

神経回路形成における軸索ガイダンス分子 draxin の役割

1. はじめに

脳では膨大な数の神経細胞がそれぞれ適切な位置に配置され、精密な神経回路網を形成している。これらの神経回路形成には、発生過程に神経軸索ガイダンス分子が担う神経細胞の選択的な軸索形成が必須である。この20年間に、Netrin, Ephrin, Slit, Semaphorinなどの軸索ガイダンス因子とそれらの受容体が同定されたことにより軸索誘導の基盤となる分子メカニズムが明らかにされてきた。本稿では、主要な軸索ガイダンス分子について紹介するとともに、筆者らが発見した軸索ガイダンス分子 draxin の機能を概説する。

2. 軸索ガイダンス分子

正確な神経ネットワークの形成には、発生期の胎児神経系において神経軸索が正しい標的細胞に向かって伸長し、シナプス結合する必要がある。この軸索ガイダンス過程で働く分子はこれまでに数多く同定されている。細胞接着分子や細胞間基質タンパク質など複数の分子が共同で働くことによって軸索の走行が決定されると考えられるが、その中でも誘因性と反発性の軸索ガイダンス分子は特に重要な

働きを持つ。ここでは、脊髄の交連神経軸索ガイダンス機構を例にして主要な軸索ガイダンス分子を簡単に紹介する。

スペインの解剖学者 Santiago Ramon Cajal によって、神経軸索を標的細胞まで導く誘因物質の存在が1世紀以上も前から提案されていたが、そのような物質が存在するかどうかは長らく不明であった。1980年代になって、米国の Marc Tessier-Lavigne らは、脊髄の交連神経の軸索が底板からの分泌因子により誘因されることを、培養実験を用いて明らかにした。その後、この活性因子がニワトリ胚の脳から精製され、Netrin と名付けられた¹⁾。実際、Netrin は脊髄の床板から分泌され、脊髄交連神経の軸索を誘引する(図1A)。Netrin 受容体としては DCC (deleted in colorectal cancer) と UNC5 がよく知られている。成長円錐の反応性はこれら2種類の受容体の発現パターンに依存し、DCCのみでは誘引、DCC と UNC5 が共発現し形質膜上で受容体ヘテロ二量体を形成すると反発を呈する²⁾。

交連神経軸索は正中線を交差後、体軸方向に沿って伸長する(図1B)。この過程において、交連神経軸索は再び床板に引き戻されないように、床板からの Netrin の反応性を消失し、新たに分泌型反発分子である Slit に対する反応性を獲得する。Slit 受容体 Robo の細胞内領域が Netrin 受容体 DCC の細胞内領域と相互作用をし、床板を通り過ぎると Netrin 感受性が消失する³⁾。一方、正中線交差前の交連神経軸索の成長円錐では Robo をほとんど発現していないが、正中線交差後に発現を増大させることにより、正中

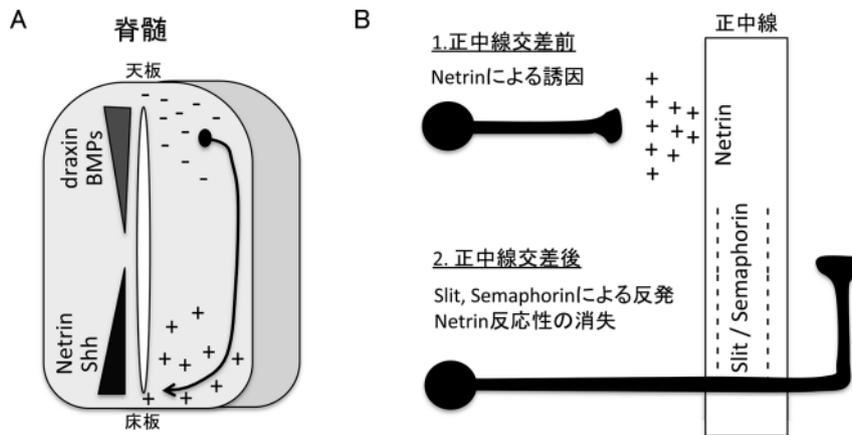


図1 脊髄の交連神経軸索ガイダンス機構

(A) 脊髄交連神経軸索は、天板からの反発分子 (draxin, BMPs) と床板からの誘因因子 (Netrin, Shh) によってガイドされる。

(B) 脊髄交連神経軸索は、正中線交差後に Slit と Semaphorin に対する反応性 (反発) を獲得し、Netrin に対する反応性 (誘因) を消失する。

線交差後に軸索が正中から遠ざかって伸びていくのを促している。

最近になって、反発性ガイダンス分子 Semaphorin が床板に発現し、Slit 同様の機能を持つことが報告された⁴⁾。正中線交差後の Semaphorin による反発活性の獲得メカニズムとして、床板に発現し誘因機能を持つ Shh (Sonic hedgehog) が関与することが示されている。Semaphorin は大きな遺伝子ファミリーを形成する軸索ガイダンス分子群で、これまでに 20 種以上の遺伝子がクローン化され、構造上の特徴から七つのクラスに分類されている。さらに、分泌型、膜貫通型、GPI 結合型など様々なタイプが存在する⁵⁾。Semaphorin 受容体としては、Neuropilin と Plexin が同定されている⁶⁾。

中枢神経系の様々な神経回路形成において重要な役割をもつ軸索ガイダンス分子に Ephrin がある^{7,8)}。Ephrin には GPI 結合型と膜貫通型があり、それぞれ EphrinA と EphrinB に区分されている。受容体である Eph は細胞内にチロシンキナーゼ領域を持ち、受容体との特異性に基づいて EphAs (8 種) と EphBs (6 種) に分けられる。さらに、Eph/Ephrin の順行性シグナルとは逆方向のシグナルが (EphA がリガンドとして、EphrinA が受容体として機能する) 存在し、この双方向性の情報伝達により高度で複雑に軸索投射機構が制御されている⁹⁾。ノックアウトマウスの解析から、EphB/EphrinB3 の順行性シグナルが脊髄交連神経の軸索ガイダンスに関与することが示されている¹⁰⁾。

軸索ガイダンス分子の機能制御として、成長円錐でのタンパク質の局所的な翻訳が重要であることが最近報告され注目されている¹¹⁾。そのメカニズムとして、Netrin1 非存在下では DCC とリボソームが結合しタンパク質合成を抑制するが、Netrin1 が結合するとリボソームが DCC から解離しタンパク質合成が開始すると考えられている。実際、脊髄交連神経軸索に対する Netrin1 の誘因活性に成長円錐でのタンパク質合成が必要であることが示されている。Semaphorin や Slit など他の軸索ガイダンス分子に関しても、局所的なタンパク質合成がそれらの機能に必要であることが明らかにされており、今後、より詳細な分子レベルでの解析が期待される。

ここで紹介した数種の軸索ガイダンス分子が同定され、軸索ガイダンス機構の基本的な分子メカニズムは明らかにされてきた。一方で、脳神経系の複雑な回路形成機構を既知の軸索ガイダンス分子の働きだけでは説明することができず、未知の軸索ガイダンス分子の働きが必要であると考えられる。

3. 軸索ガイダンス分子 draxin

1) draxin の発見

我々は新規ガイダンス分子を同定するために、膜タンパク質や分泌タンパク質の cDNA を選択的にクローニングするシグナルシーケンストラップ法を用いて、分子探索を行った。その結果、既知の軸索ガイダンス分子とは全くホモロジーのない新規の分泌型軸索ガイダンス分子を見いだし、draxin (dorsal repulsive axon guidance protein) と命名した¹²⁾。

draxin は、ニワトリ胚とマウス胚の脳から脊髄に至る中枢神経系の背側に発現する。draxin が軸索ガイダンス活性を示すことは、最初、ニワトリ脊髄の発生に着目した研究から明らかにされた。ニワトリ脊髄において draxin mRNA は天板に発現し、分泌された draxin タンパク質は濃度勾配を形成していると考えられる (図 1A)。この発現パターンは、脊髄交連神経に対する反発分子である BMP に類似することから、交連神経を含むニワトリ脊髄背側組織片を用いた培養実験により draxin に軸索ガイダンス活性があるかどうかを検証した。ニワトリ脊髄の交連神経細胞を Netrin-1 存在化でコラーゲンゲル培養すると神経突起伸長が観察されるが、draxin タンパク質を含む培地で培養すると神経突起伸長が著しく阻害された。さらに、draxin を発現する COS-7 細胞との共培養を行うと、COS-7 細胞の近位側からの神経突起伸長が著しく阻害される。さらに、ニワトリ胚脊髄にエレクトロポレーション法により draxin を過剰発現させると、脊髄交連神経軸索成長が阻害されることを観察した。これらの結果から、draxin が脊髄交連神経軸索に対して分泌型の反発性軸索ガイダンス分子として機能すると結論づけた。

2) 脳梁形成機構

神経回路形成における draxin の役割をさらに調べるために、draxin ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。脊髄交連神経の形成には顕著な異常は見られなかったものの、大脳のすべての交連神経 (脳梁、海馬交連、前交連) において重篤な形成異常が観察された¹²⁾。蛍光色素 DiI を用いたトレース実験から、脳梁や前交連の神経軸索は正中線を交差する前に走行異常を示すことが明らかとなった (図 2A)。

大脳新皮質の 2/3, 5 層から生じる脳梁神経軸索は、正中線を交差後反対側の大脳新皮質に投射される。脳梁軸索の正中線交差には、正中線グリア細胞に発現する Slit2 や Wnt5a が必須であることが知られている^{13,14)}。培養実験に

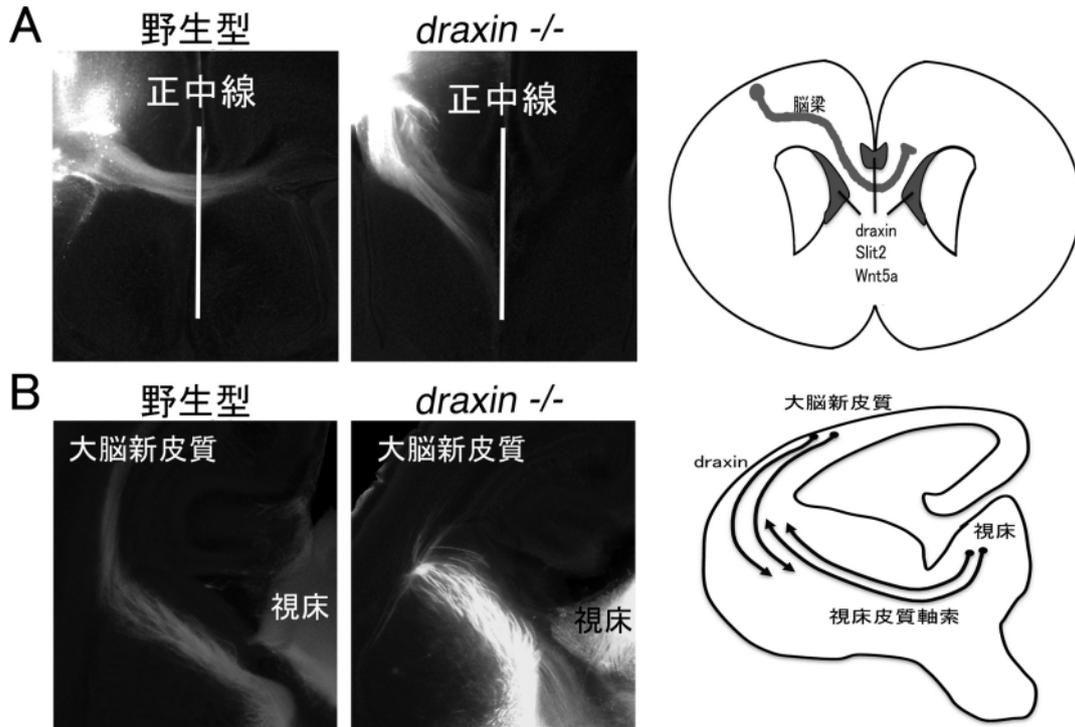


図2 脳梁と視床皮質軸索投射機構

(A) *draxin* ノックアウトマウスでは、脳梁軸索は正中線を交差できない。正中線グリア細胞からの反発活性 (*draxin*, *Slit2*, *Wnt5a*) が脳梁形成に重要であると考えられる。

(B) *draxin* ノックアウトマウスでは、視床皮質軸索は大脳新皮質へ入れない。大脳新皮質の神経細胞に発現する *draxin* が視床皮質軸索投射を制御すると考えられる。

においてこれらの分子が脳梁軸索に対して反発活性を示すことから、正中線グリア細胞からの反発活性が脳梁軸索の交差に不可欠であると考えられている (図2A)。これらの分子と同様に、*draxin* も正中線グリア細胞で強く発現する。さらに、*draxin* は脳梁神経を含む胎仔17日齢の大脳新皮質由来の神経突起成長に対し阻害活性を示す。これらのことから、正中線グリア細胞からの *draxin* の反発活性が脳梁形成に重要であると考えられる (図2A)。他方、*draxin* の発現は正中線グリア細胞だけでなく、脳梁神経細胞にも観察される。現在のところ、脳梁神経細胞における *draxin* 発現の重要性は不明であるが、*draxin* がオートクライン方式により軸索ガイダンスを調節する可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、今後、領域特異的なコンディショナルノックアウトマウスの解析が必要である。

3) *draxin* 受容体

draxin 受容体を同定するために、既知の軸索ガイダンス分子の受容体タンパク質からスクリーニングを行った。ノックアウトマウスにおいて脳梁形成異常を示す分子に関

して、*draxin* と結合するかどうかを免疫沈降法により調べた。*Slit* 受容体である *Robo1* や *Semaphorin* 受容体である *Neuropilin1* には結合しないが⁸、*Netrin* 受容体である *DCC* と特異的に結合することが分かった¹⁵⁾。さらに、*draxin* と *DCC* の K_d 値は 970pM で、*Netrin/DCC* 間よりも強い結合を持つことが明らかとなった。*Dcc* ノックアウトマウスでは、*draxin* ノックアウトマウスと同様にすべての大脳交連神経の形成不全が報告されており、これらの軸索投射において *DCC* が *draxin* の重要な受容体であることが予想された。そこで両者の関係を *in vivo* で調べるために、ダブルヘテロマウスの大脳交連神経を解析した。それぞれのシングルヘテロマウスでは観察されない重篤な脳梁形成異常が、ダブルヘテロマウスにおいて高頻度に観察された。次に、*Dcc* ノックアウトマウスの大脳新皮質組織片 (脳梁神経を含む) を用いて、*draxin* の神経突起伸長に対する阻害活性が変化するかどうかを調べた。*Dcc* ノックアウトマウス由来の神経細胞では、野生型由来の神経細胞を用いた場合と比べて、*draxin* の神経突起伸長阻害が低減することが

わかった。これらの結果から、*draxin* ノックアウトマウスにおける脳梁形成異常は、DCCを介した*draxin*の反発活性の欠如により起こると考えられた。さらに、その後の研究によって、*draxin*はDCCだけでなく、Netrin受容体として知られているUNC5, Neogenin, Dscamとも結合することが明らかとなっている。今後の課題として、*draxin*がこれらの受容体とどのように相互作用し、シグナル経路を形成しているのかを理解する必要がある。

4) 視床皮質軸索投射機構

*draxin*は胚発生期に大脳新皮質、大脳腹側部、視床など広範囲に発現が観察されることから、大脳交連神経以外の脳神経回路形成においても重要な軸索ガイダンス分子であると考えられる。これまでに*draxin*ノックアウトマウスにおいて、脳弓(海馬体から乳頭体に伸びる線維束)、皮質脊髄路(大脳新皮質から脊髄にかけて走行する軸索)、視床皮質軸索などで異常が見つかっている。ここでは、*draxin*がユニークな機能を持つと予想される視床皮質軸索投射機構に着目する。

視床にはそれぞれの感覚情報を受け持つ視床核が存在し、対応する大脳新皮質の領域へ軸索を投射している。その発生様式をみると、それぞれの視床核から発する視床皮質軸索は大脳腹側部に向かって伸長し、内包を経由して最終的な標的である大脳新皮質に侵入する(図2B)。この発生過程において、大脳新皮質から内包にバイオニア軸索をもつサブプレート神経が視床皮質軸索の投射に必須であることが数多くの研究から明らかとなっている。例えば、サブプレート神経を破壊すると視床皮質軸索の投射に異常が生じる¹⁶⁾。また、サブプレート神経が正常に形成されない転写因子(Tbr1, Coup-TF1, Fezl)のノックアウトマウスでは、視床皮質軸索が内包から大脳新皮質へ投射されない¹⁷⁾。このように、サブプレート神経軸索が視床皮質軸索のガイダンスに重要であると考えられるが、この異種軸索間相互作用に関する分子メカニズムはよくわかっていない。*draxin*ノックアウトマウスにおいて、視床皮質軸索投射は内包までは正常であるが、その後大脳新皮質に侵入できない(図2B)。*draxin*はサブプレートを含む大脳新皮質で強く発現する。さらに、サブプレート軸索に異常は見られない。これらのことから、視床皮質軸索投射において*draxin*が大脳新皮質由来の必須の軸索ガイダンス分子である可能性がある。今後のより詳細な解析により、異種軸索間相互作用による軸索ガイダンス機構の解明につながると期待できる。

4. おわりに

脊髄の交連神経軸索ガイダンスを例に、主要な軸索ガイダンスのシグナルが相互に制御されていることを紹介した。近年、脳回路形成においても、軸索ガイダンスシグナルのクロストーク機構が明らかにされつつある。今後、*draxin*機能の理解を深めるとともに、他のシグナルとの関係を明らかにし、複雑な脳回路形成においてどのようにガイダンスシグナルが統合されているのかを解明したい。

謝辞

本研究は熊本大学大学院生命科学研究部神経分化学分野(田中英明教授)で行われたもので、共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。

- 1) Serafini, T., Kennedy, T.E., Gallo, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., & Tessier-Lavigne, M. (1994) *Cell*, **78**, 409-424.
- 2) Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., & Stein, E. (1999) *Cell*, **97**, 927-941.
- 3) Stein, E. & Tessier-Lavigne, M. (2001) *Science*, **291**, 1928-1938.
- 4) Parra, L.M. & Zou, Y. (2010) *Nat. Neurosci.*, **13**, 29-37.
- 5) Yoshida, Y. (2012) *Front. Mol. Neurosci.*, **5**, 71.
- 6) Fujisawa, H. (2004) *J. Neurobiol.*, **59**, 24-33.
- 7) Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Lösinger, J., Noda, M., & Bonhoeffer, F. (1995) *Cell*, **82**, 359-370.
- 8) Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., & Flanagan, J. G. (1995) *Cell*, **82**, 371-381.
- 9) Rashid, T., Upton, A.L., Blentic, A., Ciossek, T., Knöll, B., Thompson, I.D., & Drescher, U. (2005) *Neuron*, **47**, 57-69.
- 10) Kadison, S.R., Mäkinen, T., Klein, R., Henkemeyer, M., & Kaprielian, Z. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 8909-8914.
- 11) Tcherkezian, J., Brittis, P.A., Thomas, F., Roux, P.P., & Flanagan, J.G. (2010) *Cell*, **141**, 632-644.
- 12) Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., & Tanaka, H. (2009) *Science*, **323**, 388-393.
- 13) Shu, T., Sundaresan, V., McCarthy, M.M., & Richards, L.J. (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 8176-8184.
- 14) Keeble, T.R., Halford, M.M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R.B., Stacker, S.A., & Cooper, H.M. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 5840-5848.
- 15) Ahmed, G., Shinmyo, Y., Ohta, K., Islam, S.M., Hossain, M., Naser, I.B., Riyadh, M.A., Su, Y., Zhang, S., Tessier-Lavigne, M., & Tanaka, H. (2011) *J. Neurosci.*, **31**, 14018-14023.
- 16) Ghosh, A., Antonini, A., McConnell, S.K., & Shatz, C.J. (1990) *Nature*, **347**, 179-181.
- 17) Lopez-Bendito, G. & Molnar, Z. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 276-289.

新明 洋平

(熊本大学大学院生命科学研究部神経分化学分野)

draxin functions in neural circuit formation

Yohei Shinmyo (Department of Developmental Neurobiology, Faculty of Life Science, Kumamoto University, Honjo 1-1-1, Kumamoto 860-8556, Japan)

プロテアソーム複合体形成シャペロンの構造と作用機構

1. はじめに

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を特異的に分解することにより、タンパク質の寿命を制御し、細

胞周期をはじめとするさまざまな生命現象の調節を行っている。プロテアソームはプロテアーゼ活性を有する20Sプロテアソームに19S制御因子複合体が会合し、26Sプロテアソームとしてユビキチン化修飾されたタンパク質を分解する。26Sプロテアソームは33種類、66個のサブユニットから構成される分子量250万の巨大な複合体である。そして、20Sプロテアソームはそれぞれ異なる7種類の α と β サブユニットが $\alpha 1 \sim \alpha 7$ と $\beta 1 \sim \beta 7$ の α と β リングを形成し、 $\alpha\beta\alpha$ の順に積み重なった中空樽状の構造をとる。19S制御因子複合体は生化学的にbase(基底部)とlid(蓋部)に区分されるサブ複合体とサブユニットRpn10から形成されており、baseは6種類のATPase活性を有するサブユニット(Rpt1~Rpt6)とRpn1, 2, 13, lidはRpn3, 5~9, 11, 12, 15からなる¹⁾(図1)。26Sプロテアソームはこれら66個のサブユニットが厳密に配置することにより選択的分解活性を有する複合体を形成する。本稿では

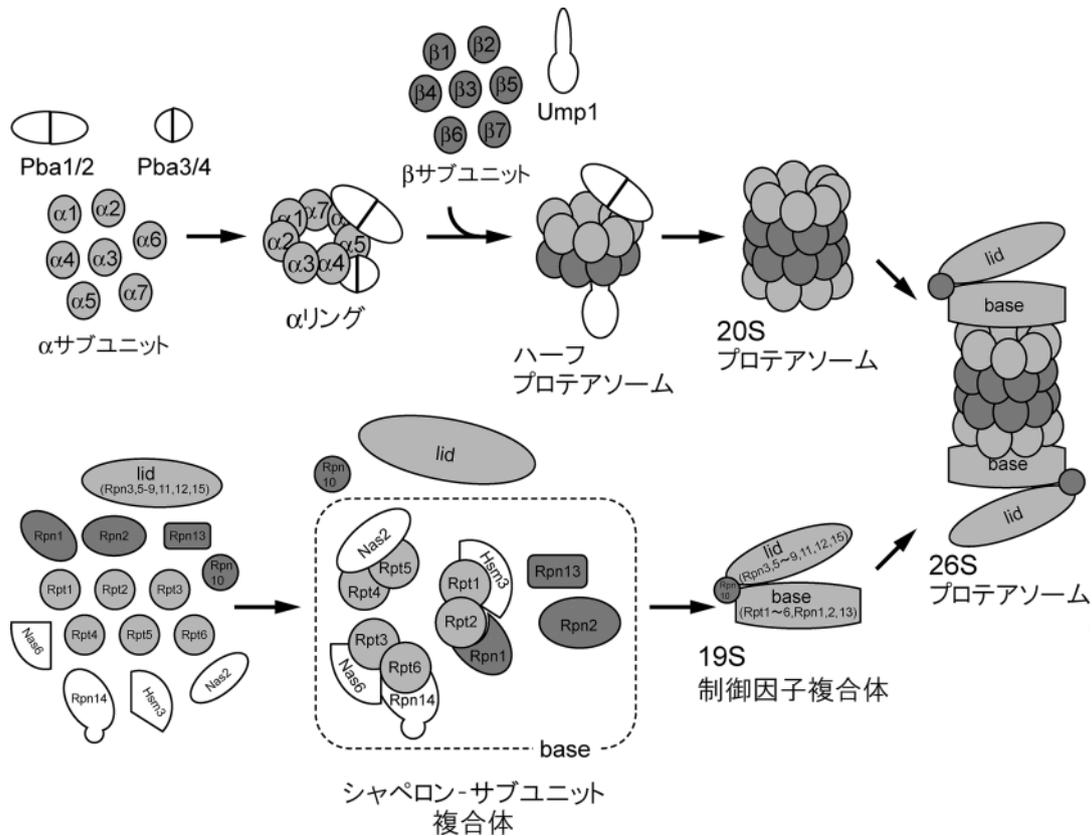


図1 プロテアソーム複合体と分子集合経路

(上段) 酵母20Sプロテアソームはそれぞれ異なる7種類の α と β サブユニットから構成される。複合体形成にはUmp1, Pba1-Pba2, Pba3-Pba4の3組の専用シャペロンを必要とする。

(下段) 酵母19S制御因子複合体は二つのサブ複合体(base, lid)からなり、base複合体の形成にはNas6, Nas2, Hsm3, Rpn14の4組の専用シャペロンを必要とする。