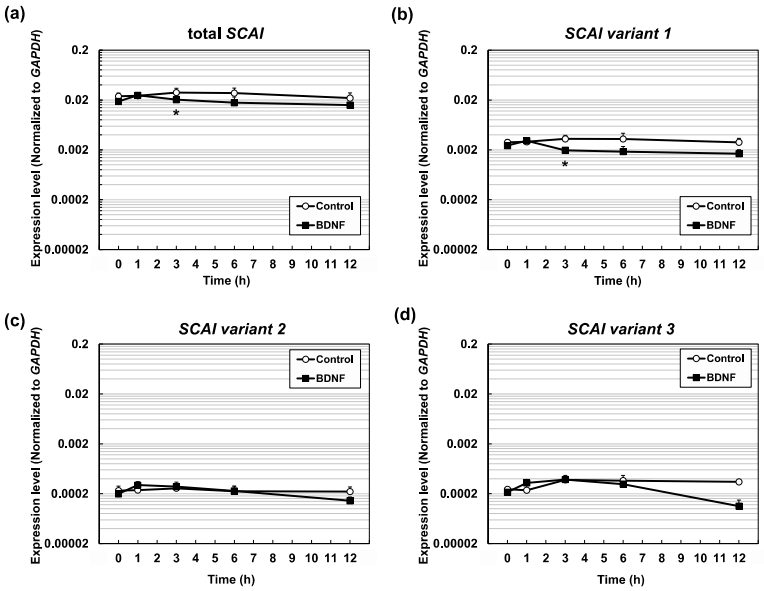
11　BDNF-MRTF-SRF理解による記憶改善創薬	田渕　明子

【目的】超高齢社会である我が国の喫緊の課題は、高齢者の QOL などを包括した健康寿命の延伸である。とりわけ脳機能改善を図ることは、認知症患者の QOL のみならず介護の負担軽減においても極めて重要であり、記憶力改善を狙った創薬基盤となる生命現象の本質的な理解と応用が望まれている。この数十年の研究により、転写因子である血清応答因子 SRF は、転写因子をコードする遺伝子群や神経ネットワーク形成やシナプス伝達の調節などに重要な分子をコードする遺伝子群を制御しており、記憶形成並びに老齢マウスの記憶改善に効果があることが明らかになった。SRF は単独では転写を制御できず、SRF コファクターと呼ばれる分子と結合して転写を活性化する。SRF コファクターには、MRTF やそれに結合して転写を抑制する SCAI が知られているが、神経細胞において、それらを制御するリガンドや細胞内情報伝達系の全容解明には至っていない。我々は、SRF 標的遺伝子であり、シナプス機能をコントロールする Arc が脳由来神経栄養因子 BDNF によって活性化される際に MRTF が関与することを明らかにしている。以上のことから、MRTF や SCAI が BDNF シグナルの受け手となること、「神経活動-BDNF-MRTF-SRF」スイッチの解明が記憶改善の戦略となると考えた。本研究は、「神経活動-BDNF-MRTF-SRF」のカスケードの解明を行った。

【方法】大脳皮質ニューロン初代培養系を調製し、BDNF を添加することで刺激を行い、SCAI mRNA の発現について調べるため、定量 PCR を行った。SCAI は、3 種類のバリアントが存在しているため、それらを選択的に増幅可能なプライマーを用い、当該バリアントの発現を全て調べた。また、発現変化をもたらすシグナル伝達経路を明らかにするため、キナーゼ阻害剤を前処理して、定量 PCR を行った。MRTF のタンパク質修飾を調べるため、ウェスタンブロット法を用いた。さらに「BDNF-MRTF-SRF」活性化を模倣するような天然物のスクリーニング系の確立を目指した。

【結果】BDNF により、SCAI mRNA の発現が減少することが明らかとなり、そのシグナル伝達系として、ERK/MAP キナーゼが関与することを示した。また、BDNF により MRTFB がリン酸化され、そのリン酸化経路にも ERKMAP キナーゼが関与することを示した。また、候補リン酸化部位を変異により非リン酸化させると、SRF 介在性遺伝子発現が減少する傾向を認めた。以上のことから、BDNF が SRF 転写因子複合体の構成要素やタンパク質修飾に変化をもたらし、SRF 標的遺伝子群の発現を調節して、脳の機能発現を行っていることが考えられた。

BDNF による SCAI バリアントの発現抑制（Ihara et al. Genes to Cells 2024 より引用）



11. BDNF-MRTF-SRF 理解による記憶改善創薬

田渕　明子

富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 分子神経生物学研究室

Key words：BDNF，SRF，SRF コファクター，認知症，遺伝子発現活性化スクリーニング

緒　言

超高齢社会である我が国の喫緊の課題は、高齢者の QOL などを包括した健康寿命の延伸である。とりわけ脳機能改善を図ることは、認知症患者の QOL のみならず介護の負担軽減においても極めて重要であり、記憶力改善を狙った創薬基盤となる生命現象の本質的な理解と応用が望まれている。

この数十年の研究により、転写因子である血清応答因子 SRF は、転写因子をコードする遺伝子群や神経ネットワーク形成やシナプス伝達の調節などに重要な分子をコードする遺伝子群を制御しており、記憶形成並びに老齢マウスの記憶改善に効果があることが明らかになった［1，2］。SRF は単独では転写を制御できず、SRF コファクターと呼ばれる分子と結合して転写を活性化する［3］。SRF コファクターには、MRTF やそれに結合して転写を抑制する SCAI が知られているが［4］、神経細胞において、それらを制御するリガンドや細胞内情報伝達系の全容解明には至っていない。我々は、SRF 標的遺伝子であり、シナプス機能をコントロールする Arc が脳由来神経栄養因子 BDNF によって活性化される際に MRTF が関与することを明らかにしている［5］。以上のことから、MRTF や SCAI が BDNF シグナルの受け手となること、「神経活動-BDNF-MRTF-SRF」スイッチの解明が記憶改善の戦略となると考えた。本研究は、「神経活動-BDNF-MRTF-SRF」のカスケードの解明を行った。その結果、BDNF が MRTFB のリン酸化を促進することを示した。また、SCAI の発現を抑制することで、脳の機能や構造の微調整を行っている可能性を示した［6］。

方　法

1. 大脳皮質ニューロン初代培養系の調製と細胞刺激

妊娠雌性 Sprague Dawley ラット（妊娠 17 日目、日本 SLC）を用い、過去の報告に従って調製した［7］。ヒト組換え BDNF タンパク質および U0126 は、それぞれ住友ファーマから提供され、また Calbiochem 社から購入した。LY294002（L9908）と U73122（U6756）は Sigma-Aldrich から購入した。刺激は培養 9 日目に行った。

2. RNA 調整と定量 PCR（qPCR）

RNA 抽出と qPCR は、既報に基づいて行った［7］。すなわち、TRIsure（Bioline）を用いて全 RNA を抽出し、SuperScript Ⅱ（Invitrogen）を用いて相補的 DNA 合成を行った。SCAI バリアントのプライマー位置を図 1 に示す。SCAI バリアント 1、2、3 および GAPDH を検出するために、SYBR Select Master Mix（Thermo Fisher Scientific）をメーカーの実験手順に従って qPCR に使用した。PCR プログラムは以下の通りであった：preheating 50℃ 2 分間、denaturation 95℃ 2 分間の後、denaturation 95℃ 15 秒間、annealing 59℃ 15 秒間、extension 72℃ 1 分間の 40 サイクル。qPCR に使用したプライマー配列は以下の通りである。GAPDH-センス：5’-ATCGTGGAAGGGCTCATGA C-3’、GAPDH-アンチセンス：5’-TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3’、total SCAI-センス：5’-GTAGCCTCTTCACGCT TTTTG-3’、total SCAI-アンチセンス：5’-

GCTTCTGAAGGTGAGGATTCTC-3’、SCAI variant 1-センス：5’-GAAAA CGGAAAAGCAGGACTG-3’、SCAI variant 1-アンチセンス：5’-CTGAGGCAAATCTTAAGCCAT-3’、SCAI variant 2-sense：5’-CCATCAAGGACCAGCAATTAAC-3’、SCAI variant 2-antisense：5’-CTGAGGCAAATC TTAAGCCAT-3’、SCAI variant 3-sense：5’-ACACTGGAGATGAAGAAATTTTAAAATG-3’、SCAI var-iant 3-antisense：5’-CTGAG GCAAATCTTAAGCCAT-3’。 DNA 断片および cDNA サンプルを含む標準ベクターは、それぞれ標準曲線および定量用に同時に増幅した。GAPDH を内部コントロールとして用いた。

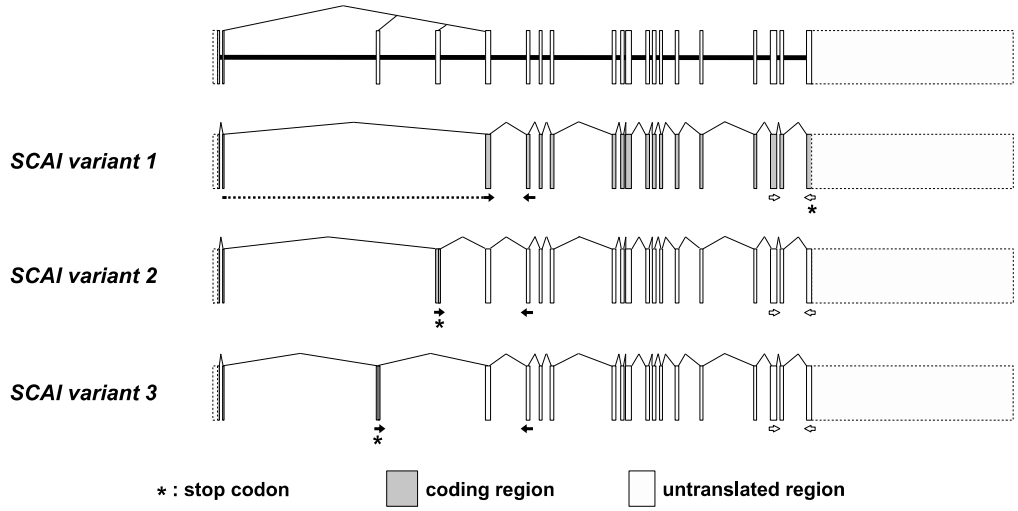


図 1. *SCAI*遺伝子の構造、スプライスバリアント、qPCR プライマー［4］
ラット SCAI バリアント 1、2、3 の遺伝子およびエクソン-イントロン構造［4］、ボックスはエクソンを示す。白矢印は total SCAI、黒矢印は SCAI バリアントのプライマーを示す。

3. ウェスタンブロット

既報に基づいて行った［5］。細胞抽出液の調製は、Whole cell (extract) buffer (25 mM HEPES、0.3 M NaCl、1.5 mM $MgCl_2$、0.2 mM EDTA、0.1%（v/v）Triton-X 20 μM β-glycerophosphate、10 μg/mL aprotinin、10 μg/mL leupeptin、1 mM Sodium orthovanadate、1 mM DTT、1 mM PMSF）により行った。ブロッティングはウェット式（BioRad）にて 100 V、90 min で行った。ブロッティング後、tris buffered saline with Tween（TBST）(97.3 mM NaCl、20 mM Tris-HCl（pH 7.5、0.1%（v/v tween-20）で溶解した 5%（w/v skim milk に、一次抗体を混合して 4℃で一晩振とうした。翌日、TBST で 5 分間 Wash を 3 回行った後、TBST に溶解した 1% skim milk に希釈した二次抗体混合溶液を室温で 1 時間処理した。1 時間後 TBST で 5 分間 Wash を 3 回行った後、enhanced chemiluminescence（ECL）systems（Amersham）を用いて、ルミノイメージアナライザーフジフィルム LAS-4000（Fujifilm）で検出を行った。

4. 天然物ライブラリースクリーニング

大脳皮質ニューロン初代培養系の調製時に、SRF の結合部位を連結した改変型ホタルルシフェラーゼベクターを導入し、96 穴プレートに播種した。培養 21 日目にルミノメーターで検出した。天然物ライブラリーは、Selleck 社より購入した。

5. 統計解析

図 2、4 のデータは、平均値±標準誤差で表した（n＝4、n は動物数）。統計解析は Microsoft Excel 2013（バージョン 15.0.5127.1000）を用い、対数変換後に Bonferroni の補正を加えた paired t-検定で行った。

結果および考察

1. BDNF は、大脳皮質ニューロンにおいて SCAI mRNA 発現を減少させる

まず最初に、大脳皮質ニューロンを BDNF で刺激し、SCAI mRNA の発現を経時的に測定した。異なる SCAI バリアントを認識するプライマーを用いた qPCR を行ったところ（図 1）、BDNF 刺激後 3 時間で、SCAI バリアント 1 と total SCAI が有意に減少した（図 2）。バリアント 2 または 3 の発現レベルは微弱で、最も発現量の多いバリアント 1 の発現レベルの約 10 分の 1 であった（図 2）。そこで、この BDNF 誘導性の発現低下に関与するシグナル伝達経路をより詳しく調べるため、バリアント 1 と total SCAI mRNA に注目した。

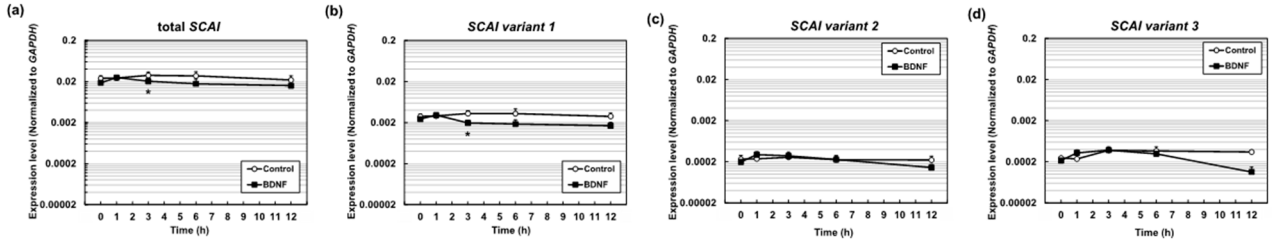


図 2. BDNF による SCAI バリアントの発現抑制［6］
100 ng/mL の BDNF で刺激した後の total SCAI（a）、SCAI バリアント 1（b）、SCAI バリアント 2（c）、SCAI バリアント 3（d）の時間経過。Total RNA を各時間で調製し、逆転写を行い、qPCR による mRNA レベルの測定に用いた。*p＜0.05/5（同時間における vs control）。

さらに、SCAI mRNA の発現量は細胞培養中に一過性に増加し、その後徐々に減少したことから（図 3）、SCAI のダウンレギュレーションと神経細胞の発達との関係が示唆された。

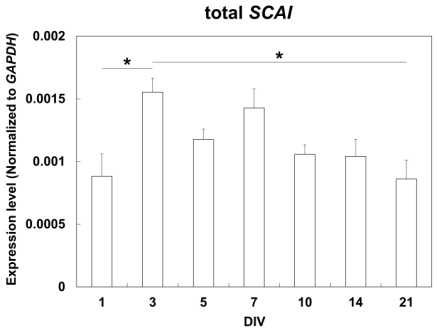


図 3. 発達中のニューロンにおける SCAI mRNA の発現レベル［6］
発達中の大脳皮質ニューロンにおける total SCAI mRNA 発現量の時間経過。1、3、5、7、10、14、21 日目に total RNA を採取し、Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix を用いて qPCR を行った。データは平均値±標準誤差を表す（n＝5～7）。統計は Turkey-Kramer の検定による一元配置分散分析で行った。*p＜0.05（vs. DIV3）。

2. BDNF による SCAI mRNA の発現抑制と MRTFB リン酸化は、ERK/MAP キナーゼを介する

Tropomyosin-related kinase B（TrkB）受容体は BDNF と結合し、シグナルを細胞内に伝播する。主なシグナル伝達経路は、ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ、細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ（ERK）／ミトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）、ホスホリパーゼ C によって媒介される［6］。Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK カスケードは、神経細胞表面における BDNF-TrkB シグナルの主な下流経路の一つである［7］。そこで次に、BDNF による SCAI mRNA レベルの低下に対する MEK 阻害剤 U0126 の効果を調べた。図 3 に示すように、U0126 は SCAI mRNA 発現に対する BDNF の抑制効果を抑制した。一方、PI3K 阻害剤である LY294002 と PLC 阻害剤である U73122 は、BDNF による SCAI バリアント 1 および total SCAI mRNA レベルの減少効果を顕著に変化させなかった（図 4）。これらの結果は、ERK/MAPK カスケードが BDNF による大脳皮質ニューロンの SCAI mRNA の減少に関与する主要な経路であることを示唆している。

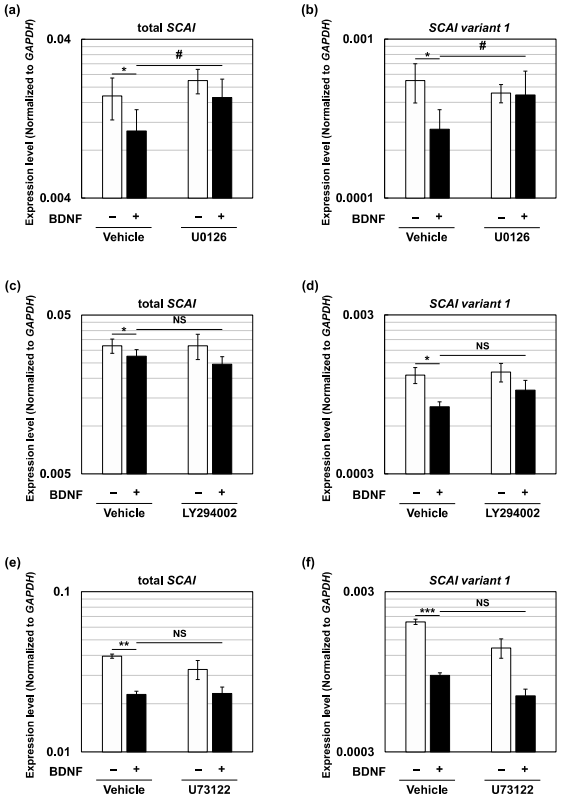


図 4. BDNF による SCAI mRNA の減少に対するシグナル阻害剤の効果［6］

BDNF 刺激（100 ng/mL）は、U0126（20 μM）、LY294002（10 μM）または U73122（10 μM）投与 30 分後に行った。BDNF 刺激の 3 時間後に total RNA を抽出し、逆転写して、qPCR による mRNA レベルの測定に用いた。*p＜0.05/2、**p＜0.01/2、***p＜0.001/2（vs. control）；＃p＜0.05/2；NS: not significant（vs. BDNF alone）。

BDNF は、c-*fos* のような代表的な SRF 標的遺伝子を活性化するリガンドである［8］。このような BDNF による SRF 介在性遺伝子発現は、MKL/MRTF を介する場合があることが報告されている［5，9］。本研究では、MKL1/MRTFA よって制御されることが報告されている遺伝子発現を抑制する SCAI の発現が、BDNF によって抑制された。このことは、BDNF 刺激後の SCAI の減少が転写の抑制を解除し、それによって神経細胞における SRF を介した転写を亢進させる可能性を示唆している。SRF の活性化は、脳の構造と機能の発達だけでなく［1］、老齢マウスの記憶回復にも重要であると報告されている［2］。また、BDNF により MRTFB がリン酸化

され、そのリン酸化経路にも ERKMAP キナーゼが関与することを阻害剤実験により示した。また、候補リン酸化部位を変異により非リン酸化させると、SRF 介在性遺伝子発現が減少する傾向を認めた。

以上のことから、BDNF が SRF 転写因子複合体の構成要素やタンパク質修飾に変化をもたらし、SRF 標的遺伝子群の発現を調節して、脳の機能発現を行っていることが考えられた。

3. 天然物ライブラリースクリーニングの確立

上記の「BDNF-MRTF-SRF」活性化を模倣するような天然物のスクリーニング系の確立を目指し、検討を行っているが、96 穴プレート上の長期間の細胞培養の過程で細胞死が進行し、ルシフェラーゼの発光検出に至らなかった。今後は、長期培養の最適化や細胞株を利用したアッセイを行い、容易に検出できるよう工夫することが重要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、富山大学学術研究部薬学・和漢系分子神経生物学研究室の伊原大輔助教である。また、本研究の遂行にあたり、富山大学薬学部分子神経生物学研究室のメンバーに深く御礼申し上げる。

文　献

1) Tabuchi A, Ihara D. SRF in Neurochemistry: Overview of Recent Advances in Research on the Nervous System. Neurochem Res. 2022 Sep;47(9):2545-2557. doi: 10.1007/s11064-022-03632-x. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35668335.

2) Iram T, Kern F, Kaur A, Myneni S, Morningstar AR, Shin H, Garcia MA, Yerra L, Palovics R, Yang AC, Hahn O, Lu N, Shuken SR, Haney MS, Lehallier B, Iyer M, Luo J, Zetterberg H, Keller A, Zuchero JB, Wyss-Coray T. Young CSF restores oligodendrogenesis and memory in aged mice via Fgf17. Nature. 2022 May;605(7910):509-515. doi: 10.1038/s41586-022-04722-0. Epub 2022 May 11. Erratum in: Nature. 2023 Jan;613(7942):E1. PMID: 35545674; PMCID: PMC9377328.

3) Tabuchi A, Ihara D. Regulation of Dendritic Synaptic Morphology and Transcription by the SRF Cofactor MKL/MRTF. Front Mol Neurosci. 2021 Nov 2;14:767842. doi: 10.3389/fnmol.2021.767842. PMID: 34795561; PMCID: PMC8593110.

4) Mizukoshi M, Nozawa A, Oomizo S, Ihara D, Shiota J, Kikuchi K, Kaito M, Ishibashi Y, Ishikawa M, Fukuchi M, Tsuda M, Takasaki I, Tabuchi A. Differential localization and roles of splice variants of rat suppressor of cancer cell invasion (SCAI) in neuronal cells. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Aug 27;529(3):615-621. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.064. Epub 2020 Jul 18. PMID: 32736682.

5) Kikuchi K, Ihara D, Fukuchi M, Tanabe H, Ishibashi Y, Tsujii J, Tsuda M, Kaneda M, Sakagami H, Okuno H, Bito H, Yamazaki Y, Ishikawa M, Tabuchi A. Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the Arc gene. J Neurochem. 2019 Jan;148(2):204-218. doi: 10.1111/jnc.14596. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30244496.

6) Ihara D, Mizukoshi M, Tabuchi A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) downregulates mRNA levels of suppressor of cancer cell invasion (SCAI) variants in cortical neurons. Genes Cells. 2024 Jan;29(1):99-105. doi: 10.1111/gtc.13086. Epub 2023 Nov 27. PMID: 38009531.

7) Ihara D, Miyata T, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. SRF and SRF Cofactor mRNA Expression Is Differentially Regulated by BDNF Stimulation in Cortical Neurons. Biol Pharm Bull. 2023 Apr 1;46(4):636-639. doi: 10.1248/bpb.b22-00825. Epub 2023 Feb 18. PMID: 36801840.

8) Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. Nat Rev Neurosci. 2013 Jan;14(1):7-23. doi: 10.1038/nrn3379. PMID: 23254191.
9) Kalita K, Kharebava G, Zheng JJ, Hetman M. Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. J Neurosci. 2006 Sep 27;26(39):10020-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2644-06.2006. PMID: 17005865; PMCID: PMC6674463.