

得られた知見を哺乳類培養細胞モデル系に適用することで、上皮の内在性がん抑制システムの普遍原理が明らかになっていくと期待される。

- 1) Slaughter, D.P., Southwick, H.W., & Smejkal, W. (1953) *Cancer*, 6, 963-968.
- 2) Land, H., Parada, L.F., & Weinberg, R.A. (1983) *Science*, 222, 771-778.
- 3) Hogan, C., Dupre-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-Lopez, L.A., Vincent, J.P., Itoh, Y., Hosoya, H., Pichaud, F., & Fujita, Y. (2009) *Nat. Cell Biol.*, 11, 460-467.
- 4) Bilder, D. (2004) *Genes Dev.*, 18, 1909-1925.
- 5) Gardiol, D., Zacchi, A., Petrera, F., Stanta, G., & Banks, L. (2006) *Int. J. Cancer*, 119, 1285-1290.
- 6) Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., & Banks, L. (2004) *Oncogene*, 23, 8033-8039.
- 7) Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Takizawa, S., Suzuki, Y., Yasugi, T., Huibregtse, J.M., & Taketani, Y. (2004) *Br. J. Cancer*, 90, 194-199.
- 8) Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J. P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., Birnbaum, D., & Borg, J.P. (2005) *Oncogene*, 24, 4330-4339.
- 9) Brumby, A.M. & Richardson, H.E. (2003) *EMBO J.*, 22, 5769-5779.
- 10) Igaki, T., Pagliarini, R.A., & Xu, T. (2006) *Curr. Biol.*, 16, 1139-1146.
- 11) Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., & Miura, M. (2002) *EMBO J.*, 21, 3009-3018.
- 12) Igaki, T., Pastor-Pareja, J.C., Aonuma, H., Miura, M., & Xu, T. (2009) *Dev. Cell*, 16, 458-465.
- 13) Miaczynska, M., Pelkmans, L., & Zerial, M. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 400-406.
- 14) Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschrwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., & Schutze, S. (2004) *Immunity*, 21, 415-428.

井垣 達史

(神戸大学大学院医学研究科 細胞生物学分野 G-COE)

Epithelial intrinsic tumor suppression by TNF-JNK signaling  
Tatsushi Igaki (Department of Cell Biology, G-COE, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunokicho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan)

## シナプスから核へのシグナリングとシナプス活動依存的遺伝子発現：前初期遺伝子 *Arc* の発現制御メカニズムを中心に

### 1. はじめに

他の多くの細胞種と同様に、神経細胞において細胞外シグナルに応答した遺伝子発現は、細胞の分化や生存、そして機能維持に根源的な意義をもつ。特に、脳の高次機能である長期記憶の形成・保持には、行動や経験に応じた遺伝子の新規発現・活性化が必須であることが明らかになってきた。神経細胞は極めて複雑な形態をもち、細胞体、軸索部、樹状突起部の三つのコンパートメントに大別される。軸索部に存在する前シナプスから神経伝達物質が放出されると、樹状突起上の後シナプス膜表面の受容体がこれを受け取り、細胞から細胞への情報の伝達が成立する。細胞の情報伝達はマイクロドメインに情報伝達分子を集積することにより効率化されているが、脂質ラフトを用いた効率化という戦略をとる一般的な体細胞と異なり、神経細胞ではシナプス前および後膜において高度に効率化されている。中枢神経系の一つの神経細胞は数百から数万ものシナプスをもち、複数の前シナプス細胞より時間的・空間的に統合された複雑なパターンのシナプス入力を受ける。このようなシナプス入力がある一定の閾値を超えると、細胞体にある核において遺伝子発現が引き起こされる。樹状突起は細胞体から長く伸長しているため、シナプスから核までが数百  $\mu\text{m}$  以上も離れている場合もある。つまり、流動性のある脂質ラフトがシグナル受容の中心である細胞種とは異なり、神経細胞では細胞膜表面から核へのシグナリングは、位置的に固定された、しかも、細胞体から遠く離れたシナプスから核へと伝えられなければならない(表1)。これはどのようにして実現されているのであろうか？ また、シナプス活動は多種類(おそらく数百種以上)の遺伝子を活性化しうることが知られており、その遺伝子産物の一部は樹状突起や軸索のシナプスで機能するタンパク質である。この場合、細胞体で産生された遺伝子産物は遠く離れたシナプス部位に輸送される必要があるが、これはどのような機構によるのであろうか？ このような神経細胞におけるシグナリングはまだ不明な点が多いが、いくつかのステップについては次第に明らかになりつつある。本稿では我々が最近明らかにしたシナプス活動依存的な遺伝子発現

表1 一般的な体細胞（上皮様細胞）と神経細胞の膜表面から核へのシグナリングの相違

	上皮様細胞	神経細胞
細胞膜におけるシグナル受容		
主な受容体	受容体型チロシンキナーゼ/Gタンパク質共役型受容体	イオンチャンネル型神経伝達物質受容体
受容中心	脂質ラフト	後シナプス
受容位置	細胞表面全体で流動的	シナプス部位はほぼ固定
細胞極性・細胞内区分	少～中程度	強い極性（樹状突起，細胞体，軸索）
核へのシグナリング距離	数～数十 $\mu\text{m}$	数十～数百 $\mu\text{m}$
局所 mRNA の存在および翻訳	無・不明	有（樹状突起部）
遺伝子発現依存的な細胞応答	細胞増殖・分化	シナプスの機能変化・構造変化

調節に関する研究成果を中心に，最近の知見の紹介と今後の課題について概説したい。

## 2. シナプスから核へのシグナリング

まず，シナプスが活性化されるとシナプス局所ではどのようなイベントが起こるのであろうか？ 中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は，後シナプス膜上に存在するイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の構造変化を引き起こし，チャンネルを開口させる。グルタミ

ン酸受容体にはいくつかのタイプが知られているが，中でも NMDA 型受容体はカルシウム透過性が高く，このチャンネルによって細胞内に流入するカルシウムイオンがシグナリングカスケードの開始に重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。また，グルタミン酸受容体によって引き起こされる膜の脱分極に伴い，電位依存型カルシウムチャンネルが活性化されることによってもカルシウムイオンの流入が引き起こされる。

このようなカルシウム流入によって活性化されるシグナ

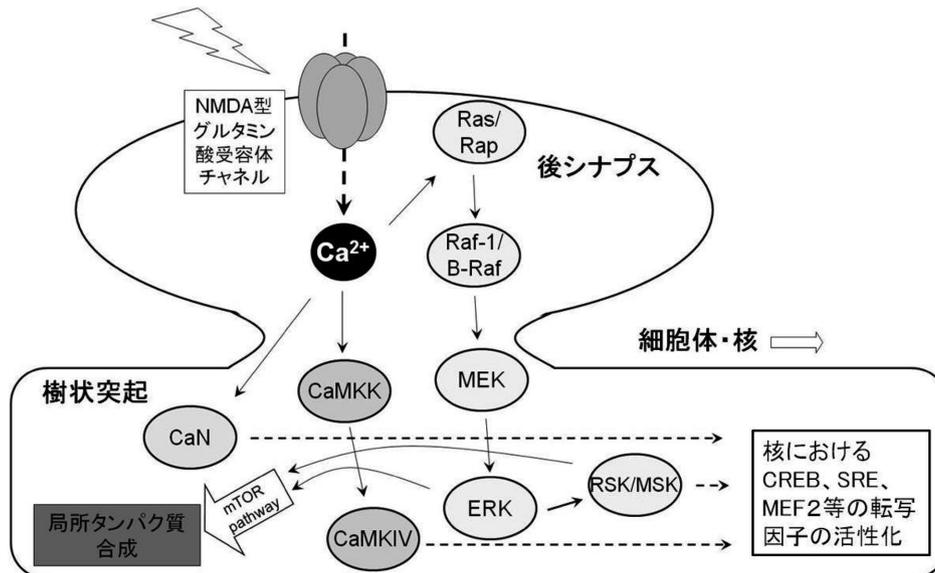


図1 シナプス局所の活性化とシグナリング

グルタミン酸受容体を介したカルシウムイオンの細胞内流入がトリガーとなり，MAPキナーゼ系やCaMキナーゼ系の活性化を引き起こす。このシグナルはシナプス部位より遠く離れた細胞体・核へと伝えられ，神経活動応答性転写因子CREBやSRF，MEF2等を活性化させる。また，神経細胞に特徴的なシナプス局所イベントとして，シナプス活動による樹状突起mRNAの翻訳（局所タンパク質合成）制御が報告されている。

CaN：カルシニューリン；CaMKK：Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存的キナーゼキナーゼ；CaMK-IV：Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存的キナーゼIV；RSK：リボソームS6キナーゼ；MSK：mitogen- and stress-activatedプロテインキナーゼ

ル伝達系はいくつか知られているが、特に Ras や Rap などの低分子 G タンパク質を介した MAP キナーゼ系や  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ) 系の重要性が示されている<sup>1,2)</sup> (図 1)。また、カルシニューリン等のカルシウム依存的な脱リン酸化酵素の活性化によるシグナル制御の重要性も示唆されている。

これらの複数のシグナル経路の使い分けや統合は、シナプス入力の時空間パターンや強度に依存している可能性が高いと考えられるが、そのルールや法則は現在のところ不明な点が多い。最近、我々はシナプス刺激によって CaM キナーゼ経路の一つである CaM キナーゼキナーゼ (CaMKK)-CaMKIV 経路が活性化されることが長期シナプス可塑性を引き起こすために必要であることを見だし報告している<sup>3)</sup>。また、より根本的な設問としては、シグナル経路のどの段階で核にシグナルが伝わるのかという問題がある。例えば、MAP キナーゼ経路の ERK やリボソーム S6 キナーゼ (RSK), mitogen- and stress-activated プロテインキナーゼ (MSK), CaM キナーゼ系の一員である CaMKIV 等のリン酸化酵素は樹状突起・細胞体および核に存在するが、これらのリン酸化酵素が細胞体で活性化された後に核へ移行しているのか、または核へ移行した後に活性化修飾を受けるのかに関しては明らかではない。

### 3. 転写因子 CREB の活性化

シナプス局所より核へと伝えられたシグナルは次に転写因子へと伝えられる。神経細胞における遺伝子発現調節因子として最も研究が進んでいるのが転写因子 CREB である。CREB は 133 番目にあるセリン残基がリン酸化されることにより活性化され、DNA 結合配列である CRE (cAMP-responsive element) からの転写を促進する<sup>4)</sup>。CREB の Ser133 のリン酸化はプロテインキナーゼ A (PKA) や CaMKIV, また RSK/MSK 等のさまざまなキナーゼによって制御されることが示されており<sup>1,5)</sup>、これら CREB キナーゼの使い分けはシナプス刺激の条件に依存している可能性が高い。CREB の Ser133 のリン酸化が起ると、CREB 結合タンパク質 CBP が誘引され、また、CREB のコアクチベーター CRTC (CREB-regulated transcription coactivator) 等と相互作用することにより、転写開始前複合体が形成され、RNA ポリメラーゼ II 依存的な転写が促進される。CRE をプロモーター領域に含む CREB 標的遺伝子としては、代表的な前初期遺伝子である *c-fos* や *zif268* (*egr-1*)、脳由来神経栄養因子 (*bdnf*) 等が挙げられる。また、*c-fos* や *zif268* 等、多くの前初期遺伝子プロ

モーター領域には serum-responsive element (SRE) が存在する。この SRE には転写因子 SRF (serum responsive factor) が結合し神経活動依存的な遺伝子発現を制御する。CREB と同様、SRF は Ser103 等の残基がリン酸化されることにより活性化される。神経細胞におけるリン酸化機構については CREB 同様、MAP キナーゼおよび CaM キナーゼが関与することが示唆されているが詳細は不明である。また SRF のコアクチベーターとして Elk/Ets ファミリータンパク質や MKL (megakaryoblastic leukemia) ファミリータンパク質が知られているが、これらの因子による制御機構にはまだ不明な点が多く、今後の解析が待たれる。

### 4. Arc プロモーター領域に存在する SARE の発見

近年、我々はシナプス活動依存的な遺伝子発現のモデル遺伝子として *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein, 別名 *Arg3.1*)<sup>6)</sup> の解析を精力的に行ってきた。この結果、*Arc* の発現は複数のシナプス-核シグナリングによって極めて巧みに制御されていることが明らかになった<sup>7)</sup>。この結果は、これまで主に研究されてきた *c-fos* や *bdnf* 遺伝子の制御機構の知見と合わせて、今後の神経活動依存的遺伝子研究の重要な基盤になると考えられる。なお、紙面の都合上割愛するが、*c-fos* や *bdnf* の発現制御機構に関しては他の優れた総説<sup>8,9)</sup>をご参照頂きたい。

#### 4-1 神経特異的前初期遺伝子 *Arc*

前初期遺伝子 *Arc* は、後シナプスに局在するタンパク質をコードする神経特異的遺伝子であり、その産物はグルタミン酸受容体のシナプス膜への発現を調節する働きをもつ<sup>10)</sup>。遺伝子改変マウスを用いた研究等により、*Arc* はシナプス伝達効率の長期増強 (long-term potentiation, LTP) や長期抑圧 (long-term depression, LTD) に関与すること、また、空間学習課題や恐怖条件付けなど長期記憶形成・保持に必須であることが明らかになってきた<sup>11)</sup>。大脳において *Arc* 遺伝子は外部から視覚・触覚などの生理的感覚刺激が入ると速やかに発現誘導される性質をもち、この発現閾値は個々の神経細胞の活動とよく相関している。このため *Arc* は大脳の神経活動をマッピングするための分子マーカーとして最も頻繁に使われている遺伝子の一つである。このように、この数年で *Arc* 遺伝子の重要性を示す知見は飛躍的に増えてきたが、一方、その発現制御機構に関してはほとんど研究が進んでいなかった。

#### 4-2 *Arc* 遺伝子の発現制御解析

このような背景のもとに、我々は *Arc* の発現制御機構の解析に乗り出した<sup>7)</sup>。*Arc* 遺伝子は進化的に脊椎動物で保



から、これら三つの転写因子が協同的に働く SARE 複合体の存在が示唆された。

また CaM キナーゼの阻害剤や MEK 阻害剤によって SARE による転写活性化は顕著に抑制されることから、SARE 活動依存的な活性化には CaMK 経路および MEK/ERK 経路が必要であることが示唆され、CREB および SRF がこれらのシグナル経路により活性化されるというこれまでの知見と一致する。しかしながら、CREB、SRF および MEF2 の三つの転写因子が協同して一つの神経可塑性調節遺伝子の発現誘導を制御するという例はこれまでになく、SARE 複合体の実体解明により、これまでにない新しい遺伝子発現制御の分子機構が明らかになる可能性が高いと考えられる。

なお、我々の報告の直後、UCSF の Finkbeiner 研究室は、我々とは独立にバイオインフォマティクスを駆使して、SARE に含まれる SRE が重要な働きをしていることを報告している<sup>12)</sup>。しかし既知コンセンサス配列から若干逸脱している SARE 中の CRE および MRE の同定には、配列検索アルゴリズムだけでは不十分で、古典的な生化学・分子生物学的解析を丹念に実践して初めて解明できたという点は興味深い。

