

しれない。

6. おわりに

H₂Sの生理機能については、H₂Sガスそのものがシグナル伝達分子だと信じられ、薬理学的知見に基づいて議論されてきた。しかし、我々はHS⁻の化学特性(求核性)に着目することで、親電子物質のスルフィド化というユニークなレドックス制御機構を見いだした。今後は、H₂S/HS⁻そのものが生体内のレドックス恒常性を制御する分子実体かどうか解明することで、レドックスシグナルの統合的理解がいつそう進展すると期待される。また、ROSシグナルの異常による慢性心不全の予防、治療という観点からも、親電子物質のスルフィド化は興味深い。H₂Sそのものは毒性や安定性に問題があることから、今後はH₂Sと同様の求核性をもち、安全で取り扱いの容易な薬または機能性食品の開発が期待される。

謝辞

本研究は文部科学省科研費新学術領域研究「活性酸素シグナル伝達」の領域的連携により得られた成果であり、公私にわたって御指導・御支援を賜りました、熊本大学・赤池孝章教授、筑波大学・熊谷嘉人教授、東北大学・山本雅之教授、本橋ほづみ先生、名古屋大学・内田浩二教授、大阪府立大学理学部・居原秀先生ならびに各研究室の皆様へ深謝致します。

- 1) Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 727-735.
- 2) D'Autréaux, B. & Toledano, M.B. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 813-824.
- 3) Akaike, T., Fujii, S., Sawa, T., & Ihara, H. (2010) *Nitric Oxide*, **23**, 166-174.
- 4) Li, L., Rose, P., & Moore, P.K. (2011) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **51**, 169-187.
- 5) Paul, B.D. & Snyder, S.H. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 499-507.
- 6) Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., & Akaike, T. (2012) *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 714-724.
- 7) Dombkowski, R.A., Russell, M.J., & Olson K.R. (2004) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**, R678-R685.
- 8) Shih, H., Lee, B., Lee R.J., & Boyle, A.J. (2011) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **57**, 9-17.
- 9) Nishida, M., Maruyama, Y., Tanaka, R., Kontani, K., Nagao,

T., & Kurose, H. (2000) *Nature*, **408**, 492-495.

- 10) Lander, H.M., Milbank, A.J., Tauras, J.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Schwartz, G.D., Kraemer, R.T., Mirza, U.A., Chait, B.T., Burk, S.C., & Quilliam, L.A. (1996) *Nature*, **381**, 380-381.
- 11) Hancock, J.F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 373-384.
- 12) Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., & Snyder, S.H. (2011) *Circ. Res.*, **109**, 1259-1268.

西田 基宏^{1,2,3}, 澤 智裕^{4,5}

(¹自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理学研究所)

心循環シグナル研究部門

²九州大学大学院薬学研究院創薬産学官連携講座

³JST さきがけ「疾患代謝」

⁴東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野

⁵JST さきがけ「炎症の慢性化機構の解明と制御」)

Regulation of redox homeostasis by hydrogen sulfide anion and its clinical application

Motohiro Nishida^{1,2} and Tomohiro Sawa^{3,4} (¹Division of Cardiocirculatory Signaling, National Institute of Physiological Sciences, ²Department of Biodesign Research, Okazaki Institute for Integrative Biosciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaijichou, Okazaki 444-8787, Aichi; ³Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8575, Japan, ⁴PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), Saitama 332-0012, Japan)

活動電位依存性の髄鞘化制御機構

1. はじめに

髄鞘は軸索周囲を何層にもシート状に巻くことにより、跳躍伝導によって50倍まで神経伝道速度を速めることが知られている。髄鞘化によって神経伝導速度が調節されることにより神経回路における情報処理を効率よく行うことができ、また神経回路の情報処理のパターンを変化させることができると考えられる。このように神経回路における情報処理が髄鞘化によって効率化されるためには個々の軸索が神経活動のフィードバックを受けて、適切に髄鞘化される必要がある。このため軸索における神経活動の情報が

髄鞘もしくはオリゴデンドロサイトにフィードバックされる必要がある。しかしながらこれまでこの髄鞘形成は神経細胞種によってきめられていて、神経活動依存性があるかどうかについてはあまり議論されてこなかった。

そこで私たちは、この髄鞘を構成するもっとも代表的なタンパク質である、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP: Myelin Basic Protein) のタンパク質合成を可視化することにより、局所におけるタンパク質合成が神経活動依存的に行われ、軸索の選定に関わることを解明した。

本研究により髄鞘化する軸索の選定にはこれまで知られている細胞種、表面マーカーなどのほかに軸索そのものの活動電位もかかわっていることが示された。

髄鞘の形成はオリゴデンドロサイトによって行われ、軸索を髄鞘化することにより活動電位の伝導速度を50倍まで速めることができる¹⁾。オリゴデンドロサイトがどのように軸索を識別し、髄鞘化するかはその細胞表面マーカー、様々なシグナル伝達の観点から研究が進んできた^{2,3)}。さらに加えて、近年ヒトのイメージングの研究から、ジャグリングなどの特殊なトレーニングによって責任領域の白質の可塑的変化が増強することが機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いる実験でわかった⁴⁾。またその白質の可塑的変化はヒトの思春期の時期まで持続的に変化することが知られている⁵⁾。これらは軸索の髄鞘化が神経活動依存性に起こることを示唆する。髄鞘は発達期に特定の軸索周囲に巻く必要がある。しかしながら、この特定の軸索への髄鞘化が神経活動依存性に起こるかどうかは不明である。もしこの髄鞘化が神経活動依存性に起こるのであれば、神経活動依存性に神経伝達速度を調節することができる。すなわち活動依存性の髄鞘化を介して脳の情報処理、学習や発達を修飾することができる。

これまで、脊髄後根神経節細胞 (DRG) が非小胞性に神経伝達物質である ATP を放出することが知られている⁶⁾。そこで私たちは非小胞性の神経伝達物質放出および小胞性の神経伝達物質がオリゴデンドロサイト、髄鞘形成に及ぼす影響を調べるため、ボツリヌス毒素を用いて小胞性神経伝達物質を阻害し、これを電気刺激法と組み合わせることにより軸索活動電位に依存して放出される神経伝達物質の髄鞘に対する役割を検討した。

2. 活動電位は髄鞘形成に関与する

まず二つの神経伝達物質であるグルタミン酸および ATP に着目してその放出を測定した。ボツリヌス毒素で

処理した DRG と処理していない DRG をフィールド電気刺激法で刺激し測定すると、処理していない群では ATP、グルタミン酸ともに上昇するのに対し、ボツリヌス毒素で処理した群では ATP のみの上昇を認めた。このことから活動電位依存性の神経伝達物質放出のうち、小胞性ではグルタミン酸と ATP が、非小胞性では ATP のみの放出が起ることがわかった。

この二つの活動電位依存性の神経伝達物質が髄鞘に及ぼす影響を検証するため、ボツリヌス毒素で処理した DRG、もしくは処理していない DRG を3週間オリゴデンドロサイトと共培養した。ボツリヌス毒素で処理した群では、していない群に対して髄鞘の形成が阻害されることがわかった。また非小胞性の神経伝達物質放出 (ATP) は、ボツリヌス毒素で阻害した群においてもオリゴデンドロサイトの分化には差が認められないことから、細胞群全体の分化レベルの規定に寄与していることが推測された。

3. 小胞性神経伝達物質はオリゴデンドロサイト前駆細胞の局所のカルシウム応答に関与する

そこでそれぞれの神経伝達物質に対するオリゴデンドロサイトの機能的応答を検証するため、ボツリヌス毒素で処理した DRG と処理していない DRG をオリゴデンドロサイト前駆細胞と3日間共培養したものに対して、カルシウムイメージングを行った。小胞性神経伝達物質放出をボツリヌス毒素で阻害すると、オリゴデンドロサイトの細胞体のカルシウム上昇は起こるが、突起 (プロセス) のカルシウム応答が阻害されることがわかった。これにより、非小胞性神経伝達物質 (ATP) は細胞体のゆっくりとしたカルシウム応答を促し、これによりオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を促していることがわかった。さらにカルシウム感受性蛍光タンパク質である GCaMP をオリゴデンドロサイト前駆細胞にのみ発現させ、それぞれの局所におけるカルシウム応答を捉えることにより検証し、小胞性に活動電位依存的に軸索から放出されるグルタミン酸がこのプロセスのカルシウム応答を引き起こしていることがわかった。またこれは細胞-細胞間結合によって引き起こされていることがわかった。

4. 軸索-オリゴデンドロサイト間の結合は活動電位により強化される

これまで軸索-オリゴデンドロサイト間にはシナプス様結合があることが知られている⁷⁾。オリゴデンドロサイトのプロセスに即時性のカルシウム応答を起こす結合を定義

するため、コレステロールリッチドメインのマーカであるトランスフェリン受容体 (TfR) を利用し、TfR を pH 感受性の緑色蛍光タンパク質 (GFP) と結合し、これをオリゴデンドロサイト前駆細胞に発現させることにより、TfR のターンオーバーを可視化した。このことによりオリゴデンドロサイトの局所における軸索との結合を定義した。

TfR の膜発現は電気刺激により促進され、グルタミン酸受容体の阻害剤、およびボツリヌス毒素処理した DRG との共培養で阻害された。これによりコレステロールリッチドメインの形成すなわちオリゴデンドロサイトの前駆細胞と軸索間の結合は神経活動電位依存性に形成されることがわかった。

5. MBP の局所発現の可視化およびその活動電位依存性

この小胞性神経伝達物質による軸索-オリゴデンドロサイト前駆細胞間結合形成の機能的意義を見いだすため MBP に着目した。MBP はこれまでの研究で mRNA が合成された後、プロセスに運ばれそこで局所発現されることが知られている⁸⁾。ただし、その意義および神経活動依存性についてはいまだ知られていない。そこでその局所発現がどのようなメカニズムで起きているのかを調べるため、光刺激による色可変タンパク質である KikumeGR に MBP もしくは MBP の 3'非翻訳領域 (3'UTR)、および MBP と 3'UTR を結合させたものを用いて、その局所発現を可視化

した。作製したタンパク質をオリゴデンドロサイト前駆細胞に発現させ、DRG と 3 日間共培養したのちに局所発現を観察した。UV 照射によって結合タンパク質の色をすべて赤に変化させたのち、フィールド電気刺激法で神経軸索を刺激したのち、MBP の局所発現を緑色で検出した。この局所発現は活動電位で促進され、ボツリヌス毒素処理の DRG との共培養で抑制されることより、小胞性神経伝達物質による応答反応であることがわかった。阻害剤を使用した実験によりこの局所発現はオリゴデンドロサイト上に発現する NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR)、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) に依存することがわかった。さらにカルシウムイメージングを用いた解析により、これら二つの受容体はオリゴデンドロサイト前駆細胞の即時性のカルシウム応答を担っていることがわかった。

6. MBP の局所発現にかかわるシグナル伝達

このオリゴデンドロサイトのカルシウム応答によって引き起こされるシグナルを、低分子干渉 RNA (siRNA) を用いた解析により調べると、MBP の局所発現にはコレステロールリッチドメインに共存する活性化 Fyn キナーゼを必要とすることおよび軸索側の L1CAM の膜発現を必要とすることがわかった。そのため L1CAM の膜発現および Fyn キナーゼの活性化に活動電位依存性があるかどうかを検証するため、まず L1CAM の刺激有無下での細胞膜発現を検証したところ、刺激によって L1CAM の膜発現が増加

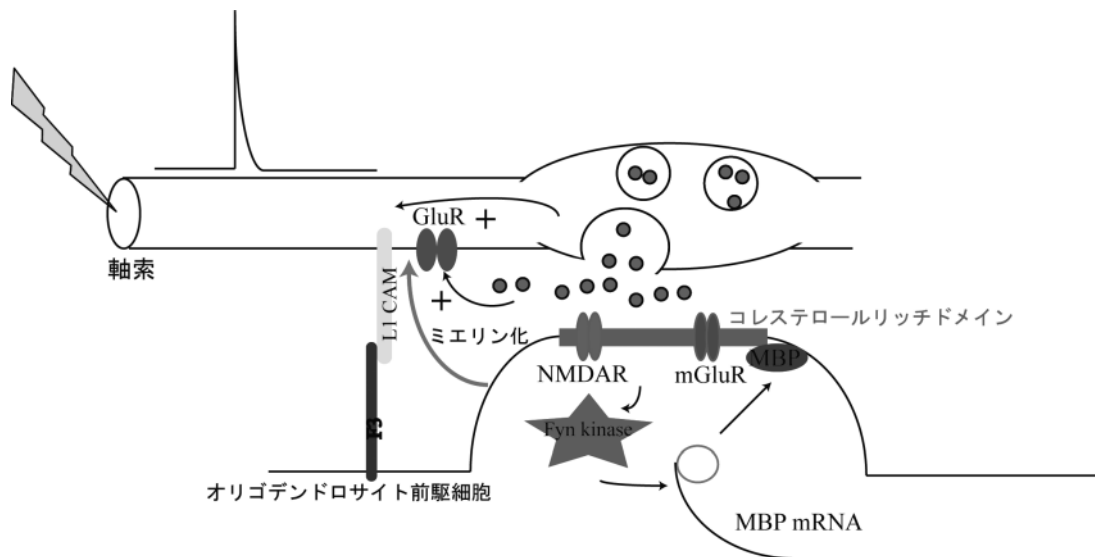


図1 活動電位依存性 MBP の局所発現

軸索活動電位依存性に放出される小胞性依存性のグルタミン酸の放出はオリゴデンドロサイト前駆細胞に発現するグルタミン酸受容体を介し、Fyn キナーゼの活性を促し、MBP の局所発現を促す。

していることが示された。つぎに Fyn キナーゼの活動電位依存性を調べるため、リン酸化 Fyn の量を検証した。電気刺激下でリン酸化 Fyn が増加し、これがボツリヌス毒素処理の DRG との共培養では刺激しても増加しないことがわかった。

7. シグナル伝達物質の局在化

この MBP の局所発現と軸索-オリゴデンドロサイト前駆細胞との結合の相関を検証するため、TfR の膜発現部位と Fyn キナーゼの活性化部位を検証したところ、共局在を認めた。これより、結合部位における活動依存性に Fyn キナーゼが活性化され、MBP の局所発現を誘導することがわかった (図 1)。

8. おわりに

これらのことより、MBP の局所発現すなわちここでは髄鞘化を促す最初のイベントである軸索の選定には活動電位依存性があり、これらの活動電位により軸索は優位に選定されることがわかった。このことより活動電位は髄鞘を介して、神経回路を修飾できる可能性を示した。

謝辞

この研究は NIH の R. Douglas Fields の研究室で行われました。留学に際し、ご協力いただいた方々に心から謝意を表します。

- 1) Sanders, F.K. & Whitteridge, D. (1946) *J. Physiol.*, 105, 152-174.
- 2) Nave, K.A. (2010) *Nature*, 468, 244-252.
- 3) Emery, B. (2010) *Science*, 330, 779-782.
- 4) Scholz, J., Klein, M.C., Behrens, T.E., & Johansen-Berg, H. (2009) *Nat. Neurosci.*, 12, 1370-1371.
- 5) Beckman, M. (2004) *Science*, 305, 596-599.
- 6) Fields, R.D. & Ni, Y. (2010) *Sci. Signal.*, 3, ra73.
- 7) De Biase, L.M., Nishiyama, A., & Bergles, D.E. (2010) *J. Neurosci.*, 30, 3600-3611.
- 8) Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., & Carson, J.H. (1993) *J. Cell Biol.*, 123, 431-441.

和氣 弘明

(自然科学研究機構基礎生物学研究所光脳回路研究部門)

The mechanism for activity dependent regulation of myelin
Hiroaki Wake (Division of Brain Circuits, National Institute of Basic Biology, NINS, Japan, 38 Nishigonaka, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan)

p53 依存性の DNA 損傷応答機構における RUNX2 の新たな役割

1. はじめに

進化的に保存された runt ドメインを有する RUNX (runt-related transcription factor) ファミリーは、塩基配列特異的な核内転写制御因子であり、ヒトでは RUNX1, RUNX2 および RUNX3 から構成される (図 1)。この runt ドメインは、RUNX ファミリーに共通のコファクターである CBFβ (core-binding factor beta) とのヘテロ二量体形成に必須の領域である。一方で、そのカルボキシル末端には転写活性化ドメイン (AD) と、この転写活性を阻害する抑制ドメイン (ID) が存在している (図 1)。これまでの研究から、RUNX ファミリーは個体の発生や細胞のがん化に深く関与することが報告されている。たとえば、RUNX1 は血液腫瘍における染色体の切断点に座位する遺伝子として発見され、血液幹細胞の産生および血球系の分化に重要な役割を担うとともに、血液腫瘍におけるがん抑制遺伝子である側面をも合わせ持つ¹⁾。この染色体転座によって、造腫瘍能を有する RUNX1-ETO (RUNX1-eight twenty one) と称される異常な融合タンパク質が生成される。また、RUNX2 は骨芽細胞の骨分化を制御するマスターレギュレーターとして機能し、その発現レベルは骨形成を促進するサイトカインである BMP (bone morphogenetic protein) によって調節されている²⁾。加えて、RUNX2 の変異は鎖骨頭骸異形成症の原因となる。さらに、RUNX3 はヒト胃がんのがん抑制遺伝子として報告されており、RUNX3 のノックアウトマウスでは胃上皮の過形成が観察されている。胃がんを含めたヒト腫瘍における RUNX3 の変異はきわめてまれであるが、腫瘍における RUNX3 の機能抑制は主としてプロモーター領域の高度メチル化による発現抑制にあると考えられている³⁾。がん抑制の主たる仕組みは、DNA 損傷などに応答したアポトーシスの促進による異常なゲノムを有するがん細胞の排除ということになるが (ゲノムの恒常性の維持)、RUNX ファミリーの DNA 損傷応答における役割については、ほとんど解析されていないというのが現状である。我々は抗がん剤刺激による DNA 損傷応答という切り口から、RUNX ファミリーの役割についての解析を行ってきたが、本稿では特に DNA 損傷に起因する p53 依存性のアポトーシス誘