

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700375

研究課題名(和文) 神経栄養因子ニューレグリン1の神経伝達物質依存的な切断・放出とその生理的意義

研究課題名(英文) Regulated processing of neuregulin1 precursors in rat cortical neurons

研究代表者

岩倉 百合子 (Iwakura, Yuriko)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：40452081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ニューレグリン1(NRG1)は上皮成長因子スーパーファミリーの一員であり、その受容体とともに脳に広く分布する。脳神経系においては、神経栄養因子としてGABA性神経細胞やグリア細胞の分化・発達、グルタミン酸受容体の発現調節等の働きを担っており、近年では統合失調症の関連遺伝子としても注目されている。しかし、脳内でのNRG1の産生・放出制御機構については未だ不明な点が多い。本研究では、グルタミン酸神経伝達に依存的なNRG1の放出機序を解明する事で、NRG1の機能や作用実態に迫った。

研究成果の概要(英文)：Neuregulin1 (NRG1) belongs to the family of epidermal growth factor (EGF) and is implicated in synaptic plasticity of glutamatergic transmission and neuronal and glial development. Recent genetic studies also indicate the association of this gene with a schizophrenia risk. However, the regulation of NRG1 processing and release in brain is poorly understood. Here we examined glutamate neurotransmission has a regulatory role in NRG1 processing and release in the central nervous system.

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：神経細胞 ニューレグリン1 グルタミン酸受容体 メタロプロテアーゼ 大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

- (1) ニューレグリン 1 (NRG1) は上皮成長因子 (EGF) スーパーファミリーの一員であり、その受容体 (ErbB3・ErbB4) とともに脳に広く分布する (Abe et al, 2009)。NRG1 の放出については、膜貫通型の前駆体の細胞外ドメインが、メタロプロテアーゼにより切断されること (シェディング) が律速段階となる事が報告されている。このシェディング機構は、EGF ファミリーの研究が進んでいる癌関連の分野や、脳神経研究分野ではアルツハイマー病での アミロイドシェディングが広く知られている。このように、シェディングは、細胞内シグナルの制御から関連病態に至るまで、タンパク機能を司る重要な翻訳後修飾の一つなのである。
- (2) NRG1 は、前駆体遺伝子の 5' 側エクソンの選択的スプライシングにより、活性や受容体親和性の異なるタイプ 1 から 6 までの N 末バリエーションを産生する。また、各スプライスバリエーション間では、シェディング様式や生理活性等が異なると予想されている。このような N 末ドメインの多様性が NRG1 バリエーションの多彩な生理作用を生んでいる事が推察されるが、それぞれのバリエーションのシェディング機構の違いや、それに伴う下流シグナル、作用機序の実態は未だに不明な点が多い。
- (3) 研究代表者らは 2011 年、脳における EGF 前駆体のシェディングが、神経伝達物質であるドーパミンに調節されていることを報告した (Iwakura et al, 2011)。発達中の脳が、神経回路や細胞単位でのダイナミックかつ厳密な栄養因子シグナル調節を行う為には、こういった神経活動依存的なシェディング機構が不可欠であると考えられる。さらに、神経伝達物質が神経栄養因子シグナルのオン/オフに強い影響を与える事は、神経活動依存的な可塑性という観点からも、高次脳機能や精神機能にとってシェディングが重要であることを示唆する。しかし、どんな神経伝達物質が、どのように NRG1 やそのスプライスバリエーションのシェディングを調節しているのかは未知のままであった。

2. 研究の目的

- (1) NRG1 は、中枢神経系において GABA 性神経細胞やグリア細胞の分化・発達、グルタミン酸受容体の発現等を調節している神経栄養因子であり、統合失調症の関連遺伝子としても注目されている。申請者の予備実験では、海馬・前頭葉皮質の培養神経細胞において、グルタミン酸刺激は細胞外にシェディング・放出される NRG1 量を

増加させる。申請者の所属研究室では、NRG1 投与が前頭葉皮質でグルタミン酸受容体サブユニットである AMPA 受容体の感受性や、発達後の動物の認知行動を調節する事を報告している (Abe et al 2011, Kato et al, 2011)。これらの事実は生体内での NRG1 のシェディング調節が、皮質神経細胞の形態的・機能的発達、統合失調症関連脳機能、に影響している事を示唆している。

- (2) また、先に述べたスプライスバリエーションのうち、タイプ 1 (NDF)、タイプ 2 (GGF2)、タイプ 3 (SMDF) の 3 種類は中枢神経系での発現が高い。申請者の所属研究室では、タイプ 1-3 の遺伝子発現系及びタンパク生産系を構築している (Wang et al, 2011)。そこで、これらのタンパク生産システムを活用し、タイプ 1-3 それぞれのシェディング調節の違いについても解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、NRG1 及び、NRG1 タイプ 1-3 前駆体のグルタミン酸神経伝達依存的なシェディング調節と、その生理活性の実際に迫る事を目的とした。そのため、下記のように分子 (in vitro)・細胞 (初代培養細胞等)・個体 (モデル動物) といった異なる実験系を設定した。それらの結果を比較・検討する事で、生体内での NRG1 シェディングに関する総合的な理解をはかった。

- (1) ラット大脳皮質初代培養系
初代培養細胞は、胎生 18-19 日のラット大脳皮質を、無血清条件下で一週間分散培養したものをを用いた。その後、グルタミン酸や受容体アゴニストなどの急性刺激を行い、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)、免疫染色やウェスタンブロット、メタロプロテアーゼ合成基質を用いた酵素活性測定等を実施した。
- (2) NRG1 タイプ 1-3 遺伝子の導入
上記初代培養細胞に、アルカリフォスファターゼ (AP) タグ付きの NRG1 タイプ 1-3 発現ベクターを導入した。導入後に各種刺激を加え、AP タグの活性や抗体反応をモニターする事で、それぞれのサブタイプのシェディングの違いを検出した。
- (3) 個体レベルでの検討
上記 (1)(2) の実験結果が、in vivo でも再現されるのか、シェディング酵素の活性化や生理活性をラット脳組織において検討した。

4. 研究成果

- (1) グルタミン酸及びアセチルコリン神経伝達は NRG1 放出を促進する
各種神経伝達物質刺激後のラット大脳皮質初代培養細胞からの NRG1 の放出を、ELISA 法を用いて測定した。アセチルコリンまたはグルタミン酸刺激を行った場合、培養上清への NRG1 への放出量が上昇した。このような神経伝達物質による NRG1 の放出は、western blot 法により実際に NRG1 の受容体である ErbB4 の活性化（リン酸化）をもたらししていることがわかった。次に、アセチルコリンとグルタミン酸それぞれの刺激について、濃度依存的な NRG1 の放出が見られるかを、同じく大脳皮質の初代培養細胞を用いて検証した。
最大放出時の濃度に違いは認められたものの、両者ともに濃度依存的な NRG1 放出の上昇を示した。
- (2) アセチルコリン刺激による NRG1 放出の増加は、グルタミン酸受容体の活性化を介した 2 次的な作用である
グルタミン酸は、他の神経伝達物質である GABA やアセチルコリンなどとも共存し、互いにその放出や神経伝達を制御し合う場合があることが報告されている。中でも、アセチルコリンは前シナプス部や後シナプス部においてグルタミン酸トランスポーターと共に発現し、グルタミン酸の放出量を調節している。そこで、我々の培養系で見られたアセチルコリン刺激による NRG1 の放出も、グルタミン酸放出をコントロールした事による 2 次的なものである可能性が考えられた。そこで、アセチルコリンやアセチルコリン受容体の各種アゴニストとグルタミン酸受容体のアンタゴニストを併用し、NRG1 の培養上清への放出量を測定した。その結果、アセチルコリンやアセチルコリン受容体アゴニスト添加による NRG1 放出量の上昇は、グルタミン酸受容体アンタゴニストでの前処理によって阻害された。
- (3) グルタミン酸刺激による NRG1 の放出増加には、NMDA 型受容体サブタイプの活性化が主に関与している
NMDA 等のイオン透過型受容体サブタイプのアゴニストを用い、どの受容体サブタイプが今回の(グルタミン酸による)NRG1 放出上昇に関与しているのかを検討した。その結果、NMDA 刺激を加えた場合、グルタミン酸刺激と同様に、培養上清中の NRG1 放出量の上昇が見られた。しかしながら、AMPA による刺激ではそのような NRG1 放出の上昇はみられなかった。また、NMDA 刺激により、培養神経細胞ではグルタミン酸刺激同様に ErbB4 のリン酸化が亢進した。また、それぞれの濃度依存性を検証した所、NMDA についてはグルタミ

ン酸刺激同様の刺激濃度増加に伴う NRG1 放出量の上昇が見られた。AMPA 刺激では、そのような濃度依存的な NRG1 放出量の変化は見られなかった。また KA についても同様の検討を行った所、グルタミン酸や NMDA による放出量増加にはおよばなかったものの、KA の濃度増加に伴う NRG1 の放出量上昇が見られた。

- (4) グリア細胞からの間接的な作用を検討
我々の使用した大脳皮質の初代培養系では、ニューロン以外にも、わずかであるがグリア細胞が存在する。グリア細胞には神経伝達物質受容体が発現しており、また各種栄養因子の発現もみられる。これまでの我々の実験結果に置いても、神経細胞からだけでなくグリア細胞からの放出も関与している可能性があった。そこで、同じラット胎児の大脳皮質から初代培養グリア細胞を作成し、グルタミン酸およびグルタミン酸受容体アゴニストによる刺激後の培養上清をサンプルとして、NRG1 量の測定を行った。グリア細胞の培養上清からも NRG1 量の測定はできたものの、その量は神経細胞からの放出量の 2-3 割にとどまった。また、大脳皮質初代培養神経細胞とグリア細胞のそれぞれで、細胞種の population を免疫染色法により確認したところ、初代培養神経細胞では、ニューロンマーカーである MAP2 陽性細胞が大多数をしめ、アストロサイトマーカーである GFAP は 1 割程度であった。グリア細胞では対多数の GFAP 陽性細胞に対して、MAP2 陽性細胞はほとんど見られなかった。これらの結果より、これまで計測した様な NRG1 の放出上昇が、グリア細胞からの間接的な作用である可能性は低いと考えられる。
- (5) NRG1 タイプ 2 は、大脳皮質神経細胞においてグルタミン酸神経伝達依存的な放出調節を受ける

NRG1 には、タイプ 1-6 までのスプライシングバリエーションがある事が報告されている。そのうち、中枢神経系で発現が高いのはタイプ 1-3 の 3 種である。この 3 種の中でもどのスプライスバリエーションの放出に影響しているのかを調べる為、AP タグのついた NRG1 タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 前駆体タンパクの発現ベクターをそれぞれ作成した。それらの発現ベクターをラット大脳皮質初代培養神経細胞に導入し、48 時間後にグルタミン酸等の刺激を行った。続いて、それらの神経細胞の表面に発現した AP タグ付き NRG1 核サブタイプを、AP 抗体を用いて免疫染色する事で発現確認した。すると、AP タグ付き NRG1 タイプ 2 遺伝子を導入した細胞では、グルタミン酸刺激によって細胞表面での発現が減少した。しかし、タイ

プ1とタイプ3については、そのような反応はみられなかった。そこで、タイプ2について、培養上清及び細胞表面のAP活性を測定する事により、グルタミン酸等の刺激に応答する放出変化をモニターした。AP タグ付き NRG1 タイプ2 遺伝子導入後の培養神経細胞にグルタミン酸刺激を与えると、培養上清中の AP 活性は増加した。それと平行して、細胞表面の AP 活性には減少がみられた。さらに、前述の内在性 NRG1 放出増加の主要因であると考えられる NMDA 刺激を行った所、グルタミン酸刺激と同様に、培養上清での活性増加、細胞表面での活性減少傾向が見られた。また、この増加は NMDA 型受容体サブタイプの阻害剤により阻害された。また、このような NRG1 タイプ2 の放出調節が実際にシェディングによるものであるかを確認する為に、膜型メタロプロテアーゼのブロードな阻害剤である GM6001 を前処理した物と比較した。その結果、グルタミン酸又は NMDA 刺激による AP 活性は、培養上清ではその増加が阻害され、細胞表面ではその減少が阻害された。この事から、グルタミン酸及び NMDA 刺激による NRG1 タイプ2 の放出は、TACE によるシェディング機構による可能性が高いと考えられた。

(6) NMDA 神経伝達は、TACE と PKC の活性化を通じて NRG1 タイプ2 のシェディングを促進する

膜型メタロプロテアーゼ群が活性化するためには、PKC 等の細胞内シグナルの活性化が必要である。NMDA 型受容体サブタイプの活性化と、膜型メタロプロテアーゼの活性化をつなぐ細胞内シグナルを同定する為、NMDA 型受容体サブタイプの下流で活性化する事が報告されている PKC, PKA に着目した。まず、PKC 阻害剤、PKA 阻害剤をそれぞれ前処理後、NMDA 刺激を行い、培養上清への内在性 NRG1 の放出を ELISA により測定した。その結果、PKC 阻害剤処理により、NMDA 刺激による NRG1 の放出増加は阻害された。NRG1 のシェディングによる放出調節に関しては、膜型メタロプロテアーゼのうち、tumor necrosis factor converting enzyme (TACE) 等が報告されている。そこで、我々は TACE 合成基質を用い、NMDA 刺激後の大脳皮質初代培養神経細胞における TACE 活性測定を行った。NMDA 刺激により、TACE 活性の上昇が認められた。この上昇は、GM6001 の前処理によって阻害された。さらに、PKC 阻害剤を NMDA 刺激前に前処理すると、同様に NMDA による TACE 活性の上昇は阻害された。しかし、PKA 阻害剤前処理は、このような NMDA 刺激による TACE 活性の上昇に影響を与えなかった。この結果から、NMDA 受容体の活性化に伴

い PKC が活性化し、それにより TACE の活性化がもたらされることで、NRG1 タイプ2 のシェディングによる放出が促進する事が示唆された。

(7) KA 投与によるけいれんモデルラット脳でも、NRG1 /ErbB4 シグナルの亢進がみられる

上記のような、in vitro におけるグルタミン酸神経伝達依存的な NRG1 シェディング調節が、実際に in vivo でも起こるのかどうかを、KA 投与によるけいれんモデルラットの海馬を用いて検討した。KA を単回投与したラットのけいれん反応を確認後、投与から 2 時間程度の海馬組織をサンプルとして、ELISA 法により総 NRG1 量測定を行った。その結果、けいれんモデル群では対照群と比較して NRG1 量の上昇が認められた。また、平行して受容体 ErbB1 の活性化(リン酸化)、TACE の活性上昇も認められた。この結果から、in vivo においてもグルタミン酸神経伝達によって、NRG1/ErbB4 シグナルの亢進が起こる事が示唆された。

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 1 件)

(1) ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease (review).

Iwakura Y. and Nawa H.

Frontiers in Cellular Neuroscience. 7(4).

doi: 10.3389/fncel.2013.00004.

Epub 2013 Feb 13.

(査読あり)

[学会発表](計 2 件)

(1) 細胞外ドメインのシェディングを介した、EGF ファミリーと神経伝達物質のクロストーク

岩倉百合子

新潟脳研 生理研 合同シンポジウム

(2014 年 2 月 26 日、愛知県岡崎市)

口頭発表

(2) Regulated processing of neuregulin-1 precursors in rat cortical neurons.

Iwakura Y., Wang R, Araki K, Tanemura S, Nawa H

第 35 回日本分子生物学会年会

(2012 年 12 月 13 日、福岡県福岡市)

口頭発表

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩倉 百合子 (IWAKURA, Yuriko)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号 : 40452321

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :