

**厚生科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業**

**パーキン蛋白の機能解析と
黒質変性及びその防御
(H14-こころ-021)**

平成 13 年度 - 15 年度
総括・分担研究報告書
(平成 14 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 3 月 25 日

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が（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、パーキン結合蛋白の1つで、exocytosis を抑制的に制御している CDCrel-1 の関与する exocytosis への変異 Parkin の影響を調べ、変異 Parkin のいくつかは exocytosis を抑制することを示した。また新規 parkin 結合蛋白を1つ抽出したが、これは主に核に発現している蛋白で、parkin によりユビキチン化される。現在その機能を検索中である。また parkin 蛋白の機能を解析するため、過剰発現すると神経細胞死を起こす a-synuclein 遺伝子をラット黒質に発現させ、parkin 蛋白を同時発現させたときの神経細胞死への影響を観察した。parkin は a-synuclein による神経細胞死を抑制し、ラットの行動も改善した。更に parkin ノックダウン細胞を樹立したが、それがアポトーシスにより死亡し、wild parkin により抑制されることを明らかにした。更にマンガンによる細胞死の系でも、parkin がそれを抑制することを示した。これらの所見は、parkin が細胞保護的作用をしていることを示している。更に parkin 蛋白のユビキチンドメインを NMR で解析し、ユビキチンに似た構造をとり、42 番目のアルギニンにて、26S プロテアソームの Rpn10 サブユニットと結合することを示した。現在更に parkin 蛋白の機能解析を進めるために、トランスジェニックアニマル、ノックアウトアニマルの作成に取り組んでいる。

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。

B. 研究方法

上記研究目的を達成するために、次の5名よりなる研究グループを組織した。主任研究者：水野美邦（順天堂大学医学部神経学）、分担研究者：永津俊治（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）、田中啓二（東京度臨床医学研究所）、小川紀雄（岡山大学医学部）、久野貞子（国立療養所宇多野病院）である。

各研究者の研究分担は、次の通りである。

水野美邦：Parkin 遺伝子・遺伝子産物解析

永津俊治：パーキントランスジェニックアニマル作製・分析

田中啓二：パーキンノックアウトマウス作製・解析

小川紀雄：パーキン発現細胞作成・解析

久野貞子：パーキン蛋白と神経細胞保護

研究方法については、各研究者の分担研究報告書を参照されたい。本年度は、次に示す研究成果が得られた。

C. 研究結果

これまで教室に集積された 479 家系、582 例の Parkinson 病患者サンプルの分析を行った。そのうち 116 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 62 家系、53.4%に parkin 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 67 家系の分析を行い、11 家系、16.4%に parkin 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）82 例を分析し、18 例、22.0%に parkin 遺伝子変異を発見した。その他に家族歴の詳細不明例が 214 例（大部分外国例）あり、そのうち 46 例、21.5%に parkin 変異がみつかった。全家系 479 家系中、137 家系、28.6%に変異がみつかったことになる。

更に変異のタイプを分析したが、parkin 変異を有する 156 家系のうち、エクソン欠失をホモ接合で有する家系が 52%、点変異をホモ接合で有する家系が 2%、エクソンの挿入を有する家系が 6%、2 つの相同遺伝子に種類の異なる変

異を有する複合ヘテロ変異を有する家系が 34%と約 3 分の 1 をしめた。また 2 つの相同遺伝子のうち、片方の遺伝子の変異しかみつからなかった家系が 15%存在した。

パーキン結合蛋白の 1 つである CDCrel-1 の関係する exocytosis への変異 parkin の影響を検討した結果、高発現したいくつかの変異パーキンが高カリウム刺激による脱分極依存性の開口放出を阻害した。C289G, T415N, Δ ubl, RING box で阻害効果が見られた。齧歯類パーキンに特異的に働く iRNA 配列を決定したが、RNA の細胞内への導入条件が悪く、脱分極刺激による放出の亢進が導入操作により障害されている。導入条件を検討中である。パーキンと SNARE タンパク質である syntaxin 1A, SNAP-25 および VAMP2 が、ラット脳シナプトソームで相互作用していることを、免疫沈降法を用いて認めた。

Parkin の新たな基質候補遺伝子産物を同定し、この因子の mRNA 発現が脳に特異的であることを明らかとした。また、Parkin と動物細胞内で結合するが、Parkin の 42 番アミノ酸のアルギニンからプロリンに変換されたユビキチン様領域内変異体においては結合活性が弱いことを示した。さらに、in vivo において、Parkin がこの因子のユビキチン化を促進することを明らかとした。現在この新規 parkin 結合蛋白の機能を検討中である。

α -synuclein との相互作用： α -synuclein 遺伝子のみを導入したラット ($\alpha + \alpha$ 群) 黒質では、13 週間後には神経細胞の脱落が認められ、残存神経細胞内には Lewy 小体様の α -synuclein 陽性の凝集体が観察された。 α -synuclein と EGFP 遺伝子を導入した $\alpha + G$ 群でも黒質神経細胞脱落は認められたが、 α -synuclein と parkin 遺伝子を導入した $\alpha + P$ 群では認められなかった。4 週時の $\alpha + G$ 黒質では rAAV に由来する α -

synuclein の高発現とカスパーゼ3発現誘導が Western blotting にて観察されたが、 $\alpha + P$ では共に認められなかった。行動評価はアポモルフイン誘発回転行動にて行い、 $\alpha + \alpha$ 群及び $\alpha + G$ 群とも回転行動が認められたが、 $\alpha + P$ 群では全く認められなかった。ヒト α -synuclein mRNA を切断できる Rz は2種類作製できた。一方はマウス α -synuclein mRNA も同様に切断したが、もう一方は切断しなかった。前者は rAAV 作製用のプラスミドに組み込み、ヒト α -synuclein 発現プラスミドと同時に HEK293 細胞に導入したところ、 α -synuclein 蛋白低下が観察された。

次に、3種類の細胞株に野生型パーキン cDNA の発現ベクターを遺伝子導入し、マンガンによる細胞毒性の変化を検討した。ドパミン産生細胞株の CATH.a 細胞、SH-SY5Y 細胞に野生型パーキン遺伝子を導入したところ、マンガンにより誘発される β -ガラクトシダーゼ陽性の細胞数の低下が、空ベクターを導入したものに比べ、有意に抑制されていた。しかし、非ドパミン Neuro2A 細胞に野生型パーキン遺伝子を導入してもマンガンによる細胞死は不変であった。

パーキンノックダウン細胞の研究では、感染した細胞は、adeno virus titer 依存的に viability の低下を認めた。LacZ control adenovirus では濃度依存的な viability の低下は認められなかった。Viability の低下した細胞は TUNEL 陽性であり Caspase 9,3,6,7 の活性化が認められ apoptosis であることが証明された。また Neuroblastoma 細胞以外のヒト由来の細胞系では同様の結果は認めなかった。また野生型の parkin で前処理をすると濃度依存的にノックダウンした細胞のアポトーシスが抑制された。

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、現在1ラインの増殖を行っている。

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が、まだノックアウト個体の作成には成功していない。

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物であるパーキンは、蛋白質分解のシグナル分子であるユビキチン (Ub) とアミノ酸配列上 32%の相同性をもつユビキチン様ドメインを含むことが知られている。本年、ヒトパーキンのユビキチン様ドメイン (Ubl) の NMR 解析を行い、その三次元構造を決定するとともに、緩和解析により Ubl のダイナミクスを明らかにすることを試みた。

NMR から得られた情報をもとに Ubl の構造計算を行った結果、Ubl は5つの α -ストランドと2つの β -ヘリックスから構成されていることが明らかとなった。さらに多次元 NMR による緩和解析の結果から、第1および第2 α -ストランド間に位置するターン部分 (Asn8-Ser10) は、複数のコンフォーマーの間を揺らいでいる構造平衡が存在していることが判明した。したがって、パーキン Ubl は Ub と同様のフォールドから構築されているが、分子の動的な性質は Ub とは異なることが明らかとなった。また Ubl の42番目のアルギニンにて、26S プロテアソームの Rpn10 サブユニットと結合することを明らかにした。

ラット脳組織各部位 (大脳皮質、脳幹、海馬、視床、中脳、線条体) におけるパーキン蛋白の、生後2週齢、10週齢、20週齢における加齢変

化を Western blot 解析にて検討した。Par-N 抗体により認識される分子量約 30,000 のバンド（パーキン蛋白の部分分解物またはユビキチンポリマーを認識か）は、2 週 \geq 10 週 \geq 20 週と加齢と共に幾分減少する傾向を示したのに対し、ユビキチンと高いホモロジーを示す蛋白を認識できる分子量 8000 近辺のバンドは、いずれの脳細分画部分においても 2 週 $<$ 10 週 $<$ 20 週と、加齢と共に著しく増加傾向を示した。また Par-M 抗体により認識される 50,000 近辺の蛋白バンド（完全長のパーキン蛋白と考えられる）は、10 週 $>$ 20 週 $>$ 2 週の順で、特に 10 週で高発現を示した。以上より、正常ラット脳のパーキン蛋白は、脳各部位にほぼ等しく存在しているが、加齢とともに顕著な発現量の変動が認められた。

一方、これらの抗血清よりアフィニティー抗体を調製し、抗体の組み合わせ実験により、ペプチドを標準品としたサンドイッチ型 ELISA 系を作製し、パーキン蛋白の高感度定量法の確立を試みている。その結果、Par-M 抗体を用いた ELISA 法により、最小感度 0.3 ng で 0.3~33 ng/ml を定量できる方法を確立した。

これらの研究成果は、多数の国際誌に発表し、また国内外からの共同研究の申し込みも多く、情報提供は活発に行ってきた。また研究成果は、孤発型パーキンソン病の発症機序解析にも貢献すると考えられ、この点で、症例の多い孤発型パーキンソン病研究への還元も視野に入れている。

D. 考察と結論

常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病（ARJP）の遺伝子診断法を確立し、パーキン蛋白の機能解析を進め、細胞保護、アポトーシス抑制に働くことを細胞モデル、動物モデルにて明らかにした。パーキン及びパーキン蛋白の機

能発見は、ユビキチンプロテアソームの異常がヒトの神経変性疾患を起こすことを始めて直接示したのものとして、関連領域にも大きなインパクトを与えている。即ち、ユビキチン化された細胞内封入体を生じる変性疾患、例えばアルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、筋萎縮性側索路硬化症などにおいても、蛋白処理機構の異常が存在する可能性がある。即ち、ユビキチンプロテアソームシステムの異常は、多くの神経変性疾患に共通する異常として存在する可能性がある。また蛋白処理機構の異常を正すような治療法が今後研究される必要を指摘している。即ち、パーキンの発見は、ARJP の解明にとどまらず、広く神経変性疾患の解明、並びにその根本的治療法開発に向けての、大きな示唆を与えたといえる。我々のグループでは、更に将来に向けたパーキン及び関連遺伝子による遺伝子治療の基礎研究を開始している。

E. 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。

Parkin 遺伝子・遺伝子産物解析

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 Parkinson 病（ARJP）の原因遺伝子である parkin の変異解析と parkin 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。またその結果に基づき孤発型 Parkinson 病の黒質変性機構についても考察した。

Parkin 遺伝子の変異は、検索家系の約 30%に認められ、parkin 変異の約3分の1は、複合ヘテロ変異であった。このことは、parkin 変異のファウンダー多いことと、保因者がかなり多いことを示唆している。また本邦にはエクソン欠失が多く、点変異が少ないことも確認できた。

Parkin 蛋白の機能解析については、exocytosis を抑制的に制御している CDCrel-1 との結合を確認すると共に、異常 parkin の一部は、CDCrel-1 の関与する exocytosis を抑制することを明らかにした。このことは、parkin 変異の一部は、ドパミンの放出の抑制とそれによる酸化的障害を起こすことを示唆している。更に、新たな parkin 結合蛋白を1つ抽出し、現在その機能を探索している。この蛋白は主に核に発現しているが、まだその機能はよくわかっていない。今後本蛋白と神経細胞死の関連を分析する。更に parkin の機能を探索する目的で、過剰発現させると細胞死を誘導する α -synuclein をラット黒質に遺伝子導入で過剰発現させ、更に parkin 遺伝子を導入した結果を検討した。それによると α -synuclein を過剰発現させると神経細胞死が誘導されるのに対し、parkin を同時に高発現させると神経細胞死が抑制され、parkin は神経細胞保護的に作用することが示唆された。更に parkin の機能を探索するために、parkin のアンチセンスをドパミン由来の SH-SY5Y 細胞に導入した所、アポトーシスによる神経細胞死が誘導され、センス parkin の前処置でそれが用量依存的に抑制され、parkin の細胞保護効果を確認した。

A. 研究目的

〔研究 1〕Parkin 遺伝子の変異解析：昨年度に引き続き国内外から寄せられたサンプルにつき、parkin 遺伝子の変異解析を行う。Parkin の機能解析には、色々な変異 parkin 遺伝子が必要であり、遺伝子変異解析を継続している。

〔研究 2〕Parkin 蛋白の機能解析 1；CDCrel-1 との結合、及び変異 parkin 蛋白が exocytosis に与える影響：CDCrel-1 は exocytosis を抑制的に調

節している蛋白である。昨年度 parkin と CDCrel-1 の結合を証明したので、本年度は変異 parkin 蛋白の exocytosis への影響を検討した。

〔研究 3〕Parkin 蛋白の機能解析 2；新たな parkin 結合蛋白の探索：parkin 蛋白の欠損と神経細胞死の関係を研究するため、新たな parkin 結合蛋白の探索を行う。

〔研究 4〕Parkin 蛋白の機能解析 3； α -synuclein との相互作用：parkin の機能を探索する目的で、

過剰発現させると細胞毒性を示すことが知られている α -synuclein 遺伝子を動物に導入し、更に parkin 遺伝子を導入した時の黒質細胞動態を解析する。

〔研究 5〕 Parkin 蛋白の機能解析 4 ; parkin ノックダウン細胞の作成 : parkin の機能を直接調べるため、ノックダウン細胞を作成し、その影響を検討する。

〔研究 6〕 プロテアソームと神経細胞死 : parkin 蛋白が、ユビキチンリガーゼの一種であることが判明し、ユビキチンプロテアソームシステムと神経細胞死の関係が注目されている。孤発型パーキンソン病について 26S プロテアソームの異常の有無を検討する。

〔研究 7〕 プロテアソームとパーキンソン病 : プロテアソーム異常がパーキンソン病の危険因子になる可能性があり、26S プロテアソーム調節ユニットの 1 つ Rpn13 の遺伝子多型とパーキンソン病との関連分析を行う。

B. 研究方法

〔研究 1〕 Parkin 遺伝子の変異解析 : parkin 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〕 Parkin 蛋白の機能解析 1 : CDCrel-との結合、及び変異 parkin 蛋白が exocytosis に与える影響 : 開口放出の実験系としてハムスター

膵臓細胞 HIT-T15 を用いた。この細胞は神経伝達物質の開口放出に参与する一群のタンパク質を含んでおり、遺伝子導入効率が高いため、導入した外来遺伝子の神経伝達物質開口放出に対する影響を調べる最も良い実験系である。HIT-T15 にパーキンを導入し、高カリウム刺激による開口放出に与える影響を調べた。また、パーキンノックダウンの影響を調べるため、iRNA (interfering RNA) を設計した。さらに、膜融合に参与する SNARE タンパク質とパーキンの相互作用を調べた。

〔研究 3〕 Parkin 蛋白の機能解析 2 ; 新たな parkin 結合蛋白の探索 : yeast two hybrid 法により parkin と相互作用する因子を単離した。また、parkin と相互作用因子の結合を COS1 細胞内において Myc タグ融合 parkin と FLAG タグ融合相互作用因子を強制発現させ、Myc 抗体を用いて免疫沈降し、FLAG 抗体で免疫ブロットし、確認した。In vivo におけるユビキチン化の検討においては、Myc タグ融合 Parkin、または Myc ベクター、FLAG タグ融合相互作用因子、HA タグ融合ユビキチンを強制発現させ、FALG 抗体を用いて免疫沈降し、HA 抗体で免疫ブロットし確認した。さらに、ノーザンブロット法において相互作用因子の組織における mRNA の発現量を確認した。

〔研究 4〕 Parkin 蛋白の機能解析 3 ; α -synuclein との相互作用 : 同力価の rAAV-EGFP, rAAV- α -synuclein, 及び rAAV-parkin を作製し、下記の 3 通りの rAAV の組み合わせをラット黒質に注入した。

- ① rAAV- α -synuclein のみ ($\alpha + \alpha$ 群)
 - ② rAAV- α -synuclein + rAAV-EGFP ($\alpha + G$ 群)
 - ③ rAAV- α -synuclein + rAAV-parkin ($\alpha + P$ 群)
- 注入後 4、13 週で免疫染色、Western blotting、及びラット行動評価の検討を行った。

リボザイムはヒト α -synuclein に対して 6 種類設計し, *in vitro* アッセイ系, 細胞内での α -synuclein 蛋白量低下, について検討した.

[研究 5] Parkin 蛋白の機能解析 4 ; *parkin* ノックダウン細胞の作成 : *parkin* 全長にたいする antisense adeno virus を作成し retinoic acid により分化誘導したヒト neuroblastoma cell に感染させ, 内因性の *parkin* 蛋白 のノックダウン解析を行った.

[研究 6] プロテアソームと神経細胞死 : 中脳黒質(孤発型パーキンソン病患者 4 例, 健常者 2 例)と, 線条体(孤発型パーキンソン病患者 2 例, 健常者 2 例)パラフィン包埋組織切片をプロテアソーム C2 抗体にて DAB 法にて免疫染色を行った. 次に剖検脳より孤発型パーキンソン病患者と健常者の中脳より各分画に分離し(600g 10 分, 8,000g 10 分, 105,000g 60 分)プロテアソーム C2 抗体を用いて, Western blotting を行った.

[研究 7] プロテアソームとパーキンソン病 : 26 S プロテアソームの PA700 調節ユニットの 1 つである Rpn13 (regulatory particle non-ATPase13) の Ser/Asp13 (G-to-A) の遺伝子多型を TaqMan MGB プローブを用いた ABI PRISM, 7700 sequence detection system を用いて解析し, 孤発型パーキンソン病発症との関連分析を行った.

C. 研究結果

[研究 1] Parkin 遺伝子の変異解析

これまで教室に集積された解析の終了した 479 家系, 582 症例の Parkinson 病患者サンプルの解析を行った. そのうち 116 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 62 家系, 53.4% に *parkin* 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 67 家系の分析を行い, 11 家系, 16.4% に

parkin 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) 82 例を分析し, 18 例, 22.0% に *parkin* 遺伝子変異を発見した. 更に家族歴詳細が不明の症例が 214 例あり, これらは大部分外国例で一見孤発例と思われたが, 孤発例との確固たる証明がないので別に集計した. これら症例の中での *parkin* 変異の頻度は 21.5% であった. 全解析家系 479 例中 137 家系, 28.6% に *parkin* 変異がみつかったことになる.

更に変異のタイプを分析したが, *parkin* 変異を有する 137 家系のうち, エクソン欠失をホモ接合で有する家系が 52%, 点変異をホモ接合で有する家系が 2%, エクソンの挿入を有する家系が 6%, 2 つの相同遺伝子に種類の異なる変異を有する複合ヘテロ変異を有する家系が 34% と約 3 分の 1 をしめた. また 2 つの相同遺伝子のうち, 片方の遺伝子の変異しかみつからなかった家系が 15% 存在した.

[研究 2] Parkin 蛋白の機能解析 1 ; CDCrel-との結合, 及び変異 *parkin* 蛋白が *exocytosis* に与える影響 : 高発現したいくつかのミュータントパーキンが高カリウム刺激による脱分極依存性の開口放出を阻害した. C289G, T415N, Δ ubl, RING box で阻害効果が見られた. 齧歯類パーキンに特異的に働く iRNA 配列を決定したが, RNA の細胞内への導入条件が悪く, 脱分極刺激による放出の亢進が導入操作により障害されている. 導入条件を検討中である. パーキンと SNARE タンパク質である syntaxin 1A, SNAP-25 および VAMP2 が, ラット脳シナプトソームで相互作用していることを, 免疫沈降法を用いて認めた.

[研究 3] Parkin 蛋白の機能解析 2 ; 新たな *parkin*

結合蛋白の探索：Parkin の新たな基質候補遺伝子産物を同定し、この因子の mRNA 発現が脳に特異的であることを明らかとした。また、Parkin と動物細胞内で結合するが、Parkin の 42 番アミノ酸のアルギニンからプロリンに変換されたユビキチン様領域内変異体においては結合活性が弱いことを示した。さらに、in vivo において、Parkin がこの因子のユビキチン化を促進することを明らかとした。現在この新規 parkin 結合蛋白の機能を検討中である。

〔研究 4〕Parkin 蛋白の機能解析 3： α -synuclein との相互作用： $\alpha + \alpha$ 群 1 3 週間後には黒質神経細胞の脱落が認められ、残存神経細胞内には Lewy 小体様の α -synuclein 陽性の凝集体が観察された。 $\alpha + G$ 群でも黒質神経細胞脱落は認められたが、 $\alpha + P$ 群では認められなかった。4 週時の $\alpha + G$ 黒質では rAAV に由来する α -synuclein の高発現とカスパーゼ 3 発現誘導が Western blotting にて観察されたが、 $\alpha + P$ では共に認められなかった。行動評価はアポモルフイン誘発回転行動にて行い、 $\alpha + \alpha$ 群及び $\alpha + G$ 群とも回転行動が認められたが、 $\alpha + P$ 群では全く認められなかった。

ヒト α -synuclein mRNA を切断できる Rz は 2 種類作製できた。一方はマウス α -synuclein mRNA も同様に切断したが、もう一方は切断しなかった。前者は rAAV 作製のプラスミドに組み込み、ヒト α -synuclein 発現プラスミドと同時に HEK293 細胞に導入したところ、 α -synuclein 蛋白低下が観察された。

〔研究 5〕Parkin 蛋白の機能解析 4：*parkin* ノックダウン細胞の作成：感染した細胞は、adenovirus titer 依存的に viability の低下を認めた。LacZ control adenovirus では濃度依存的な viability の低下は認められなかった。Viability の低下した細胞は TUNEL 陽性であり Caspase

9,3,6,7 の活性化が認められ apoptosis であることが証明された。また Neuroblastoma 細胞以外のヒト由来の細胞系では同様の結果は認めなかった。また予め野生型 parkin で前処理をしておくと、ノックダウン細胞のアポトーシスが用量依存的に抑制された。

〔研究 6〕プロテアソームと神経細胞死：パーキンソン病患者では黒質神経細胞、線条体神経細胞の核内・核周囲に C2 抗体が染色されたが、健常者では核内は染色されなかった。またその他の部位では、中脳水道周囲の灰白質では核染色あり、黒質網様層にて一部染色あり、淡蒼球外節、内節では核染色あり、島皮質では軽度核染色が認められた。赤核、黒質、線条体グリア細胞、血管内皮細胞は染色されなかった。Western blotting では、パーキンソン病患者のミクロソーム分画に強いバンドをが観察された。

〔研究 7〕プロテアソームとパーキンソン病：パーキンソン病 (P) 及び対照 (C) におけるアリル 1 (G) の頻度は、それぞれ 81% (N=589)、85% (N=325)、アリル 2 (A) の頻度はそれぞれ、19%、15%で、その差はカイ自乗検定で $P < 0.05$ のレベルで有意であった。Genotype は、パーキンソン病で GG, GA, AA の頻度は、それぞれ 69%、25%、6%、対照ではそれぞれ 76%、19%、5%で有意差はなかった。

D. 考察

Parkin 遺伝子の変異による複合ヘテロ接合体の parkin 遺伝子変異での発症者が少なくないことは parkin 遺伝子変異の保因者が以外に多いことを示唆している。また 2 つの相同遺伝子のうち片方にしか parkin 遺伝子の変異が発見されなかった家系が存在した。これらの家系は大部分劣性遺伝か若年発症の孤発例であり、もう一方の遺伝子の変異が現在の分析方法では解析でき

ない所にあると推定している。プロモーター領域の構造は、最近明らかにされたので、この部分の分析は行ったが、変異はみつかっていない。あとはイントロンであるが、parkin 遺伝子は、膨大なイントロンを有しており、またその変異分析は進んでいない。今後に残された問題である。

一方劣性遺伝を示しながら、parkin 遺伝子に変異のみつからない家系が約 50%近く存在し、これらの家系の中から、1 番染色体に連鎖する家系が多数みつかり、現在鋭意その原因遺伝子の同定作業を行っている。最近報告された DJ-1 遺伝子家系もあり、現在 PARK6 の原因遺伝子探索を精力的に行っている。

一方、parkin 蛋白の機能に関しては、exocytosis を抑制的に制御している CDCrel-1 との結合、及び変異 parkin 蛋白が exocytosis に与える影響を検討した。導入した変異パーキンの一部が高カリウムによる脱分極性開口放出を阻害することを示したが、これは、変異パーキンがドミナントネガティブ効果的に働いて、内在パーキンの機能を阻害している結果と考えた。したがって、パーキンは開口放出の正の制御因子である可能性がある。パーキンと SNARE タンパク質との *in vivo* での結合は、シナプスでパーキンが開口放出に関与する可能性が示唆している。この系における CDCrel-1 の関与は明らかではない。今後パーキンノックダウンにより、パーキンが開口放出を正に制御していることを直接的に示したい。もしこのような変異 parkin による exocytosis 障害が、黒質ドパミン細胞においても起きるとすれば、ドパミンの放出障害により、細胞質ドパミンの上昇が病初期には、おきる可能性がある。細胞質ドパミンはモノアミン酸化酵素により酸化を受けて過酸化水素を生成する。即ち酸化的障害の原因となる可能性がある。Parkin 変

異を有する黒質で、鉄の沈着が著しいことを我々は観察しており、ARJP においても酸化的障害が細胞障害の 1 機序として存在する可能性がある。

Parkin 結合蛋白は、我々が以前行った yeast two hybrid 解析によると 10 種類以上ある可能性がある。既に、CDC-rel 1, CDC-rel 2A, synphilin-1, α -synuclein-22, Pael receptor, タウが結合蛋白として報告されているが、今回我々は新たな parkin 結合蛋白を 1 つ抽出した。主に核に発現している蛋白であるが、機能は現在検討中である。今回同定した parkin 結合蛋白は parkin の変異体 R42P との結合活性が弱く、ARJP の発症に関わる因子である可能性が示唆された。また、Parkin がこの因子のユビキチン化を促進することから、parkin の基質となることが推定された。今後多数報告されている parkin 結合蛋白の中で、神経細胞死に直接かかわるものの同定が重要になっている。

Parkin が細胞保護的に作用する報告が最近相次いでいるが、我々は細胞障害性に働く α -synuclein との相互作用を、遺伝子導入で本蛋白を黒質に高発現させたラットで検討した。既に報告されているような rAAV- α -synuclein によるラット黒質神経細胞死は、我々も再現することができた。 α -synuclein 陽性凝集体は、我々が観察したものが最も Lewy 小体に類似した形態であった事より、Lewy 小体形成には α -synuclein 発現の至適量が存在すると思われた。この細胞死はカスパーゼ 3 の発現亢進を伴っていたことより、アポトーシスであると考えられる。rAAV-parkin を同時に高発現させると、rAAV- α -synuclein 誘発神経細胞死を抑制され、parkin が細胞保護的に働くことが示唆された。しかも、残存黒質神経細胞は神経機能を保持していたことより、rAAV-parkin はパーキンソン病遺伝子治療の有力な戦略であると考えられる。ヒト α -

synuclein を切断できる2種類のリボザイムは、一方はマウス配列も切断したが、もう一方は切断しなかった。これはリボザイムの配列特異性の高さを示唆する結果であり、将来的には原因遺伝子をヘテロに持つ患者の変異遺伝子のみを切断する戦略が可能かもしれない。

更に今回作成した parkin ノックダウン細胞においても、アポトーシスによる細胞死が観察されたことは、parkin がかなり直接的に細胞保護的に作用していることを示している。このアポトーシスは神経系の培養細胞に特異的であり、アポトーシスシグナルはミトコンドリアに由来しており細胞死の原因がミトコンドリアの機能不全に起因するものであることが推測された。

Parkin 遺伝子の発見、parkin 蛋白の機能解析の進展は、ユビキチンプロテアソームシステムの異常が神経変性疾患の原因になることを直接証明したのものとして、大きなインパクトを関係領域にも与えている。ユビキチン化した封入体は、パーキンソン病のみならず、アルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、筋萎縮性側索硬化症など多くの神経変性疾患で観察され、蛋白処理機構の破綻が神経変性の共通基盤として存在する可能性が浮かび上がってきた。我々は、今回孤発型パーキンソン病においても、ユビキチンプロテアソームシステムの異常がないかどうかを検討する目的で、抗プロテアソーム抗体を使用して免疫組織を行ってみたが、20Sサブユニットの核内及び核周辺への移行が見られた。その意味づけはこれからであるが、興味ある所見と考えている。また調節ユニットの1つ、Rpn13 の遺伝子多型が発症の危険因子の1つになる可能性も示した。

E. 結論

Parkin 遺伝子には多数の変異がみつきり、し

かも人種による差が存在する。アジア地域にはエクソン欠失が多く、点変異は比較的少ない、欧米では、点変異が沢山報告されている。また複合ヘテロ変異が約3分の1に見られ、保因者の頻度もかなり高いことが推定された。

Parkin 蛋白の機能はユビキチンリガーゼであることが判明しているが、近年 parkin 結合蛋白が多数見つかった。必ずしもユビキチン化されたものが全て 26S プロテアソームで破壊されるわけではないことも近年明らかにされつつあり、parkin の機能はますます複雑で解明すべき点が多々あることが解ってきた。更に parkin 結合蛋白の中で黒質変性に主役を演じるのが何であるかの解明も必要である。最近報告が増えているのは、parkin が細胞保護的に働くことである。これは parkin の欠損で黒質細胞死が起きることから予想されることではあるが、今回 α -synuclein 遺伝子導入モデル、マンガニンモデル、parkin ノックダウン細胞モデルで、parkin が細胞保護的に働くことを明らかにし、更にこれを将来遺伝子治療に応用するための基礎的研究も開始した。

更に、ユビキチンプロテアソームシステムは ARJP のみならず、孤発型パーキンソン病はもとより、その他のユビキチン化された細胞内封入体が出現する多くの神経変性疾患においても、重要な役割をしていることが示唆される。これらの疾患においては、蛋白処理機構の障害で、蛋白の異常蓄積、ユビキチン化がおきているのではないかと推定される。将来的には、異常蛋白蓄積を抑制することで、神経細胞のレスキューも可能ではないかと思われる。

F. 研究発表

[英文原著]

1) Goetz CG, Koller W, Poewe W, Rascol O,

- Sampaio C, Brin MF, Lees AJ, LeWitt P, Lozano A, Mizuno Y, Nutt J, Oertel W, Olanow E, Tolosa E. Management of Parkinson's Disease; an evidence-based review. *Mov Disord* 2002;17 (Suppl 4):S1-S166
- 2) Hyun DH, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B, Jenner P. Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* 2002;277:28572-28577
 - 3) Kobayashi H, Krüger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, Hattori N. Haploinsufficiency at the α -synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* 2002 (in press)
 - 4) Kobayashi K, Mori H, Okuma Y, Dickson D W, Cookson N, Tsuboi Y, Motoi Y, Tanaka R, Miyashita N, Anno M, Narabayashi H, Mizuno Y. Contrasting genotypes of the tau gene in two phenotypically distinct patients with P301L mutation of frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17. *J Neurol* 2002;249:669-675
 - 5) Kobayashi T, Ota S, Tanaka K, Ito Y, Hasegawa M, Umeda Y, Motoi Y, Takanashi M, Yasuhara M, Anno M, Mizuno Y, Mori H. A novel L266V mutation of the tau gene causes frontotemporal dementia with a unique tau pathology *Ann Neurol* 53: 2003(in press)
 - 6) Miwa H. Mizuno Y. Enlargements of somatosensory-evoked potentials in progressive supranuclear palsy. *Acta Neurol Scand* 2002;106:209-212
 - 7) Miwa H, Kondo T, Mizuno Y. Bell's palsy-induced blepharospasm. *J Neurol* 2002;249:452-454
 - 8) Miwa H, Mizuno Y, Kondo T. Familial hemifacial spasm: report and cases and review of literature. *J Neurol Sci* 2002;193:97-102
 - 9) Mori H, Oda M, Komori T, Arai N, Takanashi M, Mizutani T, Hirai S, Mizuno Y. Lewy bodies in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 2002;104:273-278
 - 10) Mori H, Hattori N, Mizuno Y. Genotype-Phenotype Correlation: Familial Parkinson Disease . *Neuropathology* 2003 (in press)
 - 11) Ohizumi H, Okuma Y, Fuake J, Fujishima K, Goto K, Mizuno Y. Head tremor in dentatorubral-pallidoluyasian atrophy. *Acta Neurol Scand* 2002;106:319-321
 - 12) Okuma Y, Mizuno Y, Lee RG. Reciprocal Ia inhibition in patients with asymmetric spinal spasticity. *Clin Neurophysiol* 2002;113:292-297
 - 13) Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS. Parkin localizes to the lewy bodies of Parkinson disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol* 2002;160:1655-1667
 - 14) Suzuki A, Obi K, Urabe T, Hayakawa H, Yamada M, Kaneko S, Onodera, Mizuno Y, Mochizuki H. Feasibility of ex vivo gene therapy for neurological disorders using the new retroviral GCDNsap packaged in the vesicular stomatitis virus G protein. *J Neurochemi* 2002;82:953-960
 - 15) Takanashi M, Mori H, Arima K, Mizuno Y, Hattori N. Expression patterns of tau mRNA isoforms correlate with susceptible lesions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Molecular Brain Research* 2002 (in press)
 - 16) Takanashi M, Ohta S, Matsuoka S, Mori H, Mizuno Y. Mixed multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy: a clinical and pathological report of one case. *Acta Neuropathol* 2002;103:82-87

- 17) Tanaka R, Mochizuki H, Suzuki A, Katsube N, Ishitani R, Mizuno Y, Urabe T. Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:280-288
 - 18) Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T: Migration of EGFP expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mice brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 2003 (in press)
 - 19) The Global Parkinson's Disease Survey (GPDS) Steering Committee. Factors Impacting on Quality of Life in Parkinson's Disease. Results from an International Survey. *Mov Disord.* 2002;17:60-67
 - 20) Urabe T, Tanaka R, Noda H, Mizuno Y. Anticoagulant Therapy with a Selective Thrombin Inhibitor for Acute Cerebral Infarction: Usefulness of Coagulation Markers for Evaluation of Efficacy. *Journal of Thrombosis* 2002;13:155-160
- 3) Hattori N, Asakawa S, Shimura H, Kubo S, Sato K, Kitami T, Chikaoka-Kawamura Y, Imai Y, Takahashi R, Suzuki T, Tanaka K, Shimizu N, Mizuno Y. Ubiquitin-proteasome pathway is a key to understanding of nigral degeneration in autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 291-296
 - 4) Schlossmacher MG, Prosch MP, Gai WP, Sharma N, Medina M, Ochiishi T, Shimura H, Hattori N, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS. Colocalization of parkin with a-synuclein in the Lewy bodies of Parkinson's disease. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 297-300
 - 5) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Prosch MP, Tockenbacher A, Shneider R, Mizuno Y, Kosik K, Selkoe DJ. Ubiquitination of a novel form of a-synuclein by parkin. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 301-304
 - 6) Mizuno Y, Asakawa S, Suzuki T, Hattori N, Minoshima S, Chiba T, Yoshino H, Shimizu N, Tanaka K. 28. Parkin Mutations (Park2). In *Genetics of Movement Disorders*, ed, Pulst SM, Academic Press, San Diego, 2002, pp 297-301

[英文著書]

- 1) Mizuno Y, Hattori N, Shimura H, Kitada T, Kubo S, Wang M, Satpl K, Suzuki T, Chiba T, Tanaka K, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N. Etiology, pathogenesis, and genetics of Parkinson's disease. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 239-244
 - 2) Elibol B, Kobayashi T, Ataç FB, Hattori N, Sahin G, Güreç G, Mizuno Y. Familial Parkinsonism with apathy, depression and central hypoventilation (Perry's syndrome). In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 285-290
- [英文総説]
- 1) Agid Y, Olanow CW, Mizuno Y. Levodopa: why the controversy? *Lancet* 2002;360(9332):575

[国際学会・研究会発表]

- 1) Mizuno Y. Progress in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. Seminar in Neurology, Bombai Hospital, January 15, 2002
- 2) Mizuno Y. Parkin, ubiquitin and other genes in Parkinson's disease: new aspects. 10th International Winter Conference on Neurodegeneration, Berlin, February 14-15
- 3) Mizuno Y. Familial Parkinson's Disease update. COE International Symposium On Recent Advances In Research For Neurodegeneration. COE International Symposium on Neurodegeneration: Ubiquitin System and Neurodegeneration, Tokyo, March 5-6, 2002
- 4) Mizuno Y. Mutation of the ubiquitin ligase parkin in autosomal recessive familial parkinsonism. Proteolytic Machines in Human Disease, Bellagio, Italy, June 10-14, 2002
- 5) Mizuno Y. Dementia and Depression in Parkinson's Disease. 7th International Symposium on the Treatment of Parkinson's Disease, Kobe, September 28-29, 2002
- 6) Mizuno Y. Plenary Lecture: Clinical and Genetic Aspects of Familial Parkinson's Disease. The 3rd FAONS CONGRESS, Seoul, Korea, September 28th-October 1st, 2002
- 7) Mizuno Y. Progress in the Familial parkinson's Disease: Clinical and Genetic Aspects. Taiwan Neuroscience 2002, Taipei, October 5th, 2002
- 8) Mizuno Y. Definition, Diagnosis, and Cause of Parkinson's Disease. Kindly supported by the Griffin Trust. The 2nd New Zealand International Parkinson's Conference, Wellington, 22-24 October, 2002
- 9) Mizuno Y. David Marsden Lecture. Impact of inherited Parkinson's disease on the understanding of nigral neurodegeneration. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 10) Hatano Y. S. Sato K. Kobayashi T. Yoshino H. Hattori N. Mizuno Y. PARK6 linkage analysis of autosomal recessive Parkinson's Disease. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 11) Fukae J. Kubo S. Takanashi M. Nakabeppu Y. Hattori N. Mizuno Y. Increased MYH and OGG1 in substantia nigral neurons in Parkinson's Disease. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 12) Furuya T. Mochizuki H. Yamada M. Miura M. Yuan J. Mizuno Y. Caspase-11 plays an important role in the dopaminergic cell death induced by acute MPTP treatment not but chronic treatment. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 13) Iijima M. Lizuka Y. Maehara T. Hattori N. Mizuno Y. Putaminal volume in Parkinson's Disease. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 14) Iroi A. Hattori N. Takanashi M. Kubo S. Tanaka K. Mizuno Y. Localization of the 20S proteasome in Parkinson's Disease. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 15) Machida Y. Tanaka T. Chiba T. Hattori N. Tanaka K. Mizuno Y. Parkin knockdown induces the apoptotic cell death in human neuroblastoma cells. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, U.S.A., November 10-14, 2002
- 16) Noda K. Hattori N. Yokochi M. Kondoh T.

- Mizuno Y. Clinical phenotypes of two families with Parkin gene mutations: comparison of the clinical phenotypes of monozygotic twin and two sibling. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A. , November 10-14, 2002
- 17) Oizumi H. Mochizuki H. Arai T. Mori H. Mizuno Y. Cancer incidence and causes of death in patients with Parkinson's Disease among autopsy cases in Japan. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A. , November 10-14, 2002
- 18) Takahashi M. Hattori N. Imai Y. Inoue H. Takahashi R. Mizuno Y. Immunohistochemical study for ER stress and accumulation of Pael-rin autosomal recessive juvenile Parkinsonism with Parkin gene mutations. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, U.S.A. , November 10-14, 2002
- 19) Wada K. Furuya T. Sugita Y. Schwartz J. P. Mochizuki H. Mizuno Y. Establishment of in vivo delivery system of pigment epithelium-derived factor (PEDF) using adeno-associated virus vector. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Miami, Miami, U.S.A. , November 10-14, 2002

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変異パーキントランスジェニックマウスの作製に成功した。さらにこのマウスを繁殖して成長に伴う phenotype の解析を進める。

[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、ARJP モデルマウスとしてパーキントランスジェニックマウスを作製して黒質線条体のドーパミンニューロンの神経細胞死の機構を解明する目的で、ドーパミンニューロンとグリアことにミクログリアにおけるサイトカインと神経栄養因子の変化の研究を計画している。その比較研究として、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た。孤発型パーキンソン病剖検脳において神経変性による神経脱落に相関したミクログリアの活性化を黒質線条体部位に見出した。黒質線条体部位ではミクログリアの活性化マーカーである炎症性サイトカイン遺伝子の発現増大がみられた。さらに残存しているチロシン水酸化酵素(TH)陽性繊維に活性化ミクログリアが接触している像を多数見出した。MPTP パーキンソニズムマウスでは短回投与ではミクログリアの活性化は全く検出できず、7日連続投与では顕著な活性化を認めた。しかしドーパミン神経の TH 陽性率は高度に減少したが変性脱落は見出せなかった。これらの成績からミクログリアの活性化は単に神経毒性を発揮しているだけでなく、神経保護に働いていることが推定された。

A. 研究目的

[研究 1] 水野・清水らによって、1987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、

パーキン蛋白質は 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-テトラヒドロピリジン(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ミ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変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ことにミクログリア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(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 mM) 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(*Sal*I*)) 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 (*Cl*oI) におおのこのパーキ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 (*Sal*I) 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 1 ng/micro l 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 8 mm を切断後、止血作業を行っただちに溶解液 (50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1%SDS) に入れ 55°C、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)GCAGGTAGATCAATCTACAACAGCT(537)-3') とアンチセンスプライマー 1 (5'-T(837)CCTGACGTCTGTGCACGTAATGCAA(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)TCCAGTGCAACTCCCGCCACGTGAT(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(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した。

(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た。

(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-1β)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] パーキントランスジェニック(Tg)

マウスの作製

正常(wild)と T415N (P415)変異のパーキン cDNA を用いて、Tg マウスを作製した。パーキン cDNA を pCMV/lox/CAT/lox/PA(Sall*) ベクターに入れマウス受精卵にマイクロインジェクションを行い、取れた Tg マウス (founder)を継代し、そのマウスを用いて CAT assay を行った。CAT 発現量の高いラインのマウスを選定し、CRE 蛋白発現 Tg マウスを交配することにより cre-loxP システムで組み換えが起きパーキン蛋白質が発現したマウスを得る strategy でパーキン Tg マウス作製の実験を進めた。その結果、P415 では 11 匹、wild では 9 匹の founder マウスが得られた。それらの継代を試みたが、遺伝子の伝達が確認されたものは P415 で 4 ライン、wild で 5 ラインであった。その他のラインについては死亡、不妊あるいは交配を繰り返すも遺伝子の伝達が認められなかった。遺伝子伝達が確認された各ラインの CAT assay を行ったところ P415 において positive な 1 ラインが得られた。そのライン (P415 S-#36) の子孫を CAG-cre マウスと交配して、Parkin, cre とともに positive のマウスを得た。今後はこのマウスを繁殖して成長に伴う phenotype について種々の解析を行う予定である。

このベクターでは、Parkin Wild Tg マウスが得られなかった。そこでサイトメガロウイルスプロモーターまたはチロシン水酸化酵素(TH)プロモーターに、直接に Parkin (wild と T415N mutant) cDNA を連結した construct を用いて、Tg マウス

を得る実験を開始する。

[研究 2]

パーキンソン病剖検脳と MPTP パーキンソンモデルマウスにおけるミクログリアの活性化

2.1. ヒト対照剖検脳において活性化ミクログリアを HLA-DR 抗体により染色したところ、神経脱落に相関したミクログリアの活性化と神経脱落には相関しない活性化が存在することがわかった。これまでに我々はマウス脳内に性質の異なる複数のミクログリアのサブタイプが存在していることを見いだしており、今回わかったヒト脳でのミクログリアの応答の違いがサブタイプの違いであるかどうか、またそれらがどのような役割を持っているかを検討する。

2.2 ヒトパーキンソン病剖検脳においても、同様な、神経変性による神経脱落に相関したミクログリアの活性化がみられる部位（黒質線条体系）と神経脱落には相関しない活性化がみられる部位（大脳皮質、海馬）が存在することがわかった。さらに剖検脳の一部で凍結保存されたものからパンチアウトにより脳組織を採取し、ミクログリアの活性化マーカーである炎症性サイトカイン遺伝子発現を調べたところ、黒質線条体系ではミクログリアの活性化に相関した遺伝子発現の増大がみられたのに対し、大脳皮質、海馬では有意な増大がみられなかった。一方、海馬においてはミクログリアの活性化に相関した BDNF, GDNF, TGF beta などの神経栄養因子の遺伝子発現が増大していた。

2.3 ヒトパーキンソン病剖検脳のうち、発病初期の検体のミクログリアと残存性の TH 陽性細胞との二重染色を行った結果、残存している TH 陽性繊維に活性化ミクログリアが接触している像が多数見つかった。これらのミクログリアが脳内でどのような役割を持っているかは不明であるが、単に神経毒性を発揮しているだけとは

思われず、神経保護作用も推定される観察結果であった。

2.4 MPTP 投与によるパーキンソン病モデルマウス脳において、単回投与と 7 回連続投与によるミクログリアの活性化を比較した。単回投与ではミクログリアの活性化は全く検出できなかったが、7 回連続投与では顕著な活性化がみられた。このとき、TH 陽性細胞率は約 50%程度減少するが、ドーパミン神経自身の変性脱落はみられず、このときにみられたミクログリアの活性化は神経変性に応答したのではないことが示唆された。また、7 回連続投与したマウスではその後に TH 陽性細胞数が回復することが知られているが、この回復とミクログリアの活性化の関係が今後の検討課題であると考えられる。

D. 考察

[研究 1] のパーキン(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。Parkin T415N mutant Tg マウスの作製に pCMV/lox/CAT/lox/PA(Sall*)ベクターを用いて成功したので、繁殖して成長に伴う phenotype の解析を行う。パーキンソン症状の観察と共に、黒質線条体部位におけるミクログリアの活性化とサイトカイン・神経栄養因子の変化と神経変性の関連を組織化学的分子生物学的に検索する。原因は不明であるが、このベクターでは Parkin wild Tg mice は得られなかった。そこでパーキン Tg マウスの作製に、サイトメガロウイルスプロモーターまたはチロシン水酸化酵素プロモーターに直接に Parkin (wild および T415N mutant)

cDNA を連結した construct で Tg マウスの作製を試みる。

〔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 1 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計画である。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の解明が期待される。

ヒト・パーキンソン病剖検脳における黒質線条体のミクログリアの活性化とサイトカイン・神経栄養因子の変化の検索において、正常対照脳でも孤発型パーキンソン病剖検脳でも、神経脱落に相関したミクログリアの活性化と、神経脱落に相関しないミクログリアの活性化があることが見出された。神経脱落に相関したミクログリアの活性化は黒質線条体系に特異的に認められた。発病初期の剖検脳で黒質に残存する TH 陽性繊維に活性化ミクログリアが接触している像が多数見られたので、ミクログリアの活性化は神経保護作用と推定される。

MPTP 投与マウスではミクログリアの活性化は単回投与ではみられず 7 回連続投与で認められたので MPTP 投与マウスにおける TH 陽性細胞数の回復期のミクログリアの役割を検索する。

マウスミクログリア細胞においてみられるサブタイプのうち、活性化しても神経毒がほとんどみられないサブタイプに、ある遺伝子を導入すると toxic に交換することを最近見出した。この外来遺伝子の作用点がミクログリアの toxic change の原因、ひいてはパーキンソン病の発症の原因に関連する可能性があるので、この因子を検索して同定する。また同様の因子がパーキンソン病脳でみられるかも検討する。

E. 結論

ヒト変異型 (T415N) のパーキントランスジェニックマウスの作製に成功したので繁殖して成長過程における phenotype を解析する。パーキントランスジェニックマウスの解析の対照研究として、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、ミクログリアの活性化と神経保護作用を示唆する成績を得た。

F. 研究発表

〔英文原著〕

- 1) Chen N, Ikemoto K, Sugimoto T, Murata S, Ichinose H, Nagatsu T. A highly sensitive and specific FDCD method for chirality analysis of naturally occurring pteridines. *Heterocycles* 56: 387-392, 2002
- 2) Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, Nagatsu T, Itoh K, Yagi T, Fujisawa H. Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development* 129: 671-680, 2002
- 3) Ikemoto K, Sugimoto T, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Ichinose H, Nagatsu T. (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-monapterin from