

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：23903
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22890155
 研究課題名（和文）脳形成に必須な分泌蛋白質リーリンの、
 特異的分解による機能制御機構の解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of proteolytic cleavage of Reelin

 研究代表者
 河野 孝夫（TAKAO KOHNO）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：70581742

研究成果の概要（和文）：リーリンは脳の形成に必須な巨大な分泌タンパク質であり、プロテアーゼにより特異的分解を受ける。本研究では、リーリンの特異的分解機構、及びその生理的意義を解明することを目的とした。主に、以下の知見を見いだした。(1) リーリン自身は、プロテアーゼ活性を持たない。(2) ADAMTS-4はリーリンを分解する活性を持ち、アイソフォームによって、リーリンを分解する活性が異なる。(3) 分解を受けていないCTRを持つリーリンは、既知リーリン受容体とは異なる膜蛋白質と結合する。

研究成果の概要（英文）：Reelin is a large protein that is essential for brain development. Reelin is proteolytically cleaved at specific sites. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism of proteolytic cleavage of Reelin. We found following points. (1) Reelin does not have the proteolytic activity. (2) A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) can cleave Reelin in an isoform-dependent manner. (3) Reelin with an intact CTR binds to a transmembrane protein that is different from the well-known Reelin receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：分子神経生物

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：神経細胞、脳、リーリン、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳皮質は整然とした6層構造を持ち、その正常な形成は神経細胞同士のネットワーク形成、及び脳の高次機能発現に必須

である。リーリンは、層構造形成を最上位で司る巨大分泌蛋白質である。リーリンは、分泌シグナルを含むN末端領域、8回の繰り返し構造リーリンリピート、そして塩基性アミ

ノ酸に富む C 末端領域 (CTR) からなる (図 1)。リーリンは RR5~6 部分で受容体に結合し、下流シグナルを活性化する。

近年、リーリンの機能低下がアルツハイマー病などの精神疾患の増悪化に寄与することが判ってきた。しかし、リーリンの機能調節メカニズムは不明であり、その機能を増強する方法も知られていない。従って、生体内におけるリーリンのシグナル活性制御機構を解明することは、層構造形成機構の解明だけでなく、精神神経疾患の診断法や記憶障害の治療法開発にもつながる可能性がある。

リーリンは、2 番目のリーリンリピートと 3 番目のリーリンリピートの間付近 (N site)、及び 6 番目のリーリンリピートと 7 番目のリーリンリピートの間の間付近 (C site) で特異的分解 (プロテオリシス) を受ける (図 1)。

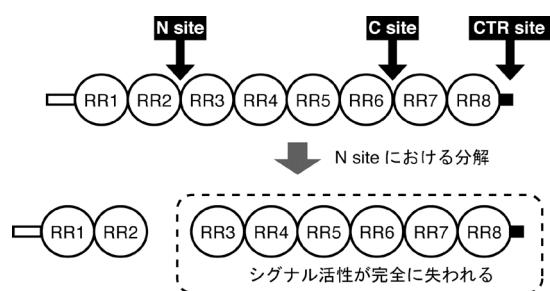


図 1 リーリンの構造と分解部位

我々は最近、N site における分解によりリーリンのシグナル活性が低下することを見出した (図 1, Kohno S et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008)。このことは、N site におけるリーリン分解を担うプロテアーゼが、生体内でリーリンのシグナル活性をスイッチオフする役割を持つことを示唆する。N 及び C site におけるリーリン分解を担うプロテアーゼについては、以下の 2 つの可能性が示唆されている。1) メタロプロテアーゼファミリーのプロテアーゼがリーリンを分解する。2) リーリンはセリンプロテアーゼ活性を持ち、これがリーリン自身や細胞外マトリックスを分解する。しかし、リーリン分解を担うプロテアーゼの実体は不明であり、未だ同定されていない。そのため、リーリンの分解機構や分解の生理的意義を考える上での大きな障害となっている。

また、申請者はリーリンの CTR 内に新たな分解部位 (CTR site) を見だし (図 1)、proprotein convertase family のプロテアーゼがこの分解を担うことを明らかにした。これまでに、CTR site で分解を受けていないリーリンは、神経細胞膜表面に結合しやすいことを見だしている。しかし、リーリン結合分子や、この結合の意義は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、リーリンの特異的分解機構、及びその生理機能を明らかにすることを目的とする。特に以下の 3 点に重点をおいた。

- (1)リーリン分解を担うプロテアーゼの同定
- (2)活性型リーリン特異的抗体の樹立
- (3)リーリンの新規分解機構、及び生理的意義の解明

3. 研究の方法

(1)リーリン分解を担うプロテアーゼの同定

リーリン自身のプロテアーゼ活性を再評価すべく、活性セリン残基と思われる残基に変異を導入し、リーリン自身を含む様々な基質に対する分解活性を検討した。

また、各種プロテアーゼ阻害剤を用いた検討を行い、プロテアーゼが属するファミリーを絞り込んだ。候補プロテアーゼの発現プラスミドを作製し、候補プロテアーゼがリーリンを分解する活性を持つか否かを調べた。

(2)活性型リーリン特異的抗体の樹立

リーリン分解産物を精製し、エドマン分解法を用いて分解部位を同定した。分解部位を含む合成ペプチドを、リーリン欠損マウスに免疫し、分解を受けていないリーリン (すなわち、活性型リーリン) のみを認識するモノクローナル抗体の樹立を試みた。

(3)リーリンの新規分解機構、及び生理的意義の解明

CTR 配列内に点変異を導入し、CTR site 分解に必要なアミノ酸残基を調べた。

分解を受けていない CTR (完全長 CTR) を持つリーリン、もしくは分解を受けた CTR を持つリーリンを培養神経細胞に添加し、形態形成に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1)-①. リーリン自身のプロテアーゼ活性の検討

以前の報告 (Quattrocchi et al., *J. Biol. Chem.*, 2002) と異なり、リーリンは自身やラミニンを分解する活性を持たなかった (論文③)。すなわち、リーリンの N-t site 分解を担うのは、分泌型のメタロプロテアーゼであると考えられる。

(1)-②. リーリン分解を担うプロテアーゼの同定

各種プロテアーゼ阻害剤を用いた検討を行ったところ、リーリン分解を担うプロテアーゼファミリーの候補として、a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) ファミリーが挙げられた。そこで、ADAMTS ファ

ミリーの中でも、脳での発現が確認されている、ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-8の発現プラスミドを作製し、これらプロテアーゼがリーリンを分解する活性を持つか否かを調べた。その結果、ADAMTS-1、ADAMTS-8はリーリンを分解する活性を持たないが、ADAMTS-4は、N-t site 及び C-t site の両方でリーリンを分解する活性を持つことが明らかになった (図 2)。ADAMTS-4

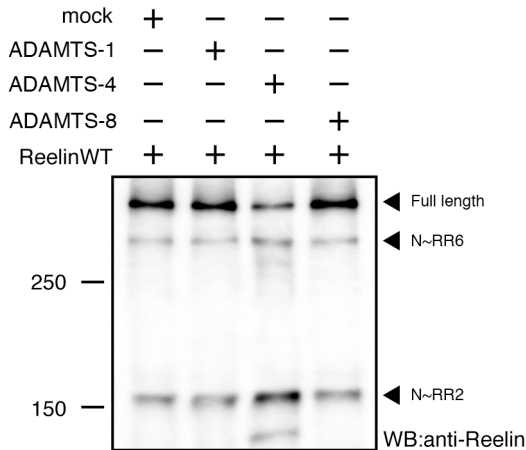


図2 ADAMTS-4はリーリンを分解する活性を持つ

にはC末端側の分解によって生じる3種類アイソフォーム (p75、p60、p50) が存在し、それぞれヘパリンへの結合性が異なることが報告されている (Flanney et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)。そこで、ADAMTS-4をヘパリンカラムクロマトグラフィーにより分離し、ADAMTS-4のどのアイソフォームがリーリン分解活性を持つかを検討した。その結果、p75はN-t siteとC-t siteの両方で、一方でp50はN-t siteでのみリーリンを分解することを見いだした。このことは、ADAMTS-4のリーリン分解活性が自身の分解により調節されることを示唆する。

さらに、抗ADAMTS-4抗体を作製し、大脳皮質由来神経細胞の上清中に存在するプロテアーゼがADAMTS-4であるかを調べたところ、リーリン分解活性を持つ画分にADAMTS-4を確認することができなかった。また、大脳皮質由来神経細胞培養上清中に存在するプロテアーゼとADAMTS-4を比べると、ヘパリンへの親和性やリーリン分解能が異なることも分かった。従って、ADAMTS-4は大脳皮質神経細胞培養上清中のリーリンを分解する主要なプロテアーゼではないと考えられる。カイニン酸投与によるてんかん発作時にADAMTS-4のmRNAが大脳皮質で増加することから、てんかん発作時に、ADAMTS-4がリーリン分解に関与する可能性が考えられる。

2. 活性型リーリン特異的抗体の樹立

アルツハイマー病患者の脳脊髄液では、リ

ーリンの分解断片が増加する知見が報告されている。リーリンの分解を迅速、簡便に測定できれば、アルツハイマー病の早期診断法になる可能性がある。そこで、分解を受けていない (すなわち、活性型) リーリンのみを認識する抗体の樹立を試みた。リーリンの分解部位をアミノ酸レベルで決定し、この知見をもとに、非分解型リーリンを認識するモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、活性型リーリンのみを特異的に認識するモノクローナル抗体の樹立に成功した (特願2011-179161)。今後、この抗体を利用することで、迅速なリーリン活性の測定が可能になると期待される。

3. リーリンの新規分解機構、及び生理的意義の解明

CTR配列内に点変異を導入したところ、3455番目のアルギニンをアラニンに置換したリーリン変異体は、分解を受けないことを見いだした。このことから、3455番目のアルギニンと3456番目のセリンの間で、特異的分解が起ることが示唆される。

また、完全長CTRを持つリーリンは、神経細胞の成長円錐を崩壊する活性を持つことが分かった。このことは、CTR siteにおけるリーリン分解は、神経回路形成に重要な役割を担うことを示唆する。さらに、完全長CTRに結合する候補分子 (既知のリーリン受容体ではない膜蛋白質) を見だし、この結合は、完全長CTRを特異的に認識するモノクローナル抗体の添加により、阻害できることも分かった。今後、この抗体を用いることで、リーリン新規分解の生体内における意義が明らかになることが期待される。

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)

- ① Kidani Y, Ohshima K, Sakai H, Kohno T, Baba A and Hattori M. Differential localization of sphingomyelin synthase isoforms in neurons regulates sphingomyelin cluster formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 1014-1017 (2012)
- ② Yasui N, Kitago Y, Beppu A, Kohno T, Morishita S, Gomi H, Nagae M, Hattori M and Takagi J. Functional importance of covalent homodimer of reelin protein linked via

its central region.

J. Biol. Chem. 286, 35247-35256 (2011)

- ③ Kohno T, and Hattori M.
Re-evaluation of protease activity of Reelin.
Biol. Pharm. Bull. 33, 1047-1049 (2010).

- ④ 河野 孝夫、服部 光治
細胞外シグナル分子リーリンの分解機構と生理的意義
生化学, 82, 963-71 (2010)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 河野 孝夫、土屋 綾香、服部 光治
脳形成に必須な分泌蛋白質リーリンの、新規分解機構とその生理的意義
日本薬学会 第 132 年会
平成 24 年 3 月 29 日

- ② 森下 駿介、久永 有紗、河野 孝夫、服部 光治
脳形成に必須な分泌タンパク質リーリンの特異的切断への ADAMTS の関与
日本薬学会 第 132 年会
平成 24 年 3 月 29 日

- ③ Kidani Y, Koie M, Hisanaga A, Kohno T and Hattori M.
Mechanism of specific proteolytic cleavage of Reelin
Neuroscience2011
平成 23 年 11 月 16 日

- ④ Kohno T, Tsuchiya A, Matsumaru S, Takayanagi M and Hattori M.
Proteolytic cleavage of Reelin within its C-terminal region regulates its ability to induce growth cone collapse
第 34 回 日本神経科学大会
平成 23 年 9 月 16 日

- ⑤ 河野 孝夫、久永 有紗、鈴木 健太、鯉江 真利、服部 光治
脳形成に必須な巨大分泌蛋白質リーリンの特異的分解を担うプロテアーゼに関する解析
第 16 回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会
平成 23 年 8 月 26 日

- ⑥ Suzuki K, Kohno S, Koie M, Kohno T

and Hattori M
Mechanism of specific proteolytic cleavage of Reelin
BMB2010
平成 22 年 12 月 7 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗体とその利用
発明者: 服部 光治、河野 孝夫、鯉江 真利、久永 有紗
権利者: 名古屋市立大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-179161
出願年月日: 2011 年 8 月 18 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/bsk/indexj1.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
河野 孝夫 (TAKAO KOHNO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 70581742

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし