

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

パーキン蛋白の機能解析と
黒質変性とその防御に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 田中 啓二
高橋 良輔
澤田 誠

平成19(2007)年 3月

目次

I. 総括研究報告	
パーキン蛋白の機能解析と黒質変性とその防御 服部 信孝	3
II. 分担研究報告	
1. パーキン蛋白の機能解析と黒質変性とその防御 服部 信孝	9
2. パーキンノックインマウスの作製・解析 田中 啓二	15
3. パーキンソン病におけるパエル受容体の役割 高橋 良輔	19
4. 神経変性疾患でのミクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究 澤田 誠	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

パーキン蛋白の機能解析と黒質変性とその防御

主任研究者：服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学講座 教授

研究要旨

パーキン遺伝子変異による Park2 は、青斑核の変性は極めて軽く選択的ドパミン神経変性のモデルとなる。また、病理学的検討では、一般にレビー小体形成が存在せず、正常パーキン蛋白が、存在することが形成上必須因子出ることが想定されている。従ってパーキン蛋白の機能解明は黒質選択的細胞死の機序を考える上で重要なヒントを与えてくれる。本研究課題の目的は、パーキン遺伝子変異に伴う Park2 の病態を解明し、更には孤発型 PD の病態を明らかにすることにある。更に既知の遺伝子変異スクリーニングを行いながら新規遺伝子座にマップされる家系の発掘を行い、原因遺伝子の単離・同定を目指した。平成 18 年度は、パーキンノックアウトマウスの解析と In vitro での解析を行った。In vivo autoradiography による解析で、ドパミン遊離異常を見出した。また protein chip の解析でミトコンドリア電子伝達系複合体 I の NDUFA4 サブユニットの低下が観察された。In vitro では、FRET を使い、parkin と Park6 の遺伝子産物の PINK1 に関して相互作用を検討した。その結果、parkin は、PINK1 の安定性に関与していることが示唆された。その機能解析と同時に新規遺伝子同定・単離のため既知の遺伝子変異スクリーニングを行った。対象は、 α -シヌクレイン、PINK1、DJ-1、LRRK2、パーキンであった。わが国には、DJ-1 遺伝子変異は存在しなかった。PINK1 遺伝子はパーキン遺伝子変異と比較すると少ないが、約 5%の陽性率であった。ヘテロ接合体でも発症している症例は、優性遺伝性 PD のうち 3.7%に認められた。パーキン遺伝子でもヘテロ接合体で発症する症例が少なからず存在することより劣性遺伝性で発症する FPD の共通した機序と考えられた。また Park9 の新規遺伝子 ATP13A2 の変異解析も行った。その結果、1 家系においてミスセンス変異を見出した。 α -シヌクレイン遺伝子の duplication 症例について、終夜脳波、PET、末梢血中の α -シヌクレイン mRNA を検討した。その結果、認知症が存在しなくとも後頭葉中心に代謝低下が観察された。LRRK2 の機能に関しては、脂質ラフトに局在していることが分かった。変異型と正常型で局在の変化がないことより gain-of-function 効果による病態への関与が推定された。新規遺伝子座の同定であるが、西日本を中心に存在している劣性遺伝性晩発性パーキンソン病について連鎖解析を行った。その結果、常染色体 3, 20 番に遺伝子座が絞られた。パエル受容体の解析では、アデノウイルスベクターにパエル受容体を組み込み、マウス線条体に注入すると細胞死が惹起されることが分かった。またこの細胞死は、パーキンノックアウトマウスやシャペロンタンパクの一種である ORP150 ノックアウトマウスのヘテロ接合体マウスに注入すると細胞死は増強した。このパエル受容体による細胞死はドパミン合成阻害剤により軽減した。またパエル受容体 Tg マウスと parkin ノックアウトマウスを掛け合わせる年齢依存性に黒質神経細胞死が惹起された。細胞死には、毒性を持ったミクログリアの関与が推定されているが、ミクログリアには二面性があり、この毒性転換の基礎的研究が、今後 PD におけるミクログリアの病態関与を証明できると考えている。HIV 脳症の発症機序にミクログリアの関与が指摘されている。その中でも、nef 遺伝子変異を導入すると毒性転換が起こることが判明している。毒性転換に必要な因子に nef 結合因子の関与が判明した。

- A. 研究目的
- パーキン遺伝子とその遺伝子産物パーキン蛋白の機能解析を推進し、本症における黒質神経細胞死の機序を分子レベルで解明すること
- を目的とする。またパーキン遺伝子陰性例が存在することが明らかにされ、PINK1(PARK6)が新たに若年性パーキンソン病の原因遺伝子として単離された。更に PARK7 の DJ-1 も単

離され、原因遺伝子産物の相互作用も注目されてきている。優性遺伝性パーキンソン病として PARK8 の LRRK2 が原因遺伝子として単離・同定されており、単一遺伝子異常から孤発型へのアプローチが有効な戦略となっている。また α -シヌクレイン遺伝子の重複型変異による FPD も報告され、正常型 α -シヌクレインの過剰産生による機序が推定された。更に本年度には Park9 の原因遺伝子 ATP13A2 が単離・同定された。本課題では、パーキン蛋白の機能解明のみならず遺伝性 PD の遺伝子産物との相互作用について検討している。また既知の遺伝子変異を持たない症例が少なからず存在することから本課題では、新規遺伝子の単離も視野に入れている。機能解析には、pakin のノックアウトマウスやパエル受容体過剰発現系マウスの確立ができていますので、これらパーキン遺伝子改変モデルが、パーキンソン病モデルに成りうるか行動学的、組織学的に検討することを目的とした。更にマイクログリアの毒性かと神経変性にも注目し、nef 遺伝子変異導入によるマイクログリアの毒性転換とその機序についても検討した。

B.研究方法

研究課題を遂行するために、次の 4 名よりなる研究グループを組織した。主任研究者：服部信孝（順天堂大学医学部神経学・老人性疾患病態治療研究センター）、分担研究者：田中啓二（東京都臨床医学研究所）、高橋良輔（独立行政法人理化学研究所脳科学総合センター）、澤田誠（名古屋大学環境医学研究所）である。

各研究者の研究分担は次の通りである。

服部信孝：パーキン遺伝子・遺伝子産物解析、新規原因遺伝子の同定・単離。

田中啓二：パーキンノックインマウス作製・解析。遺伝子産物の制御機構解析。

高橋良輔：パエル受容体の機能解析。パーキンノックアウトマウスの解析。

澤田誠：神経変性疾患でのマイクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究。

研究方法の詳細については、各研究者の分担研究報告書を参照されたい。本年度は、次に示す研究成果が得られた。

C.研究成果

遺伝子変異スクリーニングと新規遺伝子座の同定。

その後、更に解析症例（1100 症例）を増やして検討した結果パーキン遺伝子変異は劣性遺伝性 (ARPD) のうち約 40%と当初の比率より低下した。占めることが分かっている。ARPD のうち 6%は、PARK6 の原因遺伝子 PINK1 遺伝子変異よることが分かった(論文投稿中)。一方、イタリアの研究グループにより単離・同定された PARK7 の原因遺伝子 DJ-1 については、ハプロタイプからは PARK7 に連鎖可能な家系が存在していたが、変異を見出すことは出来なかった(論文準備中)。現在の処 DJ-1 遺伝子変異は、わが国には存在しないことが推定される。PINK1 と併せても約 50%強は、原因遺伝子が不明であることが推定された。興味深いこととして PINK1, パーキン共にヘテロ接合体で発症しうることが分かった。ヘテロで発症する症例は、ホモ接合体で発症する症例に比して発症年齢が高齢化の傾向があった。しかしながら、ヘテロ接合体でも発症年齢が、若年である症例も少な

から存在することより、ヘテロ接合体でも変異の部位によってはドミナントネガティブ効果で発症しうることが推定された。もう一つの可能性としては、ハプロ不全によるものが推定された。現在、劣性遺伝性 late-onset PD の新規遺伝子同定に向けて、連鎖解析を行っており、遺伝子座が常染色体 3 番、20 番と 2 カ所に絞られた。

一方、優性遺伝性パーキンソン病については、我が国で遺伝子座が決定された PARK8 の LRRK2 が単離・同定され、精力的に変異解析を行い、変異を持つ家系が少なからず存在していることが分かった。G2019S 変異は、ヨーロッパ、北アフリカで頻度が高く single founder effect が指摘されている。我が国にも同じ変異を持つ家系が存在することが明らかにされたが、ハプロタイプからは single founder の可能性は否定的であった。一方、Park8 の発端家系である相模原家系で見出された I2020T 変異は、ハプロタイプからはわが国の場合、相模原家系と先祖を共有していることが分かった。更にアジア人の PD 患者のリスクとなりうる遺伝子多型 G2385R を見出した。この遺伝子多型はアジア人特有のものであることが他の施設からも報告された。また α -シヌクレイン遺伝子の duplication が更に 3 家系、合計 5 家系が存在していることが分かった。PET による検討では、認知症の有無に関係なく後頭葉の代謝低下が観察された。終夜脳波や末梢血の α -シヌクレインの発現量は未発症者と発症者では大差なかった。

パーキンノックインマウスの解析。

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism, ARJP) の責任遺伝子であるパーキンの生理機能

とその変異・破綻によるパーキンソン病の発症機構を解明するためにパーキン遺伝子のノックインマウスを作製した。パーキン欠損マウスは正常に誕生し、1年を経過するも見かけ上の行動異常は全く観察されなかった。また組織学的な解析からも、中脳におけるドーパミンニューロンの変性・脱落等も観察されなかった。しかしパーキン欠損マウスにおいてはドーパミン (DA)代謝異常、即ち [14 C]raclopride を用いた *In vivo* autoradiography により(1) DA release の低下、(2)線条体における DA (D_1 and D_2) receptor の上昇、(3)中脳における DA レベルの上昇、(4)DA 合成の低下、等を見出した。この結果、パーキンソン病の発症機構を考察する場合、ドーパミンニューロン死に先立ってドーパミンの代謝異常が起こることが示唆された。これらの結果を総括すると、ARJP の発症にはパーキンタンパク質の機能喪失(loss-of-function)と共に、別の重要なリスクファクターの存在する可能性が示唆された。

ミトコンドリア NDUFV2 のノックアウトマウスの解析。

このマウスは胎生致死性であったが、ヘテロ接合体マウスではほぼ正常に発育した。しかし、MPTP に対する感受性については正常マウスに比して高くその障害程度は強かった。

新規パーキン結合蛋白の解析。

Parkin と PINK1 が結合することを見出した(論文投稿中)。FRET 現象を利用したもので、その結合はミトコンドリア外膜近傍で生じていることが予想された。またこの安定性に関しては、parkin 変異剖検脳や stable cell line で確認できている。その結合意義については、parkin が PINK1 の蛋白安定性に影響を与えている可能性が考え

られた。

パーキンソクインとノックアウトマウスに共通して量的変化の認められた分子の同定。

サイファーゲン社のプロテインチップを用い両モデルに共通して観察される 4 分子をピックアップした。その中で、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニット NDUFA4 の低下が観察された。これは chip から質量分析で確認出来ている。

パエル受容体 Tg マウスの解析。

Pael-R を発現するアデノウイルスを作製し、これをマウス黒質に導入することで、Parkin knockout (KO)マウスのドーパミンニューロンが Pael-R の毒性に特に脆弱であること、ドーパミンニューロンの脆弱性がドーパミン産生能に依存していることを見出した。さらに Pael-R-Tg に Parkin-KO マウスを掛け合わせた二重変異マウス (Pael-R-Tg/Parkin-KO) を作成した。二重変異マウスでは生後 6 ヶ月から黒質および青斑核に細胞脱落が観察されはじめて徐々に進行し、24 ヶ月ではヘテロ接合型マウスでは 20%、ホモ接合型マウスでは 40%の細胞死が観察された。これらの変化はカテコールアミン作動性ニューロンに特異的であり、海馬のニューロンには細胞死がみられなかった。なお変性部位には Lewy 小体様の構造物は見出せなかった。また、黒質では小胞体シャペロン BiP、転写因子 CHOP、スプライス型の XBP-1、活性化型カスパーゼ12の mRNA、蛋白質レベルでの増加が観察され、これらが黒質ではドーパミンニューロンでの変化を主として反映していることが免疫組織学的に確かめられた。さらに 18 ヶ月齢からは、ミトコンドリアの複合体 I の活性が特異的に低下することも見出した。以上よりこの二重変異マウス (Pael-R-

Tg/Parkin-KO) は AR-JP のはじめてのよいモデルになるものと思われる。一方 Pael-R KO マウスも作製した。Pael-R Tg では線条体でドーパミンが増加し、Pael-RKO マウスでは逆にドーパミンが減少することを見出し、Pael-R がドーパミン代謝に関わっていることを示した。

神経変性へのミクログリアの関与。

これまでの研究により、MPTP 投与直後のドーパミン神経のダメージに対して、部位に依存したミクログリアの活性化状態の違いがあること、および一部のミクログリアはドーパミン神経のダメージに対して保護的に作用することがわかった。そこで本年度はミクログリアの状態の違いをさらに調べるために幼弱マウスの黒質で人為的に (LPS 投与) ミクログリアを活性化するシステムを構築し神経変性を誘導したところ神経保護作用が増強することがわかった。そこで、神経細胞との共培養において神経保護作用のみを示す株化ミクログリアに HIV nef 遺伝子を導入すると神経変性を誘導するようになるモデルシステムを用いて神経毒性を持つ状態に関与するタンパク質を解析するために 2 次元電気泳動および LC-MS を用いて網羅的解析を行った。いくつかの特徴的なパターンが得られた。

D. 考察と結論

変異スクリーニングでは、pINK1, LRRK2, α -シヌクレイン遺伝子の重複が、わが国にも存在していることが分かった。スクリーニングの過程で、既知遺伝子陰性例が存在することが分かり、late-onset PD に属する大きな家系が存在することが分かった。現在、新規遺伝子座は 2 カ所に絞り込みができており、単離に向けてスクリーニングを行っている。

PINK1 と parkin のダブル変異を持った家系の

存在もあり、今回の parkin が PINK1 の安定性に
関与する結果は極めて重要であると考え。ま
たこの安定性に関しては、parkin 変異剖検脳や
stable cell line で確認できている。

本年度では、新規遺伝子座の同定にほぼ成功
した。また parkin と PINK1 の共通機構を見出し、
単一遺伝子異常に伴う PD の遺伝子産物は共通
カスケードを形成している可能性が示唆された。
ノックアウトマウスとパエル受容体 Tg マウス
での解析で、パエル受容体 Tg マウスが有効な
モデルになりうることが分かった。ミトコンド
リア電子伝達系 NDUFV2 のノックアウトマウス
を作製し、胎生致死的であった。今後は、詳細
な組織学的検討を加える予定である。ミクログ
リアに関しては二面性を持っていることが分か
った。今後は、単に神経細胞だけでなくグリア
系にも注目して検討する予定である。

D. 研究発表

分担研究報告書並びに研究成果の刊行に関する
一覧参照。

パーキン蛋白の機能解析と黒質変性とその防御

主任研究者：服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学講座 教授

研究要旨

平成 18 年度は、パーキンノックアウトマウスの解析を主に行った。パーキンノックアウトはエクソン 3,4 の二種を作製したが、表現型ほぼ正常であり、組織学的にも細胞脱落は認めなかった。一方で、in vivo autoradiography による解析で、ドパミン遊離異常を見出した。また protein chip の解析でミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニットの低下が観察された。In vitor では、FRET を使い、parkin と Park6 の遺伝子産物の PINK1 に関して相互作用を検討した。その結果、parkin は、PINK1 の安定性に関与していることが示唆された。その機能解析と同時に新規遺伝子同定・単離のため既知の遺伝子変異スクリーニングを行った。対象は、 α -シヌクレイン、PINK1、DJ-1、LRRK2、パーキンであった。わが国には、DJ-1 遺伝子変異は存在しなかった。PINK1 遺伝子はパーキン遺伝子変異と比較すると少ないが、約 5%の陽性率であった。ヘテロ接合体でも発症している症例は、優性遺伝性 PD のうち 3.7%に認められた。パーキン遺伝子でもヘテロ接合体で発症する症例が少なからず存在することより劣性遺伝性で発症する FPD の共通した機序と考えられた。また Park9 の新規遺伝子 ATP13A2 の変異解析も行った。その結果、1 家系においてミスセンス変異を見出した。 α -シヌクレイン遺伝子の duplication 症例について、終夜脳波、PET、末梢血中の α -シヌクレイン mRNA を検討した。その結果、認知症が存在しなくとも後頭葉中心に代謝低下が観察された。LRRK2 の機能に関しては、脂質ラフトに局在していることが分かった。変異型と正常型で局在の変化がないことより gain-of-function 効果による病態への関与が推定された。新規遺伝子座の同定であるが、西日本を中心に存在している劣性遺伝性晩発性パーキンソン病について連鎖解析を行った。その結果、常染色体 3，20 番に遺伝子座が絞られた。

A. 研究目的

パーキン遺伝子とその遺伝子産物パーキン蛋白の機能解析を推進し、本症における黒質神経細胞死の機序を分子レベルで解明することを目的とする。またパーキン遺伝子陰性例が存在することが明らかにされ、PINK1(PARK6)が新たに若年性パーキンソン病の原因遺伝子として単離された。更に PARK7 の DJ-1 も単離され、原因遺伝子産物の相互作用も注目されてきている。優性遺伝性パーキンソン病として PARK8 の LRRK2 が原因遺伝子として単離・同定されており、単一遺伝子異常から孤

発型へのアプローチが有効な戦略となっている。また α -シヌクレイン遺伝子の重複型変異による FPD も報告され、正常型 α -シヌクレインの過剰産生による機序が、推定された。更に本年度には Park9 の原因遺伝子 ATP13A2 が単離・同定された。本課題では、パーキン蛋白の機能解明のみならず遺伝性 PD の遺伝子産物との相互作用について検討している。また既知の遺伝子変異を持たない症例が少なからず存在することから本課題では、新規遺伝子の単離も視野に入れている。機能解析には、parkin のノックアウトマウスの確立ができ

ているので、これらパーキン遺伝子改変モデルが、パーキンソン病モデルに成りうるか行動学的、組織学的に検討することを目的とした。

B.研究方法

1. Parkin と既知の PD 遺伝子産物との結合 FRET を用いて α -シヌクレイン、parkin、PINK1 について相互作用を検討した。
2. 遺伝子陰性例の連鎖解析
常染色体劣性遺伝性 PD の連鎖解析を行った。
3. ミトコンドリア NDUFB2 の組織学的・行動学的解析
4. Protein chip による変動の見られる分子の同定
5. Park9 の原因遺伝子 ATP13A2 の変異スクリーニング
6. LRRK2 の遺伝子多型の関連分析
7. α -シヌクレイン遺伝子 duplication 家系の臨床学的検討 (PET、終夜脳波、リンパ球における α -シヌクレイン mRNA 量の定量)

C.研究成果

遺伝子変異スクリーニングと新規遺伝子座の同定。

その後、更に解析症例 (1100 症例) を増やして検討した結果パーキン遺伝子変異は劣性遺伝性 (ARPD) のうち約 40%と当初の比率より低下した。占めることが分かっている。ARPD のうち 6%は、PARK6 の原因遺伝子 PINK1 遺伝子変異よることが分かった(論文投稿中)。一方、イタリアの研究グループにより単離・同定された PARK7 の原因遺伝子 DJ-1 については、

ハプロタイプからは PARK7 に連鎖可能な家系が存在していたが、変異を見出すことは出来なかった(論文準備中)。現在の処 DJ-1 遺伝子変異は、わが国には存在しないことが推定される。PINK1 と併せても約 50%強は、原因遺伝子が不明であることが推定された。興味深いこととして PINK1, パーキン共にヘテロ接合体で発症しうることが分かった。ヘテロで発症する症例は、ホモ接合体で発症する症例に比して発症年齢が高齢化の傾向があった。しかしながら、ヘテロ接合体でも発症年齢が、若年である症例も少なからず存在することより、ヘテロ接合体でも変異の部位によってはドミナントネガティブ効果で発症しうることが推定された。もう一つの可能性としては、ハプロ不全によるものが推定された。現在、劣性遺伝性 late-onset PD の新規遺伝子同定に向けて、連鎖解析を行っており、遺伝子座が常染色体 3 番、20 番と 2 カ所に絞られた。

一方、優性遺伝性パーキンソン病については、我が国で遺伝子座が決定された PARK8 の LRRK2 が単離・同定され、精力的に変異解析を行い、変異を持つ家系が少なからず存在していることが分かった。G2019S 変異は、ヨーロッパ、北アフリカで頻度が高く single founder effect が指摘されている。我が国にも同じ変異を持つ家系が存在することが明らかにされたが、ハプロタイプからは single founder の可能性は否定的であった。一方、Park8 の発端家系である相模原家系で見出された I2020T 変異は、ハプロタイプからはわが国の場合、相模原家系と先祖を共有していることが分かった。更にアジア人の PD 患者のリスクとなりうる遺伝子多型 G2385R を見出した。この遺伝子多型はアジア人特有のもの

であることが他の施設からも報告された。また α -シヌクレイン遺伝子の duplication が更に3家系、合計5家系が存在していることが分かった。PET による検討では、認知症の有無に関係なく後頭葉の代謝低下が観察された。終夜脳波や末梢血の α -シヌクレインの発現量は未発症者と発症者では大差なかった。

パーキンノックインマウスの解析。

パーキン蛋白の機能解析に関しては、ドパミンキノン体の増加に伴い細胞死が惹起されることが分かったので、更にパーキンノックアウトマウスで in vivo autoradiography でドパミン遊離について検討した。その結果、マウス内でもドパミン代謝の変化が生じていることが証明された。しかしながら、細胞死は観察されなかった。組織学的にも行動学的にも変化は観察されなかった。更に昨年度報告した in vitro で、正常 α -シヌクレインがパーキンノックダウンによる細胞死を抑制し、変異 α -シヌクレイン (A30P and A53T) ではその抑制効果が観察されなかったことを見出したので、パーキン・ α -シヌクレインのダブルノックアウトマウスを作製した。ダブルノックアウトマウスでは、行動学的・組織学的検討で正常マウスとの差異を見出せていない。

ミトコンドリア NDUFV2 のノックアウトマウスの解析。

このマウスは胎生致死的であったが、ヘテロ接合体マウスではほぼ正常に発育した。しかし、MPTP に対する感受性については正常マウスに比して高くその障害程度は強かった。

新規パーキン結合蛋白の解析。

Parkin と PINK1 が結合することを見出した (論文投稿中)。FRET 現象を利用したもので、その結合はミトコンドリア外膜近傍で生じているこ

とが予想された。またこの安定性に関しては、parkin 変異剖検脳や stable cell line で確認できている。その結合意義については、parkin が PINK1 の蛋白安定性に影響を与えている可能性が考えられた。

パーキンノックインとノックアウトマウスに共通して量的変化の認められた分子の同定。

サイファージェン社のプロテインチップを用い両モデルに共通して観察される4分子をピックアップした。その中で、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニット NDUFA4 の低下が観察された。これは chip から質量分析で確認出来ている。

D. 考察と結論

変異スクリーニングでは、pINK1, LRRK2, α -シヌクレイン遺伝子の重複が、わが国にも存在していることが分かった。スクリーニングの過程で、既知遺伝子陰性例が存在することが分かり、late-onset PD に属する大きな家系が存在することが分かった。現在、新規遺伝子座は2カ所に絞り込みができており、単離に向けてスクリーニングを行っている。

PINK1 と parkin のダブル変異を持った家系の存在もあり、今回の parkin が PINK1 の安定性に関与する結果は極めて重要であると考えられる。またこの安定性に関しては、parkin 変異剖検脳や stable cell line で確認できている。

本年度では、新規遺伝子座の同定にほぼ成功した。また parkin と PINK1 の共通機構を見出し、単一遺伝子異常に伴う PD の遺伝子産物は共通カスケードを形成している可能性が示唆された。ミトコンドリア電子伝達系 NDUFV2 のノックアウトマウスを作製し、胎生致死的であった。今後は、詳細な組織学的検討を加える予定である。

また PD 遺伝子関連マウスとの交配を行うことで表現型の有無を検討する。 遺伝子変異解析では、新規原因遺伝子単離に向けて連鎖解析を進めると共に同定・単離を目指す。

D. 研究発表

Yamamoto S, Fukae J, Mori H, Mizuno Y, Hattori N: Positive immunoreactivity for vesicular monoamine transporter 2 in Lewy bodies and Lewy neurites in substantia nigra. *Neurosci Lett* 396:187-191, 2006

Kitami MI, Kitami T, Nagahama M, Tagaya M, Hori S, Kakizuka A, Mizuno Y, Hattori N: Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation. *FEBS Lett* 580:474-478, 2006

Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N: Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 59:298-309, 2006

Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K: Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 281:3204-3209, 2006

Sato S, Chiba T, Sakata E, Kato K, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K: 14-3-3 eta is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J* 25:211-221, 2006

Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, Sato K, Hattori T, Lu C-S, Inzelberg R, Djaldetti R, Melamed E, Amouri R, Gouider-Khouja N, Hentati F, Hatano Y, Wang M, Imamichi Y, Mizoguchi K, Miyajima H, Obata F, Toda T, Farrer MJ, Mizuno Y, Hattori N: Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries *MovDisord* 21:1102-1108, 2006

Kubo S, Hattori N, Mizuno Y: Recessive Parkinson's disease *Mov Disord* 21:885-893, 2006

Akagawa M, Ito S, Toyoda K, Ishii Y, Tatsuda E, Shibata T, Kawai Y, Ishino K, Kishi Y, Adachi T, Tsubata T, Takasaki Y, Hattori N, Matsuda T, Uchida K: Bispecific antibodies against modified protein and DNA with oxidized lipids *Proc Natl Acad Sci* 103:6160-6165, 2006

Ishihara L, Gibson RA, Warren L, Amouri R, Lyons K, Wielinski C, Hunter C, Swartz JE, Elango R, Akkari A, Leppert D, Surh L, Reeves KH, Thomas S, Ragone L, Hattori N, Pahwa R, Jankovic J, Nance M, Freeman A, Gouider-Khouja N, Kefi M, Bouar M, Sassi SB, Yahmed SB, Euch-Fayeche EG, Middleton L, Burn DJ, Watts RL, Hentati F: Clinical features of Parkinson's patients with and without LRRK2 mutations *Arch Neurol* 63:1250-1254, 2006

Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C: Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296:661-670, 2006

Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T.: Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158, 2006

Nakamura A, Kitami T, Mori H, Mizuno Y, Hattori N: Nuclear localization of the 20S proteasome subunit in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 406:43-48, 2006

Sato S, Chiba T, Nishiyama S, Kakiuchi T, Tsukada H, Hatano T, Fukuda T, Yasoshima Y, Kai N, Kobayashi K, Mizuno Y, Tanaka K, Hattori N: Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice shown by ex vivo autoradiography. *J Neurosci Res* 84:1350-1357, 2006

Manabu Funayama, Yuanzhe Li, Hiroyuki Tomiyama, Hiroyo Yoshino, Yoko Imamichi, Mitsutoshi Yamamoto, Miho Murata, Tatsushi Toda, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population *NeuroReport* (in press)

Hattori N, Machida Y, Sato S, Noda K, Iijima-Kitami M, Kubo S, Mizuno Y. Molecular mechanisms of nigral neurodegeneration in Park2 and regulation of parkin protein by other proteins. *J Neural Transm Suppl.* 70, 2006, pp205-208

Mizuno Y, Hattori N, Yoshino H, Hatano Y, Satoh K, Tomiyama H, Li Y. Progress in familial Parkinson's disease *J Neural Transm Suppl.* 70, 2006, pp191-204

服部信孝. Question & Answer Parkinson 病 うつ病とパーキンソン病について教えてください. Mebio Brain & Mind, メジカルビュー社, 東京, 2006, pp197-199

服部信孝, 西岡健弥, 佐藤栄人. 第 2 章病因・病理と病態整理 病因・発症機序. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC39 パーキンソン病, 水野美邦・編, 最新医学社, 東京, 2006, pp24-33

船山 学, 服部信孝. Parkinson 病の遺伝的要因. 医学のあゆみ 217(9), 医歯薬出版株式会社, 大畑秀穂編集, 東京, 2006, p909

富山弘幸, 服部信孝, 水野美邦. ミトコンドリア異常とその他の疾患 パーキンソン病. CLINICAL NEUROSCIENCE 24(6), 中学医学社, 東京, 青木 滋編集, 2006, pp688-690

服部信孝. パーキンソン病の薬物療法: 最近の動向と問題点. 脳神経外科ジャーナル 15(11), 日本脳神経内科コンgres, 東京, 2006, pp737-740

茂泉俊次郎, 和田 真, 吉見建二, 服部信孝, 中里泰三, 北澤 茂. 時間順序判断に対する MPTP 投与の効果. 平成 17 年度老人性疾患病態・治療研究センター研究発表会, 順天堂医学 52, 2006, p479

服部信孝. 第 47 回日本神経学会総会 セミナー パーキンソン病の発症機序 遺伝性パーキンソン病は黒質神経変性の鍵を握るか? Pharma Medica 24(11), 2006, pp91-97

招待講演

1. Hattori N. Do Familial PD Gene Products Share a Common Pathway? International Congress of Neuroscience and Molecular Imaging, 21st-22nd January, 2006, Taipei, Taiwan
2. Hattori N. Protein degradation system in nigral degeneration. World Parkinson Congress, 22nd-26th, February, 2006, Washington, USA
3. Hattori N. A common pathway among gene products of familial Parkinson's disease. Strategic Japanese German workshop on research in neurodegenerative diseases 23rd - 25th March, 2006, Tuebingen, Germany
4. Hattori N. Molecular mechanisms of nigral neuronal death in PARK2, The Movement Disorders Society's 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 28th October - 2nd November, 2006, Kyoto, Japan
5. 服部信孝. パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防御. こころの健康科学 (神経分

野) 研究成果発表会[厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業], 東京, 2月1日, 2006

6. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序～今後の展望～. 第 3 回沖縄パーキンソン病研究会学術集会, 沖縄, 2月3日, 2006
7. 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療 Up to Date. K-ネットカンファレンス, 東京, 2月8日, 2006
8. 服部信孝. 神経難病における在宅医療の必要性と問題点. 第 8 回日本在宅医学会大会, 浦安, 2月12日, 2006
9. 服部信孝. パーキンソン病の治療. 台東保健所 難病講演会, 東京, 3月28日, 2006
10. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序. 21 世紀 COE プログラム脳の機能統合とその失調, 東京, 4月25日, 2006
11. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 遺伝性パーキンソン病は黒質神経変性の鍵を握るか?. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5月11-13日, 2006
12. 服部信孝. パーキンソン病の薬物療法: 最近の動向と問題点. 第 26 回日本脳神経外科コンgres, 東京, 5月12-14日, 2006
13. 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療 Up To Date. 岡山病診連携勉強会, 岡山, 5月23日, 2006
14. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 疾患と動物モデルの類似性と相違性. 第 47 回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, 5月24-26日, 2006
15. 服部信孝. パーキンソン病の最前線. 奈良パーキンソン病学寿講演会, 奈良, 6月3日, 2006
16. 服部信孝, 村田美穂, 鈴木正彦, 高橋一司. パーキンソン病の先端医療と病気と上手なつきあい方. 全国パーキンソン病友の会東京支部 シンポジウムと文科会, 東京, 10月7日, 2006
17. 服部信孝. 「パーキンソン病の薬物療法」-薬物療法のメリット・デメリット-. 第 7 回埼玉パーキンソン病治療研究会, 埼玉, 10月19日, 2006
18. 服部信孝. パーキンソン病の最前線. 第 5 回 HENSEISHIKKAN 懇話会, 東京, 11月10日, 2006
19. 服部信孝. Mitochondrial dysfunction involving with other organelle in Parkinson's disease. 第 6 回ミトコンドリア学会, 東京, 12月13日, 2006
20. 服部信孝. 「パーキンソン病の治療そしてリハビリテーションについて」-前向きに頑張

- るためにー」. パーキンソン病テレフォン教室 2006, 東京, 12月25日, 2006
21. 服部信孝. 第一回茨城パーキンソン病研究会, 茨城, 1月24日, 2007
 22. 服部信孝. パーキンソン病の原因を追って. 第310回順天堂医学会学術集会, 東京, 3月29日, 2006
 23. 服部信孝. 「パーキンソン病の臨床とちょっと基礎」. 第2回佐賀パーキンソン病勉強会, 佐賀, 2月2日, 2007
 24. 服部信孝. Genetic features of familial PD. Asian Educational Symposium Sponsored, 東京, 2月3-4日, 2007
 25. 服部信孝. 「パーキンソン病の最前線」. 第6回京滋パーキンソン病研究会, 京都, 2月8日, 2007
 26. 服部信孝. 「パーキンソン病発症機序の解明: 遺伝子改変モデルから分かったこと」. Bio-Rad イブニングセミナー, 東京, 3月13日, 2007
 27. 服部信孝. 「パーキンソン病治療の最前線」. アルツハイマー病とパーキンソン病研究の最前線, 京都, 3月17日, 2007
 28. Hattori N. The role of levodopa in treatment of PD. TRIPLE NEUROSCIENCE STANDALONE MEETING in Beijing, Beijing, China, March 29-31, 2007
 29. 服部信孝. 「パーキンソン病の発症機序」. 平成18年度日本神経学会九州地区生涯教育講演会, 福岡, 3月18日, 2007
 30. 服部信孝. 「パーキンソン病治療戦略」. Web講演会, 東京, 3月28日, 2007

E. 特許その他

なし

パーキンノックインマウスの作製・解析

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所 副所長

研究要旨

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP) の原因遺伝子であるパーキンの病態生理学的機能を解明するためにパーキン遺伝子のノックイン(GFP)マウスを作製した。パーキン欠損マウスは正常に誕生し形態学的異常及び行動異常は観察されなかったが、同マウスを用いたドーパミン(DA)代謝研究、即ち [¹¹C]raclopride を用いた *In vivo* autoradiography から(1) DA release の低下、(2)線状体における DA (D₁ and D₂) receptor の上昇、(3)中脳における DA レベルの上昇、(4)DA 合成の低下等を見出した。本年度はさらにプロテアソームと神経変性の関係を解析するために我々が発見したプロテアソームの分子集合因子 PAC1(Proteasome Assembling Chaperone 1)遺伝子を条件的に欠損させることのできるマウス (PAC1^{Flox/Flox}) を作製した。この PAC1^{Flox/Flox} マウスを Nestin-Cre Tg マウスと交配させて作製した PAC1^{Flox/Flox}:Nes マウス (ニューロンでプロテアソームのレベルが減少) は神経変性疾患に陥ることを見出した。現在、ドーパミンニューロンに特異的にこれらの遺伝子を欠損させたマウスを作出中である。

A. 研究目的

われわれは 2000 年パーキンがユビキチン連結酵素 (リガーゼ) であることを世界で最初に突き止めて以来 (1)、パーキンの機能と病態に関する包括的研究を推進してきた。と同時に、この間、パーキンの研究は世界的に大きく進展してきたが、依然として AR-JP 及び弧発型パーキンソン病(PD)の発症機構は不明のままである。パーキン遺伝子が発見されてから今日まで世界で複数のグループがパーキンのノックアウト (KO) マウスを作製したが、PD 患者に見られる運動失調を中心とした行動異常は、殆ど観察されていない。そこで本研究では、われわれが新規に作製したパーキンノックインマウスを用い、ドーパミン代謝を中心に解析した。

一方、これまでにプロテアソーム (ユビキチン化タンパク質を選択的に分解する真核生物の ATP 依存性プロテアーゼ複合体) とパーキンソン病の関係については、多くの controversial な研究成果が報告されており、謎のままである。その大きな理由はこの問題に迫る遺伝学的な研究手段がないためである。他方、われわれは最近の研究からプロテアソームの分子集合に必須なプロテアソームに特異的な分子シャペロン Proteasome Assembling Chaperone (PAC) 1/PAC2 ヘテロダイマー (2) と PAC3/PAC3 ホモダイマーを発見した (3)。これらのシャペロン分子の発現低下は、細胞

内におけるプロテアソームレベルを低下させることが推定される。実際、PAC1 の単純ノックアウトマウスは胎生致死になった (未発表)。そこで条件的に PAC1 を欠損させることが可能なコンディショナルノックアウトマウス PAC1^{Flox/Flox} を作製し、このマウスと Nestin-Cre Tg マウスを交配して中枢神経系において特異的に PAC1 が欠損したマウス (PAC1^{Flox/Flox}:Nes) を作製した。その結果、生後 3 週間後に激しい神経変性疾患の症状を示した。

A. 研究方法

1) パーキンノックインマウスの作製

・ターゲティングベクター：12 個のエクソンからなるパーキン遺伝子のエクソン 2 をノックアウトするために、エクソン 2 のはじめの 5 塩基と GFP をインフレームで繋ぐ DNA を PCR で作製し、さらに neo 耐性遺伝子を lox で挟んだサイトを繋げ、ターゲティングベクターを構築した。

・ES 細胞のスクリーニングとノックインマウスの作製：TT2 細胞を利用し、ターゲ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。0.2 mg/ml の G418 存在下で培養し、薬剤耐性細胞をピックアップした。PCR, およびサザンブローディングによりノックアウト ES 細胞を探索した。得られた ES 細胞を、マウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、翌

日仮親の子宮に移植した。ヘテロマウスがジャームラインに入っていることを確かめ、交配によりパーキンを欠損し、代わりに GFP を導入したホモマウスを作製した。

2) Neurochemical Analysis

ドーパミン (DA) とその代謝産物である 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) と homovanillic acid (HVA) は、高速液体クロマトグラフィーで定量した。

3) In vivo Autoradiography

・ Chemicals: [^{14}C]dihydratetrabenazine ([^{14}C]DTBZ), [^{14}C] β -CFT (2 β -carbomethoxy-3 β -(4-fluorophenyl) tropane: ドーパミン transporter probe). [^{14}C]SCH23390 (D1 receptor probe) and [^{14}C]raclopride (D2 receptor probe) は、RBI (Natick, MA) から購入した。 [^{14}C] β -CFT と [^{14}C]SCH23390 は *N*-methylation of the corresponding nor-compounds with [^{14}C]methyl iodide prepared from [^{14}C]CO₂ によって調整した。 [^{14}C]DTBZ は [^{14}C]raclopride *O*-methylation of the corresponding nor-compounds with [^{14}C]methyl iodide によって合成した。

・ Ex-vivo Imaging: 各標識物質 (1 MBq/g 体重) をマウスに静脈注入し 30 分後 ([^{14}C]DTBZ, [^{14}C]SCH23390 と [^{14}C]raclopride) と 60 分後 (L-[β - ^{14}C]DOPA と [^{14}C] β -CFT) に、脳の凍結切片を作製した。それらの切片を phosphoimaging plate に 30 分間放置後、放射性の分布を phosphoimaging plate reader (BAS-1500 MAC, Fuji Film Co., Tokyo) を用いて測定した。DA 合成活性, vesicular monoamine transporter (VMAT) availability, DA reuptake site availability 及び DA (D₁ and D₂) receptor binding activities は、次式で検定した。DAindex = (RI_{str} - RI_{cere}) / RI_{cere} : RI_{str} は striatal regions (線状体) における放射活性, RI_{cere} は cerebellum (小脳) における放射活性を表示。

4) 条件付き PAC1 欠損マウス (PAC1^{Flox/Flox}) の作製

ターゲティングベクターの作製と ES 細胞のスクリーニングは、文献 (4) に従って行った。ノックアウト ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に移植、得られたヘテロマウスがジャームラインに入っていることを PCR およ

びサザンブローディングにより確認した。最終的にヘテロマウスを交配して条件的 PAC1 欠損ホモマウス (PAC1^{Flox/Flox}) を作製した。

5) 中枢神経系特異的 PAC1 欠損マウス (PAC1^{Flox/Flox}:Nes) の作製

PAC1^{Flox/Flox} マウスと Nestin-Cre トランスジェニックマウス (ニューロンで特異的に発現している Nestin のプロモーターに Cre リコンビナーゼを連結して作製した Tg マウス) を交配し、中枢神経 (CNS: central nervous system) で PAC1 が欠損したマウス (PAC^{Flox/Flox}:Nes) を作製した。

A. 研究結果

[研究 1] パーキン欠損マウスを用いたドーパミン代謝の研究 (5)。

パーキン遺伝子のエクソン 2 を欠損させた KO マウスを用い *In vivo* autoradiography によるドーパミンシグナル系を解析して以下の結果を得た。

・われわれが作製したパーキンノックインマウスは、rotarod task 等で調べた行動異常は観察されなかった。またチロシン水酸化酵素 (TH) の免疫染色での観察結果、ドーパミンニューロンの変性 (TH 陽性ニューロンの数の低下) も観察されなかった。

・パーキン欠損マウスの黒質を含む中脳においてドーパミン (DA) レベルが有意に上昇していたが、その代謝産物である 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) と homovanillic acid (HVA) は変動しなかった。一方、線状体ではパーキンの有無にかかわらず、DA、DOPAC、HVA の変化は観察されなかった。

・主要な DA レセプターである D₁ と D₂ の *In vivo* レベルは (各々のレセプター-antagonists, [^{14}C]SCH23390 と [^{14}C]raclopride の binding potential (BP) で測定)、パーキン欠損マウスで有意に上昇していた。しかしドーパミン transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT) のレベル (各々 [^{14}C] β -CFT と [^{14}C]DTBZ の BP で測定) は変動しなかった。

・他方、L-[β - ^{14}C]DOPA の [β - ^{14}C]DA への転換で測定した DA の合成活性は、パーキン欠損マウスで有意に低下していた。

・最後に methamphetamine 処理後ドーパミン D₂ receptor antagonist [^{14}C]raclopride の BP で調べた線状体における DA release 活性は大きく低下していた。

[研究2] 神経変性疾患におけるプロテアソーム動態の遺伝学的解析 (投稿準備中)。中枢神経系 (CNS) で PAC1 を欠損させた (生後3週間目の) マウスは、異常な limb-clasping 反応を示し、また rotarod 試験でハンチントン舞踏病など小脳変性に見られるのと類似の神経失調症状を示した。現在、組織学的方法および生化学的方法によりプロテアソームの低減に感受性の高いニューロンの同定を進めている。またドーパミンニューロンにおけるプロテアソームの役割を解明するために PAC1^{Flox/Flox} マウスと TH (Tyrosine Hydroxylase) -Tg マウスを交配中である。

A. 考察

ニューロンのような非分裂細胞では、タンパク質の品質管理が特に重要であり、その中心はユビキチン・プロテアソームシステムによるタンパク質分解経路である。しかし、ユビキチン・プロテアソームシステムと AR-JP の関係については不明な点が多い。

そこで本年度は新たに作製したパーキンソンノックインマウスを用いてドーパミン代謝について *In vivo* autoradiography を駆使して詳細に解析した。その結果、パーキンソン欠損マウスでは、ドーパミン遊離の低下という結果を得た。黒質におけるドーパミンレベルの上昇、ドーパミン受容体の上昇、ドーパミン合成の低下等は、ドーパミン遊離の低下に不随した結果と思われる。このドーパミン代謝の異常は、AR-JP 及び弧発型パーキンソン病発症の初期症状と思われる。

一方、これまでプロテアソーム阻害剤 (P S I : carbobenzoxy-L-isoleucyl-gamma-t-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal、lactacystin, epoxomycin 等) を中脳に注入すると、パーキンソン病床状を発症させるトキシシン (神経毒素) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の感受性が高まり、封入体の形成やチロシン水酸化酵素抗体陽性のドーパミンニューロンの脱落が引き起こされることが報告されていた。この方法は最初に報告した McNaught' protocol と呼ばれている。ところが、昨年、この報告に疑義を呈して否定する報告や逆に支持する報告も出て、激しい論争になった。しかし、プロテアソームの阻害とパーキンソン病の関係については、決着がつかないまま今日に至っている。そこで、われわれは独自に発見したプロテアソームの分子集合因子 PAC1 (2) を

ニューロンで欠損させ、神経細胞内でのプロテアソーム量を減弱させると神経変性疾患に陥ることを世界で最初に見出した。この条件的 PAC1 欠損マウスを用いてドーパミンニューロン特異的 PAC1 欠損マウスを作製すれば、上記の論争に終止符が打てると考え、現在、このマウスの作出を進めている。と同時にこの PAC1^{Flox/Flox}:Nes マウスはパーキンソン病発症過程の初期にプロテアソームの破綻でどのような異常がドーパミンニューロンに発生するかを時空間的に解析できる唯一の系であるので、この解析も精力的に進めていく計画である。

E. 結論

1) パーキンソンノックインマウスの脳においてドーパミン遊離の低下を主因とするドーパミン代謝異常を観察した。

2) 中枢神経系ニューロンで PAC1 を欠損させプロテアソームレベルを低下させると神経変性疾患が発症した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature Genet.** 25, 302-305.
- (2) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes, **Nature** 437, 1381-1385.
- (3) Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. **Mol Cell** 24, 977-984.
- (4) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. **Nature** 441, 880-884

- (5) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. **J. Neurosci, Res.** 84,1350-1357.

2. 学会発表

Keiji Tanaka : Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] . January 12-13, 2006, Osaka, Japan.

Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata : Multiple Chaperones Assist the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . The Fourth NIBB-EMBL Symposium “Biology of Protein Conjugation: Structure and Function”. Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006), Okazaki.

