

機関番号：32659

研究種目：若手研究(スタートアップ)→研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890263

研究課題名(和文) マウス脳におけるストレス応答性タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of stress-response protein in the mouse brain

研究代表者

梅村 真理子 (UMEMURA MARIKO)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30521489

研究成果の概要(和文)：ATF5はストレス負荷により mRNA 発現が誘導されるストレス応答性の転写因子である。ATF5欠損マウスを作成したところ、生後3日で7割が死に至り、脳に形態異常がみられた。そこで、ATF5の発現を抑制したマウスの大脳皮質の形成を観察したところ、移動している新生神経細胞の、神経突起が異常であることが示された。一方、ATF5欠損マウスは雄マウス特有の縄張りを守るための攻撃性が低下し、社会性行動が低下していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：ATF5 is a stress-response transcription factor. The physiological role of ATF5 was investigated by the generation of ATF5-deficient mice. The ATF5-deficient mice showed abnormal brain morphology and 70% of these mice died within three days of birth. ATF5-knockdown caused an inhibition of neurite outgrowth in migrating neurons of the cerebral cortex. Furthermore, we found that ATF5(-/-) male mice exhibited reduced aggressiveness toward intruders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	950,000	285,000	1235,000
2009年度	1,050,000	315,000	1365,000
総計	2,000,000	600,000	2600,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・精神神経科学

キーワード：脳、転写因子、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

(1) Activating transcription factor 5 (ATF5) は ATF/cyclic AMP response element-binding protein (CREB) ファミリーに属する転写因子である。当研究室において、ATF5は亜ヒ酸暴露、アミノ酸欠乏などのストレスにより mRNA 発現が誘導されることを明らかにした。また、近年、神経細胞の増殖分化、アポトーシスに関与することが

見いだされている。しかし、ATF5の生理的機能、及び転写標的遺伝子については未だ不明である。そこで、ATF5の個体における機能を明らかにするために、ATF5欠損マウスを作成したところ、生後2日目までに7割が死に至った。このとき、ATF5欠損マウスは、母マウスや兄弟と離れて単独で巣穴から離れて死んでいることが見いだされた。新生仔期のマウスを母親から分離して体温低下ストレ

スに曝すと超音波 (ultrasonic vocalization, USV) を発声することが報告されている。この USV は仔が母親を呼び寄せて巣に戻してもらい授乳を受けるための重要な母子間コミュニケーションである。近年では、USV の解析はダウン症やてんかんなどの神経発達障害のモデルマウスの研究に応用されてきており、神経発達の良い指標になっている。そこで、ATF5 欠損新生仔マウスの USV を測定したところ、野生型新生仔マウスに比べて顕著に劣っていることを示す予備データを得た。このことから、ATF5 欠損マウスでは母子間のコミュニケーションが成立しないことが致死の原因の一つであることが予想された。そこで、私たちは出産後致死性を示す原因として、神経性疾患があるのではないかと考えた。

(2) 現在までに、ATF5 は大脳皮質の脳室帯に強く発現し、神経細胞の分化を抑制すること、アポトーシスに関与することが報告されている。一方、統合失調症の原因遺伝子として Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) が報告されている。大脳の発生過程において脳室帯から増殖した神経前駆細胞はそれぞれ大脳皮質内表層に向かってに遊走する。DISC1 変異体ではこの神経前駆細胞の遊走能の低下があり、大脳皮質が正常に形成されないことが明らかになっている。ATF5 は DISC1 と相互作用するタンパク質として報告されていることから、神経発生に影響を及ぼすことが期待される。さらに、切断型 DISC1 トランスジェニックマウスにおいては、USV が顕著に減少していることも見いだされている。以上のことから、ATF5 欠損マウスは、DISC1 変異マウスと同様に神経発生に異常があることが期待される。

そこで、本研究においては、ATF5 欠損マウ

スの脳、神経発生を解析することにより、ATF5 の脳や神経発生における機能を明らかにすることを目的とし、ストレス応答反応が神経性疾患に関与する機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究において、ATF5 欠損マウスの脳、神経発生を解析することにより、ATF5 の脳や神経発生における機能を明らかにすることを目的とし、ストレス応答反応が神経性疾患に関与する機構の解明を目指す

3. 研究の方法

(1) ATF5 欠損マウス脳組織の解析

ATF5 欠損マウスの脳組織に対して、組織染色、及び免疫組織化学的解析を行い、脳の形成状況、神経発生、分化等を観察する。具体的には胎生 13 日から 20 日目の胎仔脳を摘出し、固定後、自動包埋装置及びマイクロトームを使用し脳組織切片を作成する。その後、脱パラフィンを行い、HE 染色、ニッスル染色等の組織染色及び各種マーカーの免疫組織化学染色を行う。

(2) 子宮内胎仔脳遺伝子導入法を用いた神経発生過程の観察

ATF5 は神経前駆細胞の増殖を維持し、分化を抑制することが報告されている。そこで、ATF5 欠損マウスの大脳皮質の神経発生過程を観察する。

マウスでは胎生 12 日目から 16 日目ごろに大脳皮質板神経細胞の産生がおこり、脳室帯で生じた神経前駆細胞はより脳皮質表面側に遊走し、最終的に 6 層構造からなる皮質板を形成する。本研究では、妊娠マウス子宮内の胎生 14.5 日目の胎仔の大脳皮質板に GFP 発現プラスミドをエレクトロポレーション法により導入し、移動細胞を可視化する。その後、

出産した新生仔の脳を切片化し、大脳皮質の層構造や神経細胞の移動過程を観察する。

(3) ATF5 新規結合タンパク質の探索

酵母を用いた yeast two-hybrid 法により ATF5 と結合する新規因子の探索を行い ATF5 の機能をより詳細に検討する。ATF5 はストレス応答性因子であり、ストレスによって刺激を受けない通常時は発現量が低いことが問題点であり、相互作用している周辺因子の発現量も低いと予想される。従って cDNA ライブラリー中の分子種や量を平均化した均一化ライブラリーを用いて解析を行う。

(4) ATF5 欠損マウスの行動・学習能力の解析

ATF5 欠損マウスの行動・学習能力の解析を統合失調症モデルマウスの研究を参考にして行う。ATF5 欠損マウスの脳や神経発生に異常があれば、ATF5 欠損マウスにも行動異常や学習能力の低下があることが考えられる。

以上の研究を行うことにより、ストレス応答性転写因子 ATF5 の脳における機能が明らかになることが期待される。また、ATF5 欠損マウスの神経性疾患が明らかになることにより ATF5 欠損マウスが神経疾患モデルマウスとして確立され、神経疾患治療に貢献することが期待される。

4. 研究成果

(1) ATF5 欠損マウス脳組織の解析

私達は、ATF5 の動物個体における機能を明らかにするために、ATF5 欠損マウスを作成し、C57BL/6 にコンジェニック化を行ったところ、生後 2 日で 7 割が死に至り、この致死の原因が神経性疾患の可能性があると考えた。そこで、胎児、新生児、成熟マウスの脳を解剖したところ、嗅球が顕著に萎縮しており、脳に

形態異常があることが分かった。

(2) 子宮内胎仔脳遺伝子導入法を用いた神経発生過程の観察

ATF5 は神経前駆細胞の増殖を維持し、分化を抑制することが報告されている。そこで、ATF5 欠損マウスの大脳皮質の神経発生過程を観察した。妊娠マウス子宮内の胎生 14.5 日目の胎仔の大脳皮質板に GFP 発現プラスミドをエレクトロポレーション法により導入し、移動している神経細胞を可視化した。その後、出産した新生仔の脳を凍結切片化し、神経細胞の移動過程を観察した。

ATF5 欠損マウスの神経細胞の移動は、野生型マウスと比べて、顕著に遅れてはいなかった。しかし、神経細胞の神経突起が短くなっており、方向性が乱れていた。さらに、ATF5 をノックダウンするための shRNA 発現ベクターを作成し、妊娠している ICR マウス子宮内の胎児脳に GFP 発現プラスミドと一緒にエレクトロポレーション法にて共導入した。その後 shRNA 発現ベクターで ATF5 の発現が抑制されている GFP 陽性神経細胞を観察したところ、移動は遅れていなかったが、神経突起が短くなっていることが示された。このことから、ATF5 は神経細胞の神経突起形成に重要な役割を果たしていることが分かった。

(3) ATF5 新規結合タンパク質の探索

yeast two-hybrid 法により ATF5 と結合する新規因子の探索を行った。ATF5 と結合するタンパク質として、細胞周期、タンパク質分解、転写活性に関する因子が検出されたが、DISC1 などの既知の ATF5 結合タンパク質は検出されなかった。また、これらの酵母内で ATF5 と結合することが明らかになった因子が ATF5 と哺乳動物細胞内でも結合しているかどうかを調べる必要がある。このことから、更なる

解析が必要であると考えられる。

(4) ATF5 欠損マウスの行動・学習能力の解析

ATF5 欠損マウスでは、嗅球が萎縮していたことから、嗅覚の異常があることが考えられた。そこで、床敷に餌を隠して嗅覚で餌を探す cookie-finding test を行った。しかし、野生型マウスと ATF5 欠損マウスでは、有為な差を検出できなかつた。匂いは、拡散してしまうこと、マウスの条件付けが不十分であったことから、差を検出できなかつた一因であると考えられる。

次に、雄マウスは縄張りを守るために、侵入者に対して、攻撃を行う。この攻撃は尿に含まれているフェロモンによって誘発されることが分かっていることから、この攻撃性を測定する resident-intruder test を行った。雄マウスと雌マウスをつがい1週間飼育し、雄マウスに縄張りを形成させた後に、侵入者マウスをケージ内に投入して、攻撃回数、時間を測定した。ATF5 欠損マウスは、野生型マウスに比べて、攻撃性が低下していることがわかり、社会性行動の低下があることが考えられた。今後、他の種類の行動実験をおこない、社会性行動や不安行動を測定し、精神疾患があることを解明したいと考えている。

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2件)

(1) Sagane K, Umemura M, Ogawa-Mitsuhashi K, Tsukahara K, Yoko-O T, Jigami Y. Analysis of membrane topology and identification of essential residues for the yeast endoplasmic reticulum inositol acyltransferase gwt1p. *J Biol Chem.*, 査読

有, 286, 2011, 14649-14658

(2) Yamazaki T, Ohmi A, Kurumaya H, Kato K, Abe T, Yamamoto H, Nakanishi N, Okuyama R, Umemura M, Kaise T, Watanabe R, Okawa Y, Takahashi S, Takahashi Y.

Regulation of the human CHOP gene promoter by the stress response transcription factor ATF5 via the AARE1 site in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.*, 査読有, 28, 2010, 294-301

[学会発表] (計5件)

(1) 幡野仁哉, 梅村真理子, 鈴木実菜子, 山崎高志, 高橋滋, 高橋勇二、ATF5 mRNA 発現調節機構における翻訳開始点の変動と NMD の寄与、日本農芸化学会 2011 年度 大会、2011 年 3 月 26 日、京都

(2) 梅村真理子, 幡野仁哉, 山崎高志, 高橋滋, 高橋勇二、Nonsense-mediated mRNA decay による ATF5 mRNA 発現抑制機構の解明、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会 合同大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸

(3) 水上薫, 雑賀絢, 長澤香幸, 梶原昌朗, 秋山五香, 梅村真理子, 高橋 滋, 高橋 勇二、軟体動物エストロゲン受容体様タンパク質の Non-genomic function の解析、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会 合同大会)、2010 年 12 月 7 日、神戸

(4) 幡野仁哉, 梅村真理子, 山崎高志, 高橋滋, 高橋勇二、ATF5 mRNA 発現抑制に対する NMD の関与、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京

(5) 藤井かおり、地田義明、梅村真理子、吉見立也、高橋滋、高橋勇二、肺神経内分泌細胞の分化過程における Shh シグナル経路の関与、日本分子生物学会 32 回年会、2009 年 12 月 9 日、横浜

[その他]

ホームページ等；特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村真理子 (UMEMURA MARIKO)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：30521489

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし