

進むべき道を決める力：神経細胞の軸索ガイダンスを導く因子について Factors for axon guidance of neurons

枝川 義邦

Yoshikuni EDAGAWA

(日本大学 薬学部)

1. はじめに

人生の岐路に立った場合、どの道が最良の選択なのかは、後で結果を見てみないと知ることが出来ない。どの道に進むべきか？この問いかけに対する答えを出す過程は非常に複雑であり、各個体の脳高次機能を駆使して導き出すものであろう。

脳を形成する神経細胞においても道の選択を迫られる場面が存在する。神経細胞の特徴は、自身の持つ情報を他の細胞に伝えることにある。主な情報伝達の場合はシナプス (synapse) であるが、ある神経細胞が他の神経細胞とシナプスを形成するためには、まず軸索 (axon) を伸ばし・目標とする神経細胞に軸索先端を運び・機能的なシナプスを形成するという少なくとも三段階の過程を経ることが必要である。実際の生体内では、この標的細胞にピンポイントでたどり着く過程が三次元空間において展開されるので、実験室の培養皿で再現される過程よりも複雑で正確な制御機構が働くことが必要である。目的とする標的に正確に到達するには、数々の選択肢の中から適切な方向を選び出すことが必要であらう。

神経細胞がその情報出力突起である軸索を伸ばす際には、様々な外力が作用する。神経細胞の軸索を取り巻く環境には、軸索の伸展方向を決定する因子が数多く発現

しており、軸索はそれら因子を手がかりにして標的に向かって伸展していく。これら環境からの情報収集には実に巧妙なカラクリが存在し、絶妙な制御系を形作っているのである。

本稿では、神経細胞の機能発現に必須である軸索ガイダンスについて、その運動性を制御する因子に注目してまとめてみたい。

2. 神経軸索ガイダンス研究の足跡

機能的に有効な軸索伸展の過程は、適切な軸索ガイダンスにより成立する。軸索ガイダンスは、神経軸索の先端部に位置する成長円錐 (growth cone) と呼ばれる特殊な領域の運動性の制御により導かれる。すなわち神経軸索の運動性は、成長円錐の運動性に置き換えて考えることができる。

神経成長円錐の存在を初めて指摘したのは“神経科学の父”と呼ばれる Ramon y Cajal である。19世紀末のことであった。その後、John Langley が哺乳類標本を用いていちど切断した神経線維が再び元の標的に向かって投射することを示した。当時、このような現象を受けて、神経線維が進むべき道は化学的な因子のみによって決定されていると説明された。

その後、20世紀半ば近くには、神経線維の投射は、初めから投射先が決まっている

のではなく、無作為に伸展した突起の中から機能的に適切な線維のみが生き残ると考えられるようになった。しかし、その後の Roger Sperry の登場により、再び軸索伸展の方向を制御する因子の存在が指摘され、軸索伸展が運命決定因子により操られているという考え方が再び浮上し現在に至っている。

軸索ガイダンス研究の歴史はこのようにまとめられようか。現在では、この歴史の中で主張されてきた、外部因子による伸展方向の決定と適者生存の原理の両者を組み入れることにより、軸索伸展・神経回路形成の制御機構が理解されてきている。すなわち、神経投射の大凡の位置は、外部因子により導かれ、その後形成する神経回路の微調整には適者生存の原理が働くということである。活動しているシナプスが生き残り、活動していないシナプスは脱落するという学習則が適応される神経回路や、動物の発達段階に観察される中枢神経回路形成の感受性期にある神経回路においても、このような制御機構が働いているのであろう。

3. 軸索ガイダンス因子の分類

神経細胞の軸索ガイダンスを適切に行うためには、様々な因子の寄与が必要である。大きく分類すると、拡散性の化学的因子と結合性の接触因子に大別できる。これらはさらに、軸索を引き寄せる誘引因子と、はね除ける反発因子として分類することが可能である。化学的因子には、Netrin, Slit, Semaphorin といった物質が挙げられ、接触因子には、Ephrin や細胞外基質成分が挙げられる。これらの因子は、それぞれ発生過

程のステージや神経細胞の種類により誘引・反発のどちらかの性質を示すのであるが、中にはひとつの分子が誘引・反発の両方向性の作用を併せ持つものも知られている。例えば、後述する Netrin と呼ばれる分子は、交連神経に関しては誘引因子として働くが運動神経にとっては反発因子となる。

軸索ガイダンスに関与する因子やそのシグナル伝達経路の多くは、線虫・昆虫・脊椎動物を通してよく保存されており、多細胞生物の進化の初期段階に確立したものであると考えられている¹⁾。一般的に、脊椎動物では受容体やそれに対するリガンドの種類が多くなるので、脊椎動物に特異的なメカニズムが生じてくる²⁾。また、多くの軸索ガイダンス機構は分子レベルでよく保存されているだけではなく、個体レベルでもよく保存されている³⁾ので、単純な生物から複雑な生物に至るまで種を越えての考察が可能となる。

4. 両方向性の軸索ガイダンス因子： Netrin とその受容体

軸索ガイダンス因子は、これまでに多数の分子が見いだされ、それぞれについて様々な報告がなされている。本稿では、これらの中から特徴的な因子を取り出して見ていくことにする。

まず、ひとつの分子において誘引・反発の相反する二つの作用を併せ持つ Netrin に注目してみたい。特に、二つの作用の方向性を決めるメカニズムが明らかにされている Netrin-1 についてまとめる。

Netrin-1 は細胞接着分子群である Laminin スーパーファミリーに属し約 600

アミノ酸からなるタンパク質である⁴⁾。受容体としては免疫グロブリンスーパーファミリーに属する2種類の受容体：deleted in colorectal cancer (DCC), UNC-5が知られている。DCCは誘引作用を媒介する受容体で、UNC-5は反発作用を媒介する受容体として知られるが、DCCの機能を阻害することによりUNC-5の反発作用も障害されるので、これらの作用発現機構はそれぞれ全く独立に動いているのではなく、UNC-5の反発作用発現にはDCCの機能が必要であることが考えられている⁵⁾⁶⁾。

Netrin-1の神経細胞軸索に対する二面的な作用の方向性は、軸索先端の成長円錐に発現する受容体の種類によって規定されている。このことは成長円錐ターニングアッセイと呼ばれる実験系により確かめられた⁶⁾。

神経細胞の軸索伸展の方向に対して45度の角度にNetrin-1を充填したピペットを置くと、ピペット先端から漏れだしたNetrin-1は培養皿中で細胞の軸索先端に向けて濃度勾配を作り出す。細胞発生のステージ22~24という、DCC受容体のみを発現する胚を用いた場合、神経軸索先端の成長円錐もDCC受容体のみを発現しているのでNetrin-1の誘引作用が働くことになる。その結果、成長円錐はNetrin-1の濃度勾配を感知し、より濃度が高い方向に向かって伸展するようになる。すなわち、Netrin-1非存在下で予想された伸展方向から45度曲がったピペット方向へと方向転換をすることが観察されるのである。

一方、Netrin-1の反発作用を確認するためには、反発作用を媒介するUNC-5受容体を強制発現させる。この細胞では、

Netrin-1を充填したピペットを軸索の伸展予想方向に置いた場合に、軸索は大きく伸展方向を変えてピペットを避けるように伸びていく過程が観察できる。

以上のようなNetrin-1の軸索ガイダンスにおける両方向性の誘引・反発切り替えの制御には、成長円錐内でのcAMPとcGMPという二つの細胞内情報伝達物質の量の比がどちらに傾くかというメカニズムが関与することが明らかにされている⁷⁾。すなわち、cAMPとcGMPとの比がcAMP側に傾くと、軸索は誘引作用を受ける。逆にcGMP側に傾くと反発作用を受ける。このような成長円錐内での情報伝達物質の変動を導いているのは、成長円錐に発現している受容体の活性化であり、DCC受容体が活性化すると成長円錐内cAMP量が増加し、逆にUNC-5受容体が活性化することでcGMP量が増加する⁷⁾⁸⁾。このように、発現する受容体の差異により同じ分子に対する応答性を反転させるメカニズムは、神経軸索の投射先を規定するひとつの要因となり得るであろう。

ところで、一般的に神経細胞軸索の伸展運動には、成長円錐内のCa²⁺量が至適濃度であることが必要であるとされる⁹⁾。Netrin-1は成長円錐内のCa²⁺量を増加させることが知られているが、そのソースとしては細胞膜上にある電位依存性Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入、そして細胞内のCa²⁺ストア膜上にあるIP₃受容体やリアノジン受容体を介した細胞質へのCa²⁺放出と複数の経路の関与が提示されている¹⁰⁾。これらのCa²⁺ソースのうち、電位依存性Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入やリアノジン受容体を介したCa²⁺放出は、細胞内Ca²⁺量を

十分に上昇させることにより軸索に対する誘引作用を導くことに寄与し、IP₃受容体を介した Ca²⁺放出は軸索伸展方向の安定性確保に寄与していると考えられている。

5. 正中線での秩序を守る因子：

Slit と Robo 受容体

発生期の神経発達において、個体の正中線を中心とした左右肢体の形成や神経連絡の形成は最重要項目である。ある神経が正中線に向かって神経軸索を伸ばしていく場合、正中線を跨ぐことが出来るか、そこで止まって機能するかは、その細胞の運命を決める大きな要素のひとつである。

Slit タンパク質は長距離シグナル伝達を担う化学的因子であり、とくに正中線上の細胞の発生もしくは軸索ガイダンスに関与していることが知られている¹¹⁾。特に正中線忌避物質として神経軸索が正中線を跨ぐことを阻止する作用が知られる¹²⁾。Slit はショウジョウバエにおいてはミッドライングリアと呼ばれる正中線に存在する細胞から分泌され、*slit* 遺伝子の変異体では正中線に沿った神経軸索が異常をきたし、通常見られるハシゴ状の投射とならずに1本にまとまってしまふことが知られている¹³⁾。

Slit に対する受容体としては、*slit* 遺伝子変異とは別の軸索異常変異体である *Roundabout* から同定された *robo* 遺伝子産物の Robo が挙げられる。Robo は免疫グロブリンスーパーファミリーに属す膜貫通型タンパク質であり、主に正中線に向かって伸びる神経軸索での発現が認められる。Robo を発現している軸索は Slit によって反発作用を受けるので、正中線を越えるこ

とが出来ない¹⁴⁾ が、*robo* 遺伝子変異体では軸索が自由に正中線を越えることが出来ること^{14) 15)} から、Robo 受容体が正中線忌避因子として考えられてきた。具体的な例として、正常な交連神経の軸索は正中線を一度だけ交差するのであるが、*robo* 変異体では何度も交差するようになる¹⁵⁾。正常な交連神経の軸索では正中線を交差する前には Robo の発現が抑制されており、正中線を越えて軸索を伸ばすことが出来るが¹⁵⁾、いちど正中線を交差することで Robo の発現量が顕著に上昇することが知られている¹⁴⁾。このことは、Robo を介するシステムが正中線忌避を導いているということを示すとともに Robo 発現のタイミングが正中線を跨ぐことに関与して制御されており、このことが軸索ガイダンスに秩序をもたらしていることも示している。このような絶妙なタイミングの制御は、正中線に存在する細胞で産生される因子が Robo の発現を抑制することで成り立っており、その結果として正中線を一度だけ交差するという現象に結びついているのである¹⁶⁾。

以上をまとめると、正中線から拡散する Slit タンパク質は Robo 受容体を介して反発性軸索ガイダンス因子として機能するとなる。実際、培養した嗅球神経、海馬神経、脊髄運動神経の軸索における全てにおいて、Slit は化学的反発活性を持っていることが示されている^{17) 18) 19)}。

また、Slit は反発性因子として働くと同時に、軸索の枝分かれを制御する機能も持ち合わせていることが明らかになってきた²⁰⁾。殆ど全ての神経細胞は、ひとつの細胞が他の細胞と多数の結合を形成してい

る。軸索ガイダンスの過程で、まず1本の軸索を伸展し、その後に枝分かれした軸索側枝を伸ばすことで他の細胞と複数の結合を形成する。Slitの場合、感覚神経細胞の軸索分枝の制御への関与が明らかにされており²⁰⁾、軸索ガイダンス分子としてだけでなく多彩な作用を持ち合わせている可能性が考えられている。

6. 細胞外基質にみる軸索ガイダンス： Laminin を例にして

神経軸索の伸展において、拡散性の化学的因子が成長円錐を誘引・反発することは、軸索ガイダンスを制御する上で非常に有効な手段である。しかし生体の組織内にあつては、細胞を取り巻く環境として細胞外基質が存在し、多くの細胞は常に基質と接触しながら生存し機能を発現している。神経細胞の軸索伸展においても、細胞外基質から受ける影響は大きく、細胞側にもそのシグナルを受け入れる機構が発達している。

細胞外基質に対する受容体は、主にインテグリンスーパーファミリーに属するタンパクが担っている。この受容体は、18種類の α サブユニットと8種類の β サブユニットが同定されており、これらの組合せで形成されるヘテロ2量体の分子であるので、その構造に限らず機能も多様である²¹⁾。

細胞外基質の構成成分は、Collagenファミリータンパク質、LamininやFibronectinといった非Collagen性糖タンパク質、およびProteoglycanに大別される²¹⁾。神経細胞の場合、細胞接着や突起伸展の誘導にはLamininの寄与するところが大きい。Lamininは、培養した非神経細胞株である

PC-12細胞を神経細胞様に突起誘導させる因子として同定された²²⁾²³⁾。

Lamininは分子構造が十字架型のヘテロ3量体をとる糖タンパク質であり、分子量は500~800 kDaである。構成する各サブユニットには多様性があり、 α サブユニット：4種、 β サブユニット：3種、 γ サブユニット：2種の組合せで形作られる。

軸索ガイダンスにおけるLamininの役割は、線虫において軸索誘導に必要なUNC-6が実はLaminin β サブユニットのホモログであること²⁴⁾や、Lamininをビーズにコートすることで、そのビーズに向かって接近する成長円錐の移動速度を加速させること²⁵⁾から、軸索の誘引に必要な分子であることが伺える。しかし一方では、Lamininの神経突起に対する作用として、伸展を抑制しシナプス形成を促す作用やシナプスにおいて周囲のグリア細胞の侵入を防ぐ作用も報告されている²⁶⁾。これらの作用の多様性は、受容体であるインテグリンの多様性やLamininと他の分子との相互作用による作用の多様性に起因しているのかも知れない。

7. おわりに

本稿では、いくつかの軸索ガイダンス分子についてまとめた。このような研究は、ここ10年ほどの間に大きく発展した分野であり、今後さらなる展開が期待される。今回取り上げた因子以外にも、様々な因子が軸索ガイダンスを制御しうるということが知られてきている。実際の生体内では、これら多数の因子が驚くほど絶妙な発現タイミングや局在性を示して、神経軸索のガイダンスを正確に制御しているのである。

< 参考文献 >

- 1) Chisholm A, Tessier-Lavigne M, Conservation and divergence of axon guidance mechanisms, *Curr Opin Neurobiol* 9: 603-615 (1999)
- 2) Skrabanek L, Wolfe KH, Eukaryote genome duplication – where's the evidence?, *Curr Opin Genet Dev* 8: 694-700 (1998)
- 3) Arendt D, Nubler-Jung K: Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates, *Development* 126: 2309-2325 (1999)
- 4) Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, Look AT, Fearon ER, Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas, *Cell Growth Differ* 10: 35-42 (1999)
- 5) Livesey FJ, Netrins and netrin receptors, *Cell Mol Life Sci* 56: 62-68 (1999)
- 6) Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E, A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion, *Cell* 97: 927-941 (1999)
- 7) Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM, Hong K, Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning, *Nature* 423: 990-995 (2003)
- 8) Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C, Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1, *Nature* 401: 69-73 (1999)
- 9) Kater SB, Mills LR, Regulation of growth cone behavior by calcium, *J Neurosci* 11: 891-899 (1991)
- 10) Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier-Lavigne M, Poo M, Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1, *Nature* 403: 93-98 (2000)
- 11) Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S, slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains, *Genes Dev* 4: 2169-2187 (1990)
- 12) Kidd T, Bland KS, Goodman CS, Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*, *Cell* 96: 785-794 (1999)
- 13) Sonnenfeld MJ, Jacobs JR, Mesectodermal cell fate analysis in *Drosophila* midline mutants, *Mech Dev* 46: 3-13 (1994)
- 14) Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G, Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors, *Cell* 92: 205-215 (1998)
- 15) Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS, Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline, *Neuron* 10: 409-426 (1993)
- 16) Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G, Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline, *Neuron* 20: 25-33 (1998)
- 17) Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T, Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance, *Cell* 96: 795-806 (1999)
- 18) Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y, Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons, *Cell* 96: 807-818 (1999)
- 19) Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A, Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons, *Neuron* 22:463-473 (1999)
- 20) Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M, Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching, *Cell* 96:771-784 (1999)
- 21) Hynes RO, Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell* 110: 673-687 (2002)
- 22) Lander AD, Fujii DK, Gospodarowicz D, Reichardt LF, Characterization of a factor that promotes neurite outgrowth: evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan, *J Cell Biol* 94: 574-585 (1982)
- 23) Lander AD, Fujii DK, Reichardt LF, Laminin is associated with the "neurite outgrowth-promoting factors" found in conditioned media, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2183-2187 (1985)
- 24) Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM, UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*, *Neuron* 9: 873-881 (1992)
- 25) Kuhn TB, Schmidt MB, Kater SB, Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones, *Neuron* 14: 275-285 (1995)
- 26) Patton BL, Chiu AY, Sanes JR, Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft, *Nature* 393: 698-701 (1998)