

氏 名 しおた じゅん
塩田 惇

学 位 の 種 類 博 士 (薬学)

学 位 記 番 号 富生命博甲第 69 号

学位授与年月日 平成 26 年 9 月 26 日

専 攻 名 生体情報システム科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学 位 論 文 題 目 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

論 文 審 査 委 員
(主査) 教 授 今中 常雄 (指導教員)
(副査) 教 授 大熊 芳明
(副査) 教 授 水口 峰之

【学位論文内容の要旨】

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、第 1 章では、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。第 2 章では、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、その発現パターンの解析を行った。第 3 章では、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。

《第 1 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》(文献 1)

線維芽細胞などによる解析で、MKL1 は核に移行して SRF 依存性転写を誘導することが明らかになっている。そのため本研究では、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 ΔB1B2 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。

《第2章 MKL1 新規アイソフォームの同定》(文献 2)

第1章で述べた通り、当研究室では脳における MKL ファミリーが持つ役割について解析を行ってきた。その結果、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。また、培養ラット大脳皮質ニューロンを TGF- β 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。

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、MKL1(met) 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、最初に、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, MKL1(met), 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 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、特に海馬の 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 MKL1(met) によって顕著に SRF 依存性転写が誘導された。MKL1(met) 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。

《第3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》(文献 3)

本章では、第2章において同定した MKL1 アイソフォームの脳における機能を明らかにする目的で研究を行った。最初に、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。第2章で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、MKL1(met)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、MKL1(met)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、MKL1(met)過剰発現下では樹状突起の突起数が減少した。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、MKL1(met)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。

《結論》

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。

《参考文献》

本要旨内容は、以下の論文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

【論文審査の結果の要旨】

ニューロンは、機能や構造を柔軟に変化させる神経可塑性を有する。この神経可塑性は、記憶学習等の高次脳機能発現の基盤と考えられている。神経可塑性には、アクチンなどの細胞骨格系タンパク質による神経形態変化と転写因子による遺伝子発現が重要である。そこで本研究では、その双方に関わると考えられるmegakaryoblastic leukemia 1 (MKL1)に着目した。線維芽細胞を用いた先行研究で、MKL1はRPELモチーフを介してアクチンと結合しているが、低分子量Gタンパク質Rhoの活性化によるアクチン再構成が引き金となり、アクチンと解離し核移行すること、核内で転写因子serum response factor (SRF)のコアクチベーターとして遺伝子発現を制御することが明らかとなっている。しかしながら、脳神経系におけるMKL1の役割については未解明な点が多い。そこで本研究では、最初にニューロンにおけるMKL1の細胞内局在変化と機能解析を行った。次にMKL1の詳細な機能解析のため、ラットMKL1クローニングに取り組み、同定したMKL1アイソフォームの発現パターンと機能解析に取りくんだ。研究内容と審査結果は以下のとおりである。

①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

培養ラット大脳皮質ニューロンにRho下流エフェクターであるmDiaの恒常活性化体を発現させ、MKL1の細胞内局在を調べた。その結果、MKL1の核移行が観察された。また、恒常活性化型mDiaの発現によりSRF依存性転写活性化が引き起こされたが、その活性化がMKL1ドミナントネガティブ変異体の発現により抑制された。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重要な役割を果たしていることを示した。

②MKL1新規アイソフォームの同定

MKL1の詳細な機能解析のため、ラットMKL1アイソフォームのクローニングを行った。その過程で、マウスのFLMKL1、Basic, SAP and coiled-coil domain (BSAC)に相当するアイソフォームの他、新規アイソフォームMKL1-elongated derivative of yield (MELODY)を同定した。これらアイソフォームはいずれも脳に高発現しており、脳領域によって異なる分布を示した。また、FLMKL1やMELODYは脳発達に従って発現量が減少するのに対し、海馬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、これらアイソフォームの発現ベクターを構築し、SRF依存性転写に与える影響について検討した。MKL1研究で汎用されている線維芽細胞NIH3T3細胞による解析の結果、全てのアイソフォームがSRF依存性転写を誘導した。その中でもFLMKL1に2つ存在する翻訳開始点のうち下

流の翻訳開始点から生じるとされているMKL1(met)が特にSRF依存性転写を強く誘導した。以上によりMKL1アイソフォームは脳で高発現し、脳の発達により異なる発現パターンを示すこと、MKL1(met)に強いSRF依存性転写誘導が見られることを示した。

③MKL1新規アイソフォームのニューロンにおける機能解析

ニューロンにおけるMKL1アイソフォームの機能を検討するために、上記で構築した発現ベクターと培養ラット大脳皮質ニューロンとを用いて検討を行った。その結果、MKL1(met)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、SRF依存性転写においては、MKL1(met)が強い誘導能を有していた。次に、神経形態に与える影響を検討したところ、MKL1(met)が樹状突起の数を減少させた。以上のことから、MKL1(met)はRPELモチーフが他のアイソフォームよりも1つ少ないため、核移行性が高く、強いSRF転写誘導能を持つと考えられた。また、MKL1が樹状突起の形態に影響を与えることを示した。

以上のように申請者は、①脳神経系においても Rho-MKL1-SRF のシグナル伝達系が機能していること、②ラット MKL1 の複数のアイソフォームを同定し、いずれも脳組織に高発現すること、脳発達に応じて異なる発現パターンを示すこと、SRF コアクチベーター能を有すること、③核局在性の高いアイソフォームは、SRF 依存性転写と樹状突起形態への効果が高いことを明らかにした。本研究成果は、転写因子の分子多様性による遺伝子発現微調整の意義やそれに関連した神経機能発現を理解する上で重要である。また、これらの研究内容は国際学術誌に掲載され、国内外の評価も高い。

主査および副査は、申請者塩田 惇氏に面接試験ならびに博士論文内容に関する審査を行い、博士（薬学）の学位授与に値すると判定した。

なお、本学位論文は、富山大学大学院生命融合科学教育部：津田正明教授、ならびに津田教授退職後は富山大学大学院医学薬学教育部（薬学）：田淵明子准教授の指導のもとに行なわれたものである。