

# 平成 12 年度厚生科学研究費補助金

(脳科学研究事業)

総括・分担研究報告書

「パーキンソン病における神経細胞死の分子機構と  
その保護治療に関する研究 (H10-脳-007)」

主任研究者	永津	俊治
分担研究者	水野	美邦
	小川	紀雄
	久野	貞子

## パーキンソン病における神経細胞死の分子機構と その保護治療に関する研究

主任研究者：永津 俊治 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 所長

**研究要旨** パーキンソン病は、老人に多発する運動障害を伴う神経変性疾患である。黒質線条体系ドーパミンニューロンの変性機序を分子レベルで解明し、神経細胞を保護する根本的治療法を開発することを目的として研究を進めて、平成 12 年度に次の成果を得た。6-OH-ドーパミン(6OHDA)半側パーキンソン病ラットの傷害側黒質線条体にアポトーシス細胞死をおこすサイトカインの TNF- $\alpha$ が増加することを前報で報告したが、この TNF- $\alpha$ の増加はイムノフィリンリガンドの FK506 の投与によって完全に防止されて正常値となることを見出した。この成績は、パーキンソン病線条体で TNF- $\alpha$  などのアポトーシスをおこすサイトカインの増加は FK506 のようなイムノフィリンリガンドによって防止でき、パーキンソン病における神経細胞死を防ぐ新しいイムノフィリンリガンドの開発が可能であることを示す。また前報で、パーキンソン病及びモデル動物の黒質線条体部位に特異的に brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と nerve growth factor (NGF) の神経栄養因子類が著明に減少することを報告したが、in vitro の培養細胞系で黒質線条体ドーパミン神経に強力な神経保護作用をもつことが知られている glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は正常対照脳でも黒質線条体に特異的に高濃度に存在するが、パーキンソン病黒質線条体では GDNF や NGF の高度な減少と対照的に正常脳と比べて GDNF 濃度は変化がないことを見出した。この成績は、パーキンソン病では BDNF や NGF は代償的増加が充分でなくて高度に減少するのに対して、GDNF は代償機構が強く、パーキンソン病でも正常値を保つことを示し、GDNF を増加させる薬剤の開発がパーキンソン病の進行防止に有用であることが示唆された。遺伝的素因の研究では、水野グループは新しい遺伝子若年性パーキンソン病 (ARJP) の原因 *parkin* 遺伝子を見出したが、Parkin タンパク質はユビキチンリガーゼの一種であることを発見した。さらに Parkin タンパク質の基質の 1 つとしてシナプスにおける exocytosis を抑制するタンパク質の CDC-re11 を見出した。この成績は、若年性パーキンソン病は Parkin の欠損によりおこり、CDC-re11 の分解が阻害されて、神経終末にこれが蓄積し、ドーパミンの放出が傷害され、パーキンソンニズムの発現、酸化的ストレスによる細胞障害とそれに伴うアポトーシス経路の活性化を惹起する発症機構を示唆する。小川グループは細胞株を用いたイムノフィリンリガンドのアポトーシス防止作用の研究で、免疫抑制性 FK506 も非免疫抑制性 GPI1046 も共にアポトーシス抑制効果があり、アポトーシス抑制作用の一つの機構としてグリア細胞におけるグルタチオンの増加が関与することを示した。久野グループは、培養アストロサイトにおける神経栄養因子類を増加させる神経保護治療薬の開発の研究で、パーキンソン病治療薬でモノアミン酸化酵素 B 型の阻害薬である selegiline およびその代謝物の desmethylselegiline がドーパ神経保護作用をもつ神経栄養因子の NGF, BDNF, GDNF の産生を遺伝子、タンパク質の両レベルで刺激することを見出した。以上の成績は、パーキンソン病は遺伝性でも孤発性でも、酸性的ストレスによってサイトカイン類の増加と神経栄養因子類の減少をおこし、アポトーシス経路が活性化され、神経細胞死に至る可能性と、サイトカイン類の増加を抑制するイムノフィリンリガンドや神経栄養因子類を増加させる薬剤が神経保護作用によって病気の発症と進行を防ぐことを示唆する。

研究者・研究協力者

永津俊治（藤田保健衛生大学 総合医科学研究所）

一瀬宏

鈴木崇弘

稲垣秀人

大江瑞恵

茂木真希雄（愛知学院大学歯学部）

戸苅彰史

水野美邦（順天堂大学 医学部）

服部信孝

王梅

北田徹

後藤啓五

杉田之宏

望月秀生

小川紀雄（岡山大学 医学部）

田中健一

浅沼幹夫

久野貞子（国立療養所 宇多野病院）

太田光熙

山崎俊三

水田英二

A. 研究目的

パーキンソン病は、高齢者に多発するアルツハイマー病について多い神経変性疾患であり、本邦における患者数は約 12 万と推定されさらに増加していくことが予測される。本疾患の特徴である錐体外路性運動障害は、黒質線条体系ドーパミン作動性ニューロンの選択的変性によりおこる。したがってその治療はドーパミンニューロンの機能の改善を基本とする。L-DOPA 及びドーパミンアゴニストによる、欠乏している神経伝達物質ドーパミンの補充療法は、症状の顕著な改善をもたらす。しかし、このドーパミン補充療法はあくまで対症療法であり、年余にわたる長期療法では約半数の患者で薬物効果不安定、異常不随意運動（ジスキネジア）、精神症状（幻覚・妄想）が出現し、患者・家族・社会に計り知れない負担を強いている。このために、L-DOPA 療法に代わる根本的治療法を開発することは、高齢者社会を迎えつつある日本にとって、緊急かつ重要な課題である。

本研究は、パーキンソン病の原因を分子レベルで解明し、ドーパミンニューロンの変性を予防阻止しあるいはドーパミンニューロンを保護する治療法を開発することを目的としている。パーキンソン病の病態が解明され、病気の進行を抑制することが可能になれば、患者本人の Quality of Life (QOL)を改善するだけでなく、看護する家族の負担を減らし、結果として医療経

済上の大きいメリットを生ずることが期待される。

本研究の特色は、これまでパーキンソン病の原因解明と神経細胞保護療法に最も活発に取り組んできた我が国の第一線の研究者が協力して、神経細胞死に最も寄与する因子を分子レベルで解明しつつ、その結果を踏まえた細胞保護療法の基礎的検討を行おうとするものである。比較的短期間に大きな成果が期待できる共同研究である。

永津グループ（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）は、1994 年より世界で最初にパーキンソン病患者の死後脳と脳室—脊椎—脳脊髄液で、サイトカイン類(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, TGF- $\alpha$ ,TGF- $\beta$ 1, EGF),アポトーシス関連タンパク質(bcl-2, soluble Fas)の増加を見出し、パーキンソン病の神経細胞死の原因に、サイトカインによる免疫反応とそれに続いておこる apoptosis が関連する可能性を報告してきた。平成 10 年度の研究で、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)パーキンソン病マウスと 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラットの 2 種の動物モデルで、線条体に IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ の著明な増加を見出した。また L-DOPA の連続投与では6-OH-ドーパミン注入による線条体の著明な TNF- $\alpha$ の増加は影響されないこと、従ってパーキンソン病線条体での TNF- $\alpha$ などのサイトカイン類の増加は治療薬の L-DOPA の二次作用

ではなくて、パーキンソン病の原因と関連することを示した。さらに平成 11 年度の研究で、パーキンソン病脳黒質線条体部位に特異的に神経栄養因子の BDNF と NGF が著明に減少していること、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の受容体 TNF-receptor 1 が増加していること、従ってアポトーシス経路が活性化されていることを示した。またアポトーシス経路の下流に存在するアポトーシス実行酵素である caspase 1 と caspase 3 の活性が有意に増加していることを見出した(Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A, J Neural Transm [Suppl] 60: 277-290, 2000)。

水野グループ(順天堂大学医学部)はパーキンソン病の発症機序に関して、ミトコンドリア複合体 I の低下のあることを早くから見つけ、さらに酸化ストレスの関与を黒質細胞レベルで証明し、また遺伝素因に関しても世界をリードする発表を行ってきた(Mizuno Y et al, Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum Press, New York: pp. 393-399, 1998)。平成 10 年度の研究で、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニットの遺伝子多型がパーキンソン病発症の遺伝的危険因子の 1 つになることを示した。また、酸化ストレスにより黒質の核酸障害がおこることを、8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG)とその修復酵素 8OHdGTPase の増大することから立証した。さらに日本で見出された常染色体劣性遺伝の家族性若年性パーキンソン病(AR-JP)の原因遺伝子として、新しい遺伝子 *parkin* を発見した(Kitada T et al, Nature 392: 605-608, 1998)。その後の若年性パーキンソン病の水野グループによる国際的研究によって 100 種をこえる *parkin* 遺伝子の変異が発見されて、パーキンソン病の原因に大きな手がかりを与える発見として世界の注目をあびている。

小川グループ(岡山大学医学部)は、パーキンソン病モデル動物、培養細胞、*in vitro* 実験系などを用いて、神経変性機序ことにフリーラジカルや一酸化窒素消去薬の検定法を確立し、さらに「緩徐進行性」のドーパミン神経障害をイムノフィリン結合免疫抑制薬サイクロスポリン

A が阻止することを初めて報告した(Matsuura K et al, Neurol 146: 526-535, 1997)。平成 10 年度の研究で、免疫抑制作用のあるイムノフィリンリガンドの FK506 やサイクロスポリン A は、酸化ストレスをおこす過酸化水素による細胞死を有意に抑制することを示した。平成 11 年度の研究で免疫抑制作用をもつ FK506 も、その誘導体で免疫抑制のない GPII046 も共に細胞死を抑制することを報告した。

久野グループ(国立療養所宇多野病院)は、アポトーシスを防ぐ神経栄養因子である、BDNF と NGF のパーキンソン病剖検脳での変化と神経保護作用への臨床応用を研究してきた。平成 10 年度の研究で、ドーパミン神経毒 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)によるパーキンソン病サルで、黒質のドーパミン神経における細胞死を示すチロシン水酸化酵素の免疫染色の低下よりも先行して glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の免疫染色が低下するので、MPTP によるドーパミン神経細胞死に先行して、ドーパミンニューロン内の神経栄養因子 GDNF が低下することを示唆した。平成 11 年度の研究でドーパミン受容体アゴニストのパーキンソン病治療薬 apomorphine がアストログリアの培養細胞系で、前記のようにパーキンソン病死後脳の黒質で著明に減少することを永津グループがパーキンソン病脳線条体で減少を発見した神経栄養因子である NGF と BDNF の mRNA とタンパク質とを著明に増加させること、従って神経保護作用の可能性を見出した。

この 4 グループが密接に協力して、パーキンソン病の神経細胞死の原因の *parkin* 遺伝子、サイトカインや神経栄養因子による分子レベルでの解明から、神経栄養因子を増加させる薬剤、免疫抑制薬・イムノフィリン結合薬による神経細胞の保護療法にいたる、原因と治療の新しい解明と確立をめざして国際的に先駆的で独創的な研究を進めている。

## B. 研究方法

1) 永津グループ(藤田保健衛生大学 総合医科学研究研究所)は対照正常脳とパーキンソン病死後脳について初めて神経栄養因子 GDNF の脳内分布を測定した。パーキンソン病死後脳は、水野グループ(順天堂大学医学部)と久野グループ(国立療養所宇多野病院)と共同して集めた神経疾患が全くない対照(14例)、パーキンソン病(15例)の剖検材料を使用した。対照例は男性6例、女性8例で、平均年齢60.8(24-82)年、パーキンソン病例は男性12例、女性3例で、平均年齢69.7(51-84)年で罹患期間は16.9年であった。Postmortem timeは、対照例9.5(3-18)時間、パーキンソン病例6.5(4-13)時間であった。脳は5mmの前頭断切片として、黒質、尾状核、被殻、小脳、前頭葉を切り出し-80℃に凍結した。脳組織は0.32 M sucrose/100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)/ leupeptin, pepstatin, antipain 各50 μg/ml でホモジネートとした。さらに lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperadine-N-2-ethansulfonic acid (HEPES·pH 7.5)で可溶化した。我々の確立した高感度酵素免疫測定法によって GDNF を測定した(Mogi M et al, Anal Biochem 138: 125-132, 1984)。

6-OH-ドーパミンの一側線条体注入による半側パーキンソニズムラットの作製は共同で小川グループの方法によった(Matsuura K et al, Exp Neurol 146: 526-534, 1997)。この方法では黒質線条体ドーパミンニューロンはゆるやかな変性をおこし、ドーパミンが減少し半側パーキンソニズムの症状の回転運動をおこした。この半側パーキンソン病ラットにおける黒質ドーパミンニューロンの TNF-α の傷害側の増加は平成10年度に報告した(Mogi M et al, Neurosci Lett 268: 101-104, 1999)が、イムノフィリンリガンド FK506 が TNF-α の増加を抑制するかどうかを検討し

た。FK506 (0.5, または 4 mg/kg/day) を 6-OH-ドーパミン注射後 14 日目に回転運動をおこすラットを選択して、21 日目より 2 週間連続して皮下注射した。実験群は:(1)対照群、(2)6-OH-ドーパミン処置群、(3)FK506 (0.5 mg/kg) 処置+6-OH-ドーパミン処置群、(4)FK506 (4 mg/kg) 処置+6-OH-ドーパミン処置群、の 4 群に分けた。6-OH-ドーパミン処置群のラットの線条体のドーパミンとその代謝物ジヒドロキシフェニル酢酸の濃度は対照側の 5% 以下であることを確認した。TNF-α 濃度は我々の確立した高濃度酵素免疫測定法により測定した。

2) 水野グループ(順天堂大学医学部)は、平成10年度の研究で発見した若年性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* がユビキチンリガーゼであることを発見したので、Parkin タンパク質とユビキチン結合酵素の有無、Parkin タンパク質による未知のタンパク質のポリユビキチン化の有無を免疫沈降とイムノブロットによって解析した。HFK293 細胞と SH-SY5Y 細胞で、Myc-tag *parkin* 遺伝子と FLAG-tag ubiquitin conjugate enzyme (UBC) 遺伝子を大量発現させて、細胞抽出物を抗 Myc 抗体で免疫沈降し、沈降物の FLAG 抗体を結合した UBC を抗 FLAG 抗体でイムノブロットにより検索した。In vitro ubiquitination assay は、proteasome 阻害薬 MG132 存在下に、Myc-tag *parkin* 遺伝子と FLAG-tag ubiquitin を上記の細胞で大量発現させ、抗 Myc 抗体で免疫沈降し、沈降物の ubiquitin を結合した FLAG を抗 FLAG 抗体でイムノブロットより検出した。Parkin タンパク質の探索は Yeast two hybrid system を用いて検討した。詳細は水野の報告に記載されている。Parkin タンパク質の細胞内局在は、ヒト脳 mRNA から RT-PCR で増幅した *parkin* 遺伝子断片を用いて、Myc または GFP との融合タンパク質の発現ベクターを構築して、各種の細胞に形質導入し、細胞遠心画分の免疫沈降後に immunoblot や in

in vitro ubiquitination assay, 培養細胞の免疫組織化学の共焦点レーザー顕微鏡による観察、またラットシナプス小胞の分離の後に免疫電顕による観察を行った。

孤発型パーキンソン病における関連分析として、優性遺伝家族性パーキンソン病の原因遺伝子候補の ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) 遺伝子との関連を、白血球から genomic DNA を抽出して UCH-L1 遺伝子のエキソン3をPCRで増幅して、*Rsa*I で切断し電気泳動で解析した。

- 3) 小川グループ(岡山大学医学部)は、 $H_2O_2$  による神経・グリア細胞死に対するイムノフィリンの保護効果を、ニューロブラストーマ(Neuro 2A)とグリオーマ(C6)の培養細胞系で、細胞生存率、Hoechst 33342 核染色による apoptosis の有無、DTNB 法による細胞内グルタチオン(GSH)濃度から評価した。

ドーパミン(DA)によるアポトーシスと関連分子の動態に及ぼす影響とその防御法の探索のために、SH-SY5Y 細胞の培養系で、DAトランスポーター阻害薬GBR12909、SOD、カタラーゼ、GSH の効果を、アポトーシスのHoechst 33342による検出、p53, Bax, Bcl-2のWestern blotとRT-PCRによる解析で検出した。

パーキンソン病モデルマウスについて、イムノフィリンリガンドのFK506, GPI1046を投与してその効果を、GSH量、GSH合成酵素mRNA量、カタラーゼとSODの活性、脂質過酸化反応、ドーパミン量より評価した。

- 4) 久野グループ(国立療養所宇多野病院)は、培養マウスアストログリア細胞で、培養上清中の神経栄養因子NGF, BDNF, GDNFタンパク質量を酵素免疫法で測定し、mRNA量を半定量的RT-PCR法で測定した。

パーキンソン病患者と対照者を比較して、PCR法でIL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10, TGF $\beta$ 1, MCP-1, CCR-2の遺伝子多型を解析した。

## C. 研究結果

- 1) 永津グループは、1994年世界で最初にパーキンソン病死後脳の線条体、脳脊髄液にTNF- $\alpha$ が増加していることを報告した(Mogi M et al, Neurosci Lett 165: 208-210, 1994)。それ以来IL-1 $\beta$ , IL-6等の炎症性サイトカインの増加と、BDNFとNGFの神経栄養因子の著明な減少とをパーキンソン病患者の死後脳や脳脊髄液、MPTPパーキンソン病マウスや6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラットの動物モデルで立証した。これらの成績より、パーキンソン病は、素因遺伝子に神経毒など酸化ストレスをおこす環境因子が重なって炎症性サイトカインの増加と神経栄養因子の減少によって黒質線条体部位に特異的にアポトーシス経路の活性化が起こり神経細胞死に至る、とのパーキンソン病のアポトーシス仮説を提唱して研究を進めてきた。

平成11年度の研究で、永津グループは、水野グループおよび久野グループと共同して、臨床的に十分に検討されたパーキンソン病死後脳と対照脳の供与をうけて、パーキンソン病死後脳を対照脳と比較して、神経栄養因子のBDNFとNGFの脳内分布を測定した。その結果、BDNFは黒質線条体部位にng/mg proteinの高濃度存在し、NGFはpg/mg proteinの低レベルで大脳皮質に多く黒質線条体に低い脳内分布をしているが、BDNFもNGFもパーキンソン病脳黒質線条体部位に特異的に著明に減少していることを見出した。平成12年度の研究で、ドーパミン神経細胞の維持に特異的に働くGDNFの正常対照脳とパーキンソン病脳での脳内分布を初めて測定した。GDNFの脳内分布は、対照正常脳でもパーキンソン病脳でもpg/mg proteinのレベルでBDNF量よりは低かったが、黒質線条体に高濃度に分布していた。BDNFやNGFと比べて大きく異なったのは、GDNF濃度は対照脳もパーキンソン病脳も、黒質、尾状核、淡蒼球の線条体の部位でも、大脳皮質や小脳でも全く差がない点であった。さらに脳室脳脊髄

液と脊椎脳脊髄液の BDNG の濃度を対照正常者群とパーキンソン病患者群とで測定したが、8 pg/ml 以下と測定感度の限界値であり、有意な変化は見出さなかった。

6-OH-ドーパミンの一側線条体注入による半側パーキンソニズムラットで傷害側の線条体で炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 濃度が著明に増加することを平成 10 年度の研究で報告した。この TNF- $\alpha$ の増加が、抗炎症作用のあるイムノフィリンリガンド FK506 で抑制されるかどうかを検索した。その結果、前報と一致して 6-OH-ドーパミンによる半側パーキンソン病ラットのモデルで傷害側の黒質線条体に特異的に TNF- $\alpha$ が増加したが、FK506 の投与により TNF- $\alpha$ の増加は抑制されて完全に正常値にもどることが見出された。

常染色体優性遺伝の hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation / DOPA responsive dystonia (HPD/DRD, 瀬川病)の原因遺伝子がドーパミン合成の第一律速酵素チロシン水酸化酵素の補酵素テトラヒドロピオプテリンの合成律速酵素 GTP シクロヒドロラーゼ I の変異によることを 1994 年に報告した(Ichinose H et al., Nature Genet 8, 236-242, 1994)。HPD/DRD は線条体ドーパミン欠乏症である点はパーキンソン病と同じであるが、神経細胞死はおこらず、L-DOPA の内服でジストニアの症状は完全になくなる。1995 年にドイツで常染色体劣性遺伝の DOPA responsive dystonia (AR-DRD)の原因遺伝子はチロシン水酸化酵素であり、一アミノ酸の変異で、活性が 15%に減少するとジストニアの症状をおこし、1.5%に減少するとパーキンソン病様症状を示すと報告された(Lüdecke B, Human Genet 95: 123-125, 1995; Lüdecke B et al, Hum Mol Genet 5, 1023-1028, 1996; Ichinose H et al, Biol Chem 380, 1355-1364, 1999)。AR-DRD も神経細胞死はおこらず L-DOPA の内服でジストニアやパーキンソニズムの症状は完全に消失すると報告された。

オランダの Janssen ら(Janssen R.J.R.J. et al,

Ann Human Genet, 64: 375-382, 2000)と共同して、オランダの一家系で重症なパーキンソニズムの症状を示して、チロシン水酸化酵素のエクソン 12 の欠失による 32 アミノ酸が欠失、イントロン 11 の 36 塩基の残存による 12 アミノ酸の挿入を見出した。この家系の患者の症状は L-DOPA で改善しなかったので DRD とは異なると考えられる。

- 2) 水野グループ(順天堂大学医学部)は、平成 10 年度の研究で、劣性遺伝・家族性若年性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* を発見し、平成 11 年度の研究で、Parkin タンパク質は軸索輸送に關与するタンパク質で、その欠損が黒質の変性に深く関わっていることが示唆された。本年度の研究で Parkin タンパク質は ubiquitin ligase E3 であることが明らかになった。Parkin タンパク質の基質探索を yeast two hybrid method で行い、シナプスタンパク質の一種である CDC-re11 が基質の候補の一つであることを明らかにした。さらに Parkin タンパク質の細胞内局在を検討したところ、Golgi 装置とシナプス小胞に存在することがわかった。

また Parkin タンパク質に変異がある若年性パーキンソン病の黒質に著明な鉄の沈着を見出して、酸化的ストレスの可能性を立証した。孤発型パーキンソン病の遺伝的危険因子に関する研究では、ubiquitin terminal hydrolase-L1 遺伝子のエクソン 3 に存在する遺伝子多型が、日本人においては弱いながらパーキンソン病に対する保護因子になることが明らかになった。

- 3) 小川グループ(岡山大学医学部)は、イムノフィリンリガンドによるドーパミン神経細胞の保護効果について研究を進めている。本年度の研究で、異なったタイプの細胞株を用いて、免疫抑制力のあるイムノフィリンリガンド FK506 と、非免疫抑制性のイムノフィリンリガンド GPI1046 とを比較して、培養細胞系で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により誘導したアポトーシスについて、細胞生存率とアポトーシス抑制作用と

を検索したところ、FK506 も GPII046 もどちらも細胞生存率を上昇させてアポトーシスを防ぐ効果を示し、GSH 濃度の増加が認められた。また GSH 増加作用はグリオーマがより強い効果を示すことから、イムノフィリンリガンドの神経細胞保護作用はグリア細胞を介して発揮されることが示唆された。またドーパミンのアポトーシス関連分子に及ぼす影響を検索したところ、ドーパミンは p53 や Bax を介するアポトーシス様細胞死を惹起させるが、GSH の同時添加によってドーパミンが引き起こすアポトーシスが抑制された。

in vivo でのイムノフィリンリガンドの神経細胞保護効果の作用機序を明らかにする実験として、FK506 と GPII046 を 7 日間投与したマウスの線条体で脂質過酸化が有意に抑制されることを見出した。カタラーゼや SOD 活性には有意な変化はみられなかった。他方 GSH 合成酵素の遺伝子発現が亢進していた。

- 4) 久野グループ (国立療養所宇多野病院) は、平成 11 年度の研究でドーパミン神経細胞死を抑制し、その保護治療に効果があると考えられる神経栄養因子類 GDNF と NGF の変化を MPTP パーキンソン病サルで検索して、GDNF が黒質神経細胞死の機序に関与することを示唆した。またパーキンソン病治療薬として用いられているドーパミン受容体アゴニストの apomorphine が、培養アストログリア細胞で NGF の分泌量を約 100 倍に、GDNF の分泌量を約 2 倍に増加させることを示した。

本年度の研究で、培養アストログリア細胞系で、パーキンソン病治療薬でモノアミン酸化酵素 B 型の阻害薬である selegiline (deprenyl)、およびその代謝産物である desmethyl selegiline が、神経栄養因子類の NGF、BDNF、GDNF の mRNA とタンパク質量を増加させることを見出した。24 時間後に NGF 分泌量は 26 倍、BDNF 分泌量は約 2 倍、GDNF 分泌量は約 4 倍に増加した。desmethylselegiline の効果は selegiline よりも弱い傾向にあった。

パーキンソン病における炎症性サイトカイ

ン TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の遺伝子多型を解析したところ、若年発症パーキンソン病群では TNF- $\alpha$  分泌亢進アリルが有意に増加していた。また IL-1 $\beta$  分泌低下アリルのホモ群は、分泌亢進アリルのホモ群に比べて有意に発症年齢が低かった。

#### D. 考察

永津グループ (藤田保健衛生大学総合医科学研究所) は、パーキンソン病における黒質線条体ドーパミン神経に特異的な神経細胞死は、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカイン類の増加、BDNF や NGF の神経栄養因子の減少に伴って引き起こされるアポトーシス環境 (proapoptotic environment) が黒質線条体部位におこり、その結果として黒質線条体ドーパミン神経細胞の選択的細胞死がおこるとの仮説に立って、それを立証する生化学的変化と、神経保護再生の治療をめざして研究を進めてきた。平成 11 年度までの研究で、神経栄養因子の BDNF と NGF がパーキンソン病剖検脳の黒質線条体部位に特異的に高度に減少していることを報告した。BDNF は ng/mg protein レベルと脳内濃度が高く、黒質線条体に豊富であった。BDNF は in vitro 系でドーパミン神経に特異的な保護作用が知られている。NGF の脳内濃度は pg/mg protein と、BDNF と比べて低く、しかも大脳皮質に多く分布しており黒質線条体では分布が少なかったにも拘わらずパーキンソン病剖検脳では黒質線条体部位に特異的に著明な減少がみられた。

本年度の研究でさらに、神経栄養因子の中でもドーパミン神経に強力な保護作用があると報告されている GDNF の脳内分布を対照正常脳とパーキンソン病脳とで測定した。GDNF は NGF と似て pg/mg protein のレベルであったが、NGF と異なり黒質線条体に分布が豊富で大脳皮質や小脳には分布が少なかった。さらに BDNF や NGF と異なって、対照脳とパーキンソン病脳で、黒質線条体部位に全く有意差がなかった。この成績は、神経栄養因子類の BDNF や NGF はパーキンソン病では代償が十分に働かずに高度に減

少しているのに対して、GDNF は代償作用が強力に働いてパーキンソン病でも減少がみられないことを示唆している。

久野グループ（国立療養所宇多野病院）の培養アストログリア細胞を用いた神経栄養因子のアッセイ系では、パーキンソン病治療薬の apomorphine（ドーパミン受容体アゴニスト）や selegiline（モノアミン酸化酵素 B 型阻害薬）は NGF, BDNF, GDNF の mRNA とタンパク質量を増加させる。従って、これまでドーパミンの代わりにドーパミン受容体を刺激するドーパミン受容体アゴニストとして有効と考えられた apomorphine や、ドーパミンのモノアミン酸化酵素 B 型による分解を阻止して有効であると考えられた selegiline は、神経栄養因子類を増加させることにより神経保護作用によって有効である可能性がある。神経栄養因子類はタンパク質で血液脳関門を通過せず治療に用いることに困難がある。apomorphine や selegiline のように神経栄養因子を増加させるより強力な薬剤が開発されれば、パーキンソン病の進行、さらには発症までも抑制できる可能性が考えられる。

永津グループの今年度の研究で 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病モデルの傷害側の線条体における TNF- $\alpha$  の増加が免疫抑制作用をもつ イムノフィリンリガンド FK506 の投与で完全に正常化されることが立証された。この成績は TNF- $\alpha$  の増加がパーキンソン病の原因に関係しており、FK506 のような免疫抑制作用のあるイムノフィリンリガンドがパーキンソン病における神経細胞死を防ぎ保護治療に有効であることを示唆する。他方、本年度の小川グループ（岡山大学医学部）の成績では、イムノフィリンリガンドで、免疫抑制作用のある FK506 も免疫抑制のない GPI1046 も、共にアポトーシス抑制効果があることが示された。FK506 のような免疫抑制作用はイムノフィリンリガンドがカルシニューリンを阻害して IL-2 の産生を阻害することによる。他方、FK506 は脱リン酸化によって活性化されてアポトーシスをおこすリン酸化 BAD を脱リン酸化するカルシニューリンを阻害して

直接にアポトーシスを阻害する作用がある。

パーキンソン病の黒質線条体で免疫反応がおこっているか否かについては未だ明らかでない。我々の報告してきた、パーキンソン病患者脳脊髄液のビオプテリン（主にドーパミンニューロンのテトラヒドロビオプテリン由来）の高度減少に対するネオプテリンの相対的増加（活性化されマイクログリア由来）、 $\beta$ 2-microglobulin (MHC-I light chain) の線条体における増加は免疫反応によって黒質線条体で microglia が活性化されてサイトカイン類を放出して、アポトーシス経路が活性化されて、神経細胞死に至る "apoptosis hypothesis" を支持する。

水野グループの若年性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の発見と、Parkin タンパク質の ubiquitin ligase E3 であることの発見は、国際的に極めて独創性と重要性の高い発見である。現在世界的にパーキンソン病における *parkin* 遺伝子と Parkin タンパク質の激しい競争の研究がおこっている。今年までの水野グループの成績は Parkin タンパク質の欠失や変異はシナプスタンパク質の CDC-rel1 の神経終末部に蓄積をおこしドーパミンの放出を障害し、パーキンソン病の発現、酸化ストレスによる細胞障害をおこすことを示している。CDC-rel1 のようなシナプスタンパク質の蓄積と孤発例パーキンソン病におけるサイトカイン類の増加ないしは神経栄養因子類の減少との関係は今後に残された問題である。"death receptor" から "death signal pathway" を介するアポトーシスには種々の経路があるので Parkin タンパク質の欠失・変異はどこかでアポトーシス経路につながっていると推定される。95% のパーキンソン病は遺伝の明らかでない孤発例であるが、水野グループによる若年性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の発見と Parkin タンパク質が ubiquitin ligase E3 であることの発見は、孤発例パーキンソン病の原因解明と神経保護治療の開発に大きい手がかりとなるものである。最も考えられるのは孤発例パーキンソン病の黒質線条体ドーパミン神経部位における酸化ストレスである。水野らは若年性パーキン

ソン病の黒質に高度の鉄の沈着を見出して、酸化的ストレスの可能性を示した。

パーキンソン病の神経細胞死がアポトーシスであり、microglia activation が関係するとしても、サイトカイン類の増加と神経栄養因子類の減少はまずニューロンかグリアかのいずれかから起こるかの問題が残されている。これはサイトカイン類や神経栄養因子類の変化が原因なのかそれとも神経細胞死を防ぐ代償機構による結果なのかとの疑問点にも関連する。microglia activation は神経保護作用をもつ神経栄養因子類も生産するし、また神経障害作用をもつサイトカイン類も生産する。

#### E. 結論

永津グループは 1994 年以來、パーキンソン病剖検脳とパーキンソン病モデル動物 (MPTP パーキンソン病マウスや 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラット) の脳 (線条体) で、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの増加、神経栄養因子 NGF, BDNF の減少、アポトーシス関連タンパク質 sFas, Bcl-2, TNF 受容体 TNF-R1 の増加、caspase 1 と caspase 3 の活性の増加などアポトーシス経路の上流より下流に至る因子の変化を立証した。平成 12 年度の研究で、ドーパミン神経の強力な保護効果のある神経栄養因子 GDNF が変化しないこと、おそらくこれは GDNF の代償的増加が強いことを示すことを報告した。また 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラットの傷害側の線条体の TNF- $\alpha$  の増加は、免疫抑制作用のあるイムノフィリンリガンド FK506 で完全に阻止され正常値となること、従って FK506 のような免疫抑制性イムノフィリンリガンドがパーキンソン病の治療薬となりうることを示した。

水野グループは、劣性遺伝若年性パーキンソン病の原因遺伝子として発見した *parkin* の産物 Parkin タンパク質は、ubiquitin ligase E3 であり、その基質であり Parkin の変異による活性低下によって蓄積が推定されるタンパク質の一つはシナプスタンパク質の CDC-re11 であることを明ら

かにした。さらに Parkin タンパク質の細胞内局在を検討して Golgi 装置とシナプス小胞に存在することを明らかにした。これらの成績は孤発例パーキンソン病が apoptosis によりおこるとの仮説にも重要な示唆を与えるものである。

小川グループはイムノフィリンリガンドで免疫抑制性のある FK506 も免疫抑制作用のない GPI1046 も共に、apoptosis を抑制し、その機序の一つとしてグルタチオン(GSH)の増加による可能性を示唆した。パーキンソン病の神経細胞死がアポトーシスであるとしても、免疫反応があるか否かは残された問題であるが、イムノフィリンリガンドのドーパミン神経保護作用の機序の解明と共に新しい神経保護作用のあるイムノフィリンリガンドの治療薬の開発に道を開く成果である。

久野グループはドーパミン受容体アゴニストのパーキンソン病治療薬 apomorphine と共に、selegiline (モノアミン酸化酵素 B 型阻害薬) が、神経栄養因子の NGF, BDNF, GDNF をグリア細胞で著明に増加させることを示し、神経栄養因子の増加による神経保護作用によって治療効果のあることを示唆した。神経栄養因子を増加させるパーキンソン病の神経保護による新しい治療薬の開発が期待される。

#### F. 研究発表

主任研究者の研究発表。

分担研究者の研究発表は各分担研究報告に記載。

##### 1. 論文発表

Nakashima, A., Hayashi, N., Mori, K., Kaneko, S.Y., Nagatsu, T., Ota, A. (2000). Positive charge intrinsic to Arg<sup>37</sup>-Arg<sup>38</sup> is critical for dopamine inhibition of the catalytic activity of human tyrosine hydroxylase type 1. FEBS Lett., 465, 59-63.

P. Foley, Mizuno, Y., Nagatsu, T., Sano, A., M. Youdim, P. McGeer, E. McGeer, P. Riederer (2000). The L-DOPA story — an early Japanese contribution. Parkinsonism and Related Disorders, 6, 1-6.

- Kobayashi, K., Noda, Y., Matsushita, N., Nishii, K., Sawada, H., Nagatsu, T., Nakahara, D., Fukabori, R., Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Miura, M., Kano, M., Miyama, T., Miyamoto, Y., Nabeshima, T. (2000). Modest neuropsychological deficits caused reduced noradrenaline metabolism in mice heterologous for a mutated tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurosci.*, 20, 2418-2426.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J. Neural Transm.*, 107, 335-341.
- Hibiya, M., Ichinose, H., Ozaki, N., Fujita, K., Nishimoto, T., Yoshikawa, T., Asano, Y., Nagatsu, T. (2000). Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 740, 35-42.
- Nakano, N., Higashiyama, S., Kajihara, K., Endo, T., Ishiguro, H., Yamada, K., Nagatsu, T., Taniguchi, N. (2000). NTAK $\alpha$  and  $\beta$  isoforms stimulate breast tumor cell growth by means of different receptor combinations. *J. Biochem.*, 127, 925-930.
- Shen, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Fan, D.-S., Ogawa, M., Urabe, M., Kume, A., Nagatsu, I., Urano, F., Suzuki, T., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Nakano, I., Ozawa, K. (2000). Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Human Gene Therapy*, 11, 1509-1519.
- Usukura, J., Nishizawa, Y., Shimomura, A., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Hagiwara, M. (2000). Direct imaging of phosphorylation-dependent conformational change and DNA binding of CREB by electron microscopy. *Genes to Cells*, 5, 515-522.
- Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R.J., Pastan, I., Nakanishi, S. (2000). Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289, 633-637.
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., Nagatsu, T. (2000). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neurosci. Lett.*, 289, 165-168.
- Tazawa, M., Ohtsuki, M., Ichinose, C., Shiraishi, H., Kuroda, R., Hagino, Y., Nakashima, S., Nozawa, Y., Ichinose, H., Nagatsu, T., Nomura, T. (2000). GTP cyclohydrolase I from *Tetrahymena pyriformis*: cloning of cDNA and expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 127, 65-73.
- Ichinose, H., Inagaki, H., Suzuki, T., Ohye, T., Nagatsu, T. (2000). Molecular mechanisms of hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation, Segawa's disease. *Brain and Development*, 22, S107-S110.
- Yamada, K., Ichino, N., Nishii, K., Sawada, H., Higashiyama, S., Ishiguro, H., Nagatsu, T. (2000). Characterization of the human NTAK gene structure and distribution of the isoforms for rat NTAK mRNA. *Gene*, 255, 15-24.
- Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H., Tsuji, S. (2000). Expanded polyglutamine stretches interact with TAF<sub>II</sub>130, interfering with CREB-dependent transcription.

- Nature Genet., 26, 29-35.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. (2000). Cytokines in Parkinson's disease. *J. Neural Transm., [Suppl]* 58, 143-151.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm., [Suppl]* 60, 253-266.
- Kobayashi, K., Nagatsu, T. (2000). Transgenic rescue of tyrosine hydroxylase-deficient mice: application for generating animal models with catecholamine dysfunction. In : *Progress in Gene Therapy-Basic and Clinical Frontiers*. R. Bertolotti, S.H. Parvez, T. Nagatsu (Ed.). VSP, Utrecht, The Netherlands, pp. 267-288.
- Nagatsu, T. (2000). Isoquinoline neurotoxins. In : *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders*. A. Strech, MA. Collin (Eds.) Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 69-76.
- Janssen, R.J.R.J., Wevers, R.A., Häussler, M., Luyten, J.A.F.M., Steenbergen-Spanjers, G.C.H., Hoffmann, G.F., Nagatsu, T., van den Heuvel, L.P.W.J. (2000). A branch site mutation leading to aberrant splicing of the human tyrosine hydroxylase gene in a child with severe extrapyramidal movement disorder. *Ann. Hum. Genet.*, 64, 375-382.
- Orleans, USA, November 4-9.
- Nakashima, A., Hayashi, N., Mori, K., Kaneko, Y.S., Nagatsu, T., Ota, A. (2000). Arg-37-Arg-38 is critical for dopamine inhibition of the catalytic activity of human tyrosine hydroxylase. Society for Neuroscience, 2001, 30<sup>th</sup> Annual Meeting, New Orleans, USA, November 4-9.
- Zabetian, C.P., Anderson, G.M., Gelertner, J., Ichinose, H., Nagatsu, T., Malison, R.T., Cubells, J.F. (2000). Molecular genetics of the human very low dopamine  $\beta$ -hydroxylase trait. Society for Neuroscience 2001, 30<sup>th</sup> Annual Meeting, New Orleans, USA, November 4-9.
- Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., Kurosawa, Y., Matsushita, N., Kobayashi, K., Goto, T., Kanazawa, Y., Nagatsu, T. (2001). Somatic instability of CAG repeat occurs in the HD gene knock-in mouse. American Society of Human Genetics, 5<sup>th</sup> Annual Meeting, Pennsylvania, Philadelphia, USA, October 3-7.

## 2. 学会発表

- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. 8<sup>th</sup> International Winter Conference on Neurodegeneration, Tegernsee, Germany, February 9-13.
- Ota, M., Nakashima, A., Ikemoto, K., Koga, H., Okuda, M., Nojima, S., Tanaka, M., Takeuchi, H., Mori, K., Kaneko, Y., Yamamoto, H., Nagatsu, T., Ota, A. (2000). Sequence analysis of human tyrosine hydroxylase gene exon 3 of Japanese patients with schizophrenia. Society for Neuroscience 2001, 30<sup>th</sup> Annual Meeting, New

## パーキンソン病の遺伝的素因と黒質変性機序

分担研究者 水野 美邦 順天堂大学医学部教授

### 研究要旨

パーキンソン病の発症機序に関し、我々のグループで遺伝子クローニングに成功した常染色体性劣性遺伝の若年性パーキンソン病（ARJP）の原因であるパーキン遺伝子の遺伝子産物であるパーキン蛋白の機能解析を中心に研究を行った。パーキン蛋白の機能については、田中啓二らとの共同研究にて、これがユビキチンリガーゼの一種であることを明らかにした。次にパーキン蛋白の基質探索をyeast two hybrid methodで行い、シナプス蛋白の一種であるCDC-rel1がその候補の1つであることを明らかにした。CDC-rel1は、シナプスにおいてexocytosisを抑制する蛋白であり、パーキンの欠損によりCDC-rel1の分解が障害されると、神経終末部にこれが蓄積し、ドーパミンの放出を障害し、パーキンソニズムの発現、酸化ストレスによる細胞障害を惹起する可能性がある。更にパーキン蛋白の細胞内局在を検討し、Golgi装置とシナプス小胞に存在することを明らかにした。孤発型パーキンソン病の遺伝的危険因子に関する研究では、ubiquitin terminal hydrolase-L1 遺伝子のエクソン3に存在する遺伝子多型が、日本人においては弱いながらパーキンソン病に対する保護因子になることを明らかにした。同時に解析したコーカシアンではそのような関連はなかった。

### A. 研究目的

パーキンソン病は黒質、青斑核の選択的神経細胞死により特徴づけられる原因不明の神経変性疾患で、その原因解明は焦眉の急である。大部分が孤発性であるが、一部家族性を示し、それらにおいては黒質変性機序を分子レベルで解明できる可能性が高い。本研究において、我々は家族性パーキンソン病における原因遺伝子及びその遺伝子産物の異常による黒質変性機序を明らかにし、孤発型パーキンソン病においては、発症の危険因子となる遺伝的素因の探索を行うことを研究目的とした。家族性パーキンソン病においては、我々のグループで原因遺伝子の同定に成功し、本邦に比較的多い常染色体性劣性遺伝の若年性パーキンソン病における原因遺伝子であるパーキン遺伝子の遺伝子産物、即ちパーキン蛋白の細胞内局在と機能解析に的を絞った研究を推進した。

孤発型パーキンソン病においては、優性遺伝の家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つではないかと推定されている ubiquitin-carboxy-terminal hydrolase L1 遺伝子の遺伝子多型とパーキンソン病発症との関連を解析した。

### B. 研究方法

#### 1) パーキン蛋白の機能解析

パーキン蛋白が、ユビキチン様ドメインとRING-IBR-RINGという構造をもつことから、パーキン蛋白がユビキチンシステムに関与する蛋白である可能性が高いと考えた。特に最近RING-IBR-RING構造をもつユビキチンリガーゼが発見されているので、パーキン蛋白もその可能性をまず検討すべく、免疫沈降とイムノプロットを組み合わせ、パーキン蛋白とユビキチン結合酵素の特異的結合の有無、パーキン蛋白による未知の蛋白のポリユビキチン化の有無を解析した。

即ち、Myc-tag parkin 遺伝子とFLAG-tag ubiquitin conjugate enzyme (UBC) 遺伝子をHFK293細胞及びSH-SY5Y細胞に形質導入し、それぞれの蛋白を大量発現させた。細胞抽出物を抗Myc抗体で免疫沈降し、沈降物に対し、FLAGを結合したUbcを検出するため、抗FLAG抗体（biotin-conjugated mouse monoclonal anti-FLAG antibody）でイムノプロットを行った。抗FLAG抗体の存在は、streptavidin-horseradish peroxidase complexにて検出した。parkin遺伝子は野生型の他、種々の変異

を持つものも使用した。また UBC は、Ubc2, UbcH5A, UbcH5B, UbcH5C, UbcH6, UbcH7, UbcH8 を使用した。

In vitro ubiquitination assay は、Myc-tag parkin 遺伝子と FLAG-tag ubiquitin を 26S proteasome 阻害薬である MG132 存在下に SH-SY5Y 細胞及び HEK293 細胞に大量発現させ、抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、沈降物に対し、イムノブロットを行い、抗 FLAG 抗体によりユビキチンを結合した FLAG を検出した。parkin 遺伝子は、野生型の他種々の変異をもつものも使用した。

## 2) パーキン蛋白の基質探索

パーキン蛋白の基質探索は、Yeast two hybrid system を用いて検討した。パーキン遺伝子の ubiquitin like domain から linker 部 (ubl-linker) を GAL4 DNA binding domain を含む yeast two hybrid vector (pGBD-C1) に subcloning した。Screening は Brain cDNA library および SH-SY5Y からの cDNA library を GAL4 活性ドメインと結合させ行った。パーキン ubl-linker を transfection した yeast に Brain cDNA library, SH-SY5Y cDNA library をそれぞれ transfection した。結合を確認するため pGAD-C1 cDNA clone を yeast より回収し pGBD-C1 パーキン, pGBD-C1 ubl-linker と co-transformation をおこない  $\beta$ -galactosidase assay を行った。

発現プラスミドおよび培養細胞への transfection は、pcDNA3.1(+) の KpnI/BamHI site に Myc と Flag を code する oligo DNA を結合させた。このプラスミドに PCR により増幅したパーキン全長、パーキンの ubl domain, ubl-linker, delta-ubl, RING box, および CDCrel-1 を cloning した。SH-SY5Y 細胞, PC12 細胞, NT2 および HEK293 細胞を 10% fetal bovine serum を加えた DMEM で培養した。パーキン point mutant は pcDNA3.1 Flag- に対して、site directed mutagenesis kit を使用しそれぞれの point mutant を作成した。

免疫学的検索は、Transfection 後 36 時間の培養細胞を使用し、lysis buffer で細胞を破壊し、15000g, 15 分遠心した上清を使用した。免疫沈降法の抗体はそれぞれ rabbit polyclonal anti-Myc antibody, mouse monoclonal anti-Myc antibody を使用し、Western blot の抗体は monoclonal anti-Myc antibody, mouse monoclonal anti-FLAG(M2) antibody, mouse monoclonal anti-HA antibody を使

用した。

## 3) パーキン蛋白の細胞内局在

ヒト脳メッセンジャー RNA から RT-PCR で増幅したパーキン遺伝子断片を pcDNA3.1(+), pQBI25 ベクター各々の BamHI, NheI site にサブクローニングし、Myc または GFP (green fluorescent protein) との融合蛋白質の発現ベクターを構築した。パーキン変異体は site-directed mutagenesis により作製した。HEK293, SH-SY5Y, U373 MG, COS-1 細胞を 5% CO<sub>2</sub>, 37 度で DMEM (10% FBS) 培養液中で培養し、70~80% confluent の状態でリポフェクション法にて形質導入した。これらの細胞は形質導入 36~48 時間後に解析に用いた。免疫沈降は、10 cm dish より回収した形質導入細胞沈殿に 1 ml lysis buffer を加え、4 度 30 分間攪拌し、10,000 xg 10 分間の上清を得た。この上清に 2 mg の抗 Myc ポリクローナルを加え 4 度で 1 時間反応させ、10 ml protein A sepharose ビーズにて免疫沈降を行った。ビーズを洗浄し 30 ml サンプルバッファーで溶解後、SDS-PAGE, immunoblot を行った。

in vitro ubiquitination assay は、SH-SY5Y 細胞で発現させた Myc タグパーキンを抗 Myc 抗体で免疫沈降したものに <sup>125</sup>I で標識したユビキチン、ユビキチン活性化酵素、UbcH7, ATP を加え 30 度 1 時間反応させたものをオートラジオグラフィで検出した。培養細胞の免疫染色：U373 MG および 100 mM レチノイン酸にて 3 週間処理し神経細胞様に分化した SH-SY5Y 細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて室温で 10 分間固定、M74 抗パーキンポリクローナル抗体<sup>13)</sup>と抗 g-アダプチンまたは抗シナプトタグミンモノクローナル抗体を加え、それぞれ FITC, TRITC にて発色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

ラットシナプス小胞は、20 匹の Whister ラット (adult) 脳を 180 ml の homogenization buffer (0.32M ショ糖, 4mM HEPES) 中、ガラステフロン homogenizer で破碎 (900 rpm, 9 strokes) し、ショ糖密度勾配法で各分画を得、SDS-PAGE, immunoblot のサンプルとした。ラットシナプトソームの免疫電顕は、ラットシナプトソームの 5 mm 凍結切片を 4% パラホルムアルデヒドにて 4 度で 30 分間固定後、2% ウシ血清アルブミンで 4 度 30 分間のブロッキングを行った。その後、M74 抗パーキンポリクローナル抗体で 4 度一晩反応後、HRP 標識二次抗体を加え室温で 2 時間反応させた。0.5% グルタルアルデヒド

で結合抗体を固定し、0.55 mM DABで発色後、2% OsO<sub>4</sub>で後固定し電子顕微鏡（80 kV）により観察した。

パーキンの可溶化は、ラットシナプス小胞分画を様々な濃度のNaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>にて氷上30分間処理後、超遠心（100,000 xg 1時間）で分離し、各々の分画を等量ずつSDA-PAGE, immunoblotに用いた。

蛍光顕微鏡観察と細胞遠心分画は、パーキン蛋白の種々の欠失変異を作成し、それぞれのC末端にGFPを付加した欠失変異体をCOS-1細胞に一過性に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内局在を観察した。さらに細胞を回収し0.25Mショ糖緩衝液中でsonication（10秒x3）を行い、100,000 xg, 1時間でfractionationを行った後、沈殿を上清と等量に合わせSDA-PAGE, immunoblotに用いた。

#### 4) 孤発型パーキンソン病における関連分析

孤発型パーキンソン病発症の危険因子を探索するため、優性遺伝の家族性パーキンソン病の原因遺伝子候補と考えられているubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1)遺伝子多型と発症との関連を分析した。

対象患者は、313例の孤発性パーキンソン病患者（日本人160名、コーカシアン153名）と健常対症302名（日本人160名、コーカシアン142名）である。パーキンソン病患者の発症年齢は、前例40歳以後で若年発症者は含まれていない。平均発症年齢は、日本人55.4±10.7、コーカシアン60.6±8.8歳、対照者の平均年齢は、日本人58.1歳、コーカシアン72.5歳であった。

人genomic DNAを末梢白血球から抽出し、UCH-L1遺伝子のエクソン3をPCRで増幅した。PCRの増幅産物をRsa Iで切断し、3%アガロースゲル電気泳動にかけた。エクソン3に存在するC-to-Aのtransitionのため、野生型では300bpのバンドが1本現れるのに対し、変異型では192bpと108bpの2本のバンドが出現する。

### C. 研究結果

#### 1) パーキン蛋白の機能解析

最初パーキン蛋白と特異的に結合するE2が存在するかどうかを検討したが、UbcH7が特異的に結合した。パーキン蛋白には、ユビキチンドメイン、RING box, linker部分の3つの部分からなる。どの部分が

UbcH7と特異的に結合に必要なかを見るため、種々の変異を持ったパーキン遺伝子の形質導入で同様に免疫沈降とイムノブロットを行うと、RING-boxが正常に保たれていれば、他の部分に変異があってもUbcH7との結合には支障がないことがわかった。以上の所見から、UbcH7とパーキン蛋白の結合はRING-boxにて行われると考えられた。

次に、パーキン蛋白によりポリユビキチン化される蛋白の有無を、ユビキチンとパーキン蛋白を過剰発現させた細胞で同様に免疫沈降とイムノブロットで検討すると、ドーパミンニューロン由来のSH-SY5Y細胞に発現させた場合は、ポリユビキチン化された蛋白の存在を示す、高分子側のスメアがイムノブロットで観察された。しかも、これはプロテアソームインヒビターであるMG-132を添加した場合に見られた。非神経系由来のMEK293細胞に大量発現させた場合は、ポリユビキチン化された蛋白を示す、高分子側のスメアは観察されなかった。

次にこのポリユビキチン化に、パーキン蛋白のどの部分が必須であるかを検討するため、種々の変異を有するパーキン遺伝子を形質導入して同様に検討すると、ユビキチンドメインとRING-box両者が正常に揃っている場合にのみ、スメアが観察された。RING-boxは、E2の結合に必須の部分であるから、ユビキチンドメインが基質との結合に必要であると考えられた。

次にパーキン蛋白が実際E3活性を有するかどうかを更に確認するため、in vitroのE3 assay系を確立し、その活性を検討した。即ち、MG132存在下にSH-SY5Y細胞に発現させたMyc-tagged parkinとrecombinant E1, E2 (UbcH7), <sup>125</sup>I-ubiquitin, ATPをインキュベートすると、約30kDaのバンドと共に、高分子ユビキチンの存在を示すシグナルが得られた。この反応系からE1あるいはE2を除くと高分子シグナルは得られなかった。このことから、パーキン蛋白が実際E3活性を有することが示された。またHEK239細胞にMyc-tagged parkinを発現させ、同様にin vitro E3活性を測定すると、高分子ユビキチンは検出できなかったが、これにSH-SY5Y細胞の抽出物を加えると検出できた。このことは、HEK239細胞にはパーキン蛋白の基質となるべき蛋白が存在せず、SH-SY5Y細胞には存在することを示している。

#### 2) パーキン蛋白の基質解析

患者から得られたパーキン mutantとUbcH7との結

合を調べた。RING boxに変異を持つパーキン mutantとUbcH7との結合が消失していた。そしてパーキン mutantのリガーゼ活性を調べたが、すべてのパーキン mutantでリガーゼ活性が消失していた。

次に細胞の種類によりパーキンのリガーゼ活性に違いがあるかどうかを確認するためにいくつかの培養細胞を用いてパーキンのリガーゼ活性の有無を調べた。SH-SY5Y, PC12, NT2などの神経系の培養細胞内にパーキンをtransfectionさせたところパーキンのリガーゼ活性が確認された。正確な定量は行っていないがNT2よりSH-SY5Y, PC12でpoly-ubiquitination鎖の量が多くカテコラミンをNeurotransmitterとするNeuronへ分化可能なcell lineにおいて基質が存在しているとわかった。しかし、HEK293, HeLaなどの神経系以外の培養細胞内ではパーキンのリガーゼ活性は消失していた。よりhomogeneousな材料を用いた方がbinding proteinを単離できると考えSH-SY5YのcDNA libraryを用いた。1×10<sup>7</sup>Screeningによりパーキン蛋白と結合する異なる14のclonesが得られた。その1つにCDCrel-1が含まれていた。

CDCrel-1蛋白はsynaptic vesicleに存在することが報告されており、細胞内局在はパーキン蛋白と一致している可能性が考えられた。Yeast内ではパーキンのubl domainおよびubl-linkerのみ発現させるとCDCrel-1との結合が強く見られた。このCDCrel-1をmammalian expression vectorにsubcloningし、培養細胞内にパーキン蛋白とともに過剰発現させ、免疫沈降法を用いて結合を確認した。また、パーキン蛋白の結合部位を確認するためにパーキン欠損mutant (ubl, ubl-linker, delta-ubl, RINGbox)を作成しそれぞれとCDCrel-1との結合を調べた。パーキン全長, ubl-domain, ubl-linker, RING boxとCDCrel-1との結合が確認された。Delta-ublとCDCrel-1との結合は消失していた。3) パーキン蛋白の細胞内局在

HEK293細胞にMycタグパーキンおよびFLAGタグUbcH7を共発現させ抗Myc抗体で免疫沈降を行うと、パーキンはUbcH7と共沈した。この結合はパーキンがRING box構造を有する時のみ認められた。またSH-SY5Y細胞にMycタグパーキンとFLAGタグユビキチンを共発現させると、プロテアソーム阻害剤MG132の存在下でパーキンは高分子ユビキチン化蛋白と共沈した。さらにSH-SY5Y細胞で発現させたMycタグパーキンを用いたin vitro ubiquitination assayにてパーキンのユビキチンリガーゼ活性を確認

した。次に細胞内局在を検討するため、U373 MGおよびSH-SY5Y細胞を用いて免疫染色を行った。U373 MG細胞内のパーキンは核周囲に集積して認められた。この細胞をさらにゴルジ体のトランスゴルジ網に存在する $\gamma$ -アダプチンに対する抗体を用い二重染色したところパーキンと $\gamma$ -アダプチンは共染され、パーキンはU373MG細胞においてトランスゴルジ網に存在していることが明らかとなった。

次にカテコールアミンを含有するヒト神経芽細胞種由来のSH-SY5Y細胞を用いたところ、レチノイン酸により神経様に分化させたSH-SY5Y細胞においてパーキンの免疫染色性はゴルジ体に認められ、さらに分化誘導により伸長した神経様突起内に顆粒状に存在した。これらはシナプトタグミンと共存し、パーキンがシナプス小胞に存在する可能性を考えた。そこでラット脳より遠心分画法にてシナプス小胞を精製し、シヨ糖密度勾配法によりパーキン、シナプトフィジン、およびシナプトタグミンの分布を比較検討した。パーキンはシナプス小胞分画で最も濃縮され、シヨ糖密度勾配法では二峰性のピークを示した。同時に行ったシナプス小胞蛋白(シナプトフィジン、

シナプトタグミン)のimmunoblotも同様の分布を示した。これらの結果からパーキンがシナプス小胞に局在する可能性がさらに強く示唆された。これを直接的に証明するため、シナプトソーム粗分画を用いて抗パーキン抗体による免疫電顕を行うと、シナプス小胞の膜上にパーキンの免疫染色性を認め、パーキンがシナプス小胞に局在することを明らかにした。

しかしパーキンのアミノ酸配列にはいかなるsignal sequenceも膜貫通領域も認めないことから、パーキンがどのような機序で膜に局在するのかを検討した。ラット精製シナプス小胞を様々な濃度の塩で処理し、パーキンの可溶性を調べると、パーキンは塩濃度依存性に膜から可溶化され、静電的に膜に結合していると考えられた。次にパーキンの膜局在に関与するドメインを検索する目的で行った各種パーキン欠失変異体とGFPの融合蛋白の強制発現系の実験では、Ublのみが細胞質に均一に認められ、他の変異体は核周囲に集積した。これらの細胞を界面活性剤非存在下で破碎し超遠心すると、Ublのみが可溶性分画に回収され、他の変異体は膜分画に沈殿し、生化学的にも同様の結果を得た。

#### 4) 孤発型パーキンソン病の関連分析

UCH-L1遺伝子のシークエンス解析によりC-to-A

transitionからなる遺伝子多型が発見され、その結果18番目のセリンがチロシンに変化することが判明した。これによりRsa I restriction siteを生じることが判明した。この変異アレルの頻度は、日本人では対照患者で51.2%、パーキンソン病患者で43.4%とパーキンソン病患者で有意に高かった ( $p=0.048$ , 95% CI: 0.53-0.99)。一方コーカシアンでは、変異アレルの頻度は、対照とパーキンソン病患者で有意差がなかった。

#### D. 考察

パーキン蛋白の機能に関しては、パーキン蛋白がユビキチンドメインとRING box, 更にこれらをつなぐlinker部分の3つの部分からなるという特殊な構造を持つため、ユビキチンシステムの構成要素ではないかと推定され、特にユビキチンリガーゼ(E3)の一種ではないかと推定されたが、今回の実験で、実際パーキン蛋白がE2の一種であるUbc H7を特異的に結合し、更にin vitroでのアッセイ系でE1, E2, ATP, ユビキチンの存在下に、高分子ユビキチンの産生を行うことを証明した。パーキン蛋白の基質となり、どのような蛋白がパーキンによりポリユビキチン化を受けられるかを解析することは、パーキンの欠失により、何故黒質のドーパミン神経細胞が選択的神経細胞死を生じるかを解明するために重要な研究テーマである。

パーキン蛋白の基質に関しては、パーキン蛋白との結合蛋白として異なる14のclonesが得られた。単離されたclonesのうちCDCrel-1蛋白はsyntaxinと結合することでexocytosisを抑制している蛋白である。したがって、細胞内局在ではCDCrel-1同様synaptic vesicleに存在するパーキンと一致している。さらにパーキンの基質とすればUbiquitin-protein ligase活性がないAR-JP患者脳では蓄積し、シナプスにおいてexocytosisが抑制されることが推測される。正常に行われるべきexocytosisが抑制されれば結果として神経細胞死が生ずることが予想される。

Yeast two hybridおよび免疫沈降の結果からCDCrel-1はパーキンのub1-linker部位と結合していると考えられる。従ってCDCrel-1は基質の1つとして十分詳細な検討すべきものと考えmammalian cell内におけるin vitro binding assayを行った。結果としてRING-box, ub1-linkerと2カ所で結合しているような結果が得られたがdelta-ub1では結合が見られなかったことよりRING boxでも非特異的と考えている。

パーキン蛋白の細胞内局在に関しては、Golgi装置、輸送小胞、シナプス小胞に存在することを明らかにし、パーキンがUb1より下流の広範な部位を介して、静電的にこれらに結合する蛋白であることを明らかにした。パーキンが膜輸送機構により運ばれシナプス小胞に局在するという事実は、パーキンの基質がシナプス終末に存在することを示唆する。

孤発型パーキンソン病患者の遺伝的危険因子に関するUCH-L1遺伝子多型の解析では、変異アレルの頻度が対照群でわずかではあるが、有意にパーキンソン病患者より高く、弱い発症に対する保護因子になることが推定された。しかし、パーキンソン病の遺伝的危険因子発見を目的とした関連分析では、なかなか明瞭な結果が従来からでておらず、ゲノムワイドに発症の危険因子となる遺伝子多型発見をめざした研究が必要と考えられた。

#### E. 結論

常染色体性劣性遺伝の若年性パーキンソン病の原因遺伝子産物であるパーキンの機能が、ユビキチンリガーゼ(E3)の一種であり、E2の一種Ubc H7を特異的に結合し、ある蛋白をポリユビキチン化することを明らかにした。パーキン蛋白の特異的基質が何であるかは、まだ解析が必要であるが、シナプス小胞に存在する蛋白であるCDCrel-1である可能性を示した。この蛋白は、エクソサイトーシスを抑制する蛋白であるので、もしこれが蓄積すると、ドーパミンの分泌が抑制され、ドーパミンが神経終末に蓄積して、酸化ストレスによる障害を惹起する可能性がある。パーキン蛋白は神経系全般に発現している蛋白でありながら、黒質が選択的障害を受ける機序が、ドーパミン含有量に関連する可能性も示唆される。酸化障害は、これまでも孤発型パーキンソン病における黒質障害の重要な機序の1つと考えられてきた機構であり、これとも矛盾しない結論である。パーキン蛋白の機能解析を更に推進することにより、黒質神経細胞の変性機序が分子レベルで解明できる可能性は高いと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics* 25: 302-305, 2000
- 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 Disorders* 6: 129-131, 2000
- Zhang J, Hattori N, Leroy E, Morris HR, Kubo S-I, 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 Disorders* 6: 195-197, 2000
- 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 Disorders* 6: 199-200, 2000
- Tanaka R, Kobayashi T, Motoi Y, Anno M, Mizuno Y, Mori H. A case of frontotemporal dementia with tau P301L mutation in the Far East. *J Neurol* 247 : 705-707, 2000
- 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* 100: 241-250, 2000
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107: 335-341, 2000
- Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y. Effects of blockade of metabotropic glutamatergic receptors in the subthalamic nucleus on haloperidol-induced parkinsonism in rats. *Neurosci Lett* 282 21-24, 2000
- Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y. Differential expression of c-Fos following administration of two tremorgenic agents: harmaline and oxotremorine. *NeuroReport* 11: 2385-2390, 2000
- Hattori K, Miwa H, Sugano K, Komine M, Tanaka S, Mizuno Y. Hemiparkinsonism associated with the unilateral striatal necrosis. A case report. *Parkinsonism Rel Disord* 6: 201-203, 2000
- 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* 20 . S85-S90 , 2000
- 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 Neurol Transm [suppl]* 60:101-116 , 2000
- Yamamura Y, Hattori N, Matsumine H, Kuzuhara S, Mizuno Y. Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation Clinicopathologic characteristic and molecular genetic identification. *Brain & Development* 22. S87-S91, 2000
- Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N. Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mammalian Genome* 11: 417-421, 2000
- Shimizu N, Asakawa S, Minosima 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* 58: 19-30 , 2000

### 2. 学会発表

- Mizuno Y, Autosomal recessive parkinsonism. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Mizuno Y, Message from the Asia Pacific Rim. The Fourth European Parkinson's Disease Association Conference, Vienna, Austria, November 9-12,

- 2000
- Mizuno Y, Guidelines for the Treatment of Parkinson's Disease Based on Evidence Based Medicine. Philippine Neurological Association's 22nd Annual Convention, Baguio City, Philippine, November 15-18, 2000
- Mizuno Y, Progress in Genetic Aspects of Dystonias & Parkinsonism. Philippine Neurological Association's 22nd Annual Convention, Baguio City, Philippine, November 15-18, 2000
- Mizuno Y, Molecular bases of familial Parkinson's disease. COE International Symposium on Molecular Bases of Neural Development and Neurodegenerative Diseases, Nagoya, Japan, November 30, 2000
- Mizuno Y. Progress in familial Parkinson's disease: clinical and genetic aspects. Mayo Alzheimer's and Parkinson's Disease Center Seminar Series, Jacksonville, USA, July 21, 2000
- Mizuno Y. Progress in Genetic and Clinical Aspects of Familial Parkinson's Disease: Melvin D. Yahr Lecture / Department of Neurology Grand Rounds, The Mount Sinai Medical Center, NY, USA, November 24, 2000
- Mori H, Takanashi M, Komori T, Arai N, Mizutani T, Mizuno Y. Cortical pathology in progressive supranuclear palsy. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Hattori N, Asakawa S, Minoshima S, Yohino 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
- Kobayashi T, Hattori N, Mori H, Kondo T, Mizuno Y. Sequencing search for the parkin gene mutations on sporadic cases with Parkinson's disease. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Kubo S, Hattori N, Shimura H, Mizuno Y. Parkin protein is associated with the Golgi membrane. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Shimura H, Hattori N, Knag D, Nakabeppu Y, Mizuno Y. Increase of 8-oxo-dGTPase [hMTH1] in mitochondria of nigrostriatum of parkinsonian brain. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Shimura H, Hattori N, Suzuki T, Kubo S, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y. Immunohistochemical and subcellular localization of parkin: parkin is contained with Lewy body. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Kubo S, Hattori N, Shimura H, Mizuno Y. Parkin protein is associated with the Golgi membrane. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- Wang M, Hattori N, Kitada T, Shimizu N, Mizuno Y. Expression pattern of rat parkin cDNA. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11-15, 2000
- 高梨雅史, 望月秀樹, 服部信孝, 森 秀生, 水野美邦. 常染色体劣性若年性パーキンソン症候群 (ARJP) における鉄沈着に関する病理学的検討. 第41回日本神経学会総会, 松本, 5月24-26日, 2000
- 志村秀樹, 服部信孝. 水野美邦. パーキンソン病における活性酸素障害の制御機構について-続報- 8-OXO-dGTPase (MTH1)の検討. 第41回日本神経学会総会, 松本, 5月24-26日, 2000
- 佐藤健一, 服部信孝, 久保紳一郎, 水野美邦. Parkin蛋白はprocessingされるのか?. 第41回日本神経学会総会, 松本, 5月24-26日, 2000
- 服部信孝, 吉野浩代, 吉川睦子, 今道洋子, 久保紳一郎, 水野美邦, 浅川修一, 養島伸生, 清水信義. 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

[原著論文]

1. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics* 25: 302-305, 2000
2. 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 Disorders* 6: 129-131, 2000
3. Zhang J, Hattori N, Leroy E, Morris HR, Kubo S-I, 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 Disorders* 6: 195-197, 2000
4. 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 Disorders* 6: 199-200, 2000
5. Tanaka R, Kobayashi T, Motoi Y, Anno M, Mizuno Y, Mori H. A case of frontotemporal dementia with tau P301L mutation in the Far East. *J Neurol* 247: 705-707, 2000
6. 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* 100: 241-250, 2000
7. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107: 335-341, 2000
8. Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y. Effects of blockade of metabotropic glutamatergic receptors in the subthalamic nucleus on haloperidol-induced parkinsonism in rats. *Neurosci Lett* 282: 21-24, 2000
9. Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y. Differential expression of c-Fos following administration of two tremorogenic agents: harmaline and oxotremorine. *NeuroReport* 11: 2385-2390, 2000
10. Hattori N, Miwa H, Sugano K, Komine M, Tanaka S, Mizuno Y. Hemiparkinsonism associated with the unilateral striatal necrosis. A case report. *Parkinsonism Rel Disord* 6: 201-203, 2000

[総説]

1. 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* 20: S85-S90, 2000
2. 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]* 60:101-116, 2000
3. Yamamura Y, Hattori N, Matsumine H, Kuzuhara S, Mizuno Y. Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: Clinicopathologic characteristic and molecular genetic identification. *Brain & Development* 22: S87-S91, 2000
4. Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N. Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mammalian Genome* 11: 417-421, 2000
5. 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