

平成 23 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2008 ～ 2010  
課題番号：20390023  
研究課題名（和文） シナプスと核との間の情報交換・伝達に関わる遺伝子発現制御系の解析  
研究課題名（英文） Regulation of gene expression involved in conveying information between synapses and nuclei in neurons  
研究代表者  
津田 正明 (Masaaki Tsuda)  
富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授  
研究者番号：80132736

研究成果の概要（和文）：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)を初代培養神経細胞に作用させると、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプター(NMDA-R)活性を亢進して、脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子(*Bdnf*)など一連の最初期遺伝子群(*c-fos*, *Arc* など)の誘導が引き起こされる。この機構について解析を進めた。*Bdnf* exon IV-IX (*Bdnf-eIV*) mRNA合成は、NMDA-Rからのカルシウム(Ca<sup>2+</sup>)流入に100%依存しており、特にCa<sup>2+</sup>シグナルによってカルシニューリン経路が活性化され、転写制御因子CREBが活性化されることが明らかとなった。他にβ-アドレナリン受容体やドーパミンD1レセプターを活性化しても、NMDA-R活性亢進を介した遺伝子発現が認められ、G-蛋白質共役型レセプター(GPCR)活性化による活動依存的な遺伝子発現制御系が共通に稼働している可能性が示された。この機構は、記憶/学習の機構ばかりでなく、多くの神経疾患発症あるいは薬物依存症などの原因を理解する上で重要な貢献を果たすものと期待される。これとは別に、MKLによる神経細胞における転写制御機構を形態変化との関連で解析した。この知見は、シナプス構造を保つ上での神経細胞内フィードバック制御機構の存在を示すものである。

研究成果の概要（英文）：Since G protein-coupled receptors (GPCRs) potentiate the activity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R), we comprehensively investigated gene expression induced by the stimulation of GPCRs in culture. Potentiation of NMDA-R mediated by the activation of PAC1, a GPCR, with PACAP immediately activated a limited number of genes upon Ca<sup>2+</sup> signals. The mRNA expression of the brain-derived neurotrophic factor exon IV-IX (*Bdnf-eIV*) is totally controlled by Ca<sup>2+</sup>/calcineurin, leading to the CRE/CREB-dependent transcription. Stimulation of NMDA-R under the activation of PAC1 synergistically increased *Bdnf-eIV* mRNA expression through the selective activation of calcineurin, leading to translocation of TORC1 to nucleus and activation of CREB-KID domain. The Ca<sup>2+</sup>/calcineurin-dependent mRNA expression was also induced by direct stimulation of PKA or PKC pathway and, furthermore, by that of the dopamine D1 or β-adrenergic receptor. Thus, the potentiation of NMDA-R activity mediated by GPCR induces activity-dependent gene expression through calcineurin pathway, possibly regardless of the type of neurotransmission.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、神経生物学

キーワード：遺伝子発現、シナプス、BDNF、PACAP、CREB、MKL

1. 研究開始当初の背景

従来から、向精神薬効果や薬物依存などにおいて、NMDA-R とドーパミン D1-R の関与が指摘されてきた。これは、両レセプターから Ca<sup>2+</sup>シグナル及び cAMP/PKA シグナルが細胞内で一緒になって一連の遺伝子発現 (Immediate-early genes; IEGs) が誘導され、行動薬理学的変化が起こるものと説明されてきた。しかし、これはドーパミン作動系に限られた現象として説明されている。また、最近、CREB などの転写制御因子が長期記憶に関係していることが明らかとなっており、これら神経可塑性の機構とどのように関わるかについて不明な点が多く存在した。本研究では、これら疑問を一挙に解決する可能性のある画期的な研究成果が得られた。

2. 研究の目的

シナプス伝達で誘導される遺伝子発現制御系は、脳内に電気的信号として取り込まれた環境情報を遺伝情報に変換する上で重要な役割を果たしていることが予想される。そこで、PACAP によって誘導される IEGs の活動依存的発現誘導に注目して、GPCR である PACAP 特異的レセプター PAC1 活性化によって、NMDA-R 活性亢進によって惹起される遺伝子発現制御系の解析を特に *Bdnf*, *Arc* 遺伝子に注目して解析することを目的とした。また、併せて、MKL による転写制御系と神経細胞携帯変化との関連性についても解析を行った。

3. 研究の方法

ラット大脳皮質初代神経細胞培養系を、胎生 17 日齢ラットから調製し、培養開始後 4～7 日の間に実験を行った。培養系に各種薬剤を加え、PACAP を加え細胞を刺激した。培養後、細胞を回収し全細胞 RNA を抽出し、リアルタイム PCR で各 mRNA の発現量の変化を測定した。また、DNA とランスフェクション法を用いて、各遺伝子プロモーターの活性変化についてホタルルシフェラーゼ活性を指標に測定した。

4. 研究成果

(1) GPCR 誘導性の活動依存的 *Bdnf-eIV* mRNA 発現誘導機構の解析：

PACAP38 (100 ng/mL) を培養系に加え、1 時間後に RNA を回収し、ジーンチップ解析を行った。その結果、約 150 種類の遺伝子産物が NMDA-R 活性亢進を介して発現上昇を示すことが示された。その中でも、*Bdnf-eIV* の発現上昇は NMDA-R 活性亢進による Ca<sup>2+</sup>シグナルに 100% 依存していた。他の遺伝子の Ca<sup>2+</sup>シグナル依存性は遺伝子ごとに異なっていた。

*Bdnf* プロモーター IV (*Bdnf-PIV*) は、Ca<sup>2+</sup>シグナルに CRE (又は CaRE3) だけが応答し、CREB が関与していた。また、興味深いことに、PAC1 活性化による NMDA-R 活性亢進には選択的にカルシニューリンの経路が使われていた。このカルシニューリンによって TORC1 の細胞質から核への移行が引き起こされていた。同時に、CREB の KID ドメインの活性化も誘導された。現在、これら機構がどのように CREB 活性化を調節しているかについては不明であ

る。

一方、ドーパミン D1 レセプターやβ-アドレナリンレセプターをそれぞれのアゴニストで活性化したところ、NMDA-R 活性亢進及びカルシニューリン経路に依存した *Bdnf-eIV* mRNA 合成が認められた。また、この応答は、フォルスコリンや TPA で直接 PKA 又は PKC 経路を活性化しても、同様に認められた。したがって、本研究で明らかにした応答系は、PKA/PKC 経路が活性化されれば GPCR の種類に依らない、共通性の高い応答機構である可能性が高い。本応答系は、神経可塑性のメカニズムばかりでなく、神経疾患発症を含めた多くの現象の理解を進めるものである。

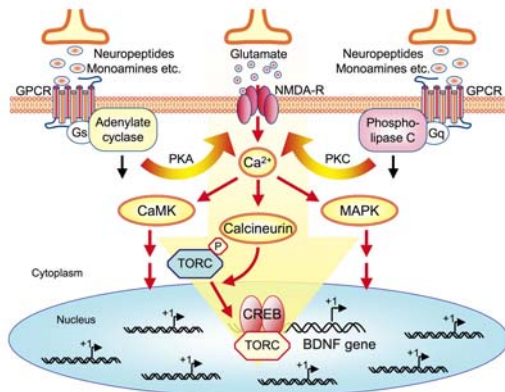


図 GPCR による NMDA-R を介した遺伝子発現制御

## (2) *Arc* 遺伝子発現調節の解析

川島らは、*Arc* 遺伝子プロモーターの活動依存的活性化に上流-7kb 付近に存在する SARE 配列が第一義的に応答することを示した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009)。PACAP による活性化にも SARE 配列が主に関わっていた。一方、BDNF 投与による活性化には、SARE 配列以外に上流-200bp までの近位プロモーターが効いている事を見いだした。この活性は SARE 配列とも連携していることが示され、SARE 配列と近位プロモーター領域との間における DNA ループ構造の形成が示唆された。また、上流-1000 付近までの欠損は、SARE 配列に対する BDNF 応答への抑制を解除した。何らかのクロマチン構造との関連性が予想され、今後の検討が期待される。また、FGF2 が同様の活性化を引き起こし、チロシンキナーゼ受容体からのシグナルと GPCR 由来の活動依存的シグナルによる制御様式に明らかな違いが認められた。今後、*Arc* プロモーターの制御が記憶固定化とどのように関わるかについて検討を進める。

## (3) MKL による転写調節機構と携帯調節

シナプスから核への情報伝達の直接的な役割を担うと予想された分子として megakaryoblastic leukemia (MKL: 別名 MAL) に着目した。MKL は、G-アクチンに結合するが、アクチン重合の促進とともに核に移行し、転写因子 serum response factor (SRF) のコアクチベーターとして働く性質がある。申請者らは、MKL が脳に高発現しており、脳の発達に伴いその発現量が増加することを明らかにした。また、MKL は大脳皮質ニューロンの樹状突起形態の複雑化に関わることで、その複雑化には、結合性の転写抑制因子 SCAI の核外排出による MKL/SRF 遺伝子発現の上昇が起因する可能性を見いだした。

## 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 10 件)

- ① Fukuchi M., Fujii H., Takachi H., Ichinose H., Kuwana Y., Tabuchi A., Tsuda M. : Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca<sup>2+</sup> signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. Brain Res. 1366: 18-26, 2010. (査読有)
- ② Fukuchi M., Tsuda M. : Involvement of the 3'-untranslated region of the brain-derived neurotrophic factor gene in activity-dependent mRNA stabilization. J. Neurochem. 115: 1222-1233, 2010. (査読有)
- ③ Dong Y. X., Fukuchi M., Inoue M., Takasaki I., Tabuchi A., Wu C. F., Tsuda M. : Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is an upstream regulator of prodynorphin mRNA expression in neurons. Neurosci. Lett. 484: 174-177, 2010. (査読有)
- ④ Ishikawa M., Nishijima N., Shiota J., Sakagami H., Tsuchida K., Mizukoshi M., Fukuchi M., Tsuda M., Tabuchi A. : Involvement of the serum response factor coactivator megakaryoblastic leukemia (MKL) in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. J. Biol. Chem. 285: 32734-32743, 2010. (査読有)

- ⑤ Hama Y., Shiraki K., Yoshida Y., Maruyama A., Yasuda M., Tsuda M., Honda M., Takahashi M., Higuchi H., Takasaki I., Daikoku T., Tsumoto T. : Antibody to varicella-zoster virus immediate-early protein 62 augments allodynia in zoster via brain-derived neurotrophic factor. *J. Virol.* 84: 1616-1624, 2010. (査読有)
- ⑥ Ishimaru N., Fukuchi M., Hirai A., Chiba Y., Tamura T., Takahashi N., Tabuchi A., Tsuda M., Shiraishi M. : Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394: 173-177, 2010. (査読有)
- ⑦ Hara D., Fukuchi M., Miyashita T., Tabuchi A., Takasaki I., Naruse Y., Mori N., Kondo T., Tsuda M. : Remote control of activity-dependent BDNF gene promoter-I transcription mediated by REST/NRSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384: 506-511, 2009. (査読有)
- ⑧ Fukuchi M., Nii T., Ishimaru N., Minamino A., Hara D., Takasaki I., Tabuchi A., Tsuda M. : Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci. Res.*, 65: 35-43, 2009. (査読有)
- ⑨ Hara D., Miyashita T., Fukuchi M., Suzuki H., Azuma Y., Tabuchi A., Tsuda M. : Persistent BDNF exon I-IX mRNA expression following the withdrawal of neuronal activity in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 648-653, 2009. (査読有)
- ⑩ Takasaki I., Takarada S., Tatsumi S., Azegami A., Yasuda M., Fukuchi M., Tabuchi A., Kondo T., Tabuchi Y., 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. (査読有)

[学会発表] (計 3 4 件)

- ① Fukuchi M., Tsuda M. : Involvement of 3'-untranslated region of brain-derived

neurotrophic factor gene in activity-dependent mRNA stabilization. *Neuroscience 2010* (The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2010, 11, 13-17, San Diego, USA.

