

# 成長円錐のタンパク質構成から見たその機能的分子基盤 —プロテオミクスからのアプローチ

五十嵐 道弘

成長円錐は、発達期の神経細胞の突起先端に形成される運動性に富んだ構造体であり、脳の複雑な神経回路を形成し、再編し、再生する際に決定的に重要な役割を果たす。これまでは、無脊椎動物や末梢神経系などの培養で、薬理学的な方法で細胞生物学的な解析が進んだが、現在主流となっている哺乳動物の中樞神経系の成長円錐は、分子機構が相当違う可能性のあることが分かってきた。また中樞神経系では複雑な分子構成があるため、系統的にシグナル伝達を理解する手段がほとんどなかったため、遺伝子改変マウスによる偶発的な発見以外に頼るより、方法がなかった。著者はこの問題点を克服するため、プロテオミクスによって成長円錐の分子基盤を明らかにしており、これに基づいて新たな成長円錐の分子マーカーを見出した。これらはいずれも線虫やショウジョウバエの様な無脊椎動物では見出されてこなかった分子であり、哺乳動物脳における独自の多様な神経成長機構の存在を意味している。このプロテオミクスから見えてきた分子基盤は、成長円錐の機能に全く新しい洞察が可能となるものであり、この分野の研究に幅広く資すると思われる。

## 1. 成長円錐とは

成長円錐は、発達期の神経細胞の神経突起先端に存在する、運動性に富んだ構造体を指す。この発見は、1890年に神経解剖学の泰斗である Santiago Ramón y Cajal が鶏胚の脊髄で発見し、*in vivo* では円錐状構造を取っているもので、*cônes de croissance* と命名した<sup>1)</sup>。Cajal は Golgi 染色という方法を駆使して、成熟脳に比べて神経細胞が比較的疎な幼若脳に適用して、神経科学の基盤となる大発見をいくつも行っており、1906年にノーベル賞を Golgi 染色の発見者 C. Golgi と同時受賞した。成長円錐はこの一連の発見の中でも特段に優れた発展である。神経成長との直接の関

連性はその後、20年程度を待つ必要があり、Harrison らの培養実験で見出された<sup>2)</sup>。しかし、Cajal は静止画像の状態では、この役割が神経成長と直結することを洞察しており、その慧眼は驚嘆に値する。また後述のとおり、成長円錐の chemotropism については、このアイディアに基づいて、Tessier-Lavigne らが netrin というガイダンス分子を発見した<sup>3)</sup>。

1956年に東京大学医学部解剖学教室の中井準之助が、成長円錐の挙動を映画に撮影して解析した<sup>4)</sup>。これもまた今日のライブイメージングの先駆となる、世界的な業績である。中井は、神経成長に関する guidance cue の多重保障説、化学的触味説を出したが、これも今日的理解で全くゆるぎない事実である。

成長円錐の研究は、おおそ1960年代-80年ころまでは、D. Bray の「アクチンが成長円錐の運動を担う」ということ<sup>5)</sup>以外、分子の研究はほとんどなく、大部分は電子顕微鏡的な内容であった。しかし、1980年代以降は、薬理学的実験やモデル生物の研究で急速に成長円錐の分子レベルの研究が高まってきた。

1990年代には軸索ガイダンス分子が一挙に見出され、

新潟大学医歯学系分子細胞機能学 (〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757)

Growth cone molecules: Molecular basis of growth cone functions revealed by proteomic analysis

Michihiro Igarashi (Division of Molecular and Cellular Biology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Asahi-machi, Chuo-ku, Niigata 951-8510, Japan)

これはモデル生物のホモログや変異体の研究、ノックアウトマウスの利用も加わって、急速に軸索ガイダンスの研究が進化した。しかしながら、成長円錐の内側に眼を向けると、一般性のある原理はそれほど確立されなかった。

## 2. 成長円錐の細胞内構造 (図1)

神経細胞には軸索と樹状突起という2種類の突起が存在するため、成長円錐は、軸索の成長円錐と樹状突起の成長が存在する。しかしながら、研究が進んでいるのは軸索の成長円錐のみであるため、本稿では軸索成長円錐についてのみ論ずる。

成長円錐は軸索に近い部分に、多数の微小管と多数の小胞を有する<sup>6)</sup>。この部分をC-domain/regionと呼ぶ。一方、さらに先端部分にはアクチン繊維が密在する。ここは、P-region/domainと呼ばれる。一般に、後者が運動性に最もかかわると思われているが、この部分だけで移動が可能となるわけではなく、成長円錐の機能を果たすためには、アクチン繊維の再編が、微小管伸長と連動して初めて可能となる。小胞の意義は、おそらくリソソームの前駆体として使われる部分が大いと思われ<sup>7)</sup>が、それ以外のリサイクリングの意義などは正確にはわかっていない。またオルガネラについては、成長円錐の電子顕微鏡の時代から不確定な部分が大い。

## 3. 軸索ガイダンス分子の発見

成長円錐がどのような経路選択をしているか、という問題は大きな課題であった。これに関しては、軸索ガイダンス分子という細胞外の諸因子が具体的に証明されたことで、一応の解決がついた<sup>8)</sup>。1980年代の後半から、C.S. Goodmanらのショウジョウバエを使った研究で、種々の神経回路形成変異体の責任分子が見出された<sup>9)</sup>。また線虫*C. elegans*でも同様のアプローチが始まった。但し、当時はまだノックアウトマウス技術がそれほど進んでいなかったため、さほど哺乳類の神経回路形成へのインパクトは大きくなかった。

しかし、1990年代に入って、鶏胚の神経細胞でアッセイされていた成長円錐の伸長因子、抑制因子が単離され、これらが線虫やショウジョウバエでの特徴的な回路形成変異体の責任分子ホモログであった点も見出され、大きなインパクトをもたらされた。すなわち、M. Tessier-Lavigneらのnetrin<sup>10)</sup>、J. Raperらのcollapsin (SemaIII)<sup>11)</sup>、F. BonhoefferらのEph receptor<sup>12)</sup>といった分子群の発見であり、これらは軸索ガイダンス分子と呼ばれる。これらの発見に続いて、21世紀になっても2003年にShh<sup>13)</sup>、2009年に田中英明(熊本大)らのDraxinの発見<sup>14)</sup>がもたらされた。

軸索ガイダンス分子の発見はきわめて重要な結果ではあるが、成長円錐にとってはいくつかある外部因子の一つに

過ぎない。また軸索ガイダンス分子は誘引または反発のいずれかの作用を持つが、同一の分子であっても神経細胞の種類によって、双方の作用を持つことが示されている。たとえば、netrinは脊髄の前後を結ぶ場合には誘引性であるが、滑車神経という眼球を動かす神経の一つに対しては反発性であると考えられる<sup>15,16)</sup>。このことは、ガイダンス分子が成長円錐の挙動を決定しているのではなく、成長円錐がガイダンス分子からの情報を受容し、これに基づいて作動するシグナル伝達が成長円錐の挙動を決定する子を意味する。したがって、成長円錐内部の分子機構の解明が一層重要になったと言える。

またこれらのガイダンス分子の発見は、基本的に鶏胚の培養神経細胞における細胞生物学的なバイオアッセイが効を奏したものであり、モデル動物でのホモログからの「飛び道具的」な発見ではなかったことは注目に値する。後述するように、分子の重複性が大きい高等脊椎動物ではさほど簡単に、モデル生物から発見された分子の各ホモログの意義を理解することはできにくいことを意味している(その後、Slit-Robo系<sup>17)</sup>ではこの連携がうまくいったが、一般には難しいのである)。

## 4. 成長円錐の分子機構

著者らのプロテオミクスを用いた研究<sup>16)</sup>以前にも当然のことながら、個別の分子に関して成長円錐の分子機構への関与を示す、非常に多数の研究があり、これらが困難な成長円錐研究を支えていたことは一定の評価に値する(例えば文献18)など)。但し、これらの大部分が薬理学的な研究であるため、阻害剤が使えない系や、分子の重複あるいは多種のアイソフォームが存在する場合には情報量が少なかった。単純なモデル細胞での薬理学的実験、無脊椎動物を用いた研究は枚挙が困難であるので、ここでは高等脊椎動物のニューロンで一定の確証が得られている内容に限定して記載する。

1) cAMP: Pooらにより、薬理学的にcAMPの増加をもたらすと成長円錐の伸長方向性が変化し<sup>19)</sup>、cGMPがそれに相反的な効果を持つことが示された<sup>20)</sup>。これはnetrin-1のガイダンスの方向性と関連付けられて論じられている<sup>19)</sup>。当初はXenopusで研究が進み、現在では哺乳動物でもイメージングを用いた研究を含めて、かなり詳細に研究されている。その下流の作用機序としては、cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)<sup>21)</sup>が想定されており、その産物との結合分子が14-3-3タンパク質であることも示されている<sup>22)</sup>。後述するが、cAMPが軸索ガイダンスに影響を及ぼすことは、ある程度の一般性を有する事象と考えられる。但し、末梢神経系や小脳などを除き、一般に哺乳動物の中樞ニューロンはcGMPで作動する系が少ないので、cGMPがcAMP

の作用に拮抗するという「陰陽説」が生理的に一般性を持って（すなわち、大脳皮質や海馬でも）成り立っているかどうかはかなり疑問視される。現状の多くの研究は、薬理的に cGMP ホモログを強制的に導入して、内因性のシグナル伝達を変化させていると考えられる実験系であり、我々のプロテオミクスの結果でも、cGMP 作動系因子は成長円錐でほとんど存在していない。

- 2)  $\text{Ca}^{2+}$ ：成長円錐の運動に  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることは、1980年代から知られている。現状では、非興奮時の  $10^{-7}$  M から  $10^{-6}$  M の中間で  $\text{Ca}^{2+}$  による作動系が考慮されている<sup>23)</sup>。この下流は非常に多岐にわたると思われるが、シグナル伝達として薬理的な証拠以外には、大してわかっていない。成長円錐での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のコントロールはおそらく電位依存性のチャネルからの流入が主体で、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位は末梢神経系ではかなり働いているようだが、中枢ニューロンでは明確な証拠に乏しい。
- 3) アクチン系：成長円錐には前述のように、フィロポディア、ラメリポディアと呼ばれるアクチン繊維の濃縮された部分があり、この部分の重合・脱重合サイクルに基づいてアクチン繊維の動的な変化が起こり、伸びていく方向が（軸索ガイダンス分子などによって）決定される<sup>24)</sup>。この性質は、種々のアクチン調節タンパク質によって生ずる。プロテオミクスで見出されたものについては後述する。フィロポディアの先端のみに存在するとされるアクチン調節タンパク質としては、微量分子であるが、Ena/VASP 系の MENA<sup>25)</sup>、非定型ミオシンの一種である myosin X<sup>26)</sup> が存在し、これらが機能していると報告されている。一方、成長円錐の C-domain を構成する膜の裏打ち構造は、通常の細胞同様に、cortical actin と呼ばれる構造が存在すると思われるが、その分子構成や動的変化の仕組みはほとんど研究されていない。
- 4) 微小管系：フィロポディアの伸長方向が決定すると、この部分に微小管がスライディングして安定化し、そこが成長円錐から新たな軸索に変化すると考えられる。微小管の安定化には、①微小管結合タンパク質 (MAP1B, tau など)、② +TIPs の 2 種類のタンパク質群が必要である。前者は微小管の側方に結合して微小管を強く安定化する。神経細胞ではこれらが大量に存在するため、通常の細胞では不安定な微小管が安定化して、突起が長く伸びられる。一方、後者の +TIPs は微小管の重合端に結合して重合を促進する分子群<sup>27)</sup> で、非常に多種類の、構造が違うものが存在する。
- 5) 小胞系：成熟神経細胞を含めて、一般の細胞では細胞内小胞輸送が重要な機能的な位置を占め、その根幹にか

かわる SNARE タンパク質群が存在する。成長円錐においてはすでに成長機構に種々の SNARE タンパク質が関わるが見出されている<sup>7,28-31)</sup>。小胞については、VAMP (v-SNARE) が存在して、膜融合によって神経成長に寄与していることが示唆されている。但し、これらがどのように調節されているか、はっきりしない。成長円錐の小胞はシナプス小胞よりも大きく、明らかに異なった実体と考えられる。現在のところ、1種類の小胞なのか、生化学的には区別される数種類のものがあるのか、わかっていない。

- 6) 情報伝達系：上記の基本的ストーリーがはっきりしていない割には、極めて多数の研究が存在する。これの大部分が、薬理的手法と、Yeast two-hybrid 法で見出された結合分子を組合わせて強引にストーリーを展開したものが多く、使っている神経細胞の種類も多様であるため、今後の整理が必要である。

## 5. 成長円錐のプロテオミクス

哺乳動物の中枢神経系では、成長円錐の作用機構はかなり複雑である。またこれまで、特定の分子のみに着目した結果、新しい分子群も見つかったが、それらが他の情報伝達系に比較して重要かどうか、全く保障の限りではない。また個々の情報伝達系の相互関係は明らかでないため、コーディネーションがどのように生じているか、全く理解できていない。さらにいくつかの重要なプロセスが全くブラックボックスである。また後述のように、従来は一つの分子について高々数種類の分子の結合が見出される程度であったが、最近プロテオミクスを使うことで、数十から 100 種類を超える結合を見出すことが *in vitro* の実験でも可能となってきており、むしろ細胞内ではきわめて多数の結合分子が存在することが当然だと考えられる。よって、現状の研究手法では、成長円錐のように多様で複雑な機能を果たす系で、本質的な分子機構を見出すためには根本的に異なった解決法がなければ、すぐに行き詰ってしまうことは必定であると考えられる。

前述のとおり、神経発生にはモデル動物である線虫やショウジョウバエの変異体スクリーニングが大きな力を発揮してきたが、これらは構造も単純であるため、そろそろ高等動物のモデルとなる部分は発掘され尽くした感もあり、分子の重複性から見てもアイソフォームが多様に存在する高等脊椎動物のモデルとしては、成長円錐機能シグナル伝達に寄与する可能性は、必ずしも高いとは言い切れない。

よって、著者らはこれらの考えに基づいて、哺乳動物脳での成長円錐分子像をまず解明し、それに基づいて新しい分子群の発見を試みることにした。この状態を根本的に解決する手段として、われわれはプロテオミクスに注目し

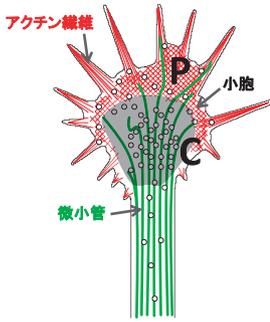
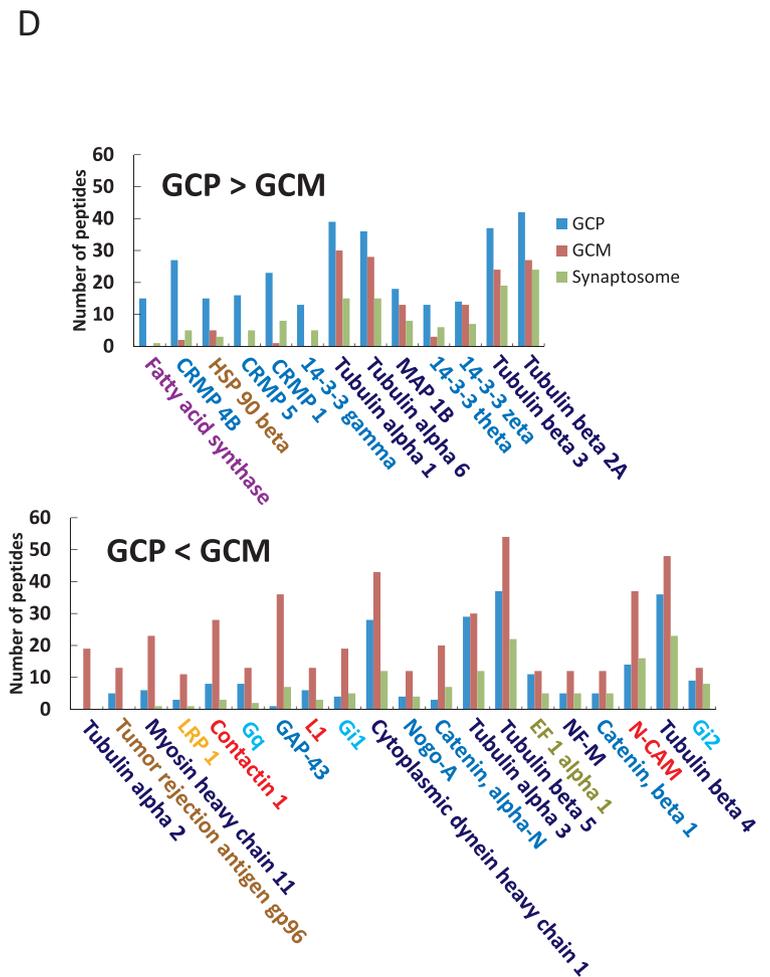
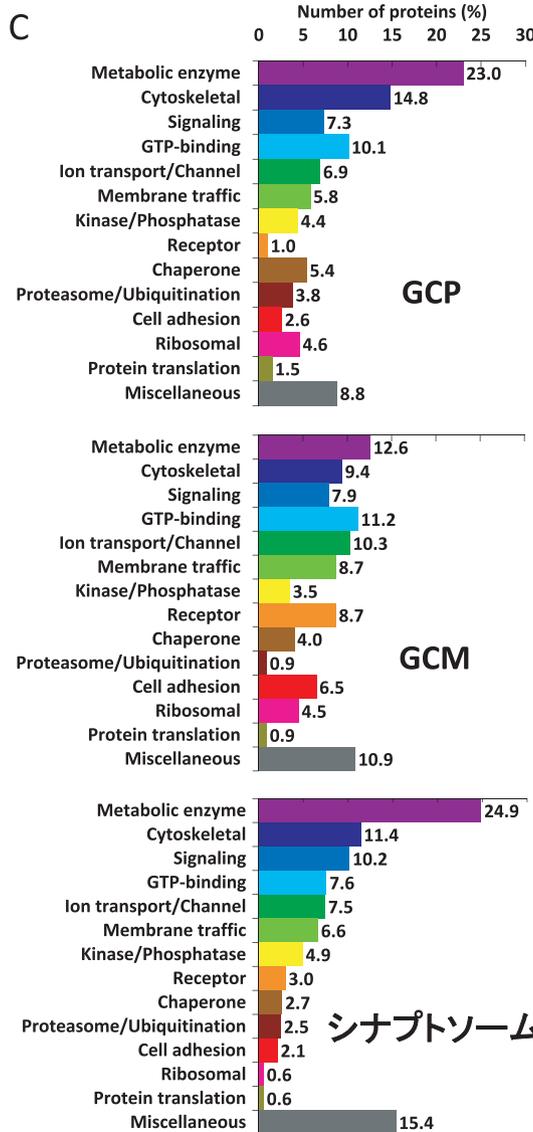
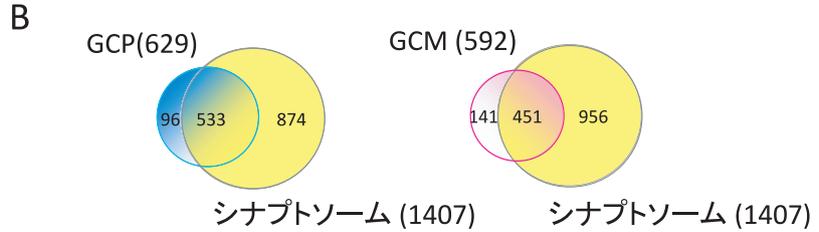
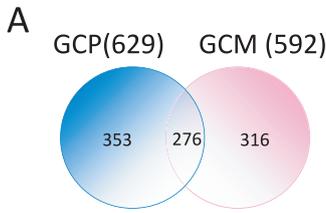


図1 成長円錐の構造。培養神経細胞の成長円錐は掌状の構造で、中心部のC-domain/regionと末梢部のP-domain/regionに分かれ、前者は微小管が、後者はアクチン繊維が多い。前者には多数の小胞が存在する。

図2 成長円錐のプロテオミクスの要約<sup>37)</sup>。A. 成長円錐全体(GCP)と成長円錐膜(GCM)のタンパク質構成。B. 成長円錐とシナプトソーム(成熟脳シナプスの生化学的単離画分)の比較プロテオミクス。C. GCP, GCMとシナプトソームの構成タンパク質比較。D. GCP, GCM間での濃縮タンパク質の比較



### 成長円錐のプロテオミクス解析

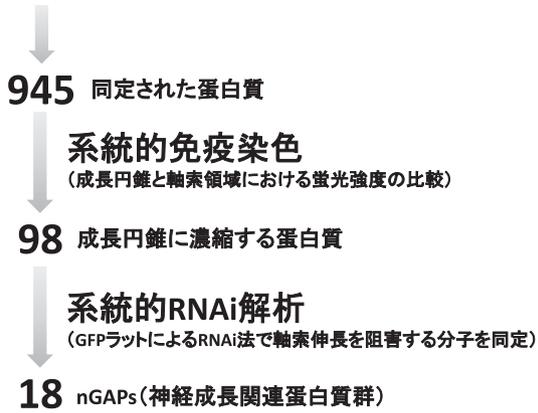


図3 nGAPs探索のストラテジー<sup>37)</sup>



図5 成長円錐のプロテオミクスから示唆される情報伝達分子群の階層性

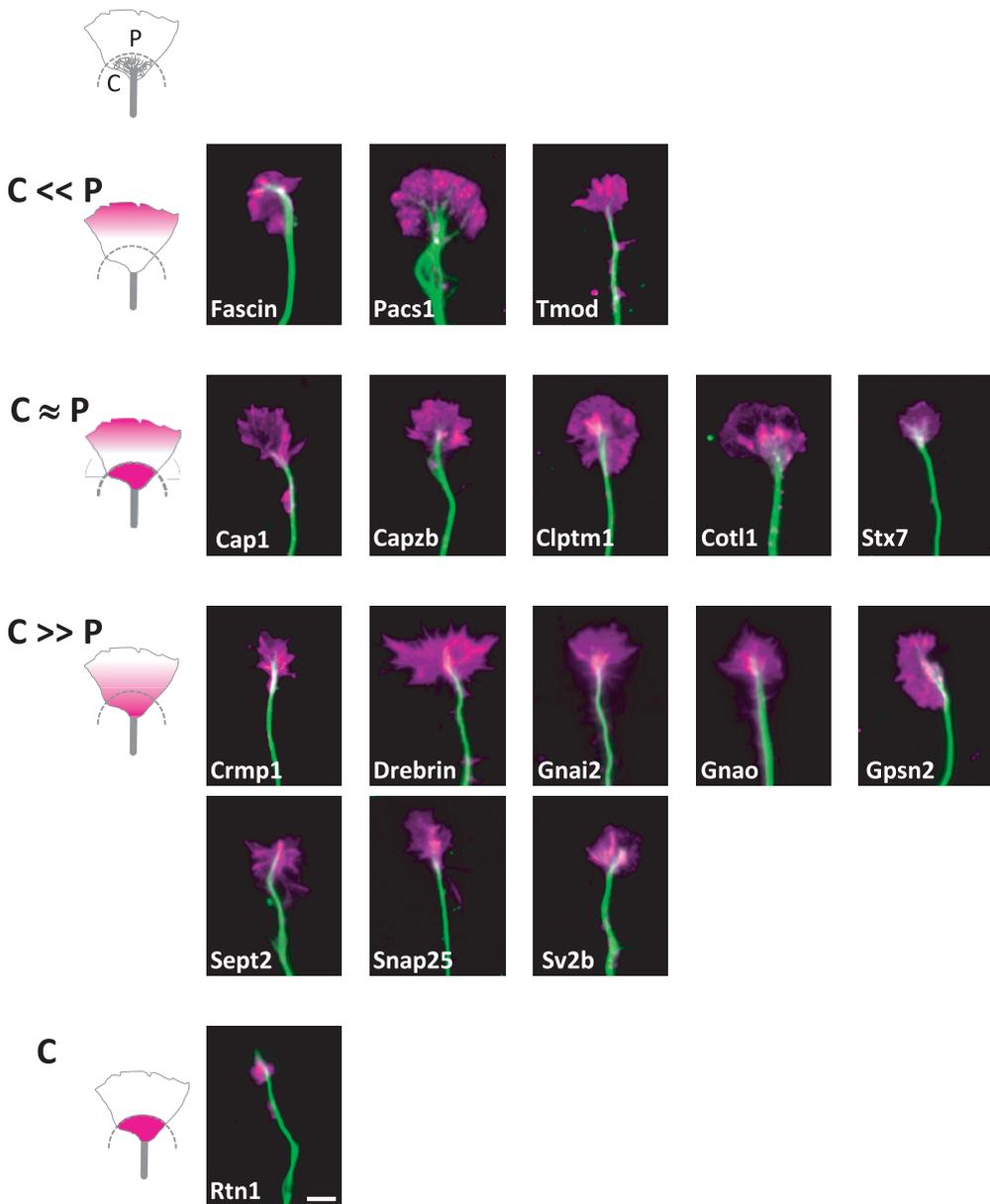


図4 nGAPsの分類と性状<sup>37)</sup>. C-またはP-domain/regionのいずれかに濃縮されているかで4型に分類される.

た。プロテオミクスは、ある系に存在するタンパク質を網羅的に同定する手法であるが、単にタンパク質の名前がわかるだけでなく、それぞれの量がある程度決定できるため、同定された分子がどの程度その系に存在するのか、おおよそ推測できる状況にある。これは後述の結合分子の同定に関してはきわめて重要な情報であり、ある特定分子の結合タンパク質が10種類程度見出された際にその中で何が最も生理的な重要な結合であるか、量的な指標に基づいて判断できるようになった。よって、成長円錐の研究においてはプロテオミクスを導入して革新的な情報を得ることを期待した。

成長円錐のプロテオミクスを行うためには、純度が高い成長円錐の標品を得る必要がある。われわれは既に予備的に検討していた細胞分画（すでに1980年代に得られていた方法論<sup>33,34)</sup>の改良)を用いて、単離成長円錐としてプロテオミクスを実行した。この際に他の画分の混入が避けられないので、その検討は成長円錐の免疫染色によって確認を行うこととした。実際には、生後1日目のラット胎仔から前脳を採取して、成長円錐画分の単離を行った。

プロテオミクスによって成長円錐全体(GCP)と膜部分(GCM)の両者を合わせると950種類のタンパク質を同定することができた。これは従来の哺乳動物での成長円錐の分子が30-50種類程度しか知られていなかった点を考慮すると、格段の進歩である(図2)。

成長円錐の特徴的な分子群として、1) 微小管関連のタンパク質、2) 脂肪酸代謝に関係するタンパク質、3) 小胞輸送系のrabファミリーなどが多量存在することが、成熟シナプスのプロテオミクスの結果との比較でわかった。しかし予想以上に多数のタンパク質の存在が証明できたため、これだけでは特徴的な分子群を絞り込むには至らない。そこで、大脳皮質の培養神経細胞を用いて定量的に免疫染色を行い、成長円錐に濃縮したタンパク質を拾い出すこととした。この方法のため、約200種類の免疫染色を行ったが、この中でいわゆる偽陽性になった分子は見られなかった。この結果は、われわれの細胞画分の純度が高く、その結果としてのプロテオミクスもきわめて信頼度が高いことを意味している。

われわれは従来からの成長円錐マーカーGAP-43<sup>35)</sup>を標準として、おおよそ70種類のタンパク質が成長円錐にGAP-43よりも相対的に濃縮されていることを見出した。また同等に濃縮されているものも30種類程度存在した。

これらの分子が機能的な成長円錐マーカーであるためには、成長円錐の局在だけでなく、神経成長を担うことを証明する必要がある。これまで神経系では多数の遺伝子に関する網羅的なRNAiを行うことができていなかったが、それを可能とするため、まずEGFP-トランスジェニックラット(グリーンラット)を用いて、以下の方法で行っ

た<sup>36)</sup>。すなわち、グリーンラットの脳からの培養神経細胞にEGFPと目的遺伝子の双方に対するsiRNAを同時投与し、免疫染色で双方が消失した神経細胞の長さを測定することで、確実にRNAi導入神経細胞を同定できた。この方法で約60%の遺伝子発現が抑制された。われわれはこの結果から、合計18種類の成長円錐分子マーカーを同定し、これらにneuronal growth-associated proteins (nGAPs)と命名した(図3; 図4)<sup>37)</sup>。これらは、細胞骨格調節、小胞輸送、情報伝達等の機能を持つ分子群で多岐にわたっていたが、これまでに線虫やショウジョウバエなどのモデル生物で神経成長に関連があると見出されていたものはわずかであった。よって、これらは従来型の研究では見出され得なかった分子群であり、その点でわれわれの研究方法が革新性を有することを意味する。これらの分子群は哺乳動物と異なり、線虫やショウジョウバエでは存在はするが必ずしも神経系に発現していないものもあり、モデル生物での変異体研究のみでは哺乳動物脳の構築機構の理解が十分でないことを示している。

これらの成長円錐マーカー分子群について、大脳皮質ニューロン以外の成長円錐マーカーなのか、その他の神経細胞でも同様の価値を有しているのか、という観点から、著者らは中枢ニューロンからは比較的系統の離れたモデル細胞のPC12D細胞(Pheochromocytomaのもともとの由来である副腎髄質細胞は、神経堤由来であるので、末梢神経系に類縁と考えられる)で、これらの局在とRNAiによる神経伸長を検討した<sup>38)</sup>。その結果、これら17種は、いずれも成長円錐に局在性が高く、しかもRNAiで有意に突起伸長が抑制された。これはPC12D細胞においても、nGAPsは成長円錐のマーカーとみなされることを意味しており、大脳皮質ニューロンと類縁性の薄い神経細胞でもこの原理は成り立つことが強く推測される。よって、著者らのアプローチは、成長円錐における全く未知の分子機構を明らかにしたことが予想された。このことは、神経細胞の種差を超えた成長円錐のマーカー分子としてnGAPsは共通性を持つことを示している。

## 6. 成長円錐のプロテオミクスで見出された分子群と、成長円錐機能に関する諸説の検証

1) 微小管: 軸索形成に最も大量に必要となるのは、微小管であり、その観点からtubulinが最も成長円錐で多量に存在するタンパク質であることは極めて理にかなっているといえる。Tubulinの $\alpha$ ,  $\beta$ の二量体からダイマーが形成されるが、 $\alpha$ ,  $\beta$ にも種々のアイソフォームが存在する。これらの大部分が成長円錐には多量に存在する。TUBB3( $\beta 3$ )の変異が、ヒト軸索ガイダンスの異常を伴う病態を呈する<sup>39)</sup>。軸索が長く安定して伸びるためには微小管結合タンパク質が微小管の側部に

結合して、重合が安定して存在することが必須である。成長円錐で最も多量に存在するのは、MAP1Bであり、次いで tau タンパク質である。これ以外に、マイナーなものとしては MAP1A, STOP (MAP6) などの存在が見出された。

一方、成長円錐では従来、+TIPs がよくわかっていなかったが、われわれの研究で EB1, EB3, APC2 などの +TIPs が確認された。+TIPs は確かに成長円錐で微小管の先端に結合していることを、われわれは EB3 についてリアルタイムイメージングで確認している。これらの役割は徐々に他のグループからも報告されている。このうち、APC2 は鶏神経細胞で神経伸長に関する報告が出された<sup>40)</sup>。

微小管上を移動するモーター分子としては、ダイニン dynein とキネシンがあるが、前者が圧倒的に多く存在する。ダイニンは、軸索遠位端、すなわちこの場合、成長円錐側から細胞体側への輸送である逆行性輸送 (retrograde transport) のモーターと考えられるが、cargo はよくわかっていない。ミオシン II, 微小管結合タンパク質 LIS1 などと関連をもち、成長円錐の運動性に寄与する<sup>41)</sup>。一方、キネシンは非常に多数のファミリー分子の存在が知られているが、成長円錐でも遅い輸送、すなわち細胞骨格の輸送を担当する KIF5 類が最も多く、次いでいくつかのファミリー分子の存在が確認される。

また微小管の脱重合を促進する因子として、Stathmin ファミリー分子群がかなり存在する。成長円錐に特異的な分子として知られる SCG10 (Stathmin 2) や、stathmin, RB3 などが存在する<sup>42)</sup>。Stathmin と SCG10 の主な差異は、膜結合が前者にはなく、後者にはあるという点のみである。微小管の脱重合因子の存在は、成長円錐での動的な不安定性を高めているものと考えられる。

- 2) アクチン：アクチンは成長円錐の方向性を決定する機能を持ち、より先端の filopodia, lamellipodia に局在性が高いが、C-domain の膜直下部分にも cortical actin としてかなりの量が存在する<sup>43)</sup>。両者の構築の違いは、電子顕微鏡でもそれほど明確でなく、精査もされていない。当然、前者の方が動的であり、後者は安定性が高いと考えられる。

前者に関して特に重視されてきたのが、ミオシン類と ARP2/3 ファミリーである。ミオシンは非常に重要なアクチン依存性の分子モーターで、ミオシン II はフィロポディアのクラッチ機能を支えることが推測されている<sup>44)</sup>。われわれの結果でもミオシン II は最も多く存在するアクチン調節タンパク質であったが、細胞質よりもはるかに多く膜結合性に存在することが分かった。従来の成長円錐で

のクラッチ仮説<sup>45)</sup>ではミオシン II の作用に膜の関与が考えられてこなかったが、われわれの結果はミオシン II が膜との相互作用を経て、アクチンを調節する可能性が高いことを示している。また膜結合型ミオシンとして、近年分子モーターとしての研究が盛んな myosin-V<sup>46)</sup> が多く存在していた。アクチン依存性に小胞などが P-domain 側でも輸送されるとすれば、この分子の働きも必須であると推測される。最近、myosin-V がフィロポディアの回転を通じて軸索成長の方向に影響することが示唆され、そのような観点からも注目される<sup>47)</sup>。

また ARP2/3 複合体の成分<sup>48)</sup>は、ARP2, ARP3, ARC1, ARC5 などの検出がみられ、アクチンとの存在比はおおよそ 1:10 程度と推測される。これらの成長円錐内での挙動は、すべてが同じ挙動を示すわけではなく、例えば ARP3 は ARP2 よりより密接にアクチン繊維の動きに関係していることをわれわれの予備の結果として得ている。

前者に関わるアクチン結合タンパク質としては、G アクチン結合のコフィリン<sup>49)</sup>が最も多く存在し、次いで F-アクチン結合性として、アクチン繊維間を束ねるファシン fascin<sup>50)</sup>が多い。コフィリンはすでに水野らによる LIM-キナーゼによるリン酸化での神経成長調節 (コフィリンの S3 リン酸化により、G アクチン結合の不活性化が起き、アクチン繊維のキャッピング能が変化する) が提唱されている<sup>51)</sup>が、それを裏付けるものと考えられる。主要なアクチン結合タンパク質のうち、後述の CAPI などのように、成長円錐の新規分子マーカーに数えられるものを見出している。CAPI は G-アクチン結合タンパク質<sup>52)</sup>であり、ショウジョウバエでは遺伝学的に軸索ガイダンスへの関与が示唆されている<sup>53)</sup>が、細胞レベルの研究はほとんどなされていない。後者については従来、ほとんど分子情報がなかったが、spectrin, ankyrin が大量に存在し、band 4.1 も見出されることから、cortical skeleton を形成する分子群が成長円錐機能で重要であることを意味している。これらの分子群<sup>54)</sup>については、ショウジョウバエでの軸索ガイダンスに関する遺伝学的関与の仕事を除いては、ほとんど成長円錐との関連性に関心がもたれていなかった<sup>55)</sup>が、成長円錐に微小管がスライディングしてこの部分が新たな軸索遠位部となり、その先端にさらに成長円錐の C-domain が形成されていくはずなので、この過程でこれらの cortical skeleton の形成は重要な問題だと考えられる。

- 3) その他の細胞骨格：中間径フィラメントを構成する分子としては、ニューロフィラメントのほかに、inter-nexin が大量に存在する。成長円錐の中では、中間径フィラメントは存在しないので、これらが重合体になっている可能性はない<sup>55)</sup>と思われるが、どのような意義でこの部位に単量体が存在するのか、著者が疑問に思っている研究課題の一つである。Septin は GTP 結

合型の「第4の細胞骨格」でヘテロ三量体の重合により形成される<sup>56)</sup>が, septin 2は其中で我々の検索で, 成長円錐の機能マーカーの一つと考えられる証拠を得ている<sup>41)</sup>. これはPC12細胞にて, 限定的な形で議論されていた septin の神経成長への関与<sup>57)</sup>を証明するものである.

- 4) 小胞輸送分子群:すでに著者らの研究, およびいくつかのグループによって神経成長に小胞輸送に関係する分子群, とりわけ小胞のターゲティングに重要な SNARE タンパク質の神経成長に関する意義が探索されていた. それを裏付ける分子群が大量に存在することが分かった. 小胞輸送に関与するもののうち, 最も多量にあるのは SM ファミリーの Munc-18-1 であり, とりわけ成長円錐膜には, これに結合する syntaxin-1 よりも大量に存在する. Munc-18 が成長円錐の機能に寄与する, というこの予見を証明する論文も最近発表され<sup>58)</sup>, 一方, かつて想定されていた tethering 複合体 (小胞を形質膜に近づけるための複合体) 成分<sup>59)</sup>である rsec6, rsec8<sup>60)</sup>はほとんど検出されない. これらの成分が神経成長時の形質膜の拡大に機能するためには相当の量が必要だと考えられるため, (少なくともわれわれがプロテオミクスを行った大脳皮質ニューロンでは) tethering 複合体の意義は少ないものと考えられる.

さらにこのほかに, シナプス関連分子群として synapsin 類, synaptotagmin 1, synaptophysin, SV2 などの存在が見出されたが, ノックアウトマウスなどの結果ではこれらが軸索成長に大きな影響を及ぼすことは知られていない. しかし, synapsin<sup>61)</sup>, Munc-18 などではある条件下で成長円錐の形態や挙動に変化が報告されているため, 分子の重複性 (ファミリー分子の重複性だけでなく, 異なる構造をもつが役割としては同じ機能を果たすものも含めて) を示す可能性もあるといえる.

一方, エンドサイトーシスに関係する分子群としてはクラスリンおよびそれに関係するアダプター分子群が多い. 成長円錐にはエンドサイトーシスが盛んであるという実験結果があるが, その生理的意義についてはまだ十分な意味づけがなされておらず, 徐々に明確な証拠が出つつある段階である<sup>62)</sup>. プロテオミクスの結果では, クラスリンが圧倒的に優位であることから, クラスリン依存性のエンドサイトーシス機構は成長円錐の膜タンパク質のリサイクリングで中核なのは間違いないであろう. また成長円錐ではシナプスで見出されているような多数の, エンドサイトーシス調節分子群<sup>63)</sup>は見出されておらず, せいぜい dynamin I や endophilin B1 などに限られる. これは, 成長円錐のエンドサイトーシスはシナプス伝達と違って, さほどスピー

ディに生ずる必要性がないことが理由と思われる.

- 5) タンパク質合成に関与する分子群:近年, タンパク質合成が種々の細胞調節機能に関わることが明らかになったが, 神経系でもシナプス後部では可塑性の発現に, 局所タンパク質合成の関与が示されている<sup>64)</sup>. 一方, 成熟シナプスでは軸索内にはリボソームは存在せず, タンパク質合成は起こらない. ところが今世紀に入って, 成長円錐では軸索先端であっても局所タンパク質合成が起こり, 成長円錐の方向性をガイダンス分子によって変える機能に関与することが, Holt, Flanagan らによって示された<sup>65,66)</sup>. したがって, 成長円錐にはリボソームが存在しなければならない. 我々のプロテオミクスの結果は, その点を明確に証明した. さらにタンパク質合成に関する initiation factor, elongation factor などの存在も確認された. これらの局所合成は, 軸索成長そのものには関与しないと考えられている<sup>65)</sup>. 局所合成はタンパク質の合成量が少ないと考えられるため, 細胞骨格や膜タンパク質を大量に必要とする軸索成長での需要を賄いきれないと考えられるためである. 近年 Holt らのグループは, 培養神経細胞から直接成長円錐を切り出し, そこから抽出された mRNA の RT-PCR 解析によって存在する mRNA のリストを明らかにしたが, そこでは 1,000 種類以上の coding mRNA が見つかった. 当然, そのうち翻訳されるものはかなり少なく, また十分量合成されるものはさらに少ないと思われる<sup>67)</sup>.
- 6) GTP 結合タンパク質:
- 三量体 G タンパク質:成長円錐は G タンパク質が豊富であると考えられていたが, われわれの結果で, Go, Gi, Gq, Gz などが極めて大量に存在することが示された. しかしながら, G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は数種類しか見出すことができなかった. このことは, 著者らが以前に示した通り, G タンパク質がシグナル伝達に関与するものの<sup>68)</sup>, 作用機序について検討が必要であることを意味している. しかし, 三量体 G タンパク質が関与する成長円錐の機能調節も実際にいろいろと働いているが<sup>69)</sup>, その正確な意義を明確にする必要があるということになる. 一方 Gs 系は少なめであるが, アイソフォームとして Gs の long form である XLas が存在し, 成長円錐の nGAPs の一つであることから, 重要性は高いと考えられる.
  - 低分子量 G タンパク質:最も多く存在するのは, rab ファミリー分子群であり, これはシナプスよりも多様であると考えられる. しかし, ras ファミリー群も多量に存在し, 従来もその神経成長への意義は広く論じられていたが, これからはさらに

検討が必要であろう。

(1) rab ファミリー：rab11 などリサイクリングエンドソームに関係するもの<sup>70)</sup>を除くと、ほとんど rab ファミリーと神経成長を関連付けた研究はない。これは大変意外なことであったが、成長円錐はシナプスなどに比べても非常に多種類、多量の rab ファミリー分子が存在する。この結果は、成長円錐では小胞輸送の機構がそれほど理解されておらず、神経成長機構との関連付けがほとんど進んでいないことを意味している。

(2) rho ファミリー：通常の rho, rac, cdc42とも当然、成長円錐には一定量存在する。これらは膜に多く存在して検出されるため、活性型の分子が多いものと推測される。特に量的に多いものとして、rac1, rac3, rhoA2, rhoC, cdc42, TC10が挙げられる。TC10は exocyst 複合体との関連が神経成長の研究で示唆されているが<sup>71)</sup>、両者の存在量にはかなりの隔りがあり、このストーリーはそのままでは成り立たないであろう。

(3) ras ファミリー：K-raas, N-ras などのクラシカルな ras 分子に加えて、ral-A, rap2, rap1, R-Ras などが見出され、量的にも少なくなかった。従来情報の伝達の中で、neurotrophin 群のシグナル伝達を除くと、ras ファミリーの寄与は重視されてこなかった部分があるが、成長円錐においてもシグナル伝達の上流でやはり相当に重要な位置を占めていると考えられる<sup>72)</sup>。

- c. 低分子量 G タンパク質に関与する分子群：GEF, GAP, GDI, 結合タンパク質などが存在するはずである。このうち、GEF は最も見出されたものが少なく、FARP2, Trio などが目立つ程度であった。これは、GEF が少量多種類で、活性が強いことに起因すると思われる。Trio はモデル動物で、以前から神経成長との関連性が示されていた GEF であり、rac-GEF として netrin のガイダンスへの寄与が示唆される<sup>73-75)</sup>。量的に最も多いのは GDI (GDP 型の低分子量 G タンパク質を維持し、細胞質側に局在させる役割を持つ) であり、これらは rab, rho についてかなり大量に存在する<sup>79)</sup>。アダプタータンパク質としては、rab11FIP などが主要である。なお核内への輸送に関わる低分子量 G タンパク質の ran やその結合分子である importin グループのものも少量存在するが、これは混入ではなく、核内への遠距離輸送に関係するものではないかと推測している<sup>80)</sup>。

- 7) 接着分子：古くから成長円錐機能に、免疫グロブリンスーパーファミリー分子群 IgSF が関係することについ

ては、培養系で相当多数の証拠がある。しかし、ノックアウトマウスの解析から、単一の IgSF メンバーを欠損させてもほとんど軸索経路や成長円錐機能に著変がないことで、IgSF の成長円錐での意義の解析は、行き詰った感がある<sup>81)</sup>。我々の結果は、NCAM, L1, contactin など、古くから知られている IgSF が大量に存在し、膜表面では最も顕著な分子である。IgSF4 (= SynCaM) など、成長円錐には 20 種類以上の IgSF の存在が証明された<sup>82)</sup>。一方、カドヘリン群は存在するものの量的には少ない。後述のように、カドヘリンと結合するカテニン類は極めて量が多いので、興味深い結果といえる。接着分子はショウジョウバエでは軸索ガイダンス分子として最も早くに見出されたものであり、意義は十分解明されていないが、最近ではシナプス形成の特異性を保証する分子群として、再び注目を浴びている<sup>83,84)</sup>。

- 8) 受容体群：軸索ガイダンス分子群や栄養因子には、受容体の存在がわかっている。例えば、netrin には DCC, Semaphorin に対しては plexin および neuropilin などが知られているが<sup>85)</sup>、これらはすべてプロテオミクスでも確認できた。Eph 受容体も存在する。これ以外に、神経伝達物質群の受容体も存在するが、意義はよくわかっていない。
- 9) イオンチャネル・輸送体：成長円錐では activity-independent process で神経回路形成に関わり、電気的興奮の必要性がないため、電気的興奮にかかわるチャネルは少ない。成長円錐の輸送体で最も顕著なのは、意外なことにこれまで神経成長にほとんど関連性が示されていなかった Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase で、膜タンパク質の中では接着分子と同等に大量に存在することが示された。次いで多いのは膜型 Ca<sup>2+</sup>-ATPase であり、これらが Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> の細胞内外の移動に中心的な役割を有することが示唆される。また近年、関心がもたれている TRPV グループの中では、TRPV2 が見出されている。これは最近柴崎らによって、神経成長への関与が示されており、興味深い<sup>86)</sup>。
- 10) 情報伝達系：
- a. タンパク質キナーゼ・ホスファターゼ：セリン・スレオニンキナーゼ群で最も量が多かったのは、PKA と CaMKII であり、この二つが群を抜いて大量に存在する。従って、cAMP 説は相当に信頼度が高いと考えられ、作動は PKA を介する確率が高いといえる。これまで CaMKII は *Xenopus* の系などを除くと、あまり成長円錐機能への関与が知られてこなかったが<sup>87)</sup>、CaMKII は神経細胞の種類によってかなり量的な差が大きいので、成長円錐の機能解析やイメージングが行われやすかった

株細胞や末梢神経系（後根神経節細胞など）ではあまり発現していなかったからかもしれない。

それ以外のS/Tキナーゼとして、PKC $\beta$ , casein kinase, p21-kinaseなどが見出された。ERK, GSK3 $\beta$ などのMAPK類はこれらよりも量的に少ないと推察されるが、キナーゼ類に関しては生理的な活性の程度が重要であるため、絶対量が少ないからといって必ずしも重要度が低いとは言いきれない部分が多い。

チロシンキナーゼに関しては、古くから src, fyn, yes などの src ファミリー分子が幼若期の神経細胞で活性が高いことを裏付けるように、成長円錐のプロテオミクスでもこれらの量が多いことを示す結果が得られた。成長円錐の src ファミリーは接着分子のシグナル伝達に関係すると想定されるが、遺伝子改変マウスなどでは証明できていない<sup>88-90</sup>。フィロポディアの制御にも関与が推定されている<sup>91</sup>。

- b. ホスファターゼ：成長円錐のホスファターゼ機能はあまり十分な解析がこれまでもなされてこなかったのは、やはり一般にもキナーゼに比べてホスファターゼの研究が遅れていたことを意味する。セリン・スレオニンホスファターゼの PP1, PP2A, PP2B, PP2C=PP3 はいずれも存在するが、特異性の問題からか、成長円錐の研究は進んでいない。一方チロシンホスファターゼでは、チロシンキナーゼの成長円錐の研究が比較的早期に着目された関係上、多くの研究がある。特にLARはショウジョウバエのホモログの研究も含め、軸索ガイダンスの研究で抑制性シグナルの一つとして注目された<sup>92</sup>。受容体型の PTP $\sigma$  や、非受容体型の SHP-2 が存在していることが見出された。受容体型のものは、最近抑制性の軸索ガイダンス分子であるコンドロイチン硫酸の受容体であることが示された<sup>93</sup>。
- c. adapter 分子群：成長円錐で最も存在が顕著なのは、CRMP family 分子で1-5のサブタイプが知られているが、いずれも大量に存在している。特にCRMP2は貝淵らによって tubulin 結合から微小管形成への機能が示されている<sup>94</sup>が、それを裏付けるに十分な量的根拠のあることが分かった。次いで、CRMP4, CRMP1 などが量的に多い。CRMP2は極めて多数の分子間相互作用を持つことが貝淵らによって示され、現状でもまだ一端が見出されているにすぎない<sup>95,96</sup>。CRMP4はFournierらによって神経成長の関与が報告されている<sup>97</sup>が、正確な意義はまだ分かっていない。CRMP5 (CRAM)

でも神経成長の修飾作用が報告され<sup>98,99</sup>、CRMP2と同様に tubulin と結合するが、伸長には抑制的である性質が報告されている<sup>100</sup>。また軸索微小管ではMAPsとして、CRMP2が機能する可能性が示唆されている<sup>101</sup>。CRMPはもともとセマフォリンシグナルのアダプター分子として見出された分子であるので<sup>102</sup>、軸索形成異常を呈する線虫のunc-33変異体責任分子 (TOAD-64) であることから、多様なシグナル伝達関与の可能性が想定される。

カテニン群は、N-catenin ( $\alpha$ 2) が非常に多く、 $\alpha$ -catenin や  $\beta$ -catenin も一定量存在する。カテニン群の最も主要な役割は、接着帯の形成における裏打ち構造の構成である<sup>103</sup>が、 $\beta$ -カテニンはそれ以外に多様な転写調節機能が発生現象では著名である<sup>104</sup>。シナプスにおいては、カテニン群の意義が、シナプスの安定化にあることは知られているが、成長円錐にカテニンが多量に存在する意義は未解明である。なお  $\alpha$ -カテニンについては Nelson らによってアクチン結合能が示されており、細胞骨格の調節因子としての役割が考えられる<sup>102,104</sup>。但し、成長円錐に大量に存在する神経型の  $\alpha$ -N-catenin<sup>105</sup>が同じ役割なのか、まだ検討されていない。先に述べたようにカテニン類と、カドヘリン類の量的アンバランスは、この系でのカテニンが接着に関するより、むしろ他の役割を果たしている可能性を示唆している。

他のアダプターとして、14-3-3 群も多量に存在し、 $\zeta$ ,  $\gamma$ ,  $\theta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$ ,  $\beta$  などが存在する。この分子群は、セリン・スレオニンキナーゼによるリン酸化分子のアダプターとしてよく知られている<sup>106</sup>。最近、Fournier らのグループは、cAMPの作動に基づく方向性の変化については、PKAの下流でそのアダプター分子として、いくつかの14-3-3アイソフォームが末梢神経系で、関与していることを示した<sup>107</sup>。一般的にはこれらが、幅広くリン酸化分子のアダプターとして働く点は間違いのないと思われるが、成長円錐のどのリン酸化とリンクしているか、これからの研究課題である。

- d. その他の情報伝達分子：成長円錐で以前からマーカー分子として知られている GAP-43<sup>108</sup> や、MARCKS protein<sup>109</sup>、CAP-23 (NAP-22)<sup>110,111</sup>、palemmen<sup>112</sup> など、PKCの基質となりやすい分子群は成長円錐の特に膜に多量に存在することが見出された。これはパルミチン酸化で膜に結合することが知られている分子群で、これらは1次構造上の特徴は共通性がさほどないにもかかわらず、上記の共通性が高い。これらは軸索の成長や再生、特

に発芽 (spouting) に非常にかかわりが深いと考えられる<sup>113)</sup>。これらの分子群は、基本的に脊椎動物にしか存在せず、それらの役割を見出すことはリン酸化プロテオミクスの目標でもある。これまでのところ、リン酸化プロテオミクスではこれらの分子も PKC でのリン酸化部位よりも、他のキナーゼ部位でのリン酸化部位が顕著であるという逆説的な結果が得られている。

- 11) 代謝酵素：成長円錐の機能を考える上で、代謝の重要性はもちろん言うまでもないが、現在までに代謝産物の網羅解析 (メタボロミクス) がなされていないため、酵素タンパク質の量的状況だけでは、個々の活性が分からず、まださほどの解釈をするのは早計といえる。但し、特徴的と思われる点を以下に挙げる。

- a. 脂肪酸合成：脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase) は、パルミチン酸までを合成する酵素であり、成長円錐で最も大量に存在する酵素であった。この酵素は細胞質で C16 までの脂肪酸を合成し、それより長鎖の脂肪酸はここで作られたものを小胞体に送って膜結合性酵素群で合成する<sup>114)</sup>。そのうちのひとつ、2,3-エノイルレダクターゼ (TER) は4段階の最後に働く酵素であるが、哺乳動物では脳内に多く存在する分子 GPSN2 と同一であることが分かった<sup>115)</sup>。成長円錐の nGAPs のひとつと考えられる。この過程で働く他の二つの酵素も成長円錐に存在することを見出している。興味深いのはこれらの合成が、長鎖不飽和脂肪酸、特に EPA, DHA などの脳に特異的に多い脂肪酸である。この酵素が非常に成長円錐に濃縮されていることを我々は見出し、さらにこのサイクルに必要な他の段階の酵素の抗体染色で、成長円錐に濃縮されていることを見出した。TER は最近、ヒトの精神遅滞を引き起こす発達障害で変異が知られており、興味深い<sup>116)</sup>。また脂肪酸結合タンパク質 FABP-7 は、成熟時にはグリア細胞に発現するが、幼若時には神経幹細胞の分化後に神経細胞に発現する<sup>117)</sup>。FABP-7 は上述の nGAPs の一つであるので<sup>118)</sup>、この結果から脂肪酸合成とそれに基づく脂肪酸の利用が、神経成長の一つの鍵となることが推察される。
- b. その他の酵素：量が多いものとしては、当然解糖系の酵素が最も多いが、そのほかにエネルギー代謝に関与するもので多いのは、クレアチンキナーゼである<sup>118)</sup>。但し、この酵素のノックアウトマウスでも神経系の大きな異常は少ないため<sup>119)</sup>、神経成長に関わる生理的意義はこれからの検討課題である。

## 7. 成長円錐のプロテオミクスから得られる分子の階層性

成長円錐に存在する分子群がどのような量的階層性を有しているか、ということは今後の研究を考える上で重要である。すなわち、成長円錐の機能を構築するために絶対量が必要な分子群が下流に大量に存在するはずで、それらが何か、ということが明確になった。一方、上流に存在する分子群は必ずしも大量に存在する必要はない。しかし、上流にはかなり大量に存在する分子もあるため、その役割を再考する必要が出てきた。

成長円錐機能の実動部隊は細胞骨格の実体 (微小管とアクチン繊維) を支えるチュープリンとアクチンであって、そのサブタイプを合計すると全体の 10% 以上を占める。特に微小管は、成長円錐の中に入り込んで新しい軸索を形成し、さらに、小胞の輸送などに寄与するレールそのものであるため、アクチンより相当多く存在する。

次にこれらの重合を調節する微小管結合タンパク質や、アクチン繊維の動きを制御するミオシン II、それに基づく輸送を司るミオシン V、コフィリン、ファシン (またフィロポディアの新しい動きも調節する<sup>47)</sup>) などのアクチン結合タンパク質が多く存在する。ここで注目すべきはアクチン結合タンパク質の中で最も多く存在するのが、スペクトリンなどの cortical actin 制御系であり、これらを制御するメカニズムが (未知ではあるが) 成長円錐機能には非常に重要であることを示唆する。

その上流にあるプロテインキナーゼとして、PKA, CaMKII はある程度の量が存在し、その系に刺激が加わった際のリン酸化調節としては重要であることを意味している。但し、リン酸化に関するキナーゼには、活性として効くために必ずしも絶対量が必要でないケースも多く、リン酸化プロテオミクスの結果からもそれが裏付けられる。

これらの上流と推測される低分子量 G タンパク質については、rho ファミリーのみならず、ras ファミリー分子が存在することは量的に明らかで、情報伝達の調節系には ras ファミリーの関与が明確であるが、その役割はさらなる研究が必要である。

その上流となる三量体 G タンパク質については、極めて多量に各種の分子が存在することがわれわれの結果で見出された。よって、三量体 G タンパク質が中枢ニューロンの成長円錐機能で必須の機能に関与し、また想像されるより広範な (未知の) 役割を果たすことが想定される。三量体 G タンパク質の活性化機構とその下流の活性化については、十分に調べられていない。特にその上位の受容体、とりわけ GPCR (G タンパク質共役型受容体) については、非常に量的に少なく、GPCR が多種類存在するとしてもそれぞれは極めて少量であることを示している (図 5)。

## 8. 網羅的アプローチによる成長円錐研究の近未来像

成長円錐に関して今後の重要な研究手法には、システムバイオロジー的な観点からの、シミュレーション研究<sup>120-122)</sup>がある。すなわち、成長円錐の複雑な機能と多様な分子情報を、直線的に関連付けようとしても限界があるのは明らかであり、そこにコンピューターシミュレーションの要素を入れていくことが必要と理解している。著者らも、軸索ガイダンスのシミュレーションを考案し、これが抑制性の軸索ガイダンス機構によくフィットすることを示すことができた<sup>120)</sup>。これまでの成長円錐に関するシミュレーションは、ほとんどが分子の情報や実体がなく、細胞生物学的現象をただ記述するだけであったが、最近はいくつかの系で特定の分子の役割に注目した優れたシミュレーションも出始めている。これらはまだ分子情報が不足しており、著者らの網羅的アプローチによる定量的な分子分布をあてはめることで、さらに重要な発見ができるものと考えている。

また網羅的アプローチについては、プロテオミクスに基づくもの(株細胞でのプロテオミクス)<sup>124)</sup>、mRNAの網羅的解析に基づくもの(局所的翻訳)<sup>125)</sup>、キナーゼ・ホスファターゼの網羅的発現に基づくもの(過剰発現系での突起形成)<sup>121)</sup>など、注目される結果がいくつもあり、今後の発展が期待される。

網羅的アプローチへの一つの批判は、「研究上、多数の分子の情報を得ても最も重要な情報は取り出せず、どの分子に着目するのか、特定できない」というものである。これに対する答えは、「定性的でなく、定量的な網羅的アプローチを行えば、最重要な分子は多数存在し、検出感度ぎりぎりの微量分子はある程度無視してよい」ということだと考えている。いささか乱暴な意見かもしれないが、量的にその系で非常に多い分子について、ほとんどストーリーがないケースがかなり多く、これを明らかにするだけでも相当重要な情報伝達系が明らかになると思われる。また著者が最近研究している成長円錐のリン酸化プロテオミクスの結果からは、ごく少量のリン酸化部位は実質的に *in vivo* では無視してよい、という結果が出ている。

以上をまとめると、量的に重要なものから研究を進める、というアプローチで非常に重要な発見が量産可能となると思われる。一研究室としてこれらのアプローチを基盤として研究を進める場合には、多数の抗体や siRNA などの道具立てが必要となり、単一の分子を研究しているのとは相当違う種類の苦勞(経費, 手間, など)があるものの、全く意外な分子への着目(他のグループの論文などを讀んだだけでは想起しえない着想)を得ることができ、多数発見されているシグナル伝達系なども重要経路と全くそうではない経路、それぞれの経路の相互関係や階層性などの発

見も見えてくるため、全く新しい世界観での研究が可能となる。このような世界観は、現状でも網羅的研究の成果であるデータベースを丹念に見ればある程度は取得できるものではあるが、自ら試行錯誤して得た実感は非常に大きく、「見えてこなかったものが見えてくる」と印象を強くしている。

我が国の研究は、着想や最初の一步では優れた点、先行した例は多数あるが、その後の物量的な研究によって米国などに凌駕されてしまうことが多いように思われる。その理由の一つとして、最初に着目した分子の下流分子群の想定が付かないため、泥沼化した部分にはまり込んでしまうことがある。生化学は新しい分子の発見を研究の是とする学問であるので、マイナーな分子であっても新規であればそれに着目する傾向にあることは否定しないが、昨今のように多数の分子群が調べられている状況下では、現象や病態の最も本質的な経路や分子にいち早く着目できなければ、研究者として大きな後れを取る事となる。結局、その系に関する基盤として理論的根拠を有するプロテオミクスのような網羅的アプローチが、研究者としての優位性をその分野で保っていくために非常に重要ではないかと考えている。現状では、まだ事例が少ないので、なかなか理解されなかったり、「言うは易く行うは難い」部分もあるが、筆者自身もそのような事例を多く作っていくよう、努力を重ねていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Cajal, S.R. (1890) *Anat. Anz.*, 5, 609-613; 621-631.
- 2) Harrison, J.G. (1910) *J. Exp. Zool.*, 9, 787-848.
- 3) Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., & Tessier-Lavigne, M. (1994) *Cell*, 78, 409-424.
- 4) Nakai, J. & Kawasaki, Y. (1959) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 51, 108-122.
- 5) Bray, D. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65, 905-910.
- 6) Dailey, M.E. & Bridgman, P.C. (1993) *J. Neurosci.*, 13, 3375-3393.
- 7) Igarashi, M., Kozaki, S., Terakawa, S., Kawano, S., Ide, C., & Komiya, Y. (1996) *J. Cell Biol.*, 134, 205-215.
- 8) Kolodkin, A.L. & Tessier-Lavigne, M. (2011) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3, pii: a001727.
- 9) Goodman, C.S. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.*, 19, 341-377.
- 10) Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., & Tessier-Lavigne, M. (1994) *Cell*, 78, 409-424.
- 11) Luo, Y., Raible, D., & Raper, J.A. (1993) *Cell*, 75, 217-227.
- 12) Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Lösinger, J., Noda, M., & Bonhoeffer, F. (1995) *Cell*, 82, 359-370.
- 13) Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., & Tessier-Lavigne, M. (2003) *Cell*, 113, 11-23.
- 14) 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.
- 15) Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. (1996) *Science*, 274, 1123-1133.

- 16) Colamarino, S.A. & Tessier-Lavigne, M. (1995) *Cell*, **81**, 621-629.
- 17) Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., & Chédotal, A. (2010) *Development*, **137**, 1939-1952.
- 18) Zheng, J.Q. & Poo, M.M. (2007) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, 375-404.
- 19) Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., & Poo, M.M. (1997) *Neuron*, **19**, 1225-1235.
- 20) Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.M., & Hong, K. (2003) *Nature*, **423**, 990-995.
- 21) Han, J., Han, L., Tiwari, P., Wen, Z., & Zheng, J.Q. (2007) *J. Cell Biol.*, **176**, 101-111.
- 22) Kent, C.B., Shimada, T., Ferraro, G.B., Ritter, B., Yam, P.T., McPherson, P.S., Charron, F., Kennedy, T.E., & Fournier, A. E. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 14059-14067.
- 23) Zheng, J.Q. & Poo, M.M. (2007) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, 375-404.
- 24) Dent, E.W., Gupton, S.L., & Gertler, F.B. (2011) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, pii: a001800.
- 25) Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., & Gertler, F.B. (1999) *Neuron*, **22**, 313-325.
- 26) Zhu, X.J., Wang, C.Z., Dai, P.G., Xie, Y., Song, N.N., Liu, Y., Du, Q.S., Mei, L., Ding, Y.Q., & Xiong, W.C. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 184-192.
- 27) Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 3415-3419.
- 28) Zylbersztejn, K., Petkovic, M., Burgo, A., Deck, M., Garel, S., Marcos, S., Bloch-Gallego, E., Nothias, F., Serini, G., Bagnard, D., Binz, T., & Galli, T. (2012) *J. Cell Biol.*, **196**, 137-146.
- 29) Coco, S., Raposo, G., Martinez, S., Fontaine, J.J., Takamori, S., Zahraoui, A., Jahn, R., Matteoli, M., Louvard, D., & Galli, T. (1999) *J. Neurosci.*, **19**, 9803-9812.
- 30) Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K.A., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., & Catsicas, S. (1993) *Nature*, **364**, 445-448.
- 31) Kabayama, H., Takeuchi, M., Taniguchi, M., Tokushige, N., Kozaki, S., Mizutani, A., Nakamura, T., & Mikoshiba, K. (2011) *J. Neurosci.*, **31**, 7357-7364.
- 32) Pfenninger, K.H. (2009) *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 251-261.
- 33) Pfenninger, K.H., Ellis, L., Johnson, M.P., Friedman, L.B., & Somlo, S. (1983) *Cell*, **35**, 573-584.
- 34) Gordon-Weeks, P.R. & Lockerbie, R.O. (1984) *Neuroscience*, **13**, 119-136.
- 35) Mosevitsky, M.I. (2005) *Int. Rev. Cytol.*, **245**, 245-325.
- 36) Lu, J., Nozumi, M., Fujii, H., & Igarashi, M. (2008) *Neurosci. Res.*, **61**, 219-224.
- 37) Nozumi, M., Togano, T., Takahashi-Niki, K., Lu, J., Honda, A., Taoka, M., Shinkawa, T., Koga, H., Takeuchi, K., Isobe, T., & Igarashi, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17211-17216.
- 38) Lu, J., Nozumi, M., Takeuchi, K., Abe, H., & Igarashi, M. (2011) *Neurosci. Res.*, **70**, 85-90.
- 39) Tischfield, M.A., Baris, H.N., Wu, C., Rudolph, G., Van Maldergem, L., He, W., Chan, W.M., Andrews, C., Demer, J.L., Robertson, R.L., Mackey, D.A., Ruddle, J.B., Bird, T.D., Gottlob, I., Pieh, C., Traboulsi, E.I., Pomeroy, S.L., Hunter, D.G., Soul, J.S., Newlin, A., Sabol, L.J., Doherty, E.J., de Uzcátegui, C.E., de Uzcátegui, N., Collins, M.L., Sener, E.C., Wabbels, B., Hellebrand, H., Meitinger, T., de Berardinis, T., Magli, A., Schiavi, C., Pastore-Trossello, M., Koc, F., Wong, A.M., Levin, A.V., Geraghty, M.T., Descartes, M., Flaherty, M., Jamieson, R.V., Möller, H.U., Meuthen, I., Callen, D.F., Kerwin, J., Lindsay, S., Meindl, A., Gupta, M.L. Jr., Pellman, D., & Engle, E.C. (2010) *Cell*, **140**, 74-87.
- 40) Shintani, T., Ihara, M., Tani, S., Sakuraba, J., Sakuta, H., & Noda, M. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 11628-11640.
- 41) Grabham, P.W., Seale, G.E., Bennecib, M., Goldberg, D.J., & Vallee, R.B. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 823-834.
- 42) Grenningloh, G., Soehrman, S., Bondallaz, P., Ruchti, E., & Cadas, H. (2004) *J. Neurobiol.*, **58**, 60-69.
- 43) Myers, K.A., Tint, I., Nadar, C.V., He, Y., Black, M.M., & Baas, P.W. (2006) *Traffic*, **7**, 1333-1351.
- 44) Burnette, D.T., Schaefer, A.W., Ji, L., Danuser, G., & Forscher, P. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1360-1369.
- 45) Jay, D.G. (2000) *J. Neurobiol.*, **44**, 114-125.
- 46) Vale, R.D. (2003) *Cell*, **112**, 467-480.
- 47) Tamada, A., Kawase, S., Murakami, F., & Kamiguchi, H. (2010) *J. Cell Biol.*, **188**, 429-441.
- 48) Goley, E.D. & Welch, M.D. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 713-726.
- 49) Sarmiere, P.D. & Bamburg, J.R. (2004) *J. Neurobiol.*, **58**, 103-117.
- 50) Jayo, A. & Parsons, M. (2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1614-1617.
- 51) Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., & Mizuno, K. (1998) *Nature*, **393**, 809-812.
- 52) Hubberste, A.V. & Mottillo, E.P. (2002) *FASEB J.*, **16**, 487-499.
- 53) Wills, Z., Emerson, M., Rusch, J., Bikoff, J., Baum, B., Perri-mon, N., & Van Vactor, D. (2002) *Neuron*, **36**, 611-622.
- 54) Koch, I., Schwarz, H., Beuchle, D., Goellner, B., Langegger, M., & Aberle, H. (2008) *Neuron*, **58**, 210-222.
- 55) Liem, R.K. & Messing, A. (2009) *J. Clin. Invest.*, **119**, 1814-1824.
- 56) Barral, Y. & Kinoshita, M. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 12-18.
- 57) Vega, I.E. & Hsu, S.C. (2003) *Neuroreport*, **14**, 31-37.
- 58) Broeke, J.H., Roelandse, M., Luteijn, M.J., Boiko, T., Matus, A., Toonen, R.F., & Verhage, M. (2010) *Biol. Cell*, **102**, 479-488.
- 59) Hertzog, M. & Chavrier, P. (2011) *Biochem. J.*, **433**, 403-409.
- 60) Vega, I.E. & Hsu, S.C. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 3839-3848.
- 61) Fornasiero, E.F., Bonanomi, D., Benfenati, F., & Valtorta, F. (2010) *Cell Mol. Life Sci.*, **67**, 1383-1396.
- 62) Winckler, B. & Choo Yap, C. (2011) *Traffic*, **12**, 1099-1108.
- 63) Clayton, E.L. & Cousin, M.A. (2009) *J. Neurochem.*, **111**, 901-914.
- 64) Bramham, C.R. (2008) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **18**, 524-531.
- 65) Campbell, D.S. & Holt, C.E. (2001) *Neuron*, **32**, 1013-1026.
- 66) Brittis, P.A., Lu, Q., & Flanagan, J.G. (2002) *Cell*, **110**, 223-235.
- 67) Zivraj, K.H., Tung, Y.C., Piper, M., Gumy, L., Fawcett, J.W., Yeo, G.S., & Holt, C.E. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 15464-15478.
- 68) Igarashi, M., Li, W.W., Sudo, Y., & Fishman, M.C. (1995) *J. Neurosci.*, **15**, 5660-5667.
- 69) Xiang, Y., Li, Y., Zhang, Z., Cui, K., Wang, S., Yuan, X.B., Wu, C.P., Poo, M.M., & Duan, S. (2002) *Nat. Neurosci.*, **5**, 843-848.
- 70) Eva, R., Dassie, E., Caswell, P.T., Dick, G., Ffrench-Constant,

- C., Norman, J.C., & Fawcett, J.W. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 11654–11669.
- 71) Dupraz, S., Grassi, D., Bernis, M.E., Sosa, L., Bisbal, M., Gastaldi, L., Jausoro, I., Cáceres, A., Pfenninger, K.H., & Quiroga, S. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 13292–13301.
- 72) Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., & Negishi, M. (2004) *Science*, **305**, 862–865.
- 73) Steven, R., Kubiseski, T.J., Zheng, H., Kulkarni, S., Mancillas, J., Ruiz Morales, A., Hogue, C.W., Pawson, T., & Culotti, J. (1998) *Cell*, **92**, 785–795.
- 74) Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K., & Hama, C. (2000) *Neuron*, **26**, 119–131.
- 75) Briançon-Marjollet, A., Ghogha, A., Nawabi, H., Triki, I., Auziol, C., Fromont, S., Piché, C., Enslin, H., Chebli, K., Cloutier, J.F., Castellani, V., Debant, A., & Lamarche-Vane, N. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2314–2323.
- 76) Patel, N.H., Snow, P.M., & Goodman, C.S. (1987) *Cell*, **48**, 975–988.
- 77) Yamagata, M., Weiner, J.A., & Sanes, J.R. (2002) *Cell*, **110**, 649–660.
- 78) Hattori, D., Millard, S.S., Wojtowicz, W.M., & Zipursky, S.L. (2008) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 597–620.
- 79) Goody, R.S., Rak, A., & Alexandrov, K. (2005) *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 1657–1670.
- 80) Higashi-Kovtun, M.E., Mosca, T.J., Dickman, D.K., Meinertzhagen, I.A., & Schwarz, T.L. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 5253–5268.
- 81) Kamiguchi, H. & Lemmon, V. (1997) *J. Neurosci. Res.*, **49**, 1–8.
- 82) Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E.T., & Südhof, T.C. (2002) *Science*, **297**, 1525–1531.
- 83) Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., & Zipursky, S.L. (2000) *Cell*, **101**, 671–684.
- 84) Hattori, D., Millard, S.S., Wojtowicz, W.M., & Zipursky, S.L. (2008) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 597–620.
- 85) Kolodkin, A.L. & Tessier-Lavigne, M. (2011) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a001727.
- 86) Shibasaki, K., Murayama, N., Ono, K., Ishizaki, Y., & Tomi-naga, M. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 4601–4612.
- 87) Wen, Z., Guirland, C., Ming, G.L., & Zheng, J.Q. (2004) *Neuron*, **43**, 835–846.
- 88) Maness, P.F., Aubry, M., Shores, C.G., Frame, L., & Pfen-ninger, K.H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 5001–5005.
- 89) Goldberg, D.J. & Wu, D.Y. (1996) *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **4**, 183–192.
- 90) Ignelzi, M.A. Jr., Miller, D.R., Soriano, P., & Maness, P.F. (1994) *Neuron*, **12**, 873–884.
- 91) Robles, E., Woo, S., & Gomez, T.M. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 7669–7681.
- 92) Prakash, S., McLendon, H.M., Dubreuil, C.I., Ghose, A., Hwa, J., Dennehy, K.A., Tomalty, K.M., Clark, K.L., Van Vactor, D., & Clandinin, T.R. (2009) *Dev. Biol.*, **336**, 10–19.
- 93) Shen, Y., Tenney, A.P., Busch, S.A., Horn, K.P., Cuascut, F. X., Liu, K., He, Z., Silver, J., & Flanagan, J.G. (2009) *Science*, **326**, 592–596.
- 94) Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., & Kaibuchi, K. (2001) *Nat. Neurosci.*, **4**, 781–782.
- 95) Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., Yamaguchi, T., Matsu-ura, Y., Kamiguchi, H., & Kaibuchi, K. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 819–826.
- 96) Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., Nakamuta, S., Funahashi, Y., Hirotsune, S., Furuta, K., Urano, T., Toyoshima, Y. Y., & Kaibuchi, K. (2009) *J. Neurochem.*, **111**, 380–390.
- 97) Alabed, Y.Z., Pool, M., Ong Tone, S., & Fournier, A.E. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 1702–1711.
- 98) Hotta, A., Inatome, R., Yuasa-Kawada, J., Qin, Q., Yamamura, H., & Yanagi, S. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 32–39.
- 99) Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., & Moradi-Améli, M. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 10639–10654.
- 100) Lin, P.C., Chan, P.M., Hall, C., & Manser, E. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 41466–41478.
- 101) Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., & Strittmatter, S. M. (1995) *Nature*, **376**, 509–514.
- 102) Maiden, S.L. & Hardin, J. (2011) *J. Cell Biol.*, **195**, 543–552.
- 103) Torre, C., Perret, C., & Colnot, S. (2011) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 271–278.
- 104) Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., & Nelson, W. J. (2005) *Cell*, **123**, 889–901.
- 105) Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S., & Takeichi, M. (1992) *Cell*, **70**, 293–301.
- 106) Bustos, D.M. (2012) *Mol. Biosyst.*, **8**, 178–184.
- 107) Kent, C.B., Shimada, T., Ferraro, G.B., Ritter, B., Yam, P.T., McPherson, P.S., Charron, F., Kennedy, T.E., & Fournier, A. E. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 14059–14067.
- 108) Denny, J.B. (2006) *Curr. Neuropharmacol.*, **4**, 293–304.
- 109) Arbusova, A., Schmitz, A.A., & Vergères, G. (2002) *Biochem. J.*, **362** (Pt. 1), 1–12.
- 110) Maekawa, S., Maekawa, M., Hattori, S., & Nakamura, S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13703–13709.
- 111) Caroni, P. (1997) *Bioessays*, **19**, 767–775.
- 112) Kutzleb, C., Sanders, G., Yamamoto, R., Wang, X., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E., & Kilimann, M.W. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 795–813.
- 113) Mosevitsky, M.I. (2005) *Int. Rev. Cytol.*, **245**, 245–325.
- 114) Reizman, H. (2007) *Cell*, **130**, 587–588.
- 115) Moon, Y.A. & Horton, J.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 7335–7343.
- 116) Çalıřkan, M., Chong, J.X., Uricchio, L., Anderson, R., Chen, P., Sougnez, C., Garimella, K., Gabriel, S.B., dePristo, M.A., Shakir, K., Matern, D., Das, S., Waggoner, D., Nicolae, D.L., & Ober, C. E. (2011) *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1285–1289.
- 117) Liu, R.Z., Mita, R., Beaulieu, M., & Gao, Z. (2010) *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 1229–1239.
- 118) Béard, E. & Braissant, O. (2010) *J. Neurochem.*, **115**, 297–313.
- 119) Zandt, H.J., Renema, W.K., Streijger, F., Jost, C., Klomp, D. W., Oerlemans, F., Van der Zee, C.E., Wieringa, B., & Heers- schap, A. (2004) *J. Neurochem.*, **90**, 1321–1330.
- 120) Aoki, K., Nakamura, T., Inoue, T., Meyer, T., & Matsuda, M. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 817–827.
- 121) Buchser, W.J., Slepak, T.I., Gutierrez-Arenas, O., Bixby, J.L., & Lemmon, V.P. (2010) *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 391.
- 122) Naoki, H., Nakamuta, S., Kaibuchi, K., & Ishii, S. (2011) *PLoS One*, **6**, e19034.
- 123) Kobayashi, T., Terajima, K., Nozumi, M., Igarashi, M., & Akazawa, K. (2010) *J. Theor. Biol.*, **266**, 712–722.
- 124) Pertz, O.C., Wang, Y., Yang, F., Wang, W., Gay, L.J., Gristen-ko, M.A., Clauss, T.R., Anderson, D.J., Liu, T., Auberry, K.J., Camp, D.G. 2nd, Smith, R.D., & Klemke, R.L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **105**, 1931–1936.
- 125) Zivraj, K.H., Tung, Y.C., Piper, M., Gumy, L., Fawcett, J.W., Yeo, G.S., & Holt, C.E. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 15464–15478.