化は、別の逆耐性現象惹起薬の cocaine 投与後にも認められた。以上の結果は、統合失調症で障害されると考えられる逆耐性現象関連情報処理システムが、生後発達とともに変化して臨界期頃に成熟することを示唆しており、発達薬理学的仮説と矛盾しない。また、このシステムは c-Fos 発現の変化が著明な脳新皮質や線条体に存在する可能性が高い。

3. 逆耐性現象関連候補遺伝子 *mrt1* の検出

そこで筆者らは、脳新皮質および線条体において、異なる条件下において発現に差のある遺伝子を同定する方法である RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) 法と、定量的 PCR 法 (competitive PCR 法, co-amplification RT-PCR 法, real time RT-PCR 法など) を組み合わせ、発達依存的に MAP への応答が変化する遺伝子を検索している^{21,22}。これまでに、ラット脳新皮質から MAP 急性投与1時間後に、生後8日には対照群と差がないが生後50日では有意な発現誘導がみられる3種の新規転写産物が検出され、*mrt1*~*mrt3* (MAP-responsive transcript 1~3) と名付けた。

このうち *mrt1* に関する解析が進み、次のように構造、発現分布およびコードするタンパクなどが明らかになった(図2)^{23,24}。①少なくとも4種のバリエーションがある全長6 kb 程度の mRNA を発現していることが予想される、② splicing acceptor site の選択により2種類のコーディングフレームが存在し、N 末端側にグリシンが豊富な領域があり(図2において G で示す)、PDZ, PX および Band 4.1 ドメインを1つずつもった2種類のタンパク *Mrt1a* および *Mrt1b* が発現する、③特異的抗体に対する *Mrt1b* 免疫反応性は、脳のシナプトゾーム画分に強く post-synaptic density (PSD) にはきわめて弱いこと、前シナプス側に局在するタンパクと共通のプロファイルを示すことから、前シナプスに多く分布すると推測される、④ *Mrt1a* 免疫反応性は脳のシナプトゾーム画

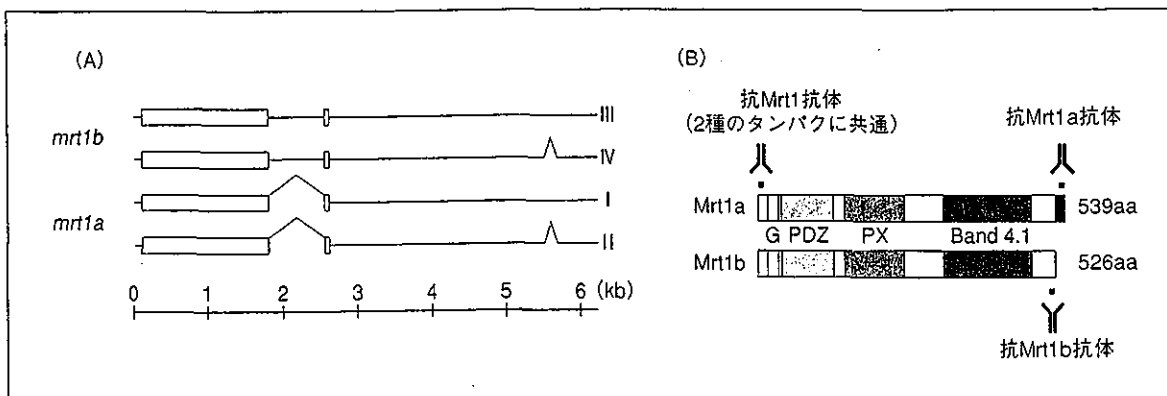


図2. *mrt1* (A) とコードタンパク Mrt1 (B) の構造の模式図

分では弱い, ⑤基礎的発現は, Mrt1b をコードする転写産物 *mrt1b* mRNA が脳優位であるのに対して, Mrt1a をコードする *mrt1a* mRNA は相対的に脳に少なく精巣に多い。

薬物の急性投与に対する反応について, ①成熟ラットの大脳新皮質において MAP 投与後に発現が増加するのは *mrt1b* mRNA であり, *mrt1a* mRNA は有意な変化が生じない²²⁾, ② *mrt1b* の MAP 応答性は, 逆耐性現象が形成されはじめる生後 3 週以前にはみられない(図 3)²²⁾, ③成熟期において, *mrt1b* mRNA は cocaine 投与後にも増加するが, 依存性があっても逆耐性現象を形成しない pentobarbital や逆耐性の成立を阻害する D₁ 受容体遮断薬投与後には変化しない²²⁾, ④ MAP 急性投与時に D₁ 受容体遮断薬を前処置しておく, *mrt1b* mRNA レベルの増加が認められなくなる²²⁾, などの特徴をもつことがわかった。

さらに, MAP を反復投与し逆耐性現象が形成された成熟ラットでは, ① *mrt1b* mRNA の基礎的発現が上昇している²³⁾, ② MAP または cocaine をチャレンジした場合, *mrt1b* mRNA の発現が対照群の動物で増加するのに対し, 変化しない²³⁾(図 4)(arc や homer1a の mRNA は急性投与時と同様に発現誘導がみられるので, *mrt1b* の応答性変化は非特異的な現象ではない²³⁾), ③ MAP 反復投与時に毎回 D₁ 受容体遮断薬を前処置すると, 逆耐性が形成されなくなるとともに, *mrt1b* mRNA の基礎的発現の上昇も認められなくなる²³⁾, などの現象が観察された。

以上のように, 脳優位に発現し, シナプトゾーム画分に多く分布するタンパクをコードする *mrt1b* mRNA は, ① MAP に対する応答性を逆耐性現象の臨界期以降に獲得し, ②逆耐性現象を引き起こす薬物に選択的な増加反応性を示す, ③逆耐性現象の成立と並行する基礎的発現量の長期的増加, などの本現象に共通した薬理学的特徴をもつことと, 逆耐性現象成立時には MAP または cocaine に対する応答が消失することが明らかになり, *mrt1b* および Mrt1b タンパクは本現象の形成と維持に関与する分子カスケードの構成因子である可能性が示唆された²³⁾。これを支持する所見として, アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内持続注入による Mrt1 タンパクの脳内発現を抑制した条件下で MAP を反復投与し

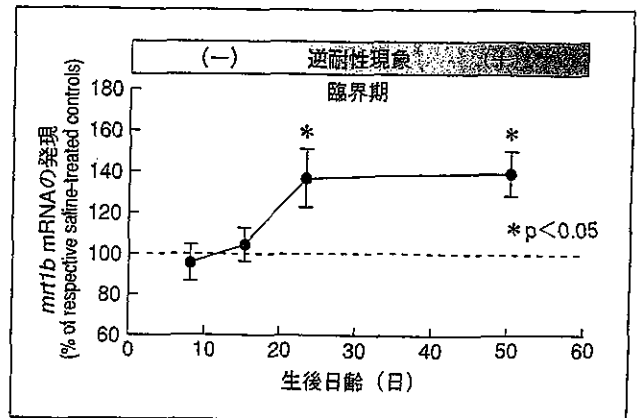


図 3. ラット大脳新皮質 *mrt1b* mRNA の発現に対する MAP の影響の生後変化

mrt1b mRNA の発現変化は, 各発達時期の生理食塩水投与群の発現を100%としたときの MAP 投与群の割合を示す。MAP に対する反応性は臨界期以降に獲得されるが, 基礎的発現は生後発達に伴って減少する(文献22参照)。データは平均値と標準誤差で表す。* $p < 0.05$: それぞれの発達期の生理食塩水投与と対照群(データ省略。各標準誤差は平均値の6%以内, 実験個体数は各群 8 匹)に対する有意差。

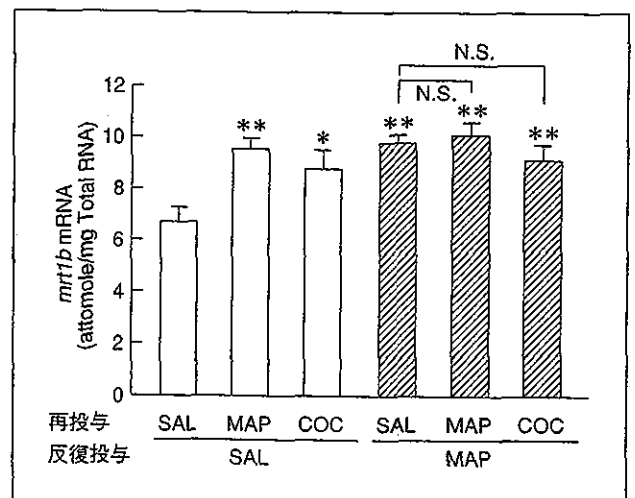


図 4. MAP 反復投与による逆耐性現象成立後のラット大脳新皮質における *mrt1b* mRNA の基礎的発現と MAP または cocaine への反応性の変化

MAP または生理食塩水(SAL, 対照群)を 1 日 1 回 5 日間反復投与した後 14 日間休薬し, MAP, cocaine(COC)または SAL をチャレンジしたときの *mrt1b* mRNA の発現変化を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: SAL 反復投与+SAL 再投与群に対する有意差。N.S.: 線で結んだ 2 群間には有意差がない。

たところ、逆耐性現象形成が抑制されるという予備的結果を得ている(未発表データ)。

4. *mrt1b* と統合失調症との関連

mrt1b および *Mrt1b* の逆耐性現象への関与については、作製中の *mrt1b* の過剰発現または欠損を示す遺伝子改変マウスを用いてさらに検討する予定である。一方、*mrt1b* は薬理学的特徴だけでなく、コードする *Mrt1b* タンパクの構造上の特色からも、逆耐性現象あるいは統合失調症との関連が考えられる。すなわち、① PDZ ドメインは神経伝達物質の受容体、トランスポーター、遊離装置などの細胞膜または近傍の分子と細胞骨格系タンパクとを結合させる働きをもつ分子に多くみられる²¹⁾、② PX ドメインはタンパク質の細胞内局在に関与する²²⁾、③ Band 4.1 ドメインは細胞膜上での分子の安定化や整列との密接な関係が推測される²³⁾、などの報告は、*Mrt1b* がシナプスにおいて情報伝達関連分子のダイナミックスを制御しうることを示唆しており、その異常が逆耐性現象あるいは統合失調症の病態形成に重要な役割を果たす可能性がある²⁴⁾。

したがって、覚醒剤精神病や統合失調症における意義を明らかにする目的で、*mrt1* のヒト相同遺伝子を同定し、血液から得られたゲノム DNA の多型と種々の精神疾患との相関を解析中である。さらに、*mrt1* が含まれる分子カスケードの他分子を、酵母ツーハイブリッド法を使ってヒト *Mrt1* タンパクと前記のドメインなどを介して相互作用をもつ分子として検索中である²⁵⁾。

おわりに

本稿で紹介した研究戦略により、発達薬理学的仮説をもとに予想したように、統合失調症様異常発現薬に対して脳で発達依存的応答を示す神経回路(脳部位)と分子が実際に存在することがはじめて示唆された。筆者らは、発達に伴って PCP に対する反応性が変化する神経回路^{21,28(29)}と遺伝子 *prt1* (PCP-responsive transcript 1)²⁰⁾を検出しているが、薬理学的反応において、臨界期は一致していたものの、MAP をプローブとして検出した *mrt1* とは異なっていた。これらの結果から、陽性症状と陰性

症状に関係する情報処理システムは機能的成熟時期は近いが、異なる分子カスケードおよび脳部位から構成されると推察される。

このように、統合失調症様異常発現薬に発達依存的応答を示す分子およびそれらと相互作用をもつ分子の研究は、新たに統合失調症との関連をもつ情報処理システムや分子を見出せる点で、本症の原因となる分子異常の手がかりを拡大するかもしれない。同時に、これら分子は、新しい予防・治療法を開発するための標的として応用できる可能性がある。

本稿で紹介した筆者らの研究は、東京医科歯科大学大学院精神行動医学分野で進めており、一部は2002年4月までの間、国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部において行いました。共同研究者は次の方々です(参加順)。海野麻未、柏淳、梶井靖(現 三菱ウエルファーマ)、平岡秀一(現 明治製菓)、藤山航(現 東北大学)、黒田安計、村岡新一郎、山本直樹、伊藤卓、金子雄二郎

● 文 献 ●

- 1) Berry N, Jobanputra V, Pal H: Molecular genetics of schizophrenia; A critical review. *J Psychiatry Neurosci* 28: 415-429, 2003
- 2) 西川徹, 海野麻未, 梶井靖, 他: 統合失調症の成因は薬理・生化学的アプローチから解明されるか. *精神科治療学* 12: 617-623, 1997
- 3) 西川徹: 統合失調症-動物モデルからのアプローチ. *Mol Med* 40: 270-278, 2003
- 4) 西川徹: 統合失調症と興奮性アミノ酸伝達異常. *精神医学レビュー別巻(21世紀に向けて精神統合失調症を考える)*, 融道男, 大森健一 編. 東京, ライフ・サイエンス, 26-37, 1994
- 5) Rapoport JL, Buchsbaum MS, Weingartner H, et al: Dextroamphetamine; Its cognitive and behavioral effects in normal and hyperactive boys and normal men. *Arch Gen Psychiatry* 37: 933-943, 1980
- 6) Rapoport JL, Buchsbaum MS, Zahn TP, et al: Dextroamphetamine; Cognitive and behavioral effects in normal prepubertal boys. *Science* 199: 560-562, 1978
- 7) Reich DL, Silvey G: Ketamine; An update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth* 36: 186-197, 1989
- 8) White PF, Way WL, Trevor AJ: Ketamine; Its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 56: 119-136, 1982
- 9) Fujiwara Y, Kazahaya M, Nakashima M, et al:

- Behavioral sensitization to methamphetamine in the rat; An ontogenic study. *Psychopharmacol* 91: 316-319, 1987
- 10) Kolta MG, Scalzo FM, Ali SF, et al: Ontogeny of the enhanced behavioral response to amphetamine in amphetamine-pretreated rats. *Psychopharmacol* 100: 377-382, 1990
 - 11) Scalzo FM, Burge LJ: The role of NMDA and sigma systems in the behavioral effects of phencyclidine in preweanling rats. *Neurotoxicology* 15: 191-200, 1994
 - 12) Scalzo, FM, Holson RR: The ontogeny of behavioral sensitization to phencyclidine. *Neurotoxicol Teratol* 14: 7-14, 1992
 - 13) Ujike H, Tsuchida K, Akiyama K, et al: Ontogeny of behavioral sensitization to cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 613-617, 1995
 - 14) Robinson TE, Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration; A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396: 157-198, 1986
 - 15) 佐藤光源, 伊藤千裕, 豊田洋, 他: 覚醒剤による遅発性精神病 - 疾患概念と成因研究の現状 -. *精神医学* 38: 796-805, 1996
 - 16) Vanderschuren LJ, Kalivas PW: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization; A critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151: 99-120, 2000
 - 17) McDougall SA, Duke MA, Bolanos CA, et al: Ontogeny of behavioral sensitization in the rat; Effects of direct and indirect dopamine agonists. *Psychopharmacology* 116: 483-490, 1994
 - 18) Morgan JL, Curren T: Stimulus-transcription coupling in the nervous system; Involvement of inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451, 1991
 - 19) 西川徹, 柏淳, 海野麻未, 他: Methamphetamine および cocaine 投与ラットにおける脳内 c-fos 遺伝子発現の生後発達に伴う変化. 厚生科学研究補助金(麻薬対策総合研究事業)「薬物依存による脳性障害とその発生機序に関する研究」, 平成 5 年度研究報告書. 35-42, 1994
 - 20) Nishikawa T, Umino A, Kashiwa A, et al: Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission. *in Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders*. Tokyo, Excerpta Medica, Ltd., 53-62, 1993
 - 21) Umino A, Nishikawa T, Takahashi K: Methamphetamine-induced nuclear c-Fos in rat brain regions. *Neurochem Int* 26: 85-90, 1995
 - 22) Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, et al: A developmentally regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Mol Psychiatry* 8: 434-444, 2003
 - 23) Fujiyama K, Kajii Y, Hiraoka S, Nishikawa T: Differential regulation by stimulants of neocortical expression of *mrt1*, *arc*, and *homer1a* mRNA in the rats treated with repeated methamphetamine. *Synapse* 49: 143-149, 2003
 - 24) Hata Y, Nakanishi H, Takai Y: Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci Res* 32: 1-7, 1998
 - 25) Wishart MJ, Taylor GS, Dixon JE: Phoxy lipids; Revealing PX domains as phosphoinositide binding modules. *Cell* 105: 817-820, 2001
 - 26) Hoover KB, Bryant PJ: The genetics of the protein 4.1 family; Organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 12: 229-234, 2000
 - 27) 柏淳, 伊藤卓, 黒田安計, 他: 逆耐性現象に関与する新規遺伝子 *mrt1b* と相互作用する分子の検索. *精神薬療研究年報* 35: 59-61, 2003
 - 28) 西川徹, 柏淳, 海野麻未, 他: Methamphetamine または phencyclidine 投与によって脳内発現が誘導される遺伝子に関する研究. 厚生科学研究補助金(麻薬対策総合研究事業)「薬物依存による脳性障害とその発生機序に関する研究」, 平成 6 年度研究報告書. 39-45, 1995
 - 29) Sato D, Umino A, Kaneda K, et al: Developmental changes in distribution patterns of phencyclidine-induced c-Fos in rat forebrain. *Neurosci Lett* 239: 21-24, 1997
 - 30) 平岡秀一, 梶井靖, 海野麻未, 他: ラット脳において phencyclidine による発現誘導が発達段階依存的に増強する遺伝子の同定. *精神薬療研究年報* 32: 17-22, 2000

Special Review

脳内D-セリンの代謝と生理作用

Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-serine in Mammalian Brains

西川 徹

Toru Nishikawa

最近, NMDA型グルタミン酸受容体のコ・アゴニストであるD-セリンが, 哺乳類の組織ではD体のアミノ酸は恒常的に存在することはないという定説に反し, 哺乳類の脳内では一生を通じて高濃度に維持され, NMDA受容体と類似した分布を示すことが明らかになった. 脳のD-セリンはグリアとニューロンの双方に含まれ, 少なくともNMDA受容体の内在性調節因子として, 様々な精神神経機能とその病態に関与することが示唆されている.

key words

D-セリン, NMDA型グルタミン酸受容体, コ・アゴニスト, 脳, グリア-ニューロン相互作用, 統合失調症

1 西川 徹 東京医科歯科大学大学院精神行動医学分野 E-mail:tnis.psyc@tmd.ac.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科修了, 医学博士, 東京医科歯科大学医学部附属病院精神科, Synthelabo-L.E.R.S., 国立精神・神経センター神経研究所などを経て, 1999年より現所属, 教授. 統合失調症を中心として精神疾患の分子機構に関する研究を行っている.

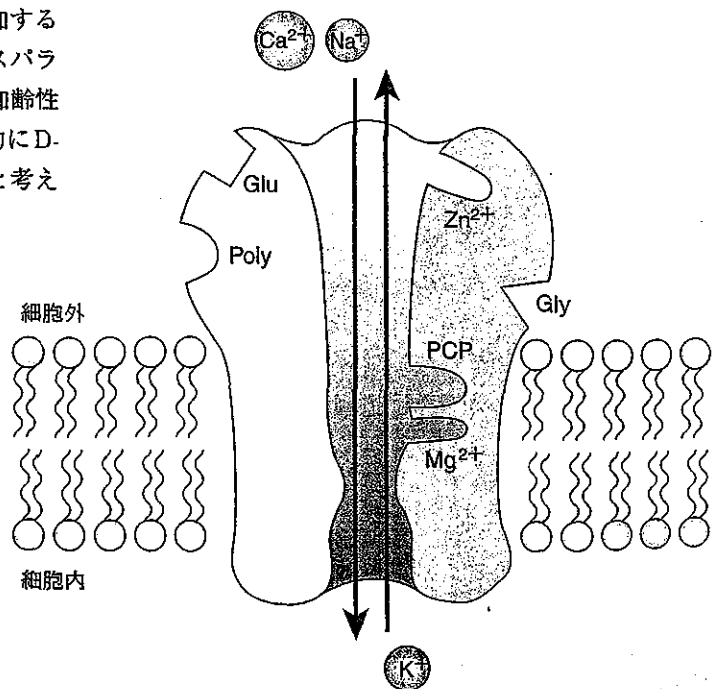
はじめに

自然界の多くのアミノ酸には, D体とL体の鏡像異性体(光学異性体)がある. 細菌や無脊椎動物とは異なり, 哺乳類組織中の生理的アミノ酸は, 遊離型かペプチドやタンパク質中の成分かを問わずL体で占められるというのが長い間の定説であった¹⁾. 分析技術の向上により, 1970年代以降, 歯, 中枢神経系の白質, 眼のレンズなどに含まれるタンパク質では, 老化とともにわずかながらアスパラギン酸, セリンあるいはアラニン残基においてD体の割合が増加することが知られるようになった²⁾. さらに, 遊離型D-アスパラギン酸が発達期の諸組織に検出されたが³⁾, これらは加齢性の病的現象か発達過程の一過性発現であって, 恒常的にD-アミノ酸が存在して生理機能を発揮することはないと考えられていた.

図1. NMDA受容体イオンチャネルの模式図

NMDA受容体は, 細胞外から Na^+ や Ca^{2+} を流入させ, 細胞内から K^+ を透過させるイオンチャネルを構成しており, グルタミン酸結合部位(Glu), グリシン結合部位(Gly), マグネシウムイオン結合部位(Mg^{2+}), フェンサイクリジン結合部位(PCP), ポリアミン結合部位(Poly)などの, 種々の調節部位を持つ. NR1サブユニット(多様なバリエーションが存在)と4種のNR2サブユニットA~Dの少なくとも1種が組み合わさったヘテロメリック集合体を形成することが示唆されており, GlyはNR1上に, GluはNR2上にあると考えられている. 最近, NR3サブユニットが同定されたが, 本模式図とは異なる調節部位を持つ可能性がある(本文参照).

ところが筆者らは, NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体遮断薬が統合失調症様異常を引き起こすことに注目し, NMDA受容体グリシン結合部位(図1)を刺激して本受容体機能を促進する, D-セリン, D-アラニンとそれらの脂肪酸化合物を用いて統合失調症の病態および新しい治療法を研究する過程で, 1991年から翌年にかけて, ラットの脳で遊離型D-セリンが一生を通じて高濃度に維持



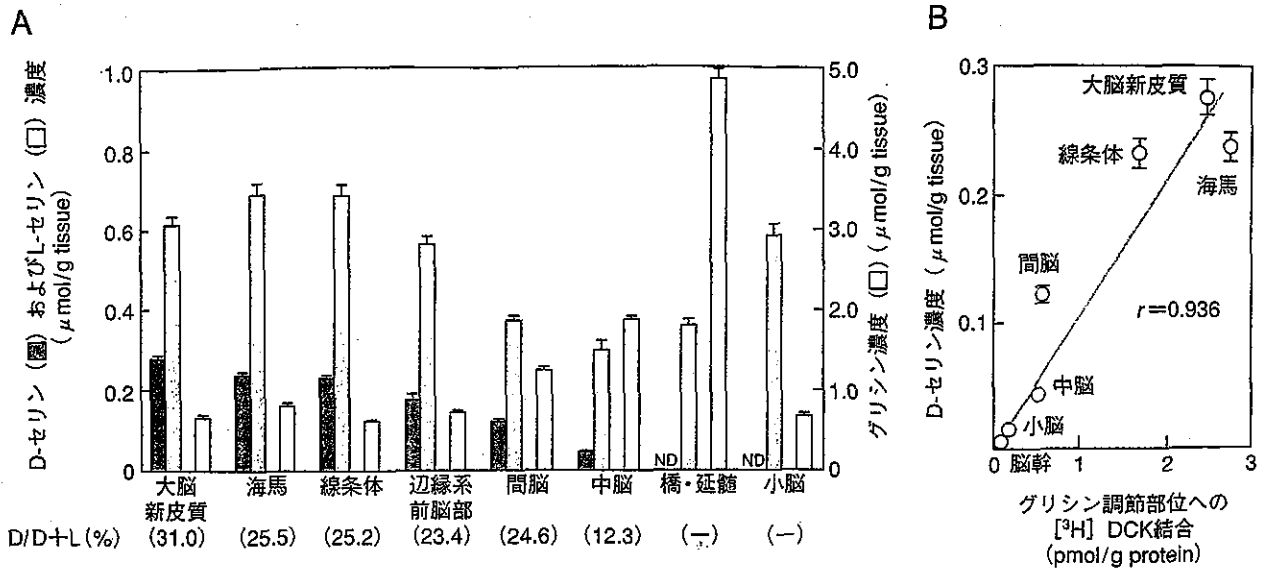


図2. 脳内D-セリンの分布

A: 成熟ラット脳各部位におけるD-セリン, L-セリンおよびグリシンの組織中濃度の比較. NDは検出感度以下を示す.

B: 脳各部位のD-セリン濃度と, NMDA受容体グリシン調節部位密度〔グリシン調節部位の選択的遮断薬5,7-dihydroxykynurenic acid (DCK)により標識〕との関係. 相関係数(r)は1に近く, 両者が酷似した分布をしていることがわかる.

されることを見いだした²⁾. さらに, 分布, 代謝および機能に関する研究を進め, 内在性D-セリンは, 哺乳類の脳においてNMDA受容体の内在性調節因子として精神神経機能の調節に関与する新しいタイプの生理活性物質であることを提唱した²⁾. その後, 内在性D-セリンの研究が次第に波及しているが, 本稿では現状と今後の課題について概説する.

I. 哺乳類脳の内在性D-セリンの分布と代謝

1. 分布

成熟ラット体内のD-セリンは脳選択的に集積し, 脊髄, 末梢各組織および血液中ではきわめて低濃度である(ただし尿中濃度は高い)²⁾. 脳内D-セリンの分布も不均一で, 前脳各部位では高濃度, 間脳, 中脳では中等度から低濃度, 後脳の組織は痕跡程度である²⁾(図2). この脳内分布は, NMDA受容体のグルタミン酸, phencyclidine (PCP) およびグリシン(図2)各結合部位の密度分布と強い正の相関を示し, 特にNMDA受容体R2BサブユニットmRNAの分布と酷似している²⁾. 内在性D-セリンの分布のこうした特徴は, 抗D-セリン抗体を用いた免疫組織化学的研究でも確認され, ヒト⁵⁾を含む哺乳類の間で共通である²⁾.

脳内D-セリンの分布は発達に伴って著しく変化し, ラットでは出生直後はほぼ均一に分布しているが, 生後3週ころまでに成熟期のパターンに近づく²⁾(図3). この変化も,

R2BサブユニットmRNAの脳内分布の発達とよく一致している²⁾.

細胞レベルでは, D-セリン様免疫反応はアストロサイトに強いが, ニューロンの細胞体, 樹状突起, 軸索にも観察される³⁾. 海馬の免疫電子顕微鏡的研究では, アストロサイトのD-セリン様免疫反応が, 血管壁やニューロンの樹状突起・スパインに隣接する突起部分に豊富なことが報告されている⁴⁾.

2. 細胞外遊離

in vivo ダイアリスिसにより, ラット脳の細胞外液中にD-セリンが検出される. その濃度は, 脳部位によって異なり組織中濃度と高い相関を示す(前頭葉皮質では約 5×10^{-6} M)²⁾. 神経の脱分極刺激後には, グリシンやグルタミン酸のように神経伝達物質として機能するアミノ酸が急速に増加するのに対して, D-セリンはかえって低下する²⁾. また, インパルスフロー遮断時やカルシウムイオンを除去した条件では細胞外液中D-セリンは有意に増加し, 神経伝達物質とは異なる機序によって細胞外へ遊離されると考えられる²⁾.

3. 取り込み

ラット脳のホモジネート^{5)~7)}または大脳皮質から得られたアストロサイト主体の培養標本²⁾, ラットグリオーマ由来のC6細胞²⁾などでは, 放射性D-セリンが取り込まれる. 脳

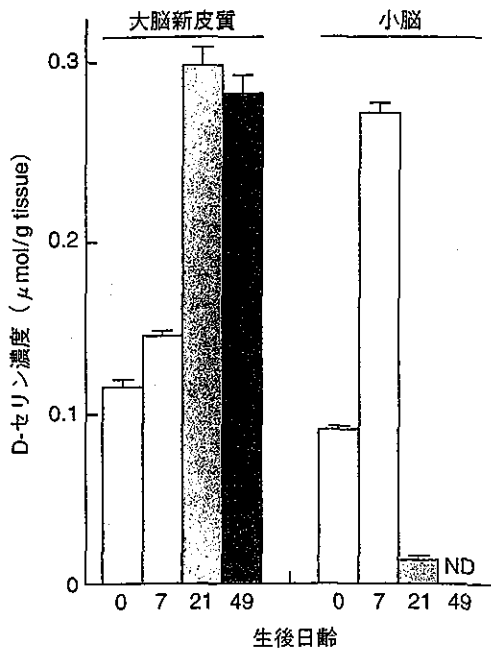


図3. 大脳新皮質と小脳におけるD-セリン濃度の生後発達
NDは検出感度以下を示す。

ホモジネートへの取り込みの薬理的性質は既知のトランスポーターとは異なり、D-セリンを細胞内に輸送する未知のキャリアの存在が示唆される。最近クローニングされたナトリウム非依存性中性アミノ酸トランスポーター Asc1 は、L-セリン、L-システイン、L-アラニンとともにD-セリンにも高親和性を示すことから、内在性D-セリンを生理的に輸送する可能性がある⁸⁾。

4. 合成

ラットの脳では、① L-セリンまたはグリシンの濃度を高めるとD-セリン濃度が上昇し、D-セリン濃度を上昇させるとグリシンやトレオニンは変化しないがL-セリン濃度が増加する、② [³H] L-セリンが[³H] D-セリンへ転換されるなどの現象が見られ、D-セリンをL-セリンから合成するセリンラセマーゼの存在が予想された²⁾。実際、Woloskerら⁹⁾はピリドキサル5'-リン酸依存性を示すラットおよびヒトのセリンラセマーゼを報告している。ただし、同定された酵素は、D-, L-セリンデヒドラターゼ反応も触媒し、酵母のアラニンラセマーゼと比較して1000分の1程度の活性しか持たない点などより、生理的にラセマーゼとして機能しているかについてはさらに検討を要するという意見がある¹⁰⁾。

このほかにも、グリシン開裂酵素活性を欠く非ケトーシス型高グリシン血症患者の脳や本酵素の阻害剤を投与したラットの脳でD-セリンが減少すること²⁾や、理論的な反応

シメチル基転移酵素、ホスホセリンホスファターゼなどがD-セリン合成に関与する可能性も研究されている²⁾。

5. 分解

D-セリン分解活性を持つ哺乳類組織の酵素としては、D-アミノ酸酸化酵素 (D-amino acid oxidase; DAO) が古くから知られている。脳のDAOは、成熟ラットにおける分布がD-セリンと逆相関し、小脳・橋・延髄などではD-セリン濃度が減少し始める生後10日前後から活性が急速に上昇する。また、本酵素活性を欠く突然変異マウスにおいては大脳皮質のD-セリン含量はわずかしこ増加しないが小脳の濃度は著明に上昇する。これらの観察から、DAOはD-セリンの脳内濃度勾配形成に関与する可能性があり、少なくとも後脳においてはD-セリンの分解に関与していると考えられる²⁾。大脳皮質から培養したアストロサイトでDAO遺伝子の発現が認められるが¹¹⁾、前脳部はDAOの活性および免疫反応がきわめて低く、生理的にD-セリンを分解する他の酵素が存在することも否定できない。

6. D-セリン反応性新規遺伝子

筆者らは、ラット大脳新皮質から、発現がD-セリンで選択的に誘導されL-セリンでは変化しない新規転写産物 dsr-1 (D-serine-responsive transcript-1)¹²⁾を見いだした。dsr-1の一部はプロトンATPaseサブユニットをコードするM9.2遺伝子と相同性があり、D-セリンの取り込みや放出に関与する可能性がある。

II. 脳内D-セリンの生理作用

1. NMDA受容体の調節

(1) NR1およびNR2サブユニットから構成されるNMDA受容体

D-セリンは、内在性物質であることが明らかになる以前から、NR1およびNR2サブユニットから構成されるNMDA受容体に作用することが知られていた。すなわち、D-セリンはグリシンやD-アラニンと同様に、NMDA型受容体のグリシン結合部位を選択的に刺激し、次のようにグルタミン酸の本受容体に対する作用を増強する¹³⁾。①脱分極、②内向き電流、③Ca²⁺流入、④cGMPの産生、⑤種々の神経伝達物質の放出、⑥神経細胞死など。また、グリシン結合部位の刺激は、単独では興奮性後シナプス膜電位を引き起こすことはないが、グルタミン酸による十分な神経伝達が生ずるためには不可欠であり、グリシン、D-セリン、D-アラニンなどはNMDA受容体の“コ・アゴニスト”と呼ばれる^{2), 13)}。

るかに強く立体選択的である^{2), 13)}.

上記のような作用の特徴とNMDA受容体と類似した脳内分布を示すこと (I章-1を参照) より, 脳内D-セリンはNMDA受容体の生理的なコ・アゴニストであると推測される²⁾. この機能については, もう1つの内在性コ・アゴニストであるグリシンと比較しながら分子・細胞生物学的な検討が進められている。

海馬のスライスまたはニューロン・グリア混合培養系において, DAOを作用させD-セリンのみを分解しグリシンの濃度を維持した条件では, NMDA受容体グルタミン酸結合部位刺激時の一酸化窒素合成酵素活性の上昇¹⁴⁾や, NMDA受容体依存的な長期増強(LTP)の誘導¹⁵⁾が著明に抑制される。これらの結果は, 海馬の少なくとも一群のNMDA受容体に, D-セリンが内在性コ・アゴニストとして作用することを支持している。

一方, グリア型グリシントランスポーター (GlyT1) の選択的阻害剤を投与したラットでは, 前頭前野のシナプス性NMDA受容体反応が増強されることから, 内在性のグリシンも前脳部でNMDA受容体調節に関与すると考えられる¹⁶⁾. また, D-セリン投与時にも同様の反応増強が認められるため, 生理的狀態では, NMDA受容体グリシン結合部位が内在性リガンドによって飽和していない場合があると推察される¹⁶⁾.

グリシンとD-セリンは, 脳内分布に著明な差異があることから, 生理的に作用するNMDA受容体の種類が異なる可能性がある。ただし, アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた, NR1とNR2A~NR2Dのいずれかを組み合わせた4種類のヘテロメリックNMDA受容体における検討では, どの受容体でも, グルタミン酸が誘導する内向き電流を増強する効果はグリシンよりD-セリンのほうが数倍強かったが, 受容体間における両者の作用差は明らかではなかった²⁾.

(2) NR1およびNR3サブユニットから構成されるNMDA受容体

NR1/NR2 NMDA受容体と異なり, NR1とNR3AまたはNR3BのヘテロメリックNMDA受容体では, グルタミン酸やNMDAへの応答が見られず, グリシンが興奮性の反応(内向き電流)を引き起こす¹⁷⁾. このグリシン誘発性電流は, グルタミン酸結合部位またはPCP結合部位の選択的拮抗薬には影響を受けないが (図1参照), グリシン結合部位の選択的拮抗薬で抑制される¹⁷⁾. 興味深いことに, NR1/NR3 NMDA受容体においては, D-セリンはグリシンとは対照的な作用を示し, 単独ではほとんど効果を及ぼさないが, グリシン誘発性電流を強く阻害する¹⁷⁾. すなわち, D-セリンはNR1/NR3型NMDA受容体の内在性調節因子の候補でもあるが, コ・アゴニストとは言えない。

2. グリア-ニューロン相互作用

脳内D-セリンは, アストロサイトを中心としてグリア細胞に多く存在していることや, 細胞外液中の濃度が脱分極によって増加しないことなどから, 神経修飾物質 (neuromodulator) としてアストロサイトから放出される可能性がある (図4). D-セリンの合成, 取り込み, 分解に関する過程あるいは酵素がアストロサイトに見いだされる点は, 脳内D-セリンの少なくとも一部はアストロサイト内で合成・貯蔵されて, グルタミン酸ニューロンが投射するシナプス間隙へ放出され, NMDA受容体に作用した後, アストロサイトに取り込まれて分解を受けることを示唆している (図4).

また, ニューロンが存在しない条件で培養したアストロサイト¹⁵⁾や, 選択的に神経細胞体を破壊した前頭葉皮質では (筆者ら; 未発表データ) D-セリン濃度が著明に低下する。さらに, カイニン酸やグルタミン酸が, 大脳皮質から得た培養アストロサイトにあらかじめ取り込ませた³H]D-セリンの放出を増加させるというデータもある²⁾.

これらの知見より, 脳内D-セリンは, アストロサイトによるNMDA受容体の機能制御のような, グリアとニューロンの相互作用に関与するシグナル分子として機能している可能性が考えられる。NMDA受容体グリシン結合部位を完全に遮断した条件下でも, ³H]D-セリンの高親和性結合活性が認められるため²⁾, この種の相互作用は, NMDA受容体以外の神経伝達系の修飾にも関係するかもしれない。

3. 神経回路形成

D-セリンと酷似した脳内発現分布を示すNMDA受容体R2Bサブユニット遺伝子のノックアウトマウスでは神経回路形成に異常が見られ²⁾, 小脳のプルキンエ細胞と登上線維および平行線維との間にNMDA受容体の活動性に依存したシナプス形成が生ずる発達期に, プルキンエ細胞周囲に突起を伸ばすバグマングリア細胞内に高濃度のD-セリンが一過性に出現する⁴⁾. このような現象は, 脳内D-セリンが一定の発達時期または神経修復の際に, NMDA受容体を介して神経回路形成に関与することを示唆している。

III. D-セリンと精神神経疾患

これまで述べてきたように, 脳内D-セリンは少なくともNMDA受容体に内在性調節因子として作用し, NMDA受容体に関与する種々の精神神経機能の発現・制御に重要な役割を果たすと推測される。したがって, 脳内D-セリンとその代謝・機能の分子機構の障害は様々な精神神経症状を生ずると考えられる。実際に, D-セリンを含むNMDA受容体

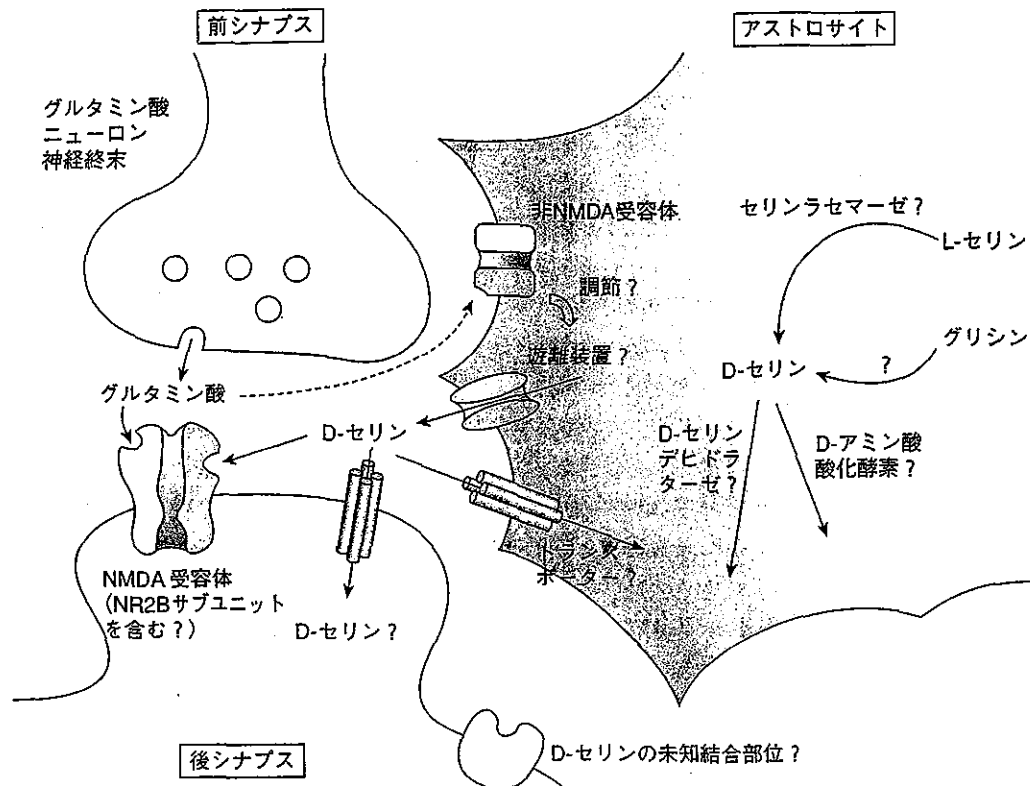


図4. 脳内D-セリン動態の模式図 (仮説)

脳内D-セリンは、ニューロンとグリア細胞の双方に含まれ、いずれかに生合成系、細胞外への放出機構、取り込み機構、分解系などが存在すると推測される。細胞外液中のD-セリンは、少なくともグルタミン酸シナプスにおいてNMDA受容体グリシン結合部位に作用し、グルタミン酸伝達を制御する。これ以外にも生理的作用部位と推測される高親和性結合部位が検出されるが、分子の実体と局在は不明である。グルタミン酸は、グリア細胞の非NMDA型受容体を介してD-セリンの放出を促進するという説がある。D-セリンの生合成および分解の経路はアストロサイト以外にも存在する可能性がある。

グリシン結合部位の作用物質は、統合失調症状、小脳失調、アルコールの作用、痴呆モデル動物の学習能、不安行動、けいれん閾値、虚血性神経細胞死、依存性薬物による長期的行動異常などに影響を及ぼす。最近には特に、内在性D-セリン発見の契機ともなった統合失調症の病態との関連が注目されている。

PCPに代表されるNMDA受容体遮断薬は遮断作用の強さに比例して、統合失調症様の精神異常を引き起こし、グリシン、D-サイクロセリン、D-セリンなどのNMDA受容体グリシン結合部位のアゴニストを服用した統合失調症患者の症状の改善が報告されていることから、統合失調症ではNMDA受容体を介するグルタミン酸神経伝達の低下が推測されている²⁾。その原因の1つとして、脳内D-セリンの代謝や機能に関与する分子の異常などによって、グリシン結合部位へのD-セリンシグナルの減少が生じ、本受容体機能が低下する可能性がある。筆者らは統合失調症患者と非精神神経疾患患者の死後脳で前頭葉皮質および側頭葉皮質の組織中D-セリン濃度を測定したが、両群間に有意な差は認め

なかった²⁾。しかし、統合失調症患者の死後脳では縁上回、角回、体性感覚野、運動前野などの大脳皮質領域でNMDAグリシン結合部位の増加が観察され、特定の神経回路におけるD-セリンの細胞外放出が減少したための代償的反応と考えることもできる。さらに分子遺伝学的解析において、DAOおよびその活性に影響するG72の遺伝子多型と統合失調症が有意に相関することが見いだされ¹⁸⁾、D-セリン代謝の変化との関連が推定されている。最近、統合失調症患者の血液中D-セリンの低下が報告されたが¹⁹⁾、アルツハイマー病患者でも同様の減少が認められ²⁰⁾、疾患特異性、薬物の影響、血液中と脳内のD-セリン濃度の関係などについて今後の検討が待たれる。

このほか、小脳失調にもD-セリンの異常が関与する可能性がある²¹⁾。すなわち、①NMDA受容体の遮断薬やNR2AおよびNR2C双方のサブユニット遺伝子のノックアウトによって小脳失調症状が生じ、②小脳ではD-セリン濃度はきわめて低い、取り込み活性は高くDAO活性欠損によりD-セリン濃度が上昇するため、D-セリンの生合成が行われ生

理的役割を果たしていると推察される。また筆者らは、薬物性あるいは遺伝性の小脳変性モデルマウスや脊髄小脳変性症患者の少なくとも一部では、D-セリンまたはD-サイクロセリンが運動失調が改善することを見だし、現在研究対象を拡大して検討中である^{2), 21)}。

非ケトーシス型高グリシン血症では、脳に病変が認められずかつ代謝性でない疾患に比べて死後脳大脳皮質中のD-セリン濃度が3分の1程度に激減していることと、精神発達遅滞、けいれん発作、無呼吸発作、嗜眠などの多彩な中枢神経症状との関連が疑われる²⁾。一方、一過性虚血時のラビット梨状葉皮質では細胞外D-セリン濃度が上昇し²²⁾、DAO処置により内在性D-セリンが選択的に低下したラットの海馬スライスでは虚血性神経損傷が抑制される事実²³⁾、脳血管性障害の病態にもD-セリンの異常が関与しうることを示唆している。

おわりに

脳の内在性D-セリンは、D体のアミノ酸であることのほか、古典的な神経伝達物質とは異なり、コ・アゴニストとしてシナプス間隙に一定以上の濃度が維持される必要がある。

り、グリアとニューロンの相互作用を担うなどの特殊性を持つ。したがって、脳内D-セリンの代謝および生理機能の分子機構が解明により、新たな生化学的知見ばかりでなく、脳機能を制御する未知の情報処理システムの手掛かりをもたらされ、精神神経疾患の原因・病態の理解と新たな治療法開発が大きく前進することが予想される。本稿で触れたように、統合失調症や小脳失調においては、すでに、D-セリンがグリシン結合部位の刺激を介してNMDA受容体遮断薬に拮抗する作用を治療に応用する研究が続けられ、既存の抗精神病薬が奏功しない統合失調症状や、治療薬の乏しい小脳失調症状が改善することが示唆されている。現在NMDA受容体機能調節物質として臨床応用可能なのは、グリシン、D-サイクロセリン、D-セリンなどに限られ、しかも有効投与量、副作用などの点で問題がある。脳内D-セリンの研究が進展すれば、例えばD-セリン特異的トランスポーターの阻害薬のように、D-セリン関連分子を標的としたD-セリンシグナル調節薬の探索を可能となり、こうした問題が克服されて、少なくとも、NMDA受容体機能異常を示す難治性の精神神経疾患に対する創薬に結び付くことを期待できよう。

文献

- 1) Fujii N: *Orig Life Evol Biosph* (2002) 32: 103-127
- 2) 西川 徹ら: *日本神経精神薬理学雑誌* (2000) 20: 33-39
- 3) Yasuda E, et al: *Neurosci Lett* (2001) 299: 162-164
- 4) Schell MJ, et al: *J Neurosci* (1997) 17: 1604-1615
- 5) Yamamoto N, et al: *Synapse* (2001) 42: 84-86
- 6) Javitt DC, et al: *Brain Res* (2002) 941: 146-149
- 7) Ribeiro CS, et al: *Brain Res* (2002) 929: 202-209
- 8) Matsuo H, et al: *Neurosci Lett* (2004) 358: 123-126
- 9) Wolosker H, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96: 13409-13414
- 10) 吉村 徹: *生化学* (2004) 76: 378-381
- 11) Urai Y, et al: *Neurosci Lett* (2002) 324: 101-104
- 12) Tsuchida H, et al: *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 280: 1189-1196
- 13) Danysz W, et al: *Pharmacol Rev* (1998) 50: 597-664
- 14) Mothet JP, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97: 4926-4931
- 15) Yang Y, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100: 15194-15199
- 16) Chen L, et al: *J Neurophysiol* (2003) 89: 691-703
- 17) Chatterton JE, et al: *Nature* (2002) 415: 793-798
- 18) Chumakov I, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99: 13675-13680
- 19) Hashimoto K, et al: *Arch Gen Psychiatry* (2003) 60: 572-576
- 20) Hashimoto K, et al: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2004) 28: 385-388
- 21) Ogawa M, et al: *J Neurol Sci* (2003) 210: 53-56
- 22) Lo EH, et al: *Neurosci* (1998) 83: 449-558
- 23) Katsuki H, et al: *J Pharmacol Exp Ther* (2004), 印刷中

Nucling Recruits Apaf-1/Pro-caspase-9 Complex for the Induction of Stress-induced Apoptosis*

Received for publication, March 16, 2004, and in revised form, July 21, 2004
Published, JBC Papers in Press, July 22, 2004, DOI 10.1074/jbc.M402902200

Takashi Sakai‡, Li Liu‡§, Xichuan Teng‡§, Rika Mukai-Sakai‡¶, Hidenori Shimada‡, Ryuji Kaji¶, Tasuku Mitani‡¶, Mitsuru Matsumoto‡, Kazunori Toida¶, Kazunori Ishimura¶, Yuji Shishido‡**, Tak W. Mak‡‡, and Kiyoshi Fukui‡§§

From the ‡The Institute for Enzyme Research and ¶School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan and the ‡‡Advanced Medical Discovery Institute, University of Toronto, Toronto, Ontario M5G 2C1, Canada

Nucling is a novel protein isolated from murine embryonal carcinoma cells with an up-regulated expression during cardiac muscle differentiation. We show here that Nucling was up-regulated by proapoptotic stimuli and important for the induction of apoptosis after cytotoxic stress. We further demonstrated that overexpressed Nucling was able to induce apoptosis. In Nucling-deficient cells, the expression levels of Apaf-1 and cytochrome *c*, which are the major components of an apoptosis-promoting complex named apoptosome, were both down-regulated under cellular stress. A deficiency of Nucling also conferred resistance to apoptotic stress on the cell. After UV irradiation, Nucling was shown to reside in an Apaf-1/pro-caspase-9 complex, suggesting that Nucling might be a key molecule for the formation and maintenance of this complex. Nucling induced translocation of Apaf-1 to the nucleus, thereby distributing the Nucling/Apaf-1/pro-caspase-9 complex to the nuclear fraction. These findings suggest that Nucling recruits and transports the apoptosome complex during stress-induced apoptosis.

Cell death is classified into two major morphologically and biochemically distinct modes, necrosis and apoptosis. Necrosis is characterized by swelling of organelles and cells, followed by lysis of the plasma membrane and random DNA degradation. In contrast, apoptosis is a process that is characterized by cell shrinkage, plasma membrane blebbing, nuclear condensation, and endonucleolytic cleavage of DNA into fragments of oligonucleosomal length and is a fundamental and indispensable process during normal embryonic development, tissue homeostasis, and regulation of the immune system (1–3). In addition, environmental stressors such as heat shock, radiation, chemi-

cal agents, and oxidative stress can also induce apoptosis. These proapoptotic stimuli bring about organellar stress, affecting the nucleus, peroxisome, lysosome, or Golgi apparatus. Most of the apoptosis-inducing signals from these organelles converge at mitochondria. Mitochondria release proteins that promote cell death after cellular stress (4). One of these proteins is cytochrome *c*, which forms a complex with the cytoplasmic protein Apaf-1 and pro-caspase-9, leading to the activation of caspase-9. Caspase-9, in turn, activates caspase-3, the protease that cleaves the majority of caspase substrates during apoptosis. Mitochondria also release apoptosis-inducing factor (AIF)¹ and endonuclease G, which appear to kill cells independently of caspases. Therefore, mitochondria are thought to be a central regulatory element in stress-induced apoptosis (5).

Nucling was originally isolated from murine embryonal carcinoma cells as a protein, the expression of which was up-regulated during cardiac muscle differentiation (6). A bovine homolog of Nucling, named β CAP73, was isolated and characterized as a novel regulator of β -actin assembly (7, 8). Recently, we reported that Nucling down-regulates expression of the antiapoptotic molecule, galectin-3, through interference with nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling (9). It has been reported that galectin-3 is translocated to the perinuclear membranes after exposure to a variety of apoptotic stimuli and becomes abundant in mitochondria, where it prevents mitochondrial damage and cytochrome *c* release (10). These findings led us to investigate whether Nucling is involved in any of the apoptotic signaling pathways. To address this issue, we performed molecular biological analyses, including gene knock-out experiments.

In this report, we show that Nucling is a regulatory molecule for stress-induced apoptosis, which interacts with the Apaf-1/pro-caspase-9 complex, thereby acting as a stabilizer for the apoptosome. Nucling was shown to be able to induce apoptosis in mammalian cells and could promote the caspase cascade. Nucling^{-/-} cells showed resistance to cellular stress. Up-regulation of Apaf-1, release of cytochrome *c*, and activation of caspase-9 induced by cytotoxic stress were not observed in Nucling^{-/-} cells. Two-dimensional native/denaturing-PAGE analysis revealed that Nucling assembles with the Apaf-1/pro-

* This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research and a grant for the 21st Century COE Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and by a Scientific Research grant from the Japan Society for the Promotion of Science. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by the Rotary-Yoneyama Memorial Foundation.

¶ Present address: Institute of Advanced Technology, Kinki University, 14-1 Minami-akasaka, Kainan, Wakayama 642-0017, Japan.

** Present address: Brain Research Institute, Niigata University, 757 Ichiban-cho, Asahimachi-dori, Niigata 951-8122, Japan.

§§ To whom correspondence should be addressed: The Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan. Tel.: 81-88-633-7429; Fax: 81-88-633-7431; E-mail: kiyoi@ier.tokushima-u.ac.jp.

¹ The abbreviations used are: AIF, apoptosis-inducing factor; NF- κ B, nuclear factor- κ B; MEF, mouse embryonal fibroblast; PI, propidium iodide; TUNEL, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling; LDH, lactate dehydrogenase; Nucl.mid, middle portion of Nucling; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; BAP, bacterial alkaline phosphatase; zVAD-fmk, benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone; zDQMD-fmk, benzylloxycarbonyl-Asp-Gln-Met-Asp-fluoromethyl ketone; TNF, tumor necrosis factor; CHX, cycloheximide; WT, wild type.

caspace-9 complex *in vivo*. These findings suggest that Nucling acts as a regulatory factor for stress-induced apoptosis, sustaining the expression level of Apaf-1 by interacting with the Apaf-1/pro-caspase-9 complex. Moreover, this assemblage composed of Nucling, Apaf-1, and caspase-9 was observed in both cytosol and nuclear fractions. Furthermore, we confirmed that Nucling was required for the translocation of Apaf-1 to the nucleus after proapoptotic stress, suggesting that Nucling is a transporter of the Apaf-1/caspase-9 complex to the nucleus.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Culture Conditions—COS7 cells, HeLa cells, and mouse embryonal fibroblast (MEF) cells were used in this study. Cells were maintained in DMEM with 100 units/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 5 µM mercaptoethanol, and 10% (v/v) fetal calf serum. They were cultured in 10 ml of medium in 95-mm plastic tissue culture plates at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in a humidified incubator. For routine propagation, cultures were split, and the growth medium was replenished every three to four days.

Construction of Expression Vectors—The cDNA fragment of Nucling was tagged with the sequence encoding the Flag peptide using the vector pFlag-CMV2 (Kodak).

Transfection of COS7 Cells with Plasmid DNA—Plasmid DNA was transiently transfected into COS7 cells using the Effecten reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For immunofluorescence microscopic analysis, a sample of COS7 cells was transferred to an eight-well chamber slide for tissue culture and incubated at 37 °C overnight before transfection.

Confocal Immunofluorescence Microscopic Analysis—After 24 h of transfection with Flag-Nucling expression plasmid vector or control vector (pFlag-BAP), cells were washed with PBS and incubated with propidium iodide (PI; 3,8-diamino-5-(3-(diethyl-methylamino)propyl)-6-phenyl phenanthridinium diiodide; Sigma) for 20 min at room temperature. After nuclear staining of dead cells with PI, cells were washed with PBS three times and then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. For blocking, the cells were incubated with 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h. After five washes with PBS, cells were incubated with anti-Flag M5 antibody for 2 h at room temperature. After five washes with PBS, the slides were incubated with FITC-conjugated secondary antibodies against mouse IgG (Amersham Biosciences) for 1 h. After five washes with PBS, the slides were mounted with anti-fade solution, sealed, and examined using a confocal laser scanning microscope and software (Leica TCS NT, Heidelberg, Germany).

Cell Death Assays—PI staining assays were performed using standard protocols (Oncor). TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assays were performed using the In Situ Cell Death Detection kit, Fluorescein (Roche) according to the manufacturer's instructions. Cell death was measured by lactate dehydrogenase (LDH) release assay or trypan blue exclusion assay. For the LDH release assay, the culture medium was centrifuged to remove detached cells, and the supernatants were used to determine the quantitative LDH activity with a Cytotoxicity Detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. For total LDH activity, cell lysate was prepared from control cells in the culture by adding a 1/100 volume of 10% Triton X-100 into the culture medium, incubated at room temperature for 15 min, and then centrifuged at 800 × *g* for 10 min. For the trypan blue exclusion assay, detached COS7 cells transfected with pFlag-Nucling, or pEGFP-C1 in culture medium, were concentrated by centrifugation (800 × *g* for 5 min) and resuspended in 100 µl of cold PBS before being incubated with 0.4% trypan blue solution (Sigma) for 10 min. More than 100 cells were scored on a hemocytometer.

Western Blot Analysis—Cellular extracts were prepared as described previously (6). Antibodies reactive to cytochrome *c* (BD Biosciences), Apaf-1 (Chemicon), caspase-9 (Cell Signaling), caspase-3 (BD Biosciences), β-actin (Sigma-Aldrich), and the middle portion of Nucling (Nucl.mid) (6) were used in this study. Western blot analysis was carried out according to standard procedures using an ECL detection kit (Amersham Biosciences) or AP detection kit (Roche). Quantification was performed by comparing densitometric scanning readings using NIH-Image v1.63 software; numbers (arbitrary units) represent values corrected for loading with the data reprobed by β-actin.

Northern Blot Analysis—After treatment, COS7 cells were washed with PBS and pelleted by centrifugation. Total RNA was isolated from cells using ISOGEN as described by the manufacturer (Nippon Gene,

Toyama, Japan). RNA was fractionated on 2.2 M formaldehyde/1.2% agarose gels and transferred overnight onto Hybond N nylon membranes (Amersham Biosciences) in 10× SSC. The RNA was cross-linked to the membrane using a UV cross-linker (Amersham Biosciences) before hybridization. A specific probe was generated by labeling the cloned cDNA fragment of full-length Nucling with [³²P]dCTP (NEN, Boston, MA) using Ready-To-Go DNA Labeling Beads (-dCTP) (Amersham Biosciences). After overnight hybridization at 42 °C, the filters were washed once in 2× SSC for 10 min (23 °C) and twice in 0.1× SSC for 15 min (68 °C), covered in plastic wrap, and exposed to Kodak X-Omat AP film at -70 °C for 3–24 h.

Generation of Nucling^{-/-} Mice—The genomic DNA containing the Nucling gene was isolated from a 129/Sv mouse genomic library. The targeting vector was constructed by inserting a PGK-neo-poly(A) cassette into a HindIII site of the exon containing the leucine zipper motif region (6) of the Nucling gene. The targeting vector thus contained 0.5- and 5.4-kb regions of homology in the 5' and 3' region of the neomycin-resistance marker, respectively. The maintenance, transfection, and selection of embryonic stem cells were performed as described (11). The mutant embryonic stem cells were microinjected into C57BL/6 blastocysts, and the resulting male chimeras were mated with female C57BL/6 mice. Heterozygous offspring were intercrossed to produce homozygous mutant animals. All mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)—Total RNA was purified from cells using ISOGEN. RT was performed using 2 µg of total RNA (at 42 °C for 2 h) in a 20-µl reaction volume containing oligo(dT) primer and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR primers, designed based on the published sequence of cytochrome *c*, and Nucling were 5'-CGAATTA AAAATGGGTGATGTTGA-A-3' (cytochrome *c*, sense), 5'-GTGGAATTACTCATTAGTAGCCTTTT-TAAG-3' (cytochrome *c*, antisense), 5'-TGATCACCAGGACCCGGAA-GTTACC-3' (Nucling, sense), and 5'-GGTGCTCTTTGAGGGCCGAGG-AGTG-3' (Nucling, antisense). The primers 1 and 14 designed by Honarpour *et al.* (12) were used for the Apaf-1 message. For PCR, 2 µl of cDNA was used in a 50-µl reaction mixture containing 0.5 mM primers, deoxynucleotide triphosphates, and TaqDNA polymerase, using the cycling profile of 45 s at 94 °C, 1 min at 56 °C, and 1 min at 72 °C for 24 cycles for cytochrome *c* and 28 cycles for Apaf-1 with a final extension at 72 °C for 10 min. The cycling profile for Nucling was 1 min at 95 °C, 1 min at 56 °C, and 2 min at 72 °C for 32 cycles with a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed on 2% agarose gel. RT-PCR of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (6) or β-actin was used as a control.

Two-dimensional Native/Denaturing-PAGE Analysis of Protein Complexes—Wild-type or Nucling^{-/-} MEF cell lysates were fractionated into cytosol or nuclear fraction as described before (6). The fractions were analyzed directly by native-PAGE (13). In short, cell lysates were resolved onto 2–15% precast gels (Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd., Tokyo, Japan). For Western blotting, the native gel was soaked in blot buffer (20 mM Tris-base, 150 mM glycine, and 0.08% SDS) for 10 min, and denatured proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA) in the same buffer using the semi-dry blotting technique. Immunodetection was carried out according to standard procedures and was visualized by the ECL method (Amersham Biosciences). For two-dimensional gel analysis, individual lanes were cut out from the first-dimension native gel and layered on top of a 15–25% gradient resolving gel, and a 7% stacking gel was poured over and around the native gel slice.

RESULTS

Nucling Is a Potent Promoter of Apoptosis—During the course of our previous study to identify Nucling (6), we had been examining the functional role of this molecule and noticed that the transfection efficiency of the Nucling-expressing plasmid into mammalian culture cells was very low. In addition, the overexpressed Nucling brought about nuclear deformation or fragmentation (data not shown). These findings led us to suspect that Nucling might be able to induce apoptosis. To investigate this possibility, we performed PI staining and TUNEL staining on transfected cells.

PI has been used as a marker of cell damage. We first checked whether the nuclei of cells could be stained with PI without permeabilization by immunofluorescence microscopy. An ~10-fold excess of cells transfected with pFlag-Nucling

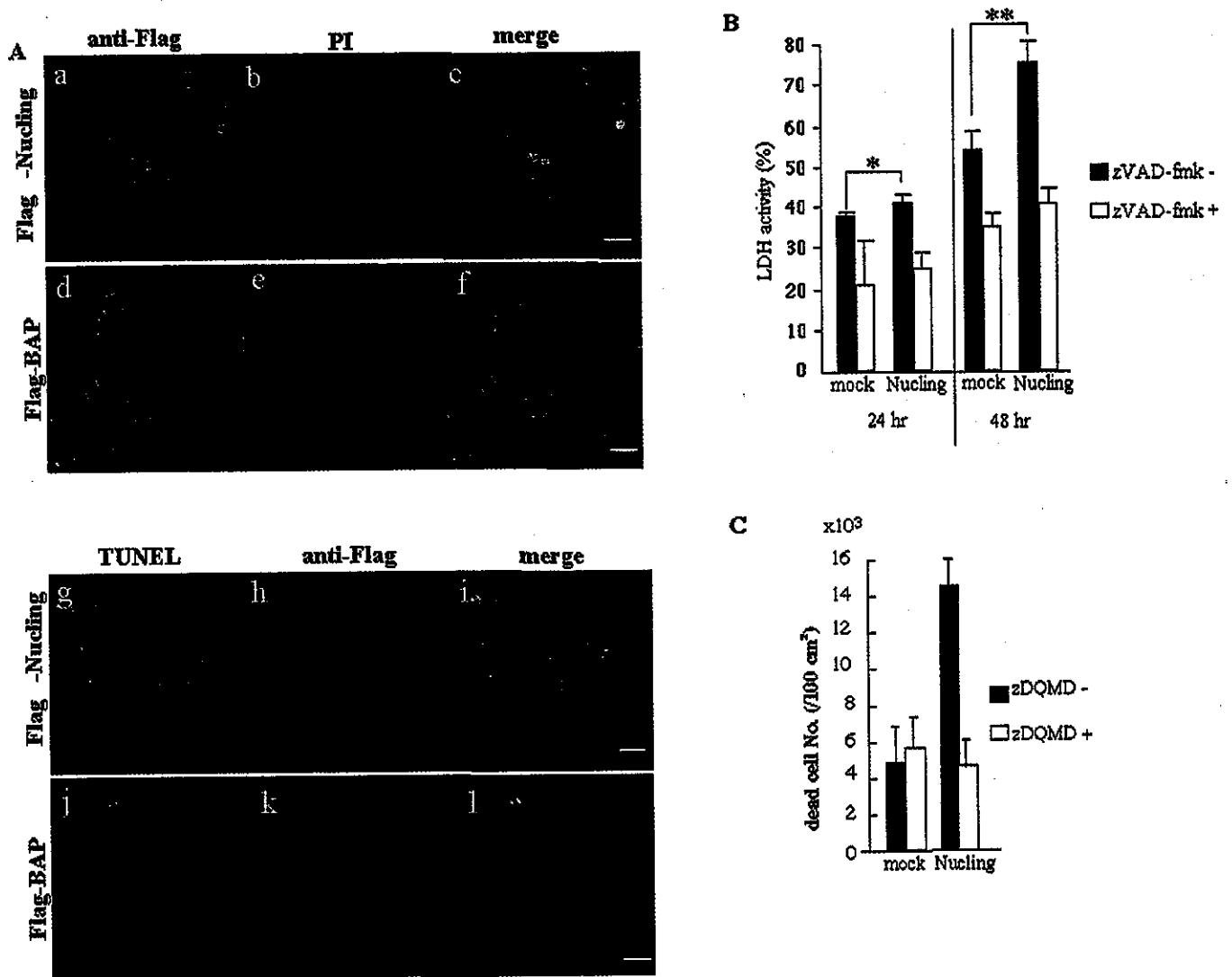


FIG. 1. Nucling promotes cell death with caspase activation. A, Nucling overexpression promoted cell death. In most of the cells overexpressing Nucling (anti-Flag, green in a and red in h), PI staining (red in b and yellow in c), or TUNEL staining (green in g and yellow in i) was also observed. On the other hand, we observed no correlation between Flag-BAP expression (green in d and f, red in k and l) and PI staining (red in e and f) or TUNEL staining (green in j). Scale bar represents 10 μ m. B, cell death-inducing activity of Nucling was caspase-dependent. The LDH activity in culture medium was measured at 24 or 48 h after transfection of the expression vector into COS7 cells. pFlag-vector (*mock*) or pFlag-Nucling was used as the expression vector. Triplicates of semiconfluent cells on a 10-cm culture dish were transfected with (+) or without (-) zVAD-fmk treatment. The values corresponding to the Flag-Nucling transfectants without zVAD-fmk (24 and 48 h) were statistically compared with those of the mock cells. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. C, Nucling promotes cell death by activating caspase-3 or caspase-6. The HeLa cells were transfected with pEGFP-C1 (*mock*) or pFlag-Nucling full-length (*Nucling*). Triplicates of the semiconfluent cells on a 10-cm culture dish were transfected with (+) or without (-) zDQMD-fmk treatment. Trypan blue exclusion assay was performed to enumerate dead detached cells.

were stained with PI compared with control cells transfected with pFlag-BAP (data not shown). In addition, we observed a strong correlation between the Flag-Nucling-expressing cells (Fig. 1Aa) and PI-positive cells (Fig. 1, Ab and Ac), whereas no correlation was found between Flag-BAP-expressing cells (control; Fig. 1Ad) and PI-positive cells (Fig. 1, Ae and Af). TUNEL assay also supported the possibility of apoptosis. We found a strong correlation between the Flag-Nucling-expressing cells (Fig. 1Ah) and TUNEL-positive cells (Fig. 1, Ag and Ai), whereas no correlation was found between Flag-BAP-expressing cells (control; Fig. 1Ak) and TUNEL-positive cells (Fig. 1, Aj and Al). To confirm these results concerning cell damage, we investigated the effect of Nucling on cell survival in COS7 cells detected using the transient transfection assay with the LDH release assay. Transfection of the pFlag-Nucling-expressing plasmid in COS7 cells was performed. The LDH release activity in the culture medium was calculated every 24 h for 2 days after transfection. Transfection of pFlag-Nucling led to an in-

crease in LDH activity compared with that of the pFlag-vector control (*mock*) at 24 and 48 h after transfection (Fig. 1B, columns). At 48 h, an ~20% increase in LDH activity was observed in Nucling-transfected cells compared with mock-transfected cells. This percentage was in good accord with the estimated transfection efficiency (~20%, data not shown) of the Nucling expression vector. These results indicate that Nucling possesses an intrinsic cell death-promoting activity.

To investigate whether the caspase system is important for the activity of Nucling promoting cell death, we performed a zVAD-fmk inhibition assay. Cell death-inducing activity of the Nucling protein was clearly reduced by zVAD-fmk, a pan-caspase inhibitor (Fig. 1B, \square). In addition, the zDQMD-fmk (an inhibitor specific for caspase-3 and caspase-6) treatment assay for the Nucling-overexpressing cells revealed that Nucling can promote cell death by activating caspase-3 or caspase-6, because this treatment clearly suppressed the cell death-inducing activity of Nucling (Fig. 1C). These results suggest that Nu-

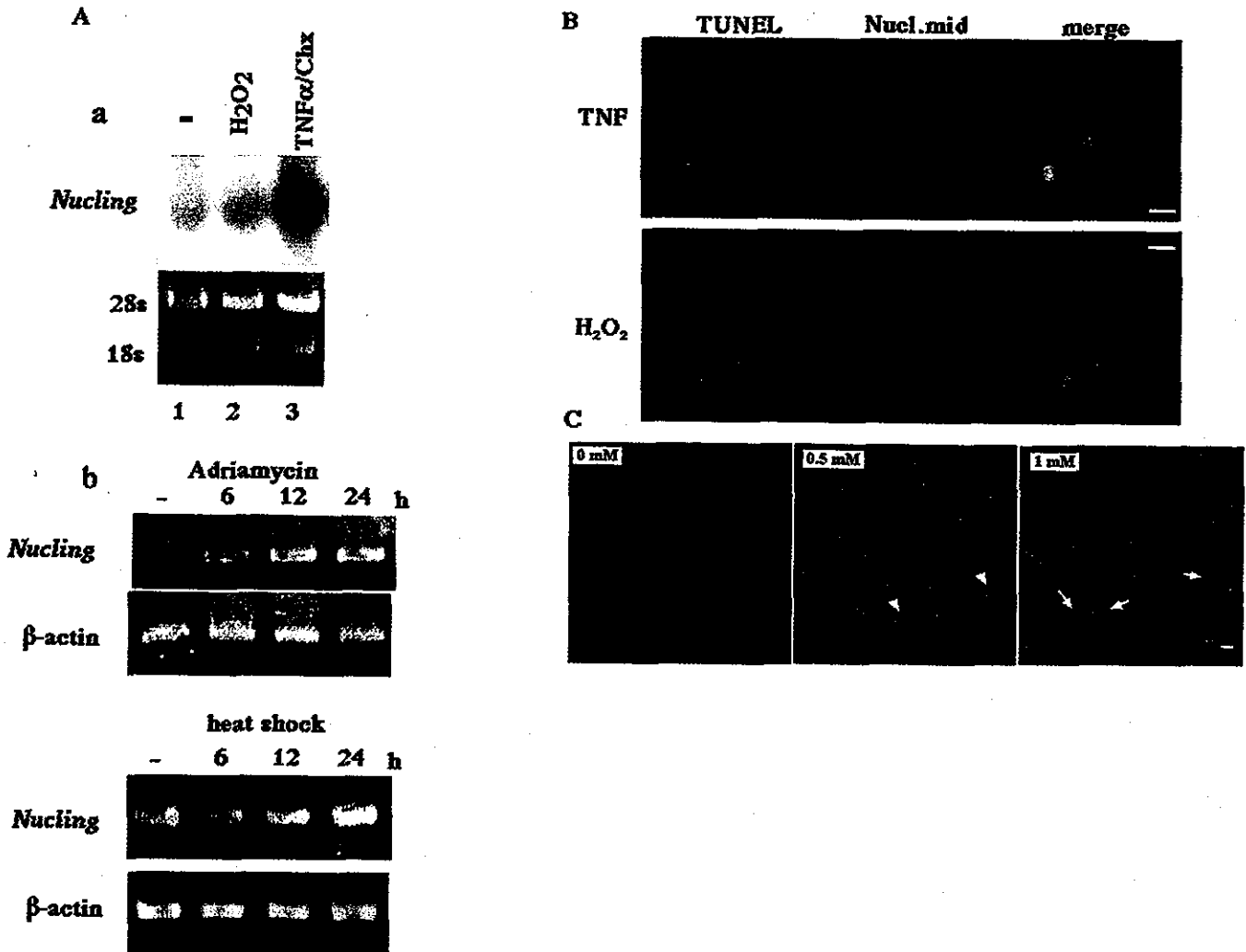


FIG. 2. Nucling expression is up-regulated by several proapoptotic stimuli. *A*, Northern blot analysis of Nucling expression. *a*, RNA was prepared from COS7 cells treated with or without proapoptotic stress including H₂O₂ (1 mM) treatment for 8 h (lane 2) or TNF-α (20 ng/ml) combined with 1 μg/ml CHX for 8 h (lane 3). Untreated COS7 cells (lane 1) were also prepared as a negative control. Aliquots of 20 μg of total RNA were loaded in each lane and separated by agarose gel electrophoresis. The integrity of the RNA loading was assessed by ethidium bromide staining of the 28 S and 18 S rRNA bands (lower panel). *b*, RT-PCR. RNA was prepared from NIH3T3 cells treated with proapoptotic stress including Adriamycin (0.3 μM) treatment for 0, 6, 12, and 24 h or heat shock (1-h incubation at 45 °C) treatment, followed by incubation for 0, 6, 12, or 24 h. Experiments were repeated two or three times with similar results. *B*, confocal images of dual immunofluorescence staining assay using the TUNEL assay system (green) and Nucl.mid antibody (red) in COS7 cells. Most of the TUNEL-positive (green) cells were stained with Nucl.mid antibody (red) as shown in TNF-α (20 ng/ml)/CHX (1 μg/ml) treated cells or H₂O₂ (1 mM) treated cells. Bar, 10 μm. *C*, H₂O₂ up-regulated Nucling expression. Dot-spot staining in the nucleus was observed in cells at 16 h after trypsinization (0 mM). Moderate stress caused by 0.5 mM H₂O₂ induced Nucl.mid antibody staining (middle panel) in the nucleus. Some cells were stained diffusively in the nucleus (arrowhead). Severe stress evoked by 1 mM H₂O₂ induced Nucl.mid antibody staining (right panel) more effectively than moderate stress (middle panel). Nuclei were stained diffusively in many cells. Some of the cells were stained ubiquitously in the nucleus and cytoplasm (arrow). Bar, 10 μm.

cling may be a member of the caspase signaling pathways.

Proapoptotic Stimuli Up-regulate Nucling Expression—To assess whether Nucling is a part of the apoptosis signaling pathways, we investigated whether endogenous Nucling expression was regulated by several proapoptotic stimuli. Northern blot analyses revealed that Nucling expression was induced in COS7 cells (Fig. 2Aa) and HeLa cells (data not shown) by tumor necrosis factor-α (TNF-α)/cycloheximide (CHX) (lane 3). Weak up-regulation by H₂O₂ stress was also observed (lane 2). RT-PCR also revealed that Nucling can be induced by Adriamycin treatment or heat shock stress (Fig. 2Ab). To reconfirm these findings, an immunofluorescence analysis was performed with Nucl.mid antibody to detect the endogenous Nucling protein. We could detect many apoptotic cells by immunofluorescence analysis after TNF-α/CHX treatment for 24 h. Most of the TUNEL-positive cells after TNF-α/CHX treatment expressed endogenous Nucling (Fig. 2B, upper panel). The same results were obtained using H₂O₂ (1 mM) in COS7 cells. Most of the

TUNEL-positive cells following H₂O₂ stress expressed endogenous Nucling as well (lower panel). To obtain the overall induction profile of endogenous Nucling expression during cellular stress, we examined expression patterns under different degrees of apoptotic stimulation. Serial concentrations of H₂O₂ were used to induce stepwise stimuli for apoptosis in COS7 cells. Immunofluorescent staining using Nucl.mid antibody was performed to reveal the expression pattern of endogenous Nucling. At 24 h after trypsinization for subculture without any other forms of apoptotic stress, we observed spots of staining in nuclei in some of the cells (Fig. 2C, 0 mM). At 48 h after the subculture, we could not observe any immunodetection cells with Nucl.mid antibody (data not shown). Mild apoptotic stress (0.5 mM H₂O₂ stress) induced Nucling expression in the nucleus (Fig. 2C, arrowheads), whereas the staining intensity and the increase in positive cell numbers became more evident under severe apoptotic stress (1 mM H₂O₂ stress) (representatives are indicated by arrows in Fig. 2C). These results suggest

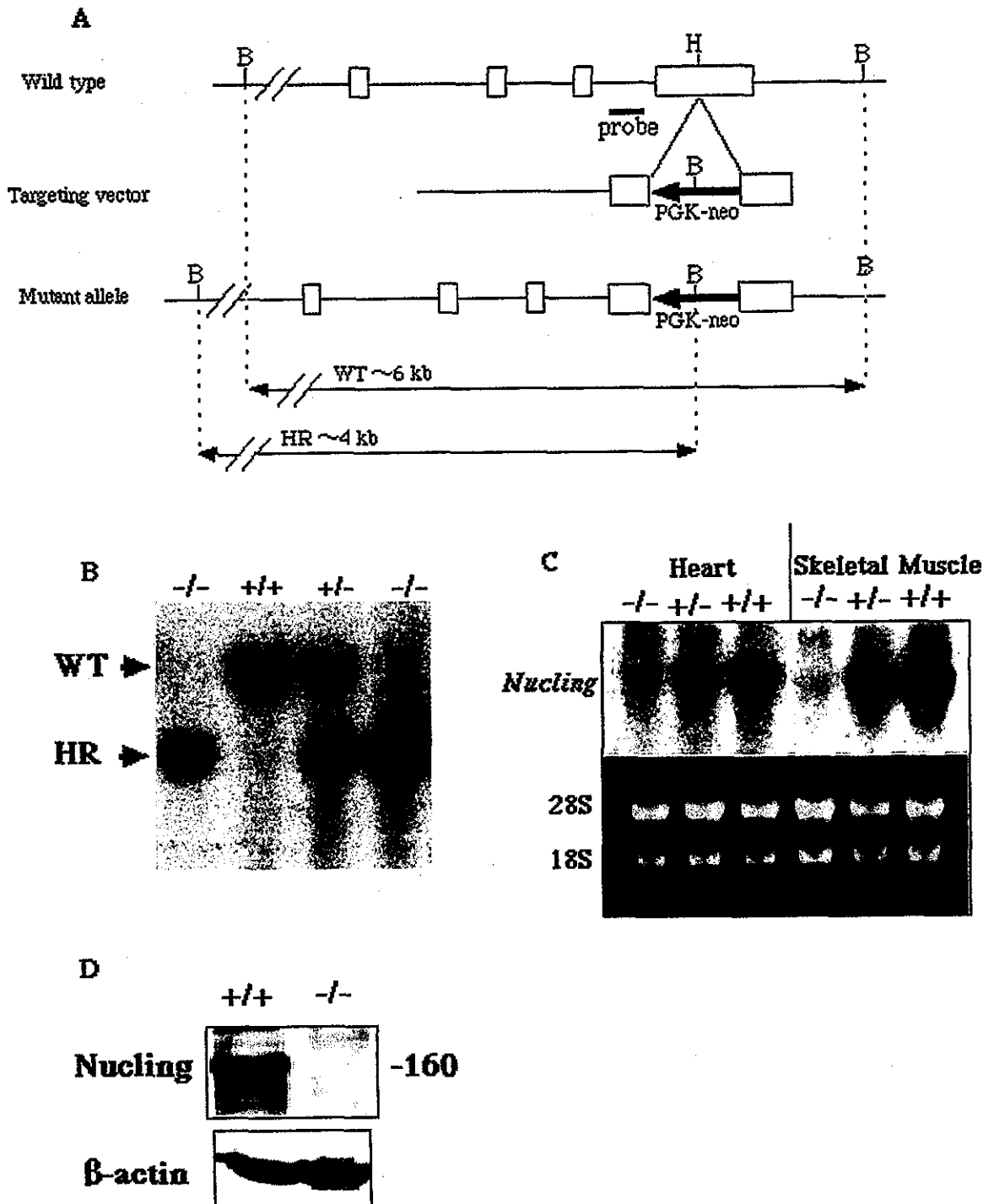


FIG. 3. Targeted disruption of the mouse Nucling gene. *A*, top, the targeted region of the Nucling gene locus; middle, the PGK-neo^r cassette was used to disrupt the Nucling gene-coding region; bottom, the expected targeted allele. The exons are depicted by open boxes. Restriction enzyme sites: B, BamHI; H, HindIII. neo, neomycin-resistance cassette. The thick black bar indicates the genomic 400-bp probe. HR, the homologous recombinant allele. *B*, Southern blot analysis of mouse tail genomic DNA. Genotypes are shown at the top. *C*, detection of Nucling mRNA in the heart and the skeletal muscle using Northern blotting. Total RNA was isolated from WT, Nucling^{+/-}, and Nucling^{-/-} mice and probed with a murine Nucling cDNA probe. The mouse genotype and the tissue prepared in each group are shown at the top. RNA loading and transfer efficiency were monitored by ethidium bromide staining of 28 S and 18 S ribosomal RNA. *D*, immunoblot analysis of Nucling and the control protein β -actin in MEFs derived from Nucling^{+/+} and Nucling^{-/-} mice.

that endogenous Nucling is induced by apoptotic stress in a dose-dependent manner.

Nucling Is Required for UV Irradiation-induced Apoptosis—To further address the issue of the physiological function of Nucling *in vivo*, we next generated Nucling^{-/-} mutant mice. We constructed a targeting vector designed to insert the neomycin-resistance cassette into the exon encoding the LZ

motif (Fig. 3A). Germline transmission was achieved from two independent clones and confirmed by Southern blot analysis (Fig. 3B). Both heterozygous and homozygous Nucling^{-/-} mice are viable and fertile. Northern blot analysis of total RNA extracted from adult (8-week) wild-type (WT), heterozygous, and homozygous hearts and skeletal muscle using the XbaI fragment of Nucling cDNA as a probe confirmed the absence of

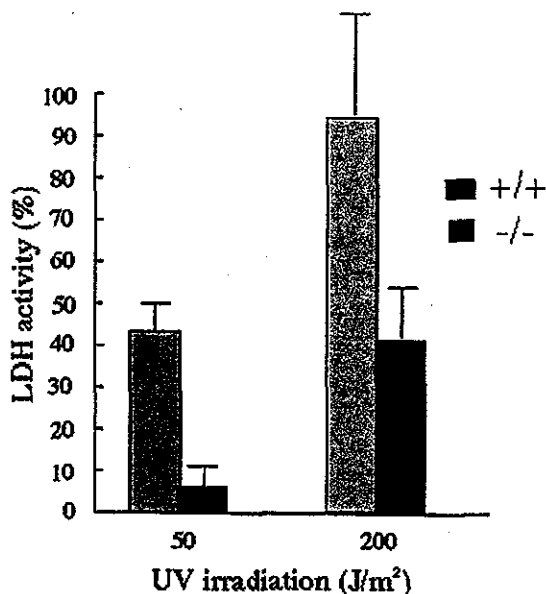


FIG. 4. Nucling deficiency conferred resistance against proapoptotic stress from UV irradiation. WT (+/+) or Nucling^{-/-} MEFs were exposed to UV irradiation (50 or 200 J/m²). Supernatants of each culture were collected, and the activities of released LDH were determined. A significantly larger number of Nucling^{-/-} cells were alive at 72 h compared with WT cells. The data are means \pm S.D. of four independent experiments.

Nucling mRNA transcripts in homozygous-deficient mice (Fig. 3C). Thus, our targeting strategy resulted in a null allele for the Nucling gene.

To obtain direct evidence that Nucling deficiency leads to defects in the regulatory mechanism for stress-induced apoptosis, we investigated the cell-death response to UV irradiation-induced cellular stress. Exposure to excessive UV irradiation is known to cause apoptosis in murine fibroblasts (14). In addition, we further reported that Nucling down-regulated the antiapoptotic factor, galectin-3, via the modification of NF- κ B activation (9). The activation of NF- κ B is known to be induced by UV irradiation, followed by the up-regulation of galectin-3 transcription. At first, we prepared MEFs from WT or Nucling^{-/-} embryos. Western blot analysis was performed to check the expression of Nucling in WT MEFs. We could detect a distinct Nucling band in WT MEFs but not in Nucling^{-/-} MEFs (Fig. 3D). Next, we investigated the reactivity of Nucling^{-/-} MEFs to a proapoptotic stress using UV irradiation. UV irradiation induced an increase in cell death in WT MEFs as compared with Nucling^{-/-} MEFs (Fig. 4). Although the total amount of LDH in Nucling^{-/-} MEFs was less than that in WT MEFs, significant levels of cell killing were observed, arguing that UV irradiation-induced apoptosis has a partial Nucling dependence. Therefore, we assumed that Nucling regulates one or some of the many apoptotic pathways induced by cytotoxic stress from UV irradiation.

Nucling May Play a Critical Role in the Expression of Apoptosome-related Molecules—To elucidate the molecular mechanism underlying the apoptosis-promoting activity of Nucling, we investigated expression levels or activation patterns of several candidate molecules related to stress-induced apoptosis. We compared first the expression levels of Apaf-1 between WT and Nucling^{-/-} mice in MEFs treated with H₂O₂ (Fig. 5A) or UV irradiation (Fig. 5B). At first, we determined whether any defect occurred in the activation of caspase-9 in Nucling^{-/-} MEFs. Immunoblot analysis revealed that not only the proenzyme of caspase-9 (pro-caspase-9) but also some of the processed type of caspase-9 (p37) does exist in WT MEFs, but no processing was observed in Nucling^{-/-} MEFs under normal

culture conditions (Fig. 5, A and B, lanes 1 and 2). In addition, this tendency was also observed in response to the apoptotic stimulus of H₂O₂ (Fig. 5A, lanes 3 and 4) or UV irradiation (Fig. 5B, lanes 5 and 6). The apoptotic pathway mediated by caspase-9 is initiated by the release of cytochrome *c* from mitochondria (15, 16). Therefore, we examined the expression level of cytochrome *c* in these MEFs. Exposure of WT MEFs to H₂O₂ caused a large increase in cytoplasmic cytochrome *c* (Fig. 5A, lane 3). The same result was observed using UV irradiation. In contrast, the apoptotic stress of H₂O₂ or UV irradiation did not cause cytochrome *c* up-regulation in Nucling^{-/-} MEFs. In addition, the expression level of cytochrome *c* in whole-cell lysate from Nucling^{-/-} MEFs was also reduced after H₂O₂ treatment or UV irradiation (Fig. 5, A and B). Western blot analysis revealed that the total level of cytochrome *c* in the normal culture without proapoptotic stress was almost the same between WT and Nucling^{-/-} MEFs (Cyto *c* (whole), lanes 1 and 2). In contrast, cytochrome *c* expression was remarkably down-regulated in Nucling^{-/-} MEFs compared with WT MEFs after the proapoptotic stress (Fig. 5, lanes 3 and 4 in A, lanes 3–6 in B). These results indicate that Nucling is essential for the up-regulation of cytochrome *c* in response to apoptotic stimuli but not for the release of cytochrome *c* from mitochondria. Western blot analysis also revealed that Apaf-1 was strikingly down-regulated in its expression in Nucling^{-/-} MEFs after proapoptotic stress (H₂O₂ in Fig. 5A and UV irradiation in Fig. 5B). In contrast, the expression level of AIF, a mitochondrial apoptosis-inducing factor, was the same in both WT and Nucling^{-/-} MEFs (Fig. 5B). Active caspase-9 (p37) was not detectable in Nucling^{-/-} MEFs (Fig. 5, A and B). Pro-caspase-3 (apoptosis executioner regulated by caspase-9) remained in its inactive form in Nucling^{-/-} MEFs (Fig. 5A, lane 4). This observation can be explained by the absence of p37 in Nucling^{-/-} mice. These results strongly suggest that Nucling may be an apoptosis-promoting factor specifically regulating the Apaf-1/cytochrome *c*/caspase-9 apoptosome pathway after cellular stress. Semiquantitative RT-PCR analysis revealed that the transcriptional levels of both cytochrome *c* and Apaf-1 expression were not decreased in Nucling^{-/-} MEFs under proapoptotic conditions as shown in Fig. 5C. Both the 0.3-kb fragment of cytochrome *c* and the 0.5-kb fragment of Apaf-1 were amplified from the RNAs of WT and Nucling^{-/-} MEFs. We could not observe any obvious change in the amplification reactions between these MEFs in response to the proapoptotic stimuli. Consequently, we postulated that the down-regulation of cytochrome *c* in Nucling^{-/-} MEFs comes from the post-transcriptional regulation of the apoptosome molecules, Apaf-1 and cytochrome *c*, after proapoptotic stress. Therefore, we focused on investigating the regulatory role of Nucling for the apoptosome components in terms of their interactions at the protein level.

Nucling Plays a Critical Role in the Nuclear Translocation of Apaf-1 after Proapoptotic Stress—To confirm whether Nucling intrinsically up-regulates Apaf-1, a double immunostaining assay was performed after transfection of the Nucling expression vector into COS7 cells. The intensity of red-stained endogenous Apaf-1 was up-regulated in most of the Nucling-overexpressing cells (green in Fig. 6A). Very interestingly, the staining pattern of Apaf-1 in the Nucling-overexpressing cells was different from that of nontransfected cells. Ectopic expression of Nucling induced translocation of Apaf-1 from cytoplasm to nucleus (Fig. 6A). To investigate whether Nucling physiologically regulates the nuclear translocation of Apaf-1, we checked the expression profiles of Apaf-1 in WT and Nucling^{-/-} MEFs after UV irradiation (Fig. 6B). We first confirmed the nuclear redistribution of Apaf-1 in WT MEFs after proapoptotic stress as reported previously (17). We found that cytochrome *c* redistributes 8 h

