

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04258

研究課題名(和文) シナプス可塑性関連因子Arcによる認知機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Role of synaptic plasticity-related gene Arc on regulating cognitive function in the brain

研究代表者

奥野 浩行 (Hiroyuki, OKUNO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80272417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞同士の情報伝達の間であるシナプスは脳の高次機能を担う最小の素子として働きます。本研究ではシナプスの活動によって発現制御されている遺伝子(活動依存的遺伝子)の一つであるArc(アーク)がシナプス機能を調節するしくみをマウスなどの動物モデルを用いて調べ、長期記憶や神経可塑性(神経回路がしなやかに変化する性質)に関与していることを明らかにしました。また脳の海馬という領域においてArcを発現する細胞は1ヶ月以上時間を経た古い記憶の想起時に重要な働きをしていることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶の形成、維持および想起メカニズムは古くより学術的な興味対象として多くの研究者によって調べられてきましたが、その分子機構に関してはいまだに多くが未解明のまま残されています。本研究ではArcという遺伝子による新しい分子制御モデルを提唱し、それが実際の大脳で起こっていることを明らかにしました。記憶や認知機能の分子的基盤解明は発達障害や認知症などに対する新たな治療法および予防策に役に立つと考えられます。

研究成果の概要(英文)：The synapse, a site of communication between two neurons, operates as a minimal functional unit that underlies a variety of cognitive functions including learning and memory. This study aims to investigate the molecular basis of synaptic regulation through a gene called, Arc, whose expression is regulated in turn by synaptic activities. Our analysis revealed that Arc is involved in for formation and maintenance of long-term memory as well as experience-dependent neural plasticity. Furthermore, we found that Arc-expressing neurons in the hippocampus play a critical role for retrieval of a month-old memory in mice. Our results suggest a fundamental role of Arc in cognitive function in the brain.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：シナプス可塑性 記憶 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

大脳記憶メカニズムの解明と理解は単なる学術的な興味対象であるばかりでなく、近年では発達障害や認知症などによる脳機能障害に対する新たな治療法および予防策を考える上で極めて重要である。日常の経験や学習から得た知識や情報は記憶として大脳の神経ネットワークに保持され、必要に応じて呼び出されアップデート機構により新たな情報が追加される。この時、記憶ネットワークを構成する個々の神経細胞ではシナプスの変化が起こっていると考えられるが、このシナプス変化を長期的に維持するためには経験依存的、学習依存的な遺伝子発現が必要であることが知られている。しかしながら、この遺伝子発現がどのようにシナプスの変化を固定化し、さらにそれがどのように記憶保持やアップデートに関わっているのかという、遺伝子と認知・行動の間をつなぐシナプスレベル、細胞レベルのメカニズムについては現在もほとんど明らかになっていない。

神経活動によって誘導される遺伝子発現に関わる遺伝子の中でも、前初期遺伝子 (Immediate early genes, IEGs) と呼ばれる遺伝子群は刺激に対して素早く、かつ、一過的に活性化されるため、学習依存的な神経変化の初期相を担う因子として注目を集めてきた。これまで申請者は、この IEG 発現をマウス、ラット、さらにニホンザルの大脳において解析してきた。近年、申請者は神経特異的な IEG の中でも特に注目されている遺伝子の一つ *Arc* に焦点を当ててその発現誘導機構や機能の解明を中心に研究を進めてきた。その結果、*Arc* はポストシナプスにおいて AMPA 型グルタミン酸受容体の動態を制御すること (Chowdhury et al., 2006)、*Arc* 遺伝子の素早い発現誘導にはシナプス活動応答エレメント (SARE) と名付けたゲノムエレメントが中心的な役割を果たすこと (Kawashima et al., 2009)、また、この発現誘導機構を利用した遺伝子発現システムなどを構築してきた (Mikuni et al., 2013; Kawashima et al., 2013)。さらに *Arc* のシナプス動態と局在機構を詳細に解析した結果、*Arc* と CaMKII β 間にタンパク質-タンパク質相互作用が動的に制御されていることを発見し、この動的相互作用により *Arc* のシナプス局在が制御されて単一シナプスレベルでグルタミン酸受容体の動態を制御していることを見出し報告した (Okuno et al., 2012)。しかしながら、活動依存的に発現した *Arc* mRNA から翻訳された *Arc* タンパク質がどのようにシナプス後部に運ばれ、そこでどのようにシナプス機能を修飾しているのかという本質的な問題については明らかになっておらず、核とシナプス間をつなぐシグナリングの理解には至っていない。また、*Arc* のシナプス調節機能がどのように認知機能を調節しているかについての詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究計画では *Arc* のシナプス調節機能が神経可塑性に果たす役割を明らかにし、さらに個体のにおける *Arc* の生理的機能探索を行うことにより、*Arc* の一過的な活動依存的発現およびシナプス調節機構が大脳認知機能に果たす役割を明らかにすることを目的とする。このため以下の目標を立てて研究を実施した。

目標1 *Arc* によるシナプス調節機構の解明

申請者らのこれまでの研究により、核・細胞体で転写・翻訳された *Arc* タンパク質は樹状突起において活性化されていないシナプスに集積しやすいことが明らかになってきた。この現象は強いシナプスを選択的に修飾するシナプスタギング仮説と反対の性質を示すため、“逆シナプスタギング”と呼ぶべき機構である。この *Arc* の逆シナプスタギング機構によるスパイン形態変化や安定性の制御およびグルタミン酸受容体の表面発現制御について培養細胞系およびインビボにおいて解析し、分子機構の解明を目指す。

目標2 *Arc* 発現神経回路の生理学的機能の解明

これまでに申請者は国内外の研究者らと協働して各種の遺伝子改変マウスや部位特異的遺伝子改変を行うためのウイルスベクターを作製してきた。本研究課題ではこれらの資源を最大限に生かし、*Arc* が認知機能へ果たす役割を解明する。特に *Arc* 部位特異的欠損マウスや *Arc* プロモーター依存的リコンビナーゼ発現 Tg マウス等を用いて *Arc* 発現神経ネットワークに機能介入し神経可塑性や各種の認知機能課題による評価を行う。

目標3 *Arc* 活性化回路における認知プロセスと関連する遺伝子発現

これまでの研究により *Arc* と共発現する活動依存的遺伝子群プロファイルが徐々に明らかになってきた。本研究ではこのような *Arc* 活性化神経細胞において発現する遺伝子群を単離し、その機能探索を行う。また *Arc* 活性化細胞におけるエピゲノム変化の検出についても試みる。

3. 研究の方法

目標1. *Arc* によるシナプス調節機構の解明

(1) 培養神経細胞を用いたグルタミン酸受容体表面発現の動態解析

Arc 欠損マウスおよび対照として野生型のマウスから培養海馬神経細胞をこれまでと同様に作成する (Okuno et al., 2012)。この神経細胞には培養 7 日目にグルタミン酸受容体レポーターである SNAP-GluA1 (または SNAP-GluA2, SNAP-GluA3) を形態マーカーである GFP と共にリポフェクション法により遺伝子導入した。この遺伝子導入された神経細胞をさらに 7 日以上培養し、十分に回路が成熟した後、表面に発現しているグルタミン酸受容体レポーターを赤色蛍光 SNAP リガンドにより染色し、さらに高頻度の電気パルス (5V/cm, 0.5 ms, 100Hz を 1 秒間を 4 回繰り返し、5 分間隔) を与えた。この刺激により培養細胞に存在する樹状突起スパインの 1/4 程度が刺激依存的な容量増大を示し、有効な長期増強刺激となる。

上記神経細胞の樹状突起部を刺激前後の数時間、蛍光顕微鏡によりタイムラプスイメージングを行った。樹状突起およびスパイン構造は GFP チャネルにより記録し、グルタミン酸受容体動態は赤色蛍光チャネルで記録した。

記録された画像は ImageJ および統計解析ソフト R を用いたオフライン解析を行い、容積増加を示したスパインと示さないスパインに分類して、そこでのグルタミン酸受容体の発現量を定量した。

(2) 大脳における *Arc* の mRNA およびタンパク質の挙動解析

Arc プロモーター-GFP-*Arc* Tg マウスを用いて海馬歯状回における mRNA および *Arc* タンパク質の局在を in situ hybridization および免疫染色、あるいは GFP 蛍光により解析した。マウスは電気痙攣刺激 (100Hz, 35 mA, 耳間電極) や新規環境刺激により *Arc* の発現誘導を促進した。また、このときタンパク質合成阻害剤であるアニソマイシンを海馬に注入し、mRNA からタンパク質への翻訳を阻害した際の mRNA 分解について解析を行った。

(3) マウス視覚野における *Arc* およびグルタミン酸受容体表面発現の動態解析

また、マウス視覚野に *Arc*-promoter GFP-*Arc* reporter と樹状突起マーカーである mCherry を単一

細胞電気穿孔法により導入した。このマウスに頭部固定状態で視覚刺激を与えることにより、生きた個体において一部のシナプスを刺激することが可能となる。この時のシナプス部における GFP-Arc の挙動を 2 光子顕微鏡により観察した。同様の実験として GFP-Arc の代わりに SEP-GluA1 を用いて表面のグルタミン酸受容体発現を生きたマウスの視覚野で観察した。(MIT との共同研究)

