

自閉症スペクトラム障害患者で発見された SRF コアクチベーターMKL2 の遺伝子変異の影響 —ヒト MKL2 における機能解析—

(中間報告)

富山大学 大学院 医学薬学研究部 (薬学) 分子神経生物学研究室 伊原 大輔

Functional analysis of gene mutation of SRF coactivator MKL2 which was found in patients with autism spectrum disorders

Laboratory of Molecular Neurobiology, Graduate School of
Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, IHARA, Daisuke

要 約

Megakaryoblastic leukemia (MKL)は、アクチン結合モチーフを有し、転写因子 SRF (serum response factor)のコアクチベーターとして働く。非神経細胞において、MKL1は Rho シグナルを介して G-アクチンから解離し、核内に移行して SRF 介在性遺伝子発現を制御するというモデルが提唱されている。当研究室では「形態変化」と「遺伝子発現」の双方から、神経系における MKL の役割について研究を進めてきた。近年、MKL ファミリーの 1 つ MKL2 が自閉症スペクトラム障害(ASD)の原因遺伝子候補であると報告された。ASD で認められる MKL2 遺伝子の *de novo* 変異の 1 つは MKL2 の B1 領域におけるシトシンからチミンへの一塩基置換であり、その結果アルギニンからトリプトファンへのアミノ酸置換が生じる。当研究室では、マウス MKL2 に上記の変異を導入すると、SRF 依存性転写活性は変化しない一方、樹状突起形態の複雑性が減少することを発見した。そこで本研究では、ASD 病態の 1 つが MKL2 機能障害であることを検証するため、野生型および変異型ヒト MKL2 遺伝子を用いた機能解析を行った。

【キー・ワード】血清応答因子(SRF), megakaryoblastic leukemia (MKL), 遺伝子発現, 形態変化, 自閉症スペクトラム障害 (ASD)

Abstract

We have focused on megakaryoblastic leukemia (MKL) family members, which have actin-binding motifs and function as transcriptional cofactors of serum response factor (SRF). MKL is suggested to act as a linker between “morphological change” and “gene expression”. It has been proposed that MKL1, released from G-actin via Rho signaling, translocates into nucleus and increases SRF-mediated gene expression. Recently, it has been reported that *de novo* mutation of

MKL2 gene is a risk factor of autism spectrum disorder (ASD). In this report, it is showed that the *de novo* mutation of cytosine in the MKL2 gene encoding B1 domain into thymine resulted in the substitution of 299th Arg into Trp. Our previous study showed that mouse MKL2, which is introduced the mutation mentioned above, decreased the dendritic complexity in neurons, without affecting the activity of SRF-mediated transcription. To confirm these results, we challenged to construct the expression vectors for expressing human MKL2 and its mutant and analyze their function in neurons.

【Key words】 SRF (serum response factor), megakaryoblastic leukemia (MKL), gene expression, morphological change, autism spectrum disorder (ASD)

背景・目的

MKL は SRF のコアクチベーターであると同時に、アクチン結合タンパク質としての機能も持つユニークな分子である。MKL は Rho シグナルの活性化に伴い G-アクチンから解離し、核内に移行して SRF 介在性遺伝子発現を制御することが示唆されている(Tabuchi, 2006 ; 図 1)。一方, ASD で認められる MKL2 遺伝子配列変化の 1 つとして報告されている *de novo* 変異は, MKL2 タンパク質 B1 領域中の 299 番目のアルギニンをコードするコドン「CGG」がトリプトファンをコードする「TGG」に変化するものである(Neale *et al.*, 2012 ; 図 2)。このアミノ酸領域はマウスでも保存されている。上記の変異をマウス MKL2 (mMKL2)に導入すると, SRF 依存性転写活性は影響を受けない一方, 樹状突起形態の複雑性は減少した(data not shown)。本研究では, ヒト MKL2 (hMKL2)遺伝子を用いて実験の追試を行い, その機能を野生型と変異型で比較することで, ASD 病態の 1 つが MKL2 機能障害であるという科学的根拠を得ることを目的として実験を行った。

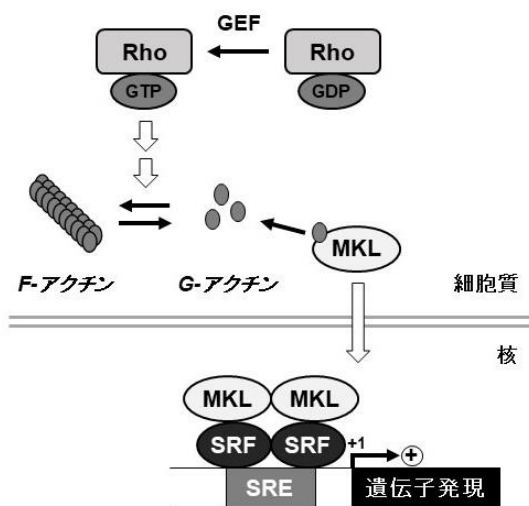


図 1 Rho-actin 経路による SRF 介在性遺伝子の発現様式

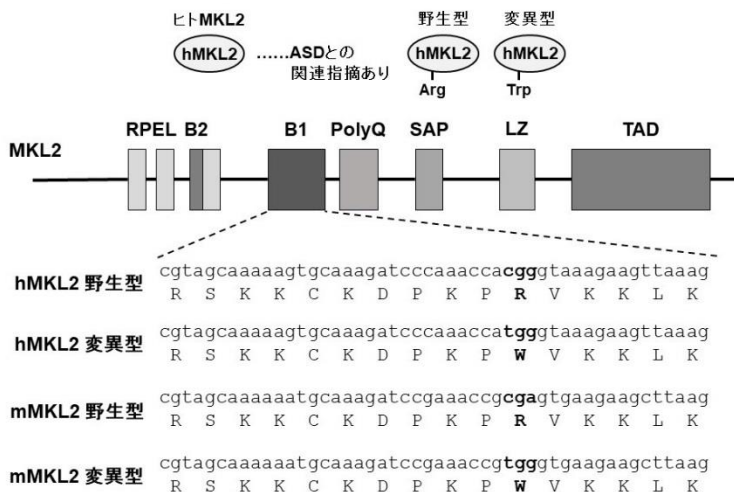


図2 hMKL2 遺伝子のドメイン構造および ASD と関連のある遺伝子配列変化

方法

【逆転写反応および PCR 反応】 ヒト海馬由来 Total RNA (Clontech) 1 µg を SuperScript II RT (Invitrogen)による逆転写反応に供し、cDNA ライブラリーを得た。手法は当研究室の以前の報告に準じた(Ishikawa *et al.*, 2013)。PCR 反応には Prime STAR Max DNA Polymerase (TaKaRa)を用い、メーカーのプロトコールに準じて行った。その PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)により精製し、以後の反応に用いた。

【In-Fusion クローニング法】 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用い、メーカーのプロトコールに準じた。

【部位特異的変異導入】 KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO)を用い、メーカーのプロトコールに準じた。

【形質転換および大腸菌の培養】 大腸菌 DH5α (TOYOBO)を用い、メーカーのプロトコールに準じた。生じたコロニーを単離し、100 µg/mL のアンピシリンを混合した LB 培地下、37°C で 16~18 時間前培養を行った。

【プラスミド精製】 塩基配列の決定に用いる際は Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), トランスフェクションに用いる際のプラスミド精製には NucleoBond® Xtra Midi EF (TaKaRa)を用い、いずれもメーカーのプロトコールに準じて行った。

【シーケンス解析】ABI PRISM 310 または ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems)を用いたキャピラリー電気泳動の後、GENETYX-SV_RC (Genetyx)を用いた解析により塩基配列を同定した。

【NIH3T3 細胞の培養および遺伝子導入】NIH3T3 細胞の培養および Lipofectamine (Invitrogen)を用いた遺伝子導入は、当研究室の以前の報告に準じた(Ishikawa *et al.*, 2013)。

【SDS-PAGE およびウェスタンブロット】当研究室の以前の報告に準じた手法で行った(Ishikawa *et al.*, 2013)。使用した抗体と希釈濃度は以下のとおりである：一次抗体；anti-mouse Myc (Cell signaling) (1:1000), anti-rabbit GFP (Medical & Biological Laboratories) (1:1000), anti-mouse α -tubulin (Sigma) (1:1000)。二次抗体；anti-rabbit IgG HRP (Amersham) (1:5000), anti-mouse IgG HRP (Amersham) (1:5000)。

結 果

【実験 1 hMKL2 遺伝子のクローニング】ヒト海馬由来 Total RNA を逆転写し cDNA を得た後、以下のプライマーを用いた PCR により hMKL2 遺伝子を増幅した；

5'-GAGCTCGGTACCCGGGGATCctgtcttcagaagcctctca-3',

5'-CAGGTCGACTCTAGAGGATCtctcagaaaagaaatctgtgacg-3'。その fragment を In-Fusion cloning 法により pUC19 vector に組み込んだ後、シーケンス解析により Insert の配列を同定した。

【実験 2 Myc タグ付き hMKL2 発現ベクターの作製】Insert fragment は、pUC19-hMKL2 ベクターを鋳型とし、以下のプライマーを用いた PCR 増幅により得た；

5'-TCAGAGGAGGACCTGatgatcgatagctccaagaa-3',

5'-CATGTCTGGATCCCCttagtcccagcagcgta-3'。Vector fragment は、pCMV-Myc ベクター (Clontech)を鋳型とし、以下のプライマーを用いた PCR 増幅により得た；

5'-GGGGATCCAGACATGATAAGATAC-3', 5'-CAGGTCCTCCTCTGAGATCAGC-3'。それぞれの fragment を In-Fusion cloning 法により連結した後、シーケンス解析により全長の配列を確認し、pCMV-Myc-hMKL2 (野生型)ベクターを構築した(図 3)。

【実験 3 部位特異的変異導入による hMKL2 変異体の作製】上記の pCMV-Myc-hMKL2 (野生型)ベクターを鋳型とし、KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いて部位特異的変異導入を行った。Inverse PCR には以下のプライマーを用いた；5'-tgggtaagaagttaaagtagcaccacaatacattccaccag-3', 5'-tggtttgggactctttgcaactttttgctac-3'。その後シーケンス解析により全長の配列を確認し、pCMV-Myc-hMKL2 (変異型)ベクターを構築した(図 3)。

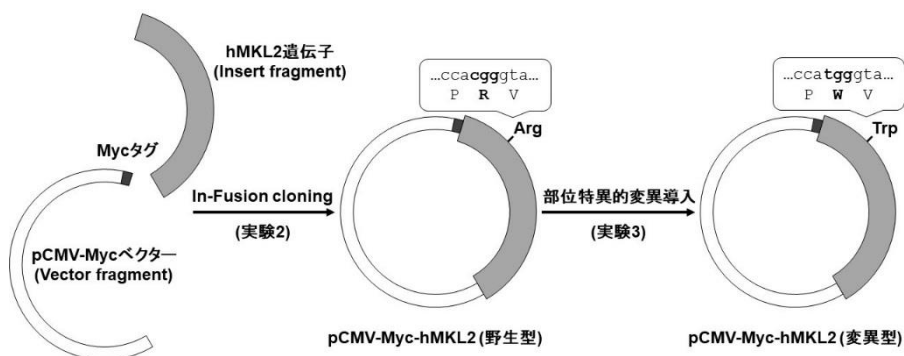


図3 Myc タグ付き hMKL2 発現ベクター（野生型および変異型）作製の流れ

【実験4 各発現ベクターの導入によるタンパク質発現】構築した pCMV-Myc-hMKL2（野生型），pCMV-Myc-hMKL2（変異型）の両ベクターを NIH3T3 細胞に遺伝子導入した。その後，タンパク質を回収しウェスタンブロットを行った結果，それぞれ同程度のタンパク質発現が認められた(図4)。

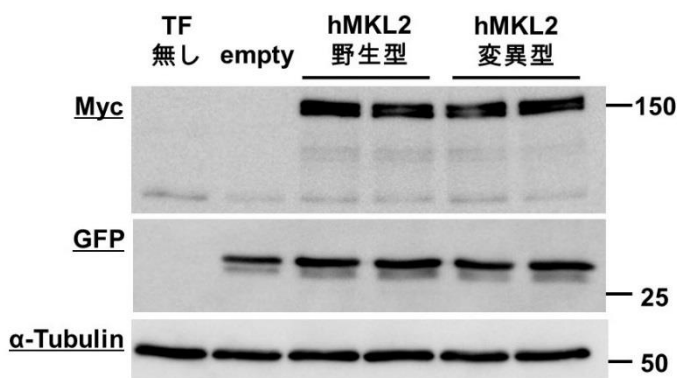


図4 野生型および変異型 hMKL2 発現ベクター導入によるタンパク質発現

考察・展望

hMKL2 遺伝子のクローニングに成功し，野生型および変異型 hMKL2 の発現ベクターをそれぞれ構築した。また，それらが NIH3T3 細胞において正常にタンパク質として発現することが確認できた。今後は，NIH3T3 細胞や神経細胞を用い，野生型および変異型 hMKL2 の局在や，それらが SRF 依存性転写活性に与える影響に関して解析を進める。さらに，野生型および変異型 hMKL2 が神経細胞の形態に与える影響についても，Sholl 法，樹状突起長，スパイン形態・密度などの観点から解析していく予定である。

引用文献

- Ishikawa *et al.* (2013) Identification, expression and characterization of rat isoforms of the serum response factor (SRF) coactivator MKL1. *FEBS Open Bio.*, 3, 387-93.
- Neale *et al.* (2012) Patterns and rates of exonic *de novo* mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 485, 242-5.
- 田渕明子(2006) 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*, 78(10), 987-97.