

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06852

研究課題名(和文) 長期記憶保持に必要な細胞小器官の空間的構造変化と分子基盤の解明

研究課題名(英文) The spatial and structural changes of organelles and the molecular basis underlying long-term memory consolidation

研究代表者

上田 奈津実(石原奈津実)(AGETA-ISHIHARA, Natsumi)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：60547561

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)：学習・記憶の素過程は、ニューロン同士の接着部位(シナプス)において伝達効率の上昇が長期的に持続する長期増強(LTP)であり、樹状突起スパインの構造変化である。スパインの構造変化はアクチン細胞骨格の重合により引き起こされるが、体積変化が数時間以上持続する基盤と電気応答の持続に關与する分子機構は不明な点が多い。本研究では刺激に対するオルガネラの移動が長期記憶維持に影響を及ぼすことを示す新たな概念を提示することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は超高齢社会を迎えており、認知症初期の時点での治療は最重要課題の一つである。臨床において、アルツハイマー病治療薬(コリンエステラーゼ阻害薬)の有効性を検討した研究があるが、根本的な治療薬は確立していない。今後は、本研究結果を認知症の治療戦略に繋ぐことを目指して、得られた基礎データに基づき、創薬や治療法の基盤となる技術開発に取り組むことを目指す。高齢化社会が進む中で基礎研究を健康寿命の延命に繋げる。

研究成果の概要(英文)：The basis of learning and memory is long-term potentiation (LTP), which involves a long-lasting increase in transmission efficiency at the adhesion sites between neurons, and structural changes in dendritic spine. The structural changes are induced by the polymerisation of the actin cytoskeleton, but many aspects of the molecular mechanisms underlying the persistence of volume changes and electrical responses for several hours are still unclear. In this study, we have successfully presented a new concept that the movement of organelles in response to stimulation affects the maintenance of long-term memory.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

学習や記憶の細胞レベルの素過程は神経活動に応じてシナプス伝達効率に変化し、維持されるシナプス可塑性である。強い興奮性入力には樹状突起スパイン容積増加と AMPA 受容体のシナプス後肥厚(PSD)へのリクルートを伴うシナプス伝達の長期的な亢進(LTP)を惹起する。さらに、スパインの可塑的变化は数時間以上継続し、蛋白質合成を伴う後期 LTP(L-LTP)をもたらす。スパインの体積増加はアクチン重合によることが支持されている一方で、数時間以上続くスパイン体積の可塑的变化に対しては、アクチンやシグナル分子のスパイン内での滞在時間は数十秒から数分であり、長い分子でも1時間程度であることから、長時間にわたってスパインの可塑的な変化を維持するための何からのメカニズムの存在が示唆されており、記憶維持に関わると考えられているが、その実体はほとんど明らかになっていない。

我々は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の神経回路形成・再編成・維持における生理的意義の研究を進めている(Ageta-Ishihara et al., Nature Commun 2013, 2015, Neurochem Int 2018, 2019年日本神経科学学会奨励賞)。セプチンは分裂細胞では細胞質分裂の際に、赤道面でリング状に形成される収縮環の構成成分として分子の非対称性を保証する拡散障壁となり、細胞質を2つに分割する(Sharma et al., Nature 2013; Koch et al., Cell 2015)。しかしながら、セプチンは非分裂細胞ニューロンで高発現し、細胞質分裂を超えたセプチン細胞骨格の機能探索の必要性が示唆されていた。さらに、英国 Biobank サンプルの大規模ゲノムワイド関連解析により認知能力を司る領域にセプチンサブユニットの1つが存在することが報告された(Davies et al., Mol Psychiatry 2016)。そこで我々は、セプチンの学習・記憶とシナプス可塑性への関与を評価し、セプチン細胞骨格のリモデリングが入力特異的なシナプス可塑性の長期化の構造的基盤である可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では我々が独自に得ている未発表データとツールを駆使し、セプチン細胞骨格に着目して、記憶保持の分子基盤を解明することを目的とする。最終的には、記憶保持すなわち LTP 維持における細胞骨格再編成の意義を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1)神経活動依存的なスパイン内へのオルガネラ侵入機構を同定

生後1日ラットの DG 組織を単離するために、断頭し、脳組織を取り出した。細胞密度を調整した後、3.5 cm ガラスボトムディッシュにプレートした。プレティング後40分間室温で放置し、10%FBS/MEM 培地(Earle's MEM 培地(Gibco)500 ml にグルコース 2.5 g、炭酸水素ナトリウム 100 mg、トランスフェリン(Merck Millipore)50 mg を添加し、フィルター滅菌をして作製した MEM-GT 溶液をもとに、2 mM グルタミンストック溶液、25 µg/ml インスリン(Sigma)ストック溶液、1×B-27 supplement 液(Gibco)、10% FBS となるように調整し、フィルター滅菌をしたもの)を加え、37 °C、5%CO₂ の条件下でインキュベートした。培養開始 45 時間後に培地の半分を AraC 含有 5%FBS/MEM 培地(MEM-GT 溶液をもとに 0.5 mM グルタミンストック溶液、25 µg/ml インスリンストック溶液、1×B-27 supplement 液、5% FBS、8 µM Ara-C(Sigma)ストック溶液となるように調整し、フィルター滅菌をしたもの)に置換し、細胞の増殖を抑制した。その後2-3日ごとに AraC フリー5%FBS/MEM 培地(AraC 含有 5%FBS/MEM 培地の Ara-C が入っていないもの)に1 ml ずつ置換した。遺伝子導入はリポフェクションにより培養7日目に行った。培養19~23日目でライブイメージングを実施した。撮影した領域は、細胞体から 50 µm 以上離れたところから 400 µm までの樹状突起で、1回以上分岐をした樹状突起(2次樹状突起)である。DG 顆粒細胞の樹状突起上スパインに対して、アデニル酸シクラーゼ活性化剤である Forskolin(FSK、Wako)とグルタミン酸(GLU)アンケーシングを組み合わせた GLU 刺激または GLU+FSK 刺激によって、E-LTP または L-LTP の誘導を模倣した。

(2)スパイン内オルガネラの生理的意義

分散培養7日目(div7)のラット DG 顆粒細胞にプラスミド・ベクター(細胞形態マーカー iRFP670、蛍光 Ca²⁺プローブ G-CaMP6f)を導入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM-780 を用いて div19-23 に薬理的 L-LTP 誘発の前(-15/+60/+300 min)に、細胞体領域の GCaMP6f 蛍光強度変化を計測した。撮影条件は、フレームサイズが 256 x 256 pixel((224 µm x 224 µm))、Averaging Line モードで1回、レーザーパワーは 488 nm が 0.5%、ピンホール径が最大((9.1 µm))で 360 枚の撮影を 4 Hz で 90 秒間行った。任意の時間 t における ROI 内の平均輝度値を Ft、全ての Ft の平均を F0 とし、式()のように F/F を算出した。

$$F/F = ((F_t - F_0) / F_0) \dots ()$$

そして、式()のように SD response を算出し、これが基準 5 を上回り、下回るまでを 1 回の

Ca²⁺イベントとした。

$$SD \text{ response} = ((F/F)) / \text{noise} \dots ()$$

この時、noise は神経発火のない任意の連続した 5 秒間の標準偏差とした。

(3) スパイン内へのオルガネラ局在に関わる分子の網羅的スクリーニング

野生型ならびにセプチンサブユニット欠損マウスの海馬歯状回と CA 領域を解剖学的に摘出し、セプチン抗体を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降産物を質量分析機にかけ、会合分子を網羅的に同定した。

4. 研究成果

(1) 神経活動依存的なスパイン内へのオルガネラ侵入機構を同定

初代培養ニューロンを用いて、スパイン内へオルガネラを侵入させる刺激を探索した結果、L-LTP を誘導しうる入力刺激として forskolin(アデニル酸シクラーゼ活性化剤)含有液中で標的スパイン近傍にレーザー光を局所的に照射して MNI-caged-L-glutamate からグルタミン酸をスパイン近傍で遊離させる実験系を用いると、L-LTP 模倣刺激に応じて持続的に拡大するスパインにオルガネラが侵入すること、オルガネラの侵入は特定のセプチンサブユニットの欠乏により阻害されることがわかった。一方、数時間で消えてしまう記憶の基盤である E-LTP 模倣刺激(グルタミン酸アンケージングのみ)では、スパイン拡大が小規模で、早期に減衰し、オルガネラは侵入しないことがわかった。

(2) スパイン内オルガネラの生理的意義

L-LTP 依存的にスパイン内へと伸展するオルガネラが細胞レベルでの神経活動に与える影響を精査するために、対照群/セプチンサブユニット欠乏群の薬理的 L-LTP 前後の神経活動をカルシウムイメージングにより定量した。

対照群では、薬理的 L-LTP 刺激後 30 分で増加したカルシウムイベント(自発発火)回数は、刺激後 300 分まで、刺激前よりも高い状態に維持された。このことは、薬理的 L-LTP 刺激により L-LTP が誘発されたことで、各スパインにおけるシナプス伝達効率の上昇が長期に維持された結果であると考えられる。一方、薬理的 L-LTP 刺激依存的なオルガネラ伸展が生じないセプチンサブユニット欠乏群では、刺激後 30 分では対照群と同様にカルシウムイベント回数が増加したものの、刺激後 300 分では、刺激前と同等のレベルまで減少する様子が観察された。以上より、L-LTP/セプチンサブユニット依存的なスパイン内へのオルガネラ伸展が、薬理的 L-LTP 刺激に伴う神経活動の亢進を長期的に維持させることに必要であることが示唆された。

(3) スパイン内へのオルガネラ局在に関わる分子の網羅的スクリーニング

野生型ならびにセプチンサブユニット欠損マウスの海馬歯状回と CA 領域で特異的にセプチンサブユニットと会合する分子を同定することに成功した。今後は、これら同定分子とオルガネラ移動との関わりを精査していくことで、分子基盤の全体像を明らかにする必要がある。

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 0件 / うちオープンアクセス 1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 23
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 S0168-0102(20)
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 30440-30445
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11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田(石原)奈津実
2. 発表標題 記憶におけるスパイン内オルガネラの新たな役割
3. 学会等名 第4回三融会・武田神経科学シンポジウム（招待講演）
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
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kinoshita M, Mitsui R, Suzuki A, Iwano D, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Hosokawa T.
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 Neuro 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実, 深澤有吾, 高雄啓三, 見学美根子, 宮川剛, 井ノ口馨, 尾藤晴彦, 木下専
2. 発表標題 セプチン細胞骨格を介した小胞体の伸長は記憶の長期化の基盤となるポジティブフィードバックを制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会ワークショップ「生体膜の構造機能を制御する分子の秩序と集合機構」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田(石原)奈津実, 木下専
2. 発表標題 記憶固定化の新たなシナプス制御機構の解明
3. 学会等名 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」(招待講演)
4. 発表年 2023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 2022年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N
2. 発表標題 A new kind of positive feed-back regulation via the organelle extension
3. 学会等名 RIKEN BDR 'Women and Future in Science' Seminar (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Kosaka Y, Fujiwara R, Fuse N, Suzuki A, Kinoshita I, Mizukami M, Kinoshita M.
2. 発表標題 The coordination of septin cytoskeleton and actomyosin underlying memory consolidation
3. 学会等名 The 80th Fujihara Seminar "Molecular and cellular mechanisms of brain systems generating individuality"
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Kengaku M, Miyakawa T, Inokuchi K, Bito H, Kinoshita M.
2. 発表標題 A myosin/septin-dependent postsynaptic regulation required for memory consolidation
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会、第1回 CJK 国際会議
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 個性の階層的理解を目指した記憶維持における分子・細胞・個体レベルでの評価系の確立
3. 学会等名 「個性」創発脳第五回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kinoshita M, Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Kengaku M, Takao K, Inokuchi K, Miyakawa T, Bito H.
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 第43回日本神経科学大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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