

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500263

研究課題名（和文） 前初期遺伝子産物 Arc のスパイン制御機能の解析

研究課題名（英文） Regulation of dendritic spines by immediate early gene product Arc

研究代表者

奥野 浩行（OKUNO HIROYUKI）

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80272417

研究成果の概要：神経特異的前初期遺伝子の産物である Arc は、長期シナプス可塑性および長期記憶形成に必須な分子である。本研究では Arc の発現制御機構およびシナプスにおける動態・機能制御機構を解析し、以下の成果を得た。1. Arc 蛋白のスパイン局在は PSD タンパクとの相互作用によってシナプス活動依存的に制御されることが明らかになった。2. Arc 遺伝子の神経活動依存的発現の分子機構を解明した。この応用として神経活動依存的な遺伝子発現レポーターを構築し、個体動物において脳活動の可視化に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

神経細胞に高頻度シナプス刺激を与えると、シナプス長期増強（LTP）等の成立と並行して前初期遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子が速やかに且つ一過的に誘導される。蛋白合成や mRNA 合成を阻害すると神経活動依存的なシナプス可塑性は長期化せず一過性に終わることから、この前初期遺伝子群の発現はシナプス変化の長期保持については神経回路の再編成に重要な

役割を果たす可能性が高いと考えられている。

前初期遺伝子の一つ Arc は発見以来、神経可塑性への関与が示唆されてきたが、生理的および生物学的機能は長らく不明であった。しかし最近、複数の研究室からノックアウトマウスや RNAi によるノックダウン法を用いた研究結果が報告され、Arc は様々なシナプス・神経回路の可塑性および認知機能に密接に関与していることが明らかになり、現在、もっとも注目さ

れる可塑性関連分子の一つとなった。また、Arc mRNA は先天性脳機能疾患 Fragile X syndrome の原因遺伝子 FMRP によって樹状突起部局所でのタンパク翻訳が制御されている可能性が示唆されている。しかし、このような興味深い性質にもかかわらず、Arc 遺伝子の発現制御機構や遺伝子産物の動態・機能制御機構に関しては未だほとんど不明のままである。

2. 研究の目的

本研究はこれまで申請者が推進してきた神経特異的前初期遺伝子の生物学的・生理学的機能に関する研究 (Okuno and Miyashita, Eur. J. Neurosci. 1996; Okuno et al., J. Comp. Neurol. 1999; Tokuyama, Okuno et al., Nat. Neurosci. 2000) を継続し、更なる発展を目指すものである。本研究では特に Arc 遺伝子に注目し、これまで申請者が見いだした知見 (Chowdhury et al., Neuron, 2006 および Okuno et al., Soc. Neurosci, Abstr. 2004) を基に以下の3つの目標、

目標1: Arc 蛋白のスパインにおける PSD 蛋白との相互作用の解析

目標2: Arc 蛋白の樹状突起における動態解析

目標3: Arc 遺伝子の神経活動依存的発現機構の解析

に焦点を絞り研究を進める。

これまで Arc の研究は、遺伝学的アプローチや認知科学・行動学的パラダイムを通して生理的・生物学的機能の探索を中心に行われてきたが、Arc のシナプス機能制御機構および Arc 蛋白自体の時・空間的な制御機構に関してはほとんど知見が集まっていない。本研究においては、海馬培養細胞を薬理的・電氣的またはフォトリス法によって神経活動依存的な遺伝子発現や蛋白合成を誘導する系を用いて Arc 蛋白の神経活動依存的な動態および遺伝子発現機構の詳細な解析を行う。本研究を推進することにより、シナプス・神経回路可塑性、さらに認知機能の分子基盤の理解に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) Arc 蛋白のスパインにおける PSD 蛋

白との相互作用の解析

これまでの研究において、神経細胞にシナプス刺激を与えると Arc は速やかに発現誘導され樹状突起の幹部およびスパインに挿入されることが明らかにされている。しかし最近これまでの予想とは異なり、誘導された Arc はシナプス活動を抑制するとスパインへの集積が促進され、逆に、シナプス刺激を続けるとスパインから除去されるという興味深い現象が観察された。この新しいタイプの活動依存的なシナプス局在制御機構を明らかにするため、海馬培養神経細胞を用いて、Arc と結合するシナプス関連タンパクを short hairpin 型の RNAi 法によって発現抑制することにより、Arc のシナプス局在への影響を検討した。

また、精製蛋白質を用いた生化学的手法によりタンパク-タンパク相互作用のカルシウム依存性を検討した。

(2) Arc 蛋白の樹状突起における動態解析
神経細胞において Arc のシナプス局在様式をより詳細に解析するため、Arc の細胞内局在の動態をリアルタイムに検出する系を構築した。

内在性 Arc の発現様式を模するため、既に単離・同定済みである Arc プロモーター (下記参照) を用いて蛍光タンパク融合 Arc を発現させるベクターを作製した。この系により海馬培養神経細胞にて発現させた GFP-Arc のスパインにおける挙動を定量的に解析した。

(3) Arc 遺伝子の神経活動依存的発現機構の解析

神経特異的・活動依存的な遺伝子発現制御は Arc による個々の神経細胞におけるシナプス機能制御および大脳における認知機能の調節機構を理解する上で重要である。マウスのゲノムより Arc 遺伝子のプロモーター上流領域を約 10kb を単離し、この領域のフラグメントについてルシフェラーゼ解析を行い、複数の転写調節領域を同定した。さらに、部分欠損や点変異を導入することにより制御コンポーネントの同定を試みた。また、得られたエレメントを用いて蛍光または発光レポーターシステムを作成し、単一神経細胞での遺伝子発現をリアルタイムで観察する系の構築を試みた。

さらに蛍光レポーターシステムをレンチウイルスベクターへ組み込み、培養細胞を用いたライブイメージングおよび子宮内感染法による個体動物におけるレポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) Arc蛋白のスパインにおける PSD 蛋白との相互作用

海馬培養神経細胞において Arc は BDNF 投与やシナプス刺激により速やかに発現誘導される。特異的抗体を用いた免疫染色により、この新規誘導された Arc 蛋白が速やかに樹状突起スパインに挿入されることを定量的に解析した。さらに、シナプス活動による Arc のスパイン局在への影響を検討したところ、予想とは反して、Arc のスパイン局在はシナプス不活性化により安定化されることが明らかになった (Okuno et al., under revision)。

上記の分子機構を明らかにするため、酵母 2 ハイブリッドシステムにより Arc 結合タンパクをスクリーニングしたところ、カルシウム・カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) 等の PSD 蛋白が同定された。shRNA 法により CaMKII の発現レベルを抑制すると、Arc のシナプス局在に変化がみられたことから、Arc シナプス局在への Arc - CaMKII との相互作用に重要性が示唆された。

In vitro binding アッセイにより CaMKII と Arc の相互作用を解析したところ、リン酸化にともなう構造変化に対応した相互作用の変化が確認され、Arc - CaMKII 相互作用がシナプスにおける Arc 局在の活動依存性の分子基盤の一つとなりうることを示唆された (Okuno et al., under revision)。

(2) GFP-Arc のスパインにおける動態

GFP 融合 Arc を神経細胞に活動依存的に発現させる系を確立し、生細胞イメージングにより Arc のスパイン挿入・シナプス集積を観察した。その結果、(1) で見いだしたシナプス不活性化によるスパイン集積の可視化に成功した (Okuno et al., under revision)。

(3) Arc の活動依存的発現制御機構の解析

ヒトとマウスの Arc プロモーター領域の比較ゲノム解析を行い、複数の相同領域を見出した。この領域の刺激応答性を、初代培養神経細胞を用いたレポーターアッセイによって測定した。その結果、マウス Arc 遺伝子の 7kb 上流の位置で強い刺激応答性を示す 100 塩基の配列を同定し、この配列を Synaptic Activity Responsive Element (SARE) と名付けた。

この SARE を含む Arc プロモーターの下

流でホタル発光蛋白を発現させるレポータープラスミドを作成、培養神経細胞において電気刺激後の発光の経時的変化の定量解析に成功した。

SARE の遺伝子発現活性化の分子機構を解析したところ、SARE には 3 つの活動依存的転写因子 CREB, MEF2, SRF の結合部位が近接して存在することが EMSA および ChIP アッセイにより明らかになった。また、SARE の活性化にはこれらの 3 つの転写因子結合部位がいずれも必要であった。薬理的解析により SARE の活性化は CaM キナーゼ経路および MAP キナーゼ経路の 2 つのシグナリング経路によって担われていることが示唆された (Kawashima et al., 2009)。

(4) SARE を用いた活動依存的レポーターウイルスの作成

SARE を利用して最小活動依存プロモーター (SARE-ArcMin) を作製し、この下流で蛍光蛋白を発現させるレポーターレンチウイルスを作製した。海馬培養神経細胞にレポーターウイルスを感染させ、ライブイメージングにより観察したところ、電気刺激による遺伝子発現応答をモニタリングすることが可能であった。

このウイルスを母胎内のマウス胎児脳室に注入・感染させることによりレポーターを個体動物の脳に導入した。成長後のマウスに単眼遮蔽を施し、左右の脳視覚野の活動に不均衡を生じさせたところ、左右の視覚野におけるレポーターの発現には優位な差があった。すなわち、レポーターウイルスにより脳の活動を可視化することに成功した (Kawashima et al., 2009)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF and Bitto H. A 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**, 316-321, 2009. 査読有り

尾藤晴彦、野中美応、布施俊光、藤井哉、竹本 木村さやか、奥野浩行、シナプス機能と PSD 構築を制御する分子機構、

蛋白質核酸酵素, **53**, 418-423, 2008. 査読なし

Takemoto Kimura S, Ageta -Ishihara N, Nonaka M, Adachi -Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, **Okuno H.**, Bito H. Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK -III/CaMKI gamma. *Neuron* **54**, 755-770, 2007. 査読有り

[学会発表](計13件)

Okuno H., Kawashima T, Adachi -Morishima A, Okamura M, Bito H. Synaptic activity-dependent regulation of neuronal immediate-early gene Arc/Arg3.1. **第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 (BMB2008)**, 2008.12.10, 神戸、口頭発表およびポスター

Okuno H., Kawashima T, Adachi -Morishima A, Okamura M, Worley P, Bito H. Critical genomic sequences for synaptic activity-dependent expression of the Arc gene. *Soc. Neurosci. Abstr.* **38.12**, **第38回北米神経科学学会年会**, 2008.11.15, Washington DC, USA. Poster

奥野 浩行、川島 尚之、安達 森島 亜希、岡村 理子、尾藤 晴彦。可塑性関連遺伝子Arcの活動依存的発現調節を担うゲノムエレメントの同定。 **第51回日本神経化学会大会**, 2008.9.13, 富山、口頭発表

Okuno H., Kawashima T, Nonaka M, Takemoto Kimura S, Fujii H, Chowdhury S, Worley P, Bito H. Regulation of synaptic localization of Arc protein through interaction with Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II beta. *6th FENS Forum 2008*, 2008.7.16, Geneva, Switzerland, Poster

Kawashima T, **Okuno H.**, Okamura M, Bito H. A novel synaptic activity-responsive element of the Arc promoter, **第31回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008)**, 2008.7.9, 東京、口頭発表

Okuno H., Fujii H, Nonaka M,

Ageta -Ishihara N, Fuse T, Takemoto Kimura S, Bito H. Quantitative imaging for elucidating neuronal signal transduction mechanisms. **第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会・合同大会 (BMB2007)**, 2007.12.14, 横浜. Zeiss Luncheon symposium、口頭発表

Okuno H., Fujii H, Fuse T, Nonaka M, Takemoto Kimura S, Bito H. Regulation of PSD complex by neuronal activity. **第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会・合同大会 (BMB2007)**, 2007.12.11, 横浜. symposium.

Morinobu S, Takahashi T, Iwamoto Y, Kawano K-I, Yamawaki S, **Okuno H.**, Bito H. Neonatal isolation induces susceptibility to learned helplessness through the decrease in LIMK1 in the adult rat hippocampus. *Soc. Neurosci. Abstr.* **501.2**. **第37回北米神経科学学会年会**, 2007.11.5, San Diego, USA. Poster

Okuno H., Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Nonaka M, Chowdhury S, Worley P, Bito H. Synaptic targeting of Arc via high affinity interaction with Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II beta. *Soc. Neurosci. Abstr.* **221.3**, **第37回北米神経科学学会年会**, 2007.11.4, San Diego, USA. Slide

Okuno H., Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Chowdhury S, Worley P, Bito H. Regulation of Arc localization at synapses via interaction with CaMKII beta, **第30回日本神経科学大会 (Neuro2007)**, 2007.9.10. 横浜、口頭発表

Okuno H., Naruse H, Bito H. Optical analysis of activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons. *2nd International workshop on Approaches to Single-Cell Analysis*, 2007.9.6-9.7, Tokyo, Japan. Poster

Okuno H., Fujii H, Naruse H, Kawashima T, Worley P, Bito H. Regulation of Arc/Arg3.1 localization in dendritic spines via interaction with Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II. *7th HFSP Awardee Meeting*, 2007.7.19,

Brisbane, Australia, Poster

Okuno H. Visualization of activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons. *1st International Symposium on Nanomedicine - from Basic to Applications - (ISNM2007) / 2nd Molecule-Based Information Transmission and Reception (MB-ITR2007)*. 2007.4.21, Okazaki, Japan. Slide (invited)

〔図書〕(計2件)

奥野浩行、藤井哉、尾藤晴彦：情報素子としてのシナプス構造・機能ならびに新たな疾患制御標的としての意義 - p220-233, in *ナノメディシン* 宇理須恒雄 編、オーム社、東京、2008.

Bito H, Takemoto Kimura S, Okuno H. Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs? p215-225, in "*Molecular Pain*" (M. Zhuo ed. Springer), 2008.

〔その他〕

新聞記事

2009年1月15日 朝日新聞(近畿版)

「記憶のきっかけ DNA配列発見」

雑誌掲載論文 (Kawashima T, Okuno H., Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto Kimura S, Worley PF and Bito H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 316-321, 2009.) に関する研究内容紹介記事。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 浩行 (OKUNO HIROYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80272417

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし