

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 17 年度 総括・分担研究報告書

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 18(2006)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
服部 信孝	
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	9
服部 信孝	
2. パーキンノックインマウス作製・解析に関する研究	17
田中 啓二	
3. パーキンソン病におけるパエル受容体の役割	22
高橋 良輔	
4. 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	25
澤田 誠	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

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

遺伝性パーキンソン病 (FPD)は、単一遺伝子異常で発症することから、その病態解明は孤発型パーキンソン病(SPD)の原因究明に繋がると考えられている。その中で最も頻度が高く、世界中に分布するタイプとしてパーキン遺伝子変異による Park2 は、青斑核の変性は極めて軽く選択的ドパミン神経変性のモデルとなる。また、病理学的検討では、一般にレビー小体形成が存在せず、正常パーキン蛋白が、存在することが形成上必須因子出ることが想定されている。従ってパーキン蛋白の機能解明は黒質選択的細胞死の機序を考える上で重要なヒントを与えてくれる。本研究課題の目的は、パーキン遺伝子変異に伴う Park2 の病態を解明し、更には孤発型 PD の病態を明らかにすることにある。更に既知の遺伝子変異スクリーニングを行いながら新規遺伝子座にマップされる家系の発掘を行い、原因遺伝子の単離・同定を目指した。平成 17 年度は、パーキンノックアウトマウスの解析を主に行った。パーキンノックアウトはエクソン 3,4 の二種を作製したが、表現型ほぼ正常であり、組織学的にも細胞脱落は認めなかった。一方で、in vivo autoradiography による解析で、ドパミン遊離異常を見出した。パエル受容体の解析では、アデノウィルスベクターにパエル受容体を組み込み、マウス線条体に注入すると細胞死が惹起されることが分かった。またこの細胞死は、パーキンノックアウトマウスやシャペロンタンパクの一種である ORP150 ノックアウトマウスのヘテロ接合体マウスに注入すると細胞死は増強した。このパエル受容体による細胞死はドパミン合成阻害剤により軽減した。このことはパエル受容体による細胞死には、ドパミン代謝と小胞体ストレスの関与が推定された。細胞死には、毒性を持ったミクログリアの関与が推定されている。この毒性転換の基礎的研究が、今後 PD におけるミクログリアの病態関与を証明できると考えている。HIV 脳症の発症機序にミクログリアの関与が指摘されている。その中でも、nef 遺伝子変異を導入すると毒性転換が起こることが判明している。毒性転換に必要な因子に nef 結合因子の関与が判明した。更にパーキンノックアウトマウスに MPTP を投与してその時関与するミクログリアに違いがあるか今後検討する予定である。機能解析と同時に新規遺伝子同定・単離のため既知の遺伝子変異スクリーニングを行った。対象は、 $\alpha$ -シヌクレイン、PINK1、DJ-1、LRRK2、パーキンであった。わが国には、DJ-1 遺伝子変異は存在しなかった。PINK1 遺伝子はパーキン遺伝子変異と比較すると少ないが、約 6%の陽性率であった。ヘテロ接合体でも発症している症例は、優性遺伝性 PD のうち 3.7%に認められた。パーキン遺伝子でもヘテロ接合体で発症する症例が少なからず存在することより劣性遺伝性で発症する FPD の共通した機序と考えられた。近年、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の multiplication で発症する FPD が報告された。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の点変異で発症する症例は少なく世界で 10 数家系に留まるが、このタイプの遺伝子重複の症例は、人種を越えて世界に分布することが判明した。わが国では duplication の症例が、西日本を中心に存在していることが分かった。また $\alpha$ -シヌクレインのコピー数に依存して症状の重篤化が起こると報告されたが、duplication でも痴呆症状が惹起されることが分かった。LRRK2 もわが国にも存在し、世界に広く分布していることが分かった。遺伝子変異スクリーニングの過程で、劣性遺伝性の late-onset PD がやはり西日本を中心に分布していることが分かった。現在連鎖解析を行い、数カ所に遺伝子座を絞っている。

- |                           |                       |
|---------------------------|-----------------------|
| A. 研究目的                   | 伝子産物パーキン蛋白の機能解析を推進し、本 |
| 常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) | 症における黒質神経細胞死の機序を分子レベ  |
| の原因遺伝子であるパーキン遺伝子とその遺      | 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。また  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の重複型変異による FPD も報告され、正常型  $\alpha$ -シヌクレインの過剰産生による機序が、推定された。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。機能解析には、パーキン遺伝子改変モデルを確立したので、パーキンソン病モデルに成りうるか行動学的、組織学的に検討することを目的とした。更にマイクログリアの毒性かと神経変性にも注目し、nef 遺伝子変異導入によるマイクログリアの毒性転換とその機序についても検討した。

## 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、新規原因遺伝子の同定・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。パーキンノックアウトマウスの解析。

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。

研究方法の詳細については、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

### 遺伝子変異スクリーニングと新規遺伝子座の同定。

その後、更に解析症例を増やして検討した結果パーキン遺伝子変異は劣性遺伝性（ARPD）のうち約40%と当初の比率より低下した。占めることが分かっている。ARPDのうち6%は、PARK6の原因遺伝子 PINK1 遺伝子変異よることが分かった(論文投稿中)。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（論文準備中）。現在の処 DJ-1 遺伝子変異は、わが国には存在しないことが推定される。PINK1 と併せて約50%強は、原因遺伝子が不明であることが推定された。興味深いこととして PINK1, パーキン共にヘテロ接合体で発症しうることが分かった。ヘテロで発症する症例は、ホモ接合体で発症する症例に比して発症年齢が高齢化の傾向があった。しかしながら、ヘテロ接合体でも発症年齢が、若年である症例も少なからず存在することより、ヘテロ接合体でも変異の部位によってはドミナントネガティブ効果で発症しうることが推定された。もう一つの可能性としては、ハプロ不全によるものが推定された。現在、劣性遺伝性 late-onset PD の新規遺伝子同

定に向けて、連鎖解析を行っており、遺伝子座が 3 - 4 カ所に絞られた。

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。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たが、ハプロタイプからは single founder の可能性は否定的であった。一方、Park8 の発端家系である相模原家系で見出された I2020T 変異は、ハプロタイプからはわが国の場合、相模原家系と先祖を共有していることが分かった。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し、計 5 家系が  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の duplication であることが分かった。興味深いことに今まで報告されてきた duplication の家系は、認知症が存在しないことが推定されていたが、我々が解析した家系では、認知症が存在していた。

#### パーキンノックインマウスの解析。

パーキン蛋白の機能解析に関しては、ドパミンキノン体の増加に伴い細胞死が惹起されることが分かったので、更にパーキンノックアウトマウスで in vivo autoradiography でドパミン遊離について検討した。その結果、マウス内でもドパミン代謝の変化が生じていることが証明された。しかしながら、細胞死は観察されなかった。組織学的にも行動学的にも変化は観察されなかった。更に昨年度報告した in vitro で、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ので、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せていない。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を行ったが、現在のところテクニカルな問題で測定できていない。

#### 新規パーキン結合蛋白の解析。

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 LM04 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。ニトロ化や BAG5 の結合により、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が示された。LM03,4 については K48, K63 をユビキチン化することが分かった。Pulse chase にてパーキン蛋白の有無により分解が促進されないことより、分解系に関わっている可能性は LM03,4 については少ないと考えられた。

#### パーキンノックインとノックアウトマウスに共通して量的変化の認められた分子の同定。

サイファーゲン社のプロテインチップを用い両モデルに共通して観察される 4 分子をピックアップした。現在、質量分析にて分子の同定作業に入った。

#### パーキンの In vitro におけるユビキチンリガーゼ活性とこの活性に及ぼす AR-JP 変異の生化学

### 学的解析。

MBP 融合パーキンを E1, E2 (Ubc7, UbcH7, Uev1/Ubc13)存在下でユビキチンと共に保温したとき、強い自己ユビキチン化活性が複数のバンドとして検出された。このユビキチン化は GST-ユビキチンを用いた場合の高分子量側へのバンドシフトで実証できた。In-frame でパーキンに融合した MBP もパーキンの疑似基質としてユビキチン化された。ポリユビキチン化を阻害するメチル化ユビキチンは、上記の活性を全く抑制しなかった。さらにユビキチン内の 7 個のリジン残基を全てアルギニンに変換したポリユビキチン鎖を形成できない lysine-less ユビキチンを用いても、野生型ユビキチンと同じ活性が観察された。これらの結果は、パーキンが少なくとも In vitro では、(自己ユビキチン化と疑似基質 MBP のユビキチン化で調べた限りであるが) 複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることが証明された。

パーキンは N-末端側に UBL(ubiquitin-like) ドメインがあり、C-端側半分に RING1,IBR (in-between RING),RING2 が並んだ構造(配列)をもっているが、全ての領域にミスセンス変異やナンセンス変異をもった AR-JP の患者が多数存在する。そこで約 16 個の AR-JP 患者由来の変異パーキンについて MBP と融合させリコンビナントタンパク質として精製した。これらを用いて、パーキンのユビキチンリガーゼ活性を In vitro で調べた結果、RING2 に変異があるパーキンは全て、自己ユビキチン化活性を完全に喪失していたが、他の領域、即ち UBL、RING1,IBR あるいは Linker 領域 (UBL と RING1 を繋ぐ領域) にミスセンス変異をもったパーキンでは、活性の喪失は観察されなかった。

### パエル受容体の解析。

アデノウィルスベクターにパエル受容体を組み込み、マウス線条体に注入すると細胞死が惹起されることが分かった。またこの細胞死は、パーキンのノックアウトマウスやシャペロンタンパクの一種である ORP150 ノックアウトマウスのヘテロ接合体マウスに注入すると細胞死は増強した。このパエル受容体による細胞死はドパミン合成阻害剤である alpha-methyl-DL-Tyrosine の腹腔内前投与により軽減した。このことはパエル受容体による細胞死には、ドパミン代謝と小胞体ストレスの関与が推定された。

### 神経変性におけるマイクログリアの関与の解析。

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。野生型 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、野生型 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 gp91 と Rac1 サブユニットの一部に結合していることが分かった。封入体形成の解析。

封入体形成のモデルを作製した。培養細胞系にプロテアソーム阻害剤を加えるとアグリゾーム形成が観察された。ビメンチンも陽性であり、定義

的にはアグリゾームと言えた。このアグリゾーム形成にユビキチン・プロテアソーム系関連分子である VCP (Valosin containing protein)が局在していた。この VCP に ATPase domainD1, D2 に変異が入った変異分子を導入して解析すると D2 domain に変異の入った分子を導入した場合にアグリゾーム形成が減少した。一方、cell viability は変化なく、アグリゾーム形成と細胞死には相関が観察されなかった。

#### プロテアソームサブユニットの細胞内局在の検討。

20S プロテアソーム  $\alpha$  サブユニットに対する抗体で免疫組織化学的検討を行った。その結果、孤発型 PD では、線条体、黒質共に核が染色された。一方、正常対象は、全く染色されなかった。更にパーキン遺伝子変異を持った Park2 についても検討を行ったが、孤発型 PD とは異なり染色されなかった。この  $\alpha$  サブユニットの核内局在がどのような意味合いがあるのか不明であるが、その病態に関わっている可能性を考えている。D. 考察と結論

変異スクリーニングでは、pInk1, LRRK2,  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の重複が、わが国にも存在していることが分かった。スクリーニングの過程で、既知遺伝子陰性例が存在することが分かり、late-onset PD に属する大きな家系が存在することが分かった。現在、新規遺伝子座の絞り込みを行っている。既に in vitro の系で、ドパミンキノン体増加による細胞死の関与を報告したが、in vivo であるノックインマウスの解析でも、ドパミン遊離障害が関与していることが分かった。直接的証明として、ドパミンキノン体の関与は、測定技術により計測出来ないが、我々が進めてきた exocytosis の機能低下と併せて、パーキンがシ

ナプス近傍で機能していることが予想された。

パエル受容体に関しては、アデノウィルスベクターに挿入し、線条体に直接注入することで細胞死が惹起された。この細胞死に小胞体ストレスやドパミン代謝が関与していることが分かった。

