

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ドーパミン神経細胞死におけるミトコンドリア遺伝子の関与

分担研究者 田中雅嗣 岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部長

パーキンソン病およびアルツハイマー病などの神経変性疾患は加齢に伴って進行するが、その病因に酸化ストレスが関与していると推定されている。一方、ミトコンドリアは細胞におけるエネルギー産生の主体である同時に、活性酸素種の主要な発生場所となっている。ミトコンドリアからの活性酸素種の発生を抑制することによって、健康で豊かな長寿を享受できると期待される。我々は、ミトコンドリア自身の有するゲノムを制御するための基礎研究を行うと同時に、老化における個体差あるいは疾患感受性の相違の基礎をなしているミトコンドリア遺伝子多型の解析をすすめている。

1. ミトコンドリア病に対する遺伝子治療

A 研究目的

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の点変異あるいは再配置は、多様な疾患の重要な病因である。現在のところ、mtDNA 変異を有する患者に対する有効な治療法はない。

Holt らは mtDNA のヘテロプラスミーを伴うミトコンドリア病を報告した。この NARP 病は Mt8993T→G によって惹起される。これらはミトコンドリアの ATP 合成酵素の α サブユニットにアミノ酸置換 Leu156Arg をもたらす。これらの変異は Leigh 氏病の患者でも検出される。疾患が顕在化するためには、変異型 mtDNA のレベルがある閾値を越える必要がある。ヘテロプラスミーが存在し、かつ、これらの変異が劣性を示すので、変異型 mtDNA を選択的に破壊し、野生型 mtDNA だけを増殖させることによって患者を治療することが可能である。

制限酵素はそれぞれの標的配列に対して高い特異性を示すので、我々はその特異性をミトコンドリア病の遺伝子治療へ利用しようとした。ここに、我々はミトコンドリアを標的とした制限酵素が変異型 mtDNA を特異的に破壊し、それによって野生型 mtDNA の増殖を促すことができることを提示する。

B. 研究方法

- 8993 変異を有するサイブリッドの構築：Leigh 脳症の患者より採取された線維芽細胞を骨肉腫由来の mtDNA を欠如した細胞 (ρ^0 206) と細胞質融合させ、8993T→G 変異を有する不死化細胞系 NARP3-1 (変異型 98%) および NARP3-2 (変異型 60%) を確立した。
- 制限酵素 *Sma*I とミトコンドリア移行シグナルペプチド cDNA の融合遺伝子の構築：制限酵素 *Sma*I 遺伝子を *Serratia macescens* の菌株の DNA から PCR 増幅しクローン化した。酵母の cytochrome *c* oxidase の第 4 サブユニットの移行シグナル(pCoxIV)の遺伝子に制限酵素 *Sma*I 遺伝子を recombinant PCR 法を用いて結合した。この融合遺伝子を SV40 プロモーターを持つベクター (pMACSK^kII) に挿入し発現プラスミドを得た (pMACSK^kII-pCoxIV-*Sma*I)。同様に制限酵素 *Eco*RI をミトコンドリアに送り込むプラスミド pMACSK^kII-pCoxIV-*Eco*RI を構築した。
- Sma*I 遺伝子の発現と変異型 mtDNA の排除：8993T→G 変異を有するサイブリッド NARP3-1 に pCox-*Sma*I 融合遺伝子を陽電荷リポソーム法を用いて導入した。

倫理面の配慮：i) 遺伝子結果については研

究対象者の不利益について説明を十分し、インフォームドコンセントに基づきプライバシーの保護を徹底した。遺伝子解析結果については患者本人の希望があれば、情報として提供した。この際においても個人のプライバシーの保護は遵守した。他施設からの遺伝子検索依頼についても、同様にインフォームドコンセントに基づき行われるよう指導した。これらの実験については国際岐阜バイオ研究所における倫理委員会の許可と指導のもとに行い、厚生省の倫理規定を遵守した。ii)動物を使った実験系については当研究所の動物実験委員会の許可の基に動物愛護上の配慮を十分に行った。

C. 研究結果

我々は、最初にサイブリッド細胞株 NARP3-1 を確立した。このために、Leigh 病患者の線維芽細胞のミトコンドリアを、mtDNA を有しない骨肉腫細胞株に細胞質融合によって導入した。サイブリッド NARP3-1 は変異型 mtDNA の割合が高かった(約 98%)。サイブリッド NARP3-1 の ATP 含量は野生型 mtDNA を有する 143B 細胞の ATP 含量の 70%であった。サイブリッド NARP3-1 のミトコンドリア膜電位は 143B 細胞よりも顕著に低かった(69%)。

*Sma*I をミトコンドリアに送り届けるために、我々は *Sma*I 遺伝子をシグナルペプチドを規定する塩基配列と融合し、この融合遺伝子を哺乳類発現ベクターに挿入した。サイブリッド NARP3-1 に融合遺伝子を含むプラスミドを用いて遺伝子導入を行うと、変異型 mtDNA が完全に排除され、痕跡程度の野生型 mtDNA のみが検出された。この段階で、遺伝子導入されたサイブリッド NARP3-1 は ρ^0 細胞に類似していた。すなわち、サイブリッド NARP3-1 は低いミトコンドリア膜電位を示した。これは野生型 mtDNA の欠乏のためである。変異型 mtDNA の割合が低いサイブリッド NARP3-2 に遺伝子導入を行った場合には、サイブリッド NARP3-1 に遺伝子導入を行った時に観察されたミトコンドリア膜電位

の一過性低下を経過せずに、膜電位の上昇が観察された。

野生型 mtDNA が変異型 mtDNA の破壊の後に増殖するかどうかを調べるために、我々は遺伝子導入されたサイブリッド NARP3-1 の培養を 3 週間続けた。その結果、野生型 mtDNA は第 23 日までに顕著に増殖した。この野生型 mtDNA の増殖は、ミトコンドリア膜電位と細胞の ATP 含量の正常化を伴っていた。融合遺伝子を挿入していない対照プラスミド pMACSK^hII を用いた場合には、変異型/野生型 mtDNA の割合、ATP レベル、ミトコンドリア膜電位に有意な変化は観察されなかった。

Mt8993T→G 変異は F_0F_1 -ATPase のプロトン輸送活性のみに影響を与えるので、サイブリッド NARP3-1 細胞は呼吸鎖の異常を示さない。この呼吸鎖はミトコンドリア膜電位の形成に主要な役割を果たしているものである。サイブリッド NARP3-1 の場合には、遺伝子導入によって変異型 mtDNA が急速に排除されるのに伴ってミトコンドリア膜電位が顕著に低下した。これとは対照的に、同じプラスミドを生体電気穿孔に用いた場合には、その効果はハムスターの骨格筋においては穏やかであった。遺伝子導入の 1 ヶ月後にチトクローム c 酸化酵素活性のわずかな低下を検出できたのみであった。これはおそらく、骨格筋におけるこの酵素のサブユニットの代謝回転が緩徐であるためと推定された。

D. 考察

変異型 mtDNA を特異的に認識する制限酵素をミトコンドリアに送り込むという手法は、ミトコンドリア病の遺伝子治療に向けた全く新しい戦略である。この戦略の特長は、制限酵素の一過性発現によって変異型 mtDNA の排除を十分に達成できる点である。ひとたび変異型 mtDNA が排除されると、野生型 mtDNA が細胞内の主要な集団となり、その結果ミトコンドリアゲノムが変異型から野生型に完全に転換される。

我々は、ミトコンドリアに運び込まれた

外来性エクソヌクレアーゼが核 DNA に毒性を示さないことを確認した。この現象は、ミトコンドリアのマトリックスあるいは膜間腔に存在する内在性エクソヌクレアーゼあるいはプロテアーゼが、ある種の病的な条件下以外では核 DNA あるいは細胞の蛋白質を攻撃しないという事実に関連しているであろう。

プラスミド DNA を注入し生体電気穿孔法を行えば、変異型 mtDNA を骨格筋から排除することができ、これによって、高乳酸血症のような全身的代謝異常を改善することができるかと期待される。骨格筋における代謝の正常化によって神経症状が改善される可能性がある。

E. 結論

以上の実験によって、変異型 mtDNA を選択的に排除する遺伝子治療法の基礎が確立された。

参考文献

1. Holt, I. J., et al. *Am J Hum Genet* **46**, 428-3 (1990).
2. Sakuta, R. et al. *Ann Neurol* **32**, 597-8 (1992).
3. Trounce, I., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8334-8 (1994).
4. Obayashi, T. et al. *Am Heart J* **124**, 1263-69 (1992).

2. パーキンソン病に関連するミトコンドリア遺伝子多型の解明およびヒトミトコンドリア DNA 多型データベースの構築

作成するデータベースの概要：ミトコンドリア DNA (mtDNA) の進化速度は核 DNA の約 10 倍であり、個体間の多型性が高い。mtDNA の機能的多様性は核ゲノム全体の多様性に匹敵する。mtDNA の全塩基配列を合計 54 名 (疾患群 43 例および百寿者 11 例) について既に決定した (16,569 塩基対 × 54 例 = 894,726 塩基対)。新たに百寿者 96 名、青年期高度肥満

者 96 名、パーキンソン病患者 96 名、糖尿病患者 96 名、対照者 192 名の mtDNA の全塩基配列を決定する。2 種のリボソーム RNA 遺伝子、22 種のトランスファー RNA 遺伝子、13 種の酸化的リン酸化系酵素サブユニットの遺伝子、およびコントロール領域の多型に関するデータベースを構築する。立体構造の明らかになっている cytochrome c oxidase (CO1, 2, 3) および cytochrome b については三次元構造上に置換残基を表示する。各多型の正常群・長寿群・疾患群における頻度比較を提示する。

データの種類と件数：mtDNA の全塩基配列を合計 54 名 (疾患群 43 例および百寿者 11 例) について既に決定した (16,569 塩基対 × 54 例 = 894,726 塩基対)。疾患群 43 例の解析 (16,565 塩基対 × 43 例 = 712,467 塩基対) の解析によって、13 種のサブユニット遺伝子 (11,320 塩基対) において合計 295 の塩基置換 (295/11320 = 2.9%) が見いだされた。そのうち、同義置換は 194 個 (66%)、非同義置換は 101 個 (34%) であった。

新たに百寿者 96 名、青年期高度肥満者 96 名、パーキンソン病患者 96 名、糖尿病患者 96 名、対照者 192 名、合計の mtDNA の全塩基配列を決定し、多型情報を集積する。単純な比例計算では、蛋白質をコードする領域において、同義置換が 2699 個、非同義置換が 1353 個発見されると期待される。また、2 種のリボソーム RNA 遺伝子、22 種のトランスファー RNA 遺伝子および遺伝子発現制御領域 (D ループ領域)、合計 5249 塩基対の領域にも、総計 1832 個の塩基置換が発見されると見込まれる。

黒質ドーパミン神経細胞死におけるミトコンドリアの関与を明らかにするために、順天堂大学神経内科から提供されたパーキンソン病患者 106 名の全塩基配列を決定する。mtDNA の全周を 60 本の断片として増幅し、その塩基配列を Dragon Genomics において決定する (60 × 106 = 6360 本)。平成 13 年 3 月までには完了予定である。比較対照として、慶応大学老年科から提供された百寿者 56 名の全塩基配列を分析する。来年秋には百寿者の分析対

象も 100 名になる見通しである。それぞれの群で見いだされた遺伝子多型の頻度をパーキンソン病患者約 1000 例および正常対照 2400 例と比較する。これによりパーキンソン病に罹患する感受性を有する遺伝子多型を明らかにする。また、肥満者・糖尿病患者についても各 96 例の全塩基配列を分析中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

7. Tanaka, M., Gong, J.-S., Zhang, J., Yamada, Y., Borgeld, H.-J. & Yagi, K. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mech. Ageing Dev.* **116**, 65-76 (2000).
8. Shimokata, H., Yamada, Y., Nakagawa, M., Okubo, R., Saido, T., Funakoshi, A., Miyasaka, K., Ohta, S., Tsujimoto, G., Tanaka, M., Ando, F. & Niino, N. Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). *J Epidemiol* **10**, S46-55 (2000).
9. Matsunaga, H., Tanaka, Y., Tanaka, M., Gong, J.-S., Zhang, J., Nomiya, T., Ogawa, O., Ogihara, T., Yamada, Y., Yagi, K. & Kawamori, R. Anti-atherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* in press (2000).
10. Miura, J., Uchigata, Y., Gong, J.-S., Zhang, J., Iwamoto, Y., Yagi, K. & Tanaka, M. Mitochondrial genotype Mt5178C is associated with diabetic nephropathy in Japanese type-1 diabetic patients. in *Diabetes Mellitus: Recent Advances for the 21st Century*. pp. 271-274 (eds. Shichiri, M., Shinn, S. & Hotta, N.) (Elsevier Science, Tokyo, 2000).
11. 田中雅嗣 ミトコンドリアと老化. *BIO Clinica* **15**, 214-219 (2000).

12. 田中雅嗣 ミトコンドリアからのメッセージ: 長寿に関連したミトコンドリア遺伝子多型と成人発症性疾患. *日本農芸化学会誌* **74**, 783-786 (2000).

13. 田中雅嗣 ミトコンドリア心筋症目で見える循環器病シリーズ 14 心筋症 (松永昭編) pp.188-191 Medical View 社 (2000).

2. 学会発表

- 1) 田中雅嗣 ミトコンドリア病の遺伝子治療 第 26 回東海遺伝子医療学会 2001 年 1 月 20 日 名古屋
- 2) Tanaka, M. Mutations and polymorphisms of mitochondrial DNA in cardiomyopathy. The Cardiomyopathy 2000, The Seventh Antwerp - La Jolla - Kyoto Research Conference on Cardiac Function (Feb 24-26, 2000) Kyoto
- 3) 田中雅嗣 長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型とその変異抑制効果 第 64 回日本生化学会中部支部例会 2000 年 5 月 13 日 静岡
- 4) Tanaka, M. Polish-Japanese Free Radical Forum on Molecular Aspects of Free Radical Dependent Processes in Cell Death and Survival. September 17-19, 2000, Gdanisk
- 5) 田中雅嗣 ミトコンドリア遺伝子と長寿 第 62 回老年学公開講座 2000 年 9 月 22 日 東京
- 6) 田中雅嗣 ミトコンドリア遺伝子と長寿. 静岡長寿フォーラム 2000 年 10 月 6-7 日 静岡
- 7) 福典之、押田芳治、武安岳史、郭麗君、田中雅嗣、佐藤祐造 ミトコンドリア遺伝子型 Mt5178C は青年男子において高度肥満に関連する 第 21 回日本肥満学会 2000 年 10 月 19-20 日 名古屋
- 8) 押田芳治、福典之、武安岳史、佐藤祐造、田中雅嗣 ミトコンドリア遺伝子レベルからのアプローチ 第 21 回日本肥満学会パネルディスカッション 3

「生活習慣病へのアプローチ」 2000
年10月19-20日 名古屋

9) 田中雅嗣 ミトコンドリア病の遺伝子
治療 第26回東海遺伝子医療研究会
2001年1月20日 名古屋

10) Tanaka, M. Mitochondrial genotype
associated with longevity and its inhibitory
effect on mutagenesis. 3rd Human Genome
Organization Pacific Meeting and 4th Asia-
Pacific Conference on Human Genetics,
Disease-related Genomics. October 18-21,
2000, Shanghai

11) Tanaka, M. & Yagi, K. Human
mitochondrial genotype associated with
longevity and its inhibitory effect on
mutagenesis. The third International
Conference on Oxygenases, Oxygen and
Life. - Oxygenases, Oxidases, and Lipid
Mediators - November 26-29, 2000, Kyoto

12) Tanaka, M. Human mitochondrial
genotype associated with longevity and its
inhibitory effect on mutagenesis. 1st

Conference of Korean Genome
Organization. Recent Progress in Genomics,
Proteomics, and Biotechnology. November
29, 2000, Seoul

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 特許出願（審査中）特願 2000-380975「融合
蛋白質発現用組換えベクター、及びその組換
えベクターを用いた非ヒト生物の核外遺伝子
分解方法」（出願平成12年12月14日）
- 2) 特許出願（審査中）特願 2000-385645「アル
コール代謝促進剤」（出願平成12年12月19
日）
- 3) 特許登録 3130295「ピルビン酸欠乏症及び
／または高乳酸血症の予防及び／治療剤」（出
願平成11年1月12日、登録平成12年11月
17日）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

正常老化およびパーキンソン病患者における酸化ストレスによる
黒質ドーパミン神経傷害

分担研究者 服部信孝 順天堂大学医学部脳神経内科 講師

研究要旨：単一遺伝子異常でおこる若年性パーキンソン病の多くはパーキンソン遺伝子変異によることが我々の研究グループにより明らかにされた。変異の分布は多岐に渡っており、ある機能的ドメインを特定することは困難である。このことはパーキンソン分子全長に渡って機能的ドメインが存在していることを示している。しかしながら、変異解析は複数存在するであろう機能的ドメインを特定するに最も有効な手段であり、変異によりもたらされる機能変化を解明することは正常老化や孤発性パーキンソン病における黒質神経細胞死の機序を解明するために極めて有用な情報を与えると考えている。また人種間における変異の違いも明らかにすることが可能である。現在日本をはじめ世界各国から456症例の若年性パーキンソン病患者のDNA解析を行っており、13%にパーキンソン遺伝子に変異を認められた。認められた変異はホモ接合体の exonic deletion が最も多く、missense ないし nonsense 変異は4例と少なかった。また様々な変異の組み合わせでおこる複合ヘテロ接合体は19例認めた。血縁結婚を認めなくともパーキンソン遺伝子変異を認める症例が存在することは複合ヘテロ接合体が少なからずいるということを示す。一方、パーキンソン蛋白の機能についてはユビキチンリガーゼであることが明らかにされた。loss-of-function 型変異でおこる変異パーキンソン蛋白が、全てユビキチンリガーゼ活性を持たなかったことはパーキンソン蛋白の基質がポリユビキチン化されずに分解されないことが予想される。パーキンソン遺伝子変異で起る若年性パーキンソン病ではユビキチン陽性 Lewy Body が存在しないことも興味深い。何れにしろ基質が分解されずに溜まることが神経細胞死を誘導することがその機序として推測されている。本研究班(丸山)では酸化修飾タンパクがユビキチン-プロテアソームで分解されることが示されており、老化あるいは遺伝子変異を持たないパーキンソン病における細胞死も同様な機序が働いている可能性がある。今後はパーキンソン蛋白の基質同定が最重要課題となる。

A. 研究目的常染色体劣性若年性パーキンソンニズム (AR-JP)の原因遺伝子であるパーキンソン遺伝子は若年発症の家族性パーキンソン病において頻度の高い原因遺伝子と

して認識されつつある。Loss-of-function型変異であることはホモ接合体をとることが多い。しかしながら、複合ヘテロ接合体を呈するような患者の変異解析においては

conventional PCR では決定することができない。したがって複合ヘテロ接合体を決定するような遺伝子変異解析方法の開発が望まれていた。我々は gene dosage technique を使い複合ヘテロ接合体を決定する方法を開発することを目的とした。また変異の分布はパーキン蛋白質の機能解析の上で重要な情報を与えてくれる。その点からも新規変異型を同定することは機能解析からも重要である。一方、機能解析については詳細な細胞内局在を検討することで機能を予測することを目的とした。更にパーキン蛋白質のアミノ酸配列から得られる情報からはユビキチン-プロテアソーム系への関与が推測されたため、その可能性について検討した。

B. 方法

1) パーキン遺伝子変異解析：変異解析を行う上でスクリーニング方法として以下のように行った。第1段階) conventional PCR でホモ接合体のエクソン欠失型変異の有無を検討した。全てのエクソンをPCRで増幅し、PCR産物の有無にて欠失の有無で変異を決定した。但し、PCR産物の認められた症例については、第2、3と解析を進めた。第2段階) 上記方法にてエクソン欠失型変異が認められなかった症例については missense ないし nonsense 変異、あるいはエクソン内に存在するような microdeletion について変異の有無を検討した。第3段階) 第1、2段階でも変異が認められない症例については、gene dosage technique を用いて検討した。Gene dosage technique とは real time PCR のことで定量可能な方法である。この方法が信頼できる定量方法であることは Fluorescence in situ hybridization (FISH)にて確認している。gene dosage technique には ABI7700 を使用した。internal reference として beta-tubulin 遺伝子にて補正し、exon の hemizygote を確定した。再現性は DNA sample を QuiaGen キットで抽出する場合は問題なかった。つまりこの Gene dosage technique は DNA の純度に依存していた。

この3段階ステップを用いた方法で解析を進めれば 100%近い変異を同定できると考えている。裏を返せばパーキン遺伝子変異を除外するには、このような多段階ステップを踏む必要がある。2) パーキン蛋白質の細胞内局在：(i) Western blot, 免疫組織化学：機能解明の上で詳細な細胞内局在は重要な情報を与えてくれる。そこでパーキン蛋白質のアミノ酸配列からペプチド抗体を作製し、免疫組織化学的検討および Western blot にて AR-JP 患者脳と孤発型 PD 脳の前頭葉を用いて確認した。(ii) 免疫電顕及びシナプス分画を用いたシナプス小胞におけるパーキン蛋白質の局在。ラット脳より synaptosomal fraction を分離し、パーキン蛋白質のシナプス小胞への関与を検討した。我々の研究室ではラットパーキン cDNA 単離されており、この実験に用いた抗体はヒト、ラットで保存されていることを確認している。(iii) tag protein として Green fluorescence protein を用いた解析。パーキン蛋白質の膜局在機構を解析するために GFP との fusion protein を用い、その局在変化を観察した。観察には BioRad 社のレーザー顕微鏡を使った。tag は全てパーキンの C 末に付加した。(iv) 塩処理により膜局在機構の検討。塩濃度を増加させることによるパーキン蛋白質の局在変化を検討した。変化はラット内在性パーキンを用いた。3) パーキンのユビキチン系への関与の検討。In vivo 系：E2 として UbcH2,3, 4, 5A, 5B, 5C, 6, 7, 8 とパーキン蛋白質の結合を検討した。In vitro 系：精製 E1, E2 そして免疫沈降したパーキン蛋白質を用いて検討した。4) 発生段階におけるパーキン遺伝子の発現パターンの検討。胎生期から adult までのパーキン遺伝子の発現パターンを検討した。また UbcH7 と一緒に発現パターンを検討した。probe のラベルには non-RI のジゴキシゲニンでラベルした。倫理面の配慮：i) 遺伝子結果については研究対象者の不利益について説明を十分し、インフォームドコンセントに基づきプライバシーの保護を徹底した。遺伝子解析結果については患者本人の希望があれば、情報として提供した。この際におい

ても個人のプライバシーの保護は遵守した。他施設からの遺伝子検索依頼についても、同様にインフォームドコンセントに基づき行われるよう指導した。これらの実験については順天堂大学における倫理委員会の許可と指導のもとに行い、厚生省の倫理規定を遵守した ii)動物を使った実験系については順天堂大学の動物実験委員会の許可の基に動物愛護上の配慮を十分に行った。

C. 研究結果：1) 変異解析では、複合ヘテロ接合体が 456 例中の検索範囲では 19 例に認められた。また人種による違いは認められ、日本人では exonic deletion が多い傾向を認めた。一方、外国症例では misense や exon 内に限局している microdeletion が多かった。2) パーキン蛋白解析：AR-JP 脳ではパーキン蛋白質の欠損を認め、細胞内局在では Golgi complex に存在していることが確認できた。更に parkin-Green fluorescence protein (GFP) の chimera protein でも Golgi complex にパーキン蛋白質が局在することが分かった。Mutant parkin を作製しても Golgi complex に局在することよりパーキン蛋白質には複数の膜局在機構があることが分かった。またシナプス小胞上にパーキン蛋白質が存在していることが分かった。この結果については免疫電顕にて確認している。更にパーキン蛋白質は塩濃度を上げると膜から遊離することが分かった。この所見がアーチファクトでないことは transmembrane domain を持つ synaptotagmine や synaptophysin を control として用いている。パーキン蛋白質は少なくとも transmembrane domain を持たずシナプス小胞上に attachment していることが予想された。3) パーキン蛋白質のユビキチン-プロテアソーム系への関与の検討：in vivo 系および in vitro 系にてパーキン蛋白がユビキチンリガーゼであることが分かった。E2 は UbcH7 と結合することが分かった。結合部位はパーキン蛋白の C 末にある RING finger motif を中心としたドメインが必要であった。基質とは ubiquitin like domain で結合して

いることが分かった。4) in situ hybridization によるパーキン遺伝子の発現パターン：成長と共にパーキン遺伝子の発現が増加した。UbcH7 も同様なパターンを示した。小脳ではプルキンエ神経細胞に強く発現していた。

D. 考察 RING finger を持つ蛋白がユビキチンリガーゼであることが分かってきた。パーキン蛋白質も RING finger motif を持っており、その可能性を検討し、ユビキチンリガーゼであることが分かった。ユビキチン-プロテアソーム系は ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), ubiquitin-protein ligase, ubiquitin, そして 26S proteasome によって構成されている。まず E2 との結合を in vivo 系で確認した。その結果 E2 の 1 つである UbcH7 と結合することが分かった。UbcH7 との結合部位を検討したところ RING finger motifs と IBR が必要であることが分かった。我々はこの部位を RING box と命名し、更に missense mutation についても検討したが、やはり missense mutation であったも結合が消失することが分かった。In vivo ubiquitination については、neuron potential を持つ SH-SY5Y neuroblastoma cell については in vivo ubiquitination を認めた。一方、non-neuronal cell である HEK293 cell では in vivo ubiquitination を認めなかった。In vivo ubiquitination 系で ubiquitin like domain に認められた missense mutation R24P でも ubiquitination を認めなかった。この mutation では UbcH7 との結合は認めることよりパーキン蛋白質の基質（基質が何かは分からない）がこの部位で結合する事が予想された。更に in vitro 系で ubiquitination の有無を確認したところ E1, E2 (UbcH7), そして immunoprecipitation したパーキン蛋白質を加えた時のみ ubiquitination を認めた。以上の結果からパーキン蛋白質がユビキチンリガーゼであることが証明された。AR-JP 患者で認められる変異を持つパー

キン蛋白質には、このユビキチンリガーゼ活性を認めなかった。Loss-of-function型変異である AR-JP 患者でリガーゼ活性を持たなかったことは AR-JP 患者に共通してパーキン蛋白質の基質が poly-ubiquitination されずに 26S proteasome により分解されないことが黒質神経細胞死に関与していると考えられる。今後は基質同定が重要課題となる。パーキン蛋白質の機能を考える上で脳発達段階でのパーキン遺伝子発現の時間的経過も機能を考える上で重要な情報を与えてくれる。Non-RI でラベルした probe を用いた方法で検討しており、脳の maturation と伴に発現が増加してくる傾向を認めた。また UbcH7 についても in situ hybridization を行ったところ全く同じ発現パターンを示していた。In vitro 系の結果と併せて神経系ではユビキチン-プロテアソーム系が重要な役割をなしていることが推測される。ユビキチンリガーゼとしてのパーキン蛋白質がシナプス終末に存在することは基質も神経終末に存在していると予想している。しかも塩処理で遊離されやすいことを考えると遊離されやすい理由があると考え。この膜局在機構としてはリン酸化により制御されていると予想している。今後パーキン蛋白質の膜局在機構について人工膜を使い検討する予定である。

E: 結論パーキン蛋白質がユビキチンリガーゼであることから今後はパーキン蛋白質の基質同定が最重要課題となる。AR-JP は loss-of-function 型変異でリガーゼ活性が消失することにより基質が poly-ubiquitination されずに 26S proteasome で分解されないことにより蓄積することで細胞死を誘導すると予想される。パーキン蛋白質の発現は広い分布であり、黒質や青斑核に局限しているわけではない。では何故黒質に局限した神経細胞死が起こるのであろうか？基質が同定されれば、その疑問点も解明されであろう。現在 Knock-out mouse を作製中であり、その解析と伴に yeast two hybrid で基質含めたパーキン蛋白質との結合蛋白をスクリーニングして

おり 14 クローンを単離できている。またパーキン蛋白質に対する抗体を複数種作製しており、内在性パーキン蛋白質と結合する蛋白質の同定を行う予定である。単一遺伝子異常で極めて黒質に局限した神経細胞死が起こる AR-JP の病態解明は、しいては孤発型パーキンソン病の病態解明に繋がる可能性が高いと考えている。一方で、ユビキチン陽性である Lewy 小体を認めない AR-JP の原因蛋白質がユビキチンリガーゼであることは興味深い。神経変性には細胞内封入体ないし核内封入体を認めることより AR-JP の病態解明はさきに述べた孤発型パーキンソン病に留まらず神経変性に共通した機序を明らかにしてくれると考えている。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

(1) 論文発表 (英文原著)

1. Kobayashi T, Wang M, Hattori N, Matsumine H, Kondo T, Mizuno Y: Exonic deletion mutations of the parkin gene among sporadic patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disord* 6:129-131, 2000.
2. Zhang J, Hattori N, Giladi N, Mizuno Y.: Failure to find mutations in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in familial Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disord* 6: 199-200, 2000.
3. Zhang J, Hattori N, Leroy E, Morris HR, Kubo S, Kobayashi T, Wood NW, Polymeropoulos MH, Mizuno Y.: Association Between a Polymorphism of Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) Gene and Sporadic Parkinson's Disease. *Parkinsonism Related Disord* 6: 199-200, 2000.
4. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T.: Familial parkinson's disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-

protein ligase. *Nature Genet* 25:302-305, 2000.

5. Urabe T, Yamasaki Y, Hattori N, Yoshikawa M, Uchida K, Mizuno Y.: Accumulation of 4-hydroxynonenal-modified proteins in hippocampal CA1 pyramidal neurons precedes delayed neuronal damage in the gerbil brain. *Neuroscience* 14:241-250, 2000.

6. Takanashi M, Mochizuki H, Yokomizo K, Hattori N, Mori H, Yamamura Y, Mizuno Y. Iron accumulation in the substantia nigra of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *Parkinsonism Related (in press)* 2000.

7. Wang M, Suzuki T, Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme, in rat brain. *J Neurochem (in press)* 2001.

8. Kubo S, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama S, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N. Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem (in press)* 2001.

9. Kitami T, Shimura H, Kubo S, Sato K, Katayama Y, Suzuki T, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. Loss of ubiquitin-protein ligase activities in mutant parkins is linked to autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Ann Neurol (in press)* 2001.

(英文総説)

1. Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Hattori N, Shimura H, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y: Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism. *Neurogenetics* 2: 207-218, 2000

2. Hattori N, Shimura H, Kubo S, Kitada T, Wang M, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Suzuki T, Tanaka K, Mizuno Y: Autosomal recessive juvenile parkinsonism: a key

to understanding nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease. *Neuropathology [Suppl]* 5: S85-S90, 2000

3. Shimizu N, Asakawa S, Minoshima S, Kitada T, Hattori N, Matsumine H, Yokochi M, Yamamura Y, Mizuno Y: PARKIN as a pathogenic gene for autosomal recessive juvenile parkinsonism. *J Neural Transm [Suppl]*:58, 19-30, 2000

4. Hattori N, Shimura H, Kubo S, Wang M, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y: Importance of familial Parkinson's disease and parkinsonism to the understanding of nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease. *J Neural. Transm [Suppl]*: 60, 85-100, 2000

5. Yamamura Y, Hattori N, Matsumine H, Kuzuhara S, Mizuno Y: Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinicopathological characteristics and molecular genetic identification. *Brain Dev [Suppl]*22:87-91, 2000

(和文総説)

1. 服部信孝. パーキンソン病の原因はどこまで明らかになったか-家族性パーキンソニズムの知見を中心に-薬の知識 51: 66-69, 2000.

2. 服部信孝, 水野美邦. 孤発型および家族性パーキンソン病の発症機構. *脳* 21 3: 189-198, 2000. 3. 服部信孝, 志村秀樹, 久保紳一郎, 水野美邦: 若年性パーキンソニズム. *神経研究の進歩* 4

4: 555-566, 2000 4. 水野美邦, Zbigniew K. Wszolek, 服部信孝: 家族性パーキンソン病. *神経研究の進歩* 44: 539-555, 2000

5. 鈴木俊顕, 志村秀樹, 服部信孝: ユビキチンリガーゼ Parkin の機能不全による家族性パーキンソン病. *細胞工学* 19: 1140-1141, 2000

6. 鈴木俊顕, 志村秀樹, 服部信孝: ユビキチンと神経変性疾患. *実験医学* 18:

1148-1482, 2000

7. 久保紳一郎, 志村秀樹, 服部信孝, 水野美邦: パーキンソン病の分子医学. 現代医療 32: 115-122, 2000

8. 水野美邦, 服部信孝: Parkinson 病研究の進歩. 日本内科学会雑誌 89:264-270, 2000

9. 鈴木俊顕, 志村秀樹, 服部信孝: ユビキチンリガーゼ Parkin の機能不全による家族性パーキンソン病. 細胞工学 19:1140-1141, 2000. 23. 服部信孝, 水野美邦: 若年性パーキンソニズムの最新情報 第2部△遺伝関係△難病と在宅ケア 6:14-18, 2000.

10. 服部信孝, 志村秀樹: ユビキチンリガーゼとしての Parkin と Parkinson 病—家族性 Parkinson 病から孤発型 Parkinson 病へ—. 実験医学 19:162-167, 2001.

(2) 学会発表

1) 服部信孝: 家族性パーキンソン病の進歩: パーキン遺伝子変異とその機能解析, 第25回東海遺伝子医療研究会, 名古屋, 8月5日, 2000

2) 服部信孝: パーキンソン病の分子遺伝学, 大脳基底核研究会, 霞ヶ浦, 7月14-15日, 2000

3) 服部信孝: 家族性パーキンソン病の分子遺伝学. 鳥取県東部医師会学術講演会, 鳥取, 11月24日.

4) 服部信孝: 家族性パーキンソン病の進歩, 第76回京滋神経セミナー, 京都, 12月1日

5) 服部信孝: AR-JP の原因遺伝子パーキンの変異解析およびその遺伝子産物の機能解析. 第41回日本神経学会総会, 松本, 5月24-26日, 2000

6) 服部信孝, 吉野浩代, 吉川睦子, 今道洋子, 久保紳一郎, 浅川修一, 蓑島伸生, 清水信義, 水野美邦: パーキン遺伝子の変異解析. 第41回日本神経学会総会, 松本, 5月24-26日, 2000

7) Hattori N, Shimura H, Kubo S, Wang M, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y. Parkin and parkin protein: a key to the understanding the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. 8th

International Winter Conference on Neurodegeneration Neurodegeneration and Neuroprotective Drugs at the Millennium, Minuch, Germany, Feb 9-11, 2000

8) Hattori N, Asakawa S, Minoshima S, Yoshino H, Yoshikawa M, Shimizu N, Mizuno Y. Mutational analysis for compound heterozygotes in AR-JP. 6th international congress of Parkinson's disease and movement disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000

9) Hattori N: Monotherapy of Permax, Agenda of Interactive Meeting at Erl Wood June 8, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他なし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編纂者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
M. Naoi, W. Maruyama Y. Akao, Y. Nakagawa, T. Tsutomu	Apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol: relevance to Parkinson's disease.	A. Storch and B. M. A. Collins	Neurotoxic factors in Parkinson's disease and related disorders	Kluwer Academic/ Plenum Publishers	New York	2000	77-89
J. Miura, Y. Uchigata, J-S. Gong, J. Zhang, Y. Iwamoto, K. Yagi, M. Tanaka	Mitochondrial genotype Mt5178C is associated with diabetic nephropathy in Japanese type-1 diabetic patients.	M. Shichiri, S. Shinn, N. Hotta	iDiabetes Mellitus: Recent Advances for the 21 st Century.	Elsevier Science	Tokyo	2000	271-274
田中雅嗣	ミトコンドリア心筋症	松永昭	目で見る循環器病(シリーズ14) 心筋症	Medical View 社	東京	2000	188-191

論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
M. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao, J. Zhang, H. Parvez	Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopamine neurons.	Toxicolog in y	153	123-141	2001
K. Oh-hashi, W. Maruyama, K. Isobe	Peroxyinitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	Free Rad. Biol. Med.	30	213-221	2001
W. Maruyama, A. A. Boulton, B. A. Davis, P. Dostert and Makoto Naoi	Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopaminergic SH-SY5Y cells: Suppression of apoptosis by N-(2-heptyl)-N-methylpropargylamine	J. Neural Transm.	108	11-24	2001
W. Maruyama, Y. Akao, M. Youdim, M. Naoi	Neurotoxin Induced Apoptosis in Dopamine Neurons: Protection by N-Propargylamine-1(R)- and (S)-aminoindan, Rasagiline and TV1022	J. Neural Transm.	(S) 60	171-186	2000
M. Naoi, W. Maruyama, T. Takahashi, Y. Akao, Y. Nagasawa	Involvement of endogenous N-methyl(R)salsolinol in Parkinson's disease: induction of apoptosis and prevention by (-)deprenyl.	J. Neural Transm. (Suppl)	58	111-121	2000
W. Maruyama, T. Yamamoto, K. Kitani, M. C. Carrillo, M. Youdim, M. Naoi	Mechanism underlying anti-apoptotic activity of a (-)deprenyl-related propargylamine, rasagiline.	Mech. Aging Dev.	116	181-191	2000

W. Maruyama, K. Sango, K. Iwasa, C. Minami, P. Dostert, M. Kawai, M. Moriyasu, M. Naoi	K. (3':4'-dihydroxybenzyl)-isouquinolines, cause different types of cell death in SH-SY5Y cells: apoptosis was induced by oxidized papaverolines and necrosis by reduced tetrahydropapaverolines.	Neurosci. Lett.	291	89-92	2000
M. Naoi, W. Maruyama, K. Yagi, M. B. H. Youdium	Anti-apoptotic function of L-(-)deprenyl (selegiline) and related compounds.	Neurobiol ogy	8	69-80	2000
W. Maruyama, Strolin-Benedetti, Naoi	N-Methyl(R)salsolinol and a neutral N-methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease.	Neurobiol ogy	8	55-68	2000
M.C. Carrilo, Minami, K. Kitani, W. Maruyama, K. Ohashi, T. Yamamoto, M. Naoi, S. Kanai, M.B.H. Youdim	Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in rat.	Life Sci.	67	577-585	2000
K. Sango, W. Maruyama, K. Matsubara, P. Dostert, C. Minami, M. Kawai, M. Naoi	Enantio-selective occurrence of (S)-tetrahydropapaveroline in human brain.	Neurosci. Lett.	283	224-226	2000

M. Tanaka, J.S. Gong, J. Zhang, Y. Yamada, H.-J. Borgeld, K. Yagi	Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mtDNA mutagenesis.	Mech. Age. Dev.	116	65-76	2000
W.S. Shin, M. Tanaka, J. Suzuki, C. Hemmi, T. Toyo-oka	A novel homoplasmic mutation in mt DNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy.	Am. J. Human Genetics	67	1617-1620	2000
H. Shimokata, Y. Yamada, M. Nakagawa, R. Okubo, T. Saido, A. Funakoshi, K. Miyasaka, S. Ohta, G. Tsujimoto, M. Tanaka, F. Ando, N. Niino	Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA).	J. Epidemiol	10	S46-55	2000
T. Kobayashi, M. Wang, N. Hattori, H. Matsumine, T. Kondo, Y. Mizuno	Exonic deletion mutations of the parkin gene among sporadic patients with Parkinson's disease.	Parkinsonism Related Disord	6	129-131	2000
J. Zhang, N. Hattori, N. Giladi, Y. Mizuno	Failure to find mutations in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in familial Parkinson's disease.	Parkinsonism Related Disord	6	199-200	2000

J. Zhang, N. Hattori, E. Leroy, H.R. Morris, S. Kubo, T. Kobayashi, N.W. Wood, M.H. Polymeropoulos, Y. Mizuno	Association Between a Polymorphism of Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) Gene and Sporadic Parkinson's Disease.	Parkinsonism Related Disorder	6	195-197	2000
H. Shimura, N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka, T. Suzuki	Familial parkinson's disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase.	Nature Genet.	25	302-305	2000
T. Urabe, Y. Yamasaki, N. Hattori, M. Yoshikawa, K. Uchida, Y. Mizuno	Accumulation of 4-hydroxyphenol-modified proteins in hippocampal CA1 pyramidal neurons precedes delayed neuronal damage in the gerbil brain.	Neuroscience	14	241-250	2000
T. Kitada, S. Asakawa, H. Matsumine, N. Hattori, H. Shimura, S. Minoshima, N. Shimizu, Y. Mizuno	Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism.	Neurogenetics	2	207-218	2000

N. Hattori, H. Shimura, S. Kubo, T. Kitada, M. Wang, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, T. Suzuki, K. Tanaka, Y. Mizuno	Autosomal recessive juvenile parkinsonism: a key to understanding nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease.	Neuropathology	(S) 5	S85-90	2000
T. Kitada, S. Asakawa, H. Matsumine, N. Hattori, H. Shimura, S. Minoshima, N. Shimizu, Y. Mizuno	Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism.	Neurogenetics	2	207-218	2000
N. Hattori, H. Shimura, S. Kubo, M. Wang, N. Shimizu, K. Tanaka, Y. Mizuno	Importance of familial Parkinson's disease and parkinsonism to the understanding of nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease.	J Neural Transm	(S) 60	S85-100	2000
Y. Yamamura, N. Hattori, H. Matsumine, S. Kuzuhara, Y. Mizuno	Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinicopathological characteristics and molecular genetic identification.	Brain Dev	(S) 22	S87-91	2000
丸山和佳子、直井信	内因性パーキンソン病発症物質の探索	日本薬理学会誌	116	333-342	2000
丸山和佳子、直井信	内因性黒質神経毒	神経研究の進歩	44	527-538	2000
丸山和佳子、直井信	パーキンソン病の機序：ドパミン神経細胞の変性機構を中心に	作業療法ジャーナル	34	873-877	2000

田中雅嗣	ミトコンドリアと老化	BIO Clinica	15	214-219	2000
田中雅嗣	トコソドリアからのメッセージ：長寿に関連したミトコンドリア遺伝子多型と成人発症性疾患	日本農芸化学会誌	74	783-786	2000
服部信孝	パーキンソン病の原因はどこまで明らかになったか-家族性パーキンソニズムの知見を中心に-	薬の知識	51	66-69	2000
服部信孝, 水野美邦	孤発型および家族性パーキンソン病の発症機構	脳21	3	189-198	2000
服部信孝, 志村秀樹, 久保伸一郎, 水野美邦	若年性パーキンソニズム	神経研究の進歩	44	555-566	2000
水野美邦, Zbigniew K. Wszolek, 服部信孝	家族性パーキンソン病	神経研究の進歩	44	539-555	2000
鈴木俊顕, 志村秀樹, 服部信孝	ユビキチンリガーゼParkinの機能不全による家族性パーキンソン病	細胞工学	19	1140-1141	2000
鈴木俊顕, 志村秀樹, 服部信孝	ユビキチンと神経変性疾患	実験医学	18	1148-1482	2000
久保伸一郎, 志村秀樹, 服部信孝, 水野美邦	パーキンソン病の分子医学	現代医療	32	115-122	2000
水野美邦, 服部信孝	Parkinson病研究の進歩	日本内科学会雑誌	89	264-270	2000
鈴木俊顕, 志村秀樹, 服部信孝	ユビキチンリガーゼParkinの機能不全による家族性パーキンソン病	細胞工学	19	1140-1141	2000
服部信孝, 水野美邦	若年性パーキンソニズムの最新情報第2部遺伝関係	難病と在宅ケア	6	14-18	2000
服部信孝, 志村秀樹	ユビキチンリガーゼとしてのParkinとParkinson病—家族性Parkinson病から孤発型Parkinson病へ—	実験医学	19	162-167	2000

20000151

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.31-37の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。