

# 神経軸索障害における MAP3K12 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12, DLK, ZPK) の役割

伊藤 高行\*<sup>1)</sup> 伊藤 あき\*<sup>2)</sup>

神経障害の治療を開発する上で、神経軸索への障害を神経細胞がどのように検知し、どう反応するかを決定する一連の分子機構の理解は不可欠である。軸索障害のような障害ストレス応答に寄与する細胞内分子機構の研究の中で、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 信号経路の上流で機能する、MAP3K12 (別称 DLK (Dual Leucine Zipper kinase)、ZPK (Zipper Protein Kinase)) が障害・ストレス信号の伝達において中核的な役割を担っている証拠が蓄積されつつある。本総説では MAP3K12 に関してこれまでの知見を概説する。MAP3K12 は軸索障害のみならず、神経発生過程に顕著なプログラム細胞死を含めた様々なストレスにより活性化される。軸索障害の場合、MAP3K12 が担う信号に対して神経細胞は神経細胞死か軸索再生かの相反する反応をとるが、総じて中枢神経では細胞死が生じ、末梢神経では軸索再生が見られる。この根底にある分子機構がある程度明らかになりつつあるが、神経細胞の系列や年齢などの様々な状況により異なる可能性がある。MAP3K12 を標的とした効果的な治療戦略を立てる上で、それぞれの神経細胞系列ごとに異なると考えられる反応の分子機構をさらに明らかにしていくことが必要と考えられる。

キーワード：Mitogen-activated protein kinase, MAP3K12, DLK/ZPK, 軸索障害, 神経細胞死, 軸索再生

## 1. はじめに

神経系はネットワークとして機能し、その信号伝達路の「電線」に相当する構造が神経細胞体から伸びる軸索である。神経疾患や外傷などで生じる神経機能障害の原因の本質に軸索の障害によるネットワークの切断があり、神経障害の治療を開発する上で軸索障害に対して神経細胞がどう反応するかを決定するメカニズムの理解は必須と考えられる。例えば、下位運動神経（以後、運動神経と略する）は脊髄ないし脳幹にある細胞体から末梢神経内に軸索を伸ばして骨格筋の収縮を直接支配しており、その軸索が外傷などにより障害されると、支配領域に一致した運動麻痺を生じ動作、姿勢維持などに支障をきたす。軸索が障害された場合、運動神経細胞の反応は個体の成熟度、神経細胞

の種類、障害の部位・性質や程度により異なる。運動神経細胞が未成熟な新生児期では軸索障害により神経細胞死が誘導される一方で、成熟個体では軸索障害後も運動神経細胞の殆どは生存し、さらに障害の状況によっては顕著な軸索再生が生じ機能回復が見られる。このように標的組織と正常な機能的接続を確立している軸索が障害された場合、神経細胞はそのストレスに対して細胞死か軸索再生かのいずれかの相反する反応をとることが認められている。このストレス応答に寄与する細胞内分子機構の研究が進んでおり、我々も Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 信号経路の上流にある、MAP3K12 (別称 DLK (Dual Leucine Zipper kinase)、ZPK (Zipper Protein Kinase)) がストレス応答を担う重要な分子であることを明らかにしてきた。本稿では軸索障害を主体とした神経細胞のストレス応答における MAP3K12 の関与に主眼を置き、この

\*1) 愛知学院大学心身科学部健康科学科、2) 愛知学院大学心身科学部健康科学科 客員研究員  
(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市阿良池12 E-mail: takito@dpc.agu.ac.jp

領域の研究者からの最近の報告を含め概説する。

## II. MAP3K12 (ZPK、DLK、MUK) について

ヒトの MAP3K12 は米国ペンシルバニア大学医学部神経内科の David Pleasure の研究室で、当時の研究教員 Usha Reddy によって Ntera2 テラトーマ細胞株がレチノイン酸処理で神経細胞に形質転換すると発現誘導されるキナーゼとして見出され、その特徴的な leucine zipper 構造から 1994 年に Zipper Protein Kinase (ZPK) の名で報告された [Reddy 1994]。神経系、特に個体発生段階での神経系に強い発現がみられる。まもなくマウスやラットのホモログもそれぞれ DLK [Holzman 1994]、MUK (MAPK-upstream protein kinase) [Hirai 1996] として報告され、同時にキナーゼ信号経路の中で MAPK 経路の最上流にある MAPK kinase kinase (MAPKKK、MAP3K) の一つであることが確認された。とりわけ、キナーゼサブドメインがセリン・スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの両者の特徴を併せ持った MAP3K である、Mixed-lineage kinase (MLK) ファミリーの一員と考えられた [Gallo 2002]。ヒトなど哺乳類の MAP3K12 の基質となる MAPK kinase (MAPKK、MAP2K) は MKK4 (MAP2K4) と MKK7 (MAP2K7) で、よって MAP3K12 は MAPK 経路の中でもストレス応答を伝達する信号系として知られる c-JUN N-terminal kinase (JNK) サブファミリーの活性化に主として寄与する。ただし、MKK4 は p38 キナーゼも基質に含むため、p38 キナーゼサブファミリ

ーの活性化にも関与しうる。図 1 に 3 段階層構造からなる MAPK リン酸化カスケードにおける MAP3K12 の位置を示すが、この MAPK 信号経路は図中に描かれていない ERK1/2 及び ERK5 サブファミリーを含め酵母から高等動物に至るまで広く真核生物の細胞において保存された経路であり、様々な細胞周囲の微細環境の変化に応じてシグナルを主に核内の遺伝子転写調節系に伝える信号系として機能している。この機能的普遍性一方で、細胞系特異的に重要なシグナルの入力系として MLK ファミリーをはじめとする MAP3K が発達してきた可能性がある。MAP3K12 の場合、無脊椎動物である線虫 *C. elegans* やショウジョウバエ *Drosophila* にも、そのホモログである DLK-1 と Wallenda がそれぞれ存在し、やはり神経系に発現が見られる。後述するように、これまでの神経系における MAP3K12 の機能解析の進展に、これらの無脊椎実験動物が寄与した部分は大きい。

種を超えて保存されている MAP3K12 のアミノ酸一次配列の比較を図 2 に示す。どの種でも全長配列のタンパクは約 900 アミノ酸からなり、N 末側にキナーゼドメインがあり、その後には 2 つの leucine zipper ドメインがタンデムに続く。脊椎動物では MAP3K12 に加えてほぼ同様のドメイン構成を持ったパラログと考えられる MAP3K13 (別名 LZK, Leucine zipper-bearing kinase) が存在し、その類似性をヒトの MAP3K13 を例として図 2 に示す。我々はアフリカツメガエルでも MAP3K12 と MAP3K13 の両者が存在することを確認している [未発表]。MAP3K13 も神経系に優位

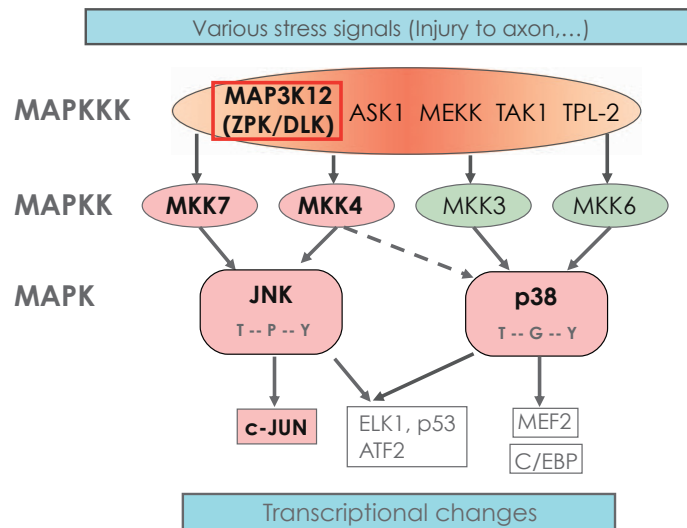


図 1. MAPK サブファミリーの JNK および p38 のリン酸化カスケードモジュールにおける MAP3K12 の位置。

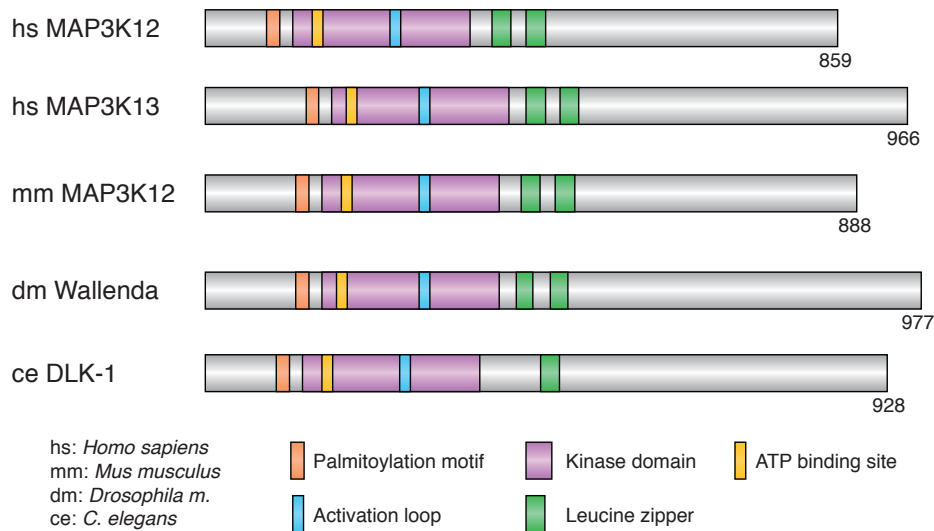


図2. 種間における MAP3K12 およびヒト MAP3K13 (LZK) のドメイン構成の比較。

な発現がみられるが、最近この MAP3K13/LZK が MAP3K12 が担う機能を協調的に補っていることが一部の神経系で報告された [Welsbie 2017]。ただ両者の機能的な重複と特異性については神経の系統などにより異なる可能性がある。さらに近年、翻訳後修飾の一つである S-パルミトイル化反応が生じるシステイン残基を含んだ領域がキナーゼドメインの上流側に隣接して種間でも保存されていることが指摘され、パルミトイル化により親水性の高い MAP3K12 が小胞などの膜構造に局在できることが機能上不可欠であることが示唆されている [Holland 2016]。また、MAP3K12 の維持と活性化に分子シャペロンの一つの HSP90 が必要であることも報告された [Karney-Grobe 2018]。

### III. 神経発生における神経細胞死 (プログラム細胞死) と MAP3K12

末梢神経系の神経細胞の場合、その発生過程で量的に過剰な神経細胞が作られ、これらが軸索を伸展し標的組織との接続を完了する過程で競争の原理が働くことで必要数の神経細胞のみが生き残り、結果的に神経細胞と標的組織との生理的な量的均衡が成立する。過剰な発生過程の神経細胞が細胞死により除去されるメカニズムは、軸索が標的組織との接続に失敗した場合、標的組織から軸索を介して伝達される生存に必要なシグナルが得られず、内因的な細胞死が誘導されるためと理解されている。このタイプの神経細胞死は発生過程でのその厳密な時間的再現性からプログラム細胞死とも呼ばれ、中でも最も早くから研究されてきた

実験モデルは、胎生期～新生児期の末梢交感神経細胞を培養系に移し、その生存維持に不可欠な神経栄養因子 (NGF) を除いた場合に生じる神経細胞死である。この実験系で、1990年代中頃には c-Jun、JNK が活性化されることが細胞死に促進的に働く証拠が示され、さらにコロンビア大学の Greene のグループが MAP3K12 を含む MLK が JNK 経路の上流にあって活性化を引き起こすことを明示した [Xu 2001]。末梢の運動神経細胞でも発生過程のプログラム細胞死で同様のメカニズムが働くことが示唆されていたが、その標的組織である骨格筋に由来する生存を促進する分子が、交感神経細胞に対する NGF のように単純ではないことが培養系による解析を複雑にしていた。我々は幸運にも MAP3K12 遺伝子を働かなくしたマウスを用いることで、MAP3K12 が欠損すると運動神経のプログラム細胞死が抑制され、結果的に倍以上の運動神経細胞が生き残ることを見出し、MAP3K12 がプログラム細胞死の中核的な担い手であることを明らかにした。さらに、軸索が骨格筋と接続できていない運動神経細胞は正常ならば神経細胞死によって除去されているはずであるが、それらが生存していることを示唆する所見を得た [Itoh 2011]。すなわち、神経発生過程の運動神経において MAP3K12 は軸索が骨格筋と接続できない場合に働き、神経細胞死を引き起こす信号を伝える中心的役割を担うが、一方で MAP3K12 が働き始めるのは発生過程で軸索が骨格筋に到達する前後の時期からであり、それまでは運動神経細胞の分化・生存と軸索の伸展は MAP3K12 と無関係に進行すると考えられる。

#### IV. 軸索障害による神経細胞変性・神経細胞死と MAP3K12

発生過程を経て標的組織と正常に接続して機能している神経細胞において、軸索が障害されると軸索再生か神経細胞死の相反する反応が引き起こされるが、これらの反応にも MAP3K12 が関与している証拠が蓄積されてきている。軸索障害が神経細胞死を引き起こす実験モデルを用いて、最初に MAP3K12 の関与を示したのは、ジョンス・ホプキンス大学医学部眼科の Zack と Welsbie のグループであった。彼らは網膜神経節細胞の軸索から構成される視神経を障害することで引き起こされる網膜神経節細胞の細胞死に関与するキナーゼを全キノーム解析でスクリーニングした結果、MAP3K12 と MKK7 を見出した。同時に MAP3K12 を遺伝子的あるいは薬理的に阻害することで、網膜神経節細胞の細胞死が抑制されることを示している [Welsbie 2013]。全く同時期にジェネテック社の Lewcock のグループも同じ実験モデルを用いて MAP3K12 の関与を示し、MAP3K12 依存性に細胞死を促進する遺伝子群に加え、軸索再生を促進する遺伝子群の発現も生じることを示している [Watkins 2013]。Zack らはさらに近年、MAP3K12 が介する網膜神経節細胞の細胞死に関連する遺伝子を機能的網羅的にスクリーニングし、MAP3K13 (LZK) が MAP3K12 と協調的に働き、また MAP3K12 と MAP3K13 (LZK) の下流で JUN、ATF2、MEF2A、SOX11 が細胞死を促進する主要な転写調節因子であると報告している [Welsbie 2017]。一方で我々は、新生児のマウスで顔面神経を障害すると、顔面神経に軸索を送っている顔面神経核の運動神経細胞に細胞死が生じ、その細胞死が MAP3K12 欠損マウスでは殆ど生じないことを見出し報告した [Itoh 2014]。これら視神経障害と新生児マウスの顔面神経の障害の両者のモデルは、軸索障害によって MAP3K12 が活性化されて神経細胞体に伝えられる信号が神経細胞死を引き起こす上で中核的な役割を果たすことを支持している点では共通であるが、MAP3K12 の活性化が生じる機序や、信号下流で細胞死を誘導する遺伝子発現などの相違については今後の検討が必要である。また、軸索変性を伴う神経変性疾患の場合、MAP3K12 の活性化を介する二次的な細胞死の誘導がどの程度関与しているのかも、臨床的に重要な問題と考えられる。

#### V. 軸索障害後の軸索再生と MAP3K12

軸索障害後の中枢側断端からの軸索再生に MAP3K12 が重要であることは、線虫の実験から最初に明らかになった。ユタ大学の Bastiani のグループは MAP3K12 の線虫のホモログである DLK-1 を欠損させた変異体あるいは人為的に発現を阻害した個体では、GABA 作動性運動神経の軸索切断後に軸索再生が全く見られないことを発見した。さらに詳細な検討から、DLK-1 は軸索再生に必須な先端部の成長円錐の形成に不可欠であるとともにその形態と挙動を制御しており、また DLK-1 の下流の標的分子が脊椎動物での MKK4 と p38 キナーゼのホモログである、それぞれ MKK-4 と PMK-3 であることを示した [Hammarlund 2009]。同時期に我々も MAP3K12 遺伝子を不活化したマウスの解析を進めていた中で、MAP3K12 を欠損すると第一次感覚神経細胞を培養した場合の神経突起の伸張が遅れることを見出していたことを急遽報告し、これが哺乳類での MAP3K12 の軸索再生における重要性を示す最初の報告となった [Itoh 2009]。注目すべき点として、線虫では軸索再生が DLK-1 に完全に依存するのに対し、マウスでは MAP3K12 が欠損しても軸索再生は遅延するが進行する。その後、ワシントン大学の DiAntonio らのグループが MAP3K12 を神経特異的に欠損させたマウスの坐骨神経の挫滅モデルを用いて改めて迅速な軸索再生に MAP3K12 が必要であることを証明するとともに、先行する軸索障害があるとその後の軸索再生が増強される現象が MAP3K12 を欠損すると見られないことを示した。加えて、軸索障害によって MAP3K12 に非依存性に活性化される STAT3 などの再生促進に働く因子の軸索から細胞体への逆行輸送にも MAP3K12 が必要である証拠を示している [Shin 2012]。これら末梢神経への軸索障害の研究からは、MAP3K12 が担う信号は軸索再生を促進することを示しているが、中枢神経への軸索障害の研究は前述した視神経を障害した場合の網膜神経節細胞の研究によるところが大きく、むしろ細胞死を促進し、MAP3K12 の発現を阻害することで細胞死が抑えられる。なぜ視神経では軸索再生ではなく細胞死かという疑問に対して Lewcock のグループは、網膜神経節細胞の PTEN 遺伝子を不活化するなど軸索再生能を増強した場合でも、MAP3K12 の発現を同時に阻害するとむしろ軸索再生が悪化するという結果を示し、よって MAP3K12 の障害信号は同時に軸索再生を促進す



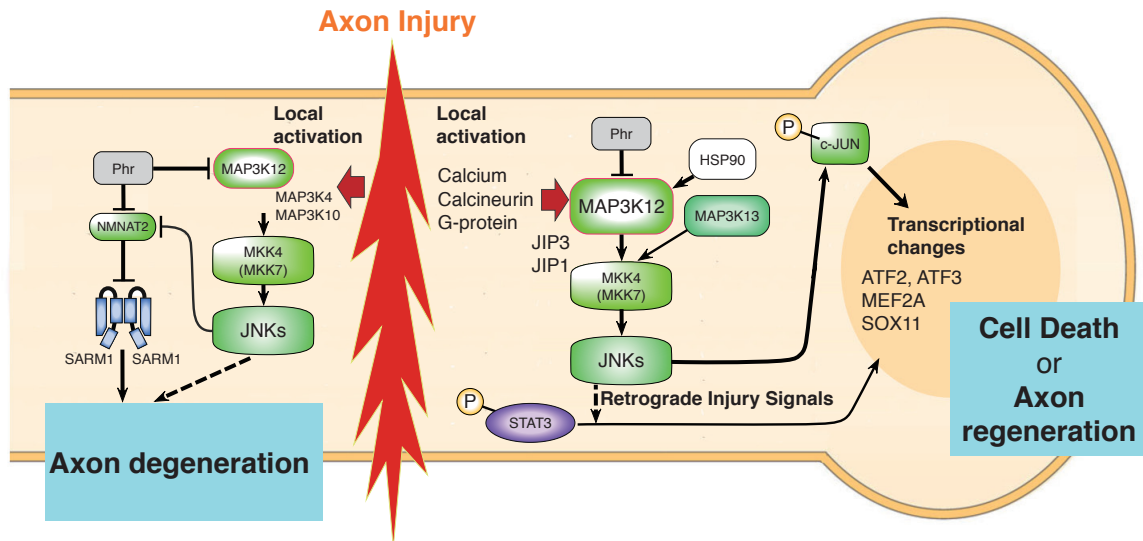


図3. 軸索障害に起因する障害中枢側および障害末梢側での MAP3K12 を介する信号経路の概要。

る反応をも引き起こしている」と指摘している。彼らの仮説では、にもかかわらず細胞死が優位となるのは、軸索再生に抑制的に働く中枢神経の環境で軸索再生が不完全、不十分な状態が持続することで細胞死を抑制するフィードバック信号が入らない可能性をあげている [Watkins 2013]。

軸索障害モデルではないものの、最近の報告でマウスの中枢神経の虚血障害モデルでは MAP3K12 がむしろ運動機能回復を促進する可能性が指摘されている。虚血障害によって大脳皮質神経細胞でケモカイン受容体の一つ CCR5 の発現増加が生じる。虚血障害後にその増加を阻害すると運動機能の回復が改善する。この CCR5 の阻害による改善に CREB と MAP3K12 の明らかな増加が伴うことが認められ、CCR5 を阻害しても MAP3K12 を同時に特異的に阻害すると改善が無効になることから、CCR5 の阻害の下流にある MAP3K12 の増加が機能改善に不可欠な役割を果たしていることが示された [Joy 2019]。これまで中枢神経の障害モデルでは MAP3K12 は治療標的としては概ね「敵」と考えられたが、障害の種類と神経の種類によってはむしろ「味方」として機能するという複雑な状況も明らかになりつつある。

軸索障害に伴う MAP3K12 の担う信号経路の最近までの知見の概要を図3に示す。軸索障害の神経細胞側の反応の問題から外れるため本稿では紹介に留めるが、図3の障害末梢側軸索に示すように MAP3K12 の担う信号経路が活性化され、ワーラー変性として知ら

れる軸索の自己破壊プログラムが進行することが明らかになっている [Gerdtts 2016]。

## VI. 今後の展望

これまでの研究から MAP3K12 は MAPK 信号経路の中でも、神経細胞特異的に軸索に生じる様々なストレスを検知するセンサーの一つとして働き、主に JNK 経路を介して細胞体に逆行性に障害・ストレス信号を伝える役割を担っていると考えられる。ただし、神経細胞がその信号入力に対して細胞死かあるいは軸索再生かのどちらの反応を選択するかは神経細胞自体の様々な状況に依存する可能性が高い。MAP3K12 を標的とした治療戦略では、神経細胞死を抑制し、軸索再生を促進するという治療目的を達成する必要があり、そのためにはむしろ神経細胞の MAP3K12 を介するストレス信号に対する反応が決定されるメカニズムをそれぞれの神経細胞系列ごとに明らかにしていくことが今後は必要となってくると考えられる。

## 引用文献

- Gallo KA, Johnson GL (2002) Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:663-672.
- Gerdtts J, Summers DW, Milbrandt J, DiAntonio A (2016) Axon Self-Destruction: New Links among SARM1, MAPKs, and NAD+ Metabolism. *Neuron* 89:449-460.
- Hammarlund M, Nix P, Hauth L, Jorgensen EM, Bastiani M (2009) Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway.

- Science 323:802-806.
- Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G, Ohno S (1996) Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12:641-650.
- Holzman LB, Merritt SE, Fan G (1994) Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. *J Biol Chem* 269:30808-30817.
- Holland SM, Collura KM, Ketschek A, Noma K, Ferguson TA, Jin Y, Gallo G, Thomas GM (2016) Palmitoylation controls DLK localization, interactions and activity to ensure effective axonal injury signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:763-768.
- Itoh A, Horiuchi M, Bannerman P, Pleasure D, Itoh T (2009) Impaired regenerative response of primary sensory neurons in ZPK/DLK gene-trap mice. *Biochem Biophys Res Commun* 383:258-262.
- Itoh A, Horiuchi M, Wakayama K, Xu J, Bannerman P, Pleasure D, Itoh T (2011) ZPK/DLK, a mitogen-activated protein kinase kinase, is a critical mediator of programmed cell death of motoneurons. *J Neurosci* 31:7223-7228.
- Itoh T, Horiuchi M, Ikeda RH Jr, Xu J, Bannerman P, Pleasure D, Penninger JM, Tournier C, Itoh A (2014) ZPK/DLK and MKK4 form the critical gateway to axotomy-induced motoneuron death in neonates. *J Neurosci* 34:10729-10742.
- Joy MT, Ben Assayag E, Shabashov-Stone D, Liraz-Zaltsman S, Mazzitelli J, Arenas M, Abduljawad N, Kliper E, Korczyn AD, Thareja NS et al. (2019) CCR5 Is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury. *Cell* 176:1143-1157.
- Karney-Grobe S, Russo A, Frey E, Milbrandt J, DiAntonio A (2018) HSP90 is a chaperone for DLK and is required for axon injury signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E9899-E9908.
- Reddy UR, Pleasure D (1994) Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 202:613-620.
- Shin JE, Cho Y, Beirowski B, Milbrandt J, Cavalli V, DiAntonio A (2012) Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration. *Neuron* 74:1015-1022.
- Watkins TA, Wang B, Huntwork-Rodriguez S, Yang J, Jiang Z, Eastham-Anderson J, Modrusan Z, Kaminker JS, Tessier-Lavigne M, Lewcock JW (2013) DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4039-4044.
- Welsbie DS, Yang Z, Ge Y, Mitchell KL, Zhou X, Martin SE, Berlinicke CA, Hackler L Jr, Fuller J, Fu J, et al. (2013) Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4045-4050.
- Welsbie DS, Mitchell KL, Jaskula-Ranga V, Sluch VM, Yang Z, Kim J, Buehler E, Patel A, Martin SE, Zhang PW, et al. (2017) Enhanced Functional Genomic Screening Identifies Novel Mediators of Dual Leucine Zipper Kinase-Dependent Injury Signaling in Neurons. *Neuron* 94:1142-1154.
- Xu Z, Maroney AC, Dobrzanski P, Kukekov NV, Greene LA (2001)

The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis. *Mol Cell Biol* 21:4713-4724.

(最終版令和元年12月26日受理)

## Roles for MAP3K12 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12, DLK, ZPK) following axon injury.

Takayuki ITOH, Aki ITOH

### **Abstract**

It is essential to enhance our understanding of sequential molecular mechanisms which detect injury to axons and determine how neurons respond to injury signals in order to develop innovative therapeutic approaches to cure neurological disorders. Accumulating evidence from a number of studies has begun to clarify the critical role of MAP3K12 (also known as DLK (Dual Leucine Zipper kinase) or ZPK (Zipper Protein Kinase)) in transduction of neuronal stress/injury signals. In this review, we provide an overview of the roles for MAP3K12 including some recent findings. MAP3K12 is activated not only by axon injury but also by various stresses such as those leading to the programmed cell death that is prominent during neuronal development. Following axon injury, either one of two conflicting outcomes is observed in response to the injury signals mediated by MAP3K12; neuronal death or regeneration of damaged axons. In general, neurons in the central nervous system undergo cell death, whereas axon regeneration occurs in neurons of the peripheral nervous system. Although the molecular basis of this difference has been elucidated to some extent, each neuronal lineage at different ages may have distinct molecular responses to axon injury. More complete knowledge of these molecular injury responses will be necessary to develop effective MAP3K12-based therapeutic strategies.

Keywords: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAP3K12, DLK, ZPK, axon injury, regeneration, neuron death

