

く寄与するものと期待される。とくに、活動電位の伝播は、一方的・不可逆的・デジタル的性質が強い情報のトランスファーであるのに対し、セカンドメッセンジャーを介したシグナルは、各々の化学情報としてのアナログ的性質、複数の経路間の相互作用（ゲート・干渉・相乗効果）、ならびに入力部位シナプスからの増幅・空間的拡散に依存するというまったく異なる性質を有する。神経回路内におけるこのようなシグナル動態の意義の解釈が大いに待たれるところである。

コラム 1 記憶学習における転写因子 CREB のセカンドメッセンジャーによる制御

転写因子 CREB はすべての組織に発現しているが、その神経機能は遺伝子改変マウスの解析を通じて詳細に調べられている。開始コドンを含むエクソン 2 を欠損したマウス (CREB α/δ -KO) は、主要な CREB 分子種である α -CREB と δ -CREB の発現が完全に消失しているが、脳神経系以外の組織では、オルタナティブ・プロモーターが選択され β -CREB 発現が亢進し、さらに CREB 類似タンパク CREM の発現誘導が起こるため、機能が代償される。129xBL6 の遺伝子背景では、発生異常・脳形態異常を認めず、海馬依存的課題 (Morris 水迷路・文脈依存的恐怖条件付け) において、短期記憶が保持されるが、長期記憶の選択的障害が報告されている。

一方、CREB の DNA 結合領域である bZIP 領域を欠損したマウス (CREB-null マウス) では、生後直後に呼吸不全により死亡する。死亡脳では、脳神経系におけるアポトーシス亢進、神経変性増大、感覚神経の軸索伸展・投射異常も認められた。floxed-CREB マウスを用いた前脳特異的 CREB 欠損マウスに CREM-null マウスを交配すると、同様の発生異常が確認されたことから、CREB には、神経発生過程における重要な制御機能があることが証明された。

CREB をリン酸化する責任酵素として、PKA, CaMKIV, RSK, MSK などが主として生化学的実験から見いだされているが、CREB 変異マウスと類似の海馬依存的長期記憶障害が報告されているのは、CaMKIV と一部の PKA 変異マウスに留まる。このことは、海馬シナプス活動により活性化された CaMKIV が CREB リン酸化を通じ長期記憶制御に寄与していることを強く示唆する。一方、PKA の基質は必ずしも CREB に留まらないため、PKA 変異マウスの表現型の解釈は複雑である。

コラム 2 広がる CaMK の機能

CaM キナーゼといえば、CaMKII のことを思い浮かべることが多いが、シナプスに非常に強く局在する CaMKII 以外にも、実は、核に強く発現する CaMKIV、脂質ラフトに集積する CaMKI γ など、神経細胞の重要な部位に存在する CaM キナーゼには、多

様性があることが注目されている。CaMKII が 12 量体を形成し、複合体の中で、相互にリン酸化する形で「自己」リン酸化して活性化するのに対し、CaMKI や CaMKIV は、上位キナーゼである CaMKK- α , - β の活性により活性化ループの Thr がリン酸化され、これに伴い酵素活性の上昇が認められる。前述のとおり、CaMKIV は主要な CREB リン酸化酵素の 1 つであるが、最近、CaMKI γ が脂質ラフト内で、BDNF 依存的 Rac 活性化を司る重要な酵素であり、初期の樹状突起伸展に寄与することが明らかにされた。すなわち、CaMKファミリーは、スパイン内でのシナプス可塑性 (CaMKII)、長期記憶に必要な転写活性化 (CaMKIV)、脳発達過程での突起形成・伸展 (CaMKI γ など) に不可欠である可能性が示唆されている (図 5.4)。

5.2 リン酸化シグナル伝達カスケードと遺伝子発現制御

5.2.1 はじめに

可逆的なリン酸化によるタンパク質の機能制御はさまざまな神経機能に重要である。リン酸化の状態はタンパク質リン酸化酵素 (protein kinase) とタンパク質脱リン酸化酵素 (protein phosphatase) によって制御される。これらの酵素は負に荷電したリン酸基をタンパク質に共有結合させ、あるいは脱離させる。細胞質タンパク質の 3 個に 1 個は共有結合で結合したリン酸基をもっており、セリン、トレオニン、チロシン残基に負に帯電したリン酸基を付加することにより、タンパク質の化学的性質を大きく変える。その結果、標的タンパク質を活性化したり、不活性化したりする。リン酸化される可能性のあるアミノ酸残基は 1 つのタンパク質中に複数個存在することもあるので、それらのリン酸化の「パターン」がタンパク質機能の多様性を生み出す場合もある。リン酸基はリン酸化されたタンパク質の機能に影響を及ぼすだけでなく、多くの生体分子にとっての「目印」となり、この「目印」を基に結合した酵素がさらにリン酸化されたタンパク質を修飾、あるいは分解するということもある。タンパク質リン酸化に関連した化学反応はしばしば、将棋倒しのように連続的に進行し「カスケード」という言葉が使われる。代表的な MAPK カスケードは非常に多くの細胞機能に関わり、高次脳機能にも重要であることが最近の解析で示されてきた。この項では、神経機能との関連が何らかの形で示されているタンパク質リン酸化のうち、とくに解析が進んでいるものを中心に記述する。ポストゲノ

ムの時代を迎え、進展の著しいマウスゲノム機能解析に基づいた視点から紹介したい。

5.2.2 タンパク質リン酸化制御酵素の遺伝子的基盤

マウスゲノム上には 527 種類のタンパク質リン酸化酵素と 160 種類のタンパク質脱リン酸化酵素をコードすると考えられる遺伝子座位が存在している (Forrest et al., 2006)。リン酸化の基質の違いに基づいて、タンパク質リン酸化酵素は大きくセリン・トレオニンリン酸化酵素とチロシンリン酸化酵素に分けられる。一方、タンパク質脱リン酸化酵素はセリン・トレオニン脱リン酸化酵素、チロシン脱リン酸化酵素、セリン・トレオニン・チロシン脱リン酸化酵素 (dual specificity phosphatase) に分けられる。リン酸化酵素、脱リン酸化酵素ともにアミノ酸配列上、よく保存された酵素触媒部位をもち、体系的な分類に利用されている。数の多いリン酸化酵素についてはそれぞれのリン酸化酵素を全体的に理解しようとする kinome のような試みも進行している (<http://kinase.com>; Caenepeel et al., 2004)。このゲノム情報を基に整理されたリン酸化関連酵素 (Forrest et al., 2003; Forrest et al., 2006) とジャクソン研究所のマウス遺伝子情報データベースを基に分類されたリン酸化制御酵素のうち、とくに高次神経機能ないし神経発生に重要であろうと考えられるものの一部が表 5.1 と表 5.2 に示されている。ここに挙げられている遺伝子は変異マウスの症状が記載されているものに限られているが、非常に多くのリン酸化制御遺伝子の変異マウスで神経行動学的な異常が認められており、高次脳機能の成り立ちにタンパク質リン酸化反応が重要な役割を占めることを示唆している。まだ機能解析のなされていないリン酸化制御酵素遺伝子が存在することを考えれば、神経生物学にとっての重要性はさらに増してくるものと予想できる。

5.2.3 MAPK・ERK シグナリング

(a) ERK ファミリータンパク質リン酸化酵素

神経系で重要な役割を果たすタンパク質リン酸化シグナルカスケードは多くの場合、神経以外の組織でも重要な役割を果たす。分子レベルの脳機能研究で非常に多くの場面で登場する mitogen activated protein kinase (MAPK) カスケードの場合、EGF, PDGF, FGF などの成長因子の受容体型チロシンリン

表 5.1 神経機能に関わる主要なタンパク質リン酸化酵素リスト

遺伝子記号	遺伝子名	タイプ	変異マウスの症状 (その他)
Fyn	Fyn proto-oncogene	NTK	哺乳行動異常, 空間記憶障害, 海馬 LTP の低下, 驚愕反応の低下, 聴覚原性てんかん, 強直発作, 概日周期の異常, 嗅覚異常, 運動協調性の障害, 不安様行動の増加, 神経の組織構築異常, 神経細胞の形態異常, ミエリン形成不全, 母性行動の異常
Src	Rous sarcoma oncogene	NTK	母性行動の異常
Yes1	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes) oncogene homolog 1	NTK	呼吸異常
Csk	c-src tyrosine kinase	NTK	神経管奇形
Abl1	v-abl Abelson murine leukemia oncogene 1	NTK	神経管閉鎖遅延, 神経細胞の形態異常
Abl2	v-abl Abelson murine leukemia oncogene 2	NTK	運動協調障害, 驚愕反応の低下, 平衡覚異常, 攻撃性の低下, 神経管閉鎖遅延, 神経細胞の形態異常
Jak1	Janus kinase 1	NTK	哺乳行動異常
FAK (Ptk2)	PTK2 protein tyrosine kinase 2	NTK	神経組織の構築異常, 神経細胞の形態異常, グリア細胞の形態異常
Egfr	epidermal growth factor receptor	RTK	小頭症, 神経細胞の形態異常, 神経組織構築異常
Epha2	Eph receptor A2	RTK	神経管奇形
Epha4	Eph receptor A4	RTK	移動量の低下, 歩行失調, LTP の低下, 筋力低下, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常
Epha8	Eph receptor A8	RTK	軸索走行路の異常
Ephb2	Eph receptor B2	RTK	回旋行動, 移動量の増加, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常
Ephb3	Eph receptor B3	RTK	回旋行動, 神経細胞の形態異常
ErbB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	RTK	運動失調, 歩行失調, 姿勢異常, 神経細胞の形態異常, シナプス形成異常, ミエリン形成不全
ErbB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	RTK	自発運動の欠如, 接触刺激に対する無反応, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常, 神経細胞のアポトーシスの増加, ミエリン形成異常, 末梢神経グリア細胞の異常

遺伝子 記号	遺伝子名	タイプ	変異マウスの症状 (その他)
Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1	RTK	運動協調障害, 姿勢異常, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常, 内耳の組織構築異常, 1 神経管奇形
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2	RTK	神経組織の構築異常, アストログリアの異常, 内耳の組織構築異常
Fgfr3	fibroblast growth factor receptor 3	RTK	歩行失調, 脱水, 聴覚障害, 摂食・飲水行動の異常, 巨脳症, 内耳の組織構築異常
Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4	RTK	脱水
Igflr	insulin-like growth factor I receptor	RTK	ミエリン形成不全, オリゴデンドログリアの異常, 神経組織の構築異常
Insr	insulin receptor	RTK	過食症
Mertk	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	RTK	神経の組織構築異常
Met	met proto-oncogene	RTK	運動協調障害, 神経組織の構築異常
Musk	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase	RTK	無動, 接触刺激への無反応, 筋力低下, 筋肉の神経支配の異常
Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	RTK	振戦, けいれん, 移動量の異常, 神経組織の構築異常, 神経管奇形, ミエリン形成不全, オリゴデンドログリアの異常
Ret	ret proto-oncogene	RTK	移動量の低下, 神経細胞の形態異常, 自律神経系神経細胞の形態異常, 筋肉の神経支配の異常, 軸索走向路の異常, シナプス伝達の異常 (ヒトでは Hirschprung 病 (腸管神経叢の発生異常) に関わる)
Tyro3	TYRO3 protein tyrosine kinase 3	RTK	神経組織の構築異常
Axl	AXL receptor tyrosine kinase	RTK	神経細胞の形態異常
Csflr	colony stimulating factor 1 receptor	RTK	聴覚障害
Kit	kit oncogene	RTK	聴覚障害, 内耳の組織構築異常
Raf1	v-raf-leukemia viral oncogene 1	SK	神経組織の構築異常
Araf	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	SK	振戦, 筋緊張度低下, 姿勢異常, アテトーゼ様異常歩行, 不安様行動の異常, 神経細胞の形態異常

遺伝子 記号	遺伝子名	タイプ	変異マウスの症状 (その他)
Braf	Braf transforming gene	SK	移動量の増加, 空間記憶障害, 海馬 LTP の低下, 連合学習の障害, 神経細胞の形態異常, 組織構築異常
Erk1 (Mapk3)	mitogen activated protein kinase 3	SK	移動量増大, 記憶障害
Erk2 (Mapk1)	mitogen activated protein kinase 1	SK	空間記憶障害, 連合学習の障害
Jnk1 (Mapk8)	mitogen activated protein kinase 8	SK	神経板・神経管形成の障害
Jnk2 (Mapk9)	mitogen activated protein kinase 9	SK	海馬 LTP の低下, 神経板・神経管の形成障害, シナプス伝達障害
Jnk3 (Mapk10)	mitogen activated protein kinase 10	SK	運動協調障害, 神経細胞の形態異常, 海馬の神経細胞の変性
Rps6ka3 (RSK2)	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3	SK	運動協調障害, 学習記憶障害 (ヒトでは Coffin Lowry 症候群 (精神・運動発達遅滞, 骨格異常を特徴とする) に関わる)
Akt1 (PKB alpha)	thymoma viral proto-oncogene 1	SK	脳の形態異常
Akt2 (PKB beta)	thymoma viral proto-oncogene 2	SK	小頭症
PDK1 (Pdpk1)	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	SK	前脳形成不全, 胎生致死
Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta	SK	探索行動の低下, 強制水泳での異常
Cdk4	cyclin-dependent kinase 4	SK	移動量の増加, 多渴症, 運動協調障害, 移動量の異常
Cdk5	cyclin-dependent kinase 5	SK	移動量の低下, 吸引反射の消失, 接触刺激への無反応, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常
Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	SK	シナプス伝達障害
Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	SK	振戦, 運動失調, 移動量の低下, 運動協調障害, 神経細胞の形態異常, シナプス伝達障害
Cask	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	SK	小頭症, 神経細胞アポトーシスの増加, 神経伝達物質の放出調節異常

遺伝子記号	遺伝子名	タイプ	変異マウスの症状 (その他)
Prkaca	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha	SK	神経管奇形
Prkacb	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta	SK	連合学習の障害, 海馬 LTP の低下, 神経組織の構築異常
Prkcc	protein kinase C, gamma	SK	空間記憶の異常, 連合学習の異常, 海馬 LTP の低下, 痛覚閾値の異常, 味覚嗜好性の異常, 不安様行動の増加 (ヒトでは脊髄小脳変性症 (SCA14) に関わる)
Prkce	protein kinase C, epsilon	SK	移動量の増加, 飲水行動の異常, 立ち直り反射の異常, 痛覚閾値の異常, 不安様行動の減少
Prkg1	protein kinase, cGMP-dependent, type I	SK	陰茎勃起障害, LTP の異常
Acvr1	activin A receptor, type I	SK	哺乳行動異常
Acvr1b	activin A receptor, type IB	SK	前脳の形態異常
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	SK	哺乳行動の異常, 筋力低下
Tgfr1	transforming growth factor, beta receptor I	SK	神経管奇形
Tgfr2	transforming growth factor, beta receptor II	SK	神経管奇形
Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	SK	移動量低下, 運動協調性障害, 神経細胞の形態異常, 神経細胞のアポトーシスの低下 (ヒトでは毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia) に関わる)
Bcr	breakpoint cluster region homolog	SK	回旋行動, 移動量の増加, 運動協調性障害, 脳の形態異常, グリア細胞の異常
Chuk (IKK1)	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	SK	神経管奇形, 神経細胞のアポトーシス増加
Cit	citron	SK	振戦, 運動失調, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常
Dmpk	dystrophia myotonica-protein kinase	SK	進行性筋衰弱
Dyrk1a	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1a	SK	小頭症, 神経細胞の形態異常, 神経組織の構築異常
Eif2ak3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3	SK	移動量の低下, 姿勢異常

遺伝子記号	遺伝子名	タイプ	変異マウスの症状 (その他)
Eif2ak4	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	SK	空間記憶障害, 連合学習の障害, LTPの低下, 痛覚閾値の異常, 味覚嗜好の異常, 不安様行動の減弱
Grk5	G protein-coupled receptor kinase 5	SK	振戦, 移動量の異常, 温覚侵襲刺激に対する閾値の上昇
Ikbkb	inhibitor of kappaB kinase beta	SK	神経管奇形, アポトーシスの増加
Nek8	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 8	SK	母性行動の異常
Nlk	nemo like kinase	SK	運動失調
Plk4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	SK	神経管奇形
Ttn	titin	SK	歩行失調, 姿勢異常, 小頭症

TrkA (Ntrk1), TrkB (Ntrk2), TrkC (Ntrk3) 変異マウスの症状については4.2節参照
 RTK: 受容体型チロシンリン酸化酵素
 NTK: 非受容体型チロシンリン酸化酵素
 SK: セリン・トレオニンリン酸化酵素

表 5.2 神経機能に関わる主要なタンパク質脱リン酸化酵素リスト

遺伝子記号	遺伝子名	変異マウスの症状 (その他)
Dusp6	dual specificity phosphatase 6 (MKP3)	聴性脳幹反応の異常 (ERK1/2の脱リン酸化に関わる)
Epm2a	epilepsy, progressive myoclonic epilepsy, type 2 gene alpha (possessing DSPc)	握力低下, 平衡能異常, 驚愕反応の増強, 受動的回避反応の異常, 神経細胞の形態異常 (ヒトでは進行性ミオクローヌスてんかんの発症に関わる)
Mtmr2	myotubularin related protein 2 (possessing PTPc domain)	振戦, 異常歩行, ミエリン形成異常 (ヒトでは Charcot-Marie-Tooth 病の発症に関わる)
Ppm1f	protein phosphatase 1F (PP2C domain containing)	過活動性, 熱侵襲刺激に対する閾値の上昇
Ppm1g	protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	驚愕反応プレパルス阻害の異常
PP1 (Ppp1cc)	protein phosphatase 1, catalytic subunit gamma isoform	(グルタミン酸受容体, GABA受容体の脱リン酸化に関わる)
PP2A (Ppp2r4, Ppp2r1a)	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, B	(ドーパミン受容体のシグナリングに関わる)
Calcineurin (Ppp3ca)	a protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	脳の形態異常

遺伝子記号	遺伝子名	変異マウスの症状 (その他)
Calcineurin (Ppp3cb)	b protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform	移動量増大
PTEN (Pten)	phosphatase and tensin homolog	社会性行動異常, 空間記憶障害, 感覚刺激反応異常, 脳の肥大, 神経細胞の形態異常 (PIP3 の脱リン酸化活性をもつ)
STEP (Ptpn5)	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	(MAPK シグナリングを抑制する)
SHP-2 (Ptpn11)	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	神経管奇形, アストログリアの減少 (ヒトでは Noonan 症候群の発症に関わる)
PTP1B (Ptpn1)	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	運動能力の低下
Ptpn12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	神経管奇形
Ptpn13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	末梢神経再生異常
Ptpn2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	移動量低下, 姿勢異常
Ptpn9	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	振戦, 不全対麻痺, 脳の形態異常
PTPa (Ptpra)	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	空間記憶障害, 移動量低下, 不安減弱
PTPd (Ptprd)	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	摂食行動異常, 空間記憶障害
PTPe (Ptpre)	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	ミエリン形成不全
PTPg (Ptprg)	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	運動協調性障害, 恐怖記憶障害, 驚愕反応の低下
Ptprq	protein tyrosine phosphatase, receptor type, Q	聴覚障害, 蝸牛有毛細胞の変性脱落
PTPr (Ptpr)	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	運動協調性障害, 筋力低下 (MAPK シグナリングを抑制する)
PTPs (Ptprs)	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	脳のサイズ低下, 嗅覚異常, 神経突起伸展の異常
PTPz (Ptprz1)	protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1	ミエリン形成不全, 連合記憶障害

酸化酵素の介するシグナル伝達系について積み重ねられた解析の結果、明らかになったものである。神経組織の中でも多くの MAPK シグナル活性化因子が存在するが、その数は非常に多く、受容体型チロシンリン酸化酵素型受容体（神経成長因子受容体 Trk など）の他にも、G タンパク質共役型受容体（グルタミン酸受容体、GABA 受容体、ドーパミン受容体など）、イオンチャネル（カリウムチャネル、カルシウムチャネルなど）などがよく知られている (Colucci-D'Amato et al., 2003)。

大まかにいえば、細胞外情報は低分子量 GTP 結合タンパク質 (Ras) を介して、3 群のタンパク質リン酸化酵素 Raf, MEK, ERK に順次伝達される (図 5.8; Gompertz et al., 2002)。古典的な受容体型チロシンリン酸化酵素による MAPK シグナリングの活性化では、受容体のリン酸化されたチロシンに SH2 ドメイン (リン酸化チロシン結合ドメイン) をもつ Shc や Grb2 のようなアダプタータンパク質が結合する。これらのアダプタータンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子 Sos と結合して複合体を形成している。Grb2/Sos 複合体は細胞膜の近くに移行して、Ras 上での GDP-GTP 交換反応を促進させる。GTP の結合した Ras (活性化型 Ras) は細胞膜に Raf-1 または B-Raf を引きつけ、活性化する。Raf は MEK (MAPK-ERK-kinase, MAPKK と呼ばれる) をリン酸化する。MEK はセリン・トレオニン残基とチロシン残基を両方ともリン酸化することができるデュアルリン酸化酵素で、その標的基質は ERK (extracellular signal regulated kinase, MAPK と呼ばれる) である。

ERK が見いだされて以来、その他にも多数の MAPK ファミリーに属するタンパク質リン酸化酵素が同定され、解析されてきた。p38, JNK, ERK5 などがこれにあたる。ERK ファミリー (ERK1-8) のリン酸化酵素は活性化 (ループ) 部位にトレオニン-グルタミン酸-チロシンの構造をもつ。このモチーフの中のトレオニンとチロシン、両者がリン酸化されることが ERK が活性化されるために必要である。この両残基のリン酸化は特異抗体によって容易に検出することができ、多くの研究者が ERK の活性化の指標として用いている。細胞の増殖分化制御・神経組織の可塑性には、ERK ファミリーの中でも ERK1/2 がとくに重要と考えられている。ERK1/2 は多くの標的タンパク質の中にある (Ser/Thr)-Pro の構造をリン酸化する。ERK1/2 以外にも、ERK5 が脳に強く発現しており、大脳皮質前駆細胞の分化に関わることが示されているが (Liu

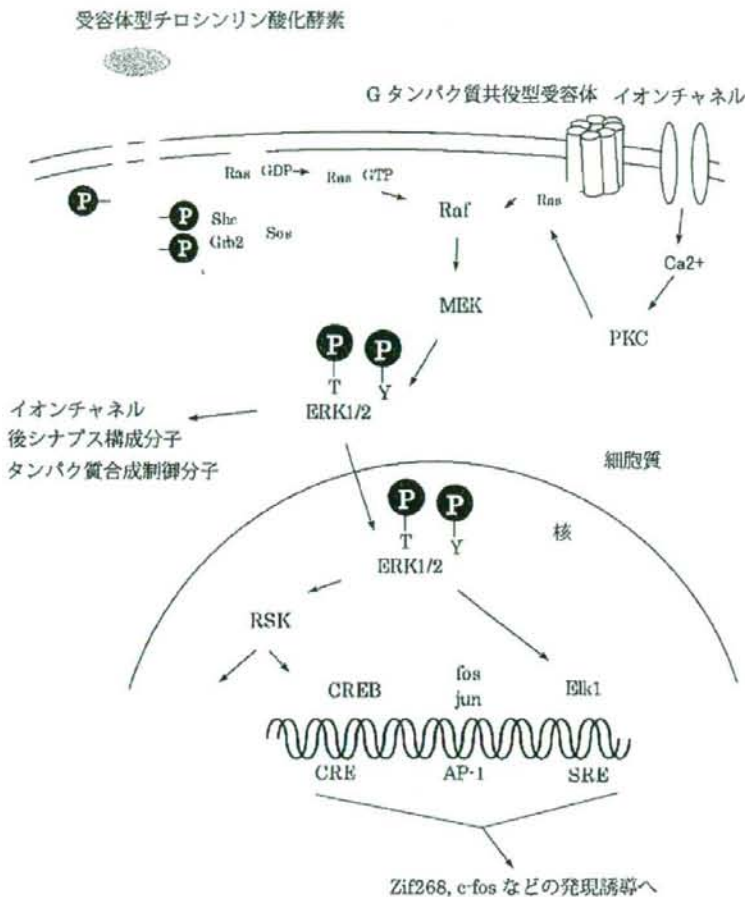


図 5.8 MAPK (ERK) シグナリング経路

et al., 2006), ERK3-8 の成熟個体脳における役割はいまだ解明されていない。MAPK カスケードによるシグナル伝達は使われる MAPK の種類によって、ERK 経路, JNK 経路, p38 経路に分けることができる。大きく ERK 経路の役割が細胞の分裂促進と分化調節であるのに対して, JNK 経路, p38 経路はストレス応答, 炎症性サイトカインに対する細胞応答に関与するものと考えられてきた。しかし, 最近の報告では神経組織中における MAPK ファミリーの役割は必ずしもこれだけに限らない例もある。

ERK の 2 ヲ所の残基がリン酸化されると核内への移行を促進するタンパク質と結合できるようになり, 核内に移行する (図 5.8)。核内に入った ERK はさまざまな形で遺伝子発現の調節に関わるが, 神経組織の中で注目される核内の下流標的は

ets ファミリーの転写因子 Elk1, 核内のリン酸化酵素 RSK (ribosomal protein S6 kinase) 1/2, MSK (mitogen- and stress-activated kinases) 1/2 などである (Roux & Blenis, 2004). リン酸化された Elk1 は SRE (serum responsive element) と呼ばれる DNA 標的配列に結合し, Zif268 や c-fos のような初期応答遺伝子の発現を上昇させる. 一方, MSK1 は線条体で cAMP 結合タンパク質 CREB とヒストン H3 をリン酸化し, 多くの遺伝子の発現状態に影響を及ぼすことが知られている. この他にも ERK は核外でリン酸化を行うことも知られており, タンパク質合成 (翻訳) 制御や, 神経活動に重要なタンパク質の機能制御も行っている.

これまでに ERK1 または ERK2 の単独ノックアウトマウスが作成されており, さまざまな解析に用いられている (Sweatt, 2001; Giovannini, 2006). ERK1 ノックアウトマウスは生存できるが (Pages et al., 1999), ERK2 ノックアウトマウスは胎生 6.5 日で致死である (Saba-El-Leil et al., 2003). ERK1 欠損マウスでは移動量が増加している以外には, 行動実験で記憶, 学習に関するはっきりとした異常は観察されなかった (Selcher et al., 2001). 一方, ERK2 変異マウスについては発現が 20-40%ほど低下するノックダウンマウスの行動解析が行われている (Satoh et al., 2007).

(b) MAPK カスケードの記憶形成における役割

現在までにモデル動物を用いた行動実験で ERK の記憶形成における役割が明らかになっている (Giovannini, 2006). 恐怖条件付け学習では学習の条件付け刺激 (信号音) と非条件刺激 (侵襲刺激 (電気ショック)) の連関についての記憶が評価される. 恐怖条件付け学習の 1 時間後に海馬や扁桃体での ERK1/2 の活性化 (リン酸化レベルの増強) が起きることが観察されている. NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤 MK801 の投与により, ERK の活性化の阻害, 連合学習の阻害が起きることから, 恐怖条件付け過程では海馬で NMDA 受容体が MAPK カスケードの上流で活性化にはたらくものと考えられている. さらに MEK 阻害剤, ERK 阻害剤を連合学習直前直後に全身投与ないし扁桃体に局所投与すると, 記憶学習に阻害が起きることも示され (Atkins et al., 1998), MAPK カスケードが恐怖記憶の成り立ちに必要なことの裏付けとなった. 一方, 遺伝学的手法による解析も進められ, MEK1 のドミナントネガティブ阻害体を発現するトランスジェニックマウスでは, ERK1/2 の海馬における活性が

低下すると同時に、恐怖条件付け学習が阻害されること (Shalin et al., 2004), ERK2 ノックダウンマウスでも恐怖条件付け学習の成績が低下すること (Satoh et al., 2007) が報告された。恐怖条件付け学習と同様に侵襲刺激を使った連合学習である味覚条件付け学習でも、この学習課題に重要な島 (insula) 皮質において ERK カスケードの活性化, ELK1 の活性化などの一連の過程が起き、学習の前に MEK 阻害剤を投与すると、長期記憶の形成が阻害されることが知られている (Berman et al., 1998)。

Morris 水迷路で代表される空間記憶の成立にも ERK1/2 が重要である。Morris 水迷路では動物は水面下に置かれた逃げ場となる台に、周囲の目印を手がかりにしながら、白濁した水の中を泳いでたどり着くことを学習する。Morris 迷路のトレーニング後に海馬の背側 (CA1, CA2) 領域の錐体細胞の ERK1/2 リン酸化が増強することが明らかになっている。ERK2 ノックダウンマウスは Morris 迷路の成績も低下している (Satoh et al., 2007)。MEK 阻害剤をトレーニングの前後に投与する実験などから、ERK の活性化は記憶の想起などには関係せず、記憶の形成に重要であると考えられている (Selcher et al., 1999)。しかし、これらの実験では記憶成立への関与が阻害剤の投与のタイミングだけで論じられており、研究者によって見解の一致しない部分もある。

以上のように MAPK シグナリングは、海馬、嗅内野、島など、さまざまな領域で長期記憶の成立に関係することが明らかになりつつあるが、学習課題の種類による ERK の役割も興味深い。海馬と扁桃体における ERK2 の活性化を比較した研究では、海馬の CA1 錐体細胞では ERK2 の活性化が一般的な空間記憶学習でみられるのに対して、扁桃体の ERK2 活性化は、恐怖条件付け学習のようなストレスのかかる状況のときのみ観察されるという報告がある。MAPK シグナリングがさまざまな神経細胞への刺激で活性化されることを考えると、ERK 活性化の場所、タイミングが、それぞれの記憶、学習過程における役割を考えるうえでは重要になるだろう。

(c) シナプス伝達の長期増強の成立における ERK の役割

シナプス伝達の長期増強 (long term potentiation: LTP) は記憶の細胞レベルでの基盤の1つと考えられている (詳細は 7.1 節参照)。LTP は使用頻度に応じたシナプス伝達効率の変化であり、海馬においてよく研究されてきたが、最近になり、大脳皮質や扁桃体などそれ以外の中枢神経系でも同様な現象が確認

されている。

LTPの成立にも、MAPKカスケードを介して活性化されるERKが重要な役割をもっている。LTPの引き金となる高頻度刺激により、脱分極、 Ca^{2+} 流入、Gタンパク質活性化が起き、細胞内のcAMPおよび Ca^{2+} 濃度が同時に上昇することにより、効率的かつ持続的なERKの活性化が起きる。ERKファミリーの中ではERK2が海馬LTPの成立に重要な役割を担っていると考えられている。なぜなら、ERK1の欠失は海馬LTPに大きな影響を及ぼさないが、海馬のERK2はさまざまな刺激により、強い活性化を受けるからである(Adams & Sweatt, 2002)。

LTPの成立は早期と後期の2相に分けて考えることができる。早期(E-LTP)は高頻度刺激後2時間未満で終わり、タンパク質合成を必要としない。後期(L-LTP)はそれ以降のステップで転写、翻訳を必要とする。グルタミン酸、アセチルコリン、ノルアドレナリン作動性のシグナル伝達系やBDNFなどのような成長因子を介する伝達系が誘導、維持に関わることが知られている。阻害剤投与実験からERKの活性化は早期、後期どちらのLTPにも必要であることが明らかになっている(Giovannini, 2006)。

早期LTPについては後シナプス膜表面に表れているAMPA受容体の数が後シナプスへのカルシウム流入により、増加することが重要と考えられている(Derkach et al., 2007)。同時にカルシウム濃度上昇とERKにより、活性化された Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II(CaMKII)がAMPA受容体GluR1のSer831をリン酸化することで、チャネルのコンダクタンスを上げることも早期LTPの成立に関与する(Soderling & Derkach, 2000)。一方、後期のプロセスについては、ERKは既存のタンパク質の機能調節、遺伝子発現制御による新たなタンパク質の合成の両面から、重要な役割を果たすと考えられる。実際にLTP誘導刺激後、わずか数分で主に細胞質に存在していたERKのうちの一部が核内に移行して、そこで転写過程を調節し、遺伝子発現制御を行うことが示されている。下流標的としては転写因子Zif268が目される。Zif268に対するアンチセンスRNAの扁桃体への局所注射は長期記憶の成立に影響を及ぼす。Zif268の下流標的遺伝子にはCdk5の調節サブユニットp35が含まれ、Cdk5もLTPの成立に必要とされている。

ERKの核外の基質の中にはホスホリパーゼA₂、SynGAPなどの後シナプス

の情報伝達に関わる分子が含まれている。一方、ERK2, MEK2, MKP2 (ERK2の脱リン酸化に関わる酵素) は後シナプス肥厚の構成成分として認められている。また、電位依存性カリウムチャネル Kv4.2 も標的分子の1つとして知られている。これらのリン酸化標的は、ERKの神経活動依存的なスパインの構造変化や、グルタミン酸受容体のシナプスへの集積、樹状突起におけるタンパク質合成の促進に関与するものと推測されている (Sweatt, 2001)。

(d) 麻薬中毒と ERK

ERKは麻薬、嗜好薬物が作用すると考えられる脳の報酬に関係した領域で活性化されることが知られており、コカインなどの麻薬中毒を考えるうえでも重要な位置にある (Lu et al., 2006; Girault et al., 2007)。麻薬中毒の一部はドーパミンによって調節される可塑性の変化として捉えることができるが、実際に ERK2 はドーパミン D1 受容体やグルタミン酸受容体の下流にあって、神経活動依存的な転写因子の発現を促す。一方、ERK1 の変異はモルヒネやコカインの作用を増強することが知られている。ERK 阻害剤の投与は麻薬による行動異常、薬物への欲求を抑える。また、麻薬により短期記憶から長期記憶への移行の障害が起きることが知られているが、これは ERK 阻害剤の投与により解除される。行動実験でよく用いられる MEK 阻害剤は ERK1 も ERK2 も阻害するので、ERK2 が濫用薬剤の作用を考えるうえでは主要な役割を担っており、ERK1 はそれに部分的に拮抗する調節的な役割をもつことが推測されている。

麻薬による ERK の活性化は、とくに側坐核、分界条床核、扁桃核、前頭前皮質などで強く起こる。これらの領域における ERK の活性化は D1 ドーパミン受容体拮抗薬の投与により阻害される。コカインやモルヒネを投与するとマウスは場所嗜好性が増強するようになり、この行動傾向がしばしば薬物の報酬効果の指標として用いられるが、MEK 阻害剤の側坐核への局所投与がコカインやアンフェタミンによる場所嗜好性の誘導を阻害することが知られており、側坐核の ERK 活性化が麻薬の報酬効果に関係するものと考えられる。

ERK の下流ではたらく核内因子も麻薬の長期的な中枢作用に関与することが明らかになっている。CREB をリン酸化する酵素 MSK1 の変異マウスではコカインによって引き起こされる易刺激応答性が部分的に減少し、場所嗜好性は増強する。CREB が嫌悪効果に関与することとも関連して、これらは薬物濫

用による線条体の遺伝子発現変化に ERK が関わることと一致しているように見える。一方、Zif268 変異マウスではコカインによる場所嗜好性の増強が認められない。

以上のように麻薬の中樞神経系に及ぼす作用を考えるうえで ERK は重要な役割を果たしているように見える。線条体ではドーパミン系、グルタミン酸系どちらのシグナル経路によっても ERK が活性化されることから、両経路が同時に活性化したことにより、可塑的な変化が起きやすくなるのではないかという考えも提唱されている (Girault et al., 2007)。

(e) 神経系のアポトーシスにおける MAPK シグナルの役割, 神経変性疾患への関与

MAPK シグナル経路が細胞死に対して役割をもつことは多くの種類の細胞で知られており, p38 経路や JNK 経路といった ERK1/2 以外の MAPK の関与がよく知られている (Cheung & Slack, 2004)。しかし, 最近の解析によれば, ERK も神経細胞の生存のみに関わるのではなく, 神経変性疾患に関係することが明らかになってきた (Colucci-D'Amato et al., 2003)。パーキンソン病では ERK はドーパミン系神経細胞に対して毒性をもつ OHDA の投与によって活性化され, 毒性は MEK 阻害剤により抑えられる。活性化された ERK はパーキンソン病の脳でよく認められる Lewy 小体にも存在する。一方, ERK はグルタミン酸の興奮毒性が現れるときにも活性化され, MEK 阻害剤は脳虚血による組織障害に対しても, 防御的にはたらく。またアルツハイマー病やそのモデル動物でも ERK の活性化が起きていることを示すデータが得られている。具体的な細胞死への関与についても, 形質膜の障害を引き起こし, それが細胞死につながっているとの結果が得られている。このように, 神経変性疾患への対処の観点からも MAPK シグナルは重要であり, MAPK シグナルを対象とした創薬・開発は今後も行われるものと予測される。

(f) MAPK シグナルの神経組織における多様な役割

ここで起きてくる1つの疑問は, MAPK シグナルがどのように増殖, 分化, 細胞死といったさまざまな状態を引き起こすか, である。おそらく, 神経細胞サブタイプの違いや分化段階の違いなども影響するだろうが, ERK 活性化の持続時間との関係でこれらの違いを説明できるという考え方がある。PC12 を例にとれば, 1時間未満の短時間の活性化は増殖を引き起こし, 1.5 から3時間ま

での中程度の持続では分化を促進し、24 時間以上の長期的な活性化は細胞死を引き起こす (Colucci-D'Amato et al., 2003; Cheung & Slack, 2004). これらの活性化持続時間の差異により、それぞれ違うタイプの転写因子が活性化されると推測され、とくに細胞死の場合には Elk-1, Egr1, Jun などの関与が考えられている. 一方、活性化 ERK の細胞内局在の違いがこれら 3 種類の応答性の違いに関係するのではないかという説も提唱されている. ERK にははっきりとした核局在シグナルが存在せず、他のタンパク質との相互作用が細胞内局在だと考えられている. これらのうち、MKP-3 と MKP-1 は ERK の細胞内局在について、反対の作用を示す (Colucci-D'Amato et al., 2003). 両者は ERK 活性化の鍵となるリン酸化チロシン、リン酸化トレオニンに対するホスファターゼ活性を有しており、MKP-3 が細胞内局在を促進するのに対して、MKP-1 は核内局在を促進する. これらの MKP はホスファターゼ活性と同時に ERK に対する強い結合性を有しており、ERK タンパク質の足場としてはたらく可能性がある. また、ERK の活性化の度合いにより、MKP 遺伝子の転写状態は異なり、MKP タンパク質の存在量が ERK の細胞内局在に影響するというフィードバックループを形成している可能性が高い.

神経組織以外にも多様な役割をもつ MAPK シグナリングであるが、神経組織における役割でとくに注目されるのは、ERK が細胞内シグナルの統合を担っている点である. 神経細胞はさまざまな細胞外からの情報を得て、それを統合して、別の神経細胞に受け渡していく性質をもっている. ERK がさまざまなシグナリングカスケードの下流で制御を受け、高次脳機能にも必要とされるということは、神経細胞内での細胞外からの情報伝達、増幅、集積に関わるということを示しており、神経機能にとって本質的なタンパク質の 1 つであると考えてもよいだろう.

5.2.4 PI3K-Akt-Gsk3 カスケードと神経機能

ERK シグナリングに並ぶ頻出のシグナル伝達系として、PI3K-Akt (protein kinase B)-GSK3 (glycogen synthase kinase 3) 経路はよく知られている (図 5.9). Akt はセリントレオニンリン酸化酵素で PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) によって活性化される. PI3K はその調節サブユニットにリン酸化チロシンを認識する SH2 ドメインをもっており、受容体型チロシンリン酸化酵素、

非受容体型チロシンリン酸化酵素の両者によって、活性化される。活性化されたPI3Kはリン脂質のphosphatidyl inositol bisphosphateの3位をリン酸化することにより生体膜中にphosphatidyl inositol(3, 4, 5)trisphosphateを増加させ、これがAktが別のタンパク質リン酸化酵素(PDK1, PDK2)によってリン酸化されるための足場となり、結果としてAktのセリン、トレオニン各1残基がリン酸化される。これらのリン酸化がAktを活性化し、活性化されたAktはさまざまな標的タンパク質中に存在するRxRxx(S/T)(F/L)モチーフ中のセリントレオニンをリン酸化することができる。とくに重要な標的タンパク質にGSK-3があり、GSK-3 α とGSK-3 β のアミノ末端領域に存在するセリン残基(それぞれS21, S9)のAktによるリン酸化により、GSK-3を不活性化する。GSK-3は常に活性を保っており、さまざまな標的タンパク質をリン酸化しうるが、Aktやその他の酵素により活性が抑えられることが、シグナルとなる。とくに神経突起伸展の際にGSK3 β の過剰な活性化が起きると軸索の形成が妨げられ、GSK3 β 活性が低くなると複数の軸索が形成されることが示され、神経細胞の極性決定に重要であると考えられた(Jiang et al., 2005)。GSK3 β はこの軸索・樹状突起の決定に重要なCRMP2(collapsin response mediator protein-2)のThr-514をリン酸化することにより、CRMP2のチューブリン結合能を抑制すること、CRMP2による軸索形成を阻害することが報告された(Yoshimura et al., 2005)。これらはPI3K-Akt-GSK3 β -CRMP2経路が神経細胞の極性決定に関わることを示しており、注目されている。

一方、PI3Kは海馬CA1の後シナプスでNMDA受容体と複合体をつくっており、NMDA受容体への選択的な刺激によって活性化され、AMPA受容体の形質膜への組み込みを促進させることが提唱されている(Man et al., 2003)。既述のように海馬CA1でのLTPでは、グルタミン酸受容体の1つAMPA受容体がシナプスの形質膜に挿入されることが、早期LTPの成立に関わる分子機構の1つとして考えられている。これらのことから、PI3KがLTPの成立に重要であることが示唆される。また、PI3K-Akt経路の下流標的であるGSK3 β はLTPの成立に伴って不活性化され、この不活性化がNMDA受容体によって引き起こされる可能性のあるLTDを抑えるために必要であるという考え方も出てきている(Peineau et al., 2007)。

最近、PI3K-Aktシグナルの高次脳機能成立における役割を考えるうえで重

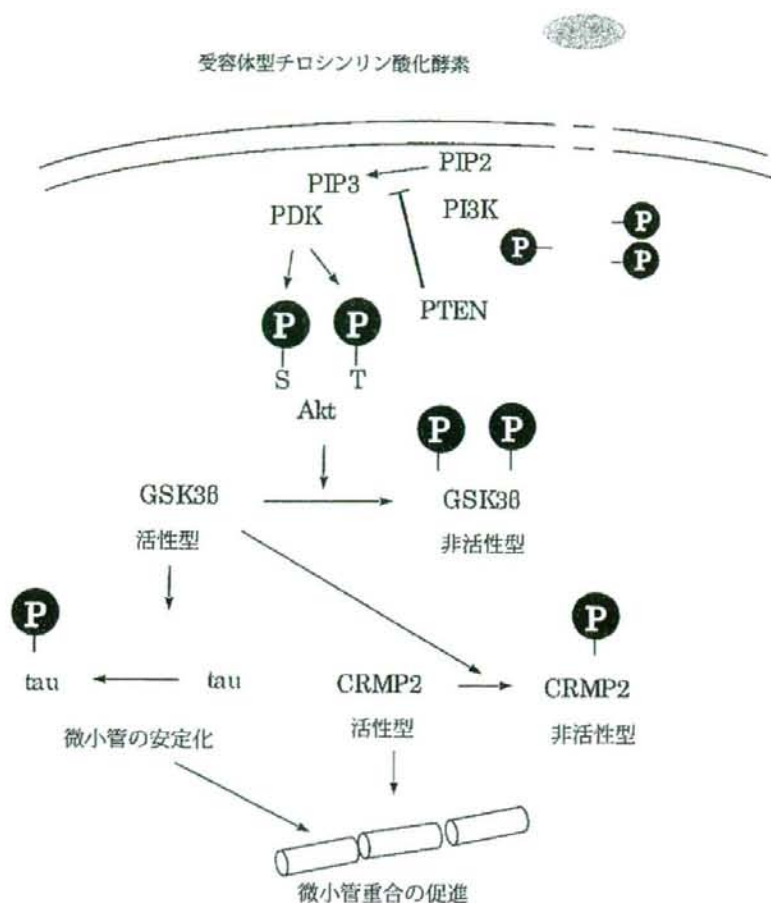


図 5.9 PI3K-Akt シグナリング経路

要な個体レベルでの解析も登場してきた。PI3K-Akt 経路は恐怖条件付け記憶の成立の際に扁桃体で活性化しており、PI3K の阻害剤 Wortmannin の扁桃体への局所投与により、恐怖記憶の形成が妨げられる (Lin et al., 2001). PI3K によってリン酸化される phosphatidyl inositol の 3 位の脱リン酸化酵素 PTEN(Phosphatase & TENsin) の変異マウスでは Akt の活性化、GSK3β の不活性化が起きる。この変異マウスは社会性行動、空間記憶、感覚刺激に対する反応に異常が観察されており、形態的にも脳の肥大、異所性の神経突起、シナプスの増加などさまざまな異常がみられる (Kwon et al., 2006). 記憶学習とは離れるが、GSK3β 単一アレル欠損 (ヘテロ接合体) マウスでは探索行動の低下、強制水泳の際の不動時間の短縮の低下が認められる (O'Brien et al., 2004).

実は GSK3 β は抗うつ薬として用いられる塩化リチウムの阻害標的酵素と考えられており、これらの行動傾向は野生型マウスに塩化リチウムを投与したときのものに似ている。このように PI3K-Akt-GSK3 β シグナルと躁うつ病の病態との関連も考えられ、興味深い。しかし、PI3K-Akt シグナル経路は神経組織に限らず、インスリン受容体の下流シグナルとしてはたらくなど、広い範囲の生命現象に関わっているので、変異マウスには神経系以外の症状も現れるので現時点で、個体レベルで神経系における役割をきれいに描き出した研究はそれほど多くない。今後の進展が注目される分野であろう。

5.2.5 タンパク質脱リン酸化酵素の神経機能における役割

以上ではタンパク質リン酸化酵素を中心に神経高次機能との関わりを紹介したが、リン酸化状態を決定するもう1つの重要な要素はタンパク質脱リン酸化酵素であり、神経高次機能との関連についての理解も進みつつある。マウスゲノム中ではキナーゼに比べて、その数は少なく(表 5.2)、1つの脱リン酸化酵素が多くの標的基質をもつ(基質特異性が低い)。しかし、各脱リン酸化酵素の遺伝子欠損マウスの症状が示すように、神経高次機能の成り立ちには不可欠の要素である。

(a) セリン・トレオニンホスファターゼ

哺乳類の主要なセリン・トレオニンホスファターゼのうち、神経組織では PP1, PP2A, カルシニューリン (PP2B) が多く発現しており、90%以上のリン酸化タンパク質を脱リン酸化することができる(Mansuy & Shenolikar, 2006)。これらのタンパク質は触媒サブユニットで向標的調節サブユニットとの結合により、特定の基質に対して作用することができる (Gompertz et al., 2002)。たとえば、カルシニューリンの調節サブユニットは Ca^{2+} 結合タンパク質である Calmodulin で、細胞内 Ca^{2+} 濃度によるリン酸化状態の調節に重要な役割をもつ。

このうち、海馬神経細胞のポストシナプスでは A-kinase でリン酸化された NMDA 受容体がカルシニューリン, PP1, PP2A で脱リン酸化される (Mansuy & Shenolikar, 2006; 5.1.5 項も参照)。たとえば NMDA 受容体 NR2A サブユニットはカルシニューリンによる脱リン酸化により、チャネル活性が低下する。一方、同じカルシニューリンは G タンパク質共役型グルタミン酸受容体に対し