

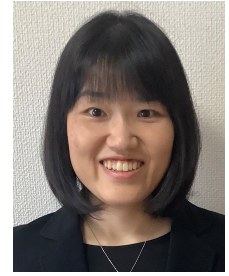
■受領No.1448

## 長期記憶維持における細胞小器官の局在変化と分子基盤の解明

代表研究者

上田 (石原) 奈津実

東邦大学 理学部 生物分子科学科 准教授



## Elucidation of the molecular mechanisms and organelle localization underlying long-term memory retention

Principal Researcher

Natsumi Ageta-Ishihara,

Department of Biomolecular Science, Faculty of Science, Toho University associate professor

昨今、軽度認知障害は正常と認知症の中間状態(経験した出来事を時間、空間的な文脈とともに記憶するエピソード記憶の障害はあるが、日常生活に支障がない状態)と定義された。申請者はセプチンの脳神経における役割を研究している。この過程で、セプチン欠損マウスはエピソード記憶の長期記憶障害を示すことを見出した。本研究では創薬や診断技術への応用を見据え、記憶維持の分子・細胞基盤を解明することを目指した。

Mild cognitive impairment has been defined as an intermediate state between normal and dementia (impairment in the retention of episodic memory, etc., while not interfering with daily life). We have been studying the physiological significance of the neural network formation and maintenance of the septin cytoskeleton. In this process, they found that septin-deficient mice exhibit long-term impairment of episodic memory. The aim is to elucidate the molecular and cellular basis of memory maintenance, which will be a breakthrough for research on drug candidate molecules and diagnostic methods for mild cognitive impairment.

### 1. 研究内容

#### 目的

認知症の中核症状は進行性の学習・記憶障害であり、日常生活に支障をきたすこともある。近年、経験した出来事を時間、空間的な文脈とともに記憶するエピソード記憶の障害はあるが、日常生活に支障をきたさない状態が正常と認知症の中間状態として軽度認知障害と定義された。認知症を根治できる薬物療法は存在しないことから、可逆性の残る軽度認知障害に対する創薬候補分子の探索が求められている。申請者は細胞骨格セプチンの脳神経回路形成と維持における生理的意義を研究

している(Ageta-Ishihara et al., Nature Commun 2013, Nature Commun 2015, Neurochem Int 2018, Neurosci Res 2021)。申請者は、系統的行動解析を実施し、認知機能を中心にセプチン欠損マウスの示す行動レベルでの異常をスクリーニングした。その結果、セプチン欠損マウスは複数の行動解析パラダイムで一貫してエピソード記憶障害のみを示す珍しいマウスであることを見出した(未発表)。

学習や記憶の細胞レベルの素過程として、神経細胞同士の結合部における伝達効率が長時間上昇する長期増強(L-LTP)が知られている。とりわけ、情報を受け取る神経線維(樹状突起)から突き出て

いるスパインの形態および構成タンパク質の可塑的变化は学習記憶などの高次機能に重要と考えられている。申請者はエピソード記憶の分子・細胞レベルの基盤を解明するため、スパイン形態と構造を精査し、興味深い結果を得ている (Ageta-Ishihara et al., 未発表)。本研究では「記憶維持の細胞基盤として神経細胞の持続的な伝達効率上昇の持続には刺激依存的なスパイン内ダイナミクスとそれに伴う局所  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が必要である」と仮説を立て立証すること、創薬や診断・治療技術への応用を見据えた分子基盤の網羅的同定を目的とした。具体的には、神経細胞に刺激を与え、対象分子や  $\text{Ca}^{2+}$  の時空間的動態をイメージングで解析するとともに、質量分析を用いたセプチン会合分子の同定を行った。

## 結果

### 1. 対象分子や $\text{Ca}^{2+}$ のイメージング

SD ラット生後 1 日 (親付) を日本エスエルシー株式会社より購入した。全ての動物実験は、名古屋大学の動物実験委員会の許可を受け、動物実験ガイドラインに従って行った。生後 1 日齢ラット海馬ニューロンを分散培養し、7 日目 (div7) にリポフェクション法を用いて、プラスミドベクターを導入した。div19-23 に共焦点レーザー顕微鏡 LSM-780 で観察した。細胞体内カルシウムイメージングは神経活動を誘発する刺激と組み合わせて実施した。刺激の 15 分前、60 分後、300 分後にそれぞれ細胞体の撮影を行った。各撮影では、 $256 \times 256$  ピクセル、0.6 倍ズーム、ピンホール径最大で、4 Hz、90 秒間の GFP (GCaMP6f) 蛍光画像を取得した。1 回の実験で 15-20 細胞程度の撮影を行った。レーザーパワーは、4Hz、5 分間の連続撮影を行った際に、①GCaMP6f のベースライン蛍光輝度値や、②カルシウムイベント (神経発火) 頻度の急激な増加が観察されないように設定した。実験中に一度もカルシウムイベントが観察されなかった細胞や、死細胞は解析から除外した。

解析には ImageJ を用いた。神経細胞の細胞体部分に ROI を設定して、ROI 内の GCaMP6f 輝度値の平均 (ROI 内の総輝度値 / ピクセル数) を算出した。同形の ROI でバックグラウンドノイズを算出し減算した ( $F(t)$ )。  $F(t)$  の平均値を  $F_0$  として、 $\Delta F/F$  を算出した ( $\Delta F/F = (F(t) - F_0) / F_0$ )。カルシウムイベントが観察されない 5 秒間の  $\Delta F/F$  標準偏差を noise と定義して、SD response を算出した ( $\text{SD response} = (\Delta F/F) / \text{noise}$ )。SD response の値が 5 を上回り、下回るまでを 1 回のカルシウムイベントと定義して、イベント回数を定量した。解析後、イベント回数を目視で計測し、解析結果と差異がないことを確認した。上記の方法で正確に解析ができなかった細胞は解析から除外した。実験の結果、対照群では、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、刺激により長期増強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、刺激依存的な対象分子の移動が生じないセプチン欠乏群では、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、刺激/セプチン依存的な対象分子の移動が、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。

### 2. 質量分析を用いたセプチン会合分子の同定

3 か月齢、オスの野生型マウスの脳を摘出し、セプチンの特異的抗体を用いた免疫沈降と質量分析によりセプチン会合分子を網羅的に同定した。同定分子群の会合や刺激に伴う翻訳後修飾の有無を生化学的解析により定量しており、刺激に伴う神経活動の亢進を長期的に維持させる分子基盤を同定している。引き続き、データを積み重ね論文として纏める。

最後になりましたが、本研究課題を実施するにあたり、多大な研究助成を賜りました公益財団法人 日立財団に深く感謝申し上げます。

## 2. 発表(研究成果の発表)

(講演会発表)

・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

2022年1月22日, オンライン

・Ageta-Ishihara N

A new kind of positive feed-back regulation via the organelle extension

RIKEN BDR 'Women and Future in Science' Seminar

2021年12月20日, オンライン

(学会発表)

・Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Kengaku M, Miyakawa T, Inokuchi K, Bito H, Kinoshita M.

A myosin/septin-dependent postsynaptic regulation required for memory consolidation

第44回 日本神経科学大会、第1回 CJK 国際会議

2021年7月30日, 神戸コンベンションセンター