目標2 Arc 発現神経回路の生理学的機能の解明

(1) Arc 欠損マウスの表現形解析

Arc 欠損マウスを用いて文脈依存のおよび手がかり音依存な恐怖条件付けによる記憶テストを行った。獲得から比較的短い長期記憶である近時記憶と獲得から 1 ヶ月程度時間を経た遠隔記憶について同じ個体を用いて調べた。また、恐怖記憶以外の課題としてバーンズ迷路を用いた空間記憶課題を Arc 欠損マウスに行わせ、その近時および遠隔記憶について野生型マウスと比較した。さらに、Arc 欠損、マウスの表現形が脳のどの領域における Arc 欠損に起因するのか同定するために、floxed Arc マウスに Cre 発現 AAV を局所感染させて部位特異的な Arc 欠損を引き起こし行動解析を行った。

(2) Arc リコンビナーゼ Tg マウスを用いた IEG 発現細胞ネットワークの動態解析

新たに開発した Arc プロモーターによってリコンビナーゼを発現する Tg マウスを用い、任意の異なる 2 つの時点における Arc 発現神経細胞ネットワークを区別して蛍光標識する系を確立した。このシステムを用いて、恐怖条件付けを行わせたマウスに近時での想起テスト(想起1)と遠隔期での想起テスト(想起2)を行わせ、それぞれで活性化した神経細胞群の重なりを評価した。同様に近時と近時、あるいは遠隔期と遠隔期に想起を行わせた際の活性化した神経細胞群の重なりも求め、記憶ネットワークのなかの再活性化される神経細胞の割合を定量的に解析した。

(3) 光遺伝学を用いた IEG 発現細胞ネットワークの機能解析

上記の実験と並行して、記憶獲得後の異なる時点における Arc 発現神経細胞ネットワークの生理的機能を明らかにするため、活動依存的遺伝子発現ウイルスの系を構築し、光遺伝学ツールであるチャネルロドプシンあるいはアーキロドプシンを Arc 発現細胞にのみ発現させることができ系を開発した。チャネルロドプシンには青色光レーザーを、アーキロドプシンには緑色レーザーを照射することにより生きた個体で Arc 発現神経細胞の活動を人為的に操作した。ウイルスは海馬歯状回、CA1 領域あるいは大脳皮質の局所(両側性)に感染させ、同部位に光ファイバーを留置した。行動評価課題として恐怖条件付けを用い、学習時あるいは想起時に Arc 陽性となった細胞群の活動を亢進あるいは抑制した際に記憶想起における影響を調べた。

(4) Arc 発現の人為的操作による認知機能への影響解析

マウス Arc 遺伝子の転写開始部位の約 7kb 上流には 100 塩基程度からなるエンハンサー領域 SARE(Synaptic Activity Responsive Element)が存在する(Kawashima et al, PNAS 2009)。活動依存的な Arc 発現の生理的意義を解析するため、この SARE エンハンサーを欠損させたマウスを作成し、これを用いた行動解析実験を行った。

目標3 Arc 活性化回路における認知プロセスと関連する遺伝子発現

これまでの研究により単一細胞 RNA-Seq 法を用いて Arc と共発現する活動依存的遺伝子のプロファイルが徐々に明らかになってきた。本研究では、これら学習に伴う遺伝子発現の機能解析をおこなった。これまでに得られた Arc 共発現リストのうちシナプス機能への関与の可能性の高いものを 20 種類程度リストアップし、それらをすべてクローニングした。これら単離された遺伝子はマウス海馬培養細胞に導入し、強制発現させた際の表現型を調べた。

4. 研究成果

目標1. Arc によるシナプス調節機構の解明

(1) 培養神経細胞を用いたグルタミン酸受容体表面発現の動態解析

Arc によるグルタミン酸受容体制御を調べるため Arc 欠損神経細胞におけるグルタミン酸受容体サブユニット GluA1 の表面発現動態を調べ、野生型神経細胞と比較した。これまでの研究と同様に(Okuno et al., 2012)、培養神経細胞にシナプス可塑性を誘導する電気刺激(100Hz, 1秒を4回)を与えると約 1/4 の樹状突起スパインにおいて容積増加を示した。このとき、刺激後に容積増加を起こしたスパインと起こさなかったスパインに分類して、スパイン容積およびグルタミン酸受容体の発現量を経時的に測定した。その結果、刺激依存的なスパイン増大を示したスパインに関しては、容積増大率は少なくとも刺激後 3 時間までに Arc 欠損神経細胞と野生型神経細胞との間に差は認められなかった。また、それぞれのスパインにおける表面 GluA1 発現についても Arc 欠損神経細胞と野生型神経細胞ともに刺激依存的な増加がみられたが、両者の間に差は認められなかった。

一方、スパイン容積が増加しなかったスパインについて解析を行ったところ、容積変化率については少なくとも刺激後 3 時間までにおいては Arc 欠損神経細胞と野生型神経細胞との間に差は認められなかったが、表面 GluA1 発現については野生型神経細胞では刺激後単調に減少する傾向あるのに対し、Arc 欠損神経細胞では表面 GluA1 発現レベルは一定に保たれており、両者の間に有意差が認められた。これらの結果は、Arc は活動性の高いシナプスでは機能しておらず、逆に活性化されないシナプスにおいてグルタミン酸受容体を制御していることを示しており、これまで提唱してきた逆シナプスタグ機構の存在を強く支持する。現在、これらの結果をまとめ、論文として投稿準備中である。

