

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580141

研究課題名(和文) 飢餓ストレス応答因子による記憶機能の制御とその応用に関する研究

研究課題名(英文) Starvation stress-responsive transcription factor is involved in the regulation of memory-independent social behavior of mouse

研究代表者

高橋 勇二 (TAKAHASHI, YUJI)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：20154875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：飢餓ストレス応答性転写因子ATF5を欠損する類遺伝子マウスを作製した。このマウスを用いて記憶テストを含む行動試験を行い、ATF5欠損が行動に及ぼす影響を検討した。ATF5欠損マウスは不安様行動が亢進し、多動であり、固執傾向が強く、社会性行動が抑制されていた。ATF5欠損マウスの作業記憶、参照記憶に関連した行動には影響が認められなかった。これらの特徴は、自閉症スペクトラムの表現型に類似しており、ATF5欠損マウスは自閉症様行動を示すことが明らかとなった。さらに、ATF5欠損マウス嗅球の解析から、顆粒細胞と傍系球体細胞が少なく、ATF5欠損マウスの嗅神経活動抑制が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activating Transcription Factor 5 (ATF5), starvation-induced stress-responsive transcription factor, is expressed strongly in the subventricular zone and weakly in the wide range of the brain. Olfactory neurons in olfactory epithelium also express ATF5 abundantly. We made ATF5-deficient congenic mice and used them to test behavioral characteristics, including anxiety, perseveration, social contact, working memory and reference memory. ATF5-deficient mice showed hyperactivity, strong anxiety, depressed social activity and strong tendency of perseveration, independent of working and reference memories. These behavioral features indicate that ATF5-deficient mice show autism spectrum-like behavioral abnormality. Histochemical examination of the odorant bulb of ATF5-deficient mice revealed that ATF5 is involved in the neural activity of odorant perception.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物学

キーワード：ストレス応答 転写調節因子 自閉症スペクトラム 嗅球

1. 研究開始当初の背景

我々は、飢餓ストレスが誘導する転写因子として、Activating Transcription Factor (ATF) 5 を同定した。ATF5 は、CREB/ATF ファミリーに属する因子であり、cAMP 応答性エンハンサー配列 (CRE: cAMP responsive element) に結合して転写を調節する CREB (CRE binding protein) の拮抗因子として働く。我々は、マウスへの絶食ストレスにより肝臓において ATF5 mRNA が増加すること、ATF5 は、ATF4 と同様に、CHOP を介した細胞死を誘導することを示してきた。また、ATF5 は、エネルギーやアミノ酸欠乏などのストレス状況下で、eukaryotic Initiation Factor (eIF)2 のリン酸化を介した翻訳制御系により、タンパク質への翻訳速度が上昇することを明らかにした。さらに、個体や組織レベルの ATF5 の機能を明らかにするために、ATF5 欠損マウスを作製したところ、ATF5 欠損マウスは、新生仔期に母マウスに向けての救済シグナルとなる超音波啼鳴が低下し、社会性行動の低下を示唆した。しかし、大脳の外見的異常は認められず、肝臓代謝系や運動機能に大きな変化はなかった。社会性行動の低下は神経ネットワークの異常を示唆している。Morrisらは、ATF5 が、統合失調症の原因遺伝子の一つである Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1) と結合すること、Angerosteroらは、ATF5 が神経幹細胞増殖を維持して神経細胞や神経膠細胞への分化を抑制することを示している。DISC1 の機能修飾や神経細胞の増殖・分化に cAMP/CREB 系が関与することが知られている。しかし、ATF5 と神経機能との関連については明らかにされていない。一方、CREB/ATF 因子の ATF4 は記憶固定に抑制的に働き、促進因子の CREB と拮抗することが、軟体動物のアメフラシ、ショウジョウバエの神経節や齧歯類の海馬で明らかにされている。さらに、記憶の固定やその抑制には神経シナプスの可塑性増大が必要であり、CREB や ATF4 mRNA からタンパク質への翻訳制御が重要であることが示されている。ATF5 は ATF4 と同様に海馬に存在し eIF2 を介した翻訳制御を受けており、CREB の抑制因子としての機能を有することから、私たちは、「ATF5 は海馬において記憶固定に抑制的に働いているのではないか」との仮説を導き、この仮説を検証することを本申請課題の目的とした。

世界の人口は 70 億人に迫り、5 歳未満の低体重児の割合は、アジアで 31% と栄養不良問題は解決の糸口さえ見えない。栄養不良と高次神経活動の低下や精神疾患の関連については、第二次大戦末期に起こった食糧不足 (Dutch Hunger Winter) の疫学解析などから指摘されている。しかし、その分子機構は不明な点が多い。細胞レベルで、糖質エネルギー不足は AMP キナーゼにより、タンパク質アミノ酸不足は GCN2 リン酸化酵素によ

