

# 末梢神経ミエリン形成を司るシグナル伝達

山内 淳 司

神経系の各前駆細胞から分化したニューロンとグリア細胞は、胎生中期からはじまる長期間の複雑なニューロン-グリア相互作用を介して、真の意味で‘機能’を有する神経‘組織’を形成する。他の臓器ではみられない神経組織としての特徴的な形態のひとつに、ミエリン（髄鞘）がある。現在まで、ミエリン形成の分子機構に関する研究は、ノックアウト技術を中心とした発生工学的手法を用いて、比較的表現型の出やすい転写因子を軸に発展してきた。しかしながら、これまで得られた結果は断片的なものが多かった。そこで、筆者らはそれらの点を線に結ぶべく、ニューロン-グリア共培養などの独創的な技術を利用して、ミエリン形成を司る一連の既知および新規の分子を同定し、ミエリン形成の分子メカニズムの「ミッシングリンク」を明らかにした。さらに、この一連の分子メカニズムが、生体内においても保存されていることを確認したので、それらについても触れたい。また、正常なミエリン発生の破綻によって起きる脱ミエリン病と、そのシグナル伝達メカニズムの関係についても最後に概説したい。

## 1. 中枢グリアと末梢グリア

哺乳類の神経系は、大きく中枢神経系と末梢神経系に分類され、その発生過程や機能は独立して論じられることが多い。この2種類の系には、共通点がある一方で、相違点も多い。それぞれの神経系において、ニューロンは各組織（部位）の名称に由来して分類され、各々異なった形態を示し、その形態が各部位でのニューロンの個性を表す。しかしながら、ニューロンの細胞生物学的機能は、中枢末梢共に類似している。一方、グリア細胞は細胞の種類に名称の由来をもち、各々機能も異なる（表1）。すなわち、中

枢神経と末梢神経の大きな違いのひとつは、グリア細胞にあると言っても過言ではない。中枢神経では、ニューロンの代謝活動を支えるアストロサイト、神経軸索の周りにミエリン（髄鞘）を形成するオリゴデンドロサイト（図1）、神経損傷や炎症反応時に活躍するミクログリア、脳室と接する神経管との内面を覆う上皮細胞などがあり、数の上ではアストロサイトが一番多い。これに対して、末梢神経ではシュワン細胞が主要なグリア細胞である。蛇足となるが、これらのグリア細胞のなかで、シュワン細胞のみが発見者の名前に由来している。テオドル・シュワン（Theodor Schwann）博士はドイツの生物学者であり、「細胞説」を提唱したひとりとしてもよく知られている。では、中枢神経系のグリア細胞とは異なり、何故末梢神経ではこのような単純な細胞構成をしているのだろうか。まず、シュワ

国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部分子薬理研究室（〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1）、東京工業大学大学院生命理工学研究科生体システム専攻（〒226-8501 横浜市緑区長津田4259）

The signaling mechanism underlying myelination in peripheral nervous system

Junji Yamauchi (Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development (NICHD), 2-10-1 Okura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan; Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori, Yokohama 226-8501, Japan)

本総説は2008年度奨励賞を受賞した。

表1 中枢神経と末梢神経を構成する細胞の種類の比較

|                | 中枢神経       | 末梢神経      |
|----------------|------------|-----------|
| ニューロン<br>グリア細胞 | 海馬神経細胞など   | 感覚神経細胞など  |
|                | アストロサイト    | シュワン細胞    |
|                | オリゴデンドロサイト | (マクロファージ) |
|                | ミクログリア     | (繊維芽細胞)   |
|                | 上皮細胞       |           |

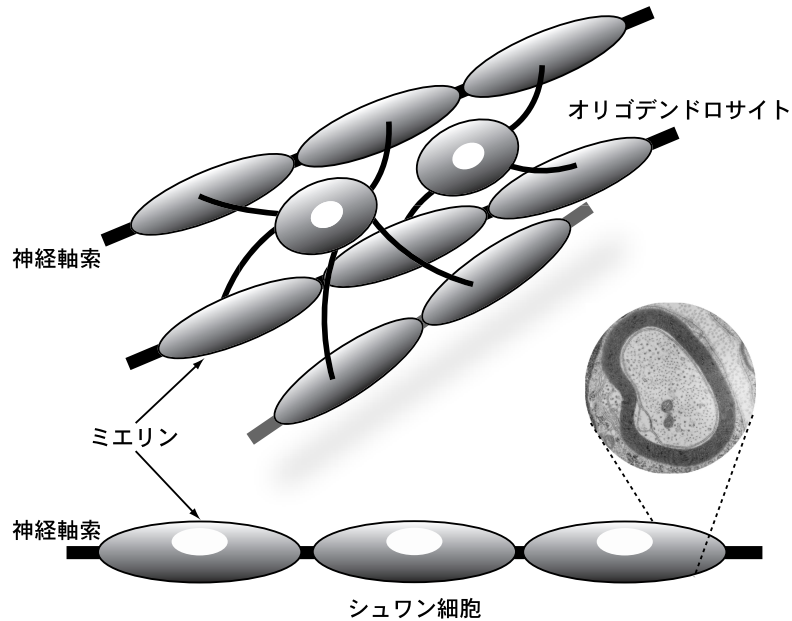


図1 中枢神経と末梢神経のミエリン構造

中枢神経ミエリンはオリゴデンドロサイトによって形成され（上図），末梢神経ミエリンはシュワン細胞によって形成される（下図）．丸枠内の電子顕微鏡写真の中央は神経軸索で，その周りをミエリンが囲っているのが分かる．

ン細胞がアストロサイトとオリゴデンドロサイトの2種類の細胞の役割を併せもつことが理由に挙げられる．つまり，シュワン細胞はニューロンの代謝活動を支える働きをもつと共に，ミエリン形成細胞としての役割ももつ（表1）．脳のように閉じられた環境では，損傷や炎症反応に対して応答できる特殊な細胞が存在しなければいけない．それに対し，末梢神経では神経線維が比較的血管に近い場所にあり，マクロファージのような免疫細胞が神経組織へ浸潤しやすい状態にあるため，マクロファージ様の役割をもつミクログリアは必要ないと推定されている．さらに，末梢神経組織内では繊維芽細胞と総称されている未知の機能をもつ細胞群が，上衣細胞の役割の一端を担うと考えられている．

最近，シュワン細胞と周辺組織の細胞の相互関係を再認識させる病態発症メカニズムが報告された<sup>1,2)</sup>．神経線維腫症I型（NF1，レックリングハウゼン病）である．この疾患は，末梢神経や皮膚に生じる良性腫瘍の一種で，外見的には皮膚に多発性・散在性のカフェ・オレ斑が見られることが特徴である<sup>3,4)</sup>．報告によると，NF1変異を有しているシュワン細胞が良性腫瘍を形成するためには，浸潤してくる好中球との絶え間ない相互作用を必要とし，好中球によって強く促進されるというものである．このことは，神経軸索がミエリンで覆われ，細胞間隙がほとんどないと考えられている末梢神経であるが，成熟後もさまざま細胞間相互作用が起こりうる柔軟性に富んだ組織であることを想像させる．ひいては，発生期における末梢神経は，我々が

想像しているよりはるかに幅広い，直接的あるいは間接的でダイナミックな細胞間相互作用を繰り返しているのではないかと考えられる．

## 2. 末梢神経ミエリンの形成過程とその構造

### (1) 末梢神経ミエリンが形成されるまでの過程

末梢グリアとニューロンは，胎生期に神経管と表皮の間に位置する神経堤細胞から分化する<sup>5,6)</sup>．神経堤から発生し，脊髄に沿ってそれぞれ一対存在する末梢神経の後根神経節（DRG）内部には，胎生初期において末梢ニューロン前駆細胞とシュワン細胞前駆細胞の両方が存在すると考えられている<sup>7,8)</sup>．とはいえ，末梢神経系の細胞系譜に関しては不明な点が多く残されており，シュワン細胞前駆細胞の定義についても未だに議論が絶えないところである．本稿では，胎生中期以降において神経軸索を伸長するニューロンおよびミエリン形成能力を有するシュワン細胞を，特に区別の必要がない限り，各々末梢ニューロン及びシュワン細胞と記述することにする．神経組織の形成は中枢神経の発生過程と同様に，末梢神経においてもまずニューロンが神経軸索を伸長することから始まる．最初に，接続すべき標的組織から神経栄養因子やネトリン様タンパク質などの誘因物質が放出され，神経軸索伸長が起こる．続いて，ミエリン形成過程に突入する<sup>9,10)</sup>．末梢神経のミエリンでは，1本の神経軸索に対して1個のシュワン細胞がミエリンをつくるのに対し，中枢神経においては1個のオリゴデンドロサイトが複数の神経軸索に対して，ミエリンを形成

する(図1)。そして、このミエリン形成過程は3過程、すなわち、①シュワン細胞が神経軸索上の目的の位置まで遊走する過程、②シュワン細胞が神経軸索に沿って二極性の突起を伸ばす前ミエリン過程、③その二極性の突起から多重層構造をもつミエリンが形成される過程、に分類される(図2)。マウスやラットにおいて、過程①は胎生中期から生後1-2日、過程②は生後数日間、過程③は生後数週間に相当する。この期間を統合すると、マウスやラットでも1ヶ月以上を費やし、ヒトにいたっては1年近くを要すると言われている。この間、それぞれの過程で絶え間なく、各々の細胞が他方の細胞を、液性因子や細胞接着因子を介して厳密に制御し合う。完成した有髄神経線維の長さは、代表的な末梢神経である座骨神経を例に挙げると、マウスやラットで数センチメートル、ヒトで1メートル近くに及ぶ。余談になるが、発生過程の研究で広く用いられる *Drosophila melanogaster* や *Caenorhabditis elegans* の神経組織には、哺乳類に見られるような特徴的なミエリン構造はないと考えられている。このことは、ミエリン形成の分子メカニズムの研究に遺伝学的手法を利用しにくいということを示しており、ミエリン研究が遅れている大きな原因のひとつにもなっている。

## (2) 末梢神経ミエリンの構造

ミエリンは、神経軸索の電気伝導効率を増加させる(情報処理機能の向上)ばかりではなく、強い神経軸索の保護

効果(外部刺激に対する耐久性の向上)を有する。ミエリンの形状はきわめて特殊化されたもので、グリア細胞由来の細胞膜からなる多重層から構成されている。限局的に述べると、ミエリンはシュワン細胞の細胞膜が分化したものであると言える。そのため、一見単純な細胞膜成分からできていると思われがちだが、跳躍電導に必要なランビエ絞輪(node of Ranvier)やシュミット-ランターマン切痕などの特殊な構造を有する<sup>11,12)</sup>。さらに、そのランビエ絞輪が存在する部位を中心として順に、ノード、パラノード、ジャクスタパラノード、インターノードとよばれる領域(ミエリンドメイン)に分かれている(図2)。それぞれの領域には特異的なタンパク質が発現しており、組織染色を行う上でのマーカーとしても利用されている。ノードにはβIV-スペクトリンが、パラノードにはキャスパー(Caspr)が、ジャクスタパラノードには電位依存型カリウムチャンネルKv1.1が特異的に発現している。ただし、インターノードに特異的に存在するタンパク質は知られていない。βIV-スペクトリンは細胞膜裏打ちタンパク質の一種で、Casprは末梢神経ではcontactinとcis-複合体を、neurofascinとtrans-結合体を形成することによりパラノード構造の安定化に寄与している。

## (3) 末梢神経ミエリンを構成する脂質と構造タンパク質

末梢神経ミエリンは、70-80%が脂質、20-30%がタンパク質から構成されている。主要な脂質は、グリセリドの

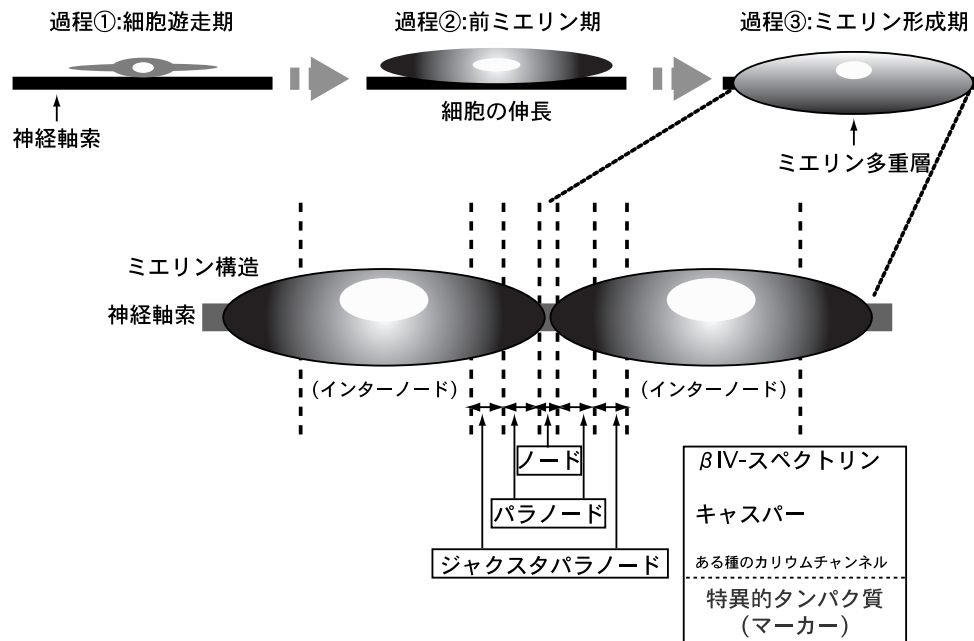


図2 末梢神経のミエリン形成過程と典型的なミエリンドメイン

胎生中期から生後まで過程①、過程②、過程③を経て、末梢神経ミエリンが形成される。完成したミエリンはいくつかのドメイン構造から成り、それぞれのミエリンドメインには特異的なタンパク質が発現している。

ような単純脂質、スフィンゴ脂質のような複合脂質、コレステロールなどの誘導脂質であり、ミエリン特異的な脂質構成成分はほとんどない。コレステロールはミエリン脂質の20-30%を占めており、その生物学的重要性が示唆され、実際にミエリン形成期にはコレステロールの生合成経路に属する酵素の発現が著しく上昇する。

一方、P0 (別名: MPZ, myelin protein zero) に代表されるミエリンを構成するタンパク質は末梢神経ミエリンに特徴的で、他の組織で発現していないか、発現していても非常に低いレベルにある<sup>11,12)</sup>。末梢神経ミエリンを構成するタンパク質は、P0が全体の半分以上を占め、次いでMBP (myelin basic protein, 5-15%), periaxin (約5%), PMP22 (peripheral myelin protein 22, 2-5%)<sup>13)</sup>, MAG (myelin-associated glycoprotein, 約1%), E (epithelial)-カドヘリン (1%以下)と続く (図3)。これらのタンパク質はシュワン細胞のミエリン化のマーカーとしても用いられ、ミエリン化とともに著しい発現上昇が見られる。PMP22<sup>9)</sup>とMAGは膜貫通型タンパク質であり、前者は4回膜貫通型構造を有し、後者は多くの受容体のように1回だけ細胞膜を貫通する。ミエリン膜間に存在するPMP22とMAGはそれぞれホモフィリックな相互作用を介して、ミエリン細胞膜同士の接着を促進する。periaxinは細胞膜内在性タンパク質であると考えられた時期もあったが、現在では細胞膜裏打ちタンパク質と考えられている。MBPは主として細胞膜の裏側に存在する構造タンパク質の一種である。E-カドヘリンは主として上皮系細胞に発現しているホモフィリックに結合する細胞接着因子であるが、数多くのプロテオーム解析でミエリンに検出されているミエリン構成タンパク質である。その役割はミエリン膜同士の結合に関与していると考えられている。ところで、E-カドヘリンに比べると圧倒的に発現量は少ないが、N (neuronal)-カドヘリンもミエリンに存在し、シュワン細胞と神経軸索との相互

作用に関係している。いずれのタンパク質もノックアウトマウスの解析からミエリン構造の維持に関与していることが確認されているが、それぞれが相補的な役割をもつケースが多い。これらのタンパク質は、ヒト末梢神経脱ミエリン病の原因遺伝子としても同定されており、それらの研究結果から末梢ミエリンにおける真の重要性が伺える (後述)。

#### (4) 末梢神経ミエリン形成に関与する転写因子

中枢神経系における神経幹細胞からニューロンへの発生過程の研究と同様に、シュワン細胞前駆細胞からシュワン細胞への分化、そしてミエリン形成までの各過程は、いくつかの転写因子によって特徴付けられている<sup>5,6,9,10)</sup>。しかし、中枢神経とは対照的に、末梢ではそれぞれの部位にそれぞれの転写因子をマッピングできるほど研究は進んでおらず、きわめて断片的な結果しか得られていない。例えば、ヘリックス・ターン・ヘリックス (HLH) 構造のDNA認識領域をもつホメオドメインタンパク質である *Pax3* 遺伝子のノックアウトマウスは、脳脱出や二分脊椎を伴う神経管欠損 (neural tube defect) という重篤な表現型を示し、一般的に中枢神経の初期発生で主要な転写因子として有名である。一方で、近年、末梢神経における *Pax3* の役割も明らかになってきており、*Pax3* がシュワン細胞前駆細胞からミエリンをつくる能力を有するシュワン細胞までの分化を制御すると考えられている。シュワン細胞の発生過程で、次に発現してくる転写因子がHLH型のPOUタンパク質である *Oct6/SCIP* である。*Oct6* 遺伝子をノックアウトすると、ミエリン形成開始前の段階にとどまっているシュワン細胞が多く残存することが知られている。しかし、*Oct6* がミエリンの構造維持に関与するタンパク質の発現に積極的に関わっているという直接的な証拠はなく、*Oct6* の真の標的遺伝子の解明が待たれる。発生段階で次

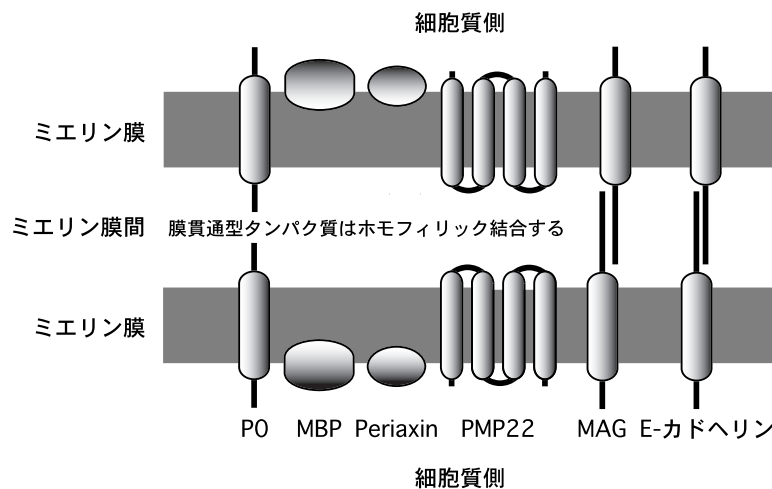


図3 末梢神経ミエリンを構成するタンパク質

に発現する重要な転写因子がジンクフィンガー型 DNA 認識領域をもつ Krox-20/Egr2 である。Krox-20 は、ミエリン膜が神経軸索を巻く段階を制御している転写因子である。Krox-20 遺伝子をノックアウトすると、最終的に不完全（未成熟）なミエリンが形成される。

上述の転写因子以外にも、ミエリン形成に必要な因子はいくつか報告がある。しかし、ひとつの転写因子をノックアウトしてミエリン形成が完全にみられなくなるという例は、Pax3 のノックアウトマウス以外にほとんど知られていない。つまり、転写因子レベルにおいても、ミエリン形成の遺伝子間に強い相補性があることが分かる。また、依然として、転写因子とミエリン形成に必須の酵素あるいは構造タンパク質の発現との関係に不明瞭な部分が多く残されている。今後の研究の進展が期待されている。

### 3. DRG ニューロンから放出される液性因子による末梢神経ミエリン形成の制御

#### (1) DRG ニューロンから放出される液性因子

シュワン細胞によるミエリン形成は、オートクライン作用を含めたシュワン細胞自体のプログラムが引き金になるというよりはむしろ、ニューロンとの細胞間相互作用を介して制御されていると考えられている。この相互作用は、N-カドヘリンなどの細胞接着因子を介するばかりではなく、ニューロンから多種類のタンパク質性因子や生理活性脂質などが放出され、それぞれの因子がそれぞれのミエリン形成過程に対して特有の効果をもつことが知られている。現在まで、DRG ニューロンの培養上清に含まれる因子として、TGF- $\beta$ （トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ ）<sup>14)</sup>、IGF-1（インスリン様増殖因子-1）<sup>15, 16)</sup>、PDGF-AA（血小板由来増殖因子-AA）<sup>15, 16)</sup>、リゾホスファチジン酸<sup>17)</sup>が知られている。また、これらの因子以外にも、細胞内サイクリック AMP がミエリン形成に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、実際にどのリガンド分子が作用してシュワン細胞内のサイクリック AMP を上昇させるかに関しては、はっきりした結論が得られていない。末梢神経に強く発現している PACAP（下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド）や VIP（血管作動性腸管ペプチド）が有力な候補であると考えられている<sup>18)</sup>。しかし、これら以外のニューロン由来のミエリン制御因子に関してはほとんど不明である。さらに、これらの因子のなかには必ずしもニューロンだけから放出されるものばかりではなく、シュワン細胞自体から放出されるものもあり、それぞれの関係は非常に複雑である。

#### (2) DRG ニューロンから放出される神経栄養因子

筆者らは DRG ニューロンから放出される液性因子に着目してその培養上清を生化学的に分画し、その中に神経栄

養因子ファミリーが存在することを明らかにした。神経栄養因子ファミリーは、Levi-Montalcini 博士により発見され、Shooter 博士により精製された NGF（神経成長因子）をはじめとし、哺乳類のニューロンの生存維持に必須の他の 3 種類の神経栄養因子、すなわち、BDNF（脳由来神経栄養因子）、NT（神経栄養因子）3、NT4/5 がある<sup>19, 20)</sup>。神経栄養因子受容体はそれぞれの神経栄養因子に特異的なチロシンキナーゼ型受容体である Trk ファミリー、とすべての因子に結合可能で、細胞内領域に酵素活性がない低親和性神経栄養因子受容体 p75 に分類される<sup>19, 20)</sup>。この 2 種類の受容体の間にはホモロジーが全くない。NGF は TrkA に、BDNF と NT4/5 は TrkB に、NT3 は TrkC に結合するが、すべての神経栄養因子は p75 受容体にも結合できる。さて、筆者らの研究グループにより、DRG ニューロンの培養上清には BDNF と NT3 が含まれていることが判明した<sup>21, 22)</sup>。一方、シュワン細胞の培養上清中にこれらの因子は検出できなかった。NGF に関しては判断が難しい。というのも、NGF は DRG ニューロンの生存維持因子であるため、培地の必須成分であり、ニューロンのオートクライン因子でもあるためである。

次に、BDNF と NT3 の放出量がミエリン形成の各過程でどのように変動するかを検討した。この検討にはニューロン-グリア共培養を用いた。これは、胎生中期から生後までの長期間に渡る末梢神経のミエリン形成過程を *in vitro* で再現する実験系であり、マウスやラットの DRG からニューロンを、座骨神経からシュワン細胞を各々 95% 以上の高純度で精製し、それらを同一シャーレ内で共培養する独自の初代共培養システムである（図 4）。つまり、過程①：シュワン細胞遊走期、過程②：前ミエリン形成期、過程③：ミエリン形成期、のすべての時期を実際の生体内のタイムコースとほぼ同じように *in vitro* で再現できる。興味深いことに、BDNF と NT3 の放出量は各過程において一定ではなく、特に NT3 は著しく変動することが分かった。すなわち、シュワン細胞を DRG ニューロンと共培養し始めると、培養液中の NT3 は著しく増加し、その後、過程②で徐々に減少し、過程③ではほとんど検出できなくなる。一方、BDNF は過程①から②までほぼ一定のレベルを保つが、過程③の後期ではやや減少傾向にあった。これらの結果から予想されることは、NT3 がシュワン細胞の遊走過程を促進し、NT3 が消失したあと BDNF の生理的効果が現れ、BDNF がその後のミエリン形成過程を制御するのではないかということである。詳細に調べたところ、NT3 はシュワン細胞の遊走を正に制御するばかりではなく、ミエリン形成を阻害した。一方、BDNF はミエリン形成を促進する役割をもつばかりではなく、シュワン細胞の遊走を強く阻害した。つまり、NT3 と BDNF は同じ神経栄養因子ファミリーであるにもかかわらず、ミエ



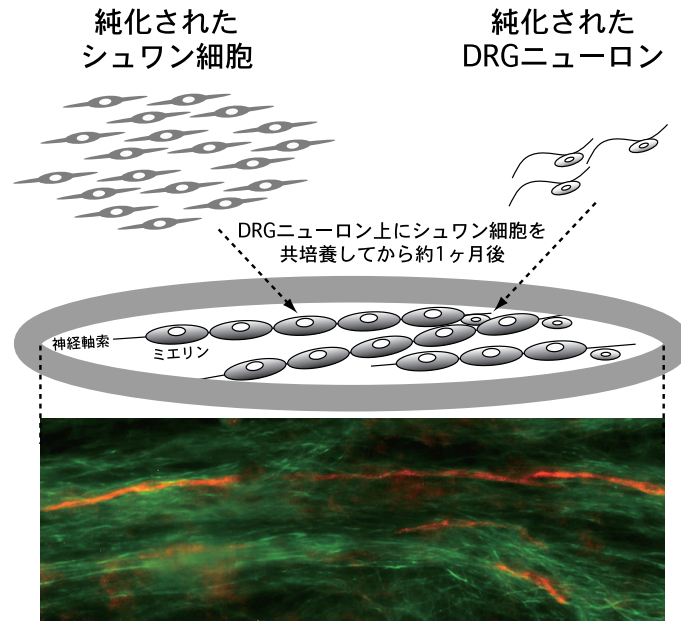


図4 シュワン細胞-DRG ニューロン共培養

マウスやラットのシュワン細胞と DRG ニューロンをそれぞれ別々に単離し精製する。その後、DRG ニューロン (写真: 緑) を培養しているシャーレの上にシュワン細胞をまき、ミエリン (写真: 赤) が形成されるまで培養する。共培養は *in vivo* でのミエリン形成を再現していると考えられている。

リン形成に対して相反する役割をもっていることになる。この現象は、NT3 と BDNF がまったく異なったシグナル伝達経路を活性化させることを想像させるのに充分であった<sup>21, 22)</sup>。結論として、過程①では、NT3 がシュワン細胞膜上の TrkC に結合して細胞遊走を促進する。過程②にはいると、NT3 に代わって BDNF の効果が見られるようになり、シュワン細胞膜上の p75 受容体を介して細胞遊走を停止させ、シュワン細胞の形態変化を引き起こす。そして、過程③では p75 受容体を介した BDNF シグナルがミエリン形成を促進するのである (図 5)。これらの現象は *in vivo* でも証明できている。

#### 4. Dbl ファミリーの交換因子による神経栄養因子からの末梢神経ミエリン形成の分子メカニズム

##### (1) 神経栄養因子からの Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化

NT3 による TrkC の活性化と BDNF の p75 受容体への結合は、どのような細胞内シグナル伝達経路を活性化するのだろうか。神経栄養因子のシグナル伝達経路は多く知られているが、筆者らは多くの生理作用に関与している低分子量 GTP 結合タンパク質に着目して研究を進めた<sup>23)</sup>。低分子量 GTP 結合タンパク質は、Ras ファミリー、H-, K-, N-Ras 分子とホモロジーを有する遺伝子産物として単離され、GTP 結合能を指標に生化学的に同定された Rho ファ

ミリー、Arf ファミリー、Rab ファミリー、Ran に大別される。すべてを合わせるとおよそ 150 種類あり、その機能は多彩である<sup>24-27)</sup>。簡潔に述べると、Ras ファミリーは細胞の増殖や分化を、Rho ファミリーは細胞の形態変化を、Arf ファミリーと Rab ファミリーが細胞内小胞器官の相互輸送を、Ran は核膜間の輸送を制御する。これらの分子は 30 年近くに渡って盛んに研究されており、多くの優れた総説がある。簡単にその分子メカニズムを述べる。低分子量 GTP 結合タンパク質は、主に GTP 結合型の活性型と GDP 結合型の不活性型の 2 種類の構造をとる分子スイッチとして機能している。一般的に、上流からのシグナルによって GDP 結合型の低分子量 GTP 結合タンパク質は GTP 結合型に変換されて構造変化が起き、その結果、エフェクター分子と結合できるようになり、さらに下流にシグナルが伝達される。

シュワン細胞と低分子量 GTP 結合タンパク質という関係で真っ先に連想することは、神経線維腫症 I 型原因遺伝子 *nf1* が Ras を負に制御するタンパク質をコードしていることである。先にも述べたように、NF1 は主として良性腫瘍の形成に関与するため、たとえシュワン細胞内である程度 Ras が活性化状態にあっても、その細胞遊走能に極端な変化を与えないと推定できる。つまり、Ras ファミリー以外の低分子量 GTP 結合タンパク質がシュワン細胞の形態変化に積極的に関与しているということが推測さ

れ、なかでも Rho ファミリーはその筆頭候補であると考えられた。筆者らが研究を始めた当初、シュワン細胞で Rho ファミリーを中心とした分子メカニズムを報告した事例は皆無に等しかった。そこでまず、神経栄養因子からのシグナル伝達経路に Rho ファミリーが関与しているかを明らかにするために、阻害剤を用いて実験を行った。その結果、ミエリン形成の過程①において、主要な Rho ファミリー分子の下流経路を阻害できる *Clostridium difficile* 毒素 B が NT3 によるシュワン細胞の遊走促進効果を阻害し、Rho サブファミリー特異的 *Clostridium botulinum* 外毒素 C が BDNF による遊走阻害効果を解除することが明らかになった。このようにタンパク質性阻害剤、薬理的阻害剤、RNA 干渉法を用いてシグナル伝達経路上の分子を明らかにしていった。また、これと並行して、阻害剤などの標的となった分子の活性が実際に神経栄養因子によって制御されているかを調べた。結論として、NT3 が Rho ファミリーの Rac1 と Cdc42 を活性化し、さらにその下流経路である JNK 経路を制御し<sup>28)</sup>、細胞遊走を促進することが分かった<sup>22)</sup>。JNK の標的分子は、細胞間隙の接着斑に存在する足場タンパク質バキシンで、その 178 番目のセリンが JNK によりリン酸化され、アクチン骨格系が直接制御されている<sup>29,30)</sup>。一方、BDNF は Src ファミリーの非受容体型チロシンキナーゼ(シュワン細胞では Fyn, Yes, c-Src が発現している)を活性化して、RhoA とそのエフェクター分子である Rho キナーゼを介して細胞遊走を阻害する<sup>31,32)</sup>。シュワン細胞上の主要な BDNF 受容体は p75 であ

るが、p75 受容体と Src ファミリーチロシンキナーゼは直接的に相互作用しなかった。そのため、p75 受容体の細胞質領域に結合する Traf6 が Src ファミリーチロシンキナーゼのアダプター分子として機能し、p75 受容体からのシグナルを細胞内に伝達すると考えられる。

## (2) Dbl ファミリーの交換因子を介したユニークなミエリン形成の分子メカニズム

さて、残る問題は受容体から低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化に関与する分子の同定である。細胞内においては、低分子量 GTP 結合タンパク質のグアニンヌクレオチド結合状態を制御する特異的な分子が存在する。それは、GDP 型から GTP 型へのヌクレオチド交換反応を促進する低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化因子、すなわち交換因子 (GEF, guanine-nucleotide exchange factor)<sup>26,27)</sup> と、GTP の加水分解反応を促進する低分子量 GTP 結合タンパク質の不活性化因子、すなわち GTPase 活性化因子 (GAP, GTPase activating protein) である。これらの 2 種類の制御分子はすべての低分子量 GTP 結合タンパク質にほぼ例外なく存在している(と考えられる)が、いくつかの低分子量 GTP 結合タンパク質には GDP 型を維持する役割を有する GDP 解離抑制タンパク質 (GDI, GDP dissociation inhibitor) がある。重要なことは、これらの制御分子の種類が低分子量 GTP 結合タンパク質のそれよりもはるかに多く、比較的組織特異的な発現分布を示すことである。このことは、制御分子が細胞内シグナル伝達の特異性

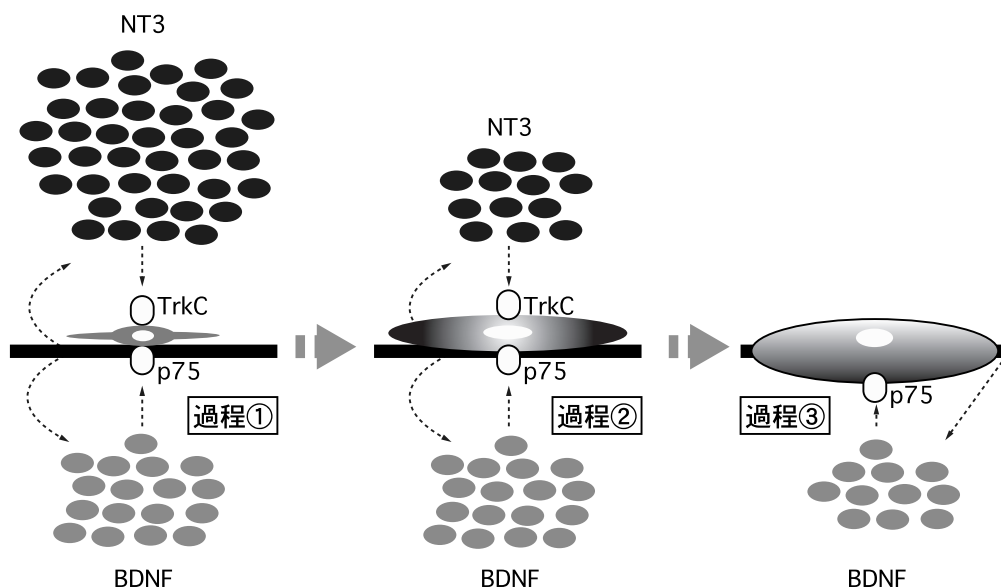


図5 神経栄養因子を介した末梢神経ミエリン形成

DRG ニューロンから NT3 が放出され、TrkC 受容体を介してシュワン細胞によるミエリン形成過程①が促進される。その後、NT3 の量が激減し、かわって BDNF のシグナルが中心になる。この DRG ニューロン由来の BDNF はシュワン細胞の p75 受容体シグナルを活性化し、過程③までのミエリン形成を制御する。

の決定やさまざまな細胞内シグナルの統合を担っているということを示唆している。つまり、上流からのシグナルを直接受け、低分子量 GTP 結合タンパク質を活性化する交換因子が同定できれば、それぞれのシグナル伝達に特有の分子メカニズムが自ずと明らかになるはずである。現在までに Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパク質の交換因子はヒトゲノム上に 70 種類以上存在する。これらの交換因子は、そのプロトタイプである *dbl* (*diffusible B cell lymphoma*) 原がん遺伝子産物に由来して Dbl ファミリーと呼ばれ、Rho ファミリーに対して触媒活性をもつ Dbl ホモロジー (DH) ドメインをもつ。また、DH ドメインに近接して膜脂質との結合に関与する PH (pleckstrin homology) ドメイン、またはそれに類似した機能を有する領域をもち、DH ドメインと共にひとつのユニットを構成している。このユニットは、Rho ファミリー交換因子の細胞生理機能を示す最小単位であると考えられ、構造学的に PH ドメインが DH ドメインの触媒活性を補佐する役割をもつ交換因子も存在する (図 6)。

では、シュワン細胞にはどの Dbl ファミリーの交換因子が存在しているのだろうか。まず、ミエリン形成の過程①の分子メカニズムを調べるために、マルチパネル PCR 法を利用し、Dbl ファミリーの発現を調べた。その結果、ミエリン化が起こる前のシュワン細胞の主要な交換因子は Tiam1, Dbs/Ost/KIAA0362, Vav2 であった。Tiam1 は Rac1 に、Dbs は主として Cdc42 に、Vav2 は主として RhoA に対して活性を示すことが知られている。そこで、実際に

シュワン細胞内で交換因子の挙動を調べたところ、期待された通りに、NT3 は Tiam1 を介して Rac1<sup>33,34)</sup> を、Dbs を介して Cdc42<sup>35)</sup> を活性化すること、また BDNF は Vav2 を介して RhoA<sup>31)</sup> を活性化することが確認された。また、それぞれの経路において交換因子の活性化機構は、非常にユニークなものであることが分かった。すなわち、NT3 から TrkC-Tiam1 経路では、TrkC と Tiam1 の間に Ras が介在し、Ras は *in vitro* では直接 Tiam1 を活性化できないものの、Ras・GTP 依存的に Tiam1 を細胞膜に移行させ、間接的にその活性化に関与していることが推測された (未発表)。これに対して、NT3 から TrkC-Dbs 経路では、TrkC は直接的な Dbs のチロシンリン酸化と活性化を引き起こした。ここまでの NT3 からの細胞内シグナル伝達をまとめると、活性化され自己リン酸化された TrkC は、アダプタータンパク質を引き寄せて Ras 活性化を誘導し、Tiam1-Rac1 ユニットを制御する。また同時に、TrkC は Dbs をリン酸化し、Dbs-Cdc42 ユニットを活性化する。これらの二つのシグナルは JNK 経路で合流し細胞遊走を促進する (図 7)。一方、BDNF は p75 受容体を介して Src ファミリーチロシンキナーゼを活性化し、Vav2 の 172 番目のチロシン残基のリン酸化を誘導し、Vav2 を活性化する。その結果、RhoA が活性化され、下流の Rho キナーゼ経路を介して細胞遊走が阻害される (図 7)。これらがミエリン形成の過程①から②で起こっている現象であると考えられる。

いくつかの細胞で、Rac1 と Cdc42 は RhoA と機能的に相反することが知られている。それは、Rac1 と Cdc42 が活性化されているような状況では RhoA が不活性化されており、逆に、RhoA が活性化されていると Rac1 と Cdc42 が不活性化されているという現象である。つまり、神経栄養因子受容体を介したミエリン形成過程のシグナル伝達メカニズムは、少なくともミエリン形成の過程①において、リガンド-受容体 (NT3-TrkC vs BDNF-p75 受容体) レベルのみならず、細胞内シグナル伝達分子 (Tiam1-Rac1 と Dbs-Cdc42 vs Vav2-RhoA) レベルにおいても相反する経路を介していることが分かる。

それでは、ミエリン形成の過程③で神経栄養因子シグナルはどのように変化していくのだろうか。この過程に入ると、NT3 からのシグナルはほとんどなくなり、それに代わって BDNF シグナルが台頭してくる。つまり、BDNF-p75 受容体からの RhoA-Rho キナーゼ経路が優位になり、ミエリン化を促進すると考えられている<sup>32)</sup>。これは、ニューロン-グリア共培養の結果から明らかにされている。しかし、BDNF-p75 受容体のシグナルは過程③の初期を境に減少するため、これ以降のミエリン形成過程において、どのように RhoA が制御されているのか不明である。この過程③の初期は、ミエリン膜の最も先端部分にミエリン形成を司る p75 受容体が集積する時期と重なるため、非常に

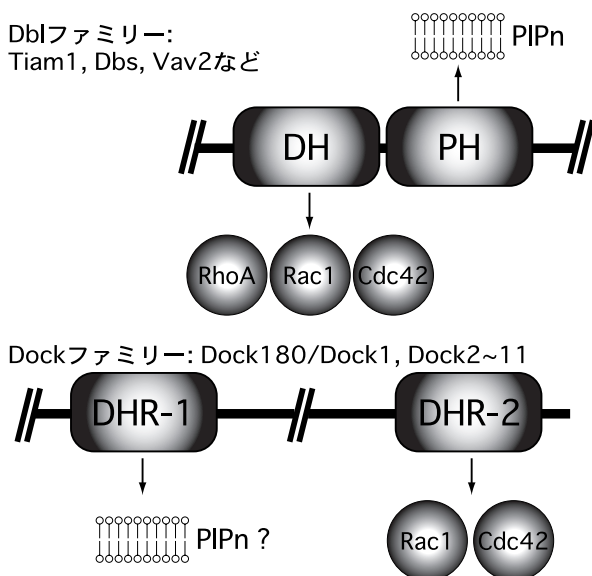


図6 Rhoファミリーを活性化する交換因子  
Dbl ファミリーの交換因子は 70 個以上存在し、Dock ファミリーの交換因子は 11 個存在する。それぞれ類似した機能をもつ典型的なタンパク質ドメインから構成されている。



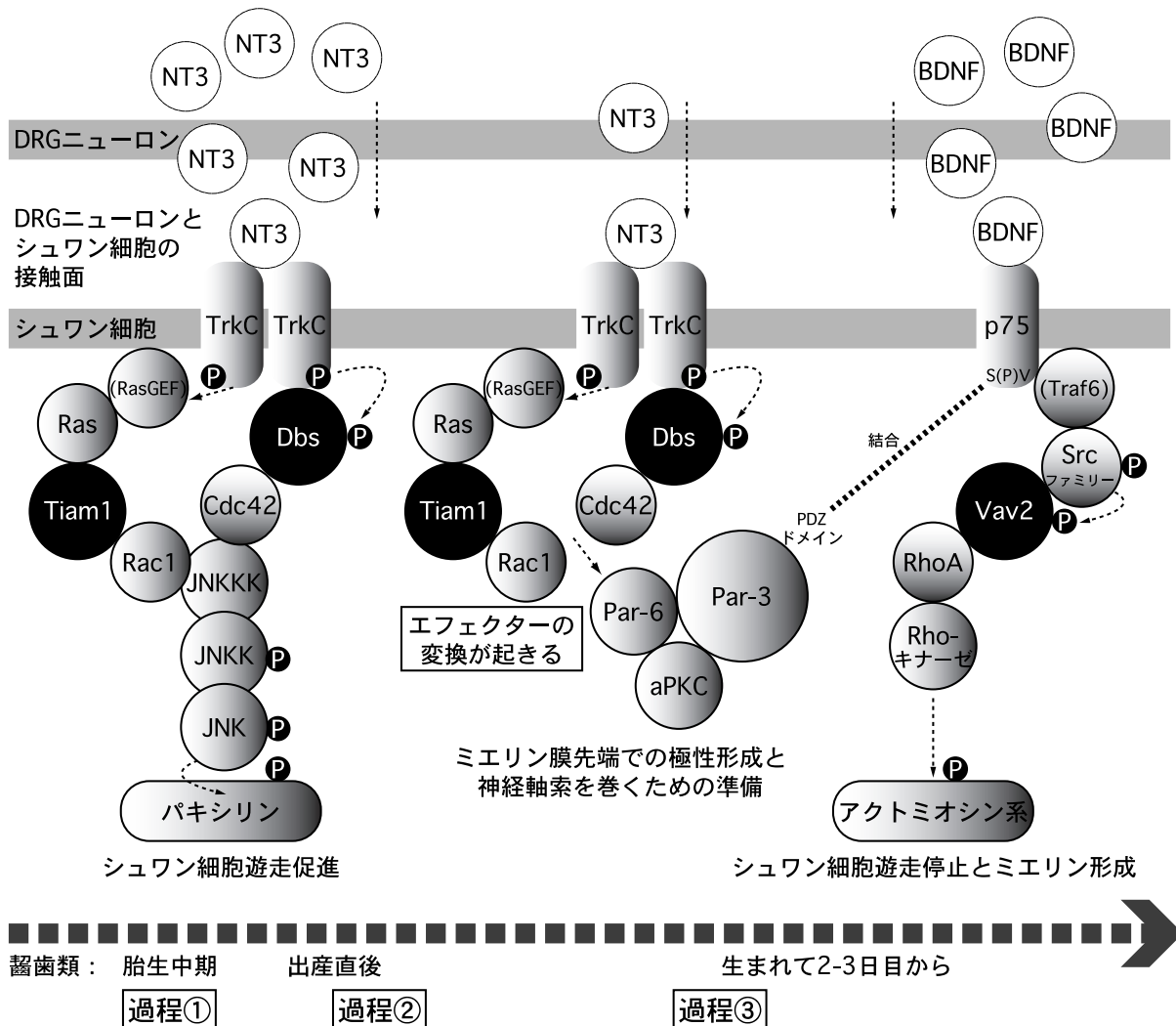


図7 神経栄養因子受容体を介した末梢神経ミエリン形成の分子メカニズム

ミエリン形成過程が進行するとともに徐々にシグナルが変化し、リガンド-受容体 (NT3-TrkC 受容体から BDNF-p75 受容体) レベルばかりではなく、細胞内シグナル伝達分子 (Tiam1-Rac1 と Dbs-Cdc42 から RhoA-Vav2) レベルでも相反する経路に移行する。もうひとつ重要なことは、ミエリン形成過程①から②に至る間に Rac1 と Cdc42 のエフェクターが JNK 経路から細胞極性分子に変化することである。

重要であると考えられている。これまでに得られている様々なエビデンスを集積すると、この過程③の初期では以下のような時間軸依存的な分子メカニズムが背景にあると推察される。まず、過程②で Rac1 と Cdc42 からの JNK 経路は、JNK 経路に属する分子の発現低下と JNK 阻害タンパク質の発現上昇<sup>28)</sup>によって、経路全体としてその活性が減弱する。次に、おそらく局在化した活性化型 Rac1 と Cdc42 がエフェクターである極性分子 Par-6 を介して極性分子複合体の構成分子 Par-3 と結合し、Par-3 と結合した p75 受容体をミエリン膜の先端部分に局在化させる<sup>36)</sup> (図 7)。では、なぜ p75 受容体が膜先端部分になければならないのだろうか。その答えのひとつは、DRG ニューロンから放出される BDNF が p75 受容体に結合しやすくなるた

めであろう。

さて、数年前から中枢神経における p75 受容体の研究が飛躍的に進み、特に神経軸索の反発作用に関与する因子としての重要性が明らかになってきた。それは、神経軸索上にある p75 受容体と同じファミリーに属する TROY (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19) 受容体が Nogo 受容体及び LINGO (leucine rich repeat and Ig domain containing)-1 と複合体を形成し、中枢神経ミエリン上に存在する Nogo や MAG や OMgp などのリガンドに応答するというものである。このリガンドと受容体が発現している細胞の関係は、末梢神経のミエリン形成の場合と比べて逆である。しかし、重要なことはどちらの場合でも p75 受容体の下流分子が RhoA であることである。中枢神経で起き

ている現象が必ずしも末梢神経で起きているわけではないが、これらの分子の発現は末梢神経で詳しく調べられておらず、中枢神経との相関性と類似点という研究の観点からも今後末梢神経での詳細な発現マップとその役割の解明が必要であろう。また、Par-3はp75受容体ばかりではなく、他に多くの細胞膜や細胞内分子と結合できるため、末梢神経におけるPar-3の結合分子の全体像を明らかにすることもミエリン膜の巻き始めの分子メカニズムを明らかにする上で必要であろう。

ところで、ミエリン膜が神経軸索を巻いている間も、ミエリン膜の先端において、局在化したRac1とCdc42（とおそらく、RhoAも含めた3分子間）の時間空間的な活性化と不活性化のサイクルが絶えず回転していると考えられる。最近、ヒト末梢神経脱ミエリン病の原因遺伝子産物として二つの研究グループからFrabin/FGD4が同定され、Frabin遺伝子の変異が原因でミエリン形成不全が起こる可能性があるという報告がなされた<sup>37,38)</sup>。さらに、GEF10/ARHGEF10の変異とヒト末梢神経ミエリン形成不全の関係も示唆されている<sup>39)</sup>。FrabinはCdc42に特異的、GEF10はRhoAに特異的な交換因子である。ミエリン化が起こる前のシュワン細胞において、Tiam1とDbsとVav2は、FrabinとGEF10と比べると圧倒的に発現量が多い。しかし、FrabinとGEF10の発現量がミエリン形成の後期過程で極端な変化を示すと仮定するならば、FrabinとGEF10はミエリン形成の過程③においてCdc42とRhoAの活性を時空間的に制御する交換因子である可能性がある。

ニューロン-グリア共培養を基礎として、シュワン細胞のミエリン形成過程を司る神経栄養因子受容体下流のシグナル伝達分子群が明らかになった。今後、それぞれの経路に含まれる中心的な遺伝子を組織特異的にノックアウトし、それぞれの遺伝子がどのようにミエリン形成に関与しているかを確認する必要があるだろう。

## 5. DRGニューロンに存在する膜結合型ニューレグリン-1によるシュワン細胞の遊走制御

DRGニューロンの培養上清を生化学的に分画している過程で、シュワン細胞の遊走を強く促進し、NRG1（ニューレグリン-1）のEGF様リガンドドメインに対するモノクローナル抗体と交差する画分を見出した。NRG1遺伝子は、統合失調症の脆弱性因子としてよく知られており、その研究は非常に活発である<sup>40,41)</sup>。NRG1は、アルタナティブスプライシングによって、15種類以上のフォームが形成される。すべてのスプライシングバリエントにはEGF様のリガンドドメイン（このドメインのみから成るリコンビナントタンパク質は*in vitro*でNRG1の活性を代用できる）が共通して存在するが、他の部分に関しては非常に多様性に富んでおり、その構造的特徴から3種類に大

別される。I型NRG1は1回膜貫通型であり、細胞外に免疫グロブリン様ドメインと糖鎖が付加されるドメインがあり、大きな細胞内領域をもつ。II型は可溶性であり、I型と同様に細胞外に免疫グロブリン様ドメインと糖鎖付加ドメインをもつが、細胞内領域をもたない。III型も膜貫通型構造を有するが、免疫グロブリン様ドメインも糖鎖付加ドメインももたない。代わりに細胞膜を貫通する長いN末端領域を有し、I型と同じ部分でさらにもう1回細胞膜を貫通する。（すなわち、2回膜貫通型構造をとると推定されている。）最近、これらの分類に当てはまらない新しいバリエントも発見され、IV型と分類されることもあるが、これは基本的にはI型と類似した構造を有している<sup>42)</sup>。I型及びIII型NRG1は、ADAM（a disintegrin and metalloprotease）ファミリーのプロテアーゼやアミロイド前駆体タンパク質を切断するβセクレターゼBACE1によって切断され、複数回にわたるプロセッシングを受け、最終的に低分子量の可溶性EGF様リガンドになると考えられている<sup>43-46)</sup>。

では、DRGニューロンの培養上清中に存在し、シュワン細胞の遊走を強く促進するNRG1はどのタイプに由来するのだろうか。研究当初、我々はそのNRG1活性は可溶性のII型NRG1に由来するものであると推定していた<sup>47)</sup>。しかし、II型NRG1は中枢神経、特に脳下垂体で発現が高いのに対し、末梢神経での発現はきわめて低く、実際に我々が用いたDRGニューロンにもII型NRG1に相当する分子量のNRG1タンパク質は検出されなかった<sup>43)</sup>。また、III型NRG1も末梢ニューロンに存在するが、ほぼすべてのミエリン形成過程で一定量発現しており、III型NRG1が特に過程①に強く関与しているとは考えにくかった。一方、I型NRG1は末梢ニューロンに存在し、ミエリン形成の過程①で高い発現量を示していたため、I型NRG1が遊走促進因子の有力な候補であると推定された。その後のプロテオーム解析により、筆者らが見出したDRGニューロンの培養上清にあるNRG1は、主としてI型NRG1由来であることが判明している（未発表）。一方、III型NRG1に関する生理的な解析は比較的進んでいる。遺伝子改変マウスの解析から、III型は末梢神経においてミエリンが神経軸索を巻くミエリン形成後期過程で重要な分子であることが判明している<sup>48,49)</sup>。

このように、ミエリン形成過程で広い役割を果たすNRG1は、どのスプライシングバリエントもすべて同じ受容体複合体に結合できることが知られている。それが、EGF受容体ファミリーであるEGF（またはErbB1）、ErbB2、ErbB3、ErbB4である<sup>40,41)</sup>。これらの受容体は、すべてほぼ同一の構造を有している。細胞外領域は、連続したシステインボックスから構成され、細胞内にはチロシンキナーゼドメインがある。しかし、ErbB2はリガンド結合能がな

く、ErbB3 はキナーゼ活性がないかきわめて弱い。この受容体ファミリーのなかで、シュワン細胞には ErbB2 と ErbB3 が顕著に発現していることが知られている。これに対して、ErbB4 の発現量はかなり低いため、ErbB2 が活性化されるためには ErbB3 との二量体形成が必須条件である。我々の結果からも、DRG ニューロンの培養上清中の NRG1 がシュワン細胞膜上の ErbB3 に結合し、そのシグナルが ErbB2 に伝達され、シュワン細胞の遊走を促進することが判明したのである。

## 6. 非典型的交換因子 Dock7 の活性化メカニズムと末梢神経ミエリン形成

### (1) Dbl ファミリーの交換因子に依存しないニューレグリン-1 (NRG1) によるシュワン細胞の遊走促進

NRG1 が ErbB3-ErbB2 複合体に結合すると、Rac1 と Cdc42 が活性化され、下流の JNK 経路へとシグナルが伝達される。その結果、パキシリンの 178 番目のセリンがリン酸化され、直接アクチン骨格系が制御され、シュワン細胞の遊走が促進されるという経路が明らかとなった (図 8)。この経路は、ミエリン形成の過程①における神経栄養因子を介する細胞内シグナル伝達経路とまったく同じである。このことは、他の細胞遊走促進シグナルも少なくとも部分的に、Rac1 と Cdc42 からパキシリンまでの経路に合流し、過程①におけるシュワン細胞の共通のシグナル伝達

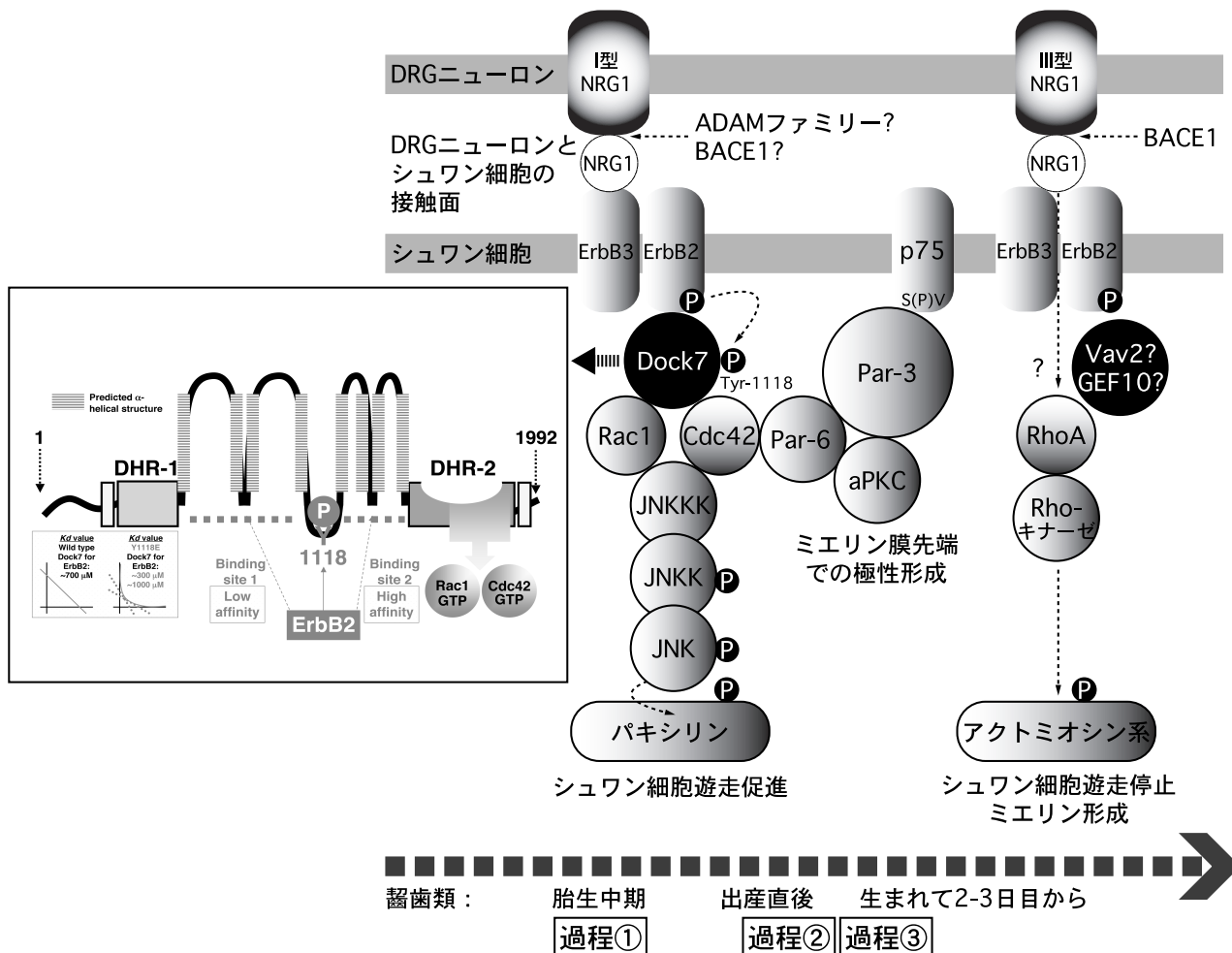


図 8 ErbB3-ErbB2 受容体を介した末梢神経ミエリン形成の分子メカニズム

神経栄養因子受容体を介する経路と類似しているが、受容体と交換因子の関係に特異性がある。図中の Dock7 の二次構造は一次構造から推定されたものである。興味深いことに、定常状態の ErbB2 と Dock7 の結合定数は  $\sim 700 \mu\text{M}$  であるが、リン酸化部位に偽リン酸化変異 (Y1118E) をいれると高親和性 ( $\sim 300 \mu\text{M}$ ) と低親和性 ( $\sim 1,000 \mu\text{M}$ ) の 2 個の結合部位をもつようになる。

経路を構成する可能性が高いことを意味している。

さて、NRG1 下流で機能する交換因子は何だろうか。低分子量 GTP 結合タンパク質の制御分子は、細胞内シグナル伝達の特異性を決定したり、さまざまな細胞内シグナルを統合する役割を担っている。NRG1 シグナルの経路上に存在する分子のうち、Rac1 と Cdc42 からパキシリンまでの経路が神経栄養因子を介する経路と共通であるため、交換因子もまた、神経栄養因子下流と同じくシュワン細胞で高発現している Tiam1 と Dbs であると推定できる。その確認実験を行うために、Tiam1 と Dbs に対する RNA 干渉を行った。しかし、驚くべきことに、Tiam1 や Dbs の small interference (si) RNA は NRG1 によるシュワン細胞の遊走促進効果に影響を及ぼさなかった。

## (2) 非典型的交換因子 Dock7 の関与

NRG1 下流のシグナルに、どのような交換因子が関与しているのだろうか。松田博士(京都大学)らは、アダプター分子 CrkII の SH (Src homology) 3 ドメインに結合するタンパク質として、Dbl ファミリー交換因子と相同性をもたない Rac1 特異的で 180k の分子量をもつ巨大な新規の交換因子 Dock180/Dock1 を同定した<sup>50,51)</sup>。2001 年にほぼすべてのヒトのゲノム配列が明らかになった後、この非典型的な交換因子に類似したものがヒトゲノム上に他に 10 種類存在することが示唆された。これらは Dock ファミリー交換因子と総称され、Dock180/Dock1 に習い、順に Dock2 から Dock11 と命名されている(ただし統一名称ではない)<sup>52,53)</sup>。筆者らは、まずゲノム情報やその部分配列情報をもとに、シュワン細胞に発現している Dock ファミリーを明らかにした。その結果、Dock7 が最も高発現で、次いで Dock180, 3, 4, 5, 8, 11 が中程度に発現していることが分かった。次に、シュワン細胞でそれぞれの分子に対する RNA 干渉実験を行ったところ、Dock7 の siRNA が NRG1 によるシュワン細胞の遊走を強く阻害することが判明した<sup>54)</sup>。したがって、Dock7 の全長のクローニングに着手し、その全長単離に成功した (GenBank Ac. No. DQ118679/DQ118680/DQ309763/DQ109674/DQ124295)。現在では、すべての Dock ファミリー遺伝子の全長が遺伝子バンクに登録されている。ところで、Dock ファミリーは、その構造的特徴から大きく 3~4 群に分類される。Dock-A/B グループ (Dock180, 2, 3, 4, 5)、Dock-C グループ (Dock6, 7, 8)、Dock-D グループ (Dock9, 10, 11) である。それぞれにいくつかのスプライシングバリエーションが存在し、いずれも分子量 180k 以上の巨大分子である。すべての分子に共通したドメイン構造として、N 末端側に DHR-1/CZH1, C 末端側に DHR-2/CZH2/Docker がある(図 6)。DHR-1 は、イノシトールリン脂質結合領域であると考えられているが、すべての Dock ファミリーの DHR-1 がイ

ノシトールリン脂質に結合するかどうか不明である。DHR-2 は触媒活性を担っているが、先に述べた交換因子に共通に含まれる DH ドメインとはアミノ酸レベルで全く相同性をもたない。Dock-A/B グループの DHR-2 は Rac1 に、Dock-D グループの DHR-2 は Cdc42 に特異性を示すと考えられている。Dock ファミリーの DHR-1 と DHR-2 の関係は、Dbl ファミリーの DH ドメインと PH ドメインの関係を連想させるが、Dbl ファミリーのように三次構造的にも隣接したひとつのユニットを形成しているかどうかは、今後の研究課題である。また、Dock-A/B グループには、N 末端に SH3 ドメインがあり、アダプタータンパク質の一種である Elmo1, Elmo2, Elmo3 と結合する。さらに、C 末端にプロリンに富んだ領域をもち、CrkII などのアダプタータンパク質の SH3 ドメインと結合する。一方、Dock-D グループの N 末端には PH ドメインがあり、リン脂質との結合に関与している。さらに、DHR-1 や PH ドメイン以外にもリン脂質の結合に関与するアミノ酸配列が知られている。また、一次構造的に、すべての Dock ファミリーの N 末端から C 末端までコイルドコイル構造が点在する。

シュワン細胞での Dock7 の役割を明らかにする前に、Dock7 の生化学的特性を調べたところ、Dock7 の DHR-2 は Rac1 と Cdc42 の両方に特異性を示し、Rac1 に比べて Cdc42 に強い活性を示すことが分かった<sup>54)</sup>。この特異性は、同じ Dock-C グループに属する Dock6<sup>55)</sup> と Dock8 (未発表) でも同様の結果であった。そして、さらに詳細な解析を進めたところ、「ErbB2 が Dock7 と複合体を形成すること」、「ErbB2 が Dock7 を直接チロシンリン酸化すること」が判明した。そこで、このチロシン残基を同定すべく、*in vitro* で詳細なリン酸化実験を行い、ErbB2 は Dock7 の 1118 番目のチロシンを直接リン酸化することを明らかにした。次に、1118 番目の周辺配列特異的リン酸化抗体を作成し、これを用いてシュワン細胞内での Dock7 の挙動を検討したところ、NRG1 刺激に応じた内在性 Dock7 のリン酸化を確認することができた。さらに、リコンビナント ErbB2 キナーゼドメインとリコンビナント Dock7 を混合してリン酸化反応を行った後に、Rac1 または Cdc42 に対するグアニンヌクレオチド交換反応を測定したところ、Dock7 の 1118 番目のチロシンのリン酸化に依存して Dock7 が活性化されることが明らかになった。さて、ErbB2 が Dock7 をリン酸化する前、つまり定常状態での ErbB2 のキナーゼドメインと Dock7 の結合定数 ( $K_d$ ) は  $\sim 700\mu\text{M}$  と算出された。しかし、Dock7 に偽リン酸化変異 (Y1118E) をくわえると、それが変化し、DHR-1 と DHR-2 の間の DHR-2 に近いところに高親和性結合部位 ( $K_d$  値  $\sim 300\mu\text{M}$ ) が、DHR-1 に近いところに低親和性結合部位 ( $K_d$  値  $\sim 1,000\mu\text{M}$ ) ができることが判明した。結論として、



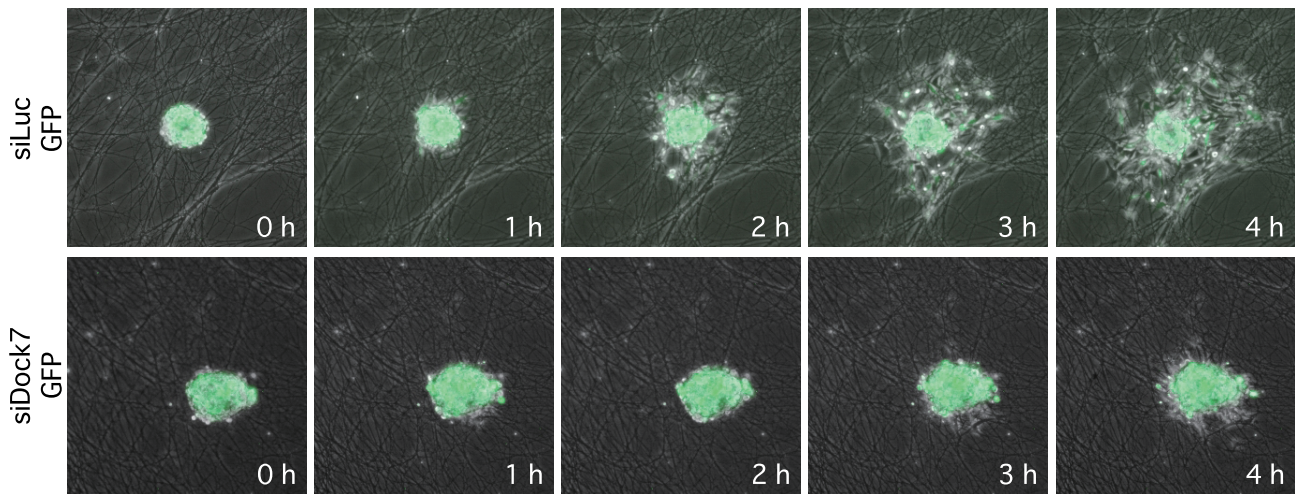


図9 Dock7 をノックダウンしたシュワン細胞の神経軸索上での細胞遊走

GFP と small interference (si) Dock7 またはコントロール siRNA (siLuc) をシュワン細胞にエレクトロポレーションしシュワン細胞再凝集体を形成させる。その凝集体を生きている DRG ニューロンの軸索上にのせ、NRG1 で刺激した。10 分毎に撮影したライブイメージの一部を抜粋し、1 時間毎に 4 時間分のイメージを示した。Dock7 がノックダウンされると、神経軸索上での細胞遊走能が顕著に低下するのが分かる。

DRG ニューロン由来の可溶性 NRG1 がシュワン細胞の ErbB3 に結合し ErbB2 が活性化されると、細胞内にシグナルが伝達され、Dock7 の 1118 番目のチロシンリン酸化が促進されて活性が上昇する。同時に、ErbB2 と Dock7 の結合も促進される<sup>54)</sup>。そして、下流の Rac1 と Cdc42 と JNK 経路を介してシュワン細胞の遊走が促進されるのである (図 8, 図 9)。

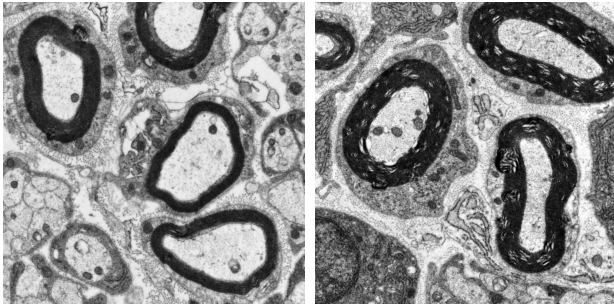
この経路を先述した神経栄養因子受容体下流のシグナル伝達経路と比較すると、受容体は特異的な交換因子と相互作用するが、それより下流の低分子量 GTP 結合タンパク質からは共通の経路を介するということになる。これは少なくともミエリン形成過程①において、既知及び未知の複数の受容体が活性化されることが生理的に Rac1 と Cdc42 の活性化状態を保つことに関与することを示唆している。おそらく、その後のミエリン形成過程も神経栄養因子下流のシグナルと共通する部分が存在すると推定される。つまり、Rac1 と Cdc42 下流の JNK 経路は、その経路に属する分子の発現低下や JNK 阻害タンパク質の発現上昇によりその役割を終え、新たな Rac1 と Cdc42 のエフェクター分子として、Par-6 にシグナルを伝達する。その結果、Par-3 と p75 受容体複合体をミエリン膜の先端部分に局在化させることによって、神経軸索上のミエリン形成を促進させると考えられる (図 8)。

### (3) 生体における Dock7 の役割の検証

以上のことから、Dock7 はミエリン形成過程①で重要な役割を果たしていることが明らかになった。それでは、その後の過程で Dock7 はどのように制御されているのだら

うか。また、個体レベルではどのような役割を担っているのだろうか。マウス Dock7 遺伝子は複数のエキソンから構成され、さまざまなアルタナティブスプライシングが起こると考えられ、エキソン 1 近辺を欠損させても Dock7 がノックアウトされにくいと推定された。そこで、Dock7 の siRNA を発現するトランスジェニックマウスを作成し、生体レベルでのノックダウン実験を行うことにした。マウス U6 プロモーター制御下に線状型 siRNA を組み込み、マーカーとして GFP をつなげた遺伝子を、定法通りに卵にマイクロインジェクションし、Dock7 の siRNA のトランスジェニックマウスを作成した。幸運にも、Dock7 は目的とする座骨神経で強くノックダウンされていたが、他の組織でのノックダウン効率は必ずしも一定ではなかった。これは、siRNA のトランスジェニックマウスの特徴であると言われている。そして、興味深いことに、Dock7 がノックダウンされると太いミエリンができることが分かった (図 10)。

この結果を単純に解釈すれば、Dock7 はミエリン形成を阻害するということになる。座骨神経での Dock7 タンパク質の発現レベルはミエリン形成時に極端な変動が観察されない (未発表) ため、Dock7 の交換因子活性が厳密に制御されているはずである。また、この現象は大変重要な概念を提起しているように思われる。神経栄養因子によるミエリン形成過程では、NT3 シグナルはシュワン細胞の遊走を促進するが、ミエリン形成を阻害する。一方、BDNF シグナルはシュワン細胞の遊走を阻害するが、ミエリン形成を促進する。可溶性 NRG1 シグナルに属する Dock7 分子の特性も、NT3 シグナルに属する分子の特性に類似し



Non-TG

ShDock7-TG

図10 Dock7をノックダウンしたマウスの座骨神経ミエリン siDock7を発現する short hairpin (Sh) Dock7 トランスジェニックマウスと、同腹のノントランスジェニックマウス由来の座骨神経の電子顕微鏡写真(7日, 5,000倍)。Dock7がノックダウンされると肥厚したミエリンが観察される。しかし、神経軸索には大きな変化は見られない。

ていると考えられはしないだろうか。そして、このことは、ミエリン形成の分子メカニズムを調べるときのひとつの重要な視点として、シグナル伝達分子間の相反する相互関係を解き明かすことにあるということを暗示しているように思われる。

以上の「3. DRG ニューロンから放出される液性因子による末梢神経ミエリン形成の制御」から「6. 非典型的な交換因子 Dock7 の活性化メカニズムと末梢神経ミエリン形成」の項までの研究は、齧歯類から得られたデータをもとにしているが、同様な分子メカニズムがヒトにおいても保存されているのではないかと予想している。近年、ヒト胚性幹細胞やヒト組織性幹細胞からシュワン細胞を作成することが可能になってきている。実験的にまだ多くのステップをクリアしないとはいけませんが、将来、これらの幹細胞を末梢ニューロンとシュワン細胞に分化させ、共培養後、ミエリンを形成させるという実験が組めるのではないかと期待している。これが可能になれば、ヒトでのミエリン形成シグナルの研究は飛躍的に発展するものであると信じている。

## 7. 末梢神経脱ミエリン Charcot-Marie-Tooth 病の責任遺伝子

Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は、先天性の末梢神経脱ミエリン病の総称として用いられる。やや聞き慣れない神経疾患であるかもしれないが、中枢神経のアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症と並ぶ代表的な神経変性疾患である。CMT 病の有病率は、2,500 人に1人程度であり、早期に発症(20歳以下)するケースも多い。電気生理学的及び病理学的に2種類の病型に大別される。1型は、4種類以上の原因遺伝子が同定されており、全体の50%以上を占める。1型ではシュワン細胞が変性

し脱ミエリン現象が起きるために、神経伝導速度が遅延(NCV<38m/sec)し、歩行困難に陥ることもある。2型では少なくとも6種類以上の原因遺伝子が明らかにされており、全体の20-40%を占める。その病変組織は感覚神経などの神経軸索そのものである。神経伝導速度の遅延は認められない(NCV>38m/sec)か、ごく僅かの低下がみられる程度であるが、進行すれば歩行困難になる。他に、4型と分類されているものと未分類のものがあるが、優れた総説があるのでそちらを参照して頂きたい<sup>56,57)</sup>。

1型で同定されている原因遺伝子は、*PMP22* (CMT1A)、*P0* (CMT1B)、*SIMPLE* (small integral membrane protein of the lysosome/late endosome) (CMT1C)、*Krox-20* (CMT1D) である。*SIMPLE* は、ユビキチンによるタンパク質分解に関与すると考えられているが、機能はよく分かっていない。2型では、*KIF1B* (kinesin family member) 1B (CMT2A)、*mitofusin 2* (CMT2A)、*Rab 7* (CMT2B)、*glycyl-tRNA synthetase* (CMT2D)、*neurofilament-L* (CMT2E)、*Hsp27* (CMT2F) が原因遺伝子として知られている。それぞれ点変異、欠損、重複等さまざまな原因でCMT病が引き起こされる。CMT2Cの原因遺伝子はクロモソームの位置関係から *ataxin-2* であると推定されたが、現在では他に原因遺伝子があると考えられている。*KIF1B* ATPase は神経軸索内で膜タンパク質を含めたさまざまな分子を輸送するモーター分子であり、*Rab7* GTPase もそのエフェクターを介して軸索輸送に関与する。*mitofusin 2* はミトコンドリア GTPase でミトコンドリアの融合などに関わる。*glycyl-tRNA synthetase* はタンパク質合成系の分子であるが、おそらくシグナル依存的に神経軸索内の局所的タンパク質合成に関係していると考えられる。

このように、CMT 病は最近になって原因遺伝子による疾患分類がなされるようになってきた。重要なことは、原因遺伝子産物の大部分が正常時のミエリン形成に関与するシグナル伝達分子やその上流下流に位置する分子であるということである。このことは、未分類の末梢神経変性症原因遺伝子として *frabin*<sup>37,38)</sup> や *GEF10*<sup>39)</sup> が同定されていることから裏付けられている。今後、ミエリン形成のシグナル伝達メカニズムの解明が、CMT 病の治療に強く結びつくことが期待される。筆者らも独自の共培養技術を応用して、病態モデル動物の座骨神経から単離したシュワン細胞、あるいは人為的に作製した病態のシュワン細胞と DRG ニューロンを同一シャーレ内で共培養し、*in vitro* で病態発症過程を再現することで、脱ミエリン病の標的分子の同定や改善薬物の開発を進めている<sup>58-63)</sup>。

## 8. 今後の研究に向けて

神経系を対象とした生化学研究の多くは、ニューロンを中心としたものが多い。しかし、シュワン細胞も興味深い

研究対象である。何故ならば、シュワン細胞は、生体内で最もダイナミックな形態変化をする細胞であると言っても過言ではないからである。近年、哺乳類のシュワン細胞のダイナミックな形態変化やミエリン形成過程をライブイメージで追うことは技術的には可能である。しかし、共培養の期間があまりにも長すぎて、殊に、蛍光タンパク質を発現させている細胞に対するダメージを考えると困難なことであるように思われる。しかし、もしこれが達成されたならば、その画像ファイルの中に存在する個々のデータには我々がまだ知らない多くの現象が記録されており、ミエリン形成の分子メカニズムの研究に必ずブレイクスルーを与えるものと確信している。勿論、ミエリン形成過程に関与するシグナル伝達メカニズムの全容解明や、それと表裏一体の関係にある脱ミエリン現象に関与するシグナル伝達メカニズムの解明も重要な課題である。同様なことは、オリゴデンドロサイトに関しても言える<sup>64-69</sup>。

本文では Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパク質に関して煩雑さを避けるため、RhoA, Rac1, Cdc42 を Rho, Rac, Cdc42 サブファミリーの代表例として用いました。交換因子の詳しい特異性に関してはそれぞれの論文を参照して頂ければ幸いです。くわえて、いくつかの生理現象の解釈に関して未だに議論が収まっていないところもあり、きわめて限定的な表現を用いた箇所があります。御容赦願えればと思います。しかし、それだけミエリン発生とその分子メカニズムに関しては未解明な点が多く存在し、非常に魅力的な研究領域であることも確かだと思えます。

## 謝辞

この研究の多くは、国立成育医療センター研究所で行われたもので、薬剤治療研究部部長の田上昭人先生と研究所副所長の藤本純一郎先生の忍耐強い御指導のおかげで達成されたものです。名取道也所長には研究を行ううえで、ひとかたならぬ励ましを頂きました。また、学生の頃から細胞内シグナル伝達研究に関して御指導を賜っている京都大学大学院医学研究科の上代淑人教授、細胞内シグナル伝達研究に関して御指導を賜っている東京工業大学大学院生命理工学研究科の喜多村直実教授、神経科学研究に関して御指導を賜っている首都大学東京大学院理工学研究科の久永真市教授、分子薬理学研究に関して御指導を賜っている京都大学大学院薬学研究科の辻本豪三教授に深く感謝致します。スタンフォード大学医学部神経生物学部門の Eric Shooter 教授と南カリフォルニア大学医学部細胞生物学部門の Jonah Chan 助教授には神経科学研究を行う機会を与えて下さり、心より感謝申し上げます。京都大学大学院生命科学研究科の加藤裕教准教授と国立障害者リハビリテ-

ションセンター研究所の緒方徹室長には分子神経科学を丁寧にご教授頂きました。そして、本研究は国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部の宮本幸さん、鳥居知宏さん、草川森士さんを始めとした研究員の皆様と東京工業大学大学院生命理工学研究科生体システム専攻の多くの先生によって支えられており、この場を借りて感謝の言葉に代えさせて頂きます。

## 文 献

- 1) Reilly, K.M. & Van Dyke, T. (2008) *Cell*, **135**, 408-410.
- 2) Yang, F.C., Ingram, D.A., Chen, S., Zhu, Y., Yuan, J., Li, X., Yang, X., Knowles, S., Horn, W., Li, Y., Zhang, S., Yang, Y., Vakili, S.T., Yu, M., Burns, D., Robertson, K., Hutchins, G., Parada, L.F., & Clapp, D.W. (2008) *Cell*, **135**, 437-448.
- 3) 宮本 幸, 山内淳司, 田上昭人 (2008) 「小児疾患診療のための病態生理」(小児内科・小児外科編集委員会編) pp. 24-29, 東京医学社, 東京.
- 4) 宮本 幸, 草川森士, 鳥居知宏, 三部 篤, 中村和昭, 山内淳司, 田上昭人 (2008) 日本小児臨床薬理学雑誌, **21**, 22-26.
- 5) Bunge, R.P., Bunge, M.B., & Eldridge, C.F. (1986) *Annu. Rev. Neurosci.*, **9**, 305-328.
- 6) Jessen, K.R. & Mirsky, R. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 671-682.
- 7) Dupin, E., Baroffio, A., Dulac, C., Cameron-Curry, P., & Le Douarin, N.M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1119-1123.
- 8) Dupin, E., Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P., & Le Douarin, N.M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5229-5233.
- 9) Bunge, R.P. (1993) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**, 805-809.
- 10) Mirsky, R. & Jessen, K.R. (1996) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 89-96.
- 11) Salzer, J.L. (2003) *Neuron*, **40**, 297-318.
- 12) Salzer, J.L., Brophy, P.J., & Peles, E. (2008) *Glia*, **56**, 1532-1534.
- 13) 宮本 幸, 山内淳司 (2007) 生化学, **79**, 384.
- 14) Einheber, S., Hannocks, M.J., Metz, C.N., Rifkin, D.B., & Salzer, J.L. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 443-458.
- 15) Oudega, M., Xu, X.M., Guénard, V., Kleitman, N., & Bunge, M.B. (1997) *Glia*, **19**, 247-258.
- 16) Ogata, T., Iijima, S., Hoshikawa, S., Miura, T., Yamamoto, S., Oda, H., Nakamura, K., & Tanaka, S. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 6724-6732.
- 17) Weiner, J.A., Fukushima, N., Contos, J.J., Scherer, S.S., & Chun, J. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 7069-7078.
- 18) Castorina, A., Tiralongo, A., Giunta, S., Carnazza, M.L., Rasi, G., & D'Agata, V. (2008) *Brain Res.*, **1241**, 29-35.
- 19) Shooter, E.M. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 601-629.
- 20) Huang, E.J. & Reichardt, L.F. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 677-736.
- 21) Cosgaya, J.M., Chan, J.R., & Shooter, E.M. (2002) *Science*, **298**, 1245-1248.
- 22) Yamauchi, J., Chan, J.R., & Shooter, E.M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14421-14426.
- 23) 山内淳司 (2005) クリニカルニューロサイエンス, **23**, 108-109.
- 24) Kaibuchi, K., Kuroda, S., & Amano, M. (1999) *Annu. Rev.*

- Biochem.*, **68**, 459–486.
- 25) Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001) *Physiol. Rev.*, **81**, 153–208.
  - 26) Schmidt, A. & Hall, A. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 1587–1609.
  - 27) Rossman, K.L., Der, C.J., & Sondek, J. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 167–180.
  - 28) Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Droggiti, A., Dickinson, S., D'Antonio, M., Mirsky, R., & Jessen, K.R. (2004) *J. Cell Biol.*, **164**, 385–394.
  - 29) Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M.D., & Jacobson, K. (2003) *Nature*, **424**, 219–223.
  - 30) Kimura, K., Teranishi, S., Yamauchi, J., & Nishida, T. (2008) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 125–132.
  - 31) Yamauchi, J., Chan, J.R., & Shooter, E.M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8774–8779.
  - 32) Melendez-Vasquez, C.V., Einheber, S., & Salzer, J.L. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 3953–3963.
  - 33) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Tanoue, A., Shooter, E.M., & Chan, J.R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14889–14894.
  - 34) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A., Wu, C., & Mobley, W.C. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10444–10449.
  - 35) Yamauchi, J., Chan, J.R., Miyamoto, Y., Tsujimoto, G., & Shooter, E.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5198–5203.
  - 36) Chan, J.R., Jolicoeur, C., Yamauchi, J., Elliott, J., Fawcett, J.P., Ng, B.K., & Cayouette, M. (2006) *Science*, **314**, 832–836.
  - 37) Delague, V., Jacquier, A., Hamadouche, T., Poitelon, Y., Baudot, C., Boccaccio, I., Chouery, E., Chaouch, M., Kassouri, N., Jabbour, R., Grid, D., Mégarbané, A., Haase, G., & Lévy, N. (2007) *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 1–16.
  - 38) Stendel, C., Roos, A., Deconinck, T., Pereira, J., Castagner, F., Niemann, A., Kirschner, J., Korinthenberg, R., Ketelsen, U.P., Battaloglu, E., Parman, Y., Nicholson, G., Ouvrier, R., Seeger, J., De Jonghe, P., Weis, J., Krüttgen, A., Rudnik-Schöneborn, S., Bergmann, C., Suter, U., Zerres, K., Timmerman, V., Relvas, J.B., & Senderek, J. (2007) *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 158–164.
  - 39) Verhoeven, K., De Jonghe, P., Van de Putte, T., Nelis, E., Zwijsen, A., Verpoorten, N., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Francis, A., Ceuterick, C., Huylebroeck, D., & Timmerman, V. (2003) *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 926–932.
  - 40) Garratt, A.N., Britsch, S., & Birchmeier, C. (2000) *Bioessays*, **22**, 987–996.
  - 41) Citri, A., Skaria, K.B., & Yarden, Y. (2003) *Exp. Cell Res.*, **284**, 54–65.
  - 42) Birchmeier, C. & Nave, K.A. (2008) *Glia*, **56**, 1491–1497.
  - 43) Zhang, Z., Prentiss, L., Heitzman, D., Stahl, R.C., DiPino, F. Jr., & Carey, D.J. (2006) *J. Neurosci. Res.*, **84**, 1–12.
  - 44) Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., & Haass, C. (2006) *Science*, **314**, 664–666.
  - 45) Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., & Yan, R. (2006) *Nat. Neurosci.*, **9**, 1520–1525.
  - 46) Hu, X., He, W., Diaconu, C., Tang, X., Kidd, G.J., Macklin, W.B., Trapp, B.D., & Yan, R. (2008) *FASEB J.*, **22**, 2970–2980.
  - 47) Mahanthappa, N.K., Anton, E.S., & Matthew, W.D. (1996) *J. Neurosci.*, **16**, 4673–4683.
  - 48) Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., & Nave, K.A. (2004) *Science*, **304**, 700–703.
  - 49) Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R.M., Loeb, J.A., Shrager, P., Chao, M.V., Falls, D.L., Role, L., & Salzer, J.L. (2005) *Neuron*, **47**, 681–694.
  - 50) Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., & Matsuda, M. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1770–1776.
  - 51) Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., & Matsuda, M. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 3331–3336.
  - 52) Côté, J.F. & Vuori, K. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 4901–4913.
  - 53) Côté, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., & Vuori, K. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 797–807.
  - 54) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Chan, J.R., & Tanoue, A. (2008) *J. Cell Biol.*, **18**, 351–365.
  - 55) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Sanbe, A., & Tanoue, A. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 791–804.
  - 56) Snipes, G.J., Suter, U., & Shooter, E.M. (1993) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**, 694–702.
  - 57) Tanaka, Y., & Hirokawa, N. (2002) *Trends Genet.*, **18**, S39–S44.
  - 58) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Sanbe, A., & Tanoue, A. (2006) *Exp. Cell Res.*, **312**, 2954–2961.
  - 59) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Murabe, M., Fujiwara, Y., Sanbe, A., Fujita, Y., Murase, S., & Tanoue, A. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 1886–1896.
  - 60) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Kusakawa, S., Torii, T., Mizutani, R., Sanbe, A., Nakajima, H., Kiyokawa, N., & Tanoue, A. (2008) *Exp. Cell Res.*, **314**, 1886–1896.
  - 61) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Torii, T., Mizutani, R., Nakamura, K., Sanbe, A., Koide, H., Kusakawa, S., & Tanoue, A. (2009) *Exp. Cell Res.*, **315**, 2043–2052.
  - 62) 山内淳司, 宮本 幸, 藤原葉子, 三部 篤, 村部麻由, 田上昭人 (2007) 日本小児臨床薬理学雑誌, **20**, 83–87.
  - 63) 村部麻由, 王 淑一, 藤原葉子, 三部 篤, 山内淳司, 田上昭人 (2007) 日本小児臨床薬理学雑誌, **20**, 88–90.
  - 64) 宮本 幸, 山内淳司 (2009) タンパク質核酸酵素, **54**, 825–832.
  - 65) Van't Veer, A., Du, Y., Fischer, T.Z., Boetig, D.R., Wood, M. R., & Dreyfus, C.F. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 69–78.
  - 66) Brinkmann, B.G., Agarwal, A., Sereda, M.W., Garratt, A.N., Müller, T., Wende, H., Stassart, R.M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., Radyushkin, K., Goebbels, S., Fischer, T.M., Franklin, R.J., Lai, C., Ehrenreich, H., Birchmeier, C., Schwab, M.H., & Nave, K.A. (2008) *Neuron*, **59**, 581–595.
  - 67) Taveggia, C., Thaker, P., Petrylak, A., Caporaso, G.L., Toews, A., Falls, D.L., Einheber, S., & Salzer, J.L. (2008) *Glia*, **56**, 284–293.
  - 68) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Chan, J.R., Okada, A., Tomooka, Y., Hisanaga, S., & Tanoue, A. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 4355–4366.
  - 69) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., & Tanoue, A. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 8326–8337.