

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659036

研究課題名(和文) 巨大分泌蛋白質リーリンの「機能増強」は、精神神経疾患の革新的改善法になり得るか？

研究課題名(英文) Can augmentation of Reelin function be a novel therapy against neuropsychiatric diseases?

研究代表者

服部 光治 (Hattori, Mitsuharu)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60272481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：リーリンは脳機能に必須の分泌タンパク質であり、その機能低下は様々な精神疾患に関与する。リーリンは特異的な分解酵素により切断・不活化されることが知られていたが、これを触媒する酵素タンパク質の実体は不明であった。申請者らは、この酵素の実体が「ADAMTS」というメタロプロテアーゼファミリーの一種であることを見出した。また、リーリンの分解部位を正確に決定し、分解抵抗型リーリン変異体の作成に成功した。これらのツールを用いた解析の結果、リーリンが神経細胞内に取り込まれたあとに分解されることが、下流シグナル遮断に必要であることを見いだした。以上の知見はリーリン機能増強による精神神経疾患治療の基礎となる。

研究成果の概要(英文)：Reelin plays important roles in the brain functions. Reelin is inactivated by a specific proteolysis but the enzyme in charge of this reaction remained elusive. In this study we found that Reelin is specifically cleaved by a member of ADAMTS metalloproteinase family. We also established an uncleavable mutant of Reelin. These informations and tools will be helpful for future therapy of neuropsychiatric diseases.

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：リーリン 脳 アルツハイマー病 神経発生

1. 研究開始当初の背景

リーリン (Reelin) は、脳の形成および高次機能発現に必須な巨大分泌蛋白質である (次項の図 1 参照)。リーリンの機能としては、神経細胞移動制御、樹状突起形成促進、シナプス伝達効率化などがあり、これらの異常は脳機能の異常につながる。そして実際近年、ヒトにおけるリーリン遺伝子の多型とメチル化、リーリンの発現量減少、リーリン分解産物の増大などが、精神神経疾患 (アルツハイマー病や統合失調症) の発症に寄与することがわかってきた。すなわち、リーリンの機能を「増強」できれば、これら疾患の根本的改善につながる可能性が高い。しかし、リーリンの機能を増強する方策は従来存在せず、また、マウス個体レベルでリーリンの「機能低下」を再現した例もなかった。

申請者は主に脳形成におけるリーリンの機能と、これに関わる分子機構の研究を行ってきた。中でも近年、分泌されたリーリンが細胞外環境においてどの程度安定に拡散するのかについて焦点をあて、多くの新規知見を得てきた。その過程で、脳ではリーリンを特異的に分解するプロテアーゼは基本的には 1 種類であることを見出し、その性状解析を行うとともに同定に挑戦してきた。現在までこの「リーリン特異的プロテアーゼ」の同定には至っていないが、その部分精製法を確立し、有力な候補分子を得た。またこれとは別に申請者は「リーリン機能低下マウス」の作製に世界で初めて成功した。このマウスでは、胎生期の脳形成は正常だが、生後になって様々な異常が観察されるようになる。このマウスは成体におけるリーリン機能低下のモデルマウスであると同時に、リーリン機能増強の効果を *in vivo* で検証する最良のツールである。

2. 研究の目的

リーリン機能低下による精神神経疾患発症または増悪化に対して、リーリン分解阻害が有効であるか否かを検証する。特に、以下の 2 点を 2 年間で達成することを目指す。

リーリンを特異的に分解するプロテアーゼの同定と、その性状解析

リーリン機能低下マウスを用いた、リーリン機能増強の効果解明

3. 研究の方法

リーリンが細胞外で特異的分解を受け、これにより完全に機能を失うことを証明した。この反応を触媒する酵素を初代培養神経細胞 (胎児マウス約 2000 匹相当) の培養上清から部分精製し、生化学的および薬理的検討を行った。さらに電気泳動上で候補となったバンドを質量分析に供した結果、ある分泌型メタロプロテアーゼの一種をリーリン特異的分解酵素の有力候補として同定した。同定した候補分子を遺伝子工学的手法により発

現させ、リーリン分解能を有するか否かを解析した。この候補分子自身は今まで全く研究されておらず、機能や基質特異性は不明であった。また、この分子に対する抗体を作製した。

リーリンの C 末端領域 (標的細胞での下流シグナル活性化に寄与) を欠くノックイン (C-KI) マウスは既に作製した。これはリーリンのゲノム改変マウスとして世界初、かつ今なお唯一の成功例である。C-KI マウスでは、胎生期における脳形成は正常だが、生後において神経細胞の樹状突起が異常になる。このことは、「強い」リーリンシグナルは脳の形成段階では不必要だが、生後脳の回路網形成に必要であるという新規概念を示唆している。リーリン C-KI マウス生後脳 (大脳および海馬) の構造を解析することで、リーリン機能低下の影響を解析した。

4. 研究成果

1. 部分精製による候補プロテアーゼ同定

N-t site 切断を担うプロテアーゼは初代培養大脳皮質神経細胞 (Cortical Neuron; CN) から分泌される。そのため、CN の培養上清をカラムクロマトグラフィーによって分画し、このプロテアーゼを部分精製することによって同定しようと考えた。当研究室ではこれまでも同様の方法で同定を試みてきたが、未だ成功に至っていなかった。そこで、カラムクロマトグラフィーによって同定するには何らかの工夫が必要だと考え、培養条件および精製条件の検討を行った。これらの検討の結果、以下の変更が有効であることを見出した。1. CN 播種時の細胞密度を従来より 4 倍薄くする。2. 細胞播種の翌日から、BSA などのタンパク質が多く含まれる B27 サプリメントを添加せずに培養し、精製前の段階における夾雑物を減らす。3. ヘパリンカラムおよび MonoQ (陰イオン交換) カラムを素早く連続して部分精製を行う。

以上の検討結果に基づき、E15 マウス約 150 匹分の CN の培養上清 880ml を、まずヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーによって分画した。溶出した各フラクションを基質と混合し、5 時間インキュベート後、各フラクションのリーリン切断活性を確認した。なお、カラムへの結合可能量を超えることによるプロテアーゼの喪失を最小限にするために、上清を約 150mL ずつ 6 回に分けて分画した。リーリン切断プロテアーゼは約 400mM NaCl および約 600mM NaCl の二カ所で溶出した。より切断活性の強い約 600mM NaCl で溶出したプロテアーゼの方が脳内での N-t site 切断により大きく寄与していると考え、こちらのプロテアーゼの同定を目指した。活性フラクション 8、9、10 を各回で回収し、透析後、MonoQ カラムクロマトグラフィーによって分画した。溶出した各フラクションのリーリン切断活性を確認した。なお、精製操作に伴ってリーリン切断活性の低下が著し

く進行するため、ここまでを 40 時間以内に行った。リーリン切断活性プロテアーゼは約 400mM NaCl で溶出した。

活性フラクション 6~11 を約 5 倍に濃縮し、銀染色を行った。これらのタンパク質の中に N-t site 切断プロテアーゼがあると考え、質量分析を行った。その結果、ADAMTS-3 というプロテアーゼが検出された。ADAMTS Family は分泌型の亜鉛イオン要求性プロテアーゼであり、Proprotein convertase family によって活性化されるため、リーリン切断プロテアーゼの特徴と一致している。よって、これらを有力な候補とした。

2. ADAMTS-3 はリーリンの N-t site を切断することができる

リコンビナント ADAMTS-3 を WT リーリンと混合し、24 時間インキュベート後、その切断産物量を比較した。その結果、ADAMTS-3 は WT リーリンを切断した。また、リーリンの中央部分を認識する抗体 R5A を用いて、ADAMTS-3 によって切断された WT リーリンを検出したところ、N-t site のみで切断されて生じる R38C 量が増加した。N-t および C-t site の両方で切断されて生じる R36 量も増加したが、これは、培養細胞由来のプロテアーゼによって切断された NR6 の N-t site が ADAMTS-3 によって切断されて生じたものであると考えられる。よって、ADAMTS-3 はリーリンの N-t site 切断のみを担うことが明らかになった。CN の培養上清に存在するプロテアーゼも N-t site のみを切断するので、この点では特徴が一致する。

3. ADAMTS-3 は PD リーリンを切断することができない

リーリンリピート 3 に含まれるプロリン残基をアスパラギン酸残基に置換した変異体リーリン (PD リーリン) は、CN の培養上清と混合しても切断されないことが分かっている (Koie et al. JBC 2014)。CN から分泌されるプロテアーゼの正体が ADAMTS-3 であれば、ADAMTS-3 も PD リーリンを切断することができないと考えられる。そこで、ADAMTS-3 が PD リーリン切断活性を持つかを調べた。

リコンビナント ADAMTS-3 を PD リーリンと混合し、14 時間インキュベート後、PD リーリン切断産物の有無を確認した。その結果、PD リーリン由来の切断産物 NR2 は検出されなかった。よって、CN の培養上清に存在するプロテアーゼと同様に、ADAMTS-3 も PD リーリンを切断できないことが明らかになった。

4. CN の培養上清に存在する N-t site 切断プロテアーゼは ADAMTS-3 である

ADAMTS-3 がリーリン切断を担うプロテアーゼの有力な候補と考えられたが、ADAMTS-3 を検出できる抗体が存在しないため、CN の培養上清に ADAMTS-3 が存在するのかが、また、リーリンを直接切断しているのかが、

明白ではない。そこで、ADAMTS-3 の disintegrin domain に含まれる 419 番目のトレオニン残基から cysteine-rich domain に含まれる 699 番目のグルタミン酸残基までを抗原とする抗 ADAMTS-3 ポリクローナル抗体を作製した。disintegrin domain よりも N 末端側はアミノ酸配列が他の ADAMTS Family と酷似していること、cysteine-rich domain よりも C 末端側はプロセッシングを受ける可能性があることから、この部位を抗原として選んだ。この抗体を用いて CN の培養上清に存在するプロテアーゼは ADAMTS-3 であるかを検証した。

CN 培養上清をヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーによって分画した。溶出した各フラクションを変異体リーリン NR3-MycHis と混合し、12 時間インキュベート後、各フラクションのリーリン切断活性を WB により確認した。そして、作製した抗 ADAMTS-3 抗体を用いて、切断活性と ADAMTS-3 の溶出パターンが一致するかを調べた。その結果、まず、リーリン切断プロテアーゼは、部分精製により ADAMTS-3 などを検出した際と同じく、約 400mM NaCl および約 600mM NaCl の二カ所で溶出された。さらに、切断活性のあるフラクションにて ADAMTS-3 と思われるバンドが検出され、そのバンドは切断活性のより強いフラクションでより濃かった。よって、CN の培養上清にて N-t site 切断を担っている主要なプロテアーゼは ADAMTS-3 であるということが示唆された。同定を試みた約 600mM NaCl で溶出されるプロテアーゼだけでなく、約 400mM NaCl で溶出されるプロテアーゼも ADAMTS-3 である可能性が浮上した。

5. ADAMTS-3 ホモ欠損マウスの大脳皮質ではリーリンの N-t site 切断が抑制される

in vivo において ADAMTS-3 がリーリンの N-t site 切断に寄与しているかを検証するために、ADAMTS-3 ホモ欠損マウスの脳において N-t site 切断が起きているかを調べた。これまでにヘテロ欠損マウス同士の 5 組の親から仔が計 26 匹産まれてきたが、これらのうち 8 匹が+/+、18 匹がヘテロ欠損であり、生後 1 日以上生存した ADAMTS-3 ホモ欠損マウスを一度も確認できていない。そのため、ADAMTS-3 ホモ欠損マウスは胎生致死の可能性が高い。そこで、胎生期における ADAMTS-3 のリーリン切断への寄与を解析した。

ADAMTS-3 ヘテロ欠損マウス同士を交配して得た E15 マウスの大脳皮質および小脳をライセートにし、リーリンの切断産物量や Dab1 量を WB によって比較した。その結果、ADAMTS-3 ホモ欠損マウスの大脳皮質では、他のマウスに比べて NR2 量が著しく減少し、Dab1 量も減少した。一方、ADAMTS-3 ホモ欠損マウスの小脳では、他に比べて NR2 量がわずかに減少したが、Dab1 量には大きな差がなかった。胎生期の大脳皮質において、リーリンの N-t site 切断を担う主要なプロテアー

ぜは ADAMTS-3 であるということが強く示唆された。また、リン酸化 Dab1 は速やかに分解されることが知られている。したがって、ADAMTS-3 ホモ欠損マウスでは、Dab1 のリン酸化が促進されていると考えられる。小脳での N-t site 切断に関しては、ADAMTS-3 も働いていると思われるが、もっと大きく寄与するプロテアーゼが他に存在す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 9 件)

Hisanaga, A., Morishita, S., Suzuki, K., Sasaki, K., Koie, M., Kohno, T., and Hattori, M. (2012) A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett.* 586, 3349-3353. (2012)

Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., Kinashi, T., and Nakajima, K. Reelin controls neuronal migration and positioning by promoting neuronal adhesion to extracellular matrix via the inside-out activation of integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Neuron* 76, 353-369. (2012)

Lee, H.C., Inoue, T., Sasaki, J., Kubo, T., Matsuda, S., Nakasaki, Y., Hattori, M., Tanaka, F., Udagawa, O., Kono, N., Itoh, T., Ogiso, H., Taguchi, R., Arita, M., Sasaki, T., and Arai, H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol. Biol. Cell* 23, 4689-700 (2012)

Perez-Martinez, F. J., Luque-Rio, A., Sakakibara, A., Hattori, M., Miyata, T., and Luque, J. M. Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells. *Biol. Open* 1, 1258-1263

Fuchigami, T., Sato, Y., Tomita, Y., Takano, T., Miyauchi, S.Y., Tsuchiya, Y., Saito, T., Kubo, K., Nakajima, K., Fukuda, M., Hattori, M., and Hisanaga, S. Dab1-mediated colocalization of multi-adaptor protein CIN85 with Reelin receptors, ApoER2 and VLDLR, in neurons. *Genes Cell* 18, 410-24 (2013)

Sugawara, T., Hisatsune, C., Le, T.D., Hashikawa, T., Hirono, M., Hattori, M., Nagao, S., and Mikoshiba, K. Type 1

inositol trisphosphate receptor regulates cerebellar circuits by maintaining the spine morphology of purkinje cells in adult mice. *J. Neurosci.* 33, 12186-96. (2013)

Britto, J.M., Tait, K.J., Lee, E.P., Gamble, R.S., Hattori, M., and Tan, S.S. Exogenous Reelin Modifies the Migratory Behavior of Neurons Depending on Cortical Location. *Cereb. Cortex*, in press (2013)

Hisatsune, C., Miyamoto, H., Hirono, M., Yamaguchi, N., Sugawara, T., Ogawa, N., Ebisui, E., Ohshima, T., Yamada, M., Hensch, T.K., Hattori, M., and Mikoshiba, K. IP3R1 deficiency in the cerebellum/brainstem causes basal ganglia-independent dystonia by triggering tonic Purkinje cell firings in mice. *Front. Neural Circuits*, 7, 156 (2013)

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 Signaling Activity of Reelin. *J. Biol. Chem.* 289, 12922-12930. (2014)

[学会発表](計 23 件)

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
ファーマバイオフォーラム 2012 2012
年 9 月 15 日 九州大学

中村晃太、河野孝夫、服部光治
リーリン C 末端領域依存的シグナルの小脳形成における機能
ファーマバイオフォーラム 2012 2012
年 9 月 15 日 九州大学

中村晃太、河野孝夫、服部光治
リーリン CTR 欠損マウスを利用した、小脳形成におけるリーリンの機能解析
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21 日 名古屋国際会議場

小林大地、河野孝夫、服部光治
脳におけるリーリンの C-t site 切断機構の解明
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21 日 名古屋国際会議場

山本恭平、田頭大志、河野孝夫、服部光治
神経突起形成における難読症関連遺伝子産物 KIAA0319 の細胞内領域の機能
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21 日 名古屋国際会議場

鈴木友美子、山本恭平、河野孝夫、服部光治
難読症関連遺伝子 KIAA0319 の生後マウス
脳における局在
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21
日 名古屋国際会議場

鯉江真利、久永有紗、河野孝夫、服部光治
リーリンの特異的分解部位の同定と、この分
解による機能制御機構の解析
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21
日 名古屋国際会議場

梅田健太郎、河野孝夫、服部光治
難読症関連遺伝子 KIAA0319 による神経細
胞形態変化の分子機構
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21
日 名古屋国際会議場

久永有紗、鯉江真利、河野孝夫、服部光治
リーリンの特異的切断を担うプロテアーゼ
に関する解析
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21
日 名古屋国際会議場

河野孝夫、中村晃太、服部光治
リーリンの新規機能調節機構の解明
第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 21
日 名古屋国際会議場

久永有紗、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 2012 年 12 月 13
日 マリンメッセ福岡

鄧夢妍、中村晃太、河野孝夫、服部光治
脳形成における、リーリン-Dab1 経路の強弱
により調節される現象の解明
第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 15
日 マリンメッセ福岡

河野孝夫、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 2012 年 12 月 15
日 マリンメッセ福岡

リーリンの特異的分解の機構と生理的意義
奥村恭子、久永有紗、鯉江真利、河野孝夫、
服部光治
Neuro2013
平成 25 年 6 月 21 日 京都 京都国際会館

難読症関連遺伝子 KIAA0319 による神経細
胞形態制御の分子機構
服部光治、田頭大志、深見瑛、梅田健太郎、
鈴木友美子、高嶋悠、杉江真梨子、松田幸江、
石井萌、馬場敦、河野孝夫
Neuro2013

平成 25 年 6 月 21 日 京都 京都国際会館

新規モノクローナル抗体を用いた
Reelin-Dab1 経路の解析
尾上文、竹内真理、河野孝夫、服部光治
第 59 回日本薬学会東海支部大会
平成 25 年 7 月 6 日 名古屋 名城大学

リーリンの特異的切断による機能制御機構
奥村恭子、久永有紗、鯉江真利、河野孝夫、
服部光治
第 59 回日本薬学会東海支部大会
平成 25 年 7 月 6 日 名古屋 名城大学

てんかん発作後に生じるリーリン切断の分
子機構
森下駿介、久永有紗、河野孝夫、服部光治
第 59 回日本薬学会東海支部大会
平成 25 年 7 月 6 日 名古屋 名城大学

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 横
浜 パシフィコ横浜

河野孝夫、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
第 85 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月
11 日 横浜 パシフィコ横浜

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

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
日本薬学会第 134 年会 平成 26 年 3 月 27
日 熊本

〔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 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：公立大学法人名古屋市立大学
種類と番号：PCT/JP2013/071911
特願 2012-180354
取得年月日：申請中（新規性ありの判断）
国内外の別：両方

〔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

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