

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19209005
 研究課題名（和文） 神経再生を誘導するための再生コア因子複合体の同定
 研究課題名（英文） Identification of a transcription factor complex which promotes nerve regeneration

研究代表者
 木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00192021

研究成果の概要（和文）：

神経再生を促進する分子群の発現を統合的に制御している中核的転写機構が存在すると予想されていた。今までの成果から、転写因子の ATF3, cJun, STAT3 の関与がとりわけ重要であることが分かっていた。本研究では、神経損傷特異的に発現する遺伝子 DINE のプロモーターを用いて、これらの転写因子が別の転写因子である Sp1 に結合し、Sp1 を介して DNA に結合していることを明らかにした。この新たな転写因子複合体は、一部の他の神経再関連分子の転写も同様に制御することから、神経再生を起動する新たな再生コア因子複合体であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Nerve injury requires the expression of large ensembles of genes. The key molecular mechanism for this gene transcription regulation in injured neurons was poorly understood. We hypothesized an existence of transcription factor complex, which promoted expressions of multiple nerve injury associated molecules. In this study we have identified a promoter complex consisting of 4 transcription factors, ATF3, c-Jun, STAT3 and Sp1. This complex substantially promoted expression of nerve injury associated proteins such as DINE and SOD. This could be one of potent transcription factor complexes especially for nerve regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2008年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2009年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
年度			
年度			
総計	38,200,000	11,460,000	49,660,000

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：解剖学・脳神経・再生医学・転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 独自の実験モデルの確立から再生関連遺伝子の探索とその機能解析

私たちは 1991 年より損傷をうけた神経細胞がどのようにして再生するのか、あるいは再生できないのかを解明することをめざして研究をおこなってきた。当時私たちは確実に再生する末梢神経の再生の分子メカニズムを解明することが中枢神経の再生に繋がると考えた。そこで、実験モデルを確立するため、各種の末梢神経の損傷モデルを試みた。将来の分子生物学的あるいは形態学的解析の発展性を考慮した結果、舌下神経の損傷モデルにたどり着いた。このモデルを用い、1992 年頃より (i) ディファレンシャルディスプレイ法や (ii) DNA マイクロアレー、(iii) 損傷神経核特異的 cDNA ライブラリーの作成、最近では (iv) 2 次元電気泳動後の蛋白スポットを質量分析するプロテオミクス解析を行い、多くの軸索損傷時に発現する遺伝子群の同定を続けている。得られた遺伝子群の一部については機能解析を行い、新たな機能を数多く解明した。これらの研究の結果、損傷後の神経細胞では、細胞死シグナルと生存シグナルが拮抗し、そのバランスが生存へ向かえば良いことが明らかになった。また、損傷後の神経細胞の生存と軸索の再生にはそれぞれ別の一群の遺伝子の発現が必要であることが明らかになった。

(2) 複数の遺伝子を同時に発現制御する転写メカニズムが存在する可能性

損傷した神経細胞が生存し、再生に向かうには多くの遺伝子の協調的な発現により生じる特定の機能が重要であることが明らかになった。また、各種の遺伝子は適切な時期に発現する必要があることも明らかになった。どうしてこのような一群の遺伝子が同調してタイミングよく発現するのであろうか。このようなキレの良い発現・分解制御を可能にしている遺伝子発現調節システムの解明は、神経再生現象を支配する中核的制御機構の解明に繋がり、きわめて重要な意義を持つと考えられる。上述の遺伝子探索の成果から、神経再生を制御する分子の発現を統合的に制御している中核的転写機構が存在するに

ちがない。これまでの研究成果から転写因子の ATF3, cJun, STAT3 などの関与がとりわけ重要であることが示唆されているが、これらが単独でそれぞれ作用するのか、あるいは複合体を形成しているのか、また他に転写に関わる重要な分子が存在するのか。このあたりの転写制御機構の解明がまたれていた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、複数の神経再生関連遺伝子の発現を統御しているメカニズムの解明である。この目標を達成するため、我々が 2000 年に同定した、中枢末梢に関わらず軸索損傷に広く鋭敏に応答する分子であるメタロプロテアーゼ DINE (Damage Induced Neuronal Endopeptidase) のプロモーター領域を代表的な遺伝子の例として用い、その発現制御を解析する。以下の目標に向け研究を進める。

(1) DINE のプロモーター領域のうち最も高い転写活性を得る上で必要な領域を同定する。特に今までの解析からプロモーター活性が高いと考えられている DINE 5' 上流領域にみられる高 CG 配列領域の意義を明らかにする。

(2) DINE プロモーターを用いて新たな転写コンプレックス (再生コア因子複合体) の構成分子を明らかにし、それらの相互作用を明らかにする。

(3) 動物においても、今回得られる複合体は機能しているか検討する。

(4) 得られたコア因子複合体は DINE 以外の神経再生関連分子の発現を制御するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いたプロモーターアッセイ

マウスの DINE プロモーター領域をクローニングし、その下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合する。培養神経細胞 (SK-N-SH) を用い、関連する各種転写因子の発現ベクターを発現させルシフェラーゼ活性を検討する。また、各種転写因子の発現ベクターはタグを付け共沈実験に供する。また、転写因子間の結合部位や機能を決定するため、各種の部分欠損ベクターを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行う。

(2) 個体における転写因子複合体の同定。片側のマウス舌下神経損傷モデルを用い健常側と損傷側の舌下神経核組織をそれぞれ取り出す。数十匹の神経核組織から細胞核を

回収し、核蛋白を得る。これらを用いて各種転写因子間の結合を共沈実験やChIPアッセイにより確認する。

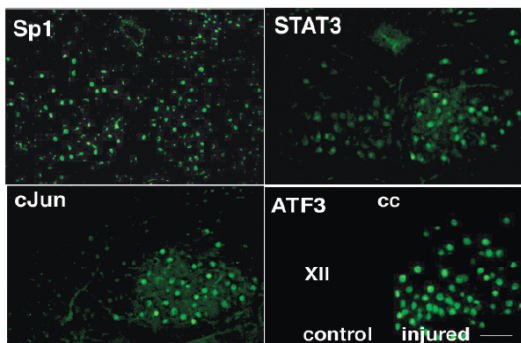
(3) マイクロアレーによる実験

ATF-3 と c-Jun のヘテロダイマーの役割とその下流で発現する遺伝子を同定するため、培養神経細胞に ATF3/c-Jun 複合体を発現させ、DNA マイクロアレーを行なう。また、得られた分子の生体での発現を確認するため、舌下神経損傷後の舌下神経核組織を集め、RNA を精製し、PCR をおこなう。さらに、片側舌下神経損傷の延髄組織標本を用い in situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学で実際の発現細胞を同定する。

4. 研究成果

(1) 転写因子複合体の同定

神経再生を制御する分子の発現を統合的に制御している中核的転写機構が存在すると考えられており、転写因子の ATF3, cJun, STAT3 の関与がとりわけ重要であることが示唆されている。これらの転写因子が直接神経再生関連遺伝子のプロモーターに結合しているのかどうか。また、何らかの分子群との複合体を形成しているとするれば、いかなる分子と複合体を形成しているかなどについて、神経損傷特異的に発現する遺伝子 DINE のプロモーターを用いて検討した。

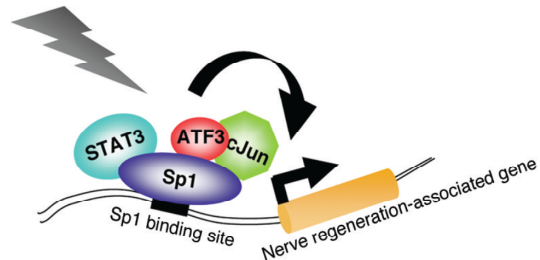


神経損傷後の各種転写因子群の発現変化

神経損傷後の舌下神経核内での転写 Sp1 は神経損傷により発現や局在に変化は見られないが、ATF3, cJun, STAT3 は損傷側で発現し核内に局在している。右；損傷側、左；健常側。 cc；中心管、XII；舌下神経核

まず、DINE プロモーターの活性化に STAT3, ATF3, cJun がどのような相互作用しているかを検討した。その結果 STAT3 と ATF3/cJun ヘテロダイマーの組み合わせが最も強力な相乗作用を示すことが明らかになった。DINE プロモーターのどの領域でこれらの転写因子群が作用しているかを検討したところ、これらの AP1 や STAT3 が結合すると考

えられるコンセンサス配列とは全く異なる領域が重要であることが明らかになった。この領域は GC が豊富で、転写因子の Sp1 が結合可能な領域であったため、ATF3, cJun, STAT3 の複合体が Sp1 と結合している可能性が浮かび上がった。そこで、免疫沈降法等で検討したところ、ATF3, cJun, STAT3 は Sp1 に結合しそれらが複合体を形成し DINE プロモーター上の Sp1 結合領域に作用していることが明らかになった。



今回同定された神経再生を促進する転写因子複合体

ATF3/cJun ヘテロダイマーと STAT3 が Sp1 をプラットフォームにして神経再生関連遺伝子のプロモーターに結合し、神経再生関連分子の発現を制御している。

このように神経再生と関連していると思われていた転写因子群 (ATF3, cJun, STAT3) が神経再生とは一見全く関係のない別の転写因子 Sp1 と複合体を形成することで、神経再生関連遺伝子を発現させていることが初めて明らかとなり、神経再生関連分子発現の新たな制御メカニズムが明らかになった。本複合体がこの他いかなる分子の発現に関与しているかを検討することが次の課題である。

(2) DNA マイクロアレーを用いた検索

ATF3 と c-Jun をフレキシブルなポリペプチド鎖で繋いだ融合蛋白を神経系の培養細胞で発現させ、DNA マイクロアレーによる遺伝子プロファイリングを行った。その結果、Translationally controlled tumor protein 1 (TCTP1), Ligand of Numb protein X2 (LNX2), Superoxide dismutase (SOD) などの神経細胞死の阻止や突起伸長に関与していると考えられる分子が複数同定された。さらに同定された遺伝子が末梢神経損傷動物でも発現誘導されていることを確認した。これらの遺伝子は、軸索損傷後 ATF3/c-Jun により発現誘導され、神経細胞の細胞死防御と突起伸長促進を通じて神経再生に関与していると考え

えられる。このように、我々が神経再生に関係していると考えている転写因子複合体のコアメンバーである ATF と c-Jun の発現は、損傷神経の修復に関わる分子群の発現を誘導することが確認された。

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 9 件)(全て査読有)

1. Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H (2010) Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuro-muscular junctions. *J Neurosci* 30(20):6954-6962.

2. Jeong YH, Ishikawa K, Someya Y, Hosoda A, Yoshimi T, Yokoyama C, Kiryu-Seo S, Kang MJ, Tachibana T, Kiyama H, Fukumura T, Kim DH, Saeki S (2010) Molecular characterization and expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein-10, a new member of the LDLR gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):1110-1115.

3. Hama I, Nakagomi S, Konishi H, Kiyama H (2010) Simultaneous expression of glutathione, thioredoxin-1, and their reductases in nerve transected hypoglossal motor neurons of rat. *Brain Res*. 1306:1-7.

4. Ampo K, Suzuki A, Konishi H, Kiyama H (2009) Induction of pancreatitis-associated protein (PAP) family members in neurons following traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 26(10):1683-93

5. Kiryu-Seo S, Kato R, Ogawa T, Nakagomi S, Nagata K, Kiyama H (2008) Neuronal injury-inducible gene is synergistically regulated by ATF3, cJun and STAT3 through the interaction with Sp1 in damaged neurons, *J Biol Chem* 283(11):6988-6996

6. Gamo K, Kiryu-Seo S, Konishi H, Aoki S, Matsushima K, Wada K and Kiyama H (2008) G protein coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity,

J Neurosci 28(46):11980-11988.

7. Takahara Y, Suzuki A, Maeda M, Kawashima H, Nakatani T, Kiyama H (2008) Expression of pancreatitis-associated proteins in urothelium and urinary afferent neurons following cyclophosphamide-induced cystitis, *J Urol* 179(4):1603-1609

8. Hisasue S, Kato R, Kobayashi K, Suetomi T, Kiyama H, Tsukamoto T (2008) Alteration of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-2 mRNA expression and its co-expression with neuronal nitric oxide synthase in pelvic ganglia following unilateral cavernous nerve injury, *Int J Urol* 15(1):82-86.

9. Konishi H, Namikawa K, Shikata K, Kobatake Y, Tachibana T, Kiyama H (2007) Identification of peripherin as a Akt substrate in neurons, *J Biol Chem* 282(32):23491-23499

〔総説〕(計 6 件)(全て査読無)

1. 木山博資 (2009) 遺伝子導入による損傷神経の温存再生—その治療標的の多様性—、臨床神経学、49 (11) 827—829

2. 木山博資 (2009) 遺伝子導入による損傷神経の温存再生の可能性 難病と在宅ケア—、15(9)19-22.

3. 木山博資 (2009) 末梢神経温存再生への戦略、頭頸部自律神経、23:1—7.

4. 桐生(瀬尾)寿美子、木山博資 (2008) 損傷運動ニューロン細胞死とグルタミン酸トランスポーター(EAAC1)、Clinical Neuroscience、26(10) 1127—1129.

5. 木山博資 (2008) 末梢神経再生の分子基盤：残された問題点、脳 21、11 (1) : 117—124.

6. 木山博資、桐生(瀬尾)寿美子 (2007) 神経細胞型グルタミン酸トランスポーターによる神経細胞死防御の分子メカニズム、Brain & Nerve (神経研究の進歩) 59 (12) : 1325—1332.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 大阪大学蛋白研セミナー「神経回路の形成と修復を司る分子機構」木山博資「神経修復を誘導する分子メカニズム」、平成 21 年 10

月 29-30 日、蛋白研、大阪

2. 第 50 回日本神経学会、シンポジウム「中枢神経系の再生・次なる半世紀」、木山博資、遺伝子導入による損傷神経の温存再生促進—その治療標的の多様性—、平成 21 年 5 月 21 日、仙台国際センター、仙台

3. 第 23 回神経組織の成長・再生・移植研究会、神経損傷後における遺伝子発現制御機構の解析 中込咲綾、濱五十鈴、木山博資、2008 年 5 月 17 日、ホテルスプリングス、千葉

4. 第 23 回神経組織の成長・再生・移植研究会、損傷神経再生時における抗酸化分子及びその還元酵素の遺伝子発現変動、濱五十鈴、中込咲綾、木山博資、2008 年 5 月 17 日、ホテルスプリングス、千葉

5. 第 113 回日本解剖学会、脳外傷後における PAP/Reg ファミリー分子の発現解析、安部恵一、鈴木了暢、小西博之、木山博資、2008 年 3 月 27 日～29 日、大分医科大学、大分

6. The Korean Physiological Society, 59th annual meeting, Oct 25-26, 2007, Grand hotel, Busan Korea, Special lecture, Kiyama H, Molecular mechanisms that determine the fate of injured motor neurons.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/anatomy1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00192021

(2) 研究分担者

小西 博之 (KONISHI HIROYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90448746

中込 咲綾 (NAKAGOMI SAYA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60423894

(3) 連携研究者

なし