

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23890065

研究課題名（和文） アクチン結合モチーフを有する転写活性化因子 MKL のシナプス形態への影響

研究課題名（英文） Functional analysis of synapse morphology regulated by MKL, an actin-binding coactivator

研究代表者

石川 充（ISHIKAWA MITSURU）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教

研究者番号：10613995

研究成果の概要（和文）：MKL ファミリーのひとつ MKL1 が、ラットの脳において、新規のバリエーションを含む様々なアイソフォームを有することを明らかにした。これらのアイソフォームの発現ベクターを構築し、ラット大脳皮質ニューロン初代培養に遺伝子導入した。その結果、これらのアイソフォーム間において、ラット大脳皮質ニューロンでの細胞内局在や転写活性、突起形態の制御能に差異が認められた。そのうちのひとつは、SRE 依存性転写活性を大いに上昇させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In characterizing MKL1 transcripts expressed in rat brain, we have identified a novel transcript in addition to the other two transcripts. Functional comparison of these isoforms with regard to their ability to localize to the nucleus, drive SRE-mediated transcription and dendritic morphology revealed that one of the MKL1 isoforms is more active than the others in all these assays.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：アクチン、SRF、転写因子、樹状突起、Rho

## 1. 研究開始当初の背景

シナプスはニューロン特有の情報交換装置であり、環境・経験（入力）に依存して形態（「かたち」）と機能が柔軟に変化する。このような「可塑性」は、記憶・学習（出力）などの脳機能の形成基盤となる。一方、入力された情報は細胞の核にまで到達し、遺伝子発現を介して、シナプスを含めた神経細胞（ニューロン）の形態と機能を調節する。

当研究室では、脳神経系において可塑性に

関与する転写因子 SRF のコアクチベーター MKL の役割に着目してきた。これまで、MKL はげっ歯類の前脳に高発現しており、発達に伴って発現上昇することを明らかにしてきた。また、ニューロンにおいて低分子量 G タンパク質 Rho の活性化を受け MKL が核移行し、SRF 依存的な転写活性を誘導することを解明した。さらに MKL は樹状突起の伸長や維持に関わること、およびこの現象が細胞外リガンドである TGF- $\beta$  ファミリーのアクチビン

で引き起こされることを解明した。しかしながら、これまでMKLがシナプスの機能や形態に影響を及ぼすかは全くの不明であった。

そこで本研究では、ラット培養神経細胞を用いてMKLのシナプス機能を解析する。本研究を通じ、シナプス可塑性における「シナプスと核との情報交換」の新たな役割を解明するとともに、「かたち」の破綻が関与する神経疾患や精神遅滞の診断・治療薬開発の糸口とする。

## 2. 研究の目的

近年、MKLの脳特異的ノックアウトマウスの報告があり、海馬での $\beta$ -アクチンの発現低下やLTPの不全、神経の回路網の変態等が知られている。これはSRFの脳特異的ノックアウトマウスの表現型と類似した点が多く、既に重要視されていたSRFのもつニューロンの機能制御機構の一部にMKLが関与することはほぼ間違いないことが明らかとなってきた。

一方で、我々は、成体ラットからのシナプトソーム抽出液中のポストシナプス区分において内在的なMKLが存在しており、その中でもPSD (Postsynaptic density) 区画に豊富に含有されていることを明らかにした。

また、これまでの様々な知見から、ポストシナプスである樹状突起スパインには細胞骨格アクチンが豊富に含まれており、シナプスの「かたち」を環境に応じて柔軟に変化させることが知られていた。そしてアクチンフィラメントに結合する様々な因子も発見され、シナプス機能や形態に重要な役割をもつものが多い。一方のMKLは単量体アクチンとの結合能があることから、スパイン形態に影響を及ぼす可能性が十分に考えられた。

さらに当研究室では、培養海馬ニューロンにおいて、MKLはPSD95と共局在し、MKLの過剰発現でスパイン形態に影響を与える傾向が確認できた。すなわち、MKLはポストシナプスの足場構造やシグナル伝達経路に関与している可能性が強く示唆された。

以上のことより、ニューロンにおけるMKLの性質を明らかにするため、本研究では主にラット培養海馬・大脳皮質ニューロンを用いてシナプスや樹状突起スパインを含めた神経突起の形態を解析し、MKLがどのように関与しているかを明らかにする。

しかし、これは単にMKLがアクチン結合性を有する分子という理由だけで検討するのではない。我々は、これまでMKL依存的な遺伝子発現とニューロンの形態との互換性を検証してきており、MKLの転写因子としての機能と、その遺伝子産物が神経形態に影響する可能性を新たに視野に入れて検討する。

## 3. 研究の方法

ラット大脳皮質ニューロン初代培養系において、MKL発現ベクターやMKL siRNA発現ベクターを導入し、SRF依存的な転写活性をレポーターアッセイ（デュアルルシフェラーゼアッセイ）で、突起形態の解析をGFPを用いて解析した。特に、MKL1のスプライス・翻訳バリエーションを同定しているため、まずそれらの脳神経系における機能に着目して解析を進めた。また、MKLが標的としている細胞骨格関連の遺伝子発現機構に関して、その遺伝子エンハンサー領域の活性化機構を解析するため、ChIPアッセイも交えて解析を行った。

## 4. 研究成果

最初にMKLファミリーのひとつMKL1がラットにおいて様々なスプライスバリエーションが存在することを明らかにした。そしてそれらの遺伝子配列を詳細に解析した（図1）。続いて各種バリエーションの発現ベクターを構築し、ラット大脳皮質ニューロン初代培養系に導入して、転写因子SRF依存的な転写活性、およびシナプス後部を含めた神経突起形態にあたる影響について検証した。その結果、バリエーション間で転写活性（図2）や突起形態の制御能（図3、図5）に差異が認められた。この結果からMKLの様々なバリエーションが、発達過程や外界からの刺激に応じてニューロンの機能と形を微調整していると考えられる。また、低分子量Gタンパク質Rhoの下流でバリエーションの機能がさらに調節されていることも明らかにした（図4）。

同時に、細胞骨格関連遺伝子の発現機構についても発見があった。脳由来神経栄養因子BDNF刺激による誘導遺伝子のひとつがMKLに大きく制御されていることを明らかにした。これによって、BDNFによる神経生存や可塑性の向上、維持、記憶・学習形成の機構にもMKLが大きく関与する可能性が示唆される。

図1 ラットMKL1バリエーション群FLMKL1、BSAC、MELODYの遺伝子構造の同定と解析

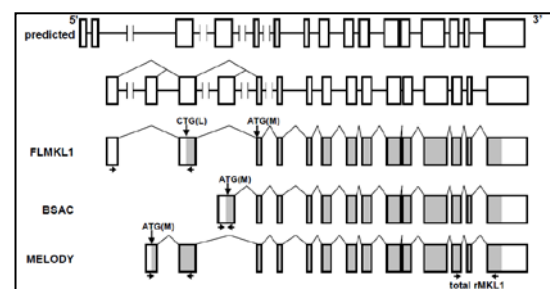


図2 ラット MKL1 バリエーション群は脳皮質ニューロンにおける転写活性化能に違いがある。

Empty、FLMKL1、BSAC、MELODY、MKL1met 発現ベクターを、それぞれ培養ラット脳皮質ニューロンに導入し、SRF 依存性転写活性 (A)、SRE 依存性転写活性 (B)、CRE 依存性転写活性 (C) をデュアルルシフェラーゼアッセイで解析した。

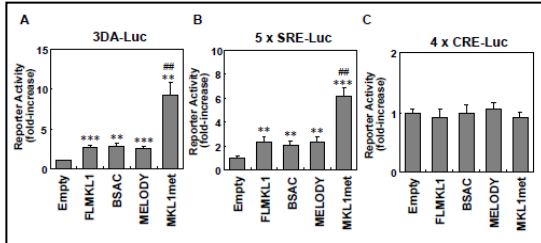


図3 ラット MKL1 バリエーション群は脳皮質ニューロンにおける樹状突起形態制御能に違いがある。

Empty、FLMKL1、BSAC、MELODY、MKL1met 発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを培養ラット脳皮質ニューロンに導入し、GFP で細胞形態を解析した。A は GFP 蛍光画像 (グレースケール)、B は樹状突起数解析結果 (改変 Sholl 法)。

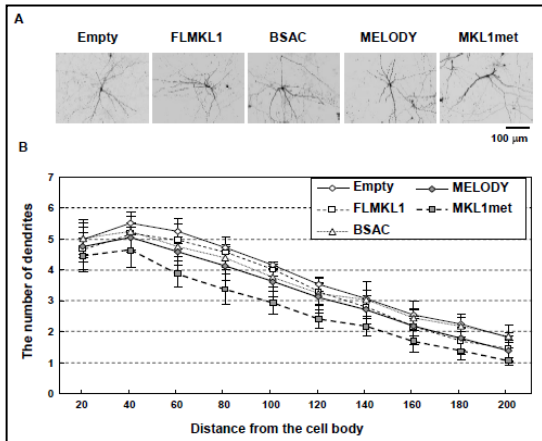


図4 ラット MKL1 バリエーション群はいずれも低分子量 G タンパク質下流で働き、核移行する。

Empty、FLMKL1、BSAC、MELODY、MKL1met 発現ベクターおよび GFP 発現ベクター (A) あるいは低分子量 G タンパク質 Rho の下流エフェクター mDia の恒常活性化体 (camDia) の GFP 融合型発現ベクター (B) を培養ラット脳皮質ニューロンに導入し、GFP で細胞形態を解析した。A、B は FLAG-MKL1 蛍光画像 (グレースケール) を行い、C はその蛍光強度から MKL1 の細胞内局在を核・細胞質の比で表した。

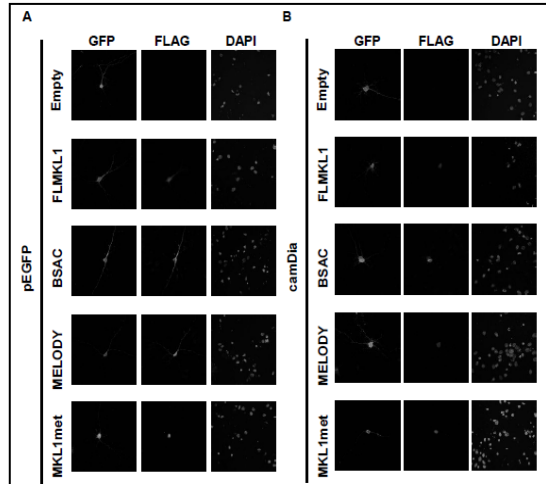
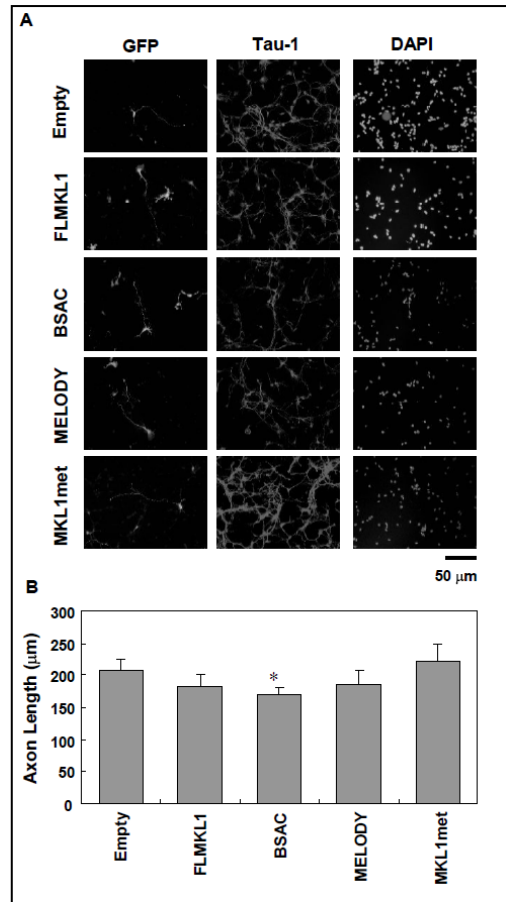


図5 ラット MKL1 バリエーション群の脳皮質ニューロンにおける軸索長の制御能には差が無い。

Empty、FLMKL1、BSAC、MELODY、MKL1met 発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを培養ラット脳皮質ニューロンに導入し、GFP で細胞形態を解析した。A は GFP 蛍光画像 (グレースケール)、B は軸索長の解析結果。



## 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0件)

[学会発表] (計3件)

① 石川充 (代表) MKL, an actin-binding coactivator for SRF, is involved in a novel signaling pathway for activin-regulated dendritic morphology in rat cortical neurons、The 6<sup>th</sup> International Conference of Neurons and Brain Disease, 2011年8月3-5日、富山

② 石川充 (代表) : Identification and characterization of a novel transcript of rat MKL1, the actin-binding coactivator for SRF: the effect on transcriptional activity and neuronal morphology in rat cortical neurons、第34回日本分子神経生物学会年会、2011年12月13日、横浜

③ 石川充 (代表) : アクチン結合性転写活性化因子 MKL が関与するアクチビン誘導性のラット大脳皮質ニューロン樹状突起形態制御における新規シグナル伝達経路の解析、第34回日本神経科学大会、2011年9月17日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/biochel/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 充 (ISHIKAWA MITSURU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・

助教

研究者番号 : 10613995

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :