

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19427

研究課題名(和文) 記憶の固定化に寄与する新規メカニズムの検証と確立

研究課題名(英文) Investigation on a novel synaptic mechanism 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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：記憶固定化のシナプス機構の一環として、「シナプス入力でSEPT3がリン酸化され、スパイン基部から遊離してER膜上に移行し、ミオシンMYO5A-ER間のアダプターとしてER牽引に寄与する」という作業仮説を立て、検証した。シナプス活動に伴うリン酸化を模倣した変異型SEPT3と活性型MYO5AはDGニューロンのスパインへのER伸展に相加的に作用した。CID法によるERj1-SEPT3、MYO5A-ERj1の会合はER含有を促進することなどから、「リン酸化SEPT3-活性型MYO5A複合体がスパイン基部のER膜と直接または間接的に接触し、アクチンを介してERを牽引する」という分子機構を想定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス伝達効率が強い入力で亢進する長期増強現象(LTP)は、一過性の前期相(E-LTP)と蛋白質合成に依存する持続性の後期相(L-LTP)に区分される。E-LTPからL-LTPへの移行は短期記憶から長期記憶への転換(固定化)のシナプス基盤とされているが、不明な点が多い。ヒトの知能とSEPT3の関連はGWASで示唆されているが、脳特異的かつニューロン選択的に発現するSEPT3の存在意義は不明であった。本研究では、SEPT3欠損マウスの記憶固定化障害を見出したことを端緒に、シナプス活動とMYO5A/SEPT3に依存したスパイン内へのERの伸展が記憶固定化のシナプス機構であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：As a part of the synaptic mechanism of memory consolidation, we set and tested the working hypothesis that "SEPT3 is phosphorylated at synaptic input, released from the spine base, and migrates onto the ER membrane to contribute to ER extension as an adaptor between MYO5A and ER". A mutant SEPT3 that mimics the synaptic activity-dependent phosphorylation, and an active mutant MYO5A additively promoted ER extension into spines of DG neurons. Given that artificial association of either ERj1-SEPT3 or MYO5A-ERj1 by the CID method promotes ER inclusion, we assume a molecular mechanism in which "the phosphorylated SEPT3-MYO5A complex directly or indirectly contacts the ER membrane at the spine base and extends the ER along actin into active spines."

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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・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る。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。

(2) 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 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。精神・神経疾患とセプチン・ファミリー(SEPT1-14)に関する知見として、a) 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)における *SEPT5*, *SEPT6*, *SEPT11* の増加(Mol Psychiatry 2008 等)しかし、神経系での生理機能や精神・神経病態での役割はほとんどわかっていない。

(3) 研究代表者らは、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を行った。*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、空間文脈記憶を 24 時間未満で忘却した。記憶固定化の選択的減弱の責任領域が嗅内皮質-海馬歯状回(pp-DG)シナプスであることを局所的レスキュー/ロックダウン実験で確定した。1 遺伝子欠損によって記憶固定化が選択的に障害される事例の報告は我々の知る限りないため、*Sept3* 欠損マウスは空間記憶減弱(および最近見出した物体記憶減弱)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関する新たな知見をもたらすことが期待された。

2. 研究の目的

Sept3 欠損マウスの pp-DG シナプスの密度、スパイン体積、PSD 面積、スパイン内 ER などの形態指標を電子顕微鏡連続切片像 3D 再構築(ssTEM)法で精密に定量解析した。検出できた唯一の形態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。この異常は初代培養 DG 顆粒細胞(以下 DG ニューロン)の *SEPT3* を RNAi で枯渇すると再現されたことなどから、細胞自律的かつ顆粒細胞選択的な現象といえるが、分子メカニズムは不明であった。一方、ラット pp-DG シナプスへの電気刺激はアクチン重合と L-LTP を誘発する(深澤、井ノ口ら Neuron 2003)。このとき *SEPT3* もリモデリングすることを見出したが、その意義も不明であった。

そこで、小脳プルキンエ細胞でスパイン内への ER 伸展に関与することが報告されているミオシン MYO5A(Nat Neurosci 2011)と *SEPT3* の相互作用やその制御機構を精査することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養 DG ニューロンの化学的刺激(培地の Mg^{2+} を除去して NMDA 受容体を活性化するとともに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 を添加することで細胞内 cAMP 濃度を増加させて PKA などのキナーゼカスケードの活性を亢進させること)によって L-LTP(chemical L-LTP, cL-LTP)を誘発する実験条件を用いて、シナプス過活動がスパインへの ER 伸展も誘発するか、DG ニューロンの ER 伸展にも MYO5A が関与するか、する場合は *SEPT3* と相互作用するかを検証した。

(2) シナプス活動に伴い、PKA、PKC、CaMKII などのキナーゼカスケードが活性化され、多数のシナプス蛋白質をリン酸化制御するが、その一環として *SEPT3* や MYO5A のリン酸化がスパインへの ER 伸展にも関与するかを疑似リン酸化型 *SEPT3* などを用いて探索、検証した。

(3) *SEPT3* や MYO5A ER 伸展の分子機構の解明を目指して CID(Chemically Induced Dimerization)法による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 培養 DG ニューロンの cL-LTP 誘発刺激によってスパイン密度は変化しないが、スパインの体積と ER 含有率が増加した。GFP-MYO5A(野生型/モータードメインを欠損するドミナントネガティブ型(dn)/コイルドコイル領域を欠損する活性型(CCtr))のうち、MYO5Adn は *SEPT3* 欠乏と同様に cLTP の有無によらず ER 含有率が低かった。無刺激下で活性型 MYO5A は ER 含有率が有意に高く、*SEPT3* を共発現するとさらに高くなることから、活性型 MYO5A と *SEPT3* との機能的相互

