

## 新生仔期に polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を投与したマウスの海馬におけるタンパク発現の変化

分担研究者：永井拓

（名古屋大学大学院医学系研究科臨床薬物情報学）

### [研究要旨]

化学物質には、生体に対してホルモン様の作用を有する物質や、逆にホルモン作用を阻害する物質、すなわち内分泌攪乱物質がある。生体内には内分泌系の他にも免疫系と呼ばれる生体恒常性を維持する機構が存在し、感染症によって異常免疫応答が惹起される。特に、周産期・発育期におけるウイルス感染症は脳発達異常を引き起こすことがある。したがって、生体内に取り込まれた化学物質が免疫系の異常を引き起こし、中枢神経系に対して障害をもたらす可能性を考える必要がある。本年度は、自然免疫機構を活性化する合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した。二次元電気泳動によってタンパクを分離した結果、2 個のスポットに有意な発現変化が認められた。polyI:C 投与群において発現が増加したスポットが 1 個、逆に発現が減少したスポットが 1 個検出された。発現変化が認められたスポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1) および collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) を同定した。以上の結果から、新生仔期に polyI:C を投与したマウスにおいて発現が変化するタンパク群が存在することが明らかとなった。今後は ALDH1L1 および CRMP5 の機能解析を行うとともに新生仔期の免疫異常によって惹起される精神発達異常との関連について検討する予定である。

### A. 研究目的

化学物質には、生体に対してホルモン様の作用を有する物質や、逆にホルモン作用を阻害する物質、すなわち内分泌攪乱物質がある。生体内には内分泌系の他にも免疫系と呼ばれる生体恒常性を維持する機構が存在し、感染症によって異常免疫応答が惹起される。特に、周産期・発育期におけるウイルス感染症は脳発達異常を引き起こすことがある。これら脳発達に影響するウイルスとしてサイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ボルナ病ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス 1 型などが報告されている<sup>1-4)</sup>。さらに、周産

期におけるウイルス感染により引き起こされる脳発達異常が、統合失調症、双極性障害および広汎性発達障害の発症に関与していることが示唆されている<sup>5,6)</sup>。したがって、生体内に取り込まれた化学物質が免疫系の異常を引き起こし、中枢神経系に対して障害をもたらす可能性を考える必要がある。本年度は、自然免疫機構を活性化する合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現の変化を網羅的に解析した。

## B. 研究方法

### 1. polyI:C 処置マウスの作製

実験には ICR 系マウスを使用した。生後 2 日目から 6 日目までの 5 日間、マウスに合成 2 本鎖 RNA アナログである polyI:C を 5 mg/kg の用量で 1 日 1 回皮下投与し、周産期擬似ウイルス感染モデルを作製した。コントロール群には溶媒として用いた生理食塩液を投与した。なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

### 2. サンプル調製

10 週齢に成長したマウスから脳を摘出し、氷冷下で海馬を分割した。脳サンプルは使用直前まで -80°C で凍結保存した。脳サンプルは proteoextract subcellular proteome extraction kit を用いて細胞質分画 (F1)、膜分画 (F2)、核分画 (F3)、細胞骨格分画 (F4) を抽出し、以下の実験に使用した。

### 3. Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 法

PolyI:C 投与マウスおよびコントロールマウスから抽出したタンパクを Cy3 または Cy5 で蛍光ラベルした。内部標準として各サンプルの混合物を Cy2 で蛍光ラベルした。これら Cy2、Cy3 または Cy5 で標識したサンプルを混合して同一ゲル内で等電点電気泳動および二次元電気泳動を行った。泳動後のゲルは蛍光スキャナー (Typhoon trio) にて可視化し、画像解析ソフト (PD Quest) を使用してデータの解析を行った。

### 4. Peptide mass fingerprinting 法

2D-DIGE 法により発現に変化が認められたタンパクをゲルから切り出し、trypsin により消化した。トリプシン処理後のペプチド断片のアミノ酸配列を質量分析装置 (LC-MS/MS) により決定し、データベース (Mascot) 検索によりタンパクの同

定を行った。

### 5. イムノブロットティング法

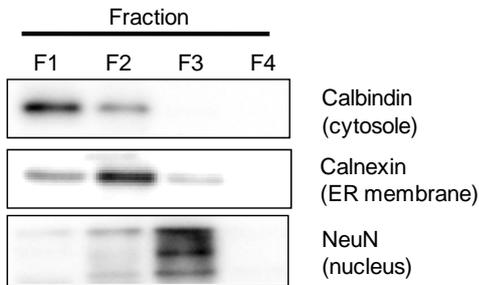
各 sample に sample buffer [ 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8) , 4% SDS , 10% sucrose , 0.006% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol ] を加え 95°C で 5 分間加熱し、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。PVDF membrane にブロットティングを行った後、メンブレンを blocking solution [ 3% BSA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 ] を用い室温で 1 時間インキュベーションした後、blocking solution で 1:2000 倍に希釈した mouse anti-NeuN ( Millipore ) 、 rabbit anti-Calbindin ( Sigma ) 、 rabbit anti-Carnexin ( Stressgen ) 、 mouse anti-ALDH1L1 ( Abnova ) 、 rat anti-CRMP5 ( Abcam ) 抗体あるいは goat anti-actin ( Santa cruz ) をインキュベーションした (4°C、一晚)。反応後、TBS-Tween [20 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] で 10 分間 3 回洗浄し、blocking solution で 1:2000 倍に希釈した house-radish peroxidase 標識 anti-mouse IgG、anti-rat IgG あるいは anti-goat IgG 抗体で室温に 1 時間インキュベーションした。TBS-Tween で 10 分間 3 回洗浄した後、ECL Western Blotting Detection System を用い、LumiViewer (AISIN) でバンドの検出を行った。

## C. 研究結果

### 1. イムノブロットティングによる細胞分画マーカータンパクの確認

海馬から調製した細胞分画が適切に行われているかを確認するため、各分画のマーカータンパクの存在についてイムノブロットティング法を用いて調べた。細胞質タンパクである carbindin の発現は F1 分画に強く、F2 分画には弱いシグナルが認められ、F3 分画には発現が認められなかった (Fig. 1)。膜タンパクである calnexin の発現は F2

分画に強く、F1 分画および F3 分画に弱く認められた (Fig. 1)。核タンパクである NeuN の発現は、F3 分画のみで認められた (Fig. 1)。F4 分画において、いずれのマーカートンパクの発現が認められなかった (Fig. 1)。

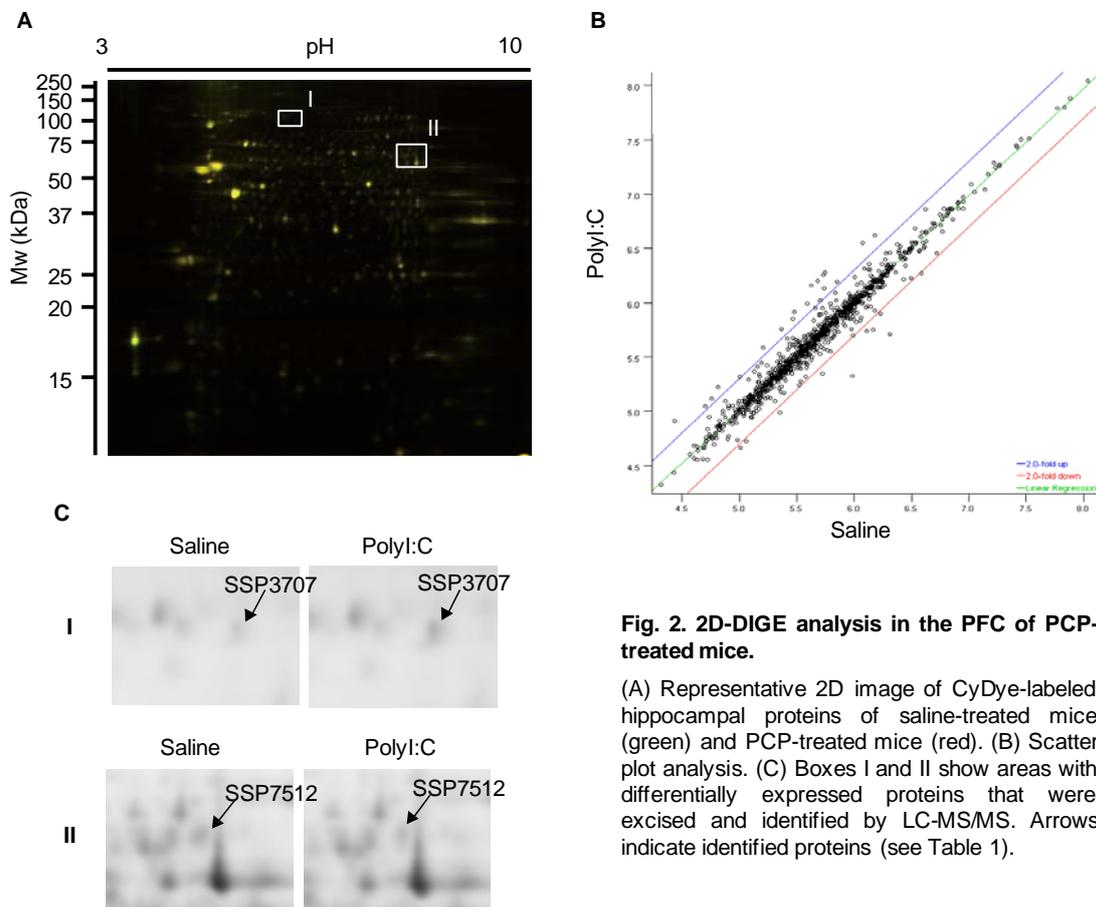


**Fig. 1. Selectivity of subcellular extraction by immunoblotting against marker proteins.**

Mouse hippocampus was extracted using proteoextract subcellular proteome extraction kit. The proteins were separated by SDS-PAGE and blotted onto PVDF membrane. Immunoblotting with antibodies directed against the indicated marker proteins show the separation of the cell compartments according to their subcellular localization.

## 2. 2D-DIGE 法を用いたタンパク発現差異解析

二次元電気泳動によってタンパクを分離した結果、約 1000 個のスポットが検出された (Fig. 2A)。各群の検出されたスポット数の平均はコントロール群が  $1065.3 \pm 0.2$  個、polyI:C 群が  $1065.8 \pm 0.2$  個であった。Scatter plot 解析の結果では、コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在した (Fig. 2B) さらに、個々のスポットについて解析した結果、スポット番号 SSP3707 および SSP7512 の 2 個のスポットに有意な発現変化が認められた (Fig. 2C)。SSP3707 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した ( $p < 0.05$ , Table 1)。逆に、SSP7512 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 0.6 倍減少した ( $p < 0.01$ , Table 1)。



**Fig. 2. 2D-DIGE analysis in the PFC of PCP-treated mice.**

(A) Representative 2D image of CyDye-labeled hippocampal proteins of saline-treated mice (green) and PCP-treated mice (red). (B) Scatter plot analysis. (C) Boxes I and II show areas with differentially expressed proteins that were excised and identified by LC-MS/MS. Arrows indicate identified proteins (see Table 1).

**Table 1. List of identified proteins that are differently expressed in the hippocampus of polyI:C-treated mice**

Spot no. <sup>a</sup>	protein name	SW/TR Acc <sup>b</sup>	Fold change <sup>c</sup>	p-value	MASCOT score <sup>d</sup>	Sequence coverage (%) <sup>e</sup>	Mr (kDa) /pI <sup>f</sup>
3707	Aldehyde dehydrogenase family 1 member L1	Q8R0Y6	1.6	<0.05	803	34	99/5.64
7512	Collapsin response mediator protein 5	Q9EQF6	0.6	<0.01	382	42	61/6.62

<sup>a</sup>Spot no. corresponds to those in Fig. 2. <sup>b</sup>Accession number is derived from Swiss-Prot/TrEMBL database.

<sup>c</sup>Fold changes in polyI:C-treated mice. <sup>d</sup>MASCOT score indicated the total of individual peptide scores.

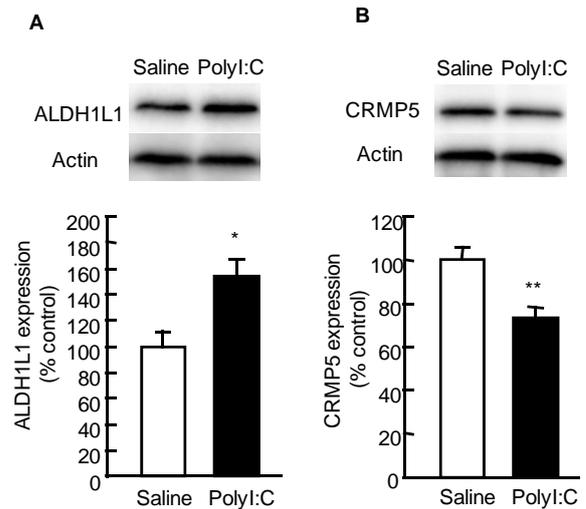
<sup>e</sup>Sequence coverage achieved by MS-Fit search. <sup>f</sup>Theoretical molecular weight (Mr) /isoelectrical point (pI) of the protein.

### 3. Peptide mass fingerprinting 法によるタンパク 同定

発現変化が認められたスポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、SSP3707はaldehyde dehydrogenase family 1 member L1 (ALDH1L1) および SSP7512 は collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) であると同定された (Table 1)。

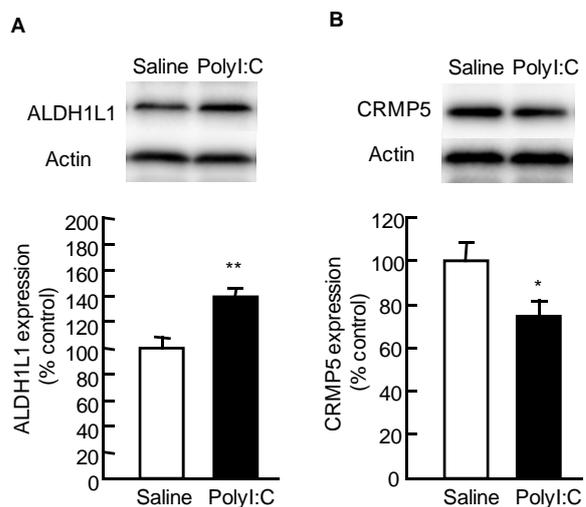
### 4. イムノブロットング法による ALDH1L1 および CRMP5 の発現解析

同定されたタンパクが ALDH1L1 および CRMP5 であるかどうかを調べるため、それぞれのタンパクに対する特異的抗体を用いてイムノブロットングを行った。PolyI:C 投与群において ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群に比べて 1.6 倍増加した ( $p < 0.05$ , Fig. 3A)。逆に、CRMP5 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群に比べて 0.7 倍減少していた ( $p < 0.01$ , Fig. 3B)。さらに、新生仔期に polyI:C を投与した 10 週齢のマウスに認められた ALDH1L1 および CRMP5 の発現変化が、polyI:C 処置直後から認められるかどうかを調べた。PolyI:C 最終投与 24 時間後のマウスの海馬において、ALDH1L1 のタンパク発現がコントロール群の 1.4 倍に増加した ( $p < 0.01$ , Fig. 4A)。逆に、CRMP5 は polyI:C 投与群においてタンパク発現がコントロール群の 0.8 倍に減少していた ( $p < 0.05$ , Fig. 4B)。



**Fig. 3. Expression of ALDH1L1 and CRMP5 in the hippocampus of polyI:C-treated mice at the age of 10 weeks**

From PD 2 to 6, mice were injected s.c. daily with either pyrogen-free saline or polyI:C at a dose of 5 mg/kg. Mice were sacrificed at the age of 10 weeks. Values indicate the mean  $\pm$  SE (n=6). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs saline



**Fig. 4. Expression of ALDH1L1 and CRMP5 in the hippocampus of polyI:C-treated mice at the age of 7 days**

From PD 2 to 6, mice were injected s.c. daily with either pyrogen-free saline or polyI:C at a dose of 5 mg/kg. Neonatal mice were sacrificed 24 h after final treatment with polyI:C. Values indicate the mean  $\pm$  SE (n=6). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs saline

