

論文の内容の要旨

申請者氏名 岡 卓也

A serine protease neuropsin expressed in the hippocampus of adult mouse brain has been implicated in synaptic plasticity. Although the expression of neuropsin mRNA achieved to the peak at neonatal stage, however, it remained to be cleared whether neuropsin participate in developmental function in central nervous system. To investigate this possibility, I examined the localization and function of neuropsin in primary hippocampal neuron. Alternatively, although crystal structure of neuropsin provides the clue to the biological activity of neuropsin, e.g. the activity of substrate hydrolysis and the secretory manner, there is no evaluation experimentally. To address this issue, I performed the mutational analyses of neuropsin.

First, it was revealed that endogenous neuropsin was localized extracellularly in neuronal cell bodies and their neurites in mouse hippocampal cultures. Furthermore, I found that, in cultured mouse hippocampal neurons, recombinant neuropsin enhanced neurite projection from soma after 14 hours of culture and neuronal aggregation with neurite fascicles at 48 hours. This suggests that neuropsin is involved in neurite outgrowth and fasciculation during the development of the nervous system.

Second, I described the examination of the several structural features of neuropsin with use of site directed mutagenesis on its activity and regulated secretion from the cell. Neuropsin is a member of the S1 (clan SA) family of serine proteases and forms characteristic surface loops surrounding the substrate-binding site (J Biol Chem 1999, 274:4220-4224). The loops include those stabilized by six disulfide bonds or a loop C (Gly⁶⁹ to Glu⁸⁰) and an *N*-glycosylated kallikrein loop (His⁹¹ to Ile¹⁰³) not containing a site linked by a disulfide bond. Little, however, is known about the roles of these loops. Thus, the present study investigated whether surface loop structures of neuropsin were essential for the generation of enzymatic activity and/or secretion of the enzyme via a regulated secretory pathway. Among the six disulfide bonds, only SS1 in loop E (Gly¹⁴² to Leu¹⁵⁵) and SS6 in loop G (Ser¹⁸⁵ to Gly¹⁹⁷) were necessary for the catalytic efficiency of neuropsin. Disruptions of loop C and the *N*-linked oligosaccharide chain on the kallikrein loop affected the catalytic efficiency and P2-specificity, respectively. Alternatively, disruptions of loop C and the kallikrein loop enhanced the regulated secretion, while, there was no one disruption which inhibited the secretion, indicating that there was no critical loop required for the regulated secretion among loops surrounding the substrate-binding site. The present results provide new information on the structure-function of family S1(clan SA) serine proteases.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 岡 卓也

近年、神経の可塑的变化において、シナプスの構造的変化がダイナミックに起こると考えられており、この微小環境の修飾にはプロテアーゼのような分解酵素が働いていると考えられている。中枢神経系において神経可塑性に関与するプロテアーゼがいくつか知られているが、それらのプロテアーゼの機能特性を明らかにする事は、神経可塑性の分子機構を解明する上で非常に重要であると考えられる。以上の観点から、本研究では、海馬に特異的に発現するセリンプロテアーゼ・ニューロプシンに注目し、ニューロプシン蛋白質の特性に関して二つの研究テーマを選定し、以下に示す成果をあげている。

- 1) ニューロプシン蛋白質の神経細胞における局在と、神経細胞の突起進展能に対する作用を、海馬の初代培養神経細胞を用いて検討した。その結果、神経細胞においてニューロプシン蛋白質が、分泌小胞を介して細胞外に分泌され、神経細胞の細胞膜上に局在する事を初めて示している。また、これまでは成体マウスにおける機能として長期増強反応やてんかん形成に関与する事が示されていたが、ニューロプシン蛋白質は神経細胞の突起進展を促進する効果を持つ事から、幼若期の回路形成期においても作用する事が示唆している。
- 2) ニューロプシンの構造が、基質特異性や調節性の分泌といったセリンプロテアーゼの機能特性にどう反影されているのか、部位特異的変異体を用いて検討している。その結果、カリクレインループ上の *N* 結合型糖鎖が、基質特異性に関与していることなど、酵素活性と構造の関係を実験的に検証している。また、ニューロプシン特有のループ構造であるカリクレインループがニューロプシンの調節性の分泌制御に関与している事を示している。これらの構造機能相関はニューロプシンの機能特性を理解する上で極めて重要な知見であると考えられる。

以上のように、本論文は神経可塑性関連プロテアーゼ・ニューロプシンの作用機構解明の一助になるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。