

平成21年 5月26日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700360
 研究課題名 (和文) カテコールアミン神経細胞の分化・生存における ATF-2 の機能と役割の解明
 研究課題名 (英文) Role of ATF-2 in differentiation and survival of catecholaminergic neurons
 研究代表者
 鈴木 崇弘 (SUZUKI TAKAHIRO)
 愛知学院大学・歯学部・講師
 研究者番号：70298545

研究成果の概要：

カテコールアミン (ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン) は脳の高度な機能を発揮する上で重要な神経伝達物質であり、中心的な合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) によって量が調節されている。胎生期の ATF-2 欠損マウスを解析した結果、転写因子 ATF-2 が脳の正常な TH 遺伝子発現に必須であることと、パーキンソン病との関連性を明らかにした。また、神経の発達や生存に重要と考えられる ATF-2 のリン酸化修飾部位を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

研究分野：細胞内情報伝達

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経化学・神経薬理学

キーワード：カテコールアミン、チロシン水酸化酵素、転写因子、ATF-2、神経発達

1. 研究開始当初の背景

(1) チロシン水酸化酵素 (Tyrosine hydroxylase, TH) は、カテコールアミン生合成の律速酵素である。これまで、培養細胞を用いた研究によって、TH の発現調節機構が精力的に解析されてきた。TH 遺伝子発現調節領域は cAMP 応答配列 (CRE) と AP-1 結合配列を有しており、ATF/CREB および AP-1 転写因子ファミリーによる TH 遺伝子発現が明らかにされてきた。特に、CREB と c-Fos は、TH 発現を活性化する因子として比較的詳細に

研究されてきた。これまでに研究代表者は、神経発達関連分子 V-1/Myotrophin 過剰発現細胞において、リン酸化型 ATF-2 による CRE の転写活性化を介した TH 発現誘導を報告している (Suzuki T, et al., J. Biol. Chem. 277: 40768-40774, 2002)。しかしながら、ATF-2 による TH 発現誘導機構は、ほとんど明らかにされていない。

(2) 転写因子 ATF-2 は脳に豊富に存在する CRE 結合タンパク質として同定されている。

ATF-2 は、CRE にホモダイマーまたは c-Jun とのヘテロダイマーとして結合することや、AP-1 配列にも結合することが示されている。ATF-2 転写活性は、Thr^{69/71}リン酸化により上昇することが示されており、JNK や p38MAP キナーゼがリン酸化実行分子として同定されている。CRE 転写活性は、神経細胞の分化、可塑性、生存を制御することが数多く報告されているのに対して、ATF-2 の Thr^{69/71}リン酸化はアポトーシス（細胞死）において主に報告されている。従って、ATF-2 は、神経の生存分化と細胞死の両方を制御すると考えられる。ATF-2 には、単なる CRE 転写活性化因子としての機能以上に、細胞の分化生存と細胞死という、相反する両方の細胞機能を制御するための未知の分子機構が隠されていると考えられる。ATF-2 のリン酸化が神経細胞の分化生存を導くためには、Thr^{69/71}リン酸化以外の何らかの制御機構が存在する可能性が考えられた。ATF-2 Thr^{69/71}のリン酸化は、分化生存シグナルに特徴的な MEK-ERK キナーゼ経路によっても実行されることが報告されており、神経栄養因子は MEK-ERK シグナル伝達経路を介して神経分化を制御する。以上から、MEK-ERK シグナル経路による ATF-2 の修飾に、ATF-2 が分化生存シグナル分子として機能するための鍵があると考えられた。

(3) ATF-2 ノックアウトマウス (KO, ホモ欠損型) は、胎便吸引不全によって生後すぐに死亡するが、E18.5 全脳における TH の mRNA 量は、野生型と比較して 20 倍以上の増大が報告されている (Maekawa M, et al., JBC 1999)。E18.5 ATF-2 欠損マウスでは胎盤形成不全による低酸素状態が起きているが、ATF-2 欠損以外の方法で低酸素状態、胎盤形成不全を誘発した他の研究報告において、胎生後期における TH 発現に大きな変化は報告されていない。以上から、ATF-2 欠損による直接的な要因が TH mRNA の上昇を引き起こすと考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題は、ATF-2 KO マウスと ATF-2 新規リン酸化部位の解析を通じて、カテコールアミン神経の分化・生存における ATF-2 の役割とその分子機能を同定するものである。

(1) 第一に、胎生期の ATF-2 KO マウスの脳の解析を進め、ATF-2 がカテコールアミン神経の正常な分化発達において必須な因子であることを明らかにする。特に、TH を含むカテコールアミン合成酵素の組織染色を、胎盤形成異常が観察されない E14.5 と、TH 発現の変化が劇的と推定される E18.5 で比較検討を行い、黒質-線条体中脳ドーパミン神経を含めた、脳内に分布する多様なカテコールアミ

ン神経それぞれの分化発達における、ATF-2 の必要性を明らかにする。

(2) 第二には、カテコールアミン神経分化生存における、Thr^{69/71}以外のリン酸化部位を同定する。Thr^{69/71}以外の ATF-2 タンパク質上の MAPK リン酸化モチーフのうち、質量分析によって細胞内で実際にリン酸化を受ける報告がなされているのは、Ser⁹⁰と Ser¹¹²残基であった。Ser⁹⁰のリン酸化は各種刺激で変化しないことを示す報告が複数あるが、Ser¹¹²リン酸化はアポトーシス誘導処理で変化しないことを示す報告が 1 例あるのみであり、リン酸化の予測プログラムでは ERK によるリン酸化を受ける可能性が高い残基である。このような背景から、Ser¹¹²残基に着目し、独自のツールとして ATF-2 Ser¹¹²残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を作出した。この特異抗体を利用して、神経栄養因子による Ser¹¹²のリン酸化上昇を示す予備的データを得ており、Ser¹¹²リン酸化部位と神経分化シグナルとの関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ATF-2 KO マウスを用いたカテコールアミン合成酵素群の発現解析

ATF-2 ホモ欠損型マウスは理化学研究所石井俊輔博士らの研究グループにより作出されたものを用いた (Maekawa M, et al. J. Biol. Chem. 274:17813-17819, 1999)。E18.5 および胎盤形成不全の起きていない E14.5 の脳切片において、TH およびその他のカテコールアミン合成酵素群の免疫組織染色を行い、野生型と ATF-2 ホモ欠損型を詳細に比較することで、ATF-2 KO マウスにおける、脳に分布するそれぞれのカテコールアミン神経の発達異常を同定する。また、同様の組織染色を末梢の交感神経でも行い、異常の有無を調べる。さらに、HE 染色等を行って、神経細胞自体の形態異常の有無を調べる。

(2) 神経栄養因子による ATF-2 Ser¹¹²リン酸化に関する解析

ATF-2 総タンパク質・Ser¹¹²リン酸化抗体を利用したウェスタンブロット解析および蛍光抗体染色解析を行い、神経栄養因子 (NGF) による ATF-2 Ser¹¹²リン酸化の制御機構と細胞内局在を解析する。その際、細胞内局在解析においては、ミトコンドリア、小胞体などのマーカー抗体・蛍光色素を用いて、Ser¹¹²リン酸化が亢進する画分を同定する。リン酸化シグナル機構の解析においては、キナーゼ阻害剤を用いた解析を行なう。また、Ser¹¹²リン酸化に対するアポトーシス誘導刺激との比較を行い、神経分化における特異性について解析する。

4. 研究成果

(1) ATF-2 欠損マウスの脳橋・延髄における TH の発現上昇

ATF-2 による脳の TH 遺伝子転写制御を検討するため、胎生期の ATF-2 KO マウス（ホモ欠損型）における TH および他のカテコールアミン合成酵素の発現について詳細な解析を行った。

ATF-2 欠損マウス E18.5 延髄の連続切片において、野生型に比べて TH の免疫反応性は著しく上昇していた（図 1）。C1 および C2 領域に存在するアドレナリン神経においては、TH の発現上昇が認められた。また、大縫線核（RM）においては異所的な TH 免疫反応性が認められた。その一方で、これらの領域におけるドーパミン酸化酵素（AADC）の免疫反応性を解析した結果、有意な変化は認められなかった。

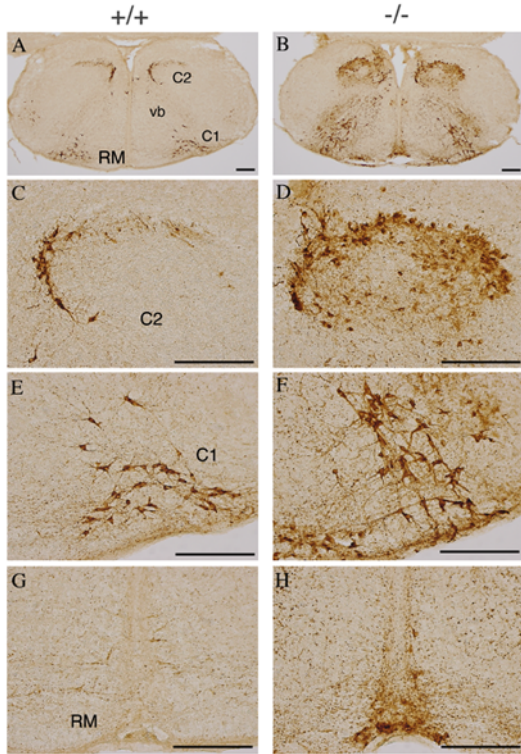


図 1 E18.5 野生型(+/+)および ATF-2 欠損(-/-)マウス延髄における TH の免疫染色。 図 C-H は、図 A, B の拡大像。スケールバーは 200 μm

ATF-2 欠損マウスでは E18.5 において胎盤の細胞栄養芽層が減少していることが報告されており、胎盤機能不全による胎生マウスの低酸素状態が起っている可能性がある。そこで、胎盤形成不全が認められない E14.5 ATF-2 欠損マウスにおいて、TH 発現の解析を行なった。その結果、E14.5 においても TH の発現は ATF-2 欠損型で顕著に上昇しており（図 2）、TH 免疫反応性の上昇は、胎盤形成不全による二次的なものではないと考えられた。

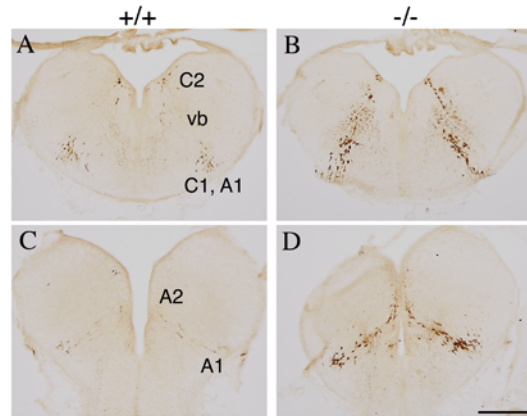


図 2 E14.5 野生型(+/+)および ATF-2 欠損(-/-)マウス延髄における TH の免疫染色。 C2, C2 アドレナリン神経細胞体; vb, 腹側ノルアドレナリン線維束; C1, C1 アドレナリン神経細胞体; A2, A2 ノルアドレナリン神経細胞体; A1, A1 ノルアドレナリン神経細胞体。スケールバーは 400 μm

E18.5 ATF-2 欠損マウス脳橋の連続切片においては、野生型に対する顕著な差異が認められた（図 3）。

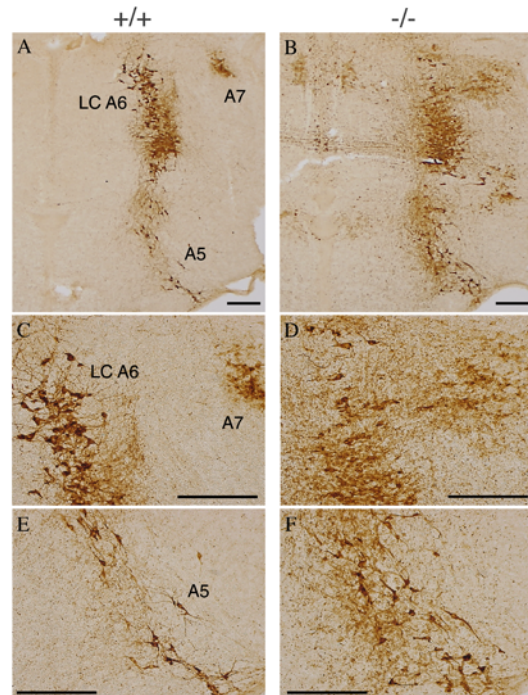


図 3 E18.5 野生型(+/+)および ATF-2 欠損(-/-)マウス脳橋における TH の免疫染色。 LC, 青斑核; A5-7, A5-7 ノルアドレナリン神経細胞体。 図 C-F は、図 A, B の拡大像。スケールバーは 200 μm

TH 免疫反応性はノルアドレナリン神経の細胞体から神経繊維の存在するすべての領域に分散していた。A5、青斑核（LC）A6、A7 ノルアドレナリン神経において、ドットまたはスポット状の TH 免疫反応性が細胞体の周囲で上昇していた。特に、青斑核 A6 ノルア

ドレナリン神経では、神経線維における TH 免疫反応性は消失していた。脳橋と延髄と同様に AADC の免疫反応性には変化は無かった。E14.5 においては、青斑核における TH 免疫反応性の上昇が起っていた (図 6)。

以上の結果から、ATF-2 欠損は延髄や脳橋など脳の尾側で TH の発現を増大させることが明らかとなった。また、TH に対して補酵素テトラヒドロピオプテリンを供給する酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH) は、TH と同様な遺伝子発現制御を受けることが多いが、ATF-2 欠損マウスにおいて GCH 免疫応答性は AADC 同様に有意な変化が無かったことから、ATF-2 は TH の正常な発現にとって重要であるが、他のカテコールアミン合成酵素群にとっては重要でないと考えられた。

(2) ATF-2 欠損マウスにおける中脳の TH 発現異常

A9 および A10 ドーパミン神経の細胞体が存在する黒質緻密部 (SNC) と腹側被蓋野 (VTA) を含む中脳の連続切片では、E18.5 ATF-2 欠損マウスにおける TH 免疫反応性の異常が以下のように認められた (図 4, 5) : 1) A10 背側の吻側神経 (A10dr) と尾側神経 (A10dc) においては、ドーパミン神経の細胞体における TH 免疫反応性が著しく減少していた。2) SNC A9 においては神経線維の免疫性が消失または著しく減少していた。3) A10dc 神経に対して腹側の部位に異所性の TH 免疫応答性が認められた。E14.5 では SNC、VTA 共に大きな変化は無かったが、A10dc 神経の消失は認められた (図 6)。その一方で、嗅球における TH 発現に変化はなかった。

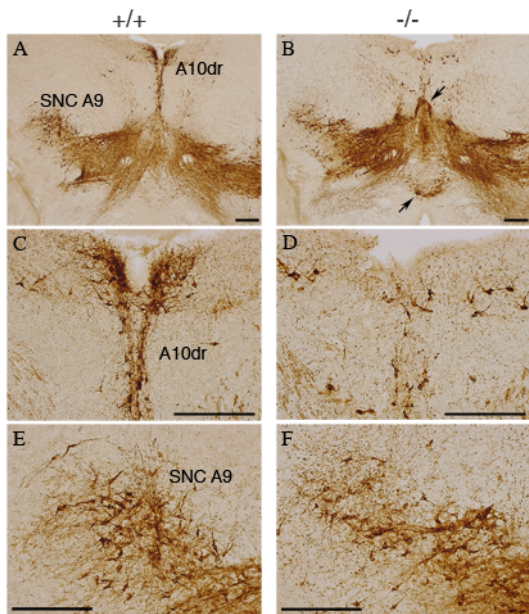


図 4 E18.5 野生型 (+/+) および ATF-2 欠損 (-/-) マウス吻側中脳における TH の免疫染色。図 E-F は、図 A、B の拡大像。スケールバーは 200 μm

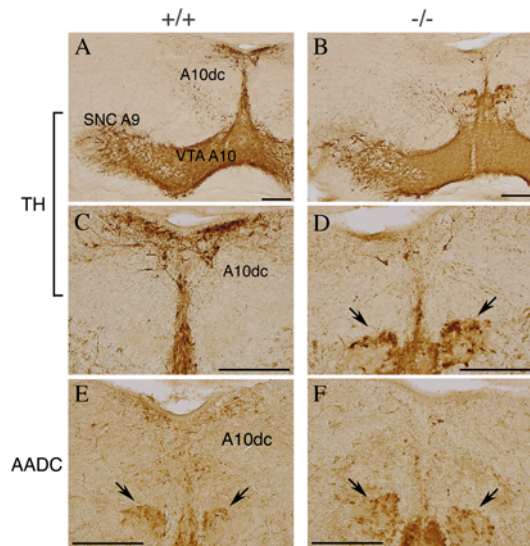


図 5 E18.5 野生型 (+/+) および ATF-2 欠損 (-/-) マウス背側中脳における TH および AADC の免疫染色。図 E、F は、図 C、D の近接切片。スケールバーは 200 μm

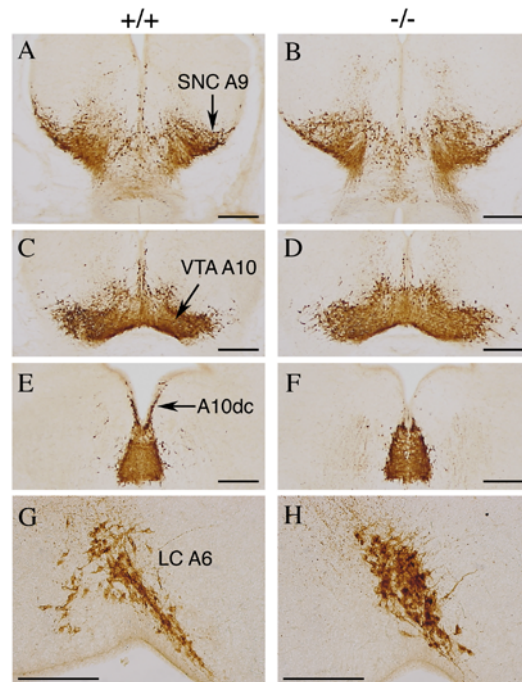


図 6 E14.5 野生型 (+/+) および ATF-2 欠損 (-/-) マウス中脳における TH の免疫染色。スケールバーは 200 μm

中脳ドーパミン神経の神経終末が存在する線条体では、E14.5 と E18.5 共に ATF-2 欠損マウスにおける TH 免疫反応性の有意な減少が認められた (図 7, 8)。ATF-2 欠損マウス中脳および線条体における AADC の免疫応答性は、延髄や脳橋と異なり、TH の場合と同様の異常を示した (図 5, 7)。以上の結果から、ATF-2 欠損は、胎生後期の黒質-線条体ド

ーパミン神経において、神経終末の減少を引き起こすことが明らかとなった。神経終末の減少や神経線維の分解は、神経細胞死に先行して起るものであり、ATF-2 は、発達期における黒質-線条体ドーパミン神経の生存に必須である可能性が考えられた。

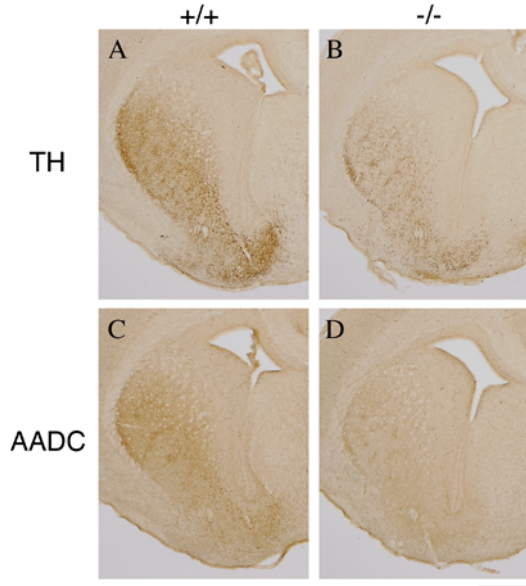


図7 E18.5 野生型(+/+)およびATF-2欠損(-/-)マウス線条体におけるTHおよびAADCの免疫染色。スケールバーは400 μm

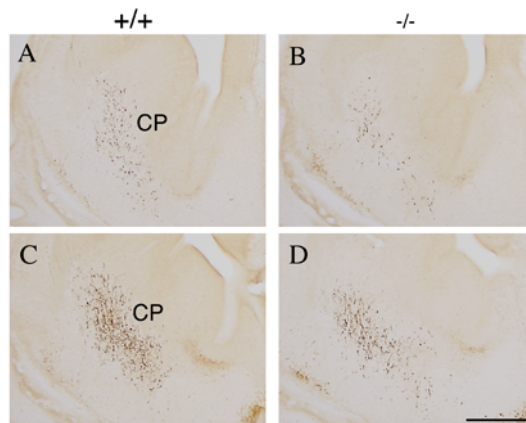


図8 E14.5 野生型(+/+)およびATF-2欠損(-/-)マウス線条体におけるTHおよびAADCの免疫染色。スケールバーは400 μm

(3) ATF-2欠損マウスにおけるTH陽性末梢神経終末の減少

線条体ドーパミン神経と同様に、末梢神経系のノルアドレナリン神経においても、褐色脂肪組織と心臓に投射する交感神経終末が減少していた。また、脳橋・延髄でもTHの発現上昇の他に神経繊維の減少が起ってお

り、ATF-2 は多くのカテコールアミン神経にとって、神経繊維の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

(4) ATF-2欠損マウス全脳におけるカテコールアミン量の変化

ATF-2欠損マウスでは、様々な部位でTHおよびAADCの発現量、局在に異常が見られたことから、E18.5全脳におけるカテコールアミン量の変化を調べた。その結果、ドーパミン量に有意な変化は無かったが、ノルアドレナリン量は僅かではあるが、有意な増大が認められた(図9)。青斑核などのノルアドレナリン神経におけるTHの発現増大がその原因として考えられた。

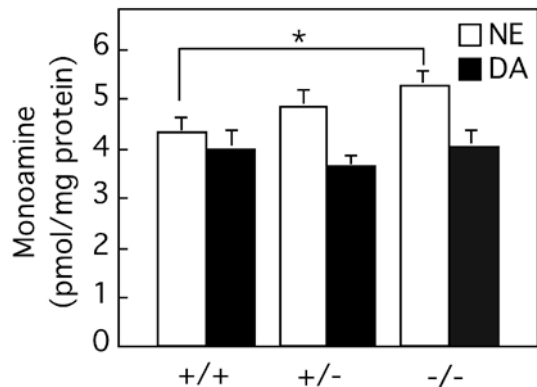


図9 E18.5 野生型(+/+)およびATF-2欠損(-/-)マウス全脳におけるノルアドレナリン(NA)およびドーパミン(DA)量。* $p < 0.05$ (Student's T検定)

(5) ATF-2欠損マウス解析結果に全般に基づく知見

胎生期におけるATF-2欠損マウスのカテコールアミン神経は、THの発現異常に加えて、神経突起の進展に異常があることを見出した。カテコールアミン神経のTH発現と神経突起伸長を適正に行うためには、ATF-2が必須であると考えられた。

脳全体の連続切片の解析から、ATF-2欠損の影響は脳の尾側(caudal)で顕著であり、頭側(rostral)に向かって徐々に影響が減少することが示された。また、胎盤形成不全が認められないE14.5からATF-2欠損によるTH発現異常は観察されることから、低酸素などの二次的要因がE18.5におけるTH発現異常の要因ではないと考えられた。

我々は以前、ATF-2はリン酸化を受ける事でTH遺伝子の転写活性を増大させることを明らかにした。また最近、ATF-2は転写抑制因子として機能することが報告されている。今回のデータから、ATF-2が非リン酸化型ではTH遺伝子の転写においてリプレッサーとして機能し、リン酸化によって活性化された

ATF-2がTHの発現誘導を生体レベルでも行う可能性が高いと考えられた。

神経栄養因子 (NGF、BDNF、GDNF など) や TGF- β のサブタイプはカテコールアミン神経の分化発達に必須であり、ATF-2 をリン酸化/活性化することが知られている。特に、中脳ドーパミン神経において、BDNF、GDNF、TGF- β は発達に必須であることや、パーキンソン病での減少が報告されている。また、中脳ドーパミン神経分化過程における ATF-2 の活性化も報告されている。今回の研究結果は、パーキンソン病との関連において、未だ明確でないドーパミン神経分化発達における ATF-2 リン酸化機構を明らかにすることの重要性を提起した。

(6) 神経栄養因子による ATF-2 新規リン酸化部位の同定

神経栄養因子や TGF- β のサブタイプはカテコールアミン神経の分化発達に必須であり、ATF-2 をリン酸化/活性化することが知られている一方で、ATF-2 のリン酸化はアポトーシスの指標とされ、神経細胞死を誘起するとされている。そこで、神経の分化発達に特異的な ATF-2 リン酸化機構の探索を行った。分化生存および細胞死の両シグナルにおいて共通な転写活性化部位 Thr^{69/71} 以外で、分化生存シグナルとして機能する MEK-ERK シグナルでリン酸化されるモチーフのうち、Ser¹¹² に着目して解析を行った。Ser¹¹² リン酸化抗体を作出し、PC12D 細胞におけるウェスタンブロット解析を行った結果、Ser¹¹² リン酸化は神経成長因子 (NGF) 刺激で亢進した。Ser¹¹² リン酸化抗体の特異性は、ATF-2 総タンパク質に対する免疫沈降実験ならびに ATF-2 過剰発現実験で確認した。NGF による Ser¹¹² リン酸化は MEK 阻害剤でほぼ完全に抑制された。また、Ser¹¹² リン酸化は、アポトーシス刺激ではほとんど誘導されなかった。さらに、NGF 刺激により Thr^{69/71} リン酸化が核内で一過性に亢進するのに対し、Ser¹¹² リン酸化は、核外膜画分で持続的に誘導された。また蛍光抗体染色解析においては、NGF 刺激によって Thr^{69/71} リン酸化が核内で亢進するのに対して、Ser¹¹² リン酸化は核外に点在して亢進することを示すデータを得た。これらの結果は、Ser¹¹² リン酸化は、ATF-2 が分化生存シグナル分子として機能するための重要な機構である可能性を示唆しており、また核外の膜組織に局在する可能性を示唆している。以上の結果から、神経分化・生存を制御する転写因子の核外機能という新しい分子機構が存在する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kojima M, Suzuki T, Maekawa T, Ishii S, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Ichinose H. Increased Expression of Tyrosine Hydroxylase and Anomalous Neurites in Catecholaminergic Neurons of ATF-2 Null mice. *Journal of Neuroscience Research* 86, 544-552, (2008) 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 崇弘 (SUZUKI TAKAHIRO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70298545