

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790080

研究課題名（和文） 新規 BDNF 前駆体の発現および機能解析

研究課題名（英文） Analysis of a novel prepro-BDNF expression and function

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：脳・神経系の機能発現に重要な脳由来神経栄養因子BDNF mRNA合成機構を解析した結果、神経活動依存的なCa²⁺-CaMKシグナルによりBDNF mRNAの1つであるexon I-IX間スプライシングの効率の亢進が認められた。さらに、BDNFの翻訳開始点は、exon IX内に存在するが、exon Iの3'末端にも存在し、通常よりもN末端が8アミノ酸長いprepro-BDNFが合成されることを明らかにした。本研究は、BDNF発現に関して新たな知見をもたらすことが期待された。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the mechanism of mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is involved in expressing a variety of neuronal functions. I found that RNA splicing of BDNF exon I-IX, which is one of alternative BDNF transcripts, was enhanced by Ca²⁺-CaMK signal evoked by neuronal activity. Moreover, a novel prepro-BDNF protein was generated from BDNF exon I-IX mRNA. These results provide a novel insight into BDNF expression in neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：BDNF, スプライシング

1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor; BDNF）は、脳・神経系に幅広く分布する神経栄養因子ファミリーの1つである。BDNFは、様々な生理活性を有しており、神経細胞の生存や分化ばかりでなく、記憶・学習といった長期的な脳・神経機能変化にも関与している。一方、うつ病やアルツハイマー病患者の脳において、BDNF発現量の低下が指摘されており、BDNFは、精神疾患や神経変性疾患等の治療のターゲット分子としても注目されている。

BDNF遺伝子の構造は、ラットでは9つのexon（exon I-IX）から構成される。このうち、5'側の8つのexon（exon I-VIII）は、非翻訳exonであり、3'側のexon IXのみにBDNF前駆体をコードする領域が存在する。さらに、BDNF遺伝子の転写産物は、exon I-IX, II-IX, III-IX…というような特徴的な選択的スプライシングによって合成されるが、このスプライシングの分子機構についての研究は、まだ進められていない。また、脳・神経系におけるBDNF遺伝子発現は、神経活動に応じて誘導されることが知られている。特に、BDNF遺伝子のexon Iおよびexon

IVの上流に存在するPromoter I、Promoter IVは、この神経活動に依存して活性化される。この活性化には、記憶・学習などの高次脳機能発現に重要な転写制御因子であるCREB (Ca²⁺/cAMP-response element-binding protein) が関与することが既に明らかとなっている。一方、申請者は、神経活動依存的にBDNF mRNAが安定化を受けること、さらに、この安定化には、exon IXの3'非翻訳領域が関与することを明らかにした (Fukuchi and Tsuda, 2010, *J Neurochem*)。このように、BDNF遺伝子発現は、転写および転写後の段階で様々な制御を受ける。しかし、すべてのBDNF遺伝子の転写産物は、共通の翻訳領域を持つため、それぞれの転写産物がコードするBDNFタンパク質は同じであり、機能的な違いは無いと考えられてきた。ところが、exon Iの3'末端には、開始コドンが存在し、この開始コドンから翻訳されるBDNF前駆体は、通常の前駆体よりもN末端が8アミノ酸長いことが明らかとなった。さらに申請者は、*in vitro*の解析により、この開始コドンからも翻訳が起こることを明らかにした。そこで、コンピュータを用いた二次構造予測などの解析を行ったところ、N末端が8アミノ酸長いことで、このBDNF前駆体のN末端には、膜貫通領域の存在する可能性が現れた。すなわち、通常の前駆体のN末端は、シグナルペプチドとして切断されるが、8アミノ酸長い新規のBDNF前駆体は、切断されず、シグナルアンカーとして働く可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、新規BDNF前駆体「Exon I-BDNF前駆体」をコードするBDNF転写産物 (BDNF exon I-IX mRNA) に着目し、BDNF exon I-IX mRNA合成機構およびExon I-BDNF前駆体の機能解析の大きく2つの研究を行う。

[A] BDNF exon I-IX mRNA合成 (スプライシング) 機構の解明

BDNF遺伝子のexon IとIXの間は、50kbp以上も離れているのにも関わらず、神経細胞内では、効率よくBDNF exon I-IX mRNAは合成される。そこで、BDNF exon I-IX間のスプライシングに着目して、その制御機構 (スプライシングに必要な配列や因子、スプライシングの神経特異性など) を解明する。また、BDNF exon I-IX mRNA発現は、神経活動に依存して強く誘導される。そこで、スプライシングと

活動依存性との関連性も解析する。

[B] Exon I-BDNF前駆体の機能解析

実際にBDNF遺伝子のexon Iの3'末端に存在する開始コドンからも翻訳が起こり、Exon I-BDNF前駆体が発現するか、遺伝子導入により解析するとともに、内在性Exon I-BDNF前駆体を検出する抗体を作成し、検討を行う。また、過剰発現系などの解析から、Exon I-BDNF前駆体の神経細胞における機能性を探ることで、Exon I-BDNF前駆体の生理的役割の解明を目指す。

