

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	西田 遼平
学 位 の 種 類	博士 (理学)
学 位 記 番 号	甲 第1772号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当
学 位 論 文 題 目	LOTUS, an endogenous Nogo receptor antagonist, is involved in synapse and memory formation
主研究指導教員	竹居 光太郎
論 文 審 査 委 員	(主査) 佐々木 幸生 准教授 (副査) 佐藤 衛 教授 (副査) 川崎 博史 准教授 (副査) 秋山 泰身 大学院客員教授

論文内容の要旨

高齢者の5人に1人は認知症と言われており高齢化に伴う記憶障害は今日大きな社会問題となっている。加齢による記憶障害を引き起こす因子として Nogo-A が知られており、Nogo Receptor 1 (NgR1) と結合し記憶形成能力を低下させると考えられている。Nogo シグナルは、海馬初代培養神経細胞のシナプス密度を低下させることが報告され、生体マウスの脳においても NgR1 過剰発現マウスはスパイン密度の低下と記憶機能の障害を示すこと知られている。竹居研究室で発見された lateral olfactory tract (LOT) usher substance (LOTUS) は LOT (外側嗅索) の形成に関与する神経回路形成因子であり、NgR1 の内因性アンタゴニストとして同定された。LOTUS は脳に広く豊富に発現しているが、加齢と共に発現量が低下する。しかし、シナプス形成や記憶機能における LOTUS の役割は明らかにされていない。そこで本研究では、LOTUS のシナプス形成に関する機能について検討し、海馬依存性記憶形成能力に与える影響について解析した。

初めに、海馬初代培養神経細胞を用いてシナプス密度の定量を行った。野生型 (WT)、LOTUS-ノックアウト (KO) マウスの海馬から得た神経細胞をポストシナプスマーカーである PSD-95、プレシナプスマーカーである Bassoon、樹状突起マーカーである MAP2 で三重染色しシナプス密度を定量した。その結果、PSD-95 と Bassoon が共局在するシナプスは WT と比較して LOTUS-KO では減少していた。従って、LOTUS は欠損す

るとシナプス密度を低下させることが示唆された。次に、海馬の樹状突起におけるシナプスの数と形態に対する LOTUS の役割を検討するために Thy1-EGFP マウスと各遺伝子型のマウスを交配することにより興奮性ポストシナプスであるスパインを可視化したマウスを作製し解析した。海馬 CA1 錐体ニューロンの apical dendrites および basal dendrites における樹状突起スパイン密度は、LOTUS-KO マウスでは WT マウスと比較して有意に減少した。また、スパインの形態別に解析すると、mushroom type および thin type のスパイン密度も WT と比較して LOTUS-KO マウスでは有意に減少した。これらの結果は、LOTUS が欠損すると海馬 CA1 錐体ニューロンの thin type、mushroom type のスパイン密度を減少させ、総スパイン密度を減少させることを示唆する。よって、LOTUS は海馬におけるシナプス形成に寄与すると考えられた。Nogo-A は NgR1 及びその共受容体である p75NTR 等を介して、RhoA を活性化し、アクチンの脱重合をもたらすことでシナプス形成を阻害すると考えられる。従って、LOTUS は Nogo シグナルと拮抗することによりシナプス形成を促進する役割があると考えられる。

LOTUS の記憶機能との関わりを検討するため、WT、LOTUS-KO、LOTUS-トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、社会性認知記憶形成能力について評価した結果、LOTUS は欠損すると社会的認知記憶形成能力が低下することが示された。次に、空間記憶形成能力を評価するためにモリス水迷路課題を行った結果、LOTUS-KO マウスは WT マウスと比較して escape latency が有意に長く、プラットフォーム設置していた TQ 区の滞在時間の割合は LOTUS-KO マウスに有意な減少が認められたことから、LOTUS-KO マウスは空間記憶形成能力に障害があることが示された。以上のことから、LOTUS は欠損すると社会性認知記憶や空間記憶などの海馬依存性記憶の形成能力を低下させることが示唆された。

最後に、加齢に伴う記憶障害における LOTUS の役割について検討した。WT では生後 2 ヶ月に比べ、18 ヶ月後の LOTUS の発現量は低下していたが、LOTUS-Tg マウスでは高い発現量を維持していた。次に社会性認知記憶形成能力について評価した結果、WT では 18 ヶ月で記憶形成が低下した一方で、LOTUS-Tg マウスでは 2 ヶ月齢と同様の記憶形成能力を示した。これらの結果は、LOTUS を用いて加齢による記憶障害を抑制する可能性を示すものである。

加齢に伴う Nogo シグナルの増加や LOTUS 発現量の減少が記憶障害を引き起こすことが報告されている。LOTUS 発現量の減少を抑制することにより、加齢に伴う記憶障害が抑制されるかどうかを検討することは興味深い。また、アルツハイマー病の原因タンパク質である $A\beta$ は NgR1 と結合してシナプス形成の阻害を介して記憶障害を引き起こすことが報告され、さらに paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) は $A\beta$ の受容体としても機能して記憶障害を引き起こすことも知られている。当研究室において LOTUS は PirB のアンタゴニストとしても機能することが確認されたので、LOTUS が $A\beta$ と NgR1 及び PirB との結合を抑制するかについては非常に興味深い課題となり、これらの更なる考究により、老齢性認知症やアルツハイマー病の予防・治療法の開発に LOTUS の機能が関与することが期待される。

論文審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出された論文の内容、および、公聴会・審査会での質疑応答に基づき、4名の審査員（主査：佐々木 幸生 准教授、副査：佐藤 衛 教授、副査：川崎 博史 准教授、副査：秋山 泰身 大学院客員准教授）によって、令和3年3月2日に行われた。審査会では、専門分野、関連分野、外国語について、各審査委員と以下の質疑応答が行われた（公聴会での質疑応答も含む）。

佐藤副査からはLOTUSは膜タンパク質である一方、可溶型も存在するが、機能的な違いは何かと質問があった。それに対し、膜結合型はNogo-A とその受容体であるNgR1の結合を阻害するが、可溶型はNgR1とその共受容体であるp75の結合を阻害することにより、Nogoシグナルを阻害すると回答した。さらに、可溶型の存在意義について質問したところ、可溶型と膜結合型のどちらがより強くNogoシグナルを阻害できるかは不明であるが、膜結合型は同一細胞膜上の受容体しか阻害できないが、可溶型は近傍の細胞にも作用する可能性があるという回答を行った。

秋山副査からはLOTUSから長期記憶までの分子機構、細胞生物学的機構を説明するようにという質問があった。それに対し、Nogoはその受容体に結合するとRhoA-ROCKを介してアクチンの脱重合を誘導し、シナプスの数が減少させるが、LOTUSはそれを阻害することによりシナプスの構造変化を防ぐことが分子機構であると答えた。さらに、シナプスの減少は長期記憶の低下とイコールなのかと質問したところ、老齢マウスではシナプスが減少するのでそうだと思うと答えた。また、LOTUS-Tgマウスで観察される記憶形成の向上がNogo受容体を介しているかを検証するにはNgR1-KOと掛け合わせればいいのかという問いに対して、LOTUS-KOとNgR1-KOを掛け合わせればいいのかと答えたが、さらにNgR1-KOの表現型を説明することで、副査を最終的には納得させる回答になった。

川崎副査からはPirBという別のNogo受容体があることを前提にすると結果はどのように解釈されるのかという質問があった。それに対し、NgR1は記憶に関与するという研究は多く行われており、Nogoの記憶に関する作用は大方NgR1を介すると考えられ、PirBの関与は少ないと思われるという回答をした。ただ、加齢に伴いNgR1の発現量は減少する一方でPirBの発現量が上昇するので、加齢に伴う記憶障害には関与する可能性があるという回答をした。さらに、加齢による記憶障害と通常の記憶障害は現象的にどう区別されるのかと質問したところ、それに関してはわからないが、どちらも表現型としては同じだろうという回答をした。また、学習に伴いシナプス密度が上昇するのではなく、初めから

Nogo-A KOではシナプス密度が高いから記憶能力が強化されていると考えていいのかという質問をしたところ、最初からシナプス密度が高いとシナプス伝達効率が高くなっている、記憶の獲得に有利だと考えていると答えた。

佐々木主査からはスパインの数だけでなく、形も重要だが、老齢マウスのスパインの形は観察しているのかと質問があった。それに対し、現在Thy1-EGFPマウスと掛け合わせた18ヶ月のWTとLOTUS-Tgマウスを準備中であり、それを解析する予定であると答えた。さらに、記憶にスパインのturnoverが関係すると考えられているが、Nogoとスパインのturnoverに関して報告されている知見があるか質問があった。それに対し、Nogo-A-KOではスパインのturnoverが落ち、記憶形成が低下していると説明があり、共同研究でLOTUS-Tgマウスのスパインのturnoverを研究しているところであると回答があった。

関連分野の知識・理解を確認する審査においては、佐々木主査からはSTED顕微鏡について説明を求められたが、励起波長による解像度の光学的限界については説明できなかった。しかし、ドーナツ状のSTED光を当てることによりその部位の蛍光を干渉させて、より高い解像度の画像が得られると説明し、原理は大まかには説明できた。川崎副査からはLOTUSのドメイン構造について説明を求められ、EC、UAドメインが拮抗作用に必要であり、FAG-GAPドメインは機能不明だが、構造安定性に寄与する可能性があると答えた。佐藤副査からはNgR1のドメイン構造について質問があった。それに対し、 β シートから構成される8つの繰り返しがあると答えたが、そのドメイン名の具体的名称については答えられなかった。秋山副査からはマッシュルーム型のスパインはどのように形成されるかについて質問されたが、細胞膜の内側にPSD-95のような足場タンパク質があると答えた。さらにそれにLOTUSがどう関与するかについては、Nogoがアクチン繊維を脱重合することでシナプス構造の崩壊が起きるが、LOTUSはそれを阻害すると答えた。

英語力を確認する審査では、佐藤主査によるイントロの説明を英語で求められたが、スライドを用いて戸惑いつつも答えることが出来た。データのスライドについてはきちんと英語で答えた。提出した英文報告書では、たどたどしい部分はあるものの、英文で説明ができていた。

以上の質疑応答の後に審査員全員で討議を行った結果、専門分野、関連分野に関する質疑応答、外国語科目等すべてを総合的に判断するならば、申請者は本学の博士号の学位を得るに十分ふさわしい資格を有すると判定された。