

増殖因子ニューレグリン1の切断を可視化する蛍光
バイオセンサーの開発とその応用

亀崎 青沙

目次

要旨	2
序論	3
材料および方法	7
結果	12
考察	27
引用文献	31
謝辞	35

要旨

Neuregulin 1 (NRG1)は、神経系および心臓の発生など多様な現象に関わる ErbB 受容体の主要なリガンドの一つである。そのアイソフォームのほとんどは膜貫通型のタンパク質であり、ADAM ファミリーや BACE などの種々の切断酵素によって細胞外ドメインで切断を受けてその細胞外ドメインを放出することが知られる。エクストドメインシェディングと呼ばれるこの翻訳後修飾は、NRG1 の機能において重要であると考えられてきた。しかしながら、その切断制御機構に関しては、*in vitro* では切断を担う酵素や切断を誘導する刺激などが多数明らかにされてきている一方で、*in vivo* ではごく一部しかわかっていない。また、従来の NRG1 の切断制御機構研究は、主に生化学的手法によりおこなわれてきたため、その細胞内分布の解析や生きた細胞・個体での解析は困難であった。本研究では、NRG1 の切断を *in vivo* および生きた細胞で詳細に解析することを目指して、NRG1 の切断を可視化する蛍光バイオセンサー (N-CISSOR)を開発した。

N-CISSOR は、NRG1 の細胞外ドメインを mCherry で標識し、細胞内ドメインを GFP で標識することで、mCherry/GFP 蛍光強度比の低下によってその切断を評価できるように作製された。まず、HEK293T 細胞に N-CISSOR を発現させ、N-CISSOR が NRG1 の細胞内局在、切断動態および生理活性を模倣することを確認した。さらに、N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞のタイムラプスイメージングをおこない、PMA 刺激による mCherry/GFP 蛍光強度比 (mCherry/GFP 比)の低下が NRG1 の切断依存的に起こることを明らかにした。また、mCherry/GFP の Ratio imaging によって、NRG1 の切断を可視化し、切断の細胞内分布をモニターすることに成功した。さらに、N-CISSOR をゼブラフィッシュ胚に導入することで、発生過程の運動神経において、NRG1 は細胞体よりも軸索で優先的に切断されることを示した。このことは、NRG1 の切断が *in vivo* において細胞内で局在性をもって制御されていることを示す重要な知見である。以上より、本研究によって、NRG1 のエクストドメインシェディングの時空間的な制御機構を解析する上で有力なツールとなり得る蛍光バイオセンサーを開発することに成功した。

序論

多くの膜タンパク質は、タンパク質分解酵素 (切断酵素)による切断を受けることでその細胞外ドメインを放出する。この翻訳後修飾は、“エクトドメインシェディング”と呼ばれ、細胞同士の接着の解除や細胞間シグナル伝達といった様々な生物学的プロセスにおける適切な細胞間相互作用に重要である (図 1a, b)。しかしながら、膜タンパク質の切断が動物個体内において時空間的に制御を受けているのか、また、細胞間シグナルや接着をどのように制御しているのかに関しては未だによくわかっていない。

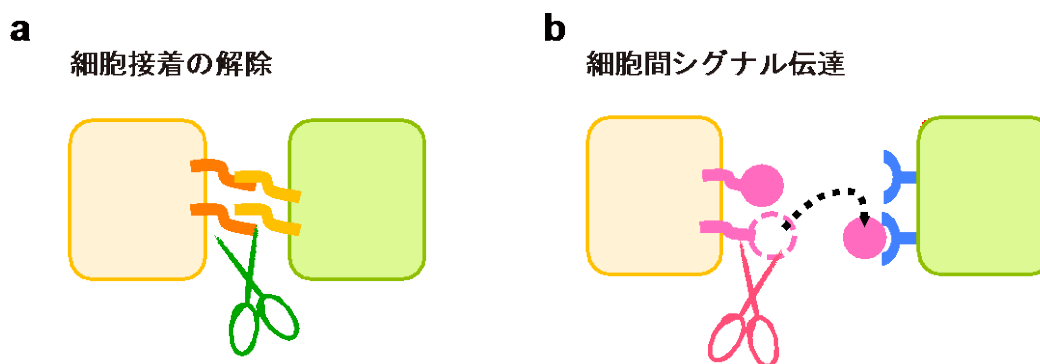


図 1 膜タンパク質のエクトドメインシェディング

a) 接着因子の切断による細胞間の接着解除 b) 膜型リガンドの切断による傍分泌を介したシグナル伝達

Neuregulin 1 (NRG1)は、ErbB 受容体の主なりガンドの一つであるが、発生や再生、シナプスの可塑性および疾患において多様な役割を果たす (1-3)。多くの場合、NRG1-ErbB シグナルは傍分泌もしくは接触分泌の様式で様々な細胞間相互作用を媒介する。例えば、神経系においては、NRG1 は主に神経細胞によって産生される一方で、ErbB 受容体はシュワン細胞前駆体や骨格筋細胞などのシグナルを受容する細胞に発現する。神経-シュワン細胞前駆体間の NRG1-ErbB シグナルはシュワン細胞前駆体の生存において重要であり、神経-骨格筋細胞間の NRG1-ErbB シグナルは骨格筋細胞におけるアセチルコリンレセプターの発現を上昇させることで神経筋接合部の維持を担うとされる。加えて、心臓発生においては、心内皮細胞における NRG1 の発現は、ErbB2/ErbB4 を発現する心筋細胞の増殖誘導を介した肉柱形成に必要であることが知られる (2, 図 2)。

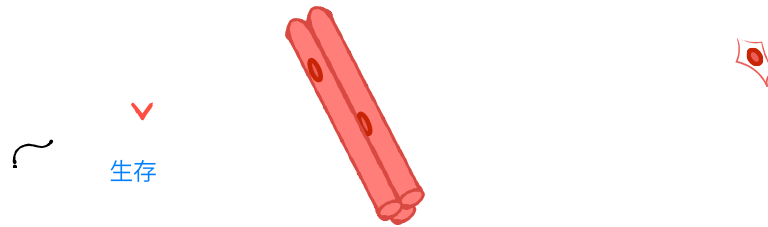


図2 発生過程における NRG1 による細胞間相互作用

a) 神経細胞に発現する NRG1 によるシュワン細胞前駆体のアポトーシス抑制作用および骨格筋細胞へのアセチルコリンレセプター (AChR) の発現制御 b) 心内皮細胞に発現する NRG1 による心筋細胞の増殖誘導を介した肉柱形成

NRG1 遺伝子は多数のスプライシングアイソフォームをコードし、そのほとんどが膜貫通タンパク質として合成され、種々の切断酵素による処理を受けて EGF 様ドメインを含む細胞外ドメインを放出するとされる。NRG1 のエクトドメインシユエディングは NRG1 の機能制御に重要であると考えられており、実際に、統合失調症などの患者の海馬では NRG1 の切断パターンが健常者と異なるパターンを示しているという報告もある (4)。 β -secretase (BACE) 1 による NRG1 の切断は特によく評価されており、シュワン細胞の適切なミエリン鞘形成や筋紡錘の形成および維持に必要であることが報告されていることから (5-8)、NRG1 の切断はその *in vivo* での機能において重要な役割を果たしていることが考えられる。NRG1 の切断には、BACE1 の他に、A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 10、ADAM17 および ADAM19 といった ADAM ファミリーの関与が培養細胞を用いた実験で報告されているものの、*in vivo* における NRG1 の切断との関与はほとんど明らかにされていない。しかしながら、BACE1 欠損マウスの表現型は NRG1 欠損マウスの多様な表現型と部分的にしか一致しないことから、NRG1 の切断には ADAM ファミリーを含む他の切断酵素も関与し得ると考えられる。以上より、*in vivo* における NRG1 の切断酵素や切断制御機構に関してはほとんどわかっていないのが現状である。

NRG1 の切断を誘導する刺激に関しては、培養細胞においてはよく調べられている。たとえば、Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) は、Protein kinase C (PKC) の潜在的活性剤であるが、NRG1 の切断を強力に誘導する (9-10)。また、カルシウムイオンの流入

や神経の活動は NRG1 の切断を誘導することが知られており (11, 12)、NRG1-ErbB シグナルの下流エフェクターである p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) もまた NRG1 の切断を活性化するとされる (13, 14)。さらに、神経細胞において、Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) などの神経栄養因子は PKC δ 依存的に NRG1 の切断を引き起こすが (15)、特に注目すべきこととして、シュワン細胞由来の BDNF は *in vitro* と *in vivo* においてともに軸索における可溶性 NRG1 の放出を誘導することが報告されている (16, 17)。これらのことから、神経細胞に発現する膜型 NRG1 が可溶性 NRG1 として軸索より放出されるまでの経路として、切断を受けて可溶性 NRG1 になった後に軸索に運ばれて放出される可能性 (図 3a) と、軸索の細胞膜上で切断を受けてその場で放出される可能性 (図 3b) が考えられる。従って、可溶性 NRG1 が軸索特異的に放出されるに至るまでの多様なプロセスを解明するには、NRG1 が神経細胞においていつどこで切断を受けるかを知る必要がある。

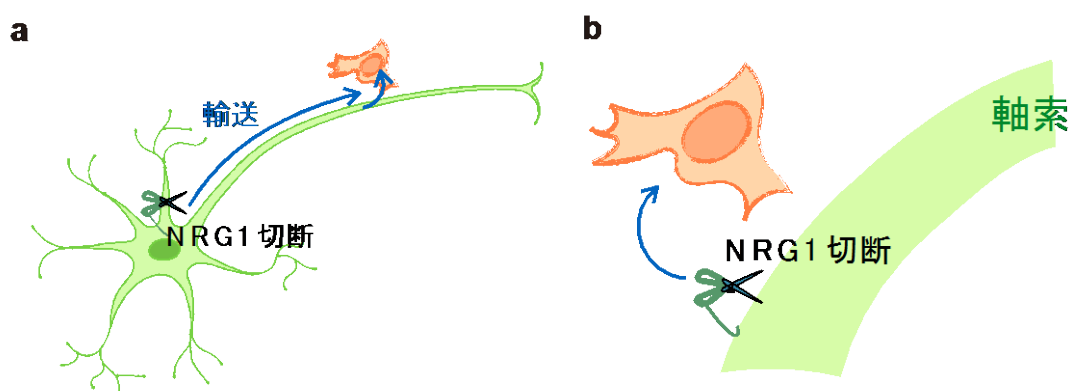


図 3 神経細胞における NRG1 の切断と放出に関する仮説

a) NRG1 が細胞体などで切断を受けた後、軸索まで輸送されて放出されるパターン b) NRG1 が軸索で切断を受け、そのまま放出されるパターン

また、NRG1 を切断することで知られる ADAM10、ADAM17、ADAM19 および BACE1 は、培養細胞中で各々多様な細胞内局在を示す。すなわち、ADAM10 は細胞膜上に発現し、ADAM17 は、活性化されると細胞膜上に移行する一方で、ADAM19 はゴルジ体に局在して NRG1 を切断することが知られる (18, 19)。また、BACE1 は、エンドサイトーシス過程やライソゾームにおいて代表的な基質である APP に作用することも近年わかった (20)。よって、*in vivo* で NRG1 を切断する切断酵素を同定する上でも、NRG1 の切断の時期や場所を知ることは重要である。しかしながら、従来のウェスタンブロットのような生化学的手法では、*in vivo* や生きた細胞において膜タンパク質の切断やその

細胞内分布を評価することは困難であった。

そこで、本研究では、NRG1 の切断を可視化する蛍光プローブ (NRG1 Cleavage-Indicating SenSOR, N-CISSOR)を開発し、*in vitro* と *in vivo* において、NRG1 の切断の定量化および可視化を試みた。

材料および方法

化合物

PMA, GM6001 および BACE inhibitor IV は Calbiochem (La Jolla, CA)より購入し、Bafilomycin A1 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。

細胞培養

HEK293T 細胞および C2C12 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)より購入し、37°Cおよび 5%CO₂ 環境下において 10%ウシ胎児血清および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S)を添加した DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)で維持した。C2C12 細胞の分化誘導時は、2%ウマ血清を添加した DMEM で 3 日間培養した。

動物飼育

ゼブラフィッシュは明暗周期 (明期 14 時間、暗期 10 時間)のある環境下において水温 28°Cで維持し、飼育方法は The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio). 4th ed. (21) に従った。

抗体作製

ゼブラフィッシュ type I NRG1 の N 末端のアミノ酸配列に相当する KESVRSNKPDNSPQAEPKLC の合成ペプチドを用いてウサギポリクローナル抗体 (683)を作製した。また、ゼブラフィッシュ NRG1 の C 末端に存在するアミノ酸配列 CLEGSRTNPALHLSPQHE の合成ペプチドを用いてウサギポリクローナル抗体 (686)を作製した。

プラスミド作製

ゼブラフィッシュの成魚の脳より抽出した RNA を用いた RT-PCR により膜型 type I NRG1 の β 1 タイプ (*zNRG1I* [GenBank accession number LC126300](#))をクローニングした。プライマーは、以下のものを使用した。

forward: 5'-CTGCATCATGGCTGAGGTGAAAGC-3'

reverse: 5'-GCATTTTCACACAGCTATAGGATC-3'

mCherry の cDNA を *zNRG1Ib1* の ORF の 89 番目と 90 番目の間に挿入し、EGFP (GFP) を 3'末端に加えた (図 4a)。このコンストラクトを、Tol2 配列をもつ pT2AUASMCS ベ

クター (22)の 5×UAS 配列の下流に挿入した (pT2AUASMCS-N-CISSOR)。NRG1 の切断領域を含むアミノ酸配列 (MASFYKHLGIEFME)をコードする塩基配列を除去した N-CISSOR (以下、N-CISSOR MUT)および活性領域のアミノ酸配列 (EGF-liked domain, PCNESEKEYCVNHGKCFITLEVTPGNIRR)をコードする塩基配列を除去した N-CISSOR (以下、N-CISSOR ΔEGF-I)は、各々以下のプライマーを用いて pT2AUASMCS-N-CISSOR をテンプレートとした inverse PCR により作製した。

N-CISSOR MUT

forward: 5'-GCTGAGGAGCTCTATCAGAAACGCG-3'

reverse: 5'-TAACGTAGTGTTGGCAGCGATCACC-3'

N-CISSOR ΔEGF-I

forward: 5'-CTTTGCAGGTGCCCAATGAGTTTAC-3'

reverse: 5'-GGGCGTCACGTCACCTGGATGTCTTGG-3'

哺乳類培養細胞において Gal4-UAS システム (23)を用いてこれらのコンストラクトを発現させる際は、ef1 ロモーターの下流に Gal4-VP16 の cDNA を挿入した pEF-BOS-Gal4-VP16 をともにトランスフェクションした。

ef1 ロモーターの下流に非標識の zNRG1 cDNA を挿入したプラスミド pEF-BOS-zNRG1Iβ1 を作製した。また、ヒト RAB7A cDNA を pCXN2-mGFP ベクター (24) にサブクローニングして pCXN2-mCFP-Rab7 を作製した。

N-CISSOR 発現細胞の観察

5.0×10⁵ 個の HEK293T 細胞を PLL でコートした 35 mm ガラスベースディッシュに播き、pT2AUAS-N-CISSOR、pT2UAS-N-CISSOR MUT ないし pT2UAS-N-CISSOR ΔEGF-I を pEF-BOS-Gal4-VP16 とともに PEI-MAX (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA)を用いてトランスフェクションした。一晚培養した後、4%PFA で室温で 5 分間固定し、DAPI で染色した。また、pEF-BOS-HA-mNRG1 (25)もしくは pEF-BOS-zNRG1Iβ1 を同様にトランスフェクションし、抗 HA 抗体 (1:500; clone ab49969, Abcam, Cambridge, MA, USA) もしくは抗 zNRG1I 抗体 (1:500; 683)を用いて免疫染色した後、DAPI で核染色をした。これらの細胞を、好感度検出器 Leica HyD を搭載した Leica TCS SP8 共焦点顕微鏡のフォトンカウンティングモードで 63x/NA 1.40 対物レンズを用いて観察した。

各種 N-CISSOR 発現細胞の *in vitro* タイムラプス解析

5.0×10⁵ 個の HEK293T 細胞を PLL でコートした 35 mm ガラスベースディッシュに播き、pT2UAS-N-CISSOR もしくは pT2UAS-N-CISSOR MUT を pEF-BOS-Gal4-VP16 と

もに PEI-MAX を用いてトランスフェクションした。一晚培養した後、少なくとも撮影 1 時間前には 1%ペニシリン/ストレプトマイシン、0.1%の BSA および 1×GlutaMAX™-1 を添加した無血清の Fluorobrite DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) に交換した。必要に応じて、PMA による刺激 30 分前に 50 μ M の GM6001 で前処理した。刺激には 1 μ M PMA を用いた。タイムラプス解析は、60x/1.40 オイル対物レンズを搭載した Olympus IX81 倒立顕微鏡で毎分ごとにおこなった (26)。取得した画像は MetaMorph ソフトウェア (Universal Imaging, West Chester, PA)を用いて以下のように処理した。バックグラウンドを差し引いた後に、mCherry/GFP の蛍光強度比 (以下、mCherry/GFP 比)を赤から青の 8 色 (Ratio color)で表し、GFP の蛍光強度をもとに 32 色のカラーグレードで示す intensity-modulated display mode で表示した。これを本研究における Ratio image とする。定量解析には、mCherry と GFP の蛍光強度を細胞全体の領域で平均化したものを Excel (Microsoft Corporation, Redmont, WA)に書き出し、mCherry/GFP 比を計算した。算出した mCherry/GFP 比は刺激前 10 分間の平均値で標準化した。

N-CISSOR の切断と生理活性のウェスタンブロット解析

1.0×10⁶個の HEK293T 細胞を PLL コートした 60 mm ディッシュに播いて PEI-MAX でトランスフェクションした後、刺激 1 時間前に Opti-MEM に培地交換した。必要に応じて、PMA による刺激 30 分前に 50 μ M の GM6001 で前処理した。刺激には、1 μ M PMA/1 ml Opti-MEM を用いた。刺激後の各種 N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞の培養上清 (1 ml) を限外濾過により 45 μ l 程度まで濃縮した。また、細胞は冷 PBS によって 1~3 回洗浄し、RIPA バッファー (10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate)により溶解した。タンパク質濃度を Pierce™ Protein Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA)により測定した。得られたサンプルを 10%2-ME を添加した 2×SDS バッファーで希釈し 95°C で 5 分間処理した。等量のサンプル (15-20 μ g/lane)もしくは細胞上清 (15-20 μ l/lane)を 10%ポリアクリルアミドゲルもしくは 4-20%プレキャストポリアクリルアミドゲル (Bio Rad, München, Germany)を用いて SDS 電気泳動をおこなった後、PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後の PVDF 膜を 1%ないし 5%スキムミルクでブロッキングした後、ブロッキング溶液に溶解させた一次抗体で 4°C で一晚処理した。一次抗体は、抗 mCherry 抗体 (1:2000; clone AB3080, Millipore, Germany)、抗 GFP 抗体 (1:2000; clone AB3080, Millipore, Germany)もしくは抗 β -actin 抗体 (1:4000; clone AC-74, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)を用いた。zNRG1 β 1 の切断評価は zNRG1 β 1 の N 末端および C 末端に対し

て作製した抗体 (683 および 686) を 1:2000 の希釈倍率で用いた。HRP 標識した抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc., CA, USA) もしくは抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc., CA, USA) を 1:2000 の倍率で希釈した二次抗体を室温で 1 時間処理した後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いてバンドを検出した。

切断効率を調べる際は、N-CISSOR ないし zNRG1 β 1 を発現させた HEK293T 細胞を PMA 刺激 15 分前、0 分後、15 分後、30 分後で細胞を回収し、抗 zNRG1 抗体 (1:1000; 686) および抗 β -actin 抗体を用いてウェスタンブロットをおこなった。N-CISSOR および zNRG1 β 1 の全長のバンドの検出強度を MetaMorph で測定し、 β -actin のバンドの検出強度で標準化した。さらにその標準化した検出強度を刺激 15 分前の検出強度で標準化した。

N-CISSOR の生理活性のウェスタンブロット解析

60 mm ディッシュに C2C12 細胞を 1.0×10^6 個播いた後 2 日間培養し、2% ウマ血清添加 DMEM で 3 日間培養して分化させた。N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞を血清無添加 DMEM で 24 時間培養し、その培養上清で分化 C2C12 細胞を 30 分間処理した後、C2C12 細胞を上述した方法で溶解した。また、10 nM のヒトリコンビナント NRG (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) をポジティブコントロールとして、その溶媒である 0.1% BSA/PBS をネガティブコントロールとして分化 C2C12 細胞に処理した。各試料を用いてウェスタンブロットをおこなった。抗体は、抗リン酸化 ErbB3 抗体 (clone 21D3, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) ないし抗リン酸化 Akt 抗体 (clone C31E5E, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) を 1:1000 の希釈倍率で用いた。

N-CISSOR 発現ゼブラフィッシュの作製と観察

最終濃度およそ 10 ng/ μ l の pT2AUAS-N-CISSOR ないし pT2AUAS-N-CISSOR MUT ベクターを各々 Tol2 トランスポザーゼの mRNA (最終濃度 100 ng/ μ l) とともに Phenol red solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解させ、ゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションした。その胚が育った成魚を Tg (HuC:Gal4-VP16) (27) ないし Tg (SAIGFF213A) (28) と交配し、得られた F1 の胚を色素形成を抑制するために 0.2 mM の PTU (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 存在下で飼育した。受精後 36 時間の胚を 4% PFA で 4°C で一晩固定し、PBS、30% グリセロール/PBS、50% グリセロール/PBS に順に浸漬して透明化した後、Leica M205C 蛍光実体顕微鏡で観察した。高解像度のイメージ取得および Ratio imaging の際は、好感度検出器 Leica HyD を搭載した Leica TCS

SP8 共焦点顕微鏡のフォトンカウンティングモードで 63x/NA 1.40 対物レンズを用いて画像を取得した。取得した画像の z-stack の最大値投影画像を LAS AF ソフトウェア (Leica Microsystems, Mannheim, Germany)を用いて作製し、Ratio image の作製および定量化に用いた。Ratio image は MetaMorph を使用して上述した培養細胞のイメージング解析と同様の方法で作製し、明るさとコントラストを調整した。mCherry/GFP 比の定量解析においては、median filter 処理後に GFP 陽性領域を voluntary thresholding で決定し、その領域における細胞体と軸索の領域の mCherry 蛍光強度を GFP 蛍光強度で割った。軸索の長さは MetaMorph によって計測し、80 μm 以上の長さの軸索を持つ神経細胞を計測対象にした。

N1E-115 細胞および魚への阻害剤処理

1.0×10^6 個の N1E-115 神経芽細胞を PLL コートした 60 mm ディッシュに播き、pT2AUAS-N-CISSOR および pEFBOS-Gal4-VP-16 で Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)を用いてトランスフェクションした。50 μM GM6001 および 10 μM BACE inhibitor IV を含む Opti-MEM で 4 時間処理し、その細胞上清および細胞溶解液を用いて上述した通りにウェスタンブロットで解析した。また、ゼブラフィッシュ胚への処理には、GM6001 および BACE inhibitor IV を各々最終濃度が 0.5 mM および 0.1 mM になるように調整した飼育水を用いた。また、阻害剤の溶媒である DMSO は最終濃度が 2% となるように調整し、ネガティブコントロールとして 2% DMSO を用いた。Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times \text{UAS:N-CISSOR}$)の F1 胚の卵殻を除去して阻害剤もしくは 2% DMSO の存在下で受精後 25-36 時間の間飼育した後、受精後 36 時間の胚を 4% PFA/PBS で 4°C で一晩固定した。N-CISSOR 発現神経細胞の撮影および解析は上述した実験と同様におこなった。

統計処理

得られた数値データは Microsoft Excel software を用いた Student's t-test によって評価した。P 値が 0.05 以下のものを統計的に有意であると定めた (**P < 0.01, ***P < 0.001)。また、データは平均値 \pm SD (標準偏差)で表した。

結果

N-CISSOR の樹立とその評価

NRG1 β type の切断は、その β -exon と呼ばれる EGF-like domain の C 末端をコードする領域で起こることが知られる (6)。私は、その性質を利用して、ゼブラフィッシュ type I NRG1 β 1 (zNRG1 β 1) の N 末端付近に赤色蛍光タンパク mCherry を、C 末端に緑色蛍光タンパク EGFP (GFP) を図 4a のように各々融合させることで N-CISSOR を作製した。

N-CISSOR 中に含まれる NRG1 の切断部位で切断が起こると、mCherry を含む細胞外領域が細胞外に放出されることで、mCherry と細胞内領域に標識した GFP が物理的に分離する原理である (図 4b)。しかしながら、共焦点顕微鏡や蛍光顕微鏡では一分子レベルでの蛍光タンパク質の分離は分解能の限界によって検出することができない。そこで、細胞内の mCherry/GFP 比を算出することで mCherry と GFP の分離を評価する手段を取った。この評価方法では、N-CISSOR 発現細胞において N-CISSOR の切断が起こると細胞内 mCherry/GFP 比が低下することが想定される (図 4c)。また、最終的に Gal4-UAS システムでゼブラフィッシュ胚の組織特異的に N-CISSOR を発現させることを考慮して、N-CISSOR は 5 \times UAS 配列の下流に挿入した。

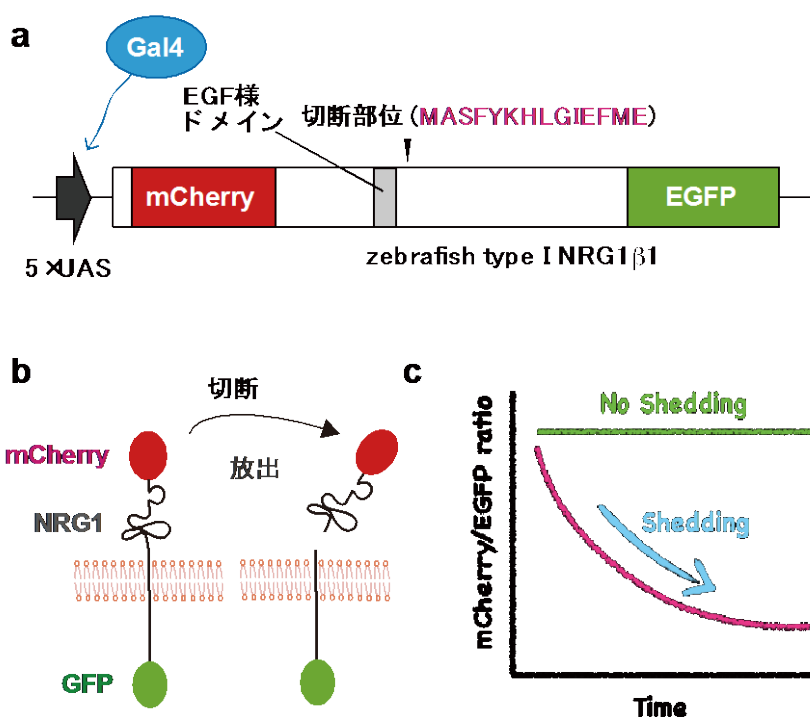


図 4 N-CISSOR の作製およびその切断検出原理

a) N-CISSOR のコンストラクトを示す。zebrafish type I NRG1 β 1 の細胞外領域に mCherry を挿入し、細胞内領域に EGFP を標識できるように設計した上で、Gal4-UAS システム

により発現させるために 5×UAS 配列の下流に挿入した。 b) 細胞膜上に発現した N-CISSOR は、切断により mCherry を標識した細胞外領域を細胞外に放出する。 c) N-CISSOR における mCherry/GFP 比の定量とその推移の予想グラフを示す。切断により細胞外領域に標識した mCherry が細胞内から失われると細胞の mCherry/GFP 比が低下することが予想される。

NRG1 がいつどこで切れているかどうかを評価するためには N-CISSOR は NRG1 の細胞内分布および切断動態を正しく模倣しなければならない。そこで、まずは作製した N-CISSOR を HEK293T 細胞に一過的に発現させ、その分布を蛍光タンパク質で標識していない NRG1 の分布と比較することで N-CISSOR の細胞内分布を評価した。その結果、N-CISSOR 発現細胞における mCherry および GFP の蛍光は主に細胞表面にみとめられ、免疫染色により検出した zNRG1Iβ1 や HA 標識 mNRG1Iβ1 の分布と同様であった (図 5a-c)。

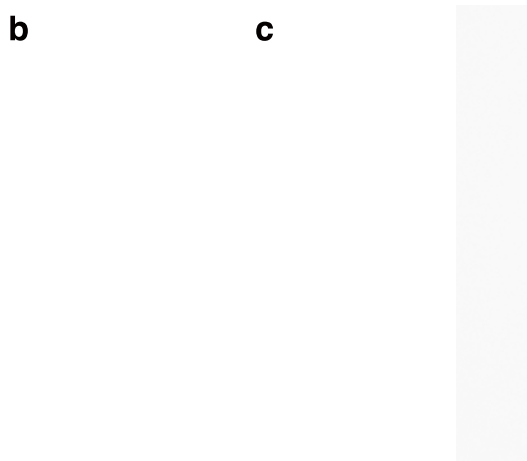


図 5 N-CISSOR の細胞内分布の検証

a) トランスフェクションにより HEK293T 細胞に発現させた N-CISSOR の細胞内分布を示す。DAPI 染色後、観察した。 b, c) 同じく HEK293T 細胞に発現させた HA-mNRG1Iβ1 (b) および zNRG1Iβ1 (c) の細胞内分布を示す。各々、免疫染色により抗 HA 抗体および抗 zNRG1I 抗体 (686) で検出し、DAPI 染色した。スケールバー：20 μm

次に、N-CISSOR のメタロプロテアーゼ依存的な切断動態を HEK293T 細胞を用いてウェスタンブロットにより評価した。PMA は、NRG1 を含む ErbB リガンドの切断を ADAM17 の活性化により誘起する (29)。そこで、N-CISSOR 発現細胞に PMA を処理してウェスタンブロットをおこなったところ、細胞上清中からおよそ 60 kDa の切断断片が抗 mCherry 抗体によって検出され、その切断断片の出現は広域スペクトラムメタロプロテアーゼ阻害剤である GM6001 の処理により抑制された (図 6a)。すなわち、

N-CISSOR は PMA 刺激によりメタロプロテアーゼ活性依存的に切断を受けることが確認された。さらに、PMA 依存的な N-CISSOR の細胞外ドメインの放出は、時間依存的に起こった (図 6b)。同様の結果が、非標識の zNRG1 β 1 発現細胞に PMA を処理した際にも得られた (図 6c, d)。そこで、N-CISSOR と zNRG1 β 1 の PMA 依存的な切断効率を比較したところ、N-CISSOR でも zNRG1 β 1 の切断効率が損なわれていないことが示された (図 5e)。

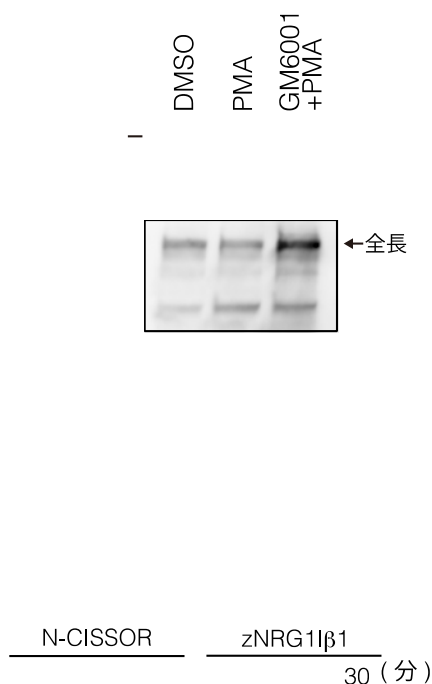


図 6 N-CISSOR のメタロプロテアーゼ依存的な切断の検証

a) トランスフェクションにより N-CISSOR を発現させた HEK293T 細胞に DMSO もしくは PMA を 20 分間処理した。必要に応じて、GM6001 を前処理し、PMA とともに処理した。薬剤処理 20 分後に細胞上清および細胞溶解液 (細胞) を回収してウェスタンブロットで上清中の細胞外領域 (切断断片)、細胞中の全長および細胞内領域 (切断断片) を各々抗 mCherry 抗体および抗 GFP 抗体で検出した。内部標準として抗 β -actin 抗体に

よる検出もおこなった。b) N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞に PMA を処理後 0 分、15 分、30 分、60 分で細胞上清を回収し、抗 mCherry 抗体を用いたウェスタンブロットにより放出された切断断片を検出した。c) zNRG1I β 1 を発現させた HEK293T 細胞を a と同様に処理し、抗 zNRG1I 抗体 (683) および抗 zNRG1 抗体 (686) で検出した。内部標準として抗 β -actin 抗体による検出もおこなった。d) zNRG1I β 1 を発現させた HEK293T 細胞を b と同様に処理し、抗 zNRG1I (683) 抗体で検出した。e) N-CISSOR もしくは zNRG1I β 1 を各々発現させた HEK293T 細胞の細胞溶解液を PMA の処理 15 分前、0 分後、15 分後および 30 分後に回収し、抗 zNRG1I 抗体 (686) を用いたウェスタンブロットをおこなった。各バンドの検出強度を測り、 β -actin のバンドの検出強度で標準化した後、初期値 (刺激 15 分前の強度) で標準化した平均値を SD とともに示す。

また、N-CISSOR 発現細胞の細胞上清を分化 C2C12 細胞に処理すると、ErbB3 および Akt のリン酸化が起こったことから (図 7a)、N-CISSOR は EGF 様ドメインの活性をもつことが示唆された。すなわち、N-CISSOR 発現細胞は zNRG1I β 1 の強制発現細胞となり得る。この強制発現の影響を防ぐため、N-CISSOR から EGF 様ドメインの 28 アミノ酸配列 (PCNESEKEYCVNHGKCFTLEVTPGNIRR) を除くと、N-CISSOR と同様に主に細胞表面に局在したのにも関わらず、PMA を処理しても切断がほとんど起こらなくなった (図 7b-d)。

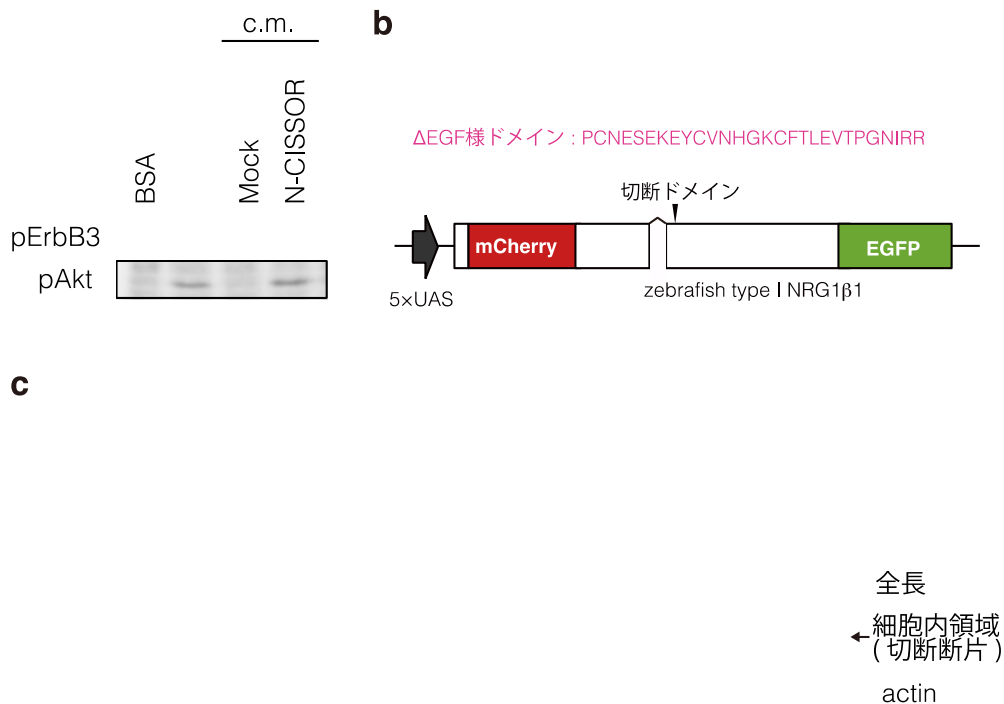


図7 N-CISSORにおけるEGF様ドメインの活性およびその除去

a) N-CISSOR 発現細胞の調整培地 (上清) を分化 C2C12 細胞に処理して 20 分後に細胞を回収し、抗 pErbB3 抗体および抗 pAkt 抗体を用いてウェスタンブロットをおこなった。陽性対象には市販のヒトリコンビナント NRG1 を用いた。b) N-CISSOR ΔEGF-1 のコンストラクト図を示す。N-CISSOR より、EGF 様ドメインに相当するアミノ酸配列 PCNESEKEYCVNHGKCFLEVTGPNIRR を除去するよう設計した。c) トランスフェクションにより HEK293T 細胞に N-CISSOR ΔEGF-1 を発現させ観察した。スケールバー : 10 μm d) N-CISSOR (WT) ないし N-CISSOR ΔEGF-1 を発現した HEK293T 細胞に PMA を処理し、20 分後に細胞上清と細胞溶解液を回収して抗 zNRG1I 抗体 (683) および抗 zNRG1 抗体 (686) 抗体を用いたウェスタンブロットをおこなった。内部標準として抗β-actin 抗体による検出もおこなった。

染色処理をおこなっていない N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞の細胞内には GFP の蛍光を伴わない mCherry 単独の蛍光が多数みとめられた (図 8a、矢印)。この mCherry 単独の蛍光は、細胞に Bafilomycin A1 を処理することによりみとめられなくなった一方で、主に細胞表面直下に mCherry および GFP 陽性の膜状の構造物がみられるようになった (図 8b、矢頭)。さらにこの構造物は Rab7-CFP と共局在した (図 8c)。

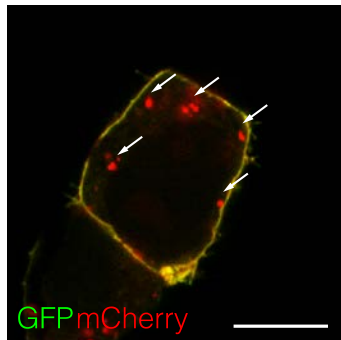


図8 N-CISSOR 発現細胞にみられる mCherry 単独蛍光
a) N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞においてみとめられた mCherry 単独蛍光 (矢印)を示す。
b) N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞に Bafilomycin A1 を処理した。 c) N-CISSOR および Rab7-CFP を共発現させた HEK293T 細胞を示す。

以上の結果より、N-CISSOR は zNRG1 β 1 の細胞内局在、切断動態および生理活性を模倣すると結論づけた。

Ratio 解析による N-CISSOR の有効性の検討

N-CISSOR は、mCherry/GFP 比の評価により NRG1 の切断を評価できる蛍光プローブとして作製された。よって、PMA 処理により NRG1 の切断を誘導した N-CISSOR 発現細胞をタイムラプスで撮影し、その mCherry/GFP 比の変化を Ratio image 作製 (Ratio imaging) もしくは定量的解析により調べることで N-CISSOR の有効性を評価した。その結果、DMSO 処理した N-CISSOR 発現細胞では Ratio color に変化はみられなかった一方で、PMA 処理した N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞において、顕著な Ratio color の変化

がみられ (図 9a, b)、PMA 処理により形成される細胞突起においては特に素早い Ratio color の変化がみとめられた (図 9b')。また、PMA 依存的な Ratio color の変化は、GM6001 の処理により抑制された (図 9c)。定量的解析によっても、PMA 処理した N-CISSOR 発現細胞でのみ時間依存的に mCherry/GFP 比の顕著な低下がみられることが確かめられた。以上の結果より、N-CISSOR 発現細胞の mCherry/GFP 比の低下はメタロプロテアーゼ活性依存的な N-CISSOR の切断を反映することが示唆された。

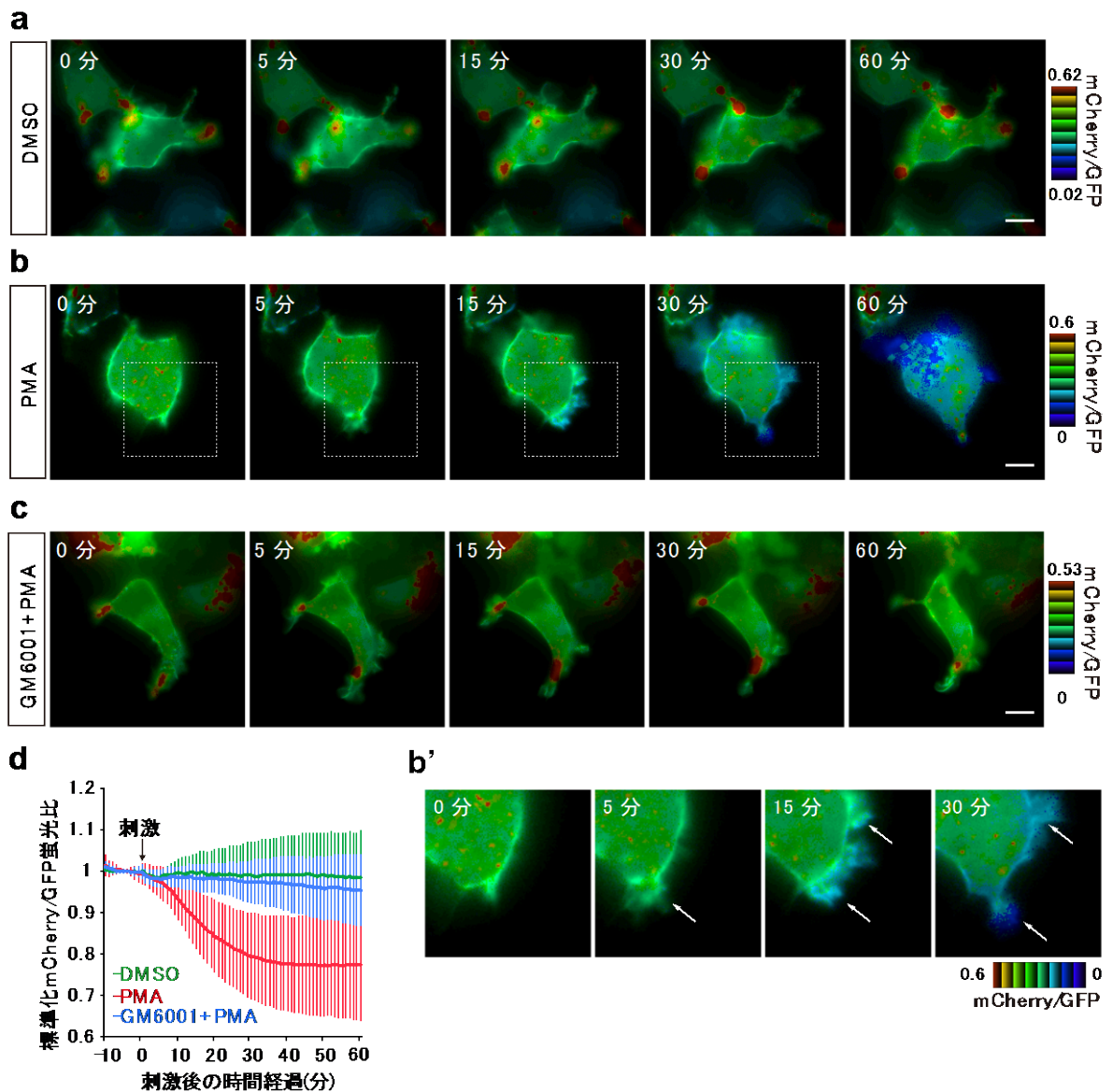


図 9 N-CISSOR 発現細胞の Ratio 解析

a-c) DMSO (a)、PMA (b)を処理した N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞の Ratio image を示す。(b')に (b)で示した細胞突起形成部分の拡大図を示す。(c)においては、刺激 30 分前から GM6001 処理し、PMA および GM6001 で刺激した。Ratio image のダイナミックレンジは各々の図の右に示す。d) (a-c)の各条件で刺激した N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞

に関して、刺激前 10 分間の mCherry/GFP 比の平均で標準化した mCherry/GFP 比の経時的变化を標準偏差とともに示す。

N-CISSOR における NRG1 の切断依存的な切断の評価

BACE1, ADAM10 および ADAM17 による NRG1 の切断部位は既に報告されており (6, 30, 31)、その周辺のアミノ酸配列はヒト、マウスおよびゼブラフィッシュにおいて高度に保存されている (図 10a)。そこで、N-CISSOR 発現細胞における PMA 刺激依存的な mCherry/GFP 比の低下が、N-CISSOR 中に含まれる NRG1 の切断に依存するかどうかを調べるために、報告されている NRG1 の切断部位周辺のアミノ酸 14 個を N-CISSOR から除いたコンストラクトを作製した (図 10b, N-CISSOR MUT)。N-CISSOR MUT を HEK293T 細胞に発現させてその局在を調べたところ、N-CISSOR MUT は N-CISSOR と同様に主に細胞表面に局在した (図 10c)。次に、N-CISSOR MUT に切断が起こらないかどうかを N-CISSOR MUT を発現させた HEK293T 細胞のウェスタンブロットにより調べた。その結果、N-CISSOR MUT は非常に弱い程度で切断されるが、PMA 処理による切断の促進はみられなかった (図 10d)。N-CISSOR MUT 発現細胞では、N-CISSOR 発現細胞と同様に mCherry 単独の蛍光がみとめられた (図 10e)。

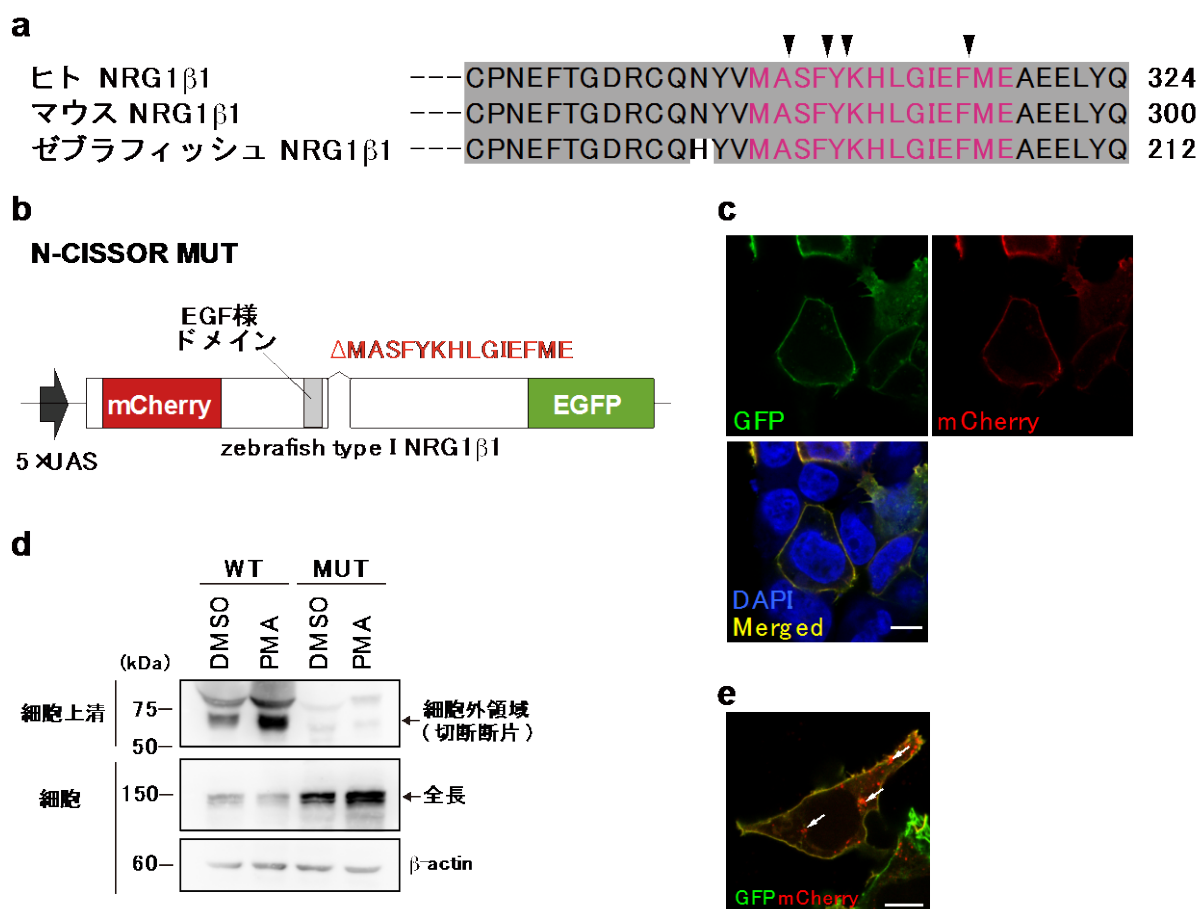


図 10 N-CISSOR MUT の作製および評価

a) ヒト、マウスおよびゼブラフィッシュの NRG1β1 のアミノ酸配列比較を示す。矢頭は報告されている切断部位を示す。 b) N-CISSOR よりアミノ酸配列 MASFYKHLGIEFME を除いて N-CISSOR MUT を作製した。 c) トランスフェクションにより HEK293T 細胞に 発現させた N-CISSOR MUT の細胞内分布を示す。DAPI 染色した後観察した。スケールバー：10 μm d) N-CISSOR WT/MUT 発現 HEK293T 細胞に PMA もしくは DMSO 処理をし、細胞上清および細胞溶解液を回収して抗 mCherry 抗体もしくは抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。β-actin を内部標準とした。 e) N-CISSOR MUT 発現細胞でみとめられた mCherry 単独蛍光 (矢印)を示す。

さらに、N-CISSOR MUT 発現細胞のタイムラプスイメージングおよび Ratio imaging においても、PMA 依存的な mCherry/GFP 比の低下はみとめられなかった (図 11a)。さらに、N-CISSOR 発現細胞ではみられた細胞突起における優先的な mCherry/GFP 比の変化もまた、N-CISSOR MUT 発現細胞ではみとめられなかった (図 11b)。以上の結果より、N-CISSOR 発現細胞における mCherry/GFP 比の変化は、N-CISSOR 中の NRG1 の切断依存的に起こっていることが確かめられたとともに、N-CISSOR 発現細胞の Ratio imaging により NRG1 の切断の細胞内分布を可視化できることがわかった。

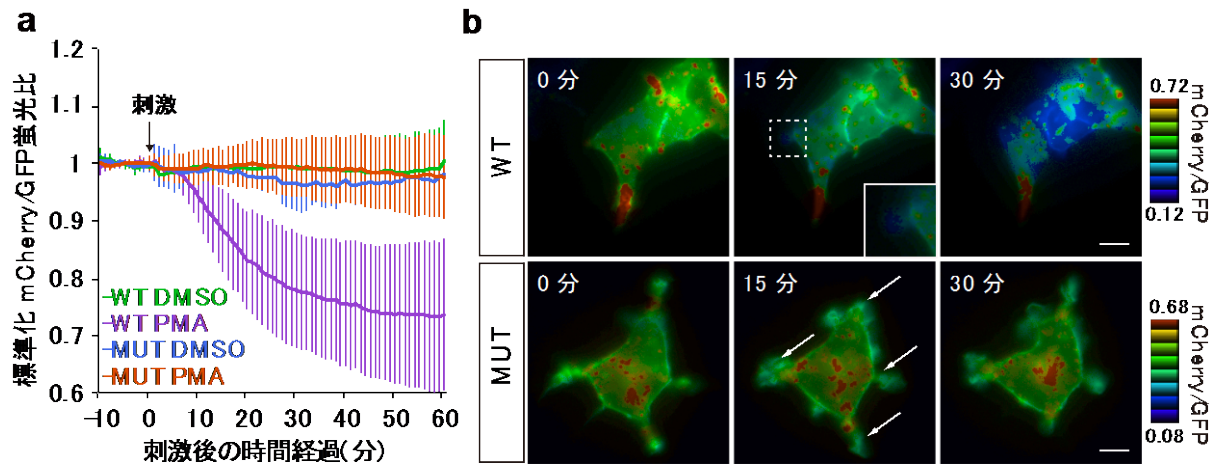


図 11 N-CISSOR MUT 発現細胞の Ratio 解析

a) PMA もしくは DMSO で刺激した N-CISSOR WT/MUT 発現 HEK293T 細胞に関して、刺激前 10 分間の mCherry/GFP 比の平均で標準化した mCherry/GFP 比の経時的変化を標準偏差とともに示す。b) PMA 刺激した N-CISSOR WT/MUT 発現 HEK293T 細胞の Ratio image を示す。白いボックスは、N-CISSOR 発現細胞の細胞突起における mCherry/GFP 比の顕著な低下を示し、矢印は、N-CISSOR MUT 発現細胞の細胞突起で mCherry/GFP 比が変化していない模様を示す。Ratio image のダイナミックレンジは各々の図の右に示す。

N-CISSOR のゼブラフィッシュ胚への導入

これまでの結果より、N-CISSOR を用いて、培養細胞において NRG1 の切断の細胞内分布を評価できることが証明された。そこで、個体内において NRG1 の切断を評価するために、N-CISSOR を組織特異的に発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュ Tg ($5 \times UAS-N-CISSOR$) を作製し、神経系で Gal4-VP16 を発現する Tg ($HuC:Gal4-VP16$) と交配した (図 12a)。得られた F1 の胚を受精 36 時間後に蛍光顕微鏡下で観察すると、神経系において GFP と mCherry の蛍光が観察され、これらの蛍光は側線神経や脊髄運動神経の軸索に至ってみとめられた (図 12b)。次に、この胚を共焦点顕微鏡下で観察したところ、GFP と mCherry の蛍光は、脊髄運動神経において、細胞体では共局在していたのに対して、軸索では GFP の蛍光に対して mCherry の蛍光が弱い傾向にあった (図 12c)。さらに、細胞内および細胞外に mCherry 単独の蛍光がみとめられた (図 12c', c'')。取得した画像を用いて mCherry/GFP 比の Ratio image を作製すると、やはり細胞体においては蛍光強度比の高い赤や黄色を示し、軸索では低い青系統の色を示した (図 12c''')。

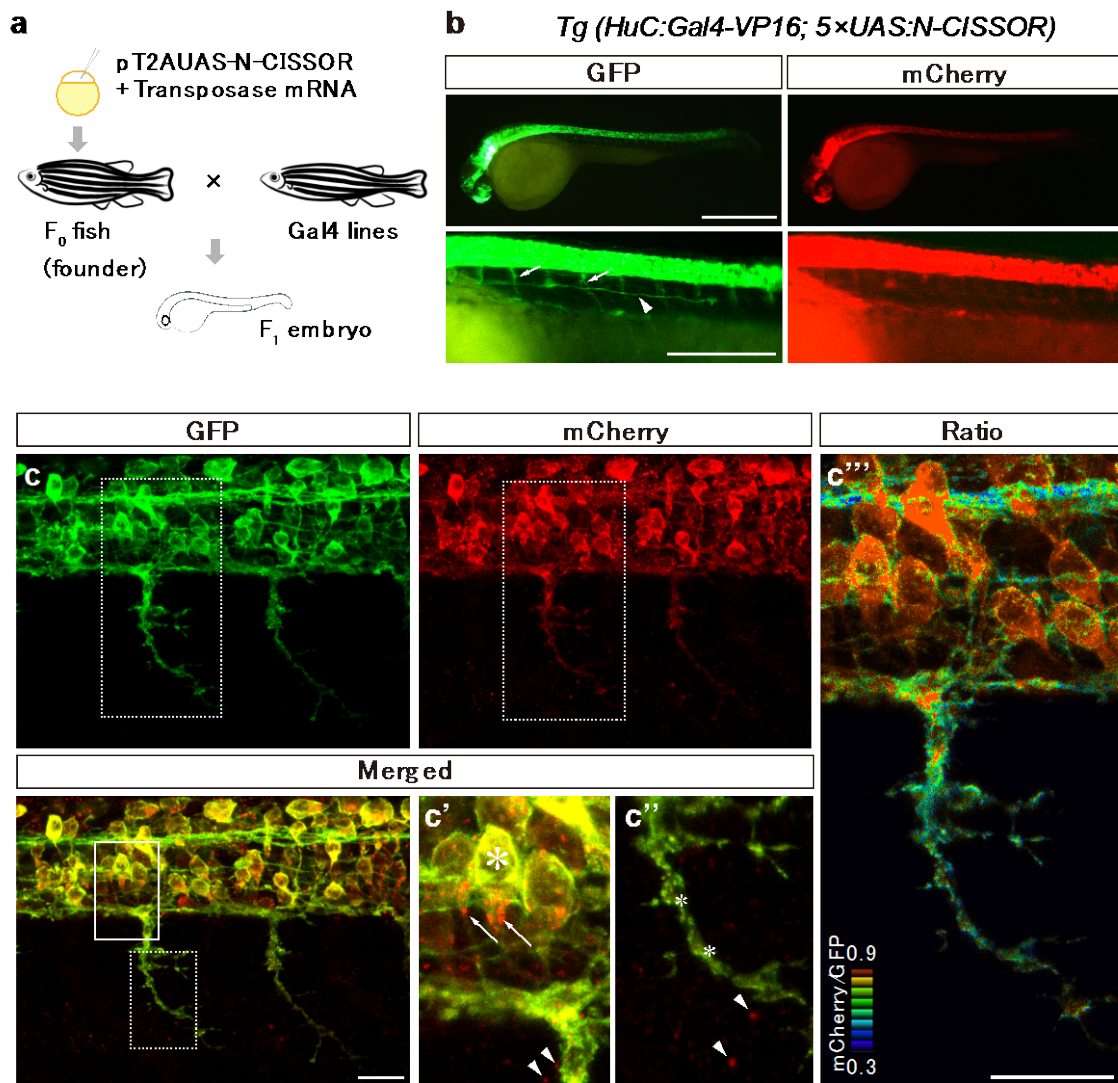


図 12 組織特異的 N-CISSOR 発現ゼブラフィッシュの作製および観察

a) Tol2 トランスポゾンによる pT2AUAS-N-CISSOR のゲノム内への導入および Gal4-UAS システムを用いた組織特異的 N-CISSOR 発現ゼブラフィッシュ胚の作製の手順 b) a で得た F1 ゼブラフィッシュ胚の蛍光顕微鏡下で観察した。矢印は脊髄運動神経を、矢頭は側線神経を示す。 c) b の胚の共焦点顕微鏡下で観察した。 c', c'' 各々 c の merged 画像の白枠と点線枠の拡大図を示す。大きな*は細胞体を、小さな*は軸索を示す。矢印は細胞内の mCherry 単独蛍光を、矢頭は細胞外の mCherry 単独蛍光を示す。 c''') c の mCherry および GFP の像の mCherry/GFP Ratio image を示す。Ratio image のダイナミックレンジは図の左下に示す。

次に、運動神経を 1 細胞レベルで可視化して細胞体と軸索における mCherry/GFP 比を定量化するために、Tg (5×UAS:N-CISSOR) を Tg (SAIGFF213A) と交配し、Cap 運動神経で N-CISSOR を発現する胚を得た。得た胚を共焦点顕微鏡下で観察すると、確かに軸索において mCherry の蛍光が弱かった。Ratio image を作製したところ、細胞体よりも

軸索において mCherry/GFP 比が低いことが確認された (図 13a-b’’)。特に、軸索の突起部分で蛍光強度比が低い傾向がみられた (図 13b’’, 矢印)。また、細胞体と軸索における mCherry/GFP 比の差は、定量によっても確認できた (図 13c)。

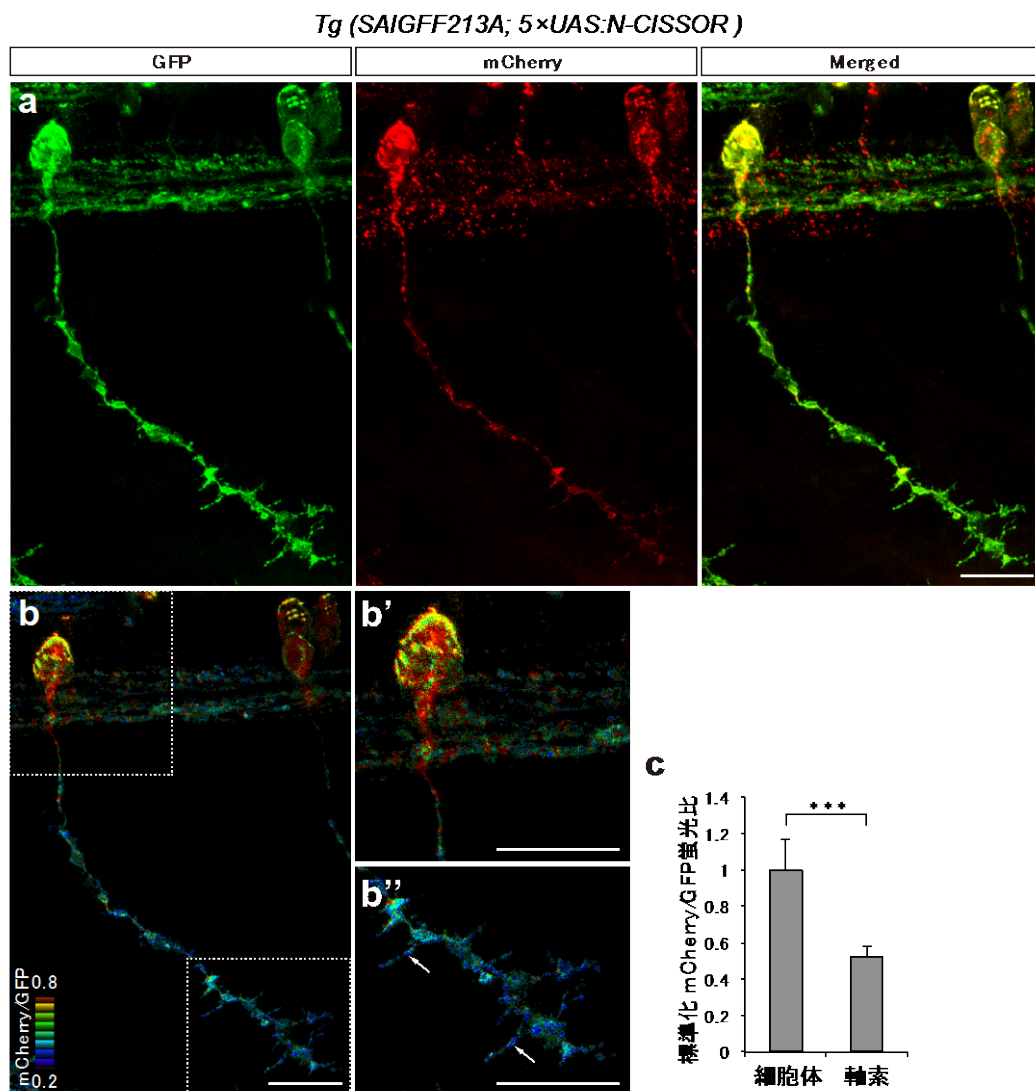


図 13 1 細胞単位での N-CISSOR 発現運動神経の観察

a) *Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR)* の CaP 運動神経を示す。スケールバー：20 μm
b) a の画像より作製した Cherry/GFP Ratio image を示す。Ratio image のダイナミックレンジは図中に示した。b', b'') b の細胞体および軸索先端の拡大図を示す。スケールバー：20 μm
c) *Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR)* の CaP 運動神経の細胞体および軸索部分の各々の mCherry/GFP 比を定量し、細胞体における比の平均値で標準化して平均値 + SD で示した。*** $p < 0.001$

しかしながら、細胞体においては、特に顕著に mCherry 単独蛍光がみとめられ (図 12a, b')、それらの蛍光が細胞体における mCherry/GFP 比を引き上げている可能性が考えられた。そこで、軸索における mCherry/GFP 比の低下が N-CISSOR の切断に依存してい

ることを確認するため、Tg ($5 \times UAS:N-CISSOR MUT$) を作製し、同様に Tg (*SAIGFF213A*) と交配した。得られた胚を受精 36 時間後に観察すると、Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times UAS:N-CISSOR$) と同様に mCherry 単独の蛍光が細胞体で強くみとめられた。しかしながら、Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times UAS:N-CISSOR$) とは異なり、軸索においても GFP と同様に mCherry の強い蛍光がみとめられた (図 14a)。そこで、mCherry/GFP 比を Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times UAS:N-CISSOR$) と比較すると、細胞体においては mCherry/GFP 比に差がなかったのに対して、軸索においては、mCherry/GFP 比が有意に高いことがわかった (図 14b, c)。

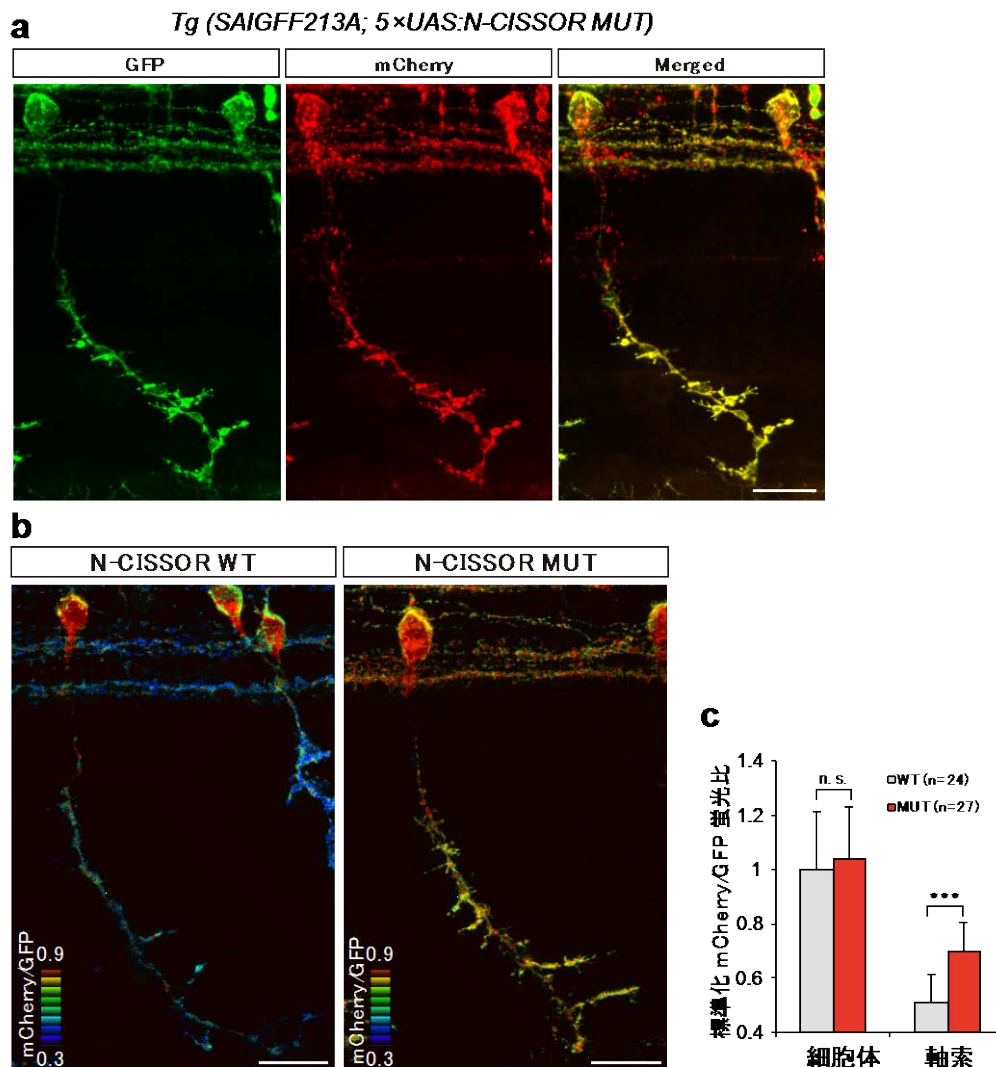


図 14 Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times UAS:N-CISSOR MUT$) の作製と Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times UAS:N-CISSOR$) との比較

a) Tg (*SAIGFF213A*; $5 \times UAS:N-CISSOR MUT$) の CaP 運動神経を示す。 b) Tg

(*SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR*) (N-CISSOR WT) と *Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR MUT)* (N-CISSOR MUT) の mCherry/GFP Ratio image を比較した。Ratio image のダイナミックレンジは各々の図中に示す。スケールバー: 20 μm c) N-CISSOR WT (WT) および N-CISSOR MUT (MUT) の CaP 運動神経の細胞体および軸索部分の各々の mCherry/GFP 比を定量し、WT の細胞体における mCherry/GFP 比の平均値で標準化して平均値 + SD で示した。*** $p < 0.001$

Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR MUT) の F1 胚では、GFP と mCherry の蛍光がともに顕著に強いものが多かった。この原因として、N-CISSOR MUT では切断を受けないため細胞内に蓄積することが考えられたが、導入遺伝子のコピー数などによる発現強度の違いが影響することも考えられた。そこで、*Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR)* と *Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR MUT)* 間の軸索における mCherry/GFP 比の差が発現強度の違いによるものであることを否定するために、*Tg (SAIGFF213A; 5 × UAS:N-CISSOR)* の胚に GM6001 と BACE 阻害剤の阻害剤混合物 (阻害剤カクテル) を処理した。この阻害剤カクテルは、ゼブラフィッシュ胚に処理した 10 分の 1 の濃度で、神経芽細胞株である N1E115 細胞において N-CISSOR の切断を効率良く阻害した (図 15a)。メタロプロテアーゼの活性阻害は、軸索伸張を阻害することが報告されている (32)。その影響を抑えるため、ゼブラフィッシュ胚へは、CaP 運動神経の軸索が少なくとも筋節にまで伸びている受精 25 時間後の胚に処理した。阻害剤カクテルの処理後 11 時間後 (受精 36 時間後) に観察したところ CaP 運動神経の軸索伸張などには支障をきたさなかった (図 15b)。しかしながら、阻害剤カクテル処理胚では、CaP 運動神経の軸索における mCherry/GFP 比の低下が有意に抑えられた (図 15c)。

以上の結果より、NRG1 の切断活性は、運動神経の細胞体よりも軸索において高いことが結論付けられ、その切断にメタロプロテアーゼもしくは BACE の活性が関与することが示唆された。

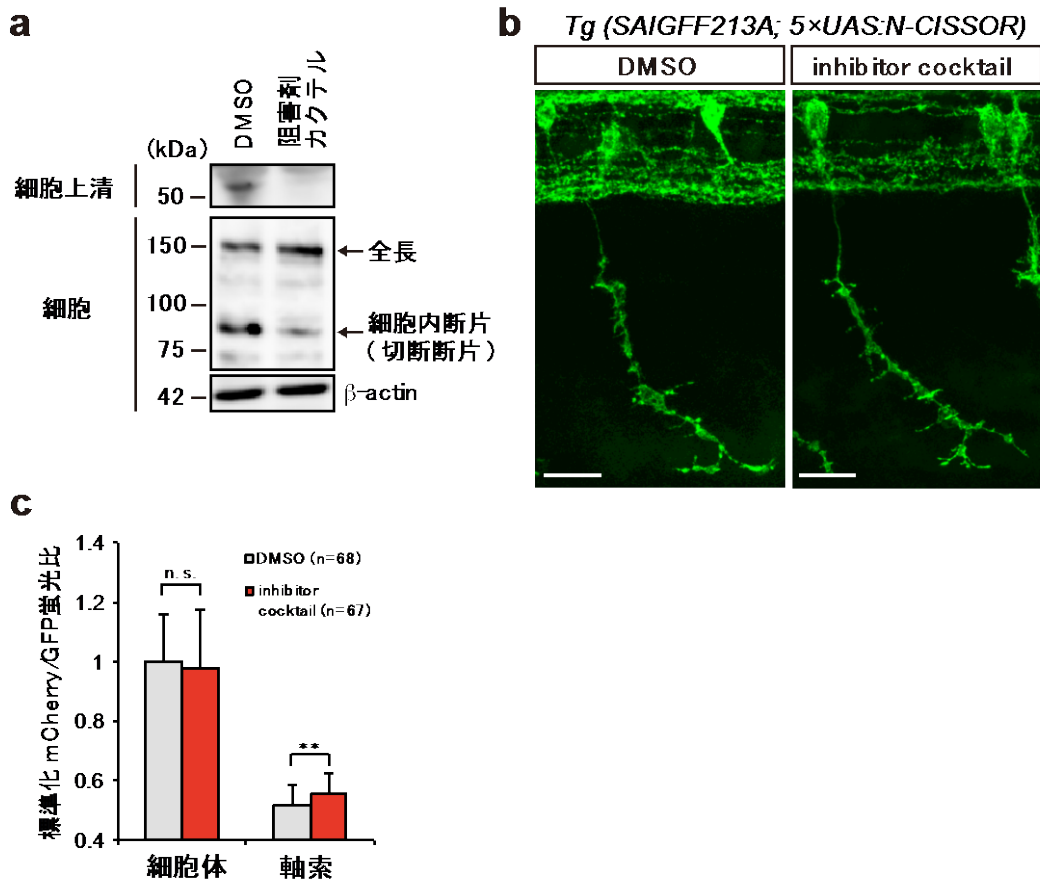


図 15 *Tg* (*SAIGFF213A*; *5×UAS:N-CISSOR*)における N-CISSOR 切断抑制

a) トランスフェクションにより N-CISSOR を発現させた N1E115 細胞に GM6001 および BACE inhibitor IV を各々最終濃度が 50 μ M および 10 μ M になるように処理し、4 時間培養した後その細胞上清と細胞溶解液を用いてウェスタンブロットをおこなった。細胞上清における N-CISSOR 切断断片は抗 mCherry 抗体を用いて検出し、細胞溶解液における N-CISSOR 全長および切断断片は抗 GFP 抗体を用いて検出した。 β -actin を内部標準とした。b) *Tg* (*SAIGFF213A*; *5×UAS:N-CISSOR*) の受精後 25 時間胚に GM6001 および BACE 阻害剤 IV を各々最終濃度が 0.5 mM および 0.1 mM になるように処理し、11 時間後に胚を固定して観察した。スケールバー : 20 μ m c) 阻害剤カクテル処理胚と DMSO 処理胚の細胞体と軸索における mCherry/GFP 比を各々定量し、DMSO 処理胚の細胞体における平均値で標準化して各々の平均値 + SD で表示した。** $p < 0.01$

考察

これまで、膜タンパク質の切断が時空間的な制御を受けることは予想されてきていたが、その研究はほとんど進んでいなかった。その理由の一つとして、タンパク質の切断に関する研究は、主にウェスタンブロットを始めとした生化学的な手法に頼られてきたことがある。膜タンパク質に蛍光タンパク質を標識することで、翻訳後修飾を細胞内で観察することのできる蛍光バイオセンサーの開発も発展しつつあるが、その多くは修飾を受ける部位以外は他のタンパク質から構成されるため、本来の膜タンパク質の細胞内分布や性質を模倣できているとは限らない。例えば、これまでに報告された膜タンパク質の切断を検出する蛍光バイオセンサーとして、**Matrix Metalloprotease (MMP)**の切断活性を検出するものがあるが、これらは、MMP が認識および切断することができるアミノ酸配列のみを使用している (33, 34)。あるいは、特定の **ADAM** プロテアーゼの切断活性を検出する蛍光バイオセンサーでは、その基質のうちの特定の膜タンパク質のシグナルペプチドおよび切断領域を含むものの、他の領域の大部分を欠くキメラタンパク質である (35)。また、**NRG1**と同じ **EGF**ファミリーである **Heparin-Binding EGF (HB-EGF)**の切断を検出する蛍光バイオセンサーは、**HB-EGF**のほとんどのアミノ酸配列を含むものの、過剰発現の効果を避けるために **EGF**様ドメインを含まない (36)。一方で、本研究で作製した **N-CISSOR**は、**NRG1**の細胞内分布や切断動態を模倣させるために、**NRG1**のすべてのアミノ酸配列を含むよう設計されている。まず、**NRG1**の細胞内領域には **PKC δ** によるリン酸化を受ける箇所があり、そのリン酸化は **NRG1**の切断に必要なことが報告されている (37, 38)。そのため、**PKC δ** 依存的な切断の活性化を模倣するには細胞内領域は必須である。次に、**NRG1**は、細胞外領域における切断の後に、膜貫通領域において **γ -secretase**による切断を受けて細胞内領域が核移行して転写活性を持つ場合があることが知られる (3, 39)。従って、**NRG1**の細胞内領域の動態を模倣するためにはその膜貫通領域も重要であると考えられる。さらに、**Notch**のように (40)、リガンド・受容体の結合が **NRG1**の切断に必要な場合もあることも報告されている (39)。実際に、本研究において、**N-CISSOR**から **EGF**様ドメインを除くと切断が起こらなくなることが示された (図 7)。さらに、**NRG1**は脂質膜に移行するが、**type I**の **NRG1**は **N**末端に膜移行のシグナルペプチドをもたないとされていることから、細胞外領域の内部にシグナルペプチドが存在する可能性がある。以上の理由から、**NRG1**の切断を模倣するには、切断部位のみが重要なのではなく、細胞外領域や膜貫通領域、細胞内領域などの他の領域も重要であると考えられたため、**N-CISSOR**は **NRG1**のすべてのアミノ酸を含む設計にした。その結果として、**N-CISSOR**は **HEK293T**細胞において非標識 **zNRG1I β 1**や **HA-mNRG1**と同様に細胞表面に適切に分布し、**PMA**処理によってメタロプロテアーゼ活性依存的に効率良く切断され、その切断効率是非標識 **zNRG1I β 1**と同様であった。さらには、分化 **C2C12**筋繊維において **ErbB3**受容体をリン酸化する活性を

持つこともわかった。よって、N-CISSOR は、その細胞内分布、切断動態および生理活性の面において NRG1 を模倣すると結論付けられた。

N-CISSOR 発現細胞のタイムラプスイメージングにより、PMA 刺激細胞で形成される細胞突起において N-CISSOR が優先的に切断を受けるのが観察されたことから、NRG1 のエクドメインシェディングは空間的に制御されていることが示唆された。PMA は、Rac を介したアクチン繊維の再構成を介して、細胞において ruffling や lamellipodia 形成を誘導する (41)。また、PMA 刺激依存的に起こるエクドメインシェディングを担う主要な切断酵素である ADAM17 は、PMA 処理によって、核周囲から ruffling する細胞膜に移行し、Rac 依存的なアクチン繊維の再構成を介して活性化することが知られる (18, 42-44)。従って、PMA 処理した際に、アクチン繊維の再構成がダイナミックに起こる細胞突出部で優先的に ADAM17 が活性化されて N-CISSOR の切断が起こると考えることは、道理にかなっている (図 16a)。また、興味深いことに、PMA 刺激による NRG1 の切断には、その細胞内領域の PKC δ 依存的なリン酸化修飾が必要であるが、PKC δ もまた、ruffling する細胞の lamellipodia に移行する (45)。これらのことより、細胞突出部位における N-CISSOR の優先的な切断は、PKC δ が移行してくる細胞突出部で NRG1 が切断に必要なリン酸化修飾を受けやすいことによるのかもしれない (図 16b)。さらに、PMA 刺激による NRG1 細胞内領域のリン酸化は PKC δ を要求するが、PKC α は要求しない。その一方で、PMA 刺激で誘導される TGF α および HB-EGF の切断は、PKC α に依存する (37)。これらのことから、細胞突出部における切断は、NRG1 と同様に PKC δ 依存的な修飾を必要とする基質に限定された特徴である可能性も考えられる。

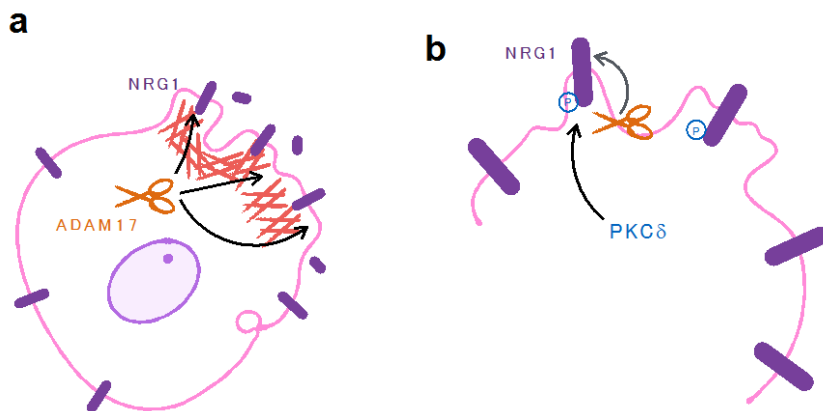


図 16 PMA 刺激時の NRG1 の切断が細胞突出部で優先的に起こるメカニズムの仮説

a) ADAM17 がアクチン繊維再構成の盛んな細胞突出部に積極的に移行して NRG1 を切断する。b) PKC δ が細胞突出部に移行して NRG1 の細胞内ドメインをリン酸化することで、NRG1 が切断を受けられるようになる。

N-CISSOR をゼブラフィッシュ胚に導入した際、運動神経において、細胞体よりも軸索にお

いて NRG1 の切断活性が高いのが観察された。シュワン細胞前駆体は、神経の軸索に沿って移動し、ミエリン形成をおこなうが、神経軸索に可溶性 Ig-NRG1 の放出を誘導する BDNF などの神経栄養因子を分泌することが報告されている (16, 17)。従って、軸索からの NRG1 の放出は、神経軸索において起こる局所的なエクストドメインシェディングによるものである可能性がある (図 3b)。しかしながら、これまで、生きた細胞や個体内において NRG1 の切断の現場を捉える手段がなかったため、NRG1 のエクストドメインシェディングに局在性があることを直接的に示した研究はなかった。本研究では、N-CISSOR を用いることで初めて、ゼブラフィッシュの個体内における運動神経細胞の軸索で局所的に NRG1 の切断が起こることを示した。PMA で刺激した HEK293T 細胞においても細胞突起で優先的な NRG1 の切断がみとめられたことから、NRG1 の切断が局在性をもって制御されていることが示唆された。また、この NRG1 の切断は、適切なタイミングで適切な場所に NRG1 シグナルを送ることを可能にし得ることから、NRG1 シグナルの時空間的制御においても重要であることが考えられた。加えて、GM6001 と BACE 阻害剤の阻害剤カクテルの処理で軸索における mCherry/GFP 比が有意に増加したことからも、軸索における NRG1 の切断は BACE もしくはメタロプロテアーゼによって制御されていることが推察された。軸索における NRG1 の切断の制御機構に関しては、さらなる研究が必要である。

N-CISSOR は効率的に NRG1 の切断をモニターしたが、未だ改良の余地はあると考える。N-CISSOR を発現させた際には、細胞内に mCherry 単独の粒状の蛍光がみとめられる。N-CISSOR 発現 HEK293T 細胞への Bafilomycin A1 処理によってこの mCherry 単独の蛍光はみとめられなくなったが、一方で、mCherry と GFP が merge して取り囲む膜状構造物が出現した。さらに、その構造物を取り囲む mCherry および GFP の蛍光は、後期エンドソームマーカーである Rab7 の局在とも重なったことから、N-CISSOR はエンドサイトーシスによって取り込まれ、その後 GFP のみが低 pH 環境に晒されてその蛍光を消失している可能性が考えられた。NRG1 は、酸性コンパートメントに移行することが報告されていることから (9)、mCherry 単独の蛍光の出現は、N-CISSOR が本来の NRG1 の動態を模倣した結果によるものかもしれない。また、ゼブラフィッシュ個体内では、mCherry 単独の蛍光は N-CISSOR 発現神経細胞の細胞外にもみとめられた。Type I NRG1 に含まれる Ig 様ドメインは、細胞外に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して集積し、持続的な NRG1-ErbB シグナルの確立に寄与するとされる (46)。このことから、mCherry 単独の蛍光は、切断を受けて放出された可溶性 N-CISSOR の集積である可能性も考えられる。もしくは、可溶性 N-CISSOR を含むエクソソームや GFP の蛍光が消失した N-CISSOR がなんらかの形で細胞外に出たものかもしれない。N-CISSOR の GFP を別の低 pH 抵抗性の蛍光タンパク質に替えることで、細胞内における NRG1 の切断をより詳細に解析できる可能性がある。

本研究で明らかとなったゼブラフィッシュ胚の神経細胞における N-CISSOR の軸索特異的な切断により、N-CISSOR を用いた個体内における NRG1 の切断の可視化の有効性が示された。また、これは、NRG1 の切断が細胞内で局在性をもって制御されていることを示唆する重要な知見である。今後、N-CISSOR は、神経軸索特異的な NRG1 の切断制御機構の解明や心臓や他の臓器における NRG1 の切断の重要性を示す上で有力なツールになることが期待される。例えば、N-CISSOR を心内皮細胞もしくは血管周囲細胞に発現させることで、心臓の肉柱形成の過程や心臓再生の過程において (47)、NRG1 の切断が局所的な心筋細胞増殖の促進にどのように重要であるかを解明できるかもしれない。以上より、N-CISSOR を用いることで、*in vitro* と *in vivo* の両方で NRG1 の切断を介した細胞間相互作用の時空間的制御機構を解明できることが期待される。また、N-CISSOR は、NRG1 切断を制御する薬剤スクリーニングにも有用となるかもしれない。

引用文献

1. Falls, D. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell. Res.* **284**, 14–30 (2003).
2. Lemke, G. Neuregulins in development. *Mol. Cell Neurosci.* **7**, 247–262 (1996).
3. Mei, L. & Xiong, W. -C. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 437–452 (2008).
4. Marballi, K., Cruz, D., Thompson, P. & Walss-Bass, C. Differential neuregulin 1 cleavage in the prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary findings. *PLoS One* **7**, e36431 (2012).
5. Cheret, C. *et al.* Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *EMBO. J.* **32**, 2015–2028 (2013).
6. Fleck, D. *et al.* Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling. *J. Neurosci.* **33**, 7856–7869 (2013).
7. Hu, X. *et al.* Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.* **9**, 1520–1525 (2006).
8. Willem, M. *et al.* Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664–666 (2006).
9. Loeb, J. A., Susanto, E. T. & Fischbach, G. D. The Neuregulin Precursor proARIA Is Processed to ARIA after expression on the cell surface by a protein kinase C-enhanced mechanism. *Mol. Cell. Neurosci.* **91**, 77–91 (1998).
10. Herrlich, A., Klinman, E., Fu, J., Sadegh, C. & Lodish, H. Ectodomain cleavage of the EGF ligands HB-EGF, neuregulin1-beta, and TGF-alpha is specifically triggered by different stimuli and involves different PKC isoenzymes. *FASEB. J.* **22**, 4281–4295 (2008).
11. Ozaki, M., Itoh, K., Miyakawa, Y., Kishida, H. & Hashikawa, T. Protein processing and releases of neuregulin-1 are regulated in an activity-dependent manner. *J. Neurochem.* **91**, 176–188 (2004).
12. Kalinowski, A. *et al.* Metalloproteinase-dependent cleavage of neuregulin and autocrine stimulation of vascular endothelial cells. *FASEB. J.* **24**, 2567–2575 (2010).
13. Monje, P. V, Bartlett Bunge, M. & Wood, P. M. Cyclic AMP synergistically enhances neuregulin-dependent ERK and Akt activation and cell cycle progression in Schwann cells. *Glia* **53**, 649–659 (2006).

14. Montero, J. C., Yuste, L., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A. & Pandiella, A. Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases. *Biochem. J.* **363**, 211–221 (2002).
15. Esper, R. M. & Loeb, J. A. Neurotrophins induce neuregulin release through Protein Kinase C activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 26251–26260 (2009).
16. Esper, R. M. & Loeb, J. A. Rapid axoglial signaling mediated by neuregulin and neurotrophic factors. *J. Neurosci.* **24**, 6218–6227 (2004).
17. Ma, Z., Wang, J., Song, F. & Loeb, J. Critical period of axoglial signaling between neuregulin-1 and brain-derived neurotrophic factor required for early Schwann cell survival and differentiation. *J. Neurosci.* **31**, 9630–9640 (2011).
18. Ebsen, H., Schröder, A., Kabelitz, D. & Janssen, O. Differential surface expression of ADAM10 and ADAM17 on human T lymphocytes and tumor cells. *PloS One* **8**, 1–16 (2013).
19. Yokozeki, T., Wakatsuki, S., Hatsuzawa, K., Black, R. a., Wada, I., & Sehara-Fujisawa, A. Meltrin β (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin β 1 in the Golgi apparatus: Fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells. *Genes to Cells*, **12**, 329–343 (2007).
20. Das, U., Wang, L., Ganguly, A., Saikia, J. M., Wagner, S. L., Koo, E. H., & Roy, S. Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. *Nat. Neurosci.* **1**, 1–11. (2015)
21. Westerfield, M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. (Eu- gene, OR: University of Oregon Press, 2000).
22. Asakawa, K. *et al.* Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1255–1260 (2008).
23. Asakawa, K. & Kawakami, K. Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish. *Dev. Growth. Differ.* **50**, 391–399 (2008).
24. Aoki, K., Yamada, M., Kunida, K., Yasuda, S. & Matsuda, M. Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 12675–12680 (2011).
25. Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T. & Fujisawa-Sehara, A (2001). Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J. Biol. Chem.* **276**, 9352–9358 (2001).

26. Miura, H., Matsuda, M. & Aoki, K. Development of a FRET biosensor with high specificity for Akt. *Cell. Struct. Funct.* **39**, 9–20 (2014).
27. Kimura, Y., Satou, C., & Higashijima, S.-I. V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord. *Development*, **135**, 3001–3005 (2008).
28. Muto, A. *et al.* Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5425–5430 (2011).
29. Blobel, C. P. ADAMs : key components in EGFR signaling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 32–43 (2005).
30. Luo, X. *et al.* Cleavage of neuregulin-1 by BACE1 or ADAM10 protein produces differential effects on myelination. *J. Biol. Chem.* **286**, 23967–23974 (2011).
31. Hu, X., He, W., Diaconu, C., Tang, X., Kidd, G. J., Macklin, W. B., Bruce, D., Trapp & Yan, R. Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *FASEB J.* **22**, 2970–2980. (2008).
32. Kalus, I., Bormann, U., Mzoughi, M., Schachner, M., & Kleene, R. Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J. Neurochem.* **98**, 78–88. (2006).
33. Yang, J. *et al.* Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor, *Biochim. Biophys. Acta.* **1773**, 400–407 (2007).
34. Ouyang, M. *et al.* Visualization of polarized membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in live cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. *J. Biol. Chem.* **283**, 17740–17748 (2008).
35. Douglas, A., Chapnick, D. A., Bunker, E. & Liu, X. A biosensor for the activity of the “sheddase” TACE (ADAM17) reveals novel and cell type – specific mechanisms of TACE activation. *Sci. Signal.* **8**, 1–10 (2015).
36. Ozawa, T. & Higashiyama, S. Spatiotemporal visualization of proHB-EGF ectodomain shedding in living cells. *J. Biochem.* **154**, 67–76 (2013).
37. Dang, M. *et al.* Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 9776–9781 (2013).

38. Parra, L. M., Hartmann, M., Schubach, S., Li, Y., Herrlich, P. & Herrlich, A. Distinct intracellular domain substrate modifications selectively regulate ectodomain cleavage of NRG1 or CD44. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3381–3395 (2015).
39. Bao, J., Wolpowitz, D., Role, L. W. & Talmage, D. Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J. Cell. Biol.* **161**, 1133–1141 (2003).
40. Mumm, J. S. *et al.* A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell.* **5**, 197–206 (2000).
41. Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B. & Imhof, B. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 2999–3012 (2000).
42. Sahin, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands, *J. Cell. Biol.* **164**, 769–779 (2004).
43. Nagano, O. *et al.* Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca²⁺ influx and PKC activation. *J. Cell. Biol.* **165**, 893–902 (2004).
44. Le Gall, S. M. *et al.* ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell. Sci.* **123**, 3913–3922 (2010).
45. Chae, Y. C. *et al.* Protein kinase C δ -mediated phosphorylation of phospholipase D controls integrin-mediated cell spreading. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5086–5098 (2010).
46. Li, Q. & Loeb, J. A. Neuregulin-heparan-sulfate proteoglycan interactions produce sustained erbB receptor activation required for the induction of acetylcholine receptors in muscle. *J. Biol. Chem.* **276**, 38068–38075 (2001).
47. Gemberling, M., Karra, R., Dickson, A. L. & Poss, K. D. Nrg1 is an injury-induced cardiomyocyte mitogen for the endogenous heart regeneration program in zebrafish. *eLife* **4**, e05871 (2015).

謝辞

本研究は、京都大学再生医科学研究所 再生増殖制御学分野の瀬原淳子教授、京都大学 生命動態システム科学拠点事業 「時空間情報イメージング拠点」青木一洋特定准教授(現・基礎生物学研究所 教授)ならびに京都大学大学院 生命科学研究所 高次生命科学専攻 分子病態学分野の松崎文雄教授のご指導のもと行われました。懇切なるご指導と大変有意義なご助言を頂きましたことを、心から感謝致します。また、共同研究者である京都大学再生医科学研究所 再生増殖制御学分野の佐藤文規助教には、魚の扱いやプラスミド作製に関して多くのご助言を頂きました。有り難うございました。同じく共同研究者である国立遺伝学研究所の川上浩一教授および浅川和秀助教には、貴重な実験材料のご提供をしていただき議論をさせていただきました。この場をお借りしましてお礼申し上げます。本研究を遂行しました博士過程のうちの2年間、経済的なご支援を賜りました日本学術振興会の皆様に感謝いたします。

最後になりましたが、私を陰ながら支え続けてくださった家族、友人、研究室室員、先生方にこの場を借り手厚く御礼申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Aosa Kamezaki, Fuminori Sato, Kazuhiro Aoki, Kazuhide Asakawa, Koichi Kawakami, Fumio Matsuzaki, Atsuko Sehara-Fujisawa

Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing *in vitro* and *in vivo*.

Scientific Reports, 6, 28873. 2016.