

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440095

研究課題名(和文) 神経回路再編成の構造的基盤としてのセプチンの役割

研究課題名(英文) The role of septin participating in the remodeling of neuronal circuits

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)：興奮性シナプスへの入力に応じた重合性蛋白質のリモデリングは構造的可塑性の主要メカニズムとして長期記憶に関与する。長期記憶ないしL-LTPの維持にはスパイン内のアクチン系のリモデリングが必須である。我々はセプチンおよび関連分子を欠損または過剰発現する複数のマウスの系統的行動解析の結果、空間学習・記憶を評価する複数のパラダイムにおいて一貫した機能障害を呈する1系統を見出した。そこで、定量性の高い質量分析手法を用いて海馬プロテオームのgenotype間比較を施行したところ、グルタミン酸受容体サブユニットを含む複数の学習・記憶関連蛋白質に量的異常を認めた。

研究成果の概要(英文)：Cytoskeletal remodeling in response to synaptic inputs is a critical process underlying structural plasticity, as is exemplified by the dependence of late-phase LTP and long-term memory on actin remodeling. Unbiased behavioral screening of several mouse lines that are deficient in or overloaded with a septin subunit or a related protein revealed that mice of one such line consistently underperform spatial learning tasks. The unique line may provide a clue to unknown molecular mechanism of spatial cognition and learning. Proteomic analysis revealed quantitative changes in the glutamate receptor subunits and other proteins in the hippocampus.

研究分野：分子神経科学

キーワード：細胞骨格

### 1. 研究開始当初の背景

発達期の脳組織で見られる神経細胞の移動や突起伸展においては微小管とアクチン細胞骨格が中心的役割を果たす。成熟脳のアクチン系のリモデリングは長期記憶ないしシナプス長期増強現象(LTP)の構造的基盤を担う。一方、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も神経系に大量に存在するが、その生理的意義には不明な点が多い。申請者は、初代培養ニューロンの突起伸展と大脳皮質体性感覚野ニューロンの軸索の対側への投射系を解析し、脱アセチル化酵素 HDAC6 とセプチンとの直接的相互作用がチュープリンのアセチル化を制御し、微小管再編成を介した神経突起伸展を制御することを見出した (Ageta-Ishihara et al., Nature Communications 2013)。一方、成体脳でもいくつかの現象にセプチンの関与の可能性を見出していた。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、個体の成熟期における独自の研究成果を発展させ、初代培養系 (*in vitro*) とノックアウトマウスを含めた個体レベルの実験系 (*in vivo*) を相補的に組み合わせた以下のプロジェクトの遂行を通じてセプチン細胞骨格系の機能を生理的コンテキストで探索する。

### 3. 研究の方法

a) 神経特異的に発現するセプチンの機能に着目し微小形態解析へのセプチンの関与を評価するため電子顕微鏡を用いて、スパイン体積、記憶関連分子の密集するシナプス後肥厚部(PSD)の面積、シナプス密度を計測した。

シナプス密度の比較: 0.8%ホルムアルデヒド+1.5%グルタルアルデヒド溶液で灌流固定したマウス海馬を 50  $\mu\text{m}$  厚にスライスした。1%酸化オスミウム後固定、酢酸ウラン染色、脱水後に樹脂包埋し、海馬 CA1 領域の連続超薄切片 (50 nm 厚 x 30-35 枚) を作製した。鉛染色後、TEM 画像 (100 kV ; x12,000) を取得した。隣接する 2 枚組を用いた dissector 法にて一定体積内に存在する非対称性シナプス (グルタミン酸作動性とみなされる) の数を網羅的かつ重複なくカウントし、野生型とセプチン欠損マウス間で比較した。

スパイン形状の比較: シナプス密度の比較と同様に連続超薄切片を作製して一連の TEM 画像 (100 kV ; x25,000) を取得し、非対称性シナプスに特徴的な PSD (postsynaptic density) とスパイン形状を網羅的に抽出して RECONSTRUCT ソフトウェアで積層、整列、3 次元再構築した。スパイン体積 (基部から頭部まで) と PSD 面積 (後シナプス膜面積) を算出し、2 群間で統計学的解析を行った。

さらに、イムノゴールド標識法によるラット海馬セプチン局在の電子顕微鏡観察を行った。ラット脳組織をリン酸緩衝ホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド溶液で灌流固定し、50  $\mu\text{m}$  厚にスライスした。セプチン抗体、金コロイド標識 2 次抗体、銀増感の順に反応した切片を樹脂包埋し、海馬歯状回中間分子層の連続超薄切片 (50 nm 厚 x 30-40 枚) を作製して透過型電子顕微鏡 (100 kV ; 24000 倍) 画像を取得した。細胞形状と金粒子をトレースし、RECONSTRUCT ソフトウェアを用いて 3 次元再構築した。

b) セプチン欠損マウスの表現型を探索する目的で海馬依存的学习・記憶能力を含む行動学的表現型を系統的にスクリーニングした。C57BL/6J 系統、同性 (雄) 同腹、同生育環境の野生型およびセプチン欠損マウス各 20 個体、計 2 群 40 個体に対して標準プロトコルに準拠した行動学的試験を系統的に施行し、以下の指標に関する定量的データを取得した: 自発活動量、痛覚感受性、協調運動/平衡感覚、聴覚性驚愕反応、社会的行動、不安様行動、うつ様行動、絶望様行動、空間学習、作業記憶。群間有意差検定には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を適用し、ソフトウェア StatView™ を用いて統計学的数値を算出した。

### 4. 研究成果

a) 野生型およびセプチン欠損マウス海馬におけるシナプス密度の比較: 4.7  $\mu\text{m}^3$  (= 9.7  $\mu\text{m}$  x 9.7  $\mu\text{m}$  x 50 nm) の dissector ペア内で計測したシナプス密度: (中央値 3.7 vs. 3.4, n = 40, 40; p = 0.47) には 2 群間で有意差を認めなかった。

野生型およびセプチン欠損マウス海馬におけるスパイン形状の比較: 30 枚の ssTEM 画像を積層して再構成した組織 33  $\mu\text{m}^3$  (= 22.1  $\mu\text{m}^2$  x 50 nm x 30) に含まれるシナプス (n = 213, 271) を網羅的に抽出して計測したスパイン体積 (中央値 0.020 vs. 0.019  $\mu\text{m}^3$ , p = 0.12) と PSD 面積 (中央値 0.030 vs. 0.029  $\mu\text{m}^2$ , p = 0.82) には群間有意差を認めなかった。

また、海馬において、特定のセプチンのシグナルはグリア細胞には認められず、神経細胞特異的であった。このセプチンは軸索と樹状突起基幹部では細胞質内に散在し、特定の領域に集積する傾向を認めなかった。さらに未熟スパイン内にはほとんど認められなかったが、成熟スパインでは局在していた。

b) マウスの体格、健康状態、筋力、自発活動量、痛覚感受性、驚愕反応、平衡感覚、協調運動能などを含むほぼ全ての項目において正常であるものの、一部の学習・記憶課題において一貫した機能低下を見出した。

今後は見出した学習・記憶障害に焦点をあて、長期記憶ないしL-LTPを維持する構造的基盤を支える細胞骨格系の協調作用の中でセブチン系が果たす役割を生理的コンテキストで理解することを目指し、引き続き研究を行う。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Horigane S\*, Ageta-Ishihara N(\*共同筆頭著者), Kamijo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H. Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI $\alpha$  pathway during neuronal polarization. *Molecular brain*, 9(1):8, 2016.

査読有

Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S, Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. *Nature Communications*, 6:10090, 2015.

査読有

Kitao Y, Ageta-Ishihara N, Takahashi R, Kinoshita M, Hori O. Transgenic supplementation of SIRT1 fails to alleviate acute loss of nigrostriatal dopamine neurons and gliosis in a mouse model of MPTP-induced parkinsonism. *F1000Research*, 4:130, 2015.

査読有

Watanabe S\*, Ageta-Ishihara N(\*共同筆頭著者), Nagatsu S\*, Takao K, Komine O, Endo F, Miyakawa T, Misawa H, Takahashi R, Kinoshita M, Yamanaka K. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Molecular brain*, 7(1):62, 2014.

査読有

査読有

査読有

[学会発表](計14件)

Elhanbaly E, Ishikawa T, Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Fukazawa Y.

A FIB-SEM-based Method for High-Resolution Measurement of Morphological Parameters of Axospinous Synapses.

The 1st ABiS Symposium

2017年2月20日(愛知県)

Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M.

Immunoelectron Microscopy 3D Reconstruction Analysis of Septin Subunits in the Cerebellum

The 1st ABiS Symposium

2017年2月19日(愛知県)

Ageta-Ishihara N, Miyata T, Watanabe M, Bito H, Kinoshita M

Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation

第39回神経科学学会 シンポジウム ニューロン形態形成を駆動する分子ダイナミクス

パシフィコ横浜(神奈川県)

2016年7月22日

Horigane S, Ageta-Ishihara N, Kamijo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H.

Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI pathway during neuronal polarization.

第39回神経科学学会

パシフィコ横浜(神奈川県)

2016年年7月20-22日

Horigane S, Ageta-Ishihara N, Kamijo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H.

Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI pathway during neuronal polarization

第16回東京大学生命科学シンポジウム

KOMCEE21(東京都)

2016年4月23日

Ageta-Ishihara N, Kinoshita M.

Septins as multifunctional cytoskeletal scaffold for the structural and functional organization of axons and synapses.

“Axons: From Cell Biology to Pathology”  
Keystone Symposia (Santa Fe)

2016年1月24-27

Ageta-Ishihara N, Masuda H, Mano Y, Sawada A, Yano Y, Takao K, Miyakawa T, Shigemoto S, Fukazawa Y, Kinoshita M

Analysis of septin mutant mice with impaired spatial recognition.

第38回神経科学学会

神戸ポートアイランド(神戸市)

2015年7月29日

上田(石原)奈津実、山崎真弥、今野幸太郎、中山寿子、阿部学、橋本謙二、西岡朋生、貝淵弘三、宮川剛、橋本浩一、渡辺雅彦、崎村建司、木下尊

シナプスを包囲するグリア膜直下のCDC42EP4/septin複合体はグルタミン酸クリアランスの足場となる

第88回日本薬理学会年会公募シンポジウム「神経伝達物質トランスポーターの局在と生理機能」

名古屋国際会議場 (愛知県)  
2015年3月21日  
Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Miyakawa T, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold that regulates glutamate clearance.  
The 18th iCeMS International Symposium / The15th International Membrane Research Forum  
京都大学 (京都府)  
2015年3月3日  
Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Miyakawa T, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. CDC42EP4-septin complex in parasynaptic domains of Bergmann glia regulates cerebellar motor learning via GLAST-mediated glutamate clearance from the parallel fiber-Purkinje cell synapses.  
Gordon Research Conference "Glial Biology: Functional Interactions Among Glia & Neurons"  
Four Points Sheraton / Holiday Inn Express (Ventura, CA)  
2015年3月2-4日  
Ageta-Ishihara N, Masuda H, Mano Y, Yano Y, Fukazawa Y, Kinoshita M. Filling the gap between genetic and behaviors traits at ultrastructural level.  
IGER International Symposium  
"Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies"  
名古屋大学 (愛知県)  
2015年1月15日  
Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Miyakawa T, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M.  
CDC42EP4-septin complex in parasynaptic domains of Bergmann glia facilitates cerebellar motor learning via GLAST-mediated glutamate clearance from the parallel fiber-Purkinje cell synapses.  
第44回北米神経科学学会年会  
Washington Convention Center (Washington, DC)  
2014年11月17日  
木下専、山崎真弥、今野幸太郎、中山寿子、阿部学、橋本謙二、西岡朋生、貝淵弘三、宮川剛、橋本浩一、渡辺雅彦、崎村建司、上田(石原)奈津実  
バーグマングリアの傍シナプス領域にグルタミン酸輸送体を集積させてグルタミン酸除去を効率化する分子機構

第36回日本生物学的精神医学会第57回日本神経化学大会  
奈良県新公会堂 (奈良県)  
2014年9月29日  
Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka N, Kaibuchi K, Miyakawa T, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. CDC42EP4/septin-dependent localization of GLAST to parasynaptic domains of Bergmann glia facilitates glutamate clearance from the parallel fiber-Purkinje cell synapses and motor learning.  
第37回日本神経科学大会シンポジウム「トランスポーター (EAATs/VGLUTs) によるグルタミン酸分布の時空間制御と精神・神経疾患」  
パシフィコ横浜 (神奈川県)  
2014年9月13日

[図書](計2件)

上田(石原)奈津実、木下専、セプチン、生化学辞典、査読無、in press  
Parajuli L, Ageta-Ishihara N, Ageta H, Fukazawa Y, Kinoshita M. Methods for Immunoblot Detection and High-resolution Subcellular Mapping of Septin Subunits in Mammalian Nervous Systems. Methods in Cell Biology, Septins, Vol 136. Chapter 16, 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田(石原) 奈津実  
(AGETA-ISHIHARA NATSUMI)  
名古屋大学・大学院理学研究科・講師  
研究者番号：60547561

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者