作用が ER 伸展を促進することが示唆された。SEPT3 欠乏による低 ER 含有率は活性型 MYO5A でレスキューされなかった。以上から、スパインへの ER 伸展には L-LTP を誘発する強度のシナプス活動、MYO5A の活性化、SEPT3 が必要であることを示した。

(2) シナプス活動で活性化する CaMKII、PKA、PKC などによるリン酸化が予測された 6 つの S/T 残基を D/E に置換した疑似リン酸化型 SEPT3 を DG ニューロンに発現すると、ある変異型 SEPT3* のみで ER 含有率が増加し、活性型 MYO5A との共発現でさらに増加した。GFP-SEPT3* は細胞質内に分散し、スパイン基部に集積するセプチン重合体からの解離と脱局在をリン酸化が促進することが示唆された。

(3) CID 法による ERj1-SEPT3、MYO5A-ERj1 の会合(二量体化)は ER 含有を促進する一方、MYO5A-SEPT3 の会合は促進しないことなどから、「リン酸化 SEPT3-活性型 MYO5A 複合体がスパイン基部の ER 膜と直接または間接的に接触し、アクチンを介して ER を牽引する」という分子機構を想定している(投稿準備中)。

[雑誌論文](2021.4-2023.3)

Goto N, Nishikawa M, Ito H, Noda M, Hamada N, Tabata H, Kinoshita M, Nagata K. Expression analyses of Rich2/Arhgap44, a Rho family GTPase-activating protein, during mouse brain development. *Developmental Neuroscience* 45(1), 19-26, 2023. (doi: 10.1159/000529051)

Viard J, Loe-Mie Y, Daudin R, Khelifaoui M, Plancon C, Boland A, Tejedor F, Huguier 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. Chr21 protein-protein interactions: enrichment in products involved in intellectual disabilities, autism and late onset Alzheimer disease. *Life Science Alliance* 5(12):e202101205, 2022. (doi: 10.26508/lsa.202101205)

Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Developmental and postdevelopmental roles of septins in the brain. *Neuroscience Research* 170, 6-12, 2021. (doi: 10.1016/j.neures.2020.08.006)

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 (doi: 10.1186/s13041-021-00738-1)

[学会発表]

2022 年 1 月 22 日 上田(石原)奈津実、木下 専 「記憶の長期化に寄与するスパイン内小胞体の役割」第 19 回神経科学研究会(オンライン)

2022 年 2 月 3 日 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Kengaku M, Miyakawa T, Inokuchi K, Bito H, Kinoshita M. Activity- and septin-dependent extension of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic mechanism of memory consolidation 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」(岡崎)

2022 年 7 月 2 日 Hosokawa T, Liu P-W, Hayashi Y, Kinoshita M. Segregation of postsynaptic proteins via liquid-liquid phase separation and their dissociation. NEURO2022 (The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) (宜野湾)

2022年7月2日 Mitsui R, Ageta-Ishihara N, Kurita H, Suzuki A, Fukazawa Y, Hosokawa T, Kinoshita M. The pivotal septin subunit SEPT7 localizes to pre-/post-/peri-synaptic membrane domains and interacts with MYH10/nonmuscle myosin IIB. NEURO2022 (The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) (宜野湾)

2022年7月2日 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Kosaka Y, Mizukami M, Takao K, Kengaku M, Miyakawa T, Inokuchi K, Bito H, Kinoshita M. Activity-triggered extension of endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation. NEURO2022 (The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) (宜野湾)

2022年11月4日 後藤直樹 西川将司 木下 尊 永田浩一 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 第54回臨床分子形態学会(長崎)

2022年11月30日 後藤 直樹, 西川 将司, 伊東 秀記, 田畑 秀典, 木下 尊, 永田 浩一 Rac 制御分子 Arhgap44/Rich2 は神経発達に伴って発現分布が変化する 第45回日本分子生物学会年会

2023年2月3日 Natsumi Ageta-Ishihara, Yugo Fukazawa, Keizo Takao, Mineko Kengaku, Tsuyoshi Miyakawa, Kaoru Inokuchi, Haruhiko Bito, Makoto Kinoshita. Activity- and septin-dependent extension of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines as a synaptic mechanism of memory consolidation 生理研研究会「ナノ・メゾスケールから捉えるシナプス制御機構の新展開」(岡崎)

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Goto Naoki, Nishikawa Masashi, Ito Hidenori, Noda Mariko, Hamada Nanako, Tabata Hidenori, Kinoshita Makoto, Nagata Koh-ichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Expression Analyses of Rich2/Arhgap44, a Rho Family GTPase-Activating Protein, during Mouse Brain Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 19~26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000529051	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, Huganir Richard L, Kinoshita Makoto, Lepagnol-Bestel Aude-Marie et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 Chr21 protein-protein interactions: enrichment in proteins involved in intellectual disability, autism, and late-onset Alzheimer's 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/lsa.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
1. 著者名 Ageta-Ishihara Natsumi, Kinoshita Makoto	4. 巻 170
2. 論文標題 Developmental and postdevelopmental roles of septins in the brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 6~12
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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

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 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

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

〔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
---------	---------