

論文の内容の要旨

論文題目 シナプス接着分子 **Neuroligin** の切断と機能的意義の解析

氏名 鈴木 邦道

【序論】

神経細胞間をつなぐシナプス構造の形成には、軸索終末部のプレシナプスと樹状突起側のポストシナプスに存在する接着分子が相互作用する必要がある。近年、シナプス形成に関わる I 型膜貫通蛋白として、**Neuroligin (NLG)** が注目を浴びている。**NLG** ファミリーはリガンドである **Neurexin (NRX)** と相互作用することによりシナプスの形成や成熟に関与する。また自閉症患者のゲノムワイド関連解析により **NLG1** 遺伝子のコピー数異常が発見され、さらに **NLG1** の過剰発現あるいは欠損マウスで自閉症様の表現型が報告された。これらの知見から、**NLG1** の発現が適切なレベルで調節されることは、脳高次機能の維持に重要と考えられる。しかしながら、**NLG1** の代謝様式や、その発現量を制御するメカニズムは不明であった。私は修士課程において、**NLG1** が老人斑の主要構成成分であるアミロイド β ペプチドの産生を担うプロテアーゼである γ セクレターゼの新規基質であることを見出した。博士課程においては、**NLG1** の細胞外切断酵素の同定と切断を制御するシグナル経路、そして神経細胞における **NLG1** 切断の生理的意義について検討を行った。

【方法と結果】

1. 内因性 NLG1 は ADAM10 および γ セクレターゼにより段階的に切断される

NLG1 は大きな細胞外ドメインを持つ I 型膜貫通タンパク質である。このような構造的特徴を持ついくつかの分子が、膜近傍の細胞外領域で切断(シェディング)を受けた後に、 γ セクレターゼにより切断されることが知られている。そこで私は NLG1 が生理的に同様の代謝を受けるかについて生化学的検討を行った。成獣ラットから大脳皮質を採取し、

抗 NLG1 細胞質内領域抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、NLG1 全長分子に加え、カルボキシ (C) 末端断片が検出された。その分子量から、NLG1 がシェディングを受け、その細胞外領域が分泌されている可能性が示唆された (Fig. 1a)。また膜画分を 37°C でインキュベートすると、膜結合型の C 末端断片からは、さらに短い可溶性の断片が産生された (Fig. 1b)。この可溶性断片の産生は、膜内配列を切断するプロテアーゼである γ セクレターゼの特異的阻害剤 DAPT で抑制され、C 末端断片が *in vivo* においても γ セクレターゼにより切断されていることが示された。次にマウス初代培養神経細胞の培養上清をウェスタンブロット解析したところ、分泌型 NLG1 が検出された。シェディング責任酵素としてメタロプロテアーゼを想定し、その阻害剤である GM6001 及び TAPI2 で処理したところ、分泌型 NLG1 の顕著な減少が認められた (Fig. 2a)。

さらに γ セクレターゼ阻害剤 DAPT 処理により細胞ライゼート中に C 末端断片の蓄積が観察されたが、この蓄積はメタロプロテアーゼ阻害剤との同時処理により消失した。シェディングを生じる酵素の探索にあたり、膜結合型メタロプロテアーゼである ADAM ファミリーに着目した。特異的阻害剤や RNAi 実験により ADAM ファミリー分子の一つである ADAM10 の関与が示唆された。そこで *Adam10 flox/flox* マウスの大脳皮質より初代培養神経細胞を採取し、アデノウイルスにて Cre リコンビナーゼを発現させ、神経細胞において ADAM10 をノックアウトした。その結果、*Adam10* ノックアウト細胞からの分泌型 NLG1 の量が野生型細胞に比して減少していることが明らかとなった (Fig. 2b)。以上の結果から、NLG1 は ADAM10 によりシェディングを受け、産生される C 末端断片が引き続き γ セクレターゼにより切断を受けることが示された。

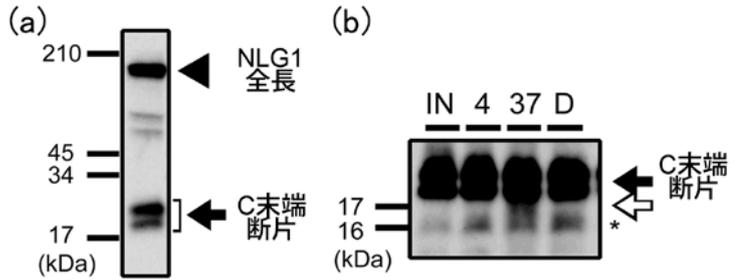


Fig. 1 内因性 NLG1 の全長および切断断片の解析

(a) ラット大脳皮質膜画分のウェスタンブロット解析
(b) セルフリーアッセイによる解析 (IN=input, 4=4°Cでの incubation, 37=37°Cでの incubation, D=DAPT を含んだ状態での 37°C incubation)。白矢印は可溶性細胞質内断片を表す (*は非特異的バンド)。

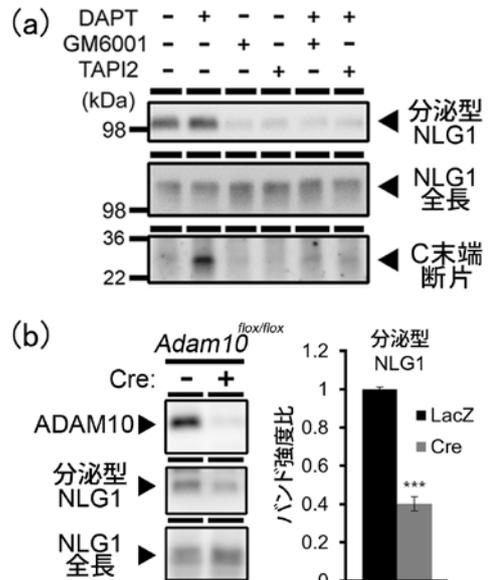


Fig. 2 NLG1 の段階的な切断

(a) マウス初代培養神経細胞における薬剤処理実験
(b) 神経細胞における *Adam10* のノックアウト
(mean \pm SEM; ***p < 0.001 by Student's t-test)

2. NLG1 のシェディングは興奮性神経活動や分泌型 NRX との相互作用により制御される

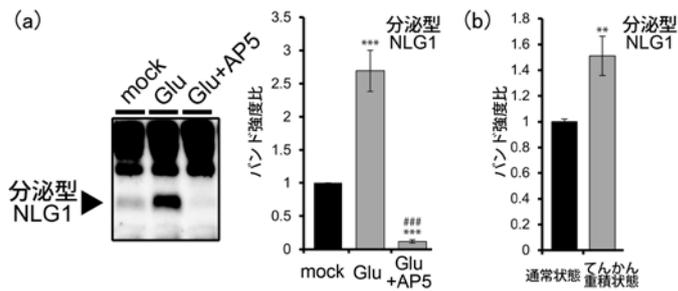


Fig. 3 神経活動による NLG1 のシェディング制御
(a) マウス初代培養神経細胞における興奮性刺激実験*** $p < 0.001$ v.s. mock; *** $p < 0.001$ v.s. Glu (b) てんかん重積状態における分泌型 NLG1 の定量 (mean \pm SEM; ** $p < 0.01$ by Student's t-test)

神経活動の活性化によりシナプスのダイナミックなリモデリングが生じることが報告されている。NLG1 は興奮性シナプスに局在することから、興奮性の刺激により切断が制御される可能性を考えた。そこでラット初代培養神経細胞をグルタミン酸で 15 分間処理後、ウェスタンブロット解析を行ったところ、分泌型 NLG1 の顕著な増加が観察された (Fig. 3a)。

この変化は NMDA 受容体の阻害剤 D-AP5 により抑制された。興奮性入力による切断亢進を *in vivo* で確認するために、マウスにピロカルピンを腹腔内投与しててんかん重積状態を誘導した。てんかん重積状態を誘導したマウス脳においても分泌型 NLG1 の顕著な増加が観察された (Fig. 3b)。このことから、NLG1 のシェディングは NMDA 受容体を介した興奮性神経活動により亢進することが明らかになった。

続いて、リガンドの結合が切断に及ぼす影響について検討した。NRX もまた NLG1 と同様にシェディングを受け、細胞外断片が放出されることを確認した。そこで NRX1 α や NRX1 β を過剰発現した細胞から分泌された細胞外断片を神経細胞に投与したところ、NLG1 のシェディングが亢進した。このことから分泌型 NRX との結合により、NLG1 の切断が亢進することが示唆された。

3. NLG1 のシェディングはシナプス形成能に対して抑制的に作用する

NLG1 切断の機能的な意義を明らかにするために、切断を受けない NLG1 の作製を試みた。NLG1 が細胞外切断を受けると予測される部位を、網羅的にアラニン置換した変異体を作製した。その中で、678 番目のプロリン残基から 681 番目のグルタミン残基までをアラニン残基に置換した PKQQ/AAAA 変異型 NLG1 において、シェディング効率が低下することを確認した。続いて、NLG1 のシェディングがシナプス形成へ及ぼす影響を調べるために、ラット海馬由来初代培養神経細胞に野生型もしくは変異型 NLG1 遺伝子を導入し、NLG1 の局在とスパイン密度を計測した。シェディングの低下する変異 NLG1 は、野生型 NLG1 に比してスパインへの強い集積を示し、スパイン密度は有意に増加した (Fig. 4)。これらの結果から、NLG1 のシェディングはシナプス形成能に抑制的に作用することが示唆された。

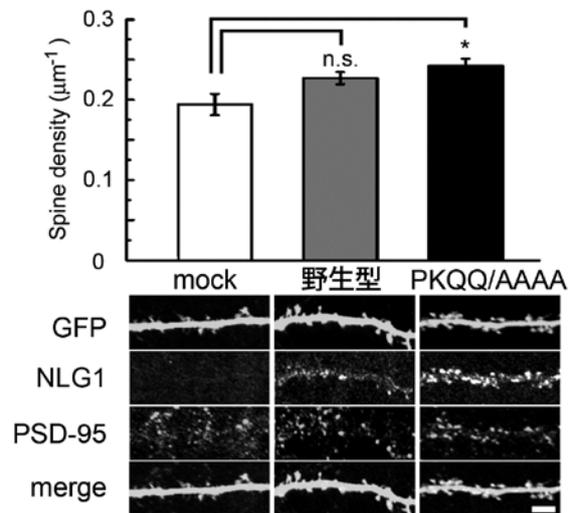


Fig. 4 切断されない NLG1 によるスパイン増加
Mean \pm SEM, * $p < 0.05$ by Dunnett's multiple comparison test

【考察】

本研究により、NLG1は細胞外側において主にADAM10によりシェディングを受け、細胞外領域が分泌型NLG1として放出されること、その結果生じたC末端断片は引き続いてγセクレターゼにより切断を受けることが明らかとなった (Fig. 5)。さらに1段階目のシェディングはNMDA受容体の活性化、可溶性NRXの結合などにより制御されることが示唆された。すなわち、NLG1はシナプスの入力状況やコンテキストに応じて切断を受け、その発現量を適切に保ち、シナプス形成を制御する可能性が想定された。NLG1は自閉症に関連するシナプス接着分子であることから、自閉症の発症メカニズムにおけるNLG1切断の意義についても興味を持たれる。今後、様々な神経疾患の病態におけるNLG1切断の意義を明らかにするとともに、切断によるNLG1発現量の増減がシナプス機能に及ぼす影響についても検討していきたい。

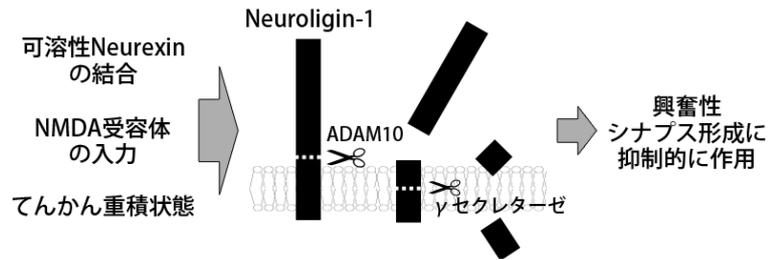


Fig. 5 研究結果から得られた NLG1 切断に関する概念図

【参考文献】

Suzuki K., et al. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroigin-1. *Neuron*, 76:410-422 (2012).