

学位論文題名

The role of tubulin deacetylation in resistance to axonal degeneration

(軸索変性耐性におけるチューブリン脱アセチル化の役割)

学位論文内容の要旨

軸索は細胞体から切り離されると変性を引き起こす。ウォーラー変性と呼ばれるこの現象は、神経系が網状に連続したものではなく、ニューロンといわれる基本単位から構成されていることを示す有力な根拠となった。個々のニューロンは細胞体と神経突起である軸索および樹状突起から構成され、その生存維持は細胞体が担っている。これに対して、細胞体から切り離されても軸索の変性が著しく遅延する突然変異マウス(slow Wallerian degeneration; *Wld^s*)の存在が1989年に明らかとなった。この事実は、軸索において自律的な生存維持機構が存在する可能性を示しており、*Wld^s*マウスの遺伝的解析により明らかになることが期待された。しかしながら、未だにその分子機構は不明である。本研究では、*Wld^s*マウスの軸索変性遅延機構を明らかにすることを目的とし、*Wld^s*および野生型マウスの比較を行い、生化学的な特徴づけを行った。さらに培養神経細胞を用いて薬理的および遺伝子工学的に検証することで、軸索変性遅延機構に関与する分子の存在を示した。

軸索変性では、細胞骨格の異常すなわち微小管の崩壊が先行して起こる。そこで、微小管重合阻害剤であるコルヒチンにより引き起こされる軸索変性を評価した。用いた小脳顆粒細胞は中枢神経系の代表的な初代培養系であり、生化学的解析に適している。その結果、細胞体変性は両系統で差は認められなかったのに対して、軸索変性は野生型に比べ *Wld^s*マウス由来顆粒細胞で著しく遅延することが明らかとなった。この結果はこれまで末梢神経系で得られた知見と一致し、また *Wld^s*マウスにおける軸索変性遅延形質として微小管の安定化が関与する可能性を示唆する。

そこで第一章では α -チューブリンの翻訳後修飾の1つであるアセチル化について検討した。アセチル化は微小管重合安定化剤であるパクリタキセルや微小管結合タンパク質であるMAP2やtauの過剰発現により促進されることから、微小管安定性の指標とされる。アセチル化レベルは野生型に比べ *Wld^s*マウス由来顆粒細胞で著しく亢進していた。この亢進は基底レベルで認められることから、ニューロンの成熟分化に伴う一過性のものではないと考えられた。またこの傾向はチューブリンとその重合体である微小管の両方で認められた。次にアセチル化レベルと軸索変性遅延との関連を調べるため、ニコチンアミドの効果を検討した。ニコチンアミドはNAD依存性チューブリン脱アセチル化酵素であるSIRT2やpoly(ADP-ribose) polymerase(PARP)を阻害することが知られている。ニコチンアミドは野生型由来顆粒細胞のチューブリンアセチル化レベルを亢進させ、コルヒチンによる軸索変性を著しく遅延させた。この効果はPARP阻害剤では得られなかった。このことから、ニコチンアミドがSIRT2の活性を阻害した結果、チューブリンアセチル化レベルが亢進し軸索変性が遅延したと考えられた。さらにこの可能性を検証するため、*Wld^s*マウス由来顆粒細胞にSIRT2を過剰発現させたところ、微小管アセチル化レベルは低下し軸索変性遅延形質が消失した。また野生型マウス由来顆粒細胞にSIRT2 siRNAをレンチウイルスにより導入したところ、SIRT2レベルの低下とともに微小管アセチル化レベルの亢進が認められ、さらに軸索変性遅延形質が獲得された。以上の結果から、軸索変性遅延にSIRT2が関与すると結論づけられた。

第二章では、前章で見出した微小管アセチル化レベルの亢進が *in vivo* でも起きていることを検証した。この目的のため、小脳皮質の分子層に着目した。分子層は顆粒細胞の軸索である平行線維で構成されていることから、軸索特異的なアセチル化レベルの比較が可能である。その結果、アセチル化レベルは生後 21 日目の *Wld^Δ* マウスにおいて有意に亢進していた。一方、 α -チューブリンレベルはこの時期において有意に低下していた。これに対して SIRT2 レベルは分子層において生後発達が進むにつれ低下するが、*Wld^Δ* マウスにおいてその低下が早まる傾向が認められた。以上は、アセチル化レベルの亢進が、SIRT2 を含めたアセチル化に関与する酵素活性だけでなく、基質である α -チューブリンレベルにより調節を受けている可能性を示唆する。

さらに、本研究を進める過程で天然由来物質であるレスベラトロールが *Wld^Δ* マウス由来顆粒細胞の軸索変性遅延形質を消失させることを見出した。そこで第三章では、レスベラトロールの作用点を生化学的に解析し同定した。レスベラトロールは *Wld^Δ* マウス由来顆粒細胞の微小管アセチル化レベルを低下させた。経時変化の詳細解析から、レスベラトロールは亢進したアセチル化の基底レベルに作用している可能性が考えられた。実際にレスベラトロールは精製した正常な SIRT2 のチューブリン脱アセチル化活性を亢進させたが、酵素活性を欠失させた SIRT2 の活性は亢進させなかった。このことはレスベラトロールが SIRT2 に直接作用してアセチル化レベルを低下させている可能性を示唆する。さらに、レスベラトロールにより軸索変性遅延形質が消失した *Wld^Δ* マウス由来顆粒細胞に SIRT2 siRNA をレンチウイルスにより導入したところ、軸索変性遅延形質が再度認められるようになった。以上は、レスベラトロールが SIRT2 依存的なチューブリン脱アセチル化を促進し、*Wld^Δ* マウス由来顆粒細胞の軸索変性遅延形質を消失させている可能性を示唆する。

本研究から、*Wld^Δ* マウスの軸索変性遅延形質において SIRT2 が関与していることが明らかとなった。またこの形質は野生型マウスでも獲得可能であることも明らかとなった。このことは、*Wld^Δ* マウスの軸索変性遅延形質には仲介分子が必要不可欠であることを示している。実際、*Wld^Δ* マウスの原因遺伝子がコードするキメラタンパク質 (*Wld^Δ*) は軸索ではなく核に局在し、軸索における仲介分子の存在が示唆されていた。また *Wld^Δ* タンパク質は N 末端 70 残基の Ubiquitin fusion degradation protein 2 (*Ufd2a*) と完全長の nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1 (*Nmnat1*) から構成されている。特に *Nmnat* は NAD 生合成に重要な律速酵素であり、また NAD 添加により軸索変性が遅延することから、NAD 依存性経路の関与が示唆されている。SIRT2 は細胞質に局在すること、また NAD 依存性酵素でもあることから仲介分子の 1 つである可能性がある。軸索変性は、神経系の発生過程では最適な神経回路網の構築に必要不可欠である一方、神経変性疾患の発症原因であることから、その分子機構の解明は極めて重要である。本研究により、*Wld^Δ* マウスの軸索変性遅延機構の解明が進むだけでなく、軸索変性が関与する生命現象の解明も進むことが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 鈴 木 範 男

学 位 論 文 題 名

The role of tubulin deacetylation in resistance to axonal degeneration

(軸索変性耐性におけるチューブリン脱アセチル化の役割)

神経細胞は、その細胞体から軸索や樹状突起を伸展した極度に分極した構造をとり、細胞体がそれらの生存維持機構を担っていると考えられている。しかし、近年、細胞体から切り離される際に起こるウォーラー変性による軸索の変性のみが著しく遅延する突然変異マウス (slow Wallerian degeneration; WldS) が発見され、軸索において自律的な生存維持機構が存在することが示唆された。原因遺伝子の同定にもかかわらず、軸索の自律的な生存維持機構については、未だにその分子機構は不明である。本研究では、WldS マウスの軸索変性遅延機構を明らかにすることを目的とし、WldS および野生型マウスの α -チューブリンの翻訳後修飾を比較し、生化学的な特徴づけを行った。さらに培養神経細胞を用いた薬理学的および遺伝子工学的研究から軸索変性遅延機構に関与する分子の存在を示したものである。

申請者は、軸索変性においては細胞骨格の異常すなわち微小管の崩壊が先行して起こることに着目し、微小管重合阻害剤であるコルヒチンにより引き起こされる軸索変性を評価した。その結果、細胞体変性は野生型と WldS マウスでは差は認められなかったのに対して、軸索変性は野生型に比べ、WldS マウス由来顆粒細胞で著しく遅延することが明らかとなった。WldS マウスにおける軸索変性遅延形質として微小管の安定化が関与する可能性を考え、チューブリンの翻訳後修飾について詳細に検討した。

第一章では微小管安定性の指標とされる α -チューブリンのアセチル化について検討した。その結果、アセチル化レベルは野生型に比べ WldS マウス由来顆粒細胞で著しく亢進していた。この亢進は基底レベルまたチューブリンとその重合体である微小管の両者で認められた。次に、NAD 依存性チューブリン脱アセチル化酵素である SIRT2 (mammalian Sir2-related protein-2) の阻害剤であるニコチンアミドの効果を検討した。ニコチンアミドは野生型由来顆粒細胞のチューブリンアセチル化レベルを亢進させ、コルヒチンによる軸索変性を著しく遅延させた。さらに、SIRT2 の関与を調べるために、WldS マウス由来顆粒細胞に SIRT2 を過剰発現させたところ、微小管アセチル化レベルは低下し、軸索変性遅延形質が消失した。また野生型マウス由来顆粒細胞に SIRT2 siRNA をレンチウイルスにより導入したところ、SIRT2 レベルの

低下とともに微小管アセチル化レベルの亢進が認められ、軸索変性遅延形質が獲得された。以上の結果から、軸索変性遅延に SIRT2 が関与すると結論づけられた。

第二章では、前章で見出した微小管アセチル化レベルの亢進が *in vivo* でも起きていることを検証した。小脳皮質の分子層は顆粒細胞の軸索である平行線維で構成されていることから、軸索特異的なアセチル化レベルの比較が可能である。その結果、アセチル化レベルは生後 21 日目の *WldS* マウスにおいて有意に亢進していた。一方、 α -チューブリンレベルはこの時期において有意に低下していた。これに対して SIRT2 レベルは分子層において生後発達が進むにつれ低下するが、*WldS* マウスにおいてその低下が早まる傾向が認められた。以上は、アセチル化レベルの亢進が、SIRT2 を含めたアセチル化に関与する酵素活性だけでなく、基質である α -チューブリンレベルにより調節を受けている可能性を示唆する。

第三章では、レスベラトロールの作用点を生化学的に解析し同定した。レスベラトロールは *WldS* マウス由来顆粒細胞の微小管アセチル化レベルを低下させた。実際、レスベラトロールは精製した正常な SIRT2 のチューブリン脱アセチル化活性を亢進させたが、酵素活性を欠失させた SIRT2 の活性は亢進させなかった。このことはレスベラトロールが SIRT2 に直接作用してアセチル化レベルを低下させている可能性を示唆する。さらに、レスベラトロールにより軸索変性遅延形質が消失した *WldS* マウス由来顆粒細胞に SIRT2 siRNA をレンチウイルスにより導入したところ、軸索変性遅延形質が再度認められるようになった。以上は、レスベラトロールが SIRT2 依存的なチューブリン脱アセチル化を促進し、*WldS* マウス由来顆粒細胞の軸索変性遅延形質を消失させている可能性を示唆する。

本論文により示された結果は、以下の 3 点において特に有意義であると考えられる。

(1) NAD 依存性チューブリン脱アセチル化酵素である SIRT2 が *WldS* マウスの軸索変性遅延形質に関与していることを初めて明らかにしたことである。従来、*WldS* マウスの原因遺伝子がコードするキメラタンパク質 (*WldS*) は核に局在し、軸索における仲介分子の存在が想定された。また、その一部である nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1 (*Nmnat1*) は NAD 生合成に重要な酵素であり、NAD 依存性経路の関与が示唆されている。SIRT2 はこの 2 点の要件を満たしていると考えられる。(2) 野生型マウスにおいても、SIRT2 の発現制御により、軸索変性を遅延させることが可能であることを初めて示したことである。これは神経変性疾患治療に道を開く成果である。(3) 赤ワインに含まれるアントシアニン類の 1 つであるレスベラトロールは、その抗酸化作用から大変注目され、種々の分野で利用されているが、これが SIRT2 の活性化剤であることを初めて明らかにしたことである。

神経系の発生過程において、軸索変性は、最適な神経回路網の構築に必要不可欠である一方、神経変性疾患の発症原因であることから、その分子機構の解明は極めて重要である。本研究により、*WldS* マウスの軸索変性遅延機構の解明が進むのみならず、軸索変性に関与する生命現象の解明も進むことが期待される。特に、軸索変性遅延を操作することが可能になったことから、神経変性の治療や再生の促進に展望が開けたといえる。審査員一同は本論文が神経生物学及び神経病理学領域の発展に重要な寄与をなすものと考えた。よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。