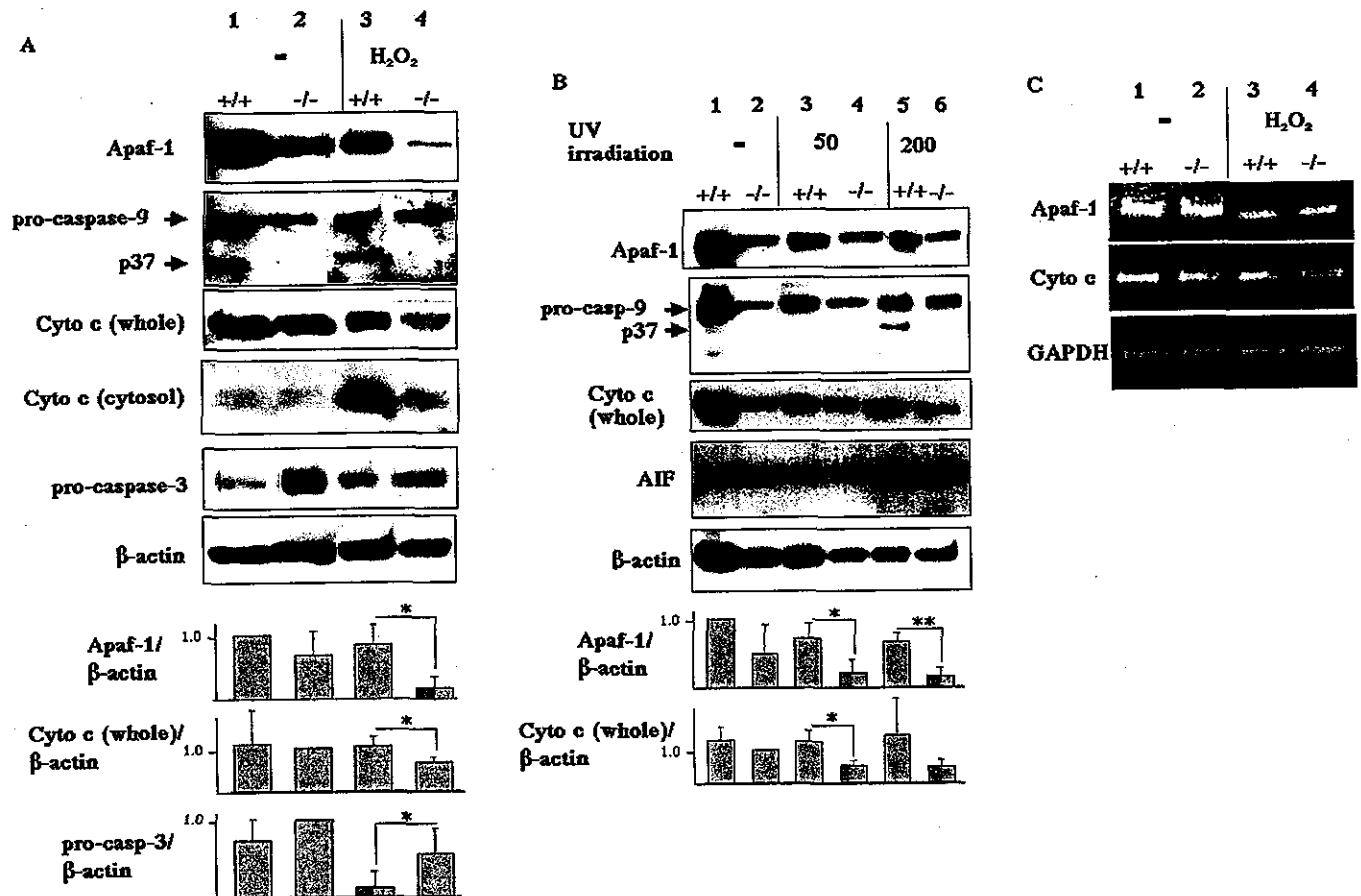


FIG. 5. Nucling regulates the apoptosome. **A**, Nucling is crucial for cytochrome *c* and Apaf-1 expression and caspase-9 activation under H_2O_2 -induced stress. WT or Nucling^{-/-} MEFs were cultured in the presence or absence of 1.0 mM H_2O_2 . Cell lysates were fractionated into whole-cell lysate for Apaf-1, caspase-9, pro-caspase-3, and cytochrome *c* (*Cyto c* (whole)) or cytosol lysate for cytochrome *c* (*Cyto c* (cytosol)) and β -actin. Fractions were blotted and probed with an antibody to Apaf-1, caspase-9, cytochrome *c*, or caspase-3. Reprobing with an antibody to β -actin served as a loading control for the cytosolic fractions. Similar results were obtained with two individual lines of Nucling^{-/-} MEFs. Bar graphs show the compiled means \pm S.E. of densitometric scanning of three experiments for Apaf-1, cytochrome *c* (whole), or procaspase-3, quantified by NIH-Image software. Data were normalized to the density of untreated WT MEFs for the Apaf-1/ β -actin ratio or the density of untreated Nucling^{-/-} MEFs for the cytochrome *c*/ β -actin and pro-caspase-3/ β -actin ratios, respectively. The values corresponding to the H_2O_2 -treated WT MEFs were statistically compared with those of the H_2O_2 -treated Nucling^{-/-} MEFs. *, $p < 0.05$. **B**, Nucling is crucial for Apaf-1, caspase-9, and cytochrome *c* expression but not for AIF under cytotoxic stress induced by UV irradiation. WT or Nucling^{-/-} MEFs were cultured for 24 h after UV irradiation as indicated. Cell lysates were fractionated into a mitochondrial fraction for AIF and cytosol lysate for cytochrome *c* (*Cyto c*), Apaf-1, and β -actin. Fractions were blotted and probed with an antibody to Apaf-1, caspase-9, cytochrome *c*, or AIF. Reprobing with an antibody to β -actin served as a loading control for the cytosolic fractions. Similar results were obtained with two individual lines of Nucling^{-/-} MEFs. Bar graphs show the compiled means \pm S.E. of densitometric scanning of three experiments for Apaf-1 or cytochrome *c* (whole), quantified by NIH-Image software. Data were normalized to the density of untreated WT MEFs for the Apaf-1/ β -actin ratio or the density of untreated Nucling^{-/-} MEFs for the cytochrome *c*/ β -actin ratio. The values corresponding to the UV-irradiated WT MEFs were statistically compared with those of the UV-irradiated Nucling^{-/-} MEFs. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. **C**, Nucling does not affect expression levels of Apaf-1 and cytochrome *c* transcripts. RT-PCR was carried out to confirm the presence of transcripts. Data are representative of at least three separate experiments. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

after UV irradiation, forming a ring structure (indicated by an arrow in Fig. 6B*g*). In addition, we detected a diffuse cytochrome *c* pattern in the nucleus (arrowhead in Fig. 6B*g*) at the time point when >40% of cells were clearly apoptotic (data not shown). In contrast, Apaf-1 was translocated to the nucleus in most of the cytochrome *c* redistributed cells (yellow arrows in Fig. 6B*h*). In Nucling^{-/-} MEFs, up-regulation of cytochrome *c* in the cytoplasm was observed as well (arrow in Fig. 6B*j*). However, nuclear localization of Apaf-1 in these cells was not observed, and the expression pattern of Apaf-1 mostly overlapped that of cytochrome *c* (arrow in Fig. 6B*l*). These results strongly suggest that Nucling might directly regulate the redistribution of Apaf-1 into the nucleus after proapoptotic stress.

Nucling Assembles with Apaf-1/Pro-caspase-9 Complex in Vivo—On the basis of the finding that Nucling regulated the expression pattern of apoptosome molecules at the protein level, we focused on whether Nucling directly interacts with

Apaf-1, caspase-9, or cytochrome *c*. First, the interaction between Nucling and Apaf-1 was investigated with coimmunoprecipitation assays. As shown in Fig. 7A, endogenous Nucling in COS7 cells was coimmunoprecipitated with Flag-tagged Apaf-1 by anti-Flag antibody. To visualize a protein complex containing Nucling or Apaf-1 directly, the cytosol fraction (Fig. 7B) or nuclear fraction (data not shown) was separated under nonreducing conditions. Immunoblots of these native gels revealed Nucling or Apaf-1 immunoreactivity within several distinct complexes in fractions from UV-irradiated WT MEFs. Immunodetection with antibodies directed against Nucling (Fig. 7B, lane 7) or Apaf-1 (Fig. 7B, lane 3) identified a common complex band of ~260 kDa in size (Fig. 7, B*b* and B*b'*, marked with arrowheads in lanes 3 and 7'). Additionally, a complex of 500 kDa was detected with Nucling antibody (Fig. 7B*a* in lanes 7 and 7'). A band of ~120 kDa was also detected with high intensity by Apaf-1 (~120 kDa) antibody (lane 3). Two bands of ~160 kDa (Fig. 7B*c*) and 80 kDa (Fig. 7B*d*) were also detected

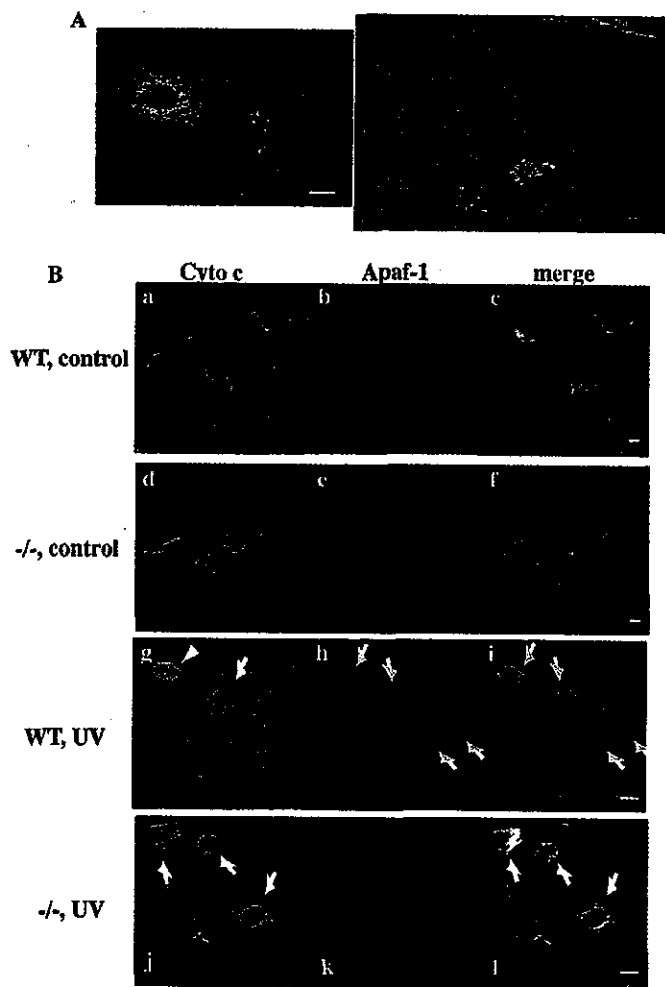


FIG. 6. Nucling regulates nuclear translocation of Apaf-1 after proapoptotic stress. A, COS7 cells were transfected with pFlag-Nucling and incubated with zVAD-fmk (100 μ M) for 18 h. Endogenous Apaf-1 was detected with polyclonal antibody against Apaf-1 and Texas Red-conjugated secondary antibody (red). Ectopic Flag-Nucling was detected by FITC-conjugated monoclonal antibody against Flag epitope (green). Two representative, double-staining images are shown. Bars, 20 μ m. B, WT and Nucling^{-/-} MEFs were cultured for 18 h after UV irradiation (0 for control and 200 J/m²), followed by immunofluorescent staining. Cytochrome *c* was detected with primary antibody against cytochrome *c* and FITC-conjugated secondary antibody (a, d, g, and j). Apaf-1 was detected with primary antibody against Apaf-1 and Texas Red-conjugated secondary antibody (b, e, h, and k). c, f, i, and l are merged images of the left two panels. Scale bars represent 10 μ m.

with Nucling (160 kDa) antibody (lanes 7 and 7'). As a next step, cytosol or nuclear proteins from UV-irradiated WT MEFs were fractionated into native complexes under nondenaturing conditions (first dimension), and then subsequently separated into their individual components (second dimension) by placing a native gel slice at a horizontal position as a stack above an SDS-PAGE denaturing gel (Fig. 7C). Second-dimension gels were also transferred and immunoblotted, confirming that the highest density band in lane 3 of Fig. 7Be was free Apaf-1 (120 kDa, Fig. 7, Ce and Ce', marked with * in Fig. 7C). We could also detect a free Nucling band only in the nuclear fraction (160 kDa, marked with **). In addition, we confirmed the presence of Nucling, Apaf-1, and pro-caspase-9 (50 kDa) in a protein complex of ~260 kDa in the native first-dimension gel (Fig. 7, b and b', marked with arrowheads). The results strongly suggest that Nucling directly interacts with Apaf-1/pro-caspase-9 complex *in vivo*. Moreover, we detected cytochrome *c* (15 kDa) and Apaf-1 spots in the lane derived from the 50-kDa native protein complex (Fig. 7Cd) in the cytosol fraction. In the nu-

clear fraction, Apaf-1 was detected at the same position as the complex (Fig. 7Cd'). We also observed that an ~500 kDa complex contained Nucling, Apaf-1, and pro-caspase-9 in the nuclear fraction (Fig. 7Ca'). Taken together, Nucling is considered to exist *in vivo* as a component of an assemblage with Apaf-1 and pro-caspase-9 during the course of stress-induced apoptosis.

DISCUSSION

Nucling has a unique cellular distribution, being expressed in the perinucleus and cytoplasm in mammalian cells. Ectopic induction of Nucling promoted apoptotic cell death in mammalian cells. To investigate the physiological function of Nucling for apoptosis, we generated Nucling^{-/-} mutant mice. The mutant mice exhibited a high incidence of inflammatory lesions in preputial glands. Cells around the lesions showed resistance to apoptosis (9). On the basis of these findings and the data showing the resistance to apoptosis of MEFs from the mutant mice, we suggest that Nucling plays a crucial role in the apoptotic reaction after cytotoxic stress.

Mitochondria play a key role in the commitment of cells to apoptosis through the release of cytochrome *c* and many apoptosis-inducing factors from the intermembrane space into the cytosol (18–25). Several proapoptotic stimuli induced endogenous Nucling expression in the nucleus, followed by the cytoplasm (Fig. 2). We also observed that Nucling was a crucial molecule for Apaf-1, cytochrome *c* up-regulation, and caspase-9 activation but not for AIF induction after exposure to a proapoptotic stimulus such as UV irradiation or H₂O₂ stress. These findings indicate that Nucling acts as a component of the mitochondrial apoptotic pathways, especially of the cytochrome *c*/Apaf-1/caspase-9 apoptosome pathway. Furthermore, a lack of Nucling expression conferred on MEF cells resistance to apoptosis after cytotoxic stress from UV irradiation (Fig. 4).

It was reported that low levels of or a deficiency in Apaf-1 protein can determine sensitivity to apoptosis downstream of mitochondrial events, suggesting that regulation of Apaf-1 may be important for apoptotic processes (26, 27). Our findings directly show the presence of a novel regulatory mechanism for Apaf-1 expression at the protein level. We confirmed that the inhibition of cytochrome *c* release in Nucling^{-/-} cells comes from the post-translational down-regulation of the apoptosome molecules, Apaf-1 and cytochrome *c*, after a proapoptotic stress (Fig. 5). During stress-induced apoptosis, caspase activation requires a large number of post-translational events, including translocation to other organelles (28). This is also the case in the translocation of caspase-9 or Apaf-1 to the nucleus (17, 29). Here we propose that Nucling may be a key molecule for the retention of the caspase-9/Apaf-1 complex, its translocation to the nucleus, and its activation. We also confirmed that endogenous Nucling assembles with the Apaf-1/pro-caspase-9 complex *in vivo* in both the nuclear and the cytoplasmic fractions (Fig. 7). The affinity of this interaction may be weak, because a large amount of free Apaf-1 was detected in Fig. 7C, lane e. In addition, Nucling itself distributes actively to the perinucleus (6). We also found that Nucling is essential for the redistribution of Apaf-1 into the nucleus (Fig. 6). On the basis of these observations, Nucling is a strong candidate for the shuttle molecule in the translocation of caspase-9/Apaf-1 to the nucleus after stress-induced apoptosis.

It is well known that proapoptotic stimuli trigger the release of cytochrome *c* from mitochondria, which forms the complex with Apaf-1. In this context, the two-dimensional PAGE analysis, as shown in Fig. 7C, revealed that an Apaf-1/cytochrome *c* complex was present in the cytosol as an ~55-kDa protein assembly. On the other hand, cytochrome *c* was not detected in the nuclear fraction in the same analysis. This result may