

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25日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800011

研究課題名（和文） 記憶行動とシナプス形態を制御する遺伝子発現調節因子の作用機序の解明

研究課題名（英文） Deciphering the activation mechanisms of a transcriptional regulator, implicated in the modulation of synaptic morphology and memory behavior.

研究代表者

野中 美応 (NONAKA MIO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：30583885

研究成果の概要（和文）：

CREBは長期記憶の形成に必要な転写因子であり、本研究の対象となるCRTC1はその補助因子である。本研究では、神経細胞内でのCRTC1の活動依存的な核移行に必要なリン酸化部位を同定した。また、CRTC1の核移行と転写活性化の関係を具に調べ、CRTC1によるCREB活性化機序は、これまで広く必須だと信じられてきたCREBリン酸化経路とは独立であることを明らかにした。さらに、ウイルスによる個体への遺伝子導入法を最適化し、CRTC1の恒常的核内局在型をマウス脳の両側海馬に発現させることによって長期記憶が向上することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

CREB is a critical transcription factor in forming long-lasting memory. CRTC1, a molecule of focus in this study, is the coactivator for CREB. In this project, we have identified phosphorylated sites of CRTC1 that are required for its activity-dependent nuclear translocation in neuronal cells. Next, we investigated the causal relationships between CRTC1 nuclear translocation and the CRE-dependent transcription activity, and revealed that the CREB activation via CRTC1 is independent from the CREB phosphorylation pathway, which had widely been believed to be essential for CRE-dependent gene expression. Lastly, we developed and optimized the in vivo viral injection method and have shown that expressing the constitutively nuclear form of CRTC1 bilaterally in the mouse hippocampus enhanced long-term memory formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：医歯薬学・神経科学一般

キーワード：長期記憶、遺伝子発現、シナプス、転写因子

1. 研究開始当初の背景

CREBは記憶の長期化に必須な転写因子であり、本研究の中心であるCRTC1はその転写の強さを調節する「アンプ」である。活性型CRTC1を用いてCRTC1-CREB経路を人工的に増強すると、c-Fos, Arc, BDNFといった記憶形成の立役者（最初期遺伝子）の発現が増強されることが明らかになっている。また、脾臓や肝臓においては、CRTC1がCREBのリン酸化を伴わずに下流遺伝子の転写を活性化することが知られているが、神経細胞においてはまだ検証されていない。また、個体脳内の長期記憶形成におけるCRTC1の役割について言及した研究は例がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、主に以下の3つである。

- (1) CRTC1の核移行メカニズム、及び、CRTC1によるCREBの転写増強のメカニズムを、生化学的手法を用いて明らかにする。
- (2) CRTC1やCREBの活性型によるスパイン形態制御を明らかにする。
- (3) ウイルスを用いて、CRTC1の機能阻害、及び、活性型のin vivo発現により、長期記憶への影響を調べる。

3. 研究の方法

- (1) ①CRTC1がCREBの遺伝子発現を増強するメカニズムを調べるため、CRTC1の構成的活性型変異体、及び、薬剤応答核移行型の変異体を作成する。
②Mass spectrometryを用いてCRTC1の神経活動依存的に脱リン酸化を受けるリン酸化部位を同定する。また、同様の手法で、CRTC1の結合タンパク質を同定する。
- (2) IMARISという解析ソフトを用いて共焦点顕微鏡画像の3次元構築を行い、シナプスにおける可塑性を反映するとされるスパインの形態変化を定量的に評価する。
- (3) CRTC1活性型を、ウイルスを用いてマウス脳内に導入し、動物個体内のCREB依存的遺伝子発現を操作して記憶行動への影響を評価する。

① ウイルスの条件検討：レンチウイルスとアデノ随伴ウイルス(AAV)の脳内注入実験を行い、ウイルス感染状況をもとに、適したウイルス・及び、その亜型の検討を行う。また、ウイルス産生と精製の条件検討を行い、高力価で高純度のウイルスを得られるよう検討する。

② ウイルス導入法の改良：ウイルスによる遺伝子導入を正確かつ迅速に行うため、手術用部品を改良し、技術習熟度を高め、ウイルス注入の時間短縮を行い、かつ、高い成功率を達成する。行動実験に用いるのに十分な、ウイルス注入動物を得られるようになれば、行動実験のパラメータを検討する。

4. 研究成果

(1) ①国立循環器病研究センターの佐々木一樹先生との共同研究により、Mass Spectrometryを用いて、刺激有/無の両条件の神経細胞から精製したCRTC1サンプルの解析を行った。その結果、CRTC1のリン酸化部位・結合タンパク質を多数同定し、このうち活動依存的に脱リン酸化される残基を2カ所同定した。この知見をもとに、活性型変異体を作成した。

②ChIPアッセイの実験手技を改良し、代表的な最初期遺伝子のプロモータ領域へのCRTC1の結合を示した。

③神経活動に関係なく薬剤に応答して核移行するCRTC1変異体を用いた実験を行い、他の生化学実験の結果と総合して、CRTC1の核移行が、神経細胞においても、真にCREBリン酸化とは独立した経路であることを示した。

(2) CRTC1の野生型、或いは活性型を過剰発現すると、興奮性シナプスの特徴的構造であるスパインの体積が増大することを明らかにした。このとき、スパインの密度については変化が見られなかった。また、活性型CREBの発現によっても同様の表現型を得られた。

(3) ①行動実験を行うに十分な高力価のウイルスの産生・精製法を最適化し、また、十分に迅速でハイスループットなインジェクション方法を開発し、東京農業大学喜田聡

教授の研究室との共同研究により、文脈依存的恐怖記憶実験を行った。その結果、AAVによる海馬特異的なCRTC1活性型発現が記憶を増強することを明らかにした。さらに、この現象が活性型CRTC1の発現量に依存することも示した。

②RNAi搭載型のノックダウン用ウイルスを開発し、in vivoで効果的に標的遺伝子の発現を抑制することを確認した。

以上の成果を、SfN 2011, Washington DCにて発表し、国際誌に投稿・再投稿を行った。

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 2 件)

①Hiroyuki Okuno, Kaori Akashi, Yuichiro Ishii, Nan Yagishita-Kyo, Kanzo Suzuki, Mio Nonaka, Takashi Kawashima, Hajime Fujii, Sayaka Takemoto-Kimura, Manabu Abe, Rie Natsume, Shoaib Chowdhury, Kenji Sakimura, Paul F. Worley, Haruhiko Bito. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII. *Cell* 査読有, Volume 149, Issue 4, 2012 pp886-898, DOI, 10.1016/j.cell.2012.02.062

② 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.* 査読有 2010 Volume 3, Issue 5. pp443-446 DOI, 10.4161/cib.3.5.12287

[学会発表] (計 7 件)

① Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Nonaka M, Okuno H, Bito H.

Novel roles of CaMKK-CaMKI cascades in neuritogenesis and circuit formation.

第 34 回 日本分子生物学会年会, 演題番号: 1S1pII-2

(パシフィコ横浜, 神奈川県, 2011.12.13) Symposium

② Nonaka M, Fukushima H, Kawashima T, Satoshi K, Okuno H, Bito H.

Increased nuclear shuttling of CRTC1 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 “SfN 2011” Presentation No. 660.07

(米国 Washington DC コンベンションセンター, 2011.11.15) Poster

③尾藤晴彦、野中美応、川島尚之、柳下一姜楠、竹本一木村さやか、奥野浩行

シナプスから核へのシグナリングの解読

第 34 回 日本神経科学大会 “Neuroscience 2011” 演題番号: S2-F-1-1

(パシフィコ横浜 神奈川県, 2011.9.15) Symposium

④ Horigane S, Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Ageta-Ishihara N, Suzuki K, Nonaka M, Okamura M, Nishimura YV, Kawauchi T, Nakajima K, Okuno H, Bito H. Regulation of radial migration of cortical pyramidal neurons by a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade. *J. Pharmacol. Sci.* 115 Suppl. 1

132P, P1J2-1, 2011.

第 84 回日本薬理学会年会 (パシフィコ横浜
神奈川県 2011. 3. 22) poster.

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. Soc. Neurosci.
Abs. 850. 8, 2010

第 40 回 北米神経科学学会年会 “SfN
2010” (米国, San Diego コンベンションセ
ンター, 2010. 11. 17) Poster

⑥ Nonaka M, Kawashima T, Okamura M, Okuno
H, Bito H. Molecular dissection of the
critical role of CRTCl-CREB in regulating
neuronal immediate early gene expression.
Neurosci. Res. 68, Suppl., e88, 02-3-4-3,
2010

第 33 回日本神経科学学会年会 (神戸国際会
議場 兵庫県, 2010. 9. 3) Oral presentation

⑦ Bito H, Kawashima T, Inoue M,
Yagishita-Kyo N, Nonaka M, Fujii H, Okuno
H. Signaling from the synapse to the
nucleus and back to the synapse. Neurosci.
Res. 68, Suppl. e10, S1-5-1-6, 2010.

第 33 回日本神経科学学会年会 (神戸国際会
議場 兵庫県, 2010. 9. 2) Symposium

[図書] (計 2 件)

① Yagishita-Kyo N, Inoue M, Nonaka M,
Okuno H, Bito H.: “CREB in Encyclopedia
of Signaling Molecules (Choi, Sangdun
(Ed.))” Springer, 掲載確定
2013 年 1 月 1 日 発行予定 (on line)

ISBN 978-1-4419-0460-7

② 野中美応、金亮、奥野浩行、尾藤晴彦
中外医学社、2012 年

“Annual Review 2012 神経”

ISBN 978-4-498-12896-5

pp43-49

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 美応 (NONAKA MIO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：30583885

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし