

令和 2 年 4 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07108

研究課題名(和文)興奮性シナプス伝達を修飾するスパイン内小胞体制御機構の探索

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of the entry of endoplasmic reticulum into dendritic spines for modifying excitatory synaptic transmission

研究代表者

上田 奈津実(石原奈津実)(Ageta-Ishihara, Natsumi)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：60547561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：海馬歯状回は類似した記憶を分離する役割を担う可能性が示唆されているが、分子基盤は不明である。我々は、セプチン細胞骨格欠損マウスが異なる形状の空間分離課題で長期記憶異常を示すこと、歯状回で小胞体含有スパインが少ないことを見出した。本研究では欠損マウスの行動異常の領域特異性を決定し、スパインに小胞体が局在する機構を精査し、長期記憶におけるセプチンの役割を明らかにすることを目指した。その結果、歯状回にセプチンが発現することが空間弁別タスクの長期記憶保持に必要であることが検証できた。さらに、歯状回顆粒細胞スパイン内への小胞体の侵入イベントにセプチンが関与することが示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、学術的には細胞小器官の移動が記憶保持に影響を及ぼすことを示す初めての概念となる。社会的には、認知症患者と診断される数年前の時点でも空間pattern separation機能が低下することが報告されていることから、空間弁別課題の長期記憶保持の基盤となる分子メカニズムの解明は薬剤探索や記憶保持機能低下を抑制する食品の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Discrimination among different spatial contexts depends on the hippocampal dentate gyrus (DG). However, molecular basis remains unclear. Here we find that Septin-null (Sept-KO) mice retain memory of spatial context for 2h, but not for 24h, in spatial pattern separation test. To narrow down brain regions responsible for the cognitive impairment, we conduct local subacute depletion of SEPT from the bilateral DG of wild-type mice, and local supplementation of SEPT into the bilateral DG of KO mice, which respectively recapitulates and rescues the defect. The perforant path-DG synapses in KO mice are normal, except for a significant scarcity of smooth endoplasmic reticulum (sER), a Ca<sup>2+</sup> reservoir in dendritic spines. The sER anomaly is recapitulated by SEPT depletion from primary cultured rat DG granule cells (DGCs). The DGC-selective requirement of SEPT will illuminate a novel gating or translocation mechanism that regulates the entry of sER from dendritic shaft into spines.

研究分野：神経化学

キーワード：細胞骨格

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Pattern separation(入力情報の分離)は類似した記憶を分離、差別化するために必須であり、計算論の立場から海馬歯状回がその役割を担う可能性が示唆されている。空間的な pattern separation タスクを用いて、歯状回シナプス長期増強現象(LTP)は空間弁別に必要であることが示され、空間弁別の基盤となる分子メカニズムの解明が期待されている。

重合性ヌクレオチド結合蛋白質ファミリーSEPT1-14 から成るセプチン細胞骨格は細胞分裂蛋白質として発見された分子ではあるが、最終分化した神経系で最も高発現する。サブユニットの一部は脳特異的発現パターンを示すことから細胞分裂を超えたセプチン細胞骨格の生理機能解明に注目が集まっている。しかしながら、セプチン遺伝子破壊マウスの多くが胎生致死となるか軽微な異常しか示さないことも災いして、神経系におけるセプチン細胞骨格の機能解析は十分になされていない。申請者は、学習・記憶におけるセプチン細胞骨格の寄与を in vivo LTP 動物モデルや遺伝子改変動物を用いて検討し以下の結果を得ている(全て未発表)。

- ・セプチン欠損マウスの海馬歯状回では小胞体を持つスパインが少ない、一方スパイン形態(シナプス密度、スパイン体積、PSD 面積)は正常である。
- ・セプチン欠損マウスは正常な空間定位能力を持つ一方で異なる形状の空間弁別能力を欠く。

### 2. 研究の目的

上記の未発表データは、セプチンが成熟した脳内でニューロンの形態変化には関与しないものの空間弁別処理に重要な役割を持つことを示している。空間弁別の中核は海馬歯状回であることが組織破壊実験や LTP 阻害実験から示され、空間弁別の基盤となる分子メカニズムの解明が期待されている。しかしながら、発生過程からのセプチン慢性欠損マウスを使用した実験を進めており領域特異性については確認出来ていない。そこで本研究では(1)セプチン急性欠乏により、セプチン欠損マウスの空間弁別障害の責任領域の確定を行うとともに、(2)ライブイメージングによりセプチンによる小胞体のスパイン内局在機構を精査することで、空間弁別におけるセプチン細胞骨格系の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)歯状回選択的ウイルス注入と行動解析

