

る神経変性のメカニズムをうまく説明する²⁵⁾ (図5)。

以上の結果より、AR-JPはミスフォールド化したパエル受容体の異常蓄積によりドーパミン神経が選択的に細胞死に陥って発症に至るのではないかと考えられる。この仮説をさらに支持する事実として、ショウジョウバエの脳にパエル受容体を大量に発現させることによってAR-JPのモデルが作製された²⁷⁾。パエル受容体をドーパミン神経特異的なプロモーターを用いて発現させると、孵化後40日で脳のある部位のドーパミン神経が半数ほどに減少する。さらにパエル受容体を神経細胞全般に発現させても、同じようにドーパミン細胞だけが変性脱落することがわかり、ドーパミン細胞が何らかの理由でパエル受容体蓄積のストレスに特別脆弱なことが想像される。

一方、マウスではパーキンの遺伝子をノックアウトしても見かけ上異常は見当たらない。これにはさまざまな説明が可能であるが、ヒトのAR-JPでも20~30歳代になるまで発症しないことから、パーキンの基質の蓄積はゆっくりとした過程であると考えられ、せいぜい2年前後しか生きないマウスでは病気を発症しないのかもしれない。

3. PARK6 : PINK1

PARK6は常染色体劣性若年性パーキンソン病の臨床病型をとり、病因遺伝子としてPINK1 (PTEN-induced kinase 1) が最近単離された²⁶⁾。PINK-1は蛋白質リン酸化酵素であるという以外の機能は明らかでないが、ミトコンドリアに局在することから、ミトコンドリアの機能維持に不可欠な役割を有している可能性がある。

おもしろいことに、孤発性パーキンソン病患者剖検例の黒質ではミトコンドリア電子伝

達系の複合体Iの活性が低下している。また、同じく複合体Iを阻害するMPTP, rotenoneといった薬剤がドーパミン神経毒として作用し、実験動物でパーキンソニズムを引き起こすことから、ミトコンドリアの機能低下が孤発性パーキンソン病の発症に密接に関連していると想像されてきた¹¹⁾。PINK1の機能解析によってミトコンドリアとパーキンソン病を結びつける強力な証拠が得られることが期待される。

4. PARK7 : DJ-1

PARK7も常染色体劣性遺伝で、若年性パーキンソン病の表現型を呈する。DJ-1の変異がオランダとイタリアのPARK7の家系に見出された²⁾。DJ-1は構造上、古細菌のプロテアーゼに類似しているが、機能はよくわかっていない¹²⁾。最初はオンコジーンとして同定されたが¹⁷⁾、最近、過酸化水素を強力に解毒する抗酸化蛋白質すなわちアンチオキシダントであることが判明した²⁴⁾。ドーパミン神経は酸化的ストレスに曝されやすい環境におかれていることから、酸化的ストレスが孤発性パーキンソン病の病因にかかわるとの考えは以前から有力であった。DJ-1はこの考えを遺伝子の側から裏づけている。

III. おわりに

家族性パーキンソン病の分子メカニズムに関する最近の知見を概観してきた。一番強調したいことは、家族性パーキンソン病の研究から孤発性パーキンソン病の病因への直接的な手がかりが得られたことである。PARK1の病因遺伝子 α -シヌクレインが孤発性パーキンソン病においても重要な役割を演じていることは疑いない。次にPARK1, PARK2の研究からパーキンソン病ではミスフォールド蛋白質の蓄積とそれを分解する役割を担うユビキチ

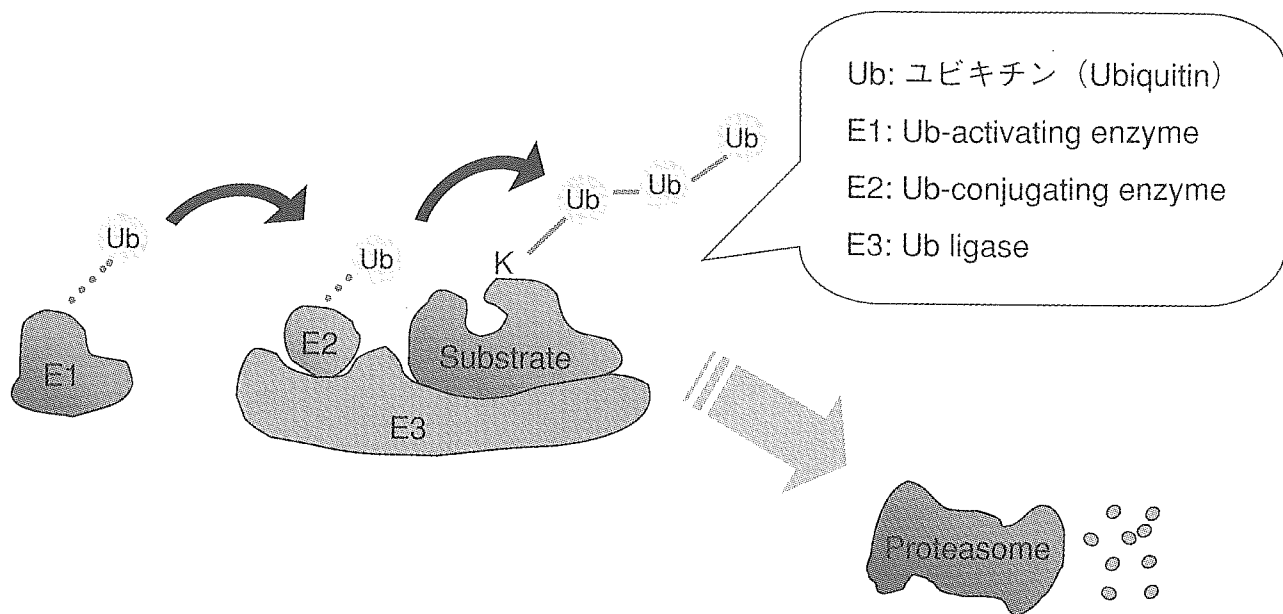


図3 ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系

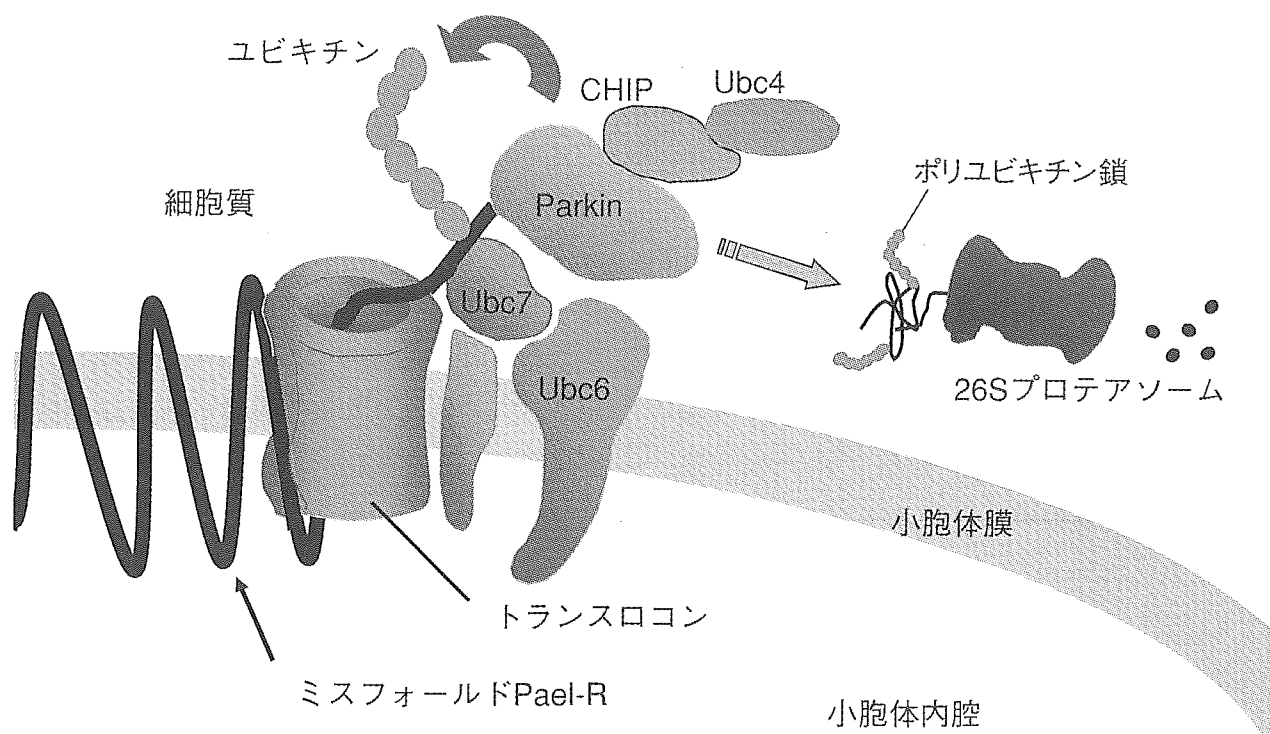


図4 小胞体関連分解 (ERAD) と Parkin の役割

Ubc6, Ubc7は小胞体膜の細胞質側にあるERADにかかわるE2である。ミスフォールド化パエル受容体 (Pael-R) はトランスロコンを通して細胞質に逆に運ばれ、ユビキチンプロテアソーム系によって分解される。

ンプロテアソーム系の破綻が神経変性を引き起こしているらしいこともわかってきた。

このような家族性パーキンソン病からの知見をもとに孤発性パーキンソン病の病因仮説をや

や単純化して図式化してみた(図6)。まず加齢に伴い複合体Iの障害が起こると酸化ストレスが生じ、 α -シヌクレインの酸化によりミスフォールド化が促進される。ミスフォールド

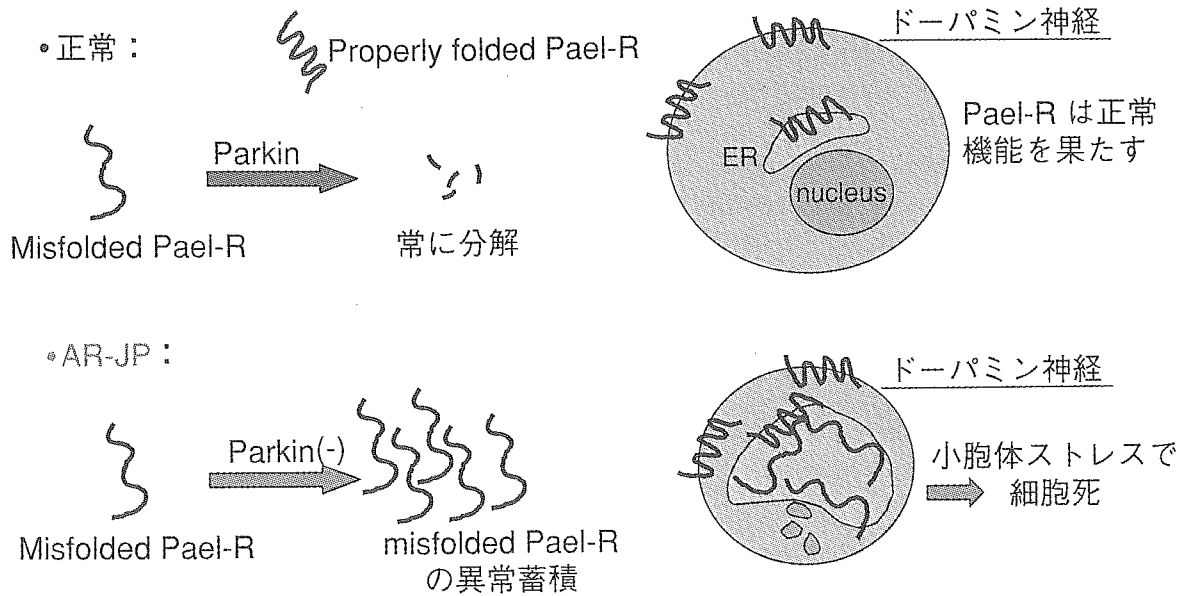


図5 AR-JP発症の分子メカニズム

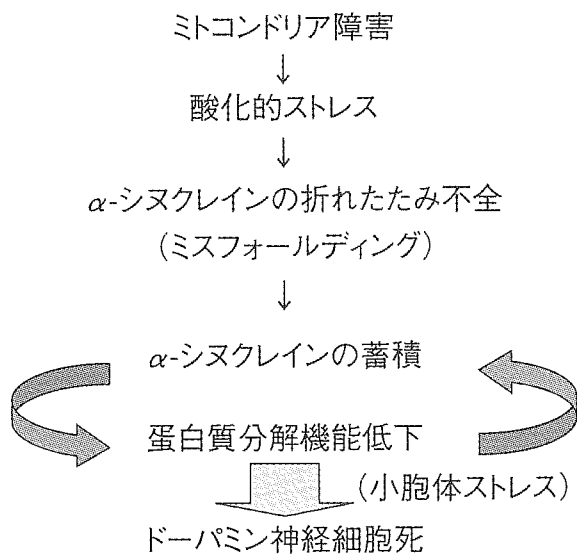


図6 家族性パーキンソン病に基づくパーキンソン病の病因仮説

化した α -シヌクレインはプロテアソームに過重な負担をかけることでプロテアソーム機能低下を引き起こし、それがERADの阻害から小胞体ストレスを誘導し、神経変性が起こるという作業仮説である。

この仮説を検証していくことによってパーキンソン病の病因が解明され、その先にある治療

法開発が実現することが期待される。

文献

- 1) Baba M, Nakajo S, Tu PH, et al: Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Am J Pathol 152: 879-884, 1998
- 2) 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
- 3) Chung KK, Zhang Y, Lim KL, et al: Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. Nat Med 7: 1144-1150, 2001
- 4) Dawson TM, Mandir AS, Lee MK: Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? Neuron 35: 219-222, 2002
- 5) Dawson TM, Dawson VL: Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. J Clin Invest 111: 145-151, 2003
- 6) Goldberg MS, Lansbury PT: Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? Nat Cell Biol 2: E115-119, 2000
- 7) Imai Y, Soda M, Takahashi R: Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. J Biol Chem 275: 35661-35664, 2000

- 8) Imai Y, Soda M, Inoue H, et al: An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105: 891-902, 2001
- 9) Plemper RK, Wolf DH: Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* 24: 266-270, 1999
- 10) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103, 2000
- 11) Dawson TM, Dawson VL: Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302: 819-822, 2003
- 12) Honbou K, Suzuki NN, Horiuchi M, et al: The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem*, in press, 2003
- 13) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608, 1998
- 14) Lansbury PT, Brice A: Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Cell Biol* 14: 653-660, 2002
- 15) Mizuno Y, Hattori N, Mori H, et al: Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 477-482, 2001
- 16) Mori, K: Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101: 451-454, 2000
- 17) Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, et al: DJ-1, a novel oncogene with which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 509-513, 1997
- 18) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2057, 1997
- 19) Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, et al: Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* 4: 301-306, 2003
- 20) 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
- 21) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, et al: (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293: 263-269, 2001
- 22) Steece-Collier K, Maries E, Kordower JH: Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13972-13974, 2002
- 23) 田中啓二：新手を繰り出すユビキチンの魔術。 *実験医学* 21: 330-339, 2003
- 24) Taira T, Saito Y, Niki T, et al: DJ-1 has a role in antioxidant stress to prevent cell death. *EMBO reports* 5: 213-218, 2004
- 25) 高橋良輔：パーキンの機能。 *生化学* 74: 471-476, 2002
- 26) 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
- 27) Yang Y, Nishimura I, Imai Y, et al: Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37: 911-924, 2003
- 28) Zhang Y, Gao J, Chung KK, et al: Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13354-13359, 2000

ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系と神経変性疾患治療戦略*

高橋 良輔**

Key Words : protein folding, conformational disease, Parkinson's disease, ubiquitin ligase, endoplasmic reticulum

はじめに

「神経変性疾患」は原因不明の難病の代名詞であったが、分子遺伝学の著しい進歩により、この20年ほどの間に主要な遺伝性神経変性疾患の病因遺伝子があらかた同定され、その遺伝子産物である病因蛋白質の機能解析が進んだ結果、さまざまな神経変性疾患にはじつは共通の分子機構があるらしいことがかなり確かな事実として浮上してきた。「共通の分子機構」とは、すなわち構造異常を起こした蛋白質の蓄積である (Fig. 1)。蛋白質は本来の機能を果たすために正しい3次構造をとるために折りたたまれる (フォールディングという) ことが必要であるが、フォールディングに失敗した蛋白質 (ミスフォールド蛋白質と呼ばれる) は機能を失うだけでなく、細胞にとって有害な性質を獲得し、神経変性を引き起こすらしい^{1, 2)}。遺伝性疾患の場合は容易に理解されるように、遺伝子変異によってアミノ酸配列が変わるために、病因蛋白質はミスフォールド化する。ところが意外なことに蛋白質のミスフォールド化はアミノ酸配列が正常でも、健康人であっても、常に生じている。これはフォールディングという過程が100%成功するプロセスではないことになっている。新しくできた蛋白質の約30%はミスフ

ォールド化するという報告³⁾は現在疑問視されているが、恒常的にミスフォールド化が生じていることは確かである。このようなミスフォールド化蛋白質は、後述のユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系の働きによって分解処理されるので、健康人では問題を起ささない。ところが、分解系が低下すると、ミスフォールド化した蛋白質は蓄積を開始し、変異蛋白質と同じように有害な性質で神経変性を引き起こす可能性がある。これは孤発性神経変性疾患の成因を合理的に説明しうる (Fig. 1)。しかも孤発性神経変性疾患は加齢が唯一かつ強力なリスクファクターであるが、加齢とともにユビキチンプロテアソーム系の活性が低下することがわかっており、観察事実からも分解系低下に孤発性疾患の成因を求める考えは当を得ているように思われる。さらに加齢とともに酸化ストレスが蓄積することもよく知られた事実であるが、酸化ストレスは蛋白質を酸化修飾して、ミスフォールド化を促進させることも容易に想定される (Fig. 1)。このようにユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系をキーワードとして考えると、遺伝性と孤発性の神経変性疾患がともにミスフォールド蛋白質の蓄積で統一的に理解できる。このような観点から、神経変性疾患は蛋白質の構

* Ubiquitin-Proteasome System and the Strategies for the Therapeutics of Neurodegenerative Diseases.

** 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 (神経内科) Ryosuke TAKAHASHI : Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine

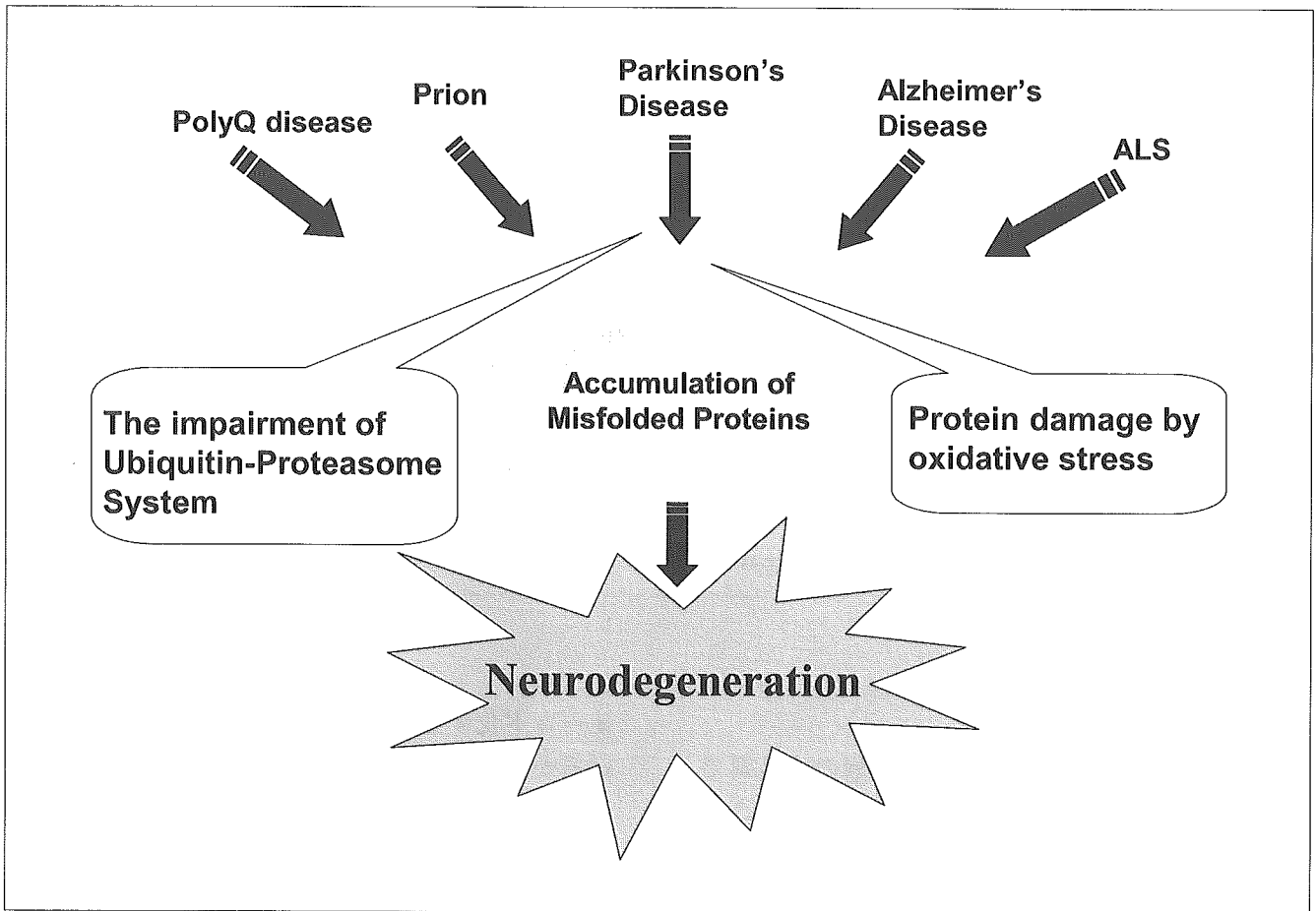


Fig. 1 Common pathogenetic mechanisms for various neurodegenerative diseases

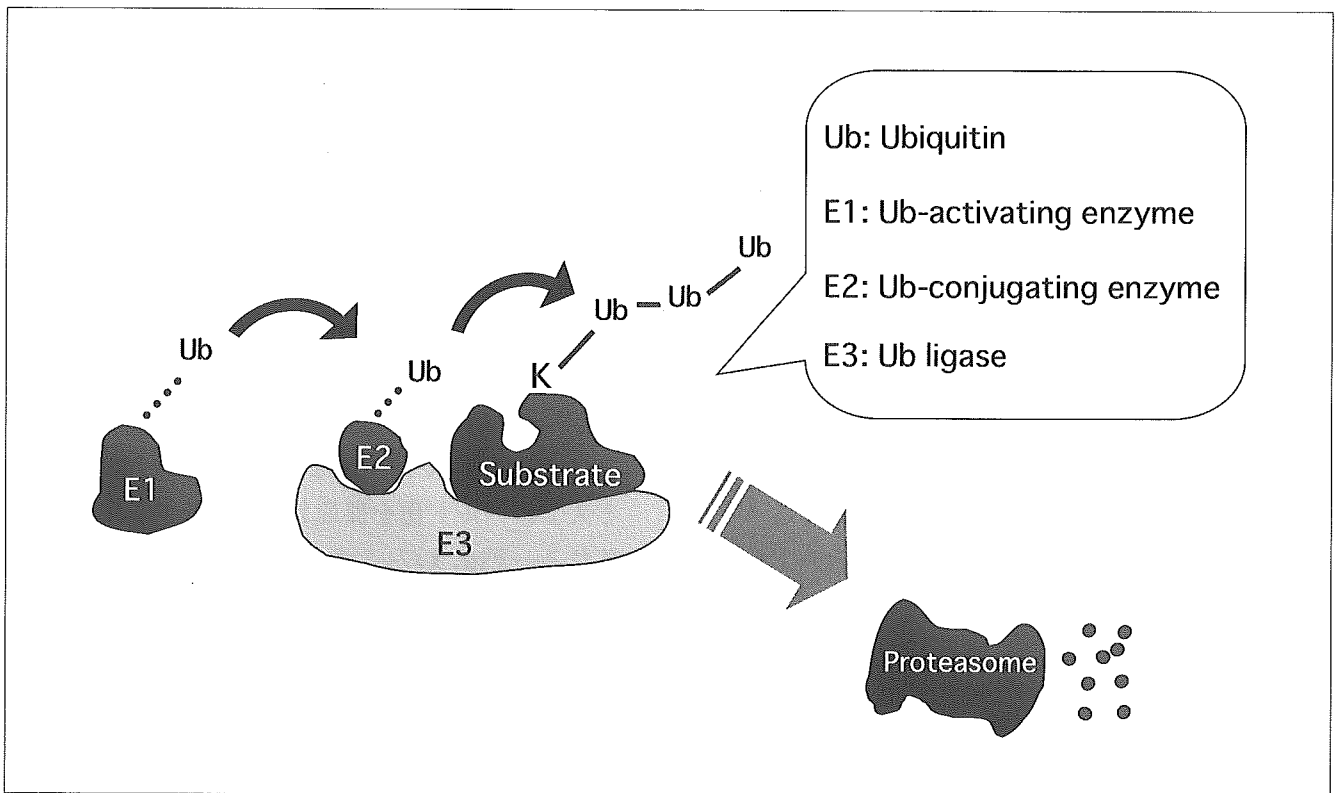


Fig. 2 Ubiquitin-proteasome system

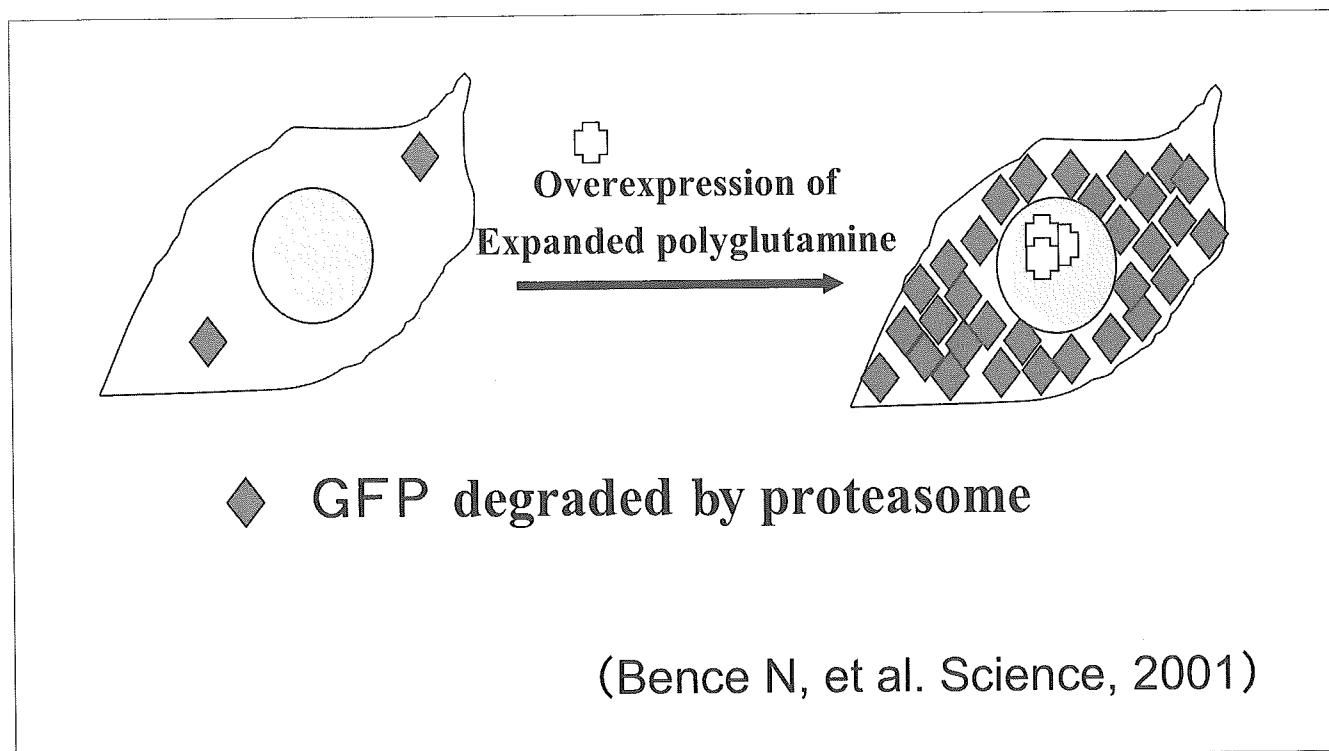


Fig. 3 Misfolded proteins inhibit proteasomal activity

造異常によって生じるという意味で、構造病（コンフォメーション病：conformational disease）の代表的な疾患と考えられるようになった^{4, 5)}。本稿ではParkinson病を中心としてユビキチンプロテアソーム系の神経変性疾患への関与について述べる。

I. ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系とは

ユビキチンプロテアソーム系（Ubiquitin-proteasome system；UPS）は細胞内のおおよそ半減期が10時間以下の短寿命の蛋白質の分解を担う主な分解系であり、分解にATPを消費するエネルギー依存性と分解する基質を選択する基質選択性をもつ2つの特徴を備えている⁶⁾（Fig. 2）。ユビキチンは76アミノ酸からなる小さな蛋白質であるが、蛋白質分解の目印としての役割を果たす。ユビキチンが4つ以上鎖状につながったポリユビキチン鎖が蛋白質に共有結合すると、プロテアソームがポリユビキチン化された基質蛋白質を認識し、分解する。すなわち、蛋白質のユビキチン化が基質の選択を決定する重要なステップとなる。ユビキチン化はE1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ）という3種類の酵素の連続的な反応によ

って行われる。このうちE1はATPを使って、高エネルギーのチオールエステル結合をユビキチンとの間に形成し、それがE2に引き渡される。E3は基質を特異的に認識する重要な役割を担うが、E3の仲立ちで、ユビキチンは基質のリジン残基に安定なペプチド結合を形成する。ユビキチン化の反応は繰り返して起こるが、2番目以降のユビキチンが直前のユビキチンに結合する結果、ポリユビキチン鎖が形成される。ポリユビキチン化蛋白質は26Sプロテアソームの19Sキャップという蓋のような部分によって認識され、ここでまたATPを使ってフォールディングを解かれ、アミノ酸のひものような形になってシリンダー状の20Sプロテアソームの内腔に送り込まれ、カタリティックサブユニットの働きで分解される。このような複雑な機構を生体が用意した理由の一部には、細胞内で絶えず産生される有害なミスフォールド蛋白質を見分け、分解処理する必要があることがあげられるであろう。

II. ミスフォールド蛋白質とUPS

ところが、ミスフォールド蛋白質はUPSの基質となると同時にUPSの機能を低下させる性質があることがわかってきた。このことを示した

Ron Kopitoたちのエレガントな実験を紹介する⁶⁾ (Fig. 3). 彼らは本来は極めて安定なGreen Fluorescent Protein (GFP)にdegronという配列を付加し、プロテアソームで速やかに分解される不安定な蛋白質GFP^uを作製した。GFP^uを過剰発現させるとプロテアソームの活性が保たれている細胞では分解されてしまうため蛍光を発しないが、プロテアソームの活性が低下すると蛋白質が蓄積する結果、蛍光を発するようになる。すなわちGFP^uはプロテアソーム活性のセンサーの役割を果たす。GFP^uを発現する細胞にミスフォールド蛋白質の代表例であるポリユビキチンを発現させると、蛍光の観察されなかった細胞で、一転して蛍光がみられるようになり、プロテアソーム活性が低下することが示された。彼らはポリグルタミンによって核内に封入体の形成された細胞で特にプロテアソーム活性が低下していることから、ポリグルタミン凝集体がプロテアソーム活性を阻害する可能性を強く考えている。しかし凝集体を形成する細胞では凝集体形成にいたるまでのミスフォールド蛋白質も増加していると思われるので、「ポリグルタミン蛋白質がプロテアソーム活性を阻害する」ことを示す証拠ととらえるのが合理的である⁷⁾。ほぼ同時期に貫名信行らのグループもポリグルタミンでプロテアソーム活性が阻害されると報告し⁸⁾、Christopher Rossらのグループは α -シヌクレイン(後述)でも同様の観察をしており⁹⁾、ミスフォールド蛋白質が一般にプロテアソーム活性を阻害する可能性が強く支持されるようになった。

ミスフォールド蛋白質がプロテアソームによって分解される一方、ミスフォールド蛋白質がプロテアソームを阻害するとすれば、ミスフォールド蛋白質の蓄積はプロテアソームの阻害を引き起こし、さらなるミスフォールド蛋白質の蓄積を招くという悪循環を経て神経変性に至るというシナリオを描くことができる。この興味深い、やや単純化され過ぎたようにも見えるこの仮説が基本的に正しいかどうかは今後個々の疾患で確かめられる必要があるだろう。

III. 家族性Parkinson病とUPS

神経変性疾患におけるUPSの重要性に関して

は、特に家族性Parkinson病において遺伝子レベルで有力な証拠が得られている。家族性Parkinson病は現在までに11種類の異なる遺伝子座にリンクする疾患が見つかっており、そのうち7疾患に関しては病因遺伝子まで単離されている。ユビキチンプロテアソーム系との関わりが示されているのは、そのうち、脱ユビキチン酵素であるUCH-L1、ユビキチンリガーゼであるParkin、そしてミスフォールド化しやすい α -シヌクレインの3種類で、それぞれ、PARK5、PARK2、PARK1の病因遺伝子である。以下では α -シヌクレインとParkinに焦点を絞ってこれらの遺伝子変異を成因とするPARK1とPARK2のUPSとの関わりについて述べる^{10, 11)}。

IV. α -シヌクレインとUPS

α -シヌクレインは140アミノ酸の神経特異的な蛋白質で神経終末に豊富に存在するが、その生理的役割は不明である。 α -シヌクレインの点突然変異によるミスセンス変異(A53T)で常染色体優性遺伝性Parkinson病になることが1997年明らかになり、その後2種類のミスセンス変異(A30P, E46K)が同定されたが、いずれもきわめてまれな変異で、日本人ではまだ見つからない。ところが、 α -シヌクレインがParkinson病の病理学的特長であるLewy小体の主成分であることが判明し、Parkinson病の鍵を握る分子として一躍注目を集めるようになった。さらに α -シヌクレインを含む染色体領域の二重複、三重複(従来PARK4と呼ばれていた家系)も優性遺伝の α -シヌクレインを引き起こすことがわかり、量的に増加するだけで発症につながる事が明らかになったことから、孤発性Parkinson病では α -シヌクレインの産生亢進、または分解低下が発症に関わるという考えがにわかに説得性を帯びるようになった。事実、 α -シヌクレインのトランスジェニック動物(マウス、ショウジョウバエ)では部分的にParkinson病の症状、病理所見を再現する。また、プロテアソーム阻害剤を全身的、または線条体局所に投与することによって α -シヌクレイン陽性細胞内凝集体形成を伴う黒質ドーパミン神経の変性が起こり、UPSの活性低下がParkinson病発症に結びつくという考えを裏付け

ている。最近、 α -シヌクレインはUPSのみならずリソソーム系、またはシャペロン介在性オートファジーによって分解されるとの証拠も提出されているので、オートファジーとParkinson病の関係も今後注目される。

V. ParkinとUPS

ParkinはPARK2, または常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の病因遺伝子であるが、UPSで重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ (E3) である。E3は前述のように基質蛋白質を特異的に認識する役割を担っていることから、Parkinの変異でE3活性が失われた結果基質蛋白質が蓄積するのがAR-JPの発症メカニズムであると考えられるようになった。現在までに10種類以上のParkinの基質候補が見つかったが、そのうち、蓄積による細胞死を最も明解に説明できる基質蛋白質が、われわれが同定したミスフォールド化パエル受容体 (Pael-R) である。Pael-Rはリガンド不明のG蛋白質共役型受容体である¹²⁾。Pael-Rを含めた新生膜蛋白質は小胞体でシャペロンの助けでフォールディングされる。正しい構造を取れた蛋白質は膜に送られるが、フォールディングに失敗し、ミスフォールド化した、いわばごみになった蛋白質は細胞質に再輸送されて、そこでUPSによって分解される。この膜蛋白質のごみ処理分解経路のことを小胞体関連分解 (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation; ERAD) と呼んでいるが、われわれはミスフォールド化Pael-RがERADにおいてParkinによってユビキチン化され、分解処理されることを突き止めた。ParkinのE3活性が失われると、ミスフォールド化Pael-Rは小胞体に蓄積して、小胞体ストレスを引き起こし、そのストレス応答の結果細胞死が起こるものと思われる。この考えに一致して、ショウジョウバエ、またはマウスでPael-Rを過剰発現するとドーパミンニューロンの変性脱落が観察される。ParkinノックアウトマウスではPael-Rを含めて既知の基質蛋白質の蓄積はみられず、ドーパミン神経細胞死も起こらない。この事実は基質の蓄積でAR-JPのメカニズムを説明できるかという根源的な疑問を生み出しているが、別の観点からは現在は困難

である不溶性蛋白質のわずかな量的変化を検出することが技術的に可能になれば、新しい証拠が得られる可能性がある。

おわりに

現在神経変性疾患の進行をとめたり、発症を予防するような有効な治療法は知られていないが、ここで述べてきたようなUPSとの関連で考えると、異常蛋白質の産生を抑制したり、あるいはその分解系を賦活化する治療法、あるいはミスフォールド化蛋白質がUPSを阻害する過程を抑制するような治療法が考えられる。またミスフォールド化蛋白質による神経変性誘発機構をより正確に理解することが、新しい治療法の確立に重要であろう。

文 献

- 1) Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH : Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296 : 1991-1995, 2002
- 2) Kopito RR : Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10 : 524-530, 2000
- 3) Schubert U, Anton LC, Gibbs J et al : Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404 : 770-774, 2000
- 4) Carrell RW, Lomas DA : Conformational disease. *Lancet* 350 : 134-138, 1997
- 5) Hershko A, Ciechanover A : The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67 : 425-479, 1998
- 6) Bence NF, Sampat RM, Kopito RR : Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292 : 1552-1555, 2001
- 7) Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R et al : Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17 : 351-365, 2005
- 8) Jana NR, Zemskov EA, Wang G et al : Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10 : 1049-1059, 2001
- 9) Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S et al : Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensi-

- tivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10 : 919-926, 2001
- 10) Cookson MR : The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 74 : 29-52, 2005
- 11) Moore DJ, West AB, Dawson VL et al : Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28 : 57-87, 2005
- 12) Takahashi R, Imai Y, Hattori N et al : Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci* 991 : 101-106, 2003

Ubiquitin-Proteasome System and the Strategies for the Therapeutics of Neurodegenerative Diseases

Ryosuke TAKAHASHI

Department of Neuology, Kyoto University Graduate School of Medicine

A growing body of evidence strongly suggests that accumulation of misfolded proteins constitutes the common pathogenetic mechanisms underlying various neurodegenerative disorders. Since ubiquitin-proteasome protein degradation system (UPS) plays a principal role in the degradation of cellular misfolded proteins, the impairment of UPS associated with aging may lead to development of sporadic neurodegenerative diseases. Moreover, misfolded proteins inhibit proteasomal activity when over expressed in the cell. Based on these lines of data, accumulation of misfolded protein and proteasomal impairment form a vicious cycle, leading to a catastrophic neurodegeneration and neuronal death. Familial Parkinson's diseases (PD) provide excellent examples for the involvement of UPS in Parkinson's disease. Missense mutations and gene multiplication mutations of α -synuclein, a neuron-specific presynaptic protein, are responsible for PARK1, an autosomal dominant form of familial PD. α -synuclein turned out to be a major component of Lewy body, suggesting that accumulation of α -synuclein leads not only to familial forms

but sporadic form of PD. Systemic or local striatal inhibition of proteasome induced dopaminergic cell loss accompanied by α -synuclein-positive intracellular aggregates, providing evidence that proteasomal impairment may be causative in sporadic PD. Parkin is the gene responsible for autosomal recessive familial parkinsonism (AR-JP), or PARK2. Parkin turned out to be a ubiquitin ligase, which specifically recognizes substrate protein (s), ubiquitinate them to promote their degradation. Among 10 different Parkin substrates, misfolded Pael-R is one of the best characterized one. Misfolded Pael-R is ubiquitinated with the help of Parkin in the endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD) pathway. When Parkin is mutated, misfolded Pael-R accumulates in the ER, leading to ER stress-induced apoptosis. Pael-R induced dopaminergic cell death is recapitulated in transgenic *Drosophila* and mice. Based on these findings, future therapeutics against intractable neurodegenerative diseases should include downregulation of the causative misfolded proteins and/or enhancement of UPS.

アポトーシス研究の現状と今後の展望*

高橋 良輔¹

はじめに

アポトーシスは英国の病理学者 Wylie, Kerr らによって形態学的に細胞が縮み、クロマチンが濃縮する特異な形態をとる細胞死として記載、命名された。機能的にはアポトーシスは細胞の自爆に例えられるように、シグナル伝達により積極的に引き起こされる細胞死である。多細胞生物では発生過程において、多くの細胞がアポトーシスを起こして正しい形態形成が行われることが知られており、プログラム細胞死と同義で使われることもある。一方、アポトーシスは発生過程だけでなく、成体となってからも DNA 損傷を起こした細胞、不要になった炎症細胞などの除去に使われており、その阻害は癌や自己免疫疾患につながると考えられる。また、逆にアポトーシスが死ぬべきでない正常な細胞に起こると、AIDS や神経変性疾患の発症に結びつくと考えられる。

このような観点から、アポトーシスの分子レベルでの理解は様々なヒトの疾患の発症メカニズムの解明と治療法開発に非常に重要である¹⁾。これまでの研究により、アポトーシスはカスパーゼというシステインプロテアーゼの活性化によって起こることが明らかになってきた。

本稿では、これまでにその概略が明らかにされたアポトーシスのシグナル伝達経路の基本骨格をカスパーゼの役割を中心に述べ、ついでカスパー

ゼ非依存的細胞死について紹介し、さらにアポトーシスと呼吸器疾患との関連についても言及する。

アポトーシスのシグナル伝達経路(1):
内因性経路(intrinsic pathway)

この10年のアポトーシス研究で明らかになった最も重要なことの一つは、ミトコンドリアがアポトーシスのセンサーとして重要な役割を果たしている事実である²⁾。細胞に様々なアポトーシス誘発刺激(栄養因子除去, 酸化ストレス, DNA 障害)が加わると、ミトコンドリアの外膜の透過性上昇(mitochondrial outer membrane permeabilization: MOMP)が起こり、膜間スペースに存在する蛋白質の一部が細胞質に漏出することによって細胞死の引き金が引かれる。MOMPの分子基盤となっているのは Bcl-2 ファミリーに属する Bax と Bak という多ドメイン蛋白質である。BAX と BAK は BH3-only protein と呼ばれるアポトーシス誘発性 Bcl-2 ファミリー分子の働きによって凝集(オリゴマー化)し、その結果 MOMP が生じる。MOMP が一旦起こると、ミトコンドリアの膜間スペースからシトクロム c が細胞質に放出され、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子(APAF-1)のオリゴマー化を惹起して、アポトソーム(apoptosome)と呼ばれる蛋白質複合体が形成される。アポトソーム複合体はプ

* Apoptosis Research: The current status and future prospects

¹ 京都大学医学部神経内科(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54) Ryosuke Takahashi: Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine

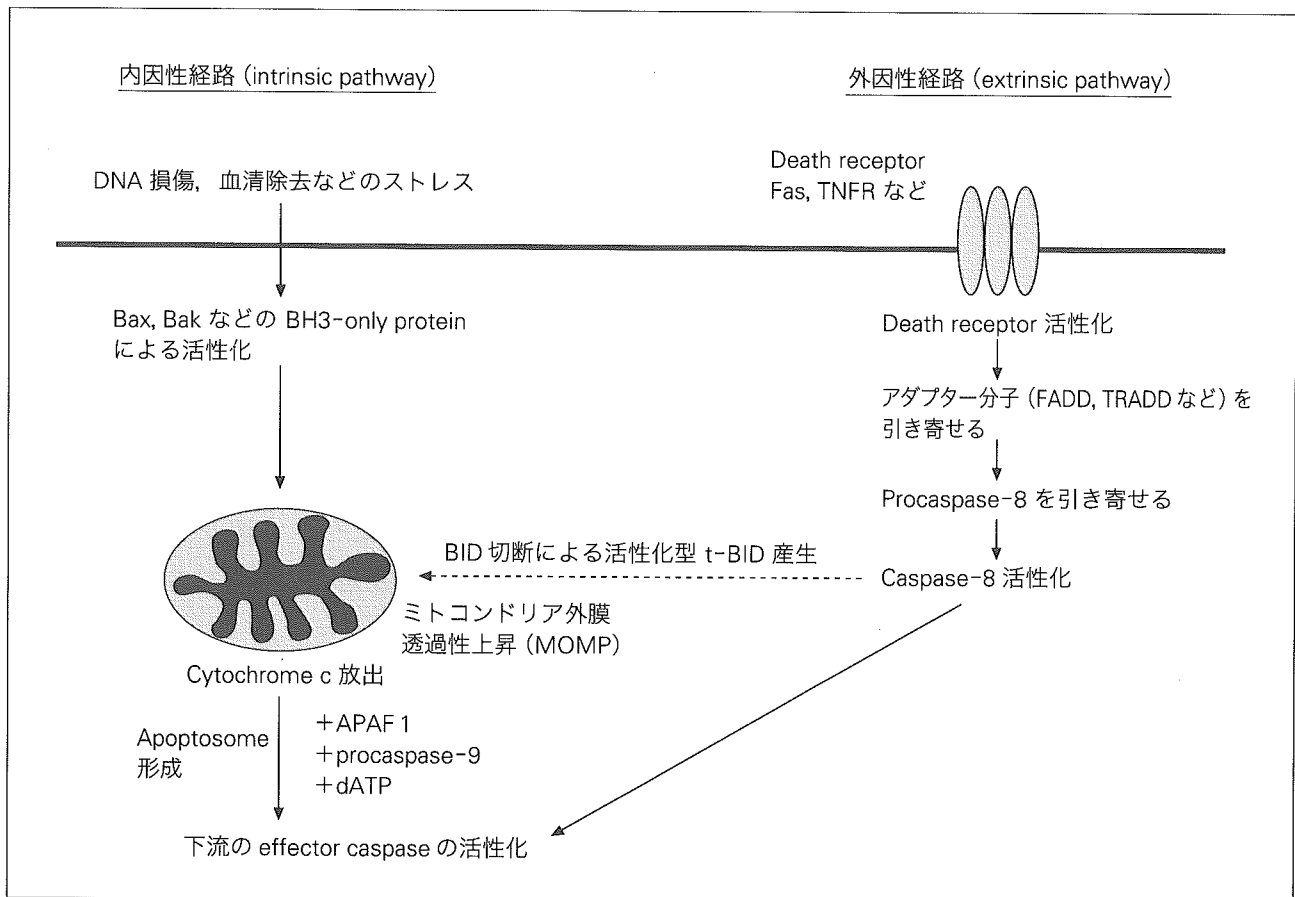


図1 アポトーシスの内因性経路と外因性経路

ロカスパーゼ9を引き寄せて活性化型のカスパーゼ-9に変換し、カスパーゼ-9は下流の実行型カスパーゼ(executioner caspase)であるカスパーゼ-3,-7などを限定分解することによって活性化し、アポトーシスが誘導される。ミトコンドリアを介するこのような経路は内因性経路(intrinsic pathway)と呼ばれており、様々な種類のアポトーシスの基本シグナルとなっている(図1)³⁾。

アポトーシスのシグナル伝達経路(2)： 外因性経路(extrinsic pathway)

一方、細胞膜に局在する受容体のリガンドによる刺激でアポトーシスが誘発されることも明らかになっており、これを外因性経路(extrinsic pathway)と呼ぶ(図1)。例えば、腫瘍壊死因子(TNF)がその受容体であるI型TNF受容体(TNFR1)に結合すると、TNF-associated death domain(TRADD)やFAS-associated death domain(FADD)が引き寄せられ、プロカスパーゼ-

8の結合と活性化をもたらす。この場合の活性化のメカニズムは近接誘導モデル(induced proximity model)で説明されている⁴⁾。すなわち、不活性の前駆体であるプロカスパーゼ-8数分子がTRADDまたはFADDのようなアダプター分子の仲介によって引き寄せられ、近接化してオリゴマー形成をすることによって活性化が起こる。このようにして活性化されたカスパーゼ-8が内因性経路のカスパーゼ-9と同様の役割を果たし、実行型カスパーゼを活性化してアポトーシスを引き起こす。しかし、ある種の細胞では外因性経路に反応するだけでなく、カスパーゼ-8を介する別経路によるシグナルの増幅が必要な場合がある。これは細胞質に存在するBH3-interacting domain death agonist(BID)というBH3-only proteinがカスパーゼ-8によって限定分解されてt-BIDという活性化型を生み出す経路である。t-BIDはBaxやBakの構造変化を引き起こして、MOMPを誘導する。このt-BIDが働く細胞では

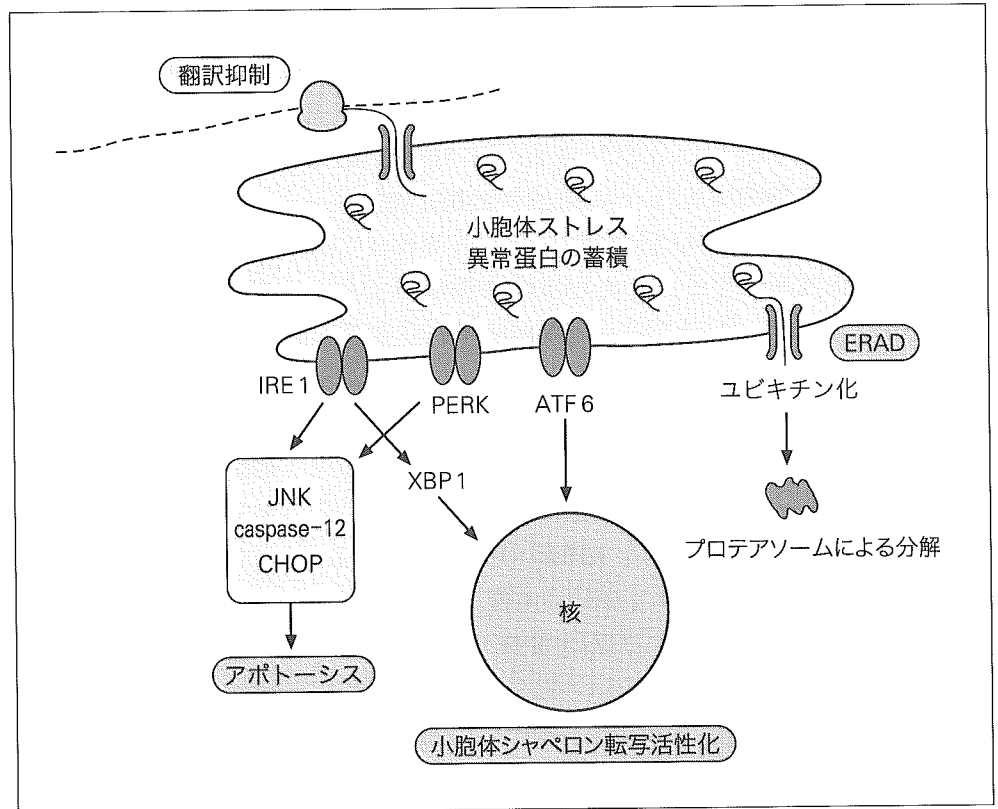


図2 小胞体ストレス応答とアポトーシスの経路

外因性経路に加えて内因性経路が利用されることになる。

**アポトーシスのシグナル伝達経路(3) :
小胞体経路(ER pathway)**

小胞体は膜蛋白質や分泌性蛋白質の品質管理を行う細胞内小器官であり、新生した分泌系蛋白質が翻訳と共役して常に小胞体内腔に送り込まれ、小胞体シャペロンがそのような分子の折り畳み(folding)を助けている。小胞体内腔に折り畳みが完了していない(unfolded protein)または折り畳みに失敗した蛋白質(misfolded protein)が小胞体に過剰に蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ^{5,6)}。小胞体ストレスはストレス応答として、小胞体センサー分子IRE1, ATF6, PERKなどを介して、小胞体シャペロンの転写活性化、翻訳の全般的抑制などを引き起こし、ストレスを回避しようとするが、これらの手段で間に合わない場合にはアポトーシスを起こす(図2)⁶⁾。

アポトーシスを起こす経路には諸説あるが、次の3種類の経路が有力といわれている。第1はセンサー分子IRE1がアダプター分子TRAF2と

結合し、TRAF2がASK1を活性化して向細胞死的に働く蛋白質キナーゼJNKを活性化する経路である⁷⁾。第2はATF6経路とPERK経路の両方で転写が誘導される転写因子CHOPによる経路である⁸⁾。CHOPの下流のシグナルはまだよくわかっていない。第3はカスパーゼ-12を介する経路である⁹⁾。カスパーゼ-12は小胞体膜の細胞質側に存在し、小胞体ストレスの際は切断され、活性化されて小胞体から遊離し、カスパーゼ-9を活性化するらしい。カスパーゼ-12のノックアウト細胞では小胞体ストレスによる細胞死は抑制される。ヒトではカスパーゼ-12に相当するカスパーゼは配列上活性を失っているが、ヒトではカスパーゼ-4が小胞体ストレス誘起性細胞死の担い手とする報告がある¹⁰⁾。

アポトーシス阻害因子とその制御

上記のようなアポトーシスはアポトーシス阻害因子(inhibitor of apoptosis proteins : IAP)と呼ばれる内因性のカスパーゼ阻害因子によって制御されることが知られている¹¹⁾。IAPはBIR(Baculovirus IAP repeat)ドメインと呼ばれる金属結

合モチーフを持つことが構造上の特徴で、8種類知られるヒトのIAPのうち、最も細胞死抑制効果が強いとされる XIAP はカスパーゼ-3, -7, -9 を阻害する。ショウジョウバエのIAPは発生過程の細胞死を制御するうえで中心的な役割を果たしているが、マウスのIAPはノックアウトしても著しい表現型はなく、これが生理的役割が大きくないことを示しているのか、類似分子により補償されているためなのか、明らかではない。ただ、ヒトのミトコンドリア膜間スペースには second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) と high-temperature-requirement protein A2 (HtrA 2)/Omi と呼ばれる2種類のIAP阻害因子が存在し、アポトーシスが起る際にはともに MOMP によって細胞質に放出されてIAPの機能を抑制することが知られていることから、哺乳類においてもIAPはアポトーシスを常に抑制する構成的因子として一定の役割を果たしているものと考えるのが妥当である^{12,13}。

カスパーゼ非依存性細胞死

アポトーシスは以上に述べてきたようにカスパーゼ依存性な細胞死を起こすが、細胞はカスパーゼの活性を抑制した状態でアポトーシス刺激を受けても死んでしまうことがある。これをカスパーゼ非依存性細胞死(caspase-independent cell death: CICD)と呼んでいる³。線虫のプログラム細胞死はカスパーゼに依存性であり、CICDが存在するという積極的な証拠はない。しかし脊椎動物ではカスパーゼ阻害剤の存在下や Apaf-1, カスパーゼ-9, カスパーゼ-3などのミトコンドリアの下流のアポトーシスシグナル分子を欠損した細胞で、ミトコンドリアクリステの膨化や細胞質の空胞形成などを特徴とする、形態的にアポトーシスとは大きく異なる細胞死が観察される。外因性経路においても、FADDやreceptor-interacting protein (RIP) 依存性にカスパーゼ活性を阻害した条件下でCICDが観察される。このシグナル経路の詳細は不明であるが、アポトーシス時にミトコンドリアから細胞質に放出される apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G, HtrA 2/Omi が関与しているとの考えもある。

また、本来は生存維持の方向に働くとされる autophagy が細胞死を誘導する可能性も提示され、注目されている¹⁴。

呼吸器疾患とアポトーシス

呼吸器科疾患では、最近、acute respiratory distress syndrome (ARDS), 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に伴う肺気腫, 喘息, 肺線維症におけるアポトーシスの関与が注目されている¹⁵。これらにトピックスに関しては本特集号でそれぞれの領域の専門家が論文を寄せられているので、以下にごく簡単に紹介する。ARDSでは多核白血球のアポトーシスの遅延と内皮・上皮細胞のアポトーシス増加が病因に関与していることが示唆されている^{16,17}。前者には生存促進作用を持つ granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) や granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の関与が、後者には外因性経路 (Fas/Fas ligand system), 内因性経路 (ストレス), nitric oxide などの関与が疑われている。COPD に伴う肺気腫に関しては、プロテアーゼおよびその阻害因子の不均衡, 酸化ストレス, 喫煙, マクロファージ, 白血球, CD8陽性T細胞による慢性炎症などが病因として挙げられている一方、肺気腫における肺胞壁の破壊には肺上皮および内皮細胞のアポトーシスが伴うことが組織学的に示されている¹⁷。COPDにおけるアポトーシスの誘因として直接的, 間接的に喫煙と酸化ストレスが働いているものと思われる。喘息の原因は不明だが、気道のリモデリングと気道・肺の好酸球, CD4陽性T細胞, マスト細胞の増加を伴う慢性炎症が原因に関わっていると思われる¹⁸。ex vivoの研究では、喘息患者における末梢のCD4陽性T細胞や好酸球のアポトーシスの減少が観察され、炎症を惹起しているのかもしれない。副腎皮質ステロイドの効果は、一部は炎症に関与する細胞のアポトーシスを誘導するところにあるものと思われるが、in vivoの研究では、この効果は β_2 アドレナリン受容体アゴニストによって拮抗されるとの注目すべき報告がなされている¹⁹。肺線維症における線維化は、肺上皮細胞のアポトーシスに二次的に生じる可能性が指摘

されている²⁰⁾。肺胞上皮細胞のアポトーシスの増加は、患者でも、げっ歯類における bleomycin 誘発性肺線維症でもみられ、後者に関してはアポトーシスも線維化もカスパーゼ阻害剤によって抑制される。肺胞上皮細胞のアポトーシスには Fas による外因性経路、アンジオテンシン、活性化 T 細胞が産生する perforin, interleukin-13 刺激, transforming growth factor β 1 の活性化などの関与が示唆されている²¹⁾。

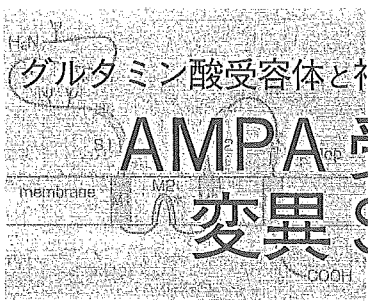
おわりに

アポトーシスと関連する細胞死の基本的なシグナル経路が解明され、様々な呼吸器疾患との関わりも最近明らかになってきた。一般的に言って、肺構造の破壊は肺上皮および内皮細胞の細胞死増加と炎症細胞のアポトーシス阻害によって引き起こされるようである。したがって、アポトーシスの阻害は強力な治療法になりうるが、タイミングよく、細胞特異的に効果が得られるように行わないと重大な副作用を来す恐れがある。今後は疾患におけるアポトーシスの役割の詳細をさらに明らかにし、分子メカニズムの正確な理解に基づいた治療法を開発する必要がある。

〔謝辞：図の作成に協力してくれた田代善崇君(京都大学大学院医科学修士課程)に感謝します。〕

文 献

- Rudin CM, Thompson CB: Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 48: 267-281, 1997
- Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998
- Chipuk JE, Green DR: Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 268-275, 2005
- Salvesen GS, Dixit VM: Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10964-10967, 1999
- Mori K: Frame switch splicing and regulated intramembrane proteolysis: key words to understand the unfolded protein response. *Traffic* 4: 519-528, 2003
- Yoshida H, Okada T, Haze K, et al: Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF- κ B (CBF) and activating transcription factors 6 α and 6 β that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 21: 1239-1248, 2001
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al: ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16: 1345-1355, 2002
- Oyadomari S, Mori M: Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11: 381-389, 2002
- Momoi T: Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 28: 101-105, 2004
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, et al: Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol* 165: 347-356, 2004
- Salvesen GS, Duckett CS: IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 401-410, 2002
- Du C, Fang M, Li Y, et al: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42, 2000
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al: A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-621, 2001
- Tsujimoto Y, Shimizu S: Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 12(Suppl 2): 1528-1534, 2005
- de Souza PM, Lindsay MA: Apoptosis as a therapeutic target for the treatment of lung disease. *Curr Opin Pharmacol* 5: 232-237, 2005
- Matute-Bello G, Martin TR: Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit Care* 7: 355-358, 2003
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A: Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125: 626-632, 2004
- Jayaraman S, Castro M, O'Sullivan M, et al: Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma. *J Immunol* 162: 1717-1722, 1999
- Tse R, Marroquin BA, Dorscheid DR, White SR: Beta-adrenergic agonists inhibit corticosteroid-induced apoptosis of airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L393-404, 2003
- Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, et al: Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 275: L1192-1199, 1998
- Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, et al: Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor β 1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 200: 377-389, 2004



グルタミン酸受容体と神経疾患

AMPA受容体と変異SOD1タンパク質異常

館野 美成子 高橋 良輔

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) は、上位および下位運動ニューロンが選択的かつ系統的に障害される代表的な進行性神経変性疾患である¹⁾。有病率は人口 10 万人当たり 2~7 人で、患者の多くは孤発性だが約 10% は家族性を示す。1993 年に家族性 ALS の最初の原因遺伝子としてスーパーオキシドジスムターゼ 1 superoxide dismutase 1 (SOD 1) が同定されて以来、変異 SOD 1 は ALS 発症分子機構を解く鍵として精力的に研究されてきた^{1,2)}。本稿では、家族性 ALS のモデルマウスである変異 SOD 1 トランスジェニックマウスにおいて、下位運

動ニューロンで特異的に発現しているカルシウム透過型 AMPA 受容体が、変異 SOD 1 タンパクの構造変換を促進し ALS 発症を促す因子であることを紹介する。

変異 SOD 1 タンパクの細胞毒性：異常タンパク仮説

SOD 1 は真核細胞の細胞質で主力となる活性酸素除去酵素で、酸素呼吸の副産物として生成されるスーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) の過酸化水素への変換を触媒する¹⁾。この SOD 1 遺伝子の変異が家族性 ALS の原因として発表された当時は、誰もが SOD 1 活性の低下が ALS の発症要因と考えたことであろう。しかしその予想は見事に打ち砕かれた。これまでの研究より、ALS を引き起こす SOD 1 変異は機能獲得型 (gain-of-function) であること、即ち、変異によって SOD 1 タンパクが新たに獲得した (未知の) 毒性によることが示されている^{1,2)}。

図 1 に変異 SOD 1 タンパクの毒性として最も支持されている仮説：異常タンパク仮説を紹介する^{2,3)}。これは変異 SOD 1 タンパクの立体構造が変化して凝集化したもの、または凝集途上の中間体 (構造異常体) が細胞毒性を有し、運動ニューロン変性が引き起こされる、という考え方である。SOD 1 はわずか 153 個のアミノ酸からなる小さなタンパクだが、ALS 患者から同定された変異は 100 種類以上に及び、変異箇所はタンパクのほぼ全域に散在している。変異 SOD 1 タンパクの多くは立体構造が不安定化で凝集しやすく、酸化修飾を受けると巨大な凝集塊を形成しうることが示されている^{3,4)}。SOD 1 構造異常体が有する細胞毒性の実態はまだ明らかにされていないが、SOD 1 変異をもつ家族性 ALS 患者やトランスジェニックマウスの残存脊髄運動ニューロン内には抗 SOD 1 抗体陽性の凝集体が観察されており^{5,6)}、このことから異常タンパク仮説が強く支持

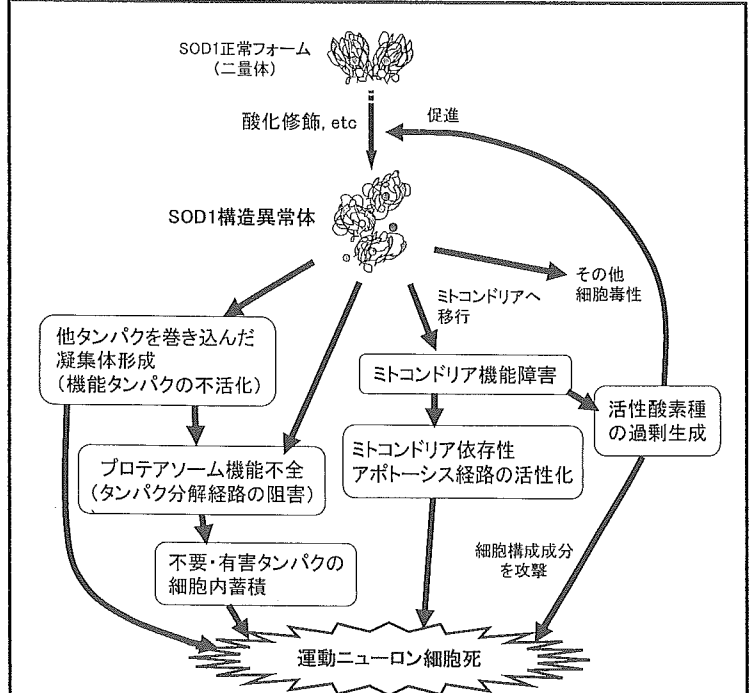


図 1 変異 SOD 1 タンパクの細胞毒性：異常タンパク仮説
変異 SOD 1 タンパクは立体構造が不安定で、酸化修飾を受けると凝集化が促進される^{3,4)}。このような構造異常体は、主にミトコンドリアやプロテアソームの機能障害を引き起こすことで運動ニューロン変性を導くと考えられている²⁾。

たての みなこ 国立精神・神経センター神経研究所/疾病研究第 5 部長
たかはし りょうすけ 京都大学教授/大学院医学研究科臨床神経学

カルシウム透過型 AMPA 受容体の減少による ALS 発症遅延と延命効果

chat-GluR2-Tg ライン	Transgene コピー数	GluR 2 発現量 ^a	chat-GluR2-Tg x hSOD1 ^{G93A} -Tg で得られた littermates 間での 発症時期 ^b ・生存期間の比較(日齢, Mean±SEM)				p value ^c
			hSOD1 ^{G93A} /+	chat-GluR2/+ ; hSOD1 ^{G93A} /+	GluR 2 増加による遅延効果		
Tg 7	10	0.96	発症時期	219.7±3.0	262.2±2.9	+42.5(=19.3%)	0.0001
			生存期間	262.5±4.5	300.1±3.9	+37.6(=14.3%)	0.0001
Tg 10	16	4.78	発症時期	219.8±2.6	238.5±2.7	+18.7(=8.6%)	0.0001
			生存期間	264.5±2.2	279.7±3.1	+15.2(=5.8%)	0.0005
Tg 3	2	1.58	発症時期	225.6±1.0	230.4±1.0	not significant	>0.05
			生存期間	267.1±5.1	273.3±5.2		

^a 脊髄運動ニューロンにおける *GluR2* mRNA 総量を定量化し, non-transgenic littermates における発現量(=1.0)に対する相対値として表記.

^b Rotarod test におけるスコア(運動能力)が急低下する時期として判定.

^c 各遺伝子型 littermates 10~15 匹における値を ANOVA+post hoc Fisher's PLSD 法で検定.

脊髄においてほぼ運動ニューロン特異的に *GluR2* 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス; *chat-GluR2*-Tg と家族性 ALS モデルマウス; *hSOD1^{G93A}*-Tg とのダブルトランスジェニックマウスでは, *GluR2* 発現量に応じて発症時期と生存期間の延長が認められた⁹⁾.

されている.

カルシウム透過型 AMPA 受容体による ALS 発症促進効果

しかし, なぜ病変部位でのみ変異 SOD1 タンパクの凝集化が認められるのだろうか. SOD1 変異をもつ ALS 患者やトランスジェニックマウスでは, 変異タンパクはもちろん全身の細胞で発現している. にも関わらず, 変異 SOD1 が病変部位特異的に構造変換・蓄積するならば, 細胞種特異的な促進要因があるはずである. この問題に対して我々は, 孤発性 ALS に対して以前から提唱されていたグルタミン酸仮説に注目した^{7,8)}. シナプス間隙に放出されたグルタミン酸はシナプス後細胞膜上のグルタミン酸受容体に結合・活性化することで興奮性刺激を伝えるが, グルタミン酸受容体の過度の刺激は神経細胞死を引き起こす(神経興奮毒性). グルタミン酸に対する脆弱性は神経細胞の種類によって異なるが, ALS で障害される脊髄運動ニューロンはグルタミン酸に対して極めて脆弱であること, 孤発性 ALS 患者の脳脊髄液中ではグルタミン酸濃度が上昇していることなどから, ALS における運動ニューロン変性にグルタミン酸毒性が関与している可能性が指摘されていた. さらに薬理的解析から, 脊髄運動ニューロンの高いグルタミン酸脆弱性はカルシウム透過型の AMPA 受容体を介していることが示唆された. AMPA 受容体は通常カルシウム非透過型だが, 脊髄運動ニューロンを含む, ごく限られたニューロンではカルシウム透過型も発現しているのである.

そこで我々は, このカルシウム透過型 AMPA 受容体と ALS における運動ニューロン変性との関係を追及することにした. AMPA 受容体は 4 種類のサブユニット *GluR1-4* がランダムに会合した 4 量体であり, カルシウム透過性は通常 *GluR2* サブユニットの有無で決定される. 即ち *GluR2* を含む受容体は非透過型, 含まずに会合すると透過型となる. 我々は脊髄運動ニューロンの *GluR2* 発現量を特異的に上げることにより AMPA 受容体のカルシウム透過性が低下したトランスジェニックマウス(*chat-GluR2*-Tg)を作成した⁹⁾. そして代表的な ALS モデルマウスである *hSOD1^{G93A}*-Tg(93 番目のグリシンをアラニンに置換したヒト変異 SOD1 遺伝子を導入)と交配し, ALS 発症時期・生存期間について littermates 間で比較した(表). *GluR2* 発現量が最も増大したライン(Tg7:野生型マウスの約 5 倍)では, 脊髄運動ニューロンにおける AMPA 受容体の大半がカルシウム非透過型を示し, 発症時期が 42.5 日(=19.3%), 生存期間が 37.8 日(=14.3%)も遅延することがわかった. *GluR2* 発現量の低いラインでは発症遅延・延命効果も低く, AMPA 受容体のカルシウム透過性と発症までの期間には相関関係が認められた. 一方, AMPA 受容体をカルシウム透過性にする変異(RNA 編集部位のアミノ酸をアスパラギンに置換)をもつ *GluR2* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは, 中年以降に ALS 様の運動能力低下を示すこと, さらにこの Tg マウスや *GluR2* ノックアウトマウスを *hSOD1^{G93A}*-Tg と交配すると発症が早まり, 生存期間が短縮されることが報告された^{10,11)}. これらの結果より, カルシウム透過型 AMPA 受容

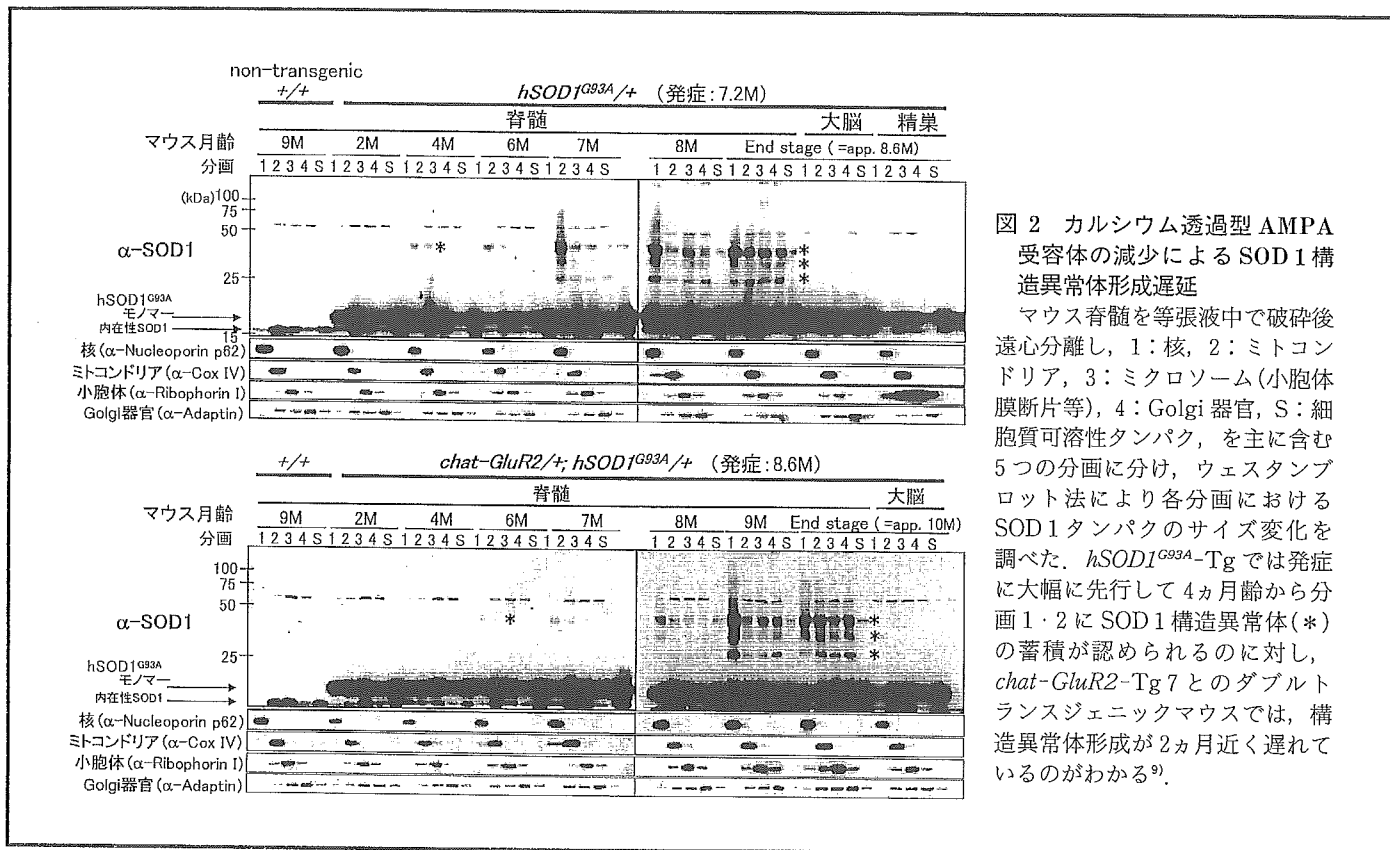


図2 カルシウム透過型 AMPA 受容体の減少による SOD1 構造異常体形成遅延

マウス脊髄を等張液中で破砕後遠心分離し、1:核、2:ミトコンドリア、3:マイクロソーム(小胞体膜断片等)、4:Golgi 器官、S:細胞質可溶性タンパク、を主に含む5つの分画に分け、ウェスタンブロット法により各分画における SOD1 タンパクのサイズ変化を調べた。*hSOD1^{G93A}-Tg* では発症に大幅に先行して4ヵ月齢から分画1・2に SOD1 構造異常体(*)の蓄積が認められるのに対し、*chat-GluR2-Tg7* とのダブルトランスジェニックマウスでは、構造異常体形成が2ヵ月近く遅れているのがわかる⁹⁾。

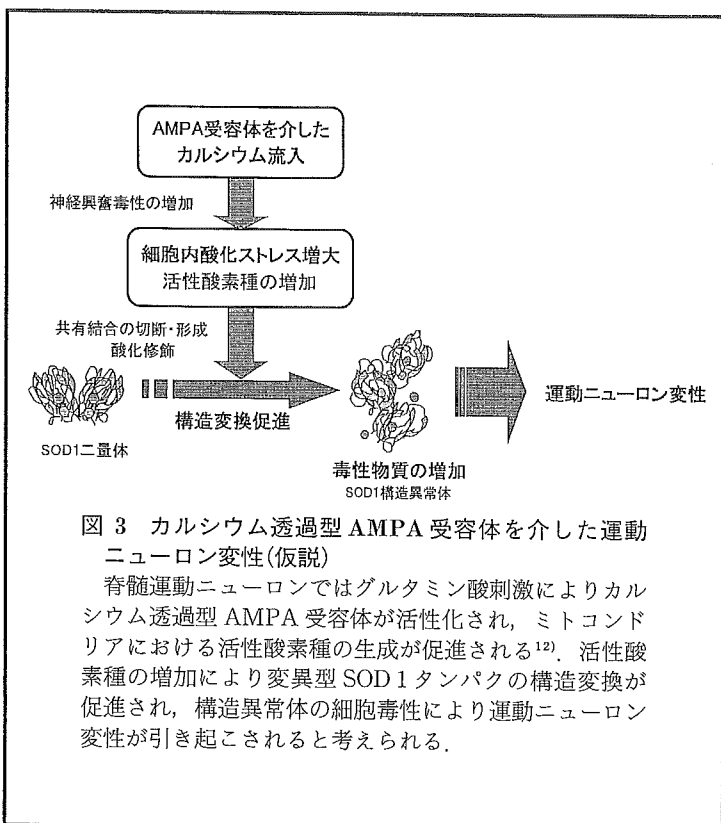


図3 カルシウム透過型 AMPA 受容体を介した運動ニューロン変性(仮説)

脊髄運動ニューロンではグルタミン酸刺激によりカルシウム透過型 AMPA 受容体が活性化され、ミトコンドリアにおける活性酸素種の生成が促進される¹²⁾。活性酸素種の増加により変異型 SOD1 タンパクの構造変換が促進され、構造異常体の細胞毒性により運動ニューロン変性が引き起こされると考えられる。

体は運動ニューロン変性の促進因子であり、変異 SOD1 の存在下では変異 SOD1 タンパクの毒性を促進して ALS 発症を早める危険因子であることが示された。

カルシウム透過型 AMPA 受容体による SOD1 構造異常体形成促進

次に我々は、カルシウム透過型 AMPA 受容体が変異 SOD1 毒性を促進するメカニズムについて解析した。異常タンパク仮説を踏まえ、マウス脊髄の細胞分画を行い、毒性を有するとされる構造異常体の細胞内分布・出現時期に及ぼす影響を調べた(図2)⁹⁾。*hSOD1^{G93A}-Tg* では発症の3ヵ月前(4ヵ月齢)には核およびミトコンドリア分画に SOD1 構造異常体が検出され、発症期には他分画にも広がり、病気の進行とともに飛躍的に蓄積していく。これに対し *chat-GluR2-Tg7* とのダブルトランスジェニックマウスでは、構造異常体の出現パターンは変わらないが出現時期が2ヵ月近く遅れていた。この結果は AMPA 受容体のカルシウム透過性が下がると SOD1 構造異常体の形成が遅れることを示している。変異 SOD1 タンパクの構造変換は酸化修飾によって著しく促進されるので^{3,4)}、脊髄抽出液中のタンパクの酸化修飾レベルを代表的な酸化修飾であるカルボニル化を指標に定量化した⁹⁾。*hSOD1^{G93A}-Tg* では

構造異常体の出現と同調してカルボニル化されたタンパク量が上昇するが、Tg7とのダブルトランスジェニックマウスでは構造異常体の遅延と同様に約2ヵ月遅れていた。よってカルシウム透過型 AMPA 受容体の発現は運動ニューロン内における酸化修飾反応を促進し、その結果、変異 SOD1 タンパクの構造変換が促進されている可能性が強く示唆された。培養下の脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸刺激後、AMPA 受容体を介して流入したカルシウムが一過的にミトコンドリアに移行して、ミトコンドリアにおける活性酸素種の生成増大をもたらすことが報告されている¹²⁾。これらの結果を総合すると、脊髄運動ニューロンではグルタミン酸に曝されるたびにカルシウム透過型 AMPA 受容体を介して細胞内酸化ストレスが上昇し、過剰に生成された活性酸素種が変異 SOD1 タンパクの構造変換を促進する、という反応が繰り返されていることが予想される(図3)¹³⁾。

■ むすび

本稿では家族性 ALS モデルマウスでの知見をもとに、脊髄運動ニューロンが特異的に発現している AMPA 受容体のサブタイプ(カルシウム透過型)が、細胞内酸化ストレスの上昇を介して原因遺伝子産物の毒性型への変換を促進している可能性を紹介した。紙面の都合上割愛したが、孤発性 ALS においてもカルシウム透過型 AMPA 受容体の増加と発症との関係が注目されている¹⁴⁾。GluR2 サブユニットは RNA 編集による厳密な制御を受けており、この編集機構が破綻した場合にも受容体はカルシウム透過性となる。孤発性 ALS 患者の脊髄運動ニューロンでは GluR2 の編集効率が有意に低下しており、よって家族性 ALS における変異 SOD1 タンパクと同様に、ある種のタンパクの酸化修飾・構造変換が亢進されて運動ニューロン変性が引き起こされている可能性が考えられる。したがって、この受容体サブタイプを特異的に阻害または減少させる手段が開発できれば、現在有効な治療法のない ALS 患者一般を救うことができるかもしれない。

文 献

- 1) Julien JP. Amyotrophic lateral sclerosis : unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*. 2001 ; 104 : 581-91.
- 2) Bruijn L, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*. 2004 ; 27 : 723-49.
- 3) Valentine JS, Hart PJ. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 ; 100 : 3617-22.
- 4) Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, et al. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2002 ; 83 : 1030-42.
- 5) Shibata N, Asayama K, Hirano A, et al. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci*. 1996 ; 18 : 492-8.
- 6) Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, et al. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis*. 2001 ; 8 : 933-41.
- 7) Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2000 ; 247 Suppl 1 : I17-27.
- 8) Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters : animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis*. 2004 ; 15 : 461-73.
- 9) Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, et al. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet*. 2004 ; 13 : 2183-96.
- 10) Kuner R, Groom AJ, Bresink I, et al. Late-onset motor neuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 ; 102 : 5826-31.
- 11) Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, et al. GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 ; 64 : 605-12.
- 12) Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, et al. AMPA exposures induce mitochondrial Ca⁽²⁺⁾ overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci*. 2000 ; 20 : 240-50.
- 13) Rao SD, Weiss JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2004 ; 27 : 17-23.
- 14) Kwak S, Kawahara Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med*. 2005 ; 83 : 110-20.

Research Report

Tonic–clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine–treated mice

Hideo Hagihara^a, Mizumi Hara^a, Kyouko Tsunekawa^a, Yukinori Nakagawa^{a,b},
Makoto Sawada^c, Kiwao Nakano^{a,*}

^aNagoya University Bioscience and Biotechnology Center, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

^bJSPS Research Fellowship for Young Scientists, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

^cResearch Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

Accepted 24 May 2005

Available online 14 July 2005

Abstract

Epileptic seizures cause severe and long-lasting events on the architecture of the brain, including neuronal cell death, accompanied neurogenesis, reactive gliosis, and mossy fiber sprouting. However, it remains uncertain whether these functional and anatomical alterations are associated with the development of hyperexcitability, or as inhibitory processes. Neurotrophic factors are probable mediators of these pathophysiological events. The present study was designed to clarify the role of various neurotrophic factors on the pilocarpine model of seizures. At 4 h following pilocarpine-induced seizures, expression of NGF, BDNF, HB-EGF, and FGF-2 increased only in the mice manifesting tonic–clonic convulsions and not in mice without seizures. NT-3 expression decreased in pilocarpine-treated mice experiencing seizures, tonic–clonic or not, compared to mice with no seizures. Neuronal cell damage, which was evident by Fluoro-Jade B staining, was observed within 24 h in the mice exhibiting tonic–clonic seizures, followed by an increase in the number of BrdU-positive cells and glial cells, which were evident after 2 days. None of these pathophysiological changes occurred in the mice which showed no seizures, although they were injected with pilocarpine, nor in the activated epilepsy-prone EL mice, which experienced repeated severe seizures. Together, these results suggest that neuronal damage occurring in the brain of the mice manifesting tonic–clonic seizures is accompanied by neurogenesis. This sequence of events may be regulated through changes in expression of neurotrophic factors such as NGF, BDNF, HB-FGF, and NT-3. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Disorders of the nervous system

Topic: Epilepsy, basic mechanisms

Keywords: Epilepsy; EL mouse; NGF; BDNF; NT-3; HB-EGF; FGF-2 neuronal progenitor cell; Seizure

1. Introduction

Severe or repeated seizures cause various pathophysiological changes, including neuronal cell death, accompanied neurogenesis, reactive gliosis, and mossy fiber sprouting.

Abbreviations: NGF, nerve growth factor; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EGF, epidermal growth factor; HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; NT-3, neurotrophin 3

* Corresponding author. Nagoya Keizai University, Uchikubo 61-1, Inuyama, Aichi 484-8503, Japan. Fax: +81 568 67 4299.

E-mail address: kinakano@nagoya-ku.ac.jp (K. Nakano).

Enhanced neurogenesis was demonstrated in various models of epilepsy, including chemical [2,15,18] and electrical kindling [15,19,24]. Hippocampal sclerosis, including activation of astrocytes and microglia [28,30], is often observed in temporal lobe epilepsy with a concomitant marked loss of hippocampal neurons [5,15]. Mossy fiber synaptic reorganization is the commonly encountered change in human epileptic hippocampus [8], and in an animal model of epilepsy [27]. However, the relationship of these events remains unclear. Furthermore, it is still controversial whether these functional and anatomical alterations may be associated