② Ishikawa M., Nishijima N., Shiota J., Sakagami H., Tsuchida K., Tsuda M., Tabuchi A. : MKL, an actin-binding coactivator for SRF, is involved in TGF- $\beta$  family-induced alteration of dendritic morphology and transcriptional activity in rat cortical neurons. *Neuroscience 2010* (The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2010, 11, 13-17, San Diego, USA.

③ Tabuchi A., Hakamata T., Ishikawa M., Shiota J., Shoji S., Fukuchi M., Tsuda M. : Isolation and characterization of rat SRF coactivator MKL1 splice variants differentially expressed in the developing brain. *Neuroscience 2010* (The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2010, 11, 13-17, San Diego, USA.

④ Tsuda M., Fukuchi M., Watanabe S., Kuwana Y., Takasaki I., Tabuchi A. : G protein-coupled receptor (GPCR) signaling induces activity-dependent gene expression through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in neurons. *Neuroscience 2010* (The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2010, 11, 13-17, San Diego, USA.

⑤ 石川充, 西嶋直紀, 阪上洋行, 土田邦博, 津田正明, 田淵明子 : アクチン結合性転写活性化因子 MKL はラット大脳皮質ニューロンにおいて TGF- $\beta$ ファミリーに誘導される樹状突起形態および転写活性の制御に関与する. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.

⑥ 庄司しずく, 袴田知之, 石川充, 津田正明, 田淵明子 : アクチン結合性転写因子 MKL2 新規スプライスバリエントの同定と機能解析. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.

⑦ 福地守, 董迎旭, 井上南, 田淵明子, 津田正明 : 大脳皮質ニューロン初代培養系における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Prodynorphin mRNA 発現誘導機構の解析. 日本薬学会第130年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.

⑧ 田渕明子, 袴田知之, 石川充, 塩田惇, 庄司しずく, 津田正明: アクチン結合性転写因子 MKL1 のラットプライスバリアントの同定. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会, 2010, 9, 2-3, 神戸.

⑨ 石川充, 西嶋直紀, 阪上洋行, 土田邦博, 津田正明, 田渕明子: アクチン結合性転写活性化因子 MKL はラット大脳皮質ニューロンにおいてアクチビンに誘導される樹状突起形態および転写活性の制御に関与する. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会, 2010, 9, 2-3, 神戸.

⑩ 福地守, 津田正明: 3' 非翻訳領域を介した活動依存的な脳由来神経栄養因子 BDNF mRNA 安定化機構の解析. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会, 2010, 9, 2-3, 神戸.

⑪ 津田正明, 福地守, 渡邊信次郎, 桑名由紀, 高崎一朗, 田渕明子: Gタンパク質共役型受容体シグナルによる NMDA 型グルタミン酸レセプターを介した神経活動依存的な遺伝子発現誘導に関する解析. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会, 2010, 9, 2-3, 神戸.

⑫ 伊原大輔, 福地守, 本間大輔, 高崎一朗, 田渕明子, 津田正明: タイプ II 型ピレスロイド殺虫剤によって誘導される BDNF 遺伝子発現制御系に関する解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

⑬ 袴田知之, 石川充, 塩田惇, 庄司しずく, 野村未希, 福地守, 津田正明, 田渕明子: Isolation and characterization of rat megakaryoblastic leukemia 1 splice variants, differentially expressed in the developing brain. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

⑭ 石川充, 西嶋直紀, 塩田惇, 阪上洋行, 土田邦博, 水越美帆, 福地守, 津田正明, 田渕明子: アクチン結合性転写活性化因子 MKL はアクチビンに誘導される転写活性およ

び樹状突起形態の変化に関与する. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

⑮ 福地守, 渡邊信次郎, 桑名由紀, 高崎一朗, 田渕明子, 津田正明: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces activity-dependent gene expression through the potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) in neurons. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

⑯ 福地守, 津田正明: Involvement of the 3' -untranslated region of the brain-derived neurotrophic factor gene in activity-dependent mRNA stabilization. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

⑰ Tsuda M.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces activity-dependent gene expression in neurons. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 2009, 10, 5-8, Kagoshima.

⑱ Fukuchi M., Tabuchi A., Watanabe S., Takasaki I., and Tsuda M.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces activity-dependent gene expression through the potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) in neurons. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 2009, 10, 5-8, Kagoshima.

⑲ 津田正明: BDNF 遺伝子発現のエピジェネティクス制御と神経可塑性. 第32回日本神経科学大会, 2009, 9, 18, 名古屋

⑳ 福地守, 下鳥政貴, 田渕明子, 津田正明: 脳由来神経栄養因子 BDNF による Arc 遺伝子転写活性化機構の解析. 第32回日本神経科学大会, 2009, 9, 18, 名古屋.

㉑ 伊原大輔, 福地守, 高崎一朗, 本間大輔, 田渕明子, 津田正明: タイプ II 型ピレスロイド殺虫剤によって誘導される BDNF 遺伝子発現制御系に関する解析. 第32回日本神経科学大会, 2009, 9, 18, 名古屋.

㉒ 福地守, 渡邊信次郎, 桑名由紀, 高崎一朗, 田渕明子, 津田正明: Gタンパク質共役

型レセプターシグナルによる NMDA 型グルタミン酸レセプターを介した神経活動依存的な遺伝子発現誘導に関する解析. 第 82 回日本生化学会大会, 2009, 10, 21-24, 神戸.

㉓ 津田正明: 遺伝情報発現から見た脳機能発達と環境との関連. 第 4 回日本情動研究会発達障害を科学する, 2009, 10, 24, 富山.

㉔ 桐越裕也, 福地 守, 森 淳美, 高崎一朗, 畔上愛子, 田渕明子, 津田正明: GABAergic stimulation induces excitatory responses in cultured rat cortical neurons. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009, 12, 9-12, 横浜.

㉕ 石川 充, 西嶋直紀, 阪上洋行, 津田正明, 田渕明子: アクチン結合性転写活性化因子 MKL2 はラット大脳皮質ニューロンにおいて Rho に誘導される樹状突起形態および転写活性の制御に関与する. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009, 12, 9-12, 横浜.

㉖ 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.

㉗ 福地守, 二井卓哉, 南野恵, 高崎一朗, 田渕明子, 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.

㉘ 石川充, 西嶋直紀, 阪上洋行, 津田正明, 田渕明子: 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.

㉙ 津田正明, 福地守, 二井卓哉, 南野恵, 原大智, 高崎一朗, 田渕明子. バ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.

㊀ 福地守, 田渕明子, 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.

㊁ 福地守, 渡邊信次郎, 高崎一朗, 田渕明子, 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 回日本神経化学会大会, 2008, 9, 11-13, 富山.

㊂ 袴田知之, 野村未希, 石川充, 塩田惇, 津田正明, 田渕明子: アクチン結合性転写活性化因子 MKL1 のスプライスバリエーションの機能解析. 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.

㊃ 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.

㊄ 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.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津田 正明 (Masaaki Tsuda)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・  
教授  
研究者番号: 80132736

### (2) 研究分担者

田渕 明子 (Akiko Tabuchi)  
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

福地 守 (Mamoru Fukuchi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・  
助教  
研究者番号: 40432108