

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790300

研究課題名(和文)活動依存的Ca²⁺シグナル系を介した小脳顆粒細胞発生・成熟機構の解明

研究課題名(英文)Activity-dependent calcium signaling plays a role in development and maturation of cerebellar granule cells

研究代表者

岡澤 慎 (Okazawa, Makoto)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40414130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くの神経細胞では、増殖・分化・移動期、静止膜電位は浅く脱分極傾向にあるが、成熟期を経た細胞では分極している。これまでに、小脳顆粒細胞の静止膜電位の分極は機能的ネットワーク形成に必須で、活動電位依存的な成熟遺伝子の発現に転写因子Etv1を介することを明らかにした。本研究では、成熟遺伝子の発現と未成熟遺伝子の発現抑制のメカニズムを解析した。その結果、Etv1が活動電位依存性のカルシウムシグナルによる制御を受けるだけでなく、TrkB-ERKシグナルによるリン酸化制御を受けることがわかった。また、Etv1と相互作用するコリプレッサーを同定した。

研究成果の概要(英文)：In many developing neuronal cell types, the resting membrane potential shift from a depolarized state to a non-depolarized state during the early postnatal period. The shift of the resting membrane potential and the resulting inactivation of calcineurin are essential for activity-dependent maturation gene expression via Etv1 transcription factor and for morphological and electrophysiological maturation in cerebellar granule cells. In this study we analyzed the signaling mechanism of maturation gene expression and of immature gene suppression during cerebellar network formation. We found that Etv1 was regulated not only by activity-dependent calcium signaling but also by TrkB-ERK signaling and that Etv1 was associated with a transcriptional corepressor which might regulate immature gene expression.

研究分野：生理学

キーワード：転写因子 神経成熟 膜電位

1. 研究開始当初の背景

神経系の発生・成熟に異常をきたすと発達障害をはじめさまざまな精神・神経疾患につながる。神経発生期(細胞増殖、分化、細胞移動を意味する)とその後の成熟期における電気的性質は、ダイナミックに変化しさまざまなカルシウムシグナルの活性を制御しているにもかかわらず、神経回路形成における役割はいまだ不明な点が多い。そこで、本研究では申請者らのこれまでの研究を進展させ、分子生物学的視点だけでなく電気生理学的視点を組み込むことで、新しい視点から神経ネットワーク構築メカニズムを明らかにし、今後の神経発生・成熟の研究に新たな方向性を示す。

多くの神経細胞で増殖・分化・移動期には、静止膜電位は恒常的に浅く脱分極傾向にあるが、成熟期の細胞では分極していることが報告されている(Nakanishi S. and Okazawa M., 2006, *J Physiol*, 575, 398-395)。小脳顆粒細胞を用いた研究で静止膜電位の脱分極は恒常的なカルシウム上昇をもたらす、カルシウム/カルモジュリン依存性カルシニューリン脱リン酸化酵素を活性化し、増殖・分化・移動を促進する。一方、静止膜電位が分極すると、カルシニューリンが不活性化し、神経成熟が誘導される。さらに、成熟期の活動電位による脱分極は周期的なカルシウム上昇を伴う。申請者らは神経細胞の成熟という最終分化プログラムの活動依存的な神経細胞成熟のマスター因子として転写因子Etv1を同定した(Abe H., Okazawa M., Nakanishi S., 2011, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 12497-12502)。しかしながら、カルシニューリン依存性、未成熟遺伝子の発現抑制メカニズムなど不明な点が多い。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに小脳顆粒細胞を用いた研究から、未成熟期と成熟期に膜電位の違いによって、それぞれ恒常的あるいは周期的カルシウム上昇をそれぞれ引き起こし、カルシニューリンの活性制御のもと、遺伝子発現や形態形成、電気的なシナプス形成の制御が行われることを明らかにした。さらに、成熟期の遺伝子発現のマスター因子として転写因子Etv1を同定した。そこで、本研究では、細胞膜の膜電位変化から成熟に至る細胞内外のシグナル伝達系を分子生物学的・薬理的に解明し、さらに、未成熟遺伝子の発現制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

生後8日齢マウスから小脳顆粒細胞を酵素処理により単離し、初代培養を行った。遺伝子発現の阻害実験では、siRNAあるいは、shRNA発現プラスミドを、細胞の単離後、培養する直前に、エレクトロポレーション法により導入した。遺伝子過剰発現実験ではCAGプロモーター下流に対象遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、同様にエレクトロポレーション法により導入した。また、薬理的な解析では、培養1日後より、種々の薬物の存在下で培養した。これらの処理による影響は、培養開始後5~7日で、細胞を回収し、定量的RT-PCRやリポーターアッセイにより、遺伝子発現への影響を検討した。蛋白質の相互作用は免疫沈降法により検討し、その他、生化学的、細胞生物学的解析等を行った。

小脳顆粒細胞のシナプス形成など、細胞形態の変化や電気生理学的解析のために、小脳顆粒細胞の器官培養を行った。すなわち、生後6~8日齢のマウス小脳のスライスをメンブレン上に培養し、33%、5%CO₂下で培養した。小脳スライス中の顆粒細胞への遺伝子導入はリポフェクションにより外顆粒層の分裂期の小脳顆粒細胞へ導入させた(Okazawa M et al, 2008 *J Neurosci*, 29(9) 2983-2947)。

4. 研究成果

(1) Etv1の制御系の解析

転写因子Etv1が活性化するメカニズムとして薬理的解析とConstitutive active体の導入による影響を検討した。その結果、Etv1がCaMKIIの活性化による制御を受けることが示唆された。さらに、培養細胞において、Etv1とCaMKIIが相互作用することを確認した。この際、カルシニューリンの制御分子の関与が考えられた。

脱分極条件下発現が上昇する未成熟遺伝子の一つである脳由来神経栄養因子BDNFが、TrkB-Erkシグナルカスケードにより、Etv1をリン酸化制御し、その結果、NR2Cなどの成熟遺伝子を発現促進することが明らかになった。

(2) 未成熟遺伝子の発現抑制

一連の未成熟遺伝子は、グルタミン酸受容体活性化による活動電位依存的な周期的カルシウム上昇、CaMKIIを介して引き起こされる転写因子Etv1の活性化によって、発現が

抑制されたが、新規に同定した遺伝子を含め、未成熟遺伝子はその発現変化は一様ではなく（図1）遺伝子発現抑制メカニズムは複数の機構が関与することが考えられた。

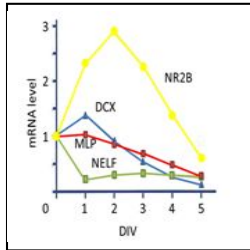


図1. 未成熟遺伝子の発現の経時変化
未成熟遺伝子の発現の変化は、成熟遺伝子とは対照的にバリエーションに富む。

神経の成熟期に発現の抑制が起こる遺伝子は多数報告されているが、発現抑制のメカニズムを明らかにした報告はほとんどない。Etv1による未成熟遺伝子の発現制御メカニズムは不明であるが、活動電位依存性に発現が上昇する遺伝子に含まれるコリプレッサーの一つがEtv1と相互作用することを明らかにした。このことは、活動依存的な未成熟遺伝子の発現抑制メカニズムを明らかにする上で意義がある。今後、Etv1がコリプレッサーとの相互作用を介して未成熟遺伝子の発現を抑制している可能性を検討する。

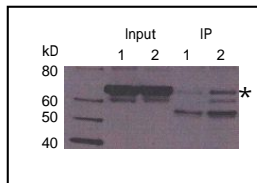


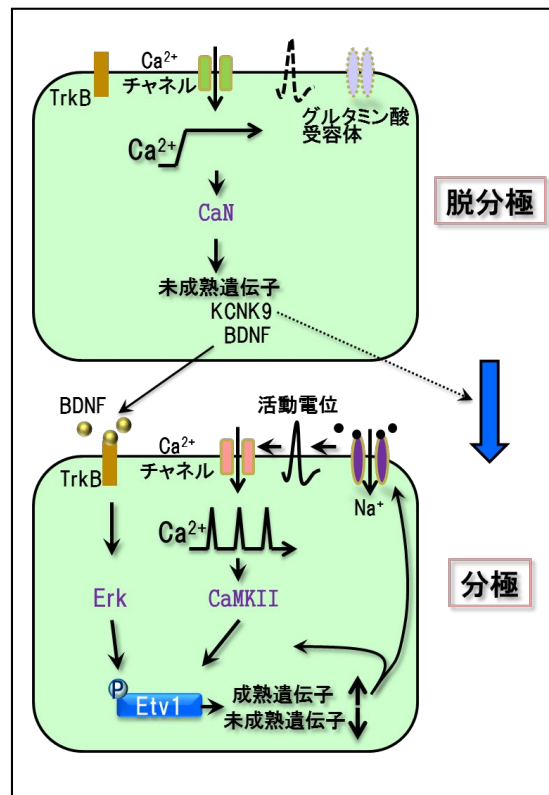
図2. 活動電位依存的に発現が上昇する corepressor (lane 1,2)はEtv1 (lane 2)と同時に発現させた

場合のみ免疫沈降によって検出された (asterisk)。

(3) 成熟遺伝子は脱分極条件下では、発現が阻害される。成熟遺伝子と未成熟遺伝子の5'あるいは3' DNA領域を用いてレポーターアッセイから、NPTX, Wnt7などの成熟遺伝子の多くの配列で、脱分極条件下で発現が上昇した。薬理的解析との結果から、成熟遺伝子の発現にヒストン修飾を介した遺伝子発現制御機構の関与が示唆された。

図3. 静止膜電位による小脳顆粒細胞の成熟制御

未成熟期、静止膜電位は脱分極している。この時期グルタミン酸受容体の発現は低い。静止膜電位の脱分極は、活動電位を阻害するが、電位依存性カルシウムチャネルの活性化により恒常的に細胞内カルシウム上昇が起こる。その結果、カルシニユリンが活性化し、未成熟遺伝子が発現する。その際、KCNK9などのカリウムチャネルの発現が静止膜電位を分極させると考えられる。一方、未成熟期



に発現上昇する BDNF は TrkB-Erk カスケードを活性化することで転写因子 Etv1 をリン酸化する。さらに、静止膜電位の分極はシナプス形成を促し、活動電位の誘発によるカルシウム上昇を引き起こす。このカルシウム上昇はCaMKII活性化により、Etv1を活性化する。Etv1の活性化は、未成熟遺伝子の発現を抑制し、成熟遺伝子を発現誘導する。その結果、シナプス関連遺伝子のさらなる発現上昇、Etv1の発現上昇が起こり、加速度的に、神経ネットワーク形成が進行すると考えられる。

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 1 件)

Abe H, Okazawa M and Nakanishi S (2012) Gene regulation via excitation and BDNF is mediated by induction and phosphorylation of the Etv1 transcription factor in cerebellar granule cells, Proc Natl Acad Sci U S A 109, 8734-8739, doi: 10.1073/pnas.1206418109. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

垣野明美、李 蕾、池末昌弘、中野厚史、藤田佳子、岡澤 慎、真下知士、沢村達也「LOX-1 遺伝子欠損 SHRSP の作製とその形質の予備的解析」第 55 回高血圧関連疾患毛

デル学会学術総会 2014年12月6日(和歌山)

Saito M, Tanaka C, Furutani K, Okazawa M, Toyoda H, Sato H, Kurachi Y and Kang Y, 「Modulation of TASK Currents by the Activity of cGMP-Dependent Protein Kinase」 第37回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(横浜)2014年9月12日

岡澤 慎 「活動電位依存的な小脳顆粒細胞の成熟メカニズム」 第10回宮崎サイエンスキャンプ 2014年2月14日(宮崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡澤 慎 (Makoto Okazawa)

国立開発研究法人国立循環器病研究センター・室長

研究者番号：40414130

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者