

**Fig. 3** Effects of overexpression of parkin on Mn- or Mn plus DA-induced cell death of SH-SY5Y and Neuro-2a cells. SH-SY5Y cells (a and e) and Neuro-2a cells (b and f) were transiently transfected with a parkin cDNA expression vector (*parkin*) or empty vector (*cont.*) together with a plasmid expressing the  $\beta$ -galactosidase gene using lipofection. At 24 h after transient transfection, cells were treated with 800  $\mu$ M Mn (a and b) or Mn plus DA (e, 100  $\mu$ M Mn plus 100  $\mu$ M DA for SH-SY5Y cells; f, 200  $\mu$ M Mn plus 50  $\mu$ M DA for Neuro-2a cells) for further 24 h, and then  $\beta$ -galactosidase-positive cells were stained. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and represent the percentages of  $\beta$ -galactosidase-positive cells in untreated empty control vector transfectants. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  compared with untreated empty control vector-transfected, + $p < 0.01$ , ++ $p < 0.001$  compared with treatment-matched empty vector-transfected cells. SH-SY5Y cells (c) and Neuro-2a cells (d) were treated with various doses of Mn plus DA for 24 h using empty Lipofectin, and cell viability was measured. Each value is mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) expressed percentage of surviving cells relative to the number in untreated group. § $p < 0.01$ , §§ $p < 0.001$  compared with untreated cells; ¶ $p < 0.001$  compared with the group treated with DA alone; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.001$  compared with each Mn alone-treated group.

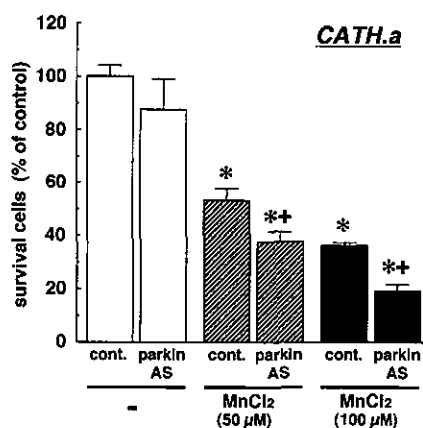
–16.75% of control, respectively) by transfection with antisense parkin cDNA expression vector (Fig. 4).

## Discussion

It has been reported that chronic Mn intoxication in human results in bradykinesia, rigidity and tremor, symptoms typical of PD, and lead to marked degeneration of DA neurons in the SN in monkey (Gupta *et al.* 1980; Huang *et al.* 1989). Furthermore, Mn induces dopaminergic cell death through activation of ER stress-associated genes (Chun *et al.* 2001). In the present study, we examined the effects of Mn exposure on the cell viability and the expression of ER stress-associated genes in dopaminergic SH-SY5Y cells and CATH.a cells as an *in vitro* model of the Mn-induced parkinsonism and also used Neuro-2a cells as a non-dopaminergic control. Mn dose-dependently induced cell death of dopaminergic SH-SY5Y and CATH.a cells and cholinergic Neuro-2a cells. Moreover, Mn increased the expression of ER chaperones, Bip and PDI, and activation of

caspase-12 in both dopaminergic cells, but not in non-dopaminergic cells. These results suggest that Mn induced cell death of dopaminergic cells via ER stress. Several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease are thought to be associated with ER stress (Imaizumi *et al.* 2001; Kouroku *et al.* 2002). Parkin was recently reported to be increased by unfolded protein stress, which contributes to ER stress in SH-SY5Y cells (Imai *et al.* 2000). Therefore, changes in expression of parkin protein were also examined after the Mn treatment. As well as expression of ER chaperones, expression levels of parkin were also significantly increased after the treatment with Mn in dopaminergic CATH.a and SH-SY5Y cells. Whereas expression of these indices in non-dopaminergic Neuro-2a cells were not increased by even high dose of Mn, suggesting that Mn induces ER stress and parkin expression, especially in dopaminergic cells.

The ER stress response leads to increase in ER chaperones such as Bip and PDI to counterbalance the accumulation of unfolded proteins in ER. In human brain, the parkin protein



**Fig. 4** Effects of transfection with antisense parkin on Mn-induced cell death of CATH.a cells. CATH.a cells were transiently transfected with an antisense parkin cDNA expression vector (parkin AS) or control vector expressing scrambled sequences (cont.) using lipofection. At 24 h after the transfection, cells were treated with 50 or 100  $\mu\text{M}$  Mn for 24 h, and then cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$ ) and represent the percentages of trypan blue-exclusion (live) cells in untreated control vector transfectants. \* $p < 0.001$  compared with each untreated cells, + $p < 0.05$  compared with treatment-matched control vector-transfected cells.

is detected in the cytosol and Golgi fractions (Shimura *et al.* 1999). Furthermore, parkin protein is also distributed in the cell bodies and cell processes, and is localized in the perinuclear region together with TRITC-WGA signal of Golgi complex (Kubo *et al.* 2001). Immunostaining using anti-parkin antibody revealed the effects of Mn on subcellular localization of parkin in SH-SY5Y and Neuro-2a cells. In non-treated both cell lines, parkin protein was diffusely distributed in the cytosolic perinuclear region along the cell processes and cell bodies similar to the distribution of Golgi complex, as reported previously (Kubo *et al.* 2001; Junn *et al.* 2002). Treatment with Mn resulted in dramatic accumulation of parkin protein in dopaminergic SH-SY5Y cells and its redistribution to the perinuclear region, especially aggregated Golgi complex, while neither expression nor redistribution of parkin was altered after Mn exposure in non-dopaminergic Neuro-2a cells. Overexpression of parkin has been reported to form aggresome-like perinuclear inclusion in the presence of proteasome inhibitor and to suppress unfolded protein stress-induced cell death (Imai *et al.* 2000; Junn *et al.* 2002). Considered together, we hypothesized that Mn-induced increase in the expression and redistribution of parkin in aggregated Golgi complex seems to protect cells from Mn-induced dopaminergic cell death.

A great number of unfolded proteins in ER is degraded by the ubiquitin-proteasome system, which is known as ER-associated degradation (Hampton 2002). Parkin acts as ubiquitin ligase to ubiquitinate its several substrates (Shimura *et al.* 2000; Imai *et al.* 2001). Unexpectedly, we observed

no changes in proteasome activity examined, chymotrypsin-like activity or post-glutamyl peptidase-like activity, in both SH-SY5Y and Neuro-2a cells after Mn exposure in the present study. These resulting data indicate that Mn exposure induces ER stress and aggregation of parkin-positive Golgi complex in dopaminergic cells, but may not affect proteasome function of either dopaminergic or non-dopaminergic cells.

We postulated a possible mechanism that induction and accumulation of parkin protein are dopaminergic cell-specific compensatory reactions to prevent or attenuate Mn-induced cell death. In the present study, transient transfection with parkin expression vector significantly inhibited Mn-induced cell death of dopaminergic SH-SY5Y and CATH.a cells, but not cell death of Mn-treated non-dopaminergic Neuro-2a cells. These results suggest that overexpression of parkin is essential for suppression of Mn-induced dopaminergic cell death. Furthermore, transfection with antisense parkin cDNA aggravated Mn-induced dopaminergic cell death. Extrapolation of these results suggests that parkin may be involved in the protective systems against Mn-induced parkinsonism.

It has been reported that non-toxic concentration of Mn enhances DA- or L-DOPA-induced neuronal cell death (Migheli *et al.* 1999; Stokes *et al.* 2000), and that Mn stimulates DA autoxidation and DA-quinone formation (Donaldson *et al.* 1982; Migheli *et al.* 1999). In both SH-SY5Y and Neuro-2a cells examined in the present study, treatment with a non-toxic dose of DA and low dose of Mn markedly caused and significantly enhanced Mn-induced cell death. We previously reported that toxicity of more higher dose of DA in SH-SY5Y cells is due to extracellular autoxidation of DA, as DA transporter blocker failed to protect cells from DA-induced toxicity (Haque *et al.* 2003). Therefore, extracellular autoxidation of DA through, in part, free radical or quinone generation may enhance Mn toxicity in both SH-SY5Y and Neuro-2a cells examined in the present study. Furthermore, overexpression of parkin attenuated Mn plus DA-induced cell death in dopaminergic SH-SY5Y cells, but not in non-dopaminergic Neuro-2a cells, although Mn plus DA produced cell death in both cell lines. These results suggest that the protective effect of parkin on Mn-induced dopaminergic cell death is not associated with the extrinsic extracellular DA but other intrinsic molecule(s) in the dopaminergic cells. Furthermore, these results in the parkin overexpression strongly support our hypothesis that induction and accumulation of parkin are compensatory reactions, especially in dopaminergic cells, to ameliorate Mn-induced cell death.

Mutations of parkin gene cause neurodegeneration specifically in the SN, although parkin is expressed not only in the SN but also in several brain regions (Shimura *et al.* 1999; Wang *et al.* 2001). In monkeys, Mn intoxication leads to impairment of the nigrostriatal dopaminergic system (Olanow *et al.* 1996). Especially in the dopaminergic cells, but

not in the non-dopaminergic cells, we demonstrated that Mn increased the expression of parkin as well as ER chaperones and resulted in the redistribution of parkin in the aggregated Golgi complex, and that overexpression of parkin prevented Mn-induced cell death. Although parkin can ubiquitinate its potential substrates (Shimura *et al.* 2000; Imai *et al.* 2001), the reported interaction of parkin with those substrates was not specific in dopaminergic neurons. Therefore, the parkin expression on aggregated Golgi apparatus in Mn-treated dopaminergic cells implies a specific involvement of parkin in dopaminergic cell death, and the protective effect of parkin on Mn-induced dopaminergic cells death may involve overexpression and redistribution of parkin. Parkin forms aggresome-like perinuclear inclusion in the proteasome dysfunction (Imai *et al.* 2000; Junn *et al.* 2002). In the present study, Mn induced ER stress and aggregation of parkin-positive Golgi complex in dopaminergic cells, but it showed no alteration in proteasome activities examined. These results suggest that parkin exerts some dopaminergic cell-specific effects which are not related to the ubiquitin-proteasome system in the case of Mn-induced dopaminergic cell death, although further examination will be required to clarify the detail mechanism of ameliorating effects of parkin against Mn-induced toxicity.

### Acknowledgements

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health, Comprehensive Research on Aging and Health, and Research on Pharmaceutical and Medical Safety from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, and by Grants-in-Aid for Scientific Research (C) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

### References

- Barbeau A. (1984) Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicology* **5**, 13–35.
- Choi P., Ostrerova-Golts N., Sparkman D., Cochran E., Lee J. M. and Wolozin B. (2000) Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system. *Neuroreport* **11**, 2635–2638.
- Chun H. S., Lee H. and Son J. H. (2001) Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. *Neurosci. Lett.* **316**, 5–8.
- Donaldson J., McGregor D. and LaBella F. (1982) Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **60**, 1398–1405.
- Gupta S. K., Murthy R. C. and Chandra S. V. (1980) Neuromelanin in manganese-exposed primates. *Toxicol. Lett.* **6**, 17–20.
- Hampton R. Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 476–482.
- Haque M. E., Asanuma M., Higashi Y., Miyazaki I., Tanaka K. and Ogawa N. (2003) Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 39–52.
- Higashi Y., Asanuma M., Miyazaki I., Haque M. E., Fujita N., Tanaka K. and Ogawa N. (2002) The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 42224–42232.
- Higashi Y., Asanuma M., Miyazaki I. and Ogawa N. (2000) Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells. *J. Neurochem.* **75**, 1771–1774.
- Huang C. C., Chu N. S., Lu C. S., Wang J. D., Tsai J. L., Tzeng J. L., Wolters E. C. and Calne D. B. (1989) Chronic manganese intoxication. *Arch. Neurol.* **46**, 1104–1106.
- Imai Y., Soda M. and Takahashi R. (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 35661–35664.
- Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y. and Takahashi R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891–902.
- Imaizumi K., Miyoshi K., Katayama T., Yoneda T., Taniguchi M., Kudo T. and Tohyama M. (2001) The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1536**, 85–96.
- Junn E., Lee S. S., Suhr U. T. and Mouradian M. M. (2002) Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. *J. Biol. Chem.* **277**, 47870–47877.
- Keller J. N., Hanni K. B. and Markesbery W. R. (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **75**, 436–439.
- Kouroku Y., Fujita E., Jimbo A. *et al.* (2002) Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1505–1515.
- Kubo S. I., Kitami T., Noda S. *et al.* (2001) Parkin is associated with cellular vesicles. *J. Neurochem.* **78**, 42–54.
- Liou H. H., Tsai M. C., Chen C. J., Jeng J. S., Chang Y. C., Chen S. Y. and Chen R. C. (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* **48**, 1583–1588.
- Migheli R., Godani C., Sciola L., Delogo M. R., Serra P. A., Zangani D., De Natale G., Miele E. and Desole M. S. (1999) Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* **73**, 1155–1163.
- Olanow C. W., Good P. F., Shinotoh H., Hewitt K. A., Vingerhoets F., Snow B. J., Beal M. F., Calne D. B. and Perl D. P. (1996) Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology* **46**, 492–498.
- Parenti M., Rusconi L., Cappabianca V., Parati E. A. and Groppetti A. (1988) Role of dopamine in manganese neurotoxicity. *Brain Res.* **473**, 236–240.
- Racette B. A., McGee-Minnich L., Moerlein S. M., Mink J. W., Videen T. O. and Perlmuter J. S. (2001) Welding-related parkinsonism: clinical features, treatment, and pathophysiology. *Neurology* **56**, 8–13.
- Rodier J. (1955) Manganese poisoning in Moroccan miners. *Br. J. Ind. Med.* **12**, 21–35.
- Roman G. C. (1998) Gene-environment interactions in the Italy-Argentina 'Colombo 2000' project. *Funct. Neurol.* **13**, 249–252.
- Schlossmacher M. G., Frosch M. P., Gai W. P. *et al.* (2002) Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* **160**, 1655–1667.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S. *et al.* (1999) Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Ann. Neurol.* **45**, 668–670.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S. *et al.* (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, 302–305.
- Smargiassi A., Mutti A., De Rosa A., De Palma G., Negrotti A. and Calzetti S. (1998) A case-control study of occupational and envi-

- ronmental risk factors for Parkinson's disease in the Emilia-Romagna region of Italy. *Neurotoxicology* **19**, 709–712.
- Stokes A. H., Lewis D. Y., Lash L. H., Jerome W. G. I., Grant K. W., Aschner M. and Vrana K. E. (2000) Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: role of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. *Brain Res.* **858**, 1–8.
- Tomas-Camardiel M., Herrera A. J., Venero J. L., Cruz Sanchez-Hidalgo M., Cano J. and Machado A. (2002) Differential regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats. *Mol. Brain Res.* **103**, 116–129.
- Wang M., Suzuki T., Kitada T., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Tanaka K., Mizuno Y. and Hattori N. (2001) Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme, in rat brain. *J. Neurochem.* **77**, 1561–1568.

## パーキンソン病の発症機序： 孤発型パーキンソン病研究から家族性パーキンソン病研究へ

服部 信孝

(臨床神経, 44: 241-262, 2004)

### 序. パーキンソン病の原因を究明に向けて

日本神経学会賞を受賞でき心より感謝するとともにこの賞の重みを感じつつ私どもが推進してきた「パーキンソン病(PD)の発症機序」に関する研究について、今までの順天堂大での研究成果を振り返り、そして21世紀には何をしなければいけないのかを探りながら特別論文として寄稿したい。私がパーキンソン病の研究テーマを水野美邦教授に与えていただいたのは平成元年である。順天堂大は初代教授植林博太郎先生の時代からわが国でもPD患者が多い屈指の病院として有名であった。正直いって、研究を始める当時、あまりにもPD患者が多く生化学には興味はあったものの神経免疫疾患を研究テーマとして研究に従事していた。水野教授が赴任され神経変性疾患も分子生物学的アプローチが必要であると唱えられ、PD発症の機序に関する研究がスタートした。私は大学院に入学し、水野教授より分子生物学の手ほどきを受けた。回診の合間にミトコンドリアDNAの抽出や免疫組織化学的検討などを大変貴重な時間をとっていただき1つ1つ丁寧に直接指導していただいた。更に水野教授よりミトコンドリア機能異常とPDについての研究を進展させるよう名古屋大生化学第2教室に国内留学させていただいた。この研究生生活の経験は大変貴重なものであった。分子生物学の考え方、そしてアプローチの仕方など小澤高将教授、田中雅嗣助教授、鈴木寛講師に鍛えていただいた。再度自分の研究生生活を振り返ってみると多くの恵まれた指導者に巡り会うことができた。この名古屋大学時代はむしろデータがまったく出ない冬の時代であったが、名古屋大時代の研究テーマが、後に慶應義塾大の清水信義教授にご教授を受ける機会を与えてくれた。そして常染色体劣性遺伝性パーキンソンニズムのパイオニアである山村安弘先生との出会いなど多くの恩師に出会い、そして仕事を進展させることができた。

研究は、十分な成果をもたらしているとはいいいがたく、やっとメカニズムの一端が明らかになったに過ぎない。高齢化社会に突入した今世紀は、神経難病克服の時代といわれている。

実際、加齢が危険因子であるPDやアルツハイマー病(AD)は今後益々増加する可能性が高く、その予防・治療方法の確立は焦眉の急である。現在PDは10万人当たり100以上の罹患率で、ADに次いで頻度の高い神経変性疾患である。L-dopa療法の発見以来その予後は劇的に改善されつつある一方で、L-dopaの治療経験が積み重ねられるにしたがい長期治療の副作用の問題が明らかにされた。しかしながら、依然として副作用の問題は克服できていない。とくにPDは50~60歳に発症する患者も多く、その臨床症状は中高年者の生活レベルを低下させるため、大きな社会問題となる要因を孕んでいる。根本治療の開発は不可欠であり、そのために、一次的要因を明らかにすることが最重要課題となっている。われわれは根本治療の開発とくに神経保護作用の薬物治療の開発に向けて10数年来研究をおこなってきた。その研究成果のなかでPDの黒質変性にミトコンドリア機能低下とくに電子伝達系複合体Iの機能低下を報告した。更にこのミトコンドリア研究のなかで常染色体劣性遺伝型を示す家族性PDの原因遺伝子parkinの単離に成功した。単一遺伝子異常にともなう疾患から孤発型疾患へのアプローチはADでもおこなわれており、家族性ADには3種の原因遺伝子が単離され、いずれの遺伝子もアミロイド蛋白の蓄積をひきおこす。遺伝性PDにおいても、病態は共通カスケードを形成している可能性があり、原因遺伝子産物の機能研究が共通メカニズムの解明に繋がる。本論文では、私が水野神経学教室でおこなってきた研究成果について解説したい。

### I. 孤発型PDにおけるミトコンドリア研究

#### (1) PDにおけるミトコンドリア機能異常

PDにおけるミトコンドリア機能低下の発見は、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)によるパーキンソンニズムの報告によるところが大きい。このMPTPがミトコンドリア機能低下を惹起させることがわかり、PDにおけるミトコンドリア機能低下が注目されるようになった。その後PDの剖検脳においてミトコンドリア電子伝達系の複合体

Table 1 Mitochondrial DNA polymorphisms in Parkinson's disease (10 patients)

PD case	Region	Position (n.p.)	Gene	Nucleotide change	Amino acid change
1	Protein-coding gene	4824	ND2	A → G	Thr → Ala
		8794	ATP6	C → T	His → Tyr
	rRNA	663	12SrRNA	A → G	
		1736	16SrRNA	A → G	
		2151	16SrRNA	A → G	
2	Protein-coding gene	14180	ND6	T → C	<u>Tyr → Cyt</u>
	tRNA	15951	tRNA (Thr)	A → G	
3	Protein-coding gene	5301	ND2	A → G	Ile → Val
		12026	ND4	A → G	Ile → Val
	rRNA	752	12SrRNA	C → T	
		1107	12SrRNA	T → C	
		1310	12SrRNA	C → T	
4	Protein-coding gene	4602	ND2	A → G	Thr → Ala
		12358	ND5	A → G	Thr → Ala
	tRNA	4386	tRNA (Gln)	T → C	
5	Protein-coding gene	12358	ND5	A → G	Thr → Ala
		15071	Cytb	T → C	<u>Tyr → His</u>
6	rRNA	1884	16SrRNA	A → G	
	tRNA	4343	tRNA (Gln)	T → C	
		15916	tRNA (Thr)	T → G	
7	Protein-coding gene	4833	ND2	A → G	Thr → Ala
		9165	ATP6	T → C	Phe → Leu
	rRNA	822	12SrRNA	G → T	
		5601	tRNA (Ala)	C → T	
		12311	tRNA (Leu)	T → C	
8	rRNA	2772	16SrRNA	C → T	
	tRNA	4386	tRNA (Gln)	A → G	
9	Protein-coding gene	8764	ATP6	G → A	Ala → Thr
		11255	ND4	T → C	<u>Tyr → His</u>
		13934	ND5	C → T	Thr → Met
10	rRNA	827	12SrRNA	A → G	

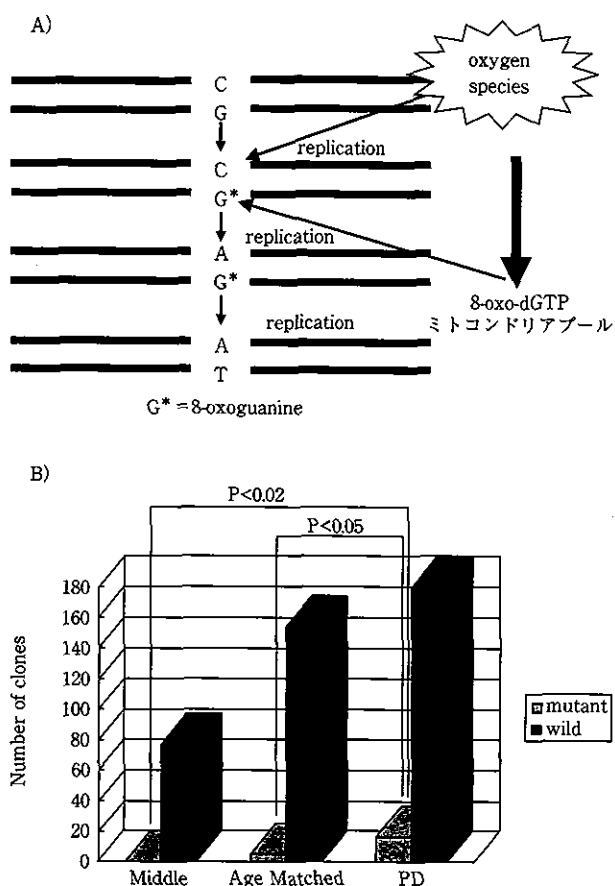
パーキンソン病 10 例にみとめられた polymorphism. Underline は活性化酸素種の攻撃を受けやすいアミノ酸に置換されたものを示す。

I 酵素活性の低下が証明された。われわれは剖検脳をもちいて電子伝達系複合体 I のサブユニットが低下していることを Western blot や免疫組織化学的アプローチで証明した<sup>12)</sup>。また酵素活性の検討ではリンパ球をもちいてもミトコンドリア電子伝達系の酵素活性が低下していることがわかった<sup>3)</sup>。更にわれわれはクエン酸回路 (TCA 回路) の律速酵素と考えられている  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体 ( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex ; KGDHC) に対する抗体をもちいた免疫組織化学的検討で、PD 患者剖検脳において KGDHC も低下していることを示した<sup>4)</sup>。このミトコンドリア機能低下は、現在では二次的要因として認識されているが、細胞死のカスケードとしてアポトーシスの関与が神経変性疾患でも指摘されており、この細胞内小器官は重要な役割をなしていることはまちがいない。後述するプロテアソーム系は、ATP 依存性のプロテアーゼであり、ミトコンドリアのアポトーシスへの関与もふくめて単に呼吸鎖の低下にとどまらず、他の反応系への影響もこの系の低下により避けられないことはまちがいない。

(2) PD のミトコンドリア遺伝子における欠失および点変異先にふれたようにミトコンドリアは加齢因子の重要な因子

であり、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の体細胞変異の蓄積が加齢過程や退行性病変において重要な役割をなしていることが推定されており、また多くの確証が存在する。この体細胞変異は、悪性腫瘍や糖尿病においてもその蓄積が報告されている<sup>5)</sup>。

体細胞変異の代表格としては、mitochondrial DNA (mtDNA) の約 5kb の欠失がある。この欠失は、PD、対照患者の全例でみとめられるが、半定量をおこなうと PD で欠失 mtDNA の蓄積は多く、その蓄積は部位特異性があり前頭葉より線条体で顕著であった<sup>6)</sup>。この体細胞変異の蓄積に、germ line 上におけるミトコンドリア遺伝子型がかかわっている可能性がある。そこで PD 患者 5 例の mtDNA 全配列を決定したところ、合計 55 カ所に変異をみだし、哺乳類の間で保存されているアミノ酸の置換をひきおこす変異が複数観察された<sup>7)</sup>。更に 10 例まで拡大して解析したところ、3 例のパーキンソン病患者では、ND4 遺伝子に Tyr を His に置換する変異と ND6 遺伝子に Tyr を Cys に置換する変異がみだされた (Table 1)<sup>8)</sup>。複合体 I のサブユニットではないが Cytb 遺伝子に Tyr から His に置換する変異をみとめた。この His や Cys は活性化酸素種の侵襲に感受性が高いといわれ



**Fig. 1** A : 8-oxo-dG は dNTP pool の 8-oxo-dGTP を strand に取り込んでも変異原性となる。8-oxo-dG は C 以外に A ともペアを組むので C : G → A : T transition を生じさせる。B : mtDNA は多重遺伝子なので数コピー存在するような変異 mtDNA を決定することは難しい。Proof reading activity のある Pfu polymerase を使い、T vector に cloning して塩基配列を決定した。変異 mtDNA は少なかったが、その頻度は PD で有意に高かった。ターゲットした領域は ND1 で、この部位では複製の際、長い時間一本鎖 DNA の状態で活性酸素種に曝されることが予想される。

ており、これら遺伝子多型による蛋白は、ラジカル脆弱性をもたらすものと予想される。

Shoffner らは tRNAGln における A-to-C transition が PD で有意に頻度が高かったとしているが<sup>9)</sup>、われわれは彼らの結果を再現できていない。複数種の遺伝子について検討したが有意差を示すような遺伝子多型は存在していなかった。しかしながら、百寿者 64 人と PD について cytochrome b 遺伝子多型である N260D, G251S について両群の頻度を検討してみると百寿者でその頻度が低いことを岐阜県国際バイオ研究所の田中雅嗣先生との共同研究で明らかにした<sup>10)</sup>。加齢が重要な因子である PD と健康体である百寿者での、この頻度の違いは mtDNA の variation がより少ないことが成人病に成りにくいことを示していると推定している。

### (3) ミトコンドリア遺伝子の体細胞変異の蓄積

mtDNA の複製の特徴として、体細胞変異が蓄積しやすいことは先にふれた。代表格が欠失であるが、点変異型体細胞変

異も機能異常を誘発する可能性がある。欠失にしても点変異にしても異常アミノ酸をコードする可能性がある。その結果、異常蛋白が翻訳されることが予想される。ミトコンドリアでは mtDNA と核遺伝子の両遺伝子により一つのユニットである複合蛋白を形成しているため、一個のアミノ酸の違いであっても複合蛋白間には“揺らぎ”が生じ活性酸素種の発生が増加することが予想される。ではなぜ mtDNA には体細胞変異が蓄積しやすいのか？ mtDNA の複製は非対称であり、複製終了には 60 分以上を要する<sup>11)</sup>。このことは、一本鎖 DNA の状態が OriL (軽鎖複製点) 近傍でもっとも長くなることが予想される。一本鎖 DNA は当然のことながら二本鎖 DNA より活性酸素種の攻撃に対して脆弱である。われわれは線条体 mtDNA をもちいて塩基配列の不均一性、つまり体細胞変異として蓄積した塩基置換について分析した。MtDNA を template にした PCR 中の reading error を最小限に押さえる目的で Pfu polymerase をもちい増幅断片をクローン化し、各クローンの塩基配列を決定し、変異頻度を比較した。予想よりは遥かに少なかったが全解析クローン中 8.4% に変異が観察された (Fig. 1, Table 2, 3)。一方、中年層では変異を持った mtDNA クローンは存在しなかった。注目すべきことに、これらには終止コドンを生じるナンセンス変異、tRNA の機能的重要な部位の変異がふくまれていた。これらの変異により mtDNA でコードされる遺伝子に病的な機能を獲得した蛋白質が翻訳されることが考えられる。

この体細胞変異によるアミノ酸置換は、複数のサブユニットにより形成される複合体 I では、各サブユニット間の結合に揺らぎが生じ、ミトコンドリア電子伝達系からのラジカル産生が増大することが考えられる。最近になり MNGIE で ND5 領域で欠失生じやすいとの報告があった<sup>12)</sup>。この領域は、一本鎖 strand でのいる時間帯が必ずしも長くない。われわれが考えている仮説とはことなることになるが、ある特定領域が欠失しやすいのは確かなのかもしれない。

### (4) PD における核由来ミトコンドリア関連蛋白 24-kDa subunit 遺伝子多型

複合体 I は最低 41 subunits からなる大型の蛋白であり、多くの subunit は核 DNA でコードされる。複合体 I 構成サブユニットの iron sulfur subunit の一つである 24 kDa subunit (NDUFV2) は核由来サブユニットであり、剖検脳の線条体をもちいた Western blot で蛋白量が PD 群で低下していたサブユニットである。まず福井県立大学生物資源の鈴木寛先生との共同研究で NDUFV2 の遺伝子構造をヒト肝由来 cDNA library よりスクリーニングし決定した。NDUFV2 遺伝子は染色体 18 番の短腕に位置する全長約 31.5 kb のエクソン 8 個からなる。遺伝子多型のスクリーニングの結果、NDUFV2 の signal peptide をコードしているエクソン 2 に、番号 29 番の Ala から Val に置換している遺伝子多型をみいだした<sup>13)</sup>。アレル頻度は対照群と有意差はなかったが、genotype で分析すると、ホモ接合体は PD 群で有意に高かった。この変異は、C 末端付近で α ヘリックス構造が β シート構造に変化することでミトコンドリア内でのシグナルペプチドのプロセッシング効率が低下することが推定されている。日本人で

Table 2 Summary of human mtDNA analyzed

Subject	Age	Sex	Diagnosis	A	B	C
PD patients						
P1	65	F	PD	62	4	49,600
P2	77	M	PD	60	5	48,000
P3	72	M	PD	58	5	46,400
Total						144,000
Controls						
C1	38	M	Malignant lymphoma	27	0	21,600
C2	47	F	Gastric cancer	24	0	19,200
C3	55	M	Renal failure	25	0	20,000
Subtotal				76		60,800
C4	64	M	Cervical spondylosis	37	0	29,600
C5	70	F	Laryngeal carcinoma	56	2	44,800
C6	78	M	Heart failure	61	2	48,800
Subtotal				154		123,200
Total						184,000

A, number of clones analysed ; B, number of mutant clones observed ; C, number of nucleotides analysed totally from each of individuals.

PCR産物を T-vector に cloning して塩基配列を決定した。Wild との比較で変異のクローンの数を解析した。

Table 3 Amino acids changes due to nucleotide substitutions observed in present study and its conservation among six mammalian species

Subject	Position	Amino acid change	Rat	Mouse	Bovine	Seal	Whale	Human	Patient
PD Patients									
P1	3543	Leu to Leu	L	L	L	L	L	L	L
	3316	Ala to Thr	I	I	I	I	I	A	T
P2	3316	Ala to Thr	I	I	I	I	I	A	T
	3543	Leu to Leu	L	L	L	L	L	L	L
P3	3457	Asp to Asn	D	D	D	D	D	D	D
	3497	Ala to Val	L	L	A	L	A	A	V
	3338	Val to Ala	I	V	I	I	L	V	A
	3506	Thr to Asn	S	S	S	S	S	T	N
	3467	Lys to Stop	K	K	K	K	K	K	Stop
Controls									
All clones	3316	Ala to Thr	I	I	I	I	I	A	T
	3380	Arg to Gln	R	R	R	R	R	R	Q
	3443	Leu to Pro	L	L	L	L	L	L	P
	3543	Leu to Leu	L	L	L	L	L	L	L
	3423	Val to Val	N	I	V	I	I	V	V

観察された変異の一部は mammalian で保存されているアミノ酸部位に存在し, stop codon に置換されているものがあった。

有意差をみとめたが, 白人では有意差がなく人種により結果がことなる。更に症例数を増やして検討する必要がある。

われわれは, 更にドパミン代謝に関与する Catechol-O-methyltransferase 遺伝子多型についても検討をおこなったが<sup>10)</sup>, 人種により頻度がことなり, MtDNA, 核 DNA ふくめて AD の ApoE 遺伝子の 4 型のような発症を促進させるようなリスクファクターは今のところはっきりしない。遺伝子関連分析では, 人種などによりその頻度がことなり, 評価が難しい。後述する UCH-L1 遺伝子多型だけは, 人種差を超えて保護的作用が存在する可能性がある。

(5) パーキンソン病におけるミトコンドリア遺伝子防御酵素活性酸素は mtDNA 中のデオキシグアノシン (dG) を 8-オキソデオキシグアノシン (8-oxo-dG) へ変化させる potential を持っており, 8-oxo-dG は複製の際にアデニンに誤読される。この 8-oxo-dG が, パーキンソン病患者脳で対照脳に比して, 組織特異的に黒質で有意に増加しているとの報告がある。われわれは脂質過酸化の代謝産物である 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) が, PD で有意に上昇していることを免疫組織化学的に証明しており<sup>15)</sup>, PD の病態に酸化ストレスが関与していることはまちがいないと考えている。更にこの HNE 修飾蛋白は Lewy 小体内にも存在していることが報告され



た。更に酸化ストレスのマーカーとなりうる 8-oxo-dG は核遺伝子より mtDNA で頻度が高く、かつ加齢で増加することが明らかになっている。神経細胞は分裂終了細胞であり核 DNA は複製しない。一方、mtDNA は細胞質内で複製は絶えずおこなわれている。この点に注目すると 8-oxo-dG の起源は DNA 鎖上の guanine がラジカルに攻撃されたものと dNTP pool 内にある 8-oxo-dGTP が考えられる。また誤読され複製の際にまちがって読み込まれた塩基が、アミノ酸置換をとまなう変異を誘導する可能性がある。この神経細胞の特性を考えて、われわれは、酸化ストレスによって生じる 8-oxo-dG 誘導遺伝子変異を細胞質およびミトコンドリアマトリックス存在し、防御作用を示している 8-oxo-dGTPase (MTH1) の PD における役割について九州大学大学臨床検査部康東天先生、同生体防御研究所中別府雄作先生との共同研究で検討した。ウェスタンブロットと免疫組織化学ともに MTH1 は PD 患者黒質緻密帯の神経細胞で組織特異的に増加していた<sup>16)</sup>。この MTH1 は PD 患者黒質でのみ増加しており、対照脳黒質、disease control である多系統萎縮症 (MSA) ではまったく増加していなかった。免疫組織化学はホルマリン固定パラフィン包埋中脳切片をもちい、PD 黒質緻密帯の神経細胞の細胞質が均一に染色され核に染色性はみとめられなかった。Western blot では、PD サンプルのみに 18-kDa バンドがみとめられた (Fig. 2)。8-oxo-dG についても同様に検討しており、8-oxo-dG も PD 患者黒質に特異的に増加していた。このことより、MTH1 は 8-oxo-dG 誘導遺伝子変異を防御するためにパーキンソン病患者黒質で増加しているのであろう。更に fractionation してミトコンドリア、核、cytosol に分け分布を検討したところミトコンドリアにて数倍増加していた。MTH1 には splicing variant が存在し、ミトコンドリア移行シグナルを持つものもあり単一遺伝子でありながら細胞を酸化ストレスから防御すべく核遺伝子と mtDNA の dNTP pool 内で生じた 8-oxo-dGTP を監視し、変異が生じないように作用している。ミトコンドリア分画での増加はミトコンドリア内で活性酸素種が増えていることを示している。進行性核上性麻痺の剖検脳の黒質でも検討してみたが 18-kDa の band はみとめられなかった。少なくとも黒質にかぎっては PD 特異的に発現が上昇しているといえる。MTH1 の研究成果は、PD 黒質神経細胞のミトコンドリア内で酸化ストレスがおこっているとする最初の証拠である。現在、他の DNA 修復酵素である 8-oxoguanosine DNA glycosylase (OGG1) や MYH についても PD について検討しており、PD において発現が上昇していることを突き止めた (論文投稿準備中)。ミトコンドリア内における DNA 修復酵素の上昇は変性疾患共通したメカニズムである可能性がある。

MTH1 の作用に拮抗して PD 脳で 8-oxo-dG が増加する事実は、G-to-T transition による変異の蓄積を防御するための代償的現象である可能性がもっとも高い。いいかえればミトコンドリア内で活性酸素種の発生が高いことを示しているのかもしれない。修復酵素の代償的 upregulation はいかにミトコンドリア内で活性酸素種の発生が高いかを示している。つまり有意味な変異を germ line 上の mtDNA にみとめなくとも

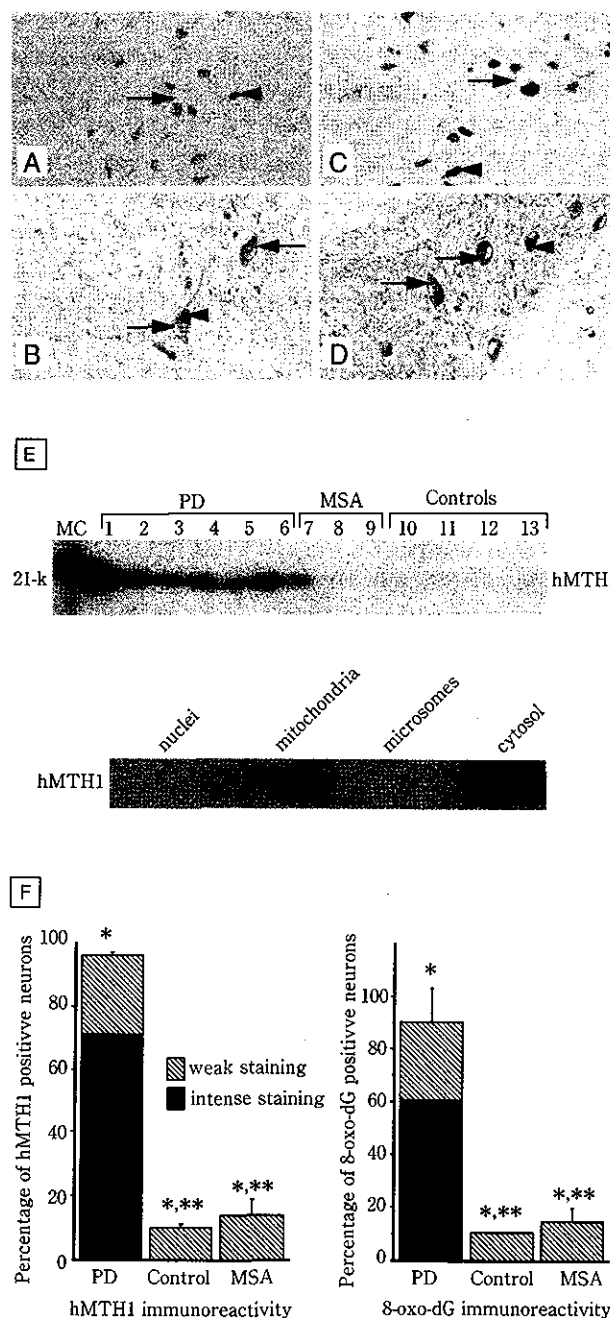


Fig. 2 A~B, 8-oxo-dG; C~D, MTH1. いずれの抗体で細胞質が染色される。E, PD のみに MTH1 のバンドが観察された。細胞分画ではミトコンドリアと細胞質に存在していた。F, 陽性細胞を定量すると PD で有意に高かった。(\* $p < 0.01$ , PD vs MSA and control; \*\* $p > 0.05$ , control vs MSA)

体細胞変異が、蓄積しうる可能性を示している。

#### (6) 今後のミトコンドリア研究の展望

PD のミトコンドリア機能低下の関与は酸化ストレスと併せて重要な誘因の 1 つであることはまちがいない。アポトーシスについても PD での関与が指摘されているが<sup>17)</sup>、アポトーシスにもミトコンドリアが関与しており、神経変性のメカニズムを考える上で、ミトコンドリアはより普遍的な細胞

活動にかかわりを持っていることは明らかである。とくに神経細胞のように分裂終了細胞では、エネルギーの産生と細胞の機能維持に重要な細胞内小器官である。一方で、ミトコンドリアは活性酸素種の主要な産生場所であり、如何にミトコンドリアの機能を維持するかが、神経変性を防ぐ上で大きな課題である。更に後述するプロテアソームの活性低下がPDで報告されている。この酵素はATP依存性プロテアーゼであり、ミトコンドリア機能低下は、このプロテアーゼの活性低下をもたらす可能性が高い。つまり蛋白分解系においてもこの系の役割は重要であることはまちがいない。神経細胞にとってミトコンドリアが重要な働きをしていることは、メンデル遺伝による家族性神経変性疾患の原因遺伝子一部にミトコンドリア関連蛋白がみいだされていることから裏付けされている。事実、Friedreich ataxiaの原因遺伝子FrataxinやWilson diseaseのcopper-transporterそしてHereditary spastic paraplegiaのparapleginはミトコンドリア関連蛋白質である。またAlzheimer病(AD)やHuntington病(HD)でもミトコンドリア電子電達系の酵素活性低下が指摘されている。HDでは、複合体II, IIIそしてaconitaseの酵素活性低下が、ADでは複合体IVの酵素活性低下が指摘されている。このように多くの変性疾患でミトコンドリア機能低下が指摘されている。したがって、ミトコンドリアは、多くの変性疾患の変性過程における共通カスケードをなしている可能性がある。このためミトコンドリア研究はPDのみならず、神経変性の共通過程を明らかにすることが可能であるし、またミトコンドリアを保護できるような薬物(Mitochondrial drug)の開発は、神経細胞死の抑制を可能にするかもしれない。老化をふくめてミトコンドリアは多くの生命現象にかかわりを持っており、今後もこの小さな細胞内小器官を中心に更なる研究の発展が望まれる。

## II. 家族性PDの発症機序の研究

### (1) 原因遺伝子Parkinの発見

われわれは、ミトコンドリア研究を推進している中で、ミトコンドリア機能異常と酸化ストレスにかかわる蛋白としてManganese superoxide dismutase (Mn SOD)に注目した。そしてMnSODのsignal peptideのVal/Ala-9に遺伝子多型をみだし、Ala多型がPD患者において有意差を持って高頻度であることを報告した<sup>18)</sup>。更にこの遺伝子多型の検討からある一家系で遺伝子多型と発症者が完全に cosegregationしていることをみだし、少なくともMn SOD近傍に常染色体劣性若年性パーキンソン症(AR-JP)の原因遺伝子が存在していることが想定された。そして連鎖解析の結果、AR-JPは6q25.1-27 (Park2)にマップされた。連鎖解析は新潟大学神経内科辻省二先生(現東京大神経内科)との共同研究で推進した<sup>19)</sup>。このAR-JPは、1973年にすでに山村らにより'Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms (EPDF)'と報告された独立性疾患であり<sup>20)</sup>。このEPDFの臨床的特徴を踏まえて連鎖解析を進め、山村安弘先生との共同研究で多数の家系で常染色体6番長腕に連鎖して

いることがわかった<sup>21)</sup>。そして偶然にも候補領域の1マイクロサテライトマーカーであるD6S305が欠失している1家系をみいだした<sup>22)</sup>。このマーカーの欠失の解釈としては、マーカーの近傍に欠失をともなった原因遺伝子が存在しているか原因遺伝子内にこのマーカーが存在していることが推定された。

若年性PDについては、早くから順天堂大の横地らにより40歳を境に通常のPDと違うことに注目していた。AR-JPについても40歳を境にその頻度は減じる傾向にあり、臨床的観察に基づきこの40歳境にした若年性PDの概念は適切なものであることが、AR-JPが6番染色体にマップされたことで証明されたことになる。横地らは、更に10歳未満で発症する瀬川病についても分類しており、分子生物学が隆盛を誇る以前より詳細な臨床研究から疾患の独立性を示していたことは臨床神経学的重要性を示している。

遺伝子座がマップされても遺伝子単離となると難航することが予想された。しかしながら、前述したようにマイクロサテライトマーカーが欠失している家系から予想に反して迅速に遺伝子単離に繋がった。遺伝子単離に慶応義塾大分子生物学清水信義先生の教室が確立していたBacterial artificial chromosome (BAC) libraryが威力を発揮したことがいうまでもない。このBAC libraryをもちいて、D6S305をふくむBACクローンを単離し、exon trappingにて候補遺伝子のexonを1つだけ単離できた。このexonをprobeにヒト胎児骨格筋cDNA libraryをスクリーニングし、その結果、原因遺伝子parkinと命名した新規遺伝子を単離することに成功した(Fig.3)<sup>23)</sup>。Parkinは全長1.4Mbの巨大遺伝子であり、進行性筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンに次いで大きな遺伝子であることがわかっている。この遺伝子構造をもとにexon-intron境界を明らかにし、polymerase chain reaction (PCR)法にて各exonを増幅し、変異解析をおこない、確かにchromosome 6に連鎖する家系でparkin遺伝子変異が存在することが確認された。単離までのプロセスとして、われわれが長い間押し進めてきたミトコンドリア関連遺伝子分析の結果として、偶然にも家族性PDの原因遺伝子単離という大きな副産物をえることができた。

AR-JPの特徴としては、1) 血縁結婚のみとめられる劣性遺伝形式をとる 2) 両親は遺伝子変異のcarrierであり、一般的にはまったく正常である 3) 発症年齢は20代が多いが、40歳を少し越える発症者も存在する 4) L-dopaを開始前より睡眠によって改善のみとめられる睡眠効果や症状の日内変動が特徴である 5) 薬物治療の開始早期よりジスキネジアやwearing offをおこしやすく、上肢より下肢優位にジストニア姿勢をみとめるのを特徴とする 6) 進行は遅く、痴呆をとまわず、自律神経症状としては発汗亢進はみとめられる 7) 深部反射は亢進していることが多いが病的反射はみとめないのを特徴とする 8) 神経病理学的には、黒質および青斑核ときわめて限局した変性を特徴とし、特筆すべきこととしてPDで特異的な封入体であるLewy小体のみとめない。以上を特徴とする。しかしながら、その後の遺伝子変異解析の結果、われわれが予想していた以上に臨床型は多岐にわ

たっており、AR-JP とは上記特徴を持つ疾患であり、上記特徴を持たない若年性パーキンソンニズムにおいても parkin 遺伝子変異が観察されることより遺伝子変異陽性症例は、

parkin-related disease とする必要がある。Park2 の名称は、あくまでもこの名称が遺伝子およびマップ名であることより不適であるとする意見がある。したがって正確には parkin-related disease とするのが最適であろう。

(2) Parkin 遺伝子の変異解析

先の連鎖解析で常染色体6番の長腕に連鎖のみとめられる日本人 AR-JP 患者の計20家系について遺伝子変異解析をおこなった。20家系の日本人家系で変異解析をおこなったところ12家系(60%)において exon そのものが欠失する exonic deletions であった<sup>29</sup>。2家系(10%)においては、exon 5 の splicing junction および Gly コドン GGT の Guanine 中から一個 guanine が欠失する one-base deletion をみとめた<sup>25</sup>。残りの家系については複合ヘテロ接合体であり、gene dosage technique でその存在を確認している。Park2 に連鎖する20家系のうち18家系については parkin 遺伝子変異を確認できた。複合ヘテロ接合体については Fluorescent in situ hybridization (FISH) で確認できている(論文準備中)。

日本人 AR-JP の患者の多くは欠失タイプを示していた。欠失タイプは様々であり、遺伝子変異の多様性を示しており、ハプロタイプからも創始者効果は否定された。欠失は exon 3~5 に集中しており、ホットスポットになっていた(Fig. 4)。われわれの研究室では、全国から AR-JP うたがいの samples が集まっているが頻度の差はあるものの、ほぼ全領域にわたって種々タイプの変異が観察された。本病型は最初本邦にのみみられる病型かと考えられたが、変異解析が進んだ結果広く世界に分布していることが明らかとなった。現在、もっとも頻度の高い遺伝性 PD の原因遺伝子であることが判明している。日本人では、点変異は少なく、欠失型が多く白人患者では点変異が日本人患者に比して多い傾向にある。変異については missense, nonsense, microdeletion, multiple exon rearrangement と様々な変異をみとめている。報告されている変異について海外データと本邦データと合わせ Fig. 4 にまとめた<sup>20-27</sup>。また同胞発症者のいない孤発型 PD についてパーキン変異の検索をおこなったところ若年発症者において変異をみとめた<sup>28,29</sup>。変異は同胞発症者のない症例でも若年発症者であると、この parkin 遺伝子に変異がみいだされる可能性は高い。

臨床症候には多岐にわたっており、通常の PD と区別つかない患者がいることがわかった。更に発症年齢についても10歳以下の症例から42歳とかなり幅がある。外国症例では64歳発症の症例もある。このように多様性が存在することがわかってきた。われわれの研究室では、約700例の若年発症の

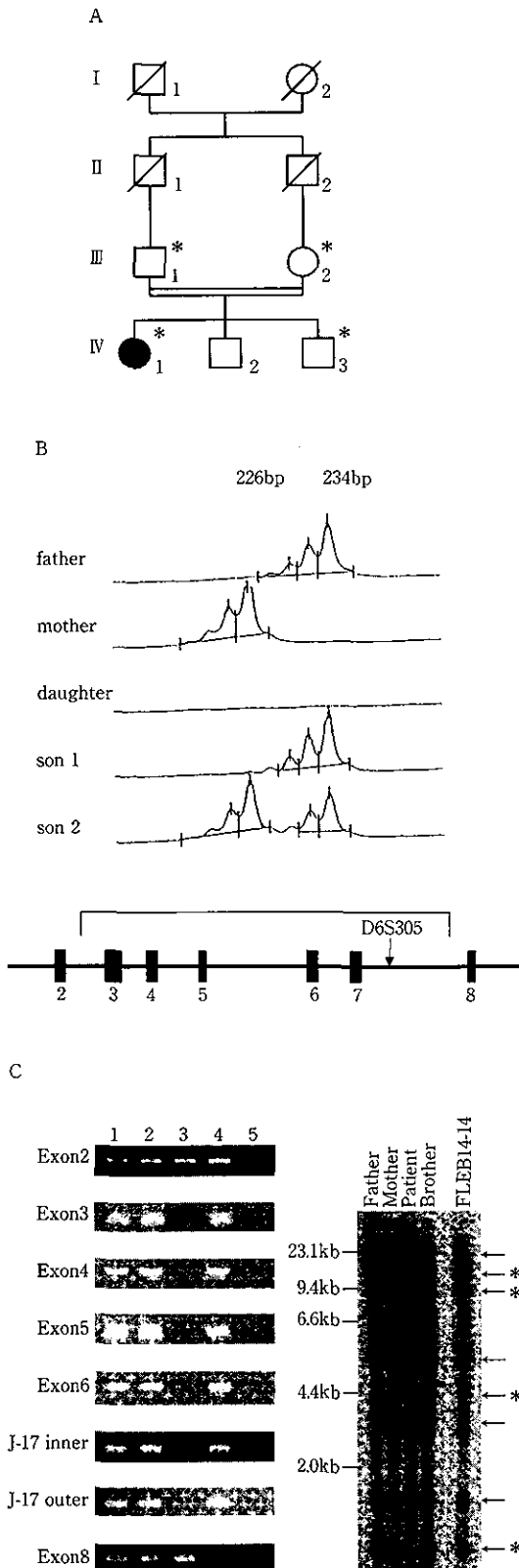


Fig. 3 A : D6S305 が欠失していた家系。B : D6S305 の PCR 産物が患者では、みとめられない。Son2 では 226bp, 234bp の二種の PCR 産物をみとめる。したがって両親は D6S305 の hemizygous に欠失していることになる。この D6S305 はパーキン遺伝子の intron 7 に位置していることが、その後明らかにされた。C : この D6S305 をふくむ BAC clone より、パーキン遺伝子を単離できた。上記患者では、exon 3-7 が欠失していた。Southern blot でも欠失は確認できた。\* : 欠失しているバンドを示す。

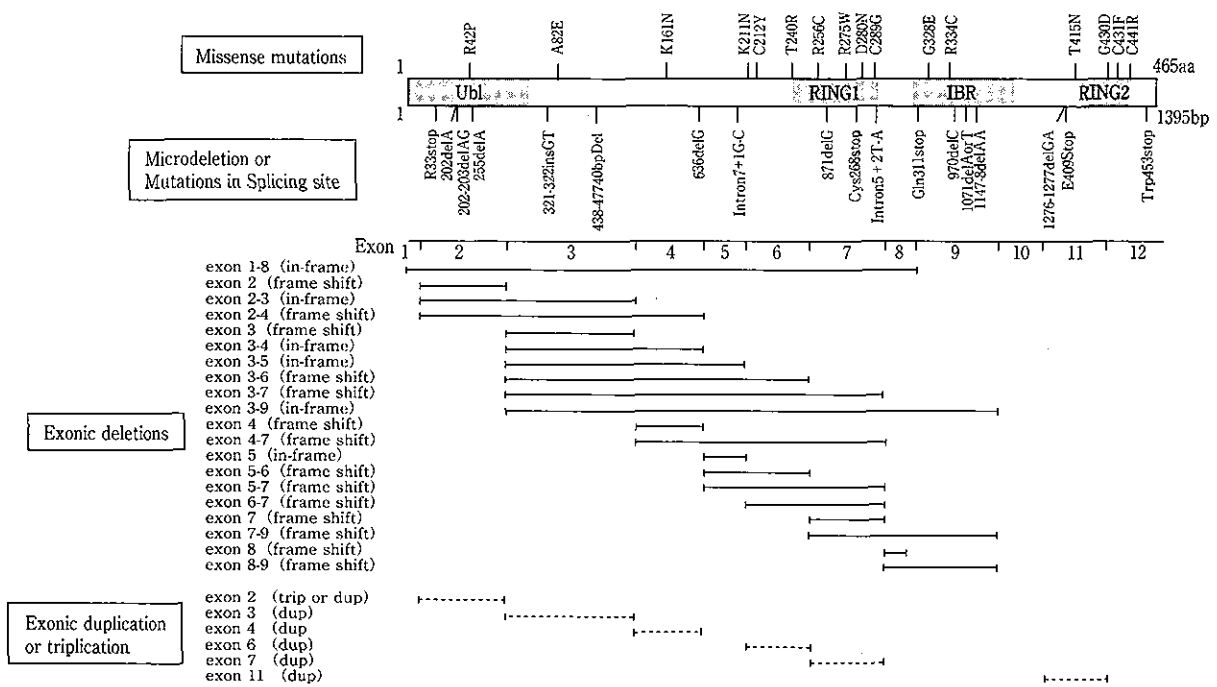


Fig. 4 今まで報告されてきたパーキン遺伝子変異。パーキン蛋白は465アミノ酸で、ubiquitin like domain (ubl), two Ring finger motifs, RING に挟まれて in between RING (IBR) によって構成されている。

PDについて変異解析をおこなっているが、劣性遺伝性であれば約50%に変異をみだしている。また一見優性遺伝性であっても parkin 遺伝子に変異を持つ家系が報告されている。われわれも数家系について同様な優性遺伝性がうたがわれる家系について parkin 遺伝子変異をみだしている。

変異での問題点としては、6番染色体に連鎖しているにもかかわらず、coding region ないし splicing junction に変異が存在しない家系があることである。Parkin 遺伝子を制御する promoter 領域に変異が存在している可能性がある。Parkin 遺伝子の promoter は 198bp しかなく、この 198-bp の promoter を挟んで別の遺伝子 (gene located upstream of parkin, Glup) が頭を向かい合わせに存在している<sup>30)</sup>。おそらくこの promoter 領域を介して両遺伝子が制御されている可能性がある。また intron 1 は GC rich であり、発現を制御している elements が存在することが報告されている。したがって、coding region に変異のない患者については、これら regulatory 領域に変異が存在している可能性があると考え現在変異解析をおこなっている。もう一つの変異解析での問題点としては、ヘテロ接合体で病的変異が存在している患者の存在である。この解釈としては、dominant negative effect も考慮すべきであるが、上記 regulatory 領域に変異が存在している複合ヘテロ接合体の可能性もある。一方で、変異を二つのアリルに持つ患者の両親に PD が発症している家系も少ないが存在している (論文準備中)。このことより carrier であっても加齢など他の因子が加わると発症しうる可能性を示していると考えている。事実、carrier における positron emission tomography (PET) 検査では、18Fluoro-dopa の取り込みの低

下が報告されている。Sub-clinical であってもドパミンの低下がおこなっていることが考えられている。この点を考慮するとハプロ不全の機序が考えられる。このことは孤発型 PD のなかにも parkin 遺伝子のヘテロ接合体が少なからず存在していることを示していると考えている。

(3) Parkin 蛋白の機能：ユビキチンリガーゼとしての parkin 蛋白

Parkin-related disease の黒質神経変性のメカニズムを明らかにするには機能解析が必要である。まずデータベースをもちいて既存の蛋白との相同性について検討をおこなった。蛋白質全体としてみるとこれに相同な他に存在しない新規な分子だが、そのアミノ末端領域にユビキチンに相同性を有する領域 (Ubl ドメイン：ubiquitin-like domain) とカルボキシル末端領域に2個の RING finger とその motif に挟まれた In between RING (IBR) と名付けた特殊な領域が存在する。われわれはこの domain を RING box と命名した。更にこの RING box と Ubl を結ぶ linker region (parkin domain) と併せてパーキン蛋白は大きく3つの部位に分けられる (Ubl domain-linker region-RING box)。RING box にみとめられる RING-finger motif は C3HC4 タイプの motif に属する。

RING-finger motif を持つ蛋白質がユビキチンリガーゼであることが示唆されていたため、parkin 蛋白がユビキチンリガーゼである可能性を東京都臨床医学総合研究所の田中啓二先生との共同研究で検討した。その結果、parkin 蛋白がユビキチンリガーゼであることがわかった (Fig.5, 6)<sup>30)</sup>。ユビキチンリガーゼはユビキチンプロテアソームシステムの1酵素である。ユビキチンプロテアソームシステムは細胞内の主要

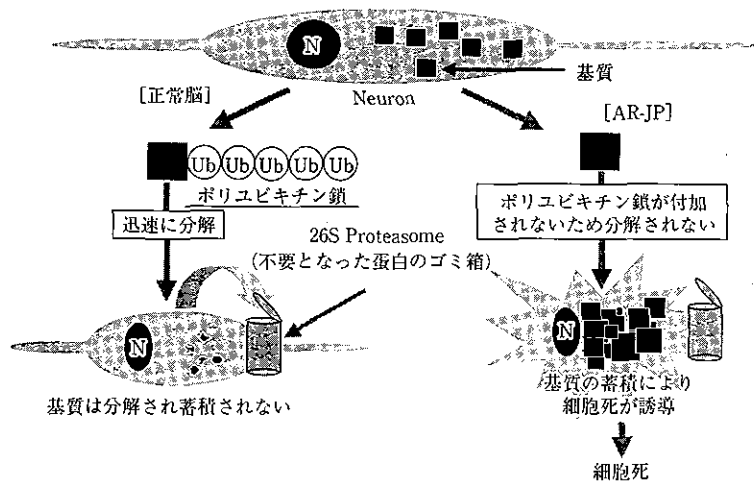


Fig. 5 正常脳では基質が蓄積されないが, AR-JP では基質が poly-ubiquitination されないために, 基質が蓄積して, 細胞死が誘導される。

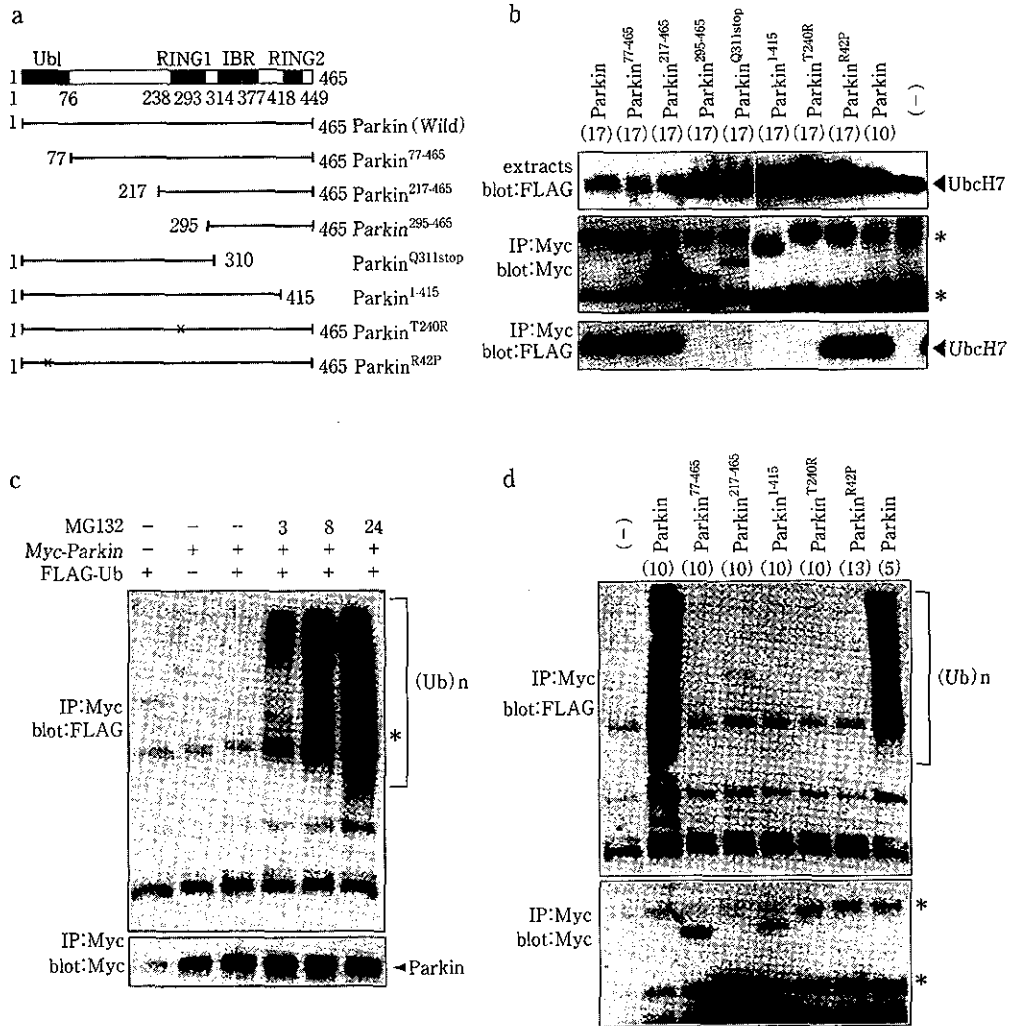
な蛋白質分解機構であり, 76 アミノ酸残基からなる修飾分子ユビキチンを分解標的蛋白質に鎖状に結合するユビキチンシステムと, 形成されたポリユビキチン鎖を認識して標的蛋白質を分解するプロテアソームから構成される。このシステムは細胞周期やシグナル伝達など様々な細胞調節機構において重要な機構を担っている。ユビキチン化反応は, ユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン結合酵素 (E2), ユビキチンリガーゼ (E3) のカスケード反応でおこなわれ, その標的分子のリジン残基上にユビキチン鎖が形成される。このなかで基質認識 (複合体) 酵素である E3 は少なくとも数十種あることが知られている。Parkin 蛋白は E2 とは RING-Box で結合してユビキチンリガーゼ活性を示す。劣性遺伝性であることから, parkin-related disease 患者でみとめられた変異 parkin 蛋白は, ユビキチンリガーゼ活性が消失している可能性が示唆されていたが, その後の検討ですべての変異体で活性が消失していない可能性が検討されている。事実, 1 症例であるが Lewy 小体が存在していたとする報告がある。この解釈としては偶然に Lewy 小体が形成されたか, 患者でみとめられた変異 parkin 蛋白のリガーゼ活性が部分的に残存していたために Lewy 小体が形成されたものと推定される。いずれにしろ, 活性低下が病態の背景にあることはまちがいない。つまり AR-JP 患者脳では, 標的蛋白質のポリユビキチン化が効率よくできないことで標的蛋白質が 26S proteasome で十分に分解されず, その蛋白質が神経細胞内に蓄積することで神経細胞死が生じると考えている (Fig. 5)。parkin-related disease 患者の病態解明の上で parkin 蛋白の基質を探索することは, 最重要課題である。

#### (4) パーキン蛋白の細胞内局在

Parkin 蛋白の基質同定においても詳細な機能解明の戦略においても細胞内局在を決定することは重要である。Parkin 蛋白のアミノ酸配列をもとに, 合成ペプチドに対する抗体を作成し, 正常, 孤発型 PD, AR-JP の剖検脳における検討をおこなった。抗体は, エクソン 3, 9 内に相当する部位に作成した (M-73, M-74)。まず前頭葉の homogenate をもちい, west-

ern blot をおこなった。Fig. 7A~C に示すように, 52kDa に相当する band をみとめた。AR-JP では, band をまったくみとめず, parkin 蛋白は合成されても, 不安定で分解速度が高いことが予想された<sup>32)</sup>。ただし, われわれが検討した症例の変異は exonic deletion あり, しかも frame-shift mutation を示すタイプであることより, open reading frame を保っている in-frame mutation のタイプでは, 蛋白合成があるのか否かは現在のところ判明していない。Missense 変異のみとめた症例については患者の同意をえて筋生検にて骨格筋をもちいて解析したが, 確かに骨格筋では 52-kDa に一致してパーキン蛋白の band をみとめた (論文準備中)。更にホルマリン固定したパラフィン包埋切片をもちい, 免疫組織化学的検討をおこなった (Fig. 7D)。Western blot と同様に AR-JP 脳では, まったく M-73, M-74 の抗体に反応を示さなかった。一方, 孤発型パーキンソン病や正常対照では, 細胞質と神経突起がよく染色された。細胞質は, granular structure が染色されており, Golgi complex に parkin 蛋白が局在していると考えられた。更に細胞分画に fractionation し, Immunoblot をおこない, Golgi fraction と Cytosol fraction に parkin 蛋白が存在していることを確認した (Fig. 7C)。Parkin 蛋白が, Golgi complex と cytosol に存在することは小胞輸送に関係している可能性を示すものである。更に正常脳を使い線条体, 黒質, 前頭葉に分け免疫組織化学的検討および western blot をおこなったところ黒質においてパーキン蛋白の合成がもっとも高かった (Fig. 7B)。これは parkin-related disease の選択的神経変性の病理所見を支持するものである。興味深いことに Lewy 小体が抗 parkin 抗体で染色された (Fig. 7E)。その後の研究では, Lewy 小体の構成成分に parkin の基質もふくまれていることがわかっている。

更に変異 parkin 蛋白の局在変化の有無を検討するために, parkin 蛋白に Green fluorescent protein (GFP) を tag 蛋白として, 変異および正常 parkin 蛋白の局在を検討した<sup>33)</sup>。Parkin 蛋白の C 末に GFP を付加し COS1 細胞に transfection し, 細胞内局在を検討し, やはり Golgi complex にあるこ



**Fig. 6** A, B : E2 との結合を免疫沈降法 (IP) で確認している。この実験系では E2 は UbcH7 と結合する。C : MG132 で proteasome を抑制すると時間依存性に high molecular mass を観察できる。D : mutant では, high molecular mass を観察できないことより, この実験系では変異パーキン蛋白はユビキチンリガーゼ活性を持たないことが予想される。E~G : in vitro ubiquitination assay で, SH-SY5Y cell にパーキン遺伝子を transfection し, 免疫沈降したものと E1, E2 (UbcH7), radioisotope ラベルした ubiquitin を in vitro で反応させた。E では E1-E3 (IP-parkin) がそろそろ high molecular mass が観察される。F では変異パーキン蛋白では活性をみとめない。G : SH-SY5Y の transfection した IP-parkin では ubiquitination が観察されたが, HEK293 では観察されない。

とを証明できた (Fig. 8A~D). 更に内在性 parkin 蛋白についてレチノイン酸により神経様細胞に分化させた SH-SY5Y 細胞をもちいて抗 parkin 抗体にて検討したところ Golgi complex と神経突起がドット状に免疫染色された (Fig. 8). このドット状の染色パターンは, まさしくシナプス小胞を示すものであり, シナプス小胞にある synaptotagmine I との二重染色では共局在していることを確認した. このことより, parkin 蛋白が膜輸送システムにかかわっていることが予想された.

この細胞内局在の結果を踏まえて, PC12 細胞を NGF (Nerve Growth Factor) により神経細胞様に分化させ, GFP を tag 蛋白として parkin 蛋白を発現させ, その局在を観察した (Fig. 9D). 融合蛋白は神経突起内と核周囲の Golgi Com-

plex に局在していた. このことより外来性 parkin 蛋白と内在性蛋白の局在が完全に一致すると考え, この融合蛋白をもちいて変異 parkin 蛋白の局在を検討した. 結果は, Ubl のみを持つ変異 parkin 蛋白は細胞質にびまん性に局在していたが, 他の変異 parkin 蛋白については Golgi complex に局在していた (Fig. 10). このことは変異 parkin 蛋白と正常 parkin 蛋白では, その局在は変わらないことを示す. したがって, 疾患の発症機序には細胞内局在の変化は関与していないと推定された. つまり患者で観察される変異 parkin 蛋白の疾患発症の機序としてはユビキチンリガーゼ活性の低下が主な作用であると結論づけた.

神経はもっとも膜輸送システムが発達した細胞であり,

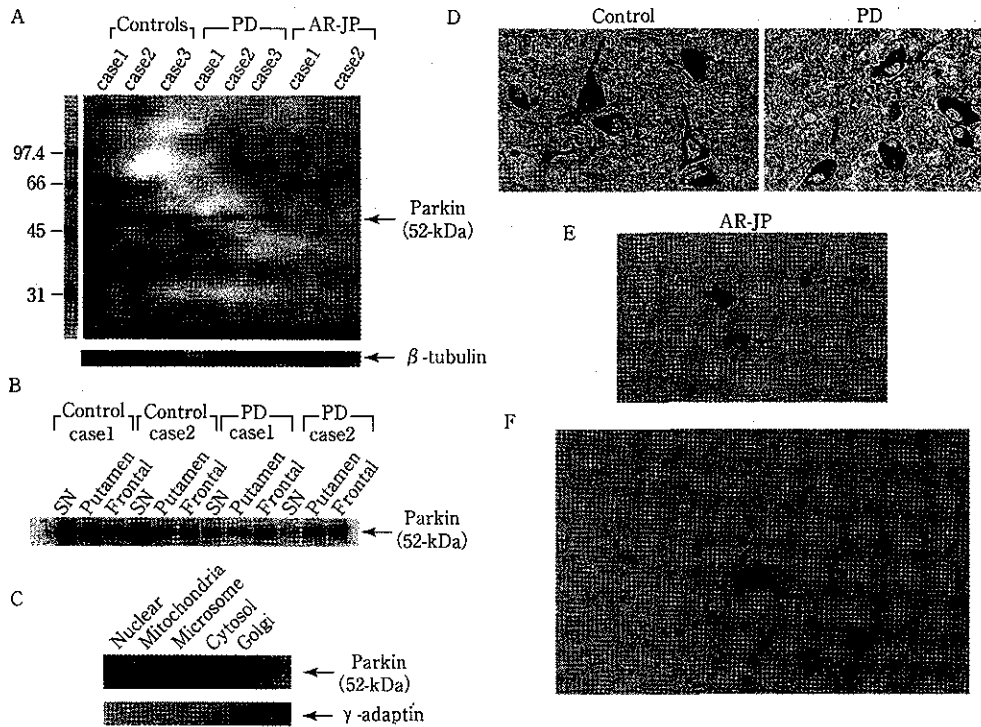


Fig. 7 A : Western blot では AR-JP にパーキン蛋白をみとめない. B : 孤発型 PD では黒質のパーキン蛋白の量が低下している. これは D に示すように細胞にパーキン蛋白が多いので, 細胞数の減少を反映していると考えられる. 一方, control ではパーキン蛋白は黒質で多い, SN, substantia nigra. C : 細胞分画では Golgi と cytosol にパーキン蛋白は分布している. D : 抗パーキン抗体では細胞質が良く染まる. AR-JP では染色性はない. (bar = 100µm). E : Lewy 小体が抗パーキン抗体で染まる.

axon 内には蛋白合成系装置が存在しないため, その局在分布から parkin 蛋白は輸送システムによって神経終末に運ばれる蛋白であることが推定された. そこでシナプス終末から synaptosomal fraction を精製し, 免疫電顕にて検討を加えてみると, 確かに parkin 蛋白はシナプス小胞上に存在していた (Fig. 11). ショ糖勾配でもシナプスに存在している synaptotagmine や synaptophysine と分布が一致していた (Fig. 12 A, B). 更に parkin 蛋白生理的塩濃度で膜成分から可溶性成分に容易に遊離されることがわかった. シナプス小胞に存在している synapsin I とまったく同様に塩処理により容易に膜から遊離しやすい傾向にあった (Fig. 12C). Parkin 蛋白は, synapsin I 同様膜貫通ドメインを持たない. Synapsin I はリン酸化されることにより膜から遊離するので, parkin もリン酸化などにより修飾を受けている可能性がある. Computer 解析によれば, PKC や cesin kinase II などのリン酸化サイトが存在しており, リン酸化により膜から遊離されると推測している. この synapsin I の膜局在機構は静電的機構と提唱されており, parkin 蛋白も同様な機序により膜に局在していると予想された.

Parkin 蛋白の機能を推定する上で, 脳の成長過程での parkin 遺伝子の発現のパターンを検討することは重要である. われわれは rat の parkin cDNA を rat 脳 cDNA library をもちいてスクリーニングし, rat parkin cDNA を単離し, これを probe に in situ hybridization をおこなった. また Ubch7

7 を probe にし, 両分子の発現パターンを検討した. In situ hybridization による検討でも Ubch7 と parkin が共局在していることを確認できたが, 興味あることにその分布は ubiquitous であり, 発達過程で発現が増加していた<sup>34</sup>. このことは発達過程で重要な機能をなしていることを推測させるが, parkin 蛋白がシナプス小胞にあることと併せて synaptogenesis などの成熟過程と関連があるのではないかと推定している. 臨床的にも発症年齢のピークが基底核の成熟過程と一致していることも parkin 蛋白の機能を考える上でも興味深い所見といえる.

#### (5) parkin の基質

上記に示したように AR-JP の発症機序を考える上でユビキチンリガーゼ活性が大きな要因であることより, 基質同定が病態解明の本質的なものといえる. われわれは基質同定のためにヒト脳 cDNA をもちいて parkin 蛋白の基質候補や結合蛋白を yeast two hybrid 法にてスクリーニングをおこなった. その一つ分子として CDCrel-1 を単離した. この分子は, Dawson 等のグループから報告されている<sup>35</sup>. われわれは, 更に理化学研究所脳科学センターの高橋良輔先生との共同研究にて Endoplasmic reticulum (ER) stress にかかわる分子 Pael (Parkin-associated endothelin receptor-like) receptor を同定した<sup>36</sup>. いずれの分子も yeast two hybrid 法にて単離したものである.

Yeast two hybrid 法とはことなる方法で単離されたのが糖

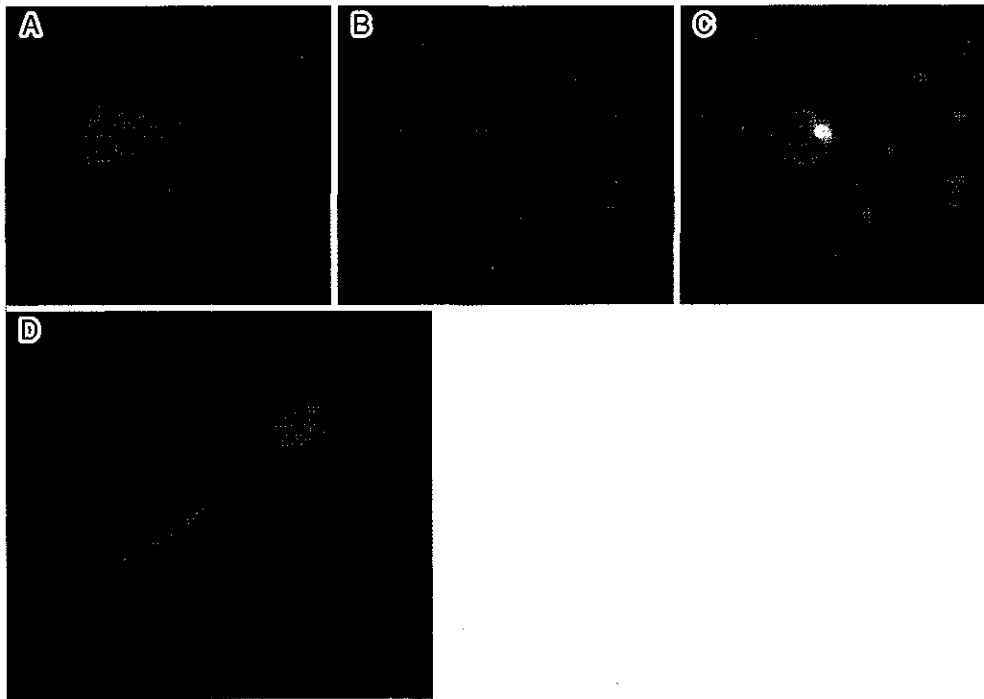


Fig. 8 A~C: Cos1 細胞に GFP-パーキン蛋白の融合蛋白をもちいて, 細胞内局在を検討した. A, GFP; B, WGA; C, superimposed image. Golgi complex に局在する. D: PC12 を NGF で神経様に分化させたもののパーキン蛋白の局在を検討した. 神経突起と Golgi complex に存在していた. (Bars = 50µm). WGA, wheat-germ agglutinin.

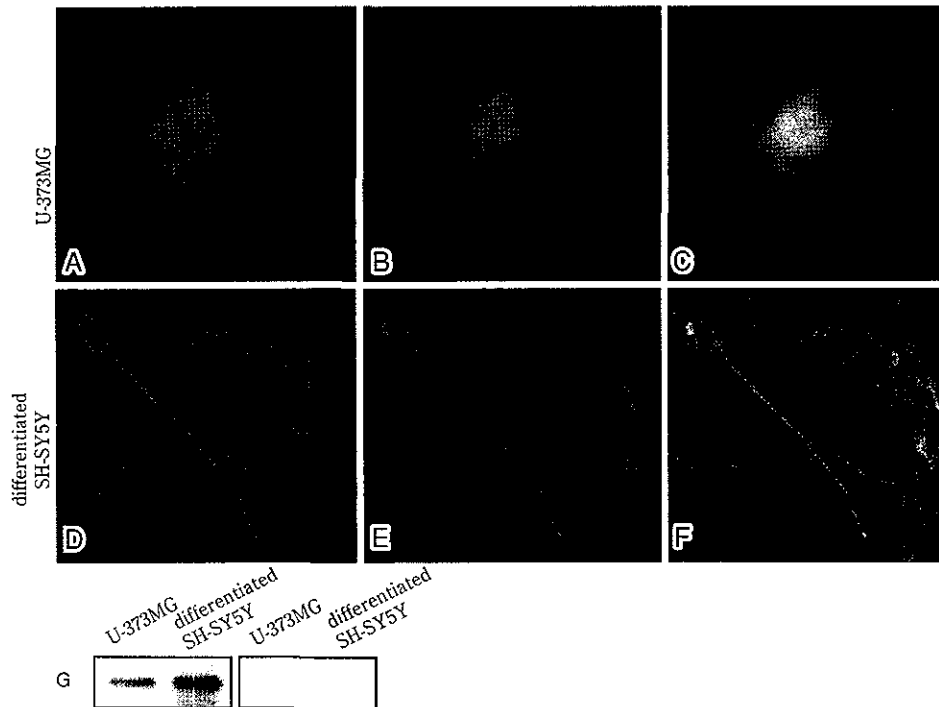


Fig. 9 A~C: U-373MG, glioblastoma cell line で内在性パーキン蛋白はこの cell line には存在していた. やはり Golgi complex にある. D~E: 神経細胞様にレチノイン酸で分化させると内在性パーキン蛋白はドット状に存在していた. シナプスにある synaptotagmine I と共局在していた. このことよりシナプスに存在していると考えられた. (Bars = 50µm)



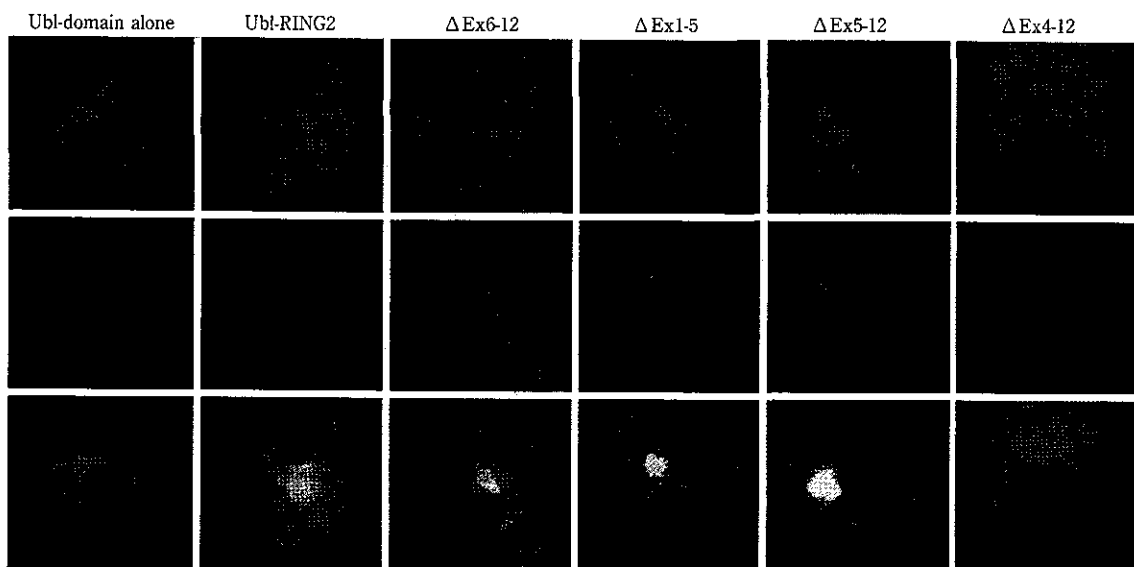


Fig. 10 Cos1 細胞に GFP-パーキン蛋白を transfection した. 上段は, GFP-パーキン蛋白, 中段は WGA で染色した. 下段は superimposed image. Ubl のみは細胞質にびまん性に染まるが, 他の変異パーキン蛋白は Golgi complex に局在していた. (Bar=50μm)

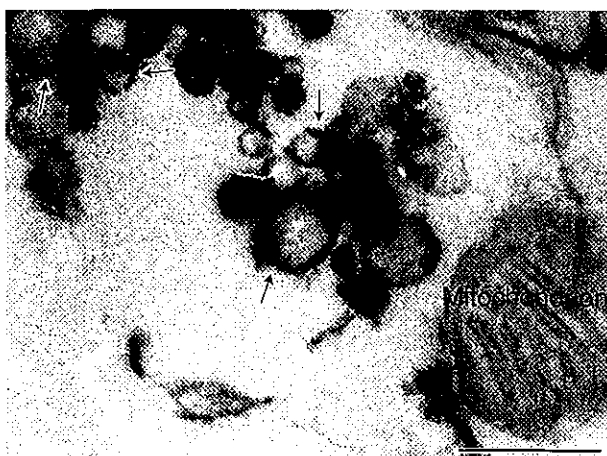


Fig. 11 免疫電顕でのパーキン蛋白の局在. Synaptic fraction に分けたものを観察した. (Bar=250nm)

化修飾された o-glycosylated  $\alpha$ -synuclein である. この分子はハーバード大の Selkoe 先生のグループとの共同研究で進めたものである<sup>37)</sup>. この分子の持つ意義は細胞死の実行分子というより Lewy 小体形成メカニズムを考える上で重要である. なぜなら AR-JP は病理学的に Lewy 小体を一般に形成しないことを特徴としている. 一方,  $\alpha$ -synuclein はこの封入対の主要分子であることが証明されており, 両分子が相互作用を示すことは封入対形成を考える上で興味深い. 正常  $\alpha$ -synuclein の分子量は 16kDa であり, 糖化修飾された分子は 22kDa の分子量を示す (Fig. 13A~C).

Yeast two hybrid 法で単離できた Pael receptor (Pael-R) と内在性分子に対する抗体をもちいて単離できた糖化修飾され

た  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ Spn22) は, いずれもわれわれのグループにより単離された分子である. すでに報告されているが CDCrel-1 についても詳細な検討をおこなっている. Pael-R は Orphan G protein であり, Pael-R は parkin 蛋白により, E2 である UBC6/UBC7 と協働して poly-ubiquitination されることがわかった. 更に Pael-R は正常では主に細胞膜に存在するが, 26S proteasome 阻害剤を投与すると endoplasmic reticulum (ER) 内に蓄積する (Fig. 14A). ER 内で蓄積すると細胞死が誘導されることがわかった (Fig. 14B). 更に Pael-R が実際に AR-JP 患者脳で蓄積しているか検討を加えた. 不溶性成分に Pael-R の蓄積を AR-JP 患者脳でみとめた (Fig. 15A). 更に ER stress 時に upregulation される Bip についても同じように患者脳で蓄積していた (Fig. 15B). Pael-R は蓄積することで細胞死が誘導されることが証明された. しかしながら,  $\alpha$ -synuclein, CDCrel-1, Pael-R ともに免疫組織化学的検討での蓄積の証明はできていない. 抗体の quality に依存するので, 更に詳細な検討が必要である.

CDCrel-1 については, parkin 蛋白と ubl と RING の 2 カ所で結合することがわかった. CDCrel-1 のリコンビナント蛋白を作製し, in vitro ubiquitination assay をおこなった. 2~3 個の ubiquitin が付加されることがわかった (Fig. 16). 一般に分解シグナルとして 4 個の ubiquitin が必要とされているので, この in vitro 系の実験では parkin 蛋白が分解シグナルに必要な polyubiquitin 鎖は付加できていない. Oligo-ubiquitination されることがどのような機能を示しているのかはわかっていない. Endocytosis される分子は monoubiquitination されるとの報告があり, 単なる分解シグナルだけでなく蛋白の合成制御もふくむ機能的コントロールにも ubiquitin 鎖がかかわっている可能性がある.

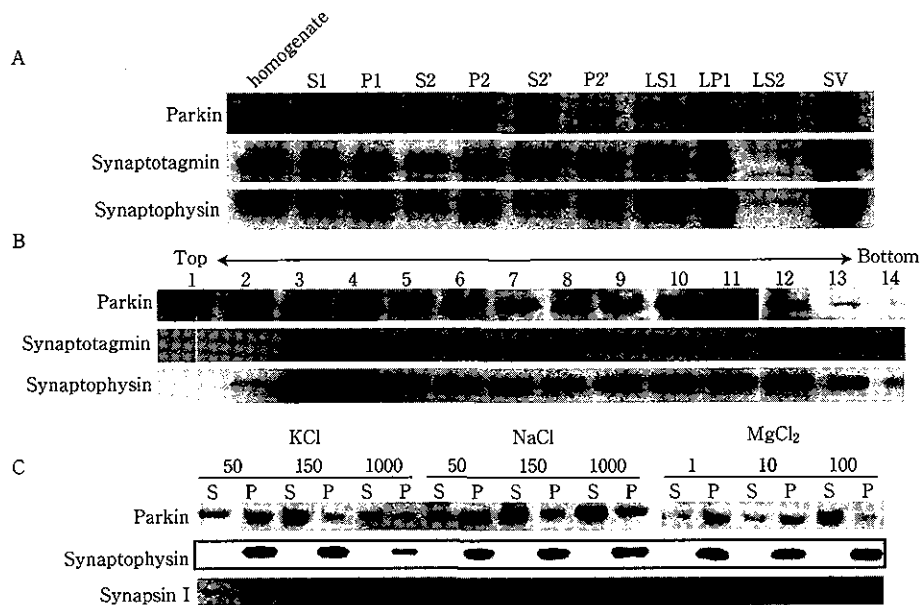


Fig. 12 A, B : synaptic fraction のうち synaptic vesicle (SV) にパーキン蛋白は存在していた。シヨ糖勾配法では 2 相性に存在していた。C : 塩濃度を上げていくと pellet から supernatant に分布を変えた。これは塩処理により膜からパーキン蛋白が遊離しやすいことを示す。

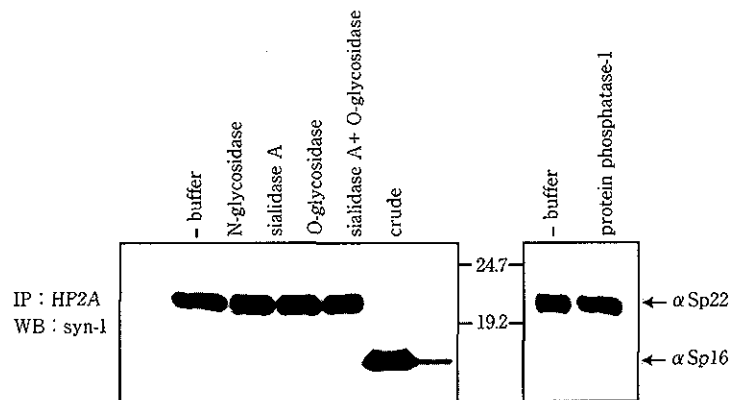


Fig. 13 ヒト剖検脳をもちいて抗 His 抗体で免疫沈降 (IP) をおこない、E1, E2 と反応させた。パーキン蛋白には His tag を付加している。この同じ処理したサンプルを抗  $\alpha$ -synuclein 抗体で immunobolt すると 22-kDa に一致した  $\alpha$ -synuclein のバンドを確認できた。高分子のバンドも同時にみとめられた。抗  $\alpha$ -synuclein 抗体で IP すると ARP (AR-JP) で 22-kDa の  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ Sp22) をみとめた。この  $\alpha$ Sp22 は o-glycosidase と sialidase の両酵素と反応させると分子量が 16-kDa に戻った。このことより糖化修飾されたものといえる。

基質か否かの問題は別として、CDCrel-1 の過剰発現が exocytosis を抑制するという報告は、ドパミンの蓄積が細胞死にかかわっている可能性を想定させる。そこでわれわれも、ハムスターの insulinoma の cell line を使い、ヒト Growth hormone をトレーサーに parkin 蛋白の exocytosis への影響を解析した。CDCrel-1 の過剰発現による exocytosis の抑制は、われわれの実験系では再現できなかったが、変異 parkin 蛋白をもちいた解析では、dominant negative effect にて exocytosis が抑制された (論文準備中)。Exocytosis の抑制効果はドパミン貯留による細胞死を想定させる。Parkin-related disease

に特異な精神症状が出現することと関連があるのかもしれない。

われわれが検討している 3 つの分子以外にも Lewy 小体の構成成分である synphilin-1 も parkin 蛋白の基質候補として検討されている。また他にも Table 4 にあげた分子が基質として検討されている。また基質ではないが、proteasome と polyubiquitin 化分子との結合に必要な Rpn10 との結合が、NMR による構造解析より推定されている<sup>38)</sup> (名古屋市立大学薬学部加藤先生との共同研究で)、ユビキチンリガーゼということを考えれば基質は当然のことながら 1 つとはかぎら

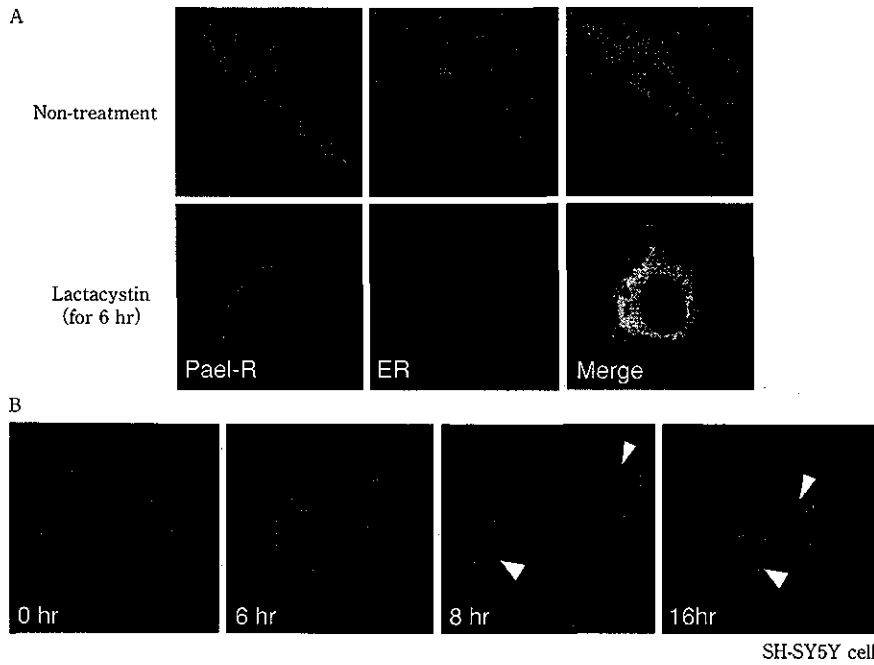


Fig. 14 A : Pael-R は proteasome inhibitor である lactacystin と反応させると ER 内に蓄積した。 B : Pael-R が時間経過とともに蓄積して細胞死が誘導された。 矢頭は aggresome like inclusion を示す。

Table 4 パーキン蛋白の基質候補と結合因子

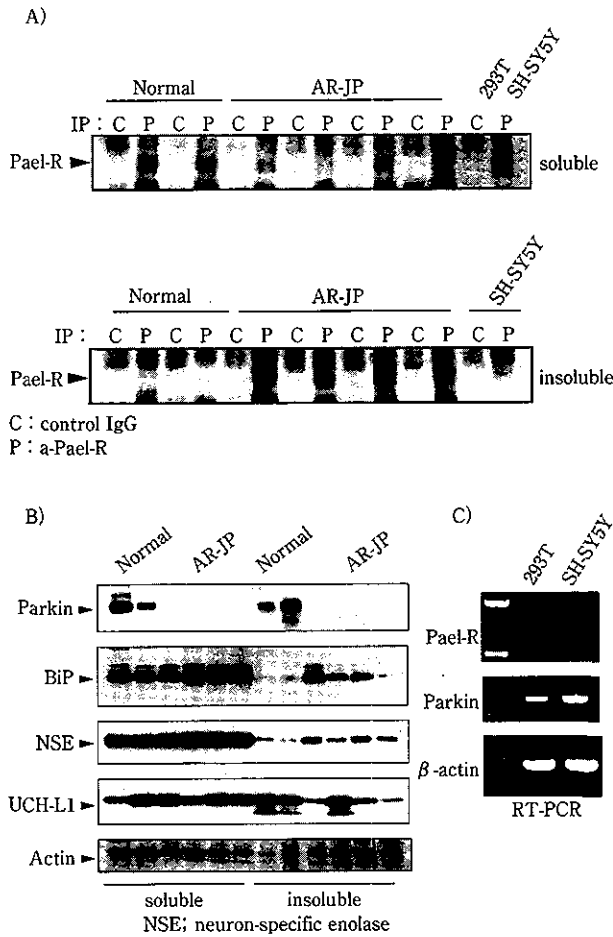
パーキン蛋白の基質候補	機能
CDCrel-1	Exocytosis (Dopamine storage?)
CDCrel-2	
Pael-receptor	ER stress (Unfolded protein response)
O-glycosylated $\alpha$ -synuclein	Lewy body formation
Synphilin-1	Lewy body formation
Cyclin E	Apoptosis (Kainate excitotoxication)
$\alpha/\beta$ Tubulin	Microtubules (assembly dysfunction)
p38 subunit	aminoacyl-tRNA syn. (protein biosynthesis)
Synaptotagmin XI	Fusion or docking, Synaptic functions
パーキン蛋白結合因子	機能
UbcH7, UbcH8, Ubc6/7, Ubc4	E2
Actin filament	Morphology
CASK/Lin2	PDZ containing scaffolding protein
Cullin-1	Multiprotein ligase
$\gamma$ -Tubulin	Centrosome
Rpn 10	Binding of parkin to proteasomal proteins

ず、すべての基質が相互作用している可能性も考えられる。事実、われわれの研究室では、yeast two hybrid 法にて上記とはことなる 13 クロンの基質候補を単離できている。基質間の相互作用ふくめて詳細な基質の機能がわかれば、parkin-related disease の脳組織特異的細胞死の機序が明らかにされるであろう。

一方で、従来の基質同定を主体とした研究戦略では限界があるのも事実である。Loss-of-function 効果を考えるとノックアウトマウスやノックインマウスの解析は有効である。最近になり 2 論文が報告されたが、表現型は存在しない<sup>39)40)</sup>。しか

しながら大脳辺縁系のドパミン代謝の亢進や線条体の細胞外のドパミン量が増加していたと報告している。われわれの研究室でもノックアウトマウスやノックインマウスを作成しており、parkin 関連蛋白のノックアウトマウスとの交配で細胞死が誘導されないか検討している。また変異 parkin 蛋白を発現させた transgenic mice も作成しており、近いうちに研究成果を発表できると考えている。

Parkin-related disease の発症機序で特記すべき点として通常の PD と比してドパミン神経細胞に変性が限局している。青斑核の変性はきわめて軽微であると報告されている。勿

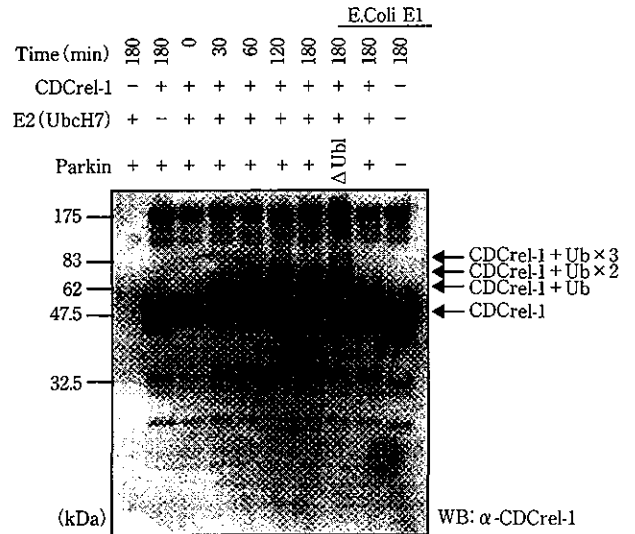


**Fig. 15** A: AR-JPではinsoluble fractionにPael-Rが蓄積していた。B: またERストレスマーカーであるBiPも同様にAR-JPで蓄積をみとめた。NSE, neuron specific enolase. C: SH-SY5YではPael-Rが存在することがRT-PCRで確認された。

論, 症例ごとによりその程度はことなるものと考えられるが, 一般にPDの青斑核の変性は黒質同様に強いことを考えると, この所見はparkin-related diseaseの発症機序を考えられる上でヒントになるかもしれない。

**(6) 変異パーキン蛋白の酸化ストレスへの関与**

Parkin蛋白がユビキチンリガーゼであることはわかったが, 基質と細胞死の関連についての詳細なメカニズムについてはわかっていない。第一の機序としてPael-Rを介したER stressの関与が推定される。第二に酸化ストレスの関与が推定される。酸化ストレスの関与については, parkin遺伝子変異が確認されているAR-JP患者剖検脳を使ったPerls染色にて鉄の沈着を確認していることより重要な因子として考えられている。PDでも鉄沈着は観察されるが, AR-JPでの鉄の沈着はPDに比してより強くみとめた<sup>41)</sup>。更にAR-JPでは全体が鉄染色にて染色され, 神経突起にも染色性をみとめた。鉄の沈着からAR-JPの酸化ストレスの関与の可能性が示唆された。われわれは更にこの結果を発展させるために変異パーキン蛋白をもちいて酸化ストレスの関与をイギリスの



**Fig. 16** in vitro ubiquitination assayを基質候補として大腸菌で作製したrecombinant proteinを使って検討した。時間依存性にCDCrel-1に3個のubiquitinが付加された。おもしろいことにCDCrel-1を基質とするとΔUblでも同様に付加が観察された(未発表データ)。

King's collegeのPeter Jenner先生との共同研究で検討した。もちいた変異parkin蛋白はexonic deletion of 3-5 (del 3-5), T240R, Q311Xの三種についてoverexpressionの系で検討した。もちいたcell lineはNT-2とSK-N-MC細胞で, wild typeとmutant typeをtransfectionし, Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalaseなどの酵素活性を測定したが, wildおよび変異parkin蛋白ともに, その活性には変化はなかったが, 3-nitrotyrosine, lipid peroxidation, protein carbonylsが上昇していた<sup>42)</sup>。更にNO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が変異parkin蛋白をtransfectionしたもので上昇していた。この上昇はneuronal nitric-oxide synthase (nNO)にともなうものであった。変異parkin蛋白が酸化ストレスを誘導することがわかった。このin vitroの実験結果はAR-JP患者剖検脳の酸化ストレスの関与を支持するものである。変異parkin蛋白により基質が蓄積し, その蓄積が酸化ストレスを誘導するか, 基質そのものが酸化ストレスに直接関与していることが予想される。

PDでは酸化ストレスの関与が指摘されており, ミトコンドリア機能低下と併せて重要な因子として考えられている。Parkin-related diseaseでのミトコンドリア機能低下の有無については報告がないが, parkinのorthologueをinactivatedさせたC. eleganceでは筋組織のミトコンドリアに変性をみとめている。なぜ, 中枢神経系に変性が生じなかったのかは不明であるが, 種の違いが影響している可能性がある。ただし, C. eleganceでも変性は筋組織のみであり, parkin-related disease同様ある特定部位の変性をみとめている。このC. eleganceのモデルからは, parkinのミトコンドリアへの関与が推定される。

**(7) 今後の展望**

Parkin蛋白がユビキチン・プロテアソーム系の直接分子