

- opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 2002; 111: 209-18.
- 4) Le WD, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet*. 2003; 33: 85-9.
 - 5) Taira T, et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. 2004; 5: 313-8.
 - 6) Valente EM, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004; 304: 1158-60.
 - 7) Kitada T, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998; 392: 605-8.
 - 8) Imai Y, et al. A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *J Biol Chem*. 2003; 278: 35661-4.
 - 9) Chung KK, et al. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*. 2004; 304: 1328-31.
 - 10) Imai Y, et al. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*. 2001; 105: 891-902.
 - 11) Yang Y, et al. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron*. 2003; 37: 911-24.
 - 12) Itier JM, et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 2277-91.
 - 13) Goldberg MS, et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2003; 278: 43628-35.
 - 14) Von Coelln R, et al. Proc Natl Acad Sci USA. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. 2004; 101: 10744-9.
 - 15) Greene JC, et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4078-83.
 - 16) Darios F, et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 517-26.
 - 17) Palacino JJ, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem*. 2004; 279: 18614-22.
 - 18) LaVoie MJ, et al. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nature Med*. 2005; 11: 1214-21.

第7章

プログラム細胞死と神経変性疾患

高橋良輔, 王 華芹, 小林芳人

アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患はおしなべて、構造の異常なタンパク質の蓄積によるコンフォメーション病であるとの考えが有力になってきた。遺伝的、または後天的要因によって構造異常を生じたタンパク質は凝集し、不溶化して蓄積する。タンパク質蓄積の下流ではミトコンドリア障害、小胞体ストレス、酸化ストレスなどが誘発されて、機能障害を経て細胞死が起こるらしい。アポトーシス阻害タンパク質などによるカスパーゼ阻害は神経変性疾患の動物モデルにおいて一定の治療的効果は認められるが、治癒に至らしめた例はない。異常タンパク質蓄積から細胞死に至る経路は複数あり、その正確な理解が治療法開発に結びつくものと考えられる。

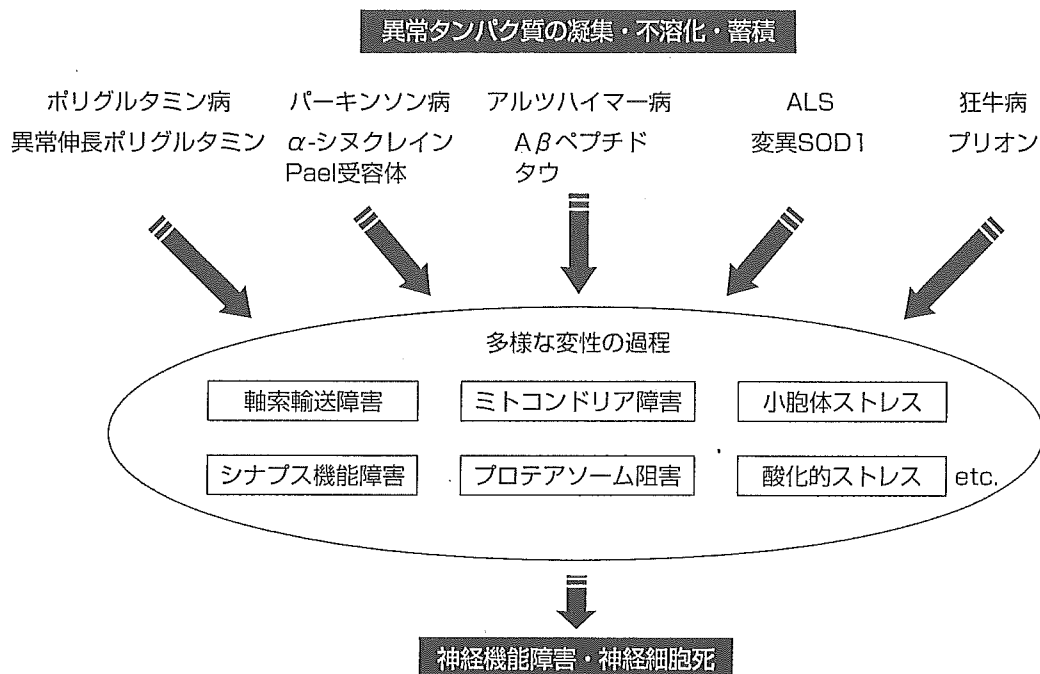
関連UP TO DATE **トピックス** 18, 19, 20

■ はじめに

神経変性疾患は、炎症、代謝異常、中毒、栄養欠乏、薬剤などの既知の原因によらず中枢神経系のある神経系だけが選択的に細胞死を起こし、重篤な進行性の障害を引き起こす遺伝性または非遺伝性の疾患群を指す。認知症の原因となるアルツハイマー病、運動障害を主徴とするパーキンソン病などが代表的な疾患で、両疾患の患者数は日本だけで優に百万人を超える。また神経変性疾患は介護者に非常に負担がかかるという点、しかも一般に高齢者に多いという特徴がある点から、高齢化の進む現在、上昇の一途をたどる社会経済的コストの面からもその病因を解明して治療法を確立することは急務である。

神経変性疾患の病因は長らく不明であったが、過去20年間の遺伝性神経変性疾患の研究からそのおおまかな分子メカニズムが明らかになってきた。遺伝子解析の結果、有力な仮説となってきたのは、神経変性疾患に共通する病因は構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールドタンパク質の異常な蓄積であるとの考えである(概略図)。遺伝性神経変性疾患は多くの場合、常染色体優性遺伝形式をとり、その病因となるような変異は多くの場合、点変異によるミスセンス変異など、変異によってもタンパク質は発現するような変異である。発現した変異タンパク質は構造が変化したミスフォールドタンパク質となって不安定化すると考えられる。ミスフォールドタンパク質は、もっぱらユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系(後述)によって分解処理されるが、その量が分解系の能力を超えると細胞内に蓄積し、凝集体を形成するようになる。このようにタンパク質がミスフォールド化し、

概略図 神経変性疾患の分子メカニズム



神経変性疾患においては遺伝性、孤発性を問わず、一般的に構造異常のタンパク質が凝集、不溶化して蓄積することが一義的な原因である可能性が高い。この意味で神経変性疾患はコンフォメーション病といえることができる。異常タンパク質の蓄積が、互に関連し、影響しあうことでさまざまな細胞機能障害、ストレスを引き起こし、複数の経路によって神経細胞機能低下、神経細胞死をもたらすことが神経変性過程ではないかと考えられる

凝集し、蓄積する一群の疾患をコンフォメーション病 (conformational disease) と呼称することが提唱されている¹⁾。一般にミスフォールドタンパク質は凝集の過程でオリゴマー、プロトフィブリルという中間体を経てアミロイド線維^{*1}を形成する性質がある。事実、多くの遺伝性神経変性疾患では変異タンパク質を主成分とする異常な線維性凝集体 (病理学的には封入体と呼ばれる) が神経病理学的特徴になっており、神経変性疾患はコンフォメーション病であるとする仮説を強力に支持する証拠となっている。このようにミスフォールドタンパク質の蓄積がまず神経細胞の機能障害を引き起こし、最終的に細胞死を引き起こすのが神経変性の本体ではないかと現在考えられるようになってきた。

一方、プログラム細胞死の生化学的解析が進み、形態学的にアポトーシスと定義された細胞死はカスパーゼ依存的細胞死、ネクローシスを含めたそれ以外の細胞死はカスパーゼ非依存的細胞死に分類されるようになった。本章では代表的な神経変性疾患における細胞死について最近の知見を紹介し、また細胞死防御が神経変性疾患の治療になりうるかどうか、アポトーシス阻害タンパク質を用いた実験的治療の例をもとに議論する。

^{*1} アミロイド線維

アミロイドとは「デンブに似た」という意味で染色性の特徴から名付けられた。病理学的に

は、①コンゴレッドで染色され、蛍光顕微鏡下で緑色偏光を呈し、②径10 nm程度の枝分かれのない線維であり、③ β シート構造であるこ

とが条件となる。アミロイド線維が蓄積する疾患はアミロイドーシスと呼ばれ、アルツハイマー病、プリオン病が代表的な疾患である。

1 アルツハイマー病

アルツハイマー病 (AD) は最も有病率の高い神経変性疾患であり、海馬と大脳皮質を中心とした変性の結果、重篤な知能障害、人格変化が生じ、認知症の原因となる。アルツハイマー病の光学顕微鏡下での特徴的な病理所見は細胞外のアミロイド斑 (老人斑) と細胞内の神経原線維変化 (NFT) であり、前者はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から切り出されてできる $A\beta$ ペプチド ($A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$)、後者は微小管関連タンパク質の一種であるリン酸化タウタンパク質から構成される。ADの強力な遺伝的な危険因子はアポリポタンパク質 E4 (ApoE4) ^{※2} の遺伝子型であり、 $A\beta$ および NFT の蓄積に影響を与えている可能性がある。

代表的な遺伝性 AD として APP と、 $A\beta$ を APP から切り出す γ セクレターゼの構成要素であるプレセニリン1 (PS1)、プレセニリン2 (PS2) の3種類の遺伝子変異が知られており、どの変異でも常染色体優性遺伝性の AD となり、 $A\beta$ ペプチドの過剰産生が生じる。このことより、孤発性、遺伝性に共通して、 $A\beta$ の蓄積が AD の特徴であり、タウの蓄積はその下流で生じると想像されている (アミロイドカスケード仮説、図1参照)²⁾。 $A\beta$ が細胞障害を引き起こす機序にはいくつもの説がある³⁾。まず、 $A\beta$ のプロトフィブリルがミクログリアを活性化し、炎症反応と神経毒性をもつサイトカインの放出を引き起こすという説がある。次に、 $A\beta$ プロトフィブリルがグルタミン酸などの興奮性アミノ酸のグリア細胞からの放出を促進し、興奮性毒性^{※3}を引き起こすという考えがある。特に NMDA 受容体を刺激すると、NO (一酸化窒素) およびきわめて毒性の強い ONOO⁻ (パーオキシナイトライト) が産生され、強い神経毒性が現れる。また $A\beta$ の可溶性のオリゴマーがシナプス伝達を阻害し、動物レベルでは記憶・学習などの高次脳機能障害を引き起こすことも示されている。さらに $A\beta$ は銅や亜鉛などの金属に結合する性質があり、その作用によって毒性の強いフリーラジカルを産生するとの見方もある。細胞死との関連では $A\beta$ がミトコンドリアの呼吸鎖酵素を阻害して酸化ストレスを引き起こすとのデータも報告されている。これらの毒性が複合的に神経機能障害、神経変性につながるのかもしれない。ただし $A\beta$ を過剰に産生するトランスジェニックマウスでは細胞死が見られないことから、*in vivo* における細胞死メカニズムの解析は進んでいない。治療面での最近の動向としては $A\beta$ を取り除くことが疾患の根本的な解決になるとの考えから、 $A\beta$ ワクチン療法^{※4}が注目を集めている。

※2 アポリポタンパク質 E4 (ApoE4)

リポタンパク質は脂質とタンパク質の複合体のことであり、アポリポタンパク質はそのタンパク質部分のみを指す。アポ E は分子量 34,000 のタンパク質であり、さまざまな種類のリポタンパク質に存在し、脂質の組織間の再分布への関与が想定されている。アポ E2、E3、E4 という遺伝子に規定される多型が存在し、アルツハイマー病では E4 が危険因子になるが、メカニズムは不明である。

※3 興奮性毒性

グルタミン酸は中枢神経系における興奮性神経伝達物質であり、その受容体の活性化によって脳のシナプス伝達を支える重要な物質である一方、特殊な状態においては受容体を過剰に活性化し結果的に神経細胞を死に至らしめる。これを興奮性毒性 (excitotoxicity) と呼び、NMDA 型、カイニン酸型、AMPA 型のイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介する細胞内へのカルシウム流入の関与が大きいと考えられている。

※4 $A\beta$ ワクチン療法

脳のアミロイド β ペプチド ($A\beta$) を免疫学的手法 (主として抗体) により除去しようとする方法。最初 $A\beta_{42}$ の投与によって疾患モデルマウスの脳内アミロイド沈着を減少させたことに端を発する。ヒトへの応用は治験で脳炎を誘発し死亡患者が出たことよりいったん頓挫したが、投与方法の工夫により脳炎を回避する方向で研究が進められている。

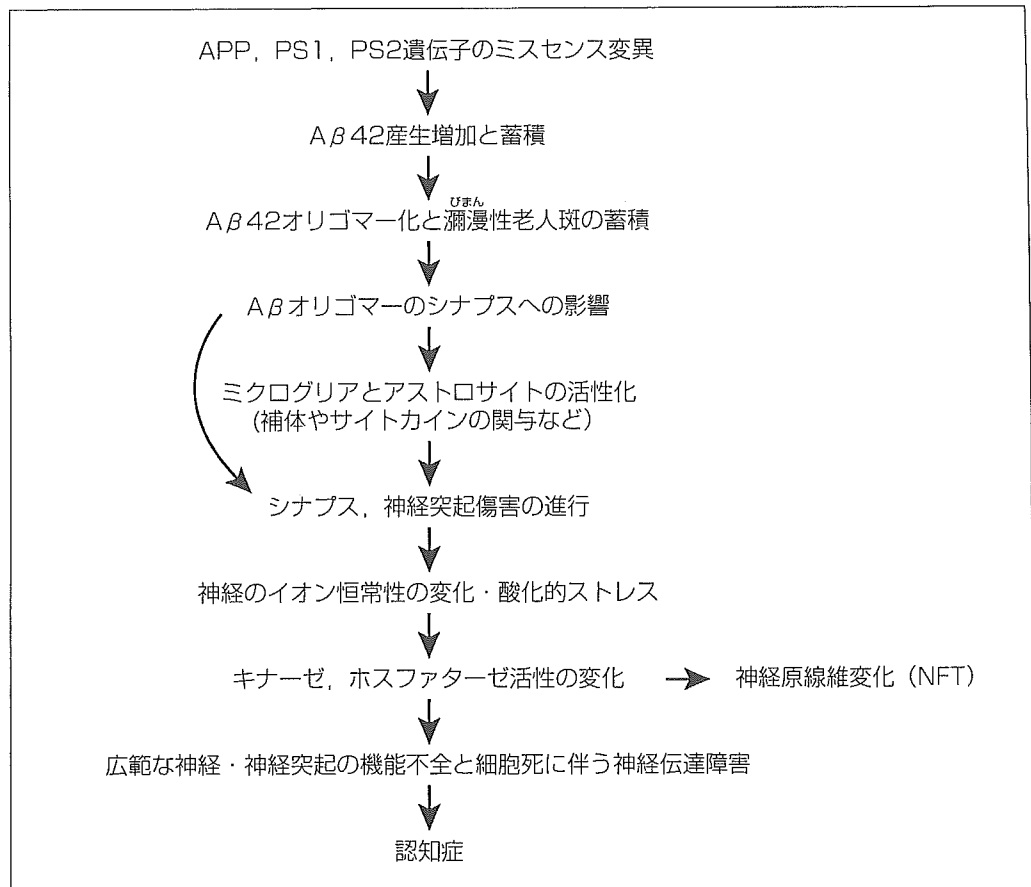


図1 アミロイドカスケード仮説

アミロイドカスケード仮説に基づくアルツハイマー病発症へ至るイベント。曲線矢印はAβオリゴマーがミクログリアとアストロサイトを活性化するのに加えて、直接脳のニューロンやシナプスを傷害することを意味している

2 パーキンソン病

パーキンソン病 (PD) も 65 歳以上の人口の 1% が罹患する頻度の高い神経変性疾患である。黒質ドーパミンニューロンを中心に、末梢神経、中枢神経のノルアドレナリン作動性ニューロンなどいくつかの系統の神経系が選択的に変性する。病理学的な特徴は変性ニューロンに特異的に見られるレビー小体 (Lewy body) と呼ばれる線維性の封入体である。臨床的な主な症状はドーパミン欠乏による運動機能障害であり、振戦 (ふるえ)、無動 (動きが少なくなり、遅くなる)、固縮 (筋肉が固くなる)、姿勢反射障害 (転倒しやすくなる) などが年余にわたって進行し、歩行困難など著しい機能障害に陥る。PD の約 5~10% は家族性 (遺伝性) であり、家族性 PD^{※5} の病因遺伝子の研究から、PD の神経変性メカニズムの理解が大きく進みつつある⁴⁾。このうち、特に細胞死との関連で研究が進んでいる α -シヌクレインと Parkin について紹介する。

※5 家族性 PD

PD 全体の 5~10% を占め、これまでに 11 部位の異なる遺伝子座に責任遺伝子を有する家族性 PD が見出され、うち 6 疾患は遺伝子が

同定されている。最近、劣性遺伝の PARK6 と PARK7 の病因遺伝子がそれぞれミトコンドリアに局在するプロテインキナーゼ PINK1 と強力なアンチオキシダント活性をもつ多機

能タンパク質 DJ-1 であることがわかり、神経毒の研究からかつて有力であったミトコンドリアと酸化的ストレスの PD への関与が再評価されている。

1) α -シヌクレイン

α -シヌクレインはシナプス前末端に豊富に存在する140アミノ酸の生理機能不明のタンパク質である。1997年、PARK1と呼ばれる常染色体優性遺伝性PDが α -シヌクレインのミスセンス変異によって生じることが示され、ついで α -シヌクレインを含む染色体領域の一部が重複、あるいは三重複する変異（遺伝子量としてはそれぞれ正常の1.5倍と2倍）が起こってもPDになることがわかった。その一方で、レビー小体の主要成分が α -シヌクレインであることがわかり、ミスフォールド化した α -シヌクレインの蓄積がPD発症の原因になるという考えが有力になった。しかし、レビー小体が細胞を殺す方向に働いているかどうかに関しては議論がある。レビー小体の構成成分は最近の研究によるとアグレソーム^{*6}と免疫組織化学的な性質が類似していることが指摘されており、少なくとも形成される時点では細胞保護的な役割を担っているものと思われる。しかしレビー小体に類似して神経突起内に形成されるレビーニューライト（Lewy neurite）は神経突起内の物質輸送を阻害する可能性があり、変性を促進する方向に働いているかもしれない。 α -シヌクレインの毒性に関して最も有力なのは、線維性のレビー小体が形成される過程でできるオリゴマー、プロトフィブリルなどの中間体が毒性をもつという考えである（図2）⁵⁾。ユニークな考えとして、*in vitro*の生物物理学的実験に基づいて、カルシウムを通す程度の半径をもつ環状のプロトフィブリルができると膜に結合して穴をあけるというアミロイドポア説が唱えられ、注目されている。ただし、このような環状のプロトフィブリルの存在は*in vivo*では証明されていない。これ以外に中間体による膜毒性、プロテアソーム阻害活性などが観察されている。 α -シヌクレインによる神経変性機構を*in vivo*で調べるために α -シヌクレイン過剰発現による動物モデルの作製が試みられている。 α -シヌクレイントランスジェニック（Tg）マウスでは非線維性封入体形成、運動機能障害は起こすが、ドーパミン細胞死は見られない。レンチウイルスによる過剰発現では細胞死が起こるが、レビー小体は形成されず、PDを再現できたと言える状況ではない。これに対し、 α -シヌクレインTgショウジョウバエでは、 α -シヌクレイン陽性の線維性封入体形成と成虫発症のドーパミン細胞死が起こる。この細胞死はHsp70の過剰発現、またはHsp70の発現を誘導する薬剤によって防御されることが示されており、 α -シヌクレインのミスフォールド化が神経変性につながるということが強く示唆されている。

2) Parkin

ParkinはPARK2、または常染色体劣性若年性パーキンソニズム（autosomal recessive juvenile parkinsonism：AR-JP）の病因遺伝子となるユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼの役割はユビチキン-プロテアソームタンパク質分解系^{*7}において、プロテアソーム分解されるためのユビキチン化のターゲットとな

^{*6} アグレソーム

ミスフォールドタンパク質の分解が障害された際、モータータンパク質ダイニンによって微小管のマイナス端に向かって逆行輸送され

て微小管形成中心（MTOC）に運ばれ、凝集体を形成する。これをアグレソーム（aggresome）と呼ぶ。 γ チューブリンや中間径フィラメントと共局在する特徴を有し、ミ

スフォールドタンパク質の毒性を封じ込める細胞保護的な機能があると想定されている。

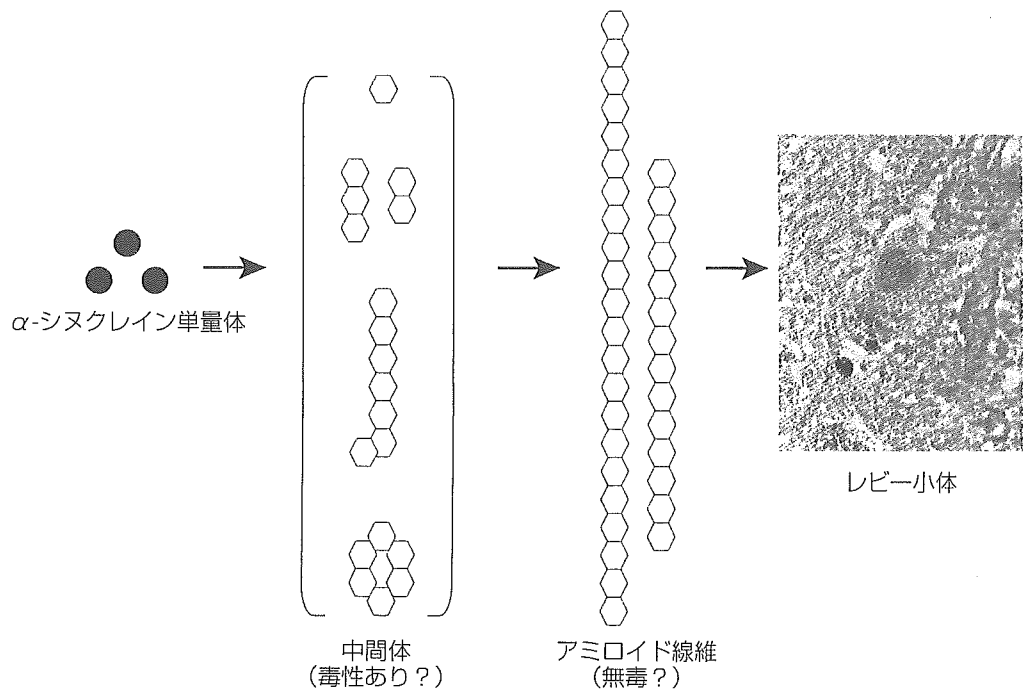


図2 α -シヌクレインの線維形成過程モデル

単量体の正常構造の α -シヌクレイン（●：正常ではnatively unfoldedの状態できちんとした構造をとらないと言われている）が構造変化を起こす（○）。構造変化を起こした α -シヌクレインは凝集し、線維形成中間体となる β シート構造に富むオリゴマーやプロトフィブリルを形成する。プロトフィブリルの中には環状構造のものも含まれる。これらは構造的に安定なアミロイド線維へと変換され、それらがさらに集まってレビー小体が形成される。文献5参照。レビー小体の写真提供：東海林幹夫先生（弘前大学医学部）

る基質タンパク質と特異的に結合し、そのユビキチン化と分解を促進することである（図3）。したがって遺伝子変異によってParkinの機能が失われると、本来分解されるべき基質タンパク質が蓄積し、神経変性が生じるものと考えられる。変性誘発のカギとなる基質タンパク質としてこれまで10種類以上の分子がクローニングされているが、そのうち、蓄積により細胞死を起こすという点で有望なのはPael受容体である⁶⁾。Pael受容体はリガンド未同定のGタンパク質共役型受容体であるが、小胞体における折りたたみ（フォールディング）が困難という性質があり、新生タンパク質の50%が折りたたみに失敗する。折りたたみに失敗し、ミスフォールド化したPael受容体は健康人では小胞体関連分解^{※8}という機構で、Parkinによってユビキチン化され、分解されているが、AR-JPでは分解されなくなるため、小胞体に蓄積する。小胞体にミスフォールドタンパク質が過剰に蓄積した状態を小胞体ストレス

※7 ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系 (UPS)

ミスフォールドタンパク質など細胞内の短寿命のタンパク質を分解する主要な経路。ユビキチンというタンパク質がATPを消費する酵素反応によって標的タンパク質に結合し、ポリユビキチン鎖が形成されると、プロテアソームという巨大タンパク質分解酵素複合体が認識して分解するシステムで、エネルギー依

存性と基質選択性の2つの特徴を有する（図3も参照）。

※8 小胞体関連分解、小胞体ストレス応答
小胞体ストレス応答には以下の4種類がある。

①小胞体シャペロンの遺伝子発現の活性化、
②小胞体関連分解によるミスフォールドタンパク質の分解（小胞体関連分解ではミスフォールドタンパク質は小胞体内腔から細胞

質に逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される）

③翻訳の全般的抑制で、小胞体への新生タンパク質流入を抑制

④アポトーシス

①、②、③でストレスを乗り越えなくなると

④に至ると考えられる。

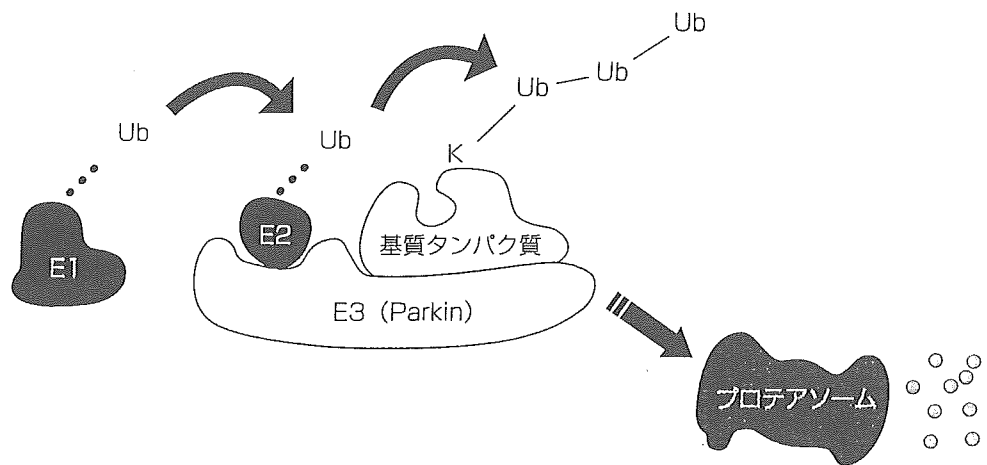


図3 Parkin とユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系

76 アミノ酸の小さなタンパク質であるユビキチン (Ub) は最初にユビキチン活性化酵素 (E1) によって活性化され、ユビキチン結合酵素 (E2) に受け渡される。さらに E2 から基質タンパク質のリジン残基 (K) に受け渡されて共有結合する。この反応が繰り返されて、基質タンパク質上にポリユビキチン鎖が形成され、これが細胞内の巨大なタンパク質分解酵素複合体、26S プロテアソームによって認識されて分解される。Parkin を含むユビキチンリガーゼの役割は基質を特異的に認識して結合し、E2 などと協調してユビキチン化、分解を促進することである

と呼ぶ。細胞はこれに対して小胞体ストレス応答⁸で対応するが、対応しきれなくなるとアポトーシスを起こす。Pael 受容体を培養細胞で過剰発現させると小胞体ストレスによる細胞死が起こる。さらにショウジョウバエでも Pael 受容体を神経細胞に過剰発現させるとドーパミン神経の変性脱落が生じることが示され、Pael 受容体の蓄積による小胞体ストレス誘発性細胞死が AR-JP の神経変性を説明するとの仮説が提唱されている。ポリグルタミン病のように核内に凝集体が形成される疾患でも、変異タンパク質がプロテアソームを阻害することによって小胞体関連分解 (ERAD) を阻害し、小胞体ストレスを引き起こすとの仮説が提出されており、この考えに基づくと、小胞体ストレスが神経変性疾患の多くを説明できるかもしれない。

3 筋萎縮性側索硬化症

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性に上位および下位運動ニューロンの変性脱落とグリオシスを生じる疾患で、通常発症後数年以内に呼吸筋麻痺のため、人工呼吸器の補助が必要になる。進行すると全身の筋肉の麻痺のため、意識・知能は保たれながら、周囲とのコミュニケーションすら困難になる難病である。家族性 ALS は ALS 全体の 5~10% を占めるが、その中でスーパーオキシサイドディスムターゼ (SOD1) の遺伝子変異による常染色体優性遺伝性 ALS の分子メカニズムの解析が進んでいる⁷⁾。SOD1 はスーパーオキシサイドを解毒処理する酵素であり、その酵素活性の低下が当初神経変性の原因と予想されていたが、153 アミノ酸の SOD1 タンパク質に 100 種類以上の変異が見つかっており、多くはミスセンス変異であること、変異 SOD1 の中には野生型と酵素活性が変わらないものが存在すること、さらには



図4 変異SOD1トランスジェニックマウスにおける変異SOD1の脊髄特異的な凝集形成
ヒトG93A変異SOD1トランスジェニックマウスは生後9カ月で運動麻痺を発症して約2週間で死亡し、ヒトのALSのよいモデルになる。このマウスの脊髄、大脳、小脳、筋肉組織でSOD1のウエスタンブロットを行うと、発症前(2カ月)はすべての組織でヒト変異SOD1の単量体のみが検出されるが、発症後(9カ月)は脊髄組織でのみヒト変異SOD1の高分子量化した凝集体(矢頭)が認められる。数字は1から5の順に可溶性から不溶性の分画を示す。hSOD1とmSOD1はそれぞれヒトとマウスのSOD1を意味する。写真提供：館野美成子先生(国立精神・神経センター)

活性を有する変異SOD1を過剰発現するトランスジェニックマウスの脊髄ではSOD1活性は数倍になるが、ヒトALSとよく似た運動ニューロン変性を起こすことがわかり、SOD1変異による新たな毒性の付与(gain of toxic function)が変性の原因であることが確実に became。現在毒性の説明として最も有力なのは、変異SOD1がミスフォールドタンパク質になって不溶化し、凝集することが原因とする考えであり、実際に変異SOD1トランスジェニックマウスではあらゆる組織にトランスジェンが発現するが、脊髄でのみ、不溶化し、凝集したSOD1タンパク質が見出される(図4)。試験管内でも変異SOD1がアミロイドフィブリルを形成しうることが明らかになっており、 $A\beta$ や α -シヌクレインと共通の毒性を有することが示唆されている。脊髄でのみ変異SOD1のミスフォールド化が進行する原因はよくわかっていないが、カルシウム透過型AMPA型受容体など運動ニューロンに特異的な細胞環境がかかわっている可能性がある。また、モデルマウスを使った実験から変異SOD1を運動ニューロンで発現させただけでは神経変性は起こらず、他の細胞での変異遺伝子の発現が、変性が起こるために必要であるとする非細胞自律(non-cell autonomous)^{*9}説が提唱され、神経変性の概念に訂正を迫る考え方として注目されている⁶⁾。

4 IAP と神経変性

アポトーシスと神経変性のかかわりを最も直接的に示したのは、遺伝性の運動ニ

^{*9} non-cell autonomous (非細胞自律)
遺伝学的な用語で、ある表現系が現れるためにその表現系を示す細胞の遺伝子だけでは不十分で、他の細胞の遺伝子の関与が必要な場

合をいう。変異SOD1トランスジェニックマウスでは運動ニューロンが特異的に変性するが、変異SOD1遺伝子を有するアストログリアやマイクログリアの関与も変性が起こるため

に必要な考えがキメラマウスの実験をもとに提唱されている。

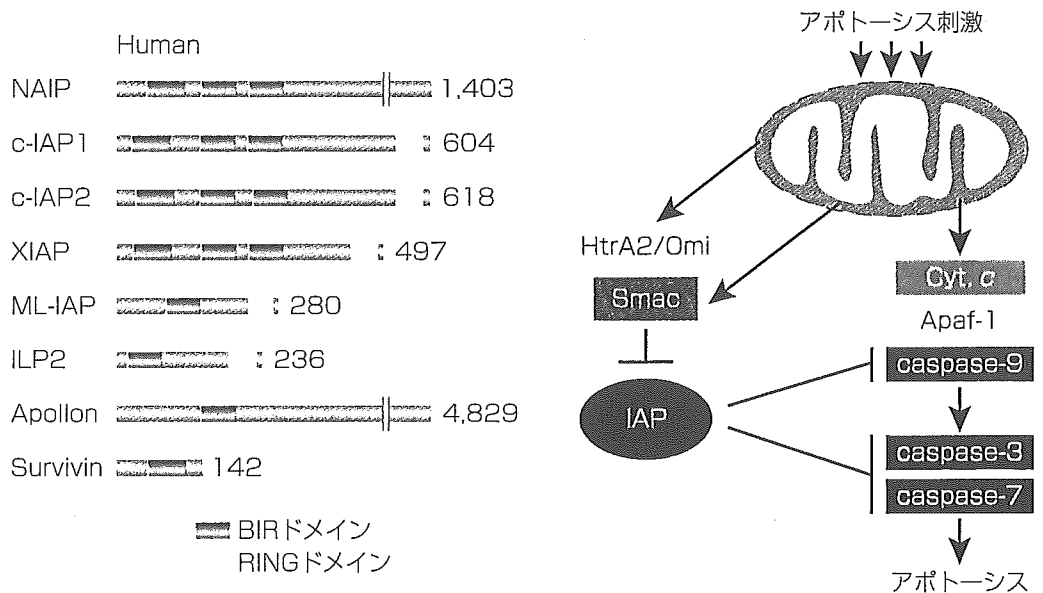


図5 IAP およびその阻害因子

左にヒトの8種類のIAPタンパク質を示す。約70アミノ酸のBaculovirus IAP repeat (BIR) ドメインが構造上の特徴である。右にアポトーシスの内因性経路を示す。IAPはミトコンドリアからシトクロムc (Cyt.c) が放出されて以後活性化されるcaspase-9, caspase-3, caspase-7を阻害する。一方、シトクロムcとともにミトコンドリア膜間スペースから放出されるSmacとHtrA2/OmiはIAPの働きを阻害して、アポトーシスの進行をスムーズに進めているらしい

ニューロン変性疾患である脊髄性筋萎縮症^{※10}の重症度を決定する因子として同定されたneuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) である。NAIPはアポトーシス阻害タンパク質 (IAP) ファミリーの一つである。IAPはBaculovirus IAP repeat (BIR) と呼ばれる Zinc Fingerモチーフに似たドメインを有することが構造上の特徴であり、その多くは内因性のカスパーゼ (caspase) 阻害因子としての働きをもつ⁸⁾。NAIPも3つのBIRドメインを有し、caspase-3, caspase-7の阻害作用をもつ。NAIPの変異で運動ニューロン変性が増悪することから、アポトーシスが変性に関与することが示唆される。ショウジョウバエではIAPが欠損すると発生時期に全身のアポトーシスで致死となり、アポトーシスの決定的制御因子としてきわめて重要なことが示されているが、哺乳類ではいくつかのIAPのノックアウトマウスでも顕著な表現型は見られず、その生理的意義はよくわかっていない。ただIAPの機能を阻害するショウジョウバエの分子 (Reaper, Hid, Grim) のホモログにあたる2種類の分子 (SmacとHtrA2/Omi) が哺乳類でも存在することから、哺乳類でも重要な役割を担っているが、IAPがヒトでは8種類あるというリダンダンシー (冗長性) のため、機能欠損の表現型をとらえることができないだけなのかもしれない (図5とUP TO DATEトピックス20参照)。

神経変性へのアポトーシスの関与を探る目的で、ヒトの疾患を忠実に再現する現

※10 脊髄性筋萎縮症

体幹および四肢近位筋優位の筋力低下と筋萎縮を示す小児期発症の下位運動ニューロン疾患であり、常染色体劣性遺伝形式を示す。原

因遺伝子は第5染色体長腕にあり、RNAスプライシングで重要な役割を果たすSMN (survival motor neuron) である。発症年齢と重症度から3型に分類されるが、重症なもの

ほど、NAIP遺伝子を欠損している割合が多いと報告されている。

在得られる唯一の動物モデルである前述の変異SOD1トランスジェニックALSマウスモデルを用いた実験が多く行われ、多くのcaspaseの関与が示唆されている。IAPの効果に関しては、caspase-3、caspase-7、caspase-9を特異的に阻害するヒトXIAPおよび広いカスパーゼ阻害のスペクトラムを有するが、caspase-9は阻害しない因子であるp35を既述のALSモデルマウスに過剰発現させて、臨床症状への効果を見る実験が行われた。この結果、XIAPはALSマウスが発症してから死亡するまでの罹病期間を延長させるのに対し、p35は発症までの期間は延ばすものの、罹病期間には影響を与えないことがわかった。このことはミトコンドリアを介する内因性経路がALSモデルマウスの神経変性に関与しており、caspase-9が治療のターゲットになることを示唆している⁹⁾。変異SOD1がミトコンドリアに蓄積し、Bcl-2(> 3章参照)に結合するという観察もこの結果に一致しており、IAPの遺伝子治療、または内因性のIAPを増加させる抗アポトーシス治療が有効な可能性がある。

5 今後の研究の展開

神経変性疾患がタンパク質の構造異常に起因するコンフォメーション病と認識されるようになってから、異常タンパク質を除去したり、分解を促進することで疾患を治療する方向に期待が集まり、最近ではRNAi^{*11}を使ったモデル動物の実験で実際に有望な結果が得られている¹⁰⁾。一方、異常タンパク質を抱えて死すべき運命をもった細胞でアポトーシスの経路だけを止めても根本的な解決にならない可能性が高い。しかしながら、神経変性疾患の発症時期では細胞死が進行過程にあることを考えると、抗細胞死治療は進行を遅らせる意味はある。また、カスパーゼ非依存的な細胞死経路も防御できれば、より高い治療効果が得られる期待ももてる。神経変性疾患の治療法開発への挑戦は始まったばかりであるが、神経変性は複合的な過程であり、異常タンパク質の除去だけでなく、抗細胞死療法も視野に入れた総合的な治療戦略の立案が必要と思われる。

キーポイント

神経変性疾患は、一般に異常タンパク質の蓄積を特徴とするコンフォメーション病である

アルツハイマー病ではA β ペプチドとタウの蓄積の下流で、炎症、興奮性毒性、酸化ストレス、シナプス機能障害、ミトコンドリア障害などの過程が起こり神経変性に至ると考えられる

パーキンソン病では α -シヌクレインの蓄積によりレビー小体が形成されるが、レビー小体そのものは細胞保護的性質をもっているらしい

^{*11} RNAi

RNAiとは、二本鎖RNA(double-stranded RNA: dsRNA)によってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子の発現が

抑制される現象。最近ウイルスベクターやトランスジーンを使ったRNAiでALSの表現型を示す変異SOD1トランスジェニックマウスのSOD1の発現を低下させたところALSの臨

床経過が劇的に改善したことから、神経変性疾患治療への応用の期待がもたれている。

家族性パーキンソン病 PARK2 の病因遺伝子 Parkin はユビキチンリガーゼであることから、パーキンソン病の病因としてユビキチン-プロテアソーム系の障害が強く示唆される

家族性 ALS の病因遺伝子 SOD1 は変異によってミスフォールド化し、脊髄特異的に凝集して神経変性を起こすらしい

IAP による細胞死抑制治療は神経変性疾患動物モデルの治療に有効であるが、神経変性過程は複合的であり、変性に結びつくさまざまな過程を抑制する治療戦略が必要である

文 献



- 1) Carrell, R. W. & Lomas, D. A. : Conformational disease. *Lancet*, 350 : 134-138, 1997
- 2) Hardy, J. & Selkoe, D. J. : The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297 : 353-356, 2002
- 3) Bossy-Wetzel, E. et al. : Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Med.*, 10, Suppl : S2-9, 2004
- 4) Moore, D. J. et al. : Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28 : 57-87, 2005
- 5) Volles, M. J. & Lansbury, P. T., Jr. : Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*, 42 : 7871-7878, 2003
- 6) Imai, Y. & Takahashi, R. : How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14 : 384-389, 2004
- 7) Bruijn, L. I. et al. : Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27 : 723-749, 2004
- 8) Vaux, D. L. & Silke, J. : Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304 : 499-504, 2003
- 9) Inoue, H. et al. : The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J.*, 22 : 6665-6674, 2003
- 10) Saito, Y. et al. : Transgenic siRNA halts ALS in a mouse model. *J. Biol. Chem.*, 280 : 42826-42830, 2005

参考図書



- 『細胞における蛋白質の一生』(小椋 光, 遠藤斗志也, 森 正敬, 吉田賢右/編), 共立出版, 2005
⇒「病態・フォールディング病」の章が神経変性疾患研究の現状を知るのに最適
- 『脳神経疾患 病態の分子生物学』(澤 明/編), 南山堂, 2005
⇒神経変性疾患と精神疾患を統一的に理解できる優れた脳神経疾患の入門書

Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress

Darren J. Moore^{1,2}, Li Zhang^{1,2}, Juan Troncoso^{2,3}, Michael K. Lee³, Nobutaka Hattori⁶, Yoshikuni Mizuno⁶, Ted M. Dawson^{1,4} and Valina L. Dawson^{1,2,4,5,*}

¹Institute for Cell Engineering, ²Department of Neurology, ³Department of Pathology, ⁴Department of Neuroscience and ⁵Department of Physiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, 21205, USA and ⁶Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Received June 6, 2004; Revised August 11, 2004; Accepted October 22, 2004

The identification of rare monogenic forms of Parkinson's disease (PD) has provided tremendous insight into the molecular pathogenesis of this disorder. Heritable mutations in α -synuclein, parkin, DJ-1 and PINK1 cause familial forms of PD. In the more common sporadic form of PD, oxidative stress and derangements in mitochondrial complex-I function are considered to play a prominent role in disease pathogenesis. However, the relationship of DJ-1 with other PD-linked genes and oxidative stress has not been explored. Here, we show that pathogenic mutant forms of DJ-1 specifically but differentially associate with parkin, an E3 ubiquitin ligase. Chemical cross-linking shows that pathogenic DJ-1 mutants exhibit impairments in homo-dimer formation, suggesting that parkin may bind to monomeric DJ-1. Parkin fails to specifically ubiquitinate and enhance the degradation of L166P and M26I mutant DJ-1, but instead promotes their stability in cultured cells. The interaction of parkin with L166P DJ-1 may involve a larger protein complex that contains CHIP and Hsp70, perhaps accounting for the lack of parkin-mediated ubiquitination. Oxidative stress also promotes an interaction between DJ-1 and parkin, but this does not result in the ubiquitination or degradation of DJ-1. Parkin-mediated alterations in DJ-1 protein stability may be pathogenically relevant as DJ-1 levels are dramatically increased in the detergent-insoluble fraction from sporadic PD/DLB brains, but are reduced in the insoluble fraction from parkin-linked autosomal recessive juvenile-onset PD brains. These data potentially link DJ-1 and parkin in a common molecular pathway at multiple levels that may have important implications for understanding the pathogenesis of inherited and sporadic PD.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder affecting ~1% of the population at the age of 65 rising to 4% of the population at the age of 85 (1,2). PD is a movement disorder that is mainly due to the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, which leads to rigidity, resting tremor, bradykinesia, postural instability and, in a subset of patients, cognitive and autonomic dysfunction (1,2). Pathologically, PD is characterized by the presence of intracytoplasmic proteinaceous inclusions termed Lewy bodies, as well as Lewy neurites, that are immunoreactive for α -synuclein (3).

The cause of PD remains unknown, and although the majority of cases appear sporadic in nature, rare monogenic forms of PD have provided tremendous insight into the

pathogenesis of this disease (4,5). Four genes, α -synuclein, parkin, DJ-1 and PINK1 have been unambiguously linked to familial PD (6–9). Missense mutations (A53T, A30P and E46K) in α -synuclein, as well as whole gene duplications, have been linked to autosomal dominant PD (6,10–13). Mutations in parkin cause autosomal recessive juvenile-onset PD (AR-JP) and are the most common cause of inherited PD, accounting for up to 50% of all recessive early-onset PD cases (7,14,15). A large number of pathogenic mutations have been identified in parkin and include exonic deletions, duplications and a variety of missense mutations and truncations. Parkin may function in the ubiquitin-proteasomal system (UPS) as an E2-dependent E3 ubiquitin ligase (16–18). A number of putative substrates for parkin exist, but their pathogenic role in PD remains elusive (16,19–26). The large number of parkin substrates may relate to the ability of

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Neurology, Institute for Cell Engineering, Johns Hopkins University School of Medicine, 733 N. Broadway, Suite 731, Baltimore, MD 21205, USA. Tel: +1 4106143359; Fax: +1 4106149568; Email: vdawson@jhmi.edu

parkin to form protein complexes with components of the UPS and chaperone systems. For example, parkin associates with the E3 ubiquitin ligase, CHIP, and the molecular chaperone, Hsp70, which together control the ubiquitination and degradation of the parkin substrate Pael-R (27).

Mutations in DJ-1 are linked with autosomal recessive early-onset PD and at least initially appear to be a rare cause of familial PD, perhaps accounting for 1–2% of all early-onset cases (28–30). A number of pathogenic mutations have been identified in DJ-1 and include exonic deletions, truncations and homozygous (L166P and M26I) and heterozygous (A104T and D149A) missense mutations (8,28–31). A rare polymorphism (R98Q) has also been identified although this is not associated with PD (32). The L166P mutant protein is impaired in its ability to form homo-dimers and exhibits markedly reduced protein stability, leading to enhanced proteasomal degradation (33–37). The biological function of DJ-1 remains obscure. DJ-1 is a highly conserved protein present in a diverse number of organisms and belongs to the DJ-1/ThiJ/PfpI protein superfamily. The crystal structure of human DJ-1 has been resolved and shows that DJ-1 exists in solution as a homo-dimer and the L166P mutation disrupts DJ-1 dimerization (38–42). The crystal structure of DJ-1 closely resembles that of *Escherichia coli* and yeast Hsp31 (42,43). The crystal structure of DJ-1 also highlights a Cys-106/His-126 catalytic dyad indicative of protease activity. Preliminary studies *in vitro* are consistent with the suggestion that DJ-1 may possess both chaperone activity and weak proteolytic activity (37,42). DJ-1 may also function as an anti-oxidant protein and/or as a redox sensor as it exhibits an acidic shift in *pI*-value under oxidative stress, owing mainly to oxidative modification of cysteine residues (44–47). Moreover, in cultured cells, overexpression of DJ-1 protects against oxidative injury, whereas DJ-1 knockdown enhances the susceptibility to oxidative stress (45,48).

There has been tremendous interest from researchers in attempting to link the familial-associated gene products in a common pathogenic pathway of neuronal degeneration in PD. Suggestions that there might be a converging or common molecular pathway are the observations that parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1, and participates in the ubiquitination of inclusions that are formed in the presence of α -synuclein and synphilin-1 (20). Furthermore, parkin may also ubiquitinate a rare *O*-glycosylated form of α -synuclein (19). In the more common sporadic form of PD, oxidative stress and derangements in mitochondrial complex-I function are thought to play a prominent role in the demise of dopaminergic neurons (49,50). Recent observations suggest that α -synuclein and derangements in complex-I function may converge in a common pathway as inhibition of complex-I leads to α -synuclein aggregation and toxicity both *in vitro* and *in vivo* (51–56). Oxidative stress can also modify the normal function of parkin, because *S*-nitrosylation of parkin impairs its E3 ubiquitin ligase activity (57). The role of DJ-1 in such a pathway and its relationship with parkin, α -synuclein and oxidative stress has not been explored. Here, we show that parkin selectively interacts with DJ-1 harboring pathogenic mutations, as well as following various forms of oxidative stress. These interactions

potentially link parkin, DJ-1 and oxidative stress in a common molecular pathway.

RESULTS

Parkin specifically but differentially interacts with pathogenic DJ-1 mutants

To investigate the relationship between DJ-1 and α -synuclein or parkin, co-immunoprecipitation experiments were performed (Fig. 1). SH-SY5Y cells were co-transfected with HA-tagged wild-type (WT) α -synuclein together with C-terminal myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) followed by immunoprecipitation (IP) with anti-myc antibody (Fig. 1A). WT α -synuclein fails to co-immunoprecipitate with WT or L166P DJ-1 (Fig. 1A). In additional experiments, WT and L166P DJ-1 also fail to interact with α -synuclein pathogenic mutants (A30P or A53T) or UCH-L1 (data not shown). Similar experiments were performed with FLAG-tagged parkin and myc-tagged WT or mutant DJ-1 (Fig. 1B). Intriguingly, parkin specifically interacts with pathogenic mutant forms of DJ-1 (Fig. 1B). In particular, the interaction of parkin with L166P DJ-1 is particularly robust, whereas that with other pathogenic mutants (M26I, A104T and D149A) are considerably weaker, producing an interaction profile of L166P \gg M26I $>$ A104T = D149A. WT DJ-1 and non-pathogenic R98Q DJ-1 fail to interact with parkin (Fig. 1B); on the other hand, parkin also fails to interact with non-pathogenic K130R DJ-1 (data not shown). As L166P DJ-1 has a number of N-terminal truncation products that may result from proteolytic processing (Fig. 1B) (33,36), we next examined whether parkin interacts with full-length or truncated forms of DJ-1 by performing co-immunoprecipitation experiments. Parkin interacts robustly with full-length L166P DJ-1 but only weakly with truncated L166P DJ-1, in addition to truncated WT DJ-1 (Fig. 1C), suggesting that full-length L166P DJ-1 primarily associates with parkin. In additional experiments, L166P DJ-1 fails to co-immunoprecipitate with various modular domains of parkin, including the RING box motif and ubiquitin-like domain (data not shown), suggesting that full-length parkin is probably required for the interaction with L166P DJ-1. To determine whether the interaction of parkin with pathogenic mutant forms of DJ-1 is associated with alterations in DJ-1 protein stability or homo-dimer formation, we examined the steady-state levels of myc-tagged WT and mutant DJ-1, as well as the capacity of myc-tagged WT and mutant DJ-1 to associate, and therefore homo-dimerize with FLAG-tagged WT DJ-1 (Fig. 1D and E). As previously reported (33), L166P DJ-1 is highly unstable, exhibiting markedly reduced steady-state levels, and fails to form homo-dimers, whereas most other DJ-1 mutants exhibit comparable steady-state levels to WT protein and share the capacity to form homo-dimers (Fig. 1D and E). A mild reduction in the steady-state levels of M26I DJ-1 is also noted, as described previously (33). Taken together, these results suggest that parkin interacts specifically with pathogenic mutant forms of DJ-1, particularly the L166P mutant, but this does not initially appear to relate to their intrinsic protein stability or their capacity to form homo-dimers.

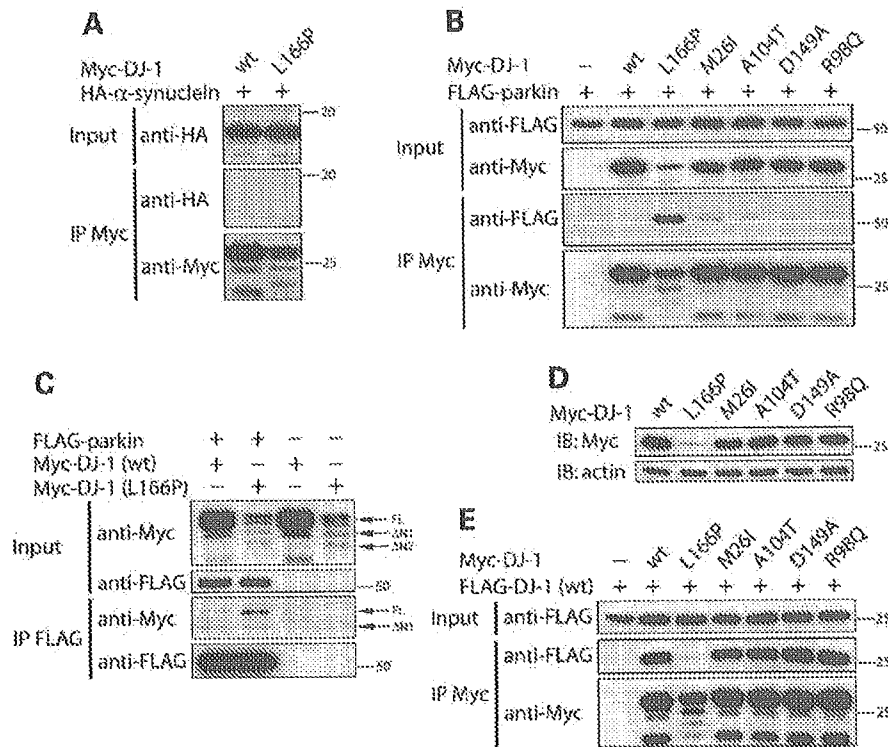


Figure 1. Parkin differentially associates with pathogenic DJ-1 mutants. (A) DJ-1 fails to interact with α -synuclein. Lysates from SH-SY5Y cells co-transfected with myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) and HA-tagged WT α -synuclein were subjected to IP with anti-myc antibody. IP and input lysates (1% total soluble lysate) were analyzed by western blotting (WB) with anti-HA and anti-myc antibodies. (B) Interaction of parkin with pathogenic DJ-1 mutants. SH-SY5Y lysates co-expressing myc-tagged WT or mutant (L166P, M26I, A104T, D149A or R98Q) DJ-1 or control plasmid, together with FLAG-tagged parkin, were subjected to IP with anti-myc antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-FLAG and anti-myc antibodies. (C) Parkin interacts primarily with full-length L166P DJ-1. SH-SY5Y lysates co-expressing myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) together with FLAG-tagged parkin or control plasmid were subjected to IP with anti-FLAG antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-myc and anti-FLAG antibodies. Full-length (FL) and N-terminally truncated (Δ N1 and Δ N2) myc-tagged DJ-1 species are indicated by arrows. (D) Analysis of steady-state protein levels of DJ-1 mutants. Lysates from SH-SY5Y cells transfected with myc-tagged WT or mutant (L166P, M26I, A104T, D149A or R98Q) DJ-1 were analyzed by WB with anti-myc antibody or with anti-actin antibody to demonstrate equal loading. (E) Analysis of dimerization of DJ-1 mutants. Lysates from SH-SY5Y cells co-transfected with myc-tagged WT or mutant (L166P, M26I, A104T, D149A or R98Q) DJ-1 or control plasmid, together with FLAG-tagged WT DJ-1, were subjected to IP with anti-myc antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-FLAG and anti-myc antibodies. Molecular weight markers are indicated in kDa. All experiments were replicated three times with similar results.

Pathogenic DJ-1 mutants share a reduced capacity to form homo-dimers

Parkin interacts robustly with L166P DJ-1, however, this mutant exists largely in a monomeric form through its inability to form homo-dimers owing to protein instability (33,38). We reasoned therefore that parkin might interact preferentially with monomeric DJ-1 and that pathogenic mutations in DJ-1, other than L166P, might reduce but not completely abrogate the capacity of DJ-1 to form homo-dimers. To investigate this possibility, SH-SY5Y cells were transfected with myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) and soluble cell lysates were treated with the covalent chemical cross-linking agent disuccinimidyl suberate (DSS). As expected, myc-tagged WT DJ-1 forms homo-dimers in a dose-dependent manner concomitant with a progressive decrease in monomeric DJ-1, whereas L166P DJ-1 fails to form homo-dimers (Fig. 2A), consistent with our co-immunoprecipitation

studies (Fig. 1E). Incidentally, the level of monomeric L166P DJ-1 also decreases in a dose-dependent manner, but fails to appear at a higher molecular weight (Fig. 2A), perhaps suggesting that it becomes incorporated into an insoluble protein complex. Endogenous DJ-1 also forms robust homo-dimers, whereas hetero-dimer formation appears nominal (Fig. 2A). These data demonstrate that DJ-1 homo-dimers are amenable to chemical cross-linking and further confirm that L166P DJ-1 fails to form homo-dimers.

Next, the capacity of myc-tagged WT or mutant DJ-1 to form homo-dimers was examined using a non-saturating concentration of DSS (5 mM). With the exception of L166P DJ-1, WT DJ-1 and the other DJ-1 mutants form varying amounts of homo-dimer following cross-linking (Fig. 2B), consistent with our co-immunoprecipitation studies (Fig. 1E). To obtain a measure of dimerization capacity or efficiency, densitometry was used to generate a ratio of dimer to monomer (Fig. 2C). When compared with WT DJ-1, pathogenic mutant forms of

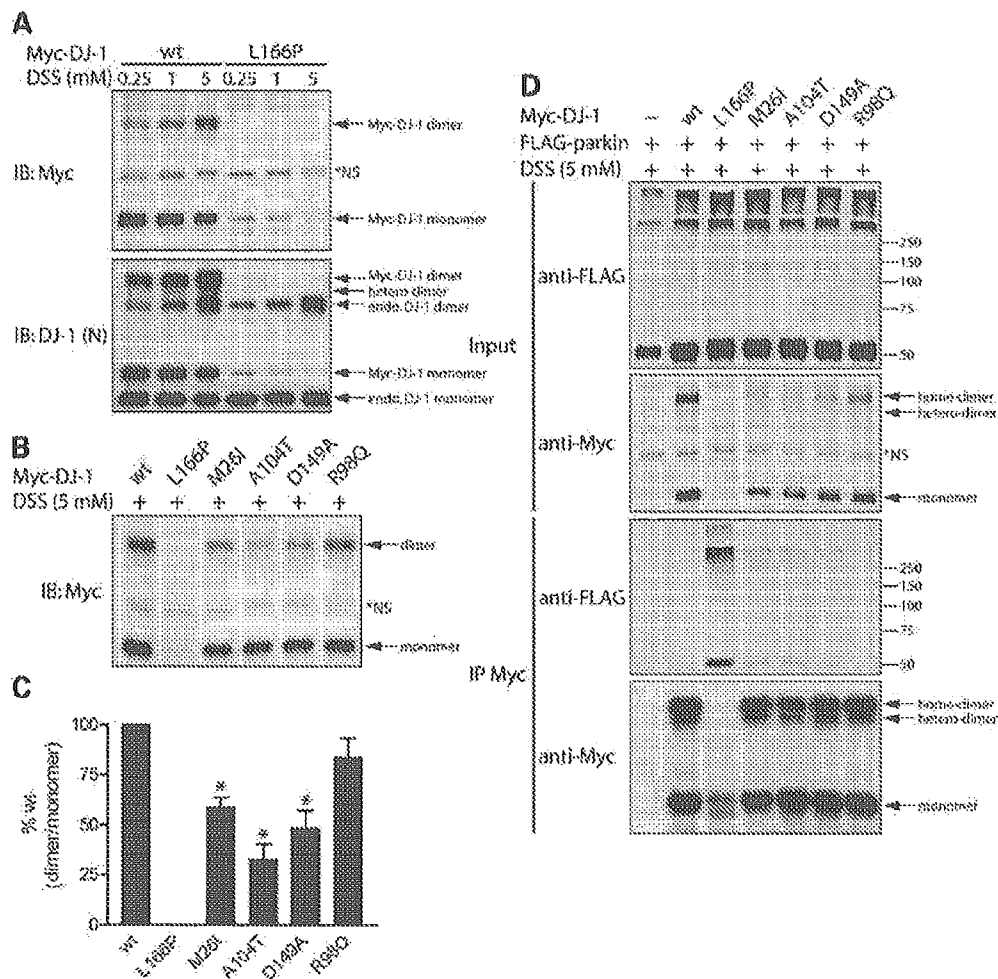


Figure 2. Reduced homo-dimerization of pathogenic DJ-1 mutants. (A) Cross-linking of DJ-1 homo-dimers. Equivalent soluble lysates from SH-SY5Y cells transfected with myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) were treated with increasing concentrations of DSS and myc-tagged or endogenous DJ-1 was detected by WB with anti-myc (upper panel) or anti-DJ-1 (N) (lower panel) antibodies, respectively. The corresponding position of myc-tagged (*Myc*) or endogenous (*endo*) DJ-1 monomers and homo-dimers are indicated. (B) Reduced cross-linking of pathogenic DJ-1 mutants. Equivalent lysates from SH-SY5Y cells transfected with myc-tagged WT or mutant (L166P, M26I, A104T, D149A or R98Q) DJ-1 were treated with 5 mM DSS and homo-dimer formation was assessed by WB with anti-myc antibody. (C) Quantification of homo-dimer levels and normalization to monomer levels from (B) by densitometry reveals a significant reduction in the homo-dimerization of pathogenic DJ-1 mutants. DJ-1 dimer–monomer ratios are expressed as a percentage (%) of WT levels, and bars represent the mean \pm SE of three independent experiments, * $P < 0.005$ when compared with WT levels (Student's *t*-test). (D) Parkin fails to cross-link to pathogenic DJ-1 mutants. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged WT or mutant (L166P, M26I, A104T, D149A or R98Q) DJ-1 or control plasmid, together with FLAG-tagged parkin. Equivalent lysates were treated with 5 mM DSS and then subjected to IP with anti-myc antibody. IP and input lysates were analyzed by WB with anti-FLAG and anti-myc antibodies. *NS denotes non-specific band detected with anti-myc antibody. Molecular weight markers are indicated in kDa. All experiments were replicated three times with similar results.

DJ-1 exhibit a significantly reduced capacity to form homo-dimers, i.e. a reduced ratio of dimer to monomer, whereas dimerization of non-pathogenic R98Q DJ-1 is comparable with WT protein (Fig. 2C). Next, to determine whether parkin interacts preferentially with monomeric or dimeric forms of mutant DJ-1, co-immunoprecipitation experiments were performed with DSS cross-linked SH-SY5Y lysates co-transfected with FLAG-tagged parkin and myc-tagged DJ-1 (WT or mutant) (Fig. 2D). Parkin fails to covalently cross-link to either monomeric or dimeric forms of mutant DJ-1 (Fig. 2D), as suggested by the absence of modified forms of DJ-1 or parkin with

increased molecular weight. These data suggest either an indirect interaction between parkin and DJ-1 mutants, or that particular amino acid side chain residues (e.g. primary amines) are not available for cross-linking at the protein interaction interface. However, pathogenic DJ-1 mutants, especially the L166P mutant, retain the ability to co-immunoprecipitate with full-length parkin in addition to a substantial proportion of high molecular weight (HMW) parkin (>250 kDa; Fig. 2D), suggesting that (i) a proportion of parkin may exist as part of a large protein complex or is extensively modified, i.e. by auto-ubiquitination and (ii) DJ-1 mutants can differentially associate

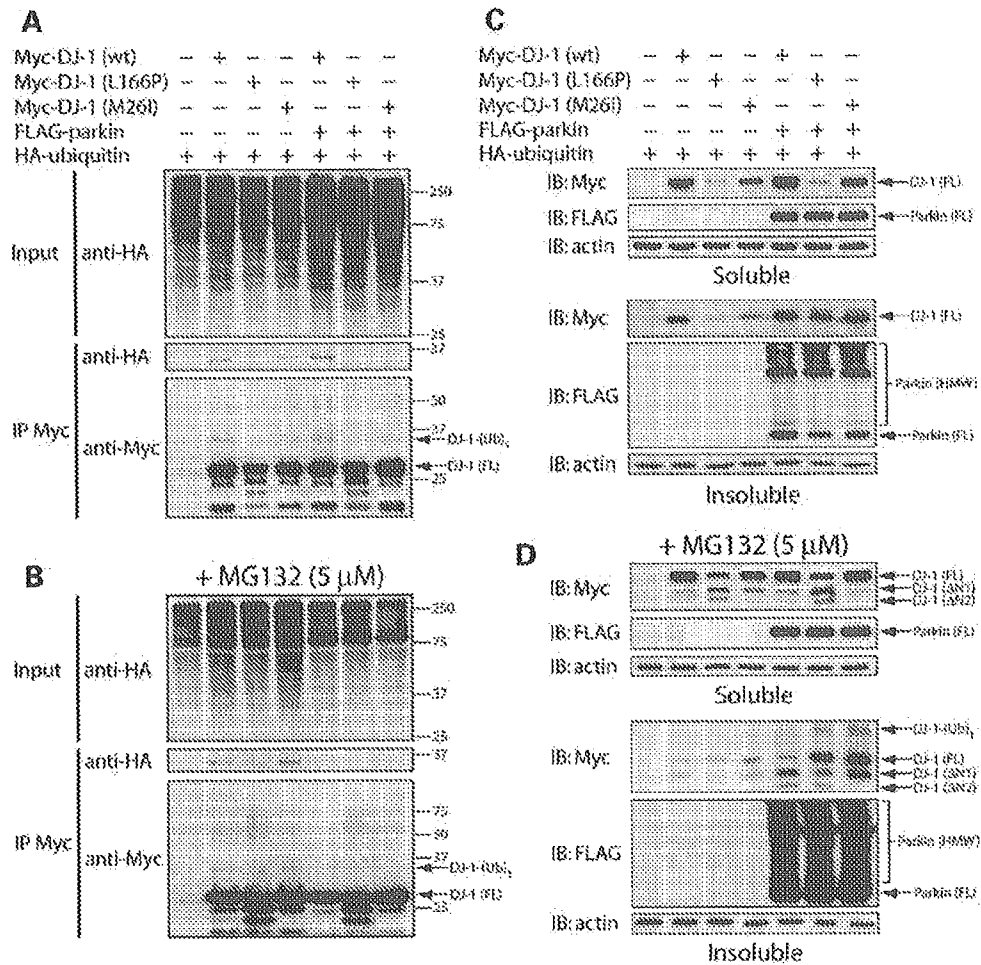


Figure 3. Parkin fails to ubiquitinate and enhance the degradation of DJ-1. (A and B) Parkin fails to ubiquitinate DJ-1. (A) SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged WT, L166P or M26I DJ-1 or control plasmid, together with HA-tagged ubiquitin, with or without FLAG-tagged parkin. Equivalent soluble lysates were subjected to IP with anti-myc antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-HA and anti-myc antibodies. (B) Similar ubiquitination experiments were performed using transfected cells treated with the proteasome inhibitor MG132 (5 μ M) for 24 h, as described earlier. (C and D) Effect of parkin on DJ-1 steady-state protein levels. (C) SH-SY5Y cells co-transfected as detailed earlier were fractionated into 1% Triton X-100-soluble or -insoluble fractions, and equivalent fractions analyzed by WB with anti-myc and anti-FLAG antibodies or with anti-actin antibody to demonstrate equal loading. (D) Similar steady-state experiments were performed using transfected cells treated with the proteasome inhibitor MG132 (5 μ M) for 24 h, as described earlier. Full-length (FL), N-terminally truncated (Δ N1 and Δ N2) and mono-ubiquitinated (DJ-1-(Ub)₁) myc-tagged DJ-1 species or HMW FLAG-tagged parkin species are indicated by arrows. Molecular weight markers are indicated in kDa. All experiments were replicated at least three times with similar results.

with both full-length and HMW forms of parkin. Importantly, using chemical cross-linking, we are unable to determine whether parkin associates preferentially with monomeric or dimeric forms of mutant DJ-1. Collectively, these findings suggest that pathogenic mutant forms of DJ-1 share a reduced capacity to form homo-dimers that strongly correlates with their propensity to interact with parkin, perhaps suggestive of parkin binding preferentially to monomeric DJ-1.

Parkin fails to ubiquitinate DJ-1 but instead enhances DJ-1 protein stability

As parkin specifically and differentially interacts with pathogenic mutant forms of DJ-1, the ability of parkin to

ubiquitinate and to enhance the degradation of these mutants was explored (Fig. 3). We chose to study further the L166P and M26I DJ-1 mutants, because these show the strongest interaction with parkin (Fig. 1B). To ascertain whether parkin ubiquitinates DJ-1, SH-SY5Y cells were co-transfected with HA-tagged ubiquitin and myc-tagged DJ-1 (WT, L166P or M26I) with and without FLAG-tagged parkin. This was followed by IP with anti-myc antibody and probing with anti-HA antibody to monitor ubiquitination of DJ-1, or with anti-myc antibody to monitor the formation of DJ-1-ubiquitin conjugates (Fig. 3A). In the absence of parkin, a small proportion of WT and M26I DJ-1 is mono-ubiquitinated, whereas mono-ubiquitination of L166P DJ-1 is not detected probably secondary to its reduced protein stability (Fig. 3A).

In the presence of parkin, we fail to observe enhanced ubiquitination of WT and mutant DJ-1 (Fig. 3A). Moreover, with the exception of mono-ubiquitinated DJ-1, we fail to observe any HMW DJ-1-ubiquitin conjugates (Fig. 3A), suggesting the absence of poly-ubiquitinated forms of DJ-1. To determine whether the failure to observe enhanced ubiquitination of DJ-1 by parkin was potentially due to the proteasomal degradation of poly-ubiquitinated forms of DJ-1, similar experiments were performed in the presence of the proteasome inhibitor MG132 (Fig. 3B). Following proteasome inhibition, we fail to detect the formation of HMW DJ-1-ubiquitin conjugates but instead consistently detect mono-ubiquitinated DJ-1 species, including L166P DJ-1 (Fig. 3B). However, we also observe a marked accumulation of full-length and truncated forms of L166P DJ-1 to near WT levels, further suggesting that this mutant is not subject to poly-ubiquitination. Parkin overexpression does not influence the overall levels of mono-ubiquitinated DJ-1 following proteasome inhibition, but rather redistributes them from a detergent-soluble to an insoluble fraction (Fig. 3B and D). Taken together, these findings demonstrate that L166P and M26I mutant DJ-1 are not ubiquitinated by parkin despite their interaction, whereas DJ-1 can exist in a mono-ubiquitinated form independent of parkin overexpression.

The failure to observe ubiquitination of L166P and M26I mutant DJ-1 in the presence of parkin was surprising. To explore whether the absence of HMW DJ-1-ubiquitin conjugates in the detergent-soluble fraction was secondary to these conjugates residing or being sequestered into the detergent-insoluble fraction, we examined and compared the 1% Triton X-100-soluble and -insoluble fractions from the earlier mentioned ubiquitination experiments (Fig. 3C and D). Unexpectedly, parkin dramatically increases the amount of full-length L166P and M26I mutant DJ-1 in the detergent-insoluble fraction, and also has a smaller effect on WT DJ-1 (Fig. 3C). In the detergent-soluble fraction, parkin also facilitates a small increase in the steady-state levels of WT, L166P and M26I DJ-1 (Fig. 3C), suggesting that parkin may generally enhance the stability of DJ-1. Although full-length and HMW forms of parkin are present in the insoluble fraction, only full-length parkin is detected in the soluble fraction (Fig. 3C). In the detergent-insoluble fraction, the stabilizing effect of parkin on full-length L166P and M26I mutant DJ-1 steady-state levels is markedly enhanced following treatment with the proteasome inhibitor MG132, having only a small effect on WT DJ-1 (Fig. 3D). In addition, parkin also enhances the levels of N-terminally truncated forms of both WT L166P and M26I DJ-1 following proteasome inhibition (Fig. 3D), and parkin also promotes the redistribution of mono-ubiquitinated DJ-1 from the soluble into the insoluble fraction (Fig. 3B and D). The enhanced levels of DJ-1 in the insoluble fraction following proteasome inhibition also correlate with the dramatic accumulation of full-length and HMW forms of parkin in this fraction (Fig. 3D), whereas in the soluble fraction only full-length parkin is detected. These HMW forms of parkin likely represent poly-ubiquitinated species that accumulate following proteasome inhibition. In the detergent-soluble fraction, the small stabilizing effect of parkin on DJ-1 levels is still observed following proteasome inhibition (Fig. 3D). In these experiments, we fail to observe

detergent-insoluble HMW DJ-1-ubiquitin conjugates in the absence or presence of parkin (Fig. 3C and D), further suggesting that parkin does not poly-ubiquitinate mutant DJ-1. Collectively, these findings demonstrate that parkin can increase the steady-state levels of L166P and M26I mutant DJ-1, primarily of detergent-insoluble species, and this effect is enhanced by proteasome inhibition. Taken together, these results indicate that although parkin interacts with L166P and M26I mutant DJ-1, parkin enhances neither their ubiquitination nor their degradation or turnover. Instead, parkin may promote the stability of L166P and M26I mutant DJ-1. This may suggest that the interaction of parkin with these mutants is either indirect or subserves an alternative as yet undetermined biological function.

Oxidative stress promotes the association of parkin and DJ-1

As parkin interacts selectively with pathogenic DJ-1 mutants but not with WT protein, the possibility that parkin may only interact with DJ-1 under pathogenic or stressful conditions was explored. To this end, the ability of WT DJ-1 and parkin to associate under conditions of oxidative stress was examined by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 4A–C). First, the effects of hydrogen peroxide on the ability of parkin and WT DJ-1 to interact were monitored. Hydrogen peroxide oxidatively modifies cysteine residues in DJ-1, particularly Cys-106, resulting in an acidic shift in *pI*-value (44,45,58). SH-SY5Y cells were co-transfected with FLAG-tagged parkin and myc-tagged WT DJ-1, followed by treatment with hydrogen peroxide for 24 h, and IP with anti-myc antibody. Hydrogen peroxide treatment results in a dose-dependent increase in the interaction of WT DJ-1 with parkin (Fig. 4A). However, WT DJ-1 and parkin fail to interact under control conditions. To determine whether parkin interacts with WT DJ-1 under other forms of oxidative stress, the effects of the mitochondrial complex-I inhibitor, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺), and the nitric oxide (NO) donor, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) were examined. Treatment with both MPP⁺ and SNAP leads to a dose-dependent increase in the interaction of parkin with WT DJ-1 comparable with that observed with hydrogen peroxide (Fig. 4B and C). Under all three oxidative conditions, a dose-dependent decrease in cell viability is observed (data not shown). Taken together, these results suggest that parkin and DJ-1 can be linked together under conditions of oxidative stress.

To determine the consequences of the interaction of parkin and WT DJ-1 following oxidative stress, we examined the ability of parkin to ubiquitinate DJ-1, as well as the effect of parkin on DJ-1 steady-state levels, under oxidative conditions. First, ubiquitination experiments were performed as described earlier with myc-tagged WT DJ-1 and FLAG-tagged parkin under similar conditions of oxidative stress that promote the maximal interaction of both proteins (Fig. 4D). We fail to detect HMW DJ-1-ubiquitin conjugates in the absence or presence of parkin following oxidative stress, but we continue to consistently observe mono-ubiquitinated DJ-1 irrespective of the presence of parkin (Fig. 4D). Parkin does not modify the actual level of mono-ubiquitinated DJ-1 observed following

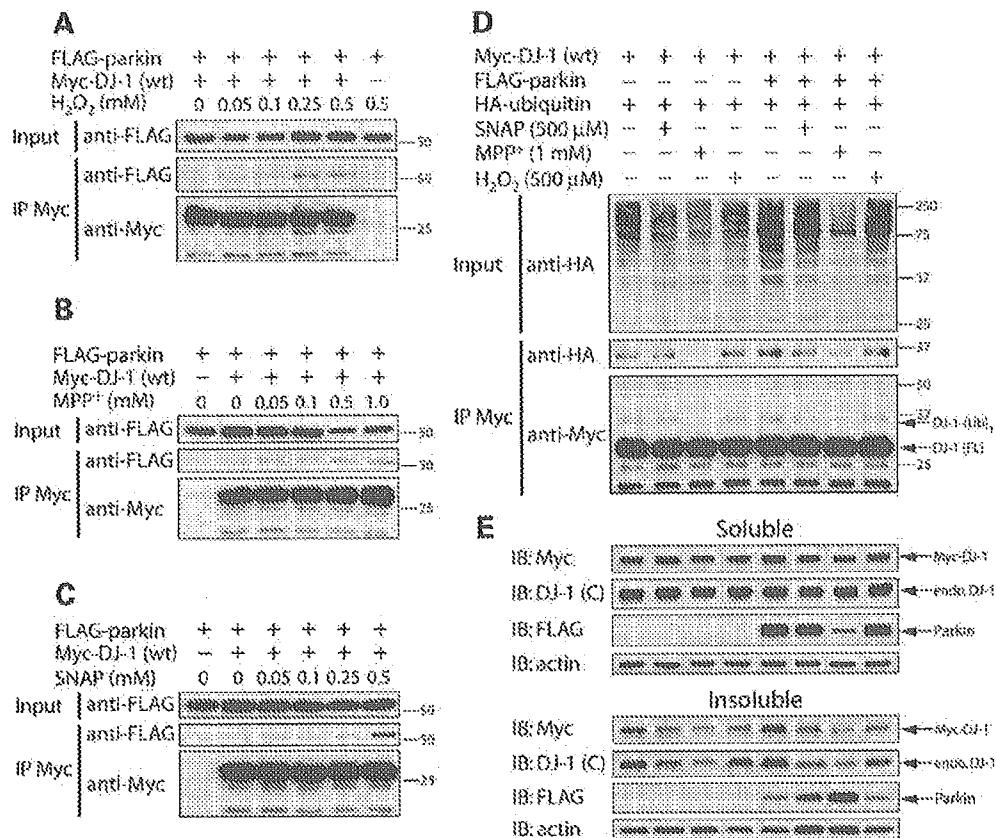


Figure 4. Oxidative stress promotes the association of parkin and DJ-1. (A) Hydrogen peroxide treatment promotes the interaction of parkin and DJ-1. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged WT DJ-1 or control plasmid, together with FLAG-tagged parkin, followed by treatment with increasing concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) for 24 h. Lysates were subjected to IP with anti-myc antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-FLAG and anti-myc antibodies. Similar experiments were performed using transfected cells treated with increasing concentrations of (B) MPP⁺ and (C) SNAP for 24 h, as described earlier. (D) Parkin fails to ubiquitinate DJ-1 following oxidative stress. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged WT DJ-1 and HA-tagged ubiquitin, with or without FLAG-tagged parkin, followed by treatment with SNAP (500 μM), MPP⁺ (1 mM) or H₂O₂ (500 μM) for 24 h. Equivalent soluble lysates (2.5 mg protein) were subjected to IP with anti-myc antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-HA and anti-myc antibodies. Full-length (FL) and mono-ubiquitinated [DJ-1-(Ub)₁] myc-tagged DJ-1 species are indicated by arrows. (E) Effect of parkin on DJ-1 steady-state protein levels following oxidative stress. SH-SY5Y cells co-transfected and treated as in (D) were fractionated into 1% Triton X-100-soluble or -insoluble fractions, and equivalent fractions analyzed by WB with anti-myc, anti-DJ-1 (C) and anti-FLAG antibodies or with anti-actin antibody to demonstrate equal loading. Myc-tagged (*Myc*) or endogenous (*endo*) DJ-1 are indicated. Molecular weight markers are indicated in kDa. All experiments were replicated at least three times with similar results.

oxidative stress, but instead marginally enhances the steady-state levels of soluble DJ-1 (Fig. 4D and E), as demonstrated earlier (Fig. 3C), thus leading to IP of greater quantities of full-length and mono-ubiquitinated DJ-1 in this experiment. This is particularly apparent under control conditions (Fig. 4D and E). It was not possible to perform this experiment in the presence of proteasome inhibitors secondary to excessive cell death (data not shown). These results suggest that WT DJ-1 is not ubiquitinated by parkin under conditions of oxidative stress.

To determine the effects of parkin on the steady-state levels of WT DJ-1 following oxidative stress, we examined and compared the detergent-soluble and -insoluble fractions from the earlier mentioned ubiquitination experiment (Fig. 4E). Under control conditions, parkin marginally enhances the levels of WT DJ-1 in both the soluble and insoluble fractions

(Fig. 4E), as observed earlier (Fig. 3C). This stabilizing effect of parkin on WT DJ-1 is abrogated under oxidative conditions (Fig. 4E). Furthermore, these oxidative conditions lead to a marked reduction in the steady-state levels of WT DJ-1 in the detergent-insoluble fraction irrespective of parkin overexpression, with no obvious changes in the soluble fraction. Oxidative stress also has a similar effect on the steady-state levels of detergent-insoluble endogenous DJ-1 in these cells (Fig. 4E). These results suggest that oxidative stress may reduce the stability of detergent-insoluble forms of DJ-1. In contrast, treatment with MPP⁺, and to a lesser extent SNAP, results in a marked redistribution of full-length parkin from the detergent-soluble to the insoluble fraction (Fig. 4E). This redistribution may reflect movement of parkin between different cellular compartments or organelles, or a change in the biochemical properties of parkin. Additional

experiments using quantitative DSS cross-linking show that oxidative stress has no effect on homo-dimer formation of detergent-soluble WT DJ-1 (data not shown). Collectively, these results indicate that although parkin interacts with WT DJ-1 under oxidative stress, this does not promote the parkin-mediated ubiquitination or degradation of DJ-1. Instead, the small stabilizing effect of parkin on WT DJ-1 may be impaired by oxidative stress. Intriguingly, oxidative stress can reduce the stability of insoluble DJ-1, as well as reducing the solubility of parkin. Our findings support the idea that the interaction of DJ-1 and parkin under oxidative stress may be an indirect association or may serve an alternative biological role.

L166P mutant DJ-1 associates with parkin, CHIP and Hsp70

Parkin exists in a macromolecular protein complex with CHIP and Hsp70, where this complex participates in the ubiquitination and degradation of parkin substrates such as Pael-R (27). To ascertain whether DJ-1 mutants could additionally interact with components of this parkin complex, co-immunoprecipitation experiments were performed (Fig. 5). We chose to study only L166P DJ-1 in these experiments because this mutant displays the most robust interaction with parkin. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) together with HA-tagged CHIP, FLAG-tagged parkin or both proteins, followed by treatment with the proteasome inhibitor MG132 for 24 h to restore L166P DJ-1 levels to those of WT, and IP with anti-myc antibody. L166P DJ-1 specifically interacts with CHIP in the presence or absence of parkin, whereas WT DJ-1 fails to interact with CHIP (Fig. 5A). Parkin fails to appreciably alter the interaction of CHIP with L166P DJ-1. In a similar manner, CHIP fails to alter the interaction of parkin with L166P DJ-1, suggesting that parkin and CHIP may interact with L166P DJ-1 independently of each other. In similar co-immunoprecipitation experiments, we also monitored the ability of L166P DJ-1 to interact with Hsp70. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged DJ-1 (WT or L166P) together with V5-tagged Hsp70 or control plasmid, followed by treatment with or without MG132 for 24 h, and IP with anti-V5 antibody. We find that only full-length L166P DJ-1 interacts with Hsp70, on the other hand, Hsp70 also interacts with N-terminally truncated forms of WT and L166P DJ-1 (Fig. 5B). In the presence of the proteasome inhibitor MG132 to restore L166P DJ-1 levels, the interaction of Hsp70 with full-length and truncated forms of L166P DJ-1 is enhanced and we additionally observe a weak interaction of full-length WT DJ-1 with Hsp70 (Fig. 5B). The interaction of full-length WT DJ-1 with Hsp70 following proteasome inhibition may relate to the putative chaperone function of DJ-1. To determine whether Hsp70 can promote the stability of L166P DJ-1, similar to the effect of parkin (Fig. 3D), we examined the steady-state levels of WT or L166P DJ-1 in the detergent-insoluble fraction in the absence or presence of Hsp70 following proteasome inhibition (Fig. 5C). Hsp70 markedly enhances the level of full-length L166P DJ-1, as well as N-terminally truncated forms of WT and L166P DJ-1, with smaller effects on full-length WT DJ-1 (Fig. 5C). This finding suggests that Hsp70 can promote the stability of detergent-insoluble DJ-1, primarily L166P DJ-1.

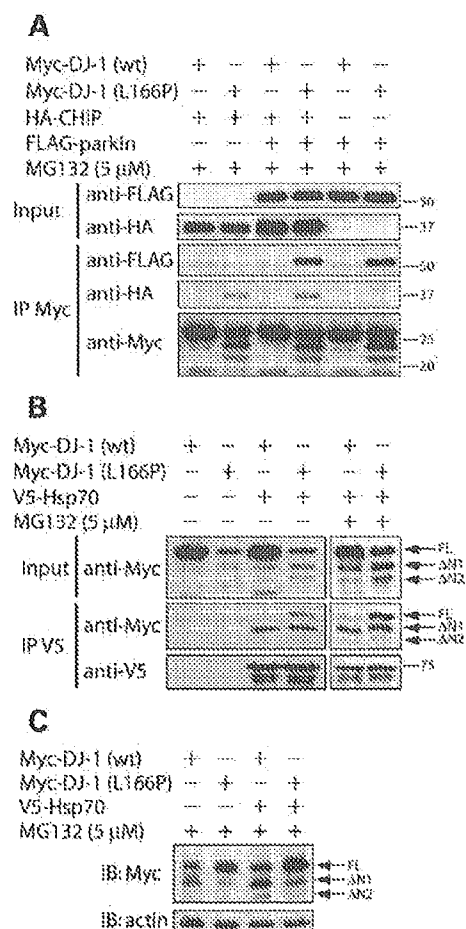


Figure 5. Association of L166P DJ-1 with parkin, CHIP and Hsp70. (A) Interaction of L166P DJ-1 with CHIP and parkin. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged WT or L166P DJ-1, together with HA-tagged CHIP, FLAG-tagged parkin or both proteins, followed by treatment with the proteasome inhibitor MG132 (5 μ M) for 24 h. Lysates were subjected to IP with anti-myc antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-HA, anti-FLAG and anti-myc antibodies. (B) Interaction of L166P DJ-1 with Hsp70. SH-SY5Y cells were co-transfected with myc-tagged WT or L166P DJ-1, together with V5-tagged Hsp70 or control plasmid, followed by treatment with or without the proteasome inhibitor MG132 (5 μ M) for 24 h. Lysates were subjected to IP with anti-V5 antibody, and IP and input lysates were analyzed by WB with anti-myc and anti-V5 antibodies. (C) Effect of Hsp70 on DJ-1 steady-state protein levels. The 1% Triton X-100-insoluble fraction from cells co-transfected with myc-tagged WT or L166P DJ-1 with or without V5-tagged Hsp70, followed by treatment with MG132 (5 μ M) for 24 h, was analyzed by WB with anti-myc and anti-actin antibodies. Full-length (FL) and N-terminally truncated (Δ N1 and Δ N2) myc-tagged DJ-1 species are indicated by arrows. Molecular weight markers are indicated in kDa. All experiments were replicated with similar results.

This stabilizing effect reflects the interaction profile of Hsp70 with WT and L166P DJ-1 (Fig. 5B). Taken together, these results indicate that both CHIP and Hsp70 are able to interact with L166P DJ-1, and suggest that parkin may associate with L166P DJ-1, and possibly other DJ-1 mutants, as part of a larger protein complex containing CHIP and Hsp70. This observation may explain the failure of parkin to directly ubiquitinate L166P and M26I mutant DJ-1 (Fig. 3A and B).