

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14964

研究課題名(和文) 軸索ガイダンス分子の長期記憶形成における役割

研究課題名(英文) The role of long-term memory formation in axon guidance molecules

研究代表者

實木 葵(高橋葵)(Jitsuki, Aoi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80760074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：長期記憶の形成には新規の遺伝子発現やタンパク質合成が必須であることが明らかになっているが、どのような分子により制御されているかについては未だに明らかではない。これまでに分泌型軸索ガイダンス分子セマフォリン3A(Sema3A)が記憶形成の分子基盤であるAMPA型受容体をシナプスへ移行し短期記憶の成立に必要なことを明らかにした。従って、Sema3Aの長期記憶の形成、AMPA受容体の新規合成を制御するかを検証した。Sema3Aの長期記憶形成における役割を明らかにすることで、Sema3Aをターゲットとした創薬や記憶障害を伴う精神疾患の病態解明の発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sema3Aはそのシグナル分子は脳・神経疾患との関与が報告されており、実際、アルツハイマー型認知症患者の死後脳において、Sema3Aの発現が増加するとの報告がある(内田ら., Gene Cells 2005; Goodら., J Neurochem 2004)。従って、記憶形成の障害による疾患のメカニズムを解明するためにも長期記憶形成時のSema3Aの生体内における分泌動態とそのメカニズムを明らかにすることは重要である。本研究で得られる知見は、Sema3Aをターゲットとしたアルツハイマー病をはじめとする脳・神経疾患の治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The formation of long-term memory requires gene expression and new protein synthesis. However, it is not clear what kind of molecule regulate the long-term memory. We have previously reported that the secretory axon guidance molecule semaphorin 3A (Sema3A) drives synaptic delivery of AMPA-type glutamate receptors (AMPA), which is the molecular basis of memory formation, is required for establishment of short-term memory. In the present study, we examined whether Sema3A facilitates de novo synthesis of AMPARs, and regulates the formation of long-term memory. By clarifying the role of Sema3A in long-term memory formation, it is expected the development of drug discovery targeting Sema3A and elucidation of the pathophysiology of mental disorders associated with memory impairment.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索ガイダンス分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

記憶には短期記憶と長期記憶があるが、この二つのメカニズムの違いとしては、長期記憶形成には新規の遺伝子発現やタンパク質合成を必要とすることである。しかしながら、未だどういった分子がこの機構を制御するかは明らかではない。またこの機構の障害はアルツハイマー型認知症、自閉症、統合失調症などの脳・神経疾患に関与する (Eichenbaum *Nat Rev.* 2000, Li ら., *Bio med Res Int.* 2015)。申請者は同機構に関与する候補分子の1つとして、神経回路形成に重要な役割を果たす分泌型軸索ガイダンス分子セマフォリン3A (Sema3A) に着目した。Sema3A は、近年、軸索における局所翻訳制御、皮質や海馬において樹状突起分枝数の調節や樹状突起スパインの成熟を促進することを明らかにされてきた (佐々木ら., *Neuron* 2002; KY ら., *Nature* 2005; 森田ら., *J Neurosci* 2006; 山下ら., *J Neurosci* 2007; 山下ら., *Nat Commun.* 2014)。

2. 研究の目的

受動的回避行動試験 (Inhibitory Avoidance: IA) を用い Sema3A の短期記憶における役割を検討した。その結果、Sema3A 受容体の一つであるプレキシン A4 (PlexinA4) の海馬 *in vivo* ノックダウンが、記憶形成の分子基盤である AMPARs のシナプスへの移行、ならびに短期記憶の獲得を抑制することを見出した。また、申請者らにより独自に樹立した抗 Sema3A 機能阻害抗体 (山下*, 實木-高橋*ら, *Int Immunol.* 2015) を海馬 CA1 領域に微量注入し、短期記憶の成立における役割を解析した。その結果、Sema3A の機能阻害は短期記憶の成立を障害するとの知見を得た。すなわち、Sema3A が分泌されることで AMPARs をシナプスへ移行し短期記憶の成立に必要であることを示唆した。また、長期記憶が形成される時 AMPARs が新規合成される (松尾ら., *Science* 2008)。そこで、本研究では分泌 Sema3A が長期記憶形成を制御し、AMPARs を新規合成する機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

長期記憶形成時における分泌領域を特定する上で、Sema3A が記憶形成時にどの領域より分泌されるかを Sema3A の分泌を可視化する事が可能な変異マウスを用い免疫組織化学染色法により検証した。また、Sema3A が AMPARs の新規合成への関与を明らかにするため初代海馬分散培養細胞 21 日目に Sema3A を添加した 24 時間後に AMPARs の各サブユニットの発現量を定量した。さらに、*in vivo* にて長期記憶形成時に分泌 Sema3A が AMPARs を新規合成しているかを明らかにするため、flag-SEP-Sema3A ノックインマウスを用いてスパインの形態を認識するためにレンチウイルスベクターに導入した Tdtomato- アクチンを分泌 Sema3A 領域へインジェクションし、IA トレーニング 90 分以内に腹腔内にアニソマイシンを投与し、24 時間後 IA テストをし記憶が障害されているかを同定する。

4. 研究成果

長期記憶形成時における分泌領域を特定する上で、Sema3A が記憶形成時にどの領域より分泌されるかを Sema3A の分泌を可視化する事が可能な変異マウスを用い免疫組織化学染色法により検証した。海馬学習依存的な受動的回避行動試験実施後、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脳切片を作成し海馬領域にてプレシナプスマーカー、ポストシナプスマーカーと分泌 Sema3A を共染色した。その結果、分泌 Sema3A はプレシナプスマーカーと共局在している事が明らかになった。以前より、*in vitro* の系で Sema3A は有芯小胞に内包されている事が報告されている。この結果は、記憶が形成される際に有芯小胞を介してプレシナプスより分泌されることが示唆された。また、Sema3A が AMPARs の新規合成への

関与を明らかにするため初代海馬分散培養細胞21日目にSema3Aを添加した24時間後にAMPARsの各サブユニットの発現量を定量した。その結果Sema3AによりAMPARsのサブユニットであるGluA1の発現量が他のGluA2/3/4サブユニットと比較して増加することが明らかになった。この結果はSema3AがGluA1の新規合成に関与することが示唆された。さらに、in vivoにて長期記憶形成時に分泌Sema3AがAMPARsを新規合成しているかを明らかにするため、flag-SEP-Sema3Aノックインマウスを用いてIAトレーニング前にスパインの形態を認識するためにレンチウイルスベクターに導入したTdtomato-アクチンを分泌Sema3A領域へインジェクションし、IAトレーニング90分以内に腹腔内にアニソマイシンを投与し、24時間後IAテストをし記憶が障害されているかを同定していく。これらの結果により、近年Sema3Aやそのシグナル分子の脳・神経疾患との関与が報告されていることから、長期記憶形成時のSema3Aの生体内における分泌動態とそのメカニズムを明らかにすることは、Sema3Aをターゲットとした脳・神経疾患の治療法の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura H, Jitsuki-Takahashi A, Makihara H, Asano T, Kimura Y, Nakabayashi J, Yamashita N, Kawamoto Y, Nakamura F, Ohshima T, Hirano H, Tanaka F, Goshima Y	4. 巻 119
2. 論文標題 Proteome and behavioral alterations in phosphorylation-deficient mutant Collapsin Response Mediator Protein2 knock-in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry international	6. 最初と最後の頁 207-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2018.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe H#, Jitsuki S#, Nakajima W#, Murata Y#, Jitsuki-Takahashi A, Katsuno Y, Tada H, Sano A, Suyama K, Mochizuki N, Komori T, Masuyama H, Okuda T, Goshima Y, Higo N, Takahashi T (#equal contribution)	4. 巻 360(6384)
2. 論文標題 CRMP2-binding compound, edonepic maleate, accelerates motor function recovery from brain damage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 50-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aao2300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe Hiroki, Jitsuki Susumu, Nakajima Waki, Murata Yumi, Jitsuki-Takahashi Aoi, Katsuno Yuki, Tada Hirobumi, Sano Akane, Suyama Kumiko, Mochizuki Nobuyuki, Komori Takashi, Masuyama Hitoshi, Okuda Tomohiro, Goshima Yoshio, Higo Noriyuki, Takahashi Takuya	4. 巻 360
2. 論文標題 CRMP2-binding compound, edonepic maleate, accelerates motor function recovery from brain damage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 50 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aao2300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aladeokin Aderemi Caleb, Akiyama Tomoko, Kimura Ayuko, Kimura Yayoi, Takahashi-Jitsuki Aoi, Nakamura Haruko, Makihara Hiroko, Masukawa Daiki, Nakabayashi Jun, Hirano Hisashi, Nakamura Fumio, Saito Takashi, Saido Takaomi, Goshima Yoshio	4. 巻 132
2. 論文標題 Network-guided analysis of hippocampal proteome identifies novel proteins that colocalize with A β in a mice model of early-stage Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104603-104603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2019.104603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 名 A Jitsuki-Takahashi, T Kawashima, S Jitsuki, T Takahashi, Y Goshima, F Nakamura
2. 発表標題 Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 1 by Semaphorin 3A-Fyn signaling regulates dendritic development
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----