

原核生物でこのようなチオエステル体が観測されたのは本研究が初めてである。この結果から好熱菌にもユビキチン化に類似したタンパク質の翻訳後修飾系があることが示唆される(図2D下側)。これは原核生物では全く新しいタンパク質の機能制御機構と考えられるので、現在好熱菌内でTtuB化されているタンパク質があるのか解析中である。また前述のように真核生物ではUrm1がタンパク質翻訳後修飾因子として機能するとともに、 $s^2U$ の生合成因子としても機能する。それゆえ真核生物のユビキチンによるタンパク質翻訳後修飾システムは、原核生物にもみられるチオカルボキシレートが関与する硫黄化合物の生合成系から進化してきたと考えられる。

### おわりに

一見単純そうに思える硫黄修飾塩基の生合成は多数の因子が関与する複雑な仕組みによって達成されることが明らかになってきた。時として生体にとって毒性を示す活性化硫黄種を安定化させる硫黄キャリアタンパク質の関与がこの生合成系の特徴である。これにより反応性の高い活性化硫黄種を安全に目的の基質とのみ反応させることができる。これは硫黄化合物生合成の共通原理であると考えられる。今後は各経路による活性化硫黄種(ペアスルフィド・チオカルボキシレート)の使い分け・その反応性の違い、キャリアタンパク質間の硫黄転移の分子メカニズムを明らかにしていきたい。

### 謝辞

これまでご指導頂いた東京大学渡辺公綱名誉教授(現東京薬科大学)・東京大学鈴木勉教授、両研究室のメンバー、共同研究者に感謝致します。また文部科学省科研費補助金・内藤記念科学振興財団のサポートにも感謝致します。

- 1) Björk, G.R. (1995) in *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (Söll, D. & RajBhandary, U. eds.), pp. 165–205, ASM press, Washington DC.
- 2) Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura, H., Yamazumi, Z., Nishimura, S., & Miyazawa, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **82**, 4905–4909.
- 3) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S., & Watanabe, K. (2001) *EMBO J.*, **20**, 4794–4802.
- 4) Watanabe, K., Oshima, T., Saneyoshi, M., & Nishimura, S. (1974) *FEBS Lett.*, **43**, 59–63.
- 5) Kowalak, J.A., Dalluge, J.J., McCloskey, J.A., & Stetter, K.O. (1994) *Biochemistry*, **33**, 7869–7876.
- 6) Awai, T., Kimura, S., Tomikawa, C., Ochi, A., Ihsanawati, Bessho, Y., Yokoyama, S., Ohno, S., Nishikawa, K., Yoko-

- gawa, T., Suzuki, T., & Hori, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20467–20478.
- 7) Yokoyama, S., Watanabe, K., & Miyazawa, T. (1987) *Adv. Biophys.*, **23**, 115–147.
- 8) Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Watanabe, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14296–14306.
- 9) Kambampati, R. & Lauhon, C.T. (2003) *Biochemistry*, **42**, 1109–1117.
- 10) Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., & Suzuki, T. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 97–108.
- 11) Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T., & Nureki, O. (2006) *Nature*, **442**, 419–424.
- 12) Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., & Watanabe, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1613–1624.
- 13) Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T., & Hayashi, H. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 2841–2847.
- 14) Nakai, Y., Nakai, M., & Hayashi, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 27469–27476.
- 15) Leidel, S., Pedrioli, P.G., Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K., & Peter, M. (2009) *Nature*, **458**, 228–232.
- 16) Noma, A., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1335–1352.
- 17) Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 7462–7465.
- 18) Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., & Watanabe, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 2104–2113.
- 19) Shigi, N., Sakaguchi, Y., Asai, S., Suzuki, T., & Watanabe, K. (2008) *EMBO J.*, **27**, 3267–3278.
- 20) Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A.S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., Deuster, O., & Brune, D.C. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 1392–1404.
- 21) Pitterle, D.M. & Rajagopalan, K.V. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13499–13505.

鳴 直樹

(独立行政法人 産業技術総合研究所  
バイオメディシナル情報研究センター)

Functions and biosynthesis pathway of sulfur-modifications in tRNA

Naoki Shigi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-4-7 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan)

### 筋萎縮性側索硬化症におけるD-セリン

はじめに

生体はL体のアミノ酸で統一されていると考えられてき

たが、げっ歯類の中樞神経系にL体の1/3もの大量のD体セリン(D-セリン)の存在が1992年に報告された<sup>1)</sup>。以来、哺乳類におけるD-セリンの生体内での生理機能が徐々に解明されてきており、L-セリンとは全く異なる機能を有していることが明らかとなった。D-セリンは、セリンラセマーゼ(SRR)によってL-セリンから生体内で変換され、グルタミン酸のイオンチャネル型受容体の一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体のNR1サブユニットに生理的に結合する<sup>2)</sup>。NR1への基質の結合は、NMDA受容体の活性に不可欠であるのみならず、グルタミン酸とNMDA受容体の親和性を増加させたり<sup>3)</sup>、脱感作を減少させたり<sup>4)</sup>、NMDA受容体の代謝回転を促進したりするため<sup>5)</sup>、NMDA受容体の調節に必須の役割を占める。D-セリンはNR1への結合を介して、生理的に情動や記憶の形成に関与することが示唆されてきている一方で、NMDA受容体の機能変化が病態と関連する疾患にも関与していることが徐々に明らかとなってきた。NMDA受容体の機能低下が原因の一つとされている病態としては統合失調症、機能亢進を認める病態としてはアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患や脳梗塞において、D-セリン量の変化が病態と関連しているのではないかと指摘されている<sup>2)</sup>。

本稿では、特にグルタミン酸による興奮毒性の寄与が高いと考えられているALSに着目し、D-セリンとの関連について述べたい。

## 1. ALS とは

ALSは、多くは中年に発症する進行性の運動神経疾患の一つである。10万人に数人程度の割合で発症する比較的稀な疾患であるが、運動神経疾患の中では最も罹患率が高い。選択的な運動神経の変性および脱落に伴い、急速に筋萎縮および筋力低下が進行し、発症後は平均3から5年という短い期間で呼吸筋麻痺に至り死亡してしまう悲惨な疾患である。特徴的な病理所見としては、運動神経の変性・脱落、凝集体の形成、変性した運動神経周囲のグリア細胞の活性化である。治療としては、グルタミン酸による神経興奮毒性を抑えることを目的としたグルタミン酸放出阻害薬が現在唯一認可されており、臨床的に数ヶ月程度ではあるが有意に寿命を延長するものの、効果に乏しい。従って、現状は主に支持療法に頼っている状況であり、根治的治療法の開発が待たれている。

## 2. ALSの病態仮説

ALSは孤発性が90%であり、10%は家族性に発症することが知られている。現在までに発見されている原因遺伝子の中では、家族性ALS全体の約20%を占めるCu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)の変異が最も多く知られており、SOD1変異体は孤発性ALSに酷似した臨床症状をもたらす<sup>6)</sup>。その臨床症状の類似性と変異SOD1マウスモデルが典型的なALS様の表現型を有することから<sup>7)</sup>、変異SOD1による選択的運動神経細胞死機構は孤発性ALSに応用できるのではないかと考えられて研究が精力的に進められた。これまでに変異SOD1モデルマウスに様々な分子が有効であることが示されたが、非常に残念なことに臨床試験で芳しい結果が得られておらず、新たな治療薬は開発されていない。

一方、ALSの大半を占める孤発性ALSの原因はほとんど明らかとなっていない。孤発性と家族性ALSに一部共通したメカニズムがあると仮定すると、酸化ストレス、異常タンパク質の凝集、ミトコンドリア機能不全、軸索輸送障害、成長因子欠乏、炎症、神経興奮毒性などが病態仮説として知られている<sup>6)</sup>。このような多様な仮説の中で、グルタミン酸興奮毒性による運動神経変性は最も重要な仮説の一つであると考えられる。運動神経細胞はグルタミン酸興奮毒性に脆弱であり、孤発性ALS患者の脊髄液中に通常の約3倍の濃度のグルタミン酸が検出されること、さらに様々な治療薬シードが存在する中で唯一有効性が確認できるのがグルタミン酸放出阻害薬であることなどから、病態への関与が示唆されている<sup>8)</sup>。

## 3. ALSにおけるD-セリン

ALSでは、グリア細胞におけるグルタミン酸トランスポーターが脊髄前角で減少することが知られている<sup>6)</sup>。シナプス内のグルタミン酸濃度調節は、グルタミン酸トランスポーターによって主に行われているため、ALSではシナプス内グルタミン酸濃度が上昇して神経興奮毒性を引き起こすことが示唆されている。神経興奮毒性はイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して、細胞内への過剰なCa<sup>2+</sup>流入によって起こると考えられている。イオンチャネル型グルタミン酸受容体(NMDA受容体、 $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)受容体、カニン酸受容体)の中でも、Ca<sup>2+</sup>透過性の高いNMDA受容体は神経興奮毒性に大きく寄与すると考えられている。一方、Ca<sup>2+</sup>透過性の低いAMPA受容体は神経興奮毒

性との関連は弱いと考えられてきたが、運動神経細胞では  $\text{Ca}^{2+}$  流入を阻害する GluR2 サブユニットを有さない AMPA 受容体が大半を占めるとされており、これにより神経過剰興奮を惹起することが近年明らかとなってきた<sup>8)</sup>。このため ALS 研究では AMPA 受容体への関心が強い一方で、NMDA 受容体はほとんど注目されてこなかったが、Wang らによって NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンが ALS モデルマウスに対して症状の進行抑制効果があることが報告され<sup>9)</sup>、NMDA 受容体と病態との関連が示唆されてきている。NMDA 受容体の活性化には D-セリンの結合が不可欠であるため、D-セリンの動態を正確に把握することが ALS における神経興奮毒性を知る上で重要であると考えられる。

### 3.1. 脊髄内 D-セリン量とその分布

D-セリンは、マウスでは前脳に主に多く存在し、小脳以下の脳幹や脊髄では相対的に低い濃度でしか存在しない。このため、脊髄を含め、D-セリンの濃度が低い領域での NMDA 受容体の活性は D-セリンと同部位に結合するグリシンにより制御されていると考えられてきたが、NMDA 受容体の興奮性シナプス後電流はグリシン存在の有無では変化せず D-セリンに依存する、という興味深い報告が近年なされた<sup>10)</sup>。脊髄内の D-セリンが NMDA 受容体にどの

ような生理的役割を示しているか詳細は未解明であるが、脊髄内での D-セリン量が増加する D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) 遺伝子突然変異マウスでは、脊髄背側神経細胞 NMDA 受容体を介したシナプス伝達が増強する<sup>11)</sup>。従って、脊髄内の D-セリン量の増加はグリシン存在下でも NMDA 受容体への D-セリンの結合を促し、NMDA 受容体の活性化に繋がること示唆される。ALS モデルである G93A 変異 SOD1 トランスジェニック (G93A-SOD1 tg) マウスの脊髄内 D-セリン含量は、筋力低下の症状が出現する 4 ヶ月齢頃から野生型に比較して高値で、さらに症状の進行とともに増加する<sup>12)</sup>。また、この傾向は HPLC による定量的分析でも確認できる (未発表データ)。脊髄前角内で増加した D-セリンは活性化したグリア細胞で顕著であり<sup>12)</sup>、進行とともに増加する。ALS におけるグリア細胞の活性化は進行に大きく関連することから<sup>13)</sup>、D-セリンの増加は運動神経細胞上にある NMDA 受容体の活性に何らかの関与をしていることが示唆される。

### 3.2. D-セリン蓄積機構

G93A-SOD1 tg マウスにおける脊髄内 D-セリン蓄積メカニズムの一つとして考えられるのは、合成酵素である SRR の発現上昇である。同マウスでは、前述の通り病態の悪化とともにグリア細胞の活性化を認め、中でもミクロ

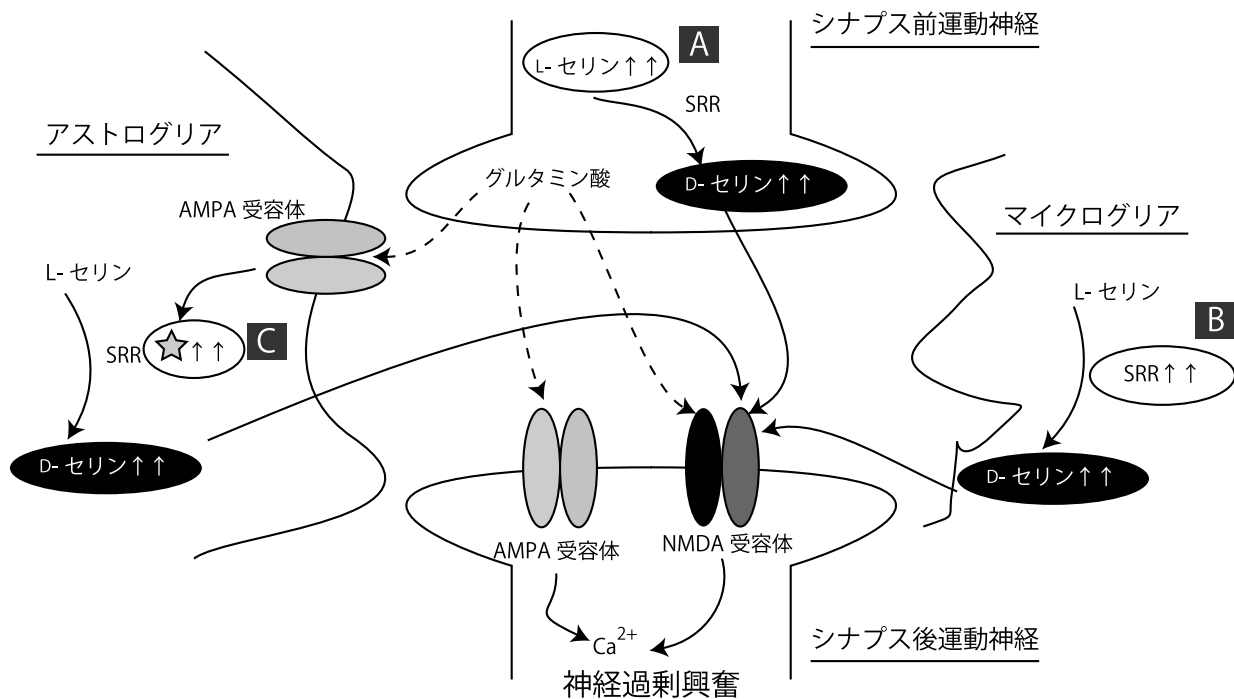


図1 D-セリン蓄積機構

A. SRR の基質の増加, B. 発現上昇, C. 活性上昇の3段階による D-セリン合成の亢進. SRR: セリンラセマーゼ.

グリアの活性化とともに経時的にSRRの発現が上昇する<sup>12)</sup>。in vitroで、ミクログリアは、炎症性刺激および変異SOD1の発現によってSRRの発現を上昇させるため<sup>12)</sup>、ALSの病態が進行するにつれて生じる炎症性刺激にミクログリアが反応し、これがD-セリン過剰産生へと繋がるのではないかと考えられる。

さらに、D-セリン蓄積には、合成基質であるL-セリン量の変化の関与も考えられる。ALSモデルマウスの一つであるG37R-SOD1 tgマウスでは、L-セリン合成酵素である3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼの発現が上昇していることが報告され、D-セリンの合成基質の濃度上昇が示唆される<sup>14)</sup>。

また、SRRの酵素活性は、AMPA受容体の活性化によって遊離するglutamate receptor interacting protein 1がSRRに結合することによって上昇することが知られている<sup>15)</sup>。シナプス内グルタミン酸濃度の高いALSでは、AMPA受容体の活性化を介して、SRRの酵素活性が上昇していることが予想され、D-セリン合成が盛んに行われている可能性がある。

このように、D-セリン蓄積は、基質の増加、酵素活性の上昇、酵素発現量の増加の3段階によって起こっているのではないかと考えられる(図1)。

### 3.3. 運動神経細胞死とD-セリン

運動神経細胞はグルタミン酸に対して脆弱であることが知られているが、脆弱性の詳細なメカニズムは未解明である。我々は、G93A-SOD1 tgマウスから初代培養脊髄細胞を作成し、運動神経細胞とグリア細胞の共培養下で、NMDAおよびD-セリンのALS運動神経細胞に対する毒性を検討した<sup>12)</sup>。ALS運動神経細胞は野生型運動神経細胞と比較して、NMDAに対して脆弱であり、さらにD-セリン量依存的にその脆弱性が増強する。D-セリンに対する脆弱性はNR1サブユニットのD-セリン結合部位に対する阻害剤で抑制できる。また、選択的なSRR阻害剤を用いた内在性SRRの活性阻害下では、NMDAによるALS運動神経細胞毒性は軽減する。これらのことから、少なくともin vitroの系では、グルタミン酸によるALSの運動神経細胞死において、D-セリンの結合を介したNMDA受容体の活性化が深く関与している可能性は高い。in vivoでのD-セリンとALS運動神経細胞死との関連は今後の課題ではあるが、D-セリンはグリシンよりもNR1サブユニットへの親和性が強いいため、徐々にこれを占拠することで運動神経興奮を増強させ病態悪化の一因となっているのではないかと考えている。

## おわりに

本稿では、神経興奮毒性と関連の深いALSの病態とD-セリンについて述べた。ALSにおける神経興奮毒性仮説はグルタミン酸に偏重した研究が続けられてきたが、神経興奮を調節するD-セリンやグリシン、GABAといった分子も同時に重要であると考えられる。ヒトALSにおけるD-セリンと病態の関連性に関しては、さらに慎重に検討を進める必要があるが、今後、中枢神経系のD-セリンの制御機構や病態生理に関するさらなる研究の発展によって、D-セリン量の調節を標的とした新たなALS治療法の開発に繋がるのではないかと期待している。

- 1) Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., & Takahashi, K. (1992) *FEBS Lett.*, **296**, 33-36.
- 2) Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., & Foltyn V.N. (2008) *FEBS J.*, **275**, 3514-3526.
- 3) Fadda, E., Danysz, W., Wroblewski, J.T., & Costa, E. (1988) *Neuropharmacology*, **27**, 1183-1185.
- 4) Lerma, J., Zukin, R.S., & Bennett, M.V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2354-2358.
- 5) Nong, Y., Huang, Y.Q., Ju, W., Kalia, L.V., Ahmadian, G., Wang, Y.T., & Salter, M.W. (2003) *Nature*, **422**, 302-307.
- 6) Buijn, L.I., Miller, T.M., & Cleveland, D.W. (2004) *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 723-749.
- 7) Gurney, M.E. (1994) *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1721-1722.
- 8) Van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2005) *Neurodegener. Dis.*, **2**, 147-159.
- 9) Wang, R. & Zhang, D. (2005) *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 2376-2380.
- 10) Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., & Oliet, S.H. (2006) *Cell*, **125**, 775-784.
- 11) Wake, K., Yamazaki, H., Hanzawa, S., Konno, R., Sakio, H., Niwa, A., & Hori, Y. (2001) *Neurosci. Lett.*, **297**, 25-28.
- 12) Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M., & Aiso, S. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4149-4159.
- 13) Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., & Cleveland, D.W. (2006) *Science*, **312**, 1389-1392.
- 14) Lobsiger, C.S., Boillee, S., & Cleveland, D.W. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7319-7326.
- 15) Kim, P.M., Aizawa, H., Kim, P.S., Huang, A.S., Wickramasinghe, S.R., Kashani, A.H., Barrow, R.K., Haganir, R.L., Ghosh, A., & Snyder, S.H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2105-2110.

笹部 潤平, 相磯 貞和  
(慶應義塾大学医学部解剖学教室)

D-Serine in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis  
Jumpei Sasabe and Sadakazu Aiso (Department of Anatomy, KEIO University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan)

## スプライシングにより生じるキネシン KIF1Bの多様性とその機能

### 1. はじめに

キネシンは微小管上を移動しさまざまな物質を輸送するモータータンパク質である。現在、キネシンは哺乳類において約45種類のファミリー遺伝子が同定されている。この多様なタンパク質群はキネシンスーパーファミリーとも呼ばれ、共通する構造として球状のモータードメインを持つ。このドメインが微小管との結合とATP加水分解によって移動する活性を持っている。モータードメイン以外の領域は比較的多様性に富んでおり、カーゴ（積荷）の選択性やモーター活性の制御などに関与している。

### 2. KIF1Bのスプライシングアイソフォーム

KIF1Bは哺乳類のキネシンスーパーファミリーの一つである。KIF1Bとアミノ酸配列上相同性の高いKIF1サブファミリーにはKIF1A, KIF1B, KIF1Cが属し、線虫ホモログはUNC104である。KIF1サブファミリーは、一般的に二量体である他のキネシンとは異なり、微小管に結合していない状態では単量体として存在すると考えられている<sup>1)</sup>。この興味深い特徴のため、微小管上を移動する際のメカニズムに関して、単量体あるいは二量体として機能するかを含めて多くの研究がなされている。

KIF1Bは1150アミノ酸、130 kDaのタンパク質として報告された(図1A, KIF1B $\alpha$ )<sup>2)</sup>。その後の研究により、1770アミノ酸、200 kDaのアイソフォームの存在が発見された(KIF1B $\beta$ )<sup>3,4)</sup>。両者はアミノ末端側660アミノ酸について全く同一であり、選択的スプライシングによって生じるアイソフォームである。初出の報告ではKIF1B $\alpha$ はミトコンドリアを、KIF1B $\beta$ はシナプス小胞を輸送すると報告され、カルボキシル末端側の違いが積荷の選択性を決定している。また、この大きな配列上の変化に加えて、モータードメインの中およびその近傍に、特定のエクソンの挿入による、6アミノ酸と40アミノ酸の2箇所の挿入配列が生じることがmRNAの解析を行った複数のグループに

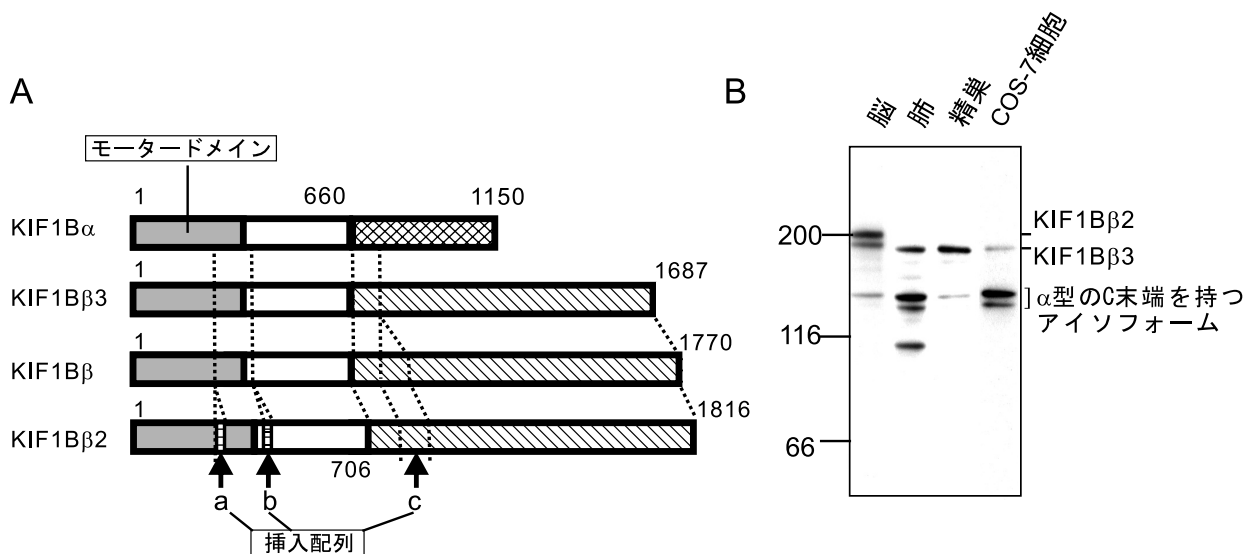


図1 KIF1Bのスプライシングアイソフォーム

(A) KIF1Bのスプライシングアイソフォームの模式図。

KIF1Bのアイソフォームは $\alpha$ 型と $\beta$ 型のカルボキシル末端を持つ2種類に大別され、さらに挿入配列の有無による違いがある。

(B) 臓器・細胞におけるKIF1Bの発現(汎KIF1B抗体による検出)。