



平成26年9月29日

科学技術振興機構 (JST)

Tel : 03-5214-8404 (広報課)

東京大学

Tel : 03-5841-3304 (総務係)

## 長期記憶形成時の脳部位に応じた遺伝子発現調節機構の発見

### ポイント

- 遺伝子発現経路で、CREBという代表的な転写因子の新たな制御機構を解明。
- 長期記憶モデルで、CREBの補助因子が脳部位特異的な役割を持つことを発見。
- 転写補助因子の役割の一端を解明したことにより、認知向上のための創薬に役立つことが期待される。

JST 戦略的創造研究推進事業において、東京大学の尾藤 晴彦 教授らは、マウスを用いた実験により、脳の部位ごとに記憶に応じた遺伝子発現の調節を可能にするメカニズムを解明しました。

脳はさまざまな情報を処理する部位に分かれています。その1つに「記憶」がかかわっている部位があり、記憶が一時的なものか長期的に持続するものかは、特定の遺伝子発現の有無にかかっていることなどが知られています。しかし、脳の各部位でどのようにして特定の遺伝子群だけを読み出し、部位ごとに異なる機能を発揮できるのか、これまで謎に包まれていました。

長期記憶<sup>注1)</sup>の形成には特定の遺伝子の発現が必要です。目的の遺伝子上に転写因子<sup>注2)</sup>と呼ばれる分子が結合することで遺伝子の転写が開始し、特定の遺伝子発現の調節が行われています。代表的な転写因子の1つにCREB<sup>注3)</sup>があり、全身のさまざまな場面で働いており、脳でも、記憶のみならず、発生・細胞の生存維持・体内時計などさまざまな機能が報告されています。今回、本研究グループはCREBの転写補助分子<sup>注4)</sup>であるCRTC1<sup>注5)</sup>に着目し、この因子の神経細胞における性質を具体的に調べ、マウスの脳でCRTC1-CREB経路が脳部位に応じて働くことを見いだしました。具体的には、長期的な記憶に必要とされる海馬<sup>注6)</sup>と扁桃体<sup>注7)</sup>で、海馬ではCRTC1の寄与が少ないのに対し、扁桃体では大きく、しかし、CRTC1を海馬で強化すると記憶が向上するが、扁桃体ではそのような作用がないことが分かりました。

このような部位ごとに異なる転写補助因子の振る舞いは、脳全体に普遍的に存在するCREBという転写因子が、脳部位ごとに異なる遺伝子発現調節を行うことを示唆するものです。CREBを初めとする記憶固定化<sup>注8)</sup>にかかわる転写因子は、認知力向上の創薬ターゲットであり、今回の研究成果は、精神疾患や学習・記憶障害などの病態解明および治療法の開発につながるものと期待されます。

なお本研究は、東京農業大学の喜田 聡 教授と共同で行ったものです。

本研究成果は、2014年10月1日(米国東部時間)に米国科学誌「Neuron」のオンライン速報版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域: 「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」

(研究総括: 小澤 滯司 高崎健康福祉大学 健康福祉学部 教授)

研究課題名: 「可塑的神経回路を支えるシグナル伝達の分子基盤解明と制御」

研究代表者: 尾藤 晴彦 (東京大学 大学院医学系研究科 教授)

研究期間: 平成22年10月~平成28年3月

JSTはこの領域で、脳神経回路の発生・発達・再生の分子・細胞メカニズムを解明し、さらに個々の脳領域で多様な構成要素により組み立てられた神経回路がどのように動作してそれぞれに特異的な機能を発現するのか、それらの局所神経回路の活動の統合により、脳が極めて全体性の高いシステムをどのようにして実現するのかを追求します。またこれらの研究を基盤として、脳神経回路の形成過程と動作を制御する技術の創出を目指します。

上記研究課題では、新規のイメージング技術により、可塑的回路を支えるシグナル伝達の分子基盤をシナプスレベルならびにシステムレベルで明らかにします。さらに、可塑的神経回路の脱構築・再構築を抑制するための新技術を開発します。

## <研究の背景と経緯>

脳はさまざまな情報を処理する部位に分かれています。生理学的な研究により、その機能の分担の一部が明らかになってきました。記憶が一時的なものであるか、長期的に持続するものであるかは、特定の遺伝子発現の有無にかかっています。記憶にかかわる遺伝子発現の調節に必要とされる転写因子の代表的なものにCREBがあります(図1)。CREBは、脳のみならず全身のさまざまな場面で働いており、脳でも、記憶・発生・細胞の生存維持・体内時計などさまざまな機能に関わることが報告されています。これら転写因子は、遺伝子のプロモータ<sup>注9)</sup>と呼ばれる発現調節領域に結合して遺伝子発現をOn/Offするためのスイッチとなりますが、CREBによって制御される遺伝子は4000個とも言われており、脳の各部位でどのようにして特定の遺伝子群だけを読み出し、部位特異的な機能を発揮できるのか、これまで謎に包まれていました。

## <研究の内容>

外の刺激に対して細胞が応答する際、ある分子の特定のアミノ酸がリン酸化<sup>注10)</sup>されることで刺激が伝わったり、特定の遺伝子の発現のOn/Offが制御されたりすることが知られています。CREBの転写補助分子であるCRTC1を生化学的に解析することによって、神経活動依存的な制御に関わるCRTC1のリン酸化部位を同定しました(図2)。また、CRTC1がCREBに作用し、実際に特定の遺伝子の発現を調節するためには、細胞質に存在しているCRTC1が核内に移行することが必要です。そこでCRTC1のリン酸化・脱リン酸化に関わる上流のキナーゼ<sup>注11)</sup>および脱リン酸化酵素を薬理学的手法にて同定し、CRTC1の核移行の調節シグナル経路を明らかにしました。またCRTC1が核移行することがCREB依存的転写の活性化に必要十分であることを転写リポーターアッセイにより示しました(図3)。さらに、CRTC1の核移行が、これまで知られていたCREBリン酸化と独立した経路であることを明らかにした上で、CRTC1の転写補助因子としてのCREB特異性をも示し、実際に神経細胞におけるIEG<sup>注12)</sup>のプロモータへの結合を証明しました。

これらの生化学的解析を、細胞数もたんぱく質量にも乏しい神経細胞初代培養で行うには、実験系の感度向上と最適化が必要とされました。特に、高度にリン酸化されたCRTC1のリン酸化部位同定は、国立循環器病センターの佐々木 一樹 先生との共同研究による質量分析<sup>注13)</sup>によるものです。

CRTC1を搭載したウイルスの個体内投与技術により、海馬と扁桃体でCRTC1の遺伝子発現抑制(ノックダウン)および活性化型CRTC1の強制発現を行い、海馬・扁桃体の両方が必要とされる文脈依存的恐怖条件付け<sup>注14)</sup>タスクをマウスに実施しました。長期記憶において海馬では内在性CRTC1の寄与が少ないのに対し、扁桃体では大きく、しかし、海馬でCRTC1機能を外因性に強化すると記憶が向上する一方、扁桃体ではそのような作用がないことが分かりました(図4)。

上記の解析は、ウイルスによる脳部位特異的遺伝子改変技術が可能にし、マウス個体の記憶行動の評価は、東京農業大学の喜田研究室との共同研究によるものです。

## <今後の展開>

CREBを初めとする記憶固定化に関わる転写因子は、認知力向上の創薬ターゲットで

あり、今回の研究成果は、精神疾患や学習・記憶障害などの病態解明および治療法の開発につながるものと期待されます。

<参考図>

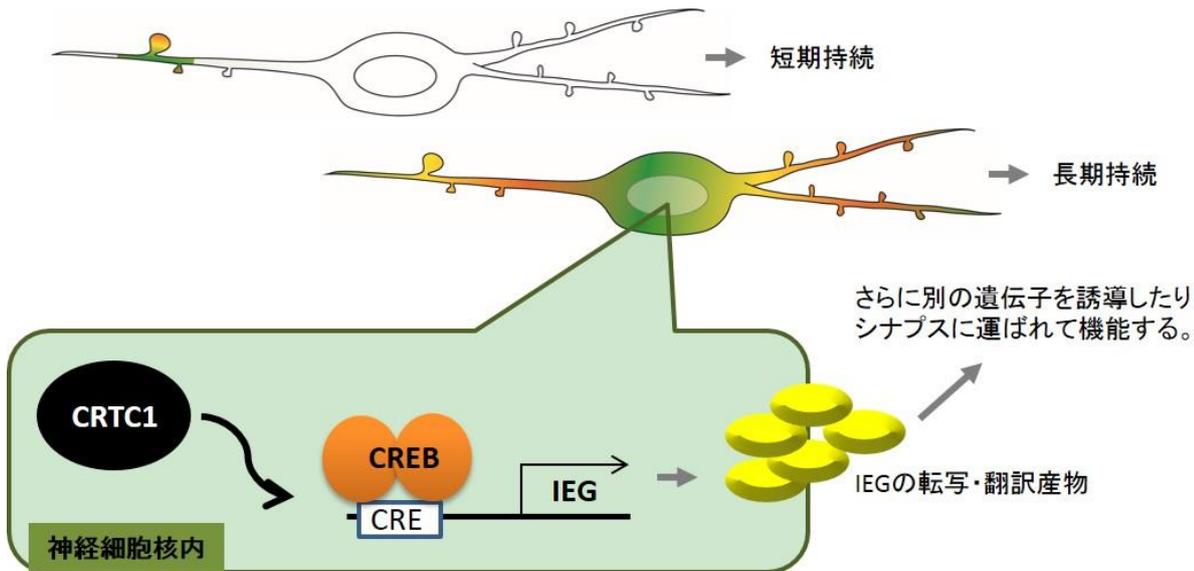


図1 記憶に関わる遺伝子発現の調節への転写因子CREBの働き

長期記憶の形成には特定の遺伝子発現が必須である。長期記憶を引き起こす強いシナプス刺激は神経細胞の核まで伝えられ、核で遺伝子発現が引き起こされる。ここで、その刺激を受け取り、特定のDNA配列に結合してIEGの発現を誘導する、という重要な役割を担っているのが転写因子である。CREBは代表的な神経活動依存的転写因子である。しかし、CREBはどのように脳領域における機能特性を発揮するのであろうか。CREBの補助因子であるCRTC1に着目し、この転写補助因子が脳領域特異的な役割を持つことが分かった。

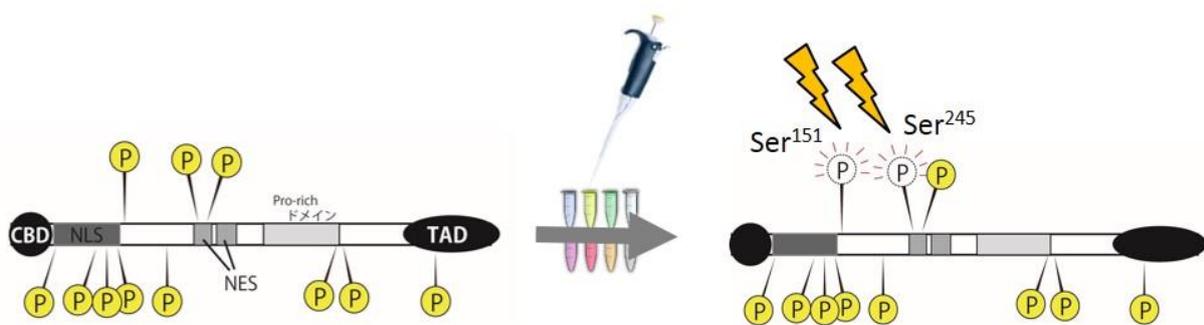
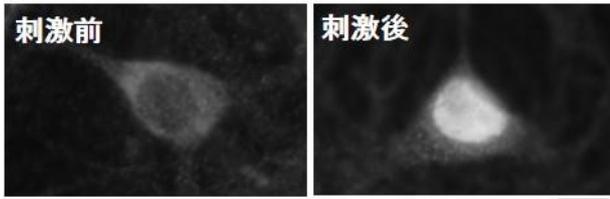


図2 転写補助因子CRTC1の神経活動依存的な制御に関わる脱リン酸化部位

CRTC1は、セリンやスレオニンを多く含み、非常に多くのリン酸化を受けるたんぱく質である。神経細胞で最大限にリン酸化された状態のCRTC1を精製し、質量分析によりリン酸化部位を同定した(左)。さらに、このうち神経細胞のシナプス刺激に依存して脱リン酸化するものを生化学的手法にて同定した(右)。

## CRTC1の核移行



## 今回の研究で明らかになった CRTC1-CREBのシグナル経路

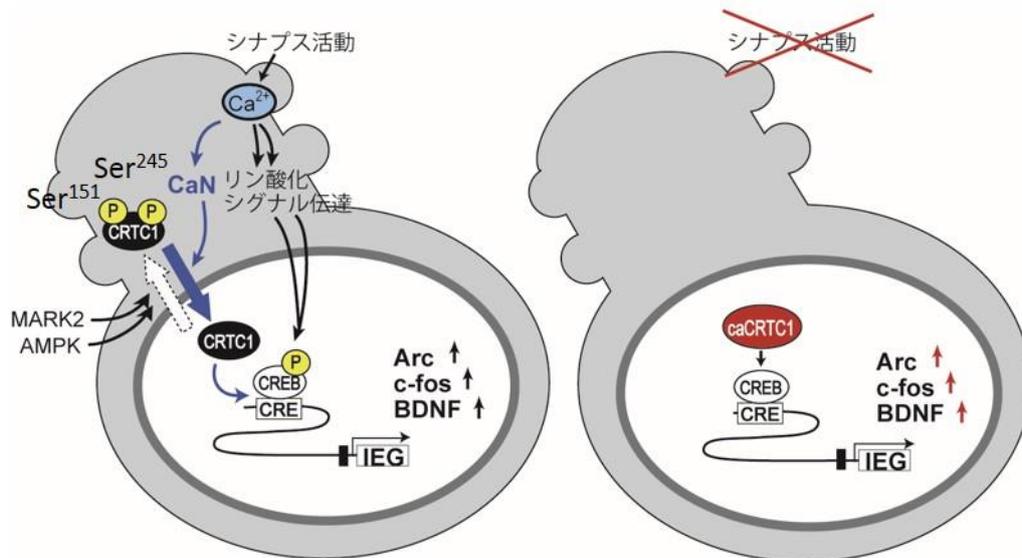


図3 CRTC1の核移行の調節シグナル経路であるリン酸化に関わるキナーゼの同定

[上段] CRTC1は神経細胞内で核移行する。刺激前・刺激後における、神経初代培養細胞のCRTC1染色。スケールバーは10 $\mu$ m (1/100mm)を示す。

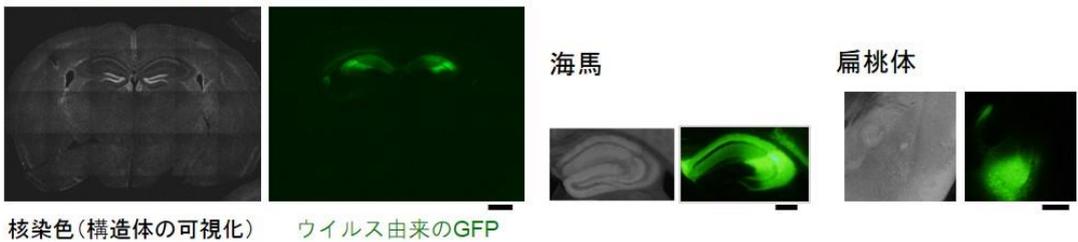
[下段左] 今回の研究では、CRTC1-CREBのシグナル経路を明らかにした。

AMPKやMARK2といった恒常活性型キナーゼがCRTC1の細胞質への局在に重要であり、カルシニューリン(CaN)がシナプス刺激依存的な核移行を引き起こす。CREBのセリン133番目のリン酸化とは独立した経路であり、生理的条件下では、シナプス刺激に応じて両方の経路が活性化され、これら2つの経路が複合的にCREB活性を制御する。また、神経細胞においてCRTC1はArc, c-fos, BDNFといったIEGの制御領域に刺激依存的に結合する。

[下段右] CRTC1活性型(caCRTC1)は、シナプス活性のない状態でもCREB下流の遺伝子を発現させる。

ウイルスを用いた脳部位特異的遺伝子改変

海馬(脳冠状切片)



CREB-CRTC1経路の脳領域特異的な役割

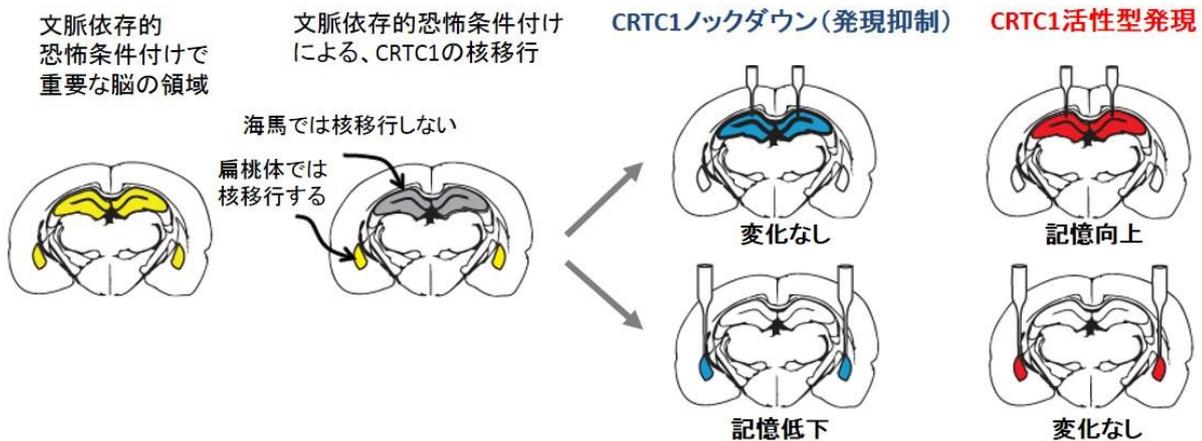


図4 文脈依存的恐怖条件付けタスクを実施したマウスの海馬・扁桃体におけるCRTC1の働き

[上段] ウイルスを用いた脳部位特異的遺伝子改変。ウイルスは、GFP（緑色蛍光たんぱく質）を発現する。この研究では、海馬のCA領域と、扁桃体のBLA領域に特異的にウイルスを感染させている。スケールバーは左側からそれぞれ、1mm、200 $\mu$ m（1/5mm）、500 $\mu$ m（1/2mm）。

[下段] マウス個体内で、CRTC1が核移行する条件を調べたところ、文脈依存的恐怖条件付けタスクに重要な役割を果たす海馬と扁桃体において、CRTC1の核移行は扁桃体のみで起こり、海馬では起こらなかった。これらの領域でCRTC1の発現を抑制したところ、扁桃体で記憶の低下が見られ、海馬では影響が見られなかった。海馬にもCRTC1は発現しており、より強い刺激では核へ移行することから、海馬に核移行型CRTC1（CRTC1活性型、caCRTC1）を発現させたところ、記憶の向上が見られた。このように、脳部位特異的なCRTC1の制御機序が明らかになった。

## <用語解説>

### 注1) 長期記憶

記憶の中でも、数十時間以上にわたって保持される記憶のこと。たんぱく合成阻害剤の影響を受ける。

### 注2) 転写因子

遺伝子の発現調節領域（プロモータ、注9）中に存在する特定の認識配列に結合し、転写開始複合体を呼び込んで転写を制御する因子。

### 注3) CREB : Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element-binding protein

プロモータ上のcAMP response element (CRE) に結合し、転写を制御する転写因子。カルシウムやcAMPといった細胞内シグナルの下流で、CREB自身のリン酸化により転写開始のスイッチがOnになることが知られていた。

### 注4) 転写補助因子

特定の転写因子に結合して転写を開始したり、転写開始複合体の結合を仲介したりするたんぱく質。クロマチン構造を変化させる活性があるものもある。それ自体にもDNA結合能を持つものもあるが、CRTC1は持たない。

### 注5) CRTC1 : CREB regulated transcription coactivator 1

CREBの活性を制御する転写補助因子の1つ。2000年前後に臍臓にて強力なCREBの転写補助因子として同定される。構造は異なるが機能は類似と推定される3つの分子のうち、脳内で多く発現するのがCRTC1で、今回の研究の対象分子である。

### 注6) 海馬

記憶や空間学習能力に関わる脳の部位。

### 注7) 扁桃体

大脳皮質側部の奥に存在する脳の領域。情動反応と記憶において主要な役割を持つことが示されている。

### 注8) 記憶固定化

記憶が長期化するために行われる脳内の過程のこと。たんぱく質合成とIEG（注12）によるシナプス強化などが行われると考えられている。

### 注9) プロモータ（発現調節領域）

DNA上で遺伝子をコードする領域の付近で、その遺伝子の転写開始・停止を調節する配列を含む領域のこと。

### 注10) リン酸化

たんぱく質の修飾の一種。セリンやスレオニンやチロシンが修飾を受ける。これが生化学的活性やたんぱく質間相互作用のスイッチになる場合がある。

### 注11) キナーゼ

たんぱく質をリン酸化する酵素の総称。

### 注12) IEG : immediate early gene

神経細胞内で刺激に応じてすみやかに発現する一群の遺伝子の総称。

### 注13) 質量分析

たんぱく質を構成するペプチドの分子質量を元に、そのたんぱく質の同定・リン酸化状態の決定・リン酸化部位の決定などを行う分析方法。

### 注14) 文脈依存的恐怖条件付け

「部屋」などといった環境による「条件付け刺激 (conditioned stimulus: CS)」と、マイルドな電気刺激などの「無条件刺激 (unconditioned stimulus: US)」と連合学習させる、記憶を定量的に検定する行動実験系。恐怖記憶は非常に強い記憶であることから、PTSDの研究のみならず、広く記憶のメカニズムを理解する上でモデルとなる実験系である。

### <論文タイトル>

“Region-Specific Activation of CRTC1-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory”  
(長期恐怖記憶形成時にCRTC1-CREBシグナリングは脳部位特異的に制御される)

doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.049

### <お問い合わせ先>

#### <研究に関すること>

尾藤 晴彦 (ビトウ ハルヒコ)

東京大学 大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生化学分野 教授

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Tel: 03-5841-3560 Fax: 03-3814-8154

E-mail: hbito@m.u-tokyo.ac.jp

#### <JSTの事業に関すること>

川口 貴史 (カワグチ タカフミ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ

〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K's 五番町

Tel: 03-3512-3524 Fax: 03-3222-2064

E-mail: crest@jst.go.jp

#### <報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel: 03-5214-8404 Fax: 03-5214-8432

E-mail: jstkoho@jst.go.jp

東京大学 大学院医学系研究科 総務係

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

TEL: 03-5841-3304 (内線: 23304)