

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

異常蛋白蓄積による運動系神経変性疾患の

治療法開発にむけた病態解明

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋 良輔

分担研究者 三澤日出巳

平成18(2006)年3月

目次

I 総括研究報告

- 異常蛋白蓄積による運動系神経変性疾患の治療法開発にむけた病態解明 3
高橋良輔

II 分担研究報告

1. プロテアソームサブユニット pmsc4 のコンディショナルノックアウトマウス作製および H₂A2 の基質タンパク質の同定 6
高橋良輔
2. 運動ニューロン特異的ノックアウトシステムを用いた神経変性メカニズムの研究 13
三澤 日出巳

III 研究成果の刊行に関する一覧表 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷り 18

異常蛋白蓄積による運動系神経変性疾患の治療法開発にむけた病態解明

研究代表者:高橋良輔 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・教授

研究要旨 神経変性疾患全般に関して、構造異常を来し、不溶化、凝集する傾向をもつ異常蛋白質、すなわちミスフォールド蛋白質の蓄積が発症要因として有力視されている。本計画ではミスフォールド蛋白質を分解処理する蛋白質分解系の機能低下が、重篤な運動機能障害を来す神経変性疾患である ALS および線条体黒質変性症の発症要因になるという仮説を動物モデル、細胞モデル、および患者の剖検検体解析を通じて検証することを目的とする。ALS に関しては平成 17 年度はミスフォールド蛋白質を処理する主要な細胞質のマシナリーであるプロテアソームを運動ニューロン特異的にコンディショナルにノックアウトするマウスの作製をめざし、26S プロテアソームの 19S 複合体の基部に位置する ATPase サブユニットである pmsc4 のエキソン 7-11 部位をノックアウトの目標とし、ES 細胞で組み替え体を得ることに成功した。一方、我々がすでに確立した脊髄運動ニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現する VChAT-Cre マウスにミトコンドリアに局在する MnSOD(SOD2)の floxed マウスを掛け合わせ、運動ニューロン特異的 SOD2 ノックアウトマウスを作製した。運動ニューロンの生存に異常はなかったが、軸索切断を行うと、軸索変性がより顕著に現れた。また、SND に関しては線条体ニューロンの生存維持に重要な役割を果たし、ミトコンドリアにおいて不要蛋白質を処理分解する機能を有すると考えられるセリンプロテアーゼ HtrA2 の基質同定を発現クローニングを用いて、そのインビトロ翻訳産物が HtrA2 で切断されるクローンを単離する方法で検索し、3 種類のミトコンドリア蛋白質すなわち POLG、MTHFD1、UQCRCFS1 を同定した。

A. 研究目的

ALS は骨格筋を支配する脊髄および脳幹の運動ニューロンが変性脱落するために、通常発症後数年で呼吸筋を含む全身の筋萎縮、運動麻痺を来して死亡する。線条体黒質変性症(SND)は線条体および被殻の著明な萎縮とグリオースと黒質の変性を中核病変とする変性疾患であり、パーキンソン病症候が主症状であるが、レボドーパは無効で、発症後数年で寝たきりになり、自律神経症候のため、突然死することもある。両疾患とも現在全く有効な治療法はない。患者数は合わせて日本国内に5-6千人と推定されるが、患者の苦しみは並たいていものではなく、長期闘病における介護者の労力や医

療費などの社会的負担は膨大なものになる。さらに、両疾患とも加齢により発症頻度が高まることから、少子高齢化社会において、これらの疾患の病因を解明し、予防、治療法を確立することの厚生行政上の意義はきわめて大きい。また本研究の成果は、ミスフォールド蛋白質の分解処理機能低下が神経変性疾患に共通する分子機構であるとの新しいコンセプトを提供し、他の神経変性疾患の解明にも貢献する可能性が高い。本研究は 2 種類のミスフォールド蛋白質の分解に関わると考えられるプロテアーゼ、26S プロテアソームとミトコンドリアのセリンプロテアーゼである HtrA2 の機能低下がそれぞれ ALS と線

条体黒質変性症の原因になるとの作業仮説を分子、細胞、動物レベルで検証することを目的とする。

B. 研究方法

研究課題を遂行するために、次の2名よりなる研究グループを組織した。主任研究者：高橋良輔(京都大学医学研究科臨床神経学)、分担研究者：三澤日出巳(共立薬科大学薬理学)である。各研究者の研究分担は下記のとおりである。

高橋良輔：1)プロテアソームサブユニット pmsc4 のコンディショナルノックアウトマウス作製

2)HtrA2 の基質タンパク質の同定

三澤日出巳：運動ニューロン特異的ノックアウトシステムを用いた神経変性メカニズムの研究

研究方法の詳細については各研究者の分担報告書を参照のこと。本年度は次に示す研究成果が得られた。

C. 研究成果

プロテアソームサブユニット pmsc4 のコンディショナルノックアウトマウス作製

PSMC4 エキソン 7-11 部位を lox で囲んだターゲティングベクターを構築した。これを C57BL/6 系由来 ES 細胞 RENKA 株にエレクトロポレーションにより導入し、細胞の選定後、マイクロインジェクションに用いた。この結果、相同組み換えを起こした独立したクローンが3種類得られた。現在、キメラマウスの発生と共にジャームラインの確立を行っている最中である。

HtrA2 の基質タンパク質の同定

発現クローニングの結果、次の3種類の基質蛋白質が得られた。

①POLYMERASE,DNA,GAMMA;POLG (GenBank accession:NM_002693,OMIM:174763)

ゲノムDNAにコードされたミトコンドリアに存在するDNAポリメラーゼであり、ミトコンドリアDNAの複製に働く。POLG蛋白はC末端側のポリメラーゼドメインとアミノ末端側のエキソヌクレアーゼドメインからなり、

エキソヌクレアーゼドメインは校正として働きミトコンドリアDNA複製の忠実度を高める。エキソヌクレアーゼのドメインの変異はミトコンドリアDNAの点変異の頻度を高める。POLGの遺伝子にはCAGリピートがあり、最も多いのは10リピートで、これは異なる人種間で均一の高い頻度で見られる。進行性外眼筋麻痺(PEO)は、進行性の外眼筋の麻痺と運動不耐を示すミトコンドリア病であり、原因遺伝子が複数知られている遺伝学的に不均一な疾患である。原因遺伝子の一つとしてPOLGが知られており、その他 adenine nucleotide translocase 1、TWINKLE (mitochondrial helicaseの一つ)などがある。これらの蛋白の異常はいずれもミトコンドリアDNA欠失の蓄積につながると考えられる。パーキンソン病においてもミトコンドリア機能異常の関与が疑われているが、PEOの7家系でパーキンソニズムとPOLGの有意な cosegregation が認められた。乳幼児期に精神発達遅滞、難治性てんかん、肝不全をきたす Alpers 症候群の原因遺伝子としてもPOLGは報告されている。また、男性不妊においても関与が疑われている。

②METHYLENETETRAHYDROFOLATE

DEHYDROGENASE 1;MTHFD1

(GenBank accession:NM_005956,OMIM:172460)

MTHFD1は細胞質にあり、

5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase,

5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase,

10-formyltetrahydrofolate synthetaseの3つの活性

を持つ。これらの酵素は、メチオニン、チミジル酸、

de novoプリン合成の基質となるテトラヒドロ葉酸の1

炭素誘導体の相互変換に働く。MTHFD1の変異は、

神経管欠損の母親側のリスクファクターであるとの

報告がある。二分脊椎患者での変異の報告もある。

③UBIQUINOL-CYTOCHROME c REDUCTASE,

RIESKE IRON-SULFUR; UQCRC1

((GenBank accession:NM_006003,OMIM:191327)

ミトコンドリア呼吸鎖のチトクロームbc₁複合体 (complex III)のサブユニットでゲノムDNAにコードされている。ミトコンドリアの内膜に存在する。

運動ニューロン特異的ノックアウトシステムを用いた神経変性メカニズムの研究

MnSOD(SOD2)を運動ニューロン特異的に欠損する出生マウスの遺伝子型の解析では、予想される数の Conditional KO マウスが得られた。これらの SOD2 の Conditional KO マウスでは出生時から生後 1 年までの間に顕著な異常(運動失調や麻痺)は観察されない。生体内の活性酸素ラジカルを特異的に検出する hydroethidine を静注したところ、運動ニューロンのミトコンドリアでの活性酸素ラジカルの顕著な産生増大が観察された。

しかし、各種抗体による組織化学的解析では細胞レベルでのいかなる神経変性の兆候も観察されなかった。今回の実験からは、少なくとも、運動ニューロンはミトコンドリア由来の活性酸素障害には高い抵抗性を有することが明らかとなった。

D. 研究発表

分担研究報告書ならびに研究成果の刊行に関する一覧参照。

プロテアソームサブユニット psmc4 のコンディショナルノックアウトマウス作製
および HtrA2 の基質タンパク質の同定

研究代表者: 高橋良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授

研究要旨 ミスフォールドタンパク質の蓄積が神経変性疾患に関与しているのではないかと考えが多くの知見により広まって来ている。このミスフォールドタンパク質を処理する主要な分解経路がユビキチンプロテアソーム系(UPS)である。UPS においてミスフォールドタンパク質分解の役割を担う蛋白質分解酵素複合体が 26Sプロテアソームである。26S プロテアソームは数多くの種類のサブユニットより成り立っているが、そのサブユニットの一つである psmc4 を Cre-lox システムを導入する事により部位特異的に欠損させ、その発現・解析を行う事でプロテアソームの働きを制限させ、神経変性疾患におけるプロテアソームの役割を解明出来るのではないかと考え、psmc4 Cre-lox システム導入マウスの作製に着手した。平成 17 年度は psmc4 の活性部位を loxP 配列で挟むターゲティングベクターを作製し、これを用いて ES 細胞で相同組み換えを起こすことに成功した。またミトコンドリアの膜間スペースに存在するセリンプロテアーゼ HtrA2 はその活性喪失型変異マウスにおいて線条体ニューロンが変性し、パーキンソニズムを呈するうえ、ヒトのパーキンソン病でも変異が同定されている。そこで HtrA2 の活性低下によりミトコンドリアに蓄積し、神経変性を引き起こしうる基質蛋白質の同定に着手した。平成 17 年度は発現クローニング法により、3 種類のミトコンドリア蛋白質、POLG、MTHFD1、UQCRCFS1 を HtrA2 の基質蛋白質の候補として同定した。

A. 研究目的

アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症等多くの神経変性疾患はそれぞれにおいて異常形成されたタンパク質(ミスフォールドタンパク質)の蓄積が認められており、これらが病因と関与していると考えられている。このミスフォールドタンパク質を分解する経路として重要な役割を担うものが UPS(ユビキチンプロテアソーム系)である。この UPS は細胞が正常に機能を果たす為に不要になったタンパク質を分解、破棄する系である。タンパク質の中でも比較的寿命の短いタンパク質の分解に関与しており、さらにタンパク質の構造形成時において異常形成されたタンパク質もここで処理される。UPS にはユビキチンとプロテアソ-

ームが用いられており、タンパク質は特定の酵素によってユビキチンを付加され、プロテアソームがそれを認識して分解を行う。タンパク質分解に関係しているプロテアソームは 26S プロテアソームであり、2.5MDa の巨大な複合体プロテアーゼであるが、これ自体はユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに結合させ、基質タンパク質の解きほぐしを行う 19S プロテアソームとその解きほぐされたタンパク質を分解する 20S プロテアソームより成り立っている。19S はさらに ATPase サブユニットを中心とする base とその上に lid と呼ばれる蓋のように存在しているサブコンプレックスに分けられ、主に base に存在する ATPase の働きによりタンパク質の認識、捕捉、脱ユビキチン化、解きほぐし、および 20S への

タンパク質誘導を行っている。我々がコンディショナルノックアウトの目標としている部位も PSMC4 と呼ばれる 19S プロテアソームの base に位置する ATPase サブユニットの一つであり、19S の ATPase サブユニットの一部をノックアウトさせた場合、胎生致死になる事が報告されている。これは 19S の ATPase 部位がプロテアソームの働きに非常に重要な部位であり、またプロテアソームが発生において重要な役割を有している事を証明するものである。現在、プロテアソームの働きを制限させ、その動きを見る研究を行う場合、プロテアソーム阻害剤を使用した方法が取られている。阻害剤を使用した場合、ノックアウトの実験結果の様な胎生致死を回避しながら、時期・部位特異的にプロテアソームの働きを阻害する事の出来る優れた方法ではあるが、薬剤を用いる事による個体の感受性の違い、投与方法・手段による薬剤の濃度分布の違い等により実験の差異が出てくる可能性がある。これらの問題を解決させ、かつ一様な研究結果を得る為にコンディショナルノックアウトマウスの作製が一番望ましいと考えられる。今回使用する Cre-lox システムは部位特異的に Cre を発現するマウスと掛け合わせる事により部位特異的、また時期特異的にもその遺伝子の発現を制限させる事の出来るシステムである。この方法を上記の PSMC4 遺伝子に用いる事により、胎生致死を回避しながら UPS の障害によって起こる様々な疾患の解析を行う事が出来ると考えている。また、ミトコンドリアの膜間スペースに局在するセリンプロテアーゼである HtrA2 はアポトーシスの際、シトクロム c などともに細胞質に放出されて、アポトーシス阻害蛋白質の阻害・分解を通じてアポトーシスを促進するほか、その活性によりカスパーゼ非依存的細胞死を引き起こすことを我々は明らかにしてきた。ところがいっぽうパーキンソニズム様の症状を呈し、線条体ニューロンが特異的に変性する mnd2 変異マウスは HtrA2 の機能喪失変異によること、ま

た HtrA2 ノックアウトマウスが mnd2 マウスとほぼ同一の表現型を呈することが発表され、HtrA2 はミトコンドリアの機能維持に不可欠な蛋白質であることが明らかになった。さらに HtrA2 の酵素活性に影響を与えるミスセンス変異が孤発性パーキンソン病患者に見出されたことから、HtrA2 の機能喪失が線条体または黒質の神経変性に関わる可能性が示された。このような神経変性は HtrA2 の活性が低下するために分解されなくなるミトコンドリア蛋白質の蓄積が原因と考えられるため、本研究では HtrA2 の基質となるミトコンドリア蛋白質の同定を行うこととする。

B. 研究方法

プロテアソームサブユニット psmc4 のコンディショナルノックアウトマウス作製

1) ターゲッティングベクターの構築

PSMC4 遺伝子は 11 個のエキソン部位より成り立つ。このうち隣接するエキソン 7-11 部位を用いればフレームシフトによる欠損が起きる為、今回のノックアウトの目標とした。C57BL/6 系由来 ES 細胞 RENKA 株 DNA を用いて目標部位上流 4.5Kbp を Short Homology として PCR 法により増幅、あらかじめ neo 耐性遺伝子を lox、Cre で挟んだサイトを有するベクターへサブクローニングした。同様に目標部位下流 5Kbp を Long Homology として PCR 法により増幅し、DT-A サイトを有するベクターへサブクローニングした。次に、目標部位 1.5Kbp を PCR 法により増幅した後、lox で挟まれる部位へ導入後、Short Homology、neo 遺伝子部位、lox、Cre を含む遺伝子部位を DT ベクターへ導入し、ターゲッティングベクターを構築した。

2) ES 細胞へのターゲッティングベクター導入

C57BL/6 系由来 ES 細胞 RENKA 株を用いて、ターゲッティングベクターをエレクトロポレーションで導入した。G418(175 μ g/ml)含有培地にて培養し、薬剤耐性細胞を採取した。

3)ES 細胞のスクリーニング

32P ラベルプローブによるサザンブロッティングによる解析により、組み替え体を選定した。今回は導入目標部位が 1.5Kbp と長いため、片側の lox 欠損が考えられるので、PCR 法により片側 lox 部位の確認を同時に行い、目的とする組み替えが行われているかどうかを確認した。

4)コンディショナルノックアウトマウスの作製

選定により得られた ES 細胞を ICR マウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションした。発生した個体を体毛変異率によりキメラ率を判別し、それぞれの個体においてジャームラインに入るかどうかを確認した。

HtrA2 の基質タンパク質の同定

in vitro translation 可能なプラスミドの遺伝子発現ライブラリーを用い、HtrA2 で分解されるクローンをスクリーニングすることで HtrA2 の基質を同定した。独立したクローンを 100 クローンずつ含むプールを in vitro Translation したものに組み替え HtrA2 を加え、分解・切断されるクローンを含むプールを 10 個に分けて同様の実験を繰り返すことにより、基質を同定した。

C. 研究結果

プロテアソームサブユニット pmsc4 のコンディショナルノックアウトマウス作製

PSMC4 エキソン 7-11 部位を lox で囲んだターゲティングベクターを構築した。これを C57BL/6 系由来 ES 細胞 RENKA 株に電ポレーションにより導入し、細胞の選定後、マイクロインジェクションに用いた。現在、キメラマウスの発生と共にジャームラインの確立を行っている段階である。

HtrA2 の基質タンパク質の同定

発現クローニングの結果、次の3種類の基質蛋白質が得られた。

①POLYMERASE,DNA,GAMMA;POLG (GenBank accession:NM_002693,OMIM:174763)

ゲノムDNAにコードされたミトコンドリアに存在する DNAポリメラーゼであり、ミトコンドリアDNAの複製に働く。POLG蛋白はC末端側のポリメラーゼドメインとアミノ末端側のエキソヌクレアーゼドメインからなり、エキソヌクレアーゼドメインは校正として働きミトコンドリアDNA複製の忠実度を高める。エキソヌクレアーゼドメインの変異はミトコンドリアDNAの点変異の頻度を高める。POLGの遺伝子にはCAGリピートがあり、最も多いのは10リピートで、これは異なる人種間で均一の高い頻度で見られる。進行性外眼筋麻痺(PEO)は、進行性の外眼筋の麻痺と運動不耐を示すミトコンドリア病であり、原因遺伝子が複数知られている遺伝学的に不均一な疾患である。原因遺伝子の一つとしてPOLGが知られており、その他 adenine nucleotide translocase 1、TWINKLE (mitochondrial helicaseの一つ)などがある。これらの蛋白の異常はいずれもミトコンドリアDNA欠失の蓄積につながると考えられる。パーキンソン病においてもミトコンドリア機能異常の関与が疑われているが、PEOの7家系でパーキンソニズムとPOLGの有意な cosegregation が認められた。乳幼児期に精神発達遅滞、難治性てんかん、肝不全をきたす Alpers 症候群の原因遺伝子としてもPOLGは報告されている。また、男性不妊においても関与が疑われている。

②METHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE 1;MTHFD1

(GenBank accession:NM_005956,OMIM:172460)

MTHFD1は細胞質にあり、5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, 5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, 10-formyltetrahydrofolate synthetaseの3つの活性を持つ。これらの酵素は、メチオニン、チミジル酸、de novoプリン合成の基質となるテトラヒドロ葉酸の1炭素誘導体の相互変換に働く。MTHFD1の変異は、神経管欠損の母親側のリスクファクターであるとの

報告がある。二分脊椎患者での変異の報告もある。

③UBIQUINOL-CYTOCHROME c REDUCTASE, RIESKE IRON-SULFUR; UQCRFS1

((GenBank accession:NM_006003,OMIM:191327)

ミトコンドリア呼吸鎖のチトクロームbc₁複合体 (complex III)のサブユニットでゲノムDNAにコードされている。ミトコンドリアの内膜に存在する。

D. 考察

プロテアソームサブユニット psmc4 のコンディショナルノックアウトマウスの作製に関しては、germ lineに組み替え体が載った個体を作製することが次の目標である。HtrA2の基質候補については今後はまずHtrA2のドミナントネガティブ変異体過剰発現細胞か、RNAiによるノックダウン細胞で、基質の蓄積が見られるかどうか検討する。さらに18年度作製予定のHtrA2変異マウスで基質の蓄積を検討する。いっぽう、同様の発現クローニング法でさらに候補分子を同定する一方、プロテオミクス的手法による基質分子の同定も18年度は試みる。

E. 結論

1) 26Sプロテアソームサブユニット psmc4 を loxP で挟んだコンディショナルノックアウトの ES 細胞を確立した。

2) 発現クローニング法により、3種類のミトコンドリア蛋白質、POLG、MTHFD1、UQCRFS1 を HtrA2 の基質蛋白質の候補として同定した。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T., Takahashi, R. Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiol. Dis.*, in press.

2. Kitajima K, Takahashi R, Yokota Y. (2006) Localization of Id2 mRNA in the adult mouse brain. *Brain Res.* 2006 Jan 26; [Epub ahead of print]

3. Rezgaoui M, Susens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier G, Franke I, Urny J, Imai Y, Takahashi R, Schaller HC. (2006) The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. *J. Cell Sci.* 119, 542-9.

4. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. (2006) Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neurosci.*, 9, 108-18.

5. Sahara, N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J. Neurochem.*, 94, 1254-63.

6. Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B. (2005) Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and PI3K/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13670-5.

7. Kim YJ, Nakatomi R, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R. (2005) Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants. *J. Biol. Chem.*, 280, 21515-21.

2. 学会発表

国際学会招待講演

Takahashi, R. :Modulators of mutant SOD1 aggregate formation. Foundation Andre Delambre Symposium at Motreal Neurological Institute “Amyotrophic Lateral Sclerosis: Causes and Therapeutic Perspectives”, Montreal, Canada (2005. 9. 9)

Takahashi, R. : Promoters of mutant SOD1 aggregate formation, The 21st Century COE Program 3rd International Symposium, Nagoya (2005.12.1)

Takahashi, R.: The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, The 3rd Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Tokyo (2005.12.6)

Takahashi, R: The molecular mechanisms of familial parkinsonism, Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program Korea-Japan Joint Seminar”Molecular and systemic basis of neurological disorders”, Okazaki (2006. 2. 9)

Takahashi, R: The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, World Parkinson Congress, Washington, D.C., U.S.A. (2006.2.24)

Takahashi, R: The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, First Japanese German Workshop Research in Neurodegenerative diseases, Tuebingen, Germany (2006. 3. 24)

国際学会発表

1.K.Yamanaka, S.Boillee, C.Lobsiger, Takahashi, R.,H.Misawa, D.W.Cleveland: Identification of the cell types in which SOD1 mutants act to generate toxicity to motor neurons.Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington DC, U.S.A.(2005.11.12)

2. H. Wang, Y.Imai, H.Inoue, A.Kataoka, S.Iita, N.Nukina and R.Takahashi: An approach to the generation of AR-JP mouse model: Crossbreeding of Pael-R/GPR37 transgenic mice with parkin knockout mice, Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington, D.C., U.S.A.(2005.11.12)

3. H. Saiki, J. Takahashi, N. Hashimoto and R Takahashi: Objective assessment of the pickingup movement using video-based motion analysis system for Parkinson monkey models. Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington, D.C., U.S.A.(2005.11.12)

4. M.Urushitani, T.Sakurai, N.Nukina, R.Takahashi, J.P.Julien: Chromogranin-mediate secretion of SOD1 mutants in ALS pathogenesis. Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington, D.C., U.S.A.(2005.11.14)

国内研究会招待講演

高橋良輔:パーキンソン病の分子メカニズム。京都大学パーキンソン病研究会、京都(2005.4.9)

高橋良輔:家族性パーキンソン病の分子メカニズム。平野朝雄教授神経病理セミナー、大阪(2005.4.30)

高橋良輔:神経変性疾患の分子メカニズム。第2回南大阪PDフォーラム、大阪(2005.5.13)

高橋良輔:家族性PDは孤発性PDの理解をどこまで深めたか。第46回日本神経学会総会ランチオンセミナー、鹿児島(2005.5.25)

高橋良輔:ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系と神経疾患治療戦略。第23回日本神経治療学会総会教育講演、鳥羽(2005.6.10)

高橋良輔:パーキンソン病における神経変性の分子機構。第120回つくばブレインサイエンスセミナー、筑波(2005.6.21)

高橋良輔:神経変性疾患の分子メカニズム。第42回北陸神経懇話会、金沢(2005.6.25)

高橋良輔:遺伝子から見たパーキンソン病の分子メカニズム。平成17年度関西医科大学大学院企画セミナー(2005.9.2)

高橋良輔:パーキンソン病の分子生物学。第13回脳の世紀シンポジウム、東京(2005.9.21)

高橋良輔:家族性パーキンソン病研究の最新の進歩。第6回東海パーキンソン病治療・症例検討会、名古屋(2005.10.7)

高橋良輔:蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。神経疾患セミナー、大阪(2005.10.14)

高橋良輔:ドーパミンニューロンの機能発現と病態におけるPael受容体/GPR37の役割。生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能と病態における意義、岡崎(2005.10.18)

高橋良輔:ミスフォールド蛋白質とパーキンソン病。第10回東海パーキンソン病研究会、名古屋(2005.10.21)

高橋良輔:神経変性疾患の分子生物学。第10回パーキンソン病フォーラム、京都(2005.10.29)

高橋良輔:家族性パーキンソン病の分子機構。第10回東北パーキンソン病治療研究会、仙台(2005.11.5)

高橋良輔:パーキンソン病の分子生物学。姫路神経カンファレンス、姫路(2005.11.19)

高橋良輔:家族性パーキンソン病発症の分子機構。大阪大学蛋白質研究所セミナー「脳神経疾患研究の最前線」(2005.11.25)

高橋良輔:神経変性疾患の分子生物学。福井臨床神経同好会(2005.11.28)

高橋良輔:ミスフォールド化Pael受容体とパーキンソン病。第28回日本分子生物学会、福岡(2005.12.9)

高橋良輔:家族性パーキンソン病の分子機構。滋賀医科大学特別講義(2006.1.4)

高橋良輔:パーキンソン病の分子病態。第5回倉敷神経内科セミナー、倉敷(2006.1.19)

高橋良輔:家族性パーキンソン病研究の最近の進歩。21世紀COEプログラム・平成17年度コロキウム、京都大学(2006.1.21)

高橋良輔:蛋白質品質管理病としてのパーキンソン

病。中四国セレギリン研究会、米子(2006. 2.11)

高橋良輔:蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。第 7 回兵庫パーキンソン病治療研究会、神戸(2006. 2.18)

高橋良輔:家族性パーキンソン病の分子機構。静岡パーキンソン病研究会、静岡(2006.3.3)

高橋良輔:遺伝子から探るパーキンソン病の分子機構。第 19 回愛媛神経内科懇話会、松山(2006.3.8)

高橋良輔:蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。第 79 回日本薬理学会年会ランチョンセミナー、横浜(2006.3.9)

高橋良輔:家族性パーキンソン病研究の最近の進歩。滋賀神経疾患研究会、大津(2006.3.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

運動ニューロン特異的ノックアウトシステムを用いた神経変性メカニズムの研究

研究代表者:三澤 日出巳 共立薬科大学・薬理学講座 助教授

研究要旨 本研究で使用する予定である運動ニューロン特異的ノックアウトシステムの有用性を検定するため、ALS の病態に関与することが報告されている活性酸素を生後の運動ニューロンのミトコンドリアのみで過剰産生させるモデルマウスを作製し、その病態解析をおこなった。その結果、従来の仮説とは異なり、運動ニューロンはミトコンドリア由来の活性酸素に極めて高い抵抗性を持つことが明らかとなった。

A. 研究目的

ミトコンドリアの機能障害や形態異常は ALS を含む多くの神経変性疾患で指摘されてきたが、近年の研究の進展により「神経変性に至る共通経路」の1つとして注目を集めている。研究代表者は生後の運動ニューロン特異的に Cre を発現するマウス(VAChT-Cre マウス)の作出に成功し、運動ニューロンにターゲットを絞った病態モデルマウスの作製を試みている。この VAChT-Cre マウスとミトコンドリアの活性酸素の除去機構として重要な MnSOD(SOD2) floxed マウス(都老人研、白澤博士より提供)を掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損するマウスの作製を試みた。ミトコンドリアで呼吸鎖(酸化的リン酸化)により消費される酸素の 1~2%が活性酸素ラジカルになると計算されている。この活性酸素は同じくミトコンドリアに存在する MnSODにより効率的に消去され、酸化ストレス障害から細胞を守っていると考えられている。以前から、ALS を含む様々な神経変性疾患や老化過程での MnSOD の動態(および活性酸素の処理の異常)に注目が集まっているが、MnSODを全身で欠失するマウスは胎生期または出生直後に拡張性心

筋症にて死亡するため、成体における働きは解析できなかった。生後の運動ニューロンの約半分で遺伝子の組み換えを誘導する VAChT-Cre マウスとの掛け合わせは、成熟した運動ニューロンにおけるミトコンドリア由来の活性酸素の影響を解析する理想的なモデルと考えられる。

B. 研究方法

生後の運動ニューロン特異的に Cre を発現するマウス(VAChT-Cre マウス)と SOD2 floxed マウスを掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損するマウスを作製した。生後 1 年令までのマウスを組織化学的、行動学的に解析した。実験は動物実験委員会の承認のもとに、動物倫理に配慮しておこなった。

C. 研究結果

出生マウスの遺伝子型の解析では、予想される数の Conditional KO マウスが得られた。これらの Conditional KO マウスでは出生時から生後 1 年までの間に顕著な異常(運動失調や麻痺)は観察されない。生体内の活性酸素ラジカルを特異的に検出す

る hydroethidine を静注したところ、運動ニューロンのミトコンドリアでの活性酸素ラジカルの顕著な産生増大が観察された。しかし、各種抗体による組織化学的解析では細胞レベルでのいかなる神経変性の兆候も観察されなかった。

D. 考察

ALS 剖検例の病理組織学的な解析から、ALS の病態形成に活性酸素障害が関与するとの報告が散見されるが、今回の実験からは、少なくとも、運動ニューロンはミトコンドリア由来の活性酸素障害には高い抵抗性を有することが明らかとなった。

E. 結論

VACHT-Cre マウスを用いて運動ニューロンにおいて floxed SOD2 allele の約 50%での遺伝子組み換えが達成された。本実験系の有用性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Olsen, O., Moore, K.A., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Kauer, F.W., Streuli, M., Misawa, H., Burlingame, A.L., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S.

Neurotransmitter release regulated by a MALS-liprin-alpha presynaptic complex. *J. Cell Biol.*, 170, 1127-1134 (2005)

Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T., Takahashi, R. Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiol. Dis.*, in press.

2. 学会発表

三澤日出巳, 中田和子, 松浦純子, 清水孝彦, 白澤卓二, 高橋良輔: 運動ニューロン特異的 SOD2 ノックアウトマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレス障害の解析: 第 28 回 日本神経科学大会; 横浜、2006 年 7 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
王 華芹 高橋良輔	家族性 PD から孤発性 PD の病態解明にむけて—Parkin 不活性化による神経変性の分子機構	柳澤信夫他	Annual Review 神経 2006	中外医学社	日本	2006	1-8
高橋良輔 王 華芹 小林芳人	プログラム細胞死と神経変性疾患	辻本賀英	細胞死・アポトーシス集中マスター	羊土社	日本	2006	100-110

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kim Y-J, Nakatomi R, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R.	Unsaturated fatty acids induce Cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked Superoxide dismutase 1 mutants.	Journal of Biological Chemistry	280(22)	21515-21521	2005
Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B.	Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A.	102(38)	13670-13675	2005
Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP.	Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis.	Nat Neurosci	9(1)	108-118	2006
Rezgaoui M, Susens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier G, Franke I,	The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37.	J Cell Sci.	119(3)	542-549	2006

Urny J, Imai Y, Takahashi R, Schaller HC.					
Misawa H, Nakata K, Matsuura J, Moriwaki Y, Kawashima K, Shimizu T, Shirasawa T, Takahashi R	Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals	Neurobil Dis			in press
金 然正 高橋良輔	コンフォメーション病のしくみ	BIO Clinica	20(7)	80-84	2005
高橋良輔	パーキンソン病の分子生物学	脳神経外科速報	15(5)	445-452	2005
高橋良輔	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	神経治療学	22(6)	697-702	2005
高橋良輔	アポトーシス研究の現状と今後の展望	呼吸と循環	54(1)	7-11	2006
高橋良輔 館野美成子	AMPA 受容体と変異 SOD1 タンパク質異常	CLINICAL NEURO SCIENCE	24(2)	226-229	2006

研究成果の刊行物・別刷り

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

京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構 王 華芹
同 脳病態生理学講座臨床神経内科 高橋良輔

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

要 約

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

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

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

動 向

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

PDのほとんどは孤立性に発症するが、一部で

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

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

表1 causative genes for familial PD

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