

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500301

研究課題名（和文） シナプス可塑性関連遺伝子 *Arc* の神経特異的・活動依存的発現制御の分子機構研究課題名（英文） Molecular basis of neuron-specific, activity-dependent regulation of the plasticity-related gene *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（和文）：神経特異的前初期遺伝子 *Arc* はシナプスの長期可塑性や長期記憶形成に関わり、その発現は神経活動によって制御されている。本研究においては、まず、この *Arc* の活動依存性を担うゲノム領域を決定し、この転写調節に関わる因子を同定した。また、*Arc* 遺伝子産物である *Arc* タンパクがシナプスに局在し、グルタミン酸受容体の動態を制御する新たな機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The neuronal immediate-early gene *Arc*, which plays critical roles in long-term synaptic plasticity and long-term memory formation, is dynamically regulated by neuronal activities in the brain. Through this study, we have determined several genomic regulatory elements in the *Arc* promoter, and have identified transcription factors that contribute to activity-dependent expression. We further uncovered a novel mechanism by which *Arc* protein is localized and thus regulates glutamate receptor trafficking at synapses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：シナプス、脳・神経、ゲノム、転写調節、*Arc*

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経活動依存的な遺伝子発現

外部からの刺激に応じて発現誘導される遺伝子は細胞、組織または個体の外界応答や順応に重要な役割を担っている。脳において活動依存的な遺伝子発現は正常な神経回路を形成するための根源的な分子メカニズムの一つであり、成熟脳においても長期シナプス・神

経可塑性や長期記憶の形成・保持に必要な機構である。中でも、前初期遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群はシナプス刺激に対して最も早く、かつ、一過的に活性化されるため、活動依存的変化の初期相を担う因子として注目を集めてきた。

(2) 可塑性関連遺伝子 *Arc*

前初期遺伝子群の中で、近年特に注目されている遺伝子の一つとして *Arc* が挙げられる。*Arc* 遺伝子は生理的な刺激に対して極めて高い発現誘導性を示し、現在大脳における神経活動の遺伝子マーカーとしてもっともよく用いられる分子の一つである。この遺伝子産物 *Arc* タンパクは後シナプスに存在し、LTP や LTD 等の長期シナプス可塑性および長期記憶形成に極めて重要な役割を果たすことが近年明らかになってきた (Wang et al., 2006; Plath et al., 2006)。

(3) *Arc* の発現調節機構

研究代表者らは、近年 *Arc* 遺伝子の高い発現誘導性の分子機構の解析を進めてきた。その結果、マウスゲノムにおいて *Arc* の転写開始部位より約 7 kb 程の上流領域に強い神経活動依存的なプロモーター活性を持つエレメントが存在することを発見した (Kawashima et al., *PNAS*, 2009)。このエレメントは 100bp 程度で十分な活性を持ち、活動依存的転写因子である CREB, SRF, MEF2 の結合配列を含んでいた (図 1)。また、その活性化にはカルシウム・カルモジュリンキナーゼ (CaM キナーゼ) 経路および MAP キナーゼ経路が関与していた。シナプス活動応答エレメント (Synaptic Activity Responsive Element, SARE) と名付けたこのゲノム配列は *Arc* の転写以外に一部の non-coding RNA の発現に関わるなど、重要な機能を持つことが明らかになった (Kim et al., 2010)。

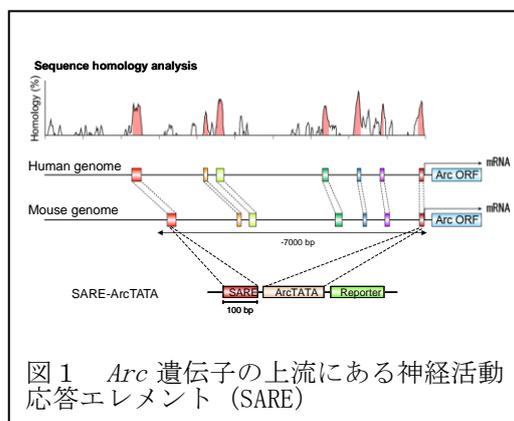


図 1 *Arc* 遺伝子上流にある神経活動応答エレメント (SARE)

2. 研究の目的

本研究では、これまでに明らかになった *Arc* の活動依存的発現機構を基にして更なる解析を進め、シナプス-核シグナルのカップリング機構および *Arc* 発現の生理的意義を明らかにすることを目的とする。具体的には以下の項目に関して研究を進める。

(1) SARE-タンパク複合体の解析

これまで CREB, SRF, MEF2 の 3 つの転写因子はいずれも単独で活動依存的な遺伝子発現制御を行うことは知られている。しか

しながら、SARE において、これらの因子がどのように相互作用しながら働いているかは不明である (図 1)。この協調性の原理を解析し、*Arc* のユニークな活動依存性を決定するメカニズムを解き明かす。

(2) SARE 活性化シグナリングの解析

SARE 活性化にはシナプスから核へのシグナル経路として CaM キナーゼ系および MAP キナーゼ系が関与することが明らかになったが、その詳細な機構はほとんど不明である。これら二つの経路の使い分および統合原理を解き明かす。

(3) *Arc* の神経特異性を決定するエレメントの同定

Arc プロモーターの主な活動依存性は SARE によって担われているが、SARE 以外の領域にも重要な機能を持つエレメントが存在すると考えられる。特に、神経細胞特異性は *Arc* 発現を特徴づける重要な性質であるため、これを決定するエレメントの同定を行う。

(4) *Arc* と共発現する活動依存的遺伝子群

既に関与済みである *Arc* プロモーターを利用した遺伝子発現レポーターを利用することにより、大脳において、転写活性化の起こった神経細胞を非侵襲的にリアルタイムで同定できるようになった。この細胞群において *Arc* 発現と他の活動依存的遺伝子の発現との相関を検討する。

(5) SARE ウイルスレポーターの開発

本研究による *Arc* 発現活性化機構を利用したウイルスレポーターを開発することにより、従来の動物種を超えた、サルなどの大型哺乳動物への応用も視野に入れた *Arc* 分子マッピングを可能にする。

3. 研究の方法

(1) SARE-タンパク複合体の解析

SARE には 3 つの転写因子 CREB, MEF2, SRF の結合配列からなるサブエレメントが存在する (図 1)。本研究では、SARE に結合する蛋白複合体および個々のサブエレメントの機能を解明するため、培養神経細胞を用いて点変異を挿入した SARE を用いたルシフェラーゼアッセイやクロマチン免疫沈降 (ChIP アッセイ) によって解析を行った。

(2) シナプスから核へのシグナリング解析

神経細胞において CREB, MEF2, SRF がどのような細胞内シグナリング経路によって活性化されるのかは明らかではなかった。これまでの知見に基づき CaMK および MAPK 経路の関与について、培養神経細胞を用いて薬理的にシグナル阻害を行った際の CREB リン酸

化等を指標に検討した。

(3) Arc プロモーターにおける神経特異性エレメントの探索

完全長の Arc プロモーターは SARE による高い神経活動依存性に加えて、高い神経特異性を持つ (Okuno, Bito, 未発表データ)。そこで、SARE 同定の際と同様に Arc の神経特異性を決定づけるエレメントをプロモーター欠損変異による領域同定法や最小プロモーターへの付加によるエレメント同定法により探索した。

(4) 神経活動レポーターによるインビボ発現解析

これまで神経特異的・活動依存的な遺伝子発現制御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開発してきた(図2)。本研究ではさらに、レンチウイルス(LV)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いたレポーター等を作成し、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。さらに並行して進めてきたArcプロモーター制御下にある発光または蛍光レポータータンパクを外来遺伝子として持つトランスジェニック(Tg)マウスを用いて神経活動とArcレポーター発現の関係を個体の脳で解析した。

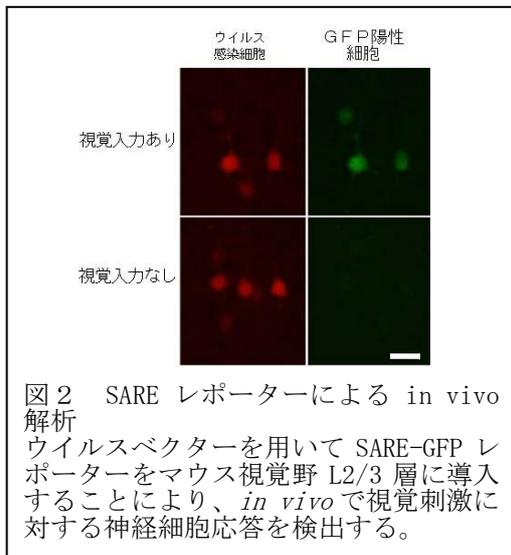


図2 SARE レポーターによる in vivo 解析
ウイルスベクターを用いて SARE-GFP レポーターをマウス視覚野 L2/3 層に導入することにより、in vivo で視覚刺激に対する神経細胞応答を検出する。

(5) Arc タンパクの樹状突起動態および PSD 蛋白との相互作用の解析

シナプス活動によって誘導された Arc の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 RNAi 法によって発現抑制し、Arc のシナプス局在への影響を検討した。

また、Arc の細胞内局在の動態をリアルタイムに検出するため、Arc プロモーター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、これを海馬培養神経細胞に導入し

て GFP-Arc のスパインにおける挙動を定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) SARE-タンパク複合体

SARE の遺伝子発現活性化に対する転写因子 3 つの CREB, MEF2, SRF およびそれらのコアクチベーターの関与を解析したところ、CREB のコアクチベーターの一つ CRTC (TORC) が大きく関与していることが明らかになった (Nonaka et al., under revision; Nonaka et al., Neuroscience 2011)。また、他のコアクチベーターの関与を示す結果も得られている。以上の結果に基づき、SARE 部位における DNA-タンパク複合体のモデルを提唱した (図3) (Okuno, *Neuroscience Res.*, 2010)。

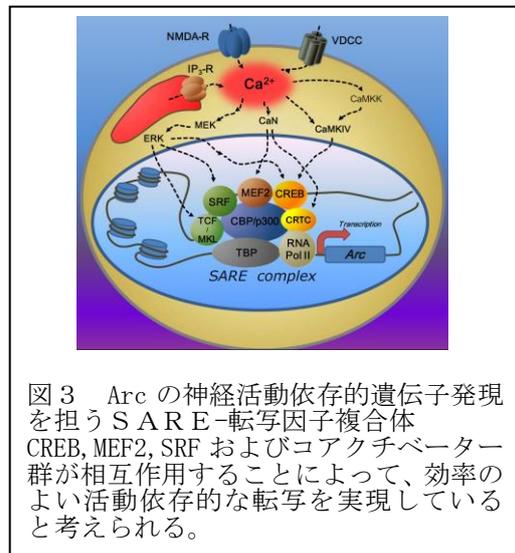


図3 Arc の神経活動依存的遺伝子発現を担う SARE-転写因子複合体 CREB, MEF2, SRF およびコアクチベーター群が相互作用することによって、効率のよい活動依存的な転写を実現していると考えられる。

(2) シナプスから核へのシグナリング解析

シナプス可塑性を誘導する電気刺激を与えると、長期増強(LTP)等のシナプス変化とともに Arc をはじめとする可塑性関連タンパクが誘導される。この際のシナプスから核へのシグナリングを薬理的におよび電気生理学的に解析したところ、CaMKK 特異的な阻害剤 STO-609 によって後期相の LTP および CREB のリン酸化が阻害された (Redondo et al., *JNS*, 2010)。一方、CaMKII 特異的な阻害では CREB のリン酸化には影響を及ぼさなかった。これらよりシナプスから核へのシグナリングの一つとして CaMKK-CaMKIV-CREB 経路が関わっていることが強く示唆された (Redondo et al., *JNS*, 2010)。

(3) Arc プロモーターにおける神経特異性エレメントの探索

Arc プロモーターにおける大脳皮質神経細

胞を用いてルシフェラーゼアッセイにより探索したところ、プロモーター領域が長い (>4 kb) ほどグリア細胞での発現は抑制されていた(Okuno et al., unpublished)。また SARE100bp に Arc の転写開始部位付近 400bp を組み合わせた AAV レポーターを用いて同様の解析を行ったところ、高い神経特異性および神経特異的な活動依存的遺伝子発現が認められた(Kawashima et al., under revision)。これらの結果から AAV の neurotropism を考慮にいれても、SARE 自体も神経特異性を担っている可能性が示唆された。

(4) 神経活動レポーターによるインビボ発現解析

転写活性化の起こった神経細胞を同定し、生化学的および分子生物学的解析を行うためには生きた個体脳で遺伝子活性化レポーターの発現を検出する必要がある。そこでアデノ随伴ウイルス(AAV)に搭載した遺伝子活性化レポーターをマウスの視覚野およびパレル野に感染し、その個体に感覚刺激を与えて脳活動とレポーター発現を解析したところ、レポーターである蛍光タンパクは実体顕微鏡および2光子顕微鏡によって単一細胞レベルで検出することに成功した(Kawashima et al., under revision)。また、Arc プロモーター制御下にある発光または蛍光レポータータンパクを外来遺伝子として持つトランスジェニック(Tg)マウスを用いて Arc レポーター発現を解析したところ、視覚野において視覚刺激等応じて顕著な蛍光タンパクレポーターの増加が認められた。

また、記憶課題遂行中のラットの大脳における Arc の遺伝子発現を調べたところ、記憶の速やかな固定化には海馬および前頭前野での Arc 発現が関与している可能性を示唆する結果が得られた(Tse et al., *Science*, 2011)

(5) Arc タンパクの樹状突起動態および PSD 蛋白との相互作用の解析

海馬培養神経細胞を用いて Arc プロモーター-GFP-Arc をもちいて、Arc の細胞内局在の動態をリアルタイムに解析したところ、Arc は活動の少ないシナプス(不活性シナプス)に多く集積することを明らかにした。また、シナプスにおける Arc の存在量は AMPA 型グルタミン酸受容体の表面発現量と負の相関を示していた。さらに、Arc の不活性シナプスへの集積機構としてカルシウム/カルモジュリン非結合状態の CaMKII β (不活性型 CaMKII β) との相互作用が重要であることが示された(Okuno et al., *in press*)。

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7件)

- ① Tse, D; Takeuchi, T; Kakeyama, M; Kajii, Y; Okuno, H; Tohyama, C; Bito, H; Morris, RGM. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science*, 査読有, **333**, 891-895, (2011). DOI: 10.1126/science.1205274
- ② Komatsu, T; Johnsson, K; Okuno, H; Bito, H; Inoue, T; Nagano, T; Urano, Y. Real-time measurements of protein dynamics using fluorescence activation-coupled protein labeling method. *JACS*, 査読有, **133**, 6745-6751, (2011). DOI:10.1021/ja200225m
- ③ Okuno, H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Res.* 査読有, **69**, 175-186, (2010). DOI:10.1016/j.neures.2010.12.007
- ④ Inoue, M; Yagishita-Kyo, N; Nonaka, M; Kawashima, T; Okuno, H; Bito, H. Synaptic Activity Responsive Element (SARE): a unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Commun. Integr. Biol.* 査読無, **3**, 443-446, (2010). DOI:10.4161/cib.3.5.12287
- ⑤ Redondo, R.L; Okuno, H; Spooner, P.A; Frenguelli, B.G; Bito, H; Morris, R.G.M. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 査読有, **30**, 4981-4989, (2010). DOI:10.1523/JNEUROSCI.3140-09.2010
- ⑥ 奥野浩行. シナプスから核へのシグナリングとシナプス活動依存的遺伝子発現: 前初期遺伝子 Arc の発現制御メカニズムを中心に. "生化学", 査読有, **82**, 841-846, (2010). <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/82-09-07.pdf>

- ⑦ **奥野浩行**、川島尚之、野中美応、尾藤晴彦。
”シナプスから核へのシグナリング：シナ
プス可塑性を長期化する分子機構，**細胞
工学**、査読無，**28**、894-899，(2009)。

[学会発表] (計12件)

- ① Ishi, Y; **Okuno, H**; Tomatsu, T; Nagano, T; Urano, Y; **Bito, H**. Real-time imaging of synaptic receptor trafficking using a fluorescence activation-coupled protein labeling (FAPL) method. 第41回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2011), 2011年11月16日, Washington DC コンベンションセンター (米国)、ポスター発表。
- ② Nonaka M; Fukushima, H; Kawashima, T; Suzuki, K; **Okuno, H**; Kida, S; **Bito, H**; Increased nuclear shuttling of CRTCl enhances activity-regulated CREB-dependent gene expression and long-term memory formation. 第41回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2011), 2011年11月15日, Washington DC コンベンションセンター (米国)、ポスター発表。
- ③ Morris, RG.; Tse, D; Takeuchi, T; Kakeyama, M; Kajii, Y; **Okuno, H**; Toyama, C; **Bito, H**. Gene activation and memory encoding in neocortex during hippocampus-dependent learning. 第41回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2011), 2011年11月14日, Washington DC コンベンションセンター (米国)、ポスター発表。
- ④ **Okuno, H**. Mechanisms of Arc targeting to synapses. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases/Association for the Study of Neurons and Diseases, 2011年8月4日, 富山クラウンプラザホテル (富山県)、招待講演。
- ⑤ **Okuno, H**; Fujii, H; Kawashima, T; Nonaka, M; Yagishita-Kyo, N; Ishii, Y; Takemoto-Kimura, S; Chowdhury, S; Worley, PF; **Bito, H**. Enhanced synaptic accumulation of activity-driven Arc protein during sensory deprivation in the mouse visual cortex. 第40回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2010)、2010年11月17日, San Diego コンベンションセンター (米国)、ポスター発表。
- ⑥ Fujii, H; Inoue, M; **Okuno, H**; Takemoto-Kimura, S; **Bito, H**; Dual FRET-based analysis of biochemical computation performed by neuronal Ca²⁺ signaling processes. 第40回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2010)、2010年11月16日, San Diego コンベンションセンター (米国)、口頭発表。
- ⑦ **Okuno, H**; Kawashima, T; Yagishita-Kyo, N; Ishii, Y; Takemoto-Kimura, S; **Bito, H**. Synaptic inactivity enhances postsynaptic contents of activity-induced Arc protein in the neocortex. 第33回日本神経科学学会年会 (Neuro2010)、2010年9月4日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)、ポスター発表。
- ⑧ Kawashima, K; **Okuno, H**; **Bito, H**. Multiple regulatory elements in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synaptic activity-responsive gene expression in activated neurons. 第32回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009) 2009年12月12日, パシフィコ横浜 (神奈川県)、ポスター発表。
- ⑨ **Okuno, H**. Activity-dependent gene regulation and nucleus-to-synapse signaling for synaptic plasticity” UNAM Symposium ”Learning and Memory”, 2009年11月12日, UNAM 神経生物学研究所 (ケラタロ州・メキシコ)、招待講演。
- ⑩ Redondo, R.L; Okuno, H; Spooner, P.A; Frenguelli, B.G; **Bito, H**; Morris, RG.M. Differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. 第39回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2009)、2009年10月18日, Chicago コンベンションセンター (米国)、ポスター発表。
- ⑪ Fujii, H; Inoue, M; Ishii, Y; **Okuno, H**; **Bito, H**. Single spine dual FRET imaging to better understanding synaptic biochemical network. 第32回日本神経科学大会, 2009年9月18日, 名古屋国際会議場 (愛知県), シンポジウム講演。
- ⑫ **Okuno, H**; Kawashima, T; Nonaka, M; Nan, K; **Bito, H**. Synaptic activity-dependent regulation of plasticity-related gene Arc/Arg3.1. IUPS2009, 2009年7月28日, 京都国際会議場 (京都府)、ポスター発表。

〔図書〕（計1件）

- ① Yagishita-Kyo, N; Inoue, M; Nonaka, M; **Okuno, H**; Bito H. “CREB” in “**Encyclopedia of Signaling Molecules**” Springer, 掲載確定（印刷中）、（2012 出版予定）

〔その他〕

本研究成果の一部は以下の URL で一般に公開されている。

- ① 東京大学 Todai Research
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/todai-research/research-information/the-law-of-the-synapses-punishing-the-weak-to-maintain-strong-synapses-strong/>
- ② 科学技術振興機構プレスリリース
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120511/index.html>

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

尾藤 晴彦 (BITO HARUHIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00291964