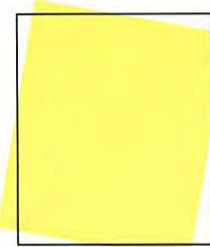
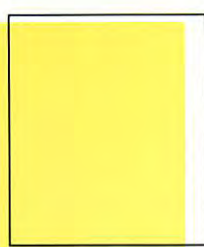
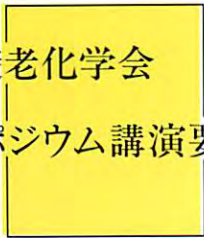


日本基礎老化学会
第20回 シンポジウム講演要旨集



22

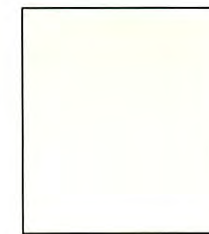
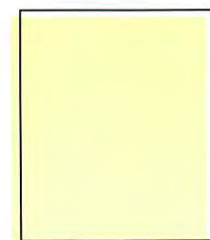
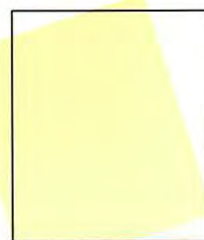
基礎老化研究

NO.2

BIOMEDICAL

1998

GERONTOLOGY



日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology

基礎老化研究

第22巻 第2号

「接着分子と神経機構」

日本基礎老化学会第20回シンポジウム講演要旨集
(平成10年11月28日 板橋ナーシングホーム講堂)

目次

- 1 発生・老化におけるコンタクチンサブグループの役割
渡辺和忠 83
- 2 未成熟オリゴデンドロサイトにおける細胞接着分子L1について
阿相皓晃、伊藤康一 87
- 3 OCAM：嗅覚神経系の軸索投射を司る新規NCAMファミリー細胞接着分子
吉原良浩 90
- 4 神経系におけるOLプロトカドヘリンの同定
平野伸二 92
- 5 神経系回路網形成に関わる細胞接着分子と裏打ち細胞骨格分子群
武内恒成 96
- 6 成長円錐の情報伝達と軸索伸長
五十嵐道弘 100

発生・老化におけるコンタクチンサブグループの役割

渡辺和忠

(財) 東京都老人総合研究所

K. Watanabe

Department of Cell Recognition

Tokyo Metropolitan Institute of

Gerontology

はじめに

脳の発生の初期段階では、神経細胞は遠く離れた標的細胞に向かって軸索を伸ばして行く。標的細胞に神経終末が触れ、先ず、互いの細胞を認識しシナプスを作るかどうかの決定が行われた後、未成熟のシナプスを作る。その後で最終的に機能するシナプスが出来上がる。これらの各々の過程において周囲の細胞を正確に認識するために、様々な神経接着分子が機能している。出来上がった神経回路網は、おおむね維持されるが、微小環境ではシナプスの再構築が起き、学習や記憶などの高次の機能を担っていると考えられている。一方、老化の過程においては神経細胞の形態変化や脱落が、また、痴呆脳ではさらに広範な神経細胞の変性・脱落が起き、脳の機能が衰退したり、更には維持できなくなるものと考えられている。

このように発生の過程、成体での脳の機能、或いは老化の過程など、それぞれの段階において神経接着分子が重大な役割を果たしているが、その変動は神経細胞の形態の変化を引き起こし、脳の機能に重大な影響を与えることが予測される。

神経接着分子と呼ばれるものの中には免疫

グロブリン様の構造を持つ分子群があり、免疫グロブリン (Ig) ・スーパーファミリーと呼ばれる。このため、このスーパーファミリーに属する分子は静的に細胞同士を接着させているのではなく、むしろ、細胞間で互いに情報を交換しているのではないかと考えられ、神経認識分子として分類されている。Ig・スーパーファミリーに属する分子は、また、学習・記憶に重要な役割を果たしていることが報告されている (Bailey et al., 1992; Cremer et al., 1994; Ronn et al., 1995)。そこで、Ig・スーパーファミリー分子のなかで、出生後に発現を始める分子が、老化の過程においても重要な意味をもっていると考え、私達はコンタクチン (F3またはF11とも呼ばれる) (Ranscht et al., 1988; Gennarini et al., 1989; Brummendorf et al., 1989) に着目して研究を行っている。コンタクチンには進化的に同一の分子から別れたと思われる分子群、TAG-1、BIG-1 (Yoshihara et al., 1994)、BIG-2 (Yoshihara et al., 1995) が報告されており、それぞれが細胞生物学的に類似の性質を持っている。しかしながら、発現の時期や場所は分子間で異なり、異なる神経細胞上で機能していると考えられる。これらの分子のうちで、TAG-1についてはその機能の一つとして、脊髄の発生の過程で交連線維がフロアプレートを横切るために必要であることが、また、コンタクチンは神経細胞とグリア細胞の相互作用に重要な機能を果たしていることが報告されている。

ここでは、老化過程におけるコンタクチンの発現変化についての知見を述べ、その役割について考察するとともに、私達が新規に単離したこのサブグループに属する分子NB-2、NB-3についても紹介する。

老化脳でのコンタクチンの発現減少

コンタクチン・サブグループのなかでも脳内で特に広範に発現しているコンタクチンについて、通常の老化過程における発現変化を検討した (shimazaki et al, 1998)。老齢ラット脳を用いてコンタクチンのin situハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学法を行った結果、in situハイブリダイゼーション法では成体脳に比較して老化脳では著しくmRNAの発現が減少していた。老化脳の海馬においては歯状回とCA3領域でmRNAの発現が認められたが、CA1領域では神経細胞が生存しているにも拘わらず、殆ど発現は認められなかった。また、ウエスタン・ブロット法および免疫組織化学法では30カ月齢のラット脳で皮質よりも海馬においてコンタクチンの顕著な減少が認められた (図1)。これらの結果から老化に伴う海馬の機能衰退にコンタクチンが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

虚血脳の実験におけるコンタクチンの発現変化

次に、神経細胞の変性・脱落に先立つ性質の変化、或いは機能の衰退との関連を明らかにする目的で、スナネズミを用いた脳虚血の

実験を行った。スナネズミで5分間の脳虚血を行なった場合、海馬のCA1領域の神経細胞は2日後までは神経細胞の形態に大きな変化は認められないが、3日目以降ではCA1領域の神経細胞の脱落が起きる。このような神経細胞の脱落以前にコンタクチンの発現が変化しているのではないかと考えて、2日後のコンタクチンのmRNAの発現変化をin situハイブリダイゼーション法により調べた (Cho et al., 1998)。その結果、虚血脳では海馬のCA1でコンタクチンのmRNA量が著しく減少していることが明らかになった。そこで、さらに詳細に検討するために虚血後、8時間、1日、6日後のコンタクチンの発現を調べたところ、8時間後に既に発現量が減少していた。このことから、コンタクチンのmRNAの発現は、神経が脱落するかなり以前から既にCA1領域で著しく減少しており、コンタクチンの減少は神経細胞死に先立つ機能の衰退に密接に関連しているのではないかと考えられた。

コンタクチンサブグループに属する新規神経接着分子NB-2とNB-3の発現

RT-PCR法およびcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、コンタクチンサブグル

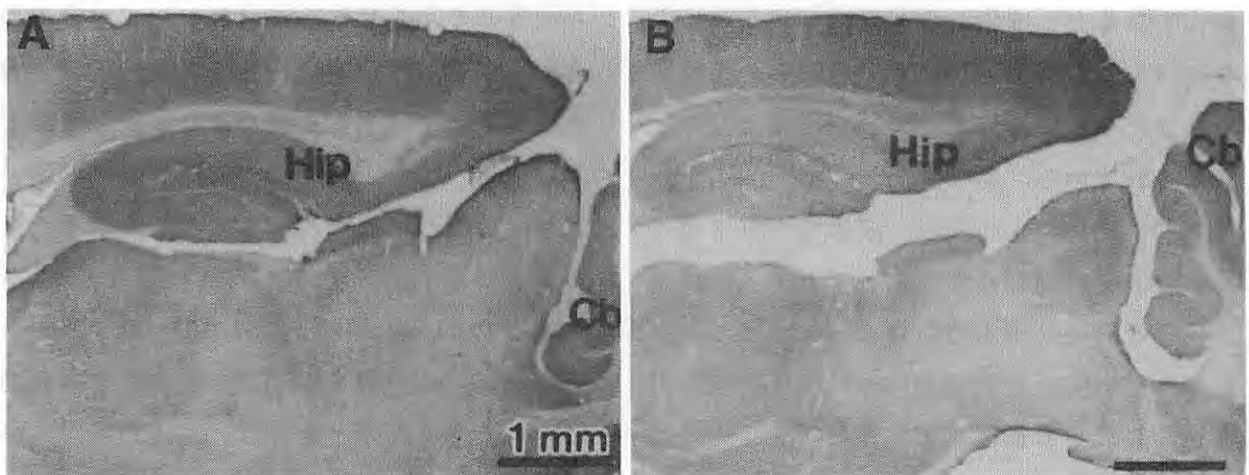


図1 若齢 (A: 3カ月) および老齢ラット脳 (B: 30カ月) におけるコンタクチンの免疫組織化学的比較

ープに属する新規の神経接着分子を単離し、これらをそれぞれNB-2、NB-3と名付けた (Ogawa et al., 1996)。

NB-2とNB-3は互いにアミノ酸レベルで約51%の類似性を持っていた。NB-2、NB-3は他のコンタクチン・サブグループとの類似度は約40%から60%くらいであった。NB-2は大脳と小脳で、NB-3は大脳、小脳、脊髄でのみ発現が認められた。また、発生過程における大脳でのmRNAの発現はNB-2、NB-3ともに胎児期では低く、生後6日目付近が最も高い発現を示した。その後、mRNAレベルでは発現が急激に減少した。蛋白質レベルでは、出生後6日から21日の間が最も多かった。

in situ ハイブリダイゼーション法では、NB-3は小脳、下丘、視床、大脳皮質で発現が強く、NB-2は上オリブ核、下丘、視床、大脳皮質で非常に強い発現が認められ、小脳でも一部で強い発現が見られた。

以上のように老化および脳虚血などの神経機能の衰退している時期にコンタクチンの発現は部位特異的に減少していた。コンタクチンには、テネイシン-Cや-R、ニューロカン、フォスファカンなどの細胞外マトリックスや、受容体型のフォスファターゼRPTP β など様々なリガンドが知られている (Peles et al., 1995)。SchlessingerのグループはコンタクチンがCasprという膜貫通型の分子を介して細胞内に情報を伝達していることを示した (Peles et al., 1997)。このことから、コンタクチンが多種多様なリガンド応じて細胞内へのいくつかの情報伝達システムを備え、様々な機能を持つ分子である可能性が大きい。

Ig・スーパーファミリー分子であるNCAMの欠損マウスは空間把握などの学習機能に欠

陥があること、また組織レベルでもNCAMの抗体を用いてLTPが抑制されることなどが報告されている。つい最近、コンタクチンのノックアウトマウスが作られ、顕著な運動障害を示し、出生後17日あたりで死亡することが報告された (Berglund et al., 1997)。このマウスの脳は一見正常に見え、形態学的な大きな異常は認められない。コンタクチンはサブグループのなかでも発現量が最も多く、出生後17日頃は正常マウスではコンタクチンの発現量が最大になる時期である。コンタクチンを最も必要とするこの時期に、コンタクチンが発現しないためにノックアウトマウスは死亡するものと考えられる。このように、神経回路の非常に微妙な変化が脳の機能、更には生命にまで重大な影響を与えることから、このような分子が老化で減少することは脳機能に重大な支障がでることを強く示唆している。

一方、私たちが新たに単離したNB-2、NB-3の発現はコンタクチンに比べて脳内での局在は限定されている。このため、NB-2やNB-3はコンタクチンよりもさらに限定された部域で機能を果たしている可能性がある。

参考文献

- Bailey, C. et al., (1992). *Science* 256, 645-649.
- Berglund, E. O. et al., (1997). 27th meeting of Soc. Neurosci., Abstr. 761.3 (1997)
- Brummendorf, T. et al., (1989). *Neuron* 2, 1351-1361.
- Cho, H., (1998) *Exp. Brain Res.* in press.
- Cremer, H., et al., (1994). *Nature* 367, 455-459.
- Gennarini, G., et al., (1989). *J. Cell Biol.* 109, 775-788.
- Ogawa, J., et al., (1996) *Neurosci. Lett.*, 218, 173-176.

- Peles, E., et al., (1995). *Cell* 82, 251-260.
- Peles, E., et al., (1997). *EMBO J.* 16, 978-988.
- Ranscht, B. (1988). *J. Cell Biol.* 107, 1561-1573.
- Ronn, L. C. B., et al., (1995). *Brain Res.* 677, 145-151.
- Shimazaki, K., (1998) *Neurosci. Lett.* 245, 117-120
- Yoshihara, Y., et al., (1994). *Neuron* 13, 415-426.
- Yoshihara, Y., et al., (1995). *J Neurobiol.* 28, 51-69.

未成熟型オリゴデンドロサイトにおける神経接着分子L1について

阿相皓晃¹、伊藤康一²

- 1) 東京都老人総合研究所・神経生物
- 2) 東京都臨床医学総合研究所・炎症

はじめに

中枢神経系の発達は内外環境のさまざまなシグナルによって調節を受けて行なわれ、例えばニューロン特有の神経電気活動によるインパルスの伝達機構によって正確な神経回路網が形成されたり、神経の可塑性が起こる。このような神経インパルス伝達機構には軸索とそれを支持するミエリン膜が大変重要な役割を担っている。中枢神経系におけるミエリン形成担当細胞はオリゴデンドロサイトであることからオリゴデンドロサイトの発生・分化とミエリン膜形成期が神経活動に及ぼす影響を調べることは単に神経回路網の形成を理解するだけでなく、広く脱髄を伴った神経疾患に至ることが期待できる。一方、神経電気活動に調節される分子はこれまでによくわかっていなかったが、最近、神経接着分子の発現及び機能が神経活動により調節されることが報告され(1)、ミエリン形成初期過程におけるオリゴデンドロサイトと軸索の認識機構に関与していることが示唆された。そこで今回私達は神経インパルス伝達に関与するオリゴデンドロサイトの機能分化と神経系における多機能接着分子L1との関係について調べた。

方法

- 1、胎生ラット大脳より桜井らの方法(2)に従って発達段階特異的未成熟オリゴデンドロサイトの大量培養法を確立する。
- 2、オリゴデンドロサイト細胞系譜上で発現する神経接着分子をmRNAとタンパクのレベルで検討する。特に接着分子のスプライシングフォームの変化に重点を置く。

- 3、神経インパルス伝達機構に関与する軸索とミエリン形成担当細胞の相互作用を明らかにするために電気刺激可能な培養系をセットして特にミエリン形成初期過程に発現する分子群の同定を遺伝子工学的手法を駆使して遂行する。

結果と考察

神経接着分子L1の発現は細胞の種類・発達の時期により正確に制御されていることが知られている。L1は神経細胞やシュワン細胞に特異的に発現しているが、L1には2種類の選択的スプライシングが存在し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトにもL1が存在することが判明した(3)。

ミエリン膜形成は未成熟オリゴデンドロサイトと未成熟神経細胞の軸索が出会うことから始まり絶縁体ができ神経活動を活発にするが、これまでミエリン膜形成の初期過程における分子機構解明のための手掛かりを得るような情報は少なかったことから、本研究ではオリゴデンドロサイトにおけるL1の機能を検討した。

オリゴデンドロサイトのプロジェニター細胞は胎生早期(E9,10)に脳室周囲の神経上皮細胞層に認められ妊娠経過に伴って脳内に広く分布し、生後の新生仔期から成熟期に至るまで白室と灰白室を含む脳の広い範囲に認められた。このプロジェニター細胞はさまざまな因子の影響下でin vitroで未成熟オリゴデンドロサイトへと分化誘導することが可能であり、このO4⁺未成熟型オリゴデンドロサイトをさらにミエリン塩基性タンパク(MBP)の細胞内発現分布の違いによって初期O4⁺未熟オリゴデンドロサイトと後期O4⁺未熟オリゴデンドロサイトに分類した後にそれぞれRT-PCR法及びウェスタンブロット法によってL1の発現パターンの違いを調べた。初期O4⁺未熟型ではL1のスプライシング型が発現しており、後期O4⁺未熟型では全長型のL1が発現していた。さらに興味深いことに、後期O4⁺未熟型ではmRNAとタンパクレベルでL1が増加していた。これらの結果は、後期O4⁺未熟型オリゴデンドロサイトに発現する全長型のL1と軸索に発現している全長型のL1が互いにホモフィリックな結合を介してミエリン膜形成開始のシグナル伝達に関与している可能性を強く示唆した。

オリゴデンドロサイトは胎生期のかなり早い時期から発生し、成熟期においてもミエリンを形成していない未熟なO4⁺オリゴデンドロサイトが多数存在しているというin vivoの所見と合わせて考えるとミエリン膜形成の初期過程におけるL1を介した相互作用が巻くためのシグナルを次にどの系に伝えることが重要なのかなどについて現在検討している。

参考文献

- 1) Itoh et al. (1995) Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific pattern of neural impulses. *Science*, 270 : 1369-1372
- 2) Sakurai et al. (1998) Differentiation of oligodendrocyte occurs in contact with astrocyte. *J.Neurosci.Res.*, 52 : 17-26
- 3) Takeda et al. (1996) A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: Tissue-specific expression and functional analysis. *J.Neurochem.*, 66 : 2338-2349

OCAM：嗅覚神経系の軸索投射を司る新規 NCAM ファミリー細胞接着分子

吉原良浩（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）

1. はじめに

多様な高次機能を有する「脳」は複雑であるが秩序だった神経回路網により構成されている。すなわち個々神経細胞がその標的細胞を正確に認識し、シナプス結合を形成しなければ、神経系は無秩序なものとなり正常に機能できなくなってしまう。そこで神経系の様々な発達過程において、神経細胞間の認識・接着さらには情報伝達を司る膜表面分子がとりわけ重要な役割を果たすと考えられる。神経系に発現する細胞接着分子群は構造を基にして、免疫グロブリン・スーパーファミリー、カドヘリン・スーパーファミリー、インテグリン・ファミリーなどに分類されるが、これらのうち構造・発現および機能が最も多様な分子群は免疫グロブリン・スーパーファミリーである。我々はこれまでに免疫グロブリン・スーパーファミリー分子群の発現・機能解析を、特に嗅覚神経系をモデルシステムとして行ってきた。

1991年の Buck と Axel による匂い分子受容体遺伝子群の発見¹⁾が契機となり、嗅覚神経系の基礎研究が近年急速に展開している。匂い分子の情報は嗅上皮に存在する嗅細胞で受容され、その軸索を介して嗅球の2次ニューロンへと伝えられる。マウスやヒトなどの哺乳動物には約 1,000 種類の匂い分子受容体遺伝子が存在し、1つの嗅細胞はそれらの中からおそらくたった1種類を選択して発現すること（one neuron - one receptor rule）が示唆されている。また、匂い分子受容体の発現分布解析から嗅上皮は4つの半同心円状ゾーンに分けられ、同じ匂い分子受容体を発現する嗅細胞は特定の1つのゾーンのみを発現し、それぞれのゾーンの嗅細胞は嗅球の対応するゾーンへと軸索を投射すること（zone-to-zone projection）が報告されている。さらに、同じ種類の匂い分子受容体を発現する嗅細胞群はそれらの軸索を嗅球の約2,000個の糸球のうち、特定の2個の糸球に集束させるという現象（glomerular convergence）が見いだされた。これらの軸索投射様式は脳が匂い分子を類別・識別するために重要な基本原理であり、嗅覚神経系は機能的神経回路形成・維持・可塑性の研究のための絶好のモデルシステムになると考えられる^{2,3)}。我々はこのような嗅覚神経系の選択的軸索投射に関与する新規細胞接着分子 OCAM を見だし、その発現・構造・機能の解析について今回報告する。

2. OCAM の発見と嗅覚神経系における発現

1985年、森らはウサギ嗅球のホモジネートを免疫原としてモノクローナル抗体（MAb）のライブラリーを作製し、その中のひとつ MAb R4B12 が嗅細胞軸索のサブセットに発現する膜蛋白質を認識することを見いだした⁴⁾。後述する構造解析の結果から、R4B12 抗原分子は嗅覚系（olfactory system）に由来する細胞接着分子（cell adhesion molecule）であることがわかり、我々はこの R4B12 抗原分子を OCAM と名付けた。OCAM mRNA および蛋白質の発現を、それぞれ in situ hybridization 法、免疫組織化学法により詳細に解析したところ、OCAM の発現が匂い分子受容体の発現によって規定される嗅上皮のゾーン構造に厳密に対応していることが見いだされた。すなわち OCAM 陽性の軸索は嗅上皮外腹側部の3つのゾーンから、OCAM 陰性の軸索は嗅上皮内背側部の1つのゾーンから、嗅球の対応するゾーンへとそれぞれ投射することがわかった⁵⁾。すなわち OCAM は嗅細胞軸索投射の基本原理のひとつである zone-to-zone projection に密接に関連する分子であることが予想された。現在 OCAM 遺伝子欠損マウスおよび OCAM 異所性発現マウスを作製しており、これらの解析によって OCAM の嗅細胞軸索投射における機能が明らかになると期待される。

3. 新規免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子 OCAM

我々はウサギ脳から OCAM 蛋白質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定し、これを基にして cDNA クローニングを行い、その全一次構造を決定した。その結果 OCAM は免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する新規細胞接着分子であることがわかった⁵⁾。OCAM はその細胞外領域に5つの免疫グロブリン様ドメインと2つのフィブロネクチン III 型ドメインを有する。また、細胞膜への結合様式の異なる2種類のアイソフォーム（細胞膜貫通型および GPI アンカー型）が存在し、これらはおそらく alternative splicing によって生じるものであると推定される。データベース検索の結果、OCAM は既知の免疫グロブリン・スーパーファミリー分子群の中では特に NCAM と同じドメイン構造を有しており、アミノ酸レベルでも高い相同性（全体で約45%の同一性）を示すことがわかった。またショウジョウバエの Fasciclin II およびアメフラシの apCAM など無脊椎動物において選択的軸索投射あるいはシナプスの可塑的变化に重要な役割を果たす分子とも、同じドメイン構造と高い相同性を有することが明らかとなった。

精製組み換え蛋白質を用いた結合実験により、OCAM はホモフィリックな結合をする細胞接着分子であることがわかった。このことから嗅細胞軸索投射におけるゾーン特異的な選択的ソーティングにおける OCAM の機能が示唆された。

以上のことから OCAM は嗅覚神経系においてゾーン特異的な軸索束形成機構 (fasciculation) あるいは標的認識機構 (target recognition) に機能する分子であると予想される。また OCAM はフェロモンの受容に関わる副嗅覚系 (鋤鼻嗅覚系) においても、選択的軸索投射に関わる分子である可能性が報告されている⁶⁾。

文献

- 1) Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
- 2) Mori, K. & Yoshihara, Y. (1995) Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Prog. Neurobiol.* 45: 585-620.
- 3) Yoshihara, Y. & Mori, K. (1997) Basic principles and molecular mechanisms of olfactory axon pathfinding. *Cell Tissue Res.* 290: 457-463.
- 4) Mori, K., Fujita, S. C., Imamura, K., & Obata, K. (1985) Immunohistochemical study of subclasses of olfactory nerve fibers and their projections to the olfactory bulb in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 242: 214-229.
- 5) Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., & Mori, K. (1997) OCAM: a new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J. Neurosci.* 17: 5830-5842.
- 6) von Campenhausen, H., Yoshihara, Y., & Mori, K. (1998) OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *NeuroReport* 8: 2607-2612.

神経系における

OLプロトカドヘリンの同定

平野伸二

愛知県コロニー発達障害研究所



はじめに

脊椎動物の神経系は、非常に多くのしかも多様な神経細胞やグリア細胞からなる複雑な組織である。その高度に発達した神経回路の形成機構を明らかにすることは容易ではないが、近年それに関わる分子の同定が急速に進んでいる。カルシウム依存性細胞接着分子カドヘリンもその一つであるが、神経組織の分離からはじまり神経突起の伸長促進や束形成、あるいは神経核や区画の形成、さらには神経回路形成に至るまで神経系形成に深く関わっていることが明らかになりつつある¹⁻³⁾。一方、従来のカドヘリン以外にも、新たなるカドヘリン様分子が次々見つかると、カドヘリンは分子スーパ

ファミリーを形成していることが明らかになった^{4, 5)}。現在では従来型のものを古典的カドヘリンと呼び区別している。プロトカドヘリンは、カドヘリンモチーフを5回あるいは6回もつ分子群で、細胞内領域は古典的カドヘリンと全く異なり、神経系で特異的に発現しているものが多い。プロトカドヘリンは、細胞内領域のアミノ酸配列からさらにプロトカドヘリン1、2、3といったサブファミリーに分類することができ、それぞれには少なくとも数種の分子が存在することがわかっている⁶⁻¹²⁾。従って、中枢神経系では、100を越えるプロトカドヘリンが存在すると予想されている。神経系の多様性を考えると、プロトカドヘリンが複雑な細胞間相互作用に寄与しているのではないかと想像することができる。今回は、我々が新たに同定したOLプロトカドヘリンについて紹介をし、神経系での役割を検討したい。

OLプロトカドヘリンのクローニング

はじめに、マウスにおけるプロトカドヘリンのクローニングを行った。ヒトプロトカドヘリン2の細胞外領域のcDNAをプ

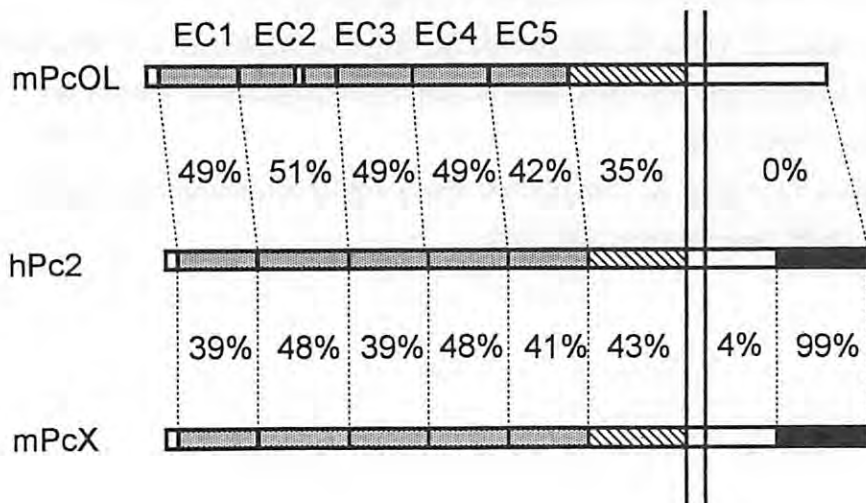


図1 OLプロトカドヘリン (mPcOL) の分子構造

プロトカドヘリン2ファミリーの分子であるhPc2やmPcXとは細胞外領域は似ているが、細胞内領域は全く異なる。

ローブにして、マウス胎児脳の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、プロトカドヘリン2以外に相同性のあるクローンが単離できた。この全長をクローニングしたところ、細胞外領域は5回のカドヘリンリピートをもちヒトプロトカドヘリンとは44%の相同性をもつが、細胞内領域は全くことなることが明らかになった。この新規なプロトカドヘリンを嗅覚系と大脳辺縁系で顕著な発現が見られることからOLプロトカドヘリンと命名した。さらに成体脳では、細胞内領域のC末端部分が異なる別のフォームが存在することが明らかになった(平野未発表)。染色体上でのマッピングを行ったところ、18番染色体のc領域にマップされた(平野、小野ら未発表)。これまで知られているプロトカドヘリンは、3番染色体上にクラスターを形成していることから^{7, 8)}、このOLプロトカドヘリンはこれまでのプロトカドヘリンと進化の過程で早い時期に分離したのかもしれない。

OLプロトカドヘリンの基本的な性質

次に、OLプロトカドヘリンの基本的な

性質を調べた。そのために胎児型OLプロトカドヘリンをほとんど細胞接着活性を持たないL細胞に強制発現させた。その結果、L細胞は弱い接着活性を獲得した。この接着力は古典的カドヘリンに比べると非常に弱いものであった。このとき、OLプロトカドヘリンは、細胞接着面に局在するしており、OLプロトカドヘリンが細胞接着分子として機能していることがわかった。分子量は約110kDaであった。接着特異性を明らかにするために、ほかのプロトカドヘリンや古典的カドヘリンを発現する細胞とOLプロトカドヘリンを発現する細胞を混合培養したところ、その異種細胞間接着面にはOLプロトカドヘリンが局在せず、OLプロトカドヘリンが他のプロトカドヘリンとは相互作用しないことが明らかになった。

OLプロトカドヘリンの発現

OLプロトカドヘリンの生体内での機能を明らかにするために、発現を調べた。ノザンプロットティングを行ったところ、胎生期から発現がみられ、その発現は基本的には神経系でのみ見られた。in situ ハイブ

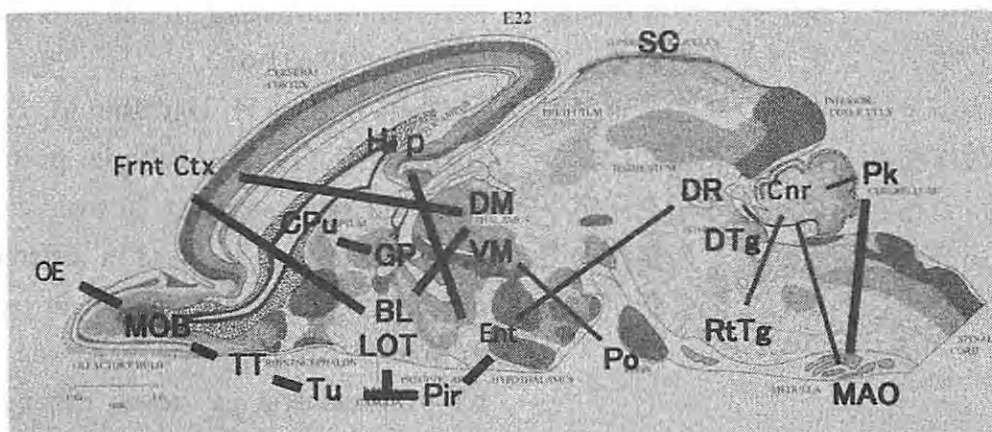


図2 OLプロトカドヘリンの発現部位と神経回路

リダイゼーションにより、発現を詳細にしらべたところ、一般的には胎児期では特定の部位以外にも比較的広範に発現が見られ、生体では特定の部位で発現が見られた。それらの発現の中で、臭上皮、臭球、臭結節、梨状葉などの臭覚系や海馬、視床の一部の核、扁桃核、大脳皮質の前側などの大脳辺縁系など機能的に関連した部位との相関が示唆された。また、小脳皮質においては発生過程で縦状の縞として発現がみられ、このとき下オリーブ核の一部も発現していた。従って、OLプロトカドヘリンの一つの機能としては、このような臭覚系-辺縁系あるいはオリーブ-皮質投射など神経回路形成に関与しているのではないかと想像された。OLプロトカドヘリンのタンパクの分布を調べてみると、臭球ではグロメルラスの部分に多く存在し、OLプロトカドヘリンがシナプスでの接着に関与している可能性が示唆された。

まとめ

OLプロトカドヘリンはプロトカドヘリンの中でも新しいタイプのプロトカドヘリンであり、その発現は臭覚系や大脳辺縁系など機能的に関連した部位でみる。従って、OLプロトカドヘリンが生体内で神経回路形成に寄与していることが考えられる。今後、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作製をし、さらにはOLプロトカドヘリンと相互作用する分子を同定しその情報伝達経路を明らかにし、生体内での機能と役割を明らかにして行く予定である。

- 1) Redies C, Takeichi M (1996) Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev Biol* 180:413-423.
- 2) Redies C (1997) Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tiss Res* 290:405-413.
- 3) Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.
- 4) Suzuki ST (1996) Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci* 109:2609-2611.
- 5) Suzuki ST (1996) Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J Cell Biochem* 61:531-542.
- 6) Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M., St. John T, Taketani S, Suzuki S (1993) Protocadherins: A large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J* 12:2249-2256.
- 7) Sago H, Kitagawa M, Obata S, Mori N, Taketani S, Rochelle JM, Seldin M, Davidson M, St. John T, Suzuki ST (1995) Cloning expression, and chromosomal localization of a novel cadherin-related protein, protocadherin-3. *Genomics* 29:631-640.
- 8) Obata S, Sago H, Davidson M, St. John T, Suzuki ST (1998) Multiple protocadherins share the same sequence in their cytoplasmic domains and are expressed in different regions of brains. *Cell Adhes Commun*, in press.
- 9) Bradley RS, Espeseth A, Kintner C (1998) NF-protocadherin, a novel member of the cadherin superfamily, is required for *Xenopus*

ectodermal differentiation. *Curr Biol* 8:325-334.
10) Yoshida K, Yoshomo-Nakagawa K, Seki N, Sasaki M, Sugano S (1998) Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of BH-protocadherin, a novel member of the cadherin superfamily. *Genomics* 49:458-461.

11) Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, Yagi T (1998) Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20:1137-1151.



神経系回路網形成に関わる細胞接着分子と裏打ち細胞骨格分子群

武内 恒成

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

1 はじめに

高次神経機構である記憶・学習などをつかさどる中枢神経系、とくに大脳の神経ネットワーク形成には、様々な神経細胞の移動・軸索の投射が必須である。非常に複雑かつ整然とした神経ネットワーク形成過程、さらにその後のシナプス形成とその維持には、数多くの細胞接着分子群が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。この細胞接着分子は、また、それ単独では機能せず、数多くの細胞膜裏打ち分子や細胞骨格によって細胞内から制御され、そしてそれらを介して細胞内へと情報伝達を行っている。さらに、神経細胞体や軸索、成長円錐の携帯維持や神経細胞の移動には細胞骨格分子や細胞膜裏打ち分子が大きく関与している。

我々は、神経系接着分子のなかでも、神経発生過程において非常に初期から発現し、様々な軸索投射のマーカーとしても用いられている TAG-1 に注目して研究を進めてきた。接着分子を細胞膜裏打ちから制御し、細胞骨格系と関わる分子として ERM ファミリー分子群と我々が新規に神経特異的アクチン結合分子として単離した ClipinC についての解析についても紹介したい。

2 神経接着分子 Tag-1

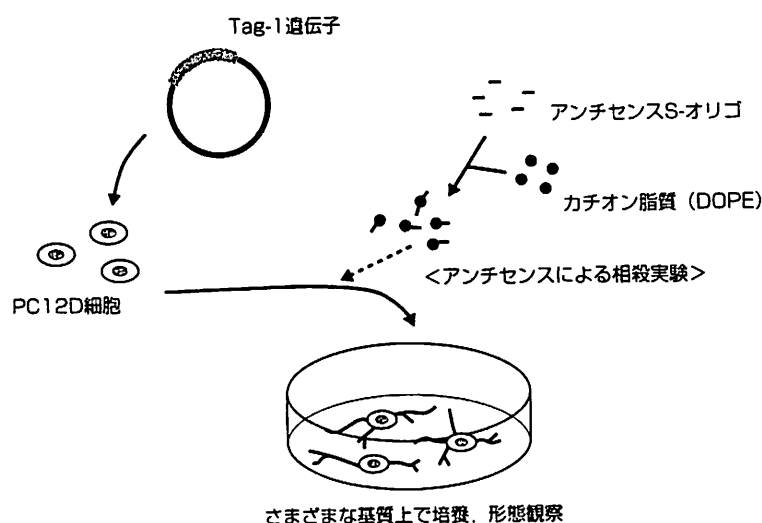
Tag-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、神経線維の伸長活性を持つ分子としてマウスから単離された¹⁾。Contactin (シンポジウム 1: 渡辺らの稿、参照) と相同性が高いが、Contactin が生後から成体期に発現が見られるのに対し、Tag-1 は発生初期の神経系発生の特定の時期 (主として神経線維の伸長がさかんな時期) に一過性に発現する。ともに、細胞膜貫通分子ではなく、膜に GPI (glycosylphosphatidylinositol) でアンカーした神経特異的細胞接着分子である。この Tag-1 は接着分子としての、Tag-1 どうしが相互作用 (homophilic interaction) するだけでなく、他の接着分子 (NCAM) や細胞外基質としても機能する Proteoglycan の一種である Phosphacan や neurocan、さらには Tenascin-C などとも蛋白質レベルでの結合能があることが示されている²⁾。しかし、Tag-1 がこのような数多くのリガンドと実際に生体内で機能相関を持っているか、生体内で相互作用するならばどのような機能に関与するかは明らかではなかった。そこで我々は、これらを明らかにするために、細胞生物学的に Tag-1 とこれらリガンドの相互作用を調べるとともに、組織化学的な解析を行うこととした。

まず、今まで多く用いられている抗 Tag-1 抗体を検証したところ、詳細にはウエスタンブロットや免疫組織化学において若干の他の分子との交差反応がみられたこと、またアフィニティーが低いな

どの問題点が認められた。そこで、Tag-1の様々な領域に対するより特異的な抗体と機能阻害可能な抗体を、モノクローナル・ポリクローナルともに数多く作製した。さらに、種々の神経系細胞株のうち、細胞生物学的にTag-1のリガンドシステムと生理機能を解析できるような発現量の高い細胞株を検索した。結果、PC12細胞の亜株PC12D細胞が発現量が高かったが、それでも以下の解析には十分でなく満足ゆく結果が得られなかった。そこでこの細胞に β アクチンプロモーターやSR α プロモーター下につないだTag-1遺伝子を導入、発現させることでさらにTag-1を高発現する細胞株を作成した。これによってTag-1分子の機能をより顕在化させて見ることができると考えた。この細胞を、Tag-1と相互作用することが知られている種々の精製リガンド分子をコーティングした基質上で培養し、細胞の接着活性を測るとともに形態変化等を観察した。この際に、遺

伝子の導入によるアーティファクトがないこと、本当にTag-1による生理機能を見ていることを確認するために、アンチセンスオリゴによってTag-1の発現を抑制、さらには抗体投与による機能阻害によって、現れた生理機能が相殺されるかどうかを検討した。(アンチセンスに関してはアンチセンス標的配列の検索、条件設定などあらかじめ十分検討を加えた³⁾)。(図1)

結果は、最も顕著であった細胞突起伸長活性についてのみにここでは留める。低濃度のNGF投与3日目で解析したところ、基質とする分子のうち、Phosphacan、Tag-1、NCAMの順に突起伸長促進活性を持っていた。しかし、neurocanを基質とした場合には、逆に突起伸長が抑えられていた。この現象の傾向は基質の濃度を替えても同様の結果が得られた。また、相互作用が示唆されていた分子のうちtenascin-Cでは大きな変化が得られなかったとともに、相互



作用しない tenascin-R や collagen I でも変化は生じなかった。これらの現象は、アンチセンス投与による Tag-1 の発現抑制によってコントロールと同等レベルの伸長活性にまで相殺された (図 2)

(Phosphacan、Tag-1、NCAM ではコントロールと同じ程度の伸長にまで落ち、Neurocan ではやはりコントロールと同程度の伸長が再現される)。これらから、Tag-1 は種々のリガンドのうち Phosphacan、Tag-1、NCAM に対しては突起伸長、Neurocan に対しては逆に伸長阻害活性があることがわかった。リガンドによってこの生理機能の違いがどのどのような細胞内シグナル伝達によるのかなどは今後の課題である。

この *in vitro* による現象が、本当に生体内でもあり得るかどうかが Tag-1 とリガンド分子の局在を再度検証した。その結果、大脳皮質の神経路形成過程 (E12)

において、Tag-1 は Phosphacan 陽性の領域の一部に認められ (intermediate zone)、その直前に発現される neurocan 陽性の領域 (subplate) を避けるようにはっきりとした境界をもって intermediate zone のみを走行することが明らかとなった。これは *in vitro* での結果をそのまま反映した領域であり、実際に生体内においても Tag-1 と様々なリガンドが相互作用しながら大脳神経回路網の構築に参与しているものと考えられる。

3 細胞接着構造・細胞膜裏打ち分子 ERM ファミリーと神経特異的アクチン結合分子 ClipinC

ERM ファミリー⁴⁾ は ezrin, radixin, moesin からなり、元は上皮系細胞の細胞間接着装置からアクチン結合能を持つ分子として、月田らにより単離された。

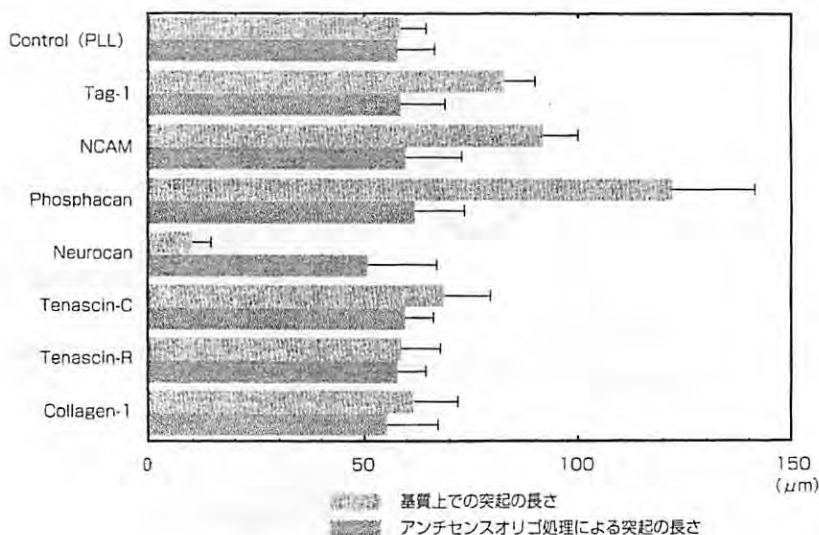


図 2. さまざまなリガンドによる突起伸長活性とそのアンチセンスによる相殺実験
一定濃度の種々のリガンド分子をディッシュ上にコート (グラフ左側がその基質の種類) し、Tag-1 を強制発現している PC12D 細胞の低濃度 NGF 処理による 3 日後の神経突起伸長を計測した。Tag-1、NCAM、Phosphacan では伸長を促進するが、Neurocan では抑制されている。これらはすべてアンチセンス投与による Tag-1 の発現抑制によって、コントロールや Tag-1 と相互作用しないリガンドと同等まで相殺され、Tag-1 による機能であることがわかる

さらに Merin と呼ばれる分子が、神経繊維腫症 2 型の原因遺伝子として単離された。この分子も ERM ファミリーに属し、シュワン細胞に発現し特にランビエ索鞘に局在する。 ezrin, radixin, moesin は広くほとんどすべての組織に発現し、神経系においては成長円錐先端や細胞体の膜直下に局在することは知られているが、神経系での細胞間接着構造でもあるシナプスや脳内・神経組織内での分布の詳細は明らかになっていない。我々は、まず神経細胞におけるこれら分子の機能を調べる目的で、アンチセンスオリゴによる発現抑制をおこなった。 広く神経細胞においては、これらの分子の単独での発現抑制による形態変化はないが、2 種の分子の組み合わせでの発現抑制では軸索伸長が阻害されるとともに、成長円錐の形成がおさえられた。 神経系ではアクチン系細胞骨格を制御してこれらの機能に関与することが示唆された。

ClipinC は我々が最近同定した新規の神経特異的アクチン結合蛋白質である。この ClipinC は、細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) のアクチン結合蛋白質 Colonin の mammal ホモログであった⁵⁾。細胞性粘菌では、その移動や食作用に関与するとされることから、我々は神経細胞においても細胞移動や軸索突起伸長に関わると考え解析を進めている。ClipinC 発現蛋白質が、colonin 同様にアクチンに結合することを生化学的に確認し、抗体を作製して、まず細胞レベルと組織での詳細な局在の解析を行った。細胞内においてもアクチンのスト

レスファイバー上に局在が認められた。さらに、神経突起先端にも強い局在があるうえに、細胞基質間接着部位にも濃縮しており、それは接着装置に局在する vinculin と colocalize した。また、神経組織内では、海馬や発生過程での視神経・三叉神経核、さらには嗅覚上皮などに強い発現が認められた。 とくに視神経内では細胞移動がさかんな時期のグリア細胞に局在し、この結果からも ClipinC は細胞移動などへの関与が示唆された。現在、この ClipinC は分子内に様々な保存された分子間結合のモジュールを備えているために、その結合分子の検索や接着への関与、神経組織内での細胞移動等における詳細な機能を解析している。

これらの分子の解析から、神経ネットワーク形成に神経細胞接着分子、細胞膜裏打ち分子群がいかに関与しているか、組織解剖学的に検証するとともに、細胞内でいかなる情報伝達系・いかなる制御系に関わるか細胞生物学的にも眺めてみたいと考えている。

文献

- 1) Furley, A. J. et al. Cell, 61, 157-170 (1990)
- 2) Milev, P. et al. J. Biol. Chem. 271, 15716-15723 (1996)
- 3) 武内恒成 et al. 実験医学, 14, 573-583 (1996)
- 4) 月田早智子 et al. 細胞工学, 15, 304-312 (1996)
- 5) Maniak, M. et al. Cell, 83, 915-924

成長円錐の情報伝達と軸索伸長

五十嵐 道弘

(群馬大学医学部分子病態学)

成長円錐は成長期の軸索の先端に形成される運動性に富んだ特殊構造で、軸索成長、軸索経路選択、シナプス形成に重要な役割を担うことが推定されている。また損傷軸索が再生する際にもこの構造が形成され、維持されなければならない。近年、軸索成長を制御する分子が多数知られるようになったが、それらの作用機序に関する分子的基盤はほとんど明らかでない。今回は、軸索成長円錐の機能を支える分子基盤について、われわれの最近の研究を中心に述べたいと思う¹⁾。

1. 軸索成長の分子機構

軸索成長は少なくとも、形質膜が面積拡大する過程と、軸索から微小管が流入して新規の軸索が形成される過程、の2つが必要である。微小管の重合機序に関しては、まだ十分明らかになっていない。軸索膜面積の拡大は、軸索ガイダンス分子の情報に基づいて生ずるが、その機構はこれまで明らかでなかった。成長円錐においては、成長円錐小胞というシナプス小胞と異なる小胞が大量に存在し、シナプス小胞とのアナロジーから開口分泌で小胞が形質膜と融合してこの過程が生ずるといふ仮説があった²⁾。しかし、この説は十分な根拠に乏しく、これに反する考え方も提示されてきたので、われわれはこの仮説を以下のストラテジーで検証した。今日、開口分泌の分子機構は SNARE機構で説明されている。これは形質膜、小胞のそれぞれに SNARE蛋白というものが存在し、これらが会合して生ずる SNARE複合体が膜融合に必須であるという考え方(図1A)である³⁾。ある系が SNARE機構を介するかどうかを調べる分子プローブとしてもっとも特異的なのが、ボツリヌス菌由来の神経毒素群であり、これらは神経細胞内で活性化されると各SNARE蛋白を特異的に分解する蛋白分解酵素として作用することによって、膜融合を阻害する(図1B)と考えられている⁴⁾。われわれはSNARE蛋白の1つであるシンタキシンを主に分解するC1神経毒素を用いて成長円錐が退縮して軸索成長が停止し、成長円錐小胞が融合して巨大化した空胞が蓄積することを見出した。蓄積した小胞の表面積は軸索膜面積の拡大に対応しており、成長円錐内にシンタキシン由来の部分配列ペプチド(他のSNARE蛋白などの相互作用に必要な部位)を導入してもC1毒素と同様の変化を成長円錐に観察することができた⁵⁾。

以上の結果から、1) 成長円錐で軸索膜面積拡大がおこり、2) その機構が開口分泌でSNARE機構という分子機構で起こることがあきらかになった。この結果は同様の別のグループの実験からも支持されている^{6),7)}。さらにこの結果は、突起の伸長がシナプス伝達と同一の分子機構を共有しており、回路網形成において軸索成長とシナプス伝達の準備を一度に果たすことができることを意味している⁸⁾。成熟脳における出芽などもこのようなメカニズムで生ずる可能性もあり、回路網の機能発達における決定的に重要な機構の1つを明らかにしたものと考えている。

2. 軸索ガイダンスに関与するCa²⁺依存性情報伝達機構

成長円錐の軸索ガイダンスを規定すると想定されている分子は数多く存在する。これらの中には軸索成長を抑制的に制御するものも見つかった。軸索ガイダンス分子は成長円錐に作用するはずなので、成長円錐膜上にはこれらの特異的受容体が存在するものと推定されているが、その情報伝達系はまだほとんどわかっていない。しかし、軸索ガイダンス分子が数多く存在するとしても、成長円錐の情報伝達経路にはそれに応じて無数に存在するのではなく、おそらくいくつかの共通な経路を共有しているものと考えられる。その根拠として、われわれは成長円錐に濃縮されているGABA_A受容体を介した成長円錐の情報伝達系を解明したところ、この情報伝達が他の多くの軸索ガイダンス分子、例えば細胞接着分子と全く同様にL型チャンネルの開口に基く細胞内Ca²⁺濃度の上昇を伴っていた(図2B)ことが挙げられる⁹⁾。この経路の下流では、他のガイダンス分子と同じように、C-キナーゼの活性化がおこり、さらに成長円錐関連蛋白のGAP-43などのリン酸化が生じていた。またこのCa²⁺流入によって成長円錐では、新たにカルパインの活性化も同時に起こっており、それによって膜の裏打ち構造の脳スペクトリンの分解が生じ、これと結合しているα-アクチニンが遊離してくることがわかった。このような変化を介して、成長円錐は大きな形態変化が可能となり、軸索の成長または後退が可能となる(図2A)ものと推定される¹⁰⁾。

最近の研究では、成熟脳でも損傷ニューロンにはGABA刺激に応じて脱分極性反応が生ずることが知られており¹¹⁾、われわれの提唱する情報伝達系がこの場合にも当てはまると推定される。したがって、これらの機序が成熟脳での損傷神経細胞の突起再生の困難さ、または変性機構を解明する手がかりとなることを期待している。

- 1) 五十嵐 道弘 (1997) 生体の科学 48: 542-554.
- 2) Catsicas S *et al.* (1994) *Trends Neurosci.* 17: 368-373.
- 3) Lin RC, Scheller RH (1997) *Neuron* 19: 1087-1094.
- 4) Niemann H *et al.* (1994) *Trends Cell Biol.* 4: 179-184.
- 5) Igarashi M *et al.* (1996) *J. Cell Biol.* 134: 205-215.
- 6) Osen-Sand *et al.* (1996) *J. Comp. Neurol.* 367: 222-234.
- 7) Williamson LC *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 7694-7699.
- 8) Igarashi M *et al.* (1997) *J. Neurosci.* 17: 1460-1470.
- 9) Fukura H *et al.* (1996) *J. Neurochem.* 67: 1426-1434.
- 10) Ohbayashi, K. *et al.* (1998) *J. Neurosci. Res.* 51: 682-696.
- 11) van den Pol A *et al.* (1996) *J. Neurosci.* 16: 4283-4292.

図1 SNARE機構の模式図(A)とその分子プローブとしてのボツリヌス神経毒素

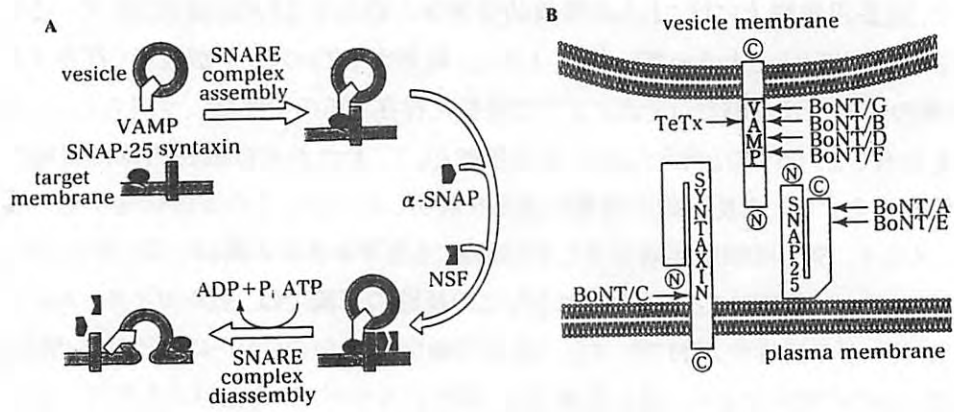


図2 L型Ca²⁺チャネル(A)および GABA_A受容体(B)の関与する成長円錐の情報伝達系

