

論文の内容の要旨

論文題目

抑制性シナプスにおけるプロテアーゼを介した
シナプス接着分子 Neuroligin 2 切断の機能解析

氏名 木村 美咲

【序論】

脳の神経細胞同士の接合部に局在するシナプス接着分子は、シナプス間の繋がりを精密に調整し神経回路の正しい形成や成熟に不可欠な分子である。様々なシナプス接着分子および関連分子をコードする遺伝子において、精神疾患に連鎖もしくは関連する変異が多数報告されていることから、疾患発症との関連が注目されている。シナプス接着分子を含む I 型膜タンパク質の多くは、プロテアーゼによるタンパク質切断を受け、その機能を調節することが知られている。特にこれまで、興奮性シナプスに局在する接着分子およびプロテアーゼにおいて、様々な研究がなされてきたが、抑制性シナプスに関連するプロテアーゼは報告されていない。加えて、抑制性シナプスの形成・維持・分解などの可塑性に関係する分子機構はほとんど明らかでない。

本研究では、抑制性シナプスに特異的に局在するシナプス接着分子 Neuroligin 2 (NL2) に着目した。NL2 は、統合失調症患者や自閉症患者から複数の遺伝子変異が同定されていることから、精神疾患発症への関与が示唆されている。これまで当研究室において、NL2 はプロテアーゼによる代謝制御を受けることを明らかにしてきた。そこで本研究では、プロテアーゼを介した NL2 の代謝と抑制性シナプスとの機能関連解明を目的とし、研究を遂行した。

【方法・結果】

1. NL2 切断酵素として MT3-MMP を同定した

これまでの検討から、NL2 のタンパク質切断にメタロプロテアーゼが関与していることが見出され、その候補分子として膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) の一種である MT3-MMP が関与していることが示唆されていた (当教室 名尾 洋亮 博士論文)。

そこで私は、NL2 切断における MT3-MMP の関与を検証するため、初代培養神経細胞を用いて MT3-MMP をコードする *Mmp16* mRNA に対する shRNA によるノックダウン (KD) を行った。その結果、*Mmp16* KD により、培養上清中の soluble NL2 (sNL2) の有意な減少及び全長 NL2 の増加が認められた。さらに、*in vivo* における MT3-MMP の関与を明らかにするため、*Mmp16* ノックアウト (KO) マウスを用いて生化学的解析を行った。その結果、*Mmp16* KO マウス脳において、可溶画分中の sNL2 の有意な減少及び不溶画分中の NL2 の増加が認められ、*Mmp16* KO マウス脳では NL2 切断が抑制されていることが明らかとなった (Fig. 1)。以上より、MT3-MMP は脳内において NL2 を基質とすると考えられた。

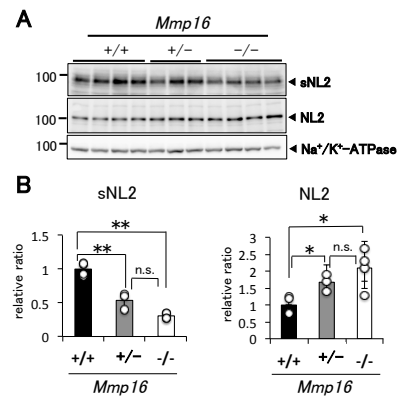


Fig.1 *Mmp16* KOマウス脳を用いたNL2切断への影響解析
(A) *Mmp16*^{+/+}, *Mmp16*^{+/-}, *Mmp16*^{-/-}マウス大脳組織の可溶画分におけるsNL2及び不溶画分における全長NL2タンパク質のウェスタンブロット解析
(B) ウェスタンブロット解析によるsNL2及び全長NL2の定量結果 (n=3-4 Mean±SEM, *P<0.05, **P<0.01, vs WT Tukey-Kramer's multiple comparisons test)

2. MT3-MMP は抑制性シナプスの形成・維持に關与する

NL2 はポストシナプスに局在し、抑制性足場タンパク質 Gephyrin と結合し GABA_A 受容体等とクラスターリングしており、抑制性シナプス形成に重要な分子であると考えられている。そこで、MT3-MMP が抑制性シナプスに与える影響を明らかにするため、*Mmp16* KO マウス大脳組織を用いた生化学的解析により検討した。その結果、*Mmp16* KO マウスにおいて Gephyrin や抑制性プレシナプスマーカー分子 VGAT の発現量が有意に増加していた

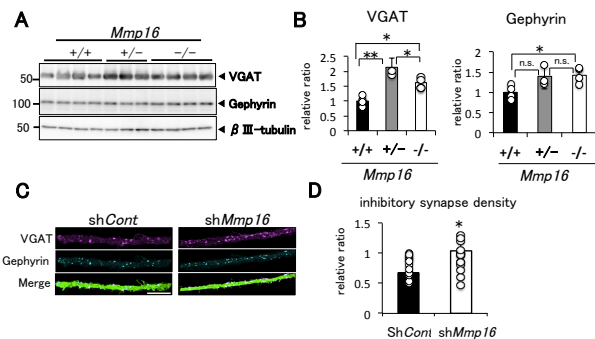


Fig.2 MT3-MMPが抑制性シナプスに与える影響の解析
(A) *Mmp16*^{+/+}, *Mmp16*^{+/-}, *Mmp16*^{-/-}の不溶画分におけるVGAT及びGephyrinのウェスタンブロット解析
(B) ウェスタンブロット解析によるVGAT及びGephyrinの定量結果 (n=3-4, Mean±SEM, *P<0.05, **P<0.01 vs WT by Tukey-Kramer's multiple comparisons)
(C) *Mmp16* KD培養神経細胞を用いた細胞免疫染色解析 (scale bar = 10 μm)
(D) 細胞免疫染色解析による樹状突起における抑制性シナプス密度の結果 (n=15, Mean±SEM, *P<0.05 vs WT by student's t test)

(Fig. 2A、B)。また、*Mmp16* KD 培養神経細胞においても抑制性シナプス密度の増加が認められた (Fig. 2C、D)。以上の結果から、MT3-MMP を介した NL2 切断は、抑制性シナプスの形成・維持に関与することが示唆された。

3. GABA_A 受容体刺激により MT3-MMP による NL2 切断が増加し抑制性シナプスが減少する

これまで、興奮性シナプスに局在する接着分子 NL1 の切断が、NMDA 受容体刺激により亢進し、スパインを不安定化することが知られている。一方、GABA_A 受容体アゴニストを添加すると、GABA_A 受容体や Gephyrin 分子が減少することが報告されていたが、そのメカニズムについては不明であった。上記の結果から、抑制性刺激に応じて MT3-MMP による NL2 切断が変化し、抑制性シナプス数を調節している可能性を考えた。

そこで、初代培養神経細胞に、GABA_A 受容体アゴニスト muscimol を処理したところ、NL2 切断が有意に増加し、広範な MMP 阻害剤である GM6001 との同時処理により、NL2 切断に対する muscimol の効果が抑制された (Fig.

3A、B)。さらにこのとき、抑制性シナプス密度が減少すること、この影響は GM6001 の共投与により抑制されることが認められた (Fig. 3C、D)。さらにこの現象に MT3-MMP が関与しているかを検証するため、*Mmp16* を KD した初代培養神経細胞に対して muscimol 刺激を行い検証した。その結果、*Mmp16* KD 培養神経細胞では、NL2 切断に変化は見られず、抑制性シナプス密度に変化も認められなかった。以上より、GABA_A 受容体刺激によって MT3-MMP を介する NL2 切断が調節されること、ひいては抑制性シナプスの形成・維持・分解が制御されている可能性が考えられた。

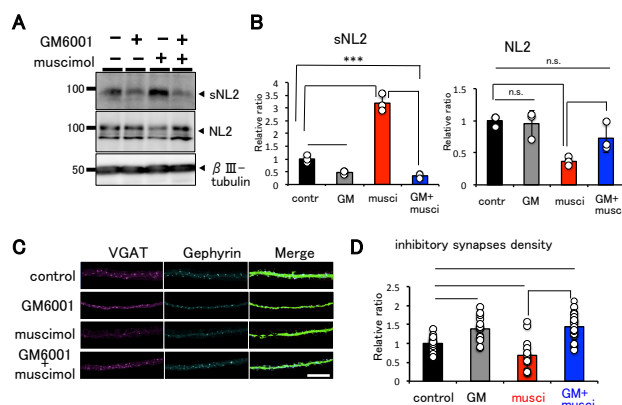


Fig.3 抑制性刺激下におけるNL2切断と抑制性シナプスの関連性の検討
 (A) 初代培養神経細胞に25μM GM6001、及び10μM muscimolを処理し、ウェスタンブロット解析によりNL2切断への影響を解析
 (B) ウェスタンブロット解析によるsNL2及びNL2の定量結果 (n=3-4, Mean±SEM, *P<0.05, **P<0.01 vs control by Tukey-Kramer's multiple comparisons)
 (C) 初代培養神経細胞にGM6001及びmuscimolを処理し、細胞免疫染色により、抑制性シナプスへの影響を解析 (scale bar = 10 μm)
 (D) 細胞免疫染色解析による樹状突起における抑制性シナプス密度の結果 (n=15, Mean±SEM, *P<0.05, **P<0.01 vs control by student's t test)

4. *Mmp16* ノックアウトマウスはPTZ誘発性けいれん発作に対し抑制効果を示す

上述の実験から、*Mmp16* 発現抑制により、抑制性シナプス分子及び密度の増加が認められた。そこでこの抑制性シナプスの増加が個体レベルでどのような変化を及ぼすかについて検討を行った。具体的には、*Mmp16* KO マウスに対して GABA_A 受容体アンタゴニストであり大脳皮質神経細胞の過剰発火によるけいれん発作誘発剤である pentylenetetrazol (PTZ) を投与し、投与後 10 分間観察し、けいれん発作に与える影響を検証した (Fig. 4)。その結果、*Mmp16* KO マウスにおいては、合計発作スコアの有意な減少、ならびに発作スコア 4 が生じるまでの潜時の延長

が認められた。以上の結果から、*Mmp16* KO による抑制性シナプスの増加は、PTZ 誘発けいれん発作に対し抑制効果を有していることが明らかとなった。このことから、MT3-MMP による NL2 切断はけいれん発作の重篤化に関与すること、即ち抑制性シナプスの機能異常に起因する神経精神疾患の発症に関与する可能性が考えられた。

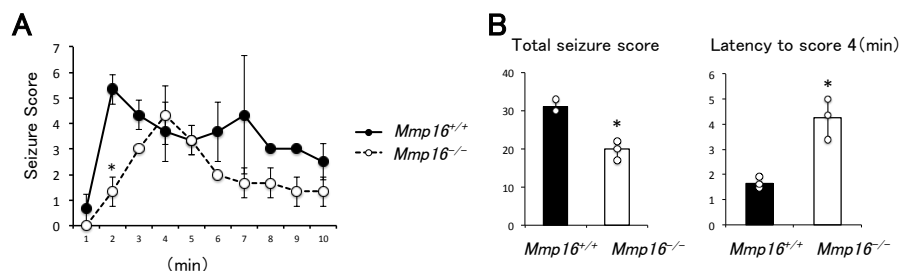


Fig.4 in vivoにおけるMT3-MMPがPTZ誘発けいれん発作に与える影響解析

(A) 50 mg/kg PTZ投与後10分間の平均けいれん発作のタイムコース (n=3, male, female/genotype)

(B) PTZ投与後10分間のけいれん発作合計スコア (n=3, Mean±SEM, *P<0.05 vs WT, t-test)

(C) 両群におけるseizure score 4に至るまでの潜時 (n=3, Mean±SEM, *P<0.05 vs WT, t-test)

【総括】

MT3-MMP はがん細胞などにおいて細胞外マトリクスの分解、そして浸潤や悪性化に関わる膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼファミリーの一つとして同定された分子である。しかし脳神経系における MT3-MMP の局在や機能については、ほとんど不明であった。本研究より、MT3-MMP が GABA_A 受容体刺激に応じて NL2 を切断し、抑制性シナプス密度を低下させる因子であること、そして生体において抑制性シナプス応答に影響する分子であることを明らかにした。またこれまでに抑制性シナプスに関連するプロテアーゼは一切報告がなく、抑制性シナプスを制御する新たな分子として MT3-MMP を見出した点で有意義なものである。

加えてヒト *MMP16* 遺伝子は GWAS により統合失調症の遺伝学的リスクファクターとして同定されていることから、MT3-MMP 及び NL2 の機能異常による抑制性シナプスの変容が精神疾患を引き起こす可能性が考えられる。また抑制性シナプス機能に対するプロテアーゼ活性による制御という観点から、精神疾患の新たな創薬標的になり得ると考えている。