

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657113

研究課題名（和文） 多核細胞における核選択的な遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Transcriptional regulation in multinucleated cells

研究代表者

山梨 裕司 (YAMANASHI YUJI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40202387

研究成果の概要（和文）：神経筋接合部（NMJ）は骨格筋収縮の運動神経支配に必須のシナプスであり、哺乳動物では各筋管の中央部のみに形成される。これは多核細胞である筋管において、NMJ 構成因子の遺伝子発現が中央部の核に選択的であることに起因する。当該発現制御には NMJ 構成因子である受容体型キナーゼ MuSK が必要であるが、その分子機構は未解明である。本研究では、NMJ 構成因子である Dok-7 が例外的に MuSK による核選択的な発現制御を受けないことに着目し、その転写制御機構の解明を進めた。

研究成果の概要（英文）：The neuromuscular junction (NMJ) is an essential synapse between a motor neuron and skeletal muscle. In mammals, the NMJ forms in the central region of each myotube, a multinucleated fibrous cell, and it is widely accepted that this requires the centrally localized, postsynaptic nuclei-specific expression of genes encoding NMJ proteins. The muscle-specific kinase MuSK, which governs the NMJ formation in skeletal muscle, plays an essential role in the post-synaptic transcriptional regulation. However, expression of the NMJ protein Dok-7 is not under the MuSK-dependent regulation. As an initial step toward understanding the regulatory mechanisms, we studied transcriptional regulation of the dok-7 gene.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写制御

1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部（NMJ：Neuromuscular Junction）は運動神経の軸索末端と筋管中央部の後シナプス構造を結ぶシナプスであり、アセチルコリン（ACh）を伝達物質とする骨格筋収縮の運動神経支配に必須の役割を担

っている。興味深いことに、筋特異的な受容体型キナーゼである MuSK やアセチルコリン受容体（AChR）などの筋由来の NMJ 構成因子の遺伝子は、多核の単一細胞である筋管の中央部の核に限局して発現していることが 20 年以上前から知られている。この「核の位置情報に依存する遺伝子発現制御機構」

(図1) は内包する普遍的な意義と NMJ 形成における重要性故に、多くの研究者を魅了し続けてきた。しかしながら、現在においても、その分子機構には未解明の部分が多い。

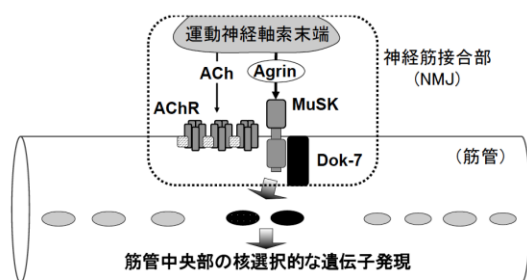


図1. 発生後期の筋管中央部における核選択的な遺伝子発現。発生後期に形成された NMJ において、MuSK は運動神経由来の糖蛋白質 Agrin と筋管の細胞内蛋白質 Dok-7 により活性化される。MuSK からのシグナルが筋管中央部の核選択的な遺伝子発現を引き起こすが、その機構は未解明である。

図1の説明にもあるように、近年、胚発生の後期における筋管中央部の核選択的な NMJ 遺伝子の発現制御が、NMJ の後シナプス領域に局在する MuSK によって支配されていることが明らかになってきた。興味深いことに、我々が NMJ 構成因子として単離した Dok-7 は、マウス胚の発生中期 (E14.5) までは他の NMJ 構成因子と同様に筋管中央部の核に選択的な遺伝子発現を示すが、発生後期には MuSK の支配は受けず、筋管全体で発現することが明らかになった。この事実は、MuSK や AChR などの NMJ 構成因子の遺伝子と dok-7 遺伝子が胚発生の中期までは同様の転写制御を受けているにも関わらず、発生後期には MuSK 下流で異なる転写制御を受けていることを示唆している。

2. 研究の目的

上記の背景と独自の知見から、dok-7 遺伝子の発現が胚発生の中期までは中央部の核に選択的な発現制御を受けているにも関わらず、他の NMJ 構成因子の中央部の核に選択的な遺伝子発現が MuSK による制御を受けようとする発生後期では、そのような制御を外れ、筋管全域の核による発現が可能となることが予想された。そこで、本研究では、MuSK や AChR 等の筋管中央部の核に選択的な転写制御を受けつづける遺伝子群と、dok-7 遺伝子の発現制御機構を比較検討することで、筋管における核選択的な転写制御機構に重要な転写制御領域や転写因子の同定とその分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) dok-7 遺伝子の転写制御領域の解析
MuSK 遺伝子と同様に dok-7 遺伝子も筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴い、その発現が上昇する。そこで、マウス dok-7 遺伝子の転写開始点の近傍 (+63) から約 8kbp 上流 (-7854) までの領域を用いたレポーターアッセイを常法に従って実施したところ、筋管細胞への分化にともなう転写活性の上昇を確認することができた。そこで本研究では、この領域内に存在する転写制御配列について、レポーターアッセイやゲルシフトアッセイ、ChIP アッセイによる解析を行い、筋管における dok-7 遺伝子の発現制御に重要な転写制御機構の解明を目指した。

(2) MuSK シグナルの増強時に高発現する転写制御因子の解析

従前の研究から、我々は骨格筋における Dok-7 の過剰発現が MuSK シグナルを増強することを明らかにしている。そこで、独自に作出した筋管特異的に Dok-7 を過剰発現するトランスジェニックマウスの筋組織において、その発現が筋管中央部で亢進する転写制御因子をリスト化した。それらの中から、dok-7 遺伝子の転写制御領域を標的とせず、また、MuSK 等の NMJ 関連遺伝子の転写制御領域を標的とする転写制御因子を絞り込み、核選択的な転写制御における機能の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) dok-7 遺伝子の転写制御領域の解析

上述の転写開始点近傍から約 8kbp 上流までの領域について、筋管細胞への分化に伴う転写活性化の責任領域を検討したところ、転写開始点からその上流 3000bp 程度の領域に保持され、その一部は転写開始点の上流約 50bp の領域にも保持されていることが明らかになった。in silico 解析の結果、その約 50bp の領域には基本転写因子 Sp1 以外の自明な標的配列は認められなかった。そこで、Sp1 による dok-7 遺伝子の発現制御について検討したところ、Sp1 が当該遺伝子発現に必須の役割を担っていることが判明した。しかしながら、Sp1 とその標的配列を介した転写制御の必要性は筋芽細胞と筋管細胞において有意な差を示さなかった。このことから、Sp1 が筋管特異的な核選択的転写制御において重要な役割を果たしてはいないことが予想された。

(2) MuSK シグナルの増強時に高発現する転写制御因子の解析

既述の通り、Dok-7 による MuSK シグナルの増強によって NMJ 構成因子の遺伝子発現が増強している筋組織においてその発現が筋管中

央部で増強する転写制御因子をリスト化した。その中には、筋管中央部の核に選択的な転写制御への関与が報告されている Erm を含む複数の候補分子が認められたが、上記の転写制御領域（転写開始点の上流 50bp）に結合するものは認められなかった。現在、dok-7 遺伝子の転写制御領域と他の NMJ 構成因子の転写制御領域の比較により、後者のみにその標的となり得る配列をもつ転写制御因子群に的を絞り、筋管における核選択的な遺伝子発現制御機構との関連を精査している。

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 3 件）

(1) Ammar AB, Soltanzadeh P, Bauche S, Richard P, Goillot E, Herbst R, Gaudon K, Huze C, Schaeffer L, Yamanashi Y, Higuchi O, Taly A, Koenig J, Leroy J-P, Hentati F, Najmabadi H, Kahrizi K, Ilkhani M, Fardeau M, Eymard B, Hantai D. A Mutation causes MuSK reduced sensitivity to agrin and congenital myasthenia. *PLoS One*, 8: e53826, 2013 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0053826

(2) Mashima R, Arimura S, Kajikawa S, Oda H, Nakae S, and Yamanashi Y. Dok adaptors play anti-inflammatory roles in pulmonary homeostasis. *Genes Cells*, 18: 56065, 2012 (査読有)

(3) Hamuro J, Hishida Y, Higuchi O, and Yamanashi Y. The transcription factor Spl plays a crucial role in dok-7 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 408: 293-299, 2011 (査読有)

〔学会発表〕（計 1 件）

① Yamanashi Y. Plenary Lecture: Dok-7, MuSK, and the development of the neuromuscular junction. 12th International Conference on Myasthenia Gravis and Related Disorders (organized by the New York Academy of Sciences). New York, USA. May 21-23 (2012) (招待講演)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/genetics/html/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山梨 裕司 (YAMANASHI YUJI)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：40202387

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：