

グルタミン酸による神経前駆細胞誘導時における

ラット *ex vivo* 網膜のプロテオーム解析

- DRP-3 long isoform のタンパク質および mRNA 発現の増強 -

氏名 徳田和央

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 眼科学

平成 27 年 6 月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	2
4. 対象および方法	
(1) 生命倫理への配慮対象	2
(2) 対象	2
(3) 方法	3-6
(4) 統計解析	6
5. 結果	6-14
6. 考察	15-16
7. 結語	16
8. 謝辞	16
9. 参考文献	16-20

1. 要旨

主要な神経伝達物質であるグルタミン酸は、高等脊椎動物において神経前駆細胞を誘導することが知られている。しかしながら、グルタミン酸による神経前駆細胞の誘導時にどのようなタンパク質がかかわっているかは分かっていない。我々は、神経前駆細胞誘導に関与するタンパク質を同定するため、ラット感覚網膜組織を培養し (*ex vivo*)、プロテオーム解析を行った。Sprague-Dawley 系雄性ラットの感覚網膜に 1 mM グルタミン酸を 1 時間添加 (Glu 群) し、洗浄後に培養液中で 24 時間培養したところ、網膜に分裂細胞が出現し、免疫組織染色により神経前駆細胞の存在が確認された。そこで、対照群と Glu 群の網膜細胞のタンパク質を 2 次元電気泳動後に比較し、有意差のあるものを質量分析法で同定した。Glu 群では、dihydropyrimidinase-related protein 3 (DRP-3)、DRP-2 および stress-induced-phosphoprotein 1 (STIP1) が上昇していた。更に、DRP-3 に関して mRNA の発現を検討したところ、2 種類のアイソフォームのうち、長いシークエンスである isoform 2 が Glu 群で有意に上昇していた。これらの結果から、グルタミン酸は、細胞周期の制御や神経突起成長にかかわる DRP ファミリーや関連タンパク質の発現を上方制御することで、成体ラット網膜に神経前駆細胞を誘導することが示唆された。

2. 研究の背景

日本人の失明原因の第一位である緑内障をはじめ、失明疾患の過半数は網膜細胞死により視機能不全を生じる [1]。網膜細胞死により失明した患者にとって、現時点で有用な治療法はないが、網膜再生が有力な治療となる可能性がある。成熟した脳において、神経細胞の産生は行われているものの、側脳室外側壁の脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) や海馬歯状回 (hippocampal dentate gyrus) など一部の部位に限定され [2, 3]、哺乳類での網膜神経細胞再生は非常に限定的である。しかし 21 世紀に入り、哺乳類の成体網膜内に休止している神経前駆細胞 (neural progenitor cell; NPC) の存在が明らかになった [4-7]。網膜において NPC を活性化する因子も、epidermal growth factor (EGF) [4, 8]、fibroblast growth factor 2 (FGF2) [4, 7, 8]、insulin と insulin-like growth factor-1 (IGF-1) [9] およびグルタミン酸とそのアナログ [10] などが報告されてきている。

中枢神経系において、グルタミン酸は主要な神経伝達物質であるばかりでなく [11]、細胞の増殖調整に関与することが知られている [12-14]。グルタミン酸受容体の過剰な活性化はいわゆる excitotoxic cell death [15] を生じるが、一方で、低濃度のグルタミン酸は高等脊椎動物において網膜細胞増殖を誘導することが報告されている [10, 16, 17]。しかし、成熟した網膜においてグルタミン酸による NPC 誘導時の特異的なタンパク質の動態は解明されていない。

3. 目的

二次元電気泳動 (two-dimensional electrophoresis; 2-DE) に基づくプロテオーム解析を行い、ラット感覚網膜細胞においてグルタミン酸による NPC 誘導時の特異的タンパクを同定する。

4. 対象および方法

(1) 生命倫理への配慮

本実験は日本学術会議が設定したガイドラインおよび本学医学部動物実験指針に従って行った。また、本実験開始にあたって、本学動物実験委員会の認可を受けた(承認番号 13-066)。動物の取り扱いに関しては「動物の愛護及び管理に関する法律 (平成 12 年施行)」「動物の愛護及び管理に関する法律施行規則 (平成 18 年環境省令)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示)」を順守して行った。

(2) 対象

Sprague-Dawley 系雄性ラット(千代田開発)を 21 日齢で購入し、12 時間周期の明暗環境下で自由摂餌させ、 30 ± 2 日齢で使用した。

(3) 方法

(3.1) *Ex vivo* ラット網膜の作製

実験は、isoflurane による十分な麻酔下で行った。眼球を摘出し、毛様体後方で円周状に切開し、角膜、水晶体および硝子体を除去した。得られた後眼部 eye cap を 2 分割し、網膜色素上皮から感覚網膜を剥離した [18]。一連の *ex vivo* 網膜作製操作は氷上で行った。分離した網膜組織は、組織回復のため培養液内のナイロンメッシュ上で 1 時間培養後、実験を開始した。培養液は人工的脳脊髄液を用い、その組成は、124 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 22 mM NaHCO₃, 10 mM glucose で、常時バブリング (95% O₂ - 5% CO₂) を行った。尚、我々はこの人工的脳脊髄液が *ex vivo* 網膜の培養液として適していることを過去に報告している [19]。本実験においては、細胞の増殖や分化に影響を及ぼす可能性がある動物胎児血清や添加物等は含まず、電解質とグルコースのみから成る培養液を用いた。

(3.2) 組織標本作製および免疫組織化学法

網膜組織は、modified Davidson's fluid [20] を用いて固定した。固定された組織は段階的に濃度を変えたアルコールおよびキシレンで脱水・透徹を行い、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックを 4 μm 厚に薄切し、シランコートスライドガラス上で伸展、風乾した。染色時は、キシレンで脱パラフィンを行い、その後段階的に濃度を変えたアルコールで再水和した。光学顕微鏡的評価には、ヘマトキシリン・エオジン染色 (Merck Millipore) を行った。

免疫組織学的評価は以下の方法を用いた。10 mM クエン酸内で 99 °C 15 分の免疫賦活化を行い (H2800 Microwave Processor, Energy Beam Sciences Inc.)、室温で 30 分間冷却した後に PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100 で 15 分間の permeabilization を行った。室温で 1 時間のブロッキング (1% goat serum / 0.1% Tween 20 を含む PBS) を行った後、一次抗体と 4 °C で一晩反応させた。一次抗体は、anti-phospho-histone H3 monoclonal antibody (1:1000, #3377; Cell Signaling Technology)、anti-nestin polyclonal antibody (1:100, N5413; Sigma-Aldrich) および anti-PAX6 monoclonal antibody (1:200, sc-53108; Santa Cruz) を使用した。PBS で洗浄後、蛍光二次抗体 Alexa Flour 488 (1:500, goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)) と室温で 1 時間反応させた。DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen) で核染色後、Fluoromount (Diagnostic BioSystems) を用いて封入した。共焦点像は、Nikon Plan Apo 60X/1.40 の対物レンズを用いて、BZ-9000 series (BIOREVO)、BZ-II Viewer software (Keyence) で撮影した。幾つかの実験においては、二次抗体として peroxidase anti-rabbit IgG および anti-mouse IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いて室温で 1 時間反応させた後、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich) で発色した。DAB 染色を行った場合は、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。陽性細胞数は、ImageJ (1.49d, National Institute of Health) を使って計測した。共焦点像の撮影および陽性細胞数の計測は盲検化するためにブラインド

