

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650189

研究課題名(和文) シナプスでの核タンパク質の局所翻訳・核への移行とシナプス可塑性

研究課題名(英文) Local translation of nuclear proteins at the synapses, translocation to the nucleus and synaptic plasticity.

研究代表者

白井 良憲 (SHIRAI, Yoshinori)

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70342798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ウィリアムズ症候群の原因遺伝子のひとつ、転写因子Gtf2iのプロモーター領域の解析を行った。CAGEデータベースの情報をもとに、ラット脳におけるGtf2i遺伝子の複数の転写開始点を予測し、既知のものに加え異なる5'非翻訳領域をもつ7種類の新規なGtf2i mRNAを同定した。これらmRNAの細胞内局在を調べたところ、いくつかは神経細胞樹状突起に局在していた。またラット脳ではGtf2iのタンパク質コード領域に既知の2つに加え、4つの新規なスプライスバリエーションが発現していた。Gtf2i mRNAの樹状突起への局在など、Gtf2i遺伝子の発現調節における5'非翻訳領域の重要な役割が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We investigated promoter region of rat Gtf2i gene and predicted alternative transcription start points of Gtf2i mRNA based on cap analysis gene expression (CAGE) database. Using these information, we identified seven novel transcripts of Gtf2i with different 5'UTRs in rat brain. We examined expression of these novel Gtf2i mRNAs with alternative 5'UTRs in rat brain by in situ hybridization. Gtf2i mRNAs with different 5'UTRs showed differential expression patterns and some of them were detected in dendritic processed of neuronal cells, suggestion that Gtf2i mRNA with these 5'UTRs exist in neuronal dendrite/PSD. We identified four novel splicing variants of the coding sequence of Gtf2i in addition to two known variants in rat brain.

These results suggest 5'UTRs of Gtf2i mRNA play important roles in expression of Gtf2i gene in the brain: differential cellular expression via alternative promoter usage, mRNA localization to and spatiotemporally specific translation in neuronal dendrites.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：mRNA 局所翻訳 核移行 遺伝子発現 シナプス可塑性 核タンパク質

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習の基礎となるシナプス可塑性の発現には、刺激を受けたシナプスが空間的・時間的に特異的に修飾され、長期にわたり維持されることが必要である。近年、シナプスの修飾に必要なタンパク質(受容体、リン酸化酵素、細胞骨格など)をコードする mRNA が、神経細胞の樹状突起のシナプス近傍に局在することが明らかになり、これらがシナプス後部で刺激依存的に「局所翻訳」され、シナプスを修飾するものと考えられている。しかしながら、「局所翻訳」によりシナプスの空間的・時間的特異的な修飾は説明できるが、長期にわたる維持・固定の説明は難しい。長期にわたるシナプスの可塑的变化の維持や固定には新たなタンパク質合成、特に核における遺伝子の発現の必要性が示唆されている。これにはシナプスから核への情報伝達、それを介した核での遺伝子発現の何らかの制御機構の存在が示唆されるが、このような「シナプスから核への情報伝達とそのダウンストリーム」の研究は未だ集約的になされていない。

われわれの研究室では、ラット大脳皮質から精製した後シナプス肥厚(PSD)に特異的に結合する PSD-mRNA を網羅的に多数(数千個)同定し、分類を行った。PSD-mRNA にはシナプスタンパク質以外に、核タンパク質(転写因子・ホルモン受容体・スプライシング因子など)をコードする mRNA も予想外に多数(200個程度)含まれていた。このことから、シナプスタンパク質のみならず核タンパク質もシナプスにおいて、刺激依存的に「局所翻訳」される可能性が考えられた。核タンパク質の本来の局在・機能から、「局所翻訳」された核タンパク質の核への移行、シナプス可塑性に関わる遺伝子発現への関与が想定された。このような、「シナプス刺激」「核タンパク質の局所翻訳」「核への移行」「新たな遺伝子発現」という、シナプスから核への情報伝達の流れは、シナプス可塑性の長期維持・固定の仕組みの根底にある新たな原理である可能性が考えられる。

本研究は、われわれの同定した PSD-mRNA の情報をもとに、核タンパク質がシナプス後部で「局所翻訳」され、「シナプスから核へと移行」し、シナプス可塑性に必要な遺伝子の発現を調節するという、新たな「シナプスから核への情報伝達」の機構を提唱する。これは遺伝子発現を介したシナプス可塑性の長期維持・固定の仕組みを明らかにしていくものである。

2. 研究の目的

正常な脳機能には、刺激を受けたシナプス特異的な修飾が、長期持続することが必要であるが、シナプス可塑的变化の長期維持・固定の機構は全く明らかになっていない。本研究は、後シナプスに局在する核タンパク質をコ

ードする mRNA が、刺激に応じて「局所翻訳」され「シナプスから核へと移行」し、核における「新たな遺伝子発現」を誘導することを示す事を目的とする。これにより、「シナプスから核への情報伝達」とそのダウンストリームを介した、シナプスの可塑的变化の長期維持・固定のメカニズムを明らかにしてゆく。具体的には、われわれが生化学的・分子生物学的に同定した PSD-mRNA のうち、核タンパク質をコードするものに着目し、まず *in vivo* で実際に後シナプス/樹状突起に局在する事を示す。次に核タンパク質のシナプスにおける局所翻訳を可視化し、続いて局所翻訳産物(核タンパク質)のシナプスから核への移行を蛍光イメージングにより調べる。最後に、核へ移行した翻訳産物により発現誘導を受ける遺伝子の同定を行う。これにより、核タンパク質がシナプス後部で局所翻訳され、シナプスから核へと移行しシナプス可塑性に必要な遺伝子発現を調節するという、新たな「シナプスから核への情報伝達」の検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in situ* hybridization による PSD-mRNA の後シナプス肥厚/樹状突起への局在の検証。まず、われわれの同定した PSD-mRNA のうち核タンパク質をコードする遺伝子について、ラット大脳皮質初代培養細胞を用いた *in situ* hybridization を行い、実際に後シナプス肥厚/樹状突起に局在するものをスクリーニングした。その結果、核タンパク質である転写因子 Gtf2i の mRNA が実際に、後シナプス肥厚/樹状突起に局在することがわかった。ヒト染色体の Gtf2 遺伝子を含む領域の欠失がウィリアムズ症候群とリンクしていることが明らかになっており、Gtf2i はウィリアムズ症候群の有力な原因遺伝子であると考えられている。ウィリアムズ症候群は自閉症スペクトラム障害に分類される神経発達障害である。Gtf2i を含む領域の重複によっても神経発達障害が見られ、Gtf2i の発現量の調節が重要であることが示唆されている。Gtf2i mRNA の樹状突起における局所翻訳が発現量の調節に関与している事が想定されたため、われわれは核タンパク質として転写因子 Gtf2i にターゲットを絞って研究を行うこととした。

一般に mRNA の神経細胞の樹状突起への局在やシナプスでの局所翻訳には mRNA の非翻訳領域が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。Gtf2i mRNA の樹状突起への局在やシナプスでの局所翻訳の機構を明らかにしていく上で、特に 5' 非翻訳領域の情報は不可欠である。しかしながら、Gtf2i の 5' 非翻訳領域の配列は一部しか明らかにされていない。また Gtf2i はタンパク質コード領域に複数のスプライスバリエーションを持つことが知られている。そこで当初の研究計

画を変更して、まず脳で発現する Gtf2i mRNA の遺伝子配列（特に 5' 非翻訳領域の配列に注目する）やスプライスバリエントを明らかにすることとした。

(2) CAGE データベースを用いた、Gtf2i mRNA の新規な 5' 非翻訳領域の同定。

Cap analysis gene expression (CAGE) データベースは、各遺伝子の転写開始点の候補となる配列のデータベースである。われわれは、マウス CAGE データベースを用いて、マウス Gtf2i の転写開始点を予測し、マウスとラットのゲノム配列の比較により（マウスとラットの転写開始点の候補となる配列は非常によく保存されている）、マウス CAGE データベースの情報をもとにラットの転写開始点を予測した。各転写開始点（=各 5' 非翻訳領域の 5' 末端）の配列をもとに順方向プライマーをデザインし、Gtf2i mRNA の 3' 非翻訳領域の 3' 末端（ポリ A 付加部位付近）の配列をもとに逆方向プローブをデザインした。これらのプライマーを用いた RT-PCR 法により、ラット脳で発現する Gtf2i mRNA 全長（5' 非翻訳領域 + タンパク質コード領域 + 3' 非翻訳領域）のクローニングを行った。

