

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06625

研究課題名(和文) 精神疾患・発達障害リスク転写因子MKLによるシナプスから核への情報伝達機構解明

研究課題名(英文) Signaling from synapses to the nucleus by transcription factor MKL, which is a risk candidate for psychiatric and neurodevelopmental disorders

研究代表者

田淵 明子 (TABUCHI, Akiko)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：40303234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子MKL1(MRTFA)およびMKL2(MRTFB)の遺伝子変異は、神経疾患のリスクファクターである。したがってMKLによる遺伝子発現制御の機構を知ることは、神経疾患発症解明に貢献する。本研究では、脳由来神経栄養因子BDNFで誘導されるArc遺伝子発現がMKL2を介することを発見した。また、神経活動依存的にMKL2がシナプスから核に移行する分子機構の一端を明らかにした。すなわち、NMDA型グルタミン酸受容体とL型カルシウムチャネルの活性化や脱リン酸化酵素カルシニューリンの活性化が核移行に必要であること、Rhoシグナル活性化によるアクチン重合も核移行に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経機能遺伝子の発現を合理的かつ効率的に活性化する仕組みを解明でき、シナプスの安定化や維持、記憶学習の本質を明らかにできる。また、本研究に用いた研究材料や技術を国内外の研究者らに提供することにより、神経科学分野のみならず、MKLの関わりが指摘されるがん転移分野などの生命科学分野の発展に貢献する。

MKLをターゲットとして精神疾患・発達障害の治療や予防に役立てることができる。MKLの核移行促進やMKL活性化を引き起こす低分子化合物、将来的には食品成分を同定することで、メンタルヘルス(精神衛生)の向上につながり、患者や家族のQOLの改善、脳の活性化を基軸とした健康寿命の延伸に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The SNPs or mutations of SRF transcriptional cofactor MKL1 (MRTFA) or MKL2 (MRTFB) gene is a possible risk factor for neurological disorders. Thus, understanding for molecular mechanisms underlying MKL-mediated gene expression contributes to elucidation of the etiology of neurological disorders. Here we have demonstrated that MKL2 mediates activation of the Arc enhancer, synaptic activity-responsive element of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) gene induced by BDNF. In addition, neuronal activity-dependent nuclear translocation of MKL2 from synapses is mediated by an NMDA receptor and an L-type voltage-dependent calcium channel, and followed by phosphatase calcineurin. On the other hand, neuronal activity induces Rho GTPase-dependent F-actin polymerization, which is required for nuclear translocation of MKL2.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：血清応答因子(SRF) 神経活動 MKL 遺伝子発現 転写因子

1. 研究開始当初の背景

神経(シナプス)活動依存的遺伝子発現は脳のはたらきに必要である。神経(シナプス)活動は、転写因子を司令塔として、自らの働きを高める分子の供給を遺伝子発現によって制御している。転写因子のノックアウトマウス等の解析や標的遺伝子の同定により、遺伝子発現が記憶学習等の脳機能に重要な役割を果たすことが示されている。またその破綻が神経疾患発症に関連している。したがって、神経活動依存的遺伝子発現の制御機構解明は、「脳機能や疾患の病態解明」、「精神疾患や発達障害の治療や予防」と「脳の活性化」を狙った分子標的薬の探索にもつながる。

MKLは、MKL1とMKL2に大別され、神経活動依存的遺伝子発現を司る転写因子SRFに結合する(脳科学辞典2012)。申請者らは、脳神経系におけるMKLの機能に関する多くの研究実績を有する。脳に高発現しており、樹状突起複雑化を引き起こすことを発見した他(J Neurochem 2005; J Neurochem 2006; JBC2010)、MKL1、MKL2の分子種や神経選択的MKL2分子種の同定や機能解析を行っている(FEBS Open Bio 2013; Neuroreport 2014)。

またMKL1とMKL2の遺伝子変異は、それぞれ統合失調症、自閉スペクトラム症のリスクファクターである(Luo et al. Schizophr Bull 2015; Neale et al. Nature 2012)。このことから、MKL1とMKL2は異なる機能を持っており、その機能破綻が特有の神経疾患病態の一因となっているものと考えた。しかし、MKL1とMKL2における機能性の違いについてはまだ未解明な点が多い。

最近、我々はMKL1とMKL2とを区別して認識する高品質抗体の作製に成功した。生化学・本抗体は従来の抗体よりもMKL1とMKL2とを区別して認識し、ウェスタンブロット、免疫染色、免疫沈降、クロマチン免疫沈降に適用できる。本抗体を用いることにより、MKL1とMKL2がシナプスにあり、シナプスの成熟化に関わること(Sci Rep 2018)、MKL2が神経活動(脱分極)によって核に移行することを発見した。また、本抗体を有効活用することにより、神経系のシナプス関連タンパク質であるactivity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)遺伝子のエンハンサーがMKL2によって制御されていることを見いだした。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)MKL1とMKL2の特異的結合分子の同定、(2)MKL1とMKL2のシナプスから核への移行制御(シグナル伝達経路等)、核内遺伝子発現制御機構の解明、(3)自閉スペクトラム症患者で発見された変異MKL2の機能破綻機構の解明を当初目的とし、MKLが関わる神経細胞の形態と機能制御の分子実体を探究した。

3. 研究の方法

(1) MKL1とMKL2の特異的結合分子の同定

非神経細胞においてMKLとすでに相互作用が報告されているβアクチンを焦点に共免疫沈降実験を行った。また、核輸送を担うと予想されたインポーチンのクローニングと発現ベクターの作製を行うとともにMKLとの相互作用を検証するため、共免疫沈降実験を行った。

(2) MKL1とMKL2のシナプスから核への移行制御(シグナル伝達経路等)、核内遺伝子発現制御機構の解明

①bicuculline/4APで培養大脳皮質ニューロンを刺激すると、MKL2が核に移行する。Bicuculline/4APは、興奮性シナプス伝達を惹起するため、MKL2核移行がカルシウムチャネルの活性化を介する可能性が予想された。そこで、NMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤であるAP5とL型電位依存性カルシウムチャネルのブロッカーであるnicardipineを前処理し、MKL2の核移行の阻害が起こるかどうかを免疫染色により検証した。また、NMDA型グルタミン酸受容体やL型電位依存性カルシウムチャネル活性化より下流のシグナル伝達系の阻害剤を用い、MKL2核移行に関わるシグナル伝達経路を免疫染色により検証した。特定したシグナル伝達分子の関与についてさらに詳細に解析するため、過剰発現ベクターの実験と導入による核移行状況や転写活性化状況を免疫染色やルシフェラーゼアッセイにより検証した。同様に、MKL1についても検討を行った。

②すでに我々は、MKL2がシナプス関連分子であるArc遺伝子エンハンサーを活性化することを示唆する予備的結果を得ていた。そこで再現実験を行い、信頼性を担保する一連の実験(レポーターアッセイ等)を行った。

(3) 自閉スペクトラム症患者で発見された変異MKL2の機能破綻機構の解明

野生型MKL2と変異型MKL2の転写活性化因子としての違いを定量PCR法やレポーターアッセイにより検証した。

4. 研究成果

(1) MKL1 と MKL2 の特異的結合分子の同定

3-(1)で述べた通り、MKL と β アクチンとの相互作用の有無を調べるため、共免疫沈降実験を行った。MKL と β アクチンはともに NIH3T3 細胞にタグ融合タンパク質として発現させ実験を行ったが、現段階では相互作用の確認に至っていない。また、インポーチンとの相互作用についても同様の実験を行ったが、本実験も相互作用の確認に至らなかった。今後は、作製した高品質抗体を用いた内在性 MKL と相互作用する分子の同定を大脳皮質ニューロンにおいて行うことや刺激依存的な相互作用の有無についても検証を行う必要がある。

(2) MKL1 と MKL2 のシナプスから核への移行制御 (シグナル伝達経路等)、核内遺伝子発現制御機構の解明

①MKL1 と MKL2 のシナプスから核への移行制御 (シグナル伝達経路等)

カルシウムチャネル阻害剤を用いた結果、神経活動依存的な MKL2 の核移行が NMDA 型グルタミン酸受容体と L 型電位依存性カルシウムチャネルを介することを明らかにした。また、シグナル伝達阻害剤のうち、カルシウムカルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの活性化が MKL2 核移行に必要であることが判明した。そこで我々は、ヒトカルシニューリンのクローニングを行い、野生型と恒常活性化型カルシニューリンの発現ベクターを作製した。両者を NIH3T3 細胞に過剰発現させたところ、MKL2 の核移行促進が引き起こされた。以上のことから、MKL2 核移行には、カルシウムチャネル活性化-カルシウム流入-カルシニューリン活性化というシグナリングが引き金となっていることが明らかとなった。

この結果から、「カルシニューリンが MKL2 を基質として認識し、直接脱リン酸化を行うことにより、核移行が引き起こされる」という作業仮説が提唱されたため、カルシニューリンと MKL2 との相互作用を共免疫沈降実験により検証したが、現段階では相互作用の確認に至っていない。また、MKL2 の脱リン酸化部位として候補となるアミノ酸について、部位特異的変異導入実験により検証を行ったが、核移行に重要な脱リン酸化部位の同定には至っていない。今後は、共免疫沈降実験の最適化等を行い、カルシニューリンと MKL2 との関係性を明らかにする必要がある。

カルシニューリン過剰発現により MKL2 核移行は認められるものの、転写活性化は引き起こさないことが明らかとなった。このことから、カルシニューリンによる MKL2 核移行は、転写活性化に必要十分ではなく、MKL2 の転写活性化機能を制御する異なるシグナル経路が存在すると予想された。ところで、カルシニューリンの機能欠損は、その前脳特異的ノックアウトマウスの表現型から、統合失調症様症状と関係するとの指摘がなされている(脳科学事典:カルシニューリンの項)。また、カルシニューリンは、転写因子 NFAT の脱リン酸化を引き起こすが、その破綻がアルツハイマー病で引き起こされる可能性も指摘されている(脳科学事典:カルシニューリンの項)。したがって、本研究によって明らかにされたカルシニューリンによる MKL2 核移行制御は、正常な脳機能発現に極めて重要な現象であり、その破綻が様々な神経疾患病態に関係することが示唆される。

MKL は、アクチンと相互作用するとの報告があることは前述の通りであるが、低分子量 G タンパク質 Rho の活性化によりアクチン重合が引き起こされると MKL はアクチンから離れ、核に移行することが指摘されている。これをふまえ、神経活動依存的な MKL2 核移行にも Rho が関与するかどうかの検証を行った。Rho キナーゼ阻害剤を用いた結果、予想通り MKL2 核移行に Rho が関係することが明らかとなった。また、F-アクチンに結合するファロイジンを免疫染色実験に用いたところ、bicuculline/4AP 刺激による神経活動惹起がアクチン重合を引き起こすことを明らかにした。今後は、アクチン重合と MKL2 核移行の時間経過が一致するかどうかを検証し、両者の関係の整合性について詳しく探究する必要がある。

一方、MKL1 (MRTFA) についても同様の解析を行った。Bicuculline/4AP 刺激による MKL1 核移行状況は軽微な変化であり、MKL2 のような顕著な核移行は認められなかった。

上述した結果は、培養細胞レベルの解析であり、in vivo において引き起こされる現象であるかどうか不明であったがマウス個体の神経活動惹起により、MKL2 の核移行が引き起こされる傾向を認めた。

②核内遺伝子発現制御機構の解明

MKL2 がシナプス関連分子である Arc 遺伝子エンハンサーを活性化することを示唆する予備的結果の再現実験を行った。脳由来神経栄養因子 BDNF の刺激により、Arc 遺伝子誘導が一過的に起こること、その誘導には、Arc 遺伝子エンハンサー配列上の SRF 結合配列が特に重要であり、その領域内に MKL2 がリクルートされている結果を得た。以上のことは、Arc 遺伝子が MKL2 の標的遺伝子であることを強く示唆する。

Bicuculline/4AP 刺激では、MKL2 核移行が引き起こされるが、BDNF 刺激では MKL2 の核移行は認められなかった。MKL2 は、定常状態では一部核にも局在しているため、核内 MKL2 のリン酸化修飾等のタンパク質修飾が Arc 遺伝子活性化に関わる可能性が考えられた。

BDNF は脳機能発現に極めて重要な神経栄養因子であり、また Arc 遺伝子も AMPA 型グルタミン酸受容体の膜表面における量を調節するというシナプス伝達の制御に関わる。以上のことから、本研究は脳の作動原理解明の一助となる。また、シナプスで働く分子の供給を活性化させるような神経疾患治療薬開発の標的提示をすることに繋がる。

(3) 自閉スペクトラム症患者で発見された変異 MKL2 の機能破綻機構の解明

野生型 MKL2 と変異型 MKL2 の転写活性化因子としての違いを定量 PCR 法やレポーターアッセイにより検証した。両者の過剰発現実験の結果、Arc, c-fos 遺伝子活性化は、変異型 MKL2 で低下していた。

したがって、変異により MKL2 の転写活性化因子としての機能が破綻している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikuchi K, Ihara D, Fukuchi M, Tanabe H, Ishibashi Y, Tsujii J, Tsuda M, Kaneda M, Sakagami H, Okuno H, Bito H, Yamazaki Y, Ishikawa M, Tabuchi A.	4. 巻 148
2. 論文標題 Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the Arc gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 204-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 伊原 大輔, 田邊 広樹, 今西 詩織, 小坂 彩, 佐野 友香里, 阪上 洋行, 加藤真之佑, 田淵 明子
2. 発表標題 シナプスに局在する転写活性化因子MRTFBは神経活動依存的に核移行しJunB遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今西 詩織, 小坂 彩, 田邊 広樹, 伊原 大輔, 佐野 友香里, 加藤真之佑, 田淵 明子.
2. 発表標題 神経活動依存的なMRTFB の核移行におけるRho-アクチニングナル伝達系の関与
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊原 大輔, 田邊 広樹, 今西 詩織, 小坂 彩, 佐野 友香里, 阪上 洋行, 加藤 真之佑, 田淵 明子
2. 発表標題 ポストシナプスに局在するSRFコアクチベーターMRTFBの局在変化を介した神経活動依存的な遺伝子発現誘導機構の解析
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Ihara, Hiroki Tanabe, Shinnosuke Kato, Shiori Imanishi, Aya Kosaka Hiroyuki Sakagami, Akiko Tabuchi
2. 発表標題 SRF転写コアクチベーターMRTFBの神経活動依存的核移行制御
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊原 大輔、田邊 広樹、今西 詩織、小坂 彩、佐野 友香里、阪上 洋行、加藤 真之佑、田淵 明子
2. 発表標題 シナプスに存在する転写活性化因子MRTFBの神経活動依存的な核移行と遺伝子発現制御機構に関する解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Ihara, Yuya Yamazaki, Natsumi Satou, Mamoru Fukuchi, Masaaki Tsuda, Akiko Tabuchi
2. 発表標題 Functional analysis of gene mutation of SRF coactivator MRTFB which was found in a patient with autism spectrum disorders
3. 学会等名 Toyama Forum for Academic Summit on "Dynamic Brain"
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneda M, Sakagami H, Hida Y, Ohtsuka T, Satou N, Ishibashi Y, Fukuchi M, Krysiak A, Ishikawa M, Ihara D, Kalita K, Tabuchi A
2. 発表標題 Synaptic localization of SRF coactivators MKL1 (MRTF-A) and MKL2 (MRTF-B) and their function in dendritic morphology were elucidated by generation and evaluation of new antibodies against MKL1 and MKL2.
3. 学会等名 International MADS Box Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ihara D, Yamazaki Y, Satou N, Fukuchi M, Tsuda T, Tabuchi A.
2. 発表標題 Mutation of SRF coactivator MKL2 which was found in patients with autism spectrum disorders negatively regulates SRE-mediated gene transcription and dendritic complexity in cortical neurons.
3. 学会等名 第3回富山・アジア・アフリカ創薬研究シンポジウム(3rd TAA-Pharm Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanabe H, Sano Y, Imanishi S, Sakagami H, Ihara D, Tabuchi A.
2. 発表標題 Mechanism of nuclear translocation of SRF transcriptional coactivator MRTFB induced by membrane depolarization of cortical neurons.
3. 学会等名 第3回富山・アジア・アフリカ創薬研究シンポジウム(3rd TAA-Pharm Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵明子, 伊原大輔, 福地守, 田邊広樹, 阪上洋行, 大塚稔久, 津田正明
2. 発表標題 神経活動によるSRF転写コファクターMKL/MRTFの制御とその役割
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学会大会 合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊原大輔, 山崎雄哉, 佐藤夏美, 福地守, 津田正明, 田淵明子
2. 発表標題 自閉症スペクトラム障害で発見されたSRFコアクチベーターMKL2遺伝子変異の機能解析
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊広樹, 佐野友香里, 加藤真之佑, 今西詩織, 阪上洋行, 伊原大輔, 田淵明子
2. 発表標題 神経細胞の脱分極による転写活性化因子MKL2の核移行制御
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊原大輔, 山崎雄哉, 佐藤夏美, 福地守, 津田正明, 田淵明子
2. 発表標題 SRFコアクチベーターMKL2の遺伝子変異が転写活性化およびニューロン形態に与える影響～自閉症スペクトラム障害とMKL2機能障害との関係～
3. 学会等名 Toyama Academic GALA 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊原大輔, 山崎雄哉, 佐藤夏美, 福地守, 津田正明, 田淵明子
2. 発表標題 自閉症スペクトラム障害で発見された遺伝子変異を導入したSRFコアクチベーターMRTFBIはSRF依存性転写活性化およびニューロン形態を負に制御する
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊広樹, 佐野友香里, 加藤真之佑, 今西詩織, 阪上洋行, 伊原大輔, 田淵明子
2. 発表標題 脱分極とシナプス活動による転写因子SRFコアクチベーターMRTFBの核移行制御に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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>
富山大学ホームページ「神経細胞のシナプスではたらく分子の遺伝子発現制御機構を解明」
<https://www.u-toyama.ac.jp/education/news/2019/0419.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------