

Murakami, K., Kondo, T., Kawase, M., Li, Y., Sato, S., Chen, S.F., Chan, P.H., 1998. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J. Neurosci.* 18, 205-213.

Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R.H.Jr., Itoyama, Y., 2001. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21, 9246-9254.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *J. Biol. Chem.* 276, 38388-38393.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2002. Amyotrophic lateral sclerosis: A proposed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9010-9014.

Pramatarova, A., Laganiere, J., Roussel, J., Brisbois, K., Rouleau, G.A., 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci.* 21, 3369-3374.

Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H.Jr., Scott, R.W., Snider, W.D., 1996.

Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genet.* 13, 43-47.

Schmued, L.C., Albertson, C., Slikker, W.Jr., 1997. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 751, 37-46.

Vande Velde, C., Garcia, M.L., Yin, X., Trapp, B.D., Cleveland, D.W., 2004. The neuroprotective factor Wld^s does not attenuate mutant SOD1-mediated motor neuron disease. *NeuroMolecular Med.* 5, 193-203.

Weisiger, R.A., Fridovich, I., 1973. Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248, 4793-4796.

Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., Price, D.L., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105-1116.

Xu, Z., Jung, C., Higgins, C., Levine, J., Kong, J., 2004. Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 395-399.

Figure legends

Fig. 1. Loss of SOD2 immunoreactivity in motor neurons from $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mice. (A-G) Paraffin-embedded sections of brain and spinal cord from $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mice at 5-months old stained with anti-ChAT antibody (A) or anti-SOD2 antibody (B-G). SOD2-immunoreactivity was lost in a subset of ChAT-positive somatomotor neurons as revealed by serial section through the hypoglossal nuclei (A, B and C) as well as sections through the oculomotor (D), abducens (E), facial (F) nuclei, and the ventral horn of the spinal cord (G). Note that SOD2 immunoreactivity was preserved in visceromotor neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus (B). X, dorsal motor nucleus of the vagus; XII, hypoglossal nucleus. The boxed area in B is enlarged in C. (H-J) Paraffin-embedded sections from the ventral horn of the spinal cord were double-stained by immunofluorescence with anti-SOD2 (H) and anti-SMI-32 (I) antibodies. The merged image is shown in J. SOD2 immunoreactivity was lost in a subset of SMI-32-positive large motor neurons (denoted by asterisks) but not in SMI-32-negative small-diameter interneurons. (K-N) Mitochondrial production of $O_2^{\cdot-}$ was increased in $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ (C-KO) mice compared with $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$ (Control) mice in motor neurons in the hypoglossal nucleus (K and L) and ventral horn of the spinal cord (M and N) as revealed by HEt oxidation. HEt signals were detected in motor neurons as small granular particles in the cytosol, indicating mitochondrial production of $O_2^{\cdot-}$ under normal physiological conditions. Scale bars = 100 μ m (A; also applies to B); 20 μ m (C); 20 μ m (D; also applies to E-G); 20 μ m (H; also applies to I, J); 20 μ m (K; also applies to L, M, N).

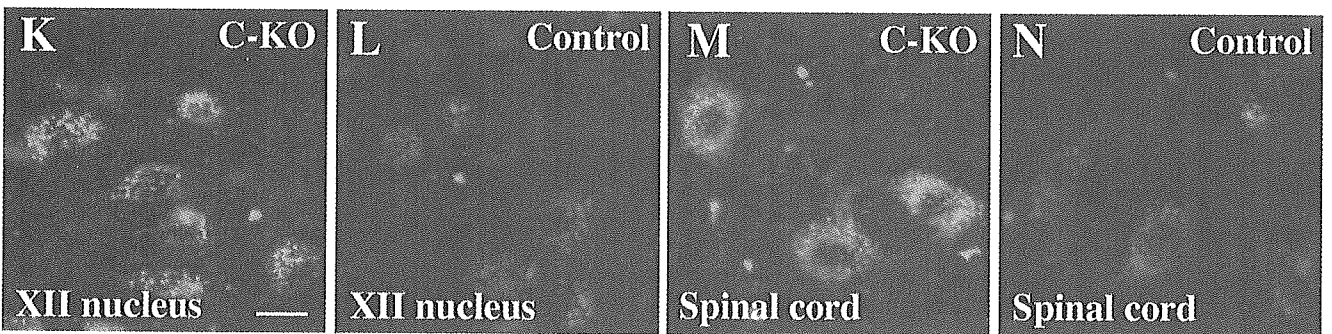
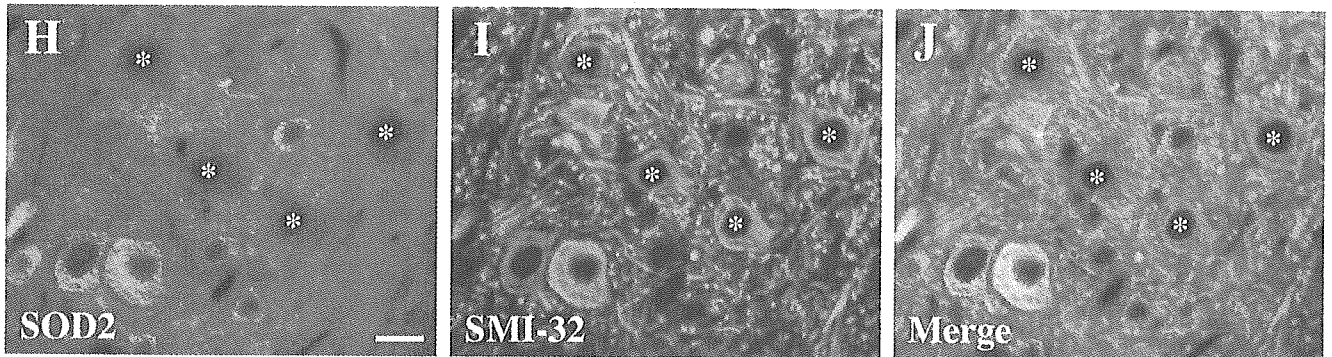
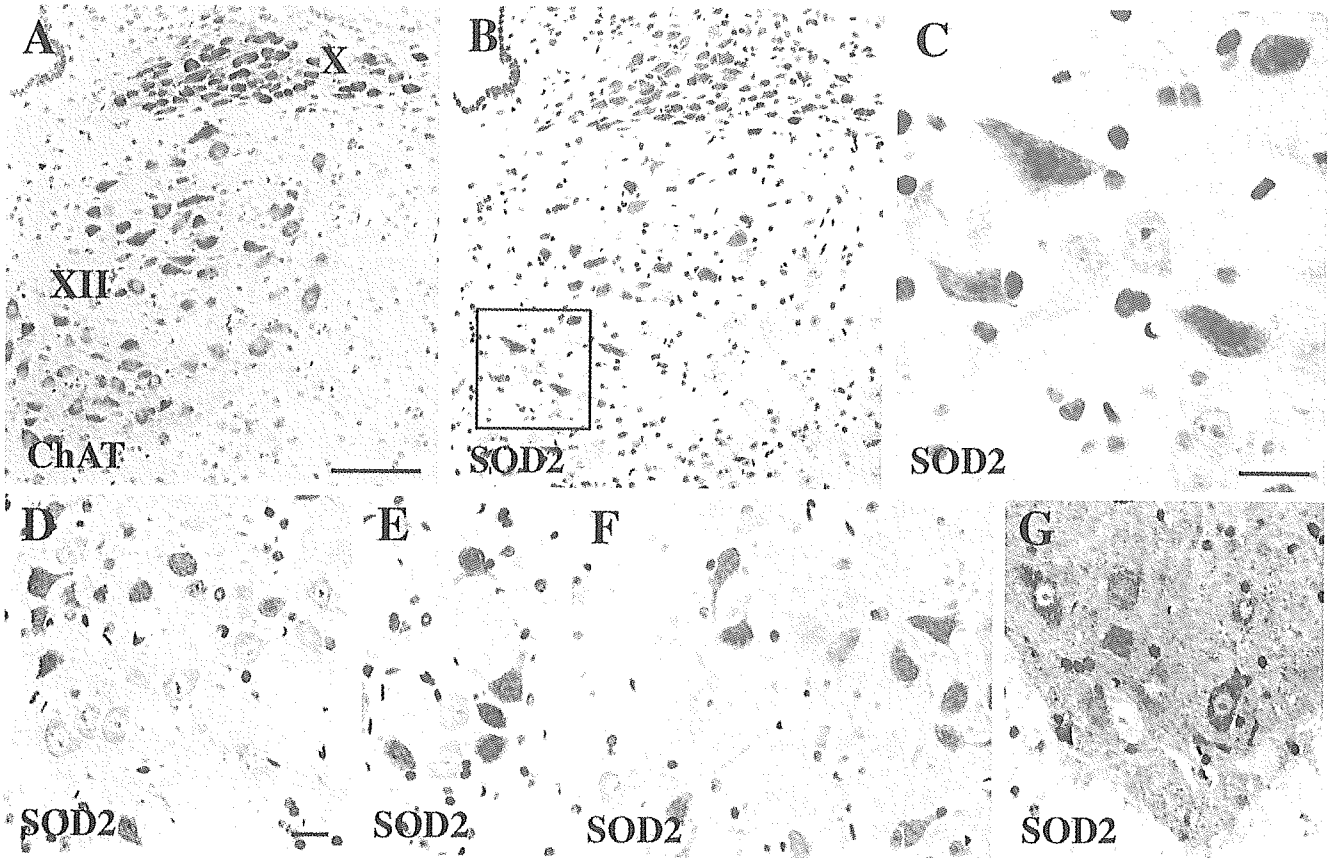
Fig. 2. Detection of SOD2-deficient and ChAT-positive motor neurons in the spinal cord of SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-} mice. Serial paraffin-embedded 5 μ m sections of the lumbar spinal cord from SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-} mice at 1 month (A, B), 3 months (C, D) or 6 months (E, F) of age were stained with anti-SOD2 (A, C, E) or anti-ChAT (B, D, F) antibodies. Arrows indicate SOD2-negative and ChAT-positive motor neurons. Scale bar = 50 μ m. (G) Numbers of spinal cord ChAT-positive motor neurons in SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-} and SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-} mice. Numbers were determined from every 5th section for a total of 15 sections. Shown are the means from three mice +/- standard deviation (n = 3).

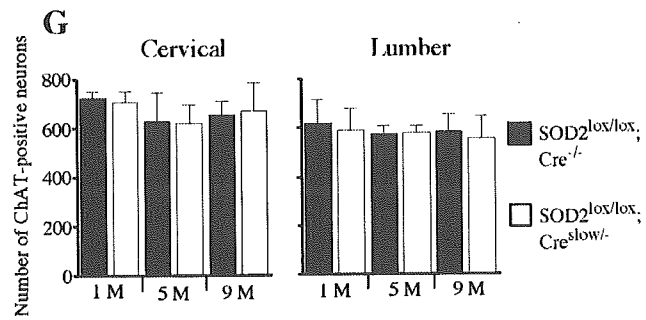
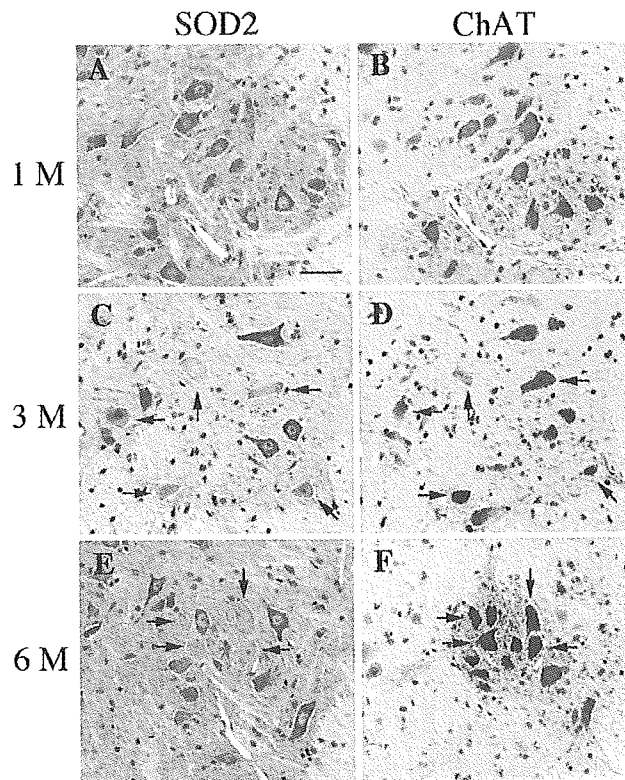
Fig. 3. Morphology of SOD2-deficient motor neurons in 9-month old SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-} mice. Serial sections from the facial nucleus (A, B) or spinal cord ventral horn (C, D) stained with an anti-SOD2 antibody (A, C) or cresyl violet (Nissl; B, D). No overt morphological changes were seen in the SOD2-deficient motor neurons (arrows). Serial sections from the hypoglossal nucleus stained with anti-SOD2 (E) or anti-SOD1 (F) antibodies. No difference in the staining pattern or intensity was evident between SOD2-negative (arrows) and SOD2-positive motor neurons. Scale bars = 20 μ m. (G) Ventral portions of the spinal cord were micro-dissected from SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-} (C-KO) and SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-} (Control) mice. Total homogenates (10 μ g) were subjected to immunoblot analysis with polyclonal anti-SOD2 or anti-SOD1 antibodies. Actin content is shown as a loading control.

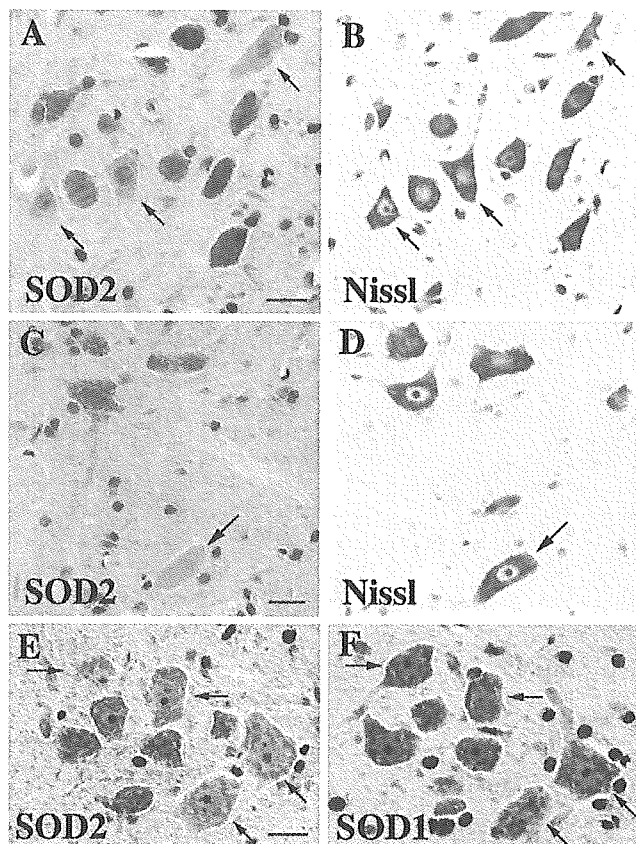
Fig. 4. Absence of muscle atrophy and denervation/remodeling of endplates in $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mice. Serial cryo-sections of gastrocnemius muscle from a 9-month old $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mouse stained with hematoxylin and eosin (A) or Gomori-trichrome (B). Paraffin-embedded sections (5 μ m) of diaphragm muscle containing neuromuscular junction from 9-month old $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mice stained with an anti-CHT antibody followed by counter-staining with hematoxylin (C). Scale bar = 20 μ m.

Fig. 5. Nissl-staining of hypoglossal motor neurons 5 weeks after axotomy in $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ (A) and $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$ (B) mice. Arrows indicate the operated side. CC, Central canal; X, dorsal motor nucleus of the vagus; XII, hypoglossal nucleus. Scale bar = 100 μ m. (C) Number of neurons in hypoglossal nuclei (uncut control or axotomized operated side) from both $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ and $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$ mice (n = 4 for each genotype).

Fig. 6. Accelerated axonal disorganization in $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mice after motor nerve injury. (A) Western blot of 200-kDa neurofilament protein (NF-200) demonstrating the extent of degeneration 2 days after nerve transection in the distal transected hypoglossal nerve (Axotomy) or corresponding contralateral uncut nerve (Uncut). The blot was re-probed with control monoclonal antibody (β -tub 2.1) against β -tubulin. Samples from three $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ and two $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$ control mice are shown. (B) Representative toluidine blue-stained sections of hypoglossal nerves 2-4 mm distal to the lesion site 2 days after transection or corresponding contralateral uninjured nerve. Scale bar = 20 μ m.







G

Control
C-KO

SOD2 —————

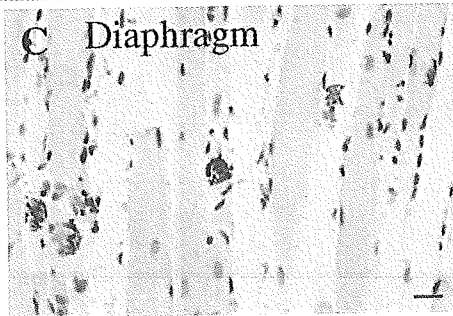
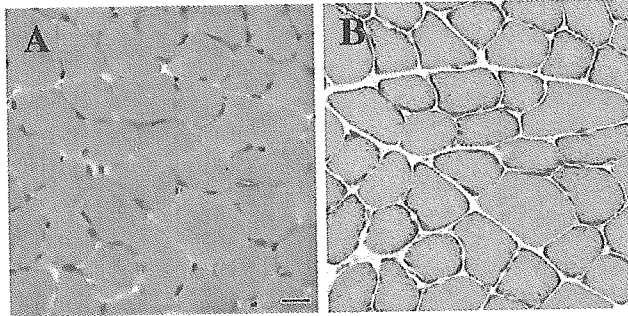
SOD1 —————

actin —————

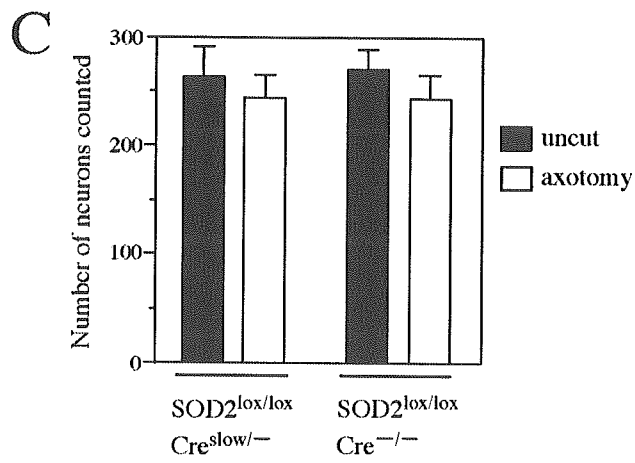
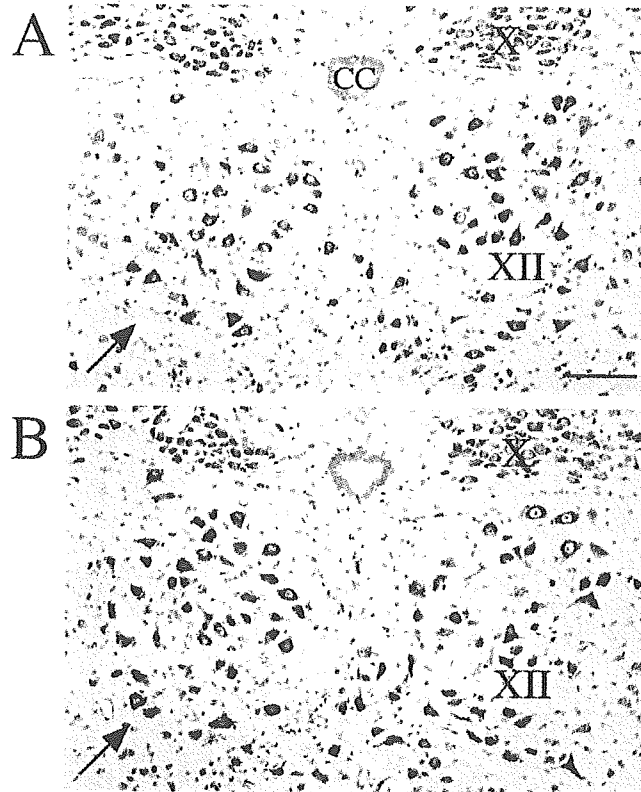
Gastrocnemius muscle

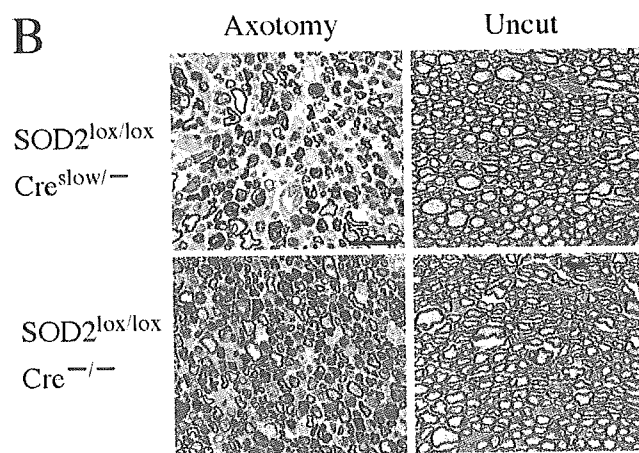
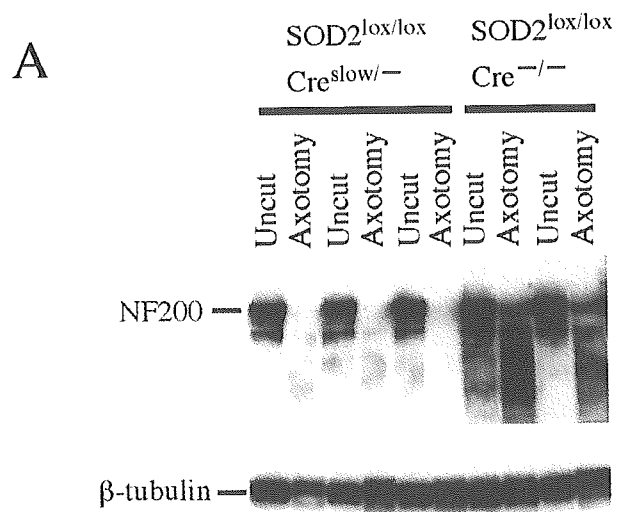
H & E

Gomori-trichrome



Anti-CHT and Hematoxylin



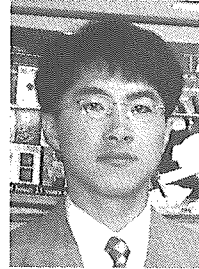


BIOLOGY TOPICS

コンフォメーション病のしくみ

きむ よんじょん たかはし りょうすけ
■ 金 然正¹⁾ ・ 高橋 良輔²⁾

- 1) 独立行政法人理化学研究所 BSI 運動系神経変性研究チーム
2) 京都大学大学院医学研究科 脳病態生理学講座



金 然正
1992年(韓国)中央大学産業科学部卒業。2001年東京大学大学院医学系研究科修了, 03年東京大学理学部助手, 03年~理化学研究所BSI研究員, 現在に至る。研究テーマは神経変性疾患における変異タンパク質の凝集機構。趣味は水泳。

Key words : コンフォメーション病, 神経変性疾患, 凝集, 封入体, タンパク質品質管理システム

Abstract

病変組織における異常タンパク質の凝集及び蓄積は神経変性疾患の共通の病理所見である。凝集の主な原因は遺伝子の変異によるタンパク質の構造異常であるが、細胞内には分子シャペロンとユビキチン・プロテアソームなどのタンパク質の品質管理システムがあり、タンパク質の機能を安定に保つための働きをしている。老化に伴う細胞ストレスはタンパク質の凝集を促進させる原因の一つであり、神経変性疾患のしくみは原因タンパク質の凝集し易い構造とそれを制御するタンパク質品質管理システムの駆け引きであろう。

はじめに

1997年, CarrellとLomasにより提唱されたコンフォメーション病(フォールディング病)とは、病変組織に異常タンパク質が凝集し、封入体を形成する疾患の総称である。コンフォメーション病は神経系, 免疫系, 内分泌系, 循環系, 心筋・骨格筋系などに幅広く存在する。特に神経系においては、日本でも発症が

報告され話題となった狂牛病(プリオン病)を始め、パーキンソン病やアルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などのいわゆる神経変性疾患で、神経細胞内外のさまざまな封入体の存在が共通の病理所見として知られている。神経変性疾患の原因は長年不明であったが、近年の研究結果から、原因タンパク質が構造異常により不溶化し凝集物を形成していく過程で、細胞死を引き起こすのではないかと考えられている。本稿ではタンパク質の立体構造, 分解, 凝集のプロセスに注目し、コンフォメーション病としての神経変性疾患の病理形成機序について論じたい。

1. タンパク質のフォールディングと凝集

蛋白質はアミノ酸が直線状につながった高分子の“ひも”である。1950年代のアンフィセン, C. (1972年ノーベル化学賞受賞)に

Mechanism for Conformational Diseases : Yeon-Jeong Kim, Ryosuke Takahashi, 1)RIKEN, Brain Science Institute, Lab for Motor System Neurodegeneration, 2)Kyoto University, Graduate School of Medicine, Department of Neurology

よるリボヌクレアーゼAの可逆的な変性及び再生実験で示されたように、タンパク質が本来の機能を果たすためには、正しく折りたたまれ、特定の立体構造を持たなければならない。タンパク質は、構成アミノ酸の配列が持つ情報に基づき折りたたまれ、特定の立体構造を形成する。タンパク質によっては、翻訳後修飾など、配列情報が複雑であり上手く折りたたまれないものもある。このようなタンパク質の折りたたみ（フォールディング）は分子シャペロンと呼ばれるタンパク質ファミリーがつかさどっており、タンパク質の正しいフォールディングを助けている。

タンパク質の立体構造は流動性（ダイナミックス）を持っており、条件に応じ、その構造は変化する。可溶性タンパク質の多くでは、親水性アミノ酸残基は立体構造の外側に、疎水性アミノ酸残基は内側に分布しており、水溶液中において安定に機能している。しかし、熱、酸化物の蓄積などのストレスにより、タンパク質の立体構造は崩壊し易く、内側の疎水性アミノ酸残基が露出され凝集してしまう。また、タンパク質の働きそのものにより、疎水性アミノ酸残基が露出される恐れがある。球脊髄性筋萎縮症（Spinal and Bulbar Muscular Atrophy）の場合、アンドロゲン受容体（AR）の遺伝子にCAGトリプレットリピートの過剰伸長(>35CAGs)が原因とされ、変異ARは伸長したグルタミン残基を持つ。ARは、非活性の時には、Hsp90というシャペロン分子が結合しており、安定な構造を取っているが、リガンド（テストステロン）と結合すると、Hsp90から離れ、構造が不安定になり凝集する。すなわち、変異ARはリガンド依存的に凝集するのである。

凝集したタンパク質を電子顕微鏡下で観察

してみると、その形態もタンパク質によってさまざまであるが、その中には規則性を持つ線維も存在する。この線維はアミロイド線維と呼ばれ、アルツハイマー病で見られる老人斑の内部構造と類似である。試験管内において、アミロイド様線維構造を形成するタンパク質は数多く、アルツハイマー病のA β ペプチド、狂牛病の変異プリオン、パーキンソン病の α -synuclein、家族性アミロイドポリニューロパチーの変異transthyretin、家族性筋萎縮性側索硬化症の変異superoxide dismutase 1 (SOD1)などが報告されている。アミロイド線維は主に β シート構造であり、Congo redやThioflavin Tのような色素と結合する性質を持つ。狂牛病の場合、正常プリオンは主に α ヘリックス構造だが、異常プリオンに感染されると β シート構造に変換（ $\alpha \rightarrow \beta$ 転移）されることが知られている。このような $\alpha \rightarrow \beta$ 転移は生物学的にも興味深い反応である。

2. タンパク質のアンフォールディングと生体内の凝集制御

試験管内でタンパク質を凝集させることは比較的容易であり、一定の条件を満たせば、後は待つのみでよい。タンパク質の多くは熱するだけでも容易に凝集物を形成することができる。生理的条件のバッファー系において、アミロイド様凝集物を作るための基本原理はタンパク質を部分的に変性（アンフォールディング）させる、何らかの条件を探ることである。コンフォメーション病の原因タンパク質は多く変異タンパク質であるため、野生型に比べ、アンフォールドしやすい。要するに、変異タンパク質は野生タンパク質より凝集しやすい立体構造を持つ。しかし、生体内にお

いて凝集物の蓄積を観察するための実験モデルを作るのは容易ではない。家族性筋萎縮性側索硬化症の原因タンパク質である、SOD1を培養細胞に発現させてみると、変異SOD1のタンパク質レベルは野生型に比べ低く、半減期も短い。最近の報告によると、SOD1はユビキチン・プロテアソーム系により分解されるという。それでは、どのようにして細胞は野生型と変異SOD1を見分けているのだろうか。その機序は変異SOD1の立体構造に起因する。変異SOD1は立体構造が不安定なため、細胞内でシャペロンHsc70と複合体を形成している。Hsc70のC-末端にはCHIP(carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein)と呼ばれるE3ユビキチン連結酵素が結合し、異常構造のSOD1をユビキチン化することが判明した。すなわち、CHIPはシャペロン依存的ユビキチン化のE3であり、シャペロンを介し変異SOD1の分解を助け、凝集を抑制する

と考えられる。最近の報告では、CHIPは変異tauやパーキンの気質の一つであるパエル受容体の分解にも関与することが明らかになった。

ユビキチン・プロテアソーム系に破綻をきたすことが病因として考えられる神経変性疾患の代表として、家族性パーキンソン病の一病型である常染色体劣性若年性パーキンソニズム(AR-JP)が挙げられる。AR-JPの原因遺伝子産物、パーキンはRING-finger型のユビキチン連結酵素である。この発見により、AR-JPがユビキチン・プロテアソーム系の破綻によって発症することが判明された。さらに、パーキンのN-末端に存在するユビキチンホモロジドメインが、26SプロテアソームのRpn10サブユニットと結合すること、そしてこの相互作用の破綻によってもAR-JPが発症することが報告された。これらのことから、コンフォメーション病におけるタンパク質の

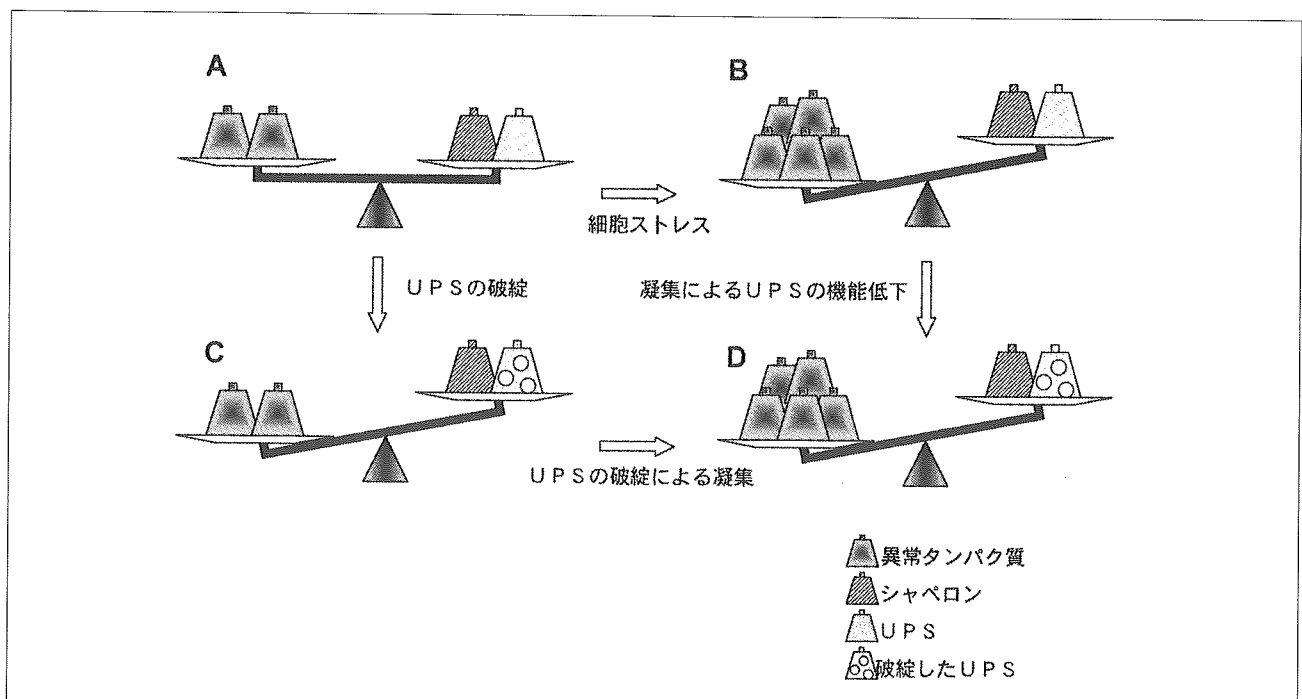


図1 異常タンパク質の凝集。細胞内の異常タンパク質のレベルはシャペロンやユビキチン・プロテアソームシステム(UPS)の働きにより均衡を保つ(A)。酸化ストレスなどの細胞ストレスにより異常タンパク質のレベルがタンパク品質管理システムを上回り(B)、UPSの機能障害を引き起こす。UPSの破綻(C)により、異常タンパク質が凝集する(D)。

凝集は原因となる異常タンパク質のレベルがシャペロンやプロテアソームなどのタンパク質品質管理システムを上回る結果であることが考えられる (図1)。

一方、タンパク質の凝集に影響するもう一つの要因は酸化ストレスや小胞体ストレスなどの細胞ストレスである。孤発性のALSとパーキンソン病においても酸化ストレスの関与が従来から報告されている。培養細胞を用いた実験において、過酸化水素水の処理により、異常タンパク質が凝集し、蓄積することが報告され、酸化ストレスが変異タンパク質のアンフォールディングを促進させることが原因の一つとして考えられている。さらに、凝集タンパク質を含む細胞が酸化ストレスに対する脆弱性を持つという報告が多い。最近では、抗酸化機能を持つDJ-1の変異が若年性パーキンソン病の原因として新たに発見された。

3. 封入体とアグリソーム

コンフォメーション病の共通の病理所見である封入体は、アルツハイマー病では老人斑および神経原線維変化、パーキンソン病ではLewy body、ポリグルタミン病では核内封入体、孤発性のALSでは、Bunina小体など、さまざまである。また、SOD1に変異のある家族性ALSでは、前角運動ニューロンなどの細胞質にLewy body-like hyaline inclusionが認められ、抗SOD1抗体染色で陽性である。これらのことは原因タンパク質の凝集が封入体の核または本体を形成している可能性を示唆している。さらに、封入体はユビキチンやシャペロン、プロテアソームの抗体染色においても陽性で、凝集タンパク質がこれらの因子を巻き込んで、長い期間にわたり、成長したも

のとして考えられている。

近年、封入体形成の機構に関し、逆行性輸送のモータータンパク質であるダイニン複合体が凝集タンパク質を中心体に集積させるという新たな研究結果が報告された。プロテアソームを阻害した際に出現する、中心体に集積したタンパク質の凝集物はアグリソームと名づけられた。アグリソームは、ユビキチン、プロテアソーム、シャペロンなどの抗体染色に陽性反応を示しており、コンフォメーション病で見られる封入体と類似のものとして考えられ、病的封入体の産生経路にダイニンモーターが関与しているのではないかと推測される。また、逆行性輸送を阻害し、アグリソームの形成を抑えると、細胞が死に至ることが見い出され、アグリソームは凝集タンパク質の毒性に対する防御機構の一つではないかと考えられるようになった。さらに、ArrasateとFinkbeinerらは、自動化した蛍光顕微鏡を用い、伸張したポリグルタミン残基を持つ蛍光タンパク質の動態を連続的に観察した。その結果、核内封入体を持っていない細胞が細胞封入体を持っている細胞に比べ細胞死を起こしやすい傾向を明らかにした。細胞間で、封入体形成の差が生じるメカニズムは不明であるが、封入体の形成が細胞防御機構の一つである可能性が示唆された。

4. 凝集タンパク質の細胞毒性

凝集タンパク質が持つ細胞毒性やタンパク質の凝集による細胞死のメカニズムに関してはaxonal transportの物理的障害、シャペロンやプロテアソームを凝集体に巻き込むことによる、タンパク品質管理システムの崩壊、カルシウム代謝やリン酸化システムのかく乱、

酸化ストレスを引き起こすことによるタンパク質のニトロ化など、膨大な論文が発表されている。これらの知見は、凝集タンパク質による細胞死が一つの経路を介して引き起こるというよりは、さまざまな細胞の代謝経路が障害され、複合的機能不全により細胞が死に至ることを支持するように思われる。

一方、2002年 Bucciantini と Stefani らは顆粒状の凝集タンパク質は細胞毒性を示すが、線維状の凝集タンパク質は毒性がないという興味深い論文を発表した。この結論は顆粒状と線維状の凝集タンパク質を加えた培地を用い、細胞を培養した際引き起こる細胞死を観察した結果、得られたものである。さらに、病気と無関係な大腸菌の HypF を用いた実験でも同様の結果が示され、毒性を持つ凝集タンパク質は線維状ではなく顆粒状であるという、凝集タンパク質の毒性に共通する知見が得られた。また、A β ペプチドを用いた実験でもこれらの結果が裏付けられ、線維形成の中間体であるオリゴマーやプロトフィブリルと呼ばれるものが主な毒性を発揮することが示唆された。凝集タンパク質が持つ細胞毒性のメカニズムにはまだ解っていない部分が多いが、最新の論文によると、毒性を持つオリゴマーは脂質二重膜の膜電位を上昇させる、すなわち、二重膜を崩壊させることや、カル

シウム代謝をかく乱し細胞内カルシウム濃度を上げる働きをすることが示された。確かに、この人為的な実験系が生体内の細胞毒性をどの程度反映しているのかは疑問ではあるが、凝集タンパク質と脂質二重膜の相互作用が細胞死と密接な関連があることを示唆した。

おわりに

コンフォメーション病における異常タンパク質の凝集は、疾患の原因となる本質的な現象であるか、あるいは、単に病気の結果に過ぎないのかは長い期間議論されてきた。これは、異常タンパク質の代謝経路から凝集体の産生及び制御機構や細胞死に至るまで、病気の全容が多く謎に包まれているからであろう。しかしながら、技術や科学の輝かしい進歩により、病気の一部が明らかになりつつあり、凝集の抑制が症状を改善や、延命に繋がる多数の証拠が提出された。異常タンパク質の生化学的性質に加え、シャペロンやプロテアソームのタンパク質品質管理システム、アグリソームなど、異常タンパク質を巡るさまざまな代謝経路の研究の更なる進歩により、神経変性疾患の治療法の確立が一日でも早まることを期待する。

< BIO Information >

日本顕微鏡学会第61回学術講演会

日本顕微鏡学会は日本顕微鏡学会第61回学術講演会を下記の日程で開催いたします。

日 時：平成17年6月1日（水）～3日（金）

会 場：つくば国際会議場（エポカルつくば）

主 催：社団法人・日本顕微鏡学会 会 長：外村 彰（日立基礎研）

お問い合わせ：〒101-8449 東京都千代田区神田錦町3-24 住友商事神保町ビル

（株）ICS コンベンションデザイン内 JSM05 事務局

電話：03-3219-3541、ファックス：03-3292-1811 電子メール：jsm05@ics-inc.co.jp

パーキンソン病の分子生物学

高橋良輔¹⁾ Ryosuke TAKAHASHI

1) 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

I. パーキンソン病とは

パーキンソン病は高齢者に多い神経変性疾患であり、有病率は約1,000人に1人で、65歳以上の人口の1%以上が罹患するといわれる。神経病理学的には中脳黒質のドーパミン神経の選択的変性脱落が主体である。病気が進行すると青斑核のノルアドレナリンニューロンやマイネルト基底核のアセチルコリンニューロンにも変性が及ぶ。さらに、光学顕微鏡的にはドーパミン神経にレビー小体とよばれる細胞質内封入体に変性するニューロンにみられるのが特徴である(図1)。

臨床的にはドーパミン欠乏症状が主症状であり、振戦(手足のふるえ)、無動(運動の緩慢化)、固縮(筋肉が固くなる)、姿勢反射障害(転倒しやすくなる)といった運動障害が徐々に出現、十数年にわたって進行し、末期には寝たきりになるという経過をたどる。L-ドーパによるドーパミン補充療法、ドーパミンアゴニストによる治療、さらに最近では深部脳刺激療法という機能外科的治療法が症状を改善させる効果があり、注目されている。

しかし、神経変性そのものを遅らせるようなより効果的な治療法の開発には発症メカニズムの解明が必須である。パーキンソン病は多くの場合、はっきりとした遺伝的要素は認められな

い孤発性であるが、5～10%のケースが家族性、すなわち遺伝性で発症する。この数年間に複数の家族性パーキンソン病の病因遺伝子が単離されてきた。その病因遺伝子の解析から遺伝子変異によって神経変性が起こるメカニズムの基本的な道筋が明らかになりつつある。

本稿では家族性パーキンソン病に焦点をあて、神経変性の分子メカニズムについて最新の知見を含めて概説する。

II. 家族性パーキンソン病

これまで遺伝子座が判明しているものに11疾患があり、そのうち六つの遺伝子が明らかになっている。家族性パーキンソン病の遺伝子座のシンボルとしてはPARKが使われている(表1)。遺伝子が同定され、その異常がパーキンソン病を引き起こすことが確実なPARK1、PARK2、PARK6、PARK7の病因遺伝子産物とその神経変性とのかかわりについて以下に詳しく述べる^{5, 14, 22)}。

1. PARK1, PARK4: α -シヌクレイン

α -シヌクレインはアミノ酸140個の蛋白質で、比較的神経特異的に発現している。神経細胞のなかでもプレシナプス領域の細胞質に多いが、生理的役割は不明である。1997年、 α -シヌクレインの点変異(A53T)が常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因になるという報告が

なされた¹⁸⁾。α-シヌクレイン遺伝子変異は大変まれであるが、レビー小体の主成分であることが明らかになったことから、俄然パーキンソン病の鍵を握る分子として注目を集めるようになった¹⁾。

さらに、PARK4はα-シヌクレインを含む染

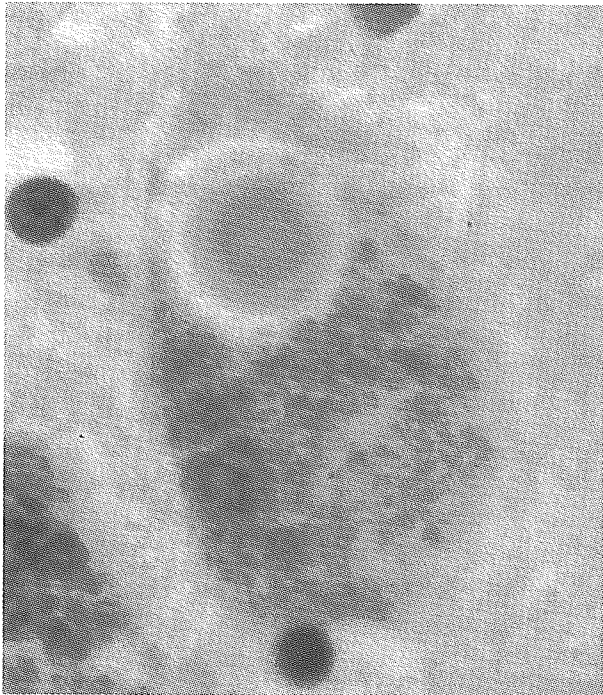


図1 レビー小体

神経細胞体にみられる異常なタンパク性の凝集物。パーキンソン病で変性する黒質や青斑核の色素含有細胞によくみられる。

色体領域の三重複によって起こることがわかった。これはα-シヌクレインが遺伝子量にして2倍になるとパーキンソン病になることを意味し、孤発性パーキンソン病がα-シヌクレインの蓄積によって起こる可能性を強力にサポートする証拠となっている。

それではα-シヌクレインはどのようにしてレビー小体を形成するようになるのか？ レビー小体のような凝集塊は封入体とよばれ、ミスフォールド蛋白質という異常蛋白質を多く含んでいる。蛋白質が本来の機能を発揮するためには正しい折れたたみ（フォールディング）が起こる必要がある。分子シャペロンは蛋白質のフォールディングを助ける役割を担うが、それでもうまく折れたたみが起こらない不良品の蛋白質、つまりミスフォールド蛋白質ができる。

通常ミスフォールド蛋白質はパーキンの項で詳しく述べるユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系の働きで分解され、処理されるが、何らかの理由で分解が間に合わなくなるとミスフォールド蛋白質が細胞内に蓄積する。α-シヌクレインは家族性パーキンソン病では変異によってミスフォールド化するが、孤発性

表1 家族性パーキンソン病の分類

		遺伝子	遺伝形式
PARK1	4q21-22	a-synuclein	AD
PARK2	6q25-27	Parkin	AR
PARK3	2p13	?	AD
PARK5	4p14	UCH-L1	AD(?)
PARK6	1p35-36	PINK1	AR
PARK7	1p36	DJ-1	AR
PARK8	12p11.2-q13.1	dardarin/LRRK2	AD
PARK9	1p36	?	AR
PARK10	1p32?	?	susceptibility locus
PARK11	2q36-37	?	susceptibility locus

パーキンソン病では翻訳後修飾によってミスフォールド化し、蓄積してレビー小体を形成するのではないかと考えられるようになった^{4, 6)}。レビー小体は電子顕微鏡で見ると径約10ナノメートルのアミロイドフィブリルとよばれる線維構造を呈するが、組み換え α -シヌクレインも試験管内でレビー小体とよく似たアミロイドフィブリルを形成することが示されている。

ミスフォールド化した α -シヌクレインの蓄積がパーキンソン病の原因になるという考えは、 α -シヌクレインを過剰発現するモデル動物がパーキンソン病類似の病態を示すようになることから支持されている^{4, 22)}。まずマウスで神経特異的に野生型または変異型の α -シヌクレインを脳で発現させると、ドーパミン神経終末が特異的に変性し、運動機能も低下する。さらに神経細胞内にレビー小体に似た凝集物が出現する。一方、ショウジョウバエでも脳に α -シヌクレインを過剰発現させるとドーパミン神経細胞死が起こり、やはりレビー小体様封入体が形成される。

現在、関心の的になっていることは細胞毒性を発揮するのがレビー小体なのか、それ以外のミスフォールド化した α -シヌクレインの分子種かという点である。 α -シヌクレインがレビー小体のような線維構造を*in vitro*で形成する過程の研究から、アミロイドフィブリルになる前の中間体であるプロトフィブリルの存在が明らかになり、線維そのものではなく、プロトフィブリルが細胞毒性を発揮するのではないかとの考えがこの数年提唱されるようになった(図2)⁶⁾。

プロトフィブリルを重視する立場からはレビー小体のような線維性の封入体は危険なプロトフィブリルに変わることを阻害したり、封じ込めてしまったりする防御的な機能をも

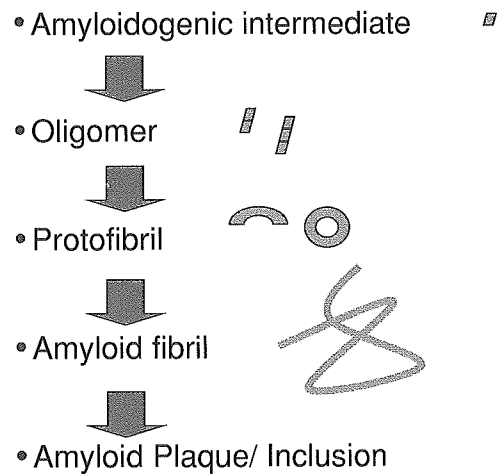


図2 α -シヌクレインの線維フィブリルの形成過程

正常な α -シヌクレインは遺伝子変異や翻訳後修飾などによってミスフォールド化し、中間体のプロトフィブリルを形成する。プロトフィブリルの形態は直鎖状、環状などさまざまであり、この一部が毒性をもつ可能性がある。プロトフィブリルは最終的にはフィブリルに転換し、レビー小体が形成される。

つことが推測されている。一方フィブリルとなったレビー小体もプロトフィブリルもプロテアソームの活性を低下させる可能性が指摘されており、どの分子種が毒性を担っているのか、今後の展開が待たれる。

2. PARK2：パーキン

AR-JPは40歳以下で発症するパーキンソン病様症状を主体とする疾患で、神経病理学的には孤発性パーキンソン病と同様、黒質・青斑核の色素含有細胞の選択的変性が特徴である。しかしレビー小体は通常みられない¹⁵⁾。

AR-JPの病因遺伝子パーキン(N末端にユビキチンホモロジー領域、C末端に二つのRINGフィンガー領域を有する蛋白質であり、ユビキチンリガーゼ(略称：E3)というユビキチンプロテアソーム蛋白分解系にかかわる酵素であることが判明している^{7, 13, 20, 28)}。ユビキチンプロテアソーム経路は短寿命の蛋白質の主な分解経路である(図3)²³⁾。

ユビキチンは76アミノ酸の小さな蛋白質であるが、活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)、連結酵素あるいはリガーゼ(E3)からなる連続的な酵素反応により標的蛋白質に共有結合し、さらにこの反応を繰り返すことによって形成されたポリユビキチン鎖が標的蛋白質の分解シグナルとして作用する。

分解シグナルを認識するのは巨大な蛋白質分解酵素複合体であるプロテアソームであり、シリンダー状の形状の20Sプロテアソームの中を通過して標的蛋白質はばらばらに分解されてしまう。E3の役割は標的蛋白質を特異的に認識し、E2の助けを借りて、そのユビキチン化を促進することである。パーキンのRINGフィンガーはE2との結合、一方N末端のユビキチンホモロジー領域はプロテアソームとの結合に必要である¹⁹⁾。

以上より、AR-JPではパーキンのE3活性の低下によってパーキンが本来ユビキチン化し、その分解を促進すべき基質がドーパミン神経に蓄積し、神経変性を引き起こすと考えられる。これまでにパーキンの標的蛋白質としていくつかの蛋白質が分離同定されている。シナプス小胞に局在するGTPaseのCDC-rel1²⁸⁾、糖鎖修飾された α -シヌクレインおよび α -シヌクレインの凝集を促進する作用をもち、レビー小体の構成成分でもあるsynphilin-1^{3, 21)}、そのほかサイクリンE、 α -/ β -チューブリン、アミノアシルtRNA合成酵素複合体p38サブユニットも標的蛋白質として報告されている。これらのなかで私たちが分離同定したパエル(Pael)受容体は小胞体ストレスとパーキンソン病を結びつけ、その蓄積が直接細胞死を誘導する分子として特に注目されている⁸⁾。

パエル受容体は、酵母2ハイブリッド法でパーキン結合蛋白質として同定されたG蛋白共役型

受容体である。パエル受容体はドーパミン神経に発現しており、蛋白質新生の段階でミスフォールド蛋白質になってしまったパエル受容体をパーキンが小胞体レベルで分解していることがわかった。

小胞体は細胞内蛋白質の約3分の1を占める膜蛋白質/分泌蛋白質の品質管理を行う細胞内小器官である¹⁶⁾。小胞体では蛋白質のフォールディングの状況によって蛋白質が選別され、うまくフォールディングされて、折れたたんた蛋白質は分泌経路にのせられるが、フォールディングに失敗したミスフォールド蛋白質は分解される。

このように分泌系蛋白質が小胞体でフォールディング状態に応じてより分けられ、分解に至る経路を小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation)とよぶ⁹⁾。ERADの基質となる蛋白質は細胞質へ逆行輸送され、細胞質のユビキチン・プロテアソーム系によって分解される(図4)。Pael受容体を過剰発現させた細胞でプロテアソーム阻害剤を投与したところ、パエル受容体の小胞体への集積が観察され、パエル受容体がERADで分解されていることがわかった。

さらにプロテアソームの阻害を持続させると、やがて細胞内で異常な凝集塊を形成し、それに伴って細胞が丸く縮んで死んでしまう。小胞体にミスフォールド蛋白質が蓄積すると細胞機能が障害されることが知られ、小胞体ストレスとよばれている。細胞は小胞体ストレスに対する究極のストレス応答として細胞死を起こす¹⁰⁾。パエル受容体は小胞体ストレス誘導性細胞死を引き起こしたと考えられる。

さらに、ヒト脳を使った検討でAR-JPの剖検脳で不溶性パエル受容体の蓄積が観察されたことから、パエル受容体の蓄積はAR-JPにみられ