

細胞外シグナル分子リーリンの分解機構と生理的意義

河野孝夫, 服部光治

リーリンは脊椎動物にのみ存在する巨大な分泌タンパク質であり、脳の構築と機能発現に重要である。リーリンは特定の部位で分解（切断）を受け、実際の脳内では大半が分解産物として存在する。また、リーリン分解産物量と精神神経疾患の発症が相関することも知られている。しかしリーリン分解の分子機構はほとんど不明であり、リーリンの生理機能や病態への関与を理解する上での障害となっている。我々は最近、リーリン特異的分解の分子機構の一端を解明するとともに、最もN末端側における分解がリーリンの機能をスイッチオフすることを見出した。また、リーリンはC末端からわずか数残基の部位でも分解を受けること、およびこの分解がリーリンの拡散を調節する可能性を見出した。リーリン分解を理解することは、「巨大な分泌タンパク質の細胞外挙動と運命制御」および「脳の進化・巨大化に伴う、分泌タンパク質の拡散の変化」という二つの大問題の解決にも不可欠である。

はじめに

ヒトの脳は感情、思考、記憶といった高次機能を司り、ヒトがヒトらしくあるために必須である。脳が適切な高次機能を発現するためにはこれが正しく形成されることが必要であり、脳形成の破綻は多くの精神神経疾患の発症の原因またはリスクと考えられている。リーリンは正常な脳形成に重要な役割を担う分泌タンパク質である¹⁾。リーリンはショウジョウバエや線虫には存在せず、脊椎動物だけに存在する分子であることから、ある程度高度な脳の発生・機能に必要であると考えられる。実際近年、リーリンと精神神経疾患との関連（統合失調症、躁鬱病、自閉症、アルツハイマー病など）が数多く指摘されている²⁾。よって、リーリンの機能制御機構を解明することは、正常な脳の構築機構と機能発現機構を理解し、精神神経疾患発症機構の

解明や治療・診断法の確立につながると考えられる。本稿ではリーリンの特異的分解に焦点をあて、最近明らかになりつつある分解によるリーリンの機能制御機構とその意義、またリーリンの分解異常と精神神経疾患発症の関連について概説したい。

1. リーリンによるシグナル伝達機構とその重要性

リーリンは、3,461アミノ酸残基からなる巨大分泌タンパク質であり³⁾、リーリンを欠損したマウスでは、大脳皮質、海馬、小脳などで神経細胞の異常配置が認められる⁴⁾。ヒトでもリーリン欠損患者が知られており、大脳皮質にシワがない滑脳症と重篤な小脳形成不全を呈する⁵⁾。発生期において、リーリンは脳の最も表層側に存在するカハル・レチウス細胞（神経細胞の一種）から主に分泌される⁶⁾。分泌されたリーリンは、リポタンパク質受容体ファミリーに属するアポリポタンパク質E受容体2 (ApoER2) または超低比重リポタンパク質受容体 (VLDLR) と結合する^{7,8)}。その結果、FynなどのSrcファミリーチロシンキナーゼ (SFK) が活性化され、細胞内のアダプター様タンパク質 Dab1 のチロシンリン酸化が誘導される⁹⁻¹¹⁾。リーリン受容体ノックアウトマウス¹²⁾、Dab1欠損マウス^{13,14)}、Dab1のチロシンリン酸化部位に変異を導入したマウス¹⁵⁾、SFK欠

名古屋市立大学大学院薬学研究科病態生化学分野
(〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

Molecular mechanism and physiological significance of proteolytic cleavage of Reelin

Takao Kohno and Mitsuharu Hattori (Department of Biomedical Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1, Tanabe-dori, Mizuhoku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan)

損マウス¹⁶⁾は、どれもリーリン欠損マウスに酷似した脳形成異常を示す。よって、リーリン受容体依存的な Dab1 のチロシンリン酸化が正常な脳形成に必要であることはほぼ間違いない。しかしこの現象が、いつ、どの神経細胞で起きているのかについては諸説あり、統一された見解はない。我々は最近、リーリンとアルカリホスファターゼの融合プローブを用いて、細胞膜表面に提示されているリーリン受容体の定量的解析を行ったが、その結果からは、発生期の脳、小脳においては、リーリンの標的細胞はかなり広範な範囲に及ぶ可能性が示唆された¹⁷⁾。しかし、リーリンが機能を保持したままどれくらい拡散するのか、それを制御する分子機構が存在するのか否かについては、全く不明である。

一方近年、成体（または発生後期）の脳において、リーリンが神経細胞の成熟や機能発現に重要な機能を持つことを示唆する知見が多数報告されている。例えば、神経細胞の樹状突起形成^{18~22)}や、学習・記憶に重要なシナプス可塑性や長期増強^{23~25)}をリーリンが正に調節するとされている。また、リーリン遺伝子の多型やプロモーター領域のメチル化と、統合失調症、気分障害、自閉症の発症が関連することも複数のグループから報告されている²⁾。これらの

報告から、リーリンは、脳の発生のみならず、脳の高次機能を維持する上でも重要な役割を担うことが示唆される。しかし、成体におけるリーリンの機能については、今のところ、*in vivo* レベルにおける明確な証拠が得られているとは言い難い。

2. リーリンの構造と、各領域の機能

リーリンの構造は大きく三つに分けられる。すなわち、N末端領域、8回の繰り返し構造リーリンリピート(RR)、そして正電荷に富むC末端領域(CTR)である(図1)²⁶⁾。このうち、N末端領域はF-スポンジと弱い相同性を持つが、RRとCTRに関しては相同性を持つタンパク質は全く存在しない。よってリーリンにはファミリー分子は存在しないが、これは、神経発生に関わるタンパク質の多く(例えば Wnt, Eph, セマフォリン(semaphorin), ネットリン(netrin)など)が比較的大きなファミリーを形成していることと対照的である。リーリン受容体である ApoER2 と VLDLR への結合には RR5 と RR6 が必要十分である²⁷⁾。32 アミノ酸残基からなる CTR はかつて、リーリンの分泌に必要であると考えられていた²⁸⁾が、我々はこれが誤りであることを見出した²⁹⁾。そしてさらに、CTR は Dab1 のチ

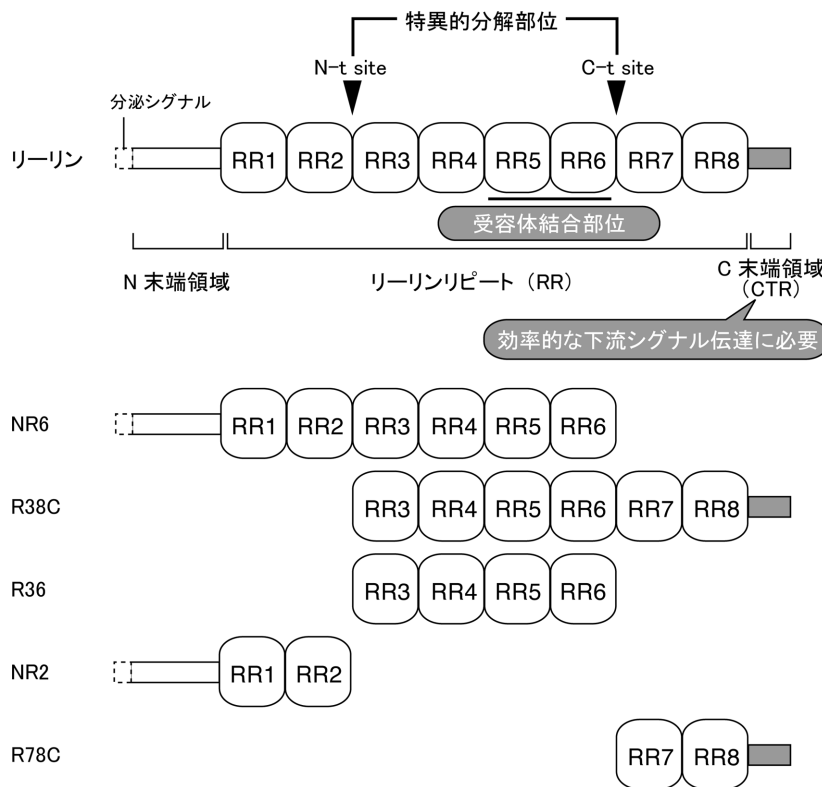


図1 リーリンの構造と特異的分解部位

リーリンはN末端領域、リーリンリピート(RR)、そしてC末端領域(CTR)からなる。リーリンはRR2とRR3の間付近(N-t site)と、RR6とRR7の間付近(C-t site)で特異的な分解を受ける。これにより五つのリーリン断片が生じる。

ロシンリン酸化を効率的に誘導するために重要であることを見出した²⁹⁾。CTRによるDab1のチロシンリン酸化効率化機構の詳細は未だ不明であるが、CTRはその直前に位置するRR8の高次構造を変化させること、構造変化したRR8が細胞膜上の未知なる共受容体に結合することでリーリンとリーリン受容体との結合を安定化する可能性が考えられる³⁰⁾。リーリンの下流シグナル伝達機構の詳細を理解するためには、この共受容体を同定することが大きな課題となる。また、N末端領域を欠損させてもDab1チロシンリン酸化誘導能は低下する³¹⁾。

3. リーリンの特異的分解部位

3-1. 細胞外及び細胞内におけるリーリンの分解

プロテアーゼによる分解は、基質タンパク質の生理活性調節において重要な役割を担う。神経発生に関与する分泌タンパク質・膜タンパク質の中では、神経細胞の軸索ガイダンス制御に重要なDCC³²⁾、セマフォリン³³⁾、エフリン(efrin) A2³⁴⁾などの生理活性が、プロテアーゼによる特異的分解により調節されている。また、細胞外における分解を担うプロテアーゼの側の研究³⁵⁻³⁷⁾からも、神経発生における細胞外タンパク質分解の重要性が証明されている。リーリンは神経発生に深く関与する分泌タンパク質の中ではおそらく最も巨大なものであり、その分解機構と生理的意義を理解することは非常に重要であると考えられる。

リーリンは、生体内で、RR2とRR3の間付近(N-t site)とRR6とRR7の間付近(C-t site)で分解を受けることが既に報告されている³⁸⁾。これらの分解により、図1に示したように五つの断片が生じる³⁹⁾。フレームシフト変異によりRR8の一部とCTRを欠くリーリンを発現するリーラーオルレアンマウス²⁸⁾では、リーリンは細胞外に分泌されていない⁴⁰⁾。このマウス脳内にはリーリンの分解断片が全く検出されない³⁸⁾。また、初代培養神経細胞の培養上清はリーリンを分解する活性を持つこと^{39,41)}ことから、リーリンは細胞外において、分泌型のプロテアーゼにより分解を受けることが強く示唆される。なお我々は、受容体に結合し細胞内に取り込まれたリーリンはエンドソーム内でN-t siteにおける分解を受けること、これにより生じる断片はRab11依存的なリサイクリング経路により細胞外に放出されることを見出した⁴²⁾。よって、リーリンは細胞外と標的細胞内の両方で分解を受け得ると考えられる。

3-2. リーリン分解を担うプロテアーゼ

N-t site及びC-t siteにおける分解を担うプロテアーゼを同定することは、リーリン分解の生理的意義を明らかにするために必須である。N-t siteとC-t siteを分解するプロテアーゼは異なることが示唆されている(詳細は後述)が、ともに未だ同定されていない。これまで、C-t siteにお

る分解を担うプロテアーゼの特徴は報告されていないが、N-t siteの分解を担うプロテアーゼの特徴については最近徐々に明らかになってきた。

N-t siteにおける分解を担うプロテアーゼとして、これまでに以下の二つの可能性が提示されてきた。1) メタロプロテアーゼファミリーに属するプロテアーゼがリーリンの分解を担う³⁸⁾。2) リーリン自身がセリンプロテアーゼ活性を持ち、これが自分自身やラミニンなど細胞外マトリックスタンパク質を分解している⁴³⁾。前者の可能性に関しては、金属(特に亜鉛)のキレート剤^{38,44)}や、メタロプロテアーゼ阻害剤GM6001の添加によりN-t siteにおけるリーリンの分解が阻害される³⁹⁾など、これを裏付ける報告が複数のグループからなされている。しかし、後者の可能性に関してはあまり検討されてこなかった。我々はリーリン自身のプロテアーゼ活性を再評価すべく、活性セリン残基と思われる残基に変異を導入し、リーリン自身を含む様々な基質に対する分解活性を検討した。その結果、以前の報告⁴³⁾と異なり、リーリンは、自身やラミニンを分解する活性をおそらく持たないと考えられた⁴⁵⁾。すなわち、リーリンのN-t site分解を担うのは、分泌型のメタロプロテアーゼであると考えて良いと思われる。

我々は、リーリンのN-t site分解を担うプロテアーゼの性状解析を進め、これが以下の二つの特徴を持つことを発見した⁴¹⁾。①プロプロテインコンベルターゼ(PC)ファミリーのプロテアーゼ(多くの分泌型プロテアーゼの成熟に必要)阻害下では、活性が検出されない。しかし、PCファミリー自身は、N-t site分解活性を持たない。②ヘパリンに強い親和性を持つ。よって、N-t site分解を担うのは、PCファミリーによって成熟化をうける、ヘパリン結合性のメタロプロテアーゼであると考えられる。現在、初代培養マウス大脳皮質神経細胞の培養上清からリーリンのN-t site分解を担うプロテアーゼの精製を試みており、有力な候補が得られつつある。精製過程において、リーリン分解活性のピークは常に一つであり(鈴木ら、未発表)、また、この活性画分はN-t siteは強く分解するがC-t siteは分解しない⁴¹⁾。よって、リーリンのN-t siteとC-t siteの分解を担うプロテアーゼは異なると考えられる。

3-3. リーリン N-t site 分解の生理的意義

これまで、複数の研究グループにより、リーリンの各領域や特異的分解がDab1チロシンリン酸化に必要であるか否かが検討された。久保らは、N末端領域の一部を欠くリーリン変異体は、全長リーリンに比べてDab1のチロシンリン酸化誘導能が低いことを見出した³¹⁾。これに対しJossinらは、Dab1のチロシンリン酸化誘導能にN末端領域は必要でなく、R36部分のみで十分(全長リーリンとほぼ同じレベルの活性を持つ)と報告した⁴⁶⁾。このように研

究グループにより、異なる見解が提唱される原因の可能性の一つとして、リン酸化された Dab1 は SFK を活性化すること（ポジティブフィードバック機構の存在）が考えられる^{10,11}。このため、実際には Dab1 チロシンリン酸化誘導能が低い変異体でも、添加濃度や神経細胞とのインキュベーション時間によっては、全長リーリンと同程度にまで Dab1 リン酸化を誘導してしまう可能性がある。よって、人工的なリーリン変異体の活性を調べる際には、十分注意することが必要である。もう一つ重要な点は、現在、N-t site 分解の部位はアミノ酸配列レベルでは判っていないことである。そのため、グループによってリーリン変異体作製の際に用いる「切れ目」が異なっており、厳密な比較が難しい。そしてこれら人工的リーリン変異体の活性は、生体内で生じるリーリン断片のそれとは異なる可能性もある。

我々は以上の点を考慮し、初代培養神経細胞上清中から部分精製した N-t site プロテアーゼにより全長リーリンを完全に分解し、その Dab1 チロシンリン酸化誘導能を解析した⁴¹。その結果、N-t site の分解は、リーリンの活性をほぼ完全に消失させることを見出した⁴¹。すなわち、N-t site における分解は、リーリンの下流シグナル活性を「スイッチオフ」することがわかった。

一方、リーリンの N-t site 分解が「スイッチオフ」以外の意義を持つ可能性も残されている。Jossin らによると、N-t site 分解を阻害する GM6001 存在下でマウス大脳スライスを培養すると、リーリン機能阻害の場合と同様の現象が観察される³⁹。しかもこのとき、スライス中における Dab1 のリン酸化量は減少する³⁹。このことは、少なくともスライス培養においては、N-t site 分解がリーリンの「機能」を亢進させることを意味している。Jossin らは、N-t site 分解により生じる中央断片 R36 だけがスライス中を拡散し、リーリン受容体を持つ細胞に到達できると考察している³⁹。しかし、GM6001 は広範なメタロプロテアーゼを阻害するので、観察された現象全てをリーリン分解阻害に帰することは多少無理があるかもしれない。また、Chameau らは、N-t site 分解によって生じる N 末端側の断片 (NR2) が、単独で、ApoER2/VLDLR 非依存的に、神経細胞の樹状突起形成を正に制御すると報告している²²。このときに、NR2 はインテグリンの機能を活性化すると想定されている²²が、その分子機構の詳細は不明である。また既に述べたように、NR2 断片はエンドサイトーシスされたリーリンから、エンドソーム内分解と再分泌によっても生じる⁴²。NR2 断片の生理的意義とその生成機構に関しては、*in vivo* での正当性も含めさらなる解析が必要と考えられる。

3-4. リーリン C-t site 分解の生理的意義

C-t site におけるリーリン分解の生理的意義を深く追究した報告はあまりない。N-t site と C-t site の両方で分解を受けた結果生じる中央断片 R36 は N-t site だけで分解を受けた結果生じる断片 R38C に比べて ApoER2 への結合能が低いこと⁴⁷、および、CTR は効率的なリーリンの下流シグナル伝達能に必要であること²⁹から、C-t site でのリーリン分解は N-t site での分解と同様にリーリンの下流シグナル伝達能を負に制御することが推察される。しかし興味深いことに、VLDLR に対する結合能は R36 と R38C の間で有為な差は認められなかった⁴⁷。最近、大脳皮質形成において ApoER2 と VLDLR は、それぞれ異なる役割を担うことがわかってきた⁴⁸。C-t site における分解が、ApoER2 と VLDLR に対する結合の違いを調節し、個別の機能発現に関与する可能性も考えられる。

4. リーリンの第3の分解部位

4-1. CTR site におけるリーリンの分解

前述の二つの分解部位は RR の境目付近で生じ、リーリンを大きく分断するので、ウエスタンブロッティング等の手法で容易に判別できる。我々は最近、これらに続く第3の分解部位を見出した(河野ら、投稿準備中)。発見のきっかけは、リーリンの C 末端にタグ (FLAG や GFP など) を付加した変異体は、培養上清中に分泌されるが、抗タグ抗体との反応性を失っている、という知見であった。このとき、分泌細胞内のリーリンは抗タグ抗体と反応することから、リーリンは分泌過程もしくは分泌後に、C 末端に極めて近い部位 (分子量の差では全く分別できないので) で分解を受けていることが強く示唆された。そこで CTR の一次構造を良く見てみると、ここに PC ファミリーの認識配列が存在することがわかった(図 2)。PC ファミリーには、Furin, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 そして PC7 の 7 種の酵素が存在することが知られており⁴⁹、塩基性アミノ酸に富んだ配列 (-Arg-X-Arg/Lys-Arg-↓, X は任意のアミノ酸、矢印は分解部位を示す) を認識し特異的に分解する⁵⁰。そこで PC ファミリーの阻害剤である decanoyl-RVKR-CMK の存在下で C 末端タグ付加リーリンを分泌させたところ、予想通り抗タグ抗体との反応性は回復した。また、PC ファミリーの酵素活性をほぼ欠失した細胞株 LoVo⁵¹ に C 末端タグ付加リーリンを発現させた場合は、阻害剤がなくても、抗タグ抗体と反応した。すなわち、リーリンは分泌過程または分泌後に、3,455 番目の Arg の C 末端側 (この部位を CTR site と名付けた) で分解を受け (図 2)、この分解により CTR の最後 6 アミノ酸残基 (SLRRYP) を欠くリーリン ($\Delta 6$ リーリン) が生じると考えられる。この分解が実際の脳でも生じるかどうかは重要な問題であったが、 $\Delta 6$ リーリンと完全長リーリンの分子

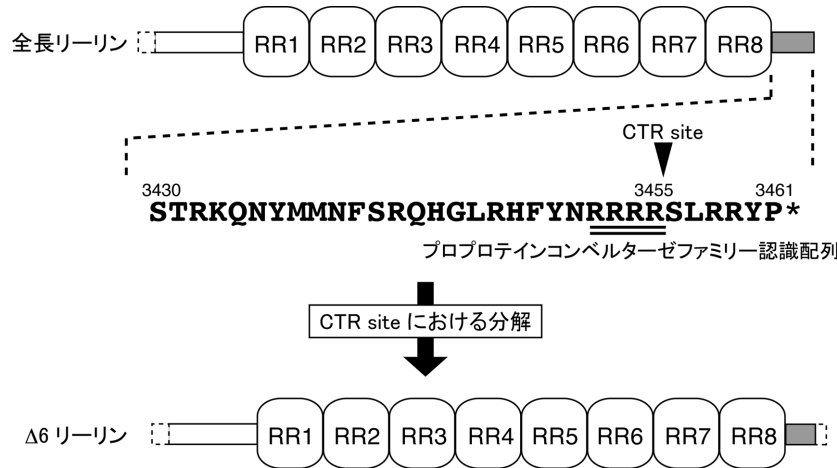


図2 リーリンの第3の分解部位
 リーリンはCTR内にプロプロテインコンベルターゼファミリーの認識配列を持つ。リーリンは3,455番目のアルギニンのC末端側(CTR site)で分解を受け、これによりCTRの最後6アミノ酸残基を欠くリーリン(Δ6リーリン)が生じる。

量の差がほとんどないため、検証が困難であった。そこで我々はCTR siteで分解されていない完全長リーリンだけを認識し、Δ6リーリンを認識しないモノクローナル抗体の作製を行った。幸いにも非常に良い抗体を得ることができ、マウスの発生に伴う分解の程度を定量的に解析することに成功した。その結果、Δ6リーリンはマウス脳内にも常に存在し、その割合は胎生期よりも出生直後のほうが高いことがわかった。

4-2. CTR siteにおけるリーリン分解の生理的意義

CTR siteでの分解は、3,461残基(実際には分泌シグナルは除かれるので、3,440残基程度か)のリーリンのうち、C末端のわずか6アミノ酸残基(全体の0.2%以下)だけを遊離するものであるが、非常に驚くべきことに、リーリンの性質を大きく変化させる。CTR siteで分解を受けていない完全長リーリンは、CTR siteで分解を受けたΔ6リーリンに比べて、細胞膜に強く結合する。これは、受容体結合部位(RR5-RR6)を含まないリーリン変異体を用いた実験においても観察されることから、完全長リーリンはリーリン受容体以外の未知分子と結合すること、およびCTR site分解はこの結合を抑制することが示唆される。しかし、CTR site分解は、リーリンのDab1リン酸化誘導能には影響を与えなかった。つまり、CTR site分解を受けていないリーリンにだけ強く結合する分子は、前述のDab1リン酸化誘導能に関与する共受容体^{29,30}とは異なることが推察される。

我々はCTR siteの分解が大脳皮質におけるリーリンの局在を制御する可能性を考え、完全長リーリンだけを認識するモノクローナル抗体を用い、その局在を免疫組織学的手法により調べた。その結果、完全長リーリンは大脳皮質

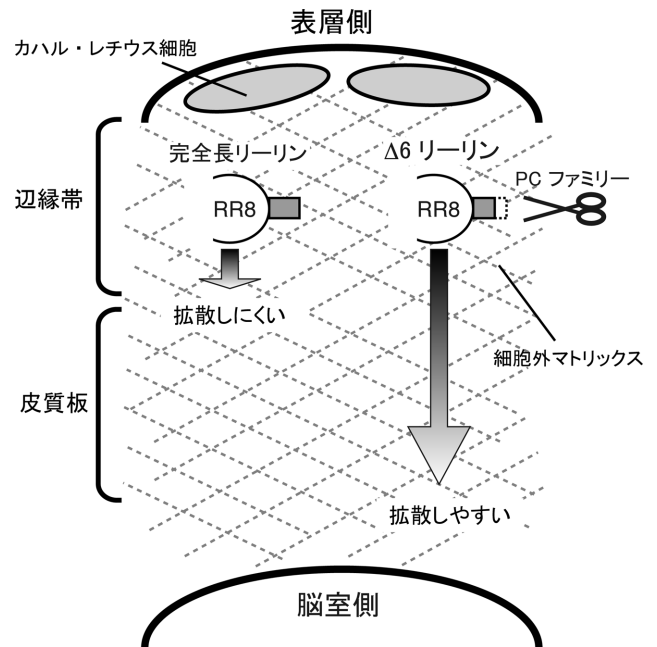


図3 CTR siteにおける分解によるリーリンの拡散制御モデル

においてカハル・レチウス細胞のごく近傍(辺縁帯)にのみ強く局在することがわかった。これまでに、Jossinらにより、RR7よりC末端側を持つリーリン全長または断片は辺縁帯に局在しやすいこと、一方、リーリンの受容体結合部位を含む中央断片は、辺縁帯だけでなく皮質板まで拡散することが提唱されている³⁹。このモデルは、今回我々が得た結果と矛盾しない。リーリンの局在を制御する機構の一つとして、CTR site分解により、リーリンと細胞膜または細胞外マトリックスとの結合が制御されるということ、我々は想定している(図3)。前述のように、CTR site分解の割合は皮質板が肥厚する胎生後期から生後にかけて

高くなることから、拡散性の高いリーリンを産生するためにCTR site 分解が増大する可能性が示唆される。

最後に、一つ問題点を指摘しておきたい。これまで、我々を含めた多くの研究グループはHEK293T細胞に発現させたリーリンを用いることで、リーリンの下流シグナルや生理機能を研究してきた^{7,9,29,52,53)}。しかし上述のように、HEK293T細胞が分泌するリーリンの大部分(実際にはほぼ100%)は、CTR site 分解を受けていることが我々の研究により明らかになった。すなわち、これまでの研究は全て、(CTR site 分解を受けていない)完全長リーリンではなく、細胞膜への親和性が低い $\Delta 6$ リーリンの機能を見ていたことになる。今後、リーリンの下流シグナル経路や生理機能を解明する上で、CTR site 分解を考慮した研究が必要になると考えられる。

5. リーリンの分解と精神神経疾患との関係

以上のように、ここ数年の研究から、リーリンの機能が特異的分解により調節される可能性が大きくなってきた。生体内においてリーリンの分解が亢進もしくは低下した場合は、リーリンの機能不全が起これ、これが脳形成機構や高次機能発現の破綻を招く可能性がある。実際、表1にまとめたように、精神神経疾患患者の脳内や血中でリーリンの分解断片が増加もしくは減少する知見が報告されている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。ここでは特に、リーリンとの関連が注目されているアルツハイマー病と記憶障害におけるリーリンの分解について述べたいと思う。

記憶障害や認知障害を主症状とするアルツハイマー病患者の前頭皮質や脳脊髄液中では、NR2断片(N-site分解によって生じる)の量が健常者に比べ増加していた^{54,55)}。一方、全長リーリントタンパク質の量やNR6断片量については健常者と比べて有為な差は認められなかったが、リーリンmRNAの量はアルツハイマー病患者において増加していた⁵⁴⁾。これらの知見は、アルツハイマー病患者の脳内では、まずリーリン全長タンパク質の産生が増加し、さらにN-t site 分解が亢進していることを示唆する。また、アルツハイマー病の原因とされるアミロイドベータ($A\beta$)の前駆タンパク質(APP)を過剰発現したトランスジェニックマウスでは、広範な神経細胞の脱落に先だって、リーリントタンパク質の量が減少する⁵⁷⁾。よって、リーリン機能低下はアルツハイマー病の発症の結果ではなく、成因の一つ

である可能性が高い。 $A\beta$ の産生や毒性発現におけるリーリンの関与は、分子レベル・細胞レベルにおいて良く研究されている。例えば、リーリンによるDab1リン酸化は、APPタンパク質の細胞膜上での発現量と、その分解($A\beta$ の産生には寄与しない部位での分解)を増大させ、これにより $A\beta$ の産生を減少させることが報告されている^{58,59)}。また、 $A\beta$ とリーリンは、シナプス可塑性の制御において拮抗的(リーリンは増強、 $A\beta$ は抑制)に働く⁶⁰⁾。さらに、人種を問わずアルツハイマー病最大の危険因子として知られるのがApoEの多型(ApoE4が高リスク)であるが、これとリーリンの関係もごく最近報告された⁶¹⁾。すなわち、ApoE4を結合したApoER2は細胞内から神経細胞膜上へリサイクルされないため、結果として機能的なApoER2の量が減少する。これにより、やはりApoER2を受容体とするリーリンによるシナプス機能増強作用が発揮されなくなる。つまり、ApoE4は、リーリンの機能を間接的に阻害することで、 $A\beta$ の産生を増加させたり、 $A\beta$ の毒性を強めるという可能性が示唆された。ApoE4がなぜアルツハイマー病発症を増加させるのかについては多くの説があるが、受容体を同じくするリーリンとの関係については今後も深く解析されていくと予想される。

以上のことを総合すると、リーリンが「正常に機能する(これが具体的に何であるのかは、まだ完全には理解されていないが)」ことは、アルツハイマー病や記憶障害の発症を抑制する方向に働くこと、言い換えると、リーリンのN-t site 分解亢進(リーリンの機能を消失させる⁴¹⁾)は、これらの病態に対して増悪的に働く可能性が強く示唆される。よってN-t site 分解を特異的に阻害する化合物は、これらの病態を改善する治療薬になる可能性がある。そのためまず重要なことはN-t site 分解を担うプロテアーゼの同定であろう。また、脳脊髄液中のNR2断片量の増加は、アルツハイマー病だけでなくパーキンソン病や核上性麻痺の患者でも認められた⁵⁴⁾。よってNR2断片量を調べることはこれら精神神経疾患を客観的に診断する上でのバイオマーカーになることも期待される。

また、一つ指摘しておかなければならないことは、「リーリンの機能低下はアルツハイマー病など精神神経疾患の原因または要因か？」という問に答えるための、個体レベルの直接的な実験はされていないということである。これを行うには、「生後でのみ、リーリンの機能が低下す

表1 精神神経疾患におけるリーリン分解断片の異常産生

精神神経疾患名	リーリンmRNA	全長リーリン	NR6	NR2	組織	文献
アルツハイマー病				↑	脳脊髄液	55
	↑	↔	↔	↑	脳脊髄液、前頭皮質	54
双極性障害		↔	↓	↓	血中	56
大うつ病性障害		↔	↔	↓	血中	

る」または「脳の構築は正常であるが、リーリン機能は低下している」というマウスが必要になるが、そのようなマウスは現在のところ存在しない。リーリンの遺伝子が巨大(cDNAは約11 kbp, ゲノムDNAは450 kbp以上)かつ複雑な構造を持つ(エキソンが64個以上)ことから、トランスジェニックマウスやゲノム遺伝子改変マウスの作製は困難であり、世界を見渡しても成功しているグループはほとんどない。リーリンのヘテロ欠損マウス(リーリントタンパク質量は、おおむね半分になっている)を用いた研究は行われているが、やや微妙な結果であるものが多い。リーリンの条件的ノックアウトマウスや、薬剤誘導によりリーリンの発現をコントロールできるマウスの完成が待ち望まれる。

6. リーリンの分解に関する研究が細胞生物学・神経科学に与えるインパクト

最後に、本稿で述べたような研究が単にリーリンだけの分解や機能制御メカニズムの理解だけにとどまらず、二つの生化学的・細胞生物学的大問題に関する視点から考えても重要であることを述べる。

一つ目は、「巨大分泌タンパク質の細胞外挙動と運命はどのように制御されているのか?」という問題である。神経ネットワーク形成の分野に限っても、セマフォリン、ネトリン、スリット(slit)など、基本的には拡散し、濃度に応じて効果を発揮するとされる重要タンパク質は多い。そのため、分解や拡散はある程度制御されていなければおかしいと思われるが、この問題に正面から取り組んだ研究の成功例は少ない。脊髄におけるネトリン拡散を調べた研究⁶²⁾では、ネトリンの濃度勾配が可視化されているが、分解産物については触れられていない。また、軸索発芽因子として知られるスリットは特異的な分解を受け、その結果生じた断片の生物活性や拡散性が(少なくとも*in vitro*では)異なることが知られている⁶³⁾。しかし、この分解を担うプロテアーゼは同定されていないため、ノックアウト動物等を用いて分解の生理的意義を遺伝学的解析した研究はない。セマフォリン、ネトリン、スリットと異なり、リーリンにはファミリー分子もなく、またこれを分解するプロテアーゼもおそらく単一である。リーリンでの分解・拡散の研究が、この関連分野での大きな参考になることが期待される。

二つ目は、「脳の進化・巨大化に伴って分泌タンパク質の拡散や機能範囲が変化すべきとき、それはどのように達成されるのか?」という問題に関することである。マウスにおいても、リーリンは意外に遠くまで効果を発揮する^{17,39)}とする説は有力であるが、より脳が大きい動物でも「遠く」まで効くのだろうか? もしそうなら、それはどのように達成されるのだろうか? ネトリンやセマフォリン

の効果範囲も、脳の巨大化とともに増大するのだろうか? これらの問題もほとんど手つかずのまま残されている。もちろん、分解・拡散の程度や制御機構は変化せずに、分泌量や受容細胞の感受性を変化させることで、脳の巨大化・複雑化に伴い機能発現の範囲を変えることは可能であろう。リーリンの研究は、脳の巨大化と進化の問題に対しても、ヒントを与えてくれるかもしれない。ちなみに、ヒト以外の哺乳類ではほぼ完全に保存されているが、ヒトでのみ大きく異なる配列を持つRNA(すなわち、ヒト脳の構造・機能の発現に関与すると予想される)として同定されたHAR1は、ヒト脳において、リーリンと同様にカハル・レチウス細胞に特異的に発現し、リーリンを中心とした情報伝達機構の制御に関与することが示唆されている⁶⁴⁾。他臓器に比べ脳が巨大化した動物であるヒトにおいて、リーリンの発現・拡散・分解がどのように調節されているのかは非常に興味深い問題である。

おわりに

リーリンの発見から現在までの約15年間で、リーリン受容体や多数の細胞内下流シグナル分子が報告された。一方で、本稿で述べたように特異的な分解によりリーリンの機能が調節される知見が最近見出されたが、リーリンの分解機構や生体内における意義に関しては依然として不明な点が多い。また、精神神経疾患ではなぜリーリンの分解や機能の異常が見られるのか、リーリンの分解異常は精神神経疾患発症の原因なのか、または結果なのかについても、不明である。これらの問題を解決するためには、リーリンの分解を担うプロテアーゼを同定後にプロテアーゼ欠損マウスやリーリン変異体(非切断型)ノックインマウスを作製すること、さらにはそれらを病態モデルマウスと交配し解析することが重要であると考えられる。今後、生体内におけるリーリンの分解の意義が解明され、精神神経疾患の治療や診断法の確立につながるものが期待される。

文 献

- 1) Tissir, F. & Goffinet, A.M. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*, 4, 496-505.
- 2) Fatemi, S.H. (2005) *Mol. Psychiatry*, 10, 251-257.
- 3) D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., & Curran, T. (1997) *J. Neurosci.*, 17, 23-31.
- 4) Curran, T. & D'Arcangelo, G. (1998) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26, 285-294.
- 5) Hong, S.E., Shugart, Y.Y., Huang, D.T., Shahwan, S.A., Grant, P.E., Hourihane, J.O., Martin, N.D., & Walsh, C.A. (2000) *Nat. Genet.*, 26, 93-96.
- 6) Nakajima, K., Mikoshiba, K., Miyata, T., Kudo, C., & Ogawa, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 8196-8201.
- 7) D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., & Curran, T. (1999) *Neuron*, 24, 471-479.

- 8) Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., & Herz, J. (1999) *Neuron*, **24**, 481-489.
- 9) Howell, B.W., Herrick, T.M., & Cooper, J.A. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 643-648.
- 10) Bock, H.H. & Herz, J. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 18-26.
- 11) Arnaud, L., Ballif, B.A., Forster, E., & Cooper, J.A. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 9-17.
- 12) Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., & Herz, J. (1999) *Cell*, **97**, 689-701.
- 13) Yoneshima, H., Nagata, E., Matsumoto, M., Yamada, M., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., & Mikoshiba, K. (1997) *Neurosci. Res.*, **29**, 217-223.
- 14) Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J.A., Goldowitz, D., & Curran, T. (1997) *Nature*, **389**, 730-733.
- 15) Howell, B.W., Herrick, T.M., Hildebrand, J.D., Zhang, Y., & Cooper, J.A. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 877-885.
- 16) Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., & Cooper, J.A. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 8578-8586.
- 17) Uchida, T., Baba, A., Perez-Martinez, F.J., Hibi, T., Miyata, T., Luque, J.M., Nakajima, K., & Hattori, M. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 10653-10662.
- 18) Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., & D'Arcangelo, G. (2004) *Neuron*, **41**, 71-84.
- 19) Jossin, Y. & Goffinet, A.M. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 7113-7124.
- 20) Matsuki, T., Pramatarova, A., & Howell, B.W. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 1869-1875.
- 21) Niu, S., Yabut, O., & D'Arcangelo, G. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 10339-10348.
- 22) Chameau, P., Inta, D., Vitalis, T., Monyer, H., Wadman, W.J., & van Hoof, J.A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 7227-7232.
- 23) Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J.M., Forster, E., Sweatt, J.D., & Herz, J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 39944-39952.
- 24) Beffert, U., Weeber, E.J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J.D., Li, W.P., Adelman, G., Frotscher, M., Hammer, R.E., & Herz, J. (2005) *Neuron*, **47**, 567-579.
- 25) Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T.S., Kavalali, E.T., Bezprozvanny, I., & Herz, J. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 8209-8216.
- 26) D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., & Curran, T. (1995) *Nature*, **374**, 719-723.
- 27) Yasui, N., Nogi, T., Kitao, T., Nakano, Y., Hattori, M., & Takagi, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 9988-9993.
- 28) de Bergcyck, V., Nakajima, K., Lambert de Rouvroit, C., Naerhuyzen, B., Goffinet, A.M., Miyata, T., Ogawa, M., & Mikoshiba, K. (1997) *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **50**, 85-90.
- 29) Nakano, Y., Kohno, T., Hibi, T., Kohno, S., Baba, A., Mikoshiba, K., Nakajima, K., & Hattori, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 20544-20552.
- 30) Kohno, T., Nakano, Y., Kitoh, N., Yagi, H., Kato, K., Baba, A., & Hattori, M. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 3043-3053.
- 31) Kubo, K., Mikoshiba, K., & Nakajima, K. (2002) *Neurosci. Res.*, **43**, 381-388.
- 32) Gallo, M.J. & Tessier-Lavigne, M. (2000) *Science*, **289**, 1365-1367.
- 33) Adams, R.H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H., & Puschel, A.W. (1997) *EMBO J.*, **16**, 6077-6086.
- 34) Hattori, M., Osterfield, M., & Flanagan, J.G. (2000) *Science*, **289**, 1360-1365.
- 35) Ohno, M., Hiraoka, Y., Matsuoka, T., Tomimoto, H., Takao, K., Miyakawa, T., Oshima, N., Kiyonari, H., Kimura, T., Kita, T., & Nishi, E. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 1506-1513.
- 36) Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C.P., Glatzel, M., De Strooper, B., & Saftig, P. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 4833-4844.
- 37) Yasunaga, K., Kanamori, T., Morikawa, R., Suzuki, E., & Emoto, K. (2010) *Dev. Cell*, **18**, 621-632.
- 38) Lambert de Rouvroit, C., de Bergcyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., & Goffinet, A.M. (1999) *Exp. Neurol.*, **156**, 214-217.
- 39) Jossin, Y., Gui, L., & Goffinet, A.M. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 4243-4252.
- 40) Derer, P., Derer, M., & Goffinet, A. (2001) *J. Comp. Neurol.*, **440**, 136-143.
- 41) Kohno, S., Kohno, T., Nakano, Y., Suzuki, K., Ishii, M., Tagami, H., Baba, A., & Hattori, M. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 93-97.
- 42) Hibi, T. & Hattori, M. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 1299-1303.
- 43) Quattrocchi, C.C., Wannenes, F., Persico, A.M., Ciafre, S.A., D'Arcangelo, G., Farace, M.G., & Keller, F. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 303-309.
- 44) Lacor, P.N., Grayson, D.R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E., & Guidotti, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 3556-3561.
- 45) Kohno, T. & Hattori, M. (2010) *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1047-1049.
- 46) Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C., & Goffinet, A.M. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 514-521.
- 47) Hibi, T., Mizutani, M., Baba, A., & Hattori, M. (2009) *Neurosci. Res.*, **63**, 251-258.
- 48) Hack, I., Hellwig, S., Junghans, D., Brunne, B., Bock, H.H., Zhao, S., & Frotscher, M. (2007) *Development*, **134**, 3883-3891.
- 49) Thomas, G. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 753-766.
- 50) Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.*, **327**, 625-635.
- 51) Takahashi, S., Nakagawa, T., Kasai, K., Banno, T., Duguay, S. J., Van de Ven, W.J., Murakami, K., & Nakayama, K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 26565-26569.
- 52) Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H.H., & Frotscher, M. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 288-299.
- 53) Jossin, Y. & Goffinet, A.M. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, RC183.
- 54) Botella-Lopez, A., Burgaya, F., Gavin, R., Garcia-Ayllon, M. S., Gomez-Tortosa, E., Pena-Casanova, J., Urena, J.M., Del Rio, J.A., Blesa, R., Soriano, E., & Saez-Valero, J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 5573-5578.
- 55) Saez-Valero, J., Costell, M., Sjogren, M., Andreasen, N., Blennow, K., & Luque, J.M. (2003) *J. Neurosci. Res.*, **72**, 132-136.
- 56) Fatemi, S.H., Kroll, J.L., & Stary, J.M. (2001) *Neuroreport*, **12**, 3209-3215.
- 57) Chin, J., Massaro, C.M., Palop, J.J., Thwin, M.T., Yu, G.Q., Bien-Ly, N., Bender, A., & Mucke, L. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 2727-2733.
- 58) Hoe, H.S., Tran, T.S., Matsuoka, Y., Howell, B.W., & Rebeck, G.W. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 35176-35185.
- 59) Hoe, H.S., Minami, S.S., Makarova, A., Lee, J., Hyman, B.T.,

- Matsuoka, Y., & Rebeck, G.W. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 6288–6299.
- 60) Durakoglugil, M.S., Chen, Y., White, C.L., Kavalali, E.T., & Herz, J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 15938–15943.
- 61) Chen, Y., Durakoglugil, M.S., Xian, X., & Herz, J. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 12011–12016.
- 62) Kennedy, T.E., Wang, H., Marshall, W., & Tessier-Lavigne, M. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 8866–8874.
- 63) Chedotal, A. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **621**, 65–80.
- 64) Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S., Pedersen, J.S., Katzman, S., King, B., Onodera, C., Siepel, A., Kern, A.D., Dehay, C., Igel, H., Ares, M., Jr., Vanderhaeghen, P., & Haussler, D. (2006) *Nature*, **443**, 167–172.
-