

論文内容の要旨

申請者氏名 清水 千草

プロテアーゼは神経系において神経突起の伸展、可塑性、神経障害等に重要な役割を果たしていると考えられている。そのなかでも、セリンプロテアーゼは生理活性物質のプロセッシングや細胞外マトリックス蛋白の分解、シナプスに存在する蛋白の分解に関与していると言われている。ニューロプシンはマウス海馬より単離・同定されたセリンプロテアーゼである。ニューロプシン遺伝子は海馬や扁桃体に強く発現しており、長期増強やキンドリング刺激時に神経活動依存的にその発現が調節されている。本研究では、バキュロウイルス発現系を用いたレコンビナントニューロプシン蛋白の作製及び精製を試みた。精製した蛋白は酵素活性を持たないプロ蛋白であったが、エンドプロテアーゼの限定分解により、活性型へと変換された。これは、プロニューロプシンの32番目のLysが切断されることにより、生じた結果であると考えられた。また、マウス脳内におけるニューロプシンを精製し、その酵素学的性質は活性型ニューロプシンと一致していた。合成ペプチド基質を用いた酵素活性測定から、脳及びレコンビナントニューロプシンはArg及びLysのC末端を分解し、特にBoc-Val-Pro-Arg-MCAを特異的に切断することがわかった。活性型のニューロプシンは細胞外マトリックス蛋白であるフィブロネクチンを分解した。これらの結果から、ニューロプシンが細胞外の環境を変化させることによって、海馬を含む辺縁系に影響を与えていると考えられた。

ヒトニューロプシン(KLK8)は、1998年に本研究室の吉田らにより、クローニングされ、マウスニューロプシンと72%のホモロジーを有している。ヒトニューロプシンが海馬で発現していることを確認した。また、アルツハイマー病海馬におけるニューロプシン遺伝子発現変化をRT-PCR法を用いた調べた。その結果、正常の海馬を比較して、アルツハイマー病海馬ではニューロプシン遺伝子の発現が、11.5倍と著しく増加していた。ニューロプシンがカリクレインファミリーに属していることから、他のカリクレイン遺伝子発現についても同様に検討を行った。その結果、KLK6mRNAがアルツハイマー病海馬で減少していた。他のカリクレイン遺伝子(KLK4,5,7,10,14)の発現は変化していなかった。よって、ニューロプシン(KLK8)は、脳内において、重要な機能を有していると考えられた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 清水 千草

記憶が長期にわたって保たれるためには、既にできあがっているシナプスが、何らかの長期的な変化が起こっていると考えられている。近年、このような神経可塑性には、シナプス結合における形態変化を伴うことが示されてきている。そのためには、シナプスにおける細胞接着をダイナミクスに変化させることが重要である。そのメカニズムとして、シナプスにおける細胞間相互作用を構築している細胞外マトリックス蛋白や接着因子をプロテアーゼが分解することが重要であると考えられ、この機構を担うプロテアーゼの解析が期待される。

本研究により、ニューロプシン蛋白質がトリプシン型のセリンプロテアーゼであること及び酵素活性を持たないプロ蛋白質として細胞外に分泌され、プロセシングを受けた後、活性型のニューロプシンに変換する機構が存在することが明らかとなった。また、ニューロプシンが細胞外マトリックス蛋白であるフィブロネクチンを分解することから、ニューロプシンはその酵素活性により、シナプス近傍の細胞外の環境を変化させることによって、神経可塑性に関与していると考えられる。さらに記憶・学習能力の著しい低下を主な症状とするアルツハイマー病の海馬において、ニューロプシン遺伝子の発現が上昇していることを示し、ニューロプシンがヒト神経変性疾患に影響を与えている可能性を示唆した最初の報告であり、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、神経可塑性に伴うシナプス形態変化の分子機構解明の一助となるもので、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。