## 5. 核からシナプスへ

前述の核へのシグナリングや活動依存的な遺伝子発現に比べて、誘導された遺伝子がどのように神経の機能を変化させるかという点、特に遺伝子産物がシナプスタンパク質をコードしている場合、翻訳されたタンパク質がどのようにシナプスへ運ばれ機能しうるかという点に関しては現在のところ研究が遅れている。特に、特定の樹状突起部位、例えば以前に活性化されたシナプス部位特異的にどのように遺伝子産物が運ばれるのか？という問いに対しての明確な答えは得られていない。

神経細胞においては、ある種の mRNA の一部は細胞体では翻訳されず、モータータンパク質により選択的に樹状突起に輸送されることが知られる<sup>13)</sup>。樹状突起に運ばれた mRNA は樹状突起上やシナプス近傍でタンパク質に翻訳されると考えられるが、この生理的意義に関しては統一した見解があるわけではなく、樹状突起 mRNA および局所翻訳の生理機能解明は今後の大きな課題である。

## 6. おわりに

本稿で概説したように、シナプス局所でのシグナルは細胞体へ伝わり、新規の遺伝子発現という形の細胞全体の応

答を引き起こす。この局所から全体へいったん拡散したシグナルは、また(未同定の)フィードバックシグナルによって再び局所へ収束し、シナプスでの変化、例えばシナプス伝達効率変化の安定性制御を行うと考えられる。電気生理学的手法による膨大な研究蓄積により、シナプスの変化は活性化された部位特異的に限定されて起こることが知られている。このためには、細胞全体に発現誘導された遺伝子産物がシナプス局所の変化と相互作用することにより空間的特異性を確保していると考えられるが、このメカニズムの解明は現在の神経科学の大きな課題の一つである。これをうまく説明するものとして、シナプスタギング&キャプチャー仮説が提唱されている<sup>14)</sup>。すなわち、入力があったシナプス局所にはある種の刻印(タグ)が押され、その印をもつシナプスのみが、細胞体から運ばれてきた可塑性関連タンパク質を捕獲(キャプチャー)し、これによって入力部位特異性が担保されるというものである。このようなシナプスタグおよび可塑性関連タンパク質の分子実体についてはまだその多くが不明であるが、最近、活動依存的遺伝子産物である Homer-1a/Vesl-1s がこの条件を満たす可能性のある分子であることが報告された<sup>15)</sup>。今後の活動依存的遺伝子発現の研究においては、発現制御機構の解明に加え、シナプスタギング&キャプチャー仮説の検証や分子実体の探求、そして発現誘導された産物がどのようにシナプス機能を制御するかという点を明らかにしていくことが必要であろう。

## 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は主に東京大学医学系研究科・神経生化学教室にて行われたものです。教室主任である尾藤晴彦准教授、大学院生の川島尚之氏と姜楠氏、研究員の野中美応博士をはじめとする共同研究者の方々に感謝致します。また、常に温かい助言・励ましをいただいた富山大学・井ノ口馨教授、同・津田正明教授、基礎生物学研究所・山森哲雄教授、ジョンスホプキンス大学・Paul Worley 教授に深く感謝致します。

- 1) 尾藤晴彦 (1998) 生化学, 70, 466-471.
- 2) West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., & Greenberg, M.E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11024-11031.
- 3) Redondo, R.L., Okuno, H., Spooner, P.A., Frenguelli, B.G., Bito, H., & Morris, R.G.M. (2010) *J. Neurosci.*, 30, 4981-4989.
- 4) Okuno, H. & Bito, H. (2006) *AfCS/Nature Molecule Pages*,

doi: 10.1038/mp.a000690.01.

- 5) Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R.W. (1996) *Cell*, **87**, 1203-1214.
- 6) Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lahnahan, A.A., & Worley, P.F. (1995) *Neuron*, **14**, 433-445.
- 7) Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., Takemoto-Kimura, S., Worley, P. F., & Bito, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 316-321.
- 8) Flavell, S.W. & Greenberg, M.E. (2008) *Annu. Rev. Neurosci.*, **31**, 563-590.
- 9) 津田正明, 原 大智, 安田 誠, 福地 守, 田淵明子 (2006) *生化学*, **78**, 998-1007.
- 10) Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R.S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., & Worley, P.F. (2006) *Neuron*, **52**, 445-459.
- 11) Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M.R., Lipp, H.P., Grant, S.G., Bliss, T.V., Wolfner, D.P., & Kuhl, D. (2006) *Neuron*, **52**, 437-444.
- 12) Pintchovski, S.A., Peebles, C.L., Kim, H.J., Verdin, E., & Finkbeiner, S. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 1525-1537.
- 13) Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004) *Neuron*, **43**, 513-525.
- 14) Morris, R.G. (2006) *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 2829-2846.
- 15) Okada, D., Ozawa, F., & Inokuchi, K. (2009) *Science*, **324**, 904-909.

奥野 浩行

(東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻  
神経生化学分野)

Synapse-to-nucleus signaling and activity-dependent gene expression in neurons: mechanisms of synaptic activity-dependent regulation of the *Arc/Arg3.1* gene

Hiroyuki Okuno (Department of Neurochemistry, University of Tokyo Graduate School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

## ヒト人工染色体ベクターの利点とその応用

### はじめに

「外来遺伝子の発現を目的通りにコントロールした動物細胞を効率よく作製する」ために、これまで種々の遺伝子導入ベクターの開発が行われてきた。動物細胞へ遺伝子を

導入する方法には大きく分けて、ウイルスベクターを用いる方法と、非ウイルスベクターを用いる方法がある。それらの遺伝子導入ベクターは、細胞に遺伝子を導入し、その機能を解析するためだけでなく、医薬品の生産や遺伝子治療のツールとしても用いられている。

汎用されているウイルスベクターとして、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターなどがあげられる。レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合、ウイルスの感染効率が高いため、多くの細胞に遺伝子を導入できるうえ、染色体上に遺伝子が挿入されるため、遺伝子発現を持続的に行う細胞クローンを得ることが可能である。しかし、一方で、挿入された染色体部位による位置効果(サイレンシング)や挿入されるコピー数のため、導入した遺伝子の発現量はクローン間で大きく異なる。また、ベクターは宿主染色体に組み込まれるため、宿主染色体上の遺伝子を破壊するなどの可能性がある<sup>1,2)</sup>。アデノウイルスベクターは感染効率が非常に高いという利点がある一方で、細胞が分裂するたびに消失するため、遺伝子の発現は一過性であるという欠点がある<sup>3)</sup>。センダイウイルスベクターは、染色体に組み込まれず、遺伝子発現を比較的長く維持できるため、高い遺伝子の発現能を示すうえ、一本鎖のマイナス鎖RNAよりなるベクターゲノムは細胞質に留まるため宿主染色体に挿入されず、挿入変異などの危険性を回避できるという利点があることから、遺伝子治療などへの利用が期待されている<sup>4,5)</sup>。しかしながら、遺伝子の長期的な発現を可能にするためには、より一層の発現の持続や、ウイルスの反復投与が可能なベクターの構築が今後必要である。

このようなウイルスベクターに共通していえることは、導入できる遺伝子サイズが10kb以下と小さく、特にセンダイウイルスベクターは5kb程度と、ウイルスベクターの中でも特に小さい。よって、導入できる遺伝子サイズに制約があるため、大きなサイズの遺伝子を導入することは困難である。また、ヒトの遺伝子治療への利用に限れば、ウイルスベクターの免疫原性の問題や、遺伝子の挿入箇所によっては近傍のがん原遺伝子を活性化させる可能性も含んでいる。実際に、2003年にヒト重症免疫不全の遺伝子治療にウイルスベクターが使用されたが、ベクターの宿主染色体への挿入によるがん(白血病)の発生が報告されている<sup>6)</sup>。

一方、非ウイルスベクターとしては、リポソームを用いた方法や、ヒト、動物、魚類の遺伝子構造の中に見られる