

図3 NRX を介した Wnt/β-カテニン経路の制御

定常状態下では NRX は還元状態にあり、Dvl と強固に結合している。酸化ストレスによって NRX が酸化されると分子内ジスルフィド結合を形成し、それに伴ってコンフォメーションを変化させて Dvl から解離する。その結果、Dvl は下流のシグナルを活性化させる。

化ストレスが発生すると NRX に分子内結合が形成され、そのコンフォメーションが変化し、それに伴って Dvl から解離する。そしてフリーとなった Dvl が下流へとシグナルを伝え、β-カテニンの蓄積を促すのである。

6. 終わりに

活性酸素種 (reactive oxygen species, 以下 ROS) は細胞の酸素呼吸に応じて産生される副産物として広く知られてきた。生命は ROS によって生じる障害から自らを守るため、種々のストレス応答経路を発展させてきた。その一方で、細胞は自らの手で積極的に ROS を産生し、それをシグナル伝達に利用していることも知られつつある^{9,10)}。しかしながら、生体内での ROS によるシグナル制御機構は未解明の領域が多く残されている。今回我々は発生、分化、そしてがん化と深くかかわっている Wnt シグナルにおけるレドックス依存的シグナル制御機構の一端を明らかにした。今後はそのさらなる詳細な分子メカニズムの解明とともに、実際の発生や分化にレドックスシグナルがどのような生理的な役割を果たしていくのか、その展開に期待したい。

- Logan, C.Y. & Nusse, R. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 781–810.
- Clevers, H. (2006) *Cell*, 127, 469–480.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., & Kaykas, A. (2004) *Nat. Rev. Genet.*, 5, 691–701.
- Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., & Miki, H. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 501–508.
- Lillig, C.H. & Holmgren, A. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, 9, 25–47.
- Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., Osawa, N., Buchberg, A.M., Moriwaki, K., Shisa, H., & Honjo, T. (1997) *Genomics*, 39, 331–339.
- Summerton, J. & Weller, D. (1997) *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 7, 187–195.
- Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., & Ichijo, H. (2006)

Semin. Cancer Biol., 16, 427–435.

- Stone, J.R. & Yang, S. (2006) *Antioxid. Redox Signal.*, 8, 243–270.
- Finkel, T. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 247–254.

船戸 洋佑^{1,2,3}, 三木 裕明¹

(¹ 大阪大学蛋白質研究所細胞内シグナル伝達研究室,

² 神戸大学大学院医学系研究科,

³ 東京大学医科学研究所腫瘍分子医学分野)

Regulation of Wnt signal pathway via nucleoredoxin

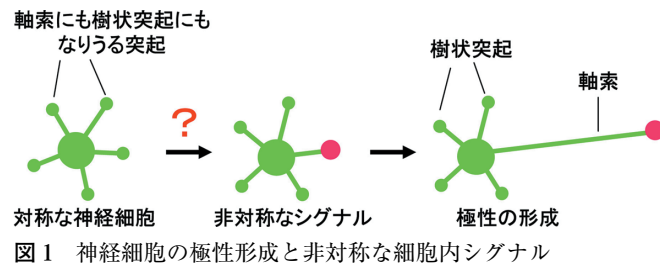
Yosuke Funato^{1,2,3} and Hiroaki Miki¹ (¹Laboratory of Intracellular Signaling, Institute for Protein Research, Osaka University (3-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan), ²Kobe University Graduate School of Medicine, ³Division of Biochemistry, Institute of Medical Science, University of Tokyo)

神経極性形成と shootin1 のフィードバックループ

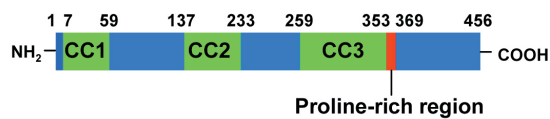
1. はじめに

組織や細胞は、発生・分化に従って、単純な形態を次々に複雑で豊かなものへと変化させて固有の形態を形づくる。生体の対称性の破壊と非対称性 (極性) の獲得はこのような形態形成の基本ステップである¹⁾。細胞の極性形成は、通常、化学物質の濃度勾配や細胞接着といった非対称な外部環境因子によってその方向が調節を受けている。しかし、神経細胞や、卵細胞、出芽酵母、白血球、上皮細胞など多くの細胞は、非対称な環境因子がなくても細胞自立的に極性を形成することができることがわかってきた²⁻⁶⁾。すなわちこれらの細胞は、条件さえ整えば対称なものから非対称なものへと勝手に変化する。このことから、これらの細胞の極性形成過程は、極性の自己組織化 (self-organization) のステップと非対称な環境因子による方向性調節のステップから構成されると考えられている^{1,5,7,8)}。

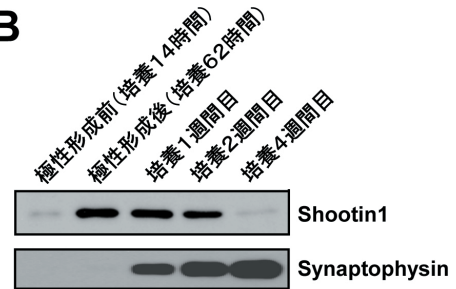
細胞極性の自己組織化の意義として、細胞が環境因子の方向性に依存することなく極性を獲得できるシステムを獲得することにより、生理的な環境での強固 (robust) な極性形成および維持を行うことが可能となると考えられる。また、細胞が対称なものから非対称な形態をどのように組織化するかという問題は、生物学的のみならず数理科学的にも大いに興味深い謎である。本稿では、著者らが最近同



A



B



C

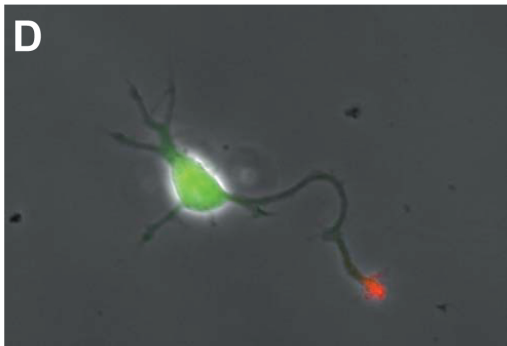
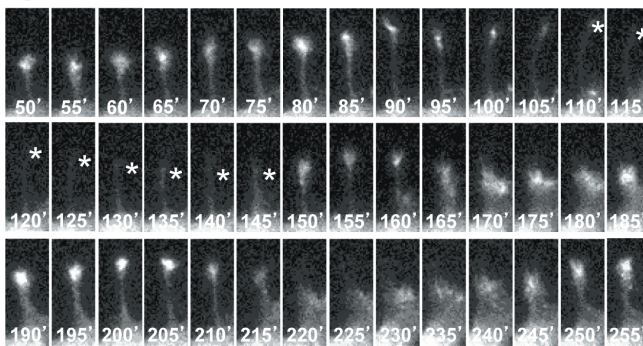
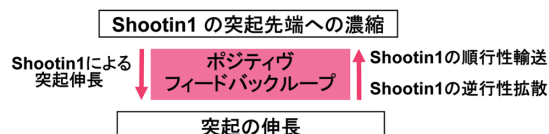


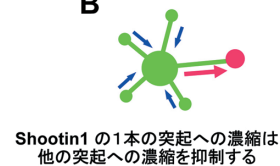
図2 神経極性形成に関与する新規タンパク質 shootin1 (文献 14 を改変)

(A) shootin1 の構造. (B) ラット培養海馬神経細胞における shootin1 の発現変動 (イムノブロット). 参考にシナプスタンパク質 synaptophysin の発現データも示す. (C) 極性形成前の未成熟な神経突起における EGFP-shootin1 量のゆらぎと、それに伴った突起の伸縮. 星印: 神経突起先端. 数値は分を表す. (D) 極性を形成した神経細胞の軸索先端に濃縮する shootin1 の免疫染色像 (赤色). 緑は蛍光色素 CMFDA によって細胞質全体を染めたもの.

A



B



C

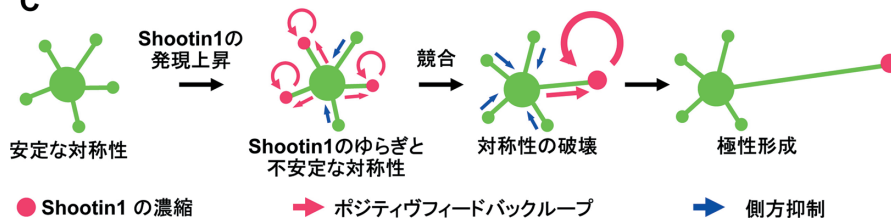


図3 shootin1 による神経極性形成のモデル (文献 14 を改変)

定した新規タンパク質 shootin1 のデータを中心に、神経細胞の極性形成の問題を考えたい。

2. 神経細胞の極性形成

多くの神経細胞は1本の長い軸索と複数の短い樹状突起を伸ばして極性を形成する。神経極性は神経細胞の行う情報の伝達や処理等その基本機能に重要な役割を果たす。このような神経細胞の極性形成過程は、主に Banker らのグループによってラットの培養海馬神経細胞を用いて精力的に解析がなされてきた²⁾。培養海馬神経細胞は、非対称な環境因子の有無に関わらず細胞自立的に極性を形成する(図1)^{2,7)}。培養開始後、まず細胞体から軸索にも樹状突起にもなりうる複数の未成熟な突起が形成される。次に、その中の1本が急激に伸びて軸索になり、その後、残りの突起が樹状突起になって極性が形成される。また、いったん極性を獲得した神経細胞の軸索を切断して極性を失わせると、再び複数の突起のうちどれか1本のみが急激に伸びて軸索となり、神経極性の再獲得が起こる⁹⁾。従って、神経極性形成の過程は強固(robust)なシステムであると考えられる。このような神経極性形成を司る分子メカニズムは長らく不明であったが、最近の数多くの研究によって、PI3-キナーゼやAkt, GSK-3 β , CRMP-2といった神経突起の伸長や軸索の形成に関与する分子の細胞内シグナル伝達に非対称性が生じると神経極性が形成されると考えられるようになってきた(図1, 赤丸)^{10~12)}。しかし、極性形成初期の対称な神経細胞内にいかにして非対称なシグナルが生まれるのかは依然として不明である(図1)。

3. 新規神経極性形成タンパク質 shootin1

最近著者らは、93cm $\times$ 103cmの巨大ゲルを用いた高感度二次元電気泳動システム¹³⁾を利用して5千個以上の軸索に局在するタンパク質と神経極性形成前後で発現量が上昇するタンパク質をスクリーニングし、新規の脳特異タンパク質を同定した¹⁴⁾。このタンパク質は、後述のように、神経の細胞体から突起先端に向かってまるでサッカーボールがシュートされるように塊となって運ばれるので、shootin1と名づけられた。shootin1は3個のコイルドコイル(CC)領域と1個のプロリンリッチ領域を有しており、既知のタンパク質との相同性は認められなかった(図2A)。

shootin1の発現量は培養海馬神経細胞の極性形成過程で急激に上昇した(図2B)。そして軸索の伸長が終了してシナプスが形成される培養4週間目には、shootin1の発現量はもとのレベルまで減少した。EGFP-shootin1を神経細胞

に発現させて極性形成に伴う細胞内分布の変化をタイムラプス顕微鏡で観察したところ、極性形成前の神経細胞ではshootin1が複数の未成熟な神経突起先端でゆらぐように濃縮と消失を繰り返すことがわかった(図2C)。また、神経突起先端におけるshootin1の濃縮は突起伸長を引き起こし、shootin1の神経突起先端における濃度のゆらぎに伴って神経突起もダイナミックに伸長と退縮を繰り返した。やがてshootin1は1本の突起に持続的に集積して、他の突起からはほとんど消失した。その結果、1本の突起が急激に伸びて軸索となり、神経細胞の対称性が破壊されて極性形成が引き起こされた(図2D)。shootin1を過剰発現させた場合、shootin1が複数の突起に持続的に濃縮して軸索が複数形成された。一方、RNAiによりshootin1の発現を抑制すると神経極性形成に遅れが生じた。

PI3-キナーゼは、神経極性形成を司るシグナル伝達の上流に位置する重要な分子である^{11,12)}。shootin1は、PI3-キナーゼと結合してPI3-キナーゼ活性の細胞内分布に影響を与えたが、PI3-キナーゼの活性を阻害してもshootin1の細胞内分布に影響はなかった。また、shootin1による軸索形成はPI3-キナーゼの活性を阻害することにより抑えられたが、反対にPI3-キナーゼによる軸索形成はshootin1の発現をRNAiにより抑制しても影響を受けなかった。これらの結果から、shootin1がPI3-キナーゼの上流において神経極性形成を調節する可能性が示唆された。

4. ゆらぎのフィードバック増殖による対称性の破壊モデル

それでは、shootin1の神経細胞内における非対称性(図2D)は、いかにして形成されるのだろうか? shootin1は神経突起内でアクチンおよびミオシン依存性に細胞体から突起先端に向かって塊となって能動的に輸送された。また同時に、少なくとも一部のshootin1が、突起先端から細胞体へ濃度勾配に従って拡散によって戻ることにもわかった。極性形成前の神経細胞においてshootin1は突起先端で大きくゆらぐように濃縮と消失を繰り返すが(図2C)、偶然shootin1が1本の突起に他の突起よりも多く濃縮した場合、shootin1は突起伸長を引き起こすのでその突起は他の突起より伸長すると考えられる。その結果、shootin1がその突起先端から細胞体に向かって拡散によって戻するのに要する時間が他の突起より延長する。そうするとその突起にとどまるshootin1の量が他の突起よりも増え、さらなる突起伸長(軸索形成)が引き起こされる。すなわち、神経突起先端へのshootin1の濃縮と神経突起の長さの間にポジ

ティヴフィードバックループが形成される(図3A)。また、神経細胞内の shootin1 の量は限られており、shootin1 が1本の突起に濃縮してゆくと他の突起へ運ばれる shootin1 の量が相対的に減少してしまう。すなわち、shootin1 の突起先端への濃縮は他の突起へ運ばれる shootin1 を奪う側方抑制効果を持つ。このようにして細胞内の shootin1 の分布に非対称性が生じると考えられる(図3B)。著者らは、以上のような shootin1 がそれ自身の突起先端における濃縮の偶然(stochastic)なゆらぎをフィードバック増殖することによって神経細胞の対称性を破壊し極性形成を引き起こすモデルを提唱した(図3C)¹⁴⁾。このモデルにおいて shootin1 の順行輸送は図3Aに示すポジティブフィードバックループの構成要素だが、実際に神経細胞における shootin1 の順行輸送をアクチンやミオシンの阻害剤で抑制すると、予想通り細胞内の shootin1 の非対称な分布が形成されなかった。

Banker らのグループは前述の軸索切断実験から、培養海馬神経細胞の極性形成過程において1本の突起の長さが他の突起より偶然長くなることの重要性を示唆しており、極性形成分子として shootin1 のような性質を持つタンパク質の存在を予想していた⁹⁾。一方、Meinhardt と Gierer は、形態形成の数値モデルとして、局所においてポジティブフィードバックを形成する分子と側方抑制を行う分子から構成されるシステムを提唱している¹⁵⁾。今回のモデルには側方抑制を行う分子は存在しないが、shootin1 の減少による側方抑制効果を側方抑制分子と解釈すれば、彼らのモデルに近いと考えられる。また最近、過剰軸索の形成を抑制して神経極性を安定化する新規タンパク質 singar1 (single axon related1) も見つかっており、この分子も側方抑制を担う可能性がある¹⁶⁾。

5. お わ り に

今回紹介したモデルは、培養条件下の細胞自立的な極性形成に関するものだが、実際の脳内における神経極性の方向は非対称な環境因子によって厳密に調節を受けていると考えられる。もし、細胞外タンパク質⁷⁾の浅い濃度勾配により引き起こされる細胞内シグナルが、shootin1 のような分子のフィードバックループによって増幅されれば、脳内における神経極性の強固(robust)な方向性の確立に寄与できるかもしれない。

今回のようなモデルを検証あるいは修正してゆくために

は、従来の生化学的、分子細胞生物学的手法による解析に加えて、細胞内における分子挙動を定量的かつできるだけ詳細に計測することが必要であろう。また、システムバイオロジーの手法を用いたデータ解析も役立つと考えられる。本文で紹介したような生体のかたちづくりの分野が、今後大きく発展してゆくことを期待したい。

- 1) Kirschner, M., Gerhart, J., & Mitchison, T. (2000) *Cell*, **100**, 79–88.
- 2) Craig, A.M. & Banker, G. (1994) *Annu. Rev. Neurosci.*, **17**, 267–310.
- 3) Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowning, B., & Stewart, R. (1989) *Development*, **107** (Suppl.), 37–51.
- 4) Wedlich-Soldner, R., Altschuler, S., Wu, L., & Li, R. (2003) *Science*, **299** (5610), 1231–1235.
- 5) Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., & Bourne, H.R. (2003) *Cell*, **114** (2), 201–214.
- 6) Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., & Clevers, H.C. (2004) *Cell*, **116**, 457–466.
- 7) Esch, T., Lemmon, V., & Banker, G. (2000) *J. Neurocytol.*, **29**, 215–223.
- 8) Wedlich-Soldner, R. & Li, R. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5** (4), 267–270.
- 9) Goslin, K. & Banker, G. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 1507–1516.
- 10) Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., & Kaibuchi, K. (2001) *Nat. Neurosci.*, **4**, 781–782.
- 11) Shi, S.H., Jan, L.Y., & Jan, Y.N. (2003) *Cell*, **112**, 63–75.
- 12) Arimura, N. & Kaibuchi, K. (2005) *Neuron*, **48** (6), 881–884.
- 13) 稲垣直之 (2005) 疾患プロテオミクスの最前線 (戸田, 荒木編), pp. 76–81, メディカルドゥ, 大阪.
- 14) Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K.B., Mitsuba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, Y., Roepstorff, P., & Inagaki, N. (2006) *J. Cell Biol.*, **175**, 147–157.
- 15) Meinhardt, H. & Gierer, A. (2000) *Bioessays*, **22**, 753–760.
- 16) Mori, T., Wada, T., Suzuki, T., Kubota, Y., & Inagaki, N. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 19884–19893.

稲垣 直之, 鳥山 道則, 島田 忠之
(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
細胞内情報学講座)

Neuronal polarity formation and feedback loop of shootin1
Naoyuki Inagaki, Michinori Toriyama, and Tadayuki Shimada (Division of Signal Transduction, Nara Institute of Science and Technology, Takayama-cho 8916-5, Ikoma, Nara 630-0192, Japan)