

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700340

研究課題名（和文）シナプス局在転写調節因子による新しい樹状突起スパイン形成機構の解明

研究課題名（英文）A novel mechanism of dendritic spine formation by synapse-resident transcriptional coactivator

研究代表者

山崎 博幸（YAMAZAKI HIROYUKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10334137

研究成果の概要（和文）：

神経細胞においてシナプス部に存在する新規転写調節因子 SPIKAR による樹状突起スパイン形成への役割を解析した。SPIKAR は神経細胞では核と細胞質の両方に存在するが、スパイン形成には細胞質での機能が重要で、特に初期過程であるフィロポディア形成を促進する事が分かった。また、SPIKAR ノックアウトマウスは胎生8日頃から成長せず致死に至ることから、SPIKAR は神経細胞の発達のみならず個体発生に重要なタンパク質であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the role of SPIKAR, a novel transcriptional-coactivator, in dendritic spine formation. SPIKAR is localized in not only nucleus but also cytoplasm. We indicated that SPIKAR is involved in early phase of spine formation, especially in filopodia formation. SPIKAR-Knockout mice showed embryonic fatality, suggesting that SPIKAR has pivotal roles in ontogenesis as well as neuronal development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：樹状突起スパイン、樹状突起フィロポディア、転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

樹状突起スパインは神経細胞において多くの興奮性シグナルが入力する棘状の構造物であり、その内部にシグナル伝達やシナプス可塑性に重要なタンパク質、オルガネラを含む情報処理ユニットとして機能している。スパイン形成に関与しているタンパク質は、低分子量Gタンパク質関連分子、細胞接着分子、PSDタンパク質等多数報告されており、

その作用機構も徐々に明らかになってきているが、いずれの場合においてもアクチン細胞骨格及びアクチン結合タンパク質が重要な役割を担っていると考えられている。これまでの研究ではアクチン重合因子によるスパイン形成機構の解明が主であり、重合したアクチン繊維を調節するアクチン架橋因子によるスパイン形成機構については未だほとんど明らかになっていない。我々は新しい

スパイン形成メカニズム探索のためスパインに特異的に局在するアクチン繊維結合タンパク質ドレブリンに注目し、ドレブリン結合タンパク質のスクリーニングを行い SPIKAR の単離を行った。SPIKAR は核タンパク質様の構造を持ち、実際に転写調節因子として機能した。また、培養神経細胞を用いて SPIKAR を RNAi で発現抑制すると、樹状突起スパインが減少するという表現形が得られることから、SPIKAR はスパイン形成に何らかの役割を担っていると考えられた。

2. 研究の目的

(1) SPIKAR による樹状突起スパイン形成機構の解析

培養海馬神経細胞において SPIKAR を RNA i でノックダウンを行うと、樹状突起スパインが減少するという表現型が得られる。本研究ではこの現象のメカニズムを明らかにするために、SPIKAR がどの領域、またどの発達段階で樹状突起スパイン形成に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。また、この機構を明らかにするためにドレブリン以外の SPIKAR 結合因子の探索も行った。

(2) SPIKAR の転写調節因子としての機能解析

SPIKAR は核で転写調節因子として機能することが分かっている。SPIKAR の転写調節機構を明らかにするために、SPIKAR ノックアウトマウスを作出し、どのような遺伝子が SPIKAR によって発現調節を受けているのかを明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) SPIKAR による樹状突起スパイン形成機構の解析

①ラット胎児よりバンカー法を用いて培養海馬神経細胞を調整し、各種 SPIKAR 変異体を導入して、スパインの密度、形態を解析する。導入するタイミングは、培養 Stage3 の幼弱な時期と培養 Stage4 以降の発達期・成熟期の2つの時期で行い、スパイン形成のどのタイミングで作用するのかも確かめる。

②SPIKAR のN末端領域を含まない断片をいくつか調節し BAIT として、ラット脳ライブラリーを Yeast Two-Hybrid 法を用いてスクリーニングを行う。一次スクリーニングで得られたポジティブクローンは、3-アミノトリアゾール濃度を増した培地上で二次スクリーニングを行う。

(2) SPIKAR ノックアウトマウスの作製・解析

①SPIKAR の第3エクソンを loxP 配列で挟むようにしてターゲティングベクターを作製し、エレクトロポレーション法でマウス ES

細胞に導入した。ES 細胞は薬剤でセクションを行ってから陽性細胞をピックアップし個別に培養を行い、それらの各細胞から DNA を抽出してサザンブロッティングでスクリーニングを行った。陽性クローン細胞は受精卵(胚盤胞)に顕微注入を行い仮親の子宮に戻した。これらの操作により得られたフロックスマウスをデリーターマウス(テレンセファリン-Cre 遺伝子ノックインマウス)と交配することにより、ヘテロ SPIKAR ノックアウトマウスを得た。SPIKAR ホモノックアウトマウスは、SPIKAR ヘテロノックアウトマウス同士の交配によって作製した。

②SPIKAR ヘテロノックアウトマウス同士を交配させ翌朝プラグチェックを行い、プラグが確認された日を胎生 0 日として記録する。胎生 10 日で親マウスから子宮を取り出し内部の胎仔を得た。それぞれの胎仔は写真撮影した後、一部の組織を採取して DNA を抽出し PCR でジェノタイピングを行った。

4. 研究成果

(1) SPIKAR は細胞質でスパイン形成の初期過程に関わる

SPIKAR の様々な変異体を培養海馬神経細胞に導入しその表現形を解析したところ、核移行シグナルに変異を導入した細胞質型 SPIKAR において樹状突起スパイン及びフィロポディアの有意な増加が観察された。また導入期間を培養開始から若い時期に行ったところ、樹状突起フィロポディアの顕著な増加が確認された。樹状突起フィロポディアは他の細胞のフィロポディアと異なり、アクチン繊維が瀰漫性に存在する幼弱型とアクチン繊維がクラスター化しシナプス形成が始まった成熟型が存在する。SPIKAR が樹状突起フィロポディア形成のどの段階で作用するのかを調べるために、細胞質型 SPIKAR によって増加したフィロポディアの幼弱型及び成熟型の解析を行ったところ、そのほとんどが幼弱型であった。このことから、SPIKAR は樹状突起スパイン形成においてフィロポディア形成の初期過程に関わっている事が分かった。

(2) SPIKAR の核外移行シグナルの特定

SPIKAR が細胞質で樹状突起スパイン形成に関与していることが判明したため、SPIKAR の神経細胞における細胞内局在機構の重要性が想起された。このため、SPIKAR の細胞内トラフィッキングシグナル、特に核から細胞質へ移行するための核外移行シグナルの同定を行った。SPIKAR をいくつかのフラグメントに分けてそれらに GFP 遺伝子を融合させた、GFP-SPIKAR 変異体を作製し、それらを COS7 細胞に導入し細胞内局在を解析した。核外にのみ局在する配列を選別し、さらに断片化し

て解析したところ C 末端領域の MYND ドメイン付近が核外移行に重要という結果を得た。これまでの過去の研究から核外移行シグナルのコンセンサス配列には疎水性アミノ酸（特にロイシン、イソロイシン）が多く見られることから、核外移行シグナルが含まれると想定される部位のロイシン、イソロイシン残基を1つずつアラニンに置換した変異体を作成し、同様に細胞内局在を解析したところ、2アミノ酸置換で核外移行が阻害される変異体を得られた。これらの事から、C 末端領域のロイシン、イソロイシンを含むアミノ酸周辺数残基が SPIKAR の核外移行シグナルであると推定された。

(3) SPIKAR 結合タンパク質の探索

SPIKAR のスパイン形成機構における分子間相互作用を解析するために結合タンパク質の探索を行った。ドレブリン結合領域を含まない部位をベイトとして酵母 Two-Hybrid 法を用いてスクリーニングを行ったところ、複数の陽性クローンを得た。その中には、細胞接着に関与する分子や脂質の代謝に関わる分子が含まれていた。現在、それらの分子と SPIKAR の相互作用解析を行っている。

(4) SPIKAR による転写調節

SPIKAR の転写調節因子としての機能を解析するために、複数の転写因子を用いてルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイを行ったところ、用いた転写因子全てにおいて転写調節活性を示した。このことから、SPIKAR による転写調節の特異性は低いだろうと考えられた。

(5) SPIKAR ノックアウトマウス

①SPIKAR ヘテロノックアウトマウス同士の交配で産仔を得たが、これらの中にはノックアウトマウスは存在しなかった。数回交配させても同じような結果だったので、SPIKAR ノックアウトマウスは発生に異常があり胎生致死であると判断した。そのため、ヘテロマウス同士の交配で妊娠した雌親の子宮から胎生 16 日目に胎仔を取り出して、その大きさ、SPIKAR 遺伝子を解析したところ、SPIKAR ヘテロノックアウトマウスは正常な発生を示したが、SPIKAR ホモノックアウトマウスは極端に小さかった。さらに遡って解析したところ、SPIKAR ホモノックアウトマウスは胎生 8 日～9 日に置いて何らかの異常によって発生が停止して致死に至る事が分かった。



図 1. 胎生 10 日目の SPIKAR ノックアウトマウス。

②SPIKAR ノックアウトマウスで発現が減少しているタンパク質 (SPIKAR によって発現を調節されている遺伝子) を同定する予定だったが、胎生致死のため固体を得ることが出来なかった。そのため、前脳特異的 CRE 発現マウスを用いて SPIKAR コンディショナルノックアウトを作成した。このマウスは正常に産出され成熟するまで成長した。現在、このマウスを用いて解析を進めている。

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 8 件)

① 山崎博幸、白尾智明

“シナプスの細胞骨格”

Clinical Neuroscience. 2010, Vol28: 858-861. 査読無

② Hanamura K, Mizui T, Kakizaki T, Roppongi RT, Yamazaki H, Yanagawa Y, Shirao T.

“Low accumulation of drebrin at glutamatergic postsynaptic sites on GABAergic neurons.”

Neuroscience. 2010, 169:1489-500. 査読有

③ Pérez-Martínez M, Gordón-Alonso M, Cabrero JR, Barrero-Villar M, Rey M, Mittelbrunn M, Lamana A, Morlino G, Calabria C, Yamazaki H, Shirao T, Vázquez J, González-Amaro R, Veiga E, Sánchez-Madrid F.

“F-actin-binding protein drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse.”

J Cell Sci. 2010, 123:1160-70. 査読有

④ Mercer JC, Qi Q, Mottram LF, Law M, Bruce D, Iyer A, Morales JL, Yamazaki H, Shirao T, Peterson BR, August A.

“Chemico-genetic identification of drebrin as a regulator of calcium responses.”

Int J Biochem Cell Biol. 2010, 42:337-45. 査読有

⑤ Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Ikeda T, Itohara S, Shirao T.

“Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood.”

Neuroscience. 2010, 165:138-50. 査読有

⑥ Aoki C, Kojima N, Sabaliauskas N, Shah L, Ahmed TH, Oakford J, Ahmed T, Yamazaki H, Hanamura K, Shirao T.

“Drebrin a knockout eliminates the rapid form of homeostatic synaptic plasticity at excitatory synapses of intact adult cerebral cortex.”

J Comp Neurol. 2009, 517:105-21. 査読有

⑦ Takahashi H, Yamazaki H, Hanamura K, Sekino Y, Shirao T.

“Activity of the AMPA receptor regulates drebrin stabilization in dendritic spine morphogenesis.”

J Cell Sci. 2009, 122:1211-9. 査読有

⑧ Mizui T, Kojima N, Yamazaki H, Katayama M, Hanamura K, Shirao T.

“Drebrin E is involved in the regulation

of axonal growth through actin-myosin interactions.”

J Neurochem. 2009, 109:611-22. 査読有

[学会発表] (計5件)

① 山崎博幸、白尾智明

“新規ドレブリン結合タンパク質の同定とその機能解析”

第1回放射線神経生物研究集会、2011年1月29日、刀城会館(群馬県)

② 山崎博幸、竹田麗子、白尾智明

“新規ドレブリン結合タンパク質の同定とその機能解析”

第18回海馬と高次脳機能学会、2009年11月21-22日、金沢湯湧創作の森(石川県)

③ 山崎博幸、児島伸彦、白尾智明

“Identification of nuclear-shuttling signals for spikar function”

第32回日本神経科学大会、2009年9月16-18日、名古屋国際会議場(愛知県)

④ 山崎博幸、児島伸彦、白尾智明

“The role of Spikar in cytoplasm and identification of its functional domain”

第52回日本神経化学会、2009年6月21-24日、伊香保ホテル天坊(群馬県)

※⑤の研究会と同時開催。発表日は23日。

⑤ 山崎博幸、白尾智明

“ドレブリン結合タンパク質 Spikar は細胞質で樹状突起棘形成に関与する”

第24回神経組織の成長・再生・移植研究会、2009年6月21日、伊香保ホテル天坊(群馬県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 博幸 (YAMAZAKI HIROYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10334137