

成体脳内における遺伝子転写制御因子の機能解明

京都大学大学院医学研究科生体情報科学講座

安部 健太郎

1. はじめに

生体脳内の神経細胞における各種遺伝子の発現は環境からの入力情報や動物の活動に応じて柔軟に変化することが知られており、それらが神経系の可塑的变化に重要な役割を果たすことが知られる。また、これらのメカニズムの破綻は、様々な精神疾患の原因となることが近年注目されている。このような柔軟な遺伝子発現の変化は、それらの転写を制御する転写因子の柔軟な活性変化によって担われていると考えられる。現在、トランスクリプトーム解析が発展し、遺伝子の発現が変化した結果については、多くの知見が得られている。一方で、遺伝子の発現はそれを制御する複数の転写制御因子の活性の総体として現れるため、生体内細胞が刺激に応じて可塑的に遺伝子発現を変化させる機構を明らかにするためには、生体内において複数の転写因子の活性を定量的に明らかにする必要がある。主として生体外で培養した神経細胞を使用したこれまでの解析により、神経活動依存的な遺伝子転写活性を有する転写因子がいくつか同定されているものの、生体内において転写因子の活性を定量的に比較し、その生理的な意義について解析することは技術的に困難であった。動物成体脳内における内在分子の転写因子活性を明らかにする新規手法を開発することは、記憶・学習など生理的な神経可塑性のメカニズムの解明や、精神疾患などの病態の解明、治療法・予防法の開発に繋がることが期待される。

2. 方法

申請者はこれまでに、細胞内在の転写活性依存的に外来レポーター遺伝子の発現をおこさせることで、内在の転写活性を定量的に評価することを可能にする新規な転写因子活性レポーターウイルスベクター系を開発している（文献 1）。本研究では、以上の新規レポーターウイルスベクター系を使用し、成体脳内において 50 種の転写因子の活性を体系的かつ定量的に計測し、動物の安静時状態または生理的な感覚情報入力後における多数の内在転写因子活性の総体である転写因子活性プロファイルを取得・比較した。実験対象動物として、申請者が開発したレポーターウイルスを感染させた CD-1(ICR)マウス（9 週齢）を用いた。レポーターウイルス感染マウスは、感覚情報入力の後、各脳部位（海馬体、大脳皮質、基底核）を切り出し、それぞれより total RNA を精製した後、レポーター遺伝子の発現量を特異的プライマーによるリアルタイム定量 PCR 法により定量的に解析した。本研究では、神経活動依存的な遺伝子発現変化が迅速に誘導されることが報告されている、マウス新規環境暴露後（文献 2）の転写因子活性変化を明らかにした。各転写因子の活性は数値化・グラフ化し、転写因子活性プロファイルとした（文献 1）。初代培養した大脳皮質細胞は胎生 16 日の CD-1 マウス大脳皮質から得た。組織を切り出し、細胞単離後に培養ディッシュ上で B27 supplement と Neurobasal medium を用い培養し、その後レポーターウイルスを感染させ、培養 14 日後の細胞を薬理的に刺激し、total RNA を精製した（文献 3）。

3. 結果

レポーターウイルスを感染させた CD-1(ICR)マウス（9 週齢）を用い、52 種の転写因子活性を定量評価した。52 種類のうち 16 種類の転写因子は研究期間内において十分な個体数を得られなかったため、解析の対

象から除外し、36種類の転写因子を解析の対象とした。マウスをホームケージ群と新規環境暴露群とに分け、大脳皮質、基底核、海馬体においてそれぞれの転写因子活性の比をとった。ホームケージ群 (n > 3 以上) と比べ新規環境暴露 45 分後群 (n > 3) において、大脳皮質、基底核、海馬体のいずれかにおいて 2 倍以上の活性の上昇がみられる転写因子は 36 種中 15 種であった。これらの転写因子の中には、培養細胞系および生体内においてこれまでに神経活動依存的な活性変化の報告がない転写因子も含まれた。また、培養細胞系においては代表的な神経活動依存的な活性を示すことが知られており、生体内においても本実験と同条件において活性の変化が起こることが報告されている転写因子 SRF (文献 2) に対するレポーターは新規環境暴露群においてホームケージ群と比較し大脳皮質において 2.3 ± 1.5 倍、基底核において 2.4 ± 0.8 倍、海馬体において 1.5 ± 0.4 倍の活性変化がみられた。また、同様に神経活動依存的な転写因子として広く知られている転写因子 CREB に対するレポーターは大脳皮質において 12.3 ± 4.3 倍、基底核において 1.1 ± 0.4 倍、海馬体において 4.5 ± 2.0 倍の活性変化がみられた。このことは、これまでに他の方法で得られた知見と同等な結果が本手法でも再現されることを示しており、本手法の有用性を支持している。また、活性が 1/2 以下に減少する転写因子は 36 種中 9 種であり、2 倍以上の上昇も減少も示さなかったのは 36 種中 11 種類であった。

新規環境暴露は幅広い脳領域において神経活動の亢進を誘発すると考えられる。一方で、神経活動以外の要因によっても転写因子の活性は変化することが想定される。そこで、純粋に神経活動依存的な転写因子活性を明らかにし、それとの比較により生体内における経験依存的な転写因子活性化のメカニズムを明らかにすることを試みた。神経活動依存的な転写因子活性変化を明らかにするために、生体外において分散培養した神経細胞を用い、生体内の神経細胞と培養した神経細胞における活性の違いを探索した。培養した大脳皮質神経細胞の初代培養系において、GABA 受容体阻害薬ビキュキュリンの培地添加によって神経活動の亢進を誘発し、生体内と同一手法により転写因子活性の変動を計測した。52 種の転写因子のうち、培養系と生体内系とともに解析に十分なデータが得られたものは 32 種であった。培養細胞系において神経活動誘発時と未処理時を比較した結果、転写因子 SRF は 1.9 ± 0.4 倍、転写因子 CREB は 2.8 ± 0.2 倍の活性変化がみられ、生体内の大脳皮質細胞と類似した挙動を示すことが認められた。一方で、培養系のみで 2 倍以上の高い変化を示し、生体内では変化がみられない転写因子が 32 種類中 4 種あり、生体内のみにおいて 2 倍以上の高い活性変化を示す転写因子が 32 種類中 5 種であった。

次に、脳の部位における転写因子活性の違いを探索した。ホームケージ群のサンプルを使用し、安静時における転写因子活性を大脳皮質、基底核、海馬体の間で比較した。最も活性が低い部位と最も活性が高い部位の違いが 2 倍以上あった転写因子は 36 種中 22 種で、4 倍以上あった転写因子は 36 種中 9 種であった。最も活性に違いがみられた転写因子では、大脳皮質と海馬体において 11.8 倍の違いがみられた。

4. 考察

本研究では、これまで解析することが困難であった成体脳内の転写因子活性を定量的に評価する新規手法をマウス成体脳に応用し、経験依存的な多数の転写因子活性の変化を定量的に明らかにすることに成功した。本研究の成果により新規環境暴露後に多くの転写因子においてその活性がダイナミックに変動することが明らかになった。このような転写因子活性の変動は細胞が発現する遺伝子セットを大きく変化させ、神経系の可塑的な変化に影響すると考えられる。現在、それらの転写因子の活性化を人為的に操作し、脳神経の可塑的な変化にどのような影響を及ぼすのかを検討している。

また、培養細胞で得られたデータとの比較により、生体内と培養系の違いが明らかになった。培養細胞系と生体内ではさまざまな要因が異なる。例えば、遠方からの神経投射や、局所回路、グリアの影響や内分泌系・血管系とのかかわりなどが生体内では存在し、培養系で観察される神経活動依存的なものに加え、それら生体内特異的な要因により脳内の経験依存的な転写因子活性は制御されると想定される。これまで広く行われている培養神経細胞を用いた解析では、生体内特異的な要因は解析できておらず、本研究で明らかにした培養系と生体内での違いは、脳内の転写制御因子の生理的な機能を明らかにする上で重要であり、今後より詳細にそのメカニズムを明らかにする必要があると考えられる。

さらに、部位間における転写因子活性プロファイルの比較から、脳部位により転写因子の活性が異なることが明らかになった。これは部位における細胞内在の遺伝子発現の違いや、神経接続する細胞の違い、グリア活性の違いなどを反映していると考えられる。本研究では、大まかに大脳皮質、基底核、海馬体の比較を行ったが、今後は免疫染色や1細胞RNA精製など、1細胞レベルでの転写活性を明らかにすることで、経験依存的な転写因子活性変化の神経機構、分子機構が明らかになると考えられ、現在それらに取り組んでいる。

本研究では、研究代表者が開発した実験手法により、成体脳内における多数の転写因子活性の定量的な評価をすることができることが確認された。本手法は、発達・学習などに関わる神経系の可塑的な変化を担う分子機構を明らかにすることに貢献するとともに、病態モデルマウスなどで転写因子活性の異常を明らかにし、それらを相補する治療用の開発などを通じ、精神疾患に対する新規治療法・予防法の確立に貢献することが期待される。

5. 参考文献

1. Abe K, Matsui S, Watanabe D (2015) Transgenic songbirds with suppressed or enhanced activity of CREB transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(24):7599-604.
2. Ramanan N, et al. (2005) SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 8(6):759- 767.
3. Abe K, Takeichi M (2007) NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron* 53(3):387- 397.