

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790262

研究課題名(和文) ミエリン形成過程におけるニューレグリン切断と活性相関の可視化技術を用いた解析

研究課題名(英文) Analysis of relationship between neuregulin-cleavage and activity upon myelination by using visualization technique

研究代表者

榎山 拓 (Kashiyama, Taku)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90338343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミエリン形成過程において、神経軸索のニューレグリン(NRG1)とシュワン細胞、またはオリゴデンドロサイトのErbB受容体を介した細胞間シグナル伝達が重要である。この時、ErbBの活性化にはNRG1が切断され、EGF様ドメインを提示することが必要と考えられている。また、切断酵素の違いによりミエリン形成に対して異なる影響が出る事が報告されているが、分子レベルでの検討はされていなかった。本研究ではNRG1の切断を詳細に調べ、切断端認識抗体を作製し、切断の検出および可視化に成功した。また、培養細胞を用いたJuxtacrineアッセイ系を構築し、切断活性相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Intercellular signaling through axonal Neuregulin-1 (NRG1) and ErbB receptor tyrosine kinase in Schwann cell or oligodendrocyte is important for myelination. It is believed that cleavage of NRG1 to present its EGF-like growth factor to ErbB receptor is essential for ErbB activation. It is reported that cleavage of NRG1 by different enzymes result in different effects on myelination. But the molecular mechanism is remain to be elucidated. In this study, we elucidated cleavage mechanism of NRG1 in detail and determined its cleavage sites. We successfully prepared anti-NRG1 cleavage-end specific antibody to detect and visualize its cleavage. We revealed the relationship between NRG1 cleavage and ErbB acitivation by establishing juxtacrine reconstitution system using cultured cells.

研究分野：薬理学

キーワード：ニューレグリン ミエリン ErbB BACE1

1. 研究開始当初の背景

神経軸索を取り囲むミエリンは絶縁性を高め、神経パルス伝導の効率と速度を高める役割を担っている。末梢神経ではシュワン細胞が、中枢神経ではオリゴデンドロサイトがミエリン形成を担うが、この時、神経細胞とミエリン形成細胞の間で適切な細胞間シグナル伝達が行なわれることが重要であると考えられている。神経細胞に発現するニューレグリン1 (NRG1) は、ミエリン形成初期にはミエリン形成細胞の遊走を促進し、後期には神経軸索にミエリンが巻き付く過程を促進していると考えられている。(Taveggia et al. 2005, Michailov et al 2004)。想定される分子メカニズムとしては、神経軸索表面に発現するNRG1の上皮成長因子(EGF)様ドメインがミエリン形成細胞表面に存在するErbB受容体に結合し、ErbB受容体のリン酸化が起こり、さらに下流のシグナルが活性化されると考えられている。このNRG-ErbBシグナル伝達ではNRGが細胞外ドメインの膜近傍領域で切断を受けることが活性化に必要と考えられており、神経系ではBACE1(アルツハイマー病の主要原因とされるアミロイド産生に関わる切断酵素; Beta-site APP cleaving enzyme-1)が切断を担っていることが知られている。BACE1ノックアウトマウスの神経組織ではNRG1の切断が抑制されており、ミエリン形成が未熟となることが報告されている(Willem et al. 2006, Hu et al 2006)。BACE1はミエリン形成が盛んな生後数週間、一過性に発現量が上昇することから、発生段階におけるミエリン形成に重要な働きをしていることが考えられる。また、成体においても神経が損傷を受けた場合、一過的にBACE1の発現量が上昇し、ミエリン再形成を促進していることが報告されている。一方、ADAMプロテアーゼも同様にNRG1の切断活性を持つことが知られているが、ADAMを神

経細胞特異的にノックダウンすると、逆にミエリン形成を促進することが報告されている(Marca et al. 2011)。彼らの主張によると、NRG1のBACE1切断はミエリン形成を促進するが、ADAM切断はNRG1を不活性化しミエリン形成を抑制するというものである。しかし、癌研究や発生学の分野ではADAMによる切断もErbB受容体を活性化することが知られている。また、ADAMもBACE1も共に膜結合型プロテアーゼであるため、切断部位は細胞外の膜近傍の範囲に限られると考えられるが、切断部位のおそらく数アミノ酸の違いがミエリン形成において逆の影響を及ぼすメカニズムについては全く明らかにされていない。さらにはNRG1の切断とErbB受容体活性化の相関についても、分子レベルの検討はされておらず、ミエリン形成部位におけるNRG1やErbB受容体の局在や切断状態についても明らかにされていない。

2. 研究の目的

ミエリン形成過程において、神経細胞とミエリン形成細胞間の細胞間シグナル伝達を担うとされるNRG1のBACE1およびADAMによる切断機構、およびErbB受容体を始めとする下流シグナル活性化の機構を明らかにする。また、NRG1を切断する酵素の違いによる下流シグナルへの影響の違いを明らかにする。上記の目的を達成するために、切断の検出と可視化を可能にするツール、および、NRG1-ErbBシグナル伝達の評価系の確立する。

3. 研究の方法

本研究ではNRG1の切断を検出することが非常に重要である。切断端の同定を行い、切断端に特異的に反応する抗体を作製する。NRG1切断とErbB活性化の相関を検討することと、切断酵素の違いによる活性化の違いのメカニズムを明らかにするために、培養細胞を用いたJuxtacrine活性アッセイ系を構築する。神経系におけるNRG1切断とErbB活性化を断端認識抗体とリン酸化ErbB抗体を用い可視化し、ミ

エリン形成の現場における分子の振る舞いを明らかにする。

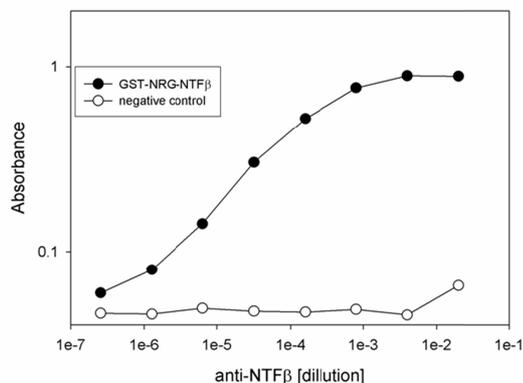
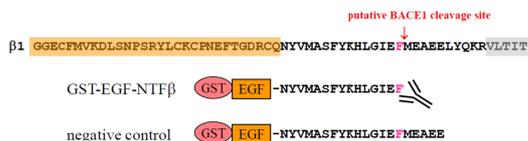
4. 研究成果

(1) NRG1切断部位の同定

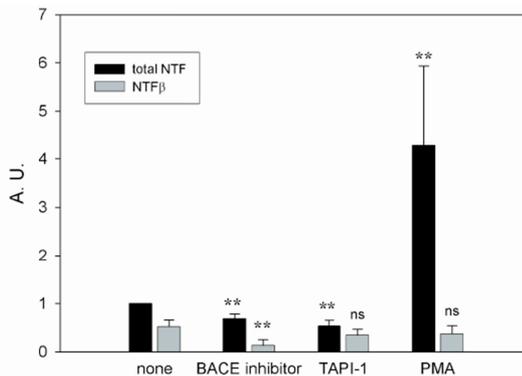
NRG1の切断を定量・可視化するために、切断端を特異的に認識する抗体の作製を行った。それに先立ち、NRG1のBACE1切断部位およびADAM切断部位の同定を行った。切断部位を含むNRG1膜貫通ドメインN末側の配列の合成ペプチドとリコンビナントのプロテアーゼを用い、*in vitro*で切断した後、質量分析で切断部位を明らかにした。切断酵素には市販のリコンビナントのBACE1、およびADAM17を用いた。BACE1による切断部位は1箇所強いピークが現れ、この部位はBACE1切断認識コンセンサス配列から予想された部位と一致していた。一方、ADAM17による切断部位は6箇所のピークが現れた。その後、国内外の他のグループからもADAM17切断部位の候補が発表されたが、切断部位の候補はさらに増え、特定するのは困難であると共に、全ての切断部位に対する断端認識抗体を作製することは現実的ではないと判断した。ただし、BACE1の切断部位とは異なっていたため、切断片全体とBACE1切断片の差分がADAM切断片と見做すことで半定量的に検出することが可能である。

(2) 切断端認識抗体の作製と評価

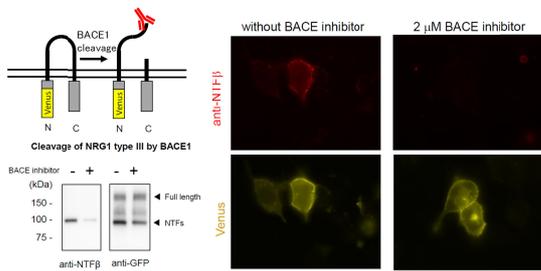
BACE1切断部位を末端とする合成ペプチド(5アミノ酸残基)をウサギに免疫し、作られた抗血清を上記抗原ペプチドでELISA法により抗体価を確認したところ、未切断の全長タンパク質には反応しないが、切断端にだけ特異的に反応する抗体が出来ていることが確認された(下図)。



次に、*in vitro*で予想したNRG1の切断部位が実際に細胞で起こる切断部位と一致していることを確認した。マウス脳からクローニングしたNRG1遺伝子を培養細胞に発現させ、切断片に対する抗体の反応性を検討したところ、確かにNRG1のBACE1切断がその部位で起きており、且つメジャーなBACE1切断部位であることが確認された。BACE inhibitor存在下では抗体反応が減少し、BACE1過剰発現により増加することも確認された。またPMA存在下でADAM切断を優位にしたときに増えてくる切断片には反応しないことが確認された(下図)。

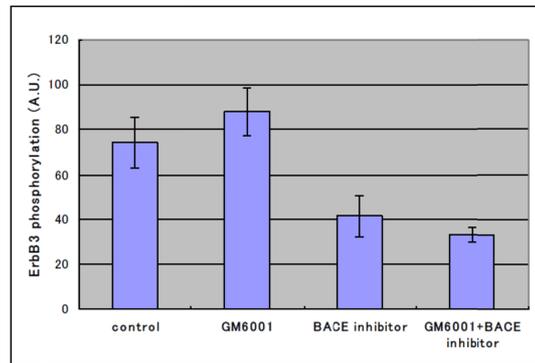
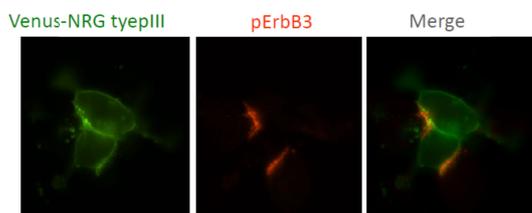


2回膜貫通型で切断後もEGFドメインを含むN末ドメインが細胞表面に提示されるアイソフォームであるNRG1 type IIIを遺伝子導入した培養細胞をこの切断端認識抗体で免疫染色したところ、特異的にNRG1の切断を可視化できることが確認された(下図)。



(3) Juxtacrine様式のErbB活性化

NRG1切断とErbB活性化機構を検討するために、培養細胞を用いたアッセイ系の構築を行った。切断後に細胞表面から遊離されparacrine様式でErbBを活性化するNRG1 type I、および切断後も細胞表面にアンカーされjuxtacrine様式で活性化するtype IIIをそれぞれFlp-In systemを用いてHEK293 tet-on誘導発現細胞を樹立した。一方、ヘテロダイマーを形成するErbB2とErbB3の両方を発現する恒常発現細胞はJump-In systemを用いて樹立した。これらNRG1発現細胞とErbB発現細胞を混ぜてディッシュに撒き、隣接した細胞間で起こるシグナル伝達 (Juxtacrine) を再現し、その制御機構と切断酵素の違いによるErbB活性化への影響を調べた。BACE1活性およびADAM活性をそれぞれBACE inhibitorとGM6001で阻害することでNRG1の切断を制御し、リン酸化ErbB特異的抗体でErbBの活性化の程度を可視化し定量したところ、BACE inhibitor存在下でErbBリン酸化が抑制されたが、GM6001存在下では抑制が見られないことが分かった (下図)。



一方、NRG1のBACE1切断片とADAM切断片を模した大腸菌産生タンパク質は同等にErbBを活性化したため、活性化への影響の違いは単に切断部位の違いではないことが分かった。詳細なメカニズムは今後調べる必要があるが、細胞内でのNRG1の輸送、切断酵素の輸送、切断後の分解系への移行、細胞表面への移行などに違いがあるのではないかと示唆される。

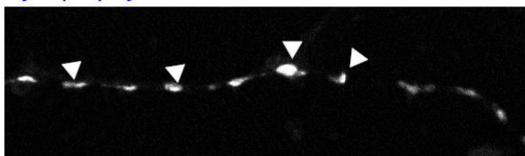
(4) 神経系におけるNRG1 type IIIの検出

次に、中枢神経と末梢神経におけるNRG1 type IIIの切断およびErbBのリン酸化を検討するために、マウスを材料として切断端認識抗体でウェスタンブロットを行なったところ、当初の予想に反し、NRG1の発現量が少なく、免疫沈降法や細胞膜表面タンパク質のビオチン化回収で濃縮しても切断端認識抗体では検出できないことが分かった。この時、切断端抗体に強く反応するバンドが見られたが、回収したバンドを質量分析にかけたところ、NRG3であることが判明した。なお、NRG3はNRG1のBACE1認識配列と同一の配列を持ち、BACE1により全く同じ切断端を持ちうることを予想された。このことから、脳組織や神経初代培養細胞を種々の抗体を用いて詳細な検討を行なったところ、NRG3のBACE1切断片がNRG1に比べ、圧倒的に多く存在していることが分かった。以上のことから、神経組織に多量に存在するNRG3のシグナルに埋もれてしまうため、NRG1の切断の可視化は困難であるという結論に達した。先行研究による発表論文を精査し

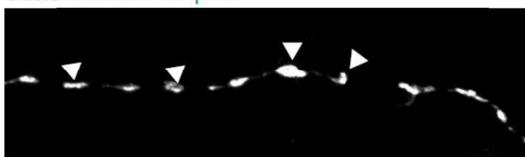
ても、NRG1 type IIIのBACE1切断片をタンパク質レベルで確認を以って検出している例が見当たらないことから、内在性NRG1 type IIIの存在量そのものが少ないことが原因と考えられる。

内在性NRG1の検出は困難だったため、次に、ラット海馬初代培養神経細胞にNRG1 type IIIをトランスフェクションし、局在を調べた(下図)。

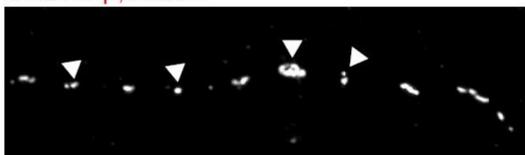
Synaptophysin-CFP



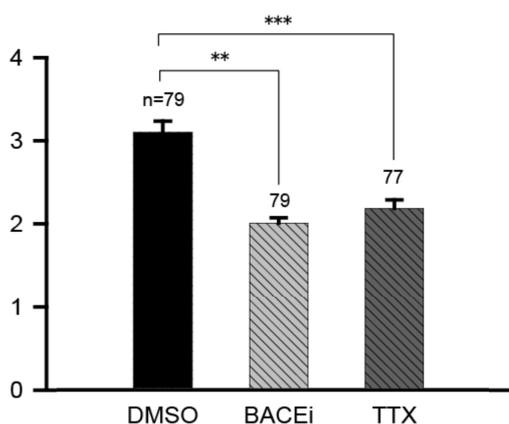
Venus-NRG1-III-β1a



anti-NTFβ, AF594



NRG1 type IIIはsynaptophysinと共局在することから、軸索のpresynapseに集積することが示唆された。また、NRG1の切断は神経活動依存的であることが分かった(下図)。



このことは、NRG1がシナプス形成に関与していることを示唆しており、神経発達におけるNRG1のBACE1切断の重要性をサポートするものであり、統合失調症リスク遺伝子であることに関連する興味深い結果である。また、今

回、NRG1より大量に存在することが分かったNRG3も統合失調症リスク遺伝子であることが報告されており、当初の計画にはなかった新たな発展の足がかりとなった。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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
<http://pharmacology.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻山 拓 (KASHIYAMA, Taku)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：90338343