

of target proteins. In fact, the metabolic energy liberated by ATP consumption is probably used for unfolding target proteins, gate opening of the 20S proteasome, and substrate translocation so that they can penetrate into the channel formed by the α - and β -rings of the 20S proteasome (Ogura and Tanaka, 2003). On the other hand, the lid-complex is thought to be involved in the recognition of polyubiquitylated target proteins, deubiquitylation of substrates for reutilization of ubiquitin, and physical interactions with various other proteins that influence proteasome activity. The details of molecular bases for functions of individual subunits, however, are largely unknown to date.

Assay of Proteasome Activity

Assay of Suc-LLVY-MCA Degrading Activity

The 26S proteasome is incubated at 37° for 10 min in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 1 mM dithiothreitol (DTT) and a 0.1 mM concentration of a fluorogenic substrate, the synthetic peptide succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methyl-coumaryl-7-amide (Suc-LLVY-MCA) (Peptide Institute). This substrate is added to the assay mixture at a final concentration of DMSO of 1% (v/v). The reaction was stopped by adding 10% SDS at final concentration of 1%, and the reaction product is measured fluorometrically (excitation 380 nm, emission 460 nm).

The 26S proteasome can be visualized on electrophoretic gels as a Suc-LLVY-MCA-degrading enzyme. Samples are subjected to nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 4° before the gels are overlaid with 0.1 mM Suc-LLVY-MCA for 10 min at room temperature. Fluorescence was then detected under ultraviolet light.

Assay of Polyubiquitylated ¹²⁵I-Lysozyme Degrading Activity

Preparation of polyubiquitylated ¹²⁵I-lysozyme can be prepared by using purified E1, E2, and E3 enzymes, as described previously (Fujimuro *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 1991). For assay of degradation of polyubiquitylated ¹²⁵I-lysozyme, samples of ¹²⁵I-lysozyme-ubiquitin conjugates (5000–10,000 cpm) are incubated at 37° for 15–60 min in a total volume of 100 μ l of reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) with 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, an ATP-regeneration system (10 μ g of creatine phosphokinase and 10 mM phosphocreatine), 1 mM DTT, and a suitable amount of the 26S proteasome. After the reaction is stopped by adding SDS-PAGE sample buffer, the proteins are subjected to

SDS-PAGE and autoradiographed. The gels are dried and exposed to x-ray film at -70° with an intensifying screen. For measuring the degradation of ^{125}I -lysozyme-ubiquitin conjugates into acid-soluble fragments by the 26S proteasome, the reaction is terminated by addition of $575\ \mu\text{l}$ of 10% trichloroacetic acid (TCA) with $125\ \mu\text{l}$ of 4% bovine serum albumin (BSA) as a carrier, and the radioactivity recovered in the acid-soluble fraction after centrifugation is determined in a γ -counter.

Assay of Polyubiquitylated Sic1 Degrading Activity

Deshaies and his colleagues devised an *in vitro* assay method of 26S proteasomes using polyubiquitylated Sic1, a CDK inhibitor in the budding yeast, as a substrate. Polyubiquitylation of Sic1 phosphorylated by CDK is catalyzed by E1, E2 (Cdc34), and E3 (SCF^{Cdc4}). The details of the methods were described previously (Verma and Deshaies, 2005; Verma *et al.*, 2001).

Saeki *et al.* devised an improved method by preparing PY motif-inserted Sic1 (Sic1^{PY}) that is effectively polyubiquitylated by Rsp5 E3-ligase and rapidly degraded by 26S proteasomes in an ATP-dependent fashion (for details, see Chapter 14 [Saeki *et al.*, 2005]). It is of note that all components used in this assay system can be easily expressed and purified using bacterial cells.

Assay of ^{35}S -ODC Degrading Activity

For quantitative and sensitive measurement of ATP-dependent proteolysis activity of mammalian proteasomes *in vitro*, ornithine decarboxylase (ODC) is a useful substrate. ODC is the best-known natural substrate of the proteasome whose recognition and degradation are independent of ubiquitylation (Murakami *et al.*, 1992). Antizyme (AZ), an ODC inhibitory protein that is needed for this *in vitro* degradation assay, is prepared as a recombinant protein (Murakami *et al.*, 1999). Rat AZ cDNA Z1 is expressed in *Escherichia coli*, and an extract of the *E. coli* (800 mg protein) is applied to a monoclonal anti-AZ antibody (HZ-2E9)-AffiGel 10 column (1 ml); the column is washed with 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 0.01% Tween 80, supplemented with 4 M NaCl. AZ is eluted with 4 ml of 3 M MgCl₂, and the eluate is dialyzed against the same buffer. ^{35}S -labeled ODC is produced by an *in vitro* translation system using rabbit reticulocyte lysate containing rat ODC mRNA, ^{35}S -labeled methionine, and ^{35}S -labeled cysteine (Du Pont NEN). The reaction is applied to a monoclonal anti-ODC antibody (HO101)-AffiGel 10 column (0.15 ml). The procedures for wash and elution are the same as AZ purification.

The degradation of the recombinant ^{35}S -labeled-ODC (2000–3000 cpm) is assayed in the presence of ATP, an ATP-regenerating system, and AZ (Murakami *et al.*, 1999). After incubation for 60 min at 37° , the amount of TCA-soluble radioactivity in the reaction mixture is measured, and the activity is expressed as a percent of total ODC added.

Comments for Assays

1. Suc-LLVY-MCA (i.e., a substrate of chymotrypsin-like activity) is recommended as a sensitive substrate. Various other fluorogenic peptides, such as Boc (*t*-Butyloxycarbonyl)-Leu-Arg-Arg-MCA and Z (benzyloxy-carbonyl)-Leu-Leu-Glu-MCA for monitoring trypsin-like and caspase-like/PGPH (peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing) activity, respectively, are suitable for measurement of 20S and 26S proteasomal activity, because proteasomes show broad substrate specificity. The hydrolytic activities toward various fluorogenic substrates are determined by measuring the fluorescence of groups liberated from these peptides. Latent 20S proteasomes can be activated in various ways. We recommend the use of SDS at low concentrations of 0.02–0.08% for activation of Suc-LLVY-MCA breakdown; the optimal concentration depends on the enzyme source and the protein concentration used. The fluorogenic peptide (e.g., Suc-LLVY-MCA) can be used for assay of the 26S proteasome, because it is active without any treatment unlike the latent 20S proteasome. MCA (4-methyl-coumaryl-7-amide) is used as a reference compound for analysis with peptidyl-MCAs.

2. Various fluorogenic peptides are suitable for measurement of 20S and 26S proteasomal activity, but note that all of them are not specific substrates for these proteasomes. For specific assay, ATP-dependent degradation of polyubiquitinated ^{125}I -lysozyme, or Sic1/Sic1^{PY} should be measured, although such assay is not easy, because three kinds of enzymes, E1, E2, and E3, must be purified for *in vitro* preparation of ubiquitinated substrates. Therefore, for quantitative and sensitive measurement of ATP-dependent proteolysis activity of mammalian proteasomes *in vitro*, ODC is a useful substrate. Note that AZ is not present in lower organisms such as yeasts, and thus this assay is not fit for proteasomes isolated from these cells.

3. The purification of the 26S proteasome is monitored by measuring ATPase activity at later steps of its purification, because the 26S proteasome has intrinsic ATPase activity (Ugai *et al.*, 1993). Note that this assay is not sensitive and cannot be used in crude extracts because of the existence of numerous other ATPases in cells.

Large-Scale Purification of 20S and 26S Proteasomes from Rat Liver

Purification Procedure of 20S Proteasomes

Step 1. Homogenize 200–400 g samples of rat liver in 3 vol of 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1 mM DTT and 0.25 M sucrose in a Potter-Elvehjem homogenizer. Centrifuge the homogenate for 1 h at 70,100g, and use the resulting supernatant as the crude extract.

Step 2. Add glycerol at a final concentration of 20% to the crude extract. Then mix the extract with 500 g of Q-Sepharose (Amersham) that has been equilibrated with buffer A (25 mM Tris-HCl [pH 7.5] containing 1 mM DTT [or 10 mM 2-mercaptoethanol] and 20% glycerol). Wash the Q-Sepharose with the buffer A on a Büchner funnel and transfer to a column (5 × 60 cm). Wash the column with buffer A and elute the material with 2 liters of a linear gradient of 0–0.8 M NaCl in buffer A, and measure the activity of proteasomes using Suc-LLVY-MCA as a substrate.

Step 3. Pool fractions containing 20S proteasomes from the Q-Sepharose column and add 50% polyethylene glycol 6000 (Sigma) (adjust to pH 7.4) to a final concentration of 15% with gentle stirring. After 15 min, centrifuge the mixture at 10,000g for 20 min, dissolve the resulting pellet in a minimum volume (approximately 50 ml) of buffer A, and centrifuge at 20,000g for 10 min to remove insoluble material.

Step 4. Fractionate the material precipitated with polyethylene glycol on a Bio-Gel A-1.5m column (5 × 90 cm) in buffer A. Collect fractions of 10 ml and assay their proteasome activity. Pool fractions of 20S proteasomes.

Step 5. Apply the active fractions from the Bio-Gel A-1.5m (Bio-Rad) column directly to a column of hydroxylapatite equilibrated with buffer B (10 mM phosphate buffer [pH 6.8] containing 1 mM DTT and 20% glycerol). Wash the column with the same buffer and elute the material with 400 ml of a linear gradient of 10–300 mM phosphate. Collect fractions of 4 ml. 20S proteasomes are eluted with approximately 150 mM phosphate.

Step 6. Combine the active fractions from the hydroxylapatite (Bio-Rad), dialyze against buffer A, and apply to a column of heparin-Sepharose CL-6B (Amersham) equilibrated with buffer A. Wash the column with the same buffer until the absorbance of the eluate at 280 nm returns to baseline. Then elute with 200 ml of a linear gradient of 0–0.4 M NaCl in buffer A, and collect fractions of 2 ml. 20 S proteasomes are eluted with approximately 75 mM NaCl.

Step 7. Pool the fractions with high proteasomal activity, dialyze against buffer A, and concentrate to about 5 mg/ml protein by ultrafiltration in an Amicon cell with a PM-10 membrane (Millipore). The enzyme can be stored at –80° for at least 2–3 years. The SDS-PAGE analysis of purified enzyme

revealed that it consists of a set of proteins, displaying the molecular weights of 20–32 kDa (see left panel of Fig. 2).

Purification Procedure of 26 Proteasomes

Step 1. Homogenize 200–400-g samples of rat liver in 3 vol of 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1 mM DTT, 2 mM ATP, and 0.25 M sucrose in a Potter-Elvehjem homogenizer. Centrifuge the homogenate for 1 h at 70,100g and use the resulting supernatant as the starting material.

Step 2. Recentrifuge the crude supernatant for 5 h at 70,100g to obtain 26S proteasomes, which precipitate almost completely. Dissolve the precipitate in a suitable volume (40–50 ml) of buffer C (buffer A containing 0.5 mM ATP) and centrifuge at 20,000g for 30 min to remove insoluble material.

Step 3. Apply samples of the preparation from step 2 to a Bio-Gel A-1.5m column (5 × 90 cm) in buffer C. Collect fractions of 10 ml and assay the 26S proteasome activity in the fractions. Pool fractions of 26S proteasomes.

Step 4. Add ATP at a final concentration of 5 mM to the pooled fractions of 26S proteasomes from the Bio-Gel A-1.5m column. Apply the sample directly to a hydroxylapatite column with a 50-ml bed volume that has been equilibrated with buffer D (buffer B containing 5 mM ATP). Recover the 26S proteasome in the flow-through fraction, because they do

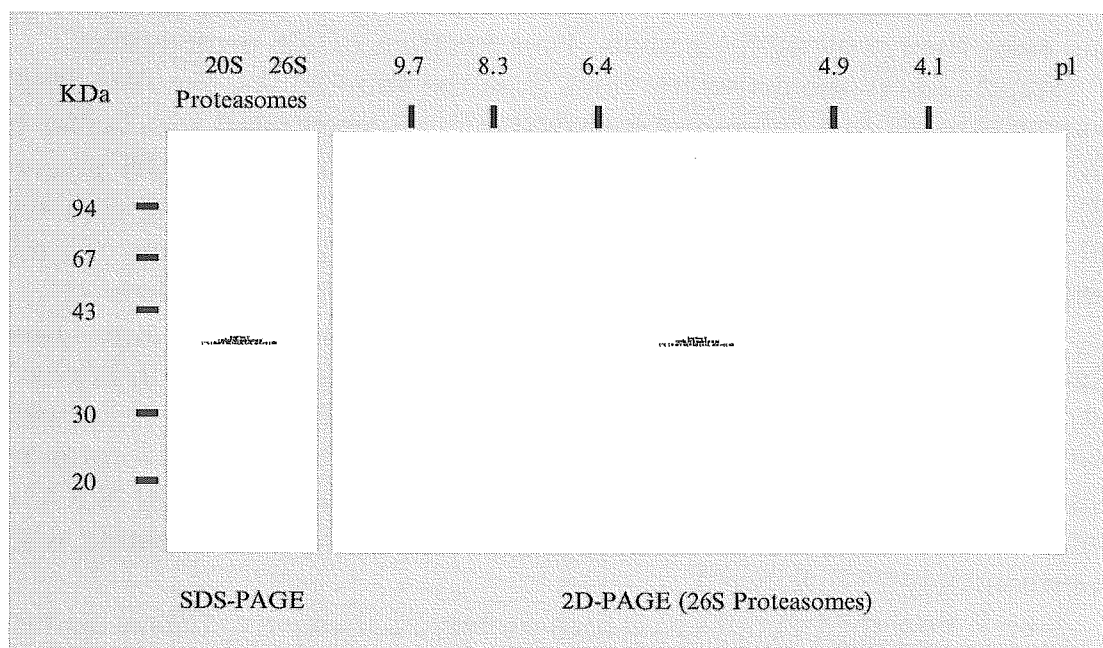


FIG. 2. Electrophoretic analyses of 20S and 26S proteasomes from rat liver. (Left panel) SDS-PAGE pattern of purified 20S and 26S proteasomes. (Right panel) 2D-PAGE pattern of purified 26S proteasomes. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB).

not associate with this column in the presence of 5 mM ATP. Approximately 70% of the proteins, including free 20S proteasomes, bind to the hydroxylapatite resin.

Step 5. Apply the flow-through fraction from the hydroxylapatite column to a Q-Sepharose column that has been equilibrated with buffer C without ATP and washed with 1 bed volume of buffer C. Wash the column with 5 bed volumes of buffer C, and elute the adsorbed materials with 300 ml of a linear gradient of 0–0.8 M NaCl in buffer C. Collect fractions of 3.0 ml. Proteins with ability to degrade Suc-LLVY-MCA with or without 0.05% SDS are eluted with approximately 0.4 M NaCl as a single symmetrical peak. ATPase activity and the ATP-dependent activity necessary to degrade ¹²⁵I-lysozyme-Ub conjugates are observed at the same position as the peptidase activity and are eluted as superimposable symmetrical peaks, which suggests a specific association of ATPase with the 26S proteasome complex. Collect the protein in fractions exhibiting high activity.

Step 6. Concentrate the 26S proteasome fraction obtained by Q-Sepharose chromatography to 2.0 mg/ml by ultrafiltration with an Amicon PM-30 membrane, and subject samples of 2.0 mg of protein to 10–40% glycerol density-gradient centrifugation (30 ml in buffer C containing 2 mM ATP). Centrifuge for 22 h at 82,200g in a SW rotor, and collect fractions of 1 ml from the bottom of the centrifuge tube. A single major peak of peptidase activity, measured in the absence of SDS, is eluted around fraction 15, but when the activity is assayed with 0.05% SDS, another small peak is observed around fraction 20. The latter peak corresponds to the elution position of 20S proteasomes. ATPase activity is observed at the same position as peptidase activity. Activity for ATP-dependent degradation of ¹²⁵I-lysozyme-Ub conjugates is also observed as a single symmetrical peak, coinciding in position with the ATPase and peptidase activities in the absence of SDS. No significant ¹²⁵I-lysozyme-Ub conjugate degrading activity is detected in fractions of 20S proteasomes. Pool fractions 12–16 and store at –80°. Two-dimensional (2D) PAGE revealed that the purified enzyme consists of a set of approximately 40 proteins displaying the molecular weights of 20–110 kDa and isoelectric points (pIs) of 3–10 (see right panel of Fig. 2).

Small-Scale Purification of 26S Proteasomes

Conventional Chromatographic Purification of Nuclear 26S Proteasomes

Preparation of Nuclear Extracts. The nuclei from rat liver were prepared as described previously (Tanaka *et al.*, 1989).

Step 1. Homogenize animal tissues (mouse or rat) (50 g) in 4 volumes (200 ml) of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing 1 mM DTT, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 % glycerol, 2.2 M sucrose, and Complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemical). The resulting homogenates are layered on a cushion of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing 1 mM DTT, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and 2 M sucrose occupying one third the volume of centrifuge tubes and are centrifuged at 83,000g for 60 min in aSW rotor to pellet the nuclei.

Step 2. Disrupt the isolated nuclei by sonication in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing 1 mM DTT, 2 mM ATP, and Complete protease inhibitor cocktail. The nuclear extracts were obtained by centrifugation at 10,000g for 20 min as the resulting supernatants (approximately 40 mg). The purity of the nuclear extracts should be examined by Western blot analysis. Histone H1, a marker of nucleus (detected with antibodies from Upstate Biotechnology), but not LDH, a marker of cytosol (detected with antibodies from Abcam), should be detected in the nuclear extracts without obvious cross-contamination.

Purification of Nuclear 26S Proteasomes

Step 1. Load the nuclear extracts on a RESOURCE Q column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer E (50 mM Tris-HCl [pH 8.0] buffer containing 1 mM DTT, 2 mM ATP, and 10% glycerol), wash the column with buffer E, and elute bound proteins with a gradient of 0–0.8 M NaCl in buffer E. Pool the fractions with Suc-LLVY-MCA degrading activity. 26S proteasomes are eluted with 450–500 mM NaCl.

Step 2. Add ATP at a final concentration of 5 mM to the pooled fractions of 26S proteasomes from RESOURCE Q column. Load the fractions on a Hydroxylapatite column (Bio-Rad) equilibrated with buffer D. Recover 26S proteasomes in the flow-through fractions. (Check Suc-LLVY-MCA degrading activity).

Step 3. Load the flow-through fractions on a Mono Q column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer E, wash the column with buffer E, and elute bound proteins with a gradient of 0–0.8 M NaCl in buffer E (0.5 ml/fraction). Pool the fraction exhibiting peak activity and the adjacent fractions. 26S proteasomes are eluted with 450–500 mM NaCl. This step helps to concentrate 26S proteasomes for the next step.

Step 4. Subject the pooled fractions (approximately 2.0 mg protein/1.5 ml) to 10–40% glycerol density-gradient centrifugation (30 ml in buffer F [50 mM Tris-HCl {pH 8.0} buffer containing 1 mM DTT and 2 mM ATP]). Centrifuge for 22 h at 82,200g in SW28 (Beckman) or P28S (HITACHI) rotor, collect fractions of 1 ml from the top of the centrifuge tube, and check

Suc-LLVY-MCA degrading activity. A single major peak of peptidase activity, measured in the absence of SDS, corresponds to 26S proteasomes sedimented around fraction 20 (approximately 0.1 mg protein). Pool fractions with high Suc-LLVY-MCA degrading activity and store at -80° .

Affinity Purification

Conventional biochemical techniques for purification of 26S proteasomes use chromatographic columns as described previously. During the purification steps, 26S proteasomes are exposed to high ionic strength buffers, which cause dissociation of proteins bound to proteasomes transiently or with low affinity. In yeast, tagging of certain subunits of 26S proteasomes that are driven by their own promoters and purification by the tag in milder conditions has enabled identification of many novel proteasome-interacting proteins (PIPs). Mammalian proteasomes are expected to have a more complicated network and it is essential to clarify mammalian PIPs to fully understand the roles of proteasomes. To solve this problem, we developed an ES cell line that has one allele of the human Rpn11 gene tagged with a C-terminal flag epitope (Rpn11^{FLAG/+} ES cells) by a homologous recombination technique. The method for establishing the ES cell line will be described elsewhere.

Procedure

Step 1. Grow Rpn11^{FLAG/+} ES cells on six 10-cm dishes on which mitomycin C-treated murine embryonic fibroblasts were laid.

Step 2. Collect cells using an appropriate scraper with PBS in a conical tube, centrifuge at 1500g for 10 min. Wash cells once more with PBS.

Step 3. The cell pellet was resuspended in 6 ml of buffer G (20 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 0.2% NP-40, 2 mM ATP, 1 mM DTT) by gentle pipetting and placed on ice for 10 min.

Step 4. Centrifuge at 10,000g for 10 min to remove cell debris.

Step 5. To preclear the lysate, pass the lysate through a column packed with 0.5 ml (bed volume) of Sepharose CL-4B (Sigma).

Step 6. Apply the flow-through onto the column packed with 50 μ l (bed volume) of M2-agarose (Sigma). Pass the flow-through through the column five times.

Step 7. Wash the column 10 times with 5 ml of buffer G supplemented with 50 mM NaCl.

Step 8. Incubate the column with 50 μ l of FLAG peptide (Sigma; dissolved at 100 μ g/ml in buffer G) on ice for 3 min.

Step 9. Recover the eluted proteins by centrifugation at 1000 rpm for 1 min.

Step 10. Repeat step 8 and step 9 three more times, and collect all the eluted materials in one tube. We usually obtained about 60 μg of 26S proteasome in this procedure. The 2D PAGE pattern of 26S proteasomes purified by this method is shown in Fig. 3.

Discussion

Proteasomes have been purified from a variety of eukaryotic cells by many investigators. Many purification methods have been reported, but no special techniques are necessary, because 20S proteasomes are very stable and abundant in cells, constituting 0.5–1.0% of the total cellular proteins. The procedures used for purification of 20S proteasomes obviously differ, depending on whether they are small or large operations. For their isolation from small amounts of biological materials, such as cultured cells, 10–40% glycerol density gradient centrifugation is very effective. 20S proteasomes are present in a latent form in cells and can be isolated in this form in the presence of 20% glycerol. For their isolation in high yield, a key point is to keep them in their latent form, because their activation results in autolytic loss of a certain subunit(s) and marked reduction of enzymatic activities, particularly their hydrolysis of various proteins. Accordingly, all buffers used contain 10–20% glycerol as a stabilizer. Furthermore, a reducing agent is required, because 20S proteasomes precipitate in its absence.

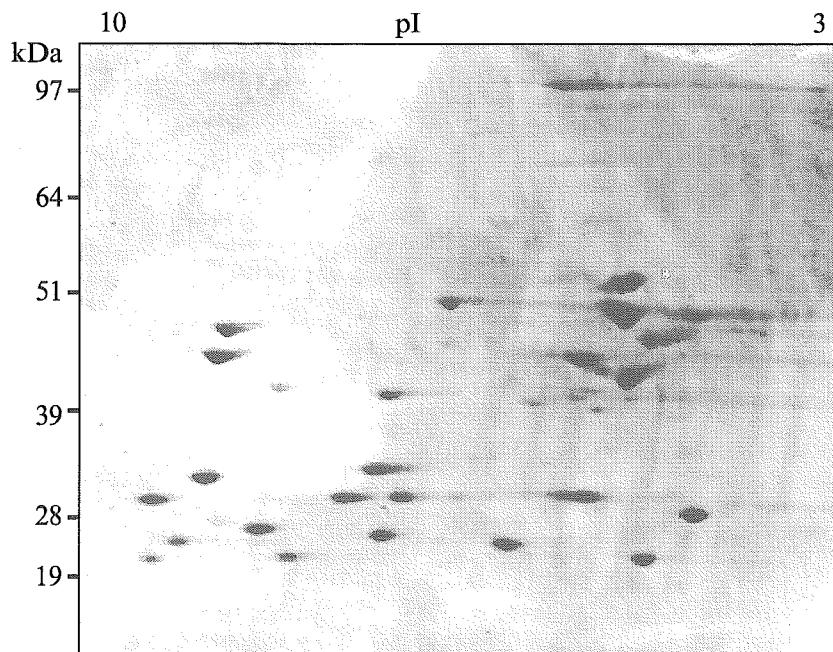


FIG. 3. Two-dimensional PAGE pattern of 26S proteasomes purified from Rpn11^{FLAG/+} ES cells. Proteins were stained with CBB.

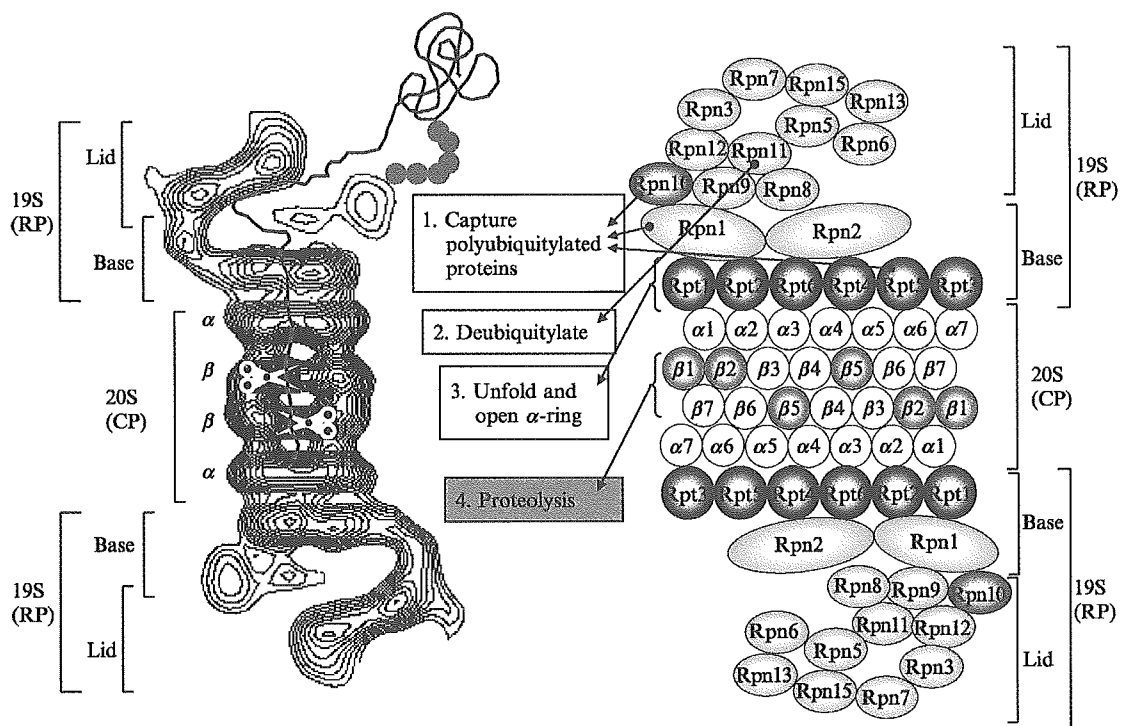
All purification procedures are performed at 4°, but operations in a high-performance liquid chromatography (HPLC) apparatus can be carried out within a few hours at room temperature.

For purification of the 26S proteasome, ATP (0.5 mM or 2 mM) together with 20% glycerol and 1 mM DTT should be added to all solutions used, because they strongly stabilize the 26S proteasome complex: the purified enzyme is stable during storage at -70° for at least 6 months in the presence of 2 mM ATP and 20% glycerol. Chromatographic steps that require high salt concentrations or extremes of pH should be avoided, because these operations may result in dissociation of the 26S complex into its constituents.

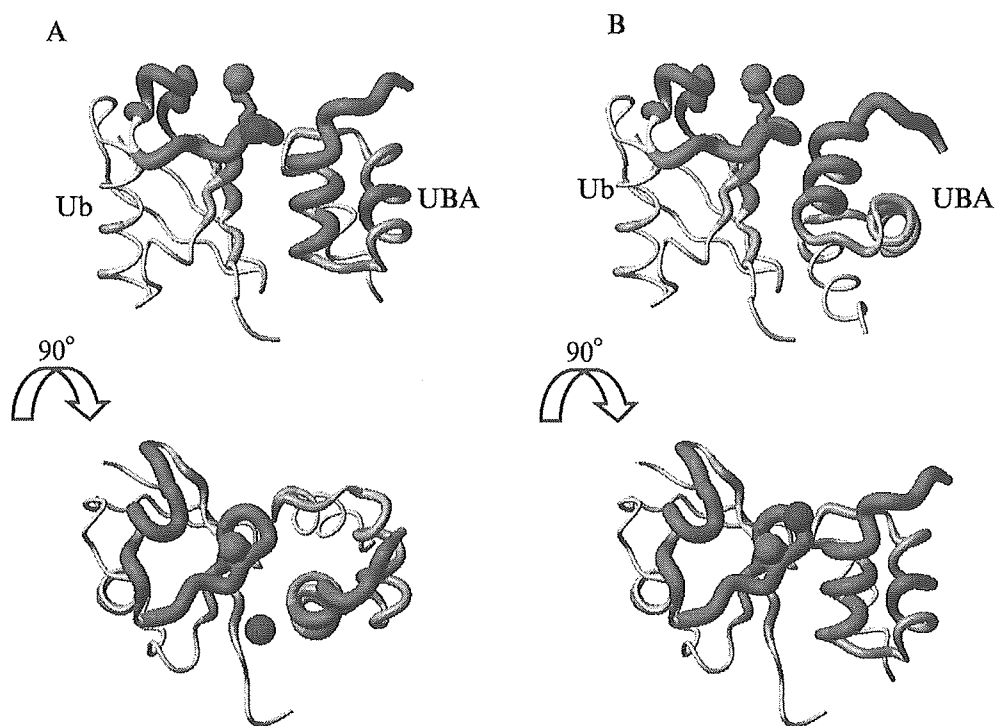
References

- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367–380.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801–847.
- Fujimuro, M., Sawada, H., and Yokosawa, H. (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett.* **349**, 173–180.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615–623.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463–471.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S. I., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1999). ATP-dependent inactivation and sequestration of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome are prerequisites for degradation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7216–7227.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**, 597–599.
- Ogura, T., and Tanaka, K. (2003). Dissecting various ATP-dependent steps involved in proteasomal degradation. *Mol. Cell* **11**, 3–5.
- Pickart, C. M. (2001). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* **8**, 499–504.
- Saeki, Y., Isono, E., and Toh-e, A. (2005). Preparation of ubiquitinated substrates by the PY motif-insertion method for monitoring 26S proteasome activity. *Methods Enzymol.* **399**, 215–227.
- Tamura, T., Tanaka, K., Tanahashi, N., and Ichihara, A. (1991). Improved method for preparation of ubiquitin-ligated lysozyme as substrate of ATP-dependent proteolysis. *FEBS Lett.* **292**, 154–158.
- Tanaka, K., Kumatori, A., Ii, K., and Ichihara, A. (1989). Direct evidence for nuclear and cytoplasmic colocalization of proteasomes (multiprotease complexes) in liver. *J. Cell Physiol.* **139**, 34–41.

- Tanaka, K., Yashiroda, H., and Murata, S. (2005). Ubiquitin and diversity of the proteasome system. In "Protein Degradation" (R. J. Mayer, A. Ciechanover, and M. Rechsteiner, eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim (in press).
- Ugai, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Takai, S., Komi, N., Chung, C. H., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1993). Purification and characterization of the 26S proteasome complex catalyzing ATP-dependent breakdown of ubiquitin-ligated proteins from rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 754–768.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure (Camb)*. **10**, 609–618.
- Verma, R., and Deshaies, R. J. (2005). Assaying degradation and deubiquitination of a ubiquitinated substrate by purified 26S proteasomes. *Methods Enzymol.* **398**, 391–399.
- Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R., 3rd, and Deshaies, R. J. (2001). Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell* **8**, 439–448.



HIRANO *ET AL.*, CHAPTER 15, FIG. 1. Molecular organization of 26S proteasomes. (Left panel) Averaged image of the 26S proteasome complex of rat based on electron micrographs. The α and β rings of the 20S proteasome are indicated. Photograph kindly provided by W. Baumeister. (Right panel) Schematic drawing of the subunit structure. CP, core particle (alias 20S proteasome); RP, 19S regulatory particle (alias PA700) consisting of the base and lid subcomplexes; Rpn, RP non-ATPase; Rpt, RP triple-ATPase. Note that relative positions of 19S subunits have not been established.



VARADAN *ET AL.*, CHAPTER 12, FIG. 4. Experimental verification of the existing models for the monoUb/UBA2 complex using site-directed spin labeling. (A) represents the Ub/UBA2 structure modeled by the Ub/CUE complex (Kang *et al.*, 2003), whereas the docked structure (Mueller *et al.*, 2004) is shown in (B). The bottom row shows views of the same structures from the top. The ribbons represent the backbone of Ub and UBA2; the atom coordinates are from Mueller *et al.* (2004). The ribbon width increases proportionally to the observed paramagnetic line broadening (hence closer distance to the spin label) and is color-coded by this distance as red (closest, <17 Å), orange (17–26 Å), and yellow (>26 Å). The spheres represent the reconstructed positions of the spin label as “seen” by Ub (green) and by UBA2 (blue). Also shown is the side chain of Cys48 (Ub), where the spin label was covalently attached. The coordinates of the spin label were obtained using a three-dimensional search algorithm aimed at satisfying all available amide–MTSL distance constraints.

1. 家族性 PD から孤発性 PD の病態解明に向けて — Parkin 不活性化による神経変性の分子機構

京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構 王 華芹

同 脳病態生理学講座臨床神経内科 高橋良輔

key words Parkin, Pael-R, ER stress, oxidative stress, dopamine

要 約

Parkinson 病 (PD) は、ドーパミン神経細胞の選択的変性による進行性の運動障害を主症状とする神経変性疾患である。孤発性 PD における神経変性の分子機構は依然解明されていないが、近年遺伝子異常による家族性 PD の報告が相次いでおり、その病態を研究することにより孤発性 PD の病因を解明することが期待されている。現在までに同定された家族性 PD の原因遺伝子産物の機能から、共通カスケードとしてユビキチンプロテアソーム系、酸化ストレスの関与が推定される。特に常染色体劣性若年性 Parkinson 病 (AR-JP) の原因遺伝子産物 Parkin はユビキチンプロテアソーム経路のユビキチンリガーゼの活性をもつことが明らかにされ、病態解明の鍵を握るといっても過言ではない。AR-JP における神経細胞死は、Parkin のユビキチンリガーゼ活性の喪失によって起こると考えられている。このことは、Parkin によって分解されるべき基質の神経細胞への蓄積がその病態の原因であることを示唆している。Parkin の基質としては、CDCrel-1 や α シヌクレイン、Pael-R (Pael-R: parkin associated endothelin receptor like receptor) がある。その中でも膜蛋白質 Pael-R は、ドーパミン神経に高い発現がみられ、ERAD により分解を受ける。

Pael 受容体は非常に折り畳み困難な蛋白質であり、神経系培養細胞内で過剰発現させると、新生蛋白質の約半分がフォールディングに失敗し、構造が異常で、機能をもたないミスフォールド蛋白質になり、過剰発現により不溶化した Pael 受容体が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスにより細胞死を引き起こす。Pael 受容体の過剰発現による不溶化 Pael 受容体の蓄積および細胞死は、野生型 Parkin の共発現により抑制される。さらに、ショウジョウバエにおいて、Pael-R の過剰発現によって特異的にドーパミン神経の変性がみられ、Parkin のノックダウンはそれを増悪する。このことは、Parkin は E3 として構成的にミスフォールド化 Pael-R をユビキチン化し、その分解を促進していると考えられる。Parkin ノックアウトマウスは、生涯にわたりドーパミン神経変性が起こらないにもかかわらず、線条体ドーパミン含量が有意に高いレベルを示している。また、Pael-R トランスジェニックマウスにおいても、線条体ドーパミン含量が高く、ドーパミン神経細胞の数が減少傾向にあることから、高濃度のドーパミンが神経変性を促進する因子となる可能性を示唆している。ドーパミンは、生理的条件下では容易に酸化し、過酸化水素を生じることにより、神経細胞に傷害を与える。さらにドーパミンの酸化物であ

ドーパミンキノンが、蛋白質のシステイン残基を修飾する。この修飾はParkinのユビキチンリガーゼ活性を失活させ、Pael-Rの凝集化を促進することがわかった。すなわちドーパミン神経に特異的である高濃度のドーパミン暴露により酸化ストレスがドーパミン神経細胞の選択的脆弱性の基礎となって、異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスがドーパミン神経細胞死には中心的な役割を果たしていると考えられている。現在、この仮説の妥当性をParkinノックアウトマウスとPael-Rトランスジェニックマウスの掛け合わせマウスを用いて検討しているところである。

動 向

Parkinson病 (PD) はAlzheimer病に次いで罹患率の高い老人性神経変性疾患であり、臨床的には振戦、固縮、無動、姿勢歩行障害などの運動症状を特徴とする。病理学的には黒質のドーパミン神経細胞を選択的に変性、脱落を認め、変性神経細胞にLewy小体 (LB) が出現する。ドーパミン神経細胞死の機序に関して、ドーパミン神経毒、特にMPTPとロテノンを用いたPDモデル動物の研究により、ミトコンドリア機能障害あるいはグリアを中心とした炎症反応に引き続く共通の障害機序として酸化ストレス、ユビキチンプロテアソーム系機能低下が重要視されてきた。非選択的にミトコンドリア機能、ユビキチンプロテアソーム系機能を抑制するにもかかわらず、ドーパミン神経に選択的な脱落、変性と封入体形成をもたらすことから、ドーパミン由来のドーパミンキノンなどのキノン体による酸化ストレスが指摘された。すなわちドーパミンの存在自体が傷害性の元となり、「高濃度のDAを含有している」というDA神経細胞であること自体が、DA神経細胞の選択的脆弱性の基礎となっているという宿命が明らかになってきた。

PDのほとんどは孤立性に発症するが、一部で

遺伝性のもも知られている。Alzheimer病 (AD) においては、家族性ADの原因遺伝子の機能解析から、アミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) の蓄積が孤発性と共通する発症機序が存在することが証明された。このADのアプローチがPDの病態解明にも応用できると考えられている。つまり、家族性PD原因遺伝子の機能解析が孤発性PDの病態メカニズムを理解する手がかりとなることが予想される。現在までに、Park1~11, NR4A2の12個の原因遺伝子座が特定され、このうち、 *α -synuclein*, *parkin*, *dj-1*, *pink-1*, *uch-11*, *nurr-1*, *lrrk2*の7つが原因遺伝子 (表1) として同定されている (ただし、*uch-11*と*nurr-1*については遺伝学的証拠はまだ充分とはいえない点がある)。これらの遺伝子産物の異常は家族性PDの発症に加えて孤発性PD発症にかかわっていることが明らかになりつつあり、家族性PD原因遺伝子の同定とその機能解明は遺伝性のみならず最も一般的な孤発性PDの病態解明につながる可能性がある。

常染色体優性遺伝性PDの病因遺伝子として同定された直後、 *α -synuclein*蛋白質はPDの病理マーカーであるLewy小体の主要構成成分であることが判明した¹⁾。さらに最近、Park4について

表1 causative genes for familial PD

| name | gene | locus | inheritance form |
|--------|---|---------------|------------------|
| PARK1 | <i>α-synuclein</i> | 4q21-23 | AD |
| PARK2 | <i>parkin</i> | 6q25.2-27 | AR |
| PARK3 | unknown | 2p13 | AD |
| PARK4 | <i>α-synuclein</i> triplication | 4q13-22 | AD |
| PARK5 | <i>uch-11</i> | 4p14-15 | AD |
| PARK6 | <i>pink-1</i> | 1p35-36 | AR |
| PARK7 | <i>dj-1</i> | 1p36 | AR |
| PARK8 | <i>lrrk2</i> | 12p11.2-q13.1 | AD |
| PARK9 | unknown | 1p36 | AR |
| PARK10 | unknown | 1p32 | AR |
| PARK11 | unknown | 2p36-37 | AD |
| NR4A2 | <i>nurr-1</i> | 2q22-23 | AD |

も α -synuclein 遺伝子を含む 1.5Mb の遺伝子領域の三重化 (triplication) が同定され、患者脳での α -synuclein 蛋白質の発現量が増加したことが判明した²⁾。これらの発見は野生型 α -synuclein の過剰産生も PD 発症の原因となることを示唆し、孤発性PDにおける α -synuclein 蓄積の原因的意義を裏付けるものである。また、他の優性遺伝の原因遺伝子として *nurr-1*, *uch-11* (Park5), *lrrk2* が相次いで報告された。UCH-L1 は脱ユビキチン化酵素としての機能を持ち、ユビキチンプロテアソーム系に關与する蛋白質である³⁾。Nurr-1 はドーパミン神経に多く発現し、チロシン水酸化酵素の転写を制御する転写因子で、変異型 Nurr-1 の転写量は野生型に比べ減少し、それに応じてチロシン水酸化酵素の転写量も減少することが報告されている⁴⁾。

常染色体劣性遺伝の原因遺伝子としては *parkin* (Park2), *dj-1* (Park7), さらに最近 *pink-1* (Park6) が同定された。家族性PD Park7の原因遺伝子と同定された DJ-1 は抗酸化ストレスとプロテアーゼ、転写調節因子などきわめて多彩な機能を有する蛋白質である。DJ-1 は活性酸素により発現誘導を受け、また、その過剰発現により酸化ストレスに対する抵抗性が生じることが報告され、DJ-1 は直接あるいは間接的な分子機構により抗酸化ストレス作用を発揮する蛋白質であることが示唆される⁵⁾。PINK-1 は癌抑制遺伝子 PTEN で制御される因子として同定され、ミトコンドリアに局在し、ストレスに反応してミトコンドリアの蛋白をリン酸化することにより、細胞を保護していると考えられている⁶⁾。孤発性PDでは黒質ドーパミン神経細胞のミトコンドリア機能の異常が報告され、またミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの阻害剤がパーキンソニズムを惹起することなどから、PDの発症にミトコンドリアの関与が強く示唆されている。PINK-1 は家族性PDの病因遺伝子の中ではじめて直接にミトコンドリア

に關連するもので、孤発性PDを含む黒質ドーパミン神経変性の発症機序解明の手がかりとなる可能性がある。特に先行した Parkin の研究から、単なる遺伝性疾患という範疇を超えて孤発性PDの解明に大きなヒントを与えてくれた。若年性で発症する劣性遺伝性パーキンソニズム (AR-JP: autosomal recessive juvenile parkinsonism) の原因遺伝子として同定された *parkin* の遺伝子産物は、細胞内蛋白質の分解にかかわるユビキチンプロテアソーム経路ではたらくユビキチンリガーゼの機能を持ち、神経保護的に働くとの認識が一般化しつつある。PDで報告される変異体は、そのユビキチンリガーゼとしての機能を損失していることが示唆されている^{7,8)}。それゆえ、ユビキチンリガーゼとしての Parkin が本来分解すべき基質蛋白質のドーパミン神経細胞内への蓄積が神経変性の原因であるとの考えを生み出し、ここ数年の Parkinson 病の病因研究に多大なヒントを与えてきた。さらに最近、Parkin はドーパミン代謝に關与することが明らかになって、他の遺伝性PDの遺伝子産物の機能を合わせて、異常蛋白質の蓄積と酸化的ストレスがPD発症の重要な鍵を握っていることはほぼ間違いないと考えられる。本稿では、Parkin とその基質 Pael-R を中心として概説し、PDがドーパミン代謝異常、ミトコンドリア機能低下による酸化的ストレスとユビキチンプロテアソーム系機能低下、異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスの両方のストレスによる疾患とする可能性を述べたい。

A. ユビキチンプロテアソーム系、小胞体ストレスとPD

ユビキチンプロテアソーム系とは ATP 依存性の蛋白質分解システムであり、蛋白質の翻訳後修飾をつかさどるユビキチンシステムと蛋白質分解をつかさどるプロテアソームシステムからなり、

生体内における不要蛋白質分解系において中心的役割を果たしている。この蛋白質分解系はE1 (Ub-activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin ligase) より構成されており、蛋白質分解を介して細胞周期, 癌, 免疫機構そして神経変性に関与していることが明らかにされた。神経系の細胞は盛んに受容体など膜蛋白質を産生するため、環境の変化, あるいは遺伝子変異によるミスフォールド蛋白質が小胞体に貯まりやすい組織であると予想される。ミスフォールド蛋白質が過剰に小胞体に蓄積し、細胞機能を障害する状態を小胞体ストレスといい、この状態が続くと、細胞が死に陥る。ミスフォールド蛋白質蓄積に対し小胞体は unfolded protein response (UPR) とよばれる対策を講じる。第一は、リボソームでの蛋白質合成の停止, 第二は小胞体シャペロンによるミスフォールド蛋白質の修復, そして第三は小胞体から細胞質への修復不可能なミスフォールド蛋白質の排出と、ユビキチンプロテアソーム系による分解 (ERAD: ER-associated degradation) を行うが、どうしても蓄積した異常蛋白質を除去できない場合には、細胞死の引き金が引かれる。常染色体劣性遺伝形式を示す *parkin* (Park2), *dj-1* (Park7) と常染色体優性遺伝形式を示す *uch-l1* (Park5) の遺伝子産物は、ともにユビキチンプロテアソーム系での関与が指摘されている。特にユビキチンプロテアソーム系の直接的構成酵素である Parkin の発見, その基質 Pael 受容体の同定はこの系の PD 関与がいかに重要であるか物語っている。他の遺伝性 PD の変異がきわめて頻度の低いものであるのに対し、AR-JP の原因遺伝子として同定された Parkin 遺伝子変異は世界中に分布し、しかも全長を通じて多様な変異がみついている。未知の遺伝子を含め、常染色体劣性遺伝性 PD においては約半数を Parkin の変異が占めるとされ、現在最も頻度の高いタイプである。ほとんどの場合、

40歳未満で発病することから、ドーパミン神経の生存においてこの遺伝子産物の重要性がうかがわれるが、Lewy小体がみられることはごくまれである。

ユビキチンリガーゼは分解される運命にある基質蛋白質を特異的に認識し、ユビキチン化して、プロテアソームによる分解を運命付ける役割を担い、細胞内環境を整える酵素である。Parkin がユビキチンリガーゼであることが判明し、蛋白質分解系の破綻がPDを引き起こすという仮説を生み出し、PDの病因研究に大きなインパクトを与えつつある。Parkinは劣性遺伝形式をとることから、患者脳においてはParkinのE3活性消失、もしくは、低下によって、本来分解されるはずの基質が分解されずに細胞内に異常蛋白質が蓄積し、神経変性を引き起こすことが推定されている。実際にParkin変異型では、E3活性消失・低下が報告されている。さらに、孤発性PD患者、MPTP投与によるPDモデルマウスの脳内でParkinがニトロ化修飾されており、その修飾によるE3活性が低下するとの報告もあった⁹⁾。これらの知見により、Parkinの役割は家族性PDにとどまらず、孤発性PDに関しても重要な役割をなし、その基質の同定がPDの病態を理解するうえで重要であると考えられる。Parkinの基質候補はこれまでに約10個の分子が報告され(表2)、混沌とした状態であるが、その中でPael受容体は、その蓄積によって細胞毒性を発揮し、ドーパミン代謝に関与し、さらにParkinが欠損するAR-JP患者脳内での蓄積が認められ、AR-JPの発症メカニズムを最も合理的に説明できる基質である。

Pael受容体は、Yeast two-hybridスクリーニングによりParkinと結合する蛋白質として同定され、リガンド不明なG蛋白質共役型受容体と推定される。Pael受容体はParkinによりユビキチン化されプロテアソームにより分解されることか

表2 putative substrates for Parkin's E3 ligase activity

| substrate | biological function |
|--|---|
| CDCrel-1 | septin family protein with unknown function |
| O-glycosylated α -synuclein | isoform of α -synuclein with unknown function |
| misfolded Pael-R | orphan G-protein coupled receptor |
| p38 subunit of aminoacyl-tRNA synthetase | role in protein biosynthesis |
| synaptotagmin XI | regulates exocytosis of neurotransmitters |
| expanded polyQ proteins | aberrant proteins responsible for polyQ diseases |
| α/β -tubulins | microtubule proteins |
| synphilin-1 | α -synuclein-binding protein |
| cyclin E | cell cycle regulation of mitotic cells; unknown function in neurons |
| SEPT5-v2/CDCrel-2 | homologous with CDCrel-1 |
| misfolded DAT | 12-TM protein, regulates uptake of DA |

ら、Parkinの生理的な基質の一つと考えられた¹⁰⁾。Pael受容体はドーパミン神経に豊富に発現し、ドーパミン作動性の神経芽細胞で過剰発現させると、不溶性のミスフォールド化Pael受容体が細胞内に蓄積し、細胞死を惹起する。これはPael受容体がもともと正しいフォールディング化されにくい蛋白質であり、ほとんどが小胞体関連分解(ERAD)で分解されるものの、ERADの処理能力を超えた発現量がunfolded protein response (UPR)を引き起こすためであると考えられる。過剰なUPRは、unfolded protein stress (小胞体ストレスともいう)を引き起こし、細胞がこのストレスに耐えられなくなると、細胞死を起こす。さらに、AR-JP患者脳でも不溶性Pael受容体が蓄積していることが確認され、Pael受容体がAR-JPへの関与が濃厚になった。

Pael受容体をショウジョウバエの脳全体に発現させると、加齢とともにドーパミン神経のみが選択的に変性することが明らかになった。このショウジョウバエにParkinをノックダウンさせるとさらにその症状が悪化し、Parkin蛋白を過剰発現させた系と交配させると細胞死が回避される¹¹⁾。このことは、Pael-R蓄積による細胞毒性をParkinの基質分解作用により緩和したと考えら

れ、PD発症メカニズムとしてとらえやすい。AR-JPは劣性遺伝のため、ParkinノックアウトマウスはAR-JPのモデルとなることが期待される。しかし、Parkinの遺伝子欠損マウスは生涯にわたってドーパミン神経細胞の顕著な変性は観察されず、行動にやや影響がみられる程度であったことが複数のグループから報告された¹²⁻¹⁴⁾。さらに、ParkinノックアウトマウスでParkinの基質であるCDC-rel1, α -synuclein, synphilin-1, Pael-Rの蓄積が認められなかった。このことは、マウスの寿命が短く、顕著な基質蓄積に至らないか、Parkin非存在下でもPael-RなどのParkin基質蛋白質の分解を代償する機構が存在する可能性を示唆している。 α -synuclein毒性、プロテアソーム抑制剤、小胞体ストレス、kainate毒性など多彩なストレスから細胞を守るため、Parkinは細胞死引き金の下流に働くと考えられる。したがって、Parkin下流ターゲットの同定、ドーパミン神経細胞保護作用メカニズムの解明はPD病態解明の鍵を握っていると考えられる。

一方、もしParkin基質の蓄積がAR-JPの原因になるならば、基質を過剰発現することによってAR-JPのモデル動物が作製できるはずである。最近我々はPael-R過剰発現マウスを作製し、20カ

月齢のマウスでパーキンソニズムまで至らないが、ドーパミン神経細胞数が野生型マウスの約70%までに減少したことを確認している。

B. ミトコンドリア, DA, 酸化ストレスとPD

一方、ミトコンドリア機能低下、酸化ストレスと孤発性PDの関連は古くから示唆されている。PD患者剖検脳内でミトコンドリア機能障害と酸化的ダメージが認められている。MPTP, ロテノン, paraquatなどのミトコンドリアコンプレックスIインヒビターは酸化ストレスを誘導し、PD発症モデル薬剤として使用されていることはさらなる証拠になる。ミトコンドリア障害と細胞変性は同時に存在するため、ミトコンドリア機能低下はPD発症の原因であるか、ただ2次的な変化に過ぎないか、明らかにされていないのが現状である。興味あることに、(1) Parkinノックアウトショウジョウバエでは、筋肉ミトコンドリア病変は最も顕著な病態であること¹⁵⁾。(2) *in vitro*でParkinの過剰発現により、ceramideなどのミトコンドリア依存性細胞死が抑制されること¹⁶⁾。(3) Parkinノックアウトマウスでは、呼吸鎖、酸化ストレスに関与するいくつかのミトコンドリア蛋白質の変化がみられること¹⁷⁾など報告され、Parkinはミトコンドリア機能に関与すると示唆している。Parkinノックアウトマウスにはミトコンドリア機能異常と酸化ストレスがみられるものの、神経変性がみられないことから、ミトコンドリア機能異常は神経変性の早期病態であることが示唆される。今後、ミトコンドリア機能異常から最終的に神経変性を引き起こす系の確立が期待される。

黒質ドーパミン神経細胞は加齢に従いその数が減少することが証明されている。この原因には酸化的ストレスが大きな役割を果たしていると考え

られる。黒質が酸化的障害の危険に曝されている原因は、おそらく高濃度にドーパミンが存在する自体であると考えられる。Parkinノックアウトマウスにはドーパミン神経細胞の変性は認めないが、線条体においてドーパミンとその代謝産物の蓄積傾向がみられ、また、アンフェタミン誘導によるドーパミン遊離の抑制が観察される。ドーパミン代謝とドーパミン遊離の低下はドーパミンの蓄積による酸化ストレスの増強効果が推定される。さらに、PARK2で死亡した患者の黒質には鉄の沈着が著しい。このような点でParkinの欠損もやはりドーパミン神経が慢性的に酸化ストレスを受けているのではないかと推定される。Parkinの他に、劣性遺伝のPDを起こす2種類の原因遺伝子であるDJ-1, PINK1も、ミトコンドリア機能と酸化的ストレスに関与することが指摘された。すなわち、ミトコンドリア機能低下、酸化的障害の亢進は、孤発性Parkinson病のみならず、PARK2, PARK6, PARK7でも観察される現象である。

PDの病因研究において最も重要な鍵となる事実は、ドーパミン神経の選択的変性である。したがって、ドーパミン神経細胞の特徴を明らかにすることで、細胞死の原因に迫る可能性がある。高濃度のドーパミンを含有していることは黒質の選択的細胞死を運命付けるのではないかと、古くから多くの研究から指摘されている。神経伝達物質であるドーパミンは容易に自動酸化されるとともにモノアミン酸化酵素(MAO)により酸化される。ドーパミンの自動酸化に伴い活性酸素が生成されると同時に、反応性に富んだセミンオンやキノンが生成される。低濃度の活性酸素は細胞機能に重要であるが、高濃度に産生された活性酸素はDNA, 蛋白質, 脂質の損傷をもたらし、種々の疾患の誘発原因となる。また、セミンオンやキノンが直接生体分子を修飾する可能性も示唆されている。事実、ごく最近、Parkin自体がキノン体

で修飾され、不活性化されるという注目すべき報告もなされている¹⁸⁾。これらのことは、神経伝達物質ドーパミンを含有している黒質神経細胞が常に酸化ストレスに曝されており、それから神経細胞を守るためには、いかに黒質神経細胞内に抗酸化蛋白あるいは物質が必要であるかを示している。この抗酸化機構が破綻すると、神経細胞は死へのプロセスをたどり始めるのではないかと推定される。

Pael-Rの遺伝子改変マウスの解析から、Pael受容体は正常なドーパミン合成、分泌に必要な蛋白質であることが明らかとなった。さらに、ドーパミン神経毒に対しては、Pael-Rを過剰発現したマウスが敏感で、一方Pael-Rノックアウトマウスが耐性で、細胞死は線条体におけるドーパミン分泌量とよい相関が示された(著者ら、投稿中)。これらのことから細胞内制御能力を超えた過剰なドーパミン産生は、ドーパミン細胞に酸化ストレスを与え、さらにカテコラミンの神経細胞内での蛋白質修飾が、折り畳みが異常になった蛋白質の生成、蓄積を助長すると考えられる。

むすび

ドーパミン神経細胞死の機序には遺伝的素因と環境因子が複雑に絡み合っており、ミトコンドリア障害、酸化ストレス障害の病態への関与に加え、家族性PDの研究から、ユビキチンプロテアソーム系の機能低下、つまり蛋白質分解異常から細胞死に至る経路の重要性が示された。ドーパミン神経に特異的である高濃度のドーパミン暴露がドーパミン神経細胞の選択的脆弱性の基礎となって、異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスがミトコンドリア機能障害、酸化ストレスによりさらに助長され、ドーパミン神経細胞死には中心的な役割を果たしていると考えられている(図1)。最近、我々はParkinノックアウトマウスにPael-Rトランスジェニックマウスを掛け合わせて、この仮説

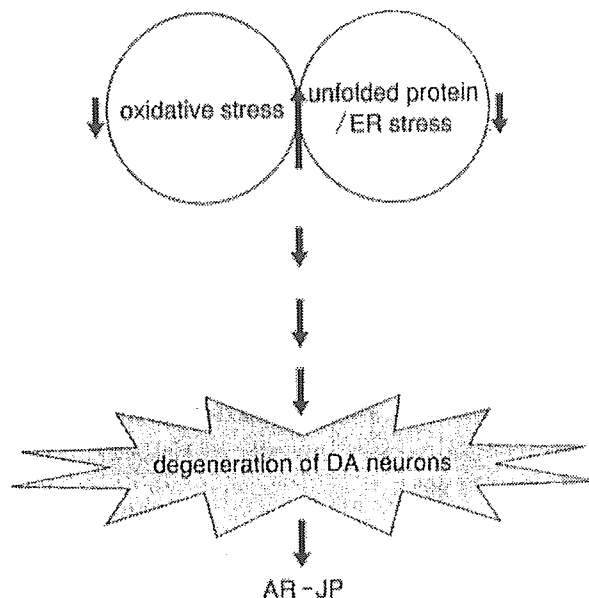


図1 hypothetical mechanism of loss of dopaminergic neurons

Parkinの機能が欠損すると異常な折り畳み構造のPael-Rが神経細胞内に蓄積し、unfolded protein stress(小胞体ストレスともいう)となる。また、ドーパミン神経においてドーパミン分泌量が増える。慢性的なドーパミン過剰およびミトコンドリア機能異常は酸化ストレスを引き起こす。同時に蛋白質の酸化修飾が異常な折り畳み蛋白質の生成・蓄積を促進し、小胞体ストレスを引き起こす。ドーパミン量の増加およびミトコンドリア機能破綻による酸化ストレスと異常な折り畳み蛋白質の蓄積による小胞体ストレスは、ドーパミン神経に負荷をかけ、神経細胞死を引き起こす。

の妥当性を検討しているところである。ParkinノックアウトマウスもしくはPael-Rトランスジェニックマウスに比べて、1年齢のマウスにおいてドーパミン神経細胞数の減少を認めている。このマウスが加齢によってAR-JPのモデルマウスになるのか、現在解析中である。

文献

- 1) Spillantini MG, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997; 388: 839-40.
- 2) Singleton A, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003; 302: 841.
- 3) Liu Y, et al. The UCH-L1 gene encodes two