視神経投射形成における 受容体型プロテインチロシンホスファターゼの役割

新谷隆史,野田昌晴

我々の脳神経系が、感覚、運動、情動、記憶・学習などの高次の神経機能を発現するた めには、発生過程において神経回路網が正しく形成されることが必要不可欠である。神経 回路形成の研究において有用な系として用いられてきたのが、視神経の網膜から視中枢へ の投射系である。本投射系においては、トポグラフィックな投射(topographic projection) と呼ばれる非常に精緻な神経結合が網膜と視中枢の間に形成される。本投射系の形成にお いては、ephrinをリガンドとする Eph 受容体(以下 Eph とする)などの受容体型チロシン キナーゼ(RPTK)とともに、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ(RPTP)が重 要な役割を担っていることが明らかになってきた。本総説においては、視神経投射におけ る RPTP の機能について、これまでの知見を紹介したい。

1. はじめに

受容体型プロテインチロシンキナーゼ(RPTK)と受容 体型プロテインチロシンホスファターゼ(RPTP)は、細 胞外からの情報をタンパク質のチロシンリン酸化レベルの 変化に変換して細胞内に伝達するシグナル伝達機構におい て中心的な役割を担っている.RPTKについては、生体内 の様々な現象において重要な役割を果たしていることが明 らかにされて来ているが、タンパク質のチロシンリン酸化 レベルを決定する上で同様に重要であるはずのRPTPに対 する研究は、RPTKに比べて著しく遅れている.

RPTP が神経回路形成において重要な役割を果たしてい ることは、1996 年になって初めて、ショウジョウバエを 用いた研究により明らかになった.すなわち、DLAR と DPTP69D の変異体においては、運動神経の走行に異常が 生じることが明らかになったのである(後述)^{1,2}.これを 機に, RPTP の神経回路形成における生理機能に注目が集 まったが,その後急速にその分子機構が明らかになった訳 ではなかった. RPTP の神経回路形成における生理機能に ついては,現在主に脊椎動物やショウジョウバエの視神経 の投射系を用いて解析が行われている.

本総説においては,最初にニワトリにおける視神経の投 射系について説明した後に,視神経投射の形成に関わる RPTP について解説する.

2. 網膜視蓋投射系におけるトポグラフィックな投射

神経回路網形成における基本様式の一つが,ある領域の 神経細胞集団が二次元的な相対位置関係を保った状態で標 的領域の神経細胞集団と神経結合を形成するトポグラ フィックな投射(topographic projection)である.トポグ ラフィックな投射は神経系の様々な領域で見られるが,網 膜から脳内の視中枢への投射系は,実験の行い易さから最 も盛んに研究されている.特にニワトリの網膜から視蓋 (鳥類等の視中枢)への投射系については,目が大きいこ と,ニワトリ用のレトロウイルスや電気穿孔法等を用いて 簡単に *in vivo* 遺伝子導入ができること等の利点から, 我々を含む多くの研究グループが研究を行っている. RPTP の神経投射に関する研究も,多くの場合ニワトリの 網膜視蓋投射系を用いて行われている.このため,本総説

基礎生物学研究所 統合神経生物学研究部門(〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1)

Functions of receptor-type protein tyrosine phosphatase on the formation of retinal projection

Takafumi Shintani and Masaharu Noda (Division of Molecular Neurobiology, National Institute for Basic Biology, 5–1 Higashiyama, Myodaiji-cho, Okazaki 444–8787, Japan)



図1 ニワトリ網膜視蓋投射系におけるトポグラフィックな投射 網膜(retina)から出た視神経は左右反対側の中脳視蓋野(tectum)に 二次元的相対位置関係を保った形式で神経結合を形成する.



図2 眼と網膜の構造

においても、ニワトリにおける知見を中心に述べるが、哺 乳類の網膜上丘投射系においても同様のメカニズムが働い ていると推定される.

ニワトリの網膜視蓋投射系について簡単に説明する.ニ ワトリの網膜の前側(鼻側),後側(耳側),背側,腹側の 4 領域についてみてみると(図1),網膜の前側領域から発 した視神経は,選択的に視蓋の後側に神経結合を形成す る.一方,網膜の後側領域から発した視神経は,やはり選 択的に視蓋の前側に神経結合を形成する.同様に,網膜の 背側からは視蓋の腹側に,腹側からは背側の領域に投射が 起きる.全体として,網膜神経節細胞は網膜における二次 元の位置関係を保った状態で視蓋へ投射することになる. このようなトポグラフィックな投射によって,網膜上に投 影された像の情報は,二次元的な形を保った状態で中枢へ 伝達される.

3. 網膜の構造と網膜視蓋投射の形成

網膜においては、1種類の幹細胞から視細胞,水平細 胞,双極細胞,アマクリン細胞,ミューラーグリア細胞, 神経節細胞などの細胞が分化し、6層よりなる層構造を形 成する(図2).これらの細胞群は,網膜内で秩序だった 神経結合を形成することにより,視覚情報の受容と処理を 行っている.上記の細胞群の中で,神経節細胞の軸索であ る視神経が視蓋と神経結合を形成することにより,視中枢 への出力を担っている.

神経節細胞は発生3日目頃になると突起を伸ばし始め る.この視神経軸索は眼球を出た後,視交叉,視索を通っ て,発生6日目頃に視蓋に届き始める.そして8日目には ほとんどの軸索が視蓋に到達する.軸索の先端部には成長 円錐(growth cone)と呼ばれる構造体があり,視蓋上に 分布する誘因性因子あるいは反発性因子に反応し,その移

網膜は, 視細胞, 水平細胞, 双極細胞, アマクリン細胞, 神経節細胞, ミューラーグリア 細胞の6種類から構成され, 整然とした層構造を形成している.



図3 網膜視蓋投射が完成するまで

網膜背側由来の視神経を例に説明する. 視神経軸索が視蓋に到着した時点では,軸索は将来の terminal zone (TZ) を中心に分散した状態で分布している(発生10日目).やがて軸索に分枝が生じ,視蓋表面を覆うように伸びてゆく.(11日目).適切な位置(TZ)に到着した分枝はさらに枝分かれをし,シナプス形成が盛んになる(12日目).また,不適切なシナプスや分枝,軸索が除去される(13日目).以上の過程を経て,最終的に投射が完成する(16日目).

動方向を変化させることにより軸索の進路を選択してい る. これを軸索ガイダンス (axon guidance) と呼ぶ. この 結果、視神経軸索は視蓋上の正しい投射位置(terminal zone, TZ) に到達すると当初は考えられていた. しかし ながら、軸索ガイダンス終了時には、大部分の軸索は将来 の TZ を中心とはするものの、背腹軸方向及び前後軸方向 に分散するとともに多くのものは通過して停止している状 況である (図3,発生10日目). 投射形成の次のステップ として軸索は視蓋上で分枝を伸ばし始め、二次元的に正し いTZを探すことになる(図3,発生11,12日目).また, 視蓋上に到達した視神経軸索は、視蓋の層構造の発達を 待って、発生12日目あたりから視蓋深部にも侵入を始め、 最終的に視蓋内の特定の層でシナプスを形成する.この 間、二次元的位置関係において、誤った位置に形成された シナプスや軸索分枝は、退縮して除かれる過程も同時進行 することになる(図3,発生13日目). これが refinement と呼ばれる過程であり、この結果、正しい TZ に形成され たシナプスのみが残り、発生16日頃までにトポグラ フィックな投射がほぼ完成する (図3,発生16日目).

このように、視蓋の適切な位置における分岐形成やシナ プス形成、及び不必要な軸索や分枝の刈り込み(refinement,精緻化)が、トポグラフィックな投射形成において 重要な最終ステップであるにもかかわらず、その詳細な分 子機構については未だ明らかになっていない.

4. 網膜視蓋投射形成の分子機構

受容体型プロテインチロシンキナーゼの Eph とそのリ ガンドの ephrin が網膜視蓋投射の形成において重要な働 きをしていることが明らかになっている. Eph と ephrin は ともに A タイプと B タイプに大別され,例外はあるが, 同じタイプ同士の ephrin と Eph が結合するという規則性



図4 前後軸方向の網膜視蓋投射形成における Eph と ephrin の 役割

耳側の軸索ほど EphA3 を多く発現しているため, 視蓋の後方 に多く発現する ephrin からより強い反発作用を受け, 視蓋前方 で伸長を停止する. EphA4-7 は網膜で均一に発現しているが, 網膜内で勾配を持って発現する ephrin の結合によって活性とし ては EphA3 と同様の勾配を持っていると考えられる. 従って これらの受容体も EphA3 とともに前後軸方向の領域識別に関 与している.

がある.

ニワトリ網膜の前後軸方向について見た場合,神経節細胞において EphA3 が後側で高い勾配を持って発現し,一 方視蓋においては、そのリガンドである ephrin-A2と ephrin-A5 が後側で高い勾配を持って発現する^{3,4)}(図 4). ephrin-A は EphA を発現する軸索に対して反発活性を発揮 するため、後側視神経は視蓋後側には侵入できないと考え られている.また ephrin-A2と-A5 は網膜前側においても 発現しているため^{5~7)},網膜において均一に発現する EphA 4~7 に対して cis に結合することから、網膜前側では Eph は脱感作を受けているとされる^{5,8)}.このため、前側視神経 は、ephrin-A2と-A5を発現する視蓋後側に侵入できると 考えられている^{9~11)}.実際、ephrin-A2と-A5を網膜全体で 発現させると、耳側神経節細胞の軸索が視蓋後側に侵入す ることから,網膜で発現する ephrin もトポグラフィック な投射に重要であることが明らかになった^{7,12)}.背腹軸方 向においては,網膜背側に ephrin-B1 と-B2 が発現し,腹 側に EphB2 と EphB3 が発現している^{5,13)}.一方,視蓋の背 腹軸方向においては,背側に ephrin-B1 が発現する¹⁴⁾. EphB と ephrin-B の相互作用については,軸索に対して反 発作用ではなく,誘引作用を発揮することにより,背腹軸 に沿ったトポグラフィックな投射に機能していることが示 されている^{14,15)}.

RPTK は通常、リガンドが結合すると二量体化あるいは 多量体化し、その結果、細胞内のキナーゼドメイン中の特 定のチロシン残基を自己リン酸化することにより活性化す る. Eph の活性化メカニズムは他の RPTK と少し異なって いる。すなわち、リガンド刺激が無い状態では、膜近傍領 域がキナーゼドメインと結合することにより、キナーゼド メインのチロシンリン酸化は抑制されている (autoinhibition)¹⁶. リガンドである ephrin が細胞外領域に結合 すると,まずこの膜近傍領域内のチロシン残基が自己リン 酸化される. その結果, 膜近傍領域とキナーゼドメインの 結合が外れ、続いてキナーゼドメイン内のチロシン残基が リン酸化されることにより活性化状態になると考えられて いる^{16,17)}. 膜近傍領域のリン酸化チロシン残基は、また、 Src, Crk, RasGAP 等の SH2 ドメインを持ったシグナル伝 達タンパク質が結合する足場として機能しており, Eph の 情報伝達において重要な働きをしていることが分かってい $Z^{18)}$.

Eph は ephrin と結合することで細胞内に情報を伝える (順行性シグナル, forward signal) だけでなく, ephrin に 対して Eph 自身がリガンドとして働き, ephrin が発現して いる細胞に対して情報を伝達すること(逆行性シグナル, reverse signal)が知られている¹⁸⁾. 視神経のトポグラフィッ クな投射の形成においても,順行性シグナルだけでなく逆 行性シグナルも重要な役割をしていることが,マウスの上 丘(ニワトリの視蓋に相当する)において前側に高い勾配 を持って発現する EphA7(図 4)のノックアウトマウスを 用いた解析より明らかになっている¹⁹⁾. EphA7 は ephrin-A サブファミリーを発現する鼻側由来の視神経軸索に対して 反発作用を示すことが示唆されている.

Eph-ephrin 系は当初,軸索ガイダンスにのみ働くと考え られていたが,最近になって,視蓋上の軸索の分枝形成を も制御することが提唱されている.すなわち,視蓋上の ephrin の勾配が,分枝の形成位置や形成方向の決定に関与 する^{14,20)}ことや,視蓋上で勾配を持って発現する EphA サ ブファミリー(図4)が,視神経軸索の ephrin に作用する ことにより,分枝形成の位置決定に関与することが示唆さ れている¹⁹⁾.今後,軸索の分枝形成における Eph と ephrin の役割について詳細が明らかになっていくものと予想され る.さらに,脳由来神経栄養因子(BDNF)とその受容体 の TrkB が分枝形成や刈り込みの制御に関与していること が示唆されており²¹⁾,今後,網膜視蓋投射系を用いて,こ れらの生理機能の解析が進められていくと予想される.

5. 受容体型プロテインチロシンホスファターゼの 構造と分類

上で述べたように、網膜視蓋投射の形成においては、 Eph などの RPTK が中心的な役割を果たしており、軸索に おけるタンパク質のチロシンリン酸化の制御が重要である ことが推測される.タンパク質のチロシンリン酸化レベル



図5 RPTP のサブファミリー

RPTP は構造上の相同性から,八つのサブファミリーに分類される.細胞外には,免疫グロブリンドメインやフィブロネクチンⅢ型リピート構造等を有し,細胞内には一つあるいは二つの PTP ドメインを持つ.

は、プロテインチロシンキナーゼ (PTK) とプロテインチ ロシンホスファターゼ (PTP) の活性のバランスによって 決定される.成長円錐内には高い PTK 活性と同時に、高 い PTP 活性が存在することが知られている²²⁾.ところが、 軸索ガイダンスにおける PTP の役割についての報告は意 外にも少なく、軸索ガイダンスにどのような PTP がどの ような局面で機能しているのか、またその基質は何である のか、などについてはほとんど明らかになっていない.

ヒトには約100のPTPをコードする遺伝子が存在する (ちなみにPTK は約90である)²³⁾. PTP には、リン酸化チ ロシン残基を特異的に脱リン酸化する古典的なPTP(classical PTP)と、リン酸化チロシンだけでなくリン酸化セリ ンやスレオニン残基を脱リン酸化する二重特異性PTP (dual specificity PTP)がある.古典的なPTP は、受容体型 と細胞質型に大別される.この内で受容体型PTP(RPTP) は、構造上の相同性から八つのサブタイプに分類される (図 5)²³⁾.

RPTP の細胞外領域には、免疫グロブリン (Ig) ドメイ ン、フィブロネクチンⅢ型リピート、Meprin-A5-PTPμ (MAM) ドメイン、炭酸脱水酵素 (CAH) 様ドメインな どの、タンパク質問の相互作用に関与することが推測され るドメインを有している.同じサブタイプに属する RPTP の細胞外領域のドメイン構造が、種を越えて非常によく保 存されていることから、種を越えた共通の機能を保持して いることが予想される.その一つがリガンド分子との結合 であり、細胞外領域にリガンド分子が結合することにより RPTPの活性が制御されていることが推測されている.

RPTP の細胞内領域には,約280 アミノ酸より構成され る PTP ドメインが一つもしくは二つ存在する.半数以上 の RPTP が細胞内に二つの PTP ドメインを有するが,R4 サブファミリーを除いて膜近傍側の PTP ドメイン (D1 ド メインと呼ばれる)のみにしか活性が無い.しかしながら, C 末側の PTP ドメイン (D2 ドメインと呼ばれる)は,PTP 活性や基質特異性,安定性に重要であると考えられてい る²³⁾.また,RPTP 分子の二量体形成においても重要な役 割を果たしていると考えられている²³⁾.

6. 視神経の投射に機能する RPTP

これまでに、多くの RPTP について、発生期の網膜にお ける発現が解析されている^{24~29)} (表 1). R2A サブファミ リーでは Ptprd (PTP\delta), Ptprf (LAR) と Ptprs (PTP σ) が、 R2B サブファミリーでは Ptprk (PTP κ), Ptprm (PTP μ) と Ptpru (PTP λ) が、R3 サブファミリーでは Ptprj (DEP1) と Ptpro (GLEPP1) が、R4 サブファミリーでは Ptpre (PTP ϵ) が、R5 サブファミリーでは Ptprg (PTP γ) と Ptprz (PTP ζ) が、R7 サブファミリーでは Ptprr が網膜神経節細胞におい て発現することが報告されている. しかしながら、これら の中で視神経投射における機能が多少なりとも解析されて

表1 各 RPTP の発生期網膜における発現

サブタイプ	RPTP 名(別名)	網膜における発現部位 (動物種)	文献
R1/R6	Ptprc (CD45)	発現しない(マウス)	24
R2A	Ptprd (PTPδ) Ptprf (LAR) Ptprs (PTPσ)	神経節細胞層,内顆粒層(ツメガエル) 神経節細胞層,内顆粒層(ツメガエル) 神経節細胞層,内顆粒層(マウス,ニワトリ,ツメガエル)	25 25 25–27
R2B	Ptprk (PTPκ) Ptprm (PTPμ) Ptprt (PTPρ) Ptpru (PTPλ)	神経節細胞層(マウス) 神経節細胞層(マウス,ニワトリ) 内顆粒層(ツメガエル) 神経節細胞層,内顆粒層(ニワトリ)	26 26, 27 25 28
R3	Ptprb (PTPβ) Ptprh (SAP1) Ptprj (DEP1) Ptpro (GLEPP1) Ptprv (OST-PTP)	? ? 神経節細胞層(マウス) 神経節細胞層,内顆粒層(ニワトリ) ?	26 27, 28
	Ptpra (PTPα) Ptpre (PTPε)	ミューラーグリア細胞(ニワトリ) 神経節細胞層(マウス)	27 26
R5	$\begin{array}{l} Ptprg & (PTP\gamma) \\ Ptprz & (PTP\zeta) \end{array}$	神経節細胞層(マウス,ニワトリ) 神経節細胞層,内顆粒層(マウス)	26, 27 29
R7	Ptprr (PTPBr7) PtpN5 (STEP) Ptpn7 (HePTP)	神経節細胞層(マウス) ? ?	26
R8	Ptprn (IA2) Ptprn2 (IA2β)	? ?	

いるものは, R2A, R2B および R3 サブファミリーの中 の, ごくわずかの RPTP のみである.以下に,比較的解析 が進んでいる,これらのサブファミリーについて解説する.

1) R2A サブファミリー: Ptprs (PTPo) と Ptprf (LAR)

R2A サブファミリーは、Ptprd (PTPδ)、Ptprf (LAR)、 および Ptprs (PTPσ)の三つのメンバーより構成される. このサブファミリーの RPTP は、細胞外に複数の免疫グロ ブリンドメインとフィブロネクチンⅢ型リピートを、細胞 内に二つの PTP ドメインを有する.このサブファミリー の RPTP は、細胞外領域の膜近傍付近でプロテアーゼによ る切断を受けるが、切断を受けた後もN末側部分はC末 側の部分と強く結合した状態で細胞膜上に存在する²³⁾.こ れら三つの RPTP は、中枢神経系において、オーバーラッ プはあるものの、それぞれ独自の発現パターンを示す³⁰⁾.

Ptprs (PTPo) については、イギリスのグループによっ て、ニワトリの視神経を用いた解析が行われている^{31,32)}. 網膜より調製した基底膜上に視神経軸索を伸長させ、 Ptprs の細胞外を認識する抗体を作用させたところ、成長 円錐が縮小するとともに軸索の伸長が抑制された³¹⁾. さら に、Ptprs の細胞外領域と免疫グロブリンの定常領域との 融合タンパク質 (PTPo-Fc)を、ニワトリの視蓋に強制発 現させると、視蓋における視神経軸索の走行に乱れが生じ た³²⁾. Ptprs の細胞外領域は、ヘパラン硫酸プロテオグリ カンに高い親和性を有する³³⁾ことから、彼らは、Ptprs の 細胞外領域と視神経の進路に存在するヘパラン硫酸プロテ オグリカンとの結合が視神経の正常な伸長に重要であり、 PTPo-Fc によって、Ptprs とリガンド分子との結合が阻害 された結果、軸索の伸長が阻害されたと結論している³²⁾.

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、コアとなるタンパク 質にグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸がポリマー 化して結合した糖タンパク質である. ヘパラン硫酸プロテ オグリカンは、膜タンパク質、あるいは分泌タンパク質と して存在し、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) などの増殖因子 や,Wntなどの形態形成因子,ラミニンなどの細胞外基質 やネトリンなどの軸索ガイダンス因子を結合して、これら の分子の生体内における分布を規定したり、機能を修飾し たりすることによって,発生や成体における様々な現象に 重要な役割を果たしていると考えられている³⁴⁾.実際,へ パラン硫酸鎖の合成に異常があると、神経回路形成に異常 が生じることが知られている. 例えば、ヘパラン硫酸鎖の 伸長に働く酵素である exostosin1 (EXT1) を欠損したマウ スでは、視交叉における視神経の経路選択に異常が生じ る³⁵⁾. また, ゼブラフィッシュにおいても, exostosin1と 同じEXTファミリー分子である dackel/ext2 と boxer/extl3 の機能が欠損すると、多くの視神経軸索が視蓋に到達する 前に異常な進路を選択するようになる³⁰.ただし、無事に

視蓋に到達した視神経軸索は視蓋上でトポグラフィックな 投射を形成することから, ヘパラン硫酸プロテオグリカン はトポグラフィックな投射には必須の役割をしていないと 考えられる.興味深いことに, R2A サブファミリーの他 のメンバーである, Ptprf (LAR)のリガンド分子もヘパラ ン硫酸プロテオグリカンであることが明らかになってお り³⁷⁾, R2A サブファミリーの RPTP は, ヘパラン硫酸プロ テオグリカンをリガンドとする傾向があるのかも知れな い.

Ptprf (LAR) の神経回路形成における機能については、 ショウジョウバエを用いて研究が行われている^{1,2,38}. DLAR (Ptprf のショウジョウバエホモログ)の変異体は, 運動ニューロンを始めとする、いくつかの神経回路におい て異常を示すが、ここでは、視神経投射の異常について説 明する.ショウジョウバエの複眼は、それぞれにレンズを 持つ約 750 の個眼が蜂の巣状に集まることによりできてい る.一つの個眼の中には八つの視細胞(R1~R8)が存在 しており、R1~R6 は視神経軸索を lamina とよばれる脳の 神経節に, R7 と R8 は軸索を medulla 神経節に投射する. R7とR8はそれぞれ medulla 内の異なる層で神経結合を形 成する. R1~R6の視細胞は、DLARとDPTP69Dの二つ の RPTP を発現しているが、DLAR の機能欠損変異体にお いては、R1~R6の軸索は lamina 神経節には到達できる が、標的のニューロンにシナプスを形成することができな い³⁸⁾. また, R7の軸索も異常を示し, medulla 神経節内 で、本来の投射位置より浅い層に投射するようになる.正 常な投射を形成するためには、DLARの PTP 活性が必要 であることが分かっている³⁸⁾.

DPTP69D も R2A サブタイプに属する RPTP であるが, このホモログ分子は脊椎動物には見出されていない.この RPTP の機能欠損変異体では,R1~R6 の軸索は lamina 神 経節を通り過ぎ,medulla 神経節に対して異常な投射を形 成する³⁹⁾.また,R7 の軸索も medulla 神経節内で,本来の 投射位置よりも浅い層で停止した状態になる.これらの視 細胞が正常な投射を形成するためには,DPTP69DのPTP 活性と FNIII ドメインが必要であることが示されている が³⁹⁾,DPTP69D の特異的なリガンド分子や基質分子につ いては明らかになっていない.

ショウジョウバエを用いた解析から、神経回路形成において、DLAR や DPTP69D(R2A サブファミリーの RPTP) と DPTP10D や DPTP99A(R3 サブファミリーの RPTP)が 遺伝的に相互作用していることが示唆されている⁴⁰.脊椎 動物においても、R2A と R3 サブファミリーの相互作用が 機能しているのか、今後の課題の一つである.

2) R2B サブファミリー: Ptprm (PTP μ)

R2B サブファミリーは、Ptprk (PTP κ)、Ptprm (PTP μ)、

Ptprt (Ptpp),および Ptpru (PTPλ)の四つのメンバーによ り構成される.このサブファミリーの RPTP は、細胞外領 域の N 末端に Meprin-A5-PTPμ (MAM)ドメインを有し、 それに続いて、一つの免疫グロブリンドメインと複数の フィブロネクチンⅢ型リピートを持つ.細胞内領域は二つ の PTPドメインより成る.このサブファミリーの RPTP も R2A サブファミリーと同様に、細胞外領域の膜近傍付 近でプロテアーゼによる切断を受けるが、切断を受けた後 も N 末側部分は C 末側の部分と強く結合した状態で細胞 膜上に存在する²³⁾.これらの RPTP は、トランスに二量体 を形成することで、細胞間の接着に関与することが知られ ている³⁰⁾.このような二量体形成には PTP 活性を必要とし ない³⁰⁾.

Ptprm (PTPµ) はカドヘリンと複合体を形成し,カドヘ リンのホモフィリックな結合に依存した視神経神経軸索の 伸長の制御に関わることが,培養系を用いた解析により示 唆されている⁴¹⁾.また,Ptprm は網膜の神経節細胞と,視 蓋で視神経が最初に侵入する部位および内部の神経細胞層 に多く分布することが報告されており,視神経軸索上の Ptprm と視蓋に発現するPtprm とのホモフィリックな結合 自身も視神経の伸長の制御に機能することが,培養系を用 いた解析から示唆されている⁴²⁾.今後,Ptprm が視神経投 射形成においてどのような生理機能を有しているのか,個 体レベルでの解析が待たれる.



図6 Ptpro による Eph の活性化抑制機構

Eph の細胞外領域にリガンドである ephrin が結合すると, 膜近 傍領域内のチロシン残基 (Y_{IXI} と Y_{IX2}) が自己リン酸化される. これがトリガーとなって Eph は活性化状態になると考えられ ている. 膜近傍領域のリン酸化チロシン残基は, Src, Crk, RasGAP 等の SH2 ドメインを持ったシグナル伝達タンパク質が 結合する足場として機能することによって, Eph の情報伝達に おいても重要な働きをしている. Ptpro は Y_{IX2} を特異的に脱リ ン酸化することによって Eph の活性化を負に制御する.



図7 Ptproの発現(活性)を変化させた場合の視神経の ephrin-A2 に対する応答性の変化 ストライプアッセイ(stripe assay)と呼ばれる実験系を用いて解析を行った.培養基質上に ephrin-A2 (灰色の部分)とコントロールのタンパク質(黒色の部分)が交互に塗布されている.通常,鼻側視 神経は Eph の発現が少ないため、ephrin-A2 が存在する領域内でも伸長できるが(上段左),耳側視神経 に野生型の Ptpro を過剰発現させると、ephrin-A2 に対する応答性が減少し、ephrin-A2 が存在する領 域内でも伸長できるようになる(下段中央).一方,鼻側視神経にドミナントネガティブ型の Ptpro を発現させると、耳側視神経のように、ephrin-A2 が存在する領域を避けて伸長するようになった (上段右).これは内因性の Ptpro の活性が阻害されることにより、Eph に対する活性化抑制効果が減 少したためと考えられる.



図8 Ptproの発現(活性)を変化させた場合の網膜視蓋投射 (A)背耳側の視神経を Dil で蛍光標識すると, 視蓋の腹側後部に投射するのが観察される(左).一方

背耳側の視神経は視蓋の腹側前部に投射する(右).(B)野生型のPtproを網膜で過剰発現させると, 背耳側視神経は視蓋の正常な投射位置を通り過ぎて,視蓋後部まで侵入する(右).(C)ドミナントネ ガティブ型 Ptproを発現させると,背鼻側視神経が本来の投射位置より手前で停止する(左).(D)Ptpro に特異的な shRNA を網膜に発現させ,内因性のPtproの発現を抑制した場合は,背鼻側視神経が本来 の投射位置より手前で停止するようになる(左).また,terminal zone(TZ)が広範囲になる.

3) R3 サブファミリー: Ptpro (GLEPP1)

R3 サブファミリーは、Ptprb (PTPβ)、Ptprh (SAP1)、 Ptprj (DEP1)、Ptpro (GLEPP1)、Ptprv (OST-PTP)の五つ のメンバーより構成される. このサブファミリーの RPTP は、細胞外に複数のフィブロネクチンⅢ型リピートを持 ち、細胞内に一つの PTP ドメインを有する. この中で、 Ptpro は、我々の研究から、Eph の活性化を制御すること によって、視神経のトポグラフィックな投射形成において 重要な役割を果たしていることが明らかになっている⁴³.

Ptproは、八つのフィブロネクチンⅢ型リピートより成 る細胞外領域と、一つの PTP ドメインから成る細胞内領 域を有している。Ptpro は網膜内で領域特異的に神経節細 胞において発現していることから、特異的な基質分子の脱 リン酸化を通じて領域特異的神経結合形成に関与すること が予想された。解析の結果、Ptpro が EphA と EphB の両受 容体ファミリーを基質として脱リン酸化することを見出し た.さらに詳細な生化学的な解析により、Ptpro は、前述 の Eph の活性化においてトリガーとしての役割をする膜 近傍領域のチロシン残基を特異的に脱リン酸化すること、 この働きにより、Eph の活性化を抑制することが明らかに なった(図 6)⁴³⁾.

次に、網膜から視蓋への領域特異的神経結合形成におけ る Ptpro の機能を明らかにするために、野生型及びドミナ ントネガティブ型の Ptpro を発現するコンストラクトを網 膜神経節細胞に導入し、軸索の挙動を in vitro 及び in vivo において解析した.網膜の器官培養系を用いた in vitro の 解析において,野生型 Ptpro の過剰発現により耳側視神経 軸索の ephrin に対する反応性の低下が観察された. 逆に, ドミナントネガティブ型の Ptpro を発現させると、鼻側視 神経の ephrin に対する反応性の上昇(獲得)が観察され た(図7). さらに同様の発現コンストラクトを用いて、 個体レベルにおける解析を行ったところ,野生型 Ptproの 過剰発現により耳側視神経が視蓋の正常な投射位置を通り 過ぎて、後側まで侵入することが明らかになった(図8). また、ドミナントネガティブ型 Ptpro の発現により、鼻側 視神経が本来の投射位置より手前で停止するという変化が 観察された. さらに, Ptpro に特異的な shRNA を網膜に発 現させ、内在性の Ptpro の発現を抑制した場合、ドミナン トネガティブ型の Ptpro を強制発現させた場合と同様に、 鼻側視神経が本来の投射位置より手前で停止することが判 明した.以上の結果から、Ptpro は Eph の活性を負に制御 することにより、領域特異的神経結合形成に重要な役割を 果たしていることが明らかになった43).

7. おわりに

本稿をご覧いただいて、神経回路形成における RPTP の 役割があまり分かっていないことに驚かれたかもしれな い. この理由として, RPTP について,遺伝子改変動物を 用いた個体レベルでの解析が遅れていることや,基質分子 の同定が進んでいないことなどが挙げられる. 著者らは, 前者に関しては,いくつかの RPTP について遺伝子欠損マ ウスの作成および解析を進めるとともに,ニワトリにおい て,多様な遺伝子発現制御システムを開発し,網膜視蓋投 射における RPTP の機能解析を進めている⁴³⁾.一方,基質 分子の同定については技術的な困難さが伴っていたが,著 者らは,酵母のツーハイブリッドシステムを基盤にした PTP の基質スクリーニング系を開発し,多くの基質分子の 同定に成功している^{44,45)}. 今後,これらの手法を用いた解 析を通して, RPTP の生理機能の解明や, RPTP が関わる シグナル伝達機構が明らかになって行くものと期待してい る.

文 献

- Desai, C.J., Gindhart, J.G. Jr, Goldstein, L.S., & Zinn, K. (1996) Cell, 84, 599–609.
- Krueger, N.X., Van Vactor, D., Wan, H.I., Gelbart, W.M., Goodman, C.S., & Saito, H. (1996) *Cell*, 84, 611–622.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Löschinger, J., Noda, M., & Bonhoeffer, F. (1995) *Cell*, 82, 359–370.
- 4) Cheng, H.-J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., & Flanagan, J. G. (1995) Cell, 82, 371–381.
- Connor, R.J., Menzel, P., & Pasquale, E.B. (1998) Dev. Biol., 193, 21–35.
- Marcus, R.C., Gale, N.W., Morrison, M.E., Mason, C.A., & Yancopoulos, G.D. (1996) *Dev. Biol.*, 180, 786–789.
- 7) Hornberger, M.R., Dütting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., Tanaka, H., & Drescher, U. (1999) *Neuron*, 22, 731– 742.
- 8) Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M.R., Löschinger, J., Pasquale, E.B., Siever, D.A., Verderame, M.F., Müller, B.K., Bonhoeffer, F., & Drescher, U. (1997) *EMBO J.*, 16, 1258– 1267.
- Walkenhorst, J., Dütting, D., Handwerker, C., Huai, J., Tanaka, H., & Drescher, U. (2000) *Mol. Cell. Neurosci.*, 16, 365–375.
- 10) Yin, Y., Yamashita, Y., Noda, H., Okafuji, T., Go, M.J., & Tanaka, H. (2004) *Neurosci. Res.*, 48, 285–296.
- Carvalho, R.F., Beutler, M., Marler, K.J., Knöll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T., & Drescher, U. (2006) *Nat. Neurosci.*, 9, 322–330.
- 12) Dütting, D., Handwerker, C., & Drescher, U. (1999) Dev. Biol., 216, 297–311.
- 13) Holash, J.A. & Pasquale, E.B. (1995) *Dev. Biol.*, 172, 683–693.
- 14) Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., & O'Leary, D.D. (2002) *Neuron*, 35, 475–487.
- 15) Mann, F., Ray, S., Harris, W., & Holt, C. (2002) Neuron, 35, 461–473.
- 16) Wybenga-Groot, L.E., Baskin, B., Ong, S.H., Tong, J., Pawson, T., & Sicheri, F. (2001) *Cell*, 106, 745–757.
- 17) Binns, K.L., Taylor, P.P., Sicheri, F., Pawson, T., & Holland,

S.J. (2000) Mol. Cell. Biol., 20, 4791-4805.

- 18) Kullander, K. & Klein, R. (2002) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3, 475–486.
- 19) Rashid, T., Upton, A.L., Blentic, A., Ciossek, T., Knöll, B., Thompson, I.D., & Drescher, U. (2005) *Neuron*, 47, 57–69.
- 20) Yates, P.A., Roskies, A.L., McLaughlin, T., & O'Leary, D.M. (2001) J. Neurosci., 21, 8548–8563.
- Marshak, S., Nikolakopoulou, A.M., Dirks, R., Martens, G.J., & Cohen-Cory, S. (2007) J. Neurosci., 27, 2444–2456.
- 22) Desai, C.J., Sun, Q., & Zinn, K. (1997) Curr. Opin. Neurobiol., 7, 70–74.
- 23) Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., & Mustelin, T. (2004) *Cell*, 117, 699–711.
- 24) Santos, A.M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.C., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J.L., Navascués, J., & Cuadros, M.A. (2008) J. Comp. Neurol., 506, 224–239.
- 25) Johnson, K.G. & Holt, C.E. (2000) Mech. Dev., 92, 291-294.
- 26) Horvat-Bröcker, A., Reinhard, J., Illes, S., Paech, T., Zoidl, G., Harroch, S., Distler, C., Knyazev, P., Ullrich, A., & Faissner, A. (2008) *Neuroscience*, **152**, 618–645.
- 27) Ledig, M.M., McKinnell, I.W., Mrsic-Flogel, T., Wang, J., Alvares, C., Mason, I., Bixby, J.L., Mueller, B.K., & Stoker, A. W. (1999) *J. Neurobiol.*, 39, 81–96.
- 28) Shintani, T., Kato, S., Yuasa-Kawada, J., Sakuta, H., Takahashi, M., & Noda, M. (2004) J. Neurobiol., 59, 34–47.
- 29) Klausmeyer, A., Garwood, J., & Faissner, A. (2007) J. Comp. Neurol., 504, 659–679.
- 30) Johnson, K.G. & Van Vactor, D. (2003) Physiol. Rev., 83, 1– 24.
- 31) Ledig, M.M., Haj, F., Bixby, J.L., Stoker, A.W., & Mueller, B.
 K. (1999) J. Cell Biol., 147, 375–388.

- 32) Rashid-Doubell, F., McKinnell, I., Aricescu, A.R., Sajnani, G., & Stoker, A. (2002) J. Neurosci., 22, 5024–5033.
- 33) Aricescu, A.R., McKinnell, I.W., Halfter, W., & Stoker, A.W. (2002) Mol. Cell. Biol., 22, 1881–1892.
- 34) Van Vactor, D., Wall, D.P., & Johnson K.G. (2006) Curr. Opin. Neurobiol., 16, 40–51.
- 35) Inatani, M., Irie, F., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2003) *Science*, **302**, 1044–1046.
- 36) Lee, J.S., von der Hardt, S., Rusch, M.A., Stringer, S.E., Stickney, H.L., Talbot, W.S., Geisler, R., Nüsslein-Volhard, C., Selleck, S.B., Chien, C.B., & Roehl, H. (2004) *Neuron*, 44, 947–960.
- 37) Johnson, K.G., Tenney, A.P., Ghose, A., Duckworth, A.M., Higashi, M.E., Parfitt, K., Marcu, O., Heslip, T.R., Marsh, J.L., Schwarz, T.L., Flanagan, J.G., & Van Vactor, D. (2006) *Neu*ron, 49, 517–531.
- 38) Clandinin, T.R., Lee, C.H., Herman, T., Lee, R.C., Yang, A.Y., Ovasapyan, S., & Zipursky, S.L. (2001) *Neuron*, 32, 237–248.
- 39) Garrity, P.A., Lee, C.H., Salecker, I., Robertson, H.C., Desai, C.J., Zinn, K., & Zipursky, S.L. (1999) *Neuron*, 22, 707–717.
- 40) Sun, Q., Schindelholz, B., Knirr, M., Schmid, A., & Zinn, K. (2001) Mol. Cell. Neurosci., 17, 274–291.
- 41) Burden-Gulley, S.M. & Brady-Kalnay, S.M. (1999) J. Cell Biol., 144, 1323–1336.
- 42) Burden-Gulley, S.M., Ensslen, S.E., & Brady-Kalnay, S.M. (2002) J. Neurosci., 22, 3615–3627.
- Shintani, T., Ihara, M., Sakuta, H., Takahashi, H., Watakabe, I., & Noda, M. (2006) *Nature Neurosci.*, 9, 761–769.
- 44) Kawachi, H., Fujikawa, A., Maeda, N., & Noda, M. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6593–6598.
- 45) Fukada, M., Kawachi, H., Fujikawa, A., & Noda, M. (2005) *Methods*, 35, 54–63.