

神経回路形成の分子生物学

筑波大学基礎医学系分子神経生物学

榎 正幸

はじめに

脳神経機能は多種多様な神経細胞が作る神経回路の上に成り立っている。この複雑かつ正確なネットワークは、発生期の胎児神経系において神経軸索が標的細胞へ正確にガイドされ正しい標的細胞とシナプス結合する事により形成される。この軸索ガイダンス過程で働く事が知られている分子の一部を図1に示す。これらは大きく分けると、細胞接着分子や細胞間基質蛋白質の様に細胞表面や細胞間で軸索の足場としての情報を伝える短距離作動性因子と、分泌された細胞から拡散して勾配を形成し軸索の伸長を制御する遠距離作動性因子がある¹⁾(図1)。前者には軸索の伸長を促進するもの(contact attraction)と軸索の伸長を抑制するもの(contact repulsion)があり、後者には軸索を誘引するもの(chemoattraction)と軸索を反発するもの(chemorepulsion)がある。前者は軸索の伸長する通路を規定し、後者は軸索の伸長方向を規定していると考えられる。実際の軸索ガイダンスでは、これらの複数の分子が共同で働き、軸索の走行が決定されると考えられる¹⁾。(後で述べる様に1つの分子が複数の作用を持つ場合もあり、上に述べた区分は絶対的なものではない。)

ここでは、軸索ガイダンスに関わる分子のうち、神経回路形成における役割が比較的明らかな4つのグループのガイダンス機構について概説する。

1. ネットリン (netrin)

1) ネットリンの構造と機能

今から約100年前にスペインの解剖学者カハール(Ramón y Cajal)は自らの形態学的な知見に基づいて、「神経軸索が標的細胞から分泌される何らかの化学因子によりガイドされる」と言う考え(化学向性説、chemotropic theory)を提唱した。予想された活性を持つ分子が実際に存在するか否かは長らく不明であったが、1988年米国のMarc Tessier-Lavigneらは神経培養系を用いて特定の神経軸索を誘引する因子が存在する事を示した。即ち、彼らは脊髄の交差性神経(交連神経と呼ばれる)の軸索がフロアプレート細胞(脊髄腹側正中部に位置する非神経性細胞)から分泌される拡散性の因子によって誘引される事を明らかにした。この活性因子としてニワトリ胚の脳から精製された蛋白質がネットリン(netrin)である²⁾。ネットリンは分子量約80キロダルトンの分泌蛋白であり、細胞外基質蛋白質ラミニンの鎖の一部と相同性を有す

る蛋白であった²⁾(図2)。しかも面白い事に、線虫(*Caenorhabditis elegans*)の *unc-6* 遺伝子がネトリンと構造が良く似た遺伝子(相同遺伝子)である事が明らかになった^{2),3)}。線虫の *unc-6* 変異体は、体の動きが異常になる変異体(*uncordinated*; *unc* と総称される)の1つで、神経軸索の走行に異常を持つ事が以前の研究から明らかにされていた⁴⁾。これまでの研究から、線虫と脊椎動物において *unc-6* 遺伝子とネトリンは機能的にも類似し、種を超えて保存されたメカニズムにより神経軸索をガイドする事が明らかになっている⁵⁾。即ち、ネトリンはある神経軸索には化学誘引物質として働き、ネトリンを分泌する標的細胞へ軸索を引きつけるが、別の神経軸索に対しては化学反発物質として働き、ネトリンが分泌されている場所から軸索を遠ざける事により軸索をガイドしている⁵⁾。また、軸索ガイダンスのみならず、ある種の神経細胞の遊走にも誘引・反発のシグナル因子として働いている⁵⁾。ネトリン-1 遺伝子のノックアウトマウスでは、脊髄の交連神経細胞の走行に特異的な異常が認められるのみならず、脳の交連(脳梁、前交連、海馬交連など)の形成にも異常が見られた⁶⁾。また、橋核や下オリーブ核の無形成も観察されたが、この異常は細胞遊走を誘導するネトリン-1 シグナルの欠如によるものと考えられている⁶⁾。ネトリンはショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどの生物にも存在し同様の働きを持つ事が示されている。

2) ネトリン受容体の構造と機能

ネトリン受容体は、DCC/UNC-40 と UNC-5 の2つグループに分類される^{7),8)}(図2)。脊椎動物では、DCC/UNC-40 ファミリーに DCC とネオゲニンの2つの遺伝子が存在し、UNC-5 ファミリーに UNC5H1~3 の3つの遺伝子が存在する^{7),8)}。前者は、細胞外に4つの免疫グロブリン様領域と6つのフィブロネクチン・タイプ リピートを持つ免疫グロブリン・スーパーファミリーの膜蛋白質である⁷⁾(図2)。後者は、細胞外に2つの免疫グロブリン様領域と2つのトロンボスポンジン・タイプ 領域を持つ膜蛋白質であり⁸⁾、細胞内に ZO-1 相同領域と death domain を持つ(図2)。

線虫の *unc-5* と *unc-40* の変異体はいずれも *unc-6* 変異体と似た軸索走行異常を持つ変異体であり、遺伝学的解析から *unc-6* の情報伝達と関連する遺伝子の変異体であろうと考えられていたが、UNC-6 蛋白と UNC-5・UNC-40 蛋白の関係は不明であった⁴⁾。DCC はヒト大腸癌の腫瘍抑制遺伝子として知られていた *Deleted in Colorectal Cancer* 遺伝子の産物であるが、我々の *in vitro* の実験と DCC ノックアウトマウスを用いた解析から、DCC が神経回路形成期にはネトリンによる軸索誘引に必要な受容体として働く事が証明された^{7),9)}。UNC-5 は、線虫ではネトリン依存性の軸索反発に必要な受容体である事を示唆するデータがあるが、脊椎動物での働きはまだ良く分かっていない。最近、小脳失調マウス(*rostral cerebellar malformation (rcm)* マウス)の疾患原因遺伝子が *unc5h* 遺伝子の1つである事が明らかにされた¹⁰⁾。*rcm* マウスの異常が神経発生期の神経細胞の遊走異常に起因すると考えられる事から、UNC5H は細胞遊走の制御

にも関わると推定されている。

また、DCC と UNC5H の細胞内の特定の領域がネトリンシグナル依存性に結合する事により受容体ヘテロダイマーを形成し、ネトリンによる軸索誘引のシグナルを軸索反発のシグナルに変換している事が示された¹¹⁾。しかしながら、これらの受容体活性化のシグナルがどの様にして細胞内に伝達されて成長円錐の運動制御につながるかに関しては未だ十分には分かっていない。

2. スリット (slit) とロボ (robo)

1) 軸索の正中交差とスリット・ロボ情報伝達系

ネトリンによりガイドされた神経軸索は、正中部を交差した後、正中部から少し離れた場所を体軸方向に沿って伸びて行く。これは、正中交差後ネトリンに対する反応性を失うとともに新しいガイダンス分子に対する反応性を獲得した為と考えられる。この様な軸索の正中交差を制御する機構に関して、ショウジョウバエの遺伝学的方法を用いた研究から多くの事が明らかにされてきた。アメリカの Corey Goodman らは、ショウジョウバエの交連 (交差性線維の束) の形成に異常を持つ変異体の系統的なスクリーニングを行い、それらの原因遺伝子の解析を行った¹²⁾。その結果、コミッサレス (*commisuresless; comm*) と呼ばれる変異体では全く交連が形成されないが、逆にロボ (*roundabout; robo*) と呼ばれる変異体では交連が過剰に形成される事が明らかになった¹²⁾。コミッサレス遺伝子は正中部のグリアに発現しており、交差性神経細胞の軸索に交差して良いと言うシグナルを送っていると考えられる^{12), 13)}。一方、ロボ変異体では、本来交差しない神経軸索が交差するのみならず、一旦交差した軸索が何度も交差を繰り返す異常が観察される¹²⁾。ロボ遺伝子は交連神経細胞に発現し、免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する膜蛋白をコードする事から、正中部に発現する軸索反発因子に対する受容体であろうと考えられていた¹⁴⁾が、最近、この反発因子がスリット (slit) と呼ばれる遺伝子の産物である事が明らかにされた^{15), 16)}。

2) スリットとロボの構造と機能

スリットは約 1,500 アミノ酸残基からなる大きな分泌蛋白であり、4つのロイシン・リッチ・リピートと数個の EGF リピート、ALPS (Agrin-Laminin-Perlecan-Slit spacer) 配列を持ち¹⁶⁾ (図2)、脊椎動物には3つの相同遺伝子が存在する。全長の蛋白が合成された後、分解を受けて活性を発揮する場合がある¹⁶⁾。ロボは、細胞外に5つの免疫グロブリン様領域と3つのフィブロネクチン・タイプ リピートが有り、1つの膜貫通部位と大きな細胞内領域を持つ¹⁴⁾ (図2)。脊椎動物には3つの相同遺伝子が存在する¹⁴⁾。

スリット蛋白は、*in vitro* で嗅球、海馬、脊髄運動神経の軸索を反発する活性を持つ事が示されている^{16), 17), 18)}。これは、ショウジョウバエの神経系でスリットがロボを

発現する軸索に対して反発活性を持つ事を示した遺伝学的データと良く一致する。また、軸索ガイダンス活性とは別に、スリットが細胞遊走において反発性に働く事^{19), 20)}や感覚神経細胞の軸索に枝分かれを誘導する活性を持つ事²¹⁾が示されている。脊髄では、スリットがフロアプレート細胞に、ロボが交連神経細胞等に発現している¹⁶⁾が、脊椎動物においてロボとスリットが軸索の正中交差の制御に必要なかどうかについては未だ明らかにされていない。最近、スリットにより活性化されたロボと DCC の細胞内の特定の領域が直接に結合する事により DCC の軸索誘引シグナルが打ち消される事が明らかにされ、正中部での軸索反応性の変換にスリットを介した情報が重要である事が示された³⁸⁾。

3. セマフォリン (semaphorin)

1) セマフォリンの構造と機能

セマフォリンは、大きな遺伝子ファミリーを形成する軸索ガイダンス分子群である。初めは、ショウジョウバエ胚の神経束に発現している分子 (fasciculin IV; 現在は Sema-1a と呼ばれる) として、あるいは培養したニワトリ後根神経節細胞の成長円錐を退縮 (collapse) させる因子 (collapsin と名付けられた) として同定された¹⁾。その後 20 種以上の遺伝子がクローン化され、構造上の特徴等から 7 つのクラスに分類されている⁵⁾ (図 3)。セマフォリンは、いずれも N 末に約 500 アミノ酸残基から成るセマ領域と呼ばれる配列を有する特徴を持つが、それ以外の部分には免疫グロブリン様領域やトロンボスポンジン・タイプ 領域を持つものがあり、更に分泌型、膜貫通型、GPI (glycosylphosphatidylinositol) 結合型など様々なタイプがある⁵⁾ (図 3)。ワクシニアウィルス等に相同な遺伝子が存在する事も知られている⁵⁾。

成長円錐退縮因子として発見されたセマフォリンの最も良く研究されている機能は、軸索の反発・軸索伸長の抑制である^{1), 5)}。この機能に基づいて、セマフォリンは神経軸索が侵入できない領域を作り神経軸索の通り道を規定する事により神経回路形成に参与していると考えられている。ショウジョウバエの変異体の研究や、神経培養を用いた *in vitro* の研究、更にセマフォリン 3A 遺伝子のノックアウトマウスの研究の結果²²⁾はこれを支持している。今までに機能的な解析が進んでいるのは、主にショウジョウバエの Sema-1a と脊椎動物のセマフォリン 3A だけであり、他のサブタイプの機能に関してはまだ殆ど分かっていない。

2) セマフォリン受容体の構造と機能

セマフォリン受容体としては、現在の所、ニューロピリン (neuropilin) とプレキシン (Plexin) が同定されている⁵⁾ (図 3)。この 2 つは、いずれも名古屋大学の藤澤らが発生期の神経軸索に発現し細胞接着活性を持つ膜蛋白として報告していた分子である。初めにニューロピリン-1 が、セマフォリン 3A に結合する蛋白質をコードする

遺伝子として発現クローニング法により単離された。脊椎動物には2つのニューロピリン(ニューロピリン-1とニューロピリン-2)が存在し、クラス3のセマフォリン分子の受容体としてホモダイマーあるいはヘテロダイマーで働く事が明らかにされている^{23), 24), 25), 26)}(図3)。ニューロピリンは、細胞外にa1/a2、b1/b2、cの3つの特徴的な領域が有り、1つの膜貫通部位と小さな細胞内領域を持つ。a1/a2は、CUB領域とも呼ばれ、補体C1r/C1sや骨形成因子BMP-1に見られる。b1/b2は、血液凝固因子・に見られ、c領域(MAM領域とも呼ばれる)は、メプリン(mepirin)や受容体型チロシンフォスファターゼに見られる。

ショウジョウバエにはセマフォリン遺伝子が存在するが、ニューロピリン遺伝子は存在しない。そこでニューロピリン以外のセマフォリン受容体があるのではないかと考えられていた所に、ウィルスのセマフォリン様蛋白に対する受容体としてVESPR(virus encoded semaphorin protein receptor)が同定され²⁷⁾、次いでそのショウジョウバエの相同遺伝子(D Plexin A)がSema-1a受容体として働く事が示された²⁸⁾(図3)。興味深い事にプレキシンの細胞外領域は、セマ領域を持ち、c-MET(癌原遺伝子の1つで、肝細胞増殖因子HGFの受容体として働く)に相同性がある²⁸⁾。細胞内にシグナル伝達分子に見られるモチーフは存在しないが、プレキシンのファミリーで保存された配列を持つ²⁸⁾。脊椎動物には少なくとも9つのプレキシンの遺伝子が存在し、ニューロピリンと共にセマフォリン受容体複合体を作り、セマフォリンの情報を伝達する事が示された^{29), 30)}。

ニューロピリン-1のノックアウトマウスの解析結果が報告されているが、その表現型はセマフォリン3Aノックアウトマウスの異常と非常に良く似ており、生体内でニューロピリン-1がセマフォリン3Aの受容体として働いている事を示している³¹⁾。ニューロピリンは血管新生に関わるVEGF(vascular endothelial growth factor)の受容体としても働いており、実際、ニューロピリン-1のノックアウトマウスでは、心血管系の形成異常も認められる³¹⁾。

4. Ephファミリー

1) Ephファミリーの構造

Ephファミリーは、受容体型チロシンキナーゼ・ファミリーの1つであり、多くのメンバーを持つ³²⁾。Ephは、初めErythropoietin-producing hepatocellular carcinomaの細胞株に発現する癌遺伝子として同定され、その後多くのサブタイプが存在する事が明らかにされた³²⁾。リガンド(エフリン(Ephrin)と総称される)にはGPI結合型と膜貫通型があり、前者として5つの遺伝子(エフリン-A1~A5)が、後者として3つの遺伝子(エフリン-B1~B3)が同定されている⁵⁾(図4)。受容体は膜を1回貫通する分子で、細胞外にリガンド結合領域と2つのフィブロネクチン・タイプリピートを

持ち、細胞内にはチロシンキナーゼ領域が存在する⁵⁾(図4)。受容体はリガンド特異性に基づいて分類されており、エフリン-A グループのリガンドに結合する EphA (EphA1~EphA8 の8種が同定されている)とエフリン-B グループのリガンドに結合する EphB (EphB1~EphB6 の6種が同定されている)の2種類がある⁵⁾(図4)。興味深い事に、これらのいわゆるリガンド・受容体間の情報伝達は双方向性であり、エフリンを発現する細胞が Eph 受容体からの情報をエフリンを介して受容する事も知られている³³⁾。リガンドはいずれの場合も膜に結合した状態で存在する事から、エフリン-Eph のシグナルは隣り合う細胞間で受け渡されると考えられる³³⁾。細胞内の情報伝達経路についても明らかにされつつある。

2) 網膜視蓋投射における Eph ファミリーの機能

Eph の神経回路形成における役割で一番良く解析されているのは、網膜視蓋投射におけるトポグラフィック地図形成への関与である³²⁾。網膜からの視覚情報は両生類や鳥類では中脳の視蓋と呼ばれる視覚中枢に送られる。この時、網膜神経節細胞の軸索は、網膜内での位置関係を保ったまま視蓋へ投射する。即ち、網膜前側(鼻側)の軸索は視蓋後部へ、網膜後側(耳側)の軸索は視蓋前部へ投射し、網膜背側の軸索は視蓋腹側へ、網膜腹側の軸索は視蓋背側へ投射する。この位置特異的地図(topographic map)が形成されるメカニズムに関しては、1960年代にスペリー(Sperry)が化学親和仮説(chemoaffinity hypothesis)を提唱していた。この仮説では、「シナプス前細胞(網膜細胞)とシナプス後細胞(視蓋細胞)が分子の勾配として表現される独立の標識を持ち、お互いに認識し合う標識を持つニューロンの中で結合が作られる」と考えられた。実際に *in vitro* の培養実験で視蓋後部の細胞膜分画成分が網膜耳側神経節細胞の軸索を反発する活性を持つ事が観察され、この軸索反発因子が化学親和仮説の標識に対応する分子ではないかと考えられた。その後この膜結合性の軸索反発因子が精製され、Eph リガンドの1つ(エフリン-A5)である事が明らかとなった³²⁾。一方、神経発生における Eph の役割を研究していたグループが独立に Eph シグナルのトポグラフィック地図形成における役割を見出した。即ち、ニワトリにおいてエフリン-A2 が視蓋の中で前方に低く後方に高い発現の勾配を持ち、このリガンドに対する受容体 EphA3 が網膜の中で前方で少なく後方で多い勾配を持って発現している事を見出した³⁴⁾。網膜耳側神経節細胞の軸索がエフリン-A2 によって反発される事から、軸索表面に Eph 受容体を多く発現する網膜後方の神経節細胞軸索ほど視蓋の前方で軸索伸長を停止することになり、前述の位置特異的地図が形成されると説明された^{34), 35)}。エフリン-A2 遺伝子ノックアウトマウスでは予想通り網膜から上丘への軸索投射に異常が生じる事が示された。

Eph ファミリーは、トポグラフィック地図形成以外にも神経回路形成に貢献している。例えば、EphB2/3 のノックアウトマウスでは、脳の前交連の形成異常³⁶⁾が、EphA4

のノックアウトマウスでは大脳皮質脊髄路の異常³⁷⁾が報告されている。Eph ファミリーは、その他にも細胞の遊走、細胞の増殖、細胞接着の制御など多彩な生物現象に参与する事が知られている。

おわりに

以上、発生期に軸索をガイドする分子とその受容体について概説した。最近10年余りの研究進展の結果、神経回路形成の分子機構についての理解が急速に進んだが、まだ多くの疑問点が残されている。例えば、セマフォリンや Eph ファミリーでは、沢山のメンバーがクローン化されているものの機能的な解析の進んでいないものが多く残されており、これらの解析が待たれる。また、軸索ガイダンス分子や受容体の機能に関しては、*in vitro* の実験結果から類推されただけのもも多く、実際の生体内での機能を確かめる必要がある。例えば、実際の胎児脳でどのリガンドがどの受容体を活性化するのか、どの受容体とどの受容体が複合体を作って情報を伝えるのか、あるいは受容体間の相互作用や拮抗作用がどうなっているのか等について明らかにする必要がある。更に、これらの軸索ガイダンス因子の信号が細胞内のどの様な情報伝達系を用いて軸索の伸長を制御しているかについても不明である。今後これらの点について研究が行われ、神経回路形成過程の全貌が明らかになっていくと考えられる。

文献

- 1) Tessier-Lavigne M, Goodman CS. *Science* **274**, 1123 (1996)
- 2) Serafini T et al. *Cell* **78**, 409 (1994)
- 3) Ishii N et al. *Neuron* **9**, 873 (1992)
- 4) Hedgecock EM et al. *Neuron* **2**, 61 (1990)
- 5) Chisholm A, Tessier-Lavigne M. *Curr. Op. Neurobiol.* **9**, 603 (1999)
- 6) Serafini T et al. *Cell* **87**, 1001 (1996)
- 7) Keino-Masu K et al. *Cell* **87**, 175 (1996)
- 8) Leonardo ED et al. *Nature* **386**, 833 (1997)
- 9) Fazeli A et al. *Nature* **386**, 796 (1997)
- 10) Ackerman SL et al. *Nature* **386**, 838 (1997)
- 11) Hong K et al. *Cell* **97**, 927 (1999)
- 12) Seeger M et al. *Neuron* **10**, 409 (1993)
- 13) Tear G et al. *Neuron* **16**, 501 (1996)
- 14) Kidd T et al. *Cell* **92**, 205 (1998)
- 15) Kidd T et al. *Cell* **96**, 785 (1999)
- 16) Brose K et al. *Cell* **96**, 795 (1999)
- 17) Li HS et al. *Cell* **96**, 807 (1999)
- 18) Nguyen Ba-Charvet KT et al. *Neuron* **22**, 463 (1999)
- 19) Wu W et al. *Nature* **400**, 331 (1999)
- 20) Hu H. *Neuron* **23**, 703 (1999)
- 21) Wang KH et al. *Cell* **96**, 771 (1999)
- 22) Taniguchi M et al. *Neuron* **19**, 519 (1997)
- 23) He Z et al. *Cell* **90**, 739 (1997)
- 24) Kolodkin AL et al. *Cell* **90**, 753 (1997)
- 25) Chen H et al. *Neuron* **19**, 547 (1997)
- 26) Takahashi T et al. *Nature Neurosci.* **1**, 487 (1998)
- 27) Comeau MR et al. *Immunity* **8**, 473 (1998)
- 28) Winberg ML et al. *Cell* **95**, 903 (1998)
- 29) Tamagnone L et al. *Cell* **99**, 71 (1999)
- 30) Takahashi T et al. *Cell* **99**, 59 (1999)
- 31) Kitsukawa T et al. *Neuron* **19**, 995 (1997)
- 32) Flanagan JG, Vanderhaeghen P. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 309 (1998)
- 33) Bruckner K, Klein R. *Curr. Op. Neurobiol.* **8**, 375 (1998)
- 34) Cheng H-J et al. *Cell* **82**, 371 (1995)

- 35) Nakamoto M et al. *Cell* **86**, 755 (1996)
- 36) Orioli D et al. *EMBO J.* **15**, 6035 (1996)
- 37) Dottori M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **95**, 13248 (1998)
- 38) Stein E and Tessier-Lavigne M. *Science* **291** 1928-1938 (2001)