

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430063

研究課題名(和文) 転写調節因子によるスパイン形成機構の解明

研究課題名(英文) Role of spine-resident transcriptional coactivator in dendritic spine formation

研究代表者

山崎 博幸 (Yamazaki, Hiroyuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10334137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写調節因子SpikarのスパインでのFRAP解析を行ったところ、Spikarのstable fractionはdrebrin及び核局在シグナルによって制御されていることが分かった。また、Spikarノックアウトマウスを解析したところ、養育行動に異常が見られた。さらに、Spikarによって転写制御されている遺伝子群を探索するためSpikarノックアウトマウスの脳を用いてマイクロアレイで解析を行った。Gene ontology解析及びパスウェイ解析を行ったところ、細胞骨格関係、アポトーシスシグナル関係シグナル分子が多く見つかった

研究成果の概要(英文)：Spikar is a transcriptional coactivator localized in dendritic spines and nucleus in neuron. We conducted real-time imaging of spikar in dendritic spines and analyses of spikar-KO mice. FRAP analysis showed that the dynamics of spikar in dendritic spine is regulated by actin-binding protein drebrin. In drebrin-knockdown neurons, the stable fraction of spikar was decreased, and the phenotype was rescued by drebrin-transfection. In the behavior analysis, we found abnormal maternal behaviors in spikar-KO mice. Spikar (-/-) females showed increased the time retrieving their pups and defect in grouping. Further, we analyzed transcriptome of spikar-KO mice brain by using microarray data. Gene ontology and pathway analyses revealed that the expression of numerous genes related with cytoskeleton and apoptosis signaling are regulated by spikar.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：樹状突起スパイン 転写調節因子 養育行動 マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

樹状突起スパイン(以下スパイン)は神経細胞において多くの興奮性シグナルが入力する棘状の構造物であり、その内部にシグナル伝達やシナプス可塑性に重要なタンパク質、オルガネラを含む情報処理ユニットとして機能している。スパイン形成に関与しているタンパク質は、低分子量 G タンパク質関連分子、細胞接着分子、PSD タンパク質、マトリックスメタロプロテアーゼ等多数報告されており、その作用機構も徐々に明らかになってきているが、いずれの場合においてもアクチン細胞骨格及びアクチン結合タンパク質が重要な役割を担っていると考えられている。アクチン結合タンパク質は大きく分けると、重合・脱重合に関わる重合因子と束化や安定化に関わる架橋因子に分けられる。これまでの研究から、Rho ファミリーに代表される低分子量 G タンパク質及びその調節因子(GEF、GAP 等)や Arp2/3 複合体によるアクチン重合機構がスパイン形成に重要な役割を担っていると報告されている。しかしながら、重合したアクチン繊維を調節するアクチン架橋因子によるスパイン形成機構についてはほとんど明らかになってはいない。我々は新しいスパイン形成メカニズム探索のためスパインに特異的に局在するアクチン繊維架橋因子である Drebrin に注目し、その結合タンパク質である Spikar がスパイン形成に関与していることを報告した。次に、Spikar-Drebrin 複合体がどのようにスパイン形成に関与しているのかを明らかにするために、酵母 Two hybrid 法を用いて Spikar 結合タンパク質の探索を行い、複数の結合タンパク質を得た。さらに、Spikar の個体レベルでの解析を行うために、Spikar コンディショナルノックアウトマウス(Spikar-KO マウス)を、行動レベル、発現遺伝子変化のレベルで解析を行った。

## 2. 研究の目的

(1) Spikar 結合タンパク質との結合解析  
酵母 Two hybrid 法で得られた Spikar タンパク質の1つは、これまでの報告から樹状突起スパイン形成を抑制するという働きを持つという事が分かっている。このタンパク質と Spikar の結合様式を解析する。

### (2) Spikar のスパインでの動態解析

Spikar は、神経細胞では樹状突起スパインと核に局在するが、スパイン形成促進機能については主に細胞質での働きだと考えられている。これまでの研究から、Spikar のスパインでの局在には Drebrin の存在が強く影響しているが、ダイナミクスへの寄与は分かっていない。ライブセルイメージングを用いてこの点を明らかにする。

### (3) Spikar-KO マウスの養育行動解析

Spikar-null ノックアウトマウスは胎生 8 日

付近で成長が止まる胎生致死であったため、CaMKII プロモーターを用いた前脳特異的 Spikar コンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、野生型マウスと同様に生育した。しかし、このマウスが産んだ仔は産後数日のうちに死んでしまうことが度々観察されたため、正常に養育されていない可能性が高いと考えられた。このため、Spikar と産後行動の関連をしらべるため、このマウスを用いて養育行動解析を行う。

### (4) Spikar によって発現調節される遺伝子の解析

Spikar は核でエストロジェン受容体やグルココルチコイド受容体のコアクチベーターとして機能することが分かっているが、実際に発現調節を受ける遺伝子は分かっている。Spikar によって発現調節される遺伝子群がスパイン形成に関与しているかを明らかにするために、Spikar-KO マウス脳のトランスクリプトーム解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) Spikar と Spikar 結合タンパク質との相互作用解析

