

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15989

研究課題名（和文）転写活性化因子MRTFによるシナプス 核間情報交換を介した遺伝子発現制御系の解析

研究課題名（英文）Neuronal activity-dependent SRF target gene expression via nuclear translocation of the SRF coactivator MRTFB

研究代表者

伊原 大輔 (Ihara, Daisuke)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：20804561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：核内における転写因子を介した遺伝子発現という一連の情報伝達は、高次脳機能発現に重要である。脳に高発現するMRTFはアクチン結合タンパク質であり、転写因子SRFのコアクチベーターである。本研究では、シナプス活性化によるMRTFの局在変化と遺伝子発現について解析した。その結果、MRTFBの核移行は神経活動および引き続くカルシニューリン経路、加えてRho経路にも依存していた。さらに、ChIP-Seqの結果、MRTFBが介在する可能性の高い遺伝子を複数同定した。以上の結果から、新規の“シナプスから核へ”のシグナリング機構“MRTF-SRF経路”が実証されつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、MRTFAは統合失調症、MRTFBは自閉症スペクトラム症および知的障害や軽度の形態異常の原因遺伝子候補となっている。本研究により、脳神経系における「MRTFを介した遺伝子発現機構」および「MRTFの分子種間におけるその違い」を明らかにすることで、精神疾患や発達障害の病態解明につなげる。さらに将来的には、MRTFをターゲットとした新たな分子標的創薬につなげ、患者および家族のメンタルヘルス向上に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Myocardin-related transcription factors (MRTFs), highly expressed in the brain, have actin-binding motifs and function as transcriptional cofactors of serum response factor (SRF). Recently, we reported that MRTFs are localized in postsynapses and involved in synaptic maturation. However, it remains unclear how MRTFs are involved in activity-dependent gene expression in neurons. Therefore, we hypothesized that MRTFs, which exist in postsynapses, act as a transducer of synapse-to-nucleus signaling and analyzed their functions in primary cultured rat cortical neurons. We found that synaptic activation-induced the nuclear translocation of MRTFB and the expression of some SRF target genes are inhibited by blockage of NMDA receptor/L-VDCC, calcineurin and Rho signaling pathway in neurons. Taken together, these findings suggest that MRTFB is a novel key molecule which contributes to the synapse-to-nuclear signaling for neuronal plasticity.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：遺伝子発現 シナプス 転写因子 SRF MRTF MKL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血清応答因子 SRF (serum response factor)は、脳形成と機能に重要な転写因子である。その標的遺伝子の発現を調節するコファクターの1つが、MRTF (myocardin-related transcription factor)である。これまでに、脳特異的な SRF ノックアウトマウスでは、最初期遺伝子の発現、LTP (Ramanan et al., Nat Neurosci. 2005)、神経突起伸長(Knöll et al., Nat Neurosci. 2006)などが障害され、またワーキングメモリーが低下することなどが報告されている(Zimprich et al., Mol Neurobiol. 2017)。そして、MRTFA/B の脳特異的ダブル KO マウスは SRF 脳特異的 KO マウスと類似した特徴を示すため、MRTF 変異と神経病態との関係が示唆されている(Mokalled et al., Development 2010)。さらに最近では、SRF 経路の活性化が老齢マウスの記憶改善に関与することも報告されている(Iram et al., Nature 2022)。したがって、SRF/MRTF 経路は脳神経系において極めて重要な役割を持つと言える。

MRTF は転写因子 SRF のコファクターとしてはたらくと同時に、アクチン結合性タンパク質としてもはたらく。MRTF ファミリーには MRTFA と MRTFB があり、いずれも脳に高発現している(Shiota et al., J Neurochem. 2006、Ishikawa et al., J Biol Chem. 2010)。我々は最近、MRTFA と MRTFB に特異性の高い高品質抗体の作製に成功した。また、MRTFA/B が神経細胞のシナプスに存在しており、それらがシナプスの成熟化に関与することを発見した(Kaneda et al., Sci Rep. 2018)。

遺伝子発現において実際に MRTF がどのように機能するのか、その詳細は明らかでなかった。しかし、我々は、MRTF ファミリーの1つ・MRTFB がシナプス可塑性関連遺伝子の1つ Arc のエンハンサー活性化に関わることを報告した(Kikuchi et al., J Neurochem. 2019)。さらに最近、神経細胞のシナプス活性化が、MRTFB の細胞質から核への移行を引き起こすことを発見した。

以上のことから、MRTFB は神経細胞のポストシナプスにおいて刺激情報の“受け手”となり、自らが核内に移行することで遺伝子発現を介在する、“情報の担い手”となっている可能性がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、上記の作業仮説を検証するため、当研究室が新規に作製した MRTF 高品質抗体を用い、主に分子生物学的・生化学的側面から解析した。この抗体は市販のものより高感度かつ低ノイズであり、MRTFA と MRTFB の両者を識別できる。さらにウェスタンブロット、免疫染色(Kaneda et al., Sci Rep. 2018)および免疫沈降、クロマチン免疫沈降実験(Kikuchi et al., J Neurochem. 2019)に使用可能など、汎用性が非常に高いという特長をもつ。これを活用し、「MRTF のトランスロケーションに基づく新規の“シナプスから核へ”のシグナリング機構」の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

神経細胞における MRTF の機能をその局在変化と遺伝子発現の観点から解析するため、下記に示す分子生物学的実験を行った。初代培養神経細胞はラット胎児の大脳皮質より調製し、DNA トランスフェクションにはエレクトロポレーション法を用いた。長期培養神経細胞に対し、Bicuculline/4-aminopyridine (Bic/4AP)処理によりシナプス活性化を誘発した。MRTFB やその関連分子の細胞内局在については蛍光免疫染色法を用い、定量解析には画像解析ソフト ImageJ または Fiji を用いた。転写活性はルシフェラーゼアッセイ、内在性 mRNA 量は定量的 PCR 法により評価した。転写因子の DNA 上への集積は ChIP アッセイにより評価した。また、ChIP-Seq 解析において、サンプル調製までは我々が行い、次世代シーケンサーを用いた解析は外部業者の受託サービスを利用した。

### 4. 研究成果

#### 1. 神経活動依存的な MRTFB 核移行のメカニズムに関する解析

最初に、MRTFA および MRTFB の核移行性の違いについて検討した。その結果、シナプス活性化により MRTFB の一過的な核移行が引き起こされる一方、MRTFA の顕著な核移行は引き

起こされなかった。その際、MRTFB とポストシナプスのマーカー PSD-95 との共局在性が低下することを確認した。したがって、MRTFB がポストシナプスから離脱し核移行することが示唆された。

次に、MRTFB 核移行における細胞内  $Ca^{2+}$  シグナリングの関与について解析した。その結果、シナプス活性化による MRTFB 核移行は NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤 APV、L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの阻害剤 nicardipine およびカルシニューリン経路の阻害剤 FK506 の前処理により抑制された。また、MRTFB 核移行の阻害剤として CCG-1423 の効果についても検証した。Rho 経路の阻害剤 CCG-1423 はアクチン結合部位である RPEL モチーフに結合し、核局在化配列 NLS をブロックすることで MRTFB の核移行を阻害する (Hayashi et al., PLoS One 2014)。実験の結果、シナプス活性化による MRTFB 核移行は CCG-1423 の前処理で抑制された。したがって、シナプス活性化による MRTFB 核移行は、NMDA 受容体や L-VGCC からのカルシウム流入および引き続くカルシニューリン経路、加えて Rho 経路にも依存することが示された。

### 3. 神経活動依存的な SRF 介在性転写活性化のメカニズムに関する解析

MRTFB は核移行したのち、SRF 介在性の転写を活性化することが強く示唆される。レポーターアッセイの結果、シナプス活性化による SRF 介在性転写活性化は APV/nicardipine および FK506、さらに CCG-1423 の前処理により抑制された。したがって、シナプス活性化による SRF 介在性転写活性化は、NMDAR や L-VGCC からのカルシウム流入およびカルシニューリン経路、加えて Rho 経路にも依存することが示された。

### 4. 神経活動依存的な SRF 標的遺伝子発現のメカニズムに関する解析

核内に移行した MRTFB は、様々な SRF 標的遺伝子の発現を制御していると考えられる。まず、最初期遺伝子の 1 つである junB 遺伝子に着目した。qPCR の結果、シナプス活性化により junB 遺伝子発現誘導が引き起こされ、それは APV、Nicardipine および FK506 により抑制されたが、CCG-1423 により抑制されなかった。したがって、シナプス活性化による junB 遺伝子発現誘導は、NMDAR や L-VGCC からのカルシウム流入およびカルシニューリン経路に依存するが、Rho 経路への依存度は低いことが示された。

### 5. 神経活動に伴う MRTFB 標的遺伝子上への結合に関する解析

核内に移行した MRTFB は、標的遺伝子の転写調節領域に結合していると考えられた。ChIP アッセイの結果、シナプス活性化により junB 遺伝子エンハンサー上への MRTFB のリクルートは増加した。

### 6. MRTFB 標的遺伝子の網羅的な解析

MRTFB の標的遺伝子群について ChIP-Seq により網羅的に解析した。その結果、これまでに報告のない、シナプス活性化により MRTFB の集積が増加する遺伝子が複数判明した。qPCR による検証の結果、記憶学習や神経保護効果などに関与する遺伝子の発現がシナプス活性化により誘導された。またそれは APV/nicardipine、および FK506、さらに CCG-1423 により抑制された。したがって、NMDAR や L-VGCC からのカルシウム流入およびカルシニューリン経路、加えて Rho 経路にも依存することが示された。

以上のことから、MRTFB ファミリーの中でも特に MRTFB は「シナプスにおいて様々な細胞外刺激を受け取り(インプット)、“自ら”核内へ移行し情報を伝え、SRF 標的遺伝子の発現を調節する(アウトプット)」ことが強く示唆される。

これまでに、転写因子 CREB のコファクター CRTC1 はポストシナプスにも局在しており (Ch'ng et al., Cell 2012)、神経活動やカルシニューリン経路依存的に核へ移行すること (Nonaka et al., Cell 2014) や、この CRTC1-CREB 経路が空間認識記憶の形成に重要である (Parra-Damas et al., J Neurosci. 2014) との報告がある。したがって、これとよく似た“MRTFB-SRF 経路”もまた、シナプスから核へのシグナリングを担う新規の神経可塑性機構であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ihara Daisuke, Miyata Tomoaki, Fukuchi Mamoru, Tsuda Masaaki, Tabuchi Akiko	4. 巻 46
2. 論文標題 SRF and SRF Cofactor mRNA Expression Is Differentially Regulated by BDNF Stimulation in Cortical Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 636 ~ 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihara Daisuke, Tanabe Hiroki, Takasaki Ichiro, Tabuchi Akiko	4. 巻 46
2. 論文標題 Endogenous SOLOIST/MRTFB i4, a Neuronal Isoform of MKL2/MRTFB, Positively and Negatively Regulates SRF Target Immediate Early Genes in Neuro-2a Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1141 ~ 1144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihara Daisuke, Mizukoshi Miho, Tabuchi Akiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Brain derived neurotrophic factor (BDNF) downregulates mRNA levels of suppressor of cancer cell invasion (SCAI) variants in cortical neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊原大輔, 田邊広樹, 今西詩織, 和泉勇輝, 小坂彩, 佐野友香里, 阪上洋行, 田淵明子
2. 発表標題 シナプスに存在する転写コアクチベーターMRTFBの神経活動依存的な核移行と遺伝子発現制御系に関する解析
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第40回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榊原信太郎, 伊原大輔, 田淵明子
2. 発表標題 BDNFによるSRFコアクチベーターMRTFBのリン酸化に関する研究
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第40回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島朋美, 伊原大輔, 田淵明子
2. 発表標題 シナプス活性化によるSRFコアクチベーターMRTFAのリン酸化に関する研究
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第40回大会
4. 発表年 2022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, 田淵明子
2. 発表標題 ポストシナプスに局在するMRTFBは神経活動依存的に核移行しSRF標的遺伝子の発現を制御する
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊原大輔, 田邊広樹, 今西詩織, 是沢由樹, 小坂彩, 佐野友香里, 阪上洋行, 田淵明子
2. 発表標題 転写活性化因子MRTFBは細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナリング依存的に核移行しSRF標的遺伝子の発現を制御する
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榊原信太郎, 伊原大輔, 田淵明子
2. 発表標題 MRTFBのリン酸化を介した脳由来神経栄養因子BDNFによるSRF依存性遺伝子発現機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022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, 田淵 明子
2. 発表標題 転写コアクチベーターMRTFBの神経活動依存的な核移行を介した遺伝子発現制御系の解析.
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 航, 伊原 大輔, 田邊 広樹, 田淵 明子
2. 発表標題 マウス大脳皮質および海馬の神経活動によるMRTFBの核移行に関する研究.
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 弥由, 伊原 大輔, 田淵 明子
2. 発表標題 A 25-35は, 初代培養ラット大脳皮質神経細胞における神経活動依存的なMRTFB核移行を阻害し, Arc遺伝子発現を抑制する.
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第39回大会
4. 発表年 2021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患者で発見された変異型SRFコアクチベーターMRTFBはSRF標的遺伝子Arcとc-fos発現誘導の減弱および樹状突起の単純化を引き起こす.
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 俊輔, 中野 葵, 福地 守, 中山 拓功, 柴原 直利, 小松 かつ子, 當銘 一文, 伊原 大輔, 田淵 明子
2. 発表標題 Induction of brain-derived neurotrophic factor gene expression by Panax notoginseng and the effect on contextual fear conditioning
3. 学会等名 第6回富山パーゼルジョイントシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2021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患者で発見されたSRFコアクチベーター MRTFBの変異はSRF標的遺伝子Arcとc-fos発現誘導および樹状突起数の減少を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022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 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- アクチンシ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, 山崎航, 小坂彩, 佐野友香里, 阪上洋行, 田淵明子
2. 発表標題 転写活性化因子MRTFBのin vitroおよびin vivoにおける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 日本生化学会北陸支部 第41回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木繁, 畑中翔, 長島由佳, 伊原大輔, 田邊広樹, 阪上洋行, 田淵明子
2. 発表標題 脱リン酸化酵素カルシニューリンによるMRTFB核移行およびSRF依存性遺伝子発現の制御に関する研究
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第41回大会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 伊原大輔, 田邊広樹, 今西詩織, 長島由佳, 小坂彩, 佐野友香里, 阪上洋行, 田淵明子
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> signaling-dependent gene expression mediated by nuclear translocation of SRF coactivator MRTFB from postsynapses
3. 学会等名 第66回日本神経化学会大会/第64回日本神経病理学会総会学術研究会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榊原信太郎, 佐々木繁, 伊原大輔, 櫻井宏明, 田淵明子
2. 発表標題 BDNF induces phosphorylation of the SRF transcriptional coactivator MRTFB and SRF-mediated transcription in neurons
3. 学会等名 第66回日本神経化学会大会/第64回日本神経病理学会総会学術研究会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島朋美, 伊原大輔, 櫻井宏明, 田淵明子
2. 発表標題 Neuronal activity induces phosphorylation of the SRF coactivator MRTFA and SRF-dependent transcription in neurons
3. 学会等名 第66回日本神経化学会大会/第64回日本神経病理学会総会学術研究会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田淵明子, 小林弥由, 伊原大輔, 東田千尋
2. 発表標題 Inhibitory effect of amyloid beta on neuronal-activity-dependent nuclear translocation of MRTFB and gene expression
3. 学会等名 第66回日本神経化学会大会/第64回日本神経病理学会総会学術研究会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊原大輔, 田邊広樹, 今西詩織, 畑中翔, 佐々木繁, 小坂彩, 佐野友香里, 阪上洋行, 田淵明子
2. 発表標題 転写活性化因子MRTFBのカルシニューリン経路依存的な核移行およびSRF標的遺伝子発現制御系に関する解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第135回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水 俊輔, 中野 葵, 福地 守, 中山 拓功, 柴原 直利, 小松 かつ子, 當銘 一文, 伊原 大輔, 田淵 明子
2. 発表標題 サンシチニンジンエキスによるBDNF遺伝子発現誘導および文脈性恐怖条件付け学習効果.
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

〔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 <a href="http://www.pha.u-toyama.ac.jp/bioche1/index-j.html">http://www.pha.u-toyama.ac.jp/bioche1/index-j.html</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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