

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

NAD・Sir2依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 荒木 敏之

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総括・分担研究報告

NAD・Sir2依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

荒木 敏之

舘野 美成子

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 10

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括・分担研究報告書

NAD・Sir2 依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

主任研究者 国立精神神経センター 神経研究所 部長 荒木 敏之

分担研究者 国立精神神経センター 神経研究所 室長 館野 美成子

研究要旨

NAD-Sir2 による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難病において神経保護による治療効果をもたらす可能性がたかく、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。本年度の研究では 1) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法について検討し、2) NAD・Sir2 依存性軸索保護機構において、NAD 産生が高まっている細胞内での変化を明らかにした。さらに、1) において最も有効な軸索保護効果を示した NMNAT 活性の過剰発現の効果をモデル動物体内で確認するため、NMNAT 活性を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作成し、そのフェノタイプに関して予備的な検討を行なった。

A. 研究目的

高齢化社会の進展に伴って、老化とともに進行する疾患への治療アプローチは一層その重要度を増している。神経変性疾患は多くの場合老化と共に進展し、有効な治療法の開発は今後の高齢化社会における喫緊の課題である。

神経軸索変性は、細胞死の防止(たとえば *bcl2* の過剰発現など)によっては抑制できないことから細胞死とは独立したプロセスであると考えられるが、その一方で、軸索変性は神経細胞死に先立って見られ、軸索変性過程のいずれかが細胞死のプロセスをスタートする引き金を引き、最終的な細胞死に至ると考えられる。これらのことから、軸索変性を抑制できれば神経変性疾患の症

状も抑制され、また軸索だけでなく神経細胞体も保護される可能性が高いと考えられ、実際そのような方法での神経保護も既に観察されている。

我々はこれまでに自然発症変異マウス *wlds* において観察される神経傷害後の著明な軸索変性遅延の原因が NAD 合成酵素活性の亢進と、それに伴う NAD 依存性蛋白デアセチル化酵素 Sir2 の活性化によるものであることを明らかにした。NAD-Sir2 による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難病において神経保護による治療効果をもたらす可能性がたかく、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。

本研究プロジェクトにおいては、NAD・Sir2 依存性軸索保護のメカニズムを解明し、神経疾患への治療応用を実現することを目的としている。3年計画の1年目にあたる本年度の研究においては、1) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法について検討し、2) NAD・Sir2 依存性軸索保護機構において、NAD 産生が高まっている細胞内での変化を明らかにする、3) 1で明らかにした、軸索保護効果の最も高い NAD 合成反応系の改変法を生体内で実現するモデルマウスを作成することを目的とした。

B. 研究方法

1) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法について

NAD 産生反応系の各酵素の過剰発現並びにそれらの酵素の基質の投与の、神経軸索の *in vitro* での傷害後変性モデルにおける軸索保護効果を明らかにするために、図

1に示した各酵素の過剰発現ならびに各基質/前駆物質の投与を行なった。

神経細胞は E12.5 のマウス胎児から取り出した後根神経節を *Explant culture* によって用いた。神経突起の伸展と Cytosine arabinoside 投与による分裂細胞 (Schwann 細胞など) の除去の後、培養開始後約 7~10 日目の細胞を実験に用いた。

各酵素の過剰発現にはレンチウイルスベクターを用いた強制発現システムを用いた。目的蛋白の発現にはユビキチンプロモータを用い、IRES-EGFP コンストラクトをつなぐことにより、目的遺伝子の発現を蛍光顕微鏡下で EGFP の発現を見ることで確認したあと、神経突起を細胞体から切り離すことによって突起の変性を誘導した。

各基質/前駆物質に関しては、上述の初代培養後根神経節細胞の培養液中に 100uM~1 mM の濃度で加え、約 24 時間後に同様に神経突起を細胞体から切り離すことによって突起の変性を誘導した。

神経突起の変性の進行はそれぞれの実験において、変性誘導前と比較して変性開始後 12, 24, 48, 72 時間後に残存している神経突起の割合 (%) を計測することによって評価した。

2) 細胞内シグナル伝達機構に関する検討

NMNAT 過剰発現細胞における遺伝子発現レベルでの変化を明らかにするためにマイクロアレイ法 (Affimetrix GeneChip) を用い、wlds マウスと正常 C57BL/6 マウスそれぞれの後根神経節から生

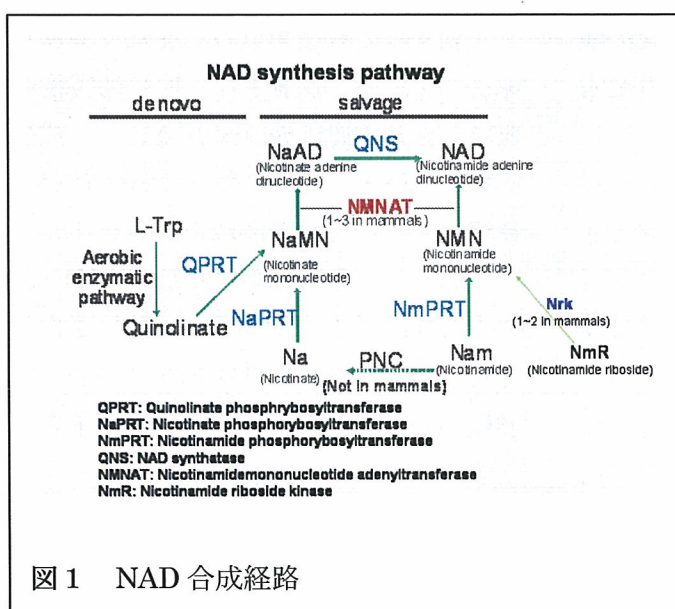


図1 NAD 合成経路

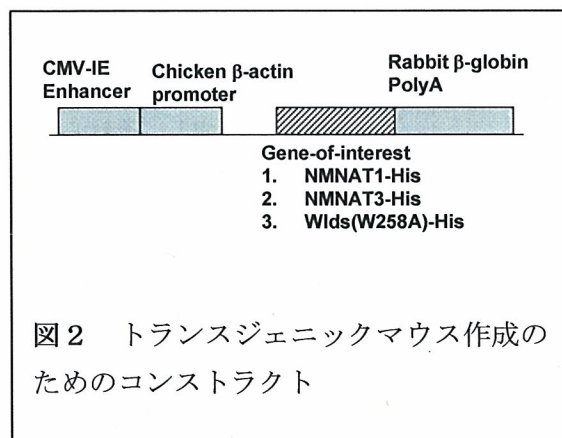
成した RNA をサンプルとして、両者の網羅的比較を行なった。

またこれまでに Sir2/Sirt1 の基質として Sirt1 によりデアセチル化されることが知られている Foxo1, Foxo3a, Foxo4, p53, NF κ B が NAD・Sir2 依存性軸索保護システムにおける Sir2 の下流の細胞内機序として作用しているかどうかを明らかにするため、1) で述べた *in vitro* 傷害後神経突起変性モデルにおいて、培養液中に加えた NAD による軸索保護効果を siRNA (Foxo1, Foxo3a, Foxo4) あるいは NF κ B superrepressor 分子が阻害するかどうか、あるいは初代培養神経細胞における NAD・Sir2 依存性軸索保護が p53 ノックアウト動物から取り出した神経細胞において成立するかどうかを検討した。

3) トランスジェニックマウスの作成

NMNAT 活性の過剰発現による軸索変性遅延効果と、これによる神経変性疾患治療効果をモデル動物体内で明らかにするため、NMNAT 活性を過剰発現するモデルマウスの作成を行なった。

トランスジーン の生体内での十分な発現レベルを実現するため、神経系でも十分な発現が得られることを確認済みである



CAG プロモータを用い、NMNAT1, NMNAT3 の各ファミリーメンバーの過剰発現モデルを作成することとした (図2 参照)。申請時の計画ではこれらに併せて、上述1) の研究によって同定した、NAD 合成反応系の酵素のなかで過剰発現による軸索保護効果が最も強いものを過剰発現するモデルも作成する予定であったが、後述するように NMNAT の過剰発現が最も強い軸索保護効果を示したため、NMNAT 以外の酵素の過剰発現モデルについては作成しなかった。

なお、Negative コントロールとして、自然発症変異マウス *wlds* において発現している Wlds 蛋白に W258A 変異を導入したものの (Wlds 蛋白における NAD 合成酵素活性中心に存在し、この変異を導入することにより NMNAT 活性が無くなる) の過剰発現マウスモデルを合わせて作成した。それぞれのトランスジーン由来蛋白の発現の確認のため、各蛋白は C 末端に Hexahistidine タグをつけた状態で発現させるようデザインした。

トランスジェニックマウスの作成は ICR マウス受精卵へのマイクロインジェクションによる定法によって行なった。トランスジーン発現は、PCR によって確認したのち、サザンブロット解析、ウェスタンブロット解析によって発現量の定量的比較検討を行なった。

倫理面への配慮

本研究においては、ヒト由来サンプルや患者由来臨床検体などを使用していない。動物実験、組換え DNA 実験に関しては、それぞれ、国立精神・神経センター 神経

研究所における小型動物実験安全委員会、組換え DNA 実験安全委員会に対して実験計画を申請し、承認のもとに行なった。

C. 研究成果

1) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法について

これまでの研究において、我々は、In vitro ワーラー変性モデルにおいて NMNAT 1 の過剰発現、ならびに培養液中への NAD の投与によって軸索変性遅延効果を観察できることを示した。本研究においては同様の方法によって、NAD 合成反応

系における他の酵素の過剰発現、並びに NAD 合成合成反応中間産物の培養液中への投与の効果を検討した。

NAD 合成中間産物に関しては、NAD の前駆物質である NMN、NaMN はいずれも 1 mM で以前に報告した NAD の示す軸索保護と同程度の保護効果を示した。次に、さらに前段階の前駆物質であるニコチンアミド、ニコチン酸の効果を検討したところ、いずれも有意な軸索保護効果を示さなかった (図 3)

最近 NAD の前駆物質として、以前から知られていた物質に加えて、Nicotinamide riboside (NmR) の重要性が報告されている。このため、NmR の軸索保護効果を調べ

たところ、NmR は NAD と同レベルの軸索保護効果を示した (図 3)。

NAD 合成系の各酵素 (NMNAT、QPRT、NmPRT、NPRT、Nr1 : 略号については図 1 参照) に関しては、それぞれの過剰発現のためのレンチウイルスベクターを作成し、それらを用いてまず、HEK293T 細胞を感染させ、それぞれのベクターが酵素活性をもった目的とする蛋白を発現

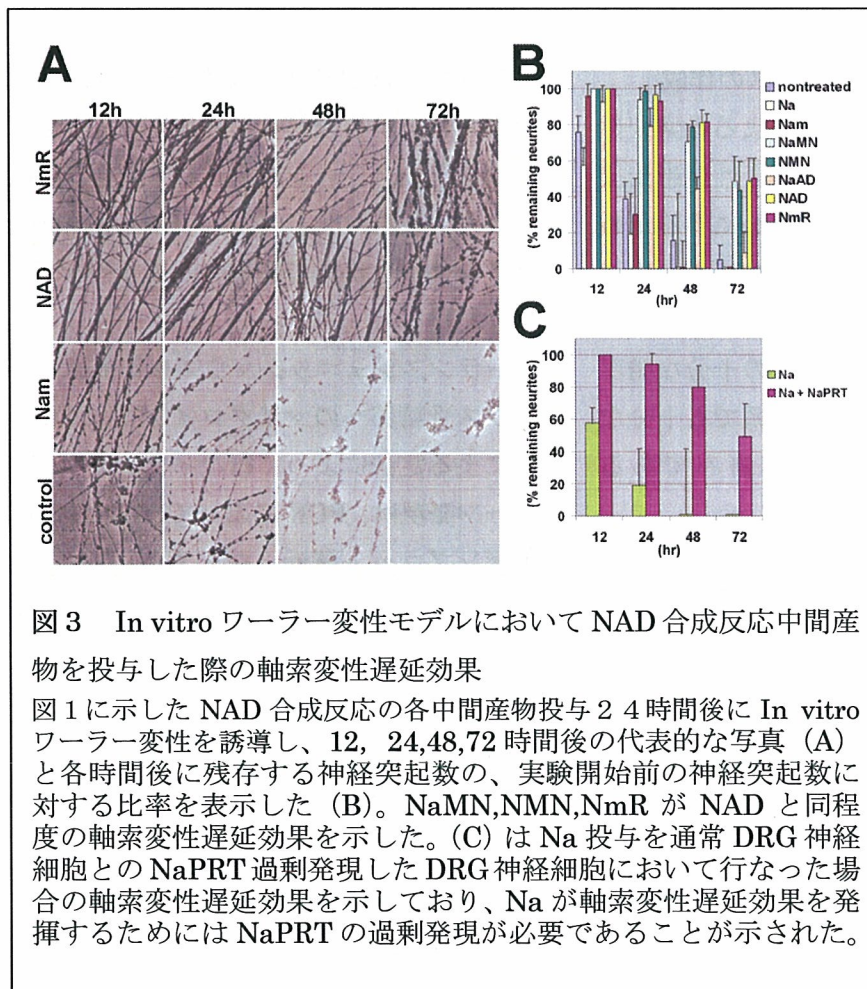


図 3 In vitro ワーラー変性モデルにおいて NAD 合成反応中間産物を投与した際の軸索変性遅延効果

図 1 に示した NAD 合成反応の各中間産物投与 24 時間後に In vitro ワーラー変性を誘導し、12、24、48、72 時間後の代表的な写真 (A) と各時間後に残存する神経突起数、実験開始前の神経突起数に対する比率を表示した (B)。NaMN, NMN, NmR が NAD と同程度の軸索変性遅延効果を示した。(C) は Na 投与を通常 DRG 神経細胞との NaPRT 過剰発現した DRG 神経細胞において行なった場合の軸索変性遅延効果を示しており、Na が軸索変性遅延効果を発揮するためには NaPRT の過剰発現が必要であることが示された。

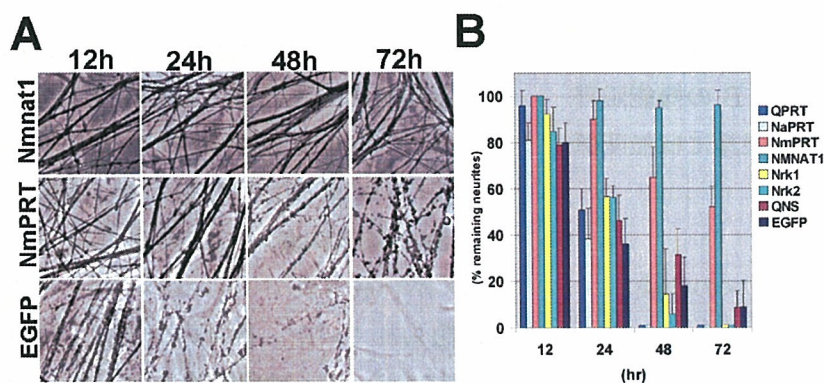


図4 NAD 合成反応系の酵素の中では NMNAT の過剰発現が最も強い軸索変性遅延効果を示す。

図1に示した各酵素、もしくはEGFPをレンチウイルスベクターによる過剰発現システムを用いて初代培養DRG神経細胞に発現させ、発現を確認後In vitroワラー変性を誘導し、12、24、48、72時間後に残存する神経突起数を定量比較した。AはNMNAT1、NmPRT、EGFPを過剰発現させた場合の代表的な実験結果を示し、Bは各酵素を発現させた場合の各時間における結果を、実験開始前と比較した際の残存神経突起の割合(%)で表示した。NMNAT過剰発現が最も強い軸索保護を示す一方、そのほかの酵素に関してはNmPRTがNADと同程度の比較的弱い変性遅延効果を示した他は、過剰発現による効果は認められなかった。

させることを確認した。ついで、各ベクターを初代培養DRG神経細胞に感染させ、軸索保護効果を検討したところ、既に報告したNMNAT以外はいずれの酵素もあきらかな効果を示さなかったがNmPRTは弱い軸索保護効果を示した(図4)。

この実験で用いた培養液にはニコチン酸は含まれないが、ニコチンアミドは生理的濃度に近い濃度で含まれている。この軸索保護実験でNmPRTの過剰発現は保護効果を示すのにNPRTは効果がなかったのは、それぞれの酵素に対する基質が培養液中に存在するかどうか依存している可能性が考えられたため、上記の実験に加えて、(培養液中のニコチン酸+NPRT過剰発現)(培養液中のニコチンアミド+NmPRT過剰発現)による軸索保護効果を検討したところ、

いずれの場合においても、培養液中にNADを加えた場合と同程度の軸索保護が認められた(図4)。

これらのことから、ニコチン酸がNaPRTによってNaMNに、ニコチンアミドがNmPRTによってNMNに、それぞれ変換される反応系は、神経細胞においては利用可能であるものの、通常の神経細胞においてはConstitutiveにActiveな反応系と

はいえないものと考えられた。一方、Nicotinamide Riboside投与が軸索変性遅延に有効であったことから、Nicotinamide RibosideがNrkによってNMNに変換される反応はConstitutiveに存在するものと考えられた。

2) 細胞内シグナル伝達機構に関する検討

マイクロアレイ解析の結果、wldsマウス神経節由来RNAにおいて正常動物に比較して発現レベルが2倍以上亢進或いは低下しているものは非常に少なく、NAD・Sir2依存性軸索保護システムにおいて、Sir2が、多数の遺伝子の発現調節に関与するような転写因子の機能調節を行なっているとは考

えられないという結果となった。

この結果と一致するように、FOXO ファミリーの各蛋白、p53、NF κ B の機能阻害も NAD \cdot Sir2 依存性軸索保護には無関係であることが示された。

3) トランスジェニックマウスの作成

NMNAT1, NMNAT3, 変異型 Wlds の各遺伝子につき、得られた F0 マウスのうちトランスジーンが導入されたものを、各 F0 マウス組織から抽出したゲノム DNA をテンプレートとする PCR 反応によって確認し、それぞれの遺伝子につき、13 匹、15 匹、9 匹のトランスジーン陽性 F0 マウスを得た。これらのトランスジーン陽性マウスについては、更にサザンブロット解析、をおこなうことによってトランスジーンのコピー数の比較を行なったところ、

の多いものを中心に、現在各トランスジェニックマウスにつき複数の異なる F0 マウス由来の系統についてフェノタイプの解析を進めている。

Preliminary な結果としては、NMNAT1 と NMNAT3 の過剰発現トランスジェニックマウスのフェノタイプは同じではない可能性が示唆されており、この結果は *in vitro* ワーラー変性モデルを用いて我々が過去に報告した結果とは異なるものである。

D. 考察

1) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法について

細胞内の NAD 合成反応系に関しては、従

来細菌・酵母において主として研究されてきた。図 1 に示すような経路はこれらに対応する酵素が哺乳動物にも存在する場合にはそのような反応経路が存在するという仮定に基づいて作成されたもので、実際に哺乳動物の細胞においてどのような経路で NAD が合成されているのかについての研究は限られていた。我々の研究は、培養神経細胞において、軸索保護を Readout とすることにより、神経細胞における NAD の生理的な合成経路をはじめて明らかにした。

我々の実験結果は、少なくとも一旦分化した神経細胞においては、ニコチンアミド、ニコチン酸を開始物質とする NAD の合成系は、いずれも通常は不活性であることを示している。(基質のみを投与した場合には軸索保護が起こらないことは、通常十分な酵素活性が細胞内にないことを意味していると考えられる。) この結果は、神経細胞以外では、膵臓 β 細胞における NAD 代謝を研究しているグループから、NmPRT の活性が NAD 合成に不可欠である、という報告を行なっているのとは異なった結果であり、細胞種によって異なった NAD 合成系があることが示唆される。ニコチンアミド、ニコチン酸とは異なり、NmR は基質単独の投与で NAD と同じ程度の軸索保護効果を示したことから、神経細胞においては、NmR に由来する NAD 合成反応が生理的に重要である可能性が示唆されている。

哺乳動物の神経系において、NmR がどのようにして供給されるのかは未だ明らかでないが、NmR が神経に比較的特異的な NAD の原材料として作用するならば、生体内に投与する場合には NAD 自身よりは副作用が少ない可能性もある。今後この物質

の生体内における代謝に関して、更に検討する必要がある。

2) 細胞内シグナル伝達機構に関する検討

マイクロアレー解析の実験結果に関しては今後さらに検討の必要があるが、発現レベルの大きい変化を示した遺伝子の数がたいへん少なかったという点に関しては、Sir2による遺伝子発現調節を他臓器において検討した過去の論文報告と一致する結果であった。

NAD・Sir 2 依存性軸索保護機構が神経細胞内でのどのような変化に基づくものであるのかに関しては、今後更に違う手法による検討が必要であると考えられた。

3) トランスジェニックマウスの作成について

我々は過去の研究において NMNAT 1 の過剰発現が wlds マウスのフェノタイプの本質であることを示した。この点から考えると、NMNAT 活性のモデルマウスにおける過剰発現は、自然発症 wlds マウスにおいて既に達成されていることから、NMNAT1 トランスジェニックマウスのフェノタイプは wlds マウスと同一であることが予想される。ところが、最近の報告によると、NMNAT1 のトランスジェニックマウスにおいては wlds マウスとは異なり、軸索変性過程は正常に進行するとされており、これが例えば単に NAD 合成酵素活性の発現量の多少によるものなのか、或いは NMNAT 1 と Wlds の生体内における挙動は同じではないからなのかは、この変異マ

ウスにおける軸索変性遅延発現機構を明らかにする上で重要なポイントとなると考えられる。また、自然発症の wlds 変異マウスにおいて過剰発現している Wlds 変異蛋白は E3 ligase である UFD2a の生理的プロモータによって発現制御を受けているが、この蛋白の発現レベルは高齢になるにつれて徐々に低下しているものと考えられ、加齢とともに発症・進行する神経変性疾患モデルに対する効果を明らかにするためには wlds マウスは必ずしも有効ではない可能性が考えられる。これらのことから、今後生体内における NMNAT 活性の過剰発現マウスモデルのフェノタイプの解析は、神経変性の分子機序を明らかにし、変性の抑制法を開発する上で極めて重要な意義を持つものと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

. Sasaki, Y. Araki, T. & Milbrandt J. Stimulation of NAD biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. J. Neurosci. 26:8484-91(2006).

2. 学会発表

国内学会

Araki, T. & Sasaki Y. A Role for the NAD biosynthetic pathway in protection against axonal degeneration. 第29回日本

神経科学大会, 京都、2006.7.19-21.

ALS/MND. 2006.11.30-12.2 Yokohama

Tateno, M., Shimazaki, Y., Saitoh, F.,
Takahashi R. & Araki, T. Unusually
folded SOD1 species sequester specific
motor molecules and inhibit the axonal
transport of their cargos. 第 29 回日本神
経科学大会, 京都、2006.7.19-21.

H.. 知的財産権の出願・登録

なし

荒木敏之、佐々木洋. NAD 合成反応系の改
変による神経軸索変性抑制効果 第 112 回
日本解剖学会総会・全国学術集会 2007.
3.27-39.

国際学会

(シンポジウム・講演)

Araki T & Sasaki Y. Inhibition of axonal
self-destruction via increased nuclear
NAD biosynthesis and Sir2 activation.
7th Biennial Meeting of Asian pacific
Society for Neurochemistry (APSN2006),
2006.7.2-4. Singapore.

Takahashi R., Tateno, M. & Araki, T.
SOD1 aggregates generated within
motoneuronal dendrites/cell bodies move
into axons before disease onset in
G93ASOD1 mice. 17th International
Symposium on ALS/MND.
2006.11.30-12.2 Yokohama

(一般発表)

Tateno M, Takahashi R. & Araki, T.
SOD1 aggregates within Motoneuronal
axons do not associate with mitochondria.
17th International Symposium on

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
荒木 敏之	軸索変性過程	中村俊	先進 脳・神経科学	培風館	東京	2006	135-145

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sasaki, Y. Araki, T & Milbrandt J.	Stimulation of NAD biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy.	Journal of Neuroscience	26巻	8484-8491	2006
荒木 敏之	神経変性疾患の神経再生	Cognition and Dementia	6巻	25-30	2007

Chapter 11

軸索変性過程

荒木敏之

- 1 軸索変性の多様性
- 2 *wld^s* 変異マウス
- 3 Sir2 活性化と軸索変性遅延
- 4 NAD・Sir2 依存性軸索保護機構による神経疾患治療の可能性
- 5 さいごに

1 軸索変性の多様性

神経軸索の変性、もしくはそれに類似した過程は神経系におけるさまざまな生理的・病的過程において観察される^[1]。最も典型的な軸索変性は神経軸索の傷害の後に見られる傷害部位より末梢部分の変性であり、ワーラー変性と呼ばれるものである。実験的には、例えば実験動物としてよく用いられるマウス・ラットにおいては末梢神経である坐骨神経を切断した場合、切断部位より末梢側の軸索は切断後直ちに変性を開始し、約4日後までには神経軸索の構造蛋白の一つであるニューロフィラメント (Neurofilament) の免疫原性は消失することが知られている (図 11.1)。これに類似した神経変性の過程は、例えば末梢神経傷害においても見られる。末梢神経変性は代謝性疾患 (糖尿病、アルコールの慢性的過剰摂取など) を原因とするものが最も多いが、このような疾患において見られるように、神経細胞が長期間にわたり慢性的に傷害刺激に曝露されることによって、神経軸索がその最も末梢側から徐々に退縮するもので、この状況は “Dying back” と呼ばれる。

これら、疾患に由来するものだけではなく、軸索変性に類似したプロセスは正常発生・発達過程にも観察される。例えば、脊髄前角に存在

する運動神経細胞は発生過程において複数の筋繊維と連絡しており、また筋繊維側から見ても複数の神経細胞が一つの筋繊維と連絡する状態になっているが、成熟動物においては単一の筋繊維は一つの神経細胞からの刺激を受ける繊維連絡となり、それ以外の軸索繊維はいったん完全な連絡を形成していたものに関しても個体の成熟に伴って除去される。このような過程は軸索除去 (Axonal elimination) あるいは軸索剪定 (Axonal pruning) などと呼ばれるものであるが、いったん形成されていた軸索繊維が無くなるプロセスである、という点においては上述のワーラー変性や Dying Back 変性と類似したプロセスであると見ることも可能である。これらの過程は、起こる状況が全く異なっており見かけ上の特徴にも異なる点が多いが、いずれのプロセスも分子レベルで理解されていることは未だにわずかであり、これらの過程の分子レベルでの異同は全く明らかではない。

本章では、著者らが近年明らかにした NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の発見をめぐる研究結果について概説しながら、軸索変性過程に関する研究の重要性と最近の研究の趨勢などについて述べる。

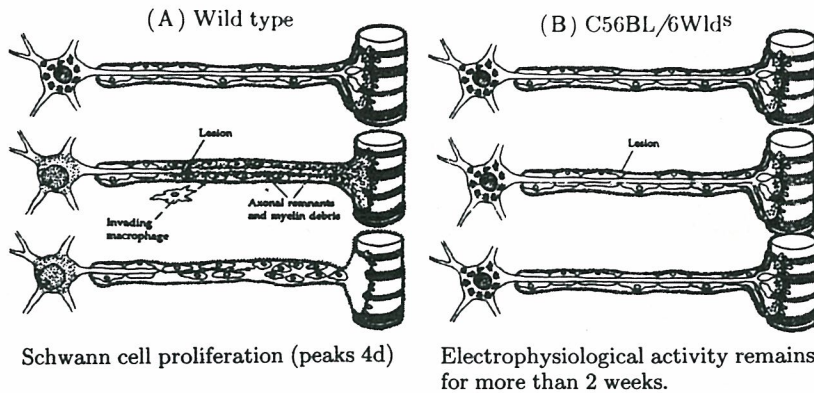


図 11.1 神経軸索の傷害後変性（ワラー変性）過程と *wld^s* マウスにおける変性遅延軸索変性の生理的過程 (A) と *wld^s* マウスにおけるその遅延の模式図。

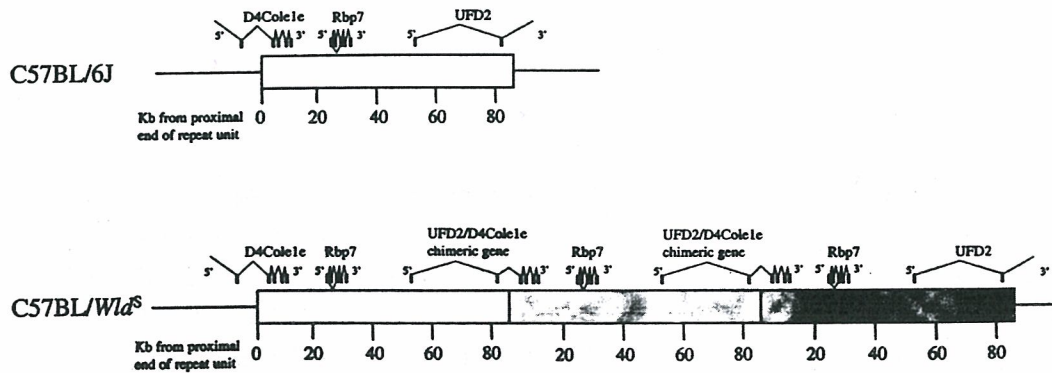


図 11.2 ポジショナルクローニングによって明らかになった *wld^s* マウスの遺伝的変異約 85kb の領域の 3 重複によって変化する遺伝子のなかで、UFD2a の N 末端領域と NMNAT1 の融合したキメラ蛋白 (*Wld^s* 変異蛋白) の発現が軸索変性遅延のフェノタイプ発現に関与していることが後に示された。

2 *wld^s* 変異マウス

軸索変性が萎縮 (Atrophy) と呼ばれるような、細胞体からのエネルギーや物質供給の途絶によって構造が維持できなくなることによる変化ではなく、エネルギーを使い、蛋白新生を必要とする積極的な反応過程であることは、軸索変性が遅延する自然発症変異マウス *wld^s* の存在によって最もはっきりと示されることになった^[2] (図 11.1)。このマウスは実験動物としての飼育環境下では発生、生殖などにおいて正常動物と区別することができないが、神経傷害後の軸索変性が著明に遅延する。例えば坐骨神経を実験的に切断した場合、

正常では直ちに軸索変性が開始され、切断の 3~4 日後にはニューロンフィラメントの免疫反応性 (Immunoreactivity) が完全に消失するが、*wld^s* マウスにおいては切断の 2 週間後においても切断部より末梢側の神経筋接合部における電気的活動が記録可能である。この変異は常染色体優性遺伝することが知られている。

1990 年代の研究によって、このマウスの軸索変性遅延は軸索に内在する変化であって Schwann 細胞には無関係であることが示されていたが、2000 年前後の一連の論文により、

- (1) *wld^s* マウスの遺伝的変化は第 4 染色体における約 85 kb の領域の三重複によって引き起こされている (図 11.2)。

- (2) この 85 kb の領域に存在する複数の遺伝子の中で、UFD2a の一部と NMNAT1 の全長の融合した異常蛋白 (Wld^s 蛋白) の発現による増進機能 (Gain-of-function) によって Wld^s マウスの Phenotype が引き起こされていることが明らかになった^[3, 4]。

UFD2a は U box 領域を機能ドメインとする Ubiquitin ligase (E3)^{*3}である。また NMNAT1 (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1) は NAD 合成反応系の最終段階に位置して NAD を直接合成する反応を触媒するものである。我々はこれらのいずれの領域が *wld^s* 変異マウスのフェノタイプ (phenotype: 表現型) 形成に必要であるのかを明らかにするために、「培養細胞をもちいたワーラー変性モデル」を開発した^[5]。

このモデルは、後根神経節神経細胞の初代培養を行ない、神経突起が十分伸展したあと、神経突起を細胞体から切り離すことによって神経突起の変性を誘導するものであるが、神経突起伸展後に外来の蛋白を過剰発現させることによって、神経突起変性過程における外来蛋白の影響を評価することができる。本実験をもちいて Wld^s 変異蛋白を過剰発現したところ *wld^s* 変異マウスにおいて観察されるのと同様の神経突起変性の著明な遅延が観察された。このことは、この方法が生体内で見られる軸索変性過程を培養細胞レベルで再現していることを確認するものであり、この方法を用いて Wld^s 変異蛋白の各領域の役割を解析することができるものと考えられた (図 11.3)。

wld^s 変異は優性を示すことから、もし UFD2a

領域がフェノタイプ形成に必要であるとするならば N 末端の 70 アミノ酸残基 (ユビキチン化に直接関与する U box 領域を含まない) からなる領域は本来の UFD2a の機能を阻害するドミナントネガティブとして作用しているものと考えられ、もし NMNAT1 領域がフェノタイプ形成に重要であるなら、NMNAT 酵素活性の Gain-of-function となっているものと考えられた。これらの可能性のうちのいずれが正しいのかを明らかにするため、「培養細胞をもちいたワーラー変性モデル」を用いて、図 11.4 に示す各蛋白の神経突起変性にもたらす影響の評価を行った。その結果 Wld^s 変異蛋白過剰発現と同様のレベルの神経突起の変性の抑制効果を示すのは NMNAT1 の過剰発現のみであることが明らかとなった (図 11.5)。

NMNAT1 は NAD を直接産生する酵素であり、過去によってその立体構造や活性部位などに関する研究結果が報告されている。それらの情報に基づいて、基質に結合せず酵素活性を持たない 1 アミノ酸変異を導入した NMNAT1 (NMNAT1(W170A))、もしくは同様の変異を持つ Wld^s 蛋白 (Wld^s (W258A)) を培養細胞におけるワーラー変性モデルに導入しても、軸索に対する保護効果は認められない。このことは *wld^s* 変異は NMNAT1 の NAD 合成能の亢進が、その本質であることを示しているものと考えられた (図 11.6)。

神経細胞は Connexin43 を細胞表面に発現しているが、この蛋白は NAD チャンネルとして作用し、神経細胞は細胞外の NAD を細胞内に取り込むことができる^[6]。このことを使って、初代培養神経細胞に対し、培養液中に NAD を添加してみると、培養神経細胞の突起は培養液中に添加された NAD によっても傷害後変性から保護されることが明らかになった。この際、NAD は神経突起に対する傷害を起こす前、少なくとも 24 時間程度か、それより以前に培養液中に投与されている必要があることから、NAD による軸索変性遅延機構には、転写・翻訳機構が介在している可能性が示唆された (図 11.7)。

蛋白ユビキチン化反応とプロテアソームの機能

*³ 蛋白ユビキチン化反応は Ubiquitin activating enzyme (ユビキチン活性化酵素: E1), Ubiquitin conjugating enzyme (ユビキチン結合酵素: E2), Ubiquitin ligating enzyme (ユビキチン連結酵素: E3) から成る複合酵素系によって標的タンパク質にユビキチンを共有結合 (ユビキチンの C 末端のカルボキシル基とタンパク質中のリジン残基の ε-アミノ基とが縮合してイソペプチド結合) する。さらにこの E1-E2-E3 のカスケード反応を繰り返して、多数のユビキチン分子が枝状に繋がったポリユビキチン鎖が形成され、蛋白のプロテアソーム分解のシグナルとして用いられるほか、細胞内シグナル伝達など多様な細胞の機能を蛋白の分解制御を通して調節している。

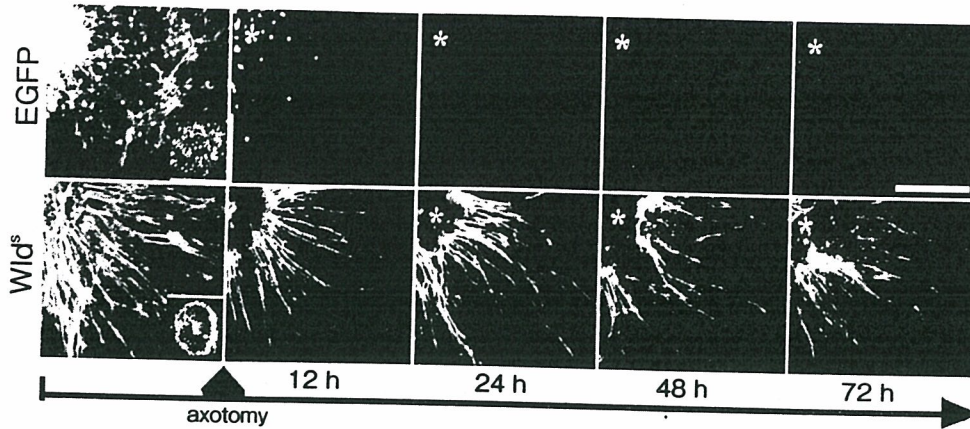


図 11.3 培養細胞をもちいたワラー変性モデル (口絵参照)

後根神経節の Explant 培養を胎生 14 日のマウス胎児から作成し、神経突起が十分にのびた段階で突起の付け根で細胞体を神経細胞体から切り離し、突起の変性を誘導する。神経突起切断前に、ウイルスベクターなどを用いて神経細胞に外来遺伝子を強制発現させておき、そのあと突起の変性を誘導することにより、神経突起の変性過程に対する特定の遺伝子の発現の影響を評価することができる。図に示すのはコントロールとしての Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 強制発現神経細胞と、Wld^s 変異蛋白と EGFP の両方を発現する神経細胞の突起の変性過程を示している。(突起は Neurofilament H に対する抗体を用いた免疫細胞化学 Immunocytochemistry によって可視化している。) EGFP 発現細胞の突起が傷害後数時間で消失するのに対し、Wld^s 変異蛋白を発現する神経細胞の突起は細胞体と分離後数日以上にわたって構造が保たれ、軸索変性が著明に遅延していることから、培養細胞を用いたこのモデルにおいて生体内の軸索変性遅延が再現されていることが示され、このモデルが軸索変性過程の研究に有用であることを示しているものと考えられる。

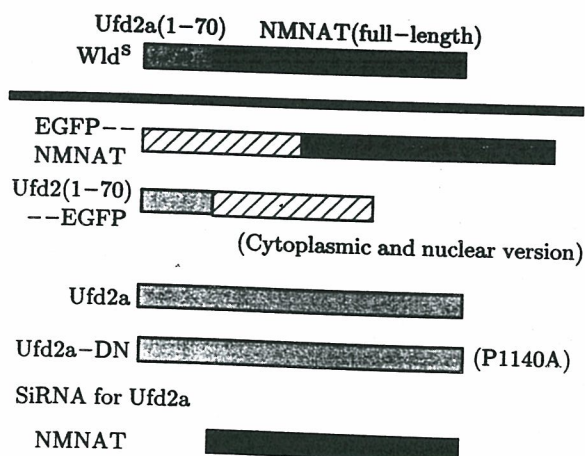


図 11.4 Wld^s 変異蛋白の活性部位の検討に用いた過剰発現コンストラクト

図に示す各遺伝子をウイルスベクターを用いた強制発現系によって初代培養神経細胞に発現させ、図 11.3 に示したワラー変性モデルにおける、これらの強制発現の軸索変性過程への影響を検討した。UFD2aDN は過去の報告によって知られている UFD2a のドミナントネガティブを形成する 1 アミノ酸変異を導入した分子を示している。

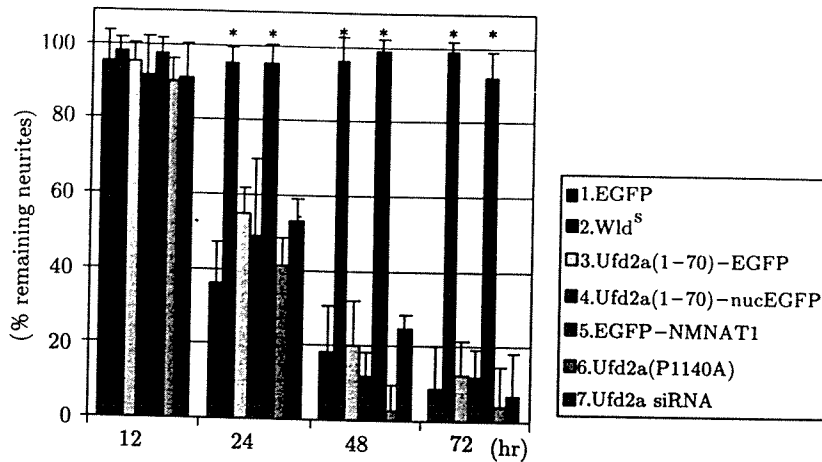


図 11.5 NMNAT1 の過剰発現が *wld^s* 変異マウスにおける軸索変性遅延を再現する (口絵参照)
 図 11.4 の各遺伝子の過剰発現の神経突起変性に対する影響を、変性誘導開始後の各時間において残存する突起数の実験開始時の突起数に対する比率を示している。Wld^s 変異蛋白と NMNAT1 の過剰発現のみが軸索変性遅延効果を示した。

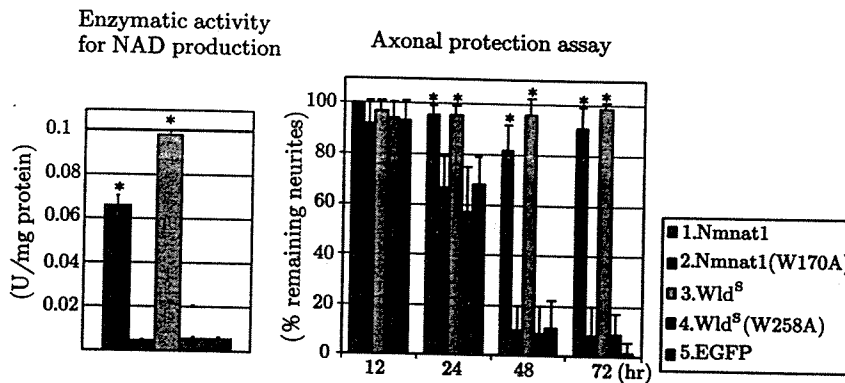


図 11.6 NAD 合成活性を持たない変異型 NMNAT1 は軸索変性遅延効果を示さない
 点変異を導入した NMNAT1, Wld^s 変異蛋白は共に NAD 合成活性を示さず、これらを過剰発現した神経細胞の突起は傷害後変性の遅延効果を示さない。

は、軸索変性反応の進行に必要であることは、すでに報告されているため、Wld^s 変異蛋白においてもユビキチン化反応に関連のある UFD2a 領域が変異マウスのフェノタイプの形成に関与している可能性が考えられたが、我々の示した結果は、*wld^s* 変異マウスにおける軸索変性遅延フェノタイプ発現に関してはユビキチン・プロテアソーム系は直接的には関与していないものと考えられた。

3 Sir2 活性化と軸索変性遅延

NMNAT1 はアミノ酸配列中に核移行シグナルをもち、核内に存在する。Wld^s 変異蛋白もこのため同様に核内に存在する。NMNAT1 酵素活性の Gain-of-function が損傷後の軸索に対し保護的な作用を持つとすれば、その下流にある細胞内シグナリングは何であるのかを考えるにあたり、Wld^s 変異蛋白の存在部位に着目すると、核内で NAD を必要とする反応が有力な候補であると考えられる。NAD はミトコンドリアの電子伝

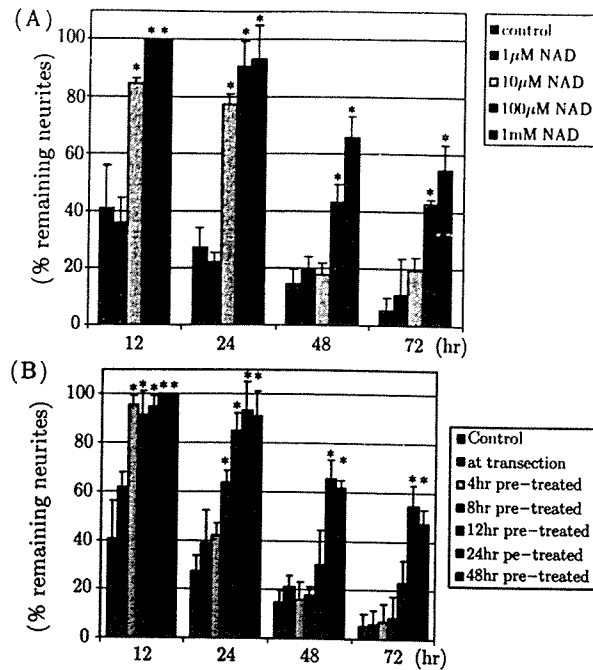


図 11.7 培養液中に添加した NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果

図に示す各濃度の NAD を細胞培養液中に添加した場合の神経突起保護効果 (A)。1mM の NAD を、神経突起変性誘導開始の図に示す各時間前に投与した場合の変性遅延効果 (B)。

達系の補酵素として解糖系反応における重要な役割を果たしているが、核内では PolyADP ribose polymerase (PARP) と Sir2 (NAD-dependent protein deacetylase) が NAD を基質として用いる主要な酵素として知られている。PARP による ADP ribose 付加反応は、DNA の損傷修復時に特に活性化されるため、PARP は DNA 鎖の損傷後修復反応に必要なものであると考えられている^[7]。また、Sir2 は蛋白デアセチル化反応を触媒する酵素であり、当初ヒストンのデアセチル化酵素として報告されたが最近、転写調節因子など多くの核内蛋白を基質とすることが報告され、これらの蛋白の機能をアセチル基の添加・除去を通して調節する機構を担っているものと考えられている^[8]。また酵母から哺乳類の一部にいたるまでの非常に幅広い生物種において、カロリーの摂取制限は寿命の延長効果をもたらすほぼ唯一の有効な方法であることが知られているが、Sir2 はこのカロリー摂取制限による個体の寿命延長効果を担う蛋白として近年非常に注目されている^[9, 10]。核内において NAD を必要とするこれら二つの酵

素が *wld^s* 変異による軸索変性遅延と関連しているかどうかを明らかにするため、NAD による神経突起保護効果に対する PARP もしくは Sir2 の薬理的阻害剤の影響を検討したところ、PARP 阻害剤の 3-aminobenzimide は軸索変性過程に影響を示さないのに対し、Sir2 の阻害剤である Sirtinol は NAD による軸索変性遅延を抑制する効果が認められた (図 11.8)。さらに、Sir2 の活性化剤としての効果を持つことが知られている Resveratrol は NAD と類似した神経突起変性遅延効果を示すこともあきらかとなった (図 11.9)。これらの結果は *wld^s* マウスにおいて認められる NMNAT1 の活性亢進は Sir2 を活性化することによって軸索保護効果を示していることを示唆していると考えられた。

哺乳類では Sir2 ファミリーは SIRT1-SIRT7 の 7 つのファミリーメンバーを持つことが知られている。これらの 7 つのうちいずれの分子が軸索変性遅延に関与しているのかを明らかにするために、それぞれのファミリーメンバーに対する siRNA を初代培養神経細胞に発現させて、NAD

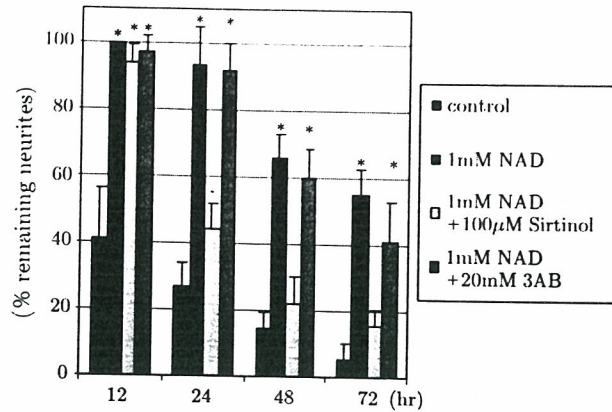


図 11.8 Sir2 の薬理的阻害剤は NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果を抑制する Sirtinol と 3-aminobenzimide による NAD の神経突起変性遅延効果への影響を示している。

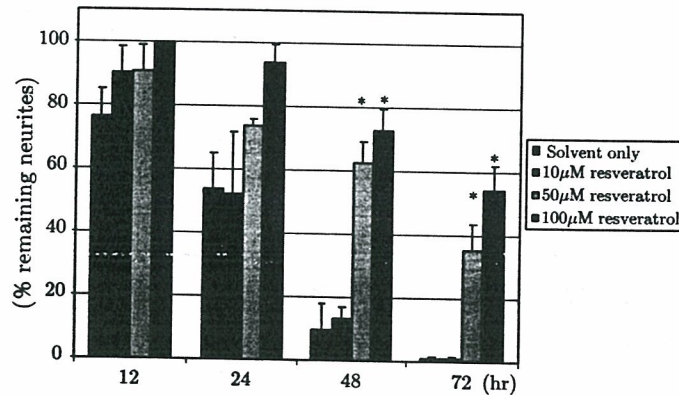


図 11.9 Resveratrol による神経突起の傷害後変性遅延効果

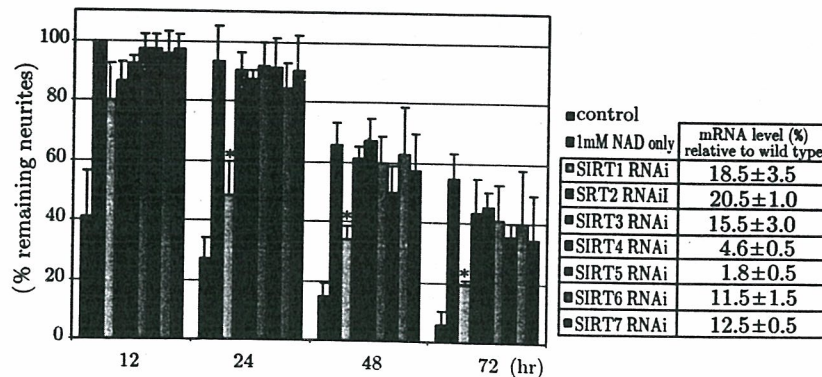


図 11.10 Sir2 各ファミリーメンバーの、NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果に対する寄与 SIRT1 の siRNA による抑制によって特異的に NAD の神経突起保護効果が抑制される。(口絵参照)

による突起変性遅延効果に対する影響をみたところ、SIRT1 に対する siRNA が特異的にこの効果を抑制し、それ以外のファミリーメンバーに対する siRNA は神経突起変性遅延に対する影響を認

めなかった (図 11.10)。このことから、*wld^s* マウスにおいて観察される軸索変性遅延のフェノタイプは NMNAT1 の発現上昇による活性亢進が NAD 産生を高め、これが Sir2 ファミリーの

デアセチル化酵素の基質として作用することから SIRT1 が活性化されることによって、軸索変性遅延効果につながっているものと考えられた。

Sir2 は上述のように寿命を制御する遺伝子として、近年注目を集めてきたが、その一方で、Sir2 と疾患との直接的な関係は知られていなかった。また、酵母などでは Sir2 はカロリー摂取制限に応答して、糖代謝関連酵素の発現レベルを調節していることが知られており、哺乳類でも肝臓、膵臓など、糖代謝と直接関連した臓器における機能が検討されてきたが、血糖の恒常性維持とは無関係な臓器である脳・神経系において Sir2 の果たす役割に関してはまったく知られていなかった。我々の研究は、Sir2 と疾患の関連の可能性に関して初めて示したものであり、また Sir2 の活性化によって軸索が変性から保護されることから、神経細胞における老化というのは、すなわち軸索の変性を意味するのではないか、という可能性をも示唆していると考えられる。

4 NAD・Sir2 依存性軸索保護機構による神経疾患治療の可能性

wld^s マウスにおいて認められる軸索変性遅延効果を神経疾患に対して治療的に用いることができる可能性が以前から指摘されている。上述のように、軸索変性は多くの神経変性疾患の発症過程において神経細胞死の前段階として観察され、また、軸索変性自体が疾患の症状の形成にも重要な役割をもっていることが指摘されている。このことは、軸索変性の遅延効果により、神経変性疾患の進行抑制、症状の改善などの効果が期待されることを意味している。実験動物における、軸索変性遅延による疾患の治療効果の検討は *wld^s* マウスのフェノタイプ出現のメカニズムに関する研究と平行していくつかの研究グループによって行われており、それらの多くが成功している [9, 10]。例えば

(1) *wld^s* マウスにおいて作成された脳虚血モデルにおいては野生型マウスにおける同様のモデルと比較して病変部位が小さくより軽症である。

- (2) 6-Hydroxydopamine 投与によるパーキンソン病モデルを *wld^s* マウスで作成した場合、軸索残存による症状の軽減効果などが観察される。
- (3) 若年期に発症する運動神経疾患のモデルとされる *pmn* マウスを *wld^s* マウスと掛け合わせることにより、*pmn* マウスの寿命が延長し、運動神経症状も改善する。
- (4) 末梢神経の遺伝性障害 (Charcot Marie Tooth 病) のモデルと考えられる MPZ/P0 のノックアウト動物を *wld^s* マウスと掛け合わせることにより、ミエリン形成障害に由来する軸索変性に対しても遅延効果が認められる。

これらの実験結果は、予想されたように、多くの神経疾患において軸索変性が症状の形成に重要な位置を占めていること、軸索に対する保護効果は神経細胞の死を抑制することにつながり、その結果として神経変性疾患に対する治療的な効果につながることを示している。この現象はそれぞれの疾患の発症機序とは無関係に観察されることから、NAD・Sir2 を介した軸索保護機構の臨床応用が可能になれば、数多くの神経疾患に共通した治療法となることが期待される。

その一方で、これまでに NAD・Sir2 を介した軸索変性遅延効果が認められない可能性が示唆されている疾患がある。運動神経変性疾患として非常に重要な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデルとされている変異型 Superoxide dismutase1 (SOD1) を過剰発現するトランスジェニックマウスに関しては、*wld^s* マウスとの掛け合わせによる寿命の延長や症状の軽減などの治療的な効果は非常に弱い、ほとんど認められないことが報告されている。また、運動神経とその標的となる筋細胞との神経連絡形成は、上述のようにいったん形成された神経突起がなくなる過程であるという意味において軸索変性過程のひとつであると考えることが可能であるが、*wld^s* マウスにおいては成熟型の神経筋連絡の形成に明らかな異常を認めないことが既に報告されている。これらの結果の解釈としては、いくつかの可能性がある。その

ひとつは観察上軸索変性に類似した過程であると考えられる過程は分子メカニズムとしては単一ではなく、そのため NAD・Sir2 を介したメカニズムで遅延させることができる過程とできない過程がある、という可能性である。可能性の第 2 としては、軸索変性に類似した過程は分子レベルでも単一であるが、*wld^s* マウスにおいて軸索変性遅延フェノタイプの原因となっている *Wld^s* 変異蛋白の発現が安定的でないため、*wld^s* マウスを用いて行われてきた、これまでの実験結果は分子レベルでの神経軸索変性様過程の多様性を反映するものではない、という考え方が可能である。(*wld^s* マウスにおける *Wld^s* 変異蛋白の発現は *UFD2a* 遺伝子のプロモーターが制御しているが、この蛋白の発現は成熟型の運動神経連絡が形成される発生過程や ALS の *SOD1* モデルにおいて神経症状の悪化を認める生後 7-8 ヶ月齢以降では発現レベルが低下しており、このために十分な軸索変性遅延効果が得られなかった可能性がある。) これらの可能性のうちの、いずれが正しいのか、もしくは第 3 の可能性があるのか、に関しては、今後の課題となっている。

5 さいごに

神経軸索変性過程が、アポトーシス (Apoptosis: プログラム細胞死) に匹敵するような一連の蛋白新生と酵素反応を介した細胞内反応系である可能性が示唆されたのは比較的最近であり、軸索変性過程に関して知られていることはアポトーシスに比べても非常に少なく、研究はまだその端緒についたばかりであるといつてよい。軸索変性に関する研究は本章で述べたように、神経変性疾患の治療、神経系の生理的な老化現象の理解とその予防につながるものである。今後のこの分野の研究の一層の進展が期待される。

文献

[1] Raff, M. C., A. V. Whitmore, et al. (2002).
"Axonal self-destruction and neurodegeneration." *Science* 296(5569): 868-71.

- [2] Lunn, E. R., V. H. Perry, et al. (1989).
"Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve." *Eur J Neurosci* 1(1): 27-33.
- [3] Conforti, L., A. Tarlton, et al. (2000).
"A *Ufd2/D4Cole1e* chimeric protein and overexpression of *Rbp7* in the slow Wallerian degeneration (*Wld^s*) mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11377-82.
- [4] Mack, T. G., M. Reiner, et al. (2001).
"Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a *Ube4b/Nmnat* chimeric gene." *Nat Neurosci* 4(12): 1199-206.
- [5] Araki, T., Y. Sasaki, et al. (2004).
"Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration." *Science* 305(5686): 1010-3.
- [6] Bruzzone, S., L. Guida, et al. (2001).
"Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells." *Faseb J* 15(1): 10-12.
- [7] Skaper, S. D. (2003). "Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 in acute neuronal death and inflammation: a strategy for neuroprotection." *Ann N Y Acad Sci* 993: 217-28; discussion 287-8.
- [8] Imai, S., C. M. Armstrong, et al. (2000).
"Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." *Nature* 403(6771): 795-800.
- [9] Kaerberlein, M., M. McVey, et al. (1999).
"The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms." *Genes Dev* 13(19): 2570-80.
- [10] Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001).
"Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 410(6825): 227-30.