

論文の内容の要旨

論文題目 : The signaling pathway for myelination
(ミエリン形成に関わるシグナル伝達経路)

氏名 : 梅森 久視

A. 概略

ミエリンは神経軸索を一定の間隔をもって隙間を開けながら取り囲んでいる膜構造で、絶縁体として働くため、神経の活動電位はその隙間ごとに引き起こされる。その結果、いわゆる跳躍伝導が可能となって、情報処理速度の上昇がもたらされる。ミエリン形成の異常は脱髄疾患として重大な神経機能異常を引き起こす。ミエリンの形成のためには、神経軸索にミエリン形成細胞（中枢神経系ではオリゴデンドロサイト、末梢神経系ではシュワン細胞）が接触し、それにより始まるミエリン形成細胞内のシグナルにより、ミエリンを構成する蛋白質が発現されていくことが必要であると考えられる。しかし、このシグナル伝達経路は今まで明らかにされていなかった。私は、ミエリン形成の初期に、Src 癌遺伝子産物のファミリーである Fyn チロシンキナーゼが、ミエリン形成に重要な細胞間接着分子であるミエリン関連糖蛋白質 (Myelin-associated glycoprotein; MAG) と結合しており、MAG への刺激に伴い活性化されること、Fyn 欠損マウスではミエリン形成が不完全であることをみだし、ミエリン形成の初期に Fyn チロシンキナーゼを介するシグナル伝達が大切であることを明らかにした。さらに、活性化された Fyn が、主要なミエリン構成蛋白質であるミエリン塩基性蛋白質 (Myelin basic protein; MBP) 遺伝子の転写を促進すること、MBP プロモーター上の Fyn response sequence に、Fyn が活性化している時期に結合する蛋白質のあること、そして、Fyn 欠損マウスでは MBP の発現量が著明に減少していることを見だし、MBP が Fyn のターゲット遺伝子の一つであることを示した。以上の結果は、ミエリン形成に、“MAG への刺激 - Fyn の活性化 - MBP 遺伝子の発現”というシグナル伝達経路が重要であることを示し、ミエリン形成のメカニズムに光明を投じた。この研究は、脱髄疾患の病態解明にも役立つであろうと考えられる。

B. 具体的な結果

1. Fyn チロシンキナーゼはミエリン形成細胞に発現している

src ファミリー癌遺伝子に属する *fyn* 遺伝子の産物は、非受容体型チロシンキナーゼで、特に血球系と神経系に発現が高い。血球系では T 細胞抗原受容体などの細胞表面蛋白質との相互作用が示されているが、神経系における機能はほとんど明らかにされていなかった。Fyn チロシンキナーゼの神経系における機能解析を目的に、まず *in situ* hybridization にて、神経系における *fyn* mRNA の分布を調べたところ、*fyn* mRNA は、神経細胞に加え、ミエリンを形成する細胞であるオリゴデンドロサイトに発現がみられた (Umemori et al., 1992)。そこで、Fyn チロシンキナーゼのミエリン形成における役割を検討した。

2. Fyn チロシンキナーゼはミエリン形成の初期に活性化されている

ミエリンは、哺乳類では出生後に形成される。ミエリン形成過程にあるマウスの脳（出生後 4 日目より 5 6 日目まで）よりミエリンを精製し、ミエリン形成過程における蛋白質チロシンリン酸化の変化を見たところ、特にその初期（生後 4-8 日目）にいくつかのチロシンリン酸化した蛋白質が認められた。この中に、Fyn チロシンキナーゼが含まれるのではないかと考え、次に、ミエリンにおける Fyn の発現量・チロシンリン酸化・キナーゼ活性の変化を検討した。その結果、Fyn は、ミエリン形成過程を通じほぼ一定の発現量を示したが、そのリン酸化とキナーゼ活性は、ミエリン形成過程の初期に高かった。すなわち、Fyn チロシンキナーゼは、ミエリン形成過程の初期に活性化されていることがわかった。

3. Fyn チロシンキナーゼはミエリン関連糖蛋白質 (MAG) に結合し、MAG 刺激により活性化される

ミエリンの形成のシグナルは神経軸索にミエリン形成細胞が接触することで始まると考えられるが、この接触到重要な細胞間接着分子の一つに、ミエリン関連糖蛋白質 (myelin-associated glycoprotein; MAG) がある。MAG は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、神経細胞とオリゴデンドロサイト間の接着に関与していることが示されている分子で、脱髄疾患との関連が示されている。Fyn は、ミエリン形成過程の初期に活性化されているので、Fyn と相互作用する蛋白質として、この MAG を考え、MAG と Fyn との結合様式を免疫共沈法にて検討した。その結果、MAG と Fyn は、マウスの脳においても、COS 細胞に co-transfection した場合にも、お互いに結合していた。その結合には、Fyn の SH2 と SH3 ドメインが必要であった。

次に、MAG と Fyn を COS 細胞に co-transfection し、機能的な関連を検討した。共発現後、MAG を抗 MAG 抗体でクロスリンクすることにより刺激し、Fyn のキナーゼ活性の変化を検討したところ、Fyn チロシンキナーゼの活性は、MAG 刺激後 1-3 分以内に、3-5 倍に上昇した。すなわち、MAG と Fyn は、機能的にも関連していることがわかった。

さらに、*in vivo* で、MAG と Fyn との結合を確認するために、ミエリン形成期のマウスの脳で MAG と Fyn の局在が一致し、MAG に Fyn の活性が伴われているかを検討した。ミエリン形成初期のマウス（生後 7 日目）では、MAG と Fyn はともにミエリンを形成している fiber tract およびオリゴデンドロサイトに発現がみられた。また、免疫共沈法の結果、生体内でも MAG にチロシンキナーゼ活性が結合しており、V8 マッピングの結果からそのチロシンキナーゼは、Fyn であることが示された。

以上の結果から、Fyn チロシンキナーゼは MAG と物理的にも機能的にも相互作用しており、MAG からのミエリン形成のシグナルを伝えていることが示唆された (Umemori et al., 1994)。

4. Fyn 欠損マウスでのミエリン形成異常

私はさらに、Fyn 欠損マウスでのミエリン形成を検討することにより、ミエリン形成における、Fyn を介するシグナルの意義について検討を加えた。Fyn 欠損マウスでは、ミエリンの形成量が正常マウスに比べ、40-60%に減少していた。また、電子顕微鏡による観察の結果では、Fyn 欠損マウスでのミエリンは正常より薄く、不揃いであった。従って、ミエリン形成に Fyn チロシンキナーゼが重要であることが確認された。

5. Fyn チロシンキナーゼはミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 遺伝子の転写を刺激する

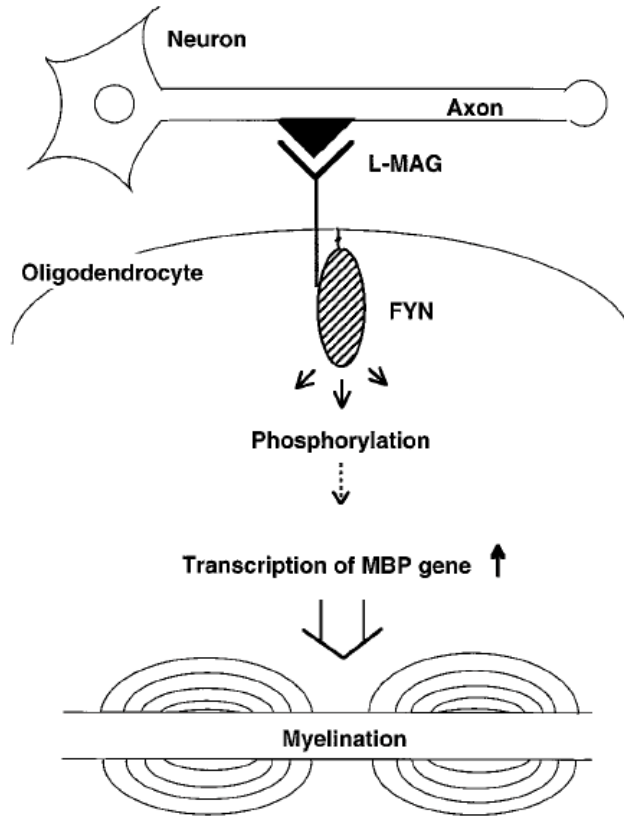
私は次に、Fyn チロシンキナーゼのターゲット遺伝子を検索した。私は、ミエリンの主要な構成蛋白質である、ミエリン塩基性蛋白質 (myelin basic protein; MBP) に注目した。MBP 遺伝子のプロモーターをクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子とつないだ construct を、細胞に、Fyn 発現ベクターあるいはコントロールベクターとともに導入し、Fyn の MBP プロモーターに対する効果をみたところ、Fyn は、MBP プロモーターの活性を約7倍活性化した。MBP プロモーターの deletion をつくることで、Fyn に反応する塩基配列が、MBP 遺伝子の転写開始点から-675 から-656 塩基の部分 (Fyn response sequence) にあることがわかった。この Fyn response sequence は、それだけで Fyn による転写の活性化に十分であった。さらに、私は、この配列に結合する蛋白質があることを、ゲルシフトアッセイを用いて発見し、この結合蛋白質が、ミエリン形成の初期、すなわち Fyn が最も活性化されているときに、最も強く Fyn response sequence に結合することを見いだした。これらのことから、Fyn は、この結合蛋白質を介して MBP のプロモーターに作用して、MBP の転写を促進することが示唆された。実際、Fyn 欠損マウスでは、MBP の蛋白質量が著明に低下しており、Fyn から MBP へのシグナル伝達経路がミエリン形成に重要であることが示された (Umemori et al., 1999)。

C. まとめ

ミエリンの形成の初期に、Fyn チロシンキナーゼが、ミエリン形成に重要な細胞間接着分子のひとつである MAG と結合しており、MAG からのシグナルをうけて活性化されていること、Fyn 欠損マウスではミエリンの形成が不完全であることを私は見だし、ミエリン形成の初期に、Fyn チロシンキナーゼを介するシグナル伝達が大切であることを明らかにした。さらに、Fyn が、主要なミエリン構成蛋白質である MBP の転写を刺激し、その結果、ミエリンが作られていくことを示した。以上の結果は、ミエリン形成のシグナル伝達経路を初めて明らかにしたもので (図1参照)、ミエリン形成のメカニズムの解明、そして、脱髄疾患の予防や治療にも役立つことが期待される。

図1：ミエリン形成のシグナル伝達経路

神経細胞とオリゴデンドロサイトが相互作用し、MAGが刺激されると、MAGに結合しているFynチロシンキナーゼが活性化される。Fynは、細胞内チロシンリン酸化そして下流のシグナルの活性化を引き起こし、MBPの転写が刺激される。その結果として、ミエリン形成が促進される。実際、Fyn欠損マウスでは、ミエリン形成の異常が認められる。



文献

Umemori H, Kadowaki Y, Y, Hironaka K, Okano (1999). Stimulation protein gene tyrosine kinase for myelination. *J Neurosci.* **19**, 1393-1397.

Umemori H, Sato S, Yagi T, Aizawa S, and Yamamoto T. (1994). Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* **367**, 572-576.

Umemori H, Wanaka A, Kato H, Takeuchi M, Tohyama M, and Yamamoto T. (1992). Specific expressions of Fyn and Lyn, lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases, in the central nervous system. *Brain Res Molec. Brain Res.* **16**, 303-310.

Hirosawa K, Yoshida H, and Yamamoto T. of myelin basic transcription by Fyn