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 actinbinding 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 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。

【シークエンス解析】

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 a-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 ×10⁶ 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 7.0×10⁵ cells/well となるように、スパイン形態の解析を行う 場合は 3.0×10⁵ 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 µg 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 → 95°C,2分 → (95°C,15 秒 → X°C, 15 秒 → 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 → 95°C,2分 → (95°C,15 秒 → 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), *b*-actin; 5'-CCCTGAGGAGCACCCTGTG-3', 5'-TGGCTGGGGGTGTTGAAGGTCTC-3' (62°C),
Egr1; 5'-CTGCTTCATCGTCTTCCTCT-3', 5'-GTGGAAACAGATAGTCAGGG-3' (56°C), *c*-fos; 5'-AGGGAGCTGACAGATACACT-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-

13

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'-CAGGT CGACTCTAGAGGATCtctcagaaaagaaatctgtgacg-3'。その fragment を In-Fusion cloning 法により pUC19 vector に組み込んだ後,シークエンス解析により 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'-CATGTCTGGATCCCCttagtcc catggcagcggta-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'-GGGGGATCCAGACATGATAAGATAC-3', 5'-CAGGTCCTC CTCTGAGATCAGC-3'。それぞれの fragment を In-Fusion cloning 法により連結した後,シークエ 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'-<u>tgggtaaagaagttaaagt</u> accaccaatacattccaccag-3', 5'-tggtttgggatctttgcacttttgctac-3'。その後シークエ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 ブロットを行った。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)。





(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 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: 5 x SRE-Luc, C: 4 x CRE-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=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 activityresponsive 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 2 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 7kb 上流までのマウスゲノム配列。

転写開始点より約7kb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1.6kb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) *B-actin* 転写開始点より 500 b上流までの ラットゲノム配列。(iv) *B-actin* レポーターベクター(B-actin-Luc)。SRE を含むラット *B-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: B-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。樹状突起の長さに関しても同様に、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 *B*-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か解析したりするこ 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 brainderived 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渕明子准教授に感謝申 し上げます。