

博士論文

有機スズの新規ターゲット因子
NRF-1 に関する毒性研究

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 薬科学専攻

平成 26 年度入学 石田 慶士

主指導教員 杉山 政則

目次

略語.....	2
第 1 章 序論.....	4
第 2 章 大脳皮質初代神経細胞に対する TBT の毒性影響	
第 1 節 緒言.....	9
第 2 節 TBT 曝露による神経細胞生存率への影響.....	9
第 3 節 TBT 曝露による GluR2 発現量への影響.....	11
第 4 節 TBT 曝露による転写因子の DNA 結合活性評価.....	14
第 5 節 TBT 曝露による COX4, COX6c, cytochrome c mRNA および細胞内 ATP 量への影響.....	19
第 6 節 TBT による NRF-1, PGC-1 α タンパク質および mRNA 発現量への影響	21
第 7 節 TBT による NRF-1, PGC-1 α 核発現量に対する影響.....	23
第 8 節 TBT による NRF-1 二量体形成に対する影響.....	24
第 9 節 小括および考察.....	25
第 3 章 NRF-1 の毒性学的機能解析	
第 1 節 緒言.....	28
第 2 節 Tet-inducible NRF-1 ノックダウン細胞株の作製.....	30
第 3 節 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム形態への影響.....	32
第 4 節 NRF-1 ノックダウンによる LAMP1 タンパク質発現への影響.....	33
第 5 節 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム関連遺伝子発現量に対する影響	35
第 6 節 NRF-1 ノックダウンによる MiT ファミリーに対する影響.....	38
第 7 節 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム活性へ影響.....	40
第 8 節 大脳皮質初代神経細胞における TBT 曝露による LAMP1 発現への影響	42
第 9 節 小括および考察.....	43
第 4 章 総括.....	46
実験の部.....	48
引用文献.....	73
謝辞.....	84

略語

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
Atp6v1h: ATPase H⁺ transporting V1 subunit H
bHLH: basic helix-loop-helix
CLEAR: coordinated lysosomal expression and regulation
CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
COX: cytochrome c oxidase
ctsb: cathepsin B
ctsd: cathepsin D
Cyt.c: cytochrome c
DBT: dibutyltin
Dox: doxycycline
GABA: γ -aminobutyric acid
gba: glucosylceramidase beta
GFP: green fluorescent protein
HA: human influenza hemagglutinin
HEK 293T: human embryonic kidney 293T
K.D.: knockdown
K.O.: knockout
LAMP1: lysosomal-associated membrane protein 1
mcoln1: mucolin 1
MiT: microphthalmia transcription factor
MITF: melanogenesis associated transcription factor
NAS: 1-naphthylacetylspermine
NMDA: *N*-methyl-D-aspartate
NRE: nuclear respiratory factor-1 binding element
NRF-1: nuclear respiratory factor-1
PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PPAR: proliferator-activated receptor
shRNA: small hairpin RNA
TBT: tributyltin
Tet: tetracycline
TFE3: transcription factor E3
TFEB: transcription factor EB
TMT: trimethyltin

REST: RE-1-silencing transcription factor

RXR: Retinoid X receptor

第 1 章 序論

我々の身の回りには莫大な数の化学物質が存在し、その数は年々増え続けている。様々な化学物質によって我々の生活は便利で快適なものになってきた一方で、それらの一部はヒトや野生生物に対して有害な影響を与えるものが少なからず存在する。産業革命が始まった 18 世紀頃から環境化学物質のヒトへの健康被害は報告されていたものの、人々の間で注目されることは少なかった。環境化学物質が世間で広く認知され始めたのは 20 世紀以降であり、地球温暖化、酸性雨、オゾンホール等の環境変化が顕著になるにつれ、人々の環境化学物質に対する関心も高くなってきた。我が国でも Polychlorinated biphenyls (PCBs) による環境汚染問題を契機として 1973 年に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法) が制定され、届けだされた新規化学物質のうち難分解性、高濃縮性、長期毒性のあるものを特定化学物質に指定し、製造・輸入が規制されることとなった。このような取り組みから、環境中からの高濃度曝露による健康影響は改善されるようになったものの、土壌や水環境中に蓄積した化学物質の低濃度長期曝露による健康影響への問題は依然として残っている。化学物質の毒性メカニズムを明らかにすることは、それらを安全に使用するために非常に重要である。

有機スズ化合物は、貝類や海藻の付着防止のために魚網や船底の塗料として広く使用されてきたが、1980 年代に雌の巻貝類に雄の生殖器官が形成されるインポセックス現象が報告されて以降、有機スズ化合物の使用は国際的に制限されている。日本の対策としては、1989 年には化審法によりトリブチルスズオキシド (TBTO) が第一種特定化学物質に指定され、製造、輸入、使用が原則禁止された。また、1992 年にはトリブチルスズクロライド (TBTCI) 等 13 種類の化合物が第二種特定化学物質に指定され、使用等に関わる規制の対象とされた。しかしながら、低温かつ嫌気条件下における有機スズ化合物の半減期は数十年と長く、使用が規制された後も魚類の血液や海底堆積物からの検出が報告されている (Vigilino et al., 2004; Miki et al., 2011)。Miki らが行った北九州の海岸地域の有機スズ化合物の汚染調査により、魚類血清から 1.4 – 190 ng/ml の TBT が検出されることが明らかとなっている (Miki et al., 2011; table 1)。Airaksinen らはフィンランド人が魚介類を介して摂取する一日あたりの平均有機スズ化合物量 { TBT、トリフェニルスズ (TPT)、ジブチルスズ (DBT)、ジオクチルスズ (DOT) } の合計が 3.2 ng/kg bw day⁻¹ であることを報告している (Airaksinen et al., 2010)。この値は、欧州食品安全機関が定めている許容一日摂取量より低い値ではあるが、有機スズ化合物に低濃度ながらも慢性的に曝露された際の毒性影響は依然として考

慮しなければならない問題である。

Fish species	N	Blood ^a		Muscle		Liver	
		DBT	TBT	DBT	TBT	DBT	TBT
<i>Pufferfish (Tetraodontiformes)</i>							
Japanese puffer (<i>Takifugu niphobles</i>)	7	1.9 ± 1.8a	130 ± 73a	2.3 ± 6.1a	13 ± 14b	6.2 ± 4.5a	18 ± 13b
Panther puffer (<i>T. pardalis</i>)	4	2.0 ± 2.3a	75 ± 69a	0.4 ± 0.5a	7.3 ± 9.0a	11 ± 12a	12 ± 14a
Finepatterned puffer (<i>T. poecilonotus</i>)	9	1.5 ± 0.9a	30 ± 8.1a	NDb	NDb	1.1 ± 1.6b	1.3 ± 2.2b
Purple puffer (<i>T. porphyreus</i>)	8	1.2 ± 0.8a	18 ± 8.6a	NDb	NDb	2.3 ± 2.2a	3.9 ± 4.4b
Green rough-backed puffer (<i>Lagocephalus wheeleri</i>)	5	NDA	16 ± 4.2a	0.5 ± 1.0a	0.2 ± 0.5b	5.2 ± 5.5a	NDb
Black scraper (<i>Thamnaconus modestus</i>)	3	1.6 ± 0.6a	15 ± 8.6a	NDA	1.5 ± 2.6a	4.9 ± 2.2a	NDA
<i>Non-pufferfish</i>							
Japanese sea perch (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	2	16	190	3.3	39	130	140
Red sea bream (<i>Pagrus major</i>)	3	1.1 ± 0.3a	8.2 ± 3.1a	NDA	NDb	4.3 ± 3.7a	NDb
Japanese common goby (<i>Acanthogobius flavimanus</i>)	5	11 ± 3.2a	26 ± 34a	NDb	NDA	52 ± 18c	NDA
Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	2	1.3	60	0.1	0.8	4.7	6.6
Rockfish (<i>Sebastes marmoratus</i>)	5	0.6 ± 0.3a	11 ± 4.9a	0.1 ± 0.1b	0.6 ± 0.2b	1.8 ± 0.8c	3.3 ± 1.2b
Conger eel (<i>Conger myriaster</i>)	5	0.3 ± 0.4a	1.4 ± 1.1a	0.4 ± 0.4a	3.7 ± 0.8b	23 ± 7.1b	15 ± 3.7c
Sea mullet (<i>Mugil cephalus</i>)	5	0.5 ± 0.4a	3.5 ± 5.9a	2.1 ± 0.4b	4.0 ± 8.5a	43 ± 58c	19 ± 37a

^a Whole blood; ND <0.1 ng/g. Values followed by the same letter in each column are not significantly different at the 5% level.

Table 1. Mean DBT and TBT concentrations (mean ± SD, ng/mL for blood and ng/g, wet weight, for liver and muscle) in pufferfish and non-pufferfish samples (Miki et al., 2011).

Retinoid X receptor (RXR) は、リガンド依存性転写因子として様々な生理機能に関与する遺伝子の発現調節を担う核内受容体の一つである。トリアルキルスズは直接 RXR のリガンド結合領域に結合し、転写活性を促進することが知られている (Nakanishi et al., 2005)。RXR は proliferator-activated receptors (PPARs) のヘテロダイマーのパートナーとして機能するため、有機スズ化合物は RXR ホモダイマーのみならず RXR/PPAR_γ ヘテロダイマーを 10-100 nM の濃度で活性化する (Kanayama et al., 2005)。また、PPARs に加えて farnesoid X receptor (FXR)、thyroid hormone receptors (TRs)、constitutive androstane receptor (CAR)、pregnane X receptor (PXR) といった核内受容体も RXR とヘテロダイマーを形成することから、有機スズ化合物はこれらの核内受容体を介して下流遺伝子の発現を誘導すると考えられる。核内受容体に対するアゴニスト作用は、有機スズ化合物の毒性メカニズムを明らかにする上で重要である。

哺乳動物の脳は一度損傷を受けると修復が不可能であることから、通常は血液脳関門により低分子化合物の脳への移行が阻害されており、毒性物質から守られている。しかしながら、有機スズ化合物は脳への移行性が高く神経毒性を引き起こすことが知られている。例えば、10, 20, 30 mg/kg bw の TBT 単独投与は血液脳関門を破壊し、TBT が大脳皮質まで到達する。その結果、酸化ストレス、炎症性タンパク質の誘導、アポトー

シグナルの活性化を引き起こし、最終的に神経細胞死を誘発する (Mitra et al., 2013)。また TBT の急性曝露は自発運動量の減少などの行動異常を引き起こすことや (Ema et al., 1991)、マウス中脳のドパミンレベルを変化させる作用も知られている (Tsunoda et al., 2004)。Mitra らは様々な脳の領域から単離した初代培養神経細胞に 30-3000 nM の TBT を曝露し細胞毒性を評価したところ、他の領域と比べて線条体が最も TBT に対する感受性が高いことを見出した (Mitra et al., 2014)。Chang と Dyer はラット海馬に対するトリメチルスズ (TMT) の神経傷害作用について検討し、歯状回において早期の神経変性が認められることや、CA3 領域の中でも内側の方が外側よりも感受性が高いことを報告している (Chang and Dyer, 1983)。このように、有機スズ化合物に対する感受性は脳の部位や領域によって異なることが示唆されている。

有機スズ化合物の神経毒性メカニズムの一つに神経伝達物質およびその受容体に対する影響が挙げられる。 γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) は中枢神経系における代表的な抑制系神経伝達物質であり、神経発生、シナプス可塑性、様々な神経活動において重要な役割を果たす。30 nM TBT を未成熟神経細胞に曝露することで GABA 性シナプス後電流頻度の減少が認められるが、成熟神経細胞においてはこの作用は認められない。このことから、TBT はシナプス新生の初期発達段階に影響を及ぼすことが示唆される (Yamada et al., 2010)。その原因として、TBT は Cl^-/OH^- アンチポーターとして働くため (Tosteson and Wieth, 1979)、その作用により Cl^- ホメオスタシスが破綻し最終的に細胞内 Cl^- 濃度依存的な GABA 系システムに影響を与えていることが挙げられる。さらに、TMT の投与によりマウス脳における GABA_A 受容体サブユニット、 GABA_B 受容体サブユニット、GABA 関連遺伝子 (小胞 GABA トランスポーターやグルタミン酸デカルボキシラーゼなど) の発現量が増加すること (Nishimura et al., 2001; Kim et al., 2015) や、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた実験により、TMT は μM オーダーで GABA_A 受容体チャンネルを阻害することが報告されている (Krüger et al., 2005)。

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、グルタミン酸受容体は神経細胞の生存や成熟に関与し (Blandini et al., 1996; Monti et al., 2002; Hirasawa et al., 2003)、学習や記憶に中心的な役割を担うことが知られている。興奮毒性や脳虚血に起因するグルタミン酸受容体を介した神経細胞へのカルシウム流入はカルシウム依存性タンパク質などの様々な細胞内シグナルカスケードを過剰に活性化し、神経細胞にダメージを与える可能性が考えられている (Choi, 1988; Tymianski, 1996;

Ying et al., 1997)。イオンチャネル型グルタミン酸受容体は主に、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体と α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 受容体の 2 種類に大別される。NMDA 受容体は主サブユニットの NR1 と副サブユニットの NR2 及び NR3 のファミリーから構成され、副サブユニットの構成は神経細胞の発達段階によって変化する。それぞれのサブユニットは特異的な役割を担い、NMDA 受容体のチャネルの性質や細胞内局在を決定する (Luo et al., 2011)ため、NMDA 受容体の構成変化は神経の活性や生存に影響を与えると考えられる。一方、AMPA 受容体は GluR1 から GluR4 の 4 種類のサブユニットのホモまたはヘテロ四量体により構成される受容体であり AMPA 受容体のサブユニットのうち GluR2 は海馬錐体細胞や顆粒細胞 (Hollmann and Heinemann, 1994)、大脳皮質細胞 (Kondo et al., 1997) 等に幅広く発現している。AMPA 受容体のカルシウム透過性は GluR2 の有無により決定され、GluR2 欠損 AMPA 受容体をもつ神経細胞は高いカルシウム透過性を示し、興奮毒性に対して脆弱であることが知られている (Liu and Zukin, 2007; Fig.1)。

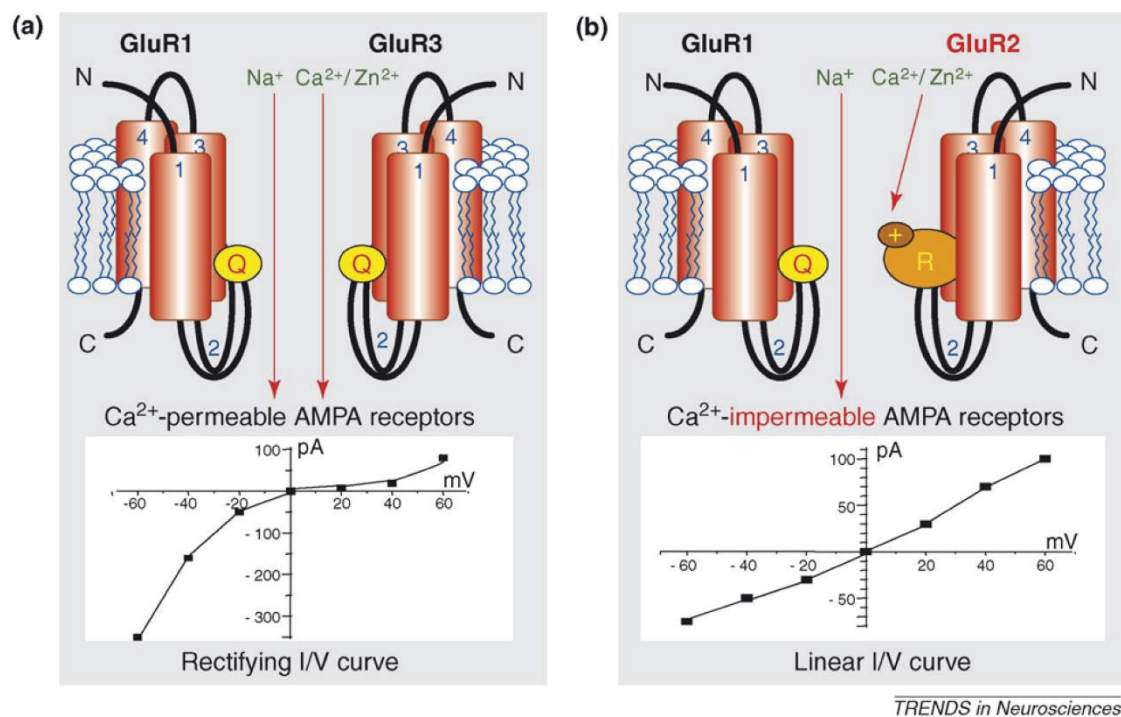


Figure 1. Ca²⁺-permeability of AMPA receptors depend on the subunit composition. (Liu and Zukin, 2007)

我々の研究室では以前よりグルタミン酸受容体を介した TBT の神経毒性メカニズムの研究に着手している。ラット大脳皮質初代神経細胞に 500 nM の TBT を曝露することで細胞外に過剰量のグルタミン酸が放出され、神経細胞死が誘発されることを Nakatsu らが明らかにした (Nakatsu et al., 2006)。この神経細胞死は AMPA 受容体の阻害剤である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) および NMDA 受容体の阻害剤である MK-801 により回復することから、TBT により誘発される神経細胞死はグルタミン酸受容体が関与していることが示唆される。さらに我々は、単独では神経細胞死を引き起こさない濃度である 20 nM の TBT が、グルタミン酸受容体のサブユニットである NR1、NR2A、GluR1、GluR2 の発現を減少させ、NR2B、GluR3、GluR4 の発現を上昇させることを見出した (Nakatsu et al., 2009)。20 nM の TBT を 9 日間曝露した神経細胞にグルタミン酸刺激を加えた結果、細胞内への Ca^{2+} 流入が増大し、それに伴い神経細胞死の増強も認められた (Nakatsu et al., 2009)。GluR2 発現低下はマウスに対する TBT の胎生期曝露によっても引き起こされる (Ishida et al., 2017a)。上述の通り、GluR2 サブユニットは AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を決定するサブユニットであり、GluR2 発現量が減少したことで AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が上昇した結果、グルタミン酸刺激に対して神経細胞が脆弱化したと予想される。したがって GluR2 の発現量低下は、低濃度 TBT の神経毒性メカニズムに関与すると考えられる。そこで、本研究では TBT による GluR2 発現減少メカニズムを検討することで、低濃度 TBT による毒性メカニズムの全貌解明を目指した。

第 2 章 大脳皮質初代神経細胞に対する TBT の毒性影響

第 1 節 緒言

以前の報告で、既知の毒性発現濃度と比べて低い濃度である 20 nM の TBT 曝露により GluR2 発現量が減少し、神経細胞が脆弱になることを示した (Nakatsu et al., 2009)。タンパク質発現減少メカニズムにはタンパク質の合成阻害と分解促進が考えられるが、20 nM の TBT 9 日間曝露により GluR2 mRNA の低下が認められることから、TBT は GluR2 の転写を阻害している可能性が考えられる。そこで本研究では、TBT が GluR2 の転写因子に与える影響を評価した。

第 2 節 TBT 曝露による神経細胞生存率への影響

初めに、Nakatsu らが明らかにした「20 nM TBT 曝露による神経細胞脆弱化 (Nakatsu et al., 2009)」が本実験系においても認められるか否かを検証した。ラット大脳皮質初代神経細胞に 20 nM TBT を 9 日間曝露後グルタミン酸を 24 時間添加し、細胞生存率を評価したところ、50 μ M グルタミン酸添加時にコントロールの神経細胞と比較して TBT を持続的に曝露した神経細胞において細胞生存率の低下が認められた。さらに、この細胞生存率低下は GluR2 を含まない AMPA 受容体選択的アンタゴニストである 1-naphthylacetylspermine (NAS) の前処理により抑制された (Fig. 2)。

したがって、本実験系においても以前の報告と同様に TBT の持続的曝露による神経細胞の脆弱化が認められた。

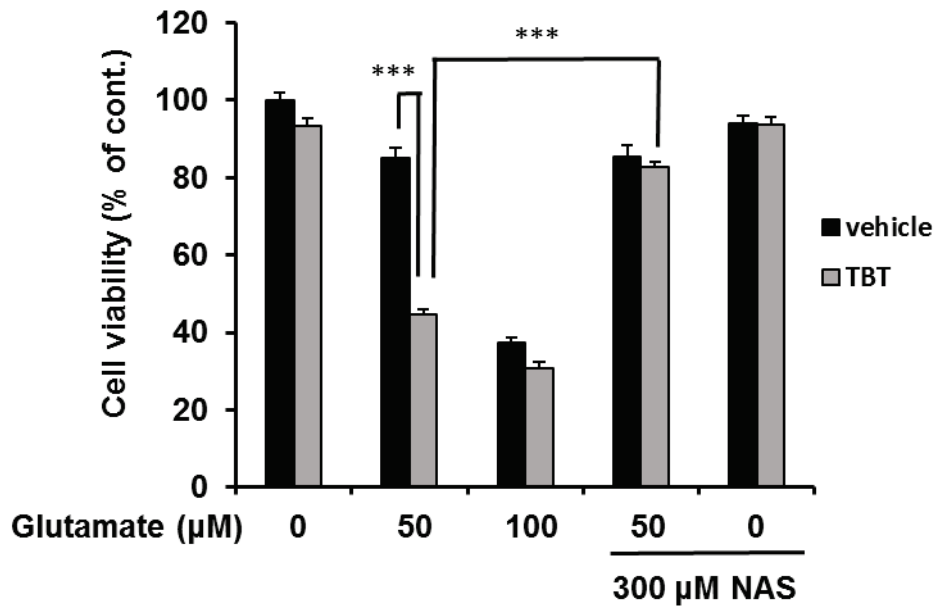


Figure 2. Effect of TBT exposure on glutamate toxicity in primary cortical neurons. Cortical neurons were exposed to 50-100 µM glutamate for 24h with or without 300 µM 1-naphtyl acetyl spermine (NAS) after TBT exposure and cell viability was measured. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n=4$). *** $P < 0.001$ vs. control (Tukey's test).

第 3 節 TBT 曝露による GluR2 発現量への影響

Nakatsu らの報告では、20 nM TBT の 9 日間曝露で GluR2 のタンパク質および mRNA の発現量が低下することを示唆しているが (Nakatsu et al., 2009)、GluR2 発現量を減少させるのに必要な TBT の曝露時間に関しては明らかになっていない。そこで TBT の時間依存的な影響を評価するために、ラット大脳皮質初代神経細胞に 20 nM の TBT を様々な時間で曝露後、タンパク質および mRNA 発現量を評価した。その結果、タンパク質発現量は曝露後 3 日目から (Fig. 3a)、mRNA 発現量は曝露後 3 時間後から有意な減少が認められた (Fig. 3b)。

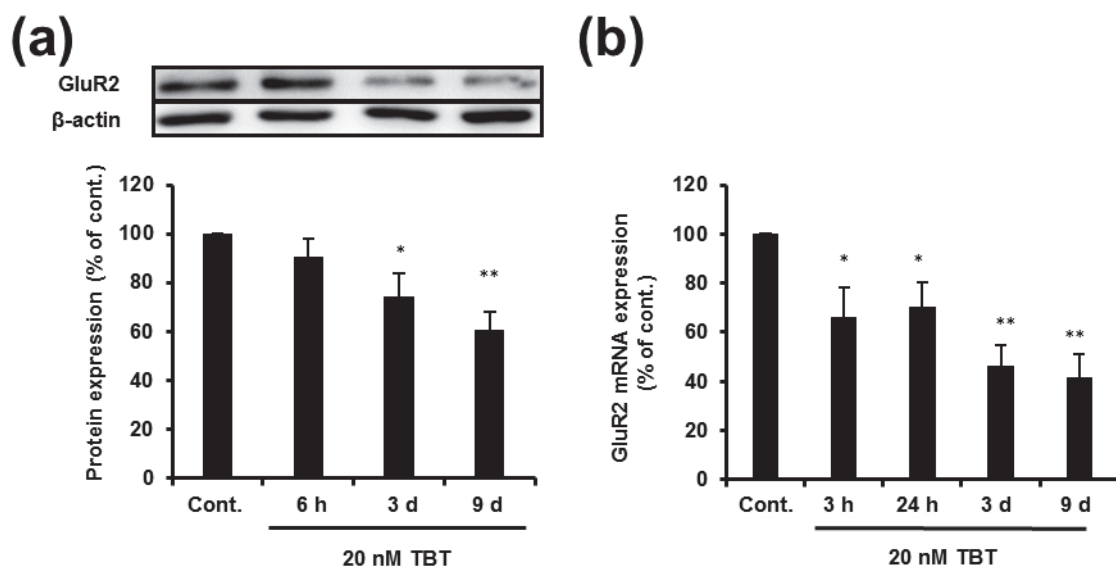


Figure 3. TBT-induced changes in GluR2 whole cell protein and mRNA expression.

(a) Cortical neurons were exposed to DMSO (as a control) or 20 nM TBT for various times, and then GluR2 protein expression was detected by western blotting. Quantitative analysis was performed using Image J software, and the GluR2 protein levels were corrected based on the β -actin protein levels. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 5$). * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.01$ vs. control (Student's t -test). (b) Cortical neurons were exposed to DMSO or 20 nM TBT for various times, and then GluR2 mRNA expression was measured by real-time PCR. The mRNA level was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 3$), * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.01$ vs. control (Student's t -test).

GluR2 はその C 末端が AMPA 受容体の輸送に関与しており、glutamate receptor interacting protein (GRIP)、protein interacting with C kinase 1 (PICK1) などのタンパク質と結合し受容体の膜輸送が調節されている (Dong et al., 1997; Wyszynski et al., 2002; Xia et al., 1999)。GRIP や PICK1 の GluR2 C 末領域への結合は protein kinase C (PKC) により制御されており、PKC により 880 番目のセリンがリン酸化された GluR2 は GRIP との結合能が低下し、内部移行が引き起こされる (Chung et al., 2000; Matsuda et al., 2000)。このような調節は、特定の運動学習に重要であるシナプスの長期抑制 (long-term depression; LTD) に不可欠であると言われている。さらに PKC のアイソフォームである PKM ζ が N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) と GluR2 の結合を促進させ、細胞膜上での GluR2 発現を安定させることで長期記憶を維持させることが示唆されている (Migues et al., 2010; Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2008) (Fig. 4)。

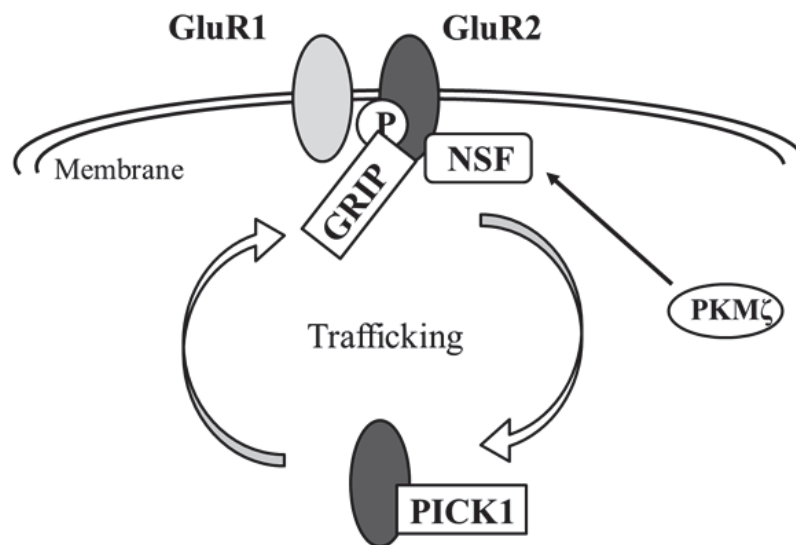


Figure 4. General mechanism of GluR2 trafficking.

通常状態において AMPA 受容体は細胞質と細胞膜を往復しているため、実際に AMPA 受容体として機能している細胞膜上の GluR2 発現量は細胞質における発現量を反映していると考えられる。したがって、Fig. 3 で認められた TBT 曝露による細胞全体の GluR2 発現量低下は、細胞膜上においても同様に認められると予想される。そこで、細胞膜における GluR2 発現量をウエスタンブロッティングで評価したところ、TBT 曝露により発現量の低下が認められた (Fig. 5a)。さらに免疫染色法を用いて GluR2 と細胞膜タンパク質である N-cadherin の局在を評価したところ、TBT と N-cadherin の共局在レベルの低下が認められた (Fig. 5b)。以上の結果より、TBT 曝露により細胞膜上の GluR2 発現量も減少することが明らかとなった。

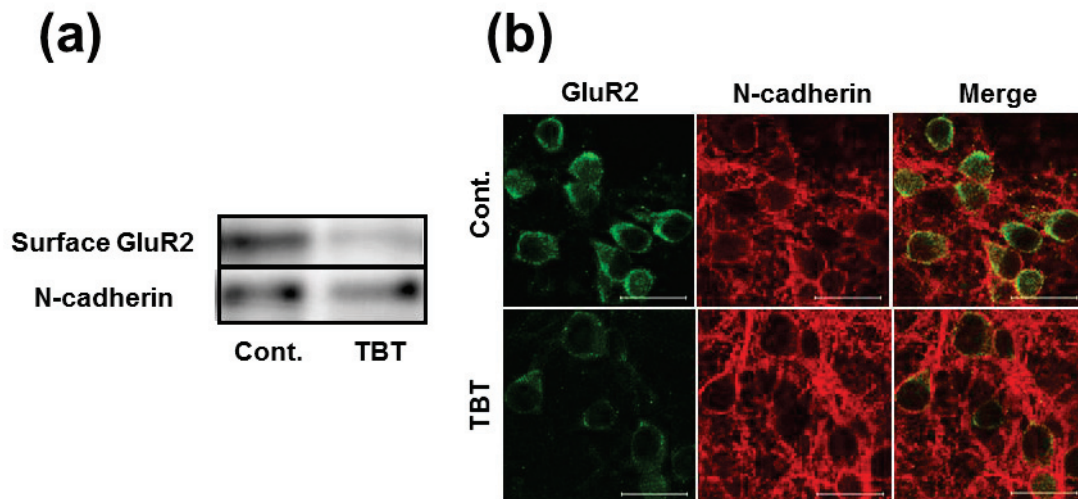


Figure 5 TBT-induced changes in GluR2 membrane protein expression.

(a) Cortical neurons were exposed to DMSO or 20 nM TBT for 9 days. The cell surface proteins were then biotinylated, and detected by western blotting; (b) Cortical neurons were exposed to DMSO or 20 nM TBT for 9 days, and immunostaining was performed using a mouse anti-GluR2 antibody that recognizes the *N*-terminal extracellular domain of GluR2 (green), and a rabbit anti-*N*-cadherin antibody (red). Yellow indicates co-localization of GluR2 and *N*-cadherin. Scale bar: 20 μ m.

第 4 節 TBT 曝露による転写因子の DNA 結合活性評価

GluR2 の mRNA 発現量は様々な転写因子によって調節されている。特に、GluR2 の転写促進因子として nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) と Sp-family transcription factor (Sp1)、転写抑制因子として RE-1-silencing transcription factor (REST) (別名 : neuron restrictive silencer factor (NRSF)) が報告されており (Myers et al., 1998; Dhar et al., 2009a)、これらの転写因子は GluR2 プロモーターの-300~1 の領域に結合部位が存在する (Fig. 6)。Sp1 はハウスキーピング遺伝子の転写調節などに関わる一般的な転写因子である (Wierstra, 2008)。また、REST は脳虚血などにより誘導され、GluR2 の発現変化や転写活性の変動を引き起こすとされている (Calderone et al., 2003)。

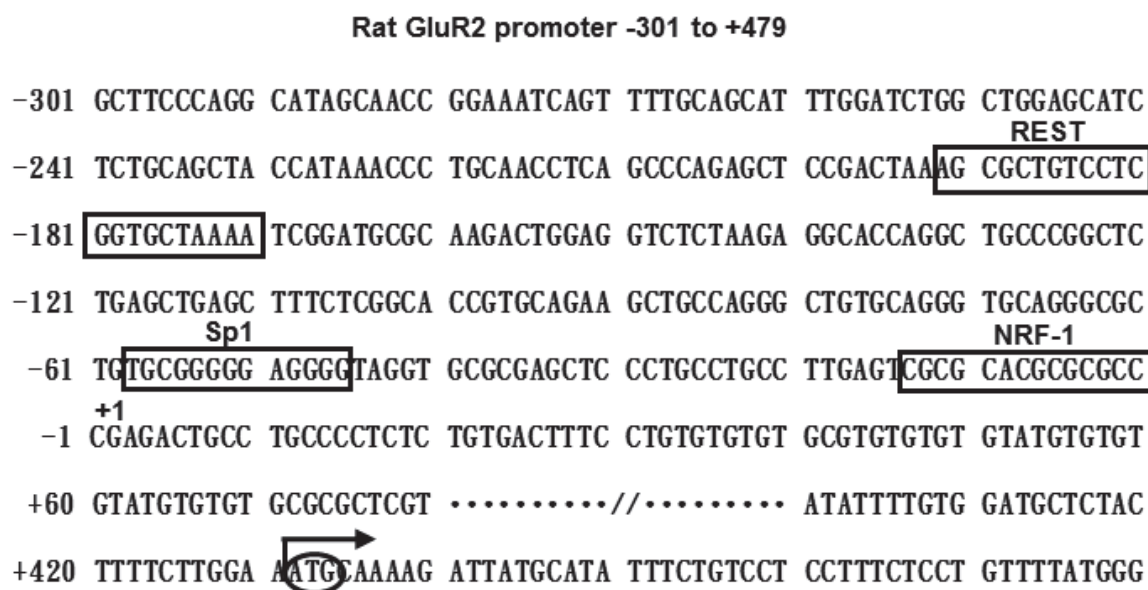


Figure 6. Putative binding sites of transcription factors to rat GluR2 promoter.

Partial nucleotide sequences of the rat GluR2 promoter, and the binding sites of NRF-1, Sp1, and REST. The 5'-most prominent initiation site is shown as the +1 transcription initiation site, located 430 bases 5' of the GluR2 AUG (bent arrow).

TBT による GluR2 発現減少メカニズムを明らかにするために、GluR2 プロモーターにおける結合部位のオリゴヌクレオチドに対する NRF-1 (Fig. 7a)、 Sp1 (Fig. 7b)、 REST (Fig. 7c) の結合量をゲルシフトアッセイを用いて評価した。

まず NRF-1 に関しては、specific competitor として標識していない NRF-1 結合配列を加えるとシフトバンドが消え (lane 3)、non-specific competitor として、AP2 結合配列を加えるとバンドが現れたことから (lane 4)、このシフトバンドが NRF-1 であることが確認できた。また、コントロール (lane 5) と比べて TBT 曝露 3 時間 (lane 6)、24 時間 (lane 7) で NRF-1 の DNA 結合活性低下が認められた。

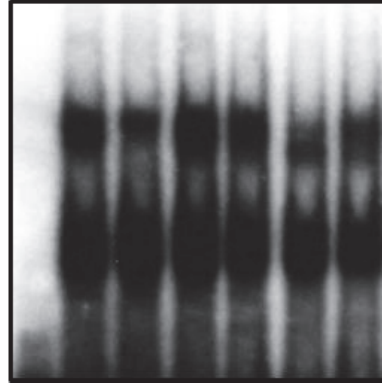
Sp1 に関しては specific competitor として標識していない Sp1 結合配列を加えるとシフトバンドが消え (lane 3)、 non-specific competitor として AP1 結合配列を加えるとシフトバンドが現れたことから (lane 4)、このシフトバンドが Sp1 であることが確認できた。また、コントロール (lane 5) と比較し、TBT 曝露 (lane 6) においてシフトバンドに顕著な変化は認められなかった。

REST においては、specific competitor として標識していない REST 結合配列を加えるとシフトバンドが消え (lane 3)、non-specific competitor として AP2 結合配列を加えるとシフトバンドが現れたことから (lane 4)、このシフトバンドが REST であることが確認できた。コントロール (lane 5) と TBT 曝露 (lane 6) を比較したところ、シフトバンドに顕著な変化は認められなかった。

(a)

³² P labeled oligonucleotide	+	+	+	+	+	+	+
Specific competitor	-	-	+	-	-	-	-
Non-specific competitor	-	-	-	+	-	-	-
Nuclear extract	-	+	+	+	-	-	-
DMSO treated nuclear extract	-	-	-	-	+	-	-
TBT treated nuclear extract	-	-	-	-	-	3h	24h
	1	2	3	4	5	6	7

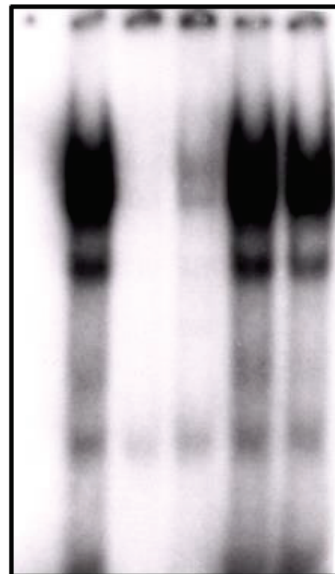
NRF-1 →



(b)

³² P labeled oligonucleotide	+	+	+	+	+	+
Specific competitor	-	-	+	-	-	-
Non-specific competitor	-	-	-	+	-	-
Nuclear extract	-	+	+	+	-	-
DMSO treated nuclear extract	-	-	-	-	+	-
TBT treated nuclear extract	-	-	-	-	-	+
	1	2	3	4	5	6

Sp1 →



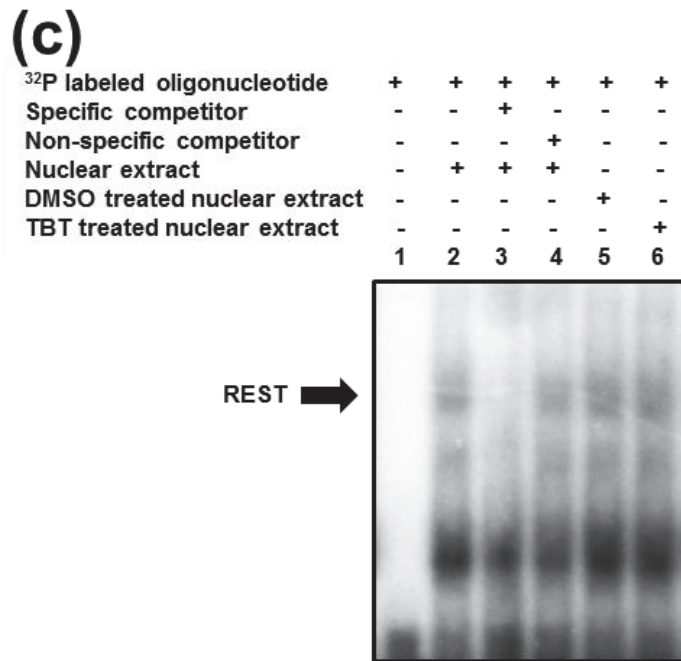


Figure 7. Effect of TBT on the binding activity of NRF-1, Sp1, and REST to their putative binding sites.

Nuclear proteins were extracted from DMSO- or TBT-exposed cortical neurons, and the DNA binding activities of NRF-1 (a), Sp1 (b), and REST (c) were analyzed by gel shift assay. An excess of specific (lane 3) or non-specific (lane 4) oligonucleotides was added as a competitor. DMSO-treated nuclear extracts (lane 5) and TBT-treated nuclear extracts (lane 6 and 7) were incubated with ³²P-labelled oligonucleotides containing the GluR2 promoter region, and DNA–protein complexes were separated from free DNA probes by gel electrophoresis. The arrows show specific band shifts.

次に、GluR2 プロモーターに対する NRF-1 の結合活性を評価するために、大脳皮質初代神経細胞に 20 nM TBT を 3 時間、3 日間、9 日間曝露し、抗 NRF-1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。その結果、NRF-1 の GluR2 プロモーターに対する結合量が TBT 曝露 3 時間後から減少し (Fig. 8)、ゲルシフトアッセイで得られた結果と一致した。

以上の結果より、TBT は NRF-1 の転写活性を特異的に低下させることが明らかとなった。

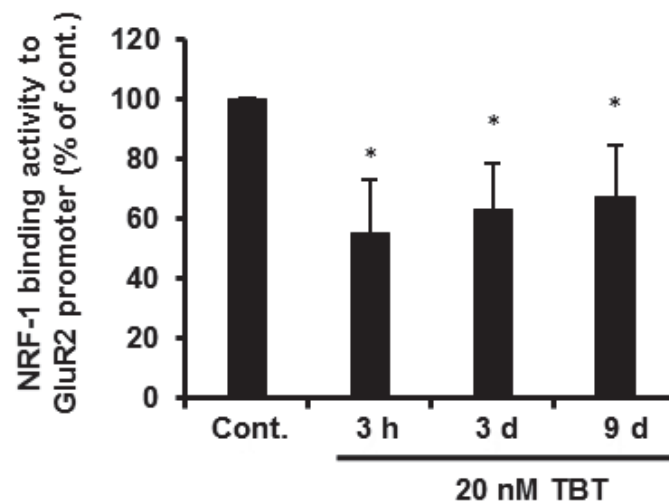


Figure 8. Effect of TBT on NRF-1 binding activity to GluR2 promoter.

Cortical neurons were exposed to DMSO as a control or 20 nM TBT for various times, and then the NRF-1 binding activity to the GluR2 promoter was examined by ChIP assay using NRF-1 antibody. Purified DNA samples were subjected to quantitative real-time PCR analyses, and the DNA levels were corrected relative to the input sample. The data are expressed as the mean + S.E.M. (n = 5). * $p < 0.05$ vs. control (Student's *t*-test).

第 5 節 TBT 曝露による COX4, COX6c, cytochrome c mRNA および細胞内 ATP 量への影響

第 4 節より TBT は NRF-1 を特異的に阻害することで GluR2 発現量の低下を引き起こすことが示唆された。NRF-1 は GluR2 以外にもミトコンドリア関連遺伝子である cytochrome c (cyt.c) や cytochrome c oxidase (COX) 等の転写因子として働くことが報告されている (Virbasius et al., 1994; Scarpulla, 2006; Dhar et al., 2008)。そこで、TBT は NRF-1 を阻害することで GluR2 以外の NRF-1 下流遺伝子に対しても転写抑制を引き起こすか否かについて検証した。大脳皮質初代神経細胞に 20 nM TBT を各時間曝露後、COX4、COX6c、cyt.c の mRNA 発現量を評価したところ、TBT 9 日間曝露においてそれらの mRNA 発現量の低下が認められた (Fig. 9a)。

また、COX4、COX6c、cyt.c はミトコンドリアの酸化的リン酸化反応を介した ATP 産生に関与する。そこで細胞内 ATP 量を評価したところ、20 nM TBT 9 日間曝露によりコントロールと比較して 88% まで ATP 量の低下が認められた (Fig. 9b)。

以上の結果より、TBT は NRF-1 を阻害することで cyt.c、COX4、COX6c の発現量を低下させ、その結果細胞内 ATP 量の低下を引き起こすことが明らかとなった。

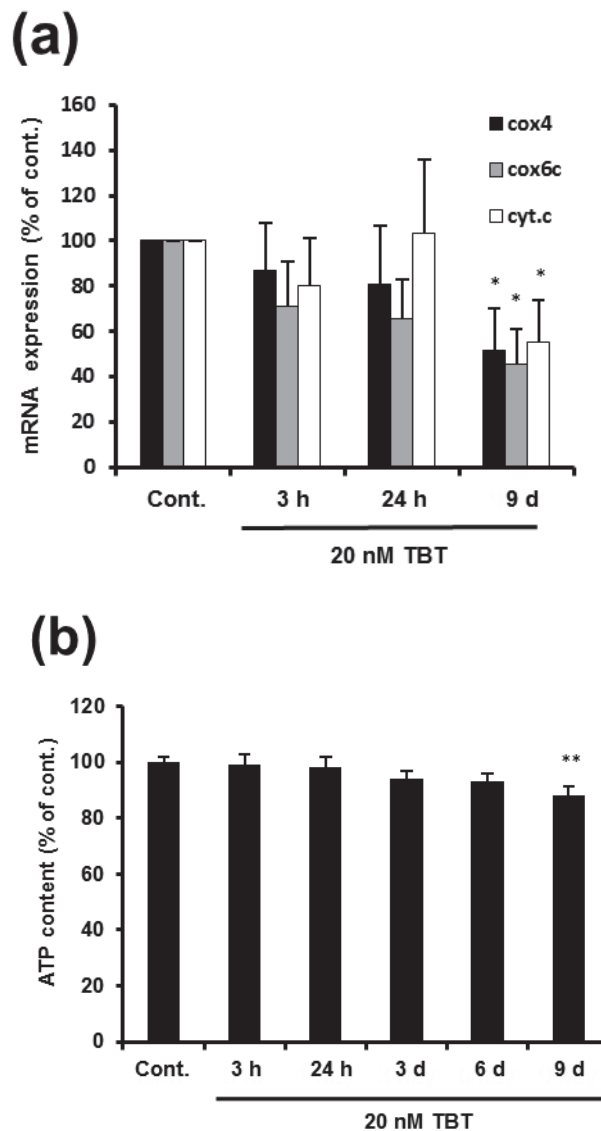


Figure 9. TBT-induced changes in COX4, COX6c, and cyt.c mRNA expression, and intracellular ATP content.

(a) Cortical neurons were exposed to DMSO or 20 nM TBT for various times, and then the mRNA expression of cyt.c, COX4, and COX6c was measured by real-time PCR. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. control (Student's t -test). (b) Cortical neurons were exposed to 20 nM TBT for various times, and the intracellular ATP content was measured. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 24$ – 32). ** $p < 0.01$ vs. control (Student's t -test).

第 6 節 TBT による NRF-1, PGC-1 α タンパク質および mRNA 発現量への影響

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) は NRF-1 を含む様々な転写因子と結合し、転写調節に重要な役割を果たす転写共役因子である。したがって、PGC-1 α の発現量が増加した場合 NRF-1 の活性も影響を受けると考えられる。そこで、TBT による NRF-1 阻害メカニズムを明らかにするために、NRF-1 および PGC-1 α のタンパク質と mRNA 発現量を評価した。大脳皮質初代神経細胞に 20 nM TBT を各時間曝露後、NRF-1 および PGC-1 α のタンパク質発現量を評価したところ、PGC-1 α タンパク質発現量の顕著な変動は認められなかったものの、NRF-1 タンパク質発現量は TBT 9 日間曝露によって有意に低下した (Fig. 10a-c)。同様に mRNA 発現量についても評価したところ、PGC-1 α mRNA 発現量に顕著な変動は認められなかったものの、NRF-1 mRNA 発現量は TBT 9 日間曝露により有意に低下した (Fig. 10d, 10e)。

以上の結果から、TBT 曝露による NRF-1 阻害に NRF-1 の発現量低下が関与していることが明らかとなった。

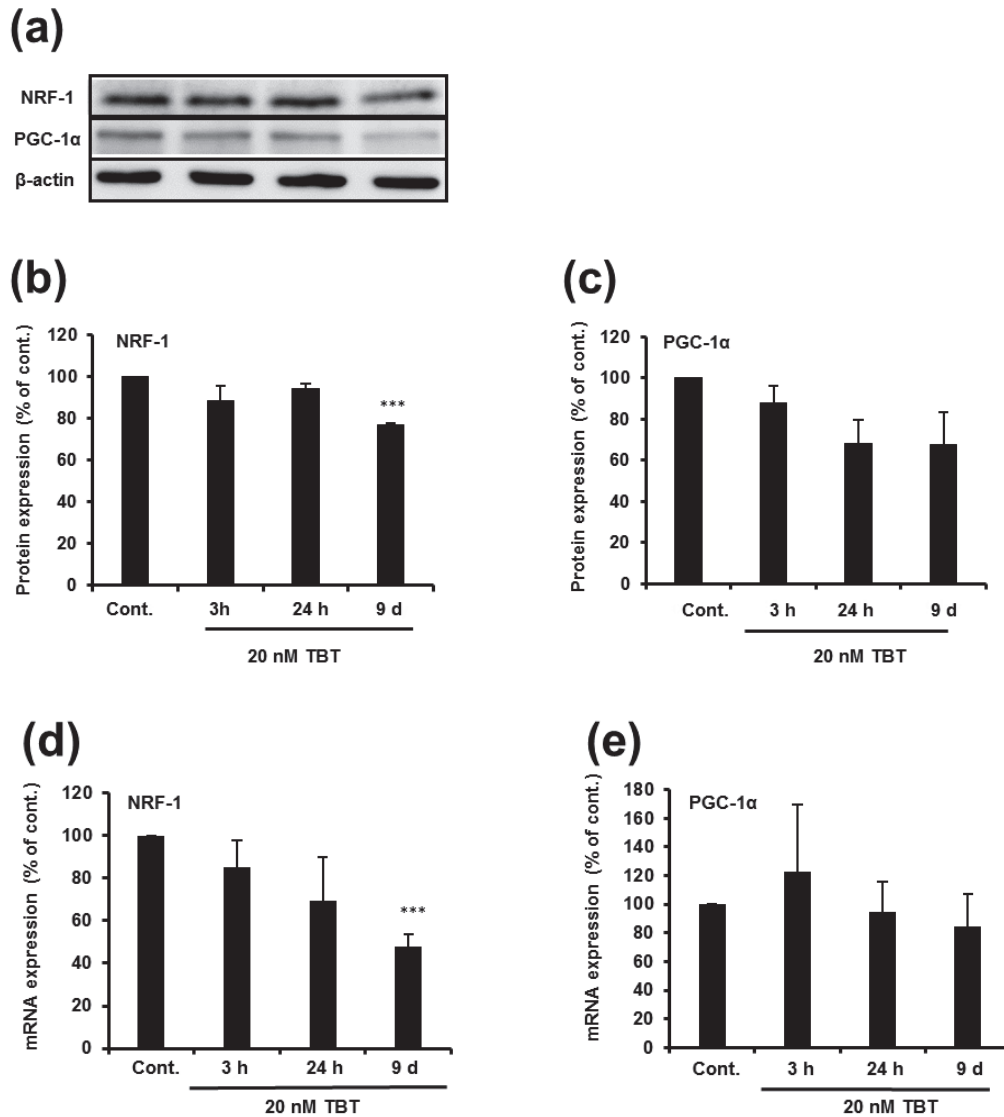


Figure 10. Effect of TBT on NRF-1 and PGC-1α expression.

(a) Cortical neurons were exposed to DMSO or 20 nM TBT for various times, then NRF-1 and PGC-1α protein expression was detected by western blotting. Quantitative analysis of the NRF-1 (b) and PGC-1α (c) protein expression was performed using Image J software, and protein levels were corrected based on β-actin protein levels. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 3$). *** $p < 0.001$ vs. control (Student's t -test). Cortical neurons were exposed to DMSO or 20 nM TBT for various times, and then NRF-1 (d) and PGC-1α (e) mRNA expression was measured by real-time PCR. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 4$). *** $p < 0.001$ vs. control (Student's t -test).

第 7 節 TBT による NRF-1, PGC-1 α 核発現量に対する影響

細胞質で合成された転写因子は核内に移行し下流遺伝子の発現調節を行うため、NRF-1 活性低下の一因として核移行の低下が考えられる。そこで大脳皮質初代培養神経細胞に 20 nM TBT を各時間曝露し、核画分と細胞質画分の NRF-1 および PGC-1 α 発現量を評価したところ、核・細胞質発現量の比はいずれも TBT 曝露によって変動しなかった (Fig. 11a, 11b)。

以上の結果より、TBT 曝露による NRF-1 阻害メカニズムに NRF-1 および PGC-1 α の核移行変動は関与していないことが示唆された。

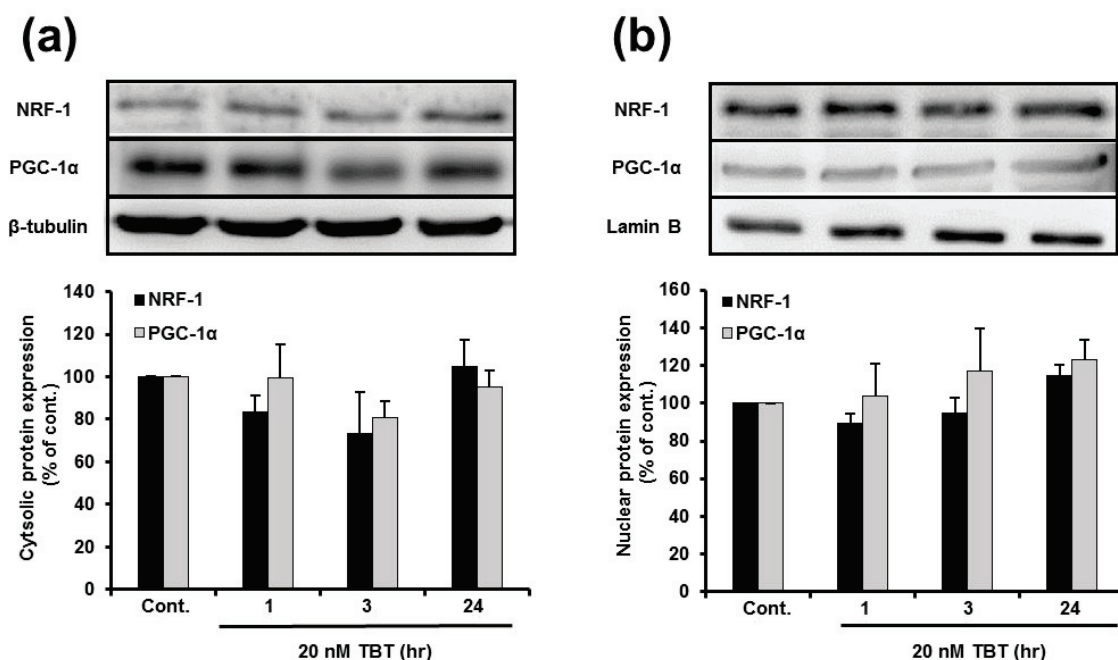


Figure 11. Effect of TBT on NRF-1 and PGC-1 α nuclear translocation.

Cytosolic proteins (a) and nuclear proteins (b) were extracted from DMSO- or TBT-treated cortical neurons, and then NRF-1 and PGC-1 α protein expression was detected by western blotting. Quantitative analysis was performed using Image J software, and the protein levels were corrected based on the β -tubulin and Lamin B protein levels. The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n = 3).

第 8 節 TBT による NRF-1 二量体形成に対する影響

NRF-1 はホモ二量体を形成することで DNA に対する結合能をもつ (Gugneja et al., 1997)。そこで、TBT 曝露による NRF-1 二量体形成に対する影響を評価するために、遺伝子導入効率の高い HEK293T 細胞を使用した。HEK293T 細胞に green fluorescent protein (GFP)-hemagglutinin (HA) タグを融合した NRF-1 と HA タグを融合した NRF-1 を共発現させた後、20 nM TBT を 3 時間曝露後の GFP-HA-NRF-1 と HA-NRF-1 の複合体形成量を評価した。その結果、TBT 曝露による NRF-1 二量体形成の阻害が認められた (Fig. 12)。

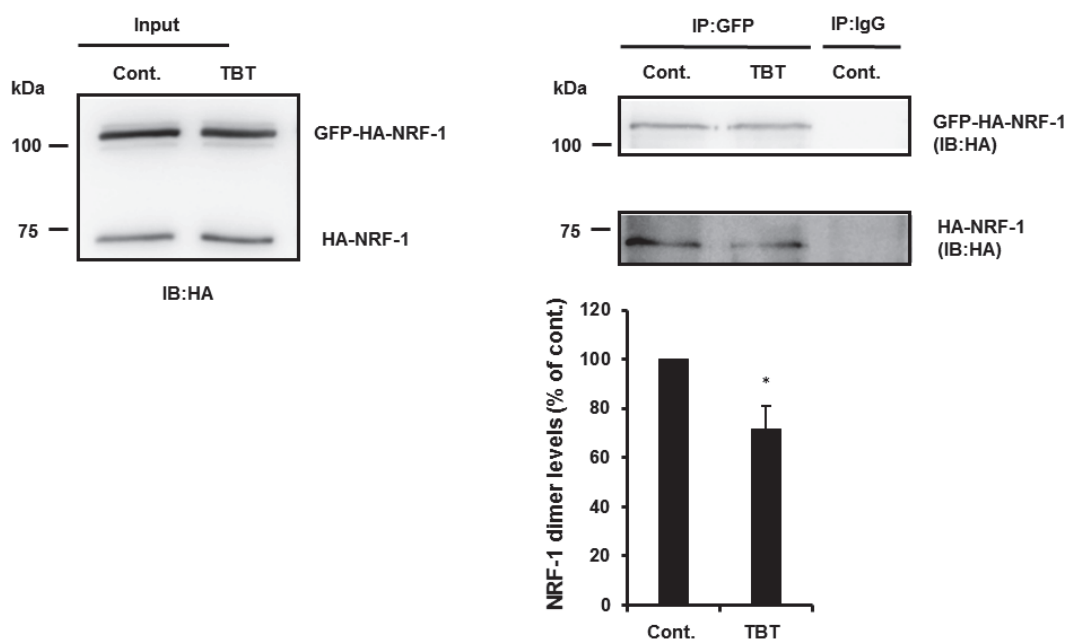


Figure 12. Effect of TBT on NRF-1 homo-dimerization.

HEK 293T cells, co-expressing GFP-HA-tagged NRF-1 (GFP-HA-NRF-1) and HA-tagged NRF-1 (HA-NRF-1), were exposed to 20 nM TBT for 3 h, and total cell extracts were prepared. Crude proteins were immunoprecipitated with anti-GFP antibody and normal mouse IgG antibody (negative control), and western blotting was performed using anti-HA antibody. The immunoprecipitated HA-NRF-1 levels were corrected relative to the immunoprecipitated GFP-HA-NRF-1 levels. The data are expressed as mean + S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0.05$ vs. control (Student's t -test)

第 9 節 小括および考察

第 2 章では主にラット大脳皮質初代培養神経細胞を用いて低濃度 (20 nM) TBT による GluR2 発現量減少メカニズムの解明を目的に検討を行った。まず、第 2 節において TBT 曝露による神経細胞への毒性影響を検討したところ、TBT を長期曝露した神経細胞ではコントロールの細胞と比較して、グルタミン酸添加時に神経細胞死の増強が認められた。これは我々のグループが以前報告した結果 (Nakatsu et al., 2009) と一致するものである。

第 3 節では 20 nM TBT 曝露により GluR2 発現量低下が細胞全体に加えて細胞膜上においても認められた。GluR2 を含まない AMPA 受容体は高い Ca^{2+} 透過性を示すことが知られており、TBT 曝露により GluR2 発現量が低下したことで神経細胞のグルタミン酸刺激に対する脆弱性が亢進したと考えられる。また、GluR2 タンパク質発現量の低下は TBT 曝露 3 日後から認められるのに対し、GluR2 mRNA 発現量の低下は TBT 曝露 3 時間後から認められた。GluR2 タンパク質の半減期はおよそ 5-7 日程度という報告があり (Kjøller et al., 2000)、mRNA と タンパク質で発現量が低下する時間に誤差が認められるのは GluR2 タンパク質の半減期の長さ起因すると考えられる。

GluR2 発現低下による神経細胞の脆弱化は、ノックダウン (K.D.) またはノックアウト (K.O.) の研究から明らかになっている。アンチセンスにより GluR2 を K.D. させたラットは海馬 CA1 及び CA3 領域において通常のラットに比べ死細胞が増加することがトルイジンブルー染色により確認されており (Oguro et al., 1999)、さらにその細胞死は NAS や CNQX の投与により減少することから、GluR2 K.D. による神経細胞死は Ca^{2+} 透過性をもつ GluR2 不含 AMPA 受容体によるものだと推測できる。さらに GluR2 をノックダウンした神経細胞はカイニン酸 (グルタミン酸受容体アゴニスト) が引き起こす神経細胞死を増強させることや、通常状態では影響を与えない程度の弱い虚血状態でも神経細胞死を引き起こすことが知られている (Friedman and Velísková, 1998; Friedman et al., 2003; Oguro et al., 1999)。さらに通常のマウスに比べ GluR2 K.O. マウスは新奇探索行動の減少や運動協調性の低下などの行動異常、自発運動量の低下、記憶障害を示すことが報告されている (Jia et al., 1996; Mead et al., 2005; Mead et al., 2006)。これらの報告からも GluR2 発現量低下は細胞レベルから個体レベルまで神経細胞にダメージを与えることは明らかである。

第 4 節から TBT が NRF-1 の GluR2 プロモーターに対する結合を阻害するこ

とが明らかとなった。一方、Sp1 と REST の DNA に対する結合活性は TBT 曝露による影響を受けなかった。Sp1 はハウスキーピング遺伝子の転写調節などに関わる一般的な転写因子であり (Wierstra, 2008)、GluR2 以外の他の AMPA 受容体サブユニットの発現量も調節することが知られている (Borges et al., 2001; Borges et al., 2003)。また、REST は GluR2 を含む多くの神経特異的遺伝子を負に制御する転写抑制因子であり (Myers et al., 1998; Schoenherr et al., 1995)、脳虚血などにより誘導され、GluR2 の発現変化や転写活性の変動を引き起こすとされている (Calderone et al., 2003)。NRF-1 は GluR2 に加えて cyt.c、COX、NMDA 受容体サブユニット 1 (NR1) の発現を正に制御することが示唆されている (Dhar et al., 2009b)。第 5 節において TBT 曝露により cyt.c、COX4、COX6c の発現量の低下が認められたことや、過去の報告において TBT 曝露によるラット大脳皮質神経細胞の NR1 の発現量低下が報告されていることから (Nakatsu et al., 2009)、TBT は NRF-1 を阻害している可能性が高いと考えられる。また、TBT 曝露により細胞内 ATP 量はわずかではあるが有意に低下した。これまでに TBT はミトコンドリアの機能を阻害することで細胞内 ATP 量を低下させることが既に報告されているが、それらの研究で用いられている TBT の濃度は細胞死が引き起こされる程度の高い濃度である (Stridh et al., 1999; Von Ballmoos et al., 2004)。一方、本研究で明らかにした細胞死を伴わない低濃度の TBT によるマイルドな細胞内 ATP 量の低下は、その原因の一つとして NRF-1 の阻害が関与していると考えられる。

第 6 節、第 7 節、第 8 節では TBT による NRF-1 阻害メカニズムの詳細な検討を行った。第 6 節の結果から TBT 9 日間曝露により NRF-1 mRNA およびタンパク質の発現減少が認められた。一方、第 7 節の結果から NRF-1 の核移行は TBT 曝露により変動しなかったものの、第 8 節の結果から HEK293T 発現システムにおいて NRF-1 の二量体形成が TBT 3 時間曝露により阻害されることが明らかとなった。二量体形成阻害が実際に神経細胞においても認められるか否かについて検討する必要があるが、NRF-1 は神経細胞以外の細胞においても発現するためその活性化機構が組織ごとに差が無いと仮定すると、今回得られた結果は神経細胞に対しても外挿できると考えられる。以上のことから、TBT 曝露による NRF-1 阻害メカニズムには短時間で起きる二量体形成量の低下と、長期的な NRF-1 発現量の低下の両方が関与していることが示唆される。また、NRF-1 の活性化機構については数報の研究により明らかになっている。Izumi らは酪酸ナトリウムが p300/CBP 関連因子を介して NRF-1 のアセチル

化を亢進し、NRF-1 核内発現量を変化させることなく N-acetylgalactosaminyltransferase-3 遺伝子のプロモーターを活性化することを報告している (Izumi et al., 2003)。さらに NRF-1 の N 末端側のリン酸化は DNA 結合活性に重要であることが DNA との *in vitro* binding assay により明らかになっている (Gugneja et al., 1997)。一方、サイクリン D1 依存性キナーゼは、NRF-1 の 47 番セリン残基をリン酸化し、NRF-1 依存的な機能を抑制することが報告されている (Wang et al., 2006)。したがって、TBT はサイクリン D1 依存性キナーゼのようなキナーゼに作用して NRF-1 のリン酸化レベルに影響を与えることで NRF-1 を阻害している可能性も考えられる。また、第 6 節、第 7 節の結果では PGC-1 α の発現量および核移行は TBT 曝露による影響を受けなかったが、PGC-1 α は NRF-1 と結合することで転写共役因子として働くため、TBT が NRF-1 と PGC-1 α の複合体形成を阻害している可能性は考えられる。さらなる研究により、TBT 曝露による NRF-1 タンパク質の翻訳後修飾の変動や PGC-1 α を含む転写複合体形成量の変動を明らかにすることで、TBT による詳細な毒性メカニズムを明らかにできるかもしれない。また、NRF-1 の活性に影響を与える因子は上記のように一部は明らかになっているものの、全貌は不明なままである。NRF-1 の活性を調節するシステムを明らかにすることができれば、NRF-1 阻害を介した TBT 毒性の全貌解明の手がかりになることが期待される。

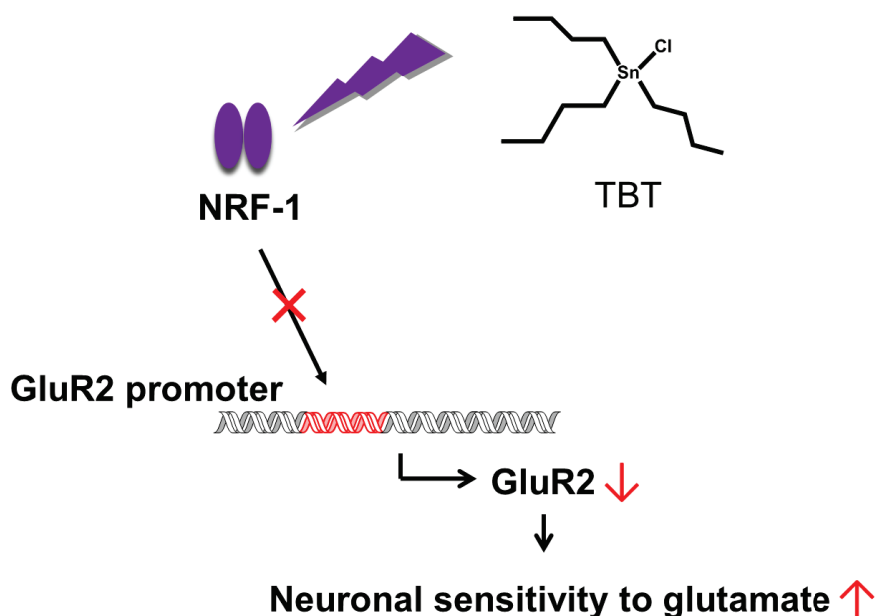


Figure 13. Schematic representation of the proposed mechanism by which TBT induces neurotoxicity via NRF-1 inhibition in primary cortical neurons.

第 3 章 NRF-1 の毒性学的機能解析

第 1 節 緒言

第 2 章より低濃度の TBT が NRF-1 の転写活性を阻害し、GluR2 発現量を減少することで神経細胞の脆弱化を引き起こすことが明らかとなった。TBT の毒性研究をさらに発展させるために次に取り組むべき課題として、NRF-1 機能が低下した際に GluR2 発現低下以外に誘発される毒性影響を明らかにすることが挙げられる (Fig. 14)。NRF-1 は 503 のアミノ酸からなり、その最適な結合配列 (NRE) は (T/C)GCGCA(C/A)GCGC(A/G) という極めて GC-rich な回文配列である (Fig. 15) (Virbasius et al., 1993; Scarpulla, 2008)。NRF-1 は *cyt.c* および COX のプロモーターに対する転写制御因子として最初に同定され (Evans and Scarpulla, 1989; Evans and Scarpulla, 1990; Chau et al., 1992)、その後も呼吸鎖 III, IV, V のサブユニットをコードする遺伝子の少なくとも一つ以上や mitochondrial transcription factor A (TFAM) (Virbasius and Scarpulla, 1991) といった核でコードされるミトコンドリアの構成因子の多くのプロモーター上に NRE があることが次第に明らかになっていった。Tong らは約 11,000 種類のヒトプロモーターを解析したところ、916 種類のプロモーターにおいて高スコアの NRE 配列が存在し、そのうち -200~+100 の間のプロモーター領域に存在し且つヒトとマウスで保存されているものとして 74 種類のプロモーターを絞り込んだ (Tong et al., 2013)。これらの解析から、エネルギー産生・細胞周期・神経突起伸展等、幅広い種類の遺伝子のプロモーターにおいて NRE が存在することが推測される。したがって、TBT による NRF-1 活性低下は GluR2 に加えてこれらの遺伝子の発現量にも影響し、関連する毒性を引き起こすことが予想される。しかしながら、NRF-1 に関して調べた研究の大部分が、NRF-1 と下流遺伝子のプロモーター領域との結合の有無を評価したものであり、実際に NRF-1 が細胞内のどのような生理機能を担っているかに関してはほとんど明らかになっていない。タンパク質の生体内における生理機能を明らかにするためにはその遺伝子を欠損させたマウス (K.O. マウス) を解析することが定石であるが、NRF-1 K.O. マウスは胎生致死であり (Huo and Scarpulla, 2001)、このことが NRF-1 の機能解析がほとんど進んでいなかった要因の一つと考えられる。第 3 章では NRF-1 の機能解析を行うことで、NRF-1 機能が低下した際の毒性影響の解明を試みた。

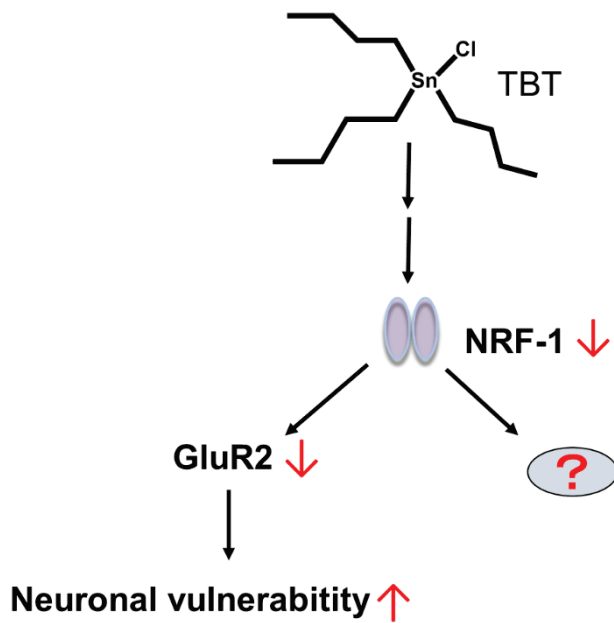


Figure 14. Scheme for further clarification of TBT toxicity.

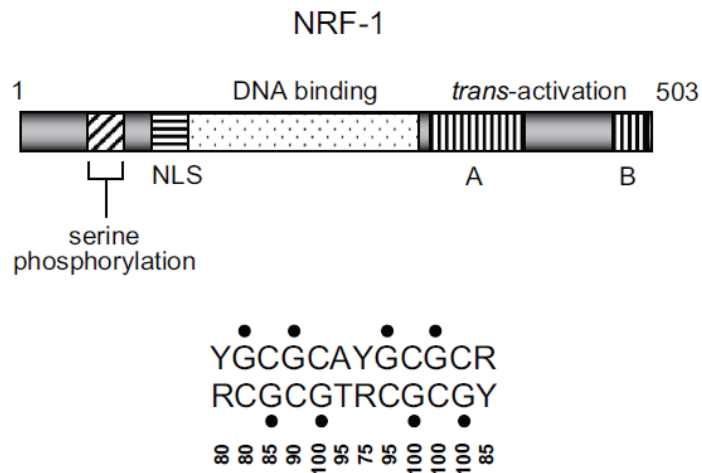


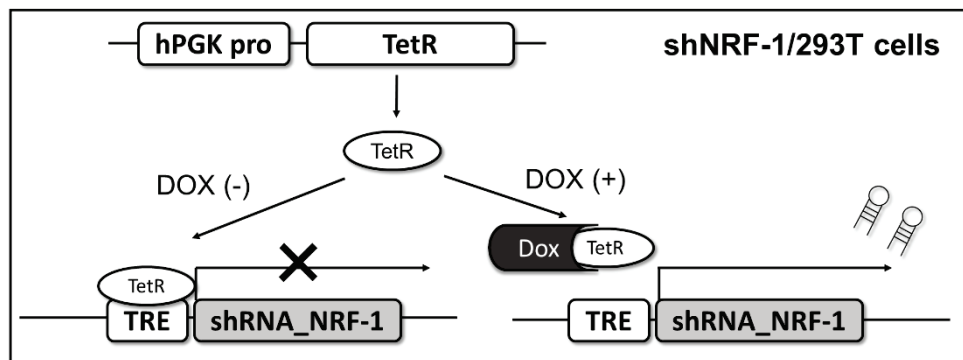
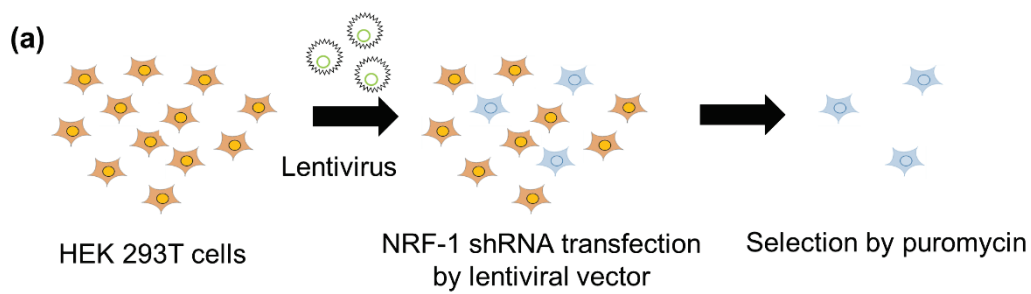
Figure 15. Summary of NRF-1 functional domains and DNA recognition site (Scarpulla, 2008).

NRF-1 has a central DNA binding domain flanked by a nuclear localization signal (NLS) and a bipartite transcriptional activation domain. The protein is phosphorylated in exponentially growing cells at multiple serine residues within a concise NH₂-terminal domain (cross-hatched box). NRF-1 binds a GC-rich palindrome (shown below the diagram) as a homodimer and makes guanine nucleotide contacts (filled circles) over a single turn of the DNA helix.

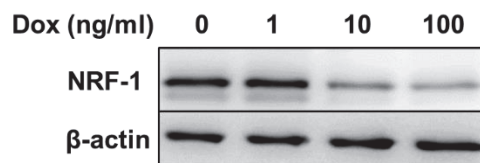
第 2 節 Tet-inducible NRF-1 ノックダウン細胞株の作製

まず、NRF-1 の機能解析を行うために、NRF-1 発現量が低下した細胞株の作製を目指し、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による HEK 293T 細胞をベースにした NRF-1 ノックアウト (K.O.) 細胞の作製を試みた。しかしながら、設計した gRNA は高いゲノム編集効率を示したにも関わらず、取得した細胞は全て片アレルのみに変異が入ったヘテロ K.O. 細胞であり、ホモ K.O. 細胞を取得することができなかった (data not shown)。最近の別グループの論文においてもデータ未公表ながら、HEK 293T 細胞をベースにした NRF-1 K.O. 細胞の取得ができなかったことが記述されており (Wang et al., 2017)、NRF-1 K.O. は動物個体レベルのみならず細胞レベルにおいても致死となる可能性が高いと考えられる。

NRF-1 K.O. 細胞を作製することができなかったため、次に Tetracycline (Tet) 誘導性 NRF-1 K.D. 細胞株の作製を試みた。Tet 誘導性 shRNA_NRF-1 のコンストラクトをレンチウイルスベクターを用いて HEK293T 細胞のゲノム DNA 上に導入した。その後選択マーカーであるピューロマイシンによりコンストラクトが導入された細胞をセレクションし、シングルセルクローニングを行うことで最も K.D. 効率の高いクローンを選別した (Fig. 16a)。その結果、Tet 系薬物である Doxycycline (Dox) の添加濃度および時間依存的に NRF-1 が K.D. される細胞を取得できた。100 ng/ml Dox 120 時間添加後に最も高い K.D. 効率を示し、この細胞を shNRF-1/293T 細胞とした (Fig. 16b, 16c)。



(b)



(c)

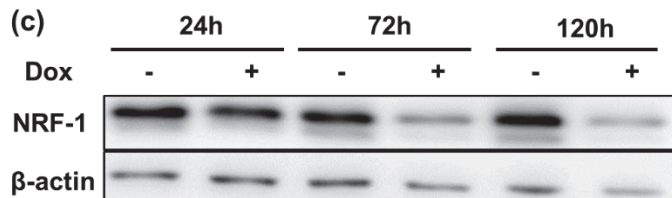


Figure 16. Construction of Dox inducible NRF-1 K.D. system.

(a) Schematic diagram of Dox inducible NRF-1 K.D. system. (b) NRF-1 expression was detected by western blotting after 1, 10, 100 ng/ml Dox treatment for 72 h. (c) NRF-1 expression was detected by western blotting after 100 ng/ml Dox treatment for 24, 72, 120 h.

第 3 節 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム形態への影響

まず、NRF-1 機能低下による毒性影響を明らかにするために、NRF-1 K.D. のオルガネラの形態を注意深く観察した。その結果、酸性オルガネラを特異的に認識するプローブである LysoTracker を添加した際に、NRF-1 K.D. によりリソソーム数の増加傾向が認められた (Fig. 17)。

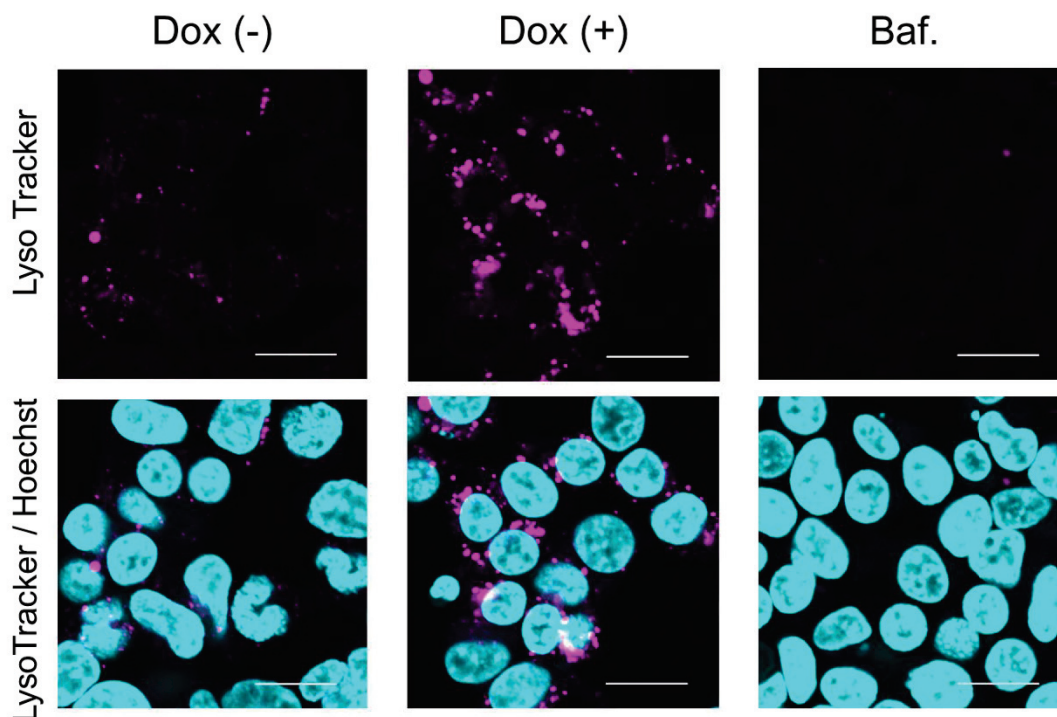
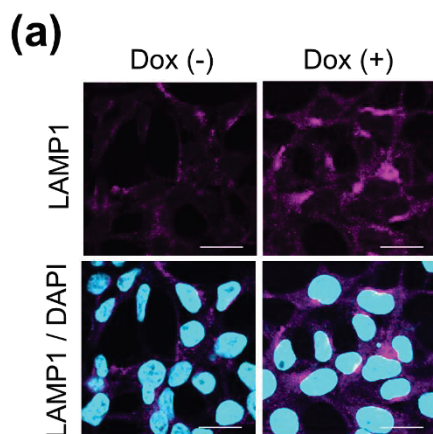


Figure 17. The number of lysosomes in NRF-1 K.D. cells.

shNRF-1/293T cells were treated with 100 ng/ml Dox for 120 h, and lysosomal density was evaluated using LysoTracker Red DND-99 (Magenta). Nuclei was stained with Hoechst 34580 (Cyan). Bafilomycin A1 (Baf.) was used as lysosomal inhibitor. Scale bar: 20 μ m.

第 4 節 NRF-1 ノックダウンによる LAMP1 タンパク質発現への影響

Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) はリソソーム膜タンパク質であり、リソソームの形態を観察するためのマーカーとしてしばしば用いられる。NRF-1 K.D. のリソソームに対する影響を詳細に検討するため、LAMP1 タンパク質発現量を免疫染色およびウエスタンブロッティングにより評価した。免疫染色の結果、NRF-1 K.D. により LAMP1 タンパク質の発現上昇が認められ (Fig. 18a)、ウエスタンブロッティングにおいても NRF-1 K.D. 72 時間後から LAMP1 タンパク質発現上昇認められた (Fig. 18b)。一方、ネガティブコントロールである scramble shRNA を発現する細胞 (sh-scram/293T 細胞) においては、Dox の有無に関わらず NRF-1 および LAMP1 のタンパク質発現量に変動は認められなかった (Fig. 18c)。



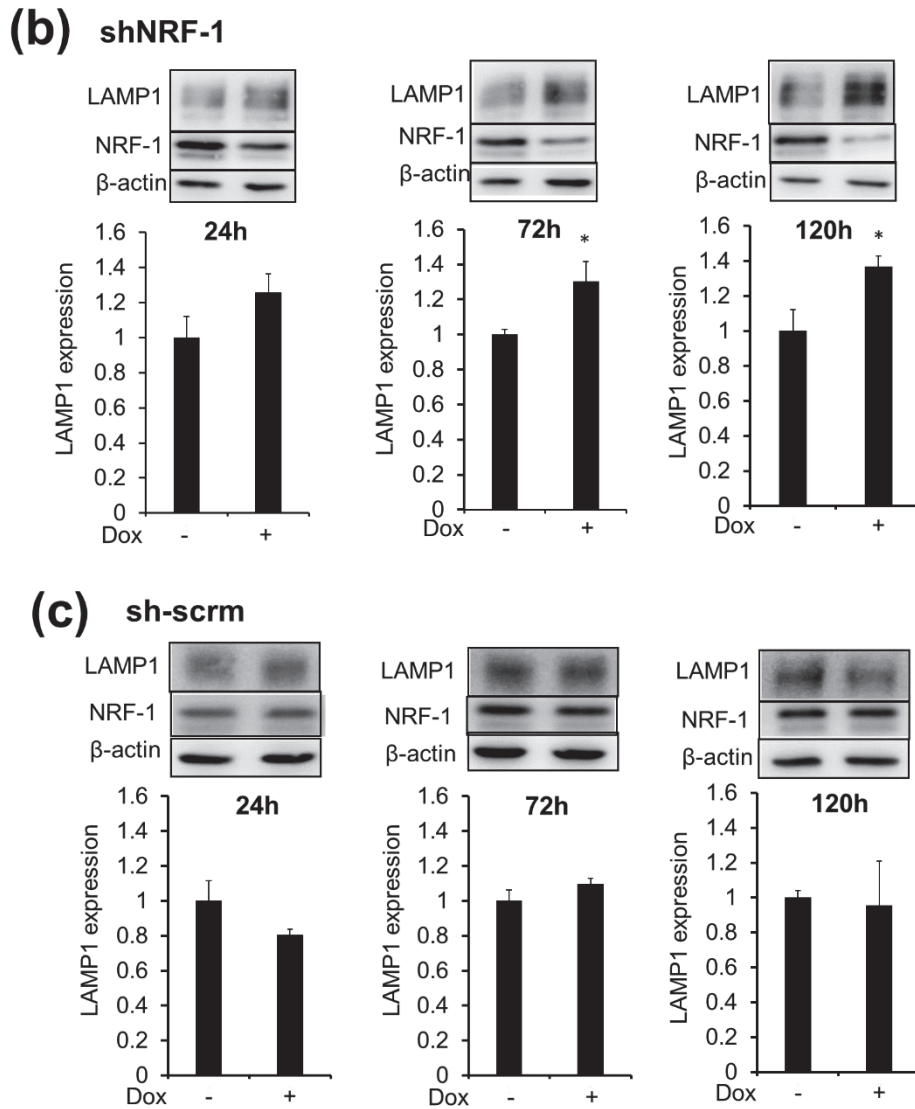


Figure 18. LAMP1 protein expression in NRF-1 K.D. cells.

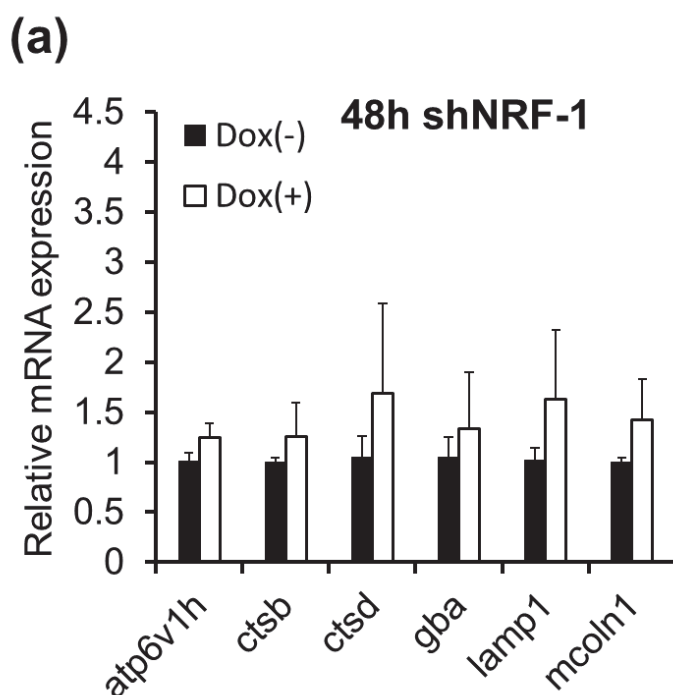
(a) shNRF-1/293T cells were treated with 100 ng/ml Dox for 120 h, and then immunostaining was performed using a rabbit anti-LAMP1 antibody (Magenta). 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) is used for nuclear staining (Cyan). Scale bar: 20 μ m. shNRF-1/293T cells (b) and sh-scrn/293T cells (c) were treated with 100 ng/ml Dox for 24, 72, 120 h, and then LAMP1 and NRF-1 protein expression was detected by western blotting. Quantitative analysis was performed using Image J software, and the LAMP1 protein levels were corrected based on the β -actin protein levels. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs. control (Student's t -test).

第 5 節 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム関連遺伝子発現量

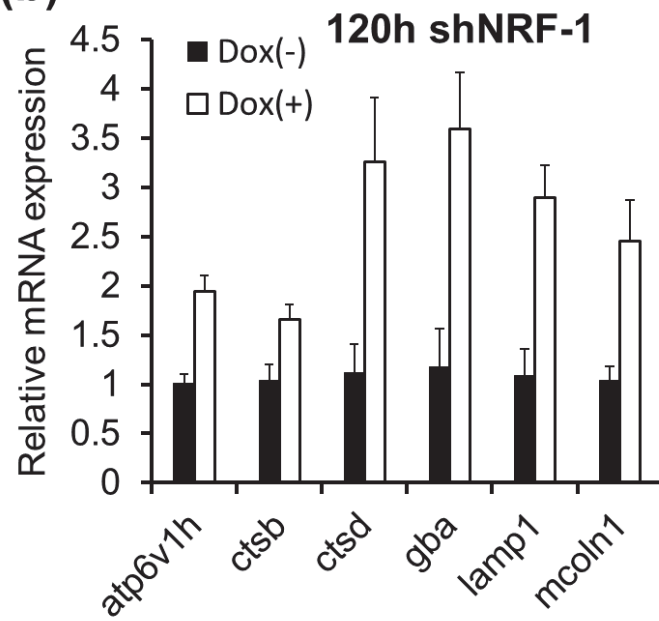
に対する影響

次に LAMP1 タンパク質発現上昇が転写誘導によるものか否かを明らかにするため、*lamp1* に加えてリソソーム関連遺伝子である *atp6v1h* (リソソーム膜上プロトンポンプ)、*ctsb*、*ctsd*、*gba* (リソソーム内加水分解酵素)、*mcoln1* (リソソーム膜タンパク質) の mRNA 発現量を評価した。その結果、NRF-1 の K.D. 48 時間後からリソソーム関連遺伝子発現の上昇傾向が認められ (Fig. 19a)、120 時間後において顕著な発現上昇が引き起こされた (Fig. 19b)。このことから、NRF-1 K.D. によりリソソーム関連遺伝子の mRNA 発現量が軒並み上昇することが明らかとなった。

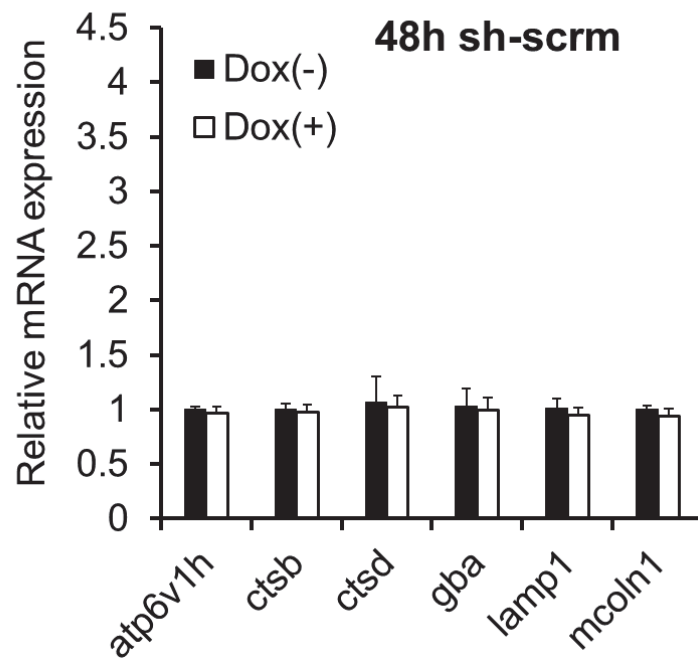
一方、ネガティブコントロールである sh-scrn/293T 細胞 においては、Dox の有無に関わらずリソソーム関連遺伝子の mRNA 発現量に変動は認められなかった (Fig. 19c, 19d)。



(b)



(c)



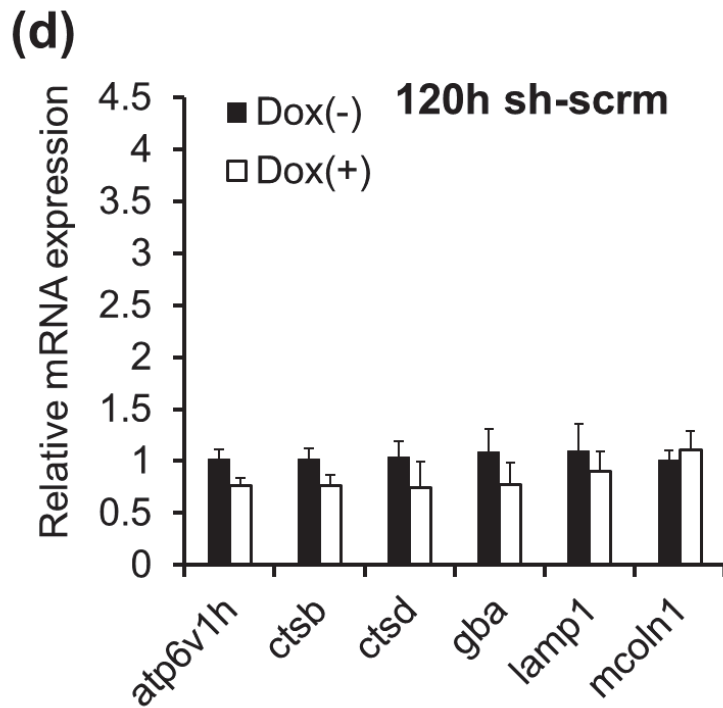


Figure 19. Lysosomal gene expression in NRF-1 K.D. cells.

shNRF-1/293T cells (a, b) and sh-scrn/293T cells (c, d) were treated with 100 ng/ml Dox for 48 h, 120 h, and then *atp6v1h*, *ctsb*, *ctsd*, *gba*, *lamp1*, and *mcoln1* mRNA expression was measured by real time PCR. The data are expressed as the mean + S.E.M. ($n = 4$).

第 6 節 NRF-1 ノックダウンによる MiT ファミリーに対する影響

リソソームを構成する膜タンパク質や加水分解酵素などをコードする遺伝子の多くはそのプロモーター上に 10 bp の GTCACGTGAC という回文配列をもつ。この配列は coordinated lysosomal expression and regulation (CLEAR) 配列と呼ばれ、リソソームの生合成に重要な役割を果たすことが知られている。CLEAR 配列は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (basic helix-loop-helix; bHLH) 転写因子である microphthalmia transcription factor (MiT) ファミリーによって認識される。MiT ファミリーは transcription factor EB (TFEB)、transcription factor E3 (TFE3)、melanogenesis associated transcription factor (MITF)、transcription factor EC (TFEC) の 4 種類が知られており、TFEB はリソソーム生合成の制御因子として最初に同定された MiT ファミリーである (Sardiello et al., 2009)。その後、TFE3 および MITF も CLEAR 配列を介してリソソーム生合成に関与していることが示唆されている (Martina et al., 2014; Ploper et al., 2014)。MiT ファミリーが転写因子として機能するためのメカニズムの一つに核移行が知られている。したがって、NRF-1 K.D. によるリソソーム関連遺伝子の発現上昇に MiT ファミリーの核移行促進が関与している可能性が考えられる。そこで TFEB、TFE3、MITF の核移行を評価したところ、NRF-1 K.D. によるそれらの核移行の促進は認められなかった (Fig. 20)。

以上の結果より、NRF-1 K.D. によるリソソーム関連遺伝子発現上昇に、MiT ファミリーの核移行促進は関与していないことが明らかとなった。

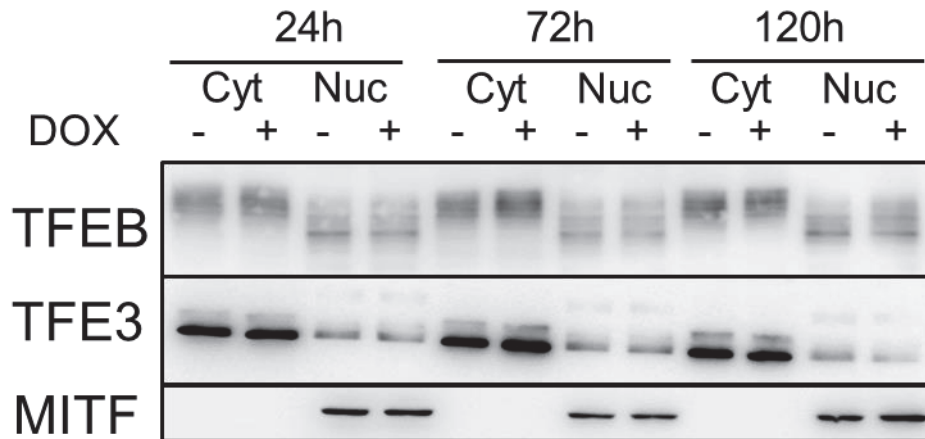


Figure 20. Nuclear translocation of TFEB, TFE3, and MITF in NRF-1 K.D. cells. shNRF-1/293T cells were treated with 100 ng/ml Dox for 24, 72, 120 h, and then TFEB, TFE3, and MITF protein expression in nuclei and cytosol was detected by western blotting.

第 7 節 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム活性へ影響

リソソームは生体高分子をバルク分解するオルガネラであり、半減期の長い長命タンパク質の分解に関与するとされている。細胞内で合成されたタンパク質の一部はリソソームに取り込まれ、アミノ酸レベルまで分解された後、細胞内で再利用されるかエクソサイトーシスにより細胞外へ放出される (Fig. 21)。リソソームを介して分解されるタンパク質は一般的に半減期が長く、それらの長命タンパク質の分解効率を調べることでリソソームの活性を算出することができる。そこで、NRF-1 K.D. によるリソソーム活性への影響を評価したところ、NRF-1 K.D. 24 時間後からリソソーム活性の低下傾向が認められ、72 時間、120 時間後においては顕著なリソソーム活性の低下が認められた (Fig. 22)。

以上の結果から、NRF-1 K.D. によりリソソーム活性の低下が引き起こされることが明らかとなった。

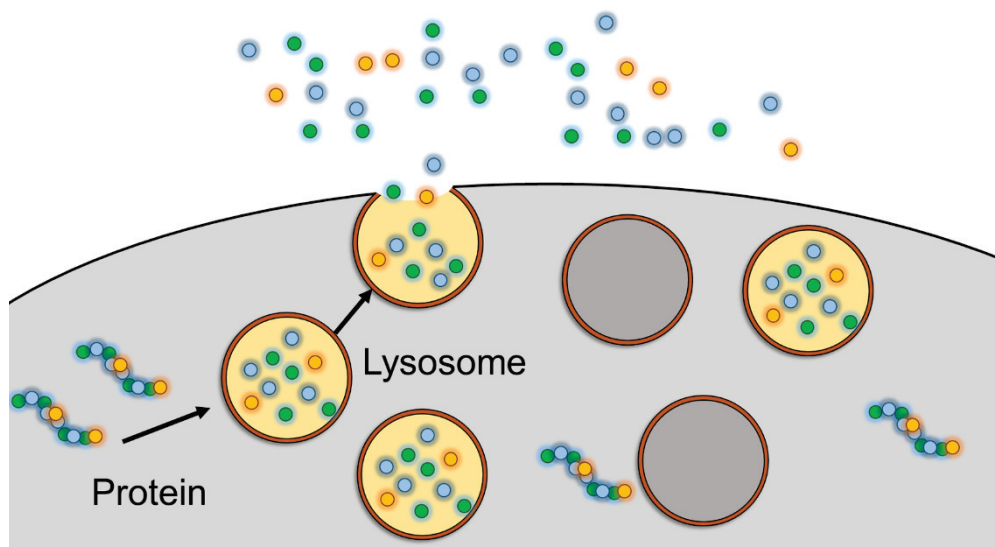


Figure 21. Protein degradation by lysosome system.

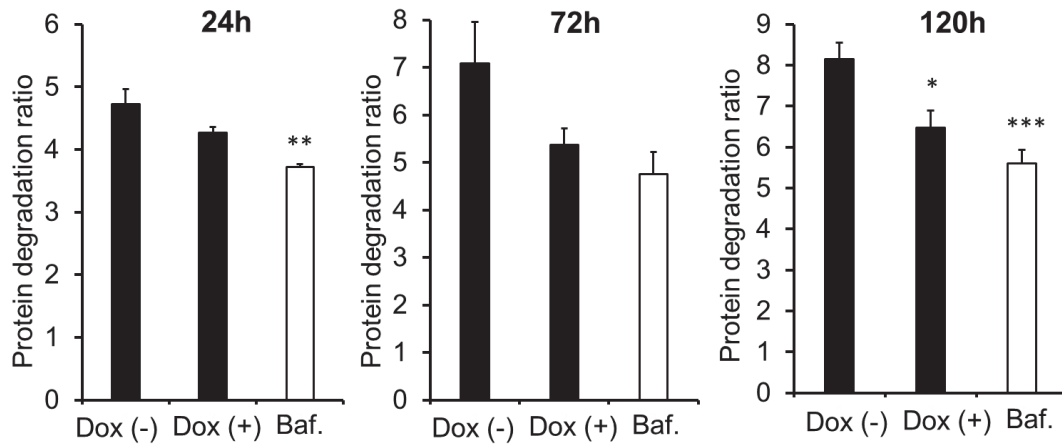


Figure 22. Lysosomal activity in NRF-1 K.D. cells.

shNRF-1 cells were treated with 100 ng/ml Dox for 24 h, 72 h, and 120 h, and then the degradation ratio of [¹⁴C]-valine-labeled long-lived proteins were measured. Bafilomycin A1 (Baf.) was used as lysosomal inhibitor. The data are expressed as mean + S.E.M. (n=4-6). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (Tukey's test).

第 8 節 大脳皮質初代神経細胞における TBT 曝露による LAMP1

発現への影響

これまでの結果から、NRF-1 を K.D. することでリソソーム関連遺伝子の発現上昇およびリソソームの活性低下が認められた。このことから、TBT は NRF-1 を阻害することでリソソームに対して上記影響を与えている可能性が考えられる。そこで、ラット大脳皮質初代神経細胞の LAMP1 発現量を免疫染色により評価したところ、20 nM TBT 曝露により LAMP1 発現量の上昇が認められた (Fig. 23)。

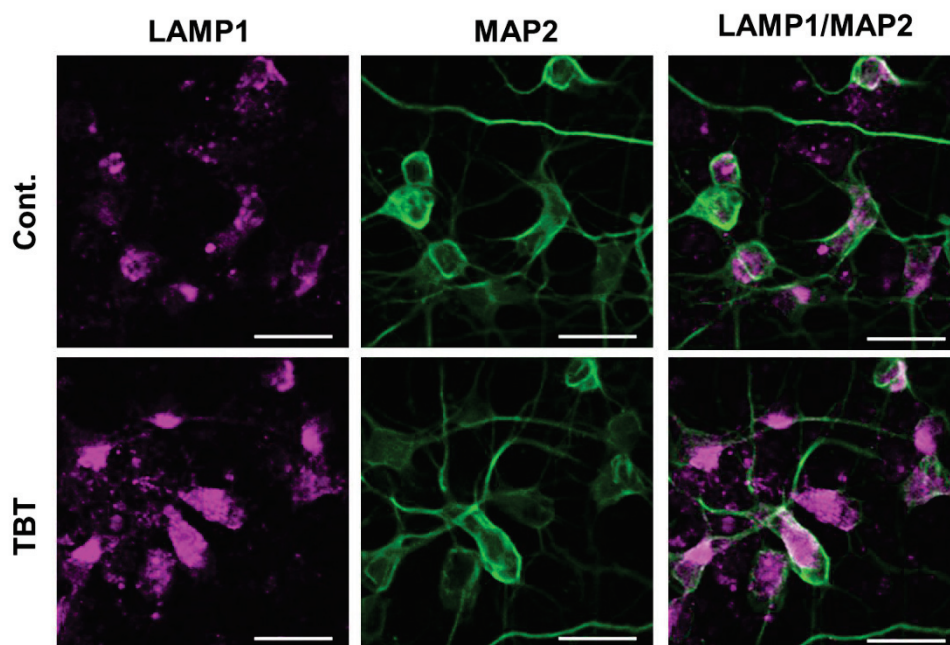


Figure 23. Effect of TBT on LAMP1 expression in primary neurons.

Cortical neurons were exposed to 20 nM TBT for 7 days and immunostaining was performed using LAMP1 (magenta) and microtubule associated protein 2 (MAP2: a neuronal marker) (green). Scale bar: 20 μ m.