Spikar をいくつかのフラグメントに分けて prey vector とし、Spikar 結合タンパク質を bait vector として酵母 Two hybrid 法で相互作用を確認する。酵母の培養開始から 48-72 時間後のコロニーサイズを指標にして陽性判定を行う。

### (2) ライブセルイメージングを用いた Spikar のスパインでの動態解析

ラット胎児よりパンカー法を用いて培養海馬神経細胞を調整し、DIV7-DIV8 に GFP-Spikar 及びその変異体を Lipofectamine2000 により導入する。DIV15-DIV16 にスパインに局限してフォトブリーチングを行い、タイムラプス撮影を行って蛍光の回復過程を記録し、Stable fraction 及び Dynamic fraction の数値を算出する。

### (3) Spikar-KO マウスの養育行動解析

Spikar-KO マウス及びコントロールマウス(フロックスマウス)が、巣作りを行っているか、産仔を巣にまとめているかを観察する。また、産仔のミルクバンドの有無を確認する。

産仔のうち、3 匹を巣から離れたケージの 3 か所のコーナーへ配置し、レトリーピング、グルーピング、クラウチングの潜時を測定する。また、3 匹それぞれの仔のレトリーピング時間も測定する。

### (4) トランスクリプトーム解析

Spikar-KO マウス及びコントロールマウスの海馬から mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて発現量の解析を行う。

Spikar-KO マウスにおいて発現量が変化し

た遺伝子に関して、クラスター解析、Gene ontology 解析、パスウェイ解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) Spikar 結合タンパク質は、Spikar の複数の部位に結合することが分かった。これまでに分かった部位は、核局在シグナルを含む N 末端領域とジンクフィンガーモチーフを含む C 末端領域である。この部位は Drebrin 結合部位とは異なっているため、Spikar 結合タンパク質は、Spikar 及び Drebrin と複合体を形成すると示唆された。

(2) Spikar の核移行シグナルに変異を加えて核移行の機能を阻害すると Spikar はスパインに安定に局在した。また、Drebrin 結合領域を欠失した Spikar 変異体は動きが速く、またスパインでの stable fraction は小さかった。Drebrin ノックダウン細胞では、核移行シグナル変異体においても stable fraction は小さくなった。これらの事から、Spikar のスパインにおけるダイナミクスには Drebrin と核移行シグナルが重要だと明らかになった。

(3) Spikar-KO マウスの養育行動を解析したところ、以下の結果を得た。巣作りは野生型マウスとほとんど変わらず、半球状又は皿状の巣を作ることが多かった。また、ミルクバンドの有無も野生型マウスと比べて差は見られなかった。一方、レトリーピング試験を行ったところ、ノックアウトマウスにおいてレトリーピング、グルーピング、クラウチングの潜時が野生型マウスに比べて大きいことが分かった。また、全てのマウスをレトリーピングせずに、巣の外に放置したままクラウチング姿勢に入ることもしばしばあった。このことは、Spikar が視床下部内側視索前野において重要な機能を担っていると示唆しており、当該部位において更なる解析の必要があると考えられる。

#### (4) トランスクリプトーム解析

マイクロアレイによって得られたデータのノーマライズを行い、56605 プローブからスクリーニング可能な 34100 の有効プローブを得た。これらのデータを用いて、Spikar-KO マウス、コントロールマウスそれぞれ 3 匹についてクラスター解析を行った結果、図 1 の結果を得た。この図から分かるように、Spikar-KO マウスはコントロールマウスに比べて遺伝子の発現様式がかなり異なることが分かった。また、主成分分析においても、同様の結果を得た。

ノーマライズ済みのマイクロアレイデータの検定を行い、コントロールと発現量に差がある遺伝子を特定した。その発現量が野生型マウスと比べて統計的に有意差のある遺伝子を抽出した。この結果、Spikar-KO マウスにおいて発現が減少しているプローブは 4 個あり、発現が上昇しているプローブは

174 個あった。これらのプローブについて Gene ontology 解析及びパスウェイ解析を行ったところ、Spikar の下流遺伝子群及び機能関連遺伝子は細胞骨格関係、アポトーシスシグナル関係のものが多かった。

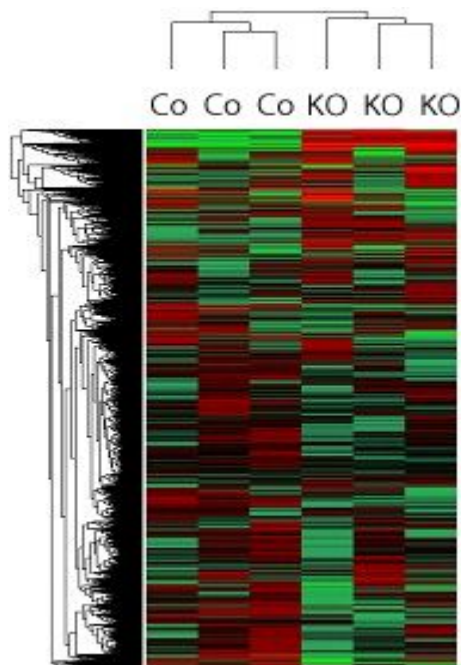


図 1. 全遺伝子セットによる全サンプルの階層的クラスタリングを行い、各サンプルの類似度を比較した。発現値の近いものを近くに配置した樹形図として表示しており、遺伝子もしくはサンプル間やクラスター間の距離が近い順に併合してある。Co はコントロールマウス。KO は Spikar-KO マウス。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Li B, Ding S, Feng N, Mooney N, Ooi YS, Ren L, Diep J, Kelly MR, Yasukawa LL, Patton JT, Yamazaki H, Shirao T, Jackson PK, Greenberg HB.

“Drebrin restricts rotavirus entry by inhibiting dynamin-mediated endocytosis.” Proc Natl Acad Sci U S A. 2017,114, E3642-E3651. 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1619266114

Shirao T, Hanamura K, Koganezawa N, Ishizuka Y, Yamazaki H, Sekino Y.

“The role of drebrin in neurons.” J. Neurochem. (2017) in press. 査読有  
DOI: 10.1111/jnc.13988

Ohara Y, Koganezawa N, Yamazaki H, Roppongi RT, Sato K, Sekino Y, Shirao T.

“Early-stage development of human induced pluripotent stem cell-derived neurons.” J Neurosci Res. 2015, 9312:1804-13. 査読有  
DOI: 10.1002/jnr.23666

Shimizu H, Ishizuka Y, Yamazaki H, Shirao T. "Allopregnanolone increases mature excitatory synapses along dendrites via protein kinase A signaling." *Neuroscience*. 2015, 305:139-45. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.079

Tanabe K, Yamazaki H, Inaguma Y, Asada A, Kimura T, Takahashi J, Taoka M, Ohshima T, Furuichi T, Isobe T, Nagata K, Shirao T, Hisanaga S. "Phosphorylation of drebrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration." *PLoS One*. 2014, 9:e92291. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0092291

Mizui T, Sekino Y, Yamazaki H, Ishizuka Y, Takahashi H, Kojima N, Kojima M, Shirao T. "Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin A from dendritic spines." *PLoS One*. 2014, 9:e85367. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0085367

〔学会発表〕(計 9 件)

Hiroyuki Yamazaki. "Thrombospondin-1 induces an axon formation in early developmental stage of human iPSC cell-derived neuron" 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 20 日 ~ 22 日、パシフィコ横浜 (横浜)

Hiroyuki Yamazaki. "CaMKIIbeta is localized in dendritic spine in a drebrin-dependent and drebrin-independent manners" Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, 2015 Oct. 17-21, Chicago, USA.

Hiroyuki Yamazaki. "Drebrin stabilizes CaMKIIβ in core region but not in postsynaptic density of dendritic spine" 第 58 回日本神経化学大会、2015 年 9 月 11 日 ~ 13 日、大宮ソニックスシティ (さいたま)

Hiroyuki Yamazaki. "CaMKIIb is localized in two distinct stable pools in a dendritic spine" 第 38 回神経科学学会大会、2015 年 7 月 28 日 ~ 31 日、神戸国際会議場 (神戸)

Hiroyuki Yamazaki. "Spikar, a novel transcriptional coactivator, regulates the formation and stabilization of dendritic spines dependent on drebrin." Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, 2014 Nov 15-19, Washington DC, USA.

Hiroyuki Yamazaki. "pikar function and its stabilization in dendritic spines are dependent on drebrin" 第 57 回日本神経科学大会 シンポジウム ("A polyhedral approach to molecular bases involved in

synaptic plasticity) 2014 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良)

Hiroyuki Yamazaki. "A novel drebrin-binding protein spikar mediates spine formation" ISN Satellite Symposium "Key molecules for neuronal maturation -Application for validating the maturation of human iPSC-derived neurons", 2014 September 23, Yayoi-hall, University of Tokyo, Tokyo.

Hiroyuki Yamazaki. "Spikar function and its stabilization in dendritic spines are dependent on drebrin." The 6th ISN Special Conference, 2014 September 20-22, Yayoi-hall, University of Tokyo, Tokyo.

Hiroyuki Yamazaki. "Spikar function and its stabilization in dendritic spines are dependent on drebrin." 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日、パシフィコ横浜 (横浜)

〔図書〕(計 1 件)

Yamazaki H, Shirao T. Drebrin (Chapter 5) "Homer, spikar and other drebrin-binding proteins in the brain." New York, Springer. (2017) in press

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ドレブリン A 及びドレブリン E の特異的定量法

発明者: 白尾智明、石塚佑太、山崎博幸

権利者: 白尾智明、石塚佑太、山崎博幸

種類: 特許権

番号: 特許出願 (2014-164695)

出願年月日: 平成 26 年 8 月 13 日

国内外の別: 内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 博幸 (YAMAZAKI HIROYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10334137