

イオンチャネルを介する神経刺激に応じた
YB-1 タンパク質による迅速な翻訳調節機構の解析と
ストレス応答における YB-1 タンパク質の役割

日本大学大学院薬学研究科

田中 融

【目次】

【目的】	1
【材料と方法】	2
〈材料〉	2
〈方法〉	4
1. 細胞培養	4
2. 培養細胞からの細胞質抽出液の調製	4
3. 組織からの細胞質画分の調製	4
4. 細胞質画分からの RNA 抽出	4
5. ショ糖勾配遠心法.....	4
6. Western blot 法.....	5
7. 免疫沈降法.....	5
8. 脳において YB-1 と結合している mRNA の解析.....	6
9. RT-PCR による RNA の検出	6
10. YB-1 の過剰発現	8
11. YB-1 のノックダウン	8
12. 神経作用薬による刺激	8
13. cycloheximide、 α -bungarotoxin、LY294002 処理.....	8
14. 亜ヒ酸処理.....	9
15. 細胞免疫染色.....	9
第一部：イオンチャネルを介する神経刺激に応じた	
YB-1 タンパク質による迅速な翻訳調節機構の解析	11
【序論】	12
【結果】	14
1. 脳における YB-1 の polysome 結合性と	
ターゲット mRNA の cDNA クローニング	14
2. GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の翻訳活性に対する YB-1 の量的変化の影響.....	16
3. 神経活動による GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の翻訳調節における	
YB-1 の関与.....	19

4. kainic acid による YB-1 の polysome 結合性の変化と GluR2、CaM1 の発現量の変化	21
5. nicotine 刺激による YB-1 と HSP60 の相互作用の増加	23
6. nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化および YB-1 と HSP60 の相互作用の増加に対する PI3K/Akt 経路の関与	25
7. nicotine 刺激による GluR2 mRNA に対する YB-1 の結合比率の変化および YB-1 と HSP-60 の相互作用の変化	26
8. polysome から遊離した YB-1 の細胞内分布に対する HSP60 の影響	28
【考察】	30
第二部：ストレス応答における YB-1 タンパク質の役割	35
【序論】	36
【結果】	37
1. 亜ヒ酸ストレスによる GluR2 mRNA の翻訳抑制と SG への取り込み	37
2. 亜ヒ酸ストレスに応じた YB-1 タンパク質と HSP70 mRNA の相互作用の変化 ..	39
3. ストレス下における HSP70 mRNA の翻訳活性化および GluR2 mRNA の翻訳抑制に対する YB-1 の関与	41
4. SG の形成における YB-1 の役割	44
【考察】	46
【謝辞】	49
【参考文献】	50

【略号一覧】

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CaM1: calmodulin 1

CaMK II α : calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α

DHPG: 3,5-dihydroxyphenylglycine

DTT: dithiothreitol

ECL: enhanced chemi luminescence

EDTA: ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

FBS: fetal bovine serum

Glur2: ionotropic glutamate receptor subunit 2

HSP: heat-shock protein

mAChR: muscarinic acetylcholine receptor

nAChR: nicotinic acetylcholine receptor

PBS: phosphate buffered saline

PI3K: phosphoinositol 3-kinase

PMSF: phenyl methyl sulfonyl fluoride

PVDF: polyvinylidene fluoride

RAR α : retinoic acid receptor

SDS: sodium dodecyl sulfate

SG: stress granule

【目的】

遺伝子の発現は、細胞の状態に応じて転写レベルと翻訳レベルの両方で調節されている。転写調節については非常に多くの転写調節配列とそれらに結合する転写因子が同定されているが、翻訳調節に関する知見はとても少ない。遺伝子の発現において、翻訳反応は転写反応よりも下流に位置しており、翻訳を調節した方が外部からの刺激に対して速やかに応答することが出来る。YB-1 は動物の一生の間で組織毎に必要な時期に供給され、特異的な mRNA の翻訳に対して促進的あるいは抑制的に働く翻訳調節因子と考えられている。特に脳では胎生後期から2週目にかけて多く存在し、mRNP 顆粒に含まれて神経細胞の dendrite まで分布しており、神経活動依存的な翻訳調節を行っていることが予想される。しかしながら、神経細胞において YB-1 がどのような mRNA と相互作用し、どのようにその翻訳を調節しているかは明らかとなっておらず、それらを調べることは神経系の発達の過程や神経疾患との関わりを分子レベルで理解するうえで大切である。

また、YB-1 は細胞がストレスを受けた際に形成するストレス顆粒(stress granule: SG) の構成成分としても知られている。SG はヒートショックや酸化ストレスなどのストレスによって生じる異常なタンパク質の蓄積を防ぐために、多くの mRNA をその中に取り込み翻訳抑制の場として機能している。一方で、分子シャペロンである HSP70 の mRNA は既存のタンパク質の変性を防ぐために、SG から排除されて翻訳が活性化することが報告されている。YB-1 は SG の構成成分の一つでありマーカーとして用いられることもあるが、その機能は明らかではなく、また HSP70 の mRNA の翻訳活性化との関わりも調べられていない。SG は神経細胞でも形成されることから、それらにおける YB-1 の役割を調べることは、神経細胞のストレス応答の機構を知るうえで重要である。

本研究では、神経細胞において YB-1 が結合する mRNA を同定し、イオンチャネルを介する神経活動に応じた YB-1 による翻訳調節を解析した(第一部)。さらに、ストレス下における SG の形成およびストレス応答タンパク質である HSP70 の mRNA の翻訳活性化に対する YB-1 の役割を調べた(第二部)。

【材料と方法】

〈材料〉

1. 動物

マウス(ddY) (三共ラボサービス)

2. 細胞

NG108-15 細胞(マウス neuroblastoma N18TG2 × ラット glioma C6BU-1)

3. 培地

DMEM (NISSUI PHARMACEUTICAL)

4. 神経作用薬

nicotine (WAKO)

carbachol, noradrenaline, kainic acid (SIGMA)

5. タンパク合成阻害薬

cycloheximide (SIGMA)

6. 酸化ストレス誘発薬

sodium arsenite (SIGMA)

7. 酵素

Ex Taq polymerase, Ribonuclease inhibitor (Human placenta), Cloned DNase I (RNase-free), Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH⁻) (以上 TAKARA BIO)

8. 抗体

rabbit anti-YB-1 antibody (当研究室にて作成)

rabbit anti-CaM1 antibody, goat anti-GluR2 antibody, goat anti-HSP60 antibody, goat anti-TIA-1 antibody, rabbit anti-HSP70 antibody, rabbit anti-β actin antibody

(以上 Santa Cruz)

rabbit anti-GFP antibody (Life Technologies)

mouse anti-L7 antibody, mouse anti-S6 antibody, rabbit anti-pAkt (Ser473) antibody (以上 Cell Signaling Technologies)

rabbit anti-nAChR- α 7 antibody (Alomone Labs)

rabbit anti-nAChR- α 4 antibody (Epitomics)

Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody, Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody, Alexa Fluor 555-conjugated donkey anti-goat IgG antibody (以上 Invitrogen)

peroxidase labeled anti-rabbit antibody, peroxidase labeled anti-mouse antibody, peroxidase labeled anti-goat antibody (以上 GE Healthcare)

9. 緩衝液

TKM buffer : 50mM Triethanolamine, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM PMSE,
1mM DTT

2×separation buffer : 0.75M Tris-HCl (pH8.8), 0.2% SDS

2×stacking buffer : 0.25M Tris-HCl (pH6.8), 0.2% SDS

10×SDS running buffer : 0.25M Tris, 1.92M glycine, 1% SDS

5×SDS sample buffer : 312.5mM Tris-HCl (pH 6.8), 50% Glycerol, 12.5% SDS, 10%
2-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue

1×transfer buffer : 25mM Tris-HCl (pH8.8), 192mM glycine, 20% methanol

10×TBST : 200mM Tris-HCl (pH7.5), 1.5M NaCl, 0.5% Tween20

CBB : 0.1% CBB-G, 45% methanol, 10% acetic acid

TBE : 89mM Tris, 2mM EDTA, 89mM Boric acid

RNA extraction buffer : 20mM Tris-HCl (pH7.5), 140mM NaCl, 2% SDS

〈方法〉

1. 細胞培養

細胞培養にはコラーゲンコートされた滅菌シャーレを用いた。NG108-15 細胞を 10% FBS、3.12mM L-glutamine、0.008% ストレプトマイシン-ペニシリンを含む DMEM 培地中、37°C、5% CO₂ で培養した。

2. 培養細胞からの細胞質抽出液の調製

以下に示す操作は全て 4°C で行った。培養細胞を PBS(-) (Life Technologies) で洗浄した後、新たに PBS を加えフラッシュすることではがして集めた。この細胞を 1000rpm、5 分間遠心して回収し、TKM buffer に懸濁して Dounce homogenizer で 40 回、さらに 23G の注射針に 40 回通した後、3000rpm、5 分間遠心した。この上清を細胞質抽出液とした。

3. 組織からの細胞質画分の調製

動物を使った全ての実験は、日本大学実験動物指針に従って行った。マウスから脳（大脳皮質・海馬領域）を摘出し、TKM buffer 中でポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。それを 3000rpm、4°C、15 分間遠心し、得られた上清を細胞質画分とした。

4. 細胞質画分からの RNA 抽出

細胞質抽出液にフェノール・クロロホルム混液を等量加えよく振り混ぜた後、15000rpm、3 分間遠心し上層を分取した。これを 2 回繰り返す。分取した上層に等量のクロロホルムを加え、よく振り混ぜた後、室温で 15000rpm、3 分間遠心して上層を分取した。これを終濃度 0.5M の NaCl 溶液とし、2.3 倍量のエタノールを加えて -20°C で一晩おいた。これを 15000rpm、4°C で 10 分間遠心して RNA を沈殿させ、70% のエタノールで洗浄後、水に溶かした。これに DNase I を加え混入している DNA を分解し、再びフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って RNA を精製した。

5. ショ糖勾配遠心法

組織から抽出した細胞質画分に Nonidet P-40 を 0.5% となるように加えた。それを 15~45% のショ糖勾配 (13mL) に積層し、SW40Ti ローター (Beckman Coulter) を用いて 28krpm で 150 分間遠心した。ペリスタポンプ (ATTO) を用い遠心チューブの底から一定量

ずつを分取し、24 フラクションに分画した。24 フラクションのうち偶数番号のものを用い、各々20 μ Lを電気泳動して、Western blot 解析を行った。抽出液の EDTA 処理は、組織から抽出した細胞質画分を終濃度 25mM となるように EDTA を加え、氷中に 30 分静置した。カニン酸を投与したマウスおよび nicotine を処理した細胞から抽出した細胞質画分については、ショ糖勾配を 20~55%とし、11 フラクションに分画した。亜硫酸処理細胞の細胞質画分は、ショ糖勾配を 20~50%とし、11 フラクションに分画した。

6. Western blot 法

6-1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質サンプルに SDS sample buffer を加え、95 $^{\circ}$ C、5 分間加熱後、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。

6-2. PVDF 膜へのトランスファーとブロッキング

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲル中で分離したタンパク質を transfer buffer を用いて、0.2A、120 分間 4 $^{\circ}$ Cで PVDF 膜にトランスファーした。PVDF 膜はあらかじめメタノール処理し、その後滅菌水に浸し、次いで transfer buffer で処理した。トランスファー後、PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む TBST 溶液 (blocking buffer)で 30 分以上ブロッキングした。

6-3. 抗体による検出

ブロッキングした PVDF 膜を、1 次抗体を含む blocking buffer 中、室温で 120 分間振とうして反応させ、その後膜を TBST で 10 分間、4 回洗った。次に、TBST で希釈した peroxidase 結合 2 次抗体を室温で 60 分間反応させた後、TBST で 10 分間、4 回洗った。目的のタンパク質は ECL detection システム(Amersham)により検出した。

7. 免疫沈降法

Dynabeads[®] Protein G (DYNAL) 50 μ L を Magnetic particle separator (MPS)にかけ、上清をすてた。残った beads を Wash buffer (0.1%BSA、0.02%NaN₃を含む PBS(-))で 1 回洗い、これに 0.01 μ g/ μ L 抗体 を含んだ Wash buffer を加え、4 $^{\circ}$ Cで穏やかに攪拌しながら一晩反応させた。反応後、Wash buffer で 4 回洗い、抽出した細胞質画分をタンパク質量で 150 μ g 加え、さらに RNase inhibitor 80 units 加えて、4 $^{\circ}$ Cで穏やかに攪拌しながら 4 時間反応させた。反応後、Wash buffer で 4 回洗い、RNA extraction buffer を加え、

MPS を用いて上清を分取した。この溶液に対してフェノール・クロロホルム抽出後エタノール沈殿を行い、RNA を精製した。タンパク質を解析する場合は、反応後 1×SDS sample buffer を加え MPS を用いて上清を分取し、Western blot を行った。

8. 脳において YB-1 と結合している mRNA の解析

抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿した複合体から RNA を抽出し、それを鋳型にして cDNA library を調製した。cDNA library の調製は SMART cDNA library construction kit (Clontech) を用いて行った。抗 YB-1 抗体で免疫沈殿した RNA に、3' SMART CDS Primer II (2.4 μ M)、SMART II Oligonucleotide (2.4 μ M) を加え、水で total 5 μ L とした。これを 72°C、2 分間処理した後、終濃度で 1×First-Strand Buffer、2mM DTT、1mM dNTP Mix、20units/ μ L Reverse Transcriptase M-MLV を加え total 10 μ L とし、42°C で 1 時間反応させた。得られた first-strand cDNA 2 μ L を鋳型とし、これに終濃度で 1×Advantage 2 PCR buffer、0.25mM dNTP Mix、0.48 μ M 5' PCR Primer II、1×Advantage 2 Polymerase Mix、水 80 μ L を加えて total 100 μ L とした。次に、95°C、1 分間処理した後、95°C-15 秒、65°C-30 秒、68°C-6 分間を 1 サイクルとして、15 サイクル反応を行った。得られた PCR 産物を TOPO® Vector (Invitrogen) につないだ後シーケンスを解析した。

9. RT-PCR による RNA の検出

9-1. 逆転写反応(Reverse Transcription: RT)

Reverse Transcriptase M-MLV キット (TAKARA BIO) を用いた。total RNA 1 μ g に 50 μ M Oligo (dT)₂₀ (invitrogen) 1 μ L を加え、さらに水を加えて全量を 13 μ L とした (免疫沈殿によって得られた RNA の場合は、得られた RNA 全てを水 12 μ L に溶かし、50 μ M Oligo (dT)₂₀ を 1 μ L 加えた)。これを 65°C、5 分間加熱し氷冷後、終濃度で 1×M-MLV buffer、0.5mM dNTP mixture、2units/ μ L ribonuclease inhibitor、10units/ μ L reverse transcriptase M-MLV とするように加え、水で total 20 μ L とし、37°C で 1 時間反応させた。反応後、70°C で 10 分間処理した後 PCR を行った。

9-2. PCR

Takara Ex Taq キット (TAKARA BIO) を用いた。RT によって得られた 1st-strand cDNA 2 μ L を鋳型とし、これに終濃度 1 μ M forward primer、1 μ M reverse primer、1×Ex-Taq buffer、0.8mM dNTP mixture、0.05units/ μ L Ex-Taq とするように加え、水で total 50 μ L

とした。次に、98°C-10 秒、55°C-30 秒、72°C-1 分を 1 サイクルとして、PCR 反応を行った。反応後、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ethidium bromide で染色して検出した。

本研究で用いたプライマーを以下に示した。

GluR2

Forward: 5'-GAAGATTGGGTACTGGAGTGAAGTG-3'

Reverse: 5'-TTAATGGAGCAATGGCAATATCAGC-3'

CaM1

Forward: 5'-ACTGTAAGCTGGTACCGTCGAGCGGTTGTCTGGT-3'

Reverse: 5'-AGTTCAGTCAGAGCTCGGGAAGAAAACATGGAGGAA-3'

YB-1

Forward: 5'-TCCGGTGGATCCGCAGACCGTAACCAT-3'

Reverse: 5'-TCTGCAGTCGACTCGACGCGCATAGGG-3'

CaMK II α

Forward: 5'-GCCTCCTGCATGCAC-3'

Reverse: 5'-TCAATGCGGCAGGAC-3'

nAChR α 7

Forward: 5'-CTTGGACCTGCAGATGCAAG-3'

Reverse: 5'-CATGCACACCAATTCAGAAG-3'

nAChR α 4

Forward: 5'-CAGGAGTGGCACGACTACAA-3'

Reverse: 5'-CGGATGATGAAGGCATAGGT-3'

HSP70

Forward: 5'-ATCGAGGTGACCTTCGACATCGACG-3'

Reverse: 5'-TGGCACTTGTCCAGCACCTTCTTCT-3'

β -actin

Forward: 5'-GATGACCCAGATCATGTTTGAG-3'

Reverse: 5'-TCAACGTCACACTTCATGATGG-3'

10. YB-1 の過剰発現

DMEM 培地を用いて、直径 35mm の滅菌シャーレの底面積に対して 70%の割合で細胞を培養し、トランスフェクションを行った。無血清 DMEM 培地 500 μ L に DNA 2.5 μ g を加えて混和した後、Lipofectamine™ LTX Reagent (Invitrogen) 6.25 μ L を加え再び混和し、室温で 30 分間静置した。これを、DMEM 培地を除いた細胞に加え、さらに無血清 DMEM 培地で total 750 μ L として 37°C で一晩培養し、タンパク質や RNA の解析を行った。

11. YB-1 のノックダウン

DMEM 培地 5mL を用いて、細胞を直径 100mm の滅菌シャーレの底面積に対して 60%の割合で培養した。無血清 DMEM 培地 625 μ L に siRNA 250pmol を加えたものと、無血清 DMEM 培地 625 μ L に Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) 12.5 μ L を加えたものを用意し、室温で 5 分間放置した。次に、これらを一つに合わせて混和し室温で 20 分間放置した後、細胞を培養したシャーレに加えて 37°C、24 時間培養した。この後、培地を無血清 DMEM 培地に換えてさらに 24 時間培養し、タンパク質や RNA の解析を行った。

12. 神経作用薬による刺激

12-1. nicotine、carbachol、noradrenaline 処理

DMEM 培地を用いて、滅菌シャーレの底面積に対して 70~80%の割合で培養した NG108-15 細胞に対して神経作用薬を処理し、経過時間ごとに細胞質画分を抽出した。神経作用薬の終濃度は、nicotine: 10 μ M、carbachol: 10 μ M、noradrenaline: 10 μ M とした。

12-2. kainic acid 処理

3 週齢のマウスの側脳室に、kainic acid (15 μ g/kg)を投与した。投与後、30 分、1 時間、3 時間経過した後、経過時間ごとに脳を摘出した。

13. cycloheximide、 α -bungarotoxin、LY294002 処理

DMEM 培地を用いて、滅菌シャーレの底面積に対して 70~80%の割合で培養した NG108-15 細胞を用いた。翻訳を阻害するために終濃度 20 μ g/mL となるように cycloheximide を加え、30 分インキュベートした後 nicotine、carbachol で処理し、3 時間後に細胞質画分を抽出した。nAChR を阻害するために、 α -bungarotoxin を nicotine 処

理の 30 分前に終濃度 10 μ M となるように加えた。PI3K/Akt 経路を阻害するために、LY294002 を nicotine 処理の 1.5 時間前に終濃度 10 μ M となるように加えた。

14. 亜ヒ酸処理

DMEM 培地を用いて、NG108-15 細胞を滅菌シャーレの底面積に対して 70~80%の割合で培養した。SG を形成させるために 1mM sodium arsenite を 30 分間処理し、Western blot、RT-PCR 解析を行った。細胞免疫染色を行う場合は、0.675cm²のチャンバーの底面積に対して 50~60%の割合で培養した細胞に、1mM sodium arsenite を処理した。

15. 細胞免疫染色

細胞を PBS で洗った後、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS で 15 分間固定した。その後、1% Triton X-100 を含む PBS で 15 分間処理した。続いて、5% スキムミルクを含む PBS 中で 1 次抗体と 2 時間反応させた。その後 PBS で洗い FITC を結合させた 2 次抗体で 2 時間インキュベートした。核は DAPI 染色で検出した。蛍光シグナルは DP-70 イメージングシステムとリンクさせた Olympus inverted microscope で検出した。1 次抗体と 2 次抗体の組み合わせは以下の通りである。

第一部 イオンチャネルを介する神経刺激に応じた YB-1 タンパク質による迅速な翻訳調節機構の解析

YB-1

1 次抗体： rabbit anti-YB-1 antibody

2 次抗体： Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody

nAChR α 4

1 次抗体： rabbit anti-nAChR- α 4 antibody

2 次抗体： Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody

nAChR α 7

1 次抗体： rabbit anti-nAChR- α 7 antibody

2 次抗体： Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody

第二部 ストレス応答における YB-1 タンパク質の役割

YB-1

1 次抗体： rabbit anti-YB-1 antibody

2 次抗体： Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody

TIA-1

1 次抗体： mouse anti-TIA-1 antibody

2 次抗体： Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody

YB-1-GFP 過剰発現細胞については、SG を goat anti-TIA-1 antibody と Alexa Fluor 555-conjugated donkey anti-goat IgG antibody によって検出した。

第一部

イオンチャネルを介する神経刺激に応じた

YB-1 タンパク質による迅速な翻訳調節機構の解析

【序論】

翻訳調節に関与すると考えられるいくつかの mRNA 結合タンパク質が知られているが(1-8)、それらの翻訳調節因子のなかで YB-1 は DNA、RNA 双方に結合活性を有し、転写因子と翻訳調節因子の両方の機能をもつユニークな多機能タンパク質である(9-11)。YB-1 は一つの遺伝子からの転写産物でありながらそれぞれの組織毎に異なるライフステージで発現する(12)。正常な細胞では、細胞質においてターゲットとなる mRNA との結合比率に依存して、polysome あるいは free の mRNP (polysome free の mRNA-タンパク質複合体)と相互作用し、翻訳促進因子として働いたり逆に抑制因子として機能することもある(11, 13, 14)。このような mRNA との相互作用の調節に関する知見として、YB-1 は mRNA の 5'キャップ構造に結合してタンパク質の翻訳を阻害し、その機能をタンパク質リン酸化酵素である Akt が調節しているという報告がある(15-20)。また当研究室ではヒートショックタンパク質である HSP60 が細胞質において YB-1 と相互作用して、polysome 結合性に影響を与えていることを見出している(21)。

動物の一生の間での組織毎の YB-1 の発現では特に脳が興味深い。これまでの研究で以下の3つのことが明らかとなっている(22, 23)。(1)脳に特異的に存在する転写因子である Math2 による調節を受けて、生後2週目までは多く存在するが、次の10日間の内に大きく減少してアダルトレベルとなる。(2)神経細胞の細胞質に存在し、核にはほとんど検出されない。(3)mRNA に結合し、polysome と相互作用して dendrite にも分布する。神経細胞では細胞体での翻訳とは別に、dendrite に輸送された mRNA が神経活動に依存して局所的に翻訳されることが知られていたが(24)、CaMKII α mRNA の dendrite での翻訳を阻害したマウスが作られ、それが記憶障害を持つことがわかったことで、脳機能における局所的タンパク質合成の重要性が明らかとなった(25)。これらのことから、YB-1 は生後の脳の発育時期において翻訳調節因子として重要な機能をもつことが考えられ、このタンパク質がどのような mRNA と相互作用し、どのようにその翻訳を調節しているかを調べることは非常に大切である。

本研究では、マウス的大脑皮質・海馬領域において polysome に含まれている YB-1 と結合している mRNA を同定した。その結果、脳の発達や機能維持に必要なタンパク質をコードするいくつかの mRNA が同定され、それらの中には GluR2 mRNA、calmodulin1 (CaM1) mRNA などがあった。GluR2 は AMPA 受容体のサブユニットで、GluR1-GluR4 サブユニットのいずれかと複合体を作って AMPA 受容体を形成し(26, 27)、Ca²⁺透過性に

影響を与えるが(28-31)、その mRNA は dendritic mRNA で神経活動依存的に翻訳されることが知られている(32-34)。CaM1 は主要な Ca²⁺結合タンパク質で、脳における様々な酵素の活性を調節しているが、CaM1 mRNA もまた dendrite に分布し、局所的な翻訳を受ける(35)。YB-1 は神経細胞の dendrite に mRNP 顆粒として分布するので、ここでは dendritic mRNA である GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の二つに着目し、YB-1 がこれらの翻訳に及ぼす影響を調べた。神経系の培養細胞である NG108-15 細胞においても YB-1 は GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の両方に結合していることを確かめ、YB-1 の存在量の変化や神経活動に応じたこれらの mRNA の翻訳活性の変化を解析した。さらに、マウスの脳にカイニン酸を投与して YB-1 の polysome 結合性の変化を調べ、投与後 30 分という非常に短時間の間に、YB-1 を含む polysome の分布が高分子側へシフトし、それと同期して GluR2 mRNA や CaM1 mRNA の翻訳活性にも変化が起こることを示した。ここまでの解析により、生後の脳において YB-1 が GluR2 mRNA や CaM1 mRNA に結合し、神経活動依存的な翻訳調節を行っていることが示唆された。

次に nAChR を介する神経活動依存的な YB-1 による翻訳調節の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、NG108-15 細胞を用いて GluR2 mRNA の翻訳調節を指標に解析した。nicotine 処理した NG108-15 細胞において、 $\alpha 7$ -nAChR を介した GluR2 mRNA の翻訳活性化が見られ、同時に YB-1 と HSP60 の相互作用が一過的に増加し Akt のリン酸化も増加するのが観察された。ショ糖勾配遠心と免疫沈殿を用いた解析により、nicotine による神経刺激を起こしたときの翻訳が活発に行われている polysome の量的変化と、その polysome 画分に存在する GluR2 mRNA に結合している YB-1 の分子比率を調べた。また、non-polysomal 画分における HSP60 と YB-1 の相互作用を調べ、HSP60 を減少させた場合に、nicotine 処理によって YB-1 の細胞内分布がどのように変わるかを観察した。これらの解析から、nicotine による神経活動依存的な YB-1 ターゲット mRNA の翻訳活性化のメカニズムのモデルを示した。本研究によって、YB-1 による翻訳調節機構の一端が明らかとなった。

【結果】

1. 脳における YB-1 の polysome 結合性とターゲット mRNA の cDNA クローニング

マウスの大脳皮質・海馬領域の細胞質画分を 15~45% のショ糖勾配遠心を用いて分画し、YB-1 とリボソーム (S6 タンパク質) の分布を調べた (Fig.1A)。YB-1 とリボソームは、共に高分子の polysome 画分に存在しており、これを EDTA 処理してリボソームを mRNA から解離させると (36)、YB-1 とリボソームは共に低分子側にシフトした。このことは、脳において YB-1 は polysome と相互作用していることを示している。YB-1 がどのような mRNA と結合しているかを調べるために、翻訳が盛んに行われている重い方の画分、No.1~8 について抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行い、得られた複合体から RNA を抽出して、cDNA クローニングを行った。シーケンスを解析し、明らかになった mRNA を Table 1 に示した。それらの中にはシグナル伝達系に關与するもの、細胞骨格系に關与するもの、翻訳系に關与するものなど様々なものが得られたが、YB-1 を含む mRNP が dendrite に分布することから、特にシグナル伝達に關わり dendritic mRNA としても知られている GluR2 と CaM1 の mRNA について、YB-1 との相互作用及び翻訳調節に關して解析していくことにした。また、dendrite で翻訳が行われる mRNA の一つとして良く知られている calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha mRNA (CaMKII α mRNA) (34, 37, 38) は、本研究で同定されたものの中にはなかった。

まず、脳において実際に YB-1 が GluR2 mRNA や CaM1 mRNA と相互作用しているかを調べるために、マウス大脳皮質・海馬領域の細胞質を EDTA 処理後、抗 YB-1 抗体で免疫沈殿を行った。RNA を抽出し、GluR2 mRNA、CaM1 mRNA、CaMKII α mRNA に対する特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。抗 YB-1 抗体で免疫沈殿したサンプルでは GluR2 mRNA、CaM1 mRNA いずれも検出されたがコントロール (CR) 抗体では検出されなかった (Fig. 1B)。CaMKII α mRNA は、flow through には存在しているのが確認されたが、YB-1 抗体では免疫沈殿されてこなかった。このことは、YB-1 は CaMKII α mRNA とは結合していないことを示している。したがって、YB-1 は脳においてある種の特異的な dendritic mRNA と相互作用していると考えられる。

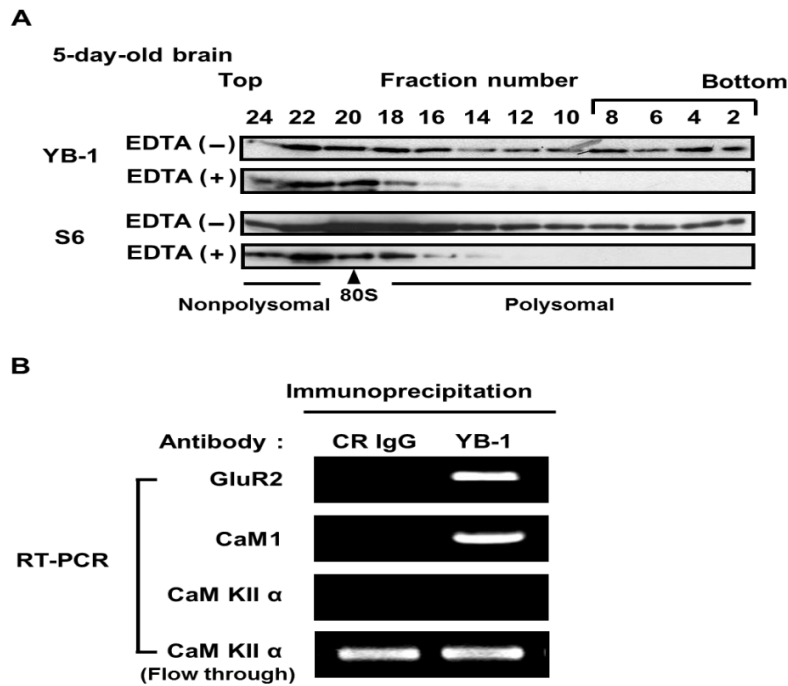


Fig. 1 生後マウスの脳の polysome 画分における YB-1 と GluR2 mRNA、CaM1 mRNA との相互作用 (A) 五日齢のマウスの大脳皮質・海馬領域から細胞質を抽出し、15~45% のショ糖勾配遠心を行った。リボソームを mRNA から解離させるために 25mM EDTA で処理したサンプルについても同様に遠心分離した。各画分をそれぞれ等量ずつ分取し、Western blot を行い、抗 YB-1 抗体、抗 S6 ribosomal protein 抗体を用いて検出した。ribosomal RNA の分布から推定される 80S ribosome の位置は図に示した。高分子量の polysome フラクシオンである No. 1~8 について免疫沈殿を行った。(B) 細胞質画分を EDTA で処理し、抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。コントロールとして CR IgG を用いた。得られた免疫複合体から RNA を抽出し、GluR2、CaM1、CaMKII α mRNA に対する特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

Table 1 マウスの脳における YB-1 ターゲット mRNA

α -tubulin	ARF: ADP-ribosylation factor
β -actin	Calmodulin 1
Catenin beta: Cadhelin binding protein	Elongation factor-1 α
Gamma-glutamyl hydrolase	GluR2: Ionotropic glutamate receptor subunit 2
Glutamine transporter	NELL2: Neural epidermal growth factor family protein
Ribosomal proteins	STAM1: Signal transducing adaptor molecule
Stathmin: microtubule destabilizing factor	

2. GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の翻訳活性に対する YB-1 の量的変化の影響

YB-1 の細胞内存在量が GluR2 mRNA や CaM1 mRNA の翻訳に及ぼす影響について解析した。まず、神経系の培養細胞である NG108-15 細胞に YB-1-GFP 発現 vector (pYB-1-GFP)あるいはコントロール GFP vector (pEGFP)をトランスフェクションした。細胞質を抽出し、抗 GFP 抗体で免疫沈殿して得られた免疫複合体から RNA を抽出後、特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、YB-1-GFP 発現細胞では GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の cDNA が観察されたが、コントロールの GFP 発現細胞では検出されなかった(Fig. 2A)。これにより、発現させた YB-1-GFP も GluR2 mRNA と CaM1 mRNA に相互作用していることが確認された。YB-1-GFP を発現させた細胞では、内在性の YB-1 の量に変化は見られなかったが、GluR2 タンパク質、CaM1 タンパク質の発現量はどちらも明らかに減少した (Fig. 2B)。このとき RT-PCR によって調べた GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の量には大きな変化が見られなかった (Fig. 2C)。当研究室では以前、新たに合成された YB-1-GFP が主にシヨ糖勾配遠心上の non-polysomal 画分に分布することを報告している(15)。これらの結果から、YB-1 の過剰発現によって polysome 形成が阻害され、GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳が抑制されたと考えられる。

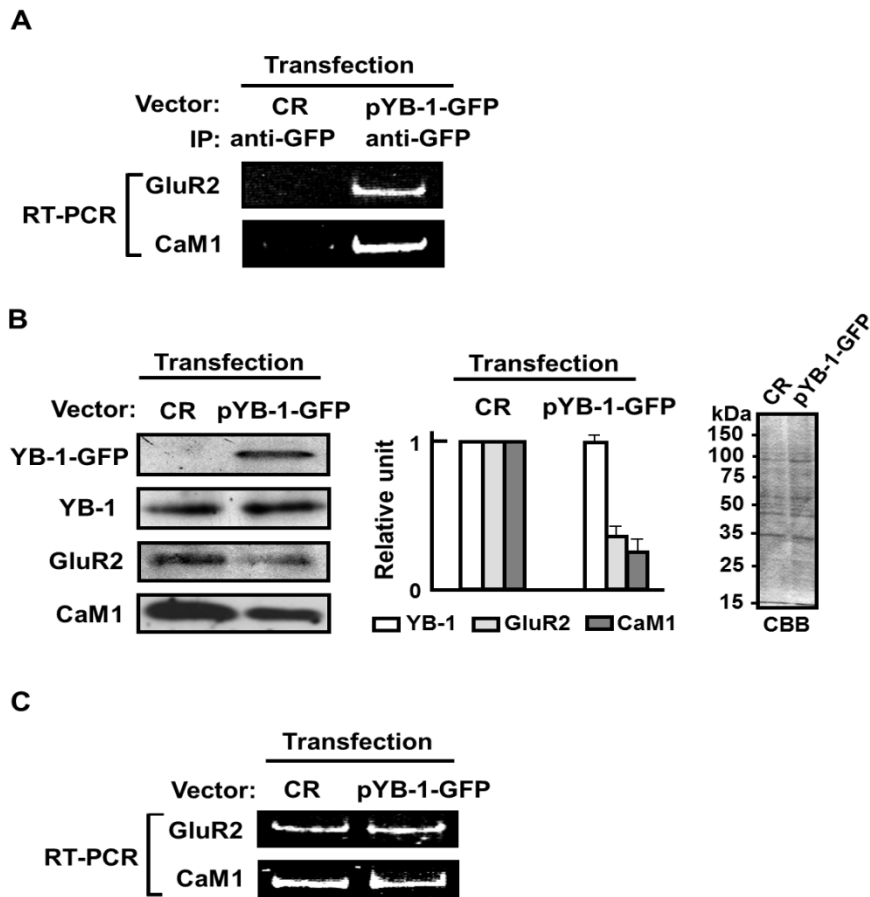


Fig. 2 NG108-15 細胞における GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳活性に対する YB-1 過剰発現の影響 (A) NG108-15 細胞に YB-1-GFP 発現ベクター(pYB-1-GFP)あるいはコントロール GFP ベクターをトランスフェクションした。細胞抽出液を抗 GFP 抗体によって免疫沈殿し、得られた免疫複合体から RNA を抽出して、GluR2 mRNA、CaM1 mRNA に対する特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。(B) Western blot により YB-1-GFP、内在性 YB-1、GluR2、CaM1 のタンパク質を解析した。バンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。pYB-1-GFP をトランスフェクションした細胞における内在性 YB-1、GluR2、CaM1 のタンパク質量は、コントロール細胞のそれぞれのタンパク質量に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。各細胞抽出液の電気泳動パターンを Coomassie brilliant blue(CBB)染色によって解析した。(C) それぞれの細胞における GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の発現量を RT-PCR によって解析した。

次に、YB-1 mRNA に対する特異的な siRNA によって YB-1 をノックダウンした場合について解析した(Fig. 3A)。YB-1 を過剰発現させたときの結果とは対照的に、GluR2 タンパク質および CaM1 タンパク質の量が明らかに増加するのが観察された。このときどちらの mRNA の量にも変化が見られなかったことから(Fig. 3B)、YB-1 の細胞内存在量の減少により GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳活性が増加したと考えられる。YB-1 はターゲット mRNA に対する結合比率に依存して、その mRNA の翻訳を活性化したり抑制したりすることが知られているので(11, 13, 14)、ここまでに得られた結果は、mRNA 上の YB-1 の分子数の変化を反映したものだと考えられる。

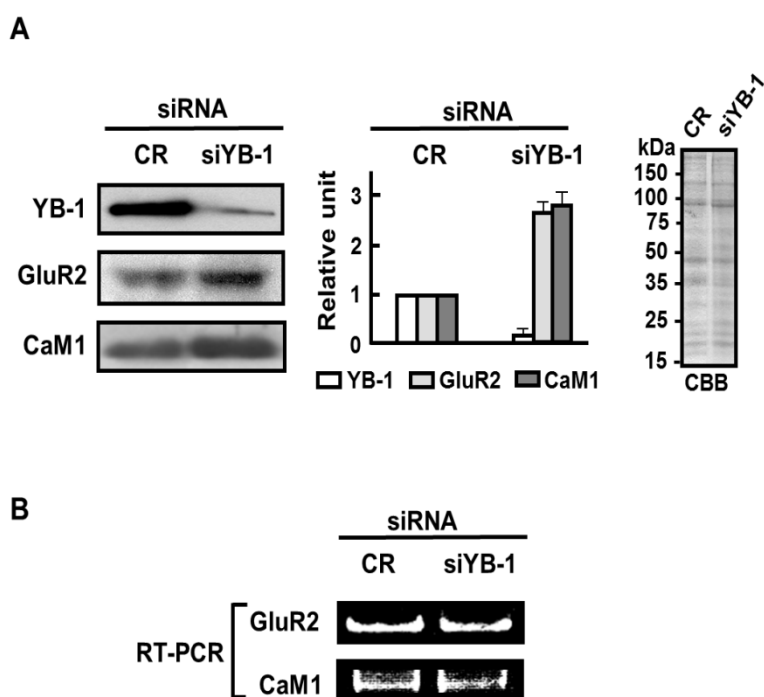


Fig. 3 NG108-15 細胞における GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳活性に対する YB-1 ノックダウンの影響 (A) NG108-15 細胞に YB-1 特異的な siRNA をトランスフェクションして細胞質を抽出し、YB-1、GluR2、CaM1 のタンパク質量を Western blot により解析した。バンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。YB-1 をノックダウンさせた細胞における YB-1、GluR2、CaM1 のタンパク質量は、コントロール siRNA をトランスフェクションさせた細胞のそれぞれのタンパク質量に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。各細胞抽出液の電気泳動パターンを Coomassie brilliant blue(CBB)染色によって解析した。(C) それぞれの細胞における GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の発現量を RT-PCR によって解析した。

3. 神経活動による GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の翻訳調節における YB-1 の関与

YB-1 は GluR2 mRNA や CaM1 mRNA の翻訳活性に影響することがわかったので、神経活動によるこれらの mRNA の翻訳の変化と、それに対する YB-1 の関与を解析した。NG108-15 細胞には、神経細胞に発現する複数の受容体が存在することが知られており(39)、またいくつかの神経作用薬によって短時間で最初期遺伝子の転写が起こることが報告されている(40)。NG108-15 細胞には脱分極を引き起こすニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)、cAMP の合成を阻害するムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)と α アドレナリン受容体が存在することが知られているため (39)、これらにそれぞれ作用する、nicotine、carbachol、noradrenaline で処理し、GluR2、CaM1、YB-1 のタンパク質の量的変化を調べた。carbachol は nAChR と mAChR の両方に作用することが知られている。nicotine や carbachol で処理したところ、YB-1 の量には変化がなかったのに対し、GluR2 と CaM1 は 30 分から 1 時間という短い間に大きく増加し、12 時間後には元に戻る傾向が見られた (Fig. 4A)。このとき GluR2、CaM1、YB-1 いずれも mRNA の量的変化は観察されなかった。noradrenaline を処理した場合ではこのようなタンパク質量の変化はみられなかった。これらのことから、nicotine や carbachol による GluR2 と CaM1 のタンパク質量の変化が nAChR のイオンチャンネルを介するものだと考えられたので、中枢神経系における主要な nAChR のサブユニットである $\alpha 7$ と $\alpha 4$ サブユニットが発現しているのを RT-PCR と細胞免疫染色により確認した(Fig. 4B)。また、この GluR2 と CaM1 の増加が翻訳の活性化によるものであることを、翻訳阻害剤である cycloheximide を用いて調べた。コントロールでは、nicotine や carbachol 処理後 3 時間で GluR2、CaM1 とともに増加したのに対し、cycloheximide 処理した細胞ではそのような変化は観察されなかったことから (Fig. 4C)、翻訳の活性化であることが示された。このような翻訳の活性化が nAChR を介して起こることを、 $\alpha 7$ -nAChR 阻害薬である α -bungarotoxin を用いて確認したところ、nicotine や carbachol による GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳の活性化は観察されなくなった(Fig. 4C)。これらのことから、nicotine や carbachol によって nAChR のイオンチャンネルを介した刺激が起こり、短時間の間に GluR2 や CaM1 の翻訳活性が増加したものと考えられる。さらに、このような神経刺激依存的な GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳活性化における YB-1 の関与について、YB-1 をノックダウンした細胞に nicotine、carbachol を処理して調べた。どちらの mRNA も nicotine や carbachol による翻訳活性の増加が観察されなくなったことから(Fig. 4D)、YB-1 は nAChR のイオンチャンネルを介し

た刺激による GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の迅速な翻訳活性化に必要であることが示された。

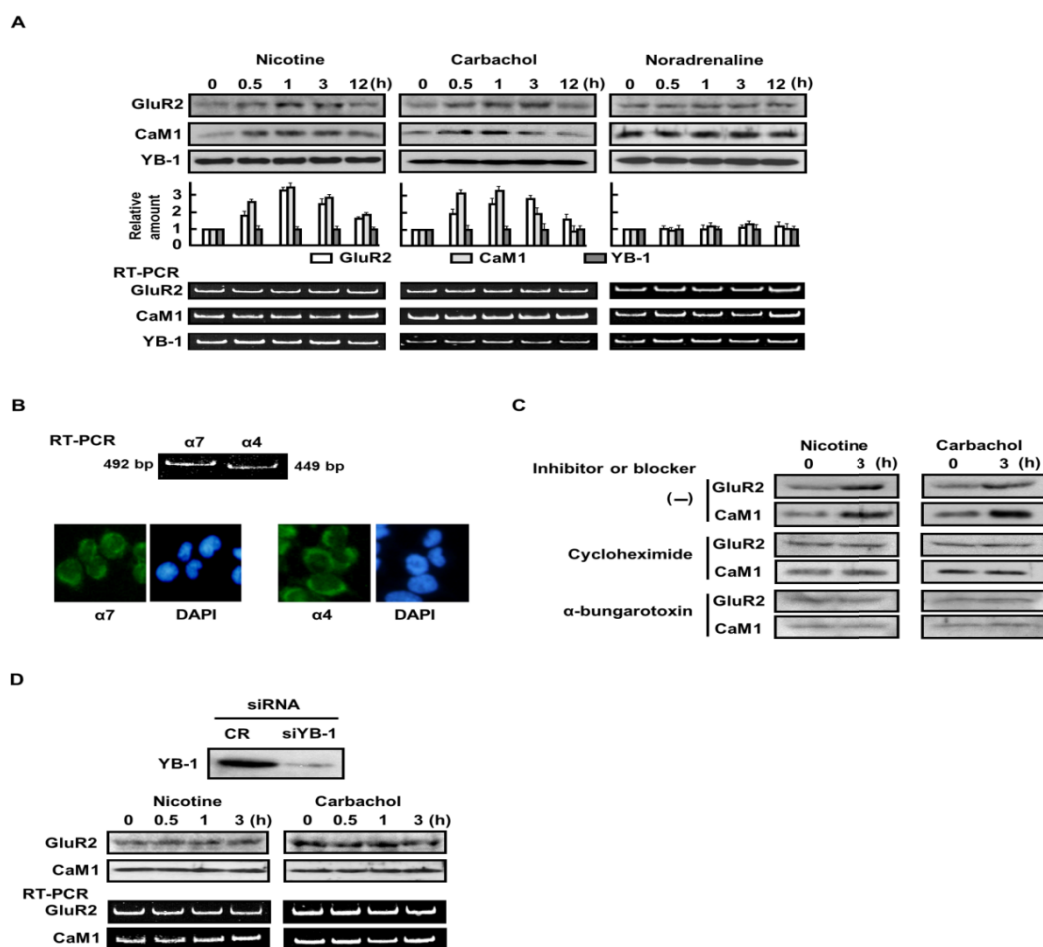


Fig. 4 神経活動依存的な GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳活性化に対する YB-1 の関与 (A) NG108-15 細胞を 10 μ M nicotine、10 μ M carbachol、10 μ M noradrenaline で 0、0.5、1、3、12 時間処理した。GluR2、CaM1、YB-1 のタンパク質を Western blot により検出し、バンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。神経作用薬処理した細胞における GluR2、CaM1、YB-1 のタンパク質量は、未処理の細胞(0h)におけるそれぞれのタンパク質量に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。各時間におけるそれぞれの mRNA 量は RT-PCR によって解析した。(B) NG108-15 細胞における α 7 および α 4-nAChR サブユニットの発現を、RT-PCR、細胞免疫染色によって解析した。(C) cycloheximide、 α -bungarotoxin 存在下における、GluR2 と CaM1 の発現に対する nicotine、carbachol の影響を調べた。翻訳反応を阻害するため、神経作用薬処理の 30 分前に cycloheximide(20 μ g/mL)を処理した。神経作用薬は 3 時間処理した。 α nAChR を阻害するために、10 μ M α -bungarotoxin を神経作用薬と共に処理した。(D) YB-1 をノックダウンさせた細胞に対して、10 μ M nicotine、10 μ M carbachol を処理し、GluR2 と CaM1 のタンパク質量を Western blot により調べ、mRNA 量を RT-PCR を用いて解析した。

4. kainic acid による YB-1 の polysome 結合性の変化と GluR2、CaM1 の発現量の変化

次にマウスを用いて神経活動による変化を解析した。培養細胞における解析で、イオンチャンネルを介した刺激を起こす nAChR によって YB-1 による翻訳活性化が起こることが分かったので、同じようにイオンチャンネルを介した刺激を起こす kainic acid を用いて調べた。kainic acid は AMPA 受容体やカイニン酸受容体を介して痙攣を誘発し、投与後 5 時間から数日の間に GluR2 (45) や CaM1 (46) の発現レベルを変化させることが報告されている。しかしながら、投与後、短時間でこれらの mRNA の翻訳を調べた報告は無い。そこで kainic acid 投与後、短時間での YB-1 の polysome 結合性や GluR2 mRNA、CaM1 mRNA の翻訳活性の変化を調べた。マウスの脳室内に kainic acid を投与したところ、2 分以内に痙攣が観察された。YB-1 の polysome 結合性の変化を調べるために、kainic acid 処理したマウス大脳皮質・海馬領域の細胞質画分を抽出し、20~55%のショ糖勾配遠心を行った。YB-1 は 30 分から 1 時間の間に高分子側にシフトし、3 時間後には元にもどっていた (Fig. 5A)。このときリボソームタンパク質である L7 も同様の変化を示していた。次に、YB-1、GluR2、CaM1 のタンパク質量と mRNA 量の変化を、それぞれ Western blot と RT-PCR によって解析した。YB-1 の量にはほとんど変化が起こらなかったが、GluR2 や CaM1 は kainic acid 投与後 30 分という非常に短時間の間にタンパク質の増加が見られ、3 時間後には元にもどっていた (Fig. 5B)。このとき、GluR2、CaM1、YB-1 いずれも mRNA の量に変化は見られなかった。この結果は、YB-1 を含む polysome が 30 分から 1 時間という短い間に、より高分子側にシフトし 3 時間でもどったこととよく相関している。したがって、kainic acid によるこれらの mRNA の翻訳の一過的な活性化は、YB-1 と mRNA の相互作用の変化によるポリソームの活性化を反映していると考えられる。

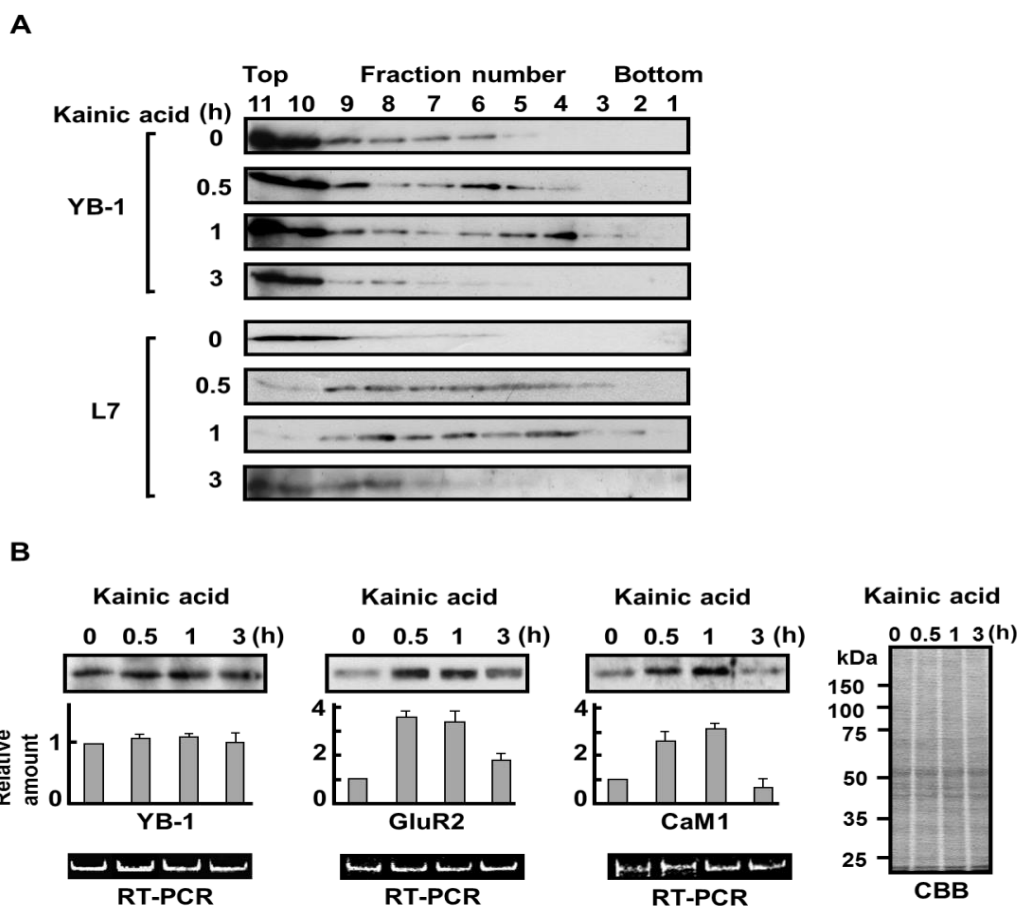


Fig. 5 kainic acidによるYB-1のpolysome結合性とGluR2 mRNAおよびCaM1 mRNAの翻訳活性の変化 (A) kainic acidをマウスに投与し、図に示した経過時間毎に大脳皮質・海馬領域から細胞質を抽出して20~55%のショ糖勾配遠心を行った。各画分をそれぞれ等量ずつ分取し、Western blotを行い、抗YB-1抗体、抗L7 ribosomal protein抗体を用いて検出した。(B) kainic acid処理したマウスの大脳皮質・海馬領域におけるYB-1、GluR2、CaM1のタンパク質量をWestern blotにより検出し、バンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。kainic acid処理後、各経過時間におけるYB-1、GluR2、CaM1のタンパク質量は、未処理(0h)におけるそれぞれのタンパク質量に対する比率をとって示した。独立した3回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。各時間におけるそれぞれのmRNA量はRT-PCRによって解析した。各経過時間のサンプルの電気泳動パターンをCoomassie brilliant blue(CBB)染色によって解析した。

5. nicotine 刺激による YB-1 と HSP60 の相互作用の増加

これまでの結果から、神経細胞において YB-1 はイオンチャネルを介した刺激に応じて GluR2 mRNA や CaM1 mRNA のような dendritic mRNA の翻訳を調節し、生後の脳の発達や機能維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、その YB-1 による翻訳調節の分子メカニズムの詳細はまだほとんど明らかになっていなかったため、次に YB-1 による翻訳調節の分子メカニズムについてさらに解析を進めた。YB-1 による翻訳調節の指標として GluR2 mRNA を用いた。当研究室ではこれまでに、細胞質において HSP60 がポリソームとは相互作用せずに YB-1 と相互作用し、YB-1 のポリソーム結合性を調節していることを報告している(21)。HSP60 が nicotine による YB-1 を介した翻訳活性化に関わっているかどうかを調べるために、まず、nicotine によって GluR2 mRNA の翻訳活性化が起こっている細胞において、その発現レベルを解析した。Fig. 4A で見られたのと同様に、GluR2 タンパク質の量は mRNA 量の変化を伴わずに、nicotine 処理 3 時間後に一過的に増加した (Fig. 6A)。このとき、HSP60 と YB-1 タンパク質の発現レベルに変化は見られなかった。次に、nicotine 刺激による YB-1 と HSP60 の相互作用の変化を解析した。nicotine 処理した細胞の細胞質画分に対して抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行い、得られた免疫複合体について特異的抗体を用いて HSP60 を検出した。nicotine 処理 3 時間後、HSP60 の全量に変化は見られなかったにも関わらず、YB-1 と共免疫沈してくる HSP60 の増加が観察され、12 時間後にはもとのレベルにまで減少していた (Fig. 6B)。この YB-1 と HSP60 の相互作用の一過的な増加は、 $\alpha 7$ -nAChR の阻害薬である α -bungarotoxin 処理によって観察されなくなった (Fig. 6C)。以上のことから、nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化には、YB-1 と HSP60 の相互作用の増加が関与していることが示唆された。

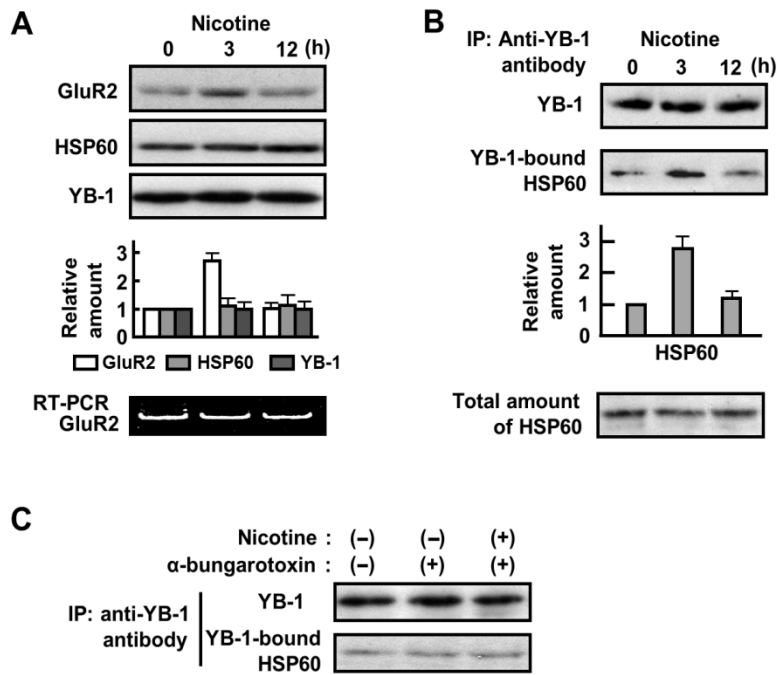


Fig. 6 nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化に伴う YB-1 と HSP60 の相互作用の増加 (A) NG108-15 細胞を 10 μ M nicotine で 0、3、12 時間処理した。GluR2、HSP60、YB-1 のタンパク質を Western blot により検出し、バンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。nicotine 処理した細胞における GluR2、HSP60、YB-1 のタンパク質量は、未処理の細胞(0h)におけるそれぞれのタンパク質量に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。各時間におけるそれぞれの mRNA 量は RT-PCR によって解析した。(B) nicotine 処理後、経過時間毎に細胞質を抽出し、抗 YB-1 抗体で免疫沈殿を行った。免疫複合体に含まれる YB-1、HSP60 を Western blot により検出し、バンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。各経過時間における YB-1 に対する HSP60 のタンパク質量の比は、未処理の細胞(0h)に対する比率をとって示した。平均値と標準誤差は、2 サンプルずつ用いて行った、独立した 3 回の実験に基づいて算出した。各時間におけるそれぞれの HSP60 の全量量は Western blot によって解析した。(C) 細胞を α -bungarotoxin 存在下 nicotine で 3 時間処理した。細胞質画分を抽出して抗 YB-1 抗体で免疫沈殿を行い、Western blot を用いて YB-1 と HSP60 のタンパク質量を解析した。

6. nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化および YB-1 と HSP60 の相互作用の増加に対する PI3K/Akt 経路の関与

YB-1 は Akt によってリン酸化を受け、mRNA に対する結合性が変化することが知られている(15-20)。また神経細胞においては、 $\alpha 7$ -nAChR を介して PI3K/Akt 経路の活性化がおこることが報告されている(47, 48)。そこで、活性化 Akt (pAkt) に対する特異的な抗体を用いて、nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化における Akt の関与を調べた。細胞を nicotine 処理すると、GluR2 mRNA の翻訳が活性化し、この時 pAkt も増加しているのが観察された(Fig. 7A)。しかしながら、PI3K を阻害することによって Akt の活性化を抑制する LY294002 存在下では、いずれの変化も起こらなくなった。さらに、免疫沈殿による解析から、LY294002 の併用で nicotine による YB-1 と HSP60 の相互作用の増加も起こらなくなることが示された(Fig. 7B)。これらのことから、nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化と、それに伴う YB-1 と HSP60 の相互作用の変化には、nAChR を介した Akt の活性化が関与していることが示唆された。

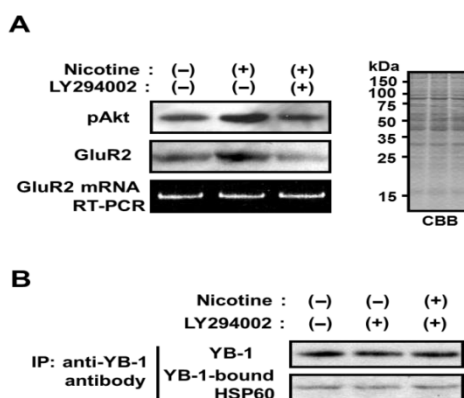


Fig. 7 nicotine 処理による GluR2 mRNA の翻訳活性化と YB-1-HSP60 複合体の形成に対する活性化 Akt の影響 (A) NG108-15 細胞を 10 μ M nicotine で 3 時間処理した(中央のレーン)。Akt のリン酸化を阻害するために nicotine 処理の 1.5 時間前に 10 μ M LY294002 を処理した(右端のレーン)。活性化 Akt と GluR2 のタンパク質は、それぞれ抗 phosphorylated Akt 抗体(抗 pAkt 抗体)、抗 GluR2 抗体を用いて検出した。GluR2 mRNA は RT-PCR によって解析した。それぞれのサンプルの電気泳動パターンを Coomassie brilliant blue(CBB)染色によって解析した。それぞれのレーンは Western blot のレーンと対応している。(B) NG108-15 細胞を 10 μ M LY294002 存在下、10 μ M nicotine で 3 時間処理し細胞質を抽出後、抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。免疫複合体に含まれる YB-1、HSP60 を Western blot により解析した。

7. nicotine 刺激による GluR2 mRNA に対する YB-1 の結合比率の変化および YB-1 と HSP-60 の相互作用の変化

YB-1 と polysome 中の GluR2 mRNA の神経活動依存的な相互作用の変化を調べるために、培養細胞を nicotine で 2 時間処理し、20~55%のシヨ糖勾配遠心を行った。YB-1、HSP60、S6 ribosome protein のシヨ糖勾配遠心上の分布はそれぞれのタンパク質に対する特異的な抗体を用いて解析した(Fig. 8A)。HSP60 の分布は nicotine 処理しても変化せず non-polysomal 画分にのみ検出された。一方で、YB-1 と S6 の分布は nicotine 処理によって明らかにより重い方の画分にシフトしていた。これは GluR2 mRNA の翻訳活性化と一致しており、活発に翻訳を行っている polysome の増加を示している。高分子量の polysome 画分である No. 1~5 を集めて YB-1 の量を比較したところ、コントロールに比べて nicotine 処理した細胞では 2.5 倍ほど多かった(Fig. 8B)。YB-1 による翻訳活性化はターゲット mRNA に結合している YB-1 の分子比率に依存しているため、高分子量の polysome 画分において YB-1 と相互作用している GluR2 mRNA 量および S6 タンパク質量の変化を調べた。YB-1 の量を等しくするために、集めたそれぞれのサンプルの量を適切に調製し、抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。得られた免疫複合体を Western blot と RT-PCR により解析した結果、YB-1 の量に対する GluR2 mRNA と S6 タンパク質の比率が nicotine 処理によってどちらも明らかに増加していた(Fig. 8C)。

non-polysomal 画分において神経活動依存的な YB-1 と HSP60 の相互作用の変化を調べるために、No. 10 と 11 を集めて HSP60 に特異的な抗体を用いて免疫沈殿を行った。HSP60 の量に変化は見られなかったが、HSP60 と相互作用する YB-1 の量は nicotine によって増加するのが観察された (Fig. 8D)。以上のことから、nicotine 刺激によって YB-1 の RNA 結合性が変化し、GluR2 mRNA に対する YB-1 の結合比率が減少することによって GluR2 mRNA の polysome 形成が活発になりその翻訳が促進され、また mRNA から解離した YB-1 は HSP60 と相互作用することが示された。

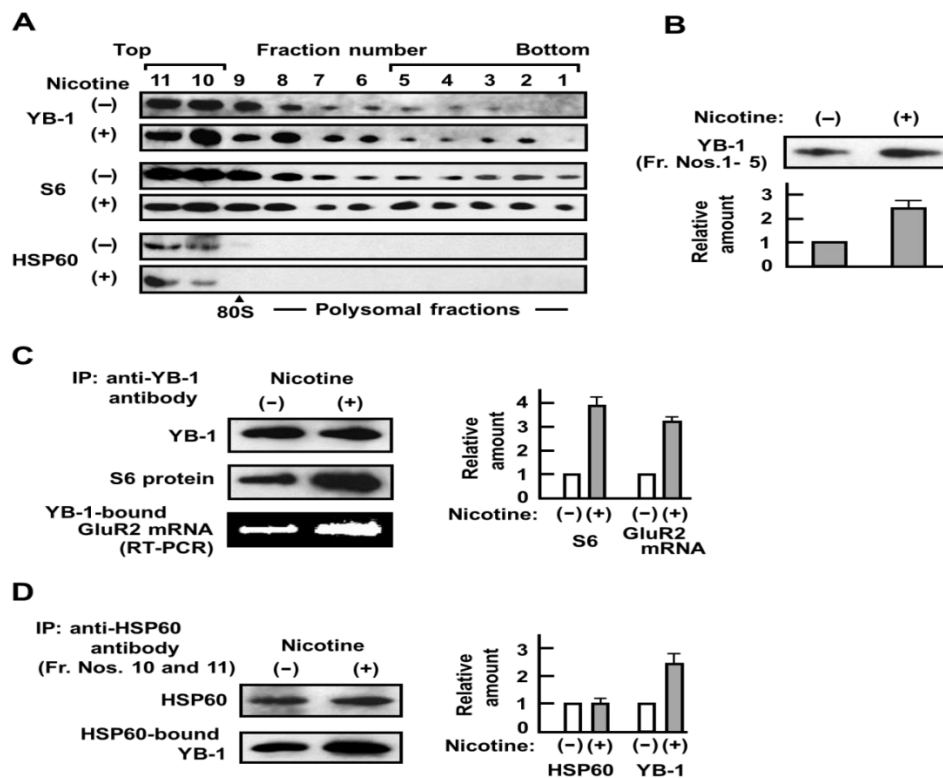


Fig. 8 nicotine 処理による活性化 polysome 中の GluR2 mRNA に対する YB-1 の結合比率の減少と、non-polysomal 画分における YB-1 と HSP60 の相互作用の増加 (A) 10 μ M nicotine で 2 時間処理した NG108-15 細胞から細胞質を抽出し、20~55%のショ糖勾配遠心を行った。各画分をそれぞれ等量ずつ分取し、Western blot を行い、抗 YB-1 抗体、抗 S6 ribosomal protein 抗体、抗 HSP60 抗体を用いて検出した。(B) 高分子の polysome 画分 (No. 1~5) を集め、Western blot により YB-1 タンパク質を検出し、バンドの強度はデンシトメーターを用いて解析した。nicotine 処理細胞の YB-1 タンパク質量は、未処理における YB-1 タンパク質量に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。(C) CR と nicotine 処理の間で YB-1 の量が等しくなるように No. 1~5 画分を調製し、抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。調製したサンプル中の YB-1 の量が CR と nicotine 処理したもので等しいことを確認後免疫沈殿を行い、免疫複合体に含まれる S6 タンパク質と GluR2 mRNA をそれぞれ Western blot と RT-PCR により解析した。S6 タンパク質のバンドの強度はデンシトメーターを用いて解析した。PCR 産物は電気泳動後臭化エチヂウムで染色し、バンドの強度を Bio-Rad Gel Documentation system により解析した。nicotine 処理細胞のサンプルにおける S6 タンパク質量と GluR2 mRNA 量は、それぞれ CR 細胞に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。(D) non-polysomal 画分 (No. 10, 11) を集め、抗 HSP60 抗体を用いて免疫沈殿を行った。Western blot により HSP60 と相互作用する YB-1 タンパク質を検出し、バンドの強度はデンシトメーターを用いて解析した。nicotine 処理細胞の HSP60 と YB-1 タンパク質量は、CR 細胞に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。

8. polysome から遊離した YB-1 の細胞内分布に対する HSP60 の影響

YB-1 の RNA 結合活性が YB-1 の細胞質局在に関わっており(18)、そして Akt の活性化が YB-1 の核移行を誘導することが報告されている(15, 49)。しかしながら、本研究におけるショ糖勾配遠心と免疫沈殿による解析では、nicotine 刺激によって Akt が活性化され、YB-1 が polysome から遊離し細胞質タンパク質である HSP60 との相互作用が増加した(Fig. 8)。当研究室では、以前 YB-NLS (YB-1 の一領域) が YB-1 の核移行に必要であり、そして HSP60 が細胞質において YB-NLS と結合することを報告している(21)。そこで、HSP60 mRNA に特異的な siRNA を用いて HSP60 をノックダウンさせた細胞に対して nicotine を処理し、細胞免疫染色によって YB-1 の細胞内分布を調べた。HSP60 の発現量は siRNA によって効果的に減少した(Fig. 9A)。コントロールの細胞では、nicotine 処理後 5 時間経っても YB-1 の細胞内分布に大きな変化は観察されなかったが(Fig. 9B)、HSP60 をノックダウンさせた細胞では、nicotine 処理後 3~5 時間で YB-1 が核にも分布するようになり(Fig. 9C)、さらに Western blot を用いた解析により核抽出物における YB-1 の増加が観察された(Fig. 9D)。このことは、HSP60 が YB-NLS と結合することによって、polysome から解離した YB-1 を細胞質に留め核移行を阻害していることを示唆している。

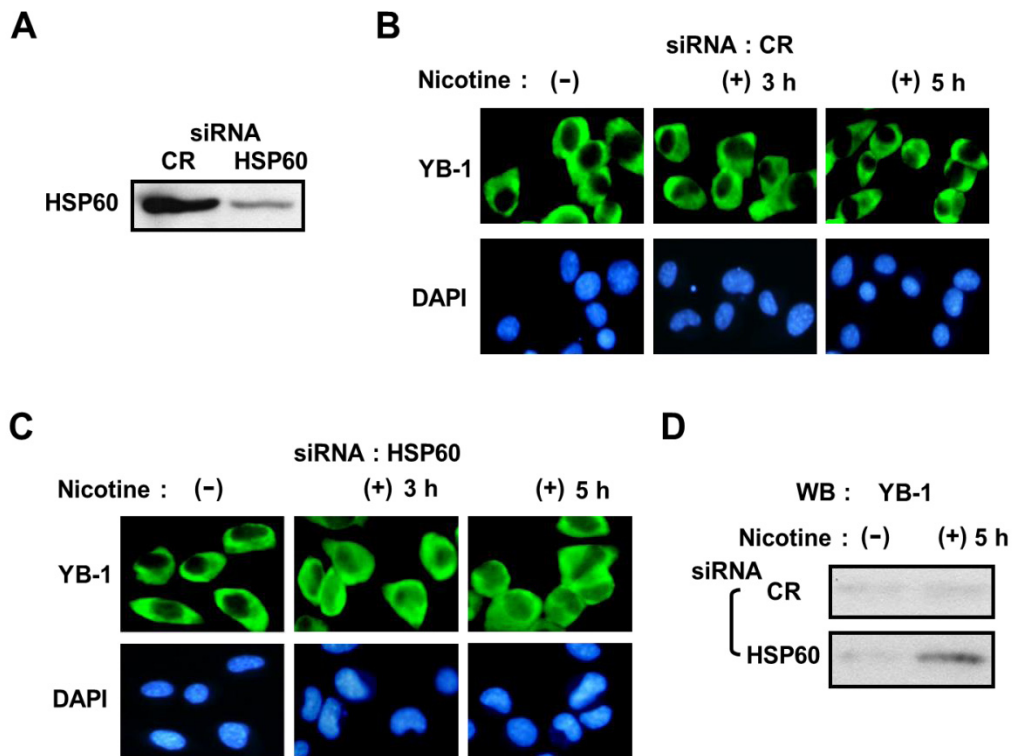


Fig. 9 polysome から遊離した YB-1 の細胞質局在に対する HSP60 の関与 (A) NG108-15細胞に CR siRNA あるいは HSP60 に対する siRNA をトランスフェクションした。HSP60 タンパク質量は Western blot により解析した。(B) CR siRNA をトランスフェクションした後、10 μ M nicotine で 0、3、5 時間処理した。YB-1 の細胞内分布は免疫染色により可視化した。核は DAPI を用いて染色した。(C) 特異的 siRNA を用いて HSP60 を減少させた細胞に 10 μ M nicotine を 0、3、5 時間処理した。YB-1 の細胞内分布は免疫染色により可視化した。核は DAPI を用いて染色した。(D) HSP60 をノックダウンさせた細胞を 10 μ M nicotine 処理して 5 時間経過後、核抽出を行った。YB-1 の量は Western blot により解析した。

【考察】

本研究により、生後の発育時期にあるマウスの大脳皮質・海馬領域において YB-1 と結合しているいくつかの mRNA が同定された。これらは高分子の polysome 画分に存在しており、これらの mRNA にコードされているタンパク質は活発に合成されていると言える (Fig. 1)。同定された mRNA は、GluR2、CaM1、glutamine transporter、 α -tubulin、 β -actin などの生後の脳の発達と機能維持に必要なタンパク質をコードするものであった (Table 1)。YB-1 は dendritic mRNP の構成要素であるが (22)、我々が行った免疫沈殿による解析によって、YB-1 は dendritic mRNA である GluR2 mRNA や CaM1 mRNA とは結合しているが、その他の dendritic mRNA の一つとしてよく知られている CaMKII α mRNA とは相互作用していないことがわかった。したがって、脳で YB-1 と結合している mRNA には特異性があることが示唆される。YB-1 は RNA の特異的な配列を認識するという報告がいくつかあるが (50-53)、神経細胞の YB-1 はターゲット mRNA の特定の配列に結合しているのか、あるいはそれぞれの mRNA 間の立体構造の違いを認識しているのかどうかは今後の課題である。

YB-1 は dendrite に存在するので、YB-1 のターゲットとして dendritic mRNA である GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の二つに注目して翻訳調節について解析を行った。NG108-15 細胞では、YB-1 タンパク質の量に応じて mRNA の翻訳活性が変化した (Fig. 2, 3)。この結果は、YB-1 がそのターゲット mRNA 分子との結合比率に依存して、翻訳反応に影響を与えるという報告に一致する (11, 13, 14)。神経活動依存的な翻訳に対する YB-1 の影響を見るために、細胞をいくつかの神経作用薬で処理し、YB-1、GluR2、CaM1 の mRNA レベルとタンパク質レベルでの変化を経時的に調べたところ、nicotine や carbachol で処理すると、YB-1 の発現レベルには大きな変化が見られなかったが、GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳は 30 分から 1 時間という短い間に増加した (Fig. 4A)。そのため、この変化は nAChR を介した刺激によって起こることが考えられたので、まず NG108-15 細胞において nAChR、特に $\alpha 7$ が発現していることを確認した (Fig. 4B)。 $\alpha 7$ -nAChR 阻害薬である α -bungarotoxin によって、nicotine や carbachol による翻訳活性化が観察されなくなったことから、この翻訳活性化は $\alpha 7$ -nAChR のイオンチャネルを介した刺激によるものであることが示された。骨格筋においても nicotine 刺激に応じて YB-1 のターゲット mRNA である AChR α mRNA の翻訳活性が一過的に増加することが見られている (Fig. 10)。このことから神経活動依存的な翻訳調節には nAChR によるイオンチ

チャンネルを介した刺激が重要であることが示唆される。また YB-1 をノックダウンした場合には、nicotine や carbachol による翻訳の活性化はおこらなくなったことから (Fig. 4D)、このような神経作用薬による短時間の翻訳活性化に YB-1 が必要であることが示された。イオンチャンネルを介した刺激を引き起こす kainic acid を投与したマウスの脳においても、シヨ糖勾配上の YB-1 の分布は 30 分という非常に短時間の間に高分子の polysome 画分へシフトするのが観察され、そして GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳の活性化が観察された (Fig. 5)。このときも、YB-1 タンパク質は一定のレベルを保っていた。これらの結果から、nicotine や kainic acid によるイオンチャンネルを介した神経刺激に応じて起こる翻訳活性化には、YB-1 と mRNA の相互作用の変化が重要な役割を果たしていると考えられる。

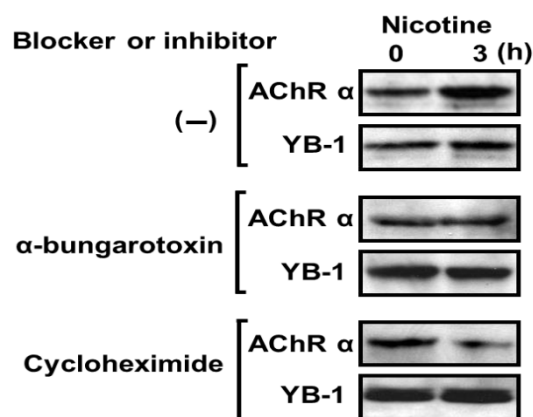


Fig. 10 C2C12 細胞における nicotine による nAChR α の翻訳活性化 nAChR を阻害するために、 $10\mu\text{M}$ α -bungarotoxin を $10\mu\text{M}$ nicotine と共に処理した。翻訳を阻害するために、nicotine 処理する 30 分前に $20\mu\text{g/mL}$ cycloheximide を処理した。タンパク質量は Western blot により解析した。

脳や培養神経細胞において、GluR2 や CaM1 の発現量が kainic acid によって変化するという報告があるが (45, 46, 54, 55)、それらは処理後数時間から数日という長時間の変化を調べたものである。一方、細胞体から切り離された dendrite 中でも高 K^+ や DHPG で処理すると、短時間で GluR2 mRNA の翻訳がおこることが知られている (31, 32)。その分子メカニズムは明らかではないが、神経細胞の mRNA 結合タンパク質が翻訳調節に重要な働きをしていると考えられている (34, 56-62)。本研究で得られたデータは、神経細胞において YB-1 がそのような神経活動依存的なタンパク質合成に関与している可能性を示して

いる。近年、核内受容体である RAR α が神経細胞において mRNP 中の CaMKII α mRNA や GluR1 mRNA と相互作用してその翻訳の開始を抑制しており、retinoic acid 刺激に応じて数分の内に翻訳が開始されることが報告されている(60, 63, 64)。興味深いことに、YB-1 のターゲットである GluR2 mRNA は RAR α によって翻訳調節を受けず(63)、また本研究のデータからは YB-1 は RAR α のターゲットである CaMKII α mRNA と相互作用していなかった。このことは、dendritic mRNA がそれぞれ特異的な翻訳調節因子と相互作用して mRNP 顆粒を形成し、それぞれ特定の場所に輸送され、特定の神経活動に応答することを示唆している。

続いて nicotine による YB-1 を介した mRNA の翻訳活性化のメカニズムについて解析を行った。nicotine によって GluR2 タンパク質の合成が一過的に誘導され、それに伴い YB-1 と HSP60 の発現量の変化なしに YB-1 と HSP60 の相互作用が増加した(Fig. 6)。そしてその効果は α 7-nAChR のアンタゴニストである α -bungarotoxin によって阻害された。YB-1 を介する翻訳調節は mRNA に結合する YB-1 の分子比率に依存するので、翻訳の活性化は polysome における GluR2 mRNA に結合する YB-1 の量の変化によると考えられる。Akt の活性化が YB-1 の RNA 結合性を変化させることや(15-20)、HSP60 が YB-1 に相互作用して polysome に対する結合性に影響を与えることが報告されている(21)。さらに、 α 7-nAChR を介するシグナル伝達が Akt を活性化することも知られている(47, 48)。これらの事実に加えて、本研究によって nicotine によって Akt が活性化を受けると GluR2 mRNA の翻訳が誘導されるが、PI3K/Akt 経路の阻害剤である LY294002 を nicotine 処理前に加えた細胞では翻訳活性化も YB-1/HSP60 相互作用も起こらなくなることが示された(Fig. 7)。これらの結果から、 α 7-nAChR を介した神経活動において、PI3K/Akt 経路の活性化とそれに続く HSP60 と YB-1 の相互作用の変化が、YB-1 を介した GluR2 mRNA の翻訳活性化に関与しているということが示唆される。20~55%のショ糖勾配遠心を用いた解析によって、nicotine 処理した細胞では YB-1 が相互作用している polysome がより重い polysome 画分にシフトすることが観察された(Fig. 8)。この高分子量の polysome 画分では、YB-1 の量に対して GluR2 mRNA と S6 ribosomal protein がともに大きく増加していた。このことは、PI3K/Akt 経路の活性化により GluR2 mRNA に結合する YB-1 の分子比率が減少し、それによって mRNA に作用するリボソームの数の増加が起こり、翻訳が誘導されたことを示している。

興味深いことに、高分子量の polysome 画分で観察されたこととは反対に、

non-polysomal 画分では YB-1 と HSP60 との相互作用が増加していた(Fig. 8)。これは、polysome から解離した YB-1 に HSP60 が結合したことを示している。nicotine 処理によって YB-1 を mRNA から解離させても YB-1 は細胞質に分布していたが、HSP60 を減少させた場合には YB-1 は細胞質と核の両方に検出された(Fig. 9)。癌細胞では、Akt を介する YB-1 の核移行がその悪性化と関連している(15-20)。しかしながら、本研究で得られたデータからは神経活動依存的な Akt の活性化は YB-1 の核移行の強い引き金とはならず、神経刺激に対する応答として機能しており、また、HSP60 が YB-1 の核移行を抑制する因子として機能しうることを示唆している。HSP60 の他にも、いくつかの細胞質タンパク質が YB-1 と相互作用することが知られている。例えば、Iron-responsive element-binding protein 2 (IRP2)、酸性タンパク質の YBAP1、tubulin などが YB-1 と mRNA の相互作用を阻害すると報告されている(10, 65, 66)。これらの細胞質タンパク質と YB-1 の相互作用は明らかに YB-1 を polysome から解離させ、また YB-1 の核移行も阻害する。したがって、HSP60 だけでなくこれらのタンパク質もまた神経活動依存的な翻訳調節や polysome から遊離した YB-1 を細胞質に留めておく因子としても働いている可能性がある。癌細胞での YB-1 の核移行は genotoxic stress が引き金になるので、YB-1 の核局在が起こっている癌細胞において、これらのタンパク質が genotoxic stress によってどのような調節を受けているか興味深い。

近年、GluR2 mRNA や BDNF mRNA の 3'非翻訳領域(3'UTR)が痙攣誘発性の神経活動依存的な翻訳調節に関与していることが報告された(67, 68)。本研究では kainic acid で痙攣を起こさせたマウスの脳において、YB-1 のターゲットである GluR2 mRNA の翻訳が増加することを示した(Fig. 5)。当研究室では BDNF mRNA もまた YB-1 のターゲットであることを確認している。神経細胞においてターゲット mRNA のどの配列に YB-1 が結合するかは明らかでないが、これらの mRNA の 3'UTR に結合する YB-1 が痙攣誘発性の翻訳調節に関わっている可能性はある。

本研究の結果から、神経活動に応じた YB-1 を介する GluR2 mRNA の翻訳活性化のメカニズムとして次のようなモデルが考えられる(Fig. 11)。α7-nAChR 刺激は PI3K/Akt 経路を活性化し、GluR2 mRNA に結合しているいくつかの YB-1 分子がリン酸化をうける。それによって、YB-1 の立体構造の変化が誘導され mRNA から解離すると共に、HSP60 が結合できるようになり、再び YB-1 と polysome が結合するのを阻害する。このような GluR2 mRNA 上の YB-1 分子の減少は、mRNA へのリボソームのリクルートを促進し、

それによって翻訳が誘導される。HSP60 が結合している YB-1 は non-polysomal な複合体として核移行することなく細胞質に留められる。上述した他の細胞質タンパク質も polysome から解離した YB-1 と相互作用していると考えられる。 $\alpha 7$ -nAChR を介する PI3K/Akt 経路の活性化はアポトーシスから細胞を保護することが知られているので(47, 48, 69, 70, 71)、この系による神経活動依存的な YB-1 による mRNA の翻訳調節が神経細胞の生存に重要な役割を果たしている可能性がある。このことは、今後解析すべきテーマであると考えている。

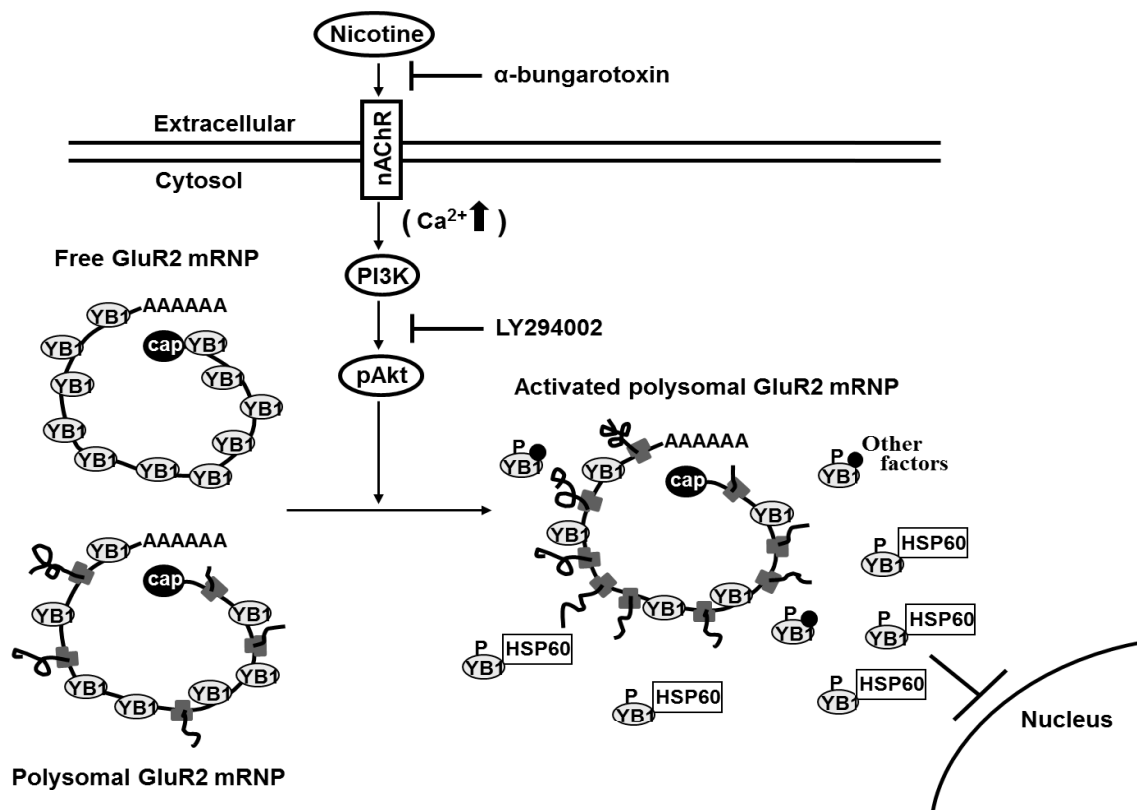


Fig. 11 神経活動に応じた YB-1 による GluR2 mRNA の翻訳活性化のメカニズムと polysome から遊離した YB-1 の細胞質局在における HSP60 役割のモデル

第二部

ストレス応答における YB-1 タンパク質の役割

【序論】

ヒートショックや酸化ストレスなどのストレスに応じて、ストレス顆粒(stress granule: SG)が TIA-1 の凝集を介して形成され、多くの mRNA はその中に取り込まれて翻訳が抑制されている(72-74)。これらの SG はいくつかの翻訳開始因子や多くの RNA 結合タンパク質を含んでいる(75)。しかし、分子シャペロン HSP70 の mRNA はストレス状態にあっても、メカニズムは分かっていないが、SG に含まれることなくそのタンパク質合成が促進される(73)。

YB-1 はストレス下では SG にも分布するので(76-79)、翻訳調節を介してストレス応答に関わっていると考えられているが、SG の形成や SG 中の mRNA の翻訳調節における YB-1 の機能は明らかとなっておらず、HSP70 mRNA の翻訳調節に対する YB-1 の関与も調べられた例はない。

そこで、亜ヒ酸を用いて NG108-15 細胞に酸化ストレスを与えたところ、形成された SG 中に YB-1 と共にターゲットである GluR2 mRNA が取り込まれて、その翻訳が抑制されることが分かった。また、YB-1 が HSP70 mRNA とも相互作用していることを見出し、ストレスによる翻訳活性化における役割を解析した。ショ糖勾配遠心を用いた解析により、ストレス下ではこれらの mRNA は YB-1 と共にそれぞれ機能の異なる翻訳調節複合体に分布していることを示した。また、YB-1 を減少させてもストレス下で SG が形成され、GluR2 mRNA の翻訳が抑制されること、そして HSP70 mRNA が SG に取り込まれるようになることを示した。また、SG の数が YB-1 の存在量の変化に応じて変わることが分かった。これらのことは、YB-1 が亜ヒ酸ストレス下で HSP70 mRNA の翻訳の活性化に関与し、SG の形成には阻害的に働くことによってその数を調節していることを示している。本研究により、細胞のストレス応答反応として重要であるが、その機構の詳細が不明であった SG の形成と HSP70 mRNA の翻訳活性化における YB-1 の役割が明らかとなった。

【材料と方法】

2~9 ページに記した。

【結果】

1. 亜ヒ酸ストレスによる GluR2 mRNA の翻訳抑制と SG への取り込み

SG が形成されるストレス条件下において、YB-1 ターゲット mRNA である GluR2 mRNA の翻訳活性の変化を調べるために、NG108-15 細胞を 1mM の亜ヒ酸ナトリウムで 30 分間処理した。亜ヒ酸処理によって GluR2 mRNA 量には大きな変化が見られなかったが、GluR2 タンパク質量は明らかに減少した(Fig. 12A)。YB-1 と β -actin は mRNA 量もタンパク質量も大きな変化は見られなかった。この条件下で、SG のマーカータンパク質である TIA-1 に対する特異的抗体を用いて細胞免疫染色を行ったところ、SG の形成が観察され、YB-1 もその SG を形成している TIA-1 と共局在していた(Fig. 12B)。SG における GluR2 mRNA の存在を調べるために、TIA-1 に対する抗体を用いて免疫沈殿を行い、免疫複合体から RNA を抽出して RT-PCR を行った。コントロール細胞では YB-1 も GluR2 mRNA も TIA-1 と相互作用していなかったが、亜ヒ酸処理した細胞では GluR2 mRNA が YB-1 と共に TIA-1 と相互作用しているのが観察された(Fig. 12C)。これらの結果から、ストレス下において GluR2 mRNA は YB-1 と共に SG に取り込まれ、そしてその翻訳が抑制されることが示された。

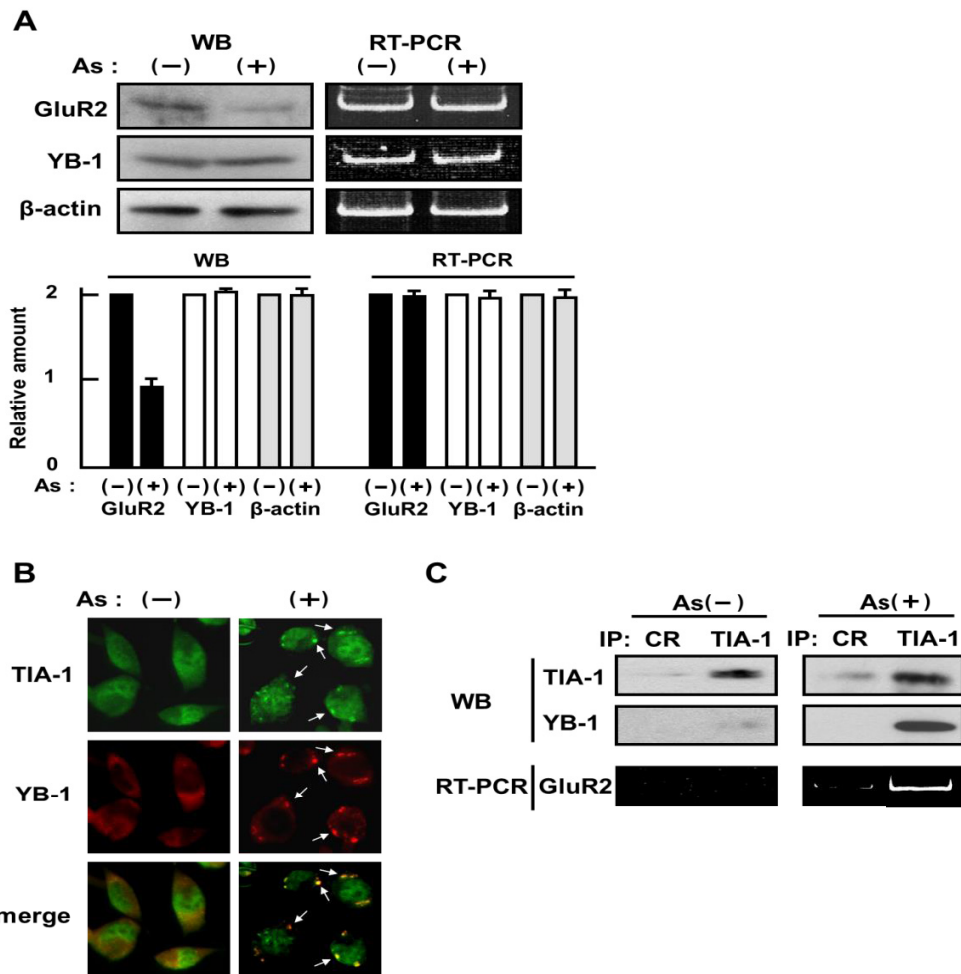


Fig. 12 亜ヒ酸ストレスによる YB-1 と GluR2 mRNA の SG への取り込みと GluR2 mRNA の翻訳抑制 (A) NG108-15 細胞を 1mM 亜ヒ酸で処理し、GluR2 mRNA と YB-1 mRNA の翻訳活性を調べた。GluR2、YB-1、 β -actin のタンパク質量と mRNA 量をそれぞれ Western blot と RT-PCR によって解析した。タンパク質のバンドの強度はデンストメーターを用いて解析した。PCR 産物は電気泳動後臭化エチジウムで染色し、バンドの強度を Bio-Rad Gel Documentation system により解析した。亜ヒ酸処理細胞のサンプルにおけるタンパク質量と mRNA 量は、それぞれ CR 細胞に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。 β -actin のタンパク質量と mRNA 量は内部コントロールとして示した。(B) 亜ヒ酸処理した細胞を抗 TIA-1 抗体と抗 YB-1 抗体を用いて二重染色した。二次抗体として TIA-1 に対しては Alexa Fluor 488-conjugated IgG (Green) を使い、YB-1 に対しては Alexa Fluor 555-conjugated IgG (Red) を用いた。merge した画像を一番下のパネルに示した。(C) 培養細胞を亜ヒ酸処理後、細胞質を抽出し、抗 TIA-1 抗体で免疫沈殿を行った。TIA-1 と YB-1 は Western blot により解析した。GluR2 mRNA は、得られた免疫複合体から RNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い解析した。

2. 亜ヒ酸ストレスに応じた YB-1 タンパク質と HSP70 mRNA の相互作用の変化

多くの mRNA はストレス下において SG に取り込まれ翻訳が抑制されるにもかかわらず、分子シャペロンである HSP70 の mRNA は SG から排除されることが知られている(73)。NG108-15 細胞に亜ヒ酸による酸化ストレスを与えると、HSP70 mRNA 量に大きな変化は見られなかったが、HSP70 タンパク質量の増加が観察された(Fig. 13A)。このことはストレスを与えて 30 分という短時間の内に HSP70 mRNA の翻訳が誘導されたことを示している。YB-1 は細胞状態に応じて翻訳抑制因子として機能するだけでなく翻訳活性化因子としても働いているので(11, 13)、YB-1 が HSP70 mRNA と相互作用しているかを調べた。抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行い、免疫複合体から RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、YB-1 と HSP70 mRNA が相互作用することが示された(Fig. 13B)。さらに、亜ヒ酸によるその相互作用の変化を調べると、YB-1 の免疫沈殿効率は変化せず、免疫沈殿された HSP70 mRNA の量が増加していた(Fig. 13C)。また、YB-1 タンパク質と HSP70 mRNA の量も変化が見られなかったことから (Fig. 12A, 13A)、YB-1 と相互作用する HSP70 mRNA の量が亜ヒ酸によって増加することが示された。これらの結果から、亜ヒ酸による酸化ストレスに応じた HSP70 mRNA の翻訳活性化には、YB-1 と HSP70 mRNA の相互作用の変化が関わっていると考えられる。

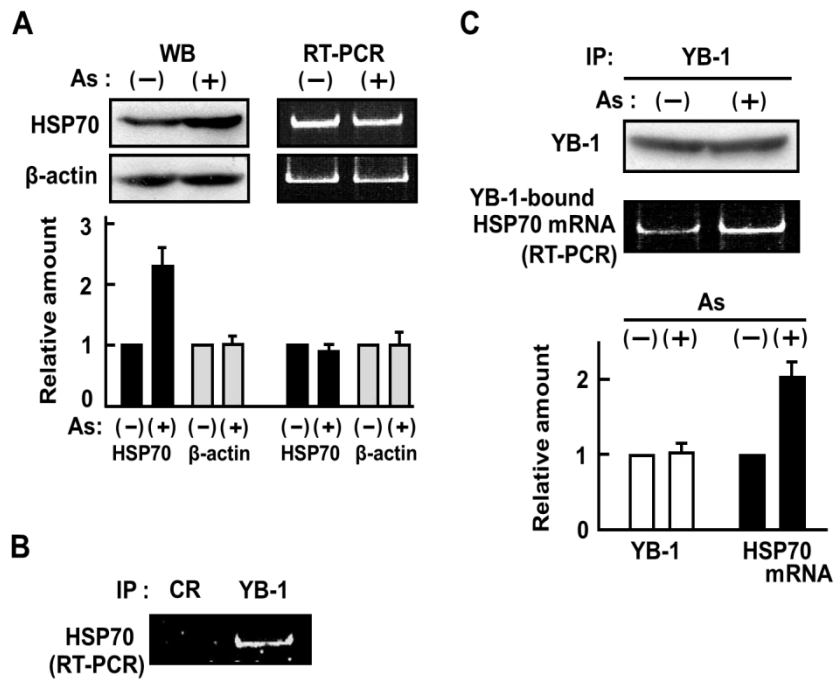


Fig. 13 亜ヒ酸ストレス下での HSP70 mRNA の翻訳活性化および YB-1 と HSP70 mRNA の相互作用の変化 (A) NG108-15 細胞を亜ヒ酸処理して細胞質を抽出し、HSP70 のタンパク質量と mRNA 量をそれぞれ Western blot と RT-PCR によって解析した。タンパク質のバンドの強度はデンストメーターで解析し、PCR 産物のバンドの強度は Bio-Rad Gel Documentation system を用いて解析した。亜ヒ酸処理細胞のサンプルにおけるタンパク質量と mRNA 量は、それぞれ CR 細胞に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。 β -actin のタンパク質量と mRNA 量は内部コントロールとして示した。(B) 細胞質画分を抗 YB-1 抗体あるいは CR 抗体で免疫沈殿を行い、得られた免疫複合体から RNA を抽出し、HSP70 mRNA に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。(C) 細胞を亜ヒ酸で処理して細胞質を抽出し、抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。免疫複合体中の HSP70 mRNA と YB-1 タンパク質の量は、それぞれ RT-PCR と Western blot によって解析した。亜ヒ酸処理細胞のサンプルにおける HSP70 mRNA 量と YB-1 タンパク質量は、それぞれ CR 細胞に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。

3. ストレス下における HSP70 mRNA の翻訳活性化および GluR2 mRNA の翻訳抑制に対する YB-1 の関与

第一部で、YB-1 は細胞状態に依存して polysome 結合性が変化し、ターゲット mRNA の翻訳を調節することを示した。そこで、亜ヒ酸による YB-1 の polysome 結合性の変化を 20~50%のシヨ糖勾配遠心により解析した。シヨ糖勾配における YB-1、TIA-1、S6 ribosome protein の分布を特異的な抗体を用いて解析した。TIA-1 の分布は亜ヒ酸処理によって変化せず、non-polysomal 画分のみ検出された(Fig. 14A)。このことは、SG の密度は翻訳開始複合体よりも小さいことを示しており、同様の結果は以前報告されている(80)。コントロールの細胞において、YB-1 は non-polysomal 画分から polysome 画分にまで分布していたが、亜ヒ酸ストレス下ではより低分子量側の polysome 画分にシフトし、S6 ribosomal protein も同様のシフトが観察された(Fig.14A)。これは、亜ヒ酸によって mRNA へのリボソームの集合が阻害されると共に、SG の形成が誘導されたことを示唆している。このときの GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の分布を調べると、亜ヒ酸ストレス下において GluR2 mRNA は高分子量の polysome 画分では観察されなくなり(No. 8~11)、低分子量の polysome 画分(No. 4~6)と non-polysomal 画分(No. 1, 2)において増加していた(Fig. 14B)。それとは対照的に、亜ヒ酸によって non-polysomal 画分における HSP70 mRNA の量は減少し、polysome 画分では増加していた(No. 4~6)。

上述の結果は亜ヒ酸ストレスによる GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の翻訳活性における相反する変化と一致している。Fig. 12 と 13 で示した結果と合わせて考えると、YB-1 は亜ヒ酸処理した細胞において SG と polysome の両方と相互作用していることが示唆される。このことから、ストレスに応じて YB-1 はタンパク質合成を制御するために、それぞれのターゲット mRNA と共に異なる翻訳調節複合体に取り込まれることが考えられた。

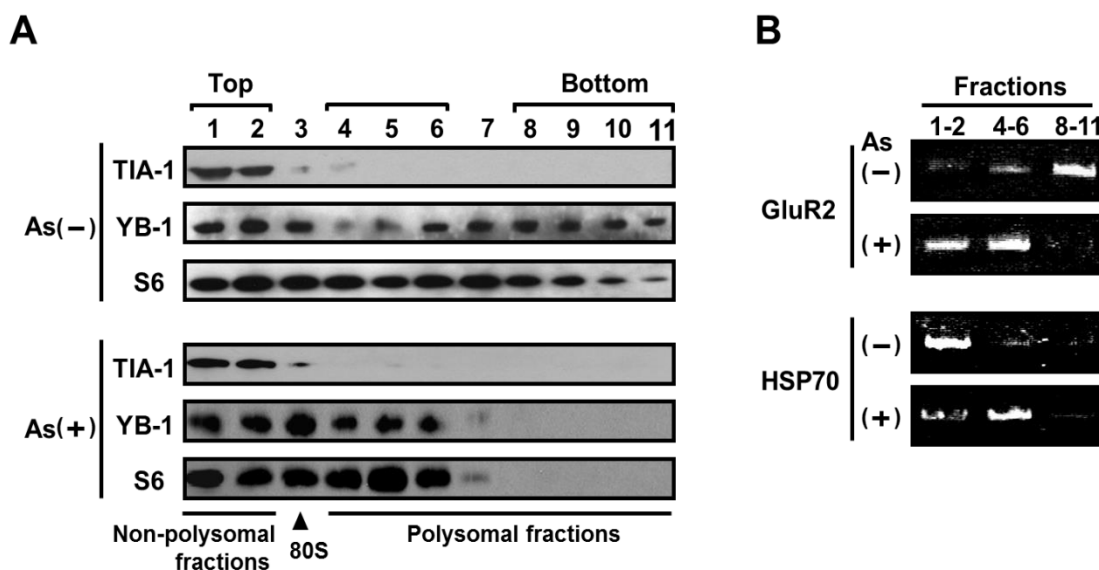


Fig. 14 亜ヒ酸ストレスによる GluR2 mRNA と HSP70 mRNA のシヨ糖勾配遠心上の分布の変化 (A) 亜ヒ酸処理した NG108-15 細胞から細胞質を抽出し、20~50%のシヨ糖勾配遠心を行った。各画分をそれぞれ等量ずつ分取し、Western blot を行い、抗 TIA-1 抗体、抗 YB-1 抗体、抗 S6 ribosomal protein 抗体を用いて検出した。(B)亜ヒ酸ストレスによる GluR2 mRNA と HSP70 mRNA のシヨ糖勾配遠心上の分布の変化。non-polysomal 画分 (No. 1~2)、低分子量の polysome 画分 (No. 4~6)、高分子の polysome 画分 (No. 8~11) を集め、等量を用いて RNA を抽出し、RT-PCR によって GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の分布を解析した。

次に亜ヒ酸ストレスによる GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の翻訳活性の変化に対する YB-1 の影響を調べるために、YB-1 をノックダウンさせた細胞に亜ヒ酸を 30 分間処理した。YB-1 特異的な siRNA によって YB-1 の発現量は著しく減少した(Fig. 15A)。YB-1 をノックダウンした細胞では、亜ヒ酸ストレスをかけても HSP70 のタンパク量および mRNA 量に大きな変化は見られなくなったが、GluR2 の場合は Fig. 12A で見られたのと同様に mRNA 量に大きな変化は見られず、タンパク質量の減少が観察された(Fig. 15B)。これらの結果から、YB-1 は亜ヒ酸による HSP70 mRNA の翻訳活性化に必要であるが、GluR2 mRNA の翻訳抑制に対しては、SG の構成成分であるにもかかわらず、必要ではないことが示唆された。そこで、GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の SG への取り込みに対する YB-1 の影響を調べるために、YB-1 をノックダウンさせた細胞を亜ヒ酸処理後抽出し、抗 TIA-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。興味深いことに、TIA-1 と GluR2 mRNA の相

相互作用は YB-1 をノックダウンさせても変化が見られず、一方、TIA-1 と HSP70 mRNA の相互作用は YB-1 をノックダウンすることにより大きく増加していた(Fig. 15C)。Fig. 14 の結果と合わせると、これらの結果は、YB-1 は HSP70 mRNA を SG から排除し、リボソームのリクルートを促進するように働くが、GluR2 mRNA の SG への取り込みには関与していないことを示唆している。また、YB-1 をノックダウンすることにより HSP70 mRNA が SG に取り込まれるようになったが、HSP70 タンパク質の量は減少せず、大きな変化は見られなかった(Fig. 15B)。これは GluR2 タンパク質とは異なり、ある程度のレベルの HSP70 はストレス下において分子シャペロンとして機能する必要があることを示唆している。

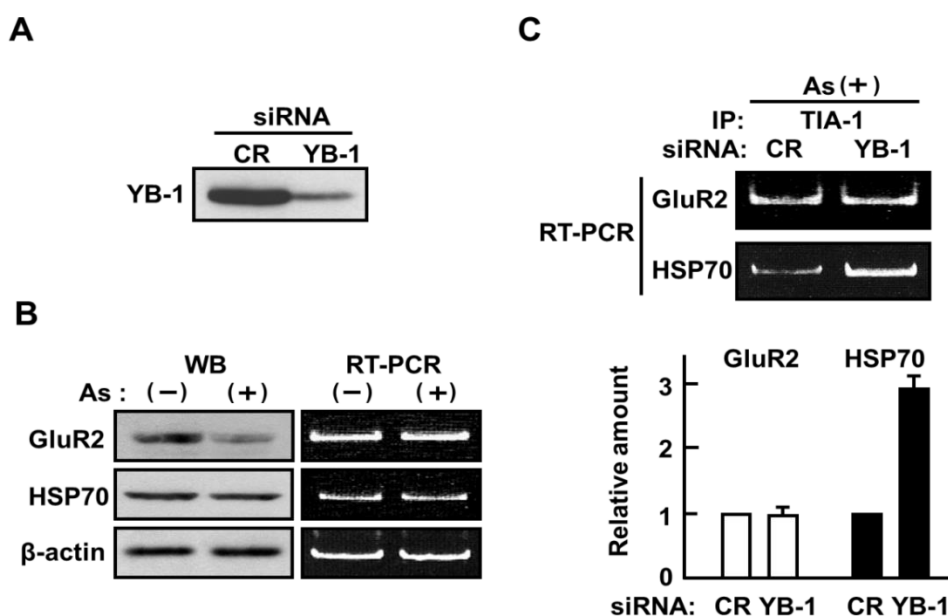


Fig. 15 亜ヒ酸による酸化ストレスに応じた HSP70 mRNA の翻訳活性化と GluR2 mRNA の翻訳抑制に対する YB-1 の関与 (A) 培養細胞に YB-1 特異的な siRNA あるいは CR siRNA を 2 日間処理し、YB-1 タンパク質量を Western blot によって解析した。(B) YB-1 ノックダウン細胞に亜ヒ酸を処理し、GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の翻訳活性を解析した。GluR2、HSP70 のタンパク質量と mRNA 量はそれぞれ Western blot と RT-PCR によって解析した。β-actin のタンパク質量と mRNA 量は内部コントロールとして示した。(C) YB-1 ノックダウン細胞と CR 細胞をそれぞれ亜ヒ酸で処理して細胞質を抽出し、抗 TIA-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。免疫複合体から RNA を抽出し、RT-PCR によって GluR2 mRNA と HSP70 mRNA を検出した。YB-1 ノックダウン細胞のサンプルにおける GluR2 mRNA 量と HSP70 mRNA 量は、それぞれ CR 細胞に対する比率をとって示した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。

4. SG の形成における YB-1 の役割

SG 形成に対する YB-1 の影響を調べるために、特異的な siRNA によって YB-1 をノックダウンした細胞を亜ヒ酸で 30 分間処理し、抗 TIA-1 抗体を用いて細胞免疫染色を行った。Fig. 15A で示したように、YB-1 は siRNA によって効率良くノックダウンされる。この様に YB-1 がノックダウンされた状態でも、亜ヒ酸により SG が形成されるのが観察され(Fig. 16A)、そして SG を形成する細胞の割合はコントロールの siRNA で処理したものとほとんど差が見られなかった(Fig. 16B)。この結果は SG の形成に必ずしも YB-1 が必要ではないことを示している。しかしながら、興味深いことに SG 形成細胞における顆粒の数は YB-1 をノックダウンすることにより明らかに増加していた(Fig. 16A, 16C)。このことは YB-1 が SG 形成に阻害的に働くことを示唆している。

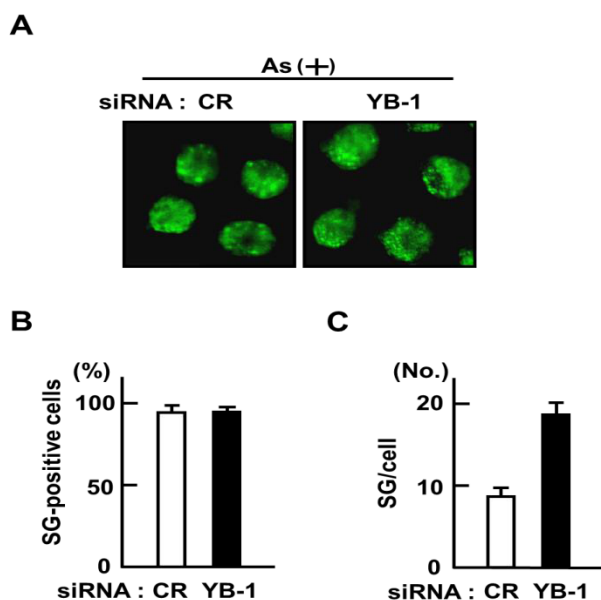


Fig. 16 SG 形成に対する YB-1 ノックダウンの影響 (A) siRNA 処理後、YB-1 ノックダウン細胞と CR 細胞の両方に亜ヒ酸を処理し、抗 TIA-1 抗体を用いて免疫染色を行った。2 次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated IgG を用いた。(B) 約 100 個の細胞を数え、SG 形成細胞の割合を比較した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。(C) SG 形成細胞一つあたりの SG の数を比較した。10 細胞ずつ比較する独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。

YB-1 が SG の形成に阻害的に働くことを確認するために、YB-1-GFP を過剰に発現させた細胞に亜ヒ酸を処理した。トランスフェクションにより YB-1-GFP は過剰に発現し、内在性の YB-1 レベルに変化は見られなかった(Fig. 17A)。GFP-YB-1 を過剰に発現させた細胞を亜ヒ酸で 30 分間処理し、抗 TIA-1 抗体を用いて SG を検出したところ(Fig. 17B)、SG が形成されている細胞の数が減少していた(Fig. 17C)。Fig. 15、16 と合わせて考えると、これらの結果は、YB-1 は SG の構成成分であるが、ストレス下において SG の数をコントロールするためにその形成に対して阻害的に機能することを示している。

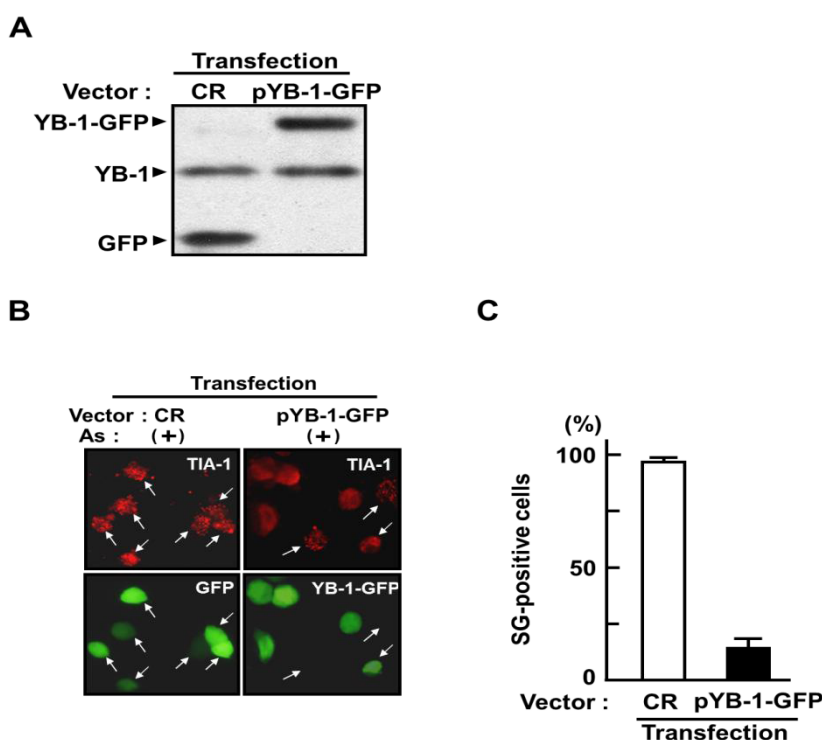


Fig. 17 SG 形成に対する YB-1 過剰発現の影響 (A) 培養細胞に YB-1-GFP 発現ベクター (pYB-1-GFP) あるいは CR GFP ベクターをトランスフェクションした。細胞質を抽出し、YB-1-GFP 量、内在性 YB-1 量、GFP 量を Western blot により解析した。抗 YB-1 抗体と抗 GFP 抗体を同時に処理して検出した。(B) pYB-1-GFP をトランスフェクションした細胞と CR 細胞の両方に亜ヒ酸を処理し、goat 由来抗 TIA-1 抗体を用いて免疫染色を行った。2 次抗体として Alexa Fluor 555-conjugated 抗 goat IgG 抗体 (Red) を用いた。Green は GFP 発現細胞と YB-1-GFP 発現細胞を示している。矢印は SG 形成細胞を示している。(C) 約 100 個の GFP 発現細胞あるいは YB-1-GFP 発現細胞を数え、SG 形成細胞の割合を比較した。独立した 3 回の実験に基づく平均値と標準誤差を示した。

【考察】

亜ヒ酸ストレス下において YB-1 は GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の両方と相互作用しているが、GluR2 mRNA は YB-1 と共に SG に取り込まれる一方で、HSP70 mRNA は YB-1 と共にシヨ糖勾配上の polysome 画分に分布していた。これらの mRNA の異なる翻訳調節複合体への局在は、これらの mRNA の亜ヒ酸による相反する翻訳活性の変化と一致しており、YB-1 がストレスに応じてこれらの mRNA の仕分けに関わっていることを示唆している。しかしながら、YB-1 をノックダウンさせた細胞においても GluR2 mRNA は相変わらず SG に取り込まれて、その翻訳は抑えられていた。一方、亜ヒ酸による HSP70 mRNA の翻訳活性化は YB-1 をノックダウンすることによって観察されなくなり、TIA-1 と相互作用するようになっていた。このことは HSP70 mRNA が SG に取り込まれるようになったことを示している。これらの結果から、YB-1 は HSP70 mRNA に対しては SG から排除するように働いて polysome に含まれるようにし、一方 GluR2 mRNA に対しては、その SG への取り込みには関与していないことが示された。

分子シャペロンである HSP70 は細胞内のストレスに応じて増加し、タンパク質の誤った折りたたみや異常なタンパク質の蓄積を防いでいる。さらに、分子シャペロンは TIA-1 の凝集を調節すると言われており(73)、HSP70 の過剰発現によって TIA-1 の凝集が阻害されることが報告されている(74)。これらのことから HSP70 はストレスが取り除かれてからの SG の解除に関わることが示唆される。そのためには、HSP70 の量がストレスの存在下とそこからの回復過程で適切にコントロールされている必要があり、YB-1 はこの過程に重要な役割をしている可能性がある。第一部で示したように、YB-1 による翻訳調節は mRNA に対する結合比率に依存している。実際に、亜ヒ酸ストレスによって YB-1 と HSP70 mRNA の相互作用の量に変化が観察された(Fig. 13)。そのため、ストレス下では HSP70 mRNA の立体構造が YB-1 の結合比率の変化を介して調節され、翻訳の促進が行われると考えられる。

YB-1 は、しばしば SG のマーカーとしても用いられている(76-79)。しかし、本研究における結果から、YB-1 は亜ヒ酸ストレス下において SG の形成に対して阻害的に働いて、SG の数に影響を及ぼすことが示された。SG の形成は TIA-1 の自己凝集と共に起こり、その他に多くの SG 相互作用タンパク質が含まれることが知られている(73, 75)。その中で、SG の構成成分の一つである Staufen は SG 形成を抑制するという興味深い報告がある(81)。本研究のデータを考え合わせると、SG 関連タンパク質のうち、いくつかは SG の数や凝

集レベルを調整するために含まれていることが示唆される。分子シャペロン HSP70 などの SG 調節タンパク質は SG をほどくことに必要であり、ストレスがなくなって細胞状態が正常に戻るために、抑制されていた翻訳が再開できるようにしていると考えられる。癌細胞では、YB-1 が多くの悪性化因子の発現を促進することにより、抗癌剤による細胞死を防いでいるという報告がある(82-87)。このように YB-1 は様々なアポトーシスを引き起こすような状態に対して、それぞれ違った系によって抵抗するように機能している。亜ヒ酸ストレス下における細胞の生存に対する YB-1 の役割を今後詳細に解析していく必要がある。

近年、内在性の mRNA を標識する技術を用いて、亜ヒ酸ストレス下において一部の mRNA が SG の内外を出入りすることが示された(88)。さらに、SG の構成タンパク質もストレス下で顆粒の内外をシャトルしていることが報告されている(89)。本研究により、YB-1 がターゲット mRNA により異なる翻訳調節複合体 (GluR2 mRNA は SG、HSP70 mRNA は polysome) に分布することが示された。そのため、YB-1 はターゲット mRNA が SG の内外をシャトルする機構にも関わっている可能性があり、興味深い。

