

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24500439
 研究課題名(和文) 神経活動依存的なニューロブシン - Neuregulin - 1シグナリングの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of activity-dependent neuropsin-neuregulin-1 signaling

研究代表者
 田村 英紀 (TAMURA, HIDEKI)
 星薬科大学・付置研究所・講師

研究者番号：80437516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：パルブアルブミン陽性(PV)細胞は、認知機能に重要であるがその活動制御メカニズムは不明である。ニューロブシンは統合失調症脆弱因子Neuregulin-1 (NRG1) を切断し、PV 細胞上のErbB4 のリン酸化を誘導する。てんかん重積状態依存的にニューロブシンが活性化し、これと同期してNRG1-ErbB4 シグナル活性の上昇およびErbB4 陽性のPV 細胞の活動の上昇が認められた。ニューロブシン遺伝子欠損マウスでは、これらのシグナルが障害されており、PV 細胞の活動が減弱し興奮性細胞の過活動が観察された。またニューロブシン-NRG1 シグナルが、ガンマ波の制御に関わることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Parvalbumin (PV) interneurons are essential for cognitive processes in the brain, but the molecular mechanisms mediating activity-dependent regulation of PV interneurons remain unclear. Neuropsin cleaves directly mature neuregulin 1 (NRG1), releasing the ligand moiety from the matrix and enabling it to trigger the phosphorylation of ErbB4. We show in mice that generation of epileptic seizure led to transiently elevated neuropsin activity, which accompany with an increased activities of NRG1-ErbB4 signaling and ErbB4-expressed PV interneurons. Neuropsin-knockout mice exhibited impaired signaling through mature NRG1 after seizure, reduced ErbB4-expressing PV interneuron activity, but increased excitatory pyramidal neuron activity. Kainic acid-induced gamma oscillations showed reduced power, reversed by the NRG1 ligand moiety, in hippocampus of neuropsin-knockout mice. Our results show that neuropsin regulates PV interneurons through NRG1-ErbB4 signaling during network activity.

研究分野：神経科学

キーワード：プロテオリシス パルブアルブミン 神経可塑性 セリンプロテアーゼ 海馬 抑制性伝達 てんかん
 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

抑制性入力が制御する神経ネットワークの興奮/抑制バランスは認知機能の根底となるメカニズムである。特に、抑制性ニューロンのパルブアルブミン陽性細胞 (PV 細胞) は、ネットワーク活動のバランス制御や神経活動の同期発火などに重要な役割を果たしている (Klausberger and Somogyi, 2008)。PV 細胞の機能低下は、興奮/抑制バランスの破綻による異常興奮を引き起こし、これがてんかんや自閉症、統合失調症などにおける認知機能障害の要因の一つと考えられている (Lewis et al., *Nat Rev Neurosci.*, 2005)。それによって、PV 細胞シグナルを適切に調節することが認知機能の発現や制御に重要であるが、神経活動依存的な PV 細胞の活動制御メカニズムはよくわかっていない。

ニューロプシンは海馬や扁桃体に特異的に局在し、神経活動依存的に活性化することで認知機能に関与するといわれている細胞外セリンプロテアーゼである (Shiosaka and Ishikawa, *J Chem Neuroanat.*, 2011)。最近、我々は活性型ニューロプシンが統合失調症脆弱因子 Neuregulin-1 (NRG1) の細胞外ドメインを切断することを見出した。興味深いことに NRG1 の受容体である ErbB4 は PV 細胞特異的に発現している (Vullhorst et al., *J Neurosci.*, 2009)。それによって本研究ではニューロプシンが NRG1 を切断することによって引き起こされる後続のメカニズムを同定し、このようなシグナルが PV 細胞が関与する生理機能に与える影響を明らかにする。

2. 研究の目的

ニューロプシン-NRG1 シグナルによる神経活動依存的な PV 細胞の活動制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

カイニン酸 (KA) による側頭葉てんかんモデルを用いて、神経活動依存的なニューロプシン-NRG1 限定機構を同定し、このシグナルが PV 細胞の活動にどのような影響を与えるかニューロプシンノックアウト (KO) マウスを用いて調べた。PV 細胞の活動は神経活動マーカーである cFos 蛋白質の発現によって評価した。また PV 細胞が中心的な役割を果たしているガンマ波についても検討した。

4. 研究成果

細胞外部位にヘパリン結合ドメインとリガンドドメインからなる NRG1 は膜近傍で切断されることで成熟型 (mature NRG1) となる。ニューロプシンは mature NRG1 のヘパリン結合ドメインとリガンドドメインの

間で切断されることが質量分析によってわかった。そこで mature NRG1 の C 末端部位に Fc タグを付加した組換え体を作製し細胞に添加後、その局在を免疫細胞染色法によって調べた。その結果、mature NRG1 が細胞周囲に局在していることがわかった。この陽性反応はヘパリン結合ドメインを欠損させた変異体 (NRG1₁₇₇₋₂₄₆) やヘパリンの共投与では観察されなかったことから mature NRG1 は細胞周囲のマトリックス蛋白質などに結合していると考えられる。またニューロプシン添加によって陽性反応が低下したことから、ニューロプシンによるプロテオリシスがリガンド部位の遊離に寄与していることがわかった。

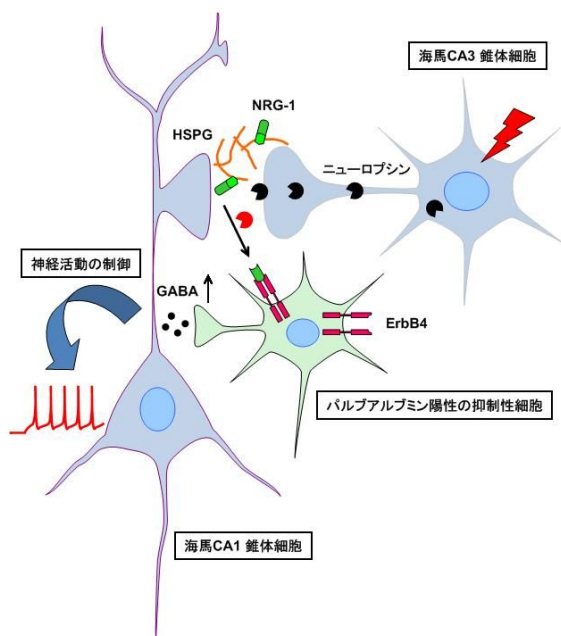
次に、ニューロプシンが mature NRG1 を切断することで生じた切断フラグメント (processed NRG-1:pNRG-1) の標的分子を明らかにするために、ビオチン標識した pNRG-1 ペプチドを麻酔下マウス海馬に投与し、その局在を調べた。その結果、ビオチン陽性反応は、PV 細胞に発現している ErbB4 受容体の陽性反応と共局在した。興味深いことに、ビオチン陽性を示した PV 細胞で、細胞内蛋白質のチロシン残基のリン酸化が確認された。このことは、pNRG-1 ペプチドが、ErbB4 受容体を介して、抑制性細胞の細胞内シグナル伝達の活性化を誘導することを示している。

ニューロプシン-NRG1 シグナルの生体内での神経活動依存的な働きを明らかにするために、KA によるてんかんモデルを用いた。マウス腹腔内への KA 投与は強直間代発作に伴う海馬の神経活動の増大を引き起こした。この神経発火は KA 投与 4 時間後には減衰しはじめたが、このタイムポイントでニューロプシンの活性増加および NRG1 mRNA の発現上昇、ErbB4 の自己リン酸化の亢進などが認められた。重要なこととして、ニューロプシン KO マウスでは、KA 投与による NRG1-ErbB4 シグナルが障害されていた。そこでこのモデルを用いて、ニューロプシン KO マウスの海馬における PV 細胞の活性を cFos の発現レベルで評価した。KA 投与は、興奮性の活動に引き続き PV 細胞が活性化することが知られている (Peng and Houser, *J Neurosci.*, 2005)。この知見と一致して KA 投与 1 時間後では海馬の興奮性の錐体細胞において cFos の顕著な免疫陽性反応が認められたが、4 時間後ではこの陽性反応は減弱し、対して PV 細胞上で強い cFos の発現が認められた。このように野生型では PV 細胞での cFos の発現に連動し興奮性細胞の活性が抑制されたが、ニューロプシン KO マウスでは PV 細胞での cFos 陽性反応が弱く、周囲の興奮性細胞の過活動が観察された。この結果と一致し、ニューロプシン KO マウスでは抑制性シナプス伝達が有意に減弱していた。この抑制性伝達の障害は NRG1₁₇₇₋₂₄₆ の

投与によってレスキューされた。

また PV 細胞は、認知機能に重要なガンマ波の形成に必要な且つ十分であることが知られているので (Cardin et al., *Nature*, 2009; Sohal et al., *Nature*, 2009)、ニューロプシンがガンマ波を修飾するかどうかを検討した。海馬における局所フィールド電位測定によって、ニューロプシン KO マウスでは野生型に比べて有意に海馬のガンマ強度が減少していることが明らかになった。NRG1₁₇₇₋₂₄₆ の脳室内投与は、ニューロプシン KO マウスのガンマ強度を野生型レベルにまで回復させた。

以上の結果から我々は以下のようなモデルを提案する。



興奮性の神経活動依存的に活性化したニューロプシン (赤) は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG; 黄色線) に結合した mature NRG-1 (緑) を切断する。それにより NRG-1 のリガンド部位が遊離し、それが PV 細胞に局在している ErbB4 (ピンク棒) に結合する。これにより下流シグナル経路が駆動し、PV 細胞の活動および抑制性シナプス伝達を修飾し、興奮性細胞の神経活動を制御する。そのため、ニューロプシン/NRG-1 システムの破綻は、抑制性伝達の障害を引き起こし、神経ネットワークの興奮/抑制バランスが破綻し錐体細胞の同期発火 (ガンマ波) が乱れる。それにより、統合失調症で特に問題となる作業記憶の障害を引き起こすと考えられる。

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)

Tamura H, Ishikawa Y and Shiosaka S.

(2013) Does extracellular proteolysis control mammalian cognition? *Rev Neurosci.*, 24, 365-374. (査読有)

Nagura H, Ishikawa Y, Kobayashi K, Takao K, Tanaka T, Nishikawa K, Tamura H, Shiosaka S, Suzuki H, Miyakawa T, Fujiyoshi Y and Doi T. (2012) Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice. *Mol Brain*, 5, 1-19. (査読有)

Tamura H, Kawata M, Hamaguchi S, Ishikawa Y and Shiosaka S. (2012) Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *J Neurosci.*, 32, 12657-12672. (査読有)

Kobayashi T, Motoyama M, Masuda H, Ohta Y, Haruta M, Noda T, Sasagawa K, Tokuda T, Tamura H, Ishikawa Y, Shiosaka S and Ohta J. (2012) Novel implantable imaging system for enabling simultaneous multipoint analysis for fluorescence potentiometry in the visual cortex. *Biosens Bioelectron.*, 38, 321-330. (査読有)

[学会発表](計7件)

田村 英紀、河田 美穂、森川 勝太、塩坂 貞夫「ニューロプシンによる統合失調症脆弱因子 Neuregulin-1 のプロセッシングを介した抑制性ネットワークの特異的制御機構」第 57 回日本神経化学学会大会(招待講演) 奈良県、2014/10/01.

森川 勝太、河田 美穂、田村 英紀、塩坂 貞夫「ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用に基づく Neuregulin-1 の機能解析」第 57 回日本神経化学学会大会、奈良県、2014/10/01.

河田 美穂、田村 英紀、塩坂 貞夫「ニューロプシンによる抑制性神経ネットワークの特異的制御機構」第 57 回日本神経化学学会大会(優秀発表賞受賞) 奈良県、2014/09/30.

田村 英紀「学習における抑制性神経ネットワークの特異的制御機構 - ニューロプシン-Neuregulin-1 システム -」第 58 回統合失調症勉強会(招待講演) 大阪府、2014/06/13.

谷川 美佑希、依平田 佳江、田村 英紀、塩坂 貞夫「プロテアーゼ基質の新規探索法」第 87 回日本薬理学会年会、宮城県仙台市、2014/03/19.

鈴木 春満、田村 英紀、塩坂 貞夫「ニューロプシン・ニューレグリン 1 による海馬パルプアルブミン抑制性ニューロンの制御 – 解剖学的検討」日本解剖学会第 89 回近畿支部学術集会、奈良県生駒市、2013/11/30.

Kawata M, Tamura H、Shiosaka S. Neuropsin-Neuregulin-1-signaling regulates GABAergic control of neural plasticity. 第 55 回日本神経化学会大会、兵庫県神戸市、2012/10/01.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田村 英紀 (TAMURA HIDEKI)

星薬科大学・先端生命科学研究センター・
講師

研究者番号：80437516