

平成14年度 厚生労働科学研究費補助金  
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

---

2003・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14年度 厚生労働科学研究費補助金 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>

「ドーパミン神経におけるp53関連遺伝子PAG608のアポトーシス発現機序に関する研究」

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） ... 11

「6-ヒドロキシドーパミン脳室内投与マウスを用いたドーパミンアゴニストのレポドバ副作用の軽減効果に関する検討」

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

「酸化ストレス障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14年度 研究成果の刊行に関する一覧表 ... 29

# 総括報告書

厚生労働科学研究費補助金（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

ドパミン（DA）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として同定された p53 関連分子 PAG608 について、DA 神経系におけるアポトーシスで果たす詳細な役割を明らかにする目的で、PC12 細胞などのカテコールアミン産生神経細胞を用いた検討を行った。その結果、カテコールアミン産生神経細胞の酸化ストレスによるアポトーシスにおいて、PAG608 は核に局在することでアポトーシスを誘導し、p53 によって誘導されるだけでなく、p53 の発現自体も調節していることを明らかにした。次に DA アゴニストの併用によるレボドパ（L-DOPA）副作用の軽減の可能性を明らかにする目的で、DA アゴニスト cabergoline との併用の利点について検討を行った。L-DOPA 投与により亢進した過酸化脂質量は cabergoline との併用で有意に抑制された。これは主に、cabergoline 併用により増強されるグルタチオン増加作用によるものと考えられた。また、L-DOPA 投与は 6-OHDA 脳室内投与によるカスパーゼ-3、-8、-9 活性化をさらに増悪するものの、cabergoline 併用は L-DOPA による増悪を顕著に抑制した。一方、酸化ストレスは蛋白質の変性・凝集を引き起こし、神経変性疾患の病因と深く関与することが知られている。それゆえ、酸化蛋白質を選択的に識別し、除去するユビキチン系の解明は治療を考える上で重要といえる。鉄代謝の制御因子 IRP2 がヘムを介して鉄を感知する過程で、ヘムと酸素により酸化される IRP2 を選択的に識別する HOIL-1 ユビキチンリガーゼを同定した。HOIL-1 リガーゼは酸化蛋白質を選択的に識別するユビキチンリガーゼとして初めて同定されたものであり、蛋白ダメージの代表である酸化蛋白質の分解系として機能していると考えられることから、神経変性疾患への関与も強く示唆された。

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

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

のドパミン (DA) 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 DA 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 DA 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、DA 神経細胞死における新規分子 PAG608 の役割をさらに詳細に検討するために、酸化ストレスによるアポトーシスと PAG608 の関連をカテコールアミン系神経細胞を用いて行った。また、パーキンソン病 (PD) 治療で使用するレボドパ合剤 (L-DOPA/carbidopa : 100/25 の配合比率) の PD モデルにおける L-DOPA 副作用の分子基盤解明と DA アゴニストの併用による L-DOPA 副作用の軽減について検討した。さらに、酸化蛋白質を選択的に識別するユビキチンリガーゼ HOIL-1 の IRP2 蛋白質のユビキチン依存性分解における役割に関して研究を進めた。

## B. 研究方法

### 1. DA 神経における p53 関連分子 PAG608 のアポトーシス発現機序に関する研究

カテコールアミン産生神経様細胞である PC12 細胞およびラット神経芽細胞種 B65 細胞を定法により培養し以下の実験に供した。PAG608 野生型ノックダウン細胞を作成するために、PAG608 野生型アンチセンス cDNA 発現ベクターを構築し、リン酸カルシウム法を用いて PC12 細胞に遺伝子導入した。また、His タグを付けた His-野生型 PAG608 の遺

伝子導入はリポフェクション法によって行った。また、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) も樹立し、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。これらの遺伝子改変細胞株を用いて DA 神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA) などの酸化ストレスによるアポトーシスにおける PAG608 の役割を明らかにする目的で PAG608, p53, Bax, Bcl-2 に対する特異的抗体を用いて ECL 発光法でウェスタンブロット解析を行った。さらに、細胞生存率を MTT 変法 (WST-1 法) あるいはトリパンプルー色素排除法を用いて定量し、カスパーゼ-3 活性および DNA 断片化を検出した。

### 2. 6-OHDA 脳室内投与マウスを用いた DA アゴニストの L-DOPA 副作用の軽減効果に関する検討

DA 神経毒 6-OHDA (60 $\mu$ g/2 $\mu$ l) をマウス脳室内に投与した PD モデルマウスを用いて、L-DOPA 投与量と L-DOPA 毒性の関連を明らかにする目的で検討を行った。6-OHDA 脳室内投与 1 日後から、L-DOPA/carbidopa を 1 日 1 回、7 日間腹腔内投与し、最終投与 1 時間後に線条体を摘出し測定に供した。上記の結果を基に、L-DOPA/ carbidopa (50/12.5 mg/kg) 投与時に長時間作用型麦角系 DA アゴニストである cabergoline (0.25 mg/kg) を併用することによる効果を検討した。実験スケジュールは上記と同様で、それぞれの薬液を 1 日 1 回、7 日間腹腔内投与し、最終投与 1 時間後に線条体を摘出し測定に供した。用いた指標は、[1] DA およびその代謝産物濃度、[2] グルタチオン (GSH) 濃度、[3] 過酸化脂質量、と [4] カスパーゼ (caspase-3, caspase-8, caspase-9) 活性についても測定した。

### 3. 酸化ストレス障害時のユビキチン系の解

## 析に関する研究

HEK-293 細胞, Cos 細胞, RD4 細胞を定法にて培養し, HOIL-1 野生型および変異体 cDNA ならびに IRP2 cDNA 発現ベクターを構築し, Fugene6 トランスフェクション試薬を用いて細胞導入した. また, HOIL-1 を特異的に認識する抗体を大腸菌を用いて発現させた GST-HOIL-1 キメラ蛋白質を抗原として作成した. 次に, バキュロウイルス発現系を用いて作成した IRP2 蛋白質に試験管内でヘムと結合させたものを基質とする *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った.

## C. 研究結果

### 1. DA 神経における p53 関連分子 PAG608 のアポトーシス発現機序に関する研究

PAG608 の恒常的な発現抑制が確認できた PC12/PAG608AS 細胞では 6-OHDA 24 時間暴露による細胞生存率の低下がほぼ完全に抑えられていた. また, 6-OHDA 添加によるカスパーゼ-3 の活性化と DNA 断片化の増加についても, PC12/PAG608AS 細胞では認められなかった. このことは昨年度に報告したミトコンドリアの膜電位の結果とも合致した. 6-OHDA 添加による p53 または Bax 蛋白質の発現増加も, PC12/PAG608AS 細胞では発現誘導が抑制されていた. しかも, p53 蛋白質の発現が His-PAG608 の発現増加に伴うことを示した. 一方, C6 グリオーマ細胞では, His-PAG608 による p53 の発現誘導は認められなかった.

### 2. 6-OHDA 脳室内投与マウスを用いた DA アゴニストの L-DOPA 副作用の軽減効果に関する検討

6-OHDA 脳室内投与により低下する線条体 DA 濃度ならび GSH 濃度は L-DOPA/ carbidopa 連続投与により用量依存的に増加した. 一方, 細胞内の酸化ストレスの強さを反映する過酸化脂質量は 6-OHDA 脳室内投与だけでは影響を認めないものの, L-

DOPA/ carbidopa 連続投与により顕著な亢進を示した. DA アゴニスト cabergoline との併用効果の検討では, 単独投与に比べて, 併用することで相加効果以上の顕著な DA 代謝回転の増加が認められた. 我々のこれまでの経験では, DA 代謝回転の亢進が認められると過酸化脂質量の増加も認められることが多いが, L-DOPA/ carbidopa 投与によって増加する過酸化脂質量が cabergoline 併用により, 有意に抑制された. このことから, cabergoline 併用により相加効果以上の顕著な GSH 増加作用を示すことが重要であると考えられた. また, 6-OHDA 脳室内投与マウスで認められる caspase の活性化を L-DOPA/ carbidopa 投与により顕著に増悪するが, cabergoline を併用することで, 著明に抑制することを示した. 以上, cabergoline 併用が L-DOPA 副作用を軽減する可能性を明らかにした.

### 3. 酸化ストレス障害時のユビキチン系の解析に関する研究

HOIL-1 は IRP2 に対し鉄依存性に結合し, HOIL-1 のユビキチン様ドメインが IRP2 との結合に重要な領域であることを明らかにした. しかも, HOIL-1 は鉄存在下においてのみ, IRP2 などと結合したことから, HOIL-1 は IRP2 の IDD ドメインを鉄依存的に識別すると考えられた. 次に IDD ドメインにはヘム結合に関与する CP モチーフ様の配列が存在することから, IRP2 にヘムが結合する可能性を検索したところ, ヘムは IDD ドメインに結合したことから, ヘムは IRP2 に結合すると考えられた. 同様に, 細胞内においても IRP2 にヘムが結合することが示唆された. 以上のことから, HOIL-1 はヘムによって酸化された IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーである可能性が考えられた. そこで, 試験管内でヘム結合 IRP2 を基質としたユビキチン化反応を行ったところ, HOIL-1 はヘム結合 IRP2 をユビキチン化したのに対し, 他

のユビキチンリガーゼではユビキチン化されず、リガーゼ活性を消失した HOIL-1 変異体もヘム結合 IRP2 をユビキチン化できなかった。また、HOIL-1 によるヘム結合 IRP2 のユビキチン化は酸素非存在下では有意に減弱された。

#### D. 考察

PAG608 発現を抑制することで 6-OHDA による DA 神経細胞のアポトーシスが阻止されたことから、PAG608 は p53 を介する 6-OHDA によるアポトーシスに関連していることが考えられた。また、PAG608 の発現が恒常的に抑制されている PC12/PAG608AS 細胞では 6-OHDA 添加によるミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ-3 の活性化や DNA 断片化が阻止された。これらの結果は、6-OHDA によるアポトーシスにおいて、PAG608 はミトコンドリアの膜電位の低下の過程よりも上流で関与していることを示しており、昨年度の結果とも合致した。また、PC12/PAG608AS 細胞を用いた結果から、PAG608 発現抑制による p53 や Bax の発現誘導性の低下が 6-OHDA 添加でのミトコンドリア膜電位の低下を阻止しているものと考えられた。

PD の根治的な治療法が確立していない現在において、L-DOPA 療法は依然として PD 治療のゴールドスタンダードであり、治療上多くの問題が指摘されていても、現状では L-DOPA 療法を PD 薬物治療の中心とせざるを得ないため、L-DOPA 副作用の分子基盤を明らかにすることは重要である。特に、L-DOPA 投与量を減らすことなく、単純に DA アゴニストを L-DOPA 投与に上乘せするだけでも、L-DOPA 副作用を軽減し得ることから、臨床における理論的基盤を明確にしたものといえる。

IRP は哺乳類細胞における鉄代謝の主たる制御因子である。本研究により、ヘムを介し

て鉄を感知した IRP2 は、HOIL-1 リガーゼにより選択的に識別されてユビキチン化される可能性を明らかにした。一方、多くの蛋白質が酸化されることで活性を消失し、分解されることは知られていたが、リガーゼは同定されていなかった。したがって、HOIL-1 ユビキチンリガーゼが酸化修飾を識別するユビキチンリガーゼであることを明らかにした点は重要な成果と考える。また、酸化修飾を受けた IRP2 が RNA 結合活性を保持していることから、IRP2 の酸化修飾が機能変換シグナルである可能性も考えられた。

