

核タンパク質の細胞外分泌と神経炎症誘導の関係性

市川 伶旺 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

神経変性疾患は、脳や脊髄にある神経細胞のなかで、ある特定の神経細胞群が徐々に障害を受け脱落する病気である。この原因は長らく未解明であった。しかし、近年では慢性的な脳内炎症によってミクログリアを始めとした脳内の免疫担当細胞が異常に活性化することが原因の1つであることが示唆されている。脳神経系ではダメージを受けた神経細胞から放出される分子(DAMPs)がミクログリアなどのパターン認識受容体(PRRs)に結合することで自然免疫を活性化させて脳内の炎症を誘導する。

近年、非ヒストン性クロマチン結合タンパク質 HMGB1 がミクログリアの PRR と結合することによって炎症応答を活性化させ、特定の神経細胞を脱落させることが報告されている[1]。HMGB1 は、グリア細胞を中心にして脳全体で発現する核タンパク質の一種であり、核内では DNA を安定化させる働きがある。一方で、LPS 刺激をかけることによって細胞外へと放出されるように、核外に出ることで DAMPs として働くことが知られている。そのため、HMGB1 が細胞外に放出されることで神経変性疾患を誘発していることが考えられる。そのため、本研究では HMGB1 に着目した。近年では HMGB1 の一部の翻訳後修飾が細胞内の局在を調節することが示唆されている[2]。そこで、私は HMGB1 の細胞外への移行についても翻訳後修飾が調節していると考えた。そこで、本研究ではまず HMGB1 にどのような翻訳後修飾がついているのかについて調べるためのシステムを立ち上げることを目的とした。

【方法】

(1) 細胞培養

細胞はマウス神経芽細胞腫(Neuro-2a)を用いた。培地は EMEM を用いた。

(2) プラスミド

HMGB1 をヒト胎児脳 cDNA ライブラリからクローニングして、pCS4-Myc の BglII と pcDNA4-Flag の BamHI の制限酵素サイトにそれぞれ組み込んだ。

(3) 遺伝子導入・薬剤処理

Myc-HMGB1 を Neuro2a にトランスフェクションさせて 24 時間後に LPS(1 µg/mL)処理した。そして、24 時間後と 48 時間後に分けてそれぞれサンプルを回収した。

(4) ウェスタンブロット

サンプル回収の際に上清と細胞溶解液に分けた。上清は培養した条件培地から 180 µL 回収して、4x Sample buffer を 60 µL 添加して 100°C で 3 分間ボイルした。細胞抽出液では、細胞を PBS で洗浄して Lysis buffer を 100 µL 用いて細胞を溶解して細胞抽出液を作った。そして 4x Sample buffer を 30 µL 加えて 100°C で 3 分間ボイルした。そして上清、細胞抽出液それぞれアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。そして、これをメンブレンに転写して、スキムミルクでブロッキングした。そして、これを TBS-T で洗浄して、anti-Myc 抗体(9E10, 1:1000)を一晩 4°C

でインキュベートした。そしてこれを TBS-T で洗浄して、HRP で標識された anti-mouse IgG 抗体で 1 時間インキュベートした。そして、TBS-T で洗浄してケミルミワン Super で検出した。

【結果】

まず、ウェスタンブロットによって pCS4-Myc-HMGB1 が発現することが確認された。次に、Neuro-2a に LPS 刺激をかけて細胞内外で HMGB1 を比較することによって LPS 刺激による細胞外への HMGB1 の放出の有無を検証した。その結果、LPS 刺激をかけた状態で条件培地中に HMGB1 が見られた。このことから、Neuro-2a でも HMGB1 が LPS 刺激によって放出されることが確認された。

【考察と展望】

今回条件培地中で見られた HMGB1 は、細胞抽出液の中の HMGB1 と比較して分子量が大きくなっていった。よって、HMGB1 が翻訳後修飾される可能性が示唆された。予備的ながら、条件培地中の Myc-HMGB1 を Myc 抗体で免疫沈降し、細胞内の Myc-HMGB1 と比較すると、約 10 kDa ほどバンドがシフトしていた。よって、HMGB1 が LPS 刺激によって未知の修飾を受けて分泌されている可能性が考えられた。

本研究では、細胞外の HMGB1 の翻訳後修飾の種類の検証のためのシステムを立ち上げた。今後は、これまでで得た材料と知見を用いて実際にどのような翻訳後修飾が生じているのか検証する予定である。

また、DAMPs が細胞外へと放出されて PRR に受容されることによって炎症応答が誘導されることから、翻訳後修飾によって細胞外への放出が調節されていた場合に炎症応答を調節する可能性も考えられる。実際に、近年の研究によって HMGB1 の脱アセチル化が内毒素血症による炎症を抑制して、生存率を上昇させることが示唆されている[3]。そのため、まずは細胞外の HMGB1 が神経炎症に重要かどうか検証するために、大腸菌から精製した HMGB1、細胞から精製した HMGB1、条件培地中の HMGB1 で炎症応答の強さを比較する予定である。

【参考文献】

- [1] Gao HM et al. 2011. HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J Neurosci.* 31(3):1081–1092.
 [2] Bonaldi T et al. 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *The EMBO Journal.*
 [3] Hwang JS et al. 2015. Deacetylation-mediated interaction of SIRT1-HMGB1 improves survival in a mouse model of endotoxemia. *Sci Rep.* 5.