オペレーターによって行った。

(3.3) タンパク質解析サンプルの作製

網膜組織を、溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 165 mM sodium chloride, 10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 mM PMSF, 10 mM EDTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 1% NP-40) 内において氷上でホモジナイズした。懸濁液を 1 時間 4°C で溶解した後、21,500 x g で 30 分間遠心分離し、上清をサンプルとした。サンプルは解析まで -80°C で保管した [21]。サンプル内の総タンパク質の濃度は、Lowry protein assay で測定した [22]。

(3.4) ウェスタンブロット法

15µg の各タンパク質抽出溶液を用いて、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)を行った。分離されたタンパク質は、PVDF メンブレン (polyvinylidene difluoride; Immobilon-P membrane, Millipore)に転写した。メンブレンは、室温で 1 時間のブロッキング (5% skim milk / TBS)を行い、0.02% Tween-20 を含む TBS で洗浄後、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。一次抗体は、anti-nestin polyclonal antibody (1:1000, N5413; Sigma-Aldrich)、anti-PAX6 monoclonal antibody (1:200, sc-53108; Santa Cruz)、anti-DRP-3 polyclonal antibody (1:500, 18969-1-AP; ProteinTech) 、anti-DRP-2 monoclonal (1:1000, sc-101348; Santa Cruz)、anti-STIP1 monoclonal antibody (1:200, H00010963-M11; Abnova) および anti-actin (1:500, sc-1616; Santa Cruz)を使用した。メンブレンに固定されたタンパク質は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)標識抗体と室温で 1 時間反応させた後、化学発光 (ImmunoStar LD, Immunostar Zeta, WAKO)により LAS-1000 system (Fuji Film)で検出した。各バンドの強度は Progenesis PG250 (Nonlinear Dynamics Ltd.)を用いて解析し、対応する actin の強度で補正した。

(3.5) 二次元電気泳動法

80µg のタンパク質抽出溶液を、膨潤液 (8 M urea, 2% CHAPS, 0.01% bromophenol blue)、1.2% Destreak reagent (GE Healthcare)および 0.5% IPG buffer (GE Healthcare)と混和後、IPGphor strip holder (GE Healthcare)に投入した。11cm の IPG ストリップ (immobilized linear pH gradient 3-10 linear gradient IPG strips, Bio-Rad)を strip holder に静置し、IPGphor 3 IEF unit (50 µA/strip)を使用して等電点電気泳動 (Isoelectric focusing ; IEF)を行った。プロトコールは、rehydration 10 時間 (no voltage applied); 0 - 500 V, 4 時間; 500 - 1,000 V, 1 時間; 1,000 - 8,000 V, 4 時間; 8,000 V, 20 分; 500 V (20,000 - 30,000 Vh)である。ストリップは、平衡化バッファ-1 (6 M urea, 0.5 M Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 2% 2-ME)で還元反応を、平衡化バッファ-2 (6 M urea, 0.5 M Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 2.5% iodoacetamide)でアルキル化を各々 10 分間行った。その後、ストリップを polyacrylamide gel (4-20% precast polyacrylamide gel, Bio-Rad)上に静置し、電気泳動(200V)を行った。泳動後のゲルは、40% エ

タノールと 10% 酢酸の混和溶液で 4 時間固定後、Flamingo™ Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad) を用いて蛍光染色した。染色されたゲルは、超純水で 3 回洗浄した。ゲル中のタンパク質スポットは、ProEXPRESS 2D Proteomic Imaging System (PerkinElmer Inc.) で撮影を行い、Progenesis SameSpot software (Nonlinear Dynamics Ltd.) を使用して定量した。群間比較は spot area x stain intensity で得られた spot intensity を指標に、ANOVA による自動解析を用いて有意水準 5% を cut-off とし、1.3 倍を超える変化のものを選出した。統計解析後、ゲルは See Pico™ (Benebiosis Co., Ltd.) を用いて再染色し、群間で発現差異のあるスポットを切り出し、ゲル内にて酵素消化を行いペプチド断片にした [23]。

(3.6) 免疫沈降法

免疫沈降は、Protein LoBind tubes (Eppendorf) を用い、ProteinG Dynabeads kit (DynaL Biotech) を使用した。50µg のタンパク質抽出溶液を熱変性した後、15 µl の抗 DRP-3 polyclonal antibody (ProteinTech) と 4°C で一晩反応させた。抗体抗原複合体は、磁気ビーズに室温 10 分間捕捉した後、washing buffer で洗浄した。目的の抗原は、loading buffer 内で溶出し、SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動した。ゲルは See Pico™ (Benebiosis Co., Ltd) で染色し、対象となるバンドを切り出し、酵素消化を行いペプチド断片にした。

(3.7) タンパク質ゲル内消化

ゲル片は、洗浄液 (50 mM ammonium bicarbonate, 50% acetonitrile) で 3 回洗浄の後、100% acetonitrile (ACN) で脱水し、吸引・乾燥した。消化酵素は sequencing grade modified trypsin (Promega) を用い、10 ng/µl の濃度 (50 mM ammonium bicarbonate を含む 10% ACN 溶液) で 37°C、一晩消化した。トリプシン処理されたペプチドは、0.1% trifluoroacetic acid (TFA) / 30% ACN、0.1% TFA / 50% ACN および 0.1% TFA / 80% ACN の 3 段階の濃度で、各々 5 分超音波処理により抽出した。抽出されたペプチドは吸引・乾燥し、20 µl の 0.1% TFA / 2% ACN で溶解した。ZipTip C18 pipette tip (Millipore) を用いて脱塩・濃縮後、質量分析法で解析した [24]。

(3.8) 質量分析法

質量分析は以下の 2 機種のいずれかを使用して行った。

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system (Agilent 1100 LC-MSD Trap XCT; Agilent Technologies) では、設定を以下の様に行った。HPLC column; Zorbax 300 SB-C18 (Agilent Technologies) of dimensions = 3.5 µm, 15 mm x 75 mm; using mobile phases = Solvent A: 0.1% formic acid and Solvent B: CH₃CN / 0.1% formic acid; with a gradient = 0-5 min 2% B, 78 min 60% B; a flow rate = 0.3 µl/min; stop time = 78 min. MS セッティング: capillary voltage at -1600V; dry gas at 5.0 cl/min, dry temperature of 500 °C。スキャン域は 286 から 2200 m/z、閾値を 100,000 とした。MS スペクトルは、Agilent Spectrum Mill MS

proteomics workbench を用いて解析した。データベースは、Swiss-Prot protein database (<http://kr.expasy.org/sprot/>)を使用した。タンパク質同定の基準を、filter by protein score >10.0, filter peptide by score >8, percentage scored peak intensity (% SPI) >70 とした。

QSTAR-Elite system (Applied Biosystems/AB SCIEX) coupled with the Ultimate NanoLC system (Thermo Scientific) では、設定を以下の様に行った。サンプルは、20 μ l の sample loop をセットした Ultimate instrument を用い、25 μ l/min で 5 mm RP C18 pre-column (Thermo Scientific)に導入した。Separation column は、3 μ m C18 beads with 100 Å pores が充填された 75 μ m internal diameter \times 150-mm length PepMap RP column (Thermo Scientific)を使用した。RP column の流量は 200 nl/min で、75 分の gradient of solvent B (85% ACN and 0.1% formic acid) (0% B from 0–5 min, to 40% B at 45 min, to 100% B at 50 min)で行った。分離したサンプルは QSTAR Elite mass spectrometer (Applied Biosystems/AB SCIEX)を使用し、Analyst QS 2.0 software (Applied Biosystems/AB SCIEX)を用いて MS スペクトルを得た。スキャンサイクルは、1 秒の MS スキャンに続き、3 大強度ピークに各 3 秒の 3MS/MS スキャンとした。取得したスペクトルは、ParagonTM algorithm [25] of ProteinPilot Version 4.1 (AB SCIEX)を用いて解析した。データベースは、UniProt Rat proteome database (release2014_07, 34,165 entries)を使用した。同定されたタンパク質は、重複を最小限にする目的で Paragon algorithm によりグループ化した。ProteinPilot cutoff score は 1.3、95% confidence とした [24, 26]。

(3.9) リアルタイム逆転写 PCR

網膜からの総 RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用い、ゲノム DNA の混入を避けるため DNase を使用し精製した。cDNA は Reverse Transcription System (Promega Corporation)を用いて調製した。Real-time polymerase chain reaction (PCR) assay は、LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche, Basel, Switzerland)を用い LightCycler system で行われ、LightCycler analysis software (ver. 3.5, Roche)で解析した。特定の PCR 産物増幅の確認のため、融解曲線分析を行った。mRNA 発現は、対応する β -actin で補正した。以下に使用したプライマー配列を示す。Total DRP-3, forward: 5'-ATCAAGGGAGGGAGAATCGT-3', reverse: 5'-TTGTCCCTTGGAAGAAATCG-3'; DRP-3 isoform 2, forward: 5'-GGATTTTGATGCCCTGAGTG-3', reverse: 5'-TCTGCAAGACCTCCTTGCCAG-3', β -actin, forward: 5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGT-3', reverse: 5'-TCATGGATGCCACAGGATTCC-3'。

(4) 統計解析

データは、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error of the mean; SEM)で示した。2 群間比較は Student's *t*-test (両側)を行った。多群間の比較は、ANOVA の後に Holm-Sidak の多重比較検定を行った (SigmaStat 13.0; Systat Software Inc.)。有意水準は 5%とした。

5. 結果

5.1 グルタミン酸は、ラット *ex vivo* 網膜において網膜外顆粒層に分裂細胞を誘導する

最初に、グルタミン酸が *ex vivo* 網膜組織に分裂細胞を誘導するかどうか検討した。対照群は、グルタミン酸を含まない培養液で網膜組織を 1 時間培養後、同じくグルタミン酸を含まない培養液で計 24 時間の培養を行った。対照群では、網膜のいずれの層にも障害がみられなかった (Fig.1A 左)。次に、グルタミン酸群 (Glu 群)では、1mM グルタミン酸を含む培養液で網膜組織を 1 時間培養した後に洗浄し、その後はグルタミン酸を含まない培養液で計 24 時間培養を行った。過去の報告と同様、組織障害なく網膜視細胞の核が存在する網膜外顆粒層内 (ONL)に分裂様細胞が出現した [10, 16]。この分裂様細胞が真に分裂しているかどうかを検討するため、有糸分裂細胞特有のマーカーである phospho-histone H3 (pHisH3)を用いて免疫染色を行った [27]。その結果、Glu 群の ONL 内に pHisH3 陽性細胞が確認された (Fig.1A 右)。続いて、グルタミン酸濃度の検討を行い、0.3mM と比較して 1mM グルタミン酸群では有意に陽性細胞が増加していた ($P < 0.01$, $n = 5$, Fig. 1B)。3mM グルタミン酸群では、**excitotoxic damage** がみられた (data not shown)。次に、1mM グルタミン酸での培養時間の検討を行った。本実験系においては、1 時間が必要な最短時間であることが判明した (Figs. 1C and 1D)。

以上の結果より、以降の実験において、Glu 群は 1mM グルタミン酸を含む培養液で 1 時間の培養を行うこととした。

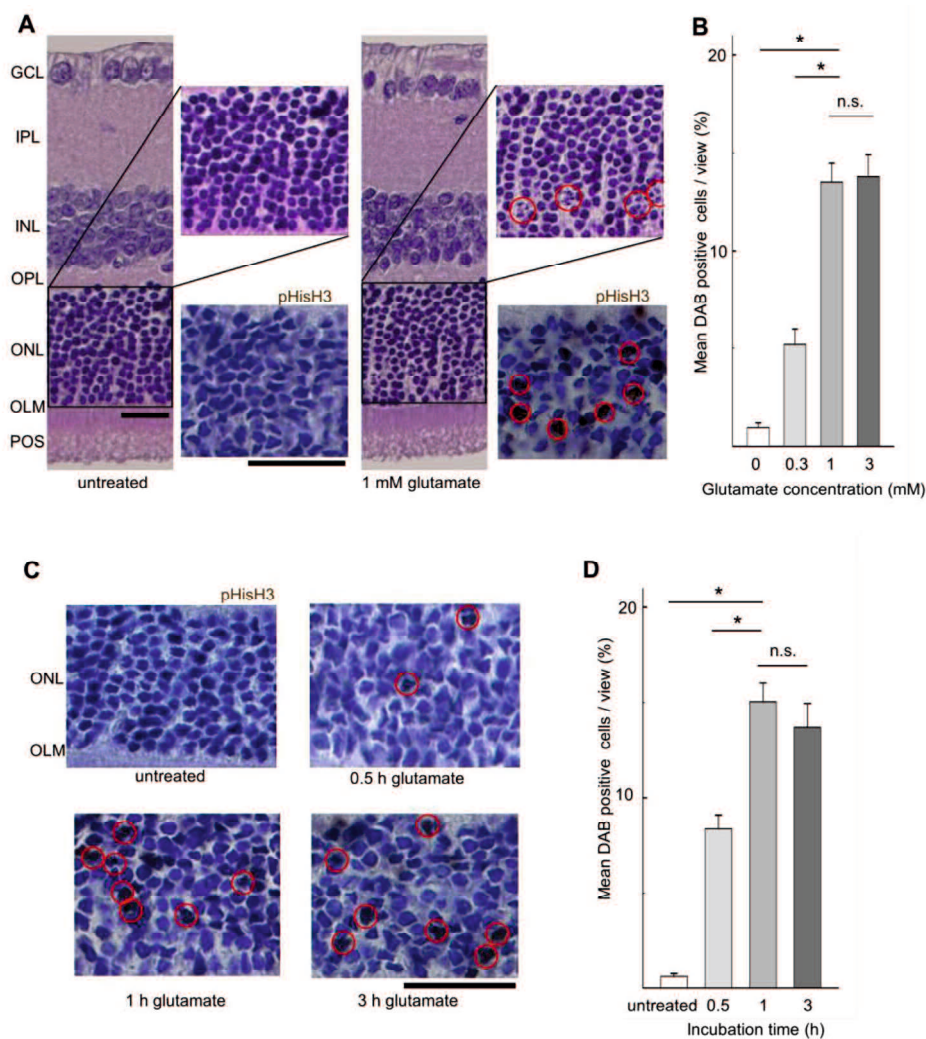


Fig. 1 ラット *ex vivo* 網膜におけるグルタミン酸による分裂細胞誘導

(A) 対照群 (左パネル; untreated) およびグルタミン酸群 (右パネル) の網膜組織、ONL 拡大像と同層部における phospho-histone H3 (pHisH3) 染色。pHisH3 は、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) で発色した。分裂細胞並びに pHisH3 陽性細胞を赤円で示した。(B) 各グルタミン酸濃度における DAB 陽性細胞 (pHisH3 陽性細胞) 数。60 倍対物レンズを使用し、3 視野の平均値を測定した (n = 5)。(C) 異なる培養時間での pHisH3 免疫染色像 (赤円)。(D) 各培養時間における DAB (pHisH3) 陽性細胞数 (n = 5)。P 値は、Holm-Sidak *post-hoc* test で算出した。* $P < 0.01$ 。GCL; 網膜神経節細胞層、IPL; 網膜内網状層、INL; 網膜内顆粒層、OPL; 網膜外網状層、OLM; 網膜外境界膜、POS; 視細胞外節、Scale bar: 20 μm 。

