

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

平成 16 年度 総括・分担研究報告

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 田中 啓二  
高橋 良輔  
澤田 誠

平成 17(2005)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 服部 信孝	3
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 服部 信孝	9
2. パーキンノックインマウス作成・解析に関する研究 田中 啓二	16
3. パーキンソン病におけるパエル受容体の役割 高橋 良輔	20
4. パーキントランスジェニックアニマル作成・分析に関する研究 (神経変性疾患でのミクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究) 澤田 誠	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

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：服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学・老人性疾患病態治療研究センター助教授

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) は、遺伝性パーキンソン病の中で最も頻度が高く、世界中に分布する疾患である。遺伝性パーキンソン病の頻度は、全パーキンソン病において高々 5%内外であるが、遺伝子産物が選択的ドパミン神経細胞死の発症機序に関わっていることが推定される。このことはパーキンソン病の殆どを占める孤発型の病態解明に有効な手段と考えられる。また AR-JP の神経病理学的に特徴に Lewy 小体を伴わないドパミン神経細胞死があることから、AR-JP の遺伝子産物パーキン蛋白の機能は、ドパミン神経細胞死のみならず Lewy 小体形成機序にも関与することが考えられる。このような作業仮説の中で、我が国で臨床病理学的特徴が明らかにされ、遺伝子単離そして機能の一端を証明した AR-JP の発症機序を分子レベルで解明することを目標にしている。本年度は、パーキン蛋白の機能解明を更に進め、確立されたパーキンノックダウンモデルを用いて、パーキンのアンチセンスによる細胞死はアポトーシスの形態を示し、細胞死にドパミンキノン体の関与、更に正常  $\alpha$ -シヌクレインによりパーキンノックダウンのよる細胞死が回避されることを証明した。興味あることに変異型  $\alpha$ -シヌクレインでは、細胞死を回避できなかった。また、パーキン蛋白の生理機能とその異常によるパーキンソン病の発症機構を解明するためにパーキン遺伝子のノックインマウスを作製した。パーキン欠損マウスは正常に誕生し、1年を経過するも見かけ上の行動異常は全く観察されなかった。また組織学的な解析からも、中脳におけるドーパミンニューロンの変性・脱落等も観察されなかった。これらの結果から AR-JP の発症にはパーキンタンパク質の機能喪失(loss-of-function)以外に重要なリスクファクターの存在する可能性が示唆された。一方、パーキン蛋白の基質候補であるバエル受容体の遺伝子改変モデルを、過剰発現系とノックアウトマウスについて作製し、検討した。明らかな表現型はないもののドパミン代謝については、過剰発現系ではドパミンレベルの増加、ノックアウトマウスでは、低下と既報されているパーキンノックアウトの動態を反映していた。

神経変性には、マイクログリアの関与も検討されている。事実、HIV の中枢神経系の感染により、痴呆の発現や神経機能低下を生じることが分かっている。また HIV 由来 nef 遺伝子導入マイクログリアは、活性酸素種を産生し細胞毒性を獲得することが分かった。AR-JP ではグリアの増生が観察されておりグリア細胞の神経変性への関与を明らかにすることは重要課題を考えている。

尚、研究報告の詳細については、各分担者の研究報告書を参照されたい。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子であるパーキン遺伝子とその遺伝子産物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序を分子レベルで解明することを目的とする。またパーキン遺伝子陰性例が少なからず存在することが明らかにされ、PINK1 (PARK6)が新たに若年性パーキン

ソン病の原因遺伝子として単離された。更に PARK7 の DJ-1 も単離され、原因遺伝子産物の相互作用も注目されてきている。優性遺伝性パーキンソン病として PARK8 の LRRK2 が原因遺伝子として単離・同定されており、単一遺伝子異常から孤発型へのアプローチが有効な戦略となっている。本課題では、パーキン蛋白の機能解明のみならず新規遺伝子の単離も視野に入れ

ている。

## B.研究方法

研究課題を遂行するために、次の4名よりなる研究グループを組織した。主任研究者：服部信孝（順天堂大学医学部神経学・老人性疾患病態治療研究センター）、分担研究者：田中啓二（東京都臨床医学研究所）、高橋良輔（独立行政法人理化学研究所脳科学総合センター）、澤田誠（名古屋大学環境医学研究所）である。

各研究者の研究分担は次の通りである。

服部信孝：パーキン遺伝子・遺伝子産物解析、新規原因遺伝子単離

田中啓二：パーキンノックインマウス作製・解析。遺伝子産物の制御機構解析。

高橋良輔：パエル受容体の機能解析。

澤田誠：神経変性疾患でのマイクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究。

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.研究成果

パーキン遺伝子変異は劣性遺伝性のうち約50%を占めることが分かっている。劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としては、PARK2, PARK6, PARK7の3つの遺伝子座が同定されている。我も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り、Lod scoreも9.88で、その候補領域は6.4 cMまで狭めた。残念なことに遺伝子の単離は外国グループにより先を越されたが、我々グループも独自にPARK6の原因遺伝子がPINK1であることを突き止めた。PINK1遺伝子の頻度としては、常染色体劣性遺伝形式を示し、若年発症でかつパーキン遺伝子陰性例の約9%が陽性を示した。一方、

イタリアの研究グループにより単離・同定されたPARK7の原因遺伝子DJ-1については、ハプロタイプからはPARK7に連鎖可能な家系が存在していたが、変異を見出すことは出来なかった。既報通りDJ-1変異は頻度的には希な原因遺伝子と考えられた。パーキン遺伝子変異は、劣性遺伝形式を呈した167家系中82家系が陽性であった(49%)。PINK1と併せて約40%は、原因遺伝子が不明であることが推定された。現在、劣性遺伝性パーキンソン病の新規遺伝子同定に向けて、連鎖解析を行っている。

一方、優性遺伝性パーキンソン病については、我が国で遺伝子座が決定されたPARK8のLRRK2が単離・同定され、精力的に変異解析を行い、変異を持つ家系が少なからず存在していることが分かった。G2019S変異は、ヨーロッパ、北アフリカで頻度が高くsingle founder effectが指摘されている。我が国にも同じ変異を持つ家系が存在することが、明らかにされ、現在ハプロタイプ解析を行い、共有する先祖の存在有無を検討している。また $\alpha$ -シヌクレインのmultiplicationの家系が報告されたが、我が国にも存在しているか解析を始めた。

パーキン蛋白の機能解析に関しては、ヒトSH-SY5Y（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を発現させることでパーキン蛋白をノックダウンさせることに成功した（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）。パーキン蛋白をノックダウン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、ドパミンキノン体の増加に伴い細胞生存率が低下した。本年度は更に、正常 $\alpha$ -シヌクレインがパーキンノックダ

ウンによる細胞死を抑制し、変異 $\alpha$ -シヌクレイン (A30P and A53T) ではその抑制効果が観察されなかったことを見出した。アデノウィルスベクターの毒性については、LacZ を組み込んだ対照では、細胞の生存率には、全く影響を与えなかった。更に、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を使ってパーキンをノックダウンさせても、細胞死には影響を与えなかった。パーキンのノックダウンによる細胞の生存率の低下は、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。

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。また孤発型 PD においても PDCD-2 の増加が観察された。ニトロ化により、パーキンのリガーゼ活性が低下することが報告されており、パーキン蛋白が黒質細胞生命維持に関わっている可能性を示した。

パーキンノックアウトマウス (exon 3)・パーキンノックインマウス(exon 2)の解析については、昨年より引き続き進めている。本年度は、確立した遺伝子改変モデルについて、行動学的・組織学的に検討を加えている。現在のところパーキンノックアウト及びノックインマウスは、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プロテアソーム阻害剤投与における変化を検討中である。プロテアソーム阻害剤を用いた理由は、パーキン遺伝子変異を伴う AR-JP 患者の剖検脳では一般に Lewy 小体形成を認めない。つまりパーキンの存在しないマウスでは、プロテアソーム阻害剤による封入体形成が観察されないことが予想される。現在のところ、パーキンノックアウトマウスでは、封入体形成が起こりにくい傾向を観察している。また基質候補の蓄積有無についても検討したが、CDCrel-1, synphilin-1 など基質候補の蓄積は認めなかった。

先の in vitro 系での検討で、ドパミンキノン体形成が、細胞死の誘発要素であることが判明した。更にそのドパミンキノン体による細胞死は $\alpha$ -シヌクレインにより抑制されたことから、パーキン null mice で表現型が出現しない理由として正常 $\alpha$ -シヌクレインが存在することにあると考え、パーキン・ $\alpha$ -シヌクレインのダブルノックアウトマウスを作製した。ダブルノックアウトマウスでは、行動学的・組織学的検討で正常マウスとの差異を見出していない。キノン体産生の有無をダブルノックアウトマウスとパーキンノックアウトマウスで検討する予定である。

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。昨年、ヒトパーキン蛋白の Ubl の NMR 解析を行い、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にした。更にパーキン-

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。そこで本年は、パーキンノックアウトマウスを用いて Rpn10 の量的な違いや分布の違いの有無を解析したが、差異を見出せなかった。

ユビキチンリガーゼであるパーキン蛋白の活性調節機構については、活性を負に制御する新しいタンパク質分子として 14-3-3 $\eta$  (脳に豊富に存在する多機能性のシャペロン様分子で Lewy Body の構成因子の一つ) の同定に成功した。実際マウス脳ライゼートを用いた免疫沈降実験の解析から、パーキン蛋白が 14-3-3 $\eta$  と物理的に結合していることを明らかにした。パーキン蛋白は N 端側に UBL ドメイン、C 端側に RING1-IBR-RING2 ドメイン (RING-Box : E3 としての触媒領域)、そして両ドメインを連結するリンカー領域から構成されている。14-3-3 $\eta$  は、主にパーキンのリンカー領域と結合することを見出した。興味深いことに、AR-JP 患者由来のミスセンス変異を持つパーキン<sup>K161N</sup> (リンカー領域に変異) は 14-3-3 $\eta$  との結合能を完全に失っていた。そして 14-3-3 $\eta$  が結合すると、パーキンの自己ユビキチン化活性および Synphilin-1 (パーキンの既知基質) を標的としたポリユビキチン化活性は完全に抑制された。この結果、14-3-3 $\eta$  はパーキンの活性阻害因子であることが判明した。さらに 14-3-3 $\eta$  と高親和性を有して結合しパー

キンの活性阻害を解除する因子として  $\alpha$ -シヌクレイン (常染色体優性の家族性パーキンソン病の責任遺伝子 SNCA の翻訳産物) の同定にも成功した。そしてパーキンソン病患者由来の変異  $\alpha$ -シヌクレイン<sup>A30P</sup> あるいは  $\alpha$ -シヌクレイン<sup>A53T</sup> は、この 14-3-3 $\eta$  によるパーキンの阻害活性を完全に喪失していた。今回、このようにパーキンのユビキチンリガーゼ活性が 14-3-3 $\eta$  と  $\alpha$ -シヌクレインによる正負の活性調節因子で巧妙に制御されていることを見出した。パーキンと 14-3-3 $\eta$  は in vitro 及び in vivo で直接結合するが、14-3-3 $\eta$  と  $\alpha$ -シヌクレインの結合は in vivo では観察されるもののリコンビナントタンパク質を用いた in vitro での結合実験では検出できないことから、われわれはこの相互作用には  $\alpha$ -シヌクレインの修飾が必要であると考えている。いずれにしても 14-3-3 $\eta$  は二つのパーキンソン病の責任遺伝子産物パーキンと  $\alpha$ -シヌクレインを連結させるユニークな調節因子と考えることができる。先のドパミンキノン体形成機序にもパーキンと  $\alpha$ -シヌクレインが関与しており、14-3-3 $\eta$  による負の制御機構と併せて遺伝子産物が共通機構をなしていることが証明された。

最近になり、 $\alpha$ -シヌクレインとオートファジー (自食作用) の関連性について報告された。我々もこの機構と神経変性との共通機序について注目している。最近、オートファゴソーム形成に関する Atg システム (ユビキチン類似のタンパク質修飾機構) が発見され、この Atg システムの活性化因子 Atg7 の条件的ノックアウトマウスの作製に成功した。そして肝臓やニューロンなどの非分裂細胞でオートファジーを欠損させると、ユビキチン化タンパク質の凝集体が細胞内に大量に集積する結果を得た。今後は、パ

ーキンノックアウトマウスや $\alpha$ -シヌクレインノックアウトマウスとの交配で変化を検討する予定である。

パーキン蛋白はユビキチンリガーゼであるが、変性蛋白異質を基質としている可能性もあり、品質管理型ユビキチンリガーゼに属するかもしれない。品質管理型ユビキチンリガーゼとしては、CHIPがある。このCHIPは、パーキン蛋白とも結合することから、パーキン蛋白も変性蛋白を基質としている可能性があり、CHIPノックアウトマウスでのパーキン蛋白の局在変化や機能変化の検討、更にはパーキンノックアウトとの交配を計画している。

パーキン蛋白の基質としてパエル受容体が有力候補として検討されている。事実、ショウジョウバエモデルでは、黒質に特異的に発現させなくとも選択的ドパミン神経細胞死が惹起されることが証明されている。本年度は、パエル受容体の遺伝子改変モデルを作製し、行動学的・生化学的検討を加えた。パエル受容体過剰発現マウスでは、線条体ドパミン量が、20%増加していたのに対し、パエル受容体ノックアウトマウスでは、40%減少していた。線条体の電気生理学的解析でもドパミン量の変化に一致する所見であった。ドパミン毒性に対する感受性は、パエル受容体の発現量と相関していた。

神経変性にマイクログリアの関与については、保護的とする所見と毒性を示すとする所見が存在する。HIV感染による痴呆、神経細胞死の誘発と神経変性疾患の発症機序にはマイクログリアを介した共通機構が存在すると考えられている。一般に毒性を持たないマイクログリアはHIV由来nef遺伝子を導入すると神経障害性の活性酸素種を産生するようになる。多くの神

経変性疾患では、活性酸素種による酸化ストレスが主因の1つであることが指摘されており、nef遺伝子導入による形質転換が神経変性の引き金になっている可能性を検討した。nef遺伝子発現量に伴って神経毒性を発揮した。nef遺伝子のN末に変異を導入し、ミリストイル化が、生じないG2Aの変異体は、活性酸素種の産生増大や神経毒性を示さなかった。更に野性型nef遺伝子と変異nef遺伝子で2次元タンパク解析法により発現タンパクの差異の有無を検討した。その結果、野性型nef遺伝子導入マイクログリアでは、塩基性タンパクの集積を観察し、活性型nef蛋白は、NADPHオキシダーゼサブユニットの一部と結合していることが分かった。

#### D. 考察と結論

常染色体劣性若年性パーキンソン症 (AR-JP) の遺伝子診断を確立し、更に新規遺伝子PINK1, DJ-1 更にはLRRK2遺伝子異常に伴う家系の存在により、同一遺伝子変異グループに分類することが可能になり、新規遺伝子による変異家系の絞り込みを行っている。パーキン蛋白の機能解析では、リガーゼの制御機構を明らかにし、14-3-3 $\eta$ により活性が抑制されること分かった。この制御機構にも $\alpha$ -シヌクレインも関与しており、パーキンノックダウンによるドパミンキノン体増加による細胞死も $\alpha$ -シヌクレインにより抑制されることが明らかにされ、家族性パーキンソン病の遺伝子産物が、共通機序を形成していることが証明された。また選択的細胞死の説明としてドパミンキノン体の関与を証明できたことにより、あらゆる組織にパーキン蛋白が発現しているにも関わらず、ドパミン神経細胞に選択的に障害が惹起される説明として、ドパミンキノン体障害による細胞死が考えられた。

パーキン遺伝子改変モデルでは、行動異常や組織学的変化は観察されていない。また基質の蓄積も今のところ証明されていない。一方、パエル受容体の過剰発現系マウスやノックアウトマウスでは、ドパミン代謝が対称的動向を示しており、基質候補して有力と考えている。過剰発現系マウスでは、ドパミンが増加を、ノックアウトではドパミンが低下を示しており、既報されているパーキンノックアウトマウスのドパミン代謝と類似性が高い結果となった。しかしながら、基質の蓄積と細胞死の関係については、更に詳細な実験結果が必要と考えており、蛋白分解系とは別の機能でのユビキチン化も可能性も検討する必要があると考えている。

本年度では、遺伝子改変モデルを作製したが、パーキンソン病を説明可能な表現型は観察されなかった。更に薬物付加やプロテアソーム阻害剤の投与などで正常マウスとの相違を検討する予定である。

パーキン蛋白と $\alpha$ -シヌクレインが共通機序に関与していることより、パーキン蛋白の機能解析は、孤発型パーキンソン病の機序も説明可能とする情報を提供するものと考え。更には神経保護作用も持つ薬剤の開発も期待できる。

#### D. 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：服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学・老人性疾患病態治療研究センター助教授

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) は、遺伝性パーキンソン病 (FPD)の中で最も頻度が高く、世界中に分布する疾患である。遺伝性パーキンソン病の頻度は、全パーキンソン病 (PD)において高々 5%内外であるが、遺伝子産物が選択的ドパミン神経細胞死の発症機序に関わっていることが推定される。このことはパーキンソン病の殆どを占める孤発型の病態解明に有効な手段と考えられる。また AR-JP の神経病理学的に特徴に Lewy 小体を伴わないドパミン神経細胞死があることから、AR-JP の遺伝子産物パーキン蛋白の機能は、ドパミン神経細胞死のみならず Lewy 小体形成機序にも関与することが考えられる。このような作業仮説の中で、我が国で臨床病理学的特徴が明らかにされ、遺伝子単離そして機能の一端を証明した AR-JP の発症機序を分子レベルで解明することを目標としている。本年度は、パーキン蛋白の機能解明を更に進め、パーキン遺伝子変異陰性例も少なからず存在することより、未だ不明原因遺伝子変異による家系の集積と連鎖解析を行い、新規原因遺伝子同定も課題とした。

AR-JP は loss-of-function 効果で発症することが推定される。パーキンノックアウトマウスには長期経過観察でも表現型が存在しないことから、パーキンノックダウンにより細胞死の誘導、細胞死の実行分子の同定を行い、ドパミンキノン体の関与とドパミンキノン体の増加が細胞死を誘導していることを見出した。更に正常  $\alpha$ -シヌクレインでドパミンキノン体の産生が抑制され、変異型  $\alpha$ -シヌクレイン <sup>A53T</sup> や  $\alpha$ -シヌクレイン <sup>A30P</sup> では細胞死を抑制できなかった。マウスでは正常型が  $\alpha$ -シヌクレイン <sup>A53T</sup> であるので何故パーキンノックアウトマウスでは、細胞死が誘導されないのかが疑問点として残った。

パーキン蛋白の新規基質候補として LMO4 と PDCD-2 を検討し、LMO4 は pulse chase でも分解されず、剖検脳においても蓄積を確認できないことより蛋白分解系としての基質の可能性より K63 を介したユビキチン化などの他の pathway に関与している可能性を考えている。PDCD-2 については、ヒト剖検脳で AR-JP, 孤発型 PD 共に増加していた。孤発型 PD での増加は、パーキン蛋白のユビキチンリガーゼ活性のニトロ化などによる抑制効果の結果と考えた。

パーキン遺伝子変異陰性例については、PARK6 の原因遺伝子 PINK1 の可能性や PARK7 の DJ-1 変異の可能性を検討し、常染色体劣性遺伝性で若年発症の PD の約 9%が陽性を示した。更に優性遺伝性 PD の PARK8 の LRRK2 が単離・同定され、我が国で遺伝子座が最初に決定された相模原地区の発端家系のみならず他の家系やイスラエル、チュニジア、韓国、台湾を広く分布していることが分かった。PARK1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 と遺伝子が同定されたが、依然原因遺伝子不明家系が約 40%存在していることが判明し、新規遺伝子座含めた解析を始めた。

B. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子であるパーキン遺伝子とその遺伝子産物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序を分子レベルで

解明することを目的とする。またパーキン遺伝子陰性例が少なからず存在することが明らかにされ、PINK1(PARK6)が新たに若年性パーキンソン病の原因遺伝子として単離された。更に PARK7 の DJ-1 も単離され、原因遺伝子産物の

相互作用も注目されてきている。優性遺伝性パーキンソン病として PARK8 の LRRK2 が原因遺伝子として単離・同定されており、単一遺伝子異常から孤発型へのアプローチが有効な戦略となっている。本課題では、パーキン蛋白の機能解明のみならず新規遺伝子の単離も視野に入れている。

パーキン蛋白の機能については、世界に先駆けてユビキチンリガーゼであることを突き止めた。更に基質候補として糖化修飾  $\alpha$ -シヌクレイン、バエル受容体などが基質候補として報告した。更に我々は、yeast two hybrid スクリーニングで 13 分子を単離し、そのうち LMO4, PDCD-2 について詳細な検討を行った。一方、細胞死の機序についてはパーキンノックアウトマウスが表現型を持たないため病態解析が困難となっていた。そこでパーキンをノックダウンさせることで loss-of-function 効果を誘導し、細胞死の有無、また実行分子の同定を目指した。

パーキンノックアウトマウスについては、表現型を持たないが、正常マウスとのプロテオーム解析で違いが生じている可能性がある。そこでサイファーゲン社のプロテインチップを用いて exon3 をターゲットにしたノックアウトマウス、exon2 に GFP-タウ蛋白をノックインさせたノックインマウスについて、正常マウスとの比較で共通して差異を示す分子の同定を目指す。またプロテアソーム阻害剤の投与で一般に観察される細胞内封入体形成の有無を検討し、パーキン蛋白の存在が、ユビキチン陽性封入体形成に必須か否かを検討する。

## B. 研究方法

### PARK2, PARK6, PARK7, PARK8 の変異解析

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 8 家系を決定した。連鎖している可能性の高い 8 家系について単離・同定された PINK1 について変異解析を行った。変異解析は PCR を行い、直接塩基決定法にて変異の有無を検討した。同様に PARK7 に連鎖可能性の高い家系について原因遺伝子 DJ-1 の変異解析を行った。PARK2 については、更に症例数を増やし変異解析を行った。最近になり、優性遺伝性 PD の原因遺伝子 PARK8 の遺伝子 LRRK2 が同定された。この PARK8 は、我が国の相模原に在住一大家系により遺伝子座が決定されたもので、他の家系にも変異を持つ家系が存在するか検討した。

### パーキン蛋白のノックダウン

1) アデノウイ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) パーキンノックダウン後に同様にしてアデノウイ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。用いた  $\alpha$ -シヌクレインは、正常型、や変異型  $\alpha$ -シヌクレイン <sup>A30P</sup> or <sup>A53T</sup> を用いて細胞死抑制効果を検討した。

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 の吸光度で測定した。

### 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 poly-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。また LMO4 については pulse chase にて分解の時間経過を検討した。

#### 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。また孤発型 PD についても同様に検討した。

### プロテアソーム阻害剤に対するパーキンノックアウトマウスの反応

exon3 をターゲットにノックアウトマウスを作製（理研高橋良輔先生より恵与）。このマウスに fore brain bundle にプロテアソーム阻害剤を投与し、ユビキチン陽性封入体形成の有無を検討した。抗体には、ユビキチン抗体、 $\alpha$ -シヌクレイ

ン抗体を用い、細胞内局在も検討した。

### $\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスを作製

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マウスを用いて、交配させた。

## E. 研究成果

### 遺伝性 PD の変異解析

パーキン遺伝子変異は劣性遺伝性のうち約 50% を占めることが分かっている。劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としては、PARK2、PARK6、PARK7 の 3 つの遺伝子座が同定されている。優性遺伝性 PD では、PARK1、PARK4、PARK8 が単離されている。我々も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り、Lod score も 9.88 で、その候補領域は 6.4 cM まで狭めた。残念なことに遺伝子の単離は外国グループにより先を越されたが、我々グループも独自に PARK6 の原因遺伝子が PINK1 であることを突き止めた。PINK1 遺伝子の頻度としては、常染色体劣性遺伝形式を示し、若年発症でかつパーキン遺伝子陰性例の約 9% が陽性を示した。一方、イタリアの研究グループにより単離・同定された PARK7 の原因遺伝子 DJ-1 については、ハプロタイプからは PARK7 に連鎖可能な家系が存在していたが、変異を見出すことは出来なかった。既報通り DJ-1 変異は頻度的には希な原因遺伝子を考えられた。パーキン遺伝子変異は、劣性遺伝形式を呈した 167 家系中 82 家系が陽性であった (49%)。優性遺伝形式でも変異陽性例が存在して、偽性優性遺伝型を呈していた。しかしながら、明らかに優性遺伝形式で 1 世代下の世代では、発症年齢が若年

化する家系も存在し、ヘテロ接合体のみでも発症し、2アレルに変異を持つ患者では若年性 PD の表現型を示すものと考えた。実際にヘテロ接合体のみの患者も少なからず存在し、ヘテロ接合体でも発症すること明らかにされた。パーキン遺伝子については、Glup 遺伝子がパーキンと約 200 bp 離れて N 末を付き合わせた位置づけで、直列的に配置しているが、少なくとも 1 家系において Glup を含む領域に欠失が存在していることが明らかにされた。Glup はパーキン遺伝子により制御を受ける遺伝子とされていたが、Glup とパーキン遺伝子に両遺伝子に欠失が存在しても表現型には違いがないことが分かった。

PINK1 と併せて約 40% は、原因遺伝子が不明であり、劣性遺伝性パーキンソン病の新規遺伝子同定に向けて、連鎖解析を行っている。特に劣性遺伝性 PD で late onset を呈している家系が少なからず存在し、しかも多くの家系が西日本に集中して分布していた。

一方、優性遺伝性パーキンソン病については、我が国で遺伝子座が決定された PARK8 の LRRK2 が単離・同定され、精力的に変異解析を行い、変異を持つ家系が少なからず存在していることが分かった。特に G2019S 変異は、ヨーロッパ、北アフリカで頻度が高く single founder effect が指摘されていたが、この変異は我が国にも存在することが、明らかにされた。現在ハプロタイプ解析を行い、共有する先祖の存在有無を検討している。また  $\alpha$ -シヌクレインの multiplication の家系が報告されたが、我が国にも存在しているか解析を始めた。Exon3 を first screening として TaqMan probe を用いた gene dosage technique で検討している。Preliminary の結果であるが、 $\alpha$ -シヌクレインの duplication が

我が国にも存在していることが推定されている。

### パーキン蛋白の機能解析

パーキン蛋白の機能解析に関しては、ヒト SH-SY5Y (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ストランドを発現させることでパーキン蛋白をノックダウンさせることに成功し、ノックダウンにより、細胞生存率が低下した。この生存率の低下はドパミンクロムの産生量の増加に伴い増強した。興味あることに正常  $\alpha$ -シヌクレインによりパーキンノックダウンによる細胞死が抑制され、変異  $\alpha$ -シヌクレイン (A30P or A53T) ではその抑制効果が観察されなかった。

### 新規パーキン結合蛋白の解析 (PDCD-2, LMO4)

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、PDCD-2 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。また孤発型 PD においても PDCD-2 の増加が観察された。ニトロ化により、パーキン蛋白のリガーゼ活性が低下することが報告されており、パーキン蛋白が黒質細胞生命維持に関わっている可能性を示した。LMO4 については、pulse chase による分解が観察されず、ヒト剖検脳でも蓄積が観察されなかった。パーキンが K63 リジンにポリユビキチンを付加させる可能性も指摘されており、LMO4 については、プロテアソーム非依存性によるパーキンのユビキチン付加作用でコントロールを受けている可能性が考えられた。

### パーキンノックアウトマウス (exon 3) の解析

モデル解析は、昨年より引き続き進めている。本年度は、確立した遺伝子改変モデルについて、行動学的・組織学的に検討を加えている。現在のところパーキンノックアウトは、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プロテアソーム阻害剤投与における変化を検討中した。現在のところ、パーキンノックアウトマウスでは、封入体形成が起こりにくい傾向を観察している。また基質候補の蓄積有無についても検討したが、CDCrel-1, synphilin-1 など基質候補の蓄積は認めなかった。

### $\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスの解析

先の *in vitro* 系での検討で、ドパミンキノン体形成が、細胞死の誘発要素であることが判明した。更にそのドパミンキノン体による細胞死は  $\alpha$ -シヌクレインにより抑制されたことから、パーキン null mice で表現型が出現しない理由として正常  $\alpha$ -シヌクレインが存在することにあると考え、パーキン・ $\alpha$ -シヌクレインのダブルノックアウトマウスを作製した。行動学的・組織学的には正常マウスとの差異を見出していない。キノン体産生の有無をダブルノックアウトマウスとパーキンノックアウトマウスで検討する予定である。

### D. 考察

常染色体劣性若年性パーキンソン症 (AR-JP) の遺伝子診断を確立し、更に新規遺伝子 PINK1,

DJ-1 更には LRRK2 遺伝子異常に伴う家系の存在により、同一遺伝子変異グループに分類することが可能になり、新規遺伝子による変異家系の絞り込みを行っている。実際に劣性遺伝性 PD の late onset 型は西日本に分布している傾向が見られ、現在遺伝子座の決定、原因遺伝子の同定を目指している。パーキン蛋白の機能解析では、パーキンノックダウンによるドパミンキノン体の増加が、アンチセンスによるパーキンノックダウンのよる細胞死の実行分子であることが分かった。既にパーキン null state が、exocytosis を抑制することが推定されており、ドパミンキノン体の増加は、パーキン null state による exocytosis の抑制効果の結果として細胞質内におけるドパミンの増加、それに伴うドパミンキノン体への変換と産生増加と考えた。

新規基質候補としては、LMO4 が K63 を介してユビキチン化されている可能性が考えられた。PDCD-2 については、孤発型 PD、AR-JP でも蓄積傾向が観察されており、黒質神経細胞死に PDCD-2 が関与している可能性が考えられた。パーキンノックアウトマウスでは、行動異常や組織学的変化は観察されていない。また基質の蓄積も今のところ証明されていない。プロテアソーム阻害剤投与による変化では、ユビキチン陽性封入体形成の低下が観察された。パーキンとプロテアソームの共同作用が推定された。 $\alpha$ -シヌクレインとのダブルノックアウトマウスでは、組織学的にも行動学的にも変化を認めていない。

### E. 結論

AR-JP の選択的細胞死にドパミンキノン体の関与が推定された。そして  $\alpha$ -シヌクレインにより

細胞死が抑制された。 $\alpha$ -シヌクレインは、dual function を持っており、高発現では細胞毒性を、低濃度でもドパミンキノン体をトラップ出来ず結果としてフリーのドパミンキノン体を増加させることで細胞死を誘導することが推定された。このドパミンキノン体による細胞死が明らかにされたことで選択的ドパミン神経細胞死の機序が明らかにされた。更に強調すべきこととしては、PARK1, PARK2 の遺伝子産物が共通機構を形成していることである。

遺伝子変異解析では、我が国を代表する研究室として PARK2, PARK4, PARK6, PARK7, PARK8 の変異解析を順調に進めている。しかしながら、約 40%は変異遺伝子が不明であり、今後原因遺伝子が同定される可能性が高い。また同定のための戦略としては、既知の遺伝子変異解析を進めることで、たとえ小さい家系でも同じ遺伝子座に連鎖している可能性の高い家系をグループングすることが可能になってきており、新しい FPD の原因遺伝子の単離に向けて検討中である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng Ar, Rosales RL, Hassin-Bear S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N.: PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004.
- Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Ng Ar, Rosales RL, Hassin-Bear S, Shinar Y, Lu CS, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N.: Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004.
- Hattori N, Mizuno Y.: Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364:722-724, 2004
- Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y.: Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 29;1695(1-3):235-47.
- Takahashi R, Imai Y, Hattori N, Mizuno Y.: Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann NY Acad Sci* 99: 101-106, 2004
- Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res.* 14:1832-50, 2004
- Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N, Mizuno Y, Ogawa N.: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem.* 89:1490-7, 2004
- 服部信孝. パーキンソン病の発症機序：孤発型性パーキンソン病研究から家族性パーキンソン病研究へ。(日本神経学会賞受賞) *臨床神経学* 第44巻 第4号, 2004, pp241-262
- 服部信孝. 3. パーキンソン病とParkin. *実験医学* 第三章蛋白質修飾・分解異常と病気, Vol.22 No.2, 2004, pp180(286)-186(292)
- 服部信孝. 常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソンニズム. *週間医学のあゆみ* Vol.208 No.6, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2003, pp 526-53
- 服部信孝. 第八章 遺伝性パーキンソン病 1 Parkinson's disease1(S N C P) :  $\alpha$ -synuclein. *脳の科学* 第26巻増刊号, 星和書店, 東京, 2004, pp173-177
- 服部信孝. 第八章 遺伝性パーキンソン病 2 Parkinson's disease2(Park2):パーキン. *脳の科学* 第26巻増刊号, 星和書店, 東京, 2004, pp178-186
- 服部信孝. 臨床編 常染色体劣性遺伝子若年性パーキンソンニズム. *医学のあゆみ* Vol.208 No.6, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2004, pp526-532

14. 服部信孝, 野田和幸. 《ここまでわかったパーキンソン病の発症機序と病態生理》[発症機序] ユビキチン・プロテアソーム系障害—家族性パーキンソン病研究から得たもの. 臨床雑誌 内科4 特集パーキンソン病—治療の問題点と今後の展開—, 南光堂, 東京, 2004, pp616-622
  15. 服部信孝. 特集 神経変性疾患治療への展望—病態機序に基づく治療戦略—, パーキンソン病の分子標的治療. 最新医学 第59巻 第7号, 最新医学社, 大阪市, 2004, pp56-62
2. 学会発表及び講演
1. 服部信孝. シンポジウム 6-1 パーキンソン病をめぐる最近の話題 パーキンソン病の発症機序-遺伝性パーキンソン病からのヒントをえて. 臨床神経 44 第45回日本神経学会総会, 東京, 5月11日-14日, 2004
  2. Hattori N, Yoshino H, Imamichi Y, Mizuno Y. Parkin mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism (AR-EP). NO.8<sup>th</sup> international congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, Roma, June 14-17, 2004
  3. 服部信孝, 町田 裕, 佐藤栄人, 波田野靖子, 波田野琢, 李 元哲, 佐藤健一, 水野美邦, 田中啓二, 高柳 淳, 浅川修一, 清水信義. パーキンソン病の発症機序: 遺伝型と孤発型パーキンソン病の共通メカニズム. 第11回日本遺伝子診療学会大会, 東京, 9月17日-18日, 2004
  4. 服部信孝. パーキンソン病とは~その病態と今後の展望~. パーキンソン病とうまくつきあうために~ひとりで悩まないで~, 静岡, 4月3日, 2004
  5. 服部信孝. パーキンソン病の治療. 奈良県BIF 発売記念学術講演会, 奈良, 4月15日, 2004
  6. 服部信孝. パーキンソン病薬物治療と最新の研究. パーキンソン病学術講演会, 仙台, 6月26日, 2004
  7. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序~最新の知見より~. 第3回筑後地区パーキンソン病懇話会プログラム, 福岡, 7月14日, 2004
  8. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 遺伝型と孤発型パーキンソン病の共通メカニズム. 第11回日本市電氏診療学会大会シンポジウム, 東京, 9月17日, 2004
  9. 服部信孝. パーキンソン病について. 順天堂大学・東京理科大学交流セミナー, 千葉, 9月25日, 2004
  10. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第5回パーキンソン病治療・症例検討会, 名古屋, 10月1日, 2004
  11. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第2回新潟パーキンソン病治療研究会, 新潟, 10月22日, 2004
  12. 服部信孝. パーキンソン病の研究・診断・治療. 第10回青函神経疾患フォーラム, 青森, 11月6日, 2004
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
服部信孝. 常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因遺伝子の発見と機能解明. Thomson Scientific Academic Symposium 表彰式—最先端研究領域において活躍する日本の研究者

パーキンノックインマウス作製・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

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, ARJP) の責任遺伝子であるパーキンの生理機能とその異常によるパーキンソン病の発症機構を解明するためにパーキン遺伝子のノックインマウスを作製した。パーキン欠損マウスは正常に誕生し、1年を経過するも見かけ上の行動異常は全く観察されなかった。また組織学的な解析からも、中脳におけるドーパミンニューロンの変性・脱落等も観察されなかった。これらの結果から ARJP の発症にはパーキンタンパク質の機能喪失(loss-of-function)以外に重要なリスクファクターの存在する可能性が示唆された。さらに本年度は、パーキン活性を正負に制御する新しい活性調節機構を見出したので、その結果も併せて報告する。

C. 研究目的

2000年、パーキンがユビキチンリガーゼ（連結酵素）であることを世界で最初に突き止めて以来、われわれはパーキンの構造・機能・病態に関する包括的研究を推進し、ARJPの発症機構解明を目指す研究に取り組んできた。本研究課題においては、発生工学的手法を駆使してパーキン遺伝子の欠損マウスを作製し、個体レベルでのパーキンの病態生理を研究することを目的としている。パーキンは、細胞内に蓄積した不要タンパク質を分解する所謂「品質管理」機構において作用する酵素と考えられるので、本研究では、タンパク質の品質管理機構全般におけるタンパク質分解系の研究も併せて推進し、パーキンソン病の発症機構解明の全体像に迫ることを目標としている。このニューロンの健全性維持を分子レベルで解明することは、ヒトの健康を守る研究の根幹に係わると考えている。

D. 研究方法

1) パーキンノックインマウスの作製

・ターゲティングベクター：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12Kbp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'側ショートアーム1.5Kbp、5'側ロングアーム8Kbp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シ

オンで導入した。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, およびサザンプロテイングによりノックアウト ES 細胞を探索した。

・ノックインマウスの作製：得られた 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。最終的に、得られたヘテロマウスがジャームラインに入っていることを確かめ、交配によりパーキンを欠損し、代わりに GFP を導入したホモマウスを作製した。

2) 生化学的方法

パーキンのユビキチンリガーゼとしての酵素活性を指標に、内在性の阻害タンパク質および活性化タンパク質の探索を行った。パーキンのユビキチンリガーゼ活性は、自己ユビキチン化およびモデル基質として Synphilin-1 を用いた。Western-blot は、定法に従って行った。

E. 研究結果

[研究1] パーキンの発生工学的機能解析。

12個のエクソンからなるパーキン遺伝子のエクソン2を欠損させたノックアウトマウスを作製した。この遺伝子改変マウスは、エクソン2のはじめの5塩基に Green Fluorescence Protein (GFP) の cDNA をインフレームで連結したノックインマウスである。当初の予想に反して、作製したパーキン欠損マウスは行動異常を全く示さず、また中脳および他の脳の形態学的所見においても、ニューロンの変性・脱落を含む異常は、ほとんど観察されなかった。

また、これまでパーキンの候補基質として



報告されてきた  $\alpha$  Synuclein, Synphilin-1, CDCrel-1, Pael R, Cyclin E 等についてマウス中脳の抽出物を用いて調べた結果、パーキン欠損マウスにおいて有意な変動は見られなかった。

このようにパーキン欠損マウスにおいて、既報の Parkin の基質の蓄積やドーパミンニューロンの脱落は観察されず行動異常等を含む顕著な表現型を示さなかったため、現在、PET を用いた解析や、様々なストレス負荷の影響などについて詳細に解析中である。その結果、予備的な結果であるが、ドーパミン代謝に関与する分子系列に欠陥のあることが示唆された。今後、これらのパーキン欠損マウスを用いて、生体内におけるパーキンの病態生理学的研究を推し進めていく計画である。

#### 〔研究2〕パーキンの活性調節機構。

われわれは常染色体劣性若年性パーキンソン症候群 (AR-JP) の責任遺伝子 (PARK2) 産物パーキンがユビキチンリガーゼであることを明らかにした。一方最近、われわれはパーキンの活性調節機構に関する研究を行ってきた。その結果、パーキンのユビキチンリガーゼ活性を負に制御する新しいタンパク質分子として 14-3-3 $\eta$  (脳に豊富に存在する多機能性のシャペロン様分子で Lewy Body の構成因子の一つ) の同定に成功した。実際マウス脳ライゼートを用いた免疫沈降実験の解析から、パーキンが 14-3-3 $\eta$  と物理的に結合していることを明らかにした。パーキンは N 端側に UBL ドメイン、C 端側に RING1-IBR-RING2 ドメイン (RING-Box: E3 としての触媒領域)、そして両ドメインを連結するリンカー領域から構成されている。14-3-3 $\eta$  は、主にパーキンのリンカー領域と結合することを見出した。興味深いことに、AR-JP 患者由来のミスセンス変異を持つパーキン<sup>K161N</sup> (リンカー領域に変異) は 14-3-3 $\eta$  との結合能を完全に失っていた。そして 14-3-3 $\eta$  が結合すると、パーキンの自己ユビキチン化活性および Synphilin-1 (パーキンの既知基質) を標的としたポリユビキチン化活性は完全に抑制された。この結果、14-3-3 $\eta$  はパーキンの活性阻害因子であることが判明した。さらに 14-3-3 $\eta$  と高親和性を有して結合しパーキンの活性阻害を解除する因子として  $\alpha$  シヌクレイン (常染色体優性の家族性パーキンソン病の責任遺伝子 PARK1 の翻訳産物) の同定にも成功した。そしてパーキンソン病患者由来の変異  $\alpha$  シヌクレイン<sup>A30P</sup> あるいは  $\alpha$  シヌクレイン<sup>A53T</sup> は、この 14-3-3 $\eta$  によるパーキンの阻害抑圧活性を完全に喪失していた。今回、このようにパーキンのユビキチンリガーゼ活性が 14-3-3 $\eta$  と

$\alpha$  シヌクレインによる正負の活性調節因子で巧妙に制御されていることを見出した。パーキンと 14-3-3 $\eta$  は in vitro 及び in vivo で直接結合するが、14-3-3 $\eta$  と  $\alpha$  シヌクレインの結合は in vivo では観察されるもののリコンビナントタンパク質を用いた in vitro での結合実験では検出できないことから、われわれはこの相互作用には  $\alpha$  シヌクレインの修飾が必要であると考えている。いずれにしても 14-3-3 $\eta$  は二つのパーキンソン病の責任遺伝子産物パーキンと  $\alpha$  シヌクレインを連結させるユニークな調節因子と考えることができる。現在、この調節機構の破綻によってパーキンソン病が発症する可能性について検討中である。

#### 〔研究3〕品質管理ユビキチンリガーゼ CHIP の機能解析。

CHIP は Hsp70 や Hsp90 と会合し、これらの分子シャペロンが捕捉した変性タンパク質を選択的にユビキチン化するリガーゼである。Hsp70 の作用には Hsp40 のようなコシャペロンが必要であるが、われわれはニューロン特異的な Hsp70 を CHIP の新規パートナー (コシャペロン) 分子として同定した。また CHIP が DRiPs (フォールディングに失敗したタンパク質の急速分解) に関係していることも突き止めた。そして CHIP のノックアウトマウスを作製した結果、CHIP 欠損マウスは失調性歩行異常の症状を呈し神経細胞の機能異常が示唆された。

#### 〔研究4〕オートファジー (自食作用) の遺伝学的機能解析。

オートファジー (自食作用) はオートファゴソーム (自食胞: 細胞成分を取り込んだ二重膜小胞) による標的成分の取り囲みの形成機構であり、その後リソソーム/液胞と融合して内容物を分解する細胞内のタンパク質分解機構である。最近、オートファゴソーム形成に関する Atg システム (ユビキチン類似のタンパク質修飾機構) が発見され、注目されている。われわれは、この Atg システムの活性化因子 Atg7 の条件的ノックアウトマウスの作製に成功した。そして肝臓やニューロンなどの非分裂細胞でオートファジーを欠損させると、ユビキチン化タンパク質の凝集体が細胞内に大量に集積するという驚くべき結果を得た。

#### F. 考察

ニューロンにおいては、タンパク質の品質管理を担うための複数のタンパク質分解装置が完備されていることが分かった。それは、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系である。前者において重要な役割を担

っているのは、パーキンや CHIP などわれわれが提案した「品質管理リガーゼ」であると考えられる。しかし、パーキンの遺伝学的機能解析、即ちパーキン欠損マウスがほとんど表現型を示さないという予期しない結果を得た。しかしこの結果は、パーキンの機能を補完・代替する酵素が存在することよりも、ARJP が常染色体劣性の変異であることを考えると、パーキンと連携してその機能に影響する別の機構が存在し、それが時間依存的なドーパミンニューロン死を誘起させる可能性を示唆していると考察される。次年度以降、この未知機構の解明に取り組んでいきたい。

さらに CHIP の欠損が神経異常を誘起することやオートファジー（自食作用）を条件的に欠失させるとユビキチン陽性の封入体が蓄積することを考え合わせると、他のタンパク質分解系の破綻という複合要素が絡み合って最終的なニューロン死に至るという道筋も考えられるので併せて検討していきたい。

#### E. 結論

細胞内のタンパク質は生合成（転写翻訳）・フォールディング（立体構造形成）の誤謬や環境ストレスの負荷などによって不断に傷害を受けている。これらの異常タンパク質が長期間にわたって細胞内に蓄積すると、凝集し封入体などを形成して細胞毒性を示すようになり、最終的に組織変性を引き起こす。これらの異常タンパク質は、通常、分子シャペロンの作用でリフォールディングされ機能タンパク質に変換されるが、再生不能に陥った場合には、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系を中心としたタンパク質分解装置によって破壊されることが判明した。ニューロンのような非分裂細胞では、この品質管理機構が細胞の恒常性維持に必須であり、最近この品質管理システムの破綻が神経細胞のアポトーシスを誘導する原因となり、この状態が長期的に持続すると神経変性に至ることが明らかとなってきた。パーキンは、ドーパミンニューロンにおける品質管理に係わる最も重要な酵素と考えられるが、その機能は複数のパスウェイとの関連性で討議すべきであることが判明した。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S.

J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 11, 365-370.

Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K. (2004) A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* 23, 1977-1986.

Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E. H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., and Shirakawa, M., (2004) Structural basis for distinct roles of Lys 63- and Lys 48-linked polyubiquitin chains. *Genes to Cells* 10, 865-875

Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004) Physical and functional interaction between Dofin and VCP that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.*, 279, 51376-51385.

Yoshida, Y., Fukuya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. *EMBO Rep.* in press

Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, and Nukina N. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem.* in press

Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K., and Hanaoka, F., UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* in press

##### 2. 学会発表

Keiji Tanaka: The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on "Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases", 2004.5.16-21, Jerusalem (Israel)

Keiji Tanaka: Ubiquitin ligases linked to neurodegeneration. FASEB Summer Conference. 2004.6.26 - 7.1, Vermont,

U.S.A

Keiji Tanaka : Ubiquitin-Proteasome System  
Normal Function and Outcome of its  
Dysfunction in Neurodegeneration. 12th  
International Winter Conference on  
Neurodegeneration. 2004.11.29 - 12.2,  
Kyoto.

Keiji Tanaka : Cellular apparatus responsible  
for the protein quality control in cells.  
The 27th Annual Meeting of the Molecular  
Biology Society of Japan, 2004.12.8 - 11,  
Kobe

6. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

パーキンソン病におけるパエル受容体の役割

研究代表者：高橋良輔 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー

**研究要旨** パーキンの基質蛋白質であるパエル受容体 (Pael-R) の病態生理学的役割を明らかにするため、Pael-R を神経細胞に過剰発現するトランスジェニックマウスと Pael-R を欠損するノックアウトマウスを作製し、解析したところ、線条体のドーパミンレベルが前者では増加、後者では減少し、行動学的実験及び電気生理学的解析でも、ドーパミンの増減に一致する変化が観察された。以上より、Pael-R が黒質線条体経路のドーパミン代謝を正に制御する役割を持つものと考えられる。

**A. 研究目的**

パーキンソン病(PD)は高齢者に多い神経変性疾患であり、その克服は急務である。我々が家族性 PD の病因遺伝子パーキンの基質蛋白質として同定した Pael-R の生理的役割を明らかにすることで、新たな PD の治療法を開発する。

**B. 研究方法**

常法に従って Pael-R の exon 1 を欠損するノックアウト (Pael-R-KO) マウスとプリオンプロモーター制御下にヒト Pael-R を過剰発現するトランスジェニックマウス(Pael-R-Tg)を作製し、神経化学的、行動学的解析を加えた。実験は内規に従い、動物倫理に配慮して行なった。

**C. 研究結果**

Pael-R-Tg では線条体のドーパミン量が 20%増加していたのに対し、Pael-R-KO では 40%減少していた。それに対応してオープンフィールドテストでは Pael-R-Tg で活動性が亢進していたのに対し、Pael-R-KO では減少傾向であった。

線条体の電気生理学的解析もドーパミン量の変化に一致する所見であった。

**D. 考察**

Pael-R の量的変化がドーパミン量の変化をもたらしたことは Pael-R が黒質ドーパミンニューロンに高度に発現することに一致する事実である。

**E. 結論**

Pael-R が黒質線条体経路のドーパミン代謝を正に制御する役割を持つ。

**F. 研究発表**

1. 論文発表

Urushitani M, et al. *J. Neurochem.*, 90,231-44, 2004.  
Tateno M, et al. *Hum. Mol. Genet.*, 13, 2183-2196, 2004

2. 学会発表

I mai Y, et al. The essential role of Parkin-associated endothelin receptor-like (Pael) receptor in the dopamine metabolism of the nigrostriatal system. 北米神経科学学会、サンディエゴ、2004

**H. 知的財産権の出願・登録状況**