(2) 大脳における Arc の mRNA およびタンパク質の挙動解析

Arc mRNA は 3 つのエクソンからなるが、第一エクソンにのみ open reading frame を持つため、翻訳時に nonsense-mediated RNA decay (NMD) の影響を受ける可能性がある。この可能性を調べるため、内在性の Arc 遺伝子と Arc プロモーター下流に単一エクソンとして GFP-Arc 融合タンパク質をコードする Tg マウスを用いて海馬歯状回における mRNA および Arc タンパク質の局在および安定性を in situ hybridization および免疫染色法によって解析を行った。その結果、GFP-Arc mRNA は内在性 Arc mRNA に比して安定性が高く、NMD 制御が示唆された。また、Arc mRNA は樹状突起に運ばれ、局所翻訳制御を受ける可能性が示唆されている。そのため、内在性 Arc および GFP-Arc mRNA の樹状突起部での存在量を調べたところ、内在性 Arc mRNA の方が効率よく樹状突起に輸送されていることが明らかになった。一方、タンパク質の発現局在では明確な差は検出されなかった。これらの結果は Arc mRNA のエクソン構造が mRNA の樹状突起輸送および NMD を介した分解速度を決定している可能性を示唆する。これらの結果は Frontiers in Molecular Neuroscience 誌に発表した

(Steward et al., 2018)。(カルフォルニア大学アーバイン校などの共同研究)

(3) マウス視覚野における Arc およびグルタミン酸受容体表面発現の動態解析

上記 A において培養神経細胞においては Arc の逆シナプスタグ機構を示すことができたが、実際に個体の動物において Arc が逆シナプスタグとして機能しているかについては不明である。この問題を明らかにするため、マサチューセッツ工科大学の Sur 教授との共同研究を行った。Sur 教授らのグループは生きたマウスを用いて視覚刺激と光遺伝学を組み合わせることで、視覚野において単一シナプスでの長期増強を誘導することに成功している。このとき GFP で標識した Arc の局在量およびその変化を調べたところ、長期増強が起こった樹状突起スパインにおいては Arc の局在量は少なく、逆に近傍の増強が起こっていないシナプスでは Arc の量は多かった。同様に、SEP-GluA1 を用いて表面のグルタミン酸受容体発現レベルを調べたところ、刺激依存的に増強が起こったスパインには GluA1 の発現量が多く、逆に周りでは少ないことが明らかになった。この結果は培養神経細胞の結果とよく一致した。これらの結果は Science 誌に掲載された(El-Boustani et al., 2018)。

目標2 Arc 発現神経回路の生理学的機能の解明

(1) Arc 欠損マウスの表現形解析

これまでの他グループからの報告では Arc 欠損マウスでは文脈依存的および手がかり音依存的な恐怖記憶などが障害されていることが報告されている(Plath et al., 2006; Peebles et al., 2010)。しかしながらこれらの結果は獲得から数日以内の比較的短い長期記憶(近時記憶)であった。一方、これまでの臨床および動物実験の結果から獲得から 1 ヶ月程度時間を経た古い記憶(遠隔記憶)は近時記憶とは異なるメカニズムで脳に蓄えられていると考えられる。そこで Arc 欠損マウスを用いて近時記憶と遠隔記憶を同じ個体を用いて調べた。その結果、Arc 欠損マウスでの近時記憶の障害は比較的軽度であるが、それに比して遠隔記憶では重篤な障害があることが明らかになった。また、障害のおこるタイムコースを調べてみたところ、記憶獲得から 1~2 週間程度に有意な記憶低下がみられた。さらに空間記憶課題としてバーンズ迷路を行ったところ、Arc 欠損マウスにおいて学習および近時記憶での障害は認められなかったが、訓練後 2 カ月たった時点での遠隔記憶は顕著に障害されていた。このような Arc 依存的な遠隔記憶障害の脳責任部位を調べるため、前帯状皮質(ACC)および脳梁膨大後部皮質(RCS)の Arc を選択的に欠損させたところ、一部の個体において著しい遠隔記憶障害が再現された。現在、これらの結果をまとめ論文として投稿準備中である。

(2) Arc リコンビナゼ Tg マウスを用いた IEG 発現細胞ネットワークの動態解析

近時記憶想起時に活性化される神経細胞ネットワークと遠隔記憶の想起時に活性化される神経細胞ネットワークの同異を明らかにするため、新しい 2 時点 2 蛍光細胞標識システムをマウスで構築し、恐怖条件付け記憶課題を用いて解析した。その結果、近時記憶想起で Arc 発現が活性化される海馬歯状回神経細胞の一部は遠隔記憶想起時においても Arc 発現が再活性化されることが明らかになった。また、海馬歯状回における記憶想起関連活性化細胞は近時、遠隔期を問わず日々変化しているが、近時に比べ遠隔期では変化率が低下することが明らかになった。これらの結果は次項の結果と合わせ、論文としてまとめる予定である。

また、米国スタンフォード大学との共同研究では、2 光子顕微鏡を用いたインビボイメージングとウイルスベクターを用いたレポーターシステムを組み合わせ、マウス海馬 CA1 領域における Arc 発現細胞を同一個体で繰り返し観察した。その結果、空間認知と Arc 発現パターンとの相関を生きた個体で初めて示すことに成功した(Attardo et al., 2018)。

(3) 光遺伝学を用いた IEG 発現細胞ネットワークの機能解析

恐怖記憶想起時に活性化される Arc 発現神経細胞ネットワークの生理学的機能を明らかにするため、海馬歯状回での Arc 発現細胞にチャネルロドプシンを発現させて光照射による人為的な活性を行った。その結果、近時記憶想起時の Arc 発現細胞の活性化は恐怖応答を誘起した。驚いたことに、同様の実験を遠隔記憶想起時の Arc 発現細胞において行ったところ、やはり恐怖応答を誘起することが明らかになった。このことは遠隔記憶想起プロセスにおいても海馬が重要な役割を果たしていることを示唆する。アーキロドプシンによる活動抑制実験でも上記結果を支持する結果が得られた。

(4) Arc 発現の人為的操作による認知機能への影響解析

マウス Arc 遺伝子のエンハンサー領域 SARE は強力な活動依存的転写活性化能を持つ。この SARE 領域を欠損させたマウスを作出しその表現型を解析した。SARE 欠損は脳における刺激依存的な Arc 発現を低減させたが完全には無くなることはなかった。SARE 欠損マウスをいくつかの行動試験や記憶課題に課したがいずれも野生型マウスとの差を見出すことはできなかった。

目標3 Arc 活性化回路における認知プロセスと関連する遺伝子発現

Arc レポーターマウスを用いた単一細胞 RNA-Seq 解析により Arc と共発現する遺伝子の同定を試みた。その結果、20 種類程度の遺伝子が再現性良く Arc 発現細胞で発現上昇がみられた。また、活動依存的遺伝子発現のタイムコースを調べるため、電気痙攣刺激を与えたマウスの海馬 CA1 領域および歯状回領域より神経細胞を刺激後いくつかの時点で単離し、RNA-Seq による解析を行った。これらの遺伝子の中から神経細胞における機能が未知のものを選び、培養神経細胞に発現させたところ、複数の遺伝子に関して樹状突起スパインの延長、樹状突起スパイン数の減少、樹状突起の分枝増加、などの神経形態やシナプス構造の変化が観察された。これらの遺伝子については引き続き解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件) すべて査読あり

- (1) Itoh M, Okuno H, Yamada D, Yamashita M, Abe M, Natsume R, Kaizuka T, Sakimura K, Hoshino M, Mishina M, Wada K, Sekiguchi M, Hayashi T. Perturbed expression pattern of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus of GluA1 C-terminal palmitoylation-deficient mice. 2019. Neuropsychopharmacol Rep. 39(1):61-66. DOI: 10.1002/npr.2.12044.
- (2) 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. 2019, J Neurochem. 148(2):204-218. DOI: 10.1111/jnc.14596.
- (2) Chawla MK, Gray DT, Nguyen C, Dhaliwal H, Zempare M, Okuno H, Huentelman MJ, Barnes CA. Seizure-induced Arc mRNA expression thresholds in rat hippocampus and perirhinal cortex. 2018, Front Syst Neurosci. 12: Article 53. DOI: 10.3389/fnsys.2018.00053.