5.2 グルタミン酸は、成熟した網膜細胞において神経前駆細胞を誘導する

次に、Glu 群 (1mM グルタミン酸を含む培養液で 1 時間培養後、グルタミン酸を含まない培養液で計 24 時間培養) に神経前駆細胞 (neural progenitor cells; NPC) が出現する

か検討を行った。Paired box 6 (PAX6)は網膜の発生に重要な転写調節因子であり、前駆細胞マーカーである [28]。免疫組織染色を行ったところ、Glu 群には PAX6 陽性細胞が ONL 内に確認された (Fig. 2A)。ウエスタンブロットでも、Glu 群の網膜内に PAX6 が著明に上昇することが判明した (treated vs. untreated $P < 0.01$, $n = 3$, Figs. 2B and 2C)。更に、別の神経前駆細胞マーカーである nestin [10, 29] を用い、同様の検討を行った。免疫染色では対照群に比べ Glu 群に強い染色性 (Fig. 2D) がみられ、ウエスタンブロットにおいて群間に有意差が確認された (treated vs. untreated, $P < 0.01$, $n = 3$, Figs. 2E and 2F)。

以上の結果から、毒性を呈さない低濃度のグルタミン酸が、成熟したラット網膜に NPC を誘導することが示された。

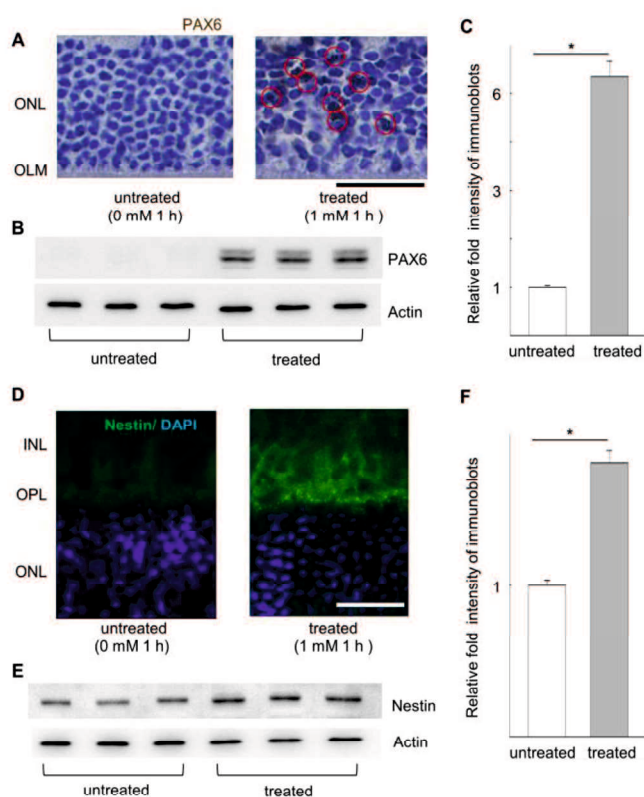


Fig. 2 グルタミン酸による神経前駆細胞誘導

(A) 対照群およびグルタミン酸群網膜の抗 PAX6 抗体を用いた免疫染色 (DAB 法)。PAX6 陽性細胞を赤円で示した。(B)、(C) ウエスタンブロットによる対照群およびグルタミン酸群の PAX6 発現の比較 ($n = 3$)。(D) 対照群およびグルタミン酸群網膜の抗 nestin 抗体 (green)を用いた免疫染色。核染色は、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で行った (blue)。(E)、(F) ウエスタンブロットによる対照群およびグルタミン酸群の nestin 発現の比較 ($n = 3$)。P 値は、Student's *t*-test で算出した。* $P < 0.01$ 。INL ; 網膜内顆粒層、OPL ; 網膜外網状層、OLM ; 網膜外境界膜、Scale bar: 20 μ m。

5.3 グルタミン酸で特異的に誘導される 3 種類のタンパク質を質量分析法により同定

グルタミン酸による網膜内神経前駆細胞誘導時のタンパク質動態は、未だ明らかにされていない。そこで我々は、対照群および Glu 群の網膜組織のプロテオーム解析を行った。各群網膜から抽出したタンパク質を用いて 2 次元電気泳動 (2-DE) を行い、各群とも 1400 を超えるスポットが分離された (Figs. 3A and 3B)。群間を比較し、強度に有意差を呈したスポットを切り出し、ゲル内消化されたペプチドを質量分析法で同定した。同定されたタンパク質を Fig. 3C に示した。

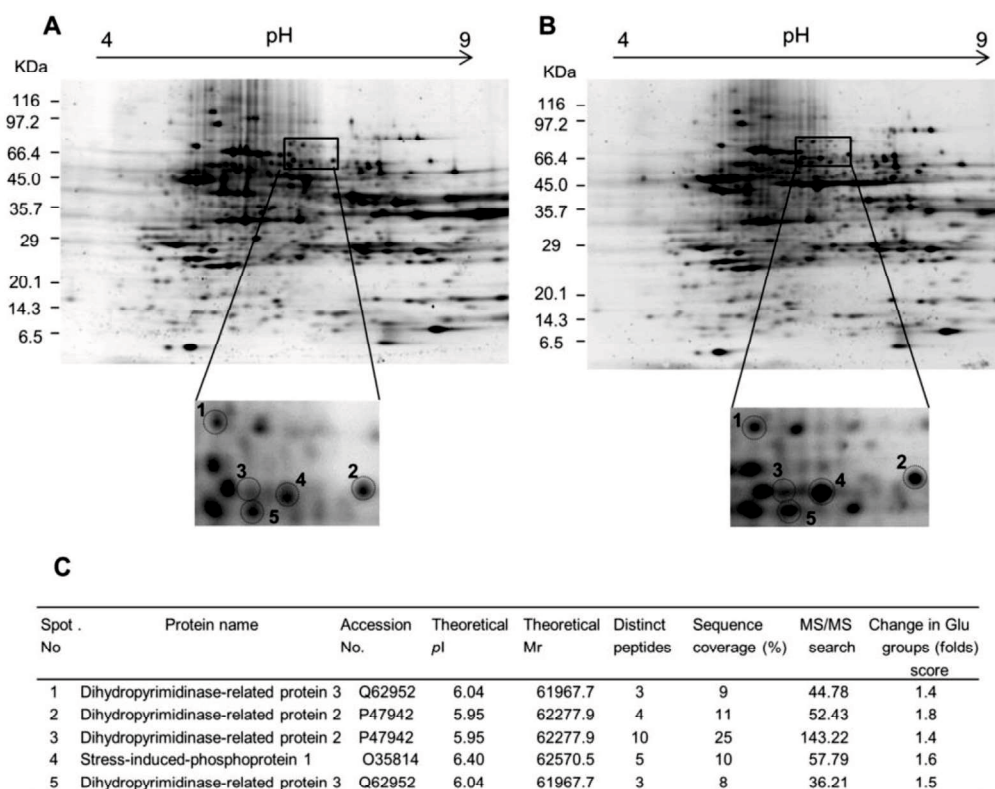


Fig. 3 質量分析法を用いたグルタミン酸による神経前駆細胞誘導時の特異的タンパク質同定

対照群(A) およびグルタミン酸群 (B) 網膜の二次元電気泳動像。各群 80 μ g のタンパク質を用い、ゲルは FlamingoTM Gel Staining で染色した。各群を比較し (n = 3)、有意差のあるスポットを切り出し、質量分析法で同定した。(C) 同定されたタンパク質のリスト。円内に示したスポット番号 (A, B の拡大図内)は、リスト (C)と一致している。

5.4 グルタミン酸により網膜内で DPR-3、特に isoform 2 が増加する

Dihydropyrimidinase-related proteins (DRPs) は神経組織の発達期において強く発現する細胞質内リン酸化タンパク質である [30]。DRP ファミリーのうち、DRP-3 は胎生期および出生初期の脳内に一時的に発現し、成人では殆んど見られない [31]。本実験では、質

量分析の結果からグルタミン酸群で DPR-3 が発現し、対照群に比べ有意に上昇することが示された。そこで、ラット網膜でのグルタミン酸による DPR-3 の変化を探求することにした。過去の報告と一致して、本研究でも 30 日齢のラットの網膜には、DRP-3 の発現はほとんどなかった (pre-treatment, Fig. 4A)。更に、質量分析の結果と一致して、ウエスタンブロットでは対照群に比べ Glu 群で DRP-3 のタンパク質が有意に増加していた (1.39-fold, $P < 0.01$, $n = 5$, Fig. 4B)。興味深い事に、DRP-3 の複数のバンドのうち、高分子のバンドがより強い強度を呈していた。実際、最も高分子のバンド強度を比較したところ、対照群に比べて Glu 群では 1.68 倍に増加しており ($P < 0.01$, $n = 5$, Fig. 4C)、このバンドは分子量から DRP-3 isoform 2 と推察された [32]。

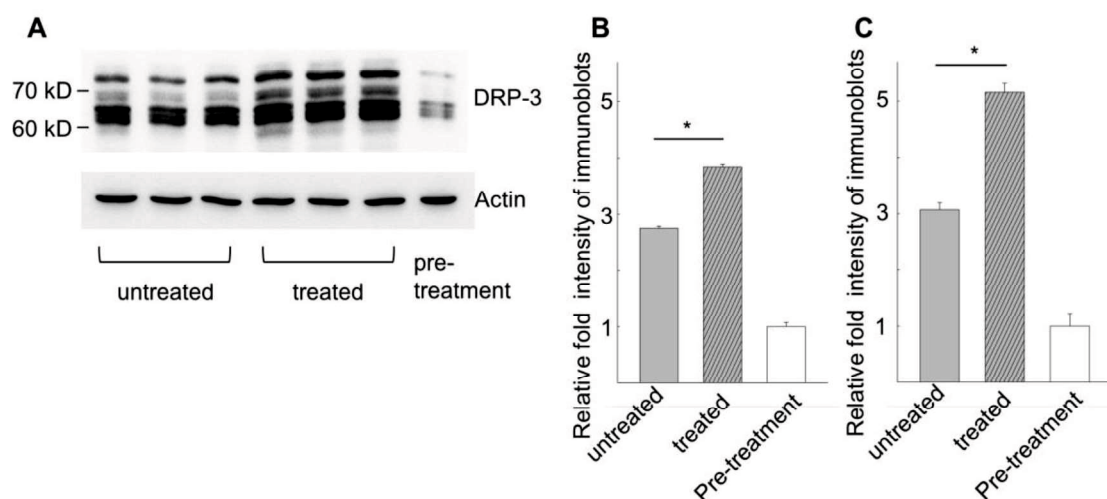


Fig. 4 ウエスタンブロットによる網膜内 DRP-3 の発現

(A) 対照群およびグルタミン酸群網膜の DRP-3 発現。「pre-treatment」は、眼球より摘出直後の網膜から抽出したサンプル。(B) 各群における DRP-3 発現 (全バンド) の比較 ($n = 3$)。 (C) 各群における DRP-3 の内、最も高分子側バンドの比較 ($n = 3$)。 P 値は、Holm-Sidek *post-hoc test* で算出した。* $P < 0.01$ 。

また、質量分析法により同定された DRP-3 以外の 2 種のタンパク質についても、ウエスタンブロットにより各々の抗体を用いてタンパク質の量的確認を行った ($P < 0.01$, 各 $n = 6$, Fig. 5)。

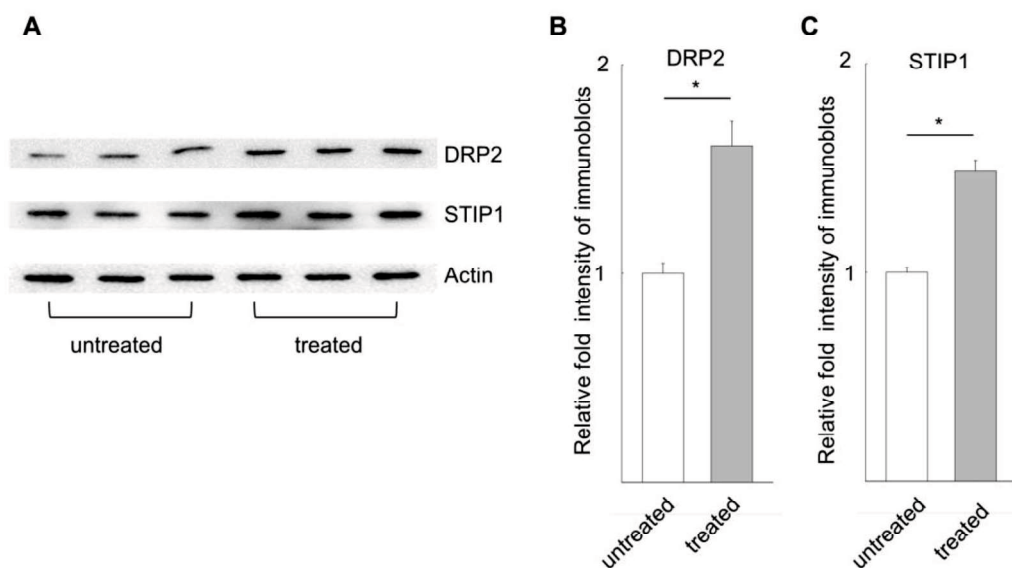


Fig. 5 ウェスタンブロットによる網膜内 DRP-2 および STIP1 の発現

(A) 対照群およびグルタミン酸群網膜内の DRP-2 および STIP1 発現。(B) 各群における DRP-2 発現の比較 (n = 6)。(C) 各群における STIP1 発現の比較 (n = 6)。P 値は、Student's *t*-test で算出した。* $P < 0.01$ 。

5.5 免疫沈降後の質量分析で、グルタミン酸による DRP-3 isoform 2 の発現上昇が確認された

DRP-3 には 2 つの isoform が存在することが知られている [32, 33]。前述のウェスタンブロット (Fig. 4A) で複数のバンドが確認されたため、抗 DRP-3 抗体を用いた pull-down assay を行い、質量分析法により各バンドのタンパク質を同定した。各バンドは DRP-3 のペプチド配列を呈し (Fig. 6)、5 つのバンド中 4 つは DRP-3 isoform 2 と同定された (Fig. 7)。

```

-----
1 MASGRRGWDSHEDDLVYLARPGTTDQVPRQKYGGMFCNVEGAFESKTLDFDALSVQGRGAKTFRSSQGSGR
2 MASGRRGWDSHEDDLVYLARPGTTDQVPRQKYGGMFCNVEGAFESH TLDFDALSVQGRGAKTFRSSQGSGR
3 MASGRRGWDSHEDDLVYLARPGTTDQVPRQKYGGMFCNVEGAFESH TLDFDALSVQGRGAKTFRSSQGSGR
4 MASGRRGWDSHEDDLVYLARPGTTDQVPRQKYGGMFCNVEGAFESH TLDFDALSVQGRGAKTFRSSQGSGR
5 MASGRGWDSHEDDLVYLARPGTTDQVPRQKYGGMFCNVEGAFESKTLDFDALSVQGRGAKTFRSSQGSGR 73

-----MSYQGK-----KNIPRITSDRLLIKGGRIVNDQSFYA 33
1 GAGHRPQVGGDTRRGGPGRRESREPVFESPKPAGVEIRSATGKEVLQNLGPKDKSDRLLIKGGRIVNDQSFYA
2 GAGHRPQVGGDTRRGGPGRRESREPVFESPKPAGVEIRSATGKEVLQNLGPKDKSDRLLIKGGRIVNDQSFYA
3 GAGHRPQVGGDTRRGGPGRRESREPVFESPKPAGVEIRSATGKEVLQNLGPKDKSDRLLIKGGRIVNDQSFYA
4 GAGHRPQVGGDTRRGGPGRRESREPVFESPKPAGVEIRSATGKEVLQNLGPKDKSDRLLIKGGRIVNDQSFYA
5 GAGHRPQVGGDTRRGGPGRRESREPVFESPKPAGVEIRSATGKEVLQNLGPKDKSDRLLIKGGRIVNDQSFYA 146

DIYMEDGLIKIQGDNLIVPGGVKIIEANGMVMFPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGGTTMIID 106
1 DIYMEDGLIKIQGDNLIVPGGVKIIEANGMVMFPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGGTTMIID
2 DIYMEDGLIKIQGDNLIVPGGVKIIEANGMVMFPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGGTTMIID
3 DIYMEDGLIKIQGDNLIVPGGVKIIEANGMVMFPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGGTTMIID
4 DIYMEDGLIKIQGDNLIVPGGVKIIEANGMVMFPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGGTTMIID
5 DIYMEDGLIKIQGDNLIVPGGVKIIEANGMVMFPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGGTTMIID 219

HVVPPESSLLEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWDSVKQEVQNLSEKGVNSFMVYMAKDLVQVSN 179
1 HVVPPESSLLEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWDSVKQEVQNLSEKGVNSFMVYMAKDLVQVSN
2 HVVPPESSLLEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWDSVKQEVQNLSEKGVNSFMVYMAKDLVQVSN
3 HVVPPESSLLEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWDSVKQEVQNLSEKGVNSFMVYMAKDLVQVSN
4 HVVPPESSLLEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWDSVKQEVQNLSEKGVNSFMVYMAKDLVQVSN
5 HVVPPESSLLEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWDSVKQEVQNLSEKGVNSFMVYMAKDLVQVSN 292

ELYEIFTCLGELGAIQAQVHAENGDI IAQEQARMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAAVFRITVASQTNCLPV 252
1 ELYEIFTCLGELGAIQAQVHAENGDI IAQEQARMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAAVFRITVASQTNCLPV
2 ELYEIFTCLGELGAIQAQVHAENGDI IAQEQARMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAAVFRITVASQTNCLPV
3 ELYEIFTCLGELGAIQAQVHAENGDI IAQEQARMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAAVFRITVASQTNCLPV
4 ELYEIFTCLGELGAIQAQVHAENGDI IAQEQARMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAAVFRITVASQTNCLPV
5 ELYEIFTCLGELGAIQAQVHAENGDI IAQEQARMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAAVFRITVASQTNCLPV 365

TKVMSKSAADLISQARKGNVVFGEPI TASLGIDGTHYWSKNWAKAAAFVTSPPSPDPTTDPYINSLASGD 325
1 TKVMSKSAADLISQARKGNVVFGEPI TASLGIDGTHYWSKNWAKAAAFVTSPPSPDPTTDPYINSLASGD
2 TKVMSKSAADLISQARKGNVVFGEPI TASLGIDGTHYWSKNWAKAAAFVTSPPSPDPTTDPYINSLASGD
3 TKVMSKSAADLISQARKGNVVFGEPI TASLGIDGTHYWSKNWAKAAAFVTSPPSPDPTTDPYINSLASGD
4 TKVMSKSAADLISQARKGNVVFGEPI TASLGIDGTHYWSKNWAKAAAFVTSPPSPDPTTDPYINSLASGD
5 TKVMSKSAADLISQARKGNVVFGEPI TASLGIDGTHYWSKNWAKAAAFVTSPPSPDPTTDPYINSLASGD 438

LQLSGSAHCTFSTAQAIGKDNFTAIPEGTNGVEERMSVINDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIENLYPRK 398
1 LQLSGSAHCTFSTAQAIGKDNFTAIPEGTNGVEERMSVINDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIENLYPRK
2 LQLSGSAHCTFSTAQAIGKDNFTAIPEGTNGVEERMSVINDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIENLYPRK
3 LQLSGSAHCTFSTAQAIGKDNFTAIPEGTNGVEERMSVINDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIENLYPRK
4 LQLSGSAHCTFSTAQAIGKDNFTAIPEGTNGVEERMSVINDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIENLYPRK
5 LQLSGSAHCTFSTAQAIGKDNFTAIPEGTNGVEERMSVINDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIENLYPRK 511

GRIAVGSDSDLVIMWDPDAVKIVSAKHNQSVAEYNI FEGMELRGAPLVVICQGKIMLEDGNLHVTTQGAGRFIPC 471
1 GRIAVGSDSDLVIMWDPDAVKIVSAKHNQSVAEYNI FEGMELRGAPLVVICQGKIMLEDGNLHVTTQGAGRFIPC
2 GRIAVGSDSDLVIMWDPDAVKIVSAKHNQSVAEYNI FEGMELRGAPLVVICQGKIMLEDGNLHVTTQGAGRFIPC
3 GRIAVGSDSDLVIMWDPDAVKIVSAKHNQSVAEYNI FEGMELRGAPLVVICQGKIMLEDGNLHVTTQGAGRFIPC
4 GRIAVGSDSDLVIMWDPDAVKIVSAKHNQSVAEYNI FEGMELRGAPLVVICQGKIMLEDGNLHVTTQGAGRFIPC
5 GRIAVGSDSDLVIMWDPDAVKIVSAKHNQSVAEYNI FEGMELRGAPLVVICQGKIMLEDGNLHVTTQGAGRFIPC 584

SFFSDVYKRIKARIMADLHAVFRGMIDGFVFDLTTTPKGGTPAGSTRGSPTRNPFVVRNLHQSGFSLSGTQ 544
1 SFFSDVYKRIKARIMADLHAVFRGMIDGFVFDLTTTPKGGTPAGSTRGSPTRNPFVVRNLHQSGFSLSGTQ
2 SFFSDVYKRIKARIMADLHAVFRGMIDGFVFDLTTTPKGGTPAGSTRGSPTRNPFVVRNLHQSGFSLSGTQ
3 SFFSDVYKRIKARIMADLHAVFRGMIDGFVFDLTTTPKGGTPAGSTRGSPTRNPFVVRNLHQSGFSLSGTQ
4 SFFSDVYKRIKARIMADLHAVFRGMIDGFVFDLTTTPKGGTPAGSTRGSPTRNPFVVRNLHQSGFSLSGTQ
5 SFFSDVYKRIKARIMADLHAVFRGMIDGFVFDLTTTPKGGTPAGSTRGSPTRNPFVVRNLHQSGFSLSGTQ 657

VDEGVRASAKRIVAPPGRSNTSLS 570
1 VDEGVRASAKRIVAPPGRSNTSLS
2 VDEGVRASAKRIVAPPGRSNTSLS
3 VDEGVRASAKRIVAPPGRSNTSLS
4 VDEGVRASAKRIVAPPGRSNTSLS
5 VDEGVRASAKRIVAPPGRSNTSLS 683

```

Fig. 6 質量分析法により同定された各バンドの DRP-3 ペプチド配列
質量分析法により 95%以上の confidence で同定されたペプチド配列を緑色で呈した。DRP-3 isoform 2 の配列は灰色で示した。最上段には、参照のため DRP-3 isoform 1 の配列を示した。

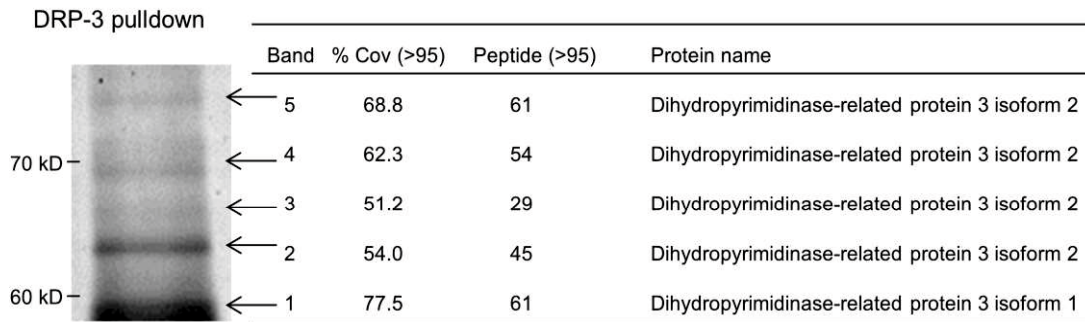


Fig. 7 質量分析法により同定された各バンドのタンパク質

グルタミン酸群網膜の抽出タンパク質を DRP-3 抗体を用いて pull-down assay し、溶離したタンパク質を SDS-PAGE ゲルで分離、Coomassie Brilliant Blue で染色した。各バンドを切り出し、ゲル内消化によりペプチドとし、質量分析法で同定した (n = 5)。

5.6 グルタミン酸により DRP-3、特に DRP-3 isoform 2 の mRNA 発現が上昇する

免疫沈降後の質量分析の結果 (Fig. 7)、ウエスタンブロットで対照群に比べより高強度を呈した DRP-3 の高分子バンド (Fig. 4A) は DRP-3 isoform 2 と同定された。この結果を受け、対照群と Glu 群とで DRP-3 の mRNA 発現量を比較した。Isoform 1 と 2 双方を含む総 DRP-3 の mRNA 発現は、対照群に比べ Glu 群で有意に上昇していた ($P < 0.01$, n = 6, Fig. 8A)。更に isoform 2 のみの DRP-3 の mRNA 発現量を調べたところ、対照群に比べ 6 倍以上の上昇がみられた (6.57-fold, $P < 0.01$, n = 3, Fig. 8B)。

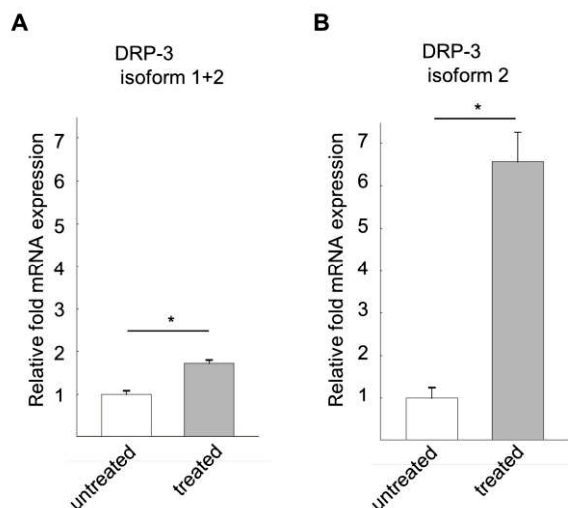


Fig. 8 対照群およびグルタミン酸群の DRP-3 mRNA 発現の比較

(A) 各群における DRP-3 (isoform 1 + isoform 2) mRNA の発現 (n = 6)。 (B) 各群における DRP-3 isoform 2 mRNA の発現 (n = 3)。P 値は、Student's *t*-test で算出した。* $P < 0.01$ 。

6. 考察

グルタミン酸により成熟網膜に神経前駆細胞 (neural progenitor cells; NPC)が誘導された [10, 17]。ラット *ex vivo* 網膜においてグルタミン酸による NPC 誘導時のタンパク質動態を 2 次元電気泳動に基づくプロテオーム解析を用いて行った結果、Glu 群で DRP-3、DRP-2 および STIP1 が有意に上昇していた。特筆すべきことに、DRP-3 の mRNA 発現が上昇し、特に DRP-3 isoform 2 が対照群に比べ 6 倍以上に上昇していた。

DRP (TOAD64/Ulip/CRMP) ファミリーは発育中の神経系に強く発現しており、軸索のガイダンスや伸長に関与している [34-36]。脊椎動物では現在、5 種類のサブタイプ (DRP1-5)が同定されている [37, 38]。そのうち、DRP-3 は中枢神経系の発達時に短期間発現し [30]、大人では海馬の限られた部位にのみ確認されている [39]。本研究においてもこれらの過去の報告と同じく、成熟したラット網膜には DRP-3 の発現はほとんどみられなかった (Fig. 4)。DRP-3 は、有糸分裂時に微小管のダイナミクスを調節し [40]、またヒト成人乳房上皮先駆細胞において幹細胞マーカーCK15 と結合する事が報告されている [41]。これらの報告から、本研究において DRP-3 は、NPC 誘導時の細胞周期制御にかかわっている可能性が示唆された。

いずれの DRP サブタイプにも 2 種の isoform、配列の短い isoform “a” (N 末端の一部欠損)および isoform “b”が存在する [32, 33]。DRP-3 isoform “b” (本文では isoform 2)の機能は十分に解明されていないが、Quinn らは、神経細胞成長円錐において小胞機能の制御および軸索伸張と分岐を促進すると報告した[32]。更に、本研究においてグルタミン酸で網膜に発現が上昇した STIP1 は heat shock protein 70 (Hsp70) および Hsp90 の co-chaperon としての機能の他 [42]、前述の DRP-3 isoform 2 同様プリオンタンパク質と協調し軸索伸長や神経タンパク質合成調整に関与することが知られている [43, 44]。以上より、グルタミン酸による NPC 誘導時には、STIP-1 および DRP-3 isoform 2 が神経突起生成の調整に関与している可能性が考えられた。

グルタミン酸は中枢神経系において主要な神経伝達物質であるが、過剰なグルタミン酸は細胞毒性を生じ、“excitotoxicity”と呼ばれている [15]。言い換えると、低濃度のグルタミン酸は興奮性シグナルのメディエーターとして脳機能を維持するが、高濃度で過剰になると細胞に致死的障害を引き起こす。一方、この中間濃度のグルタミン酸は、神経先駆細胞に対し、細胞増殖、生存や分化をコントロールするといった特異的な作用を呈することが報告されている [45-49]。実際、本研究においても、毒性水準下のグルタミン酸が成熟網膜に NPC を誘導した (Fig. 2)。グルタミン酸によるこの特異的な作用は、主に定常(basal)濃度と毒性(toxic)濃度との間の毒性水準下域で生じると思われるが、この作用域は種や組織あるいは年齢によって異なる可能性があると考えられる。また、グルタミン酸は、2つのタイプの受容体、すなわちイオンチャンネル型受容体と G タンパク質共役受容体である代謝型グルタミン酸受容体を通じて作用するが、いずれの受容体も NPC 増殖への関与が報告され

ている [14, 47, 48]。本実験において、いずれのサブタイプが関与したのかは不明であり、今後解明する必要がある。

7. 結語

Ex vivo ラット網膜においてグルタミン酸による神経前駆細胞誘導時、3種類のタンパク質 DRP-3、DRP-2 および STIP1 の発現量が上昇していた。更に、DRP-3 では特に isoform 2 の mRNA の発現が著明に上昇していた。今後、グルタミン酸がどのように DRP-3 の発現を調整しているのか、そして DRP-3 isoform 2 が NPC 誘導にどのように関与しているかを追及する必要がある。

8. 謝辞

本研究の遂行にあたりご指導いただきました山口大学大学院医学研究科眼科学園田康平教授、プロテオーム・蛋白機能制御学分野 中村和行名誉教授、藏満保宏准教授に深く感謝申し上げます。また、質量分析では、熊本大学生命科学研究部腫瘍学分野 荒木令江准教授、小林大樹博士、長山慈氏のご指導を賜りました。山口大学医学部大学院 プロテオーム・蛋白機能制御学分野の北川孝雄先生、Baron Byron 博士並びに教室員の皆様にはご協力、ご支援をいただき感謝申し上げます。

9. 参考文献

1. 石橋達朗：厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業網脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究. 平成 17 年度総括・分担研究報告書: 2006, pp. 263-267.
2. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965; 124: 319-335.
3. Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog Neurobiol.* 2003; 69: 49-69.
4. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, *et al.* Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000; 287: 2032-2036.
5. Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, *et al.* Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci.* 2001; 4: 1163-1164.
6. Coles BL, Angénioux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, *et al.* Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 15772-15777.
7. Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, Hughes EH, Rice CM, Halfpenny CA, *et al.* Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol.* 2005; 89: 102-106.
8. Klassen H, Ziaieian B, Kirov II, Young MJ, Schwartz PH. Isolation of retinal progenitor cells

- from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors. *J Neurosci Res.* 2004; 77: 334-343.
9. Fischer AJ, Reh TA. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol.* 2000; 220: 197-210.
 10. Takeda M, Takamiya A, Jiao JW, Cho KS, Trevino SG, Matsuda T, *et al.* alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Müller glia in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49: 1142-1150.
 11. Watkins JC. L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28: 297-309.
 12. LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron.* 1995; 15: 1287-1298.
 13. Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci.* 2000; 20: 5764-5774.
 14. Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M, Poulsen FR, Zimmer J. Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology.* 2005; 49 Suppl 1: 146-156.
 15. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969; 164: 719-721.
 16. Izumi Y, Kirby CO, Benz AM, Olney JW, Zorumski CF. Müller cell swelling, glutamate uptake, and excitotoxic neurodegeneration in the isolated rat retina. *Glia.* 1999; 25: 379-389.
 17. Fischer AJ, Reh TA. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci.* 2001; 4: 247-252.
 18. Tokuda K, Zorumski CF, Izumi Y. Involvement of illumination in indocyanine green toxicity after its washout in the ex vivo rat retina. *Retina.* 2009; 29: 371-379.
 19. Tokuda K, Tsukamoto T, Fujisawa S, Matsubara M. Evaluation of toxicity due to vital stains in isolated rat retinas. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004; 82: 189-194.
 20. Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.* 2002; 30: 524-533.
 21. Kuramitsu Y, Harada T, Takashima M, Yokoyama Y, Hidaka I, Iizuka N, *et al.* Increased expression and phosphorylation of liver glutamine synthetase in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Electrophoresis.* 2006; 27: 1651-1658
 22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
 23. Kuramitsu Y, Miyamoto H, Tanaka T, Zhang X, Fujimoto M, Ueda K, *et al.* Proteomic

- differential display analysis identified upregulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human malignant pleural mesothelioma cell lines. *Proteomics*. 2009; 9: 5078-5089.
24. Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, Morikawa T, Nagayama M, Midorikawa U, *et al.* Integrated proteomics identified novel activation of dynein IC2-GR-COX-1 signaling in neurofibromatosis type I (NF1) disease model cells. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12: 1377-1394.
 25. Shilov IV, Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, *et al.* The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6: 1638-1655.
 26. Kobayashi D, Kumagai J, Morikawa T, Wilson-Morifuji M, Wilson A, Irie A, *et al.* An integrated approach of differential mass spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8: 2350-2367.
 27. Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, *et al.* Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem*. 1999; 274: 25543-25549.
 28. Xu S, Sunderland ME, Coles BL, Kam A, Holowacz T, Ashery-Padan R, *et al.* The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol*. 2007; 304: 713-721.
 29. Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995; 84: 109-129.
 30. Wang LH, Strittmatter SM. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci*. 1996; 16: 6197-6207.
 31. Horiuchi M, El Far O, Betz H. Ulip6, a novel unc-33 and dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain. *FEBS Lett*. 2000; 480: 283-286.
 32. Quinn CC, Chen E, Kinjo TG, Kelly G, Bell AW, Elliott RC, *et al.* TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J Neurosci*. 2003; 23: 2815-2823.
 33. Yuasa-Kawada J, Suzuki R, Kano F, Ohkawara T, Murata M, Noda M. Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur J Neurosci*. 2003; 17: 2329-2343.
 34. Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*. 1995; 376: 509-514.
 35. Byk T, Ozon S, Sobel A. The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties. *Eur J Biochem*. 1998; 254: 14-24.
 36. Quinn CC, Gray GE, Hockfield S. A family of proteins implicated in axon guidance and

- outgrowth. *J Neurobiol.* 1999; 41: 158-164.
37. Byk T, Dobransky T, Cifuentes-Diaz C, Sobel A. Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product. *J Neurosci.* 1996; 16: 688-701.
 38. Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, Kawachi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, *et al.* Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem.* 2000; 275: 37957-37965.
 39. Minturn JE, Fryer HJ, Geschwind DH, Hockfield S. TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a *C. elegans* gene involved in axon outgrowth. *J Neurosci.* 1995; 15: 6757-6766.
 40. Ong Tone S, Dayanandan B, Fournier AE, Mandato CA. GSK3 regulates mitotic chromosomal alignment through CRMP4. *PLoS One.* 2010; 5: e14345. doi: 10.1371/journal.pone.0014345.
 41. Moreira JM, Cabezón T, Gromova I, Gromov P, Timmermans-Wielenga V, Machado I, *et al.* Tissue proteomics of the human mammary gland: towards an abridged definition of the molecular phenotypes underlying epithelial normalcy. *Mol Oncol.* 2010; 4: 539-561.
 42. Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem.* 1998; 273: 3679-3686.
 43. Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, *et al.* Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 2005; 25: 11330-11339.
 44. Roffé M, Beraldo FH, Bester R, Nunziante M, Bach C, Mancini G, *et al.* Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 13147-13152.
 45. Luk KC, Kennedy TE, Sadikot AF. Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. *J Neurosci.* 2003; 23: 2239-2250.
 46. Brazel CY, Nuñez JL, Yang Z, Levison SW. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience.* 2005; 131: 55-65.
 47. Di Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, *et al.* Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 1124-1133.
 48. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci.* 2006; 24: 645-653.
 49. Castiglione M, Calafiore M, Costa L, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A. Group I metabotropic glutamate receptors control proliferation, survival and differentiation of cultured neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of adult mice. *Neuropharmacology.* 2008;

55: 560-567.