以上の解析により、これまで同一とされてきたBDNF転写産物の機能性の違いを解析することで、その生理的意義を提示する。

3. 研究の方法

本研究では、Exon I-BDNF前駆体の神経系における発現およびその機能解析を以下の内容で進めた。

[A] BDNF exon I-IX mRNA合成 (スプライシング) 機構の解明

BDNF遺伝子のexon I-IXのスプライシング解析用ベクター (スプライシング受容部位・供与部位・ブランチ部位を含むBDNF遺伝子領域を持つ) を用いて、スプライシングに必要なサイト・領域、因子を同定する。また、神経・非神経細胞でのスプライシング様式の相違や神経活動への応答性も検討する。

[B] Exon I-BDNF前駆体の機能解析

Exon I-BDNF前駆体が神経細胞で発現するのか、通常の前駆体と比較しながら、プロセッシング様式の相違、タンパク質局在、過剰発現などの方法により解析を行う。

4. 研究成果

[A] BDNF exon I-IX mRNA合成 (スプライシング) 機構の解明

スプライシング解析用ベクターを用いた結果、exon I-IX間スプライシングは、神経細胞においては非常に効率よく認められたのに対し、NIH3T3細胞やHeLa細胞では、ほとんど認められなかった。したがって、BDNF exon I-IX間のスプライシングは、神経細胞特異的に制御されることが示唆された。一方、神経細胞におけるexon I-IX間スプライシングは、細胞膜の脱分極により惹起されるL型電位依存性Ca²⁺チャンネルおよびNMDA型グルタミン

酸受容体由来のCa²⁺シグナル依存的にその効率が上昇することが明らかとなった。特に、CaMK経路がこのスプライシング効率に重要であった。また、exon II-IXやexon III-IXといった他のスプライシングは、Ca²⁺シグナルによる影響を受けない傾向にあった。また、exon Iの下流のintron領域に、exon I-IX間のスプライシングに関与する領域が存在する可能性が考えられたが、部分欠損体を構築して詳細に解析したところ、別の領域に存在する可能性が新たに考えられた。今後、さらに詳細な解析を進める必要がある。

[B] Exon I-BDNF 前駆体の機能解析

実際に exon I の翻訳開始点から Exon I-BDNF 前駆体が翻訳されるかについて、prepro-BDNF 発現ベクターを用いて、点変異導入による解析を行った。その結果、exon I の 3' 末端に存在する翻訳開始点から、prepro-BDNF が翻訳されることが明らかとなった。そこで、Exon I-BDNF 前駆体および通常の prepro-BDNF である Exon IX-BDNF 前駆体の神経細胞内局在を解析するため、GFP 融合タンパク質発現ベクターを構築した。その結果、Exon I-BDNF 前駆体-GFP および Exon IX-BDNF 前駆体-GFP を発現させた場合、どちらも神経細胞内において、細胞体および神経突起に GFP シグナルが確認された。特に、軸索と思われる突起には、GFP シグナルが突起の末端にまで広く分布していたことから、これらタンパク質は軸索内を輸送されていることが示唆された。しかし、本研究を進めている中で、GFP 融合タンパク質を発現させた場合、わずかに GFP のみの発現も確認されたため、Exon I-BDNF 前駆体および Exon IX-BDNF 前駆体の細胞内局在性の相違を厳密に検討することが困難であることが明らかとなった。そこで、Myc-tag を用いた新たな融合タンパク質発現ベクターを構築した。現在、これらベクターを用いて、細胞内局在性に関する詳細な解析を進めている。また、Exon I-BDNF 前駆体の機能解析をさらに進めるため、exon I-IX mRNA 発現を特異的にノックダウンする shRNA 発現ベクターの構築も試みた。今後、これらの解析ツールを用いることで、Exon I-BDNF 前駆体の神経細胞における生理機能をより詳細に解明することが可能である。

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2件)

(1) 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*, 査読有, 62: 1091-1098, 2012.

(2) 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.*, 査読有, 20: 2564-2571, 2012.

[学会発表] (計6件)

① 福地守, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 前畑陽佑, 津田正明 : 生物発光イメージングによる脳由来神経栄養因子BDNF発現変化のモニタリング. 日本薬学会第133年会, 2013, 3, 27-30, 横浜.

② 福地守, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 前畑陽佑, 津田正明 : 生物発光を利用したマウス脳内における脳由来神経栄養因子BDNF遺伝子発現変化の解析. 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, New Orleans, USA.

④ 福地守, 中島布久美, 田淵明子, 奥野浩行, 尾藤晴彦, 津田正明 : BDNF誘導性Arc遺伝子転写制御におけるプロモーター近傍領域の関与. 第35回日本神経科学大会, 2012, 9, 18-21, 名古屋.

⑤ 福地守, 桑名由紀, 竹森洋, 田淵明子, 津田正明. PACAPはNMDAレセプター活性化によるカルシニューリン-TORC1-CREB経

路を介してBDNF遺伝子発現を誘導する. 第34回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.

⑥ Fukuchi M.: Involvement of the promoter proximal region in brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced *Ard/Arg3.1* gene transcription. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases, 2011, 8, 3-5, Toyama.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/bioche1/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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