

## 転写因子 Npas4 による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構

吉原 誠一, 坪井 昭夫

### 1. はじめに

我々の脳の中では、神経細胞（ニューロン）どうしがシナプスを介して、複雑かつ巧妙につながり合っており、外界からの刺激を受容・処理し、適応している。大脳皮質や網膜などの神経回路は、外界からの感覚入力によって生じた神経活動に応じて再編され、刺激に適応した回路に成熟するという“可塑性（plasticity）”があることが知られている。また、海馬においては、経験による神経活動依存的なシナプス形成が新たな記憶形成の重要な基盤になっていると考えられている。一方、このような神経活動依存的なシナプス形成に異常をきたすと、自閉症や精神発達遅滞などの精神疾患が引き起こされると考えられており、神経活動依存的な回路形成の分子機構の解明は、生物学的にも医学的にも重要な課題である。

近年の研究により、神経活動依存的な回路形成に関与する分子カスケードの上流には、CREB、MEF2やMeCP2などの転写因子が存在することがわかっている<sup>1)</sup>。脳内の神経細胞で活動が活発化し、細胞内カルシウム濃度が上昇すると、Ca<sup>2+</sup>カルモジュリン依存性キナーゼ（Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase）やカルシニューリン（calcineurin）などのシグナル分子が活性化され、上述した転写因子をリン酸化または脱リン酸化する。修飾により活性化された転写因子は、その下流にあるc-fos、Arc、egr-1、Npas4などの最終期遺伝子（immediate early gene）の発現を誘導して、シナプス形成を促進すると考えられている<sup>1)</sup>。したがって、上述した転写因子の下流遺伝子の同定やその機能解析は、神経活動依存的な回路形成の分子機構を理解するのに、きわめて重要な課題である。

最近、ハーバード大のMichael Greenbergらにより、上記の最終期遺伝子の一つである転写因子Npas4が、大脳皮質

や海馬などのニューロンにおいて神経活動依存的なシナプス形成に重要な役割を果たすことが明らかにされた<sup>2)</sup>。また、Npas4ノックアウトマウスは、不安、抑うつ様行動や学習行動障害を示すので、Npas4は精神疾患と密接に関連していると推測されている<sup>3)</sup>。以上のことから、Npas4による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構に関して、近年、注目が集まっている。

我々はこれまで、成体でも常時新生されている嗅球の介在ニューロン（olfactory bulb interneuron）の発達機構について研究してきた。そして最近、嗅球介在ニューロンにおいて、匂い刺激に応じて発現量に変化する遺伝子を体系的に探索したところ、匂い刺激によりNpas4遺伝子が速やかに発現誘導され、シナプス形成を促進していることを見いだした<sup>4)</sup>。さらに、嗅球介在ニューロンにおいて、Npas4は微小管結合タンパク質であるダブルコルチン（doublecortin: Dcx）のタンパク質量を調節することにより、シナプス形成の度合いを制御しているという新規の分子メカニズムを明らかにした<sup>4)</sup>。本稿では、我々の知見を中心にして、Npas4による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構について紹介する。

### 2. 神経活動依存的にシナプス形成を促進する転写因子 Npas4

Npas4は当初、bHLH（basic helix-loop-helix）とPAS（Per/Arnt/Sim）ドメインを持った脳特異的に発現する転写因子NXFとして、住友化学の大江師久らにより、世界に先駆けて同定された（図1）<sup>5)</sup>。NXFはPASドメインを持った別の転写因子であるArntとヘテロ二量体を形成して、アクチン結合タンパク質であるドレブリン（Drebrin）遺伝子の発現を正に制御することが報告されたが<sup>5)</sup>、シナプス形成との関連は不明であった。その後、NXFはNpas4（neuronal PAS domain-containing protein 4）と改名され、以下のように、大脳皮質や海馬の興奮性ニューロンにおいて神経活動依存的にシナプス形成を促進する機能を持つことが明らかにされている<sup>2)</sup>。1) 大脳皮質や海馬の興奮性ニューロンにおいて、Npas4遺伝子の発現が神経活動により速やかに誘導される。2) 産生が誘導されたNpas4タンパク質は、神経栄養因子であるBDNF（brain-derived neurotrophic factor）遺伝子のプロモーター領域に結合して、その発現

奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学  
〒634-8521 奈良県橿原市四条町840

**Transcription factor Npas4 regulates the development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons depending on sensory experience**

Sei-ichi Yoshihara and Akio Tsuboi (Laboratory for Molecular Biology of Neural System, Advanced Medical Research Center, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan)  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880220

© 2016 公益社団法人日本生化学会

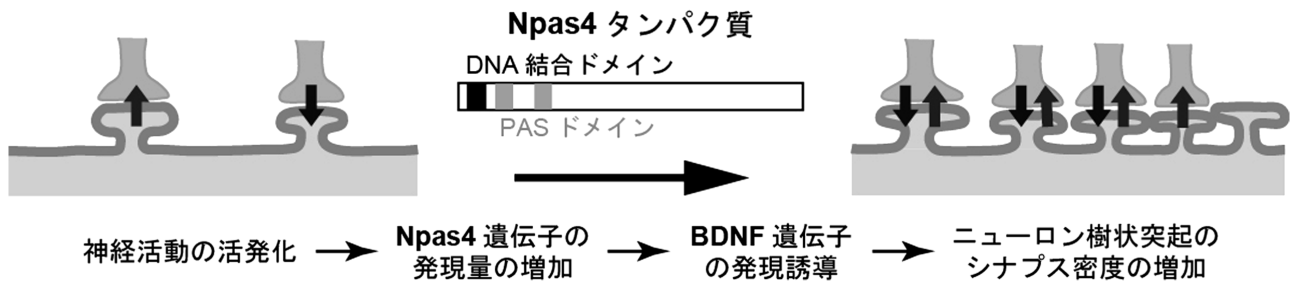


図1 興奮性ニューロンにおける転写因子 Npas4 の機能

神経活動によって発現が誘導される Npas4 は PAS ドメインを持つ転写因子であり、下流の遺伝子の発現を制御する。大脳皮質や海馬の興奮性ニューロンにおいては、神経活動によって Npas4 の発現が上昇すると、下流ターゲットである BDNF の発現を誘導することにより、シナプス数の増加を引き起こすことが知られている。

を誘導する。3) Npas4 により BDNF 遺伝子の発現が誘導されることで、興奮性ニューロンにおける抑制性のシナプス形成が促進される (図1)。また、Npas4 欠損マウスは記憶学習行動や情動・認知行動に異常を示すことから<sup>3,6)</sup>、Npas4 はこれらの行動の獲得のみならず、経験依存的な神経回路の可塑性の成立にも重要な役割を果たすと考えられている。実際に、海馬の CA3 ニューロンにおける Npas4 遺伝子の発現が、恐怖条件づけ文脈学習 (contextual fear conditioning) の成立に必須であることが示されている<sup>6)</sup>。さらに、Npas4 遺伝子の発現は BDNF 遺伝子の発現上昇を介して、海馬の CA1 ニューロンにおいて細胞体上の抑制性シナプスを増加し、樹状突起上の抑制性シナプスを減少させるというシナプスの再配置を引き起こすことも報告されているが<sup>7)</sup>、ニューロンの部位特異的なシナプス再配置の分子機構は不明である。脳内のニューロンは、上述したグルタミン酸作動性の興奮性ニューロンと、GABA (gamma-aminobutyric acid) 作動性の抑制性ニューロンの2種類に大別されるが、Npas4 による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構は両者で異なると報告されている<sup>7,8)</sup>。すなわち、大脳皮質や海馬の興奮性ニューロンでは、Npas4 により BDNF 遺伝子の発現が誘導されることで、抑制性のシナプス形成が促進されるが<sup>7)</sup>、大脳皮質の抑制性ニューロンでは、Npas4 は BDNF 以外の Nptx2 (neuronal pentraxin-2) 遺伝子などの発現を制御することにより、興奮性のシナプス形成を促進すると推測されている<sup>8)</sup>。しかしながら、抑制性ニューロンでの Npas4 の作用機序についてはまったくわかっていない。最近、我々は抑制性ニューロンにおいて、Npas4 が神経活動依存的にシナプス形成を制御する分子機構を明らかにしたので、次に詳細に述べる。

### 3. Npas4 による嗅球介在ニューロンの神経活動依存的なシナプス形成の制御機構

嗅細胞で感知された匂い情報はその軸索を通して、一次投射先である嗅球に伝えられ、処理されている。嗅球

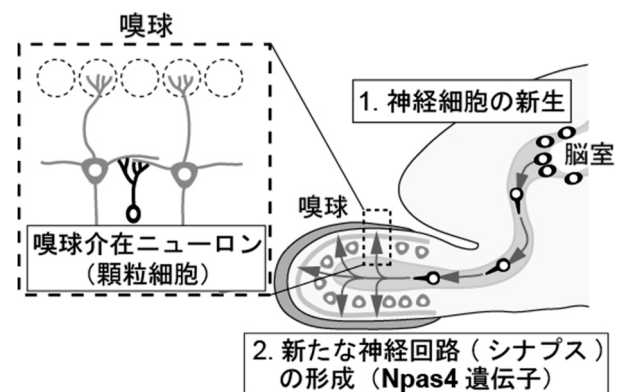


図2 嗅球介在ニューロン (顆粒細胞) の発達

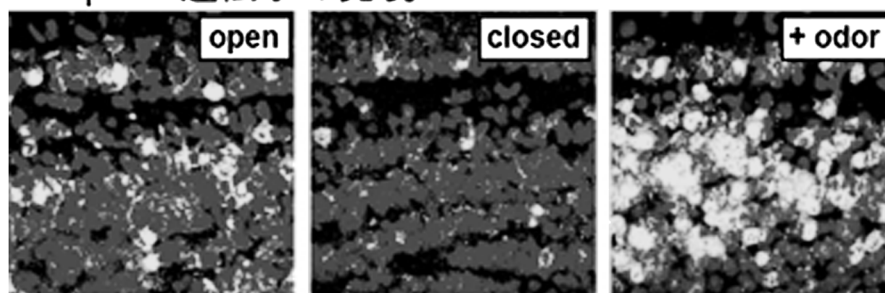
抑制性の嗅球介在ニューロン (顆粒細胞) は成体になっても脳室周辺で新しく産まれて、嗅球に移動し、既存の神経回路に組み込まれている。

における抑制性の介在ニューロンである傍糸球細胞 (periglomerular cell) や顆粒細胞 (granule cell) は、嗅覚二次ニューロンである僧帽細胞 (mitral cell) や房飾細胞 (tufted cell) とシナプスを形成し、匂い分子の検出や識別などの情報処理を行っている (図2)。また、嗅球介在ニューロンは例外的に、胎生期のみならず成体においても常に新生され、既存の神経回路に編入されるという興味深い特徴を持っている。近年、嗅球における介在ニューロンの樹状突起の発達や神経回路の形成には、匂い刺激により誘発される神経活動が必要であることが報告されているが、その分子メカニズムは明らかにされていなかった。

#### 1) 神経活動依存的なシナプス形成を制御する転写因子

我々は最初に、匂い刺激による神経活動が嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達にどのような影響を及ぼすのかを検討した。マウスの片鼻の鼻孔を閉じて匂い刺激を遮断すると、閉じた側の嗅球において縮退がみられた。これは匂いが遮断された側の嗅球において、介在ニューロンのアポトーシスが亢進されることによると考えられる。次に、匂い刺激を遮断されたマウスにおける嗅球介在ニュー

## A Npas4 遺伝子の発現



## B 嗅球介在ニューロン樹状突起のスパイン



図3 Npas4の嗅球介在ニューロンにおける機能

(A)鼻を閉じて匂い刺激を遮断したマウスの嗅球では、嗅球介在ニューロンでNpas4の発現(白)が顕著に減少した。匂い刺激を加えると対照的に、Npas4の発現が強く誘導された。(B)レンチウイルスによりNpas4を過剰発現させる(GOF: gain of function)と嗅球介在ニューロンの樹状突起のスパイン密度が増加した。Npas4 ノックアウトマウス(LOF: loss of function)では対照的に、そのスパイン密度が減少した。

ロンを可視化するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターを嗅球介在ニューロンの幹細胞に感染させた<sup>9)</sup>。レンチウイルスに感染させて2週間後に、嗅球介在ニューロンの形態を解析したところ、その樹状突起上に存在する“スパイン(spine)”と呼ばれるトゲ状の構造体の数が、鼻を閉じた側において減少していることがわかった。スパインにはシナプスが存在していることから、ニューロンどうしの接続には、匂い刺激による神経活動が必要であることが明らかになった。さらに、匂い刺激依存的なシナプス形成の分子メカニズムを明らかにするために、鼻の開いている側と閉じている側の嗅球の間で発現が変動している遺伝子を、DNAマイクロアレイと*in situ*ハイブリダイゼーションを用いてスクリーニングした。その結果、嗅球介在ニューロンにおいてNpas4遺伝子の発現が、匂い刺激依存的に誘導されることを新たに見いだした(図3A)。そこで、Npas4の機能を明らかにするために、レンチウイルスベクターを用いて、嗅球介在ニューロンにおいてNpas4遺伝子を過剰発現させた。その結果、Npas4が過剰に産生された嗅球介在ニューロンでは、通常のニューロンに比べて、樹状突起上のスパイン密度が増加していた。一方、Npas4遺伝子の発現をRNAiによりノックダウンした嗅球介在ニューロンや、Npas4 ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンでは、通常のニュー

ロンに比べて樹状突起上のスパイン密度が減少していた(図3B)。これらの結果から、匂い刺激による神経活動によりNpas4遺伝子が速やかに発現誘導され、Npas4遺伝子の発現量に応じて、嗅球介在ニューロンのスパイン密度の増減が制御されていることが明らかになった<sup>4)</sup>。

## 2) Npas4 遺伝子の下流で神経活動依存的なシナプス形成を制御する因子

Npas4は転写因子であることから、スパイン形成を制御する下流遺伝子の発現を調節していると推測される。そこで、Npas4が発現制御する下流遺伝子を探索するために、Npas4タンパク質が結合するDNA領域をその抗体を用いて同定するクロマチン免疫沈降シーケンシング(chromatin immunoprecipitation-sequencing: ChIP-Seq)を行った。そして、ChIP-Seqにより得られた候補遺伝子について、野生型とNpas4 ノックアウトマウスにおける発現を比較したところ、タンパク質の分解を促進するユビキチンリガーゼの一種であるMdm2(mouse double minute 2)遺伝子の発現が、野生型と比べてNpas4を欠損した嗅球介在ニューロンにおいて増加していることがわかった。さらに、Mdm2がユビキチン化し、分解する標的タンパク質を、iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)というプロテオミクスの手法で探索した。その結果、Npas4 ノック



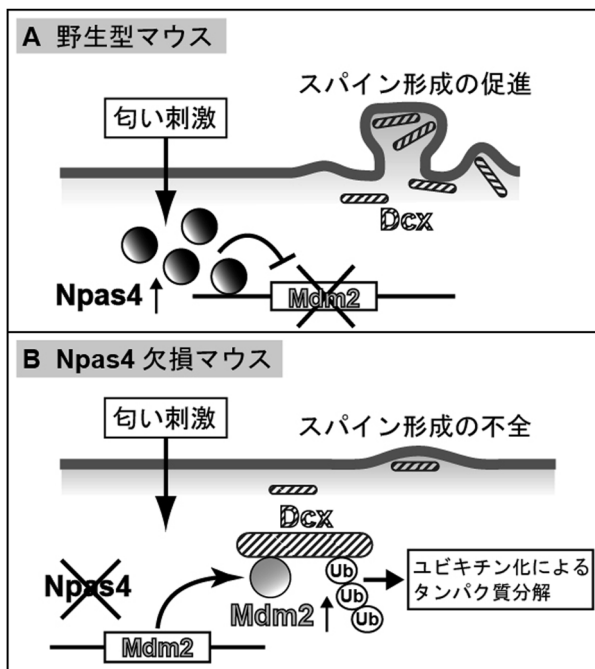


図4 Npas4によるスパイン形成の制御機構

(A)野生型の嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激によりNpas4の発現量が増加し、Mdm2の発現を抑制している。(B)Npas4を欠損した嗅球介在ニューロンでは、Mdm2の発現量が増加して、ダブルコルチン(Dcx)タンパク質の分解が促進される。Dcxはスパイン形成を促進するので、Npas4がDcxタンパク質の量を調節することにより、新たに作られるスパインの数を制御している。

アウトマウスの嗅球介在ニューロンでは、Mdm2の増加に応じて、微小管結合タンパク質であるダブルコルチン(Dcx)のユビキチン化と分解が促進されていることが判明した。また、嗅球介在ニューロンにおいて、ダブルコルチン遺伝子のみを過剰発現させると、樹状突起上のスパイン密度が増加することがわかった。以上の結果から、嗅球介在ニューロンでは、Npas4遺伝子の発現量に応じて、Mdm2によるダブルコルチンのユビキチン化や分解を調節することで、スパイン密度を制御していることが明らかになった(図4)<sup>4)</sup>。

匂い刺激が高頻度で与えられ、神経活動が活発になった嗅球介在ニューロンでは、Npas4遺伝子の発現量が増加するのに応じて、樹状突起上のスパイン密度が増加して、より多くのニューロンと接続できるようになると推測される。また、嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激に応じて樹状突起上のスパイン密度が制御されることにより、嗅球内の神経回路がより洗練されたものに改編されていると考えられる。実際に、嗅球介在ニューロンで特異的にNpas4をノックアウトしたマウスでは、二つの光学異性体のうちの片方の分子と砂糖を関連づけた匂い識別学習ができなくなるので、嗅球介在ニューロンにおける匂い刺激によるスパ

イン密度の制御は、嗅覚情報の精密な処理に必要であることが明らかになった<sup>4)</sup>。

#### 4. 今後の展望

Npas4遺伝子は嗅球介在ニューロンだけでなく、大脳皮質や線条体等の他の種類の抑制性ニューロンにおいても発現しているので、これらのニューロンの神経活動依存的なシナプス形成も制御していると推測されるが、その分子機構は不明である<sup>8)</sup>。したがって、嗅球介在ニューロンにおけるNpas4によるスパイン形成の制御機構が、他の抑制性ニューロンにも適用されるかどうかを検討する必要がある。また、微小管結合タンパク質であるダブルコルチンは、幼若ニューロンの移動を制御していることが知られていたが<sup>10)</sup>、我々のNpas4の機能解析を通して、ダブルコルチンが嗅球介在ニューロンの樹状突起におけるスパイン形成を促進する機能を持つことが初めて明らかになった(図4)<sup>4)</sup>。スパインはアクチン繊維が密集している構造であることが知られているが、スパインと微小管繊維との関連はほとんどわかっていない。今後、ダブルコルチンがスパイン形成を促進するメカニズムを詳細に解析することにより、スパイン形成に関する新規メカニズムが明らかになると考えられる<sup>11)</sup>。さらに、嗅球介在ニューロン特異的なNpas4ノックアウトマウスに関して、嗅球における情報処理機構を電気生理学的に解析することで、嗅球介在ニューロンによる匂い刺激依存的な神経回路再編の生理的意義が解明されると期待される。

それに加えて、Npas4は医学的にも興味深い性質を持っている。脳梗塞モデルマウスにおいて、梗塞により障害された脳の周辺領域(penumbra)で、Npas4遺伝子の発現が顕著に上昇していることが報告されている<sup>12)</sup>。この現象は、梗塞時に障害されたニューロンではNpas4遺伝子の発現が増加して、神経回路の再編を促進することにより、損傷部位での神経回路の修復を亢進する可能性を示唆している。また、脳梗塞モデルマウスにおいては、嗅球介在ニューロンの一部が損傷した脳の領域に移動し、神経回路を修復する性質を持っていることが知られている<sup>13)</sup>。したがって、今後、脳梗塞モデルマウスにおけるNpas4の機能解析から得られる知見は、脳血管障害時の神経回路修復における新たな治療法の開発という臨床医学への応用にもつながると期待される。

#### 謝辞

本稿で紹介した研究は、科学研究費補助金の基盤研究(B)・(C)、挑戦的萌芽研究および新学術領域研究(適応回路シフト)、上原記念生命科学財団、喫煙科学研究財団、山田科学振興財団、アステラス病態代謝研究会、武田科学

振興財団の助成を受けて行われました。また、本研究は奈良県立医科大学・脳神経システム医科学講座にて行われたものですが、共同研究者の高橋弘雄博士（奈良県立医科大学）、山田清文博士（名古屋大学）、平井宏和博士（群馬大学）ならびに、研究室のメンバーに深く感謝いたします。

## 文 献

- Nonaka, M., Kim, R., Sharry, S., Matsushima, A., Takemoto-Kimura, S., & Bito, H. (2014) *Neurobiol. Learn. Mem.*, **115**, 21–29.
- Lin, Y., Bloodgood, B.L., Hauser, J.L., Lapan, A.D., Koon, A.C., Kim, T.K., Hu, L.S., Malik, A.N., & Greenberg, M.E. (2008) *Nature*, **30**, 1198–1204.
- Coutellier, L., Beraki, S., Ardestani, P.M., Saw, N.L., & Shamloo, M. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e46604.
- Yoshihara, S., Takahashi, H., Nishimura, N., Kinoshita, M., Asahina, R., Kitsuki, M., Tatsumi, K., Furukawa-Hibi, Y., Hirai, H., Nagai, T., Yamada, K., & Tsuboi, A. (2014) *Cell Reports*, **8**, 843–857.
- Ooe, N., Saito, K., Mikami, N., Nakatuka, I., & Kaneko, H. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 608–616.
- Ramamoorthi, K., Fropp, R., Belfort, G.M., Fitzmaurice, H.L., McKinney, R.M., Neve, R.L., Otto, T., & Lin, Y. (2011) *Science*, **334**, 1669–1675.
- Bloodgood, B.L., Sharma, N., Browne, H.A., Trepman, A.Z., & Greenberg, M.E. (2013) *Nature*, **503**, 121–125.
- Spiegel, I., Mardinly, A.R., Gabel, H.W., Bazinet, J.E., Couch, C.H., Tzeng, C.P., Harmin, D.A., & Greenberg, M.E. (2014) *Cell*, **157**, 1216–1229.
- Yoshihara, S., Takahashi, H., Nishimura, N., Naritsuka, H., Shirao, T., Hirai, H., Yoshihara, Y., Mori, K., Stern, P.L., & Tsuboi, A. (2012) *J. Neurosci.*, **32**, 2217–2226.
- Fu, X., Brown, K.J., Yap, C.C., Winckler, B., Jaiswal, J.K., & Liu, J.S. (2013) *J. Neurosci.*, **33**, 709–721.
- Yoshihara, S., Takahashi, H., & Tsuboi, A. (2015) *Front. Neurosci.*, **9**, 514.10.3389/fnins.2015.00514
- Shamloo, M., Soriano, L., von Schack, D., Rickhag, M., Chin, D.J., Gonzalez-Zulueta, M., Gido, G., Urfer, R., Wieloch, T., & Nikolic, K. (2006) *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 2705–2720.
- Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., & Sawamoto, K. (2010) *Stem Cells*, **28**, 545–554.

## 著者寸描

### ●吉原 誠一（よしはら せいいち）



奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学講師。理学博士。

■略歴 1973年東京都に生る。96年東京大学理学部卒業。2002年同大学院理学系研究科博士課程修了。同年理化学研究所脳科学総合研究センター研究員。06年奈良県立医科大学先端医学研究機構助教。14年より現職。

■研究テーマと抱負 成体新生嗅球介在ニューロンの発達機構とその生理的意義の解明。成体においても常に新生され続けている新生嗅球介在ニューロンの発達機構とその臨床応用への可能性について関心を持っています。

■ウェブサイト <http://www.narmed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

■趣味 水泳。

### ●坪井 昭夫（つばい あきお）



奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学教授。農学博士。

■略歴 1957年名古屋市に生る。80年名古屋大学農学部卒業。82年同大学農学部助手。89年米国DNAX分子細胞生物学研究所博士研究員。93年東京大学医科学研究所客員研究員。同年岡崎基礎生物学研究所助手。96年東京大学大学院理学系研究科助手。2000年JST・PRESTO研究員

兼任。06年より現職。

■研究テーマと抱負 匂い感覚のシステム、即ち、嗅覚系をモデルにして「神経回路がどの様にして形成され維持されるのか、また神経回路が何らかの原因で破壊された時、どの様にして再構築されるのか」を明らかにし、嗅覚系にとどまらず神経系全般に適用し得る基本原理を解明することを目指しています。

■ウェブサイト <http://www.narmed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

■趣味 映画・音楽鑑賞。