

ルラジカル、スーパーオキシド、脂質由来酸素中心ラジカル等が挙げられてきた。これらのラジカル種を不活性化する内因性ラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸や α -トコフェロールが酸化ストレス疾患の誘導を予防できないことに加え、これら疾患に有効なラジカルスカベンジャーの標的ラジカルが低酸素下におけるリポキシゲナーゼ-脂質アリルラジカル複合体であるとする、これもまた、古くからの“疾患とフリーラジカル”に対する知識の縛りから大きく放たれることになる。リポキシゲナーゼの活性を巧みに制御することで、動脈硬化、虚血再灌流障害、がん転移といった、死因のトップ集団を走る疾病の予防が可能になるかもしれないという夢を持ちながら、この分野の研究を行っている。

- 1) Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., & Brash, A.R. (2007) *Chem. Biol.*, 14, 473-488.
- 2) Coffa, G., Imber, A.N., Maguire, B.C., Lazmikanthan, G., Schneider, C., Gaffney, B.J., & Brash, A.R. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 38756-38766.
- 3) Labelle, M., Falgoutyret, J.P., Reindeau, D., & Rokach, J. (1990) *Tetrahedron*, 46, 6301-6310.
- 4) Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T., & Komatsu, M. (2005) *J. Lipid Res.*, 46, 2506-2513.
- 5) Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T., & Komatsu, M. (2006) *Biochem. J.*, 395, 303-309.
- 6) Takajo, T., Tsuchida, K., Ueno, K., & Koshiishi, I. (2007) *J. Lipid Res.*, 48, 1371-1377.
- 7) Takajo, T., Tsuchida, K., Murahashi, T., Ueno, K., & Koshiishi, I. (2007) *J. Lipid Res.*, 48, 855-862.
- 8) Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishii, K., Kume, N., Ooshima, A., Yoshida, H. & Kawai, C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5928-5931.
- 9) Rak, R., Chao, D.L., Pluta, R.M., Mitchell, J.B., Oldfield, E.H., & Watson, J.C. (2000) *J. Neurosurg.*, 92, 646-651.

輿石 一郎

(群馬大学医学部保健学科)

Lipid-derived radicals in lipoxygenase reactions

Ichiro Koshiishi (School of Health, Faculty of Medicine, Gunma University, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan)

神経シナプスにおけるポンプ活性非依存的なナトリウムポンプ

1. はじめに

ナトリウムポンプ (sodium pump, あるいは Na^+/K^+ ATPase) は、原形質膜上に存在し、細胞内外のイオン濃度勾配形成を司る中心的分子として古くから知られている。ATP1 分子の加水分解から得られるエネルギーを用い、イオン濃度勾配に逆らって 3 個の Na^+ を細胞外に、2 個の K^+ を細胞内に輸送することで、細胞内の K^+ 濃度を高く、 Na^+ 濃度を低く維持する。カルシウムポンプ (Ca^{2+} ATPase) やプロトンポンプ (H^+/K^+ ATPase) と同じ P 型 ATPase のタイプ 2 に属し、これらの分子と同様に二つの α サブユニットと二つの β サブユニットが一つのポンプ分子を構成する。そのイオンポンプとしての作用機序や機能の重要性についての詳細はここでは割愛するが、近年この分子がポンプ活性とは非依存的に、すなわちイオンポンプとは独立した機能を有し細胞内の様々な生理現象を制御することが分かってきた。本ミニレビューでは、筆者らが発見した線虫 (*C. elegans*) のシナプスにおけるナトリウムポンプの新規機能に併せて、ヒト神経疾患に関しての最近の知見と神経細胞死抑制に対する役割について議論したい。これにより、六十年に渡る長いポンプの研究から得られてきた概念を越えた、ナトリウムポンプの生体内、特に神経系における役割についての理解が深まり、ナトリウムポンプ遺伝子上の突然変異が引き起こすヒト神経疾患の発症原因の解明に繋がれば幸いである。

2. 神経系におけるナトリウムポンプと線虫ポンプ変異体のシナプス伝達異常

細胞内外のイオン濃度勾配形成を司る中心的分子であるナトリウムポンプは、脱分極あるいは過分極などによりイオン濃度勾配変化の多い神経細胞の機能維持には必須の分子である。ポンプの異常は強い神経機能の喪失を引き起こすが、多くの場合でイオン濃度勾配変化による膜電位形成異常が原因と考えられてきた。しかしながら、その神経細胞内での分布パターンなど、詳細な細胞・分子レベルでの解析は近年までほとんどなされていなかった。最近 Hilgenberg らによって、哺乳類では四つあるナトリウムポンプ α サブユニットのうち、脳特異的に発現している $\alpha 3$

サブユニットがシナプス部位に集積し、アグリンの受容体として働くことが示された¹⁾。アグリンは神経筋接合部においてアセチルコリン（以下 Ach）受容体の集積を促す分子として良く知られているが、脳などの中枢神経系にも多量に発現している。このアグリンと $\alpha 3$ サブユニットがシナプス間隙を介して結合すると、詳細な機構は不明であるがナトリウムポンプの機能を抑制し、神経細胞の膜電位を脱分極させることで活動電位の発火頻度を制御していると考えられている。

筆者らはモデル生物線虫を用いて、行動異常を指標にシナプス伝達に関与する新規因子群の同定とその機能解析を行ってきた²⁾。線虫は、全ゲノム解析や古典的な遺伝解析の蓄積により分子遺伝学的解析が容易であることと併せて、約 300 個の神経細胞が形成するほぼ全てのシナプスが同定されていること、様々な行動異常変異体が単離・解析されていること等から、タンパク質の神経機能に対する解析にも非常に適した実験材料である。特に様々な薬剤に対する感受性を調べることで、神経筋接合部のシナプス伝達異常の有無を簡便に推測する手法が確立している³⁾。筆者らもこの薬剤感受性を指標にしたシナプス伝達異常変異体のスクリーニングの過程で、ナトリウムポンプ α サブユニットの一つをコードする *eat-6* 遺伝子の変異体が野生型に比べて強いシナプス伝達異常を示すことを見出した⁴⁾。線虫の体壁筋には、興奮（筋収縮）を引き起こす Ach 受容体として、レバミソールとニコチンという異なるアゴニストに対して特異的的感受性を示す二つの Ach 受容体が発現・機能している（図 1A）。また哺乳類の筋肉とは異なり、収縮した筋肉の弛緩は GABA 受容体を介した再分極によってもたらされる。これらの受容体のアゴニストに対する反応を調べたところ、*eat-6* 変異体はレバミソール、ニコチンどちらの Ach 受容体アゴニストに対しても異常な感受性を示すが（図 1B）、GABA に対する感受性には変化がなかった。したがってこの現象はコリン作動性シナプス特異的な現象といえる。当初この現象は、ポンプ機能の異常により筋肉の膜電位が脱分極側にシフトし、そのため少量の伝達物質（アゴニスト）に対しても過度の細胞興奮が引き起こされるためではないかと予想された。しかしながら同じ *eat-6* 遺伝子の複数の突然変異（*ad 467*, *ad 601*, *ad 997* の三つ。変異部位は図 2A 参照）を解析してみたところ、その感受性が変異体間で大きく異なることが分かった。*eat-6* 変異体は、「eat」という名前の由来である餌を食べるための咽頭筋の収縮・弛緩異常、体長や子孫数の減少といった多様な表現型異常を示す⁵⁾。これらの表現型の

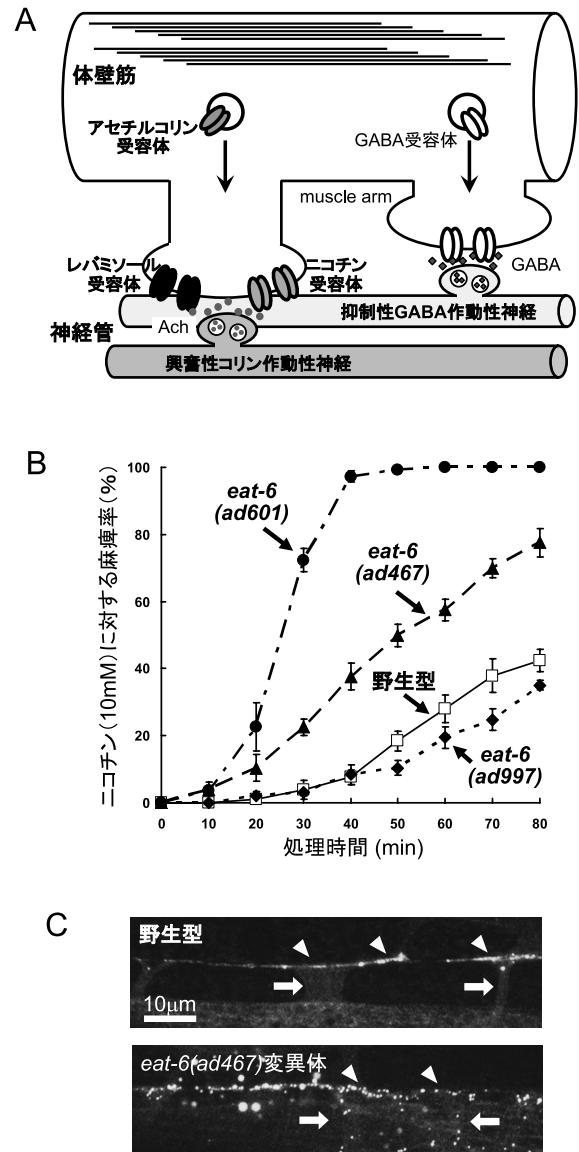


図 1 線虫の神経筋接合部とナトリウムポンプ変異体の表現型
A) 体壁筋は muscle arm と呼ばれる腕を各運動神経に向かって伸ばし、その先端に受容体を集積させる。B) ニコチン処理時間に伴う野生型およびナトリウムポンプ変異体の麻痺率。C) 野生型およびポンプ変異体の神経筋接合部における Ach 受容体の集積。図中の矢印は muscle arm を、矢頭は神経筋接合部を示す。

強さは *eat-6* (*ad 467*) 変異体が他と比べて最も顕著な異常を示し、咽頭筋の活動電位および静止膜電位も *ad 467* 変異体では有意に脱分極側にシフトする⁵⁾。逆に *ad 601* 変異体は最も野生型に近く、形態や行動レベルではほぼ野生型と区別がつかない。*ad 997* 変異体は両者の中間の表現型を示す。したがって、Ach アゴニストに対する反応もこ

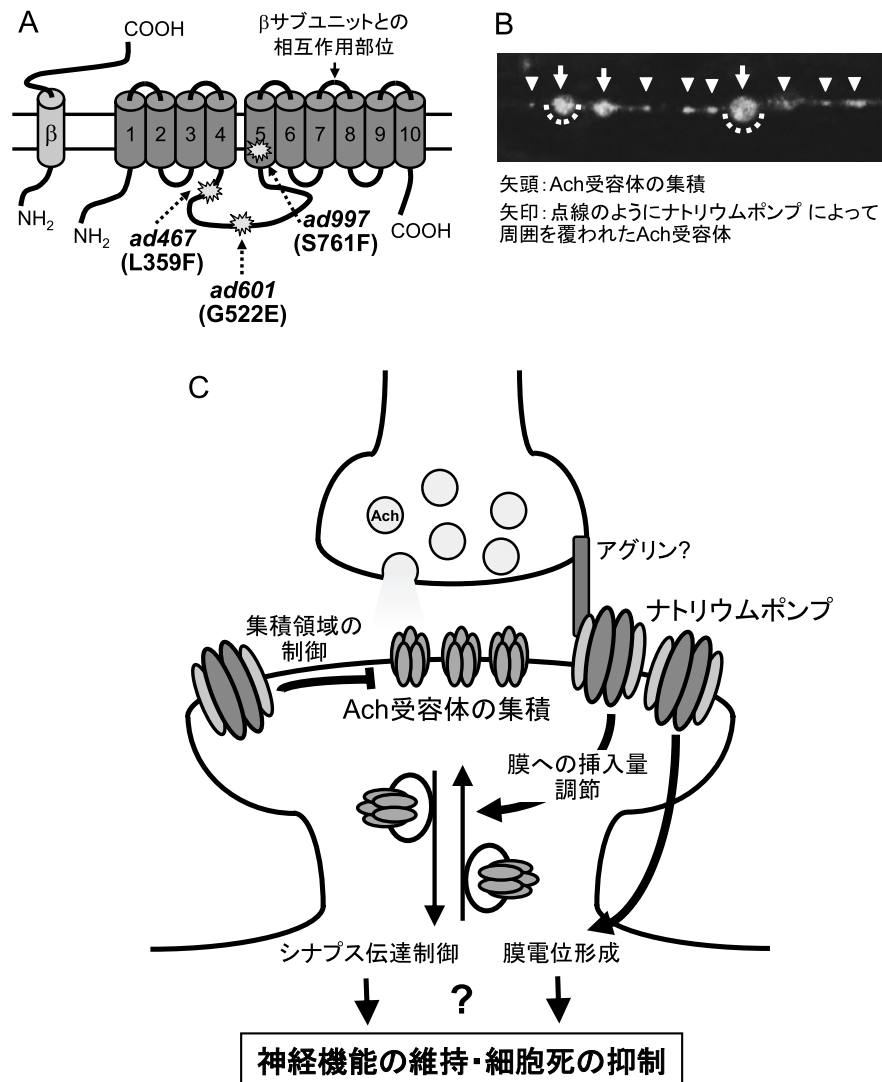


図2 ナトリウムポンプによるシナプス伝達制御

A) ナトリウムポンプの二次構造と線虫 *eat-6* 変異体のアミノ酸変異挿入部位. B) ナトリウムポンプと Ach 受容体のシナプス共局在. ポンプにより周囲を覆われた Ach 受容体を矢印で示す. C) ナトリウムポンプによるシナプスにおける Ach 受容体集積制御の模式図. ポンプは Ach 受容体の集積領域を区画化する障壁として, あるいは小胞輸送を介して挿入位置や量を制御していると考えられる.

の *ad 467* 変異体が最も強い感受性を示すと推測された. しかしながら興味深いことに, *ad 601* 変異体が *ad 467* 変異体よりも有意に強い感受性を示し, 逆に *ad 997* 変異体はほぼ野生型と同じか弱い抵抗性を示した (図 1B). もしポンプ活性の異常, すなわち静止膜電位の変化がそのまま Ach に対する感受性に対応しているならば, 他の表現型異常と同じような傾向を示すはずである. そこで Ach への感受性はポンプ活性とはリンクしていないのではないかと

いう仮説が考えられた. これを検証するためにポンプ活性を失わせた変異型 *eat-6* 遺伝子を作製し, 突然変異体に導入することで Ach 感受性異常の表現型, あるいはそれ以外の表現型異常が回復できるのかを調べた. その結果, 野生型の *eat-6* 遺伝子では全ての表現型異常が回復したのに対し, ポンプ活性を失った変異型 *eat-6* 遺伝子ではアゴニストに対する感受性はほぼ野生型と同じレベルまで回復したが, それ以外の表現型異常は全く回復されなかった. こ

の結果は、Ach に対する感受性異常はポンプ活性の低下とそれによって引き起こされる静止膜電位の異常によるものではなく、ナトリウムポンプ（あるいはEAT-6サブユニット）分子の異なる機能が関与していることを示している。またそれ以外の表現型についてはポンプとしての機能、すなわち静止膜電位の維持が重要であることを示唆している。

解析に用いた各突然変異体の変異部位は、*ad 601* と *ad 467* は4番目と5番目の膜貫通部位に挟まれた大きな細胞内領域の、*ad 997* は5番目の膜貫通ドメイン内の1アミノ酸置換である（図2A）。この細胞内領域にはポンプとしての構造変化時に重要なリン酸化サイトとATP結合部位があり、イオンポンプとして中心的な機能を持つ。変異を起こしているアミノ酸はどれも他の動物のナトリウムポンプと高い相同性を示すが、これらの変異と相同なアミノ酸変異は他の動物では見つかっておらず、その機能については今のところ不明である。

3. シナプスにおけるナトリウムポンプ

上記の結果から、ナトリウムポンプは膜電位形成以外にシナプス形成、あるいはシナプス伝達に何らかの役割を持つことが示唆される。そこで *eat-6* 変異体のシナプスにおけるAch受容体の動態変化を、GFP融合タンパク質を用いて観察した。体壁筋と運動神経が形成するシナプス（神経筋接合部）における受容体は、体壁筋から伸びているmuscle armと呼ばれる構造の先端部に強く集積する（図1A）。ニコチン感受性のAch受容体の動態について調べたところ、野生型では接合部のみに融合タンパク質の局在が観察されるのに対して、感受性異常を示す *ad 467* 変異体および *ad 601* 変異体では、接合部のみではなくmuscle armの幹の部分などにも多くの受容体が発現しているのが観察された（図1C）。これらの集積は、いわゆるextra synapseとして細胞膜表面上に発現していると予想され、外からのアゴニストに対して筋肉の過度の収縮を引き起こす受容体として働いていると思われる。レバミソールに感受性を持つAch受容体についても、野生型の神経筋接合部で観察される発現量に対して、*eat-6* 変異体では異常に多量に集積しているのが観察された。このような集積異常はアゴニストに対する感受性の強さと対応し、*ad 601* 変異体で最も顕著であり、*ad 997* 変異体ではほとんど異常は観察されない。この結果から、ナトリウムポンプ突然変異は線虫筋細胞において、受容体サブユニットの膜上での発現量やその挿入領域を制御している可能性が示唆され

る。次に、*eat-6*（ナトリウムポンプ $\alpha 1$ サブユニット）とGFPとの融合遺伝子を作製し、体壁筋での局在パターンを観察したところ、哺乳類の $\alpha 3$ サブユニットと同様にシナプス部位の、特にコリン作動性シナプスのAch受容体の周辺でそれを囲むように分布していることが明らかになった（図2B）。これらの結果から、ナトリウムポンプはポストシナプス部におけるAch受容体の凝縮した集積をサポートする足場タンパク質として、あるいはその適切な挿入量や部位を調節する小胞輸送に関与しているのではないかと推測された（図2C）。

4. ポンプ活性非依存的なナトリウムポンプ機能とヒト神経疾患

近年筆者らの研究のように、ポンプ活性を伴わないナトリウムポンプの新規機能が存在することが幾つか報告されている。例えば同じ線虫で別のP型ポンプ α サブユニットをコードする *catp-1* 遺伝子の突然変異体では、発生時期特異的な細胞分裂や分化が異常になり、二齢幼虫から三齢幼虫への移行ができない。このナトリウムポンプによる発生制御もポンプ活性を伴わないものであり、またそのシグナルの下流ではインシュリン経路とRas-MAPキナーゼ経路が機能していることも分かっている⁶⁾。同様にショウジョウバエにおいても、ナトリウムポンプはいわゆる足場タンパク質として、そのポンプ活性非依存的に上皮細胞間の中隔接合（septate junction）形成を制御することが明らかにされている^{7,8)}。このようなポンプ活性非依存的な機能は、現在のところ線虫やショウジョウバエのようなモデル生物でしか見つかっていないが、そのアミノ酸相同性から哺乳類においても同様な機能を有することは十分考えられ

る。ヒトにおいては、ナトリウムポンプ遺伝子が家族性片麻痺性片頭痛や若年性パーキンソン病といった幾つかの神経疾患の原因遺伝子であることが報告されている。それぞれの疾患を発症している家系において、二型家族性偏頭痛はナトリウムポンプ $\alpha 2$ 遺伝子（*Atp1A2*）上に複数の突然変異が⁹⁾、若年性のパーキンソン病については $\alpha 3$ 遺伝子（*Atp1A3*）上に複数の変異が見つかった¹⁰⁾。各突然変異によるアミノ酸置換部位はポンプ分子上に広く分散しており、一部の機能的ドメインとリンクしているようには思われな。また発見された突然変異を導入した遺伝子を培養細胞に発現させると、ナトリウムポンプの阻害剤であるウアバイン処理により高頻度の細胞死を引き起こす。したがって、見つかった変異は機能損失型であり、発現し

たポンプはその活性を失っているのではないかと予想されている。これらのヒト疾患とポンプ活性非依存的な機能の関連性については現時点では見出されていない。しかしながら、筆者らは上記の線虫ナトリウムポンプ変異体を用いて、寿命（日齢）に伴うドーパミン神経の生存率を解析したところ、アゴニストに対して弱い抵抗性を示すポンプ変異体において有意に早い細胞死が誘発されることを明らかにしている（投稿準備中）。

今後線虫を含めたモデル生物を用いることで、個々のアミノ酸変異部位がもたらすポンプ機能と神経機能、特に神経細胞死との関係についての詳しい解析が、ポンプ変異がもたらすヒト神経疾患の原因解明に繋がることを期待している。

- 1) Hilgenberg, L.G., Su, H., Gu, H., O'Dowd, D.K., & Smith, M. A. (2006) *Cell*, 125, 359–369.
- 2) Doi, M. & Iwasaki, K. (2002) *Neuron*, 33, 249–259.
- 3) Mahoney, T.R., Luo, S., & Nonet, M.L. (2006) *Nat. Protoc.*, 1, 1772–1777.
- 4) Doi, M. & Iwasaki, K. (2008) *Mol. Cell. Neurosci.*, 38, 548–558.
- 5) Davis, M.W., Somerville, D., Lee, R.Y., Lockery, S., Avery, L., & Fambrough, D.M. (1995) *J. Neurosci.*, 15, 8408–8418.
- 6) Ruaud, A.F. & Bessereau, J.L. (2007) *Development*, 134, 867–879.
- 7) Paul, S.M., Palladino, M.J., & Beitel, G.J. (2007) *Development*, 134, 147–155.
- 8) Paul, S.M., Ternet, M., Salvaterra, P.M., & Beitel, G.J. (2003) *Development*, 130, 4963–4974.
- 9) De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., & Casari, G. (2003) *Nat. Genet.*, 33, 192–196.
- 10) de Carvalho Aguiar, P., Sweadner, K.J., Penniston, J.T., Zaremba, J., Liu, L., Caton, M., Linazasoro, G., Borg, M., Tijssen, M.A., Bressman, S.B., Dobyns, W.B., Brashear, A., & Ozelius, L.J. (2004) *Neuron*, 43, 169–175.

戸井 基道

(独立行政法人産業技術総合研究所
脳神経情報研究部門)

Pump activity-independent novel functions of Na⁺/K⁺ ATPase in the nervous systems

Motomichi Doi (Neuroscience Research Institute, AIST, Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

ユビキチン化によるリン酸化シグナルの新たな時空間的制御機構—MAP キナーゼシグナル複合体の受容体から細胞質移行による活性化—

はじめに

これまでリン酸化シグナルの活性化は、受容体でのキナーゼ複合体形成が発端となり、その場で引き起こされるものと考えられてきた。しかし、この従来のモデルだけでは、生物が限られたシグナル伝達経路のみで、微妙な環境変化や外的ストレスに迅速に対応し、多様で複雑な生理応答を示すことを説明できない。これを可能とするのは、受容体下流に平行して幾つも存在するシグナル経路が時間差を持って複雑に相互作用しながらシグナルを制御していること、また、同じシグナル分子であっても複合体の構成因子や細胞内局在の違いで異なる機能を示すことによる。「いつ、どこでシグナルが発信されるか」、つまり、細胞内シグナルのダイナミックな時間的および空間的制御が多様な生理応答を可能としている。例えば、TNF 受容体では刺激直後に TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) などのアダプター分子群により受容体下で形成された複合体が、生存や細胞の基本機能の維持に重要な NF-κB (nuclear factor-κB) 経路を活性化した後、別な細胞内因子 FADD (Fas-associating protein with death domain) と結合して細胞質移行することで逆にアポトーシスシグナルを誘導する¹⁾。しかし、実際どのような仕組みでこのようなシグナルの時空間的制御が可能となるのかについては、これまで不明であった。

我々は、同じ TNF ファミリーで B 細胞の増殖や抗体産生に重要な CD40 受容体に注目し、その下流で活性化する MAP3K (mitogen-activated protein 3 kinase) である MEKK1 (MAP/ERK kinase kinase 1) のシグナル複合体とその活性化機構について解析した。その理由は、我々が以前、その欠損マウスで胚中心形成や抗体産生などの B 細胞機能に異常を見出していたからである²⁾。また、CD40 受容体下流には MEKK1 経路以外にも、NF-κB 経路³⁾など複数のシグナル経路が存在するが、以前から NF-κB シグナルの活性化は MEKK1 より常に時間的に早いことが分かっており、この分子メカニズムの詳細な解析が、シグナルの時空間的制御の解明に繋がると考えられた。本研究による解析