

樹状突起スパイン形成における DHA の
新規作用機序の解明

鈴木 慎一郎
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス領域 神経システム生物学研究室
(稲垣 直之 教授)

令和4年3月14日提出

目次

	ページ番号
序論	・・・3
材料と方法	・・・7
結果	・・・18
考察と展望	・・・26
謝辞	・・・32
参考文献	・・・33
図表	・・・39
略語	・・・68

序論

バランスの良い栄養摂取は健康の維持および正常な発生、疾患の予防などに肝要である。特に糖質、タンパク質、脂質は三大栄養素として知られており、糖質は主にエネルギー源として、タンパク質は筋肉などの構成物質として、脂質はエネルギー源や細胞膜の構成物質として機能する。脂質を構成する脂肪酸は飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸に分類される。飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸は主にエネルギー源や細胞膜の構成物質として機能するが、多価不飽和脂肪酸は細胞膜の構成成分の他にシグナル分子として機能する。多価不飽和脂肪酸はオメガ3脂肪酸、オメガ6脂肪酸、オメガ9脂肪酸に分類され、近年では特にオメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸の摂取バランスについて着目されている。ヒトにおいて、オメガ3脂肪酸の欠乏により学習能力の低下・網膜電位図の異常・視覚障害・麻痺・下肢痛といった神経系の障害が引き起こされる (Connor et al, 1992)。オメガ6脂肪酸の欠乏により成長障害・生殖障害・皮膚病変・脂肪肝・多飲症を含む非神経系の障害が引き起こされる (Holman et al, 1982)。オメガ3脂肪酸は青魚に豊富に含まれており、オメガ6脂肪酸は牛肉や卵に多く含まれることが知られている。食事において理想的なオメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸の摂取比率は1:2であるが、現在の西洋型食生活ではその摂取比率が1:10から1:20となっている (Simopoulos, 2011)。世界保健機関 (WHO; World Health Organization)はオメガ3脂肪酸であるDHAとEPAの1日あたり200 - 250 mgの摂取を推奨している。さらに厚生労働省は「2020年日本人の食事摂取基準」においても抗炎症作用や動脈硬化予防などのためDHAの積極的な摂取を推奨している。特に、妊婦や授乳中の女性に対して1日あたり200 mg以上のDHAの摂取が推奨されている (Koletzko et al., 2008)。

オメガ3脂肪酸の一つであるDHAは神経系において豊富に存在することが知られている。脳内においてDHAは総脂質の10 - 20%を占め、オメガ3脂肪酸の90%以上を占める。DHAは特に神経細胞の細胞体が多く存在する灰白質に存在する (Brenna and Diau, 2007)。また、網膜においては総脂質の33%以上がDHAである (Hamano et al, 1996)。

DHAは前駆体である α -リノレン酸 (ALA; α -linolenic acid)やエイコサペンタエン酸 (EPA; eicosapentaenoic acid) から主に肝臓で生合成され、一部網膜や脳においてアストロサイトや血管内皮細胞からも生合成される。しかし、これら前駆体からDHAへの変換効率は非常に低く、ヒトの肝臓におけるALAからDHAの変換効率は0.1%以下であり、ALAやEPAの摂取による血液中のDHAレベルの変化が認められなかった (Plourde et al., 2007; Brenna et al., 2009)。

以上のことから、オメガ3脂肪酸、特にDHAの積極的な摂取が脳内における適切なDHAレベルの維持に肝要であると考えられた。

摂取した DHA の脳内移行経路

食事により摂取された DHA は、小腸や肝臓により低密度リポタンパク質 (LDL; low density lipoprotein) やアルブミンと結合して血流にのり体内を循環する。DHA が血液中から脳内に移行するためには、血液脳関門 (BBB; Blood-Brain Barrier) を通過する必要がある。多くの分子は BBB を通過するためには輸送タンパク質などにより運ばれる (Benarroch, 2011)。BBB おいて、輸送タンパク質 MFSD2A が高発現しており、MFSD2A により DHA が脳内に輸送される。MFSD2A に遺伝子変異を持つヒト疾患患者やモデルマウスでは脳内の DHA の減少に伴い、小頭症・脳室拡大・脳梁形成不全をはじめとする顕著な脳構造の異常を示すことが報告されている (Alakbarzade et al., 2015; Guemez-Gamboa et al., 2015)。

DHA の効果の疫学的知見

疫学的研究により、DHA の積極的な摂取が脳機能向上や精神疾患罹患リスクを軽減させることが報告されている。45-70 歳の健常人を対象としたコホート研究において、言語性記憶テストを行った結果、DHA の摂取とテストの成績に正の相関があると報告された (Kalmijn et al., 2004)。また、オメガ 3 脂肪酸欠乏ラットにおいて、脳内の低い DHA レベルと記憶学習課題の成績不良が相関した (Bourre et al., 1989)。

DHA の摂取はアルツハイマー病 (AD; Alzheimer's disease) の発症リスク低減に寄与することが示唆されている。AD は進行性の認知症をもたらす神経変性疾患の一つである。AD は認知症の 70% 以上を占めており、全世界の 65 歳以上において 4.4% が罹患していると算出されている (Ward et al., 2012)。米国のコホート研究において、1 週間に 1 回以上の魚の摂取により AD の発症リスクが 60% 減少し、DHA が発症リスク減少に重要因子であると報告された (Morris et al., 2003)。また、ラットに AD の原因因子として知られている Amyloid β のペプチドを投与すると、コントロールでは記憶障害が引き起こされるが、予め DHA を摂取させたラットでは記憶障害が引き起こされないと報告された (Hashimoto et al., 2002)。AD 患者では樹状突起スパインの減少が認められ、記憶障害を引き起こす一因として考えられている (Grutzendler et al., 2007; Knobloch and Mansuy, 2008)。

軸索末端と樹状突起との間にシナプスが形成される。軸索末端のプレシナプスからグルタミン酸などの神経伝達物質が放出され、樹状突起上のポストシナプスに存在する AMPA 受容体や NMDA 受容体などの受容体に受容されて伝達が起こる。興奮性神経細胞の樹状突起は樹状突起スパインという棘状の構造物を形成しており、ほとんどの興奮性シナプスは樹状突起スパイン上に存在する。長期増強 (LTP; long-term potentiation) とはシナプスの伝達効率が長期的に増強される現象のことであり、シナプスに高頻度刺激を与えることで誘導される。ラット海馬 CA1 におけるシナプスの LTP 誘導により、ポストシナプスの NMDA 受容体が活性化してシナプスの伝達効率の向上および樹状突起スパインの新生や肥大化が起こると報告された (Engert and Bonhoeffer, 1999)。一方で、長期抑圧 (LTD; long-term depression) とはシナプスの伝達

効率が長期的に減弱する現象のことであり、シナプスに低頻度刺激を与えることで誘導される。ラット海馬 CA1 におけるシナプスの LTD 誘導により樹状突起スパインの委縮や退縮が引き起こされると報告された (Zhou et al, 2004)。また、DHA 欠乏マウスでは、LTP 誘導が抑制されることが報告された (Cao et al., 2009)。樹状突起スパインは形態学的に mushroom、thin、stubby、filopodia 型に分類される。成体ラットの大脳皮質や海馬では約 25%が成熟型である mushroom 型であり、65%以上が未成熟の thin 型である (Harris et al, 1992; Peters and Kaiserman-Abramof, 1970)。精神疾患患者では樹状突起スパイン密度の変化や異常な形態変化がみられることが報告されている。精神遅滞患者で大脳皮質において stubby 型や mushroom 型の樹状突起スパイン密度が減少し、異常に伸長した thin 型の樹状突起スパインが認められた (Purpura, 1974)。また、統合失調症患者においては、大脳皮質の樹状突起スパイン密度の減少が認められた (Glantz et al., 2000)。神経発達時において不必要なシナプスの刈り込みが起こることが知られているが、自閉症スペクトラム症患者では正常なシナプスの刈り込みが起こらず、大脳皮質において異常な樹状突起スパイン密度の増加が起こると報告された (Hutsler and Zhang, 2010)。これらのことから、神経回路網形成と高次脳機能発揮には正常な樹状突起スパインの形成が重要であると考えられる。

中枢神経系における DHA の生理機能

DHA は神経系に対して様々な作用をもたらす。神経伝達において、プレシナプスから放出された神経伝達物質グルタミン酸はポストシナプスの AMPA 受容体や NMDA 受容体に結合する。AMPA 受容体は GluR1、GluR2、GluR3、GluR4 のサブユニットから成り、NMDA 受容体は NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D、NR3A、NR3B のサブユニットから成る。海馬培養神経細胞において DHA の刺激により GluR1、GluR2、NR1、NR2A、NR2B のタンパク質の存在量が増加すると報告された (Cao et al., 2009)。マウスの皮質培養神経細胞において DHA の処理により軸索伸長が促進されること (Kharebava et al., 2015)、マウスの海馬培養神経細胞において DHA の処理により細胞外からシグナルの受容と伝達を行う一次繊毛の形成が促進されること (荏田 修士論文, 2018)、脳内に DHA が豊富に存在するとマウス海馬神経において樹状突起スパインの形成が促進されること (He et al., 2009)が報告された。また、成体において神経幹細胞は海馬や嗅球に存在し、DHA 摂取により成体ラット海馬の神経新生が促進される (Kawakita et al., 2006)。神経新生や樹状突起スパイン形成が学習形成や記憶形成に正に関与すると考えられることから (Schinder and Gage, 2004; Kasai et al., 2010)、DHA による記憶・学習能力向上作用は神経新生や樹状突起スパイン形成促進が大きく寄与していると推測される。

DHA は①細胞膜の構成成分および②シグナル分子として機能する。細胞膜の構成成分として、DHA は細胞膜に挿入されて膜の流動性を上昇させることが報告されている (Feller et al., 2002)。また、神経芽腫細胞株 Neuro 2A 細胞において、DHA が細胞膜に挿入されることにより Phosphatidylcholine (PC)が生合成され、PI (3)K/Akt シグナ

ルにより細胞の生存率が向上したと報告された (Akbar et al., 2005)。DHA は lysophosphatidic acid acyltransferase 3 (LPAAT3)によって DHA は細胞膜に挿入されるが、LPAAT3 ノックアウトマウスでは細胞膜の DHA の減少が引き起こされ、網膜の層構造に異常がみられる (Shindou et al., 2017)。

DHA はシグナル分子として、神経細胞のペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (PPAR γ ; peroxisome proliferator activated receptor- γ)を活性化させて遺伝子発現を調節すること (Weiser et al., 2016)や、細胞膜に局在する G protein-coupled receptor 40 (GPR40)や G protein-coupled receptor 120 (GPR120)などの G タンパク質共役型受容体に結合することでシグナル伝達を誘導することが報告されている (Yamashima, 2015)。所属研究室では DHA が転写因子 nuclear factor of activated T-cells (NFAT)を活性化させて神経細胞の一次繊毛の形成を促進する新たな分子機構を明らかにした (荏田 修士論文, 2018)。DHA が神経細胞の GPR40 に受容されると細胞内 Ca⁺濃度が上昇して脱リン酸化酵素 Calcineurin が活性化され、NFAT が脱リン酸化される。NFAT が脱リン酸化されると核内に移行し、Cyclooxygenase-2 (COX-2)の発現を誘導して、Prostaglandin E2 が産生されることにより一次繊毛の形成が促進される (荏田 修士論文, 2018)。多くの場合、転写因子は複数の遺伝子発現を制御することから、DHA により多数の遺伝子発現が調節されることが予想された。

DHA による樹状突起スパイン形成促進の作用機序の解明

すでに DHA は転写因子を活性化して遺伝子発現を制御することが明らかとなっている。通常、転写因子は複数の遺伝子の発現を調節するが、DHA により活性化された転写因子によりどの遺伝子の発現を調節するかはよくわかっていない。また、DHA が軸索伸長・一次繊毛形成・樹状突起スパイン形成等を促進することはすでに報告されているが、それらの作用機序について不明な点が数多く残されている。

本研究では、DHA により発現が誘導される遺伝子群の同定、DHA により発現誘導された遺伝子の神経細胞における機能解析に焦点を絞り研究を進めた。特に、樹状突起スパイン形成が記憶・学習能力に密接に関与していることから、本研究では DHA が樹状突起スパイン形成を促進する機序の解明を目指した。

材料と方法

HEK293T 細胞 (ヒト胎児由来腎臓細胞)の培養

直径 10 cm ディッシュ (Greiner)上で、10% Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)、0.001% Gentamicin (Thermo Fisher Scientific)、Penicillin/Streptomycin (100 units/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin) (Nacalai tesque)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich)で HEK293T 細胞を培養した (37°C、5% CO₂)。培養中にディッシュが約 80%の細胞密度になったら継代培養を行った。

海馬神経細胞の初代培養

胎生 16.5 日目の ICR マウス (日本 SLC あるいは日本クレア)の脳を摘出し、氷上の Solution G (0.4% Glucose (Nacalai tesque))を含む PBS (pH 7.4, Thermo Fisher Scientific)に移した。脳から海馬を摘出し、Solution A+ (0.18% Glucose (Nacalai tesque)、0.1% Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)、0.0012% DNase I (Sigma-Aldrich)、0.05% Papain (Nacalai tesque)を含む PBS (pH 7.4)の溶液)中に回収した。37°Cで 20 分間インキュベートし、上清を除いた。Solution A- (0.18% Glucose、0.1% BSA、0.0012% DNase Iを含む PBS (pH 7.4)の溶液)を 2 ml 加えてパスツールピペットによるピペッティングを 4 回行い、Solution A-を 8 ml 加えた。37°Cで 15 分間インキュベートし、溶液中の死細胞に由来する DNA を除いた。遠心 (1,500 rpm、4°C、3 分)した後に上清を除去し、10% FBS、Penicillin/Streptomycin (100 units/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin)を含む Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific)に再懸濁し、細胞数を血球計算盤でカウントし、0.1 mg/ml Poly-D-Lysine (PDL) (Thermo Fisher Scientific)でコーティングした 13 mm glass cover slip (Matsunami)もしくは 3.5 cm プラスチックディッシュ (Greiner)に神経細胞を播種した。神経細胞を播種してから 2 時間後に培地を 2% B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific)、1 mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific)、Penicillin/Streptomycin (100 units/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin)を含む Neurobasal medium に交換し、培養した (37°C、5% CO₂)。

Glass cover slip の洗浄

MilliQ を入れたビーカーに 13 mm cover slip を入れて洗浄を 3 回行った。70%エタノールをビーカーに入れて 13 mm cover slip の洗浄を 3 回行った。MilliQ を 13 mm cover slip が入ったビーカーに入れて、10 分間静置した。ビーカーに硝酸 (Nacalai Tesque)を入れて一晩静置した。MilliQ で 13 mm cover slip を洗浄し、pH 7 付近になるまで繰り返した。MilliQ に 13 mm cover slip を浸し、1 時間おきに 2 回、30 分おきに 2 回 MilliQ を入れ替えた。225°Cで 6 時間、乾熱滅菌を行った。

Total RNA 抽出

RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA の抽出を行った。直径 3.5 cm ディッシュ (Greiner) 上で培養した海馬神経を用いた。培地を取り除き、3 ml の PBS を加えた。PBS を除去して、1 ml の Buffer RLT (Qiagen) に 10 μ l の 2-mercaptoethanol を混合したものを 350 μ l 加えた。コレクションチューブにセットした Qiashreder (Qiagen) に移して遠心 (15,000 rpm、室温、1 分) した。コレクションチューブの溶液に 350 μ l の 70% エタノールを加えて混和した。コレクションチューブにセットした RNeasy spin column (Qiagen) に溶液を移して、遠心 (8,000 rpm、室温、15 秒) して溶液を捨てた。350 μ l の Buffer RW1 (Qiagen) を加えて、遠心 (8,000 rpm、室温、15 秒) して溶液を捨てた。70 μ l の Buffer RDD (Qiagen) と 10 μ l の DNase I stock solution (Qiagen) を混和した溶液を RNeasy spin column に加えて 15 分間静置した。350 μ l の RW1 を加えて、遠心 (8,000 rpm、室温、15 秒) して溶液を捨てた。500 μ l の Buffer RPE (Qiagen) を RNeasy spin column に加えて、遠心 (8,000 rpm、室温、15 秒) して溶液を捨てた。RNeasy spin column を新しいコレクションチューブにセットして遠心 (15,000 rpm、室温、1 分) した。使用前まで -80°C で保存した。

Real time RT-qPCR

反応液 (表 1) を調整して、StepOne (Thermo Fisher Scientific) を用いて下記の Primer (表 2) で PCR 反応を行った。PCR 条件は表 3 に示した。StepOne Software version 2.1 を用いて蛍光強度と増副産物の融解曲線の解析を行った。

cDNA 合成

Total RNA 1 μ g に 50 mM Oligo d(T)₂₀ (Thermo Fisher Scientific) を 1 μ l、10 mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific) を 1 μ l、DEPC-treated Water (Thermo Fisher Scientific) を合計 13 μ l になるように調整して、RNA-Primer Mix とした。65°C で 5 分間インキュベートし、氷上で 2 分間静置した。5xSSIV buffer (Thermo Fisher Scientific) を 4 μ l、100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific) を 1 μ l、RNase OUT (Thermo Fisher Scientific) を 1 μ l 混和して、RT Reaction Mix とした。RNA-Primer Mix を RT Reaction Mix に加えて、混和した。55°C で 10 分間、80°C で 10 分間インキュベートした。RNase H を 1 μ l 加えて、37°C で 20 分間インキュベートした。使用前まで -30°C で保存した。

遺伝子発現ベクター

上記の方法により作製した海馬培養神経細胞の cDNA を Template として、制限酵素サイトを付加したプライマー (表 4) を用いて PCR 反応を行い、増幅された DNA を pBluescript I SK (+) (Stratagene) にサブクローニングした。シーケンスにより塩基配列に変異がないことを確認した後、pCAGGS-Myc、pEGFP-C1、pCMV-Flag、pGEX-6P-1 に組み込んだ。

発現抑制ベクターの構築

RNF39 の発現抑制を行う際に用いたベクターの構築には、BLOCK-iT Pol 2 miRNAi expression vector kit (Thermo Fisher Scientific)を使用した。マウス RNF39 の 509 番目から 529 番目 (RNF39-RNAi #1 : 5'-ACCGTGATCTGCTCATCTCCT-3') 及び、941 番目から 961 番目 (RNF39-RNAi #2 : 5'-GCTCATTGGACTTGCTCTTCG-3') を標的とする塩基配列を pcDNA 6.2-GW/emGFP-miR vector (Thermo Fisher Scientific)に Ligation して、発現抑制ベクターを構築した。

HEK293T 細胞への遺伝子導入

細胞密度が 70%になるまで HEK293T 細胞を 6 cm ディッシュおよび 10 cm ディッシュで培養した。HEK293T 細胞の培養液を新しい 10% FBS、0.001% Gentamicin、Penicillin/Streptomycin を含む DMEM に交換し、2 時間培養した (37°C、5% CO₂)。Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 100 µl に導入するプラスミドおよびその 3 倍量の Polyethylenimine (PEI) (Polyscience)をそれぞれ加え、5 分間静置した。プラスミドを含む Opti-MEM と PEI を含む Opti-MEM を混和して、15 分間静置した。その後、HEK293T 細胞の培養液に混合液を添加して、一晚培養した (37°C、5% CO₂)。培養液を新しい 10% FBS、0.001% Gentamicin、Penicillin/Streptomycin (100 units/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin)を含む DMEM に交換して一晚培養した (37°C、5% CO₂)。

海馬神経細胞への遺伝子導入

海馬神経細胞への遺伝子導入は Neon® Transfection System (Thermo Fisher Scientific) を用いたエレクトロポレーション法で行った。培養海馬神経細胞を回収し、遠心した (1,500 rpm、4°C、5 分)。上清を除去して PBS で再懸濁し、遠心した (1,500 rpm、4°C、5 分)。上清を除去し、R buffer (Thermo Fisher Scientific)で再懸濁してプラスミド DNA を加えた。電気刺激 (1400 V、10 ms、3 pulses)を与えて遺伝子導入を行った。10% FBS、Penicillin/Streptomycin (100 units/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin)を含む Neurobasal medium で 2 時間培養した (37°C、5% CO₂)。2% B-27 supplement、1 mM Glutamine、Penicillin/Streptomycin を含む Neurobasal medium に培地を交換して培養した (37°C、5% CO₂)。

免疫細胞染色

37%ホルムアルデヒド (Nacalai tesque)、2xKreb's Buffer (表 5)、MilliQ を混合し、3.7%ホルムアルデヒドを含む 1xKreb's Buffer を調整して、固定液とした。神経細胞が培養されている 13 mm cover slip を氷上 (4°C)で固定液に浸し、15 分間固定した。13 mm cover slip を PBS に移し、氷上で 10 分間静置した。PBS を除き、0.1% Triton X-100 を含む PBS を加え、氷上で 10 分間静置して透過処理を行った。0.1% Triton X-100 を含む PBS を除き、Blocking solution (10% FBS、0.1% Triton X-100 を含む PBS)を加え、室温で 30 分間静置してブロッキングを行った。13 mm cover slip を 24 well plate (IWAKI)

の蓋に移し、Blocking solution で希釈した一次抗体 (表 6)を加え、4°Cで一晩反応させた。13 mm cover slip を PBS で浸し、氷上で 40 分間静置して一次抗体の洗浄を行った。13 mm cover slip を 24 well plate の蓋に移し、PBS で希釈した二次抗体 (表 7)を加え、遮光して室温で 40 分間反応させた。13 mm cover slip を PBS で浸し、室温で 40 分間静置して二次抗体の洗浄を行った。13 mm cover slip を slide glass (MATSUNAMI)に移し、cover glass (MATSUNAMI)を上へのせ、50%グリセロール (Nacalai tesque)を含む PBS で封入し、マニキュアで密閉した。蛍光顕微鏡 (Axioplane 2, Axiovision 3, Plan-Apochromat×63 oil 1.40 NA; Carl Zeiss)で観察し、Image J (NIH)を用いて PSD-95 陽性シグナル数のカウントを行った。

大脳皮質神経細胞の DiI 標識

生後 14 日目の ICR マウスに DHA もしくは薬剤 (表 8)を 50 mg/kg となるように腹腔内注射により投与した。生後 16 日目に 1.5% パラホルムアルデヒド (PFA; Paraformaldehyde (Wako))により灌流固定を行った後、脳を摘出した。摘出した脳を 1.5% PFA により 4°Cで一晩浸漬し、その後 PBS に置換した。ビブラトームにより厚さ 100 μm の冠状切片を作製した。脳梁に DiI 結晶 (Thermo Fisher Scientific)をインジェクションして、37°Cで 2 週間インキュベートした。DiI により蛍光標識された脳切片を共焦点顕微鏡 (Nikon)を用いて撮影した。

タンパク質の回収

HEK293T 細胞もしくは培養海馬神経細胞をディッシュで培養した。培養液を除去して PBS で細胞を洗浄した。PBS を除去して、氷上で HEK293T 細胞では RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、1.0% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate、1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Nacalai tesque)、0.01 mM Leupeptin (Nacalai tesque)、10 mM NaF、10 mM Beta-Glycerophosphate)を加え、培養海馬神経細胞では NP-40 lysis buffer (0.5% NP-40 (Nacalai tesque)、20 mM HEPES (pH 7.5) (Nacalai tesque)、3 mM MgCl_2 、100 mM NaCl、1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM PMSF、0.01 mM Leupeptin、10 mM NaF、10 mM Beta-Glycerophosphate)を加えた。セルスクレイパーを用いて細胞を掻き取った。細胞破碎液を氷上で 10 分間静置し、遠心 (15,000 rpm、4°C、10 分)した後、上清を回収した。上清と等量の 2xSDS sample buffer を加え、95°Cで 5 分間インキュベートした。

MG-132 (Santa Cruz)で処理をする場合は、タンパク質回収の 4 時間前に 10 μM となるように培地中に加えた。

HEK293T 細胞タンパク質の共免疫沈降

6 cm ディッシュで培養した HEK293T を上記に示した方法により遺伝子導入を行い、目的のタンパク質を HEK293T 細胞に発現させた。培養液を除去して PBS で細胞を洗浄した。PBS を除去して、氷上で NP-40 lysis buffer (0.5% NP-40、20 mM HEPES (pH 7.5)、

3 mM MgCl₂、100 mM NaCl、1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM PMSF、0.01 mM Leupeptin) を 500 μl 加え、セルスクレイパーを用いて細胞を掻き取った。細胞破碎液を氷上で 10 分間静置し、遠心 (15,000 rpm、4°C、10 分) した後、上清を回収した。上清に 1 μg の抗 Flag 抗体 (MBL) を加え、4°C で 2 時間回転混和した。遠心 (15,000 rpm、4°C、15 分) して、上清を回収した。NP-40 lysis buffer で平衡化した Protein G-Sepharose 4B (GE Healthcare) を 30 μl 加えて、4°C で 1 時間回転混和した後、NP-40 Lysis buffer で 4 回洗浄した。遠心 (3,000 rpm、室温、10 秒) し、上清を除いた。Protein G-Sepharose 4B に 2xSDS sample buffer を 25 μl 加えて、95°C で 5 分間インキュベートした。

マウス脳タンパク質の共免疫沈降

マウスの全脳を摘出し、PBS で洗浄した。脳重量に対して 3 倍量の Lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、5% glycerol、1mM DTT、1 mM PMSF、0.01 mM Leupeptin、10 mM NaF、10 mM Beta-Glycerophosphate) を加え、ホモジナイザーで組織を破碎した。氷上で 10 分間静置した。遠心 (15,000 rpm、4°C、20 分) して、Protein G sepharose を加えた。4°C で 60 分間回転混和した後、遠心 (8,000 rpm、4°C、5 分) した。上清を回収して、Lysate 1 ml あたり 4 μg の抗体を加えた。4°C で 4 時間回転混和した後、Protein G sepharose を加えた。4°C で 1 時間回転混和した後、Lysis buffer で 5 回洗浄した。上清を除き、2x SDS sample buffer を 25 μl 加えて、95°C で 5 分間インキュベートした。

タンパク質精製

pGEX-6P-1 vector (GE healthcare) を大腸菌 BL21 (codon plus) に形質転換して、50 μg/ml Ampicillin を含む LB 寒天培地で培養した (37°C)。形成されたシングルコロニーをピックアップして、50 μg/ml Ampicillin を含む LB 培地 2 ml で一晩振とう培養した (37°C)。培養液を 50 μg/ml Ampicillin を含む LB 培地 100 ml に移して、OD 値が 0.6 から 0.9 の間になるまで振とう培養した。培養液に Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を 0.25 mM となるように加えて、室温で 24 時間振とう培養した。培養液を遠心 (4,800 rpm、4°C、15 分) して、上清を捨てて菌体を回収した。菌体に Lysis buffer (0.1% Triton X-100、1 mM EDTA、5 mM DTT、0.2 mg/ml Lysozyme (Nacalai tesque)、1 mM PMFS、0.01 mM Leupeptin を含む PBS) を 4 ml 加えて懸濁して、氷上で 10 分間静置した。氷上で超音波破碎した。遠心 (15,000 rpm、4°C、15 分) して、上清を回収した。0.45 μm のフィルターを用いてろ過し、Wash buffer (0.1% Triton X-100 を含む PBS) で平衡化した Glutathione sepharose 4B を 750 μl 加えた。4°C で 3 時間回転混和した後、Glutathione sepharose 4B を Wash buffer で 5 回、PBS で 2 回洗浄した。Elution buffer (30 mM 還元型 Glutathione、5 mM DTT を含む PBS) を 1 ml 加えて混和した。遠心 (15,000 rpm、4°C、1 分) して上清を回収した。Mini Dialysis Kit (GE healthcare) を用いて PBS で 3 時間以上透析を行った。この透析を 3 回繰り返した。透析後、タンパク質溶液を回収した。

In vitro binding assay

Wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% Triton X-100) で平衡化した Glutathione sepharose 4B 50 μ l と精製した GST タグ付きのタンパク質 200 pmol を Binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM DTT、1 mM PMSF、0.01 mM Leupeptin、10 mM NaF、10 mM Beta-Glycerophosphate) 500 μ l に加えて、4°Cで一晩回転混和した。Wash buffer で2回洗浄し、100 μ l となるように Binding buffer を加えた。半量を回収し、Binding buffer 500 μ l および Myc タグ付きのタンパク質 100 pmol を加えた。4°Cで3時間回転混和した後、Wash buffer で5回洗浄した。上清を除き、SDS sample buffer を加えて、95°Cで5分間インキュベートした。

SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamide-Gel を作製し、専用の電気泳動装置 (Bio craft) にセットし、電気泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS) に浸した。SDS 化したサンプルをウェルにアプライし、電気泳動を行った。

ウエスタンブロット法

SDS-PAGE 後の SDS-Polyacrylamide-Gel を Transfer buffer (192 mM glycine (Nacalai tesque)、100 mM Tris (Nacalai tesque)、5% MeOH を含む MilliQ) に浸し、室温で15分間振とうした。Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Bio-Rad) を使用し、PVDF 膜 (Millipore) にタンパク質を転写した (2 mA/cm²、室温、90分)。3% スキムミルク (森永乳業) を含む TBST buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl (Nacalai tesque)、0.05% Tween20 (Nacalai tesque)) に PVDF 膜を浸し、室温で1時間振とうしてブロッキングを行った。1% スキムミルクを含む TBST buffer で希釈した一次抗体 (表 9) で PVDF 膜を浸し、4°Cで一晩反応させた。TBST buffer で PVDF 膜を浸して8分間振とうする操作を3回繰り返した。1% スキムミルクを含む TBST buffer で希釈した二次抗体 (表 10) で PVDF 膜を浸し、室温で1時間反応させた。TBST buffer で PVDF 膜を浸して8分間振とうする操作を4回繰り返した。ECL prime (GE healthcare) を MilliQ で4倍希釈した溶液に PVDF 膜を1分間浸した。その後、シグナルを EZ-Capture ST (ATTO) で検出した。

抗 RNF39 抗体や抗 MDM2 抗体を用いる場合は以下の方法により行った。上記と同様の方法により PVDF 膜にタンパク質を転写した。TBST buffer で PVDF 膜を浸して10分間振とうした。PVDF Blocking Reagent (東洋紡) により40分間振とうしてブロッキングを行った後、*Can get signal Solution 1* で希釈した一次抗体で PVDF 膜を浸し、4°Cで一晩反応させた。TBST buffer で PVDF 膜を浸して8分間振とうする操作を3回繰り返した。1% スキムミルクを含む TBST buffer で希釈した二次抗体 (表 10) で PVDF 膜を浸し、室温で1時間反応させた。TBST buffer で PVDF 膜を浸して10分間振とうする操作を5回繰り返した。ECL prime に PVDF 膜を1分間浸した。シグナルを EZ-Capture ST で検出した。

銀染色

銀染色を行う際には 2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品株式会社)を用いた。SDS-PAGE 後の SDS-Polyacrylamide-Gel を固定液 I (MeOH (Nacalai tesque)25ml、酢酸 (Nacalai tesque)5 ml、MilliQ 20 ml の混合液)に浸し、室温で 10 分間振とうした。固定液 I を捨て、固定液 II (MeOH 15 ml、酢酸 5 ml、固定化剤 2.5 ml、MilliQ 27.5 ml の混合液)に浸し、室温で 15 分間振とうした。固定液 II を捨て、前処理液 (MeOH 25 ml、前処理化剤 2.5 ml、MilliQ 22.5 ml の混合液)に浸し、室温で 10 分間振とうした。前処理液を捨て、MilliQ 50 ml を注ぎ、室温で 5 分間振とうした。MilliQ を捨て、銀染色液 (染色液 A 2.5 ml、染色液 B 2.5 ml、MilliQ 45 ml の混合液)に浸し、室温で 15 分間振とうした。銀染色液を廃液容器に捨てた。MilliQ 50 ml を注ぎ、室温で 2 分間振とうし、MilliQ を捨てる操作を 3 回繰り返した。現像液 (現像原液 2.5 ml、MilliQ 47.5 ml の混合液)に浸し、適度な染色像が得られるまで室温で振とうした。停止液を 10 ml 加え、10 分間振とうした。SDS-Polyacrylamide-Gel を水洗し、減圧乾燥を行った。

MS 解析

銀染色 MS キット (和光純薬工業株式会社)を用いた。SDS-PAGE 後の SDS-Polyacrylamide-Gel を固定液 1 (MeOH 25 ml、酢酸 2.5 ml、MilliQ 22.5 ml の混合液)に浸し、室温で 20 分間振とうした。固定液 1 を捨て、固定液 2 (MeOH 25 ml、MilliQ 25 ml の混合液)に浸し、室温で 10 分間振とうした。固定液 2 を捨て、MilliQ 50 ml を加え、室温で 10 分間振とうした。MilliQ を捨て、増感液 (増感原液 2.5 ml、MilliQ 22.5 ml の混合液)に浸し、室温で 1 分間振とうした。増感液を捨てた。MilliQ 50 ml を加え、室温で 1 分間振とうし、MilliQ を捨てる操作を 2 回繰り返した。染色液 (染色原液 5 ml、MilliQ 45 ml の混合液)に浸し、室温で 20 分間振とうした。染色液を廃液溶液に捨てた。MilliQ 50 ml に浸し、室温で 1 分間振とうし、MilliQ を捨てる操作を 2 回繰り返した。現像液 (現像粉末 1 g、MilliQ 42.5 ml、現像原液 2.5 ml の混合液)に浸し、適度な染色像が得られるまで室温で振とうした。停止液 5 ml を加え、室温で 1 分間振とうし、現像液を捨てた。MilliQ 50 ml に浸し、室温で 1 分間振とうし、MilliQ を捨てる操作を 3 回繰り返した。ゲルを切り出し、脱色液 A と脱色液 B の等量混合液に浸し、脱色を行った。脱色液を除き、MilliQ で水洗した。この後の操作は倉田理恵技術職員に依頼した。ゲルを IAA と DTT で還元アルキル化の後に、トリプシンにてゲル内消化を行った。消化液を回収し、ろ過 (0.45um フィルター)にて夾雑物を除き、LC-MS サンプルとし、リニアイオントラップ - 電場型フーリエ変換質量分析計 (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。得られた Raw data は Mascot を用いてデータベース検索を行った。なお、検索条件は表 11 示した。

統計解析

得られたデータを ImageJ (NIH) で解析を行った。2 群の有意差検定は Excel 2016 (Microsoft) を用いて F 検定を行った後、Student's *t*-test を行った。なお、標準化した 2 群の有意差検定は Graphpad Prism 6 を用いて Mann-Whitney *U* test を行った。多群の有意差検定は Graphpad Prism 6 を用いて Dunnett's test もしくは Tukey's test を行った。

表 1. Real time RT-PCR の反応液

Luna universal One-Step Reaction Mix (NEB)	10 μ l
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (NEB)	1 μ l
Forward primer (10 mM)	0.8 μ l
Reverse primer (10 mM)	0.8 μ l
Template RNA (20 ng/ μ l)	5 μ l
Nuclease-free Water	2.4 μ l

表 2. Real time RT-PCR に用いたプライマー一覧

標的遺伝子	プライマー (5'→3')	Fw: Forward, Rv: Reverse
MDM2	Fw :	CCGAGTTTCTCTGTGAAGGAGC
	Rv :	GTCTGCTCTCACTCAGCGATGT
DCX	Fw :	CTGACTCAGGTAACGACCAAGAC
	Rv :	TTCCAGGGCTTGTGGGTGTAGA
GAPDH	Fw :	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Rv :	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

表 3. Real time RT-PCR の条件

サイクルステップ	温度	時間	サイクル数
Reverse Transcription	55°C	10 min	1
Initial Denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	10s	40-50
Extension	60°C	1 min	
Melt Curve	60-95°C		

表 4. 遺伝子発現ベクター作製に用いたプライマー一覧

遺伝子名	プライマー (5'→3') Fw: Forward, Rv: Reverse, 制限酵素配列 (グレー色)
RNF39 (1-352 a.a.)	Fw: (EcoRI 配列) GGAAGAATTCATGGAGGCTCCCGAGCTGGGCCCCG Rv: (EcoRI 配列) CCTTGAATTCTCAGGCTTCTCCAGGCAAGATACGC
RNF39 (1-153 a.a.)	Fw: (EcoRI 配列) GGAAGAATTCATGGAGGCTCCCGAGCTGGGCCCCG Rv: (XhoI 配列) CCTTCTCGAGTCAGTTTTTTGACCACGGGGTAATC
RNF39 (154-352 a.a.)	Fw: (EcoRI 配列) GGAAGAATTCATGCTTCACAGGCTGACAGC Rv: (XhoI 配列) CCTTCTCGAGTCAGGCTTCTCCAGGCAAGA

表 5. 2xKreb's buffer の組成

試薬名	終濃度
NaCl	236 mM
KCl	9.4 mM
KH ₂ PO ₄	2.4 mM
MgSO ₄	2.4 mM
NaHCO ₃	8.4 mM
CaCl ₂	4 mM
Glucose	20 mM
HEPES-NaOH (pH 7.0)	20 mM
Sucrose	800 mM

表 6. 免疫染色で用いた一次抗体

抗体名	免疫動物と種類	Cat#	メーカー	希釈倍率
Anti-PSD95	Mouse、Monoclonal	MA1-045	Thermo Fisher Scientific	x500
Anti-Myc	Rabbit、Polyclonal	562-5	MBL	x1000
Anti-Myc	Chick、Polyclonal	A-21281	Thermo Fisher Scientific	x1000
Anti-MAP2	Rabbit、Polyclonal	AB5622	Millipore	x1000
Anti-GFP	Chicken、Polyclonal	GFP-1010	Aves Labs	x500

表 7. 免疫染色で用いた二次抗体

抗体名	Cat#	メーカー	希釈倍率
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG	A-11031	Thermo Fisher Scientific	x1000
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG	A-11036	Thermo Fisher Scientific	x1000
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	A-11029	Thermo Fisher Scientific	x1000
Alexa Fluor 488 goat anti-chicken IgY	A-11039	Thermo Fisher Scientific	x1000
Alexa Fluor 350 goat anti-rabbit IgG	A-21068	Thermo Fisher Scientific	x1000

表 8. 本研究で使用した薬剤

名前	CAT#	メーカー	Solvent	Function
GW9508	10008907	Cayman chemical	DMSO	GPR40 agonist
TAK875	A11018	AdoQ Bioscience	DMSO	GPR40 agonist
DC260126	SML1050	MERCK	DMSO	GPR40 antagonist
G3335	sc-202771	Santa Cruz	DMSO	PPAR γ antagonist
GW9662	sc-202641	Santa Cruz	DMSO	PPAR γ antagonist
Nutlin-3	sc-45061	Santa Cruz	DMSO	MDM2 inhibitor
MG-132	sc-201270	Santa Cruz	DMSO	proteasome inhibitor

表 9. ウェスタンブロットで用いた一次抗体

抗体名	免疫動物と種類	Cat#	メーカー	希釈倍率
Anti-Flag	Mouse、Polyclonal	KO602-L	TransGenic inc.	x2000
Anti-Myc	Rabbit、Polyclonal	562-5	MBL	x2000
Anti-RNF39	Mouse、Monoclonal	LS-C338009	LSBio	x200
Anti-MDM2	Mouse、Monoclonal	sc-965	Santa Cruz	x100
Anti-DCX	Mouse、Monoclonal	sc-271390	Santa Cruz	x1000
Anti-GAPDH	Mouse、Monoclonal	010-25526	Wako	x20000

表 10. ウェスタンブロットで用いた二次抗体

抗体名	Cat#	メーカー	希釈倍率
Goat anti-mouse IgG HRP	115-035-003	Jackson ImmunoResearch	x10000
Goat anti-rabbit IgG HRP	111-035-003	Jackson ImmunoResearch	x10000

表 11. Mascot の検索条件

項目	条件
Database	NCBIProt 20180924 (170547177 sequences; 62282394533 residues)
Taxonomy	Homo sapiens (human) (330535 sequences)
Enzyme	Trypsin
Fixed modification	Carbamidomethyl (C)
Variable modification	Oxidation (M)
Mass values	Monoisotopic
Peptide mass Tolerance	± 10 ppm
Fragment Mass Tolerance	± 0.8 Da
Max Missed Cleavages	1

結果

DHA は GPR40 を介して培養神経細胞の樹状突起スパインの形成を促進する

マウスに DHA を経口摂取させると海馬の神経細胞において樹状突起スパインの形成を促進することがすでに報告されている (Sakamoto et al., 2007)。まず、DHA 刺激により培養神経細胞の樹状突起スパインの形成を促進するかについて解析を行った。胎生 16 日目のマウスにより調製した海馬神経細胞を解析モデルとして用いた。培養 7 日目の培養海馬神経細胞に DHA を 1 μM 、5 μM 、10 μM となるように刺激した。本研究において DHA および薬剤を使用する実験では、コントロールとして DMSO を使用した。培養 14 日目に抗 PSD-95 抗体を用いた免疫細胞染色法により解析した。PSD-95 はポストシナプスの細胞膜を裏打ちする足場タンパク質であり、種々の先行研究において成熟した樹状突起スパインの主要なマーカーとして使用される。本研究において、PSD-95 陽性シグナルを成熟した樹状突起スパインの指標として解析を行った。樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.23 ± 0.04 個、DHA (1 μM) では 2.36 ± 0.04 個、DHA (5 μM) では 2.41 ± 0.06 個、DHA (10 μM) では 2.64 ± 0.05 個となった (図 1)。この結果から、DHA は樹状突起スパインの形成を促進することが示唆された。

先行研究により、神経細胞において DHA が PPAR γ を活性化して遺伝子発現を制御すること (Weiser et al., 2016) や、細胞膜に局在する GPR40 に結合することでシグナル伝達を誘導することが報告されている (Yamashima et al., 2015)。そこで、DHA による樹状突起スパインの形成促進作用のシグナル伝達経路の同定を試みた。まず、GPR40 agonist である GW9508 により GPR40 を活性化させて実験を行った。培養 7 日目の培養海馬神経細胞に GW9508 を 1 μM 、5 μM 、10 μM となるように刺激して、培養 14 日目に免疫細胞染色法により解析した。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.58 ± 0.05 個、GW9508 (1 μM) では 2.91 ± 0.05 個、GW9508 (5 μM) では 3.09 ± 0.05 個、GW9508 (10 μM) では 3.16 ± 0.05 個となった (図 2 A-B)。異なる GPR40 agonist である TAK875 を用いて同様の実験を行った。培養 7 日目の培養海馬神経細胞に TAK875 を 1 μM 、5 μM となるように刺激して、培養 14 日目に免疫細胞染色法により解析した。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.72 ± 0.05 個、TAK875 (1 μM) では 3.09 ± 0.05 個、TAK875 (5 μM) では 3.32 ± 0.06 個となった (図 2 C-D)。これらの結果から、GPR40 の活性化は樹状突起スパインの形成を促進することが示唆された。

続いて、GPR40 antagonist である DC260126 を用いて実験を行った。培養 7 日目の培養海馬神経細胞を DHA (10 μM) および DC260126 (10 μM) により刺激した。培養 14 日目に免疫細胞染色法により解析した。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.73 ± 0.06 個、DHA では 3.17 ± 0.07 個、DC260126 では 2.29 ± 0.05 個、DHA + DC260126 では 2.28 ± 0.05 個となった (図 3)。

コントロールと比較して、DHA 刺激細胞では PSD-95 陽性シグナルの数が有意に増加した。一方で、DC260126 刺激細胞では、DHA 刺激の有無に関わらず PSD-95 陽性シグナルの数の増加が認められなかった。この結果から、DHA による樹状突起スパイン形成促進効果は GPR40 の阻害により消失することが示唆された。

次に、PPAR γ antagonist である G3335 を用いて実験を行った。培養 7 日目の培養海馬神経細胞を DHA (10 μ M) および G3335 (30 μ M) により刺激した。培養 14 日目に免疫細胞染色法により解析した。その結果、樹状突起 10 μ m あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.72 ± 0.05 個、DHA では 3.10 ± 0.05 個、G3335 では 2.70 ± 0.06 個、DHA + G3335 では 3.02 ± 0.06 個となった (図 4 A-B)。コントロールと比較して、DHA 刺激細胞では PSD-95 陽性シグナルの数が有意に増加した。G3335 刺激細胞においても、DHA 刺激により PSD-95 陽性シグナルの数が有意に増加した。

異なる PPAR γ antagonist である GW9662 を用いて実験を行った。培養 7 日目の培養海馬神経細胞を DHA (10 μ M) および GW9662 (10 μ M) により刺激した。培養 14 日目に免疫細胞染色法により解析した。その結果、樹状突起 10 μ m あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.73 ± 0.05 個、DHA では 3.14 ± 0.06 個、GW9662 では 2.76 ± 0.05 個、DHA + GW9662 では 3.09 ± 0.05 個となった (図 4 C-D)。コントロールと比較して、DHA 刺激細胞では PSD-95 陽性シグナルの数が有意に増加した。GW9662 刺激細胞においても、DHA 刺激により PSD-95 陽性シグナルの数が有意に増加した。これらの結果から、PPAR γ の阻害は DHA による樹状突起スパイン形成促進効果に影響を与えないことが示唆された。

以上の結果から、培養海馬神経細胞において DHA は GPR40 を介して樹状突起スパイン形成を促進すると考えられた。

DHA は GPR40 を介してマウス的大脑皮質の樹状突起スパインの形成を促進する

マウス個体においても DHA が GPR40 を介して樹状突起スパイン形成を促進するか解析を行った。生後 14 日目マウスに DHA (50 mg/kg) および GPR40 antagonist である DC260126 (50 mg/kg) を腹腔内注射により投与し、生後 16 日目に解剖、DiI により大腦皮質の神経細胞を蛍光標識することで解析を行った。その結果、樹状突起 10 μ m あたりの樹状突起スパインの数は、コントロールでは 4.95 ± 0.24 個、DHA では 6.03 ± 0.17 個、DC260126 では 4.61 ± 0.30 個、DHA + DC260126 では 4.26 ± 0.29 個となった (図 5 A-B)。コントロールと比較して、DHA の投与により樹状突起スパインの数が有意に増加した。一方で、DC260126 投与マウスでは、DHA と同時に投与した場合と比較して、樹状突起スパインの数に有意な差は認められなかった。

次に、生後 14 日目マウスに GPR40 agonist である GW9508 (50 mg/kg) を腹腔内注射により投与して同様の実験を行った。その結果、樹状突起 10 μ m あたりの樹状突起スパインの数は、コントロールでは 4.67 ± 0.70 個、GW9508 では 6.87 ± 0.39 個となった (図 5 C-D)。コントロールと比較して、GW9508 マウスでは樹状突起スパインの数に有意な増加が認められた。

以上の結果から、マウス個体においても DHA は GPR40 を介して樹状突起スパインの形成を促進すると考えられた。

DHA により培養神経細胞の遺伝子発現がダイナミックに変動する

所属研究室ではすでに DHA が転写因子 NFAT を活性化することを明らかにしている (荻田 修士論文 2018)。転写因子は通常、複数の標的遺伝子の発現を同時に制御することが知られていることから、遺伝子転写産物の網羅的解析を行った。胎生 16 日目のマウスの海馬神経を初代培養して、培養 33 時間後に 1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に培地を交換し、培養 36 時間後に培地中に DHA (5 μ M) を添加した。培養 48 時間後に RNA 抽出を行い、遺伝子転写産物の網羅的解析を行った。この実験を 3 回繰り返し、Student's *t*-test により有意差検定を行った。その結果、検出された遺伝子数は 21,556 個であった。そのうち、*p* 値が 0.05 未満で、DHA 刺激により有意に 1.5 倍以上に発現量が上昇した遺伝子数は 114 個、2/3 以下に発現量が減少した遺伝子数は 146 個となった (図 6)。

RNF39 は DHA 刺激により発現量が上昇する

DHA 刺激により発現量が上昇する遺伝子のうち、RING Finger Protein 39 (RNF39) に着目した。RNF39 は長期増強 (LTP: long-term potentiation) の誘発により発現量が上昇することが報告されている (Matsuo et al., 2001; Ploski et al., 2010)。LTP は、神経細胞に発現している NMDA 受容体の活性化の結果、樹状突起スパインの肥大化やシナプスの伝達効率の上昇が起こり、それが長時間維持する現象であり、記憶や学習に関連すると考えられている。一方で、DHA の積極的な摂取はヒトにおいて記憶・学習能力を向上させることが報告されている (Stonehouse et al., 2013)。これらのことから、RNF39 が樹状突起スパインの形成に関与し、DHA による樹状突起スパインの形成促進や記憶・学習能力向上は RNF39 を介する可能性が考えられた。

ドメイン検索データベース SMART によるバイオインフォマティクス解析の結果、RNF39 は RING Finger domain、SPRY domain、PRY domain を有することが示唆された (図 7 A)。

DHA 刺激による RNF39 のタンパク質の量の変動を解析するために、培養 14 日目の培養海馬神経細胞を DHA (5 μ M) により刺激してウエスタンブロットを行った。その結果、コントロールと比較して、RNF39 のタンパク質の量は DHA 刺激後 3 時間で 2.50 ± 0.44 倍、刺激後 6 時間で 3.89 ± 0.93 倍に増加した (図 7 B-C)。次に、培養 14 日目の培養海馬神経細胞を GPR40 agonist である GW9508 (5 μ M) により刺激して、ウエスタンブロットを行った。その結果、コントロールと比較して、RNF39 のタンパク質の量は GW9508 刺激後 6 時間で 2.02 ± 0.45 倍に増加した (図 7 D-E)。これらの結果から、DHA は GPR40 を介して RNF39 の発現量を増加させることが示唆された。

RNF39 の過剰発現は樹状突起スパインの形成を促進する

樹状突起スパインの形成における RNF39 の機能解析を行った。海馬培養神経細胞に Myc-RNF39 およびコントロールとして Myc-GST の遺伝子導入を行い、培養 14 日目に樹状突起スパインのマーカーとして抗 PSD-95 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、Myc-GST では 2.25 ± 0.07 個、Myc-RNF39 では 2.68 ± 0.09 個となった (図 8)。この結果から、RNF39 は樹状突起スパインの形成を促進する機能を有することが示唆された。

RNF39 の発現抑制は樹状突起スパインの形成を抑制する

作製した RNF39 の knockdown vector の発現抑制効果を検証するために、HEK293T 細胞に Flag-RNF39 および knockdown vector (RNF39-RNAi #1 もしくは RNF39-RNAi #2) の遺伝子導入を行った。その後、ウエスタンブロット法により解析を行った。その結果、コントロールと比較して Flag-RNF39 のタンパク質の量が RNF39-RNAi #1 では 0.19 ± 0.022 倍に、RNF39-RNAi #2 では 0.20 ± 0.021 倍に減少した (図 9 A-B)。この結果から、全ての knockdown vector により RNF39 の発現抑制がされると考えられた。

次に、RNF39 の発現抑制による樹状突起スパインの形成への影響を解析した。海馬培養神経細胞に RNF39-RNAi #1、RNF39-RNAi #2 の遺伝子導入を行い、培養 7 日目に DHA (10 μM) により刺激した。その後、培養 14 日目に抗 PSD-95 抗体により免疫細胞染色法を行った。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 2.81 ± 0.07 個、DHA では 3.42 ± 0.08 個、RNF39-RNAi #1 では 2.36 ± 0.05 個、RNF39-RNAi #1 + DHA では 2.39 ± 0.06 個、RNF39-RNAi #2 では 2.31 ± 0.05 個、RNF39-RNAi #2 + DHA では 2.35 ± 0.07 個となった (図 9 C-D)。コントロールと比較して、DHA 刺激細胞では PSD-95 陽性シグナルの数が有意に増加したが、RNF39 発現抑制細胞では有意に減少した。RNF39 発現抑制細胞では、DHA 刺激を行っても PSD-95 陽性シグナルの数に有意な差は認められなかった。この結果から、RNF39 の発現抑制により樹状突起スパインの形成が抑制されること、および DHA による樹状突起スパイン形成促進効果は RNF39 の発現抑制により消失することが示唆された。

RNF39 は様々なタンパク質と相互作用をする

RNF39 が樹状突起スパインの形成を促進するメカニズムを探究するために、RNF39 の相互作用分子の探索を行った。まず HEK293T 細胞に Flag-RNF39、Flag-GST の遺伝子導入を行い、抗 Flag 抗体による免疫共沈降および銀染色を行った。銀染色の結果から、RNF39 は多種多様なタンパク質と相互作用すると予測された (図 10 A)。

その後に行った LC-MS 解析により、RNF39 は代謝に関連する Carbamoyl-Phosphate Synthetase 2, Aspartate Transcarbamylase, And Dihydroorotase (CAD) や ATP Citrate Lyase (Acly)、細胞接着に関連する Protocadherin 7 (Pcdh7) や Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 2 (CELSR2)、転写因子である p53、E3-ユビキチンリガーゼである

Mouse Double Minute 2 (MDM2)や STIP1 Homology And U-Box Containing Protein 1 (STUB1)などといったタンパク質と相互作用することが示唆された (図 10 B-C, 表 12)。

先行研究により、マウス嗅球の抑制性神経細胞において、MDM2 は樹状突起スパインの形成を抑制する機能を有すると報告されている (Yoshihara et al., 2014)。そこで、RNF39 は MDM2 の機能を抑制することで樹状突起スパイン形成を促進する可能性が考えられ、以後の解析を進めた。

RNF39 は MDM2 と相互作用する

RNF39 と MDM2 の相互作用を解析するために、HEK293T 細胞に Flag-RNF39 および Myc-MDM2 を遺伝子導入して、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降を行った。抗 Myc 抗体を用いたウエスタンブロット法により RNF39 は MDM2 と相互作用することが示唆された。また、抗 Myc 抗体による免疫沈降を行い、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットによっても同様の結果が得られた (図 11 A-B)。次に、生後 2 日目マウスの全脳から抽出したタンパク質に抗 MDM2 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 RNF39 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、内在性のタンパク質においても、RNF39 による MDM2 との相互作用が認められた (図 11 C)。

RNF39 と MDM2 の直接結合するか検証するために、精製タンパク質 GST-RNF39 と Myc-MDM2 を用いて、GST で pull down を行った。その結果、RNF39 と MDM2 は直接結合することが示された。また、RNF39 の N 末側の RING Finger ドメインを有する断片 GST-RNF39 (1-153 aa)と、C 末側の PRY ドメインと SPRY ドメインを有する断片 GST-RNF39 (154-352 aa)を用いて同様の実験を行った。その結果、N 末側の RING Finger ドメインをもつ断片 RNF39 (1-153 aa)で MDM2 と直接結合することが示された (図 12)。

MDM2 は樹状突起スパインの形成を抑制する

MDM2 による樹状突起スパイン形成への影響を解析するために、培養海馬神経細胞に Myc-MDM2 およびコントロールとして Myc-GST を遺伝子導入し、培養 14 日目に抗 PSD-95 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、Myc-GST では 2.02 ± 0.05 個、Myc-MDM2 では 1.70 ± 0.04 個となった (図 13 A-B)。この結果から、MDM2 の過剰発現は樹状突起スパインの形成を抑制することが示唆された。

また、培養 7 日目の培養海馬神経細胞に MDM2 inhibitor である Nutlin-3 を 0.5 μM 、1 μM となるように刺激して、培養 14 日目に抗 PSD-95 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。その結果、樹状突起 10 μm あたりの PSD-95 陽性シグナルの数は、コントロールでは 1.98 ± 0.04 個、Nutlin-3 (0.5 μM)では 2.14 ± 0.04 個、Nutlin-3 (1 μM)では 2.41 ± 0.05 個となった (図 13 C-D)。この結果から、MDM2 の阻害は樹状突起スパインの形成を促進することが示唆された。

以上より、MDM2 は樹状突起スパイン形成の抑制する機能を有すると示唆された。

RNF39 はプロテアソームを介して MDM2 の分解を誘導する

RNF39 は E3-ユビキチンリガーゼとして機能することが報告されており (Wang et al., 2021)、相互作用分子のプロテアソームを介した分解誘導を引き起こすと予想された。そこで、HEK293T 細胞に Myc-MDM2 と Flag-RNF39 を遺伝子導入して、ウエスタンブロット法により Myc-MDM2 のタンパク質の量の変動について解析した (図 14 A-B)。その結果、RNF39 により MDM2 のタンパク質が減少することが示唆された。

RNF39 による MDM2 のタンパク質減少が非特異的な反応でないことを確認するために、HEK293T 細胞に Myc-MDM2 と Flag-RNF39 もしくはコントロールとして E3-ユビキチンリガーゼである Flag-STUB1 を遺伝子導入してウエスタンブロット法により解析を行った。その結果、Myc-MDM2 のみの発現細胞と比較して、Flag-RNF39 の共発現細胞では Myc-MDM2 のタンパク質の量が 0.48 ± 0.01 倍に、Flag-STUB1 の共発現細胞では 1.02 ± 0.10 倍となった (図 14 C-D)。この結果から、STUB1 は MDM2 のタンパク質の量に影響を与えないことが示唆され、RNF39 による MDM2 のタンパク質減少は非特異的な反応ではないと考えられた。

続いて、Myc-MDM2 と Flag-RNF39 を遺伝子導入した HEK293T 細胞にプロテアソーム阻害剤である MG-132 ($10 \mu\text{M}$)により処理し、ウエスタンブロット法により Myc-MDM2 のタンパク質の量の変動について解析した。その結果、コントロールと比較して、Myc-MDM2 のタンパク質の量は MG-132 を添加した細胞では 1.05 ± 0.02 倍、Flag-RNF39 の共発現細胞では 0.52 ± 0.06 倍、MG-132 を添加した Flag-RNF39 の共発現細胞では 0.92 ± 0.03 倍となった (図 15)。この結果から、RNF39 はプロテアソームを介して MDM2 の分解を誘導することが示唆された。

DHA は GPR40 を介して MDM2 の分解を誘導する

DHA による MDM2 のタンパク質の量への影響を解析するために、培養 14 日目の培養海馬神経細胞を DHA ($5 \mu\text{M}$)により刺激して、抗 MDM2 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析を行った。その結果、コントロールと比較して、MDM2 のタンパク質の量が刺激後 3 時間では 0.85 ± 0.19 倍、刺激後 6 時間では 0.42 ± 0.02 倍となった (図 16 A-B)。この結果から、DHA 刺激は MDM2 のタンパク質を減少させることが示唆された。

培養 14 日目に GPR40 agonist である GW9508 ($5 \mu\text{M}$)により GPR40 を活性化して、同様の実験を行った。その結果、コントロールと比較して、MDM2 のタンパク質の量が刺激後 6 時間で 0.64 ± 0.07 倍となった (図 16 C-D)。この結果から、GPR40 の活性化は MDM2 のタンパク質を減少させることが示唆された。

次に、DHA および GPR40 agonist による MDM2 のタンパク質の減少が MDM2 の mRNA 量の減少により引き起こされるか解析を行った。培養 14 日目の培養海馬神経細胞を DHA ($5 \mu\text{M}$)により刺激して、12 時間後に RT-qPCR を行った。その結果、コン

トロールでは MDM2 の相対 mRNA 量が 1.00 ± 0.09 となり、DHA では 1.10 ± 0.05 となった (図 16 E)。この結果から、DHA は MDM2 の mRNA 量に影響を与えないことが示唆された。

GPR40 agonist である GW9508 (5 μ M)により、GPR40 を活性化させて同様の実験を行った。コントロールでは MDM2 の相対 mRNA 量が 1.00 ± 0.05 となり、GW9508 では 0.89 ± 0.06 となった (図 16 F)。この結果から、GPR40 の活性化は MDM2 の mRNA 量に影響を与えないことが示唆された。

以上の結果から、培養海馬神経細胞において DHA による GPR40 を介した MDM2 のタンパク質の減少は、MDM2 の mRNA 量の減少ではなく、タンパク質の分解誘導に起因していることが示唆された。

MDM2 は DCX の分解を誘導する

先行研究により、MDM2 は Doublecortin (DCX)の分解を誘導すること、および DCX が樹状突起スパインの形成を促進することが報告されている (Yoshihara et al., 2014)。このことから、RNF39 は MDM2 の分解誘導を介して、DCX のタンパク質を増加させることで樹状突起スパインの形成を促進する可能性が考えられた。

MDM2 による DCX の分解誘導を解析するために、HEK293T 細胞に Myc-MDM2 および Flag-DCX を遺伝子導入して、ウエスタンブロット法により解析した (図 17)。この結果から、MDM2 は DCX の分解を誘導することが再現された。

RNF39 は DCX のタンパク質を増加させる

RNF39 による DCX のタンパク質の量への影響を解析するために、HEK293T 細胞に Myc-RNF39 および Flag-DCX を遺伝子導入して、ウエスタンブロット法による解析を行った。その結果、コントロールと比較して、Myc-RNF39 との共発現細胞では Flag-DCX のタンパク質の量が 2.67 ± 0.66 倍に増加した (図 18)。この結果から、RNF39 は DCX のタンパク質を増加させることが示唆された。

培養神経細胞において、DHA は GPR40 を介して DCX のタンパク質を増加させる

DHA による DCX のタンパク質の量への影響を解析するために、培養 14 日目の培養海馬神経細胞を DHA (5 μ M)により刺激して、抗 DCX 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析を行った。その結果、コントロールと比較して、DCX のタンパク質の量が刺激後 3 時間では 0.91 ± 0.10 倍、刺激後 6 時間では 0.86 ± 0.02 倍、刺激後 12 時間では 1.26 ± 0.04 倍となった (図 19 A-B)。この結果から、DHA は DCX のタンパク質を増加させることが示唆された。

GPR40 agonist である GW9508 (5 μ M)により GPR40 を活性化させて、同様の実験を行った。その結果、コントロールと比較して、DCX のタンパク質の量が刺激後 6 時間では 1.11 ± 0.11 倍、刺激後 12 時間では 1.27 ± 0.03 倍となった (図 19 C-D)。この結果から、GPR40 の活性化は DCX のタンパク質を増加することが示唆された。

次に、DHA および GPR40 agonist による DCX のタンパク質の増加が DCX の mRNA 量の増加により引き起こされるか解析を行った。培養 14 日目の培養海馬神経細胞を DHA (5 μ M)により刺激して、12 時間後に RT-qPCR を行った。その結果、コントロールでは DCX の相対 mRNA 量が 1.00 ± 0.18 となり、DHA では 1.02 ± 0.04 となった (図 19 E)。この結果から、DHA は DCX の mRNA 量に影響を与えないことが示唆された。

GPR40 agonist である GW9508 (5 μ M)により GPR40 を活性化させて同様の実験を行った。コントロールでは DCX の相対 mRNA 量が 1.00 ± 0.05 となり、GW9508 では 0.93 ± 0.02 となった (図 19 F)。この結果から、GPR40 の活性化は DCX の mRNA 量に影響を与えないことが示唆された。

以上の結果から、培養海馬神経細胞において DHA により GPR40 を介した DCX のタンパク質の増加は認められるが、DCX の mRNA 量増加によるものではないことが示唆された。

マウス脳内において、DHA は RNF39、MDM2、DCX のタンパク質の量を制御する

培養海馬神経細胞を用いた実験により、DHA が RNF39 のタンパク質を増加させ、MDM2 のタンパク質を減少および DCX のタンパク質を増加させることが示唆された。マウス個体の脳内においても DHA の投与により、同様の現象が認められるか解析を行った。生後 14 日目マウスに DHA (50 mg/kg)を投与して、生後 16 日目に回収した脳タンパク質をウエスタンブロット法により解析した。コントロールと比較して、DHA の投与により、RNF39 のタンパク質の量は 1.58 ± 0.12 倍に増加、MDM2 のタンパク質の量は 0.74 ± 0.06 倍に減少、DCX のタンパク質の量は 1.40 ± 0.11 倍に増加した (図 20)。これらの結果から、マウス個体の脳内においても、培養海馬神経細胞と同様に、DHA は RNF39 の発現量を上昇させて、MDM2 のタンパク質を減少および DCX のタンパク質を増加させることが示唆された。

DHA は樹状突起スパイン形成を促進する作用があることが報告されているが (Sakamoto et al., 2007)、その作用機序を中心に未解明な点が数多く残されていた。本研究により、DHA は GPR40 を介して RNF39 を発現誘導し、MDM2 のプロテアソームによる分解を誘導して DCX のタンパク質を増加させることで、樹状突起スパインの形成を促進すると示唆された。

考察

DHA に代表されるオメガ 3 脂肪酸は、脳機能の向上や脳の発生に関わる重要な栄養成分の 1 つとして広く認知されている (Gamoh et al., 1999)。DHA により神経細胞の樹状突起スパインの形成が促進されることが示唆されているが (He et al., 2009)、その分子メカニズムを中心に不明な点が数多く残されている。神経細胞において DHA が PPAR γ を活性化して遺伝子発現を制御すること (Weiser et al., 2016) や、細胞膜に局在する GPR40 や GPR120 などの G タンパク質共役型受容体に結合することでシグナル伝達を誘導することが報告されている (Yamashima et al., 2015)。これらを介し、DHA により遺伝子発現が制御され、神経細胞の樹状突起スパインの形成が促進されると推察した。本研究では DHA により発現が誘導される遺伝子群の同定、さらに発現が誘導された遺伝子 RNF39 の神経細胞における機能解明を中心に解析を進めた。

DHA は GPR40 を介して樹状突起スパインの形成を促進する

DHA による樹状突起スパイン形成促進作用を明らかにするために、培養海馬神経細胞およびマウス個体を用いて、DHA 刺激による樹状突起スパイン形成の解析を行った。その結果、DHA により樹状突起スパインの形成が促進されることが示唆された (図 1, 図 5 A-B)。さらに、DHA による樹状突起スパイン形成促進の経路を解明するために、培養神経細胞およびマウス個体において、GPR40 agonist により刺激したところ、樹状突起スパインの形成が促進された (図 2, 図 5 C-D)。一方で、DHA と GPR40 antagonist により同時に刺激したところ、DHA による樹状突起スパイン形成促進作用が消失した (図 3, 図 5 A-B)。これらの結果から、DHA は GPR40 を介して樹状突起スパインの形成を促進すると考えられた。次に、培養海馬神経細胞において DHA と PPAR γ antagonist により刺激したところ、樹状突起スパイン形成促進作用の消失は認められなかった (図 4)。従って、PPAR γ は DHA による樹状突起スパイン形成促進作用における主要な因子ではないと考えられた。

脳内における、細胞外に存在する DHA の濃度は明らかではないが、GPR40 に作用する DHA の EC₅₀ は $5.37 \pm 0.10 \mu\text{M}$ と報告されており (Briscoe et al., 2003)、本研究で用いた DHA 濃度は生理的な濃度から大きく逸脱していないと考えられる。

DHA は GPR40 を介して RNF39 の発現を誘導する

先行研究により、DHA が GPR40 に結合して転写因子 NFAT を活性化させて遺伝子発現を制御すること (苅田 修士論文, 2018)、DHA が PPAR γ を活性化させて遺伝子発現を制御すること (Weiser et al., 2016) が報告されている。通常、転写因子は多数の遺伝子発現を調節することから、はじめに DHA が調節する遺伝子を解析するために遺伝子転写産物の網羅的解析を行った。その結果、*p* 値が 0.05 未満で、5 μM の DHA 刺激により有意に 1.5 倍以上に発現量が上昇した遺伝子数は 114 個、2/3 以下に発現量が

減少した遺伝子数は 146 個となり (図 6)、DHA は海馬培養神経細胞の遺伝子発現をダイナミックに制御することが示唆された。

DHA 刺激により発現誘導される遺伝子のうち、樹状突起スパインの形成促進に関わる遺伝子に候補を絞った。LTP の誘導により樹状突起スパインの形成が促進すると報告されたことから、LTP の誘導においても発現が誘導される遺伝子を調べた結果、RNF39 が候補遺伝子として挙げられた (Engert and Bonhoeffer, 1999; Matsuo et al., 2001; Ploski et al., 2010)。先行研究により、マクロファージにおいて RNF39 は E3-ユビキチンリガーゼとして働き、DEAD-box RNA helicase 3 X-linked (DDX3X) のユビキチン化を介したタンパク質の分解誘導を引き起こすことが報告された (Wang et al., 2021)。そのため、DHA の樹状突起スパインの形成促進作用は、RNF39 の発現誘導と基質分子の分解を介する可能性が考えられた。以上のことから、RNF39 に着目して、以後の解析を進めた。

そこでまず、DHA による RNF39 の発現誘導経路を解析した。まず、培養海馬神経細胞を DHA により刺激して、ウェスタンブロット法により解析した結果、RNF39 のタンパク質が約 3.89 倍に増加した (図 7 B-C)。また、GPR40 agonist により刺激した場合には、約 2.02 倍に増加した (図 7 D-E)。以上より、DHA は GPR40 を介して RNF39 の発現を誘導することが示唆された。

RNF39 は MDM2 のタンパク質分解誘導を介した DCX の安定化により、樹状突起スパインの形成を促進することが示唆された

培養海馬神経細胞に RNF39 を過剰発現させ、免疫染色法により解析した結果、樹状突起スパインの数が有意に増加した (図 8)。一方で、RNF39 を発現抑制した培養海馬神経細胞では樹状突起スパインの数が有意に減少した (図 9)。また、RNF39 の発現抑制細胞を DHA により刺激しても樹状突起スパインの数に有意な増加は認められなかった (図 9)。これらの結果から、RNF39 は DHA による樹状突起スパイン形成促進作用を正に制御する因子の一つであると考えられた。

免疫沈降法による RNF39 結合分子のスクリーニングの結果から、RNF39 は多くのタンパク質と相互作用することが示唆された (図 10, 表 12)。本研究では、相互作用候補分子の中から MDM2 に着目した。先行研究から、マウス嗅球の抑制性神経細胞において、MDM2 は DCX のタンパク質の分解誘導を介して樹状突起スパインの形成を抑制すると報告された (Yoshihara et al., 2014)。培養海馬神経細胞において MDM2 阻害剤を用いた実験および MDM2 の過剰発現実験により、MDM2 は樹状突起スパインの形成を負に制御することが示唆された (図 13)。共免疫沈降法から RNF39 は MDM2 と相互作用することが示された (図 11)。さらに *in vitro* binding assay により、RNF39 は MDM2 と直接結合することが示され、特に RING Finger domain を介して直接結合することが示唆された (図 12)。

RNF39 は E3-ユビキチンリガーゼとして機能することが報告された (Wang et al., 2021)。そのため、RNF39 は相互作用分子である MDM2 のユビキチン化を介して、プ

プロテアソームによる分解を誘導する可能性が考えられた。RNF39 の過剰発現により MDM2 のタンパク質が減少した (図 14)。しかし、プロテアソーム阻害剤である MG-132 により処理すると、MDM2 のタンパク質の量に変化が認められなかった (図 15)。これらの結果から、RNF39 はプロテアソームを介して MDM2 の分解を誘導することが示唆された。しかし、RNF39 が直接 MDM2 をユビキチン化することにより、MDM2 のタンパク質の分解を誘導するかは明らかとなっておらず、今後、*in vitro* ユビキチン化アッセイにより解析する必要がある。培養海馬神経細胞において DHA および GPR40 agonist の刺激により、MDM2 のタンパク質が減少したが、MDM2 の mRNA の増減は認められなかった (図 16)。これらの結果から、DHA による GPR40 を介した MDM2 のタンパク質減少は、mRNA の減少ではなく、タンパク質の分解誘導に起因すると示唆された。

先行研究により、MDM2 は DCX のタンパク質の分解を誘導することや、DCX が樹状突起スパインの形成を促進することが報告された (Yoshihara et al., 2014)。そこで、RNF39 は MDM2 のタンパク質の分解誘導を介し、DCX のタンパク質を増加させることで樹状突起スパインの形成を促進する可能性が考えられた。RNF39 の過剰発現により DCX のタンパク質が増加した (図 18)。また、培養海馬神経細胞において DHA および GPR40 agonist の刺激により、DCX のタンパク質が増加したが、DCX の mRNA に増減は認められなかった (図 19)。これらの結果から、DHA は GPR40 を介して DCX のタンパク質の安定化に寄与すると考えられた。

培養海馬神経細胞と同様に、動物個体の脳内においても DHA によりタンパク質の量の変動が起こるか解析を行った。その結果、DHA の投与によりタンパク質レベルで RNF39 の増加、MDM2 の減少、DCX の増加が認められ、培養海馬神経細胞の実験と同様の結果が得られた (図 20)。そのため、マウス個体の脳内においても、DHA により RNF39 の発現量が増加し、MDM2 のタンパク質の分解誘導を介して DCX のタンパク質が増加することで樹状突起スパインの形成が促進すると考えられた。

DHA による樹状突起スパイン形成の促進機構

本研究から、以下のことが示唆された。

1. DHA による樹状突起スパイン形成の促進は GPR40 を介する
2. DHA は GPR40 を介して RNF39 の発現量を上昇させる
3. RNF39 は MDM2 のタンパク質分解を誘導して、DCX のタンパク質を上昇させる
4. RNF39 は樹状突起スパインの形成を促進させる機能を有する

これらのことから、DHA は GPR40 を活性化させることで RNF39 の発現量を増加させ、MDM2 のタンパク質を分解誘導することで DCX のタンパク質を増加させて、樹状突起スパインの形成が促進されると考えられた (図 21)。

RNF39 と神経疾患

精神疾患患者では樹状突起スパインの形成異常が認められ、アルツハイマー病患者や統合失調症患者では樹状突起スパイン密度の減少が報告されている (Glantz et al., 2000)。しかし、DHA の積極的な摂取によりアルツハイマー病の罹患率が減少することや、DHA をはじめとするオメガ 3 脂肪酸の摂取により統合失調症の進行を抑制することが報告された (Morris et al., 2003)。これらのことは、DHA による樹状突起スパイン形成促進作用によるものと考えられる。本研究により、DHA による樹状突起スパイン形成促進作用において、RNF39 は正に制御する重要な因子であることが示唆された。従って、DHA による精神疾患の予防作用は、RNF39 の発現誘導を介した樹状突起スパイン形成の促進が大きく寄与していると考えられた。

今後の展望

本研究の結果、DHA は GPR40 を介して RNF39 の発現量を増加させ、MDM2 のタンパク質分解を誘導することで、DCX のタンパク質を増加させることが示唆された。DCX により樹状突起スパインの形成が促進することは報告されたが (Yoshihara et al., 2014)、その分子機構は不明な点が数多く残されている。先行研究により、Adenomatous Polyposis Coli Stimulated Exchange Factor 2 (Asef2) はアクチン結合タンパク質である spinophilin と相互作用して樹状突起スパインに集められ、Rac を活性化することで樹状突起スパインの形成を促進することが報告されている (Evans et al., 2015)。DCX は微小管結合タンパク質であるが、protein kinase A (PKA) などによりリン酸化されると微小管から解離して Asef2 や spinophilin と結合する (Toriyama et al., 2012; Tsukada et al., 2005)。これらのことから、リン酸化された DCX が樹状突起スパイン上で Asef2 や spinophilin と相互作用することで Rac を活性化し、樹状突起スパインの形成を促進する可能性が考えられた。そこで、今後、DCX の疑似リン酸化変異体を作製して、樹状突起スパインの形成への影響を解析する必要がある。

免疫沈降法による RNF39 結合分子のスクリーニングの結果、RNF39 は多数の分子と相互作用することが示唆された (図 10, 表 12)。本研究により RNF39 は MDM2 のタンパク質の分解誘導により樹状突起スパインの形成を促進することが示唆されたが、MDM2 以外に樹状突起スパインの形成に関与すると考えられるタンパク質として p53 が挙げられた (補足図 1, 表 12)。p53 は転写因子として機能して、アポトーシスや老化などに関連する遺伝子を発現調節することが報告された (Vousden et al., 2009)。さらに、p53 はシナプス関連遺伝子である Amphiphysin、Clathrin light chain、Clathrin heavy chain、Rab26、Synaptotagmin β などの転写を促進することが示唆された (Merlo et al., 2014)。しかし、脳・神経系における p53 の機能について未解明な点が数多く残されている。p53 の樹状突起スパインの形成における解析を行ったところ、p53 の活性化剤により PSD-95 陽性シグナル数が増加した。一方で、p53 の阻害剤により PSD-95 陽性シグナル数が減少した (補足図 2)。この結果から、p53 の活性化により樹状突起スパインの形成が促進されることが示唆された。しかし、RNF39 が相互作用すること

による p53 への影響や、p53 がどのようにして樹状突起スパイン形成へ関与しているかについて未解明な点が数多く残されている。そこで、RNF39 の過剰発現した神経細胞において、p53 の阻害剤を用いた樹状突起スパインの形成への解析を行う必要がある。樹状突起スパインの形成において、p53 が RNF39 の下流に存在するならば、p53 の阻害剤により、RNF39 の樹状突起スパインの形成促進作用が消失すると考えられる。

MDM2 の相互作用分子の一つとして、小胞輸送関連タンパク質 Numb が挙げられる。ラット培養海馬神経細胞において、Numb は樹状突起スパインに存在し、Numb とホモログである Numb-like の発現抑制により樹状突起スパインの形成が抑制されると報告された (Nishimura et al., 2005)。MDM2 はユビキチン化を介して Numb のタンパク質分解を誘導する (補足図 3) (Yogosawa et al., 2003; Juven-Gershon et al., 1998)。本研究により、DHA により発現量が上昇する RNF39 は、MDM2 のタンパク質分解を誘導して、DCX のタンパク質増加による樹状突起スパインの形成促進が示唆された。さらに、MDM2 のタンパク質分解誘導に伴い、DCX 以外にも Numb のタンパク質増加により、樹状突起スパインの形成が促進される経路も考えられた。DHA による樹状突起スパイン形成促進作用が Numb を介するかを解析するために、神経細胞において、DHA 刺激および GPR40 の活性化により、Numb のタンパク質が増加するか解析する必要がある。

EGFP-RNF39 を遺伝子導入して、培養 14 日目に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、RNF39 は核および細胞質全域に存在して、特に軸索末端に濃縮することが示唆された (補足図 4)。所属研究室では RNF39 がリン酸化されることを明らかにした (未発表データ)。リン酸化などによる修飾により細胞内局在が変わるタンパク質は多数報告されている (Ch'ng et al., 2012)。RNF39 においてもリン酸化により細胞内局在が変わる可能性が考えられた。そこで、RNF39 の疑似リン酸化変異体を作製し、野生型 RNF39 と比較して細胞内局在に変化が生じるか解析する必要がある。

また、組織および個体レベルで RNF39 の生理機能を明らかにするために、RNF39 ノックアウト (KO) マウスを用いた解析を行う必要がある。本研究により、培養海馬神経細胞において、RNF39 は樹状突起スパインの形成を促進させる機能を有することが示唆された。樹状突起スパインの正常な形成がシナプスの構築や、記憶・学習能力の発揮に必要である。そこで、RNF39 KO マウスにおいて、①神経細胞を DiI により標識して、樹状突起スパインの形成に異常が生じるか、②パッチクランプ法により活動電位を計測して、シナプス伝達に異常が生じるか、③モリス水迷路試験や Y 字迷路試験などの行動実験により、RNF39 KO マウスに学習・記憶障害が生じるか解析を行う。

結論

DHA は脳機能の向上に寄与することが知られている。妊婦に DHA を摂取させて出生児を追跡調査した結果、対照群と比較して知能指数 (IQ; intelligence quotient) が向上したと報告された (Gould et al., 2017)。また、成人においても DHA の積極的な摂取により記憶・学習能力が向上したと報告された (Stonehouse et al., 2013)。DHA は樹状突起スパインの形成を促進することや (He et al., 2009)、また樹状突起スパインの形成が記憶・学習能力に正に関与することから (Kasai et al., 2010)、DHA による記憶・学習能力向上作用には、樹状突起スパイン形成促進が大きく寄与していると考えられる。しかし、DHA がどのようにして樹状突起スパインの形成を促進するかについては作用機序を中心に未解明な点が数多く残されていた。

本研究により、DHA による樹状突起スパイン形成促進作用において RNF39 が重要な役割を担っていることが示唆された。まず、DHA は GPR40 を活性化させることで RNF39 の発現量を上昇させる。発現量が上昇した RNF39 は MDM2 をプロテアソームによる分解を誘導することで、DCX のタンパク質を増加させ、その結果、樹状突起スパインの形成が促進されると考えられた (図 21)。

DHA の摂取により、精神疾患の予防や進行の抑制に効果があると報告されている。アルツハイマー病や統合失調症では樹状突起スパイン密度の減少が認められている (Glantz et al., 2000)。これらの効果は、DHA の樹状突起スパイン形成促進作用が寄与していると考えられた。そのため、DHA により発現誘導される RNF39 が精神疾患の予防および治療において重要な鍵になると予想される。

謝辞

本研究を進めるにあたり最高の研究環境を与えていただくとともに、終始熱心なご指導をしてくださった稲垣直之教授には深く感謝致します。鳥山道則講師には常々より実験手法のご指導や、論文作成にあたり多くのご助言をして頂きましたこと、厚くお礼を申し上げます。

分子免疫制御研究室の河合太郎教授、機能ゲノム医学研究室の石田靖雅准教授には本研究のアドバイザーとして貴重なご助言をしていただくとともに、本論文をご精読していただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

研究を遂行するにあたり、プラスミドを譲渡してくださった分子薬理学研究室の鳥山真奈美助教、質量分析をしてくださった倉田理恵様には深く感謝致します。

博士課程より特別研究派遣学生として受け入れてくださいました関西学院大学の矢尾育子教授は、新しい環境でも研究を没頭できる環境を用意してくださり、感謝いたします。矢尾研究室の皆様には、普段から積極的に議論をしてくださり、また、多くの場面で支えていただきました。皆様のおかげで有意義な研究生生活を送ることができました。心より感謝を申し上げます。

最後に、陰ながら支え続けてくださった家族や友人たちに感謝を申し上げます。

参考文献

Abe K, Chisaka O, Van Roy F, Takeichi M. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci.* 2004;7(4):357-363. doi:10.1038/nn1212

Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 6;102(36):12997]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):10858-10863. doi:10.1073/pnas.0502903102

Alakbarzade V, Hameed A, Quek DQ, et al. A partially inactivating mutation in the sodium-dependent lysophosphatidylcholine transporter MFSD2A causes a non-lethal microcephaly syndrome. *Nat Genet.* 2015;47(7):814-817. doi:10.1038/ng.3313

Benarroch EE. Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications. *Neurology.* 2011;77(12):1198-1204. doi:10.1212/WNL.0b013e31822f04a0

Bourre JM, Durand G, Pascal G, Youyou A. Brain cell and tissue recovery in rats made deficient in n-3 fatty acids by alteration of dietary fat. *J Nutr.* 1989;119(1):15-22. doi:10.1093/jn/119.1.15

Brenna JT, Diau GY. The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77(5-6):247-250. doi:10.1016/j.plefa.2007.10.016

Brenna JT, Salem N Jr, Sinclair AJ, Cunnane SC; International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL. alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009;80(2-3):85-91. doi:10.1016/j.plefa.2009.01.004

Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11303-11311. doi:10.1074/jbc.M211495200

Cao D, Kevala K, Kim J, et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem.* 2009;111(2):510-521. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06335.x

Ch'ng TH, Uzgil B, Lin P, Avliyakov NK, O'Dell TJ, Martin KC. Activity-dependent transport of the transcriptional coactivator CRTC1 from synapse to nucleus. *Cell*. 2012;150(1):207-221. doi:10.1016/j.cell.2012.05.027

Connor WE, Neuringer M, Reisbick S. Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. *Nutr Rev*. 1992;50(4 (Pt 2)):21-29. doi:10.1111/j.1753-4887.1992.tb01286.x

Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 1999;399(6731):66-70. doi:10.1038/19978

Evans JC, Robinson CM, Shi M, Webb DJ. The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Asef2 promotes dendritic spine formation via Rac activation and spinophilin-dependent targeting. *J Biol Chem*. 2015;290(16):10295-10308. doi:10.1074/jbc.M114.605543

Feller SE, Gawrisch K, MacKerell AD Jr. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J Am Chem Soc*. 2002;124(2):318-326. doi:10.1021/ja0118340

Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience*. 1999;93(1):237-241. doi:10.1016/s0306-4522(99)00107-4

Glantz LA, Lewis DA. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(1):65-73. doi:10.1001/archpsyc.57.1.65

Gould JF, Treyvaud K, Yelland LN, et al. Seven-Year Follow-up of Children Born to Women in a Randomized Trial of Prenatal DHA Supplementation. *JAMA*. 2017;317(11):1173-1175. doi:10.1001/jama.2016.21303

Grutzendler J, Helmin K, Tsai J, Gan WB. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1097:30-39. doi:10.1196/annals.1379.003

Guemez-Gamboa A, Nguyen LN, Yang H, et al. Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome. *Nat Genet*. 2015;47(7):809-813. doi:10.1038/ng.3311

Hamano H, Nabekura J, Nishikawa M, Ogawa T. Docosahexaenoic acid reduces GABA response in substantia nigra neuron of rat. *J Neurophysiol.* 1996;75(3):1264-1270. doi:10.1152/jn.1996.75.3.1264

Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published correction appears in *J Neurosci* 1992 Aug;12(8):followi]. *J Neurosci.* 1992;12(7):2685-2705. doi:10.1523/JNEUROSCI.12-07-02685.1992

Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, et al. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem.* 2002;81(5):1084-1091. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00905.x

He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(27):11370-11375. doi:10.1073/pnas.0904835106

Holman RT, Johnson SB, Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr.* 1982;35(3):617-623. doi:10.1093/ajcn/35.3.617

Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* 2010;1309:83-94. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.120

Juven-Gershon T, Shifman O, Unger T, Elkeles A, Haupt Y, Oren M. The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):3974-3982. doi:10.1128/MCB.18.7.3974

Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocké M, Verschuren WM, Kromhout D, Launer LJ. Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology.* 2004;62(2):275-280. doi:10.1212/01.wnl.0000103860.75218.a5

Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 2010;33(3):121-129. doi:10.1016/j.tins.2010.01.001

Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 2006;139(3):991-997. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.01.021

Kharebava G, Rashid MA, Lee JW, Sarkar S, Kevala K, Kim HY. N-docosahexaenoylethanolamine regulates Hedgehog signaling and promotes growth of cortical axons. *Biol Open*. 2015;4(12):1660-1670. Published 2015 Nov 6. doi:10.1242/bio.013425

Kim IH, Wang H, Soderling SH, Yasuda R. Loss of Cdc42 leads to defects in synaptic plasticity and remote memory recall. *Elife*. 2014;3:e02839. Published 2014 Jul 8. doi:10.7554/eLife.02839

Koletzko B, Lien E, Agostoni C, et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med*. 2008;36(1):5-14. doi:10.1515/JPM.2008.001

Matsuo R, Asada A, Fujitani K, Inokuchi K. LIRF, a gene induced during hippocampal long-term potentiation as an immediate-early gene, encodes a novel RING finger protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289(2):479-484. doi:10.1006/bbrc.2001.5975

Merlo P, Frost B, Peng S, Yang YJ, Park PJ, Feany M. p53 prevents neurodegeneration by regulating synaptic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):18055-18060. doi:10.1073/pnas.1419083111

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2003;60(7):940-946. doi:10.1001/archneur.60.7.940

Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, et al. Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2. *Mol Biol Cell*. 2006;17(3):1273-1285. doi:10.1091/mbc.e05-07-0700

Peters A, Kaiserman-Abramof IR. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat*. 1970;127(4):321-355. doi:10.1002/aja.1001270402

Ploski JE, Park KW, Ping J, Monsey MS, Schafe GE. Identification of plasticity-associated genes regulated by Pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurochem*. 2010;112(3):636-650. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06491.x

Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements [published correction appears in *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Feb;33(1):228-9]. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32(4):619-634. doi:10.1139/H07-034

Purpura DP. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science.* 1974;186(4169):1126-1128. doi:10.1126/science.186.4169.1126

Sakamoto T, Cansev M, Wurtman RJ. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res.* 2007;1182:50-59. doi:10.1016/j.brainres.2007.08.089

Schinder AF, Gage FH. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda).* 2004;19:253-261. doi:10.1152/physiol.00012.2004

Shindou H, Koso H, Sasaki J, et al. Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem.* 2017;292(29):12054-12064. doi:10.1074/jbc.M117.790568

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol.* 2011;44(2):203-215. doi:10.1007/s12035-010-8162-0

Stonehouse W, Conlon CA, Podd J, et al. DHA supplementation improved both memory and reaction time in healthy young adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(5):1134-1143. doi:10.3945/ajcn.112.053371

Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, et al. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem.* 2012;287(16):12691-12702. doi:10.1074/jbc.M111.316307

Tsukada M, Prokscha A, Ungewickell E, Eichele G. Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J Biol Chem.* 2005;280(12):11361-11368. doi:10.1074/jbc.M405525200

Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009;137(3):413-431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037

Wang W, Jia M, Zhao C, et al. RNF39 mediates K48-linked ubiquitination of DDX3X and inhibits RLR-dependent antiviral immunity. *Sci Adv.* 2021;7(10):eabe5877. Published 2021 Mar 5. doi:10.1126/sciadv.abe5877

Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, et al. Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology.* 2012;38(1):1-17. doi:10.1159/000334607

Weiser MJ, Butt CM, Mohajeri MH. Docosahexaenoic Acid and Cognition throughout the Lifespan. *Nutrients.* 2016;8(2):99. Published 2016 Feb 17. doi:10.3390/nu8020099

Yamashima T. Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor 'GPR40' for human health. *Prog Lipid Res.* 2015;58:40-50. doi:10.1016/j.plipres.2015.01.002

Yogosawa S, Miyauchi Y, Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Mammalian Numb is a target protein of Mdm2, ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(4):869-872. doi:10.1016/s0006-291x(03)00282-1

Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, et al. Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. *Cell Rep.* 2014;8(3):843-857. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.056

Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron.* 2004;44(5):749-757. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.011

修士論文

荏田 憲人,

ドコサヘキサエン酸 (DHA)による神経細胞の一次繊毛形成機構の解明 (2018)

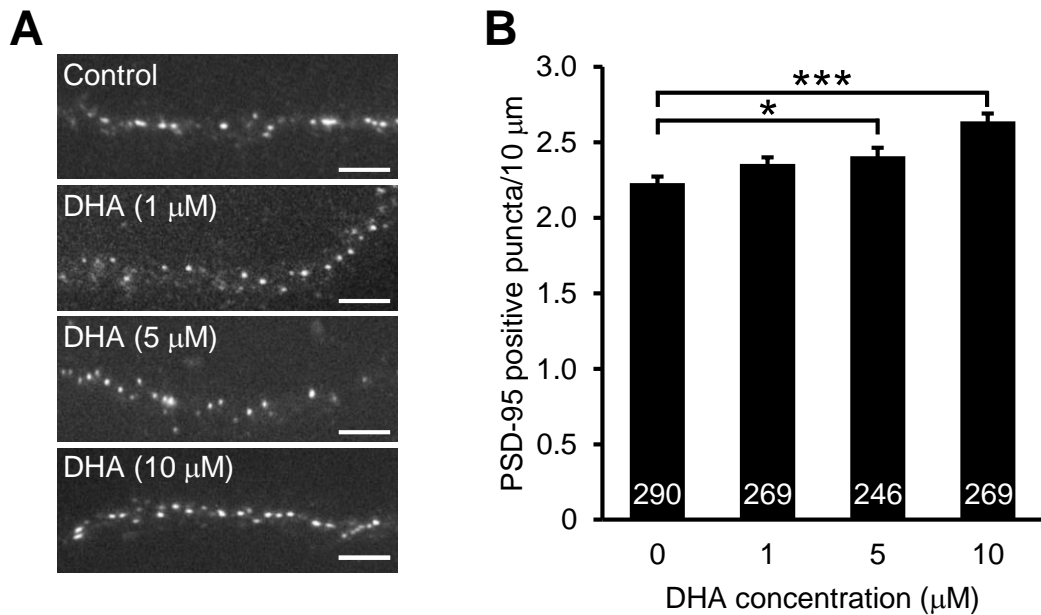


図1. DHA刺激は培養海馬神経細胞の樹状突起スパインの形成を促進する

(A-B) 培養7日目の培養海馬神経細胞にDHAを終濃度1 μM 、5 μM 、10 μM となるように刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。

Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μm)

(* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$)

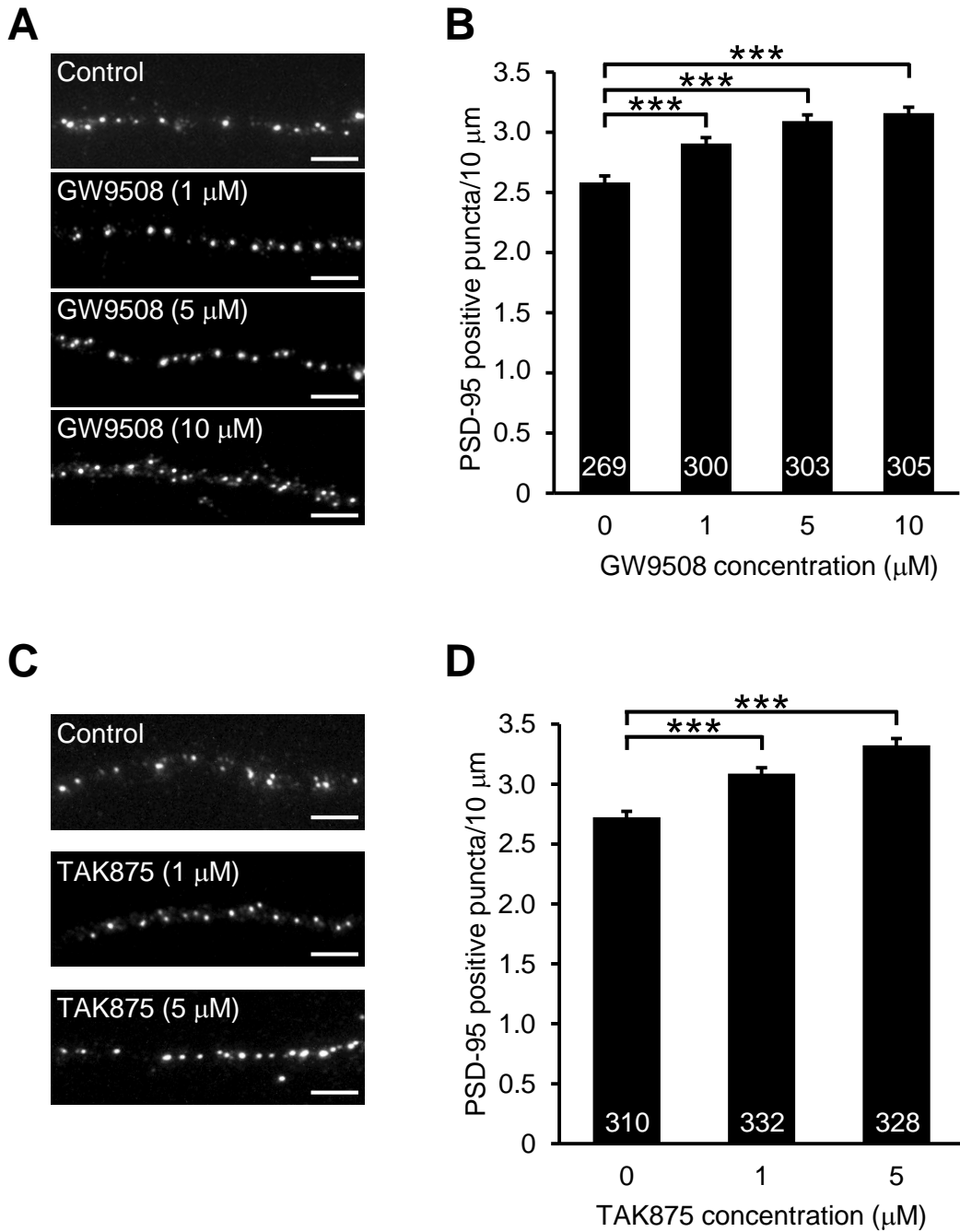


図2. GPR40の活性化は培養海馬神経細胞の樹状突起スパインの形成を促進する

(A-B) 培養7日目の培養海馬神経細胞にGPR40 agonistであるGW9508を終濃度1 μ M、5 μ M、10 μ Mとなるように刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 培養7日目の培養海馬神経細胞にGPR40 agonistであるTAK875を終濃度1 μ M、5 μ Mとなるように刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μ m) (***) : $p < 0.001$)

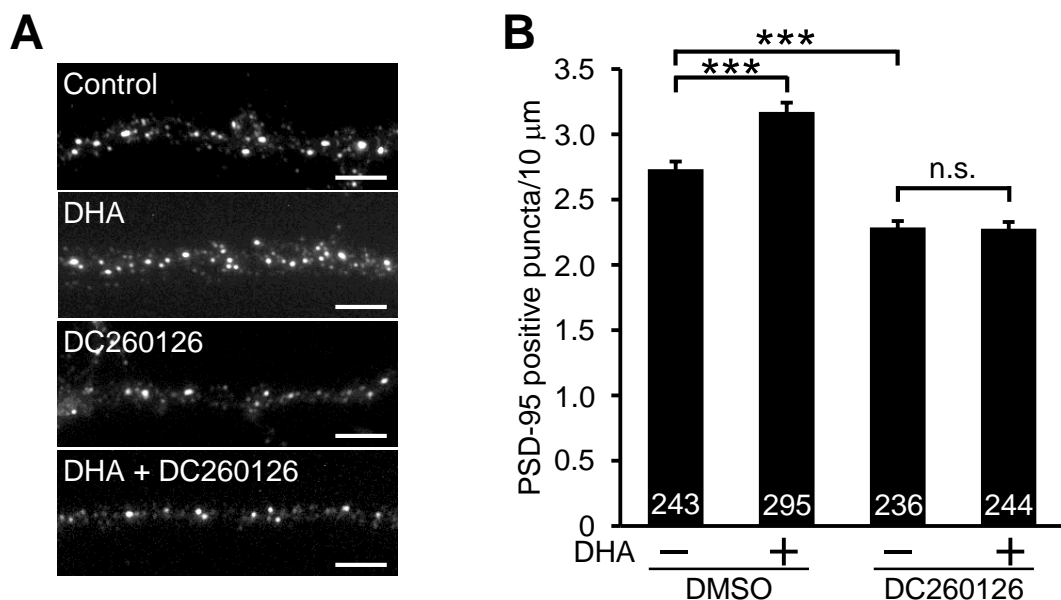


図3. DHAによる培養海馬神経細胞の樹状突起スパイン形成促進作用はGPR40の阻害により消失する
(A-B) 培養7日目の培養海馬神経細胞をDHA (10 μM)およびGPR40 antagonistであるDC260126 (10 μM)により刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N = 3)
 なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μm)
 (***) : $p < 0.001$, n.s. : 有意差なし)

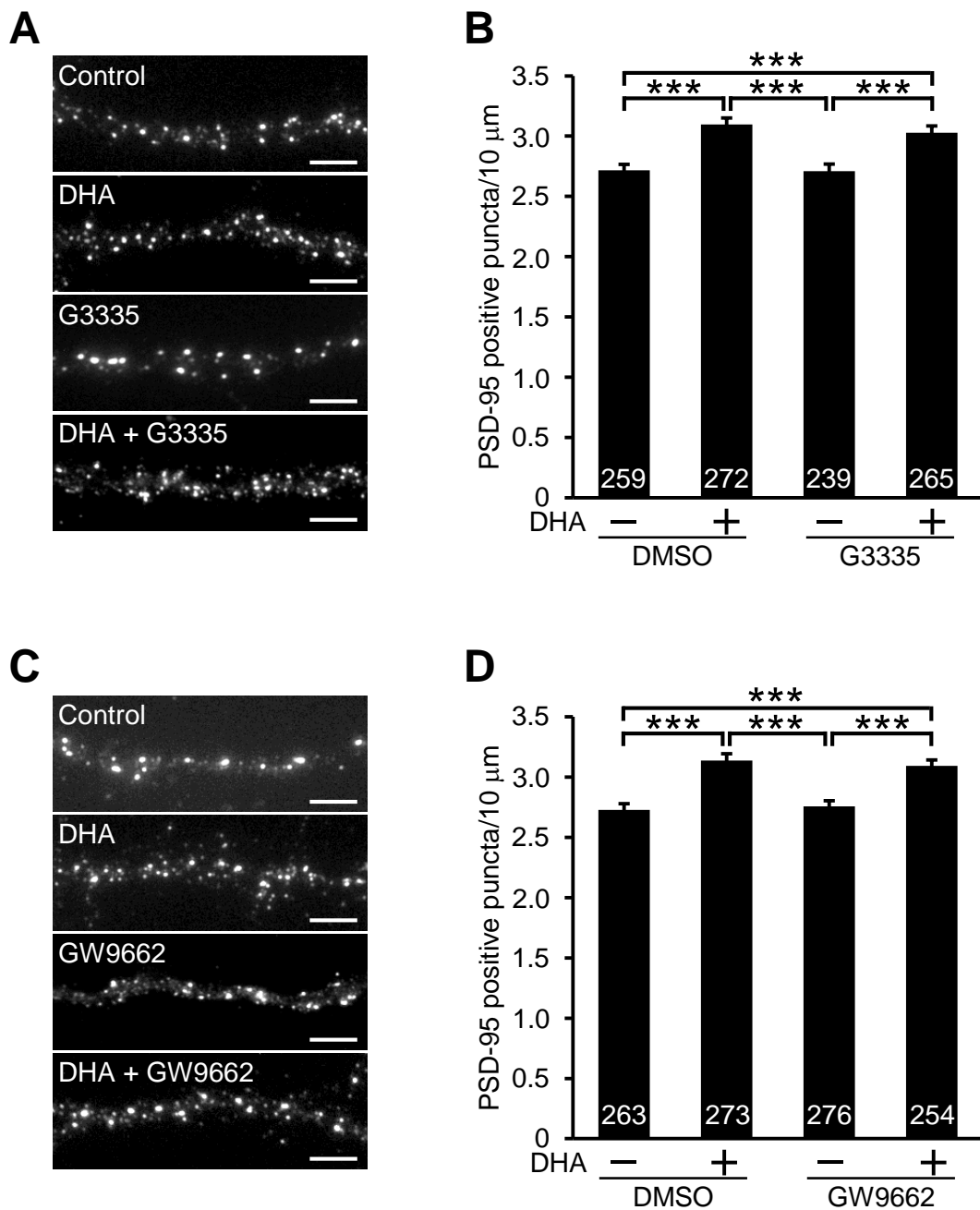


図4. DHAによる培養海馬神経細胞の樹状突起スパイン形成促進作用はPPAR γ に依存しない

(A-B) 培養7日目の培養海馬神経細胞をDHA (10 μ M)およびPPAR γ antagonistであるG3335 (30 μ M)により刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 培養7日目の培養海馬神経細胞をDHA (10 μ M)およびPPAR γ antagonistであるGW9662 (10 μ M)により刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μ m) (***) : $p < 0.001$)

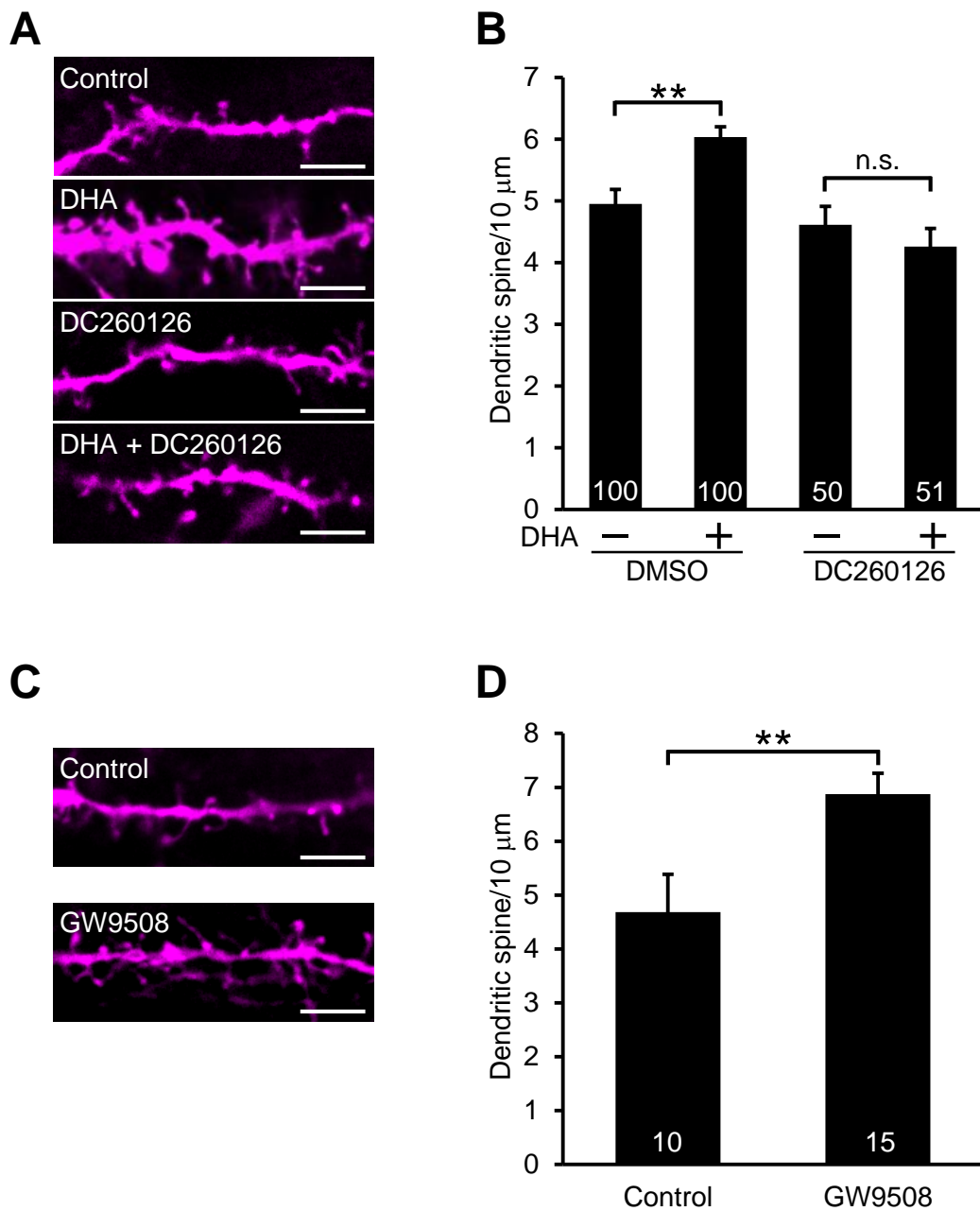


図5. DHAはGPR40を介してマウス的大脑皮質の樹状突起スパインの形成を促進する

(A-B) 生後14日目マウスにDHA (50 mg/kg)およびGPR40 antagonistであるDC260126 (50 mg/kg)を腹腔内注射により投与した。生後16日目に解剖、DiIにより大脑皮質の神経細胞を蛍光標識することで樹状突起スパイン数の解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 生後14日目マウスにGPR40 agonistであるGW9508 (50 mg/kg)を腹腔内注射により投与した。生後16日目に解剖、DiIにより大脑皮質の神経細胞を蛍光標識することで樹状突起スパイン数の解析を行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μm)

(** : $p < 0.01$, n.s. : 有意差なし)

A

検出された総RNA: 21556
 発現が上昇した遺伝子: 114 (1.5倍以上)
 発現が減少した遺伝子: 146 (2/3倍以下)

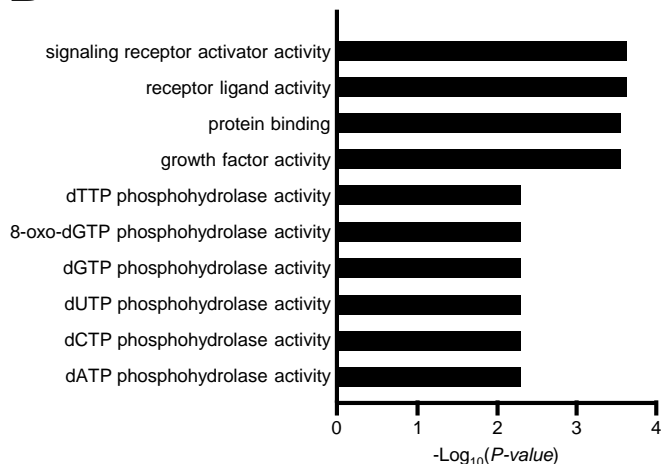
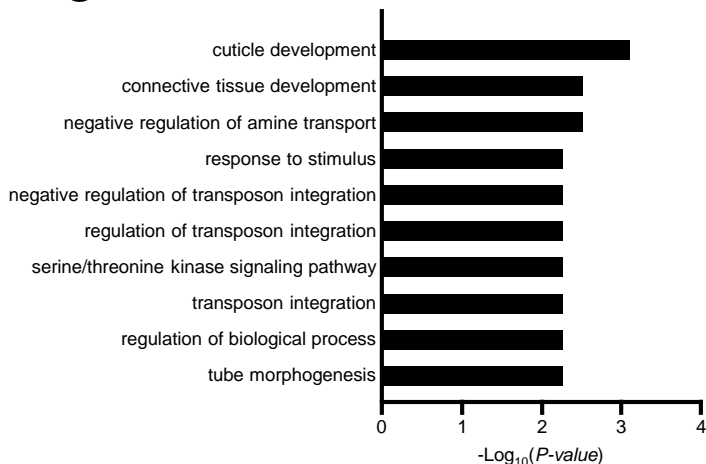
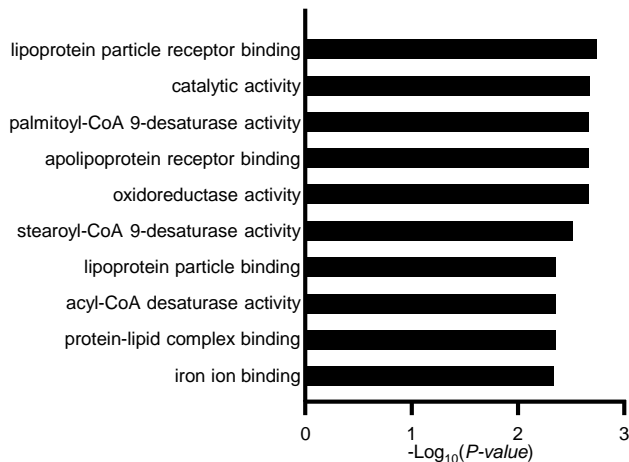
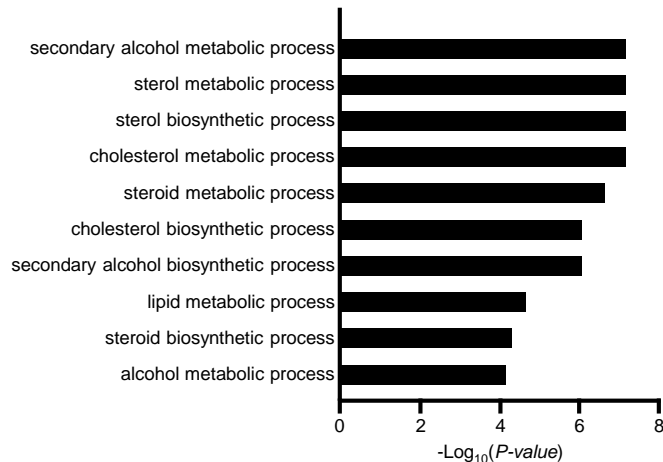
B**C****D****E**

図6. DHA刺激により遺伝子発現がダイナミックに変動する

(A) コントロールに比べてDHA刺激により p 値が0.05未満で、有意に1.5倍以上に増加した遺伝子および2/3倍以下に減少した遺伝子の数。

(B) DHA刺激により発現量が上昇した遺伝子におけるGO analysisによる分子機能の分類

(C) DHA刺激により発現量が上昇した遺伝子におけるGO analysisによる生物学的プロセスの分類

(D) DHA刺激により発現量が減少した遺伝子におけるGO analysisによる分子機能の分類

(E) DHA刺激により発現量が減少した遺伝子におけるGO analysisによる生物学的プロセスの分類

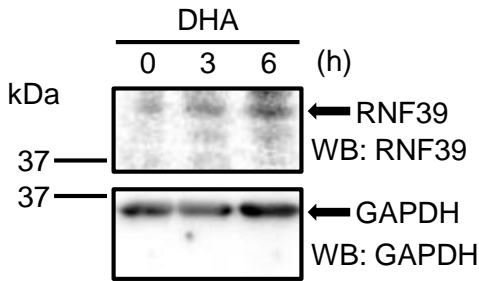
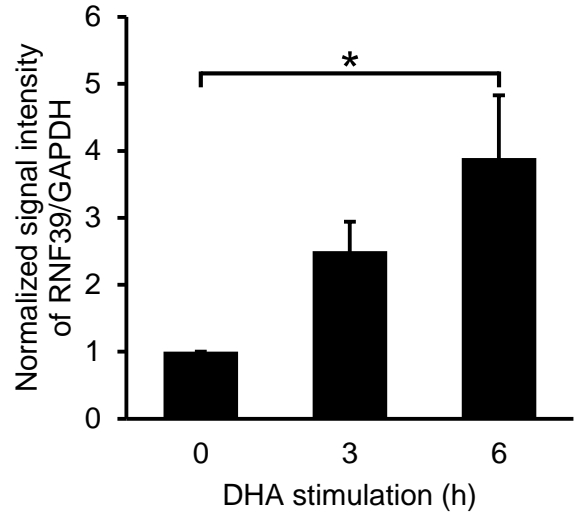
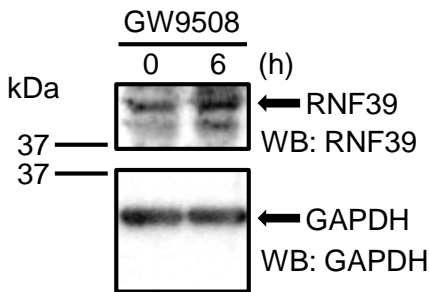
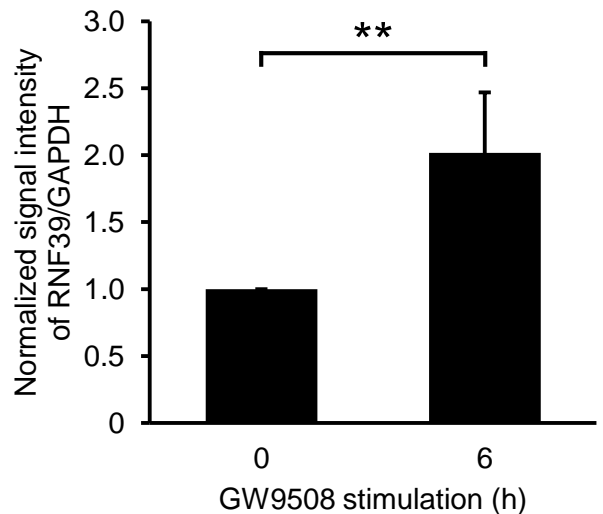
A**B****C****D****E**

図7. DHA刺激によりRNF39の発現量が上昇する

(A) RNF39のドメイン構造。RNF39はRING Finger domain (20-60 aa)、PRY domain (159-212 aa)、SPRY domain (213-349 aa)を有する。

(B-C) 培養14日目の培養海馬神経細胞をDHA (5 μ M)により刺激して、RNF39のタンパク質の量をウエスタンブロット法により解析した。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(D-E) 培養14日目の培養海馬神経細胞をGPR40 agonistであるGW9508 (5 μ M)により刺激して、RNF39のタンパク質の量をウエスタンブロット法により解析した。Mann-Whitney U testにより統計処理した。(N = 5)

エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

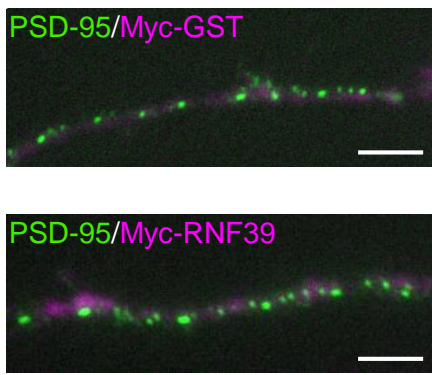
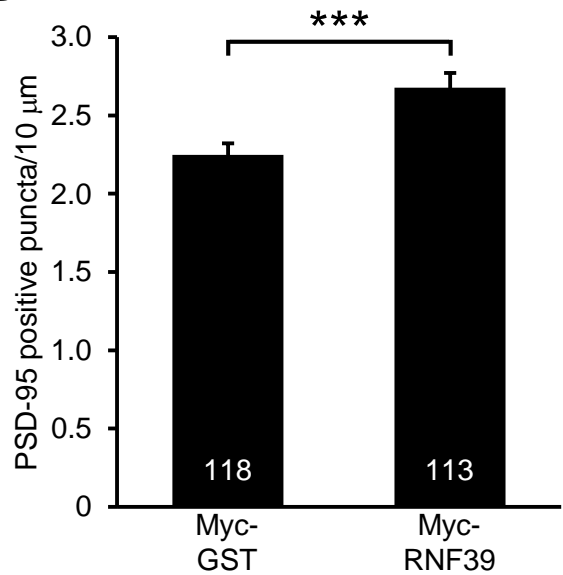
A**B**

図8. RNF39の過剰発現は樹状突起スパインの形成を促進する

(A-B) 培養海馬神経細胞にMyc-RNF39およびMyc-GSTの遺伝子導入を行い、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μm) (***) : $p < 0.001$)

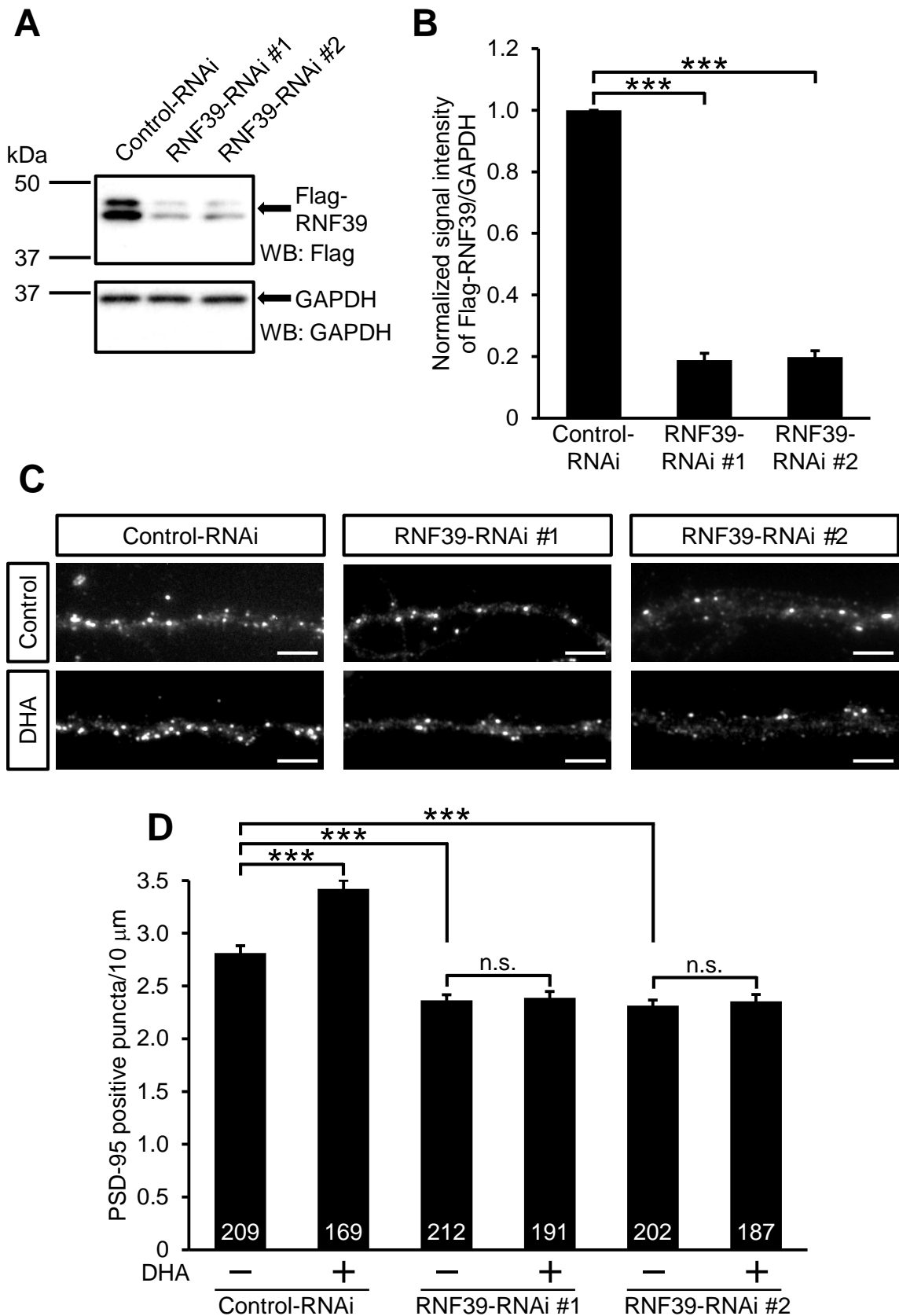


図9. RNF39の発現抑制は樹状突起スパインの形成が抑制する

(A-B) HEK293T細胞にFlag-RNF39およびknockdown vectorの遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法により解析した。全てのknockdown vectorにおいてFlag-RNF39の発現抑制が認められた。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) RNF39の発現抑制ベクターを海馬培養神経細胞に発現させ、培養7日目にDHA (10 μ M)により刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μ m)

(*** : $p < 0.001$, n.s. : 有意差なし)

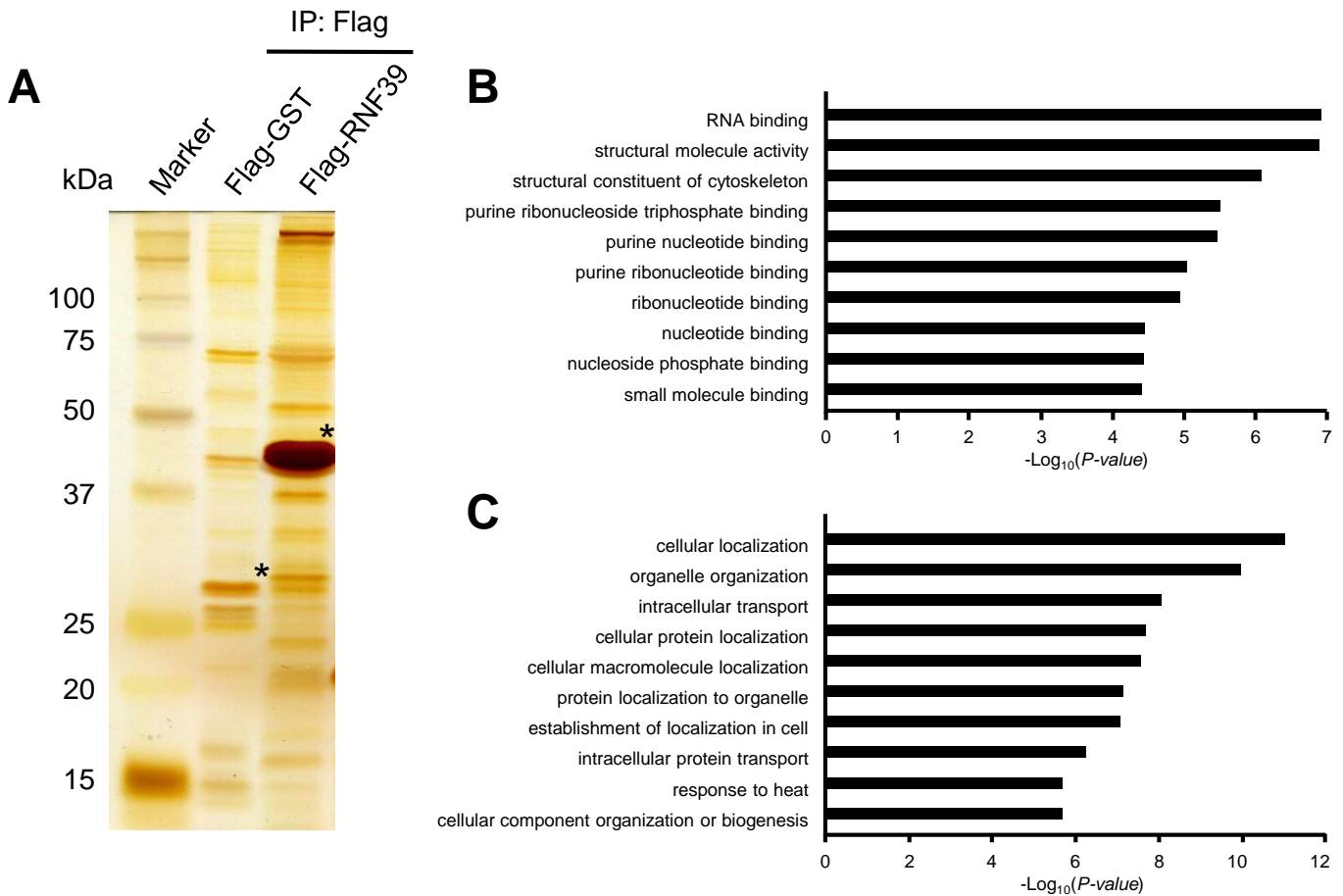


図10. RNF39は様々なタンパク質と相互作用する

(A) HEK293T細胞にFlag-RNF39を発現させ、抗Flag抗体を用いた共免疫沈降および銀染色を行った。

(B) RNF39相互作用分子のGO analysisによる分子機能の分類

(C) RNF39相互作用分子のGO analysisによる生物学的プロセスの分類

アスタリスクはbaitタンパク質を示す。

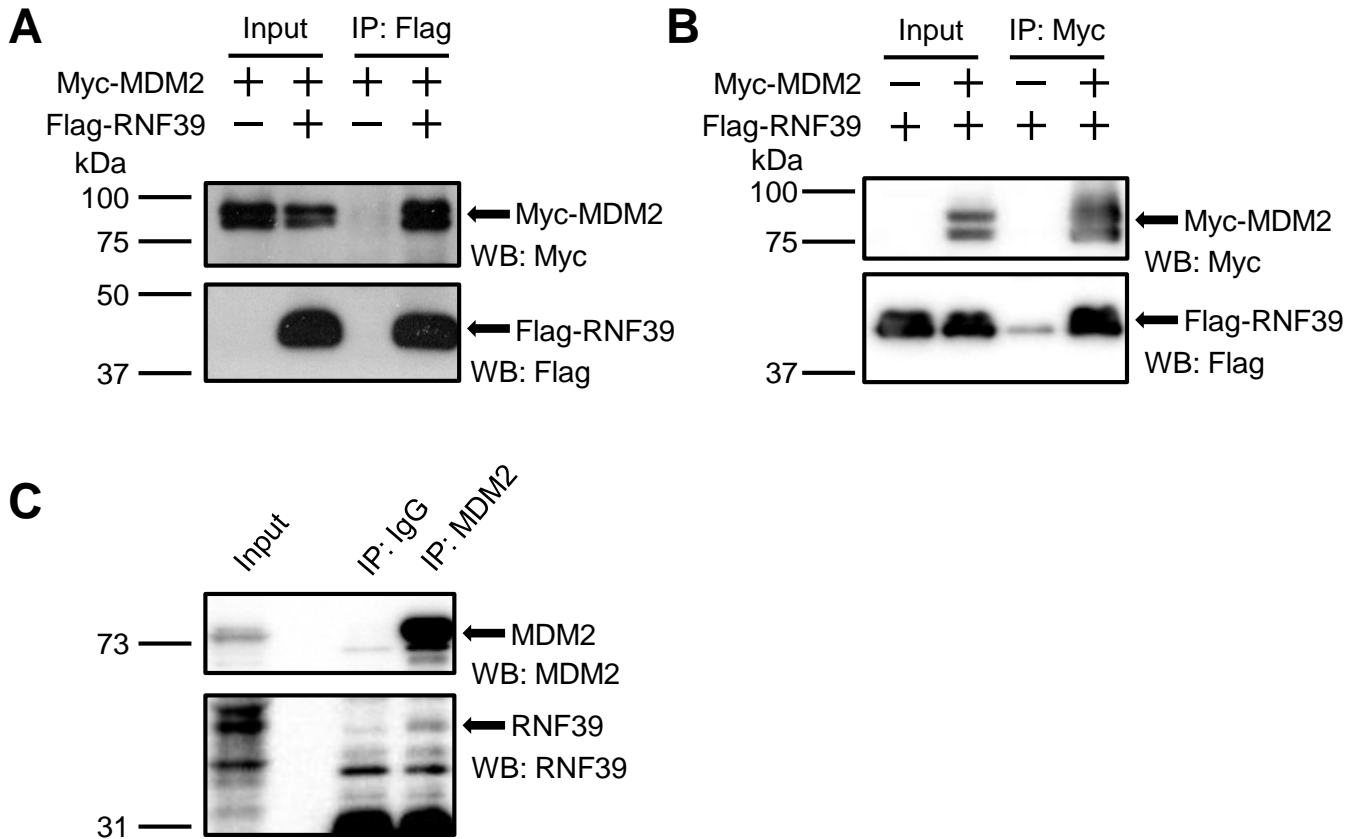


図11. RNF39はMDM2と相互作用する

(A) HEK293T細胞にFlag-RNF39およびMyc-MDM2を発現させ、抗Flag抗体を用いた免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。

(B) HEK293T細胞にFlag-RNF39およびMyc-MDM2を発現させ、抗Myc抗体を用いた免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。

(C) 生後2日目マウスの脳から抽出したタンパク質を用いて、抗MDM2抗体により免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。

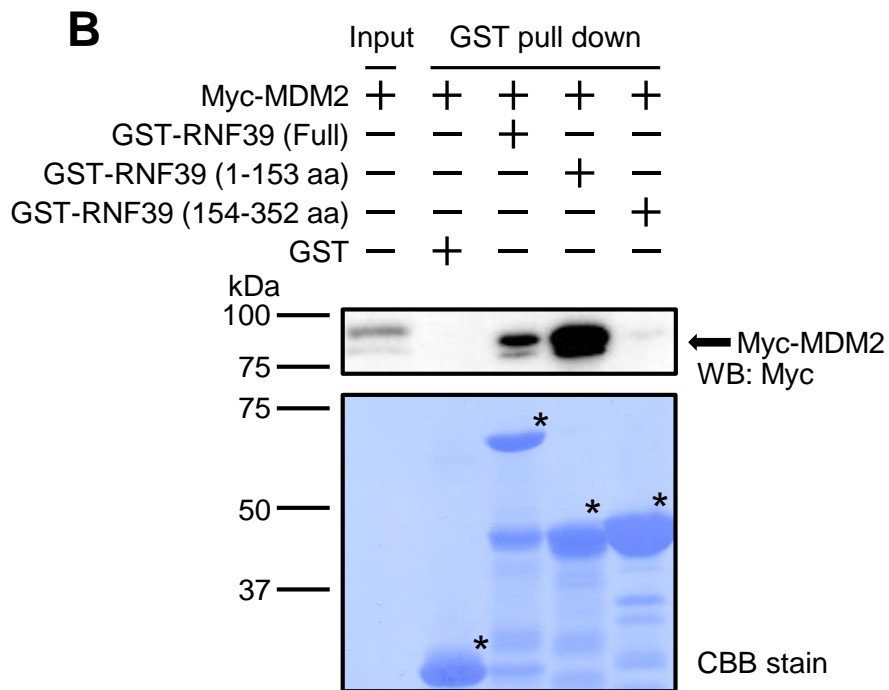
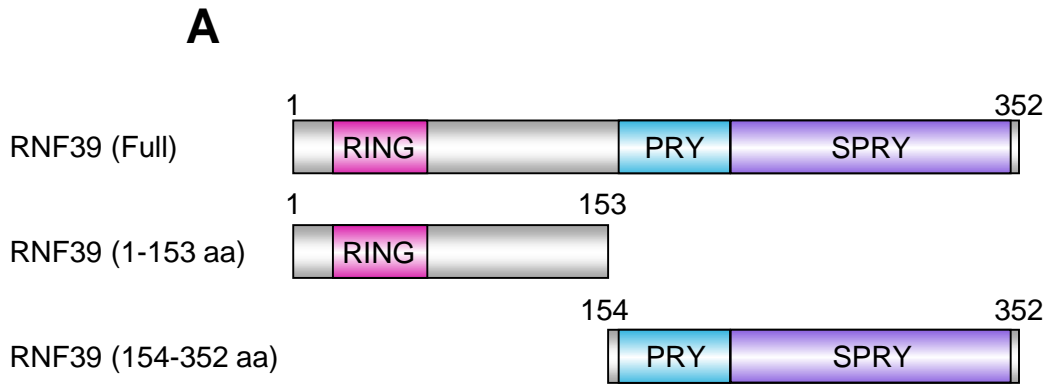


図12. RNF39はMDM2と直接結合する

(A) RNF39 (Full)、RNF39 (1-153 aa)、RNF39 (154-352 aa)のドメイン構造。

(B) 精製タンパク質GST-RNF39とMyc-MDM2を用いた*in vitro* binding assayを行った。アスタリスクはbaitタンパク質を示す。

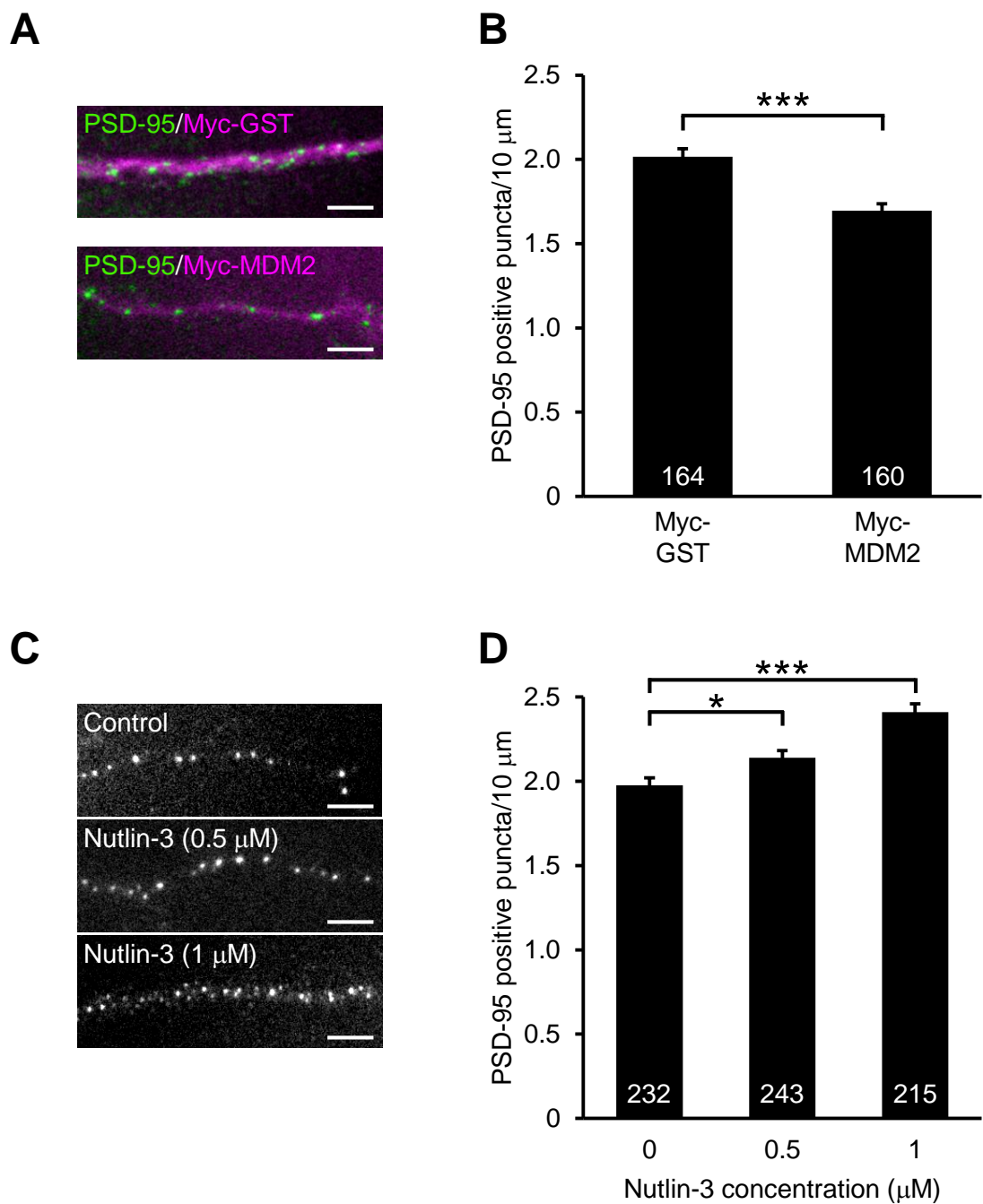


図13. MDM2は樹状突起スパインの形成を抑制する

(A-B) 培養海馬神経細胞にMyc-MDM2およびMyc-GSTの遺伝子導入を行い、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 培養7日目の培養海馬神経細胞にNutlin-3を終濃度0.5 μM 、1 μM により刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Dunnnett's testにより統計処理した。(N = 3)

なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μm) (* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$)

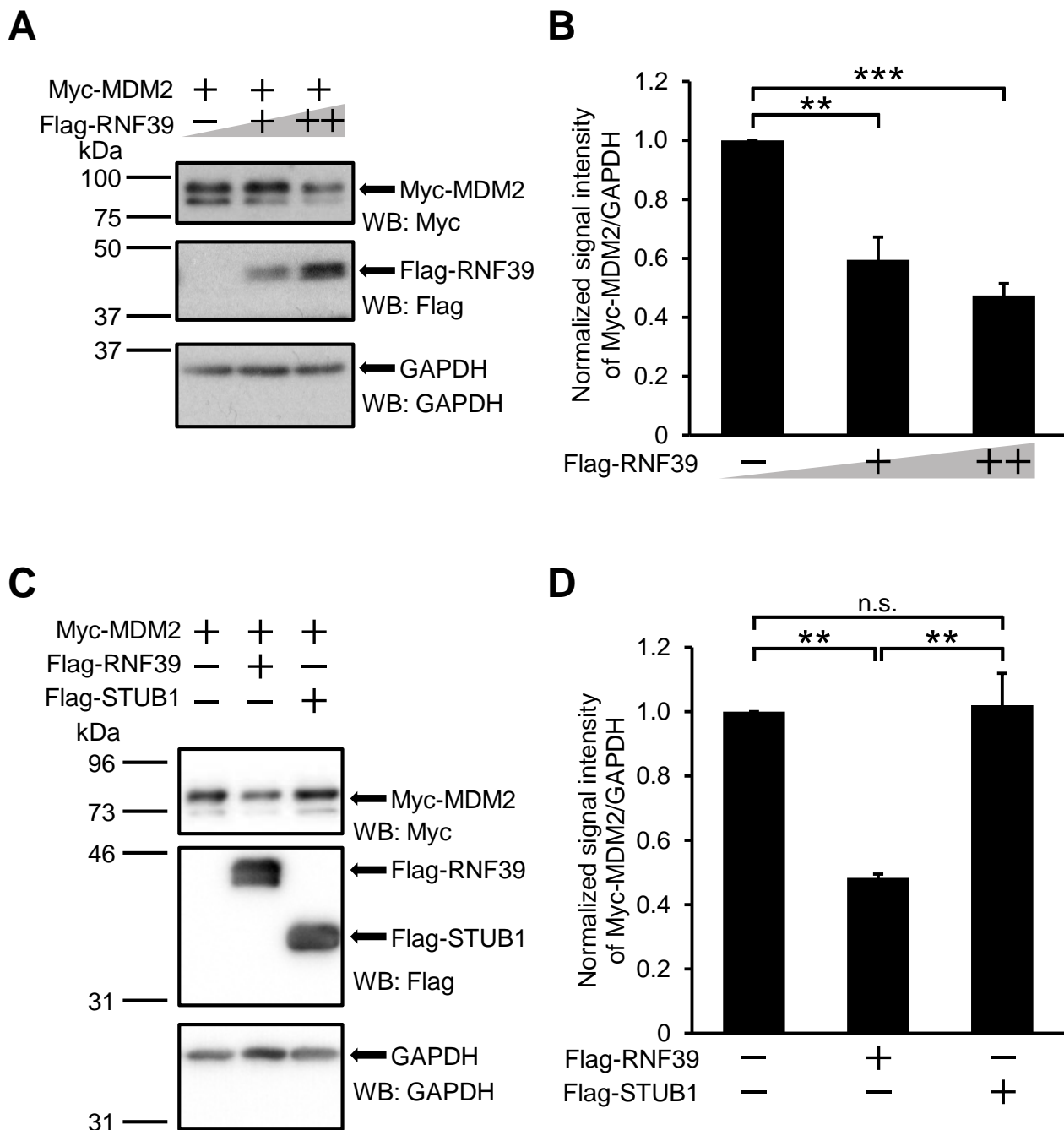


図14. RNF39はMDM2のタンパク質の分解を誘導する

(A-B) HEK293T細胞にMyc-MDM2およびFlag-RNF39の遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法により解析を行った。Dunnnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) HEK293T細胞にMyc-MDM2およびFlag-RNF39もしくはFlag-STUB1の遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法により解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N = 3)

エラーバーはSEMを示す。(** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, n.s. : 有意差なし)

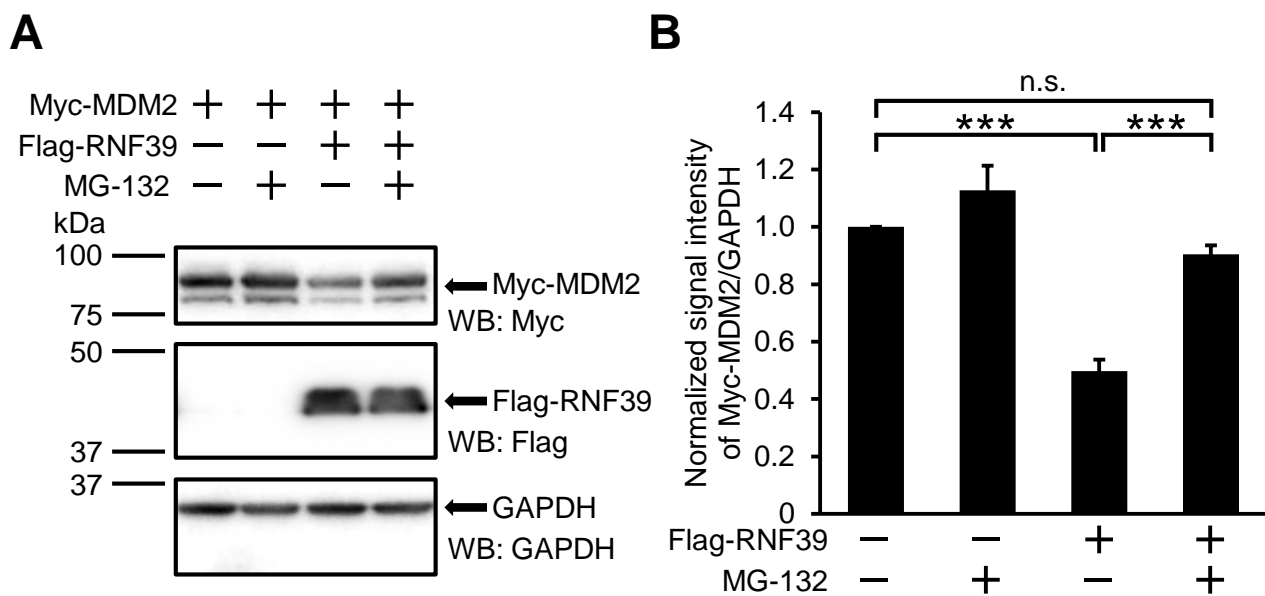


図15. RNF39によるMDM2のタンパク質の分解誘導はプロテアソームを介する

(A-B) Myc-MDM2およびFlag-RNF39を遺伝子導入したHEK293T細胞にプロテアソーム阻害剤であるMG-132 (10 μ M)により処理して、ウエスタンブロット法により解析を行った。Tukey's testにより統計処理した。(N=3)

エラーバーはSEMを示す。(***) : $p < 0.001$, n.s. : 有意差なし)

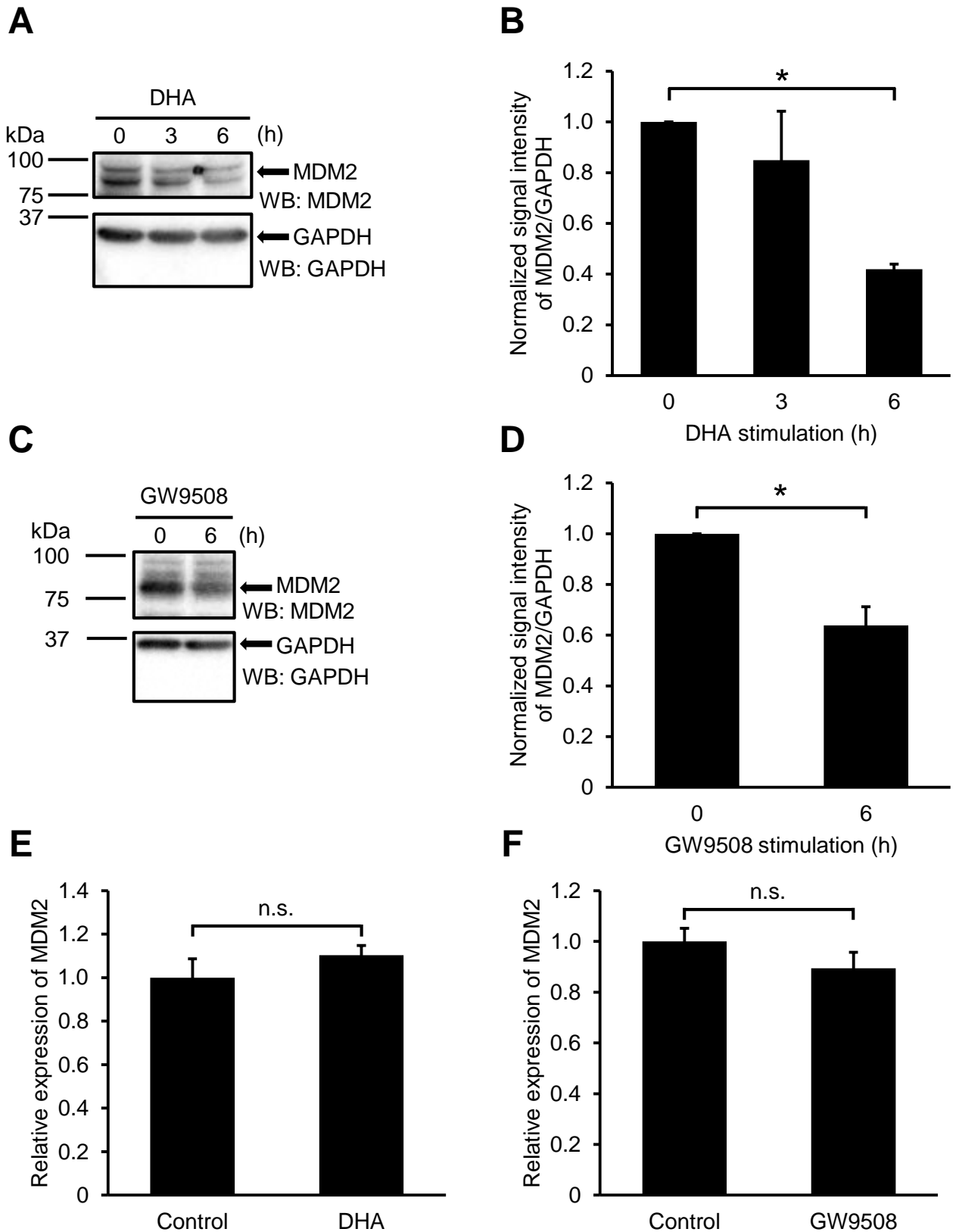


図16. 培養神経細胞においてDHAはGPR40を介してMDM2のタンパク質の分解を誘導する

(A-B) 培養14日目の培養海馬神経細胞をDHA (5 μ M)により刺激して、ウエスタンブロット法により解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 培養14日目の培養海馬神経細胞をGPR40 agonistであるGW9508 (5 μ M)により刺激して、ウエスタンブロット法により解析を行った。Mann-Whitney *U* testにより統計処理した。(N = 4)

(E) 培養14日目の培養海馬神経細胞をDHA (5 μ M)により刺激して、12時間後にRT-qPCRを行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

(F) 培養14日目の培養海馬神経細胞をGW9508 (5 μ M)により刺激して、12時間後にRT-qPCRを行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$, n.s. : 有意差なし)

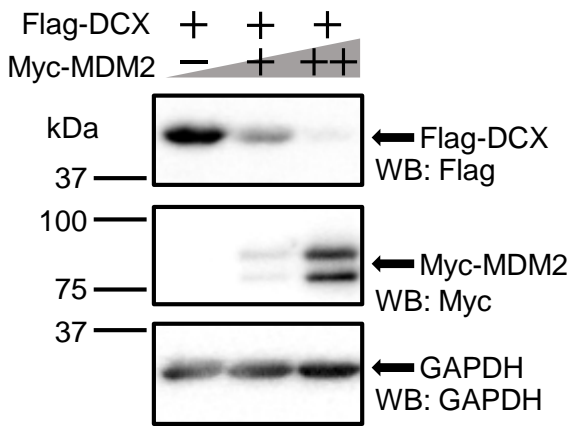
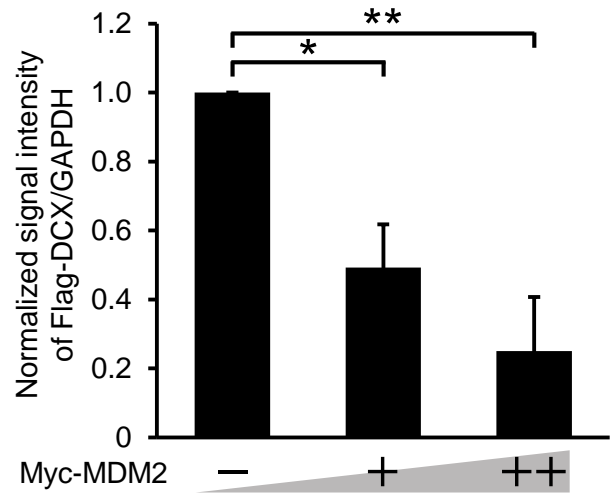
A**B**

図17. MDM2はDCXのタンパク質の分解を誘導する

(A-B) HEK293T細胞にMyc-MDM2およびFlag-DCXの遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法により解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N=4)

エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

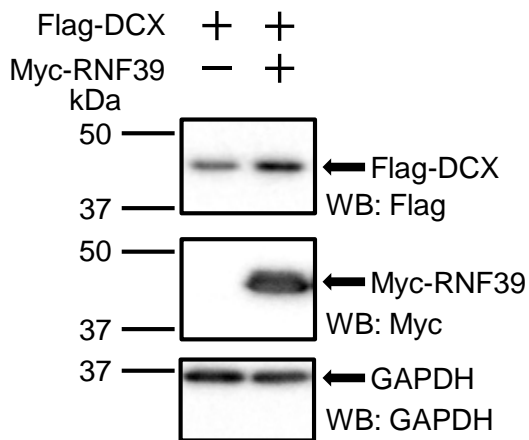
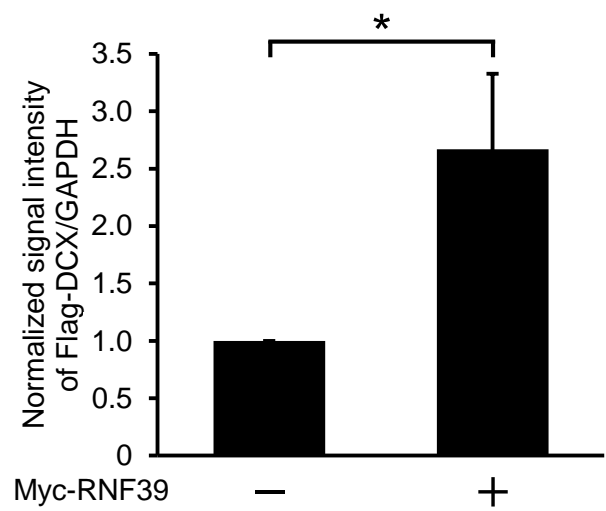
A**B**

図18. RNF39はDCXのタンパク質を増加させる

(A-B) HEK293T細胞にMyc-RNF39およびFlag-DCXの遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法により解析を行った。Mann-Whitney *U* testにより統計処理した。(N = 7)

エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$)

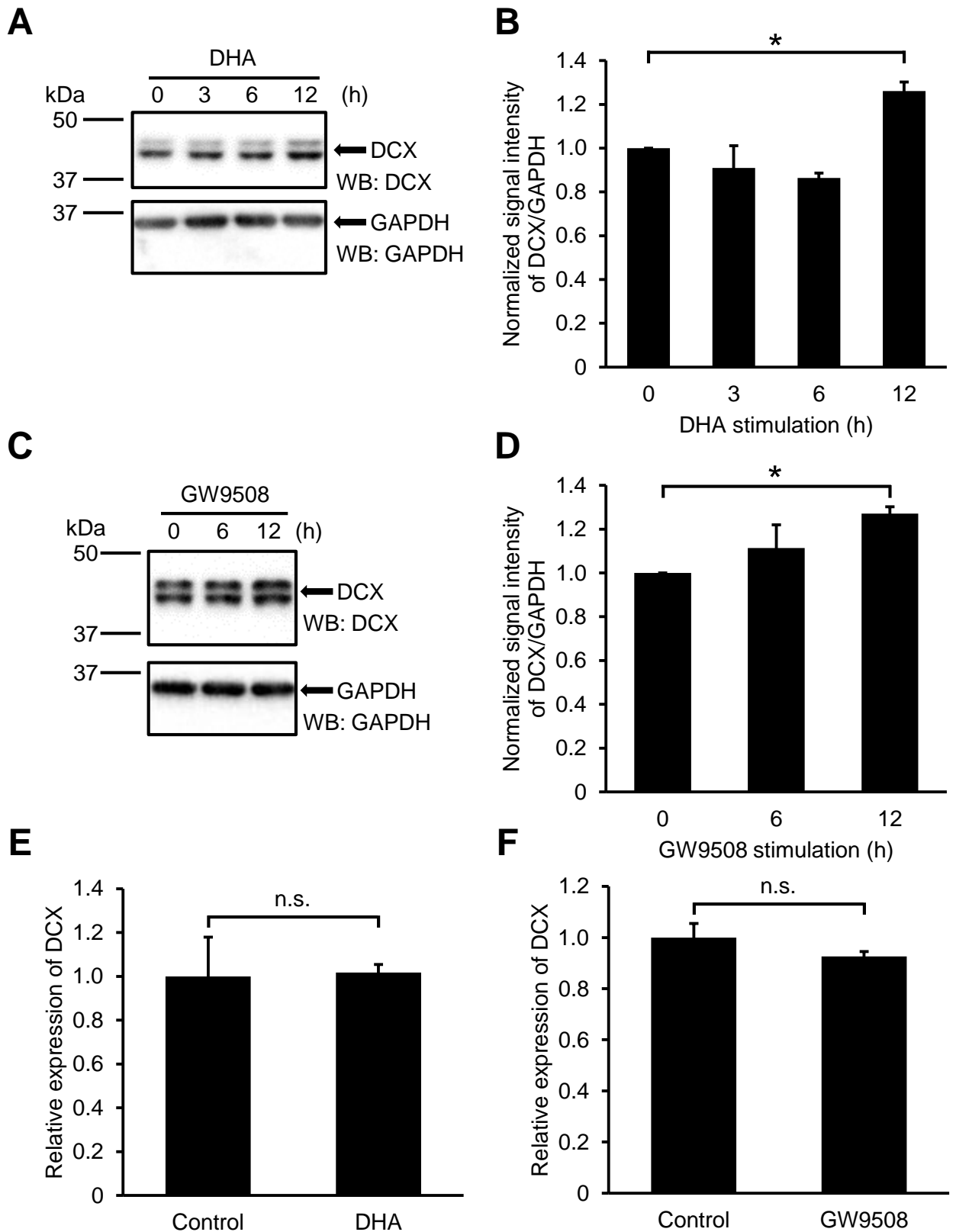


図19. 培養神経細胞においてDHAはGPR40を介してDCXのタンパク質を増加させる

(A-B) 培養14日目の培養海馬神経細胞をDHA (5 μ M)により刺激して、ウエスタンブロット法により解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 培養14日目の培養海馬神経細胞をGPR40 agonistであるGW9508 (5 μ M)により刺激して、ウエスタンブロット法により解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(E) 培養14日目の培養海馬神経細胞をDHA (5 μ M)により刺激して、12時間後にRT-qPCRを行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

(F) 培養14日目の培養海馬神経細胞をGW9508 (5 μ M)により刺激して、12時間後にRT-qPCRを行った。Student's *t*-testにより統計処理した。(N = 3)

エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$, n.s. : 有意差なし)

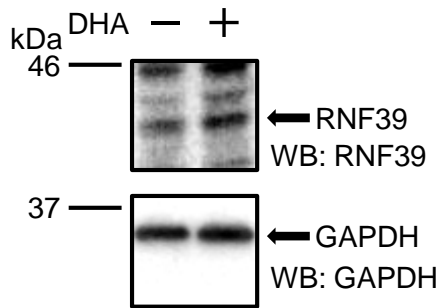
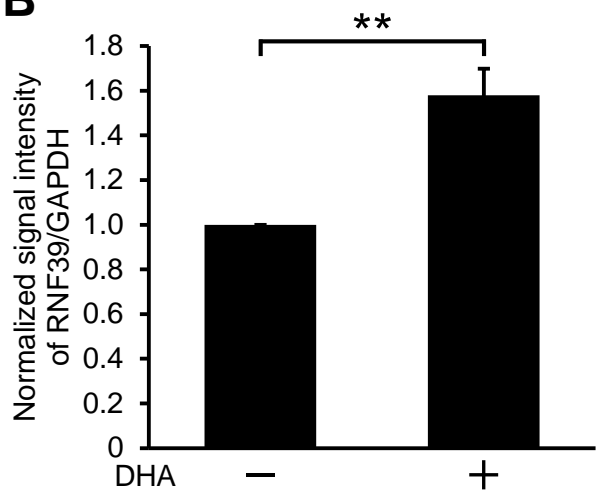
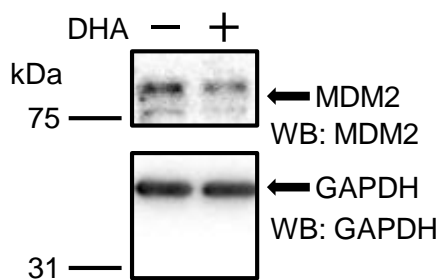
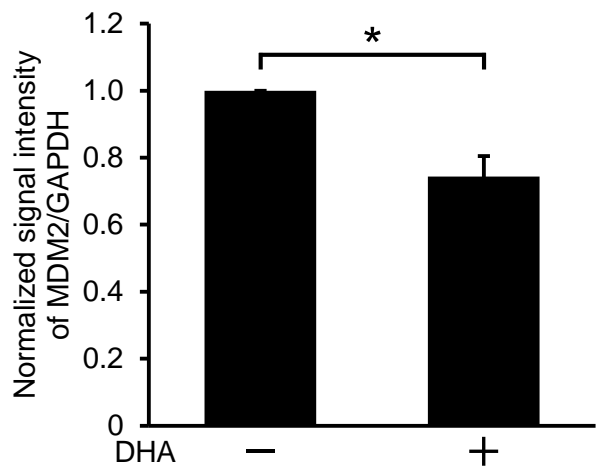
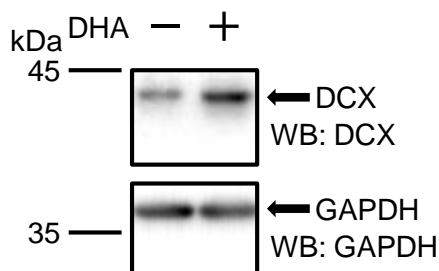
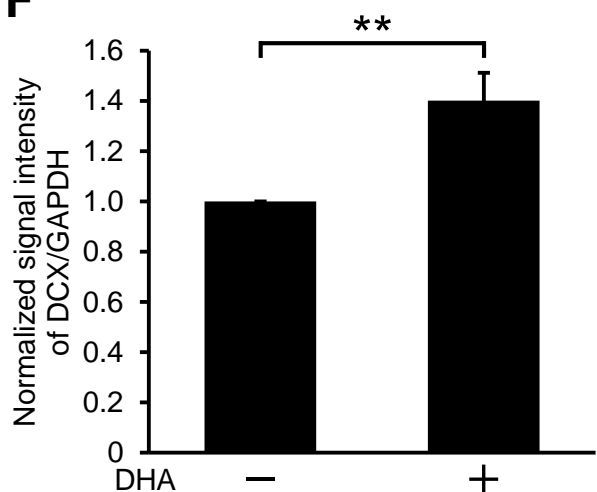
A**B****C****D****E****F**

図20. DHAの投与はマウス脳内のタンパク質の量を制御する

(A-B) 生後14日目マウスに腹腔内注射によりDHA (50 mg/kg)を投与して、生後16日目に回収した脳タンパク質を用いてウエスタンブロット法によりRNF39のタンパク質量の解析を行った。(N = 5)

(C-D) 生後14日目マウスに腹腔内注射によりDHA (50 mg/kg)を投与して、生後16日目に回収した脳タンパク質を用いてウエスタンブロット法によりMDM2のタンパク質量の解析を行った。(N = 4)

(E-F) 生後14日目マウスに腹腔内注射によりDHA (50 mg/kg)を投与して、生後16日目に回収した脳タンパク質を用いてウエスタンブロット法によりDCXのタンパク質量の解析を行った。(N = 5)

全てMann-Whitney *U* testにより統計処理した。エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

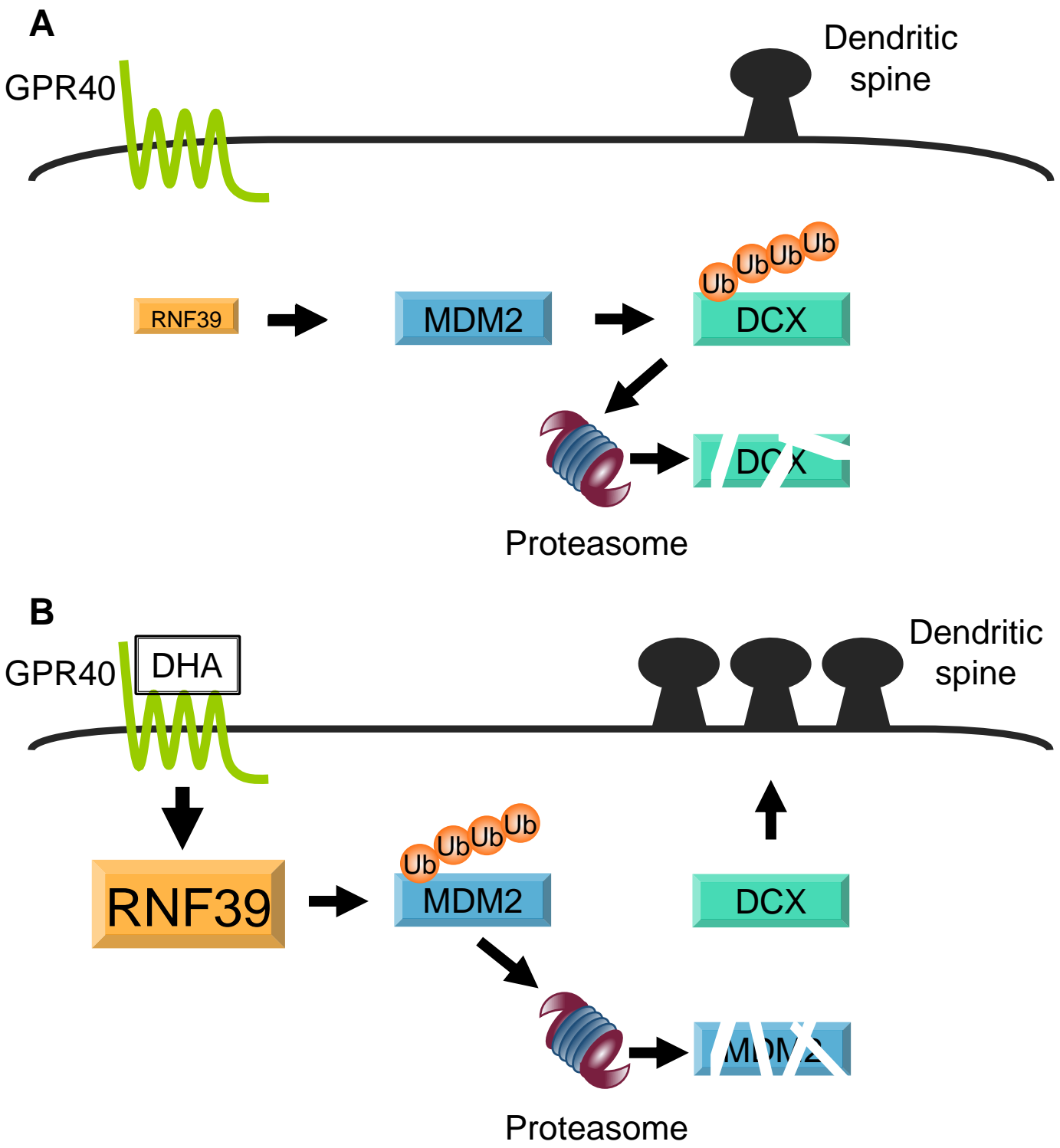
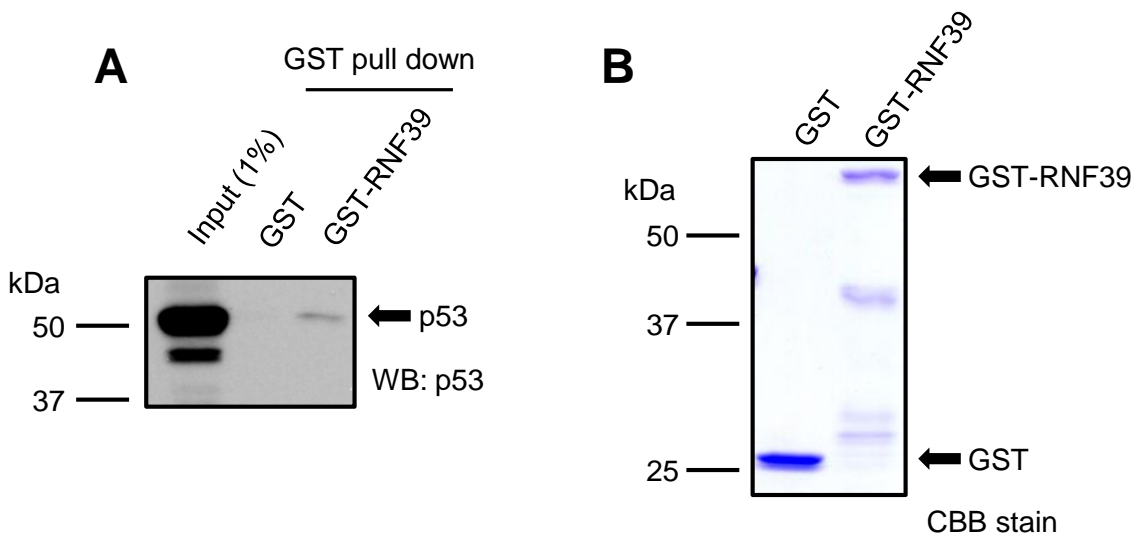


図21. DHAが樹状突起スパインの形成を促進させるモデル図

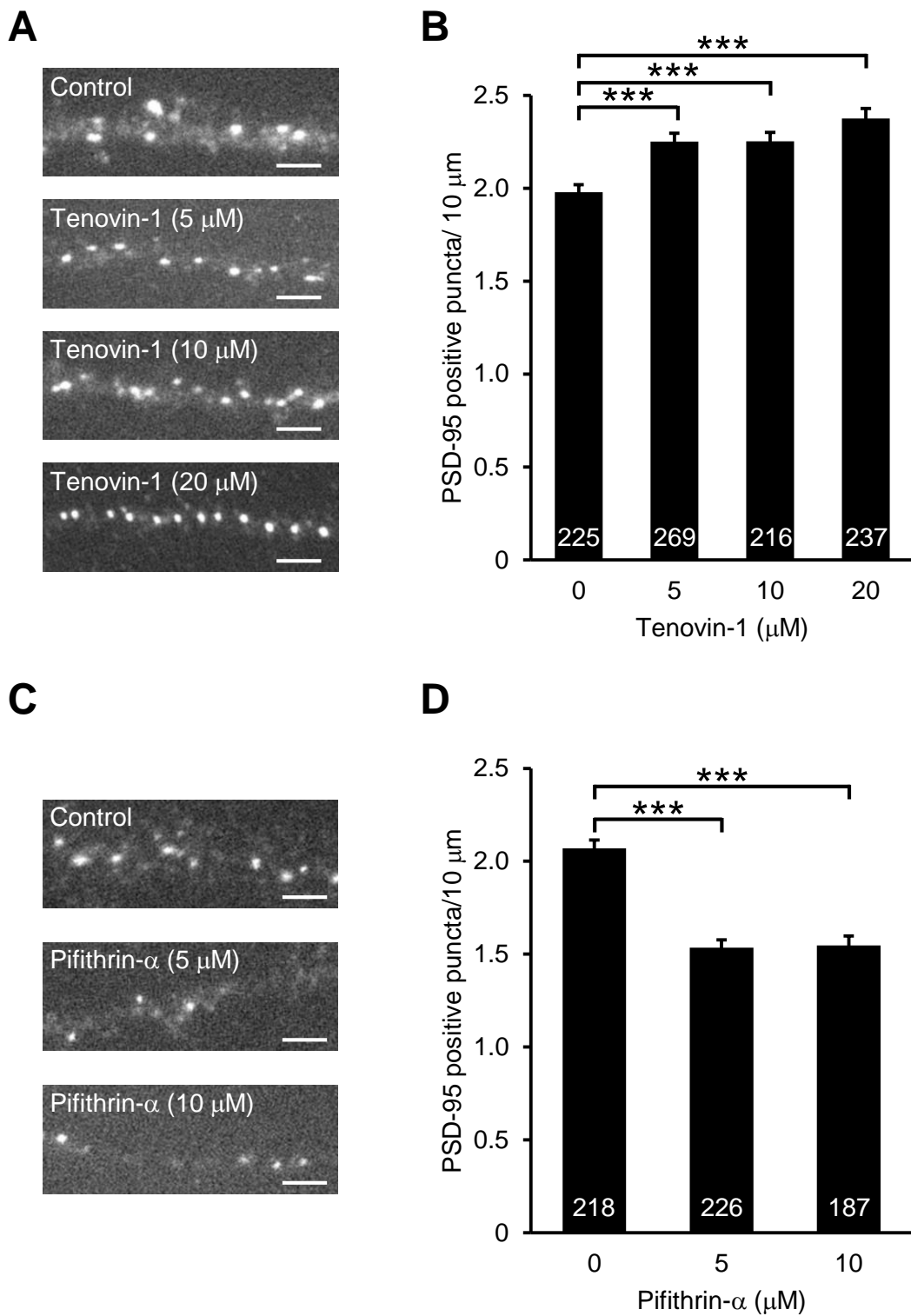
(A) MDM2はDCXのエビキチン化を介したタンパク質分解を誘導する。
 (B) DHAがGPR40を活性化させることでRNF39の発現量を増加させる。発現量が増加したRNF39がMDM2の分解を誘導してDCXのタンパク質量を増加させることで、樹状突起スパイン形成が促進される。



補足図1. *in vitro* binding assayによりRNF39はp53と相互作用することが示唆された

(A) GSTタグ付きの精製タンパク質とHEK293T細胞から回収したタンパク質を用いて*in vitro* binding assayを行い、その後に抗p53抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(B) GSTタグ付きの精製タンパク質を電気泳動してCBB染色を行った。

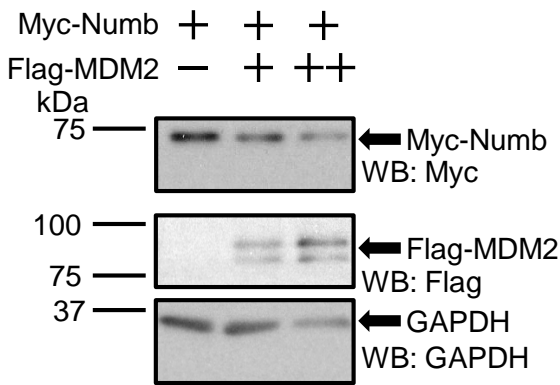
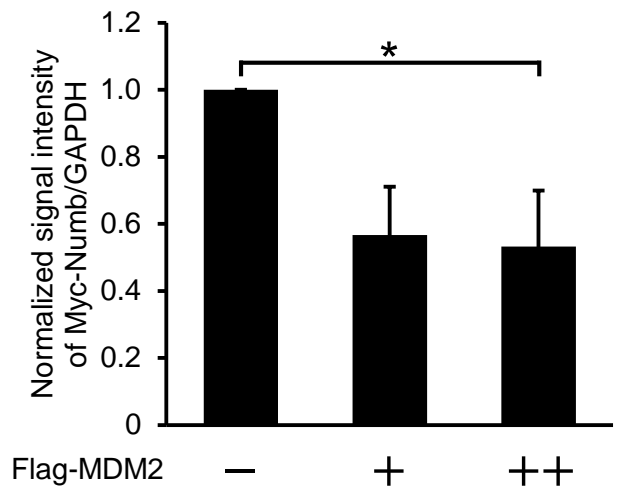


補足図2. p53は培養海馬神経細胞の樹状突起スパインの形成を促進する機能を有する

(A-B) 培養7日目の培養海馬神経細胞にp53 activatorであるTenovin-1を終濃度5 μ M、10 μ M、20 μ Mとなるように刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Dunnnett's testにより統計処理した。(N = 3)

(C-D) 培養7日目の培養海馬神経細胞にp53 inhibitorであるPifithrin- α を終濃度5 μ M、10 μ Mとなるように刺激した。その後、培養14日目に抗PSD-95抗体を用いて免疫細胞染色を行い、PSD-95陽性シグナル数の解析を行った。Dunnnett's testにより統計処理した。(N = 3)

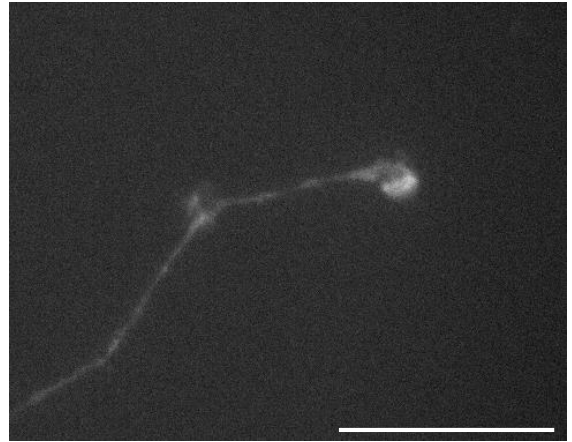
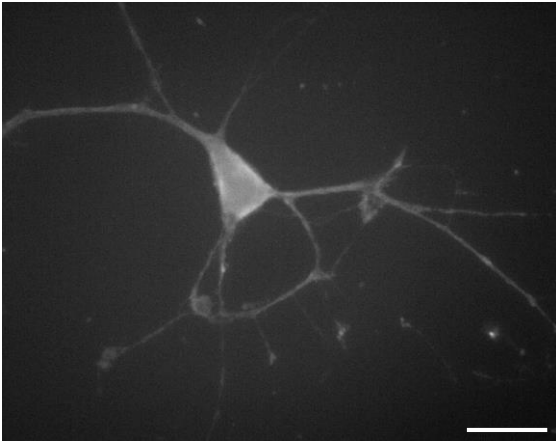
なお、グラフバー内の数値は解析した樹状突起の数を示す。エラーバーはSEMを示す。(Bars; 5 μ m) (***) : $p < 0.001$)

A**B**

補足図3. MDM2はNumbの分解を誘導する

(A-B) HEK293T細胞にMyc-NumbおよびFlag-MDM2の遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法により解析を行った。Dunnett's testにより統計処理した。(N = 5)

エラーバーはSEMを示す。(* : $p < 0.05$)



補足図4. RNF39は核および細胞質全域に存在し、特に軸索末端に濃縮する

EGFP-RNF39を海馬培養神経細胞に発現させて、培養14日目に抗GFP抗体を用いて免疫染色を行った。RNF39は核および細胞質全域に存在し、特に軸索末端に濃縮することが示唆された。

(Bars; 20 μ m)

表12. LC-MS解析によるRNF39の相互作用分子のスクリーニング結果

Gene name	Protein Name	Score
TUBB4B	tubulin beta-4B chain [Homo sapiens]	6639
TUBB4A	tubulin 5-beta [Homo sapiens]	5850
TUBB2A	tubulin beta-2A chain isoform 1 [Homo sapiens]	5633
CAD	CAD protein isoform 1 [Homo sapiens]	5444
TUBB3	tubulin beta-3 chain isoform 1 [Homo sapiens]	4752
TUBB6	unnamed protein product [Homo sapiens]	2302
TUBB8	TUBB8 protein, partial [Homo sapiens]	2230
PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit isoform 1 [Homo sapiens]	2078
TUBA1B	alpha-tubulin [Homo sapiens]	1582
TUBA1C	tubulin alpha 6 variant, partial [Homo sapiens]	1508
HSPA2	heat shock protein [Homo sapiens]	1478
HSPA4	heat shock 70 kDa protein 4 [Homo sapiens]	1297
HSPH1	heat shock protein 105 kDa isoform 1 [Homo sapiens]	1018
HSP90AB1	heat shock protein HSP 90-beta isoform a [Homo sapiens]	971
HSPA9	stress-70 protein, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	813
HSPA4L	heat shock 70 kDa protein 4L isoform 1 [Homo sapiens]	749
IRS4	insulin receptor substrate 4 [Homo sapiens]	722
TUBB6	tubulin, beta 6, isoform CRA_b, partial [Homo sapiens]	694
PCNA	proliferating cell nuclear antigen [Homo sapiens]	514
STUB1	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP isoform a [Homo sapiens]	503
SNRNP200	SNRNP200 protein, partial [Homo sapiens]	494
ATP1A1	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 isoform a [Homo sapiens]	494
EEF2	elongation factor 2 [Homo sapiens]	465
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1 isoform b [Homo sapiens]	458
WDR62	WD repeat-containing protein 62 isoform 2 [Homo sapiens]	456
DDB1	DNA damage-binding protein 1 [Homo sapiens]	410
AIFM1	apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial isoform AIF precursor [Homo sapiens]	375
C1QBP	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	356
SPTLC1	serine palmitoyltransferase 1 isoform a [Homo sapiens]	333
EMD	emerin [Homo sapiens]	316
RCN2	reticulocalbin-2 isoform a precursor [Homo sapiens]	289
SSR4	translocon-associated protein subunit delta isoform 2 precursor [Homo sapiens]	289
XPOT	exportin-T [Homo sapiens]	283
SLC25A6	ADP/ATP translocase 3 [Homo sapiens]	279
TRIM28	transcription intermediary factor 1-beta [Homo sapiens]	267
COPB1	beta-cop homolog [Homo sapiens]	261
TUBA4B	unnamed protein product [Homo sapiens]	245
ACLY	ATP-citrate synthase isoform 1 [Homo sapiens]	243
SEC16A	protein transport protein Sec16A isoform 1 [Homo sapiens]	242
USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked, isoform CRA_a [Homo sapiens]	237

Gene name	Protein name	Score
TUBA3E	RecName: Full=Tubulin alpha-3E chain; AltName: Full=Alpha-tubulin 3E; Contains: RecName: Full=Detyrosinated tubulin alpha-3E chain	97
LAS1L	LAS1-like (S. cerevisiae), isoform CRA_c [Homo sapiens]	93
PPP6R1	SAPS1 protein, partial [Homo sapiens]	92
COPG1	COPG protein, partial [Homo sapiens]	92
DNAJA3	dnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial isoform 1 [Homo sapiens]	90
FAR1	unnamed protein product, partial [Homo sapiens]	89
CELSR1	CELSR1 protein, partial [Homo sapiens]	87
DDX20	probable ATP-dependent RNA helicase DDX20 [Homo sapiens]	85
HSPA8P8	similar to heat shock 70kDa protein 8 isoform 2; heat shock cognate protein, 71-kDa; heat shock 70kd protein 10; heat shock cognate protein 54; constitutive heat shock protein 70; lipopolysaccharide-associated protein 1; LPS-associated protein 1 [Homo sapiens]	84
RPS13	ribosomal protein S13, partial [Homo sapiens]	84
MAD2L1	mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A [Homo sapiens]	81
PNKD	probable hydrolase PNKD isoform 3 precursor [Homo sapiens]	81
HSP90AB4P	PUTATIVE PSEUDOGENE: RecName: Full=Putative heat shock protein HSP 90-beta 4	80
CBWD1	HCOBP [Homo sapiens]	80
ALYREF	RecName: Full=THO complex subunit 4; Short=Tho4; AltName: Full=Ally of AML-1 and LEF-1; AltName: Full=Aly/REF export factor; AltName: Full=Transcriptional coactivator Aly/REF; AltName: Full=bZIP-enhancing factor BEF	80
FASN	fatty acid synthase [Homo sapiens]	79
TIMM21	HSPC154 [Homo sapiens]	78
GPRASP2	G-protein coupled receptor-associated sorting protein 2 [Homo sapiens]	77
Phb2	prohibitin-2 [Mus musculus]	76
NUP205	nuclear pore complex protein Nup205 isoform 1 [Homo sapiens]	75
RNF39	HZFw1 protein [Homo sapiens]	74
RABGAP1	unnamed protein product [Homo sapiens]	72
GANAB	Glucosidase II (plasmid) [Homo sapiens]	72
CCT2	T-complex protein 1 subunit beta isoform 1 [Homo sapiens]	70
PPP6C	serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit isoform b [Homo sapiens]	70
HEATR1	unnamed protein product [Homo sapiens]	69
WDR6	unnamed protein product [Homo sapiens]	67
UBL4A	ubiquitin-like protein 4A [Homo sapiens]	66
COPA	coatamer subunit alpha isoform 2 [Homo sapiens]	64
FAT1	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila), isoform CRA_a [Homo sapiens]	64
NUP93	Nucleoporin 93kDa [Homo sapiens]	64
ESYT1	unnamed protein product [Homo sapiens]	64
NME1	nucleoside diphosphate kinase A isoform b [Homo sapiens]	64
PABPC4	polyadenylate binding protein II, partial [Homo sapiens]	63

Gene name	Protein name	Score
DNAJB6	dnaJ homolog subfamily B member 6 isoform b [Homo sapiens]	63
IPO7	importin-7 [Homo sapiens]	62
RADX	hypothetical protein FLJ10178, isoform CRA_b [Homo sapiens]	61
TERF2	telomeric repeat factor 2, partial [Homo sapiens]	60
SCO2	protein SCO2 homolog, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	60
CDC42EP1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1 [Homo sapiens]	59
Pcbp1	poly(rC)-binding protein 1 [Mus musculus]	59
POLDIP2	polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2 [Homo sapiens]	59
EIF4G1	eukaryotic initiation factor 4 gamma, partial [Homo sapiens]	57
HSPB1	heat shock protein beta-1 [Homo sapiens]	57
AKAP11	A kinase (PRKA) anchor protein 11, isoform CRA_b [Homo sapiens]	55
ATP5F1C	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial isoform H (heart) precursor [Homo sapiens]	55
FBLL1	rRNA/tRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar-like protein 1 [Homo sapiens]	55
PRPF39	PRPF39 protein [Homo sapiens]	54
PRDX1	peroxiredoxin-1 [Homo sapiens]	54
ATG2B	RecName: Full=Autophagy-related protein 2 homolog B	53
FANCI	KIAA1794, isoform CRA_a [Homo sapiens]	53
PAF1	unnamed protein product [Homo sapiens]	53
PGAM5	Phosphoglycerate mutase family member 5 [Homo sapiens]	53
CSDE1	cold shock domain-containing protein E1 isoform 2 [Homo sapiens]	52
CTNNB1	catenin beta-1 isoform 1 [Homo sapiens]	51
GEMIN4	unknown [Homo sapiens]	51
RPL7A	ribosomal protein L7a, partial [Homo sapiens]	51
MARS1	methionine--tRNA ligase, cytoplasmic [Homo sapiens]	50
SLK	KIAA0204 protein, partial [Homo sapiens]	49
SMC4	hypothetical protein [Homo sapiens]	49
CTNNA1	catenin alpha-1 isoform 1 [Homo sapiens]	47
TCP1	t-complex polypeptide 1 [Homo sapiens]	47
RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1 isoform 1 [Homo sapiens]	47
FANCD2	hypothetical protein, partial [Homo sapiens]	46
GGT7	GGT7 protein, partial [Homo sapiens]	45
SKP1	S-phase kinase-associated protein 1 isoform a [Homo sapiens]	43
IARS1	isoleucyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	40
ASAP2	development and differentiation enhancing factor 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	40
PPP2R1A	unnamed protein product [Homo sapiens]	40
FAM184A	unnamed protein product [Homo sapiens]	40
COPZ1	coatamer subunit zeta-1 isoform 1 [Homo sapiens]	39
SUPT6H	transcription elongation factor SPT6 [Homo sapiens]	38
SSRP1	FACT complex subunit SSRP1 [Homo sapiens]	38
ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B [Homo sapiens]	38
EARS2	Glutamyl tRNA synthetase [Homo sapiens]	38

Gene name	Protein name	Score
MRPL47	CGI-204 [Homo sapiens]	38
UTS2	urotensin-2 isoform b preproprotein [Homo sapiens]	37
SFT2D1	SFT2 domain containing 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	36
KATNAL2	Katanin p60 subunit A-like 2 [Homo sapiens]	36
FAM76B	protein FAM76B isoform 1 [Homo sapiens]	36
YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide, isoform CRA_b [Homo sapiens]	35
VWDE	von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein isoform X1 [Homo sapiens]	35
ARHGAP10	RecName: Full=Rho GTPase-activating protein 21; AltName: Full=Rho GTPase-activating protein 10; AltName: Full=Rho-type GTPase-activating protein 21	34
PRDX4	peroxiredoxin-4 precursor [Homo sapiens]	34
MT-CO2	cytochrome c oxidase subunit II (mitochondrion) [Homo sapiens]	34
CRYBG3	very large A-kinase anchor protein [Homo sapiens]	33
PPP4R3B	KIAA1387 protein, isoform CRA_e [Homo sapiens]	33
SGSM2	Small G protein signaling modulator 2 [Homo sapiens]	33
MATN3	matrilin-3 precursor [Homo sapiens]	31
SYNE1	TPA_exp: spectrin-like protein of the nuclear envelope and Golgi [Homo sapiens]	30
FBLN1	fibulin-1 isoform C precursor [Homo sapiens]	30
LRRC8E	LRRC8E protein, partial [Homo sapiens]	30
KNG1	kininogen-1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	26
ND2	NADH dehydrogenase subunit 2 (mitochondrion) [Homo sapiens]	26

略語

aa	Amino acids
AD	Alzheimer's disease
ALA	Alpha-linolenic acid
ASEF2	APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor 2
BBB	Blood-brain barrier
DCX	Doublecortin
DHA	Docosahexaenoic acid
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
EPA	Eicosapentaenoic acid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPR120	G protein-coupled receptor 120
GPR40	G protein-coupled receptor 40
GST	Glutathione S-transferase
HEK293T	Human Embryonic Kidney cells 293T
IP	Immunoprecipitation
MDM2	Murine double minute2
MFSD2A	Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2A
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
PKA	Protein kinase A
PPAR γ	Peroxisome proliferator- activated receptor gamma
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RNF39	RING Finger Protein 39
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
STUB1	STIP1 Homology and U-Box Containing Protein 1
WB	Western blot