(3) Gtf2i mRNA の 5' 非翻訳領域の違いによる発現パターンの解析。

ラット脳で発現する Gtf2i mRNA は、複数の転写開始点を持つことが予測されたため、Gtf2i mRNA はそれぞれの転写開始点に対応する異なる 5' 非翻訳領域を持つものが複数種類存在することが予想された。それぞれの 5' 非翻訳領域をもつ Gtf2i mRNA の発現パターンや神経細胞の樹状突起への局在明らかにするために、各 5' 非翻訳領域の配列をプローブにした *in situ* hybridization を行い、異なる 5' 非翻訳領域を持つ Gtf2i mRNA のラット脳での発現を調べた。

(4) ラット脳における Gtf2i のスプライスバリエントの同定。

Gtf2i タンパク質には、4 つのスプライスバリエント（アルファ型、ベータ型、ガンマ型、デルタ型）が存在することが知られている。これらは Gtf2i の転写因子としての機能に重要な役割をはたしていることが報告されている。脳における Gtf2i の機能を明らかにするために、ラット脳で発現する Gtf2i のスプライスバリエントの同定を行った。

4. 研究成果

(1) 主な成果

PSD-mRNA のうち核タンパク質をコードする mRNA について、ラット大脳皮質培養細胞を用いて *in situ* hybridization を行い、実際にはシナプス肥厚/樹状突起に局在するものをスクリーニングした。その結果、核タンパク質である転写因子 Gtf2i をコードする mRNA

が実際に大脳皮質初代培養細胞の樹状突起に局在する事がわかった。Gtf2i は自閉症スペクトラム障害（ASD）に分類される神経発達障害であるウィリアムズ症候群の有力な原因遺伝子候補である。ウィリアムズ症候群は、Gtf2i を含む領域の重複によっても神経発達障害が見られ（ただし欠失の場合と正反対の症状を示す）、Gtf2i の発現量の調節が重要であることが示唆される。

次に、CAGE データベースを利用した Gtf2i mRNA の新規な 5' 非翻訳領域の同定を行った。mRNA の神経細胞の樹状突起への局在や、樹状突起における局所翻訳には mRNA の非コード領域（5' 非翻訳領域または 3' 非翻訳領域）が重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、特に翻訳の調節には 5' 非翻訳領域が重要な役割をはたしている。Gtf2i mRNA の局所翻訳の機構を明らかにしていく上で、5' 非翻訳領域の配列情報は不可欠であるが、Gtf2i の 5' 非翻訳領域の配列は一部しか明らかになっていない。われわれは、マウス CAGE データベースの情報をもとに、ラット Gtf2i の転写開始点を予測し、RT-PCR 法により、ラット脳における Gtf2i mRNA 全長（5' 非翻訳領域 + ORF + 3' 非翻訳領域）をクローニングした。その結果、Gtf2i mRNA の新規な 7 つの 5' 非翻訳領域が同定され、ラット脳においては異なる 5' 非翻訳領域をもつ合計 8 種類の Gtf2i mRNA が発現していることが明らかになった。

続いて、新規な Gtf2i mRNA の 5' 非翻訳領域の違いによる、ラット脳での Gtf2i mRNA の発現パターンの解析を行った。本研究で同定した Gtf2i mRNA の 8 種の 5' 非翻訳領域の配列をプローブにした *in situ* hybridization を行い、それぞれの 5' 非翻訳領域をもつ Gtf2i mRNA の発現パターンを調べたところ、5' 非翻訳領域の違いにより Gtf2i mRNA の発現する細胞種に違いが見られた。神経細胞に特異的に発現しているもののなかには、神経樹状突起に局在するものもあり、5' 非翻訳領域の違いにより、Gtf2i mRNA の発現パターンが異なり、Gtf2i mRNA の 5' 非翻訳領域は mRNA の樹状突起への局在にも関与することが明らかになった。

最後に、脳における Gtf2i タンパク質コード領域のスプライスバリエントの同定を行った。本研究で全長クローンした、脳で発現する 8 種の Gtf2i mRNA のタンパク質コード領域のシーケンスを行い、脳特異的なスプライスバリエントを調べたところ、脳においては既知のベータ型、ガンマ型に加えて、4 つの新たなスプライスバリエントが発現していることが明らかになった。

以上の結果から、Gtf2i mRNA の 5' 非翻訳領域は Gtf2i 遺伝子の脳での発現制御において重要な役割をはたしていることが示唆される。すなわち、複数のプロモータの選択による、発現する細胞種の制御、5' 非翻訳領域の選択による mRNA の局在や局所翻訳の制御

への関与が想定される。

(2) 得られた成果の位置づけとインパクト
正常な脳機能には、刺激を受けたシナプスの空間的・時間的に特異的な可塑的变化、可塑的变化の長期にわたる維持が必要であり、シナプス後部における「局所翻訳」が重要な役割をはたしていることが分かってきた。自閉症スペクトラム障害の患者で局所翻訳の制御因子 (TSC、PTEN、FMRP など) の変異が見つかり、これらの遺伝子の変異マウスでは実際に局所翻訳の亢進が見られること、亢進した局所翻訳の阻害により知覚や社会行動の異常が改善することなどから、局所翻訳によるターゲット mRNA の発現量の調節が、自閉症スペクトラム障害の発症に重要な役割をはたしていることがわかってきた。また、神経回路の抑制シナプスによる興奮の抑制の不全 (シナプスの興奮/抑制バランス異常) が自閉症スペクトラム障害の原因の一つであると考えられ始めている。

転写因子 Gtf2i は自閉症スペクトラム障害に分類されるウィリアムズ症候群の原因遺伝子の一つである。本研究で新たに同定した Gtf2i mRNA の 5' 非翻訳領域には、Gtf2i mRNA の樹状突起への局在に関与するものがあつた。この 5' 非翻訳領域の情報をもとに、核タンパク質 Gtf2i のシナプスでの「局所翻訳」「核への移行」「新たな遺伝子発現」と「興奮性・抑制性シナプスの強化や減弱」との関連を明らかにすることにより、自閉症スペクトラム障害のメカニズムを明らかにしてゆくことが期待される。

(3) 今後の展望

長期にわたるシナプス可塑的变化の維持や固定には、シナプスから核への情報伝達・核での遺伝子発現・それを介したシナプス維持の機構の存在が推測されるが、その機構の研究は未だ集約的に進められていない。本研究の継続により、核タンパク質が「局所翻訳」され、「シナプスから核へと移行し」、シナプス可塑性に必要な遺伝子の発現を調節し、それらがシナプスの強化や減弱を調節するという、「シナプスから核への情報伝達とそのダウンストリーム」による「シナプスの興奮/抑制バランスの制御」機構を明らかにする研究へと発展させることが可能である。

これはシナプスの可塑的变化の長期維持・固定の仕組みという、未解決の大きな問題に答えを与えるものであり、さらには、この仕組みの破綻による疾病 (自閉症スペクトラム障害) の新たな治療法の開発への応用が期待できる。

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)

〔学会発表〕(計1件)

白井良憲・鈴木龍雄、「CAGE データベースを用いた Gtf2i の新規な 5'UTR の同定および脳での発現」、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/departement/doctor/grdkareii-ikaso>

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.WFfeuNkh.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 良憲 (SHIRAI, Yoshinori)
信州大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70342798

(2) 研究分担者

鈴木 龍雄 (SUZUKI, Tatsuo)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80162965