

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300117

研究課題名(和文) シナプス活動依存的遺伝子 Arc の可塑性調節機能の解明

研究課題名(英文) Role of activity-dependent gene Arc in synaptic plasticity

研究代表者

奥野 浩行 (OKUNO, Hiroyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定准教授

研究者番号：80272417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスで起った可塑的变化を長い期間にわたり保持・持続するためには、活動依存的な新規遺伝子発現が必須である。しかし誘導された遺伝子産物がシナプス機能制御を行うメカニズムは不明な点が多い。本研究では代表的な活動依存的遺伝子の1つArcに注目し、そのシナプス制御機構および生理機能について解析を行った。その結果、ArcとCaMKII複合体による逆シナプスタグという新しい仮説を提唱した。また、転写コアクチベーターCRTC1がArc発現に果たす役割を解析し、Arcエンハンサーを介した活動依存的な遺伝子発現やシナプス機能および認知機能を調節していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Long-term synaptic plasticity and memory formation require activity-dependent gene expression. However, it remains unknown how such activity-induced gene products are targeted to proper cellular compartments including synapses. In the present study, we investigated the targeting of the memory related-protein Arc from the soma to the synapses, and elucidated a novel "inverse" synaptic tagging mechanism that enables Arc to specifically target the un-potentiated synapses. The findings provide new mechanistic insights into how the contrast between strong and weak synapses is maintained during long-term synaptic plasticity. We further identified the CREB coactivator CRTC1 as a critical factor for Arc expression as well as memory function.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：シナプス 長期記憶 海馬 Arc CaMKII

1. 研究開始当初の背景

大脳で記憶を貯蔵するための基礎メカニズムと考えられている長期シナプス可塑性には、神経活動に反応した一過的な遺伝子発現は重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。高頻度の入力シナプス部位に生じると、局所のカルシウム濃度上昇をきっかけとしてリン酸化酵素カスケード等によってシグナルが細胞体に伝わり、核での転写活性化がおこる(=シナプスから核へのシグナリング)。この遺伝子発現によって産生された遺伝子産物の一部は細胞体からシナプス部位へ戻り、シナプス可塑性の長期化に寄与していると考えられる(=核からシナプスへのシグナリング)。これまでの研究代表者らを含む研究グループの研究などによりシナプスから核のシグナリングについては徐々に明らかになってきた。しかしながら、核からシナプスへのシグナリングについての実体はいまだほとんど不明である。

神経活動に反応した発現を示す遺伝子の中で、刺激に対して最も素早く、かつ、一過的に発現が誘導される一群の遺伝子は前初期遺伝子と呼ばれている。この前初期遺伝子群の中で、近年特に注目されているもの一つに *Arc* 遺伝子がある。近年、我々の研究グループは *Arc* の機能の解明を中心に研究を進めており、*Arc* 遺伝子の発現誘導機構などを明らかにしてきた。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 PSD 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かった。

2. 研究の目的

本研究計画では「シナプスから核」および「核からシナプス」へのシグナリングを理解することを目的とし、*Arc* 遺伝子の活動依存的発現および遺伝子産物によるシナプス機能調節に焦点を当てて研究を進めた。具体的には、以下の項目について研究目標を設定して研究をおこなった。

(1) *Arc* によるシナプス機能調節機構の解明

これまでに *Arc* タンパク質は CaMKII β と結合し、この結合が *Arc* タンパク質のシナプス局在に重要であることは明らかになってきた。このタンパク複合体がどのようにシナプス機能を調節するのかについて解析を行う。

(2) 核からシナプスへのシグナルの解明
長期シナプス可塑性の入力特異性を説明するモデルとして、活動依存的遺伝子発現産物が活性化されたシナプスに捕捉されるといふシナプスタギング・キャプチャー(STC)説が提唱されている。そこで *Arc* タンパク質の細胞内動態を解析し、シナプスタギングとの関係を明らかにする。

(3) *Arc* 遺伝子発現の生理的機能の解明

Arc 遺伝子の発現レベルが増加または減少する遺伝子改変マウスを作成し、活動依存的な *Arc* 発現の生理的な機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Arc* によるシナプス機能調節機構の解明

初代培養神経細胞は胎児または新生ラットより調製した (Kawashima et al., PNAS, 2009)。2週間以上培養した細胞を用いて薬剤刺激を行い、4%パラホルムアルデヒドにより固定をしたのち、抗 *Arc* 抗体による免疫染色を行った。

グルタミン酸受容体 GluA1 の動態調節は抗 GluA1 抗体を用いた表面生細胞染色により評価した。また、酵素タグを用いたグルタミン酸受容体表面蛍光ラベル法によって受容体動態をライブイメージングによって解析した。

(2) 核からシナプスへのシグナルの解明

海馬培養神経細胞に緑色蛍光タンパク質 GFP 標識した *Arc* (GFP-*Arc*) および赤色蛍光タンパク質 RFP を導入し、GFP-*Arc* の動態および樹状突起の微細構造を数時間以上にわたり蛍光顕微鏡(Olympus IX81)にて観察した。遺伝子導入は培養 7 日以降にリポフェクタミン 2000 (Life Technologies) によりプラスミドをトランスフェクションした。

取得したライブ画像はオフライン処理で画像解析を行い、容積増大を示す樹状突起スパインと示さないスパインの間に *Arc* の動態・集積の違いがあるか否かを検討した。

(3) *Arc* 遺伝子発現の生理的機能の解明

活動依存的な *Arc* 発現の生理的な機能を個体で調べるため、*Arc* プロモーター領域に存在する活動依存的転写調節に必須なエンハンサーを相同組換えによって欠損マウスを作成した (新潟大・崎村研究室との共同研究)。また同様に *Arc* 遺伝子の欠損マウスを作製した。これらとは逆に *Arc* を過剰

発現するモデルとして *Arc* プロモーター下に *GFP-Arc* 遺伝子を配置したトランスジェニック(Tg)マウスも作成した。

これらの遺伝子改変マウスに対して生化学的・分子生物学的解析、解剖学的解析ならびに動物行動解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Arc* シナプス局在と CaMKII との結合

試験管内において *Arc* タンパク質は非活性化型の CaMKII β と強い結合を示し、この結合は Ca²⁺/CaM の添加により著しく減弱する。*Arc*-CaMKII β の結合活性と CaMKII β の活性化状態を明らかにするため、様々なタイプの CaMKII β 変異体を作成して *Arc* との結合能を解析した。その結果、不活性化型 CaMKII β 変異体 (T287A) の *Arc* 結合能は野生型と同等であったが、活性化型変異体 T287D の結合能は著しく減弱していた(Okuno et al., *Cell*, 2012)。

さらに、これらの CaMKII β 変異体が *Arc* のシナプス局在にどのような寄与をするのかを検討するため、初代培養神経細胞に CaMKII β 変異体を発現させ、*Arc* のシナプス局在を定量した。その結果、不活性化型 T287A 体やカルモジュリン非結合変異体 A303R などでは *Arc* をシナプスに局在させる働きがあることが明らかになった。

成熟した脳に存在する CaMKII β は F-actin との結合能を持つことが知られるが、発達期においては F-actin と結合しないアイソフォーム CaMKII β e が存在する。上記の方法と同様に培養神経細胞を用いてこの CaMKII β e アイソフォームを発現させたところ、CaMKII β e は *Arc* シナプス局在促進活性を持たないことが明らかになった (Okuno et al., *Cell*, 2012)。

(2) 個体における *Arc*-CaMKII β の機能

上記の *Arc*-CaMKII β の複合体が実際に個体で存在することは免疫沈降実験により確かめられていたが、活性化型-非活性化型の CaMKII β との複合体形成調節が起こっているのかについては不明であった。そこで、*GFP-Arc* トランスジェニックマウスを用いて *Arc* のシナプス局在を解析した。視覚入力遮断することによりマウスの大脳視覚野の非活性化状態を作り、また、逆に強い視覚入力を与えることで大脳皮質の活性化を促進した。これらの視覚野で *GFP-Arc* と PSD-95 の共局在解析したところ、*GFP-Arc* のシグナルは非活性化状態の視覚野で上昇

していた (Okuno et al., *Cell*, 2012)。

(3) *Arc* によるグルタミン酸受容体 GluA1 の動態調節

Arc は GluA1 のエンドサイトーシスを亢進する機能をもつ。この機能に対して *Arc* のシナプス局在がどのように関与しているのかについて検討した。テタヌス毒素フラグメントをシナプス前終末に発現させることにより単一シナプスの活動を抑制することが可能である。この条件において *Arc* タンパク質は周りの非抑制シナプスに比べて有意に集積するが、このとき GluA1 の表面発現量を解析したところ、*Arc* 集積シナプスでの GluA1 の発現量は周りのシナプスに比して有意に低かった。この結果は細胞全体で *Arc* のシナプス局在を増加させたこれまでの実験結果と一致し、*Arc* が単一シナプスレベルで GluA1 の動態を制御している可能性が示された (Okuno et al., *Cell*, 2012)。

(4) シナプスから核へのシグナリングの解析

これまでの研究において *Arc* エンハンサー SARE を制御する転写因子としては CREB, SRF および MEF2 の3つが同定されていた。*Arc* の転写活性化をさらに詳細に解明するため、これら転写因子に対する補活性化因子について解析を行った。その結果、CREB の補活性化因子の一つである CRTC1 が *Arc* の転写活性化に重要な役割を果たしていることが明らかになった(Nonaka et al., *Neuron*, 2014; Fukuchi et al., *J. Neurosci.*, 2015)。さらに活性化型 CRTC1 をマウスの海馬に発現させたところ、長期恐怖記憶の向上が認められた。この結果に対応して、扁桃体において CRTC1 の発現をノックダウンしたところ、長期恐怖記憶の減弱がみられた (Nonaka et al., *Neuron*, 2014)。

(5) *Arc* エンハンサーを基にした人工プロモーターの開発

Arc プロモーター遠位に存在するエンハンサー SARE は強力な転写活性化能を持つ。このエンハンサー領域と最小プロモーター領域を融合させた人工プロモーターの開発を行ったところ、5つの SARE を *Arc* の転写開始部位付近のプロモーター領域とタンデムにつないだコンストラクトは従来の SARE コンストラクトよりも顕著な転写活性化能を持っていることが示された (Kawashima et al., *Nat. Methods*, 2013)。この改良版 SARE (ESARE) プロモーターをウイルスベクターに搭載して神経活動依存的な遺伝子発現

レポーターを作成したところ、マウス大脳視覚野においてマクロ蛍光観察や2光子顕微鏡によるライブイメージングを可能とする性能を有することが明らかになった (Kawashima et al., *Nat. Methods*, 2013)。

また、*Arc* エンハンサーを含む 7kb 程度の *Arc* プロモーター領域の下流に蛍光タンパク cDNA をつないだ *Arc* 発現レポーター Tg マウスを作成し、恐怖条件付けや生後発達期における *Arc* 発現細胞の分布を明らかにした (Vousden et al., *Brain Struct. Funct.* 2014; Mikuni et al., *Neuron*, 2013)。

(6) GFP-Arc 動態と逆シナプスタギング

高頻度シナプス刺激を与えたシナプスはその体積が増大し、シナプスの伝達効率が上昇することが知られる。この変化と *Arc* のシナプス動態を解析したところ、*Arc* はシナプス増大を起こさない非活性化シナプスに選択的に集積することが明らかになった。この *Arc* のシナプス動態と前記の *Arc*-CaMKII β の調節機構を合わせて考察した結果、新たなシナプス制御モデルである“逆シナプスタギング”を考案した (Okuno et al., *Cell*, 2012; Kim et al., *Commun. Integr. Biol.*, 2012)。

(7) *Arc* 遺伝子発現の生理的機能の解明

活動依存的な *Arc* 発現の生理的な機能を個体で調べるため、GFP-Arc Tg マウスにおける生化学的解析および行動解析を行った。その結果、GFP-Arc Tg マウスにおいては生化学的解剖学的な変化は見られず、また、行動学試験においても大きな異常は観察されなかった (Okuno et al., *in preparation*)。一方、*Arc* 欠損マウスを用いて行動解析を行ったところ、恐怖条件付けを始めとするいくつかの認知機能課題において障害が認められた (Okuno et al., *in preparation*)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Yamamoto, K., Tanei, Z., Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Okuno, H., Naka, Y., Yizhar, O., Fenno, LE., Fukayama, M., Bito, H., Cirrito, JR., Holtzman, DM., Deisseroth, K., Iwatsubo, T. Chronic optogenetic activation augments Abeta pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Rep II*: 859-865, (2015). 査読有
DOI:10.1016/j.celrep.2015.04.017.
- ② 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., Bito, H., Tsuda, M. Neuromodulatory effect of Gas- or G α q-coupled GPCR on NMDAR selectively activates the NMDAR/Ca²⁺/calcineurin/CREB-regulated transcriptional coactivator 1 (CRTC1) pathway to effectively induce Bdnf expression in neurons. *J. Neurosci.*, **35**:5606-5624, (2015). 査読有
DOI:10.1523/JNEUROSCI.3650-14.
- ③ Nonaka, M., Kim, R., Fukushima, H., Sasaki, K., Suzuki, K., Okamura, M., Ishii, Y., Kawashima, T., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Okuno, H., Kida, S., Bito, H. Region-specific activation of CRTC1-CREB signaling mediates long-term fear memory. *Neuron*, **84**: 92-106, (2014). 査読有
DOI:10.1016/j.neuron.2014.08.049.
- ④ Kawashima, T., Okuno, H., Bito, H. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Front. Neural Circuits*, **8**: 37, (2014). 査読有
DOI:10.3389/fncir.2014.00037.
- ⑤ Vousden, DA., Epp, J., Okuno, H., Nieman, BJ., van Eede, M., Dazai, J., Ragan, T., Bito, H., Frankland, PW., Lerch, JP., Henkelman, RM. Whole-brain mapping of behaviourally induced neural activation in mice. *Brain Struct. Funct. Epub ahead of print*, (2014). 査読有
DOI: 10.1007/s00429-014-0774-0.
- ⑥ Kawashima, T., Kitamura, K., Suzuki, K., Nonaka, M., Kamijyo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., Okuno, H., Ohki, K., and Bito, H. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nat Methods*, **10**: 889-895, (2013). 査読有
DOI:10.1038/nmeth.2559.
- ⑦ Mikuni, T., Uesaka, N., Okuno, H., Hirai, H., Deisseroth, K., Bito, H., Kano, K. Arc/Arg3.1 is a postsynaptic mediator of activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron*, **78**: 1024-1035, (2013). 査読有
DOI:10.1016/j.neuron.2013.04.036.
- ⑧ Fujii, H., Inoue, M., Okuno, H., Sano, Y., Takemoto-Kimura, S., Kitamura K., Kano,

M., and Bito, H. Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII α and Calcineurin. *Cell Reports*, **3**: 978-987, (2013). 査読有 DOI:10.1016/j.celrep.2013.03.033,

- ⑨ Okuno, H., Akashi, K., Ishii, Y., Yagishita-Kyo, N., Suzuki, K., Nonaka, M., Kawashima, T., Fujii, H., Takemoto-Kimura, S., Abe, M., Natsume, R., Chowdhury, S., Sakimura, K., Worley, P.F., and Bito, H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell*, **149**: 886-898, (2012). 査読有 DOI:10.1016/j.cell.2012.02.062.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Okuno, H., Endo, T., Kim, R., Ishii, Y., Minatohara, K., Araki, A., Sakimura, K., Bito, H. Regulation of synaptic and cognitive function through the activity-dependent gene Arc/Arg3.1. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会、2014 年 9 月 29 日、奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市).
- ② Okuno, H., Minatohara, K., Masuda, H. Arc's roles in inverse synaptic tagging and memory formation. 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
- ③ 奥野浩行、石井雄一郎、川島尚之、野中美応、明石馨、崎村建司、尾藤晴彦. Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ II β と Arc による AMPA 型グルタミン酸受容体の量的制御 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ④ Okuno, H. Regulation of synaptic strength by Arc/Arg3.1-CaMKII β interaction through inverse tagging process. *Korean Physiology Society (KPS 2013)*, 2013 年 10 月 23 日、ソウル (韓国).
- ⑤ Okuno, H., Bito, H., Kawashima, T., Nonaka, M., Inoue, M., Fujii, H., Ishii, Y. The role of Arc in inverse tagging of inactive synapses. *International Society for Neurochemistry (ISN2013)*, 2013 年 4 月 22 日、カンクン(メキシコ).
- ⑥ Okuno, H., Ishii, Y., Kawashima, T., Nonaka, M., Akashi, K., Sakimura, K., Bito, H. Inverse synaptic tagging: a new mechanism for late-phase synaptic plasticity, 第 35 回日

本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市).

[図書] (計 3 件)

- ① Okuno, H., Araki, A., Minatohara, K. Inverse synaptic tagging by Arc. In "Novel Mechanisms of Memory" eds., Giese, K.P. & Radwanska, K., Springer, *in press*.
- ② Okuno, H., Neuroplasticity In "Homeostatic control of brain function" eds., Masino, SA. & Boison, D, Oxford University Press, *in press*.
- ③ Okuno, H., Smythies, J., Edelman L. Selected key areas for future research on the claustrum. In "The Claustrum" eds., Smythies., Edelman L., & Ramachandran, V.S., Elsevier, p363-376, (2014).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：神経活動依存的プロモータ活性を有する DNA、及びこれを含むベクター
発明者：尾藤晴彦、奥野浩行、川島尚之
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2013/068289
出願年月日：平成 25 年 7 月 3 日
国内外の別：国内 (国際出願)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 浩行 (OKUNO, Hiroyuki)
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授
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・教授
研究者番号：00291964

崎村 建司 (SAKIMURA, Kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325