

2007年8月25日

独立行政法人 理化学研究所

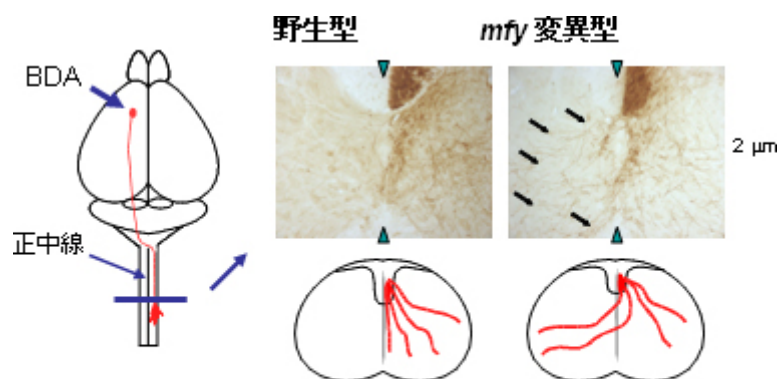
手足の動きを制御する神経回路の左右混線を防ぐ仕組みを解明

- 突然変異マウスの発見から神経回路形成の基本機構の解明まで -

私たちが左右の足を交互に出して歩くことや左右の手を別々に動かすことができるのは、左半身と右半身の運動を制御する神経回路が脊髄の左右で分離しているためです。脳科学総合研究センターの行動遺伝学技術開発チームは、左右の足を交互に出すことができず、ウサギのように両足をそろえて跳ねながら歩く突然変異マウスを発見し、「mfy (ミッフィー) 変異マウス」と名づけました。さらに、その原因となる遺伝子「 α キメリン遺伝子」を特定し、神経回路形成時に左右混線を防ぐ仕組みを明らかにしました。

正常のマウスでは、例えば、大脳の左半球の運動野から伸びた神経細胞の軸索は、延髄で交差して右側の脊髄へ入って、右半身の動きを制御します。軸索が伸びる際、その先端にある成長円錐は、脊髄内の左右の境界面となる脊髄正中線を認識し、それを越えることはありません。ところが、mfy 変異マウスでは、 α キメリンの機能が失われ、成長円錐が脊髄正中線を認識することができないため、境界を越えて神経回路網が形成されました。

生体内での α キメリンの機能が明らかになったのは初めてのことであり、 α キメリンを介在した情報伝達の仕組みが明らかになったことにより、神経科学、発生・再生医学など幅広い分野の発展に大きく貢献することが期待されます。



大脳皮質にBDAと呼ばれるトレーサーを注入して神経細胞の軸索の投射を比較。正常マウスでは脊髄で正中線(矢頭)を越えないが、mfy 変異マウスでは正中線を越えているものが多く見られる(右上の図の黒い矢印)。

2007年8月25日
独立行政法人 理化学研究所

手足の動きを制御する神経回路の左右混線を防ぐ仕組みを解明

- 突然変異マウスの発見から神経回路形成の基本機構の解明まで -

◇ポイント◇

- ・ウサギのような歩き方をする突然変異マウスを発見し、その原因遺伝子を同定
- ・ α キメリンが運動を制御する神経回路の左右混線を防ぐ鍵であることを発見
- ・広範な生命現象で重要な働きをする「エフリン-Eph シグナル伝達機構」に新展開

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、左右の前後肢をそろえてウサギのような歩き方をする突然変異マウスを発見しました。さらに、その原因となる遺伝子を特定し、左右の体の動きを制御する神経回路が、脊髄（せきずい）正中線を越えて混線することを防ぐ機構を解明しました。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）行動遺伝学技術開発チームの岩里琢治 副チームリーダーら及び国立大学法人京都大学、独立行政法人産業技術総合研究所との共同研究による成果です。本研究は、文部科学省特定領域研究「統合脳」及び独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業「認識と形成」研究領域の一環として行われました。

私たちは、左右の手で異なる動きをしたり、左右の足を交互に出して歩いたりすることができます。こうした動きは、左半身と右半身の運動を制御する神経回路が、脊髄の左右で分離しているからこそ可能になります。これらの回路が形成される時期の脊髄では、左右の境界面である正中線にエフリン^{*1}という膜タンパク質が配置されています。一方、神経軸索の先端には、Eph^{*1}というエフリンの受容体が配置されています。そして、正中線に突き当たった軸索先端では、エフリンによって刺激されたEphが軸索内に反発性のシグナルを誘導することで、軸索の伸長が止まることが知られています。しかしながら、エフリンからEphへのシグナルが、どのようにして軸索の伸長をとめるのかは明らかにされていません。

研究チームでは、特異な歩き方をする突然変異マウスを発見し、そのマウスの運動を制御する神経回路が、脊髄正中線を交差して左右混線していることを見つけました。さらに、順遺伝学と逆遺伝学^{*2}の手法を駆使し、RhoファミリーGタンパク質（Rhoファミリー）^{*3}を不活性化する因子の一つである「 α キメリン^{*4}」の遺伝子の欠損が、マウスの異常の原因であることを突き止めました。また、生化学的解析を行い、 α キメリンがエフリン-Ephシグナル伝達で鍵となる役割を担うことを明らかにしました。本研究により、運動を制御する神経回路ができるとき、脊髄正中線でエフリンに触れた軸索先端のEphは、 α キメリンを介して、Rhoファミリーのメンバーの一つで軸索伸長の"アクセル役"であるRacを不活性化し、"アクセルを放す"ことで軸索伸長を止め、左右の回路が混線することを防いでいることがわかりました。

エフリン-Ephシグナルは、神経回路形成だけでなく、広範な生命現象で重要な働きをしていますが、いずれの系でもその作用機構はほとんどわかっていません。今回の成果は、エフリン-Ephシグナル伝達機構の理解を大きく進展させるものであり、神経科学、発生・再生医学など幅広い分野の発展に貢献することが期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『Cell』（8月24日付け）に掲載されます。

1. 背景

神経回路が正常に機能するためには、正しい配線が必要です。成長中の神経細胞の軸索先端は、成長円錐と呼ばれる円錐状の構造を持ちます。それが脳や脊髄の中にあるさまざまな標識に誘導されながら進むべき経路を見つけ、正しい標的までたどり着き、神経回路を形成します (図 1)。こうした標識となる物質の中で特に重要なものに「エフリン」という細胞膜結合タンパク質があり、成長円錐の進入を防ぐ "進入禁止" を示す標識の役割を担っています。このエフリンと成長円錐の表面にある受容体「Eph」とが作用することにより、反発性のシグナルが誘導され軸索は伸長を止めます。左右の手足の動きを制御する神経軸索が脊髄の正中線を越えることも、この仕組みによって防がれています (図 1)。もし、こうした仕組みが壊れれば、混線した神経回路ができあがり、動物の行動は異常をきたすこととなります。

RhoファミリーGタンパク質 (Rhoファミリー) は軸索伸長を制御する鍵となるものですが、その一つであるRhoAは軸索伸長の "ブレーキ役" です。RhoファミリーはRho-GEFという活性化因子によって正の制御を受けますが (図 2)、エフリン-EphシグナルがRho-GEF^{*5}の一つであるエフェキシン^{*6}を介してRhoAを特異的に活性化することが報告されています。こうした報告に基づきこれまで広く信じられてきた仮説では、「エフリン-Ephシグナルはエフェキシンを介してRhoAを活性化し軸索伸長を止める」、つまり、車に例えれば、進入禁止の標識で止まるためには "ブレーキを踏めばよい" と考えられていました。

一方、RhoファミリーのメンバーでもRacは軸索伸長の "アクセル役" です。また、RhoファミリーはRho-GAP^{*7}という不活性化因子によって負の制御を受けます (図 2)。したがって、もし、エフリン-EphシグナルがRho-GAPを制御することが可能であれば、それを介してRacを不活性化する、すなわち "アクセルを放す" ことによって軸索伸長を止められるかもしれない」とも考えられます。しかし、これまでエフリン-EphシグナルがRho-GAPという抑制系を介してRhoファミリーを制御する可能性、およびその重要性はまったく想定されていませんでした。

さらに、エフリン-Ephシグナルは、軸索誘導だけでなく、幅広い生命現象で重要な働きをしますが、これまでその機構はもっぱら培養細胞を用いた単純かつ人工的な環境で研究されてきました。前出のエフェキシンは培養系では非常に重要な働きをすることが示されています。しかし、そのノックアウトマウスは作製されていますが、特別な異常は示さないことが報告されています。したがって、これまで実際の動物の体の中で、エフリン-Ephシグナルがどのように働いているかについてほとんどわかっていませんでした。

2. 研究手法と成果

(1) 新規突然変異マウスの発見

研究チームは、マウスの兄妹交配を行う過程で、左右の前後肢をそろえてウサギのように飛び跳ねる歩き方をするマウスを発見し、「miffy (ミッピー: mfy) 変異マウス」と名付けました (図 3)。さらにこれが劣性突然変異であることを見だし、新規の突然変異マウス系統として確立しました。

(2) mfy 変異マウスにおける大脳皮質-脊髄回路の異常の発見

野生型マウスでは、左半身の動きは脳の右半球、右半身の動きは左半球が制御しています。左右の大脳皮質運動野から伸びた神経軸索は延髄で交差し、反対側の脊髄内の白質を下行、それぞれ必要な場所で髄質に入り、筋肉の動きを制御する末梢運動神経と直接あるいは間接的にシナプスを作り接続します。このとき、通常は脊髄内で左右が再び交差し混線するようなことはありません。ところが、**mfy** 変異マウスの大脳皮質-脊髄路をトレーサーで解析した結果、多くの軸索が脊髄正中線を越えて左右混線していることを発見しました (図 4)。

(3) **mfy** 変異マウスにおける脊髄内局所回路の異常の発見

歩行運動のようなリズムカルな運動は、中枢パターン発生器 (**central pattern generator, CPG**) とよばれる脊髄内の局所回路の制御を受けることが知られています。マウスの脊髄を培養しある種の刺激を与えると **CPG** の制御によって、野生型では左右の筋肉の動きを支配する神経間で交互の信号を発しますが、**mfy** 変異マウスではこれと異なり、左右で同調した信号を発していました (図 5)。どちらもマウスの歩行パターンと一致します。さらに、トレーサーを用いて **CPG** 回路を解析した結果、**mfy** 変異マウスでは多くの軸索が脊髄正中線を越えて左右混線していることを発見しました (図 6)。

(4) 原因遺伝子の同定

連鎖解析^{*8}によって原因遺伝子が存在する位置を染色体上にマッピングし、その領域内に存在する 30 の候補遺伝子を網羅的に解析しました。その結果、**mfy** 変異マウスのゲノムでは、 α キメリンという **Rac** 特異的な **Rho-GAP** の仲間の遺伝子が壊れていることがわかりました。

さらに、以下の実験により、 α キメリンが **mfy** 変異の原因遺伝子であることを確認しました。

- 1) α キメリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製しました。そのマウスを用いて、**mfy** 変異マウスと交配することにより、変異マウスに α キメリンが導入され、歩行の改善が見られました。
- 2) **ES** 細胞を用いた遺伝子標的法によって、 α キメリン遺伝子のノックアウトマウスを作製し、解析したところ、**mfy** 変異マウスとまったく同様の歩行異常、回路異常を示しました。

(5) シグナル伝達機構の解明

運動を制御する神経軸索の正中線での交差を防ぐ仕組みには、**B3** タイプのエフリン (エフリン **B3**) から **A4** タイプの **Eph** (**EphA4**) へのシグナルが重要なことが知られています。 α キメリンがこのシグナルに関与する可能性を以下の実験で検証しました。

- 1) 脳脊髄組織および培養神経細胞を用いて免疫染色を行いました。その結果、**EphA4** と α キメリンは運動を制御する神経軸索と一緒に存在していることがわかりました。
- 2) 免疫沈降^{*9}を行い、神経細胞で α キメリンと **EphA4** が結合していることを

見つけました。

- 3) 培養細胞に **EphA4** と α キメリンの両方を発現させると、エフリン刺激によって **Rac** の不活性化が誘導できました。しかし、**EphA4** と α キメリンのどちらか一方が欠ければ **Rac** 不活性化は起きませんでした。したがって、エフリン **B3-EphA4** シグナルが α キメリンを介して **Rac** の不活性化をすることが確認できました。
- 4) **EphA4** を発現する神経細胞を培養しエフリン **B3** で刺激すると、成長円錐崩壊 (= 軸索退縮) が起きることが知られています。しかし、**mfy** 変異マウス由来の神経細胞やノックダウン法で α キメリンのタンパク量を減らした神経細胞では、この反応が起きにくくなります。したがって、エフリン **B3-EphA4** のシグナルが成長円錐崩壊を誘導する反応を、 α キメリンが媒介していることが明らかになりました。

(6) まとめ

研究グループは、マウスと培養細胞系にまたがる包括的な解析を行うことによって、エフリン-**Eph** シグナルが神経回路の混線を防ぐ仕組みを、世界で初めて明らかにしました。成長円錐の表面にある **EphA4** が、脊髄正中線においてエフリン **B3** の"進入禁止"の標識を認識すると、成長円錐内で **EphA4** に結合している α キメリンが活性化されます。すると α キメリンは、**Rac** を不活性化します。**Rac** は、成長円錐を前進させる働きをするタンパク質であるため、その働きを抑制すると成長円錐の前進は止まります (図 7 左)。ところが、**mfy** 変異マウスでは、 α キメリンがないため成長円錐は止まることができず、正中線を越えて左右の神経が混線し、両足がそろった歩き方といった運動異常を生じます (図 7 右)。つまり、運動を制御する神経軸索の伸長を脊髄の正中線で止めるためには、"ブレーキを踏む"ことではなく、 α キメリンという **Rho-GAP** を介して、**Rac** というアクセル役を不活性化すること、つまり、"アクセルを放す"ことが鍵であることを見つけました。

3. 今後の期待

運動を制御する神経軸索が正中線を越えて左右混線すると左右の手足の使い分けができなくなりますが、今回の研究結果から、それを防ぐ仕組みが世界で初めて明らかになりました。このことは、脊髄損傷の再生医療研究においても重要な知見となると考えられます。また、ヒトでも、両手が同時に動いてしまうなどのミラー・ムーブメントを示す遺伝病が数家系知られていますが、いずれでも原因遺伝子はわかっていません。本研究成果がその原因究明の手がかりになる可能性があります。

また、エフリン-**Eph** のシグナルは、軸索誘導だけでなく、樹状突起やスパインの形成、記憶学習、体節形成、細胞移動、臓器形成、新脈管形成などさまざまなところで重要な働きをする分子ですが、その仕組みに関してはほとんどわかっていません。主に培養神経細胞を用いた研究からは、さまざまな生命現象においてエフリン-**Eph** のシグナルは、特異的な **Rho-GEF** を活性化し、それにより特異的な **Rho** ファミリーメンバーを活性化することによって機能していると考えられてきました。つまり、これまでは"アクセルを踏む"、"ブレーキを踏む"という操作だけでア

クチン細胞骨格を制御し機能していると想像されてきました。

一方、キメリンは **Rho-GAP** と呼ばれる分子群のメンバーであり、この分子群は **Rho** ファミリーを不活性化します。つまり、**Rho-GAP** のメンバーは、"アクセルを放す"、"ブレーキを放す"という働きをします。本研究により、エフリン-**Eph** シグナルの作用機構に、**Rho-GAP** という大きな分子群が関与することが初めて明らかになりました。このことは、さまざまな系でのエフリン-**Eph** のシグナルの働きの理解、関連した病気の治療法の開発にも貢献することが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 行動遺伝学技術開発チーム

副チームリーダー 岩里 琢治 (いわさと たくじ)

Tel : 048-467-9724 / Fax : 048-467-9725

脳科学研究推進部 嶋田 庸嗣 (しまだ ようじ)

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 エフリンと Eph(発音はイーピーエッチまたはエフ)

受容体型チロシンリン酸化酵素である Eph は、EphA1~EphA9, EphB1~EphB6 からなり、膜結合型タンパク質であるエフリン (エフリン A1~エフリン A6 とエフリン B1~エフリン B3) との間で双方向性の反発性シグナルを誘導する。エフリン-**Eph** シグナルは、幅広い生命現象で細胞間コミュニケーションを担い重要な働きをすることが知られている。運動を制御する神経回路を正中線で分離する仕組みには EphA4 とエフリン B3 が関与することが知られている。

※2 順遺伝学と逆遺伝学

順遺伝学 (フォワード・ジェネティクス) は、「表現型から遺伝子」という古典的な研究手法。最初に表現型 (異常) がわかっている、その原因となる遺伝子を探索するもの。たとえば、ヒトの遺伝病の原因遺伝子探索などがこれにあたる。逆遺伝学 (リバース・ジェネティクス) は「遺伝子から表現型」という研究手法であり、遺伝子の機能を知るために、トランスジェニック動物やノックアウト動物などを作ることなどがこれにあたる。

※3 Rho ファミリーG タンパク質 (Rho ファミリー)

アクチン細胞骨格を制御する鍵となる因子であり、RhoA と Rac はその主要メンバー。軸索の伸長および退縮は、成長円錐のアクチン線維の重合および脱重合によって引き起こされる。RhoA はアクチン脱重合を誘導し軸索を退縮させる機能、Rac はアクチン重合を誘導し軸索を伸長させる機能を持つ。

※4 α キメリン

Rho-GAP^{※7}のメンバーでRacを特異的に不活性化する。これまで生体での機能は不明だった。

※5 Rho-GEF

Rho ファミリーG タンパク質を活性化する機能を持つ分子群。RhoA を特異的に活性化するエフェキシン 1 もこれに属する。近年、培養細胞を用いた研究で、エフリン-Eph シグナルがさまざまな Rho-GEF を介して Rho ファミリーを活性化していることが報告されている。

※6 エフェキシン

Rho-GEF のメンバーで RhoA を特異的に活性化する。エフェキシンのノックアウトマウスには特別な異常は観察されていないので、生体での機能は不明である。

※7 Rho-GAP

Rho ファミリーG タンパク質を不活性化する機能を持つ分子群。Rac を特異的に不活性化する α キメリンもこれに属する。これまでエフリン-Eph シグナルに Rho-GAP が関与することは想定されていなかった。

※8 連鎖解析

順遺伝学で表現型の原因となる遺伝子を探索する手法の一つ。染色体上のマーカー（マイクロサテライトや SNP など）を利用して遺伝子変異の位置を染色体上にマッピングする。

※9 免疫沈降

A と B の二種類のタンパク質が細胞内で結合しているかどうかを調べるための生化学的な方法の一つ。細胞や組織を溶解し、A を特異的に認識する抗体を用いて A および A と結合するタンパク質を一緒に沈降させる。もし、その中に B が含まれていれば、A と B が結合していると結論づけられる。本研究で用いているような神経細胞や脳組織を用いた免疫沈降は難度が高いが、成功すれば結合していることの強い証拠となる。

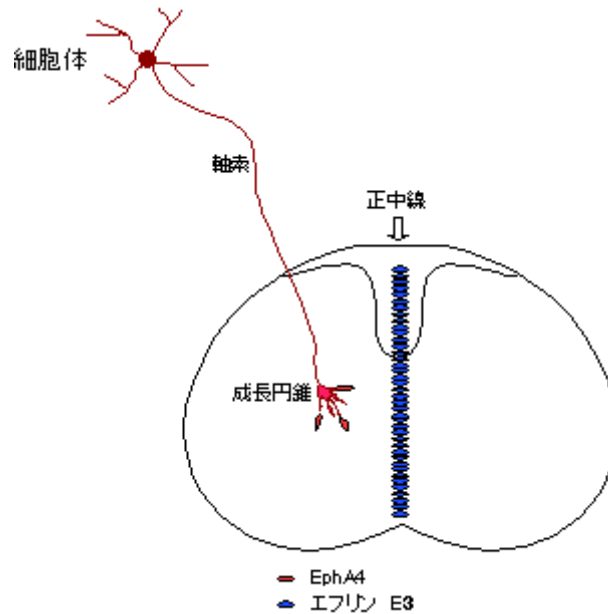
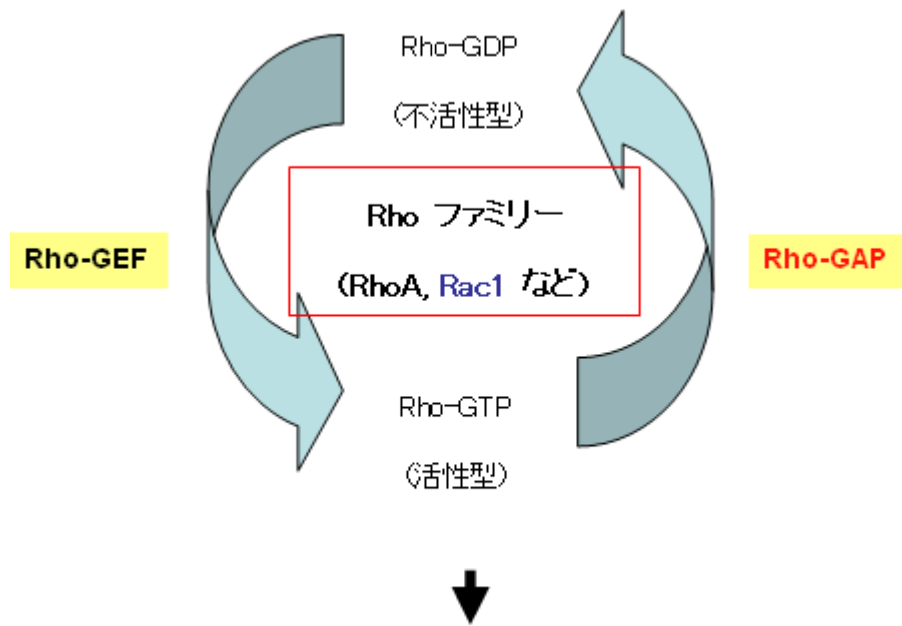


図1 脊髄正中線における運動制御系の神経軸索の反発

成長中の神経細胞は標的に向かって軸索を伸ばすが、その先端の成長円錐が脳や脊髄の中にあるさまざまな標識を認識しながら進むべき経路を見つける。エフリンはそうした標識の一つであり、Eph はエフリンの受容体である。運動を制御する神経回路を形成する軸索先端（成長円錐）には A4 タイプの Eph (EphA4) があり、脊髄の左右をわける正中線には B3 タイプのエフリン（エフリン B3）が存在する。成長円錐が正中線に突き当たると、エフリン B3 からの刺激を受けた EphA4 が成長円錐内に反発性のシグナルを誘導することによって、軸索伸長が止まることが知られている。しかし、エフリン B3-EphA4 シグナルがどのようにして軸索伸長を止めるのか（反発の生じる仕組み）についてはわかっていなかった。



アクチン細胞骨格の制御 (細胞の形態と運動の制御)

図2 Rho-GEF と Rho-GAP

低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーは、アクチン細胞骨格を制御する鍵となる分子群であり、Rho-GEF により活性化、Rho-GAP により不活性化される。 α キメリンは Rho-GAP に属する。なお、成長円錐における Rho ファミリーによるアクチンの重合と脱重合は、それぞれ軸索の伸長と退縮を引き起こす。近年、培養細胞を用いた研究で、さまざまな Rho-GEF (エフェキシンなど) がエフリン-Eph シグナル伝達機構で重要な働きをすることが次々と報告され、大きな注目を集めている。一方、エフリン-Eph シグナルにおける Rho-GAP の役割はまったく想定されていなかった。

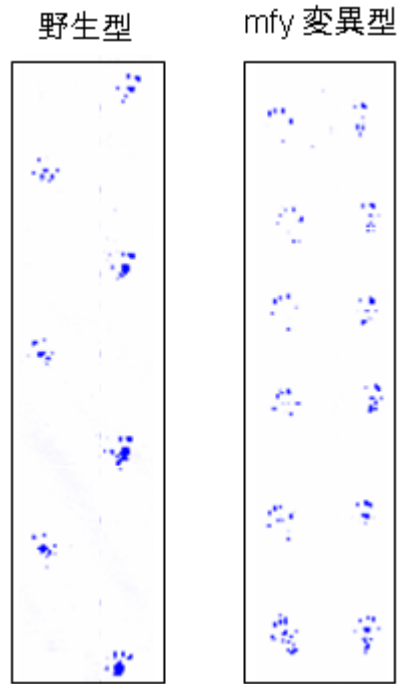


図 3 後肢の足跡

野生型マウスは左右の後肢を交互に出して歩くが、mfy 変異マウスは両足をそろえてウサギのように歩く。後肢に墨汁をつけて白い紙の上を歩かせた足跡。前肢も似たパターンを示す。

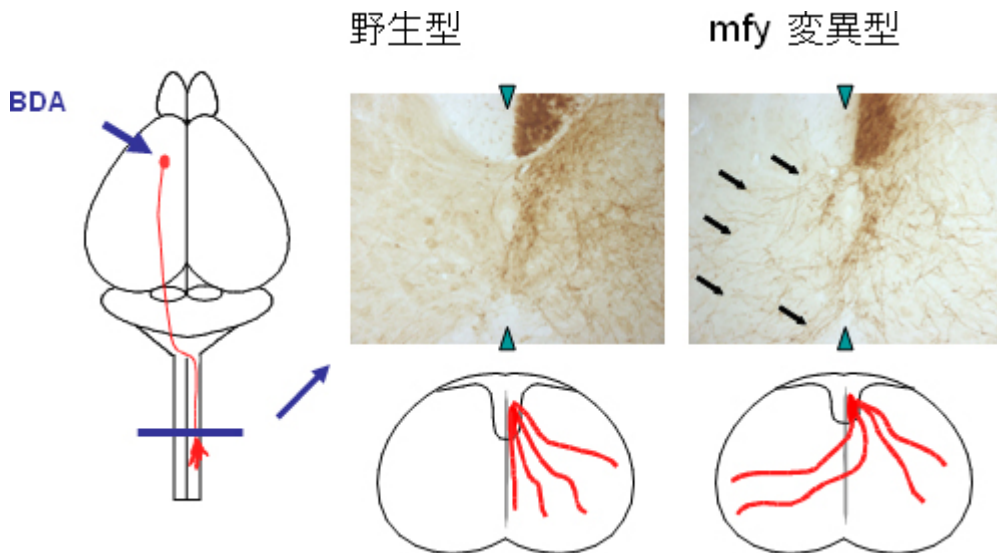


図 4 皮質-脊髄路のトレーサー解析

(左図) マウスの脳脊髄の模式図。大脳皮質運動野の脊髄投射神経細胞の細胞体（赤い点）から伸びる軸索（赤い線）は延髄で左右交差し、反対側の脊髄内の白質を下行する。そのとき軸索先端の成長円錐（掌状のもの）がさまざまな標識を認識して軸索を正しい標的まで誘導する。軸索走行の様子を解析するた

め左側の大脳皮質に BDA というトレーサーを注入した。

(右図) 脊髓の断面。下は模式図。野生型、*mfy* 変異マウスいずれも、軸索（茶色に染まっているもの）は右側の脊髓背側白質を下行し、それぞれ適当な箇所で髓質に入る。野生型の脊髓では軸索は正中線（矢頭）を交差することはないが、*mfy* 変異マウスでは多くの軸索が交差して左右混線が起きている。

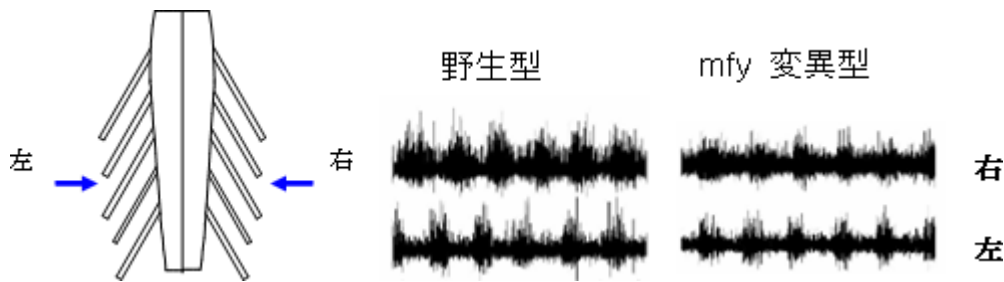


図 5 脊髓中枢パターン発生器 (CPG) 回路の電気生理学的解析

(左図) マウス脊髓の模式図。

(右図) 脊髓には歩行のリズムを制御する局所回路 (CPG) が存在する。培養脊髓を薬剤で刺激し、矢印 (左図) の位置で左右の神経の出力を記録した。野生型では左右交互のリズム、*mfy* 変異マウスでは左右同期したリズムを刻み、いずれも歩行のパターンと一致する。

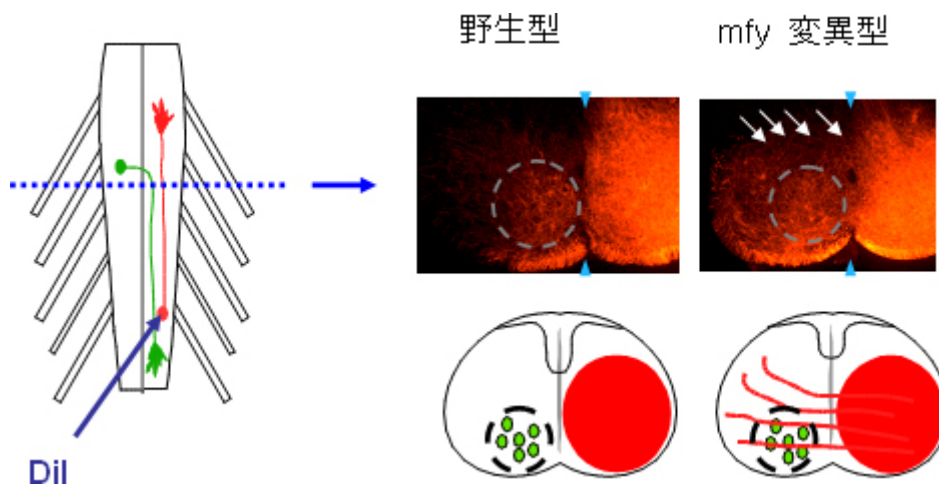


図 6 脊髓 CPG 回路の軸索走行の解析

DiI というトレーサーを脊髓片側に注入した実験。どちらのマウスでも左右の連絡をする神経軸索の走行に異常はみられない (緑) が、これらの神経細胞は *EphA4* を発現していない。一方、*EphA4* を発現する軸索 (赤) は野生型では正中線 (青い矢頭) を越えないが、*mfy* 変異マウスでは多くのものが正中線を横切っているのがわかる (白い矢印)。

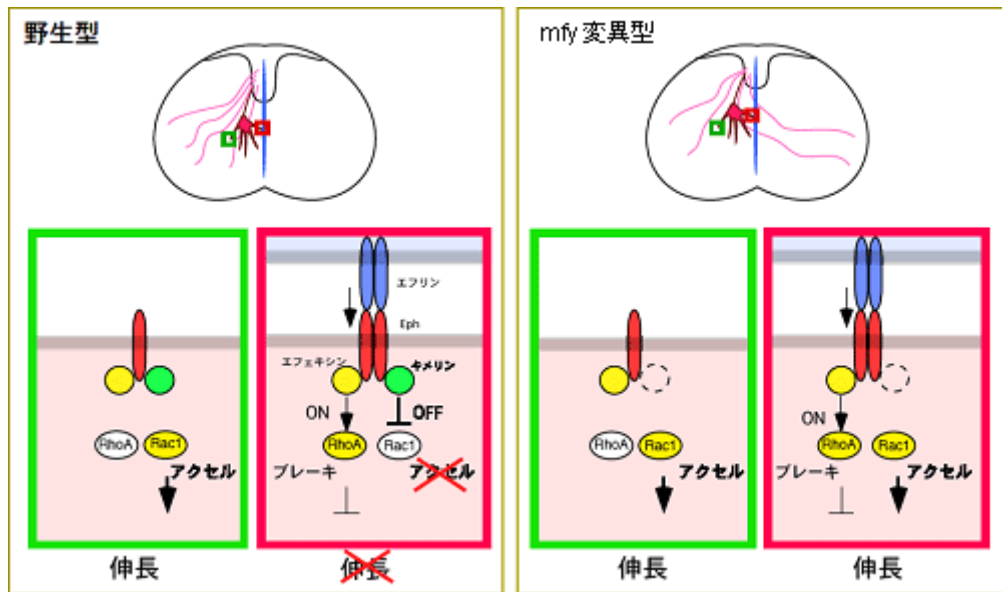


図 7 脊髓正中線における運動系神経軸索の反発

- (左図) 従来、培養神経細胞を用いた研究から、エフリン-Eph シグナルは、Rho-GEF であるエフェキシン (黄丸) を介して、RhoA というブレーキ役の Rho ファミリーメンバーを活性化して、軸索伸長を抑制すると想像されていた。つまり、これまでは、エフリン-Eph シグナルは、"ブレーキを踏んで軸索伸長を止める"と信じられていた。研究グループは、マウス運動制御系と培養神経細胞の両システムにまたがる包括的な解析を行い、 α キメリン (緑丸) という Rho-GAP を介して Rac というアクセル役の Rho ファミリーメンバーを不活性化すること、つまり、"アクセルを放す"ことがエフリン-Eph シグナル伝達の鍵であることを見つけた。
- (右図) *mfy* 変異マウスでは、エフェキシンの機能は正常でも、 α キメリンが欠如することによって、軸索は正中線で止まることができず左右混線する。(一方、エフェキシンのロックアウトマウスの神経回路には、異常がみられないことが報告されている。)