

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に関する研究  
(H13-こころ-021)

平成 13 年度 - 15 年度  
総括・分担研究報告書  
(平成 15 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 16 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防御に関する研究	3
水野美邦	
II. 分担研究報告	
1. パーキン遺伝子の変異解析及び機能解析に関する研究	11
水野美邦	
2. パーキントランスジェニックアニマルの作製・分析に関する研究	15
永津俊治	
3. マンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキンの保護効果と ドパミンキノンの関与に関する研究	21
小川紀雄	
4. パーキン蛋白と神経保護：a-Synuclein 蛋白の定量法の 開発とパーキンソン病態への関与に関する研究	29
久野貞子	
5. パーキンノックアウトマウス作製・解析に関する研究	33
田中啓二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

## 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、パーキン蛋白の機能解析を更に進め、パーキンノックダウン細胞株を樹立し、細胞死がおきること、それがアポトーシスによること、その際ドーパミン、L-Dopa の自動酸化物が増加することをあきらかにした。またパーキンノックダウンマウスの作出に成功したが、今の所臨床症状や黒質神経細胞死は観察されていない。パーキントランスジェニックマウスの作出も、T415N (P415)変異のパーキン cDNA を用いて成功したが、やはりそのままでは行動異常は見られず、現在種々の負荷を加えた状況での、行動及び病理変化を検討中である。パーキン結合蛋白も新たに3種類同定したが、そのうちの1つ 14-3-3 蛋白は、 $\alpha$ -シヌクレインとも結合し、 $\alpha$ -シヌクレインと結合することにより、パーキン蛋白が活性型になる機構が存在することを明らかにした。分子レベルでのパーキンと $\alpha$ -シヌクレインの相互作用を始めて明らかにした所見である。またマンガンによる細胞障害にパーキンが保護作用を示すことを明らかにしたが、この作用が、細胞内小胞外のドーパミンあるいはその自動酸化で生成されるキノン体などのドーパミン神経細胞の内在性因子への作用に基づくことを明らかにした。パーキン蛋白はキノン体によるドーパミン神経毒性に対し保護的に作用している可能性が考えられる。

尚、研究報告の詳細に関しては、各分担研究者の研究報告書も参照されたい。

### A. 研究目的

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

### 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

パーキン蛋白の機能解析に関しては、ヒト SHS5Y (神経芽細胞腫) 細胞においてパーキン (PARK2 遺伝子産物) 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化型への変換や活性化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、等を中心に検討した結果、ドーパミンの代謝産物 (DOPA/DA-クロム) の有意な蓄積を認めた。興味深いことに、このパーキン低下による DOPA/DA-クロムの蓄積は、 $\alpha$ -シヌクレイン (PARK1 の責任遺伝子産物) の共発現で顕著に抑制された。

新規パーキン結合蛋白の解析については、PDCD-2 の細胞局在は細胞質にあり、パーキン抗体との二重染色では共局在していた。また LMO4 についても転写因子との報告であるが、細胞質に局在していた。In vivo ubiquitination については両分子ともに polyubiquitination されていた。パーキン蛋白による分解効果については時間経過と共に分解されていた。AR-JP 剖検脳では PDCD-2 については増加傾向にあった。

$\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスについては現在詳細な検討を行っている。

パーキン遺伝子に異常のなかった家族性パーキンソン病の連鎖解析では、ハプロタイプからは 39 家系 8 家系が Park6 に連鎖している可能性があった。Lod score は 9.88 であり、候補領域は 6.4 cM まで狭めることができた。現在、原因遺伝子同定に向けて解析中である。

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。本年度、新たに分離した複数のノックアウト ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、翌日仮親の子宮に移植した結果、その中の一つのマウスがジャームラインに入った。そこで、このヘテロマウスの交配から、ホモパーキン欠損マウスを作製することに成功した。しかし、ノックアウトパーキンマウスは、顕著な行動異常は観察されなかった。また中脳および他の脳組織の切片を作製して形態学的に詳細に解析したが、顕著なニューロンの変性・脱落を含む異常は、観察されなかった。そこで、パーキンノックアウトマウスにおける表現型の変化について酸化ストレス (ROS 生成薬剤) 負荷や 1-methy-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP) あるいはその誘導体である 1-methyl-4-phenylpyridium (MPP<sup>+</sup>) 等の neurotoxins や lipophilic pesticide (rotenone) など environmental toxins の影響を中心に解析中である。

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 (Ubl) を含むことが知られている。本年、ヒトパーキンの 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した。

NMR から得られた情報をもとに Ubl の立体構造を決定した結果、Ubl は、ユビキチンと同じように 5 つの  $\alpha$ -ストランドと 2 つの  $\beta$ -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  $\alpha$ -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 と同様のいわゆる“ユビキチンフォールド”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。

最近、hHR23a, Dsk2 など Ubl ドメインを有する多くの蛋白質が、26S プロテアソームと相互作用することが報告されている。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  $\alpha$  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。この結果から、パーキンとプロテアソームの相互作用の構造的基盤がはじめて明らかになった。とくに、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。このミスセンス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との相互作用の喪失、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 が発症することが示唆された。

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「14-3-3」を見出した。14-3-3 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、14-3-3 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。そして、パーキンの相互作用解析から、14-3-3 がパーキンのリンカー領域 (N 端側の Ubl ドメインと C 端側の RING ボックスドメインを連結させる領域) に会合することが判明し、リンカー領域にミスセンス変異を持った AR-JP 患者由来の変異パーキンでは、14-3-3 との相互作用が喪失していた。

興味深いことに 14-3-3 はパーキンのユビキチンリガーゼ活性 (Synphilin-1 を基質とした活性のみならずパーキンの自己ユビキチン化活性) を強く阻害した。

さらにこの 14-3-3 によるユビキチンリガーゼとしてのパーキンの活性抑制は、 $\alpha$  シヌクレイン (PARK1 の責任遺伝子産物) の強制発現によって解除されることが判明した。即ち、 $\alpha$  シヌクレインは、14-3-3 とパーキンの結合より高い親和性でパーキンと結合し、14-3-3 の結合を切り離すことでパーキンを再活性化することが示唆された。そして興味深いことに遺伝性パーキンソン病患者に由来する変異  $\alpha$  シヌクレインはこの 14-3-3 との結合能及びパーキンの再活性化能が喪失していた (論文投稿中)。

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 (異常蛋白質による小胞体負荷応答) 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。

昨年、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 (Fbs1 と改名) の分離に成功した。Fbs1 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<sup>Fbs1</sup> 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<sup>Fbs1</sup> 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  $\beta$  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細胞表面の接着分子である。その際、多く (約十種) の  $\alpha$  サブユニットを相手とする  $\beta$  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<sup>Fbs1</sup>はこの前駆体型β1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<sup>Fbs1</sup>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る。さらに、SCF複合体を形成しないドミナントネガティブFbs1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<sup>Fbs1</sup>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、Fbs1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)の形成を完全にブロックした。この結果は、Fbs1が封入体形成に関与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Fbs1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Fbs1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、Fbs1が糖鎖を結合する様式が原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という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<sup>Fbs1</sup>が品質管理リガーゼとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

本年さらにわれわれは、ユビキタスに発現しているSCF<sup>Fbs1</sup>のファミリー酵素としてSCF<sup>Fbs2</sup>を見出した。そしてSCF<sup>Fbs2</sup>もERADに関与することを証明し、糖鎖識別リガーゼ酵素が小胞体における品質管理機構に普遍的に重要な役割を果たしていることを解明した。

パーキントランスジェニック(Tg)マウスの作製に関しては、正常(wild)とT415N(P415)変異のパーキンcDNAを用いて、Cre-loxP制御によるパーキンTgマウスを作製した。パーキンcDNAをpCMV/lox/CAT/lox/PA(SalI\*)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。PCRで遺伝子伝達が確認された7ラインについてCAT assayを行ったところP415においてpositiveな1ライン(P415+)マウス)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 positive loxP(-)のマウス(T415N-Dマウス)を得た。パーキンの過剰発現とCAT活性の消失から高効率で組換えが起こっていることがわかった。筋肉と小脳の発現量が大きく、中脳でも発現していた。小脳でのブルキンエ細胞の発現量が多かった。現在のところT415-N-Dマウスには行動に目立った変化はない。またTHニューロン数、alpha-シヌクレイン、CDCre1-1にも量的変化は認めていないが、行動解析を継続している。

このP415(+)マウスに、Creアデノウイルスを定位脳手術によって片側黒質に注入して、脳部位特異的組換えを行った。対照としてlacZアデノウイルスを用いた。4週間後、アポモルフィンを投与すると10例中2例に回転運動(半側パーキンソニズム)が誘発された。コントロール5例は回転運動をおこさなかった。この回転運動を示したマウスの1例について、黒質TH陽性神経の脱落を認めた。さらに再現性の確認を行っている。

このベクターでは、パーキン野性型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、直接にパーキン(wildとT415N mutant) cDNAを連結したコンストラクトを用いて、Tgマウスを得る実験を進めている。

パーキンソン病剖検脳におけるサイトカイン・神経栄養因子の変化とミクログリアの活性化に関しては、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。これまでに澤田誠らはマウス脳内に神経保護作用(trophic)、神経毒性作用(toxic)の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おり trophic サブタイプは toxic サブタイプに変換することを見いだしている。

ヒトパーキンソン病剖検脳において、これまでの研究で、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、黒質線条体系ではミクログリアの活性化に相関した炎症性サイトカイン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ず、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することを報告した。

ヒトパーキンソン病剖検脳のうち、発病初期の検体と進行期の検体を比較してミクログリアの活性化と残存性の TH 陽性細胞との二重染色の結果を比較検討した。発症初期の検体で、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ない、神経保護作用(trophic)も推定される観察結果であった。発病進行期の検体では、黒質で変性像の TH 陽性細胞の周囲に多数の活性化ミクログリアを認め、ミクログリアが神経細胞死を促進して病期の進行を促進していることが推定された。この進行期におけるミクログリアは toxic と推定され、パーキンソン病の進行に伴って黒質線条体で活性化ミクログリアは trophic より toxic に toxic change をおこすことが推定された。

マンガン添加によるパーキン蛋白の細胞内局在の変化に関しては、ドパミン産生細胞株とし

てヒト 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パーキン蛋白の細胞内局在を免疫染色で検討した。マンガン暴露によりドパミン神経細胞の SH-SY5Y 細胞において核周囲にパーキン蛋白の著明な発現誘導と集積が認められ、これは TRITC-WGA 陽性のゴルジ体に一致していた。一方、非ドパミン産生神経細胞の Neuro2A 細胞ではマンガン添加によってもパーキン蛋白の発現誘導や集積は認められなかった。

マンガン暴露によるプロテアソーム活性の変化に関しては、SH-SY5Y 細胞および Neuro2A 細胞に、細胞死を惹起する濃度の塩化マンガンを追加し、プロテアソーム活性を測定したが、いずれの細胞においてもキモトリプシン様活性、ポストグルタミルペプチダーゼ様活性ともに、添加 48 時間後まで有意な変化は認められなかった。

マンガン暴露による活性酸素種生成に関しては、さらに、SH-SY5Y 細胞および Neuro2A 細胞に、塩化マンガン(800  $\mu$ M)を追加し、4 時間あるいは 24 時間後の活性酸素種の生成を蛍光指示薬で検討した。マンガン暴露によりいずれの細胞においても過酸化水素、スーパーオキシドの生成が惹起されたが、細胞間の明らかな差異は認められず、むしろ Neuro2A 細胞において多く生成されている傾向がみられた。

マンガン+ドパミンによる細胞毒性と野生型パーキン cDNA の一過性遺伝子導入の効果に関しては、ドパミン神経細胞 SH-SY5Y 細胞、非ドパミン神経細胞 Neuro2A 細胞に塩化マンガンとドパミンの同時添加を行い、細胞毒性を検討した。両細胞とも塩化マンガンあるいはドパミンの単独添加において濃度依存性の細胞死を惹起するが、単独では軽度の障害を誘発するあるいは障害がみられない濃度の塩化マンガンとドパミンを同時暴露すると著明な細胞死が惹起され、その効果は相乗的であり濃度依存性であった。

次に、このマンガン+ドパミン同時暴露による細胞死に対する野生型パーキン cDNA 遺伝子

導入の効果について検討するために、SH-SY5Y 細胞および Neuro2A 細胞に野生型パーキン cDNA の発現ベクターを遺伝子導入し、24 時間の暴露で細胞生存率が約 30-50%となる濃度のマンガン+ドパミン (SH-SY5Y: マンガン 100  $\mu$ M +ドパミン 100  $\mu$ M, Neuro2A: マンガン 200  $\mu$ M +ドパミン 50  $\mu$ M)を添加し、細胞毒性の変化を検討した。マンガン+ドパミン同時暴露で惹起されるb-ガラクトシダーゼ陽性の細胞数の低下が、ドパミン系 SH-SY5Y 細胞では野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制された。しかし、非ドパミン系 Neuro2A 細胞では野生型パーキン遺伝子を導入してもマンガン+ドパミン同時暴露による細胞死は不変であった。

マンガンによる小胞体シャペロン増加に対する野生型パーキン cDNA 導入の効果に関しては、昨年度、マンガン暴露によりドパミン産生細胞において、小胞体シャペロンの PDI, Bip の発現が増加し、パーキン蛋白が著明に誘導されること、さらにマンガンによる細胞死が野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されることを明らかにした。パーキン遺伝子導入による保護効果と小胞体ストレスとの関連を明らかにするために、CATH.a 細胞におけるマンガンによる小胞体シャペロン増加に対する野生型パーキン遺伝子導入の効果について検討した。野生型パーキン cDNA の遺伝子導入により、マンガン暴露による CATH.a 細胞の細胞死は抑制されたにもかかわらず、マンガンによる小胞体シャペロン PDI の増加は不変であった。

アンチセンスパーキン 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に関しては、CATH.a 細胞を用いて、マンガン誘発細胞死に対するアンチセンスパーキン cDNA の遺伝子導入の効果について検討した。アンチセンスパーキン遺伝子導入によりマンガンによる細胞生存率の低下は有意に増悪した。

アンチセンスパーキン cDNA の遺伝子導入およびマンガン暴露によるドパミン・DOPA クロム、キノプロテインの変化に関しては、CATH.a 細胞へのマンガン(100  $\mu$ M)暴露あるいはアンチセンスパーキン遺伝子

導入により、細胞内のドパミン・DOPA クロムおよびキノプロテインは増加した。

a-Synuclein のラジオイムノアッセイに関しては、a-Synuclein の競合型 RIA 法の確立に成功した。測定感度は、0.5 ng/ml であり、中および組織中a-Synuclein 量の定量が可能であった。PD 患者血清を用いて、血中a-Synuclein 量を測定した結果、正常者血清より痴呆を伴う重症PD患者で高値を示す症例が多く見られた。PDモデルサルを作製する際、MPTP 投与前および1, 2, 4, 7日後に採血したサルの血中a-Synuclein 量は、5匹中3匹で、投与後4日目に急性症状の出現に一致して血中濃度がピークを示す変動が観察された。RIA 法により、ラット脳分画 PBS 抽出液中のa-Synuclein 量を定量したところ、大脳皮質、海馬、線条体が最も多く、またこれらの部位での週齢による変化は、2週、4週、10週と増加傾向を示し、20週では10週に比べ同等か若干の減少を示した。ウエスタンブロット法によりラット脳分画中のa-Synuclein 量を解析した結果、RIA 法による定量結果と同じ傾向を示した。

酸化ストレスにより誘導される SH-SY5Y の細胞死に対するアポモルフィンの保護効果に関しては、6-OHDA により引き起こされる SH-SY5Y 細胞の細胞死は、Apomorphine を共存させることにより濃度依存的に抑制された。また、この Apomorphine の細胞保護作用は、細胞を Apomorphine で 24 時間前処理することによっても Apomorphine 濃度依存的に抑制された。6-OHDA による活性酸素種 (ROS) の産生は、Apomorphine を共存させることにより抑えられることから、6-OHDA により誘導される細胞死に対するアポモルフィンの細胞保護作用には、アポモルフィンのラジカルスカベンジャーとしての作用が関与していると考えられた。6-OHDA により誘導される JNK のリン酸化や DNA の断片化が、Apomorphine との共存下で抑制された。Apomorphine を 24 時間前処理することにより、DNA の断片化は、Apomorphine 同時処理に比べさらに抑制されたが、JNK のリン酸化については、Apomorphine 前処理効果は認められなかった。6-OHDA による細胞死に対する Apomorphine の細胞保



護作用は、ドパミン D1/D2 受容体アンタゴニストにおいても完全には阻害されないことから、Apomorphine の細胞保護作用にはドパミン受容体を介さない機構が部分的に関与していると考えられた。

5) アポモルフィン、細胞内グルタチオン量に影響を及ぼさなかった。

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。

本年度は、パーキン蛋白の機能解析を更に進め、パーキンノックダウン細胞株を樹立し、細胞死がおきること、それがアポトーシスによること、その際ドーパミン、L-Dopa の自動酸化物が増加することをあきらかにした。またパーキンノックダウンマウスの作出に成功したが、今の所臨床症状や黒質神経細胞死は観察されていない。パーキントランスジェニックマウスの作出も、T415N (P415)変異のパーキン cDNA を用いて成功したが、やはりそのままでは行動異常は見られず、現在種々の負荷を加えた状況での、行動及び病理変化を検討中である。パーキン結合蛋白も新たに3種類同定したが、そのうちの1つ 14-3-3 蛋白は、 $\alpha$ -シヌクレインとも結合し、 $\alpha$ -シヌクレインと結合することにより、パーキン蛋白が活性型になる機構が存在することを明らかにした。分子レベルでのパーキンと $\alpha$ -

シヌクレインの相互作用を始めて明らかにした所見である。またマンガンによる細胞障害にパーキンが保護作用を示すことを明らかにしたが、この作用が、細胞内小胞外のドパミンあるいはその自動酸化で生成されるキノン体などのドパミン神経細胞の内在性因子への作用に基づくことを明らかにした。パーキン蛋白はキノン体によるドパミン神経毒性に対し保護的に作用している可能性が考えられる。

今後ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを使用した解析を進めることにより、更にパーキン蛋白の機能解析、更にこれを用いた神経細胞保護の研究の進展が期待できる。

#### 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。

## パーキン遺伝子の変異解析及び機能解析

研究代表者：水野 美邦 順天堂大学医学部脳神経内科 教授

**研究要旨** パーキン遺伝子変異による若年性パーキンソンニズム (AR-JP)は loss-of-function 型変異効果により疾患表現型が出現すると推定される。しかしながら、その詳細な機能についてはユビキチンリガーゼであることは分かっているものの神経細胞死の機序については依然不明であると言わざるを得ない。更に機能解析についてパーキン遺伝子改変マウスモデルの解析やアンチセンスパーキンをを用いたパーキン蛋白をノックダウンさせることで細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とした。一方で、パーキン遺伝子変異陰性例が少なからず存在することが判明し、新たな遺伝子座による遺伝性パーキンソン病の存在が判明しており、原因遺伝子同定を課題とした。

[研究 1] AR-JP の発症機序に loss-of-function 型変異効果が想定される。パーキンノックアウトマウスの報告が相次いだ。表現型は観察されていない。そこでアンチセンスパーキンをを用いてパーキン蛋白をノックダウンさせることで細胞死を誘導できるか検討した。

[研究 2] ユビキチンリガーゼであるパーキン蛋白の疾患への寄与としては、パーキンの基質が蓄積することで細胞死が惹起されることが推定されている。我々は yeast two hybrid 法で 13 種のクローンを単離できおり詳細な検討を行っている。既報されているものとは異なる分子 PDCCD-2 と LMO4 について検討を加えた。

[研究 3] 研究 1 の解析結果よりパーキン、 $\alpha$ -シヌクレインがドパミン代謝に関わっていることが分かり、両分子共に抗アポトーシス作用を示すことが判明した。この in vitro 実験系の結果をもとに $\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスを作製した。

[研究 4] パーキン遺伝子陰性例について Park6 のハプロタイプ解析を行った。また Park7 の原因遺伝子である DJ-1 遺伝子変異について解析を行った。DJ-1 変異解析家系は全てハプロタイプからは Park7 に連鎖している可能性のある家系に限って行った。

### A. 研究目的

[研究 1] 常染色体劣性遺伝若年性パーキンソンニズム (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、loss-of-function 効果でパーキン蛋白の基質が蓄積することで細胞死が惹起されることが予想される。パーキン蛋白の基質候補としては 9 種類の分子が既に報告されており、NMR による結晶解析を含めて結合分子として 9 種類の分子が報告されている。結合分子は、パーキン蛋白によりポリユビキチン化さ

れないことが報告されている。従って基質候補からは除外されているが、パーキン蛋白の機能を考える上で重要なヒントを与えてくれる。

パーキン蛋白の機能解析からは基質を同定することが重要であることは間違いないが、現在まで 9 種類の分子が報告されているが細胞死のメカニズムを十分解明されたとは言い難い。基質スクリーニングの方法とは別に AR-JP が loss-of-function 効果で発症することを考えるとパーキン蛋白をノックダウンさせることは病態解明上重要な情報を提供してくれる可能性が高い。ノックダウンとしてはアデノウィルスベクターにパーキンの全長アンチセンスを使い、細胞死惹

起の有無を検討する。

[研究 2] 既に基質候補として 13 分子を yeast hybrid 法で単離できており、その一つに CDCrel-1 を単離したが、この分子は他の研究室からも基質候補として報告されている。我々の研究室で単離されたものとして LMO4 と PDCD-2 がある。それぞれの基質について解析を行った。

[研究 3] 研究 1 からパーキン蛋白と  $\alpha$ -シヌクレインがドパミンキノン体を介して共通の抗アポトーシス作用を示していることが分かった。研究 1 の結果から両分子をノックダウンさせた遺伝子改変マウスを作製した。

[研究 4] 若年性パーキンソン病の原因遺伝子として最も頻度が高いのがパーキン遺伝子であることは間違いない。しかしながら劣性遺伝性であっても約半分の症例はパーキン遺伝子変異を認めない。最近になり Park7 の原因遺伝子 DJ-1 が同定され、パーキン遺伝子陰性例について遺伝子変異解析を行ったが一例も変異を見出せなかった。陰性例はハプロタイプからは Park7 に連鎖している可能性の高い症例に限って行っている。一方、劣性遺伝性 PD として Park6 もマップされているが、原因遺伝子は単離されていない。そこでハプロタイプから Park6 に連鎖する家系のスクリーニングと候補領域の絞り込みを行った。更に候補領域に存在する遺伝子群について変異の有無をスクリーニングし原因遺伝子の同定を目指した。

## B. 研究方法

[研究 1] パーキン蛋白のノックダウン

1) アデノウィルスベクターに全長のパーキンのアンチセンスストランドを組み込み、ドパミン神経細胞のモデルである SH-SY5Y 細胞に感染させ、その効果を検討した。

2) アデノウィルスベクターにセンスストランドの  $\alpha$ -シヌクレインを組み込み SH-SY5Y 細胞に感染させた。

3) ドパミンキノン体の測定

直接的にキノン体を測定できないため代謝産物であるドーパクロムないしドパミンクロムを 475nm の吸高度で測定した。

[研究 2] パーキン蛋白の基質候補の解析

Yeast two hybrid 法でスクリーニングされた 13 分子のうち PDCD-2, LMO4 について詳細な検討を行った。

1) 抗体の作製

PDCD-2, LMO4 についてペプチド抗体を作製した。Western blot にて抗体の特異性を確認した。

2) パーキン蛋白との結合

COS1 に LMO4, PDCD-2 を transfection し、パーキン蛋白との結合を確認した。

3) パーキン蛋白による ubiquitination

HA-ubiquitin と FLAG-パーキンを double transfection して、in vivo ubiquitination を観察した。

4) パーキン蛋白による各分子の分解

PDCD-2, LMO4 の分解過程を観察した。COS1 細胞に PDCD-2 とパーキンを double transfection し、時間経過による蛋白の分解をみた。

5) AR-JP 剖検脳による PDCD-2, LMO4 の蓄積の検討。

パーキン遺伝子変異が確認されている剖検脳を用いて同じタンパク量を使い densitometry で蛋白の増減を確認した。

[研究 3]

$\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスを作製した。作製方法は、 $\alpha$ -シヌクレインは exon 1,2 をターゲットとし、パーキンは exon 3 をターゲットとした。

[研究 4]

パーキン遺伝子と DJ-1 の両遺伝子の陰性例 39 家系について遺伝子解析を行った。両遺伝子については蛋白コーディングしている領域について変異が否定されている。用いたサテライトマーカーは、D1S483, D1S199, D1S2843, D1S2732, D1S2828, D1S478, D1S2702, D1S2734, D1S2674, D1S2885, D1S247 であり、ハプロタイプから Park6 に連鎖している家系を決定した。

## C. 研究結果

[研究 1] パーキン蛋白のノックダウン

アンチセンスパーキンを使いパーキン蛋白をノックダ

ウンすると細胞死が誘導された。細胞死はドパミン神経様である Sh-SY5Y 細胞で観察されたが、同じくヒト由来である HeLa 細胞では細胞死が誘導されなかった。またこの細胞死の形態はアポトーシスであり、Caspase 6, 9 が活性化された。この細胞死にはドパミンキノン体が増加しており細胞死の実行分子としてドパミンキノン体が関与していることが分かった。また  $\alpha$ -シヌクレインを感染させると細胞死が抑制された。抑制とともにドパミンキノン体が減少していた。

#### [研究 2]

PDCD-2 の細胞局在は細胞質にあり、パーキン抗体との二重染色では共局在していた。また LMO4 についても転写因子との報告であるが、細胞質に局在していた。In vivo ubiquitination については両分子ともに polyubiquitination されていた。パーキン蛋白による分解効果については時間経過と共に分解されていた。AR-JP 剖検脳では PDCD-2 については増加傾向にあった。

#### [研究 3]

$\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスについては現在詳細な検討を行っている。

#### [研究 4]

ハプロタイプからは 39 家系 8 家系が Park6 に連鎖している可能性があった。Lod score は 9.88 であり、候補領域は 6.4 cM まで狭めることができた。現在、原因遺伝子同定に向けて解析中である。

### D. 考察

[研究 1] ノックダウンにアポトーシスが誘導され、ドパミンキノン体が細胞死の実行分子として関与したことより、AR-JP の組織選択性が証明できると考える。基質候補として CDCrel-1 が検討されており、exocytosis の関与が推定されている。AR-JP ではこの exocytosis の破綻によりドパミンの過剰状態が惹起される可能性があると考えている。

[研究 2] PDCD-2, LMO4 は何れも有力な候補であると考えている。PDCD-2 は Rp8 とホモロジーが高くアポトーシスに関与していることが推定される。LMO4 はドパミン神経に対し、神経突起の伸長に関与することが推定されている。LMO4 が過剰状態になると突起伸長が

減弱することが考えられる。

[研究 3] ダブルノックアウトの作製には成功した。現在、詳細な解析を行っている。

[研究 2] 従来の候補領域より狭めることができた。また Park7 の原因遺伝子 DJ-1 変異は頻度的には少ないが Park6 に連鎖する家系はアジア人種にも存在していることが分かった。

### E. 結論

AR-JP の細胞死にドパミンキノン体の関与が明らかになった。また  $\alpha$ -シヌクレインは dual function を持っており、濃度によって細胞毒性にであったり保護的であったり二重の作用を示すことが分かった。またパーキンの基質として PDCD-2, LMO4 が有力候補として単離された。研究 1 で明らかになった  $\alpha$ -シヌクレインとパーキンの相互作用をマウスモデルで確認するためダブルノックアウトマウスを作製した。Park6 が我が国に存在することを確認でき、更に原因遺伝子単離に向けて検討中である。

### F. 研究発表

#### [論文発表]

Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, Sfar S, Belal S, Hamida C. B, Hamida M. B, Hattori N, Mizuno Y, Hentati F. Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. Parkinsonism Rel Disord 9: 247-251, 2003

Okuma Y, Hattori N, Mizuno Y. case report, Sensory neuropathy in autosomal recessive juvenile parkinsonism (PARK2). Parkinsonism Rel Disord 9: 313-314, 2003

Inzelberg R, Hattori N, Nisipeanu P, Abo Mouch S, Blumen S.C., carasso R. L., Mizuno Y. Camptocoemia, axial dystonia, and parkinsonism: Phenotypic heterogeneity of a parkin mutation. Neurology 60: 1393-1394, 2003

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: 133-137,

2003

Kobayashi T, matsumine H, Zhang J, Imamichi Y, Mizuno Y, Hattori N. Pseudo-autosomal dominant inheritance of PARK2: two families with parkin gene mutations. *J Neurol Sci* 207: 11-17, 2003

Kobayashi H, Krger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y and Nobutaka. Haploinsufficiency at the  $\alpha$ -synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* 126: 32-42, 2003

Tanaka, R., Komine-Kobayashi, M., Mochizuki, M., Yamada, M., Furuya, T., Migita, M., Shimada, T., Mizuno, Y., and Urabe, T. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 117: 531-539, 2003

Furuya T, Tanaka R, urabe T, hayakawa J, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H. Establishment of modified cyhimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders. *NeuroReport* 13: 1-3, 2003

Narabayashi H, Mizuno Y. Preface: Malignant syndrome in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 9: S1, 2003

Mizuno Y, Takubo H, Mizuta E, Kuno S. Malignant syndrome in Parkinson's disease: concept and review of the literature. *Parkinsonism & Related Disorders*. 9 S3-S9, 2003

Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Yokoyama S, Yamada S, Kawahara H, Yokosawa H, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Reports* 4: 301-306, 2003

Mizuno Y, Yanagisawa N, Kuno S, Yamamoto M, Hasegawa K, Origasa H, Kowa H, The Japan Pramipexole Study Group. Randomized, Double-Blind Study of Pramipexole with Placebo and Bromocriptine in Advanced Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 18: 1149-1156, 2003

## 2. 学会発表

Mizuno Y. Progress in the Genetic Aspects of Parkinson's disease. X Russian National Congress (Man and

Medicine), Moscow, 10 April, 2003

Mizuno Y. GENETICS OF PARKINSON'S DISEASE: UPDATE. 6th INTERNATIONAL CONFERENCE AD/PD 2003, Spain, May 8-12, 2003

Mizuno Y. Non-LB Neurodegeneration in DLB and PDD. Third International Workshop on Dementia with Lewy Bodies and Parkinson's Disease Dementia(DLB/PDD), United Kingdom, September 17-20, 2003

Mizuno Y. Genetics of PD. 4th International Symposium of the Asian and Pacific Parkinson's Disease Association, Satelete Symposium, Korea, October 3rd, 2003

Mizuno Y. Genetics of PD. 4th International Symposium of the Asian and Pacific Parkinson's Disease Association, Scientific Program, Korea, October 4th, 2003

Mizuno Y. Lectureship-The Latest in Parkinson's Research and treatment. Parkinson Society Canada 2003 ANNUAL GENERAL MEETING, NATIONAL Volunteer Awards & THE DR. DONALD CALNE LECTURE. Montreal, Canada, November 16th, 2003

Mizuno Y. Progress in Genetics of parkinson's disease. Neurology Symposium: Movement Disorders, National Brain Research Centre, India, December 3rd, 2003

Mizuno Y. Natural history and prognosis of Parkinson's disease. 7th World Parkinson's Day International Symposium, India, December 6th-7th, 2003

Mizuno Y. Aetiopathogenesis and genetics of Parkinson's disease. 7th World Parkinson's Day International Symposium, India, December 6th-7th, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

Pael 受容体, Pael 受容体発現細胞および動物ならびにパーキンの機能 (米国特許出願中)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## パーキンソンズ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 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以下の成果を得た。

[研究 1] パーキンソンズジェニックマウスの作製。ヒト正常パーキンソン遺伝子と、常染色体劣性遺伝若年性パーキンソン症候群 (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ソン (T415N) 遺伝子とを用いて、Cre-loxP 制御によるパーキンソンズジェニックマウスの作製を進めて変異パーキンソンズジェニック P415(+)マウスの作製に成功した。パーキンを過剰発現させるために CAG-Cre-トランスジェニックマウスと交配して組換えを行い、パーキンソン過剰発現 loxP(-) の P415(+)マウスを得た。変異型パーキンは筋肉と小脳（ことにブルキンエ細胞）、および中脳で発現していた。このマウスの成長に伴う表現型の変化を現在観察している。また P415(+)マウスに、Cre アデノウイルスを黒質に直接に定位脳手術で注入して、部位特異的組換えを行った。アポモルフィン投与で回転運動が誘発され、黒質チロシン水酸化酵素陽性ドーパミンニューロンの脱落したマウスを得た。このトランスジェニックマウスが半側性パーキンソンモデルとなりうるか再現性を検討している。

[研究 2] 脳内サイトカインと神経栄養因子の解析。研究 1 において、ARJP モデルマウスとしてパーキンソンズ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分子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た。その比較研究として、これまでの研究に引き続いて、さらに詳細に孤発型パーキンソン病剖検脳の黒質線条体におけるサイトカインや神経栄養因子の遺伝子発現における変化を、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の初期の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特異的に見出した。他方、大脳皮質や海馬でも神経脱落に相関しない活性化が存在することを認めた。黒質線条体部位に特異的に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が、線条体で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。これらの成績より、初期の孤発型パーキンソン病脳では、ミクログリアの活性化は、むしろ神経保護に働いていることが推定された。さらに進行した孤発型パーキンソン病の黒質線条体部位で、神経変性による神経脱落に相関したミクログリアが増大する傾向を認めた。これらの成績と、澤田誠らの活性化ミクログリアは神経保護性サブセットが神経毒性サブセットに変換する新しい知見とから、孤発型パーキンソン病の黒質線条体部位では、発病初期には活性化グリアは主に神経保護に作用するが、病期の進行に伴って神経毒性に働くことが示唆された。

### 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ン症候群 (autosomal

recessive juvenile parkinsonism, ARJP) の原因遺伝子パーキンソンが発見されて、現在までに数十種類のパーキンソ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。パーキントランスジェニックマウスの黒質線条体でミクログリアの活性化とサイトカイン類の変化があるかを検索する。

[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)誘発パーキンソンニズムマウスや 6-ヒドロキシドーパミン誘発パーキンソン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。しかしグリア細胞の活性化が神経細胞死に保護的(trophic)に作用するか、毒性(toxic)に作用するかが明らかでない。本研究で作製をめざしているパーキントランスジェニックマウス、その対照実験として発病初期と進行期の孤発型パーキンソン病剖検脳と MPTP パーキンソン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。ミクログリアの活性化によるサイトカイン類の変化が、パーキンソン病において黒質線条体ドーパミンニューロンに対して、神経細胞死を防ぐ二次的変化か、神経細胞死を促進する一次的変化かを解明する。

## 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) Cre-loxP 制御によるパーキントランスジェニックマウスの作製

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(SaII\*)) 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(CMV)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ーニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)がある。この遺伝子の下流の制限酵素部位 (*Clal*) にお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 (*SaII*) で 1 本鎖 DNA として遺伝子精製キットを用いて精製した。

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 1 6 時間、5 %CO<sub>2</sub> 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、1 9 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、止血作業を行いただちに溶解液 (50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1%SDS) に入れ 5 5 °C、1 6 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)CTTTTCATCGACTCTGTAGGCCTGAGTA(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。

(2) LoxP を用いないパーキントランスジェニックマウスの作製を、CMV プロモーターまたは TH プロモーターを用いた construct で、定常に従って進めている。

[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、比較実験として、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方法で進めた。

発病初期と進行した病期のパーキンソン病患者の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。活性ミクログリアを HLA-DR 抗体で染色し、チロシン水酸化酵素(tyrosine hydroxylase, TH)陽性ドーパミンニューロンとの二重染色で検索した。

グリア細胞とニューロンを切片よりレーザーで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、Cre-loxP 制御によるパーキン Tg マウスを作製した。パーキン cDNA を pCMV/lox/CAT/lox/PA(SalI\*) 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。PCR で遺伝子伝達が確認された 7 ラインについて CAT assay を行ったところ P415 において positive な 1 ライン (P415(+))マウス) が得られた。

(1) そのライン (P415 S-#36) の子孫を CAG-cre マウスと交配して、Parkin positive loxP(-)のマウス(T415N-D マウス)を得た。パーキンの過剰発現と CAT 活性の消失から高効率で組換えが起こっていることがわかった。筋肉と小脳の発現量が大きく、中脳でも発現していた。小脳でのプルキンエ細胞の発現量が多かった。現在のところ T415-N-D マウスには行動に目立った変化はない。また TH ニューロン数、alpha-シヌクレイン、CDCre1-1 にも量的変化は認めていないが、行動解析を継続している。

(2) この P415(+))マウスに、Cre アデノウイルスを定位脳手術によって片側黒質に注入して、脳部位特異的組換えを行った。対照として lacZ アデノウイルスを用いた。4 週間後、アポモルフィンを投与すると 10 例中 2 例に回転運動 (半側パーキンソニズム) が誘発された。コントロール 5 例は回転運動をおこさなかった。この回転運動を示したマウスの 1 例について、黒質 TH 陽性神経の脱落を認めた。さらに再現性の確認を行っている。

このベクターでは、パーキン野性型 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、直接にパーキン(wildと T415N mutant) cDNA を連結したコンストラクトを用いて、Tg マウスを得る実験を進めている。

#### [研究 2]

パーキンソン病剖検脳におけるサイトカイン・神経栄養因子の変化とミクログリアの活性化

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。これまでに澤田誠らはマウス脳内に神経保護作用(trophic)、神経毒性作用(toxic)の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おり trophic サブタイプは toxic サブタイプに変換することを見いだしている。

ヒトパーキンソン病剖検脳において、これまでの研究で、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、黒質線条体系ではミクログリアの活性化に相関した炎症性サイトカイン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ず、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することを報告した。

ヒトパーキンソン病剖検脳のうち、発病初期の検体と進行期の検体を比較してミクログリアの活性化と残存性の TH 陽性細胞との二重染色の結果を比較検討した。発症初期の検体で、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(trophic)も推定される観察結果であった。発病進行期の検体では、黒質で変性像の TH 陽性細胞の周囲に多数の活性化ミクログリアを認め、ミクログリアが神経細胞死を促進して病期の進行を促進していることが推定された。こ

の進行期におけるミクログリアは toxic と推定され、パーキンソン病の進行に伴って黒質線条体で活性化ミクログリアは trophic より toxic に toxic change をおこすことが推定された。

#### D. 考察

[研究 1]のパーキン(T415N)トランスジェニック (Tg) 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。Cre-loxP 制御により、ヒト変異型(T415N)パーキンを発現する T415(+Tg) マウスを作製して、CAG-Cre-Tg マウスを交配してパーキン T415N-D line mutant Tg マウスの作製に成功したので、繁殖して成長に伴う phenotype の解析を行っているが、現在のところ、行動に目立った変化はない。パーキンは筋肉、小脳に発現量が多く、中脳でも発現していた。小脳ではブルキンエ細胞の発現量が多かった。そこで T415N(+Tg) マウスに Cre をコードするアデノウイルスを黒質に定位脳手術で注入して、部位特異的に変異パーキンを発現させることを試みたところ、アポモルフィンによる回転運動、黒質 TH 陽性ニューロンの脱落を認めた半側パーキンソニズムのマウスを得た。この結果は重要で興味深い、さらに確認の実験を進めている。このパーキン Tg マウスでパーキンソニズムが確定すれば、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、このベクターではパーキン wild Tg マウスは得られなかった。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ている。

[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〕でパーキンソン症候群マウスの 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 モデルパーキンソン症候群マウスと MPTP パーキンソン症候群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、家族性パーキンソン病と孤発型パーキンソン病とで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・孤発型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、神経脱落に関連したミクログリアの活性化と、神経脱落に関連しないミクログリアの活性化があることが見出された。神経脱落に関連したミクログリアの活性化は黒質線条体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(trophic)と推定される。進行期の剖検脳で黒質の変性ニューロンの周囲に多数の活性化ミクログリアを認められたので、病期の進行に toxic に働いていると推定される。澤田誠らは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、nef 遺伝子を導入すると toxic に変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と進行とに関連する可能性があるため、同様の因子がパーキンソン病脳でみられるかを検討している。

## E. 結論

Cre-loxP 制御によるヒト変異型(T415N)パーキンソンを発現する P415(+)/Tg マウスを作製して、CAG-Cre-Tg マウスを交配して、ヒト変異型 (T415N)のパーキンソン症候群マウスの作製に成功した。変異型パーキンソンが筋肉、小脳（プルキンエ細胞）、中脳に発現

することを見出した。このトランスジェニックマウスの成長過程における phenotype を解析している。また P415(+)/マウスに Cre アデノウイルスを黒質に直接に定位脳手術で注入して、部位特異的組換えを行い、半側パーキンソン症候群マウスを認めたので、さらにこの結果を追試確認している。パーキンソン症候群マウスのサイトカイン類解析の対照研究として、初期と進行期の孤発型パーキンソン病剖検脳で、黒質線条体部位のサイトカインと神経栄養因子の変化を、ことにグリア細胞の変化に注目して細胞レベルで検索して、マイクログリアの活性化は、発病の初期には神経保護作用、病期の進行期には神経毒性作用を示唆する成績を得た。これらの結果より、孤発型パーキンソン病では、黒質線条体部位にいわゆる神経性炎症(neuroinflammation)によるマイクログリアの活性化がおこり、初期には主に神経保護に働くが、病期の進行と共に trophic type より toxic type に toxic change をおこして神経細胞死に働き、病期を進行させる可能性が示唆された。パーキンソン症候群マウスでも、黒質線条体にサイトカイン・神経栄養因子の変化とマイクログリアの活性化を伴う”neuroinflammation”がおこるかが注目される。マイクログリアの toxic change をおこす分子の同定、”neuroinflammation”を防ぐ薬剤の開発は創薬に重要と考えられる。

## F. 研究発表

〔論文発表〕

Ichinose H, Ohye T, Shinotoh H, Arai K., Yamazaki S, Mizuta E, Kuno S, Nagatsu T. Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9: S11-S14

Takubo H, Harada T, Hashimoto T, Inabe Y, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Yanagisawa N, Narabayashi H. A collaborative study on the malignant syndrome in Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9: S31-S41

Ikebe S, Harada T, Hashimoto T, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Takubo H, Yanagisawa N, Narabayashi H.

- Prevention and treatment of malignant syndrome in Parkinson's disease: a consensus statement of the malignant syndrome research group. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9: S47-S49
- Lu YY, Wang LJ, 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 transport. *Neurosci Res* 2003; 45: 33-40
- Yuyama K, Yamamoto H, Nakamura K, Nishizaki I, Yamakuni T, Song SY, Sora I, Nagatsu T, Yamamoto T. Overexpression of V-1 prevents nitric oxide-induced cell death: involvement of enhanced tetrahydrobiopterin biosynthesis. *J Neurosci Res* 2003; 72: 716-725
- Shiraishi H, Kato T, Atsuta K, Sumi-Ichinose C, Ohtsuki M, Itoh M, Hishida H, Tada S, Udagawa Y, Nagatsu T, Hagino Y, Ichinose H, Nomura T. cGMP inhibits GTP cyclohydrolase I activity and biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 265-2771
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 518-526
- 永津俊治、澤田誠. サイトカインおよび神経栄養因子—パーキンソン病における変化— *脳の科学* 2004; 増刊号 121-125
- [総説]  
Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Nagatsu T, Nomura T. Dopa-responsive dystonia. In: *Genetics of Movement Disorders*, ed Pulst SM, Academic Press, Amsterdam, 2003, pp 419-428

## マンガン誘発ドーパミン神経毒性に対するパーキンの保護効果とドーパミンキノンの関与

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** パーキン蛋白のドーパミン神経細胞における生理的機能およびその遺伝子変異による黒質ドーパミン神経に選択的な神経障害のメカニズムを明らかにするために、昨年度は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、マンガン暴露によりドーパミン神経細胞において、小胞体シャペロンの発現増加とともにパーキン蛋白が著明に誘導されること、さらにマンガンによるドーパミン神経細胞死が野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されることを明らかにした。本年度はマンガン誘発ドーパミン神経毒性に対するパーキンの保護効果の発現機序をさらに詳細に検討した。マンガン暴露により、ドーパミン神経細胞ではゴルジ体に一致したパーキン蛋白の著明な誘導と集積が認められたが、非ドーパミン神経細胞ではみられなかった。ドーパミン、非ドーパミン神経細胞ともにマンガン添加によりプロテアソーム活性は変化しなかった。また、マンガン暴露によるドーパミン神経細胞での PDI の増加に対する野生型パーキンの遺伝子導入の効果について検討したが、マンガンによる細胞死は抑制されたにもかかわらず、小胞体シャペロン PDI の増加は不変であった。マンガンとドーパミン同時暴露による細胞死は、ドーパミン神経細胞では野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されたが、非ドーパミン神経細胞では抑制されなかった。ドーパミン神経細胞へのマンガン暴露あるいはアンチセンスパーキンの遺伝子導入により、ドーパミン・DOPA クロムおよびキノプロテインは有意に増加し、アポトーシスが惹起された。以上の結果から、マンガン暴露によりドーパミン神経細胞では小胞体ストレスならびにゴルジ体に一致したパーキン蛋白の著明な誘導と集積が惹起されること、さらにパーキン蛋白はドーパミン神経細胞において特異的にマンガン神経毒性に対して保護的に機能していることを明らかにできた。また、このパーキン蛋白のマンガン誘発細胞死に対するドーパミン神経特異的な保護効果は、小胞体ストレスやユビキチン・プロテアソーム系への作用に基づくものではなく、細胞内小胞外のドーパミンあるいはその自動酸化で生成されるキノン体などのドーパミン神経細胞の内在性因子への作用に基づくことを明らかにできた。パーキン蛋白はキノン体によるドーパミン神経毒性に対し保護的に作用している可能性が考えられる。

### 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ことから、このパーキン蛋白の機能解析が精力的に行われている。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。また、ユビキチンリガーゼとしての基質候補因子の機能異常による細胞死の機序も報告されている。しかし、このパーキン蛋白の神経細胞特にドー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。

一方、金属マンガンの暴露により黒質ドー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、マンガンが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も報告され、