

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

の結果、MEKK1下流のMAPキナーゼ活性化の時空間的制御にはMEKK1複合体の受容体からの細胞質移行が必須であり、その移行にはユビキチン化を介した、ある一つの複合体構成因子のタンパク質分解が重要であることが明らかとなった^{4,5)}。

1. TRAFファミリーによるMEKK1活性制御

CD40受容体には、シグナルの振り分けの鍵となる重要なTRAFファミリーアダプター分子の中で主にTRAF2, TRAF3, TRAF6が結合することから⁶⁾、まず、それぞれの欠損B細胞でのMEKK1活性化について検討したところ、TRAF2欠損細胞において、MEKK1およびその下流のMAP2KであるMKK4やMAPKであるJNK, p38の活性化が著しく減少しており、TRAF2がMEKK1活性化に必須であることが判明した。興味深いことに、TRAF3欠損細胞では逆にMEKK1活性化が刺激後早い時間で増強されており、TRAF3が何らかのメカニズムでシグナルを阻害していることが予想された(図1A)。なお、TRAF6は別のMAP3KであるTAK1の活性化に必須であることが分かっている。

2. MEKK1シグナル複合体の形成と受容体からの細胞質移行

このTRAF3のシグナル阻害メカニズムの解明のため、CD40刺激依存的なMEKK1結合分子を同定する過程で、MEKK1が巨大なシグナル複合体を形成することを見出した。このMEKK1シグナル複合体の構成因子を免疫沈降法によって詳細に解析したところ、このMEKK1複合体にはTRAF2以外にも、Ubc13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) やIKK γ (IkB kinase γ), c-IAP1/2 (inhibitor of apoptosis proteins 1 and 2), TRAF3といったシグナル関連分子が含まれていた。面白いことに、これらの構成因子はCD40刺激に伴って一旦CD40受容体に会合して複合体形成後、時間経過と共に細胞質へと遊離されることが明らかとなった(図1B)。また、TRAF2欠損細胞では複合体は形成されず、TRAF2がMEKK1シグナル複合体形成の核となると

考えられる。

3. c-IAP1/2依存的なTRAF3のユビキチン化と分解による複合体の細胞質移行

これら構成因子のうち、c-IAP1/2はK48結合型ユビキチンE3リガーゼであり、ユビキチン化を介して標的タンパク質の分解を促進する⁷⁾。MEKK1シグナル複合体の細胞質移行メカニズムを明らかにする目的で、このc-IAP1/2の欠損細胞および阻害剤⁸⁾を用いて検討を行い、c-IAP1/2欠損およびその阻害剤によりシグナル複合体の細胞質移行が著しく抑制されることを見出した(図1B)。同様な結果がプロテアソーム阻害剤によっても得られたことから、c-IAP1/2によるユビキチン化を介した何らかのターゲット分子のタンパク質分解が、シグナル複合体の細胞質移行に重要であることが予想された。

そこで、本シグナルの重要なアダプター分子であるTRAF分子の分解を詳細に検討した結果、TRAF3の分解が刺激後に観察され、その分解はc-IAP1/2阻害剤によって抑制された(図1C)。さらに実際に、c-IAP1/2依存的なTRAF3のユビキチン化がタンパク質分解関連のK48結合型であり、同様にc-IAP1/2阻害剤によって抑制されることも確認している。即ち、TRAF3によって膜に留められたMEKK1シグナル複合体が、c-IAP1/2依存的なユビキチン化によるTRAF3の分解によって初めて細胞質に遊離できることが分かった。

最も重要なのは、MEKK1や下流のJNK, p38の活性化がc-IAP1/2欠損やc-IAP1/2およびプロテアソーム阻害剤で抑制されたことである(図1D)。これは、TRAF3分解を介してシグナル複合体が細胞質に移行して初めて活性化できることを意味している。TRAF3欠損細胞でのみMEKK1やJNK, p38の活性化が刺激後早い時間で増強されていた理由は、このメカニズムのためであり、TRAF3分解を経ずにシグナル複合体が細胞質に移行して活性化してしまうものと考えられる。なお、このTRAF3を介したTRAF2-MEKK1経路の活性化機構は、他のTRAF6-TAK1経路でも保存されていた。

図1 c-IAP1/2依存的なTRAF3分解によるシグナル複合体の細胞質移行とMAPキナーゼ活性化

(A)TRAF2欠損細胞でのMEKK1, JNK, p38の活性化抑制とTRAF3欠損細胞での初期活性化シグナルの増強。それぞれの活性化はリン酸化認識抗体を用いて検出した。(B)細胞を細胞膜と細胞質画分に分画し、CD40およびMEKK1で免疫沈降した。MEKK1シグナル複合体の構成因子は、阻害剤で未処理の細胞ではCD40刺激に伴ってCD40受容体に会合した後、複合体は時間経過と共に細胞質へと遊離した。一方、c-IAP1/2阻害剤で処理すると、MEKK1シグナル複合体は30分でも受容体に結合したままであり、複合体の細胞質移行はc-IAP1/2依存的であった。(C)CD40受容体刺激後にTRAF3の分解が観察され、その分解はc-IAP1/2阻害剤によって抑制された。(D)MEKK1, JNK, p38の活性化のc-IAP1/2阻害剤による抑制。IP; immunoprecipitation, IB; immunoblot.

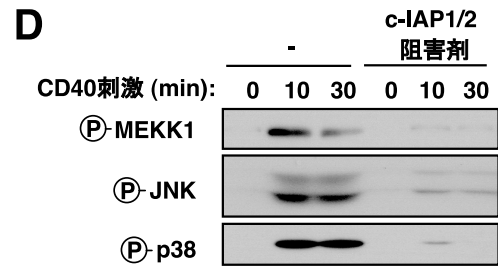
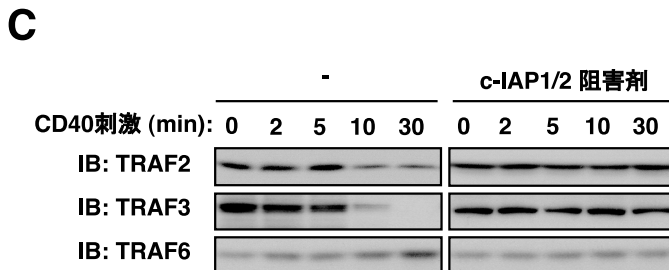
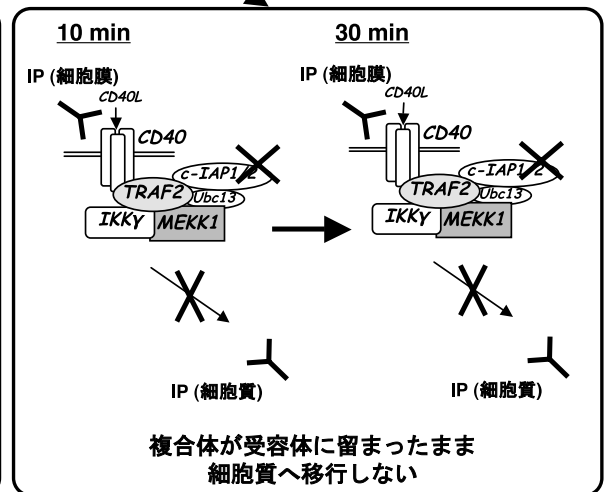
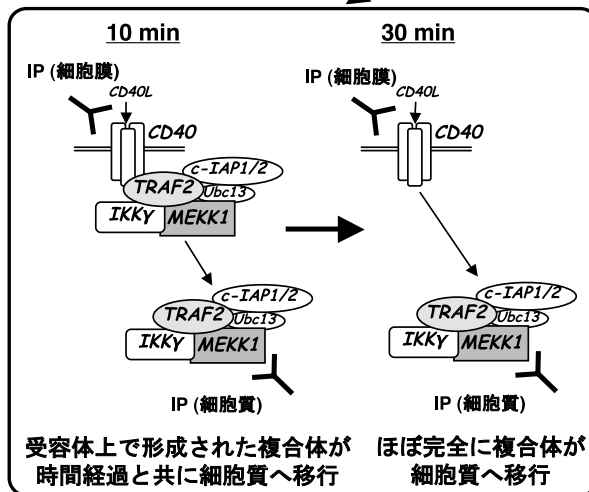
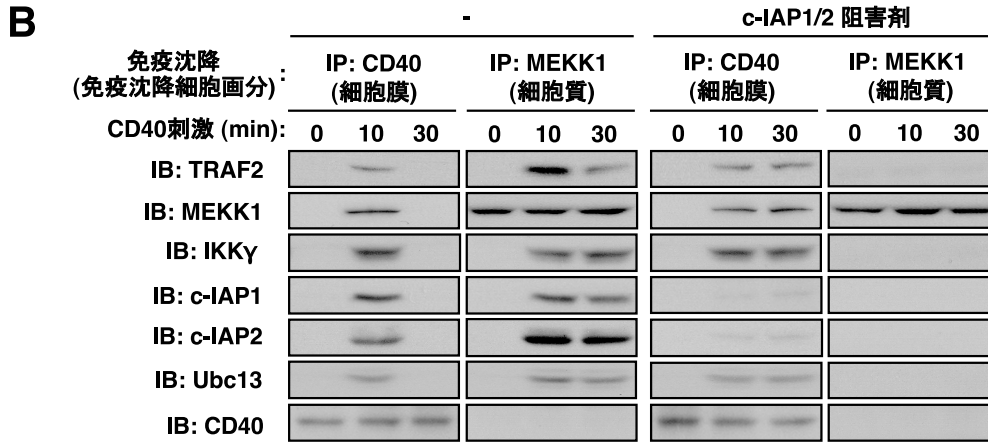
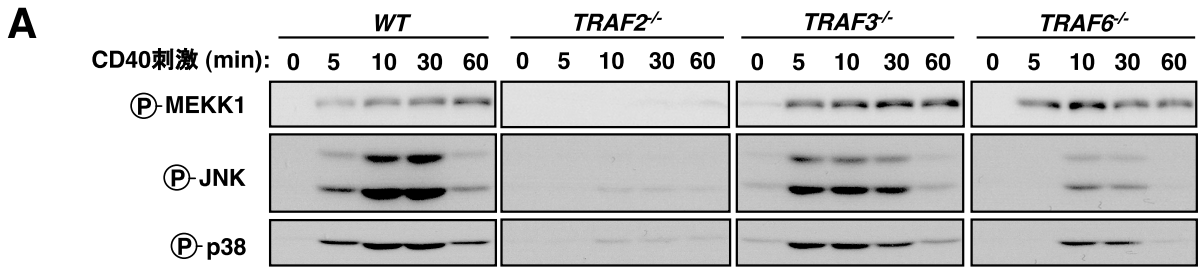


図 1

4. 2段階シグナル機構とその意義

このようなシグナル複合体の受容体への会合と c-IAP1/2 依存的な TRAF3 のユビキチン化による分解を介した細胞質への遊離という空間的な移行のメカニズムを、我々は「2段階シグナル機構 (two-stage signaling mechanism)」と呼ぶことにした (図2)。最初に述べたように、NF- κ B 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いたが、そのメカニズムはこれまで不明であった。実は、NF- κ B シグナルは c-IAP1/2 阻害剤に非感受性で、NF- κ B の上流キナーゼ IKK α/β の活性化が既に受容体で起こってしまうことから、2段階シグナル機構ではないことが判明した。従って、この2段階シグナル機構は MAP キナーゼシグナル経路に特有の機構であると考えられ、MEKK1 シグナルと NF- κ B シグナルは、時間的にも空間的にも異なるメカニズムで活性化することが明らかとなった。

このように一つの受容体下流に二つの経路が存在する意義は一体何であろうか。おそらく、このシステムはシグナル経路相互の時空間的制御によるシグナル変化を可能とする仕組みであり、例えば、NF- κ B のような1次シグナルの活性化によって生存など細胞の基本機能が維持された後

に、MEKK1 のような2次シグナルによって1次シグナルを調節することで、微妙なシグナルのバリエーションを生じさせ、一つの受容体刺激からでも多様な生理応答を生み出すことができると考えられる (図3)。また、生存シグナルを細胞死シグナルより先行させるため、という TNF シグナルでの例と同じく、このシステムは生命の恒常性にとって重要な意義を持つと考えられ、活性化の時間的順序の逆転は細胞死や間違った細胞応答を引き起こしかねない。さらに我々は、MEKK1 の下流のエフェクター分子である JNK や p38 が、シグナル複合体の細胞質移行後に初めて複合体に結合し活性化することを見出しており、シグナル活性化の空間的違いも生理応答の発現に重要な意味を持つと考えられる。

5. ユビキチン化によるリン酸化シグナル制御

最後に、MEKK1 シグナル複合体のそれぞれの因子の役割について概説する。我々は、c-IAP1/2 の活性化メカニズムについて解析した結果、TRAF2 が c-IAP1/2 の活性化因子であること、また K63 結合型ユビキチン化の特異的認識抗体を用いて⁹⁾、CD40 刺激に伴い c-IAP1/2 が TRAF2 依存的に K63 結合型ユビキチン化を受けることを見出した。K63 結合型ユビキチン化は一般的にタンパク質機能制

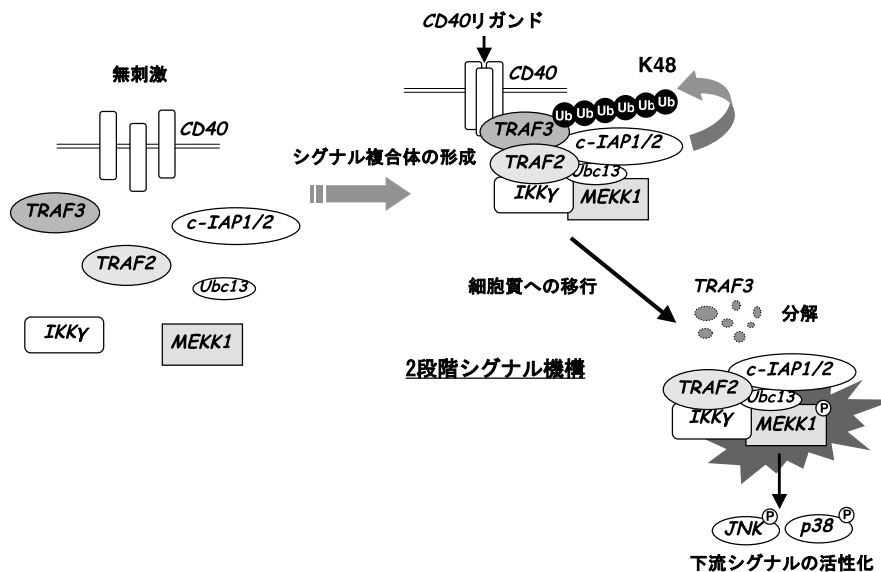


図2 2段階シグナル機構による MAP キナーゼ活性化

複合体構成因子が解離した無刺激の状態から、CD40 受容体刺激後、一旦、MEKK1 シグナル複合体が受容体に形成される。シグナル複合体と受容体とのリンカータンパク質である TRAF3 が c-IAP1/2 による K48 結合型のユビキチン化を介して分解され、複合体が細胞質へ移行することで活性化した MEKK1 が、下流エフェクター分子である JNK や p38 を活性化する。このメカニズムを「2段階シグナル機構」と呼ぶ。

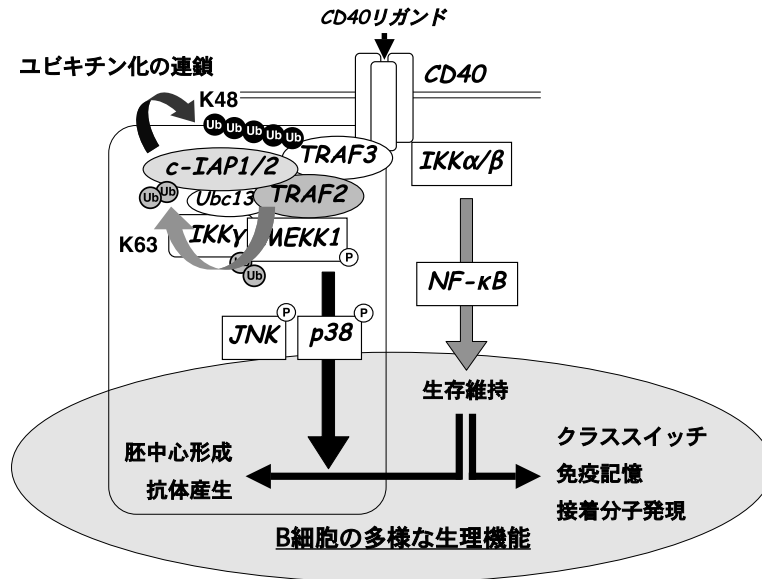


図3 ユビキチン化を介したリン酸化シグナルの時空間的分離機構
 NF-κB シグナルは2段階シグナル機構ではなく、MAPキナーゼシグナルとは時間的・空間的に分離可能である。NF-κB シグナルが生存や細胞の基本機能を維持した後にMEKK1シグナルによる制御を受けることで、シグナルのバリエーションが生じ、B細胞におけるCD40受容体のような多様な生理応答が生み出されると考えられる。リン酸化カスケードの上流では、TRAF2依存性のc-IAP1/2やIKKγのK63結合型ユビキチン化、次いでc-IAP1/2依存性のTRAF3のK48結合型ユビキチン化といったユビキチン化カスケードとも言えるような、異なる結合型のユビキチン化の連鎖によって、キナーゼシグナルの活性化が厳密に制御されている。シグナル複合体 (signalosome) は、そのようなシグナルの時空間的な振り分けが行われる場として重要である。

御に関与することが分かっている¹⁰⁾。さらに前述のように、MEKK1シグナル複合体中にはK63特異的E2ユビキチン結合酵素Ubc13¹¹⁾が含まれていた。そこで、Ubc13をノックダウンしたところ、CD40刺激によるMEKK1活性化がほぼ完全に消失した。これらの結果はおそらく、CD40刺激によって受容体に集積し活性化したTRAF2がユビキチンE3リガーゼとしてUbc13と共に、c-IAP1/2をK63結合型ユビキチン化し、それによって活性化したc-IAP1/2が次にTRAF3をK48結合型ユビキチン化することによってTRAF3が分解し、最終的にMEKK1が細胞質に移行して活性化するものと考えられる。

さらに我々は、MEKK1シグナル複合体因子であるIKKγもTRAF2依存的にK63結合型ユビキチン化を受けることを発見した。IKKγのノックダウン細胞でも、MEKK1の活性化がほぼ消失しており、同時にMEKK1がシグナル複合体へ会合できなくなっていることが判明した。これらの結果から、TRAF2依存性のIKKγのK63結

合型ユビキチン化がMEKK1との結合に関与し、シグナル複合体へのMEKK1の会合を促進しているのではないかと予想している。実際、MEKK1分子内にはユビキチン結合モチーフであるUIM (ubiquitin interaction motif) が存在することから、このようなドメインによってIKKγのK63結合型ユビキチン化が認識されているのかも知れない。

このようにシグナル複合体がMEKK1活性化にとって重要であり、複合体中のそれぞれの因子がそれぞれに役割を担ってMEKK1活性化に寄与することが分かってきた。そして、キナーゼカスケードを形成するリン酸化シグナルの上流で、いわばユビキチン化カスケードと言っても良い、異なる結合型のユビキチン化の複雑な連鎖によってシグナルの時空間的、空間的な分離機構が厳密に制御されていることは、リン酸化とユビキチン化のクロストークを考える上で興味深い(図3)。

おわりに

最近我々は、この TRAF2 と c-IAP1/2 による TRAF3 分解システムが、NF- κ B の非標準経路の上流キナーゼである NIK (NF- κ B-inducing kinase) の分解にも関わっていることを見出した^{12,13)}。またシグナル複合体によるキナーゼ活性化システムは、CD40 受容体のファミリーである TNF 受容体や BAFF (B cell-activating factor) 受容体だけでなく、一部の TLR 受容体にも保存されたシステムであることが分ってきた。このようなシグナル複合体 (signalosome) の存在については、キナーゼシグナルに留まらず、様々なシグナル経路でその重要性が明らかになりつつある^{14,15)}。シグナル複合体上で行われるユビキチン化やリン酸化の一連の複雑な制御システムが、微妙な環境変化や外的ストレスに迅速に対応し、一つの受容体刺激からでも多様で複雑な生理応答を生み出すメカニズムだと考えられる。シグナル複合体は言わばポイント (分岐点) としての役割を担っており、その複合体上でのシグナルの時空間的な振り分けが、生命恒常性のバランス調節にとって不可欠である。

謝辞

この一連の研究は、California 大学 San Diego 校の Michael Karin 教授の研究室で行ったものである。

- 1) Mischeau, O. & Tschopp, J. (2003) *Cell*, 114, 181-190.
- 2) Gallagher, E., Enzler, T., Matsuzawa, A., Anzelon-Mills, A., Otero, D., Holzer, R., Janssen, E., Gao, M., & Karin, M. (2007) *Nat. Immunol.*, 8, 57-63.
- 3) Baud, V. & Karin, M. (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 33-40.
- 4) Matsuzawa, A., Tseng, P.H., Vallabhapurapu, S., Luo, J.L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D.A., Gallagher, E., & Karin, M. (2008) *Science*, 321, 663-668.
- 5) Eliopoulos, A.G. (2008) *Science*, 321, 648-649.
- 6) Bishop, G.A. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 775-786.
- 7) Li, X., Yang, Y., & Ashwell, J.D. (2002) *Nature*, 416, 345-347.
- 8) Li, L., Thomas, R.M., Suzuki, H., De Brabander, J.K., Wang, X., & Harran, P.G. (2004) *Science*, 305, 1471-1474.
- 9) Wang, H., Matsuzawa, A., Brown, S.A., Zhou, J., Guy, C.S., Tseng, P.H., Forbes, K., Nicholson, T.P., Sheppard, P.W., Häcker, H., Karin, M., & Vignali, D.A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 20197-20202.
- 10) Chen, Z.J. & Sun, L.J. (2009) *Mol. Cell*, 33, 275-286.
- 11) Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 962-970.
- 12) Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.H.,

- Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A., Bergsagel, P.L., & Karin, M. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1364-1367.
- 13) Wallach, D. & Kovalenko, A. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1325-1327.
 - 14) Shaw, A.S. & Filbert, E.L. (2009) *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 47-56.
 - 15) Matsuzawa, A. & Ichijo, H. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1780, 1325-1336.

松沢 厚

(東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室)

A novel spatiotemporal regulation of kinase signaling by ubiquitination: MAP kinase is activated through translocation of the signaling complex from receptor to cytosol
Atsushi Matsuzawa (Laboratory of Cell Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

シナプスレベルから見た海馬の左右非対称性

はじめに

神経細胞間の情報伝達は主に (化学) シナプスを介して行われているが、哺乳類においては興奮性のシナプスではグルタミン酸、抑制性のシナプスでは γ アミノ酪酸 (GABA) がその主要な伝達物質である。中枢神経の大多数のシナプスは興奮性であるので、脳では神経細胞間の情報伝達の大部分はグルタミン酸が担っていることになる¹⁾。このシナプスでの情報伝達強度は一定ではなく、神経活動に依存して変化するため (シナプスの可塑性)、記憶・学習の分子メカニズムと考えられており、神経科学では研究がさかんな分野である。特に、シナプスに発現しているグルタミン酸受容体の量は、後シナプス神経細胞の興奮性を直接決定するので、シナプスでの情報伝達強度を左右する主要な因子である。シナプス形態もまた、シナプスでの情報伝達強度を決定する因子である。大きいシナプスは概して小さいシナプスより長期間安定で、形態も複雑であり、グルタミン酸受容体をたくさん発現していることが知られている²⁾。

哺乳類で空間記憶に重要である海馬は、シナプスの回路構築が単純であり、電気生理的にシナプスの可塑的变化が誘導しやすいため、脳の中でも最もよく研究が行われている部位である。解剖学的には大きく分けて歯状回 (DG)・