

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02579

研究課題名（和文）シナプス活動で遊離したセブチンによるPSDと小胞体の再編が記憶固定化に寄与する

研究課題名（英文）Activity-dependent postsynaptic remodeling underlying memory consolidation

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）：SEPT7T426のリン酸化の生理的意義は不明であったが、膜局在におけるSEPT7 C末端12残基の必要性、SEPT7T426Dの脱局在傾向とSEPT7より高い可動性、膜局在と可動性のMYH10との類似を示すFRAPデータから、SEPT7は膜骨格のMYH10と会合し、神経活動によるT426のリン酸化が膜骨格からの遊離シグナルとなるモデルが支持された。記憶のモデル系として電気刺激で過活動を誘発したマウス脳を3D電顕解析すると、スパイン近傍のER膜上のSEPT3とMYO5Aが増加した。野生型でみられた電気刺激によるER含有率の増加はSept3欠損型では認めなかったこともこのモデルを支持する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、学習・記憶の基盤となるシナプス近傍の膜骨格のリモデリング機構の一端を明らかにした。過活動したシナプス近傍の小胞体膜上にSEPT3とMYO5Aが集積することは、「強いシナプス活動がSEPT3のリン酸化による遊離とMYO5Aの活性化を誘発し、両者がシナプス近傍のER膜上で会合してスパイン内へERを牽引する」という独自の作業仮説を支持する。本研究の結果に基づき、長期記憶のシナプス基盤と想定されるスパイン内ER伸展の分子メカニズムの解明と、他の長期記憶障害モデルにおいてもスパイン内ER伸展障害がみられるかの検証を進めている。

研究成果の概要（英文）：Physiological significance of SEPT7T426 phosphorylation on the database was unknown, but our FRAP data showing a requirement of C-terminal 12 residues of SEPT7 in membrane localization, a higher mobility of SEPT7T426D than SEPT7, and similarity with MYH10 in terms of membrane localization and mobility, support our model in which the neural activity-dependent T426 phosphorylation releases SEPT7 from the membrane skeleton. 3D electron microscopy analysis of electrically stimulated mouse brains (an in vivo model of long-term memory) showed an increase in SEPT3 and MYO5A on ER membranes near dendritic spines in the hippocampus. The increase in ER-containing spines by electrical stimulation was not observed in the Sept3-null mice unlike their wild-type littermates. These data supports the working model.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：シナプス スパイン 長期増強 記憶 ミオシン セブチン 滑面小胞体 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

(1) 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。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に相当するが、メカニズムには不明な点が多い。

シナプス後肥厚(PSD)は、グルタミン酸受容体、Ca²⁺/カルモデュリン依存性キナーゼII(CaMKII)、足場/アダプター蛋白質 PSD-95、SynGAP、Shank3、Homerなどの記憶関連分子が高密度に集積した準安定な凝集相である(Zeng, Zhangら Cell 2016, 2018)。一方、UCSFのJan研は、自閉症責任蛋白質の1つTAOK2キナーゼによるリン酸化を模倣するSEPT7T426DがPSD-95と会合することと、SEPT7T426Dの過剰発現がスパインを拡大させることを示したが、SEPT7の由来やSEPT7リン酸化の生理的意義は不明であった(Yadav, Janら Neuron 2017)。応募者らは、樹状突起基幹部からスパインに移行するスパイン基部の細胞膜直下にSEPT5、SEPT7、SEPT11などのセプチン・サブユニットが集積することをマウス脳の免疫電子顕微鏡解析で見出し、培養神経細胞における動態を光退色後蛍光回復/FRAP法で示した(木下ら J Comp Neurol 2000; Dev Cell 2002; 萩原、木下ら Cytoskeleton 2011)。微小管上のSEPT7は胎生期の幼若ニューロンの神経突起伸展に寄与する(上田-石原、木下ら Nat Commun 2013)、成体脳の成熟ニューロンのシナプス伝達におけるスパイン基部のセプチン集合体の機能は不明である。

2. 研究の目的

上記問題へのアプローチの一環として、強いシナプス入力で活性化されたCaMKII、PKA等によるリン酸化カスケードの下流の事象と想定される作業仮説を検証することが本研究の目的である。即ち、「スパイン基部のセプチン集合体は、リン酸化SEPT7やSEPT3などの活性サブユニットをシナプス活動に応じて遊離するデポとして機能する」、「遊離SEPT7はPSDをリモデリングする」、「遊離SEPT3はスパイン内アクトミオシン系と協調してERをスパイン内へと伸展させ、Ca²⁺反応を増強する」、「相互に関連するこれらの事象がL-LTP/記憶固定化に寄与する」である。以上により、後シナプス分子群(足場/細胞骨格/モーター蛋白質)とオルガネラとの相互作用の実体、および海馬シナプスにおけるスパイン内ERの生理的意義(L-LTP/記憶固定化への寄与)を明らかにすることである。

3. 研究の方法

上記作業仮説の検証には、遺伝子/蛋白質/小胞体/スパイン/ニューロン/神経回路/脳組織/個体(行動)レベルにわたる実験手法(組み換え蛋白質の再構成を中心とした生化学的手法、初代培養ニューロンの分子生物学的・薬理学的操作とFRAPアッセイを含む蛍光ライブイメージング、遺伝子改変マウスの免疫電子顕微鏡解析、空間文脈記憶課題、物体記憶課題等を用いた。研究計画A:「スパイン基部のセプチン集合体のリン酸化によるリモデリング リン酸化SEPT7とSEPT3の遊離」仮説の検証

本研究に向けた予備実験として、初代培養ラット海馬歯状回顆粒細胞(div21)に対して次の実験条件を最適化した。L-LTP誘発刺激(chemical LTP, cLTP: フォルスコリンに加えてcAMP分解阻害剤口リプラム、Mg²⁺除去によるNMDA受容体の脱抑制)を与えると、直後に多数のスパインが拡大し、長時間持続する。このL-LTPモデル系を利用して、cLTP刺激後に培養ニューロンの蛋白質を生化学的に抽出・分画し、可溶性/不溶性画分におけるSEPT3/7、およびリン酸化型の割合を

Phos-tag 法で定量解析する（予想：可溶性画分の SEPT3、リン酸化型 SEPT7 の増加）。本計画は 2023 年度末時点で未完了のため 2024 年度以降も継続中。

研究計画 B1：「遊離した SEPT3 の MY05A との会合 ER のスパイン内伸展」仮説の検証

L-LTP 誘発刺激直後にはスパインが拡大し、長時間持続する。我々は独自に、神経活動依存的に拡大したスパイン内に 40 分 ± 20 分遅れて ER が伸展することを見出した。この ER 伸展には SEPT3 と MY05A の両方が必要であり、SEPT3 と MY05A が直接会合しうることもわかったが、神経活動依存的な調節も含めてどのような制御を受けるかは不明である。そこで Chemically-induced dimerization (CID) 法で MY05A-SEPT3 を融合したキメラ蛋白質がスパイン内への ER 伸展活性を示すことを計画した。

実験手法：高密度分散培養したラット DG ニューロン (div7) にプラスミドベクター (1. 細胞形態マーカー iRFP670/TagRFP、2. Sept3-shRNA または対照 shRNA、3. 蛍光 Ca²⁺ プローブ GCaMP6f、4. ER マーカー TagRFP/EGFP-KDEL、5. ECFP-SEPT3T211E または ECFP、6. FKBP-iRFP670-ERJ1、FRB-ECFP-SEPT3) を適宜組み合わせ導入し、div19-23 に実験を行った。共焦点レーザー顕微鏡 LSM-780/FV3000 で撮像し、Ca²⁺ イベント回数 (自発発火頻度) と ER スパインの割合 (ER 含有率) を算出した。

研究計画 B2：「スパイン内 ER からの Ca²⁺ 放出 Ca²⁺ transient の遷延」仮説の検証

蛍光 Ca²⁺ プローブ GCaMP6f による予備実験により、顆粒細胞スパインの Ca²⁺ シグナルが微弱で検出不能であった一方、顆粒細胞 soma 付近の自発発火は容易に可視化できたため、SEPT3 欠乏が L-LTP 刺激後の発火頻度の一過性亢進を早期に減衰させるかを示した。

実験手法：薬理的 L-LTP/E-LTP 誘発 (Mg²⁺ 非存在下 (L-LTP) / 存在下 (E-LTP) でアデニル酸シクラーゼ活性化剤 forskolin とホスホジエステラーゼ阻害剤 rolipram で 16 分間/15 分間処理) の前後 (-15/+20/+300 min) に、細胞体領域の GCaMP6f 蛍光強度変化を計測した。細胞体内 [Ca²⁺] 動態の指標として、 $F/F_0 = (F - F_0) / F_0$ (F: 各時点での平均輝度値、F₀: F の平均) を算出した。薬理的 E-LTP 誘発刺激として、ER 伸展を誘発する CID 法 (上記 6 と rapamycin analog (rapalog, 100 nM) で処理) と組み合わせ実験した。

研究計画 C：研究計画 AB に関連する *in vivo* 実験として、電気刺激で過活動を誘発したマウス脳を長期記憶のモデル系として、透過型電子顕微鏡連続切片像再構築 (ssTEM) 法を用いてスパイン近傍の SEPT3、MY05A の分子局在と ER 伸展の関連を精査した。

実験手法：電気刺激による神経過活動誘発 (Electroconvulsive Seizure, ECS) 静穏環境で 3 日間飼育したマウス (C57BL/6N 系統, 10-16 週齢雄) の両側耳介に設置した電極から経頭蓋的に脳を電気刺激して (40mA, 0.2ms x20/0.2s) 神経過活動を誘発した。110 分後に灌流固定し (4%パラホルムアルデヒド+0.05%グルタルアルデヒド/リン酸緩衝溶液)、脳組織切片 (冠状断, 60 μm 厚) を作製した。

免疫電子顕微鏡法 (pre-embedding immunogold labeling method, immuno EM)

脳組織切片を凍結融解処理後、浮遊法にて 1 次抗体 (4 日, 2-3 日間)、金コロイド標識 2 次抗体 (4 日, 1 日間) と反応させ、銀増感反応、酸化オスミウム/酢酸ウラン染色、エタノール脱水、酸化プロピレン処理の後、切片をエポキシ樹脂に包埋した。MML 領域を含む連続超薄切片 (50 nm 厚 x 約 30 枚) を作製し、クエン酸鉛染色後、TEM で撮像した (100 kV, x25,000-30,000)。成熟スパイン、PSD、ER の形状と標識粒子の局在を RECONSTRUCT ソフトウェア上でトレースし、3 次元再構築と解析を行った (図 A)。

4. 研究成果

B(1) 「SEPT3 は L-LTP 誘発後の神経過活動の維持に必要である」

cL-LTP 誘発 20 分後には、SEPT3 欠乏 (KD) 群 (ER 伸展-) も対照群 (ER 伸展+) と同等レベルの過活動状態であった ([-15 分] 0.34 vs. [20 分] 3.8, p<0.0001)。一方、300 分後には、対照群では弱い過活動状態が維持されていたが、SEPT3 KD 群では刺激前レベルまで減衰した ([-15 分] 0.34 vs. [300 分] 0.59, p>0.99)。

B(2) E-LTP から L-LTP への移行には ER 伸展のみでは不十分である

薬理的 E-LTP 誘発刺激+rapalog 添加後 20 分後には、自発発火頻度が増加したが([-15 分] 0.77 vs. [20 分] 2.9, $p < 0.0001$)、300 分後には刺激/添加前レベルまで減衰した([-15 分] 0.77 vs. [300 分] 0.43, $p > 0.99$)。

B(3) マウス由来の培養 DG/CA ニューロンを用いた高密度培養系の確立と *Sept3* 欠損による ER 含有率低下の再現

Sept3 KO マウス由来の培養 DG/CA ニューロンでは野生型より ER 含有率が低く、マウス脳組織での異常が *in vitro* で再現された(DG; WT 70% vs. KO 46%, $p = 0.0015$. CA; WT 71% vs. KO 43%, $p = 0.0046$)。

C(1) ECS による長期記憶モデルマウスのシナプス形態定量解析

野生型、*Sept3* 欠損型を問わず、ECS 群では DG ニューロンを含む一部の神経細胞の核で c-Fos の高発現を認め、L-LTP 様の強い神経活動が示唆された。DG-MML の非対称性シナプス密度、スパイン体積、PSD 面積には、ECS の有無による差を認めなかった。一方、スパインの ER 含有率は、野生型の ECS 群で有意に高かった(対照群 vs. ECS 群: 67% vs. 82%, $p = 4.0 \times 10^{-3}$, $n = 135, 165$)。 *Sept3* 欠損マウスの ER 含有率は野生型より低く、ECS の有無による差を認めなかった(45% vs. 44%, $p = 0.84$, $n = 210, 190$)。

C(2) スパイン近傍の ER に着目した SEPT3 と MYO5A の局在解析

SEPT3 は ECS の有無によらずスパイン Neck/Base に局在していた。対照群と比較して ECS 群の SEPT3 密度は高く、ER 含有スパインの Neck で顕著であった。セプチン・オリゴマーの中核サブユニット SEPT7 も Neck に局在していたが、ECS の有無による差は認めなかった。ER 含有スパインに限定した Neck/Base 近傍の ER 膜上の SEPT3 と MYO5A の存在率はいずれも ECS 群で有意に高かった(対照群 vs. ECS 群: SEPT3, Neck 10% vs. 32%, $p = 9.8 \times 10^{-8}$; Base 13% vs. 32%, $p = 5.4 \times 10^{-7}$; $n = 41, 54$) (MYO5A, Neck 18% vs. 34%, $p = 4.2 \times 10^{-4}$; Base 26% vs. 51%, $p = 1.0 \times 10^{-14}$; $n = 76, 31$)。一方、SEPT7 の ER 膜上存在率に群間差はなかった(Neck 12% vs. 9%, $p = 0.34$; Base 7% vs. 9%, $p = 0.62$; $n = 24, 51$)。

まとめ

本研究 C により、過活動したスパイン Neck/Base の ER 膜上での SEPT3 と MYO5A の集積が示されたことは、「強いシナプス活動が SEPT3 のリン酸化による遊離と MYO5A の活性化を誘発し、両者が Neck/Base 近傍の ER 膜上で会合してスパイン内へ ER を牽引する」という作業仮説を支持する。

本研究 B により、L-LTP には SEPT3 と MYO5A の協調によってスパインに伸展した ER が必要であることが示された。一方、人為的な ER 伸展のみでは E-LTP から L-LTP への移行に十分ではなく、他の要素の必要性が示唆された。

マウス海馬初代培養系を確立し、*Sept3* 欠損によるスパインへの ER 伸展阻害が DG 以外のニューロンでもみられる現象であることを示した。この実験系により、*Sept3* と類似遺伝子 *Sept9* との機能重複の検証、L-LTP を促進する代謝産物/生理活性物質や *Sept3* 欠損による障害をレスキューする因子の探索、ER 伸展を含めたシナプス調節機構の探索などが可能となった。そこでこの系を用いて、代表的な神経栄養因子や成長因子などの ER 伸展促進効果や L-LTP 促進効果などの評価を開始した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Viard J, Loe-Mie Y, Daudin R, Khelifaoui M, Plancon C, Boland A, Tejedor F, Huganir R, Kim E, Kinoshita M, Liu G, Haucke V, Moncion T, Yu Y, Hindie V, Blehaut H, Mircher C, Herault Y, Deleuze J-F, Rain J, Simonneau M, Lepagnol-Bestel A-M.	4. 巻 5(12)
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 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101205	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 7件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Hosokawa T, Liu P-W, Hayashi Y, Kinoshita M.
2. 発表標題 Segregation of postsynaptic proteins via liquid-liquid phase separation and their dissociation.
3. 学会等名 NEURO2022 (The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsui R, Ageta-Ishihara N, Kurita H, Suzuki A, Fukazawa Y, Hosokawa T, Kinoshita M.
2. 発表標題 The pivotal septin subunit SEPT7 localizes to pre-/post-/peri-synaptic membrane domains and interacts with MYH10/nonmuscle myosin IIB
3. 学会等名 NEURO2022 (The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Kosaka Y, Mizukami M, Takao K, Kengaku M, Miyakawa T, Inokuchi K, Bito H, Kinoshita M.
2. 発表標題 Activity-triggered extension of endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation.
3. 学会等名 NEURO2022 (The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsumi Ageta-Ishihara, Yugo Fukazawa, Keizo Takao, Mineko Kengaku, Tsuyoshi Miyakawa, Kaoru Inokuchi, Haruhiko Bito, Makoto Kinoshita.
2. 発表標題 Activity- and septin-dependent extension of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic mechanism of memory consolidation
3. 学会等名 記憶学習研究会「記憶・学習の包括的理解に向けたアプローチ」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤直樹 西川将司 木下 専 永田浩一
2. 発表標題 神経発達におけるRac1制御分子Rich2の発現プロファイル解析
3. 学会等名 第54回臨床分子形態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsumi Ageta-Ishihara, Yugo Fukazawa, Keizo Takao, Mineko Kengaku, Tsuyoshi Miyakawa, Kaoru Inokuchi, Haruhiko Bito, Makoto Kinoshita.
2. 発表標題 Activity- and septin-dependent extension of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic mechanism of memory consolidation
3. 学会等名 生理研研究会「ナノ・メソスケールから捉えるシナプス制御機構の新展開」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohisa Hosokawa, Pin-Wu Liu, Makoto Kinoshita, Yasunori Hayashi
2. 発表標題 Calcium-induced persistent formation of protein condensate on Post-Synaptic Density by liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会年会/第1回CJK国際会議(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsumi Ageta-Ishihara, Yugo Fukazawa, Keizo Takao, Mineko Kengaku, Tsuyoshi Miyakawa, Kaoru Inokuchi, Haruhiko Bito, Makoto Kinoshita
2. 発表標題 A myosin/septin-dependent postsynaptic regulation required for memory consolidation
3. 学会等名 第44回日本神経科学会年会/第1回CJK国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohisa Hosokawa, Pin-Wu Liu, Makoto Kinoshita
2. 発表標題 Modification of physical properties and reconstruction of postsynaptic density by liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 第 44 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実, 木下 専
2. 発表標題 記憶の長期化に寄与するスパイン内小胞体の役割
3. 学会等名 第19回神経科学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Kinoshita
2. 発表標題 Activity-triggered extension of endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation
3. 学会等名 EMBO Workshop Molecular and cell biology of septins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------