

平成21年 4月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700342

研究課題名（和文） ニューロプシンによる細胞接着分子L1のプロセッシング

研究課題名（英文） Processing of cell adhesion molecule L1 via neuropsin

研究代表者

田村 英紀（TAMURA HIDEKI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80437516

研究成果の概要：マウス脳において神経可塑性関連タンパク質である細胞外セリンプロテアーゼニューロプシンが直接切断するタンパク質を探索した。その結果、ニューロプシンは、神経細胞の形態変化および神経突起の伸展に関与する G protein-Regulated Inducer of Neurite outgrowth 1 (GRIN1) に直接結合し、速やかに切断することを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,300,000 | 0       | 1,300,000 |
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 600,000 | 3,900,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：プロテアーゼ、プロテオリシス、プロテオーム、カリクレイン、細胞接着分子、海馬、シナプス、神経可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

記憶や学習の基礎過程と考えられている長期増強現象（LTP）にはスパインの形態変化や新生などを伴う。このようなシナプス構造可塑性を誘導するためには、シナプス間の接着分子などのプロテオリシスが必要であると考えられているが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。我々は、これまで、

細胞外セリンプロテアーゼニューロプシン（NP）のプロテアーゼ活性が記憶の獲得やLTPの誘導に密接に関与することを明らかとしてきた。NPノックアウトマウスでは、モリス水迷路における空間記憶やY迷路における作業記憶が障害されており、テタヌス刺激によるLTPの誘導も阻害された。また、NPは、高頻度刺激後、NMDA受容体依存的に急速且つ一過的に活性化し、その活性阻害剤

を脳内に投与すると、LTP が阻害された。また NP は、細胞接着分子 L1 を介することで、シナプスの新生や成熟を誘導する。注目すべきことに、L1 は、未成熟なプレシナプスに局在しており、活性化した NP によって、L1 シナプスは成熟化する。このように、神経活動依存的な NP のプロテオリシス機構が、シナプスの新生および増強に重要な役割を果たしていると考えた。

## 2. 研究の目的

カリクレインファミリーに属する細胞外セリンプロテアーゼニューロプシン (NP; KLK8) は、大脳辺縁系の海馬や扁桃体に局在しており、神経活動依存的に活性化し、そのタンパク分解活性は LTP や記憶形成過程に重要な役割を果たしている。活性型リコンビナント (r-) NP を海馬内に投与すると、神経突起の伸長およびシナプス伝達の増強に伴うシナプスの成熟化が誘導されるが、その詳細な分子メカニズムは明らかではない。

NP は、不活性な状態で分泌後、高頻度の電気刺激や NMDA などの化学刺激などによって、細胞外で活性化する。活性化したニューロプシンがシナプスへ効果を発揮するためには、細胞外に局在する細胞接着分子や細胞外マトリックス分子をプロセッシングしていることが考えられる。近年、NP は、免疫グロブリンスーパーファミリーの一つである細胞接着分子 L1 のシグナル経路に関与することが示されたが、NP の基質は明らかではない。そこで、本研究では、NP-L1 システムのメカニズムを明らかとし、シナプス構造可塑性の分子メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) L1 は、全長 200 kDa の一回膜貫通タンパク質であるが、種々のプロテアーゼによ

るプロセッシングをうけ 140, 80, 50, 30 kDa など様々な長さのフラグメントとして存在している。そこで、まず新規 L1 抗体 (Y3) を用いたウェスタンブロット法により、脳の各領域における L1 のプロセッシング様式を調べた。

(2) NP はプロテオリシスを誘導する際、基質と結合し酵素基質複合体を形成した後、加水分解反応を行うと考えられているがその証拠はつかめていない。変異型 NP を用いて、基質との結合状態を調べた。

(3) NP mRNA は海馬の錐体細胞に豊富に存在しているが、NP タンパク質の細胞内局在の詳細は明らかではない。海馬初代培養細胞を用いて、NP 遺伝子を導入後、NP タンパク質の局在を免疫蛍光染色によって調べた。

## 4. 研究成果

(1) 脳の各領域で L1 フラグメントの発現を調べたところ海馬・扁桃体・嗅球において、他の領域では見られない 120 kDa のフラグメントが存在していた。興味深いことに、このフラグメントは、r-NP によって速やかに分解され、新たに 37 kDa のバンドが現れた。この 120 kDa のフラグメントを Y3 抗体を用いて精製後、LC-MS/MS により解析したところ、神経細胞の形態変化および神経突起の伸長に関与する膜結合タンパク質 G protein-Regulated Inducer of Neurite outgrowth 1 (GRIN1) であることがわかった。実際、マウス脳ホモジネイトにおいて Y3 抗体の免疫沈降産物を、抗 GRIN1 抗体でブロットしたところ、120 kDa の位置に陽性反応を示した。また、マウス脳ホモジネイトに r-NP を投与し、GRIN1 のプロテオリシスを調べたところ、r-NP の濃度および時間依存的に分

解され 75 kDa と 37 kDa のフラグメントが遊離された (図 1 および図 2 参照)。さらに精製した r-GRIN1 と r-NP を反応させたところ、r-GRIN1 は速やかに切断された。これにより G タンパク質のプロテアーゼによる制御の可能性が初めて示唆された。

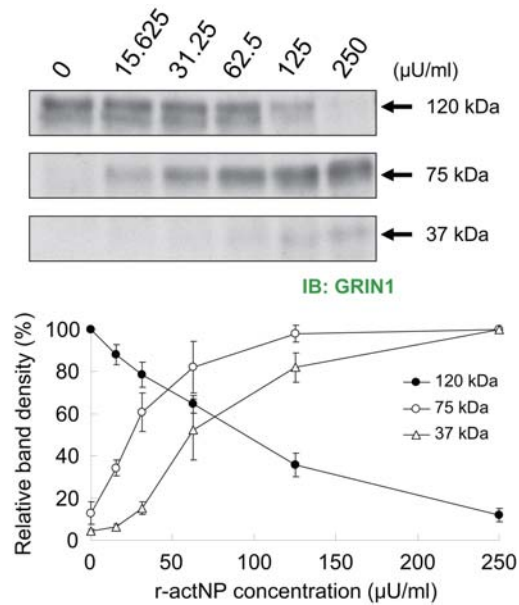


図 1. NP の濃度依存的な GRIN1 の切断

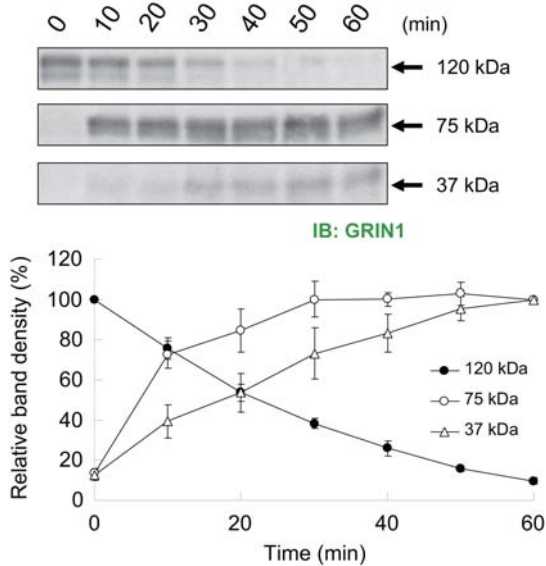


図 2. NP による GRIN1 切断のタイムコース

(2) Myc タグを付加した NP および FLAG タグを付加した GRIN1 をそれぞれ作成し、pull down assay を行った。その結果、活性型 NP と GRIN1 の複合体を検出することに成功した (図 3 参照)。NP の活性中心である 212 番目のセリン残基 (S212) をアラニンに変えた変異型 NP ではこの複合体が形成されなかったことから、GRIN1 は NP の S212 残基に結合していることが明らかとなった。本来プロテアーゼはそのタンパク分解活性によって基質タンパク質を切断してしまうので、複合体として検出することは困難である。その中で今回初めてプロテアーゼと基質の酵素基質複合体を検出することに成功した。今後は、このシステムを用いて、NP のシナプス部位における相互タンパク質の探索を行う。

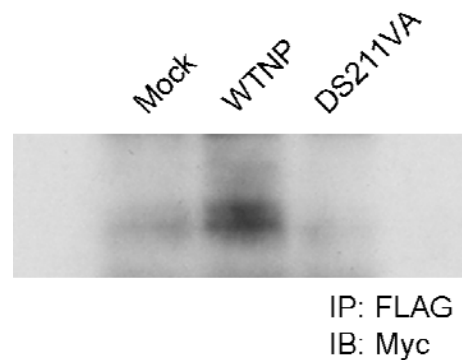


図 3. NP と GRIN1 による酵素基質複合体

(3) NP を発現させた海馬初代培養細胞において NP の免疫蛍光染色を行った。その結果、NP は細胞体および神経突起 (軸索および樹状突起) に局在していた (図 4 参照: 緑色が NP で赤色は MAP2 である)。特に、神経突起上ではドット状に分布しており、分泌顆粒によって NP が運ばれていることが示された。今後は、NP が細胞外に分泌後、基質タンパク質に結合している部位を特定したい。

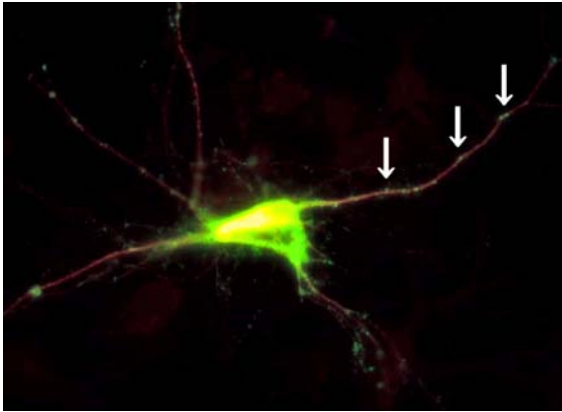


図 4. NP の細胞内局在

#### 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 8 件)

- ① 田村 英紀、塩坂 貞夫 「細胞外プロテアーゼと神経可塑性」, 分子精神医学誌, 第 35 号, 68-71, 2009, 査読無
- ② Tamura H, Ng DC, Tokuda T et al. (他 7 名, 1 番目), One-chip sensing device (biomedical photonic LSI) enabled to assess hippocampal steep and gradual up-regulated proteolytic activities. J Neurosci Meth., 173, 114-20, 2008, 査読有
- ③ Ng DC, Nakagawa T, Mizuno T et al. (他 6 名, 6 番目), An implantable and fully integrated complementary metal-oxide semiconductor device for in vivo neural imaging and electrical interfacing with mouse hippocampus. Sens Actuators A, 145-6, 176-86, 2008. 査読有
- ④ Ishikawa Y, Horii Y, Tamura H and Shiosaka S\*. Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. J Neurosci., 28, 843-9, 2008. 査読有
- ⑤ Ng DC, Nakagawa T, Mizuno T et al. (他 6 名, 6 番目) Integrated in vivo neural imaging and interface CMOS devices: design, packaging, and implementation. IEEE Sensors J., 8, 121-30, 2008. 査読有
- ⑥ 田村 英紀 「シナプス可塑性におけるプロテオリシス機構の働き」, 神経化学誌, 47, 21-9, 2008. 査読無
- ⑦ Ng DC, Nakagawa T, Mizuno T, et al. (他 6 名, 6 番目) Towards a fully-integrated CMOS-based in vivo neural imaging and interface device. Solid-State Sensors,

Actuators and Microsystems Conf., 423-6, 2007. 査読無

- ⑧ Ng DC, Nakagawa T, Tokuda T et al. (他 5 名, 5 番目) Development of a fully integrated complementary metal-oxide-semiconductor image sensor-based device for real-time in vivo fluorescence imaging inside the mouse hippocampus. Jpn J Appl Phys., 46, 2811-9, 2007. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 田村 英紀, ニューロプシンはサイトメガロウイルスプロモーターの活性を増大させる, 第 51 回神経化学会, 2008.9, 富山
- ② 石川 保幸, Neuropsin 依存的・非依存的シナプス・タギング, 第 51 回神経化学会, 2008.9, 富山
- ③ 田村 英紀, セリンプロテアーゼニューロプシンは GRIN1 を特異的に切断する第 31 回神経科学会, 2008.7, 東京
- ④ 石川 保幸, Neuropsin 依存的・非依存的シナプス・タギング, 第 31 回神経科学会, 2008.7, 東京
- ⑤ DC Ng, Design and packaging of an implantable CMOS neural imaging and interface device, International Image Sensor Workshop, 2007.6, Ogunquit
- ⑥ DC Ng, Towards a fully-integrated CMOS-based in vivo neural imaging and interface device, The 14th Int. Conf. Solid-state Sensors, Actuators and Microsystems, 2007.6, Lyon
- ⑦ 田村 英紀, マウス海馬 CA1 領域におけるシータバースト刺激後のセリンプロテアーゼ in vivo リアルタイムイメージング, Neuro2007, 2007.9, 神奈川
- ⑧ 松井 信樹, シナプス可塑性関連プロテアーゼニューロプシンによる 120 kDa タンパク質のプロセッシング, Neuro2007, 2007.9, 神奈川
- ⑨ Ng DC, Fusion of CMOS and MEMS technologies for development of a fully integrated and implantable neural imaging and interface device, The 1st Int. Symposium on Information and Computer Elements, 2007.9, 北九州
- ⑩ Ng DC, Integration of CMOS and MEMS technologies in the development of a neural imaging and interface device: showcase of an emerging bioimaging technique, Proc. IEEE Custom Integrated Circuits Conference, 2007.9, San Jose
- ⑪ Ng DC, Development of a CMOS-based neural imaging and interface device, 2007 Intl. Conf. on Solid State Devices and Materials, 2007.9, 筑波

⑫ Tamura H, Real time in vivo Long-term Potentiation imaging in the CA1 area of the mouse hippocampus, Society for Neuroscience 2007, 2007.11, San Diego

⑬ Ishikawa Y, Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent Synaptic Tagging in the mouse Schaffer-collateral Pathway, Society for Neuroscience 2007, 2007.11, San Diego

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/shiosaka/siosaka.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田村 英紀 (TAMURA HIDEKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80437516

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：