

新規転写制御エレメント SARE を利用した記憶痕跡の探索

東京大学大学院 医学系研究科 神経生化学分野
奥野 浩行

1. はじめに

多くの体細胞種と同様に、神経細胞においても細胞外シグナルに応答した遺伝子発現は細胞の分化や生存、そして機能維持に根源的な意義をもつ。特に、脳の高次機能である長期記憶の形成・保持には、行動や経験に応じた遺伝子の新規発現・活性化が必須であることが明らかになってきた。しかしながら記憶形成過程において、どのようなシグナルがどのような因子を介してどのような遺伝子の発現を誘導することが重要であるかという点に関しての詳細はいまだ不明である。これまでに遺伝子改変マウスを用いた研究や大脳の遺伝子マッピング等の結果からいくつかの仮説が提唱されてきた (Tokuyama et al., 2000; Chowdhury et al., 2006; 奥野, 2010)。なかでも *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、またノックアウトマウスやアンチセンスオリゴ法などによる遺伝子発現阻害によって記憶形成障害や長期増強 (LTP) 等のシナプス可塑性が障害されることから、この遺伝子は脳における記憶形成機構に関与していると考えられており、現在もっとも注目を集めている神経特異的・活動依存的遺伝子の一つである。

我々は近年、*Arc* 遺伝子の高い発現誘導性に注目し、その分子機構解析を進めてきた。バイオインフォマティクスおよび培養神経細胞を用いた転写活性化の定量解析法を用いることにより、マウスゲノムにおいて *Arc* の転写開始部位より約 7kb 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。シナプス活動応答性エレメント SARE と名付けたこのエレメントは①100bp 程度で十分な活性を持つこと、②活動依存的転写因子である CREB, SRF, MEF2 の結合配列を有すること、③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ることを明らかにした (Kawashima et al, 2009; Inoue et al., 2010)。

本研究では、我々が同定した SARE のシナプス活動依存的な活性化機構を利用した様々な遺伝子発現レポーターシステムを構築することにより、マウス・ラット大脳において学習・記憶等の脳高次機能に関連する神経ネットワークを可視化・同定することを目標とする。この活動依存的神経特異的レポーターによって標識される神経細胞群は電気生理学的手法や分子生物学的手法による解析が可能であり、分子から細胞、回路レベルでの縦断的研究を行うことができることが期待される。

2. 方法

2-1 活動依存的・神経特異的発現プロモーターの最適化

これまでに単離された *Arc* プロモーターおよび SARE フラグメントの最適化を行い、GFP や RFP 等の蛍光タンパク質およびルシフェラーゼ等の発光タンパク質をレポーターとした遺伝子発現レポーターシステムの構築を行った。これらレポーターをラット大脳初代培養神経細胞にエレクトロポレーション法により導入し、この神経細胞にシナプス刺激を与えることにより活動依存的遺伝子発現を検出・定量した。

2-2 ウイルスベクターによる感染実験

最適化した遺伝子発現レポーターを個体動物へ効率良く導入するために、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターへレポーターの組み込みを行った。これらウイルスを *in utero* infection 法およびガラスマイクロピペットによる微量注入によりマウス脳に感染させた。

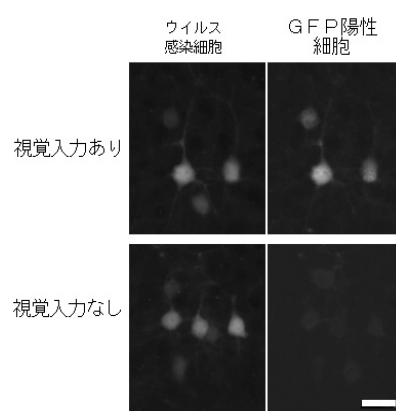
2-3 トランスジェニックマウス

ウイルスに依らない個体動物への遺伝子導入として、遺伝子発現レポーターを用いてトランスジェニックマウスを作製した。この蛍光タンパクレポーターまたは発光タンパクレポータートランスジェニックマウスを用い、個体動物の脳における神経活動依存的な遺伝子発現を検出した。本研究においては、視覚入力刺激に伴う遺伝子発現の変化を観察した。

3. 研究成果

3-1 遺伝子発現レポーターウイルスの構築

まず大脳神経細胞において神経活動に応答した遺伝子発現を可視化するためのレポーターウイルスの作成を行った。我々はこれまで既に SARE と最小活動依存プロモーター(SARE-ArcMin)を連結した活動依存プロモーターの下流で蛍光蛋白 GFP を発現させるレポーターレンチウイルスの作製し、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活動依存的な遺伝子発現を可視化することに成功している(右図, Kawashima et al., 2009)。今回我々は、このウイルスを基に更なる改変を施し、改良型高感度レポーターウイルスを作成することに成功した。このウイルスを用いることにより生理的条件下での神経活動依存的な遺伝子発現を感度良く検出することが可能となった。



神経活動依存的遺伝子発現ウイルスレポーターによるマウス視覚野神経活動の検出

SARE を用いた活動依存的遺伝子発現レポーターウイルスを感染させた大脳皮質神経細胞は感覚入力に応答して GFP を発現する。

3-2 遺伝子発現レポータートランスジェニックマウス

最適化した *Arc* プロモーターの下流に GFP の改良型蛍光タンパク Venus cDNA を配置したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを2日間暗所飼育した後に明環境に2時間暴露したところ、大脳一次視覚野において Venus 発現細胞が多数観察された。対照である暗所飼育群では視覚野における Venus 発現細胞はほとんど認められなかった。同様の結果は発光タンパクであるルシフェリンをレポーターとしてもトランスジェニックマウスにおいても得られた。発光イメージングは低侵襲に行えるため、本トランスジェニックマウスを用いることにより遺伝子発現の経時変化を長期的にモニターすることができる可能性が示された。

4. まとめ

Arc 遺伝子産物は神経可塑性に必須の役割を持つことから、本研究成果のレポーターによって標識された神経細胞群は、単純に神経活動の反映したものというよりも、可塑的な変化を起こしている神経細胞群

を反映していると考えることができる。今回開発されたウイルスベクターおよびトランスジェニックマウスによって可視化した神経細胞は十分なシグナル強度を持つことが確認され、これら細胞を脳スライスやインビボ標本において電気生理学的手法や分子生物学的手法によって単一細胞解析を行うことが十分可能であると考えられる。また、従来遺伝子操作可能な実験動物にしか応用できなかった遺伝子発現のリアルタイムモニタリング・マッピングという手法をウイルスを用いることによって、げっ歯類以外の哺乳動物への応用の可能性を示唆できた意義は大きいと考える。

5. 発表論文/参考文献

【発表論文】

- (1) **Okuno, H.** (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res*, *in press*.
- (2) Redondo, RL, **Okuno, H.**, Spooner, PA, Frenguelli, BG, Bito, H and Morris, RGM. (2010) Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* **30**, 4981-4989.
- (3) Inoue, M., Yagishita-Kyo, N., Nonaka, M., Kawashima, T., **Okuno, H.** and Bito, H. (2010) Synaptic Activity Responsive Element (SARE): a unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Communicative & Integrative Biology* **3:5**, 1-4.
- (4) **奥野浩行** (2010) 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* **82**: 841-846.

【参考文献】

- (1) Kawashima, T., **Okuno, H.**, Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., Takemoto-Kimura, S., Worley, PF., and Bito, H. (2009) 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.
- (2). 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.**, and Bito, H. (2007) Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ . *Neuron* **54**, 755-770.
- (3). Chowdhury, S., Shepherd, JD., **Okuno, H.**, Lyford, G., Petralia, RS., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, RL. and Worley, PF. (2006) Arc interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, **52**, 445-459.
- (4) Tokuyama, W., **Okuno, H.**, Hashimoto, T., Li, Y-X. and Miyashita, Y. (2000) BDNF upregulation during declarative memory formation in the monkey inferotemporal cortex. *Nature Neurosci.* **3**, 1134-1142.