

も  $\alpha$ -synuclein 遺伝子を含む 1.5Mb の遺伝子領域の三重化 (triplication) が同定され, 患者脳での  $\alpha$ -synuclein 蛋白質の発現量が増加したことが判明した<sup>2)</sup>. これらの発見は野生型  $\alpha$ -synuclein の過剰産生も PD 発症の原因となることを示唆し, 孤発性 PD における  $\alpha$ -synuclein 蓄積の原因的意義を裏付けるものである. また, 他の優性遺伝の原因遺伝子として *nurr-1*, *uch-l1* (Park5), *lrrk2* が相次いで報告された. UCH-L1 は脱ユビキチン化酵素としての機能を持ち, ユビキチンプロテアソーム系に関する蛋白質である<sup>3)</sup>. Nurr-1 はドーパミン神経に多く発現し, チロシン水酸化酵素の転写を制御する転写因子で, 変異型 Nurr-1 の転写量は野生型に比べ減少し, それに応じてチロシン水酸化酵素の転写量も減少することが報告されている<sup>4)</sup>.

常染色体劣性遺伝の原因遺伝子としては *parkin* (Park2), *dj-1* (Park7), さらに最近 *pink-1* (Park6) が同定された. 家族性 PD Park7 の原因遺伝子と同定された DJ-1 は抗酸化ストレスとプロテアーゼ, 転写調節因子などきわめて多彩な機能を有する蛋白質である. DJ-1 は活性酸素により発現誘導を受け, また, その過剰発現により酸化ストレスに対する抵抗性が生じることが報告され, DJ-1 は直接あるいは間接的な分子機構により抗酸化ストレス作用を発揮する蛋白質であることが示唆される<sup>5)</sup>. PINK-1 は癌抑制遺伝子 PTEN で制御される因子として同定され, ミトコンドリアに局在し, ストレスに反応してミトコンドリアの蛋白をリン酸化することにより, 細胞を保護していると考えられている<sup>6)</sup>. 孤発性 PD では黒質ドーパミン神経細胞のミトコンドリア機能の異常が報告され, またミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤がパーキンソニズムを惹起することなどから, PD の発症にミトコンドリアの関与が強く示唆されている. PINK-1 は家族性 PD の病因遺伝子の中ではじめて直接にミトコンドリ

アに関連するもので, 孤発性 PD を含む黒質ドーパミン神経変性の発症機序解明の手がかりとなる可能性がある. 特に先行した Parkin の研究から, 単なる遺伝性疾患という範疇を超えて孤発性 PD の解明に大きなヒントを与えてくれた. 若年性で発症する劣性遺伝性パーキンソニズム (AR-JP: autosomal recessive juvenile parkinsonism) の原因遺伝子として同定された *parkin* の遺伝子産物は, 細胞内蛋白質の分解にかかわるユビキチンプロテアソーム経路ではたらくユビキチンリガーゼの機能を持ち, 神経保護的に働くとの認識が一般化しつつある. PD で報告される変異体は, そのユビキチンリガーゼとしての機能を損失していることが示唆されている<sup>7,8)</sup>. それゆえ, ユビキチンリガーゼとしての Parkin が本来分解すべき基質蛋白質のドーパミン神経細胞内への蓄積が神経変性の原因であるとの考えを生み出し, ここ数年の Parkinson 病の病因研究に多大なヒントを与えてきた. さらに最近, Parkin はドーパミン代謝に関与することが明らかになって, 他の遺伝性 PD の遺伝子産物の機能を合わせて, 異常蛋白質の蓄積と酸化的ストレスが PD 発症の重要な鍵を握っていることはほぼ間違いないと考えられる. 本稿では, Parkin とその基質 Pael-R を中心として概説し, PD がドーパミン代謝異常, ミトコンドリア機能低下による酸化的ストレスとユビキチンプロテアソーム系機能低下, 異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスの両方のストレスによる疾患とする可能性を述べたい.

#### A. ユビキチンプロテアソーム系, 小胞体ストレスと PD

ユビキチンプロテアソーム系とは ATP 依存性の蛋白質分解システムであり, 蛋白質の翻訳後修飾をつかさどるユビキチンシステムと蛋白質分解をつかさどるプロテアソームシステムからなり,

生体内における不要蛋白質分解系において中心的役割を果たしている。この蛋白質分解系はE1 (Ub-activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin ligase) より構成されており、蛋白質分解を介して細胞周期、癌、免疫機構そして神経変性に関与していることが明らかにされた。神経系の細胞は盛んに受容体など膜蛋白質を産生するため、環境の変化、あるいは遺伝子変異によるミスフォールド蛋白質が小胞体に貯まりやすい組織であると予想される。ミスフォールド蛋白質が過剰に小胞体に蓄積し、細胞機能を障害する状態を小胞体ストレスといい、この状態が続くと、細胞が死に陥る。ミスフォールド蛋白質蓄積に対し小胞体は unfolded protein response (UPR) とよばれる対策を講じる。第一は、リボソームでの蛋白質合成の停止、第二は小胞体シャペロンによるミスフォールド蛋白質の修復、そして第三は小胞体から細胞質への修復不可能なミスフォールド蛋白質の排出と、ユビキチンプロテアソーム系による分解 (ERAD: ER-associated degradation) を行うが、どうしても蓄積した異常蛋白質を除去できない場合には、細胞死の引き金が引かれる。常染色体劣性遺伝形式を示す *parkin* (Park2), *dj-1* (Park7) と常染色体優性遺伝形式を示す *uch-l1* (Park5) の遺伝子産物は、ともにユビキチンプロテアソーム系での関与が指摘されている。特にユビキチンプロテアソーム系の直接的構成酵素である Parkin の発見、その基質 Pael 受容体の同定はこの系の PD 関与がいかに重要であるか物語っている。他の遺伝性 PD の変異がきわめて頻度の低いものであるのに対し、AR-JP の原因遺伝子として同定された Parkin 遺伝子変異は世界中に分布し、しかも全長を通じて多様な変異がみついている。未知の遺伝子を含め、常染色体劣性遺伝性 PD においては約半数を Parkin の変異が占めるとされ、現在最も頻度の高いタイプである。ほとんどの場合、

40歳未満で発病することから、ドーパミン神経の生存においてこの遺伝子産物の重要性がうかがわれるが、Lewy小体が見られることはごくまれである。

ユビキチンリガーゼは分解される運命にある基質蛋白質を特異的に認識し、ユビキチン化して、プロテアソームによる分解を運命付ける役割を担い、細胞内環境を整える酵素である。Parkin がユビキチンリガーゼであることが判明し、蛋白質分解系の破綻がPDを引き起こすという仮説を生み出し、PDの病因研究に大きなインパクトを与えつつある。Parkin は劣性遺伝形式をとることから、患者脳においては Parkin の E3 活性消失、もしくは、低下によって、本来分解されるはずの基質が分解されずに細胞内に異常蛋白質が蓄積し、神経変性を引き起こすことが推定されている。実際に Parkin 変異型では、E3 活性消失・低下が報告されている。さらに、孤発性 PD 患者、MPTP 投与による PD モデルマウスの脳内で Parkin がニトロ化修飾されており、その修飾による E3 活性が低下するとの報告もあった<sup>9)</sup>。これらの知見により、Parkin の役割は家族性 PD にとどまらず、孤発性 PD に関しても重要な役割をなし、その基質の同定がPDの病態を理解するうえで重要であると考えられる。Parkin の基質候補はこれまでに約10個の分子が報告され (表2)、混沌とした状態であるが、その中で Pael 受容体は、その蓄積によって細胞毒性を発揮し、ドーパミン代謝に関与し、さらに Parkin が欠損する AR-JP 患者脳内での蓄積が認められ、AR-JP の発症メカニズムを最も合理的に説明できる基質である。

Pael 受容体は、Yeast two-hybrid スクリーニングにより Parkin と結合する蛋白質として同定され、リガンド不明な G 蛋白質共役型受容体と推定される。Pael 受容体は Parkin によりユビキチン化されプロテアソームにより分解されることか

表2 putative substrates for Parkin's E3 ligase activity

substrate	biological function
CDCrel-1	septin family protein with unknown function
O-glycosylated $\alpha$ -synuclein	isoform of $\alpha$ -synuclein with unknown function
misfolded Pael-R	orphan G-protein coupled receptor
p38 subunit of aminoacyl-tRNA synthetase	role in protein biosynthesis
synaptotagmin XI	regulates exocytosis of neurotransmitters
expanded polyQ proteins	aberrant proteins responsible for polyQ diseases
$\alpha/\beta$ -tubulins	microtubule proteins
synphilin-1	$\alpha$ -synuclein-binding protein
cyclin E	cell cycle regulation of mitotic cells; unknown function in neurons
SEPT5-v2/CDCrel-2	homologous with CDCrel-1
misfolded DAT	12-TM protein, regulates uptake of DA

ら, Parkinの生理的な基質の一つと考えられた<sup>10)</sup>. Pael受容体はドーパミン神経に豊富に発現し, ドーパミン作動性の神経芽細胞で過剰発現させると, 不溶性のミスフォールド化Pael受容体が細胞内に蓄積し, 細胞死を惹起する. これはPael受容体がもともと正しいフォールディング化されにくい蛋白質であり, ほとんどが小胞体関連分解(ERAD)で分解されるものの, ERADの処理能力を超えた発現量がunfolded protein response (UPR)を引き起こすためであると考えられる. 過剰なUPRは, unfolded protein stress (小胞体ストレスともいう)を引き起こし, 細胞がこのストレスに耐えられなくなると, 細胞死を起こす. さらに, AR-JP患者脳でも不溶性Pael受容体が蓄積していることが確認され, Pael受容体がAR-JPへの関与が濃厚になった.

Pael受容体をショウジョウバエの脳全体に発現させると, 加齢とともにドーパミン神経のみが選択的に変性することが明らかになった. このショウジョウバエにParkinをノックダウンさせるとさらにその症状が悪化し, Parkin蛋白を過剰発現させた系と交配させると細胞死が回避される<sup>11)</sup>. このことは, Pael-R蓄積による細胞毒性をParkinの基質分解作用により緩和したと考えら

れ, PD発症メカニズムとしてとらえやすい. AR-JPは劣性遺伝のため, ParkinノックアウトマウスはAR-JPのモデルとなることが期待される. しかし, Parkinの遺伝子欠損マウスは生涯にわたってドーパミン神経細胞の顕著な変性は観察されず, 行動にやや影響がみられる程度であったことが複数のグループから報告された<sup>12-14)</sup>. さらに, ParkinノックアウトマウスでParkinの基質であるCDC-rel1,  $\alpha$ -synuclein, synphilin-1, Pael-Rの蓄積が認められなかった. このことは, マウスの寿命が短く, 顕著な基質蓄積に至らないか, Parkin非存在下でもPael-RなどのParkin基質蛋白質の分解を代償する機構が存在する可能性を示唆している.  $\alpha$ -synuclein毒性, プロテアソーム抑制剤, 小胞体ストレス, kainate毒性など多彩なストレスから細胞を守るため, Parkinは細胞死引き金の下流に働くと考えられる. したがって, Parkin下流ターゲットの同定, ドーパミン神経細胞保護作用メカニズムの解明はPD病態解明の鍵を握っていると考えられる.

一方, もしParkin基質の蓄積がAR-JPの原因になるならば, 基質を過剰発現することによってAR-JPのモデル動物が作製できるはずである. 最近我々はPael-R過剰発現マウスを作製し, 20カ

月齢のマウスでパーキンソニズムまで至らないが、ドーパミン神経細胞数が野生型マウスの約70%までに減少したことを確認している。

## B. ミトコンドリア, DA, 酸化ストレスとPD

一方, ミトコンドリア機能低下, 酸化ストレスと孤発性PDの関連は古くから示唆されている。PD患者剖検脳内でミトコンドリア機能障害と酸化ダメージが認められている。MPTP, ロテノン, paraquatなどのミトコンドリアコンプレックスIインヒビターは酸化ストレスを誘導し, PD発症モデル薬剤として使用されていることはさらなる証拠になる。ミトコンドリア障害と細胞変性は同時に存在するため, ミトコンドリア機能低下はPD発症の原因であるか, ただ2次的な変化に過ぎないか, 明らかにされていないのが現状である。興味あることに, (1) Parkinノックアウトショウジョウバエでは, 筋肉ミトコンドリア病変は最も顕著な病態であること<sup>15)</sup>。(2) *in vitro*でParkinの過剰発現により, ceramideなどのミトコンドリア依存性細胞死が抑制されること<sup>16)</sup>。(3) Parkinノックアウトマウスでは, 呼吸鎖, 酸化ストレスに関与するいくつかのミトコンドリア蛋白質の変化がみられること<sup>17)</sup>など報告され, Parkinはミトコンドリア機能に関与すると示唆している。Parkinノックアウトマウスにはミトコンドリア機能異常と酸化ストレスがみられるものの, 神経変性がみられないことから, ミトコンドリア機能異常は神経変性の早期病態であることが示唆される。今後, ミトコンドリア機能異常から最終的に神経変性を引き起こす系の確立が期待される。

黒質ドーパミン神経細胞は加齢に従いその数が減少することが証明されている。この原因には酸化ストレスが大きな役割を果たしていると考え

られる。黒質が酸化障害の危険に曝されている原因は, おそらく高濃度にドーパミンが存在する自体であると考えられる。Parkinノックアウトマウスにはドーパミン神経細胞の変性は認めないが, 線条体においてドーパミンとその代謝産物の蓄積傾向がみられ, また, アンフェタミン誘導によるドーパミン遊離の抑制が観察される。ドーパミン代謝とドーパミン遊離の低下はドーパミンの蓄積による酸化ストレスの増強効果が推定される。さらに, PARK2で死亡した患者の黒質には鉄の沈着が著しい。このような点でParkinの欠損もやはりドーパミン神経が慢性的に酸化ストレスを受けているのではないかと推定される。Parkinの他に, 劣性遺伝のPDを起こす2種類の原因遺伝子であるDJ-1, PINK1も, ミトコンドリア機能と酸化ストレスに関与することが指摘された。すなわち, ミトコンドリア機能低下, 酸化障害の亢進は, 孤発性Parkinson病のみならず, PARK2, PARK6, PARK7でも観察される現象である。

PDの病因研究において最も重要な鍵となる事実, ドーパミン神経の選択的変性である。したがって, ドーパミン神経細胞の特徴を明らかにすることで, 細胞死の原因に迫る可能性がある。高濃度のドーパミンを含有していることは黒質の選択的細胞死を運命付けるのではないかと, 古くから多くの研究から指摘されている。神経伝達物質であるドーパミンは容易に自動酸化されるとともにモノアミン酸化酵素(MAO)により酸化される。ドーパミンの自動酸化に伴い活性酸素が生成されると同時に, 反応性に富んだセミキノンやキノンが生成される。低濃度の活性酸素は細胞機能に重要であるが, 高濃度に産生された活性酸素はDNA, 蛋白質, 脂質の損傷をもたらし, 種々の疾患の誘発原因となる。また, セミキノンやキノンが直接生体分子を修飾する可能性も示唆されている。事実, ごく最近, Parkin自体がキノン体

で修飾され、不活性化されるという注目すべき報告もなされている<sup>10)</sup>。これらのことは、神経伝達物質ドーパミンを含有している黒質神経細胞が常に酸化ストレスに曝されており、それから神経細胞を守るためには、いかに黒質神経細胞内に抗酸化蛋白あるいは物質が必要であることを示している。この抗酸化機構が破綻すると、神経細胞は死へのプロセスをたどり始めるのではないかと推定される。

Pael-Rの遺伝子改変マウスの解析から、Pael受容体は正常なドーパミン合成、分泌に必要な蛋白質であることが明らかとなった。さらに、ドーパミン神経毒に対しては、Pael-Rを過剰発現したマウスが敏感で、一方Pael-Rノックアウトマウスが耐性で、細胞死は線条体においてのドーパミン分泌量とよい相関が示された(著者ら、投稿中)。これらのことから細胞内制御能力を超えた過剰なドーパミン産生は、ドーパミン細胞に酸化ストレスを与え、さらにカテコラミンの神経細胞内での蛋白質修飾が、折り畳みが異常になった蛋白質の生成、蓄積を助長すると考えられる。

### むすび

ドーパミン神経細胞死の機序には遺伝的素因と環境因子が複雑に絡み合っており、ミトコンドリア障害、酸化ストレス障害の病態への関与に加え、家族性PDの研究から、ユビキチンプロテアソーム系の機能低下、つまり蛋白質分解異常から細胞死に至る経路の重要性が示された。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がドーパミン神経細胞の選択的脆弱性の基礎となっており、異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスがミトコンドリア機能障害、酸化ストレスによりさらに助長され、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(図1)。最近、我々はParkinノックアウトマウスにPael-Rトランスジェニックマウスを掛け合わせて、この仮説

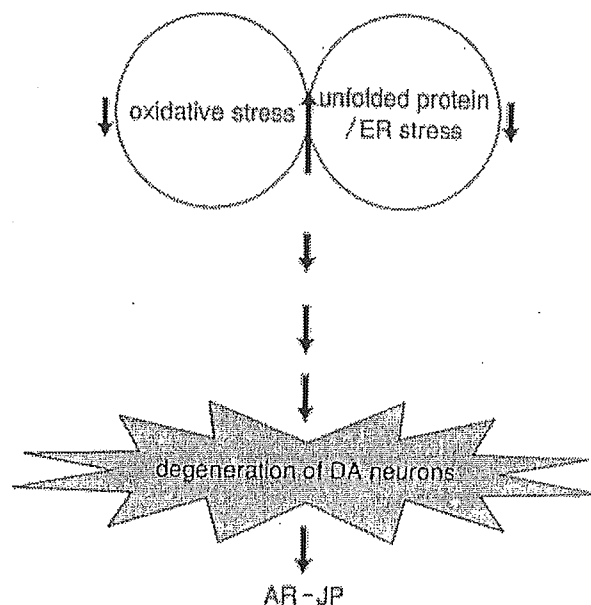


図1 hypothetical mechanism of loss of dopaminergic neurons

Parkinの機能が欠損すると異常な折り畳み構造のPael-Rが神経細胞内に蓄積し、unfolded protein stress(小胞体ストレスともいう)となる。また、ドーパミン神経においてドーパミン分泌量が増える。慢性的なドーパミン過剰およびミトコンドリア機能異常は酸化ストレスを引き起こす。同時に蛋白質の酸化修飾が異常な折り畳み蛋白質の生成・蓄積を促進し、小胞体ストレスを引き起こす。ドーパミン量の増加およびミトコンドリア機能破綻による酸化ストレスと異常な折り畳み蛋白質の蓄積による小胞体ストレスは、ドーパミン神経に負荷をかけ、神経細胞死を引き起こす。

の妥当性を検討しているところである。ParkinノックアウトマウスもしくはPael-Rトランスジェニックマウスに比べて、1年齢のマウスにおいてドーパミン神経細胞数の減少を認めている。このマウスが加齢によってAR-JPのモデルマウスになるのか、現在解析中である。

### 文献

- 1) Spillantini MG, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997; 388: 839-40.
- 2) Singleton A, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003; 302: 841.
- 3) Liu Y, et al. The UCH-L1 gene encodes two

- opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 2002; 111: 209-18.
- 4) Le WD, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet*. 2003; 33: 85-9.
  - 5) Taira T, et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. 2004; 5: 213-8.
  - 6) Valente EM, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004; 304: 1158-60.
  - 7) Kitada T, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998; 392: 605-8.
  - 8) Imai Y, et al. A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *J Biol Chem*. 2003; 278: 35661-4.
  - 9) Chung KK, et al. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*. 2004; 304: 1328-31.
  - 10) Imai Y, et al. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*. 2001; 105: 891-902.
  - 11) Yang Y, et al. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron*. 2003; 37: 911-24.
  - 12) Itier JM, et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 2277-91.
  - 13) Goldberg MS, et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2003; 278: 43628-35.
  - 14) Von Coelln R, et al. Proc Natl Acad Sci USA. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. 2004; 101: 10744-9.
  - 15) Greene JC, et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4078-83.
  - 16) Darios F, et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum. Mol. Genet*. 2003; 12: 517-26.
  - 17) Palacino JJ, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 18614-22.
  - 18) LaVoie MJ, et al. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nature Med*. 2005; 11: 1214-21.

