

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790081

研究課題名(和文) 精神神経疾患の診断・治療を目指した、巨大分泌蛋白質リーリンの特異的分解機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of Reelin proteolysis

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：脳の形成に必須な役割を担う分泌タンパク質リーリンは、プロテアーゼにより2カ所(N-t、及びC-t site)で特異的な分解を受ける。しかし、リーリン分解のメカニズムや生理的意義はほとんど分かっていない。本研究では、N-t分解部位をアミノ酸レベルで決定し、N-t分解はリーリンの生理活性持続時間や、その効果範囲を制御することを明らかにした。また、神経細胞培養上清からリーリン分解酵素を同定し、このプロテアーゼは、胎生期大脳皮質においてリーリン分解を担う主要なプロテアーゼであることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Reelin is a secreted glycoprotein that plays essential roles in the brain formation. Reelin is specifically cleaved at two sites (N-t and C-t site). However, the mechanism and the physiological role of Reelin cleavage is largely unknown. In this study, we determined the N-t cleavage site, and found that N-t cleavage of Reelin plays critical roles in regulating the duration and range of Reelin functions. Furthermore, we identified the protease from supernatant of cultured neurons, and found that this protease is the major protease in charge of Reelin cleavage in embryonic cerebral cortex.

研究分野：分子神経生物

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リーリン プロテアーゼ プロテオリシス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質は整然とした6層構造からなり、その正常な形成は高次機能発現に必須である。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

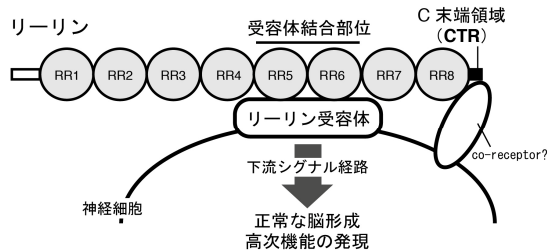


図1 リーリンの構造と下流シグナル活性機構

ルを伝達する(図1)。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(記憶やシナプス可塑性)に必須である。

近年、リーリンの遺伝子のメチル化、リーリンの発現量減少や異常分解が、アルツハイマー病や統合失調症などの精神神経疾患の発症に関与することが相次いで報告されている。これらのことは、リーリンの発現量や機能の低下が、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ている。しかしリーリンの機能調節メカニズムは今までほとんど分かっていない。

リーリンは8回の繰り返し構造(リーリンリピート:RR)を持ち、細胞外や細胞内(エンドソーム内)で、プロテアーゼにより2カ所(N-t site 及び C-t site)で分解(プロテオリシス)を受ける(図2)。また、N-t siteに

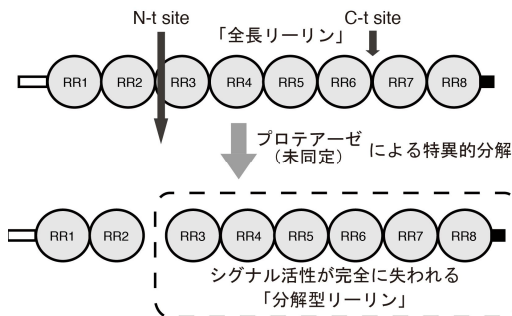


図2 プロテアーゼによるリーリン分解

おけるリーリン分解は、アルツハイマー病患者において亢進することが報告されている。そこで、申請者はリーリンのプロテオリシスがリーリンの機能を調節するのではないかと仮説を立て、リーリン分解の生理的意義の解明を試み、以下の知見を得た。1. プロテオリシスによりリーリンのシグナル活性が完全に失われる(図2)。2. 神経細胞培養上清中から、リーリン分解を担う候補プロテアーゼを同定した。3. リーリンの分解部位をアミノ酸レベルで同定し、分解を受けていない(非分解型)リーリン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。

2. 研究の目的

リーリン分解機構、及び生理的意義を解明し、アルツハイマー病などの精神神経疾患の新規診断法や治療薬への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1)リーリン分解機構及び生理的意義の解明

(1)-1 培養神経細胞に、非分解型もしくは野生型リーリン(リーリン WT)を添加し、下流シグナル活性化能、及びエンドサイトーシス後のリーリン分解抵抗性を調べる。また、非分解型リーリン特異的抗体を用いた組織免疫染色により、脳内でのリーリン分解を可視化する。

(1)-2 候補プロテアーゼが、リーリン分解活性を持つか否かを調べる。また、このプロテアーゼの脳における発現パターンを明らかにする。

(2)リーリン活性測定系の構築

非分解型リーリンのみを認識する抗体を利用し、リーリン活性を定量的、迅速かつ簡便に測定する実験系を構築する。

4. 研究成果

(1)-1 エンドソーム内でのリーリン分解の意義の解明

これまでの研究により神経細胞上清から部分精製したプロテアーゼは、リーリンを1244番目のProと1245番目のAlaの間(RR3内)で特異的に分解することが分かった。そこで、1244番目のPro残基に点変異を導入し、Asp残基に変えたリーリン(リーリンPD)を作製した。リーリンPDは、部分精製したプロテアーゼに抵抗性を持ちN-t siteで分解を受けないことが分かった(図3)。

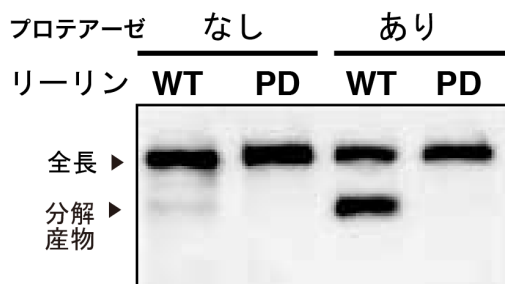


図3 リーリンPDは、プロテアーゼ抵抗性を持つ

N-t siteでのリーリン分解は、エンドソーム内でも起り、リーリンのN末断片はリサイクリングエンドソームを経て細胞外へ再放出される(Hibi and Hattori., *FEBS lett.*, 2009)。リーリンPDを神経細胞に添加し、エンドソーム中での分解に抵抗性を持つか否かを調べた。その結果、細胞内に取り込まれたリーリンPDは、1) エンドソーム内でも分解を受けないこと、2) リーリンWTに比べて、下流シグナル活性を持ち続けること、3) 細胞外に再放出されるN末断片が著しく

減少することが分かった。

また、リーリンのN末端領域を認識する抗体と、非分解型リーリンを認識する抗体を用いた組織免疫染色により、N末端領域を持つリーリンは、リーリン産生細胞から離れたところにも存在するが、非分解型リーリンはリーリン産生細胞の近傍にのみ存在することが分かった。

以上のことから、エンドソーム内におけるリーリンの分解は、リーリンの生理活性持続時間や、その効果範囲を制御することが示唆された (Koie et al., *J. Biol. Chem.*, 2014)。

(1)-2 リーリン分解プロテアーゼの同定

質量分析法により、部分精製プロテアーゼを含む画分からメタロプロテアーゼの一種である ADAMTS-3 を同定した。リコンビナント ADAMTS-3 がリーリン分解活性を持つか否かを検討したところ、ADAMTS-3 は N-t site でリーリンを分解する活性を持つことが分かった。さらに、神経細胞培養上清から得た部分精製プロテアーゼ含有画分に、ADAMTS-3 が含まれることが分かった。また、ADAMTS-3 の脳における発現を in situ hybridization 法により調べ、胎生期では皮質板に広く発現することが分かった。

生体内での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、Wellcome Trust Sanger Institute より、ADAMTS-3 ノックアウトマウスを分与していただき、胎生期大脳皮質におけるリーリン分解量を調べた。その結果、野生型マウスと比べて ADAMTS-3 ノックアウトマウスでは、リーリンの分解産物量が著しく減少することが分かった。

以上のことから、胎生期大脳皮質において ADAMTS-3 はリーリン分解を担う主要なプロテアーゼであることが強く示唆された。今後、各種神経細胞マーカーや、移動中の神経細胞を GFP で標識することにより、リーリン分解の大脳皮質形成における意義を解明する予定である。

(2) リーリン活性測定系の構築

リーリン活性を定量的、迅速かつ簡便に測定できれば、N-t site 分解に対する阻害剤の探索が効率的に行える。そこで、非分解型リーリンのみを認識する抗体を利用し、リーリン活性測定系の構築を試みた。しかし、抗非分解型リーリン抗体は、精製を行うと抗原を認識しにくくなることが分かり、高濃度かつ高純度の抗体を準備することが難しく、実験系の構築には至らなかった。

N-t site 分解を受けたリーリンのみを認識するモノクローナル抗体の作製にも着手し、有望なクローンをいくつか樹立した。今後の検討により良い抗体が得られれば、リーリン活性測定系の構築が可能になると考えている。

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 2 件)

Koie M, Okumura K, Hisanaga A, Kamei T, Sasaki K, Deng M, Baba A, Kohno T and Hattori M.

“Cleavage within Reelin Repeat 3 Regulates the Duration and Range of the Signaling Activity of Reelin Protein.”

J. Biol. Chem., 289, 12922-12930 (2014) 査読有り

doi: 10.1074/jbc.M113.536326.

Hisanaga A, Morishita S, Suzuki K, Sasaki K, Koie M, Kohno T and Hattori M.

“A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner.”

FEBS Lett., 586, 3349-3353 (2012) 査読有り doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.017.

[学会発表](計 23 件)

Arisa Hisanaga, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori

“The mechanism and physiological significance of proteolytic cleavage of Reelin”

Neuroscience2013:Society for Neuroscience

平成 25 年 11 月 11 日 サンディエゴ

河野孝夫

「精神神経疾患の治療を目指した、リーリンの特異的分解機構の解明」

第 57 回日本薬学会関東支部大会

平成 25 年 10 月 26 日 帝京大学

河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、村上達郎、仲嶋一範、服部光治

「リーリンの新規分解は、生後の神経発達を制御する」

日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜

久永有紗、鯉江真利、奥村恭子、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切断機構の解明」

日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜

奥村恭子、久永有紗、鯉江真利、河野孝夫、服部光治

「リーリンの特異的分解の機構と生理的

意義」
Neuro2013
平成 25 年 6 月 21 日 京都国際会館

河野孝夫
「脳の形成を司る細胞外因子リーリンの
プロテオリシスによる機能制御機構の解
明」
生理研研究会「シナプス恒常性維持の分子
基盤とその破綻」
平成 25 年 6 月 7 日 生理学研究所

河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、
中野良美、村上達郎、仲嶋一範、
服部光治
「大脳皮質上層神経細胞の樹状突起配向
におけるリーリンの新規機能」
第 85 回日本生化学会大会
平成 24 年 12 月 15 日 マリンメッセ福岡

久永有紗、鯉江真利、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
質リーリンの切断機構の解明」
第 35 回日本分子生物学会年会
平成 24 年 12 月 11 日 福岡国際会議場

河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、
村上達郎、中野良美、本間夏美、
仲嶋一範、服部光治
“Novel regulatory mechanism of the
Reelin functions”
第 35 回日本神経科学大会
平成 24 年 9 月 21 日 名古屋国際会議場

久永有紗、森下駿介、鯉江真利、河野孝夫、
服部光治
“Characterization of the protease in
charge of specific cleavage of Reelin”
第 35 回日本神経科学大会
平成 24 年 9 月 20 日 名古屋国際会議場

²¹鯉江真利、久永有紗、佐々木一友、
森下駿介、河野孝夫、服部光治
“The N-t site cleavage of Reelin occurs
after specific residue”
第 35 回日本神経科学大会
平成 24 年 9 月 20 日 名古屋国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：ADAMTS-3 を用いたリーリン分解
発明者：服部光治、河野孝夫、久永有紗、
鯉江真利、鈴木健太
権利者：公立学校法人名古屋市立大学
種類：特許

番号：特願 2012-180354
出願年月日：2012 年 8 月 16 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/index1.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