#### E. 結論

昨年度ならびに本年度の研究により、p53 によって発現誘導される PAG608 は、酸化ストレスによる DA 神経細胞のアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害より上流の過程で p53 ならびに Bax の発現を誘導し、ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していることを明らかにした。PD 病態モデルである 6-OHDA 脳室内投与マウスを用いた検討により、L-DOPA 連続投与は脂質過酸化反応の亢進とアポトーシスの増悪を引き起こすが、DA アゴニスト cabergoline の併用によりこの変化を著明に抑制した。また、cabergoline 併用効果の作用機序は主に GSH 増加作用と caspase 活性化抑制作用によるものと考えられた。新たに同定した HOIL-1 ユビキチンリガーゼは酸化蛋白質を選択的に識別するリガーゼとして初めて同定されたものであり、酸化修飾を選択的に識別するユビキチン修飾系の分子機構の少なくとも一部を明らかにした。

# 分担報告書



厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

ドパミン神経における p53 関連遺伝子 PAG608 の  
アポトーシス発現機序に関する研究

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

研究協力者：東 洋一郎，ハーク エムダウル，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

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として、昨年度 L-DOPA 投与片側パーキンソン病モデルラットを用いた differential display 法で同定した p53 関連遺伝子 p53-activated gene 608 (PAG608)のドパミン神経細胞のアポトーシスにおける作用機構をさらに詳細に検討した。カテコールアミン産生神経様培養細胞 PC12 において 6-hydroxydopamine (6-OHDA)添加は PAG608, p53 発現を増加させたが、PC12 細胞へのアンチセンス PAG608 cDNA の導入は、6-OHDA または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるアポトーシスを抑制し、6-OHDA によるカスパーゼ 3 の活性化や DNA の断片化、ミトコンドリアの膜電位の低下、p53, Bax 発現の誘導も抑制した。しかし、1-methyl-4-phenylpyridinium ion による細胞死は抑制しなかった。また、PC12 細胞あるいはカテコールアミン系 B65 細胞に PAG608 cDNA を導入すると p53 発現が増加したことから、PAG608 が p53 発現を誘導する可能性を明らかにした。これらの結果より、p53 によって発現誘導される PAG608 は、酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害より上流の過程で、p53 ならびに Bax の発現を誘導し、ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していることを明らかにした。

A. 研究目的

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のドパミン神経系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、昨年度まで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 L-DOPA により

特異的に発現が誘導される mRNA を differential display 法で検索し、p53 関連遺伝子 p53-activated gene 608 (PAG608)を同定した。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いる。

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。

昨年度は、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、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、PAG608 発現抑制 PC12 細胞株では、6-OHDA による細胞死がほぼ完全に抑制され、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著明に抑制されることを明らかにした。これらの結果から、PAG608 は何らかの翻訳後修飾あるいは蛋白質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、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という過程より上流で関与していることを示している。

今年度はドパミン神経細胞死における PAG608 の作用機構をさらに詳細に明らかにするために、酸化ストレスとして 6-OHDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) を、培養カテコールアミン系神経細胞株として PC12 細胞および B65 細胞を用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1. カテコールアミン系神経細胞の培養

PC12 細胞を 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で RPMI1640 培養液に 10% 非動化ウマ血清, 5% ウシ胎児血清, 10 U/ml ペニシリン, 10 μg/ml ストレプトマイシンを添加し培養した。

ラット神経芽細胞種 B65 細胞は 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下でダルベッコ改良イーグル培養液に 10% ウシ胎児血清, 2 mM グルタミン, 60 μg/ml カナマイシンを添加し培養した。

### 2. PAG608 野生型, アンチセンス cDNA 発現ベクターの作成

Sprague-Dawley 系ラット脳組織より 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。また His 標識 (His<sup>-</sup>) 野生型 PAG608 発現ベクターも作成した。

### 3. 一過性遺伝子導入

アンチセンス PAG608 cDNA 発現ベクター (10 μg) または空ベクターを β-ガラクトシダーゼ発現ベクター (2 μg) と共にリン酸カルシウム法を用いて PC12 細胞に遺伝子導入し、導入 48 時間後から 100 μM 6-OHDA に 8 時間暴露し X-gal で染色した。His<sup>-</sup> 野生型 PAG608 (2 μg) の遺伝子導入はリポフェクション法によって行い、導入 24, 48 時間後に細胞より蛋白質を抽出した。

### 4. PAG608 アンチセンス cDNA 遺伝子導入細胞株の樹立

アンチセンス PAG608 cDNA 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 μg/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。

## 5. ウェスタンブロット解析

6-OHDA 添加 B65 細胞, PC12 細胞または遺伝子導入 B65 細胞, PC12/CTL 細胞または PC12/PAG608AS 細胞から蛋白質を RIPA バッファーで抽出した. また, His-野生型 PAG608 遺伝子導入 PC12 細胞, B65 細胞からも蛋白質を抽出した. PAG608, p53, Bax, Bcl-2 のウェスタンブロット解析は定法に従い, 蛋白質を SDS-polyacrylamide gel で電気泳動後, ニトロセルロース膜に転写し, それぞれに対する特異的抗体を用いて ECL 発光法で検出した.

## 6. 細胞生存率の解析

PC12/PAG608AS 細胞, PC12 細胞, PC12/CTL 細胞に, 100  $\mu$ M 6-OHDA または 50-200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し, 添加 24 時間後の細胞生存率を MTT 変法 (WST-1 法) によって定量した. MPP<sup>+</sup> 添加の場合は, 250  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> の添加 48, 72 時間後に, 0.5% トリパンブルーを排除している細胞の数を生細胞として計算した (トリパンブルー色素排除法).

## 7. カスパーゼ-3 活性の測定

PC12 細胞と PC12/PAG608AS 細胞に 100  $\mu$ M 6-OHDA を添加し, 4 時間後に蛋白質を抽出し 0.2 mM acetyl-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilide と反応させ, これから分離されるパラニトロアニリンの吸光度を測定することでカスパーゼ-3 活性を定量した.

## 8. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) 法

PC12 細胞と PC12/PAG608AS 細胞への 6-OHDA (100  $\mu$ M) 添加の 8 時間後に, 細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し, ビオチン標識ヌクレオチドと, TdT を反応させ DNA の断片化を検出した.

## C. 研究結果

### 1. PAG608 発現抑制 PC12 細胞株における酸化ストレスによるアポトーシス

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確認した. 無処置 PC12 細胞, 空ベクターを導入した PC12/CTL 細胞, PC12/PAG608AS 細胞に 6-OHDA (100  $\mu$ 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 1).

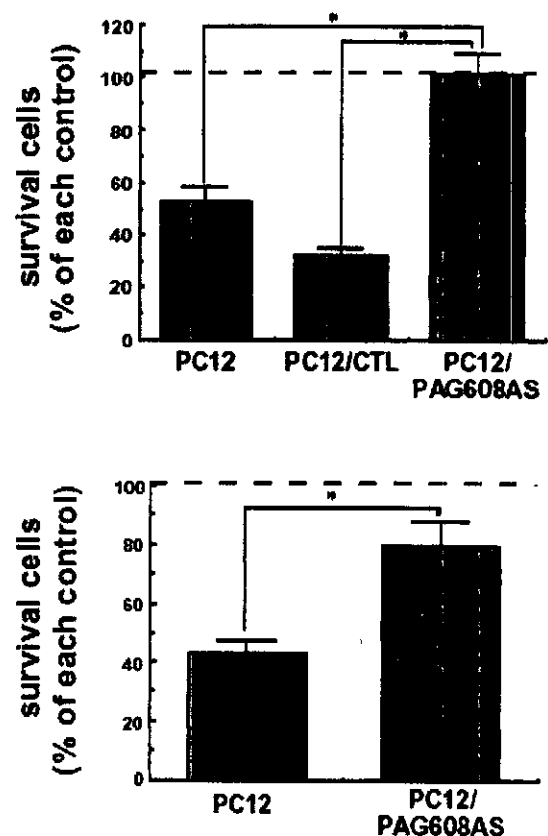


図 1 無処置 PC12 細胞, 空ベクター導入 PC12/CTL 細胞および PAG608 発現抑制 PC12/PAG608AS 細胞における 100  $\mu$ M 6-OHDA (上段) および 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (下段) 添加 24 時間後の細胞生存率の変化. 6-OHDA あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 未添加 PC12 細胞の生存数を 100 とした. \**p* < 0.01 between the two indicated groups.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露も同様に PC12 細胞の細胞生存率を減少させるが, PC12/PAG608AS 細胞では細胞死が抑制されていた (図 1). しかし,

PC12細胞, PC12/PAG608AS細胞にMPP<sup>+</sup>を暴露したところ, 両細胞に細胞増殖抑制と細胞死が認められた.

## 2. PAG608 発現抑制の 6-OHDA 誘発アポトーシスに対する効果

6-OHDA添加によりPC12細胞では著しくカスパーゼ-3の活性化とDNAの断片化が増加していたが, PC12/PAG608AS細胞ではそれらの有意な増加はみられなかった(図2).

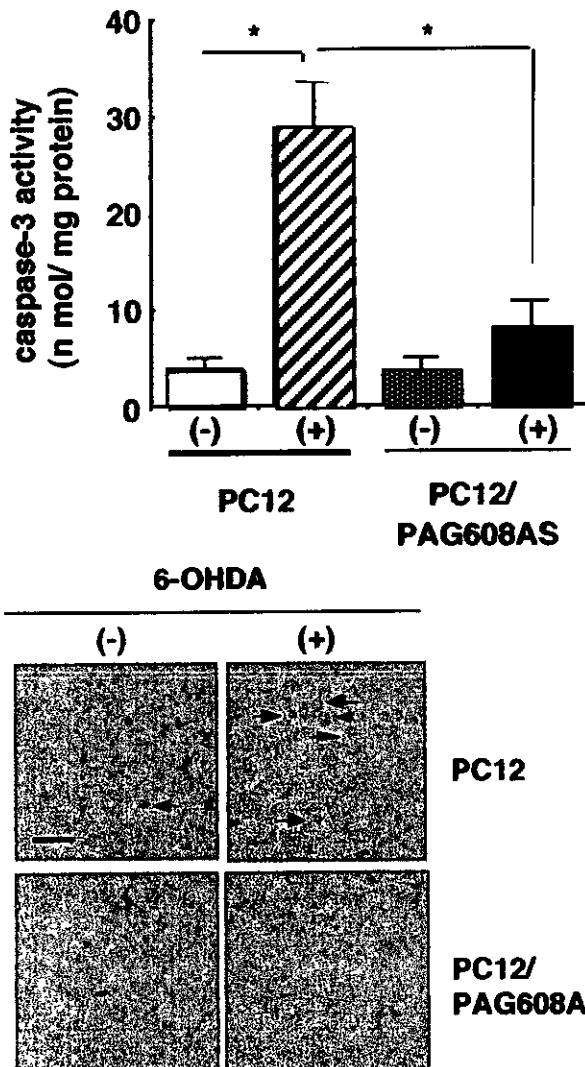


図2 PC12細胞, PAG608発現抑制PC12/PAG608AS細胞における6-OHDA (100  $\mu$ M)添加4時間後の casapase-3活性の変化(上段)と8時間後のDNA断片化を示すTUNEL陽性細胞(下段).

6-OHDA添加によりPC12細胞ではミトコンドリアの膜電位が低下していたが, PC12/PAG608AS細胞では正常に維持され

ていた(昨年度結果).

6-OHDA添加によりPC12細胞では, p53蛋白質またはBax蛋白質発現増加が認められたが, PC12/PAG608AS細胞ではそれらの発現誘導が抑制されていた(図3). Bcl-2発現については両細胞ともに発現誘導は認められなかった.

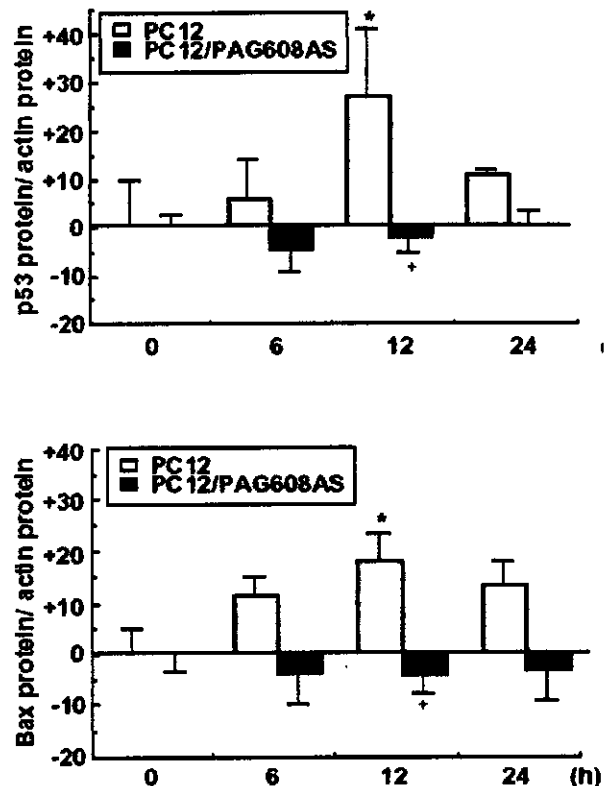


図3 PC12細胞, PAG608発現抑制PC12/PAG608AS細胞における6-OHDA (100  $\mu$ M)添加6, 12, 24時間後のp53(上段)およびBAX(下段)の変化. \* $p < 0.05$  vs. 6-OHDA未添加群. + $p < 0.01$  vs. 無処置PC12 cells.

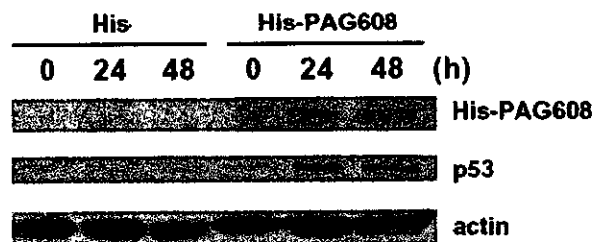


図4 B65細胞におけるHis-PAG608過剰発現によるp53発現の経時的変化

## 3. PAG608 過剰発現による p53 発現誘導

His-野生型PAG608発現ベクターをPC12

細胞, B65 細胞に導入したところ, p53 蛋白質の発現が His-PAG608 の発現増加に伴って増加していた (図 4)。一方, C6 グリオーマ細胞に His-野生型 PAG608 を導入しても p53 蛋白質の増加はみられなかった。

#### 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を検索し, 昨年度は p53 関連遺伝子 PAG608 を同定し, その神経細胞死における役割について検討し, PAG608 の発現抑制により 6-OHDA によるミトコンドリアの膜電位の低下ならびにアポトーシスが抑制されることを明らかにし, PAG608 は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カスケードにおいてミトコンドリア障害より上流の過程で 6-OHDA によるアポトーシス発現に関与している可能性を示した。

今年度はドパミン神経細胞死における PAG608 の作用機構についてさらに詳細に, 複数種の酸化ストレスならびに培養カテコールアミン系神経細胞株を用いて検討した。

PAG608 発現を抑制すると 6-OHDA または  $H_2O_2$  による神経細胞のアポトーシスが阻止された。MPP<sup>+</sup>は p53 を介さず細胞死または細胞増殖抑制を誘導することが報告されているが, 本研究においても PC12 細胞の PAG608 発現を抑制しても MPP<sup>+</sup>による細胞死や細胞増殖抑制効果に影響は認められなかった。したがって, PAG608 は p53 を介する 6-OHDA や  $H_2O_2$  によるアポトーシスに関連していると考えられた。6-OHDA および  $H_2O_2$  によるアポトーシスでは, ミトコンドリアの膜電位の低下, カスパーゼ-3 の活性化, DNA の断片化が惹起されることが知られている。PAG608 発現が恒常的に抑制されている PC12/PAG608AS 細胞では 6-OHDA 添加によるミトコンドリアの膜電位の低下が阻止されており, さらに, カスパーゼ-3 の活性化

や DNA の断片化も著しく阻止されていた。これらの結果は, 6-OHDA によるアポトーシスにおいて, PAG608 はミトコンドリアの膜電位の低下の過程よりも上流で関与していることを示している。また, ミトコンドリアの膜電位を低下させる p53 と Bax の 6-OHDA による発現誘導が PC12/PAG608AS 細胞では認められなかったことから, PAG608 発現抑制による p53 や Bax の発現誘導性の低下により 6-OHDA 添加でのミトコンドリアの膜電位の低下が阻止されていると考えられた。さらに, 野生型 PAG608 cDNA 発現ベクターをカテコールアミン系の PC12 細胞, B65 細胞へ導入すると p53 の発現が増加したが, グリオーマ由来の C6 細胞では p53 の発現誘導が認められなかった。このように, 元来 p53 によって誘導される分子とされている PAG608 は酸化ストレスによるカテコールアミン系神経細胞のアポトーシスにおいては, 逆に p53 の発現を正に調節しうることを明らかにした。

#### E. 結論

昨年度ならびに本年度の研究により, p53 によって発現誘導される PAG608 は, 酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて, ミトコンドリア障害より上流の過程で, p53 ならびに Bax の発現を誘導し, ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していることを明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Haque, M.E., Tanaka, K. and Ogawa, N.: The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 277: 42224-42232, 2002.

- ② Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Cadet, J.L. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced increase in striatal p53 DNA-binding activity is attenuated in Cu, Zn-superoxide dismutase transgenic mice. *Neurosci. Lett.*, 325: 191-194, 2002.
- ③ Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K., Haque, M.E., Fujita, N. and Ogawa, N.: Aggravation of 6-hydroxy-dopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 327:61-65, 2002.
- ④ Yoshioka, M., Tanaka, K., Miyazaki, K., Fujita, N., Higashi, Y., Asanuma, M. and Ogawa, N.: The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neurosci. Res.*, 43: 259-267, 2002.
- ⑤ Miyazaki, I., Asanuma, M., Higashi, Y., Sogawa, A.C., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Age-related changes in expression of metallothionein-III in rat brain. *Neurosci. Res.*, 43: 323-333, 2002.
- ⑥ Tanaka, K., Fujita, N., Higashi, Y. and Ogawa, N.: Neuroprotective and antioxidant properties of FKBP-binding immunophilin ligands are independent on the FKBP12 pathway in human cells. *Neurosci. Lett.*, 330: 147-150, 2002.
- ⑦ Ogawa, N. and Tanaka, K.: Cyclosporin-mediated amelioration of degeneration of dopaminergic neurons in experimental models of parkinsonism. *Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection*, (Borlongan, C.V. eds) pp.35-48, Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 2002.
2. 学会発表
- ① Ogawa, N.: Modulation of dopamine system by immunophilin ligands in Parkinson's disease models. 23rd Congress of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum, 2002.
- ② 小川紀雄: パーキンソン病の保護的治療の可能性. 第7回パーキンソン病フォーラム, 2002.
- ③ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 小川紀雄: パーキンソン病モデル線条体グリア細胞におけるドパミントランスポーターの発現誘導. 第45回日本神経化学学会大会, 2002.
- 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トランスポーターを介したドパミン取り込み機構. 第45回日本神経化学学会大会, 2002.
- ⑤ 小川紀雄, M. Emdadul Haque, 宮崎育子, 東 洋一郎, 浅沼幹人: L-DOPAおよびドパミンのキノン体生成を介したアポトーシス誘導性とそれに対する防御に関する検討. 第32回日本神経精神薬理学会, 2002.

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

6-ヒドロキシドパミン脳室内投与マウスを用いた  
ドパミンアゴニストのレボドパ副作用の軽減効果に関する検討

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

研究協力者：藤田尚子，宮崎育子

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

研究要旨

本研究ではドパミン (DA) アゴニストの併用によるレボドパ (L-DOPA) による副作用の軽減の可能性を明らかにする目的で、長時間作用型麦角系 DA アゴニストである cabergoline を用いた検討を行った。cabergoline はパーキンソン病 (PD) モデルに対する神経保護作用を有し、はじめに L-DOPA 投与が DA 神経毒 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) 脳室内投与マウスに与える影響を検討した結果、L-DOPA 投与は 6-OHDA 脳室内投与により低下した線条体 DA およびその代謝産物濃度とグルタチオン (GSH) 濃度を用量依存的に増加させた。一方、6-OHDA 脳室内投与だけでは変化が認められない線条体過酸化脂質 (TBA-RS) 量も L-DOPA 投与により有意に増加したが、用量依存的ではなかった。次に cabergoline との併用効果について検討したところ、L-DOPA 投与により亢進した線条体 TBA-RS 量は cabergoline 併用で有意に抑制された。これは主に、単独投与よりも併用で増強される GSH 増加作用によるものと考えられた。さらに、アポトーシスの指標である caspase 活性を線条体および中脳黒質について測定したところ、L-DOPA 投与は 6-OHDA 脳室内投与による caspase-3, -8, -9 活性化をさらに増悪するものの、cabergoline 併用で L-DOPA による増悪を顕著に抑制した。以上、cabergoline は L-DOPA 投与量を減量しなくても、併用するだけで 6-OHDA 脳室内投与マウスで認められる L-DOPA 投与による脂質過酸化反応の増加を有意に抑制し、その主な機序は GSH 増加作用と caspase 活性抑制作用によることを明らかにした。

A. 研究目的

Parkinson 病 (PD) の治療に L-DOPA が導入されてから、症状改善には劇的な効果が見られているものの、さまざまな問題も報告されてきた。特に、L-DOPA 慢性投与による

問題症状の発現頻度は L-DOPA 投与量に依存していることが臨床的に報告されている。したがって、L-DOPA 投与量の減量は PD の L-DOPA 療法において極めて重要と考えられる。現在では主にドパミン (DA) アゴニス

トを併用するか、DA 代謝酵素阻害薬のような DA のエコノマイザーを投与することで、L-DOPA 投与量を抑える方法がとられている。また、現在使用されている L-DOPA 製剤のほとんどは、末梢性ドパ脱炭酸酵素阻害薬 (DCI) と L-DOPA との合剤であり、DCI には carbidopa と benserazide の 2 種類がある。L-DOPA と DCI の配合の割合も我が国で用いられている L-DOPA/carbidopa (100/10) 合剤と L-DOPA/benserazide (100/25) 合剤の他に、欧米では carbidopa の量が不十分であるとの指摘から L-DOPA/carbidopa (100/25) 合剤が使用されている。両合剤を用いた臨床研究では PD の症状改善に差がないものと信じられているが、結果を詳細に検討すると、DCI の違いにより同一の効力を得るための投与量が異なったり、副作用の程度に差が認められるなど、必ずしも一致していない。また、DCI を増量して L-DOPA との比率を高くすることで、L-DOPA 投与量を下げる試みも報告されている。特に少量の L-DOPA 投与時には DCI の配合比率が低いと効果が弱く副作用が強いため、100 対 25 の配合比率が望ましいとされる。

一方、L-DOPA 減量の目的で用いられる DA アゴニストの利点としては、これ以外にも、L-DOPA 副作用の軽減と DA アゴニスト自体の神経保護作用が期待されている。我々はこれまでの検討で、作用機序に違いはあるものの、多くの DA アゴニストが酸化ストレスに対する抗酸化作用を有し、これが神経保護作用の主な基盤の一つであることを明らかにしてきた。本研究では、DCI の種類や比率の違いと L-DOPA/DCI 合剤の薬効との関連に関するこれまでの検討結果を考慮して、L-DOPA/carbidopa を 100 対 25 の配合比率で混ぜた薬液を用い、PD モデルにおける L-DOPA 副作用の分子機序解明と DA アゴニストの併用による L-DOPA 副作用の軽減に

関して検討を行った。

## B. 研究方法

① DA 神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA;  $60\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) をマウス脳室内に投与した PD モデルマウスを用いて、L-DOPA 投与量と L-DOPA 毒性の関連を明らかにする目的で検討を行った。用いた L-DOPA/carbidopa は 3 種類 (12.5/3.125, 25/6.25, 50/12.5 mg/kg; 以下、かっこ内は投与量で単位は mg/kg) で、6-OHDA 脳室内投与 1 日後から、それぞれ 1 日 1 回、7 日間腹腔内投与し、最終投与 1 時間後に線条体を摘出した。対象として、vehicle (0.25% methylcellulose) 投与についても同様にを行い、摘出した線条体を以下の測定に供した。測定方法は、[1] DA およびその代謝産物濃度: HPLC-ECD 法, [2] グルタチオン (GSH) 濃度: 酵素リサイクリング法, [3] 過酸化脂質 (TBA-RS) 量: 自動酸化を組み合わせた 2-thiobarbituric acid 法, をそれぞれ用いた。

② ① の実験結果を基に、L-DOPA/carbidopa 投与量を (50/12.5 mg/kg) に固定し、長時間作用型麦角系 DA アゴニストである cabergoline (0.25 mg/kg) の併用による効果を検討した。実験スケジュールは①と同じで、それぞれの薬液を 1 日 1 回、7 日間腹腔内投与し、最終投与 1 時間後に線条体を摘出し測定に供した。用いた指標は、①と同様に [1] DA およびその代謝産物濃度, [2] GSH 濃度, [3] TBA-RS 量, の他に [4] カスパーゼ (caspase-3, caspase-8, caspase-9) 活性: 吸光度測定法, についても検討した。

## C. 研究結果

① 6-OHDA 脳室内投与により低下する線条体 DA 濃度ならび GSH 濃度は L-DOPA/carbidopa 連続投与により用量依存的に増加



した。一方、細胞内の酸化ストレスの強さを反映する脂質過酸化反応の指標である線条体 TBA-RS 量は 6-OHDA 脳室内投与だけでは影響を認めないものの、L-DOPA/ carbidopa 連続投与により有意な亢進を示した。しかし、その程度は L-DOPA/ carbidopa 低用量から高用量までほぼ同じレベルを示すことから、用量依存的ではなかった。

② DA アゴニスト cabergoline (0.25 mg/kg) との併用効果について L-DOPA/ carbidopa (50/12.5 mg/kg) を用いて検討した。DA およびその代謝産物に対する影響は、特に DOPAC や HVA といった代謝産物において顕著に認められた。すなわち、cabergoline, L-DOPA/ carbidopa 単独投与による代謝産物濃度の増加に比べて、併用することで相加効果以上の顕著な増加が認められた。これに伴い DA 代謝回転についても、併用により L-DOPA/ carbidopa 投与で認められる DA 代謝回転の亢進を抑制するのではなく、むしろ増強した。我々がこれまでに得ている結果では、DA 代謝回転の亢進が認められると TBA-RS 量の増加が認められることが多い。しかしながら本実験系においては、L-DOPA/ carbidopa 投与によって増加する TBA-RS 量が cabergoline 併用により、有意に抑制された。この一つの理由として、cabergoline, L-DOPA/ carbidopa 単独投与に比べて、両者を併用することで相加効果以上の GSH 濃度の顕著な増加が認められた線条体 GSH 濃度の結果から、GSH 増加作用が重要な役割を果たしているものと考えられた。以上、cabergoline の併用は L-DOPA 副作用を軽減する可能性が明らかになったものの、特に L-DOPA/ carbidopa 単独投与でも 6-OHDA 脳室内投与マウスにおいては用量依存的な GSH 増加作用が認められることから、より詳細な検討が必要なものと考えられた。我々はその端緒として、PD によるドパミン神経細胞死の基盤の一つとして考えられてい

るアポトーシスの代表的な指標である caspase の活性について検討を行った。なお、caspase 活性については、線条体だけでなく中脳黒質についても測定した。すると 6-OHDA 脳室内投与マウスにおいて、線条体・中脳黒質共に、今回検討した 3 種類の caspase 活性が全て有意に増加していた。これに対し、L-DOPA/ carbidopa 投与群では両方の部位で 3 種類とも顕著な増悪が認められた。ところが、cabergoline 単独投与では明確な caspase 活性抑制作用は認められないものの、L-DOPA/ carbidopa に cabergoline を併用することで、L-DOPA/ carbidopa 単独投与による caspase 活性の増悪を著明に抑制した。

#### D. 考察

L-DOPA 副作用については、元々 L-DOPA および DA が生体内で代謝される過程において酸化ストレスを生じることから、指摘されたものである。しかし、実際の臨床において明確に証明されていないこともあり、反対意見も根強く存在する。それにも関わらず、我々が L-DOPA 副作用にこだわるのは、PD の根治的な治療法が確立していない現在において、L-DOPA 療法は依然として PD 治療のゴールドスタンダードであり、治療上多くの問題が指摘されていても、現状では L-DOPA 療法を PD 薬物治療の中心とせざるを得ないためである。L-DOPA 投与量の減量だけでなく、L-DOPA 投与による副作用の軽減という観点からも本研究結果は重要な知見を示したものとする。特に今回の実験のように、L-DOPA 投与量を減らすことなく、単純に DA アゴニストを L-DOPA 投与に上乘せするだけでも、L-DOPA 毒性を軽減し得ることから、臨床における理論的基盤を明確にしたものとする。ただし、結果の項でも指摘した通り、併用時の DA 代謝回転の顕著な亢進など、さらなる検討が必要な点もあるため、

今後は6-OHDA脳室内投与マウスの黒質-線条体系のDA神経細胞死の分子機序を考慮した検討や他のDAアゴニストとの併用効果に関する検討も行う必要があると考える。

## E. 結論

PD病態モデルである6-OHDA脳室内投与マウスを用いた検討により、cabergolineの併用はL-DOPA/carbidopa連続投与で認められる、脂質過酸化反応の亢進とアポトーシスの増悪を著明に抑制し、その作用機序は主にGSH増加作用とcaspase活性化抑制作用によるものと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Tanaka, K., Fujita, N., Higashi, Y. and Ogawa, N.: Effects of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Synapse*, 43: 219-222, 2002.
- ② Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N., Yoshioka, M. and Ogawa, N.: GPI1046 prevents dopaminergic dysfunction by activating glutathione system in the mouse striatum. *Neurosci. Lett.*, 321: 45-48, 2002.
- ③ Tanaka, K., Wada-Tanaka, N., Miyazaki, I., Nomura, M. and Ogawa, N.: Chronic cerebral hyperfusion induces striatal alterations due to the transient increase of NO production and the continuous depression of glutathione content. *Neurochem. Res.*, 27: 331-336, 2002.
- ④ Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Haque, M.E., Tanaka, K. and Ogawa, N.: The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 277: 42224-42232, 2002.
- ⑤ Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K., Haque, M.E., Fujita, N. and Ogawa, N.: Aggravation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 327:61-65, 2002.
- ⑥ Yoshioka, M., Tanaka, K., Miyazaki, K., Fujita, N., Higashi, Y., Asanuma, M. and Ogawa, N.: The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neurosci. Res.*, 43: 259-267, 2002.
- ⑦ Tanaka, K., Fujita, N., Higashi, Y. and Ogawa, N.: Neuroprotective and antioxidant properties of FKBP-binding immunophilin ligands are independent on the FKBP12 pathway in human cells. *Neurosci. Lett.*, 330: 147-150, 2002.
- ⑧ Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Blockade of late-onset reduction of muscarinic acetylcholine receptors by immunosuppressants in ferebrain ischemia. "Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection" , ( Borlongan, C.V. eds) pp.215-229, Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 2002.

## 2. 学会発表

- ① Tanaka K. and Ogawa N.: Immunophilin ameliorates apoptotic neuronal cell death. Summer school 2002 of the international society of CBFM, and joint international symposium on Molecular mechanism and epochal therapeutics for ischemic stroke and dementia, 2002.
- ② Tanaka K., Nomura M. and Ogawa N.: Effects of FK506 on chronic cerebral hypoperfusion-induced discrimination learning disabilities in Wistar rats. Summer school 2002 of the international society of CBFM, and joint international symposium on Molecular mechanism and epochal therapeutics for ischemic stroke and dementia, 2002.
- ③ 田中健一, 藤田尚子, 東洋一郎, 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(2) - 神経栄養因子の活性化 -. 第75回日本薬理学会年会, 2002.
- ④ 田中健一, 藤田尚子, 東洋一郎, 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(3) - 抗アポトーシス作用の関与 -. 第25回日本神経科学学会大会, 2002.
- ⑤ 吉岡真世, 田中健一, 藤田尚子, 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄: ドパミンアゴニスト cabergoline が示す神経保護効果の作用機序. 第45回日本神経化学学会, 2002.
- ⑥ 田中健一, 藤田尚子, 小川紀雄: 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抗アポトーシス作用に関する検討. 第102回日本薬理学会近畿部, 2002.

## 酸化ストレス障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種々の生体機能分子が障害を受ける。蛋白質もその例外ではなく、蛋白質は酸化によりダメージを受けて失活するが、加えて酸化は蛋白質の変性・凝集を引き起こし、神経変性疾患の病因と深く関与することが知られている。それゆえ、酸化蛋白質を選択的に識別し、除去するユビキチン系の同定はそれら疾患の治療を考える上で非常に重要である。我々は鉄代謝の制御因子 IRP2 の鉄依存性分解機構の研究を進め、IRP2 がヘムを介して鉄を感知すること、ヘムと酸素により酸化される IRP2 を選択的に識別する HOIL-1 ユビキチンリガーゼを同定した。HOIL-1 リガーゼは酸化蛋白質を選択的に識別するユビキチンリガーゼとして初めて同定されたものであり、蛋白ダメージの代表である酸化蛋白質の分解系として機能していると考えられ、その神経変性疾患における関与も深く示唆される。

### 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では、ユビキチンを含んだ複合体である Lewy 小体が特徴的な病理変化として知られているばかりでなく、若年性家族性パーキンソン病の原因遺伝子として Parkin ユビキチンリガーゼが同定されるなどユビキチン修飾系の関与が強く示唆されている。ユビキチン修飾系は E1/E2/E3 の3種の酵素群の働きにより標的蛋白質にユビキチンを付加することにより蛋白質の機能を制御する翻訳後修飾系である。ユビキチン化蛋白質のほとんどはプロテアソームによる分解へと導かれるが、膜蛋白質の内在化・蛋白質の局在決定など分解以外の機能も明らかにされつつある。そのようなユビキチン系の多彩な機能は、タイムリーにかつ選択的に標的蛋白質を識別し、修飾できることに由来する。それゆえ、標的蛋白質を識別し、E2 から標的へのユビキチン付加を促進する分子である E3:ユ

ビキチンリガーゼが、ユビキチン修飾系の中で最も重要な分子であると考えられている。生体内には特異性を異にする 1,000 種類以上の E3 が存在すると考えられている。また、タイムリー・選択的な基質識別にはユビキチンリガーゼのみならず、リン酸化などの基質蛋白質の基質修飾が重要な機能を有していることが知られている。一方、パーキンソン病においては病巣への鉄の沈着・酸化ストレスのドパミンニューロン脱落への関与が知られている。

我々は、これまで鉄代謝の制御蛋白質である IRP2 (iron regulatory protein 2) の鉄依存性分解機構の解析を進め、これまでに

1. 鉄による IRP2 の酸化が IRP2 の選択的なユビキチン修飾の始動シグナルとして機能すること
2. IRP2 に特異的な 73 アミノ酸からなる IDD(iron-dependent degradation)ドメインが IRP2 の鉄依存性分解に必須である