

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：34452

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290022

研究課題名(和文) 認知機能に関係する神経可塑性プロテアーゼ基質の網羅的探索とそのシグナル系の解析

研究課題名(英文) Screening of plasticity-relating protease substrates and their signaling system

研究代表者

塩坂 貞夫 (Shiosaka, Sadao)

大阪行岡医療大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：90127233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアーゼに対する新規基質の網羅的解析を試み、KLK8(ニューロプシン)について既報告のニューレグリン1(NRG1)の再現実験をおこなった。その結果、海馬においてKLK8はErbB4を活性化し、バルブアルブミン陽性の抑制性GABAニューロンを賦活し、興奮性-抑制性(E/I)バランスを正常に保つ。一方、KLK8KO動物ではこのシグナル系に異常を生じ、E-Iバランスの異常を生じた。また、本網羅的解析によって、Fibronectin, Vitronectinを同定した。一方組織plasminogen activatorの基質としてプラスミンを確認した。

研究成果の概要(英文)：Screening of substrates for proteases localized in the hippocampus and amygdala was carried out. Using mouse brain homogenates, we identified several candidates forming substrate-(mutant) enzyme intermediates with loop G-mutated KLK8 or tissue plasminogen activator (tPA).

NRG1 that we identified previously as a substrate of KLK8 was confirmed and further analyzed physiologically in the present study. Processing of NRG1 by KLK8 triggered ErbB4 signaling in the parvalbumin-positive inhibitory neuron and relates slow gamma oscillation of the hippocampus. Extracellular matrix proteins, fibronectin and vitronectin were also bound directly with mutant KLK8. However, we could not find direct binding of EphB2 and L1cam in the present study that were previously reported.

In addition, loop G-mutated tPA was found to bind plasminogen protein as previously reported.

研究分野：神経化学

キーワード：プロテアーゼ 組織プラスミノゲンアクティベータ ニューロプシン KLK8 NRG1 fibronectin vitronectin

1. 研究開始当初の背景

エンドプロテアーゼは分子進化学から示されるようにもっとも古い機能蛋白質に属する酵素の一群である。その機能は原始的には消化吸収から始まり、血液凝固・線溶、免疫、炎症、そして神経機能など多岐にわたっている。プロテアーゼは基質タンパク質に対して非特異的か特異的か2者に大別できるが、前者が消化機能、炎症などに対応するのに対し、後者のうち高いタンパク質特異性を有するものは複雑な細胞機構に直接関与して精緻な調節を行うと考えられる。こうしたことからプロテアーゼは神経細胞とグリア細胞の移動、細胞同士の認識、スパイン形成、シナプスの認識、形成、維持および脱落などの脳生理機能にも関わる。多くの神経細胞のネットワーク調整機能によって高度な認知機能を営んでいる脳・神経系においては、プロテアーゼはシナプス可塑性を介して高度な脳機能に深くかかわることが次第に明らかとなってきた。事実、我々が解析してきた神経可塑性セリンプロテアーゼ・KLK8(Neuropsin)においても、特異的天然基質を同定したところ、思いもかけず統合失調症リスク蛋白質の一つ、neuregulin1(NRG1)を同定することが出来た。遺伝子欠損マウス生理学的研究からKLK8が作業記憶にきわめて重要な機能を有することが明らかとなり、また統合失調症・双極障害・アルツハイマー病など認知症と大いに関係することが明らかとなった。

2. 研究の目的

プロテアーゼの基質(天然タンパク性基質)の同定法についてこれまでは“Try & Error”であった。我々は新規基質スクリーニング法 Direct-protease substrate interaction 法の開発に成功し、これを用いてプロテアーゼ KLK8 が統合失調症リスク因子 Neuregulin 1 (NRG1)を切断してリガンド部分を放出させ、その受容体(ErbB4)を介して GABA インターニューロンを特異的に活性化させる系; KLK8-ErbB4 系を見いだした。この神経活動依存的な蛋白質切断によるリガンド放出は、タンパク質内に含まれるリガンド部分の細胞機能発現にきわめて重要なプロセスであった。この方法論は新たなシグナル系を網羅的に発見できるツールとして使用できる。本研究ではプロテアーゼを起点とする神経可塑性シグナル系を見だし、体系化することを目的とする。

3. 研究の方法

Direct-protease substrate interaction 法

天然基質の同定が困難な理由は、プロテアーゼが基質分解後すぐに基質を切り離し、タンパク質-基質タンパク質コンプレックスの形成がごく短時間であって、神経伝達・修飾物質受容体に見られるような安定結合によるスクリーニングが出来ないことである。

これを克服するため、我々は結合するものの、切り離さないミュータントリコンビナントプロテアーゼタンパク質を作製し、新規天然基質 プロテアーゼタンパク質の安定結合からその同定に成功した。この方法を応用した研究によって、我々はプロテアーゼ KLK8 起点のシグナル系が統合失調症・双極障害・アルツハイマー病など神経難病に関わることをはじめて明らかとした。

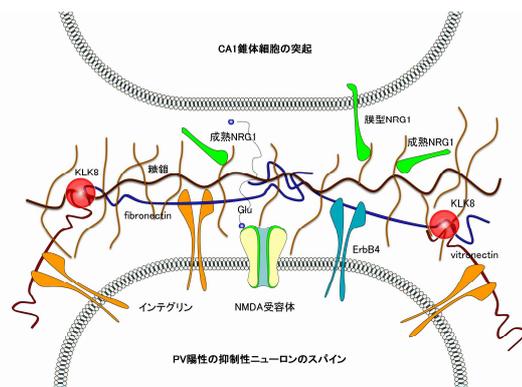
また、スクリーニングによって得られたニューロプシンの基質がIgGスーパーファミリーに属することから、同じタンパク構造を持つ既知タンパク質についても基質特異性を示すかどうか同時に調べた。このようにして得られた基質タンパク質をプロテアーゼが実際に切断することを確かめた。

4. 研究成果

(1) KLK8(Neuropsin)の基質

fibronectin, vitronectin の切断

蛋白質-基質蛋白質コンプレックスの形成による基質同定によって2つのマトリクスタンパク質を同定することができた。220Kd fibronectin を 200Kd と 170Kd に分解し、また 70Kd vitronectin を 62Kd に分解する。リコンビナント KLK8 を in vivo 脳内注入することによってシナプス形成をすることがすでに明らかとなっている(1)。したがってこの分解過程はシナプス形成において、



(図 1)シナプス間隙における fibronectin, vitronectin の分布

これら2つのマトリクスタンパク質はインテグリンと RGD を介して結合し、前後シナプス接着を形成する。KLK8 は LTP が入力されたときに部分切断されることにより接着性を緩め、シナプスの動きを滑らかにすると考えられる。

構造可塑性に関係するものと考えられた。テタヌス刺激が入力され、長期増強が成立するまでは KLK8 が不活性であることが示唆されている(2)ので静止状態では 220Kd fibronectin, 70Kd vitronectin およびペリ

ニューラルネットの糖鎖構造とのコンプレックスが形成されていると考えられる(図1)

EphB2の切断

KLK8はEphB2を切断することが報告されている(3)。レセプター型チロシンキナーゼであるEphB2は扁桃体外側核にある興奮性シナプスにおいてNMDA受容体と結合して、NMDA受容体のシグナルを抑制的にコントロールしている。KLK8が神経活動によってその酵素活性が活性化されるとEphB2を切断して、その結合が外れる。結果として、NMDA受容体の活性化をもたらす、扁桃体における不安知覚系の亢進をもたらすことが明らかとなった(3)。しかし本法を用いて検討したところ直接の結合は観察されなかった。このことはこれらの結合が、直接結合でないか、プロテアーゼ:基質=1:1という中間体の生成および基質の切断ではなく、複数の物質が絡み合い、またその順序が必要など高度な仕組みが必要である可能性がある。

Neuregulin 1 (NRG1)の切断

proNRG1(膜型)および成熟NRG1(糖鎖結合型)を3ヶ所で切断することを再現した(4)。これは神経活動依存的に起こりNRG1から糖鎖結合部位を削除して遊離NRG1を抑制性の後シナプスに向けてリリースさせる。この遊離NRG1は受容体ErbB4のリン酸化を起こす(図2)

NRG1切断断片認識抗体の作製

KLK8がmatureNRG1を切断するアミノ酸配列FKWFKNの6残基を抗原として、切断断片認識抗体(68-73抗体)を作製した。KLK8とmatureNRG1を反応させ、その後、68-73抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、全長mNRG1(34kDa)は検出されず、28kDaのNRG1断片のみが認められた。このように68-73抗体は、KLK8によるプロセシングを受けて生じた28kDaのNRG1切断断片のみを認識することが明らかになった。またこのことは、KLK8がmNRG1のSLRとFKWのアミノ酸配列間で切断することをさらに保証するものである。

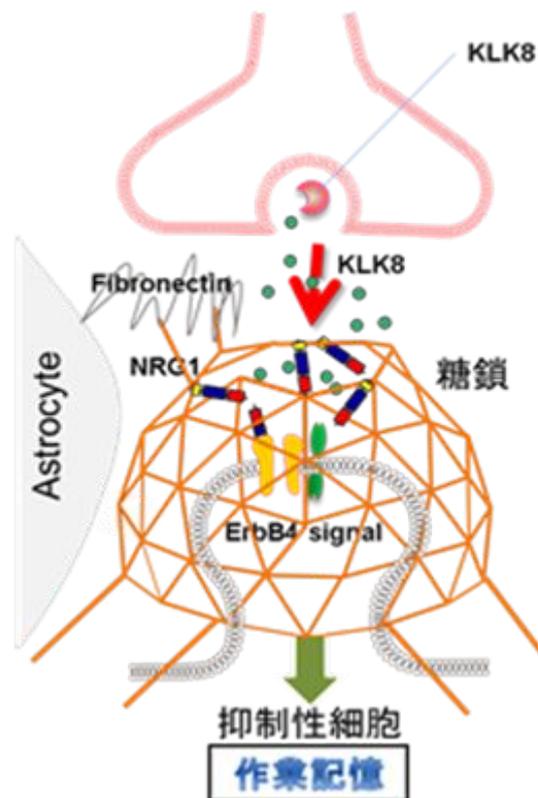
KLK8によるNRG1切断の生理学的意味

KLK8基質候補としてNRG1が同定されその切断断片がerbB4を活性化し効果を発揮する、すなわちKLK8-NRG1シグナルシステムが報告された(4)。

今回、このシグナル系が海馬帯域活動に関与し、KLK8KO動物ではこの活動が損なわれるとともに、NRG1活性ドメインの動物への投与によって回復することを見出した。この成果は神経疾患のE-Iバランス起源説を強く裏付けるものとなり、本シグナルシステムが神経難病の治療への有効性を強く示唆した。

また、KLK8は連合性長期可塑性の成立、と

くにシナプスタグ形成に大きな役割を演じていることも明らかになっている(5)。しかしながらNRG1-KLK8切断断片が連合性長期可塑性に関わっているかどうかは不明であった。今回、関連性を明らかにするためにKLK8欠損マウス由来海馬新鮮切片を用いて二経路刺激実験を行い連合性長期可塑性におけるNRG1活性部分の効果を検討した。その結果、NRG1活性部分の添加により連合性長期可塑性が誘導されることが明らかとなった。したがってKLK8-NRG1 signaling axisの連合性長期可塑性への関与が示唆された。



(図2) 網羅的基質探索の結果得られたKLK8 - 基質結合から推定される抑制性シナプスでの相互作用

抑制性細胞には糖鎖から構成されるカゴ状構造(perineuronal net)があり、NRG1は静止状態ではこの部分に保持されている。長期増強が誘導されると神経活動依存的に糖鎖に結合しているNRG1がKLK8による限定分解を受け、活性部分が分離されて、後シナプス(抑制性細胞)のErbB4に結合して、これを刺激した結果、ErbB4がリン酸化されシグナル系が駆動することになる。これは結果として作業記憶の形成に関係すると考えられる。

(2)tPAの基質

Plasminogenの切断

Loop Gを変異させた Expression vector を作成し、ミュータントリコンビナント tPA を作成した。脳ホモジェネートと Co-incubation して結合タンパク質を採取し、解析したところ、これは市販されている plasminogen protein と結合することが示された。このことはこれまで報告された結果を追認したものである (6,7)、すなわち tPA が plasminogen を直接結合して、切断することを直接に示した。

網羅的基質スクリーニング法(Direct protease-substrate interaction 法)についての技術的コメント

新規天然基質 - ミュータントプロテアーゼの安定結合を形成させ、これによって基質候補を得るのがこの方法の特徴である(4)。酵素活性を持たず結合性のみを維持するミュータントプロテアーゼを作成して、脳ホモジェネートを Co-incubation によって結合タンパク質を得るのがねらいである。しかし、試験管の実験では、必ずしも思い通りの結合物を作らせることができなかった。KLK8 の場合には神経細胞に KLK8 の発現ベクターを組み込んで、発現タンパク質 (KLK8) を特異抗体を用いて免疫沈降させるという方法を用いた。この方法は再現されたので、これをリコンビナントタンパク質 市販基質と混合し試験管内で行ったところ思い通りの結合コンプレックスを作らせることはできなかった。このことは KLK8 が NRG1 などの基質タンパク質を認識する際に、これまで考えられてきたプロテアーゼ 基質という単純な結合ではない可能性を示唆している。すなわちプロテアーゼ:基質=1:1 という中間体の生成および基質の切断ではなく、複数の物質が絡み合い、またその順序が必要など高度な仕組みが必要である可能性がある。プロテアーゼ 基質間の認識機構についてはより詳細なアプローチが必要であろう。

<引用文献>

- (1) Nakamura Y, Tamura H, Horinouchi K, Shiosaka S. Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *Journal of Cell Science*, 119,1341-9, 2006.
- (2) Matsumoto-Miyai K, Ninomiya A, Yamasaki H, Tamura H, Nakamura Y, Shiosaka S. NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *Journal of neuroscience*, 27, 7727-36, 2001.
- (3) Attwood, B., Bougognon, J-M., Patel,

S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, AE., Young, KW., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., Pawlak, R., *Nature*, 493, 372-375, 2011. Doi:10.1038/nature09938.

- (4) Tamura H, Kawata M, Hamaguchi S, Ishikawa Y, Shiosaka S. Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *Journal of neuroscience*. 32, 12657-72, 2012.
- (5) Ishikawa Y, Horii Y, Tamura H, Shiosaka S. Neuropsin (KLK8)- dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 28, 843-9, 2008.
- (6) Stricker, R., Wong, D., Shiu, D., Reyes, P., Shuman, M. Activation of plasminogen by tissue plasminogen activator on normal and thrombasthenic platelets: effects on surface proteins and platelet aggregation. *Blood*, 68, 275-80, 1986.
- (7) Miles, LA., Plow, EF, Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol. Chem.* 260, 4303-4311, 1985.

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 11 件)

Morikawa, S., Shiosaka, S., Tamura, H., Trophic modulation of hippocampal oscillations (Review), *Neurochemistry International*, in press (2017)

塩坂貞夫、学習・認知に係るニューロプシンシグナル 機能、異常および進化、大阪行岡医療大学紀要、4, 13-17, 2017.

Kawata, M., Morikawa, S., Shiosaka, S. and Tamura, H., Ablation of neuropsin- neuregulin 1 signaling imbalances ErbB4 inhibitory networks and disrupts hippocampal gamma oscillation, *Transl Psychiatry* 7. e1052-13, 2017. doi:10.1038/tp.2017.20.

塩坂貞夫、吉田成孝、(特集)切っても

切れない細胞同士の縁 プロテアーゼが細胞ネットワークを作る、脳 21, 19 (2) 98-101, 2016.

吉田成孝、カリクレイン関連プロテアーゼとグリア細胞、脳 21, 19 (2) 105-111, 2016.

田村英紀、塩坂貞夫、ニューロプシンによる海馬認知機能の制御、脳 21, 19 (2) 112-117, 2016.

石川保幸、プロ BDNF と BDNF の二面性電気生理学的側面から、脳 21, 19 (2) 131-135, 2016.

Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., Lume, M., Matsumoto, T., Hara, T., Yamawaki, S. et al. BDNF pro-Peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Pro Nat Acad Sci* 112 (23): 2015. E3067-74. doi:10.1073/pnas.1422336112.

Kobayashi, T., Masuda, H., Kitsumoto, C. Haruta, M., Motoyama, M., Ohta, Y., Noda, T., et al. Functional brain fluorescence plurimetry in rat by implantable concatenated CMOS imaging System. *Biosensors and Bioelectronics* 53:2014 31-36. doi:10.1016/j.bios.2013.09.033.

Suzuki, H., Kanagawa, D., Nakazawa, Y., Tawara-Hirata, Y. Kogure, Y., Shimizu-Okabe, C., Takayama, C., Ishikawa, Y., Shiosaka, S., Role of neuropsin in parvalbumin immunoreactivity changes in hippocampal basket terminals of mice reared in various environments. *Front Cell Neurosci* 8: 420.2014. doi:10.3389/fncel.2014.00420.

Tamura, H., Ishikawa, Y. Shiosaka, S. Does extracellular proteolysis control mammalian cognition? *Reviews in the Neurosciences* 24 (4), 365-74, 2013 doi:10.1515/revneuro-2013-0007.

〔学会発表〕(計 9 件)

田村英紀, 河田美穂, 森川勝太, 塩坂貞夫, ニューロプシンによる統合失調症脆弱因子 Neuregulin-1 のプロセッシングを介した抑制性ニューロンの制御機構, S36-3, 第 57 回日本神経化学会, 9/29-10/1, 奈良, 2014.

森川勝太, 河田美穂, 田村英紀, 塩坂貞夫, ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用に基づく Neuregulin-1 の機能解析, 015-5, 第 57 回日本神経化学会, 9/29-10/1, 奈良, 2014.

中澤瞳, 富永沙葉, 塩坂貞夫, マウス海馬興奮性神経細胞への抑制性入力 of 免疫組織化学的解析, 015-6, 第 57 回日本神経化学会, 9/29-10/1, 奈良, 2014.

河田美穂, 田村英紀, 塩坂貞夫, ニューロプシンによる抑制性神経ネットワークの特異的制御機構, E02-4, 第 57 回日本神経化学会, 9/29-10/1, 奈良, 2014.

谷川美由紀, 俵 平田佳江, 田村英紀, 塩坂貞夫, Unbiased search for potential substrate for proteases, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 - 21 日

Sasagawa, K., Ohta, Y., Motoyama, M. Noda, T. Tokuda, T., Ohta, J., Shiosaka, S. An Implantable Micro Imaging Device for Molecular Imaging in a Brain of Freely-Moving Mouse. In 2014 IEEE International Symposium on Bioelectronics and Bioinformatics, IEEE ISBB 2014. doi:10.1109/ISBB.2014.6820892.

Sunaga, Y., Kitsumoto, C. Motoyama, M. Ohta, Y., Noda, T., Sasagawa, K. Ishikawa, Y., Tokuda, T., Shiosaka, S., Ohta, J. Needle Type CMOS Imaging device for fluorescence imaging of deep brain activities with low invasiveness. In Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics, CLEO - Technical Digest. 2014 doi:10.1109/CLEOPR.2013.6600112.

Tokuda, T., Nakajima, S., Maezawa, Y., Noda, T., Sasagawa, K., Ishikawa, Y., Shiosaka, S., Ohta, J., An in Vitro Demonstration of CMOS-based optoelectronic neural interface device for optogenetics. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS, 2013. pp799-802. doi:10.1109/EMBC.2013.6609621.

Tokuda, T., Nakajima, S., Maezawa, Y., Noda, T., Sasagawa, K., Ishikawa, Y., Shiosaka, S., J. Ohta, J., 2013. An in vitro demonstration of CMOS-based optoelectronic neural interface

device for optogenetics. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2013. pp799-802.

オサイエンス研究科・助教
(現)星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80437515

〔図書〕(計 1 件)

Ishikawa, Y., Shiosaka S. Neuropsin-dependent and -independent synaptic tagging and modulation of long-term potentiation: A quest for the associated signaling pathway(s). synaptic tagging and capture: from synapses to behavior. S. Sajikumar (Ed) 2015. Springer doi:10.1007/978-1-4939-1761-7_4.

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩坂 貞夫 (SHIOSAKA, Sadao)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
大阪行岡医療大学・医療学部・教授
(平成 27 年度に移籍)
研究者番号：90127233

(2)研究分担者 (平成 25 年度)

宮井 和政 (MIYAI Kazumasa)
(元)秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
(現)大阪府立大学・総合リハビリテーション学
研究科・教授
研究者番号：60283933

研究分担者 (平成 25 年度)

板東 良雄 (Bando Yoshio)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20344575

研究分担者 (平成 25-26 年度)

石川 保幸 (ISHIKAWA Yasuyuki)
前橋工科大学・工学部・准教授
研究者番号：90346320

研究分担者 (平成 28 年度)

吉田 成孝 (YOSHIDA Shigetaka)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：20230740

研究分担者 (平成 28 年度)

中澤 瞳 (NAKAZAWA Hitomi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：20712300

(3)連携研究者

田村 英紀 (TAMURA Hideki)
(元)奈良先端科学技術大学院大学・バイ