

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590080

研究課題名（和文） 神経形態と遺伝子発現のリンク：アクチン結合性転写因子 MKL と BDNF を中心として

研究課題名（英文） Linkage of neuronal morphology to gene expression: actin-bound transcription cofactor MKL and its regulation by BDNF

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（和文）：

本研究では、神経機能制御因子 activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) 遺伝子が転写因子 serum response factor (SRF) とその結合因子（コファクター）によって、活性化と不活性化の制御を受けることを見いだした。この SRF コファクターによるスイッチング機構は、脳機能発現機構の理解を深め、SRF コファクターを標的とした創薬基盤構築の一助となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) is a regulator of neuronal function. In this study, we have found that SRF cofactors, megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) and Ets-like transcription factor 1 (Elk1), activate and inhibit Arc gene transcription, respectively. These findings, at least in part, contribute to a better understanding of brain function and provide a novel insight into SRF cofactor-based drug design.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：神経生物学

キーワード：遺伝子発現、転写因子、脳由来神経栄養因子(BDNF), SRF, Arc

### 1. 研究開始当初の背景

神経突起やシナプスの形態制御とともに核内の遺伝子発現制御も脳機能に重要である。転写因子 serum response factor (SRF) 欠損マウスの解析から、SRF が記憶学習の基礎過程や神経形態に重要であることが明らかになっている。SRF は、形態に関わる細胞骨格関連遺伝子やシナプス機能制御分子で

あ る activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) 遺伝子の発現制御を行う。Arc 遺伝子は、脳由来神経栄養因子 (BDNF) により劇的に活性化を受ける。また、Arc 遺伝子には、SRF 結合配列を含む synaptic activity responsive element (SARE) が存在しており、転写活性化の中心的な役割を果たす配列があることが

明らかになっている。しかしながら、SRF 依存性遺伝子発現の詳しい調節機構は不明であった。近年、SRF に結合するコファクターが明らかにされ、megakaryoblastic leukemia (MKL)ファミリーと Elk1 が属する Ternary complex factor (TCF)に大別される。そして、それらがどのようにして SRF 依存性遺伝子発現を調節するのかについて国内外で研究が進みつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では、BDNF による Arc 遺伝子発現に SRF とそのコファクターがどのように関わるかを明らかにするため、以下の点について検討を行った。

(1) Arc 遺伝子 SARE 配列の BDNF 応答性遺伝子発現への関与

(2) SRF コファクターの関与

(3) SRF コファクターの新規分子種の同定と発現パターン

## 3. 研究の方法

上記目的 (1) (2) を検討するための方法を記載する。培養ラット大脳皮質ニューロンを BDNF で刺激し、Arc mRNA 発現、タンパク質発現変化を定量 PCR やウェスタンブロットで調べた。また、Arc 遺伝子プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを導入後、BDNF 刺激を行い、プロモーター上の SARE の関与について検討した。また、クロマチン免疫沈降を行い、SRF コファクターの Arc 遺伝子クロマチンへの動員状況について検討した。さらに、MKL1, Elk1 を大脳皮質ニューロンに発現させ、Arc プロモーターの活性化、不活性化のどちらに関与するかを検討した。

上記目的 (3) に関しては、ラット海馬 RNA から cDNA を作製し、cDNA クローニングを行うとともに、分子種特異的な発現パターンを定量 PCR で調べた。

## 4. 研究成果

まず、上記目的 (1) (2) に関する結果について以下にまとめる。Arc 遺伝子の SARE に存在する 3 つの転写因子 CREB, MEF2, SRF 応答配列が全て、BDNF 誘導性活性化に関与することが明らかとなった。そのうち、SRF 結合配列が最も強く関与し、Elk1 が結合する配列が抑制的に働いていることが明らかとなった。実際、Elk1 は、Arc 遺伝子発現を抑制する活性があり、MKL1 はその逆に活性化に働くことが分かった。また、BDNF で刺激すると、Elk1 がクロマチンからはずれ、代わりに MKL1 がリクルートされることが明らかとなった。これらのことから、SRF/Elk1 複合体から SRF/MKL1 複合体への構成変化が、Arc 遺伝子発現のスイッチオンを担う新規機構をひと

つであることが示された。

目的 (3) に関する結果では、新規 MKL1 分子種である MKL1-elongated derivative of yield (MELODY)を同定した。そして、既知の分子種とともに脳領域別、脳発達過程における発現パターンを解析したところ、部位別、発達段階別でそれぞれ異なった発現パターンを示すことが明らかとなった。また、神経樹状突起に対する影響が分子種で異なっていることも分かった。

以上のことは、脳機能発現の分子機構の一端を理解する一助となる。また SRF コファクターを神経疾患の標的分子候補ととらえることで新たな創薬基盤の構築に貢献すると考えられる。

## 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 6 件)

1. (査読有) Matsuya, Y., Ihara, D., Fukuchi, M., Honma, D., Itoh, K., Tabuchi, A., Nemoto, H. and Tsuda, M. Synthesis and biological evaluation of pyrethroid insecticide-derivatives as a chemical inducer for Bdnf mRNA expression in neurons. *Bioorg. Med. Chem.* 20: 2564-2371 (2012).
2. (査読有) Ihara, D., Fukuchi, M., Honma, D., Takasaki, I., Ishikawa, M., Tabuchi, A. and Tsuda, M. Deltamethrin, a type II pyrethroid insecticide, has neurotrophic effects on neurons with continuous activation of the Bdnf promoter. *Neuropharmacology* 62: 1091-1098 (2012).
3. (査読有) Matsuyama, R., Tomi, M., Akanuma, S., Tabuchi, A., Kubo, Y., Tachikawa, M. and Tsuda, M. Up-regulation of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in cultured rat retinal capillary endothelial cells in response to glucose deprivation. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 27: 317-324 (2012).
4. (査読有) Fukuchi, M., Fujii, H., Takachi, H., Ichinose, H., Kuwana, Y., Tabuchi, A. and Tsuda, M. Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca(2+) signals via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Brain Res.* 1366: 18-26 (2010).
5. (査読有) Dong, Y. X., Fukuchi, M., Inoue,

M., Takasaki, I., Tabuchi, A., Wu, C. F. and Tsuda, M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is an upstream regulator of prodynorphin mRNA expression in neurons. *Neurosci, Lett*, 484: 174-177 (2010).

6. (査読有) Ishikawa, M., Nishijima, N., Shiota, J., Sakagami, H., Tsuchida, K., Mizukoshi, M., Fukuchi, M., Tsuda, M. and 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).

[学会発表] (計 37 件)

1. 石橋悠太\*, 石川充, 塩田惇, 袴田知之, 庄司しずく, 福地守, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合性転写制御因子MKL1 アイソフォームのラット脳組織における発現および機能解析. 第35回日本分子生物学会年会, 2012, 12, 11-14, 福岡
2. 石川充, 福地守, 菊池啓悦, 石橋悠太, 辻井惇也, 津田正明, 奥野浩行, 尾藤晴彦, 田淵明子: ラット大脳皮質ニューロンでのBDNF誘導性Arc/Arg3.1 遺伝子発現における転写因子SRFコファクター間の競合的關係. 第35回日本分子生物学会年会, 2012, 12, 11-14, 福岡.
3. Fukuchi M., Tabuchi A., Takasaki I., Takemori H., and Tsuda M. : G-protein-coupled receptor-mediated activity-dependent gene expression via NMDA receptors in neurons. *Neuroscience 2012 (Society for Neuroscience's 42nd annual meeting)*, 2012, 10, 13-17, NewOrleans, USA.
4. 石橋悠太\*, 辻井惇也, 石川充, 福地守, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合性転写活性化因子MKL1 のリン酸化による SRF介在性遺伝子発現制御. 第35回日本神経科学大会, 2012, 9, 18-21, 名古屋
5. 石川充, 塩田惇, 袴田知之, 石橋悠太, 庄司しずく, 福地守, 津田正明, 田淵明子: アクチン結合性転写活性化因子MKL1 の新規スプライスバリエーションの同定とラット大脳皮質ニューロンにおける機能解析. 第35回日本神経科学大会, 2012, 9, 18-21, 名古屋
6. 石川充, 塩田惇, 袴田知之, 石橋悠太, 庄司しずく, 野村未希, 福地守, 津田正明, 田淵明子. Identification and characterization of a novel transcript of rat MKL1, the actin-binding coactivator for SRF: the effect on transcriptional activation and

neuronal morphology in rat cortical neurons. 第34回日本分子生物学会年会, 2011, 12, 13-16, 横浜

7. 水越美帆\*, 石川充, 皆藤真季, 福地守, 津田正明, 田淵明子. 脳の発達段階におけるMKL/SRF転写抑制因子SCAIの発現分布. 第34回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.
8. 石川充, 西嶋直紀, 阪上洋行, 土田邦博, 水越美帆, 塩田惇, 福地守, 津田正明, 田淵明子. アクチン結合性転写活性化因子MKLが関与するアクチン誘導性のラット大脳皮質ニューロン樹状突起形態制における新規シグナル伝達経路の解析. 第34回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜
9. 田淵明子, 石橋悠太, 辻井惇也, 石川充, 福地守, 津田正明. 脳由来神経栄養因子BDNFによって誘導されるSRFコアクチベーターMKL1 のリン酸化修飾. 第34回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜
10. Tabuchi A.: Differential expression of rat SRF coactivator MKL1 transcripts during brain development: the possible involvement in dendritic morphology. *The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases*, 2011, 8, 3-5, Toyama.
11. 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, 田淵明子: アクチン結合性転写活性化因子MKLはアクチ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.
12. 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, SanDiego, USA
13. 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, SanDiego, USA
14. 田淵明子, 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 のラットスプライスバリエーションの同定. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会, 2010, 9, 2-3, 神戸.

[図書] (計 1 件)

1. 中山和久 (監訳)、田渕明子 (第 11 章担当)  
化学同人「プロッパ<sup>o</sup>細胞生物学」  
(2013) (第 11 章 : 403-431 : 総ページ数 29  
ページ)

## 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :