

平成13年度 厚生科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業 総括・分担研究報告書

---

大脳基底核部ドーパミン神経系の  
維持・再生に関する研究

---

2002・3

主任研究者 小川紀雄

(岡山大学大学院医歯学総合研究科教授)

# 平成13年度 厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業 研究報告書

研究課題名：大脳基底核部ドーパミン神経系の再生・維持に関する研究  
主任研究者：小川 紀雄（岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授）

研究組織：

小川紀雄 岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野 教授  
田中健一 岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野 助手  
岩井一宏 大阪市立大学大学院医学研究科 分子制御分野 教授

## 目 次

### <総括研究報告書>

「大脳基底核部ドーパミン神経系の維持・再生に関する研究」

小川 紀雄 （岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野） ... 5

### <分担研究報告書>

「ドーパミン神経細胞死におけるp53関連遺伝子PAG608の関与」

小川 紀雄 （岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野） ... 11

「酸化ストレスによるドーパミン神経細胞死とその防御法の開発」

田中 健一 （岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野） ... 17

「酸化ストレス傷害時のユビキチン系の解析に関する研究」

岩井 一宏 （大阪市立大学大学院医学研究科 分子制御分野） ... 22

### <研究成果一覧表>

平成13年度 研究成果の刊行に関する一覧表 ... 29

# 総括報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

大脳基底核部ドパミン神経系の維持・再生に関する研究

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 教授

研究要旨

生理的老化ならびに神経変性疾患などの病的老化の共通の機序と考えられる酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される分子の探索・同定を試みた結果、p53 関連分子 (PAG608) を得た。PAG608 が主に翻訳後修飾あるいは蛋白質間の相互作用によってドパミン神経毒 6-OHDA によるアポトーシスの発現を調節・修飾していることを示した。また、ミトコンドリア膜電位低下以前の比較的上流の過程で機能していることを明らかにし、PAG608 がドパミン神経細胞死において重要な役割を果たしている可能性を指摘した。ドパミン神経変性時に特異的に沈着する  $\alpha$ -シヌクレインの過剰発現株を樹立し、剖検脳の病理組織像と同様にユビキチン化が進行していることを示した。神経保護修復薬として注目されているイムノフィリンリガンドの神経保護作用には免疫抑制作用は必要なく、その作用機序には脳内グルタミン系の活性化を介した抗酸化作用と神経栄養因子 GDNF の増加作用が寄与することを見い出した。酸化ストレスにより生じる酸化蛋白質を処理するユビキチン系の分子機構を明らかにする目的で鉄代謝の主たる制御因子である IRP2 蛋白質の酸化変化がユビキチン系に識別され分解に至ることを明らかにするとともに、酸化 IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼとして HOIL-1 を同定した。

分担研究者

田中健一 岡山大学大学院医歯学総合研究科  
脳神経制御学講座 神経情報学  
助手  
岩井一宏 大阪市立大学大学院医学研究科  
分子制御分野 教授

のドパミン神経系はこの巧妙な協調運動の調節機構の中核をなしている。これらの背景から、生理的老化ならびに神経毒などの病的傷害の共通の機序と考えられる酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子およびその遺伝子産物（以下、新規分子）を探索・同定し、酸化ストレスによって障害されたタンパク質の処理機構を解明する。次に、その新規分子とドパミン神経系変性時に特異的に沈着する  $\alpha$ -シヌクレインによるドパミン神経細胞傷害機序への関与を、遺伝子改変細胞ならびにモデル動物を用いて解析し、遺伝子レベルから丸ごとの個体レベ

A. 研究目的

高齢人口の急速な増加にともなって「寝たきり」状態の発生機序の解明と予防が強く求められている。ヒトが独立して動作・歩行できるということは想像以上に精緻なメカニズムに支えられており、なかでも大脳基底核部

ルまで総合的に検討することで、「寝たきり」老人の発生の予防に役立てる。本年度は、特異的新規分子の探索・同定と特異的新規分子ならびに $\alpha$ -シヌクレインの遺伝子改変細胞の作成、酸化ストレス傷害時のユビキチン系の解析などを中心に検討を行なった。

## B. 研究方法

①ドパミン関連酸化ストレス（パーキンソン病状態+レポドパ負荷）によるドパミン神経傷害時に特異的に発現する遺伝子およびその産物を検索する目的で、ドパミン神経毒 6-OHDA により作成した片側パーキンソン病ラットにレポドパを投与し、16 時間後の線条体を測定に供した。得られたトータル RNA を用いて、ディファレンシャル・ディスプレイ法にてレポドパ投与群の傷害側線条体においてのみ発現が誘導されているバンドを同定し、塩基配列を決定した。

②実験①で得られた PAG608 の機能を明らかにする目的で以下の実験を行なった。酸化ストレス下での PAG608 の動態を明らかにするために 6-OHDA を暴露したカテコールアミン産生細胞 PC12 細胞の PAG608 および p53 の発現量の変化を抗 PAG608 抗体および抗 p53 抗体を用いたウェスタンブロット法により経時的に検討した。次に PAG608 ノックダウン細胞を作成するために PAG608 アンチセンス cDNA 発現ベクターを構築し、リン酸カルシウム法により PC12 細胞に導入した。6-OHDA で誘導されるアポトーシスにおける PAG608 の役割を明らかにするために、細胞生存率とミトコンドリア膜電位について、作成した PAG608 ノックダウン細胞を用いた検討を行なった。

③ $\alpha$ -シヌクレインの過剰発現細胞を作成するために $\alpha$ -シヌクレイン cDNA 発現ベクターを構築し、リン酸カルシウム法により SH-SY5Y 細胞に導入した。作成した $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞の細胞内ユビキチン発現量を抗ユビキチン抗体を用いたウェスタン

ブロット法で測定した。

④過酸化水素による細胞死に対するイムノフィリンリガンドの保護作用とその作用機序を明らかにする目的でヒトニューロblastoma由来のカテコールアミン産生細胞株 SH-SY5Y とヒトグリオーマ由来の U251 細胞株を用いて、細胞生存率と細胞内グルタチオン濃度を指標に評価した。6-OHDA 毒性に対するイムノフィリンリガンドの神経保護作用については、ICR 系雄性マウス（7 週齢）に 6-OHDA を脳室内投与したマウス線条体のドパミン濃度を指標に検討した。また、6-OHDA 脳室内投与時の脳内分子動態を明らかにするため、過酸化脂質量 [TBA-RS 量]、抗酸化物質活性 [グルタチオン濃度・SOD 活性・カタラーゼ活性]、神経栄養因子活性 [GDNF および BDNF 濃度・GFR- $\alpha$ 1 および TrkB 発現量] についても検討した。

⑤鉄代謝の主要制御因子である IRP2 を選択的に認識するユビキチンリガーゼを探索・同定するために、新たに開発した酸素存在下・非存在下でのディファレンシャル酵母ツーハイブリッドスクリーニング法により検討した。

## C. 研究結果

①片側パーキンソン病ラット線条体においてレポドパ投与群の傷害側でのみ、発現が誘導されている遺伝子を複数得た。定法により、クローニングを行ない、塩基配列を決定したが、そのうちの 1 つが p53 関連分子である PAG608 であることを見出した。

②PC12 細胞に 6-OHDA (100  $\mu$ M) を添加して、PAG608 蛋白の発現誘導の有無、さらに p53 蛋白の発現変化を検討した結果、6-OHDA 添加 3 時間後から著明な p53 の発現増加が認められたが、PAG608 蛋白の発現は 6-OHDA 添加 24 時間後まで有意な変化は認められなかった。PAG608 ノックダウン細胞において PAG608 蛋白の発現が抑制されていることを確認した。次に PAG608 ノックダウン細胞に 6-OHDA (100  $\mu$ M) を 24 時間暴

露したところ、6-OHDA による細胞生存率の低下がほぼ完全に抑制されていた。また、コントロール細胞では6-OHDA 暴露 8 時間後の時点において、ミトコンドリア膜電位の低下が認められたのに対し、PAG608 ノックダウン細胞では6-OHDA 暴露によるミトコンドリア膜電位の低下が抑制され、正常な細胞の状態が保たれた。

③ $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞において $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の過剰な発現が誘導されていることを確認した。また、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞では抗ユビキチン抗体で染色されるバンドが認められ、特に高分子量の領域ではスメア状に認められ、コントロール細胞に比べ明らかに高い染色性を示した。

④FK506 (免疫抑制性) および GPI1046 (非免疫抑制性) とともに予め 24 時間添加しておくことで、過酸化水素暴露による細胞生存率の低下を有意に抑制した。また、2 種類のイムノフィリンリガンドの過酸化水素に対する保護作用の力価は同程度であった。一方、細胞内グルタチオン濃度についても、FK506、GPI1046 どちらも有意な増加作用を示したが、両者とも SH-SY5Y 細胞よりも U251 細胞でより顕著に認められた。予め FK506 (0.5 mg/kg/day) と GPI1046 (10 mg/kg/day) を投与しておく、6-OHDA のドパミン神経毒性を有意に抑制した。また、2 種類のイムノフィリンリガンドは予め投与することで自動酸化による脂質過酸化反応を有意に抑制し抗酸化作用を示した。抗酸化物質に対する作用についてはどちらも線条体グルタチオン量の増加作用を示したものの、SOD およびカタラーゼの活性については有効な作用を示さなかった。神経栄養因子については、FK506、GPI1046 はどちらも中脳黒質における GDNF 量を増加させると共にそのレセプターである GFR- $\alpha$ 1 発現量を有意に低下させた。FK506 については、線条体における BDNF 量を増加させると共にそのレセプターである TrkB 発現量を低下させた。

⑤酸化タンパク質である酸化 IRP2 を選択的に認識するユビキチンリガーゼとして HOIL-1 を同定した。

#### D. 考察

ドパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される分子の探索・同定を試みた結果、p53 関連分子 (PAG608) を得た。ドパミン神経毒 6-OHDA 暴露により PC12 細胞でアポトーシスが惹起される際に、アポトーシス誘導分子である p53 の発現誘導は認められたが、PAG608 の発現は変化しなかった。しかし、PAG608 ノックダウン細胞では、6-OHDA による細胞死がほぼ完全に抑制されたことから、PAG608 は主に翻訳後修飾あるいはタンパク質間の相互作用によって6-OHDA によるアポトーシスの発現を調節・修飾しているものと考えられた。また、6-OHDA 暴露によって惹起されるアポトーシスでは、ミトコンドリアの膜電位が低下することが知られているが、PAG608 ノックダウン細胞では膜電位の低下がほぼ完全に抑制されていたことから、PAG608 はミトコンドリア膜電位の低下以前の比較的上流の過程で機能していることを明らかにした。以上より、PAG608 がドパミン神経細胞死において重要な役割を果たしている可能性を指摘した。

パーキンソン病の進行性病変に対する治療薬には何が必要なのか解明するために、ドパミン神経系における代表的沈着タンパク質である $\alpha$ -シヌクレインの過剰発現細胞株を樹立した。しかも、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞ではコントロール細胞に比べてユビキチン化が顕著に進行していたことから、ヒトのパーキンソン病での病態を的確に表現しているものと考えられた。過酸化水素による細胞生存率の低下に対するイムノフィリンリガンドの抑制作用は2種類の細胞間で顕著な差は認められなかった。ところが、グルタチオン増加作用については U251 細胞でより強く認め

られたことから、神経細胞よりもグリア細胞により強く作用をするものと考えられた。この結果は、脳内におけるグルタチオンならびに関連酵素の局在が元々神経細胞よりもアストロサイトなどのグリア細胞に多いとするこれまでの報告を考慮すると妥当な結果と思われた。また、*in vitro* 培養細胞系を用いた検討により、GPI1046(非免疫抑制性)はFK506

(免疫抑制性)と同程度の細胞保護効果を示すことから、イムノフィリンリガンドの神経保護作用の分子機序には免疫抑制作用は必要ないことを明らかにした。また、イムノフィリンリガンドの神経保護作用の分子機序にはグルタチオン増加作用を主とする抗酸化作用と神経栄養因子の活性化作用が寄与していることを示した。神経栄養因子活性化作用については、神経栄養因子自体の濃度は増加するのに対して、そのレセプターの発現レベルが低下し、しかもその低下の程度がそれほど強くないことから、神経栄養因子量の増加に伴うダウンレギュレーションの結果である可能性が示唆された。したがって、神経栄養因子活性化作用の作用点は神経栄養因子の合成以前の過程にあるものと推察された。

蛋白質の酸化は代表的な蛋白質ダメージの1つであり、酸化蛋白質はユビキチン修飾系で選択的に分解されることが知られているが、そのユビキチン化を担うユビキチンリガーゼは同定されていなかった。我々が同定したHOIL-1 cDNA自体は既に報告されていたものの、その機能は不明であったが、本研究により酸化蛋白質を選択的に認識するユビキチンリガーゼであることを初めて明らかにした。しかも、HOIL-1は全ての臓器に発現しており、酵母にも相同性を有した遺伝子が存在していることから、広く酸化蛋白質を識別し蛋

白質の品質管理に関与するリガーゼである可能性が示唆された。また、HOIL-1は全長468アミノ酸であり、N末側にユビキチン様ドメイン、C末側にRINGフィンガードメインを有するが、若年性家族性パーキンソン病の原因遺伝子とされるParkinも465アミノ酸、N末側にユビキチン様ドメイン、C末側にRING-IBRドメインを有することから、HOIL-1はParkinと相同性を有した蛋白質と思われた。パーキンソン病剖検脳の黒質では鉄沈着が増加することが知られており、この点からもHOIL-1が鉄代謝の制御因子IRP2の鉄依存性分解を担うユビキチンリガーゼである事実は非常に興味深く、研究の今後の展開が期待できる。

## E. 結論

本研究により、P53関連分子であるPAG608は6-OHDAによるアポトーシス発現に関与していることから、ドパミン神経細胞死の過程で重要な役割を果たしている可能性が考えられた。イムノフィリンリガンドの神経保護作用の分子機序には免疫抑制作用は必要ないことを明らかにするとともに、グルタチオン増加作用を主とする抗酸化作用と神経栄養因子の活性化作用が寄与していることを示した。また、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞をヒトニューロblastoma由来のカテコールアミン産生細胞であるSH-SY5Y細胞を用いて樹立した。鉄代謝の制御因子であるIRP2を酸化依存的に識別するユビキチンリガーゼとして同定したHOIL-1は家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つであるParkinと相同性を有するリガーゼであることから、HOIL-1のドパミン神経細胞死への関与が示唆された。

# 分担報告書



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

ドパミン神経細胞死における p53 関連遺伝子 PAG608 の関与

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 教授

研究要旨

ドパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子を同定するために、片側パーキンソン病モデルラットにドパミン関連酸化ストレスとしてL-DOPAを投与し、傷害側線条体において発現が誘導される mRNA を differential display 法で検索した結果、p53 関連遺伝子 p53-activated gene 608 (PAG608) を同定することができた。次に、ドパミン神経細胞のアポトーシスにおける PAG608 の関与について明らかにするために、カテコールアミン産生神経様培養細胞 PC12 に神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を添加し、PAG608 および p53 の蛋白発現の変化を検討し、さらに、PAG608 アンチセンス cDNA の遺伝子導入により PAG608 発現抑制 PC12 細胞株を樹立し、6-OHDA 添加によって惹起されるアポトーシスに対する PAG608 発現抑制の影響について検討した。6-OHDA 添加により PC12 細胞でアポトーシスが惹起される際に、p53 の発現誘導は認められたが、PAG608 の発現は変化しなかった。しかし、PAG608 発現を抑制した細胞株では、6-OHDA による細胞死がほぼ完全に抑制されていた。また、6-OHDA 添加によって惹起されるミトコンドリアの膜電位の低下も、PAG608 発現抑制 PC12 細胞株では著明に抑制されていた。これらの結果より、PAG608 はその遺伝子転写レベルにおいてではなく、何らかの翻訳後修飾あるいは蛋白間の相互作用によってアポトーシス発現を調節・修飾していることを明らかにできた。さらに、6-OHDA によるアポトーシス発現機構において、PAG608 はミトコンドリア膜電位の低下以前の比較的上流の過程で機能していると考えられる。PAG608 はドパミン神経細胞死およびその保護において重要な役割を果たしていると考えられ、新たな標的分子として注目される。

A. 研究目的

加齢に伴う大脳基底核部のドパミン神経系機能の低下は、協調運動障害や歩行障害をもたらすことから、ドパミン神経系の傷害機序を解明し、その傷害を抑制することは重要な課題である。生理的老化ならびに神経毒などの病的傷害の共通の機序と考えられる酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現

誘導される遺伝子を同定し、その機能解析を行い、ドパミン神経細胞の傷害過程における役割を明らかにするために、本検討ではまず、片側パーキンソン病モデルラットにドパミン関連酸化ストレスとしてL-DOPAを投与し、傷害側線条体においてL-DOPAで発現が誘導される mRNA を differential display 法で検索した。その結果、誘導されている遺伝子

として p53 関連遺伝子 p53-activated gene 608 (PAG608)を同定することができた。

アルツハイマー病、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患では、その神経細胞死の過程にアポトーシスが関与していることが報告されている。特にパーキンソン病では黒質線条体路のドパミン神経細胞の特異的な変性、脱落がみられるが、神経細胞の変性過程におけるアポトーシスの関与については未だ十分に明らかにされていない。パーキンソン病モデルの作製に繁用されている神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA)はラット副腎褐色細胞腫由来のカテコールアミン産生神経様培養細胞株 PC12 においてアポトーシスを惹起することが知られており、このとき p53 などのアポトーシス誘導分子の発現が増加することも報告されている。転写因子である p53 は、さまざまな細胞外ストレスなどにより活性化され、アポトーシスや細胞増殖などに関与する分子の発現を調節している。

PAG608 は p53 によって発現が誘導される遺伝子であり、PAG608 遺伝子を細胞へ導入し過剰に発現させるとアポトーシスを惹起することが知られており、さらに脳虚血に際して脆弱な領域にその他のアポトーシス関連因子とともに発現が増加していることも報告されている。ドパミン神経細胞死における PAG608 の関与について明らかにするために、われわれは PAG608 アンチセンス cDNA を遺伝子導入した PAG608 発現抑制 PC12 細胞株を用いて、6-OHDA 添加によって惹起される PC12 細胞のアポトーシスにおける PAG608 の役割について検討した。

## B. 研究方法

### 1. L-DOPA 投与により片側パーキンソン病モデル線条体で誘導される遺伝子の検索

雄性 Sprague-Dawley ラットの片側黒質線条体路に 6-OHDA (8  $\mu$ g)を投与し、片側パーキンソン病モデルを作製した。6-OHDA 投与 4 週後に apomorphine (0.1 mg/kg, s.c.)

投与を行い、非傷害側への回旋運動がみられるものを実験に供した。5 週後に L-DOPA/carbidopa (100/10 mg/kg, i.p.)投与を行い、16 時間後に傷害側、非傷害側の線条体組織を取り出し、total RNA を抽出した。対照群には溶媒である 0.25%メチルセルロースを投与した。differential display法は Delta Differential Display Kit (CLONTECH)を用いて行った。すなわち、抽出した RNA を逆転写させ cDNA を得て、その後ランダムな塩基配列を有する上流、下流プライマーにより PCR を行い、polyacrylamide gel で電気泳動し、L-DOPA 投与群の傷害側線条体においてのみ発現が誘導されているバンドを切り出し、クローニングベクターに挿入し増幅させ、塩基配列を決定した。

### 2. 6-OHDA 添加 PC12 細胞における PAG608 および p53 の発現

ラット副腎褐色細胞腫由来のカテコールアミン神経様培養細胞株 PC12 (1 x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>)を 24 時間培養し、100  $\mu$ M 6-OHDA を添加しさらに 3, 6, 9, 24 時間後の total cell lysate を抽出した。この total cell lysate を SDS-polyacrylamide gel で電気泳動した後ナイロンメンブランに転写し、抗 PAG608 抗体および抗 p53 抗体を用いて ECL 発光法で PAG608, p53 を検出するウェスタンブロット法により検討した。また、内部標準として Ponceau-S によってメンブラン上の蛋白を染色し、ECL 発光法で検出されたバンド強度と比較することにより PAG608, p53 の発現量を定量した。

### 3. PAG608 アンチセンス cDNA 発現ベクターの構築と遺伝子導入細胞株の樹立

ラット脳組織より total RNA を抽出し、PAG608 mRNA に特異的な primer を用いた RT-PCR 法により PAG608 cDNA を増幅した。この PAG608 cDNA を逆向きに発現ベクター pcDNA3.1 (+)に挿入し、PAG608 アンチセンス cDNA 発現ベクターを構築した。そして、この発現ベクターを PC12 細胞にリン

酸カルシウム法により導入し、遺伝子導入の選択マーカーである G418 (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を培養液に加えて培養することで、PAG608 アンチセンス cDNA を恒常的に過剰発現している PAG608 発現抑制 PC12 細胞株 (PC12/PAG608AS) を樹立した。さらに、この細胞株において PAG608 発現が抑制されていることを抗 PAG608 抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。また、この細胞株のコントロールとして未挿入の発現ベクターを導入した細胞株 (PC12/CTL) も同様に樹立した。

#### 4. 6-OHDA 毒性に対する PAG608 発現抑制の効果

無処置 PC12 細胞と 2 種類の遺伝子導入細胞株 PC12/PAG608AS 細胞、PC12/CTL 細胞 ( $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) を 24 時間培養し、100  $\mu\text{M}$  6-OHDA を添加してさらに 24 時間後に、それぞれの細胞株の生存率を WST-1 アッセイ (MTT アッセイの変法) によって検討した。

#### 5. ミトコンドリア膜電位に対する PAG608 発現抑制の効果

PC12 細胞と PC12/PAG608AS 細胞 ( $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) を 24 時間培養し、100  $\mu\text{M}$  6-OHDA を添加してさらに 8 時間後に、ミトコンドリアの膜電位をその指示薬である JC-1 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加することで検討した。この JC-1 は、膜電位が正常に維持されている状態では赤色～黄色の蛍光を呈し、膜電位が低下している状態では緑色の蛍光を呈する。JC-1 からの蛍光は蛍光顕微鏡により検出した。

### C. 研究結果

#### 1. L-DOPA 投与により片側パーキンソン病モデル線条体で誘導される遺伝子

片側パーキンソン病モデルを用いた differential display 法での検討で、L-DOPA 投与群の傷害側線条体においてのみ発現が誘導されている遺伝子をいくつか得ることができた。それらをクローニングし、塩基配列を決定したところ、そのうちのひとつがラット

PAG cDNA であることが判明した。

#### 2. 6-OHDA 添加による PC12 細胞での PAG608 および p53 の発現変化

PC12 細胞に 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) を添加して、PAG608 蛋白の発現誘導の有無、さらに p53 蛋白の発現変化を検討した。6-OHDA 添加 3 時間後から著明な p53 の発現増加が認められたが、PAG608 蛋白の発現は 6-OHDA 添加 24 時間後まで有意な変化は認められなかった (図 1)。

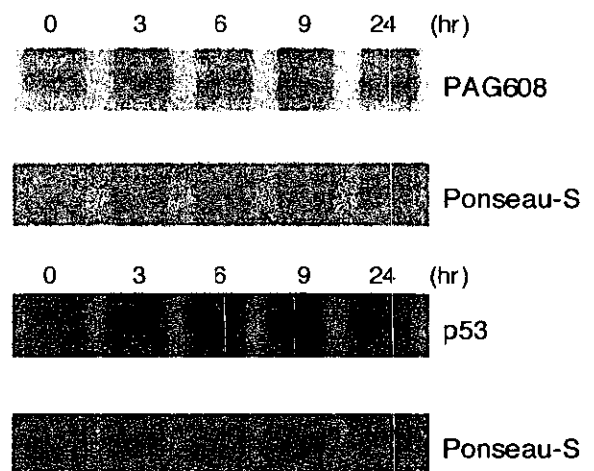


図 1 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) 添加 PC12 細胞における PAG608 および p53 発現の経時的変化

#### 3. PAG608 発現抑制 PC12 細胞株の樹立と 6-OHDA 毒性に対する効果

PAG608 アンチセンス cDNA 発現ベクターを遺伝子導入した PC12/PAG608AS 細胞株において、実際に PAG608 発現が抑制されていることをウェスタンブロット法により検討した。無処置 PC12 細胞と空ベクターを導入した PC12/CTL 細胞では PAG608 蛋白の発現が認められたが、PC12/PAG608AS 細胞においては PAG608 蛋白の発現が抑制されていた (図 2)。そして、これら 3 種類の細胞株に 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間暴露したところ、PC12 細胞と PC12/CTL 細胞の細胞生存率は、それぞれ 52.6%、31.8% にまで減少した。しかし、PC12/PAG608AS 細胞においては 6-OHDA による細胞生存率の低下がほぼ完全に抑制されていた (図 2)。

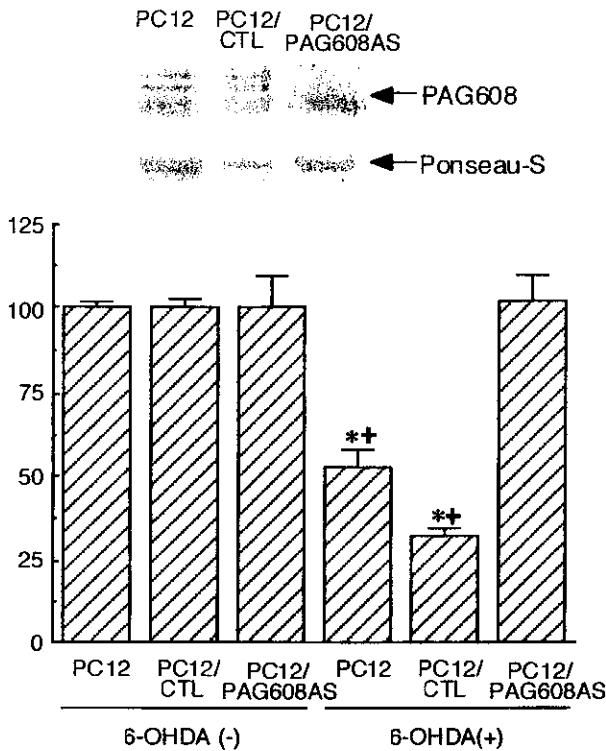


図2 無処置PC12細胞, 空ベクター導入PC12/CTL細胞およびPAG608発現抑制PC12/PAG608AS細胞におけるPAG608蛋白の発現(上段)と6-OHDA (100  $\mu$ M)添加24時間後の細胞生存率の変化(下段). 6-OHDA未添加PC12細胞の生存数を100とした. \* $p < 0.001$  vs. each cell without 6-OHDA, + $p < 0.001$  vs. 6-OHDA-treated PC12/PAG608AS cells.

#### 4. 6-OHDAによるミトコンドリア膜電位の低下に対するPAG608発現抑制の効果

6-OHDAを添加していないPC12細胞, PC12/PAG608AS細胞では, JC-1添加によりミトコンドリアでの赤色~黄色の蛍光が認められ, 両細胞とも膜電位は正常に維持されていた. これに対し, PC12細胞に6-OHDA (100  $\mu$ M)を添加すると, 8時間後においてJC-1の蛍光は緑色に変化しており, ミトコンドリアの膜電位が低下していることが確認できた(図3). ところが, PC12/PAG608細胞では6-OHDA添加8時間後においても6-OHDA非添加群と同様の赤色~黄色の蛍光が認められ, ミトコンドリアの膜電位は正常に維持されていた(図3).

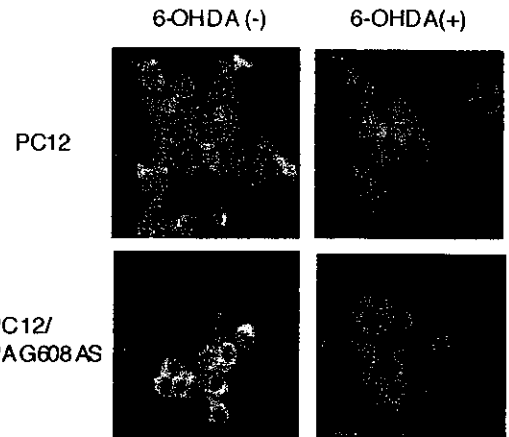


図3 PC12細胞, PAG608発現抑制PC12/PAG608AS細胞における6-OHDA (100  $\mu$ M)添加8時間後のミトコンドリア膜電位の変化. ミトコンドリアの膜電位の変化はその指示薬JC-1 (10  $\mu$ g/ml)添加により得られる蛍光色の変化で評価した.

#### D. 考察

ドパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子として, p53 関連遺伝子で末梢でのアポトーシスに関与するPAG608を differential display 法により同定することができた. 神経系におけるPAG608の発現に関しては, 脳虚血において脆弱な領域にその発現が増加するという報告があるが, 神経細胞死におけるPAG608の役割についての詳細な検討はなされていなかった.

そこで, 6-OHDAにより惹起されるドパミン細胞のアポトーシスにおけるPAG608の役割について, PAG608 アンチセンスcDNA導入細胞株PC12/PAG608ASを用いて検討した. 6-OHDA添加によりPC12細胞でアポトーシスが惹起される際に, アポトーシス誘導分子であるp53の発現誘導は認められたが, PAG608の発現は変化しなかった. しかし, PAG608アンチセンスcDNA発現ベクターを導入し内因性のPAG608発現を抑制した細胞株PC12/PAG608ASでは, 6-OHDAによる細胞死がほぼ完全に抑制されていた. このことは, PAG608が6-OHDAによるアポトー

シスの発現機構に関与していることを示している。さらに、PAG608はその遺伝子転写レベルにおいてではなく、何らかの翻訳後修飾あるいは蛋白間の相互作用によってアポトーシス発現を調節していると考えられる。

アポトーシスには、ミトコンドリアの膜電位の低下を伴うミトコンドリア依存的なもの、非依存的なものが知られている。6-OHDA添加によって惹起されるアポトーシスでは、ミトコンドリアの膜電位が低下することが知られているが、本検討においても6-OHDA添加によりPC12細胞のミトコンドリア膜電位は低下していた。これに対して、PC12/PAG608AS細胞株では膜電位の低下がほぼ完全に抑制されていた。これらの結果より、6-OHDAによるアポトーシス発現機構において、PAG608はミトコンドリア膜電位の低下という過程より上流で関与していると考えられる。6-OHDAによって惹起されるアポトーシスカスケードのどの過程でPAG608が実際に機能しているのか、今後さらに詳細な検討を行う予定である。

PAG608がドパミン神経毒6-OHDAによって誘導されるアポトーシスカスケードの比較的上流で関与しており、さらにこの分子の機能を抑制することでアポトーシスが阻止されるという本検討の結果は、PAG608がドパミン神経細胞死および神経保護における新たな標的分子となりうる可能性を示している。

## E. 結論

本検討により、P53関連分子であるPAG608は、その遺伝子転写レベルにおいてではなく、何らかの翻訳後修飾あるいは蛋白間の相互作用によって6-OHDAによるアポトーシス発現に関与していること、さらに、PAG608は6-OHDAによるアポトーシスカスケードにおいてミトコンドリア障害以前の比較的上流の過程で機能していることを明らかにした。PAG608はドパミン神経細胞死およびその保護において重要な役割を果たして

いる可能性が考えられ、新たな標的分子として注目される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J. Neurochem.*, 76: 1895-1904, 2001.
- ② Kondo, F., Asanuma, M., Miyazaki, I., Kondo, Y., Tanaka, K., Makino, H. and Ogawa, N.: Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats. *Neurosci. Res.*, 39: 339-346, 2001.
- ③ Ogawa N and Tanaka K.: Potential of immunophilin-ligands for neuronal cell rescue. *Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis* (Abe K ed.), pp. 341-348, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- ④ Aoki Sogawa, C., Asanuma, M., Sogawa N., Miyazaki, I., Nakanishi, T., Furuta, H. and Ogawa, N.: Localization, regulation, and function of metallothionein-III/ growth inhibitory factor in the brain. *Acta Med. Okayama*, 55: 1-9, 2001.
- ⑤ 浅沼幹人, 小川紀雄: フリーラジカルと脳障害, *Clinical Neuroscience*, 19: 555-559, 2001.
- ⑥ 小川紀雄, 浅沼幹人: 酸化ストレスと神経細胞死, *Clinical Neuroscience*, 19: 665-667, 2001.
- ⑦ 浅沼幹人, 小川紀雄: 酸化ストレスによる神経障害とその防御, 酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線(吉川敏一編), pp177-181, 医歯薬出版, 東京,

2001.

2. 学会発表

- ① Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Direct redistribution and accumulation of dopaminergic drugs in the nucleus. 9th International Catecholamine Symposium, 2001.
- ② 浅沼幹人, 東洋一郎, 宮崎育子, 田中健一, 小川紀雄: ニューロメラニン合成酵素チロシナーゼとドパミン神経障害の相互連関に関する検討-II, 第42回日本神経学会総会, 2001.
- ③ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東洋一郎, 小川紀雄: Metallothionein-I, II ノックアウトマウスにおける 6-hydroxydopamine によるドパミン神経毒性の増悪. 第28回日本脳科学会, 2001.
- ④ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東洋一郎, 小川紀雄: アストロサイトにおけるドパミンレセプターおよびトランスポーターの発現. 第44回日本神経化学会・第24回日本神経科学合同大会, 2001.
- ⑤ 東洋一郎, 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 小川紀雄: 6-hydroxydopamine 誘導神経細胞死における PAG608 の関与. 第44回日本神経化学会・第24回日本神経科学合同大会, 2001.
- ⑥ 浅沼幹人, 東洋一郎, 宮崎育子, 辻武史, 田中健一, 小川紀雄: メタンフェタミン神経毒性における p53 関連遺伝子の関与. 第31回日本神経精神薬理学会年会, 2001.
- ⑦ Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Expression of tyrosinase, melanin synthetic enzyme, in hemi-parkinsonian model. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2001.

- ⑧ 東洋一郎, 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 小川紀雄: 6-OHDA 誘導神経細胞死における PAG608 の関与. 第24回日本分子生物学会年会, 2001.

研究協力者

東洋一郎

宮崎育子

浅沼幹人

(岡山大学大学院医歯学総合研究科  
脳神経制御学講座神経情報学)

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

酸化ストレスによるドパミン神経細胞死とその防御法の開発

分担研究者 田中 健一

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助手

研究要旨

神経保護修復薬として注目されているイムノフィリンリガンド (IPLs) のパーキンソン病における進行性病変に対する治療薬としての可能性を明らかにする目的で *in vitro* および *in vivo* 実験系を用いて検討した。*In vitro* 培養細胞株を用いた検討により, IPLs である FK506 (免疫抑制性) ならびに GPI1046 (非免疫抑制性) は過酸化水素による細胞生存率の低下を有意に抑制し, 両者は同程度の力価を示した。これは2種類の IPLs が細胞内グルタチオン (GSH) 濃度を増加させることで抗酸化作用を示し, 酸化ストレスによる神経細胞死を防いだものと考えられた。一方, *in vivo* での有効性については, ドパミン神経毒である 6-OHDA 脳室内投与マウスを用いて検討したところ, FK506 ならびに GPI1046 は同様な DA 神経保護作用を示し, *in vivo* においても神経細胞保護作用を有することを明らかにした。また, *in vivo* における検討から, IPLs の神経保護作用の分子機序には, 脳内 GSH 系の活性化を介した抗酸化作用に加えて, 神経栄養因子である GDNF 増加作用も関与することを示した。

ドパミン神経細胞死は酸化ストレスによる直接傷害だけでなく, 変性タンパク質の蓄積によっても引き起こされることから, ドパミン神経系における代表的な沈着タンパク質である  $\alpha$ -シヌクレインが恒久的に過剰発現した細胞株を作成した。予備検討の結果,  $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞はコントロール細胞に比べて, 顕著にユビキチン化されていることから, パーキンソン病の進行性病変に対する防御法を考える上で有用な細胞モデルであると考えられた。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) では黒質-線条体系のドパミン (DA) 神経細胞が特異的に変性・脱落することから, DA の前駆体であるレボドパを補充することを中心に治療が行われている。レボドパ補充療法は初期には劇的な症状改善効果を示すものの, 長期にわたる投与の過程で様々な問題症状が発現することも報告されてきた。また, 同様に使用されてきた DA アゴニストについても, 単独の効果はレボドパに比べて弱い上に DA アゴニスト自身

の神経保護作用というよりは併用によるレボドパ投与量の減量による効果の方が主であるものと考えられている。したがって, 現時点における治療はすべて対症療法といっても過言ではなく, PD の進行性病変を抑える根本的な治療法の開発は急務といえる。我々は PD の防御法について研究を進めてきたが, 本研究ではイムノフィリンリガンド (IPLs) に着目して PD の進行性病変に対する治療薬としての可能性を明らかにする目的で検討を行った。免疫抑制剤であるタクロリムス

(FK506)やシクロスポリンAは内在性結合タンパク質であるイムノフィリンと結合することで作用を発揮することから、IPLsとして知られている。我々は既にIPLsが様々な病態モデルにおいて神経変性を阻止することを報告してきた。しかも、IPLsの神経保護作用は従来報告されてきた免疫抑制作用ではなく、別の作用機序に基づく可能性を指摘してきた。最近では免疫抑制作用を示さない非免疫抑制性IPLsが神経保護作用を示すことも報告されたが、その作用点や分子機序については不明な点も多く、また神経保護修復薬としては改良すべき余地があることも指摘されている。したがって、我々は非免疫抑制性IPLsの神経保護作用の分子機序を明らかにすることで非免疫抑制性IPLsの神経保護修復薬としての可能性を検討するとともにPDの進行性病変に対する治療薬には何が必要なのか明らかにする目的でFK506とその非免疫抑制性誘導体であるGPI1046を用いた検討を行なった。一方、PDにおけるDA神経細胞死は酸化ストレスによる直接傷害だけでなく、変性タンパク質の蓄積によっても引き起こされることから、DA神経系における代表的沈着タンパク質である $\alpha$ -シヌクレインを過剰発現させた細胞株を用いた検討についても行なった。

## B. 研究方法

### ① 過酸化水素による細胞死に対するIPLsの細胞保護作用とその作用機序に関する検討

In vitro 培養実験にはヒトニューロblastoma由来のカテコールアミン産生細胞株SH-SY5Yとヒトグリオーマ由来のU251細胞株を用いたが、これらの細胞は定法により培養した。IPLsの細胞保護作用は(1)WST-1測定法[MTT改良法]による細胞生存率と(2)DTNB法による細胞内グルタチオン(GSH)濃度を指標として評価した。実験スケジュールは、細胞生存率の検討では、IPLsを予め添加して24時間培養した後、新しい

培養液中に過酸化水素を加えて1時間暴露した後評価した。また、細胞内GSH濃度についてはIPLsを培養液に加えて24時間培養した後測定した。

### ② 6-OHDA毒性に対するIPLsの神経保護作用とその作用機序に関する検討

In vivoでの検討にはICR系雄性マウス(7週齢)を用いてIPLsを予め7日間皮下投与した後、最終投与1時間後にDA神経毒である6-OHDAを脳室内投与した。脳室内投与7日後に線条体を取り出し測定に供した。また、6-OHDA脳室内投与時の脳内分子動態を明らかにするため、IPLsを7日間皮下投与し、最終投与1時間後に取り出した線条体を用いた検討も併せて行なった。測定方法は、(1)DA濃度:HPLC-ECD法、(2)過酸化脂質量[TBA-RS量]:2-thiobarbituric acid法、(3)抗酸化物質活性[GSH濃度・SOD活性・catalase活性]:各定法、(4)神経栄養因子活性[GDNFおよびBDNF濃度・GFR- $\alpha$ 1およびTrkB発現量]:ELISAおよびウエスタンブロット法、をそれぞれ用いた。

### ③ $\alpha$ -シヌクレインcDNA発現ベクターの構築と遺伝子導入細胞株の樹立

SH-SY5Y細胞株よりtotal RNAを抽出し、 $\alpha$ -シヌクレインmRNAに特異的なprimerを用いたRT-PCR法により $\alpha$ -シヌクレインcDNAを増幅した。この $\alpha$ -シヌクレインcDNAを発現ベクターpcDNA3.1(+に挿入し、 $\alpha$ -シヌクレインcDNA発現ベクターを構築した。この発現ベクターをSH-SY5Y細胞にリン酸カルシウム法により導入し、遺伝子導入の選択マーカーであるG418(500 $\mu$ g/ml)を培養液に加えて培養することで、 $\alpha$ -シヌクレインcDNAを恒常的に発現している $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現SH-SY5Y細胞株(SH-SY5Y/SYN)を樹立した。さらに、この細胞株において $\alpha$ -シヌクレインが過剰発現していることを $\alpha$ -シヌクレイン抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。同様に、この細胞株のコントロールとして未



挿入の発現ベクターを導入した細胞株 (SH-SY5Y/CTL) も樹立した。

#### ④ $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞のユビキチン化に関する予備検討

$\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞とコントロール細胞の細胞抽出液を調整し、パーキンソン病の典型的な病理所見であるレビー小体中に $\alpha$ -シヌクレインと共に存在することが報告されているユビキチンについて、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロット法で検討した。

### C. 研究結果

#### ① 過酸化水素による細胞死に対する IPLs の細胞保護作用とその作用機序に関する検討

予備検討結果に基づいて、SH-SY5Y 細胞には 1mM と U251 細胞には 2mM の過酸化水素を 1 時間暴露することにして実験を行なった。その結果、FK506 (免疫抑制性) および GPI1046 (非免疫抑制性) とともに予め 24 時間添加しておくことで、過酸化水素暴露による細胞生存率の低下を有意に抑制した。また、2 種類の IPLs の過酸化水素に対する保護作用の力価は同程度であった。一方、細胞内 GSH 濃度についても、FK506、GPI1046 どちらも有意な増加作用を示したが、両者とも U251 細胞でより顕著に認められた。

#### ② 6-OHDA 毒性に対する IPLs の神経保護作用とその作用機序に関する検討

予め FK506 (0.5 mg/kg/day) と GPI1046 (10 mg/kg/day) を投与しておくことで、6-OHDA の DA 神経毒性を有意に改善し、神経保護作用を有することを明らかにした。そこで、IPLs の 6-OHDA 毒性に対する神経保護作用の作用機序を明らかにする目的で、抗酸化作用と神経栄養因子様作用について着目した。すると 2 種類の IPLs は予め投与することで自動酸化による脂質過酸化反応を有意に抑制することから抗酸化作用を示すことを明らかにした。また、抗酸化物質に対する作用についてはどちらも線条体 GSH 量の増加

作用を示したものの、SOD および catalase の活性については有効な作用を示さなかった。一方、神経栄養因子様作用については、FK506、GPI1046 はどちらも中脳黒質における GDNF 量を増加すると共にそのレセプターである GFR- $\alpha$ 1 発現量を有意に低下させた。FK506 については、線条体における BDNF 量を増加すると共にそのレセプターである TrkB 発現量を低下させた。

#### ③ $\alpha$ -シヌクレイン cDNA 発現ベクターの構築と遺伝子導入細胞株の樹立

$\alpha$ -シヌクレイン cDNA 発現ベクターを遺伝子導入した SH-SY5Y/SYN 細胞株において、実際に $\alpha$ -シヌクレインが過剰発現されていることをウエスタンブロット法により検討した。無処置 SH-SY5Y 細胞と空ベクターを導入した SH-SY5Y/CTL 細胞でも内在性のものと思われる $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の発現がわずかに認められたものの、SH-SY5Y/SYN 細胞においては $\alpha$ -シヌクレイン蛋白が過剰に発現していた。

#### ④ $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞のユビキチン化に関する予備検討

空ベクターを導入したコントロール細胞と $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞の細胞抽出液を調整し、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロット法で検討したところ、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞において抗ユビキチン抗体で染色されるバンドが認められ、特に高分子量の領域ではスメア状に染色された。一方、コントロール細胞でも、抗ユビキチン抗体での染色が認められたものの、その染色性は $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞に比べて明らかに低かった。

### D. 考察

過酸化水素による細胞生存率の低下に対する IPLs の抑制作用は 2 種類の細胞間で顕著な差は認められなかった。ところが、GSH 増加作用については U251 細胞でより強く認められたことから、神経細胞よりもグリア細胞

により強く作用をするものと考えられた。この結果は、脳内における GSH ならびに関連酵素の局在が元々神経細胞よりもアストロサイトなどのグリア細胞に多いとするこれまでの報告を考慮すると妥当な結果と考えられた。また、in vitro 培養細胞系を用いた検討により、GPI1046 は FK506 と同程度の細胞保護効果を示すことから、IPLs の神経保護作用の分子機序には免疫抑制作用は必要ないことを明らかにした。In vitro 培養細胞系の結果に加えて in vivo での結果を考慮すると、IPLs の神経保護作用の分子機序には GSH 増加作用を主とする抗酸化作用と神経栄養因子の活性化作用が寄与しているものと考えられた。神経栄養因子の活性化作用については、神経栄養因子自体の濃度は増加するのに対して、そのレセプターのタンパクレベルが低下し、しかもその低下の程度がそれほど強くないことから、神経栄養因子量の増加に伴うダウンレギュレーションの結果である可能性が示唆された。したがって、神経栄養因子活性化作用の作用点は神経栄養因子の合成以前の過程にあるものと推察されたが、今後さらに詳細な検討を行なう予定である。

次に PD における進行性病変に対する治療薬には何が必要なのか解明するために、DA 神経系における代表的沈着タンパク質である  $\alpha$ -シヌクレインの過剰発現細胞株を樹立した。しかも、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞はコントロール細胞に比べてユビキチン化が顕著に進んでいたことから、ヒトの PD での病態を的確に表現しているものと考えられた。今後はこのモデル細胞を用いて PD の進行性病変に対する防御法の開発に関する検討を行なう予定である。

## E. 結論

本研究により、IPLs の神経保護作用の分子機序には免疫抑制作用は必要ないことを明らかにするとともに、GSH 増加作用を主とする抗酸化作用と神経栄養因子の活性化作用が寄

与していることを示唆した。また、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現細胞をヒトニューロブラストーマ由来のカテコールアミン産生細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて樹立したことから、今後の検討が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Tanaka, K., Fujita, N., Yoshioka, M. and Ogawa, N.: Immunosuppressive and non-immunosuppressive immunophilin ligands improve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage by increasing glutathione levels in NG108-15 cells. *Brain Res.*, 889: 236-239, 2001.
- ② Tanaka, K., Hori, K., Wada-Tanaka, N., Nomura, M. and Ogawa, N.: FK506 ameliorates the discrimination learning impairment due to preventing the rarefaction of white matter induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res.*, 906: 184-189, 2001.
- ③ Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N., Haque, Md. E., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular mechanism in activation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D2 agonist. *Neurochem. Res.*, 26: 31-36, 2001.
- ④ Hironaka, N., Tanaka, K., Izaki, Y., Hori, K., Niki, H. and Nomura, N.: Memory related acetylcholine release from the rat prefrontal cortex and hippocampus: A microdialysis study. *Brain Res.*, 901: 143-150, 2001.
- ⑤ Haque Md.E., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Relationship between locomotor activity and monoamines following single and double transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurochem. Res.*, 26: 401-406, 2001.

## 2. 学会発表

- ① Tanaka K, Miyazaki I, Fujita N, Asanuma M and Ogawa N.: Molecular mechanism in protective effects of cabergoline. 9th International Catecholamine Symposium, 2001.
- ② Ogawa N, Tanaka K, Miyazaki I, Fujita N and Asanuma M.: Protective properties of GPI-1046, a non-immunosuppressive immunophilin ligand. 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, 2001.
- ③ Ogawa N, Tanaka K, Miyazaki I, Fujita N, Asanuma M and Higashi Y.: Biochemical basis for neuroprotective effects of cabergoline. 14th International Congress on Parkinson's Disease, 2001.
- ④ 田中健一, 藤田尚子, 浅沼幹人, 小川紀雄: イムノフィリンリガンドが示す神経保護効果の生化学的基盤. 第74回日本薬理学会年会, 2001.
- ⑤ 田中健一, 小川紀雄: 細胞内グルタチオン系の活性化を基盤としたパーキンソン病薬物療法に関する研究. 第1回パーキンソン病フォーラム, 2001.
- ⑥ 田中健一, 藤田尚子, 宮崎育子, 吉岡真世, 東 洋一郎, 浅沼幹人, 小川紀雄: 免疫抑制性ならびに非免疫抑制性イムノフィリンリガンドが示す細胞保護効果と作用機序. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 2001.
- ⑦ 藤田尚子, 田中健一, 宮崎育子, 小川紀雄: ドパミンアゴニスト ropinirole が示す神経保護効果の作用機序. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 2001.
- ⑧ 田中健一, 吉岡真世, 藤田尚子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 非免疫抑制性イムノフィリンリガンドの神経保護効果とその分子機序. 第31回日本神経精神薬理学会年会, 2001.

## 研究協力者

藤田 尚子

東 洋一郎

(岡山大学大学院医歯学総合研究科  
脳神経制御学講座神経情報学分野)

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

酸化ストレス傷害時のユビキチン系の解析に関する研究

分担研究者 岩井 一宏

大阪市立大学大学院医学研究科分子制御分野 教授

研究要旨

酸化ストレスにより蛋白質はダメージを受け失活するのみならず、蛋白質の蓄積・凝集をきたすことが知られており、神経変性疾患の病因の大きな位置を占めることが知られている。それゆえ酸化蛋白質の処理にあたるユビキチン系の解析は神経変性疾患の予防・治療を考える上で非常に重要である。我々はこれまでに鉄代謝の主たる制御因子である IRP2 の鉄依存性分解の研究から、鉄による IRP2 蛋白質の酸化変化がユビキチン系に識別され分解に至ることを明らかにしてきた。本研究では、我々が新たに開発した酸素存在下、非存在下での differential 酵母 2-ハイブリッドスクリーニングにより酸化 IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼの同定に成功し、HOIL-1 と名付けた。今後、HOIL-1 リガーゼのドパミン神経系脱落への関与の検索を進める予定である。

A. 研究目的

ドパミン神経系の変性・脱落によって生じるパーキンソン病においては、鉄の沈着・酸化ストレスがその細胞死に関与していることが知られている。酸化ストレスは遺伝子発現の誘導など多彩な作用を有していることが知られているが、神経変性疾患においては蛋白質の酸化ダメージが引き起こす、蛋白質の失活、凝集がその病因の大きな部分を占めることが明らかとなっている。

ユビキチン系は E1/E2/E3 の 3 種の酵素群の働きで基質蛋白質にエネルギー依存的に低分子蛋白質であるユビキチンを付加し、付加された基質蛋白質をプロテアソームによる分解に至らしめるシステムである。これらの分子群のなかで E3:ユビキチンリガーゼが基質を選択的に識別する最も重要な分子である。

酸化蛋白質はユビキチン系で処理されることが知られているが、これまでのところ、酸化ダメージを受けた蛋白質を選択的に識別す

るユビキチンリガーゼは明らかになっていない。

我々は、これまで鉄代謝の制御因子である iron regulatory protein 2(IRP2)の鉄依存性分解の分子機構の解析に従事し、鉄による IRP2 の酸化が、IRP2 の鉄依存性分解のシグナルとして機能すること、IRP2 の鉄依存性分解に必須のドメインである IDD (iron dependent degradation)ドメインを明らかにしてきた。そこで、本研究においては酸化 IRP2 をモデル系として、酸化蛋白質を選択的に識別する E3:ユビキチンリガーゼの同定を目的として、IDD ドメインを Bait とした酵母 2 ハイブリッドスクリーニング法を用いて、IDD ドメインと選択的に結合する分子をコードする cDNA の単離を目指した。

B. 研究方法

出芽酵母 AH109 株に pGBKT7-IDD を transform した株に  $1.4 \times 10^6$  クローンのヒト