

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20300128

研究課題名（和文） 短期記憶形成シナプスに同期する相関 LTP シナプスの成熟とタギング

研究課題名（英文） Synaptic maturation and tagging between early and late long-term potentiation-induced synapses

研究代表者

塩坂貞夫（SHIOSAKA SADA0）

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

研究者番号：90127233

研究成果の概要（和文）：

シナプスの形態とその構成分子を変化させる新しいメカニズムとして、細胞外プロテアーゼによる接着分子やマトリクス蛋白の再構成からなる神経可塑性の調節メカニズムが動物の短期および長期の記憶に重要であると考えられる。これまでセリンプロテアーゼニューロプシンの膜タンパク質の細胞外ドメインおよびマトリクス蛋白質の特異的切断能について明らかとしてきた。本研究ではニューロプシンシグナル系を探る過程で、その結合タンパク質の同定を試みた。ニューロプシンのプロテアーゼ活性を持たないミュータントを作製し、これを細胞内に導入することによって、培養神経細胞における細胞外分泌動態を検討した。活性を持たないように変異させたニューロプシンも、ワイルドタイプと同様に分泌されるが、これとは異なり培養細胞の膜表面に固定化された。Native page によってこの部分では大きな分子コンプレックスを形成することが明らかとなった。これをワイルドタイプで処理すると、低分子側に移行することからこの部分を活性化酵素が活動依存的に攻撃することで一連の生理作用が惹起されている可能性を示した（田村ら）。このシグナル系はシナプス・タグの形成に関与することおよび異シナプス間の連関（後期連関可塑性）にかかわることを示した（石川ら）。さらに免疫沈降と質量分析によって同定した結合分子すなわちターゲット基質の生理学的機能、分布、および LTP 刺激によるシグナル系伝達などを検討した結果、海馬 Schaffer 側枝から CA1 錐体細胞へのシナプスにおいては NMDA 受容体依存的な神経可塑性にはニューロプシン—ニューレグリンのプロテオリシス後シグナリングが駆動することが明らかとなった。その新しいシグナル系は身体様々な生理機能に関与し、その不調和は神経疾患に関わると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Accumulating evidence has suggested pivotal roles for neural proteases in cognitive functions. Among such proteases, neuropsin, a kallikrein gene-related (KLK) endoprotease, appears to have a significant plasticity function that has been analyzed primarily in the hippocampal Schaffer-collateral pathway. Enzymatically active neuropsin is necessary to establish the early phase of long-term potentiation (LTP). Associations between early and persistent-LTP synapses may be related to mammalian working memory and consequently integration in learning and memory (Ishikawa et al). We challenged and succeeded to obtaining specific substrate for protease neuropsin and found that neuregulin-1 is the most suitable native substrate for neuropsin (Tamura et al). Novel signaling pathway of neuropsin-neuregulin might be a significant in mammalian cognition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ニューロプシン (KLK8)、海馬シャーファー側枝、海馬 CA1、LTP、受容体蛋白質、NMDA 受容体、Synaptic tagging

1. 研究開始当初の背景

我々は 1995 年、マウス海馬に特異的に発現するセリンプロテアーゼ遺伝子を見だし、ニューロプシンで名付けた。この遺伝子が神経活動依存的に大きく増加することから海馬の神経活動（認知）に何らかの機能があるものと考えた。ニューロプシンノックアウトマウスは生理試験・行動試験によって統合失調症・双極障害のいくつかの類似症状を示した。すなわち長期増強低下 (Tamura et al., 2006)、海馬の易興奮性 (Chen et al., 1995)、作業記憶の減退 (Tamura et al., 2006)、社会行動の低下 (未発表データ)、尾懸垂試験の無動時間の増加 (未発表データ) およびストレスに対する脆弱性 (Horii et al., 2008)、などである。またニューロプシンは統合失調症患者で問題とされる領域にその局在がよく一致していた、たとえば前頭葉、帯状回、海馬、扁桃体などである (Chen et al. 1995)。

2. 研究の目的

ニューロプシンを活性化するプロテアーゼカスケードの探索、ニューロプシンの分泌後の動態、およびニューロプシンは二つの異なる回路の同期(association)にどのように関わるかを解明する。

3. 研究の方法

免疫沈降法、質量分析、酵素活性測定法を用いて、ニューロプシンの活性化、活性ニューロプシンの基質、基質によるシグナリングの伝搬について総合的な解析を行った。その際、Schaffer-collateral pathway の長期増強現象をスライス電気生理法、in vivo 電気生理法によって解析した。

4. 研究成果

ニューロプシンの特異的阻害剤、抗体、ノックアウト動物を用いた実験などからニューロプシンの酵素活性がその生理機能に重要であると考えられたため、我々はその特異的基質の探索を行うことにした。その結果、統合失調症関連因子ニューレグリン 1 と特定したほか、マトリクスタンパク質であるフィブロネクチンおよび L1cam などと同定した (Shimizu et al. 1998; Matsumoto-Miyai et al. 2003)。興味深いことに電子顕微鏡をもちいて海馬の L1cam の免疫陽性シナプスを解析すると、L1cam の免疫陽性シナプスは未熟な小型シナプスであり、それ以外に後シナプスとコンタクトを持たない前シナプスのみのブートンも免疫陽性であった。これを定量的に解析するとノックアウト動物ではこれら未熟型前シナプスの増加が認められ、これはリコンビナント蛋白質の脳内注入によって回復された。つまりニューロプシンはシナプス形成あるいはシナプス形成の際の認識メカニズムに関係すると考えられた。

海馬においてニューロプシンは Schaffer collateral-CA1 錐体細胞間の長期増強を調節 (濃度依存的に増強と抑制) する (Tamura et al. 2006)。一方ニューロプシンはレセプター型チロシンキナーゼである EphB2 を切断し、不安をコントロールすることも明らかとなった。EphB2 は扁桃体外側核興奮性シナプスにおいて NMDA 受容体と結合しており、ニューロプシンはこれを切断してその結合を外し、NMDA 受容体の活性化をもたらす (Attwood et al. 2011)。細胞膜あるいは細胞外のリガンドタンパク質を切断・活性化し、興奮性および抑制性シナプスに作用するものと考えられた。これら 2 つのニューロプ

シン 経由シグナリングのいずれもが統合失調症などの精神疾患に関与すると考えられ、治療薬に重要な標的となると思われる。

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)

1. SHIOSAKA, S. & ISHIKAWA, Y. (2011). Neuropsin-a possible early phase synaptic mediator. *J. Chem. Neuroanat.* 42, 24-29.
2. ATTWOOD, B. K., BOURGOGNON, J. M., PATEL, S., MUCHA, M., SCHIAVON, E., SKRZYPIEC, A. E., YOUNG, K. W., SHIOSAKA, S., KOROSTYNSKI, M., PIECHOTA, M., PRZEWLOCKI, R. & PAWLAK, R. (2011). Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
3. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. (2011). Diversity of Neuropsin (Kallikrein 8)-dependent Synaptic Associativity in the Hippocampal Pyramidal Neuron. *Journal of Physiology [London]* 589, 3559-3573.
4. SHINGAKI, K., MATSUZAKI, S., TANIGUCHI, M., KUBO, T., FUJIWARA, T., KANAZAWA, S., YAMAMOTO, A., TAMURA, H., MAEDA, T., OOI, K., MATSUMOTO, K., SHIOSAKA, S. & TOHYAMA, M. (2010). Molecular mechanism of kallikrein-related peptidase 8/neuropsin-induced hyperkeratosis in inflamed skin. *Br. J. Dermatol.* 163, 466-475.
5. ISLAM, M. S., TATSUMI, K., OKUDA, H., SHIOSAKA, S. & WANAKA, A. (2009). Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions. *Neurochem. Int.* 54, 192-198.
6. HARADA, A., SHIOSAKA, S., ISHIKAWA, Y. & KOMAI, S. (2008). Acute stress increases neuropsin mRNA expression in the mouse

hippocampus through the glucocorticoid pathway. *Neurosci. Lett.* 436, 273-277.

7. HORII, Y., YAMASAKI, N., MIYAKAWA, T. & SHIOSAKA, S. (2008). Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice. *Behav. Neurosci.* 122, 498-504.
8. ISHIKAWA, Y., HORII, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 28, 843-849.
9. IZUMI, A., IJIMA, Y., NOGUCHI, H., NUMAKAWA, T., OKADA, T., HORI, H., KATO, T., TATSUMI, M., KOSUGA, A., KAMIJIMA, K., ASADA, T., ARIMA, K., SAITOH, O., SHIOSAKA, S. & KUNUGI, H. (2008). Genetic variations of human neuropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions. *Neuropsychopharm.* 33, 3237-3245.
10. NG, D. C., NAKAGAWA, T., MIZUNO, T., TOKUDA, T., NUNOSHITA, M., TAMURA, H., ISHIKAWA, Y., SHIOSAKA, S. & OHTA, H. (2008). Integrated In vivo Neural Imaging and Interface CMOS Devices: Design, Packaging, and Implementation. *IEEE Sensor J.* 8, 121-130.
11. TAMURA, H., NG, D. C., TOKUDA, T., NAOKI, H., NAKAGAWA, T., MIZUNO, T., HATANAKA, Y., ISHIKAWA, Y., OHTA, J. & SHIOSAKA, S. (2008). One-chip sensing device (biomedical photonic LSI) enabled to assess hippocampal steep and gradual up-regulated proteolytic activities. *J. Neurosci. Meth.* 173, 114-120.

[学会発表] (計 21 件)

1. 塩坂貞夫、(招待講演)、Neuropsin (KLK8) シグナル系—精神疾患の新規治療戦略への期待、大阪神経科学研究会 (ORIGIN)

- 大阪、2012.3
2. 石川 保幸、田村 英紀、塩坂 貞夫、海馬におけるニューロブシン依存的シナプス連合性の解析、第 54 回日本神経化学学会大会、金沢、2011
 3. 山下 春奈、石川 保幸、塩坂 貞夫、自由行動下マウスの海馬 CA1 におけるニューロブシン依存的シナプス可塑性、第 54 回日本神経化学学会大会、金沢、2011
 4. 鈴木 春満、金河 大、塩坂 貞夫、マウス海馬におけるマトリックスメタロプロテアーゼ活性の組織学的解析、第 54 回日本神経化学学会大会、金沢、2011
 5. 河田美穂、田村英紀、塩坂貞夫、ニューロブシン・ニューレグリンシステムの脳内分布と機能、第 87 回日本解剖学会近畿支部学術集会、兵庫、2011
 6. 金河大、鈴木春満、畠中由美子、石川保幸、塩坂貞夫、新奇環境はシナプス可塑性に関与するプロテアーゼ、ニューロブシン(klk8)の遺伝子発現を高める、第 88 回生理学会第 116 回解剖学会合同大会、横浜、2011
 7. 中村雪子、石川保幸、塩坂貞夫、Chemical LTP 刺激によってシナプス膜に集積する分子のスクリーニング、第 88 回生理学会第 116 回解剖学会合同大会、横浜、2011
 8. KANAGAWA, D., ISHIKAWA, Y., & SHIOSAKA, S. Novel environment increases plasticity-related protease neuropsin gene without change in tPA gene ISN-ESN (2011) 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece.
 9. SUZUKI, H., KANAGAWA, D., & SHIOSAKA, S. Histological profile of synaptic matrix metalloproteinase activity in the mouse hippocampus. (2011) 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece.
 10. Kobayashi, T., TAMURA, H., HATANAKA, Y., MOTOYAMA, M., NODA, T., SASAGAWA, K., TOKUDA, T., ISHIKAWA, Y., SHIOSAKA, S., OHTA, J. Functional neuroimaging by using an implantable CMOS multimodal device in a freely-moving mouse. Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), IEEE, 2011.
 11. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. (2011) Diversity of neuropsin-dependent synaptic associativity, Society for Neuroscience, Washington, DC, USA.
 12. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. (2010) Neuropsin dependent synaptic tagging in mouse hippocampus, Society for Neuroscience, San Diego, USA.
 13. 田村英紀、濱口晴也、石川保幸、塩坂貞夫、細胞外セリンプロテアーゼニューロブシンの基質探索、第 53 回日本神経化学学会大会、神戸、2010
 14. 石川 保幸、田村 英紀、塩坂 貞夫、ニューロブシン依存的シナプスタギングの解析、第 53 回日本神経化学学会大会、神戸、2010
 15. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. (2009) Neuropsin dependent compartment specific and process specific synaptic tagging, Society for Neuroscience, Chicago, USA.
 16. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. Neuropsin dependent compartment specific and process specific synaptic tagging, 第 32 回日本神経科学会、名古屋、2009
 17. TAMURA, H., HATANAKA, Y., MINAMI, H., TAGAWA, A., NODA, T., SASAGAWA, K., TOKUDA, T., OHTA, J., ISHIKAWA, Y., SHIOSAKA, S. Real-time in vivo molecular quantification for freely-moving mouse's hippocampus. 第 32 回日本神経科学会、名古屋、2009
 18. KANAGAWA, D., ISHIKAWA, Y., & SHIOSAKA, S. Environmental enrichment enhances neuropsin mRNA in the hippocampus, 第 32 回日本神経科学会、名古屋、2009
 19. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. Neuropsin (KLK8) dependent compartment specific and process specific synaptic tagging 第 52

回日本神経化学会大会、伊香保、群馬、2009

20. ISHIKAWA, Y., TAMURA, H. & SHIOSAKA, S. Neuropsin-dependent and -independent synaptic tagging, 第51回日本神経化学会大会、富山、2008

21. 石川 保幸、堀井洋一郎、田村 英紀、塩坂 貞夫、 Neuropsin 依存的・非依存的シナプスタギング、第31回日本神経科学会、東京、2008

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ニューレグリン-1 (Neuregulin-1) 部分ペプチド

発明者：塩坂貞夫、田村英紀

権利者：奈良先端科学技術大学院大学

種類：特許

番号：特願 2011-259056

出願年月日：平 23.11.28

国内外の別：国内

○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

<http://bsw3.naist.jp/courses/courses205.html>

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

研究者番号：90127233

(2) 研究分担者

吉田 成孝 (YOSHIDA SHIGETAKA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：20230740

(3) 連携研究者

石川 保幸 (ISHIKAWA YASUYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90346320

(4) 連携研究者

田村 英紀 (TAMURA HIDEKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：8043756