

## 論文の内容の要旨

論文題目           抑制性シナプス特異的接着分子 Neuroligin-2 の  
プロテアーゼによる代謝と機能制御に関する研究

氏     名           名尾     洋亮

### 【序論】

シナプスは神経細胞間の情報伝達の間として機能する接着構造であり、多数のシナプス接着分子がその発達と維持に関与する。Neuroligin (NL) ファミリー分子は1型膜貫通タンパク質であり、ポストシナプスに局在し、プレシナプスのリガンド Neurexin (NRX) と相互作用することで、シナプスの成熟に寄与する接着分子である。また NL1 は興奮性シナプスに、NL2、NL4 は抑制性シナプスに、NL3 は両方のシナプスに局在している。自閉症や統合失調症などの様々な精神疾患において NL/NRX およびその相互作用分子の遺伝子異常が見出されており、NL の病的役割の研究が注目を集めている。

一方これまで NL をはじめとしたシナプス接着分子については、シナプス形成機能に着目して研究が行われてきた。しかしシナプスは環境刺激などの要因でダイナミックに構造を変えることが知られている。これはシナプス構造可塑性と呼ばれ、学習・記憶などに関連する。シナプスが構造を変化させるためには、新たに細胞間接着構造を形成するプロセスに加え、一度できた接着構造を壊す必要がある。しかし接着分子の代謝との関連は不明な点が多い。これまで当研究室では、興奮性シナプス接着分子 NL1 について解析を行い、NMDA 受容体シグナル依存性にプロテアーゼによる代謝を受け、シナプス形成能が負に制御されていることを明らかにしてきた。本研究においては抑制性シナプスに特異的な接着分子 NL2 のプロテアーゼによる切断およびその制御機構について解析した。

### 【方法・結果】

#### Neuroligin-2 は2種類のプロテアーゼにより段階的に切断を受け、発現量が制御される

まず内因性 NL2 がプロテアーゼによる切断を受けているかについて、初代培養神経細胞を用いて検討した。培養上清中には、細胞ライゼート中の全長タンパクよりやや分子量の小さいバンドが検出された。このバンドはメタロプロテアーゼの阻害剤である TAPI2 や GM6001 により消

失したことから、メタロプロテアーゼによる切断（シェディング）によって産生される可溶性 N 末端断片（sNL2）であると考えられた。またこれらの阻害剤処理により、NL2 の全長タンパク量が有意に増加した。さらに膜タンパク質分解酵素である  $\gamma$ -secretase 阻害剤 DAPT を処理すると、細胞内に 20kDa 程度の C 末端断片（NL2-CTF）が蓄積し、TAPI2 や GM6001 の同時処理により消失した。したがって、NL2 はメタロプロテアーゼによるシェディングと  $\gamma$ -secretase によって段階的に切断を受けていること、第一段階目のシェディングにより定常的な発現量が制御されていることが示された。

### MT3-MMP は Neuroligin-2 のシェディングに関与する

興奮性シナプスに局在する NL1 は膜結合型メタロプロテアーゼの一つ ADAM10 によってシェディングを受ける。しかしノックアウトマウス線維芽細胞を用いた解析から、NL2 については ADAM10 およびそのファミリー分子の寄与が小さいことが明らかになった。そこで別の膜結合型メタロプロテアーゼファミリーである MT-MMP ファミリーに着目し、NL2 のシェディングへの影響を検討した。Neuro2a 細胞に NL2 と同時に各 MT-MMP を過剰発現したところ、MT3-MMP を同時に発現した際に顕著な sNL2 の産生増加が観察された。一方 MT3-MMP の活性中心アミノ酸に変異を導入した E247A 変異体では、そのような変化は認められなかった。さらに初代培養神経細胞において MT3-MMP を shRNA でノックダウンしたところ、sNL2 の有意な減少が認められた。以上の結果から、NL2 のシェディングに MT3-MMP が関与していることが示唆された。

### Neuroligin-2 のシェディングは GABA<sub>A</sub> 受容体刺激により促進する

興奮性シナプスに存在する接着分子 NL1 のシェディングは、NMDA 受容体刺激などの興奮性刺激により亢進する。そこで抑制性シナプス接着分子である NL2 は、抑制性シナプスに対する入力刺激によって調節を受けるのではないかと考えた。初代培養神経細胞に GABA<sub>A</sub> 受容体のアゴニストであるムシモールを処理すると、sNL2 の有意な増加が観察された。この結果から、NL2 のシェディングは GABA<sub>A</sub> 受容体刺激により制御されていることが示唆された。

### Neuroligin-2 のシェディング部位変異体の解析

NL2 の細胞外領域は、NRX と相互作用するアセチルコリンエステラーゼ様ドメインと、糖鎖修飾を受けるが特定の構造を取らないと考えられるストーク領域から構成される。sNL2 の分子量から、膜貫通領域近傍のストーク領域においてシェディングを受けている可能性が示唆された。そこでストーク領域に対して各種変異体を作成し、sNL2 産生への影響について検討した。その結果、ストーク領域の C 末端側 20 アミノ酸の欠損変異体 del657 では、sNL2 産生がほぼ抑制されることが明らかとなったことから、NL2 の 657-676 番目のアミノ酸配列中にシェディング部位が存在することが示唆された。そこで、この配列を 2~4 アミノ酸ごとにアラニンに置換した変異体を作成し解析した結果、GPR\_AAA 変異体において sNL2 産生が顕著に亢進した。そこでこの GPRA 配列に着目し、全てアスパラギン酸に置換した GPRA\_DDDD 変異を作成したところ、

sNL2 の産生量が減少した。さらに各変異体について全長タンパク量を検討したところ、シェディングの亢進した GPR\_AAA 変異体では、細胞表面に発現する NL2 (mature NL2) の発現量が減少していた。一方、シェディングの減少した del657、GPRA\_DDDD 変異体では全長 NL2 の量は増加していた。以上の結果から、NL2 のシェディングはストーク領域で生じており、特に GPRA 配列がシェディング部位、もしくはシェディング活性に大きく影響するドメインであること、また全長タンパク量および細胞表面膜上に存在する NL2 の量を調節する機構として機能していると考えられた。

NL2 のシェディングの変化が、NL2 が持つシナプス形成能にどのように影響を与えるか検討するため、NL2 を培養海馬神経細胞に過剰発現し、シナプス誘導能を調べた。野生型 NL2 を発現した神経細胞の周囲には、mock と比べて有意に強く抑制性プレシナプスマーカーの VGAT の集積が認められた。しかし、シェディングの亢進した GPR\_AAA 変異体では、この効果が著しく減弱していた。この結果から、NL2 のシェディングは全長タンパク量を制御し、シナプス誘導能を負に調節していることが示唆された。

#### 【総括】

本研究から、定常的なシェディングは NL2 の全長タンパク量を減少させ、NL2 の持つシナプス形成能を負に制御することが示唆された。また GABA<sub>A</sub> 受容体刺激により切断が亢進した際にも、全長 NL2 発現量の減少傾向が観察された。これらを合わせて考えると、GABA<sub>A</sub> 受容体刺激による切断の亢進は、NL2 を減少させることで、過剰な抑制性刺激に対してシナプス強度を弱めようとするホメオスタティックな可塑性の機構として働いているのではないかと推察している。また、統合失調症患者において NL2 の細胞表面発現を完全に欠失する変異体が同定されている。さらに興味深いことに、NL2 の切断酵素候補として見出した MT3-MMP は、統合失調症のゲノムワイド関連解析において、遺伝子座近傍の一塩基多型が疾患リスクを上昇させることが報告されており、統合失調症における NL2 の切断異常と量の変動が疾患に関与する可能性がある。近年、抑制性シナプスの異常と精神疾患の関係が注目されており、本研究で作出した変異体を用いて NL2 のプロテアーゼによる代謝とシナプス機能に対する影響をより詳細に解析することで、精神疾患におけるシナプス病態解明の一助となり、かつ未だ謎の多い抑制性シナプスの可塑性のメカニズムの一端を解明できるのではないかと期待される。