

- Escherichia coli*, a novel natural unconjugated tetrahydropterin. *Biol Chem* 383: 325-330, 2002
- 4) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, Ozawa K. Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Therapy* 13: 345-354, 2002
 - 5) Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K. Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Therapy* 9: 381-389, 2002
 - 6) Ohtsuki M, Shiraishi H, Kato T, Kuroda R, Tazawa M, Sumi-Ichinose C, Tada S, Udagawa Y, Itoh M, Hishida H, Ichinose H, Nagatsu T, Hagino Y, Nomura T. cAMP inhibits cytokine-induced biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci* 70: 2187-2198, 2002
 - 7) Suzuki T, Inagaki H, Yamakuni T, Nagatsu T, Ichinose H. Enhanced expression of GTP cyclohydrolase I in V-1-overexpressing PC12D cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 962-968, 2002
 - 8) Nagatsu T. Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Transm* 109: 731-745, 2002
 - 9) Ichino N, Yamada K, Nishii K, Sawada H, Nagatsu T, Ishiguro H. Increase of transcriptional levels of *egr-1* and *nur77* genes due to both nicotine treatment and withdrawal in pheochromocytoma cells. *J Neural Transm* 109: 1015-1022, 2002
 - 10) Nakashima A, Kaneko YS, Mori K, Fujiwara K, Tsugu T, Suzuki T, Nagatsu T, Ota A. The mutation of two amino acid residues in the N-terminus of tyrosine hydroxylase (TH) dramatically enhances the catalytic activity in neuroendocrine AtT-20 cells. *J Neurochem* 82: 202-206, 2002
 - 11) Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 22: 6920-6928, 2002
 - 12) Nagatsu T. Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease: Past, present, and future. *Neurotoxicology and Teratology* 24: 565-569, 2002
 - 13) Ikemoto K, Suzuki T, Ichinose H, Ohye T, Nishimura A, Nishi K, Nagatsu I, Nagatsu T. Localization of sepiapterin reductase in the human brain. *Brain Res* 954: 237-246, 2002
 - 14) Lu Y-Y, Wang L-J, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transcript. *Neurosci Res* 45: 33-40, 2003
- [英文総説]
- 1) Kajita M, Niwa T, Nagatsu T. Tetrahydroisoquinolines (TIQ) and neurodegeneration. In: *Role of Catecholamine Quinone Species in Cellular Toxicity*. Edited by

- Creveling CR, F. P. Graham Publishing, Johnson City, TN, USA, p. 169-190, 2002
- 2) Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease: involvement in apoptosis. In: Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease. Edited by Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 265-270, 2002
 - 3) Nagatsu T. Molecular genetics of catecholamines: key molecules bridging basic science with clinical science. In : Catecholamine Research, From Molecular Insights to Clinical Medicine. Edited by Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, Goldstein D. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 5-17, 2002
 - 4) Yamakuni T, Yamamoto T, Yamamoto H, Song SY, Nagatsu T, Kobayashi K, Yokoyama M, Nakano A, Suzuki R, Suzuki N, Iwashita S, Omori A, Ichinose Y, Kato C, Kobayashi M, Ishida Y. Enhancement of noradrenergic phenotype expression in transgenic mice overexpressing V-1, a cytoplasmic ankyrin repeat protein. In: Catecholamine Research, From Molecular Insights to Clinical Medicine. Edited by Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, Goldstein D. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 53-56, 2002
 - 5) Ishiguro H, Yamada K, Sawada H, Nishii K, Sawada M, Goto J, Kanazawa I, Nagatsu T. Dopamine neurons are not affected by expanded polyglutamine stretches in HD gene knock-in mice. In: Catecholamine Research, From Molecular Insights to Clinical Medicine. Edited by Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, Goldstein D. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 99-102, 2002
 - 6) Cubells JF, Zabetian CP, Anderson GM, Price LH, Meyers BS, Malison RT, Nelson JC, Nagatsu T, Ichinose H, Gelernter J. Molecular genetic analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in depression. In: Catecholamine Research, From Molecular Insights to Clinical Medicine. Edited by Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, Goldstein D. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 423-426, 2002
 - 7) Ichinose H, Ichinose CS, Nagatsu T, Nomura T. Dopa-responsive dystonia. In: Genetics of Movement Disorders. Edited by Pulst SM. Academic Press/Elsevier Science, Amsterdam, p. 419-428, 2003
- [学会発表]
- 1) Nagatsu T. The molecular mechanism of neuronal death in Parkinson's disease. "Interdisciplinary Approaches for the Understanding of Neuropsychiatric Disorders", Motorship MS Passau, Danube River, Germany, April 28-30, 2002

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 副所長（分子腫瘍学部門 事務取扱）

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5課題を中心に包括的に進めた。

<研究1> パーキンの遺伝学的機能解析

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ある。また線虫（*Caenorabditis elegans*）パーキンのトランスジェニック線虫およびノックアウト線虫を作製した。

<研究2> アンチセンスRNAを用いたパーキン蛋白質の機能解析

パーキンのアンチセンスRNAを細胞内に過剰発現してパーキンのレベルを低下させると、神経細胞に特異的なアポトーシスの誘導が観察された。

<研究3> パーキンと26Sプロテアソームの相互作用解析

パーキンのN末端にあるUbl（ユビキチン様ドメイン）と26SプロテアソームのRpn10（ユビキチンレセプター）が物理的に相互作用することをNMR（核磁気共鳴）スペクトラムで解明した。

<研究4> パーキンと相互作用する分子の同定

ウシ脳からパーキンと特異的に相互作用する蛋白質“X”の同定に成功した。Xは分子シャペロン様機能を有することが知られているので、「パーキンのユビキチンリガーゼ活性を仲介する分子」という仮説を想定している。

<研究5> 蛋白質の品質管理に関与するユビキチンリガーゼの機能研究

蛋白質の正常と異常を区別して分解する機構の破綻が神経変性の共通の機構となりつつある状況を踏まえ、「品質管理リガーゼ」として作用する2種のユビキチンリガーゼ（CHIPとSCF^{Fbx2}）の機能解析を行った。

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。具体的には、パーキンの生理機能を解明するために、構造生物学的手法、細胞生物学的手法及び遺伝学的方法を駆使し、分子から固体に至るパーキンの物性・機能・病態に関わる諸問題についての包括的研究の遂行。

[研究1]

パーキン遺伝子のノックインマウス及びノックアウト線虫を作製し、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。さらに線虫（*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、パーキン欠損線虫を作製し、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を解析する。これらの知見を基にヒトパーキンの機能解明に向けての有効な情報を得ることを目指す。

[研究 2]

パーキンの機能を細胞レベルで解析するためにパーキンをコードする全長鎖アンチセンス RNA を SHSY5Y ニューロblastoma 細胞内に発現して細胞内のパーキンをノックダウンし、神経細胞の機能動態に対する影響を調べる。

[研究 3]

パーキンの N 端側にはユビキチン (Ub) と相性の高い領域、即ちユビキチン様ドメイン (Ubl)、が存在するが、その役割は不明である (但し、この領域にミスセンス変異をもった AR-JP の家系が存在する)。そこで、NMR 法を用いパーキンのユビキチン様ドメインの高次構造の解明とダイナミクス (具体的には 26S プロテアソームとの相互作用) の解析を行い、パーキンの作用機能解明へ迫る。

[研究 4]

パーキンと相互作用する分子を探索してパーキンのユビキチンリガーゼ活性における役割の解明を目指す。

[研究 5]

パーキンソン病をはじめ多くの神経変性疾患での病理所見として、ユビキチン化された異常蛋白質の集積が残存ニューロン内に頻りに観察されていることから、蛋白質の品質管理機構の破綻がこれらの疾患に共通した発症原因になっている可能性が高まっている。そこで、蛋白質の品質管理機構を解明して、神経変性疾患の発症機能の共通のメカニズム解明を目指す。とくにシャペロン型リガーゼである CHIP と小胞体関連分解 (ERAD) に関与する SCF^{Fbx2} について

多面的に検討する。

B. 研究方法

[研究 1]

1) ターゲティングベクターとノックアウト (イン) マウスの作製: 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' 側シークエンスアーム 1.5K、5' 側ロングアーム 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: 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トングによりノックアウト ES 細胞を探索する。得られたクローンについては、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する。最終的に、得られたヘテロマスがジャームラインに入る (パーキンを欠損したホモマウスの作製) が否かを検証する。

2) 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。

[研究 2]

パーキンの全長に対するアンチセンス RNA とセンス RNA を組み込んだアデノベクターを作製して、標的培養細胞に感染させた。対照として LacZ を組み込んだアデノベクターも作製し、

実験に供した。パーキンの発現量は Western Blotting で解析した。生細胞数は tetrazolium salt WST-8 [2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] をの代謝活性(ミトコンドリアの代謝量)で測定した。アポトーシスは TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 染色と DAPI 染色との 2 重染色で確認すると共に、PARP (poly ADP ribose polymerase) のカスパーゼによる限定分解及びカスパーゼ-3, -6, -9 の自己消化による活性型への変換でも検討した。

[研究 3]

パーキンの N 末端にある Ubl (ユビキチン様ドメイン) と 26S プロテアソームの Rpn10 (ユビキチンレセプター) を大腸菌で発現させたのち、精製して実験に供した。物理的な相互作用は NMR (核磁気共鳴) スペクトラルで解析した。大腸菌発現系を用いることにより安定同位体標識した Ubl を精製・単離し、異種核多次元 NMR 測定を行った。

[研究 4]

ウシ脳抽出液を抗ヒトパーキン抗体で免疫沈降し、パーキンに結合する分子群をプロテオミクスで解析した。同定した蛋白質については、個別に相互作用の信憑性を検討した。

[研究 5]

昨年発見した分子シャペロン (Hsp90 や Hsp70-Hsp40) 依存性の品質管理リガーゼ CHIP のノックアウトマウスを作製した。このマウスは、CHIP をコードする遺伝子 (約 15 kbp) のほぼ全領域を欠失させている。

新規な複合体型ユビキチンリガーゼである SCF^{Fbx2} については、Skp1, Cullin-1, Fbx2, Roc1 遺伝子を baculo virus に組み込んでから、昆虫細胞に多重感染させ、細胞内で活性型の酵素複合

体を分離・精製した。本精製酵素を用いて、糖鎖要求性のユビキチンリガーゼ活性を測定した。さらに Fbx2 の立体構造を X 線結晶構造解析により解明すると共に糖 (Chitobiose) との共結晶化させた複合体についての解析も進め、3次元構造から両者の相互作用の分子機構を解明する。

C. 研究結果と考察

[研究 1]

パーキン遺伝子のノックアウトの作製については、昨年より引き続いて進めた。前年度、得られたノックアウト ES 細胞の 3 クローンについては、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が、これらのマウスはジャームラインに入らなかったため、現在、さらに多くのノックアウト ES 細胞クローンを分離して、検討中である。

パーキントランスジェニック線虫の解析から、パーキンは生体全体に広く発現しているが、とくに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、ノックアウトパーキン線虫は、顕著な行動異常は観察されなかった。そこで、パーキンノックアウト線虫における表現型の変化について酸化ストレス負荷などの影響を中心に解析中である。

[研究 2]

ヒト SHSY5Y (神経芽細胞腫) 細胞においてパーキンの全長鎖アンチセンス RNA を発現させると、細胞の生存率が導入アデノベクターの量に比例して、急激に低下した (実際、細胞内のパーキン量を Western blotting で調べても、検出限度以下にまで低下していた)。しかし、LacZ を組み込んだ対照アデノベクターでも、また同じパーキンの全長鎖センス RNA を発現させても細胞の生存率には、全く影響しなかった。しかも、アンチセンス RNA を HeLa (ヒト子宮頸

癌)細胞に発現させて場合には細胞増殖に影響しなかったことから、パーキンのノックダウンによる細胞の生存率の急激な低下はニューロンに特異的に認められる現象であることが判明した。この急激な細胞生存率の低下がアポトーシスであることは、TUNEL法やカスパーゼ3、6、9の自己消化による活性型への変換や活性型カスパーゼによるPARPの限定分解によっても確認した。現在、このような条件下において、ドーパミン代謝経路の活性変動、等を中心に詳細な解析を進めている。

[研究3]

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。

近年、多くの変異がパーキン遺伝子上で確認されており、その結果 E3 としての機能が損なわれることが報告されている。しかしながら、パーキン-Ubl の機能は未だ明らかではない。本研

究では NMR 解析を行い、パーキン-Ubl の動的三次元構造を決定するとともに、その分子認識機構を明らかにすることを試みた。hHR23a, Dsk2 などの Ubl を有するタンパク質が、26S プロテアソームと相互作用することが最近報告されている。今回、パーキン-Ubl とプロテアソームの相互作用を検討するため、26S プロテアソームの構成サブユニットである Rpn10 のフラグメント (196-306) とパーキン-Ubl の結合に伴う NMR スペクトルの変化を解析した。その結果、パーキン-Ubl は主に α シートの第 3, 4 ストランド (R40-R51) を用いて Rpn10 と相互作用していることが判明した。この結果は、E3 とプロテアソームの相互作用の構造的基盤を初めて与えるものである。特に、パーキン-Ubl 上の Rpn10 の結合部位に位置する Arg42 は、AR-JP において部位特異的に Pro に変異している家系が報告されている。この変異によりパーキンの Rpn10 結合部位に高次構造変化が誘起され、26S プロテアソームとの複合体形成に破綻をきたすものと考えられる。この結果、プロテアソームとパーキンの相互作用の喪失、即ちパーキンによってユビキチン化された基質蛋白質の分解異常によっても AR-JP が発症することが明確になった。

[研究4]

ウシ脳抽出液を抗ヒトパーキン抗体で免疫沈降し、パーキンに結合する分子群をプロテオミクスで解析した。分離した蛋白質の中に脳で高く発現している蛋白質「X: 仮称」を見出した。X は分子シャペロン様の機能を有し、多くのリン酸化蛋白質と結合できる蛋白質であった。実際、X とパーキンを細胞内で導入して共発現蛋白質間での相互作用について免疫学的方法で検討した結果、両者が物理的に会合していることが明らかになった。現在、欠損変異株を作製して、両者の相互作用ドメインを同定中である。さら

にこの相互作用に意義についても生化学的解析を進めている。

[研究 5]

昨年、インビトロで CHIP が分子シャペロンである Hsp90 や Hsc70 が捕捉した熱変性蛋白質（ルシフェラーゼ）を選択的にユビキチン化する品質管理リガーゼであることを証明した。CHIP が分子シャペロン依存的な品質管理リガーゼであることの発見は、異常蛋白質の処理が分子シャペロンとユビキチンシステムで精緻にハンドリングされていることを直接的に証明したことになり、注目された。本年、CHIP のインビボにおける生理機能を解析するためにノックアウトマウス作製を開始し、その作製に成功した。CHIP 欠損マウスは誕生するが、体重が野生型マウスの半分以下であり、また下肢の脆弱性が確認された。さてアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病、プリオン病などの神経変性疾患は、多かれ少なかれ、蛋白質の品質管理に破綻をきたした疾病と位置づけられる。これらの神経変性疾患の発症あるいは増悪化に分子シャペロンとユビキチンプロテアソームシステムが連携した蛋白質の品質管理機構の破綻が関係している可能性は高いと想定される。そこで、これらの神経変性疾患の責任遺伝子（ハンチンチンなど）のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスと CHIP 欠損マウスと交配して 2 重変異マウスを作製し、神経変性などの病態発症における両者の協調性等について解明中である。

一方、最近、小胞体ストレスとニューロン死の関係が注目されている。それは unfolded protein response（小胞体負荷に対する細胞応答）による小胞体ストレスが Ask1-JNK シグナリングを介した細胞死に直接カップルしていることが明らかになってきたからである。小胞体ストレスに

対する応答の一つに ERAD（小胞体関連分解）がある。よく知られているように膜蛋白質や分泌蛋白質などの分泌系蛋白質は翻訳と共役して細胞質から小胞体に移行し、そこで高次構造形成が行われる。ERAD は小胞体内のミスフォールド蛋白質や余剰サブユニットを細胞質へ逆行輸送しユビキチン・プロテアソーム系により分解する品質管理機構である。

本年、われわれは N 結合型糖蛋白質の結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリガンドとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、Fbx2 の分離に成功した。Fbx2 はニューロンに特異的に発現している F-box 蛋白質であり、SCF 複合体（Skp1-Cullin1-F-box-Roc1）型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbx2} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることが判明した。そして細胞内における SCF^{Fbx2} の認識する基質の一つを同定したところ、細胞接着分子インテグリンの β 1 サブユニット、特に小胞体中に存在する前駆体型の糖鎖構造を持つものであることを明らかにした。インテグリンは小胞体中で $\alpha\beta$ 二量体を形成して細胞膜へ輸送される。その際、多く（約十種）の α サブユニットを相手とする β 1 は、過剰に作られて小胞体中にプールされていることがわかっている。SCF^{Fbx2} はこの前駆体型 β 1 と細胞質中で会合し、プロテアソーム依存的分解に導いた。従って、SCF^{Fbx2} は ERAD において糖鎖を認識してユビキチン化する役割を果たしているものと推定された。さらに、SCF 複合体を形成しない Fbx2 変異体を強制発現させたところ既知の ERAD 基質の分解が抑制されたことから SCF^{Fbx2} は ERAD 機構で作用していることが裏付け

られた。さらに興味深いことに、Fbx2 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤を用いた ERAD 阻止によって誘導される Aggresomes (ERAD 基質の分解異常による異常蛋白質の凝集体) 形成を完全にブロックした。この結果は、Fbx2 が封入体形成に関係している可能性を示唆するものとして注目される。

併せてごく最近、われわれは Fbx2 の X 線結晶解析による立体構造の解明に成功した。同時に Chitobiose (GlcNAc-GlcNAc 糖鎖) との共結晶構造にも成功し、Chitobiose が Fbx2 の構造変化によって生じる疎水性領域に突き刺さる様式 (水素結合) で会合していることが判明した。この結果、Fbx2 が糖鎖を結合する様式が分子レベルで判明した。本研究成果は、小胞体ストレスに関連したニューロン死の分子機構解明に大きく貢献することが期待される。言い換えれば、細胞質の蛋白分解異常によるストレスが小胞体ストレスの感受性を増加させ、引き続いてニューロン死を助長するスキームが提案されているが、この魅力的な提案機構において SCF^{Fbx2} が品質管理リガーゼとして重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

D. 結論

本年、われわれはパーキンの機能解析に向けての包括的研究を行った。マウスを用いた発発生工学的研究においては、現在なおノックインマウスの作製に至っていないが、鋭意遂行中である。しかし、パーキンのアンチセンス RNA 法によって発現を低下させると、神経細胞特異的な細胞死がおきることを見出した。また、パーキンと特異的に相互作用する分子の同定にも成功し、現在その解析を進めている。さらにパーキンが 26S プロテアソームと会合できないことが、AR-JP の発症に繋がることを見出した。こ

れはプロテアソーム依存性の蛋白質分解が AR-JP の発症に関係している可能性を強く示唆しており、興味深い知見と考えている。

他方、われわれはパーキンソン病やその他の神経変性疾患の発症原因として、蛋白質の品質管理機構の破綻がその一翼を担っているとの仮説を立てている。すなわちニューロン内にユビキチン化された異常蛋白質が累積し、細胞死ひいては神経変性に至るとの考え方である。本年、われわれは蛋白質の正常と異常を分子のレベルで区別することができる品質管理リガーゼ CHIP のノックアウトマウスの作製に成功した。また小胞体ストレスに関係する新規なユビキチンリガーゼ SCF^{Fbx2} の同定と機能解析及び高次構造解析にはじめて成功した。われわれは、AR-JP の原因遺伝子産物であるパーキンが CHIP や SCF^{Fbx2} のような品質管理リガーゼと連携して作用していると考えており、今後、この方向での研究も併せてすすめていく計画である。

F. 研究発表

[英文原著]

- 1) Hendil, K. B., Hartmann-Petersen, R., and Tanaka, K. (2002) 26S proteasomes function as stable entities. *J. Mol. Biol.* 315, 627-636.
- 2) Combaret, L., Tilignac, T., Claustre, A., Voisin, L., Taillandier, D., Obléd, C., Tanaka, K., and Attaix, D. (2002) Torbafylline is a powerful inhibitor of enhanced ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer rats. *Biochem. J.* 361, 185-192.
- 3) Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10, 609-618.
- 4) Kadoya, K., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michine, T., Asahara, T., Tanaka,

- K., Asashima, N.M., and Kikuchi, A. (2002) Desumoylation activity of Axam, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of b-catenin. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3803-3819.
- 5) Asai, A., Tanahashi, N., Qiu, J.H., Saito, N., Chi, S., Kawahara, N., Tanaka, K., and Kirino T. (2002) Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 22, 705-710.
- 6) Yanagawa, Y., Hasezawa, S., Kumagai, F., Fujimuro, M., Naito, T., Makino, T., Yokosawa, H., Tanaka, K., Komamine, A., Hashimoto, J., Sato, T., and Nakagawa, H. (2002) Cell-cycle dependent dynamic change of 26S proteasome distribution in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiol.* 43, 604-613.
- 7) Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N, and Gotoh Y. (2002) Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 21843-21850.
- 8) Yamano, T., Murata, S., Shimbara, N., Tanaka, N., Chiba, T., Tanaka, K. Yui, K., and Udono, H. (2002) Two distinct pathways mediated by PA28 and hsp90 in MHC class I antigen processing. *J. Exp. Med.* 196, 185-196.
- 9) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418, 438-442.
- 10) Park, K. C., Kim, J. H., Choi, E.-J., Min, S. W., Rhee, S., Baek SH, Chung, S. S., Bang O, Park, D., Chiba, T., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2002) Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9733-9738.
- 11) Niwa, J., Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G. (2002) Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 36793-36798
- 12) Imai, N., Matsuda, N., Tanaka, K., Nakano, A., Matsumoto, S., and Kang, W. K. (2003) The ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins. *J. Virol.* 77, 923-930.
- 13) Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Kato, K., (2003) Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain. *EMBO Rep.* in press.

[英文総説]

- 1) Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Kitami, T., Machida, Y., Sato, S., Hattori, N., and Mizuno, Y. (2002) Autosomal recessive juvenile parkinsonism and the ubiquitin pathway. *Rec. Adv. Cancer Res.* 205-220 (2002)
- 2) Ogura, T. and Tanaka, K. Dissecting multiple ATP-dependent steps in proteasomal degradation. (2003) *Mol Cell* 11, 3-5.
- 3) Murata, S., Chiba, T., and Tanaka, K. CHIP : a quality-controlling E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* in press.
- 4) Mizuno, Y., Hattori, N., Yoshino, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Suzuki, T., Chiba, T., and Tanaka K. (2002) Parkin mutations (Park2). In "Genetics of Movement Disorders: Chapter "28. 305-314, Elsevier Sci. (USA)
- 5) Tanaka, K. and Tanahashi, N. (2002) Preparation of proteasomes. in "Cell Biology : A Laboratory Handbook" (Ed. by J. E. Celis)

3rd edition. in press, Academic Press, New
York.

パーキン発現細胞作成・解析：

マンガン誘発ドパミン神経毒性におけるパーキン蛋白の関与

分担研究者：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

パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能およびパーキン遺伝子の変異によって起こる黒質ドパミン神経に選択的な神経細胞障害のメカニズムを明らかにするために、本年度は黒質ドパミン神経の神経細胞障害ならびにパーキンソニズムを惹起する金属マンガンの神経毒性におけるパーキン蛋白の役割について検討した。ドパミン神経細胞 CATH.a 細胞、SH-SY5Y 細胞へのマンガン暴露により、用量依存的な細胞死に先行して、小胞体シャペロンの protein disulfide isomerase (PDI)、Bip (GRP78) の発現が増加し、caspase-12 の活性化が惹起され、それに引き続きパーキン蛋白が著明に誘導された。非ドパミン神経細胞 Neuro2A 細胞はマンガン暴露に対して抵抗性であり、PDI やパーキン蛋白の誘導はみられなかった。CATH.a 細胞または SH-SY5Y 細胞に同種のマウスあるいはヒト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細胞死は有意に抑制された。しかし、Neuro2A 細胞に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。以上の結果から、金属マンガン暴露による神経細胞毒性はドパミン神経に比較的選択的であり、小胞体ストレスを伴うとともにパーキン蛋白が誘導されることを明らかにできた。また、マンガンのドパミン神経毒性の発現機構において、パーキン蛋白は保護的に機能している可能性を明らかにした。このマンガンによるドパミン神経細胞障害は、パーキン遺伝子の変異を有する常染色体性劣性遺伝性の家族性パーキンソン病 (ARJP) の病態モデルになりうると考えられる。

A. 研究目的

常染色体性劣性遺伝性の家族性パーキンソン病 (ARJP) の原因遺伝子として同定されたパーキン遺伝子の変異およびその遺伝子産物パーキン蛋白の欠失による黒質神経変性の機序を解明することに注目が集まっている。このパーキン蛋白の機能解析を明らかにすることにより、孤発性パーキンソン病の神経細胞死のメカニズムを解明する糸口を得ることができると考えられて

いるからである。パーキン蛋白自身が蛋白質の代謝に関わるユビキチンリガーゼ活性を有することが報告されており、さらに、いくつかの遺伝子変異による活性異常も報告されている。しかしながら、このパーキン蛋白の神経細胞特にドパミン神経細胞における機能や変異によるパーキンソン病発症機序の詳細については未だ明らかになっていない。

パーキン遺伝子の変異によって起こる細胞死

のメカニズムを解析することを目的として、昨年度はマウスドパミン産生神経細胞 CATH.a を用いて外来性の野生型または変異型のヒトパーキン cDNA の過剰発現細胞株の樹立を試みたが、野生型、変異型とも安定的に株化するものは得られなかった。さらに、ヒトパーキン遺伝子の野生型、変異型およびアンチセンス cDNA を一過性にマウス CATH.a 細胞に遺伝子導入したところ、いずれの場合においても遺伝子導入された細胞数の有意な減少が認められたことから、マウス CATH.a 細胞においては異種のヒト野生型・変異型パーキン蛋白を過剰発現させたり、逆に内在性パーキン蛋白の発現を抑制することは致死的事であることが明らかになった。

金属マンガンの暴露により黒質ドパミン神経の細胞障害を伴うパーキンソニズムが惹起されることは古くからよく知られており、その病理所見は孤発性パーキンソン病に類似している。また最近、マンガンの小胞体ストレスに関与しているシャペロンの Bip (GRP78) や caspase-12 の活性化を引き起こすことが報告され、マンガンは小胞体での異常蛋白の蓄積をもたらす神経細胞死を惹起している可能性が示されている。そこで、パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能およびパーキン遺伝子の変異によって起こる黒質ドパミン神経に選択的な神経細胞障害のメカニズムを明らかにするために、本年度はマンガン誘発ドパミン神経毒性に着目し、マウスドパミン産生神経細胞 CATH.a 細胞、ヒトドパミン系神経細胞 SH-SY5Y 細胞、さらに非ドパミン神経細胞 Neuro2A 細胞を用いて、金属マンガンの神経毒性におけるパーキン蛋白の役割について検討した。

B. 研究方法

1. 培養細胞と培養条件

マウスドパミン産生細胞株 CATH.a 細胞は RPMI1640 培地 (含 8%ウマ血清, 4%ウシ胎児血清) で、ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y 細胞は RPMI1640 培地 (含 10%ウマ血清, 5%ウシ胎児血清) で、マウスアセチルコリン産生神経細胞株である Neuro2A 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (含 10%ウシ胎児血清) で、それぞれ 37°C, 5% CO₂ で培養した。

2. マンガン誘発細胞毒性の検討

CATH.a 細胞, SH-SY5Y 細胞, Neuro2A 細胞に、塩化マンガン(100-800 μ M)を添加し、24 時間後に生存細胞数を MTT 変法で測定した。

3. マンガン添加による小胞体ストレス関連因子の変化

CATH.a 細胞, SH-SY5Y 細胞, Neuro2A 細胞に、塩化マンガンをそれぞれ IC₅₀ の濃度で添加し、経時的に細胞から total cell lysate を抽出した。小胞体ストレスの指標であるシャペロン Bip (GRP78), protein disulfide isomerase (PDI), 小胞体ストレス関連細胞死の指標となる caspase-12, ならびにパーキン蛋白のウエ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。

4. 野生型パーキン cDNA の一過性遺伝子導入によるマンガン誘発細胞毒性の変化

マウス CATH.a 細胞, ヒト SH-SY5Y 細胞, マウス Neuro2A 細胞を培養ディッシュで 24 時間培養し、それぞれ同種のマウスあるいはヒト野生型パーキン cDNA の発現ベクターあるいはコントロールとして空ベクターを b-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現ベクターとともにリポフェクション法で一過性に遺伝子導入をした。遺伝子導入 24 時間後に塩化マンガンを添加し、さらに 24 時間培養し b-ガラクトシダーゼ遺伝子の導入

された細胞を染色し定量した。

C. 研究結果

1. マンガン誘発細胞毒性

ドパミン産生細胞株としてマウス CATH.a 細胞、ヒト SH-SY5Y 細胞、非ドパミン産生神経細胞株としてマウス Neuro2A 細胞に塩化マンガンを追加し、それぞれの細胞におけるマンガンの細胞毒性を検討した。いずれの細胞株においても用量依存性の細胞死が認められたが、マンガン誘発細胞毒性はドパミン産生細胞である CATH.a 細胞 > SH-SY5Y 細胞で著明であり、これらに比して非ドパミン産生神経細胞の Neuro2A 細胞はマンガンに対し抵抗性であった。

2. マンガン暴露による小胞体ストレス関連因子の変化

3種類の細胞株に細胞毒性を惹起する用量のマンガンを追加し、マンガン暴露による小胞体ストレス関連因子の変化を検討した。ドパミン産生細胞株の CATH.a 細胞、SH-SY5Y 細胞では、細胞死に先行して小胞体シャペロンの PDI、Bip の発現が増加し、caspase-12 の活性化が惹起され、さらにそれらに引き続きパーキン蛋白が著明に誘導されていた。しかし、マンガン暴露に対して抵抗性の非ドパミン Neuro2A 細胞では、細胞死を惹起する用量のマンガンを追加しても、PDI やパーキン蛋白の誘導はみられなかった。

3. 野生型パーキンの一過性遺伝子導入のマンガン誘発細胞毒性への影響

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b-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。

D. 考察

パーキン遺伝子は、普遍的に様々な組織で発現していることが知られているが、この遺伝子の変異によって引き起こされる ARJP は、黒質ドパミン神経の選択的な神経変性を示す。パーキン蛋白がユビキチンリガーゼ活性を有することから、その基質の検索が行われ、小胞体の Pael レセプターが発見され、パーキンの小胞体ストレスとの関連が注目されている。一般に小胞体ストレスの際に生じた小胞体の異常蛋白はユビキチン-プロテアソーム系により分解される。パーキン蛋白はそのユビキチンリガーゼ活性により、小胞体ストレス時に小胞体に集積する異常な Pael レセプター蛋白を CHIP と共役してユビキチン化する。しかし、パーキン遺伝子の変異による神経細胞障害のドパミン神経選択性のメカニズムは未だ明らかにされていない。

そこで、ドパミン神経におけるパーキン蛋白の機能や ARJP での選択的な細胞死の発現機序を解析するために、本年度は黒質ドパミン神経の神経細胞障害ならびにパーキンソニズムを惹起する金属として古くから知られているマンガンの神経毒性におけるパーキン蛋白の役割について、ドパミン産生神経細胞と非ドパミン産生神経細胞を用いて検討した。

マンガンが小胞体シャペロンの Bip (GRP78) や caspase-12 の活性化を引き起こすことが報告され、マンガンは小胞体での異常蛋白の蓄積をもたらし、いわゆる小胞体ストレスを介して神経細胞死を惹起している可能性が示されている。本検討においてもマンガン暴露によりドパミン産生神経細胞 CATH.a 細胞、SH-SY5Y 細胞では

用量依存的な細胞死に先行して、小胞体シャペロン PDI, Bip (GRP78)の発現が増加し、caspase-12の活性化が惹起され、これらの小胞体関連因子の変化に引き続きパーキン蛋白が著明に誘導されることを明らかにできた。また、ドパミン産生神経細胞への同種の野生型パーキン遺伝子導入により、マンガンにより誘発される細胞死は有意に抑制された。さらに、非ドパミン神経細胞 Neuro2A 細胞はマンガン暴露に対して抵抗性であり、小胞体シャペロンやパーキン蛋白の誘導はみられず、野生型パーキン遺伝子を導入してもマンガン誘発細胞死は不変であった。これらの結果から、マンガン誘発神経細胞毒性はドパミン神経に比較的选择的であり、小胞体ストレスならびにパーキン蛋白の誘導を伴っていること、さらにその毒性の発現機構において、パーキン蛋白は保護的に機能している可能性を明らかにできた。このマンガンによるドパミン神経細胞障害は、パーキン遺伝子の変異を有するARJPの病態モデルとして有用であるかもしれない。本検討は、パーキン蛋白のドパミン神経選択的なプロファイルをはじめ示したものであり、パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能ならびにその変異によるドパミン神経選択的な細胞障害のメカニズムを解明するうえで重要な資料となると考えられる。

今後は、マンガン誘発神経細胞毒性とパーキン蛋白の異常のドパミン神経選択性を明らかにし、それらの相互作用ならびに障害メカニズムを明らかにするために、マンガン暴露による細胞死ならびに小胞体ストレスに対する変異型パーキンの遺伝子導入の効果について検討する。また、ドパミン神経細胞において、マンガンにより誘導され小胞体シャペロンならびにパーキン蛋白と相互作用する分子を West-Western 法や Antibody Array を用いて検索する。

E. 結論

本研究により、マンガン誘発神経細胞毒性はドパミン神経に比較的选择的であり、小胞体ストレスならびにパーキン蛋白の誘導を伴っていること、さらにその毒性の発現機構において、パーキン蛋白は保護的に機能している可能性を明らかにすることができた。このマンガンによるドパミン神経細胞障害は、ARJPの病態モデルとして有用であるかもしれない。本検討の結果は、パーキン蛋白のドパミン神経選択的なプロファイルを示すものであり、パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能ならびにその変異によるドパミン神経選択的な細胞障害のメカニズムを解明するうえで重要である。

F. 研究発表

[英文原著]

- 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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) Yamamoto, N., Kabuto, H., Matsumoto, S., Ogawa, N. and Yokoi, I.: α -Tocopheryl-L-ascorbate-2-o-phosphate diester, a hydroxyl radical scavenger, prevents the occurrence of epileptic foci in a rat model of post-traumatic epilepsy. *Pathophysiology*, 8: 205-214, 2002.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 39-52, 2003.

[英文総説]

- 1) Ogawa, N. and Tanaka, K.: Cyclosporin-mediated amelioration of degeneration of dopaminergic neurons in experimental models of parkinsonism. In: (ed.) Borlongan, C.V., Isacson, O. and Sanberg, P.R., *Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection*, Humana Press, Totowa, 2002, pp35-48.
- 2) Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Blockade of late-onset reduction of muscarinic acetylcholine receptors by immunosuppressants in forebrain ischemia. In: (ed.) Borlongan, C.V., Isacson, O. and Sanberg, P.R., *Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection*, Humana Press, Totowa, 2002, pp215-229.

研究協力者

浅沼 幹人

東 洋一郎

宮崎 育子

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)

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

分担研究者：久野 貞子 国立療養所宇多野病院 臨床研究部長

研究要旨

弧発性パーキンソン病患者の脳脊髄液、脳各部位におけるパーキン蛋白を定量し、パーキン蛋白の病態への関与を明かにする目的で、まず本蛋白の部分ペプチドおよびそれらの特異抗体を作製し、ラット脳におけるパーキン蛋白の局在を Western blot 法にて検討するとともにパーキン蛋白の微量定量法の確立を試みた。

パーキン蛋白のうち、異なる3つの領域であるN末端部分配列(Par-N)、分子中央部分配列(Par-M)およびC末端部分配列(Par-C)に対する特異抗体をウサギで作製した。これらの抗体を用いて、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。

A. 研究目的

常染色体劣性遺伝若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism, ARJP) の原因遺伝子産物パーキン蛋白の、脳、特に黒質線条体における局在や加齢による変動を Western 解析にて検討するとともにパーキン蛋白の定量法を確立し、本蛋白の遺伝性・孤発型

Parkinson 病態への関与を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1] ヒトパーキン蛋白の推定アミノ酸配列より、以下の3ヶ所の領域を選び、特異抗体を作製した。

(1) ヒトパーキン蛋白のアミノ酸配列を基に、N 末端領域で、ユビキチンと相同性が高く、マウス、ラットとも同一の配列を有するペプチド (GVPADQLRVIFAGKE: Par-N)

(2) 第 1 リングフィンガー領域と IBR ドメインの領域に囲まれた部分 (P NSLIKELHHFRILGEEQY : Par-M と EQARWEEASKETIKKTTKPC : Par-3)

(3) パーキン蛋白の C 末端領域で第 2 リングフィンガー領域を含まないペプチド (EWNRACMGDHWFDV : Par-C)を合成した。次に、これらのペプチド 5mg と KLH (4mg) をグルタルアルデヒドにより縮合させ、これを完全アジュバントとともに 1~2 週間おきに計 7 回、3 匹のウサギ背部に免疫し特異抗体を作製した。

2] アフィニティー精製パーキン IgG およびビオチン化 IgG の調製

ウサギ抗血清 2ml より HiTrap Protein G カラム

(Amersham) を用いてマニュアルに従い IgG を調製した。次に活性化 HiTrap カラムに各ペプチド 5mg を固相化した。これに精製 IgG 10mg を通し、PBS にて素通り画分を十分に流し出した後、1M クエン酸溶液で結合画分を溶出させ、直ちに溶出液を中性にすることによりアフィニティー精製 IgG を得た。固相化カラムの作製は以下の方法に従った。すなわちペプチドを、0.2M NaHCO₃ (0.5M NaCl 含、pH8.3)に溶かし、1mM HCl であらかじめ活性化した NHS-カラムの中に導入し、室温で 1 時間反応させた。このカラムを、次に 0.5M エタノールアミン液 (0.5M NaCl 含、pH8.3)で 2 回、0.1M 酢酸 (0.5M NaCl、pH4.0) で 2 回、交互に洗浄することにより、ペプチド樹脂を作製した。各抗体 10mg より数 10~100mg のアフィニティーIgG が得られた。

次に各アフィニティー精製パーキン IgG 5mg

を 50ml の 0.2M NaHCO₃ に溶かし、これにビオチン化試薬 (Biotin-AC5-Osu, 同仁化学)10ml (mg/ml DMSO) を加え、攪拌した後、25° C、2 時間反応させた。次に、1M の塩化アンモニウム 10ml を加え、さらに 25° C、1 時間反応させた後、0.1M トリス塩酸(pH 7.6)を 925ml 加え、全量を 1ml とした。

3] パーキンリコンビナント蛋白の作製

パーキンの全長および部分タンパクの作製を試みた。大腸菌による HisTag 発現系では、全長はうまく発現されなかったが、パーキン部分蛋白 (1~315) は発現できた。現在ニッケルカラムにより、精製を行っている途中段階である。

4] Western blot

ラット脳湿重量当たり、5 倍量の PBS を加え、ポリトロンにてホモゲナイズした後、10000xg、10 分遠心後の大脳上清をウエスタンブロット法のサンプルとした。還元変性後、5~20%グラジエントゲルを用いて 2 時間 SDS 電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。膜を 10% ブロックエースを含む液でブロッキング後、抗血清 (25~100 倍希釈) と反応させた。ペルオキシダーゼの基質として 4-クロロ-1-ナフトールを用いた。

C. 研究結果

1] 4 種の異なるパーキン蛋白抗血清を用いて、ラット脳ホモジネートを用いた Western blot による検討から以下の結果が得られた。(1)ユビキチンと高いホモロジーを有するペプチド (Par-N) 抗血清を用いたウエスタンブロット法では、分子量 8000 近辺のユビキチンに相当するバンドとともに、3 万近辺にも特異的に反応するバンドがえられた。

(2)Par-3, Par-M 抗血清は、分子量 5 万を示すバンドと強く反応した。

2] ラット脳を細分画し、大脳皮質、脳幹、海馬、視床、中脳、線条体、小脳に分け、パーキン蛋白の局在を検討したところ、いずれの分画におけるパーキン蛋白バンドも総ての脳分画に等しく存在していた。次に加齢によるこれらの蛋白の変動を Western blot 法で検討した。生後 2 週、10 週、20 週における大脳皮質、脳幹、海馬、視床、中脳、線条体を分析したところ、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する分子量 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 週がピークを示した。

2] リコンビナント HisTag パーキン蛋白との反応性

大腸菌に発現させたヒ HisTag-Par (1~315) リコンビナント蛋白の C 末端部分が Par -M ペプチドの約 50% を含むことから、Par-M 抗血清は、部分パーキン蛋白 (1~315) と良好に反応した。

1] ELISA 系の作製

計 12 種のウサギ IgG よりアフィニティーカラムを用いて、それぞれのアミノ酸配列に対応したアフィニティーIgG およびビオチン化 IgG を作製した。各ペプチドを標準品としてサンドイッチ法による測定系を検討した結果、現在の所、最も高感度に定量できる抗体の組み合わせは、Par-M 抗体、Par-N 抗体で、0.3~33ng/ml の範

囲で定量可能であった。他の抗体は、目下検討中である。

D. 考察

作製した抗血清のうち、Par-N 抗血清は、アミノ酸配列の 90% がユビキチンと同一であることから、分子量 8000 を示すバンドはユビキチンと推定される。分子量 30000 を示すバンドは、パーキンの部分分解物か、ユビキチンのポリマーを認識している可能性がある。一方、Par-3 や Par-M 抗血清は、分子量 50000 近辺蛋白を共通して認識したことより、完全なパーキン蛋白を認識すると考えられた。一方、ELISA 系は、Par-M, Par-N 抗体間で作製できたが、Par-N 抗体は、ユビキチンと反応することが推定出来ることから、Par-M 抗体による測定系の改良を行い、弧発性パーキンソン病患者の脳脊髄液、脳各部位におけるパーキン蛋白を定量し、パーキン蛋白の病態への関与を明かにする計画である。

E. 結論

パーキン蛋白のうち、異なる 3 つの領域 N 末端部分 (Par-N)、分子中央部分 (Par-M)、C 末端部分 (Par-C) 配列に対する特異抗体をウサギで作製し、これらの抗体を用いて、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、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か、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した。また Par-M 抗