

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460064

研究課題名(和文) 脳内SRFコファクター切替えによるArc転写制御：機構解明とASD創薬基盤構築

研究課題名(英文) Regulation of Arc gene transcription by SRF cofactors: mechanism and application for drug design in ASD

研究代表者

田淵 明子 (TABUCHI, Akiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：40303234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経活動は、神経細胞内の遺伝情報の取り出し(遺伝子発現)をコントロールし、脳の働きに関係する分子の量を調節する。Arcは、シナプスで機能する分子であり、その遺伝子の発現制御機構を理解することは創薬基盤の構築に繋がる。本研究では、転写因子SRFに結合するMKLのうち、MKL2がArc遺伝子活性化に中心的役割を担うことを明らかにした。また、MKL2の新規分子種であるSOLOISTが種々の最初期遺伝子の発現を活性化することを明らかにした。現在、マウス個体レベルにおけるSOLOISTの機能を遺伝子組換え動物作製により検討中である。また、MKL1、MKL2の抗体を作製した。

研究成果の概要(英文)：Neuronal activity controls gene expression in neurons and regulates the amounts of molecules which are involved in brain function. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) functions at synapses. Thus, understanding the molecular mechanism of Arc gene expression contributes to the construction of drug design for neurological disorders. Transcription factors play a central role in gene expression. One of the representative transcription factor is serum response factor (SRF). We have focused on SRF-bound cofactor, megakaryoblastic leukemia (MKL). In this study, we found that MKL2 play an important role in activating Arc gene in neurons. In addition, SOLOIST, a novel MKL2 isoform, which we discovered activated several immediate early genes. We are now generating genetically modified mice to investigate the in vivo function of SOLOIST. Furthermore, we produced MKL1 and MKL2 antibodies.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：神経活動 血清応答因子(SRF) MKL Arc 遺伝子発現 転写因子

1. 研究開始当初の背景

脳内遺伝子転写は、神経機能分子の供給源として記憶学習に不可欠であり、その破綻が神経疾患発症の一因となっている。遺伝子転写は、転写因子が制御するが、近年それら転写因子に結合する転写コファクターの役割が注目を集めている。転写因子 serum response factor (SRF)は、脳形成と機能に重要であるとの知見が数多く報告されている(Tabuchi 脳科学辞典 2012)。そして、その転写コファクターである megakaryoblastic leukemia (MKL)は、アクチン結合モチーフを有し、非神経細胞では細胞質と核とを移動する性質が報告されている。MKLには、MKL1とMKL2がある(Miralles et al. Cell, 2003)。主に研究代表者らは、MKLが脳に高発現しており、樹状突起形態制御を行うことを報告してきた(Tabuchi et al. J. Neurochem. 2005; Shiota et al. J. Neurochem 2006; Ishikawa et al. JBC 2010)。また、MKL1やMKL2には様々なアイソフォームがあることを明らかにしている(Ishikawa et al. FEBS Open Bio 2013)。その中でもMKL2の新規アイソフォーム spliced neuronal long isoform of SRF transcriptional coactivator (SOLOIST)は、研究代表者らが発見した神経細胞に選択的に発現するアイソフォームである(論文準備中)。培養大脳皮質ニューロンにSOLOISTを過剰発現させると、樹状突起数を低下を起すことが判明し、従来知られているMKL2アイソフォーム1とは異なる性質を持つ(論文準備中)。

以上のように、MKLは脳機能において重要な働きを持つと想定されるが、神経系標的遺伝子の制御機構や個体レベルにおける機能解析は進んでいない。一方で、MKL1遺伝子配列変化が統合失調症(Luo et al. Schizophr Bull 2015)、MKL2遺伝子配列変化が自閉スペクトラム症と関係する(Neale et al. Nature 2012; Holt et al. Eur J. Hum. Genet 2010)との報告がなされており、神経疾患病態への関与が考えられた。

2. 研究の目的

(1)そこで本研究では、MKLの神経系標的遺伝子として activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)に着目し、その制御機構を明らかにすることを目的とした。Arcは、ポストシナプスにおいてAMPA型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを促進する働きを持つ分子であり(Okuno et al Cell 2012)、シナプス活動や脳由来神経栄養因子BDNFにより転写活性化が引き起こされる(Kawashima et al. PNAS 2009; Pintchovski et al. J. Neurosci 2009)。また、SRFの標的遺伝子のひとつがArc遺伝子であるとの報告がなされている(Ramanan et al. Nat Neurosci 2005)。この背景を基にMKLがArc遺伝子を標的としているかどうかを検証した。

(2)また、研究代表者らが発見したSOLOISTの機能を細胞レベルと個体レベルで明らかにすることも目的とした。細胞レベルでは、神経系細胞株であるNeuro2a細胞を用いた。これまで知られている既知のMKL2アイソフォームに加え、SOLOISTを過剰発現させることで種々の最初期遺伝子や細胞骨格関連遺伝子の活性化を比較検討した。また、RNA干渉によるノックダウンの影響についても検討を進めた。個体レベルでは、SOLOISTノックアウトマウスの作製を目指した。SOLOISTは、特異的エキソンを有しているため、そのエキソンを欠失させる戦略を取った。

研究期間内における目的は上述したとおりである。本研究は、研究代表者らが見いだした新規分子や新規機構を基盤としているところが特色であり、将来的な大きな目的としては、脳機能原理の解明と創薬基盤構築を掲げている。SOLOISTノックアウトマウスが神経疾患の動物モデルとして有用であれば、治療薬のスクリーニング系として応用できる可能性が高い。

(3)一方、MKL1とMKL2を認識する高品質の抗体の必要性から抗体作製を行った。

3. 研究の方法

(1)MKL標的遺伝子としてのArc遺伝子制御機構

①Arc遺伝子プロモーターには、シナプス活動に応答する配列が存在する。特にSRF結合配列、ならびにSRF結合配列に隣接して存在するSRFコファクター ternary complex factor (MKLとは異なる転写コファクター)の結合配列が重要であるかどうかを調べた。Arc遺伝子プロモーターを連結させたルシフェラーゼ遺伝子レポーターベクターを培養大脳皮質ニューロンに導入し、BDNF刺激を行った。その後、ルシフェラーゼアッセイを行い、転写活性を検出した。その際、野生型に加え、転写因子の結合配列に変異を導入した変異型も使用し、転写活性における重要度を検証した。

②ノックダウン実験によるArc遺伝子発現誘導におけるMKLの関与

BDNFによるArc遺伝子発現誘導にMKLが関与するかどうかの検証には、ノックダウン実験を用いた。コントロールベクターとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の配列を持つshR-Lucを構築した。また、すでにMKL1、MKL2をノックダウンするベクターは既に構築済みである。これらベクターをArc遺伝子プロモーターに連結させたルシフェラーゼ遺伝子レポーターベクターとともに培養大脳皮質ニューロンに導入し、BDNF刺激を行った。その後、ルシフェラーゼアッセイを行い、転写活性を検出した。

③クロマチン免疫沈降法によるArc遺伝子ク

ロマチン上への MKL のリクルート状態の検出
MKL が Arc 遺伝子発現を制御しているのであれば、Arc 遺伝子クロマチン上に MKL がリクルートされているはずである。その検証のため、MKL1 と MKL2 の抗体によるクロマチン免疫沈降法を行った。培養大脳皮質ニューロンを BDNF で刺激した後にクロマチン免疫沈降法を行った。コントロール遺伝子として GAPDH 遺伝子を、抗体のコントロールは IgG を用いた。

(2) 細胞レベルおよび個体レベルにおける SOLOIST の機能解明

①細胞レベルの解析：SOLOIST 過剰発現で制御される遺伝子群の同定

SOLOIST は、MKL2 のアイソフォームであり、他の MKL2 アイソフォームと同様に転写活性化ドメインを有する。したがって、SOLOIST も標的とする遺伝子群が存在していると想定された。内在性の遺伝子群の活性化を検出するため、遺伝子導入効率の高い神経細胞株である Neuro2a 細胞を使用した。MKL2 の種々のアイソフォームを Neuro2a に導入し、RNA を抽出した。定量 PCR により最初期遺伝子や細胞骨格関連遺伝子の発現変化を検出した。

②個体レベルの解析：SOLOIST ノックアウトマウスの作製

SOLOIST には、特有のエキソンが存在している。したがって、エキシソンの両端に loxp 配列を組み込んだノックインマウスを作製して、cre レコンビナーゼによるエキソン欠失をおこない SOLOIST ノックインマウスを得るという戦略を立てた。

(3)MKL の抗体作製

MKL1 と MKL2 との相同性が低い領域を抗原とし、モルモットを免疫して抗体を作製した。

4. 研究成果

(1)MKL 標的遺伝子としての Arc 遺伝子制御機構

①Arc 遺伝子プロモーター上の配列の関与 (方法(1)①を行った成果)

以前、研究代表者らは、Arc 遺伝子プロモーター上の配列のうち、CREB, MEF2, SRF 配列すべてが BDNF に応答することを確認している。本研究においてもその再現性を得ることができた。それに加え、ternary complex factor の結合配列に変異を導入したものは、BDNF で刺激をしていない際の basal level を上昇させていることを確認した。したがって、MKL とは異なる別の SRF コファクターである TCF が抑制的に働いていることを示唆する結果を得た。

②ノックダウン実験による Arc 遺伝子発現誘導における MKL の関与 (方法(1)②を行った成果)

培養大脳皮質ニューロンに MKL1, MKL2 を

ノックダウンするベクターを導入したところ、MKL2 ノックダウンベクターを導入したサンプルで BDNF 刺激による Arc 遺伝子プロモーター活性化が抑制された。一方、MKL1 ノックダウンベクターを導入したサンプルではコントロールである shR-luc と同程度の誘導活性を得た。このことから、MKL のうち、MKL2 が BDNF による Arc 遺伝子プロモーター活性に寄与する可能性が考えられた。

③クロマチン免疫沈降法による Arc 遺伝子クロマチン上への MKL のリクルート状態の検出
クロマチン免疫沈降の結果、コントロールである IgG では Arc 遺伝子を増幅するプライマーではバンドが検出されず、MKL1 および MKL2 抗体処理でバンドが検出された。特に MKL2 抗体ではコントロールの GAPDH 遺伝子の顕著な増幅はかからなかったことから、少なくとも MKL2 は Arc 遺伝子クロマチン上に結合していることが示唆された。

以上のことより、Arc 遺伝子が MKL の標的遺伝子であることが強く示唆された。

(2) 細胞レベルおよび個体レベルにおける SOLOIST の機能解明

①(方法(2)①を行った結果)

SRF の標的遺伝子は、最初期遺伝子群や細胞骨格関連遺伝子群がある。まず、代表者らは、定量 PCR 用のベクターを構築した。マウス Arc, β -actin, actinin α 1, gelsolin, egr1, c-fos, srf, GAPDH の cDNA の部分断片をクローニングした。次に MKL2 のアイソフォームである MKL2 variant1, 3, SOLOIST をそれぞれ neuro2a 細胞に導入し、24 時間後に total RNA を回収し、上記の遺伝子群の発現を定量 PCR で調べた。その結果、Arc, c-fos, egr1 遺伝子は variant1, SOLOIST で有意に発現誘導されていることが明らかとなった。特に variant1 の誘導能は、SOLOIST よりも高いものであった。一方、 β -actin, actinin α 1, gelsolin, srf の発現は各種アイソフォームの過剰発現下で顕著な上昇を認めなかった。

以上のことより、SOLOIST を含む MKL2 は、発現が顕著に誘導されるという報告がない遺伝子群の発現は上昇させず、主に最初期遺伝子群の発現上昇を行っている可能性が新たに示唆された。現在、SOLOIST を特異的にノックダウンする RNA 干渉用ベクターの構築に成功している。今後は、そのベクターを用い、内在性 SOLOIST が上記の最初期遺伝子群の発現を制御しているかどうかを検証し、標的遺伝子群の同定に繋げる予定である。

②(方法(2)②を行った結果)

SOLOIST ノックアウトマウスの作製は、まず大腸菌人工染色体を用いたターゲットングベクターをマウス ES 細胞に導入し、マウスゲノムとの間で相同組換えを起こさせた。

相同組み替えがおこっている ES 細胞をサブプロットで選別したところ、1 クローン得ることに成功した。次に、その ES 細胞を偽妊娠マウスへ移植し、キメラマウスを得た。本研究では、まずキメラマウス 2 匹を得ることができた。キメラ率の確認を行った後にキメラマウスからの germline transmission の確認を行うため、キメラマウスの仔マウスのゲノタイピングを行った。しかし、germline transmission を確認することはできなかった。現在、共同研究で別のキメラマウスを得ることに成功し、germline transmission が確認できる段階まで進んでいる。今後は、ヘテロマウスの交配を進め、ノックアウトマウスを作製する。

(3)MKL の抗体作製

(方法 (3)を行った結果)

MKL1 と MKL2 に交差特異性のある抗体の作製に成功した。今後は、この抗体をウェスタンプロット、免疫染色、クロマチン免疫沈降法などに用いていく予定である。

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. Mizuguchi M, Fujii T, Obita T, Ishikawa M, Tsuda M, Tabuchi A. Transient α -helices in the disordered RPEL motifs of the serum response factor coactivator MKL1. *Sci Rep*. 2014 Jun;4:5224 doi: 10.1038/srep05224
2. Ishikawa M, Shiota J, Ishibashi Y, Hakamata T, Shoji S, Fukuchi M, Tsuda M, Shirao T, Sekino Y, Baraban JM, Tabuchi A. Cellular localization and dendritic function of rat isoforms of the SRF coactivator MKL1 in cortical neurons. *Neuroreport*. 2014 May;25:585-92. doi: 10.1097/WNR.0000000000000141

[学会発表] (計 17 件)

1. 田淵明子, 金田真理彩, 菊池啓悦, 佐藤夏美, 石橋悠太, 阪上洋行, 大塚稔久, 飛田耶馬人, 福地 守, 津田正明. 高品質抗体を利用した SRF 転写活性化因子 MKL1 と MKL2 のシナプスにおける局在と機能の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会; 2016 Nov 30-Dec 2; 横浜
2. 金田真理彩*, 阪上洋行, 佐藤夏美, 石橋悠太, 福地 守, 津田正明, 田淵明子. SRF 転写活性化因子 MKL1 および MKL2 のポストシナプス局在とその意

義. 日本薬学会北陸支部第 128 回例会; 2016 Nov 27; 金沢.

3. 田淵明子. 脳神経系における転写因子 SRF とそのコファクターの発現と機能 第 3 回北陸エビジェネティクス研究会; 2016 Nov 21-22; 福井.
4. Kaneda M, Sakagami H, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. Specific detection of SRF transcriptional coactivator MKL1 and MKL2 by using new antibodies: application to visualization of subcellular localization in neurons. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (1st TAA-Pharm Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.
5. Tanaka T, Ishibashi Y, Shoji S, Kubo Y, Hakamata T, Sakagami H, Fukuchi M, Okuno H, Bito H, Tsuda M and Tabuchi A. Identification and characterization of SOLOIST, a novel neuronal isoform of SRF coactivator MKL2: comparison to other MKL2 isoforms. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (1st TAA-Pharm Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.
6. Tabuchi A, Kikuchi K, Fukuchi M, Ishibashi Y, Tsujii J, Okuno H, Bito H, Tsuda M. Involvement of SRF cofactors MKL and TCF in BDNF-induced Arc gene promoter regulation in cortical neurons. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (1st TAA-Pharm Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.
7. 田中拓郎*, 石橋悠太, 庄司しずく, 久保友喜美, 袴田知之, 阪上洋行, 福地守, 奥野浩行, 尾藤晴彦, 津田正明, 田淵明子. SOLOIST, a novel neuronal isoform of SRF coactivator MKL2, but not other isoforms, activates endogenous Arc gene transcription in neuronal cells. 第 38 回日本生物学的精神医学会第 59 回日本神経化学会大会合同大会; 2016 Sep 8-10; 福岡
8. 金田真理彩*, 阪上洋行, 福地 守, 津田正明, 田淵明子. Evaluation of new antibodies against SRF coactivator MKL1 and MKL2. 第 38 回日本生物学的精神医学会第 59 回日本神経化学会大会合同大会; 2016 Sep 8-10; 福岡
9. 田淵明子, 福地 守, 菊池啓悦, 久保友喜美, 庄司しずく, 袴田知之, 田中拓郎, 佐藤夏美, 石橋悠太, 阪上洋行, 尾藤晴彦, 奥野浩行, 大塚稔久, 津田正明. 神経可塑性関連遺伝子の発現調

- 節における CREB および SRF コファクターの役割. 第 39 回日本神経科学大会シンポジウム「神経活動依存的な遺伝子発現の制御と機能」; 2016 Jul 20-22; 横浜.
10. 田中拓郎, 石橋悠太, 庄司しずく, 久保友喜美, 袴田知之, 阪上洋行, 福地守, 津田正明, 田淵明子. SRF コアクチベーター MKL2 の新規アイソフォーム SOLOIST の発現と機能解析. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会; 2015 Nov 15; 富山.
 11. Tanaka T, Ishibashi Y, Shoji S, Kubo Y, Hakamata T, Sakagami H, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. SOLOIST, a novel isoform of SRF coactivator MKL2 that is enriched in neurons and negatively regulates dendritic complexity of cortical neurons. 第 58 回日本神経化学学会大会; 2015 Sep 11-13; さいたま.
 12. Satou N, Ishibashi Y, Ohtsuka T, Tobita Y, Tsujii J, Ishikawa M, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. Subcellular localization of the SRF coactivators, MKL1 and MKL2, in the brain: possible involvement in dendritic spine morphology. 第 58 回日本神経化学学会大会; 2015 Sep 11-13; さいたま.
 13. Kikuchi K, Fukuchi M, Ishibashi Y, Tsujii J, Ishikawa M, Tsuda M, Okuno H, Bito H, Tabuchi A. Involvement of SRF cofactors in BDNF-induced Arc gene expression. 第 58 回日本神経化学学会大会; 2015 Sep 11-13; さいたま.
 14. 菊池啓悦, 塩田惇, 山田哲也, 福地守, 津田正明, 田淵明子. Rho-SRF シグナル阻害剤がラット大脳皮質神経細胞の SRF 介在性遺伝子発現と形態に与える効果. 第 38 回日本神経科学大会; 2015 Jul 28-31; 神戸.
 15. 菊池啓悦, 福地守, 石橋悠太, 辻井惇也, 石川充, 津田正明, 奥野浩行, 尾藤晴彦, 田淵明子. SRF コアクチベーター MKL による BDNF 誘導性 Arc 遺伝子発現制御機構の解析. 日本生化学会北陸支部第 33 回大会; 2015 May 23; 富山.
 16. Tabuchi A, Miyata T, Kaito M, Kikuchi K, Ishibashi Y, Fukuchi M, Hakamata T, Tsuda M. Expression and dendritic roles of actin- and protein phosphatase-1-binding protein, Scapinin/Phactr3, in rat cortical neurons. 6th Special Conference of The International Society for Neurochemistry; 2014 Sep 20-22; Tokyo.
 17. 田淵明子, 石橋悠太, 庄司しずく, 久保友喜美, 袴田知之, 宮田智陽, 佐藤

夏美, 阪上洋行, 福地守, 津田正明. SRF 転写コファクター MKL2 のアイソフォーム発現と樹状突起形態制御. 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11-13; 神奈川.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
富山大学薬学部分子神経生物学研究室ホームページ
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/bioche1/index-j.html>

富山大学公式チャンネル Tom's TV 2015
<https://www.youtube.com/watch?v=RgPrxbZBYe0>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 明子 (TABUCHI, Akiko)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) 准教授
研究者番号: 40303234

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

森 寿 (Mori, Hisashi)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学) 教授
研究者番号: 00239617

(4) 研究協力者

福地 守 (FUKUCHI, Mamoru)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
助教