

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06771

研究課題名(和文) PSD局在性核移行タンパク質を介したシナプス-核シグナリングの解析

研究課題名(英文) Analyses for synapse-nuclear signaling via a PSD-localizing transcription factor

研究代表者

鈴木 龍雄 (Suzuki, Tatsuo)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：80162965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはシナプス後部局在型Gtf2i splice variant mRNAを同定した。ついで、ラット脳内に、シナプス後部局在型のGtf2i mRNAの5'UTR (5'側非翻訳領域)中の限定配列に対して特異的に結合するタンパク質を4種同定した。このことを手がかりとして、その5'UTRによるシナプス後部でのGtf2iタンパク質の合成制御の仕組みを調べた。その結果、mRNAがシナプス後部に局在する転写因子、Gtf2i、のシナプス後部での局所翻訳はその5'UTR部分の特定領域とそれに対する複数の特異的結合タンパク質との相互作用により、多重制御されている事が明らかになった。

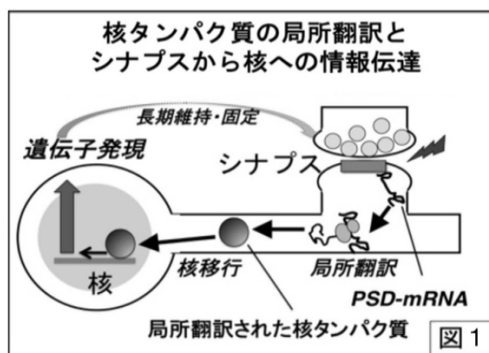
研究成果の概要(英文)：We identified a Gtf2i splice variant mRNA that is specifically localized at the postsynaptic sites. We also identified in the brain four proteins that interact with a limited sequence in the 5'UTR of postsynaptically localizing Gtf2i mRNA. Then we studied mechanism(s) for regulation of local protein synthesis of the Gtf2i protein at the postsynaptic sites. Our experiment suggests that expression of postsynaptically localized Gtf2i proteins are under control of multiple protein factors at the postsynaptic site via interaction with 5'UTR of postsynaptically localizing Gtf2i mRNA.

研究分野：神経科学

キーワード：postsynaptic density local protein synthesis splice variants synaptic plasticity transcription factor mRNA Gtf2i dendrite

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ラット大脳皮質から精製したシナプス後肥厚部 (PSD) に mRNA が多数結合していることを発見し、この一群の mRNA を Dem (dendritic mRNA) と名付けた(1)。Dem (ここではわかりやすく *PSD-mRNA* と呼ぶ) は多様なタンパク質をコードする数千種の mRNA から構成されていたが、典型的なシナプスタンパク質や細胞質タンパク質のみならず、いわゆる“核タンパク質”をコードするものも多数含まれていた(2)。このことから、研究代表者は、一般的ルールとして、「刺激に応じてシナプスで局所翻訳されたいわゆる“核タンパク質”がシナプスから核への情報伝達分子として核へ移行し、核においてシナプス可塑性発現、特に、長期シナプス可塑性の発現、に必要な遺伝子の発現を調節している」可能性を考えた (図1)。



転写因子 Gtf2i (general transcription factor 2i) mRNA はそれら核タンパク質をコードする *PSD-mRNA* のひとつである。ヒト染色体上の Gtf2i 遺伝子を含む領域の欠失は Williams Beuren 症候群 (WBS, 自閉症スペクトラム障害 (ASD) に分類される神経発達障害) とリンクしていることから、Gtf2i 遺伝子は WBS の有力な原因遺伝子候補とされている。さらに、Gtf2i を含む領域の duplication を持つ患者では、欠失患者とは異なる症候の神経発達障害がみられたことから、Gtf2i の発現量が症状の発現パターンに影響を与えることが示唆されている。

最近、ASD の症候発生に、抑制シナプスを介する神経興奮制御の不全が関係しているとの報告が出された (3)。WBS (ASD) の原因遺伝子候補 Gtf2i は Dlx5/Dlx6 ホメオボックス遺伝子の発現を制御して、抑制性ニューロンの分化や成熟に重要な役割を果たすことが示唆されている (4) ので、「シナプス後部で局所翻訳された Gtf2i が核に移行し、核での Dlx5/Dlx6 などの新規遺伝子発現を介して抑制系ニューロンを制御して特定シナプス機能の強化や減弱に関わっている」可能性も考えられる。

シナプスでの局所翻訳系と ASD の症状発現の間には何らかの関連があることは最近の論文で示唆されている (5)。つまり、ASD 患者で局所翻訳の制御因子 (TSC, PTEN, FMRP 等) の変異が見つかっていること、ASD モデルマウスで局所翻訳の亢進が見られること、局所翻訳の阻害により知覚や社会行動の異常が改善することなどである。さらに研究代表者らの最近の解析によ

り、Gtf2i mRNA 配列上に局所翻訳制御系のタンパク質に対する結合モチーフがあることが明らかになった(未発表)。これらの事柄は、上記のシナプス可塑性発現維持モデルを支持する。

全体的に考えて、シナプス後部の Gtf2i mRNA, Gtf2i の生理機能/神経系に対する作用、局所翻訳系、シナプス長期可塑性、ASD 症候、興奮系-抑制系バランスとの間にリンクが存在している可能性が高い。それを整理して、Gtf2i がシナプス可塑性に関わるメカニズムとして以下のような作業仮説(図1参照)を考えるに至った。「シナプス入力依存性にシナプス後部で局所翻訳された Gtf2i は核へ移行し、新たな遺伝子発現を誘導して興奮系-抑制系シナプスのバランスを修飾してシナプス可塑性の長期維持と神経学的症候の発現に影響を与える」。この新規仮説の検証を行うため、本計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

正常な脳機能が発揮されるためには、刺激を受けたシナプスに特異的な修飾が長期間持続することが必要であるが、この仕組みの詳細は明らかになっていない。研究代表者らは、単離したシナプス後肥厚部 (PSD) に転写因子 Gtf2i の mRNA が結合していることを発見した。そして「シナプス後部に局在する転写因子 Gtf2i-mRNA が入力刺激に応じて局所翻訳され、合成された Gtf2i タンパク質がシナプスから核へ移行してそこで新たな遺伝子発現を誘導し、シナプス可塑性の長期発現の維持に関わる」という作業仮説を考えるに至った。本研究では、この仮説を実験によって様々な角度から検証し、シナプス後部由来転写因子 Gtf2i によるシナプス可塑性発現の維持の仕組みを分子レベルで明らかにする。さらに、mRNA が PSD に存在する他の分子についても分析し、シナプスから核へのシグナリングの一般的な仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ラット脳に発現している Gtf2i 遺伝子, mRNA, タンパク質情報の明確化と発現の解析

rat Gtf2i cDNA のクローニング, splice variants の同定, in situ hybridization による Gtf2i splice variant mRNA の局在解析, 特に valiant 依存性の dendrite 局在の同定, 5'UTR の解析による転写開始部位およびプロモーター部位の解析, Gtf2i タンパク質の脳内発現部位の解析(免疫組織化学, 細胞分画の western blot 解析), およびカイニン酸投与による神経興奮誘導における Gtf2i mRNA および protein の発現誘導と神経細胞内局在の変化の解析。

(2)シナプス後部の局所翻訳制御因子と Gtf2i とのリンクの証明

Gtf2i mRNA 配列中に局所翻訳制御因子と

の結合モチーフをサーベイする。このモチーフを介した結合を検証する。さらにこのモチーフを欠損した Gtf2i との結合無効化による検証を行う。逆に、シナプス後部局在型の Gtf2i variant mRNA 中の 5'UTR 配列中の限定領域に対する結合タンパク質(局所翻訳制御因子候補)をラットおよびマウス脳内ライセート中にサーチし、同定する。方法は、ビオチンラベルの bait を作成し、脳ライセートとインキュベーションして結合コンプレックスを streptavidin ビーズに回収する。次いで、回収タンパク質を電気泳動して分離した後、バンドを切り出して質量分析法にてタンパク質種を同定する。その後、相互作用の領域特異性をさらに調べる。

(3)シナプス後部 Gtf2i の局所翻訳活性制御の解析

シナプス後部に局在する Gtf2i mRNA が実際に局所翻訳されるかどうかを検証する。また、上記に同定したシナプス後部局在型の Gtf2i variant mRNA 中の 5'UTR 配列中の特異的限定領域による Gtf2i の局所翻訳活性への影響を明らかにする。その具体的方法：シナプス後部に局在する Gtf2i mRNA の Gtf2i の種々の領域の 5'UTR とそのダウストリームにルシフェラーゼを組み込んだ人工ベクターを作成し(市販のキットを用いる)、*in vitro* の系でタンパク質合成活性を測定する(培養細胞などを用いるアッセイ系よりも結果の解釈がシンプルと考えて *in vitro* の系を採用)。使用するアッセイ系は、利用可能な少なくとも2種を用いる。アッセイ系によって含まれる、5'UTR と相互作用タンパク質(翻訳制御因子)が異なる可能性があるからで、制御の仕組みを考える上で有用である。