マイクログリアの PD への関与については、nef 変異を導入すると毒性転換が起こることが分かった。マイクログリアの PD への関与については、次年度に詳細を検討する予定である。

VCP を用いたアグリゾーム形成について検討し、D2 domain に変異が入るとアグリゾーム形成が抑制されることが分かった。アグリゾーム形成と細胞死の関連性については証明できなかった。少なくとも封入体形成が直接的細胞死誘導因子であるとは言い難いと言える。

本年度では、遺伝子改変モデルの詳細な検討を行った。行動異常、組織学的検討でも明らかな異常は見出せなかった。次年度は、ミトコンドリア電子伝達系 NDUFV2 のノックアウトマウスを作製し、交配することで遺伝子背景としてミトコンドリア機能異常を持つマウスを作製し、パーキンソニズムが出現するか検討する。パエル受容体については、遺伝子改変モデルの長期経過フォローアップの組織学的検討を更に発展させる予定である。マイクログリアに関しては、まず MPTP マウスモデルを作製し、毒性転換されたマイクログリアにより細胞死は増強されるか検討する。

遺伝子変異解析では、新規原因遺伝子単離に向けて連鎖解析を進めると共に同定・単離を目指す。

#### 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

遺伝性パーキンソン病（FPD）の原因遺伝子産物は、黒質変性の共通カスケードを形成している可能性がある。その中で劣性遺伝性 PD のうち最も頻度の高いパーキン遺伝子についてその機能を明らかにし、黒質変性のカスケードの一端を突き詰めることにある。また本研究課題では、変異スクリーニングを行い、既知遺伝子変異陰性例について新規原因遺伝子を同定することも重要な目的の1つである。スクリーニングでは、新たに LRRK2 変異，PINK1 変異， $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の重複例を見出した。更に常染色体劣性遺伝形式で、late-onset PD に位置する一大家系を見出しており、現在連鎖解析にて数カ所まで候補遺伝子座を絞り込めた。パーキンの機能解析では、新規基質候補として PDCD-2，LMO3,4 を見出した。PDCD-2 では、孤発型 PD での蓄積が観察された。また LMO3,4 では、K63 によるポリユビキチン鎖が、反応系に重要であることが分かった。 $\alpha$ -シヌクレインとパーキンのダブルノックアウトマウスを作製したが、明らかな表現型は存在しなかった。Park2 は、一般にレビー小体形成を認めないので、*in vitro* における封入体形成のメカニズムについて検討した。ユビキチン・プロテアソーム系に關与する VCP の封入体形成への關与について検討した。その結果、VCP の ATPase binding domain の D2 サイトに変異を入れると封入体形成が抑制された。しかしながら、封入体形成と細胞死には密接な関連を見出せなかった。パーキンが、ユビキチン・プロテアソーム系に關与することからプロテアソームの孤発型 PD への關与を検討し、孤発型 PD では 20S プロテアソーム  $\alpha$  サブユニットの局在が核に認められた。一方、Park2，正常対象者では染色されなかった。少なくともプロテアソームの局在の違いがあることから、黒質変性にプロテアソームの關与が推定された。

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），DJ-1（PARK7）のも単離され、原因遺伝子産物の相互作用も注目されてきている。更に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。

本年度は、PINK1，DJ-1 LRRK2， $\alpha$ -シヌクレインの重複の有無について検討した。また本課題では、パーキン蛋白の機能解明のみならず新規遺伝子の単離・同定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、パ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 LMO3,4，PDCD-2 について詳細な検討を行った。



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的とした。

封入体形成と細胞死の関連について検討するためユビキチン・プロテアソーム系の E4 として作用があると言われている VCP と封入体形成の関連について検討した。

## B. 研究方法

### 遺伝子スクリーニング

パーキン遺伝子変異陰性例について、優性遺伝型、劣性遺伝型に分け、新たに同定された遺伝子変異についてスクリーニングした。既知の原因遺伝子として LRRK2,  $\alpha$ -シヌクレイン (SNCA), PINK1, DJ-1 について検討した。

方法は、PINK1, DJ-1, LRRK2 については点変異が多いので、PCR 産物を直接塩基決定法にて変異の有無を確認した。PINK1, DJ-1 についてはエクソンの欠失型も存在するので TaqMan probe をエクソン毎に作製し、real time PCR にて定量した。SNCA の multiplication については、TaqMan probe にて定量した。ポジティブコントロールとして Science 誌に報告された Iowan family を用いて exon / beta-tubulin の比率が 2.0 前後になることを確認した。その上で優性遺伝性 PD 家系 130 例について一次的スクリーニングを行った。Multiplication が疑われる症例については、リンパ芽球化して FISH にて確認した。

### 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, LM03, 4 について詳細な検討を行った。

#### 1) 抗体の作製

PDCD-2, LM03, 4 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 LM03, 4, 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。Ubiquitin 分子については、K48, K63 のみリジン残基であるものを作製して用いた。

#### 4) パーキン蛋白による各分子の分解

PDCD-2, LM04 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 LM03, 4 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, LM04 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。

### ノックインマウス及びノックアウトマウスの解析

正常マウスとノックアウトマウス群のプロテオミクスでの違いをサイファーゲン社のプロテインチップで解析した。サンプルは、中脳、線条体を用いた。

### 封入体形成の解析

プロテアソーム阻害剤を投与することで封入体

が形成を観察する。観察された封入体については、免疫組織化学的検討で、ビメンチン、ユビキチン、 $\alpha$ -シヌクレインで検討した。用いた細胞は、HEK293 細胞であった。また VCP と  $\alpha$ -シヌクレインの結合有無については、 $I\kappa B\alpha$  をポジティブコントロールにして検討した。VCP の封入体形成に関する検討のため VCP の ATPase の D1, D2 domain に変異を挿入させ、プロテアソーム阻害剤下における封入体形成の変化を検討した。

#### 20S プロテアソームの $\alpha$ サブユニットの細胞内局在の検討

PD の剖検脳を用いて、 $\alpha$  サブユニットに対する抗体を用いて細胞内局在を検討した。用いた抗体は、分担研究者である田中啓二先生より譲り受けた。抗体の characterization を行い、Western blot と免疫組織化学的検討で行った。用いた組織は、黒質と線条体。対象は、孤発型 PD, Park2, 正常対象であった。

#### $\alpha$ -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。

### C. 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 (ARPD) のうち約 40%を占め、ARPD のうち 6%は、PARK6 の原因遺伝子 PINK1 遺伝子変異よることが分かった。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、変異を持つ症例は一例も見出すことは出来なかった。現在の処 DJ-1 遺伝

子変異は、わが国には存在しないことが推定される。パーキンと PINK1 と併せても、約 50%強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 late-onset PD の新規遺伝子同定に向けて、連鎖解析を行っており、遺伝子座が 3-4 カ所に絞られた。

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。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たが、ハプロタイプからは single founder の可能性は否定的であった。一方、Park8 の発端家系である相模原家系で見出された I2020T 変異は、ハプロタイプからはわが国の場合、相模原家系と先祖を共有していることが分かった。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し、計 5 家系が  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の duplication であることが分かった。興味深いことに今まで報告されてきた duplication の家系は、認知症が存在しないことが推定されていたが、我々が解析した家系では、認知症が存在していた。また duplication の家系では、浸透率が 33%と低く、平均発症年齢を超えても発症しない症例が少なからず存在する。新規パーキン結合蛋白の解析 (PDCD-2, LM04) 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 LM04 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。パーキンのニトロ化により、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。LM03, 4 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。LM03, 4 はパーキンにより K48 と K63 リジンにポリユビキチンが付加されることが分かった。LM03, 4 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。

#### ノックインマウス及びノックアウトマウスの解析

サイファーゲン社のプロテインチップで正常マウスとノックアウトマウスでの違いを検討した。分子量 8kDa に一致した分子が、マウスモデルで低下していた。現在、質量分析にて解析中である。

#### 封入体形成の解析

培養細胞系にプロテアソーム阻害剤を加えるとアグリゾーム形成が観察された。ビメンチンも陽性であり、定義的にはアグリゾームと言えた。このアグリゾーム形成にユビキチン・プロテアソーム系関連分子である VCP (Valosin containing protein) が局在していた。この VCP に ATPase domainD1, D2 に変異が入った変異分子を導入して解析すると D2 domain に変異の入った分子を導入した場合にアグリゾーム形成が減少した。一方、cell viability は変化なく、アグリゾーム形成と細胞死には相関が観察されなかった。 $\alpha$ -シヌクレインのアグリゾーム形成への関与について

は、封入体内に局在を確認できなかった。従ってレビー小体の形成にプロテアソームの活性低下は、重要と考えられるが、それだけでは $\alpha$ -シヌクレインがレビー小体内に取り込まれないことが推定された。

#### 20S プロテアソームの $\alpha$ サブユニットの細胞内局在の検討

20S プロテアソーム $\alpha$ サブユニットに対する抗体で免疫組織化学的検討を行った。その結果、孤発型 PD では、線条体、黒質共に核が染色された。一方、正常対象は、全く染色されなかった。更にパーキン遺伝子変異を持った Park2 についても検討を行ったが、孤発型 PD とは異なり染色されなかった。この $\alpha$ サブユニットの核内局在がどのような意味合いがあるのか不明であるが、その病態に関わっている可能性を考えている。

#### $\alpha$ -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。しかしながら、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したが技術的問題で測定できなかった。

#### D. 考察

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (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が可能となった。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。α-シヌクレインの multiplication の存在がわが国でも確認された。1 家系については、詳細な遺伝子スクリーニングができており、浸透率が 33%であった。この発症者、非発症者の違いを検討することで、進行阻止の機序を明らかに出来る可能性がある。今後、この発症者、非発症者の違いを嗅覚障害、REM 睡眠障害、SNCA の mRNA の量などから臨床診断や進行と相関のあるマーカーの開発が可能となったと言える。

新規基質候補としては、LM03, 4 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が、プロテインチップによる解析では、8kDa の小分子がマウスモデルで低下していた。プロテアソーム阻害剤投与では、ユビキチン陽性封入体形成が観察された。この封入体はビメンチンや nocodazole で消失することよりアグリゾームと定義されると考えられた。この封入体には α-シヌクレインは局在していなかったことより、プロテアソームの活性低下のみではレビー小体が形成されないことが予想された。また、このアグリゾームにユビキチン・プロテアソーム系関連分子である VCP (Valosin containing protein) が局在していた。この VCP

に ATPase domainD1, D2 に変異が入った変異分子を導入して解析すると D2 domain に変異の入った分子を導入した場合にアグリゾーム形成が減少した。一方、cell viability は変化なく、アグリゾーム形成と細胞死には相関が観察されなかった。このことは、封入体自体は毒性を持つ可能性が低いことを示していると考えている。言い換えれば、レビー小体は、神経保護作用を持っている可能性を示す。

α-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。メラニンが存在しないことと関連が想定された。今後は、ミトコンドリア電子伝達系 24-kDa サブユニットのノックアウトマウスと交配させることでパーキンソン病モデルに成りうるか検討したい。

## E. 結論

Park1,4 の multiplication がわが国にも存在していた。わが国の症例は、duplication で有り、認知症を合併していた。我々の研究室は、わが国の遺伝子スクリーニング的ラボであり、約 1,000 例の DNA をバンク化している。この中で 40%前後がパーキン遺伝子陽性であった。

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。その結果、PINK1, SNCA の duplication, LRRK2 とわが国も変異が存在していたが、トータルでも 10%内外であり、残り約 50%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ピングす

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。

機能解析においては、新規基質候補の詳細な解析を行い、PDCD-2, LM03,4 を同定した。PDCD-2 はアポトーシス関連分子であり、LM03,4 は転写因子であるが、tyrosine hydroxylase の発現に関与していることが報告されており、興味深い。

封入体形成の解析では、細胞死にとって毒性とも保護的とも関連はなさそうで、独立した現象の可能性が考えられた。しかしながら、今回我々の検討したアプローチは、培養細胞系を用いた解析であるので、今後マウスモデルなど *in vivo* の解析が必要と考える。

プロテアソームの  $\alpha$  サブユニットの免疫組織化学的検討で、孤発型 PD で核内局在を示したことは、何らかのタンパク分解系の変化を示すものと考えられる。しかしながら、培養細胞で、脳内で起こっている現象の再現を試みたが、成功しなかった。今後、再現できるような条件設定の探索が必要と考える。

マウスモデルに関しては、ノックアウトマウスで優位に低下している 8 kDa 分子の同定を継続して行う。またミトコンドリア電子伝達系複合体 I の 24-kDa サブユニットノックアウトマウスを作製したので、詳細な検討を行い、今後パーキンノックアウトマウスと交配し、遺伝学的にミトコンドリア機能低下のあるマウスで表現型が出現するか否か検討する予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL: Association of DJ-1 and parkin

mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14:71-84, 2005

2. Clarimon J, Johnson J, Djaldetti R, Hernandez D, Hattori N, Sroka H, Barhom Y, Singleton A: Mutation of the Parkin gene in a Persian family: Clinical progression over a 40-year period. *Mov Disord* 20:887-890,
3. Suzuki M, Hattori N, Orimo S, Fukumitsu N, Abo M, Kono Y, Sengoku R, Kurita A, Honda H, Inoue K: Preserved myocardial [(123)I]metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: First case report. *Mov Disord* 20:634-636, 2005
4. Noda K, Kitami T, Gai WP, Chegini F, Jensen PH, Fujimura T, Murayama K, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N: Phosphorylated IkappaBalpha is a component of Lewy body of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 331:309-17, 2005
5. Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N, Koyama A, Iwatsubo T, Ito S, Jansen PH, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N: Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332:233-240, 2005
6. Fukae J, Takahashi M, Kubo S, Nishioka K, Nakabeppu Y, Mori H, Yoshikuni M, Hattori N: Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 109; 256-262, 2005
7. Fukae J, Kubo S, Hattori N, Komatsu K, Kato M, Aoki M, Mizuno Y: Hoarseness due to bilateral vocal cord paralysis as an initial manifestation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis* 6: 122-124, 2005
8. Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 64:1955-1957, 2005

9. Sato S, Mizuno Y, Hattori N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. *Neurology* 64:1081-1083, 2005
  10. Li G, Kitami T, Wang M, Mizuno Y, Hattori N: Geographic and ethnic differences in frequencies of two polymorphisms (D/N394 and L/I272) of the *parkin* gene in sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11:485-491, 2005
  11. Kubo S, Nemami VM, Chalkley RJ, Anthony MD, Hattori N, Mizuno Y, Edwards RH, Fortin DL: A combinatorial code for the interaction of  $\alpha$ -synuclein with membranes. *J Biol Chem* 280:31664-31672, 2005
  12. Inzelberg R, Hattori N, Mizuno Y. Dopaminergic dysfunction in unrelated, asymptomatic carriers of a single parkin mutation. *Neurology* 65:1843, 2005
  13. Orimo S, Amino T, Yokochi M, Kojo T, Uchihara T, Takahashi A, Wakabayashi K, Takahashi H, Hattori N, Mizuno Y: Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in PARK2. *Mov Disord* 20:1350-1353, 2005
  14. Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, Fonzo AD, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Rohe CF, Breedveld GJ, Hattori N, Gasser T, Oostra BA, Bonifati V: The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11:521-522, 2005
  15. Ide M, Yamada K, Toyota T, Iwayama Y, Ishitsuka Y, Minabe Y, Nakamura K, Hattori N, Asada T, Mizuno Y, Mori N, Yoshikawa T: Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease. *Hum Genet* 117:520-527, 2005
  16. Kitami MI, Kitami T, Nagahama M, Tagaya M, Hori S, Kakizuka A, Mizuno Y, Hattori N: Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation. *FEBS Lett* 580:474-478, 2006
  17. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N: Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 59:298-309, 2006
  18. Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K: Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem*. 281:3204-3209, 2005
  19. Sato S, Chiba T, Sakata E, Kato K, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K: 14-3-3 eta is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J*, 25: 211-221, 2006
  20. 波田野靖子, 李曉冰, 服部信孝, 水野美邦: パーキンソン病の遺伝子異常. *日本内科学会雑誌* 94: 169-175, 2005
  21. 服部信孝, 町田裕, 野田和幸: パーキンソン病の発症機序: parkin と  $\alpha$ -synuclein の共通カスケードと新規 Lewy 小体構成蛋白. *臨床神経学* 45: 905-907, 2005
  22. 服部信孝: パーキンソン病: 単一遺伝子から黒質神経変性の病態解明へのアプローチ. *ゲノム医学* 5:85-90, 2005
  23. 西岡健弥, 服部信孝: *内科* 95: 1592, 2005
  24. 服部信孝: パーキンソン病のゲノム疫学: 単一遺伝子異常から孤発型の病態解明に挑む. *Bio Clinica* 20: 52-58, 2005
2. 学会発表及び講演
    1. Hattori N. Gene mutations for familial Parkinson's disease and molecular mechanisms of neuronal death, The Second International Workshop by the 21st Century COE of Fujita Health University Progress in Diagnosis and Treatment for Neural and Mental Diseases, Nagoya, March 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup>, 2005
    2. Hattori N, Sato S, Mizuno Y: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease, New Orleans, Louisiana, USA March 5-8, 2005
    3. Hattori N, Protein degradation system in Parkinson's disease, 16th International Congress on Parkinson's Disease and Allied Disorders, Berlin,

- Germany, June 5-9, 2005
4. 服部信孝 パーキンソン病の発症機序, 第46回日本神経学会総会(シンポジウム), 鹿児島, 2005年5月26日
  5. 服部信孝 第46回日本神経学会総会ランチョンセミナー12, パーキンソン病の最前線: 基礎から臨床まで, 鹿児島, 5月26日
  6. 服部信孝 パーキンソン病におけるドパミン代謝の神経細胞死への関与, 第35回日本神経精神薬理学会年会・第27回日本生物学的精神医学会年会合同年会(シンポジウム), 大阪, 2005年7月6-8日
  7. Hattori N. Do Familial PD Gene Products Share a Common Pathway? International Congress of Neuroscience and Molecular Imaging, 2006, Taipei, Taiwan, 21<sup>st</sup>-22<sup>nd</sup> January
  8. Hattori N. Protein degradation system in nigral degeneration. World Parkinson Congress, Washington, USA, 22<sup>nd</sup>-26<sup>th</sup>, 2006
  9. Hattori N. A common pathway among gene products of familial Parkinson's disease. Strategic Japanese German workshop on research in neurodegenerative diseases, Tuebingen, Germany, 23<sup>rd</sup>-25<sup>th</sup> March, 2006

講演

1. 服部信孝, 第6回兵庫パーキンソン病治療研究会, パーキンソン病の基礎から臨床まで, 2月19日, 兵庫
  2. 服部信孝, 第7回和歌山・泉南地区パーキンソン病治療研究会, パーキンソン病の基礎から臨床まで, 3月12日, 堺
  3. 服部信孝, 第11回徳島神経難病治療薬研究会, パーキンソン病の研究の最前線—臨床から基礎まで—, 高松, 6月17日
  4. 服部信孝, 第6回関西パーキンソン病治療フリーディスカッション, パーキンソン病の研究の最前線—臨床から基礎まで—, 大阪, 6月23日
  5. 服部信孝, 第6回栃木パーキンソン病治療研究会, パーキンソン病の基礎から臨床まで, 6月24日, 宇都宮
  6. 服部信孝, 第43回信毎健康フォーラム《長野》, 新しい治療法と今後の探訪, 長野, 7月23日
  7. 服部信孝, 第5回山陰地区セレギリン研究会, M・J・フォックスから学んだパーキンソン病 -神経科学者はラッキーマンになれるか?-, 米子, 7月29日
  8. 服部信孝, 第3回浜松神経機能研究会, パーキンソン病の研究の最前線—臨床から基礎まで—, 浜松, 9月2日
  9. 服部信孝, パーキンソン病講演会, パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—, 市原, 9月8日
  10. 服部信孝, 学術講演会, パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—, 甲府, 9月14日
  11. 服部信孝, Parkinson's disease セミナー, パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—, 横浜, 9月20日
  12. 服部信孝, パーキンソン病懇話会, パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—, 新宿, 10月6日
  13. 服部信孝, パーキンソン病懇話会, パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—, 出雲, 11月17日
  14. 服部信孝, 第6回北九州パーキンソン病研究会, パーキンソン病の診断と治療 -サブクリニカルにおける早期診断の可能性と問題点-, 北九州, 11月18日
  15. 服部信孝, パーキンソン病研究の最前線, 東京パーキンソン病友の会, 10月7日
  16. 服部信孝, パーキンソン病研究の最前線, 区民公開講座, 江東, 10月8日
  17. 服部信孝, パーキンソン病などの神経変性疾患の防いでいます, 平成17年度特定領域研究・第6回公開シンポジウム(都民公開講座), 東京, 12月24日
  18. 服部信孝, パーキンソン病の治療について, 区民公開講座, 台東, 3月28日
- 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  
なし

パーキンソ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, AR-JP) の原因遺伝子であるパーキンの病態生理学的機能を解明するためにパーキン遺伝子のノックイン(GFP)マウスを作製した。パーキン欠損マウスは正常に誕生し、見かけ上、形態学的異常及び行動異常は観察されなかった。しかし同マウスを用いた研究からドーパミン(DA)代謝異常、即ち [<sup>11</sup>C]raclopride を用いた *In vivo* autoradiography により(1) DA release の低下、(2)線状体における DA (D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>) receptor の上昇、(3)中脳における DA レベルの上昇、(4)DA 合成の低下、等を見出した。この結果、パーキンソン病の発症機構を考えた場合、ドーパミンニューロン死に先立ってドーパミンの代謝異常が発生することが示唆された。本年度はさらにパーキンのユビキチンリガーゼ活性について *In vitro* で解析し、パーキン分子が複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることを初めて明らかにした。そして AR-JP 患者由来のミスセンス変異の解析から、パーキンのドメイン構造と機能について新情報を得たので、その結果も併せて報告する。

A. 研究目的

われわれは 2000 年、パーキンがユビキチン連結酵素 (リガーゼ) であることを世界で最初に突き止めて以来、パーキンの構造・機能・病態に関する包括的研究を推進してきた。この間、パーキンの研究は世界的に大きく進展してきたが、以前として AR-JP 及び弧発型パーキンソン病 (PD) の発症機構は不明である。パーキン遺伝子が発見されてから (1) 今日まで世界で複数のグループがパーキンのノックアウト (KO) マウスを作製したが、PD 患者に見られる運動失調を中心とした行動異常は、殆ど観察されていない。そこで本研究では、われわれが新規に作製したパーキンノックインマウスを用い、ドーパミン代謝を中心に解析した。

パーキンがユビキチンリガーゼであることが見出されて (2) から数多くの基質候補が報告されてきたが、それらのほとんどがパーキン KO マウスで変動しないことから、それらが真の基質であることの信憑性に大きな疑義が提示されてきている。パーキンのユビキチンリガーゼ活性については、これまで *In vivo* 及び *In vitro* で多数報告されてきたが、われわれは生化学的に緻密に考えると、必ずしも正確に評価できないと想定した。そこで、ユビキチンシステムが存在しない大腸菌で作製したリコンビナント酵素を用いた完全 *In vitro* システムでパーキンの活性を再評価した (3)。と同時に AR-JP 患者由来のミスセンス変異パ

ーキンについてもリガーゼ活性との関係について詳細に解析し、AR-JP 発症機構について考察を加えることにした。

B. 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、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、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とノックインマウスの作製：TT2 細胞を利用し、ターゲティングベクターをエレクトロポレーションで導入した。0.2 mg/ml の G418 存在下で培養し、薬剤耐性細胞をピックアップした。PCR、およびサブプロテイングによりノックアウト ES 細胞を探索した。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。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) Neurochemical Analysis

ドーパミン (DA) とその代謝産物である 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC)



と homovanillic acid (HVA)は、高速液体クロマトグラフィーで定量した。

### 3) In vivo Autoradiography

・ Chemicals: [ $^{14}\text{C}$ ]dihydratetrabenazine ([ $^{14}\text{C}$ ]DTBZ), [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -CFT (2 $\beta$ -carbomethoxy-3  $\beta$ -(4-fluorophenyl) trop ane: ドーパミン transporter probe). [ $^{14}\text{C}$ ]SCH23390 (D1 receptor probe) and [ $^{14}\text{C}$ ]raclopride (D2 receptor probe) は、RBI (Natick, MA) から購入した。 [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -CFT と [ $^{14}\text{C}$ ]SCH23390 は *N*-methylation of the corresponding nor-compounds with [ $^{14}\text{C}$ ]methyl iodide prepared from [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub>によって調整した。 [ $^{14}\text{C}$ ]DTBZ は [ $^{14}\text{C}$ ]raclopride *O*-methylation of the corresponding nor-compounds with [ $^{14}\text{C}$ ]methyl iodide によって合成した。

・ Ex-vivo Imaging: 各標識物質 (1 MBq/g 体重) をマウスに静脈注入し 30 分後 ([ $^{14}\text{C}$ ]DTBZ, [ $^{14}\text{C}$ ]SCH23390 と [ $^{14}\text{C}$ ]raclopride) と 60 分後 (L-[ $\beta$ - $^{14}\text{C}$ ]DOPA と [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -CFT) に、脳の凍結切片を作製した。それらの切片を phosphoimaging plate に 30 分間放置後、放射性の分布を phosphoimaging plate reader (BAS-1500 MAC, Fuji Film Co., Tokyo) を用いて測定した。DA 合成活性, vesicular monoamine transporter (VMAT) availability, DA reuptake site availability 及び DA (D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>) receptor binding activities は、次式で検定した。DAindex = (RIstr - RIcere) / RIcere : RIstr は striatal regions (線状体) における放射活性, Ricere は cerebellum (小脳) における放射活性を表示。

### 4) Purification of recombinant proteins

リコンビナント野生型パーキンおよび AR-JP 患者由来のミスセンス変異パーキンは、全て MBP (maltose binding protein)-融合タンパク質として大腸菌で産生し、精製して使用した。

### 5) In vitro ubiquitylation assay

E1 と各種 E2 も全て、大腸菌でリコンビナント酵素として作製し、完全な In vitro ユビキチン化システムを構築し、アッセイした。

## C. 研究結果

[研究 1] パーキン欠損マウスを用いたドーパミン代謝の研究 (論文投稿中)。

パーキン遺伝子のエクソン 2 を欠損させた KO

マウスを用い *In vivo* autoradiography によるドーパミンシグナル系を解析して以下の結果を得た。

・われわれが作製したパーキンノックインマウスは、rotarod task 等で調べた行動異常は観察されなかった。またチロシン水酸化酵素 (TH) の免疫染色での観察結果、ドーパミンニューロンの変性 (TH 陽性ニューロンの数の低下) も観察されなかった。

・パーキン欠損マウスの黒質を含む中脳においてドーパミン (DA) レベルが有意に上昇していたが、その代謝産物である 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) と homovanillic acid (HVA) は変動しなかった。一方、線状体ではパーキンの有無にかかわらず、DA、DOPAC、HVA の変化は観察されなかった。

・主要な DA レセプターである D<sub>1</sub> と D<sub>2</sub> の In vivo レベルは (各々のレセプター-antagonists, [ $^{14}\text{C}$ ]SCH23390 と [ $^{14}\text{C}$ ]raclopride の binding potential (BP) で測定)、パーキン欠損マウスで有意に上昇していた。しかしドーパミン transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT) のレベル (各々 [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -CFT と [ $^{14}\text{C}$ ]DTBZ の BP で測定) は変動しなかった。

・他方、L-[ $\beta$ - $^{14}\text{C}$ ]DOPA の [ $\beta$ - $^{14}\text{C}$ ]DA への転換で測定した DA の合成活性は、パーキン欠損マウスで有意に低下していた。

・最後に methamphetamine 処理後ドーパミン D<sub>2</sub> receptor antagonist [ $^{14}\text{C}$ ]raclopride の BP で調べた線状体における DA release 活性は大きく低下していた。

[研究 2] パーキンの In vitro におけるユビキチンリガーゼ活性とこの活性に及ぼす AR-JP 変異の生化学的解析 (3)。

・MBP 融合パーキンを E1, E2 (Ubc7, UbcH7, Uev1/Ubc13) 存在下でユビキチンと共に保温したとき、強い自己ユビキチン化活性が複数のバンドとして検出された。このユビキチン化は GST-ユビキチンを用いた場合の高分子量側へのバンドシフトで実証できた。

・In-frame でパーキンに融合した MBP もパーキンの疑似基質としてユビキチン化された。

・ポリユビキチン化を阻害するメチル化ユビキチンは、上記の活性を全く抑制しなかった。さらにユビキチン内の 7 個のリジン残基を全てアルギニンに変換したポリユビキチン鎖を形成できない lysine-less ユビキチンを用いても、野生型ユビキチンと同じ活性が観察された。これらの結果は、パーキンが少なくとも In vitro では、(自己ユビキチン化と疑似基質 MBP

のユビキチン化で調べた限りであるが) 複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることが証明された。

・パーキンはN-末端側にUBL(ubiquitin-like)ドメインがあり、C-端側半分にRING1, IBR(in-between RING), RING2が並んだ構造(配列)をもっているが、全ての領域にミスセンス変異やナンセンス変異をもったAR-JPの患者が多数存在する。そこで約16個のAR-JP患者由来の変異パーキンについてMBPと融合させリコンビナントタンパク質として精製した。これらを用いて、パーキンのユビキチンリガーゼ活性をIn vitroで調べた結果、RING2に変異があるパーキンは全て、自己ユビキチン化活性を完全に喪失していたが、他の領域、即ちUBL、RING1, IBRあるいはLinker領域(UBLとRING1を繋ぐ領域)にミスセンス変異をもったパーキンでは、活性の喪失は観察されなかった。

#### D. 考察

ニューロンのような非分裂細胞では、タンパク質の品質管理が重要であり、このために複数の品質管理リガーゼが存在する。これらの中で、われわれは、CHIP(4-6)やSCF<sup>Fbs</sup>ファミリー(7-9)について精力的に解析してきた。また最近では、オートファジー(自食作用)系の破綻でもユビキチン代謝異常が誘発されること(10)や神経変性疾患が発症することも(論文投稿中)見出してきた。これら以外では、とくにパーキンがユビキチンリガーゼであることを見出して以来(2)、その細胞生物学的役割(11, 12)やIn vivoにおける正負の活性制御機構(13)などについての研究を推進してきた。しかし、以前としてパーキンの機能喪失がどのようにしてAR-JPを発症させるかについては、不明なことが多い。

そこで、本年度は新たに作製したパーキンノックインマウスを用いてドーパミン代謝についてIn vivo autoradiographyを駆使して詳細に解析した。その結果、パーキン欠損マウスでは、ドーパミン遊離の低下という結果を得た。黒質におけるドーパミンレベルの上昇、ドーパミン受容体の上昇、ドーパミン合成の低下等は、ドーパミン遊離の低下に不随した結果と思われる。このドーパミン代謝の異常は、AR-JP及び孤発型パーキンソン病発症の初期症状と思われる。

パーキンのユビキチンリガーゼ活性と基質については、多くの報告があるが、曖昧な点があり、生化学的な知見に乏しい。In vivoで

ユビキチン化を見ている例が多いが、これらの結果は正確にパーキンの活性を測定していると言いがたい。In vitroのユビキチン化アッセイでもImmunoprecipitationしたパーキンを用いている場合が殆どで、この場合には内在性の因子を巻き込んでいる可能性があり、パーキン単独酵素として正しい評価を得ることが出来ない。またこれまでに多くのパーキンの基質が見つかったが、殆どの場合、細胞内でのユビキチン化をパーキンとの共発現で観察し、しかも同時に発現したユビキチンタグで検出している。この方法は感度が高いために基質に共雑したユビキチン化タンパク質を検証している可能性を払拭出来ない。これらの諸問題を解決するためには、ユビキチンシステムが存在しない原核生物で作製した酵素群を用いたIn vitroのアッセイ系の確立が必須である。そこで、われわれは大腸菌内で合成したリコンビナント酵素群を用いて原点に立ち返り基礎からパーキンのユビキチン化活性を検証した。

その結果、パーキン分子が複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることを初めて明らかにした。しかし、これは自己ユビキチン化活性とパーキンに融合した疑似基質MBPへのユビキチン化活性であるため、真の基質が発見された場合にポリユビキチン化反応を触媒する可能性を否定するものでない。またIn vivoでは、パーキンと相互作用するE4様の酵素が存在してポリユビキチン化反応を触媒する可能性も否定できない。これらについては、今後の検証が必要である。

また多くのAR-JP由来の変異パーキンを用いた解析からC-末端側に存在するRING2ドメインがパーキンの活性中心を形成しているRING-fingerドメインであることが明確になった。AR-JPは常染色体劣性の遺伝形式を取る家族性疾患であるので、RING2ドメインの変異は、Loss-of-Functionで病気が発症することは明確であるが、他のドメインの変異によって発症する場合は、酵素活性の喪失以外に細胞内でのパーキンの働きが損なわれることを示唆しており、今後のAR-JPの発症機構を考えると非常に興味深い知見を得たことになる。AR-JPの発症機構とパーキンのドメイン機能との関連性については、更なる研究の推進が必要である。

#### E. 結論

1)パーキンノックインマウスの脳においてドーパミン遊離の低下を主因とするドーパミン代謝異常を観察した。

2) パーキンはIn vitroで複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることが判明した。パーキン活性中心はRING2ドメインであること、AR-JPの患者ではユビキチンリガーゼ活性の喪失以外の原因で発症する場合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

- (1) Kitada, T., *et al.* (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392**, 605-608.
- (2) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet.* **25**, 302-305.
- (3) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Keiji Tanaka (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* **281**, 3204-3209.
- (4) Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* **2001**; **2**: 1133-1138
- (5) Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, and Nukina N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem.* **280**, 11635-11640
- (6) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, and Takashima A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem.* **2005**; **94**:1254-1263
- (7) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **2002**; **418**: 438-442
- (8) Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., and Tai, T. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J. Biol. Chem.* **2003**; **278**: 43877-43884
- (9) 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

- (10) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**, 425-434.
- (11) Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Kato, K. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain. *EMBO Rep.* **2003**; **4**: 301-306
- (12) Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N, Koyama A, Iwatsubo T, Ito S, Jansen PH, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. (2005) Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **332**, 233-240.
- (13) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K., (2006) 14-3-3 $\sigma$  is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J.* **25**, 211-221.

2. 学会発表

- Keiji Tanaka : Cellular Apparatus for Proteolysis in Eukaryotes. Large-scale Analysis of Cellular Function -Advanced Technology for Proteomic Biology- January 27-28, 2005 Tokyo, Japan
- Keiji Tanaka : Recognition of Glycosylated Substrates by SCF<sup>Fbs</sup> Ubiquitin Ligases. Keystone Symposium "Ubiquitin and Signaling" February 22-27, 2005, Taos Convention Center in Taos, New Mexico, USA
- Keiji Tanaka : Structure, Function, and Assembly of Mammalian Proteasomes. The 6th Workshop on Proteasomes. April 24-26, 2005, Clermont-Ferrand (France)
- Keiji Tanaka : Uncovering the mystery of the ubiquitin-proteasome system . The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (plenary lecture) October 17-18, 2005. Seoul, Korea
- Keiji Tanaka : A multistep-ordered Mechanism for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . International Symposium on "Life of Proteins" AWAJI YUMEBUTAI (October 30-November 3, 2005. Awaji
- Keiji Tanaka : Structure, Assembly and Functions of Mammalian Proteasomes. 2nd Meeting of Bone Biology Forum. November 18-19, 2005, Mishima

G. 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