

## 記憶学習を担う新規分子機構の解明およびその分子マシナリーの認知症患者における遺伝子発現の解析

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科

嶺岸 卓徳

### 1. 諸言

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。脳の中で記憶学習を司る海馬の神経回路では、樹状突起上に存在する棘状の樹状突起スパインが他の神経細胞の軸索とシナプスを形成しており、われわれが物事を記憶学習する際には、スパインの新生あるいは拡大が起こり、シナプス間の情報伝達効率が増強され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みられることが報告されている。

スパインには神経伝達物質の受容体とシグナル分子に加え、アクチン線維が豊富に存在する。スパイン内のアクチン線維は、その重合端をスパイン先端に向けており、アクチンモノマーが重合することで細胞膜を押し出す。一方、細胞膜を押し出す力の反作用としてアクチン線維は後方に押し返される。このとき、アクチン線維は逆行性移動と呼ばれる重合方向とは逆向きの流動を示す。これまで、スパインの拡大は、軸索終末から放出される神経伝達分子グルタミン酸に応答し活性化したアクチン重合によって引き起こされると考えられていた。

最近われわれは、所属する研究室グループが独自に同定したタンパク質 Shootin1a がスパイン形成に関与することを見出した。また、Shootin1a はスパイン内で逆行性移動するアクチン線維と細胞接着分子を連結することを明らかにした。さらに、グルタミン酸刺激に応答してリン酸化修飾を受けた Shootin1a が、逆行性移動するアクチン線維と細胞接着分子の連結を増強し、スパイン拡大のための力を生み出すことを明らかにした<sup>1)</sup>。そのため、スパイン形成と拡大を担う Shootin1a を介した力の発生機構が記憶学習に関与する可能性が考えられる。本研究課題では、動物個体を用いた行動バッテリー試験によりこの可能性を検証することで、記憶学習を担う力学機構の解明を目指した。

### 2. 方法

われわれはこれまでに、Shootin1 floxed マウスと CaMKII $\alpha$ -CreERT2 マウス<sup>2)</sup>から、タモキシフェン誘導により海馬および大脳皮質で Shootin1 遺伝子を欠失するコンディショナルノ

ックアウトマウス (Shootin1 cKO マウス) を作製した。本研究では、Shootin1 cKO マウスを用いて、モーリス水迷路試験、新奇物体認識試験、Y 字迷路試験を行った。

### 2.1 モーリス水迷路試験

円形水槽の壁面に4つの目印(四角、星、円、三角)を提示し、目印を基準に水槽を4つのエリア(東西南北)に分けた。避難用プラットフォームは東エリアに設置した。水温は $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、部屋の照度を30~50ルクスに設定した。本研究では、生後4ヵ月の雄マウスを3分間遊泳させる試験を30分間隔で1日目に4回、2日目に3回行った。遊泳は、各試験で交互に北または南エリアから開始した。また、試験中にプラットフォームに到達できなかったマウスは、ケージに戻す前にプラットフォームに10秒間滞在させた。2日目では、マウスがプラットフォームを視認できないようにするために、スキムミルクを用いて水を白濁させ、プラットフォームの1cm上まで水を加えた。そして、1日目の試験が終了した24時間後に試験を開始した。自動認識ソフトウェア TopScan Suite (CleverSys) を用いて、プラットフォームへの到達時間および水槽内の各エリアの滞在時間を計測した。

### 2.2 新奇物体認識試験

はじめに、生後4ヵ月の雄マウスを正方形の箱(45 cm×45 cm)に入れて、1時間自由探索させることで環境に馴化させた後、マウスをケージに戻した。7~8時間後、再びマウスを箱に入れて箱内を5分間自由探索させた後、フィールド上に2個の同一物体を置き、5分間探索させた。1日目の試験が終了した24時間後、マウスを箱に入れて箱内を5分間自由に探索させ、1日目と同じ位置に片方を新奇物体に変えた2つの物体を置き、さらに5分間探索させた。マウスの探索行動は、新奇物体認識試験装置 SCANET-40(メルクエスト)を用いて記録・解析した。

### 2.3 Y 字迷路試験

はじめに、生後4ヵ月の雄マウスをY字迷路の中心に置き、5分間自由探索させることで環境に馴化させた。その後、一度マウスをケージに戻し、5分後、再びマウスをY字迷路の中心に置き、8分間試験を行った。マウスの行動は、振舞自動認識ソフトウェア TopScan Suite (CleverSys) を用いて解析した。マウスがアーム領域内に進入した回数を総アーム進入数としてカウントし、3回連続で異なるアームに進入した回数を交替行動数としてカウントした。

## 3.結果

### 3.1 Shootin1a の空間記憶形成への関与

モーリス水迷路試験では、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する。マウスはプールの壁面に提示される幾何学模様を手がかりにプラットフォームの位置を記憶するため、試験を繰り返すごとにプラットフォームへの到達時間が減少する。したがって、モーリス水迷路試験ではプラットフォームへの到達時間から空間記憶を評価できる。本研究では、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。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 マウスではプラットフォームへの到達時間が遅れる傾向がみられた (図 1A)。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みられた (図 1B)。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。

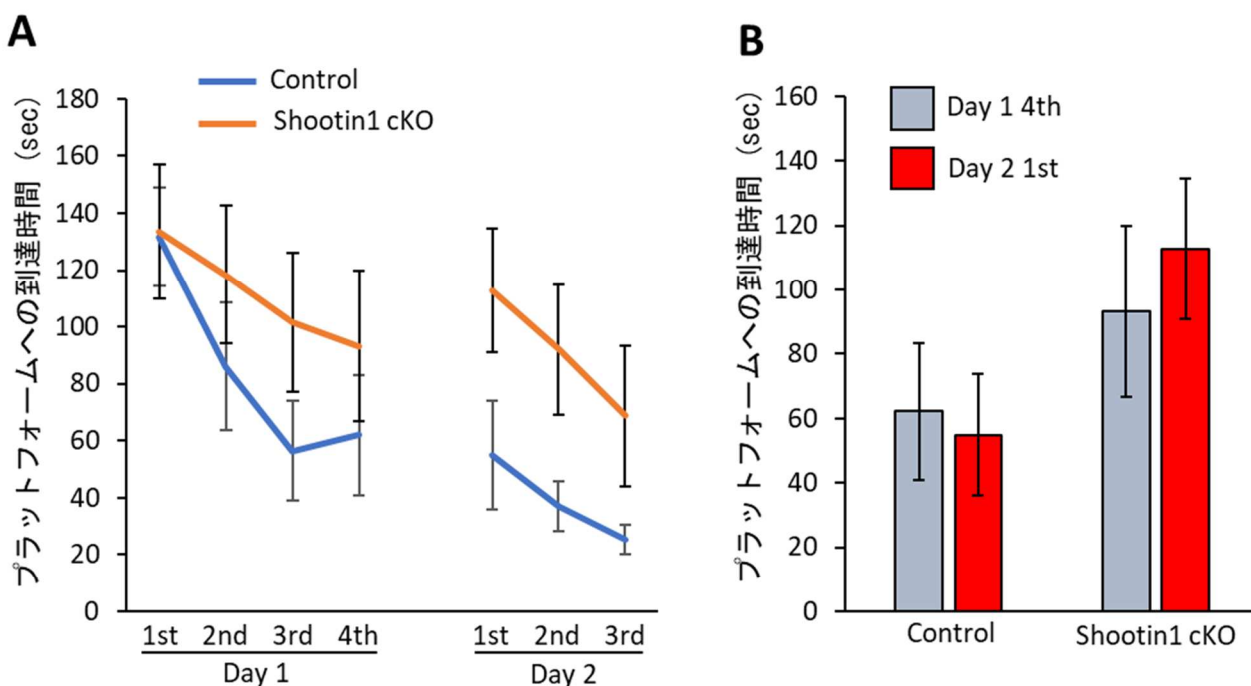


図 1 モーリス水迷路試験による空間記憶の解析

- (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への到達時間。

Control マウス : n=9、Shootin cKO マウス : n=8

### 3.2 Shootin1a の物体認識記憶形成への関与

新奇物体認識試験は、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る。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。そのため、この試験で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 マウスを用いて新奇物体認識試験を行ったところ、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 マウスと比較して新奇物体の探索割合に減少傾向がみられた (図 2)。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。

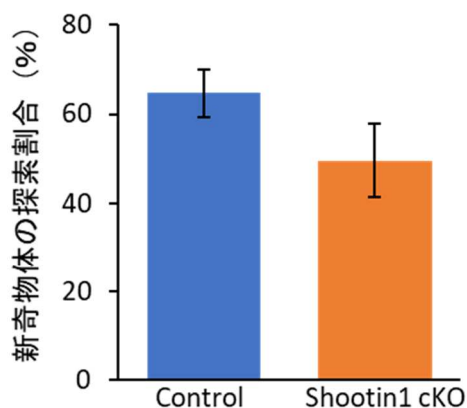


図 2 新規物体認識試験による物体認識記憶の解析

Control マウス : n=14、Shootin cKO マウス : n=14

### 3.3 Shootin1 cKO マウスにおける空間作業記憶の解析

Y 字迷路試験では、マウスを Y 字型の迷路内に置き、3 本のアームを自由探索させた。マウスは新奇性環境を好むため、直前に入ったアームとは異なるアームに進入する性質 (自発的交替行動) がある。したがって、Y 字迷路試験では、総アーム進回数に対する自発的交替行動数の割合から空間作業記憶を評価できる。現在までに、Shootin1 cKO マウスでは交替行動率に有意な差はみられていないが、試験に用いた個体数が少ないため (Control マウス n=12、Shootin cKO マウス n=6)、引き続き解析を行う。

## 4. 考察

スパインは記憶学習に応じて新生・拡大することが知られている。われわれはこれまでに、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し、スパインの形成・拡大のための力を生み出すことを明らかにした<sup>1)</sup>。また本研究は、動物個体を用いた行動解析により、Shootin1a が空間記憶および物体認識記憶に関与する可能性を見出した。これらの結果より、Shootin1a によるスパイン形成・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。今後は、引き続きモリス水迷路試験と新奇物体認識試験を行い、Shootin1 cKO マウスで空間記憶およ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。また、Y 字迷路試験の解析個体数を増やし、Shootin1 cKO マウスで空間作業記憶の形成が阻害されるかを検証する。

最近、知的障害を発症する家系の血液内 mRNA を用いた遺伝子解析が行われ、知的障害

の家系では Shootin1 の発現量が著しく減少することが報告された<sup>3)</sup>。知的障害の患者の脳では、スパインの数や形態に異常を示すことが知られている。そのため、Shootin1a の分子機構の破綻がスパインの形成・拡大に障害を起こすことで、知的障害発症の一因となる可能性が考えられる。今後は、アデノ随伴ウイルスを用いて Shootin1a を遺伝子導入することで Shootin1 cKO マウスの記憶学習能力が改善するかを検証し、記憶学習障害の分子病態の解明を目指す。また、知的障害を発症する家系で Shootin1 mRNA 発現量が減少することから、Shootin1 をバイオマーカーとして利用することで、同じく記憶学習障害を示す認知症を診断できる可能性が考えられる。本研究課題では、認知症患者の血液サンプル内に存在する Shootin1a の mRNA を qPCR により定量し、健常者の血液サンプルと比較することで、Shootin1 の発現量と認知症発症との相関関係を調べることを計画していたが、新型コロナウイルス感染拡大のため実施することができなかった。新型コロナウイルス感染が収束後に、認知症患者の血液サンプルを用いた遺伝子発現解析を行い、Shootin1 が認知症のバイオマーカーとして利用できるかを検証する。

## 5.結語

本研究は、スパインの形成・拡大のための力を生み出す Shootin1a が記憶形成に関与する可能性を示した。Shootin1a による力の発生機構の破綻は知的障害の発症原因になる可能性があるため、記憶学習障害の原因遺伝子、発症機序の解明を目指す医学・薬学分野にも学術的な波及効果をもたらすことが期待できる。

## 6.文献

- 1) Kastian R\*, Minegishi T\*, Baba K, Saneyoshi T, Katsuno-Kanbe H, Hayashi Y, Inagaki N. Shootin1a-mediated actin-adhesion coupling generates force to trigger structural plasticity of dendritic spines. Cell Reports.2021;35:109130. \*equal contribution
- 2) Erdmann G, Schutz G, and Berger S. Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. BMC Neuroscience. 2007;8:63.
- 3) InanlooRahatloo K, Peymani F, Kahrizi K, Najmabadi H. Whole-transcriptome analysis reveals dysregulation of actin-cytoskeleton pathway in intellectual disability patients. Neuroscience. 2019;404:423-444.

## 7.成果発表

### 雑誌論文

- Kastian R, Minegishi T, Inagaki N. Simultaneous analyses of clutch coupling and actin polymerization in dendritic spines of rodent hippocampal neurons during chemical LTP. STAR Protocols. 2021;2:100904
- Minegishi T, Fujikawa R, Kastian R, Sakumura Y, Inagaki N. Analyses of actin dynamics, clutch

coupling and traction force for growth cone advance. *Journal of Visualized Experiments*. 2021;176.  
doi : 10.3791/63227.

• Minegishi T, Kastian R, Inagaki N. Mechanical regulation of synapse formation and plasticity. *Semin Cell Dev Biol*. 2022;S1084-9521(22)00174-4..

学会発表

• 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. 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. 第44回神経科学大会. 神戸. 2021年7月28日-31日.

• Kastian R, Minegishi T, Baba K, Saneyoshi T, Katsuno-Kambe H, Saranpal S, Hayashi Y, Inagaki N. Shootin1a-mediated actin-adhesion coupling generates force to trigger structural plasticity of dendritic spines. 第44回神経科学大会. 神戸. 2021年7月28日-31日.