

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17082007

研究課題名（和文）

巨大分泌蛋白質リーリンによる、脳のレイヤー構造形成制御の分子機構

研究課題名（英文）

Molecular mechanism of brain layer formation regulated by Reelin

研究代表者

服部 光治 (HATTORI MITSU HARU)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60272481

研究成果の概要（和文）：リーリンは脳のレイヤー構造形成に必須の分泌蛋白質であるが、その詳細な機能及び情報伝達機構は不明である。我々は、リーリンのC末端領域が、リーリン受容体とリーリンの間の相互作用を安定化させること、これによりレイヤー構造形成制御に関わることを見出した。また、リーリンを特異的に分解する酵素の同定に成功した。最後に、リーリンがいつ・どの細胞に受容されるのかについて解析し大脳・小脳ともに、移動神経細胞の初期からその機能を発揮していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Reelin is essential for brain layer formation, but its exact function and underlying mechanism are not well understood. We found that the C-terminal region of Reelin plays important roles in the interaction between this protein and neuronal cell membrane. We identified the protease in charge of specific proteolysis of Reelin. We also investigated when and where Reelin is received in the developing brain and found that Reelin acts on pre/early migratory neurons,

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	11,200,000	0	11,200,000
2006年度	16,700,000	0	16,700,000
2007年度	15,000,000	0	15,000,000
2008年度	14,300,000	0	14,300,000
2009年度	13,700,000	0	13,700,000
総計	70,900,000	0	70,900,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経化科学・神経科学一般

キーワード：脳、タンパク質、遺伝子、プロテアーゼ、神経細胞、精神神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脳は美しいレイヤー（層）構造を持っている。この構造は、機能的に類似した神経細胞をグループ化し、ネットワーク形成や情報伝達を効率化するために存在すると

考えられており、事実その形成破綻と高次脳機能障害（統合失調症など）の発症には密接な関連がある。全長3,461アミノ酸残基からなる巨大分泌蛋白質リーリンは、脳のレイヤー形成を最上位で司るとされる分子であり、

その遺伝子変異はマウス・ヒトの両者においてレイヤー形成異常を引き起こす。リーリンは、神経細胞の増殖や分化ではなく、分化を終えた神経細胞が脳表層へ順次移動するステップに必要であることが知られているが、今日までそのシグナル伝達機構の実体はほとんど不明である。その大きな要因の一つは、リーリン分子の細胞外環境におけるふるまい(分解・拡散・他の細胞外分子との相互作用など)が全く判っていないために、脳の発生過程において、いつ・どこに・どのような状態でリーリン分子が機能しているのかを議論できないことである。特に近年、リーリンが分泌後に特異的な分解を受けることや、その受容体が血清リポ蛋白質受容体ファミリーに属することが明らかとなってきたが、それらの意義は全く解っていない。

## 2. 研究の目的

リーリン分子を蛋白生化学的・細胞生物学的に解析することで、脳のレイヤー構造形成におけるリーリンの情報伝達機構を包括的に理解する。

## 3. 研究の方法

(1)リーリンの分泌後分解について、その分子機構及び各断片の拡散や寿命を知る。

(2)細胞外においてリーリンと相互作用する蛋白質及び脂質分子等を探索し、細胞外環境におけるリーリンの挙動を知る。

(3)上記の二点から明らかとなった分子機構の、実際のレイヤー形成における意義を検討する。

## 4. 研究成果

大脳皮質及び小脳にはそれぞれ特徴的なレイヤー(層)構造があり、脳の正常な機能発現に極めて重要な役割をもつ。リーリンはこのレイヤー構造形成に必須の分泌蛋白質である。我々は、リーリンのC末端領域(CTR)が、細胞膜上にあるリーリン受容体とリーリンの間の相互作用を安定化させることを既に見出した。そこで、CTRを特異的に欠損する遺伝子改変マウスを作製し、その生理的意義を検討した結果、CTRは、「強く局在したシグナル」を介して、レイヤー構造形成制御に関わることが示唆された。このとき、標的細胞は少なくとも2種類あることを見いだした。また、CTRに特異的に結合する分子をスクリ

ーニングし、その候補分子を得た。現在、その妥当性の確認を進めている。

分泌されたリーリンによるシグナルのスイッチオフ機構については今までほとんど判っていなかった。我々は、リーリンを特異的に分解する酵素の同定を行い、ほぼこれに成功した。また、今まで知られていなかった新規分解部位をC末端領域内に見いだした。この分解を担うプロテアーゼの一群も同定し、さらに、この分解によってリーリンの拡散が制御されている可能性を見いだした。

最後に、リーリンがいつ・どの細胞に受容されるのかについて解析した。小脳では従来、移動中のプルキンエ細胞によって受容されると考えられてきたが、プルキンエ細胞は移動の極めて初期にリーリンを受容していることが示された。これは、大脳において脳室付近でリーリンが受容されることも良く合致し、リーリンは大脳・小脳ともに、移動神経細胞の初期からその機能を発揮してい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11件)

Kohno, T. and Hattori, M. (2010) Re-evaluation of protease activity of Reelin. **Biol. Pharm. Bull.**, in press.

Kohno, S., Kohno, T., Nakano, Y., Suzuki, K., Ishii, M., Tagami, H., Baba, A., and Hattori, M. (2009) Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 380, 93-97.

Baba, A., Akagi, K., Takayanagi, M., Flanagan, J., Kobayashi, T., and Hattori, M. (2009) Fyn tyrosine kinase regulates the surface expression of GPI-linked ephrin via the modulation of sphingomyelin metabolism. **J. Biol. Chem.** 284, 9206-9214.

Hibi, T. and Hattori, M. (2009) The N-terminal fragment of Reelin is generated after endocytosis and released through the pathway regulated by Rab11. **FEBS Lett.** 583, 1299-1303.

Kohno, T., Nakano, Y., Kitoh, N., Yagi, H., Kato, K., Baba, A., and Hattori, M. (2009) C-terminal region-dependent change of antibody-binding to the eighth Reelin repeat reflects the signaling activity of Reelin. **J. Neurosci. Res.** 87, 3043-3053.

Uchida, T., Baba, A., Pérez-Martínez, F. J., Hibi, T., Miyata, T., Luque, J. M., Nakajima, K., and Hattori, M. (2009) Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/pre-migratory stages. **J. Neurosci.** 29, 10653-10662.

Hibi, T., Mizutani, M., Baba, A., and Hattori, M. (2009) Splicing variations in the ligand binding domain of ApoER2 results in functional differences in the binding properties to Reelin. **Neurosci. Res.** 63, 251-258.

Nogi, T., Sangawa, T., Tabata, S., Nagae, M., Tamura-Kawakami, K., Beppu, A., Hattori, M., Yasui, N., and Takagi, J. (2008) Novel affinity tag system using structurally defined antibody-tag interaction: application to single-step protein purification. **Protein Sci.** 17, 2120-2126.

Yasui, N., Nogi, T., Kitao, T., Nakano, Y., Hattori, M., and Takagi, J. (2007) Structure of a receptor-binding fragment of Reelin and mutational analysis reveal a recognition mechanism similar to endocytic receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 104, 9988-9993.

Nakano, Y., Kohno, T., Hibi, T., Kohno, S., Baba, A., Mikoshiba, K., Nakajima, K., and Hattori, M. (2007) The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. **J. Biol. Chem.** 282, 20544-20552.

Nogi, T., Yasui, N., Hattori, M., Iwasaki, K., and Takagi, J. (2006) Structure of a signaling-competent Reelin fragment revealed by X-ray

crystallography and electron tomography. **EMBO J.** 25, 3675-3683.

〔学会発表〕(計 48 件)

(1) 馬場敦、内田貴之、日比輝正、服部光治 リーリンは移動初期の神経細胞を標的とする。第 32 回日本分子生物学会大会 2009 年 12 月 10 日

(2) 阪野英幸、中野良美、馬場敦、河野孝夫、高柳麻衣、服部光治 ノックインマウスを用いたリーリン C 末端領域の機能解析 第 32 回日本分子生物学会大会 2009 年 12 月 10 日

(3) 鈴木健太、河野志織、河野孝夫、服部光治 リーリンの特異的切断機構、及び意義の解析。第 32 回日本分子生物学会大会 2009 年 12 月 10 日

(4) 高柳麻衣、馬場敦、河野孝夫、服部光治 リーリンの C 末端領域内での切断はリーリンと神経細胞膜との相互作用を調節する。第 32 回日本分子生物学会大会 2009 年 12 月 10 日

(5) 五味宏樹、河野孝夫、服部光治 脳形成に必須な分泌蛋白質の、リーリン N 末端領域の機能解明 バイオフィーマフォーラム 2009 2009 年 11 月 14 日

(6) 阪野英幸、中野良美、日比輝正、河野孝夫、服部光治 神経細胞層構造の形成と維持における、リーリン C 末端領域の機能 バイオフィーマフォーラム 2009 2009 年 11 月 14 日

(7) Mitsuharu Hattori, Takayuki Uchida, Atsushi Baba, Takao Kohno, Terumasa Hibi. Downregulation of Functional Reelin Receptors in Projection Neurons Implies That Primary Reelin Action Occurs at Early/Premigratory Stages. Construction and reconstruction of brain. 2009年 10 月 8 日

(8) Takao Kohno, Atsushi Baba, Mitsuharu Hattori Cleavage of Reelin within C terminal region by proprotein convertase

modulates its interaction with the neuronal cell membrane. 第32回日本神経科学大会. 2009年9月18日

(9) Hideyuki Banno, Yoshimi Nakano, Atsushi Baba, Mitsuharu Hattori Function of the C-terminal region of Reelin: a knock-in study. 第32回日本神経科学大会. 2009年9月18日

(10) Atsushi Baba, Kennichi Oshima, Mitsuharu Hattori Localization and function of sphingomyelin synthase isoforms in neurons. 4th International Conference on Phospholipase A2 and lipid mediators. 2009年5月27日

(11) 大島健一、高柳麻衣、酒井秀行、服部光治 神経細胞におけるスフィンゴミエリン合成酵素の局在及び機能解析 2008年12月9日 BMB2008

(12) 日比輝正、服部光治 リーリン受容体 ApoER2 の二つのスプライシングバリエーションにおける機能的差異 2008年12月9日 BMB2008

(13) 石井萌、松田幸江、馬場敦、鈴木健裕、堂前直、服部光治 難読症関連遺伝子 KIAA0319 は神経突起の異常な分岐を誘導する 2008年7月10日 第31回日本神経科学大会

(14) 馬場敦、赤木浩士郎、服部光治 Fyn の酵素活性は細胞膜上における Ephrin-A の量を調節する 2008年7月10日 第31回日本神経科学大会

(15) 内田貴之、馬場敦、宮田卓樹、仲嶋一範、服部光治 リーリンとアルカリフォスファターゼの融合タンパク質を用いた、リーリン受容体の機能的発現部位の決定 2008年7月10日 第31回日本神経科学大会

(16) 中野良美、河野孝夫、日比輝正、馬場敦、仲嶋一範、御子柴克彦、服部光治 リーリン DC-FLAG ノックインマウスの表現型解析 2008年7月10日 第31回日本神経科学大会

(17) 河野孝夫、服部光治 脳の層構造形成を司る分泌蛋白質リーリンの新規分解機構と、その生理的意義の解明 2008年7月5日 第56回日本薬学会東海支部大会

(18) 日比輝正、水谷真人、馬場敦、服部光治 リーリン受容体 ApoER2 スプライシングバリエーションに対するリーリンの結合能の差異 2008年7月5日 第56回日本薬学会東海支部大会

(19) 大島健一、酒井秀行、服部光治 神経細胞におけるスフィンゴミエリン合成酵素の局在制御機構の解析 2008年7月5日 第56回日本薬学会東海支部大会

(20) Regulated expression and downregulation of functional Reelin receptors indicates complex action of Reelin during brain development. Takayuki Uchida, Atsushi Baba, Terumasa Hibi, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori. 2008年5月23日 Cortical Development Meeting 2008

(21) Function of the highly conserved C-terminal Region of Reelin: A knock-in study. Yoshimi Nakano, Terumasa Hibi, Takao Kohno, Atsushi Baba, and Mitsuharu Hattori 2008年5月23日 Cortical Development Meeting 2008

(22) Takayuki Uchida, Terumasa Hibi, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori

Where Does Reelin Work? Localization of Functional Reelin Receptors in the Developing Mouse Brain as Revealed by Reelin-Alkaline Phosphatase Fusion Probe. 2008年3月24日 CDB Symposium 2008 "Turning Neurons into a Nervous System"

(23) Yoshimi Nakano, Takao Kohno, Terumasa Hibi, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori Functions of The Highly Conserved C-terminal Region of Reelin and Its Regulation by Proteolysis. 2008年3月24日 CDB Symposium 2008 "Turning Neurons into a Nervous System"

- (24) 赤木浩士郎、服部光治 Fyn 酵素活性による ephrin-A 機能制御解析 2007 年 12 月 14 日 BMB2007
- (25) 河野志織、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特異的な切断に關与するプロテアーゼの解析 2007 年 12 月 14 日 BMB2007
- (26) 松田幸江、石井萌、馬場敦、服部光治 難読症関連遺伝子産物 KIAA0319 の神経細胞における機能解析 2007 年 12 月 14 日 BMB2007
- (27) 日比輝正、服部光治 リーリンはエンドサイトーシス後にプロセッシングを受け、N 末側断片が細胞外に放出される 2007 年 12 月 14 日 BMB2007
- (28) 河野 孝夫、鬼頭 典子、中野 良美、馬場 敦、服部光治 脳形成を司る分泌蛋白質リーリンの新規分解機構と、その生理的意義の解明 2007 年 12 月 14 日 BMB2007 (横浜)
- (29) Yoshimi Nakano, Takao Kohno, Terumasa Hibi, Shiori Kohno, Atsushi Baba, Katsuhiko Mikoshiba, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required of downstream signaling. 2007 年 11 月 3 日 Neuroscience2007
- (30) Takayuki Uchida, Atsushi Baba, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima, Mitsuharu Hattori Localization of functional Reelin receptors as revealed by Alkaline Phosphatase-Reelin fusion protein. 2007 年 11 月 3 日 Neuroscience2007
- (31) Takayuki Uchida, Atsushi Baba, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima, Mitsuharu Hattori Localization of functional Reelin receptors as revealed by Alkaline Phosphatase-Reelin fusion protein. 2007 年 9 月 12 日 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会
- (32) 中野良美、河野志織、馬場敦、御子柴克彦、仲嶋一範、服部光治 脳形成に必須の分泌タンパク質リーリンの分泌と機能における、C 末端領域の機能解析 2007 年 9 月 12 日 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会
- (33) 内田貴之、馬場敦、宮田卓樹、仲嶋一範、服部光治 リーリンとアルカリフォスファターゼの融合タンパク質を用いたリーリン受容体の機能的発現部位の決定. 2007 年 7 月 7 日 第 53 回日本薬学会東海支部大会
- (34) 内田貴之、日比輝正、馬場敦、宮田卓樹、仲嶋一範、服部光治 リーリンとアルカリフォスファターゼの融合タンパク質を用いたリーリンの機能的受容体の決定 2006 年 12 月 20 日 平成 18 年度神経発生討論会
- (35) 中野良美、河野志織、馬場敦、仲嶋一範、服部光治 脳形成に必須の分泌タンパク質リーリンの分泌と機能における、C 末端領域の機能解析 2006 年 12 月 20 日 平成 18 年度神経発生討論会
- (36) 河野孝夫、中野良美、日比輝正、服部光治 脳形成に必須の分泌蛋白質リーリンの C 末端領域依存的な構造変化 2006 年 12 月 20 日 平成 18 年度神経発生討論会
- (37) 酒井秀行、馬場敦、服部光治 スフィンゴミエリン合成酵素の神経細胞における機能 2006 年 12 月 7 日 日本分子生物学会 2006 フォーラム
- (38) 内田貴之、日比輝正、馬場敦、宮田卓樹、仲嶋一範、服部光治 リーリンとアルカリフォスファターゼの融合タンパク質を用いたリーリンの機能的受容体の決定 2006 年 12 月 7 日 日本分子生物学会 2006 フォーラム
- (39) 中野良美、河野志織、馬場敦、仲嶋一範、服部光治 脳形成に必須の分泌タンパク質リーリンの分泌と機能における、C 末端領域の機能解析 2006 年 12 月 7 日 日本分子生物学会 2006 フォーラム
- (40) 河野孝夫、中野良美、馬場敦、服部光治 脳形成に必須の分泌蛋白質リーリンの C 末端領域依存的な構造変化 2006 年 12 月 7 日 日本分子生物学会 2006 フォーラム

(41) 河野孝夫、中野良美、服部光治 脳形成に必須の分泌タンパク質リーリンのC末端領域依存的な構造変化 2006年7月1日第52回日本薬学会東海支部大会

(42) 赤木浩士郎、服部光治 PAF アセチルヒドロラーゼ 型触媒サブユニットの神経細胞における機能解析 2006年7月1日 第52回日本薬学会東海支部大会

(43) 河野志織、河野孝夫、服部光治 脳形成に必須の分泌蛋白質リーリンの特異的分解に関する解析 2006年7月1日 第52回日本薬学会東海支部大会

(44) Yoshimi Nakano, Shiori Kohno, Atsushi Baba, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori

The C-terminal domain of Reelin is not necessary for secretion but is involved in activation of its downstream signaling. 2006年6月20日 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology

(45) Takayuki Uchida, Terumasa Hibi, Atsushi Baba, Takai Miyata, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori. Localization of functional Reelin receptors as revealed by Alkaline Phosphatase-Reelin fusion protein 2006年6月20日 IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology

(46) 河野孝夫、中野良美、日比輝正、馬場敦、服部光治 脳形成に必須な分泌タンパク質リーリンの抗体反応性はC末端領域依存的に変化する 2006年3月28日 日本薬学会126年会

(47) 馬場 敦、小林久美子、内田貴之、服部光治 脳形成に必須な分泌タンパク質リーリンの膜親和性についての解析 2006年3月28日 日本薬学会第126年会

(48) Yoshimi Nakano, Takayuki Uchida, Shiori Kohno, Atsushi Baba, and Mitsuharu Hattori

The C-terminal domain of Reelin is not necessary for secretion but is involved in

activation of downstream signaling 2006年1月30日 Keio University School of Medicine International Symposium, Dynamics of Cortical Development and Neuronal Migration.

[ 図書 ] (計0件)  
[ 産業財産権 ]  
出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[ その他 ]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

服部 光治 (HATTORI MITSU HARU)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：60272481

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし