

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	780 千円
研究代表者 : 田渕 明子	所属 : 学術研究部薬学・和漢系	職位 : 准教授
研究題目 : 転写因子 MKL によるシナプスから核へのシグナリング機構の解明		

研究概要

記憶学習などの高次脳機能には、神経活動依存的な遺伝子発現が必要である。申請者らは、遺伝子発現の司令塔である転写因子 MKL2 が神経活動依存的にシナプスから核へと移行することを発見した。神経活動依存的な遺伝子発現の主役としてすでに転写因子 CREB とそのコアクチベーター CRTC1 が知られているが、本研究は、その既知の経路に加え、新規経路 SRF とそのコアクチベーター MKL を浮上させ、新たな記憶学習の基礎となる神経可塑性の分子機構を提示することになると考えた。

神経活動依存的な遺伝子発現は、20 年近く解析され続けた脳研究における大きな課題の一つであるため、本研究はその研究の流れを大きく変える転機になると考える。以上のことは、学術的波及効果に大きく影響する。また、本研究を将来的に発展させると、MKL の活性化を狙った神経疾患治療薬にも応用が期待できる。

成果要約

培養大脳皮質神経細胞において KC1 による脱分極やビキュキュリン/4AP によるシナプス活性化を引き起こすと、MKL2 が核に移行する。この核移行には、L 型カルシウムチャネルあるいはグルタミン酸受容体を経由する Ca^{2+} 流入と、 Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが関与することを見いだしている。そこで本研究では、野生型カルシニューリンの発現ベクターおよび、恒常活性化型カルシニューリンの発現ベクターを作製し、その影響について検証した。その結果、野生型カルシニューリン、恒常活性化型カルシニューリンを NIH3T3 細胞に過剰発現させると、MKL2 の核移行が促進される傾向を見いだした。MKL2 には、MKL1 と同様、核移行に重要な脱リン酸化部位と予想されるアミノ酸残基が存在していたためアラニン置換した変異体を作製し、核局在化に与える影響や遺伝子発現に与える影響を検証したが、野生型と比較して顕著な変化は見いだされなかった。MKL1 は、高度にリン酸化されているが、MKL2 のリン酸化状態については未解明な点が多い。今後は、MKL2 がカルシニューリンにより直接脱リン酸化されることの確認に加え、核移行に重要な他の脱リン酸化部位の同定を行う必要がある。また、シナプス活動により核移行する転写因子は、ダイニン複合体により輸送されるとの報告がある。その類似性を考慮し、核移行に重要な分子モーターを明らかにするため、ダイニン複合体の一つであるダイナミチンの発現ベクターを構築し、その役割についても検証中である。

さらに、*In vivo* における MKL2 の核移行の検証も行った。マウスに神経活動を活性化する刺激（痙攣誘発）を行った。その後、切片を作製、免疫染色を行った。その結果、MKL2 が核移行する傾向を認めた。

以上のことから、カルシニューリンが作用することは MKL2 の核移行を促進することにつながり、生きた脳内においても MKL2 の動態がダイナミックに変化することが示唆される。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】 学会発表 1. Daisuke Ihara, Hiroki Tanabe, Shinnosuke Kato, Shiori Imanishi, Aya Kosaka Hiroyuki Sakagami, <u>Akiko Tabuchi</u> 「SRF 転写コアクチベーターMRTFB の神経活動依存的核移行制御」 2019 年 7 月 Neuro2019 新潟 2. 伊原 大輔、田邊 広樹、今西 詩織、小坂 彩、佐野 友香里、阪上 洋行、加藤 真之佑、<u>田淵 明子</u>「シナプスに存在する転写活性化因子 MRTFB の神経活動依存的な核移行と遺伝子発現制御機構に関する解析」2019 年 11 月 日本薬学会北陸支部第 131 回例会金沢 3. Daisuke Ihara, Yuya Yamazaki, Natsumi Satou, Mamoru Fukuchi, Masaaki Tsuda, <u>Akiko Tabuchi</u> 「Functional analysis of gene mutation of SRF coactivator MRTFB which was found in a patient with autism spectrum disorders」 2019 年 12 月 Toyama Forum for Academic Summit on “Dynamic Brain” 富山</p>																																						
<p>経費の 執行状況</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="320 1016 810 1070">区 分</th> <th data-bbox="815 1016 1114 1070">執行額 (円)</th> <th data-bbox="1118 1016 1450 1070">備 考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="3" data-bbox="320 1077 1450 1115">【物品費】</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1122 810 1160">実験動物</td> <td data-bbox="815 1122 1114 1160">73,054 円</td> <td data-bbox="1118 1122 1450 1160" rowspan="4">本助成金は実験を遂行するための左記の消耗品費用に充てた。</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1167 810 1205">遺伝子工学試薬</td> <td data-bbox="815 1167 1114 1205">129,529 円</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1211 810 1249">細胞生物学試薬</td> <td data-bbox="815 1211 1114 1249">524,140 円</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1256 810 1294">プラスチック製品等</td> <td data-bbox="815 1256 1114 1294">53,277 円</td> </tr> <tr> <td colspan="3" data-bbox="320 1301 1450 1339">【旅費】</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1346 810 1384">なし</td> <td data-bbox="815 1346 1114 1384"></td> <td data-bbox="1118 1346 1450 1384"></td> </tr> <tr> <td colspan="3" data-bbox="320 1391 1450 1429">【謝金】</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1435 810 1473">なし</td> <td data-bbox="815 1435 1114 1473"></td> <td data-bbox="1118 1435 1450 1473"></td> </tr> <tr> <td colspan="3" data-bbox="320 1480 1450 1518">【その他】</td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1525 810 1563">なし</td> <td data-bbox="815 1525 1114 1563"></td> <td data-bbox="1118 1525 1450 1563"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="320 1928 810 1964">合計</td> <td data-bbox="815 1928 1114 1964">780,000 円</td> <td data-bbox="1118 1928 1450 1964"></td> </tr> </tbody> </table>	区 分	執行額 (円)	備 考	【物品費】			実験動物	73,054 円	本助成金は実験を遂行するための左記の消耗品費用に充てた。	遺伝子工学試薬	129,529 円	細胞生物学試薬	524,140 円	プラスチック製品等	53,277 円	【旅費】			なし			【謝金】			なし			【その他】			なし			合計	780,000 円			
区 分	執行額 (円)	備 考																																					
【物品費】																																							
実験動物	73,054 円	本助成金は実験を遂行するための左記の消耗品費用に充てた。																																					
遺伝子工学試薬	129,529 円																																						
細胞生物学試薬	524,140 円																																						
プラスチック製品等	53,277 円																																						
【旅費】																																							
なし																																							
【謝金】																																							
なし																																							
【その他】																																							
なし																																							
合計	780,000 円																																						