

綜 説

新規シナプス後部タンパク質の同定と機能の解明：
特に LRP4研究の進展について

鈴木 龍 雄

信州大学大学院医学系研究科加齢適応医科学系独立専攻
分子細胞学部門神経可塑性学分野

Identification and Functional Clarification of
Novel Postsynaptic Proteins : Progress in LRP4 Research

Tatsuo SUZUKI

Department of Neuroplasticity, Institute on Aging and Adaptation,
Shinshu University Graduate School of Medicine

Key words : postsynaptic density (PSD), dendritic mRNA, LRP4

シナプス後肥厚部, 樹上突起に局在する mRNA, LRP4

I はじめに

ヒトの脳の機能は複雑な神経回路網の働きの上に成り立っている。神経回路網を構成する基本素子がシナプスである。よく制御された無数のシナプスの正常な活動があって初めて脳の高次な機能が発現する。シナプスには、その機能を発揮するための多数の分子群が機能的に配備されている。シナプスは、神経伝達物質の放出に関わるシナプス前部と、神経伝達物質を受け取った後の細胞内情報処理に関わるシナプス後部の二つの部分に分かれる。我々は長年シナプス後部に存在するシナプス後肥厚部, postsynaptic density (PSD), の分子構築やそこでの情報処理のメカニズムを研究してきた。シナプス後部では、神経伝達物質からの情報を受容体を受け取ったあと、様々な分子間の反応が引き起こされて細胞内情報が処理される。その反応が集中して効率よく、しかも巧妙に制御された形で行われる場の一つとしてシナプス後肥厚部が存在する。PSDを構成する分子種数は数百から千のオーダーに及ぶと見積られる。それらの多数の分子の働きによって正常なシナプス後部機能が発揮される。逆に、それらの分子の異常により、シナプス機能の破綻がも

たらされる。その症状は、精神機能の低下や異常、神経系の病気などとなって現れる。

脳の高次機能の発現メカニズムを知り、また、神経系の病気を理解するとともに有効な治療法を見つけるためには、シナプス後部におけるシグナル伝達系の制御について分子レベルで理解することが必須である。そのためには、未知分子が半数を占め(後述)、まだ完全には全体像が把握されていないシナプス後部タンパク質群について、新規の分子を発見し、それらの機能を明らかにすることが不可欠である。

PSDはシナプス膜直下にある特殊な細胞骨格系で、複雑な細胞内情報処理を効率的に行う細胞内装置である。PSDは電子顕微鏡で見ると、その分子密度の高さを反映して一様に染まってしまい、内部の微細構造は判別しにくい(図1)。特殊な細胞骨格系であるPSDは、短時間でも変化を起こすダイナミックな構造体である。シナプス伝達に関わる情報処理反応はPSD周辺ばかりでなく、場合によっては核にまで伝達され、遺伝子発現の変化をも引き起こし、逆に、PSDは核からのフィードバックを受ける。筆者らはシナプス後部に存在する新規のタンパク質の網羅的同定とそれぞれの分子の機能の解明を目指して研究を行ってきた。

別刷請求先: 鈴木 龍雄 〒390-8621

松本市旭3-1-1 信州大学大学院神経可塑性学分野

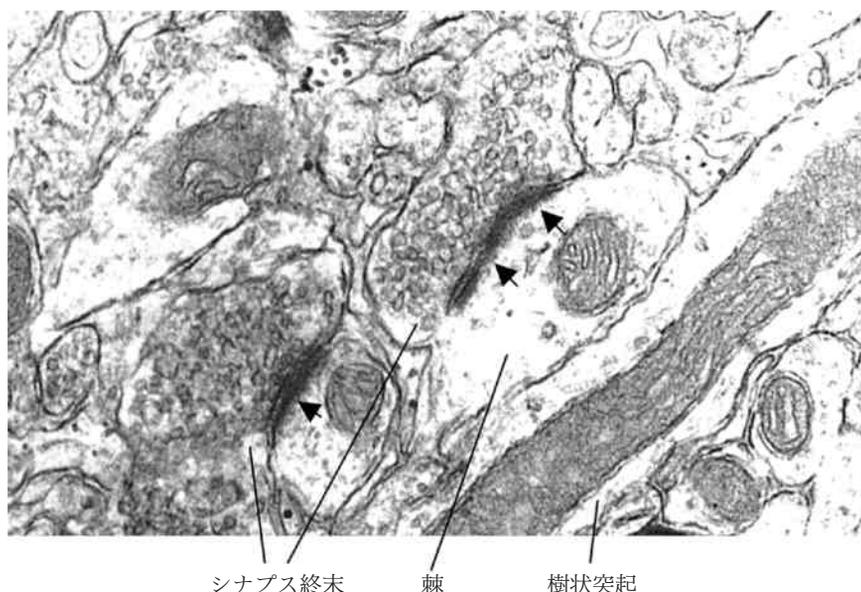


図1 シナプス部位の電子顕微鏡写真
矢印はシナプス後肥厚部。一個のシナプス棘が一本の樹状突起から出ているのが分かる。

II 新規 PSD タンパク質の網羅的同定の方法

細胞内には核周囲での翻訳系の他に、細胞内局所翻訳系が存在している。神経細胞の樹状突起においてもこの仕組みが備わっている。mRNA、リボソーム、小胞体などの翻訳系の基本的な要素のほか、翻訳系の制御に関わる様々な分子もほとんどシナプス後部の局所翻訳系に備わっている¹⁾。シナプス後部の局所翻訳系は、シナプス可塑性の発現、特に長期増強 (Long-term potentiation, LTP) の遅い相や記憶の固定のプロセスなどに関与しているといわれる。この系により、①シナプス入力に対してすばやいたンパク質合成、②シナプス入力部に限局したタンパク質合成が可能となる。また、③細胞体からタンパク質を運搬する場合に比べ、mRNA を運搬して同量のタンパク質を供給する場合の方がエネルギー効率は、はるかに優れていると考えられる。

未同定の PSD タンパク質を明らかにするための方法のうち、現在最も主流となっているのは、PSD 画分のプロテオーム解析である。現在では、PSD 分子のプロテオーム解析は、世界各所の研究機関でほぼ完了している²⁾⁻⁸⁾。筆者らは、新規分子を網羅的に効率よく見つけるためには新しい方法を用いることが不可欠であると考え、シナプス後部の局所翻訳系に着眼した網羅的同定法⁹⁾を確立した。

シナプス後部に局在する mRNA 種をここでは総括して Dem (a molecule whose mRNA is localizing in the dendrite) という (時に Dem mRNA として Dem protein [Dem mRNA から翻訳される protein] と区

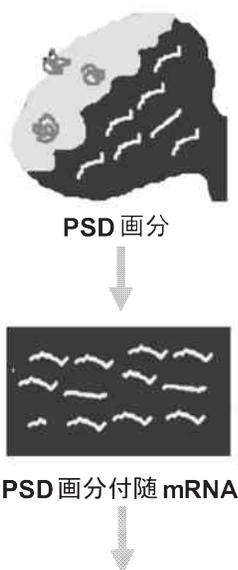
別する)。Dem mRNA は樹状突起 (dendrite) 内で局所翻訳されて、産物 (Dem protein) はシナプス後部のいろいろな場所に輸送・配備される。従って、Dem を同定することにより PSD を含むシナプス後部タンパク質の同定がなされることになる。ラットの脳から Siekevitz の方法により PSD 画分を分離し、そこに含有されている mRNA 種を、塩基配列を片端から決めることにより同定した。もう一つの網羅的方法としてジーンチップマイクロアレイを用いて Dem mRNA を包括的に同定、解析した (図 2)。

III PSD 画分付随 mRNA

最初の試行で、PSD 画分に含まれる mRNA 650 種を精製し、そのうち約 320 種の cDNA 断片をクローニングした。それらのうち、未知の Dem 候補遺伝子 (得られた断片配列がデータベース上で同定できないもの) は 121 クローンであった。詳細は省略するが、PSD 画分に付随する mRNA 種のうちの多くが真の Dem である可能性が高い。

ジーンチップでの解析には Affimetrix 社のチップ (Rat Expression Array 230A) を用いた¹⁰⁾。ジーンチップ解析により、PSD 画分に偏って存在する mRNA 種が多数あることがわかった。この解析に基づいて、PSD 画分特異的遺伝子 777 種、PSD 画分に高濃度に濃縮された遺伝子 115 種 (濃縮率 [前脳全体における発現強度に対する PSD 画分での発現強度の比] > 4), 774 種 (同 > 2.4), 1,370 種 (同 > 2.4) を同定した。PSD 画分付随 mRNA がコードするタンパク質種の概要を図 3 に示した。特徴を整理する。①レセ

A



- 1) Comprehensive identification
- 2) Analysis of novel genes
- 3) Production of cDNA library

B

protein	function	publications
synGAP β	GAP for ras	Li et al., 2001 Moon et al., 2008
LRP4	LDL receptor family	Tian et al., 2006, Lu et al., 2007 Zisman et al., 2007 Zhang et al., 2008
synUSP	de-ubiquitinating enzyme	Tian et al., 2003
NIDD	nNos-binding, palmitoyltransferase?	Saitoh et al., 2004
synArfGEF	GEF for Arf	Inaba et al., 2004
r-p55	scaffolding	Zhang et al., 2005 Terada et al., 2007
TANC	scaffolding	Suzuki et al., 2005, Nonaka et al., 2008
BAALC1-6-8	CaMKII-binding	Wang et al., 2005

図2 PSD画分付随 mRNA の解析プロセス (A) と成果 (B)

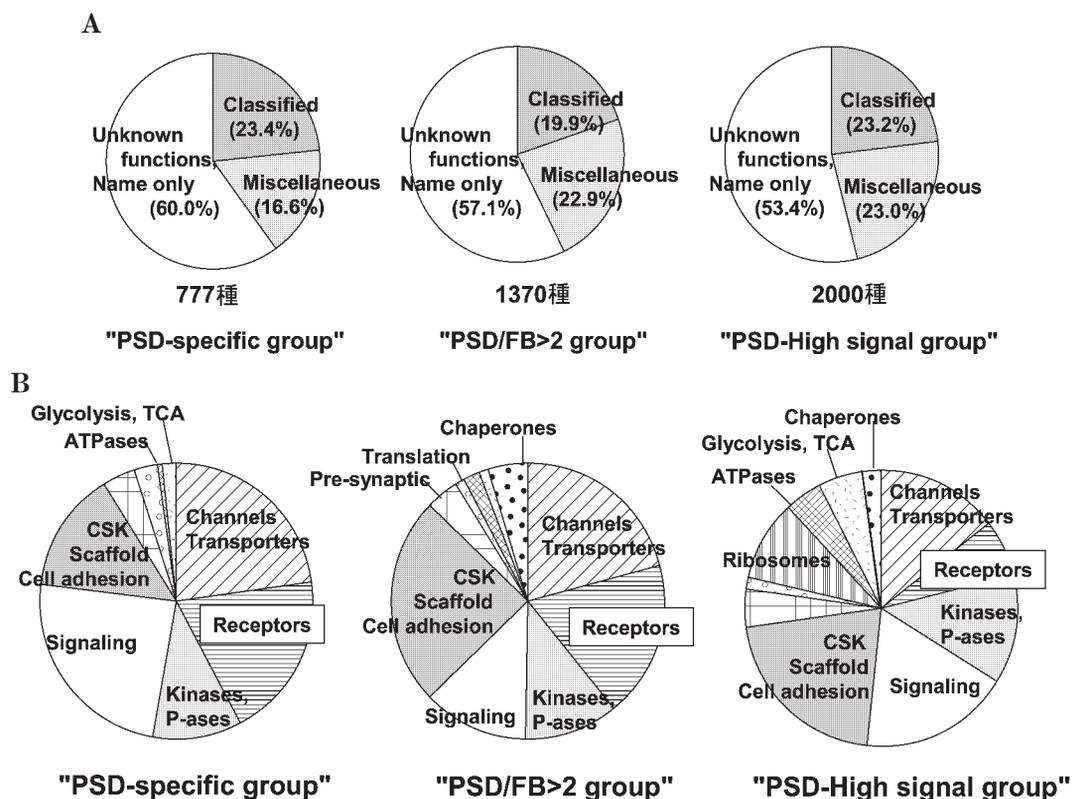


図3 PSD画分付随 mRNA の内訳 (A), classified protein の内訳 (B) 論文10) に基づく。現在ではデータベースの更新により比率はやや異なる。

プターをコードする mRNA が PSD 画分に高度に濃縮されている。②シグナル分子をコードする mRNA が PSD 画分に多量存在し、かつ高度に濃縮されている。③Cytoskeletal/scaffold/cell adhesion 分子、channel/transporter および kinase/phosphatase をコードする mRNAs が PSD 画分に多量存在し、かつ濃縮されている。④house-keeping タンパク質をコードする mRNAs は PSD 画分には濃縮されていない。⑤ribosome タンパク質をコードする mRNAs は PSD 画分に多量存在するが濃縮されてはいない。詳細は論文¹⁰⁾を参照されたい。

PSD 画分付随 mRNA の解析により、Dem 分子は、今まで知られていた以上に多数存在することが示唆された。我々の Dem プロジェクト開始以前に Dem として知られていた既知分子は、わずか24種ほどであったが、現在では、前述したように、少なくとも数百から千のオーダーで存在すると推定される⁹⁾¹¹⁾。この指摘は最近の報告からも支持されるものである¹¹⁾¹²⁾。もう一つ重要な点は、機能や性質が全く調べられていないタンパク質をコードする mRNA 種がまだ数百種も存在している点である。シナプス後部の機能や可塑性発現における役割などの正しい理解のためには、これらの mRNA がコードするタンパク質の機能の解明が必須である。

IV LRP4 (LDL receptor-related protein 4)

Dem プロジェクトで、当初得られた121個の未知遺伝子の中から、現在までに完全長 cDNA が得られた分子が7種類ある (図2B)。個々のタンパク質については、それぞれの論文を参照されたい。本総説では LRP4 研究の進展について、筆者らが関与して明らかになった点を中心に述べる。

LRP4 は Low density lipoprotein (LDL) receptor 遺伝子ファミリーの新規メンバーであった (注: 最初に報告された LRP4¹³⁾とは別物である) (図4)。LDL receptor ファミリーのいずれのメンバーも大きな細胞外領域に細胞外リガンド結合部位と思われる LDL receptor ドメイン クラス A (LDL_A or リガンド結合タイプリピート) を有している。今まで見つかったすべてのメンバーに apoE が結合するほか、多数のリガンド結合能を有するメンバーもある。また、カルボキシル末端側の短い細胞質ドメインにはエンドサイトーシスに関わるコート小胞への集積シグナルがある。このような構造から、このメンバータンパク質は、細胞

内シグナル伝達系に繋がるある種のレセプターで、エンドサイトーシスに関わると予想されている。脳では、LDL receptor ファミリーメンバーは、単にリポタンパク質の取り込み受容体として働いているばかりでなく、下流へのシグナル伝達、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) やアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の取り込みを介して、シナプス可塑性やアルツハイマー病、脳の発育に関わっていることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。

LRP4 はシナプス後部へのターゲティングシグナルを持つ唯一の LDL receptor メンバーであり、筆者らの研究により、LRP4 タンパク質が、カルボキシル末端の PDZ ドメイン結合配列で PSD-95, SAP97 などと相互作用して、シナプス後部に局在することが明らかになった¹⁶⁾。また、LRP4 は CaMK II の良いリン酸化基質で、Ser1905 のリン酸化により、PSD-95 や SAP97 との相互作用がネガティブに影響をうける¹⁶⁾。このことから、シナプス後部の神経活動によって LRP4 レセプター複合体がダイナミックに制御される可能性が考えられる (図5)。以下にその後、明らかになった LRP4 の生理機能について述べる。これまでに三種のリガンドを明らかにすることができた。

A apoE 結合とシナプス構造と神経細胞生存に対する LRP4 の役割

筆者らはまず apoE がリガンドの一つである可能性について検討した¹⁷⁾。一般に、LDL receptor ファミリータンパク質へのリガンド結合には、レセプターの生理的な立体構造が重要であることが指摘されていたので、我々は、Cos7 細胞に全長 LRP4 を発現させ、細胞外から apoE を投与したあと、免疫共沈を行った。この場合、リガンドとレセプターとの結合を化学的に固定することにより結合を証明することができた。シナプス部位は周囲をアストロサイトの突起によって囲まれており、アストロサイトから放出される液性因子によって調節を受けていると言われている。最近、コレステロールがシナプスの形成や機能に必要な成分であることが報告された¹⁸⁾。apoE の多くはアストロサイトで産生されるので、シナプスの LRP4 はシナプス周囲を囲むアストロサイトから放出される apoE/cholesterol を受け取って、シナプスの構造や活性の維持に関わっている可能性が、筆者らの実験からうかがわれた。実際、LRP4 の細胞外ドメインに対する抗体を培養液に加えて LRP4 の apoE 結合をブロックすると、シナプス構造が壊れてしまう¹⁷⁾。シナプス後部に局在する LRP4 の生理機能の一つは、apoE/

Protein name	Ligands	functions
LDLR	ApoB, E, LDL	lipoprotein/cholesterol uptake
LRP1	ApoE, α 2-MG, APP etc (>30)	lipoprotein uptake, APP processing, intracellular signaling, synaptic transmission
LRP2 (Megalin/gp330)	ApoB, E, J, H, etc	defect -> holoprosencephaly, VD deficiency
VLDLR	ApoE, Reelin	role in neuronal migration (embryo), especially in cerebellum
LRP8 (ApoER2)	ApoE, Reelin	role in neuronal migration (embryo), especially in hippocampus and neocortex
LRP1b	?	?
LRP4	ApoE, F-spondin, agrin	axonal guidance, synaptogenesis in muscle, finger development
LRP5 (=LRP7)	Wnt proteins, dickkopf proteins (?)	bone formation, ocular embryonic development
LRP6	Wnt proteins, dickkopf proteins	Wnt signaling, caudal paraximal mesoderm, mid- and hindbrain development etc.
LRP11/SorLa	ApoE, Head activator peptide	Head regeneration in hydra, neurodevelopment

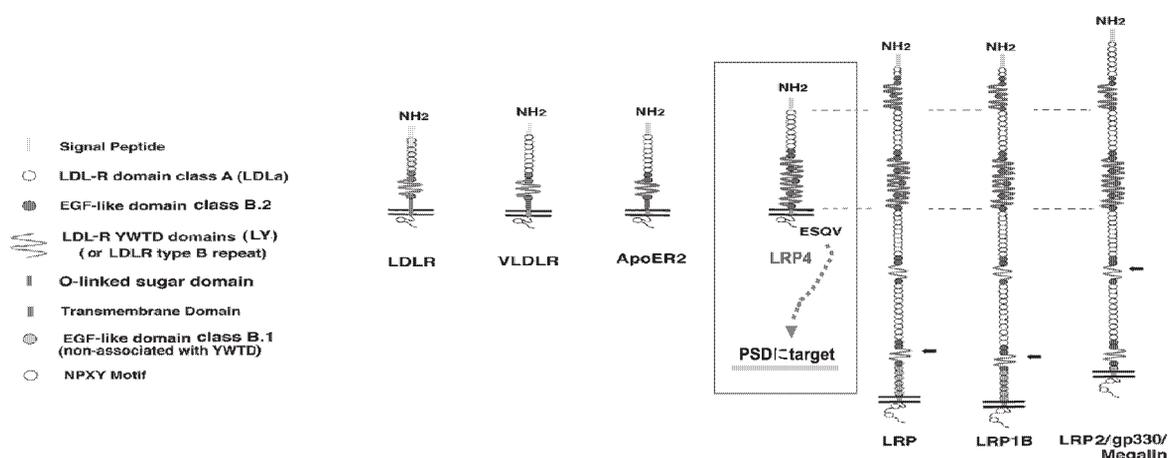


図4 LDL receptor family member の特徴とドメイン構造

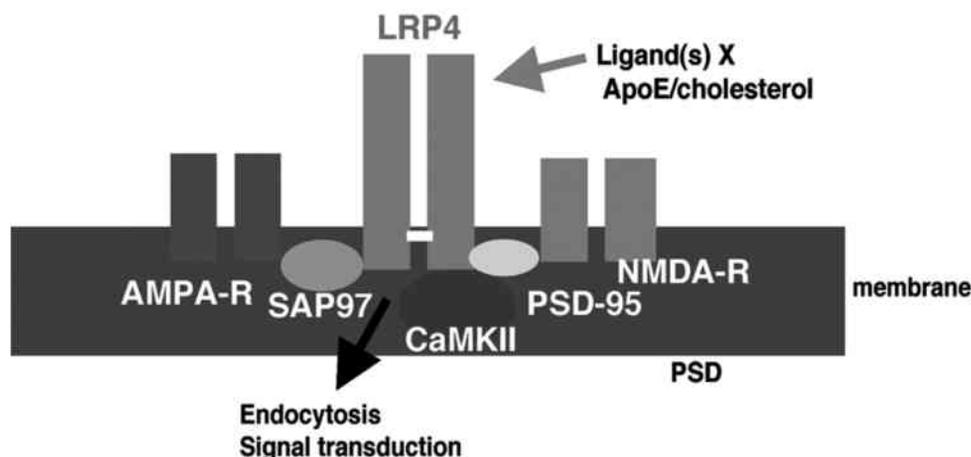


図5 シナプス後部における LRP4 と他の PSD タンパク質との相互作用モデル

コレステロールの受容体として働き、グリアーシナプス相関を媒介することであると考えられる。さらに、LRP4はコレステロールの取り込みに関わるほかにも、多彩な機能を脳で果たしていると考えられているが、

今後の研究課題である。

B Muscle でのシナプス形成における LRP4 の役割

2005~2007年にかけて、LRP4遺伝子の異常による表現系がマウス、牛で相次いで報告された¹⁹⁾⁻²⁴⁾。ほ

ほぼ共通して syndactyly (合指症) がみられ、顔面と頭蓋骨の異常も報告された。また、一つの mutation では神経筋接合部 (neuromuscular junction, NMJ) の形成不全が報告された²⁴⁾。

NMJ の形成に関しては、運動神経の神経終末から分泌される糖タンパク質 agrin が作用するという“agrin 仮説”が20年近く前に提唱されていた²⁵⁾。その後、遺伝子改変マウスの解析から NMJ 形成には agrin の他に MuSK (muscle-specific kinase), Dok-7, rapsin が必須であることが明らかにされた (これらの遺伝子欠損マウスでは NMJ が形成されない)。しかし、agrin と MuSK は直接結合しないので、神経終末から分泌された agrin がどのようにして筋肉細胞内で MuSK を活性化し、NMJ 形成のシグナル処理がなされるかが不明であった。そこで agrin 分子から MuSK にシグナルを渡す仮定の agrin 結合分子、MASC (myotube-associated specificity component)²⁶⁾、の存在が想定されていたが、長い間、この分子の本体は不明のままであった。近年、LRP4 遺伝子異常でも NMJ が形成されないことが明らかになった²⁴⁾ことをうけて共同研究者の Dr. Mei (Medical college of Georgia, USA) は、LRP4 が NMJ に高濃度に局在すること、LRP4 が謎の MASC 分子であり、筋肉細胞における MuSK signaling に関わっていることを明らかにした (図6)²⁷⁾。このように NMJ 形成における LRP4 の関与が明らかになった。agrin は脳にも存在し、その発現抑制により dendrite の発達やシナプス形成が損なわれる²⁸⁾²⁹⁾ので、中枢神経系のシナプス形成においても LRP4 が関わっていることが想像される。

C axon-guidance における LRP4 の役割

共同研究者の Dr. Klar (Hebrew University, Israel) らは apoE, agrin のほかに F-spondin が LRP4 のリガンドとして働いて axon 伸長の進路決定に関わっていることを示した (図7)³⁰⁾。F-spondin は軸索伸長の進路を決めるガイダンス分子である。F-spondin は底板 (floor plate) に発現し、細胞外に分泌される。その際、タンパク質分解酵素により限定分解をうけて四つのフラグメントに分かれる。そのうちの二つの断片が神経管背側部から腹側に向かって伸びる交連神経の軸索 (commissural axon) に対して反発と誘因性という相反する作用を示す。反発性の断片は floor plate 細胞表面に分布する LRP4 などのレセプター分子に結合して一時的に floor plate に固定される。一方、

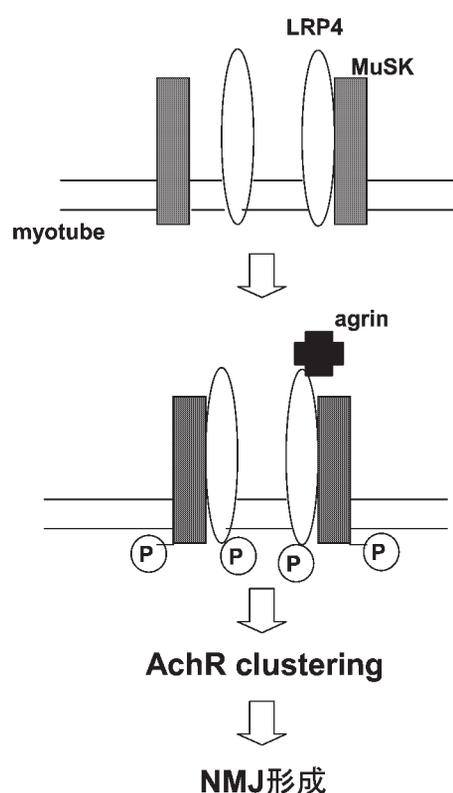


図6 Agrin から MuSK へのシグナルの流れ (モデル)

LRP4 は長い間不明であった agrin 受容体であった。アグリン存在下では LRP4 と MuSK 間の相互作用が増強し、MuSK とダウンストリームのシグナル伝達系の活性化が起きて、AChR のクラスター化が誘導される (文献27から改変)。

誘因性断片は floor plate 腹側の細胞外基質/基底膜 (ECM/BM) に結合する。結果として、commissural axon は floor plate を回避して腹側の ECM/BM に沿って伸長する。つまり、F-spondin という一種の分子が限定分解をうけてその断片が適材適所に分布することにより、axon guidance が制御される仕組みが明らかになった。LRP4 はこの過程に関わっている。Klar らは、Cos7 細胞に LRP4 を発現させ、共発現させた F-spondin の TSR-1-4 ドメイン (F-spondin の axon 反発性ドメイン) との細胞外表面での共局在により、F-spondin と LRP4 の結合性を示した。

V おわりに

以上、筆者が信州大学へ赴任してから開始し、現在も継続している研究の経緯とその進展をまとめた。現在までに複数の新規シナプス後部タンパク質の性質を論文としてまとめることができた。このプロジェクトによって、PSD 画分特異的 mRNA や PSD 画分に高濃度に濃縮された機能未知のシナプス後部タンパク質

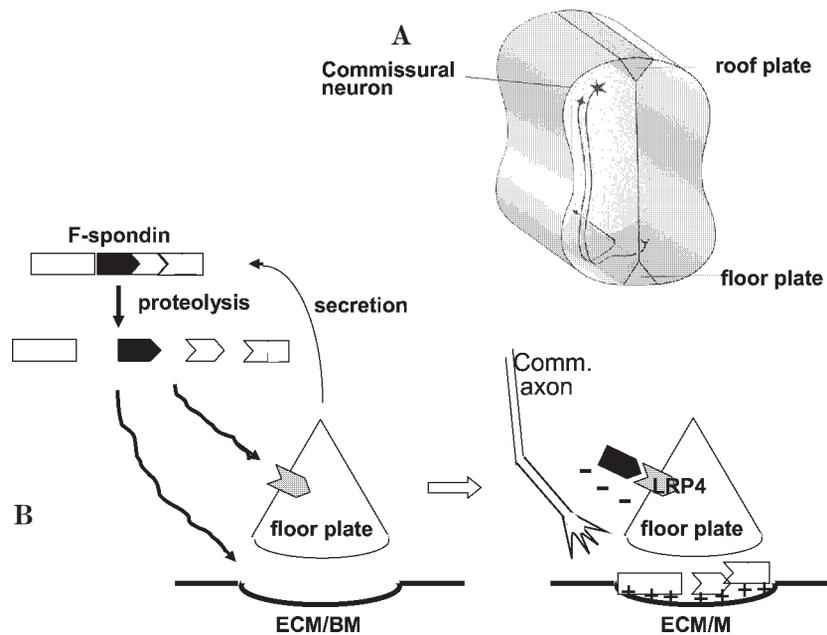


図7 交連ニューロンからの軸索の伸長経路(A)と交連ニューロン軸索伸長に対する F-spondin と LRP4の役割(B)

F-spondin は floor plate 細胞から分泌され、限定分解をうけ、四つの断片に分かれる。Reelin/spondin domain, TSR5,6domain (TSR6は commissural axon 誘因性。“+”で示す)は floor plate 下面の ECM に結合し、TSR1-4断片 (commissural axon 反発性。“-”で示す)は apoER2, megalin や LRP4などの受容体タンパク質に結合して floor plate cell 背側表面に分布する。F-spondin 分解産物の誘因性と反発性によって commissural axon の伸長方向が決まる。

が数百から千のレベルで存在することが改めて浮き彫りになった。つまり、神経科学研究の大きなターゲットの一つがここに存在するわけである。それらの機能

未知のタンパク質の生理機能の解明をせずしてシナプス機能や脳の正しい理解は得られない。今後も Dem プロジェクトを強力に推進したいと考えている。

文 献

- 1) Asaki C, Usuda N, Nakazawa A, Kametani K, Suzuki T: Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. *Brain Res* 972: 168-176, 2003
- 2) Walsh MJ, Kuruc N: The postsynaptic density: constituent and associated proteins characterized by electrophoresis, immunoblotting, and peptide sequencing. *J Neurochem* 59: 667-678, 1992
- 3) Satoh K, Takeuchi M, Oda Y, Deguchi-Tawarada M, Sakamoto Y, Matsubara M, Nagasu T, Takai Y: Identification of activity-regulated proteins in the postsynaptic density fraction. *Genes Cells* 7: 187-197, 2002
- 4) Yoshimura Y, Shinkawa T, Taoka M, Kobayashi M, Isobe T, Yamauchi T: Identification of protein substrates of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 948-954, 2002
- 5) Yoshimura Y, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Donai H, Takahashi N, Isobe T, Yamauchi Y: Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Neurochem* 88: 759-768, 2004
- 6) Li KW, Hornshaw MP, Van Der Schors RC, Watson R, Tate S, Casetta B, Jimenez CR, Gouwenberg Y, Gundelfinger ED, Smalla KH, Smit AB: Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *J Biol Chem* 279: 987-1002, 2004
- 7) Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M: Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279: 21003-21011, 2004
- 8) Collins MO, Yu L, Coba MP, Husi H, Campuzano I, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SG: Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *J Biol Chem* 280: 5972-5982, 2005
- 9) Tian QB, Nakayama K, Okano A, Suzuki T: Identification of mRNAs localizing in the postsynaptic region. *Brain*

- Res Mol Brain Res 72 : 147-157, 1999
- 10) Suzuki T, Tian QB, Kuromitsu J, Kawai T, Endo S : Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res* 57 : 61-85, 2007
 - 11) Eberwine J, Belt B, Kacharina JE, Miyashiro K : Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem Res* 27 : 1065-1077, 2002
 - 12) Moccia R, Chen D, Lyles V, Kapuya E, Kalachikov YES, Spahn CM, Frank J, Kandel ER, Barad M, Martin KC : An unbiased cDNA library prepared from isolated *Aplysia* sensory neuron processes is enriched for cytoskeletal and translational mRNAs. *J Neurosci* 23 : 9409-9417, 2003
 - 13) Tomita Y, Kim DH, Magoori K, Fujino T, Yamamoto TT : A novel low-density lipoprotein receptor-related protein with type II membrane protein-like structure is abundant in heart. *J Biochem* 124 : 784-789, 1998
 - 14) Ulery PG, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi RE, Rebeck GW, Hyman BT, Strickland DK : Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275 : 7410-7415, 2000
 - 15) Herz J : The LDL receptor gene family : (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron* 29 : 571-581, 2001
 - 16) Tian QB, Suzuki T, Yamauchi T, Sakagami H, Yoshimura Y, Miyazawa S, Nakayama K, Saitoh F, Zhang JP, Lu Y, Kondo H, Endo S : Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Neurosci* 23 : 2864-2876, 2006
 - 17) Lu Y, Tian QB, Endo S, Suzuki T : A role for LRP4 in neuronal cell viability is related to apoE-binding. *Brain Res* 1177 : 19-28, 2007
 - 18) Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM : Alzheimer's disease : the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6 : 345-351, 2003
 - 19) Johnson EB, Hammer RE, Herz J : Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. *Hum Mol Genet* 14 : 3523-3538, 2005
 - 20) Simon-Chazottes D, Tutois S, Kuehn M, Evans M, Bourgade F, Cook S, Davisson MT, Guenet JL : Mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor LRP4 cause abnormal limb development in the mouse. *Genomics* 87 : 673-677, 2006
 - 21) Duchesne A, Gautier M, Chadi S, Grohs C, Floriot S, Gallard Y, Caste G, Ducos A, Eggen A : Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics* 88 : 610-621, 2006
 - 22) Johnson EB, Steffen DJ, Lynch KW, Herz J : Defective splicing of *Megf7/Lrp4*, a regulator of distal limb development, in autosomal recessive mulefoot disease. *Genomics* 88 : 600-609, 2006
 - 23) Drogemuller C, Leeb T, Harlizius B, Tammen I, Distl O, Holtersshinken M, Gentile A, Duchesne A, Eggen A : Congenital syndactyly in cattle : four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4). *BMC Genet* 8 : 5, 2007
 - 24) Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA : LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 133 : 4993-5000, 2006
 - 25) McMahan UJ : The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55 : 407-418, 1990
 - 26) Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD : Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85 : 513-523, 1996
 - 27) Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L : LRP4 serves as a co-receptor of agrin. *Neuron* 60 : 285-297, 2008
 - 28) Bose CM, Qiu D, Bergamaschi A, Gravante B, Bossi M, Villa A, Rupp F, Malgaroli A : Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20 : 9086-9095, 2000
 - 29) Ferreira A : Abnormal synapse formation in agrin-depleted hippocampal neurons. *J Cell Sci* 112 : 4729-4738, 1999
 - 30) Zisman S, Marom K, Avraham O, Rinsky-Halivni L, Gai U, Kligun G, Tzarfaty-Majar V, Suzuki T, Klar A : Proteolysis and membrane capture of F-spondin generates combinatorial guidance cues from a single molecule. *J Cell Biol* 178 : 1237-1249, 2007

(H 20. 10. 27 受稿)