

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24659028

研究課題名（和文）シナプス接着分子代謝の変容によるアルツハイマー病シナプス病態の解明

研究課題名（英文）Alterations of proteolytic processing of synaptic adhesion molecules in Alzheimer disease

研究代表者

富田 泰輔 (Taisuke Tomita)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30292957

研究成果の概要（和文）：脳における神経細胞間接続であるシナプスは、神経活動に応じた高い可塑性を持つことが知られている。その可塑性の分子基盤としてシナプス接着分子が知られているが、その代謝については不明であった。本研究において、自閉症に関連が知られているシナプス接着分子 Neuroligin 1 が神経活動に応じて連続した 2 つのプロテアーゼによって切断を受け、シナプス形成を負に制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In brain, each single neuron is connected to other neurons via synapses. Synapses can change their strength in response to neuronal activity, and synaptic adhesion molecules are implicated in the synapse plasticity. However, the metabolism of the synaptic adhesion molecules remains unknown. In the research, we found that neuroligin 1, which is associated with autism spectrum disorder, is sequentially processed by two proteases. This processing is modulated by synaptic activity and negatively regulates synapse formation in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,00	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経細胞、シナプス、接着分子

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、アルツハイマー病（AD）は大きな社会問題となっている。その発症機序においては、Amyloid precursor protein (APP) から β 及び γ セクレターゼによる 2 段階の切断により生じるアミロイド β タンパク ($A\beta$) の蓄積が深く関与するとする「アミロイド仮説」が広く受け入れられている（図 1）。近年、急速に進んだ臨床イメージング研究の解析から、ヒトにおいて、 $A\beta$ 蓄積や fMRI によって検出される Default mode network の異常が、AD 発症リスクと有意に相関することが示されつつある。そこで $A\beta$ 蓄積によるシナプス異常が神経回路の変容

を生じさせ、さらなる $A\beta$ 蓄積を招く悪循環経路の存在が想定されている (Palop et al., Nat Neurosci 2010)。しかし $A\beta$ がどのような病的分子機構を経てシナプス異常を惹起するのかわについては、未だ明らかではない。近年になり、シナプス接続の構造的基盤を支える分子機構として、シナプス接着分子の重要性が示されつつある (Williams et al., Neuron 2010)。これら接着分子の異常が、統合失調症や自閉症などの原因遺伝子もしくは遺伝的リスクとなることが明らかとなり、病的状態における神経接着因子の役割が注目を浴びている。

2. 研究の目的

我々はこれらシナプス接着分子が神経活動に依存してプロセッシングを受け、シナプス結合性を変化させることを見出していた (Tomita et al., Mol Neurodegener 2006)。すなわち、 $A\beta$ のような神経毒性因子によって惹起される異常な神経活動がシナプス接着分子の代謝に影響を与えることが示唆された。本研究においては $A\beta$ がシナプス毒性を發揮するメカニズムとして、シナプス接着分子に注目し、 $A\beta$ にその発現量や代謝様式に異常を生じる可能性について検討する。

3. 研究の方法

$A\beta$ 毒性がシナプス接着分子のプロセッシングに異常を惹起し、神経回路の変容を導くという仮説を検証する目的で、特に検討が先行している Neurologin, ephrin B の病的状況下における挙動を分子レベルで解析しながら、他の接着分子のプロセッシング異常についても検証し、その影響がシナプス機能に与える影響について検討を進めた。

主に初代培養神経細胞やスライス培養系を用い、これら Neurologin や ephrin B のプロセッシングについて各種ニューロトランスミッター刺激を行い特異性の検討を行った。また膜結合型メタロプロテアーゼ (ADAM や MT-MMP) に対する網羅的 siRNA ライブラリーや、各種ノックアウトマウス由来細胞を用いて、各分子のプロセッシングに関連する責任酵素の同定を行った。そして神経細胞に対してこれら切断によって生じた分子を特異的に発現、解析を行い、各種シナプス接着分子のプロセッシングがシナプスに及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

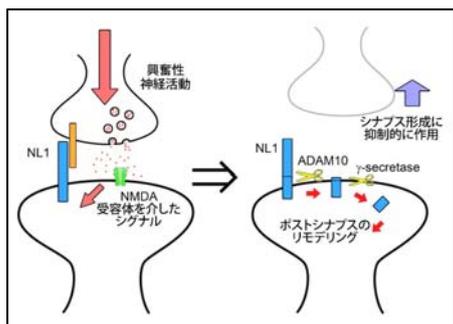
シナプス接着分子のうち、Neurologin 1 が細胞外領域でシェディングを受け C 末端断片が γ セクレターゼによって分解されることを見出していた。不死化線維芽細胞を用いた解析からそのシェディング責任酵素が ADAM10 であることが示唆されていたが、神経細胞における切断は不明であった。そこでマウス神経芽細胞種である Neuro2a 細胞を用いて RNAi を行ったところ、ADAM10 のノックダウンによって Neurologin 1 のシェディングが抑制された。さらに ADAM10 flox ノックアウトマウスより初代培養神経細胞を得ることができたため、リコンビナントアデノウイルスを用いて Cre リコンビナーゼの導入を行い検討したところ、やはり Neurologin 1 のシェディングが特異的に抑制された。一方 Neurologin 2 の切断には大きな変化が見られなかった。さらに CamKII-Cre を用いて生後神経細胞特異的に ADAM10 をノックアウトしたコンディショナルノック

アウトマウスの脳を用いて検討したところ、Neurologin 1 のプロセッシングが特異的に低下していることが明らかとなった。これらの結果から Neurologin 1 のシェディングは ADAM10 によって行われていることが明らかとなった。

次にこの切断の制御機構を検討するために各種神経伝達物質によるシェディングの変化を検討したところ、NMDA 受容体を介したグルタミン酸刺激により神経細胞表面膜上の Neurologin 1 が切断を受けることが明らかとなった。この切断が神経細胞シナプスで行われているかどうかを検討するため、化学的 LTP 誘導刺激を行ったところ、やはり Neurologin 1 のシェディングが亢進していること、またラット脳のシナプトニューロソーム画分をインキュベートしたところ Neurologin 1 の切断が生じたことなどから、グルタミン酸を介してシナプスにおいて Neurologin 1 のシェディングが ADAM10 によって行われていることが明らかとなった。また Neurologin 1 のシェディングはリガンドである Neurexin 処理によって増加した。興味深いことに、興奮性シナプスに局在する EphA4 のシェディングを亢進させる ephrin B は Neurologin 1 のシェディングに影響を与えなかった。in vivo における検討を行うため、ピロカルピンによるてんかんモデルを用いて人工的に神経活動を亢進させてその脳における Neurologin 1 のプロセッシングを検討したところ、やはりシェディングが亢進していた。これらの結果から、Neurologin 1 の切断はグルタミン酸を介した神経活動に応じて制御されていると考えられた。またアルツハイマー病モデルマウスにおいて Neurologin のプロセッシングが変化している可能性が示唆され、アルツハイマー病態とシナプス接着分子の切断に病的連関が示唆された。

次にこの切断に関する生理的意義を検討するために、全長 Neurologin の他、シェディング後、もしくは γ セクレターゼによる切断を受けた後の切断産物を模倣した ΔE 、ICD をコードする遺伝子をマウス海馬顆粒細胞に導入し解析したところ、全長 Neurologin によってスパイン形成が促進し、シェディングはその形成能を抑制的に制御していること、 ΔE にはスパイン形成能がまだ保たれているが、ICD にはスパイン形成能が失われていることが明らかとなった。一方各種変異体を作成し、シェディングを受けてにくい変異体の作成に成功した。その変異 Neurologin 1 を初代培養神経細胞に過剰発現させたところ、野生型 Neurologin 1 よりもスパイン形成能が高いことが明らかとなった。すなわち Neurologin のプロセッシングは、ADAM10、 γ セクレターゼによる二段階切断を受けて初

めてスパイン形成能を失うと考えられた。



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6件)

1. Tomita T, Iwatsubo T: Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases. *J Biol Chem* 288(21):14673-14680, 2013. doi: 10.1074/jbc.R113.463281.
2. Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, Isshiki H, Takeo K, Tomita T, Iwatsubo T: FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- β production in neurons. *PloS ONE* 8(5):e64050, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064050.
3. Imamura Y, Umezawa N, Osawa S, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Iwatsubo T, Kato N, Tomita T, Higuchi T: Effect of helical conformation and side-chain structure on γ -secretase inhibition by β -peptide foldamers: Insight into substrate recognition. *J Med Chem* 56(4):1443-1454, 2013. doi: 10.1021/jm301306c.
4. Takagi-Niidome S, Osawa S, Tomita T, Iwatsubo T: Inhibition of γ -secretase activity by a monoclonal antibody against the extracellular hydrophilic loop of presenilin 1. *Biochemistry* 52(1):61-69, 2013. doi: 10.1021/bi301252r.
5. Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N,

Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T: Activity-dependent Cleavage of Neuroigin 1. *Neuron* 76(2):410-422, 2012. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.003

6. Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of γ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. *J Biol Chem* 287(31):25834-25843, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.336347

[学会発表] (計4件)

1. 富田泰輔: セクレターゼ活性の制御とシナプス機能の分子連関 日本薬学会 133 年会 2013年3月28日 横浜
2. Taisuke Tomita, Kunimichi Suzuki, Takeshi Iwatsubo: Activity-dependent proteolytic cleavage of Neuroigin 1. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. December 13, 2012, Fukuoka, Japan.
3. 富永綾、富田泰輔、岩坪威: γ -secretase 活性中心サブユニット Presenilin 1 の第4膜貫通領域の構造解析 第31回日本認知症学会学術集会 2012年10月26日 つくば
4. Taisuke Tomita: The alpha-helical structure of the hydrophilic loop 1 of presenilin 1 contributes to the formation of the substrate binding site. Neuroscience 2012, October 13, 2012, New Orleans, USA.

[図書] (計2件)

1. 富田泰輔、鈴木邦道: 自閉症に関連するタンパク質 Neuroigin の神経活動に依存的な代謝はニューロンのシナプス形成を制御している ライフサイエンス 新着論文レビュー 2012年11月8日
2. 鈴木邦道、富田泰輔、岩坪威: シナプス接着分子 neuroigin-1 の神経活動依存的なタンパク質切断 実験医学 vol 31, 419-422 (2012)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsy/entranceja2.html>

本研究成果は、以下のメディアにおいて取り上げられた。

東京大学、セクレターゼによる興奮性シナプス形成の抑制機構を発見 日経バイオテク
2012年10月18日

自閉症に 2 酵素関与 日経産業新聞 2012
年10月19日

自閉症発症の関連分子が脳神経細胞シナプスを制御する仕組みを発見 - 東大 マイナビニュース 2012年10月19日

東大、自閉症関与たんぱく質の制御酵素 2 種を特定 日刊工業新聞 2012年10月23日

富田泰輔：自閉症原因たんぱく質の制御解明 毎日新聞 2012年10月30日

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 泰輔 (Taisuke Tomita)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30292957