

特集：酵母から動植物まで包括するユビキチン-プロテアソーム系の新展開

ユビキチン・プロテアソーム系によって制御される 軸索変性の分子メカニズム

若月修二, 荒木敏之

軸索変性はアルツハイマー病などの神経変性疾患に共通した所見であるとともに、発生過程における軸索の刈り込みなど、脳神経系のさまざまな局面において観察されるが、その制御メカニズムの詳細はこれまで明らかではなかった。最近、筆者らは軸索変性過程においてセリン・スレオニンキナーゼ AKT がユビキチンリガーゼ ZNRF1 のはたらきによってプロテアソーム依存的に分解され、軸索から消失することによって変性が促進されることを明らかにした。この発見によって、軸索変性とユビキチン・プロテアソーム系 (UPS, ubiquitin proteasome system) を関連付ける分子メカニズムが初めて明確となり、神経変性疾患の新しい治療標的の創成に発展できる可能性が強く示唆された。

はじめに

神経が物理的に傷害を受けると傷害部位より末梢側で神経繊維を構成する軸索が変性、消失する。この過程は英国の神経生理学者 Augustus Waller によって初めて記述され、彼の名に因んでワラー変性 (Wallerian degeneration) と呼ばれている¹⁾。ワラー変性は物理的な傷害によって開始されるだけでなく、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患において共通に認められる所見である。また、発生過程における軸索の刈り込みなど、脳神経系のさまざまな局面においてワラー変性に類似した現象が観察される (図 1)。近年まで、ワラー変性を含む軸索変性は細胞死に付随したメカニズムで進行すると考えられてきたが、例えば、顕著な軸索変性を認める運動ニューロンの変性疾患モデルにおいて、カスパーゼ 3 などの分子

群を阻害しても軸索変性の進行を阻止できないことなどから、現在では細胞死とは独立した軸索自律的な変性メカニズムによって制御されると考えられている²⁾。しかしながら、これまでその制御メカニズムについては十分な理解が得られていなかった。

軸索変性では、細胞骨格系の変性、すなわち微小管の脱重合やニューロフィラメントの分解が共通して観察されるが、この過程は MG132 などのプロテアソーム阻害剤を与えることによって遅延することから、UPS を介したタンパク質分解が関与すると考えられている³⁾。プロテアソーム阻害剤による遅延効果は微小管の重合に直接影響を与えるピンクリスチンによって誘導される変性には無効であることから、UPS は細胞骨格系に直接作用するのではなく、細胞骨格系の維持に関わるタンパク質分子を標的として分解することによって軸索を変性させると考えられる。UPS は選択的タンパク質分解を介してさまざまな細胞内シグナル伝達系の制御に関与しており、細胞骨格系の維持に関わるタンパク質分子およびこれを標的とするユビキチンリガーゼを同定することは、軸索変性を制御する細胞内シグナル伝達系を理解する上で極めて重要である。

このような背景のもと、筆者らはセリン・スレオニンキナーゼ AKT がユビキチンリガーゼ ZNRF1 (zinc and ring finger 1) を介してプロテアソーム系依存的に分解されて

(独) 国立精神・神経医療センター神経研究所疾病研究第 5 部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1)

Molecular mechanisms of axon degeneration regulated by the ubiquitin proteasome system

Shuji Wakatsuki and Toshiyuki Araki (Department of Peripheral Nervous System, National Institute of Neuroscience, National Center for Neurobiology and Psychiatry, Ogawahigashi 4-1-1, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

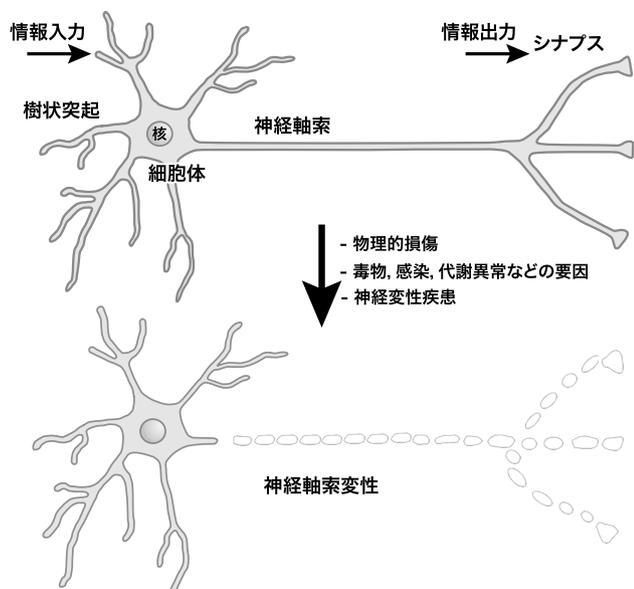


図1 軸索のワーラー変性は神経変性疾患をはじめ、さまざまな局面で観察される。

神経細胞は情報の出力を行う軸索と情報の入力を行う樹状突起という機能的に異なる神経突起を持つ。ワーラー変性は軸索への物理的損傷や毒物などの外的要因だけでなく、アルツハイマー病やパーキンソン病などの遺伝性神経変性疾患や代謝異常などの内的要因によって引き起こされる。

AKTが軸索から失われることにより、定常状態の軸索においてはAKTによって抑制されている下流のシグナル伝達系が活性化し、軸索変性が促進されることを明らかにした⁴⁾。本稿では、ZNF1を中心として軸索、樹状突起の伸長や形態形成を制御するユビキチンリガーゼについて紹介する。

1. UPS (ubiquitin proteasome system)

真核細胞には進化的に保存されたUPSやオートファジーなどの複数のタンパク質分解機構が存在し、細胞の恒常性を維持、監視している。特にUPSによるタンパク質分解は迅速で明確な基質特異性をもつ反応であり、細胞増殖や分化などさまざまなプロセスに関わるタンパク質分子を選択的に分解することでそのはたらきを質的、量的に変動させ、細胞機能を調節することが明らかとなっている。

UPSによって分解されるタンパク質分子は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) による一連の酵素反応によってユビキチン分子が付加され、26Sプロテアソームに運ばれ分解されるが、この一連の反応が正常にはたらくことは細胞の生存や恒常性の維持に極めて重要である。神経細胞においても、例えば、パーキンソン病の原因遺伝子のひとつであるPARKINはユビキチンリガーゼ活性を持ち、PARKINの遺伝的変異による機能異常によって異常なタンパク質凝

集体が蓄積することがパーキンソン病の症状の形成や進行と関連すると考えられている。

2. ユビキチンリガーゼの多様性と基質特異性

ゲノム情報の解読により、ヒトゲノム中におよそ600のユビキチンリガーゼが存在することが明らかとなり、大きくわけてHECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) 型、RING (really interesting new gene) 型、Uボックス型の三つのクラスに分類されている。HECT型ユビキチンリガーゼはパピローマウイルスE6タンパク質と結合し、がん抑制遺伝子p53をユビキチン化するユビキチンリガーゼとして同定されたE6AP (E6 associated protein) のカルボキシル末端領域と相同性なHECTドメインを持つ。HECTドメインはN-ローブとC-ローブと呼ばれる二つのサブドメインからなるL型構造をしており、N-ローブはE2と結合し、C-ローブは活性型システイン残基を含みユビキチンを基質タンパク質に転移する前にユビキチンと共有結合することを特徴とする。RING型ユビキチンリガーゼは亜鉛を配位するRINGフィンガードメインを持ち、ユビキチンリガーゼの中でも最も数が多く、現在では100以上の報告例がある。RINGフィンガードメインを介してE2と、それ以外の領域で基質タンパク質と結合し、両者を近傍に配置することでE2による基質タンパク質のユビキチン化を触媒する。一方、Uボックス型ユビキチンリガーゼはRING型の亜系であり、アミノ酸一次配列から予想される立体構造がRINGフィンガーと類似したUボックスと呼ばれる構造を持つ。UボックスはRINGフィンガーと異なり亜鉛を配位しないが、RINGフィンガーと同様にこの構造を介してE2と結合し、基質タンパク質へのユビキチン化を触媒すると考えられている。

このように、それぞれのクラスによってユビキチンを転移する様式に違いはあるが、ユビキチンリガーゼはユビキチンと結合したE2と同時に基質タンパク質と特異的に結合することから、UPSの基質特異性はユビキチンリガーゼによって規定されることが考えられる。しかしながら、ひとつのタンパク質分子を標的とするユビキチンリガーゼが複数存在する例も知られており、UPSによって制御される細胞機能を真に理解するためには、ユビキチンリガーゼと基質タンパク質との組合せに加えて、例えば発生過程における発現時期や細胞内局在など、時空間的な組合せを知る必要がある。

3. 神経突起の伸長や形態を制御するユビキチンリガーゼ

神経細胞には情報の出力に関わる軸索と情報の入力に関わる樹状突起の機能的に異なる神経突起が存在する。発達段階にある幼弱な神経細胞では軸索の先端に成長円錐と呼ばれる構造が出現し、周囲の環境を感知して適切な方向へ

表1 神経突起の伸長, 形態形成を制御するユビキチンリガーゼ

ユビキチンリガーゼ	基 質	機 能
APC	Liprin- α	軸索伸長の調節
β -TRCP	SPAR	神経突起棘の形成
Cullin3-KLHL3	PDZ-RhoGEF	神経突起伸長の制御
Fbxo45	不明	シナプス形成
OBSL-Cullin7Fbxw8	Grasp65	樹状突起のパターン形成
Nedd4	PTEN, Rap2	軸索, 樹状突起の分岐形成
Phr1	DLK	軸索伸長の調節 シナプス形成
Rnf6	LIM キナーゼ 1	軸索伸長の調節 アクチン骨格の制御
Smurf1	RhoA, Par6	軸索伸長の調節 神経突起形成の制御
Smurf2	Rap1B	神経突起形成の制御
TRIM2	ニューロフィラメント L 鎖	神経突起の維持
TRIM3	GKAP	神経突起棘の形成
ZNRF1	AKT	軸索変性の制御 微小管の制御

と軸索を伸長させ, 適切な標的, 多くの場合は樹状突起との間にシナプスを形成する. この過程は神経突起の伸長や退縮など, 細胞骨格系のダイナミックな変化を伴う細胞内反応を含んでおり, その制御に関わるユビキチンリガーゼがこの10年ほどの間に次々と明らかにされた(表1).

3-1 神経突起の形態形成を制御するユビキチンリガーゼ

Nedd4 (neuronal precursor cell expressed and developmentally downregulated protein 4) ファミリーは神経細胞に豊富に存在する HECT 型ユビキチンリガーゼで, 軸索では PTEN⁵⁾を, 樹状突起では Rap2⁶⁾をそれぞれ標的としており, いずれの神経突起においても分岐構造を増やすはたらきがある.

Smurf (smad ubiquitin regulatory factor) は, Smad をユビキチン化することで TGF β シグナルを制御する分子として同定された HECT 型ユビキチンリガーゼであり, Smurf1 と 2 が存在する. 神経細胞において Smurf1 は Par6 と RhoA という異なるタンパク質の分解を促進する. 海馬神経細胞では, 細胞が成熟するにつれて1本の軸索と複数の樹状突起を持つ, いわゆる極性を持った形態を呈するようになるが, Par6 は軸索の先端に局在してその伸長を促進するはたらきがあり, 反対に RhoA は軸索の伸長を抑制するはたらきがある⁷⁾. 極性形成に伴う軸索の伸長には PKA の活性化が必須であるが, Smurf 1 は PKA によるリン酸化を受けると RhoA への親和性が高まること, すなわち, RhoA を分解する活性が高まることが明らかとなっている.

3-2 神経突起伸長を制御するユビキチンリガーゼ

Phr1 はショウジョウバエでは Highwire, 線虫では RPM-

1 と呼ばれ, これらのモデル生物を用いた遺伝学的なスクリーニングにより, 軸索の形態やシナプス形成に関わる分子として同定された RING 型ユビキチンリガーゼである^{8,9)}. 同様の表現型は遺伝子欠損マウスにおいても認められている¹⁰⁾. Phr1 は軸索の先端部分にある成長円錐発現する DLK (double leucine kinase) を標的とする¹¹⁾. Phr1 は成長円錐を除く軸索全体に発現し, DLK の発現を成長円錐に限局させるはたらきがある.

APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) は複数のサブユニットから構成されるユビキチンリガーゼで, 細胞分裂期から G1 期にかけてサイクリンなどの細胞分裂に深く関わるタンパク質群を標的とし, 細胞周期の進行を制御する¹²⁾. APC のはたらきは調節因子である Cdc20 や Cdh1 によって制御され, この二つの因子と複合体を形成し細胞周期を制御する. Cdc20-APC は細胞分裂初期, Cdh1-APC は細胞分裂後期および G1 期にはたらく. 驚いたことに, この二つの複合体は非分裂細胞である神経細胞に発現し, Cdh1-APC は軸索伸長やパターン形成を¹³⁾, Cdc20-APC は樹状突起の形態形成やプレシナプスの分化を制御することが明らかになっている^{14,15)}.

ここまで, 神経突起の伸長や形態形成を制御するユビキチンリガーゼを幾つか例を挙げて紹介した. 前述のように, 神経突起の退縮を制御するメカニズムは伸長と同様に細胞骨格系の変化を伴う細胞内反応を含んでいる. 筆者らがこれまで研究対象としてきた軸索変性は広義には神経突起の退縮と捉えることができ, 細胞骨格系のダイナミックな変化を伴う細胞内反応によって制御されていることが近年明らかになってきた. 次項では, 筆者らが最近明らかに

した軸索変性を制御するユビキチンリガーゼ ZNRF1 について詳しく述べる。

4. 軸索変性を制御するユビキチンリガーゼ ZNRF1

末梢神経に傷害を与えると、野生型マウスの軸索は24時間以内に変性するが、wlds (Wallerian degeneration slow) と呼ばれる自然発生変異マウスの軸索は数日から数週間保持され、変性が著しく遅延する。この変異マウスでは、遺伝的変異によってニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの生合成に関わる酵素のアミノ酸配列全長を含むキメラタンパク質の発現が亢進しており、この酵素を過剰発現させた培養神経細胞やトランスジェニックマウスでは軸索変性が顕著に遅延することが証明されている^{2,4,16)}。この変異マウスを対象とした一連の研究による成果は、神経細胞にもともと備わっている細胞内反応に関わる酵素の発現を亢進、あるいは阻害することによって、軸索変性の進行を制御できる可能性を強く示唆するものであり、そのような酵素を明らかにすることは軸索変性の制御メカニズムを知る上で有効なアプローチとなると考えられた。

4-1 GSK3B 阻害による軸索変性の抑制

リン酸化反応はタンパク質の機能を制御する主要な細胞内反応のひとつである。筆者らはタンパク質のリン酸化反応が軸索の安定性や変性を制御する可能性を考え、*in vitro* 軸索変性モデル (このモデルではマウス胚より調製した後根神経節を培養して軸索を伸長させた後、神経節を取り除くことで細胞体から切り離された軸索が変性する過程を経時的に観察する)^{16,17)} に対してキナーゼ阻害剤ライブラリー中のそれぞれの阻害剤を与え、軸索変性を遅延させる阻害剤をスクリーニングした。数種類のそれぞれ独立したキナーゼに対する阻害剤が変性遅延効果を示したが、中でもグリコーゲン合成酵素 3B (GSK3B) 阻害剤は微小管の脱重合、ニューロフィラメントの分解、細胞膜の崩壊など、軸索変性過程で観察される構造的変化を幅広く抑制した (図 2A)。また、GSK3B 阻害剤は神経栄養因子 (NGF) 除去によって誘導される軸索変性についても抑制効果を示した。GSK3B は微小管の重合・脱重合を調節し、軸索伸長を制御することから^{18,19)}、筆者らは GSK3B と軸索変性との関連を詳しく調べた。

4-2 AKT のプロテアソーム依存的分解

GSK3B は9番目のセリン残基がリン酸化されると不活性化型 (pGSK3B) となる。変性過程の軸索における GSK3B の活性化状態の変化をウェスタンブロットにより調べると、pGSK3B は徐々に減少しており、阻害剤を用いた実験結果から予想される通り、GSK3B が変性開始後に活性化することが分かった (図 2B, C)。GSK3B は AKT によってリン酸化され、活性が抑制されることが知られていることから、変性過程の軸索における AKT の存在量、ならび

に AKT のキナーゼ活性を調べたところ、いずれも減少していた。これらのことから、軸索変性に伴う AKT の消失によって AKT を介した活性抑制が失われ、GSK3B が活性化すると考えられた。

それでは変性過程において、AKT はどのようにして軸索から消失するのだろうか。前述のように、軸索変性には UPS が関与している³⁾。これまで、AKT の UPS による分解はさまざまな細胞種で報告されており^{20,21)}、特に、神経細胞では、神経突起形成の制御と深く関連することが報告されている²²⁾。図 2D, E に示すように、プロテアソーム阻害剤によって変性を抑制させた軸索では、AKT はポリユビキチン化されており、かつこのとき、AKT の存在量、およびキナーゼ活性が保持されることが分かった。これらの結果から、変性軸索中において AKT はプロテアソームにより分解されていることが示唆された。

4-3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1

ZNRF1 は幼弱期から成熟期までの神経細胞に広範に発現する RING フィンガー領域と ZINC フィンガー領域をひとつずつ持つ RING 型ユビキチンリガーゼである²³⁾。筆者らは ZNRF1 の機能解析を行う過程で、ユビキチンリガーゼ活性を欠く変異分子 ZNRF1 C184A の過剰発現により、軸索変性が顕著に抑制されることに気づいていた。そこで、ZNRF1 を介したプロテアソーム依存的な AKT の分解制御の可能性を、無細胞系、培養細胞を用いた強制発現系によって検討したところ、ZNRF1 が AKT をユビキチン化することが分かった (図 3A)。また、ZNRF1 の部分欠失変異体を用いた結合試験により、ZNRF1 は ZINC フィンガー領域を介して AKT のプレクストリン相同領域と結合し、この領域に存在する脊椎動物に高度に保存された五つのリシン残基が ZNRF1 によるユビキチン化に重要であることが明らかとなっている (図 3B)。

4-4 軸索変性を促進するシグナルカスケード

ZNRF1 が AKT をプロテアソーム依存的なタンパク質分解に導くことから、次に筆者らは ZNRF1 が制御するリン酸化シグナルカスケードを活性化もしくは阻害することによる軸索変性への影響を調べた。ZNRF1, AKT, GSK3B それぞれの野生型と変異分子をアデノウィルスベクターにより培養後根神経節に導入し、*in vitro* 軸索変性モデルを用いて軸索変性への影響を検討した。その結果、ユビキチンリガーゼ活性を欠く不活性化型 ZNRF1 (ZNRF1 C184A)、野生型 AKT および活性化型 AKT (myrAKT)、キナーゼ活性を欠く不活性化型 GSK3B (GSK3B KM) は軸索変性を顕著に抑制することが分かった (図 4A)。軸索変性の抑制効果は内在性の ZNRF1、あるいは GSK3B を RNA 干渉によって発現抑制した場合にも認められた。これらのことから、AKT を介したリン酸化シグナルカスケードは軸索変性を負に制御しており、ZNRF1 はプロテアソーム依存的

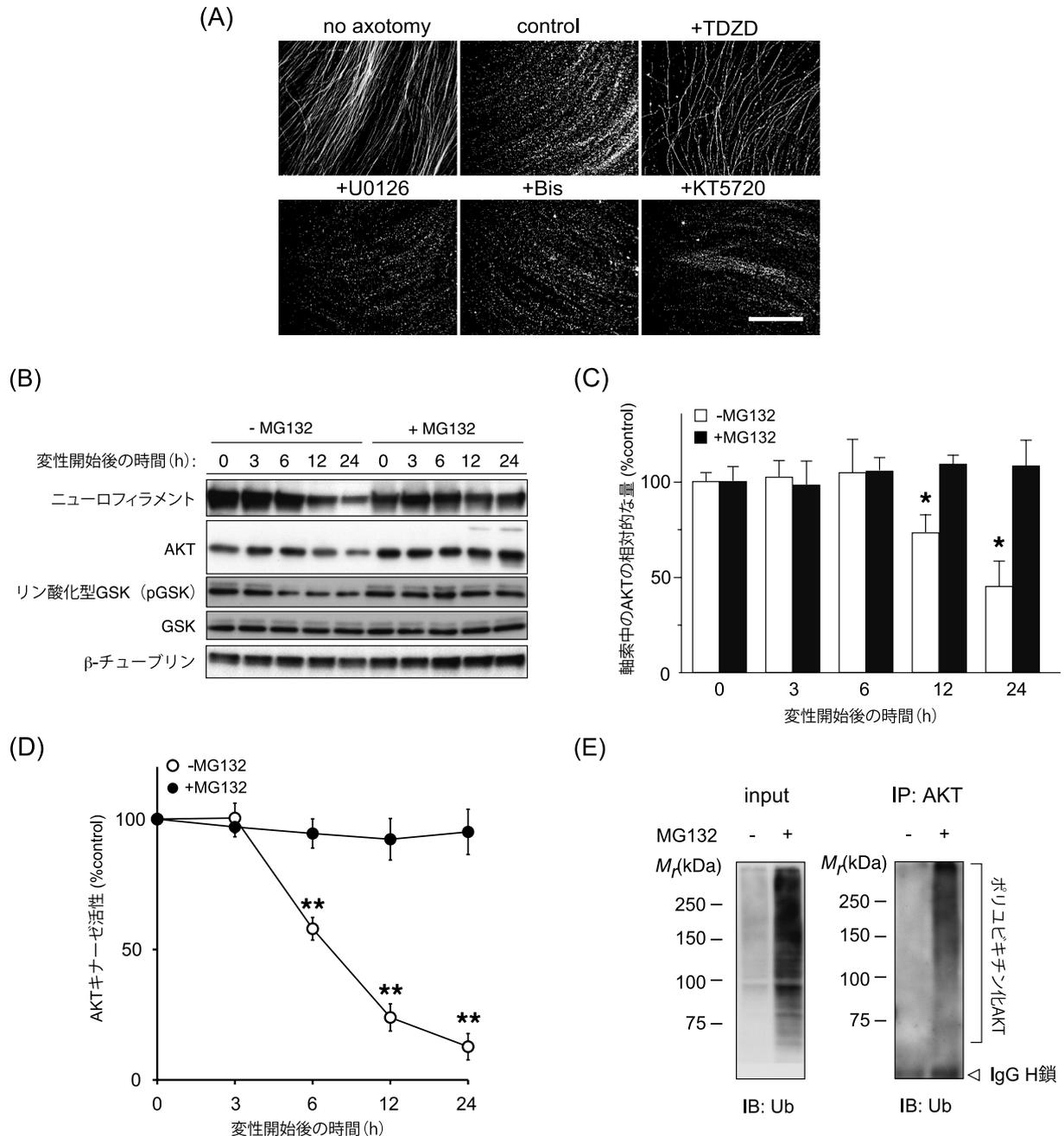


図2 軸索変性はAKTがUPS依存的に分解されて軸索から消失することによって進行する。

(A) *in vitro* 軸索変性モデルにおける細胞骨格系の経時変化を微小管に対する免疫染色により示した。軸索変性開始前 (no axotomy) はチューブリンの免疫染色により精緻な軸索の構造を認める。変性の進行に伴う細胞骨格の崩壊により、微小管は単量体のチューブリンに脱重合するため、軸索は点状の染色態度を呈する (control) が、GSK3B 阻害剤 TDZD (+TDZD) の存在下では顕著に抑制されるが、MAP キナーゼ (+U0126), プロテインキナーゼ C (+Bis), ならびにプロテインキナーゼ A (+KT5720) に対する阻害剤は抑制効果を示さなかった。Scale bar = 100 μm. (B) 変性開始後の軸索の細胞抽出液に対するイムノブロット。AKT, GSK 3B (GSK), リン酸化型 GSK 3B (pGSK), チューブリンに対する抗体で検出した。(C) イムノブロットの結果を定量し、チューブリンに対する相対値で表した。AKT の相対量は軸索変性に伴い減少することが分かる。(D) 変性開始後、経時的に軸索の細胞抽出液から抗 AKT 抗体による免疫沈降した沈降物を用い、AKT の基質となる合成ペプチドへのリン酸化をイムノブロットによって評価し、キナーゼ活性を定量した。(E) 変性開始 24 時間後の軸索の細胞抽出液から抗 AKT 抗体による免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体によるイムノブロットを行った。UPS 阻害剤 MG132 存在下ではポリユビキチン化 AKT が検出された。

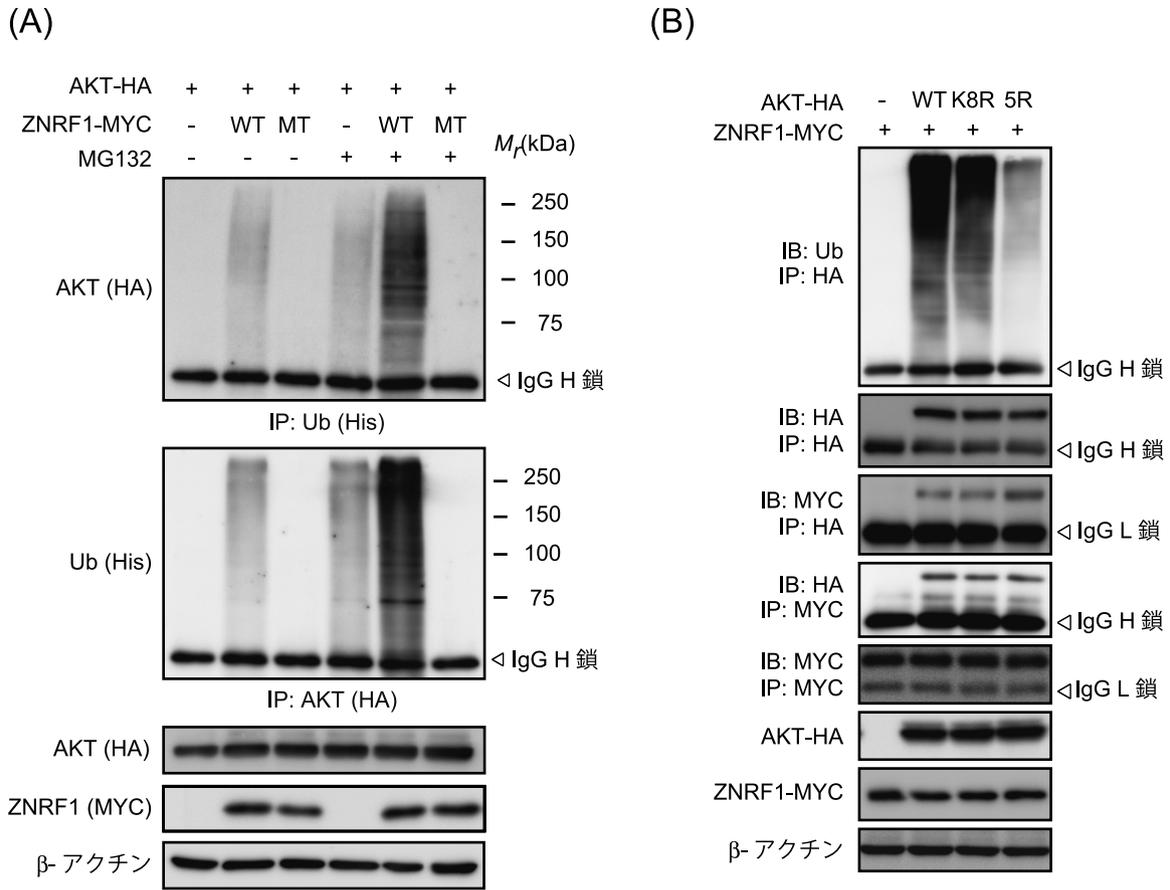


図3 ZNRF1はAKTを基質とするユビキチンリガーゼである。

(A) HEK293細胞にAKT-HA, ZNRF1-MYC, His-Ubをそれぞれ強制発現させ、抗HA抗体で免疫沈降を行い、抗His抗体によるイムノプロットを行った。UPS阻害剤MG132存在下では、野生型ZNRF1(WT)によってAKTに対するユビキチン化が検出されたが、ユビキチンリガーゼ活性を欠くZNRF1変異体(MT)では検出されなかった。抗His抗体で免疫沈降を行い、抗HA抗体によるイムノプロットを行った場合にも同様の結果が得られた。

(B) AKTのPH領域にある五つのリシン残基のうち一つを(K8R),あるいは五つ全て(5R)をアルギニン残基に置換したZNRF1では野生型AKTと比べてZNRF1によるユビキチン化が低下した。

なタンパク質分解を介してこのカスケードを制御する「鍵分子」であると考えられた。

4-5 GSK3BによるCRMP2のリン酸化を介した微小管脱重合の促進

GSK3Bはさまざまな細胞内シグナルの制御に関与している。軸索に発現するGSK3Bの標的分子にはCRMP2, MAP1B (microtubule associated protein 1 B), β -cateninなどがある。これらの分子はいずれも変性の進行に伴って軸索での存在量が減少し、変性開始後24時間ではほとんど検出されなくなるが、プロテアソーム阻害剤によって軸索変性を抑制した場合には、CRMP2の減少のみが顕著に抑制された。CRMP2はチューブリン $\alpha\beta$ ヘテロダイマーと結合して微小管の重合を促進し、安定化させるはたらきがある。このチューブリンとの結合はGSK3Bによってリン酸化依存的に制御されており、CRMP2の514番目のスレオニン残基がリン酸化されるとチューブリンとの結合能を失い、微小管の脱重合が促進される²⁴⁾。そこで、軸索変性

過程においてCRMP2の514番目のスレオニン残基のリン酸化状態の変動を調べたところ、変性開始後6時間でリン酸化が亢進し、かつこのリン酸化亢進はGSK3B活性の阻害だけでなく、プロテアソーム阻害によっても打ち消された。さらに、非リン酸化型CRMP2(CRMP2 T514A)の導入によって、軸索変性の進行が顕著に抑制されることも明らかとなった(図4A)。これらのことから、CRMP2は軸索変性におけるGSK3Bの主要な標的分子であることが示された。このことは視神経変性モデルを用いた動物個体レベルにおける実験においても実証され(図4B, C), GSK3Bを介したCRMP2のリン酸化による微小管の脱重合の促進を阻害することによって、個体レベルでも軸索変性を阻害することができることが示された。このように、軸索変性はZNRF1-AKT-GSK3B-CRMP2という反応経路によって制御されており、この反応経路をいずれかのステップで止めた場合、どのステップで止めても神経軸索の変性が強く抑えられることが明らかとなった。

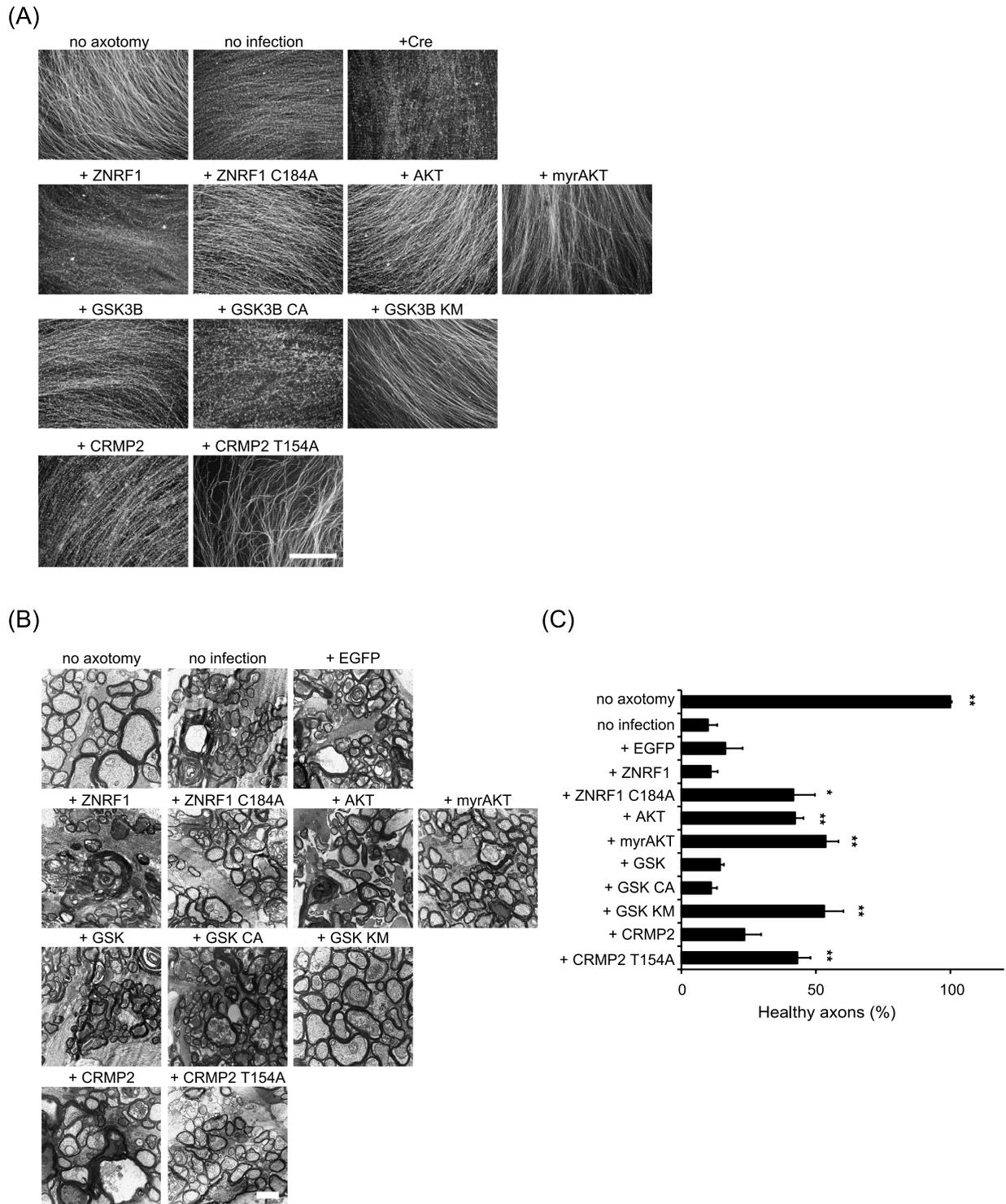


図4 ZNR1 を介した軸索変性促進シグナルを阻害することによりワーラー変性が抑制される。

(A) *in vitro* 軸索変性モデルにおける細胞骨格系の経時的变化を微小管に対する免疫染色により示し、ZNR1 を介した軸索変性促進シグナルを阻害することによるワーラー変性の抑制効果を示した。遺伝子略称についてはテキストを参照のこと。Scale bar = 100 μ m. (B) アデノウィルスベクターを用いて網膜神経節細胞を介してそれぞれの遺伝子を視神経に導入した後に視神経変性を誘導し、視神経の超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。Scale bar = 1 μ m. (C) 精緻な微小管構造をもつ軸索を Healthy axons と定義し、視野に確認できる軸索に占めるその割合に基づき変性に対する抑制効果を評価した。

おわりに

筆者らが同定したユビキチンリガーゼ ZNRF1 は変性開始後の軸索において AKT をプロテアソーム依存的に分解することによって、GSK3B の活性化と CRMP2 のリン酸化を促進し、微小管を不安定化させるシグナルカスケードを制御することが分かった (図 5)。このシグナルカスケードこそ、これまで不明であった軸索変性の進行を制御する分子メカニズムの本体であると筆者らは考えている。未解明の課題として、ZNRF1 の活性化メカニズムが挙げられる。ZNRF1 は幼弱期から成熟期までの神経細胞に広く発現することから、例えば、軸索変性の開始による活性化誘導など、何らかの活性制御が存在すると考えられる。現在のところこの問いに対して明確に答えることはできないが、ひとつの候補となるメカニズムとしてタンパク質の酸化修飾を挙げることができる。筆者らはこれまでに、末梢神経における髄鞘形成細胞であるシュワン細胞において、ZNRF1 がグルタミン合成酵素をユビキチン化しプロテアソーム依存的に分解することを明らかにしている²⁵⁾。この例では、神経繊維への傷害によってシュワン細胞内の活性酸素種レベルが上昇し、グルタミン合成酵素を含むタンパク質が酸化されることが ZNRF1 による分解を開始すると考えられる。今後は、AKT のみならず、ZNRF1、および ZNRF1 活性を制御する分子への活性酸素種の影響を明らかにする必要があると考えている。

一方、Wlds マウス由来の軸索では、ワーラー変性を誘導しても、プロテアソームによる AKT の分解や GSK3B

の活性化、CMRP2 のリン酸化と分解はいずれも認められないが、ZNRF1 やキナーゼ活性を欠く AKT、活性型 GSK3B を過剰発現させたり、あるいは RNA 干渉によって AKT、CRMP2 を発現抑制させたりすると変性に対する抑制効果が失われた¹⁷⁾。このことは、Wlds マウスに存在する「軸索保護活性」は ZNRF1 を介した変性促進シグナルの上流にあることを示唆している。Wlds マウスにおける軸索保護メカニズムと ZNRF1 を介したシグナルとの間にはどのようなクロストークが存在するのかについては今後さらに検討の必要がある。

以上のように、筆者らの研究成果は軸索変性と UPS とを直接関連付ける分子メカニズムを初めて明確にするとともに、リン酸化シグナルの活性化を制御することにより軸索を変性から保護できる可能性を強く示唆した。今後はこの成果を発展させ、軸索を変性から保護・温存する方法論に基づく神経変性疾患の治療方法の創成に繋げるとともに、軸索の刈り込みなど、発生過程への寄与についても明らかにしたい。

文 献

- 1) Waller, A. (1851) *Edinburgh Med. Surg. J.*, 76, 369-376.
- 2) Coleman, M.P. & Freeman, M.R. (2010) *Annu. Rev. Neurosci.*, 33, 245-267.
- 3) Zhai, Q., Wang, J., Kim, A., Liu, Q., Watts, R., Hoopfer, E., Mitchison, T., Luo, L., & He, Z. (2003) *Neuron*, 39, 217-225.
- 4) Wang, J.T., Medress, Z.A., & Barres, B.A. (2012) *J. Cell Biol.*, 196, 7-18.
- 5) Drinjakovic, J., Jung, H., Campbell, D.S., Strohlic, L., Dwiv-

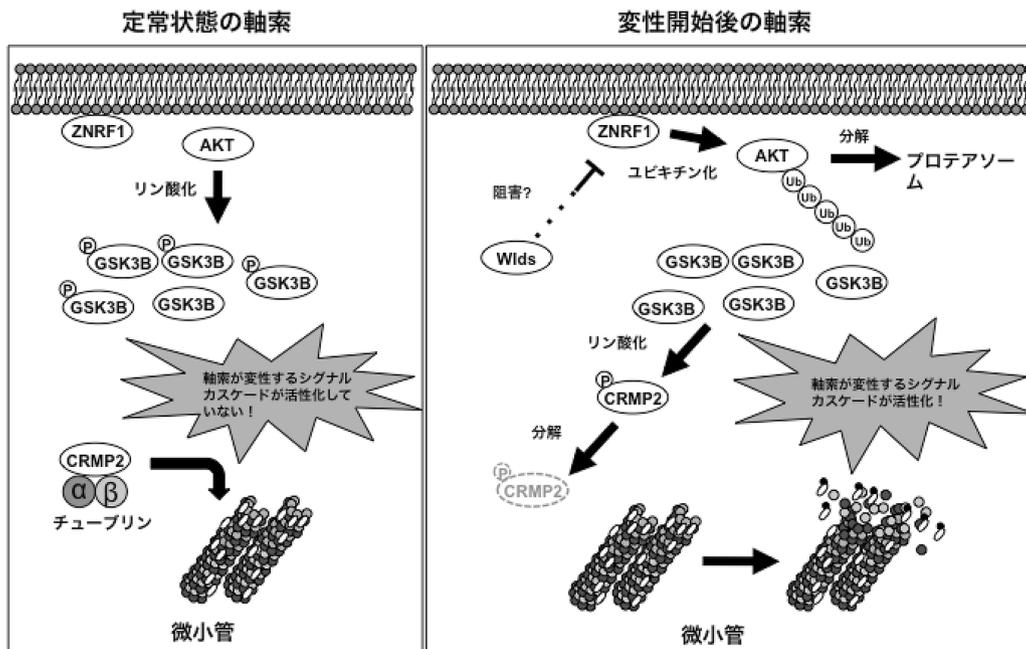


図 5 ZNRF1 は UPS 依存的に AKT を分解することによって軸索変性を促進する。

- edy, A., & Holt, C.E. (2010) *Neuron*, **65**, 341–357.
- 6) Kawabe, H., Neeb, A., Dimova, K., Young, S.M., Jr., Takeda, M., Katsurabayashi, S., Mitkovski, M., Malakhova, O.A., Zhang, D.E., Umikawa, M., Kariya, K., Goebbels, S., Nave, K. A., Rosenmund, C., Jahn, O., Rhee, J., & Brose, N. (2010) *Neuron*, **65**, 358–372.
 - 7) Cheng, P.L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., & Poo, M.M. (2011) *Neuron*, **69**, 231–243.
 - 8) Collins, C.A., Wairkar, Y.P., Johnson, S.L., & DiAntonio, A. (2006) *Neuron*, **51**, 57–69.
 - 9) Grill, B., Bienvenut, W.V., Brown, H.M., Ackley, B.D., Quadroni, M., & Jin, Y. (2007) *Neuron*, **55**, 587–601.
 - 10) Bloom, A.J., Miller, B.R., Sanes, J.R., & DiAntonio, A. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 2593–2606.
 - 11) Lewcock, J.W., Genoud, N., Lettieri, K., & Pfaff, S.L. (2007) *Neuron*, **56**, 604–620.
 - 12) Pesin, J.A. & Orr-Weaver, T.L. (2008) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 475–499.
 - 13) Konishi, Y., Stegmuller, J., Matsuda, T., Bonni, S., & Bonni, A. (2004) *Science*, **303**, 1026–1030.
 - 14) Kim, A.H., Puram, S.V., Bilimoria, P.M., Ikeuchi, Y., Keough, S., Wong, M., Rowitch, D., & Bonni, A. (2009) *Cell*, **136**, 322–336.
 - 15) Yang, Y., Kim, A.H., Yamada, T., Wu, B., Bilimoria, P.M., Ikeuchi, Y., de la Iglesia, N., Shen, J., & Bonni, A. (2009) *Science*, **326**, 575–578.
 - 16) Araki, T., Sasaki, Y., & Milbrandt, J. (2004) *Science*, **305**, 1010–1013.
 - 17) Wakatsuki, S., Saitoh, F., & Araki, T. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 1415–1423.
 - 18) Yoshimura, T., Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 10626–10630.
 - 19) Zhou, F.Q. & Snider, W.D. (2005) *Science*, **308**, 211–214.
 - 20) Riesterer, O., Zingg, D., Hummerjohann, J., Bodis, S., & Pruschy, M. (2004) *Oncogene*, **23**, 4624–4635.
 - 21) Dickey, C.A., Koren, J., Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Jinwal, U.K., Birnbaum, M.J., Monks, B., Sun, M., Cheng, J.Q., Patterson, C., Bailey, R.M., Dunmore, J., Soresh, S., Leon, C., Morgan, D., & Petrucelli, L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3622–3627.
 - 22) Yan, D., Guo, L., & Wang, Y. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 415–424.
 - 23) Araki, T. & Milbrandt, J. (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 9385–9394.
 - 24) Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., & Kaibuchi, K. (2005) *Cell*, **120**, 137–149.
 - 25) Saitoh, F. & Araki, T. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 1204–1212.
-