

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脳21 (2016.3) 19(2):98-103.

切っても切れない細胞同士の縁 - プロテアーゼが細胞ネットワークをつくる

塩坂 貞夫, 吉田 成孝

切っても切れない細胞同士の縁 —プロテアーゼが細胞ネットワークをつくる

しおさかさだお | 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科神経機能科学研究室(〒630-0192 奈良県生駒市高山町8916番地の5)
塩坂貞夫 | E-mail : sshiosak@bs.naist.jp

よしだしげたか | 旭川医科大学解剖学講座機能形態学分野(〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1-1-1)
吉田成孝 | E-mail : syoshida@asahikawa-med.ac.jp

はじめに

細胞は人間の社会に似て、お互い同士が連絡しあい、個々の細胞の認識、同調あるいは反発しながら細胞社会つまり細胞同士のネットワークを形成する。そこでは細胞間のシグナル伝達および細胞集団での可塑性といったダイナミックな変化に対応するべく、それぞれの細胞が分泌する栄養因子の活性化、お互いの接着変化、さらには細胞間シグナル伝達変化のために細胞外プロテアーゼが各細胞活動に対応する細かな調節を行っているのである。こうした細胞ネットワークの調節は発達期や成熟期の動物において身体のあらゆる部位で見られるが、どの臓器においても共通したメカニズムが存在するのかどうか未だに不明である。しかし例えば一見無関係に見える神経と表皮においても、細胞のさまざまな変化が同じ分子を用いて互いに同調しながら分化し、変化していく様子は共通するメカニズムがあるように見える。それもそのはずである。脳と表皮はここでとりあげる細胞外プロテアーゼだけでなく、シグナル伝達に関わるさまざまな分子、N-methyl D-aspartic acid (NMDA) 受容体、カルシウムチャネル、ナトリウムチャネルなどが共通して存在し、それらによって駆動される機能においても共通するメカニズムの存在をうかがわせる。皮膚と脳神経が同時に侵される neurocutaneous 症候群の存在は、一見かけ離れている臓器が共通の縁で結ばれていることを示している。このようなことから特集1では神経可塑性に主眼を置きながらも、表皮細胞のネットワークについても言及したいと思う。そこから神経研究者が思いもしない新たな発見があるかもしれない。

特集によせて

この特集で取り上げるのは細胞ネットワークの影の立役者である細胞外プロテアーゼである。約25年前に私達がこうした研究をはじめたころは、はっきりいって誰からも注目されなかった。まさしく影以下である。しかし、近年、下記に述べるようにさまざまな細胞外プロテアーゼによる新たな機能について発見が相次いだ。1993年に古典的細胞外プロテアーゼの一つ組織プラスミノゲンアクティベータ(tPA)が従来からよく知られていた血液凝固線溶系ではなく、まったく新たな機能として神経の可塑性モデレー

切っても切れない細胞同士の縁

タであることが明らかとなったことである¹⁾。このNatureに掲載された論文は私たちに大きなインパクトを与えた。というのはこのころすでに私たちは人工的に神経活動を誘起した海馬から tPA だけでなく未知プロテアーゼを多数見出していたからである²⁾。その後、tPA に関してさらに驚くような結果がもたらされた。視覚野の眼優位性の成立があってはじめて私たちは立体視ができ、鋭敏な視覚が得られるようになる。眼優位性の変化には受容する神経細胞のスパインの刈込が必要で、視覚の発達には必須の条件である。この刈込と眼優位可塑性という生理機能に tPA が必要であることが見出され、また細胞外プロテアーゼの新たな機能が加わった(貞廣, 森下, 俣賀氏の総説)³⁾。

一方、カリクレインは古典的プロテアーゼの一つである。発痛、血圧調節など体内で大きな働きをしているのはよく知られている。これには構造は似ているが機能を持たない(あるいはわからない)前立腺特異抗原(KLK3)およびカリクレイン2(KLK2)という二つのホモログがすでに見出されていたもののこれらは機能蛋白質とみなされなかったのであまり注目はされていなかった。つまり機能的に重要なのはカリクレイン1(KLK1)のみであろうと長く思われていたのである。しかし、吉田らが1998年、ヒトにおいて新たなカリクレインホモログを見出すなど、長く手つかずであった細胞外プロテアーゼの世界にもようやく活気がもどってきた⁴⁾。これを契機に新たに12種類ものカリクレイン様細胞外プロテアーゼが見出され、これら15種の遺伝子配列はアミノ酸配列と構造はよく似ているが組織分布と機能は大きく異なるマルチジーンファミリーであることが明らかとなった。ヒト19番染色体に存在していたこのプロテアーゼ候補群はKallikrein-related peptidase(KLK1~15)あるいはhuman kallikrein(hK)1~15とよばれ、neuropsin*(KLK8)のように発見時の名前でもよばれることもある。ここではneuropsinを取り上げ総論およびグリア機能での役割については吉田が、海馬認知機能の制御については田村および塩坂がまとめた。吉田の稿ではKLK6の機能についても考察している。現在あきらかとなっている最新の研究状況について参考にしていただけたら幸いである。

もう一つ新発見のプロテアーゼとして忘れてはならないものがある。上記とほぼ同時期に、いくつかのグループから新規プロテアーゼが報告され、三井氏らが発見したMotopsin、スイスのグループが発見したNeurotrypsinは同一の細胞外プロテアーゼであった^{5,6)}。驚いたことにヒトにおいてこの遺伝子のわずか4-base pairの欠損によって重篤な精神遅滞が引き起こされる。さらに分子構造の特徴として上記KLK群とは異なり、tPAやprothrombinと同様にKringle domainを有するマルチドメイン(モザイク)プロテアーゼであった⁷⁾。構造による特徴からKLKに比べるとKringleによるマトリクス蛋白質に対する接着性が大きいと考えられる。このことは基質特異性に重要な意味を持つようである。事実ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるマトリクス蛋白質アグリンに対して特異的に結合しそれを切断する。アグリンは神経筋接合部および脳においてシナプス形成の際に出現するFilopodiaの誘導因子であるので、この異常においては新規Filopodiaの形成に大きな障害をもたらすことになる。そしてこうした細胞外プロテアーゼとマトリ

* : Neuropsin という名称についてはその後、発見された新たな視蛋白質 Opsin の一つが Neuropsin となづけられ、名称がきわめて混乱した。そのため現在では neuropsin/KLK8 と neuropsin/Opn5 として記載されることが多い。

切っても切れない細胞同士の縁

クスとの関係は動物の行動を左右し、ひいては社会行動をも規定する細胞メカニズムであると考えられている (三井氏の総説)。

シナプス機能をモデュレートする細胞外プロテアーゼは他にもたくさんある。Matrix metalloproteinases (MMPs) もその一つである。数ある MMP のなかでも神経可塑性 (正確には長期増強) に関係するのは MMP2 および MMP9 である。とりわけ MMP9 については樹状突起スパインの構造的可塑性との関連から多くの研究がなされてきた⁸⁾。しかし、多くのプロテアーゼ研究がそうであるように細胞機能の現象論にとどまっており、特異基質を通じた生化学的議論が深まっていないのは残念である。プロテアーゼが細胞現象の起爆剤であるならば、実際に作用する活性因子やマトリクスそのものの働きが重要であるだろう。そうした意味から、MMP9 がその基質としての Pro-BDNF から BDNF のリリース (Plasmin を介している

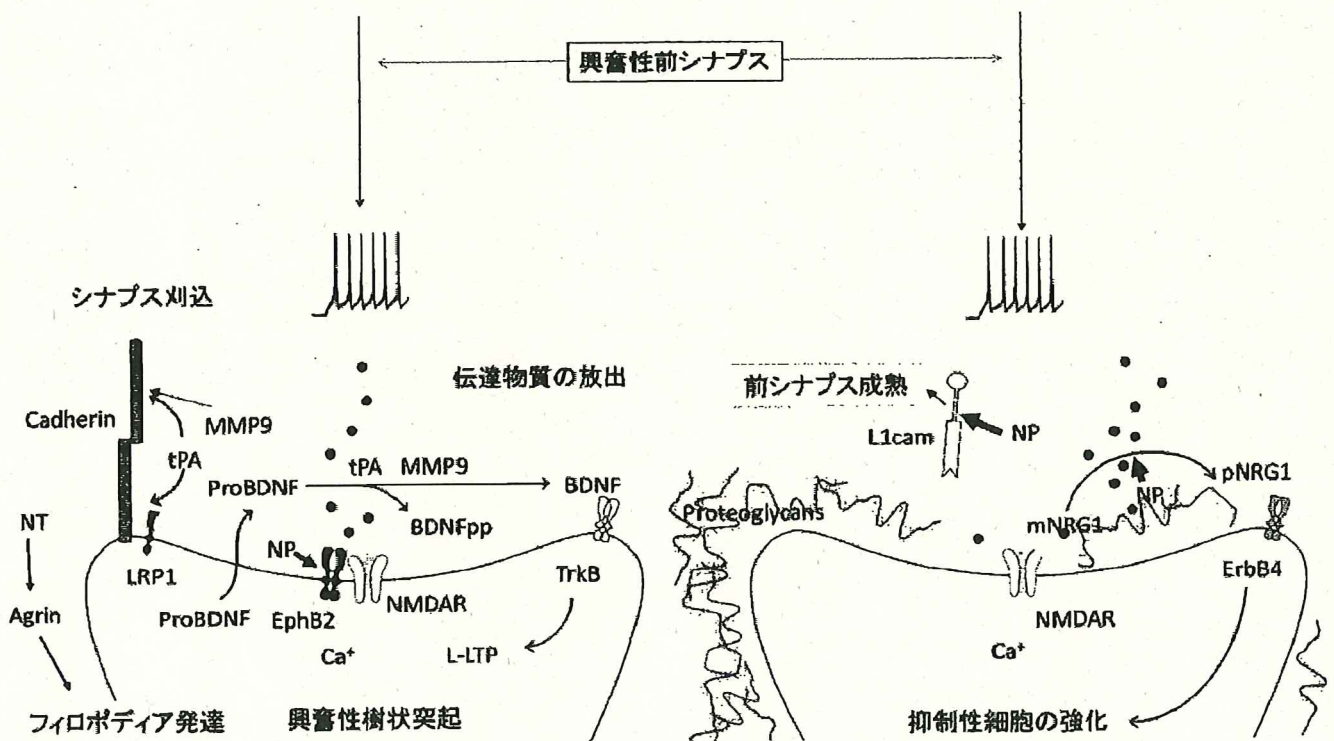


図1 細胞外プロテアーゼとシナプスおよびフィロポディアへの機能

興奮性前シナプス (軸索終末) と興奮性細胞樹状突起 (後シナプス) が同期発火することにより、シナプス間に長期増強が発生する。このとき後シナプスの NMDA 受容体 (NMDAR) の活性化は多くの細胞外プロテアーゼの分泌あるいは活性化を促進する。活動依存的に活性化されたプロテアーゼはカドヘリン (cadherin) や L1cam など接着分子 (図2) の切断, proBDNF や mNRG1 などの栄養因子の活性化などを通してシナプス刈込, フィロポディアの発達, 前シナプスの成熟, 抑制性細胞の強化などさまざまな細胞機能を誘導する。伝達物質 (緑丸) が放出され、シナプス伝達が起こると同時に、それを修飾する各種細胞外プロテアーゼが、それぞれの作用部位に作用し (赤矢印)、その結果細胞機能を誘導する (黒矢印)。

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor, BDNFpp: BDNF propeptide, ErbB4: Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4, EphB2: Ephrin type-B receptor 2, L1cam: L1 cell adhesion molecule, L-LTP: 後期長期増強, LRP1: Lipoprotein receptor-related protein 1, MMP9: matrix metalloproteinase 9, mNRG1: 成熟型 neuregulin1, NP: neuropsin/KLK8, NT: Neurotrypsin/Motopsin, pNRG1: 切断 neuregulin1, proBDNF: 前駆体 BDNF, tPA: 組織型プラスミノゲンアクティベータ, TrkB: TrkB 受容体

切っても切れない細胞同士の縁

との説もある)を通じて長期増強や神経可塑性の病態に関して大きな役割をもっているという事実はプロテアーゼ研究に手がかりを与えてくれる。しかし、BDNFの役割もTrkBに作用するという従来考えられてきた単純な形式よりももっと複雑であろうと考えられている。石川氏らはProBDNF、BDNFの機能に加え、その切断断片も生理的に意味を持つのではないかと考えている(石川氏の総説)。以上のシナプス可塑性に関係する細胞外プロテアーゼの役割についてモデル図を示した(図1)。また、一部の接着分子はシナプス機能と深い関わりをもつと考えられる(図2)。

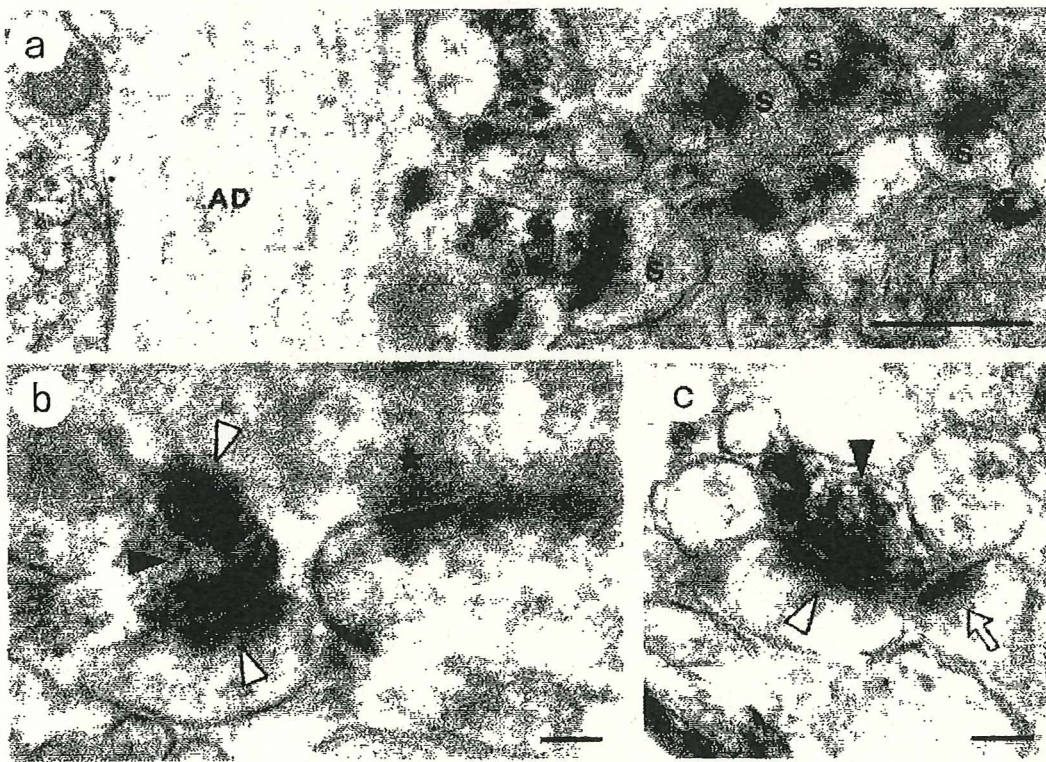


図2 L1cam陽性軸索終末の免疫電子顕微鏡像(マウス海馬CA1領域)

シナプスにはNCAM、カドヘリン、L1camなど多数の接着分子が隣り合う細胞同士の結合に関与している。A-C: L1cam細胞内ドメイン抗体によってL1camは前シナプスの細胞膜の内側に裏打ちされたように染色される。L1陽性の前シナプスはどれも小型(径約200 nm)の未熟シナプスであり(a)、また、強拡像により前シナプス小胞がリング状に染まっているのがわかる(bおよびc)。L1camはニューロブリンにより切断を受け、シナプスの可塑性によって刺激依存的に大型の成熟シナプスに成長すると考えられる^{9,10}。L1陽性の前シナプスが結合する後シナプスはいずれもシナプス後肥厚が顕著な非対称型シナプスである。黒い沈着がdiaminobenzidine反応によるL1cam陽性構造。黒矢頭は陽性前シナプス、白抜き矢頭は陰性のポストシナプス、星印は陰性のシナプス。

AD: Apical dendrite. S: Spine. スケールバー: A 500 nm, B, C 100 nm。

最後に、先にふれたように表皮においても、神経系と同様、細胞同士が互いに同調しながら分化し、変化していく様は神経系と共通するメカニズムがあるように見える。実はKLK8を見出した時、かなり初期からin situハイブリッド法によって皮膚でそのmRNAの存在を認めていたために、神経機能と平行し

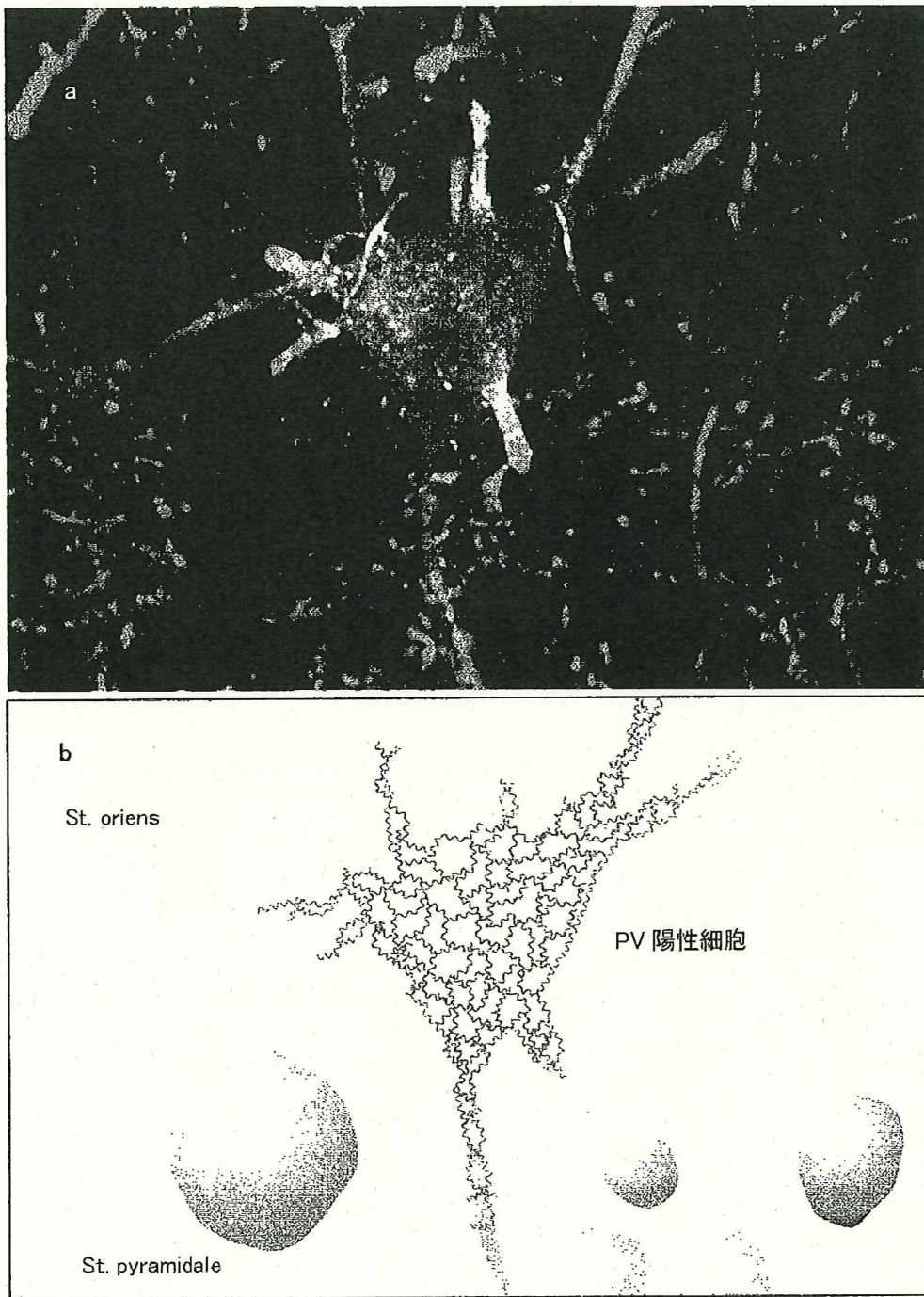


図3 海馬抑制性ニューロン（パルブアルブミン陽性細胞）の周囲を取り巻くペリニューロナルネット

a: 蛍光二重染色法によりノダフジレクチン（WFA: 赤の蛍光）で染色されたペリニューロナルネットがパルブアルブミン陽性ニューロン（緑の蛍光）を籠のように取り巻いているのが観察できる。ペリニューロナルネットはプロテオグリカンをはじめ複数の細胞外マトリックスタンパク質からなり、細胞構造やシグナル伝達を修飾することで細胞機能を制御している。一方、パルブアルブミンで染色されない興奮性ニューロン（写真の黒い部分）にはWFAペリニューロナルネットは観察できない。

b: ペリニューロナルネットの模式図。インターニューロンの細胞の外側を網目のように取り巻いている。水色は興奮性ニューロンの細胞体をしめす。PV: パルブアルブミン、St: stratum

切っても切れない細胞同士の縁

てその機能探索を模索したことがある。現在、世界的にも KLK 研究の一つの柱が皮膚疾患での KLK の役割である。この分野の最新の知見を岸部・山本氏の総説から伺うことができるであろう。ここでもわかるように細胞接着は単に細胞接着分子を介した蛋白-蛋白間結合といった単純なものではなく、アグリンやラミニンといったプロテオグリカンなどの糖蛋白質が複雑に絡み合って細胞外マトリクスを形成し、結果として隣り合う細胞同士の結合を行っている。機能的な細胞接着であるシナプスにおいては、Synaptic specialization とよばれてきたように接着分子、マトリクス、伝達物質受容体の細胞外部分などが凝集してシナプス間隙を被っている。これらは接着のみならず栄養因子のリザーバーとして働くなど、驚くほど多彩な構造をしており、且つ精密にコントロールされていることが徐々に明らかになってきた(図3)。しかしながら、脳および皮膚においてまだこれらの機能には不明な点が多く、その生理と病態メカニズムとの関連は新しい問題として注目されている。この特集ではこの20年の間で理解されるようになった蛋白プロセッシングシグナリングの概念とその異常による病態において今中心となっている問題点に焦点をあてる。

参考文献

- 1) Qian Z, et al : Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361 : 453-457, 1993.
- 2) Yoshida S, Shiosaka S : Plasticity-related serine proteases in the brain (review). *Int J Mol Med* 3 : 405-409, 1999.
- 3) Mataga N, et al : Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* 44 : 1031-1041, 2004.
- 4) Yoshida S, et al : Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. *Gene* 213 : 9-16, 1998.
- 5) Sonderegger P, Matsumoto-Miyai K : Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. *Trends Neurosci* 37 : 413-423, 2014.
- 6) Mitsui S, et al : Mosaic serine proteases in the mammalian central nervous system. *Front Biosci* 13 : 1991-2000, 2008.
- 7) Ozhogina OA, et al : NMR solution structure of the neurotrypsin Kringle domain. *Biochemistry* 47 : 12290-12298, 2008.
- 8) Stawarski M, et al : Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Front Neuroanat* 8 : 68, 2014.
- 9) Matsumoto-Miyai K, et al : NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23 : 7727-7736, 2003.
- 10) Nakamura Y, et al : Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci* 119 : 1341-1349, 2006