り感知されて、eIF2 のリン酸化を介して一般タンパク質の翻訳が抑制される。一方、ATF5 や ATF4 は mRNA の構造が特別で、アミノ酸欠乏化下に GCN2 が活性化されて eIF2 がリン酸化されると、翻訳速度が高まりタンパク質量が増加する。栄養素不足にตอบสนองする転写因子の ATF5 が、神経活動制御に果たす分子機能を明らかにしようとする本研究は、栄養代謝と脳高次機能の接続点を明らかにするという観点からきわめて新規性が高い。記憶は、飢餓を回避する本能的な食物探索行動のみならず、外的状況の高度な判断から感情の形成にいたる人間の高次な神経精神活動の基礎機能として不可欠である。ATF5 は、ATF4 と同様に CREB/ATF ファミリーに属しており、ATF4 と補完しながら、記憶制御に柔軟性を付与していることが予想される。

2. 研究の目的

ATF5 が、統合失調症の原因遺伝子の一つである DISC1 と結合すること、神経幹細胞増殖に関連するなどが示唆されている。しかし、ATF5 と神経機能との関連については明らかにされていない。ATF5 は海馬に存在し記憶固定に関連することを仮定し、ATF5 の神経系での機能を明らかにすることを目的に次の検討を行う。

- (1) ATF5 欠損コンジェニックマウスの表現型の検討を行う
- (2) ATF5 欠損コンジェニックマウス行動学的解析を行う。
- (3) 高次神経ネットワークモデルとしての嗅球の組織学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ATF5 欠損マウスのコンジェニックラインの確立 ATF5 欠損マウスは 129 系由来の ES 細胞 (D3) を用い、キメラマウス(オス)と C57BL/6 雌を交配し、その子から ATF5 欠損ヘテロマウス(雌)を選択した。その個体と野生型の C57BL/6 雄を交配した。このような戻し交配を 23 代にわたり行い ATF5 欠損 C57BL/6 コンジェニックラインを確立した。このラインから、ATF5 欠損ホモマウスを作製し、生存率、繁殖性、直腸温測定、体重測定、ひげ・体毛の状態の観察、ひっくり返して元に戻るか、ひげを触ったときの反応、耳を触ったときの反応、宙ぶりにしたときに前の机に手を伸ばすか、逆さにした金網に捕まっていられるか、握力測定、鍵束を振る音への反応 (聴覚) および痙攣感受性を測定した。

(2) 行動学的解析 成熟オス個体 (野生型および ATF5 欠損型) マウス各 35 匹を用いて以下のテストを行った。明暗切り替えテスト、オープンフィールドテスト、十字迷路テスト、熱反射テスト、社会性相互作用テスト、新規社会性相互テスト、プレプラス驚愕阻害テスト、強制水泳テスト、8 方向放射状迷路テ

ト、T字型迷路テスト、恐怖条件付けテスト、縄張り侵入テスト

(3)高次神経ネットワークモデルとしての嗅球の解析 野生型あるいは ATF5 欠損の新生仔あるいは成熟マウスの脳を試料とした。情報に従い脳を固定後、凍結切片を作成し、嗅球を抗体で染色し、嗅球の組織学的検討を加え、神経ネットワーク形成状態を観察した。

4. 研究成果

(1) ATF5 欠損マウスのコンジェニックラインの表現型の検討 成熟雄マウスは野生型に比較し体重が 94%と有意に軽い値を示した。また、雌雄 ATF5 欠損マウスの交配により出生回数は有意に低下した。オスマたはメスの野生型と ATF5 欠損マウスを交配したときには出産回数の低下は認められなかった。このことから、出生回数の低下は、両性間の情報伝達不良に原因があると予想された。直腸温、ひげ・体毛の状態の観察、ひっくり返して元に戻るか、ひげを触ったときの反応、耳を触ったときの反応、宙ぶりにしたときに前の机に手を伸ばすか、逆さにした金網に捕まっていられるか、握力測定、鍵束を振る音への反応(聴覚)および痙攣感受性に表現型は認められなかった。

(2)行動学的解析 明暗切り替えテストより、ATF5 欠損マウスは多動であり、明環境に滞在する時間が短く、不安傾向が強かった。オープンフィールドテストの結果 ATF5 欠損マウスは新規環境下におかれた場合、その環境に慣れるまでは多動傾向にあり、慣れるにつれて不安様行動をとると考えられた。十字迷路テストにより実験開始 5 から 10 分における解放アームに存在する時間は ATF5 欠損マウスにおいて短く不安傾向の増大が認められた。熱反射テストにおいて ATF5 欠損マウスはより短い時間で反応があり、熱感受性の亢進が認められた。社会性相互作用テストから ATF5 欠損マウスは社会性が低下していることが明らかとなった。新規社会性相互作用テストから ATF5 欠損マウスは社会性が低下しておりさらに多動であることが示された。プレパルス驚愕阻害テストは統合失調症の良い指標として用いられている。今回のテストでは、有意な変化は認められなかった。強制水泳テストにおいて有意な変化は認められなかった。8方向放射状迷路テストでは有意な変化はなく作業記憶および参照記憶の異常は認められなかった。T字型迷路テストにおいて固執傾向が認められた。恐怖条件付けテストから文脈記憶や恐怖記憶に有意差は認められなかった。縄張り侵入テストから ATF5 欠損マウスでは、有意に攻撃回数が減少しており社会性の低下が示唆された。

以上、ATF5 欠損マウスは多動で、社会性が低下し、固執傾向が強くと自閉症スペクトラムの表現型に類似していた。よって、ATF5

欠損マウスは自閉症様行動を示すことが明らかとなった。

(3) 高次神経ネットワークモデルとしての嗅球の解析

Nissle 染色法と免疫組織化学染色法を用いて、ATF5 欠損マウスの嗅球の層構造の形態を詳細に観察した。その結果、胎仔期、新生仔期、成熟期の嗅球の層構造に大きな崩れは見られなかった。しかし、嗅球の表層に存在し、嗅上皮から嗅神経の軸索が投射される嗅神経層が薄く、また投射せず停留している軸索も観察された。また、成熟期 ATF5 欠損マウスの系球体の形成に異常がみられる部位もあり、嗅上皮からの神経伝達ができない部位が多く存在すると考えられた。また、新生仔期 ATF5 欠損マウスでは投射ニューロンである僧帽細胞の配列が乱れており、樹上突起の伸びが短く投射する方向が乱雑であった。よって、ATF5 欠損マウスでは僧房細胞層の層構築と系球体との神経接続に異常があることが考えられた。また、胎仔期と新生仔期 ATF5 欠損マウスの嗅球では、GABA 作動性ニューロンである顆粒細胞と傍系球体細胞が少なく、特に tyrosine hydroxylase (TH) 陽性の傍系球体細胞と嗅神経軸索との接続が見られなかった。よって、ATF5 欠損マウスでは嗅神経活動の抑制が起こっていると考えられた。

以上の結果より、ATF5 が嗅球介在ニューロンの細胞増殖を制御し、嗅覚系の投射および介在ニューロンの神経接続の回路形成に機能を持ち、嗅覚を介する行動にも必須な遺伝子であることが推定された。

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 8 件)

1. Abe T., Kojima M., Akanuma S., Iwashita H., Yamazaki T., Okuyama R., Ichikawa K., Umemura M., Nakano H., Takahashi S., and Takahashi Y. N-terminal hydrophobic amino acids of ATF5 confer IL-1b-induced stabilization, J Biol Chem, 2014, 289, 3888-3900, 査読有り doi: 10.1074/jbc.M113
2. Hatano M., Umemura M., Kimura N., Yamazaki T., Takeda H., Nakano H., Takahashi S., and Takahashi Y. The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress, FEBS J, 2013, 280, 4693-4707, 査読有り doi: 10.1111/febs.12440
3. Yun YS., Noda S., Shigemori G., Kuriyama R., Takahashi S., Umemura M., Takahashi Y., and Inoue H. Phenolic diterpenes from rosemary suppress cAMP responsiveness of gluconeogenic gene

- promoters, *Phytother Res*, 2013, 27, 906-910, 査読有り doi: 10.1002/ptr.4794
4. Yoko-O T., Ichikawa D., Miyagishi Y., Kato A., Umemura M., Takase K., Ra M., Ikeda K., Taguchi R., and Jigami Y. Determination and physiological roles of the glycosylphosphatidylinositol lipid remodeling pathway in yeast. *Mol Microbiol*, 2013, 88, 140-155, 査読有り doi: 10.1111/mmi.12175
 5. Nakano H., Yamada Y., Miyazawa T., Yoshida T. Gain-of-function screening identify miR-193a regulating proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 2013, 42, 1875-1882, 査読有り doi: 10.3892/ijo.2013.1896
 6. Lu J., Zhang S., Nakano H., Simmons D.G., Wang S., Kong S., Wang Q., Shen L., Tu Z., Wang W., Wang B., Wang H., Wang Y., van Es J. H., Clevers H., Leone G., Cross J.C., Wang H. A positive feedback loop involving Gcm1 and Fzd5 directs chorionic branching morphogenesis in the placenta. *PLoS Biol.*, 2013, 11, e1001536, 査読有り doi: 10.1371/journal.pbio.1001536
 7. Goto, Y., Kajiwarra, M., Yanagisawa, Y., Hirose, H., Yoshimi, T., Umemura, M., Nakano, H., Takahashi, S., Shida, Y., Iguchi, T., Takahashi, Y., Miura T. Detection of vertebrate-type steroid hormones and their converting activity in the neogastropid, *Thais clavigera*. *J. Mol. Studies*, 78, 197-204 (2012) 査読有り doi: 10.1093/mol/lys/eys001
 8. Haraguchi, T., Nakano H., Tagawa T., Ohki T., Ueno Y., Yoshida T., Iba H. A potent 2'-O-methylated RNA-based microRNA inhibitor with unique secondary structures. *Nucl. Acids Res.*, 40, e58 (2012). 査読有り doi: 10.1093/nar/gkr1317
- [学会発表](計 26件)
1. 金子 将人、雨宮 ゆう子、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二、転写因子 ATF5 による嗅覚受容体の発現調節、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014/3、東京
 2. 鈴木誠人、飯田吉剛、青木満里恵、笹川洋、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、マウス鋤鼻細胞の増殖とアポトーシスに関する転写因子 ATF5、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014/3、東京
 3. 阿部貴則、岩下弘実、奥山隆一、山崎高志、高橋滋、高橋勇二、IL-1b による ATF5 タンパク質安定化の免疫応答における役割、日本生化学会 関東支部例会 2013/6、甲府市
 4. 森 直人、梅村 真理子、松崎 彩子、中野 春男、高橋 滋、高橋 勇二、ATF5 欠損マウスの脳内モノアミン量の解析、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜
 5. 中間翼、関百恵、渡邊弘明、伊東翼、金子浩子、梅村真理子、中野春男、高橋滋、高橋勇二、軟体動物の組織再生に関わるレチノイン酸シグナルおよび幹細胞関連因子の解析、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜
 6. 飯田吉剛、鈴木誠人、青木満里恵、笹川洋、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、マウス鋤鼻器における転写因子 ATF5 の機能解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013/12、神戸
 7. Watanabe, H., Itou, T., Nagasawa, K., Kaneko, H., Mizukami, K., Aya Saiga, A., Nakano, H., Umemura, M., Shigeru Takahashi, S., Takahashi, Y. Involvement of retinoic acid pathway in tissue regeneration of *Thais clavigera* Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors. 2012/6, New Hampshire, USA
 8. 山崎高志、阿部貴則、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、ATF5/C/EBP γ heterodimer regulates sodium-arsenite induced DR5 gene expression in human hepatoma cells. 第 85 回日本生化学会大会、2012/12、博多
 9. 幡野仁哉、梅村真理子、鈴木実菜子、中野春男、高橋滋、高橋勇二、ATF5 mRNA 発現調節機構における翻訳開始点の変動と NMD の寄与、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3、京都
 10. 大川佳子、山崎高志、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、環境ストレスによる C/EBP γ mRNA の安定化制御、第 85 回日本生化学会大会、2012/12、博多
 11. Umemura, M., Hatano, M., Kimura, N., Yamazaki, T., Takeda, H., Nakano, H., Takahashi, S., Takahashi, Y., The 5'-untranslated region regulates the stability of ATF5mRNA by nonsense-mediated mRNA decay, Cold spring harbor laboratory the 2011 meeting on eukaryotic mRNA processing, 2011/8, New York, USA
 12. Yamazaki, T., Okawa, Y., Watanabe, R., Murakoso, S., Nakano, H., Takahashi, S., Takahashi, Y., Regulation of C/EBP γ mRNA stability by environmental stresses, Cold spring harbor laboratory the 2011 meeting on eukaryotic mRNA processing, 2011/8, New York, USA
 13. 恒松加奈子、梅村真理子、清水悠介、中野春男、高橋滋、東浦康友、岡部勝、高橋勇二、嗅覚系の発達における ATF5 の機能解明、第 34 回日本分子生物学会年会、

2011/12、横浜

〔図書〕(計 1 件)

最新栄養学 第10版 建帛社 2014年 翻訳担当 第36章 ヨウ素とその欠乏による障害、p490-501.

〔その他〕

ホームページ

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/Life-Science/lemp-4/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勇二 (YUJI TAKAHASHI)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：20154875

(2) 研究分担者

梅村 真理子 (MARIKO UMEMURA)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：305211489

中野 春男 (HARUO NAKANO)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：60601870

(3) 連携研究者

該当なし