

特集：細胞外プロテオリシス研究の最前線

# ナルディライジンによる細胞外ドメインシェディング制御機構と、その神経軸索・髄鞘形成における役割

西 英 一 郎

膜近傍部におけるタンパク質分解により、膜タンパク質の細胞外ドメインが不可逆的に切断される現象を、細胞外ドメインシェディングという。多岐にわたる膜タンパク質が、この翻訳後修飾による機能調節を受けており、重要な生理的および病理的役割を担うものと考えられるが、シェディング制御の分子機構はまだ充分解明されていない。我々は、膜型増殖因子 HB-EGF の結合タンパク質として同定したメタロプロテアーゼ、ナルディライジン (nardilysin : NRDC) が、細胞外ドメインシェディングの活性化因子であることを明らかにしてきた。また最近作製した NRDC 欠損マウスの解析から、NRDC がニューレギュリンのシェディングを介して、神経軸索の成熟と髄鞘形成を司ることを明らかにした。本稿では、NRDC によるシェディング制御機構と、その生体における役割について概説する。

## 1. はじめに

神経細胞は、軸索という細胞体から長く伸びる特有の構造を持ち、神経細胞に入力された情報は、この軸索を通じて伝達される。情報が伝達されるスピード(神経伝達速度)は軸索の径に依存するが、このスピードを大幅に高めるのが、軸索を取り巻いて絶縁体として働き、跳躍伝導を可能とする髄鞘という構造である。髄鞘は絶縁体として、情報の混線を防ぐ働きも持つので、軸索成熟(径が大きくなること)と髄鞘形成は、神経系ネットワークにおいて、情報伝達の種類と精度を決定付ける極めて重要な要素である。

髄鞘はグリア細胞(中枢神経ではオリゴデンドロサイト、末梢神経ではシュワン細胞)から供給され、神経細胞の軸

索が一定の径に達すると、髄鞘形成が開始される。軸索が髄鞘化された後も、軸索と髄鞘の相互作用によって、お互いが成熟していくものと考えられている(図1)が、その詳細な分子機構は明らかではなかった。

今回我々は、遺伝子改変マウスの解析によって、ナルディライジンというメタロプロテアーゼが、神経細胞軸索の成熟と髄鞘形成を制御することを明らかにした。ナルディライジンは、「細胞外ドメインシェディング」という

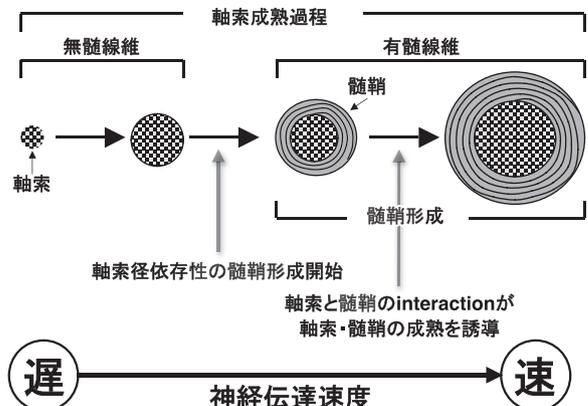


図1 神経軸索の成熟と髄鞘形成

京都大学大学院医学研究科循環器内科学 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54)

Regulation of protein ectodomain shedding by nardilysin—A critical role of nardilysin in axonal maturation and myelination—

Eiichiro Nishi (Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

翻訳後修飾を制御している。

## 2. 細胞外ドメインシェディングとは？

膜近傍部におけるタンパク質分解により、膜タンパク質の細胞外ドメインが不可逆的に切断される現象を、細胞外ドメインシェディングという（以下シェディングと略）。増殖因子やサイトカインの前駆体、様々な受容体や接着分子、さらに Notch やアミロイド前駆体タンパク質 (APP) など、多岐にわたる膜タンパク質がシェディングによる制御を受けており、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) プロテアーゼをはじめとして、MMP (matrix metalloproteinase) ファミリー分子や BACE1 (beta-site APP-cleaving enzyme 1) など様々な酵素群が“シェデース (shedase)” (切断酵素) として報告されている<sup>1,2)</sup>。

膜タンパク質の機能発現におけるシェディングの重要性は、例えば基質膜タンパク質である TGF- $\alpha$  の欠損マウスの表現型(毛髪、皮膚、角膜)が、切断酵素 ADAM17(TNF- $\alpha$  converting enzyme : TACE) の欠損マウスと酷似すること<sup>3)</sup>、すなわち適切にシェディングされないことが、分子そのものの欠損と同じ意味を持つことから示唆される。TGF- $\alpha$  と同じ EGF ファミリーに属するヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) の欠損マウスは、心臓の弁形成に異常を認めるが、この表現型は TACE 欠損マウス、さらに EGF 受容体 (EGFR) 欠損マウスにも同様に認められる<sup>4)</sup>。この事実は、TACE でシェディングされた分泌型 HB-EGF が、EGFR を介して情報を伝えることが、正常な心臓弁形成に必須であることを示している。より直接的に、単分子のシェディングの生物学的重要性を示した例として、シェディングを受けない変異体タンパク質をノックインしたマウスの解析が HB-EGF および TNF- $\alpha$  で行われている。HB-EGF の場合、非切断型変異体ノックインマウスは、HB-EGF 欠損マウスと同様の心臓表現型を呈し、正常な心臓発生における HB-EGF シェディングの重要性が再確認された。その一方で、ノックインマウスの生存率が欠損マウスより明らかに高くなったことから、HB-EGF の膜型前駆体が独自の機能を有することも示唆された<sup>5)</sup>。TNF- $\alpha$  の非切断型変異体ノックインマウスにおいては、TNF- $\alpha$  欠損マウスで生じたリンパ組織の発生異常をほとんど認めなかったことから、発生段階では TNF- $\alpha$  のシェディングは必須ではないことが示唆された。しかしながら、炎症疾患モデルにおける炎症巣形成には異常を認め、膜型前駆体と分泌型サイトカインが異なる生物学的機能を請け負っていることが明らかになった<sup>6)</sup>。

以上の個体レベルにおける解析からも明らかなように、シェディングは単なる基質タンパク質の活性化、不活性化というよりは、膜タンパク質の機能変換や多機能化を担う重要な翻訳後修飾と言えよう。多機能化という観点からい

えば、Notch や APP のように、シェディングが先行することで、 $\gamma$ セクレターゼによる膜内切断 (RIP : regulated intramembrane proteolysis) が誘導され、遊離した細胞質ドメインが新たな機能を持つもの (Notch の場合、転写調節機能) などは、その良い例と言えるだろう。

シェディングの生物学的機能は、切断される分子(基質)によって全く異なるわけだが、TACE 活性欠損細胞において多彩な分子群のシェディングが減少すること、ホルボールエステルが多くの膜タンパク質のシェディングを活性化することなどから、シェディング制御の分子機構は、基質間で、また異なる基質を持つ膜型プロテアーゼ間で、ある程度共通しているのではないかと考えることができる。シェディングは、様々な刺激による細胞の活性化に伴い誘導されることから、生体では厳密な制御下におかれ、重要な生理的および病理的役割を担うものと考えられる。ADAM プロテアーゼなどのシェデースの阻害を介して、細胞外ドメインシェディングを負に制御する因子として、TIMP や RECK などが同定されているが、シェディングの活性化を制御する分子機構は意外なほどわかっていない。TNF- $\alpha$  とその受容体、EGF 受容体のリガンド群、そして APP などのシェディング活性化機構を解明することは、炎症性疾患、がん、アルツハイマー病の病態解明に、そしてシェディングを標的とした新たな治療法の開発につながるものと期待される。

## 3. ナルディライジンによる細胞外ドメインシェディング制御機構

我々は、メタロプロテアーゼの M16 ファミリーに属するナルディライジン (nardilysin, N-arginine dibasic convertase ; NRDC) を、EGF ファミリーに属する HB-EGF の結合タンパク質として同定した<sup>7)</sup>。もともと NRDC の発見は、放射性ヨード標識した HB-EGF を、神経細胞や乳がん細胞表面でクロスリンクさせた時に、HB-EGF-EGFR (EGFR : ErbB1) 複合体とは明らかに分子量の異なる複合体が検出されたことに端を発する。同複合体が HB-EGF と HB-EGF の新規受容体から成ると考え、チューブ内クロスリンクによる複合体形成を指標として、乳がん細胞株 MDA-MB453 細胞からタンパク質生化学的に精製を行った結果、NRDC の同定に至った。細胞表面上で HB-EGF と特異的に結合するタンパク質として同定したにもかかわらず、NRDC は膜貫通ドメインのない可溶性のメタロエンドペプチダーゼであった。NRDC は明らかなシグナル配列は持たず細胞質に存在するが、細胞外にも分泌され一部は細胞表面に留まる。その機序は現在に至るまで明らかにできていないが、哺乳類のタンパク質で唯一 NRDC と高い相同性 (アミノ酸レベルで約 40%) を持ち、同じ M16 ファミリーに属する insulin degrading enzyme (IDE) が、非古

典型的分泌経路を通して細胞外に放出されることから、両者に共通する分泌機序が存在するのかもしれない。最近、細胞外小胞エクソソームに、ADAMプロテアーゼとその基質膜タンパク質が存在し、シェディングの新たなプラットフォームになっている可能性が示唆されている<sup>8)</sup>。IDEがエクソソームに存在しているという報告もあり、NRDcの分泌やシェディング増強機能にも関与している可能性があり興味深い。

NRDcは分子量約140 kDaで、他の多くのメタロプロテアーゼの活性中心(His-Glu-Xaa-Xaa-His)とは逆さまのHis-Xaa-Xaa-Glu-Hisという活性中心を持つM16ドメインと、このドメインと低いホモロジーを有するが、活性中心のない二つのM16不活性ドメイン以外に、既知のドメイン構造は有さない。IDEを含む他のM16ファミリー分子にはない特徴として、NRDcはM16ドメイン内に大きな高度酸性ドメイン(ヒトでは57アミノ酸長:うち43アミノ酸がAsp, Glu)が挿入されていることが挙げられる(図2)。この高度酸性ドメインは、HB-EGFとの結合ドメインでもある<sup>9)</sup>。マウス生体におけるNRDcの発現は広範で、週齢による変化も大きく一概には言えないが、中枢神経系、心臓、精巣、肺や肝臓で特に強い発現を認める。

分泌型HB-EGFの新規膜表面結合タンパク質としてNRDcを同定した経緯から、NRDcがEGFRの共役受容体として機能しているのではないかと考えたが、NRDc-EGFRの二量体あるいはHB-EGF-NRDc-EGFRの三量体の存在は確認できなかった。NRDcが、HB-EGFによるEGFR活性化を修飾するかどうかを検討したところ、NRDc単独でもEGFRが活性化され、その活性化がHB-EGF阻害剤(HB-EGFとEGFRの結合を阻害する)によって抑制されることがわかった。HB-EGFは膜結合型の前駆体として生成された後、細胞外ドメインシェディングを受けて分泌型(活性型)となることから、NRDcがHB-EGF前駆体に作用して細胞外ドメインシェディングを誘導し、切断された分泌型HB-EGFがEGFRを活性化する、という段階を経ているのではないかと考えた。実際に、NRDcの組換えタンパク質をHB-EGF前駆体を強発現させた細胞の培地中に加えたところ、その細胞外ドメインシェ

ディングを効率よく誘導することが明らかになった。その後、細胞における過剰発現系を用い、

- 1) NRDcがHB-EGFのシェディングを正に調節すること、
- 2) NRDcはTACEと複合体を形成し、TACEと協調してシェディングを増強すること、
- 3) メタロエンドペプチダーゼ活性のない変異型NRDcも野生型と同等のシェディング増強活性があること、
- 4) シェディング誘導因子(ホルボールエステルなど)がNRDcの細胞膜上への移動を惹起しTACEとの複合体形成を促進すること、を示した。

更にNRDcとTACEの組換えタンパク質を用いた実験によって、

- 5) NRDcはTACEと直接結合すること、
- 6) チューブ内ペプチド切断アッセイにおいてNRDcはTACEの切断酵素活性を直接増強すること、を示した<sup>10)</sup>。

これらの結果は、NRDcがTACEと複合体を形成し、TACEの活性化を介してHB-EGFのシェディングを増強することを示唆した。6)のペプチド切断アッセイで用いた基質ペプチドは、HB-EGFの膜近傍の切断部位に相当するもので、NRDcとの結合ドメイン(ヘパリン結合ドメイン)は含んでいなかった。したがって、NRDcによるTACEの活性化は、NRDcのHB-EGF結合能に依存しない可能性が示唆された。実際その後の検証によって、NRDcのシェディング増強効果を受ける基質はHB-EGFだけでなく他のEGFRリガンド、TNF- $\alpha$ 、APPなど、広範な膜タンパク質群に及ぶことが明らかになった。さらにNRDcは、TACE以外のADAMプロテアーゼのうち、少なくともADAM9とADAM10の活性も増強することを示し、NRDcが非常に多くの膜タンパク質の細胞外ドメインシェディングを制御している可能性が示唆された<sup>11,12)</sup>。以上の実験結果は、シェディング誘導因子による細胞の活性化に伴い、

- ①『NRDcの細胞膜上への移動』が起こり、②『ADAMプロテアーゼと結合』することによって、③『ADAMプロテアーゼの酵素活性の増強』を起こし、その結果④『基質膜タンパク質の細胞外ドメインシェディングの増強』を誘導するというNRDc-ADAMプロテアーゼシステムの存

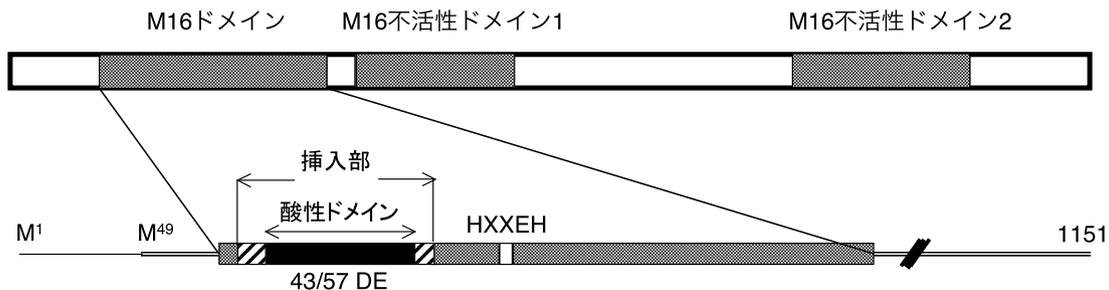


図2 ナルディライジン(ヒト)のドメイン構造

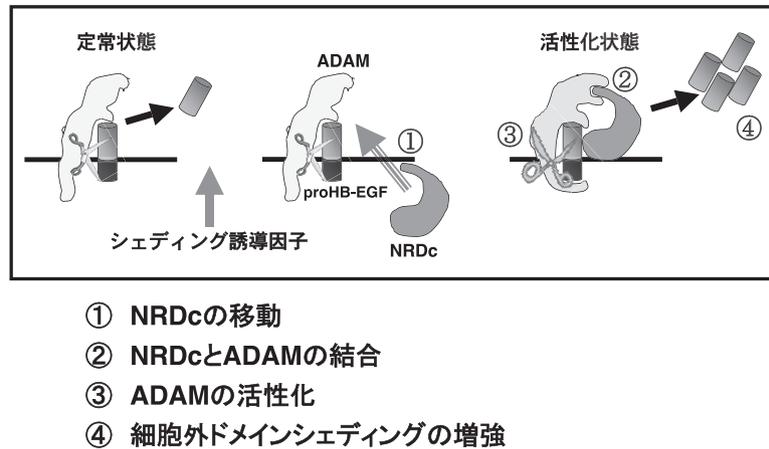


図3 細胞外ドメインシエディング誘導における“NRDc-ADAMs システム”仮説

在を示唆した(図3)。

細胞外ドメインシエディングにおけるADAMプロテアーゼの基質特異性の解釈は混沌としている。理由は、用いる実験系によって得られる結果が異なること、例えば、あるADAMによる基質のシエディングを強制発現(機能獲得)によって評価する場合と、ノックアウト(機能欠損)によって評価する場合に、しばしば、両者の結果が相反しないことがある。ADAMタンパク質群間の基質特異性における冗長性(redundancy)が影響するのだろう。我々は、TACE活性を欠損した細胞にNRDcを強発現するとTNF- $\alpha$ のシエディングが増加することを示した。また、ADAM10単独の強発現では明らかなTNF- $\alpha$ シエディング誘導は認めなかったが、ADAM10とNRDcを共に発現させることで同シエディングが増加することを示した<sup>12)</sup>。この結果から、NRDcが酵素活性の増強のみならず、基質特異性の調節にも関わっている可能性が示唆された。今後、NRDcの結晶構造解析や、ADAMプロテアーゼとの結合様式の解明に努め、NRDcによるADAMプロテアーゼ活性化様式の本態に迫りたい。

#### 4. NRDc欠損マウス—神経軸索と髄鞘形成におけるNRDcの役割—

個体レベルにおけるNRDcの生物学的機能を明らかにするため、NRDc欠損マウスを作製したところ、同ホモ接合体(NRDc $^{-/-}$ )はメンデルの法則にそって誕生したが、約70%が48時間以内に死亡した。NRDc $^{-/-}$ の出生時体重はNRDc $+/+$ の70%程度で、生後の成長遅延も認めしたが、生存したNRDc $^{-/-}$ は摂食能、運動能に一見問題なく、少なくとも2年齢まで元気に発育した。しかしながら、尾懸垂試験にて異常反射が残存(limb-clasping反射陽性)していたことから、中枢神経系の異常を疑い、脳(3ヶ月齢)を観察したところ、著明な大脳皮質の菲薄化と側脳室の拡大を認めた(図4A上パネル)。皮質

神経細胞にアポトーシスは認めず、ニッスル染色ではNRDc $^{-/-}$ の大脳皮質における神経細胞密度の増加を示したことから(図4A下パネル)、神経細胞の数が減少しているのではなく、神経細胞体以外の部分の体積減少が大脳皮質の菲薄化の原因であることが示唆された。そこで髄鞘および軸索に特異的な染色を行ったところ、特に脳梁部分に顕著な染色性低下を認め、NRDc $^{-/-}$ における髄鞘および軸索の低形成が示唆された。さらに経時的(14, 30, 90, 120, 365日齢)に、脳梁部分の電子顕微鏡による観察を行ったところ、1) NRDc $^{-/-}$ において髄鞘形成の開始が明らかに遅延していること、2) 全ての日齢のNRDc $^{-/-}$ において、有髄線維の数が少なく無髄線維の数が多量なこと、3) 全ての日齢のNRDc $^{-/-}$ の有髄線維において、軸索の径が小さく髄鞘厚が薄いこと、が明らかになった(図4B上パネルに14日齢、中パネルに90日齢の写真を示す)。以上から、NRDcが中枢神経における軸索成熟および髄鞘形成を制御していることが明らかになった<sup>13)</sup>。

次に、NRDcが末梢神経においても軸索成熟・髄鞘形成に関わっているかどうかを検討するため、坐骨神経を電子顕微鏡で観察した。野生型と比較して、NRDc $^{-/-}$ の有髄神経軸索径は有意に小さく、髄鞘厚は薄いことがわかり、NRDcが中枢神経同様、末梢神経においても軸索成熟および髄鞘形成を制御していることが明らかになった(図4B下パネル)。

NRDc $^{-/-}$ マウスは成長障害を呈したため、神経軸索・髄鞘の表現型も二次的に生じている可能性は否定できなかった。そこで、NRDcの直接作用を検証するために、成長障害など肉眼的表現型を一切認めないヘテロ変異体マウス(NRDc $+/-$ )における中枢神経系表現型の解析を行ったところ、NRDc $+/-$ の軸索径、髄鞘厚はいずれも野生型マウスより有意に低値で、野生型とNRDc $^{-/-}$ の中間的な表現型を呈していた<sup>13)</sup>。さらに、calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2プロモーター

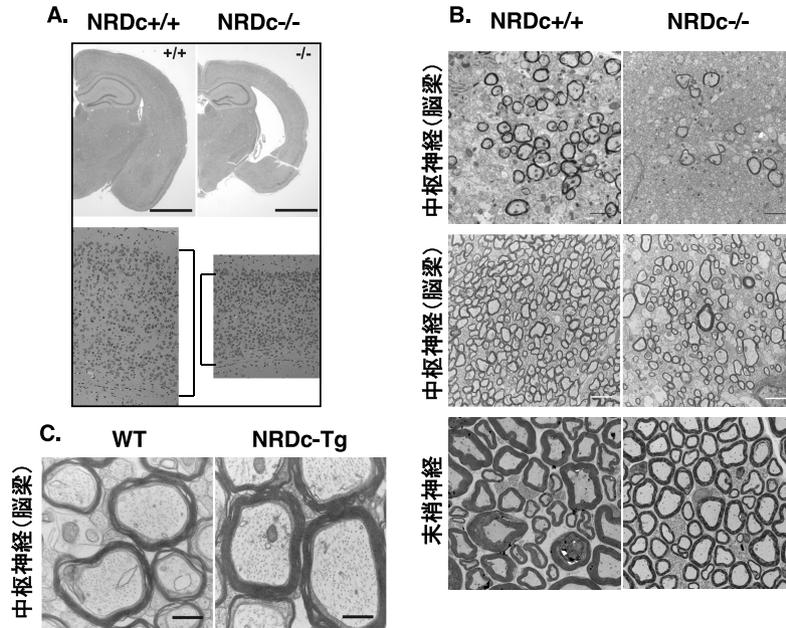


図4 NRDC遺伝子改変マウスにおける髄鞘形成異常  
 (A) 上パネル：NRDC欠損脳における大脳皮質の菲薄化と側脳室の拡大（90日齢：HE染色），下パネル：NRDC欠損マウスの大脳皮質における神経細胞密度の増加（Aと同じ切片：大脳皮質のニッスル染色）。  
 (B) NRDC欠損マウスの中枢・末梢神経における髄鞘低形成（電子顕微鏡解析）。  
 上中パネル：脳梁における髄鞘形成開始の遅延（上：14日齢）と髄鞘低形成（中：90日齢）。NRDC欠損マウスでは、有髄線維の数が少なく無髄線維が多い。有髄線維の軸索径は細く、髄鞘厚は薄い。下パネル：NRDC欠損マウスの坐骨神経（1年齢）における軸索と髄鞘の低形成。  
 (C) 神経細胞特異的NRDC過剰発現マウス（NRDC-Tg）における髄鞘の過形成（30日齢：脳梁）。（文献13より改変）

(CamKII)を用いて、前脳の神経細胞特異的にNRDCを強発現させたマウス(NRDC-Tg)を作製し、同様の検討を行ったところ、導入遺伝子が発現している部位特異的に軸索・髄鞘マーカータンパク質の発現が上昇しており、脳梁部分の髄鞘は野生型マウスと比較して明らかに厚くなっていた(図4C)。一方、軸索の径には有意な差はなく、これはCamKIIプロモーターが生後5日目くらい(神経系細胞の分化は終わっているが、髄鞘形成は開始されていない時期)から活性化されるためかと思われるが、NRDCが軸索成熟を介さずに直接髄鞘形成を制御し得ることを示している。これらの結果は、NRDCが*in vivo* (脳内)で、発現量依存的(ホモ変異体<ヘテロ変異体<野生型<過剰発現：図5)に髄鞘厚を制御していることを示しており、NRDCの軸索・髄鞘形成における直接的な効果が示唆された。

さらに、解剖学的表現型が神経機能に及ぼす影響を検討するため、行動解析を行った。その結果、NRDC<sup>-/-</sup>マウスが運動機能障害を呈すること(Beamテスト, Rotarodテスト)、認知機能障害を呈すること(T字迷路)が明らかになった。認知機能テストにおいて、NRDC<sup>-/-</sup>マウスの参照記憶は正常に維持されていたが、作業記憶は明ら

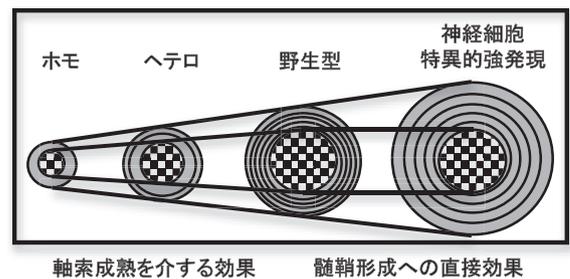


図5 NRDCによる発現量依存性の軸索・髄鞘形成制御

かに障害されており、初期の認知症と同じパターンを呈していた<sup>13)</sup>。

### 5. ナルディライジンによる軸索・髄鞘形成の分子機構

中枢神経の髄鞘形成は、神経細胞の軸索とオリゴデンドロサイトの相互作用によって制御されており、軸索が一定の径に達すると髄鞘形成が開始されると考えられている。もちろんオリゴデンドロサイトへの分化や、同細胞の増殖が障害されても髄鞘低形成は生じるが、NRDC<sup>-/-</sup> (胎生18.5日, 5日齢)の脳において、オリゴデンドロサイ

ト前駆細胞の数, およびオリゴデンドロサイトのマーカータンパク質の発現レベルは, 野生型と変わらなかった<sup>13)</sup>. したがって, NRDCはオリゴデンドロサイトの分化, 増殖には関与せず, 髄鞘化のみを制御していることが示唆された. NRDCに対する抗体による免疫染色を行ったところ, NRDCは神経細胞に強く発現しているが, オリゴデンドロサイトにはほとんど発現が観察されなかったことから, 神経細胞に発現するNRDCが, 何らかのシグナルをオリゴデンドロサイトに伝えることで, 髄鞘形成を制御しているものと考えられた.

NRDCによる髄鞘形成制御の分子機構を考える上で, 我々はニューレギュリン1 (NRG1) に注目した. NRG1は軸索側に発現し, グリア細胞側に発現する受容体 (ErbB4) を介して髄鞘形成を制御することがわかっている. 特に末梢神経では, 軸索のNRG1発現が低い (NRG1+/-マウス) と髄鞘は薄く, NRG1の発現が高い (NRG1強発現マウス) と髄鞘が厚くなることが報告され, NRG1が髄鞘形成のマスターレギュレーターであると考えられている. NRG1はHB-EGFと同じEGFファミリーに属し, 膜型前駆体として生成され, 細胞外ドメインシェディングによる機能制御を受ける. NRG1のシェディングを司る酵素として, これまでにTACEを含むADAMプロテアーゼと, アミロイドβ産生酵素のひとつであるβセクレターゼBACE1が報告されている. BACE1に関しては, その欠損マウスが髄鞘低形成を呈したことからNRG1との関連が検討され, BACE1がNRG1を切断することが報告されている<sup>14)</sup>. そこで我々は, 神経細胞 (軸索) に発現するNRDCが, TACEあるいはBACE1と協調してNRG1のシェディングを増強し, オリゴデンドロサイト側へ受容体 (ErbB4) を介して強い髄鞘化シグナルを伝えることで, 髄鞘形成が亢進するのではないかと考えた (図6). この仮説を証明

するため, まず細胞での強発現系を用いて, NRDCのNRG1シェディングにおける役割を検討した (図7A). 本実験では, NRG1のN末端にHAタグを付与しており, 細胞溶解液 (TCL) ではNRG1の全長タンパク質 (FL) とN末断片 (NTF) が, 培養上清 (CM) 中では遊離したNTFが, HAに対する抗体で検出できる. その結果, NRDCはTACEのみならず, BACE1とも協調して, NRG1のシェディングを増強することがわかった. NRDCによるTACE活性の増強は, 培養上清におけるNRG1細胞外ドメインの増加を伴った. 一方NRDCをBACE1と共発現させた場合, 切断されたNRG1は細胞内では明らかに増加したにもかかわらず, 細胞上清での増加は認めなかった (図7A). この結果は, NRDCがTACEとは従来の仮説通り細胞表面で協調しているが, BACE1とは細胞内で協調している可能性を示しており, NRDCが異なる機序で両酵素の活性を調節している可能性が示唆された (図7B).

さらに, NRDCを欠損した細胞, あるいはNRDC-/-マウスの脳組織における検討で, NRG1の全長型の発現上昇と, 切断型の発現低下を認めたことから, NRDCが*in vivo*においてもNRG1のシェディングを正に制御していることが示唆された. 興味深いことに, NRDC-/-マウスの脳組織において, BACE1の成熟型タンパク質 (正しく翻訳後修飾を受けたタンパク質) の発現が低く, 未成熟型タンパク質の発現が増加していた<sup>13)</sup>. この結果は, NRDCがBACE1の翻訳後修飾の調節を介してNRG1のシェディングを調節している可能性も示唆している.

末梢神経に関しては, NRG1ヘテロ欠損マウス, BACE1およびNRDCホモ欠損マウスの三者が, レマーク束の微細構造に至るまで, 酷似した表現型を呈しており, 基質: NRG1, 切断酵素: BACE1, 切断酵素の活性化因子: NRDCという組み合わせが髄鞘形成に必須であることが強く

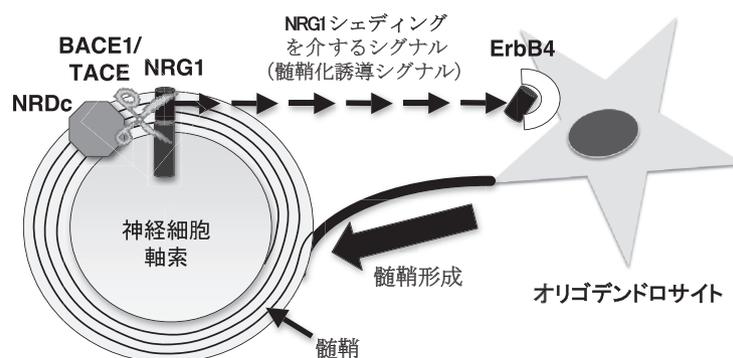
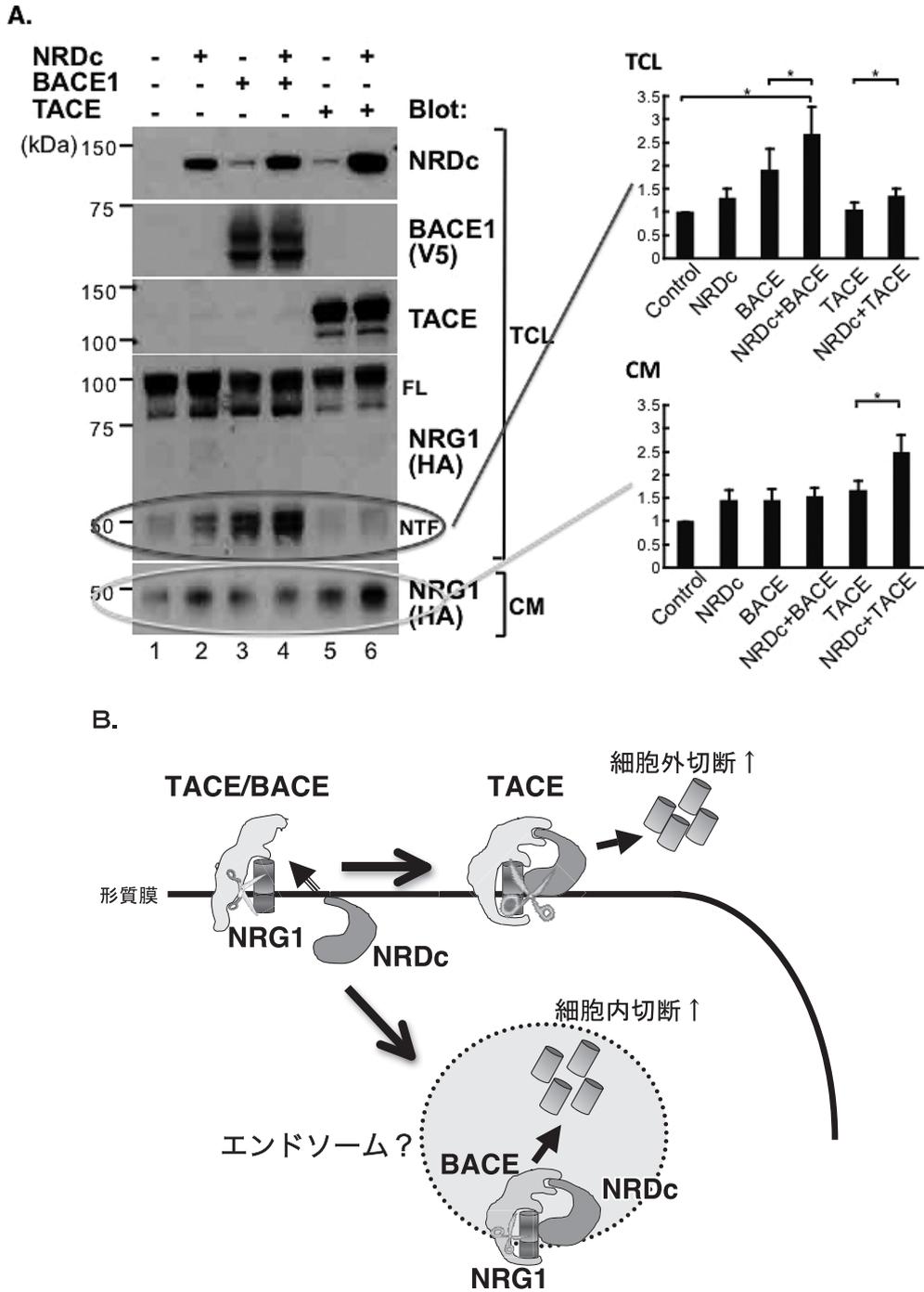


図6 NRG1シェディングを介する髄鞘形成誘導シグナル

神経細胞 (軸索) に発現するNRG1は, BACE1, TACEなどの切断酵素による細胞外ドメインシェディングを介して, オリゴデンドロサイトに発現する受容体 (ErbB4) を通じて髄鞘形成の指令を出す. NRDCは切断酵素の活性を調節することで, 神経細胞からオリゴデンドロサイトへの髄鞘形成の指令を制御すると考えられる.



**図7** NRDcはBACE1/TACEによる細胞外ドメインシエディングを増強する  
 (A) NRDc (FLAG タグ), BACE1 (V5 タグ), TACE, NRG1 (HA タグ) を図のように COS7 細胞にトランスフェクションし, 24 時間後に培地を交換, その 4 時間後に細胞溶解液 (TCL) と培養上清 (CM) をウェスタンブロットにて解析した. 右は, TCL 中および CM 中の NRG1 の N 末断片 (NTF) を, デンシトメトリーで定量化したもの (5 回の独立した実験の平均 ± 標準誤差, \*P<0.05) (文献 13 より改変).  
 (B) NRDc が異なる “場” で, BACE1 と TACE を活性化している可能性.

示唆された<sup>13)</sup>. これまで TACE 欠損マウスの神経系表現型の報告はないため, 同分子の関与は現段階では不明である. しかしながら, 複数の異なるプロモーター Cre マウス

を用いて作製された神経細胞特異的 NRG1 欠損マウスにおいて, そのどれもが中枢神経の髄鞘形成に異常を認めなかったことから, 中枢神経系髄鞘形成における NRG1 の

役割は明瞭ではなくなっている<sup>15)</sup>。NRDcは明らかに、中枢および末梢神経双方の髄鞘形成を制御しているが、中枢神経においては、NRG1以外の基質タンパク質の切断制御を介して髄鞘形成に関与している可能性もある。さらに、NRG1+/-マウスとBACE1-/-マウスにおいて軸索成熟不全は認めないなど、NRDc欠損による軸索の表現型発現の分子機構にはこれから解明すべき部分が多い。

## 6. 生体におけるシェディング解析の困難さ

最後に、*in vivo*における細胞外ドメインシェディング検出の困難さについて触れてみたい。培養細胞を用いた実験であれば、1) 培養液中の細胞外ドメイン(N末端断片: 基質膜タンパク質はI型とする)の増加、2) 細胞溶解液中の全長型の減少と細胞質ドメイン(C末端断片)の増加、の両者を認めれば、細胞外ドメインシェディングが生じた、と考えて良いだろう。しかしながら、全長型タンパク質と、切断後に生じるC末端断片は、異なる時系列、経路で分解・代謝される可能性があることに注意しなければならない。例えば、図8はホルボールエステル刺激によるニューレギュリン1のシェディングを、刺激開始後5、15、60分後にウェスタンブロット(C末を認識する抗体)で検出したものだが、5分後において全長型の消失と共にC末端断片が明らかに増加しており、培養液中のN末断片の増加(図は示さず)と合わせて、細胞外ドメインシェディングが生じたことがわかる。ところが、切断によって生じた細胞質(C末)断片は、15、60分後と減少しており、シェディングをうけた後、急速に分解されたことが推測される。本実験のように、培養液中のN末断片と、細胞溶解液中のC末断片が別々に検出可能で、かつ刺激時間を調節できるような系では、細胞外ドメインシェディングの観察は可能である。しかしながら、*in vivo*で同様のデータを得るためには、1) 同一分子の細胞外と細胞質ドメインを別々に、しかも内因性発現レベルで検出できる抗体が存在すること、2) *in vitro*の培養液と細胞を分離す

るように、*in vivo*で細胞外と細胞質ドメインを含むサンプルを分離して採取できること、3) 経時的なサンプル採取が可能なこと、などが必要だが、現実的にこれらの条件が満たされることは極めて稀だと言わざるを得ない。特に、遺伝子改変マウスをコントロール動物と比較する場合などは、大抵サンプル採取時(動物を屠殺した時点)のワンポイントにおける、細胞質あるいは細胞外ドメインどちらかのスナップショット解析から推測せざるを得ないのである。その場合、実際には細胞外ドメインシェディングが亢進しているとしても、図のPMA刺激5分後に認められているような、全長型の減少と切断断片の増加が得られて、“シェディング増強が示唆される”ケースは必ずしも多くはないのではないだろうか。図の60分後に認められるように、全長型のみが減少しているパターン、もしくはシェディング増強により、全長型と切断型両方のターンオーバーがともに亢進すれば、コントロールとは見かけ上、全く変化がなく見える場合もあるだろう。極端な話、タンパク質生成と分解のバランスによっては、見かけ上、全長型が増加し切断型が減少して、“シェディング減弱が示唆される”こともあり得る。したがって、結局は組織(*in vivo*)から得られた結果と、細胞実験(gain of function, loss of function)、さらに遺伝子改変動物から得た初代培養細胞による解析などを含め、総合的に判断していく必要があると考えられる。

生体において細胞外ドメインシェディングの活性化は、時間的・空間的特異性をもって微細に調節されていると考えられる。したがって、特殊なケースを除き、生体におけるレスキュー実験(例えばシェディングが障害された膜タンパク質の細胞外ドメインを補充することによる表現型の改善)は困難なことが多いだろう。さらに、細胞外ドメイン自体が機能タンパク質(サイトカインや増殖因子など)であることがほとんどであり、その投与で生じる結果の解釈は難しいことが多い。

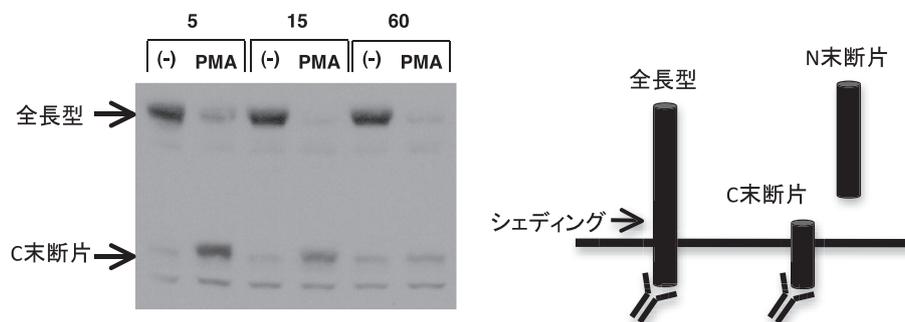


図8 ホルボールエステルによる内因性NRG1シェディングの誘導

マウス線維芽細胞を、PMA(100 nM)刺激なし、ありで5、15、60分培養し、細胞溶解液中のNRG1を、細胞質ドメイン(C末)を認識する抗体で検出した。同抗体は、全長型と、シェディング後のC末断片を認識する。

## 7. おわりに

我々は、NRDcがニューレグリンのシェディングを介して、神経軸索・髄鞘形成を司ることを示し、NRDcが個体レベルにおいても、重要なシェディング調節因子であることを明らかにした。今後、脱髄と髄鞘再形成を主病態とする多発性硬化症や、損傷を受けた神経の再生におけるナルディライジンの意義を追求していきたい。

NRDc<sup>-/-</sup>マウスは、本稿で詳説した神経系の表現型以外にも、成長障害(胎内・生後)、エネルギー代謝異常、循環動態異常など、多彩な表現型を呈した(未発表)。この結果は、NRDcによるシェディング制御機構が、さまざまな生命現象において重要な役割を果たしていることを示唆している。NRDc<sup>-/-</sup>マウスが多彩な表現型を呈したことは、①「NRDcが制御に関わっている切断酵素、基質膜タンパク質が多岐にわたっている」からと考えられる。一方、多彩な表現型を呈してはいるものの、生後48時間を乗り越えれば長期生存可能であることは、②「シェディングの微細な制御は障害されているものの、切断酵素自体は存在しているため基礎レベルのシェディングは保たれている」からと推測することができるだろう。我々が、タンパク質および細胞レベルで明らかにしてきた、NRDcの細胞外ドメインシェディング活性化機能と、この欠損マウスの表現型を結びつけることで、今までよくわかっていなかった『個体レベルにおけるシェディング制御の意義』をさらに明らかにしたい。ひいては、炎症性疾患、がん、アルツハイマー病など難治性疾患における、細胞外ドメインシェディングの病態生理学的意義を解明し、これらの新たな治療法の開発に繋げていきたい。

## 文 献

1) Arribas, J. & Borroto, A. (2002) *Chem. Rev.*, **102**, 4627-4638.

- 2) Levine, S.J. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 14177-14181.
- 3) Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J., & Black, R.A. (1998) *Science*, **282**, 1281-1284.
- 4) Jackson, L.F., Qiu, T.H., Sunnarborg, S.W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., & Lee, D.C. (2003) *Embo. J.*, **22**, 2704-2716.
- 5) Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., & Mekada, E. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 469-475.
- 6) Ruuls, S.R., Hoek, R.M., Ngo, V.N., McNeil, T., Lucian, L.A., Janatpour, M.J., Korner, H., Scheerens, H., Hessel, E.M., Cyster, J. G., McEvoy, L.M., & Sedgwick, J. D. (2001) *Immunity*, **15**, 533-543.
- 7) Nishi, E., Prat, A., Hospital, V., Elenius, K., & Klagsbrun, M. (2001) *Embo. J.*, **20**, 3342-3350.
- 8) Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006) *Immunol. Lett.*, **107**, 102-108.
- 9) Hospital, V., Nishi, E., Klagsbrun, M., Cohen, P., Seidah, N. G., & Prat, A. (2002) *Biochem. J.*, **367**, 229-238.
- 10) Nishi, E., Hiraoka, Y., Yoshida, K., Okawa, K., & Kita, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31164-31172.
- 11) Hiraoka, Y., Ohno, M., Yoshida, K., Okawa, K., Tomimoto, H., Kita, T., & Nishi, E. (2007) *J. Neurochem.*, **102**, 1595-1605.
- 12) Hiraoka, Y., Yoshida, K., Ohno, M., Matsuoka, T., Kita, T., & Nishi, E. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 154-158.
- 13) Ohno, M., Hiraoka, Y., Matsuoka, T., Tomimoto, H., Takao, K., Miyakawa, T., Oshima, N., Kiyonari, H., Kimura, T., Kita, T., & Nishi, E. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 1506-1513.
- 14) 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.
- 15) Brinkmann, B.G., Agarwal, A., Sereda, M.W., Garratt, A.N., Muller, 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.