## 第7章

## プログラム細胞死と神経変性疾患

高橋良輔, 王 華芹, 小林芳人

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

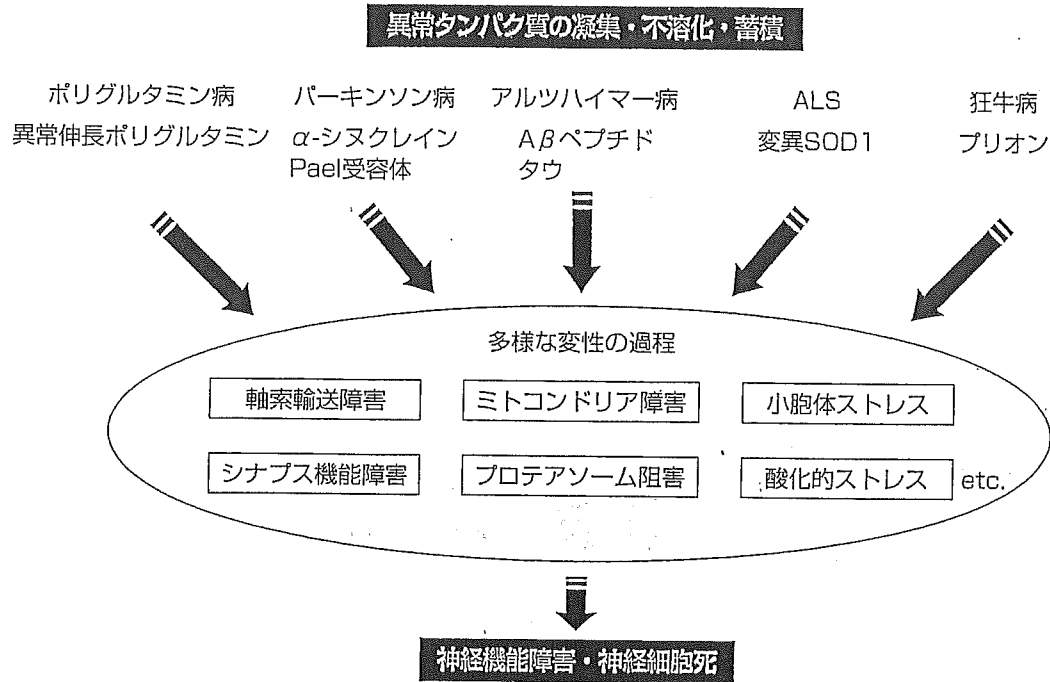
関連UP TO DATE  18, 19, 20

## ■ はじめに

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

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

## 概略図 神経変性疾患の分子メカニズム



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

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

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

<sup>\*1</sup>アミロイド線維

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

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

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



## ■ アルツハイマー病

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

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

### <sup>\*2</sup>アポリポタンパク質 E4 (ApoE4)

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

### <sup>\*3</sup>興奮性毒性

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

### <sup>\*4</sup> $A\beta$ ワクチン療法

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

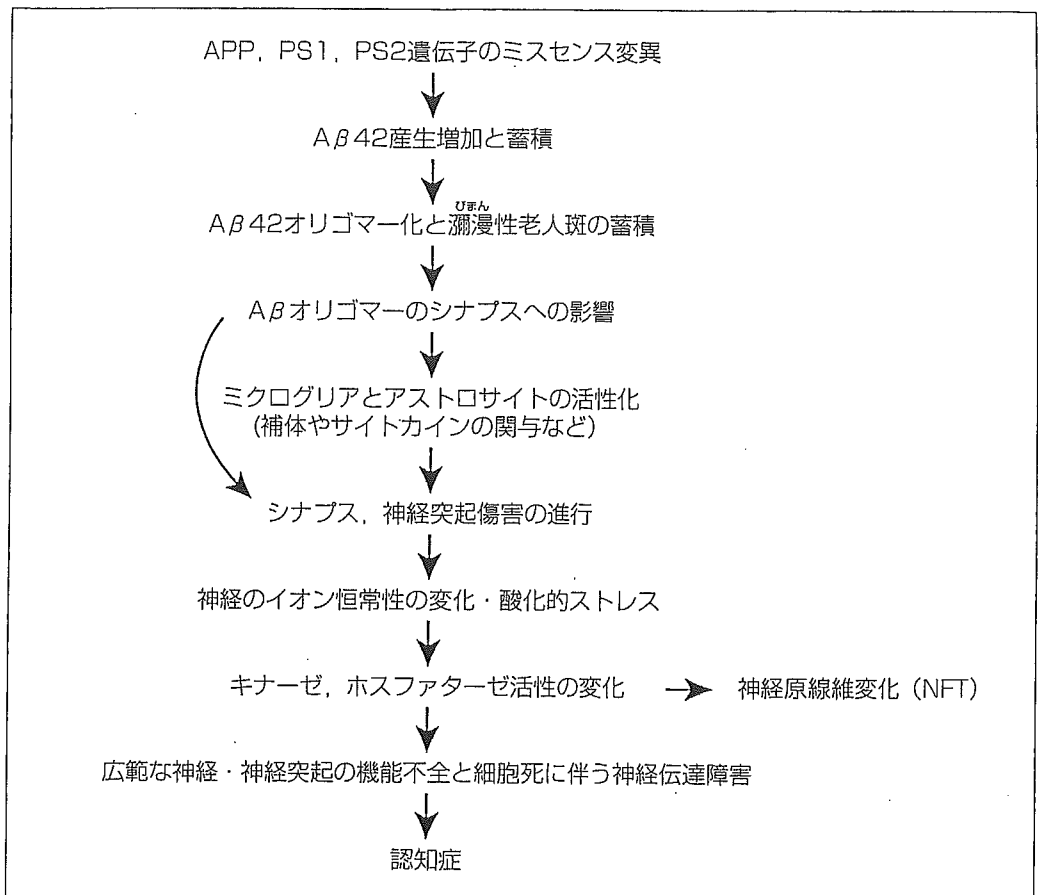


図1 アミロイドカスケード仮説

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

## ② パーキンソン病

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

\*5 家族性PD

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

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

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

## 1) $\alpha$ -シヌクレイン

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

## 2) Parkin

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

.....  
<sup>※6</sup>アグレスーム

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

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

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

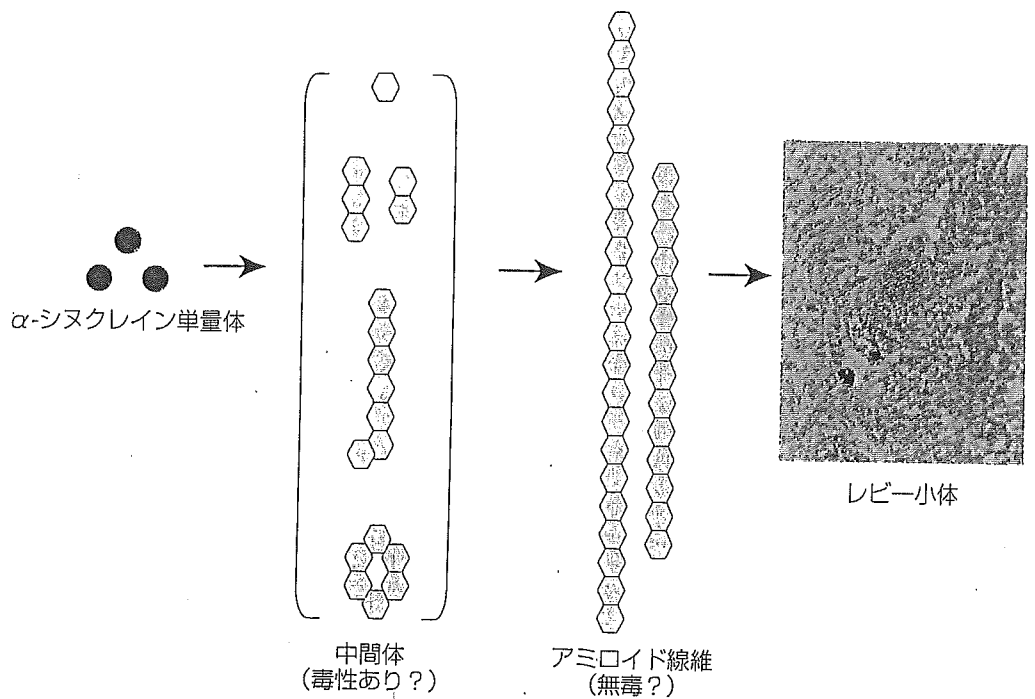


図2  $\alpha$ -シヌクレインの線維形成過程モデル

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

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

<sup>7)</sup>ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系 (UPS)

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

存性と基質選択性の2つの特徴を有する（図3も参照）。

<sup>8)</sup>小胞体関連分解、小胞体ストレス応答小胞体ストレス応答には以下の4種類がある。  
①小胞体シャペロンの遺伝子発現の活性化、  
②小胞体関連分解によるミスフォールドタンパク質の分解（小胞体関連分解ではミスフォールドタンパク質は小胞体内腔から細胞

質に逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される）

③翻訳の全般的抑制で、小胞体への新生タンパク質流入を抑制

④アポトーシス

①、②、③でストレスを乗り越えなくなると④に至ると考えられる。

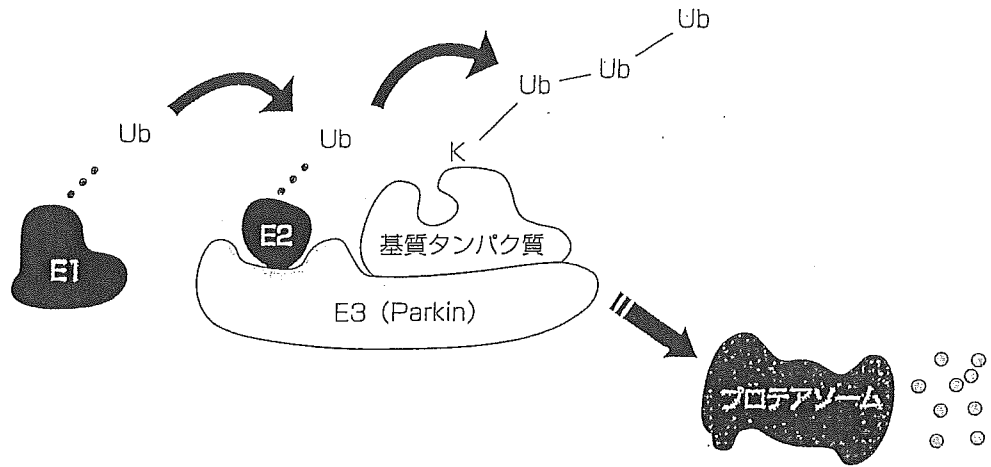


図3 Parkinとユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系

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

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

## 筋萎縮性側索硬化症

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

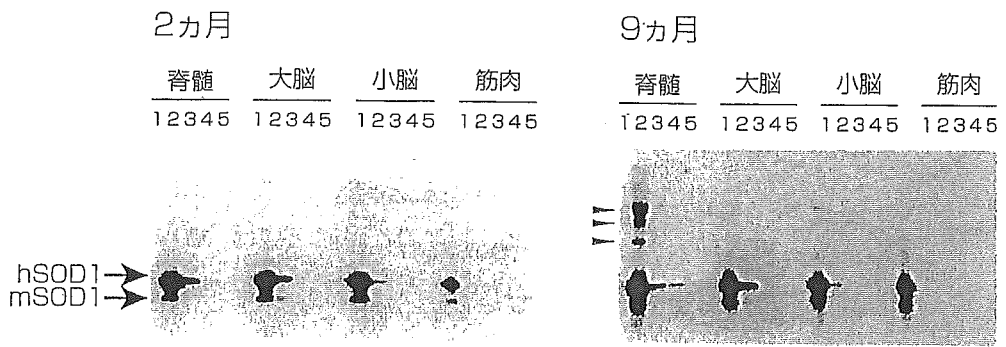


図4. 変異SOD1トランスジェニックマウスにおける変異SOD1の脊髄特異的な凝集形成  
 ヒトG93A変異SOD1トランスジェニックマウスは生後9カ月に運動麻痺を発症して約2週間で死亡し、ヒトのALSのよいモデルになる。このマウスの脊髄、大脳、小脳、筋肉組織でSOD1のウエスタンブロットを行うと、発症前(2カ月)はすべての組織でヒト変異SOD1の単量体のみが検出されるが、発症後(9カ月)は脊髄組織でのみヒト変異SOD1の高分子量化した凝集体(矢頭)が認められる。数字は1から5の順に可溶性から不溶性の分画を示す。hSOD1とmSOD1はそれぞれヒトとマウスのSOD1を意味する。写真提供: 鶴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

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

## 4 IAP と神経変性

アポトーシスと神経変性のかかわりを最も直接的に示したのは、遺伝性の運動ニ

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

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

に必要な考えがキメラマウスの実験をもとに提唱されている。

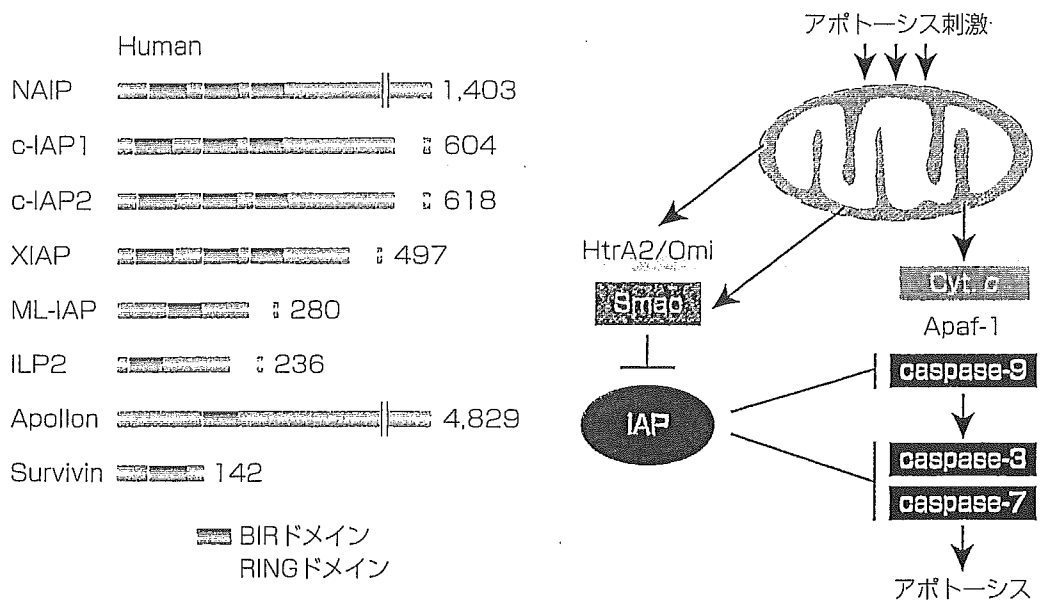


図5 IAP およびその阻害因子

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

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

神経変性へのアポトーシスの関与を探る目的で、ヒトの疾患を忠実に再現する現

\*10 脊髄性筋萎縮症

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

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

ほど、NAIP遺伝子を欠損している割合が多いと報告されている。

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

## 5 今後の研究の展開

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

### キーポイント

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

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

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

\*11 RNAi

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

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

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



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

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

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

## 文 献



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

## 参考図書



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

# Unsaturated Fatty Acids Induce Cytotoxic Aggregate Formation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Superoxide Dismutase 1 Mutants\*

Received for publication, February 28, 2005  
Published, JBC Papers in Press, March 29, 2005, DOI 10.1074/jbc.M502230200

Yeon-Jeong Kim‡, Reiko Nakatomi§, Takumi Akagi§, Tsutomu Hashikawa§,  
and Ryosuke Takahashi‡¶||

From the Laboratories for ‡Motor System Neurodegeneration and §Neural Architecture, RIKEN Brain Science Institute, Saitama 351-0198, Japan and ¶Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan

Formation of misfolded protein aggregates is a remarkable hallmark of various neurodegenerative diseases including Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease, prion encephalopathies, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Superoxide dismutase 1 (SOD1) immunoreactive inclusions have been found in the spinal cord of ALS animal models and patients, implicating the close involvement of SOD1 aggregates in ALS pathogenesis. Here we examined the molecular mechanism of aggregate formation of ALS-related SOD1 mutants *in vitro*. We found that long-chain unsaturated fatty acids (FAs) promoted aggregate formation of SOD1 mutants in both dose- and time-dependent manners. Metal-deficient SOD1s, wild-type, and mutants were highly oligomerized compared with holo-SOD1s by incubation in the presence of unsaturated FAs. Oligomerization of SOD1 is closely associated with its structural instability. Heat-treated holo-SOD1 mutants were readily oligomerized by the addition of unsaturated FAs, whereas wild-type SOD1 was not. The monounsaturated FA, oleic acid, directly bound to SOD1 and was characterized by a solid-phase FA binding assay using oleate-Sepharose. The FA binding characteristics were closely correlated with the oligomerization propensity of SOD1 proteins, which indicates that FA binding may change SOD1 conformation in a way that favors the formation of aggregates. High molecular mass aggregates of SOD1 induced by FAs have a granular morphology and show significant cytotoxicity. These findings suggest that SOD1 mutants gain FA binding abilities based on their structural instability and form cytotoxic granular aggregates.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)<sup>1</sup> is a progressive and fatal neurodegenerative disorder that mainly affects motor

\* This work was supported by research grants from RIKEN Brain Science Institute and a grant-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Tel.: 81-75-751-3770; Fax: 81-75-761-9780; E-mail: ryosuket@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; FALS, familial amyotrophic lateral sclerosis; SOD1, superoxide dismutase 1; FA, fatty acid; AA, arachidonic acid; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium.

neurons in the brain stem and spinal cord. Approximately 10% of ALS patients are familial cases, with autosomal dominant inheritance. More than 90 different mutations in the gene coding for superoxide dismutase 1 (SOD1) have been identified in about 20% of familial ALS (FALS) families (1, 2). Although the molecular mechanisms of selective motor neuron degeneration by SOD1 mutants in FALS remain largely unknown, common pathological features of conformational diseases, as evidenced by SOD1 immunoreactive inclusions, are found in the spinal cord of ALS patients and in the SOD1 mutant FALS mouse model (3–8). The characteristics of FALS resemble those of many other neurodegenerative diseases in which a causative protein undergoes a conformational rearrangement, which endows it with a tendency to aggregate and form deposits within affected tissues.

SOD1 is a 32-kDa homodimeric enzyme that decreases the intracellular concentration of superoxide radicals by catalyzing their dismutation to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ALS-linked mutations of SOD1 are distributed throughout the primary and tertiary structures, and most mutations appear unrelated to the dismutase activity. Many biochemical and biophysical studies have reported that SOD1 mutants are structurally unstable compared with wild-type forms (10–13). These observations suggest that the mutations primarily affect the structural stability of SOD1 rather than the enzyme activity.

The half-life of SOD1 mutants is shorter than that of wild-type forms in cultured cells (14). SOD1 mutants form a complex with Hsp70 and CHIP, which promotes degradation of SOD1 through the ubiquitin-proteasome system (15). Hsp70 directly binds metal-deficient wild-type SOD1 as well as SOD1 mutants, suggesting that destabilized SOD1 is targeted by the molecular chaperone system (15, 16). These observations imply that structural stability of SOD1 may also be strongly involved in refolding by the chaperone or in degradation of SOD1 by the ubiquitin-proteasome system. On the other hand, aggregates of mutant SOD1 are observed to have aggresome-like morphology when cells are treated with a proteasome inhibitor (14). This aggresome-like morphology resembles pathological inclusions of neurodegenerative diseases in affected tissues. These findings suggest that in disease states, misfolded proteins overwhelm the protein handling systems, including chaperones and proteasomes. Therefore, the formation of cellular inclusions may be required for other factors to act as modulators to promote protein aggregates. In fact, lipid molecules, including unsaturated fatty acids (FAs), phosphatidylserine, and phosphatidylinositol, promote amyloidogenesis of amyloid  $\beta$ -peptides, tau (17), and  $\alpha$ -synuclein (18, 19) *in vitro*. These molecules are biologically significant as mediators for signal-

ing and inflammation during disease progression of neurodegeneration.

Here we investigated *in vitro* SOD1 aggregation affected by FAs to create an aggregation model system for FALS. We demonstrated that unsaturated FAs promote self-assembly and cytotoxic aggregate formation of SOD1. Aggregation by FAs is strongly correlated with structural instability and FA binding activity of SOD1, which may have significant implications in FALS.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Expression, Purification, and Characterization of Recombinant SOD1 Proteins**—pcDNA3-SOD1 (20) was digested with EcoRV and XhoI and subcloned into blunted NcoI and XhoI sites of pET-15(b) (Novagen) to construct the expression plasmid. Expression of recombinant SOD1 proteins was induced in BL21(DE3)pLysS by adding 1 mM isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside, 0.1 mM CuCl<sub>2</sub>, and 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> until cells were grown to 0.6 absorbance unit at 600 nm, and then bacterial cells were further cultured at 23 °C for 6 h. Cells were pelleted and resuspended in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). Cells were then disrupted by sonication. Insoluble materials were removed by centrifugation at 10,000  $\times$  g for 30 min. Supernatant was collected for further purification. Purification was performed according to Hayward *et al.* (11), with minor modifications. Briefly, ammonium sulfate powder was added to the supernatant to 65% saturation with gentle stirring on ice. The supernatant, after centrifugation at 10,000  $\times$  g for 30 min, was directly loaded for phenyl-Sepharose (Amersham Biosciences) column chromatography. The column was thoroughly washed with TNE buffer containing 2 M ammonium sulfate. Proteins were eluted using a linearly decreasing salt gradient. SOD1 activity measurement using a xanthine/xanthine oxidase-based method (21) identified fractions containing SOD1. Activity fractions were desalted by ultrafiltration using a centricon filter (Millipore). SOD1 was re-metallated as described previously (22). The proteins were then loaded onto a Q-Sepharose (Amersham Biosciences) anion exchange column and eluted using a linearly increasing salt gradient toward a buffer containing 200 mM NaCl and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Fractions containing SOD1 were pooled and concentrated. Homogeneity of SOD1 was >95%, as verified by SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue staining. Specific activity of the purified enzymes was assayed and calculated by bovine SOD1 (Cayman) or human SOD1 purified from erythrocytes (Sigma-Aldrich) as standards. Fully metallated SOD1 was delipidated using hydroxyalkoxypropyl dextran type III (Sigma-Aldrich) as described previously (19) before de-metallation. Metal-deficient apo-enzymes were prepared as described previously (23), and loss of enzyme activity was confirmed after de-metallation. The metal content of purified enzymes was estimated as described previously (22).

**Oligomerization of SOD1**—A stock solution of 25 mM FAs was prepared in 0.01 M NaOH containing 25  $\mu$ M butylated hydroxytoluene. SOD1 proteins were filtered through Microcon YM-100 (100-kDa cutoff) filters (Millipore) to remove high molecular mass SOD1 before oligomerization. FAs were added directly to preincubated SOD1 at 37 °C in 50 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 150 mM NaCl and 0.1 mM EDTA and further incubated at the same temperature.

**SDS-PAGE and Western Blotting**—For detection of SOD1 oligomers, SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions using 12.5% polyacrylamide gels. After oligomerization of SOD1, protein samples were prepared in SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% glycerol, and 0.007% bromophenol blue) in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol and then boiled at 95 °C for 3 min before loading. Western blotting was performed as described previously (24). Briefly, proteins were transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), followed by UV cross-linking, boiling membranes in 2% SDS and 50 mM Tris, pH 7.6, for 10 min, and extensive washing in Tris-buffered saline. For detection of SOD1, rabbit anti-SOD1 antibody (Stressgen) was used.

**Glycerol Density Gradient Centrifugation and Densitometric Analysis**—A glycerol linear gradient of 10–40% was prepared in a centrifuge tube. Formation of the SOD1 oligomer was performed as described above. Approximately 200  $\mu$ l of incubated SOD1 was layered onto a glycerol cushion and separated by centrifugation with a SW41Ti rotor (Beckman) at 35,000 rpm for 15 h. In a parallel experiment, protein standards (Amersham Biosciences) were separated simultaneously in order to calibrate fractions. Fractions were subjected to SDS-PAGE

under non-reducing conditions, and then Western blotting was performed. Western blot images were analyzed using image analysis software (Scion Image Beta 4.02; Scion Corp.).

**Solid-phase Oleic Acid Binding**—Sodium salt of oleic acid (Sigma-Aldrich) was coupled to EAH-Sepharose (Amersham Biosciences) by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (Pierce) to prepare oleate-Sepharose according to Peters *et al.* (25). Oleic acid coupling was verified by binding bovine serum albumin and recombinant  $\alpha$ -synuclein protein. Mock-Sepharose was prepared from EAH-Sepharose by blocking coupling ligand with 1 M acetic acid. For the binding assay, 200 ng of Microcon-filtered protein was incubated with oleate-Sepharose or mock-Sepharose in 400  $\mu$ l of phosphate-buffered saline containing 0.1 mM EDTA at 37 °C for 30 min with agitation. Protein bound to Sepharose was settled on a spun column and washed extensively with phosphate-buffered saline. The bound protein was then eluted with 50% ethanol. Eluates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting.

**Transmission Electron Microscopy**—SOD1 proteins (40  $\mu$ M) were incubated at 37 °C for 24 h in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 150 mM NaCl and 0.1 mM EDTA supplemented with 100  $\mu$ M arachidonic acid. The samples were absorbed to a glow-charged supporting membrane on 400-mesh grids and fixed by floating on 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 5 min. After three washes with distilled water, samples were negatively stained by 2% sodium phosphotungstic acid and dried. Specimens were observed in a LEO 912AB electron microscope (LEO Electron Microscopy), operated at 100 kV.

**Toxicity Assay**—Cytotoxicity of protein aggregates was measured as described previously (26, 27). In brief, neuro2a mouse neuroblastoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were differentiated in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium with 0.3 mM dibutyl cAMP before use. Cells were plated at 30,000 cells/well in 96-well plates and differentiated overnight. The medium was removed, and prepared SOD1 aggregates were added in new medium without phenol red. After incubation for 18 h at 37 °C, the cells were assayed using an MTS reduction assay kit (Promega). Another plate also treated as described above was stained for 1 min with trypan blue, and stained cells were counted as dead cells.

#### RESULTS

**Unsaturated Fatty Acids Promote Self-assembly of SOD1s**—We expressed and homogeneously purified recombinant human SOD1s from the bacterial expression system (Fig. 1A). The purified wild-type and G93A enzymes showed comparable specific activity; however, A4V mutant showed ~56% activity compared with that of wild-type enzyme (Fig. 1B). The zinc ion content of the purified enzymes showed almost full occupancy; however, copper ion content of A4V was 54.5% of the wild-type level (Fig. 1C). Specific activity was correlated with copper ion occupancy of purified enzyme, indicating proper metal loading in the active site.

