

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790052
 研究課題名（和文） RPEL/Phactr バリエーションの機能解析：細胞形態と核内情報との関わり
 研究課題名（英文） Functional analysis of RPEL/Phactr variants: relationship between cell shape and nuclear information

研究代表者

田淵 明子 (TABUCHI AKIKO)
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授
 研究者番号：40303234

研究成果の概要：神経突起などの「かたち」の変化は、記憶学習の基盤と考えられている。申請者らは、「かたち」をコントロールするアクチン細胞骨格に結合する性質と、遺伝子を制御する性質の両方を持つ分子群[megakaryoblastic leukemia (MKL) と Phactr]に焦点を当てた研究を行った。神経細胞は、樹状突起と軸索という特徴的なかたちを持っているが、本研究結果から、MKL は主に樹状突起形態を、Phactr は軸索形態をコントロールしている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：serum response factor, megakaryoblastic leukemia, phactr, siRNA, transcription factor, 大脳皮質ニューロン

1. 研究開始当初の背景

神経突起やシナプスの形態変化は、神経回路網構築や再編成に不可欠な記憶学習の基盤である。近年、形態変化に寄与する分子群の機能解析がなされてきたが、その多くがアクチンなどの細胞骨格系タンパク質と相互作用するという共通の性質を有している。申請者らは、そのなかでもアクチン結合モチーフ RPEL (コンセンサス配列 RPXXXEL) を有する分子群 (総称：RPEL ファミリー) に着目している。

RPEL ファミリーは、総じて細胞の「かたち」に影響を及ぼす性質があり、転写コアクチベーターとしての機能も兼ね備えた MAL (megakaryocytic acute leukemia) ファミリーと Phactr (phosphatase and actin regulator) ファミリーとに大別される。MAL ファミリーは、SRF (serum response factor) に結合し、転写を活性化する。申請者らは、すでに MAL ファミリーが Rho-アクチン動態の活性化で核移行すること、大脳皮質ニューロンを用いた解析で樹状突起の形成あるいは

維持に必要であることを明らかにしている。また、脳の発生が進むにつれて MAL mRNA の発現上昇が認められること、MAL が樹状突起上に点状クラスターを形成していること、脳由来神経栄養因子 BDNF で MAL リン酸化が促進されること、そして突起上を輸送される可能性を示している。以上の研究成果は、MAL ファミリーには神経突起形態と遺伝子発現とをリンクさせるユニークな機能が備わっていることを示唆している。しかしながら、もう一つの RPEL ファミリー、Phactr ファミリーの解析は遅れている。Phactr は、脳に高発現するタイプのものや神経シナプスへの局在が報告されているものなどがあり、細胞株への過剰発現により細胞の「かたち」を変化させる（フィロポディア様、ラメリポディア様）ことが海外研究者により報告されている。また、一部の Phactr ファミリーメンバーは核に存在するなど、核内情報制御にも関与する可能性がある。以上の背景は、MAL ファミリーのみならず、RPEL ファミリー全体が「かたちと遺伝子発現をリンクさせる共通の仕組み」を有している可能性を示唆する

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで行った研究成果を発展させる（MAL ファミリーと Phactr ファミリーの相互関係をさぐる）ため、最初に Phactr ファミリーのクローニングと機能解析を行う。これは最初の到達目標であり、RPEL ファミリー全体の基本的性質を正確に、そして着実に理解することを意味する。そして、Phactr ファミリーが惹起する神経系特有の生命現象（樹状突起や軸索の形態変化）に関する分子レベルの解析に取り組む。（具体的には、神経形態における役割を細胞生物学的に解析したり、遺伝子発現レベルの研究を分子生物学的に遂行したりする。）そして、これまで解析されていなかった MAL ファミリーとの相互関係について明らかにする予定である。

この達成目標は、今後個体レベルの実験を遂行していくための基礎的情報を得る、という点でも必要不可欠である。後半では、具体的現象として、神経回路構築に不可欠な細胞移動と神経突起形態制御を念頭に置いた解析を個体レベルの実験も含めて実行する予定である。

3. 研究の方法

(1) Phactr ファミリーのクローニングと機能解析。

①研究目的の項でも述べたが、最も重要なことは、MAL ファミリーと Phactr ファミリーと

の相互関係を調べるための「土台」づくりを着実にやることである。最初に、脳神経系において発現している Phactr ファミリーのクローニングに取り組む。これは、現在4つ知られている Phactr メンバーのスプライスバリエーションを含めてクローニングする。クローニング戦略としては、RPEL モチーフをコードする配列をプライマーとした部分 cDNA クローンを得たあと、RACE 法による全長クローニングを行うという常法に則る。

②その後、in situ hybridization あるいはリアルタイム PCR 解析により、それぞれのバリエーションの脳内発現部位や発現量に関する基本的情報を得る。具体的には、マウスあるいはラットの脳切片を作製し、ラジオアイソトープラベルしたプローブにより、in situ hybridization を行う。リアルタイム PCR 解析は、脳の各領域から RNA を調製する必要がある。海馬、大脳皮質、線条体、小脳から組織を採取し、凍結させたものをポルトロンホモジナイザーで粉碎し、RNA を採取する。リアルタイム PCR には、CyberGreen 蛍光色素を用いる。

③次に、機能解析ツールとして有用となるタグ付き発現ベクターの構築を行う。タグとしては、FLAG, myc, HA などを用いることとする。

その後は、具体的な細胞内局在部位、細胞形態への影響、転写への影響などの機能解析に移る。前述した発現ベクターを NIH 3T3 細胞などの細胞株に導入し、細胞内局在部位（細胞質あるいは核）、細胞形態（フィロポディア、ラメリポディアの形成の有無など）を調べる。MAL ファミリーは、SRF の転写コアクチベーターとして機能するため、Phactr バリエーションがその機能性に影響を与えるかどうかアッセイする（SRF レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイによる）。また、申請者らは、Banker らの方法に基づいた海馬ニューロンの長期培養法を導入することで、シナプス形態を効果的に観察する方法を既に試みており、現在、ほぼ確立するに至っている。したがって、細胞株のみならず、ニューロンを用いた細胞内局在の詳細（細胞質と核のみならず、樹状突起のスパインあるいは軸索末端にいたる局在）を調べることが可能である。

4. 研究成果

2007 年度においては、ラットおよびマウスの海馬 cDNA ライブラリーから Phactr3 オルソログのクローニングを行った。そして、HA タグ付き発現ベクターにサブクローニングを行った。そして、NIH3T3 細胞にそれら発現ベクターを導入し、免疫染色による形態観

察および SRF レポーターアッセイを行った。その結果、NIH3T3 細胞がフィロポディア様突起を形成するなどの形態変化が起こることが明らかとなった。また、SRF レポーターアッセイの結果から、若干の SRF 転写活性化能を持つことが明らかとなった。

つぎに、2008 年度では、培養大脳皮質ニューロンに HA タグ付き発現ベクターを遺伝子導入して機能を解析した。その結果、初代培養ニューロンでは、Phactr3 の過剰発現が認められないこと (HA タグ付き発現ベクター導入後の HA positive neuron が確認されないことから) が判明した。内在性の Phactr3 mRNA およびタンパク質の発現は、他研究グループおよび申請者からも確認していること尾から、何らかの発現制御システムが存在している可能性が考えられた。しかしながら、preliminary な data ではあるが、HA-Phactr3tpGFP を同時に導入したニューロンでは、軸索に相当すると考えられる神経突起が異常に伸長している現象が観察された。RPEL ファミリーのもう一つのメンバーである MKL ファミリーは、樹状突起形態に関与していることをふまえると、同じ RPEL モチーフを有していても MKL は樹状突起形態、Phactr は軸索形態という役割分担がなされている可能性がある。

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 4 件)

- (1) Takasaki, I., Takarada, S., Tatsumi, S., Azegami, A., Yasuda, M., Fukuchi, M., Tabuchi, A., Kondo, T., Tabuchi, Y. and Tsuda, M. Extracellular adenosine 5'-triphosphate elicits the expression of brain-derived neurotrophic factor exon IV mRNA in rat astrocytes. *Glia* 56: 1369-1379 (2008).
- (2) Tabuchi, A. Synaptic plasticity regulated gene expression: a key event in the long-lasting changes of neuronal function. *Biol. Pharm. Bull* 31: 327-335 (2008).
- (3) Yasuda, M., Fukuchi, M., Tabuchi, A., Kawahara, M., Tsuneki, H., Azuma, Y., Chiba, Y. and Tsuda, M. Robust stimulation of TrkB induces delayed increases in BDNF and Arc mRNA expressions in cultured rat cortical neurons via distinct mechanisms. *J. Neurochem.* 103: 626-636 (2007).
- (4) Ishimaru, N., Tabuchi, A., Hara, D., Hayashi, H., Sugimoto, T., Yasuhara, M.,

Shiota, J. and Tsuda, M. Regulation of neurotrophin-3 gene transcription by Sp3 and Sp4 in neurons. *J. Neurochem.* 100: 520-531 (2007).

[学会発表] (計 26 件)

- (1) Fukuchi M., Watanabe S., Takasaki I., Tabuchi A. and Tsuda M.: Activity-dependent cascade of gene expression regulated by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in neurons. Neuroscience 2008 (The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2008, 11, 15-19, Washington D. C., USA
- (2) 福地守, 二井卓哉, 南野恵, 高崎一朗, 田淵明子, 津田正明: 遺伝子発現異常による興奮性・抑制性不均衡化と脳・神経機能発達障害との関連. 日本薬学会第128年会, 2008, 3, 26-28, 横浜
- (3) 石川充*, 西嶋直紀, 阪上洋行, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合性転写因子 MKL2 の突起形成と遺伝子発現における機能解析. 第31回日本神経科学大会, 2008, 7, 9-11, 東京
- (4) 津田正明, 福地守, 二井卓哉, 南野恵, 原大智, 高崎一朗, 田淵明子. ハルプロ酸によるヒストンアセチル化を介した神経興奮性・抑制制関連遺伝子の発現制御. 第31回日本神経科学大会, 2008, 7, 9-11, 東京
- (5) 福地守, 田淵明子, 津田正明. 3' 非翻訳領域を介した脳由来神経栄養因子 BDNF mRNA の安定化機構の解析. 第31回日本神経科学大会, 2008, 7, 9-11, 東京
- (6) 福地守, 渡邊信次郎, 高崎一朗, 田淵明子, 津田正明: 下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド PACAP により誘導される神経活動依存的な遺伝子発現カスケードに関する解析. 第51回日本神経化学学会大会, 2008, 9, 11-13, 富山
- (7) 袴田知之*, 野村未希, 石川充, 塩田惇, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合性転写活性化因子 MKL1 のスプライスバリエントの機能解析. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), 2008, 12, 9-12, 神戸.
- (8) Fukuchi M., Shimotori M., Tatsumi S., Tabuchi A. and Tsuda M.: Transcriptional activation of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) gene regulated by brain-derived

- neurotrophic factor (BDNF) in neurons. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), 2008, 12, 9-12, 神戸
- (9) Fukuchi M., Nii T., Minamino A., Takasaki I., Tabuchi A. and Tsuda M.: Valproic acid regulates the expression of excitatory or inhibitory neuron-related gene through histone acetylation. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), 2008, 12, 9-12, 神戸
- (10) 田淵明子: アクチン結合モチーフを有する転写コアクチベーターMKLによる神経形態制御. 遺伝情報DECODE・転写研究会共催冬のワークショップ, 2007, 1, 25-27, 湯沢
- (11) 福地守, 田淵明子, 津田正明: Activity-dependent stabilization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA regulated by calcium signals in neurons. 遺伝情報DECODE・転写研究会共催冬のワークショップ, 2007, 1, 25-27, 湯沢
- (12) 津田正明: 環境情報変換に果たす神経活動依存的遺伝子発現制御系の役割. 日本薬学会第127年会, 2007, 3, 28-30, 富山
- (13) 田淵明子, 塩田惇, 石川充, 堤下寛之, 西嶋直紀, 阪上洋行, 津田正明: アクチン結合モチーフを有する転写活性化因子MALによる新規情報伝達. 日本薬学会第127年会, 2007, 3, 28-30, 富山
- (14) 塩田惇, 阪上洋行, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合モチーフを有する転写コアクチベーターMKL1がニューロンの形態に及ぼす影響. 日本薬学会第127年会, 2007, 3, 28-30, 富山
- (15) 福地守, 田淵明子, 津田正明: 神経細胞におけるカルシウムシグナル依存的な脳由来神経栄養因子 (BDNF) mRNAの安定化機構の解析. 日本薬学会第127年会, 2007, 3, 28-30, 富山
- (16) 原大智, 宮下敏秀, 田淵明子, 津田正明: クロマチン構造を介した神経活動依存的なBDNF遺伝子プロモーターI制御機構の解明. 日本生化学会北陸支部第25回大会, 2007, 5, 26, 石川
- (17) 石川充, 西嶋直紀, 堤下寛之, 阪上洋行, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合モチーフを有する転写活性化因子MKL2の機能解析. 日本生化学会北陸支部第25回大会, 2007, 5, 26, 石川
- (18) 田淵明子, 石川充, 阪上洋行, 西嶋直紀, 塩田惇, 津田正明: 突起形態と転写制御におけるアクチン結合モチーフを有する転写活性化因子MKL1/2の機能解析. 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会, 2007, 9, 10-12, 横浜
- (19) 原大智, 宮下敏秀, 田淵明子, 津田正明: BDNF遺伝子プロモーターIの転写制御機構と神経活動のクロマチン構造への組み込み. 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会, 2007, 9, 10-12, 横浜
- (20) 石川充, 西嶋直紀, 阪上洋行, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合性転写活性化因子MKL1/2の組織・時期特異的分布. 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会, 2007, 9, 10-12, 横浜
- (21) 西嶋直紀, 石川充, 堤下寛之, 塩田惇, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合モチーフを有する転写活性化因子MKL1/2の突起形態と遺伝子発現における機能解析. 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会, 2007, 9, 10-12, 横浜
- (22) 二井卓哉, 南野恵, 原大智, 高崎一朗, 福地守, 田淵明子, 津田正明: ハルプロ酸により誘導される興奮性・抑制性関連遺伝子発現の網羅的解析. 日本薬学会北陸支部平成19年度第117回例会, 2007, 11, 11, 金沢
- (23) Ishikawa M., Nishijima N., Sakagami H., Tsuda M., and Tabuchi A.: Functional analysis of MKL1/2, antin-binding coactivator for SRF, in morphology and transcription of neurons. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007, 12, 11-15, 横浜
- (24) Hara D., Miyashita T., Tabuchi A., Fukuchi M., Takasaki I., and Tsuda M.: Integration of neuronal activity into chromatin on the BDNF gene promoter I against the repressive transcriptional activity of REST/NRSF in neurons. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007, 12, 11-15, 横浜
- (25) 福地守, 下鳥政貴, 二井卓哉, 渡邊信次郎, 高崎一朗, 田淵明子, 津田正明: 下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドPACAPによる神経活動依存的な遺伝子発現カスケードの活性化. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007, 12,

11-15, 横浜

- (26) 田渕明子, 石川充, 堤下寛之, 西嶋直紀, 阪上洋行, 津田正明: アクチン結合モチーフを有する転写活性化因子MALによる新規情報伝達. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007, 12, 11-15, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田渕 明子 (TABUCHI AKIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
准教授

研究者番号: 40303234