## D. 考察

Toll-like receptor 3 を介して自然免疫機構を活性化する合成 2 本鎖 RNA アナログである polyI:C を新生仔期に投与されたマウスでは、正常なマウスに比較して学習・記憶の障害、感覚情報処理の障害、不安関連行動の増加、社会性行動の異常などが認められる<sup>7)</sup>。さらに、学習・記憶との関連性が示唆されている海馬におけるグルタミン酸放出の異常も確認されている<sup>7)</sup>。本年度は、新生児期の異常な免疫応答が学習・記憶や情動の発達に影響をおよぼす因子を調べるために、polyI:C を新生仔期に投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現変化を網羅的に解析した。

細胞内には何千種類ものタンパクが存在し、微小な変化を一度に検出することは困難である。また、細胞内の情報伝達に関与するタンパクのほとんどは細胞質に存在することから、海馬組織から細胞質に存在するタンパクを抽出することを試みた。細胞質分画のマーカータンパクである carbindin は F1 分画に強い発現、F2 分画には弱い発現が認められ、F3 分画には発現が認められなかった。また、F1 分画に膜タンパクである calnexin の弱い発現が認められたが、核タンパクの NeuN については発現が認められなかった。したがって、本実験条件にて調製した F1 分画は細胞質タンパクを多く含む分画であると考えられる。

これまで二次元電気泳動の欠点として再現性が低いこと。定量性に問題があること。ロースループレットであること。比較的少量のタンパクを必要とすること指摘されてきた。したがって、本研究では上記問題点を回避するため 2D-DIGE 法を採用した。その結果、約 1000 個のスポットが検出され、その中で有意な発現変化を示したスポットは 2 個であった。Scatter plot 解析の結果では、コントロールマウスに比べて polyI:C を投与したマウスで発現が 2 倍以上の増減を示すスポットが 29 個存在したことから、サンプル数を増やして解

析する必要があると考えられる。

有意な発現変化が認められたスポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、ALDH1L1 および CRMP5 を同定した。ALDH1L1 は 10-formyltetrahydrofolate、NADP<sup>+</sup>および H<sub>2</sub>O から tetrahydrofolate、CO<sub>2</sub> および NADPH へ変換する酵素であり、細胞質に存在する。ALDH1L1 の強制発現は細胞の増殖を抑制し、逆にガン細胞においては ALDH1L1 の発現が減少していることが報告されている<sup>8,9)</sup>。また、中枢神経系においては発生時期の神経管の正中部の放射状グリア細胞に特異的に発現すること<sup>10)</sup>、成体脳ではアストロサイトに発現していることが報告されている<sup>11)</sup>。したがって、新生仔期の polyI:C 処置によって誘導される ALDH1L1 タンパクの増加が発達段階におけるアストロサイトの機能に影響を及ぼしている可能性がある。

一方、CRMP は神経細胞の分化および軸索の伸長に関与している分子である<sup>12)</sup>。CRMP5 は主に脳に発現しており、胎生期から新生児期に最も高い mRNA 発現が認められる<sup>13)</sup>。PolyI:C が作用する Toll-like receptor 3 は神経細胞の軸索形成に重要な役割を果たしている成長円錐に存在し、polyI:C は軸索形成を阻害することが報告されている<sup>14)</sup>。したがって、新生仔期の polyI:C 投与による CRMP5 の発現低下が神経発達に影響をおよぼしている可能性がある。今後は ALDH1L1 および CRMP5 の機能解析を行うとともに新生仔期の免疫異常によって惹起される精神発達障害との関連について検討する予定である。

## E. 結論

新生仔期に polyI:C を投与し、成長したマウスの脳内におけるタンパク発現を 2D-DIGE 法により解析した結果、発現が変化する分子として ALDH1L1 および CRMP5 を同定した。したがって、新生仔期の異常な免疫応答が学習・記憶や情動の

発達障害の発現機序として ALDH1L1 および CRMP5 が関与している可能性が推測された。

#### [参考文献]

1. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, et al. Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathol Int.* 58: 257-267, 2008.
2. Patterson PH. *Neuroscience. Maternal effects on schizophrenia risk.* *Science* 318: 576-577, 2007.
3. Gonzalez-Dunia D, Volmer R, Mayer D, et al. Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res.* 111: 224-234, 2005.
4. Lawrence DM, Durham LC, Schwartz L, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells. *J Virol.* 78: 7319-7328, 2004.
5. Ross CA, Margolis RL, Reading SA, et al. *Neurobiology of schizophrenia.* *Neuron* 52: 139-153, 2006.
6. Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, et al. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiat.* 13: 208-221, 2008.
7. 山田清文ら. 周産期における異常免疫応答による神経精神毒性に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク総合研究事業) 分担研究報告書, 2009.
8. Krupenko SA and Oleinik NV. 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth. Differ.* 13: 227-236, 2002.
9. Oleinik NV and Krupenko SA. Ectopic expression of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in A549 cells induces G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cancer Res.* 1: 577-588, 2003.
10. Anthony TE and Heintz N. The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J. Comp. Neurol.* 500: 368-383, 2007.
11. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28: 264-278, 2008.
12. Hou ST, Jiang SX, Smith RA. Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267: 125-181, 2008.
13. Fukada M., Watakabe I., Yuasa-Kawada J, et al. Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J. Biol. Chem.* 275: 37957-37965, 2000.
14. Cameron JS, Alexopoulou L, Sloane JA, et al. Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *J. Neurosci.* 27: 13033-13041, 2007.

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nagai T, Murai R, Matsui K, Kamei H, Noda Y, Furukawa H, Nabeshima T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D<sub>1</sub> and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Psychopharmacology.* 202: 315-328, 2009.
- 2) Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J. Neurochem.* 105: 921-932, 2008.
- 3) Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Murai R, Nagai T, Yamada K, Nabeshima T. The extensive nitration of neurofilament light chain in the

hippocampus is associated with the cognitive impairment induced by amyloid beta in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327: 137-147, 2008.

- 4) Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Nagai T, Kamei H, Yamada K. GABA<sub>B</sub> receptor agonist baclofen improve methamphetamine-induced cognitive deficit in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 602: 101-104, 2009.
- 5) Nagai T, Nabeshima T, Yamada K. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: Regulation of nicotine reward by the tissue plasminogen activator (tPA)-plasmin system via proteinase-activated receptor 1. *J. Pharmacol. Sci.* 108: 4048-414, 2008.
- 6) Lu L, Mamiya T, Lu P, Niwa M, Mouri A, Zou LB, Nagai T, Hiramatsu M, Nabeshima T. The long-lasting effects of cross-fostering on the emotional behavior in ICR mice. *Behav. Brain Res.* 198: 172-178, 2009.

## 2. 学会発表

- 1) Ibi D, Nagai T, Mizoguchi H, Nitta A, Takuma K, Yamada K. Development of schizophrenia-like behaviors and susceptibility gene expression in a viral infection model during perinatal stage. *International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders.* Nagoya, Japan, September 24, 2008.
- 2) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, 田熊一徹, 山田清文. 周産期ウイルス感染モデルにおける認知障害. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.9-11.
- 3) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 田熊一徹, 北原裕子, 小池宏幸, 日比(古川)陽子, 新田淳美, 米田幸雄, 山田清文. 周産期におけるウイルス感染が精神機能発達および統合失調症関連遺伝子発現に及ぼす影響. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2008.10.1-3.
- 4) 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 新田淳美, 山田清文. 周産期における免疫応答異常が精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系に及ぼす影響. 第114回日本薬理学会近畿部会, 神戸, 2008.11.4.
- 5) 永井拓, 北原裕子, 衣斐大祐, 山田清文. 周産期 polyinosine:polycytidylic acid 投与による精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系の変化. 第19回マイクロダイアリス研究会, 東京, 2008.12.6.
- 6) 永井拓, 衣斐大祐, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文. 周産期における免疫異常は思春期マウスにおける情動および認知機能を障害する. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都, 2008.12.20-21.
- 7) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文. 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第82回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18. (予定)

## H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし