

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02525

研究課題名（和文）セプチン欠損マウスの空間認知・弁別障害から未知のシナプス制御機構を解明する

研究課題名（英文）Exploration of synaptic mechanism underlying spatial cognitive defect of septin-null mice

研究代表者

木下 専（KINOSHITA, MAKOTO）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30273460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：Sept3欠損マウスを多階層的に精査し、以下の知見を得た。系統的行動解析では空間文脈弁別課題のみ低成績であった。AAVベクター定位注入による発現・枯渇実験により、その責任領域を同定した。ssTEM法による3D形態計測ではシナプス分布密度やスパイン体積は正常であったが、滑面小胞体含有スパインが少なかった。この異常は初代培養顆粒細胞で再現された。培養顆粒細胞に後期長期増強を誘発するとシナプス拡大後のER伸展が再現された。さらに、SEPT3欠乏はシナプス拡大には影響せずER伸展を阻害したことから、顆粒細胞スパインへのER侵入は神経活動依存的かつSEPT3依存的であると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶の獲得・想起を司る海馬神経回路において、嗅内皮質から歯状回顆粒細胞に投射するシナプスの低い発火特性は入力情報のゲーティングに寄与する。顆粒細胞は成体における新生や、PTSDやうつなどへの関与も知られており、神経科学的にも臨床医学的にも重要なニューロンである。ヒトのSEPT3（重合性GTPase）遺伝子はヒトの知能と強く関連する22q11.3領域に存在し、顆粒細胞で高発現するが、生理機能は未知である。本研究において、Sept3欠損マウスの記憶固定化減弱を端緒として得られた一連の知見は、他のアプローチでは得難い記憶の分子メカニズムを解明しつつある。

研究成果の概要（英文）：We systematically examined Sept3-deficient mice at various levels and the following findings were obtained. In systematic behavioral analysis, they selectively showed underperformance in the spatial context discrimination task. We pinpointed the responsible region by stereotactic injection of AAV expression and knockdown vectors. 3D morphometry using ssTEM revealed normal synaptic distribution density and spine volume, but fewer spines containing smooth endoplasmic reticulum. This abnormality was reproduced in primary cultured granule cells. We optimized condition of late long-term potentiation under which ER extension followed spine enlargement. SEPT3 depletion did not affect actin-based spine enlargement, while selectively inhibited ER extension, suggesting that ER entry into the granule cell spine is activity-dependent and SEPT3-dependent.

研究分野：神経化学、分子神経生物学

キーワード：シナプス 樹状突起棘 滑面小胞体 セプチン 長期記憶 長期増強 海馬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達の長期増強(LTP)は、個体発生/発達過程での神経回路の自己組織化と、生涯にわたる学習・記憶の素過程であり、精神遅滞、発達障害、精神・神経疾患の病態と密接に関連する。LTP は後シナプス膜の強い脱分極によってシナプス伝達効率が増強するポジティブ・フィードバック現象であり、Hebb の学習則の根幹を成す。LTP のうち、瞬時に成立する一過性の early LTP(E-LTP)の主な分子基盤は、1)シナプス後膜上のイオンチャンネル型グルタミン酸受容体(AMPA)の増加、2)アクチン重合などによる樹状突起棘(スパイン)の拡大に伴うシナプス面積の拡大である。さらに強い入力、新規蛋白質合成に依存する持続性の late LTP(L-LTP)をもたらす(図 1,2)。E-LTP から L-LTP への遷移は、シナプスの重み付けを維持することで特定の神経回路(セルアセンブリー)を長時間持続させる。個体レベルでは短期記憶から長期記憶への固定化(consolidation)に相当するが、メカニズムには不明な点が多い。

セプチンは多様な組み合わせでフィラメント状に重合して足場や細胞骨格として機能するユビキタな GTP 結合蛋白質であり、特に最終分化したニューロンやグリアで高発現する。国内外の臨床研究により、精神・神経疾患とセプチン・ファミリー(SEPT1-14)に関する知見が独立に蓄積してきた: a) 遺伝性末梢神経障害(Hereditary Neuralgic Amyotrophy)の原因遺伝子が優性変異型 SEPT9 であること(Nat Genet 2005 等) b) 統合失調症の大規模 GWAS において SEPT3 が責任遺伝子候補として同定されたこと(Nature 2014) c) 統合失調症や双極性障害の患者死後脳(背外側前頭前皮質)多数例における SEPT5, SEPT6, SEPT11 の増加(Mol Psychiatry 2008 等) d) 常染色体劣性若年性パーキンソン病(PARK2)の責任蛋白質 Parkin(ユビキチン E3 リガーゼ)の機能喪失によって蓄積し得る基質(SEPT4, SEPT5, α -synuclein 等)であること(PNAS 2000 等)など。しかし、神経系での生理機能や精神・神経病態における役割に関して解決すべき課題が多く残されている。我々は、脳特異的かつニューロン選択的に高発現する機能不明のセプチン遺伝子 *Sept3* を欠損するマウスの系統的行動スクリーニングと精査により、記憶固定化障害(空間文脈記憶を 2 時間以上保持するが、24 時間未満で忘却)を見出した。3D 電顕での形態精査で認めた唯一の異常が海馬歯状回顆粒細胞のスパイン内滑面小胞体(ER)の欠乏であった。

2. 研究の目的

本研究で解析対象とした *Sept3* 欠損マウスは、空間定位、作業記憶、空間文脈記憶の獲得は正常であるにもかかわらず、空間文脈記憶の固定化が選択的に減弱していることを見出し、その責任領域が歯状回であることも確定した。1 遺伝子欠損によって記憶の固定化プロセスが選択的に障害される事例の報告はないため、*Sept3* 欠損マウスは限局的な空間認知・弁別障害のユニークなモデルとして、シナプス制御の分子メカニズムに切り込むための貴重な知見をもたらすと期待された。

3. 研究の方法

1) *Sept3* 欠損マウス顆粒細胞での ER 含有スパインの減少が細胞自律的な現象かを検証するため、初代培養顆粒細胞の SEPT3 を RNAi で枯渇させて ER 動態をライブイメージングした。
2) 電子顕微鏡連続切片像 3D 再構築(ssTEM)法で pp-DG シナプスの 3 次元形態と分子局在を高分解能撮像し、スパイン体積、PSD 面積、スパイン内 ER などの形態指標を精密に定量解析した。
3) 小脳プルキンエ細胞でスパイン内への ER 伸展に関与するとの報告がある Myosin Va/MY05A などを SEPT3 と相互作用し得る候補分子として、RNAi によるスパイン内 ER 動態への影響をスクリーニングし、関連性の高い分子は免疫電子顕微鏡(immunogold)法による分子局在のマッピングや SEPT3 との免疫共沈などを検討した。

4. 研究成果

1) 初代培養ラット海馬顆粒細胞に後期長期増強(late LTP)を誘発し得るレベルの入力模倣刺激を薬理学的操作によって与えると、直後にシナプスが拡大し、遅れて ER 伸展が再現された。RNAi による SEPT3 枯渇はシナプス拡大には影響せず ER 伸展を阻害したことから、顆粒細胞スパインへの ER 侵入は神経活動依存的かつ SEPT3 依存的であると結論づけた。
2) 3D 電顕(ssTEM)法を用いた海馬 DG-CA3-CA1 領域の系統的な 3D 形態計測においては、スパイン密度、スパイン体積、PSD 面積等はいずれの領域も正常であったが、pp-DG のみでスパイン内小胞体の減少を認めた(CA 領域では認めなかった)ことから、*Sept3* 欠損マウスの記憶固定化障害の原因が pp-DG シナプスに限局したシナプス機能障害であり、スパイン内小胞体の減少からポストシナプス(=顆粒細胞)側の異常を主徴とすることが判明した。
3) RNAi による MY05A の枯渇は SEPT3 枯渇と類似した ER 伸展を阻害したことから、両者の機能的協調が示唆された。免疫電子顕微鏡による局在比較では、いずれもスパイン内小胞体近傍にも存在し得ることまでは示せた。しかし、電顕グレードの抗体がいずれもウサギ由来であることから SEPT3 と MY05A の 2 重標識は試みておらず、今後の課題である。

スパイン内ERはCa²⁺/脂質シグナリングを介したシナプス伝達に関与すると想定されているが、ER伸展の制御機構とともに検証されていない。SEPT3が1) 神経活動に伴ってリン酸化され、2) スパイン基部からER膜近傍に移行し、3) MYO5Aと会合する、ことを示唆するデータが得られたため、「SEPT3がMYO5AとERを連結するアダプターないし連結安定化因子である」という仮説を立て、併せて検証を行っている。

〔雑誌論文〕(2018.4-2021.3)(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Developmental and postdevelopmental roles of septins in the brain. Neuroscience Research in press.

Asada-Utsugi M, Uemura K, Kubota M, Noda Y, Tashiro Y, Uemura MT, Yamakado H, Urushitani M, Takahashi R, Hattori S, Miyakawa T, Ageta-Ishihara N, Kobayashi K, Kinoshita M, Kinoshita A. Mice with a cleavage-resistant N-cadherin exhibit synapse anomaly in the hippocampus and outperformance in spatial leaning tasks. Molecular Brain 14:3, 2021

Shindo A, Inoue Y, Kinoshita M, Wallingford JB. PCP-dependent transcellular regulation of cortical actomyosin oscillation facilitates convergent extension of vertebrate tissue. Developmental Biology 446, 159-167, 2019.

Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi N, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, Kahyo T, Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka N, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H, Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K. A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. Nature Communications 9:3936, 2018. Press Release

Shindo A, Audrey A, Takagishi M, Takahashi M, Wallingford JB, Kinoshita M. Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing. Journal of Cell Science 131, 212647, 2018.

Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M. CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. Neurochemistry International 119, 190-198, 2018.

木下 専 「19章：神経ネットワークの形と機能を制御する細胞骨格系分子群」DOJIN BIOSCIENCE SERIES 28 脳神経化学 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか(森泰生、尾藤晴彦編) 京都廣川書店 pp. 204-211, 2018.

〔学会発表〕

2018年6月28日. Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. An activity-regulated septin subunit SEPT3 is required for the entry of sER into dendritic spines and spatial discrimination. Gordon Research Conference “Cell Biology of the Neuron” (Waterville Valley, NH, USA)

2018年9月7日. Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. A postsynaptic dysregulation in hippocampal granule cells that underlies spatial discrimination defect. “Dynamics and significance of subcellular distribution and turnover of crucial molecules in the spine.” The Joint Congress of the 40th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry and the 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (Kobe)

2018年10月5日 Sakakibara K, Fukumasu N, Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Kinoshita M. Requirement of a septin subunit SEPT3 in the dentate gyrus granule cells for dendritic spine maturation and spatial discrimination. The 6th Neural Circuits Joint Workshop (Nagoya, Japan).

2018年10月5日 Ageta-Ishihara N, Kurita H, Yamazaki M, Abe M, Fukazawa Y, Sakimura K, Kinoshita M. Unexpected motor and histopathological phenotype found in mice that lack SEPT7 in the cerebellum. The 6th Neural Circuits Joint Workshop (Nagoya, Japan).

2018年11月28日 Kinoshita M. Exploring pre-/post-/peri-synaptic functions of the septin cytoskeleton. Special Lecture Tokuron 2018, Neuroscience Course, Nagoya Univ. Graduate School of Medicine (Nagoya, Japan).

2019年3月18日 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. Septin-dependent entry of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic basis of persistent memory. OIST Mini-Symposium: The 16th International Membrane Research Forum (OIST)

2019年7月26日 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Kengaku M, Takao K, Inokuchi K, Miyakawa T, Bito H, Kinoshita M. Activity- and septin-dependent entry of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic basis of persistent memory. Neuro2019(第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学学会大会) (新潟)

2019年10月17日 Fujiwara R, Kinoshita M. ssTEM mapping of SEPT3 reveals its association with ER extending into active spines. The 7th Neural Circuits Joint Workshop (Nagoya, Japan).

2019年10月17日 Asami Y, Kinoshita M. Activity- and SEPT3-dependent ER entry into dendritic spines underlies long-term memory. The 7th Neural Circuits Joint Workshop (Nagoya, Japan).

2019年11月23日 木下 専 「セプチン細胞骨格サブユニット SEPT3 はスパインへの小胞体侵入を介して記憶保持に寄与する」第17回神経科学研究会 (東京)

2020年2月4日 小坂優介、木下 専 「Activity- and SEPT3-dependent ER entry into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation」文部科学省 新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 (大津)

Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Kengaku M, Takao K, Inokuchi K, Miyakawa T, Bito H, Kinoshita M. Activity- and septin-dependent extension of smooth ER into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation 第43回日本神経科学大会 (神戸)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Asada-Utsugi M., Uemura K., Kubota M., Noda Y., Tashiro Y., Uemura T. M., Yamakado H., Urushitani M., Takahashi R., Hattori S., Miyakawa T., Ageta-Ishihara N., Kobayashi K., Kinoshita M., Kinoshita A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Mice with cleavage-resistant N-cadherin exhibit synapse anomaly in the hippocampus and outperformance in spatial learning tasks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00738-1	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 -

1. 著者名 Ageta-Ishihara Natsumi, Kinoshita Makoto	4. 巻 1
2. 論文標題 Developmental and postdevelopmental roles of septins in the brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.08.006	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 -

1. 著者名 Viard Julia, 略, Kinoshita Makoto, Liu Guofa, Haucke Volker, Moncion Thomas, Yu Eugene, Hindie Val?rie, Bl?haut Henri, Mircher Clotilde, Herault Yann, Deleuze Jean-Fran?ois, Rain Jean-Christophe, Simonneau Michel, Lepagnol-Bestel Aude-Marie	4. 巻 1
2. 論文標題 Chr21 protein-protein interactions: enrichment in products involved in intellectual disabilities, autism and Late Onset Alzheimer Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2019.12.11.872606	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Shindo Asako, Inoue Yasuhiro, Kinoshita Makoto, Wallingford John B.	4. 巻 446
2. 論文標題 PCP-dependent transcellular regulation of actomyosin oscillation facilitates convergent extension of vertebrate tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 159 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.12.017	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 該当する

1. 著者名 Ageta Hiroshi, Ageta-Ishihara Natsumi、略、Kinoshita Makoto、Ochiya Takahiro、Mann Matthias、Setou Mitsutoshi、Tsuchida Kunihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06197-y	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 該当する

1. 著者名 Ageta-Ishihara Natsumi, Konno Kohtarou, Yamazaki Maya, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Watanabe Masahiko, Kinoshita Makoto	4. 巻 119
2. 論文標題 CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 190 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.01.003	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 -

1. 著者名 Shindo Asako, Audrey Anastasia, Takagishi Maki, Takahashi Masahide, Wallingford John B., Kinoshita Makoto	4. 巻 131
2. 論文標題 Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.212647	査読の有無 無
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 木下 専	4. 巻 28
2. 論文標題 神経ネットワークの形と機能を制御する細胞骨格系分子群	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DOJIN BIOSCIENCE SERIES 28脳神経化学 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fujiwara R, Kinoshita M.
2. 発表標題 ssTEM mapping of SEPT3 reveals its association with ER extending into active spines.
3. 学会等名 The 7th Neural Circuits Joint Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asami Y, Kinoshita M.
2. 発表標題 Activity- and SEPT3-dependent ER entry into dendritic spines underlies long-term memory.
3. 学会等名 The 7th Neural Circuits Joint Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Kosaka Y, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M.
2. 発表標題 Activity- and septin-dependent extension of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation. Outcome Presentation Meeting FY2019.
3. 学会等名 Platforms for Advanced Technologies and Research Resources
4. 発表年 2020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
連携研究者	上田(石原) 奈津実	名古屋大学・理学研究科・講師	
	(Ageta-Ishihara Natsumi)		
	(60547561)	(13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------