

# 博士論文

転写因子 SRF コアクチベーターMKL1 のニューロン内局在変化  
及びアイソフォーム発現と機能に関する研究

2014 年 9 月

富山大学大学院

生命融合科学教育部 生体情報システム科学専攻

分子神経生物学研究室

塩田 惇

## 目次

要旨.....	3
略語.....	6
第1章 序論.....	
1.1 細胞の形態変化.....	10
1.2 中枢神経系の構成.....	13
1.3 ニューロンの形態.....	14
1.4 遺伝子の発現制御.....	15
1.5 転写因子 SRF .....	16
1.6 SRF コアクチベーターMKL.....	17
1.7 SRF および MKL ノックアウトマウスの知見.....	20
1.8 本研究への導入.....	20
第2章 ニューロンにおける Rho シグナルによる MKL1 の局在・機能解析.....	
2.1 緒言.....	22
2.2 実験材料, 方法.....	22
2.3 結果.....	28
2.4 考察.....	32
第3章 MKL1 新規アイソフォームの同定.....	
3.1 緒言.....	34
3.2 実験材料・方法.....	34
3.3 実験結果.....	41
3.4 考察.....	55
第4章 MKL1 新規アイソフォームのニューロンにおける機能解析.....	
4.1 緒言.....	58
4.2 実験材料・方法.....	58
4.3 実験結果.....	62
4.4 考察.....	69
総括・展望.....	71
参考文献.....	74
謝辞.....	80
公表論文.....	81

## 要旨

ニューロンは、外部環境からの入力などによって、“神経可塑性”と呼ばれる機能や構造の変化を引き起こすことを特徴とし、この可塑性が記憶・学習・認知・情動などといった高次脳機能に深く関与していると考えられている。すなわち、この神経可塑性に関与する分子の研究が、神経機能原理の解明や精神疾患の病態解明に寄与すると考えられる。神経可塑性に関わる重要な現象の一つに、ニューロンの形態変化がある。ニューロンの形態変化には、アクチンをはじめとする細胞骨格系分子の重合・脱重合が関与している。一方、転写因子を介した遺伝子発現も神経可塑性に密接に関与していることが知られている。そのため、本研究では、細胞の形態変化と遺伝子発現を制御するタンパク質である Megakaryoblastic leukemia (MKL)1 (別名 Megakaryocytic acute leukemia: MAL) に着目した。MKL1 は、N 末端にある RPEL モチーフを介して、単量体アクチンに結合しているが、細胞骨格系に関与する低分子量 G タンパク質である Rho のシグナル活性化により、アクチンの再構成が引き起こされ、MKL1 と単量体アクチンが解離する。単量体アクチンと解離した MKL1 は核内に移行し、転写因子 serum response factor (SRF) のコアクチベーターとして転写を誘導する。SRF には、複数のコアクチベーターが関与することが知られているが、MKL1 の標的遺伝子群には細胞骨格関連遺伝子が多く含まれている。すなわち、MKL1 はアクチンを介する細胞骨格系への作用に加え、細胞骨格関連遺伝子の発現を介した形態変化にも作用し、それぞれが協調的に作用すると考えられている。しかし、MKL ファミリーの研究は、株化細胞や血管平滑筋細胞などの非神経細胞において解析が進んでおり、MKL1 の脳神経系における役割は解明されていなかった。そのため、最初に培養ラット大脳皮質ニューロンを用いて、MKL1 の局在解析を行った。次に、クローニングの行われていなかったラット MKL1 のクローニングを行い、複数のアイソフォームを同定し、その発現パターン解析を行った。最後に同定された MKL1 のアイソフォームがニューロンに与える影響を検討した。

本研究ではまず、ニューロンにおける MKL1 の機能を明らかにする目的で、培養ラット大脳皮質ニューロンで Rho シグナル伝達系を活性化させた際の MKL1 の細胞内局在を調べた。培養 7 日目の培養ラット大脳皮質ニューロンに、リン酸カルシウム法で MKL1 発現ベクターのトランスフェクションを行い、免疫染色法で MKL1 の局在を調べた。その結果、Rho の下流エフェクターである mDia の恒常活性化体を過剰発現したニューロンでは、顕著に MKL1 の核移行が引き起こされていた。さらに、培養ラット大脳皮質ニューロンにおける SRF 依存性転写をルシフェラーゼアッセイによって測定したところ、mDia の恒常活性化体の発現によって SRF 依存性転写が誘導されたが、MKL1 のドミナントネガティブ変異体である  $\Delta$ B1B2 の共発現下では、

転写が抑制された。以上の結果より、ニューロンにおいても Rho-MKL1-SRF のシグナル伝達系が機能していることが示された。(Tabuchi et al., *Journal of Neurochemistry*, 2005)

その後の当研究室による脳における MKL ファミリーが持つ役割について解析を行った結果、MKL1 は脳に高発現し、脳の組織によって発達段階における発現パターンが異なること、培養ラット大脳皮質ニューロンにおいても、siRNA や MKL1 のドミナントネガティブ変異体によって SRF 依存性転写が減少し、ニューロンの突起数が減少することを示してきた (Shiota et al., *Journal of Neurochemistry*, 2006)。また、培養ラット大脳皮質ニューロンを TGF- $\beta$ ファミリーの一員であるアクチビンで処理すると、SRF 依存性転写活性化や樹状突起数上昇が起こるが、その双方に MKL が関わることを明らかにした (Ishikawa et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2010)。

一方、遺伝子発現においては、一つのゲノムから、複数の異なる成熟メッセンジャーRNA やタンパク質がアイソフォームとして発現することがあるが、このアイソフォームの多様性は、高等生物が多様な機能を獲得することができた一因と考えられている。すなわち、脳に多く発現するタンパク質のアイソフォームを解析することが、複雑な脳機能の解明に役立つと考えられる。本研究で着目している MKL1 にはアイソフォームが存在することが知られている。マウス MKL1 には、全長型 (FLMKL1) の他に、MKL1met と Basic, SAP and Coiled-coil domain (BSAC) が知られているが、各アイソフォーム間における機能の違いは解明されておらず、また、ラット MKL1 についてはクローニングが行われていなかった。そこで本研究では、MKL1 が持つ各アイソフォームの発現パターンと機能を明らかにすることを目的とし、ラット MKL1 アイソフォームのクローニングを行った。事前の検討において、ラット MKL1 の mRNA を RT-PCR で確認したところ、複数のバンドが得られたことから、アイソフォームが存在していることを予想し、5'-RACE 法を用いて、ラット MKL1 cDNA の 5'-末端を同定した。その結果、マウスの FLMKL1, MKL1met, BSAC に相当するアイソフォームの他に、新規アイソフォームである MKL1-elongated derivative of yield (MELODY) を同定した。次に、MELODY を含めたアイソフォームの発現パターンについて検討するため、成体ラットの全身の各組織と、脳については全脳と大脳皮質、海馬、小脳、嗅球の RNA をそれぞれ抽出した。リアルタイム RT-PCR (Ishimaru et al., *Journal of Neurochemistry*, 2007) で発現量を定量することとし、その際、プライマーには各アイソフォーム特異的であるものを用いた。その結果、MKL1 はラットでもマウスと同様に脳に多く発現していることが明らかとなった。さらに、BSAC が特に海馬に高発現しているなど、アイソフォームの発現は脳領域部位において異なる分布を示した。また、胎生 15 日から生後 3 週間までのラット脳の各部位から RNA を抽出し、脳の発達に応じたアイソフォームの

発現変化を調べたところ、FLMKL1 や MELODY が、発達に従って発現が減少するのに対し、BSAC は発達後期にかけて発現が上昇している結果が得られた。さらに、これらのアイソフォームの発現ベクターを作製し、SRF 依存性転写に与える影響について検討した。最初に、MKL1 研究で良く用いられている NIH3T3 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイによって検討した結果、すべてのアイソフォームの過剰発現下において、SRF 依存性転写が誘導されたが、特に MKL1met によって顕著に SRF 依存性転写が誘導された。MKL1met は単量体アクチンと結合する RPEL モチーフが、他のアイソフォームに比べて 1 つ少なく、2 つしか持たないため、MKL1 が核に移行しやすく、その結果、SRF 依存性転写を強く誘導したと考えられる。(Ishikawa et al., *FEBS Open bio*, 2013)

最後に、同定した MKL1 アイソフォームの脳における機能を明らかにする研究を行った。まず、培養ラット大脳皮質ニューロンにおける MKL1 アイソフォームの細胞内局在を調べた。作製した発現ベクターを培養ラット大脳皮質ニューロンに導入し、免疫染色法でその細胞内局在を解析した。その結果、MKL1met は、他のアイソフォームに比べて、核に多く局在していた。また、これらのアイソフォームの過剰発現下において SRF 依存性転写をルシフェラーゼアッセイによって調べたところ、NIH3T3 細胞と同様に、MKL1met が他のアイソフォームより強く SRF の依存性転写を誘導した。次に、これらのアイソフォームが与える樹状突起の複雑性に着目した。培養ラット大脳皮質ニューロンに発現ベクターのトランスフェクションを行い、免疫染色を用いた Sholl 法によって樹状突起形態の解析を行った。その結果、MKL1met 過剰発現下では樹状突起の複雑性が減少した。一方、軸索長についても解析を行ったが、いずれのアイソフォームも影響を与えなかった。以上の結果より、MKL1met は、他の MKL1 と比較して強い SRF 依存性転写誘導能を有しており、その結果として樹状突起形態にも強く影響を与える可能性が考えられた。(Ishikawa et al., *Neuroreport*, 2014)

本研究によって、脳神経系においても Rho-MKL-SRF のシグナル伝達系が機能することが明らかになった。また、新規アイソフォームである MELODY を含む複数のラット MKL1 アイソフォームの存在を明らかにした。さらに、それぞれのアイソフォームは異なる発現パターンを示し、また SRF 依存性転写やニューロンの樹状突起形態に影響を与えた。以上の結果より、アイソフォーム発現による MKL1 分子多様性は、神経機能の微調整に関与する可能性が示唆された。

## 略語

5'-RACE	5'-rapid amplification cDNA-end
ANOVA	analysis of variance
Arf	ADP-ribosylation factor
B1	basic 1
B2	basic 2
BSA	bovine serum albumin
BSAC	Basic, SAP, and coiled-coil domain
ca	constitutively active
cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
Cdc42	cell division cycle 42
CRE	cAMP response element
CREB	CRE binding protein
Crm1	Chromosome region maintenance 1
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic Acid
DNase	deoxyribonuclease
DTT	dithiothreitol
E	embryonic
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	extracellular signal regulated kinase
ETS	E twenty-six
FCS	fetal calf serum
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAP	GTPase activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanine nucleotide diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor

GFP	green fluorescent protein
GTP	guanine nucleotide triphosphate
HA	hemagglutinin
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HRP	horse radish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
kDa	kilo-dalton
LIM	Lin11, Isl-1 and Mec-3
LIMK	LIM kinase
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
Luc	luciferase
LZ	leucine zipper
MADS	mcm1, agamous, deficiens, SRF
MAL	megakaryocytic acute leukemia
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mDia	mammalian diaphanous related formin
MEF2	myocyte enhancer factor-2
MELODY	MKL1-elongated derivative of yield
MICAL-2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
MKL	megakaryoblastic leukemia
mRNA	messenger RNA
Mrtf	myocardin-related transcription factor
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P	postnatal
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PolyQ	poly-glutamine repeat
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Rab	Ras-like proteins in brain

Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ras	raus sarcoma
Rho	Ras homologous
ROCK	Rho kinase
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
RPEL	RPxxxEL motif
RT	reverse transcription
rpm	revolutions per minute
SAP	SAF-A/B, Acinus, PIAS
SD	Splague-Dawley
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SRF	serum response factor
SUMO	small ubiquitin-related (like) modifier
TAD	transcriptional activation domain
TBST	Tris-buffered saline Tween
TCF	ternary complex factor
Tech	transcript-enriched in cortex and hippocampus
TK	thymidine kinase
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$

# 第 1 章 序論

## 1.1 細胞の形態変化

### 1.1.1 概論

細胞は、その形態を変化させることで適切な時期に細胞移動や細胞分裂を行っている。その一方で、細胞形態は、細胞移動や細胞分裂以外においても重要な役割を果たす。特にニューロンでは、樹状突起、シナプス、軸索等の突起がそれぞれ特徴的な機能を有する。したがって、細胞形態制御は細胞機能を支持する基盤となっていると考えられる。細胞形態変化をもたらす主軸となるのが、細胞骨格の存在である。細胞骨格は、細胞外リガンドによる刺激によってダイナミックに変化し、その変化は、細胞内シグナル伝達系や遺伝子発現によって制御される。細胞骨格系分子は、アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメントの3種類が知られている<sup>1</sup>。以下に、この3種類の分子について述べる。

### 1.1.2 微小管

微小管は、チューブリンと呼ばれるタンパクが重合して形成されており、その直径は 25 nm と、3 種類の細胞骨格系タンパク質の中で最も直径が大きい。微小管には極性があり、プラス (+) 端での伸張とマイナス (-) 端での縮退が同時に起こっている（トレッドミル状態：トレッドミルの概要はアクチンフィラメントの項で後述する）。細胞内で微小管は細胞の形態維持や細胞分裂などに役立つ他、キネシン、ダイニンなどによる物質輸送経路の基盤となっている<sup>1,2</sup>。

### 1.1.3 中間径フィラメント

中間径フィラメントは、ケラチンやビメンチンなどにより形成されており、その直径は 10 nm 程度である。中間径フィラメントは、細胞や組織の安定化に重要であることが知られている<sup>1</sup>。

### 1.1.4 アクチンフィラメント

アクチンフィラメントは、その名の通り、アクチンから形成されており、3 種類の細胞骨格系分子の中では最も直径が小さく、7 nm 程度である。アクチンフィラメントは、ミオシンと共に、筋肉細胞において筋収縮などに重要な役割を示すことが知られている。また、ニューロンを含む全ての細胞で最も含量の多い細胞骨格系タンパク質である<sup>1,3</sup>。本研究においては、細胞骨格系の中でも、特にアクチンが密接に関与するため、以下にアクチンについて詳述する。

### 1.1.5 アクチンダイナミクス

アクチンは、分子量約 40 kDa, 375 アミノ酸からなるタンパク質で、G アクチン(Globular actin: G-actin)を形成している。生理的なイオン条件下では、一分子の ATP 及びカルシウムもしくはマ

グネシウムイオンと結合することによって、G アクチン同士が重合し、数珠状に 2 本の鎖がよじられているように見える状態 (F アクチン: Fibrous actin: F-actin) を形成する。この重合反応は可逆的であり、微小管と同様にプラス端に新しい G アクチンが結合する一方、マイナス端から G アクチンが解離することでトレッドミル状態を形成している (図 1-a)。このようなアクチンダイナミクスによって、網目構造や束構造などの様々な細胞形態を作り出している<sup>1,3</sup>。

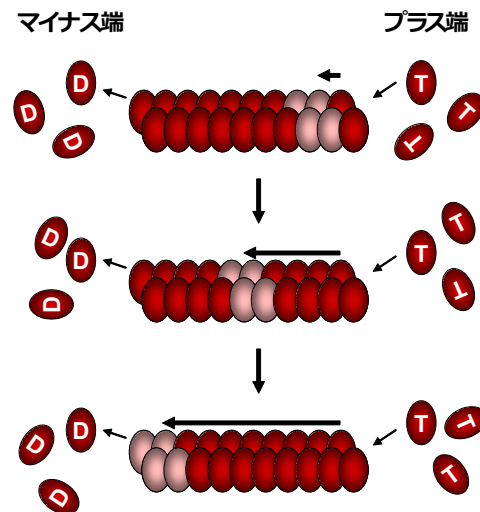


図 1-a トレッドミルの概略図<sup>1</sup>

T は ATP 結合型アクチン, D は ADP 結合型アクチンを示す。プラス端に ATP 結合型アクチンが結合し、マイナス端から ADP 結合型になって離脱する。

#### 1.1.6 アクチンと Rho シグナル伝達系

細胞形態変化の際には、アクチン細胞骨格によるフィラメント形成が起こる。その種類として主に 3 つが挙げられる。まずはフィロポディア(糸状仮足: filopodia)と呼ばれる棘状の形態、次にラメリポディア(葉状仮足: lamellipodia)と呼ばれる扇状の形態、もう一つはストレスファイバー(stress fiber)である。これら 3 つの形態は低分子量 G タンパク質 (Small GTPase: Small G) の 1 つである Rho ファミリーのシグナル伝達に関与している<sup>1, 3</sup>。Small G は、合計の分子量が 100 kDa を超える三量体 G タンパク質と比べると、分子量が 20~30 kDa と小さく、サブユニットを持たない単量体であるが、三量体 G タンパク質と同様に、GTPase 活性を持つ。Small G のシグナル伝達系の活性化は、GDP から GTP への交換反応 (リン酸の付加ではない) を介して行われる。この反応は、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF), GTPase 活性化タンパク質 (GTPase activating protein: GAP), グアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDP dissociation inhibitor: GDI) という 3 種類の外部因子によって調節されている (図 1-b)<sup>4</sup>。

Small G には、主に細胞増殖に関与する Raus sarcoma (Ras) をはじめ、Ras homologous (Rho), Ras-like protein in brain (Rab), ADP ribosylation factor (Arf) などのファミリーが存在する<sup>4</sup>。このうち Rho ファミリーは、ストレスファイバーの形成に関与することが知られている RhoA, ラメリポディアを形成する Ras-related C3 bothlinum toxin substrate 1 (Rac1), フィロポディアを形成する cell division cycle 42 (Cdc42)の主に 3 種類がある。これらはアクチンを介した細胞骨格制御によって、細胞形態、細胞運動、細胞接着、細胞分裂など幅広い機能に関与している<sup>1,5</sup>。

RhoA の下流シグナル伝達系には、Rho kinase (ROCK), Lin11, Isl-1 and Mec-3 (LIM)キナーゼを介してコフィリンを抑制し、アクチンフィラメント切断を抑制する経路と、mDia を介してプロフィリンを活性化し、アクチン重合を促進する経路という 2 つの独立した経路が存在している。この 2 つの経路はいずれも F アクチンの重合を促進する経路である (図 1-c)<sup>3</sup>。

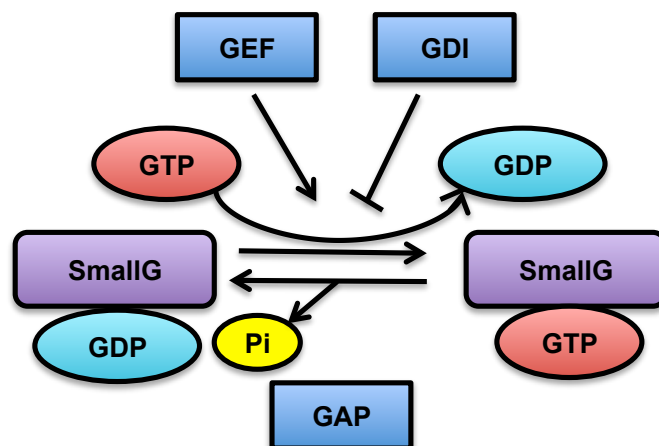


図 1-b 低分子量 G タンパク質 (SmallG) の制御機構<sup>4</sup>。SmallG は、GTP 結合型において、活性を示し、GEF, GDI, GAP などの因子によって制御が行われている。

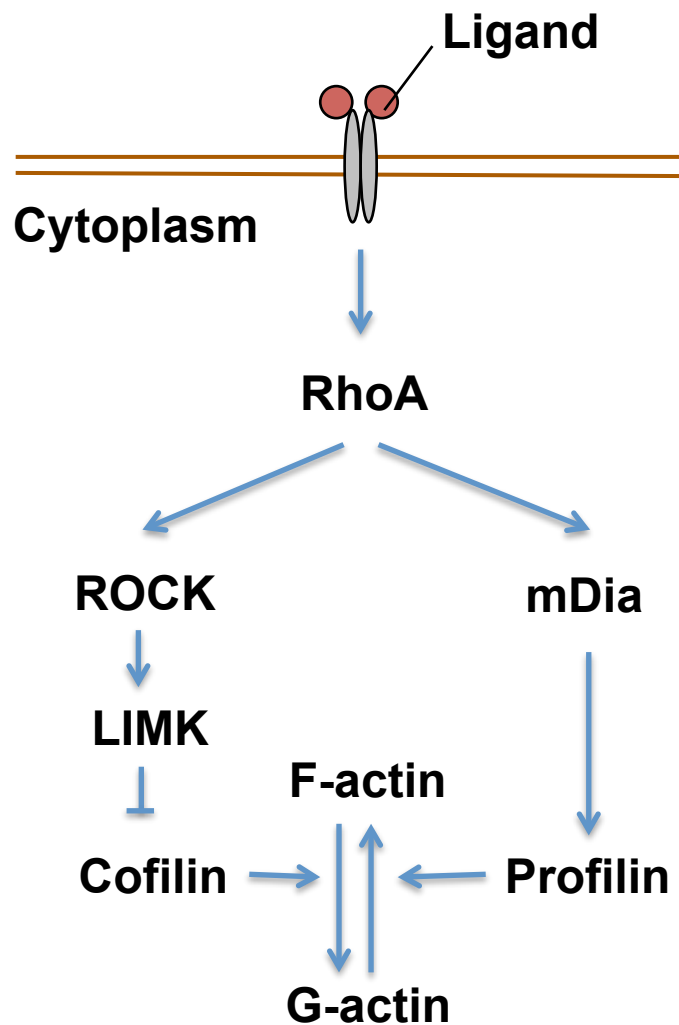


図 1-c RhoA が形態変化を起こすシグナル伝達経路<sup>3</sup>

RhoA は、アダプタータンパク質の構造を持つ mDia の活性化 → アクチン重合促進因子プロフィリン活性化という経路に加え、Rho キナーゼ (ROCK) → LIM キナーゼのリン酸化 → アクチン脱重合促進するコフィリンの不活性化という経路をそれぞれ活性化する。このような独立した 2 つの経路によってアクチン重合を誘導しており、この結果、ストレスファイバー形成等が惹起される。

## 1.2 中枢神経系の構成

中枢神経系には、ニューロンと、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアから構成されるグリア細胞が存在している。このうち、ニューロンは細胞の情報伝達や、運動、呼吸をはじめ、認知、情動、記憶、学習など高次脳機能に至る多くの脳機能において重要な役割を果たしている<sup>7</sup>。一方、グリア細胞は、一般的には脳構造の支持や、神経栄養因子の合成、免疫系

への関与など、補助的な役割を示すと言われてきたが、現在では、神経伝達物質の受容体を持ち、細胞内シグナル伝達にも能動的に関与していることが明らかになりつつある<sup>6</sup>。

### 1.3 ニューロンの形態

#### 1.3.1 概論

ニューロンは、複数の長い突起を持つ、形態学的に特徴的な構造を持つ細胞である。その突起は軸索と樹状突起の2種類に大別される。軸索は、多くのニューロンの場合1本であるのに対して、樹状突起は複数存在しており、複雑な分岐を持つ。また、これらの軸索や樹状突起の基点には、核を持つ細胞体が存在する。複数のニューロンの間では、樹状突起と軸索が接近して、情報伝達を行っている場があり、この場をシナプスと呼ぶ。ニューロンの軸索末端であるプレシナプスから遊離した神経伝達物質は、樹状突起上のポストシナプスにある受容体を介して受け取られ、シナプス伝達が行われる。シナプス伝達の情報、細胞体を通り、軸索に伝えられ、軸索末端のプレシナプス部位より次のニューロン、もしくは各種の受容器や効果器へ情報が伝えられる<sup>1,7</sup> (図 1-d)。シナプス伝達は、次のニューロンへの応答連絡を起こすだけでなく、細胞内シグナル伝達系を介して、核へと情報を伝え、遺伝子発現制御を行う。

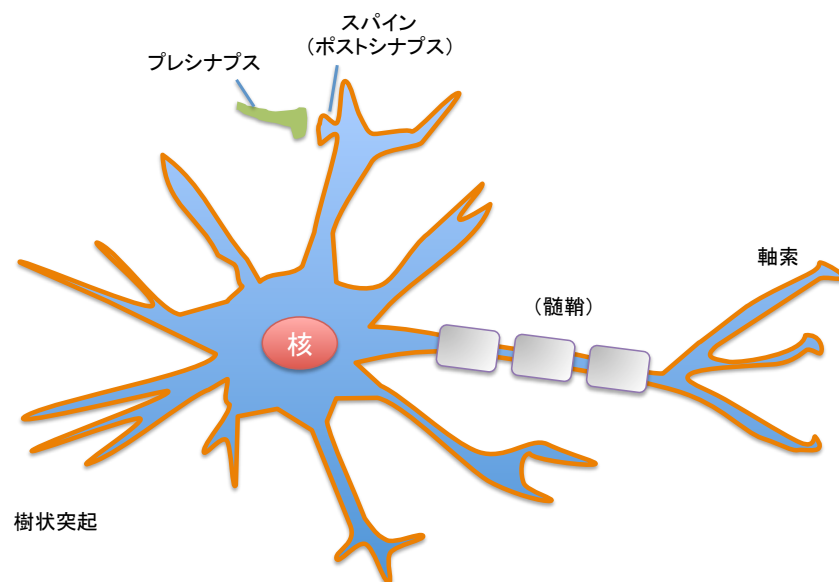


図 1-d ニューロンの形態<sup>1,7</sup>

ニューロンは、複雑に分岐した突起を持っている。ニューロンは細胞体から伸びる複数の樹状突起を持つ。樹状突起は、棘突起であるスパインを持つこともあり、スパインはポストシナプスを形成する。また、プレシナプスを形成しているのは軸索末端である。シナプス伝達は、軸索にあるプレシナプスからポストシナプスに向けて神経伝達物質を介して行われる。

### 1.3.2 ニューロンにおける形態変化の意義

脳神経系を形成するためにニューロンは、適切な時期に産生され、適切な位置へと移動する。そして、樹状突起や軸索伸長、シナプス形成・退縮を起こしながら、ニューロンネットワークを構築する。ニューロンのシナプス形態は、長期増強現象 (long-term potentiation: LTP) や長期抑圧現象 (long-term depression: LTD) 等の記憶の基礎過程と考えられている現象と密接に関与する<sup>8,9</sup>。したがって、神経形態、シナプス形態制御の機構解明に多くの神経科学者が取り組んでいる。ポストシナプス発現部位であるスパインの形態変化には、前述したアクチン細胞骨格の動態が関与していることが知られている、そのため、殊に神経細胞におけるアクチン、アクチン結合タンパク質群の機能解析が進んできた。また、精神疾患の患者や、行動異常を示す患者のスパインを観察すると、異常な形態が認められることがある<sup>10</sup>。したがって、神経形態制御機構を解明することは、神経機能原理の解明のみならず、神経疾患発症機構の解明に役立つと考えられる。

### 1.3.3 ニューロンにおける形態変化の仕組み

ニューロンにおいては、前述した3種類のフィラメントのうち、微小管が軸索と樹状突起のシャフト部位に多く存在し、骨組みとしての役割が想定される。そして、ニューロフィラメントと呼ばれる中間径フィラメントが、アクチンフィラメントと微小管をつなぎ合わせている。アクチンフィラメントは、シャフト部分には相対的に少ないものの、スパイン部分や軸索末端の成長円錐部分には豊富に存在しているため、特にシナプス部位の形態変化をもたらすのに役立っていると考えられている<sup>1,11</sup>。

## 1.4 遺伝子の発現制御

### 1.4.1 転写因子と遺伝子発現

転写因子は、DNA に結合して、DNA から mRNA への転写を促進、または抑制するタンパク質のことを示す。転写因子は単独でこの機能を示すこともあるが、コアクチベーター、コリプレッサーのようなタンパク質と複合体を形成することもある。リガンドなどからの刺激を受けて、転写因子は、対象となる遺伝子の発現を促進もしくは抑制する。この働きによって細胞分化や細胞周期など、様々な細胞機能が調節されている<sup>1</sup>。細胞形態についても、転写因子によって細胞骨格系の遺伝子の発現を促進・抑制することによって制御されている<sup>12</sup>。

### 1.4.2 mRNA のスプライシング機構

細胞がシグナルを受けて、転写、翻訳されるとき、核内において mRNA が転写される。このとき、生成した mRNA は、翻訳に使用されるエキソン領域と、それ以外のイントロンと呼ばれ

る領域に区別される。mRNA は、スプライシングという過程を経て成熟 mRNA となる。スプライシングは、はじめにスプライソソームが mRNA 前駆体に結合し、エステル転移反応を介してエキソンがイントロンから離れる。次に、次のエキソンとの間にエステル転移反応が起き、イントロンが解離する<sup>1</sup>。

### 1.4.3 アイソフォーム

同一ゲノム上においても、異なる転写開始点から、機能の異なるタンパク質を発現することがある。また、複数のイントロンを持つ mRNA 前駆体は、異なるスプライシングを受けることがあり、それによって単一の遺伝子から複数の mRNA が産生され、機能の異なるタンパク質が生じることがある（選択的スプライシング）<sup>1,13,14</sup>。また、一つの mRNA 上に異なる翻訳開始点があり、その使い分けにより異なるタンパク質が生じることもある。以上のような制御により、生じるタンパク質をアイソフォームと呼ばれている。ヒトの遺伝子の数は限られているが、このような発現制御が巧妙に行われることで、多種多様なタンパク質を合成することが可能になり、その結果、限られた遺伝子から高度な機能をもたらすことが可能になっていると考えられている<sup>13,14</sup>。

## 1.5 転写因子 SRF

### 1.5.1 概論

血清応答因子 (Serum response factor: SRF) は、血清 (serum) の刺激を受けて活性化する転写因子として発見された転写因子<sup>15</sup>である。SRF、哺乳動物において、脳を含むほとんど全ての組織に発現している<sup>16</sup>。SRF は、血清のみならず、様々な増殖因子によるシグナルを受けて活性化することが知られている<sup>17,18</sup>。SRF は、mcm1, agamous, deficiens, SRF (MADS) box と呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を介してホモ二量体を形成し、CC(A/T)<sub>6</sub>GG という塩基配列 (CArG box) に SRF が結合することによって、その転写調節を行う<sup>19</sup>。SRF は、それ自身で遺伝子発現を惹起することができないため、コファクターが相互作用することで転写が制御されている。

SRF のコファクターとしては、Ets-like transcription factor-1 (Elk-1), SRF accessory protein-1/2 (SAP-1/2) などの ternary complex factor (TCF)ファミリーが知られている。TCF ファミリーは、SRF CArG box の近傍にある E twenty-six (ETS) box 塩基配列へ結合するとともに SRF と結合し、ヘテロ三量体を形成する。TCF のうち、Elk-1 は extracellular signal regulated kinase (ERK) / mitogen-activated protein kinase (MAPK) のシグナル伝達経路を通じてリン酸化され、SRF コアクチベーターとして機能するとの報告がある<sup>20,21</sup>。一方、近年、TCF ファミリーとは異なる SRF コ

アクチベーターが知られるようになった。Rho シグナル伝達系が SRF 転写活性化を誘導することが知られていたが、Megakaryoblastic leukemia (MKL) ファミリーが同定され、それら MKL が Rho シグナル伝達系を通じて活性化されることが明らかとなった<sup>22</sup>。

## 1.6 SRF コアクチベーターMKL

### 1.6.1 Myocardin/MKL ファミリー

Myocardin/MKL ファミリーは、Myocardin, MKL1, MKL2 の 3 種類でファミリーを形成している。最初に発見されたものは、心筋に高発現する Myocardin であり<sup>23</sup>、次に、小児の急性骨髄性白血病の原因遺伝子として Megakaryoblastic Leukemia: MKL1 (megakaryocytic acute leukemia: MAL, myocardin- related transcription factor-A: Mrtf-A) が発見され<sup>24,25</sup>、その後、骨格筋に多く発現する MKL ファミリーとして、MKL2 (MAL16, Mrtf-B) が発見された<sup>26</sup>。これらのすべてが、転写因子 SRF のコアクチベーター活性を持ち、後述するような特徴的なドメイン構造を持つ<sup>27,28</sup>。

### 1.6.2 Myocardin/MKL の構造<sup>22,27,28</sup>

Myocardin/MKL ファミリーの持つ最も特徴的な構造は、N 末端側に、2 個ないしは 3 個存在する RPEL モチーフである。RPEL モチーフは、RPxxxEL アミノ酸配列を持っており、単量体アクチンである G アクチンと結合することができる。塩基性領域である B1, B2 領域は、核移行に必要なドメインであるだけでなく、特に B1 領域は SRF との結合にも重要であることが報告されている。また、グルタミン残基が連続するポリグルタミンリピートは、SRF との結合を促進している一方で、核移行には抑制的な効果を持つとされている。また、核タンパク質に認められることがある SAP ドメイン<sup>29</sup>も存在している。二量体形成に重要なロイシンジッパーもっており、C 末端には転写活性化ドメインが存在している (図 1-e)。

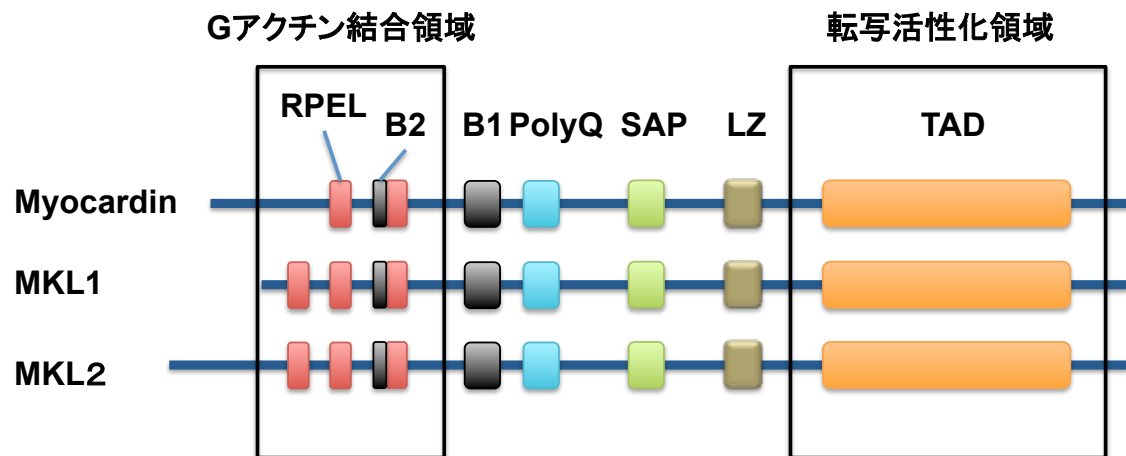


図 1-e Myocardin/MKL ファミリーの構造<sup>22,27,28</sup>

Myocardin/MKL ファミリーは、Myocardin, MKL1, MKL2 から構成されている。MKL ファミリーは、単量体アクチンと結合する RPEL モチーフ、核移行に関与する B1,B2 領域、ポリグルタミンリピート (PolyQ) , SAP ドメイン、ロイシンジッパー (LZ) 及び転写活性化領域(TAD)を有している。

RPEL: RPxxxEL motif; B1, B2: Basic regions; PolyQ: Poly-glutamine repeat; SAP: SAF-A/B, Acinus, PIAS domain; LZ: Leucine zipper; TAD: Transcriptional activation domain.

### 1.6.3 MKL1 に関する知見

低分子量 G タンパク質の一つである Rho は、アクチン細胞骨格の再構成を起こす<sup>30,31</sup>が、Treisman らによる株化細胞を用いた実験により、MKL1 が単量体アクチンに結合すること、Rho シグナル伝達系の活性化によって F アクチンへの重合が促進された結果、MKL1 に結合した G アクチンが奪われ、G アクチンが解離した MKL1 が核へ移行し、転写因子 SRF のコアクチベーターとして機能することが示された<sup>22</sup>。TCF により発現誘導する遺伝子群は *c-fos* などの転写因子をコードする最初期遺伝子が多く報告されている一方で、MKL 誘導遺伝子群はβアクチン遺伝子やトロポミオシン遺伝子、セマフォリン遺伝子など細胞骨格関連遺伝子が多いことが示されている (図 1-f)<sup>32,33,34</sup>。

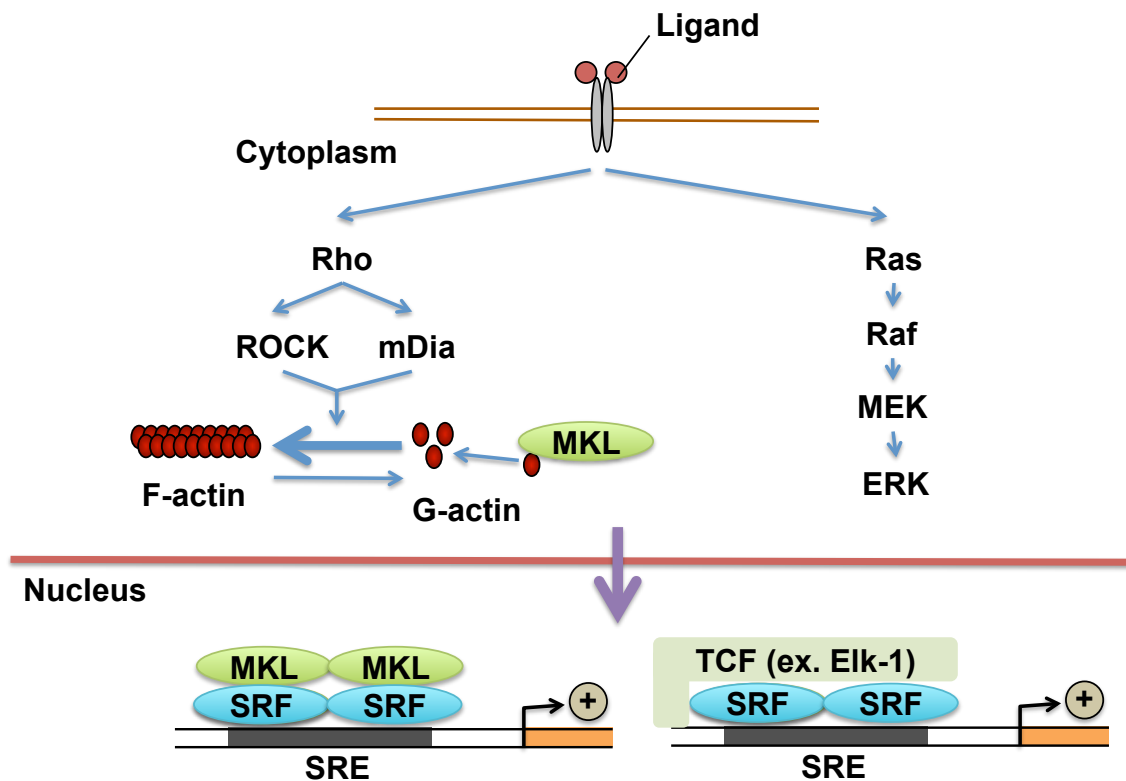


図 1-f SRF 介在性遺伝子発現を誘導する 2 種類のシグナル経路<sup>22,27,28</sup>

ERK/MAP キナーゼ経路を介するシグナル伝達経路と、Rho-アクチンのシグナル伝達経路が知られている。TCF で誘導される SRF 標的遺伝子には、主に細胞増殖関連遺伝子が多く報告されている。一方、MKL で誘導される SRF 標的遺伝子には、細胞骨格関連遺伝子が多く報告されている。

#### 1.6.4 MKL の核移行に関する知見

上述した通り、MKL の核移行は SRF と結合して転写を活性化するために必須である。そのため MKL の核移行の分子メカニズムについては様々な研究が行われている。MKL は核内のアクチンと結合すると SRF 転写活性化を誘発せず、核外に輸送されること<sup>35</sup>、Importin- $\alpha$ ,  $\beta$  が MKL 1 の核移行に関わっており、G アクチン結合がこれを阻害すること<sup>36,37</sup>、それとは逆に exportin (Crm1) が核からの排出に関与していること<sup>35,38</sup>、RPEL モチーフのアクチン結合性は、一アミノ酸残基異なると損なわれること<sup>39</sup>などが示されている。また、最近の知見では、microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2 (MICAL-2) が核内アクチンの酸化還元修飾を行い、SRF 依存性転写を誘導することが報告されている<sup>40</sup>。

## 1.7 SRF および MKL ノックアウトマウスの知見

ここで転写因子 SRF 及びその MKL1 に関するノックアウトマウスの知見をまとめる。SRF ノックアウトマウスは胎生致死である<sup>41</sup>ため、脳特異的なコンディショナルノックアウトマウスを用いた研究が行われた。その結果、最初期遺伝子の発現が抑制されること<sup>42</sup>、記憶や学習に必要な長期増強 (Long-term potentiation: LTP) や、長期抑圧 (Long-term depression: LTD) に影響を与えること<sup>42,43</sup>が示された。さらに、形態に関しても、神経回路網の構築や神経突起の伸張に異常が認められている<sup>44</sup>。

MKL1 のノックアウトマウスは、乳腺からの母乳分泌に異常が認められることが報告されている<sup>45,46</sup>他、ショウジョウバエの MKL1 に相当する遺伝子のノックアウトでは、細胞運動に異常が認められることが知られている<sup>47,48</sup>。一方、構造の類似した MKL2 のノックアウトマウスについては、胎生致死である<sup>49</sup>。また、脳特異的な MKL1/MKL2 のダブルコンディショナルノックアウトマウスも作製されており、その表現型としては、脳の層構造に異常を来とし、生後間もなく死に至ることが報告されている<sup>50</sup>。

## 1.8 本研究への導入

上述したように、線維芽細胞などの非神経細胞においては、MKL1 の研究が進んでいる。その研究結果は、MKL1 がアクチン結合分子として働き、細胞形態をアクチン細胞骨格の再構成に関わることで、MKL1 が SRF コアクチベーターとして働き、細胞骨格関連遺伝子の発現を介して形態変化を行うというものである。また、アクチン動態活性化で MKL1 が核に移行することから、細胞形態と遺伝子発現を結びつける分子として MKL1 が働くことが示されてきた<sup>22</sup>。非神経細胞に加え、MKL1 タンパク質は脳にも発現していることが報告された<sup>51</sup>。ところが、脳神経系において MKL1 がどのような機能を担っているのかは不明であった。そこで、第 2 章では、培養ラット大脳皮質ニューロンを用いて、ニューロンにおいても Rho-MKL-SRF のシグナル伝達系が機能しているかどうかを検討した。一方、マウスの MKL1 については、FLMKL1 の他に、MKL1met, BSAC と呼ばれる複数のアイソフォームが存在することが知られていた<sup>22,52</sup>が、それぞれのアイソフォームがどのような異なる作用を持っているかは不明であった。また、ラットの MKL1 に関しては、クローニングも行われていなかった。そこで第 3 章では、ラット MKL1 のクローニングを行い、そのクローニングの過程で、マウスの FLMKL1, MKL1met, BSAC に該当するアイソフォームの他に新規アイソフォームである MELODY を発見し、これらアイソフォームの組織別、時期別の発現パターン及び SRF 依存性転写に与える影響を解析した。第 4 章では、第 3 章で同定した MKL1 のアイソフォームが培養ラット大脳皮質ニューロンの突起形態の解析及び SRF 転写活性に与える影響を検討した。

## 第 2 章

# ニューロンにおける Rho シグナルによる MKL1 の局在・機能解析

## 2.1 緒言

ニューロンにおいて、形態制御はニューロンが適切な位置に移動し、正常な神経回路網を形成し、記憶・学習などの高次脳機能を発揮する上で重要である。このようなニューロンの形態制御にはアクチン細胞骨格が重要であり、ニューロンにおけるアクチン動態の制御機構を解明することが、高次脳機能を明らかにする上で重要であると考えられる。線維芽細胞などの非神経細胞において、MKL1はRhoシグナル伝達によるアクチン動態活性化に伴い核移行し、SRF依存性転写を活性化することが示されている<sup>22</sup>。また、MKL1タンパク質は、脳に発現することが報告されている<sup>52</sup>。しかし、MKL1の脳神経系における役割はこれまで詳細に解明されていなかった。そのため、脳におけるMKL1の機能を明らかにすることは、ニューロンの形態制御による高次脳機能を明らかにする一助となると考えられる。そのため本研究では、ニューロンにおいてもRho-MKL1-SRFの経路が作用しているかどうかを明らかにするため、培養ラット大脳皮質ニューロンを用いて、Rhoの下流エフェクターであるmDiaの恒常活性化体を導入した際のMKL1の細胞内局在及びSRF依存性転写の評価を行った。

## 2.2 実験材料, 方法

### 2.2.1 培地, 試薬

PBSは、137 mM NaCl (Wako), 8.10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako), 2.68 mM KCl (Wako), 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Wako)を、超純水に溶解し、オートクレーブ滅菌して用いた。Dissection Mediumは、Hank's balanced salt solution (Life Technologies) に、4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 33.3 mM glucose, 0.3% BSA, 12 mM MgSO<sub>4</sub>, and 5 µg/mL gentamicin (以上、Life Technologies)を加え、pH = 7.3 に調製して用いた。Digestion Mediumは、Hank's balanced salt solution (Life Technologies) に、4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako), 25 mM HEPES (pH 7.4) (Life Technologies), 137 mM NaCl (Wako), 5 mM KCl (Wako)を加えて調製して用いた。Neurobasal mixtureは、500 mL NEUROBASAL Medium (Life Technologies) に 10 mL B-27 supplement (Life Technologies), 12.5 mL 200 mM L-Glutamine (Life Technologies), 20 µL 50 mg/mL Gentamicin (Life Technologies) を加え、0.20 µm フィルター (Sartorius)で濾過滅菌を行った培地を用いた。Serum-free DMEMは、DMEM powder 13.4 g (Life Technologies), 3.7 g NaHCO<sub>3</sub> (Wako)を超純水に溶解させ、0.22 µm フィルター (MILLIPORE) による濾過滅菌を行った溶液を用いた。2×HBS (Hepes-buffered saline)は、274 mM NaCl (Wako), 9.5 mM KCl (Wako), 2.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako), 15 mM glucose (Wako), 4.2 mM HEPES (Wako) を超純水に溶解し、pH 7.03-7.09 までの複数のpH値のものを調製し、0.20 µm フィルター (MILLIPORE) で濾過滅菌した。その後、実際に検討実験を行い、至適pHのものを決定して用いた。NIH3T3 mediumは、DMEM powder 13.4 g (Life Technologies)を超純水に溶解させ、3.7 g NaHCO<sub>3</sub>, 10% (v/v) FBS (Life Technologies):

Cat#26140-079), 10% (v/v) Nu-serum (BD Biosciences), 2 mM L-Glutamine (Life Technologies), 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Life Technologies)を添加して, 0.22  $\mu$ m フィルター (MILLIPORE) による濾過滅菌を行った溶液を用いた. TBST は, 56.88 g NaCl (Wako), 200 mL 1M Tris-HCl (Wako; pH = 7.51)を超純水で 1000 mL にメスアップした溶液を超純水で 10 倍に希釈して用いた.

## 2.2.2 プラスミド, 抗体

レポーターアッセイに用いた 3DA-Luc プラスミド, Hemagglutinin (HA)-タグを付加した MKL1-HA および, dominant negative MKL1 (MKL1  $\Delta$ B1B2) プラスミド, は, R. Treisman 博士 (Cancer Research UK, London Research Institute)から恵与頂いた (図 2-a, 2-b) <sup>22</sup>.

GFP タグを付加した恒常活性化型 mDia (constitutively active mDia: ca mDia) プラスミドは, 京都大学 成宮周博士より恵与いただいた<sup>53</sup>.

レポーターアッセイにおける内部標準プラスミドである TK-Renilla は, Promega より購入した. (phRL-TK).

免疫染色には, 以下の抗体を用いた.

rat monoclonal anti-HA antibody (Roche; 1 867 423 1 : 250)

Texas red-conjugated anti-rat IgG (Vector; TI-9400 1 : 500)

FITC-conjugated anti- rabbit IgG (Vector; FI-1000 1 : 500)

ウェスタンブロットには, 加えて以下の抗体を用いた.

Rabbit polyclonal anti-GFP (Life Technologies; A-11122 1 : 1000)

Mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma; T9026 1 : 1000)

HRP-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG (GE Healthcare; NA934 1 : 5000)

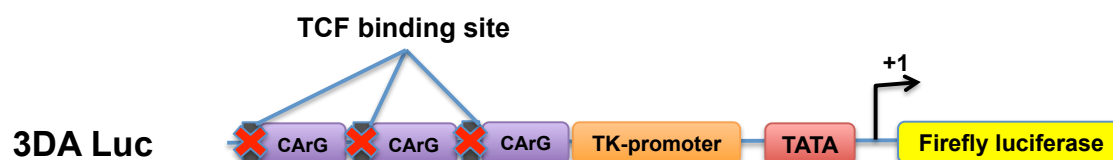


図 2-a 3DA Luc の構造 <sup>22</sup>.

3DA Luc は, SRF 結合部位 (CArG)を 3つ, タンデムに持つルシフェラーゼベクターであり, 各 SRF 結合部位の TCF 結合部位が欠損していることが特徴である.

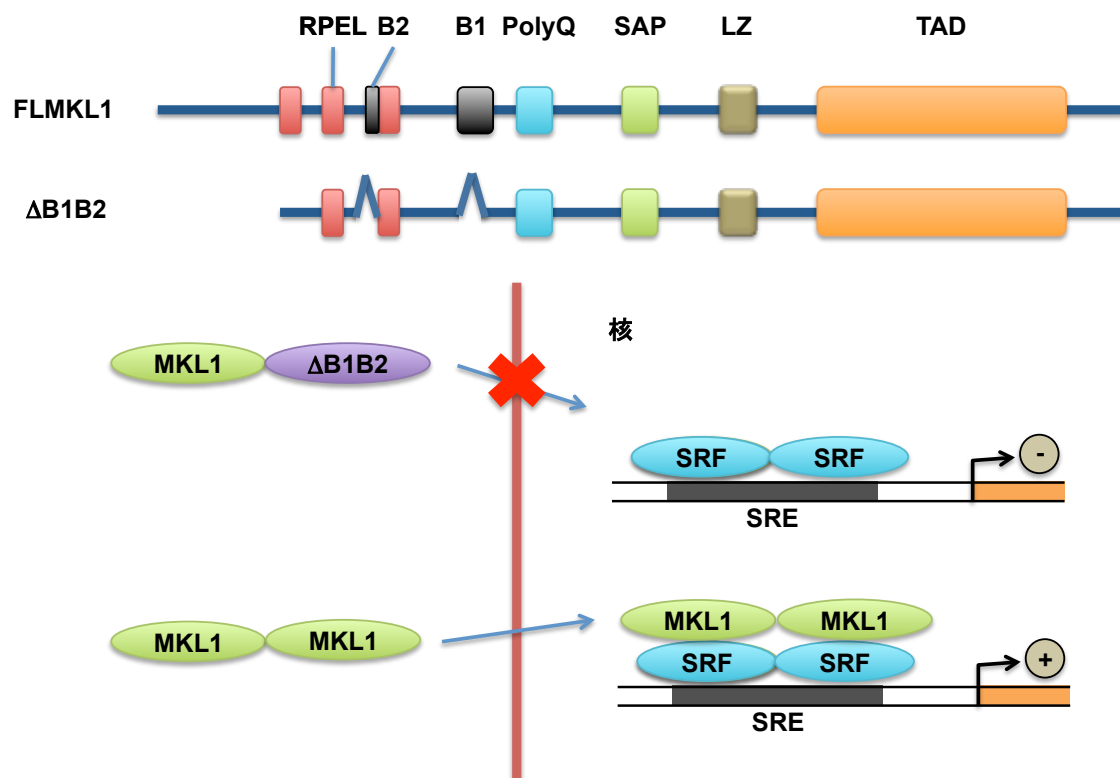


図 2-b MKL1 ドミナントネガティブ体の構造.

ΔB1B2 は、核移行に必須のドメインである B1, B2 領域を欠損しているため、内在性の MKL1 とヘテロダイマーを形成して、MKL1 が核へ移行することを阻止することにより、ドミナントネガティブ体として働く。

### 2.2.3 動物

ラット大脳皮質ニューロンの単離には、胎生 17~18 日齢の SD ラット(日本 SLC・納入：三協ラボサービス)を用いた。動物実験は、富山医科薬科大学動物実験取扱規則に従って実施した。

### 2.2.4 培養ラット大脳皮質ニューロンの初代培養

培養ラット大脳皮質ニューロンの初代培養は、Marx らの方法に基づいて行った<sup>54</sup>。妊娠ラットの腹部を切開し、胎児を取り出した。胎児の頭部を 70% エタノールで消毒した後、頭部および頭蓋骨を切開し、Hank's balanced salt solution (Life Technologies)に摘出した。次に全脳から、大脳皮質を Hank's balanced salt solution に単離し、これを先曲バサミで細切し、Hank's balanced salt solution で洗浄した後、trypsin- EDTA (2 mg/mL, Life Technologies) and DNase (0.6 mg/mL, Roche) を含有した Digestion Medium で 37 °C、2 分のインキュベートを行った。その後、trypsin inhibitor (2 mg/mL)を加えた dissection medium で 10 分間、数回インキュベートを行った。次に、

DNase (0.6 mg/ mL)を含有した dissection medium を加えて、大きな細胞沈渣が認められなくなるまでインキュベートして、遠心後、Neurobasal mixture を加えて、細胞とした。免疫染色の場合、細胞は  $1 \times 10^6$  cells/well を、18-mm 丸型スライドグラス (MATSUNAMI)を、12 穴プレート (IWAKI)に入れ、poly D-lysine (SIGMA)でコーティングしたものに播種した。ルシフェラーゼアッセイに用いる場合は、 $5 \times 10^6$  cells を 60 mm 培養皿に播種した。

#### 2.2.5 培養ラット大脳皮質ニューロンへの DNA トランスフェクション

DNA トランスフェクションは、既報の方法に基づいて行った<sup>55</sup>。すなわち、最初に、あらかじめ前日に 37 °C 10% CO<sub>2</sub> でインキュベートしておいた 2 mL (12 穴プレートの場合は 1 mL) の serum-free DMEM に培地交換し、約 1 時間、インキュベートを行った。なお、conditioned medium は回収し、37 °C でインキュベートしておいた。

インキュベートの間に、リン酸カルシウム/プラスミドの混液を作製した。すなわち、1 サンプルにつき 4 µg のプラスミドに、41 µL の注射用水 (大塚)、5 µL の 2.5 M CaCl<sub>2</sub> を加え、よく攪拌した後、50 µL の 2x HBS の入っている別のチューブに、プラスミドの混液を攪拌させながら一滴ずつ加え、15 分静置した。次に、培地交換してから 1 時間経過した細胞にこの混液を 100 µL 加え、10~15 分、37 °C、10% CO<sub>2</sub> でインキュベートした。その後、2 mL (12 穴プレートは 1 mL) の serum-free DMEM で 2~3 回洗浄を行い、conditioned medium を戻し、37 °C、10% CO<sub>2</sub> でインキュベートした。そして、24~72 時間後にサンプリング、もしくは細胞の固定を行った。

#### 2.2.6 免疫染色

カバーグラスを入れた 12 穴プレートの培地をアスピレーターで吸引し、PBS (+) (0.9 mM CaCl<sub>2</sub> (Wako), 0.33 mM MgCl<sub>2</sub> (Wako) を PBS に溶解させた溶液) に 4% (w/v) sucrose (Wako) を加えた溶液 1 mL で 3 回洗浄した。次に PBS (+) + 4% (w/v) sucrose + 4% (v/v) formaldehyde (Wako) 300 µL を加え、15 分、室温で静置した。次に、PBS (+) 1 mL で 3 回洗浄した。続いて、パラフィルム (Pechiney plastic packaging) 上にカバーグラスを静置し、blocking PBS (+) + Triton X-100 を 200 µL を加え、1 時間、室温で静置し、ブロッキング反応を行った。次に、blocking PBS で希釈した一次抗体を 70~100 µL 加え、水の入ったチャンバー内で一晩、4 °C で静置することによって一次抗体反応を行った。次に、PBS (+) で 3 回洗浄し、blocking PBS で希釈した二次抗体を 150 µL 加え、室温で 1 時間、穏やかに振とうさせた。次に PBS (+) 1 mL で、3 回洗浄し、PBS (+) + 300 nM DAPI (Life Technologies) を 200 µL 加え、室温で 10 分間静置し、核の染色を行った後、PBS (+) 1 mL を加え、スライドグラス (MATSUNAMI) にマウントし、サンプルとした。

#### 2.2.7 NIH 3T3 細胞の培養

NIH3T3 細胞株は、共同研究を行っている米国ジョーンズホプキンス大学医学部・神経科学部よ

り恵与いただいたものを用いた。培養には、NIH 3T3 medium 及び、培養細胞用のコーティング処理が施されている 100 mm の培養皿 (Corning) を用い、37 °C 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。細胞の継代は、細胞が 70~90%程度にまで増殖が認められたときに行った。培地を吸引したあと、Trypsin-EDTA (Life Technologies) を 1.5 ml 加え、1 分間、5 %の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。その後、NIH3T3 medium を 5 ml 加え、ピペッティングによって細胞を剥離させ、1.5 krpm 3 分で遠心を行った。遠心後、上清を吸って、NIH3T3 medium を 5 ml 加え、よく懸濁して、5.0x10<sup>6</sup> cells を、NIH3T3 medium を 10 ml 加えてある新しい 100 mm 培養皿に加えた。実験に供する場合は、1.5 ml の NIH3T3 medium が分注してある培養細胞用のコーティング処理がされた 6 穴プレート(Nunc)に、5.0x10<sup>5</sup> cells / well の細胞を播種した。

#### 2.2.8 NIH 3T3 細胞への DNA トランスフェクション

トランスフェクションには、Lipofectamine (Life Technologies) を用いたリポフェクション法を用いた。すなわち、トランスフェクション反応の 2 時間前に、新しい NIH 3T3 medium への培地交換を行った後、1.5 ml チューブに、1 well につき 2 µg のプラスミドを加え、100 µL の DMEM (serum-free; Life Technologies) を加え、よく攪拌した後、Plus Reagent (Life Technologies)を 6 µL 加え、15 分間常温で静置し、次に、Lipofectamine Reagent (Life Technologies) 4 µL と 100 µL の serum-free DMEM との混液を加えて、よく攪拌し、15 分常温で静置した。その後、200 µL ずつ、細胞の培養してあるプレートに加えた。37 °C、5% CO<sub>2</sub> で 4 時間インキュベートした後、新しい NIH 3T3 medium に培地交換した。その後、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> でインキュベートした。

#### 2.2.9 レポーターアッセイ

NIH3T3 細胞の場合、レポーターアッセイに用いる細胞には、あらかじめ 1 µg のレポータープラスミドと、0.1 µg の内部標準プラスミドを、各発現ベクター (1 µg) と同時にトランスフェクションした。培養ラット大脳皮質ニューロンの場合、1.6 µg のレポーターベクターと、0.4 µg の内部標準プラスミドを、各発現ベクター(4 µg)と同時にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後、アスピレーターで培地を吸い、2 mL の PBS で 3 回洗浄した後、40 µl の 5x Passive lysis buffer (Promega)を、注射用水で溶解し、全量を 200 µl にした溶液を用いて、細胞を剥離した。その後、メーカーのプロトコールに準じて細胞抽出液を調製した。ルシフェラーゼアッセイは、Dual Luciferase Assay System (Promega) を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。活性値は、ホタルルシフェラーゼの値をウミシイタケルシフェラーゼの値で除した数値とした。

#### 2.2.10 ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、レポーターアッセイに用いたサンプルを用いた。サンプルに等量の Laemmili buffer (5%  $\beta$ -mercaptoethanol (Wako) を Laemmili sample buffer (BIO-RAD) に溶かした溶液) を加え、ヒートブロックを用い、95 °C、5 分で熱変性を行ってサンプルとした。

SDS-PAGE は常法に従って行い、ブロッティングは湿式 (BIO-RAD) で、100 V、90~120 分で行い、泳動されたタンパク質をメンブレン (Bio-Rad Immun-Blot PVDF Membrane 0.2  $\mu$ m) に転写した。ブロッティング後、TBST で溶解した 5% (w/v) skim milk (Wako) を用いて、1 時間振とうさせることでブロッキングした。次に、Can Get Signal (Toyobo) Solution 1, もしくは TBST に溶解した 1% skim milk を使い、前述したとおりに一次抗体を希釈して、一次抗体反応をハイブリバッグ (飛龍) 中で、4 °Cで一晩、振とうさせながら反応させた。反応後、TBST で3 回洗浄した後、Can Get Signal (Toyobo) Solution 2, あるいは TBST に溶解した 1% skim milk に二次抗体混合溶液を用いて、室温 1 時間で反応させた。その後、ECL system (GE Healthcare) を用いて発光反応を惹起させ、X 線フィルム (Fujifilm) を用いてバンドの検出を行った。

## 2.3 結果

### 2.3.1 培養ラット大脳皮質ニューロンにおける ca mDia 存在下の MKL1 の局在変化

非神経細胞において、MKL1 は Rho シグナル伝達活性化に伴い核へ移行し、SRF 依存性転写を誘導することが報告されている<sup>22</sup>。しかしながら、ニューロンにおいて MKL1 が Rho シグナル伝達活性化により、核移行する性質があるかどうかは不明であった。本実験では、培養ラット大脳皮質ニューロンにおける MKL1 の局在変化を調べた。MKL1 発現ベクターと、mDia の恒常活性化体 (ca mDia) の発現ベクターをコトランスフェクションして、Rho のシグナル伝達系を活性化させた。その結果、対照として GFP をトランスフェクションした細胞では、MKL1 は細胞質、もしくは細胞質と核の両者に局在していたが、ca mDia 発現細胞では、MKL1 はそのほとんどが核に局在していた (図 2-c)。

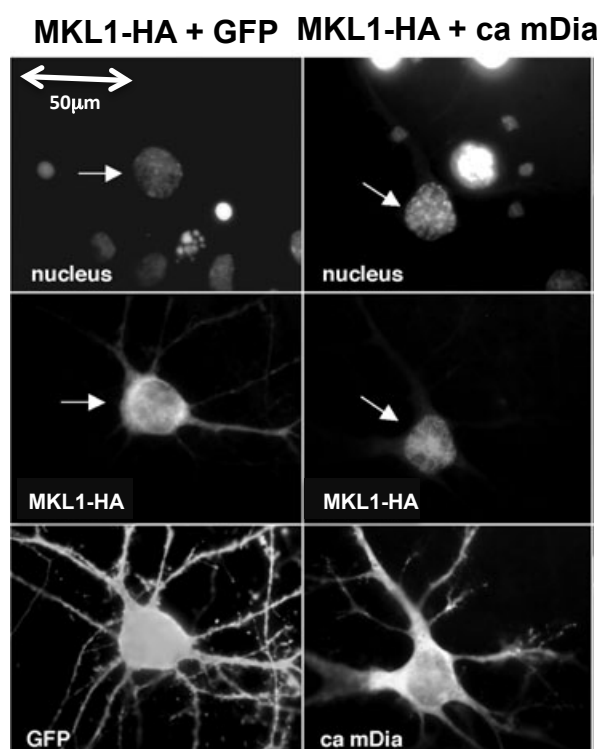


図 2-c mDia 恒常活性化体発現下における MKL1 の核移行

培養 8 日目のラット大脳皮質ニューロンに 3  $\mu$ g の MKL1-HA プラスミドと 1  $\mu$ g の GFP もしくは ca mDia プラスミドのトランスフェクションを行い、24 時間後に細胞を固定した。最上段は、DAPI による核染色、中段は、HA の免疫染色による MKL1-HA の局在、下段は、GFP の蛍光画像を示している (ca mDia プラスミドには GFP が付加されているため、ca mDia がトランスフェクションされた細胞は GFP による蛍光が認められる)。矢印で示した細胞が、MKL1 過剰発現細胞である。

### 2.3.2 NIH 3T3 細胞及び培養ラット大脳皮質ニューロンにおける, ca mDia による SRF 依存転写の誘導及びドミナントネガティブ MKL1 による抑制

2.3.1 の実験により, 培養ラット大脳皮質ニューロン MKL1 は, Rho の下流エフェクターである mDia の恒常活性化体 (ca mDia) を発現させることにより, 核へ移行することが示された. そのため, ニューロンにおいても, Rho シグナル伝達に伴い, SRF 依存性転写が誘導する可能性が考えられた. そこで本研究では, MKL1 の研究で良く用いられている株化線維芽細胞<sup>22</sup>である NIH3T3 細胞, 及び培養ラット大脳皮質ニューロンにおいて, 恒常活性化体 mDia を過剰発現させた時の SRF 依存性転写をレポーターアッセイによって調べた. レポーターベクターには, 同じく SRF のコアクチベーターとして働くことが知られている, Ternary Complex Factor (TCF) の結合部位を欠損した SRF 結合部位を 3 つ持つ, 3DA-Luc を用いた (図 2-a 参照). また, 内部標準プラスミドとして, TK-Renilla を用いた.

その結果, ca mDia の過剰発現によって, NIH3T3 細胞 (図 2-d), 培養ラット大脳皮質ニューロン (図 2-e) の両方で, 顕著に SRF 依存性転写が上昇した.

一方, MKL1 のドミナントネガティブ体 (作用機構については, 2.2.2 項を参照) を同時に過剰発現させ, 内在性 MKL1 の機能を抑制したところ, NIH3T3 細胞, 培養ラット大脳皮質ニューロンの両者において, SRF 依存性転写が強く抑制された.

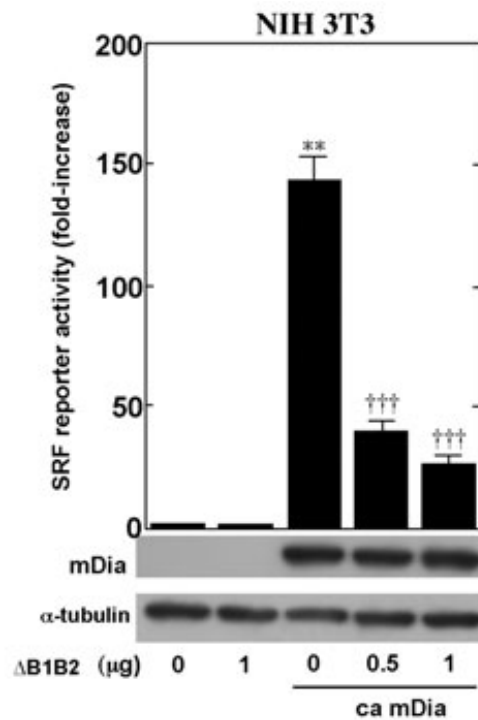


図 2-d NIH3T3 細胞における ca mDia 発現による SRF 依存性転写の誘導.

1  $\mu\text{g}$  の 3DA Luc プラスミド, 0.1  $\mu\text{g}$  の TK-Renilla プラスミド, 0.5  $\mu\text{g}$  の ca mDia プラスミド, 及びグラフに示した量の  $\Delta\text{B1B2}$  をトランスフェクションし, 36-48 時間後に細胞を回収した. 全体のプラスミド量が 4  $\mu\text{g}$  になるように empty vector でプラスミド量を調整した. レポーターアッセイに用いたサンプルについて, ウェスタンブロットを行い, MKL1 のドミナントネガティブ体共発現下においても mDia の発現に影響がないことを確認している (ca mDia 発現ベクターには GFP タグが付加されているので, GFP 抗体で mDia の発現を評価した).

N=3, mean  $\pm$  SD, \*\*:  $P < 0.01$  vs. control (最左端), +++:  $P < 0.001$  vs. ca mDia (+)  $\Delta\text{B1B2}$  (-) by Student's *t*-test.

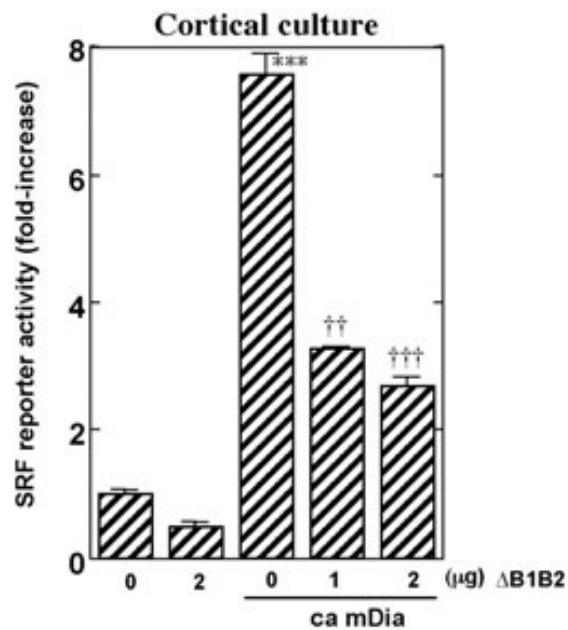


図 2-e 培養ラット大脳皮質ニューロンにおける ca mDia 発現による SRF 依存性転写の誘導.

1 μg の 3DA-Luc プラスミド, 0.2 μg の TK-Renilla プラスミド, 4 μg の ca mDia プラスミド, 及びグラフに示した量の ΔB1B2 をトランスフェクションし, トランスフェクション 36-48 時間後に細胞を回収した. 全体のプラスミド量が 8 μg になるように empty vector でプラスミド量を調整した.

N=3 mean ± SD, \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. control (最左端) ††:  $P < 0.01$ , †††:  $P < 0.001$  vs. ca mDia (+) ΔB1B2 (-) by Student's *t*-test.

## 2.4 考察

本研究によって、培養ラット大脳皮質ニューロンにおいて、Rho シグナル伝達を過剰に活性化させると MKL1 が核移行を引き起こし、SRF 依存性転写を誘導することが示された。この SRF 依存性転写誘導は、MKL1 のドミナントネガティブ体で抑制されることから、この SRF 転写活性化が MKL1 を介していることが示された。

以上のことから、培養ラット大脳皮質ニューロンにおいても NIH3T3 細胞で報告のあった Rho-MKL1-SRF 経路が働くことが示された。本稿では示していないが、内在性 MKL1 も *ca mDia* の存在下で核移行することを示している (Tabuchi et al, *Journal of Neurochemistry*, 2005: 主論文 1)。また、ニューロンに高く発現する RhoGEF である *Transcript-enriched in cortex and hippocampus* (Tech) を用いた研究では、RhoA のシグナルを活性化させることによって、同様に SRF の依存性転写を誘導している (主論文 1)、さらに、選択的な RhoA の阻害剤である C3 transferase によって、この活性が阻害されることも示している (主論文 1) これらの結果は、脳神経系において、Rho-MKL1-SRF の経路が作用していることをより強固なものにするものである。

第 1 章で述べた通り、線虫を用いた MKL1 の研究では、MKL1/SRF の経路が細胞運動に関与していることを示している<sup>45,46</sup>。また、序論で述べた通り、ニューロンにおいてシナプスをはじめとした形態制御には、アクチン細胞骨格が重要であることが知られている<sup>1,11</sup>。本研究では、ニューロンにおいて MKL1/SRF 経路が作用していることが示された。これらの知見から、ニューロンの機能性および形態変化にアクチン細胞骨格の動態と MKL1/SRF 遺伝子発現が協調的な関係で作用を及ぼす可能性が考えられる。実際に、ニューロンの細胞形態にこれら経路が影響していることを示している<sup>56</sup>。

序論で述べたとおり、SRF は、MKL ファミリー以外にも、TCF と呼ばれるコファクターを介しても転写を制御していることが知られている。ところが、MKL と TCF をどのように使い分けて遺伝子発現を誘導しているのかは不明のままである<sup>20,21</sup>。この課題については、今後、より詳細な発現遺伝子の網羅的解析や、個々の標的遺伝子において SRF コファクターがどのように関与しているかを調べることが重要である。

## 第 3 章

### MKL1 新規アイソフォームの同定

### 3.1 緒言

ヒトをはじめとする高等生物の遺伝子の数は、約 2 万個強と言われており、線虫のような生物と比べても決して多くない。ところが、高等生物では限られた遺伝子数から、高次脳機能をはじめとした複雑な機能を獲得している。限られた遺伝子から多様なタンパク質を発現させる仕組みの一つに、アイソフォームの発現があると考えられている。アイソフォーム発現は、同一の遺伝子から異なる機能を持ったタンパク質を発現させることによって得られる。アイソフォームの発現が、限られた遺伝子数から複雑な生体機能を制御できる一因と考えられている<sup>14</sup>。

マウスの MKL1 には、全長型 (FLMKL1) の他に、N 末端が欠損した MKL1met、さらに、N 末端の異なる BSAC という、合計 3 種類のアイソフォームが存在していることが知られている<sup>22,52</sup>。しかし、これらのアイソフォーム間における機能や発現パターンの違いは未だ不明であった。また、ラットにおける MKL1 のクローニングは行われていなかった。そのため本研究では、最初にラット MKL1 のクローニングに取り組み、その際に得られたラット MKL1 のアイソフォームについての組織別・発達別の発現解析を行い、更にそれぞれのアイソフォームが SRF 依存性転写に与える影響を調べた。

### 3.2 実験材料・方法

#### 3.2.1 培地・試薬

DMEM は、DMEM powder (Life Technologies) 13.4 g, 3.7 g NaHCO<sub>3</sub> (Wako) を超純水に溶解させ、0.22 µm フィルター (Millipore) による濾過滅菌を行って用いた。75 % (v/v) エタノールは、特級エタノール (Wako) を超純水でメスアップして用いた。Whole Cell Buffer は、25 mM HEPES (Life Technologies), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Wako), 0.2 mM EDTA (Life Technologies), 0.1% (v/v) Triton-X 100 (Wako) を超純水に溶解した後、用時に 20 µM β-glycerophosphate, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin, 1 µM Sodium orthovanadate, 1 µM DTT, 1 mM PMSF を加えて用いた。0.1% DEPC 処理水は、超純水に 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) (w/v) を添加し、37 °C で 1 時間反応させた後、121 °C 15 分のオートクレーブを用いて、DEPC を失活させた後に用いた。

#### 3.2.2 プラスミド・抗体

3DA Luc, TK-Renilla は第 2 章を参照。ラット MKL1 アイソフォーム発現ベクターは、pFLAG-CMV2 (Sigma) に、ラット海馬 cDNA よりサブクローニングして構築した発現ベクターである(3.2.10 に詳述する)。pCRE-Luc (4 x CRE-Luc), pSRE-Luc (5 x SRE-Luc) は、Stratagene より購

入した.

ウェスタンブロットには, 下記の抗体を用いた.

anti-FLAG M2 mouse IgG (SIGMA; F3165 1:1000)

anti-GFP mouse IgG (Santa Cruz; sc-9996 1:1000)

anti- $\alpha$ -tubulin mouse IgG (SIGMA; T9026 1:1000)

anti-mouse IgG HRP (GE Healthcare; NA931 1:5000)

### 3.2.3 動物

mRNA の採取には, SD ラット (日本 SLC・納入: 三協ラボサービス) を用いた. なお, 動物実験は, 国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に従って実施した.

### 3.2.4 組織からの RNA 調製

ラット各組織からの RNA の抽出には, TRISure (Bioline)を用いて行った. すなわち, 液体窒素によって急冷した組織重量を測定し, 組織重量が 50 mg 以下の場合は 500  $\mu$ L, 100 mg 以下の場合は 1000  $\mu$ L の TRISure 試薬を添加し, ホモジナイザー (Polytron) を用いて組織を破碎した. 破碎後, クロロホルム (Wako) を TRISure の 1/5 量加え, 30 秒の攪拌後, 室温で 3 分間静置し, 高速冷却遠心機で 15,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 10 分間の遠心を行った. 遠心後, 上清を除去し, 沈殿に氷冷した 75 % エタノールを 500  $\mu$ L 添加し, 攪拌し, 7,500 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 10 分間の遠心を行った. 沈殿を風乾後, DNase I (RNase free) (TaKaRa) 0.4  $\mu$ L, 2.5x DNaseI buffer を 8  $\mu$ L, 0.1M DTT (Life Technologies) を 1  $\mu$ L, RNase inhibitor (Life Technologies) を 0.2  $\mu$ L, を 0.1% DEPC 処理水で全量 20  $\mu$ L にした混合液を加え, 恒温器を用いて 37  $^{\circ}$ C で 1 時間, インキュベートした. 反応後, 再度 TRISure 試薬と, 100  $\mu$ L のクロロホルムを加え, 30 秒の攪拌後, 室温で 3 分間静置し, 15,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 10 分間の遠心を行った. 遠心後, 水層を採取し, 等量の 2-プロパノール(Wako)を加え, 10 秒間の攪拌後, 室温で 10 分間静置し, 15,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 10 分間の遠心を行った. その沈殿に氷冷した 75 % エタノールを加え, 軽く攪拌したのち, 7,500 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 10 分間の遠心を行った. この遠心で得られた沈殿を風乾した後, 0.1% DEPC 処理水を 10-20  $\mu$ L 加え, 恒温槽 (TAITEC) で 55  $^{\circ}$ C 30 分間のインキュベートを行い, サンプルとした. RNA 濃度測定にはナノドロップ (Nano-Drop) を用い, 260 nm 及び 280 nm の吸光度より濃度を求め, 定量した RNA は, -80  $^{\circ}$ C のディープフリーザーで保存した.

### 3.2.5 逆転写反応

逆転写反応は、前項で得られた total RNA 1 µg に、0.5 µL の 10 µM Oligo dT プライマー (Life Technologies), 0.5 µL の 10mM each dNTP mix (Roche) を加え、サーマルサイクラー (Bio-Rad) で 65 °C 5 分間のインキュベーションを行い、5x first strand buffer (Life Technologies) 2.0 µL, 0.1M DTT 1.0 µL, RNase inhibitor (Life Technologies) 0.5 µL, Superscript II RT (Life Technologies) 0.5 µL を加え、サーマルサイクラーを用いて 42 °C 50 分 (逆転写反応) → 70 °C 15 分 (逆転写酵素の失活) のプログラムを実行し、必要に応じて、RNase H (Life Technologies) 0.5 µL 及び注射用水 (大塚) 9.5 µL を加え、37 °C 30 分の反応を行い、注射用水で全量を 40 µL とし cDNA とした。

### 3.2.6 塩基配列の同定

(1) エタノール沈殿を用いた処理を行い、ABI PRISM 310 を用いて解析を行う方法

Template 200 ng, 5x Buffer (Applied Biosystems) 6.4 µL, 1 µM プライマー 3.2 µL, BigDye 3.1 (Applied Biosystems) 1.6 µL, を注射用水に溶解し全量を 2 µL としたサンプルを、サーマルサイクラー (TaKaRa) を用いて、96 °C 1 分 → 96 °C 10 秒, 50 °C 5 秒, 60 °C 4 分を 25 サイクル → 4 °C のプログラムで、ジデオキシ反応を行った。その後エタノール沈殿を行ったサンプルに、12 µL の TSR reagent (Applied Biosystems) を加え、よく沈殿を溶解した後、95 °C, 2 分で熱変性を行った。熱変性後、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いて、injection time: 30 秒, injection voltage: 2.0 kV, Run voltage: 15.0 kV, Run temperature: 50 °C, run time: 36 分 の条件でキャピラリー電気泳動を行った。泳動後、GENETYX-SV\_RC (Genetyx) を用いてデータを解析することによって、塩基配列を同定した。

(2) Clean SEQ を用いた処理を行い、ABI PRISM 3100 を用いて解析を行う方法

Template 100 ng, 5x Buffer 1.9 µL, 1 µM プライマー 1.6 µL, BigDye 3.1 0.25 µL を注射用水に溶解し全量を 10 µL にしたサンプルを、サーマルサイクラーで、95 °C 1 分 → 95 °C 10 秒, 50 °C 5 秒, 60 °C 2.5 分を 40 サイクル, → 4 °C のジデオキシ反応を行った。

その後、メーカーのプロトコールに準じて、CleanSEQ (BECKMAN COULTER) を用いた精製を行い、サンプルを ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) を用いて、injection time: 20 秒, injection voltage: 1.5 kV, Run voltage: 12.2 kV, Run temperature: 50 °C, run time: 6500 秒でキャピラリー電気泳動を行った。泳動後、GENETYX-SV\_RC を用いてデータを解析することによって、塩基配列を同定した。

### 3.2.7 MKL1 の 5'末端の同定及びサブクローニング

MKL1 のサブクローニングには, 5'-rapid amplification cDNA-end (5'-RACE) 法を用いて行った (図 3-a). NCBI reference sequence XM\_235497.4 において, sequence tagged sites (STS), expressed sequence tags (EST) によって予測された rat MKL1 mRNA の配列より, exon 7 及び exon 8 に相当する部分で以下のプライマーを設計して使用した (Life Technologies).

RT (5'-TCTCATTGAGGTC-3'),

sense 1 (5'-GAGCCTTCTCTCCAGGCCAA-3'),

antisense 1 (5'-AGGTCTCTTCCAGAATGTGC-3')

sense 2 (5'-GCTGAAGCTGAAGAGAGCCA-3')

antisense 2 (5'-CCTGACCAGCTCTGATCTCT-3')

5'-RACE 反応は, 5'-RACE core kit (TaKaRa)を使用して, メーカーのプロトコールに従って行った. すなわち, AMV Reverse transcriptase (TaKaRa)と, 設計した RT(アンチセンス)プライマー, 1 µg のラット海馬から抽出した total RNA を用いて逆転写反応を行い, その後, RNase H (TaKaRa)によって mRNA を分解した. その後, エタノール沈殿を行ってから, T4 Polynucleotide kinase (TaKaRa) を用いた 5'リン酸化反応を, メーカーのプロトコールに従って行った. その後, 再度エタノール沈殿を行い, T4 DNA ligase (TaKaRa)によるライゲーションをメーカーのプロトコールに従って行い, cDNA を環化, もしくはコンカテマー化させた. その後, PCR を 2 段階で行い, 得られた断片の塩基配列を同定した.

1 回目の 5'-RACE 法の結果, マウスの FLMKL1 と BSAC にあたる配列を得た. しかし, NCBI の配列情報で予測された 1 番目と 2 番目のエキソンは欠損していた. そのため, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 5'-RACE Core kit を用いて, 再度 5'-RACE を行った. プライマーは, 配列情報で予測された 3 番目のエキソン配列で設計した. 配列情報は以下の通りである.

RT2 (5'-CCGCTCACTAAGTG-3')

sense3 (5'-GAACTGCAGGAGCTGTCCCT-3')

antisense3 (5'-TTGGCAACAGCTTCGCTCTG-3')

sense4 (5'-TGACTCTGGGCCTCCATCCT-3')

antisense4 (5'-CAGAGACAGGAGCACCGGTT-3')

この 5'-RACE の結果, 新規の 5'末端を同定し, この配列を含むアイソフォームを MELODY と名付けた.

これらの同定された領域を含む cDNA を得るために, PCR を行った. 鋳型には, 7 週齢のラッ

ト海馬 cDNA を用い, DNA ポリメラーゼには PrimeSTAR Max DNA polymerase (TaKaRa) を用いた. また, 用いたプライマー配列は以下の通りである.

sense primer

FLMKL1 (5'-CGGTACCCGGGGATCCTCGCTAGCCACGCTCCCTC-3')

BSAC (5' -CGGTACCCGGGGATCGCTGGGCTTCCTGTCTGCAC-3' )

MELODY (5' -CGGTACCCGGGGATCGCAGAGACACCTGTCAGGAC-3')

antisense primer (共通) (5'- CGACTCTAGAGGATCGCCTCTAGGGACTGTGATTGTC-3')

PCR で増幅後, DNA シークエンスで塩基配列を同定した.

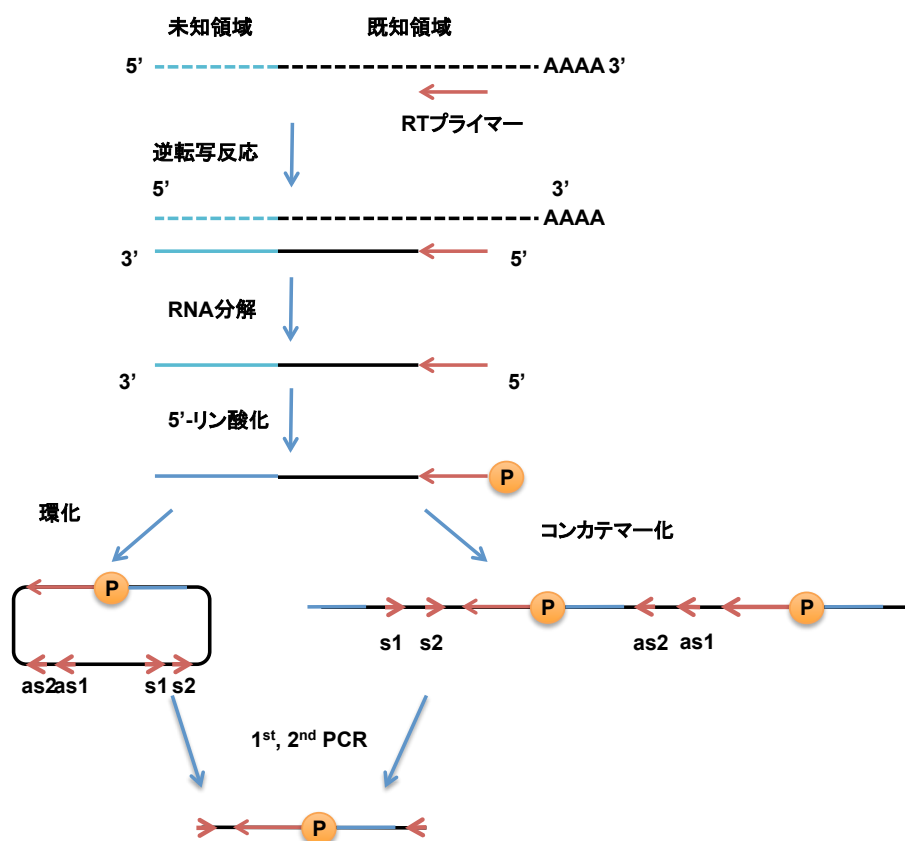


図 3-a 5'-RACE 法の概要. mRNA から逆転写反応で cDNA を生成し, RNA 分解, 5'-リン酸化を行って, 環化もしくはコンカテマー化させた. その後, 2 段階の PCR で未知領域を含んだ cDNA を増幅し, シークエンスで塩基配列を同定した. 破線は mRNA, 実線は cDNA, 赤矢印はそれぞれプライマーを示している.

### 3.2.8 転写因子結合サイトの検索

転写開始点上流部位の転写因子結合部位の検索には、TF search

(<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>: GBF-Braunschweig) を用いた。今回得られた各アイソフォームの上流 1 kbp について、threshold score = 96.0 にて検索を行った。

### 3.2.9 定量 RT-PCR

定量 RT-PCR の解析は、石丸らの方法に基づいて行った<sup>57</sup>。まず、検量線用のプラスミド溶液を  $10^{-2}$ ~ $10^5$  fg/mL となるように 10 倍希釈列を調整した。その後、MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) に 1 well あたり、2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Applied Biosystems) 10  $\mu$ L, x500 ROX (Applied Biosystems) 0.3  $\mu$ L, 10  $\mu$ M sense primer と antisense primer 各 0.4  $\mu$ L, 検量線用プラスミドもしくは RT 産物 2  $\mu$ L に注射用水を加え、総量 20  $\mu$ L とした。次に、96-Well Reaction Plate を Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems) で覆い、Mx3000P Real-time PCR system (Stratagene) により解析を行った。

本研究の定量 PCR で用いたプライマーの配列は以下の通りである。

FLMKL1 (5'-TCCTTGAGGCTCGGGAGGATA-3', 5'-GTCCAGCCCATTACAGCAATG-3')

BSAC (5'-GCTTCCTGTCTGCACTCACTC-3', 5'-GACGGAGTCCTCACGGAAAC-3')

MELODY (5'-CAGAGACACCTGTCTCAGGACG-3', 5'-GTCCAGCCCATTACAGCAATG-3')

mRNA の定量化は、以下のように行った。cDNA の最初のコピー数を  $[DNA_0]$ , PCR によって増幅された cDNA のコピー数を  $[DNA]$ , Ct 値  $c$ , 増幅効率を  $e$  として、Standard curve より算出した値を、 $[DNA] = [DNA_0] (1 + e)^c$  の数式に代入して求めた。

### 3.2.10 発現ベクターの作製

pFLAG-rMKL1 FL, pFLAG-rMKL1 met, pFLAG-rBSAC, pFLAG-rMKL1 MELODY の各発現ベクターは、pFLAG-CMV2 (Sigma) に、ラット海馬 cDNA より各 MKL1 アイソフォームをサブクローニングして構築した発現ベクターである。発現ベクターには、以下の配列を導入した。

FLMKL1: 5'-CCCCCTTCCGTCATT-3' から 5'-TGGGATTCCTGCTTG-3' まで、

BSAC: 5'-ACTCTGCTGGAGCCT-3' から 5'-TGGGATTCCTGCTTG-3' まで、

MELODY: 5'-GGAGGGGTTACCATC-3' から 5'-TGGGATTCCTGCTTG-3' まで、

MKL1met: 5'-CCGCCTTTGAAAAGT-3' から 5'-TGGGATTCCTGCTTG-3' まで、

上記した配列を、pFLAG-CMV2 (SIGMA) ベクターの FLAG タグ下流に導入した。

(導入部位の上流配列: 5'-CTTGCGGCCGCGAATTCA-3')

### 3.2.11 NIH 3T3 細胞の培養

第2章に準じた。実験に供する場合は、1.5 ml の NIH3T3 medium が分注してある培養細胞用のコーティング処理がされた6穴プレート (Nunc) に、 $5.0 \times 10^5$  cells / well の細胞を播種した。

### 3.2.12 NIH 3T3 細胞へのトランスフェクション

第2章に準じた。

### 3.2.13 ウェスタンブロット

細胞のサンプリングは、PBS で3回洗浄した後、Whole cell buffer を160  $\mu$ L 添加し、ラバーポリスマンを用いて細胞を回収した。次に、剥離した細胞を4  $^{\circ}$ C、15 krpm で10分間遠心して、上清をサンプルとした。その後の操作は、第2章に準じて行い、バンドの検出には、LAS-4000 (Fujifilm) を用いた。

### 3.2.14 レポーターアッセイ

第2章に準じた。

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 ラット MKL1 アイソフォーム塩基配列の同定

マウスMKL1については、全長型 (FLMKL1) の他に、翻訳開始点の異なるMKL1met、さらにBSACと呼ばれるアイソフォームが存在していることが知られている。これまでラットMKL1に対する研究は行われておらず、クローニングも行われていなかった。そこで、ラットMKL1のクローニングに取り組んだ。その結果、RT-PCRによって複数のバンドが得られた(未発表データ)。また、マウスにおけるアイソフォームは、その5'末端が異なるものが知られている。以上の知見より、5'-RACE法を用いて、ラットMKL1の5'末端の塩基配列を同定した。その結果、マウスで既知であったFLMKL1, BSACの他に、新規アイソフォームを加えた断片が得られた。今回得られた新規アイソフォームをMELODY (MKL1-elongated derivative of yield) と命名した (図3-b)。次に、TF searchを用いて各アイソフォーム配列上流の転写因子結合ドメインを検索した。各アイソフォームの上流1 kb以内について検索を行ったところ、FLMKL1の上流にはETS, AML-1aが、MELODYの上流にはSRY, CdxA, Nkx-2が、BSACの上流にはSRY, CdxAがヒットした。これらの転写因子結合サイトが、それぞれのMKL1アイソフォームの発現制御に関与している可能性がある。一方、FLMKL1には翻訳開始点が2カ所あり、FLMKL1の他にMKL1metを発現する。このMKL1metを加えた4種類のアイソフォームのドメイン構造を検索した結果を図3-cに、また、それぞれのアイソフォームのN末端のアミノ酸配列を図3-dに示した。図3-cにも示してある通り、MKL1metは他のアイソフォームに比べると、単量体アクチンと結合するRPELモチーフが1つ少ない。また、BSACが持つ最もN末端のRPELモチーフについては、アミノ酸残基が異なっていた。なお、各アイソフォームの塩基配列およびアミノ酸配列を図3-e, 3-f, 3-gに示している。

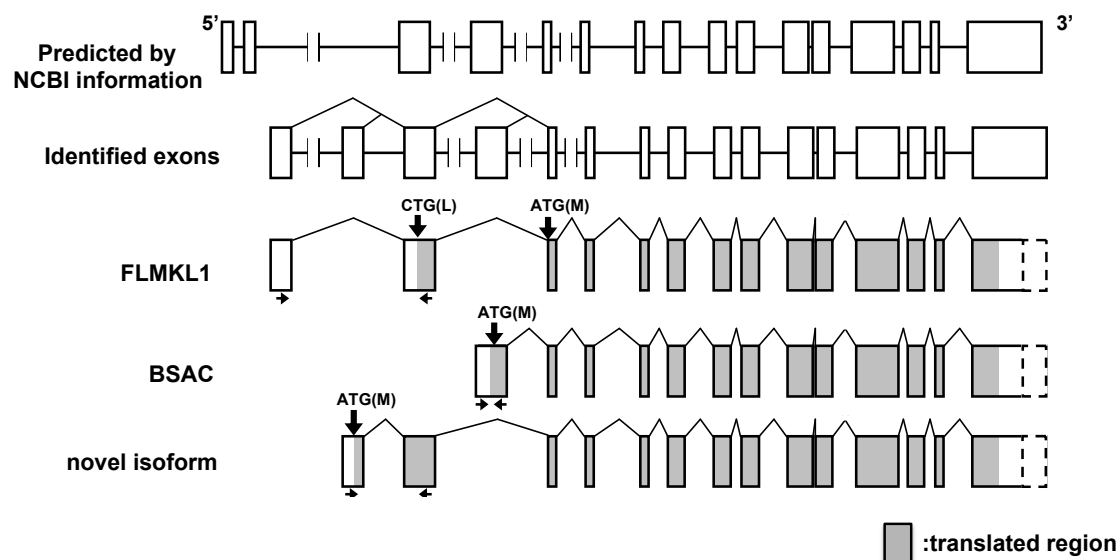


図 3-b ラット MKL1 のエキソン-イントロン構成。

四角がそれぞれエキソンを示す。最上段のエキソン部位は、NCBI の情報を基に予測されたものである (XM\_235497.4, NW 047780.1)。2 段目の図は本実験によって明らかにされたエキソン部位である。3 段目以降は、今回同定した 3 種類のアイソフォームのエキソン-イントロン構成を示しており、翻訳領域を灰色で示している。未同定の 3' 末端の予測部位を破線で示し、下向きの矢印は翻訳開始点、左右の矢印は後述する定量 RT-PCR による解析で用いたプライマー部位を示している。なお、FLMKL1 には翻訳開始点の異なる MKL1met もあり、その翻訳開始点も示している。

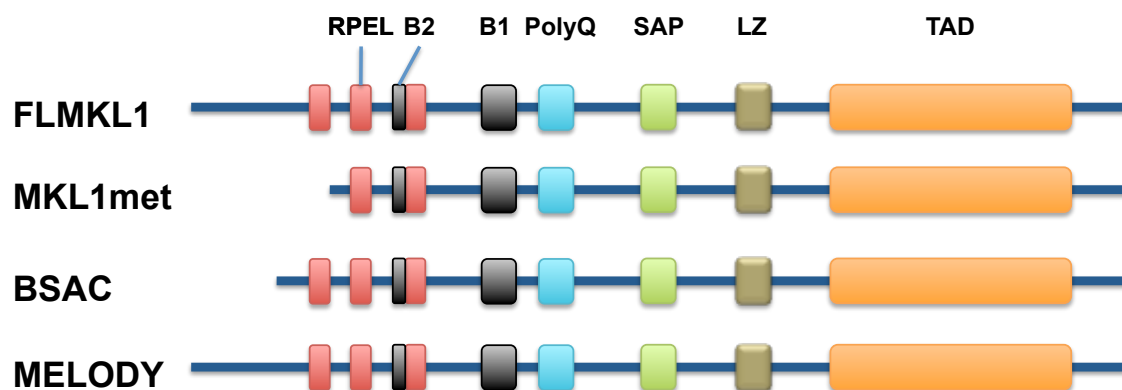


図 3-c 各アイソフォームにおけるドメイン構造. MKL1met は, 他のアイソフォームに比べて, 単量体アクチンと結合する RPEL モチーフが 1 つ欠損している. このドメイン構造は, Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/>) によって予測されたものである. 各ドメインの詳細については, 第 1 章を参照.

```

(FLMKL1)  1:-----LPPSVIAVNGLDGGGAGENDEEPVLLSLSAAPSPQSEAVANELQELSLQP  52
(MKL1met) 0:----- 0
(BSAC)    0:----- 0
(MELODY)  1:MGGVTITKAKVDFSSVVC LPPSVIAVNGLDGGGAGENDEEPVLLSLSAAPSPQSEAVANELQELSLQP  70

```

**RPEL**

```

53:TLGLHPGRNP NLPPLSERK N V L Q L K L Q Q R R T R E E L V S Q G I M P P L K S P A A F H E Q R R S L E R A R T E D Y L K R K I 122
1:----- M P P L K S P A A F H E Q R R S L E R A R T E D Y L K R K I 30
1:----- M T L L E P E M L M M A V Q S V L Q L K L Q Q R R T R E E L V S Q G I M P P L K S P A A F H E Q R R S L E R A R T E D Y L K R K I 65
71:TLGLHPGRNP NLPPLSERK N V L Q L K L Q Q R R T R E E L V S Q G I M P P L K S P A A F H E Q R R S L E R A R T E D Y L K R K I 140

```

図 3-d 各アイソフォーム N 末端のアミノ酸配列.

四角で囲んだ部分が最も N 末端の RPEL モチーフである. 反転した部分のアミノ酸残基がアイソフォームによって異なる.



# BSAC

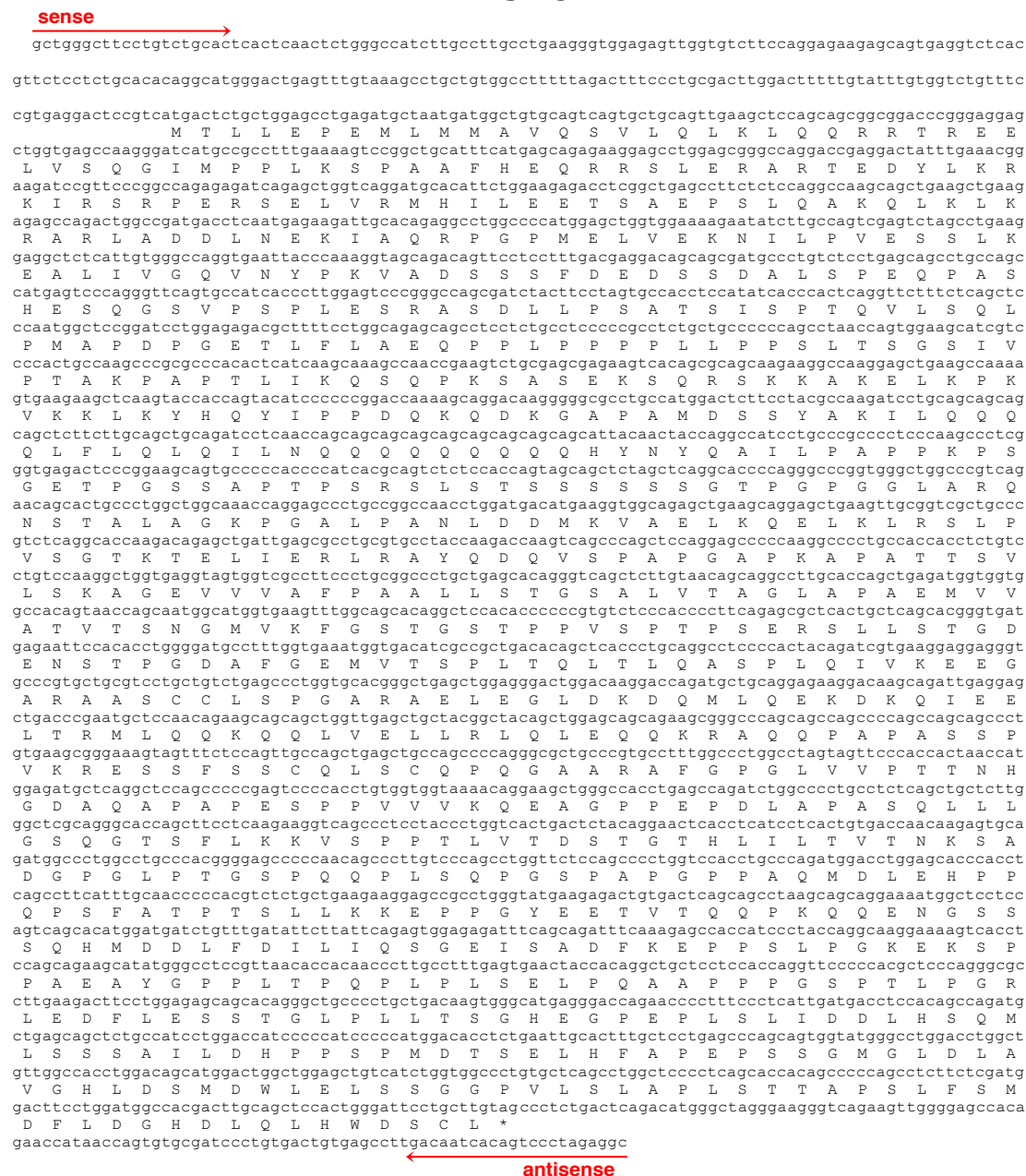


図 3-f BSAC の遺伝子配列及びアミノ酸配列。DDBJ Accession No. AB588920.

**sense**

**antisense**

46

### 3.3.2 ラット組織別 MKL1 アイソフォーム mRNA の発現量変化

次に、上述の実験で得られたラット MKL1 のアイソフォーム mRNA の組織別発現分布を、定量 RT-PCR 法<sup>57</sup>を用いて検討した。我々は MKL1 の脳における mRNA 発現パターンを調べており、その結果、脳の海馬、大脳皮質や線条体などに多く発現していることを示している<sup>56</sup>。そのため、特に脳の各部位と、その他の全身の組織の RNA を抽出した。FLMKL1, BSAC, MELODY にそれぞれ特異的なプライマーを図 3-b に矢印で示した通り作製した（配列情報は 3.2.9 項を参照）。なお、これらのプライマーが、それぞれのアイソフォーム特異的に増幅することを、電気泳動によってシングルバンドが検出されることによって確認した（図 3-h）。また、RT 反応を行っていない control (-) サンプルでは増幅が起こらないことを確認した。一方、RT 反応を行った各組織のサンプル及び、ポジティブコントロールとして用いた各種アイソフォームのプラスミドを加えたサンプルでは、バンドが認められた。バンドはそれぞれ予測されたサイズの場所にのみ認められた。

定量 RT-PCR の結果、すべてのアイソフォームが脳組織に多く発現していることが認められた（図 3-i）。FLMKL1 及び MELODY は、精巣にも多く発現が認められたが、BSAC ではあまり発現が認められなかった。また、BSAC は特に海馬に多く発現していた。他のアイソフォームに比べ、MELODY の mRNA 量は非常に少なかった。

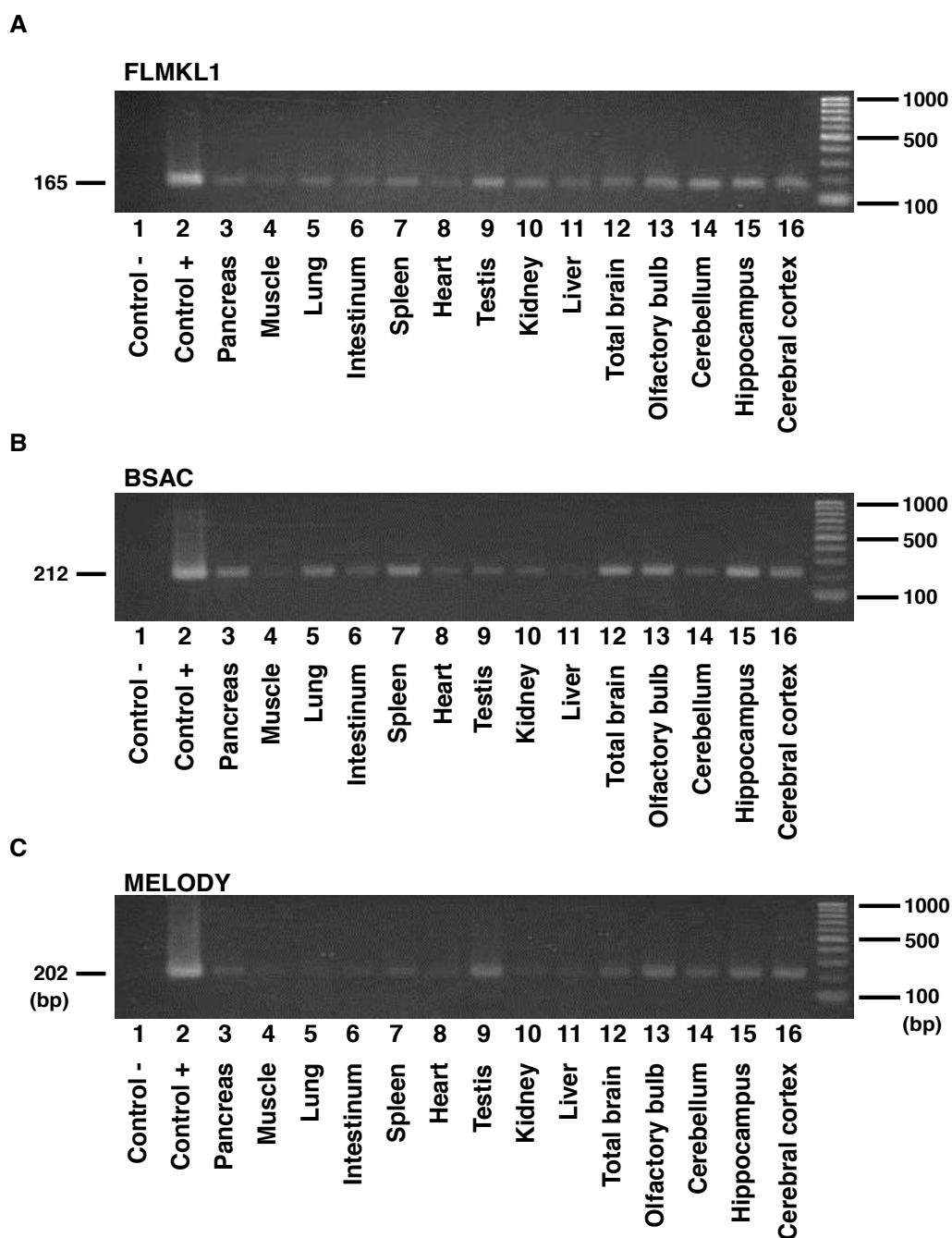


図 3-h ラット組織別 MKL1 アイソフォーム mRNA の発現. 7 週齢ラットを用いて組織を採取し, mRNA を抽出した. その後, RT-PCR を行った. Control (+)ではそれぞれに対応したプラスミドを用いた. PCR 反応は, 95 °C 10 分 → 95 °C 45 秒, 60 °C 45 秒, 72 °C 1 分を 35 サイクルのプログラムで行った. PCR 産物の分子量はそれぞれ 165 bp (FLMKL1), 212 bp (BSAC), 202 bp (MELODY) である. Pancreas=膵臓, Muscle=筋肉, Lung=肺, Intestinum=腸, Spleen=脾臓, Heart=心臓, Testis=精巣, Kidney=腎臓, Liver=肝臓, Total brain=全脳, Olfactory bulb=嗅球, Cerebellum=小脳, Hippocampus=海馬, Cerebral cortex=大脳皮質.

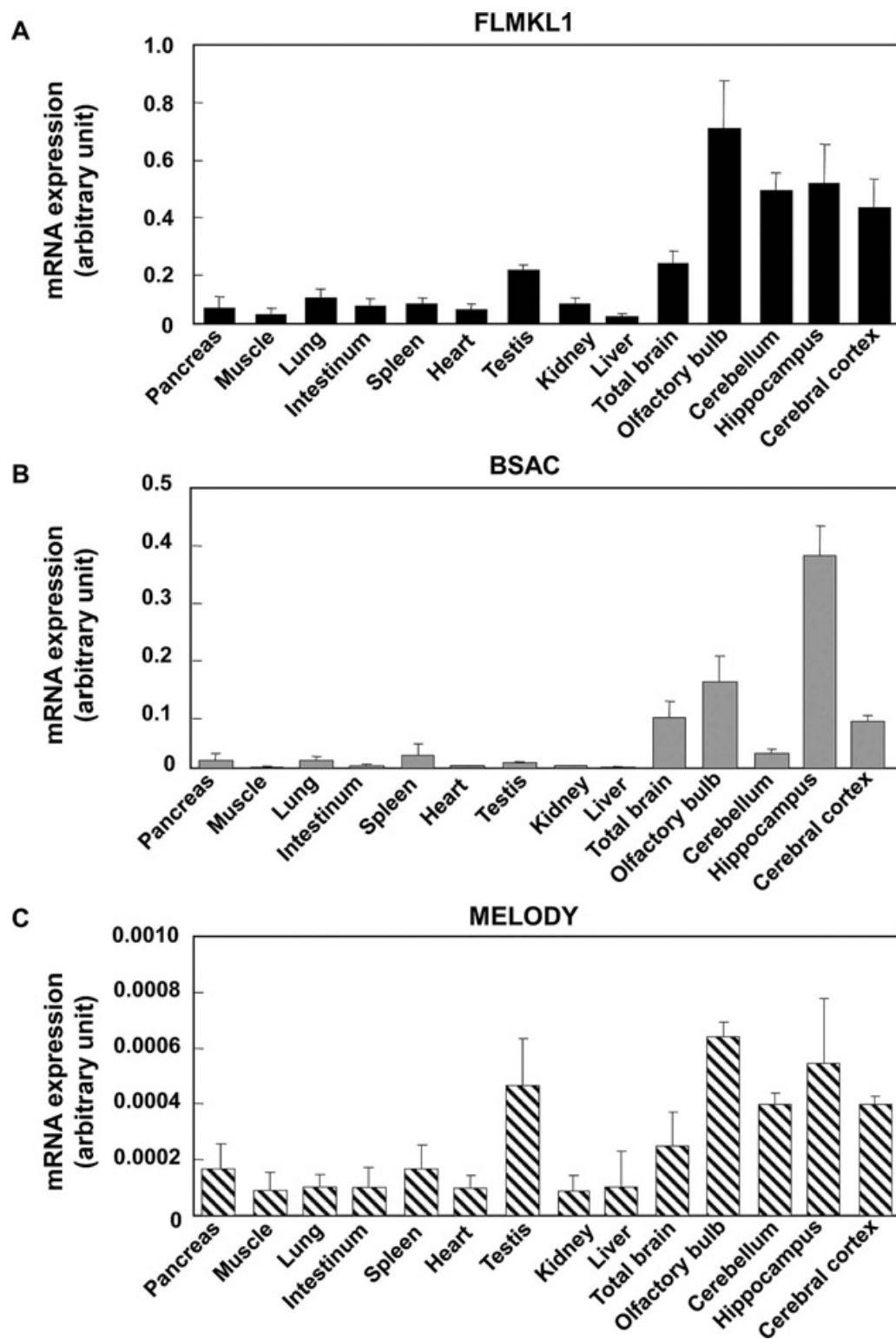


図 3-i ラット MKL1 アイソフォームの発現分布. 7 週齢のラットから組織を抽出し, 定量 RT-PCR を行った.  $N \geq 3$ , mean  $\pm$  SD. 各組織の和名については, 図 3-h を参照.

### 3.3.3 ラット発達段階における脳領域部位別の MKL1 アイソフォーム mRNA 発現量変化

3.3.2 の実験で、ラット MKL1 は脳組織に多く発現していることが示された。脳はその発達段階において、形態や機能を変化させて正常なニューロンネットワークや高次脳機能発現をもたらす。そのため、脳発達段階における MKL1 アイソフォーム発現パターンを解析することが重要である。そこで、本実験では、MKL1 アイソフォームの発現変化を定量 RT-PCR 法にて調べた。嗅球、大脳皮質、海馬、小脳、及び全脳において胎生期より生後 3 週間まで (E15~P21)、MKL1 アイソフォーム mRNA 発現を検討した (図 3-j)。その結果、BSAC は P10-P15 の海馬及び大脳皮質で特に多く発現が認められた。一方、MELODY の脳内の発現量は、成長に伴い減少して行くことが示された。FLMKL1 については、様々な発現パターンの変動が認められたが、大脳皮質では成長に伴い発現量が減少する傾向が認められた。以上の結果より、MKL1 アイソフォーム発現は、脳組織の発達に伴い発現制御を受けていることが明らかとなった。

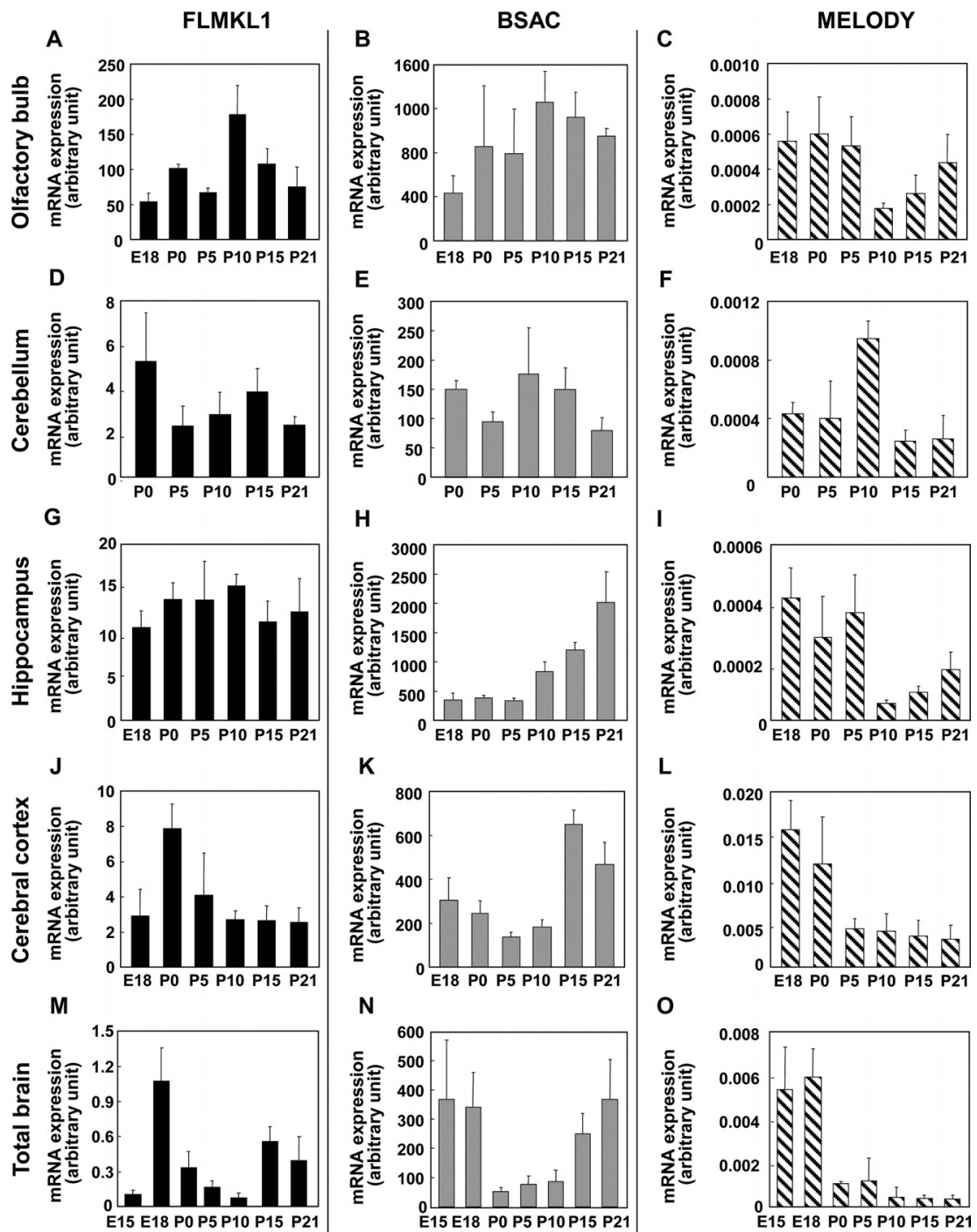


図 3-j MKL1 各アイソフォームの脳組織における発達における発現パターン. 定量 RT-PCR を行った. 嗅球 (A-C), 小脳 (D-F), 海馬 (G-I), 大脳皮質 (J-L), 全脳 (M-O) を示している.  $N \geq 3$ , mean  $\pm$  SD.

### 3.3.4 ラット MKL1 発現ベクターの構築

次に、これらのアイソフォームの機能を明らかにするために、FLAG タグを付加した発現ベクターを作製した。MKL1 研究でよく用いられているマウス線維芽細胞の株化細胞である NIH3T3 細胞を用いて、これらの発現ベクターの発現レベルをウェスタンブロット法で調べた。内部標準として、pEGFP-C1 (Clontech) ベクターも同様に導入した。図 3-k は、各アイソフォームの発現ベクターを、0.5–1  $\mu$ g、トランスフェクションし、24 時間後のサンプルをウェスタンブロットした結果を示している。なお、コントロールとして 1  $\mu$ g の pEGFP-C1 ベクターもコトランスフェクションしている。FLAG、トランスフェクションのコントロールである GFP、タンパク質量のコントロールである  $\alpha$ -tubulin を検出した。アミノ酸配列から予測された MKL1 タンパク質の分子量は、約 108 kDa であったが、FLAG のバンドは 150 kDa 付近に観察された。MKL1 は、血清の刺激を受けてリン酸化されること<sup>58</sup>、ニューロンでは脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) によってリン酸化されること<sup>59</sup>、293T 細胞において small ubiquitin related modifier (SUMO) 化による翻訳後修飾を受けること<sup>60</sup>が報告されている。すなわち、今回同定した各アイソフォームについても、このような修飾を受け、その結果、ウェスタンブロットで得られた分子量がシフトアップしていたと推測される。

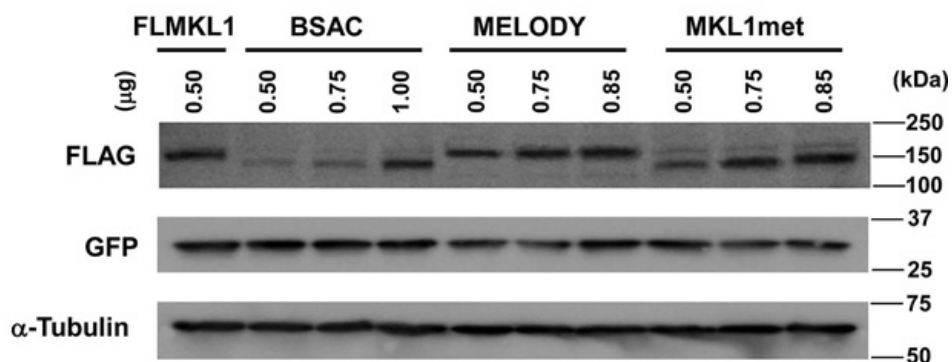


図 3-k 各 FLAG タグ付加発現ベクターの発現確認。

上段に示した量の MKL1 発現ベクターと、1  $\mu$ g の GFP 発現プラスミドを NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。プラスミドの総量が 2  $\mu$ g になるように empty vector を同時にトランスフェクションしている。24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロットでバンドを検出した。トランスフェクション効率のコントロールとして GFP、タンパク質量のコントロールとして  $\alpha$ -tubulin のバンドも示した。

### 3.3.5 ラット MKL1 アイソフォームが SRF 依存性転写活性に与える影響

次に、3.3.4 で構築した MKL1 アイソフォーム発現ベクターを用いて、各 MKL1 アイソフォームを、NIH3T3 細胞にトランスフェクションすることによって過剰発現させたときに、SRF 依存性転写に与える影響を調べた。レポーターベクターには、図 3-1 に示した 3 種類を用いた。結果を図 3-m に示す。4 種類の MKL1 アイソフォームはすべて、3DA Luc 及び、5x SRE Luc レポーターベクターを用いたレポーターアッセイにおいて SRF 依存性転写を誘導したが、特に MKL1met が他と比べて顕著に転写活性を上昇させた。一方、cAMP-response element (CRE) レポーターベクターを用いて、転写活性を評価したところ、いずれの発現ベクターの過剰発現でも有意な転写活性の上昇は認められなかった。以上のことから、ラット MKL1 アイソフォームは、SRF 依存性転写を特異的に誘導していることが示された。

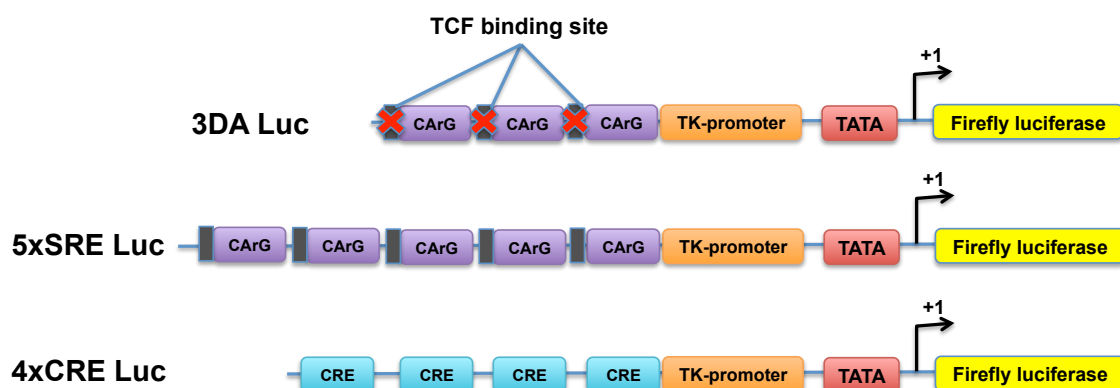


図 3-1 用いたレポーターベクター。3DA Luc については第 2 章参照。5 x SRE Luc には、SRF 結合サイト (SRE) が 5 つタンデムに連結されている。4 x CRE Luc には、CREB 結合サイト (CRE) が 4 つタンデムに連結されている。4 x SRE Luc は転写因子に対する特異性を評価するために用いた。

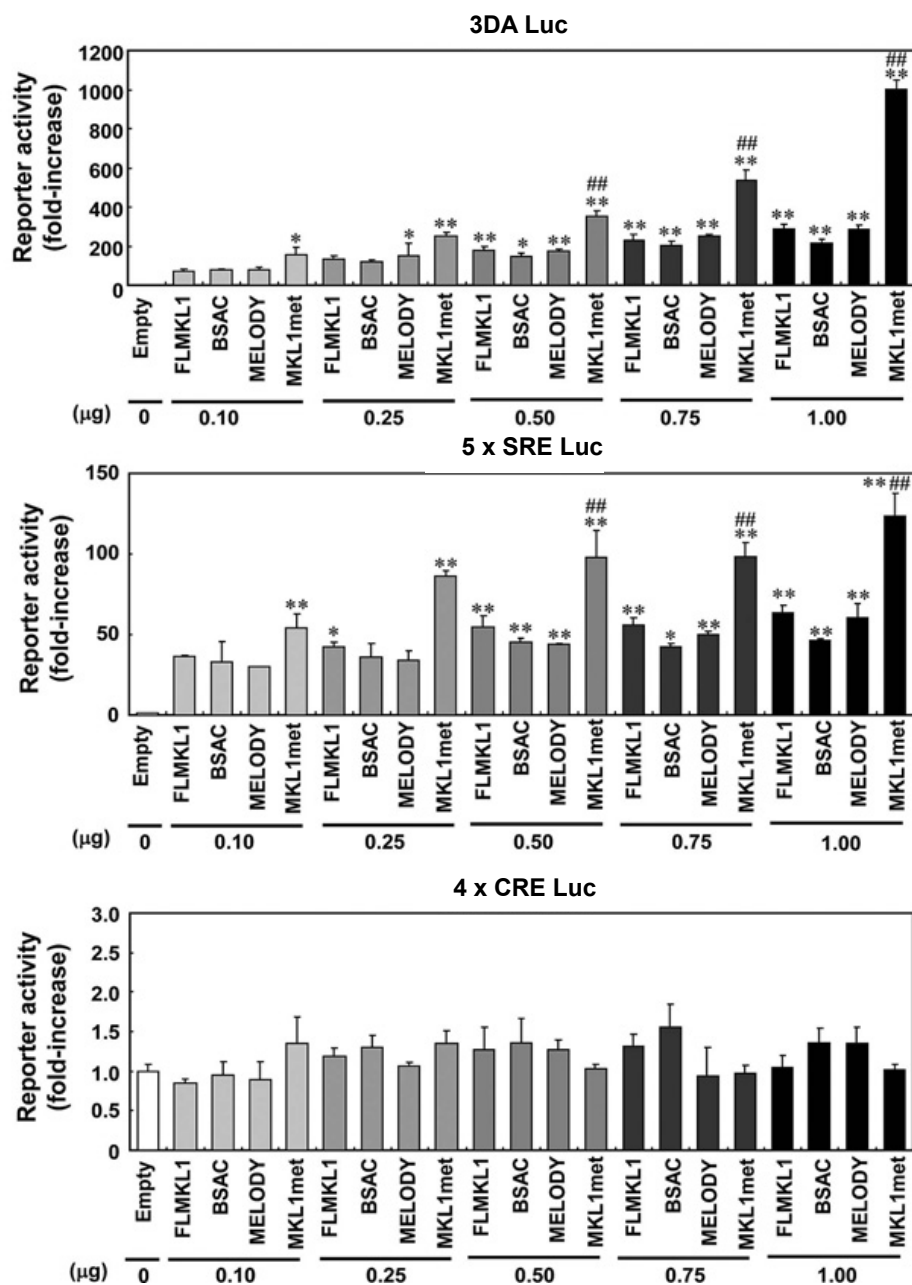


図 3-m 各発現ベクター導入時の SRF 及び CREB 介在性転写活性.

レポーターベクターを 1 μg (上: 3DA Luc, 中央: 5 x SRE Luc, 下: 4 x CRE Luc) と, 内部標準ベクター (TK-Renilla) を 0.2 μg を, 表の下に示した量の MKL1 発現ベクターと同時にトランスフェクションした. なお, 各サンプルで, プラスミドの合計量が一定(2 μg)になるように, empty vector を同時にトランスフェクションしている. トランスフェクション 24 時間後に細胞をサンプリングした.

N ≥ 3, mean ± SD, \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01 vs. Empty, ###: P < 0.01 vs. FLMKL1 by ANOVA.

### 3.4 考察

本研究において、ラット MKL1 のクローニングの過程で、マウス MKL1 において報告のあるホモログである FLMKL1, MKL1met と BSAC の他に、新規のアイソフォームである MELODY を同定した。FLMKL1, BSAC, MELODY は、いずれも異なる 5'-エキソンを持っていることが判明した。このことから、FLMKL1, BSAC, MELODY の mRNA 発現は、それぞれの転写開始点の上流に存在するプロモーターにより独立して転写されることが示唆された。ウェブサイトを用いて、これらプロモーターに存在する既知の転写因子結合部位の検索を行ったところ、MKL1 アイソフォームの上流には異なる転写因子が制御している可能性が考えられた。このことからアイソフォーム発現は、時空間的に異なった調節を受ける可能性が示唆された。そのため、組織発現分布及び発達段階におけるアイソフォームの発現変化を調べたところ、異なるパターンが見受けられた。発現レベルに着目すると、MELODY は他のアイソフォームより顕著に低いことが示された。そのため、通常状態では MELODY は働かず、特定の条件下において発現誘導される可能性が考えられた。

次に、各アイソフォーム発現ベクターを作製し、ラット MKL1 アイソフォームの SRF コアクチベーター活性を調べた。その結果、新規アイソフォームである MELODY を含むすべてのアイソフォームが SRF 依存性転写を上昇させ、特に MKL1met は強い転写活性を示した。FLMKL1, BSAC, MELODY は、G アクチンと結合する RPEL モチーフを 3 つ有するのに対して、MKL1met は 2 つしか持っていない。3 つの RPEL モチーフは、合計 5 分子の G アクチンとの結合能を持つとの報告がある<sup>61</sup>。1 つの RPEL モチーフの欠損が、結果として G アクチン結合性を減少させ、その結果、MKL1 の核移行が容易になり、SRF のコアクチベーター活性が増強すると考えられる。我々はすでに MKL1 の機能を抑制したときに、ニューロンの突起の複雑性が減少することを示している<sup>56</sup>。次の章では、培養ラット大脳皮質ニューロンを用いて、MKL1 の細胞内局在性と機能解析を行っているため、ニューロンにおける MKL1 アイソフォームの機能性の違い等については次章で考察する。

本章では、ラット MKL1 アイソフォーム発現が時空間的に制御されていることを明らかにした。このような発現変化により、遺伝子発現が巧妙に微調整される可能性が考えられた。今回同定した各アイソフォームが SRF 依存性転写に与える異なる影響を、MKL1 ノックアウトマウス由来の細胞に MKL1 のアイソフォームを過剰発現させるレスキュー実験によって明確にできるかもしれない。



## 第 4 章

# MKL1 新規アイソフォームの ニューロンにおける機能解析

## 4.1 緒言

第3章では、ラット MKL1 アイソフォームを同定し、その発現パターン及び線維芽細胞である NIH3T3 細胞における転写活性化能について解析した。その結果、新規アイソフォームを含む各アイソフォームは、脳内の各組織や発達段階で異なる挙動を示した。また、MKL1met がその他の MKL1 アイソフォームよりも強く SRF 転写活性を上昇させた。そのため、これらのアイソフォームがニューロンに異なる影響を与えることが考えられた。我々はこれまでに MKL1 の機能を抑制したときに、ニューロンの樹状突起の複雑性が減少することも報告している<sup>56</sup>。これらの結果をふまえ、本章では MKL1 アイソフォームの細胞内局在、ニューロン形態変化を含む機能の違いについて培養ラット大脳皮質ニューロンを用いて検討した。

## 4.2 実験材料・方法

### 4.2.1 培地・試薬

ラット胎児の全脳摘出後、大脳皮質摘出後、Trypsin および DNaseI 処理後に用いる DMEM + 10% FCS は、DMEM powder 13.4 g (Life Technologies), 3.7 g NaHCO<sub>3</sub> (Wako), 110 mg ピルビン酸ナトリウム (Wako) を超純水に溶解させ、0.22 µm フィルター (MILLIPORE) で濾過滅菌を行い、10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) (三光純薬 Lot# APA20504), 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Life Technologies) を加えたものを用いた。Neurobasal mixture, Serum-free DMEM, 2×HBS (Hepes-buffered saline)の組成については、第2章を参照。

### 4.2.2 抗体・プラスミド

FLAG タグを付加したラット MKL1 発現ベクターについては、第3章で作製したベクターを用いた。SRF レポーターベクターである 3DA Luc については、第2章に述べた通りである。3DA Luc 以外のレポーターベクターについては、第3章を参照。

免疫染色には以下の蛍光抗体を用いた。

Alexa Fluor 488 or 594-conjugated anti-rabbit IgG (Life Technologies; A-11008 or A-11012 1:1000)

Alexa Fluor 488 or 594-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies; A-11001 or A-11005 1:1000)

anti-GFP rabbit IgG (Life Technologies; A-11122 1:500, Medical and Biological Laboratories; 598 1:1000)

anti-FLAG mouse IgG (Sigma; F3165 1:1000)

anti-Tau-1 mouse IgG (Chemicon; MAB3420 1:1000)

anti-MAP2 mouse IgG (Sigma; M4403 1:1000)

#### 4.2.3 動物

ラット大脳皮質ニューロンの単離には、胎生 17 日齢の SD ラット(日本 SLC・納入：三協ラボサービス)を用いた。動物実験は、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に従って実施した。

#### 4.2.4 ラット大脳皮質ニューロンの初代培養

ラット大脳皮質ニューロンの初代培養は、既報の方法に基づいて行った<sup>55</sup>。すなわち、妊娠ラットの腹部を切開し、胎児を取り出した。胎児の頭部を 70% エタノールで消毒した後、頭部および頭蓋骨を切開し、全脳を DMEM + 10 % FCS に摘出した。次に全脳から、大脳皮質を DMEM + 10 % FCS に単離し、これを先曲バサミで細切し、1,500 rpm, 3 分の遠心を行った。その後、細胞沈査に 2 mL の Trypsin Solution (0.125% Trypsin を PBS に溶解させ、0.20  $\mu$ m フィルター (Sartorius)で濾過滅菌を行ったもの)を加え、攪拌を行いながら、10~13 分間、37 °C でインキュベートした。次に、4 mL の DMEM + 10% FCS を加え、1,500 rpm, 3 min の遠心を行った。次に、細胞沈査に 2 mL の DNase I (0.004% DNase I (Sigma) + 0.003% Trypsin inhibitor (Sigma) を PBS に溶解し、0.20  $\mu$ m フィルター (Sartorius) で濾過滅菌を行ったもの)を加え、攪拌を行いながら、15 分 37 °C でインキュベートした。そして、4 ml の DMEM+10% FCS を加え、1,500 rpm, 3 min の遠心を行った。最後に、5 mL の Neurobasal mixture を加え懸濁し、0.5% トリパンプル (Wako) を用いて、血球計数板 (Burker-Turk) で細胞を計数した。2.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well (レポーターアッセイの場合：6 穴プレート (Nunc) に 62.5  $\mu$ g/mL poly-D- lysine でコーティングを施したもの)、もしくは 7.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well (免疫染色の場合：12 穴プレート (IWAKI) に 18 mm $\phi$  カバークラス (MATSUNAMI) を入れ、62.5  $\mu$ g/mL poly-D-lysine で 6~24 時間コーティング処理したもの)の濃度で、それぞれ細胞を播種した。6 穴プレートには 2 ml, 12 穴プレートには 1 mL の Neurobasal mixture をあらかじめ分注し、5% CO<sub>2</sub>, 37 °C でインキュベートし、週 2 回、培地の半量交換を行った。

#### 4.2.5 トランスフェクション (リン酸カルシウム法)

第 2 章に準じた。

#### 4.2.6 トランスフェクション (エレクトロポレーション法)

軸索長の測定を行った細胞については、エレクトロポレーション法によるトランスフェクションを行った。すなわち、E17 のラットから摘出した大脳皮質ニューロン(5.0 x 10<sup>6</sup> cells)に、Amaxa

Rat Neuron Nucleofector Kit (Lonza) を用いて、メーカーのプロトコールに従ってエレクトロポレーションを行った。細胞はラット胎児からの摘出直後のものを用いた。一方、 $3.0 \times 10^5$  cells の細胞を、18 mm のカバースリップを入れ、poly-D-lysine でコーティングした 12 穴プレートに播種しておいた。このプレートに、先ほどエレクトロポレーションを行った直後の細胞を、DMEM + 10% FCS 培地と共に、 $4.0 \times 10^5$  cells ずつ播種（細胞の全量は  $7.0 \times 10^5$  cells/ well になる）した。播種の 3 時間後、Neurobasal mixture に培地交換を行い、48 時間後に細胞を固定し、免疫染色に供した。

#### 4.2.7 免疫染色

第 2 章に準じた。

#### 4.2.8 局在解析

免疫染色後のサンプルについて、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM700) と、ソフトウェア ZEN (Zeiss) を用いて、局在解析を行った。すなわち、細胞体全体を GFP 陽性部位、核を DAPI 陽性部位で認識させ、GFP 陽性・DAPI 陽性部位を核、GFP 陽性、DAPI 陰性部位を細胞質としてカウントした。最低 20 細胞のニューロンについて解析を行った。

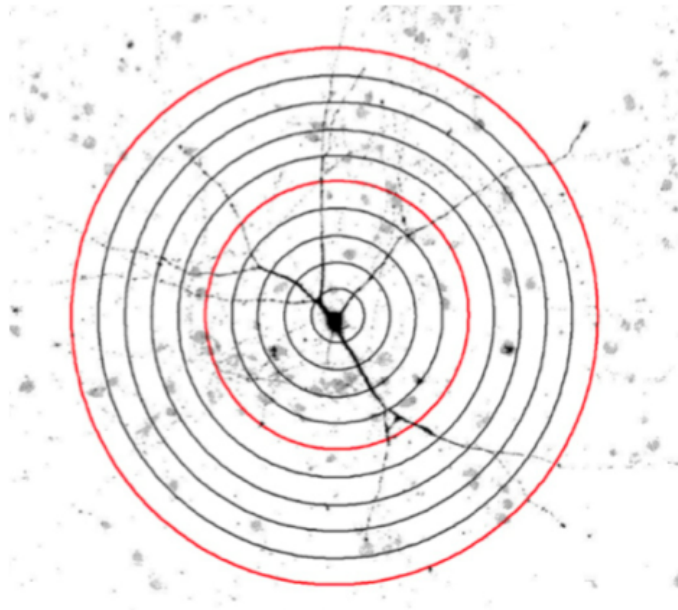
#### 4.2.9 レポーターアッセイ

第 2 章に準じて行った。ただし、内部標準には RSV- $\beta$  gal を内部標準に用いた<sup>55</sup>。この場合、200 $\mu$ L の Galacto star lysis solution (TROPIX) で細胞を剥離し、メーカーのプロトコールに準じて細胞抽出液を調製した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイは、GALACTON STAR (TROPIX) を用い、メーカーのプロトコールに準じて行った。活性の値は、ホタルルシフェラーゼの値を  $\beta$  gal の値で除した数値とした。

#### 4.2.10 ニューロンの形態解析

ニューロンの突起解析には Sholl 法を用いた<sup>62</sup>。すなわち、染色後の GFP 陽性ニューロンを蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50-34-FLA-1) で観察し、接続したデジタルカメラ (DP70 : Olympus) で錐体様の細胞をニューロンとして画像を取得した。次に、その画像の核の中心部分に半径 20  $\mu$ m ずつ離れた同心円 (20  $\mu$ m ~ 200  $\mu$ m) を重ね、その円と細胞の突起が交差する数を計測した。また軸索と判断したものについては計測の対象から除外した。軸索突起長については、上記と同

様に取得したニューロン画像について、軸索マーカーである Tau-1 陽性の突起を軸索とみなし、Image J(NIH)ソフトウェアを用いて細胞体から出ている軸索をトレースし、その長さを計測した。



**図 4-a Sholl 法の概要.** 同心円を、細胞体の中心に重ね、それぞれの円と交差する突起の数を計測した。赤色の同心円はそれぞれ半径 100, 200  $\mu\text{m}$  の円である。

### 4.3 実験結果

#### 4.3.1 ラット MKL1 アイソフォームの培養ラット大脳皮質ニューロンにおける局在

第1章で述べた通り，MKL1の核移行は，MKL1がSRFのコアクチベーターとして働く上で重要である．また，第2章で示した通り，ニューロンにおいても，MKL1はRhoシグナル伝達を過剰に活性させた際に核移行し，またその際にSRF依存性転写を上昇させる．また，第3章では，RPELモチーフが一つ少ないアイソフォームであるMKL1metの転写活性化能が高かった．したがって，MKL1アイソフォームの細胞内局在性の違いが考えられた．そこでまず，培養ラット大脳皮質ニューロンにおける局在解析を行った．第3章で作製したFLAGタグを付加した発現ベクターをGFP発現ベクターとコトランスフェクションして局在を解析した．図4-bに細胞の代表例を，図4-cに核と細胞質の割合を示したグラフを表している．その結果，FLMKL1，BSAC，MELODYに関しては，核と細胞質の割合の比が同程度であったのに対し，MKL1metの局在は他と比べ有意に核に多く認められた．

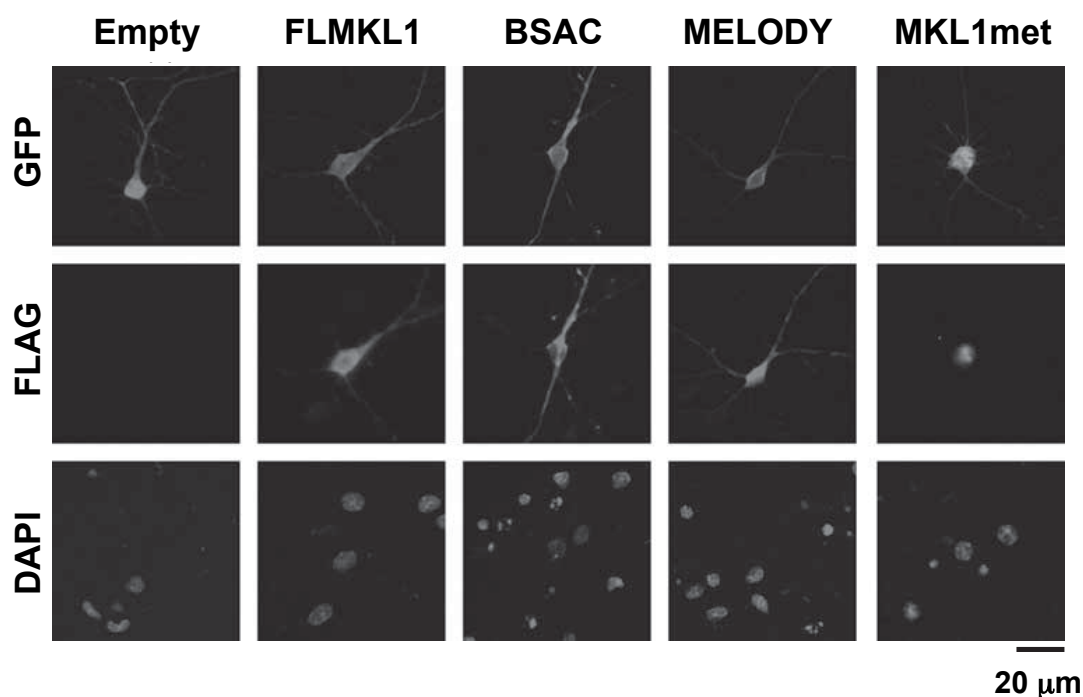


図 4-b 培養ラット大脳皮質ニューロンにおける MKL1 アイソフォームの局在解析．培養 7 日目 の培養ラット大脳皮質ニューロンにそれぞれ，empty: 2.0 μg, FLMKL1: 1.0 μg, BSAC: 2.0 μg, MELODY: 1.0 μg, MKL1met: 1.5 μg を GFP ベクター 2.0 μg とコトランスフェクションし，プラスミドの全量が 4 μg となるように empty vector を導入した．24 時間後に細胞固定を行った．その後，免疫染色を行った．

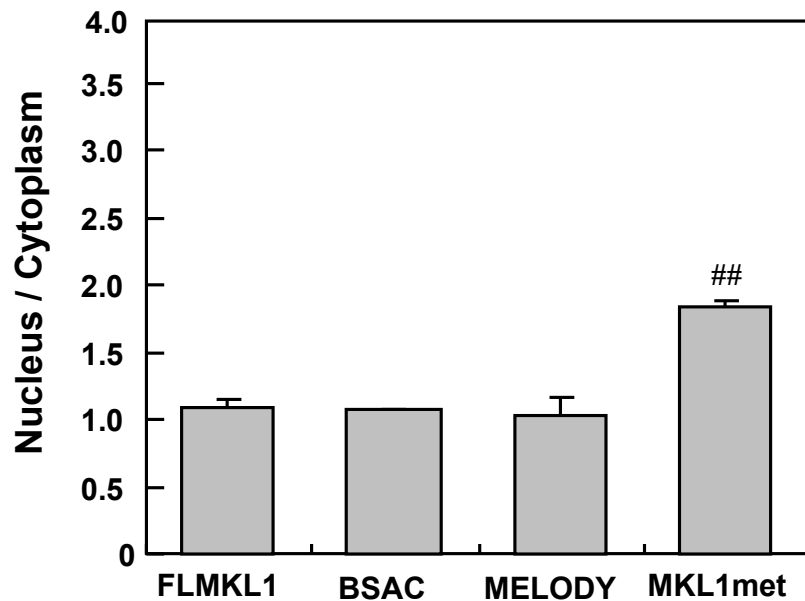


図 4-c 培養ラット大脳皮質ニューロンにおける MKL1 アイソフォームの局在解析. 図 4-b で得られた写真から, ソフトウェア ZEN を用いて核/細胞質の比率を求めてグラフ化した. 各実験では, 20 以上の細胞を評価している. Mean ± SD, N = 3, ##: P < 0.01 vs. FLMKL1 by one-way ANOVA.

#### 4.3.2 培養ラット大脳皮質ニューロンにおける SRF 依存性転写活性

第 3 章では, NIH 3T3 細胞における SRF 依存性転写活性に関する研究を行った. そこで本研究では, 培養ラット大脳皮質ニューロンにおける SRF 依存性転写を測定した. 方法としては, 培養ラット大脳皮質ニューロンに各発現ベクターとルシフェラーゼプラスミド, 内部標準プラスミドをコトランスフェクションし, レポーターアッセイにて測定した. レポーターベクターには, 第 3 章と同じ, 3DA Luc, 5 x SRE Luc, 対照として 4 x CRE Luc を用いた. その結果, FLMKL1, BSAC, MELODY に比べ, MKL1met では有意に高い転写活性の上昇を示した (図 4-d). 一方, CRE の転写活性については, いずれのアイソフォームも転写活性に影響を与えなかった. MKL1met の高い転写活性は, 4.3.1 の実験で示したように, MKL1met の核移行性の高さに起因すると考えられる.

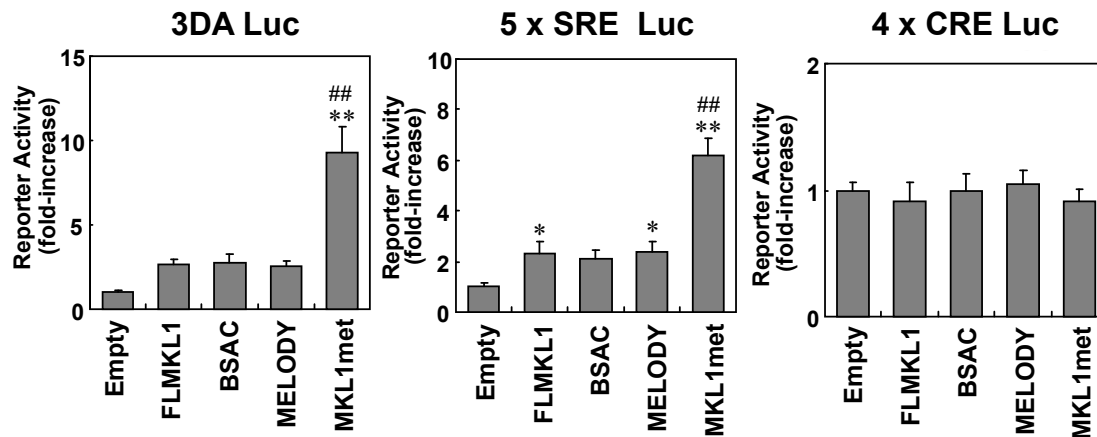
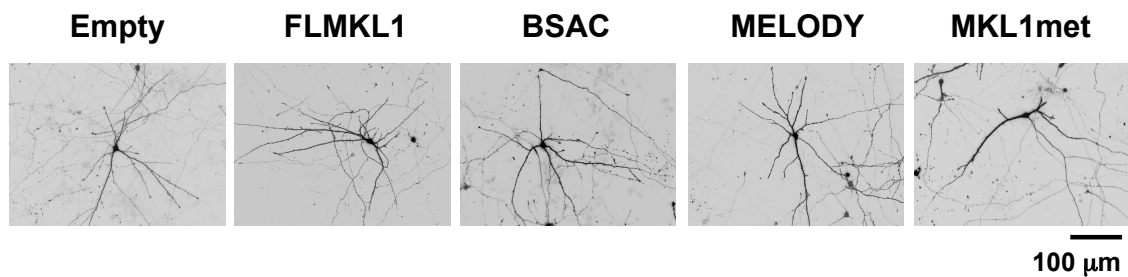


図 4-d ラット大脳皮質ニューロンにおける MKL1 アイソフォームの SRF 依存性転写に与える影響。

Empty: 3.0  $\mu$ g, FLMKL1: 1.5  $\mu$ g, BSAC: 3.0  $\mu$ g, MELODY: 1.5  $\mu$ g, MKL1met: 2.25  $\mu$ g と, 3DA Luc, 5 x SRE Luc, 4 x CRE Luc をそれぞれ 1.0  $\mu$ g, さらに $\beta$ -galactosidase ベクターである RSV- $\beta$ gal を 0.2  $\mu$ g, 培養 7 日目のラット大脳皮質ニューロンにコトランスフェクションし, 転写活性を測定した. プラスミドの全量 (RSV- $\beta$ gal を除く) が 4  $\mu$ g になるように empty vector で調整している. トランスフェクションして 48 時間後に, 細胞抽出液を調製し, レポーターアッセイを行った. Mean  $\pm$  SD, N = 4 (3DA Luc, SRE Luc) or 3 (CRE Luc), \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01 (vs. empty), ##: P < 0.01 (vs. FLMKL1) by one-way ANOVA.

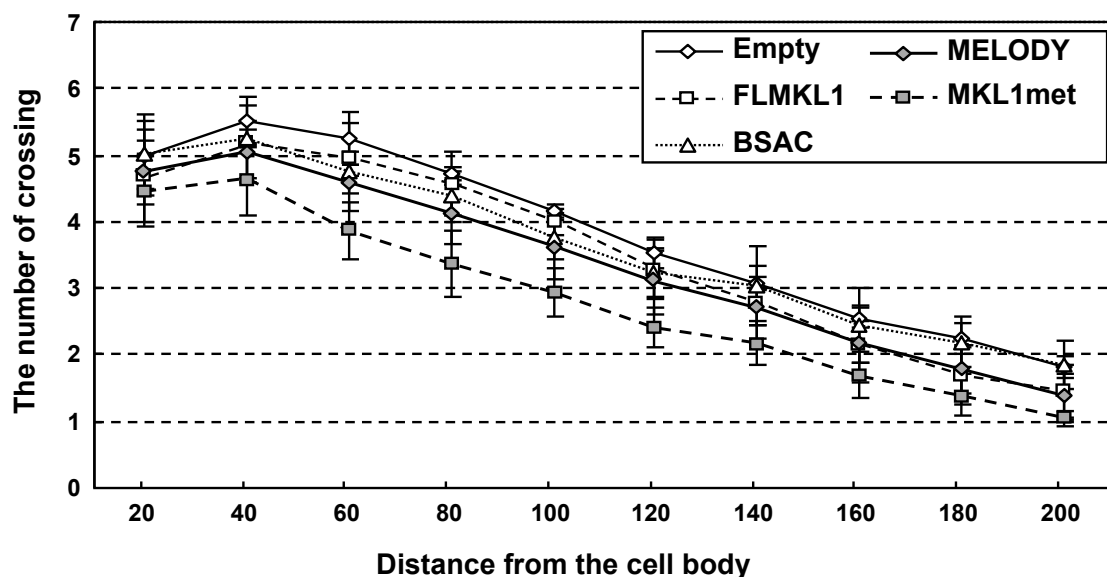
#### 4.3.3 ラット MKL 1 アイソフォームが突起形態に与える影響の解析

我々は既に MKL1 の機能を抑制した際に, 樹状突起の複雑性が減少することを見いだしている<sup>56</sup>. そのため, SRF 依存性転写や核移行性の異なるアイソフォームの過剰発現下では, 突起の形態に影響を与える可能性が考えられた. そこで, MKL1 の各アイソフォームが樹状突起形態に与える影響を評価した. 各発現ベクター及び GFP プラスミドをトランスフェクションした細胞を, GFP で免疫染色し, Sholl 法にて突起数を計測した. 細胞の代表例を図 4-e に, Sholl 法の結果および有意差検定の結果を図 4-f に示す. その結果, FLMKL1, BSAC, MELODY では, コントロールと比べて有意な変化は認められなかったが, MKL1met は, 有意に突起の数を減少させた.



**図 4-e** ラット大脳皮質ニューロンにおけるラット **MKL1**アイソフォームの樹状突起形態に与える影響.

Empty: 2.0  $\mu$ g, FLMKL1: 1.0  $\mu$ g, BSAC: 2.0  $\mu$ g, MELODY: 1.0  $\mu$ g, MKL1met: 1.5  $\mu$ g を, 2.0  $\mu$ gのGFPベクターと, 培養7日目のラット大脳皮質ニューロンにコトランスフェクションした. なお, プラスミドの全量が4  $\mu$ gになるようにempty vectorで調整している. 細胞はトランスフェクション48時間後に固定し, GFPで免疫染色を行った. この写真は, 撮影した画像に対してグレースケール化, 反転を行った後, 輝度を-70%に設定したものである.



		Distance from the cell body (μm)									
		20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
MKL1FL	vs Empty	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	vs BSAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSAC	vs Empty	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	vs FLMKL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	vs MKL1met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melody	vs Empty	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	vs FLMKL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	vs BSAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MKL1met	vs Empty	-	-	**	**	*	*	-	-	-	*
	vs FLMKL1	-	-	*	*	**	-	-	-	-	-
	vs BSAC	-	-	-	*	*	-	-	-	-	*
	vs MELODY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図 4-f ラット大脳皮質ニューロンにおけるラット MKL1 アイソフォームの樹状突起形態に与える影響。

図4-eの写真を用いて，Sholl法によって突起の複雑性の解析を行った．上は細胞体の中心からの距離で突起と交差する点の数を示している．各実験回では，最低20のニューロンについて解析を行っている．下のデータは，上の結果について統計学的有意差を示している． mean ± SD N = 4, \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01 by one-way ANOVA.

#### 4.3.4 ラット MKL1 アイソフォームが軸索長に与える影響の解析

ニューロンにおいてアクチンが軸索末端に多く局在していることが知られている. そこで MKL1 アイソフォームが軸索長に与える影響についても検討した. エレクトロポレーション法によってトランスフェクションした細胞を, 軸索のマーカーである Tau-1 で免疫染色し, 軸索長を計測した. 細胞の代表例を図 4-g に, 軸索長をグラフ化したものを図 4-h に示す. その結果, いずれのアイソフォームも, 軸索長に影響を与えなかった.

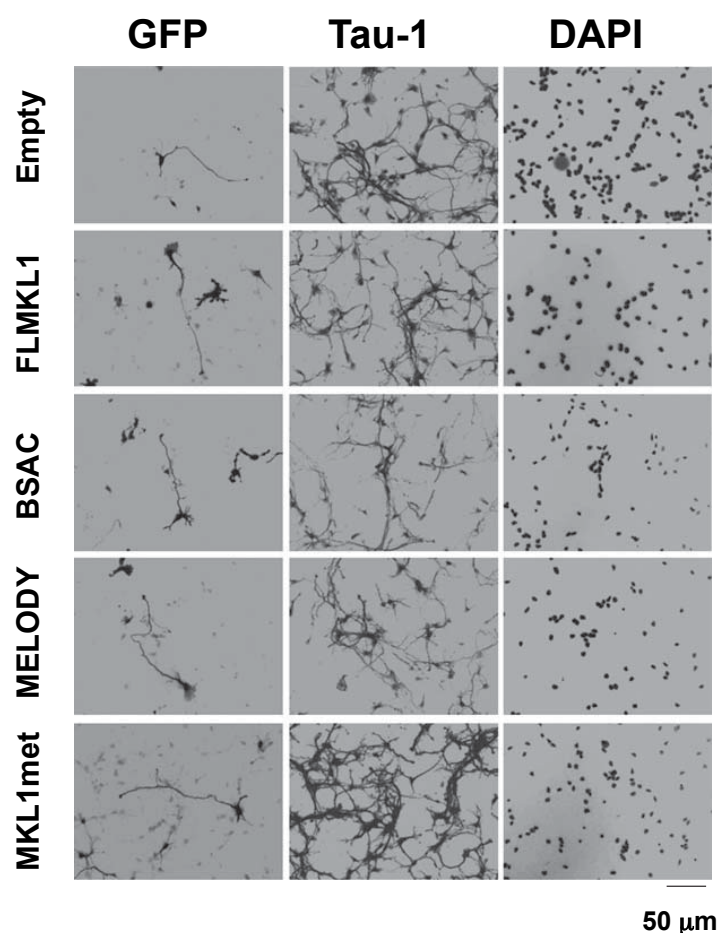


図 4-g ラット大脳皮質ニューロンにおける ラット MKL1 アイソフォームが軸索長に与える影響.

empty: 2.0 μg, FLMKL1: 1.0 μg, BSAC:2.0 μg, MELODY:1.0 μg, MKL1met:1.5 μg の発現ベクターをそれぞれ, 2.0 μgのGFP 発現ベクターを, それぞれラット大脳皮質ニューロンに, エレクトロポレーション法でトランスフェクションした. なお, 全体のプラスミド量が4.0 μgとなるようにempty vectorを加えている. トランスフェクション48時間後に細胞を固定し, GFPとTau-1で免疫染色を行った. ここで示した細胞の画像は, 反転, グレースケールにして, 輝度 -40%, コントラスト -40%で補正をかけたものである.

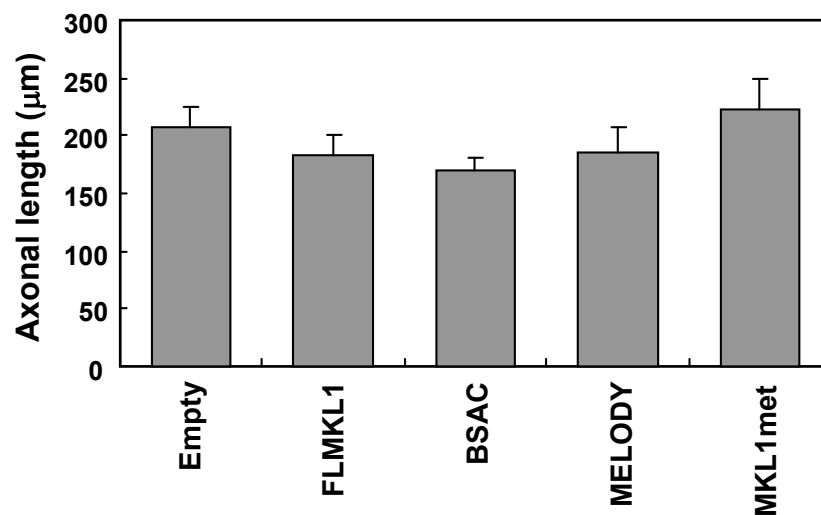


図 4-h ラット大脳皮質ニューロンにおけるラット MKL1 アイソフォームが軸索長に与える影響.

図4-gの写真から, Tau-1及びGFPの両者が陽性の突起について, ImageJを用いてトレースした. 各実験回では, 最低20のニューロンについて解析を行っている. いずれの結果間にも有意な差は認められなかった. Mean  $\pm$  SD, N = 3, by one-way ANOVA.

#### 4.4 考察

本研究では、第3章で作製したラット MKL1 アイソフォーム発現ベクターを、培養ラット大脳皮質ニューロンに過剰発現した時に与える影響を調べた、その結果、MKL1met では、他のアイソフォームより核に局在している細胞の割合が高く、SRF 依存性転写も強く誘導した。第3章の考察で述べた通り、この現象は、G アクチンと結合する RPEL モチーフの数が影響している可能性が考えられる。また、樹状突起の数が MKL1met の過剰発現で低下したことについては、MKL1met が核に多く存在するため、SRF 依存性転写が亢進し、細胞骨格系関連遺伝子の発現誘導が起きている可能性が考えられる。

RPEL モチーフは、数アミノ酸残基の違いによってもアクチン結合能が異なることが報告されている<sup>39,63</sup>。BSAC と FLMKL1, MELODY の間では、3 つ存在する RPEL モチーフのうち、1 番目の最も N 末端側のアミノ酸残基が異なる。特に、BSAC については部位・時期的な発現パターンが異なることから、今回示したニューロンの突起形態以外にも、脳神経系における形態にこれらのアイソフォームが影響を与えている可能性も考えられる。

また、核内において、G アクチンと結合した MKL1 は、核外に放出され、また、SRF の依存性転写誘導を抑制する<sup>35</sup>。その結果、RPEL モチーフの少ない MKL1met は、SRF 依存性転写を他のアイソフォームより強く誘導する可能性が考えられる。そのため、RPEL モチーフを一つ欠損した BSAC や MELODY が、MKL1met と同様に強い SRF 依存性転写活性やニューロンの形態制御活性を持つ可能性が考えられる。

本研究では、MKL1met の過剰発現がニューロンの突起の複雑性を減少させる影響をもたらすことを示した。一方、我々は、同じく SRF のコアクチベーターとして働く MKL2 の過剰発現によって、樹状突起の複雑性が増加する結果を示している<sup>64</sup>。このことから、MKL1met と MKL2 は、樹状突起に異なる影響を与えるような遺伝子を発現誘導すると考えられる。一方、MKL1 と MKL2 の、それぞれの siRNA によるノックダウン実験では、突起の複雑性が同様に減少することを示している。また、脳特異的な MKL1/MKL2 のダブルノックアウトマウスの研究では、ニューロンの移動や、突起の伸張に影響が認められている<sup>50</sup>。MKL1 と MKL2 の機能を明確にするためにも、今後、それぞれの標的遺伝子を調べる必要がある。

また、軸索の末端にもアクチンが豊富に存在しているため、MKL1 の過剰発現によって大脳皮質ニューロンの軸索長が変化する可能性が考えられた。ところが、本研究では軸索長への効果を見いだすことはできなかった。Nordheim らは、MKL1 が軸索の成長円錐に与える効果を評価している<sup>44</sup>。その結果、MKL1 の過剰発現では影響を与えないことを示しており、この結果は本研究の結果と一致する。Rho シグナル伝達系において RhoA と Rac1・Cdc42 の間で相反する作用

を持つことからわかるように、互いにフィードバックする機構が多く存在する。MKL1 が軸索に与える影響についても、何らかのフィードバック機構が作用している可能性がある。

第3章では、今回用いた各アイソフォームが、脳の組織において、時空間的に異なる発現パターンを示すことを明らかにしている (Ishikawa et al, FEBS open bio, 2013: 主論文 2) さらに、本章では MKL1 のアイソフォームのうち、RPEL モチーフの少ない MKL1met が、樹状突起の複雑性を減少させることを示した。以上、一連の結果より、MKL1 のアイソフォームがそれぞれ異なる遺伝子群を発現し、成体の脳組織の形態に影響を与えている可能性が示唆される。

## 総括・展望

本研究では、MKL1 が神経細胞においても Rho シグナル伝達経路を通じて核に移行し、SRF 依存性転写を活性化する性質があることを示した。また、新規 MKL1 アイソフォームである MELODY を含むラット MKL1 の複数のアイソフォームを同定し、その発現と機能に関する検討を線維芽細胞と培養ラット大脳皮質ニューロンにおいて行った。

本研究の冒頭では、Rho 下流エフェクターである *ca mDia* の神経細胞における過剰発現という条件下で MKL1 の核移行が起こったことを報告した。同条件下では、内在性 MKL1 の核移行も起こる (data not shown)。それでは、Rho シグナルを活性化させる細胞外リガンドとはどのようなものであるのか？また、そのようなリガンドは神経細胞で MKL1 の核移行を促進するのであるだろうか？我々は、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が MKL1 の核移行を促進するという報告<sup>65</sup>を参考に、脳で発現している TGF- $\beta$ ファミリーの一員であるアクチビンによる MKL1 の核移行を検討した。その結果、アクチビンにより顕著な MKL1 の核移行は観察されなかった<sup>64</sup>。しかし、時間的分解能を向上させ、また局所にフォーカスを充てた動態解析を行うことにより、神経細胞における MKL1 動態制御を行うリガンドを同定することができる可能性がある。リガンドの解明は、MKL1 核移行が関与するシグナル伝達経路をより精密に解析するための一助となるため、今後の課題である。

次に本研究では、MKL1 の機能をより詳細に検討するため、MKL1 アイソフォームの同定に取り組んだ。今回は、5'末端の異なるアイソフォームの同定を試みた。その結果、それぞれ固有の 5'-エキソンを有する MKL1 アイソフォームを同定することができた。3'末端の異なるアイソフォームが存在している可能性や脳以外の MKL1 高発現部位に特異的に発現するアイソフォームが存在する可能性もあり、すべての MKL1 アイソフォームを網羅的に同定しているかどうかは不明である。今回同定できた MKL1 アイソフォームは、転写開始点がそれぞれ異なるため、alternative promoter により制御されていることを示唆する。定量 RT-PCR の解析により、アイソフォームの mRNA 発現は、時間的、空間的に異なっているため、それぞれのアイソフォームに存在するプロモーターが時間的、空間的に異なった応答性を示した結果である可能性がある。また、今回同定した MKL1 アイソフォームは、N 末端のアミノ酸配列が異なっていた。心筋に高発現する Myocardin は、MKL とドメイン構造が類似している SRF コアクチベーターであるが、N 末端の異なるアイソフォームが存在することが明らかとなっている<sup>66</sup>。そのアイソフォームは機能的に異なっており、転写因子 myocyte enhancer factor 2 (MEF2) に対する結合性に差異が認められた。この違いにより、MEF2 依存性転写が制御される<sup>66</sup>。したがって、本研究で見いだされた MKL1 アイソフォームも N 末端の違いにより、他の転写因子や異なった種類の分子との相互

作用に影響を与え、異なった標的遺伝子の転写制御に寄与する可能性がある。また、Myocardin と MKL1 がヘテロダイマーを形成する報告があること<sup>67</sup>、MKL1 と MKL2 がヘテロダイマーを形成する可能性を示唆する報告があること<sup>26</sup>から、Myocardin/MKL ファミリー間相互作用を視野に入れて考える必要がある。MKL1 アイソフォーム発現の生理的意義を理解するためにも相互作用分子との親和性を調べることは重要である。

次に MKL1 によるニューロンにおける遺伝子発現制御と形態制御について考察する。本研究では、同定した MKL1 アイソフォームのうち、MKL1met が最も核に局在していた。前述の通り、MKL1met は、他のアイソフォームよりもアクチン結合モチーフである RPEL を一つ欠損している。RPEL モチーフを3つ有する MKL1 は、G アクチンと5つ結合するとの報告がある<sup>61</sup>。したがって、MKL1met は、RPEL モチーフが少ないため結合する G アクチン数が少ないかもしれない。そのため、他の MKL1 アイソフォームと比較して、核移行が起こりやすいと考えられる。また、核内においてもアクチンは、MKL1-SRF 介在性遺伝子発現を抑制する方向に働くことが知られている<sup>35</sup>。したがって、MKL1met が他のアイソフォームよりも SRF 介在性遺伝子発現を強く活性化するのは、核内においても結合する G アクチン数が少ないためであると示唆される。また、本研究で MKL1met の SRF 介在性遺伝子発現活性化と樹状突起複雑性の低下が相関関係にあることが明らかとなった。このことから、MKL1met が樹状突起形態を負に調節する遺伝子の発現を上昇させた結果、樹状突起複雑性低下を起こした可能性がある。最近、ヒトの MKL1 アイソフォームによる遺伝子発現制御の違いが報告された<sup>68</sup>。この報告では、筋線維芽細胞の TGF- $\beta$  シグナルによる分化は、N 末端の短い MKL1 アイソフォーム特異的なものであると述べている。本研究では、SRF 結合部位をタンデムに持つレポーターベクターによる SRF 介在性遺伝子発現の解析に留まっている。今後は MKL1met 特異的である具体的な標的遺伝子を同定できると、樹状突起形態の分子機構に迫ることができるかもしれない。また、MKL1met は、FLMKL1 に2つ存在する翻訳開始点のうち、下流から翻訳が開始されることにより産生される。本研究では、発現解析として、MKL1 アイソフォームの mRNA 発現に特化した解析を行っており、MKL1met の翻訳制御に関しては検討を行っていない。種々の細胞外リガンドによる MKL1met の産生制御、あるいは神経疾患病態発症に起因する MKL1met の発現上昇などが認められれば、MKL1met の果たす意義が明確になると考えられる。

本研究では、MKL1 がラット大脳皮質ニューロンにおける樹状突起・軸索に与える影響を評価した。序論で述べた通り、樹状突起スパインがシナプスの可塑性や病態に深く関与するため、今後は、MKL1 のスパイン形態に与える影響に関しても検討していく必要がある。アクチビンによってスパインの形態が制御されていることが報告されている<sup>69</sup>ことから、MKL1 とスパイン形

態とは密接に関連していると考えられる。

最後に、MKL と創薬について考える。MKL は、樹状突起形態を制御する<sup>56,64</sup>。序論で述べた通り、種々の精神疾患では、ニューロンの形態に異常が認められることが知られている。MKL の上流には、TGF- $\beta$  シグナルが関与することが知られており<sup>70</sup>、また、自閉症患者では TGF- $\beta$  発現量が減少している<sup>71</sup>。また、最近、自閉症スペクトラム患者において MKL2 遺伝子配列の多型や *de novo* 変異が認められたとの報告があり、MKL2 が自閉症スペクトラムの候補遺伝子である可能性がある<sup>72,73</sup>。これらのことをふまえると、MKL 分子が神経疾患の分子標的となる可能性がある。近年、Rho-SRF シグナル伝達を抑制する CCG-1423 と呼ばれる化合物が知られるようになった<sup>74,75</sup>。CCG-1423 については、SRE のレポーターアッセイによるランダムスクリーニングによって見出された化合物である<sup>74</sup>。その後継化合物である CCG-203971 については、ガンや、臓器の線維化を対象疾患として、モデル動物を用いた研究が進んでいる<sup>76,77,78</sup>。しかし、CCG-1423 や CCG-203971 を適用した神経疾患創薬基盤構築は未だ進んでいない。これら低分子化合物を動物に投与することで、新しい神経疾患モデル動物を作製できるかもしれない。一方、MKL1 の RPEL モチーフと単量体アクチンの結合様式については X 線構造解析も行われており<sup>39</sup>、また、本学大学院医学薬学研究部（薬学）の構造生物学研究室と当研究室との共同研究により、フリーの RPEL モチーフが持つ立体構造についても解析が行われた<sup>79</sup>。標的となる分子の詳細な立体構造が判明している場合、*in silico* による立体構造の情報を基にしたドラッグスクリーニングが可能になる。この方法では、ランダムスクリーニングに比べて、低濃度でターゲット分子の機能を抑制する化合物を見出しやすいメリットがある。また、転写因子は様々な機能に関与するため、転写因子自体を直接阻害するより、特定の機能に関与するコファクターに対する阻害作用を持つ薬剤の方が、予期せぬ副作用の危険性が少ないと考えられる。ゆえに、MKL は神経疾患に対する創薬の標的候補として魅力的なものになりうると考えている。

## 参考文献

- <sup>1</sup> Alberts B, Johnson A, Lewis j, Raff M, Roberts K and Walter P., *Molecular Biology of the Cell, 5th edition*. New York: Garland Science, 2007.
- <sup>2</sup> Desai A and Mitchison TJ., Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13, 83-117.
- <sup>3</sup> Pollard TD and Borisy GG., Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003, 112, 453-465.
- <sup>4</sup> Takai Y, Sasaki T and Matozaki T., Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 2001, 81, 153-208.
- <sup>5</sup> Hotulainen P and Hoogenraad CC., Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*, 2010, 189, 619-629.
- <sup>6</sup> Auld DS and Robitaille R., Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron*, 2003, 40, 389-400
- <sup>7</sup> Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., *Molecular Cell Biology. 4th edition*. New York: W.H. Freeman, 2000.
- <sup>8</sup> Lamprecht R and LeDoux J., Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5, 45-54.
- <sup>9</sup> Sdrulla AD and Linden DJ., Double dissociation between long-term depression and dendritic spine morphology in cerebellar Purkinje cells. *Nat Neurosci*, 2007, 10, 546-548.
- <sup>10</sup> Fiala JC, Spacek J and Harris KM., Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 39, 29-54.
- <sup>11</sup> Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- <sup>12</sup> de la Torre-Ubieta L and Bonni A., Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain. *Neuron*, 2011, 72, 22-40.
- <sup>13</sup> Black DL, Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72, 291-336.
- <sup>14</sup> Matlin AJ, Clark F and Smith CW., Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6, 386-98.
- <sup>15</sup> Treisman R., Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J*, 1995, 14, 4905-4913.
- <sup>16</sup> Miano JM., Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35, 577-593

- <sup>17</sup> Marais R, Wynne J and Treisman R., The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 1993, 73, 381-393.
- <sup>18</sup> Hill CS, Marais R, John S, Wynne J, Dalton S and Treisman R., Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell*, 1993, 73, 395-406.
- <sup>19</sup> Norman C, Runswick M, Pollock R and Treisman R., Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, 1988, 55, 989-1005.
- <sup>20</sup> Dalton S, Marais R, Wynne J and Treisman R., Isolation and characterization of SRF accessory protein. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci*, 1993, 340, 325-332.
- <sup>21</sup> Buchwalter G, Gross C and Wasylyk B., Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 2004, 324, 1-14.
- <sup>22</sup> Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI and Treisman R., Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 2003, 113, 329-342.
- <sup>23</sup> Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardoson JA, Small E, Krieg PA and Olson EN., Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*, 2001, 105, 851-862.
- <sup>24</sup> Mercher T, Coniant MB, Monni R, Mauchauffe M, Nguyen Khanc F, Gressin L, Mugneret F, Lablanc T, Dastugue N, Berger R and Bernard OA., Involvement of a human gene related to the *Drosophila* spen gene in the recurrent t(1:22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98, 5776-5779.
- <sup>25</sup> Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, Bouman D, Li Y, Mehta PK, Nizetic D, Kaneko Y, Chan GC, Chan LC, Squire J, Scherer SW and Hitzler JK., Fusion of two novel genes, *RBM15* and *MKLI*, in the t(1:22)(p13;q13) of acute megakryoblastic leukemia. *Nat Genet*, 2001, 28, 220-221.
- <sup>26</sup> Selvaraj A and Prywes R., Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *J Biol Chem*, 2003 278, 41977-41987.
- <sup>27</sup> Zaromytidou AI, Miralles F and Treisman R., MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on the serum response factor DNA-binding domain. *Mol Cell Biol*, 2006, 26, 4134-4148.
- <sup>28</sup> 田渕明子, アクチン結合タンパク質 RPEL/MAL ファミリーの転写コアクチベーターとしての機能と細胞形態制御. *生化学*, 2006, 78, 987-997.
- <sup>29</sup> Aravind L and Koonin EV., SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25, 112-114.
- <sup>30</sup> Hill C.S, Wynne J and Treisman R., The Rho family GTPases RhoA, Rac1, Cdc42Hs

regulate transcriptional activity by SRF. *Cell*, 1995, 81, 1159-1170.

<sup>31</sup> Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J and Treisman R., Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*, 1999, 98, 159-169.

<sup>32</sup> Cingolani LA and Goda Y., Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9, 344-356.

<sup>33</sup> Knöll B and Nordheim A., Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci*, 2009, 32, 432-442.

<sup>34</sup> Olson EN and Nordheim A., Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11, 353-365.

<sup>35</sup> Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B and Treisman R., Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science*, 2007, 316, 1749-1752.

<sup>36</sup> Pawłowski R, Rajakylä EK, Vartiainen MK and Treisman R., An actin-regulated importin  $\alpha/\beta$ -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of Mrtf-A. *EMBO J*, 2010, 29, 3448-3458.

<sup>37</sup> Nakamura S, Hayashi K, Iwasaki K, Fujioka T, Egusa H, Yatani H and Sobue K., Nuclear import mechanism for myocardin family members and their correlation with VSMC phenotype. *J. Biol. Chem*, 2010, 285, 37314-37323.

<sup>38</sup> Hayashi K and Morita T., Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factor A. *J Biol Chem*, 2013, 288, 5743-5755.

<sup>39</sup> Mouilleron S, Guettler S, Langer CA, Treisman R and McDonald NQ., Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL. *EMBO J*, 2008, 27, 3198-3208.

<sup>40</sup> Lundquist MR, Storaska AJ, Liu TC, Larsen SD, Evans T, Neubig RR and Jaffrey SR., Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling. *Cell*, 2014, 156, 563-576.

<sup>41</sup> Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschläger M, Rütther U and Nordheim A., Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J*, 1998, 17, 6289-6299.

<sup>42</sup> Ramanan N, Shen Y, Sarsfield S, Lemberger T, Schütz G, Linden DJ and Ginty DD. SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci*, 2005, 8, 759-767.

<sup>43</sup> Etkin A, Alarcón JM, Weisberg SP, Touzani K, Huang YY, Nordheim A and Kandel ER., A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron*, 2006, 50, 127-143.

- <sup>44</sup> Knöll B, Kretz O, Fiedler C, Alberti S, Schütz G, Frotscher M and Nordheim A., Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci*, 2006, 9, 195-204.
- <sup>45</sup> Li S, Chang S, Qi X, Richardson JA and Olson EN., Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol Cell Biol*, 2006, 26, 5797-5808.
- <sup>46</sup> Sun Y, Boyd K, Xu W, Ma J, Jackson CW, Fu A, Shillingford JM, Robinson GW, Hennighausen L, Hitzler JK, Ma Z and Morris SW., Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Mol Cell Biol*, 2006, 26, 5809-5826.
- <sup>47</sup> Somogyi K and Rorth P., Evidence for tension-based regulation of *Drosophila* MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev Cell*, 2004, 7, 85-93.
- <sup>48</sup> Han Z, Li X, Wu J and Olson EN., A myocardin-related transcription factor regulates activity of serum response factor in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, 12567-12572.
- <sup>49</sup> Li J, Zhu X, Chen M, Cheng L, Zhou D, Lu MM, Du K, Epstein JA and Parmacek MS., Myocardin-related transcriptional factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, 8916-8921.
- <sup>50</sup> Mokalled MH, Johnson A, Kim Y, Oh J and Olson EN., Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development*, 2010, 137, 2365-2374.
- <sup>51</sup> Wang DZ, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schratt G, Richardson JA, Nordheim A and Olson EN., Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 14855-14860.
- <sup>52</sup> Sasazuki T, Sawada T, Sakon S, Kitamura T, Kishi T, Okazaki T, Katano M, Tanaka M, Watanabe M, Yagita H, Okumura K and Nakano H., Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death. *J Biol Chem*, 2002, 277, 28853-28860.
- <sup>53</sup> Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Higashida C, Kimura K, Furuyashiki T, Arakawa Y, Birge RB, Nakamoto T, Hirai H and Narumiya S., ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 2002, 157, 819-30.
- <sup>54</sup> Marx R, Henderson J, Wang J and Baraban JM., Tech: a RhoA GEF selectively expressed in hippocampal and cortical neurons. *J Neurochem*, 2005, 92, 850-858.
- <sup>55</sup> Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H and Tsuda M., Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem*, 2002, 277, 35920-35931.
- <sup>56</sup> Shiota J, Ishikawa M, Sakagami H, Tsuda M, Baraban JM and Tabuchi A., Developmental expression of the SRF co-activator MAL in brain: role in regulating dendritic morphology. *J*

*Neurochem*, 2006, 98, 1778-1788.

<sup>57</sup> Ishimaru N, Tabuchi A, Hara D, Hayashi H, Sugimoto T, Yasuhara M, Shiota J and Tsuda M., Regulation of neurotrophin-3 gene transcription by Sp3 and Sp4 in neurons. *J Neurochem*, 2007, 100, 520-531.

<sup>58</sup> Muehlich S, Wang R, Lee SM, Lewis TC, Dai C and Prywes R., Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 2008, 28, 6302-13,

<sup>59</sup> Kalita K, Kharebava G, Zheng JJ and Hetman M., Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *J Neurosci*, 2006, 26, 10020-10032.

<sup>60</sup> Nakagawa K and Kuzumaki N., Transcriptional activity of megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) is repressed by SUMO modification. *Genes Cells*, 2005, 10, 835-850.

<sup>61</sup> Mouilleron S, Langer CA, Guettler S, McDonald NQ and Treisman R., Structure of a pentavalent G-actin\*MRTF-A complex reveals how G-actin controls nucleocytoplasmic shuttling of a transcriptional coactivator. *Sci Signal*, 2011, 4, ra40.

<sup>62</sup> Sholl DA, Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 1953, 87, 387-406.

<sup>63</sup> Posern G, Miralles F, Guettler S and Treisman R., Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J*, 2004, 23, 3973-3983.

<sup>64</sup> Ishikawa M, Nishijima N, Shiota J, Sakagami H, Tsuchida K, Mizukoshi M, Fukuchi M, Tsuda M and Tabuchi A., Involvement of the serum response factor coactivator megakaryoblastic leukemia (MKL) in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *J Biol Chem*, 2010, 285, 32734-32743

<sup>65</sup> Morita T, Mayanagi T and Sobue K., Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol*, 2007, 179, 1027-1042.

<sup>66</sup> Creemers EE, Sutherland LB, Oh J, Barbosa AC and Olson EN., Coactivation of MEF2 by the SAP domain proteins myocardin and MASTR. *Mol Cell*, 2006, 23, 83-96.

<sup>67</sup> Du KL, Chen M, Li J, Lepore JJ, Mericko P and Parmacek MS., Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17578-17586.

<sup>68</sup> Scharenberg MA, Pippenger BE, Sack R, Zingg D, Ferralli J, Schenk S, Martin I and Chiquet-Ehrismann R., TGF- $\beta$ -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *J Cell Sci*, 2014, 127, 1079-1091.

<sup>69</sup> Shoji-Kasai Y, Ageta H, Hasegawa Y, Tsuchida K, Sugino H and Inokuchi K., Activin

increases the number of synaptic contacts and the length of dendritic spine necks by modulating spinal actin dynamics. *J Cell Sci*, 2007, 120, 3830-3837.

<sup>70</sup> Hinson JS, Medlin MD, Lockman K, Taylor JM and Mack CP, Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292, H1170-1180.

<sup>71</sup> Okada K, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suda S, Suzuki K, Sugihara G, Matsuzaki H, Sugiyama T, Kawai M, Minabe Y, Takei N and Mori N., Decreased serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007, 31, 187-190.

<sup>72</sup> Holt R, Barnby G, Maestrini E, Bacchelli E, Brocklebank D, Sousa I, Mulder EJ, Kantojärvi K, Järvelä I, Klauck SM, Poustka F, Bailey AJ, Monaco AP et al., Linkage and candidate gene studies of autism spectrum disorders in European populations. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18, 1013-1019.

<sup>73</sup> Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, et al., Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 2012, 485, 242-245.

<sup>74</sup> Evelyn CR, Wade SM, Wang Q, Wu M, Iñiguez-Lluhí JA, Merajver SD and Neubig RR., CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6, 2249-2260.

<sup>75</sup> Evelyn CR, Bell JL, Ryu JG, Wade SM, Kocab A, Harzendorf NL, Showalter HD, Neubig RR and Larsen SD., Design, synthesis and prostate cancer cell-based studies of analogs of the Rho/MKL1 transcriptional pathway inhibitor, CCG-1423. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20, 665-672.

<sup>76</sup> Bell JL, Haak AJ, Wade SM, Kirchhoff PD, Neubig RR and Larsen SD., Optimization of novel nipecotic bis(amide) inhibitors of the Rho/MKL1/SRF transcriptional pathway as potential anti-metastasis agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23, 3826-3832,

<sup>77</sup> Johnson LA, Rodansky ES, Haak AJ, Larsen SD, Neubig RR and Higgins PD., Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF- $\beta$ -induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20, 154-65.

<sup>78</sup> Haak AJ, Tsou PS, Amin MA, Ruth JH, Campbell P, Fox DA, Khanna D, Larsen SD and Neubig RR., Targeting the myofibroblast genetic switch: inhibitors of myocardin-related transcription factor/serum response factor-regulated gene transcription prevent fibrosis in a murine model of skin injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349, 480-486.

<sup>79</sup> Mizuguchi M, Fujii T, Obita T, Ishikawa M, Tsuda M and Tabuchi A., Transient  $\alpha$ -helices in the disordered RPEL motifs of the serum response factor coactivator MKL1. *Sci Rep*, 2014, 4, 5224.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導を賜りました富山大学大学院 医学薬学研究部 分子神経生物学研究室・准教授 田渕明子先生に深く感謝致します。

そして適切なご指導、ご鞭撻を賜りました元富山大学大学院 生命融合科学教育部 分子神経生物学研究室・教授(現・富山大学学長補佐・名誉教授) 津田正明先生、富山大学大学院 生命融合科学教育部 分子細胞機能学研究室・教授 今中常雄先生に深く感謝致します。

また、ご意見、ご指導を賜りました富山大学大学院 医学薬学研究部 分子神経生物学・助教 福地守先生・元富山大学大学院 医学薬学研究部 分子神経生物学・特任助教(現・慶応義塾大学医学部 生理学研究室 特任助教) 石川充先生に感謝致します。

3DA Luc レポーターベクター、 $\Delta B1B2$  発現ベクターを恵与下さいました、英国 London Cancer Research Institute, Richard Treisman 博士に感謝いたします。

また、ca mDia 発現ベクターを恵与くださいました、京都大学 成宮 周先生に感謝いたします。

吸光度測定、定量 RT-PCR、および蛍光顕微鏡を用いた蛍光免疫染色の写真撮影には、富山大学生命科学先端研究センターの設備を使用させていただきました。ご協力くださいました施設の皆様に感謝いたします。

最後になりましたが、様々な点でご協力、並びに暖かく励ましてくださいました富山大学大学院 医学薬学研究部 分子神経生物学研究室の研究室員、卒業生の皆様に心より感謝いたします。

2014 年 9 月

塩田 惇

## 公表論文

本論文の内容は、以下の3報の主論文(1-3)において公表済である。

- 【1】 Tabuchi A, Estevez M, Henderson JA, Marx R, Shiota J, Nakano H, Baraban JM.  
Journal of Neurochemistry, 94, 169-180, 2005
  
- 【2】 Ishikawa M\*, Shiota J\*, Ishibashi Y\*, Hakamata T\*, Shoji S, Fukuchi M, Tsuda M,  
Shirao T, Sekino Y, Ohtsuka T, Baraban JM, Tabuchi A. (\*: equally contributed)  
FEBS Open Bio 3, 387-393, 2013
  
- 【3】 Ishikawa M\*, Shiota J\*, Ishibashi Y\*, Hakamata T\*, Shoji S, Fukuchi M, Tsuda M,  
Shirao T, Sekino Y, Baraban JM, Tabuchi A. (\*: equally contributed) Neuroreport 25,  
585-592, 2014