

## 審査の結果の要旨

氏名 鈴木 邦道

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、Neurologin (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。申請者はこれまでに、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。さらに、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。

### 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。そこで申請者は 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。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。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。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。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されることが示された。

### 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 神経活動の活性化によりシナプスのダイナミックな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。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。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 $\alpha$  や NRX1 $\beta$  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。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。

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  $\gamma$  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。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。

以上のごとく本研究は神経系におけるタンパク質代謝制御ならびに発達障害の発症原理に重要な示唆を与えるものであり、博士（薬学）の学位に相応しいものと判定した。