第 9 節 小括および考察

第 3 章では NRF-1 機能低下による毒性影響を明らかにすることを目的とし、Tet-inducible NRF-1 K.D. 細胞株 (shNRF-1/293T 細胞) を作製して NRF-1 機能解析を行った。shNRF-1/293T 細胞のオルガネラ形態を観察したところ、第 3 節で NRF-1 K.D. によりリソソーム数が増加することが明らかとなり、第 4 節でリソソーム膜タンパク質である LAMP1 の発現が増加することが明らかとなった。これらの結果から、NRF-1 K.D. はリソソームの生合成を誘導していると考えられる。また、第 5 節の結果から NRF-1 K.D. により *lamp1* mRNA 発現量の増加も認められたことから、LAMP1 発現上昇は転写レベルで引き起こされることが示唆される。また、NRF-1 K.D. により *lamp1* のみならず、他のリソソーム関連遺伝子の mRNA 発現量も上昇することが明らかとなった。

リソソームはエンドサイトーシスやオートファジーによって取り込まれたタンパク質やオルガネラを加水分解するオルガネラである。オートファジーには、マクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー、ミクロオートファジーの 3 種類が存在する。最も一般的な機構であるマクロオートファジーのメカニズムは、まず細胞質に隔離膜という脂質二重膜が出現し、隔離膜が細胞質成分を取り囲むことでオートファゴソームを形成する。オートファゴソームはリソソームと融合し、オートリソソームを形成することで最終的にリソソーム内加水分解酵素により細胞質成分を分解する。シャペロン介在性オートファジーはオートファゴソーム形成を介さないオートファジーであり、Hsc70 シャペロンタンパク質が KFERQ 様モチーフを持つタンパク質を認識してその高次構造をほどこき、そのタンパク質は LAMP2A を介してリソソームに取り込まれる。ミクロオートファジーもオートファゴソームを介さない機構であり、リソソーム膜の内部陥入により小分子を直接リソソーム内に取りこむ。いずれの機構も最終的にリソソームにおいて生体高分子の分解が行われる。

近年、オートファジー機構の解明を目的にリソソーム関連遺伝子の発現調節機構がいくつかの研究により明らかになっている。Sardiello らは 96 種類のリソソーム関連遺伝子のプロモーターを解析したところ、68 種類のプロモーター上に CLEAR 配列が存在することを見出した (Sardiello et al., 2009)。CLEAR 配列は bHLH 転写因子のターゲット配列の一部と一致するため、Sardiello らはさらに bHLH 転写因子であり MiT ファミリーの TFEB を HeLa 細胞に過剰発現して 23 種類の遺伝子発現量を評価したところ、22 遺伝子の発現上昇が認められた。このことから、TFEB がリソソ

ーム関連遺伝子のマスターレギュレーターであることが示唆され、その後の研究から TFEB の活性化機構が明らかになりつつある。通常状態において TFEB は mammalian target of rapamycin (mTOR) によってリン酸化され、細胞質に局在している。細胞が飢餓状態となった場合、TFEB のリン酸化状態は解除されて核に移行することで、リソソームやオートファジーの関連遺伝子を誘導する (Settembre et al., 2012; Martina et al., 2013; Roczniak-Ferguson et al., 2012)。さらに、TFE3 および MITF も核移行することで CLEAR 配列を介してリソソーム生合成に関与していることが示唆されている (Martina et al., 2014; Ploper et al., 2014)。第 6 節において、NRF-1 K.D. による TFEB、TFE3、MITF の核移行の顕著な変化は認められなかったものの、リソソーム関連遺伝子の発現上昇の原因の一つとして、MiT ファミリーとリソソーム関連遺伝子プロモーターの直接の結合が低下している可能性が考えられる。また、zinc finger ファミリー DNA 結合タンパク質である ZKSCAN3 (ZNF306) は転写抑制因子であり、リソソーム関連遺伝子を負に制御する。細胞が飢餓状態になると、ZKSCAN3 は核から細胞質に移行し、プロモーターの抑制を解除することでリソソーム関連遺伝子を誘導することが報告されている (Chauhan et al., 2013; Li et al., 2016)。したがって、NRF-1 K.D. によって認められたリソソーム関連遺伝子発現上昇も転写抑制因子が関与している可能性も考えられる。

NRF-1 K.D. によりリソソーム関連遺伝子の発現が上昇することから、リソソームの機能もそれに伴い亢進している可能性が高いと考えたが、予想に反して NRF-1 K.D. によりリソソーム活性が低下することが第 7 節の結果から明らかとなった。このことから、リソソーム関連遺伝子の発現上昇はリソソーム機能低下に応答して働いた代償機構である可能性が考えられる。それを証明するためにはリソソーム活性低下の原因を明らかにした後、その原因に基づいてリソソームの機能を回復させることでリソソーム関連遺伝子の誘導が起きなくなるか否かを検討する必要がある。酸性オルガネラであるリソソーム内には酸性域に至適 pH をもつ 50 から 60 種類の加水分解酵素が存在すると言われ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、リパーゼ、ホスファターゼなどが知られている。リソソーム内 pH が変化した場合、これらの加水分解酵素の機能が低下しリソソーム活性は低下する。本研究においてリソソーム阻害剤として用いた Bafilomycin A₁ は H⁺-ATPase 特異的阻害剤であり、リソソームの酸性化を阻害することでリソソームの活性を低下させる。実際に本実験系においても Bafilomycin A₁ はリソソームの酸性化を阻害し (第 3 節)、リソソーム活性の低下を引き起こした (第 7 節)。一方、

NRF-1 K.D. 細胞はリソソームの酸性化を阻害することなく、リソソームの活性低下を示すことが明らかとなった。リソソーム内加水分解酵素の一部は不活性型の未成熟体として合成され、小胞体やゴルジ体で糖鎖付加や切断などの修飾をうけて成熟体として最終的にリソソームに輸送される。そのため、リソソーム加水分解酵素の輸送障害は **NRF-1 K.D.** によるリソソーム活性低下の要因の一つである可能性が考えられる。**NRF-1** が転写因子であることを考えると、**NRF-1** が直接制御する輸送関連遺伝子が存在し、**NRF-1 K.D.** によりそれらの遺伝子発現量に変化することで加水分解酵素の輸送障害が引き起こされたのかもしれない。リソソーム機能低下は細胞内における不要となったタンパク質の分解不全を引き起こし、最終的に細胞毒性に繋がることが予想される。今後の課題として、**NRF-1** がどの遺伝子を直接制御しているのかをマイクロアレイ等の網羅的解析により明らかにする必要がある。

第 4 章 総括

TBT は 1960 年代から船底への貝類付着を防止する目的などに有用な船底塗料として使用されてきたが、巻貝類に対する内分泌かく乱作用が明らかになって以降使用が制限されている。水環境中からの検出濃度は以前より低下しているものの、2000 年代以降の調査においても魚類の血液や海底堆積物中から検出されている (Vigilino et al., 2004; Miki et al., 2011)。その原因として、一部の国では大型船などで未だに有機スズが用いられていることや、海底堆積物中における半減期が長いことなどが挙げられる。

これまで TBT の毒性研究は数多く行われてきたが、そのほとんどは μM オーダーの毒性を調べたものであり、その濃度の TBT は一般的な哺乳動物由来細胞に対して 24 時間以内に細胞死を引き起こす。一方、本研究では単独では細胞死を引き起こさない濃度である 20 nM の TBT が転写因子 NRF-1 を阻害し、AMPA 受容体サブユニット GluR2 の発現量を低下させることで、神経細胞をグルタミン酸刺激に対して脆弱化することを明らかにした。NRF-1 阻害が低濃度 TBT の毒性メカニズムを解明する上で重要なカギを握ると考え、さらに本研究では十分に明らかになっていない NRF-1 の機能について検討した。その結果、NRF-1 がリソソーム機能調節に関与していることが示唆された。第 3 章・第 8 節においてラット大脳皮質初代神経細胞に 20 nM TBT を曝露したところ、LAMP1 の発現量上昇が認められた。この発現上昇は TBT が NRF-1 を阻害し、リソソーム活性を低下させることによる代償誘導である可能性が高いと考えられる。今後、TBT が実際に神経細胞のリソソーム活性を低下させているか否かを検討することで、NRF-1 阻害を介した低濃度 TBT の新たな毒性メカニズムを明らかにできると考えられる。

我々のグループは、二価鉛・ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)・カルボフラン等といった一部の環境化学物質が TBT と同様にラット大脳皮質初代神経細胞の GluR2 発現量を低下させることを報告してきた (Ishida et al., 2013; Ishida et al., 2017b; Umeda et al., 2017; Ishida et al., 2017c)。PFOS に関してはラットに対しても発達期曝露により大脳皮質における GluR2 発現量を低下させ、グルタミン酸アナログであるカイニン酸の腹腔内投与により神経細胞死を増悪させることを明らかにした (Ishida et al., 2017c)。また、有機物質の不完全燃焼によって生じるベンゾ [a] ピレンやパーキンソン病様症状誘発神経毒である 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) が NRF-1 発現量を低下させ、細胞毒性を引き起こすことが報告されている (Zhang et al., 2014; Sivasubramanian et al., 2015; Ye et al., 2017)。したがって、GluR2 発現減少お

よび NRF-1 阻害は一部の化学物質に共通して認められる毒性メカニズムである可能性が高い。化学物質を安全に使用するためにはその毒性を正確に把握する必要があるが、経済協力開発機構（OECD）で定められている化学物質の毒性試験を行うためには膨大な時間と実験動物数が必要となる。NRF-1 を介した毒性影響が他の低濃度化学物質においても認められることを明らかにすることができれば、NRF-1 活性を新しい毒性指標として用いることで従来の毒性スクリーニングでは検出できなかった毒性を検出でき、化学物質毒性評価の効率化につながると期待される。

近年、オートファジーリソソーム経路の破綻とパーキンソン病・ハンチントン病・アルツハイマー病などの神経変性疾患の発症を関連付ける研究が数多く報告されている。特にこれらの神経変性疾患は脳内の凝集タンパク質の異常蓄積とその除去機能の破綻が疾患の進行を加速させるためである (Yamamoto and Simonsen, 2011)。また、NRF-1 はパーキンソン病等の神経変性疾患との関連 (Shin et al., 2011) や、統合失調症患者の死後脳において発現量が低いこと (McMeekin et al., 2016) が報告されている。本研究で見出されたリソソーム機能調節という NRF-1 の新しい機能は毒性分野のみならず、リソソーム機能低下との関連が示唆されている疾患の研究に対しても重要な知見として提供できると考えられる。

実験材料および実験方法

【試薬】

Cytosine arabinofuranoide (ara-C) および 1-naphthylacetylspermine (NAS) は Sigma-Aldrich より購入した。Bafilomycin A₁ は Cayman Chemical より購入した。Tributyltin chloride (TBT) は和光純薬株式会社より購入した。Doxycycline Hyclate (Dox) は LKT Laboratories, Inc. より購入した。Polyethylenimine (PEI; transfection 用) は polysciences, Inc. より購入した。

【抗体】

タンパク質	メーカー・番号	用途
GluR2	Millipore, MAB397	WB, ICC
β-actin	Sigma-Aldrich, AC-15	WB
N-cadherin	Santa Cruz Biotechnology, sc-7939	WB, ICC
NRF-1	Abnova, H00004899-M01	WB
NRF-1	Abcam, ab34682	ChIP
PGC-1α	Santa Cruz Biotechnology, sc-13067	WB
β-tublin	WAKO, 014-25041	WB
Lamin B	Santa Cruz Biotechnology, sc-6217	WB
GFP	Santa Cruz Biotechnology, sc-9996	IP
HA	MBL, 561	WB
LAMP1	Cell Signaling Technology, 9091	WB, ICC
LAMP1	Abcam, ab24170	ICC (rat)
TFEB	Cell Signaling Technology, 4241	WB
TFE3	Sigma-Aldrich, HPA023881	WB
MITF	Santa Cruz Biotechnology, sc-515925	WB
MAP2	Millipore, MAB3418	ICC
Tuj1	Covance Research Products, MRB435P	ICC
GFAP	Sigma-Aldrich, G3893	ICC

【ラット大脳皮質初代神経細胞培養】

本実験は広島大学動物実験委員会の承認を得ており、広島大学動物実験等規則を遵守し行った。Slc: Wistar/ST 妊娠 18 日齢ラットよりクリーンベンチ下で胎仔を摘出した。ハンクス液中で大脳皮質を切り出し、ハンクス液を適量加えてパスツールピペットで懸濁し、セルストレイナーに通した後、4°C、1000 rpm、3 分間遠心した。上清を除去し、10% FCS 添加イーグル MEM 培地 10 mL に再懸濁した。セルカウンターを用いて $1.8\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/mL に調製し、24 well plate あるいは 3.5 cm dish に播き、培養は 37°C、CO₂ インキュベーター中で行った。ダイセクションの日を 1 日目とし、2、4、6 日目は 10% FCS 添加イーグル MEM 培地を、8 日目は 10% HS 添加イーグル MEM 培地を用いて半量ずつ交換した。培養 6 日目に ara-C(最終濃度: 10 μ M) を添加し、培養 10 日目の細胞を各アッセイに使用した。この培養系では約 90% のニューロンが得られている (Fig. 24)。

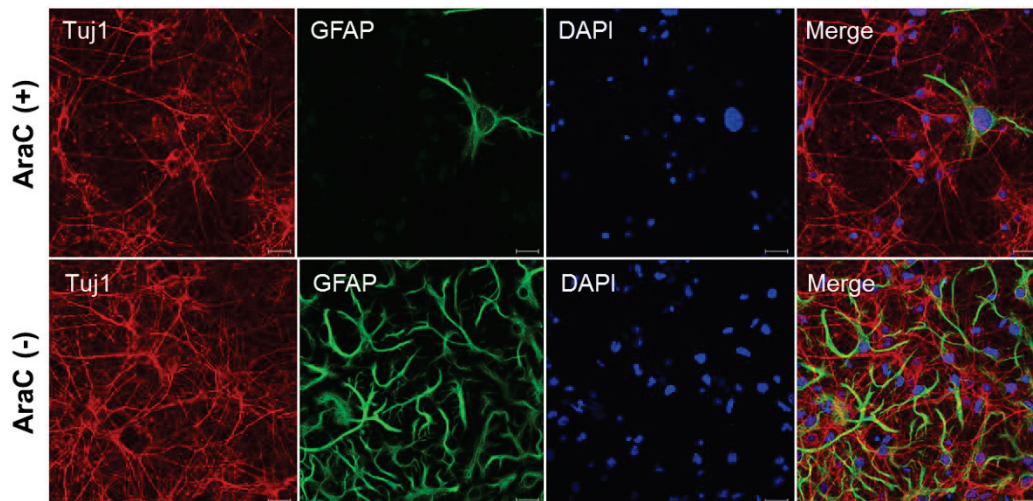


Figure 24. Immunocytochemistry of neuronal and glial cells of the primary culture on DIV 11.

To evaluate neuronal and glial populations, cultures were grown to DIV 11 with or without arabinosylcytosine (AraC) to inhibit the proliferation of glial cells. Then, immunostaining was performed using an anti-Tuj1 (neuronal marker) antibody (red) and an anti-GFAP (glial marker) antibody (green). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for nuclear staining (blue); scale bar = 20 μ m.

ハンクス液 (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 不含) 組成	g/L
NaCl	8
KCl	0.4
Na ₂ HPO ₄	0.0479
KH ₂ PO ₄	0.06
D-glucose	1
HEPES	0.568

D.W. 1L に溶解後、1N NaOH で pH 7.2 に調製→濾過滅菌後、冷蔵保存

イーグル MEM 培地組成	g/L
イーグル MEM 培地	9.4
NaHCO ₃	2
L-glutamine	0.29
D-glucose	1
HEPES	2.38

D.W. 1L に溶解後、濾過滅菌後、冷蔵保存

【毒性評価】

各種薬物曝露後の HS 添加イーグル MEM 培地を除き、0.4% トリパンブルーを 1 well あたり 100 μ L 加え、10 分放置後、10% 氷冷ホルマリンを 500 μ L 加える。2 分放置後、生理食塩水で洗い、顕微鏡下で生細胞、死細胞を計測した。この結果から、生細胞数率を算出し、control 群に対する割合をもって viability (% of control) とした。Sample は系 1 つにつき 4 well 使用し (n=4)、1 well あたり 200 個以上の細胞を計測した。

【タンパク質調整】

(1) Whole-Cell Extracts

薬物曝露後の上清を除去し、PBS(-)で洗う。その後、TNE Buffer を加え、セルスクレイパーにて lysate を 1.5 mL チューブに回収し、ボルテックス 10 秒後、30 分間 4°C でローテーションする。その後 4°C、13,500 rpm で 20 分冷却遠心し、pellet が浮遊しないように上清を他のチューブに移す。

TNE buffer 組成	最終濃度
Tris-HCl (pH 7.8)	50 mM
NP-40	1%
EDTA	20 mM
Sodium orthovanadate	1 mM 用事調整
NaF	1 mM 用事調整
Protease inhibitor cocktail	1:100 用事調整

(2) Nuclear Extract

薬物曝露後の上清を除去し、PBS(-)で洗う。その後、PBS を加え、セルスクレイパーにて細胞を 1.5 mL チューブに回収し、hypotonic buffer で懸濁する。氷上で 15 分静置後、0.5% NP-40 を加えて最大スピードでボルテックスし、10,000 g 10 分遠心する。上清を 1.5 mL チューブに移し、細胞質画分とする。ペレットを hypotonic buffer で再懸濁し、10,000 g 10 分遠心後、上清を除去する（必要であればこの wash 作業を繰り返す）。ペレットに hypertonic buffer で再懸濁し、ソニケーション (10s x3) 後、12,000 g 10 min 遠心する。上清を 1.5 mL チューブに移し、核画分とする

(3) Membrane Extracts

細胞を PBS で洗浄した後、Sulfo-NHS-biotin solution 0.5 mg/ml (PBS (+)) (Thermo, San Jose, CA, USA) を加え、4°C、20 分間インキュベーションする。反応を停止するため、100 mM glycine 含有 PBS を加え、4°C、30 分間インキュベーションする。TNE buffer を加え細胞を剥ぎ取りチューブに入れ、4°C、1 時間ローテーションする。4°C、15000 rpm で 15 分遠心後、total lysate を一部保存した。ビーズの処理を行い (PBS : avidin beads = 1 : 1)、lysate に加え 4°C、一晩ローテーションする。

4℃、15000 rpm、15 分間遠心し、上清を intracellular 画分とする。Pellet に sample buffer を加え、70℃、30 分間熱処理をすることで、膜タンパクと biotin との結合を切断する。

【タンパク定量】

プロテインアッセイ染色液 (Bio Rad) を用いて Bradford 法により行った。Bradford 原液を 5 倍希釈した溶液 200 μ L を 96 well plate に入れ、そこに希釈濃度の異なるサンプルを加え攪拌後、5 分間放置した。その後、吸光度プレートリーダーで 595 nm にて測定した。検量線の作成には BSA を使用し、タンパク質の濃度を算出した。

【Western blotting】

サンプルに 2×Sample buffer を等量加え、95 °C で 3 分間加熱し、熱変性させた。調製したサンプルを 7.5-10% アクリルアミド分離ゲル、0.15% アクリルアミド濃縮ゲルにアプライし、200V の一定電圧で約 1 時間泳動する。Blotting はセミドライ式 (Trans-Blot Turbo, BioRad) を用いて、PVDF メンブレンに 25V、1.0A の一定電圧 30 分で転写する。このメンブレンを 5% スキムミルク in TBS-T で 1 時間振とうしてブロッキングし、各種一次抗体を 4℃ 一晩振とうした。TBS-T で洗浄後、HRP 標識した二次抗体を常温で 1 時間振とうした。Chemi-Lumi One L[®] で反応させ、その発光を Image Quant Las 4000 mini (GE Healthcare) で検出する。

2x sample buffer 組成	最終濃度
Tris-HCl (pH6.8)	100 mM
SDS	4%
Glycerol	20%
ブロモフェノールブルー	0.004%
メルカプトエタノール	5% 用事調整

【mRNA 抽出およびリアルタイム PCR】

(1) mRNA 抽出

SV total RNA Isolation system (Promega) を使用した。細胞をセルスクレイパーで剥ぎ取り、チューブに入れ、遠心により細胞を回収した。回収した細胞に lysis buffer 175 μ L 加え、添付の説明書に従い total RNA を抽出した。

(2) cDNA 作製

上記で抽出した RNA に、oligo (dT)₁₅ primer (0.5 μ g/ μ L) 1 μ L を加えた後、70°C 5 分間熱変性させ、5 分間氷冷したのち、下に示す組成で 42°C 1 時間逆転写反応を行い、75°C 15 分間で逆転写酵素を失活させた。

組成	μ L
AMV RT 5×Reaction buffer	8
RNase inhibitor (40 units/ μ L)	1
AMV reverse transcriptase (10 units/ μ L)	1
dNTP mix (25 mM)	1.6
RNA(2 μ g/ μ L)	27.4
Total	40 μ L

(3) リアルタイム PCR

第 2 章における解析

QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit を使用した。下に示す組成および Thermal cycling parameters にて、各種 mRNA の発現量を、OPTICON3 にて解析した。スタンダード溶液が、ある一定の蛍光強度に達するのに要するサイクル数から作製した検量線を元にサンプルの発現量を算出した。さらに内部標準遺伝子として用いた GAPDH の発現量により補正した。

組成	μ L	Thermal cycling parameters
QuantiTect solution	7.5	1. 95 °C 3 min
Primers (20pmol/ μ L)	0.8	2. 95 °C 15 sec
D.W.	8.9	3. 60 °C 30 sec
Template cDNA or standard	2.0	4. 72 °C 30 sec
Total	20 μ L	5. go to line 3 for 49 more times

第 3 章における解析

PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher) を使用した。下に示す組成および Thermal cycling parameters にて、各種 mRNA の発現量を、Piko Real にて解析した。遺伝子発現量は RPL13a を内部標準遺伝子として用い、 $\Delta \Delta Ct$ 法により解析した。

組成	μL	<u>Thermal cycling parameters</u>
SYBR Green Master Mix	3.45	1. 95 °C 3 min
Primers (5 μM)	0.4	2. 95 °C 15 sec
D.W.	3.75	3. 60 °C 30 sec
Template cDNA	2.0	4. 72 °C 30 sec
Total	20 μL	5. go to line 3 for 39 more times

使用したプライマー

r-GluR2 Fw	AACGAGTACATCGAGCAGAGGAA
r-GluR2 Rv	GATGCCGTAGCCTTTGGAATC
r-NRF-1 Fw	AAAAGGCCTCATGTGTTTGAGT
r-NRF-1 Rv	AGGGTGAGATGCAGAGAACAAT
r-PGC-1 α Fw	CAATGAATGCAGCGGTCTTA
r-PGC-1 α Rv	ACGTCTTTGTGGCTTTTGCT
r-cytochrome c Fw	GGCAAGCATAAGACTGGACCAA
r-cytochrome c Rv	TTTCAAATACTCCATCAGGGTATC
r-COX4 Fw	CACTTCGGTGTGCCTTCGGG
r-COX4 Rv	AAAGGCTGCTCCAGTCGGC
r-COX6c Fw	AGCGTCTGCGGGTTCATA
r-COX6c Rv	GCCTGCCTCATCTCTTCAA
r-GAPDH Fw	CTCGTCTCATAGACAAGATGGTGAAG
r-GAPDH Rv	AGACTCCACGACATACTCAGCACC
h-atp6v1h Fw	GGAAGTGTCAGATGATCCCA
h-atp6v1h Rv	CCGTTTGCCTCGTGGATAAT

h-ctsd Fw	CTGATTCAGGGCGAGTACATGA
h-ctsd Rv	CGACACCTTGAGCGTGTAGT
h-ctsb Fw	AGTGGAGAATGGCACACCCTA
h-ctsb Rv	AAGAAGCCATTGTCACCCCA
h-gba Fw	TGGGTACCCGGATGATGTTA
h-gba Rv	AGATGCTGCTGCTCTCAACA
h-lamp1 Fw	ACGTTACAGCGTCCAGCTCAT
h-lamp1 Rv	TCTTTGGAGCTCGCATTGG
h-mcoln1 Fw	TTGCTCTCTGCCAGCGGTACTA
h-mcoln1 Rv	GCAGTCAGTAACCACCATCGGA
h-rpl13 Fw	GGATCCCTCCACCCTATGACA
h-rpl13 Rv	CTGGTACTTCCACCCGACCTC

【免疫染色】

(1) 初代神経細胞の GluR2 発現量評価

24 well プレート上の polyethyleneimine-coated カバーガラスに初代神経細胞を播種し、20 nM TBT を 9 日間曝露後、PBS(-) で wash し、4% paraformaldehyde/PBS(-) により室温で 10 分間固定する。PBS(-) で wash し、2 滴の Image-iT™ FX Signal Enhancer で 1 時間ブロッキング後、一次抗体反応 (mouse GluR2 antibody, 1:250; rabbit N-cadherin antibody, 1:250) を室温 1 時間で行う。カバーガラスを PBS(-) で 3 回 wash 後、Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500) または Alexa Fluor® 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500) で 1 時間遮光条件でインキュベート。カバーガラスを PBS(-) で 3 回 wash した後 Prolong® Diamond で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000-D (Olympus)にて観察する。

(2) shNRF-1/293T 細胞の LAMP1 発現量評価

24 well プレート上の poly-D-lysine-coated カバーガラスに shNRF-1/293T 細胞を播種し、Dox を 120 h 添加後、PBS(-) で wash し、4% paraformaldehyde/PBS(-) により室温で 10 分間固定する。PBSTx (0.1% Triton-X in PBS) で膜透過処理を室温 10 分で 2 回行い、3% BSA in PBSTx で 1 時間ブロッキング後、一次抗体反応 (rabbit

LAMP1 antibody, cell signaling technology, 1:400) を室温 1 時間で行う。カバーガラスを PBSTx で 3 回 wash 後、Alexa Fluor® 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500) で 1 時間遮光条件でインキュベート。カバーガラスを PBS(-) で 3 回 wash した後 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を加え 5 分間インキュベート後、さらに PBS(-) で 3 回 wash する。最後に Prolong® Diamond で封入し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

(3) 初代神経細胞の LAMP1 発現量評価

24 well プレート上の polyethyleneimine-coated カバーガラスに初代神経細胞を播種し、Neurobasal medium (B-27 supplement、penicillin/streptomycin、グルタミンを含む) で培養した。20 nM TBT を 7 日間曝露後、PBS(-) で wash し、4% paraformaldehyde/PBS(-) により室温で 10 分間固定する。PBSTx で膜透過処理を室温 10 分で 2 回行い、3% BSA in PBSTx で 1 時間ブロッキング後、一次抗体反応 (rabbit LAMP1 antibody, abcam, 1:400; mouse MAP2 antibody, 1:250) を室温 1 時間で行う。カバーガラスを PBSTx で 3 回 wash 後、Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500) または Alexa Fluor® 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500) で 1 時間遮光条件でインキュベート。カバーガラスを PBS(-) で 3 回 wash した後 Prolong® Diamond で封入し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

【NRF-1 二量体形成評価】

(1) HEK 293T 細胞培養およびトランスフェクション

HEK 293T 細胞を DMEM 培地 (10% FBS、0.58 mg/ml L-グルタミン、2 mg/ml NaHCO₃、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、4.5 g/l グルコース) にて培養する。FuGENE HD (Promega) を用いて pcDNA3.1(+)_HA-hNRF-1 および pAcGFP-C1_HA-hNRF-1 をトランスフェクションする。48 時間後、20 nM TBT を 3 時間曝露し、TNE バッファーにて可溶化する。

(2) 免疫沈降

Dynabeads protein G (Invitrogen) 50 µL を先太チップで 1.5 mL チューブにとり、マグネットにおいて上清を除き、マグネットからチューブをとり PBS-T (PBS with 0.1% Tween 20) で 2 回 wash する。マグネットにおいて上清を除き、GFP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, sc-9996) 1 µg の入った 200 µL の PBS-T を加え、室温

で 10 分間ローテーションする。マグネットにおいて上清を除き、200 μ L の PBS-T で wash する。マグネットにおいて上清を除き、20 nM TBT 3 時間曝露後の whole cell extract を加え、PBS-T で全量 200 μ L に液量を合わせ、室温で 20 分間ローテーションを行う。Dynabeads-antibody(Ab)-antigen(Ag) complex を 200 μ L の PBS-T で 3 回 wash する。Dynabeads-Ab-Ag complex を 100 μ L の PBS-T で再懸濁し、新しいチューブに移す。マグネットにおいて上清を除き、20 μ L の 2 \times Sample buffer を加え、95 $^{\circ}$ C 3 分間ヒートブロックする。マグネットにおいて上清を回収し、ウエスタンブロッティングのサンプルとし、全量をアプライする。

【ゲルシフトアッセイ】

(1) 核タンパク質抽出

薬物曝露した細胞をセルスクレイパーで剥ぎ取り、回収し、細胞体積の 3 倍量の hypotonic buffer を加え懸濁した。10 分間氷上に放置後、24G syringe により破碎した。その後、4 $^{\circ}$ C、10000 rpm、30 分間遠心し、上清を捨て、pellet に low salt buffer を 1/2 倍量加え懸濁した。更に、high salt buffer を 1/2 倍量加え時々懸濁しつつ 30 分間放置後、4 $^{\circ}$ C、14000 rpm、30 分間遠心し、上清を核タンパク抽出物とした。

Hypotonic buffer 組成	μL
0.1 M HEPES (pH 7.9)	100
1 M MgCl ₂	1.5
1 M KCl	10
1 M DTT	0.5
5×complete	200
D.W.	688
Total	1000 μL

Low salt buffer 組成	μL
0.1 M HEPES (pH 7.9)	200
1 M KCl	20
1 M MgCl ₂	1.5
50 mM EDTA	2
80% glycerol	313
0.1 M DTT	2
5×complete	200
D.W.	261.5
Total	1000 μL

High salt buffer 組成	μL
0.1 M HEPES (pH 7.9)	200
3 M KCl	200
1 M MgCl ₂	1.5
80% glycerol	313
0.1 M DTT	2
5×complete	200
D.W.	83.5
Total	1000 μL

(2) アニーリング

2×annealing buffer に oligonucleotide を加え、アニーリングを行なった。

<u>2×annealing buffer</u>		<u>Annealing reaction mixture</u>	
組成	μL	組成	μL
2 M Tris-HCl (pH 7.5)	125	oligonucleotide Fw (50 μM)	20
0.5 M EDTA	175	oligonucleotide Rv (50 μM)	20
5 M NaCl	40	2×annealing buffer	50
Nuclease free water	660	Nuclease free water	10
Total	1000 μL	Total	100 μL

Annealing reaction

95°C, 5 min.

↓ 0.1°C/s to 70°C

70°C, 10 min

↓ 0.1°C/s to 60°C

※ annealing 後の oligonucleotide = consensus oligo.

60°C, 10 min.

consensus oligo conc.: 10 pmol/μL

↓ 0.1°C/s to 50°C

50°C, 10 min.

↓ 0.1°C/s to 40°C

40°C, 10 min.

↓ 0.1°C/s to 30°C

30°C, 10 min.

↓ 0.1°C/s to 20°C

20°C, hold

Oligonucleotide 配列

NRF-1 Fw	TTTTGCCTCGAGTCGCGCACGCGCGCCCGGGACTGC
NRF-1 Rv	TTTTGCAGTCCCGGGCGCGCGTGC GCGACTCGAGGC
REST Fw	AGCTCCGACTAAAGCGCTGTCTCGGTGCTAAAATCGG
REST Rv	CCGATTTTAGCACCGAGGACAGCGCTTTAGTCGGAGCT
Sp1 Fw	ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC
Sp1 Rv	GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT

(3) リン酸化反応

Consensus oligo. (1.75 pmol/ μ L)	2 μ L
T4 Polynucleotide Kinase 10 \times Buffer	1 μ L
[γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol.at 10 mCi/mL)	2.2 μ L
Nuclease free water	3.8 μ L
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ L
Total	10 μ L

Incubation at 37°C, 30 min.

↓0.5 M EDTA 1 μ L

↓TE buffer (up to 50 μ L)

Labeled oligonucleotide (精製前 probe)

(4) 精製効率の確認

50 mL tube に入れた G25 約 0.4 g に対して milli Q を約 30 mL 加え室温で一晩静置した。翌日、G25: milliQ = 1:1 になるよう milliQ をアスピレーターで吸引した。Tube を転倒混和し、0.65 mL tube に 300 μ L の G25 を入れた。Tube の底に 18G needle で穴を開け、1.5 mL tube に入れ、5000 rpm、3 分間遠心した。(3) の精製前 oligonucleotide を G25 の tube に移し、5000 rpm、3 分間遠心により新しい 1.5 mL tube に精製した。Blank (TE buffer)、精製前 oligonucleotide、精製後 oligonucleotide をそれぞれ 0.65 mL tube に 1 μ L 入れ、チャレンコフ、P.T 1.0 で測定した。

(5) ゲル作製

5 \times TBE buffer	3.0 mL
40% acrylamid (w/v), AA:bis=60:1	3.0 mL
80% glycerol	940 μ L
D.W.	22.8 mL
TEMED	15 μ L
10% APS	225 μ L

1 時間以上室温で静置した。

(6) DNA 結合反応

	NC	PC	Specific oligo.	Non-specific oligo.	cont.	TBT
Nuclease free water	11	6	4	4	6	6
5×binding buffer	3	3	3	3	3	3
oligo. (1.75 pmol/μL)	0	0	2	2	0	0
nuclear extract	0	5	5	5	5	5

Total volume 14 μL

↓

Incubation at 25°C, 30 min.

↓←probe 1 μL

Incubation at 25°C, 20 min.

↓gel loading 10×buffer 1.5 μL

Electrophoresis

(7) 電気泳動

Pre-run: 200 V for 60-90 min. (buffer: 0.5×TBE)

↓

Well wash & sample アプライ

↓

Run: 200 V for 80 min. (until BPB is 3/4 of the way down the gel)

↓

Place the gel on 3 MM paper

↓

Cover with saran wrap

↓

Dry on the gel dryer for 30-90 min. at 80°C

↓

Expose to X-ray film

(8) 現像

十数時間から 48 時間感光させたフィルムを現像した。

【クロマチン免疫沈降法】

(1) DNA の抽出

薬物曝露後の細胞を 1% formaldehyde で 10 分間インキュベート後、glycine (final 0.125 M) を添加し 5 分間インキュベートする。その後、セルスクレイパーを用い PBS (-) で細胞を回収し、1.5 mL チューブに移す。4,200 rpm で 3 分間冷却遠心し細胞を落とし、500 μ L Cell lysis buffer で細胞を再懸濁し再び 4,200 rpm で 3 分間冷却遠心を行う。その沈殿物を 100 μ L Cell lysis buffer にて懸濁し 10 分間氷上に置く。その後、Dounce homogenizer を用い 15 回ホモジナイズを行い、250 μ L Cell lysis buffer で 2 回洗いこみ、6,200 rpm で 10 分間冷却遠心し核を沈殿させる。ペレットに 150 μ L Sonication buffer を加えて懸濁し、DNA を断片化するため 30 秒間×3 回の超音波破碎を行った。超音波破碎は Handy Sonic model UR-20P (TOMY) を用い、強さ 5 で行った。その後 12,000 rpm、10 分間冷却遠心し、上清の DNA 量を nanodrop により 260 nm の吸光度から算出し、各サンプルの DNA 濃度を Sonication buffer にてそろえ、-80 $^{\circ}$ C でサンプルを保存した。

(2) 免疫沈降

(a) 抗体とビーズの結合反応

Dynabeads を 50 μ L、1.5 mL チューブにとり、マグネットにおいて上清を除去する。マグネットからチューブをとって、ビーズを 400 μ L PBS (-) で 2 回洗い、0.5% BSA、2 μ g NRF-1 antibody (ChIP Grade) の入った 200 μ L PBS (-) で再懸濁し、4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトでローテーションする。その後、400 μ L PBS (-) で再懸濁を行う。

(b) 抗原抗体反応

(1) で抽出した Chromatin solution 60 μ L を 540 μ L ChIP dilution buffer で 10 倍希釈し、そのうち 20 μ L を Input 用に 1.5 mL チューブにとり、-20 $^{\circ}$ C で保存する。残り 580 μ L の Chromatin solution を (2)-(a) Dynabeads/antibody complex に加え、4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトでローテーションを行う。その後、マグネットにのせ、上清を除き、400 μ L の各 buffer (ChIP washing buffer ①×1 回、ChIP washing buffer ②×1 回、LiCl immune complex wash buffer×2 回、TE buffer×2 回) で洗う。

(3) 抗原の溶出と脱クロスリンク

Elution buffer を用意し、250 μ L Elution buffer で Dynabeads/antibody/antigen complex を再懸濁し、室温で 15 分間ローテーションを行う。マグネットに置き上清を新しい 1.5 mL チューブにとり、Dynabeads/antibody/antigen complex を再び Elution buffer で懸濁し、15 分間ローテーションする。上清を同じ 1.5 mL チューブにとる。

(2)-(b) で保存した Input 用のサンプルに 500 μ L Elution buffer を加え、IP、Input 共に 20 μ L 5M NaCl を添加し 65 $^{\circ}$ C で最低 4 時間以上インキュベートした。

(4) DNA の精製

65 $^{\circ}$ C インキュベーション後のサンプルに 500 μ L phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1 を加えてピペッティングを行い、12,000 rpm で 5 分間遠心を行う。境界部分に触らないよう上清を新しい 1.5 mL チューブにとり、50 μ L 3 M NaOAc (pH 5.2)、2 μ L 20mg/mL glycogen、1 mL ethanol を加え、20 分間以上ドライアイスにおく。その後、15,000 rpm、15 分間冷却遠心し、上清を除き、80% ethanol で沈殿物を再懸濁する。15,000 rpm、15 分間冷却遠心後、沈殿物を風乾し、50 μ L N.F. 水を加えて溶解し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

(5) DNA の定量

リアルタイム PCR により IP DNA 量と Input DNA 量をそれぞれ測定し、IP/Input の値を結果として示した。リアルタイム PCR は QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit を使用し、CFX Manager により解析を行った。DNA 量の相対定量解析は $\Delta\Delta Ct$ 法により行った。

組成		Thermal cycling parameters	
KAPA SYBR [®] FAST qPCR MasterMix	7.5 μ L	1. 95 $^{\circ}$ C	3 min
Primers (5 mM)	0.8 μ L	2. 95 $^{\circ}$ C	15 sec
N.F. water	8.9 μ L	3. 62 $^{\circ}$ C	30 sec
Template DNA	2 μ L	4. 72 $^{\circ}$ C	30 sec
Total	20 μ L	5. go to line 3 for 49 more times	

(6) 各種 buffer 組成

<u>Cell lysis buffer</u>		<u>Sonication buffer</u>	
組成	最終濃度	組成	最終濃度
HEPES (pH 7.9)	10 mM	Tris (pH 8.1)	50 mM
MgCl ₂	1.5mM	EDTA	10 mM
KCl	10 mM	SDS	1%
DTT	0.5 mM	protease inhibitor cocktail	用時調製
PMSF	0.2 mM		

↑ ↓ 用時調製

ChIP dilution buffer

組成	最終濃度
Tris (pH 8.1)	25 mM
NaCl	140 mM
Triton X-100	1%
SDS	0.1%
EDTA	3 mM
protease inhibitor cocktail	↑↓ 用時調製

ChIP washing buffer①

組成	最終濃度
Tris (pH 8.1)	16.7 mM
SDS	0.01%
Triton X-100	1%
EDTA	1.2 mM
NaCl	150 mM

ChIP washing buffer②

組成	最終濃度
Tris (pH 8.1)	16.7 mM
SDS	0.01%
Triton X-100	1%
EDTA	1.2 mM
NaCl	500 mM

LiCl immune complex wash buffer

組成	最終濃度
Tris (pH 8.1)	10 mM
LiCl	0.25 M
NP40	1%
sodium deoxycholate	1%
EDTA	1 mM

TE buffer

組成	mL
1M Tris-HCl (pH 8.0)	2mL
0.5M EDTA	0.4 mL
MilliQ	197.6 mL
Total	200 mL

Elution buffer

組成	μL
1% SDS	1000
1 M NaHCO ₃	50
100μg/mL ssDNA	0.1

↑↓ 用時調製

(7)プライマー配列

NRE_GluR2_promoter_Fw	CGCAAGACTGGAGGTCTCTAA
NRE_GluR2_promoter_Rv	CGCACACACACAGGAAAGTC

【ATP 測定】

薬物曝露後、上清培地と等量の Cell Titer-Glo®を添加し、攪拌後 10 分間室温反応させた。この溶液 10 μL をルミノメータにて測定し、それぞれのタンパク濃度で除した値の control 群に対する割合を算出し結果として示した。

【Lyso Tracker によるリソソーム形態観察】

4 分割 35 mm ガラスボトムディッシュに shNRF-1/293T 細胞を播種し、Dox を 120 時間添加する。PBS で wash 後、Lyso Tracker Red DND-99 (final 50 nM) を添加し 15 分間インキュベートする。PBS で wash 後 F12 メディウムで置換し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

【NRF-1 クローニング】

完全長 HA タグ融合 human NRF-1 は以下のプライマーと Prime STAR HS polymerase を用いて作製した。PCR 産物は Hind III と Not I により制限酵素処理を行い、pcDNA3.1/Zeo (+) vector (Invitrogen) と pAcGFP-C1 vector (Takara bio Inc) に組み込んだ。PCR で作製した全ての配列はシーケンス解析により目的配列であることを確認した。

【shNRF-1/293T 細胞の作製】

pLKO-Tet-On <shNRF-1> プラスミド作製

(1) shRNA 設計

NRF-1 を認識する shRNA および scramble shRNA を以下のように設計した。

NRF-1_Top1	CCGGCCGTTGCCCAAGTGAATTATTCTCGAGAATAATTCA CTTGGGCAACGGTTTTT
NRF-1_Bottom1	AATTAAAAACCGTTGCCCAAGTGAATTATTCTCGAGAATA ATTCAGTTGGGCAACGG
scramble_Top1	CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCG ACTTAACCTTAGGTTTTT
scramble_Bottom1	AATTAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGA GGGCGACTTAACCTTAGG

(2) オリゴアニーリング

shRNA の Top および Bottom を以下の組成で混合し、サーマルサイクラーにかけ、オリゴアニーリングを行った。

組成	
Top oligo (100 μM)	11.25 μL
Bottom oligo (100 μM)	11.25 μL
10 × アニーリングバッファー	2.5 μL

Thermal cycling parameters

95°C から 5 min 毎に
2.5°C ずつ下がるプロト
コル

○ 10 × アニーリングバッファー

1 M Tris	5 mL	
5M NaCl	10 mL	
Total	50 mL	
HCl により pH 7.4 に合わせろ過滅菌を行った		

作製した shRNA を 0.5 × アニーリングバッファーにて 400 倍希釈した。

(3) プラスミド制限酵素処理

EcoRI および *AgeI* により double digestion を行った。以下に示す組成で 37°C、2 時間インキュベーションした。

組成	
Tet-pLKO-puro (#21915, Addgene)	400 ng
10 × H buffer	1 μL
<i>EcoRI</i>	0.5 μL
<i>AgeI</i>	0.5 μL
D.W. で全量 10 μL に調製	

(4) ゲル抽出

制限酵素処理をしたプラスミドを 0.7% アガロースゲルに泳動し、ゲル抽出を行った。なお、溶出は 20 μL の D.W. で行った。

(5) ライゲーション

以下に示す組成でライゲーションを行った。16°C、1 時間インキュベーションした。

組成	
希釈 oligo	1 μL
プラスミド	20 ng
Ligation high ver.2	7.5 μL
TE buffer で全量 15 μL に調製	

(6) 形質転換

コンピテントセル (Stbl3) 100 μL にライゲーション産物を 5 μL を加え、氷上で 20 分間静置した。その後、42°C で 40 秒間インキュベーションした後、氷上で 5 分間静置した。LB 寒天プレートに形質転換したコンピテントセルを全量播き、37°C で一晚インキュベーションした。

(7) ダイレクトコロニー PCR 法、プラスミド抽出

形成されたコロニーを下に示す組成及び Thermal cycling parameters にて、ダイレクトコロニー PCR を行った。

組成	
10 × Ex Taq Buffer	1 μL
dNTP mix (2.5 mM)	0.8 μL
Ex Taq (5 units/μL)	0.1 μL
Forward primer (100 μM)	0.1 μL
Reverse primer (100 μM)	0.1 μL
D.W.	7.9 μL
Total	10 μL

Thermal cycling parameters

Stage 1 × 1	98°C	30 sec
Stage 2 × 30	98°C	10 sec
	55°C	30 sec
	72°C	90 sec
Stage 3 × 1	72°C	5 min

shRNA_seq_Fw	GGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGA
pLKOtet_10596_Rv	CAAAGTGGATCTCTGCTGTCC

PCR 産物を 0.7% アガロースゲルに泳動し、インサートが確認できたコロニーを増やし、プラスミドを GenElute™ Plasmid Miniprep Kit を用いて抽出した。抽出物はエタノール沈殿法により精製した。

(8) インサート確認

抽出したプラスミドを *XhoI* を用いて、37°C、2 時間制限酵素処理を行った。

組成	
プラスミド DNA	500 ng
<i>XhoI</i>	0.5 μL
10 × H buffer	1 μL
D.W. で全量 10 μL に調製	

2% アガロースゲルに泳動し、100 bp 付近にバンドが 2 本認められたものをインサ

ートの入っているプラスミドとし、シーケンス解析により目的プラスミドを得られたことを確認した。

レンチウイルスパッケージング

Day 1 HEK 293T 細胞の播種

1. poly-D-lysine コーティングした 100 mm dish に HEK 293T 細胞を 400 万 cells で播種する
2. 24 時間 CO₂ インキュベーターで培養する

Day2 メディウム交換・トランスフェクション

1. 以下の通り transfection mixture を作製し、10 分間静置する
2. 培養メディウムを 8 ml の新鮮なメディウムと交換する
3. Transfection mixture を細胞に滴下し、O/N インキュベートする

	Plasmid	ug/ul	ug/plate	ul/plate
Transfer Plasmid	Tet-pLKO-hNRF-1	1	5	5
Packaging Plasmid	pMDLg/pRRE	1	1.7	1.7
Envelope Plasmid	pMD2.G	1	1.7	1.7
RNA Export Plasmid	pRSV-Rev	1	1.7	1.7
	PEI(pH4.5)	1	40	40
	Optimem			950
total				1000.1

Day 3 メディウム交換

1. 13-16 時間後、10 μ M forskolin (x500 stock solution at -30 °C; 10 mg/ 4.872 ml DMSO) を含む新鮮なメディウム 9 ml に交換
2. 48 時間インキュベーション

Day 5 ウイルスの回収・濃縮 (全て氷上操作)

1. 培養メディウムを 0.45 μ m PVDF フィルターでろ過し 50 ml チューブに移す

2. 4x PEG-it (3 ml PEG-it / 9 ml メディウム)を加える
3. 4 °C O/N
4. 1,500 g 30 分遠心
5. 上清を除去（一部を残す）し、ペレットを再懸濁する
6. 1,500 g 5 分遠心
7. 上清を除去し、optimem（培養メディウム量の 1/500 量）で再懸濁する
8. 小分けにして -80 °C で保存

インフュクション・シングルセルクローニング

1. HEK 293T 細胞を 24 well plate に播種し、O./N.
2. レンチウイルス液 (1-5 μ l) と polybrene 8 μ g/ml を添加し、24 時間培養する
3. PBS wash、メディウム交換して 24 時間培養する
4. 1 μ g/ml ピューロマイシンを含むメディウムに置換し、2 週間程度セクションを行う
5. セクション後の細胞を 100 cells / 100 mm dish で播種し、1 週間程度培養する
6. コロニーが形成されたら、各コロニーをピックアップし Dox 添加時の NRF-1 発現量を解析し、最も K.D. 効率の高いコロニーを選別する

【長命タンパク質分解効率評価】

Poly-D-lysine コーティングした 24 well プレートに shNRF-1/293T 細胞を播種する。100 ng/ml Dox を各時間添加後、L-[¹⁴C] valine (final 0.2 μ Ci/ml) を含むメディウム 400 μ l に置換し、20-24 インキュベートする。PBS で wash した後 10 mM valine 含有メディウム 500 μ M に置換し 2 時間インキュベートする。PBS で wash 後、10 mM valine 含有アッセイメディウムに置換する。4 時間インキュベート後 plate を氷上に置き、1.5 ml チューブに 400 μ l のメディウムを移し、40% TCA を 200 μ l (final 10%) と、20 mg/ml BSA を 200 μ l を加える。ボルテックスして 4°C 5-30 min 静置し、12,000 rpm 5 分間遠心して、上清 400 μ l をシンチレーションバイアルに移し、3 ml シンチレータを加える。液体シンチレーションカウンタで放射活性を測定する (cpm released)。Plate を ice cold 10% TCA で 2 回 wash し、1 M NaOH を加える。37°C

20 分間インキュベート後、ピペッティングして 250 μ l をシンチレーションバイアルに移し 3 ml シンチレータを加え液体シンチレーションカウンタで放射活性を測定する (cell cpm)。タンパク質分解率 (%) を以下の通り算出する。

$$(\text{release cpm} \times 1.25 \times 2 \times 100) / \{(\text{release cpm} \times 1.25 \times 2) + (\text{cell cpm} \times 2)\}$$

【統計解析】

論文のデータは全て mean + S.E.M. で表記している。統計学的有意差は Student's *t*-test または Turkey test にて判定した。

引用文献

Airaksinen, R., Rantakokko, P., Turunen, A. W., Vartiainen, T., Vuorinen, P. J., Lappalainen, A., Vihervuori, A., Mannio, J. and Hallikainen, A. (2010) Organotin intake through fish consumption in Finland. *Environ Res*, **110**, 544-547.

Blandini, F., Porter, R. H. and Greenamyre, J. T. (1996) Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, **12**, 73-94.

Borges, K. and Dingledine, R. (2001) Functional organization of the GluR1 glutamate receptor promoter. *J Biol Chem*, **276**, 25929-25938.

Borges, K., Myers, S. J., Zhang, S. and Dingledine, R. (2003) Activity of the rat GluR4 promoter in transfected cortical neurons and glia. *J Neurochem*, **86**, 1162-1173.

Calderone, A., Jover, T., Noh, K. M. et al. (2003) Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci*, **23**, 2112-2121.

Chang, L. W. and Dyer, R. S. (1983) A time-course study of trimethyltin induced neuropathology in rats. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **5**, 443-459.

Chau, C. M., Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1992) Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem*, **267**, 6999-7006.

Chauhan, S., Goodwin, J. G., Manyam, G., Wang, J., Kamat, A. M. and Boyd, D. D. (2013) ZKSCAN3 is a master transcriptional repressor of autophagy. *Mol Cell*, **50**, 16-28.

Choi, D. W. (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, **11**, 465-469.

Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X. and Huganir, R. L. (2000) Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci*, **20**, 7258-7267.

Dhar, S. S., Liang, H. L. and Wong-Riley, M. T. (2009a) Nuclear respiratory factor 1 co-regulates AMPA glutamate receptor subunit 2 and cytochrome c oxidase: tight coupling of glutamatergic transmission and energy metabolism in neurons. *J Neurochem*, **108**, 1595-1606.

Dhar, S. S., Ongwijitwat, S. and Wong-Riley, M. T. (2008) Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *J Biol Chem*, **283**, 3120-3129.

Dhar, S. S. and Wong-Riley, M. T. (2009b) Coupling of energy metabolism and synaptic transmission at the transcriptional level: role of nuclear respiratory factor 1 in regulating both cytochrome c oxidase and NMDA glutamate receptor subunit genes. *J Neurosci*, **29**, 483-492.

Dong, H., O'Brien, R. J., Fung, E. T., Lanahan, A. A., Worley, P. F. and Huganir, R. L. (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*, **386**, 279-284.

Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H. (1991) Behavioral effects of acute exposure to tributyltin chloride in rats. *Neurotoxicol Teratol*, **13**, 489-493.

Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*, **264**, 14361-14368.

Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded

respiratory genes in animal cells. *Genes Dev*, **4**, 1023-1034.

Friedman, L. K., Segal, M. and Velísková, J. (2003) GluR2 knockdown reveals a dissociation between $[Ca^{2+}]_i$ surge and neurotoxicity. *Neurochem Int*, **43**, 179-189.

Friedman, L. K. and Velísková, J. (1998) GluR2 hippocampal knockdown reveals developmental regulation of epileptogenicity and neurodegeneration. *Brain Res Mol Brain Res*, **61**, 224-231.

Gugneja, S. and Scarpulla, R. C. (1997) Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem*, **272**, 18732-18739.

Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S. and Uchino, S. (2003) Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J Neurosci Res*, **74**, 676-687.

Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 31-108.

Huo, L. and Scarpulla, R. C. (2001) Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol*, **21**, 644-654.

Ishida, K., Kotake, Y., Miyara, M., Aoki, K., Sanoh, S., Kanda, Y. and Ohta, S. (2013) Involvement of decreased glutamate receptor subunit GluR2 expression in lead-induced neuronal cell death. *J Toxicol Sci*, **38**, 513-521.

Ishida, K., Saiki, T., Umeda, K., Miyara, M., Sanoh, S., Ohta, S. and Kotake, Y. (2017a) Prenatal Exposure to Tributyltin Decreases GluR2 Expression in the Mouse Brain. *Biol Pharm Bull*, **40**, 1121-1124.

Ishida, K., Kotake, Y., Sanoh, S. and Ohta, S. (2017b) Lead-Induced ERK Activation Is Mediated by GluR2 Non-containing AMPA Receptor in Cortical Neurons. *Biol Pharm Bull*, **40**, 303-309.

Ishida, K., Tsuyama, Y., Sanoh, S., Ohta, S. and Kotake, Y. (2017c) Perfluorooctane sulfonate induces neuronal vulnerability by decreasing GluR2 expression. *Arch Toxicol*, **91**, 885-895.

Izumi, H., Ohta, R., Nagatani, G., Ise, T., Nakayama, Y., Nomoto, M. and Kohno, K. (2003) p300/CBP-associated factor (P/CAF) interacts with nuclear respiratory factor-1 to regulate the UDP-N-acetyl-alpha-d-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-3 gene. *Biochem J*, **373**, 713-722.

Jia, Z., Agopyan, N., Miu, P. et al. (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron*, **17**, 945-956.

Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T. and Nishikawa, J. (2005) Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol*, **67**, 766-774.

Kim, J., Son, Y., Lee, S. et al. (2015) Developmental and degenerative modulation of GABAergic transmission in the mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci*, **47**, 320-332.

Kjøller, C., and Diemer, N. H. (2000) GluR2 protein synthesis and metabolism in rat hippocampus following transient ischemia and ischemic tolerance induction. *Neurochem Int* **37**, 7-15.

Kondo, M., Sumino, R. and Okado, H. (1997) Combinations of AMPA receptor subunit

expression in individual cortical neurons correlate with expression of specific calcium-binding proteins. *J Neurosci*, **17**, 1570-1581.

Krüger, K., Diepgrond, V., Ahnefeld, M., Wackerbeck, C., Madeja, M., Binding, N. and Musshoff, U. (2005) Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels by trimethyltin chloride. *Br J Pharmacol*, **144**, 283-292.

Li, Y., Xu, M., Ding, X. et al. (2016) Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nat Cell Biol*, **18**, 1065-1077.

Liu, S. J. and Zukin, R. S. (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci*, **30**, 126-134.

Luo, T., Wu, W. H. and Chen, B. S. (2011) NMDA receptor signaling: death or survival? *Front Biol*, **6**, 468-476.

Martina, J. A. and Puertollano, R. (2013) Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *J Cell Biol*, **200**, 475-491.

Matsuda, S., Launey, T., Mikawa, S. and Hirai, H. (2000) Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J*, **19**, 2765-2774.

McMeekin, L. J., Lucas, E. K., Meador-Woodruff, J. H., McCullumsmith, R. E., Hendrickson, R. C., Gamble, K. L. and Cowell, R. M. (2016) Cortical PGC-1 α -Dependent Transcripts Are Reduced in Postmortem Tissue From Patients With Schizophrenia. *Schizophr Bull*, **42**, 1009-1017.

Mead, A. N., Brown, G., Le Merrer, J. and Stephens, D. N. (2005) Effects of deletion of *gria1* or *gria2* genes encoding glutamatergic AMPA-receptor subunits on place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **179**, 164-171.

Mead, A. N., Morris, H. V., Dixon, C. I., Rulten, S. L., Mayne, L. V., Zamanillo, D. and Stephens, D. N. (2006) AMPA receptor GluR2, but not GluR1, subunit deletion impairs emotional response conditioning in mice. *Behav Neurosci*, **120**, 241-248.

Migues, P. V., Hardt, O., Wu, D. C., Gamache, K., Sacktor, T. C., Wang, Y. T. and Nader, K. (2010) PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci*, **13**, 630-634.

Miki, S., Ikeda, K., Oba, Y., Satone, H., Honda, M., Shimasaki, Y., Onikura, N., Arakawa, O. and Oshima, Y. (2011) Tributyltin in blood of marine fish collected from a coastal area of northern Kyushu, Japan. *Mar Pollut Bull*, **62**, 2533-2536.

Mitra, S., Gera, R., Siddiqui, W. A. and Khandelwal, S. (2013) Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood-brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: an in vivo and in vitro study. *Toxicology*, **310**, 39-52.

Mitra, S., Siddiqui, W. A. and Khandelwal, S. (2014) Early cellular responses against tributyltin chloride exposure in primary cultures derived from various brain regions. *Environ Toxicol Pharmacol*, **37**, 1048-1059.

Monti, B., Marri, L. and Contestabile, A. (2002) NMDA receptor-dependent CREB activation in survival of cerebellar granule cells during in vivo and in vitro development. *Eur J Neurosci*, **16**, 1490-1498.

Myers, S. J., Peters, J., Huang, Y., Comer, M. B., Barthel, F. and Dingledine, R. (1998) Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci*, **18**, 6723-6739.

Nakanishi, T., Nishikawa, J., Hiromori, Y. et al. (2005) Trialkyltin compounds bind

retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions. *Mol Endocrinol*, **19**, 2502-2516.

Nakatsu, Y., Kotake, Y., Komasa, K., Hakoza, H., Taguchi, R., Kume, T., Akaike, A. and Ohta, S. (2006) Glutamate excitotoxicity is involved in cell death caused by tributyltin in cultured rat cortical neurons. *Toxicol Sci*, **89**, 235-242.

Nakatsu, Y., Kotake, Y., Takishita, T. and Ohta, S. (2009) Long-term exposure to endogenous levels of tributyltin decreases GluR2 expression and increases neuronal vulnerability to glutamate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **240**, 292-298.

Nishimura, T., Schwarzer, C., Furtinger, S., Imai, H., Kato, N. and Sperk, G. (2001) Changes in the GABA-ergic system induced by trimethyltin application in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, **97**, 1-6.

Oguro, K., Oguro, N., Kojima, T., Grooms, S. Y., Calderone, A., Zheng, X., Bennett, M. V. and Zukin, R. S. (1999) Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *J Neurosci*, **19**, 9218-9227.

Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A. and Sacktor, T. C. (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, **313**, 1141-1144.

Roczniak-Ferguson, A., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T. C. and Ferguson, S. M. (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal*, **5**, ra42.

Scarpulla, R. C. (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*, **97**, 673-683.

Scarpulla, R. C. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, **88**, 611-638.

Schoenherr, C. J. and Anderson, D. J. (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, **267**, 1360-1363.

Serrano, P., Friedman, E. L., Kenney, J. et al. (2008) PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol*, **6**, 2698-2706.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L. et al. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*, **31**, 1095-1108.

Shin, J. H., Ko, H. S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y. I., Pletinkova, O., Troconso, J. C., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (2011) PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, **144**, 689-702.

Sivasubramanian, M., Kanagaraj, N., Dheen, S. T. and Tay, S. S. (2015) Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's disease and in MPP⁺-treated MN9D cells in vitro. *Neuroscience*, **290**, 636-648.

Stridh, H., Fava, E., Single, B., Nicotera, P., Orrenius, S. and Leist, M. (1999) Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production. *Chem Res Toxicol*, **12**, 874-882.

Tong, C. W., Wang, J. L., Jiang, M. S., Hsu, C. H., Chang, W. T. and Huang, A. M. (2013) Novel genes that mediate nuclear respiratory factor 1-regulated neurite

outgrowth in neuroblastoma IMR-32 cells. *Gene*, **515**, 62-70.

Tsunoda, M., Konno, N., Nakano, K. and Liu, Y. (2004) Altered metabolism of dopamine in the midbrain of mice treated with tributyltin chloride via subacute oral exposure. *Environ Sci*, **11**, 209-219.

Tymianski, M. (1996) Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro. *Adv Neurol*, **71**, 85-105.

Umeda, K., Miyara, M., Ishida, K., Sanoh, S., Ohta, S. and Kotake, Y. (2017) Carbofuran causes neuronal vulnerability to glutamate by decreasing GluA2 protein levels in rat primary cortical neurons. *Arch Toxicol*.

Viglino, L., Pelletier, E. and St-Louis, R. (2004) Highly persistent butyltins in northern marine sediments: a long-term threat for the Saguenay Fjord (Canada). *Environ Toxicol Chem*, **23**, 2673-2681.

Virbasius, C. A., Virbasius, J. V. and Scarpulla, R. C. (1993) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev*, **7**, 2431-2445.

Virbasius, J. V. and Scarpulla, R. C. (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1309-1313.

von Ballmoos, C., Brunner, J. and Dimroth, P. (2004) The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11239-11244.

Wang, C., Li, Z., Lu, Y. et al. (2006) Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor

1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 11567-11572.

Wang, X., Pan, L., Zou, Z., Wang, D., Lu, Y., Dong, Z. and Zhu, L. (2017) Hypoxia reduces testosterone synthesis in mouse Leydig cells by inhibiting NRF1-activated StAR expression. *Oncotarget*, **8**, 16401-16413.

Wierstra, I. (2008) Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **372**, 1-13.

Wyszynski, M., Kim, E., Dunah, A. W., Passafaro, M., Valtschanoff, J. G., Serra-Pagès, C., Streuli, M., Weinberg, R. J. and Sheng, M. (2002) Interaction between GRIP and liprin-alpha/SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron*, **34**, 39-52.

Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J. and Huganir, R. L. (1999) Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron*, **22**, 179-187.

Yamamoto, A. and Simonsen, A. (2011) The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, **43**, 17-28.

Ying, H. S., Weishaupt, J. H., Grabb, M., Canzoniero, L. M., Sensi, S. L., Sheline, C. T., Monyer, H. and Choi, D. W. (1997) Sublethal oxygen-glucose deprivation alters hippocampal neuronal AMPA receptor expression and vulnerability to kainate-induced death. *J Neurosci*, **17**, 9536-9544.

Zhang, L., Bao, Y., Liu, Y. and Li, J. (2014) Downregulation of nuclear respiratory factor-1 contributes to mitochondrial events induced by benzo(a)pyrene. *Environ Toxicol*, **29**, 780-787.

基礎となる原著論文

Ishida K., Aoki K., Takishita T., Miyara M., Sakamoto S., Sanoh S., Kimura T., Kanda Y., Ohta S., Kotake Y. (2017) Low-Concentration Tributyltin Decreases GluR2 Expression via Nuclear Respiratory Factor-1 Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences* **18**. E1754.

本論文に関連した原著論文

Hanaoka S., Ishida K., Tanaka S., Sakamoto S., Okuda K., Sanoh S., Ohta S., Kotake Y. Tributyltin induces epigenetic changes and decreases the expression of nuclear respiratory factor-1. *Metallomics* in press.

Umeda K., Miyara M., Ishida K., Sanoh S., Ohta S., Kotake Y. (2018) Carbofuran causes neuronal vulnerability to glutamate by decreasing GluA2 protein levels in rat primary cortical neurons. *Archives of Toxicology* **92**. 401-409.

Ishida K., Saiki T., Umeda K., Miyara M., Sanoh S., Ohta S., Kotake Y. (2017) Prenatal exposure to tributyltin decreases GluR2 expression in the mouse brain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **40**. 1121-1124.

Ishida K., Kotake Y., Sanoh S., Ohta S. (2017) Lead-induced ERK activation is mediated by GluR2 non-containing AMPA receptor in cortical neurons. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **40**. 303-309.

Ishida K., Tsuyama Y., Sanoh S., Ohta S., Kotake Y. (2017) Perfluorooctane sulfonate induces neuronal vulnerability by decreasing GluR2 expression. *Archives of Toxicology* **91**. 885-895.

Miyara M., Umeda K., Ishida K., Sanoh S., Kotake Y., Ohta S. (2016) Protein extracts from cultured cells contain nonspecific serum albumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **80**. 1164-7.

Umeda K., Kotake Y., Miyara M., Ishida K., Sanoh S., Ohta S. (2016) Methoxychlor and fenvalerate induce neuronal death by reducing GluR2 expression. *Journal of Toxicological Sciences* **41**. 255-64.

Ishida K., Kotake Y., Miyara M., Aoki K., Sanoh S., Kanda Y., Ohta S. (2013) Involvement of decreased glutamate receptor subunit GluR2 expression in lead-induced neuronal cell death. *Journal of Toxicological Sciences* **38**. 513-521.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、最適な研究環境を与えていただきました 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 未病・予防医学研究室 杉山 政則 教授に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜りました 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学研究室 太田 茂 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、直接の御指導並びに多大なるご助言をいただきました 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学研究室 古武 弥一郎 准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、数多くの貴重な御助言をいただきました 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学研究室 佐能 正剛 助教、宮良 政嗣 博士、坂本 修一郎 博士に深く感謝いたします。

本研究において審査、ご助言を賜りました 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 治療薬効学研究室 小澤 孝一郎 教授、広島大学大学院医歯薬保健学研究科 薬効解析科学教室 森岡 徳光 教授、広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生理化学研究室 樋木 薫 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、常に実験環境を整えてくださり、多くのご助言、ご討論をしていただきました 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学研究室の諸先輩方、同級生、後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後に、学生生活を支え、見守ってくれた家族に深く感謝いたします。