本研究で得られたデータは、ストレス下においても YB-1 の mRNA 量やタンパク質量が影響を受けないということも示している。ストレスによって合成が急速に抑制され、短い間に分解されてしまうような多くのタンパク質とは異なり、YB-1 は様々な状況に応じて、SG の形成やその解除を介した翻訳反応の調節に必要である。さらに、YB-1 はストレス下で HSP70 mRNA を含む polysome の形成にも関与することが示された。そのため、YB-1 の量はストレス下においても一定のレベルで維持される必要があると考えられる。この点に関して、YB-1 は自らの合成を翻訳レベルで調節していることが報告されているが(52)、ストレス下で機能的な YB-1 の細胞内量が一定に保たれるメカニズムは明らかではない。また、YB-1 は発達期や若い脳には高度に発現しているが、大人や老齢の脳では低いレベルでしか発現していない(12, 23)。そのような加齢に伴う YB-1 の減少は、様々なストレスに対する神経保護機能を低下させるかもしれない。

YB-1 による SG 形成の調節と HSP70 mRNA の翻訳調節のモデルを Fig. 18 に示した。亜ヒ酸ストレス下では、YB-1 は翻訳が抑制される mRNA と共に SG に取り込まれるが、SG 形成自体に対しては阻害的に働き、その数を調節する。一方で、YB-1 は HSP70 mRNA と相互作用して、SG への取り込みを回避させ、翻訳を活性化する。これらの働きを通じて、YB-1 はストレスからの細胞の保護とストレスが除去された後のタンパク質合成の再

開に重要な役割をしていると考えられる。

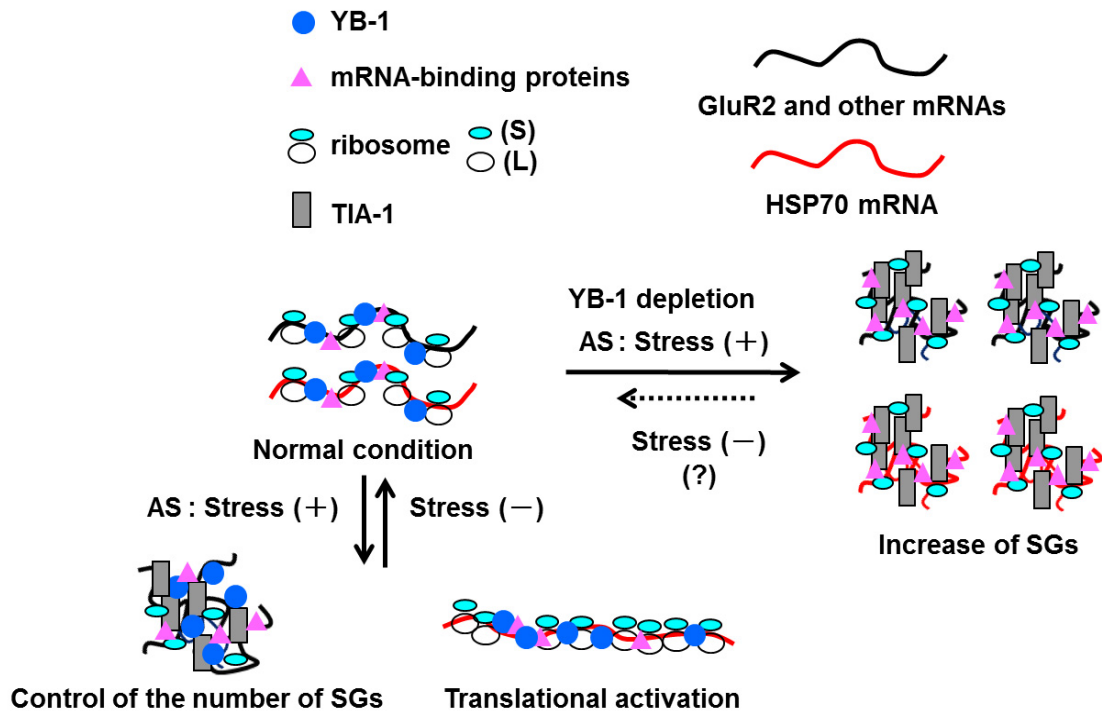


Fig. 18 YB-1 による SG 形成の調節と HSP70 mRNA の翻訳調節 亜ヒ酸ストレス下において YB-1 は、SG 形成や HSP70 mRNA を含む活性化 polysome 内で分子シャペロンとして存在している。YB-1 ノックダウン細胞では SG の数が増加する。ストレス除去後の SG 解除における YB-1 の機能はまだ明らかではない。

【謝辞】

本研究に際し、直接の御指導、ご鞭撻を賜りました生化学研究室 小林俊亮先生には心から感謝しております。小林俊亮先生には実験手法だけでなく研究者としての在り方や物事に対する深い洞察など、これからの私の人生にとって非常に大切なことを学ばせていただきました。また、様々な経験をする機会も与えて下さり、大変有意義な大学院生活をおくることができました。本研究を行うにあたり、様々な面でサポートしていただいた同研究室 大橋祥世先生にも大変感謝しております。大橋祥世先生は、実験が上手くいかない時に的確なアドバイスをして下さり、何度も助けていただきました。また、本学位論文作成に際し、御助言を下さった同研究室 草間國子先生にも深く感謝いたします。

【参考文献】

1. Wakiyama M, Imataka H, Sonenberg N. (2000) Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Curr. Biol.*, **10**, 1147-1150.
2. Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2276-2283.
3. Quattrone A, Pascale A, Nogues X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL. (2001) Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **98**, 11668-11673.
4. Okano H, Imai T, Okabe M. (2002) Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci.*, **115**, 1355-1359.
5. Yang J, Chennathukuzhi V, Miki K, O'Brien DA, Hecht NB. (2003) Mouse testis brain RNA-binding protein/translin selectively binds to the messenger RNA of the fibrous sheath protein glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S and suppresses its translation in vitro. *Biol. Reprod.*, **68**, 853-859.
6. Skabkina OV, Skabkin MA, Popova NV, Lyabin DN, Penalva LO, Ovchinnikov LP. (2003) Poly(A)-binding protein positively affects YB-1 mRNA translation through specific interaction with YB-1 mRNA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18191-18198.
7. Dugré-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4797-4812.
8. Cao Q, Richter JD. (2002) Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J.*, **21**, 3852-3862.
9. Matsumoto K, Wolffe AP. (1998) Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.*, **8**, 318-323.
10. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. (2003) The pleiotropic

- functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*, **25**, 691-698.
11. Skabkin MA, Kiselyova OI, Chernov KG, Sorokin AV, Dubrovin EV, Yaminsky IV, Vasiliev VD, Ovchinnikov LP. (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5621-5635.
 12. Miwa A, Higuchi T, Kobayashi S. (2006) Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1675-1681.
 13. Evdokimova VM, Ovchinnikov LP. (1999) Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 139-149.
 14. Pisarev AV, Skabkin MA, Thomas AA, Merrick WC, Ovchinnikov LP, Shatsky IN. (2002) Positive and negative effects of the major mammalian messenger ribonucleoprotein p50 on binding of 40 S ribosomal subunits to the initiation codon of beta-globin mRNA. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15445-15451.
 15. Sutherland BW, Kucab J, Wu J, Lee C, Cheang MC, Yorida E, Turbin D, Dedhar S, Nelson C, Pollak M, Leighton Grimes H, Miller K, Badve S, Huntsman D, Blake-Gilks C, Chen M, Pallen CJ, Dunn SE. (2005) Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 4281-4292.
 16. Evdokimova V, Ovchinnikov LP, Sorensen PH. (2006) Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle*, **5**, 1143-1147.
 17. Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, Sorokin AV, Ovchinnikov LP, Buckley J, Triche TJ, Sonenberg N, Sorensen PH. (2006) Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 277-292.
 18. Bader AG, Vogt PK. (2008) Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1. *Oncogene*, **27**, 1179-1182.
 19. Bader AG, Vogt PK. (2005) Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 2095-2106.
 20. Bader AG, Felts KA, Jiang N, Chang HW, Vogt PK. (2003) Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol

- 3-kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 12384-12389.
21. Ohashi S, Atsumi M, Kobayashi S. (2009) HSP60 interacts with YB-1 and affects its polysome association and subcellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 545-550.
 22. Funakoshi T, Kobayashi S, Ohashi S, Sato TA, Anzai K. (2003) Isolation and characterization of brain Y-box protein: developmentally regulated expression, polyribosomal association and dendritic localization. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **118**, 1-9.
 23. Ohashi S, Fukumura R, Higuchi T, Kobayashi S. (2009) YB-1 transcription in the postnatal brain is regulated by a bHLH transcription factor Math2 through an E-box sequence in the 5'-UTR of the gene. *Mol. Cell Biochem.*, **327**, 267-275.
 24. Steward O, Schuman EM. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 299-325.
 25. Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M. (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, **36**, 507-519.
 26. Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH. (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*, **249**, 556-560.
 27. Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**, 597-603.
 28. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, **252**, 851-853.
 29. Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*, **252**, 1715-1718.
 30. Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, **8**, 189-198.

31. Oh MC, Derkach VA. (2005) Dominant role of the GluR2 subunit in regulation of AMPA receptors by CaMKII. *Nat. Neurosci.*, **8**, 853-854.
32. Kacharmina JE, Job C, Crino P, Eberwine J. (2000) Stimulation of glutamate receptor protein synthesis and membrane insertion within isolated neuronal dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 11545-11550.
33. Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC. (2004) Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.*, **7**, 244-253.
34. Bramham CR, Wells DG. (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 776-789.
35. Palfi A, Kortvely E, Fekete E, Gulya K. (2005) Multiple calmodulin mRNAs are selectively transported to functionally different neuronal and glial compartments in the rat hippocampus. An electron microscopic in situ hybridization study. *Life Sci.*, **77**, 1405-1415.
36. Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW. (1997) The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1465-1472.
37. Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD. (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron*, **21**, 1129-1139.
38. Mayford M, Baranes D, Podsypanina K, Kandel ER. (1996) The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**, 13250-13255.
39. Hamprecht B, Glaser T, Reiser G, Bayer E, and Propst F (1985) Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma × glioma hybrid cells, in methods in enzymeology, pp.316-341. academic press, new york.
40. Katayama N, Iwata E, Sakurai H, Tsuchiya T, Tsuda M. (1993) Additive induction of Egr-1 (zif/268) mRNA expression in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells via cholinergic muscarinic, alpha 2-adrenergic, and bradykinin receptors. *J.*

Neurochem., **60**, 902-907.

41. Darsow T, Booker TK, Piña-Crespo JC, Heinemann SF. (2005) Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, **280**, 18311-18320.
42. Sallette J, Pons S, Devillers-Thiery A, Soudant M, Prado de Carvalho L, Changeux JP, Corringer PJ. (2005) Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron*, **46**, 595-607.
43. Kuryatov A, Luo J, Cooper J, Lindstrom J. (2005) Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.*, **68**, 1839-1851.
44. Takada-Takatori Y, Kume T, Ohgi Y, Fujii T, Niidome T, Sugimoto H, Akaike A. (2008) Mechanisms of alpha7-nicotinic receptor up-regulation and sensitization to donepezil induced by chronic donepezil treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **590**, 150-156.
45. Sommer C, Roth SU, Kiessling M. (2001) Kainate-induced epilepsy alters protein expression of AMPA receptor subunits GluR1, GluR2 and AMPA receptor binding protein in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol.*, **101**, 460-468.
46. Solà C, Tusell JM, Serratosa J. (1997) Differential response of calmodulin genes in the mouse brain after systemic kainate administration. *Neuroscience*, **78**, 155-164.
47. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A. (2001) alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 13541-13546.
48. Akaike A, Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y. (2010) Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *J. Mol. Neurosci.*, **40**, 211-216.
49. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Sakai K, Shimoyama T, Nishio K, Kuwano M. (2007) Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene*, **26**, 2736-2746.

50. Stickeler E, Fraser SD, Honig A, Chen AL, Berget SM, Cooper TA. (2001) The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J.*, **20**, 3821-3830.
51. Dong J, Akcakanat A, Stivers DN, Zhang J, Kim D, Meric-Bernstam F. (2009) RNA-binding specificity of Y-box protein 1. *RNA Biol.*, **6**, 59-64.
52. Skabkina OV, Lyabin DN, Skabkin MA, Ovchinnikov LP. (2005) YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 3317-3323.
53. Ray D, Kazan H, Chan ET, Peña Castillo L, Chaudhry S, Talukder S, Blencowe BJ, Morris Q, Hughes TR. (2009) Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins. *Nat. Biotechnol.*, **27**, 667-670.
54. Bai X, Wong-Riley MT. (2003) Neuronal activity regulates protein and gene expressions of GluR2 in postnatal rat visual cortical neurons in culture. *J. Neurocytol.*, **32**, 71-78.
55. Jia YH, Zhu X, Li SY, Ni JH, Jia HT. (2006) Kainate exposure suppresses activation of GluR2 subunit promoter in primary cultured cerebral cortical neurons through induction of RE1-silencing transcription factor. *Neurosci. Lett.*, **403**, 103-108.
56. Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K. (2002) Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 37804-37810.
57. Mallardo M, Deitinghoff A, Müller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 2100-2105.
58. Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B. (2004) Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 13357-13362.

59. Bannai H, Fukatsu K, Mizutani A, Natsume T, Iemura S, Ikegami T, Inoue T, Mikoshiba K. (2004) An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53427-53434.
60. Chen N, Onisko B, Napoli JL. (2008) The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J. Biol. Chem.*, **283**, 20841-20847.
61. Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD. (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron*, **21**, 1129-1139.
62. Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, **43**, 513-525.
63. Chen N, Napoli JL. (2008) All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J.*, **22**, 236-245.
64. Maghsoodi B, Poon MM, Nam CI, Aoto J, Ting P, Chen L. (2008) Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **105**, 16015-16020.
65. Matsumoto K, Tanaka KJ, Tsujimoto M. (2005) An acidic protein, YBAP1, mediates the release of YB-1 from mRNA and relieves the translational repression activity of YB-1. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 1779-1792.
66. Chernov KG, Mechulam A, Popova NV, Pastre D, Nadezhdina ES, Skabkina OV, Shanina NA, Vasiliev VD, Tarrade A, Melki J, Joshi V, Baconnais S, Toma F, Ovchinnikov LP, Curmi PA. (2008) YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules. *BMC Biochem.*, **9**, 23.
67. Irier HA, Shaw R, Lau A, Feng Y, Dingledine R. (2009) Translational regulation of GluR2 mRNAs in rat hippocampus by alternative 3' untranslated regions. *J.*

- Neurochem.*, **109**, 584-594.
68. Lau AG, Irier HA, Gu J, Tian D, Ku L, Liu G, Xia M, Fritsch B, Zheng JQ, Dingledine R, Xu B, Lu B, Feng Y. (2010) Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**, 15945-15950.
69. Shimohama S, Kihara T. (2001) Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biol. Psychiatry*, **49**, 233-239.
70. Nakamizo T, Kawamata J, Yamashita H, Kanki R, Kihara T, Sawada H, Akaike A, Shimohama S. (2005) Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors protects motor neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**, 1285-1289.
71. Resende RR, Adhikari A. (2009) Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun. Signal*, **7**, 20.
72. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.*, **147**, 1431-1442.
73. Kedersha N, Anderson P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 963-969.
74. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5383-5398.
75. Anderson P, Kedersha N. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 141-150.
76. Yang WH, Bloch DB. (2007) Probing the mRNA processing body using protein macroarrays and "autoantigenomics". *RNA*, **13**, 704-712.
77. Kedersha N, Anderson P. (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.*, **431**, 61-81.
78. Onishi H, Kino Y, Morita T, Futai E, Sasagawa N, Ishiura S. (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 1994-2002.

79. Wehner KA, Schütz S, Sarnow P. (2010) OGFOD1, a novel modulator of eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation and the cellular response to stress. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 2006-2016.
80. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 195-210.
81. Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. (2009) Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.*, **122**, 563-573.
82. Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, Koike K, Wada M, Kuwano M, Kohno K. (1998) Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5997-6000.
83. Shibahara K, Sugio K, Osaki T, Uchiumi T, Maehara Y, Kohno K, Yasumoto K, Sugimachi K, Kuwano M. (2001) Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 3151-3155.
84. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, Berger U, Schmidt A, Jürchott K, Schmitt M, Royer HD. (2002) Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer*, **97**, 278-282.
85. Chatterjee M, Rancso C, Stühmer T, Eckstein N, Andrulis M, Gerecke C, Lorentz H, Royer HD, Bargou RC. (2008) The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood*, **111**, 3714-3722.
86. Lasham A, Print CG, Woolley AG, Dunn SE, Braithwaite AW. (2013) YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem. J.*, **449**, 11-23.
87. Xu W, Zhou L, Qin R, Tang H, Shen H. (2009) Nuclear expression of YB-1 in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Eur.*

J. Haematol., **83**, 313-319.

88. Zhang J, Okabe K, Tani T, Funatsu T. (2011) Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. *J. Cell Sci.*, **124**, 4087-4095.
89. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.*, **151**, 1257-1268.