歯状回選択的セプチン補填：セプチンと発現モニタリング用 GFP を共発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターと、GFP のみを発現する対照ベクターを調整し、セプチン欠損マウスの両側歯状回に脳定位固定装置を用いて注入した。ウイルス力価はセプチン発現量が野生型と同程度になるよう調整した。歯状回でセプチンを過剰発現する野生型マウスが空間弁別異常を呈さないことも確認した。

歯状回選択的セプチン枯渇：セプチンを標的とする shRNA と発現モニタリング用 GFP を共発現する AAV ベクターと標的配列部分をスクランブルした対照ベクターを調整し、培養細胞での動作確認の後、野生型マウスの両側歯状回に脳定位固定装置を用いて注入した。

空間弁別試験：術後 1 か月時に実験室環境や捕獲・拘束などのストレスに馴化させるため、5 時間のハンドリングを 5 日間行った後、以下の実験を施行した。

Day1：実験群・対照群の各々を 2 群に分け、素材と床面積が共通で形状のみが異なる 2 つの箱(A；1 辺 30 cm の立方体、B；d= 34 cm, h= 30 cm の円筒)のいずれかにマウスを入れて箱の中を探索させ、移動距離を 6 分間計測した。

Day2：Day1 と同じ箱での移動距離を 3 分間計測した。

Day3：Day1-2 とは異なる箱での移動距離を 3 分間計測した。

Day1(前半 3 分間)に対する Day2 および Day3 の移動距離の比を算出し、t 検定、二元配置分散分析を行った。

#### (2)ライブイメージング

生後 1 日齢ラットから海馬歯状回を取り出し、ニューロン(顆粒細胞)を初代培養した。培養 7 日目に下記のプラスミドベクターをリポフェクション法で導入した。セプチン欠乏群：PGK-mRFP1-shSept-H1(mRFP1 とセプチン標的 shRNA を共発現)。対照群：PGK-mRFP1-shNega-H1(標的配列をスクランブル)。共通：CaMKII-EGFP-ER(N 末にシグナル配列、C 末に小胞体滞留配列を付加した EGFP を発現)。培養 20-21 日目に細胞体から 50-400  $\mu\text{m}$  の範囲にある 2 次樹状突起を共焦点レーザー顕微鏡 LSM-780 でライブイメージングした(pinhole 1 AU, Z-stack 0.8  $\mu\text{m}$  x 3, gain 800, averaging x 2, scan speed 3.15  $\mu\text{s}/\text{pixel}$ , frame size 512 x 100 pixel(scan area 67.48 x 13.18  $\mu\text{m}$ ), 0.2 fps x 30 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。取得画像は ImageJ で解析した。群間有意差検定には、 $\chi^2$  検定(スパイン形態)、二項検定(小胞体のスパイン内滞在時間)、Mann-Whitney U 検定(侵入頻度、退出頻度)を適用した。

### 4. 研究成果

#### (1)歯状回選択的ウイルス注入と行動解析

新奇環境における探索行動量に群間有意差がないことは Day1(前半 3 分間)の移動距離において確認した(セプチン欠損群  $13 \pm 1.7\text{m}$  vs. レスキュー群  $13 \pm 1.33\text{m}$ ,  $p=0.99$ ; 野生型対照群  $13 \pm 1.7\text{m}$  vs. セプチン欠乏群  $13 \pm 0.9\text{m}$ ,  $p=0.77$ )。

セブチン欠損マウスでの歯状回選択的セブチン補填実験では、Day2/Day1 比(既知空間での探索行動)に群間有意差を認めなかった(セブチン欠損群  $66 \pm 4.2\%$  vs. レスキュー群  $80 \pm 4.9\%$ ,  $p=0.24$ , 図 1-A)。一方、Day3/Day1 比(新規空間での探索行動)はレスキュー群が有意に高かった ( $72 \pm 5.3\%$  vs.  $93 \pm 8.7\%$ ,  $p<0.05$ ,  $n=7, 7$ , 図 1-A)。

野生型マウスでの歯状回選択的セブチン枯渇実験では、Day2/Day1 比に群間有意差を認めなかった(対照群  $50 \pm 4.5\%$  vs. セブチン欠乏群  $57 \pm 4.1\%$ ,  $p=0.315$ , 図 1-B)。一方、Day3/Day1 比はセブチン欠乏群が有意に低かった ( $76 \pm 3.4\%$  vs.  $59 \pm 2.8\%$ ,  $p<0.01$ ,  $n=8, 11$ , 図 1-B)。

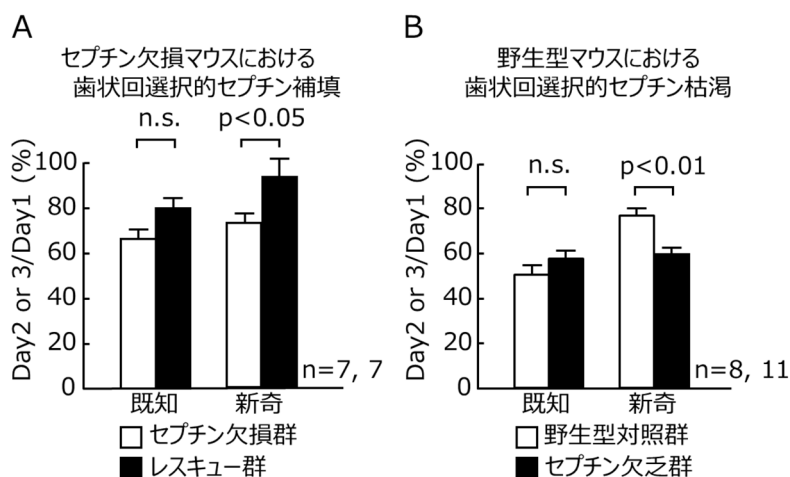


図 1: セブチンを海馬歯状回選択的に補填 / 枯渇したマウスの空間弁別試験結果

顆粒細胞が大多数を占める歯状回においてセブチンが発現することが空間弁別に必要であることと、セブチン欠損マウスの空間弁別障害の正常化には歯状回に局限したセブチンの発現で十分であることが検証できた。併せて、セブチン欠損マウスの空間弁別障害が神経系発生・発達過程に起こる不可逆的な後遺障害ではなく、成熟後のセブチン補填で矯正可能であることも示された。また研究を進める中でセブチン欠損マウスは空間弁別課題において短期記憶は正常である一方、長期記憶に異常を示すことがわかってきた。

## (2) ライブイメージング

スパイン形態: スパイン頭部径の最大値 H、頸部径の最大値 N、長さ L によりスパイン形態を Mushroom 型 ( $H>N$ ,  $H \geq L$ ) / Stubby 型 ( $H \approx N$ ,  $L \approx H$ ) / Thin 型 ( $H < N$ ,  $N < L$ ) / Filopodia 型 ( $L > 3 \mu\text{m}$ ) の 4 型に分類すると、対照群では  $85.1/4.6/8.8/1.5$  (%), セブチン欠乏群では  $90.0/4.5/4.5/0.9$  であり、群間有意差を認めなかった ( $p=0.3$ )。

小胞体のスパイン内滞在時間: セブチン欠乏群で有意に少なかった ( $65.7 \pm 2.94\%$  vs.  $25.3 \pm 2.77\%$ ,  $p<0.01$ , 図 2-A)。

小胞体のスパインへの侵入およびスパインからの退出頻度: 小胞体不在時間に対する侵入頻度はセブチン欠乏群で有意に少なく(中央値  $0.045$  vs.  $0$ ,  $p<0.001$ , 図 2-B)、逆に、小胞体滞在時間に対するスパインからの退出頻度には群間有意差を認めなかった(中央値  $0$  vs.  $0$ ,  $p=0.495$ , 図 2-C)。

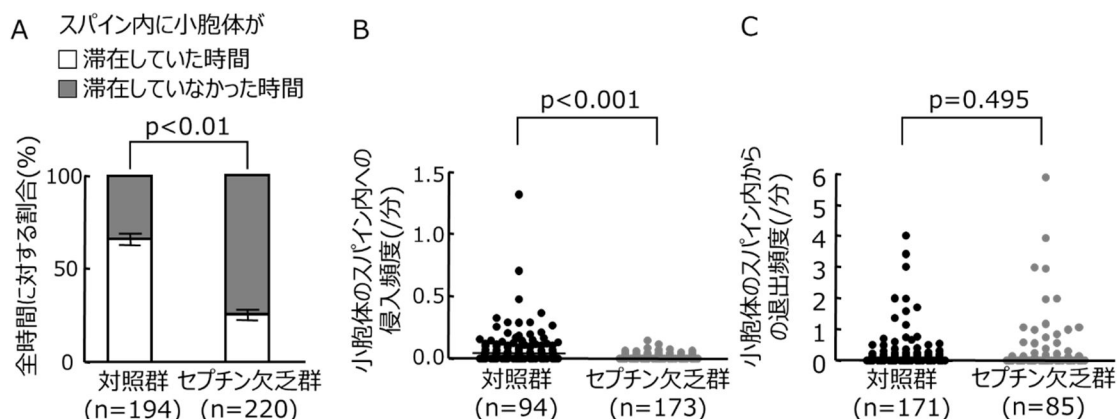


図 2: 歯状回ニューロンにおけるスパイン内小胞体の動態

セブチン欠損マウス歯状回の電顕観察で見出されたスパイン内小胞体の減少が、ラット顆粒細胞のセブチン欠乏時においてもスパイン内小胞体滞在率の低下として再現された。セブチン欠乏によるスパイン内への小胞体侵入頻度の低下から、歯状回顆粒細胞スパイン内への小胞体の侵入イベントにセブチンが必要であることが示唆された。

セプチン欠損マウスの顆粒細胞におけるスパイン内への小胞体侵入障害と空間弁別課題における長期記憶障害との因果関係は不明であるが、前者の背景となるメカニズムは初代培養顆粒細胞の遺伝子および薬理学的操作とイメージングで探索中である。成体においても例外的に分裂・増殖して神経回路に組み込まれる顆粒細胞の異常はヒトの認知・記憶障害、うつ病、PTSDなどとも関連する。顆粒細胞におけるセプチン機能の理解がこれらの現象の理解に寄与することを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi K, 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.	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 3936
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 N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M.	4. 巻 S0197-0186
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 30442-4
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14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ageta Hiroshi, Ageta-Ishihara Natsumi, Hitachi K, Onouchi T, Yamaguchi H, Yoshioka Y, Kosaka N, Ide T, Kinoshita M, Ochiya T, Setou M, Tsuchida K.
2. 発表標題 A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles
3. 学会等名 ISEV2019, Symposium session: EV Biogenesis II（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下専, 上田(石原)奈津実, 深澤有吾, 宮川剛, 高雄啓三, 尾藤晴彦
2. 発表標題 神経活動とセブチンに依存した樹状突起棘への小胞体侵入による記憶の長期化
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実、木下専
2. 発表標題 空間弁別の個性を形成する環境的要因と遺伝的要因の複合解析
3. 学会等名 「個性」創発脳第四回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実、榊原広大、福栞直人、藤原里沙子、小坂優介、高雄啓三、宮川剛、尾藤晴彦、井ノ口馨、深澤有吾、木下専
2. 発表標題 個性の階層的理解を目指した評価系の確立 -空間弁別の分子・細胞学的基盤 -
3. 学会等名 「個性」創発脳第四回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実、木下専
2. 発表標題 環境要因により影響を受ける認知機能に対するアプローチ
3. 学会等名 資生堂女性研究者サイエンスグラント受賞者 特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実、木下専
2. 発表標題 長期記憶保持に必要な分子・細胞基盤の解明
3. 学会等名 2019 GTR Seeds Seminar (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小坂優介、上田(石原)奈津実、深澤有吾、見学美根子、高雄敬三、宮川剛、尾藤晴彦、木下専
2. 発表標題 Activity- and septin-dependent extension of smooth ER into dendritic spines as a synaptic basis of memory consolidation
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara Natsumi, Asami Yurika, Fukumasu Naoto, Sakakibara Kodai, Fuse Naoki, Mitsui Riku, Fukazawa Yugo, Kengaku Mineko, Takao Keizo, Miyakawa Tsuyoshi, Inokuchi Kaoru, Bito Haruhiko, Kinoshita Makoto
2. 発表標題 A synaptic basis of spatial pattern separation in the hippocampal dentate gyrus is activity- and septin-dependent extension of smooth endoplasmic reticulum into dendritic spines
3. 学会等名 第16回成体脳のニューロン新生懇談会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K,
2. 発表標題 An activity-regulated septin subunit SEPT3 is required for the entry of sER into dendritic spines and spatial discrimination.
3. 学会等名 Gordon Research Conference “Cell Biology of the Neuron” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Takao K, Miyakawa T, Hioki H, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M.
2. 発表標題 Spatial discrimination defects caused by chronic, systemic loss of a septin subunit is recapitulated by its acute, local depletion in the hippocampal dentate gyrus
3. 学会等名 第1回国際シンポジウム “Towards Understanding INDIVIDUALITY” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakakibara K, Fukumasu N, Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Kinoshita M.
2. 発表標題 Requirement of a septin subunit SEPT3 in the dentate gyrus granule cells for dendritic spine maturation and spatial discrimination
3. 学会等名 The 6th Neural Circuits Joint Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Kurita H, Yamazaki M, Abe M, Fukazawa Y, Sakimura K, Kinoshita M.
2. 発表標題 Unexpected motor and histopathological phenotype found in mice that lack SEPT7 in the cerebellum
3. 学会等名 The 6th Neural Circuits Joint Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実, 深澤有吾, 鈴木悠大, 増田啓吾, 高雄啓三, 宮川剛, 尾藤晴彦, 木下 専
2. 発表標題 空間弁別に必要なセプチン依存的シナプス制御
3. 学会等名 第40回神経科学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実, 木下 専
2. 発表標題 A septin-dependent synaptic regulation required for spatial discrimination
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会(招待講演)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----