4. 研究成果

(1)Gtf2i mRNA において複数の splice variant を新たに同定した。興味深いことに、ORF 領域以外にも 5'UTR 領域に比較的多数の splice variants を発見した。脳切片を用いた、それらの *in situ hybridization* により、シナプス後部に局在型の Gtf2i splice variant mRNA 1 種を同定した。さらに、ラット脳ライセート中に、シナプス後部局在型の Gtf2i mRNA の 5'UTR 部分に対する結合タンパク質 4 種を最終的に質量分析、さらに western blotting により同定した。いずれのタンパク質も翻訳制御に実際に関わる可能性を有するものであった。そのうち、今回は1種の結合タンパク質について、シナプス後部局在型 Gtf2i splice variant mRNA の 5'UTR 領域との結合特性について詳細に調べ、まず、5'UTR 配列中の 64 塩基(ラット)からなる結合最小責任領域を同定した。マウスの場合は 60 塩基であった。次に *in vitro* の rabbit reticulocyte 翻訳活性測定系を用いて、Gtf2i mRNA の 5'UTR 由来の種々の領域の、その下流のタンパク質合成活性に与える影響を系統的に検討した。その結果、先に同定した 64 塩基(ラ

ット)の結合最小責任領域は、その下流にコードされたタンパク質の合成活性を抑制する事が明らかになった。このことは、Gtf2i mRNA の 5'UTR 64 塩基(ラット)の結合最小責任領域が rabbit reticulocyte 中の特異的結合タンパク質と相互作用することにより、下流にコードされるタンパク質の合成を負に制御することを示している。当該結合タンパク質は rabbit reticulocyte 中に存在していることを確認した。同様のタンパク質合成活性の実験を、HeLa 細胞ライセートを用いた翻訳活性測定系を用いて行った。HeLa 細胞ライセート中には rabbit reticulocyte 中には存在しない 5'UTR 結合タンパク質が存在していて、今回発見した他の 5'UTR 結合タンパク質を考慮して 5'UTR 部分による Gtf2i タンパク質合成活性の制御のメカニズム解明に近づくことが出来るからである。64 塩基(ラット)の結合最小責任領域は HeLa 細胞を用いたアッセイ系で下流のタンパク質合成活性に、rabbit reticulocyte を用いた系とは異なる効果を示した。詳細は省略するが、系統的な解析の結果、以下の事が示唆された。“シナプス後部局在型 Gtf2i splice variant mRNA のシナプス後部局所翻訳(合成)はシナプス後部においてその 5'UTR 部分の特定領域とそれに対する複数の特異的タンパク質との相互作用により、多重に制御されている。”(図2)

(2) Gtf2i の他にも mRNA が PSD に結合している他種の遺伝子についても、今回と同様な解析を行い、有意義な結果を得ている(未発表データ)。

(3)今後の展望と研究の意義

本研究によって、シナプス後部に mRNA が存在する転写因子という、きわめて特殊なシナプスタンパク質の機能発現の様式が明らかにされつつある。おそらく図1に示したように、シナプス入力に応じて転写因子タンパク質が局所翻訳され、核移行して核でダウストリームの遺伝子発現を誘導ないし修飾する。そのことにより、さらにダウストリームへ影響を与えると同時に、自身にもフィードバックを受けて、シナプス可塑性の発現



に繋がるという流れがあるのであろう。Gtf2i の他の同様転写因子についても類似の結果がえられたので、Gtf2i に限定した機能発現様式ではなく、この種の転写因子に一般化できると予想される。この様式の機能破綻が起きたときにはシナプス可塑性の異常が

起き、精神的な異常や行動の異常が起きると想像されるが、シナプス後部局在型の Gtf2i の機能異常がどのような精神や行動の異常を引き起こすのか、どんな病気・病態の原因となっているのかについてますます興味もたれるこの研究成果をえて、次のステップの研究に移行する計画である。このことを見越して、以前より、Gtf2i 研究は上海交通大学バイオ X 研究院の Li Weidong 教授と共同研究体制を組んでいた。Li 研究室では、遺伝子改変マウスを用いて精神疾患研究を行っている。既にシナプス後部局在型 Gtf2i mRNA の 5' UTR 特定領域を欠損したマウスの作成に取りかかっている。この領域は、本研究で明らかになった様に、Gtf2i のシナプス後部局所翻訳に影響を与えるし、文献的には Gtf2i mRNA のシナプス後部へのターゲティングにも影響を与えている可能性が示唆されている。いずれにしても、この領域を欠損させることにより、シナプス後部での Gtf2i タンパク質の合成に影響が出ると考えられる。この後は、作出されたマウス個体の行動やフェノタイプ、脳の形態や機能の解析を行い、精神疾患や知能との関係を明らかにしてゆく計画である。

<引用文献>

- (1) Tian, Q. B., Nakayama, K., Okano, A. and Suzuki, T. (1999) Identification of mRNAs localizing in the postsynaptic region. *Molecular Brain Research*, **72**, 147-157.
- (2) Suzuki, T., Tian, Q. B., Kuromitsu, J., Kawai, T. and Endo, S. (2007) Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neuroscience Research*, **57**, 61-85.
- (3) Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M. and Gillberg, C. (2013) Progress toward treatments of synaptic defects in autism. *Nature Medicine*, **19**, 685-694.
- (4) Poitras, L., Yu, M., Lesage-Pelletier, C. et al. (2010) An SNP in an ultraconserved regulatory element affects Dlx/Dlx6 regulation in the forebrain. *Development*, **137**, 3089-3097.
- (5) Kelleher, R. J., 3rd and Bear, M. F. (2008) The autistic neuron: troubled translation? *Cell*, **135**, 401-406

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yoshinori Shirai, Weidong Li and Tatsuo Suzuki (Role of splice variants of Gtf2i, a transcription factor localizing at postsynaptic sites, and its relation to neuropsychiatric diseases.) *Int. J. Mol. Sci.* 2017, **18**, 411, 2017, 査読有 doi: 10.3390/ijms18020411 (invited review).

- ② Yoshinori Shirai, Masahiko Watanabe, Hiroyuki Sakagami and Tatsuo Suzuki (Novel splice variants in the 5' UTR of Gtf2i expressed in the rat brain: alternative 5' UTRs and differential expression in the neuronal dendrites.) *J. Neurochem.* 134, 578-589, 2015, 査読有 doi: 10.1111/jnc.13136

[学会発表] (計5件)

- ① Yoshinori Shirai, Weidong Li, Katsuhiko Tabuchi and Tatsuo Suzuki (Translational regulation of Gtf2i mRNA in neuronal dendrites by Pur α , an RNA binding protein, 精神疾患関連遺伝子 Gtf2i mRNA の 5' UTR および RNA 結合タンパク質 Pur α による神経細胞樹状突起での局所翻訳調節) 第 41 回日本神経科学学会, 2018.
- ② Yoshinori Shirai, Weidong Li, Tatsuo Suzuki (Alternative 5' UTRs of Gtf2i mRNA, localization in neuronal dendrites via 5' UTR, and identification of RNA binding proteins specifically associate to the dendritic 5' UTR. 精神疾患関連遺伝子 Gtf2i mRNA の 5' UTR 依存的な神経細胞樹状突起への局在と 5' UTR 特異的な RNA 結合タンパク質の同定) 第 40 回日本神経科学学会, 2017.
- ③ Yoshinori Shirai and Tatsuo Suzuki (2016) Novel splice variants of Gtf2i expressed in the neuronal dendrites of rat brain. Neuroscience 2016 SFN, 2016.
- ④ Yoshinori Shirai and Tatsuo Suzuki (A PSD-attached mRNA coding ASD-related gene Rail: Alternative 5' UTRs, mRNA localization to dendrites and RNA binding proteins. PSD に付随する ASD 関連遺伝子 Rail mRNA: alternative 5' UTRs, mRNA の樹状突起への局在と RNA 結合タンパク質) 第 39 回日本神経科学学会, 2016.
- ⑤ Yoshinori Shirai and Tatsuo Suzuki (Alternative 5' UTRs of PSD attached mRNAs of ASD-related genes and their differential expression in the rat brain. PSD に局在する ASD 関連遺伝子 mRNA の alternative 5' UTRs と脳での発現) 第 38 回日本神経科学学会, 2015.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
鈴木 龍雄 (SUZUKI, TATSUO)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号: 80162965

(2)研究分担者

白井 良憲 (SHIRAI, YOSHINORI)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号： 70342798

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

李 衛東 (Li Weidong)
上海交通大学・バイオ X 研究院・教授