- (4) Itoh M, Yamashita M, Kaneko M, Okuno H, Abe M, Yamazaki M, Natsume R, Yamada D, Kaizuka T, Suwa R, Sakimura K, Sekiguchi M, Wada K, Hoshino M, Mishina M, Hayashi T. Deficiency of AMPAR-Palmitoylation Aggravates Seizure Susceptibility. 2018, *J Neurosci*. 38(47):10220-10235. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1590-18.2018.
- (5) Attardo A, Lu J, Kawashima T, Okuno H, Fitzgerald JE, Bitto H, Schnitzer MJ. Long-term consolidation of ensemble neural plasticity patterns in hippocampal area CA1. *Cell Rep*, 25:640-650, 2018, *Cell Rep*. 25(3):640-650.e2. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.09.064.
- (6) Yamada M, Suzuki Y, Nagasaki S, Okuno H, Imayoshi I. Light control of the Tet-gene expression system in mammalian cells. *Cell Rep*, 25:487-500, 2018, *Cell Rep*. 25(2):487-500.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.09.026.
- (7) Nishiguchi KM, Fujita K, Tokashiki N, Komamura H, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Bitto H, Nakazawa T. Retained plasticity and substantial recovery of rod-mediated visual acuity at the visual cortex in blind adult mice with retinal dystrophy. 2018, *Mol Ther*. 26(10):2397-2406. DOI: 10.1016/j.yymthe.2018.07.012.
- (8) El-Boustani S, Ip JPK, Breton-Provencher V, Knott GW, Okuno H, Bitto H, Sur M. Locally coordinated synaptic plasticity shapes cell-wide plasticity of visual cortex neurons in vivo. 2018, *Science*, 360:1349-1354. DOI: 10.1126/science.aao0862.
- (9) Okuno H, Minatohara K, Bitto H. Inverse synaptic tagging: An inactive synapse-specific mechanism to capture activity-induced Arc/arg3.1 and to locally regulate spatial distribution of synaptic weights. 2018, *Semin Cell Dev Biol*, 77: 43-50. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.025.
- (10) Steward O, Matsudaira-Yee K, Rarris S, Salgado-Pirbhoy P, Worely P, Okamura K, Okuno H, Bitto H. Delayed degradation and impaired dendritic delivery of intron-lacking EGFP-Arc/Arg3.1 mRNA in EGFP-Arc transgenic mice. 2018, *Front Mol Neurosci*, 10:Article 435. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00435
- (11) Honjoh S, de Vivo L, Bitto H, Okuno H, Tononi G, Cirelli C. Higher Arc nucleus-to-cytoplasm ratio during sleep in the superficial layers of the mouse cortex. 2017, *Front Neural Circuits*, 11:Article 60. DOI: 10.3389/fncir.2017.00060
- (12) Jenks KR, Kim T, Pastuzyn ED, Okuno H, Taibia AV, Bitto H, Bear MF, Jason SD. Arc restores juvenile plasticity in adult mouse visual cortex. 2017, *Proc Natl Acad Sci USA*, 114:9182-9187. DOI: 10.1073/pnas.1700866114.
- (13) Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bitto H, Kikusui T, Sakano H. Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses. 2017, *Nat Commun*, 8:15977. DOI: 10.1038/ncomms15977.
- (14) Hirano Y, Ihara K, Masuda T, Yamamoto T, Iwata I, Takahashi A, Awata H, Nakamura N, Takakura M, Suzuki Y, Horiuchi J, Okuno H, Saitoe M. Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in *Drosophila* mushroom bodies. 2016, *Nat Commun*. 7:13471. DOI: 10.1038/ncomms13471
- (15) Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. 2016, *Front Mol Neurosci*. 8:Article 78. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00078.
- (16) Vousden DA, Epp J, Okuno H, Nieman BJ, van Eede M, Dazai J, Ragan T, Bitto H, Frankland PW, Lerch JP, Henkelman RM. Whole-brain mapping of behaviorally-induced neural activation in mice. 2015, *Brain Struct Funct* 220:2043-57. DOI: 10.1007/s00429-014-0774-0.
- (17) Fukuchi M, Nakashima F, Tabuchi A, Shimotori M, Tatsumi S, Okuno H, Bitto H, Tsuda M. Class I Histone deacetylase-mediated repression of the proximal promoter of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein gene regulates its response to brain-derived neurotrophic factor. 2015, *J Biol Chem*. 290:6825-36. DOI:10.1074/jbc.M114.617258
- (18) Fukuchi M, Tabuchi A, Kuwana Y, Watanabe S, Inoue M, Takasaki I, Izumi H, Tanaka A, Inoue R, Mori H, Komatsu H, Takamori H, Okuno H, Bitto H, Tsuda M. Neuromodulatory effect of Gαs- or Gαq-coupled GPCR on NMDAR selectively activates the NMDAR/Ca2+/calcineurin/CREB-regulated transcriptional coactivator 1 (CRTC1) pathway to effectively induce Bdnf expression in neurons. 2015, *J Neurosci*. 35:5606-24. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3650-14.2015.

[学会発表] (計 30 件)

- (1) Okuno H. Role of Arc for recent and remote memory, 2019 WCNP Meeting, Symposium, 2019/2/12, Moorea, French Polynesia.
- (2) 伊藤 政之、山下 真梨子、金子 雅規、奥野 浩行、阿部 学、山崎 真弥、夏目 里恵、山田 大輔、貝塚 利恵、諏訪 麗子、崎村 建司、関口 正幸、和田 圭司、星野 幹雄、三品 昌美、林 崇. AMPA 受容体パルミトイル化サイトの欠損は発作感受性を高める 第 41 回 日本分子生物学会 ポスター. 2018/11/28 横浜
- (3) Kim R, Kondo Y, Kawashima T, Inoue M, Ishii Y, Inokuchi K, Sakai K, Nonaka M, Sakamoto H, Okuno H, Bitto H., Specification of a remote memory cell ensemble during cortical tagging. Soc for Neurosci. Annual Meeting, Poster, 2018/11/5, San Diego, USA.
- (4) 湊原 圭一郎、鈴木 穰、菅野 純夫、尾藤 晴彦、奥野 浩行、認知活動により活性化される前初期遺伝子 Arc 発現海馬神経細胞におけるスパイン形態解析およびトランスクリプトーム解析, 第 91 回日本生化学会大会 ポスター, 2018/9/25, 京都.
- (5) 奥野 浩行、認知活動により発現誘導される遺伝子の単一細胞レベルでの網羅的解析(Memory-related activity-regulated transcripts revealed by single cell RNASeq analysis), 第 61 回日本神経化学大会 シンポジウム SY37, 2018/9/8, 神戸.
- (6) 奥野 浩行、Contribution of dentate gyrus granule cells to remote memory retrieval revealed by novel Arc-based labeling methods, 第 41 回日本神経科学大会 シンポジウム 2S03m, 2018/7/27, 神戸.
- (7) Minatohara K, Onami S, Araki A, Akiyoshi M, Bitto H, Okuno H. Activity-dependent neuronal labeling by Tet-ON expression system under the control of enhanced Arc promoter. 第 41 回日本神経科学大会 ポスター, 2018/7/27, 神戸.
- (8) Okuno H, Ishii Y, Endo T, Minatohara K, Bitto H. Regulation of surface expression dynamics of AMPA receptors and cognitive refinement processes by Arc. 第 95 回日本生理学会大会 シンポジウム, 2018/3/28, 高松.
- (9) Okuno H, Ishii Y, Endo T, Uehara M, Suzuki Y, Minatohara K, Araki A, Abe M, Imayoshi I, Kakeyama M, Sakimura K, Bitto H. Roles of Arc/arg3.1 on surface expression dynamics of AMPA receptors during structural plasticity and on cognitive refinement processes. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017), (Poster), 2017/11/11, Washington DC, USA.
- (10) Minatohara K, Ishidate F, Akiyoshi M, Araki A, Takahashi Y, Bitto H, Okuno H. Morphological analysis of dendritic spines in the hippocampal neurons activated during fear memory retrieval using Airyscan microscopy. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017), (Poster), 2017/11/15, Washington DC, USA
- (11) Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bitto H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of neuronal subpopulation in the dentate gyrus during memory recalls with long intervals. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017), (Poster), 2017/11/11, Washington DC, USA.

- (12) Mahringer D, Zmarz P, Okuno H, Bito H, Keller G: Functional cell type specific expression of immediate-early genes in mouse visual cortex. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017), (Poster), 2017/11/14, Washington DC, USA.
- (13) Ip P, El-Boustani S, Breton-Provencher V, Okuno H, Bito H, Sur M. Redistribution of synaptic proteins between identified synapses of V1 neurons during experience-dependent plasticity *in vivo*. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017), (Poster), 2017/11/15, Washington DC, USA.
- (14) El-Boustani S, Ip P, Breton-Provencher V, Okuno H, Bito H, Sur M: Plasticity of identified, functionally heterogeneous synapses shapes cell-wide plasticity of V1 neurons *in vivo*. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017), (Poster), 2017/11/15, Washington DC, USA.
- (15) Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, Sakano H: Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2017 (Neuroscience 2017) (Slide) 2017/11/15 Washington DC USA
- (16) 荒木 杏菜, 湊原 圭一郎, 秋吉 美歌, 今吉 格, 金 亮, 川島 尚之, 尾藤 晴彦, 影山 龍一郎, 奥野 浩行. Reactivation of a neuronal subpopulation in hippocampal dentate gyrus during recent and remote memory recall. 第40回日本神経科学大会 口演 2017/7/21 幕張
- (17) 伊藤 正之, 山下 真梨子, 山田 大輔, 奥野 浩行, 阿部 学, 山崎 真弥, 夏目 里恵, 金子 雅規, 貝塚 利恵, 崎村 建司, 関口 正幸, 和田 圭司, 星野 幹雄, 三品 昌美, 林 崇, Disruption of AMPA receptor-palmitoylation leads excitatory/inhibitory imbalance and elevated seizure susceptibility. 第40回日本神経科学大会 ポスター, 2017/7/21, 幕張
- (18) 井ノ口 霞, 竹内 春樹, 今村 文昭, 金 亮, 奥野 浩行, 西住 裕文, 尾藤 晴彦, 菊水 健史, 坂野 仁, Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral cells to mediate odor-induced attractive social responses. 第40回日本神経科学大会 ポスター 2017/7/21 幕張
- (19) 湊原 圭一郎, 秋吉 美歌, 高橋 維子, 荒木 杏菜, 石館 文善, 尾藤 晴彦, 奥野 浩行. Selective enhancement of spine formation in neuronal ensembles expressing *Arc* in the mouse hippocampus after contextual fear memory retrieval. 第40回日本神経科学大会 ポスター, 2017/7/21, 幕張.
- (20) 金 亮, 酒井 一輝, 川島 尚之, 近藤 弥生, 井上 昌俊, 野中 未応, 坂本 雅行, 岡本 理子, 阿部学, 崎村 建司, 今吉 格, 奥野 浩行, 尾藤 晴彦, Specification of a remote memory cell ensemble during cortical tagging through activity-dependent *Arc* signaling. 第40回日本神経科学大会 口演, 2017/7/20, 幕張.
- (21) 奥野 浩行. シナプス活動依存的遺伝子発現に基づく記憶関連細胞標識法の開発と応用. 日本薬学会第137年会 (シンポジウム), 2017/3/24. 仙台.
- (22) Minatohara K, Akiyoshi M, Takahashi Y, Bito H, Okuno H. Increased spine density in *Arc*-expressing neurons after contextual fear memory retrieval in the mouse hippocampus. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2016 (Neuroscience 2016), Poster, 2016/11/15, San Diego, USA.
- (23) Kim T, Pastuzyn ED, Jenks KR, Okuno H, Ichida J, Bito H, Bear MF, Shepherd JD. Increasing *Arc* prolongs the critical period for juvenile plasticity in primary visual cortex. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2016 (Neuroscience 2016), Poster, 2016/11/15, San Diego, USA.
- (24) Yagishita-Kyo N, Okuno H, Kamijyo S, Kawashima T, Uemura Y, Takemoto-Kimura S, Bito H. Mapping emerging neocortical active ensembles during retrieval of remote memory via functional bioluminescence imaging of *Arc* promoter activity. Soc for Neurosci. Annual Meeting 2016 (Neuroscience 2016), Poster 2016/11/15, San Diego, USA.
- (25) 湊原 圭一郎, 植原 雅裕, 金 亮, 阿部 学, 崎村 建司, 尾藤 晴彦, 奥野 浩行. The crucial role of the immediate-early gene *Arc* in remote fear memory formation. 第39回日本神経科学大会 ポスター, 2016/7/21, 横浜
- (26) 植原 雅裕, 鈴木 裕輔, 遠藤 俊裕, 掛山 正心, 阿部 学, 崎村 建司, 今吉 格, 尾藤 晴彦, 奥野 浩行. *Arc* knockout mice exhibit specific impairment during reversal learning phase in a spatial memory task. 第39回日本神経科学大会 ポスター, 2016/7/21, 横浜.
- (27) Kim R, Sakai K, Kawashima T, Nonaka M, Goto M, Koyama H, Kobari S, Imayoshi I, Okuno H, Bito H. Critical roles of CREB-*Arc* signaling in fear memory formation. 第39回日本神経科学大会 (シンポジウム), 2016/7/21 横浜.
- (28) Araki A, Imayoshi I, Minatohara K, Kim R, Kawashima T, Kageyama R, Bito H, Okuno H. An enduring cell labeling for active cell ensembles within a restricted time window. 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会大会合同大会 ポスター, 2015/12/2, 神戸.
- (29) Okuno H, Endo T, Kim R, Minatohara K, Araki A, Abe M, Kageyama M, Sakimura K, Bito H. *Arc/arg3.1* knockout mice exhibit impaired behavioral flexibility in a serial reversal learning task. Soc for Neurosci. Annual Meeting, Poster, 2015/10/19. Chicago, USA.
- (30) 奥野 浩行, 遠藤 俊裕, 金 亮, 湊原 圭一郎, 阿部 学, 掛山 正心, 崎村 建司, 尾藤 晴彦. *Arc* 欠損マウスに見られる行動柔軟性の障害および社会行動の変化. 第38回日本神経科学大会 口演, 2015/7/29, 神戸.

〔図書〕(計 2件)

- (1) 奥野 浩行. Single-cell RNA-Seq ②(試案編). In 鈴木讓編, *RNA-Seq 実験ハンドブック*. 東京:羊土社; 2016. pp166-173.
- (2) 奥野 浩行. 神経特異的前初期遺伝子 *Arc* によるシナプス機能調節機構. In 廣川信隆編. *ブレインサイエンスレビュー2016*. 東京:クバプロ; 2016. pp.99-118.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：今吉 格

ローマ字氏名：Itaru Imayoshi

研究協力者氏名：平野 恭敬

ローマ字氏名：Yukinori Hirano

研究協力者氏名：尾藤 晴彦

ローマ字氏名：Haruhiko Bito

研究協力者氏名：ビクター・ラミレス・アマヤ

ローマ字氏名：Victor Ramirez Amaya