

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860043

研究課題名(和文) 脳の形成と機能を司る分泌蛋白質リーリンの、機能制御機構の解明とその創薬への応用

研究課題名(英文) The functional regulation of Reelin and its application to drug discovery

研究代表者

河野 孝夫 (Kohno, Takao)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70581742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リーリンは脳形成と脳機能発現に必須な蛋白質であり、その機能低下は精神神経疾患の発症に関与する。本研究では、リーリンがそのC末端領域内で分解を受けることを新たに見出し、この分解によるリーリンの機能制御は、上層神経細胞の正常な配置と樹状突起発達に必要であることが明らかになった。また、生体内でのリーリンのN末側での分解抑制は、リーリンの機能を増強すること、このリーリン機能増強は胎生期の脳形成には影響を与えないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Reelin is glycoprotein that is essential for normal brain formation and function. The hypofunction of Reelin is related to neuropsychiatric disorders.

We found that Reelin is cleaved within its C-terminal region and this cleavage regulates position and dendrite development of upper-layer neurons. Furthermore, we found the upregulation of Reelin activity by inhibition of Reelin cleavage does not affect the neuronal layer formation in embryonic stages.

研究分野：分子神経生物

キーワード：脳 リーリン プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

リーリンは、脳の層構造形成を司る巨大分泌蛋白質であり、神経細胞膜上に存在するリーリン受容体を介して下流シグナルを伝達する。この下流シグナル経路の活性化は、神経細胞の配置や高次機能発現に必須である。

近年、リーリンの発現量低下が、精神神経疾患の発症に関与することが多くの論文で報告された。これらの知見は、リーリンの機能低下が、精神神経疾患の発症や、病態の増悪化に関与することを意味し、これを改善することができれば精神神経疾患の治療にも繋がることを示唆する。しかし、リーリンが分泌された後の機能調節機構は不明であり、機能を増強するアイデアも存在しなかった。

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、種を超えて高度に保存されるC末端領域(CTR)からなり、その分子内でプロテアーゼによる特異的な分解を受ける(図1)。

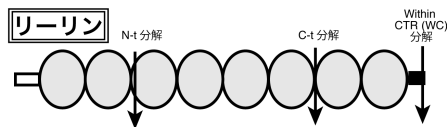


図.1 リーリンの構造と分解部位

これまでに申請者は、リーリンの生理活性が、N-t 分解により制御されることを見出し、この分解を担うプロテアーゼの候補として ADAMTS-3 を同定した。また、リーリンは CTR 内で特異的な分解 (within CTR (WC) 分解) を受けることを見出した。

2. 研究の目的

リーリンのプロテオリシスによる機能制御機構と、その生理的意義の解明を行い。脳構造形成期に、リーリンの機能を増強させた際の効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

リーリン分解機構と、その生理的意義の解明

1) ADAMTS-3 ノックアウト(KO)マウスを用いた生化学的、組織学解析により、リーリン N-t 分解における ADAMTS-3 の寄与と、大脳皮質形成におけるリーリン分解の意義を明らかにする。

2) WC 分解の生理的意義を明らかにするために、CTR 欠損 (C-KI) マウスの大脳皮質構造を解析し、リーリン過剰発現系を用いて大脳皮質形成における WC 分解の意義を調べる。また、リーリンとアルカリフォスファターゼとの融合タンパク質発現ベクターを各種作製し、リーリンと神経細胞との結合性を調べる。

脳構造形成におけるリーリン機能増強効果の解明

1) リーリン発現ウイルスベクターを作製し、これを用いることで、生体内でのリーリン機能増強効果を評価する系を樹立する。

2) C-KI マウスの大脳皮質形成異常が、リーリンの分解抑制による機能増強により回復するか否かを明らかにするために、ADAMTS-3KO マウスと C-KI マウスを交配し、大脳皮質構造を組織学的解析により調べる。

4. 研究成果

リーリン分解機構と、その生理的意義の解明

1) 脳におけるリーリン分解に対する ADAMTS-3 の寄与を明らかにするために、ADAMTS-3KO におけるリーリン分解を調べた。野生型マウスに比べ、ADAMTS-3KO マウスの大脳皮質では、有意にリーリンの N-t 分解が減少した。さらに、ADAMTS-3KO マウスでは、リーリンの下流シグナル分子である Dab1 の量が減少することもわかった。Dab1 はリーリンシグナルによりリン酸化を受け、リン酸化を受けた Dab1 は速やかに分解されることが知られている。従って、Dab1 の減少はリン酸化を受けた Dab1 が多いことを示す。以上から、胎生期の大脳皮質において ADAMTS-3 はリーリン機能を負に制御する酵素であること、また ADAMTS-3 の阻害はリーリン機能を増強させることが明らかになった。さらに各種層マーカーを用いた組織免疫染色により、ADAMTS-3KO の大脳皮質は、正常に形成されることがわかった。このことは、リーリン N-t 分解抑制によるリーリン機能増強が、胎生期の神経細胞移動には影響を与えないことを示唆する。現在、成体脳でのリーリン分解における ADAMTS-3 の寄与を明らかにすべく研究を進めており、これが明確になれば、精神神経疾患の新規治療標的として ADAMTS-3 が注目されることが期待される。

2) リーリン WC 分解の生理的意義を明らかにするために、C-KI マウスの大脳皮質構造を調べた。下層に位置する神経細胞の配置は正常であったが、上層の神経細胞は通常より表層側に配置し、樹状突起の発達が悪いことがわかった。さらに、リーリン過剰発現系を用いた検討により、上層神経細胞の正常な配置に、WC 分解を受けていない(すなわち完全長 CTR を持つ)リーリンが必要であることが明らかになった。また、WC 分解を受けていないリーリンは、WC 分解を受けたものに比べ強く神経細胞に結合することがわかった。以上から、リーリン CTR は上層の神経細胞の配置と樹状突起形成に必要であり、WC 分解によりこの機構が制御されることが示唆された。(Kohno et al., J. Neurosci., 2015)。現在、WC 分解によりリーリンとの結合が制御される分子の候補を得ており、今後大脳皮質形成におけるこの分子の重要性を明らかにする予定である。

3) リーリン N-t 分解の研究の過程で、C-t 部位でのリーリン分解活性は、大脳皮質神経細胞の培養上清にはほとんど含まれないが、小

脳顆粒細胞の培養上清には、N-t 分解活性に加え、C-t 分解活性が含まれることを見つけた。そこで、C-t 分解断片を大量に精製し、エドマン分解により、C-t 分解部位をアミノ酸レベルで同定することに成功した。C-t 分解部位周辺の配列から、meprin と meprin が、リーリン分解プロテアーゼとして候補に挙がり、これらはリーリン分解活性を持つことがわかった。しかし、meprin KO マウスの大脳や小脳では、リーリン分解が抑制されなかったため、生体内での meprin のリーリン分解への寄与は低いと思われる (Sato et al., J. Biochem., 2016)。

脳構造形成におけるリーリン機能増強効果の解明

1) 従来用いられているウイルスベクターは長くても 8kbp 程度の外来 DNA を挿入するのが限界であった。リーリンは、全長 10kbp を超える巨大分子であり、従来法ではウイルスベクターを作製することができなかった。そこで、20kbp を超える DNA を挿入できるガットレスアデノウイルスベクターを利用し、リーリン発現アデノウイルスベクターを作製した (アデノウイルスの作製は、東京大学の斎藤教授にご協力いただいた)。生後マウス大脳皮質にリーリン発現アデノウイルスベクターを注入したところ、リーリンの発現を確認することができた。しかし、その発現は非常に弱かったため、脳層構造形成や樹状突起発達に効果があるかどうかは分からなかった。今後、ウイルスベクターの力価を上げ、感染時期と部位を検討することにより、ウイルスベクターを用いたリーリンの機能増強評価系を樹立する予定である。

2) ADAMTS-3 を欠損させると C-KI マウスの大脳皮質脳でもリーリンの分解が抑制され、リーリンの Dab1 活性能が増強されることがわかった。しかし、このマウスの大脳皮質構造を組織学的解析により解析したところ、C-KI マウスで見られる表現系 (上層神経細胞の配置異常) は回復しなかった。このことから、大脳皮質上層神経細胞が正常に配置されるためには、リーリン下流シグナルが単に増強されるだけでは不十分であり、リーリン CTR を介したシグナルが必要であることが示唆された。

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 5 件)

1 Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
CUB and Sushi multiple domains 3 regulates dendrite development.
Neurosci. Res., in press 査読有

doi: 10.1016/j.neures.2016.03.003.

2 河野孝夫、服部光治
「巨大分泌タンパク質リーリンによる神経細胞移動の制御機構」
生化学 88, 1, 105-113 (2016) 査読無

3 Yoshitaka Sato, Daichi Kobayashi, Takao Kohno, Yujiro Kidani, Johannes Prox, Christoph Becker-Pauly, Mitsuharu Hattori.
Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprin metalloproteases to the cleavage.
J. Biochem., 159, 305-12. (2016) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvv102.

4 Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori.
Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis.
J. Neurosci., 35, 4776-87. (2015)
査読有
doi:10.1523/JNEUROSCI.4119-14.2015.

5 Aya Onoue, Mari Takeuchi, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori.
Aberrant fragment of Dab1 protein is present in yotari mouse.
Neurosci. Res., 88:23-7. (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.neures.2014.08.001.

[学会発表](計 30 件)

1 末永舞、柳生隼太、河野孝夫、服部光治
脳形成に必須な巨大分泌タンパク質リーリンの新規作用の解明
日本薬学会第 136 年会
2016 年 3 月 26 日-29 日
パシフィコ横浜(神奈川)

2 山影祐子、河野孝夫、服部光治
アミロイド ペプチドが分泌タンパク質リーリンに及ぼす影響の解明
日本薬学会第 136 年会
2016 年 3 月 26 日-29 日
パシフィコ横浜(神奈川)

3 Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori.
C-terminal region of Reelin is required for development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its functions are regulated by specific proteolysis.

大脳新皮質構築終了国際シンポジウム
「Neocortical Organization III」2016年2月11日-12日東京大学小柴ホール(東京都)

4 奥村恭子、鯉江真利、河野孝夫、服部光治
リーリンの N-t site 切断はシグナルの持続性と範囲を制御している
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会
2015年12月1日-4日
神戸ポートアイランド(兵庫)

5 加藤路尚、荻野ひまり、河野孝夫、服部光治
リーリン特異的分解酵素 ADAMTS-3 の欠損は、リーリン C 末端領域欠損マウスの脳構造異常を改善するか？
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会
2015年12月1日-4日
神戸ポートアイランド(兵庫)

6 柳生隼太、河野孝夫、服部光治
脳形成に必須な分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した機能制御機構の解明
日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部
2015年11月1日
金城学院大学(愛知)

7 Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, Mitsuharu Hattori.
Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis.
Society for Neuroscience, Neuroscience 2015 meeting 2015年10月17-21日
Chicago (U.S.A.)

8 Himari Ogino, Arisa Hisanaga, Yuta Kondo, Hitomi Tsuiji, Takao Kohno, and Mitsuharu Hattori
ADAMTS-3 is the major protease that inactivates Reelin in brain.
Society for Neuroscience, Neuroscience 2015 meeting 2015年10月17-21日
Chicago (U.S.A.)

9 Kaori Sakai, Hirotaka Shoji, Takao Kohno, Tsuyoshi Miyakawa, and Mitsuharu Hattori
The significance of the highly basic C-terminal region of Reelin for behavior.
Society for Neuroscience, Neuroscience 2015 meeting 2015年10月17-21日
Chicago (U.S.A.)

10 荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、築地仁美、河野孝夫、服部光治
生体におけるリーリン切断酵素の同定とその生理的意義の解明
第14回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム
2015年9月11日-12日
千葉大学(千葉)

11 酒井かおり、昌子浩孝、河野孝夫、宮川剛、服部光治
リーリン機能低下が脳高次機能に及ぼす影響の解析
第14回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム
2015年9月11日-12日
千葉大学(千葉)

12 Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
Effect of CSMD3, a Candidate Gene of Neuropsychiatric Disorders, on Neuronal Morphology.
第38回日本神経科学大会
2015年7月28日-7月31日
神戸(兵庫)

13 Kaori Sakai, Hirotaka Shoji, Takao Kohno, Tsuyoshi Miyakawa, and Mitsuharu Hattori
The significance of highly basic C-terminal region of Reelin for behavior.
第38回日本神経科学大会
2015年7月28日-7月31日
神戸(兵庫)

14 Himari Ogino, Arisa Hisanaga, Yuta Kondo, Hitomi Tsuiji, Takao Kohno, and Mitsuharu Hattori
ADAMTS-3 is the major protease that inactivates Reelin in brain.
第38回日本神経科学大会
2015年7月28日-7月31日
神戸(兵庫)

15 別府茉莉子、中村晃太、河野孝夫、服部光治
リーリン C 末端領域欠損マウスにおけるプルキンエ細胞の異常配置に関する解析
第61回日本薬学会東海支部総会・大会
2015年7月4日
名古屋市立大学(愛知)

16 牧野誠、山田梨絵、河野孝夫、服部光治
難読症関連遺伝子が神経形態に与える影響の解明
第61回日本薬学会東海支部総会・大会
2015年7月4日
名古屋市立大学(愛知)

17 水上智晴、河野孝夫、服部光治

精神疾患関連遺伝子 CSMD3 の神経細胞における機能の解明

第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会

2015 年 7 月 4 日

名古屋市立大学 (愛知)

18 亀井隆奈、本郷彩、久永有紗、築地仁美、河野孝夫、服部光治

リーリンの特異的切断に関するプロテアーゼの解析

第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会

2015 年 7 月 4 日

名古屋市立大学 (愛知)

19 奥村恭子、鯉江真利、河野孝夫、服部光治

リーリンの特異的切断の生理的意義の解明

第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会

2015 年 7 月 4 日

名古屋市立大学 (愛知)

20 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、土屋綾香、村上達郎、阪野英幸、仲嶋一範、服部光治

巨大分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した大脳皮質形成機構

第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会

2015 年 7 月 4 日

名古屋市立大学 (愛知)

21 奥村恭子、鯉江真利、久永有紗、荻野ひまり、河野孝夫、服部光治

リーリンの特異的切断による不活化の分子機構と生理的意義の解明

日本薬学会 第 135 年会

2015 年 3 月 25 日-28 日

神戸学院大学 (兵庫)

22 佐藤嘉高、小林大地、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 C-t site 切断プロテアーゼに関する解析
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2014

2014 年 11 月 9 日

静岡県立大学 (静岡)

23 Kyoko Okumura, Arisa Hisanaga, Mari Koie, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori

Specific proteolytic cleavage of Reelin regulates duration and range of its Signaling.

Society for Neuroscience, Neuroscience 2014 meeting

2014 年 11 月 15 日-19 日

Washington D.C. (U.S.A.)

24 Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno,

Kazunori Nakajima and Mitsuharu Hattori.
The novel function of Reelin in the dendrite development and layer formation in the postnatal brain.

Society for Neuroscience, Neuroscience 2014 meeting

2014 年 11 月 15 日-19 日

Washington D.C. (U.S.A.)

25 Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori

Effect of CSMD3, a candidate gene of neuropsychiatric disorders, on neuronal morphology

Society for Neuroscience, Neuroscience 2014 meeting

2014 年 11 月 15 日-19 日

Washington D.C. (U.S.A.)

26 高嶋悠、牧野誠、山田梨絵、河野孝夫、服部光治

難読症関連遺伝子産物 mKIAA0319 による神経細胞形態制御の分子機構の解明

第 87 回日本生化学会大会

2014 年 10 月 15 日-18 日

国立京都国際会館 (京都)

27 荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、奥村恭子、深田正紀、河野孝夫、服部光治

脳の形成と機能に重要な分泌タンパク質リーリンの不活化を担うプロテアーゼ ADAMTS-3 に関する研究

第 87 回日本生化学会大会

2014 年 10 月 15 日-18 日

国立京都国際会館 (京都)

28 Kaori Sakai, Takao Kohno, Hayata Yagyu, and Mitsuharu Hattori

海馬形成におけるリーリン C 末端領域の重要性

第 37 回 日本神経科学学会

2014 年 9 月 11 日-13 日

パシフィコ横浜 (神奈川)

29 Kyoko Okumura, Mari Koie, Arisa Hisanaga, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori

リーリンの特異的分解はシグナルの持続性と範囲を制御している

第 37 回 日本神経科学学会

2014 年 9 月 11 日-13 日

パシフィコ横浜 (神奈川)

30 水上智晴、河野孝夫、服部光治

精神疾患関連タンパク質 CSMD3 の生理機能の解明

第 60 回 日本薬学会東海支部大会

2014 年 7 月 5 日

鈴鹿医療科学大学白子キャンパス (三重)

〔図書〕(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 (KOHNO, Takao)

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