

20010646

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

パーキン蛋白の機能解析と

黒質変性及びその防御

(H13-脳-005)

平成 13 年度 - 15 年度

総括・分担研究報告書

(平成 13 年度分)

主任研究者 水野 美邦

分担研究者 永津 俊治

田中 啓二

小川 紀雄

久野 貞子

平成 14 年 4 月 5 日

厚生科学研究費補助金
脳科学研究事業

パーキン蛋白の機能解析と
黒質変性及びその防御
(H13-脳-005)

平成 13 年度 - 15 年度
総括・分担研究報告書
(平成 13 年度分)

主任研究者 水野 美邦

平成 14 年 4 月 5 日

様式 A (4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 14 年 4 月 5 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 〒114-0014 東京都北区田端 6-3-20
ツカガナ ミズノ ヨシヒ

研究者 氏 名 水 野 美 邦

(所属機関 順天堂大学医学部)

平成 13 年度厚生科学研究費補助金(脳科学 研究事業)に係わる研究事業を完了したので
次の通り報告する。

研究課題名(課題番号) : パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防御 (H13-脳-005)
国庫補助金精算所要額 : 金 98,020,000 円也 (うち間接経費 22,620,000 円)

目 次

I. 総括研究報告	
パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防御に関する研究 水野美邦	1
II. 分担研究報告	
1. パーキン遺伝子・遺伝子・遺伝子産物解析 水野美邦	5
2. パーキントランスジェニックアニマルの作製・分析 永津俊治	11
3. パーキンノックアウトマウス作製・解析 田中啓二	17
4. パーキン発現細胞作製・解析: マウスドパミン発現細胞における パーキン遺伝子導入およびその発現抑制の影響 小川紀雄	23
5. パーキン蛋白と神経細胞保護: ELISA によるパーキン蛋白の 定量法の確立とパーキン病態への関与 久野貞子	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防御

主任研究者：水野 美邦 順天堂大学医学部 神経学教授

研究要旨

常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病（ARJP）は、遺伝性パーキンソン病の中で最も頻度が高く、世界に広く分布する疾患である。全パーキンソン病の中で、遺伝性パーキンソン病の占める割合は低い（5～10%）、分子レベルで発症機構を解明できる利点があり、その結果は必ずや孤発型パーキンソン病の解明に寄与するはずである。このような理念のもとに ARJP における黒質神経細胞死の分子機構を解明することを目標に研究を推進している。本年度は、本症の原因蛋白であるパーキン蛋白（ユビキチンリガーゼの一種）と結合する蛋白3つ（CDCrel-1、 α -synuclein、Pae1受容体）を抽出した。後2者はユビキチンリガーゼとしてのパーキン蛋白の基質となり、本症患者の脳での蓄積を証明した。現在これらの蛋白と黒質神経細胞死の関連に関し研究を進めている。CDCrel-1、パーキン蛋白共にシナプス小包体に存在し、両者が関連して伝達物質放出・取り込みに関与する可能性が考えられ、現在分析中である。

更にパーキン蛋白の機能解析を推進するため、トランスジェニック・ノックアウト動物の作製を進めており、それぞれ F1、キメラマウスの作製まで成功した。ノックアウト動物が作製できれば、将来のパーキンソン病遺伝子治療のモデルとしての有用性も高い。またパーキン蛋白には、神経細胞死抑制作用を示唆するデータがあり、この点でも孤発型パーキンソン病の発症機構の解析と根本的治療法開発の研究に寄与するものと考えられる。

尚、研究報告の詳細に関しては、各分担研究者の研究報告書も参照されたい。

A. 研究目的

常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病（ARJP）の原因遺伝子であるパーキン遺伝子とその遺伝子産物であるパーキン蛋白の機能解析を推進し、本症における黒質神経細胞死の機構を分子レベルで解明することを目的とする。更にその結果を応用し、頻度の高い孤発型パーキンソン病の発症機構解明をめざすことを目的とする。

B. 研究方法

パーキン遺伝子の変異解析は、12 のエクソンを特異的に増幅するプライマーを設定、PCRにて

増幅後、アガロースゲル電気泳動にて各エクソンを検出した。本法でエクソン欠失が検出できなかった場合は、各エクソンを増幅後、直接塩基配列決定を行い、点変異や小さな欠失の有無を分析した。更に点変異も発見されない場合は、ヘテロ接合の変異の有無を、Taq Man Probe を使用して、gene dosage technique にて解析した。

パーキン蛋白の機能解析は、酵母 two hybrid 法にてパーキンの全長及び ubl (ubiquitin-like domain) と linker 部分の cDNA を bait にヒト脳 cDNA library をスクリーニングした。更に単離した分子を mammalian cell 内での結合を確認し

た。またパーキンと結合する脳内在性の分子をスクリーニングした。リコンビナントパーキン蛋白を精製し、若年性パーキンソン病凍結剖検脳や孤発型パーキンソン病の凍結剖検脳を使い抗パーキン抗体で免疫沈降法を行いパーキン蛋白と結合する分子を検索した。

パーキン蛋白の細胞内分布は、SH-SY5Y neuroblastoma を用い、抗パーキン抗体で細胞内局在を検討した。また GFP を tag 蛋白として正常パーキン蛋白と mutant form でその分布の違いを検討した。更にシナプス小胞画分を精製し、免疫電顕で、パーキン蛋白の局在を確認した。

パーキン mRNA の発現分布は、ジゴキシゲニンでラベルしたパーキン cRNA を probe にして、ラット脳を用い発達過程でのパーキン mRNA の分布とその変化を検討した。更にパーキン蛋白と結合するとされる E2 である UbcH7 の rat 型である UbcR7 を、同じようにラベルし in situ hybridization にて、その分布を観察した。

パーキントランスジェニックアニマルの作製は、ファウンダーマウスとして正常パーキン遺伝子導入トランスジェニックマウスは雄 4 匹、雌 5 匹を得た。また、パーキン(T415N)遺伝子導入マウスは雄 5 匹、雌 8 匹を得た。順次 10 週齢マウスになった個体から交配を行って F1 マウスを作製している。また、F1 マウス作製時に CAT 遺伝子産物の確認には抗 CAT 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いた。

更にトランスジェニックアニマルを用いた研究の準備の 1 つとして、グリア細胞因子 (サイトカイン、抗原提示分子、神経栄養因子など) について、パーキンソン病患者剖検脳からパンチアウトされた組織、及び MPTP 投与マウス脳を用い、酵素免疫測定法 (ELISA) と RT-PCR 法によって測定し、また免疫組織化学法で細胞分布を検索した。

パーキンノックアウトアニマルの作製は、12

個のエクソンからなるパーキン遺伝子のエクソン 2 をノックアウトするために、BAC クローンよりエクソン 2 周囲約 12K をブルースクリプトベクターにクローニングした。エクソン 2 のはじめの 5 塩基と GFP をインフレームで繋ぐ DNA を PCR で作製し、さらに neo 耐性遺伝子を lox で挟んだサイトを繋げ、3' 側シークエンス 1.5K、5' 側ロッキングアーム 8K のターゲティングベクターを構築した。ES 細胞のスクリーニングは、TT2 細胞を利用し、ターゲティングベクターをエレクトロポレーションで導入した。0.2 mg/ml の G418 存在下で培養し、薬剤耐性細胞をピックアップした。3' 側にプライマーおよびプローブを設定し PCR、およびサザンブロッティングによりノックアウト ES を探索した。得られた ES クローンをマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、翌日仮親の子宮に移植した。

線虫を用いた研究として、線虫パーキン遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子を連結したベクターを構築し、これを用いてトランスジェニックパーキン線虫を作製した。また、パーキン遺伝子を欠損させたノックアウト線虫を作製した。

C. 研究結果

パーキン遺伝子の変異は 474 家系のサンプルについて変異解析を行い、劣性遺伝の明らかな 152 家系では 58.9% にパーキン遺伝子の変異が発見された。また一見優性遺伝の家系にも 11.3% にパーキン遺伝子変異が発見された。また若年発症 (40 歳未満) の孤発型パーキンソン病患者 260 例の 13.1% にパーキン変異が発見された。本邦ではエクソンの欠失が多いが、点変異も認められた。

パーキン蛋白の機能解析については、3 つのパーキン結合蛋白を抽出した。即ち CDCrel-1、 α -synuclein-22、Pael 受容体である。CDCrel-1

は、パーキンと結合するが基質とはならず、ユビキチン化はされなかった。後2者はユビキチン化され、患者前頭葉での蓄積が証明され、黒質変性に重要な働きをする物質と考えられ、今後これらの蓄積が細胞に及ぼす効果を分子レベルで探索することにより、黒質変性機序の解明が推進すると考えられた。

パーキン蛋白の細胞内分布は、ゴルジ装置、細胞質、シナプス小胞に存在することが判明した。CDCrel-1 はシナプス蛋白の一種であり、パーキンと結合して伝達物質放出の制御に関わる可能性が考えられ、今後この方面の研究の重要性が認識された。またラット脳で、パーキン mRNA 及びパーキン蛋白と特異的に結合するユビキチン結合酵素 UbcR7 の mRNA の発現分布をラットにて分析した。両者の mRNA 発現分布は極めて類似しており、胎生 19 日から発現が見られ、広く脳に発現していたが、大脳皮質、海馬、小脳で高発現をみた。両者の発現分布が類似していることは、パーキン蛋白のユビキチンリガーゼとしての機能が神経細胞にとって重要なことを示唆している。

パーキントランスジェニックマウスに関しては、ヒト正常パーキン遺伝子と、415 番のアミノ酸がトレオニン(T)からアスパラギン酸(N)に変異したパーキン(T415N)遺伝子とを用いて、パーキントランスジェニックマウスの作製を進め、F1マウスの作製に成功した。

パーキントランスジェニックマウスにおける脳内サイトカインと神経栄養因子の解析を予定しているため、その準備として、孤発型パーキンソン病剖検脳と 1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン (MPTP) パーキンソニズムモデルマウスの黒質線条体におけるサイトカインや神経栄養因子の変化を、グリアとニューロンの細胞レベルで検索し、マイクログリアの活性化を示す予備的成績を得た。またパーキンソニズ

ムをおこすマンガン(Mn)が *in vitro* で黒質線条体ドーパミンニューロンに対して MPTP と類似の作用をもつことを見出した。

パーキンノックアウトマウスに関しては、パーキン遺伝子のエクソン2の最初の5塩基にインフレームする形で GFP を融合したノックインマウスを作製中で、現在、キメラマウスの作製に至っている。

線虫パーキンの遺伝学的機能解析については、パーキンのトランスジェニック線虫の作製を行い、パーキンが、脳神経組織や生殖器官に強く発現していることを明らかにした。また、パーキン遺伝子を欠損させたノックアウト線虫を作製したが、大きな行動異常は観察されていない。

D. 考察

常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病 (ARJP) は、遺伝性パーキンソン病の中で最も頻度が高く、世界に広く分布する疾患であることが判明した。全パーキンソン病の中で、遺伝性パーキンソン病の占める割合は低い(5~10%)、分子レベルで発症機構を解明できる利点があり、その結果は必ずや孤発型パーキンソン病の解明に寄与するはずである。このような理念のもとに ARJP の研究を推進し、パーキン蛋白と結合する蛋白3つ (CDCrel-1、 α -synuclein、P a e l 受容体) を抽出した。後2者はユビキチンリガーゼとしてのパーキン蛋白の基質となり、本症患者の脳での蓄積を証明した。今後それらの蓄積と神経細胞死の解析が重要であり、取り組んでいる。CDCrel-1 は、シナプス小包体蛋白の一種で、パーキン蛋白と結合し、伝達物質放出への関与が予想され、分析中である。このことは、パーキン蛋白がユビキチンリガーゼ以外の機能も有することを示唆する。

更にパーキン蛋白の機能解析を推進するため、

トランスジェニック・ノックアウトアニマルの作製を進めており、それぞれ F1、キメラマウスの作製まで成功した。ノックアウトアニマルが作製できれば、将来のパーキンソン病遺伝子治療のモデルとしての有用性も高い。またパーキン蛋白には、神経細胞死抑制作用を示唆するデータがあり、この点でも孤発型パーキンソン病の発症機構の解析と根本的治療法開発の研究に着よするものと考えられる。

F. 研究発表

分担研究報告書並びに研究成果の刊行に関する一覧表参照.

パーキン遺伝子・遺伝子産物解析

主任・分担研究者：水野 美邦 順天堂大学医学部 神経学教授

研究要旨 常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病（ARJP）の原因遺伝子であるパーキンの変異解析とパーキン蛋白の機能解析を中心に研究を進め、本症における黒質神経細胞の変性機構を分子レベルで研究した。

パーキン遺伝子の変異は 474 家系のサンプルについて変異解析を行い、劣性遺伝の明らかな 152 家系では 58.9% にパーキン遺伝子の変異が発見された。また一見優性遺伝の家系にも 11.3% にパーキン遺伝子変異が発見された。また若年発症（40 歳未満）の孤発型パーキンソン病患者 260 例の 13.1% にパーキン変異が発見された。本邦ではエクソンの欠失が多いが、点変異も認められた。

パーキン蛋白の機能解析については、3 つのパーキン結合蛋白を抽出した。即ち CDCrel-1、 α -synuclein-22、Pael 受容体である。CDCrel-1 は、パーキンと結合するが基質とはならず、ユビキチン化はされなかった。後 2 者はユビキチン化され、患者前頭葉での蓄積が証明され、黒質変性に重要な働きをする物質と考えられ、今後これらの蓄積が細胞に及ぼす効果を分子レベルで探索することにより、黒質変性機序の解明が推進すると考えられた。

パーキン蛋白の細胞内分布は、ゴルジ装置、細胞質、シナプス小胞に存在することが判明した。CDCrel-1 はシナプス蛋白の一種であり、パーキンと結合して伝達物質放出の制御に関わる可能性が考えられ、今後この方面の研究の重要性が認識された。またラット脳で、パーキン mRNA 及びパーキン蛋白と特異的に結合するユビキチン結合酵素 UbcR7 の mRNA の発現分布をラットにて分析した。両者の mRNA 発現分布は極めて類似しており、胎生 19 日から発現が見られ、広く脳に発現していたが、大脳皮質、海馬、小脳で高発現をみた。両者の発現分布が類似していることは、パーキン蛋白のユビキチンリガーゼとしての機能が神経細胞にとって重要なことを示している。

A. 研究目的

【研究 1】 パーキン遺伝子の変異解析：パーキン遺伝子変異による常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病は、いまや最も頻度の高い家族性パーキンソン病で、世界に幅広く存在することが判明しつつある。本遺伝子に見られる変異の種類を解析し、変異の集積部位の検討並びに臨床相関の有無の解析を目的とする。

【研究 2】 パーキン蛋白の機能解析：パーキン蛋白と結合する蛋白をスクリーニングし、その機

能解析を行うことを目的とする。パーキン蛋白の機能自体は、我々のグループの研究により、既にユビキチンリガーゼの一種であることが判明している。従ってパーキンと特異的に結合する蛋白の同定とそれらにユビキチンリガーゼ活性があるかどうかを解析することが重要である。更にこれらの結果を踏まえ、本症における黒質神経細胞死の機序をあきらかにすることを目的とする。

【研究 3】 パーキン蛋白の細胞内局在：パーキン蛋白の細胞内局在を解析し、パーキン蛋白の機

能解析結果と合わせ、正常細胞内でのパーキン蛋白の機能の解明、並びにその異常による黒質神経細胞死の分子機構を明らかにすることを目的とする。

〔研究 4〕パーキン mRNA の発現分布：パーキン蛋白は、ユビキチンリガーゼの一種であることを明らかにしているが、これを更に検証するため、パーキン蛋白と特異的に結合するユビキチン結合酵素及びパーキンの mRNA の発現分布をラットを用いて分析することを目的とする。

B. 研究方法

〔研究 1〕パーキン遺伝子の変異解析

パーキン遺伝子は、12 のエクソンを持つ。それぞれのエクソンを特異的に増幅するプライマーを設定、PCR にて増幅後、アガロースゲル電気泳動にて各エクソンを検出した。本法では、エクソンのホモ接合の欠失が検出できる。本法エクソン欠失が検出できなかった場合は、各エクソンを増幅後、直接塩基配列決定を行い、点変異や小さな欠失の存在の有無を分析した。更に点変異も発見されない場合は、ヘテロ接合の変異の有無を、Taq Man Probe を使用して、gene dosage technique にて解析した。

〔研究 2〕パーキン蛋白の機能解析

(1) CDCrel-1:

酵母 two hybrid 法にてパーキンの全長及び ubl (ubiquitin-like domain) と linker 部分の cDNA を bait にヒト脳 cDNA library をスクリーニングした。更に単離した分子を mammalian cell 内での結合を確認した。

(2) α -synuclein:

パーキンと結合する脳内在性の分子をスクリーニングした。リコンビナントパーキン蛋白を精製し、若年性パーキンソン病凍結剖検脳や孤発型パーキンソン病の凍結剖検脳を使い抗パーキン

抗体で免疫沈降法を行いパーキン蛋白と結合する分子を検索した。

(3) Pael-receptor:

CDCrel-1 と同様に酵母 two hybrid 法にて全長パーキン cDNA を bait として用いて、ヒト成人脳 cDNA library をスクリーニングした。

〔研究 3〕パーキン蛋白の細胞内局在

SH-SY5Y neuroblastoma を用い、抗パーキン抗体で細胞内局在を検討した。また GFP を tag 蛋白として正常パーキン蛋白と mutant form でその分布の違いを検討した。更にシナプス小胞画分を精製し、免疫電顕で、パーキン蛋白の局在を確認した。

〔研究 4〕パーキン mRNA の分布

ジゴキシゲニンでラベルしたパーキン cRNA を probe にして、ラット脳を用い発達過程でのパーキン mRNA の分布とその変化を検討した。更にパーキン蛋白と結合するとされる E2 である UbcH7 の rat 型である UbcR7 を、同じようにラベルし in situ hybridization にて、その分布を観察した。

C. 研究結果

〔研究 1〕パーキン遺伝子の変異解析

これまで教室に集積された 474 家系のパーキンソン病患者サンプルの分析を行った。そのうち 152 家系は、兄弟間での発症または両親の血族結婚があり、あきらかに劣性遺伝の家系であった。これらの家系中 88 家系、58.9%にパーキン遺伝子変異が発見された。更に累代発症があり、一見優性遺伝と見られる 62 家系の分析を行い、7 家系、11.3%にパーキン遺伝子変異を認めた。これらの家系における発症者は両方の染色体に変異を有し、一見優性遺伝であるが、発症者と保因者の婚姻による発症であることがわかり、本質的には劣性遺伝であった。また家族歴のない若年発症

者（40歳未満の発症）260例を分析し、34例、13.1%にパーキン遺伝子変異を発見した。

エクソンの欠失変異は、エクソン3から6の間に集中する傾向があった。本邦では、点変異は少なく、エクソン欠失が多かった。

発症年齢その他、臨床症候と、変異のタイプとのはっきりした相関は認められなかった。現在これらの症例につき、変異部位、種類、臨床との関係につき、詳細な報告を準備中である。

[研究2] パーキン蛋白の機能解析

(1) CDCrel-1

CDCrel-1は、シナプス小胞体に存在する蛋白の一種である。Yeast two hybrid法でパーキンと結合する蛋白をスクリーニングし、とれたクローンの1つをシーケンスした結果、その結合蛋白は、CDCrel-1であることが判明した。CDCrel-1とパーキンの結合は、ユビキチン様ドメインとリンカー部分と、RING boxの2カ所で結合した。次にFlag-パーキンとMyc-CDCrel-1をHEK-293細胞にトランスフェクトし、抗Myc抗体で免疫沈降を行い、沈渣を可溶化して抗CDCrel-1抗体でWestern blottingを行った所、ポリユビキチン化を示す高分子スメアは観察されず、CDCrel-1は、パーキン蛋白とは結合するが、ポリユビキチン化はされない、即ちパーキンの主要な基質とはならないことが示された。

(2) α -synuclein-22

次にパーキン遺伝子変異の判明している患者剖検脳と対照患者脳から、パーキン結合蛋白の抽出を試みた。前頭葉ホモジェネートを抗パーキン抗体で免疫沈降し、抗 α -synuclein抗体でWestern blottingを行った。22kDaの位置に、抗 α -synuclein抗体と反応するバンドがAR-JP患者4例の前頭葉いずれからも検出された。対照脳及び孤発型パ

ーキンソン病患者剖検脳やLewy小体型痴呆患者脳からは検出されなかった。正常の α -synucleinのバンドは、16kDの所にバンドがでる筈であるが、この部位には検出されなかった。しかし、前頭葉ホモジェネートを抗 α -synuclein抗体で免疫沈降し、Western blottingも別の抗 α -synuclein抗体で行うと、全例で太い16kDバンドが観察された。AR-JP脳では、更に22kDの所にもバンドが得られたが、対照脳、孤発型パーキンソン病脳では観察されなかった。22kDaのバンドは、免疫沈降法で得た沈渣をシアリダーゼとグリコシダーゼの両酵素で処理すると22kDのバンドが16kDのバンドとして認められた。従って、 α -synucleinの修飾は α 結合型糖鎖と結論づけた。

(3) Pael 受容体

酵母two hybrid法で単離できたG蛋白質共役型膜タンパク質と推定される分子をPael receptorと名付けた。この分子の抗体を作製し、その分布を検討したところ、脳に広範囲に渡って発現していたが、脳と脳梁で高発現していた。更にAR-JP患者剖検脳で蓄積の有無を確認したところTriton X-100不溶性画分に蓄積を認めた。またER stressに關与するBipの上昇も認められた。この分子を一過性高発現させる時間経過とともに細胞死が誘導された。この系にパーキン蛋白を発現させると神経細胞死が抑制された。これら実験結果はPael receptorが神経細胞死を誘導する分子であることが推定される。

[研究3] パーキン蛋白の細胞内局在

ドパミン神経細胞のよいモデルであるSH-SY5Yを使い内在性パーキン蛋白の局在を検討した。Retinoic acidで処理したSH-SY5Yではドット状に染色され、胞体ではGolgi complexが染色された。更にmutantパーキンの局在を検討

するために GFP を tag 蛋白としてパーキン蛋白の C 末に付加し、局在を検討した。C 末に tag を付加した場合は上記内在性パーキン蛋白とその分布に違いがないことを確認した上で mutant form の局在の違いを検討した。その結果 Ubl ドメインのみを含む mutant form だけが細胞質全体に分布したが、他の mutant form は全て Golgi complex に局在していた。パーキン蛋白が Golgi complex に局在することは axonal transport など膜輸送に関与していることが予想された。このことからシナプス小胞にパーキン蛋白が存在していることを考え更に免疫電顕で観察したところパーキン蛋白はシナプス小胞上に存在していた。

[研究 4] パーキン mRNA の発現分布

両者の mRNA 発現分布は極めて類似しており、胎生 19 日から発現が見られ、広く脳に発現していたが、大脳皮質、海馬、小脳で高発現をみた。その発現は発達と共に増加していた。但し分布は脳広範囲にわたって認められた。黒質ドパミン細胞にも発現は認められた。UbcR7 の発現はパーキン mRNA とほぼ同じパターンを示していた。両者の発現分布が類似していることは、パーキン蛋白のユビキチンリガーゼとしての機能が神経細胞にとって重要なことを示唆している。

D. 考察

パーキン遺伝子の変異による ARJP の存在が世界に広く存在することは、今回海外から依頼された検体の分析からも明らかになった。文献に報告されたものを合わせると、台湾、韓国などアジアの国を始め、アメリカ、カナダ、ヨーロッパ諸国、イスラエル、一部のアフリカにも存在が確認され、今や家族性パーキンソン病の中で、最も高頻度に見られる病型として、世界の研究者お注目を集めるに至っている。まだ保因者の頻度は推定の域を

でないが、複合ヘテロ接合体のパーキン遺伝子変異での発症者が少なくないことや、孤発型若年発症者の間でも、今回の研究で約 13% にパーキン遺伝子の変異が見つかったことは、パーキン遺伝子変異の保因者が以外に多いことを示唆している。

一方劣性遺伝を示しながら、パーキン遺伝子に変異のみつからない家系が約 40% 存在することも明らかとなり、劣性遺伝のパーキンソン病を示す別の遺伝子が存在することが明らかになりつつある。事実パーキン遺伝子に変異の見つからなかった我々の家系の中から、1 番染色体に連鎖する家系が 5 家系みつきり、現在鋭意その原因遺伝子の同定作業を行っている。もう 1 つ原因蛋白が見つれば黒質変性機序の解明に大きな手がかりになると期待できる。本研究の思わぬ方向での成果の 1 つと考えられる。

一方、パーキン蛋白の機能に関しては最重要課題としてパーキン蛋白の基質同定がある。その基質として CDCrel-1、 α -synuclein-22、Pael receptor の 3 分子が候補である。CDCrel-1 は exocytosis に関与する分子として注目され、 α -synuclein-22 は Lewy 小体との関連で注目されている。そして Pael receptor は細胞死を惹起させる分子として注目されているが、何れの分子が AR-JP の細胞死を起こすかは現時点では不明である。今後の検討が必要であるが、我々の研究室では、他にも 12 種のクローンを単離できており、更に解析を進めて行く予定である。

パーキン蛋白の局在ではシナプス小胞と Golgi complex に存在していることより、基質もまたシナプス小胞に存在している可能性がある。このような観点で考えると CDCrel-1 が有力な候補であるが、我々の実験結果からは、主な基質とはいえない。残りの基質候補である α -synuclein-22 と Pael receptor であるが、 α -synuclein-22 は孤発型 PD と

- first report on a Parkin gene mutation in a Taiwanese family. *Mov Disord* 16: 164-166, 2001
- Mochizuki H, Hayakawa H, Migita M, Shibata M, Tanaka R, Suzuki A, Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Yamada M, Tamayose K, Shimada T, Miura M, Mizuno Y. An AAV-derived apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *PNAS* 98: 10918-10923, 2001
- Mori H, Motoi Y, Kobayashi T, Hasegawa M, Yamamura A, Iwatsubo T, Mizuno Y. Tau accumulation in a patient with pallidoniigroluysian atrophy. *Neurosci Lett* 309: 89-92, 2001
- Noda K, Okuma Y, Fukae J, Fujishima K, Sadamasa H, Yoshiike T, Mizuno Y. Sweet's syndrome associated with encephalitis. *J Neurol Sci* 188: 95-97, 2001
- Noda K, Miwa H, Miyashita N, Tanaka S, Mizuno Y. Monoataxia of upper extremity in motor cortical infarction. *Neurology* 56: 1418-1419, 2001
- Okuma Y, Tanaka R, Fujishima K, Kobayashi T, Mizuno Y. Cortical reflex action myoclonus in neurosyphilis. *Eur Neurol* 45: 193-194, 2001
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. Ubiquitination of a new form of α -synuclein by Parkin from human brain: Implications for Parkinson's disease. *Science* 293: 263-269, 2001
- Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Hattori N, Watanabe Y, Nagao T, Yokochi M, Hamamoto M, Mizuno Y. Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and risk of atherothrombotic cerebral infarction in the Japanese. *Stroke* 32: 1481-1486, 2001
- 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 Disord* 7: 311-314, 2001
- Tanaka R, Mochizuki M, Suzuki A, Katsube N, Ishitani R, Mizuno Y and Urabe T: Induction of Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. 2001 (in press)
- 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 Parkininteracting and ubiquitin- conjugating enzyme, in rato brain. *J Neurochem* 77: 1561-1568, 2001
- [総説]
- Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K. Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 477-482, 2001
- Tanaka K, Suzuki T, Chiba T, Shimura H, Hattori N, Mizuno Y. Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med* 79: 482-494, 2001
- [英文・単行本]
- Mizuno Y, Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Mori H, Shimura H, Kubo S, Kobayashi H, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N. Familial Parkinson's disease α -synuclein and Parkin. *Parkinson' Disease: Advanced in Neurology* vol. 86, Calne D, Clane S, eds, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp 13-21

パーキントランスジェニックアニマル作製・分析

分担研究者：永津 俊治 藤田保健衛生大学 名誉教授 客員教授

研究要旨 ヒト正常型および変異型のパーキンのトランスジェニックアニマルを作製して、動物の表現型の変化を、分子、細胞、個体レベルで分析することを目的として研究を進めている。

[研究 1] パーキントランスジェニックマウスの作製。ヒト正常パーキン遺伝子と、常染色体劣性遺伝若年性パーキンソニズム(autosomal recessive juvenile parkinsonism, ARJP)原因遺伝子の一種である 415 番のアミノ酸がトレオニン(T)からアスパラギン酸(N)に変異したパーキン(T415N)遺伝子とを用いて、パーキントランスジェニックマウスの作製を進めている。F1 マウスの作製に至っている。

[研究 2] 脳内サイトカインと神経栄養因子の解析。研究 1 において、パーキントランスジェニックマウスの作製による ARJP モデルマウスの分析と比較するために、孤発型パーキンソン病剖検脳と 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)パーキンソニズムモデルマウスの黒質線条体におけるサイトカインや神経栄養因子の変化を、グリアとニューロンの細胞レベルで検索している。マイクログリアの活性化を示す予備的成績を得ている。またパーキンソニズムをおこすマンガン(Mn)が *in vitro* で黒質線条体ドーパミンニューロンに対して MPTP と類似の作用をもつことを見出した。

A. 研究目的

[研究 1] 水野・清水らによって、1968 年に、常染色体劣性遺伝若年性パーキンソニズム(autosomal recessive juvenile parkinsonism, ARJP)の原因遺伝子パーキンが発見されて、現在までに数十種類のパーキン遺伝子の変異が世界から報告されている。さらに水野・田中らによって、パーキンは E3 ユビキチンリガーゼであることが発見された。パーキン蛋白質の変異によって黒質線条体ドーパミンニューロンが特異的に変性する分子機構を解明する研究の一つとして、水野グループと共同して、ヒト正常パーキンと ARJP 変異パーキンを発現させたパーキントランスジェニックアニマルを作製して、分子・細胞・個体レベルで分析する。

[研究 2] 我々はこれまでの研究で、パーキンソン病死後脳と 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テ

ラヒドロピリジン(MPTP)誘発パーキンソニズムマウスや 6-ヒドロキシドーパミン誘発パーキンソニズムラットの生化学的検索により、黒質線条体部位に特異的に炎症性サイトカイン、神経栄養因子、アポトーシス関連因子が変化することを発見して、黒質線条体ドーパミンニューロン死がアポトーシスであるとの仮説で分子機構を追求してきた。これらの因子は主にグリア細胞のマイクログリアやアストロサイトが産生することから、パーキンソン病発症の過程においてグリア細胞の質的变化が重要な意味をもつことが推定される。パーキントランスジェニックマウス、孤発型パーキンソン病剖検脳、MPTP パーキンソニズムマウスについて黒質線条体ドーパミン神経細胞と共に、神経細胞をとり巻く環境因子としてグリア細胞の動態を中心に解析を進める。

B. 研究方法

[研究 1] パーキンソン病トランスジェニックマウス

の作製

(1) トランスジェニックマウス作製用構造遺伝子の作製

水野グループにより発見・分離された、正常パーキンソン遺伝子と、415番目のアミノ酸がトレオニン(T)からアスパラギン(N)変異したパーキンソン(T415N)遺伝子を用いた。各々の遺伝子を制限酵素(*Bam*HI)で切断し、デオキシヌクレオチド(2.5 M)とT4 DNAポリメラーゼ(タカラ、2040A)を用いて平滑末端にした後に遺伝子精製キット(ジーンクリーン II、フナコシ)にて精製した。一方、これらの遺伝子を発現ベクター(pCMV/lox/CAT/lox/PA(*Sall**))に順方向に導入した。この発現ベクターはサイトメガロウイルスの最小発現プロモーターを持っており、その下流にloxP塩基配列で挟まれたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)がある。この遺伝子の下流の制限酵素部位(*Clal*)におのおののパーキンソン遺伝子を順方向に連結させた。これらが大腸菌内で増幅、精製した後、制限酵素(*Sall*)で1本鎖DNAとして遺伝子精製キットを用いて精製した。

(2) トランスジェニックマウス作製の手順

定法に従い精製1本鎖DNAをマウス受精卵(0.5日胚)に1ng/μlの濃度を用いて注入した。その後、卵を16時間、5%CO₂インキュベーターにて培養後、2細胞期の卵を顕微鏡下にて選択した。卵を偽妊娠マウスの卵管に1匹あたり2-4個程度を移植し、19日目に帝王切開にて胎児マウスを得た。8週間の飼育後、離乳観察してファウンダーマウスを得た。遺伝子型を決める目的でマウスの尾からDNAを調製した。マウス尾8mmを切断後、止血作業を行いただちに溶解液(50mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS)

に入れ55℃、16時間反応して完全に液体とした。除蛋白処理をした後、濃縮して測定用DNAとした。遺伝子型を決めるにあたってはPCR法を行なった。用いたプライマーは遺伝子番号Acc#AB009973においてセンスプライマー1(5'-A(512)GCAGGTAGATCAAICTACAACAGCT(537)-3')とアンチセンスプライマー1(5'-T(837)CCTGACGTCCTGTGCACGTAATGCA(812)-3')の組み合わせを用いた。再確認の為に、センスプライマー2(5'-T(852)TCCAGTGC AACTCCCGCCACGTGAT(877)-3')とアンチセンスプライマー2(T(1298)CTTTCATCGACTCTGTAGGCCTGAGTA(1262)-3')の組み合わせも用いて確認した。PCRの条件は94℃、2分の後、94℃、15秒と59℃、30秒の後、72℃、30秒のサイクルを25回(ABI9700)行なって増幅DNAを得た。このPCR産物は2.5%アガロースゲルを用いてDNAの大きさを電気泳動法にて確認した。

[研究 2] パーキンソン病トランスジェニックマウスが作製されて、ことにパーキンソン(T415N)遺伝子トランスジェニックマウスで黒質線条体ドーパミン神経に特異的に神経細胞死がおこることが予測される。そこで[研究 1] パーキンソン病トランスジェニックマウスの作製と平行して、これまでの孤発型パーキンソン病剖検脳やMPTPパーキンソンニズムマウスの生化学的研究で発見した、黒質線条体部位に特異的なサイトカイン、神経栄養因子、アポトーシス関連因子の変化を、さらに細胞レベルでことにグリア細胞に注目して分析する。このため、(1) パーキンソン病剖検脳を用いた解析と(2) マウスパーキンソンニズムモデルにおける神経脱落の全過程の検索を以下の計画のように進めた。

(1) パーキンソン病患者剖検脳からパンチアウ

トされた組織を用いてグリア細胞因子（サイトカイン、抗原提示分子、神経栄養因子など）について免疫化学的および分子生物学的に検索する。

(2) パーキンソン病モデルとしてMPTP投与マウスを作成し、ドーパミン神経の脱落過程でのミクログリアの活性化およびグリア細胞因子の変化と神経脱落の関係を組織化学的および分子生物学的に調べる。

(3) グリア機能が擾乱していることが明らかであるサイトカイン(IL-1 β)ノックアウトマウスを使ってパーキンソン病モデルを作成し、同様の検索を行う。

グリア細胞とニューロンを切片より切り出してサイトカインおよび神経栄養因子を酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)とRT-PCR法によって測定し、また免疫組織化学法で細胞分布を検索した。

C. 研究結果

[研究 1] パーキンソン病モデルマウスの作製

ファウンダーマウスとして正常パーキンソン病遺伝子導入トランスジェニックマウスは雄4匹、雌5匹を得た。また、パーキンソン病(T415N)遺伝子導入マウスは雄5匹、雌8匹を得た。現在、順次10週齢マウスになった個体から交配を行ってF1マウスを作製している。また、F1マウス作製時にCAT遺伝子産物の確認には抗CAT抗体を用いたウエスタンブロット法を用いる。この実験に必要な条件検討は終了した。また、loxPに挟まれたCAT遺伝子を欠失して正常パーキンソン病遺伝子もしくはパーキンソン病(T415N)遺伝子を発現させるために用いるCAGプロモーターを持ったCreリコンビナーゼ発現マウス（大阪大学医学部、宮崎純一教授より供与）の繁殖は順調に進行してい

る。

[研究 2]

(1) パーキンソン病患者剖検脳7例、対照剖検脳6例からパンチアウトを実施した。これまで、被核と海馬（対照部位）におけるサイトカインと神経栄養因子の遺伝子発現を解析した。

(2) マウスにMPTPの単回投与および連続投与を行い、神経脱落前と神経脱落中のミクログリアの活性化を検索している。

(3) IL1 β ノックアウトマウスを用いて同様の検索を実施している。

以上の研究は現在進行中であるが、パーキンソン病剖検脳とMPTPパーキンソン病モデルマウスでミクログリアの活性化がおこっていることを示す予備的成績を得ている。

パーキンソン病モデルマウスとして、マンガンの(Mn²⁺)はヒトやサルでパーキンソン病様症状をおこすことが報告されている(manganism)。我々は以前の研究でパーキンソン病モデルマウスをおこす神経毒MPTPが急性にラット線条体スライス系でドーパミン合成のチロシン水酸化酵素を阻害することを報告した。パーキンソン病モデル動物を作る試みとしてMnのラット線条体スライス系に対する作用を検討したところ、MPTPと同じく急性にチロシン水酸化酵素系を阻害し、また水野らがMPTPで発見した成績と同じく、電子伝達系を阻害することを見出した。この成績はMPTPとMnが黒質線条体ドーパミン合成系に対して類似した作用をもつことを示す。2価金属イオンの中でMn²⁺に特有であり、Mg²⁺やZn²⁺は全く作用がなかった。

D. 考察

[研究 1] のパーキンソン病(T415N)トランスジェニックマウスの作製はARJPモデルマウスとなること

を期待している。ヒト正常パーキントランスジェニックマウスは、対照として、またパーキンの生理的役割を *in vivo* で解明し、さらに遺伝子治療にパーキンを応用する研究に有用である。

〔研究 2〕の孤発型パーキンソン病剖検脳や MPTP パーキンソニズムマウスの脳での、黒質線条体部位でのグリア細胞とドーパミン神経細胞におけるサイトカイン、神経栄養因子の細胞レベルでの変化の成績は、黒質線条体ドーパミンニューロンに特異的な細胞死の分子機構、ことにアポトーシス仮説の細胞レベルでの立証に重要である。

〔研究 1〕でパーキントランスジェニックマウスの ARJP モデルが作製できれば、その分析の重要な課題の一つとして、〔研究 2〕におけるサイトカイン、神経栄養因子、アポトーシス関連因子の生化学的分子細胞生物学的解析を行う。ARJP モデルパーキントランスジェニックマウスと MPTP パーキンソニズムモデルマウスおよび孤発型パーキンソン病を比較することにより、神経細胞死の共通した分子機構を解明する。

Mn パーキンソニズムモデルアニマルの作製とパーキントランスジェニックマウスとの比較も計画している。

E. 結論

ヒト正常型および変異型のパーキントランスジェニックマウスの作製を順調に進めている。他方、パーキントランスジェニックマウスの解析の一つとして、孤発型パーキンソン病剖検脳と MPTP パーキンソニズムマウスで、黒質線条体部位のサイトカインと神経栄養因子の変化を、ことにグリア細胞の変化に注目して細胞レベルで検索して、マイクログリアの活性化を示唆する成績を得ている。

F. 研究発表

〔論文発表〕

- Sugimoto T, Ikemoto K, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Hagino Y, Ichinose H, Nagatsu T, Wada A. A convenient determination of chiral pteridines; application of fluorescence detected circular dichroism (FDCCD) to the major pterin from *Escherichia coli*. *Heterocycles* 54: 283-290, 2001
- Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elson RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim KS, Kim CH, Malison RT, Gelernter J, Cubells JF. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine -hydroxylase activity: Evidence for a major polymorphism at the *DBH* locus. *Am J Hum Genet* 68: 515-522, 2001
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett* 300: 179-181, 2001
- Ota M, Nakashima A, Ikemoto K, Nojima S, Tanaka M, Okuda M, Koga H, Mori K, Kaneko YS, Fujiwara K, Yamamoto H, Nagatsu T, Ota A. Exon 3 of tyrosine hydroxylase gene: lack of association with Japanese schizophrenic patients. *Mol Psychiat* 6: 315-319, 2001
- Sugimoto T, Ikemoto K, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Hagino Y, Ichinose H, Nagatsu T. Identification of (6*R*)-5,6,7,8-tetrahydro-D-monapterin (= (6*R*)-2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-6-[(1*R*,2*R*)-1,2,3-trihydroxypropyl]-pteridine-4(3*H*)-one) as the native pteridine in *Tetrahymena pyriformis*. *Helvetica Chimica Acta* 84: 918-927, 2001
- Ishiguro H, Yamada K, Sawada H, Nishii K, Ichino N, Sawada M., Kurosawa Y, Matsushita N, Kobayashi K, Goto J, Hashida H, Masuda N, Kanazawa I, Nagatsu T. Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in

- mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci Res* 65: 289-297, 2001
- Kaneko YS, Mori K, Nakashima A, Nagatsu I, Nagatsu T, Ota A. Determination of tetrahydrobiopterin in murine locus coeruleus by HPLC with fluorescence detection. *Brain Res Protocols* 8: 25-31, 2001
- Hirata Y, Kiuchi K, Nagatsu T. Manganese mimics the action of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion, a dopaminergic neurotoxin, in rat striatal tissue slices. *Neurosci Lett* 311: 53-56, 2001
- Ohye T, Ichinose H, Yoshizawa T, Kanazawa I, Nagatsu T. A new splicing variant for human tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla. *Neurosci Lett* 312: 157-160, 2001
- Sumi-Ichinose C, Urano F, Kuroda R, Ohye T, Kojima M, Tazawa M, Shiraishi H, Hagino Y, Nagatsu T, Nomura T, Ichinose H. Catecholamine and serotonin are differently regulated by tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 276: 41150-41160, 2001

[総説]

- Riederer P, Reichmann H, Janetzky B, Sian J, Lesch KP, Lange KW, Double KL, Nagatsu T, Gerlach M. Neural degeneration in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86: 125-136, 2001
- Ichinose H, Suzuki T, Inagaki H, Ohye T, Nagatsu T. DOPA-responsive dystonia. *Adv Neurol* 86: 173-176, 2001
- Ichinose H, Ohye T, Suzuki T, Inagaki H, Nagatsu T. Quantification of tyrosine hydroxylase mRNA. *Meth Mol Med* 62: 157-166, 2001

パーキンノックアウトマウス作製・解析

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所分子腫瘍学部門 部長

研究要旨 常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム（autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP）の原因遺伝子であるパーキンの機能解析に関する研究を、下記の4課題を中心に包括的に進めた。

<研究1> パーキンノックインマウスの作製

パーキン遺伝子のエクソン2の最初の5塩基にインフレームする形でGFPを融合したノックインマウスを作製中で、現在、キメラマウスの作製に至っている。

<研究2> ロテノンパーキンソニズムモデルマウスの作製

マウスにロテノンを持続投与しパーキンソニズムモデルマウスを作製中である。

<研究3> 線虫パーキンの遺伝学的機能解析

線虫（*Caenorabditis elegans*）にはヒトパーキンと構造類似性が高い相同遺伝子が存在する。そこで、パーキンのトランスジェニック線虫を解析した結果、パーキンは、脳神経組織や生殖器官に強く発現していることが判明した。また、パーキン遺伝子を欠損させたノックアウト線虫を作製したが、大きな行動異常は観察されていない。

<研究4> 品質管理リガーゼCHIPの機能解析

タンパク質の正常と異常を区別して分解する機構において、シャペロン依存性のユビキチンリガーゼであるCHIPが「品質管理リガーゼ」として作用することを見出した。

A. 研究目的

パーキンの機能解析とその異常によって発症するAR-JPの機構解明に関する基礎的研究。

[研究1]

パーキン遺伝子ノックアウトマウスを作製し、パーキン変異による神経変性機序の解析をおこなう。具体的には、エクソン2のはじめの5塩基にインフレームする形でGFPを融合したパーキンノックインマウスを作成し、中脳黒質細胞におけるパーキンの発現および神経の可視化により変性の過程を明らかにする。

[研究2]

現在、ロテノンによるパーキンソニズムモデルラ

ットの報告があり、レビー小体の形成が確認されている。そこで、マウスにロテノンを持続投与し同様なモデルマウスを作製中である。パーキンソン病のモデルマウスを作製して、黒質ニューロンの異常について、病理組織学的に検討する。

[研究3]

線虫（*Caenorabditis elegans*）にはヒトパーキンと構造類似性がきわめて高い相同遺伝子が存在するので、線虫パーキンの生理機能解明と環境ストレス負荷後の動態（パーキン欠損線虫s）を解析することによってヒトパーキンの役割の解明に繋げる成果を得ることを目的としている。

[研究4]