

される。さらに既知のNF- κ B 標的遺伝子 (IkB α , RelB など) の発現誘導も TLR/CD40 リガンド刺激と同様に TSLP 刺激により認められる。興味深いことに TSLP による p50 の核移行は TLR/CD40 リガンド刺激に比して遷延する傾向にあった。これらより、TSLP は NF- κ B 経路を活性化し得ると考えられるが、これが TSLP 受容体から直接生じるのか、あるいは何らかのタンパク質新生を介して生じているのかは明らかでない。TSLP で刺激した mDC は 48 時間以内に Th2 分化因子の OX40L を発現する¹⁰⁾。一方、TLR/CD40 リガンド刺激では OX40L が発現しない。OX40L 遺伝子のプロモーター領域に NF- κ B の結合配列があり、この領域には TSLP 刺激特異的な p50 を中心とする NF- κ B 複合体が結合することがゲルシフトアッセイにより明らかになった (図 2g)。また刺激 48 時間以降に RelB が結合することが ChIP 法で明らかになった (図 2h)。実際にこの領域を含む OX40L プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に結合させたレポーターコンストラクトは RelB と p50 の共発現により強力に活性化されたこと (図 2i) から、TSLP による特異的 OX40L の誘導には RelB と p50 の活性化が寄与していると考えられた。

5. 今後の展望

プライマリー DC を用いてシグナル解析を行うことで、従来説明がつかなかった TSLP の生物作用に一応の分子基盤が与えられた (図 1b)。しかしなぜ単一のサイトカインがこのように幅広い細胞内シグナル伝達経路を活性化するのは今後の生化学的課題である。とはいえ、TSLP はアレルギー侵入などによる上皮ダメージを免疫系に伝える役割をしており、ヒト TSLP 受容体の発現は mDC、肥満細胞、好酸球といった細胞に限られている (図 1a)。よって、TSLP の機能阻害はアレルギー侵入による免疫応答の最上流を選択的に阻害することになるので、新たなアレルギー治療戦略として非常に有望であると思われる。

謝辞

一連の研究は著者が Yong-Jun Liu 博士 (米国 MD アンダーソン癌センター) の研究室にて行ったものであり、博士のご指導に感謝する。

- 1) Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000) *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 767–811.
- 2) Pulendran, B., Tang, H., & Manicassamy, S. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 647–655.

- 3) Liu, Y.J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.H., de Waal Malefyt, R., Omori, M., Zhou, B., & Ziegler, S.F. (2007) *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 193–219.
- 4) Ziegler, S.F. & Artis, D. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 289–293.
- 5) Allakhverdi, Z., Comeau, M.R., Jessup, H.K., Yoon, B.R., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S.F., Sarfati, M., & Delespesse, G. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 253–258.
- 6) Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., & Medzhitov, R. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 310–318.
- 7) Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu, M., Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., & Bazan, J.F. (2001) *J. Immunol.*, 167, 336–343.
- 8) Lu, N., Wang, Y.H., Wang, Y.H., Arima, K., Hanabuchi, S., & Liu, Y.J. (2009) *J. Exp. Med.*, 206, 2111–2119.
- 9) Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt, R., Bazan, F., Kastelein, R. A., & Liu, Y.J. (2002) *Nat. Immunol.*, 3, 673–680.
- 10) Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X., Yao, Z., Cao, W., & Liu, Y.J. (2005) *J. Exp. Med.*, 202, 1213–1223.
- 11) Wong, C.K., Hu, S., Cheung, P.F., & Lam, C.W. (2010) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 43, 305–315.
- 12) Nagata, Y., Kamijuku, H., Taniguchi, M., Ziegler, S., & Seino, K. (2007) *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 144, 305–314.
- 13) Arima, K., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Chang, M., Sun, S.C., & Liu, Y.J. (2010) *Sci. Signal.*, 3, ra4.
- 14) Fulkerson, P.C., Zimmermann, N., Hassman, L.M., Finkelman, F.D., & Rothenberg, M.E. (2004) *J. Immunol.*, 173, 7565–7574.
- 15) Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., & Feldmann, M. (2001) *Int. Immunol.*, 13, 675–683.

有馬 和彦

(佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野)

The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic response

Kazuhiko Arima (Division of Medical Biochemistry, Department of Biomolecular Sciences, Saga Medical School, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan)

精神遅滞における樹状突起スパイン形態異常とそのシグナル伝達機構

1. はじめに

脳神経細胞は互いの結合部位であるシナプスによって接触し、伝達を行い、様々な刺激条件の下でシナプス数は増

減する。中枢神経系のほとんどの興奮性シナプス入力は神経伝達物質であるグルタミン酸によるもので、興奮性シナプスは樹状突起上にある無数の小さな棘突起（スパイン）上に形成される。つまり、スパインは脳の神経細胞において興奮性シナプス入力を受信している部位である。スパインは、脳機能の発達・成熟に伴って成長し、成熟後においても脳の経験や刺激に応じてその数や形態を変化させる。それらの刺激に応じたスパインの形態変化は、カルシウム動態・シナプス電流の大きさ・シナプス可塑性の違いを反映しており、学習・記憶とも密接に関係している。さらに、脳の学習・記憶によりもたらされたシナプスの可塑的变化を長期的に保持するために、スパイン形態の刺激頻度依存的変化が起こる。これまでの研究では、精神遅滞や統合失調症等の精神疾患ではスパイン密度の変化や異常な形態変化が見られることが報告されている¹⁾。一方、私達は以前の研究において、カルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) の過剰な活性化がスパイン形態異常を引き起こすことを報告した²⁾。本稿では、X-連鎖精神遅滞原因遺伝子変異マウスにおける樹状突起スパイン形態変化とその細胞内メカニズムについて、原因遺伝子 *ATRX* (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) に関する私達の研究成果を含め紹介する。

2. X-連鎖精神遅滞と樹状突起スパイン

精神遅滞は子供や若い成人の約 2-3% に見られ、その発症は環境要因等の非遺伝的要因と遺伝的要因に起因すると考えられている。環境要因には、アルコール、栄養失調、妊娠中の感染症、早産、周産期無酸素症、外傷等が挙げられる。X-連鎖精神遅滞は、X 染色体上の単一の遺伝子の変異に関連付けられている精神遅滞であり、遺伝性の精神遅滞の中でも X 染色体上に原因遺伝子が同定される頻度は極めて高い³⁾。これまでの研究で 40 以上の X-連鎖精神遅滞原因遺伝子が同定されているが⁴⁾、これらの分子はこれまでの研究で解明された範囲で機能的に大きく三つに分類される。

一つ目は、神経細胞のスパイン形態やシナプス結合を直接的に調節する分子群である。これらの多くは Rho GTPases シグナル伝達系に関与している。Rho GTPases である RhoA, Rac1, Cdc42 は細胞骨格の主要な調節因子であり細胞分裂や移動に関与するが、中枢神経系では神経軸索の伸長、樹状突起の発達やスパイン形態を調節する。Rac1 と Cdc42 は神経突起伸長に、RhoA は突起の退縮に関与する⁵⁾。例えば、X-連鎖精神遅滞原因遺伝子として同

定された *PAK3*, *OPHN1*, *ARHGEF6* にコードされるタンパク質は Rho GTPases と結合し、アクチン細胞骨格を調節、スパイン形態を変化させる。また、これらの分子はシナプス可塑性にも関与する⁶⁾。

二つ目としてタンパク質の翻訳を調節する分子群が挙げられる。その中でも FMRP (fragile X mental retardation protein) が最もよく研究されており、FMRP をコードする遺伝子 *FMR1* は X-連鎖精神遅滞のひとつである fragile X 精神遅滞症候群の原因遺伝子である。興味深いことに、FMRP は自身のいくつかの結合ドメインを介して mRNA と相互作用し、単一のシナプスにおいて特定の mRNA の翻訳を促進、もしくは抑制する。*FMR1* 遺伝子欠損マウスでは、スパインに存在する足場タンパク質である PSD-95 (postsynaptic density-95)、神経活動依存的に誘導される Arc (activity-regulated cytoskeletal-associated protein)、シナプス可塑性に関与する AMPA 受容体サブユニットである GluR1 の合成速度が増加している。また、*FMR1* 遺伝子欠損マウスでは長く細いフィロポディア様スパインの数の増加とシナプス可塑性の障害が見られる⁷⁾。

三つ目として、エピジェネティックな遺伝子発現調節に関与する分子群が同定されており、*MECP2* (methyl-CpG-binding protein 2) と *ATRX* が挙げられる。MeCP2 はメチル化した DNA のシトシン残基に結合し、他の遺伝子の発現を制御する転写因子である。*MECP2* 変異マウスの樹状突起はスパイン密度が低く、シナプス可塑性の障害も報告されている⁸⁾。MeCP2 や *ATRX* は神経細胞以外の細胞でも細胞核内に広く見られ、多くの遺伝子発現制御に関わっているが、なぜこれらの遺伝子の異常が精神遅滞をひき起こすのか、詳しいメカニズムは明らかとされていない。私達は、*ATRX* 変異精神遅滞モデルマウスを用いて、スパイン形態異常とその細胞内メカニズムについて検討した。

3. *ATRX* 変異精神遅滞モデルマウスの樹状突起スパイン形態異常

ATRX は Xq13.3 に局在し、300 kb に広がり 36 エクソンからなる X-連鎖精神遅滞原因遺伝子のひとつである。*ATRX* は二つの主要なモチーフを持つ。N-末端には PHD (plant homeodomain) zinc finger ドメイン、C-末端には SWI2/SNF2 (Switch 2, sucrose non-fermenting 2) ファミリーの helicase ドメインを持ち、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子として考えられているが、その詳細な機能は明らかとされていない。典型的な α -サラセミア X-連鎖精神遅滞症候群 (ATR-X 症候群) は重度の精神遅滞、顔

面異形症, てんかん発作, 赤血球のヘモグロビン封入体を含む様々な臨床症状を示す。また, *ATRX* の変異は, *ATR-X* 症候群だけでなく, 精神遅滞を呈する Juberg-Marsidi 症候群, Carpenter-Waziri 症候群等の原因遺伝子としても報告されていることから, *ATRX* の変異は幅広い精神疾患と関連付けられている。

ATRX タンパク質を完全に欠損させたマウスでは, 大脳皮質の成長段階早期において神経細胞のアポトーシスが增加することにより大脳皮質の体積が減少し, ほとんどが胎生致死に至る⁹⁾。また, ヒトにおいてはこれまで, *ATRX* タンパク質の完全な喪失は報告されていない。*ATRX* 遺伝子にはいくつかスプライスバリエントが存在するため, 点変異が起こったとしても全長 *ATRX* タンパク質の部分的な減少が見られるに過ぎないと考えられる。

これまでヒトにおいて, 軽度の精神遅滞症状を示す Chudley-Lowry 症候群を含めた *ATRX* の exon2 における変異 (R37X) が報告されている¹⁰⁾。そこで私達は *ATRX* の exon2 を欠損させたマウス (*ATRX*^{ΔE2} マウス)¹¹⁾ を用いて解析を行った。実際に *ATRX*^{ΔE2} マウスでは認知機能の障害が見られた。また, 組織学的解析により, *ATRX* は神経細胞やグリア細胞の核内, 特にヘテロクロマチンに局在が確認された。しかしながら, *ATRX*^{ΔE2} マウスは神経細胞数, グリア細胞数, 大脳皮質の層構造に野生型との大きな差は見られなかった¹²⁾。

次に, *in vivo* における樹状突起スパインの形態解析を行った。方法として, 灌流固定した脳を 250 μm にスライスし, DAPI で可視化した細胞に対して電気的にルシファーイエローを注入し, 解析した。興味深いことに, *ATRX*^{ΔE2} マウスは内側前頭前野において, 精神遅滞の死後脳で見られるような, 長く細いフィロポディア様スパインの数が有意に増加していた。逆に, マッシュルーム型のような成熟スパインの数は有意に減少しており, 総スパイン数に野生型との有意な差は見られなかった (図 1)¹²⁾。

4. *ATRX*^{ΔE2} マウスのスパイン形態異常の細胞内シグナル伝達機構

私達は以前, ラット海馬切片培養神経細胞に活性化型 CaMKII を注入することで, 長く細いフィロポディア様スパインが多数見られることを報告した²⁾。そこで, 実際に *ATRX*^{ΔE2} マウスにおいて CaMKII 活性が変化しているか検討した。結果として, *ATRX*^{ΔE2} マウスの内側前頭前野において CaMKII の活性が異常に上昇していることを見出した (図 1)。また, 細胞骨格の形態調節に参与する Rho GTPases シグナル伝達系では, CaMKII の基質であり, Rac1-GEF である Tiam1 と Kalirin-7 のリン酸化, 及びその下流である PAK (p21-activated kinase) の活性が有意に上昇していた。これらの結果より, *ATRX*^{ΔE2} マウスでは CaMKII の過剰な活性上昇, 続いて Rac1-GEF/PAK シグナ

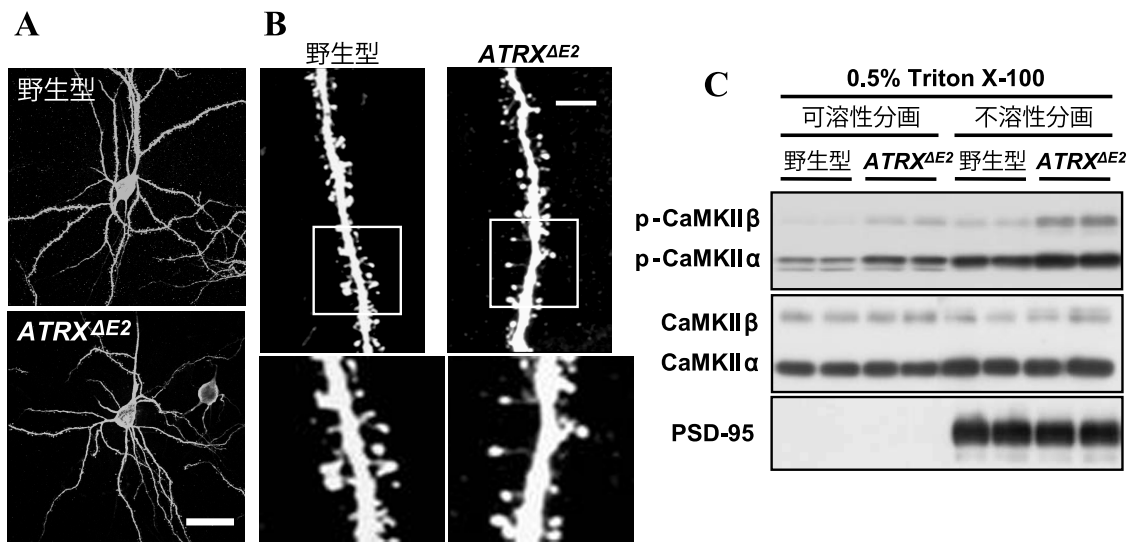


図 1 内側前頭前野における *ATRX*^{ΔE2} マウスのスパイン形態と CaMKII 活性

A, B. 野生型と *ATRX*^{ΔE2} マウスの神経細胞全体像と樹状突起スパイン。 *ATRX*^{ΔE2} マウスのスパインにはネックが細長く, ヘッドが小さい未成熟なものが多数みられた (Scale bar; A, 30 μm; B, 4 μm)。 C. *ATRX*^{ΔE2} マウスでは CaMKII の自己リン酸化が異常に亢進していた。文献 12) Shioda *et al.*, *J. Neurosci.* (2011) を改変。

ルの亢進によりスパイン形態異常をひき起こすことが明らかとなった。

5. *ATRX*^{ΔE2} マウスのスパインにおける CaMKII/PP1 活性バランスの破綻

なぜ *ATRX*^{ΔE2} マウスでは CaMKII の過剰な活性上昇が見られるのか検討した。CaMKII はカルシウム・カルモデュリン依存性のセリン/スレオニンキナーゼであり、スパインのシナプス後肥厚部に豊富に存在し、主に NMDA 受容体から細胞内に流入するカルシウムイオンによってその活性が調節されている。また、CaMKII はシナプス後肥厚部において NMDA 受容体サブユニットの NR1, NR2B だけでなく、F-actin, densin-180, α -actinin-2 のような細胞骨格タンパク質とも結合する。*ATRX*^{ΔE2} マウスでは CaMKII のタンパク質発現量に変化は見られないため、細胞骨格タン

パク質との相互作用の量的変化によりシナプスの骨格を変化させた可能性は低い。また、その他の主要なキナーゼである PKC や ERK, 同じ CaMK ファミリーである CaMKI や CaMKIV の活性に変化が見られなかったことから、CaMKII 活性上昇は単に細胞内のカルシウム濃度上昇によるものではないと推察される。

この他に CaMKII 活性を細胞内において直接制御する分子として、脱リン酸化酵素が考えられる。そこで、シナプス後肥厚部において CaMKII を直接脱リン酸化することが知られている PP (protein phosphatase)-1, -2A, -2B, -2C のタンパク質発現量と酵素活性の測定を試みた。結果として *ATRX*^{ΔE2} マウスにおいて PP1 (特に PP1 γ 1) の発現低下、及び活性低下が起こることを見出した¹²⁾。これらの結果は *ATRX*^{ΔE2} マウスでは CaMKII/PP1 の活性バランスが破綻していることを示唆している (図 2)。

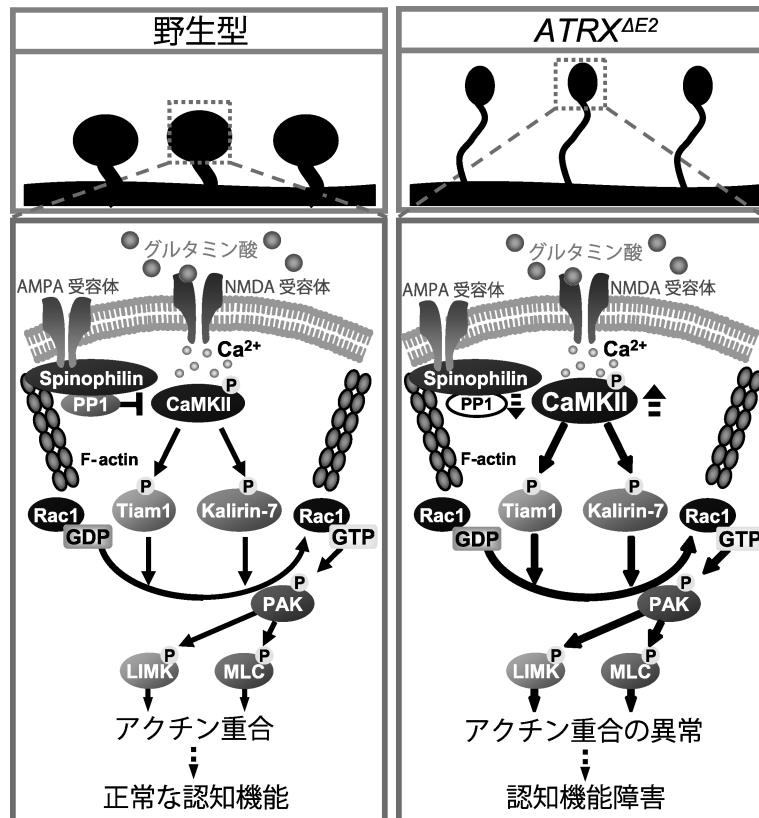


図 2 *ATRX*^{ΔE2} マウスにおけるスパイン形態異常の細胞内メカニズム
野生型では、Spinophilin に結合した PP1 が NMDA 受容体からのカルシウムイオンによって活性化した CaMKII を脱リン酸化することにより、バランスを保っている。適度に活性化した CaMKII は Rac1-GEF を活性化し、下流のアクチン重合に関与する分子を介してスパインを形成する。*ATRX*^{ΔE2} マウスにおいては PP1 の活性低下により CaMKII とのバランスが崩壊し、CaMKII 活性が異常に上昇するため、アクチン重合の異常が起こる。

6. エピジェネティクス制御による PP1 発現抑制の可能性

興味深いことに、成体ラットの恐怖条件付け文脈学習では、記憶固定期にDNAメチル基転移酵素の発現が上昇し、*PP1γ1* 遺伝子のCpGアイランドが高度にメチル化を受け、その発現が抑制される¹³⁾。ATR-X症候群にはDNAメチル化パターンに変化が見られる¹⁴⁾。今後、*PP1γ1* 遺伝子のメチル化がATR-X症候群を含めた精神遅滞において重要な役割を担うか検討する。

7. その他の精神遅滞モデルマウスと CaMKII 活性の関連性

X-連鎖精神遅滞であるRett症候群は、*MECP2* 遺伝子の変異に起因する。CaMKIIによるMeCP2 (Ser421) のリン酸化はMeCP2依存性のBDNF (brain-derived neurotrophic factor) の誘導を制御し、樹状突起の伸展やスパイン形態に関与することが報告された¹⁵⁾。Angelman症候群は、母由来15番染色体上の*UBE3A* 遺伝子コピーの欠失または変異により引き起こされる重度の精神遅滞である。*UBE3A* 遺伝子改変マウスでは海馬におけるCaMKII活性の低下が見られ、スパインの長さが短く、密度も低い。さらに、そのマウスを活性化型CaMKIIを発現する遺伝子改変マウスと掛け合わせることで、*UBE3A* 遺伝子改変マウスのCaMKII活性の低下が修復され、シナプス可塑性の障害、学習記憶の改善が見られた¹⁶⁾。これらの結果は、CaMKII活性制御が精神遅滞の治療に役立つ可能性を示している。

8. おわりに

今回紹介した精神遅滞だけでなく、統合失調症やADHD等の精神疾患においても樹状突起スパインの異常な形態変化や密度変化が報告されている。樹状突起スパイン制御機構解明の研究が、精神疾患の原因解明だけでなく、将来的に、精神疾患の治療に貢献できると考えている。

- 1) Kaufmann, W.E. & Moser, H.W. (2000) *Cereb. Cortex*, 10, 981-991.
- 2) Jourdain, P., Fukunaga, K., & Muller, D. (2003) *J. Neurosci.*, 23, 10645-10649.
- 3) Zechner, U., Wilda, M., Kehrer-Sawatzki, H., Vogel, W., Fundele, R., & Hameister, H. (2001) *Trends Genet.*, 17, 697-701.
- 4) Ropers, H.H. & Hamel, B.C. (2005) *Nat. Rev. Genet.*, 6, 46-57.
- 5) Govek, E.E., Newey, S.E., & Van Aelst, L. (2005) *Genes*

- Dev.*, 19, 1-49.
- 6) Boda, B., Dubos, A., & Muller, D. (2010) *Curr. Opin. Neurobiol.*, 20, 519-527.
- 7) Pfeiffer, B.E. & Huber, K.M. (2009) *Neuroscientist*, 15, 549-567.
- 8) Calfa, G., Percy, A.K., & Pozzo-Miller, L. (2011) *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 236, 3-19.
- 9) Bérubé, N.G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R.J., Higgs, D.R., Slack, R.S., & Picketts, D. J. (2005) *J. Clin. Invest.*, 115, 258-267.
- 10) Howard, M.T., Malik, N., Anderson, C.B., Voskuil, J.L., Atkins, J.F., & Gibbons, R.J. (2004) *J. Med. Genet.*, 41, 951-956.
- 11) Nogami, T., Beppu, H., Tokoro, T., Moriguchi, S., Shioda, N., Fukunaga, K., Ohtsuka, T., Yoko, I., Sasahara, M., Shimada, Y., Nishijo, H., Li, E., & Kitajima, I. (2010) *Hippocampus*, 21, 678-687.
- 12) Shioda, N., Beppu, H., Fukuda, T., Li, E., Kitajima, I., & Fukunaga, K. (2011) *J. Neurosci.*, 31, 346-358.
- 13) Miller, C.A. & Sweatt, J.D. (2007) *Neuron*, 53, 857-869.
- 14) Gibbons, R.J., McDowell, T.L., Raman, S., O'Rourke, D.M., Garrick, D., Ayyub, H., & Higgs, D.R. (2000) *Nat. Genet.*, 24, 368-371.
- 15) Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., Hu, L., Steen, J.A., Weitz, C.J., & Greenberg, M.E. (2006) *Neuron*, 52, 255-269.
- 16) van Woerden, G.M., Harris, K.D., Hojjati, M.R., Gustin, R.M., Qiu, S., de Avila Freire, R., Jiang, Y.H., Elgersma, Y., & Weeber, E.J. (2007) *Nat. Neurosci.*, 10, 280-282.

塩田 倫史, 福永 浩司

(東北大学大学院薬学研究科薬理学分野)

Abnormal dendritic spine morphology and its signal transduction mechanisms in mental retardation
Norifumi Shioda and Kohji Fukunaga (Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki-Aoba, Aobaku, Sendai 980-8578, Japan)

ユニークな酵素活性——超好熱アーキア由来耐熱性糖代謝酵素の特性

1. はじめに

糖は、大部分の生物でエネルギー源・細胞表層の構成物・情報伝達物質の構成要素として重要な役割を担っている。その代謝及び各反応を司る酵素の活性や機能について大腸菌をはじめとするモデル生物で詳しく解析されてきている。近年では次世代シーケンサーの登場で微生物のゲノ