

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—

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 (Miralles *et al.*, 2003; Tabuchi *et al.*, 2005 ; 図 1)。

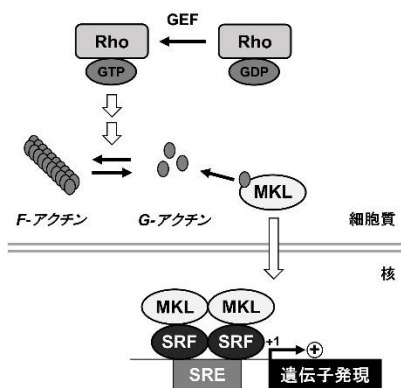


図 1 Rho-actin 経路による SRF 介在性遺伝子の発現様式

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)。

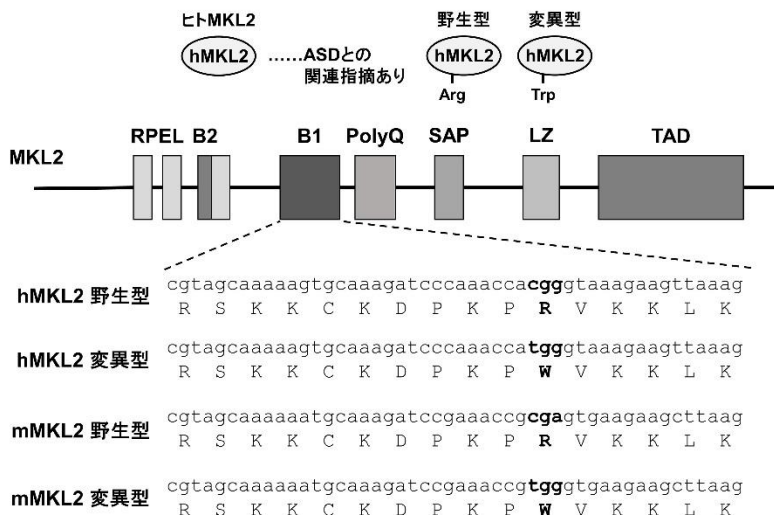


図2 hMKL2 遺伝子のドメイン構造および ASD と関連のある遺伝子配列変化

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。

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 DH5 α (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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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)。

【実験動物】

神経細胞の培養には、胎生 17 日齢の SD ラット(日本 SLC)を用いた。動物実験は、富山大学動物実験取扱規則に従って実施した。

【神経細胞の初代培養】

神経細胞の初代培養は、当研究室の以前の報告に準じた(Kaneda *et al.*, 2018; Kikuchi *et al.*, 2019)。胎児より摘出した大脳皮質に対し、Trypsin 処理(0.125% Trypsin (DIFCO), 1 mM EDTA)および DNase I 処理(0.004% DNase I (Sigma), 0.03% Trypsin inhibitor (Sigma))を行った。レポーターアッセイを行う場合は、62.5 mg/L poly-D-lysine (Sigma)コーティング済みの 6 穴 dish (Nunc)に 2.0×10^6 cells/dish となるように細胞懸濁液を加えた。免疫染色を行う場合は、62.5 mg/L poly-D-lysine コーティング済みの 18 mm のカバーガラス(MATSUNAMI)を置いた 12 穴プレート(Iwaki)を用意し、樹状突起形態の解析を行う場合は 7.0×10^5 cells/well となるように、スパイン形態の解析を行う場合は 3.0×10^5 cells/well となるように細胞懸濁液を加えた。神経細胞は 2% B-27 supplement

(Invitrogen), 0.5 mM L-glutamine, 2 mg/L gentamycin 入りの neurobasal medium (Invitrogen) 中で培養し, 3 日ごとに conditioned medium の半量を交換した。

【遺伝子導入およびレポーターアッセイ】

各種プラスミド DNA および内部標準 phRL-TK(-)の溶液は, NucleoBond Xtra Midi EF (TaKaRa) を用いて調製した。リン酸カルシウム法を用いた神経細胞への遺伝子導入は当研究室の以前の報告に準じた(Kikuchi *et al.*, 2019)。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)のプロトコールに準じて行い, 細胞抽出液の化学発光は TD-20/20 Luminometer (Promega)で測定した。

【Neuro2a 細胞の培養および遺伝子導入】

Neuro2a 細胞の培養は, 当研究室の以前の報告に準じた(Ishimaru *et al.*, 2010)。継代の 24 時間後に Lipofectamine (Invitrogen)を用いた遺伝子導入を行った。

【RNA 精製および定量的 PCR】

当研究室の以前の報告に準じた手法で行った(Kikuchi *et al.*, 2019)。グアニジン-フェノール-クロロホルム法を用いて total RNA を調製した。TRIsure (BIOLINE)で total RNA を抽出し, DNase I (TaKaRa)処理によりゲノム DNA を分解した。DNase I の除去後, 分光光度計 Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologie)で RNA 濃度を測定し, 0.5 μ g の total RNA を SuperScript II RT (Invitrogen)で逆転写し cDNA を合成した。定量的 PCR は SYBR Select QPCR Master Mix (Applied Biosystems)のプロトコールに従って行い, その結果を Mx3000P Real-Time PCR System (STRATAGENE)により解析した。各遺伝子の定量に際し, プライマーのアニーリング温度が 60°C 未満の場合は以下のプロトコールを適用した; 50°C, 2 分 \rightarrow 95°C, 2 分 \rightarrow (95°C, 15 秒 \rightarrow X°C, 15 秒 \rightarrow 72°C, 1 分) x 40 cycles (X はアニーリング温度)。プライマーのアニーリング温度が 60°C 以上の場合は以下のプロトコールを適用した; 50°C, 2 分 \rightarrow 95°C, 2 分 \rightarrow (95°C, 15 秒 \rightarrow 60°C, 1 分) x 40 cycles。各遺伝子増幅のために使用したプライマーとそのアニーリング温度は以下のとおりである:

Arc; 5'-CGCTGGAAGAAGTCCATCAAG-3', 5'-ATCAGCTTCCTGGCAGTAGG-3' (58°C),
 β -actin; 5'-CCCTGAGGAGCACCCCTGTG-3', 5'-TGGCTGGGGTGTGAAGGTCTC-3' (62°C),
Egr1; 5'-CTGCTTCATCGTCTTCCTCT-3', 5'-GTGGAACAGATAGTCAGGG-3' (56°C),
c-fos; 5'-AGGGAGCTGACAGATACT-3', 5'-CGTTGCTGATGCTCTTGACT-3' (58°C),
Gapdh; 5'-AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3', 5'-GTTGAAGTCGCAGGAGACAA-3' (58°C)。

【蛍光免疫染色】

当研究室の以前の報告に準じた手法で行った(Kaneda *et al.*, 2018; Kikuchi *et al.*, 2019)。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 MAP2 (Sigma) (1:1000)。二次抗体 ; CF488A anti-rabbit IgG (Biotium) (1:1000), CF594A anti-mouse IgG (Biotium) (1:1000)。

【神経細胞の形態学的解析】

当研究室の以前の報告に準じた手法で行った(Ishikawa *et al.*, 2010; Kaneda *et al.*, 2018)。樹状突起形態について解析する場合はデジタルカメラ付蛍光顕微鏡 BX50-34-FLA-1 (OLYMPUS)を用いて画像取得を行った。複雑性の解析には Sholl 法を用い、細胞体から半径 20 μm ごとの同心円と樹状突起が交差する点を目視でカウントした。突起長の解析には画像解析ソフト Image J を用い、細胞体から直接伸びている樹状突起を 4 本トレースしその長さを計測した。なお、MAP2 陽性のものを樹状突起と判断し、軸索と判断したものについては測定対象外とした。スパイン形態について解析する場合は共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss)を用いて画像取得を行った。1 細胞につき 2 本の樹状突起上にあるスパインの形態を、目視により以下の 3 つに分類した ; mushroom 型(m)およびネック部分が無い stubby 型(s), ネック部分が細長くヘッド部分が膨らんでいる thin 型(t)および針状の filopodia 型(f), 上記 2 グループのいずれにも属さない irregular 型(irr)。

【統計学的解析】

統計学的解析には一元配置分散分析(one-way ANOVA), および多重比較検定には Tukey-Kramer's test または Scheffé's F-test を用いた。統計解析の結果は図の説明文中に記載した。

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'-CAGGTCGACTCTAGAGGATCtctcagaaaagaatctgtgacg-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'-CATGTCTGGATCCCCttagtcctcatggcagcggtta-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)。

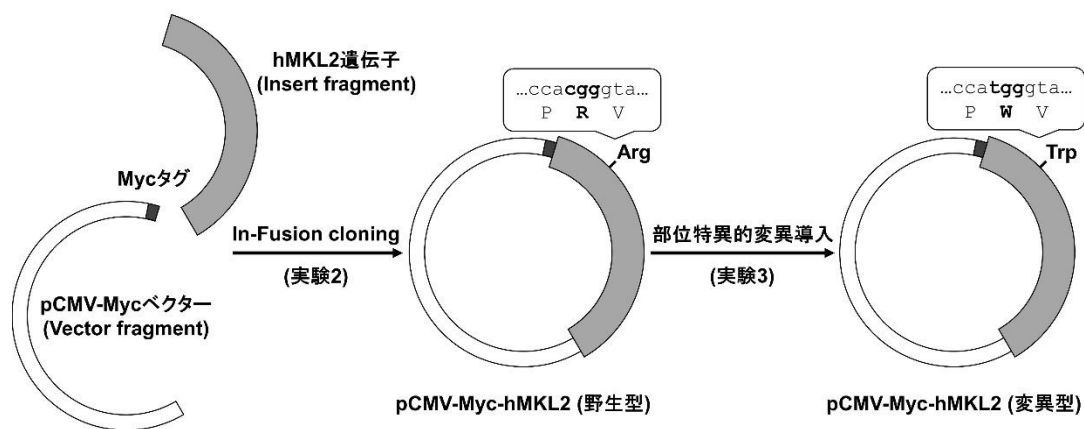


図3 Myc タグ付き hMKL2 発現ベクター (野生型および変異型) 作製の流れ

【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'-tgggtaagaagtaaagt accaccaatacatccaccag-3', 5'-tggtttgggatctttgcactttttgctac-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)。

【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)。

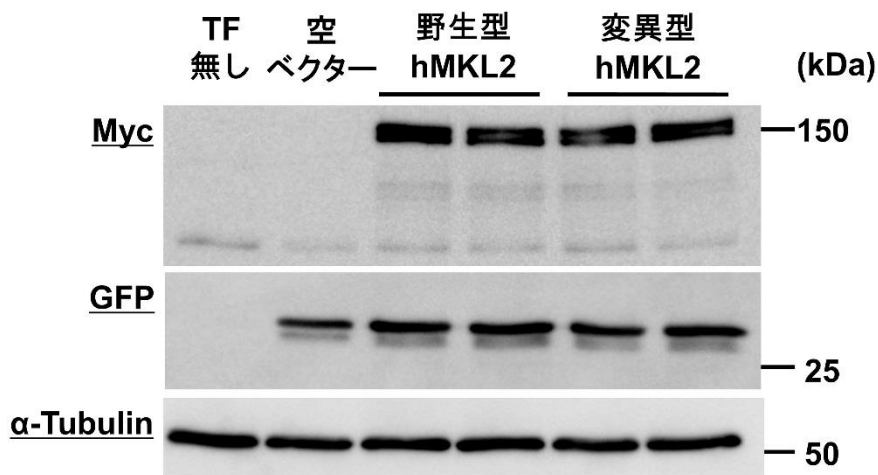


図4 野生型および変異型 hMKL2 発現ベクター導入によるタンパク質発現

野生型および変異型 hMKL2 発現ベクター1.5 μg, GFP 発現ベクター0.5 μg を NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。その24時間後にタンパク質を回収し、ウェスタン

プロットを行った。hMKL2 の発現は抗 Myc 抗体で検出し、トランスフェクション効率の指標として GFP を、タンパク質量の指標として α -Tubulin をそれぞれ用いた。

【実験 5 hMKL2 への変異導入が SRF および CREB 依存性転写活性に与える影響】

最初に、野生型および変異型 hMKL2 が SRF 依存性転写活性へ及ぼす影響について解析した。SRE 配列を 5 つタンデムに配置し、その下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターベクターを用いた。ルシフェラーゼアッセイの結果、いずれのコンストラクトにおいても SRF 依存性転写活性の増加が認められたが、変異型 hMKL2 による転写活性化は、野生型の場合と比較して有意に低かった。続いて、野生型および変異型 hMKL2 が CREB (cAMP-response element (CRE)-binding protein) 依存性転写活性へ及ぼす影響についても解析した。CRE 配列を 4 つタンデムに配置し、その下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターベクターを用いた。ルシフェラーゼアッセイの結果、いずれのコンストラクトも CREB 依存性転写活性に影響を与えなかった(図 5)。

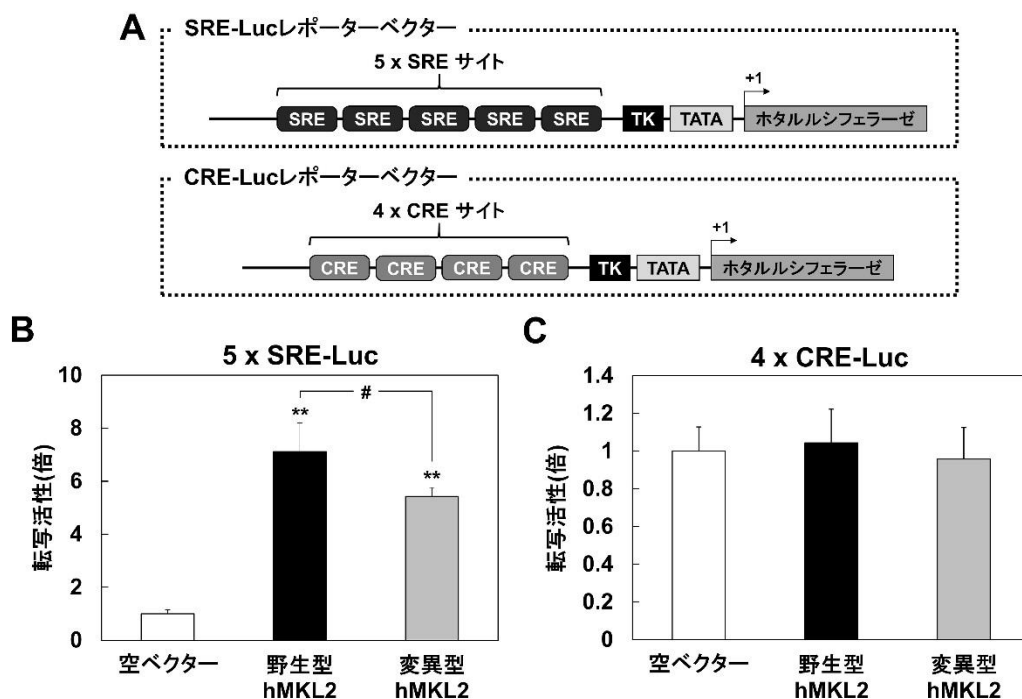


図 5 野生型および変異型 hMKL2 が SRF および CREB 依存性転写活性に与える影響

(A) 実験に用いたレポーターベクター。(B, C) 培養 7 日目のラット大脳皮質神経細胞に、空ベクター、myc タグ付き野生型 hMKL2 または変異型 hMKL2 発現ベクター(3.0 μ g/well)を各レポーターベクターとコトランスフェクションした(B: 5 x SRE-Luc, C: 4 x CRE-Luc, 1.0 μ g/well)。内部標準として phRL-TK(-) (0.2 μ g/well)を用いた。48 時間後、細胞を回収しルシフェラーゼアッセイを行った。Mean \pm SD, n=3-4, ** p <0.01 vs 空ベクター, ### p <0.01 vs 野生型 hMKL2 (one-way ANOVA with Scheffé's F-test)。

【実験 6 hMKL2 への変異導入が SRF 標的遺伝子のプロモーター活性に与える影響】

次に、具体的な SRF 標的遺伝子のプロモーター活性へ及ぼす影響について解析した。本研究では、SRF 標的遺伝子の代表例として、神経可塑性を担う最初期遺伝子の 1 つ *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) および細胞骨格の形成を担う *β-actin* という 2 つの遺伝子に着目した。*Arc* 遺伝子は、その転写開始点から約 7 kb 上流に遠位エンハンサー・SARE (synaptic activity-responsive element) を有する (Kawashima *et al.*, 2009)。SARE には、CREB, MEF2 (myocyte enhancer factor 2), SRF の結合部位が含まれる。また、約 1.6 kb 上流までの近位プロモーター内にも 2 個の SRE が存在する (Fukuchi *et al.*, 2015)。一方、*β-actin* 遺伝子はその転写開始点のすぐ上流に SRE を 1 つ有している (Ishikawa *et al.*, 2010)。これらの遺伝子のプロモーター領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターベクターを用い、各遺伝子のプロモーター活性について解析した。その結果、いずれのコンストラクトにおいても *Arc* プロモーターの活性化が認められたが、変異型 hMKL2 によるプロモーター活性化は、野生型の場合と比較して有意に低かった。同様に、変異型 hMKL2 による *β-actin* プロモーターの活性化は、野生型の場合と比較して有意に低かった (図 6)。

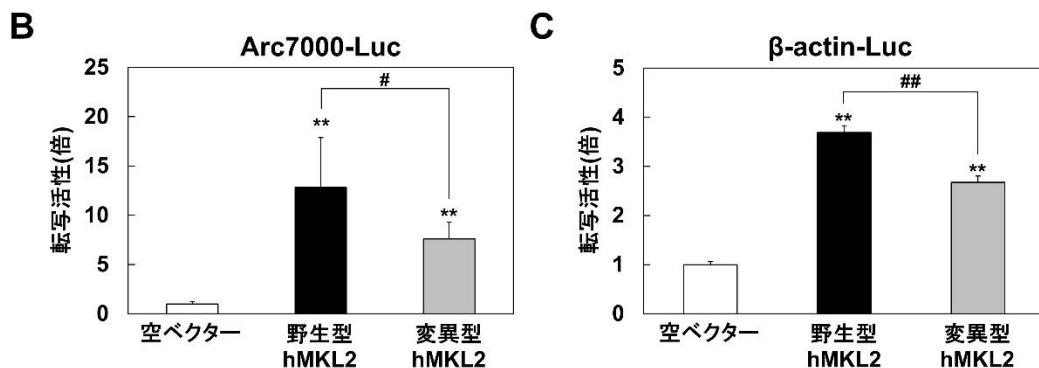
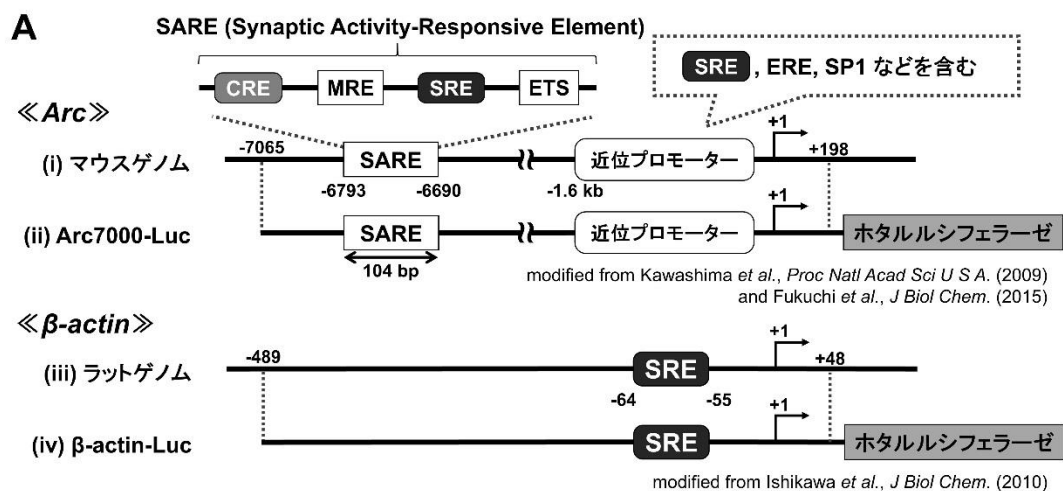


図 6 野生型および変異型 hMKL2 が SRF 標的遺伝子のプロモーター活性に与える影響

(A) 実験に用いたレポーターベクター。(i) *Arc* 転写開始点より 7 kb 上流までのマウスゲノム配列。

転写開始点より約 7 kb 上流に位置する遠位エンハンサー・SARE には, CREB, MEF2, SRF の結合部位が含まれる。転写開始点より 1.6 kb 上流までに位置する近位プロモーターには, SRF, Elk1, SP および EGR ファミリーなどの転写因子群の結合部位が含まれる。(ii) Arc7000-Luc レポーターベクター(Arc7000-Luc)。SARE および近位プロモーターを含むマウス *Arc* プロモーターの全長をホタルルシフェラーゼ遺伝子に連結した。(iii) *β-actin* 転写開始点より 500 b 上流までのラットゲノム配列。(iv) *β-actin* レポーターベクター(*β-actin*-Luc)。SRE を含むラット *β-actin* プロモーターをホタルルシフェラーゼ遺伝子に連結した。(B, C) 培養 7 日目のラット大脳皮質神経細胞に, 空ベクター, myc タグ付き野生型 hMKL2 または変異型 hMKL2 発現ベクター(3.0 μg/well) を各レポーターベクターとコトランスフェクションした(B: Arc7000-Luc, C: *β-actin*-Luc, 1.0 μg/well)。内部標準として phRL-TK(-) (0.2 μg/well) を用いた。48 時間後, 細胞を回収しルシフェラーゼアッセイを行った。Mean ± SD, n=4, ***p* < 0.01 vs 空ベクター, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs 野生型 hMKL2 (one-way ANOVA with Scheffé's F-test)。

【実験 7 hMKL2 への変異導入が内在性の SRF 標的遺伝子発現に与える影響】

さらに, 野生型および変異型 hMKL2 が SRF 標的遺伝子の発現へ及ぼす影響についても解析した。比較的遺伝子導入効率の高い Neuro2a 細胞に各コンストラクトを導入し, 内在性の各遺伝子の発現量について定量的 PCR を行った。その結果, 変異型 hMKL2 による *Arc* および *c-fos* 遺伝子発現誘導は, 野生型の場合と比較して有意に低かった。一方, *Egr1* については, 野生型と変異型とで遺伝子発現誘導に差は認められなかった(図 7)。

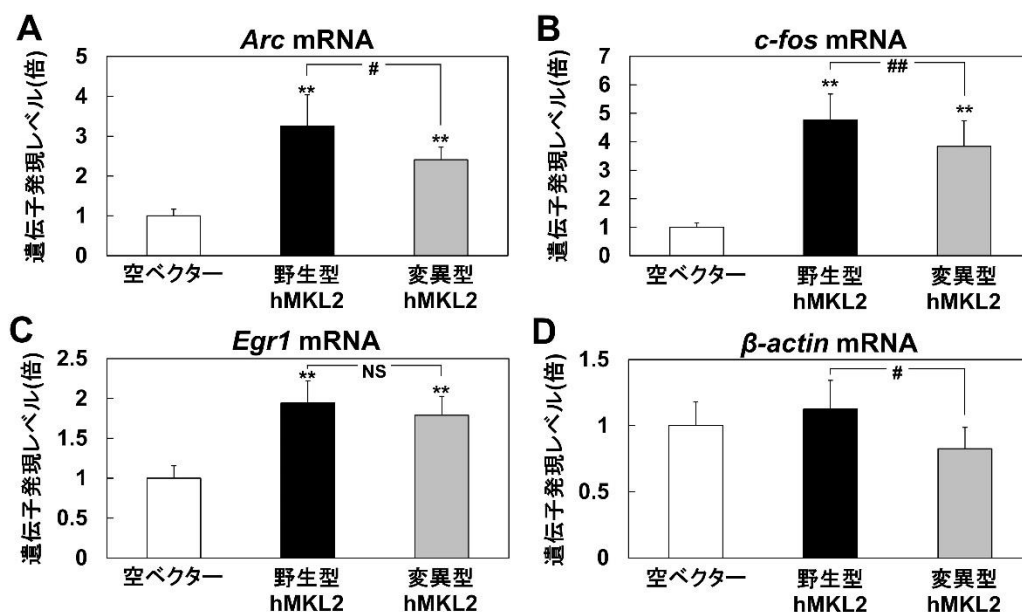


図 7 野生型および変異型 hMKL2 が内在性の SRF 標的遺伝子群の発現に与える影響

Neuro2a 細胞に, 空ベクター, myc タグ付き野生型 hMKL2 または変異型 hMKL2 発現ベクター(4.0 μg/well) をトランスフェクションした。24 時間後, total RNA を回収し定量的 PCR を行った。Mean ± SD, n=7-9, ***p* < 0.01 vs 空ベクター, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs 野生型 hMKL2

(one-way ANOVA with Scheffé's F-test (A-C) or Tukey-Kramer's test (D)).

【実験 8 hMKL2 への変異導入が神経細胞の樹状突起形態に与える影響】

ここで、野生型および変異型 hMKL2 が神経細胞形態へ及ぼす影響について解析した。各コンストラクトを培養神経細胞にトランスフェクションし免疫染色を行った結果、野生型 hMKL2 を導入すると、コントロールと比較し樹状突起数は有意に増加した。一方、変異型 hMKL2 を導入すると、コントロールと比較し樹状突起数は有意に減少した。樹状突起の長さについても同様に、野生型 hMKL2 により増加する一方、変異型 hMKL2 により減少した。したがって、変異型 hMKL2 は神経細胞の樹状突起形態を負に制御することが示された(data not shown)。

【実験 9 hMKL2 への変異導入が神経細胞のスパイン形態に与える影響】

最後に、野生型および変異型 hMKL2 が神経細胞のスパイン形態へ及ぼす影響について解析した。各コンストラクトを培養神経細胞にトランスフェクションし免疫染色を行った結果、野生型および変異型 hMKL2 の導入による成熟型スパインの比率やスパイン密度についての有意な差は認められなかった。したがって、hMKL2 への変異導入は神経細胞のスパイン成熟には影響を与えないことが示唆された(data not shown)。

考察・展望

本研究では、まず 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(図 3)。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(図 4)。その変異型 hMKL2 を神経細胞に導入すると、野生型 hMKL2 を導入した場合と比較して SRF 依存性転写活性化は有意に低下した(図 5)。また、変異型 hMKL2 の導入により SRF 標的遺伝子である *Arc* および *β-actin* 遺伝子のプロモーター活性化は、野生型 hMKL2 を導入した場合と比較して有意に低下した(図 6)。この結果に関して、変異型 hMKL2 は核移行や SRF との結合に関与する B1 ドメインに 1 アミノ酸置換が生じているため、SRF との結合が障害されたことにより SRF-MKL 標的遺伝子の発現が部分的に抑制されたと考えるのが妥当である。

上述の通り、ASD における MKL2 の遺伝子変異はアクチンとの結合に関与する RPEL モチーフとは無関係である。しかしながら、変異型 hMKL2 の導入により神経細胞の樹状突起形態が負に制御された(data not shown)ことから、変異型 hMKL2 においてはアクチンとの結合も障害されていることが示唆される。つまり、神経細胞の樹状突起形態に関して、変異型 hMKL2 は内在性の野生型 MKL2 に対してヘテロダイマーを形成しその機能を一部障害する、"ドミナントネガティブ様"作用を有すると考えられる。

この矛盾について、B1 ドメインに生じたアルギニン残基からトリプトファン残基への 1 アミノ酸置換により、電荷や立体障害が変化することにより SRF との結合が弱くなること以外にも、タンパク質の折りたたみにも影響を及ぼし RPEL モチーフの機能を変化させるという可能性もある。上記

の機構について解明するためには、免疫染色法により変異型 hMKL2 の核への局在性が変化するかについて、また共免疫沈降法により変異型 hMKL2 と SRF やアクチンなどの MKL 関連タンパク質との相互作用に変化が生じるかについて検証する必要がある。

また、野生型および変異型 hMKL2 は、成熟型スパインの比率に影響を与えなかった(data not shown)。その理由としては、今回用いた培養神経細胞には内在性の MKL2 が高発現しており、トランスフェクションを行わなくてもすでにスパインの成熟に十分な量の MKL2 が存在していたと考えられる。そのため、変異型 hMKL2 を過剰発現させても、その"ドミナントネガティブ様"作用が認められなかったものと推測される。

本研究の結果より、ASD で発見された遺伝子変異を hMKL2 に導入することで、神経可塑性や細胞骨格に関与する SRF/MKL 標的遺伝子群の発現が一部抑制される結果、神経細胞の樹状突起形態が負に制御されると考えられる。したがって、以上のような MKL2 の機能障害が、ASD の病態の 1 つであることが示唆された。今後は、ASD で発見された hMKL2 の遺伝子変異を導入したノックインマウスを作製し、その初代培養神経細胞における SRF 介在性の遺伝子発現や神経細胞の形態に与える影響を解析したり、さらにそのノックインマウスが自閉症様行動を呈するの解析したりすることで、MKL2 の遺伝子変異と ASD との関連性をより詳細に解明できると考える。将来、この成果が ASD をはじめとした様々な発達障害や精神神経疾患の原因解明への一助となることを期待する。

引用文献

- Fukuchi *et al.* (2015) Class I histone deacetylase-mediated repression of the proximal promoter of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein gene regulates its response to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol. Chem.*, 290 (11), 6825-36.
- Ishikawa *et al.* (2010) Involvement of the SRF coactivator megakaryoblastic leukemia in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *J Biol. Chem.*, 285(43), 32734-43.
- 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.
- Ishimaru *et al.* (2010) Differential epigenetic regulation of *BDNF* and *NT-3* genes by trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394, 173-7.
- Kaneda *et al.* (2018) Synaptic localisation of SRF coactivators, MKL1 and MKL2, and their role in dendritic spine morphology. *Sci Rep.*, 8(1), 727.
- Kawashima *et al.* (2009) Synaptic activity-responsive element in the *Arc/Arg3.1* promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(1), 316-21.
- Kikuchi *et al.* (2019) Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the *Arc* gene. *J Neurochem.*, 148, 204-18.
- Miralles *et al.* (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL.

Cell, 113, 329-42.

Neale *et al.* (2012) Patterns and rates of exonic *de novo* mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 485, 242-5.

Tabuchi *et al.* (2005) Nuclear translocation of the SRF co-activator MAL in cortical neurons: role of RhoA signalling. *J Neurochem.*, 94, 169-80.

謝 辞

本研究の実施にあたり助成を賜りました，公益財団法人 発達科学研究教育センターに心より御礼申し上げます。Arc7000 promoter-Luc vector を恵与いただきました，東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生化学教室 尾藤晴彦教授，鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 生体機能制御学講座 生化学・分子生物学分野 奥野浩行教授に深謝申し上げます。本稿を終えるにあたり，共同研究者である富山大学大学院 医学薬学研究部(薬学) 分子神経生物学研究室の田淵明子准教授に感謝申し上げます。

