

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430030

研究課題名(和文) 転写抑制型CREBの発現機構と生理的役割の解析

研究課題名(英文) The mechanism that regulates CREB activator to repressor ratio in Drosophila.

研究代表者

宮下 知之 (MIYASHITA, Tomoyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：70270668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CREBは学習をきっかけとした新たな遺伝子発現を担う、長期記憶形成に必須の転写因子である。ショウジョウバエのCREBは1つのゲノム領域からalternative splicingにより転写活性型CREBと転写抑制型CREBが作られる。我々はこれまでの研究で、転写活性型と転写抑制型のCREBの発現にフィードバック機構があることを見いだした。しかし転写抑制型CREBの生理的な機能やその発現のメカニズムについては全く明らかになっていない。我々は転写抑制型CREBの発現をコントロールする因子を同定し、これをロックダウンする事で長期記憶形成が強化されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：CREB-dependent gene expression is critical for long-term memory (LTM) formation. In Drosophila single CREB (dCREB2) gene generates both activator dCREB2a and 2d and repressor dCREB2b isoforms by alternative splicing. Thus, it has been suggested that activator to repressor (activator/repressor) ratio is critical for LTM-related gene expression and this ratio is increased by spaced training which produces LTM. However, the splicing mechanism that regulates activator/repressor ratio is not yet known.

To explore the mechanism that regulates activator/repressor ratio, we focused on K-homology(KH) domain proteins which regulates alternative splicing of mRNA. In this study we report a KH domain protein which expression was increased by overexpressing dCREB2d, during spaced training. We suspect that this KH domain protein may play critical role in activator/repressor regulation during LTM formation.

研究分野：神経科学

キーワード：CREB alternative splicing K-homology(KH) domain

1. 研究開始当初の背景

Alternative splicingは、一つのゲノム領域から転写された遺伝子から、exonの組み合わせを変えることで、異なった機能をもつタンパク質をコードするmRNAを生み出す機構である。一方、CREBは学習をきっかけとした新たな遺伝子発現のマスタースイッチとして働き、動物の種を超えて、長期シナプス可塑性及び、長期記憶 (long-term memory; LTM) に必須の転写因子である。しかし学習・記憶におけるCREBそのものの動態についてはあまり研究されていない。ショウジョウバエのCREBは1つのゲノム領域からAlternative splicingにより転写活性型CREB(以下、活性型CREB)と転写抑制型CREB(以下、抑制型CREB)が作られる(Yin, et. al., Mol Cell Biol. 1995)。転写抑制型CREBをexogenouslyに過剰発現させるとLTM形成が抑制されることは知らせていたが、endogenousな抑制型CREBの発現が変化するという表現型はこれまで報告が無かった。我々はショウジョウバエの匂い連合学習を用い、NMDA受容体のマグネシウムブロックを無くしたショウジョウバエは学習が正常にできるが、LTM形成が障害される事を見出し、その原因が抑制型CREBの増加にあることを報告した(Miyashita, et. al., Neuron, 2012)。ほ乳類においても、CREBはalternative splicingによって活性型(CREB₁、CREB₂ など)と抑制型(i-CREB、CREB₋₁₄、CREB₋₃₅など)のisoformが発現してくることが知られているが(Bernhard and Marc. Nature Reviews Mol. Cell Bio., 2001, William, et. al., J.Bio.Chem., 1996)、活性型CREBと抑制型CREBが生理的にどのように使い分けられているのか、また、どのような分子メカニズムで活性型と抑制型の発現がコントロールされているのかは、全く明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では活性型CREBと抑制型CREBが

生理的にどのように使い分けられているのか?なぜ alternative splicing による多様性が必要なかを明らかにし、その発現の調節機構を調べる目的で研究を行う。 ショウジョウバエにおける LTM 形成には、間隔をあけて trial を繰り返す Spaced training が必要である。trial の間隔をあげない Massed training では LTM 形成は抑制されてしまう。これまで申請者は 1) spaced training 中、CREB は MAPK の活性依存的に Immediate early genes の1つである c-fos の転写を活性化し、c-fos は c-jun との複合体 AP-1 を MAPK 依存的に形成し、活性型 CREB 遺伝子を発現させること。このため Spaced training 中、trial を繰り返すたびに活性型 CREB と c-fos はお互いを転写し合う positive-feedback loop を形成していることを明らかにしてきた。この positive-feedback loop により、trial の数依存的に転写活性型 CREB が増加し、LTM 形成が強化されることも明らかにした。更に 10 回の trial をおこなう Spaced training において、10 回の trial 終盤に抑制型 CREB も発現上昇していることを見いだした。さらに exogenous に活性型 CREB を過剰発現させると endogenous な抑制型 CREB の遺伝子発現が増え、exogenous に抑制型 CREB を過剰発現すると endogenous な活性型 CREB の遺伝子発現が上昇することを突き止めた。**そこで、まず 1)抑制型 CREB の発現上昇は活性型 CREB の増加が原因であることを確かめる。2) 次にこれまでに見いだしてきた抑制型 CREB が増加する条件下で、抑制型 CREB mRNA を作り出す Alternative splicing factor の同定を行う。過剰発現や、RNAi や変異体を用いて Alternative splicing factor の発現抑制したとき、活性化型 CREB と抑制型 CREB の比が変化するかを確かめる。またそのときの学習、記憶をはじめとする行動がどのように変化するかを調べることで生理的な抑制型の役割を調べるのが可能になる。さらに候補となった Alternative splicing factor が**

CREB の pre-mRNA のどこに結合するかを同定し、結合部位を同定した後、ゲノム編集技術で変異や欠損を導入することで、抑制型 CREB が発現しないショウジョウバエを作成する。このショウジョウバエで学習や記憶にどのような変化がおこるかを調べることで、抑制型 CREB の生理的な機能を明らかにしていく。

3. 研究の方法

本研究では、学習、記憶の研究方法が確立し、記憶成分の同定が容易なショウジョウバエを用いて行う。また、ショウジョウバエは遺伝学的手法も確立され、容易に使うことができる。抑制型 CREB の生理的役割とその発現調節機構を明らかにするために、1) **抑制型 CREB の発現上昇をもたらす原因の同定**、2) **抑制型 CREB mRNA を作り出す alternative splicing factor の同定** 3) **抑制型 CREB のもつ生理的な役割の探索**。について遺伝学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法、行動学的手法を用いて明らかにしていく。まず、これまで見出てきた endogenous な抑制型 CREB の発現上昇する条件下で、発現変化のある alternative splicing factor を RT-QPCR により同定する。抑制型 CREB を発現させる alternative splicing factor の候補(factor X)が同定できたら、1) factor X のノックダウンを行うことで抑制型 CREB の発現が本当に抑制されるのかを調べる。また、factor X が CREB pre-mRNA のどこに結合し抑制型 CREB mRNA を作り出しているのかを同定するために、intron 部分の mRNA を合成し factor X との binding assay を行う。factor X の結合部位が同定できたら、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術でゲノム上の結合配列に変位または欠損を入れる事で、抑制型 CREB が発現できないショウジョウバエを作成することができる。このショウジョウバエの学習、記憶を調べることで抑制型 CREB の生理的機能を明らかにする

ことができる。

4. 研究成果

これまで endogenous に抑制型 CREB が発現を変化させることは知られていなかったが、本研究において我々は、1) ショウジョウバエで 10 回の trial を、間隔をあけて行う (Spaced Training) と、活性型 CREB の発現が Trial の回数依存的に増加するが、抑制型の CREB も Spaced Training の終盤に発現が増加すること。2) 活性型の CREB を exogenous に過剰発現すると、endogenous に抑制型 CREB が発現上昇するし、その逆に抑制型の CREB を exogenous に過剰発現すると endogenous に活性型 CREB が発現上昇することも明らかにしてきた。また、我々は以前に 3) NMDA 受容体の Mg^{2+} block をなくしたショウジョウバエは endogenous に抑制型 CREB が発現上昇することを明らかにした。これら endogenous に抑制型 CREB が発現上昇する 3 つの条件下で発現が変化する alternative splicing factor X を同定した。この factor X を RNAi でノックダウンすると、Spaced Training の終盤の endogenous な抑制型 CREB の発現が抑制された(図 1)。さらに我々は spaced training 時に活性型 CREB の発現と同様に発現上昇していた factor Y も同定した。factor Y を RNAi でノックダウンすると spaced training にともなう活性型 CREB の発現上昇が抑制された (図 1)。

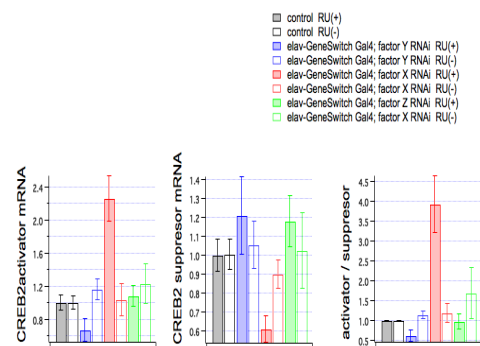


図 1

このことから factor Y は活性型 CREB の

splicing をコントロールしていることが示唆された。factor X のノックダウンショウジョウバエは抑制型 CREB が減少し、活性型 CREB が増加していたので、長期記憶形成が強化される可能性がある。そこで、抑制型 CREB がタンパクになると考えられるまでの回数 trial を繰り返し(20 x spaced training)、training 後 1 週間の記憶スコアをノックダウンしていないショウジョウバエと比べた。その結果、factor X をノックダウンしたショウジョウバエでは、1 週間記憶が増強していた。この結果から、抑制型 CREB の減少、活性型 CREB の増加によって長期記憶形成が増強したと考えられる。(図2)

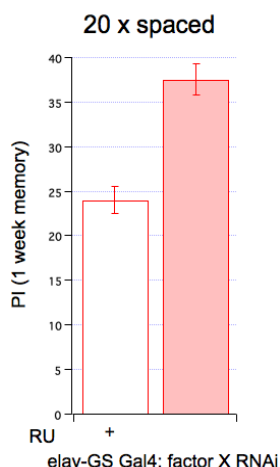


図2

しかし factor X によって alternative splicing をコントロールされている遺伝子は CREB だけとは限らない、CREB 遺伝子は 7 つの exon を持つことが知られており、活性型 CREB は全ての axon を使用し、exon6 を失うと抑制型 CREB になる。そこで factor X が CREB pre-mRNA のどこを認識して抑制型 CREB を作り出しているのかを見出すために、exon6 前後の intron 配列から mRNA を合成し factorX が結合する配列を見出した。現在その配列を CRISPR Cas9 を用いて欠損または変異を導入し、factorX による抑制型 CREB の発現がおこらないショウジョウバエを作成中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1)宮下知之 CREB の転写活性のバランスはどのように調節されているのか? 第 6 回分子高次機能研究会 平成 25 年 9 月 17 日 軽井沢倶楽部 ホテル軽井沢(長野県軽井沢町)

2)宮下知之、齊藤実 The mechanism that regulates CREB activator to repressor ratio in Drosophila. 第 35 回日本神経科学会 平成 24 年 9 月 19 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/memory/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮下 知之(MIYASHITA, Tomoyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野 主席研究員

研究者番号: 70270668

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし