

5. おわりに

筆者が研究を開始した当初 20 例あまりだった TNSALP の変異が現在では 200 例に迫りつつある。変異の同定には日本人研究者の寄与も大きい。ただ、臨床例の報告は大多数が北米，ヨーロッパ，日本でなされたものであり，今後アジアやアフリカでの研究が盛んになればさらに様々な変異が報告されてくる可能性がある。個々の変異が TNSALP 分子へ及ぼす影響は実際に細胞に発現してみなければ推測できないのが現状で，立体モデルに基づいたコンピューターシミュレーションで予測できるようになるにはまだ時間がかかりそうである。また，今年からアメリカで酵素補充療法による低ホスファターゼ症の治験も開始されると聞いているので，その発症機序の解明が単に学術上の興味を越えて，治療に役立つことを願っている。

最後に，共同研究者の方々に感謝します。また，校閲をお願いした池原征夫教授（第一薬科大学）にお礼を申します。

- 1) Millán, J.S. (2006) in *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 2) Mornet, E., Stura, E., Lia-Baldin, A.S., Stigbrand, T., Menez, A., & LeDu, M.H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 31171–31178.
- 3) Weiss, M.J., Cole, D.E., Ray, K., Whyte, M.P., Lafferty, M.A., Mulivor, R.A., & Harris, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 7666–7669.
- 4) Fedde, K.N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S.P., Ryan, L. M., Weinstein, R.S., Waymire, K., Narisawa, S., Millán, J.L., MacGregor, G.R., & Whyte, M.P. (1999) *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 2015–2026.
- 5) Shibata, H., Fukushi, M., Igarashi, A., Misumi, Y., Ikehara, Y., Ohashi, Y., & Oda, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 968–977.
- 6) Fukushi, M., Amizuka, N., Hoshi, K., Ozawa, H., Kumagai, H., Omura, S., Misumi, Y., Ikehara, Y., & Oda, K. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 613–618.
- 7) Fukushi-Irie, M., Ito, M., Amaya, Y., Amizuka, N., Ozawa, H., Omura, S., Ikehara, Y., & Oda, K. (2000) *Biochem. J.*, **348**, 633–642.
- 8) Ito, M., Amizuka, N., Ozawa, H., & Oda, K. (2002) *Biochem. J.*, **361**, 473–480.
- 9) Ishida, Y., Komaru, K., Ito, M., Amaya, Y., Kohno, S., & Oda, K. (2003) *J. Biochem. (Tokyo)*, **134**, 63–70.
- 10) Brun-Heath, I., Lia-Baldini, A.S., Maillard, S., Taillandier, A., Utsch, B., Nunes, M.E., Serre, J.L., & Mornet, E. (2007) *Eur. J. Med. Genet.*, **50**, 367–378.
- 11) Cai, G., Michigami, T., Yamamoto, T., Yasui, N., Satomura, K., Yamagata, M., Shima, M., Nakajima, S., Mushiake, S.,

- Okada, S., & Ozono, K. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3936–3942.
- 12) Mumm, S., Jones, J., Finnegan, P., & Whyte, M.P. (2001) *J. Bone Miner. Res.*, **16**, 1724–1727.
 - 13) Nasu, M., Ito, M., Ishida, Y., Numa, N., Komaru, K., Nomura, S., & Oda, K. (2006) *FEBS. J.*, **273**, 5612–5624.
 - 14) Numa, N., Ishida, Y., Nasu, M., Sohda, M., Misumi, Y., Noda, T., & Oda, K. (2008) *FEBS. J.*, **275**, 2727–2737.
 - 15) Komaru, K., Ishida, Y., Amaya, Y., Goseki-Sone, M., Orimo, H., & Oda, K. (2005) *FEBS. J.*, **272**, 1704–1717.
 - 16) 大藪恵一 (2007) *Clin. Calcium*, **17**, 128–132.

織田 公光

(新潟大学医歯学系口腔生化学分野)

Molecular basis of hypophosphatasia

Kimimitsu Oda (Division of Oral Biochemistry, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 2-5274 Gakkocho-dori, Chuo-Ku, Niigata 951-8514, Japan)
投稿受付：平成 20 年 6 月 3 日

嗅覚神経系の発達過程におけるケモカインシグナルの役割

はじめに

ニューロンは誕生後に適切な場所へ移動して，特定の個性を持った細胞集団（層，神経核，神経節など）を形成する。その後，異なる細胞集団同士が軸索と樹状突起を介して精緻に接続することで，秩序立った機能的神経回路網が形成される。すなわち，脳神経系の成り立ちを理解するには，「ニューロンの移動」と「軸索の投射」という二つの連続したプロセスがどのような分子メカニズムによって制御されているのかを解明することが重要である。嗅覚神経系の発達過程もその例外ではない。匂い分子の受容を司る嗅細胞の前駆細胞は，生誕地から移動，集合して嗅プラコード（後の嗅上皮）と呼ばれる細胞集団を形成する。その後，嗅プラコード内で嗅細胞へと分化し，軸索を脳の嗅球に正確に伸長して，二次ニューロンである僧帽細胞と特異的シナプス結合を形成する。これにより，嗅球における匂い分子受容体地図が構築され，匂いの情報が脳内に表現される。

魚類は嗅覚系が発達しており，古くから嗅覚研究に適したモデル生物として匂い分子の受容機構，匂い情報の脳への伝達，匂い刺激による行動や内分泌系の変化など，嗅覚

研究の様々な側面の解明に大きく寄与してきた。また、稚魚の身体が透明で遺伝子工学的手法が確立されている熱帯魚ゼブラフィッシュは、発生神経生物学の分野で有用なモデル生物として注目されている。最近筆者らはこのゼブラフィッシュを用いて、嗅細胞の前駆細胞が正しく嗅プラコードに配置するために、ケモカインシグナルが必要であることを明らかにした¹⁾。さらに、ケモカインシグナルは嗅プラコードの形成のみならず、嗅細胞の軸索が嗅球へと伸長するために重要な役割を果たすことを見いだした¹⁾。本稿では、嗅覚神経回路の形成過程におけるケモカインの二元的な役割について概説する。

1. 嗅プラコードの形成とケモカインシグナル

ケモカインファミリーは分子量約 10,000 の分泌性タンパク質群で、免疫系において炎症部位に白血球を誘導する因子として発見された²⁾。現在までに 50 種を超えるケモカインが同定されている。それらのうち、Cxcl12 (別名 SDF-1: stromal cell-derived factor-1) とその受容体 Cxcr4 は、神経系の発達過程において重要な役割を果たすことが近年明らかとなってきた³⁻⁸⁾。

ゼブラフィッシュにおいて、嗅細胞の前駆細胞は前方神経板の外側に沿った前後に細長い領域で誕生する (図 1, 左)⁹⁾。その後、発達にともない徐々に細胞が集合して、将来、鼻となる位置に嗅プラコードと呼ばれる嗅覚器 (嗅上皮) 原基を形成する (図 1, 中央)。一方、マウスおよびゼブラフィッシュの初期発達過程において、ケモカイン受容体 Cxcr4 の最も顕著な発現部位の一つが嗅プラコードで

あることが知られていた^{10,11)}。嗅覚系の発達過程におけるケモカインシグナルの役割を調べるために、筆者らはまず、Cxcr4 およびそのリガンド Cxcl12 の発現パターンを詳細に解析した。Cxcr4 は嗅細胞前駆細胞の誕生領域である前方神経板の外側領域で発現し、その発現領域は発生が進むにつれて嗅プラコードに収斂した。この間、Cxcl12 は前方神経板内で発現し、その領域は常に Cxcr4 発現細胞群と隣接する位置関係を示した。このことから、ケモカインシグナルが嗅プラコードの形成に関与することが予想された。そこで筆者らは、ゼブラフィッシュの利点である様々な遺伝学的手法を用いて、ケモカインシグナルの loss-of-function および gain-of-function 解析を行った。嗅細胞可視化トランスジェニックフィッシュ^{12,13)}と Cxcr4 機能欠損変異体フィッシュ (*odysseus*)¹⁴⁾を交配して嗅細胞を観察したところ、嗅プラコードの腹側および内側部に異常な配置を示す嗅細胞が存在することがわかった (図 2A, 中央)。また、修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドであるモルフォリノを受精卵に注入し、Cxcl12 ケモカインのノックダウンを行うと、Cxcr4 変異体と同様の表現型が観察された (図 2A, 右)。このことから、Cxcl12/Cxcr4 シグナルは嗅プラコードの形成に必要であることが明らかとなった。さらに、Cxcl12 発現プラスミドを受精卵に注入し、モザイク状の異所性発現を行った。その結果、本来の嗅プラコードより腹側に存在する外来性 Cxcl12 の発現組織近傍に、いくつかの嗅細胞が異所的に配置した。このことは、Cxcl12 が Cxcr4 発現嗅細胞を誘引またはその近傍にとどめる働きを持つことを示している。

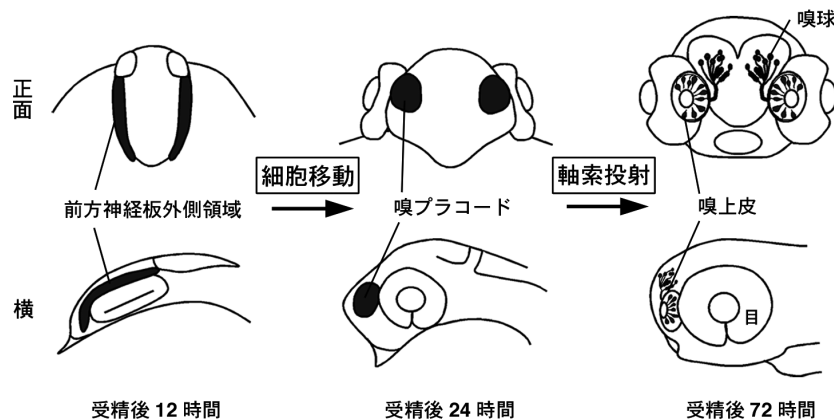


図 1 ゼブラフィッシュにおける一次嗅覚経路の発達過程

嗅細胞の前駆細胞は、前方神経板の外側に沿った前後軸に長い領域で誕生し (左)、移動、集合して嗅プラコードを形成する (中央)。嗅細胞は嗅プラコード内で分化し、軸索を嗅球へと正確に伸長する (右)。

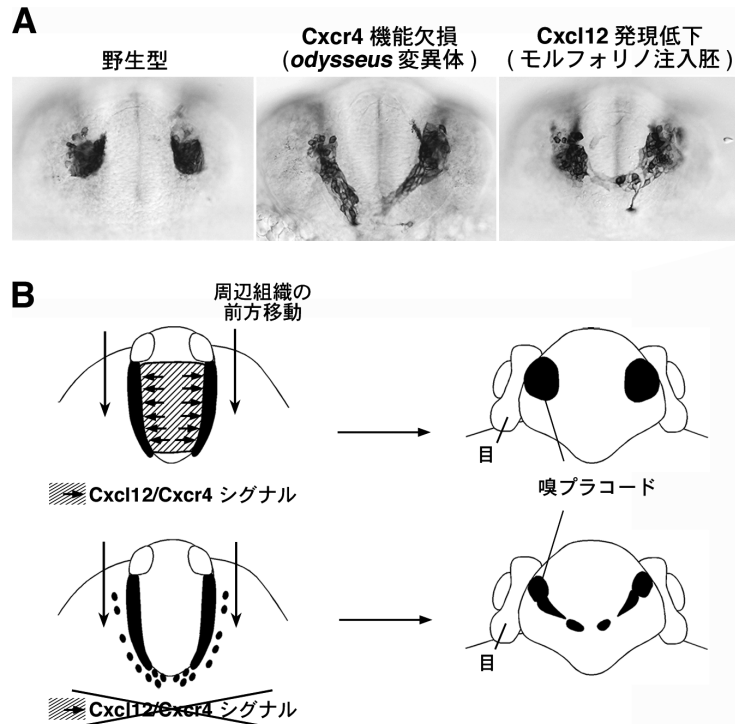


図2 Cxcl12/Cxcr4 シグナルは嗅細胞前駆細胞の嗅ブラコードへの集合に必要である

(A) Cxcr4 機能欠損変異体 (中央) および Cxcl12 発現低下個体 (右) では、嗅ブラコードに集合できずに腹側部および内側部に取り残された嗅細胞が観察される。

(B) 筆者らの実験結果から推察されるモデル。Cxcl12/Cxcr4 シグナルは、嗅細胞前駆細胞が頭部発達過程に生じる周辺組織の前方移動に逆らって、将来の鼻の位置にとどまるための保持シグナルとして働くと考えられる。

ゼブラフィッシュの頭部形成過程では、発達にともなうダイナミックな組織の前方移動 (anterior morphogenetic movement) が知られている (図 2B)¹⁵⁾。Cxcl12 と Cxcr4 の発現領域が近接していることや、外来性 Cxcl12 発現領域に嗅細胞が異所的に集まることから、Cxcl12/Cxcr4 シグナルは嗅細胞の前駆細胞が Cxcl12 発現領域近傍にとどまるための保持シグナルとして働くことが示唆される。すなわち、Cxcl12/Cxcr4 シグナルを欠損すると、頭部形態形成にともなう周囲の組織の前方移動に逆らうことができず、嗅細胞が前方腹側部に異所的に配置すると考えられる (図 2B 下)。

2. 嗅細胞軸索の嗅球への投射とケモカインシグナル

嗅ブラコードの形成後、Cxcr4 の発現は初期軸索伸長期の間も、分化しつつある嗅細胞で維持される。この時期、リガンドである Cxcl12 ケモカインは、軸索の通り道であ

る「嗅上皮-終脳」境界領域に発現している (図 3A)。これらの発現パターンから、筆者らは Cxcl12/Cxcr4 シグナルが嗅ブラコードの形成のみならず嗅細胞の軸索投射に関与するのではないかと予想し、Cxcr4 変異体における嗅細胞の軸索投射を解析した。その結果、約半数の個体で、ほとんど全ての嗅細胞軸索が「嗅上皮-終脳」境界領域で停滞し、嗅球への投射を完全に欠損するという表現型が観察された (図 3B, 右)。次に筆者らは、Cxcl12 が嗅細胞の軸索誘引因子として働いている可能性を検証した。外来性 Cxcl12 を全身に強制発現することにより、内在性 Cxcl12 の発現局在を覆い隠す実験を行った。その結果、嗅細胞前駆細胞のブラコードへの集合については Cxcr4 機能欠損変異体と同様の異常が認められたが、嗅細胞の軸索投射は正常であった。すなわち、Cxcl12 は軸索を誘引して伸長方向を制御するのではなく、軸索伸長のための「許容シグナル」として機能することが示唆された。筆者らは、Cxcl12/

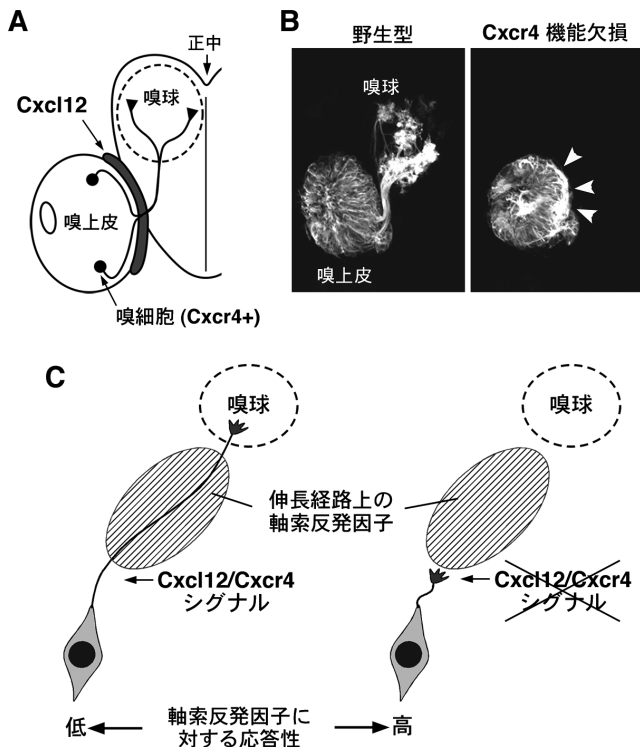


図3 Cxcl12/Cxcr4 シグナルによる嗅細胞軸索投射の制御

(A) Cxcr4 を発現する嗅細胞は、Cxcl12 を発現する「嗅上皮-終脳」境界領域を通して脳に侵入し、同側の嗅球に投射する。(B) Cxcr4 機能欠損変異体では、嗅細胞の軸索が「嗅上皮-終脳」境界領域で停滞し(矢尻)、嗅球への投射を欠損する。(C)筆者らの実験結果から推察されるモデル。Cxcl12/Cxcr4 シグナルは、伸長経路上に存在する未知の反発因子に対する軸索の応答性を減弱することによって、軸索が嗅球まで伸長するための許容シグナルとして働いていると考えられる。

Cxcr4 シグナルが伸長経路上に存在する未知の反発因子に対する軸索の応答性を減弱させることによって、軸索が嗅球まで伸長できる環境を提供していると考えている(図3C)。また、この結果は同時に、Cxcr4 変異体における軸索投射異常が単に嗅プラコードの形成異常に起因した二次的なものではないことを示しており、同じ細胞においてCxcl12/Cxcr4 シグナルが「細胞の移動」と「軸索の投射」という二つの異なる発達プロセスを制御することが示された。

おわりに

ニューロンの移動と軸索の伸長は、「細胞体そのものの移動」と「細胞の一部である軸索の移動」という違いがあるものの、制御メカニズムの多くは共通していると考えられている。実際、軸索ガイダンス分子として同定された

Semaphorin, Netrin, Slitなどは、細胞体の移動もガイドすることが既に明らかとなっている。筆者らは、異なった発達段階の嗅細胞に対してCxcl12ケモカインが継続的に作用し、細胞の移動と軸索の伸長という連続した二つの発達プロセスを制御することを明らかにした。さらに、Cxcl12は同じCxcr4受容体を介するが、それぞれの発達プロセスに対する作用様式が異なる可能性も示された。同一細胞集団に対して一つの分子が異なる発達プロセスを制御するためには、異なる作用様式を用いることが有効な戦略であると考えられる。今後、Cxcl12/Cxcr4シグナルの発達段階における相違を解明することで、「細胞体の移動」から「軸索の移動」へ移行する分子メカニズムが明らかになると期待される。

本研究を遂行するにあたり多大な支援を頂いた、吉原良浩チームリーダー(筆者所属研究室)、Holger Knaut博士(米国・ハーバード大学)に感謝いたします。

- 1) Miyasaka, N., Knaut, H., & Yoshihara, Y. (2007) *Development*, 134, 2459-2468.
- 2) Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000) *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 217-242.
- 3) Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y.R., Littman, D.R., Tessier-Lavigne, M., & Pleasure, S.J. (2002) *Development*, 129, 4249-4260.
- 4) Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X.C., Nagasawa, T., Wu, J.Y., & Rao, Y. (2002) *Nat. Neurosci.*, 5, 719-720.
- 5) Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalq, M., Nagasawa, T., Höllt, V., & Schulz, S. (2003) *J. Neurosci.*, 23, 5123-5130.
- 6) Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E.A., & Miller, R.J. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 3995-4003.
- 7) Knaut, H., Blader, P., Strähle, U., & Schier, A.F. (2005) *Neuron*, 47, 653-666.
- 8) Borrell, V. & Marin, O. (2006) *Nat. Neurosci.*, 9, 1284-1293.
- 9) Whitlock, K.E. & Westerfield, M. (2000) *Development*, 127, 3645-3653.
- 10) Chong, S.W., Emelyanov, A., Gong, Z., & Korzh, V. (2001) *Mech. Dev.*, 109, 347-354.
- 11) Tissir, F., Wang, C.E., & Goffinet, A.M. (2004) *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 149, 63-71.
- 12) Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S.Y., Hutson, L.D., Chien, C.B., Okamoto, H., & Yoshihara, Y. (2005) *Development*, 132, 1283-1293.
- 13) Sato, Y., Miyasaka, N., & Yoshihara, Y. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 889-897.
- 14) Knaut, H., Werz, C., Geisler, R. & Nüsslein-Volhard, C. (2003) *Nature*, 421, 279-282.
- 15) Karlstrom, R.O. & Kane, D.A. (1996) *Development*, 123, 461.

宮坂 信彦

(独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・
シナプス分子機構研究チーム)

Roles of chemokine signaling during development of the olfactory system

Nobuhiko Miyasaka (Laboratory for Neurobiology of Synapse, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan)

タンパク質 S-パルミトイル化酵素

1. はじめに

多くのタンパク質はリン酸化、糖鎖修飾、ユビキチン化あるいは脂質修飾など、いわゆる「翻訳後修飾」によって動的な機能、局在および安定性などの制御を受ける。このような個々のタンパク質の翻訳後修飾による制御は、細胞周期の進行や細胞運動など、細胞の機能において非常に重要であり、その制御機構の解明は現代の細胞生物学の大きなテーマの一つとなっている。

パルミトイル化は翻訳後脂質修飾の一種で、飽和脂肪酸であるパルミチン酸を基質タンパク質に付加する反応である。グリシン/システイン残基にアミド結合によって付加する不可逆的な N-パルミトイル化、ならびに、システイン残基にチオエステル結合によって付加する可逆的な S-パルミトイル化が知られており、前者はおもにソニックヘッジホッグ (Shh) ファミリー等の細胞外分泌タンパク質、後者はおもに細胞内あるいは膜タンパク質で見られる。S-パルミトイル化は細胞内において多数のタンパク質に見られる一般的な修飾であり、基質タンパク質の局在・動態制御に非常に重要な役割を果たしていることが指摘されている。しかし、S-パルミトイル化を触媒する酵素の有無をはじめ、細胞内タンパク質のパルミトイル化制御機構の詳細は、約 30 年間不明なままであった。最近、酵母遺伝学からタンパク質パルミトイル化酵素が見出され、タンパク質 S-パルミトイル化の制御機構の解明が様々な種で本格化しつつある。本稿では S-パルミトイル化触媒酵素の発見とその展開について解説する。以降、S-パルミトイル化を「パルミトイル化」と称する。

2. タンパク質パルミトイル化

これまでに、パルミトイル化を受ける基質タンパク質として、三量体 G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$; $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$), 低分子量 G タンパク質 (H-Ras, N-Ras, RhoB), NO 合成酵素 (NOS; eNOS, iNOS), チロシンキナーゼ (Fyn, Lck), 各種受容体 (β_2 アドレナリン受容体, CD4) や各種足場タンパク質 (PSD-95, Cbp/PAG) など情報伝達に重要なタンパク質が多数報告されている¹⁾。パルミトイル化脂質修飾の結果、基質タンパク質の疎水性が増大し、細胞膜や細胞内小器官等の膜構造への親和性が亢進すると考えられている。例えば、野生型 $G\alpha_q$ は通常細胞膜直下に集積しているが、パルミトイル化をうけるシステイン残基をセリン残基に変異させたパルミトイル欠損型 $G\alpha_q$ は細胞質に一様に局在する (図 1A)。基質タンパク質によってはパルミトイル化により ER・ゴルジ装置間 (GAD65), 核・細胞膜間 (R7BP) やゴルジ装置・細胞膜間 (H-Ras, N-Ras) など細胞内小器官・細胞膜間を移動するものが知られている^{1,2)}。これらのことから、タンパク質の機能におけるパルミトイル化依存的な局在制御が果たす役割が注目されている。さらに、細胞膜上における情報伝達のホットスポットである脂質ラフトへの情報伝達分子の集積にパルミトイル化が関与していることが指摘されている (図 1B)³⁾。

パルミトイル化はミリストイル化などの他の脂質修飾とは異なり可逆的で、パルミトイル化反応と脱パルミトイル化反応からなるパルミトイル化サイクルの存在が示唆されている (図 1B)。興味深いことに、 $G\alpha_s$ や PSD-95 など、いくつかの基質タンパク質において外界刺激依存的なパルミトイル化レベルの変化が報告されており^{4,5)}、外界刺激依存的なパルミトイル化サイクルの変動による基質タンパク質の動的な局在・機能制御が行われていることが予想される。パルミトイル化サイクルには、タンパク質リン酸化におけるリン酸化酵素と脱リン酸化酵素に相当するパルミトイル化酵素 (PAT, palmitoyl-acyl transferase) および脱パルミトイル化酵素 (PPT, palmitoyl-protein thioesterase) の関与が想定され、これら酵素の外界刺激依存的な活性制御機構の存在が期待されてきた。しかし、これらの酵素は存在の有無すら長年不明であったため、細胞内タンパク質のパルミトイル化調節機構の詳細は明らかとなっていなかった。