

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：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22700396

研究課題名（和文） 分泌された活性型ニューロプシンの隣接シナプスに与える分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of effect of secreted active neuropsin on neighboring synapses

研究代表者

田村 英紀（TAMURA HIDEKI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80437516

研究成果の概要（和文）：

中枢神経系におけるプロテアーゼシグナルは、細胞移動や神経突起の伸展、神経可塑性の調節、さらにはヒトの精神活動に関与することが明らかとなってきた。しかしながら、プロテアーゼの基質蛋白質やその切断部位の同定については極めて曖昧であり、どの系においてもその相互関係を断定するまでに至っていない。これまで、ニューロプシンが記憶形成や精神疾患に直接関与する細胞外プロテアーゼであることを明らかとしてきた。本研究では、基質蛋白質に結合する変異体ニューロプシンを用いて、ニューロプシンが直接切断する基質として統合失調症脆弱因子 **Neuregulin-1 (NRG-1)** を同定した。ニューロプシンは、**NRG-1** のヘパリン結合ドメインを切断除去し、それによりヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合した **NRG-1** からリガンド部位（**EGF** ドメイン）が遊離し、**ErbB4** 受容体のリン酸化を誘導することを示した。さらに、ニューロプシン-**NRG-1**-**ErbB4** シグナルは、海馬 **Schaffer** 側枝の長期増強の制御に関わることを示した。従って、このようなシグナル系は、動物やヒトの認知機能に重要であり、その破綻が統合失調症や双極性障害などの精神疾患に関与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Protease-mediated signaling is an important modulator of the nervous system. However, identifying the specific signaling substrates of such proteases is limited by the rapidity with which intermediate substrate forms are cleaved and released. Here, a screening method to detect non-cleaved enzyme-bound forms was developed and used to identify a novel neuropsin/neuregulin-1 (NRG-1) proteolytic signaling system, which is specifically localized in microdomain of synaptic cleft. The extracellular protease, neuropsin, cleaved mature NRG-1 (comprising the NRG-1 extracellular domain) at three newly-identified sites to remove the NRG-1 heparin-binding domain. This released the ligand moiety from the matrix-glycosaminoglycan pool and enabled it to phosphorylate the NRG-1 receptor, p185 (ErbB4). Thus, processed-NRG-1-ErbB4 signaling contributes to the modulation of early-phase long-term potentiation of Schaffer collaterals. This signaling system may be important for both animal and human cognition, and its dysfunction may contribute to human mental disorders such as schizophrenia and bipolar disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：Neuregulin-1、カリクレイン、プロテオリシス、LTP、海馬、神経可塑性、統合失調症

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、ニューロプシンが初期長期増強（LTP）の誘導やシナプス形成に密接に関係することを明らかとし（Tamura et al., 2006; Nakamura et al., 2006）、ひいてはニューロプシンがワーキングメモリーに直接関与するプロテアーゼであることを示してきた（Tamura et al., 206）。ニューロプシンは、記憶形成に関与する海馬や扁桃体に豊富に発現しており、不活型で細胞外に分泌される（Chen et al., 1995）。LTP 誘導後、NMDA 受容体シグナル経路の下流で、細胞外で急速且つ一過的に活性化する（Matsumoto-Miyai et al., 2003; Tamura et al., 2008）。活性型ニューロプシンの細胞外投与は、細胞内にある AMPA 受容体のリン酸化レベルを修飾する（Tamura et al., 2006）。従って、これら一連の結果を考察すると、神経活動依存的に活性化したニューロプシンによる基質蛋白質の切断がシグナルとなるか、もしくは、その分解産物が受容体等に結合することによりシグナルが細胞内に伝わるのが考えられる。しかしながら、これまでニューロプシンの基質および基質の解裂に引き続き細胞シグナルは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

海馬においてニューロプシンが結合し、切断する基質蛋白質の同定、および基質切断が誘発するシグナルを解明する。

3. 研究の方法

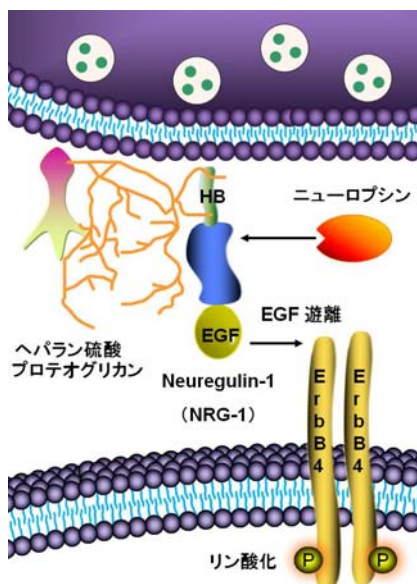
酵素活性を欠失した変異体ニューロプシンを作製し、これを用いて酵素基質複合体を形成させることで、基質の同定を試みた。

4. 研究成果

基質蛋白質に対する親和性を変えずに、蛋白切断・解離活性のみを失活させた組換えニューロプシンは基質と安定な複合体を形成するのではないかと仮定して、何種類もの組換え体を作成し試みた結果、特定の組換え体のみが海馬初代培養細胞で、仮定される蛋白質と複合体を細胞外のスパイン膜上で形成した。実際に真にニューロプシンの基質となり得るかのコントロール実験を繰り返した後、この細胞を可溶化し、非変性条件下で抗ニューロプシン抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、約 1 MDa という高分子量のバンドが検出された。このことから、ニューロプシンが細胞外でいくつかの高分子蛋白質と結合していることが考えられたので、これを質量分析によって解析した結果、細胞外マトリックス分子の Fibronectin や Vitronectin、膜蛋白質の Neuregulin-1 (NRG-1) が検出され、またセリンプロテアーゼインヒビターの Neuroserpin や Alpha-2-macroglobulin なども検出され、後者の 2 つは、これまでに同定されてきた結果と一致した（Kato et al., 2001）。また前者の Fibronectin や Vitronectin が基質であると示唆したこれまでの結果とよく一致していたため（Shimizu et al., 1998）、統合失調症のリスク遺伝子として知られている NRG-1 がニューロプシンの新たな基質であることが考えられた。

そこで、NRG-1 が、ニューロプシンが直接切断する基質であるかを調べるために、活性型ニューロプシンと NRG-1 を試験管内で反応させたところ、NRG-1 は速やかに切断された。その切断部位は、アミノ酸配列分析により、NRG-1 のヘパリン結合（HB）ドメインと EGF ドメインの間であることがわかった（次頁図参照）。そのため、ニューロプシンの切断を受けた NRG-1 はヘパリン結合

性が減弱した。それにより、ニューロプシンによる NRG-1 の限定解離が、NRG-1 の EGF 領域を含むリガンド部位の遊離機構であることが考えられ、我々は、活性型ニューロプシンの細胞外投与によって、NRG-1 の HB ドメインの切断除去および EGF 領域の遊離、それに引き続く NRG-1 の受容体である ErbB4 のリン酸化という一連の反応が惹起されることを示し、この仮説を立証した(下図；論文投稿中)。



また、このニューロプシンによる NRG-1 の切断機構が、海馬 CA1 領域の LTP の誘導に関与することを、ニューロプシン遺伝子欠損マウスで見られる LTP 障害の NRG-1 EGF ペプチドの投与によるレスキュー実験により明らかとした(論文投稿中)。このような可塑性関連プロテアーゼと精神疾患関連蛋白質との直接的な関係性は、プロテアーゼ活性が精神疾患治療や予防の新しい標的となることを示している。

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 4 件)

① Kobayashi T, Tamura H, Hatanaka Y, Motoyama M, Noda T, Sasagawa K, Tokuda T, Ishikawa Y, Shiosaka S and Ohta J. (2011) Functional neuroimaging by using implantable CMOS multimodal device in freely-moving mouse. *Pros. IEEE BioCAS*, 110-113. (査読有)

② Ishikawa Y, Tamura H and Shiosaka S. (2011) Diversity of Neuropsin (Kallikrein

8)-dependent Synaptic Associativity in the Hippocampal Pyramidal Neuron. *J Physiol.*, 589, 3559-3573. (査読有)

③ Kobayashi T, Tagawa A, Noda T, Sasagawa K, Tokuda T, Hatanaka Y, Tamura H, Ishikawa Y, Shiosaka S and Ohta J. (2010) Potentiometric Dye Imaging for Pheochromocytoma and Cortical Neurons with a Novel Measurement System Using an Integrated Complementary Metal-Oxide-Semiconductor Imaging Device. *Jpn J Appl Phys.*, 49, 117001-7. (査読有)

④ Shingaki K, Matsuzaki S, Taniguchi M, Kubo T, Fujiwara T, Kanazawa S, Yamamoto A, Tamura H, Maeda T, Ooi K, Matsumoto K, Shiosaka S and Tohyama M. (2010) Molecular mechanism of kallikrein-related peptidase 8/neuropsin-induced hyperkeratosis in inflamed skin. *Br J Dermatol.*, 163, 466-475. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① 河田 美穂、田村 英紀、塩坂 貞夫、ニューロプシン・ニューレグリンシステムの脳内分布と機能、第 87 回日本解剖学会・近畿支部学術集会、兵庫県西宮市、2011/12/03.

② Ishikawa Y, Tamura H and Shiosaka S. Diversity of neuropsin-dependent synaptic associativity. Society for Neuroscience 2011, Washington DC, USA, 2011/11/16.

③ Kobayashi T, Tamura H, Hatanaka Y, Motoyama M, Noda T, Sasagawa K, Tokuda T, Ishikawa Y, Shiosaka S and Ohta J. Potential fluorescent imaging for on-chip cultured neurons, acute slice, and visual cortex by using an implantable imaging device. Society for Neuroscience 2011, Washington DC, USA, 2011/11/13.

④ 石川 保幸、田村 英紀、塩坂 貞夫、海馬におけるニューロプシン依存的シナプス連合性の解析、第 54 回日本神経化学学会大会、石川県多賀市、2011/9/27.

⑤ Ishikawa Y, Tamura H and Shiosaka S. Neuropsin dependent synaptic tagging in mouse hippocampus. Society for Neuroscience 2010, San Diego, USA, 2010/11/17.

⑥ 石川 保幸、田村 英紀、塩坂 貞夫、ニューロプシン依存的シナプスタギングの解析、第 53 回日本神経化学学会大会、兵庫県

神戸市、2010/9/4.

⑦ 田村 英紀、濱口 晴也、石川 保幸、
塩坂 貞夫、細胞外セリンプロテアーゼニュー
ーロブシンの基質探索、第 53 回日本神経化
学会大会、兵庫県神戸市、2010/9/3.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ニューレグリン-1 (Neuregulin-1)

部分ペプチド

発明者：田村 英紀、塩坂 貞夫

権利者：奈良先端科学技術大学院大学

種類：特許

番号：特願 2011-259056

出願年月日：2011.11.28

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://bsw3.naist.jp/shiosaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 英紀 (TAMURA HIDEKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教

研究者番号：80437516