

リレー連載

▶▶ 監修：水谷修紀

単  
遺一  
伝子  
ゲ

病

と

ム

## ① 脳神経変性疾患

② 遺伝性悪性腫瘍

③ 骨格筋疾患

④ 成人内分泌・代謝性疾患

⑤ 循環器疾患

⑥ 動脈硬化・血管炎

⑦ 小児内分泌疾患

⑧ 先天性代謝異常症

⑨ 先天性腎/尿路疾患

⑩ 先天性出血性疾患

⑪ 感覚器疾患1—難聴等—

⑫ 感覚器疾患2—網膜色素変性症等—

## ①-2. パーキンソン病

：単一遺伝子異常から黒質神経変性の病態解明へのアプローチ

Hattori Nobutaka / 服部信孝

順天堂大学医学部脳神経内科助教授

老人性疾患病態治療研究センター助教授

## Key Words

- Familial Parkinson's disease
- *parkin*
- *α-synuclein*
- *DJ-1*
- *PINK1*
- *UCH-1*
- *LRRK2*
- *Nurr1*
- Lewy bodies

## はじめに

孤発性パーキンソン病(PD)は遺伝的素因、環境素因の関与する多因子疾患と考えられている。これまでに酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、加齢変化の関与などが指摘されているが、病態解明には至っていない。PDという terminology では単一疾患であるが、その病態は多様に広がっており、孤発性PDからのみのアプローチでは、病態を明らかにすることは困難であるといわざるを得ない。一方で、若年性パーキンソニズムにおける研究はめざましい進歩を遂げた。若年発症のPD

の原因に、単一遺伝子異常が関与していることは間違いなく、事実、遺伝子異常にともなう家族性PDの遺伝子座のうち、原因遺伝子として *parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*), *DJ-1* (*PARK7*) が同定・単離されている。もちろん、通常型PDにおいても遺伝的素因の関与は十分に推定されているが、ゲノムワイドな解析なくして真の感受性遺伝子の同定は難しいため、母集団の臨床診断の正確性、そして均一性が重要な鍵を握っているといえる。感受性遺伝子の単離・同定ができればPDリスクグループの遺伝子診断が可

# 単一遺伝子病とゲノム

能になり、予防医学の発展へと展開できることが予想される。一方で、5~10%の家族性PD(FPD)の病態解明は、その遺伝子産物の機能が黒質神経細胞の脱落という共通機序を形成している可能性があり、神経保護作用をもつ薬物の開発が現実的になると考えている。本稿では、FPDの病態を中心に論じ、孤発型PDの原因について解説したい。

## 家族性パーキンソン病の分類と臨床型

現在のところ PARK11 までの報告があり、そのうち6つの原因遺伝子が

同定されている。常染色体優性遺伝性PD(ADPD)では、*SNCA*<sup>1,2)</sup>、*UCHL-1*<sup>3)</sup>、*LRRK2/dardarin*<sup>4,5)</sup>が、常染色体劣性遺伝性PD(ARPD)では、*parkin*<sup>6)</sup>、*DJ-1*<sup>7)</sup>、*PINK1*<sup>8)</sup>が同定された(表1)。PARK10はPDの疾患感受性遺伝子としてマップされている。

FPDの分類は遺伝形式から優性型、劣性型に、PDの神経病理学的必須事項としてLewy小体の有無で分類される。従来Lewy小体形成は病理学的診断上欠かせない要素であったが、遺伝子診断が可能になった現時点では臨床症状とドパ反応性がPD診断にとって重要になってきている。もちろん、

Lewy小体の有無については現在もその存在が不可欠とする意見もあり決着がつかない。本稿では、臨床症状とドパ反応性に重点を置きLewy小体が神経病理学的に存在しなくともパーキンソニズムとはせずPDとして扱いたい。

同定されている原因遺伝子のうち、日本人ではわれわれのグループにより単離・同定された*parkin*遺伝子変異のみが報告されていたが、最近になりPARK6の原因遺伝子である*PINK1*遺伝子異常をもつ日本人のARPDが存在することが判明した<sup>9)</sup>。日本は島国であり歴史背景から近親婚が多かつ

表1 遺伝性パーキンソン病の分類

gene	locus	Hereditary form	Lewy body
PARK1 <i>α-synuclein</i>	4q21-23	AD	+
PARK2 <i>parkin</i>	6q25.2-27	AR	-
PARK3 ?	2p13	AD	+
PARK4 <i>α-synuclein triplication</i>	4q13-22	AD	+
PARK5 <i>UCHL-1</i>	4p14-15	AD	?
PARK6 <i>PINK1</i>	1p35-36	AR	?
PARK7 <i>DJ-1</i>	1p36	AR	?
PARK8 <i>dardarin/LRRK2</i>	12p11.2-q13.1	AD	-/+
PARK9 ?	1p36	AR	?
PARK10 ?	1p32	感受性遺伝子	?
PARK11 ?	2q36-37	AD	?
NR4A2 <i>Nurr1</i>	2q22-23	AD	?

現在わかっている家族性PDの分類を示す。

## 2. パーキンソン病：単一遺伝子異常から黒質神経変性の病態解明へのアプローチ

たという事情もあり、常染色体劣性若年性パーキンソンニズム(ARPD)が多い。第二次世界大戦以後、人口の移動にともない近親婚率は減少しているが、日常外来で ARPD に遭遇することは決してまれではないと思われる。

一方、AD 型 PD については船山らにより相模原地方に存在する一大家系の ADPD が PARK8 としてマップされた。わが国にも PARK8 が存在することは間違いなく、今後の遺伝子解析結果が注目される。このように、原因遺伝子群が単離・同定され遺伝子産物間の相互作用の検討が可能になってきており、事実、遺伝子間における相互作用の報告が相次いでおり、今後は単一遺伝子異常にともなう FPD の共通カスケードの解明に重点が置かれると推定される。

### 優性遺伝性 PD-SNCA, PARK4 (triplication)

1997 年から 1998 年にかけてヨーロッパの AD の家系において  $\alpha$ -synuclein の A53T, A30P の 2 つの点変異が報告された。さらに、スペイン家系に E46K のミスセンス変異が報告されたが、いずれも頻度的には低い。ミスセンス変異は創始者効果が示唆されており、A53T 変異については先祖が共通していることがわかっている。臨床症状はやや経過が速く一部に痴呆を認める。蛋白の生化学的解析により  $\alpha$ -synuclein が凝集しやすい性質を獲得していることが推測されている。

最近になり、PARK4 としてマップされていた Iowa 家系のマップは間違

いであり、 $\alpha$ -synuclein の triplication によることが報告された<sup>2)</sup>。遺伝子のコピー数が正常者の 2 倍あることにより遺伝子発現レベルが過剰状態となり、その結果として正常  $\alpha$ -synuclein の脳内の凝集が惹起されていると推定されている。つまり、 $\alpha$ -synuclein の過剰状態や蛋白の変性しやすさが  $\alpha$ -synuclein の凝集傾向を生じさせ、その凝集が細胞死を誘導していると考えられている。triplication(コピーが 3 個のものと正常 1 個)とは別に duplication(コピーが 2 個と正常 1 個)が報告されているが<sup>10,11)</sup>、duplication の症例は臨床的に痴呆をとともわず孤発型と類似しており、コピー数と痴呆発現との関連が指摘されている。事実、 $\alpha$ -synuclein の過剰発現系マウスではほとんどの研究室でヒト PD の再現を見出していない。

$\alpha$ -synuclein の変異頻度は少ないものの、Lewy 小体の主要構成成分であり<sup>12)</sup>、PD における Lewy 小体形成や選択的細胞変性にどのように関与しているかメカニズムの解明の糸口となり得る重要な蛋白質であることは間違いない。この蛋白とドパミンキノン体の複合体形成が指摘されており<sup>13,14)</sup>、ドパミン神経細胞死との関連が注目されている。この蛋白を中心とした Lewy 小体形成阻止剤の開発が重要課題といえる。

### 優性遺伝性 PD-PARK8 (LRRK2/dardarin)

PARK8 に連鎖する ADPD の原因遺伝子として最近同定された LRRK2/

dardarin は、 $\alpha$ -synuclein とは対照的にその変異頻度はかなり高いことが報告されている<sup>4,5)</sup>。遺伝子マップは、相模原地方を起源とする一大家系を中心に決定された。変異頻度は 5%前後にもおよぶとされている。蛋白の機能については何もわかっていないがリン酸化にかかわっている可能性が指摘されている。PARK8 の特徴としては Lewy 小体が同じ家系内であっても存在する場合としない場合があることと、臨床的に遺伝性の進行性核上性麻痺(PSP)と思わせるような家系も存在することである。発症年齢も若年のケースもあるが、通常の PD 同様の中高年で発症するケースもあり、多様性に富んだタイプといえる。PSP と PD の要素をもつことは、この分子がタウオパチーとシヌクレイノパチーの両病態の上流に位置するものと推定される。後述する PARK2 が Lewy 小体を一般に形成しないことを特徴とし、PSP に特徴的なタウ蛋白の蓄積を認める症例も存在することより PARK8 は PARK2 と PD の中間的位置付けに考えている。LRRK2 がリン酸化酵素であることより、 $\alpha$ -synuclein を基質とするか否かが今後の大きな課題である。

### 劣性遺伝性 PD-PARK2 (parkin)

1973 年に Yamamura らによりその臨床型が発表され、その後、連鎖解析から遺伝子同定までを世界に先がけてわが国により確立されたものであり、現在ではわが国のみならず世界に分布

# 単一遺伝子病とゲノム

する最も頻度の高いタイプであることが明らかにされた<sup>15,16)</sup>。変異型としては、欠失が本邦に多く、海外ではミスセンス変異および microdeletion が多い<sup>16)</sup>。特徴的臨床症状として日内変動、レボドパ(levodopa; L-dopa)治療後の早期に出現する motor complication, 睡眠効果, 痴呆を認めないなどほかにも多彩な表現型の報告があり、遺伝子変異タイプと表現型との相関ははっきりしない。その頻度は ARPD の約 50% と報告されている。発症年齢は 40 歳以下が多いが 7~72 歳と幅がある。AR の家族歴をもつ家系が多いが、家族歴のない孤発の若年発症にも報告は少なくない。出現頻度は自律神経症状 60%, 経過中のジストニア 78%, 精神症状 56%, 睡眠効果 63% とする報告がある<sup>15)</sup>。10 歳以下の発症で、ジストニアを呈する症例は瀬川病(dopa responsive dystonia; DRD)との鑑別が重要である。ジストニアが初発である場合、整形外科を受診するケースも多い。経過は数十年と長いにもかかわらず、on のとき Yahr3, off のとき Yahr4 を越えるような重症例は少ない。精神症状に関してはパーキンソニズムの前に精神症状が先行しているケースもある。精神症状としては、うつ病が多いが、パラノイア, 不安神経症, 神経性食欲不振症の報告もある。キャリア(ヘテロ接合体で *parkin* 遺伝子異常を認めるがパーキンソニズムは認めない)において精神症状がでやすいとする報告もある。また、一部のキャリアでは、発症年齢はホモ接合体と比して高齢化ではあるが、発症することが報告されており、

その機序としてドミナントネガティブ効果(変異蛋白が正常蛋白の機能を阻害する)かハプロ不全(1つの遺伝子アレルに異常があると正常では2つのアレルが機能として作用するので、キャリアでは正常蛋白が正常者の半分となるために発症する)で発症することが推定される。後述する ARPD の原因遺伝子 *DJ-1*, *PINK1* ともにキャリアでも発症するケースが存在することから、ARPD に同じメカニズムの関与が推定されている。

Parkin は、ubiquitin-proteasome system (UPS) で働くユビキチンリガーゼ(E3)であり<sup>17)</sup>、これまでに CDCrel-1, Pael-receptor, *o*-glycosylated  $\alpha$ -synuclein などが基質候補として挙げられている<sup>18)</sup>。また、立体構造上、parkin が proteasome の Rpn10 サブユニットで結合することが指摘されている<sup>19)</sup>。神経病理学的には、Lewy 小体形成を一般に認めず、一部の症例ではタウ蛋白の蓄積を認め進行性核上性麻痺に類似した病理所見を呈する<sup>20)</sup>。しかしながら、*Drosophila* で人為的に遺伝子操作すると、Pael 受容体による選択的黑質変性が生じることは報告されているものの<sup>21)</sup>、ヒトやマウスでの基質の蓄積を証明できていないことから、Parkin の E3 機能については、48 番目のリジン残基を介さないポリユビキチン鎖の形成に関与している可能性が指摘されている。最も可能性の高いポリユビキチン鎖は 63 番目のリジン残基を介した場合で、この場合プロテアソームの分解シグナルとはならずエンドサイトーシス, DNA 修復, アミノ酸輸送, 蛋白の翻訳に関与する

とされている。特に parkin は、シナプス小胞にも局在することより、エンドサイトーシスやエクソサイトーシスに関与する可能性を考えている。事実、parkin が negative regulator として機能して、シナプス小胞において docking, fusion に関与している可能性を考えている。

## 劣性遺伝性

### PD-PINK1(PARK6), DJ-1(PARK7)

PARK7 はヨーロッパの AR の家系を対象とした連鎖解析により 1p36 にマップされ、2002 年 Bonifati らにより原因遺伝子として *DJ-1* 遺伝子が同定された<sup>7)</sup>。オランダ家系においてエクソン 1~5 にまたがる 2000bp の広範の欠失が見出され、イタリア家系にて L166P の点変異が認められた。*DJ-1* 遺伝子は全長 23.5 Kb, 189 のアミノ酸から構成され、脳も含め体内の各組織にユビキチンに発現している。機能は不明であるが、酸化ストレスへの関与、ユビキチン様蛋白である SUMO-1 との結合により UPS との関連も指摘されている。追試により、海外で点変異 5 例、欠失 2 例を認めているが、大規模調査にても陰性例が多く、まれな変異である可能性が示唆されている。当研究室においてもアジアの ARPD を対象にハプロタイプ解析を施行し、PARK7 に連鎖している家系を 6 家系見出したが *DJ-1* 遺伝子変異は認めなかった。*DJ-1* 遺伝子変異の患者は、発症は平均 34.6±9.2 歳で PARK2 に類似した臨床症状を呈する。神経症や精神症状(不安神経症, パニック発

## 2. パーキンソン病：単一遺伝子異常から黒質神経変性の病態解明へのアプローチ

作、幻覚)をとまなうことが報告されているが、症例数が少なく今後の検討が必要である。

PARK6 は、シシリア島の AR の家系を対象とした連鎖解析により 1p35-36 に Locus が絞られ、候補遺伝子の変異解析により *PINK1* (PTEN Induced Putative Kinase 1) 遺伝子異常が報告された<sup>8)</sup>。イタリアの 2 家系にノンセンス変異 W437X, スペインの 1 家系に G309D が認められた。われわれもアジアの ARPD の家系を中心に 6 家系(日本 R246X, H271Q, E417G, イスラエル R246X, フィリピン L347P, 台湾 Q239X/R492X)に *PINK1* の病的変異を見出した<sup>9)</sup>。点変異が主体であるが、わが国でエクソン 6~8 まで欠失している家系を見出した。*PINK1* での欠失の存在は、日本人には欠失が生じやすい人種的特徴の存在を示唆するのかもしれない。また、ナンセンス変異(R246X)と欠失を認めた患者では、痴呆症状を認めたことも興味深い。いずれにしても、変異の多くはセリン/トレオニンキナーゼドメインに集中して存在しており、このドメインが機能的に重要な箇所であると予想される。

*PINK1* 遺伝子は 581 のアミノ酸からなり、マウスと 95% の相同性をもつことから種間を共通して保存されている重要な蛋白であると予想される。構造上、最初の 34 のアミノ酸残基にミトコンドリアへの移行シグナルをもち、後半の大部分をカルモジュリンファミリーのセリン/トレオニンキナーゼドメインが占める。PARK8 の *LRRK2* 同様、リン酸化酵素に関連性が指摘されており、PD の共通機序にミトコン

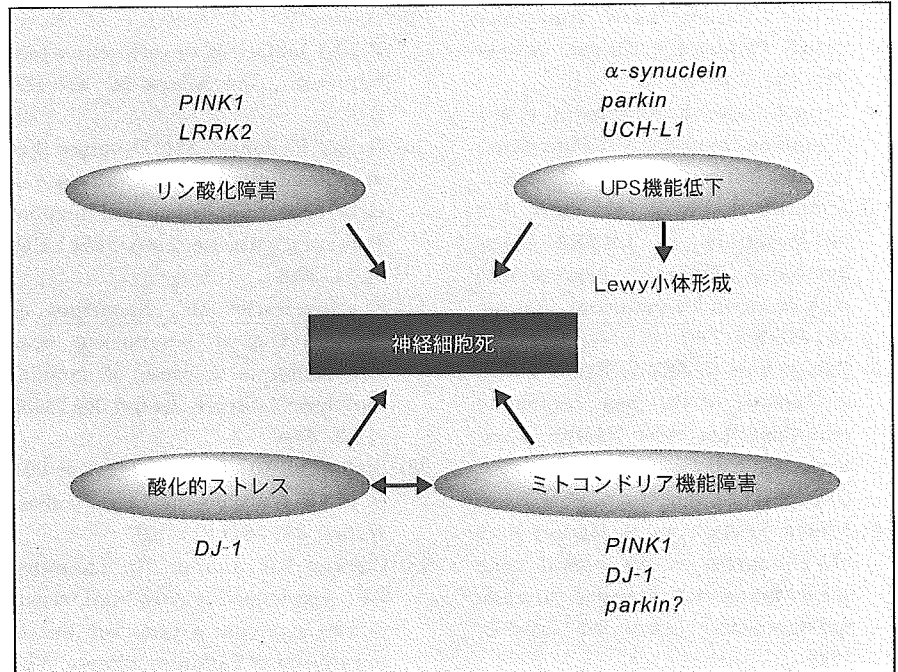


図1 家族性パーキンソン病の発症機序

各遺伝子産物は細胞死に対し、ミトコンドリア機能、酸化ストレス、ユビキチン・プロテアソーム系、リン酸化を通じて作用していることが予想される。実際に、*parkin* と *DJ-1* が相互作用する論文報告もあり、今後は各分子間の相互作用が注目される。

ドリア機能、酸化ストレス、蛋白分解系、そしてリン酸化が考えられる。

### おわりに

原因遺伝子産物の機能解明により、遺伝子産物群が形成するカスケードを明らかにすることで黒質神経変性の発症機序を解明することが最も効率の良い戦略と考えている。今後は、これら遺伝子産物間の相互作用を明らかにすることが重要であると考え(図1)

一方、上記の既存の遺伝子異常を認めない家族性パーキンソン病の患者も数多く存在する。事実、ARPDであってもいまだ 40% の FPD は原因遺伝子が不明である。現在、われわれの研究グループでも精力的に未知の原因遺

伝子単離の解析を進めている。ゲノムワイドな連鎖解析、その候補領域の検討も行われており、新規遺伝子座あるいは感受性遺伝子の発見も待たれる。また、SNP による薬剤の個体での反応の差異、原因遺伝子に対応した薬剤の選択法など、個々の患者に対応した遺伝子レベルでの治療方針、つまりオーダーメイド医療の確立もそう遠くない未来にくるかもしれない。

### References

- 1) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E et al: Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047, 1997
- 2) Singleton AB, Farrer M, Johnson J et

- al :  $\alpha$ -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302 : 841, 2003
- 3) Leroy E, Boyer R, Auburger G et al : The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395 : 451-452, 1998
  - 4) Zimprich A, Biskup S, Leitner P et al : Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44 : 601-607, 2004
  - 5) Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW et al : Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked parkinson's disease. *Neuron* 44 : 595-600, 2004
  - 6) Kitada T, Asakawa S, Hattori N et al : Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392 : 605-608, 1998
  - 7) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ et al : Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299 : 256-259, 2003
  - 8) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V et al : Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304 : 1158-1160, 2004
  - 9) Hatano Y, Li Y, Sato K et al : Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56 : 424-427, 2004
  - 10) Ibanez P, Bonnet AM, DeBarges B et al : Causal relation between  $\alpha$ -synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364 : 1169-1171, 2004
  - 11) Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C et al :  $\alpha$ -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364 : 1167-1169, 2004
  - 12) Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM et al :  $\alpha$ -synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388 : 839-840, 1997
  - 13) Conway KA, Harper JD, Lansbury PT : Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant  $\alpha$ -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med* 4 : 1318-1320, 1998
  - 14) Xu J, Kao SY, Lee FJ et al : Dopamine-dependent neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein : A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 8 : 600-606, 2002
  - 15) Lucking CB, Durr A, Bonifati V et al : Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 342 : 1560-1567, 2000
  - 16) Hattori N, Matsumine H, Asakawa S et al : Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr 240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 249 : 754-758, 1998
  - 17) Shimura H, Hattori N, Kubo S et al : Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25 : 302-305, 2000
  - 18) Hattori N, Mizuno Y : Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364 : 722-724, 2004
  - 19) Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E et al : Parkin binds the Rpn 10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* 4 : 301-306, 2003
  - 20) van de Warrenburg BP, Lammens M, Lucking CB et al : Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 56 : 555-557, 2001
  - 21) Yang T, Nishimura I, Imai Y et al : Parkin suppressed dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37 : 911-924, 2003

# 7 パーキンソン病の ゲノム疫学

## 一単一遺伝子異常から孤 発型の病態解明に挑む

はっとり のぶたか  
■服部 信孝

順天堂大学医学部

脳神経内科・老人性疾患病態治療研究センター



服部 信孝

1985年順天堂大学医学部卒。90～93年まで名古屋大学医学部生化学第2国内留学，95年順天堂大学神経学助手，2003年より現職。2002年ベルツ賞一等賞受賞。03年日本神経学会賞受賞。04年トムソンサイエンティフィック社リサーチフロントアワード受賞。研究テーマはパーキンソン病の発症機序に関する研究。ミトコンドリア機能と加齢。趣味は娘と遊ぶこと，スキー。

Key words : Familial Parkinson's disease, parkin, alpha-synuclein, DJ-1, PINK1, UCH-1, LRRK2, Nurr1, Lewy bodies

### Abstract

パーキンソン病は運動障害をきたす神経変性疾患としては最も頻度が高く、遺伝性のない孤発型がほとんどを占める。しかし、単一遺伝子異常で発症する家族性パーキンソン病の報告が相次いで、遺伝的素因の関与が孤発型においても重要であることが提唱されている。全ての原因遺伝子が同定されたわけでないが、遺伝子産物は共通カスケードを形成している可能性があり、事実、複数の原因遺伝子産物が、蛋白分解系に関与している。未だ一時要因は不明であるが、遺伝性の病態解明から真の原因究明への戦略が最も効率かつ有効であると考えられている。

### はじめに

孤発性パーキンソン病 (PD) は遺伝的素因、環境素因の関与する多因子疾患と考えられている。これまでに酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、加齢変化の関与などが指摘されているが、病態解明には至っていない。一方で若年性パーキンソニズムにおける研究はめざましい進歩を遂げた。加齢が重要な危険因子であるPDにおいて加齢の影響を受けない若年発症のPDの研究は大きな情報を我々に提供してくれた。若年発症のPDの場

合、同胞発症が多く遺伝的関与が濃厚であることが分かっており、分子生物学の進歩と共にその原因が加速的に解明されている。もちろん、通常型PDにおいても遺伝的素因の関与は推定されるが、十分に遺伝的素因の関与の証明はなされていない。ゲノムワイドな解析なくして真の感受性遺伝子の同定は難しいため母集団の臨床診断の正確性、そして均一性が重要な鍵を握っているといえる。感受性遺伝子の単離・同定ができればPDリスクグループの遺伝子診断が可能になり、予防医学の発展へと展開できることが予想される。一方で、5～10%の家族性PD (FPD) の病態解明は、その遺伝子産物の機能が黒質神経細胞の脱落という共通機序を形成している可能性があり、神経保護作用も持つ薬物の開発が現実的になると考えている。本稿では、FPDの病態を中心に論じ、孤発型PDの原因について解説したい。

### 1. 家族性パーキンソン病の分類と臨床型

現在のところPARK11までの報告があり、



そのうち6つの原因遺伝子が同定されている。常染色体優性遺伝性PD (ADPD) では, SNCA, UCHL-1, LRRK2/dardarinが, 常染色体劣性遺伝性PD (ARPD) では, parkin, DJ-1, また最近になり新たにPINK1が同定された(表1)。PARK10はPDの疾患感受性遺伝子としてマップされている。

FPDの分類は遺伝形式から優性型, 劣性型に, PDの神経病理学的必須事項としてLewy小体の有無で分類される。従来Lewy小体形成は病理学的診断上欠かせない要素であったが, 遺伝子診断が可能になった現時点では臨床症状とドパ反応性がPD診断にとって重要になってきている。もちろん, Lewy小体の有無については現在もその存在が不可欠とする意見もあり決着がついていない。本稿では, 臨床症状とドパ反応性に重点を置きLewy小体が神経病理学的に存在しなくともパーキンソニズムとはせずPDとして扱いたい。

同定されている原因遺伝子のうち, 日本人では我々グループにより単離・同定されたparkin遺伝子変異のみが報告されていたが,

最近になりPARK6の原因遺伝子であるPINK1遺伝子異常をもつ日本人のARPDが存在することが判明した。日本は島国であり歴史背景から近親婚が多かったという事情もあり, 常染色体劣性若年性パーキンソニズム (ARPD) が多い。第二次世界大戦以後, 人口の移動に伴い近親婚率は減少しているが, 日常外来でARPDに遭遇することは決して稀ではないと思われる。

一方, AD型PDについては船山らにより相模原地方に存在する一大家系のAADPDがPARK8としてマップされた。残念なことに, このPARK8の原因遺伝子LRRK2は海外のグループより単離・同定されているが, 我が国にも存在することは間違いなく今後の遺伝子解析結果が注目される。このように原因遺伝子群が単離・同定され遺伝子産物間の相互作用の検討が可能になってきており, 事実遺伝子間における相互作用の報告が相次いでおり, 今後は単一遺伝子異常に伴うFPDの共通カスケードの同定に重点が置かれると推定される。

表1 遺伝性パーキンソン病の分類

	gene	locus	Hereditary form	Lewy body
PARK 1	$\alpha$ -Synuclein	4q21-23	AD	+
PARK 2	parkin	6q25.2-27	AR	—
PARK 3	?	2p13	AD	+
PARK 4	$\alpha$ -Synuclein triplication	4q13-22	AD	+
PARK 5	UCHL-1	4p14-15	AD	?
PARK 6	PINK1	1p35-36	AR	?
PARK 7	DJ-1	1p36	AR	?
PARK 8	Dardarin/LRRK2	12p11.2-q13.1	AD	-/+
PARK 9	?	1p36	AR	?
PARK10	?	1p32	AD	?
PARK11	?	2q36-37	AD	?
NR4A2	Nurr 1	2q22-23	AD	?



2. 優性遺伝性PD-SNCA, PARK4  
(triplication), PARK8  
(LRRK2/dardarin)

1997年から1998年にかけてヨーロッパのADの家系において $\alpha$ -synucleinのA53T, A30Pの二つの点変異が報告された。更にスペイン家系にE46Kのミスセンス変異が報告されたが、何れも頻度的には低い。ミスセンス変異は創始者効果が示唆されており、A53T変異については先祖が共通していることが分かっている。臨床症状はやや経過が早く一部に痴呆を認める。蛋白の生化学的解析により $\alpha$ -synucleinが凝集しやすい性質を獲得していることが推測されている。最近になりPARK4としてマップされていたIowa家系がマップは間違いであり、 $\alpha$ -synucleinのtriplicationによることが報告された。遺伝子のコピー数が正常者の2倍あることにより遺伝子発現レベルが過剰状態となり、その結果として $\alpha$ -synuclein

の脳内の凝集が惹起されていると推定されている。つまり $\alpha$ -synucleinの過剰状態や蛋白の変性しやすさが $\alpha$ -synucleinの凝集傾向を生じさせ、その凝集が細胞死を誘導していると考えられている。Triplication(コピーが3個のものと同正常1個)とは別にduplication(コピーが2個と同正常1個)が報告された。duplicationについては、臨床的に痴呆を伴わず孤発型と類似した症例もあり興味深い。コピー数と痴呆発現との関連が推定されている。これまで日本を含めアジアからの報告はないが、multiplicationは欠失と同じような機序により発生している可能性があることから(同じ欠失であっても一般に創始者効果は少ない傾向にある)、人種とは関係なくmultiplicationが生じる可能性がある。むしろ欠失変異の多い日本人は白人以上にこのタイプの変異が多いことも予想される。現在我々研究グループもこのタイプの変異の存在についてTaqMan probeを使った定量PCRでスクリーニングしてい

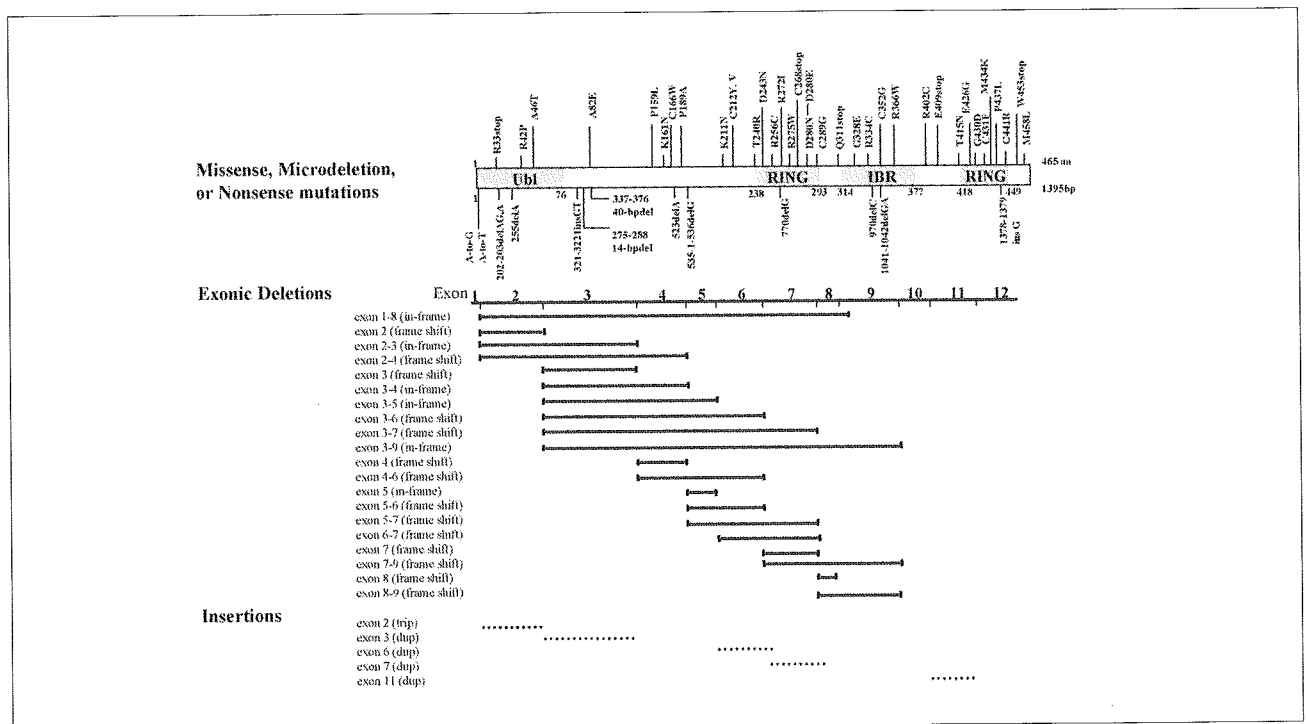


図1 パーキン遺伝子変異の種類と分布

る。また  $\alpha$ -synuclein のコピー数による痴呆の有無が決定される可能性もあるが、multiplication の領域が必ずしも同一とは限らず、その重複している部位とその部位に含まれる遺伝子群により規定されることも十分にあると考えている。事実、 $\alpha$ -synuclein の過剰発現系マウスではほとんどの研究室でヒト PD の再現を見出していない。

$\alpha$ -synuclein の変異頻度は少ないものの、Lewy 小体の主要構成成分であり、PD における Lewy 小体形成や選択的細胞変性にどのように関与しているかメカニズムの解明の糸口となりうる重要な蛋白質であることは間違いない。この蛋白質を中心とした Lewy 小体形成阻止剤の開発が重要課題といえる。

PARK8 に連鎖する ADPD の原因遺伝子として最近同定された LRRK2/dardarin は  $\alpha$ -synuclein とは対比的にその変異頻度はかなり高いことが報告されている。遺伝子マップは我が国の存在している相模原地方を起源とす

る一大家系を中心に決定された。遺伝子単離は海外のグループによりなされ、変異頻度は 5% 前後にも及ぶとされている。特にホットスポットが存在するようでエクソン 41 は頻度的にも高いことが分かっている。蛋白質の機能については何も分かっていないが、リン酸化に関わっている可能性が指摘されている。PARK8 の特徴としては Lewy 小体が同じ家系ないであっても存在する場合としない場合があることと臨床的に遺伝性の進行性核上性麻痺 (PSP) と思わせるような家系も存在することである。発症年齢も若年のケースもあるが通常の PD 同様の中高年で発症するケースもあり多様性に富んだタイプと言える。後述する PARK2 が Lewy 小体を一般に形成しないことを特徴とし、PSP に特徴的な病理所見を持つことより PARK8 は PARK2 と PD の中間的位置づけにくると考えている。LRRK2 がリン酸化酵素であることより  $\alpha$ -synuclein を基質とするか否かが今後の大きな課題である。

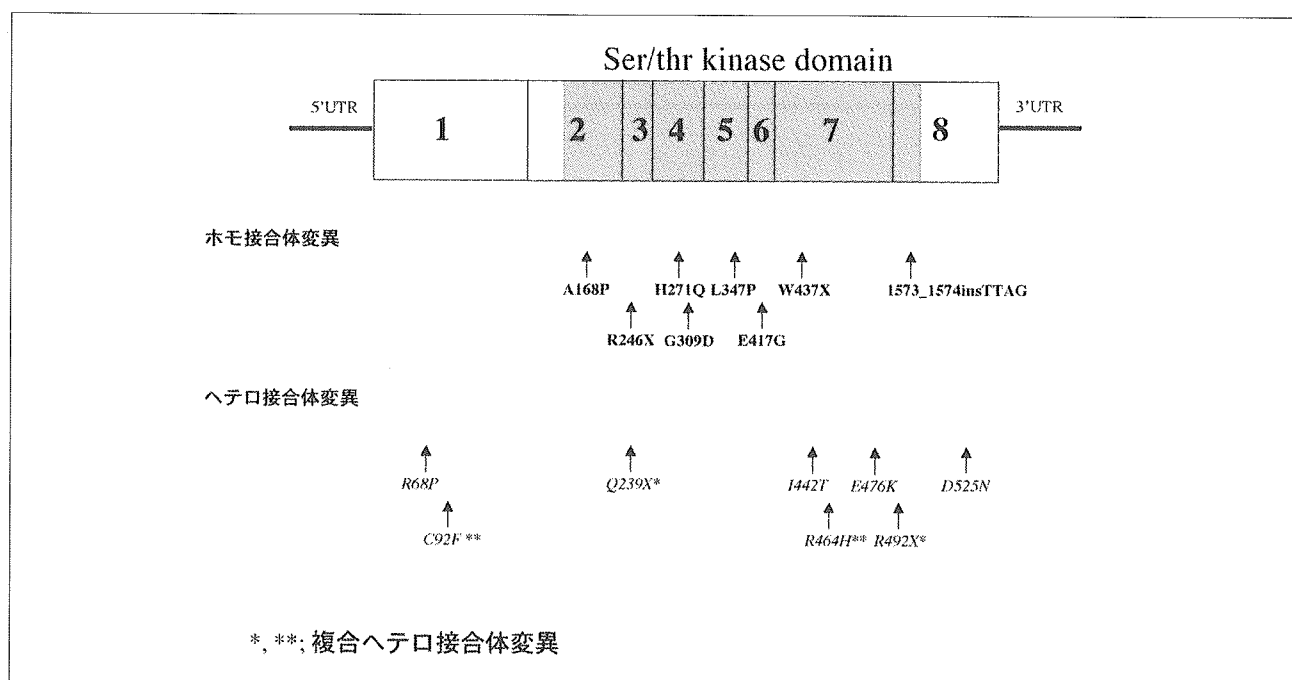


図2 PINK1 遺伝子変異の分布

### 3. ARPD-PARK2 (parkin), PARK6 (PINK1), PARK7 (DJ-1)

1973年にYamamuraらによりその臨床型が発表され、その後連鎖解析から遺伝子同定までを世界に先がけて我が国により確立されたものであり、現在では我が国のみならず世界に分布する最も頻度の高いタイプであることが明らかにされた。変異は、欠失は本邦にて多く、海外ではミスセンス変異及びmicrodeletionが多い(図1)。特徴的臨床症状として日内変動、L-ドパ治療後の早期に出現するmotor complication、睡眠効果、痴呆を認めないなど他にも多彩な表現型の報告があり、遺伝子変異タイプと表現型との相関ははっきりしない。その頻度はARPDの約50%と報告されている。発症年齢は40才以下が多いが7~72才と幅がある。ARの家族歴をもつ家系が多いが、家族歴のない孤発の若年発症にも報告も少なくない。出現頻度は自律神経症状60%、経過中のジストニア78%、精神症状56%、睡眠効果63%とする報告がある。10才以下の発症で、ジストニアを呈する症例は瀬川病(dopa responsive dystonia; DRD)との鑑別が重要である。ジストニアが初発である場合整形外科を受診するケースも多い。経過は数十年と長いにもかかわらず、onの時Yahr3、offの時Yahr4を越えるような重症例は少ない。精神症状に関してはパーキンソニズムの前に精神症状が先行しているケースもある。精神症状としては、うつ病が多いが、パノイア、不安神経症、神経性食欲不振症の報告もある。キャリア(ヘテロ接合体でparkin遺伝子異常を認めるがパーキンソニズムは認めない)において精神症状がやすい

とする報告もある。また一部のキャリアでは、発症年齢はホモ接合体と比して高齢化ではあるが、発症することが報告されており、その機序としてドミナントネガティブ効果(変異蛋白が正常蛋白の機能を阻害する)かハプロ不全(一つの遺伝子アリルに異常があると正常では2個のアリルが機能として作用するのでキャリアでは正常蛋白が正常者の半分となるために発症する)で発症することが推定される。後述するARPDの原因遺伝子DJ-1、PINK1ともにキャリアでも発症するケースが存在することからARPDに同じメカニズムの関与が推定されている。

Parkinは単離されて以来精力的にその機能の解明が追究されてきた。異なる民族を共通して高頻度に認めておりPDの発症メカニズムを解明する際の中核となる蛋白といえる。その実体はubiquitin-proteasome system (UPS)で働くユビキチンリガーゼ(E3)であり、これまでにCDCrel-1, Pael-receptor, o-glycosylated  $\alpha$ -synucleinなどが基質候補としてあげられている。Loss-of-function効果でありながらその長期予後はYahr 4を越えることが少ないとされており、比較的良性的経過をたどる。一方で細胞レベルやin vivo系の実験ではparkinが $\alpha$ -synuclein凝集による細胞死を保護することが報告されており、黒質神経細胞生存の必須因子の可能性も指摘されている。

PARK7はヨーロッパのARの家系を対象とした連鎖解析により1p36にマップされ、2002年Bonifatiらにより原因遺伝子としてDJ-1遺伝子が同定された。オランダ家系においてexon1から5にまたがる2000 bpの広範な欠失が見いだされ、イタリア家系にてL166Pの点変異が認められた。DJ-1遺伝子は全長23.5Kb、

189のアミノ酸から構成され、脳も含め体内の各組織にユビキタスに発現している。機能は不明であるが、酸化ストレスへの関与、ユビキチン様蛋白であるSUMO-1との結合によりUPSとの関連も指摘されている。追試により、海外で点変異5例、欠失2例を認めているが、大規模調査にても陰性例が多く、稀な変異である可能性が示唆されている。当研究室においてもアジアのARPDを対象にハプロタイプ解析を施行し、PARK7に連鎖している家系を6家系見いだしたがDJ-1遺伝子変異は認めなかった。DJ-1遺伝子変異の患者は、発症は平均 $34.6 \pm 9.2$ 才でPARK2に類似した臨床症状を呈する。神経症や精神症状（不安神経症、パニック発作、幻覚）を伴うことが報告されているが、症例数が少なく今後の検討が必要である。

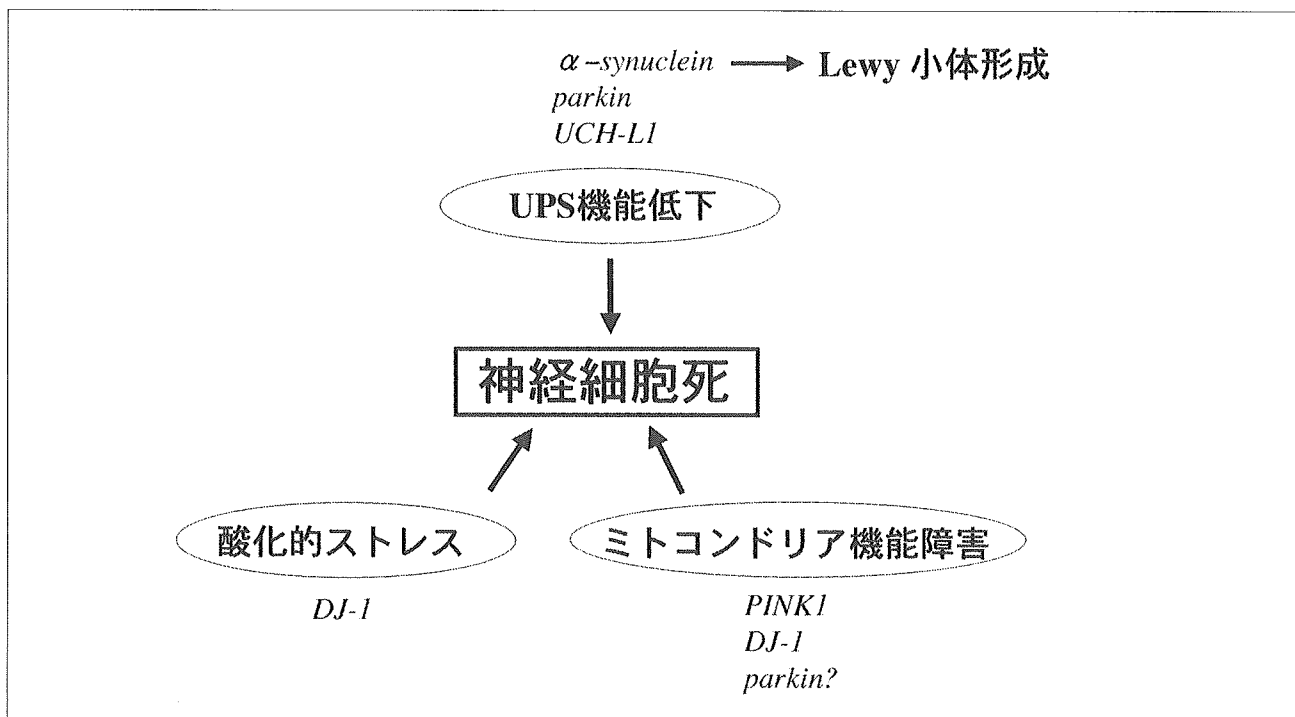
PARK6は、シシリア島のARの家系を対象とした連鎖解析により1p35-36にLocusが絞られ、候補遺伝子の変異解析によりPINK1

(PTEN Induced Putative Kinase 1) 遺伝子異常が2004年4月に報告された。イタリアの2家系にノンセンス変異W437X、スペインの1家系にG309Dが認められた。我々もアジアのARPDの家系を対象にハプロタイプ解析を施行し、1p35-36に連鎖する家系を8家系認めた。そのうち6家系（日本R246X, H271Q, E417G, イスラエルR246X, フィリピンL347P, 台湾Q239X/R492X）にPINK1の病的変異を見いだした。

点変異が主体であり、欠失、挿入の報告は1例ずつしかない（図2）。また日本とイスラエルにて同様の変異（R246X）を認めるが、ハプロタイプ解析では創始者効果は否定的であり、変異のホットスポットである可能性がある。

変異の多くはセリン/トレオニンキナーゼドメインに集中して存在する。また、ホモ接合体ミスセンス変異の箇所は、種族間を経てアミノ酸が保存されており、機能的に重要な箇

表2 家族性パーキンソン病の発症機序



所であると予想される。

PINK1はUnokiらにより癌関連遺伝子であるPTENを活性化した際に高発現する遺伝子として単離された。PINK1遺伝子は581のアミノ酸からなり、マウスと95%の相同性をもつことから種間を共通して保存されている重要な蛋白であると予想される。構造上、最初の34のアミノ酸残基にミトコンドリアへの移行シグナルを持ち、後半の大部分をカルモジュリンファミリーのセリン/トレオニンキナーゼドメインが占める。PARK8のLRRK2同様リン酸化酵素に関連性が指摘されておりPDの共通機序にミトコンドリア機能、酸化ストレス、蛋白分解系、そしてリン酸化が共通機序として考えられる。

これまでにイタリア5家系、日本4家系、スペイン、フィリピン、台湾、イスラエルそれぞれ1家系ずつの報告がある。まだ症例数が少なく、人種間における差異、頻度など明確な点は不明であるが、アジアでは比較的頻度が高い傾向がありparkin陰性例の約10%がPINK1遺伝子異常をもつと考えられる。その臨床型は、発症年齢は平均 $32 \pm 7.87$ 才、罹患期間平均17.5年、l-dopaが奏功し、Park2に比し発症時のジストニア、睡眠効果、日内変動、腱反射亢進を呈する症例は少ない傾向がある。精神症状は稀ではあるが、一部の患者に発症前に統合失調症様症状、うつ状態を認めている。若年の発症で孤発型に類似した臨床症状であればPINK1遺伝子異常を検索する必要があると思われる。イタリアのホモ接合体変異の家系において18F-dopaの線条体での取り込み低下が認められているが、心筋シンチ、SPECTの報告は未だない。剖検例もなく、Lewy小体の有無は不明である。

#### 4. その他の遺伝子異常

ADの家系において認められた原因遺伝子にUCH-L1とNurr1があるが、追試の報告はなく、非常に稀な変異である可能性がある。UCH-L1はユビキチンリガーゼ活性を持つとの報告もあり、UPSでの機能解明が期待される。

#### 5. PDにおける選択的細胞変性へのプロセス

家族性パーキンソニズムの原因遺伝子産物は酸化ストレス、UPS機能低下、ミトコンドリア機能低下、リン酸化との関連性が指摘されている(表2)。これら因子は同時にPD発症の誘因としても注目されており、FPDとPDには共通したメカニズムが存在していると言える。また多くの遺伝子産物がLewy小体の構成成分であることからその機能破綻が黒質ドパミン神経細胞死に関与している可能性がある。

#### おわりに

上記の既存の遺伝子異常を認めないFPDの患者も数多く存在する。事実、ARPDであっても未だ40%のFPDは原因遺伝子が不明である。現在我々の研究グループでも精力的に解析が進められている。ゲノムワイドな連鎖解析、その候補領域の検討も行われており、新規遺伝子座あるいは感受性遺伝子の発見も待たれる。またSNPによる薬剤の個体での反応の差異、原因遺伝子に対応した薬剤の選択法など、個々患者に対応した遺伝子レベルでの治療方針、つまりオーダーメイド医療の確立もそう遠くない未来にくるかもしれない。



## DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitinated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex

Noriyuki Matsuda<sup>a</sup>, Keiko Azuma<sup>a,b</sup>, Masafumi Saijo<sup>c</sup>, Shun-ichiro Iemura<sup>d</sup>,  
Yusaku Hioki<sup>d</sup>, Tohru Natsume<sup>d</sup>, Tomoki Chiba<sup>a</sup>, Kiyoji Tanaka<sup>c</sup>, Keiji Tanaka<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Oncology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan

<sup>b</sup> Department of Biology, Ochanomizu University, 2-1-1 Ohtsuka, Tokyo 112-8610, Japan

<sup>c</sup> Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University and Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation, 1-3 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>d</sup> National Institutes of Advanced Industrial Science and Technology, Biological Information Research Center (JBIRC), Kohtoh-ku, Tokyo 135-0064, Japan

Accepted 17 December 2004

### Abstract

Xeroderma pigmentosum (XP) is a genetic disease characterized by hypersensitivity to UV irradiation and high incidence of skin cancer caused by inherited defects in DNA repair. Mutational malfunction of damaged-DNA binding protein 2 (DDB2) causes the XP complementation group E (XP-E). DDB2 together with DDB1 comprises a heterodimer called DDB complex, which is involved in damaged-DNA binding and nucleotide excision repair. Interestingly, by screening for a cellular protein(s) that interacts with Cullin 4A (Cul4A), a key component of the ubiquitin ligase complex, we identified DDB1. Immunoprecipitation confirmed that Cul4A interacts with DDB1 and also associates with DDB2. To date, it has been reported that DDB2 is rapidly degraded after UV irradiation and that overproduction of Cul4A stimulates the ubiquitylation of DDB2 in the cells. However, as biochemical analysis using pure Cul4A-containing E3 is missing, it is still unknown whether the Cul4A complex directly ubiquitylates DDB2 or not. We thus purified the Cul4A-containing E3 complex to near homogeneity and attempted to ubiquitylate DDB2 *in vitro*. The ubiquitylation of DDB2 was reconstituted using this pure E3 complex, indicating that DDB–Cul4A E3 complex in itself can ubiquitylate DDB2 directly. We also showed that an amino acid substitution, K244E, in DDB2 derived from a XP-E patient did not affect its ubiquitylation.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Nucleotide excision repair; E3; Ubiquitin; DDB1; DDB2; Cullin 4A

### 1. Introduction

Several proteins that bind specifically to ultraviolet (UV) irradiation damaged-DNA have been discovered by electrophoretic mobility shift assay or filter-binding assay since 1970s [1]. Previous studies that have characterized the damaged-DNA binding (DDB) protein indicated that the minimal DDB complex is a heterodimer comprised of a 127 kDa DDB1 subunit and 48 kDa DDB2 subunit. The binding activ-

ity of damaged DNA is thought to reside in this heterodimeric complex (for reviews, see [2,3]).

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare genetic disease characterized by clinical and cellular hypersensitivity to UV radiation and high incidence of skin cancer [4]. Cells from XP patients show defective repair of DNA damage that had been induced by UV or chemical agents, and tendency for skin carcinogenesis. In 1988, Chu and Chang [5] reported that cells from XP complementation group E (XP-E) individuals (GM02415/XP2RO) lacked this damaged-DNA binding activity, suggesting that DDB is functionally involved in the XP-E disease. This is also true for some other alleles of XP-E

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3823 2237; fax: +81 3 3823 2237.  
E-mail address: [tanakak@rinshoken.or.jp](mailto:tanakak@rinshoken.or.jp) (K. Tanaka).

patients [6]. Further evidence for the involvement came from microinjection experiments indicating that the purified DDB complex complements the XP-E cells' defect [7,8]. Other studies demonstrated that ectopic expression of human *DDB2* enhanced DNA repair in Chinese hamster V79 cells, which rarely express endogenous rodent *DDB2* [9]. Soon after the identification of *DDB1* and *DDB2* genes, Nichols et al. [10] revealed that *DDB2* was in fact mutated in XP-E cells lacking DDB activity. However, the molecular basis of the XP-E phenotype was ambiguous, because several groups found that cells from other patients with XP-E had normal levels of DDB activity (DDB+) and possessed no mutation in *DDB2* gene (reviewed in [2,3]). This discrepancy was puzzling until recently. Based on a thorough analysis, however, it was found that some DDB+ cell lines were mistakenly assigned to XP-E, and now it appears that all known authentic cases of XP-E are caused by *DDB2* mutations [11,12].

In eukaryotic cells, selective protein degradation is largely mediated by the ubiquitin/proteasome system. When ubiquitin is attached to the target protein by the ubiquitylation machineries, the proteasome recognizes the poly-ubiquitylated substrate to be degraded. This ubiquitin conjugating system requires the cascade reaction of three enzymes, namely E1, a ubiquitin-activating enzyme, E2, a ubiquitin-conjugating enzyme, and E3, a ubiquitin ligase. In 1999, Shiyanov et al. [13] reported that Cullin 4A (Cul4A) associates with the DDB complex. The cullin family of proteins compose a multimeric E3 complex. Cullin 1, which is the most well characterized cullin, serves as a rigid scaffold of its E3 complex and catalyses ubiquitylation through appropriate positioning of E2 and the substrate [14]. Other cullin family proteins including Cul4A are believed to function as well. The interaction between Cul4A and DDB1 was also demonstrated by several other groups recently ([15–20] and this work). These results, together with the rapid degradation of DDB2 after UV irradiation [21,22], suggest the involvement of Cullin 4A in DDB2 ubiquitylation and degradation. Strikingly, over-production of Cul4A stimulates the ubiquitylation of DDB2 [15,16]. However, since the latter studies did not show biochemical evidence of Cul4A involvement in the ubiquitylation of DDB2, it is still unknown whether the Cul4A-containing E3 complex in itself directly ubiquitylates DDB2 or not. To further investigate the mode of this ubiquitylation, an *in vitro* reconstitution by biochemical approach is obviously required. Here, we show that DDB2 can be ubiquitylated directly by the purified DDB–Cul4A E3 complex in a reconstitution *in vitro* experiment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Protein identification by LC–MS/MS analysis

The Cullin 4A-associated complexes were digested with *Achromobacter* protease-I and the resulting peptides were analyzed using a nanoscale LC–MS/MS system as described

previously [23,24]. The peptide mixture was applied to a Mightysil-PR-18 (1  $\mu$ m particle, Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) frit-less column (45 mm  $\times$  0.150 mm i.d.) and separated using a 0–40% gradient of acetonitrile containing 0.1% formic acid over 30 min at a flow rate of 50 nl/min. Eluted peptides were sprayed directly into a quadruple time-of-flight hybrid mass spectrometer (Q-T of *Ultima*, Micromass, Manchester, UK). MS and MS/MS spectra were obtained in data-dependent mode. Up to four precursor ions above an intensity threshold of 10 counts/s were selected for MSMS analyses from each survey scan. All MS/MS spectra were searched for protein sequences of Swiss Prot and RefSeq (NCBI) using batch processes of Mascot software package (Matrix Science, London, UK).

### 2.2. Cell culture condition

High-Five insect cells were maintained as an adherent culture in Grace insect media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 8% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen). ts41 cells established from Chinese hamster [25] were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin–streptomycin under 5% CO<sub>2</sub> condition at 34 °C.

### 2.3. Immunoprecipitation experiment

To express DDB1, DDB2 and cullin family proteins, all plasmids were constructed from pcDNA3 or pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen). Additional details of the plasmid construction processes will be provided upon request. Mammalian ts41 cells at 48 h after DNA transfection were harvested, washed by phosphate-buffer saline (PBS) and lysed with buffer A containing 20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 and 10% glycerol. After removal of the debris by centrifugation, anti-Flag antibody (M2)-conjugated agarose (Sigma) was added to the lysate and the mixture was incubated at 4 °C for 2 h under constant rotation. After extensive washing of immunoprecipitates with buffer A, binding proteins were eluted with sodium dodecyl sulphate (SDS)-containing buffer and boiled at 95 °C for 5 min. The eluate was subjected to immunoblotting using anti-Flag (M2; Sigma), anti-Myc (Santa Cruz, Delaware, CA, USA), anti-Cul4A (our laboratory collection) and anti-DDB1 antibodies (Zymed, San Francisco, CA, USA).

### 2.4. Protein purification

To overproduce His-DDB1, Flag-DDB2, Cullin 4A-HA and T7-Rbx1 proteins in insect cells, the tagged full-length cDNAs were inserted into pFastBac donor plasmid (Invitrogen). Additional details of the plasmid construction processes can be provided upon request. Subsequent production of baculovirus particles was carried out according to the protocol provided by the manufacturer. Baculovirus particles for His-



DDB1 and Flag-DDB2 were used to simultaneously infect High-Five cells, as well as viruses for Cullin4A-HA and T7-Rbx1. Insect cells were incubated for 48 h after infection, washed using PBS at 4 °C and then harvested by centrifugation. The cell extract was collected using buffer B containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 10 mM 2-mercaptoethanol, 6% glycerol and a protease inhibitor mixture without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Roche, Mannheim, Germany). After centrifugation, the cell lysates were mixed together and incubated at 4 °C for 5 h with occasional gentle mixing. For initial purification, the cell lysate was loaded on a single-stranded DNA cellulose (Sigma) column equilibrated with buffer B. The column was then washed with buffer B containing 0.3 M NaCl followed by elution with buffer B containing 0.7 M NaCl. The eluted fraction was subsequently purified with nickel-chelating agarose (Qiagen, Stanford, CA, USA) pre-equilibrated with buffer B and eluted by 120 mM imidazole. This purified complex was further separated on a glycerol gradient sedimentation, which was carried out through a 10–40% glycerol gradient in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 2 mM ATP for 22 h at 25,000 rpm ultracentrifugation. Fractions of 1 ml were collected from the top of the gradient and subjected to silver staining and immunoblotting.

To purify DDB2 (K244E)-containing complex, cell lysates containing His-DDB1, Flag-DDB2 (K244E), Cullin 4A-HA and T7-Rbx1 proteins in buffer B were collected as mentioned above. The DDB2 (K244E) complex was roughly purified with nickel-chelating agarose (Qiagen) pre-equilibrated with buffer B and eluted by 100 mM imidazole. Obtained fractions were then loaded onto HiTrap Heparin HP column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), washed with buffer C [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 4.5% glycerol and protease inhibitor mixture without EDTA (Roche)], and eluted with a 0.15–0.75 M NaCl gradient in buffer C. The DDB2 (K244E)-containing complex was eluted around 0.5 M NaCl and was subjected to dialysis with buffer D containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl, 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, and 1 mM DTT. A protein complex containing wild-type DDB2 was simultaneously isolated by the same method and used as a control.

To collect the authentic DDB-Cul4A complex from mammalian cells, HeLa cells stably expressing N-terminally FLAG-HA-tagged DDB2 were used. The genuine DDB-Cul4A complex was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody followed by anti-HA antibody as described previously [17]. The eluates were further purified by Mini Q (Amersham Biosciences) column chromatography instead of glycerol density gradient centrifugation.

### 2.5. *In vitro* ubiquitylation assay

The ubiquitylation assay was essentially performed as described previously [26,27]. Briefly, the purified DDB-Cul4A

complex was incubated in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 25  $\mu$ M MG132 (Peptide Inc., Osaka, Japan), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 2 mM ATP, 50  $\mu$ g of ubiquitin (Sigma)/ml, 2  $\mu$ g of E1/ml and 70  $\mu$ g of various E2-expressing *Escherichia coli* lysate/ml at 32 °C for 2 h and subjected to immunoblotting with anti-His (penta-His antibody; Qiagen, Stanford, CA, USA), anti-HA (HA.11, Berkeley Antibody Company, Berkeley, CA, USA), anti-Flag (M2; Sigma) and anti-T7 (Novagen, Madison, WI, USA) antibodies. In some cases, GST-ubiquitin was used instead of native ubiquitin.

## 3. Results

### 3.1. DDB complex physically interacts with Cullin 4A

To explore the molecular function of Cullin 4A, we examined the cellular partner(s) that interact with Cul4A in cells. A thorough analysis of human EST and genome sequences showed that the registered human Cul4A sequence (659 amino acid protein [28]) lacks its N-terminal 100 amino acid residues and thus the full-length Cul4A was obtained by PCR-assisted cDNA cloning and used hereafter. The complete nucleotide sequence of full-length Cul4A has been registered under accession number AB178950.

Flag-tagged Cul4A was expressed in HEK293 cells followed by immunoprecipitation by anti-Flag antibody. The immunoprecipitates were eluted with a Flag peptide and then digested with Lys-C endopeptidase (A. protease I) and the cleaved fragments were directly analyzed using a highly sensitive “direct nano-flow LC-MS/MS” system (for detail, see Section 2). Following database search, a dozen of peptides were assigned to MS/MS spectra obtained from four nano-LC-MS/MS analyses for the Flag-Cul4A-associated complexes and DDB1 was identified as one of the Cul4A-interacting proteins.

To confirm the interaction between Cul4A and DDB1, we performed immunoprecipitation experiment. Plasmids carrying Flag-tagged cullin family proteins (Cul1, 2, 3, 4A, 4B and 5) and myc-tagged DDB1 were concurrently transfected into ts41 cells. Extracts of the transfected or mock-transfected cells were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibody followed by immunoblotting with anti-DDB1 antibody. As shown in Fig. 1A, Cul4A significantly interacted with DDB1. Cul1 also bound DDB1 weakly, whereas the other Cullins tested did not interact with DDB1. We next examined whether DDB2 also associates with Cul4A, because DDB1 and DDB2 are part of the DDB complex. Plasmids carrying 6myc-tagged cullin family proteins were transfected into ts41 cells along with a plasmid harboring Flag-tagged DDB2. Each extract was then subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibody and immunoblotting with anti-myc antibody. Consistent with the above results, DDB2 also interacted strongly with Cul4A and weakly with Cul1 and Cul4B (Fig. 1B). DDB2 did not bind with other cullin fam-

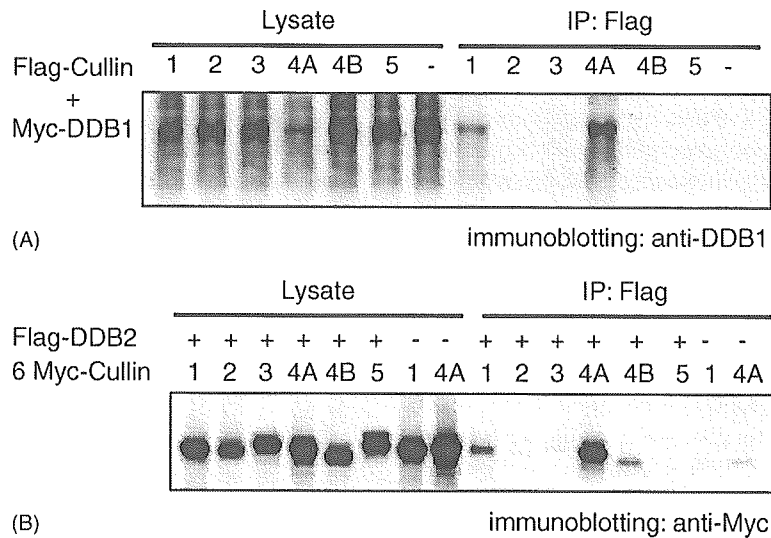


Fig. 1. DDB complex interacts with Cullin 4A. (A) Cul4A interacts with DDB1. Flag-tagged cullin family proteins and Myc-tagged DDB1 were simultaneously transfected into ts41 cells. After immunoprecipitation (IP) by anti-Flag antibody, the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting using anti-DDB1 antibody. (B) Cul4A also associates with DDB2. IP was similarly performed using FLAG-tagged DDB2 and Myc-tagged cullin family protein concurrently transfected into ts41 cells. After IP by anti-FLAG antibody, the resulting immunoprecipitates were analyzed using anti-Myc antibody.

ily proteins (Cul2, 3 and 5) examined. These results showed that DDB complex preferentially interacts with Cul4A, as reported previously [16].

### 3.2. Purification of DDB–Cul4A complex

We next attempted to purify DDB–Cul4A E3 complex using baculovirus expression system to perform biochemical experiments. Flag tag was fused to DDB2 at its N-terminus to facilitate its detection. This Flag-tagged DDB2 is thought to be functional because recent studies showed that ectopic expression of Flag-DDB2 enhanced DNA repair in Chinese hamster V79 cells [9], and purified Flag-DDB2 protein could restore damaged-DNA binding activity in extracts of XP-E patient cells [12]. DDB complex has been purified previously using DNA affinity column [13] and we also used DNA cellulose for initial purification of this complex. His6-tagged DDB1 and Flag-tagged DDB2 were simultaneously expressed in High-Five insect cells by the baculovirus induction system. Cul4A-HA and T7-Rbx1 were expressed concurrently as well. Each cell lysate was mixed and the resulting protein complex was purified by sequential column chromatography on single-stranded DNA cellulose, nickel-chelating agarose and subsequent 10–40% glycerol gradient by ultracentrifugation. The E3 complex comprised of DDB1, DDB2, Cul4A and Rbx1 was collected to near homogeneity as a peak fraction of glycerol gradient as shown in Fig. 2. Note that several other proteins were also detected in the final preparation (for example, a typical protein is shown by an asterisk in Fig. 2). However, since the peak fraction of such protein was inconsistent with that of the E3 complex in the glycerol gradient (data not shown), we think the protein is a contaminant derived from insect cells or a degradation

product of the expressed protein, rather than a protein physiologically associated with the E3 complex.

### 3.3. DDB2 is ubiquitylated by purified Cul4A complex

Using this purified complex, we next tried to reconstitute the ubiquitylation of DDB2 to check whether DDB–Cul4A complex per se can ubiquitylate DDB2. Since E3 generally requires specific E2 to mediate ubiquitylation, we tested eight different E2 enzymes (E2-20k, E2-25k, Ubc3, Ubc4, UbcH5a, UbcH5c, Ubc7 and Ubc8). Slower-migrating ladders derived from auto-ubiquitylation of Cul4A (see below) were observed only from the reaction with Ubc4, UbcH5a and UbcH5c, whereas the other E2 enzymes tested did not support this modification (Fig. 3A). We thus used UbcH5 family as a source of E2 in the following experiments. Purified DDB–Cul4A complex was incubated with ATP, ubiquitin, E1 and UbcH5a, and subjected to immunoblotting with the antibody for each component. As expected, ladders derived from the auto-ubiquitylation of Cul4A were observed (Fig. 3B, single asterisk in the middle panel). Moreover, apparent high molecular-mass ladders were evident when DDB2 was detected using the anti-Flag antibody (Fig. 3B, single asterisk in the left panel). In order to demonstrate that this modification was due to ubiquitylation, we repeated the ubiquitylation assay in the presence or absence of ubiquitin. The slower migrating ladders were not detected without ubiquitin, and the addition of GST-ubiquitin instead of native ubiquitin resulted in the appearance of larger molecular-mass bands (Fig. 3B, double asterisks), indicating that this modification indeed is ubiquitylation. In the case of DDB1, a single high-molecular band also emerged after *in vitro* ubiquitylation (Fig. 3B, right panel). However, this ubiquitylation sig-

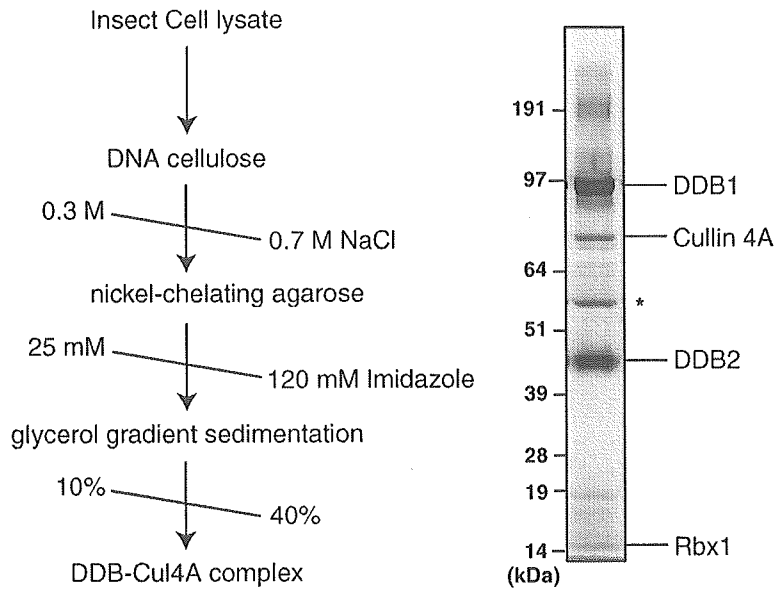


Fig. 2. Purification of the baculovirus-expressed DDB–Cul4A complex. The DDB–Cul4A complex was purified by sequential column chromatography and subsequently separated onto a 10–40% glycerol gradient by ultracentrifugation. The peak fraction of DDB–Cul4A complex was resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. Asterisk shows the contaminant protein (see Section 3).

nal of DDB1 was fainter than that of Cul4A and DDB2 (see Section 4).

To further investigate the biochemical characteristics of DDB–Cul4A complex, we next purified it under more physiological conditions. HeLa cells stably expressing FLAG-HA-tagged DDB2 [17] were used to collect E3 complex. The DDB2-containing complex was immunoprecipitated with

anti-FLAG antibody followed by anti-HA antibody as described previously [17] and the eluates were further purified by Mini Q column chromatography. The authentic E3 complex, comprised of DDB1, DDB2, Cul4A and Rbx1, was purified to almost homogeneity (Fig. 4A). When this complex was incubated with ATP, ubiquitin, E1 and UbcH5a, apparent high molecular-mass ladders derived from the ubiquity-

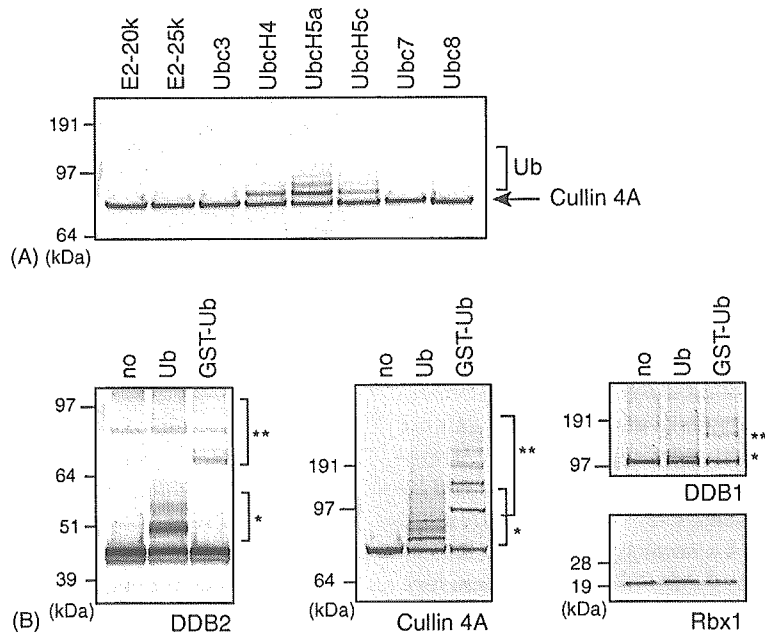


Fig. 3. In vitro reconstitution of DDB2 ubiquitylation. (A) The DDB–Cul4A E3 complex cooperates with Ubc4 and UbcH5 subfamily of E2 enzymes. Purified DDB–Cul4A E3 was incubated with the indicated E2 enzymes and subjected to immunoblotting with anti-HA antibody to identify the auto-ubiquitylation. (B) DDB2 was directly ubiquitylated by the DDB–Cul4A complex. Pure DDB1–DDB2–Cul4A complex was subjected to in vitro ubiquitylation assay in the absence (no) or presence of ubiquitin (Ub) or GST-ubiquitin (GST-Ub) and analyzed by immunoblotting with each antibody. Single asterisks show the ubiquitin conjugation and double asterisks indicate GST-ubiquitin conjugation.

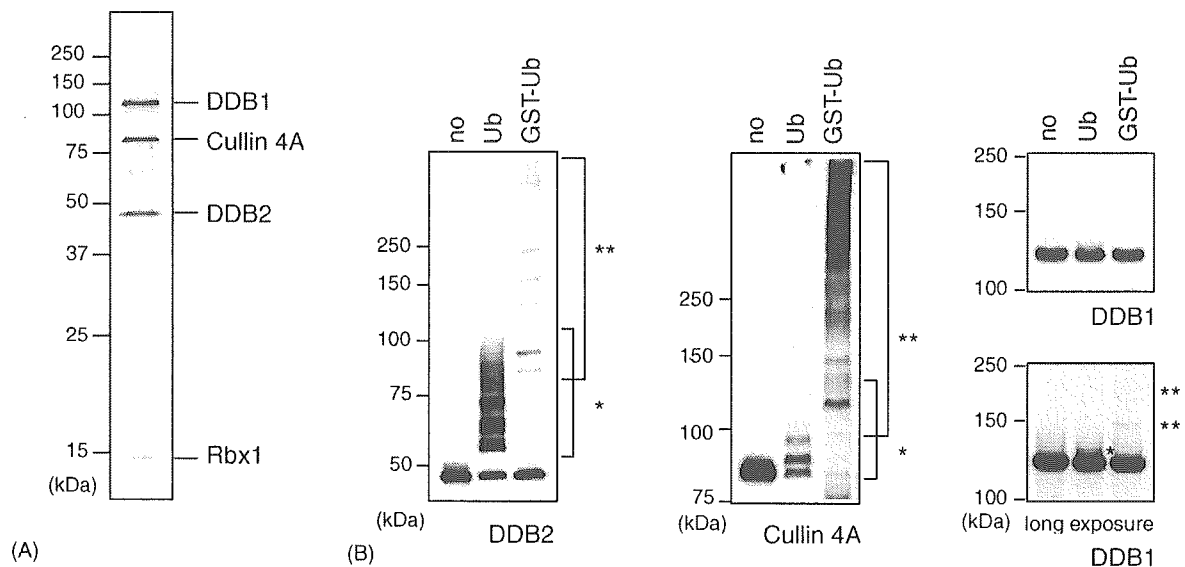


Fig. 4. In vitro ubiquitylation of DDB2 using authentic DDB–Cul4A complex. (A) Purification of the genuine DDB–Cul4A complex. Purified complex was resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. (B) In vitro ubiquitylation of DDB2 and auto-ubiquitylation of Cul4A. The authentic DDB–Cul4A complex was subjected to in vitro ubiquitylation assay in the absence (no) or presence of ubiquitin (Ub) or GST-ubiquitin (GST-Ub) and analyzed by immunoblotting with anti-HA (DDB2), anti-Cul4A and anti-DDB1 antibodies. Single asterisks show the ubiquitin conjugation and double asterisks indicate GST-ubiquitin conjugation.

lation of DDB2 and Cul4A were again observed (Fig. 4B, single asterisk). The exclusion of ubiquitin from the assay quenched these bands and replacement of native ubiquitin with GST-ubiquitin retarded their mobility (Fig. 4B, double asterisks). In contrast, DDB1 was rarely ubiquitylated, although a faint ubiquitylation signal was observed after long exposure (Fig. 4B, right panel). Because the DDB–Cul4A complex derived from both insect (Fig. 3) and mammalian (Fig. 4) cells directly ubiquitylated DDB2, we concluded that DDB2 was ubiquitylated by genuine DDB–Cul4A complex.

### 3.4. XP-E mutation does not affect ubiquitylation of DDB2 in vitro

Two cell lines established from XP-E patients, XP2RO and XP82TO, have been characterized in detail. XP2RO and XP82TO cells harbor naturally occurring single amino acid substitutions, R273H and K244E, in DDB2 protein, respectively. It has been reported that the XP82TO mutant protein (DDB2-K244E) interacts normally with DDB1 and Cul4A. Conversely, XP2RO mutant protein (DDB2-R273H) interacts with neither of them [13,29]. We also confirmed by immunoprecipitation experiments that DDB2-K244E interacts with DDB1 and Cul4A normally, but DDB2-R273H did not associate with either of them (Fig. 5A). Intriguingly, Rapic-Otrin et al. [21] reported that UV-induced rapid degradation of DDB2 protein did not occur in XP82TO cell line. This information prompted us to test whether K244E mutation affects the in vitro ubiquitylation of DDB2. Because DDB1–DDB2 (K244E)-Cul4A complex did not interact effectively with DNA cellulose, we were unable to purify it

compared with the wild-type complex (data not shown). We thus purified this mutant protein complex by affinity chromatography on nickel-chelating column and subsequent heparin column, and the bound DDB2 (K244E) complex was eluted around 0.5 M NaCl (Fig. 5B). As a control, the wild type DDB2-containing complex was simultaneously isolated by the same method. The DDB1–DDB2 (K244E)-Cul4A complex was incubated with ATP, ubiquitin, E1 and UbcH5a, and subjected to immunoblotting with the anti-Flag antibody. The mutant DDB2 protein was ubiquitylated in a manner equivalent to that of the wild-type control (Fig. 5C), indicating that XP82TO mutation (K244E) did not affect the ubiquitylation of DDB2 in vitro. This result also suggests that the mutated site of DDB2 (244th K) per se is not the unique ubiquitylation site.

## 4. Discussion

The DDB complex is regulated through several processes when cells are exposed to UV irradiation, namely very rapid translocation into the nucleus and binding to chromatin [17,29–31], hasty degradation of DDB2 protein [21,22] and final transcriptional induction of *DDB2* mRNA [32,33]. Chemical inhibition of proteasomes prevents rapid degradation of DDB2 protein, suggesting that this process is mediated by the ubiquitin/proteasome system. Among these regulation processes of DDB2, proteolytic degradation is the most intriguing because several recent reports [13,15–17] and our present results have shown a tight relationship between the DDB complex and proteins involved in ubiquitylation.

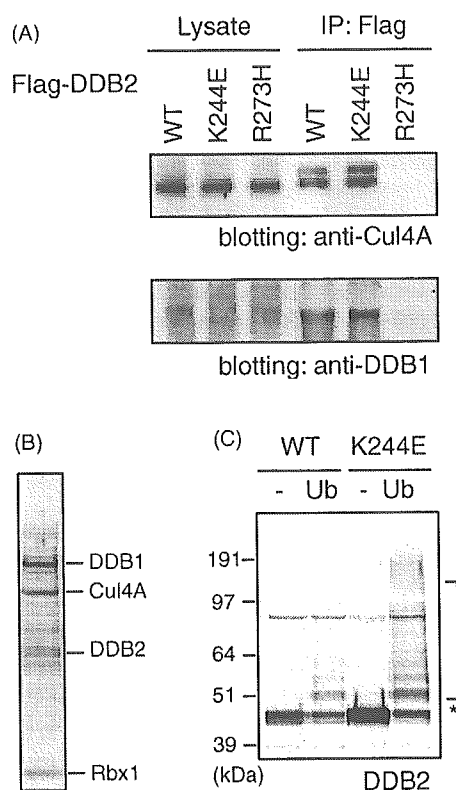


Fig. 5. XP82TO mutation (K244E) does not affect the *in vitro* ubiquitylation of DDB2. (A) DDB2-K244E interacts with DDB1 and Cul4A, but DDB2-R273H associates with neither. Flag-DDB2 (WT, K244E or R273H) was co-transfected with Myc-Cul4A and HA-DDB1 into ts41 cells. After immunoprecipitation (IP) by anti-Flag antibody, the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting using anti-Cul4A and anti-DDB1 antibodies. (B) The DDB2 (K244E) complex was resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. (C) Ubiquitylation of DDB2 protein with XP-E mutation (DDB2-K244E) was comparable with that of wild-type DDB2 *in vitro*. The DDB–Cul4A complex containing mutant or wild type DDB2 was subjected to *in vitro* ubiquitylation in the presence (Ub) or absence (-) of ubiquitin. Asterisk indicates the ubiquitin-conjugated DDB2.

Interestingly, ectopic over-production of Cullin 4A accelerates the degradation of DDB2, suggesting that Cul4A ubiquitylates DDB2 [15,16]. However, no reconstitution experiments were performed and thus this information did not exclude the possible involvement of other E3(s) downstream of Cul4A in the ubiquitylation of DDB2, rather than directly by Cul4A. This situation prompted us to reconstitute the *in vitro* ubiquitylation of DDB2 and we presented in this study biochemical evidence for the ubiquitylation of DDB2 directly by the DDB–Cullin 4A complex.

#### 4.1. *In vitro* ubiquitylation of each subunit of the DDB complex

It is well established that a significant fraction of DDB2 is degraded promptly after UV irradiation [21,22] and is also degraded in a cell cycle-dependent manner [16]. Conversely, it is still controversial whether another component of the DDB complex, DDB1, is a target of ubiquitylation and subsequent

degradation. Zhou's group reported that overproduction of Cul4A in cells stimulates the ubiquitylation of DDB1 [15]. In contrast, neither ectopically expressed Cul4A nor UV irradiation accelerates degradation of DDB1 was reported by other groups [12,16]. In our reconstitution experiment, DDB1 was very weakly ubiquitylated in the DDB–Cul4A complex from insect cells (Fig. 3B) and seldom ubiquitylated in the complex from HeLa cells (Fig. 4B). Because the HeLa cell-derived complex is purer and was considered to be isolated under more physiological conditions, this result supports the notion that DDB1 is not ubiquitylated by the Cul4A E3 complex. Even though DDB1 was faintly ubiquitylated, such mono- or di-ubiquitylation is insufficient for the proteasomal degradation. Therefore, we favor the scenario that not DDB1 but DDB2 is the target of ubiquitylation by Cul4A E3 complex *in vivo* [12,16].

#### 4.2. XP-E mutation did not affect the ubiquitylation of p48 *in vitro*

Rapic-Otrin et al. [21] reported that UV-induced rapid degradation of DDB2 did not occur in the XP-E cell line (XP82TO) whose DDB2 harbors a K244E mutation. Because this mutant protein (DDB2-K244E) can interact with DDB1 and Cullin 4A (Fig. 5A [13]) but not with damaged DNA [8,12,34], this result suggests that the binding activity to damaged-DNA is necessary for the degradation of DDB2. Another possibility is that the mutated site of DDB2 (244th K) per se is the main ubiquitylation site, as suggested previously [21]. However, the latter is unlikely because we showed that this mutant protein was still ubiquitylated in a manner similar to the wild-type DDB2 protein *in vitro* (Fig. 5C). Perhaps binding to damaged-DNA renders the conformation of DDB complex more acquiescent for ubiquitylation and/or UV recruits DDB to some specialized chromatin place where the other ubiquitylation machinery is easy to access *in vivo*.

#### 4.3. Biochemical role of DDB in nucleotide excision repair

In XP-E cells lacking the DDB activity, the nucleotide excision repair (NER) of cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) is significantly impaired [32], suggesting the importance of DDB complex in NER *in vivo*. However, this DDB complex is not essential for the reconstitution of the cell-free NER *in vitro*. The NER reaction was successfully reconstituted in the absence of DDB [35–37], although it may exhibit some stimulatory or inhibitory effects under certain conditions [38–40]. One interpretation of these results is that some partner protein(s) of DDB complex may be missing in such NER assay *in vitro*. Recent studies [13,15–20,41–43] and the present work emphasize the role of the DDB1 complex in the ubiquitin ligation. We can thus speculate that the effect and requirement of DDB could change if other ubiquitylation machinery was added to the *in vitro* NER assay.