

ニューロブシン- Neuregulin-1 シグナルを介した
抑制性神経ネットワークの特異的制御機構

河田 美穂

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 神経システム生物学的研究室

(稲垣 直之 教授)

平成 29 年 2 月 13 日提出

所属 (主指導教員)	神経システム生物学研究室 (稲垣 直之 教授)		
氏名	河田 美穂	提出	平成 29 年 1 月 31 日
題目	ニューロプシン-Neuregulin-1 シグナルを介した 抑制性神経ネットワークの特異的制御機構		

【背景と目的】

脳の高次機能は、多数の神経細胞によって形成される神経ネットワークの活動に基づくと言われている。特に、神経細胞集団が同期発火することで生じる高頻度の周期的なネットワーク活動（ガンマ波）は、学習や記憶などの認知機能と密接に関係している。近年、ガンマ波の発生には抑制性細胞のパルブアルブミン陽性（PV）細胞の活動が必須であることが明らかになった。興味深いことに、認知機能障害を伴う多くの中枢性疾患患者に共通して PV 細胞の異常が認められている。それゆえ、この細胞の活動を制御しているシグナル分子を標的とした治療薬の開発が期待されている。

細胞外セリンプロテアーゼ・ニューロプシンは哺乳類特異的な遺伝子であり、精神疾患で特に問題となる海馬や扁桃体に特異的に発現している。ニューロプシンは細胞外に分泌後、神経活動依存的に活性化し、シナプス伝達の長期増強やワーキングメモリー、てんかん発作、不安などに関与する。また、ヒトニューロプシンの一塩基遺伝子多型（SNPs）が言語性 IQ や注意・集中力といった認知機能障害および統合失調症、双極性障害などの精神疾患と関係することが報告され、ニューロプシンが関わるシグナルカスケードが注目されている。最近、我々のグループは、ニューロプシンの基質として統合失調症脆弱因子である Neuregulin-1（NRG-1）を同定した。膜貫蛋白質である NRG-1 は細胞膜近傍で切断され成熟型（mNRG-1）となった後、細胞外でヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）と結合する。mNRG-1 の上皮成長因子（EGF）ドメインは PV 細胞に局在している ErbB4 受容体に結合するリガンドとして知られているが、mNRG-1 の解裂によって EGF を遊離させるメカニズムはわかっていない。そこで本研究では、ニューロプシンによる NRG-1-ErbB4 シグナルの活性化機構を明らかにし、PV 細胞の活動制御機構の解明を目指す。またカイニン酸（KA）による神経興奮モデルを用いて、ニューロプシン-NRG-1 シグナルがネットワークバランスやガンマ波に関与するかどうかを明らかにする。

【方法と結果】

ニューロプシンと mNRG-1 の各組換え蛋白質を *in vitro* で反応させると、5 分以内に mNRG-1 の切断フラグメントが出現することが CBB 染色によって認められた。アミノ酸配列解析により、mNRG-1 が切断される部位は、ヘパリン結合ドメインと EGF ドメインの

間に3箇所存在していることがわかった。mNRG-1は細胞外でHSPGと結合しており、この状態ではErbB4受容体と結合することができない。しかしながら、NRG-1を発現させたCOS-7細胞の培養上清にニューロプシンを添加すると、ヘパリン結合ドメインの切断除去に続いてEGFドメインが遊離し、ErbB4受容体の自己リン酸化が誘導された。次に、ニューロプシンによるmNRG-1の限定解裂が神経機能に与える影響を明らかにするために、ニューロプシンによって切断されたmNRG-1 (processed NRG-1; pNRG-1) ペプチドを海馬に投与し、その局在を調べた。その結果、pNRG-1の陽性反応は、興奮性細胞には観察されず、PV細胞に認められたことから、ニューロプシンによるmNRG-1のプロセッシングは、ErbB4受容体を介したPV細胞へのシグナル伝達に関わることが示唆された。

ニューロプシン-NRG-1シグナルの生理的な役割を明らかにするために、KAによる側頭葉てんかんモデルを用いた。マウスにKAを腹腔内投与したところ、投与4-6時間後にニューロプシンの活性が有意に上昇した。これと並んで、ErbB4受容体の自己リン酸化レベルも投与4-6時間後に増大したが、ニューロプシンノックアウト(KO)マウスでは、ErbB4の自己リン酸化レベルは変化しなかった。注目すべきことに、KA投与4時間後において、ニューロプシンKOマウスでは、野生型に比べてより強いてんかん発作状態が引き起こされた。次に、神経活動マーカーであるcFosの抗体を用いて、神経細胞の活動状態を調べた。海馬CA1領域においてKA投与1時間後に多数の錐体細胞でcFos陽性反応が観察されたが、PV細胞ではほとんどcFos陽性反応は認められなかった。興味深いことに、4時間後では、錐体細胞におけるcFos陽性反応は減弱し、PV細胞で顕著なcFos陽性反応が観察された。しかしながら、ニューロプシンKOマウスでは、KA投与4時間後でもPV細胞でcFosの陽性反応は認められず、逆に多数の錐体細胞で強いcFos陽性反応が観察された。すなわち、PV細胞の活動低下により、脳内の興奮-抑制(E/I)バランスが崩れ、海馬の興奮性が高まっていることが明らかになった。ニューロプシンKOマウスにNRG-1のEGFドメインペプチド(NRG-1₁₇₇₋₂₄₆)を投与すると、このE/Iバランスの障害や重度のてんかん症状が野生型レベルにまで回復したことから、ニューロプシン-NRG-1シグナルがPV細胞の活動制御に関わっていることが示された。

PV細胞の活動は、ガンマ波の形成に重要であるので、野生型とニューロプシンKOマウスで、カイニン酸の投与によって引き起こされるガンマ波の強度を比較した。その結果、ニューロプシンKOマウスでは、野生型に比べて、顕著に低周波のガンマ波の強度が減少していた。さらにこのガンマ波の障害は、NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ペプチドの投与によって回復した。

以上の結果から、神経活動依存的に活性化したニューロプシンは、mNRG-1を切断し、結果としてErbB4受容体の自己リン酸化を誘導する。このようなシグナル伝達は、PV細胞の活動を上昇させ、ガンマ波の形成に関与することが明らかになった。

【結論と考察】

統合失調症患者の脳で見られるPV細胞の機能低下やガンマ波の低下といった特徴は、本研究で示されたニューロプシンKOマウスの表現系に酷似している。すなわち、ニューロプシン-NRG-1シグナルの破綻は、脳内E/Iバランスの不均衡を生み出し、認知機能障害を引き起こすことから、このシグナル系を回復させることが統合失調症の新たな治療法になり得る可能性が示唆される。

目次

序論.....	6
材料と方法.....	8
1. 実験動物	
2. プラスミド作製	
3. ニューロプシンによる mNRG-1, Fibronectin, Vitronectin の切断解析	
4. N 末端ペプチドシーケンス	
5. 酵素活性と反応速度パラメータの測定	
6. p185 チロシンリン酸化アッセイによる mNRG-1 とヘパリンとの相互作用の解析	
7. 組換えニューロプシンによる細胞表面に局在している mNRG-1 の遊離	
8. 免疫細胞化学染色	
9. pNRG-1 のビオチン化および海馬内投与	
10. ErbB4 の免疫沈降	
11. 灌流固定および凍結切片の作製	
12. 免疫組織化学染色	
13. マウス海馬の生化学的細胞分画	
14. カイニン酸投与とてんかん行動解析	
15. 内在性ニューロプシン蛋白質の濃度測定および酵素活性測定	
16. 定量リアルタイム PCR	
17. NRG-1 ELISA 解析	
18. 抗リン酸化 ErbB4 抗体を用いたウェスタンブロッティング	
19. 抗 cFos 抗体を用いた免疫組織化学染色	
20. cFos 発現細胞数の解析	
21. 局所場電位 (Local field potential, LFP) 測定	
22. NRG-1 ペプチドの側脳室内投与	
23. NRG-1 切断断片認識抗体の作製および評価	
24. 統計解析	
結果.....	19
1. ニューロプシンは mNRG-1 を速やかに切断する	
2. ニューロプシンは mNRG-1 を 3 箇所切断する	
3. ニューロプシンは mNRG-1 とヘパリンとの結合を減少させる	
4. ニューロプシンによる mNRG-1 の切断は EGF 機能ドメインを遊離させる	
5. mNRG-1 による p185 の自己リン酸化はニューロプシンの切断に依存的である	

6. NRG-1 は海馬シナプスに局在する
7. マウス海馬における pNRG-1 の局在
8. カイニン酸投与は内在性ニューロプシン活性、*Nrg-1* mRNA の発現、ErbB4 の自己リン酸化レベルを上昇させる
9. ニューロプシンはカイニン酸誘発てんかん重積状態に寄与する
10. てんかん海馬においてNRG-1-ErbB4 シグナルはニューロプシンによって発動する
11. ニューロプシン KO マウスでは、ErbB4 発現パルブアルブミン陽性インターニューロンで、てんかんによる cFos 蛋白質の発現が減少している
12. ニューロプシン KO マウスでは、海馬ガンマ波の誘導が障害されており、またこの障害は NRG-1₁₇₇₋₂₆₄ によって回復する
13. NRG-1 切断断片認識抗体はニューロプシンによるプロセッシングで生じた NRG-1 切断断片のみを特異的に認識する

考察.....	28
謝辞.....	32
参考文献.....	34
図表.....	41

序論

脳高次機能の発現は、多数の神経細胞が形成する神経ネットワークの活動に基づくことが知られている。このようなネットワーク活動は、主に神経細胞集団へのシナプス伝達の活動によって規定されており、このシナプス伝達が神経活動依存的に可塑的に変化することが、学習や記憶といった認知機能の発現に重要であると考えられている (Caroni et al., 2012; Caroni et al., 2014)。シナプスの量や質の改変には、シナプスにおける接着が神経活動に応じて分子レベルで変化する必要がある。シナプス間隙に局在する細胞外プロテアーゼは、神経栄養因子や接着分子、受容体などのシグナル因子を不可逆的にプロセッシングし、細胞移動、神経突起の進展、シナプス可塑性や記憶・学習など、我々の精神活動に極めて重要な役割を果たしている (Dityatev et al., 2010; Shiosaka and Ishikawa, 2011; Sonderegger and Matsumoto-Miyai, 2014)。しかしながら、このような神経機能に細胞外プロテアーゼがどのように関わっているのか、その詳細な分子メカニズムは明確ではない。

ニューロプシンは、神経可塑性に富む脳領域である海馬や扁桃体といった大脳辺縁系に特異的に局在している細胞外セリンプロテアーゼである (Chen et al., 1995)。翻訳後、不活性型として細胞外に分泌されたニューロプシンは、神経活動の上昇に伴って興奮性シナプス後膜に局在する NMDA 受容体依存的に活性化する (Shimizu et al., 1998; Matsumoto-Miyai et al., 2003; Tamura et al., 2008)。ヒトニューロプシンの一遺伝子多型 (SNPs) が言語性 IQ や注意・集中力および統合失調症や双極性障害などに関係することが示された (Izumi et al., 2008)。また動物実験において、ニューロプシン遺伝子の欠損によって、シナプス伝達の長期増強 (LTP) や後期連関可塑性 (late associativity)、ワーキングメモリーなどに重篤な障害が引き起こされることが報告された (Tamura et al., 2006; Ishikawa et al., 2008)。このようにニューロプシンが認知機能に重要な遺伝子であることが示されてきたが、ニューロプシンの生理的な基質が明らかとなっておらずその作用メカニズムは未解明のままである。

最近、当研究室において基質に対する親和性は保持したまま酵素活性のみを欠失させた変異型ニューロプシンが、マウス海馬初代培養細胞の細胞外スパイン膜上で、分子量約 1 MDa の蛋白質複合体を形成することが示された (Tamura et al., 2012)。この複合体を質量分析によって解析したところ、ニューロプシンの既知のインヒビターである Neuroserpine や Alpha-2-macroglobulin の他に、細胞外マトリックス蛋白質の Fibronectin と Vitronectin、そして神経栄養因子である Neuregulin-1 (NRG-1) が同定された (Tamura et al., 2012)。Fibronectin や Vitronectin はこれまでニューロプシンの基質であることが示唆された結果とよく一致していたため (Shimizu et al., 1998)、統合失調症のリスク遺伝子として知られている NRG-1 がニューロプシンの新たな基質であることが考えられた。

NRG-1 は、当初アイルランドおよびスコットランド家系解析によって統合失調症や双極性障害との関連性が報告され、さらにそれ以降、他の人種・民族でも相次いで同様の精神疾患との関連性が認められた (Stefansson et al., 2002; Corfas et al., 2004; Harrison and Weinberger, 2005)。また、NRG-1 遺伝子改変動物では、多動性、注意欠陥、記憶障害、認知機能障害、社会的ひきこもりや NMDA 受容体の減少など、統合失調症と良く似た特徴を示し、この分子メカニズムの解明が求められている (Mei and Xiong, 2008; Mei and Nave, 2014)。Figure 1 に示すように、NRG-1 は N 末端側を細胞外に配置した一回膜貫通型の前駆体として合成された後、type I 膜貫通プロテアーゼ (tumour necrosis factor- α converting enzyme (TACE) や β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1), meltrin β) などによる切断を受け、成熟型 (mNRG-1) となる (Mei and Xiong, 2008)。この mNRG-1 は、N 末端部にヘパリン結合ドメインがあるため、細胞外に遊離した後、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と結合する (Loeb and Fischbach, 1995)。それゆえ、HSPG から mNRG-1 が遊離する機構が示唆されてきたが、その機構は明らかとなっていない。

一方、mNRG-1 の受容体として ErbB4 が知られているが、ErbB4 の発現は抑制性細胞のパルブアルブミン陽性 (PV) 細胞に極めて限局していることから (Krivosheya et al., 2008; Longart et al., 2007; Vullhorst et al., 2009)、HSPG からの mNRG-1 遊離機構は、ErbB4 を介して抑制性シグナル伝達に関与することが考えられる。実際に、NRG-1 は抑制性神経伝達物質である GABA の放出を促進することが知られており、この作用は ErbB4 を介する (Woo et al., 2007)。興味深いことに、近年 PV 細胞の活動は、E/I バランスの制御や神経細胞の同期的周期発火であるガンマ波の形成に重要であることが明らかになってきた (Klausberger and Somogyi, 2008; Sohal et al., 2009; Cardin et al., 2009; Wulff et al., 2009; Lewis et al., 2012; Hu et al., 2014; Caraig and McBain, 2015)。統合失調症患者脳や認知機能障害を伴う多くの中枢性疾患患者で、共通して PV 細胞の機能低下やガンマ波の消失が観察されていることから (Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2012)、これらの分子メカニズムの解明が、統合失調症の新たな治療法に繋がると期待されている。

そこで本研究では、ニューロプシンによる NRG-1-ErbB4 シグナルの活性化機構を明らかとし、PV 細胞の活動制御機構の解明を目指す。さらに PV 細胞におけるニューロプシン-NRG-1 シグナルが E/I バランスやガンマ波に与える影響を明らかにする。

材料と方法

1. 実験動物

本研究では、C57BL/6J マウス (6-10 週齢, 雄; SLC, Hamamatsu, Japan) とニューロプシンノックアウト (KO) マウスおよびそれに対応した野生型マウス (6-10 週齢, 雄) (Hirata et al., 2001) を用いた。ニューロプシン KO マウスは C57BL/6J マウスと少なくとも 20 回以上戻し交配を行った。明暗 12 時間サイクル (午前 8 時点灯) の飼育環境で、餌は自由摂取させた。動物の管理および操作は National Institutes of Health の指針に従って行い、これらは奈良先端科学技術大学院大学の動物実験委員会の承認を受けた。動物の使用数を最小限に留めるとともに、動物の苦痛の排除に努めた。

2. プラスミド作製

マウス *Nrg-1* は、Forward primer: 5'- ATG TCT GAG CGC AAA GAA GG -3' と Reverse primer: 5'- TAC AGC AAT AGG GTC TTG GTT AG -3' を用いて、マウス脳由来 first-strand cDNA (Genostaff, Tokyo, Japan) から増幅し、pBluescript II SK(+/-) (Stratagene, La Jolla, CA) ベクターにライゲーションした後、大腸菌 (DH5 α) に形質転換した。増幅したプラスミドは Miniprep kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いて、精製した (pBluescript II SK(+/-)-NRG-1)。

EGFP 融合 NRG-1 発現プラスミドは、pBluescript II SK(+/-)-NRG-1 に KpnI サイトを付加し、XhoI と KpnI で NRG-1 cDNA を切り出した後、pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) ベクターにライゲーションすることで得た。

変異 NRG-1 は、インバース PCR 法を用いて、以下の標的配列にて、3 つのアルギニン (R) をアラニン (A) に変異させることで得た。

- R18A (5'- GAC GCG GGA TCC CGC GGG AAG CC -3')
- R67A (5' -GCA TTC AAA TGG TTC AAG AAC GGG AAT GAG C -3')
- R98A (5' -GCA ATC AAC AAA GCG TCC CTG GCT G -3')

3. ニューロプシンによる mNRG-1, Fibronectin, Vitronectin の切断解析

組換えニューロプシンは以前示されたようにバキュロウィルス-昆虫細胞発現系によって作製した (Shimizu et al., 1998)。組換え前駆体ニューロプシンをリジルエンドペプチダーゼ (Wako, Osaka, Japan) によって活性化し (Kato et al., 2001)、ニューロプシンの酵素活性は、合成基質である Boc-Val-Pro-Arg-MCA (Peptide Institute, Osaka

Japan) を用いて測定した。30 °C で 1 分間に 1 μ mol の基質を加水分解するのに必要な量を 1 unit (U) とした。ニューロプシンと bovine fibronectin (Trevigen, Gaithersburg, MD) および human vitronectin (amino acids 20–478; R&D Systems, Minneapolis, MN), human NRG-1- β 1 extracellular domain (mNRG-1; amino acids 2–246; R&D Systems) を 0.5 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 の溶媒中で 37 °C で反応させた。反応させたニューロプシンと 3 種類それぞれの基質は、比率が等量になるように調整した。

反応終了後、分解された Fibronectin および Vitronectin は、それぞれ 6% および 10% の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (SDS-PAGE) 後、銀染色 (Silver staining kit; GE Healthcare, Tokyo, Japan) によって可視化した。ニューロプシンと反応した mNRG-1 は、15% SDS-PAGE ゲルで分離し、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad, Richmond, CA) にトランスファーした。この膜を 5% スキムミルク/ TTBS (0.1% Tween 20, 20mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl) で、30 分間室温でブロッキング後、rabbit 抗 NRG-1 N-terminal extracellular domain (N-NRG-1) ポリクローナル抗体 (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) で 1 時間室温で反応させた。それから、horse radish peroxidase (HRP) 融合 donkey 抗 rabbit IgG (1:10,000; Jackson ImmunoResearch) で 1 時間室温で反応後、化学発光試薬 (Immobilon Western; Millipore, Bedford, MA) を処理し、X-blue film (Fujifilm, Tokyo, Japan) に曝した。

ニューロプシンによる内在性の海馬 NRG-1 の切断は、以下の方法で確認した。マウスから海馬を摘出後、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate で可溶化後、ニューロプシン (10 mU/ml) を加え 37 °C で 1 時間反応させた。これを SDS-PAGE 後、抗 N-NRG-1 抗体 (1:400; Santa Cruz Biotechnology) を用いてウェスタンブロットを行った。

4. N 末端ペプチドシーケンス

組換えヒトニューロプシンと NRG-1 (3 μ g) を 1 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 の溶媒中で混合し、37 °C で 20 分間反応させた。それから、15% SDS-PAGE ゲルで分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF; Bio-Rad) 膜にトランスファーし、蒸留水で洗浄後、CBB 染色液 (0.1% CBB-R-250 / 50% MeOH) に 1 分間浸した。染色後、脱色液 (50% MeOH, 10% 酢酸) に 20 分間浸した後、アルミ箔上で PVDF 膜を乾燥させた。それから、メスで目的のバンド (32, 28, 19, 15, 6 kDa) を切り出し、1.5 ml tube に入れて N 末端ペプチドシーケンスを行った。アミノ酸配列は、Procise 492 cLC sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて Edman 法によって決定した。

5. 酵素活性と反応速度パラメータの測定

様々な MCA 合成基質に対する組換えニューロプシンの酵素活性と速度パラメ

ータは、30 °C で 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 の溶媒を用いて決定した。遊離した蛍光物質 AMC は、microplate reader (Mithras LB940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いて、励起波長 355 nm、蛍光波長 460 nm で測定した。酵素濃度 [E] に依存したニューロプシンの反応速度 [V] は、Hanes-Woolf プロットによって決定した。しかし、Ac-KER-MCA と Ac-DVR-MCA に対するニューロプシンの [V] は、関数 $V = V_{\max} E^h / (E^h + K_m^h)$ ($V_{\max}$, 最大反応速度、 K_m , 酵素の反応速度が $V_{\max}$ の半分になるときの基質濃度、 h , Hill 係数) によってシグモイドカーブをフィットした。AMC の生成は反応時間と共に増大していくため、 h は 1 以上とした。

6. p185 チロシンリン酸化アッセイによる mNRG-1 とヘパリンとの相互作用の解析

mNRG-1 とヘパリンとの結合は、p185 のチロシン自己リン酸化によって評価することができ、以前に示されたように行った (Loeb and Fischbach, 1995)。mNRG-1 と組換えニューロプシンまたは溶媒を 10 μ l Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM CaCl_2 , and 1 mg/ml BSA) 中で、37 °C で 20 分間反応させた。それから Heparin (1.5 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加え、10 分間室温で反応させた後、この混合液を MCF-7 細胞 (human breast cancer, JCRB0134, established by Soule H.D. et al., Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan) に添加し、20 分間 37 °C でインキュベートした。反応終了後、上清を除去し 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) で洗浄し、lysis buffer (50 mM HEPES, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% CHAPS, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 1 mM PMSF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% protease inhibitor cocktail) によって細胞を加え、可溶化した後、5 分間ソニケーションした。その後、4 °C で 12,000 $\times g$ 、15 分間遠心し、上清を回収した。蛋白質濃度は、BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) によって決定した。7.5% SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、一次抗体に mouse 抗 phosphotyrosine モノクローナル抗体 (4G10; 1:1,000, Millipore)、二次抗体に HRP 融合 donkey 抗 mouse IgG (1:10,000, Jackson ImmunoResearch) を用いて p185 のチロシン自己リン酸化レベルを測定した。ローディングコントロールとして HRP 融合 mouse 抗 β -actin モノクローナル抗体 (1:10,000, Jackson ImmunoResearch) を用いた。

7. 組換えニューロプシンによる細胞表面に局在している mNRG-1 の遊離

トランスフェクション 1 日前に、COS-7 細胞 (1.5×10^5 cells/ml) と MCF-7 細胞 (1.25×10^5 cells/ml) を 10% foetal bovine serum (FBS) と 1% penicillin-streptomycin 含有の high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で 24 ウェルプレートに播種し、37 °C で 5% CO_2 /95% air 環境下で培養した。COS-7 細胞および MCF-7 細胞を PBS で洗浄後、培地を OPTI-MEM (Invitrogen,

Carlsbad, CA) に置換し、COS-7 細胞には、NRG-1-EGFP をエンコードした pEGFP-N1 ベクターを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。20 時間後、組換えニューロプシンおよび heparitinase (10 mU/ml, Seikagaku, Tokyo, Japan) を投与し、上清を MCF-7 細胞に添加し、37 °C で 20 分間反応させた。上清を除去後、MCF-7 細胞を lysis buffer で可溶化し、SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 3% SDS, 10% Glycerol, 1% BPB) で 5 分間ボイルした。p185 のチロシン自己リン酸化レベルは上記のようにウェスタンブロット法により検出した。バンド密度は、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) で定量し、 β -actin で規格化した。

8. 免疫細胞化学染色

COS-7 細胞を poly-L-lysine (0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich) コートした 13-mm coverslip (Matsunami, Osaka, Japan) に 2.5×10^4 cells / coverslip の密度で播種した。トランスフェクションした COS-7 細胞を PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde / 4% sucrose で 15 分間固定し、5% BSA / 0.3% Triton X-100 / PBS によって室温で 1 時間ブロッキングした。それから rabbit 抗 NRG-1 EGF-like domain ポリクローナル抗体 (1:1,000, Abcam) を用いて 4 °C で 1 晩反応させ、免疫陽性反応は、Alexa Fluor 594 融合 goat 抗 rabbit 二次抗体 (1:1,000; Molecular Probe, Eugene, OR) で検出した。Hoechst 33342 (1:1,000; Wako) で 10 分間染色後、ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probe) を用いて封入した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Jena, Germany) で Z 方向に 0.5 μ m の厚さでスキャンし、画像解析ソフト (ZEN 2009) で 3-4 枚の画像を重ね合わせた。

9. pNRG-1 のビオチン化および海馬内投与

マウス海馬において、ニューロプシンによる mNRG-1 の切断によって生じる HB domain-lacked mNRG-1 (processed NRG-1; pNRG-1) の局在を同定するために、組換え mNRG-1 (R&D Systems) のビオチン化および pNRG-1 の作製は以下の方法で行った。mNRG-1 を EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, IL) と 1:20 のモル比で混合し、氷上で 2 時間静置した。未結合のビオチンを除去するために、反応溶液を 1.5 時間透析した (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit, 2K, Thermo Fisher Scientific)。ビオチン化 mNRG-1 はニューロプシンと 37 °C で 20 分間反応させた後、pNRG-1 の生成は goat 抗 biotin 抗体 (1:10,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と rabbit 抗 N-NRG-1 抗体 (1:400; Santa Cruz Biotechnology) を用いたウェスタンブロット法により確認した。マウスを 10% ウレタン (Wako) で麻酔後、ビオチン化 pNRG-1 および PBS を右海馬 CA1 領域 (2.06 mm posterior and 1.5 mm lateral to bregma; 1.5 mm ventral from surface of dura) ヘシリンジポンプ (CFV-2100; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) によって駆動するハミルトンシリンジを用いて、0.05 μ l/min の速度で 15 分間投与した。1.5% の

Chicago Sky Blue 6B (Sigma-Aldrich) / PBS を用いて、投与部位および海馬内での溶液の拡散を確認した。

10. ErbB4 の免疫沈降

pNRG-1 を 15 分間投与し、それから 0, 1, 3, 6 時間後にマウスから海馬を摘出した。Chicago Sky Blue 6B の拡散に基づき、背側海馬 3/4 を実験に使用した。摘出した海馬を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 1% protease inhibitor cocktail) で可溶化し、ライセート (1.2 mg protein) に rabbit 抗 ErbB4 抗体 (1.2 µg; Santa Cruz Biotechnology) を加え、4 °C で 1 晩攪拌した。免疫複合体は Protein G Sepharose beads (GE Healthcare, Tokyo, Japan) で回収し、50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 で洗浄後、SDS sample buffer で溶出した。それから mouse 抗 phosphotyrosine (4G10; 1:1,000, Millipore) を用いたウェスタンブロット法によりリン酸化 ErbB4 を定量した。総 ErbB4 蛋白質は、rabbit 抗 ErbB4 (1:500; Santa Cruz Biotechnology) を用いて検出した。

11. 灌流固定および凍結切片の作製

麻酔下マウスを開胸し、灌流ポンプを用いて、左心室から 0.85% NaCl を 5 分間灌流した後、固定液 (4% paraformaldehyde / PBS) を 15 分間灌流した。摘出した脳は固定液に 4 °C で 1 晩浸漬し、それから 30% sucrose / PBS で 2 日間浸漬した。Tissue-teck (Sakura Finetek, Torrance, CA) を適量のせた木製ブロックに sucrose 溶液を拭き取った脳をのせ、細かく砕いたドライアイスで急速に凍結した。-13 °C クリオスタット内でミクロトームを用い、30 µm の冠状切片を作成した。

12. 免疫組織化学染色

切片を PBS に浮遊切片として集め、5% BSA / 0.3% Triton X-100 / PBS によって室温で 1 時間ブロッキングした。それから以下に示す抗体で 4 °C で 1 晩反応させた。Rabbit 抗 NRG-1 EGF-like domain (1:1,000; Abcam), chicken 抗 MAP2 (1:5,000; Abcam), mouse 抗 parvalbumin (1:2,000; Sigma-Aldrich), goat 抗 biotin (1:2,500; Sigma-Aldrich), rabbit 抗 ErbB4 (1:500; Santa Cruz Biotechnology), mouse 抗 phosphotyrosine (4G10; 1:1,000, Millipore) 抗体。

二次抗体は以下のものを使用し、4 °C で 1 晩反応させた。Donkey 抗 rabbit Alexa Fluor 488 (1:1,000; Molecular Probe), donkey 抗 rabbit Alexa Fluor 647 (1:500; Molecular Probe), goat 抗 rabbit Alexa Fluor 594 (1:1,000; Molecular Probe), goat 抗 chicken DyLight

594 (1:1,000; Jackson ImmunoResearch), goat 抗 mouse Alexa Fluor 647 (1:1,000; Molecular Probe), donkey 抗 mouse Alexa Fluor 594 (1:1,000; Molecular Probe), donkey 抗 goat Alexa Fluor 488 (1:1,000; Molecular Probe) 抗体。

それから PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1,000; Wako) で 10 分間染色し、ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probe, Eugene, OR) を用いて封入した。画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて得た。

13. マウス海馬の生化学的細胞分画

マウスの両側海馬を氷冷した homogenize buffer (0.32 M sucrose, 0.5 mM EDTA, 5 mM HEPES, pH 7.4, 1% protease inhibitor cocktail) を 2 ml 加え、ホモジェナイザーで懸濁し、懸濁液を 1.5 ml チューブに 1 ml ずつ分注し、氷上で 30 秒間静置した。ここから 90 μ l 採取し、分画前のサンプル (H) とした。1.5 ml チューブを $1,000 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を S1 とし、ペレットを P1 とした。S1 分画を $12,000 \times g$ で 20 分間遠心し、上清を S2 とし、ペレットを homogenize buffer で懸濁し、粗シナプトソーム分画 (P2) とした。P2 分画を 7.5% / 12% Ficoll / 0.32 M sucrose の上部に添加し、 $68,000 \times g$ で 1 時間遠心した。7.5% Ficoll 層の上層をミエリン分画 (My)、7.5% と 12% Ficoll の間の層をシナプトソーム分画 (SS) として回収した。SS 分画を 10 倍量の氷冷蒸留水を加え、低浸透圧ショック後、 $68,000 \times g$ で 20 分間遠心することでシナプス膜分画 (SM) を得た。それぞれの分画から等量の蛋白を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。NRG-1 の細胞内局在を同定するために、rabbit 抗 NRG-1 cytoplasmic tail (C-NRG-1) ポリクローナル抗体 (1:400, Santa Cruz Biotechnology) と rabbit 抗 N-NRG-1 抗体 (1:400, Santa Cruz Biotechnology) を用いてウェスタンブロットを行った。シナプス分画はシナプスマーカーである PSD-95 の抗体 (1:6,000; Upstate Biotechnology) を用いて確認した。

14. カイニン酸投与とてんかん行動解析

てんかん発作を誘導するため、マウス腹腔内に PBS で溶解したカイニン酸 (25mg/kg; Enzo Life Sciences, NY, USA) を投与した。カイニン酸投与 1, 2, 3, 4, 6, 8 および 24 時間後にマウスから海馬を摘出した。コントロール群として、カイニン酸と同量の PBS を腹腔内投与したマウスを用いた。てんかん発作のレベルは Racine スケールを用いて評価した (Racine, 1972)。ステージ 0, 正常; ステージ 1, 不動化および凝視行動; ステージ 2, 前肢および尾の強固な伸展; ステージ 3, 前肢痙攣、反復して起こるうなずき行動; ステージ 4, 立ち上がる、後肢の強直間代性の動き; ステージ 5, 連続的な強直間代性けいれん、走り回る、飛び跳ねる; ステージ 6, 死亡。本実験では、別段の定めがない限りステージ 4 あるいは 5 以上に達したマウスを使用した。カイニン酸投与 1 時間後にステージ 4 または 5 に達しなかったマウスには低

濃度のカイニン酸 (10 mg/kg) を追加投与した。

15. 内在性ニューロプシン蛋白質の濃度測定および酵素活性測定

マウスの片側海馬に氷冷した Lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton, 5 µg/ml leupeptin) 750 µl を加え、ホモジナイザーで懸濁し、懸濁液を 4 °C、14,000 × g で 30 分間で遠心した。上清を回収し、BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) によって蛋白濃度を決定した。それぞれのサンプルの蛋白質濃度を揃えた後、抗ニューロプシン抗体 (mAbF12, 100 µg; Molecular and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) を加え、4 °C で 1 晩撹拌した。免疫沈降複合体は Protein G Sepharose beads (GE Healthcare) で回収し、Lysis buffer で洗浄後、50mM Tris-HCl (pH 8.0) の溶媒を用いて、合成基質 Pro-Phe-Arg-MCA (Peptide Institute) と 37 °C で 18 時間反応させた。ニューロプシンの全蛋白質濃度は、免疫沈降複合体を予め lysyl Endopeptidase (Wako) で 37 °C、5 分間反応した後、Pro-Phe-Arg-MCA (Peptide Institute) に対する酵素活性を測定することで算出した (Momota Y et al., 1998)。遊離した蛍光物質 AMC は F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) で測定した (励起波長 370 nm, 測定波長 460nm)。

16. 定量リアルタイム PCR

マウスの片側海馬に 1 ml の TRIzol Reagent (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を加え、室温で 5 分静置した。これに 200 µl のクロロホルムを加え、ボルテックスで撹拌し、室温で 3 分静置した後、4 °C で 14,000 × g、10 分間遠心した。遠心後、水層 350 µl を 1.5 ml チューブに回収し、500 µl のイソプロパノールを加え、ボルテックスで撹拌し、室温で 10 分静置した後、4 °C で 14,000 × g、10 分間遠心した。上清を取り除き、ペレットに 1 ml の 70% エタノールを加え、ボルテックスで撹拌し、4 °C で 14,000 × g、10 分間遠心した。それから上清を取り除き、ペレットを風乾した後、55 µl の DEPC 水を加え、55 °C、10 分間インキュベーションし、RNA を回収した。cDNA を合成するために、TaqMan R Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystem) を用いて、BIOER LifeTouch Thermal cycler (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) により逆転写反応を行った。反応液 20 µl 中に total RNA (0.5 µg) を使用し、以下の試薬の終濃度がそれぞれ、1 × TaqMan RT buffer, 5.5 mM Magnesium Chloride, 500 µM dNTP mix, 1.25 µM Random Hexamers, 1.25 µM Oligo d(T) 16, 0.4 U/µl RNase Inhibitor, 1.25 U/µl MultiScribe Reverse Transcriptase (Life technologies) となるように調整した。これを 25 °C で 10 分間インキュベーションした後、48 °C で 30 分間逆転写反応させ、95 °C で 5 分間の熱処理により酵素を失活させた。得られた cDNA は使用するまで -20 °C で冷凍保存した。

リアルタイム PCR 法は LightCycler R 480 Real-time PCR system (Roche Diagnostics,

Basel, Switzerland) を用いて行った。96 well プレーットの 1 well あたりに、10 μ l 2 $\times$ SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics)、0.2 μ M forward primer、0.2 μ M reverse primer を含む反応液 15 μ l と cDNA 5 μ l を加えた。これを 95 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性させた後、95 $^{\circ}$ C で 10 秒間 (熱変性)、60 $^{\circ}$ C で 10 秒間 (アニーリング)、72 $^{\circ}$ C で 14 秒間 (伸長の反応) を 40 サイクル行った。cDNA の増幅に使用した *Nrg-1 type I*、*Nrg-1 type III*、*GAPDH* 遺伝子それぞれのプライマー配列は以下の通りである。GAPDH は内在性標準遺伝子として用いた。

- *Nrg-1 type I* (forward 5'-atgtctgagcgcaaagaagg-3'; reverse 5'-ctcctggttttcatctctttca-3')
- *gapdh* (forward 5'-cggaagcccatcaccatc-3'; reverse 5'-gaggggcatccacagtctt-3')

17. NRG-1 ELISA 解析

NRG-1 蛋白質量は sandwich ELISA kit (Usen Life Science Inc., Hubei, People's Republic of China) を用いて測定した。マウス海馬に 1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail / PBS を加え、ホモジナイザーで懸濁し、懸濁液を 4 $^{\circ}$ C、14,000 $\times g$ で 10 分間遠心した。遠心後、上清分画を回収し、NRG-1 抗体がコートされた 96-well に一定分量ずつ分注し、2 時間 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。反応終了後、biotin-conjugated 抗 NRG-1 抗体を加え、インキュベートし、反応終了後、avidin-conjugated HRP を加えた。発色基質としてテトラメチルベンジジンを使用した。反応終了後、光学密度は 450 nm で microplate reader (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。マウス海馬内 NRG-1 蛋白質濃度は、上記 kit に含まれている標準 NRG-1 蛋白質を用いて作成した検量線から算出した。

18. 抗リン酸化 ErbB4 抗体を用いたウェスタンブロッティング

マウスの片側海馬に氷冷した 750 μ l の Homogenize buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1% protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma-Aldrich) を加え、ホモジナイザーで懸濁し、懸濁液を 4 $^{\circ}$ C で 1,000 $\times g$ 、5 分間遠心した。遠心後、ペレットを除去し、上清分画を回収し、4 $^{\circ}$ C で 12,000 $\times g$ 、20 分間遠心した。遠心後、ペレット画分を SDS lysis buffer (5 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1% protease inhibitor cocktail) に再懸濁し、室温で 14,000 $\times g$ 、10 分間遠心し、上清を回収した。蛋白質濃度は BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) によって決定した。調製したサンプルを 7.5% SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories) に転写した。この膜を 5% スキムミルク / TTBS (0.1% Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl) で、30 分間室温でブロッキング後、一次抗体に rabbit 抗リン酸化 HER4/ErbB4 抗体 (Y1284) (21A9; 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、二次抗体に HRP 融合 donkey 抗

rabbit IgG (1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いた。ローディングコントロールとして HRP 融合 mouse 抗 β -actin モノクローナル抗体 (ab20272; 1:40,000, Abcam) を用いた。

総 ErbB4 蛋白質を検出するために、ニトロセルロース膜をリプロブ処理し、一次抗体に rabbit 抗 ErbB4 抗体 (C-18; 1:600, Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体に HRP 融合 donkey 抗 rabbit IgG (1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いた。陽性反応は、化学発光試薬 (Immobilon Western; Millipore, Bedford, MA) で処理した後、X-blue film (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。バンド密度は、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) で定量し、 β -actin で規格化した。

19. 抗 cFos 抗体を用いた免疫組織化学染色

カイニン酸投与 1 あるいは 4 時間後のマウスをウレタン (1.25 g/kg, i.p.; Wako) で麻酔した後、開胸し、灌流ポンプを用いて、左心室から 0.85% NaCl を 5 分間灌流した後、固定液 (4% paraformaldehyde / PBS) を 15 分間灌流した。摘出した脳は固定液に 4 °C で 1 晩浸漬し、その後 30% sucrose / PBS で 2 日間浸漬した。Tissue-teck (Sakura Finetek, Torrance, CA) を適量のせた木製ブロックに sucrose 溶液を拭き取った脳をのせ、細かく砕いたドライアイスで急速に凍結した。-14 °C クリオスタット内でミクロトームを用い、30 μ m の冠状切片を作成した。

切片を PBS に浮遊切片として集め、5% BSA / 0.3% Triton X-100 / PBS によって室温で 1 時間ブロッキングした。それから以下に示す一次抗体で 4 °C で 1 晩反応させた。Rabbit 抗 cFos (AB-5; 1:5000; Millipore, Bedford, MA), Goat 抗 cFos (sc-52-G; 1:5,000, Santa Cruz Biotechnology), rabbit 抗 ErbB4 (sc-283; 1:300, Santa Cruz Biotechnology), mouse 抗 ErbB4 (Ab77; 1:100, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), rabbit 抗 parvalbumin (ab11427; 1:3000, Abcam), mouse 抗 parvalbumin (P3088; 1:3000, Sigma-Aldrich) 抗体。mouse 抗 CAMKII (Clone6G9; 1:100, Millipore) 抗体は室温で 1 晩反応させた。

PBS で洗浄後、二次抗体は以下のものを使用し、4 °C で 1 晩反応させた。Donkey 抗 mouse Alexa Fluor 488 (A21203; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Donkey 抗 rabbit Alexa Fluor 488 (A21206; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific), Donkey 抗 mouse Alexa Fluor 594 (A21203; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific), Donkey 抗 rabbit Alexa Fluor 594 (A21207; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific), Donkey 抗 goat Alexa Fluor 594 (A11058; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific), Donkey 抗 mouse Alexa Fluor 647 (A31571; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific), Donkey 抗 rabbit Alexa Fluor 647 (A31573; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific), Donkey 抗 goat Alexa Fluor 647 (A21447; 1:1,000; Thermo Fisher Scientific)。

PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1,000; Wako) で 10 分間染色し、ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes) を用いて封入した。画像は、共焦点レーザー顕微

鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて得た。

20. cFos 発現細胞数の解析

倍率 20 の対物レンズを装着した共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Jena, Germany) で cFos の陽性反応が現れてから、Z 方向に 2.0 μm の厚さで連続スキャンし、6 枚の画像を取得した。画像内の海馬 CA1 領域に存在する cFos, ErbB4, PV 陽性細胞を ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いて disector-based cell counting method に従ってカウントした (Chintawar et al., 2009)。Figure 2 に示すように、cFos 陽性が認められた切片を reference section、cFos 陽性が検出されなくなった切片を look-up section と定義し、reference section でのみ検出され、look-up section では検出されない神経細胞のみをカウントした。各マウス群の脳スライスにおいて解析領域の体積は $500,000\mu\text{m}^3$ とした。E/I バランスは cFos 発現錐体細胞数 / cFos 発現 ErbB4 陽性細胞あるいは cFos 発現 PV 細胞の割合として算出した。

21. 局所場電位 (Local field potential, LFP) の測定

マウスをウレタン (1.25 g/kg, i.p; Wako) で麻酔後、頭皮を切開した。その後、Ear bar を用いて脳定位固定台 (Narishige Co., Tokyo, Japan) に固定後、タングステン記録電極 (MicroProbers, Gaithersburg, MD, USA) を右海馬領域 (2.46 mm posterior and 2.0 mm lateral to bregma; 1.20 mm ventral from surface of dura) に挿入した。ガンマ波を誘発させるためにカイニン酸 (25mg/kg; Enzo Life Sciences, NY, USA) を一回投与した。LFP はカイニン酸投与 30 分前および投与 4 時間後まで測定した。Slow gamma (30-50Hz) と fast gamma (65-120Hz) のパワースペクトルおよび積算パワー強度は LabChart software (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) を用いて、5 分間隔ごとにフーリエ変換することで算出した。電極の挿入位置は組織学的に確認した。

22. NRG-1 ペプチドの側脳室内投与

電気生理学的実験において、マウスをウレタン (1.25 g/kg; i.p; Wako) で麻酔した後、カニューレ (Plastics One, Roanoke, VA, USA) を右側脳室領域 (0.22 mm anterior and 1.0 mm lateral to bregma; 2.0 mm ventral from surface of dura) に刺入した。それから PBS に溶解した human NRG-1 EGF-like domain (5 μM ; NRG-1₁₇₇₋₂₄₆; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) をシリンジポンプ (CFV-2100; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) によって駆動されるハミルトンシリンジを用いて、0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で 10 分間投与した。

NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ 投与によるてんかん行動解析および cFos 発現解析において、マウスをイソフルラン (2%; Wako) で麻酔した後、ガイドカニューレ (Plastics One) を右側脳室領域に刺入し、歯科用セメントで固定した。ダミーカニューレ (Plastics One) を

ガイドカニューレ内に挿入し、1 週間後、ダミーカニューレを injection カニューレ (ダミーカニューレの位置よりも 0.5 mm 以下の位置になる) と交換した。5 μ M の NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ および溶媒をカイニン酸投与 3 時間後に 0.2 μ l/min の速度で 10 分間投与した。

23. NRG-1 切断断片認識抗体の作製および評価

ニューロプシンが mNRG-1 を最も効率良く切断する配列であるアミノ酸配列 6 残基 (FKWFKN) を抗原として、ウサギの血清から切断断片認識抗体 (68-73 抗体) を抽出した (MBL)。この抗体の特異性を評価するために、組換えヒトニューロプシンと NRG-1 (0.16 μ g) を 1 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 の溶媒中で混合し、37 °C で 60 分間反応させた後、ウェスタンブロットを行った。一次抗体 rabbit 抗 NRG-1 N-terminal extracellular domain (N-NRG-1) ポリクローナル抗体 (1:400; Santa Cruz Biotechnology)、68-73 抗体 (1:500; MBL) を 1 時間室温で反応させ、二次抗体は horse radish peroxidase (HRP) 融合 donkey 抗 rabbit IgG (1:10,000; Jackson ImmunoResearch) を用いて 1 時間室温で反応させた。免疫陽性バンドを検出するために、化学発光試薬には (Immobilon Western; Millipore) を用いて、X-blue film (Fujifilm) に免疫反応を行った膜を曝した。

24. 統計解析

全ての図表データは平均値 $\pm$ SEM として表示した。統計的有意差は、2 グループ間の比較には two-tailed paired Student's *t* test (正規分布) および Mann-Whitney *U* test (非正規分布) で、多グループ間での比較には一元配置分散分析 (ANOVA) 後の post hoc テストとして Turkey's test あるいは Dunnett's test、もしくは二元配置 ANOVA 後の post hoc テストとして Sidak test により決定した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

1. ニューロプシンは mNRG-1 を速やかに切断する

活性を欠損させた変異ニューロプシンを発現させたマウス海馬神経細胞において、ニューロプシンを含む蛋白質複合体が観察され、この複合体を質量分析によって解析したところ、ニューロプシンの基質候補蛋白質として NRG-1、Fibronectin および Vitronectin が検出された (Tamura et al., 2012)。ニューロプシンの基質を同定するために、成熟型 NRG-1 (mNRG-1)、Fibronectin、Vitronectin をそれぞれ様々な活性の組換えニューロプシンと反応させ、その切断効率を調べた。前駆体の膜貫通型 NRG-1 は、膜型プロテアーゼによって切断され、その細胞外部位が mNRG-1 となるため (Mei and Xiong, 2008)、本実験では mNRG-1 を使用した。ニューロプシンと反応後、mNRG-1 の切断レベルはウェスタンブロットによって調べ (Fig. 3A)、また Fibronectin と Vitronectin の切断レベルは、銀染色によって調べた (Fig. 3B, C)。その結果、mNRG-1 は、ニューロプシンによって最も速やかに且つ効率的に切断された。0.3 mU/ml という低いニューロプシン活性で 32 kDa の切断フラグメントが確認され、また 15 分後には二つの主要な分解フラグメント (32, 19 kDa) の陽性反応がプラトーに達した。さらに海馬ホモジェネイトにニューロプシンを投与したところ、内在性の NRG-1 もニューロプシンによって速やかに切断された (Fig. 4)。以上のことから、ニューロプシン複合体の構成成分として検出された基質候補蛋白質の中で、ニューロプシンは、mNRG-1 を最も効率良く直接切断することがわかった。

2. ニューロプシンは mNRG-1 を 3 箇所切断する

mNRG-1 に対するウェスタンブロットの結果、ニューロプシンによって 32 および 19 kDa のバンドが出現することがわかった。次に、全ての切断サイトを検出するために、ヒスタグを付加したヒトニューロプシン (37 kDa) と mNRG-1 を混合し、クマシー (CBB) 染色を行った。その結果、32、28、19 kDa の 3 つのバンドが検出された (Fig. 5A)。これら 3 つの切断断片を N 末端ペプチドシーケンスしたところ、32 kDa のバンドは G¹⁹SGKKP... の配列からはじまり、また 28 kDa のバンドは F⁶⁸KWFKN...、19 kDa は I⁹⁹NKASL... の配列であった。G¹⁹SGKKP 配列はヘパリン結合ドメイン (HB) の直後に、F⁶⁸KWFKN と I⁹⁹NKASL 配列はイムノグロブリン様 (Ig) ドメイン内に位置している (Fig. 4B)。また、Tris-tricine ゲルを用いた SDS-PAGE によって、さらに 15 および 6 kDa のフラグメントが検出され、両者は同じ N 末端配列であり、HB ドメインの配列 : S²ERKEGRGKGKGKK... と一致していた。この 15 と 6 kDa は 19 と 28 kDa のフラグメントのカウンターパートであると考えられる。

それによって、ニューロプシンは mNRG-1 の HB ドメインと EGF ドメインの間 (KER¹⁸/GSG, SLR⁶⁷/FKW, ELR⁹⁸/INK) の 3 箇所を切断することが明らかになった。

次に、新規に同定された mNRG-1 の切断サイトに対応する合成基質を使用し、ニューロプシンに対する酵素反応速度定数を決定した。ヒト NRG-1 から KER-MCA、SLR-MCA、ELR-MCA を、またヒト K¹⁶ER のアミノ酸配列に対応するマウス NRG-1 から KDR-MCA を作製し、速度パラメータ (Km, kcat) を測定した (Table 1)。VPR-MCA は α -thrombin に対する基質で、これまでニューロプシンに対して高い切断活性を示すことが知られており (Shimizu et al., 1998)、これをポジティブコントロールとして使用した。KER-MCA (ヒト) や KDR-MCA (マウス) は 32 kDa のフラグメント (ニューロプシンと反応させたときに最初に出現したバンド; cf. Fig. 3A) に対応する切断サイトであり、この合成基質は効率良くニューロプシンによって切断された。SLR-MCA は mNRG-1 の Ig ドメイン内の切断サイト (Fig. 5B) に対応し、これも効率良く切断された。しかしながら、19 kDa のフラグメントに対応する ELR-MCA は、ニューロプシンに対して低い切断活性を示した。19 kDa のフラグメントは、高濃度 (>10 mU/ml) のニューロプシンと反応させたときのみに出現したので (Fig. 3A)、このサイトに対するニューロプシンの親和性は低いのもかもしれない。このように、mNRG-1 においてニューロプシンが求核反応を起こすアミノ酸配列は、KER、SLR、ELR (arrows, Fig. 5B) の 3 つであることを再確認した。また、以前にニューロプシンが Fibronectin および EphB2 を切断することが示され、その切断サイトとして報告されたアミノ酸配列に対する合成基質である DVR-MCA や YGR-MCA に対しては (Attwood et al., 2011; Shimizu et al., 1998)、ニューロプシンはほとんど切断活性を示さなかった (Table 1)。合成基質と全長蛋白質では構造が異なることや、ニューロプシンによる Fibronectin や EphB2 の切断が、彼らが示した箇所とは別のサイトで起こる可能性が考えられる。これら蛋白質の切断機構はさらなる解析が必要である。

3. ニューロプシンは mNRG-1 とヘパリンとの結合を減少させる

N 末端ペプチドシーケンスによって、ニューロプシンは、mNRG-1 の HB ドメインより C 末端側を切断することがわかった。HB ドメインの共通配列は、細胞外マトリックの構成成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のグリコサミノグリカン (ヘパリンなど) と相互作用することが知られているので (Dreyfuss et al., 2009)、ニューロプシンは mNRG-1 とヘパリンとの結合を修飾することが考えられる。mNRG-1 の受容体 p185 (ErbB) が発現した MCF-7 細胞において、ヘパリンと結合した mNRG-1 は ErbB と結合できないため p185 の自己リン酸化は誘導されない。つまり p185 の自己リン酸化は、mNRG-1 とヘパリンとの結合に依存する (Loeb and Fischbach, 1995)。そこで、リン酸化された p185 に対する抗体 (抗 phosphotyrosine 抗体) を用いて、ニューロプシンによって切断された mNRG-1 がヘパリン存在下で p185 の自己リン酸化が誘導されるかを検討した。その結果、ヘパリン存在下では

mNRG-1 が誘導する p185 の自己リン酸化は見られなかったが、予め mNRG-1 をニューロプシンで処理すると、p185 の自己リン酸化が誘導された (Fig. 6)。以上のことから、ニューロプシンは、mNRG-1 の HB ドメインを除去し、ヘパリンにによる抑制作用を低下させることがわかった。

4. ニューロプシンによる mNRG-1 の切断は EGF 機能ドメインを遊離させる

mNRG-1 がニューロプシンにとって効果的な基質であるならば、その切断フラグメントは、mNRG-1 の下流シグナル経路にとって重要な機能を保持していると考えられる。そこで、ニューロプシンによる mNRG-1 の切断の機能的意義について調べた。静止状態では、mNRG-1 は HSPG と結合しているため、ニューロプシンによる mNRG-1 の HB ドメインの除去は、mNRG-1 シグナルの最初のステップである EGF 機能ドメイン (リガンド部位) の遊離および引き続く mNRG-1 受容体 p185 の自己リン酸化を駆動するのに重要であると考えられる。そこで、NRG-1 発現細胞を用いて、ニューロプシンによる mNRG-1 の切断が EGF 機能ドメインの分泌を誘導するかを検討した。COS-7 細胞に EGFP を融合した NRG-1 を発現させ、培地中にニューロプシンを投与し、その上清を p185 が発現している MCF-7 細胞に添加した。分泌された EGF 量は、以前示されたように (Loeb and Fischbach, 1995) 受容体 p185 のチロシン自己リン酸化レベルによって評価した。その結果、0.3 mU/mL のニューロプシンから濃度依存的に p185 の自己リン酸化レベルが増大し (Fig. 7A, B1)、また 0 - 60 分の間では、自己リン酸化レベルは直線的に増大した (Fig. 7A, B2)。以上のことから、ニューロプシンは、mNRG-1 のリガンド部位である EGF 機能ドメインの遊離を誘導することが明らかとなった。

5. mNRG-1 による p185 の自己リン酸化はニューロプシンの切断に依存的である

HSPG のグリコサミノグリカン (ヘパリン) による mNRG-1 の捕捉およびニューロプシンによる EGF 機能ドメインの遊離をさらに確認するために、ヘパリチナーゼ (グルコサミニド結合を切断する酵素) またはニューロプシンを MCF-7 細胞に投与し、両者の p185 自己リン酸化効果を比較した。その結果、ヘパリチナーゼとニューロプシンは、ほぼ同程度の p185 の自己リン酸化レベルを示した (Fig. 8)。このように、グリコサミノグリカンの分解とニューロプシンによる mNRG-1 の切断は、同レベルの NRG-1 シグナルを誘導することがわかった。

次に、ニューロプシンによる mNRG-1 の切断が p185 の自己リン酸化に必須であるかを調べるために、上記で示されたニューロプシンによる mNRG-1 の 3 つの切断サイト (R^{18} / R^{67} / R^{98}) のアルギニンを全てアラニンに変異させた mutant NRG-1 ($R18A$ / $R67A$ / $R98A$) を作製した。その結果、変異による細胞膜上での局在への影

響はみられなかったが (Fig. 9A)、mutant NRG-1 を発現させた COS-7 細胞では、ニューロプシンの投与前後において、p185 の自己リン酸化レベルに有意な差異は認められなかった (Fig. 9B)。このように、ニューロプシンによる mNRG-1 の切断は p185 の自己リン酸化の誘導に重要であることが明らかになった。

6. NRG-1 は海馬シナプスに局在する

次に、*in vivo* でのニューロプシン-NRG-1 システムの働きを調べるために、まずマウス海馬内における NRG-1 の局在を抗 NRG-1 EGF-like domain 抗体による免疫組織化学染色によって調べた。NRG-1 の免疫陽性反応は、以前に示されたニューロプシン mRNA *in situ* hybridization (Chen et al., 1995) の結果とよく一致して、歯状回の顆粒細胞層と CA1-3 領域の錐体細胞層に認められた (Fig. 10A)。MAP2 陽性反応で示されるようにその形態的特徴からこれらニューロンは、興奮性の錐体細胞および顆粒細胞であると考えられる (Fig. 10B)。また、多くの NRG-1 は、Fast-spiking GABA 作動性インターニューロンのマーカー (Markram et al., 2004) であるパルブアルブミンと共局在していた (Fig. 10B, arrow)。このように、NRG-1 は興奮性細胞だけでなく抑制性細胞にも発現していた。本実験で使用した抗 NRG-1 抗体の特異性は、組換え mNRG-1 による吸収実験により確認した (Fig. 10C)。次に、前駆体 NRG-1 および mNRG-1 それぞれの細胞内局在を調べるために、マウス海馬を生化学的に分画し、抗 NRG-1 cytoplasmic tail 抗体と抗 NRG-1 N-terminal extracellular domain 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、前駆体 NRG-1 (pro-NRG-1) および mNRG-1 は、PSD-95 で示されるようにシナプトソーム分画 (SS) とシナプス膜分画 (SM) に局在しており、特に mNRG-1 は SS に濃縮していた (Fig. 10D)。それによって mNRG-1 はシナプス間隙においてグルコサミノグリカンと相互作用していると考えられる。

7. マウス海馬における pNRG-1 の局在

次に、ニューロプシンの切断によって産生される HB domain-lacked mNRG-1 (processed NRG-1; pNRG-1) が *in vivo* で ErbB4 発現細胞に局在するか調べた。ビオチン標識した mNRG-1 とニューロプシンを反応させ、HB ドメインを除去し (pNRG-1; Fig. 11A)、これをマウス海馬 CA1 領域に投与した (Fig. 11B)。それから 1 時間後に海馬を摘出し、ビオチン (exogenous pNRG-1 を示す)、ErbB4、パルブアルブミン (Fast-spiking GABA 作動性インターニューロンを示す) または phosphotyrosine (細胞内蛋白質の全チロシンリン酸化を示す) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、pNRG-1 の陽性反応は ErbB4 が豊富な細胞体周囲にドット状に観察された (Fig. 12C)。興味深いことに、pNRG-1 と ErbB4 陽性反応は、興奮性の錐体細胞には観察されず、パルブアルブミン陽性の抑制性細胞でのみ認められた

(Fig. 11C)。この pNRG-1 が ErbB4 陽性細胞の生理応答を発揮するかを調べるために、ビオチン、ErbB4、phosphotyrosine (細胞内蛋白質の全チロシンリン酸化を示す) に対する 3 重染色を行った。その結果、pNRG-1 が局在した ErbB4 陽性細胞で、高レベルのチロシンリン酸化反応が認められた (Fig. 12A, upper panel)。さらに、pNRG-1 を投与した海馬において ErbB4 の自己リン酸化が増大した (Fig. 12B)。溶媒を投与した海馬では、ErbB4 陽性細胞でチロシンの自己リン酸化は認められなかったことから (Fig. 12A, lower panel)、ErbB4 陽性細胞上での細胞内蛋白質のリン酸化は、投与した pNRG-1 の効果である。リン酸化が認められた細胞は、パルブアルブミン陽性の GABA 作動性細胞であることから、pNRG-1 は、ErbB4 シグナル経路の活性化を介して、GABA 作動性細胞を制御していることが示唆された。

以上のことから、ニューロプシンが mNRG-1 の HB ドメインを除去することで、機能的な EGF ドメインが遊離し、パルブアルブミン陽性の Fast-spiking GABA 作動性インターニューロンに局在している ErbB4 シグナルを活性化することで、抑制性活動を制御していることが考えられる (Fig. 13)。そこで実際ニューロプシン-NRG-1 シグナルが、神経活動依存的に抑制性細胞の活動を制御するのかを明確にすると共に、このシグナルがどのような生理機能に関与するのかを調べた。

8. カイニン酸投与は内在性ニューロプシン活性、*Nrg-1* mRNA の発現、ErbB4 の自己リン酸化レベルを上昇させる

神経活動依存的なニューロプシン-NRG-1 シグナルの働きを明らかにするために、カイニン酸の腹腔内投与によって誘発される側頭葉てんかんの動物モデルを用いた。まず、内在性ニューロプシンがてんかん発作の活動によって活性化するかどうかを検討した。神経活動を評価するために海馬 CA1 領域に記録電極を挿入した。てんかん発作の行動学的レベルは、Racine スケールを用いてスコア化した (Racine, 1972; see 材料と方法)。マウスにカイニン酸を投与すると、投与約 1 時間後には多数の神経細胞の同期発火が観察され、その発火レベルは 2 時間後から 2 時間 30 分後にピークに達し、4 時間後から減少していった (Fig. 14A)。マウスの行動学的レベルは、カイニン酸投与 1 時間後には単発の全身性痙攣発作が誘発し、その後、発作を断続的に繰り返すてんかん重積状態が少なくとも 4 から 8 時間後まで持続したが、翌日には痙攣発作は認められなかった (Fig. 14B)。

次に、カイニン酸投与後の様々なタイムコースで海馬を採取し、内在性ニューロプシンを免疫沈降によって精製した後、合成基質 Pro-Phe-Arg-MCA を用いてニューロプシンの酵素活性を測定した。興味深いことに、内在性ニューロプシンの活性は、神経活動の増加がピークに達するカイニン酸投与 1-2 時間後には認められず、神経の過活動が減少しはじめた 4 から 6 時間後に有意な上昇が認められ、その後、活性は減少した (Fig. 14C; 左)。またカイニン酸を投与してもてんかん重積状態にならなかったマウスでは、ニューロプシンの活性は変化しなかった (Fig. 14C; 右)。一方、ニ

ニューロプシン mRNA は、てんかん発作の間変動しなかった (Fig. 14D)。また、海馬内のニューロプシン蛋白質量は PBS 投与時と比較して、カイニン酸投与によって、わずかではあるが、有意に減少していた (Fig. 14E)。

このように、ニューロプシンは、カイニン酸投与によるてんかん発作によって活性化することが明らかになった。またその活性上昇は、転写や翻訳の促進によるものではなく、細胞外に存在する不活性型ニューロプシンが活性型に変換されたことによるものである。

9. ニューロプシンはカイニン酸誘発てんかん重積状態に寄与する

内在性ニューロプシンの活性が、カイニン酸投与 4-6 時間後に有意に上昇したことから、ニューロプシンがカイニン酸誘発てんかん重積状態に寄与するかをニューロプシン遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて検討した。持続性けいれんが引き起こされるカイニン酸投与量とてんかん重積状態に至るまでの時間は、野生型マウスとニューロプシン KO マウスとの間で有意な差は認められなかった (Table 2)。しかしながら、カイニン酸投与 4 時間後において、ニューロプシン KO マウスでは、野生型マウスに比べてより強いてんかん発作症状が引き起こされた (Fig 15)。

このことから、ニューロプシン遺伝子の欠損によって、カイニン酸誘発てんかん重積状態の増悪化が引き起こされることが明らかになった。

10. てんかん海馬において NRG-1-ErbB4 シグナルはニューロプシンによって発動する

ニューロプシンのプロテアーゼ活性は、NRG-1-ErbB4 シグナルに重要であるため、てんかん発作によって活性化したニューロプシンは、NRG-1-ErbB4 シグナルを惹起することが考えられる。そこで、様々なタイムコースで採取した海馬を用いて、*Nrg-1* mRNA の発現と ErbB4 の自己リン酸化レベルをそれぞれリアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法によって調べた。その結果、ニューロプシン活性化のタイムコースと一致して、*Nrg-1* mRNA の発現と ErbB4 の自己リン酸化レベルはカイニン酸投与 4-6 時間後に有意に上昇した (Fig. 16A-D)。このような *Nrg-1* mRNA や ErbB4 自己リン酸化の変動はカイニン酸を投与してもてんかん重積状態にならなかったマウスでは観察されなかった。以上の結果から、カイニン酸投与によるてんかん重積依存的にニューロプシン活性、*Nrg-1* mRNA の発現および ErbB4 の自己リン酸化レベルが増大することが明らかになった。

次に、ニューロプシン KO マウスで、てんかん重積状態の間に NRG-1-ErbB4 シグナルの異常が起こっているかどうかを検討した。ニューロプシン活性がピークとなるカイニン酸投与 4 時間後で、野生型およびニューロプシン KO マウスにおいて *Nrg-1* mRNA の発現が増大したが、両者に有意な差はみられなかった (Fig. 17A)。次

に、NRG-1 蛋白質量を抗 NRG-1 抗体を用いた ELISA によって調べた。カイニン酸投与 4 時間後において、野生型およびニューロプシン KO マウス共に、NRG-1 の蛋白質量の増大が認められたが、野生型に比べてニューロプシン KO マウスのほうが NRG-1 蛋白質量が多かった (Fig. 17B)。この結果から、ニューロプシン KO マウスの海馬内において、NRG-1 が HSPG に結合した状態で蓄積していることが示唆された。さらに、カイニン酸投与 4 時後において、ErbB4 のリン酸化レベルは、野生型マウスでは有意な上昇が見られたのに対して、ニューロプシン KO マウスでは有意な変化は認められず、ErbB4 の総蛋白質量は両マウスともカイニン酸による影響を受けなかった (Fig. 17C, D)。以上の結果から、神経活動依存的なニューロプシンによる mNRG-1 のプロセッシングが、NRG-1-ErbB4 シグナルの誘導に重要な役割を果たしていることが示唆される。

11. ニューロプシン KO マウスでは、ErbB4 発現パルブアルブミン陽性インターニューロンで、てんかんによる cFos 蛋白質の発現が減少している

NRG-1 は ErbB4 発現パルブアルブミン陽性 (PV) インターニューロンの興奮性を制御しているので (Li et al., 2012)、ニューロプシンも同様にその細胞の活動制御に寄与するかどうかを調べた。それによって私は、まず神経活動のマーカーである cFos 蛋白質を指標として、カイニン酸投与後の海馬の ErbB4 発現細胞の活動状態を評価した。カイニン酸投与 1 時間後では、PBS を投与したマウスに比べて、多数の海馬錐体細胞層で cFos 蛋白質の増大が認められたが、ErbB4 発現細胞ではほとんど cFos の陽性反応は検出されなかった (Fig. 18A; 上段, 中段, Fig. 18B)。一方、カイニン酸投与 4 時間後では、大部分の錐体細胞において cFos の陽性反応細胞数が減少したが、ほとんどの ErbB4 発現細胞で強い cFos の免疫陽性反応が観察された (Fig. 18A; 下段, Fig. 18B)。この cFos 陽性を示した ErbB4 発現細胞は、興奮性細胞のマーカーである CAMKII は発現しておらず、PV が発現していた (Fig. 19)。この ErbB4 発現細胞の活性化のタイミングと一致して、cFos 発現 PV 細胞数は、カイニン酸投与 1 時間後よりも 4 時間後の方が有意に多かった (Fig. 20)。これらの結果は、ErbB4 発現 PV 細胞は、興奮性錐体細胞よりも遅れて活性化することを示しており、そのタイミングはニューロプシンの活性化と一致していた。

ErbB4 発現細胞における cFos の発現が、ニューロプシンを介しているかどうかを明らかにするために、私はニューロプシン KO マウスにカイニン酸を投与し、その 4 時間後に取り出した海馬で上記と同様の実験を行った。野生型に比べて、ニューロプシン KO マウスの cFos 陽性 ErbB4 発現細胞の数は有意に低下していたが、cFos 陽性錐体細胞の数は有意に増大していた (Fig. 21A-C)。また cFos 陽性 ErbB4 発現細胞数に対する cFos 陽性錐体細胞数との割合である E/I バランスは、野生型マウスと比べて、ニューロプシン KO マウスでは有意に上昇していた (Fig. 21D)。しかしながら、ErbB4 発現細胞の密度は野生型およびニューロプシン KO マウス間で有意

な差は認められなかった ($500,000 \mu\text{m}^3$ あたりの ErbB4 発現細胞数: 20.0 ± 3.6 (野生型)、 19.5 ± 3.3 (ニューロプシン KO)、 $P = 0.8571$)。従って、ニューロプシンの欠損によって、ErbB4 発現細胞の活性化が障害され、結果として、錐体細胞が過活動状態になることで E/I バランスが崩れるとが考えられる。また上記と同様に、ニューロプシン KO マウスでは、PV 細胞の活動も低下しており (Fig. 22A-C)、cFos 陽性 PV 細胞数に対する cFos 陽性錐体細胞数との割合で定義した E/I バランスも、野生型マウスと比べて、ニューロプシン KO マウスでは有意に上昇していた (Fig. 22D)。このようなニューロプシン KO マウスで認められる E/I バランスの障害や抑制性細胞の低い cFos 発現は、カイニン酸投与 3 時間後に NRG-1 の EGF ドメインペプチド (NRG-1₁₇₇₋₂₄₆) を側脳室内に投与することで回復した (Fig. 23A-C)。興味深いことに、NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ の側脳室内投与は、カイニン酸投与 4 時間後のニューロプシン KO マウスにおけるてんかん発作症状を抑制した (Fig. 23D)。

以上の結果から、てんかん様過剰神経活動は、ニューロプシン-NRG-1 シグナルを介して、ErbB4 発現 PV 細胞の活性化を誘導することが明らかになった。

12. ニューロプシン KO マウスでは、海馬ガンマ波の誘導が障害されており、またこの障害は NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ によって回復する

PV 細胞の活動は、ガンマ波の誘導に必須であり (Sohal et al., 2009; cardin et al., 2009; Lewis et al., 2012; Yizhar et al., 2011)、NRG-1 は、ErbB4 の活性化を介してガンマ波の強度を増大させる (Fisahn et al., 2009)。またニューロプシンが、ErbB4 発現 PV 細胞の活性化に寄与していたので、私は、ニューロプシンがカイニン酸によって誘導される海馬ガンマ波の誘導に寄与しているかどうかを調べた。ウレタン麻酔下のマウス海馬 CA1 領域に記録電極を挿入し、カイニン酸を腹腔内投与した後、局所場電位 (LFP) における slow ガンマ波 (30-45 Hz) と fast ガンマ波 (65-120 Hz) を記録した (Fig. 24, Fig. 25)。30 分ベースライン値を記録した後、カイニン酸 (25mg/kg, i.p.) を投与した。野生型およびニューロプシン KO マウスともに、ベースライン測定時における slow ガンマ波のパワー強度は同等であったが、カイニン酸投与後におけるニューロプシン KO マウスの slow ガンマ波のパワー強度は、野生型マウスと比較して有意に減少していた (Fig. 24A-C)。しかしながら、ニューロプシン KO マウスの側脳室内に、NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ を投与することによって、slow ガンマ波のパワー強度が野生型マウスと同程度まで回復した (Fig. 24C)。また、NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ の側脳室内投与は野生型マウスの slow ガンマ波のパワー強度も上昇させた (Fig. 24C)。一方、全ての群において、slow ガンマ波のピーク頻度には有意な差は認められなかった (Fig. 24D)。さらに、fast ガンマ波においては、そのパワー強度およびピーク頻度は野生型マウスとニューロプシン KO マウスの間において有意な差は認められず (Fig. 25A-C)、NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ の側脳室内投与は両群のガンマ波強度を同レベルまで上昇させた (Fig. 25C)。

このように、ニューロプシン KO マウスでは、slow ガンマ a が障害されており、またその障害は、ErbB4 に対するリガンド部位からなる NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ の添加によって回復した。

以上本研究により、ニューロプシンが神経活動依存的に mNRG-1 を限定解裂し、ErbB4 の自己リン酸化を誘導することで、PV 細胞の活動制御に寄与していることがわかった。また、このようなニューロプシン-NRG-1 シグナルを介した抑制性細胞の活動制御が興奮性細胞の発火パターンを修飾し、周期的ネットワーク活動のガンマ波の誘導に寄与していることが明らかになった。

13. NRG-1 切断断片認識抗体はニューロプシンによるプロセッシングで生じた NRG-1 切断断片のみを特異的に認識する

ニューロプシンによる mNRG-1 の切断を直接調べるために、私は NRG-1 切断断片のみを認識する抗体を作成した。ニューロプシンは mNRG-1 を 3 箇所切断するが、その中で最も親和性の高い部位は N 末端側から 2 箇所目に位置するところであり、mNRG-1 はこの箇所で切断を受けると 28 kDa のフラグメントとなる (Fig. 26A)。このフラグメントの N 末端のアミノ酸配列 FKWFKN の 6 残基を抗原として用いた。作成された切断断片認識抗体 (68-73 抗体) を既存の市販抗体である NRG-1 N-terminal extracellular domain 認識抗体 (N-NRG-1 抗体) と比較した。組換え NRG-1 と組換えニューロプシンを反応させ、その後、両抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、N-NRG-1 抗体は、全長 mNRG-1 (34 kDa) およびニューロプシンによって切断された 3 つの NRG-1 切断断片 (32, 28, 19 kDa) の全てを認識した (Fig. 26B, left)。しかしながら、大変興味深いことに、68-73 抗体は全長 mNRG-1 は認識せず、28kDa の NRG-1 断片のみを認識した (Fig. 26B, right)。このバンドは抗原ペプチドによる吸収によって消失したことから、検出されたバンドは、NRG-1 切断断片であることが確認された (Fig. 26C)。このように 68-73 抗体は、ニューロプシンによるプロセッシングを受けて生じた 28 kDa の NRG-1 切断断片のみを認識することが明らかになった。またこのような結果は、ニューロプシンが mNRG-1 の SLR と FKW のアミノ酸配列間で切断することをさらに保証するものである。

考察

今回の研究で、ニューロプシンの基質として ErbB4 受容体チロシンキナーゼの主要なリガンドである mNRG-1 が同定された。mNRG-1 はプロテアーゼによってプロセシングされるまで、ErbB4 受容体を介してポストシナプスへシグナルを伝えることができない (Loeb and Fischbach, 1995)。ここで、私は、ニューロプシンが mNRG-1 の HB ドメインを切断・除去することで、EGF 機能ドメインを遊離し、抑制性の PV 細胞に発現している ErbB4 受容体の自己リン酸化を誘導することを明らかにした (Fig. 27)。さらにてんかん重積によって、一過的に内在性ニューロプシンがマウス海馬で活性化すること、および、ニューロプシン依存的に ErbB4 発現 PV 細胞が活性化することを明らかとなった。ニューロプシン-ErbB4 シグナルの低下が認められたニューロプシン KO マウスでは、ガンマ波のパワー強度が減少しており、この障害は NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ の投与によって回復することが明らかになった。以上のことから、ニューロプシン-NRG-1 シグナルは抑制性神経ネットワークの活動を制御し、脳内 E/I バランスを維持するための重要なシグナル系であることが考えられる。

ニューロプシンは翻訳後、細胞外に分泌し、静止状態では不活性型としてシナプス間隙に留まっている (Shimizu et al., 1998)。これまで細胞外に分泌されたニューロプシンは神経活動依存的に活性化することが知られており (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Tamura et al., 2008)、その知見と一致して、今回ニューロプシンがカイニン酸による神経興奮誘導 4-6 時間後に一過的に活性化することがわかった。活性化したニューロプシンは、細胞外基質蛋白質のプロセシングを介して LTP やてんかん活動などの海馬の神経可塑性を制御する (Komai et al., 2000; Davies et al., 2001; Tamura et al., 2006)。私はニューロプシンが mNRG-1 を直接切断することを示したが、最近当研究室においてこの反応が LTP の誘導に重要であることを報告した (Tamura et al., 2012)。それによって、NRG-1 がニューロプシンの基質であると考えられてきた。一方、近年 NRG-1-ErbB4 シグナルがてんかん発作に関与することが示された (Tan et al., 2012 and Li et al., 2012)。私はこの知見を確認し、NRG-1 の発現および ErbB4 の自己リン酸化が、ニューロプシンの活性化と同じタイミングで増大することを明らかにした。興味深いことに、てんかん発作の間、野生型に比べてニューロプシン KO マウスでは NRG-1 蛋白質量が豊富にも関わらず、ErbB4 の自己リン酸化レベルが低下していた。ErbB4 の総蛋白質量は、野生型とニューロプシン KO マウスで同程度であったことから、上記の結果は、ニューロプシンの欠損によって、NRG-1 から ErbB4 に向かうシグナル伝達が障害されることを示唆している。今回の研究で示されたように、ニューロプシンは、HSPG に結合した mNRG-1 からの EGF 機能ドメインの遊離に関与し、この機構が ErbB4 の自己リン酸化を誘導することを考慮すると、てんかん活動によって活性化したニューロプシンは、mNRG-1 のプロセシングを介して

ErbB4 シグナルを惹起すると考えられる。

本研究によって、ニューロプシンによるプロセッシングによって生じた pNRG-1 が、興奮性細胞ではなく、抑制性の PV 細胞に局在することがわかった。1 個の抑制性 PV ニューロンは約千個の興奮性錐体細胞を神経支配しており (Halasy et al., 1996)、この抑制性活動が錐体細胞の同期発火を生み出すことで、認知機能や記憶形成に関与すると考えられている (Hensh, 2005; Donato et al., 2013)。こうした興奮と抑制の神経ネットワークのバランスによる情報処理機構について多くの知見が生み出されてきているが (Froemke., 2015)、神経活動依存的な抑制性細胞の制御機構はいまだ明らかとされていない。これまで ErbB4 は、抑制性細胞の特に PV 細胞に発現していることが確認されており (Vullhorst et al., 2009)、これと一致して、今回の組織学的データは、多くの pNRG-1 が PV 細胞上の ErbB4 と共局在した。また、興味深いことに、pNRG-1 の PV 細胞上への局在が、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化を誘導した。最近、NRG-1 が、ErbB4 を介して電位依存性カリウムチャネル Kv1.1 上のチロシンのリン酸化を誘導することで、このチャネルの機能を抑制することが示された (Li et al., 2012)。NRG-1 による Kv1.1 の抑制は、活動電位の閾値を下げ、PV 細胞の興奮性を上昇させる (Li et al., 2012)。海馬培養細胞において、NRG-1 の細胞外添加が GABA の分泌を促すことを考えると (Woo et al., 2007)、pNRG-1 による ErbB4 の自己リン酸化は、抑制性 PV 細胞の活動を上昇させ、GABA の放出を促すことが考えられる。このような知見と一致して、ニューロプシン KO マウスでは、てんかん発作に伴う PV 細胞の cFos 発現が野生型に比べて減少していた。それによって、ニューロプシン-NRG-1 シグナルは神経活動依存的な PV 細胞の活動制御に関与していることが考えられる。これまで、動物を用いた側頭葉てんかんモデルの海馬において、興奮性細胞よりも数時間遅れて抑制性細胞で cFos の発現が上昇することが報告されてきたが (Peng and Houser et al., 2005)、その分子メカニズムは明らかになっていない。今回私は、カイニン酸投与によって興奮性細胞の活動後、ニューロプシンの活性化に付随して抑制性シグナルが惹起されることを明らかにした。ErbB4-Kv1.1 シグナルによる細胞興奮は cFos の発現に関与していることから、ニューロプシン-NRG-1-ErbB4 シグナルによって、てんかん発作に伴う抑制性細胞の遅延性 cFos 発現機構を説明できるかもしれない。

中枢神経系において mNRG-1 は、HSPG に分布および蓄積していることが知られている (Loeb et al., 1999)。ニューロプシンが mNRG-1 の HB ドメインを切断することから、ニューロプシンは、GABA 作動性抑制性細胞上の興奮性シナプスにおいて、シナプス間隙における pNRG-1 の量を調節することによって GABA の分泌を制御しているのかもしれない。GABA の枯渇は、過興奮状態となり神経ネットワークの障害を引き起こす。最近、ニューロプシン KO マウスで見られる神経の過剰興奮が抑制性伝達の障害によって引き起こされることが示された (Tamura et al., 2012)。これらの知見と一致して、NRG-1 KO マウスでも、過剰興奮を示す (Gerlai et al., 2000)。さらに本研究でも示されるように、ニューロプシン-NRG-1 シグナルの異常は、GABA

作動性 PV 細胞の活動異常や E/I バランスの障害を引き起こす。最近のオプトジェネティクス研究によって、PV 細胞の活動が、認知機能に重要なガンマ波の形成に必要・十分であることが示された (Cardin et al., 2009)。ガンマ波は認知機能の基礎過程であることが知られており、ワーキングメモリーの形成とガンマ波の強度は強く関連している (Lewis et al., 2012)。これらの知見と一致して、認知機能が障害されている統合失調症患者では、ガンマ波が障害されている (Cho et al., 2006; Minzenberg et al., 2010)。NRG-1 は ErbB4 の活性化を介してガンマ波の強度を増大させることが知られており、ErbB4 遺伝子欠損マウスの脳スライスにおいては、ガンマ波の強度が減少する (Fisahn et al., 2009; Hou et al., 2014)。これらの結果から、NRG-1-ErbB4 シグナルはガンマ波のパワー強度を制御する分子機構であることが示唆される。実際に、本研究で示されるように、ニューロプシン KO マウスではガンマ波のパワー強度が減弱しており、この障害は、NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ ペプチドの投与によって回復させることができることから、ニューロプシン KO で観察されるワーキングメモリーの障害は、抑制性活動異常に伴うガンマ波の欠損が原因となっているのかもしれない。実際、ワーキングメモリーの形成には PV 細胞を介する神経伝達が必要であることが明らかとなっている (Murray et al., 2011)。このように、神経活動のバランスの乱れは、てんかんや自閉症、統合失調症などの精神疾患で見られる行動異常を引き起こすと考えられる (Cossart et al., 2005; Rubenstein and Merzenich, 2003; wassef et al., 2003; Yizhar et al., 2011)。

ヒトにおける連鎖解析において *Nrg-1* は、双極性障害および統合失調症脆弱遺伝子として同定され (Green et al., 2005; Stefansson et al., 2002)、また、*Neuropsin* は、双極性障害関連因子であり、特にニューロプシンのエクソン 6 内にあるミスセンス変異である SNP22 が重篤な統合失調症患者において検出された (Izumi et al., 2008)。NRG-1 mRNA の増大が統合失調症患者の脳皮質と海馬において観察されたことから、現在、過剰な NRG-1-ErbB4 シグナルが認知障害を引き起こしていると考えられているが (Chong et al., 2008; Law et al., 2006)、過剰発現ではなく NRG-1 や ErbB4 の遺伝子欠損マウスにおいて、統合失調症様症状 (多動性・記憶障害・認知障害・社会的ひきこもり) が観察されたことから (Chen et al., 2008; Duffy et al., 2010; O'Tuathaigh et al., 2008)、NRG-1-ErbB4 シグナル過剰仮説にはいくつか矛盾がある。例えば、統合失調症患者で NRG-1 mRNA の発現は増加しているが、前駆体 NRG-1 蛋白質の発現レベルは健常者と有意な差は見られず、代わりに mNRG-1 が脳内で増大している (Hahn et al., 2006)。その一方で、血清中に分泌された NRG-1 のレベルは減少していた (Shibuya et al., 2010)。以上のことから、統合失調症患者では、ニューロプシンの機能不全によって mNRG-1 が蓄積し、NRG-1-ErbB4 シグナル伝達が低下しているかもしれない。シナプス間隙における mNRG-1 の蓄積量は、前駆体 NRG-1 の合成とメタロプロテアーゼによるプロセッシングおよび HSPG の mNRG-1 の許容量に依存し、シナプス間隙では神経ペプチドの取り込みや分解が起こらないことから (Kandel and Abel, 1995)、ニューロプシンによるプロセッシングが唯一の分解経路である。統合失調

症患者でニューロプシンの活性レベルはまだ測定されていないが、ニューロプシン上でみられた SNP22 は酵素活性ドメインをコードしており (Izumi et al., 2008)、ニューロプシンの活性が低下しているかもしれない。本研究で作製した NRG-1 切断断片認識抗体は、前駆体や mNRG-1 は認識せず、ニューロプシンによって切断された断片のみを認識するため、ニューロプシン-NRG-1 シグナル強度を測定することが可能である。NRG-1 やニューロプシンが精神疾患と強く関係することから、この抗体は、精神疾患解明の新たなツールとなるだけでなく、臨床診断への応用が期待される。

ここで私の研究により、精神医学関連シグナルにおいて新しい知見を与える。神経活動依存的なニューロプシン-NRG-1 限定解裂は、抑制性細胞の活動を介して興奮性錐体細胞の発火パターンを制御する。これにより、細胞の同期発火を誘発し、ガンマ波を伴うワーキングメモリーを成立させる。このニューロプシン-NRG-1 限定解裂機構の障害による NRG-1-ErbB4 シグナル伝達の機能不全が精神疾患で特に問題となる認知機能障害などを引き起こすと考えられる。

謝辞

本研究に携わる素晴らしい機会と環境を、そして研究を続けていく勇気と希望を与えて下さり、長年ご指導ご鞭撻賜りました、大阪行岡医療大学 塩坂貞夫教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際して、終始熱心なご指導ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 稲垣直之教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際して、未熟な私に辛抱強くご指導下さり、研究者として実験に取り組む姿勢や物事の考え方を、そしてなにより研究の楽しさ、面白さを教えてくださいました星薬科大学 田村英紀准教授に心から感謝いたします。

研究室における様々な場面で、教師と学生という垣根を越えて、惜しみないご支援、ご助言を下さり、研究生活を日々支えて下さいました前橋工科大学 石川保幸准教授、旭川医科大学 中澤瞳助教に深く感謝いたします。

そして、公私にわたり、楽しく実りある学生生活を支えて下さいました、神経機能科学研究室の先輩、同期、後輩、スタッフの皆様に心から感謝すると共に、御礼申し上げます。

研究室配属当時、何もわからなかった私に研究室の様々な事柄を優しくご指導くださいました中村雪子さん、畠中由美子さん、原田暁子さん、堀之内和広さんに心から感謝いたします。

博士後期課程の困難を共に分かち合い、支えて下さいました鈴木春満さん、金河大さん、桐原朋子さん、荒井光徳さん、奥山史さん、鈴木裕輔さんに心から感謝いたします。

博士前期課程の間、研究だけでなく、徹夜スポッチャにも喜んでお付き合いくださいました濱口晴也さん、春田牧人さん、山崎裕介さん、山本拓未さん、横田清夏さんに心から感謝いたします。

博士前期課程の間、私の一番の相談相手となり、共に切磋琢磨し合い、学生生活を輝かしいものにしてくれた山下春奈さん、丸山裕平さん、桃田菜央さん、木村文香さんに心から感謝いたします。

至らない私を先輩として慕って下さった上島恒平さん、角間一誠さん、畑潤一さん、吉田有花さん、谷川美祐希さん、酒井惇さん、常陰幸乃さん、東野佑紀さん、増永あずささんに心から感謝いたします。

一番苦しい博士後期課程三年次を明るく元気に乗り越える力を与えて下さった福本世界さん、森川勝太さんに心から感謝いたします。

実験のサポートや活発なディスカッションをしてくださり、若い力を分け与えてくださった木下美佳子さん、富永沙葉さん、廣芝和之さんに心から感謝いたします。

たくさんのご迷惑をおかけしたにも関わらず、研究生活を日々快適に過ごせる様ご尽力下さった俵佳江さん、高尾布由子さんに心から感謝いたします。

研究活動の犠牲となり、研究の進行を助けてくれた実験動物に哀悼の意を表すると共に感謝いたします。

最後に、長い学生生活を送ることになった私を叱咤激励し、我慢強く支えてくださいました両親、家族、友人に心から感謝いたします。

参考文献

- Attwood, B. K., Bourgognon, J. M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A. E., Young, K. W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., *et al.* (2011). Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
- Caroni, P., Donata, F., Mukker, D., *et al.* (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci* 13, 478-490.
- Caroni, P., Chowdhury, A. and Lahr, M. (2014). Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to delicate sub-circuits. *Trends Neurosci* 37, 604-614.
- Cardin, J. A., Carlen, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L. H. and Moore, C. L. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663-667.
- Chen, Y. J., Johnson, M. A., Lieberman, M. D., Goodchild, R. E., Schobel, S., Lewandowski, N., Rosoklija, G., Liu, R. C., Gingrich, J. A., Small, S., *et al.* (2008). Type III neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviors, and corticostriatal circuit components. *J Neurosci* 28, 6872-6883.
- Chen, Z. L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H. and Shiosaka, S. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.
- Chintawar, S., Hourez, R., Ravella, A., Gall, D., Orduz, D., Rai, M., Bishop, D. P., Geuna, S., Schiffmann, S. N. and Pandolfo, M. (2009). Grafting neural precursor cells promotes functional recovery in an SCA1 mouse model. *J Neurosci* 29, 13126-13135.
- Cho, R. Y., Konecky, R. O. and Carter, C. S. (2006). Impairment in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19878-19883.
- Chong, V. Z., Thompson, M., Beltaifa, S., Webster, M. J., Law, A. J. and Weickert, C. S. (2008). Elevated neuregulin-1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr Res* 100, 270-280.

- Cossart, R., Bernard, C. and Ben-Ari, Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signaling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28, 108-115.
- Corfas, G., Roy, K. and Buxbaum, J. D. (2004). Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 7, 575-580.
- Craig, M. T. and McBain, C. J. (2015). Fast gamma oscillations are generated intrinsically in CA1 without the involvement of fast-spiking basket cells. *J Neurosci* 35, 3616-3624.
- Davies, B., Keams, I. R., Ure, J., Davies, C. H. and Lathe, R. (2001). Loss of hippocampal serine protease BSP1/neurospisin predisposes to global seizure activity. *J Neurosci* 21, 6993-7000.
- Dityatev, A., Schachner, M. and Sonderegger, P. (2010). The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11, 735-746.
- Donato, F., Rompani, S. B. and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272-276.
- Dreyfuss, J. L., Regatieri, C. V., Jarrouge, T. R., Cavaleiro, R. P., Sampaio, L. O. and Nader, H. B. (2009). Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 81, 409-429.
- Duffy, L., Cappas, E., Lai, D., Boucher, A. A. and Karl, T. (2010). Cognition in transmembrane domain neuregulin 1 mutant mice. *Neuroscience* 170, 800-807.
- Fisahn, A., Neddens, J., Yan, L. and Buonanno, A. (2009). Neuregulin-1 modulates hippocampal gamma oscillations: implications for schizophrenia. *Cereb Cortex* 19, 612-618.
- Fromke, R. C. (2015). Plasticity of Cortical excitatory-inhibitory balance. *Ann Rev Neurosci* 38, 195-219.
- Gerlai, R., Pisacane, P. and Erickson, S. (2000). Heregulin, but not ErbB2 or ErbB3, heterozygous mutant mice exhibit hyperactivity in multiple behavioral tasks. *Behav Brain Res* 109, 219-227.
- Green, E. K., Raybould, R., Macgregor, S., Gordon-Smith, K., Heron, J., Hyde, S., Grozeva, D., Hamshere, M., Williams, N., Owen, M. J., *et al.* (2005). Operation of the schizophrenia susceptibility gene, neuregulin 1, across traditional diagnostic boundaries to increase risk for bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62, 642-648.

- Hahn, C. G., Wang, H. Y., Cho, D. S., Talbot, K., Gur, R. E., Berrettini, W. H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K. E., Siegel, S. J., *et al.* (2006). Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* 12, 824-828.
- Halasy, K., Buhl, E. H., Lorinczi, Z., Tamas, G. and Somogyi, P. (1996). Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 6, 306-329.
- Harrison, P. J. and Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10, 40-68.
- Hensch, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6, 877-888.
- Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, A., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Toshida, N. and Shiosaka, S. (2001). Abnormalities of synapses and neuropsin in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.
- Hou, X. J., Ni, K. M., Yang, J. M. and Li, X. M. (2014). Neuregulin 1/ErbB4 enhances synchronized oscillations of prefrontal cortex neurons via inhibitory synapses. *Neuroscience* 261, 107-117.
- Hu, H., Gan, J. and Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* 345, 1255263-1-1255263-13.
- Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H. and Shiosaka, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *J Neurosci* 28, 843-849.
- Izumi, A., Iijima, Y., Noguchi, H., Numakawa, T., Okada, T., Hori, H., Kato, T., Tatsumi, M., Kosuga, A., Kamijima, K., *et al.* (2008). Genetic variations of human neuropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions. *Neuropsychopharmacology* 33, 3237-3245.
- Kandel, E. and Abel, T. (1995). Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. *Science* 268, 825-826.

Kato, K., Kishi, T., Kamachi, T., Akisada, M., Oka, T., Midorikawa, R., Takio, K., Dohmae, N., Bird, P. I., Sun, J., *et al.* (2001). Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. *J Biol Chem* 276, 14562-14571.

Klausberger, T. and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53-57.

Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S. and Shiosaka, S. (2000). Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci* 12, 1479-1486.

Krivosheya, D., Tapia, L., Levinson, J. N., Huang, K., Kang, Y., Hines, R., Ting, A. K., Craig, A. M., Mei, L., Bamji, S. X. and El-Husseini, A. (2008). ErbB4-neuregulin signaling modulates synapse development and dendritic arborization through distinct mechanisms. *J Biol Chem* 283, 32944-32956.

Law, A. J., Lipska, B. K., Weickert, C. S., Hyde, T. M., Straub, R. E., Hashimoto, R., Harrison, P. J., Kleinman, J. E. and Weinberger, D. R. (2006). Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 6747-6752.

Lewis, D. A., Hashimoto, T. and Volk, D. W. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6, 312-324.

Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R. and Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci* 35, 57-67.

Li, K. X., Lu, Y. M., Xu, Z. H., Zhang, J., Zhu, J. M., Zhang, J. M., Cao, S. X., Chen, X. J., Chen, Z., Luo, J. H., Duan, S. and Li, X. M. (2012). Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat Neurosci* 15, 267-273.

Loeb, J. A. and Fischbach, G. D. (1995). ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain. *J Cell Biol* 130, 127-135.

Loeb, J. A., Khurana, T. S., Robbins, J. T., Yee, A. G. and Fischbach, G. D. (1999). Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* 126, 781-791.

- Longart, M., Chatani-Hinze, M., Gonzalez, C. M., Vullhorst, D. and Buonanno A. (2007). Regulation of ErbB-4 endocytosis by neuregulin in GABAergic hippocampal interneurons. *Brain Res Bull* 73, 210-219.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793-807.
- Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y. and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.
- Mei, L. and Xiong, W. C. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9, 437-452.
- Mei, L. and Nave, K. A. (2014). Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron* 83, 27-49.
- Minzenberg, M. J., Firl, A. J., Yoon, J. H., Gomes, G. C., Reinking, C. and Carter, C. S. (2010). Gamma oscillatory power is impaired during cognitive control independent of medication status in first-episode schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 35, 2590-2599.
- Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K. *et al.* (1998). Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci* 10, 760-764.
- Murray, A. J., Sauer, J. F., Riedel, G., McClure, C., Ansel, L., Cheyne, L., Bartos, M., Wisden, W. and Wulff, P. (2011). Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nat Neurosci* 14, 297-299.
- O'Tuathaigh, C. M., O'Connor, A. M., O'Sullivan, G. J., Lai, D., Harvey, R., Croke, D. T. and Waddington, J. L. (2008). Disruption to social dyadic interactions but not emotional/anxiety-related behaviour in mice with heterozygous 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin-1. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 462-466.
- Peng, Z. and Houser, C. R. (2005). Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of the temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 25, 7210-7220.
- Racine, R. J., Gartner, J. G. and Burnham, W. M. (1972). Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain Res* 47, 262-268.

Rubenstein, J. L. and Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2, 255-267.

Shibuya, M., Komi, E., Wang, R., Kato, T., Watanabe, Y., Sakai, M., Ozaki, M., Someya, T. and Nawa, H. (2010). Measurement and comparison of serum neuregulin 1 immunoreactivity in control subjects and patients with schizophrenia: an influence of its genetic polymorphism. *J Neural Transm* 117, 887-895.

Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A. and Shiosaka, S. (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem* 273, 11189-11196.

Shiosaka, S. and Ishikawa, Y. (2011). Neuropsin--a possible modulator of synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat* 42, 24-29.

Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O. and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702.

Sonderegger, P. and Matsumoto-Miyai, K. (2014). Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. *Trends Neurosci* 37, 413-423.

Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T. T., *et al.* (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71, 877-892.

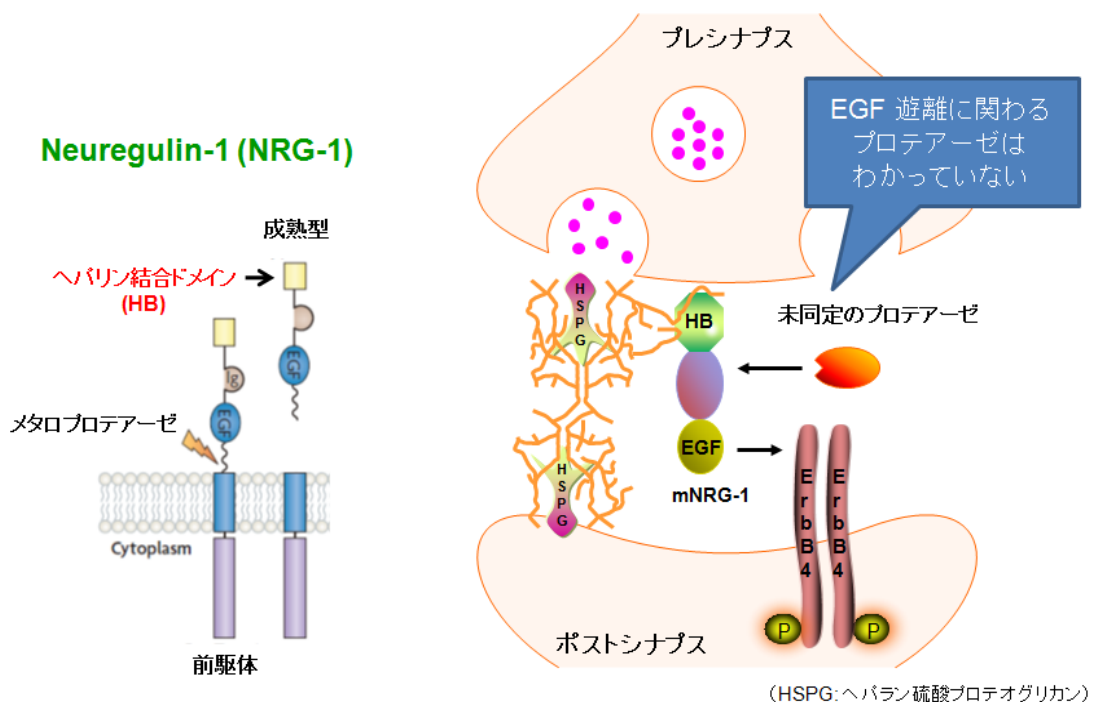
Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S. and Shiosaka, S. (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J Physiol* 570, 541-551.

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 Methods* 173, 114-120.

Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., and Shiosaka, S., (2012). Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *J Neurosci* 32, 12657-12672.

- Tan, G. H., Liu, Y. Y., Yin, D. M., Mei, L. and Xiong, Z. Q. (2012). Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci* 15, 258-266.
- Vullhorst, D., Neddens, J., Karavanova, I., Tricoire, L., Petralia, R. S., McBain, C. J. and Buonanno, A. (2009). Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. *J Neurosci* 29, 12255-12264.
- Wassef, A., Baker, J. and Kochan, L. D. (2003). GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* 23, 601-640.
- Woo, R. S., Li, X. M., Tao, Y., Carpenter-Hyland, E., Huang, Y. Z., Weber, J., Neiswender, H., Dong, X. P., Wu, J., Gassmann, M., *et al.* (2007). Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54, 599-610.
- Wulff, P., Ponomarenko, A. A., Bartos, M., Korotkova, T. M., Fuchs, E. C., Bahner, F. *et al.* (2009). Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 3561-3566.
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O'Shea, D. J., Sohal, V. S., Godhen, I., Finkelstein, J., Paz, J. T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J. R., Hegemann, P. and Deisseroth, K. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171-178.

図表



(Mei and Xiong, *Nat Rev Neurosci.*, 2008)

(Modified from Loeb et al., *J Cell Biol.*, 1995)

Figure 1. NRG-1 のプロセッシング機構

(左) NRG-1 は、細胞外領域に、ヘパリン結合 (HB) ドメイン、イムノグロブリン様 (Ig) ドメイン、上皮成長因子様 (EGF) ドメインを持つ一回膜貫通型前駆体ポリペプチドとして合成される。マトリックスメタロプロテアーゼによって切断されることで成熟型 (mNRG-1) となる。

(右) mNRG-1 は HB ドメインを介して、細胞外マトリックスであるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のグリコサミノグリカンと結合する。一度結合すると、未同定の細胞外プロテアーゼによって HB ドメインもしくは Ig ドメインが切断されるまで、蓄積したままとなり、プロセッシングを受けることで機能的な EGF ドメイン (リガンド) が遊離される。これにより、遊離した EGF ドメインはポストシナプス受容体 (ErbB4 受容体) を介してシグナルを伝える。

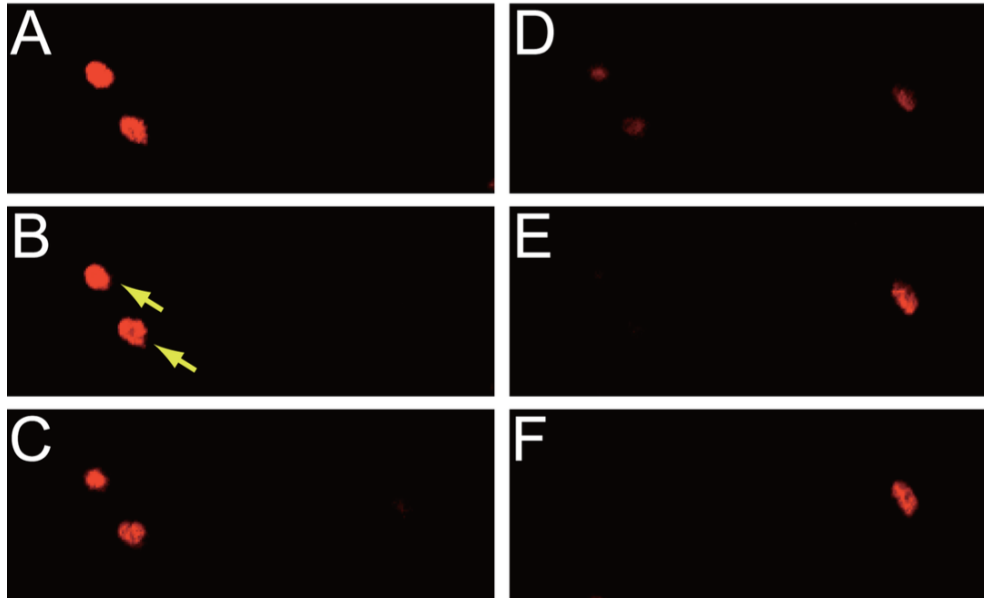


Figure 2. Disector-based cell counting

抗 cFos 抗体で染色した成熟マウス海馬の冠状切片から、Z 方向に 2.0 μm の厚さで連続スキャンして得た 6 枚の画像。それぞれ first section (A), second section (B), third section (C), forth section (D), fifth section (E), last section (F) を示す。First section (A), second section (B) を reference section とし、reference section で検出され、look-up section (ここでは E の画像にあたる) では検出されない細胞のみをカウントした (黄色矢印)。

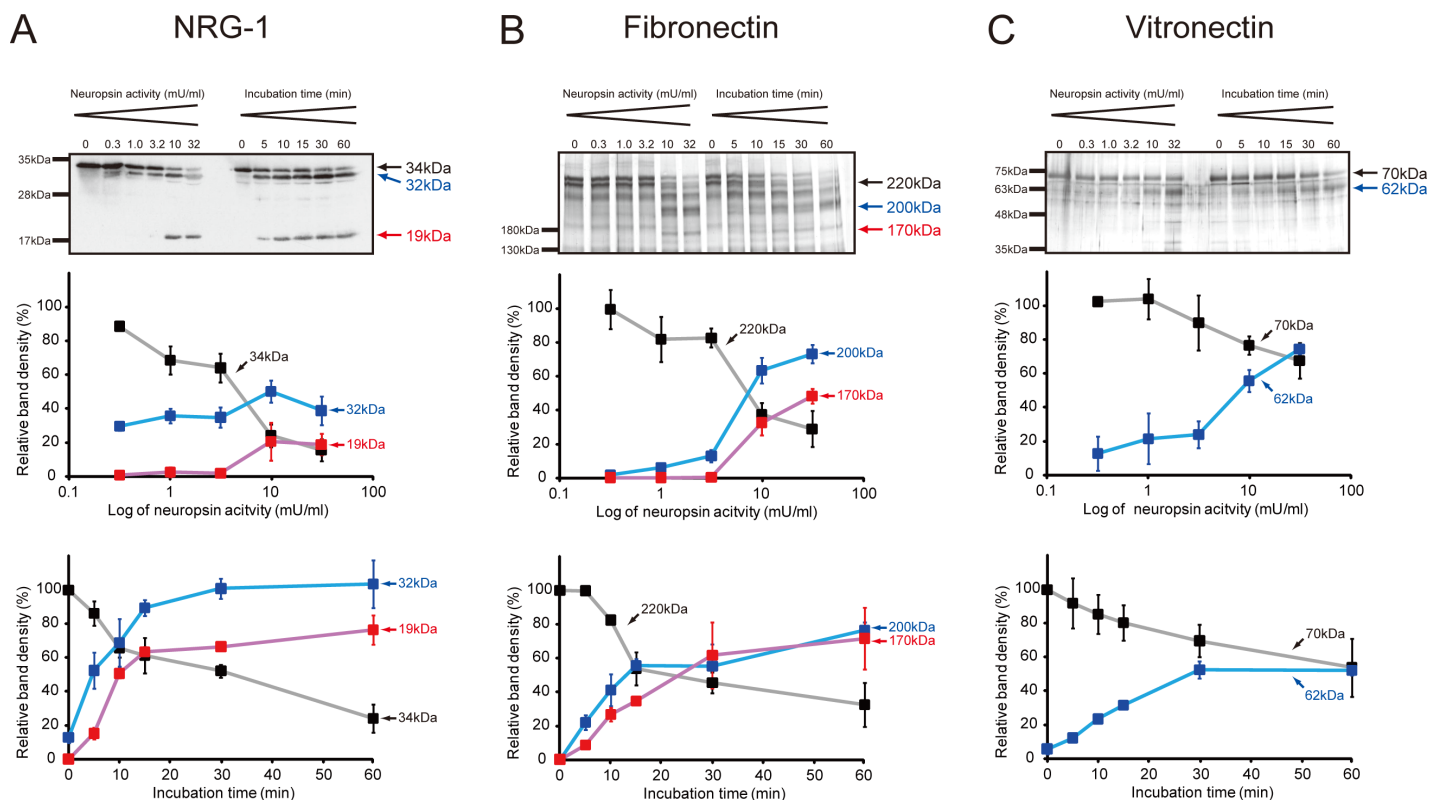


Figure 3. ニューロプシンは mNRG-1 を効果的に直接切断する

ニューロプシンの活性と反応時間に依存した mNRG-1 (A), Fibronectin (B), Vitronectin (C) の切断を、ウェスタンブロット (A) および銀染色 (B, C) によって可視化した。溶媒のみ (0 mU/ml) または、4 °C でニューロプシンを投与した直後 (0 min) のサンプルのバンド密度を 100 % とした。ニューロプシンの様々な活性 (upper graphs) および反応時間 (lower graphs) に対する相対的バンド密度のグラフを示す。ニューロプシンの切断によって産生されたバンド密度を青および赤四角で、全長蛋白質のバンド密度を黒四角でプロットした。10 mU/ml のニューロプシンで反応時間を検討した。また、ニューロプシン濃度依存性の検討は 37 °C, 20 分のインキュベーション時間で検討した。データは平均値±SEM で示す。(A, B, C 共に $n = 3$).

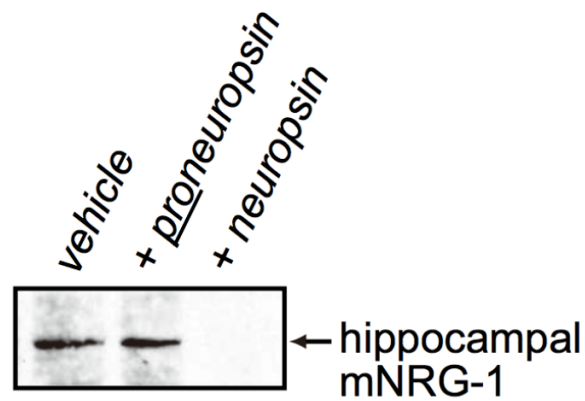


Figure 4. ニューロプシンは内在性 mNRG-1 を切断した

マウス海馬ホモジネイトに Vehicle, 組換え proneuropsin (不活性型), 組換え neuropsin (活性型) を混合した後、NRG-1 N-terminal extracellular domain 認識抗体 (N-NRG-1 抗体) を用いてウェスタンブロットを行った。Vehicle と酵素活性を持たない proneuropsin を投与した場合は、海馬 mNRG-1 が検出されたが、活性型の neuropsin を投与したものではそれが消失し、neuropsin によって内在性 mNRG-1 が切断されたことが確認された ($n = 3$)。

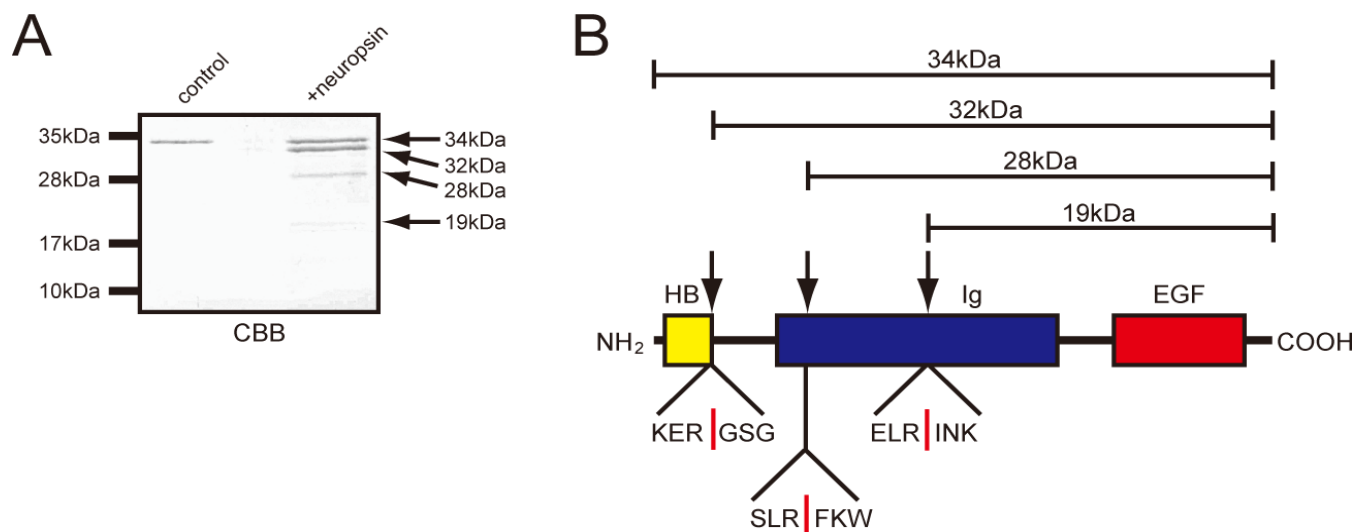


Figure 5. ニューロプシンは mNRG-1 を 3 箇所切断する

(A) 組換えヒト mNRG-1 を、組換えヒトニューロプシン非存在下 (control) または存在下 (+neuropilin) で 37 °C でインキュベーションした。サンプルは SDS-PAGE 後、PVDF 膜にトランスファーし、それから CBB 染色を行った。ニューロプシンは mNRG-1 を切断し、32, 28, 19 kDa の切断断片を生成した。それぞれのフラグメントについて、N 末端ペプチドシーケンスを行った ($n = 3$)。

(B) mNRG-1 のドメイン構造。mNRG-1 は N 末端側から、ヘパリン結合 (HB) ドメイン、免疫グロブリン様 (Ig) ドメイン、上皮成長因子様 (EGF) ドメインから構成されている。ニューロプシンによる切断サイトは、矢印および下に示す 6 残基アミノ酸配列の中で、赤バーで示す。

Table 1. ニューロプシンの酵素活性および反応速度パラメータ

Enzyme activities and kinetic parameters of neuropsin as measured
on MCA-containing synthetic substrates

Substrate	mU/mg protein (%)	k_{cat} (min^{-1})	K_{m} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{mM}^{-1}/\text{min}$)
Ac-SLR-MCA	241 (177)	20.7	162	128
Boc-VPR-MCA	136 (100)	12.8	77.0	166
Ac-KDR-MCA	94.1 (69.2)	17.2	550	31.2
Ac-KER-MCA	61.5 (45.2)	2.70	550	16.7
Ac-ELR-MCA	11.3 (8.31)	4.16	332	12.5
Ac-DVR-MCA	0.55 (0.40)	1.34	380	3.54
Ac-YGR-MCA	0.0014 (0.001)	0.57	247	2.31

MCA 蛍光合成基質を用いて、ニューロプシンの酵素活性と反応速度パラメータを決定した。30 °C で1 分間に1 μmol の基質を加水分解するのに必要な量を1 unit (U) とした。Boc-VPR-MCA に対する酵素活性に対する割合 (%) を括弧内に示す。Ac-SLR-MCA がニューロプシンに対して最も優れた合成基質であった。

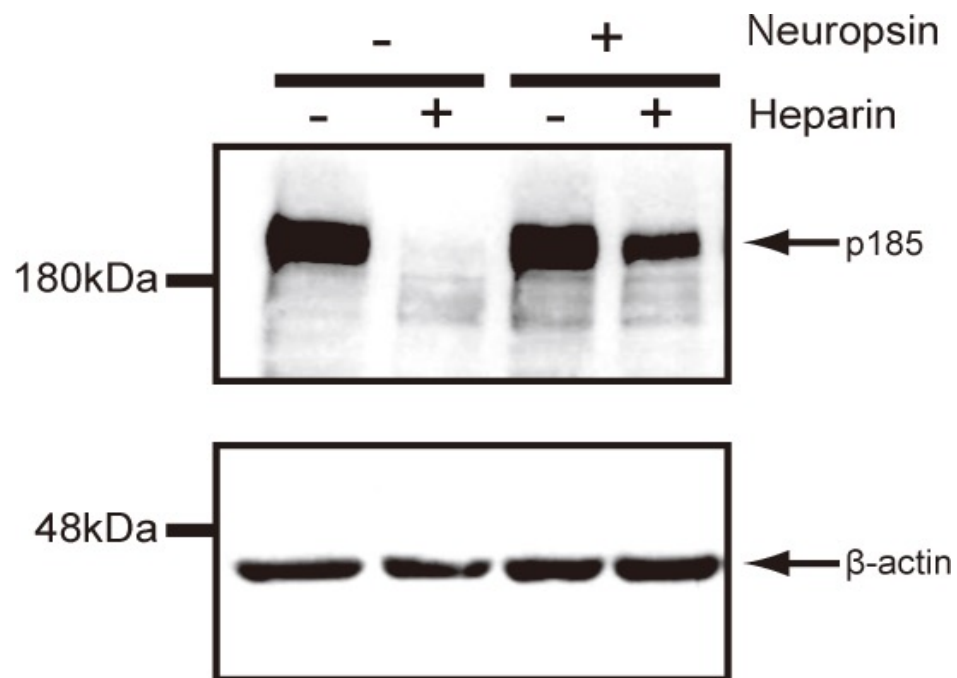


Figure 6. ニューロプシンは mNRG-1 とヘパリンとの結合を修飾する

mNRG-1 (3 nM) を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で 37 °C で 20 分間 10 mU/ml の neuropsin と反応させた。ニューロプシン処置および未処置の mNRG-1 を、3 mg/ml のヘパリンの存在下または非存在下で混合した後、20 分間 MCF-7 細胞に添加した。受容体 p185 のリン酸化レベルは、抗 phosphotyrosine 抗体を用いたウェスタンブロット法により測定した ($n = 4$)。

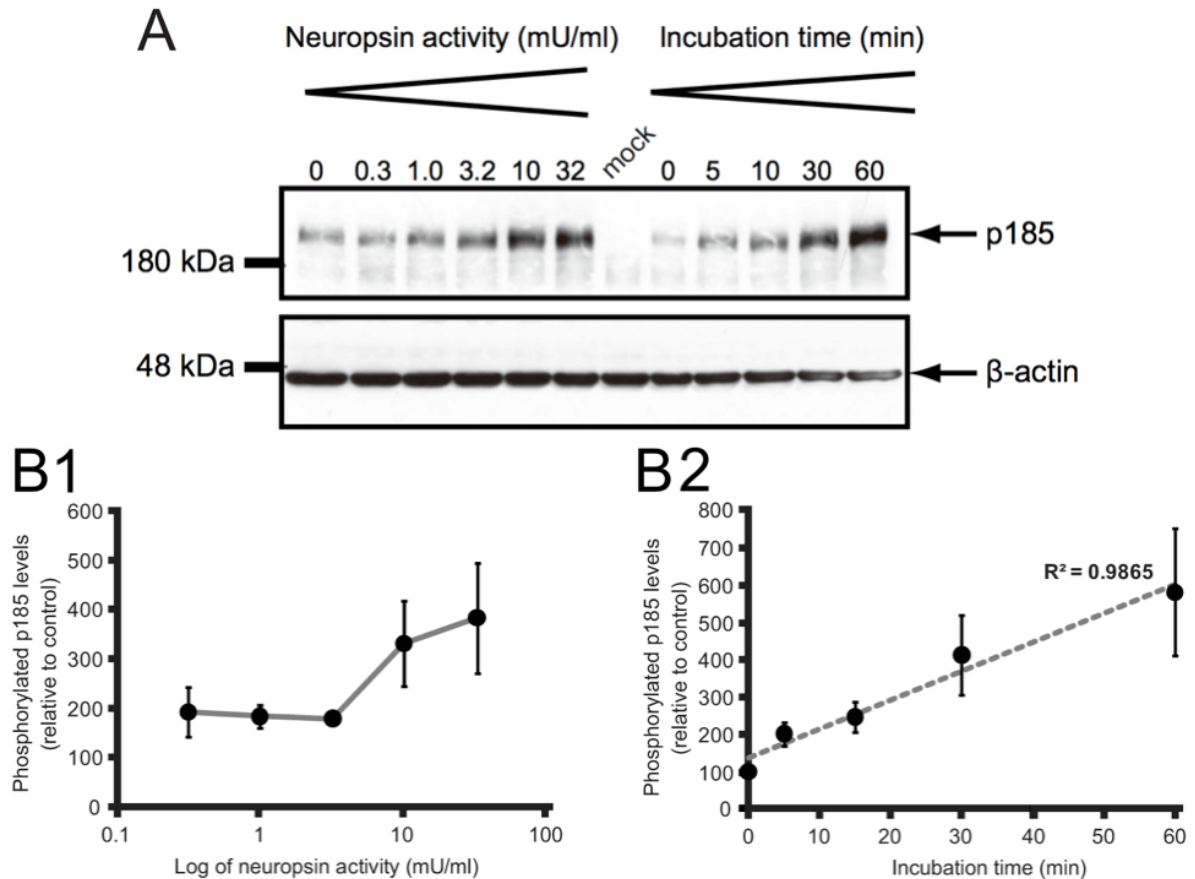


Figure 7. ニューロピシンの mNRG-1 の切断および p185 のリン酸化における効果

(A) NRG-1 を発現させた COS-7 細胞を、(20 分間の反応時間で) 様々な活性のニューロピシンと (10 mU/ml のニューロピシンで) 様々なインキュベーション時間で反応させた。上清を p185 (ErbB) が発現している MCF-7 細胞に投与し、p185 の自己リン酸化レベルをウェスタンブロットによって調べた。NRG-1 を発現させていない COS-7 細胞にニューロピシンを加えた上清を MCF-7 細胞に投与したときのサンプルをコントロールとした (mock)。

(B1, B2) (A) の条件下での p185 自己リン酸化レベルを定量化した (black line)。点線は、p185 のリン酸化 (black) の回帰直線を示す。相関係数は 0.9865 である ($n=4$)。

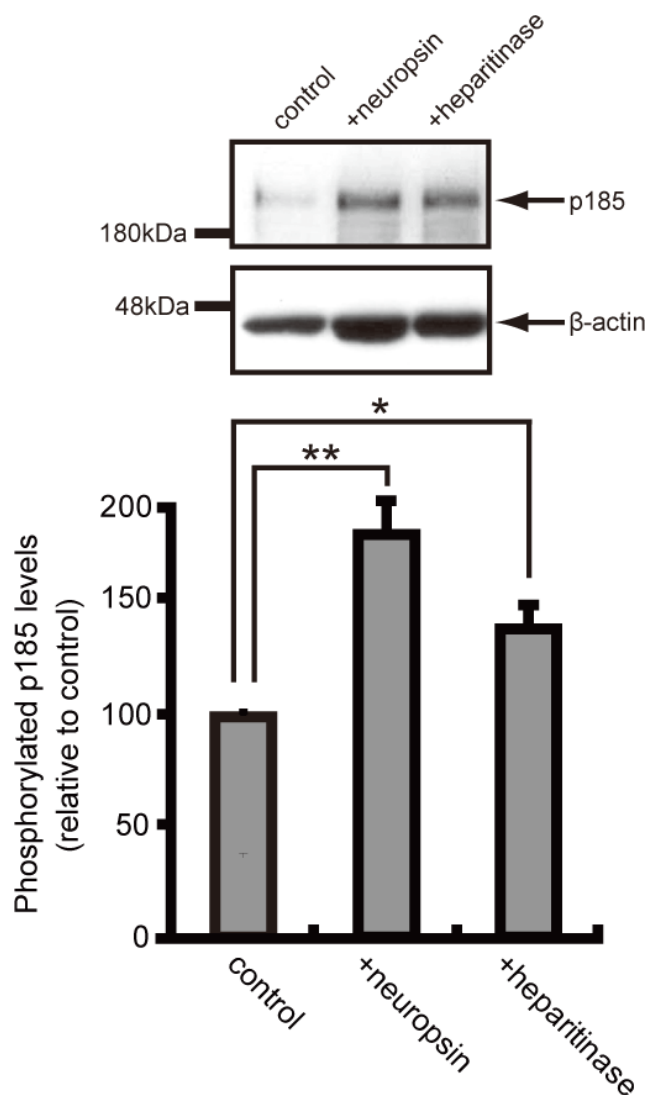


Figure 8. ヘパリチナーゼはニューロプシンと同レベルの **p185** のリン酸化を誘導する

NRG-1 を発現させた COS-7 細胞を 10 mU/ml ニューロプシン、もしくはヘパリチナーゼとインキュベーションし、その細胞上清を MCF-7 細胞に添加し、p185 のリン酸化を検討した ($n = 8-9$)。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。エラーバーは SEM で示す。

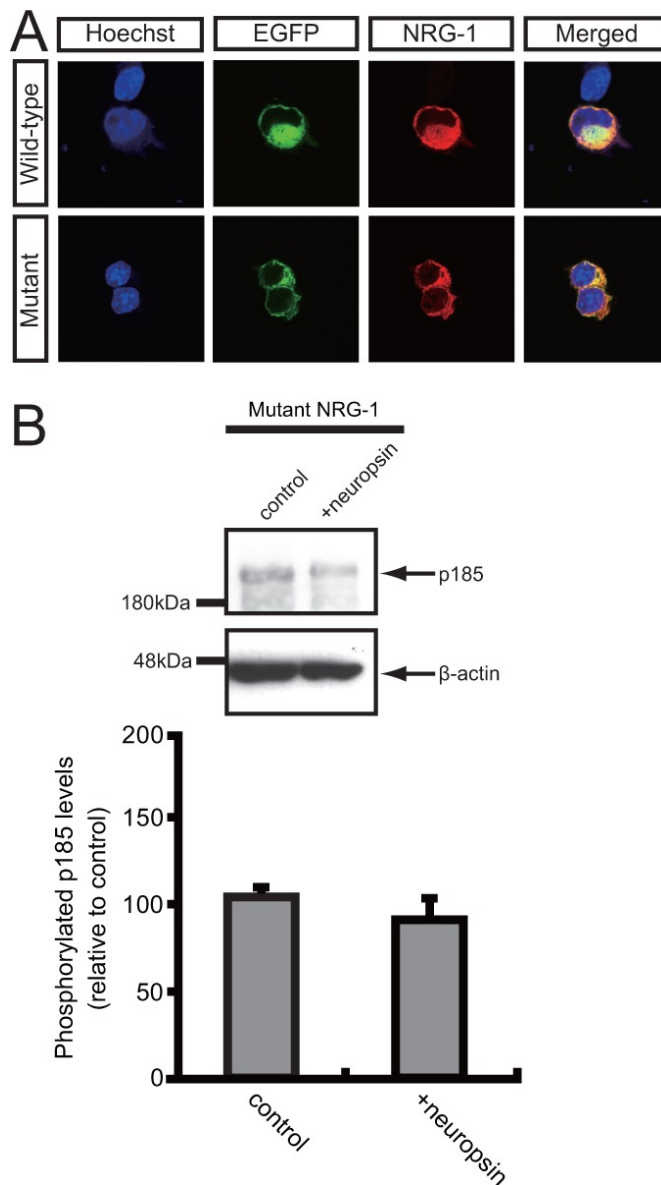


Figure 9. Mutant NRG-1 発現細胞へのニューロトロフィンの投与は、p185 のリン酸化に影響を及ぼさない

(A) GFP 融合 NRG-1 (Wild-type) と mutant NRG-1 (Mutant) を発現 (green) させた COS-7 細胞を抗 NRG-1 EGF-like domain 抗体 (red) を用いて免疫細胞化学染色を行った。核を Hoechst によって染色した。Wild-type および Mutant 間で NRG-1 の発現量および mNRG-1 の局在に差異はない。

(B) Mutant NRG-1 (Arg¹⁸, Arg⁶⁷, Arg⁹⁸ を全て Ala に置換) を COS-7 細胞に発現後、10 mU/ml のニューロトロフィンを 60 分間添加し、その上清を MCF-7 細胞に加えた。MCF-7 細胞ライセートは抗 phosphotyrosine 抗体でウェスタンブロットを行った ($n = 8$)。

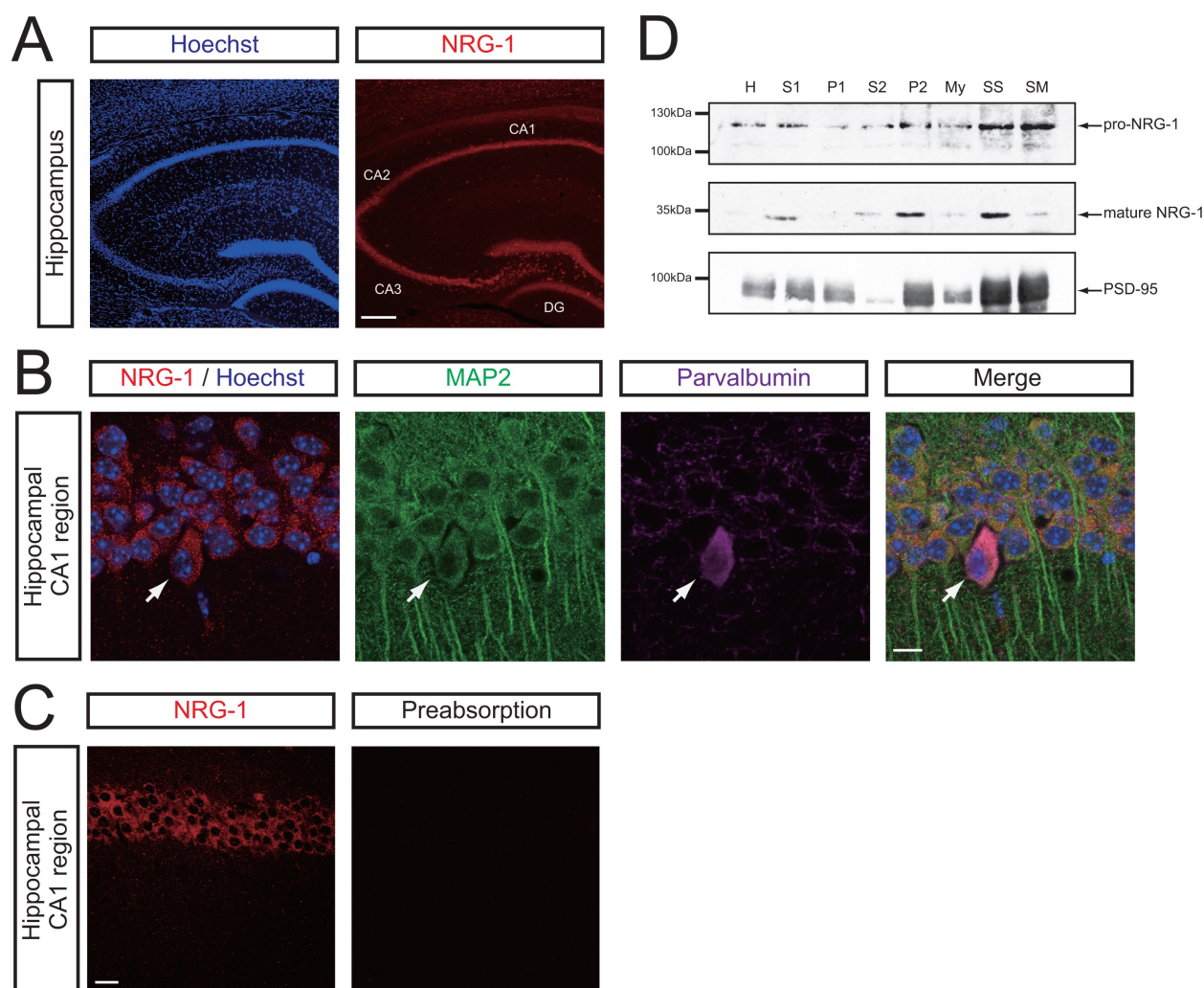


Figure 10. マウス海馬における NRG-1 蛋白質の局在

(A) 抗 NRG-1 EGF-like domain 抗体で染色した成熟マウス海馬の冠状切片。NRG-1 陽性反応は、CA3-1 領域の錐体細胞層および歯状回 (DG) の顆粒細胞層で検出された。スケールバー：200 μ m。

(B) NRG-1 (red) / Hoechst (blue), MAP2 (green), パルブアルブミン (magenta) の 4 重染色像。矢印は、パルブアルブミン陽性細胞を示す。NRG-1 は興奮性と抑制性細胞の両方で発現していた。スケールバー：10 μ m。

(C) 抗 NRG-1 抗体の特異性。抗 NRG-1 抗体またはブロッキングペプチドで吸収した抗 NRG-1 抗体と反応させた冠状連続切片。スケールバー：20 μ m。

(D) マウス海馬から調製したシナプトソーム (SS) とシナプス膜 (SM) の抗 C-NRG-1 抗体および抗 N-NRG-1 抗体によるウェスタンブロットを示す。PSD-95 は SS および SM 分画に豊富であり、生化学的分画のコントロールとなる。mNRG-1 は主に SS 分画で検出された。H, ホモジェネイト；S1, 上清 1；P1, ペレット 1；S2, 上清 2；P2, ペレット 2；My, ミエリン分画。(A, B, C, D 共に $n = 3$)。

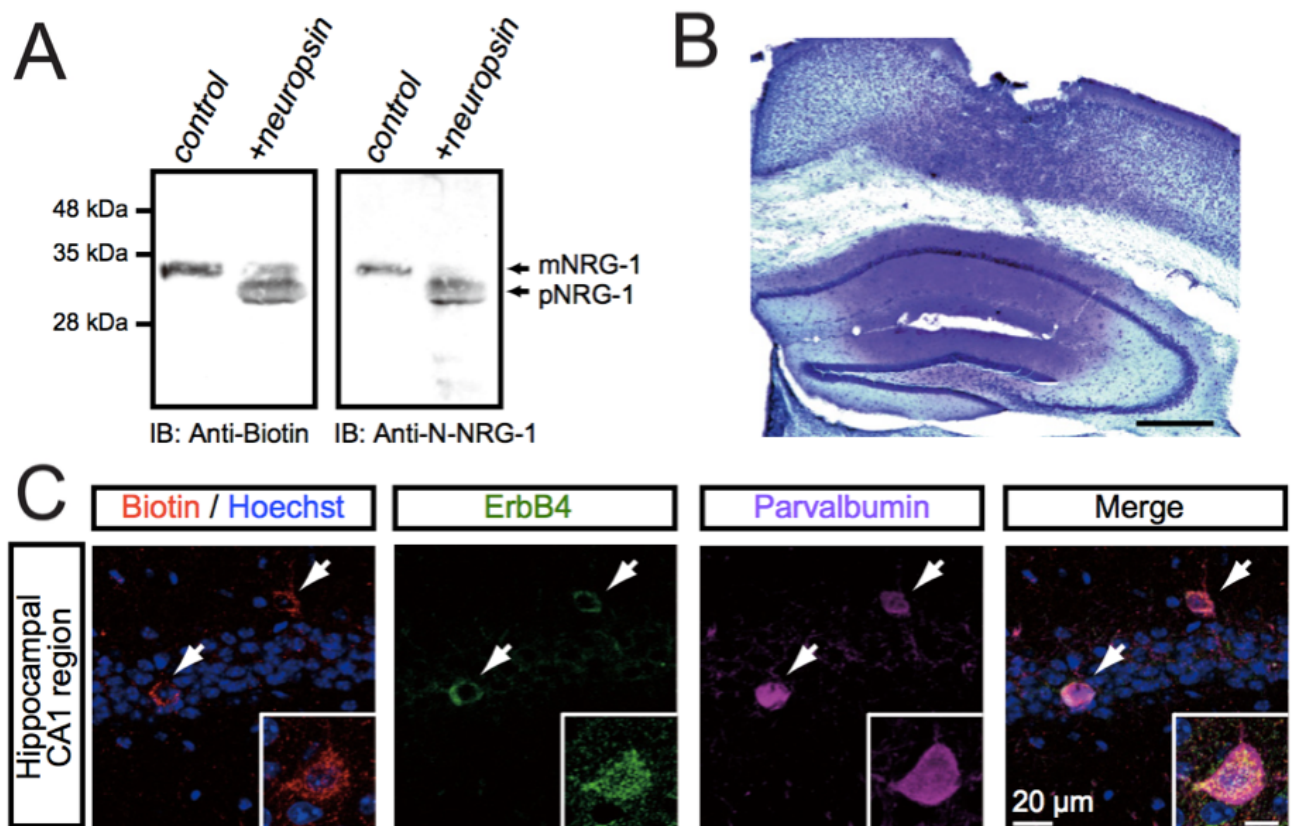


Figure 11. NRG-1 のビオチン標識および海馬内投与

(A) ビオチン標識した mNRG-1 (Control) およびこれをニューロトロフィンの切断によって産生した HB domain lacked mNRG-1 (pNRG-1; +neurotrophin) を SDS-PAGE し、ニトロセルロース膜にトランスファーした後、抗 biotin 抗体 (左) と抗 N-NRG-1 抗体 (右) でウェスタンブロットを行った ($n = 3$)。

(B) pNRG-1 と 1.5% の Chicago Sky Blue 6B を投与した後 (purple)、Nissl 染色 (blue) を行った冠状海馬切片 ($n = 3$)。

(C) pNRG-1 の海馬内投与 1 時間後にビオチン (red) / Hoechst (blue), ErbB4 (green), パルブアルブミン (magenta) に対する抗体で免疫組織化学染色を行った冠状切片。ビオチンと ErbB4、パルブアルブミンは共局在していた (arrows)。挿入図は強拡大図を示す ($n = 3$)。

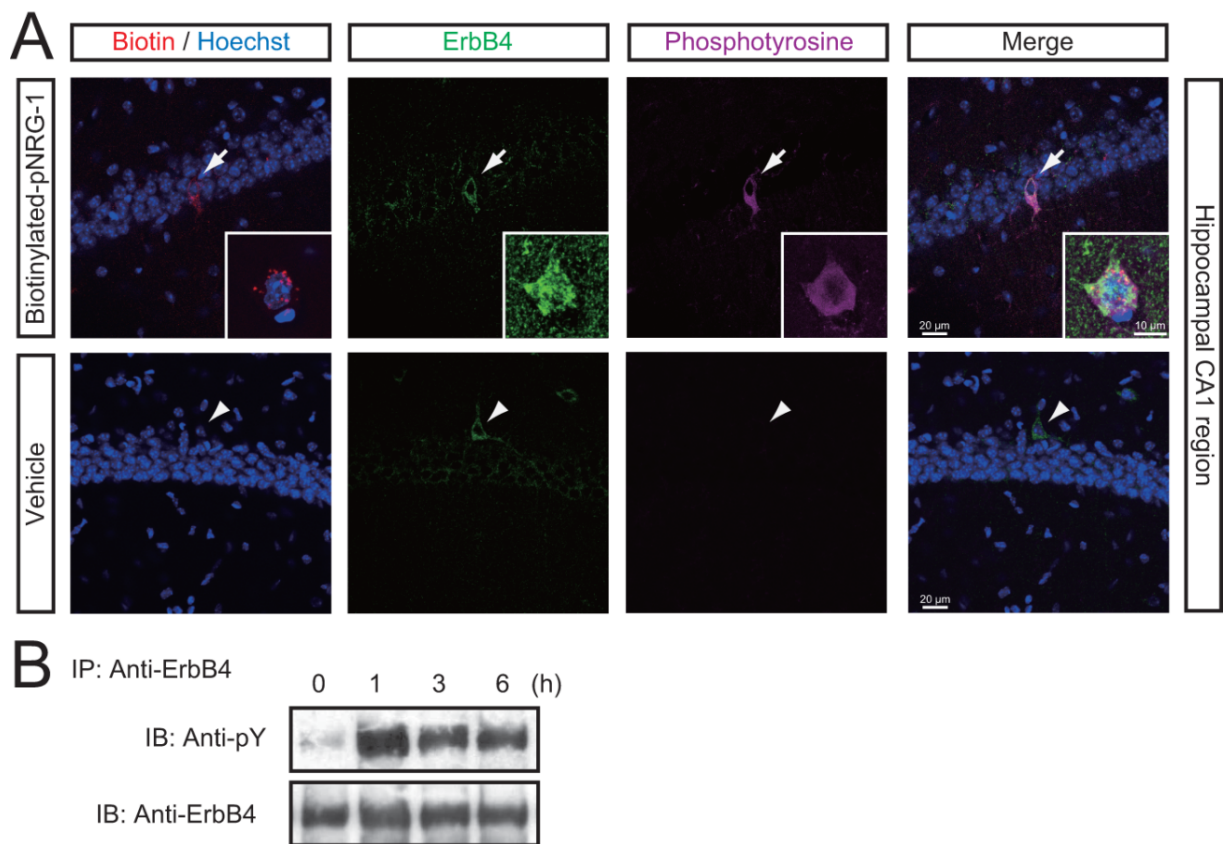


Figure 12. マウス海馬における pNRG-1 の局在および ErbB4 の活性化

(A) pNRG-1 の海馬内投与 1 時間後にビオチン (red) / Hoechst (blue), ErbB4 (green), phosphotyrosine (magenta) に対する抗体で免疫組織化学染色を行った冠状切片。pNRG-1 は ErbB4 陽性細胞と共局在しており、その細胞はチロシンリン酸化が増大していた(上段)。 Vehicle 投与群ではチロシンリン酸化の増大は観察されなかった(下段)。 ($n=3$)。

(B) pNRG-1 を海馬に投与後 0, 1, 3, 6 時間後に調製した海馬ライセートを抗 ErbB4 抗体で免疫沈降し、それを抗 phosphotyrosine 抗体 (anti-pY) でウェスタンブロットを行った。 ($n=4$)。

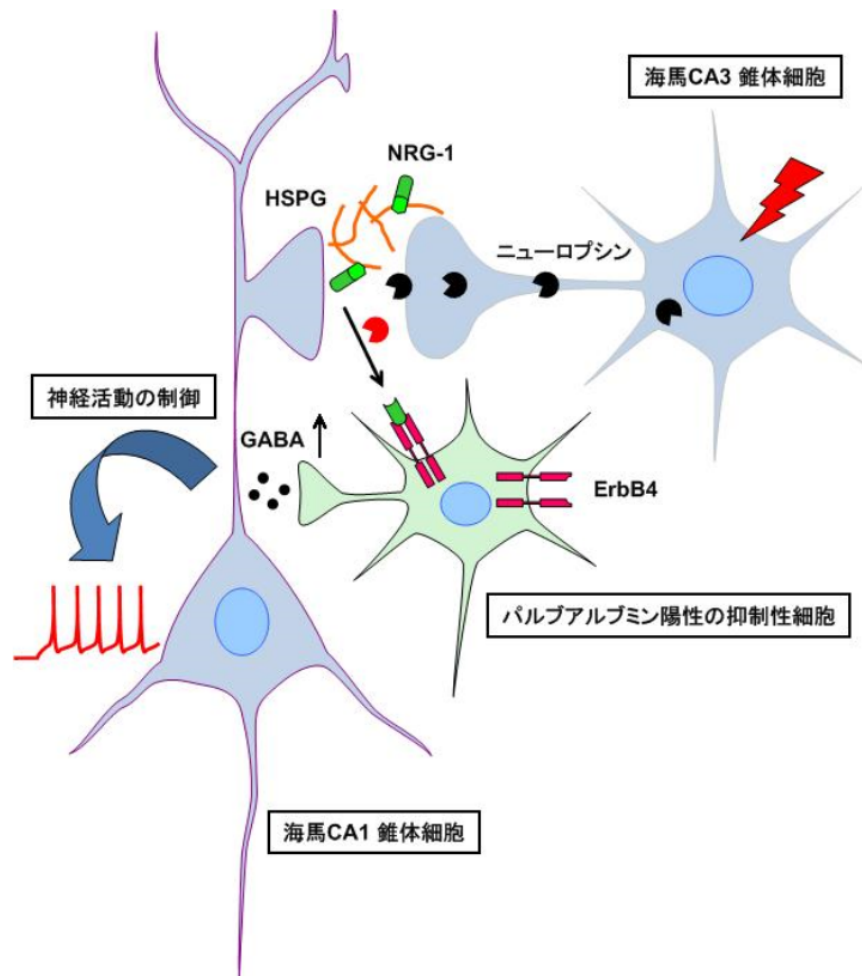


Figure 13. ニューロブシン- NRG-1-ErbB4 シグナルのモデル図

興奮性の神経活動依存的に活性化したニューロブシン (赤) は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG; 黄色線) に結合している NRG-1 (緑) を切断する。それにより、NRG-1 のリガンド部位が遊離し、それが抑制性の PV 細胞に局在している ErbB4 (ピンク棒) に結合する。これにより下流シグナル経路が駆動し、GABA 伝達を修飾し、興奮性細胞の神経活動を制御する。

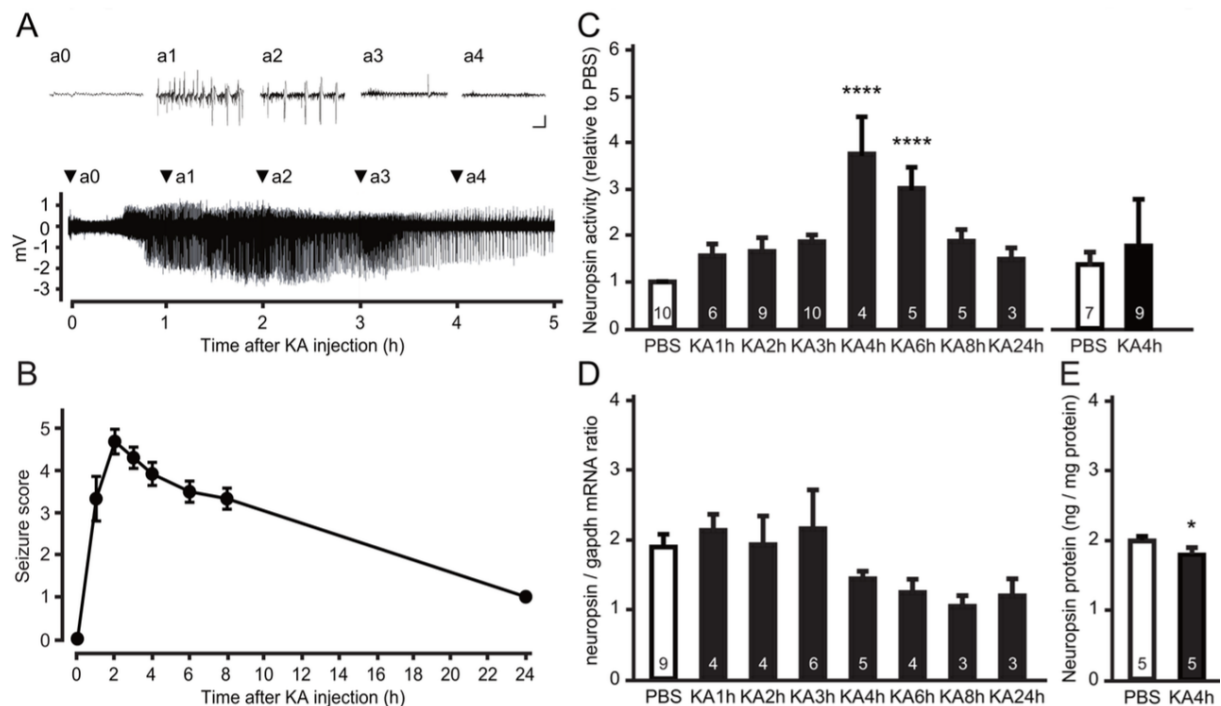


Figure 14. カイニン酸投与はニューロプシン活性を上昇させる

(A) マウスをウレタン (1.25g/kg; i.p) で麻酔し、海馬 CA1 領域にタングステン記録電極を挿入した後、腹腔内にカイニン酸 (25mg/kg) を投与し、局所場電位 (LFP) を測定した。

(B) カイニン酸投与後のマウスの表現型を Racine スケールを元に評価した seizure score。マウスにカイニン酸を投与すると、投与約 1, 2 時間後に全身性痙攣発作 (ステージ 5) が誘導される。その後、てんかん発作を断続的に繰り返すてんかん重積状態 (ステージ 4) が 4 から 8 時間後まで持続する ($n = 13$)。

(C) カイニン酸投与後の内在性ニューロプシン活性の変動。海馬を採取し、ニューロプシンを免疫沈降した後、合成基質 Pro-Phe-Arg-MCA と反応させ、遊離した蛍光物質量を比較検討した。カイニン酸投与により、てんかん重積状態が誘導されたマウス海馬内におけるニューロプシン活性 (左)、カイニン酸を投与してもてんかん重積状態にならなかったマウス海馬内におけるニューロプシン活性 (右) を示す。

(D) ニューロプシン mRNA の発現。カイニン酸投与後の海馬内におけるニューロプシン mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR によって調べた。

(E) ニューロプシンの蛋白質濃度。C, D, E のカラム内の数値は n 数を示す。

* $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$ 。エラーバーは SEM で示す。

Table 2. 野生型およびニューロプシン KO マウス間におけるカイニン酸投与量とてんかん発作開始時間の比較

	<i>n</i>	KA dosage (mg/kg)	Seizure onset time (min)
Wild type	11	33.18 ± 2.26	80.27 ± 10.7
Neuropsin KO	11	32.27 ± 1.95	77.91 ± 8.39
<i>P</i> value		0.7641	0.8634

てんかん重積状態 (stage 4 or 5) に至るまでに要したカイニン酸投与量、ならびに、立ち上がりや後肢の強直間代性行動 (stage 4) が出現するまでの時間を算出した。持続性けいれんを引き起こすカイニン酸投与量とてんかん重積状態に至るまでの時間は、野生型マウスとニューロプシン KO マウスとの間に有意な差は認められなかった。値は平均値± SEM で示す。

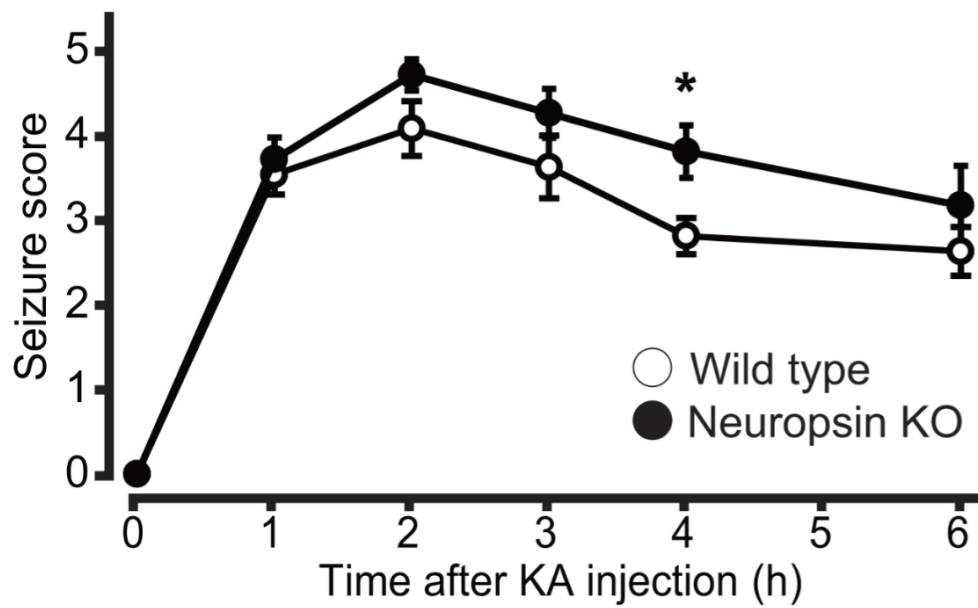


Figure 15. 野生型およびニューロプシン KO マウスにおける seizure score のタイムコース

カイニン酸投与後の野生型マウス (white circle; $n = 11$) およびニューロプシン KO マウス (black circle; $n = 11$) の表現型を seizure score によって評価した。* $P < 0.05$ 。エラーバーは SEM で示す。

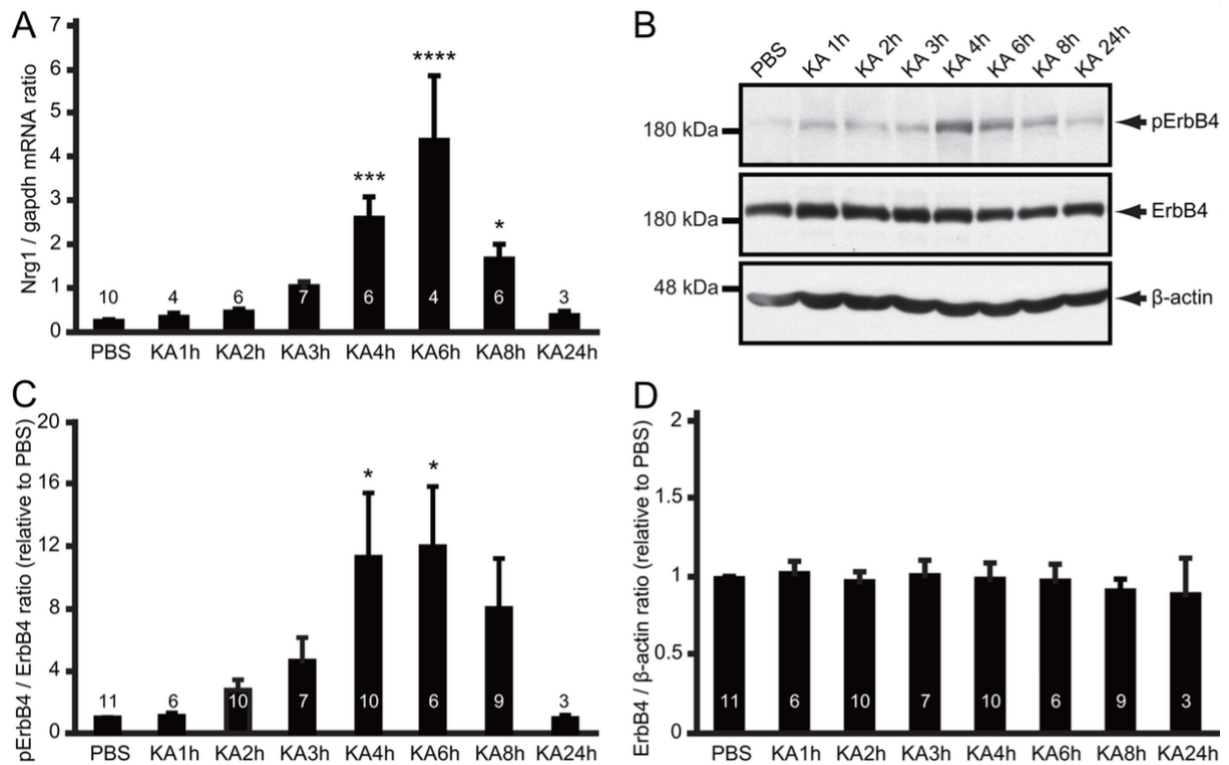


Figure 16. カイニン酸投与は *Nrg-1* mRNA の発現および ErbB4 の自己リン酸化レベルを上昇させる

(A) カイニン酸投与後の *Nrg-1* mRNA 発現の変動。カイニン酸投与後のマウス海馬における *Nrg-1* mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR によって調べた。 *Gapdh* mRNA を内標準として使った。

(B, C, D) カイニン酸投与後の ErbB4 自己リン酸化の変動。ウェスタンブロッティングにより、マウス海馬における ErbB4 自己リン酸化レベルと ErbB4 蛋白量を測定した。pErbB4/ErbB4 および ErbB4/β アクチン の割合を示す。野生型マウスの PBS 投与群に対する割合で規格化した。A, C, D のカラム内の数値は n 数を示す。

* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。エラーバーは SEM で示す。

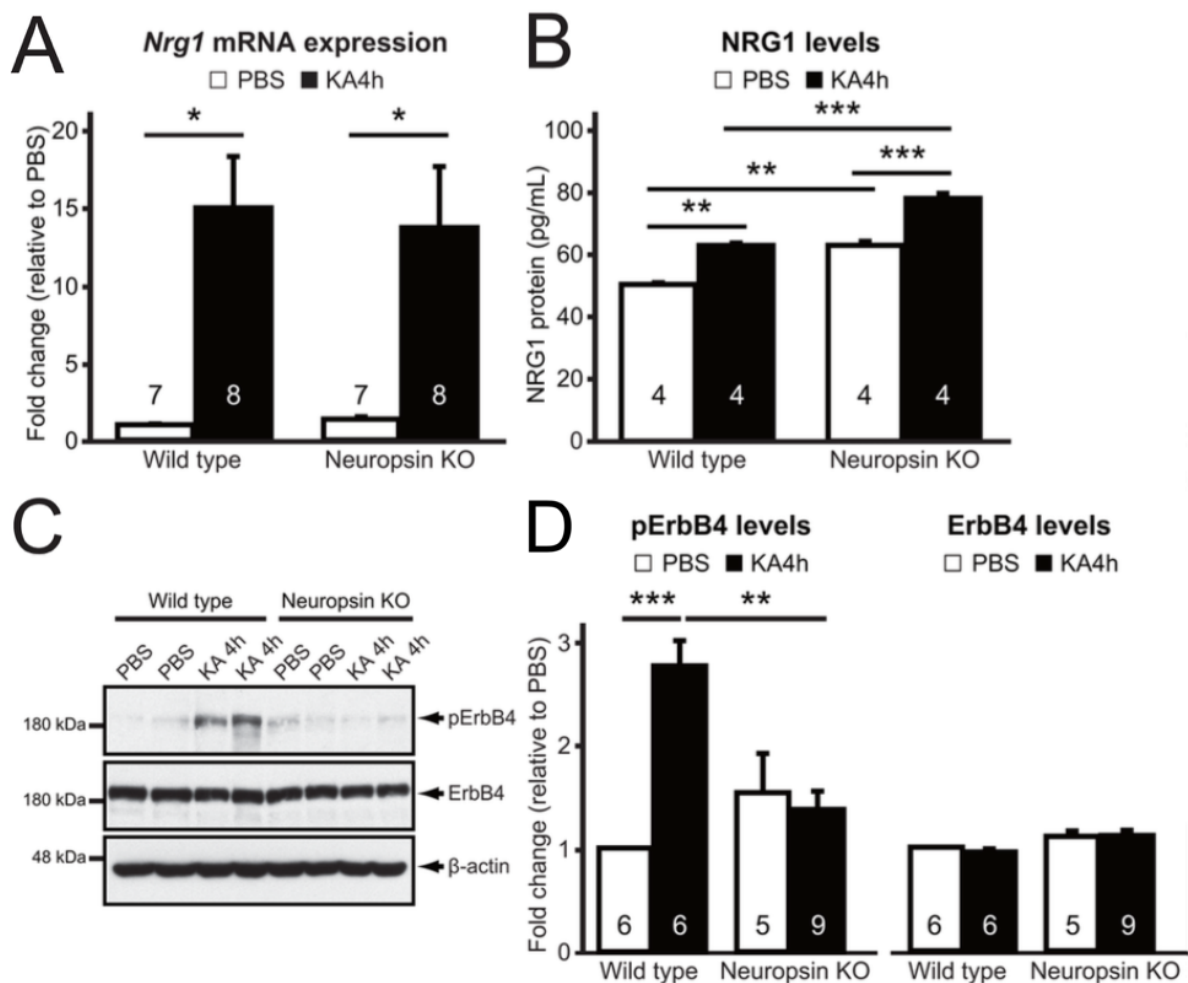


Figure 17. ニューロプシン KO マウスにおける神経活動依存的な *Nrg-1* mRNA 発現および ErbB4 自己リン酸化レベルの変動

(A) カイニン酸投与 4 時間後の野生型およびニューロプシン KO マウスの *Nrg-1* type I の発現をリアルタイム PCR によって測定した。野生型マウスに PBS を投与した群で規格化した。

(B) ELISA によって測定された NRG-1 蛋白質濃度。

(C, D) カイニン酸投与 4 時間後の野生型およびニューロプシン KO マウスの ErbB4 自己リン酸化レベルおよび ErbB4 蛋白質量をウェスタンブロットにより測定した。pErbB4/ErbB4 および ErbB4/β アクチン の割合を示す。野生型マウスの PBS 投与群に対する割合で規格化した。A, B, D のカラム内の数値は n 数を示す。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。エラーバーは SEM で示す。

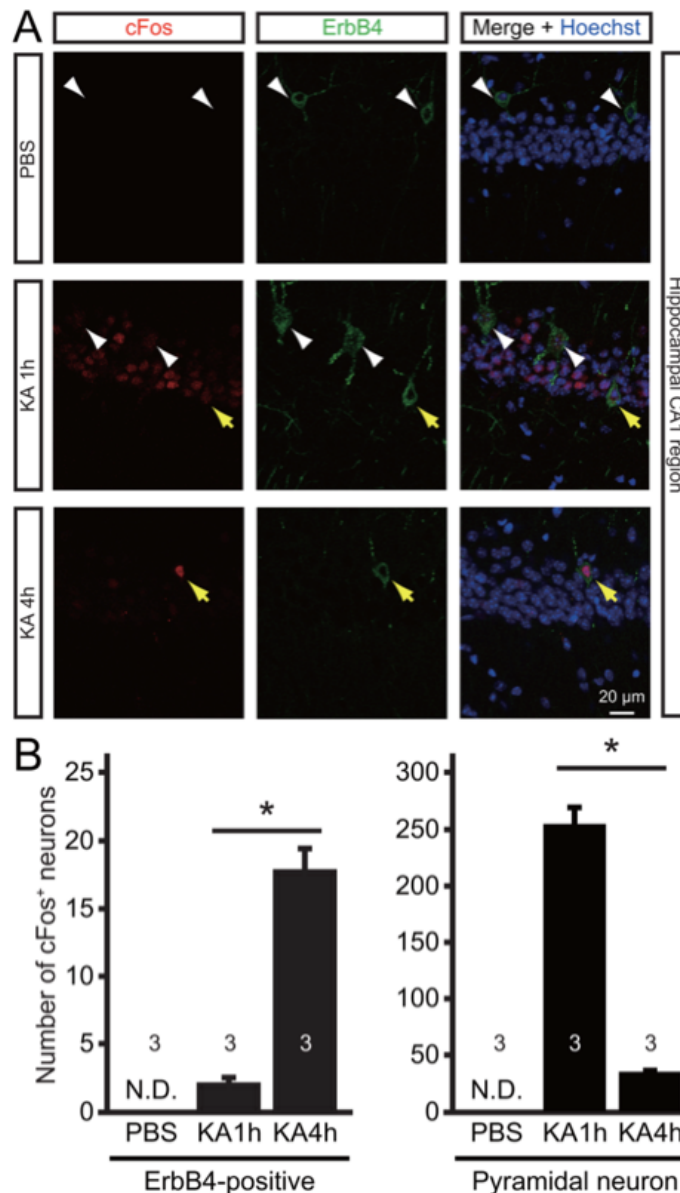


Figure 18. カイニン酸投与による ErbB4 陽性細胞における cFos の発現は興奮性細胞よりも数時間遅れて発現する

(A) cFos (red) と ErbB4 (green) に対する抗体で免疫組織化学染色を行った野生型マウスの冠状切片。上段に PBS、中段にカイニン酸投与 1 時間後、下段にカイニン酸投与 4 時間後の染色像を示す。白矢頭が、cFos を発現していない ErbB4 陽性細胞を示しており、黄色矢印が cFos を発現している ErbB4 陽性細胞を示している。

(B) cFos 陽性細胞数の定量解析。PBS あるいはカイニン酸を投与した際の海馬 CA1 領域における cFos 発現 ErbB4 陽性細胞数 (左)、cFos 発現錐体細胞数 (右) を定量した。カラム内の数値は n 数を示す。N.D. は not detected。* $P < 0.05$ 。エラーバーは SEM で示す。

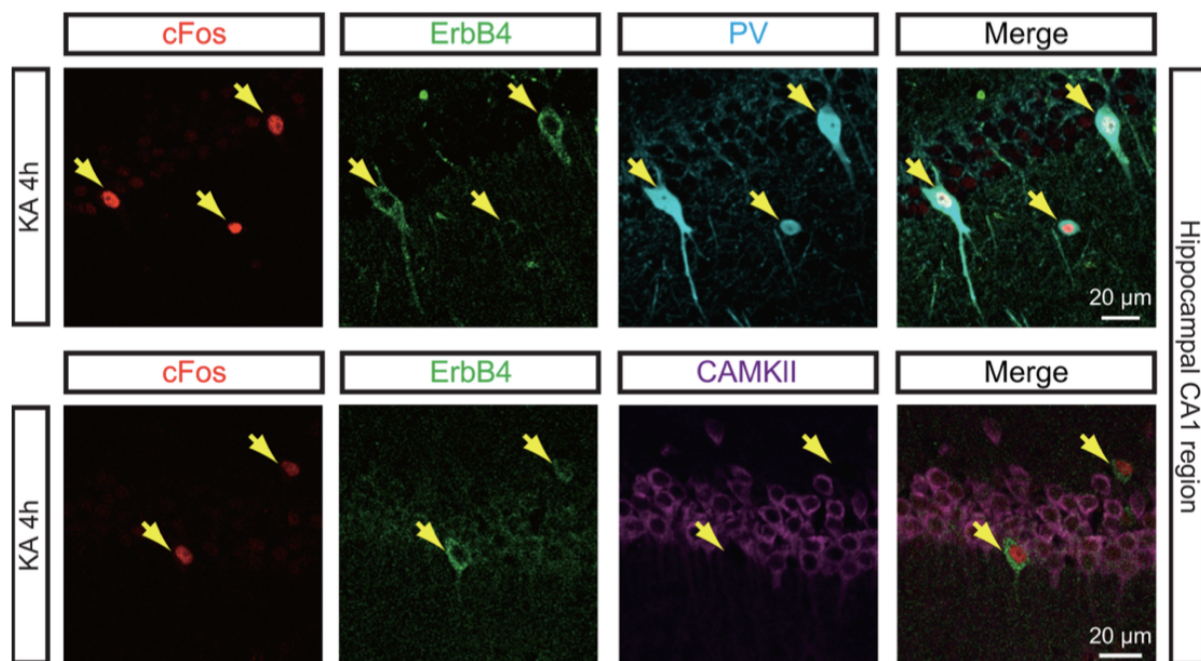


Figure 19. 遅延性の活性化を示す ErbB4 発現細胞は興奮性細胞ではなく PV 細胞である

カイニン酸投与 4 時間後の野生型マウスの海馬 CA1 領域における cFos (red) と ErbB4 (green)、PV (cyan)、CAMKII (magenta) に対する免疫組織化学染色像。cFos/ErbB4 陽性反応は PV 細胞に認められたが (黄色矢印)、CAMKII 発現細胞には検出されなかった。

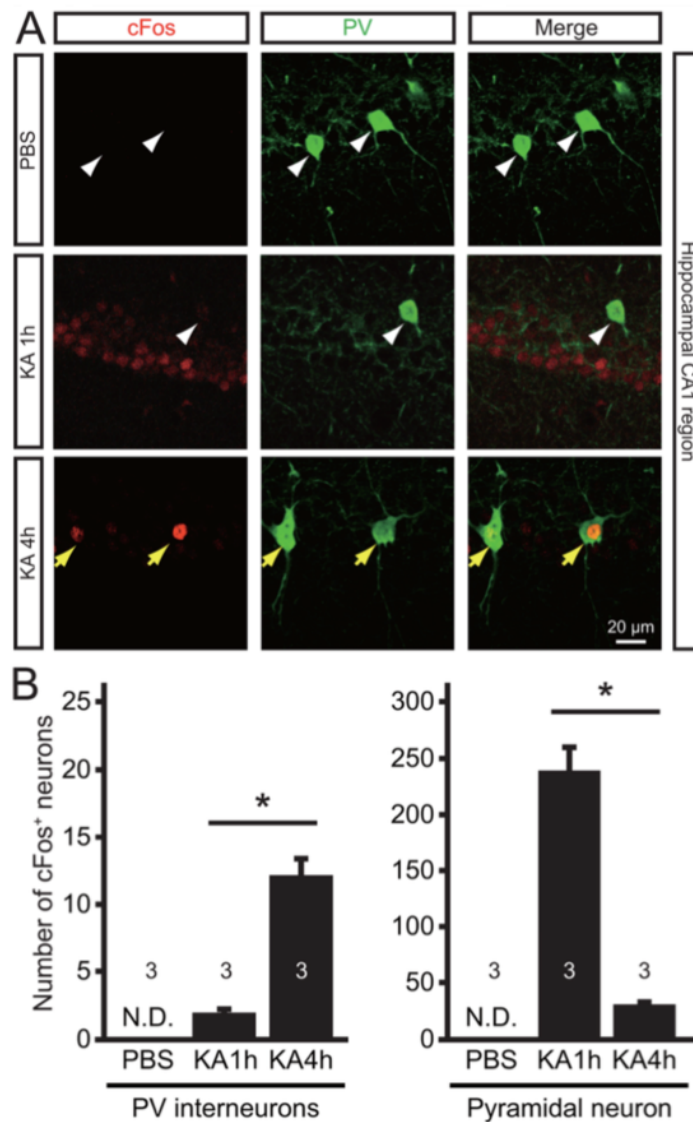


Figure 20. カイニン酸投与による PV 細胞の cFos の発現は興奮性細胞よりも数時間遅れて発現する

(A) cFos (red) と PV (green) に対する抗体で免疫組織化学染色を行った野生型マウスの冠状切片。上段に PBS、中段にカイニン酸投与 1 時間後、下段にカイニン酸投与 4 時間後の染色像を示す。白矢頭が、cFos を発現していない PV 細胞を示しており、黄色矢印が cFos を発現している PV 細胞を示している。

(B) cFos 陽性細胞数の定量解析。PBS あるいはカイニン酸を投与した際の海馬 CA1 領域における cFos 発現 PV 細胞数 (左)、cFos 発現錐体細胞数 (右) を定量した。カラム内の数値は n 数を示す。N.D. は not detected。* $P<0.05$ 。エラーバーは SEM で示す。

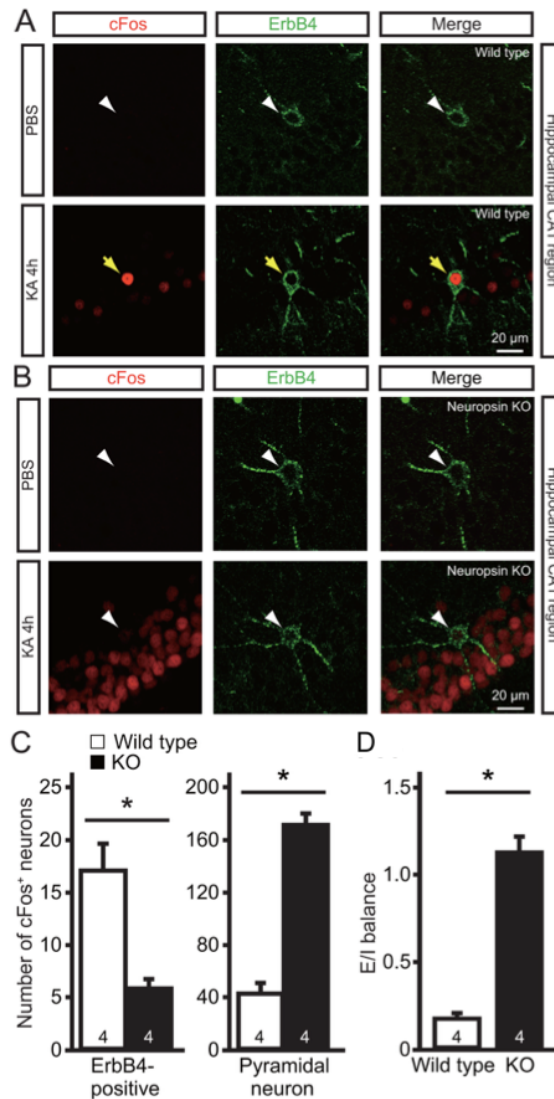


Figure 21. ニューロプシン KO マウスは ErbB4 発現細胞での cFos の発現が低く、興奮性細胞の活動が高い

(A, B) PBS (上) またはカイニン酸 (下) を投与した 4 時間後における野生型 (A) およびニューロプシン KO マウス (B) の ErbB4 (green) および cFos (red) の発現。白矢頭が、cFos を発現していない ErbB4 陽性細胞を示し、黄色矢印が cFos 発現 ErbB4 陽性細胞を示す。

(C) cFos 陽性細胞数の定量解析。カイニン酸投与 4 時間後の海馬 CA1 領域における cFos 発現 ErbB4 陽性細胞数 (左) と cFos 発現錐体細胞数 (右) を定量した。White bar が野生型マウス、black bar がニューロプシン KO マウスの結果を示す。

(D) cFos 陽性 ErbB4 発現細胞数に対する cFos 陽性錐体細胞数の割合から算出した E/I バランス。C, D のカラム内の数値は n 数を示す。* $P < 0.05$ 。エラーバーは SEM で示す。

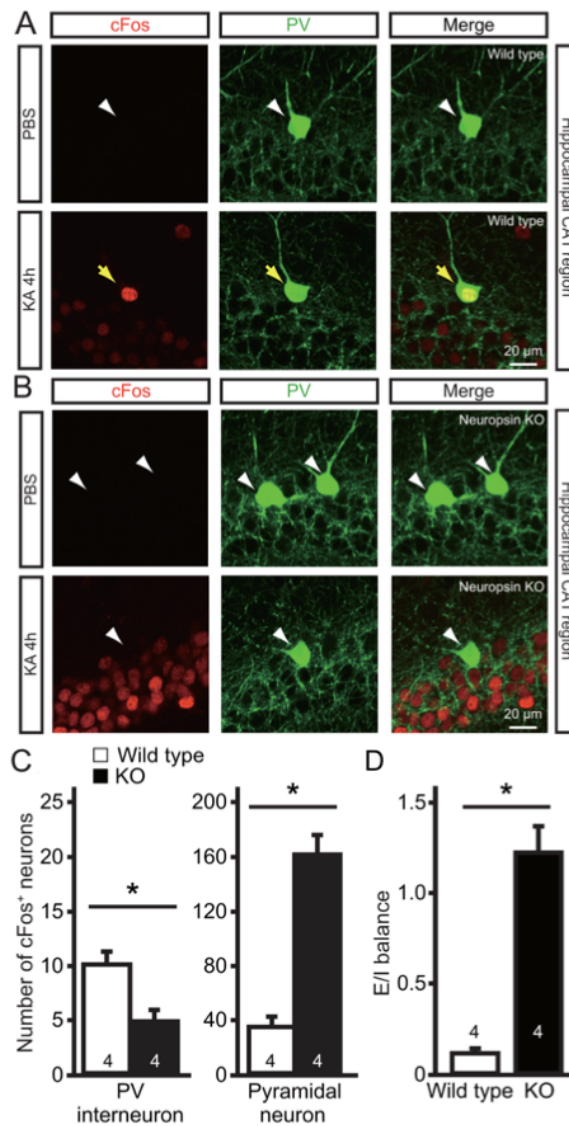


Figure 22. ニューロプシン KO マウスは PV 細胞での cFos の発現が低く、興奮性細胞の活動が高い

(A, B) PBS (上) またはカイニン酸 (下) を投与した 4 時間後における野生型 (A) およびニューロプシン KO マウス (B) の PV (green) および cFos (red) の発現。白矢頭が、cFos を発現していない PV 細胞を示し、黄色矢印が cFos 発現 PV 細胞を示す。

(C) cFos 陽性細胞数の定量解析。カイニン酸投与 4 時間後の海馬 CA1 領域における cFos 発現 PV 細胞数 (左) と cFos 発現錐体細胞数 (右) を定量した。White bar が野生型マウス、black bar がニューロプシン KO マウスの結果を示す。

(D) cFos 陽性 PV 細胞数に対する cFos 陽性錐体細胞数の割合から算出した E/I バランス。C, D のカラム内の数値は n 数を示す。* $P < 0.05$ 。エラーバーは SEM で示す。

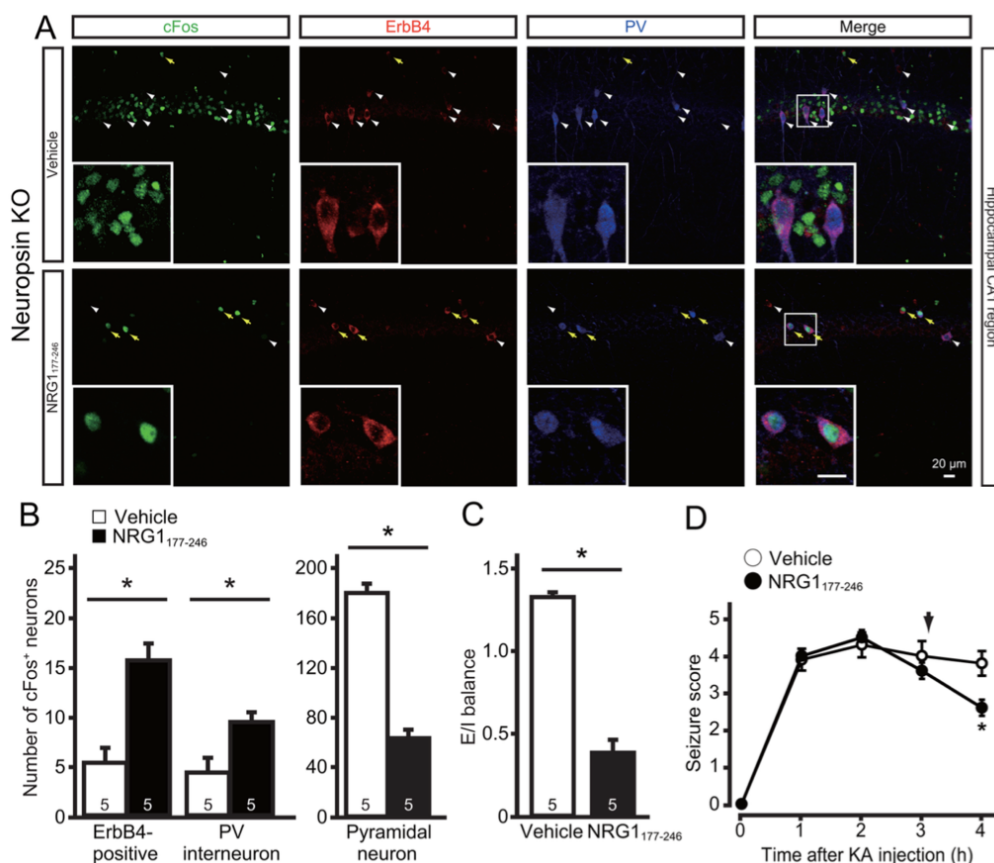


Figure 23. ニューロプシン KO マウスにおける E/I バランスおよびカイニン酸誘発てんかん発作に対する NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ 側脳室内投与の影響

(A) cFos (green), ErbB4 (red), PV (blue) に対する抗体で免疫組織化学染色を行ったニューロプシン KO マウスの冠状切片。画像はそれぞれ、カイニン酸投与 3 時間後に Vehicle (上段) あるいは NRG1 177-246 (下段) を投与し、4 時間後の海馬免疫染色像を示す。白矢頭が、cFos を発現していない ErbB4 陽性細胞を示しており、黄色矢印が cFos 発現 ErbB4 陽性細胞を示す。

(B) cFos 陽性細胞数の定量解析。カイニン酸投与 4 時間後の海馬 CA1 領域における cFos 発現 ErbB4 陽性細胞あるいは PV 細胞数 (左)、cFos 発現錐体細胞数 (右) を定量した。White bar が Vehicle 投与群、black bar が NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ 投与群の結果を示す。

(C) cFos 陽性 ErbB4 発現細胞数に対する cFos 陽性錐体細胞数との割合から算出した E/I バランス。

(D) Vehicle あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ を投与したニューロプシン KO マウスにおける seizure score のタイムコース。White circle (n=5) が Vehicle 投与群、black circle (n=5) が NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ 投与群の結果を示す。矢印は Vehicle あるいはカイニン酸を投与した時点を示している。B, C のカラム内の数値は n 数を示す。**P*<0.05。エラーバーは SEM で示す。

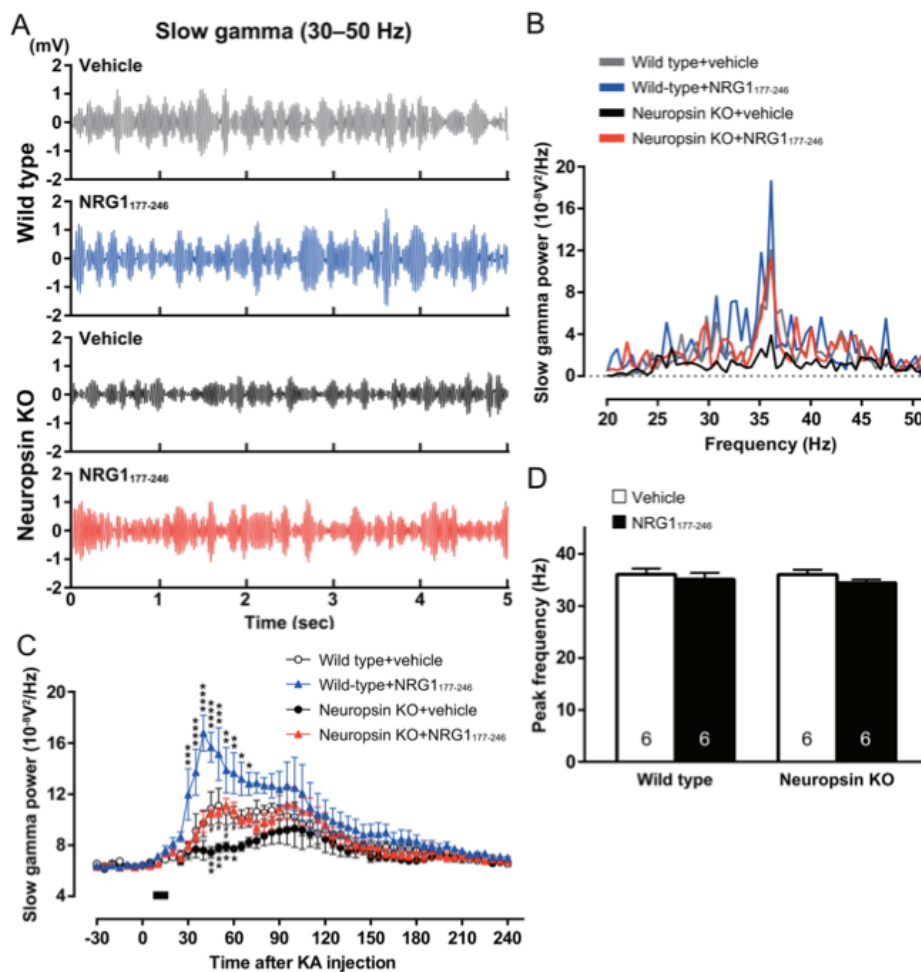


Figure 24. ニューロプシン KO マウスは slow ガンマ波が障害されている

(A, B) 野生型マウスの側脳室内に Vehicle (grey) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (blue) を投与した際のカイニン酸誘発 slow ガンマ波とニューロプシン KO マウスに Vehicle (black) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (red) を投与した際の slow ガンマ波 (30-50 Hz) (A) およびパワースペクトル (B)。

(C) 野生型の側脳室内に Vehicle (white circles; $n = 6$) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (blue triangles; $n = 6$) を投与した際のカイニン酸誘発 slow ガンマ波とニューロプシン KO マウスに Vehicle (black circles; $n = 6$) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (red triangles; $n = 6$) を投与した際の slow ガンマ波のパワー強度のタイムコースを示す。黒下線は Vehicle あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ を投与したタイムポイントを示している。

(D) Slow ガンマ波のピーク頻度を平均化したグラフ。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ 。エラーバーは SEM で表示。

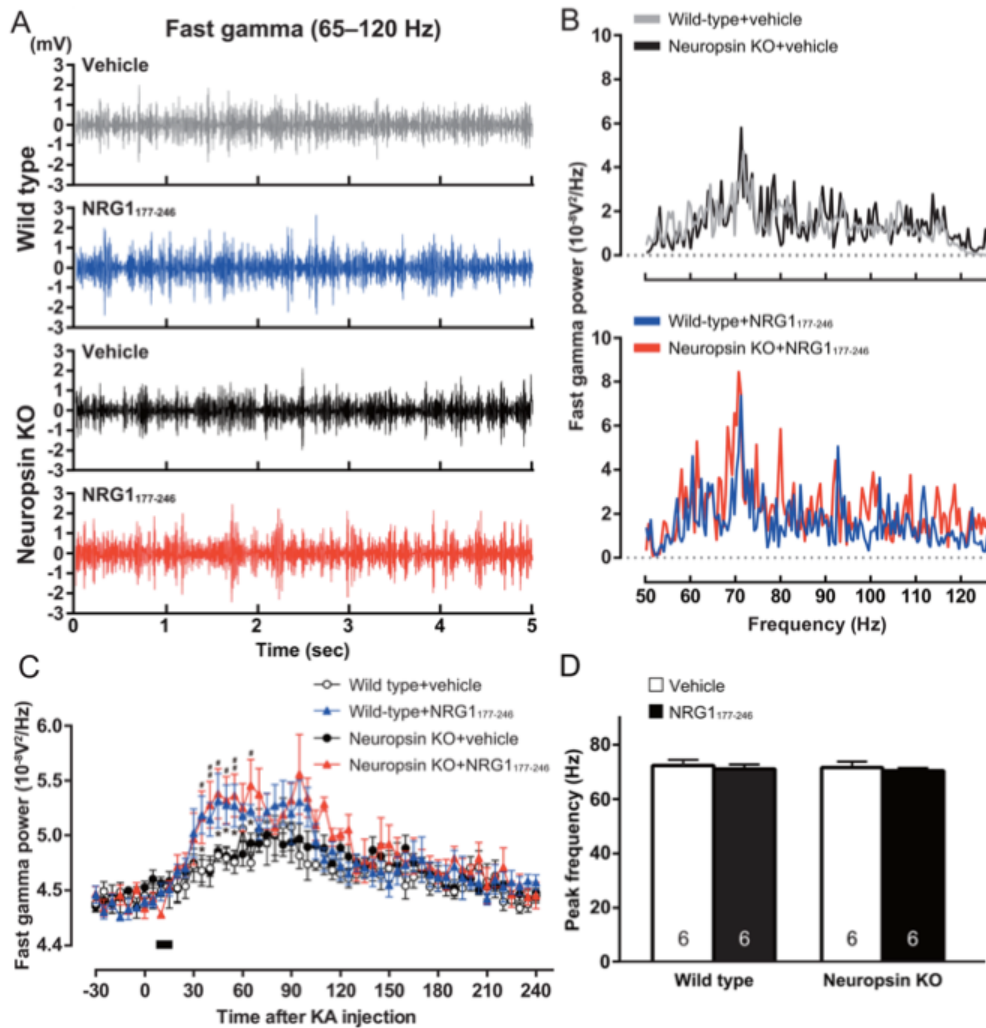


Figure 25. ニューロプシン KO マウスの fast ガンマ波は正常である

(A, B) 野生型マウスの側脳室内に Vehicle (grey) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (blue) を投与した際のカイニン酸誘発 fast ガンマ波とニューロプシン KO マウスに Vehicle (black) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (red) を投与した際の fast ガンマ波 (65-120 Hz) (A) およびパワースペクトル (B)。

(C) 野生型の側脳室内に Vehicle (white circles; $n = 6$) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (blue triangles; $n = 6$) を投与した際のカイニン酸誘発 fast ガンマ波とニューロプシン KO マウスに Vehicle (black circles; $n = 6$) あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ (red triangles; $n = 6$) を投与した際の fast ガンマ波のパワー強度のタイムコースを示す。黒下線は Vehicle あるいは NRG-1₁₇₇₋₂₄₆ を投与したタイムポイントを示している。

(D) Fast ガンマ波のピーク頻度を平均化したグラフ。

* $P < 0.05$. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ 。エラーバーは SEM で表示。

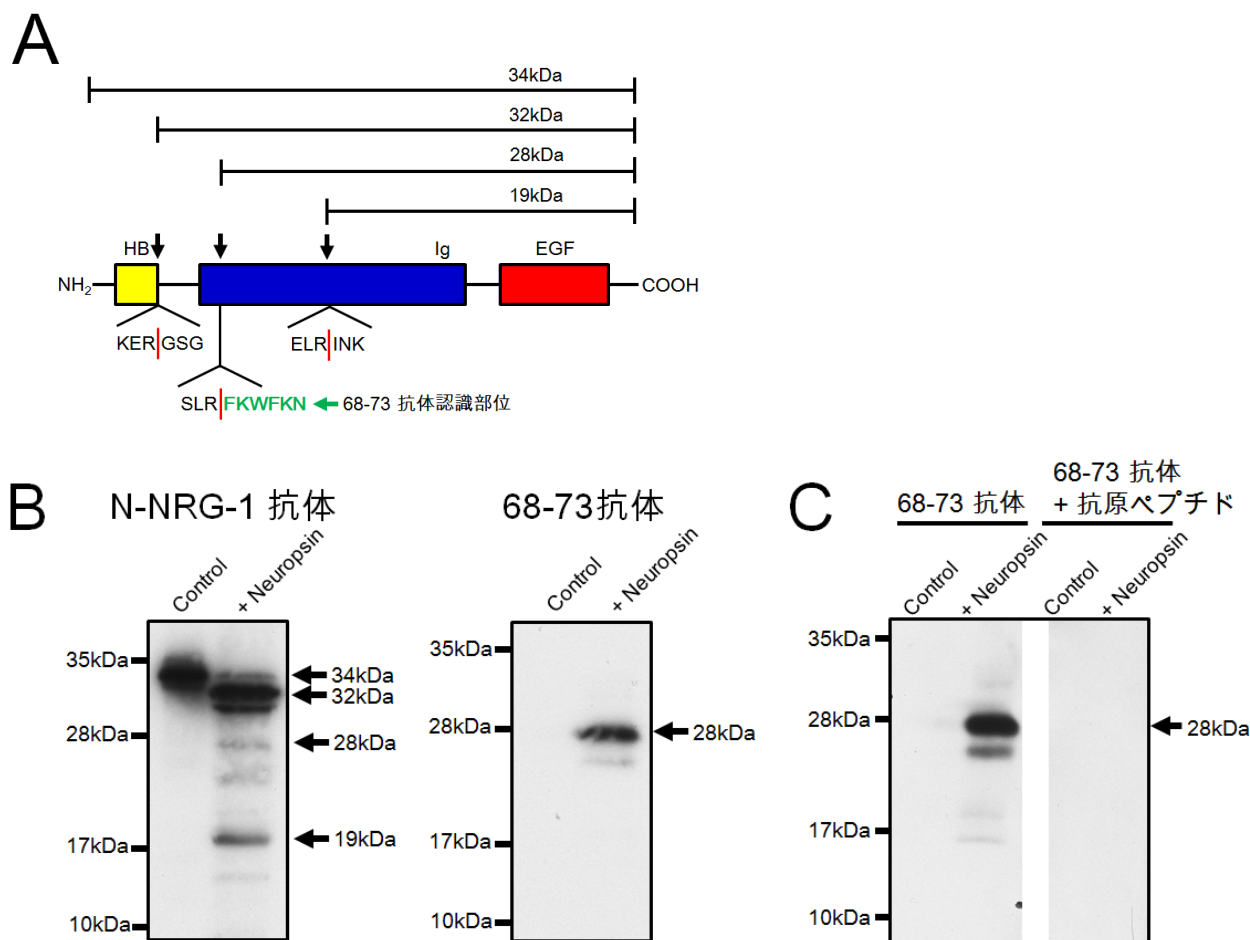


Figure 26. NRG-1 切断断片認識抗体の評価

(A) 68-73 抗体の認識配列とニューロプシンによる切断サイトの図。ニューロプシンによる切断サイトは、矢印および下に示す 6 残基アミノ酸配列の中で、赤バーで示す。

(B) 組換えヒト mNRG-1 を、組換えヒトニューロプシン非存在下 (control) または存在下 (+neuropilin) で 37 °C でインキュベーションした。その後、一次抗体に NRG-1 N-terminal extracellular domain 認識抗体(N-NRG-1 抗体)、68-73 抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。

(C) NRG-1 切断抗体と抗原ペプチドを反応させ、抗体の吸収実験を行った結果。陽性反応が消失したことから、NRG-1 切断抗体は NRG-1 を認識していることが確認された。

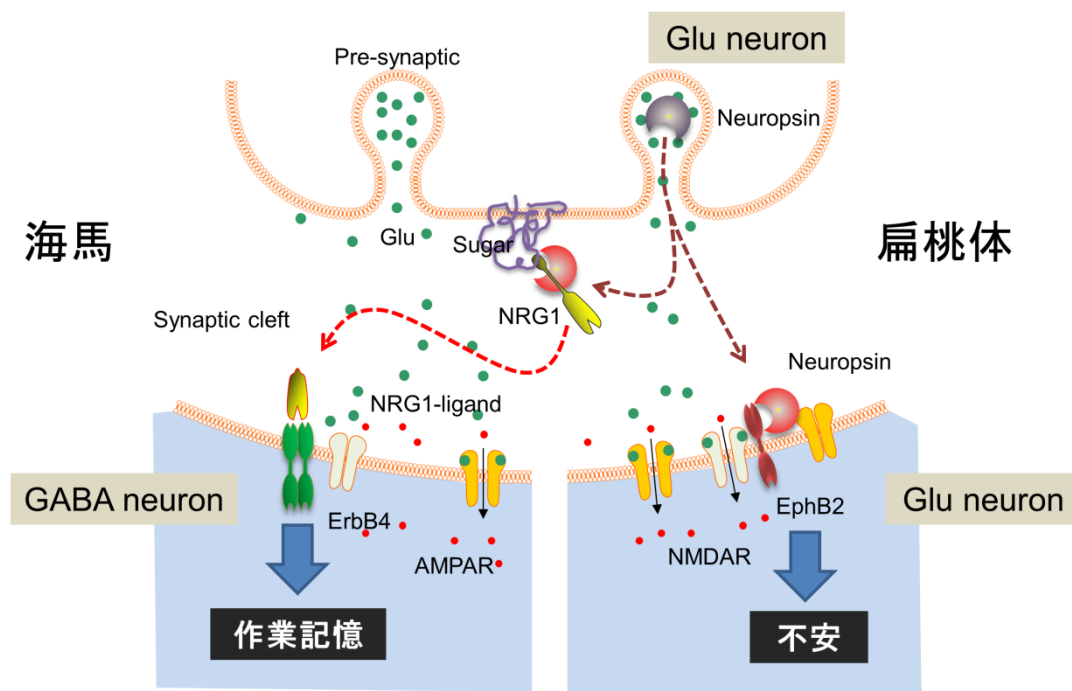


Figure 27. ニューロプシン-**NRG-1** シグナルを介した抑制性神経ネットワークの特異的制御機構

海馬において、ニューロプシン (右上, 灰色丸) は興奮性シナプスから分泌されたのち、細胞外で神経活動依存的に活性化する。活性化したニューロプシン (中央, 赤丸) は **NRG-1** (中央, 黄色棒) を切断し、ヘパラン硫酸プロテオグリカンからの **EGF** リガンドドメインの遊離および **ErbB4** 受容体の自己リン酸化 (左下, 緑棒) を誘導する。このようなニューロプシン-**NRG-1** シグナルは抑制性 **PV** 細胞の活動を制御し、ガンマ波の形成に関与し、作業記憶などの認知機能の実現に貢献していると考えられる。また、扁桃体において、ニューロプシンがエフィリン受容体の **EphB2** (右下, 赤棒) を切断し、不安の発現に関与することが報告されている (Attwood et al., 2011)。統合失調症患者では、作業記憶の障害、喜怒哀楽の表現が乏しくなる感情鈍麻などの症状が知られている。以上のことから、ニューロプシン-**NRG-1** シグナルは統合失調症に関与する新たなシグナル系であり、臨床的にも極めて重要なシステムである。