

< 標的識別とシナプス形成の分子機構 >

1. はじめに：トポグラフィックな投射形成とは

神経回路網の形成においては、それぞれの神経結合がランダムに生じるのではなく、神経細胞が正しい結合相手を探し出し、特異的な結合を形成するという厳然とした規則性が存在している。このような神経回路網形成における基本様式の一つとなっているのが、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がどのようにして形成されてくるかを明らかにすることは、神経回路網形成のメカニズムを明らかにする上で最も重要な課題の一つであり、これまでその解明を目指して多くの研究が積み重ねられてきた。

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、網膜から発する視神経が脳の視中枢に投射する網膜視蓋投射 (retinotectal projection) 系 (ほ乳類では、網膜上丘投射 (retinocollicular projection) 系と呼ばれる) はその代表的なものである。ニワトリの網膜視蓋投射系においては、網膜の鼻側 (前側) あるいは耳側 (後側) の領域から発した視神経は、視中枢 (中脳背側部; 視蓋と呼ばれる) のそれぞれ後側、前側の領域に選択的に神経結合を形成する。同様に、背側からは腹側に、腹側からは背側の領域に投射が起こる (図 1)。したがって網膜に写った像は、二次元的に保存された形で視中枢に投影されることになる。

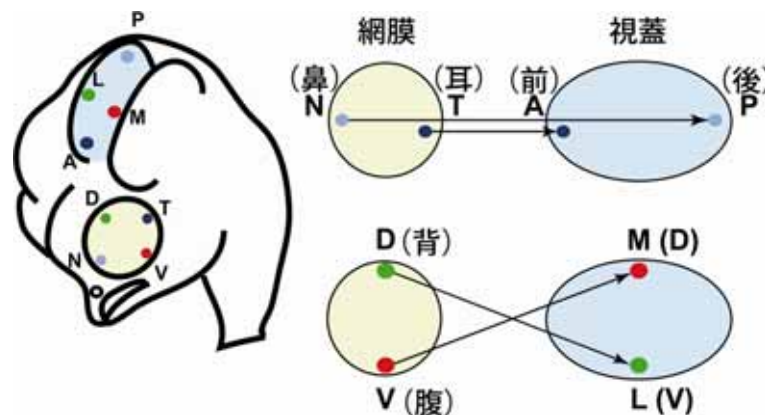


図 1 網膜視蓋投射におけるトポグラフィックな投射

ニワトリ網膜 (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。

2. 網膜視蓋投射の形成過程

網膜視蓋投射の形成過程についてニワトリの発生を追って見てみる。ニワトリの眼は発生開始から約 30 時間後 (ステージ 8~9) に、前脳胞の両側の一部が外側に膨出することにより形成されてくる。この膨出構造は眼胞と呼ばれ、表皮外胚葉に働きかけ水晶体板を形成させる (ステージ 13)。眼胞はやがて中央部が陥入して眼杯となる (ステージ 16)。眼杯の壁は互いに重なり合って、脳室であった部分は狭い隙間となる。眼杯の外層は後に色素上皮層となる。一方、内層は神経網膜となり、神経節細胞、視細胞、アマクリン細胞、

水平細胞、双極細胞、ミューラーグリアが分化してくる。網膜神経節細胞は発生3日目(E3)後半になると軸索を伸ばし始める。網膜を出た視神経軸索は視交叉を經由して、E6 からE8 にかけて視蓋に到達する。軸索の先端部には成長円錐(growth cone)と呼ばれる構造体がある。この成長円錐が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 を中心にはするものの、背腹軸方向及び前後軸方向に分散あるいは通過して停止している状況である(図 2)。投射形成の次のステップとして軸索は視蓋上に分枝を伸ばし始め、二次元的に正しい TZ を探すことになる。視蓋の層構造の発達を待って、E12 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、二次元的な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。これは refinement (精緻化)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、E15 頃までにトポグラフィックな投射がほぼ完成する。

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 refinement が、トポグラフィックな投射形成において重要な最終 step 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。

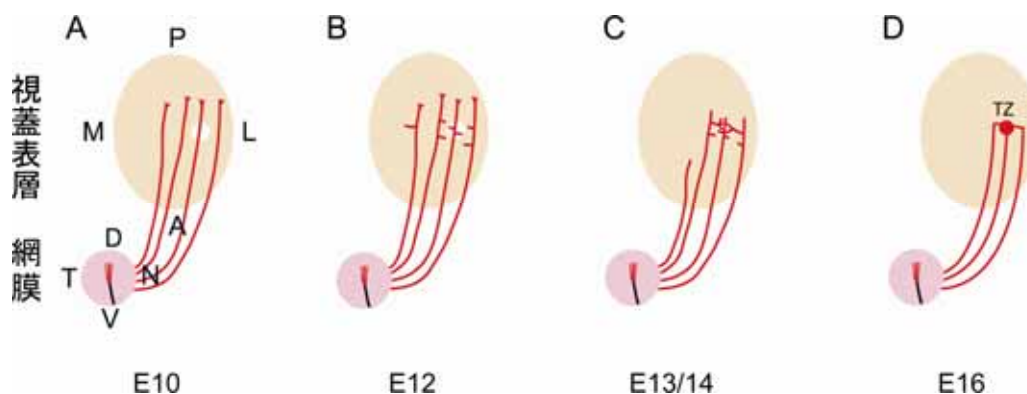


図 2 網膜視蓋投射が完成するまで

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 (A)。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とともに視蓋内部への侵入を開始する (B)。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。また、不適切なシナプスや分枝、軸索が除去される (C)。以上の過程を経て、最終的に投射が完成する (D)。

3 . Eph は網膜視蓋投射形成において必須の役割を果たしている

網膜視蓋投射の形成に重要な役割を果たしている分子として、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 が知られている。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(図3)。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おり、網膜において均一に発現する EphA4~7 に対して cis に結合することにより脱感作を誘導しているとされている。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。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。一方、視蓋の背腹軸方向においては、腹側に ephrin-B1 が発現する。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。

また、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、視蓋上の軸索の分岐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、分岐の形成位置や形成方向の決定に関与することや、視蓋上で勾配を持って発現する EphAs が視神経軸索の ephrin にリガンドとして作用することにより、分岐形成の位置決定に関与することが示唆されている。

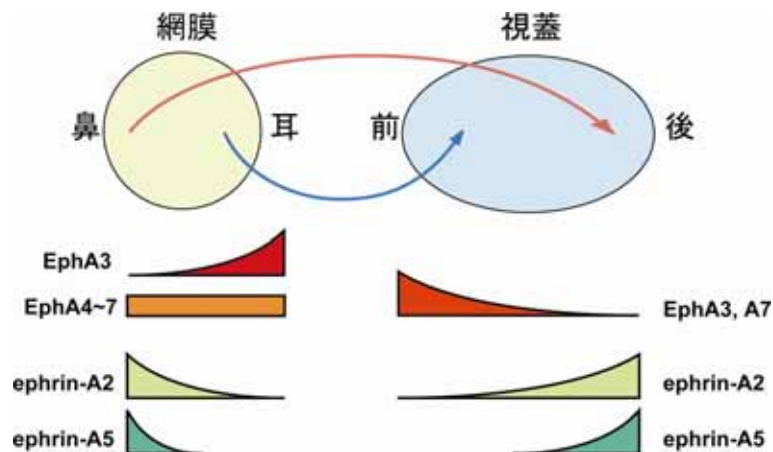


図3 EphAs と ephrin-As による前後軸方向の網膜視蓋投射の制御

耳側の軸索ほど EphA3 受容体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、網膜内で勾配をもって発現する ephrin の結合によって活性としては EphA3 と同様の勾配をも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。

4 . Ptpro は Eph の活性を制御することにより投射形成において機能している

Eph は、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 (auto-inhibition)。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。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る。

我々は、受容体型のプロテインチロシンホスファターゼ(RPTP)である Ptpro(protein tyrosine phosphatase receptor type O)が、Eph 受容体の活性化の制御において重要な役割を果たしていることを明らかにした。Ptpro は、8つのフィブロネクチン型リピートより成る細胞外領域と、1つの PTP ドメインから成る細胞内領域を有している。網膜内においては、Ptpro は網膜内で領域特異的に神経節細胞において発現するため、特異的な基質分子の脱リン酸化を通じて領域特異的な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 は 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 受容体の活性化においてトリガーとしての役割をしてい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により、Eph 受容体の活性化を抑制することが明らかになった(図4)。

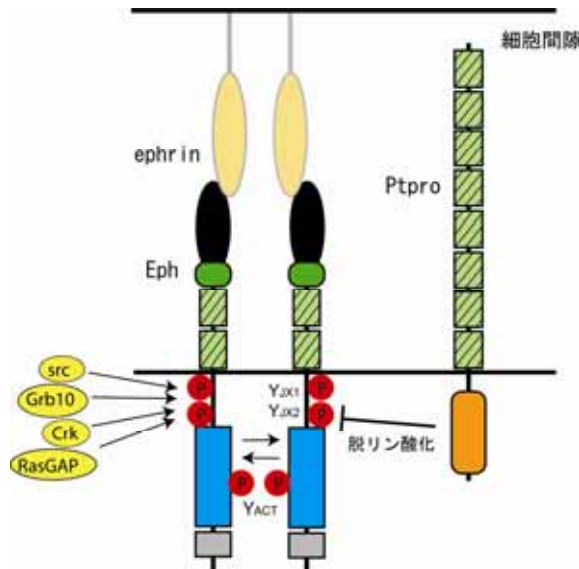


図4 Ptpro による Eph 受容体の活性化抑制機構

Eph 受容体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 (YJX1 と YJX2) が自己リン酸化される。これがトリガーとなって Eph 受容体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も、Eph の情報伝達において重要な働きをしている。Ptpro は YJX2 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。

次に、網膜から視蓋への領域特異的な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5）。

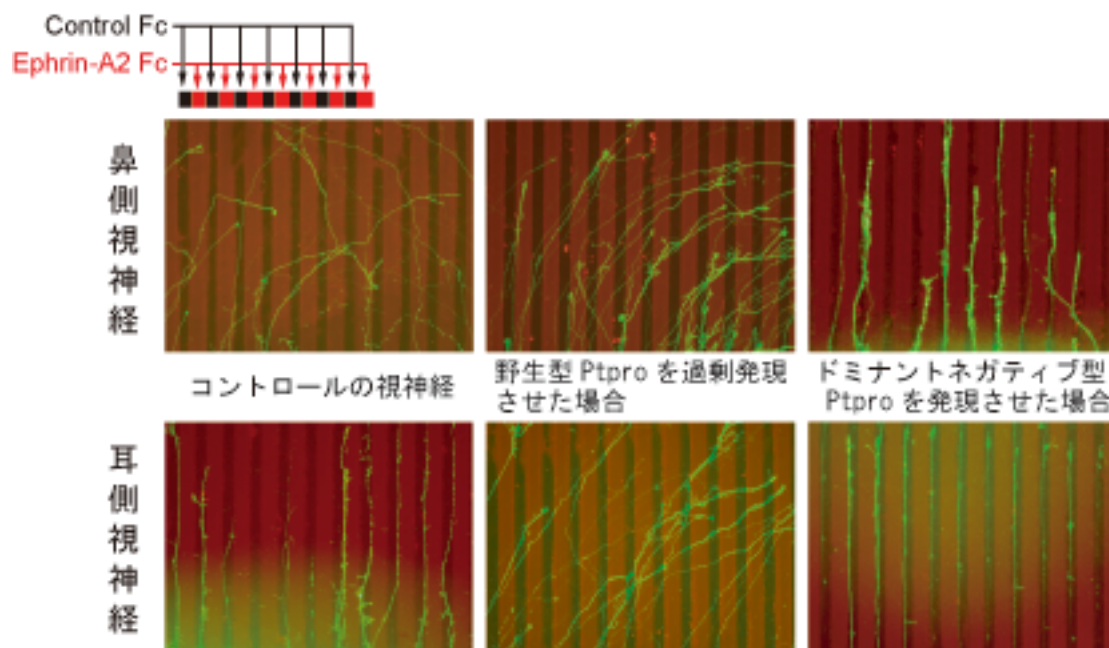


図5 Ptpro の発現（活性）を変化させた場合の視神経の ephrin-A2 に対する応答性の変化

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(赤色の部分)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）、耳側視神経は Eph の発現が多いため、ephrin-A2 が存在する領域を避けて伸長する（下段左）。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。

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6)。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。

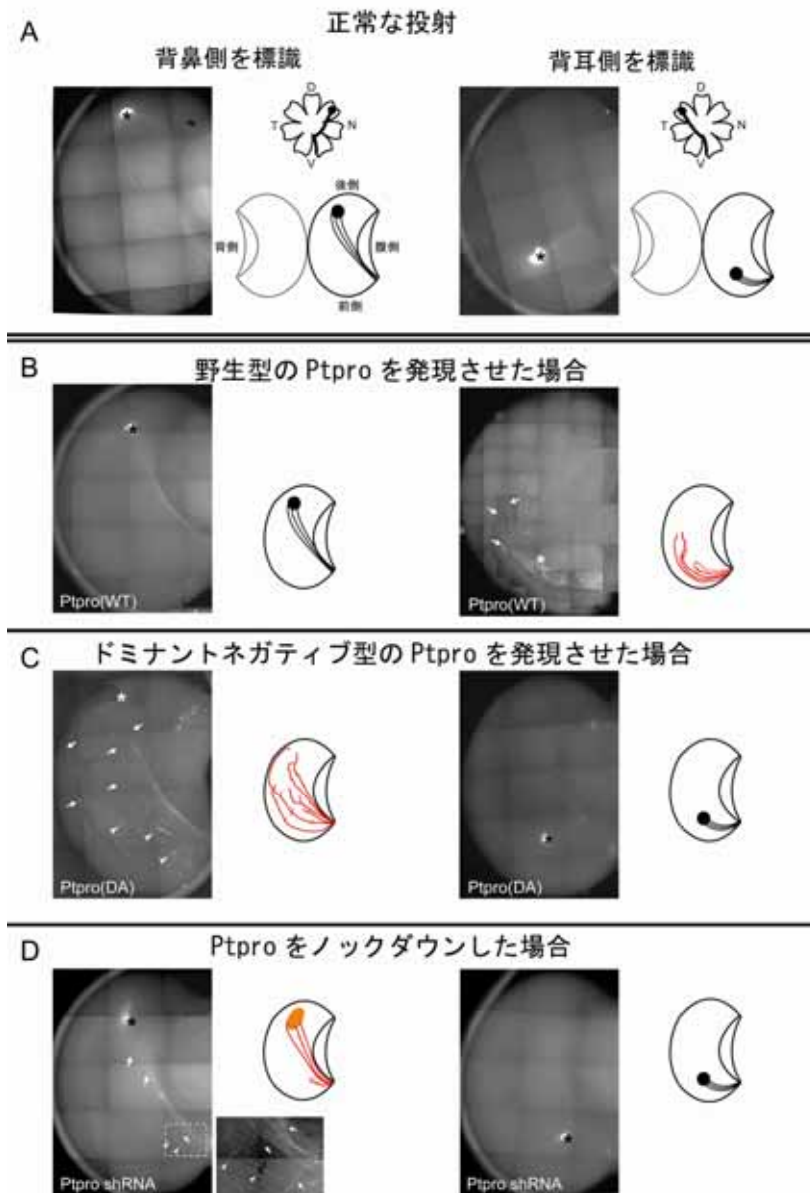


図6 Ptproの発現(活性)を変化させた場合の網膜視蓋投射

(A)背耳側の視神経を DiI で標識すると、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、内在性の 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(左)。また、TZ が広範囲になる。

5 . APC2 は軸索内の微小管の安定性を制御する

軸索はその細長い構造を維持するために内部に「細胞骨格」を有している。それに加えて、細胞骨格の制御は軸索の伸長の方向やスピードなどを決定する上でも必須の役割を果たしていると考えられている。軸索ガイド分子の情報も最終的に細胞骨格の制御につなが

ると考えられており、これらの情報伝達機構の解明は神経発生学における必須の課題の一つとなっている。軸索の伸長に関わる細胞骨格には、アクチンと呼ばれる分子が集まった微細繊維(マイクロフィラメント)と、チューブリンと呼ばれる分子が集まった微小管(マイクロチューブ)がある。軸索ガイダンス分子がどのように細胞骨格を変化させるかについては盛んに研究が進められているが、微小管を制御する機構についてはほとんど分かっていない。

我々は、神経系で高発現する Adenomatous polyposis coli 2 (APC2) という分子に注目して、神経回路形成における役割を解析した。APC2 は、癌抑制遺伝子である Adenomatous polyposis coli (APC) と構造上相同性の高い分子として単離されたが、その生理機能については明らかになっていなかった。まず APC2 に対する抗体を用いて神経系における APC2 タンパク質の分布について調べたところ、APC2 は軸索全体にわたって微小管に沿って分布していることが観察された。さらに、APC2 の発現を人為的に増加させると、それに伴い微小管の安定性が上昇すること、また、APC2 の発現を減少させると微小管の安定性が低下することから、APC2 は微小管に結合し、微小管の安定化に機能することが明らかになった。

次に、視神経軸索における APC2 の発現を抑制した場合の変化について調べた。すると、軸索の伸長スピードに変化はないものの、軸索の分枝。また大変重要なことに、APC2 の発現抑制により、反発性の軸索ガイダンス分子である ephrin-A2 に対する反応性も低下することが明らかになった(図7)。微小管を不安定化させる薬剤のノコダゾールによっても ephrin-A2 に対する反応性が低下すること、APC2 の発現抑制をした視神経に微小管を安定化させる薬剤のタキソールを作用させると ephrin-A2 に対する反応性が回復することから、APC2 による微小管の安定性の制御が ephrin-A2 に対する応答に必要であることが判明した。

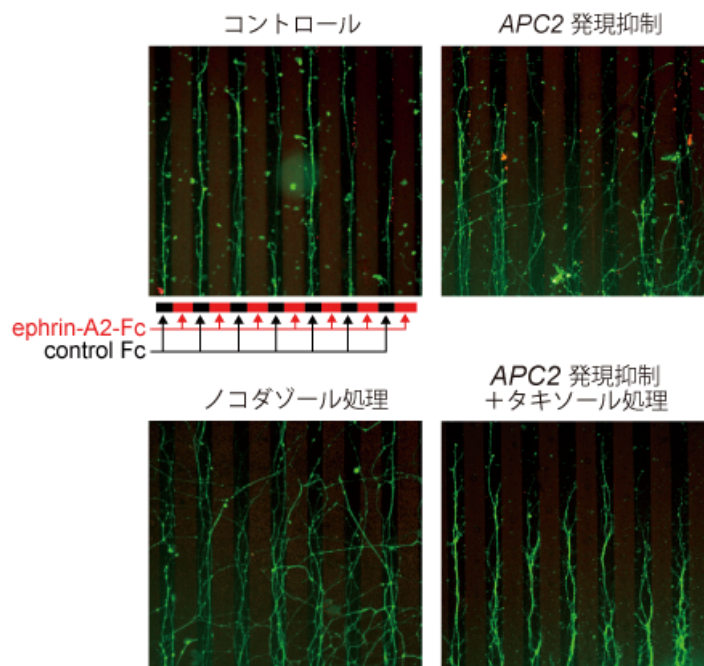


図7 APC2 の発現抑制、並びに微小管の安定性を変化させた場合の視神経

の ephrin-A2 に対する応答性の変化

コントロールの耳側視神経軸索は反発性ガイダンス分子の ephrin-A2 のあるレーン（赤色）を避けて伸長する。APC2 の発現を抑制すると、多くの耳側視神経が ephrin-A2 のレーンに侵入して伸長するようになる。また、ノコダゾールによって微小管を不安定化した場合でも、ephrin-A2 のレーンに侵入する。一方、APC2 の発現を抑制した場合でもタキソールにより微小管を安定化させるとコントロールの視神経軸索のように ephrin-A2 に対する反応性が復帰する。これらの結果から、APC2 による微小管の安定性の制御が、軸索ガイダンス分子に対する正しい応答に必須であることが分かる。

また、APC2 を抑制した場合の視神経軸索の脳への神経連絡について、ニワトリの網膜視蓋投射系を用いて調べた。ニワトリの視神経のほとんどは視交叉を通過して反対側の視蓋に投射する（図8左）。すなわち、右眼の視神経は左側だけに投射する。ところが、APC2 の発現を抑制した場合には、視交叉における進路選択に誤りが生じて、左の視蓋だけでなく右の視蓋にも侵入することが分かった（図8右）。また、視蓋上では、蛇行して伸長する視神経が観察された。さらに、将来の投射位置付近に集中して形成される軸索の分枝が視蓋の広い領域に分散した状態で形成されているのが観察された。視交叉、および視蓋上には様々な軸索ガイド分子が分布していることが知られているが、APC2 の発現を抑制した視神経軸索は、これら軸索ガイド分子に対して正常に反応できなくなったと推測される。

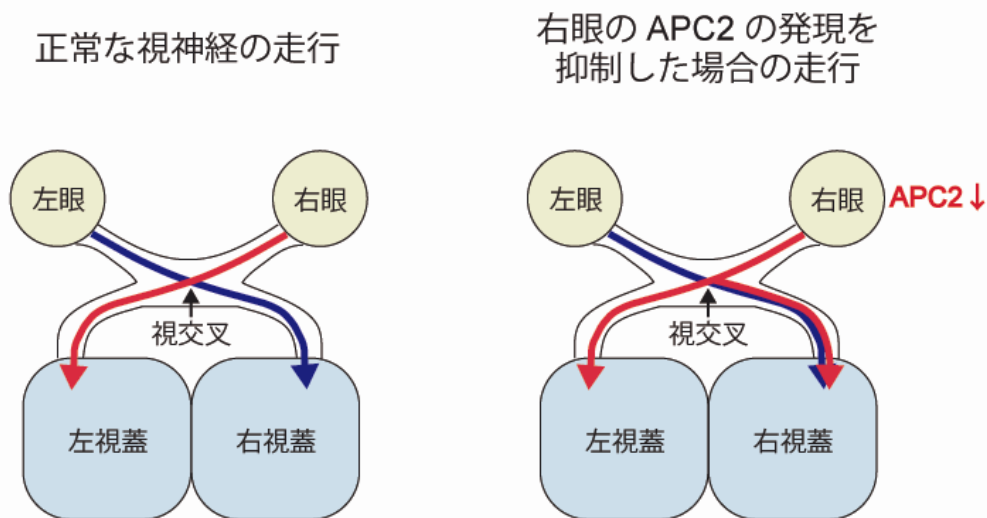


図8 APC2 の発現を抑制した場合の視神経の走行の変化（発生12日目）
正常発生（12日目）ではそれぞれの眼から発した視神経軸索は反対側の視蓋に投射する（左図）。ところが、APC2 の発現を抑制した視神経軸索は、視交叉における進路選択に異常が生じ、反対側だけでなく同側の視蓋にも侵入するようになる。

次に、投射が完成した時期（18日目）に解析を行うと、APC2 の発現を抑制した場合には、形成されるべき領域特異的な投射が形成されていなかった（図9）。すなわち、APC2 の発現を抑制すると、本来の投射位置以外で全体として分散した投射を形成するとともに、

軸索の蛇行や異常な側枝の形成も観察される。以上の結果から、視神経軸索が軸索ガイダンス分子に対して応答して正しい経路を選択するためには、APC2 による軸索内の微小管の安定性の制御が重要な役割を果たしていると考えられる。

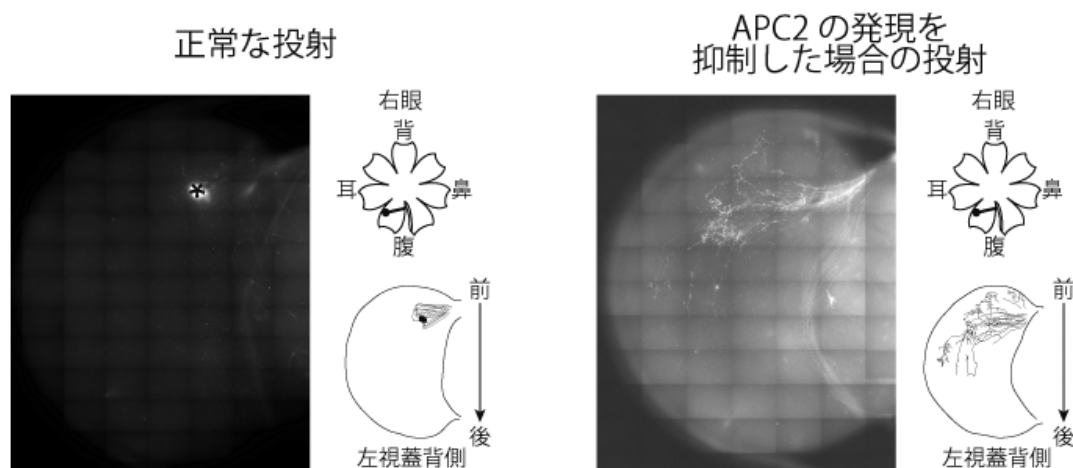


図9 APC2の発現を抑制した場合の網膜視蓋投射

右眼の耳腹領域の一部の視神経を蛍光色素で標識して、発生投射が完成した18日目の時期に観察すると、視神経は通常、左側視蓋の背側前側に収束して投射する。ところが、APC2の発現を抑制すると、本来の投射位置以外で全体として分散した投射を形成する。また、蛇行や異常な側枝の形成も観察される。発生12日目に見えていた同側の視蓋への投射はこの時期には消失していた。

(今後の展望)

軸索ガイド分子など投射形成に関わる細胞外分子の情報は、軸索の細胞表面に分布する特異的な受容体群やそれらの活性を制御する分子によって受容・翻訳され、軸索内に伝達される。そして最終的に、それらの情報によって軸索内の細胞骨格の再編成が生じ、軸索の伸長方向や伸長スピードが変化したり、新たな軸索分枝の形成が起こったりと考えられる。このような情報伝達機構については不明な点が数多く残されており、私達はこれから新規の情報伝達機構を明らかにすることを目指して研究を進めている。

(参考文献)

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 生化学 80: 733-742 (2008)

領域特異的な視神経投射形成の分子機構

新谷隆史、作田拓、野田昌晴 Brain and Nerve 60: 425-435 (2008)