

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0067

研究課題名(和文) 神経活動依存的な遺伝子発現システムの構成的解析

研究課題名(英文) Constructive analysis of the neural activity dependent gene regulation system

研究代表者

安部 健太郎 (Abe, Kentaro)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70462653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現制御は複数の転写因子が関与する複雑なシステムである。遺伝子発現制御システムの全容を明らかにするためには、システムのアウトプットとしてのトランスクリプトームの情報だけでなく、システムを構成する多数の転写因子の活性を取得する必要がある。本研究では研究代表者によって新規に開発された「転写因子レポーターウイルス」を用い、培養下の神経細胞において神経活動依存的な遺伝子発現に関与する50種以上の転写因子活性を定量的かつ経時的に評価し、各転写因子の活性化タイムコースを明らかにすることに成功した。本研究は脳神経系の発達機構や記憶や学習の分子メカニズムの解明に資する新規解析法と解析結果を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶の形成の過程において脳内の神経細胞での新規遺伝子の発現が重要であることは知られるが、その分子メカニズムの詳細に関しては不明な部分が多い。神経活動により発現が変化する遺伝子は多く知られるが、どのような分子メカニズムによりそれらの遺伝子の転写が増減するのかはわかっていなかった。本研究で遺伝子の転写を制御する転写因子の内在活性を定量する技術確立し、時間とともに細胞内の転写因子の活性がダイナミックに変化することを示した。本研究を進展させ、記憶形成や脳の発生・発達のメカニズムを明らかにすることで、各種脳機能障害の克服や、教育・学習の効率化などに資することができる。

研究成果の概要(英文)：The regulation of gene expression is the output of complicated system which involves multiple transcription factors. In order to unveil the whole view of this gene-regulation system, the information regarding not only the transcriptome as the output of this system, but also the activity of various transcription-factors are necessary. In this research, we quantitatively analyzed over 50 activity dependent transcription factors in cultured neurons by our newly developed "transcription-factor-reporter virus" and succeeded to obtain the time-course of their activity changes upon neuronal activity enhancement. This research established a novel method to analyze the mechanisms involved in the development of brain function and learning and memory of animals.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 シグナル伝達 脳・神経 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

細胞の遺伝子の発現調節機構は多数の因子が関与する複雑なシステムであり、これを構成的に理解するためにはアウトプットとしての遺伝子発現プロファイルだけでなく、それらを読み出す複数の転写因子の活性の把握が不可欠である。細胞には数十種類もの転写因子が発現しており、それらが刺激に応じてダイナミックに活性を変動させ、協調して働くことにより個々の遺伝子の発現を制御する。例えば、神経細胞では神経活動依存的に複数の転写因子の活性が変動し、細胞に発現する遺伝子のプロファイルを短期的または長期的に変化させることが、動物が情報を記憶したり、環境に応じて可塑的に発達したりすることに必須であることが知られる。しかしながら、遺伝子の発現制御に関わる複数の転写因子群の転写活性の相対的比較や、転写因子間の活性クロストーク、活性化のタイムコースの比較や、各遺伝子発現への寄与度については体系的に解析されていないのが実状であった。その一因として、転写因子の活性を直接定量し、複数の転写因子の活性を比較する際の技術的制限や、解析手法の不足が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では細胞が内在に発現する多数の転写因子に対し、その遺伝子転写活性を定量的に計測することを可能にする新規な転写因子レポーターウイルスを作成する。神経細胞が神経活動依存的に遺伝子発現を変化させる機構をモデルに、細胞が刺激の inputs を受けて遺伝子発現プロファイルを変化させる機構を明らかにする。具体的には、このレポーターウイルスを用い、培養神経細胞において神経活動依存的な遺伝子発現に関与する 50 種以上の転写因子の転写活性を定量的に評価し、それらを統合した「転写因子活性プロファイル」を複数のタイムコースにおいて取得する。また、個々の転写因子の転写活性を実験的に操作した状態における転写活性プロファイルや、転写因子活性のアウトプットであるトランスクリプトームの情報を取得し、転写因子同士の活性クロストークや、個々の遺伝子発現に対する寄与度を明らかにする。さらに、培養細胞系での神経活動依存的な転写活性プロファイルと生体内におけるプロファイルの比較や、神経情報伝達分子の操作を通じ、神経細胞の機能に関連する転写調節機構とその生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

培養神経細胞における転写因子活性測定：本研究では、胎生 15 日齢マウス胎児の大脳皮質から取得した神経細胞の初代分散培養系を用いて培養条件下における神経活動依存的な転写因子活性の測定を行った。分散培養した神経細胞にレンチウイルスを感染させたのち、培養後 15 日において神経活動を誘発した後、複数のタイムポイントにおいて細胞を溶解し核酸を回収・精製し、逆転写により cDNA サンプルを作成した。作成した cDNA サンプルについて各レポーター遺伝子対して設計した PCR プライマーを用いて定量 PCR 法による発現量の定量測定し、転写因子活性を算出した。

生体内神経細胞における転写因子活性測定：妊娠マウスを開腹し、胎生 15 日齢マウス胎児の脳室に *in utero* においてレポーターウイルスを注入し、大脳皮質 2/3 層細胞の神経細胞にレポーターコンストラクトを感染させた。マウスが成体になった後に、刺激を提示した後、脳部位を切り出し、核酸を回収、上記と同様の方法にて転写因子活性の定量を行った。

4. 研究成果

(1) 転写因子活性を定量化する転写因子活性レポーターウイルスの作成

生体内において重要な役割を果たすことが知られる 70 種の転写因子に対しその内在の転写因子活性を測定するコンストラクトを作成し、それをレンチウイルスベクターに搭載した。それらについて、高力価のウイルスを精製した。各レポーターウイルスはそれぞれの転写因子に対応するプロモーターを有し、異なるレポーター遺伝子を発現する。PCR のプライマーを検討することにより同一サンプルから同時に 12 種類のレポーター遺伝子の発現定量を可能にすることに成功した。

(2) 培養神経細胞における神経活動依存的な転写因子活性プロファイルの変化の同定

マウス大脳皮質初代培養において転写因子活性レポーターウイルスを感染させたのち、神経活動を誘発した後の各転写因子の遺伝子発現制御活性の測定を行った。神経活動誘発刺激としては、高カリウムイオン濃度バッファーの添加による神経細胞の脱分極誘発、およびピキュキュリンによる抑制性シナプス伝達の遮断に伴う興奮性神経伝達の増強の 2 種の刺激を行った。また、確認のため、光遺伝学的手法による神経活動の誘発についても実施した。高カリウム刺激による脱分極後、6 時間後において 52 転写因子中 9 転写因子が 2 倍以上の転写因子活性の変化を示した。6 時間後に活性変化した転写因子のなかには、CREB、SRF、MEF2 など、これまでの知見より神経活動依存的な活性を示すことが知られているものが含まれたが、これまでに神経細胞

において活性の変化や明確な機能が知られていない複数の転写因子についても活性の変化が引き起こされることが分かった。また、活性が上昇するものの他、2倍以上活性が低下する転写因子も複数確認された。次にピキュキュリン刺激を同様に行ったところ、2倍以上活性が変化する転写因子は、52 転写因子中 10 転写因子であった。ピキュキュリン処理後、CREB、SRF、MEF2などは高カリウム処理と同様に転写因子活性の増加がみられたが、処理により異なる活性を示す転写因子も4種観察された。また、各転写因子に対してより詳細なタイムポイントでのデータ取得を行い、活性変化のタイムコースを比較したところ、転写因子によって異なるタイムコースを示すことが明らかになった。

また、遺伝子発現プロファイルと転写因子活性プロファイルの情報を統合した解析を行った。各遺伝子の発現は複数の転写因子によって制御されるが、それらの制御は単に遺伝子近辺に転写因子結合配列の存在する転写因子の活性の単純な加算ではなく、多数の転写因子が協調的に働き当該遺伝子発現を制御することが確認された。

(3) 生体内神経細胞における神経活動依存的な転写因子活性プロファイルの変化の同定

マウス大脳皮質 2/3 層細胞に転写因子活性レポーターウイルスを感染させたのち、神経活動を誘発した後の転写因子活性の測定を行った。神経活動誘発刺激としては、すでに大脳皮質における神経活動と転写因子活性の増強が引き起こされることが報告のある、環境エンリッチメント刺激を行った。転写因子活性レポーターを発現するマウスを、ホームケージから隠れ場所や新規物体を多く含む広いケージに移した後、1時間においてサンプルの回収を行い、転写因子活性の計測を行った。その結果、環境エンリッチメント刺激後、1時間において35 転写因子中 10 転写因子で2倍以上の活性変化がみられた。培養神経細胞での高カリウム刺激と生体内神経細胞における環境エンリッチメント刺激1時間後において共通して活性上昇がみられた転写因子は CREB と SRF であった。培養細胞系と生体内では刺激強度や神経修飾分子、グリアの関与などさまざまな条件が異なる。これらの違いが転写因子活性プロファイル変化の違いを生み出すと考えられる。

本研究成果によりこれまで計測することが困難であった細胞内在の転写因子の活性を定量的に取得することが可能になった。また、細胞内の転写因子はダイナミックな活性変化を呈するものであることが確認された。本研究において、神経細胞を含む生体内細胞が刺激を受けてダイナミックに変容する機構の一部が明らかにされた。本研究は記憶や学習の分子メカニズムの解明に資する新規解析法と解析結果を提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡部 真緒, 安部 健太郎
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおける脳内転写因子活性の変化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Araki Satomi, Hajime Yamamoto and Abe Kentaro
2. 発表標題 Measuring the activity of transcription factors in the brain of depression model mouse.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiraishi Takeru, Fukue Ryotaro and Abe Kentaro
2. 発表標題 Measuring the activity of transcription factors relating to short and long term memory formation.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Morita Hiroya and Abe Kentaro
2. 発表標題 Measuring the activity of transcription factors in day and night brain.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kentaro Abe
2. 発表標題 Mechanisms underlying the experience-dependent development of birdsongs
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安部 健太郎
2. 発表標題 生後能力発達に影響する「生まれ」と「育ち」
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安部 健太郎
2. 発表標題 脳機能の発達と可塑的变化を引き起こす脳内機構の解明の試み
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安部健太郎
2. 発表標題 CREBの活性化が鳴禽類の社会学習を促進する
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安部健太郎
2. 発表標題 鳴禽類における世代を超えた情報の口承に関わる神経機構
3. 学会等名 生理学研究所東北研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kentaro Abe & Dai Watanabe
2. 発表標題 CREB-mediated interplay of genes and environment in the postnatal song learning in songbirds
3. 学会等名 Society of Neuroscience annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kentaro Abe
2. 発表標題 Transcription factor-mediated interplay of genes and environment in the social learning of vocal skills in songbirds
3. 学会等名 Wiring and Functional Principles of Neural Circuits (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考