We next examined the effect of long-chain FAs on oligomerization of SOD1 proteins. Wild-type and mutant (A4V and G93A) SOD1 were incubated with various concentrations of arachidonic acid (AA) as described under "Experimental Procedures." After incubation, oligomerized SOD1 was subjected to SDS-PAGE and then detected by Western blotting. Under reducing conditions, mainly bands of ~16 and 38 kDa, corresponding to monomer and dimer sizes of SOD1, respectively, were detected (Fig. 2A). In contrast, under non-reducing conditions, smeared patterns of >50 kDa in size were supposed to be SOD1 oligomers (Fig. 2A). These observations suggest that disulfide bonds maintained SOD1 oligomers. Thus, non-reducing SDS-PAGE was thought to be an efficient method to detect SOD1 oligomers and aggregates. Among the holo-enzymes, wild-type and G93A were not oligomerized; instead, they segregated as monomer and dimer size bands (Fig. 2B, *top panel*). After incubation with >100  $\mu$ M AA, holo-A4V showed a faint smear pattern that was seen from 50 kDa to near the stacking gel range beside monomer- and dimer-size bands (Fig. 2B, *top panel*). In contrast, all metal-deficient enzymes, regardless of mutations, were oligomerized in the presence of >30  $\mu$ M AA

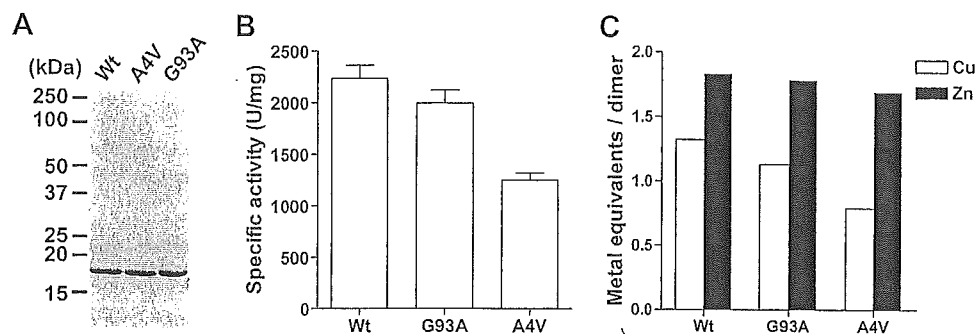


FIG. 1. Characterization of purified recombinant SOD1s. *A*, purified SOD1s were separated using SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. *B*, dismutase activity of the purified SOD1s was assayed by the xanthine/xanthine oxidase-based method. One unit of the activity is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% of dismutation of the superoxide radicals. *C*, metal content of the purified SOD1s was measured using 4-pyridylazoresorcinol assay in 6 M guanidine-HCl.

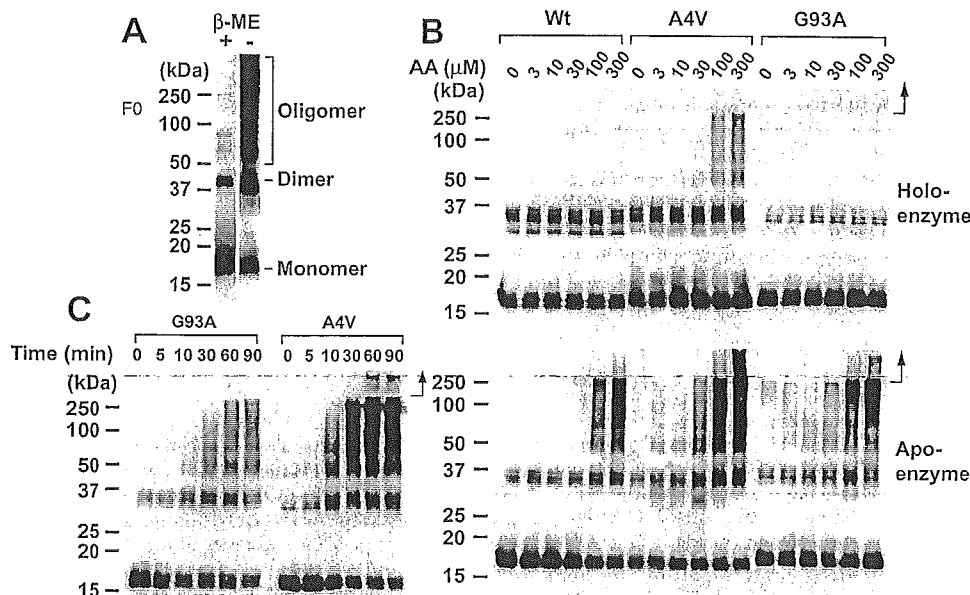


FIG. 2. Arachidonic acid promotes SOD1 oligomerization. *A*, FA-inducing oligomers of SOD1 were separated using SDS-PAGE with or without  $\beta$ -mercaptoethanol. *B*, apo-enzymes of SOD1 mutants ( $2.5 \mu\text{M}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of  $100 \mu\text{M}$  AA. At each time point, aliquots were placed on ice to stop the reaction. *C*, purified holo- or apo-SOD1 proteins ( $2.5 \mu\text{M}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 90 min in the presence of the indicated AA concentration. Incubated proteins were mixed directly with SDS-PAGE treatment buffer without reducing agents and boiled. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions. Proteins were detected by Western blotting as described under "Experimental Procedures." Arrows indicate the position of stacking gels.

(Fig. 2*B*, bottom panel). Apo-enzymes demonstrated higher oligomerization propensity than holo-enzymes depending on AA concentration (Fig. 2*B*). Thus, AA efficiently promoted oligomerization of SOD1s.

Next, we performed a time-course analysis of SOD1 oligomerization in the presence of AA. Metal-deficient G93A and A4V were oligomerized in a time-dependent manner (Fig. 2*C*). Maximum oligomerization was reached within 60 min of incubation in the presence of AA (Fig. 2*C*).

We then examined the effect that various FAs, including stearic acid, oleic acid, linoleic acid, and AA, have on SOD1 oligomerization. Unsaturated FAs, including oleic acid, linoleic acid, and AA, promoted SOD1 oligomerization (Fig. 3). However, saturated FAs and stearic acid had little effect on SOD1 oligomerization (Fig. 3). SOD1 oligomerization induced by FAs required at least monounsaturated FAs. This result may reflect the difference of solubility between unsaturated and saturated FAs in the buffer.

We verified the formation of SOD1 oligomers using a 10–40% glycerol density gradient centrifugation because presumable artifacts after detection of SOD1 oligomers using non-reducing SDS-PAGE may have remained. After fractionation, we could not observe high molecular mass SOD1 oligomers

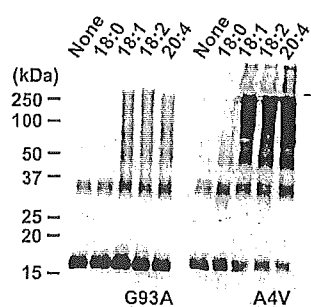


FIG. 3. Unsaturated fatty acids affect oligomerization of SOD1. Apo-enzymes of SOD1 mutants were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 90 min in the presence of FAs at concentrations of  $100 \mu\text{M}$ : 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; and 20:4, arachidonic acid. Arrows indicate the position of stacking gels.

from the incubated sample in the absence of AA; fractions were  $<67$  kDa and potentially represented monomer and dimer states (Fig. 4*A*, top panel). In contrast, we detected high molecular mass oligomers in fractions of  $>440$  kDa from the incubated sample in the presence of AA (Fig. 4*A*, bottom panel). Under these conditions, SOD1 with molecular mass of  $<67$  kDa was dramatically decreased compared with the sample incu-