

第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会,  
岡山理科大学, 3.30, 2009

一般演題

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.

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.

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.

齋藤文典, 荒木敏之: ZNRF1 によるユビキチン・プロテアソーム系を介した、グルタミン合成酵素の発現制御機構. 第 30 回神経科学大会・第 50 回日本神経化学会・第 17 回日本神経回路学会大会 合同大会 2007.9.10 横浜

徳永慎治, 荒木敏之: 自然発症軸索変性遅延マウス *wlds* 由来神経細胞が示すストレス刺激に対する保護効果. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会 2007.12.14 横浜

徳永慎治・荒木敏之

自然発症軸索変性遅延 *wlds* マウス神経細胞における保護効果

第 23 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 2008 年 5 月 17 日

勝又 澄, 西山 潤, 本橋淳子, 武田純三, 荒木敏之, 柚崎 通介  
ラーチャーでの神経変性に対するワーラー変性遺伝子の役割.

第 31 回日本神経科学大会, 東京国際フォーラム, 7.9, 2008

館野美成子, 臺 知子, 高橋良輔, 荒木敏之  
変異性 SOD1 の凝集化によって引き起こされるコリンアセチル基転移酵素の輸送障害. 第 31 回日本神経科学大会, 東京国際フォーラム, 7.9, 2008

八幡直樹, 湯浅茂樹, 荒木敏之  
NAD 合成酵素(NMNAT)過剰発現マウスにおける軸索変性遅延効果の検討.  
第 31 回日本神経科学大会, 東京国際フォーラム, 7.10, 2008

富樫和也, 荒木敏之  
細胞外イオンによるオートファジーの調節  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.10, 2008

徳永慎治, 荒木敏之  
自然発症軸索変性遅延 *wlds* マウス神経細胞における保護効果  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.11,

2008

齋藤文典, 荒木敏之

ZNRF1によるユビキチン・プロテアソーム系を示したグルタミン合成酵素の発現制御機構

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.12, 2008

徳永慎治, 荒木敏之

自然発症軸索変性遅延マウス wlds 由来大脳皮質神経細胞は低酸素-再酸素化およびミトコンドリア機能障害が引き起こす細胞死に抵抗性を示す。

第8回日本ミトコンドリア学会年会, 東京女子医科大学, 12.19, 2008

荒木敏之, 八幡直樹

神経細胞におけるNMNAT過剰発現による軸索保護とミトコンドリア機能

第8回日本ミトコンドリア学会年会, 東京女子医科大学, 12.19, 2008

荒木敏之, 齋藤文典

ZNRF1によるユビキチン・プロテアソーム系を介したグルタミン合成酵素の発現制御機構

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 岡山大学, 3.29, 2009

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 ALS/MND. 2006.11.30-12.2 Yokohama

YAHATA, N. & ARAKI, T.: Differential axonal protection against Wallerian degeneration in vivo is observed in mice overexpressing family members of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (Nmnat). 37th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.5, San Diego, USA.

YAHATA, N. & ARAKI, T.: Differential axonal protection against Wallerian degeneration in vivo is observed in mice overexpressing family members of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT). CDB Symposium 2008, 2008.3.24-26 Kobe,

Japan

Yahata N, Yuasa S, Araki T: Axonal protection against Wallerian degeneration in vivo is observed in mice overexpressing NMNAT3 located in mitochondria. Society for Neuroscience, Washington D.C., U.S.A. 11.18, 2008

G.. 知的財産権の出願・登録

なし

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
荒木 敏之	軸索変性メカニズムと神経変性	高橋 良輔	神経変性疾患のサイエンス	南山堂	東京	2007	113-121

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
Wakatsuki S, Yumoto N, Komatsu K, Araki T, Seharaba A.	Roles of meltrin beta/ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration.	Journal of Biological Chemistry	284	957-2966	2009
Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T.	Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3.	Human Molecular Genetics	18	942-945	2009

## 軸索変性過程

荒木敏之

- 1 軸索変性の多様性
- 2 *wld<sup>Δ</sup>* 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・病理的過程において観察される<sup>[1]</sup>。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が可能である。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。

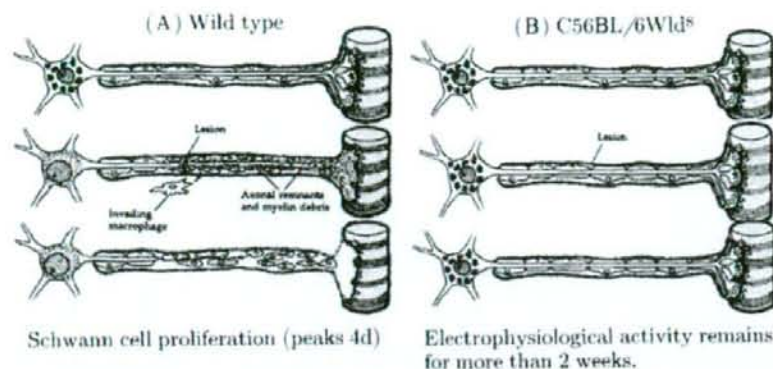


図 11.1 神経軸索の傷害後変性（ワラー変性）過程と *wld<sup>s</sup>* マウスにおける変性遅延軸索変性の生理的過程 (A) と *wld<sup>s</sup>* マウスにおけるその遅延の模式図。

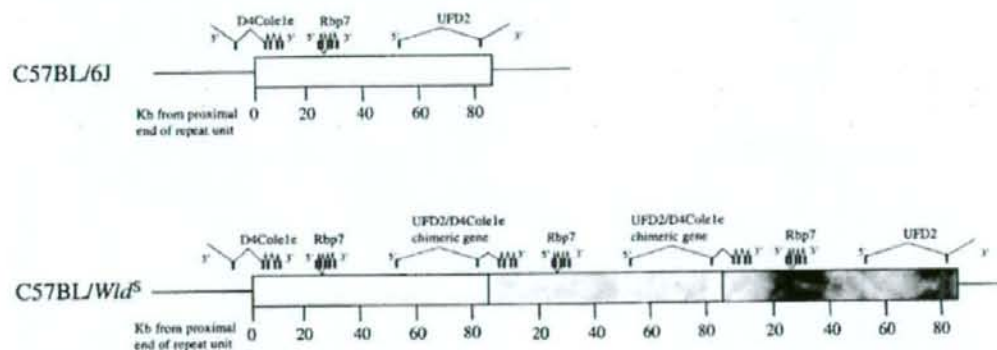


図 11.2 ポジショナルクローニングによって明らかになった *wld<sup>s</sup>* マウスの遺伝的変異約 85kb の領域の 3 重複によって変化する遺伝子のなかで、UFD2a の N 末端領域と NMNAT1 の融合したキメラ蛋白 (*Wld<sup>s</sup>* 変異蛋白) の発現が軸索変性遅延のフェノタイプ発現に関与していることが後に示された。

## 2 *wld<sup>s</sup>* 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<sup>s</sup>* の存在によって最もはっきりと示されることになった<sup>[2]</sup> (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<sup>s</sup>* 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<sup>s</sup>* 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<sup>a</sup> 蛋白) の発現による増進機能 (Gain-of-function) によって Wld<sup>a</sup> 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<sup>[3, 4]</sup>。

UFD2a は U box 領域を機能ドメインとする Ubiquitin ligase (E3)<sup>\*3</sup> 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<sup>a</sup>* 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<sup>[5]</sup>。

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<sup>a</sup> 変異蛋白を過剰発現したところ *wld<sup>a</sup>* 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup>* 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 蛋白 (Wld<sup>a</sup> (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<sup>a</sup>* 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<sup>[6]</sup>。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。

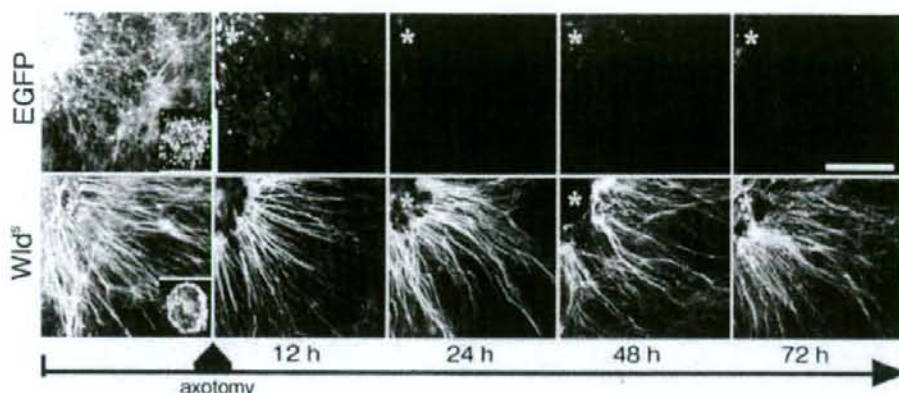


図 11.3 培養細胞をもちいたワーラー変性モデル (口絵参照)

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<sup>Δ</sup> 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<sup>Δ</sup> 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。

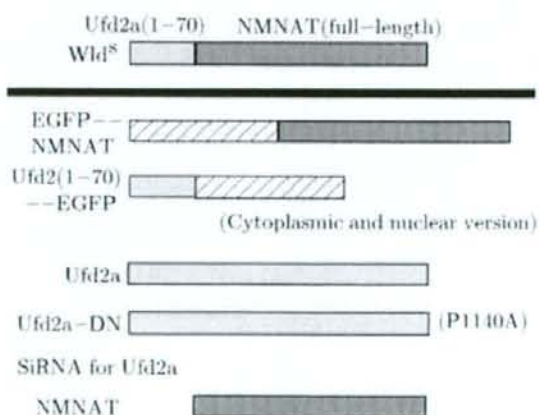


図 11.4 Wld<sup>Δ</sup> 変異蛋白の活性部位の検討に用いた過剰発現コンストラクト

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 に示したワー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。



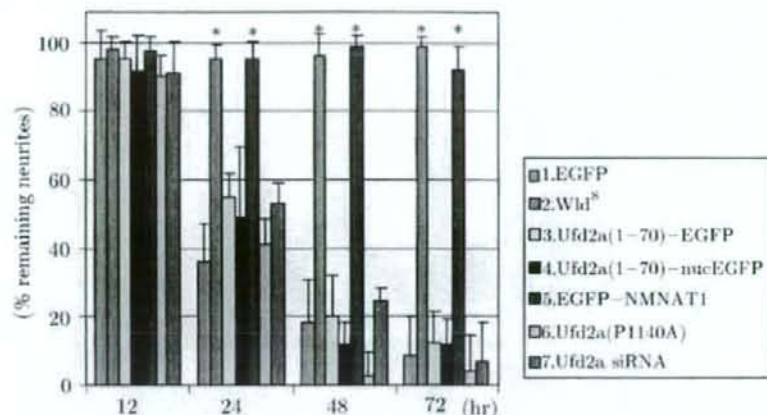


図 11.5 NMNAT1 の過剰発現が *wld<sup>S</sup>* 変異マウスにおける軸索変性遅延を再現する (口絵参照)  
 図 11.4 の各遺伝子の過剰発現の神経突起変性に対する影響を、変性誘導開始後の各時間において残存する突起数の実験開始時の突起数に対する比率を示している。*Wld<sup>S</sup>* 変異蛋白と NMNAT1 の過剰発現のみが軸索変性遅延効果を示した。

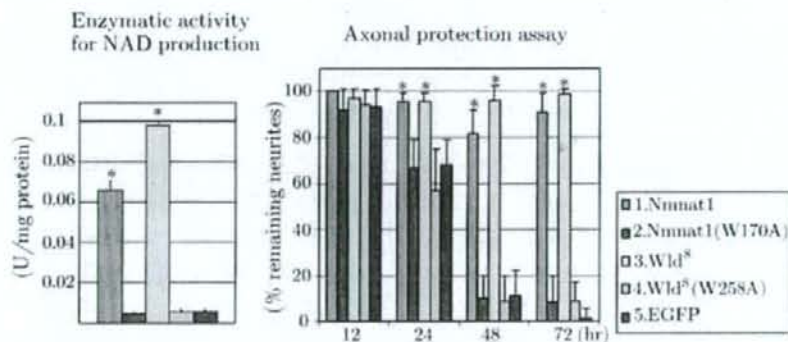


図 11.6 NAD 合成活性を持たない変異型 NMNAT1 は軸索変性遅延効果を示さない  
 点変異を導入した NMNAT1, *Wld<sup>S</sup>* 変異蛋白は共に NAD 合成活性を示さず、これらを過剰発現した神経細胞の突起は傷害後変性の遅延効果を示さない。

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<sup>S</sup>* 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<sup>S</sup>* 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<sup>S</sup>* 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<sup>S</sup>* 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

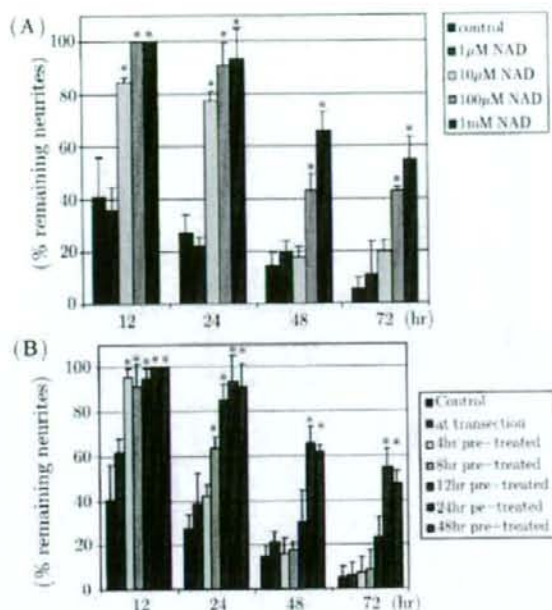


図 11.7 培養液中に添加した NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果  
図に示す各濃度の NAD を細胞培養液中に添加した場合の神経突起保護効果 (A)。1mM の NAD を、神経突起変性誘導開始の図に示す各時間前に投与した場合の変性遅延効果 (B)。

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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。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<sup>[9, 10]</sup>。核内において NAD を必要とするこれら二つの酵

素が *wld<sup>a</sup>* 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-aminobenzimidazole 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<sup>a</sup>* 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

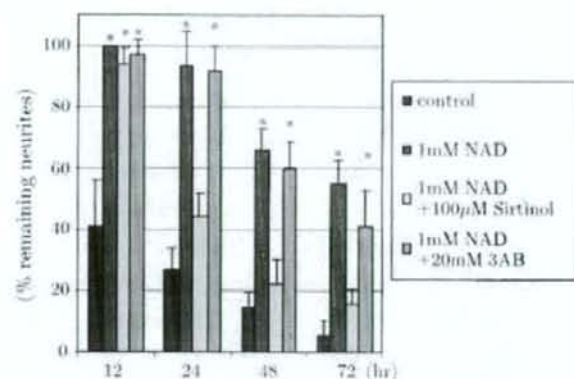


図 11.8 Sir2 の薬理的阻害剤は NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果を抑制する Sirtinol と 3-aminobenzimidazole による NAD の神経突起変性遅延効果への影響を示している。

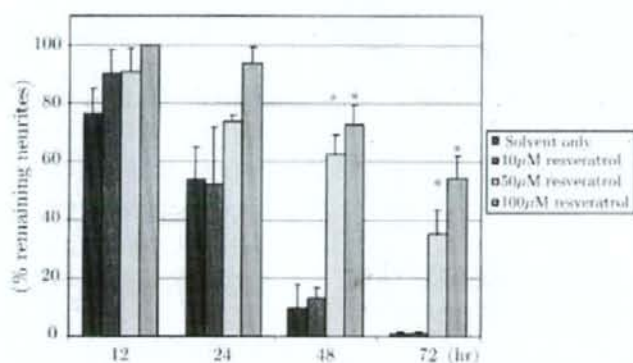


図 11.9 Resveratrol による神経突起の傷害後変性遅延効果

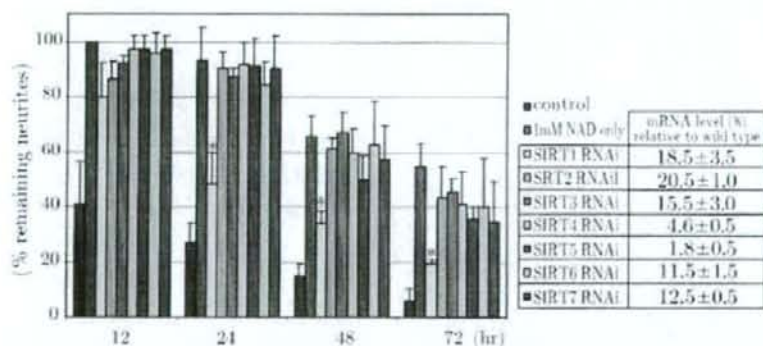


図 11.10 Sir2 各ファミリーメンバーの、NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果に対する寄与 SIRT1 の siRNA による抑制によって特異的に NAD の神経突起保護効果が抑制される。(口絵参照)

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、*uld<sup>a</sup>* 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<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* 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<sup>[9, 10]</sup>。例えば

(1) *wld<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* 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 *pnn* マウスを *wld<sup>Δ</sup>* マウスと掛け合わせることににより、*pnn* 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<sup>Δ</sup>* マウスと掛け合わせることににより、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<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* 変異蛋白の発現が安定的でないため、*wld<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* マウスにおける *Wld<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>*) 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 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> 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.

## 11

軸索変性メカニズムと  
神経変性

荒木 敏之

## 要旨

神経軸索変性は酵素反応を伴う能動的なプロセスであり、軸索変性を抑制することによって神経を保護し、神経疾患に対する治療的効果を得ることができると考えられる可能性はあるが、軸索変性の反応機構に関する知見は未だ限られている。

われわれは、自然発症変異マウス *wld<sup>o</sup>* におけるワーラー変性遅延が、細胞内での NAD 産生酵素の過剰発現と、それに伴う NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sir2 の活性化によって引き起こされていることを示した。このメカニズムを利用し、今後、神経疾患の進行抑制や治療などの臨床応用を行える可能性が高い。

## キーワード

- Sir2
- 軸索剪定 axonal pruning
- ワーラー変性 Wallerian degeneration

## 11-1 ● 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・病理的過程において観察される<sup>1)</sup>。最も典型的な軸索変性は神経軸索の傷害の後に傷害部位より末梢部分で観察される変性であり、ワーラー変性 Wallerian degeneration とよばれるものである。たと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タンパク質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、このような機械的切断や坐滅以外にもさまざまな病理的・生理的状況において観察される。たとえば、糖尿病、アルコールの慢性的過剰摂取などの代謝性疾患を原因とする末梢神経変性は、末梢神経の変性疾患の原因として最も多いが、このような疾患では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。“dying back” とよばれるこの状態は、軸索変性過程であると考えられる。また、疾患に由来するものだけでなく、いったん完全な連絡を形成していた神経線維連絡がなくなるという意味で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、軸索剪定 axonal

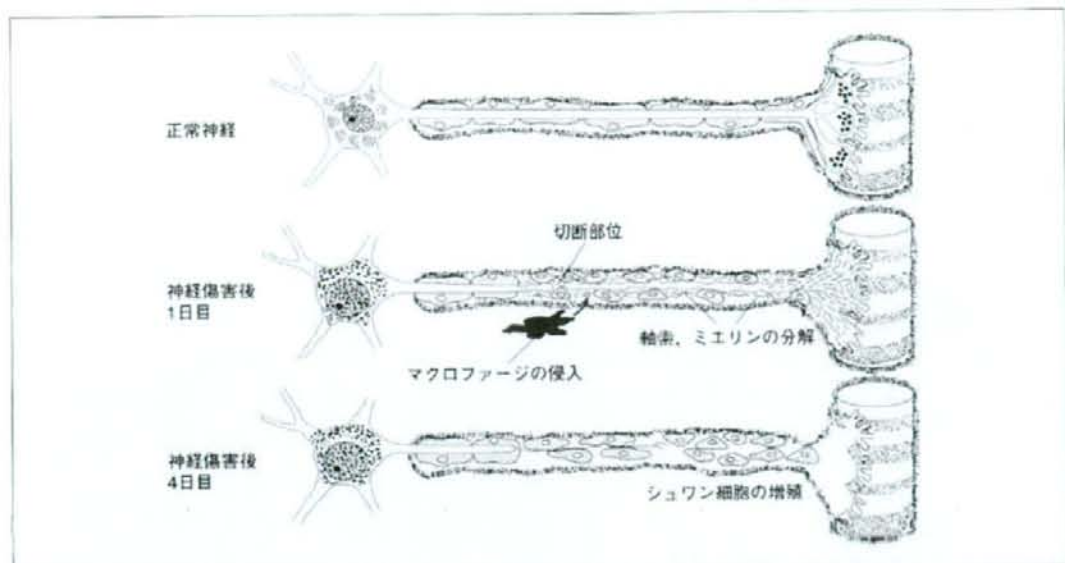


図11-1 神経軸索の傷害後変性（ワラー変性）過程の模式図

[Nicholls JG, et al.: "Function of the Nervous System", 3rd ed., Sinauer Associates, Inc.を一部改変]

pruning などとよばれているが、軸索剪定過程も軸索変性と見かけ上は類似している。最近のいくつかの論文はこのような軸索剪定過程と軸索変性過程の相違点と類似点を指摘しているが、依然として全貌は明らかでない。

神経軸索変性過程に関する研究は、このような見かけ上類似したメカニズムの分子レベルでの詳細を明らかにすると同時に、疾患治療につながる可能性も持っている。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。

## キーワード解説

- **Sir2**: タンパク質脱アセチル化酵素には NAD 依存性と非依存性のものがあり、Sir2は NAD を必要とするグループの一員である。哺乳類における七つのファミリーメンバー (SIRT1~SIRT7) の機能解析が現在報告されつつある。
- **軸索剪定 axonal pruning**: 哺乳類において、たとえば個々の筋線維は発達過程でいったん複数の神経細胞由来の軸索に支配されるが、成熟に伴い単一の軸索による支配となり、残りの軸索はなくなる。このような過程は軸索剪定とよばれる。
- **ワラー変性 Wallerian degeneration**: 神経軸索の傷害後変性。末梢神経では、シュワン細胞の突起が折り重なるように見えるビュングナー帯 bands of bungner の形成などが変性に特異的な形態学的特徴とされる。

11-2 • *wld<sup>s</sup>* 変異マウス

軸索変性が、抑止可能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<sup>s</sup>* の存在によって最もはっきりと示された<sup>2)</sup>。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。たと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日後にはニューロフィラメントの免疫原性が完全に消失するが、*wld<sup>s</sup>* 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シュワン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<sup>s</sup>* マウスの遺伝的変化は第4染色体における約85kbの領域の三重複 triplication によって引き起こされている (図11-2)。
- 2) この85kbの領域に存在する複数の遺伝子のなかで、UFD2aの一部とNMNAT1 (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1) の全長の融合した異常タンパク質 (Wld<sup>s</sup> タンパク質) の発現による機能獲得変異 gain-of-function によって、*wld<sup>s</sup>* マウスの表現型が引き起こされていることが明らかになった<sup>3), 4)</sup>。

UFD2aはU-box領域を機能ドメインとするユビキチンリガーゼE3である。またNMNAT1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 (p.116, 解説コラム参照)。われわれはこれらのいずれの領域が *wld<sup>s</sup>* 変異マウスの表現型形成に必要なものであるのかを明らかにするために、“培養細胞を用いたワラー変性モデル”を開発した<sup>5)</sup>。

このモデルは、後根神経節神経細胞の初代培養を行い、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タンパク質を過剰発現させることによって、神経突起変性

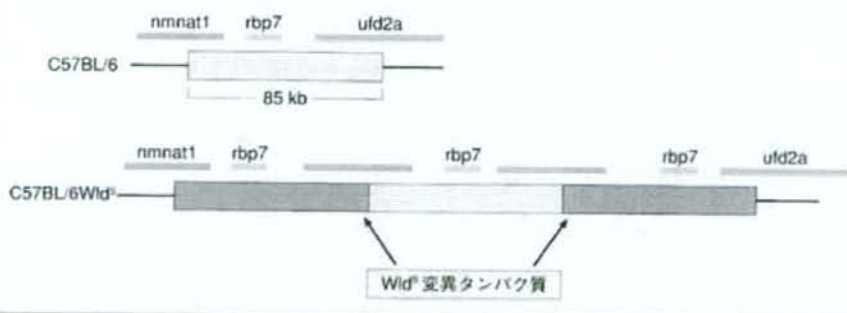


図11-2 ポジショナルクローニングによって明らかになった *wld<sup>s</sup>* マウスの遺伝的変異

約85kbの領域の三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の融合したキメラタンパク質 (Wld<sup>s</sup> 変異タンパク質) の発現が軸索変性遅延の表現型発現に関与していることがのちに示された。



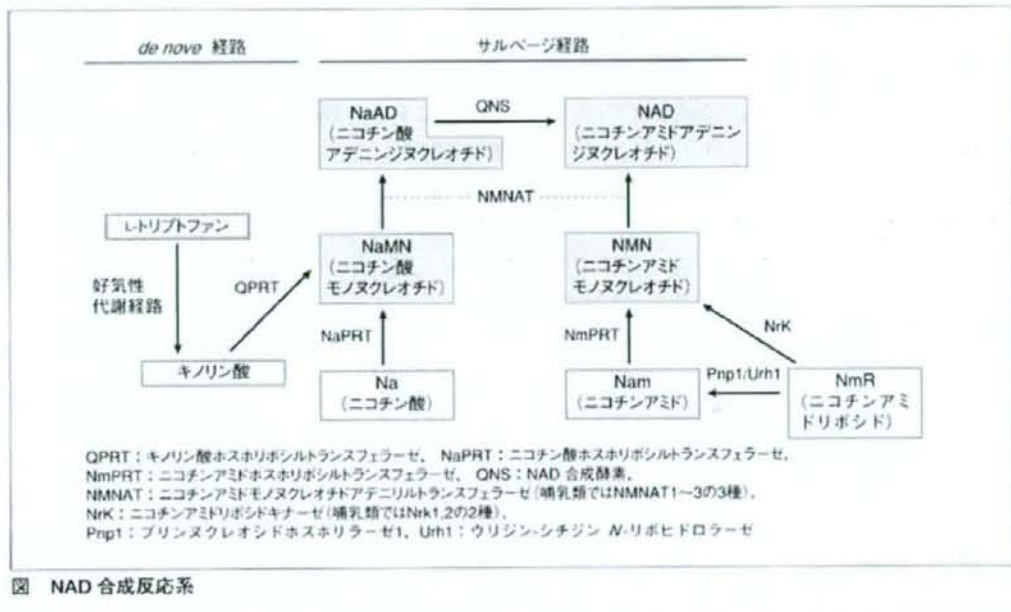
## NAD 合成反応系

NAD 合成反応は、細菌や酵母における反応についてよく研究されており、哺乳類における反応系はおもに酵母において同定された酵素のオルソログ ortholog を同定することによって構築された。それによると、ニコチンアミドまたはニコチン酸から合成される

“サルベージ経路 Salvage pathway”と、トリプトファンから合成される“新生経路 *de novo synthesis pathway*”があり、そのほかにニコチンアミドリボシドから合成される経路がある。

NAD はミトコンドリアの呼吸鎖反応の補酵素として必要である

ことからすべての細胞において不可欠であると考えられるが、それぞれの酵素タンパク質は臓器ごとに異なった発現分布を示し、図に示す可能な反応経路のうちどれが主として用いられているかは臓器ごとに異なる可能性がある。



過程における外来タンパク質の影響を評価することができる。本実験を用いて *Wld<sup>a</sup>* 変異タンパク質を過剰発現したところ *wld<sup>a</sup>* 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み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<sup>a</sup>* 変異タンパク質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 (巻頭写真5)。

*wld<sup>a</sup>* 変異は優性を示すことから、もし UFD2a 領域が表現型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 (ユビキチン鎖延長に直接関与する 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 領域が表現型形成に重要であるなら、NMNAT 酵素活性の機能獲得変異となっているものと考えられた。これらの可能性のうち、いずれが正しいのかを明らかにするため、培養細胞を用いたワラー変性モデル

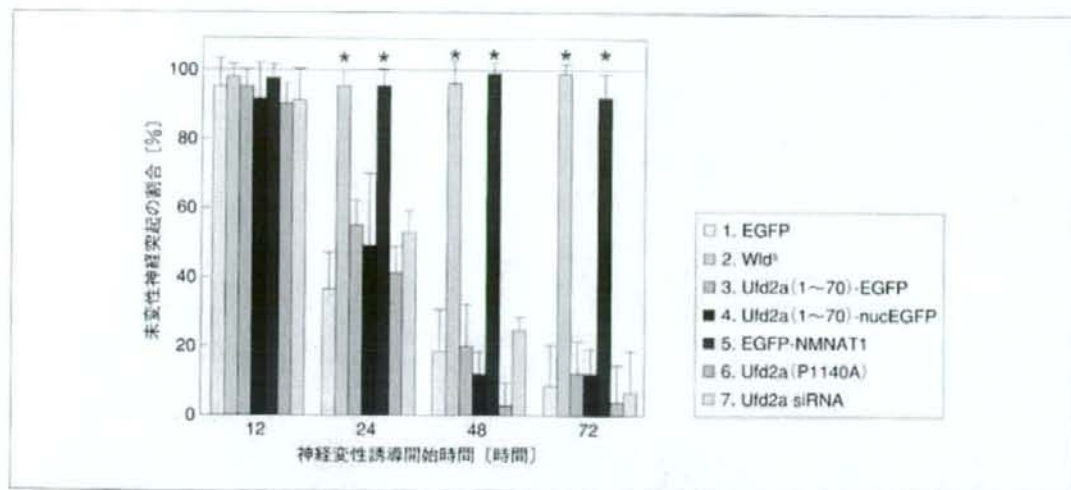


図11-3 NMNAT1の過剰発現が *wld<sup>Δ</sup>* 変異マウスにおける軸索変性遅延を再現する

1~7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によって示している。Wld<sup>Δ</sup>変異タンパク質とNMNAT1の過剰発現のみが軸索変性遅延効果を示した。なお、3はUfd2aのN末端側70アミノ酸残基(Wld<sup>Δ</sup>タンパク質に含まれる領域)にEGFPを結合したキメラタンパク質、4は3のコンストラクトのC末端側に核移行シグナルを結合したもの、5はNMNAT1のN末端側にEGFPを結合したもの、6はUfd2aのドミナントネガティブ dominant negative をそれぞれ過剰発現した実験を示している。

ル”を用いた解析を行った(図11-3)。その結果、Wld<sup>Δ</sup>変異タンパク質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。さらにわれわれは、培養液中にNADを添加することによっても神経突起変性遅延効果を得ることができることを示した。この効果の発現にはNAD添加後およそ24時間を必要とする(p.118, 図11-4)。

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<sup>Δ</sup>変異タンパク質もこのため同様に核内に存在する。NMNAT1酵素活性の機能獲得変異が損傷後の軸索に対し保護的な作用をもつと仮定し、Wld<sup>Δ</sup>変異タンパク質の存在部位に着目すると、その下流にある細胞内シグナル伝達としては何であるのかを考えるにあたり、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。われわれは、そのなかでNAD依存性タンパク質脱アセチル化酵素であるSir2ファミリー<sup>81)</sup>に注目した。Sir2は、酵母から哺乳類の一部に至るまでの非常に幅広い生物種において観察される。カロリー摂取制限による個体の寿命延長効果を担うタンパク質として近年非常に注目されている<sup>73, 83)</sup>。また、Sir2は、当初ヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase (HDAC) として報告されたが、最近転写調節因子など多くの核内タンパク質を基質とすることが報告され、これらのタンパク質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<sup>81)</sup>。

われわれは、Sir2の阻害剤であるSirtinolがNADによる軸索変性遅延を抑制する効果をもつこと、Sir2の活性化剤としての効果をも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から、*wld<sup>Δ</sup>*マウスにおいて認められ

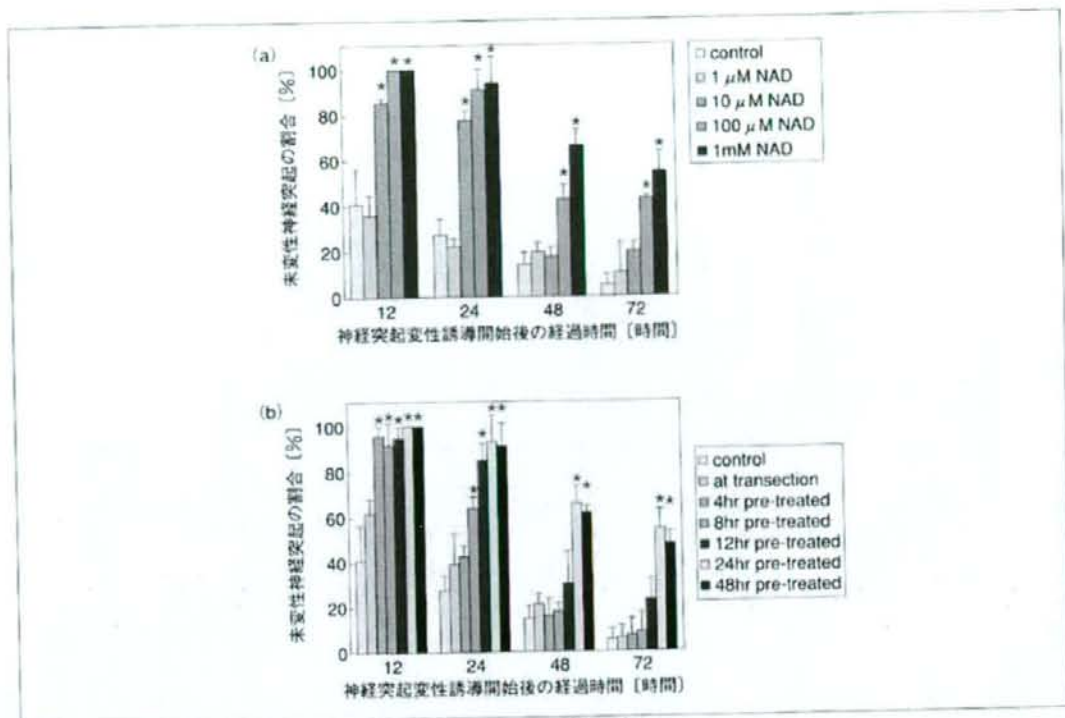


図11-4 培養液中に添加したNADによる神経突起の傷害後変性遅延効果。(a) 図に示す各濃度のNADを細胞培養液中に添加した場合の神経突起保護効果。(b) 1 mMのNADを、神経突起変性誘導開始の図に示す各時間前に投与した場合の変性遅延効果。

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た。哺乳類ではSir2ファミリーはSIRT1~SIRT7の七つのファミリーメンバーをもつことが知られている。これらの七つそれぞれに対するsiRNAを初代培養神経細胞に発現させてNADによる突起変性遅延効果に対する影響をみると、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11-5)。このことから、*wld<sup>Δ</sup>*マウスにおいて観察される軸索変性遅延の表現型は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反応して、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。われわれの研究は、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

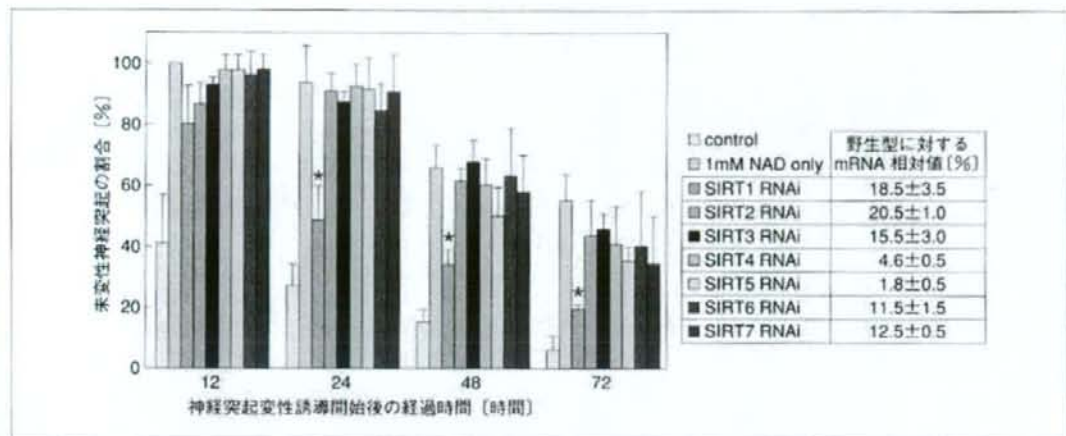


図11-5 Sir2各ファミリーメンバーの、NADによる神経突起の傷害後変性遅延効果に対する寄与。SIRT1のsiRNAによる抑制によって特異的にNADの神経突起保護効果が抑制される。

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。

### 11-3 • 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<sup>Δ</sup>* 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<sup>Δ</sup>* マウスの表現型出現のメカニズムに関する研究と並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<sup>10)</sup>。たとえば、

- 1) *wld<sup>Δ</sup>* マウスにおいて作製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-ヒドロキシドーパミン投与によるパーキンソン病モデルを *wld<sup>Δ</sup>* マウスで作製した場合、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 *pnn* マウスを *wld<sup>Δ</sup>* マウスとかけ合わせることで、*pnn* 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である 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<sup>Δ</sup>* マウスとかけ合わせることで、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