

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of the molecular mechanism that mediate Reelin signaling

和 訳 リーリンシグナルを伝達する分子メカニズムの解析

指導教官 御子柴 克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月 入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 久保 健一郎

哺乳類の中樞神経系では、大脳、小脳、海馬など、神経細胞が脳の表面に並行して規則正しく配置する層構造が見られる。このうち大脳皮質では、各々の層毎に特徴的な形態と繊維連絡をもつ神経細胞群が整然と配置する6層の多層構造が形成される。この多層構造の各層内の神経細胞は、脳室近く（脳室帯）で誕生し、脳表面の軟膜方向へ向かって移動し、規則的な配列をとって層構造を形成する。常染色体劣性遺伝を示すリーラー(*reeler*)突然変異マウスは、この神経細胞の配置が乱れて全体として逆転することから、約半世紀前より多くの研究者に研究されてきた。最近、このリーラーマウスの変異遺伝子座と、そこに存在するリーリン (*reelin*) 遺伝子が同定された。*reelin* mRNA は、3461 アミノ酸から成る蛋白質をコードする。Reelin 蛋白質は、分子量が 400k に及ぶ細胞外マトリックス様分子で、脳発生過程において、大脳皮質の最表面に位置する Cajal-Retzius 細胞から分泌される。本研究において申請者は、この Reelin 分子を中心に、脳皮質形成を制御する分子メカニズムについて解析した。

近年、細胞内のリン酸化アダプター蛋白質である Disabled1 (Dab1)の変異がリーラーと同様の表現型を示すことが発見され、Dab1 が Reelin のシグナルカスケードの下流に存在することが示唆された。実際、神経細胞の分散培養に Reelin を添加すると、Dab1 のチロシンリン酸化が誘導される。これらのことから、細胞外に分泌された Reelin が、細胞表面上のなんらかの受容体に結合して、細胞内の Dab1 のリン酸化を誘導することが予想された。そこで、申請者は、Reelin 分子が結合する蛋白質をスクリーニングするこ

とにより、Reelin のシグナル伝達に必須な分子の同定を試みた。

cDNA library を株化細胞 (293T) に導入・発現させ、Reelin をコートした培養皿上にまいて、洗浄後、残った細胞から cDNA を回収する作業をくり返すことにより、Reelin に結合する分子を持つ細胞を濃縮した。その結果、意外にも *reelin* cDNA そのものが次第に濃縮されてくることを見いだした。この結果は、Reelin 分子間のホモフィリックな結合の存在を示唆したので、この Reelin 同士のホモフィリックな結合を、異なったエピトープタグをつけた Reelin 分子の免疫共沈降によって生化学的にも証明した。すなわち、FLAG タグまたは HA タグをつけた Reelin を混合し、FLAG タグで免疫沈降を行うと、HA タグをつけた Reelin も沈降した。FLAG タグをつけた Reelin がない時には HA タグをつけた Reelin は落ちてこず、FLAG タグを付けた Reelin が HA タグをつけた Reelin と会合していることが証明できた。

そこで次に、Reelin 分子は何分子が互いに会合するのかを検討した。Reelin は単量体でも分子量 400k の大きな蛋白質であることから、Reelin 分子を電気泳動する際にアガロース PAGE 法を用いることにより、会合体の分子量を調べた。無血清条件下で培地中に分泌された Reelin は、還元剤の非存在下では、2 量体に当たる分子量にシフトした。これは架橋剤を用いても同様で、3 量体以上の多量体は検出されなかった。血清存在下ではさらに大きな分子量をとりうるが、多くは 2 量体として存在するという結果が得られた。脳のサンプルを用いても同様の結果が得られ、生体内でも S-S 結合による 2 量体を基本構造として存在すると考えられた。

丁度この頃、他研究者により、偶然に、リポ蛋白質の受容体である very low density lipoprotein receptor (VLDLR) と、ApoE receptor 2 (ApoER2) のダブルノックアウトマウスが、リーラーと同様の表現型を示すことが見いだされた。そこで申請者が独自に検証した結果、ApoER2 は直接 Reelin に結合することが生化学的に明らかになった。リポ蛋白質受容体は、細胞内で Dab1 と結合することが既に知られていたことから、以上の結果は、2 量体の Reelin 会合体が受容体に結合し、細胞内の Dab1 をチロシンリン酸化するシグナル伝達経路の存在を強く示唆した。さらに現在までに、cadherin-related neuronal receptors (CNRs) と alpha3beta1 integrin も生化学的に Reelin に結合する受容体として報告されている。しかし、これらの受容体はいずれも細胞内にチロシンキナーゼ活性をもたないため、Reelin が如何に Dab1 をチロシンリン酸化するかが、次に明らかにされるべき最も重要な問題となった。

さて、Reelin が互いに会合することは、細胞外において、複数の Reelin 受容体がりガンドを介して架橋される可能性を示唆する。また、Dab1 は、細胞内のチロシンキナーゼ

である Src ファミリーチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化を受けうることが既に試験管内では知られていた。果たして Reelin によって誘導される Dab1 のチロシンリン酸化が Src ファミリーチロシンキナーゼによるものであるか否かを検証するために、Src ファミリーの阻害剤である PP2、及び対照として PP3 で処理して、リーリンによる Dab1 のチロシンリン酸化誘導に与える影響を調べた。PP2 で処理した際にのみ、リーリンによる Dab1 のチロシンリン酸化誘導が特異的に阻害された事から、培養細胞において Dab1 が Src ファミリーチロシンキナーゼによってリン酸化されることが初めて確かめられた。そこで、申請者は、Src ファミリーのチロシンキナーゼが濃縮されていて、細胞膜上の受容体の架橋によりシグナル伝達分子が集積する、細胞膜上のラフト構造が、Reelin のシグナル伝達に関わっているのではないかと仮説を立てた。ラフトは、界面活性剤不溶性糖脂質複合体 (detergent-insoluble glycolipid-rich complexes, DIG) とも呼ばれ、コレステロールとスフィンゴ糖脂質によって作られる特異な構造体である。低温で界面活性剤に不溶性で、密度勾配にかけると浮遊性画分として回収される。そこでまず、Dab1 がラフトでチロシンキナーゼと共存しているかどうかを調べてみた。

マウス胎仔の脳からラフト画分を精製し、Western Blot により解析すると、報告されていたように Src ファミリーのチロシンキナーゼはラフト画分に多く存在した。Dab1 はラフト画分には少量しか含まれなかったが、Dab1 に特異的な抗体で免疫沈降により Dab1 を精製したところ、ラフト画分に存在する Dab1 は可溶性画分よりはるかに少ないにも関わらず、チロシンリン酸化はむしろ全体量としても多く、ラフトで Dab1 が高度にリン酸化されていることが示された。

次に、Dab1 のラフトへの局在が Reelin に依存しているか否かを調べるために、*reeler* の皮質細胞を初代培養して、Reelin を添加した。その結果、最初は可溶性画分に存在していた Dab1 が、Reelin 処理により時間経過とともにラフト画分に移行することを発見した。このとき、可溶性画分とラフト画分から Dab1 を免疫沈降してみると、Dab1 蛋白質あたりのチロシンリン酸化は、ラフト画分において五倍程度亢進していた。

次の問題は、Dab1 のラフトへの移行が、チロシンリン酸化の結果として起こる現象であるのか、逆に移行した結果としてラフト内でリン酸化されるのかである。この点に答えるために、Src ファミリーの阻害剤である PP2、及び対照として PP3 で処理して、リーリンによる Dab1 の不溶性画分への移行に与える影響の有無を調べた。その結果、PP2 によって Dab1 のリン酸化が阻害された条件下であっても、対照と同様に、リーリンによる不溶性画分への移行は認められた。

次に、ラフトの存在が、Reelin による Dab1 リン酸化のために必要であるかどうかを

検討するために、ラフトを破壊して、その影響を調べた。その結果、ラフトを破壊した後では、Reelin による Dab1 のリン酸化は著しく減少した。以上の結果から、ラフトが、Reelin の Dab1 へのシグナル伝達に非常に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

さらに、Dab1 のラフトへの移行が、その後のチロシンリン酸化にとって十分条件でありうるかを検討した。まずは、細胞内分子をラフトに強制的に局在化させるシグナル (CAAX) を、Dab1 の C 末に付けた。Neuro2A 細胞に強制発現させると、CAAX シグナルを付けた Dab1 は、Reelin 非存在下でも高度にチロシンリン酸化されるのが観察された。そこで、Reelin シグナル伝達に必須とされる Dab1 上のチロシンをフェニルアラニンに置換し、Reelin 依存的なチロシンリン酸化を受けなくなるように変異させた 5F-Dab1 に、CAAX シグナルをつけて同様の実験を行ったところ、チロシンリン酸化は見られなかった。この結果は、Reelin 非存在下で強制的にラフトへ局在させた Dab1 で見られた高度のチロシンリン酸化は、Reelin シグナル伝達に必須のチロシンで起こったことを意味する。さらに、以上の Dab1 の変異体を培養神経細胞に導入した。するとやはり CAAX を付けた Dab1 でのみ、高度のチロシンリン酸化が見られた。以上より、ラフトに移行した Dab1 は、Reelin が存在しなくても、移行することのみで本来のチロシンリン酸化が効率的に誘導されることが分かった。最後に、発生期の脳皮質におけるラフトの局在を可視化したところ、確かに、Reelin の機能部位とされている辺縁帯に非常に濃縮されていることが確認できた。この結果は、*in vitro* の系で得られた上記のラフトを介した機構が、*in vivo* においても機能していることを強く示唆する。

従来報告されていた Reelin の受容体は、いずれも細胞内にチロシンキナーゼ活性をもっていないため、Reelin が如何に Dab1 をチロシンリン酸化するかが最重要な疑問であった。本研究により、Reelin 会合体 (2 量体) の受容体への結合は、Dab1 のラフトへの移行を引き起こし、その結果として、ラフトに存在するチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化を受け、さらに下流へとシグナルを伝達することが分かった。皮質層構造という高度に秩序付けられた形態形成を可能にするうえで、細胞の極性化と効率的なシグナル伝達の両方に関わるラフトが、重要な役割を担っていると考えられる。Reelin-Dab1 シグナル伝達経路の生体内での役割は、今をもって判然としていないが、本研究によって、その解明に新たな視点が加わった。また、Reelin のシグナル伝達経路において、受容体を共有する ApoE を初め、アルツハイマー病に関連した分子がしばしば登場することも関心を呼んできたが、ラフトはアルツハイマー病を引き起こす A β が作られ蓄積される場所として知られており、発生過程と病的過程の新たな接点が明らかになった。