

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16258

研究課題名（和文）Shootin1aを基盤とした記憶形成を担う分子力学機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanics of shootin1a-mediated learning and memory

研究代表者

嶺岸 卓徳（Minegishi, Takunori）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：40823670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：樹状突起スパインの拡大は、記憶形成に重要な役割を果たすことが知られているが、スパイン拡大を引き起こす力がいかにして生み出されるのか、その分子機構は不明であった。本研究の結果から、Shootin1aが逆行性移動するアクチン線維と細胞接着分子を連結し、逆行性移動の力を細胞外基質に伝達することでスパイン拡大のための力を生み出すことがわかった。また、Shootin1遺伝子欠損マウスを用いた動物行動解析から、Shootin1aが記憶形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状突起スパインは脳内の記憶素子であると考えられており、記憶学習障害を示す認知症や知的障害の患者の脳では、樹状突起スパインの数や形態に異常が見られることが報告されている。また、最近になり、知的障害の家系で血液における発現量が大きく減少する遺伝子の一つとしてShootin1が報告された（InanlooRahatloo et al., Neuroscience, 2019）。そのため、本研究の成果は記憶形成のメカニズムの理解を深めるだけでなく、知的障害等の記憶学習障害の原因解明に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Expansion of dendritic spine is essential for learning and memory. However, the molecular mechanism of how forces for spine expansion are generated remains unclear. We found that shootin1a couples actin filament (F-actin) retrograde flow and cell adhesion molecules and transmits the force of F-actin retrograde flow to the substrate, thereby generating forces for spine expansion. In addition, animal behavioral analyses using shootin1 gene knockout mice suggest that shootin1a is involved in learning and memory.

研究分野：細胞生物学

キーワード：樹状突起スパイン シナプス可塑性 アクチン線維 Shootin1 L1-CAM N-cadherin クラッチ分子
記憶形成

1. 研究開始当初の背景

運動や記憶学習をはじめとする脳の高次機能の情報処理を担う神経細胞は、シナプスと呼ばれる接着部位を介して神経細胞間の情報伝達を行う。樹状突起スパインは神経伝達物質グルタミン酸を介したシナプス入力により拡大し、細胞間のシナプス伝達効率を増加させることが知られている。そのため、スパインは脳内の記憶素子であると考えられており、記憶学習障害を示す認知症や知的障害の患者の脳では、スパインの数や形態に異常が見られることが報告されている。

脳内において、スパインは、その周りを他の細胞と細胞外マトリックスを含む接着性基質に取り囲まれている。接着性基質はスパインの拡大に関与することが知られているが、スパインが拡大するには、細胞外環境を押し広げる力を生み出す必要がある。しかしながら、どのようにしてスパインの拡大を引き起こす力が生み出されるのか明らかでなかった。

当研究グループはこれまでに軸索伸長を促進する Shootin1a を同定した (Toriyama et al., *J Cell Biol*, 2006)。さらに、Shootin1a が軸索の成長円錐内において逆行性移動するアクチン線維及び細胞接着分子と相互作用し、逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結することで軸索伸長のための推進力を生み出すことを明らかにした (Shimada et al., *J Cell Biol*, 2008)。また、最近になり、Shootin1a が樹状突起スパイン内においても逆行性移動するアクチン線維と相互作用すること、Shootin1 ノックアウトマウスではスパインの数が減少するという予備データが得られた。また、グルタミン酸刺激により Shootin1a がリン酸化を受け、逆行性移動するアクチン線維及び細胞接着分子 L1-CAM、N-cadherin との親和力が増大することが見出された。

2. 研究の目的

先行研究の結果から、グルタミン酸刺激によりリン酸化された Shootin1a が逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結を増強することでスパイン拡大のための力を生み出す可能性が考えられる。そこで、本研究では Shootin1a に注目し、スパイン拡大のための力を生み出す分子機構と記憶形成のメカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、*in vitro* 環境下においてシナプス活性化を模倣できるグリシンを用いた化学的長期増強法 (cLTP) (Hruska et al., *Nat Neurosci*, 2018) によりスパイン拡大を誘導した。また、Shootin1a を介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結を阻害するために、Shootin1 切断変異体をドミナントネガティブ体 (DN) として用いた。具体的には、内在性 Shootin1a と内在性 L1-CAM の相互作用を阻害する Shootin1 1-125 アミノ酸残基 (Shootin1a DN1) (Baba et al., *eLife*, 2018)、または、内在性 Shootin1a と内在性 N-cadherin の相互作用を阻害する Shootin1 30-146 アミノ酸残基 (Shootin1a DN2) を用いた。Shootin1a のリン酸化によるアクチン線維-基質間の連結増強がスパイン拡大に必要であるかを検証するため、Shootin1 DN1 または DN2 神経細胞を過剰発現する神経細胞のスパイン内におけるアクチン線維の逆行性移動を 1 分子計測法 (Ria et al., *STAR protocol*, 2021) により解析した。さらに、細胞外基質に生み出される牽引力を推定するために、蛍光ナノビーズを包埋したゲル上で神経細胞を培養し、スパイン前駆体と考えられている樹状突起フィロポディア直下のビーズの動きを解析した (Minegishi et al., *JOVE*, 2021)。また、Shootin1a のリン酸化がスパイン拡大に必要であるかを検証するため、Shootin1a RNAi ベクターを用いて内在性 Shootin1a を発現抑制し、遺伝子導入された GFP の蛍光輝度から cLTP 誘導後の樹状突起スパインの体積変化を計測した。生体組

織内の樹状突起スパインの拡大における Shootin1 の機能を解析するために、2光子励起法によるラット海馬切片内における単一樹状突起スパインのグルタミン酸刺激を行い、Shootin1 RNAi ベクターが遺伝子導入された神経細胞の GFP の蛍光輝度から樹状突起スパインの体積を計測した (Bosch et al., *Neuron*, 2014)。さらに、Shootin1a が記憶形成に関与するかを検証するため、タモキシフェン投与により海馬および大脳皮質で Shootin1 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Shootin1 cKO マウス) を作製してモーリス水迷路試験、新奇物体認識試験を行った。

4. 研究成果

(1) スパイン内において、Shootin1a は逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結することで牽引力を生み出す

逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質間の連結が阻害されると、アクチン線維が空回りし、逆行性移動速度が増加することが知られている。一方、アクチン線維と細胞外基質間の連結が増強すると、逆行性移動速度が増加することが知られている。Shootin1a DN1 または Shootin1a DN2 を神経細胞に過剰発現させ、樹状突起スパイン内のアクチン線維の逆行性移動を 1 分子計測法により解析したところ、Shootin1 DN1 または Shootin1a DN2 を過剰発現する神経細胞では、コントロール細胞と比較してアクチン線維の逆行性移動速度が増加した。この結果から、Shootin1a が L1-CAM 及び N-cadherin との相互作用を通して、スパイン内で逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結することが示唆された。逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結するのであれば、逆行性移動の駆動力が細胞外基質に伝達され、細胞外基質に牽引力が生み出されると考えられる。そこで、Shootin1 DN1 を過剰発現する神経細胞の樹状突起フィロポディア直下の牽引力を計測したところ、コントロールと比較して牽引力が減少した。すなわち、スパイン内において、Shootin1a は逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結することで牽引力を生み出すことが明らかとなった。

(2) シナプス活性化により Shootin1a を介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結が増強される

次に、cLTP 誘導後のスパイン内のアクチン線維の動態を一分子計測により解析した。その結果、コントロール細胞では、アクチン重合の速度が増加した一方で、逆行性移動の速度が減少することが解った。この結果は、シナプス活性化が逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質間の連結を増強することを示唆している。次に、Shootin1a がシナプス活性化によるアクチン線維-細胞外基質の連結増強に関与するかを検証するために、Shootin1a DN1 または Shootin1a DN2 を過剰発現する神経細胞における cLTP 誘導後のアクチン線維の動態を解析した。その結果、アクチン線維の重合速度及び逆行性移動速度の増加がみられた。以上の結果から、シナプス活性化により Shootin1a を介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結が増強されることが明らかとなった。

(3) Shootin1a のリン酸化によるアクチン線維-基質間の連結増強はスパイン拡大に必要である

最近、我々は、cLTP 誘導がグルタミン酸刺激と同様のシグナル伝達経路で Shootin1a のリン酸化を引き起こすことを見出した。そこで、Shootin1a のリン酸化によるアクチン線維-基質間の連結増強がスパイン拡大に必要であるかを検証した。具体的には、Shootin1a RNAi ベクターを用いて内在性 Shootin1a の発現を抑制した神経細胞に、野生型 Shootin1a (Shootin1 WT)、リン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型 Shootin1a (Shootin1 AA)、あるいはリン酸化部位をアスパラギン酸に置換した疑似リン酸化型 Shootin1a (Shootin1 DD) を共発現させ、cLTP 誘導後の樹状突起スパインの体積変化を計

測した。はじめに、Shootin1a RNAi ベクター単体を遺伝子導入された神経細胞では、cLTP 誘導後のスパイン拡大率がコントロール細胞と比較して減少した。同様の結果は、Shootin1 DN1 または Shootin1a DN2 を過剰発現する神経細胞で見られた。即ち、Shootin1a を介したアクチン線維-基質間の連結がスパイン拡大に必要であることが示唆された。Shootin1 WT または Shootin1 DD を共発現する神経細胞では、コントロール細胞と同様に cLTP 誘導後のスパイン拡大がレスキューされた。一方、Shootin1a AA を共発現する神経細胞ではスパイン拡大はレスキューされなかった。以上の結果から、Shootin1a のリン酸化による逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結増強がスパイン拡大に必要であることが示唆された。

(4) 生体組織内において Shootin1a のリン酸化を介したアクチン線維-基質間の連結増強がスパイン拡大のための力を生み出す

脳内において、スパインは、その周りを他の細胞と細胞外基質を含む接着性基質に密接に取り囲まれている。そのため、スパインが拡大するには、細胞外環境を押し広げる力を生み出す必要がある。Shootin1a のリン酸化を介したアクチン線維-基質間の連結増強が生態環境下においてスパイン拡大のための力を生み出すかを検証するために、2光子励起法による海馬内の単一樹状突起スパインのグルタミン酸刺激を行った。Shootin1a RNAi ベクターにより Shootin1a の発現が抑制された神経細胞では、グルタミン酸刺激によるスパイン拡大が阻害された。また、Shootin1a RNAi ベクターと Shootin1a WT を共発現する神経細胞では、コントロール細胞と同様にグルタミン酸刺激にตอบสนองしてスパインが拡大した。以上の結果から、生体組織内において Shootin1a のリン酸化を介したアクチン線維-基質間の連結増強がスパイン拡大のための力を生み出すことがわかった (図 1) (Kastian*, Minegishi* et al., *Cell Rep*, 2021, *equal contribution)。

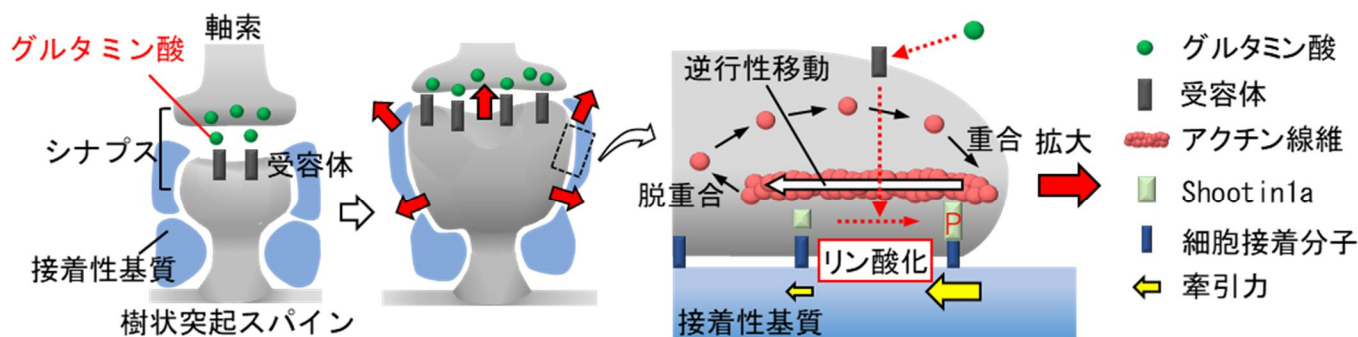


図1. 樹状突起スパイン拡大のための力を生み出す分子機構

(5) Shootin1a の空間記憶形成への関与

Shootin1a が記憶形成に関与するかを検証するため、本研究ではタモキシフェン投与により海馬および大脳皮質で Shootin1 遺伝子を欠損する Shootin1 cKO マウスを作製した。このマウスを用いて、最初に空間記憶を評価するモーリス水迷路試験を行った。本試験では、マウスをプールに強制遊泳させ、プラットフォームに退避するまでの時間を計測した。また、1日目の試験でマウスにプラットフォームの位置を学習させ、2日目では、プラットフォームを隠した状態で行った。その結果、試験に用いた個体数が少ないため有意差は確認できなかったが、Shootin1 cKO ではプラットフォームへの到達時間が遅れる傾向が見られた(図 2A)。また、Control マウスは、2日目1回目の試験におけるプラットフォーム到達時間が1日目4回目の試験より減少したのに対して、Shootin1 cKO マウスでは増加傾向が見られた(図 2B)。以上の結果から、Shootin1a が空間記憶の形成に関与する可能性が示唆された。

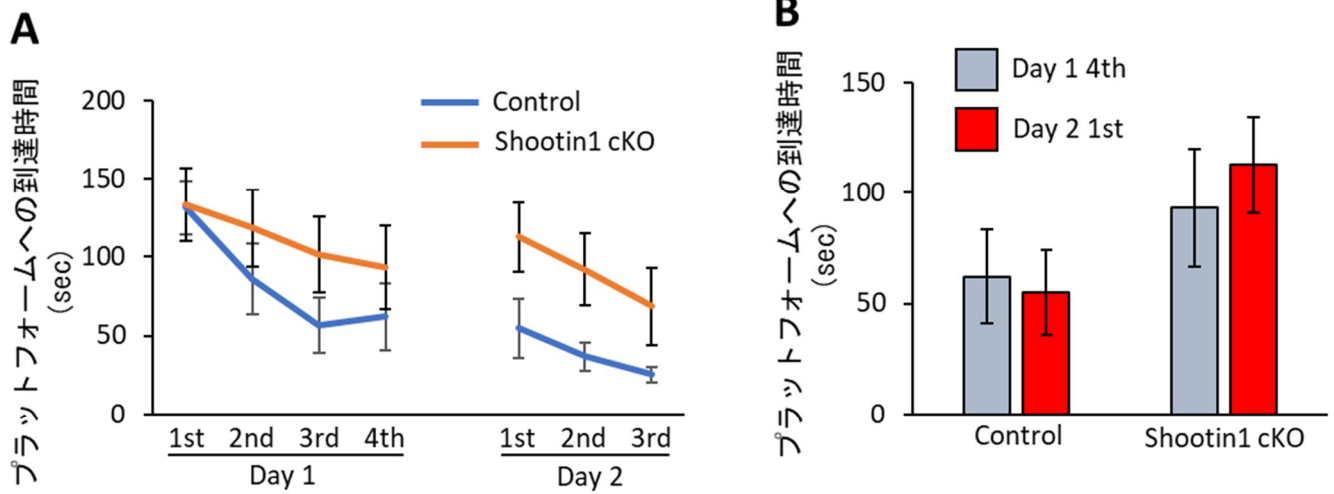


図2. モーリス水迷路試験による空間記憶の解析。(A) 各試験におけるプラットフォームへの到達時間。(B) 1日目4回目の試験と2日目1回目の試験におけるプラットフォーム到達時間。Controlマウス n = 9 匹、Shootin cKOマウス n = 8 匹。

(6) Shootin1a の物体認識記憶形成への関与

次に、Shootin1 cKO マウスを用いて新奇物体認識試験を行った。本試験では、マウスに2つの同一物体を学習させ、その24時間後に、片方を新奇物体に置き換えた状態で探索させた。マウスは新奇性のものに関心を示すため、新奇物体を多く探索する性質がある。従って、この試験は物体の総探索回数に対する新奇物体の探索割合から物体認識記憶を評価できる。Shootin1 cKO マウスの新奇物体の探索割合を調べたところ、試験に用いた個体数が少ないため有意差は確認できなかったが、Controlマウスと比較して減少傾向がみられた(図3)。この結果から、Shootin1a が物体認識記憶の形成に関与する可能性が示唆された。

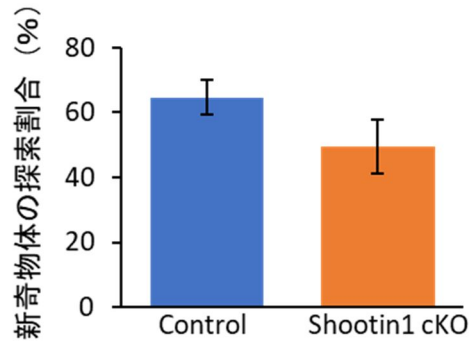


図3. 新奇物体認識試験による物体認識記憶の解析。Controlマウス n = 14匹、Shootin cKOマウス n = 14匹

以上の結果から、Shootin1a はシナプス活性化にตอบสนองしてスパイン拡大のための力を生み出すことがわかった (Kastian*, Minegishi* et al., *Cell Rep*, 2021, *equal contribution)。また、動物行動解析により、Shootin1a が空間記憶及び物体認識記憶に関与する可能性が示唆された。これらの結果より、Shootin1a によるスパイン拡大のための力発生が記憶形成に重要である可能性が考えられる。引き続きモーリス水迷路試験と新奇物体認識試験を行い、Shootin1 cKO マウスで空間記憶及び物体認識記憶の形成能力が有意に阻害されるかを検証する。記憶形成メカニズムのより深い理解のためにも、詳細な解析により Shootin1a によるスパイン拡大のための力の発生と記憶の関係性を明らかにすることは今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Minegishi T., Inagaki N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Forces to drive neuronal migration steps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00863	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 Kastian R.*, Minegishi T.*, Baba K., Saneyoshi T., Katsuno-kambe H., Saranpal S., Hayashi Y. and Inagaki N., *equal contribution	4. 巻 -
2. 論文標題 Shootin1a-mediated actin-adhesion coupling generates force to trigger structural plasticity of dendritic spines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Minegishi T.*, Fujikawa R., Kastian R., Sakumura Y., Inagaki N.*, *corresponding authors	4. 巻 -
2. 論文標題 Analyses of actin dynamics, clutch coupling and traction force for growth cone advance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/63227	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 Kastian R., Minegishi T., Inagaki N.	4. 巻 2
2. 論文標題 Simultaneous analyses of clutch coupling and actin polymerization in dendritic spines of rodent hippocampal neurons during chemical LTP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100904 ~ 100904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100904	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 Minegishi Takunori, Kastian Ria Fajarwati, Inagaki Naoyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanical regulation of synapse formation and plasticity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 in press
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 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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Minegishi T., Hasebe H. and Inagaki N.
2. 発表標題 Shootin1b-mediated leading process extension triggers Ca ²⁺ transient for somal translocation during neuronal migration
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kastian K., Minegishi T., Baba K., Saneyoshi T., Katsuno-kambe H., Saranpal S., Hayashi Y. and Inagaki N.
2. 発表標題 Shootin1a-mediated actin-adhesion coupling generates force to trigger structural plasticity of dendritic spines
3. 学会等名 第44回神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶺岸 卓徳、長谷部 帆南、青山 友耶、成瀬 恵治、高橋 康史、稲垣 直之
2. 発表標題 神経細胞移動における先導突起の伸長と細胞体の移動の膜張力を介した同調機構
3. 学会等名 第44回神経科学大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 嶺岸卓徳, 稲垣直之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 疾患に挑むメカノバイオロジー	

〔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
---------	---------