Keiji Tanaka : Ablation of autophagy causes neurodegeneration . The Movement Disorder Society’s (MDS) 10th International Congress of Parkinson’s Disease and Movement Disorders (November 1, 2006), Kyoto.

Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka: Ablation of constitutive autophagy in neural cells causes neurodegeneration in mice, The 4th Congress of Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies November 30-December 4, 2006 Hong Kong, China.

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

パーキン蛋白の機能解析と

黒質変性及びその防御に関する研究

パーキンソン病におけるパエル受容体の役割

研究代表者：高橋良輔 京都大学医学研究科・臨床神経学 教授

研究要旨

常染色体劣性遺伝性パーキンソニズム(AR-JP)の病因遺伝子として同定された Parkin はユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであり、蛋白質分解系の破綻が PD の発症に関わることを示す強い証拠を提供している。我々はパーキンの基質蛋白質として構造異常を起こした Pael 受容体(Pael-R)を単離し、Parkin の変異によって分解されなくなった Pael-R が蓄積し、小胞体ストレスを引き起こして神経変性が生じるという仮説を提唱している。本年度は Pael-R のトランスジェニック (Tg) マウスと Parkin ノックアウトマウスを掛け合わせた二重変異 (Pael-R Tg/Parkin KO) マウスを作製した。Pael-R/Parkin-KO マウスでは黒質、青班核のカテコールアミン作動性ニューロンが特異的変性し、二年齢で Tg のホモ接合型では 40%の細胞脱落が認められた。また同部位で小胞体ストレス応答および酸化ストレスが惹起されていた。α-シヌクレイン陽性封入体は認められなかった。以上より Pael-R Tg/Parkin KO 二重変異マウスは AR-JP のよいモデルになるものと考えられた。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物 Parkin は、細胞内タンパク質の分解にかかわるユビキチン・プロテアソーム経路のユビキチンリガーゼ (E3) の活性を持ち、AR-JP 患者でみられる変異体はこのユビキチンリガーゼ活性が欠失または低下している。このことは、Parkin によって本来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。我々が Parkin の基質として同定した膜タンパク質パエル受容体 (Pael-R) は神経系培養細胞内で過剰発現させると、高度なユビキチン化とともに細胞死が観察される。この原因は Pael-R が折り畳み効率の低いタンパク質であり、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小胞体及び細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こすからであると考えられる。

Pael-R をショウジョウバエの脳神経全体に発現させると、加齢とともにドーパミン神経のみ選択的に変性欠落する。これらの結果を踏まえ、パーキンソン病モデルマウスを作出する目的で、Pael-R トランスジェニックマウス (Pael-R Tg) を作製し、更に Pael-R の蓄積を増強させるため、パーキンノックアウト(Parkin-KO)マウスを掛け合わせた。パーキンソン病モデルの作成を試みた。

B. 研究方法

ヒト Pael-R cDNA を神経特異的な PDGF プロモーター及び prion プロモーターの下流に連結したプラスミドを作製し、それらをマウス受精卵に導入して Pael-R Tg マウスを作製した（平成 16 年度研究報告参照）。これに、同じく常法により作製したエクソン 3 を欠損する Parkin KO マウスと掛け合わせ、パーキン欠損のバックグラウンドのもとに non-Tg, hemizygous Tg, homozygous Tg の 3 種類の遺伝子型のマウスを作製し、神経病理学的解析、行動学的解析、神経化学的解析を行った。

C. 研究結果

Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスでは、可溶性のみならず、不溶性 Pael-R の発現量が hemizygote で non-Tg の 10 倍以上と顕著に増加しており、その程度はパーキンに関して野生型の Pael-R Tg マウスに比べても有意に増えていた。また選択的に黒質ドーパミンニューロンの脱落が認められ、homozygous Tg では 12 ヶ月で 20%、24 ヶ月の加齢マウスでは約 40%もの減少が観察された。Hemizygous Tg マウスでは細胞死の程度は Homozygous Tg のちょうど半分程度であった。 α -シヌクレインの抗体で染色する限りではレビー小体、レビーニューライト様の構造は検出できなかった。細胞死は観察されたものの、行動学的にはオープンフィールド試験でもロタロッド試験でも、二重変異マウスとコントロールの間で差は見られなかった。小胞体ストレスの指標では、6 ヶ月齢から BiP、CHOP の発現レベルが持続的に上昇しており、活性化型カスパーゼ 12 及びリン酸化 JNK2 も量も増加していた。また、Pael-R Tg においては、ドーパミン及びその代謝産物である HVA、DOPAC が 6 ヶ月齢でトランスジーンの量依存的に増えていたが、12 ヶ月齢以降、特に homozygote で低下傾向がみられた。さらに中脳では酸化的ストレスの指標とな

るカルボニル化タンパク質のレベルが 6 ヶ月齢から上昇傾向あり、24 ヶ月齢で顕著な差が見られるようになったが、大脳皮質では 24 ヶ月齢でもコントロールとの間に有意な差はみられなかった。最後に 18 ヶ月齢以降、黒質におけるミトコンドリアの複合体 I の活性が特異的に低下した。

D. 考察

Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスは Parkin-KO とのかけ合わせで更に Pael-R 量が増加することから、Pael-R がパーキンの基質であることが更に裏付けられた。また、二重変異マウスは時間依存的、トランスジーン量依存的な慢性進行性のカテコールアミン作動性ニューロン特異的変性を示し、レビー小体陰性であったことより、ヒト AR-JP のよいモデルになるものと思われた。細胞死が生じたにもかかわらず、行動学的な異常がみられなかったのは、ヒトのパーキンソン病でも 50-60%以上の細胞死が起こらないと発祥しないという観察事実と一致する。初期の Pael-Tg におけるドーパミン及びその代謝産物の増加は Pael-R がドーパミン代謝にかかわっているという昨年度の我々の研究結果を裏付けるものであった。細胞死の原因はこれまで我々が示してきたように、小胞体ストレスの関与が大きいと考えられる。黒質では更に酸化的ストレスの亢進がみられたが、これはドーパミンの存在、変性にとまなうミクログリオシスなどが複合的に関与しているものと想像される。ミトコンドリア複合体 I の選択的活性低下の原因は今後更に検討をすすめていく必要があるが、小胞体ストレスおよびそれに伴う細胞死の下流にミトコンドリア複合体 I の活性低下があることを示唆しており、大変興味深い。

E. 結論

Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスは時間依存的、トランスジーン量依存的な慢性進行性のカテコールアミン作動性ニューロン特異的変性を示し、レビー小体陰性であったことより、ヒトAR-JP のよいモデルとなる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, M., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, K. and Nomura, Y. (2006) A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin., **J. Neurochem.**, 99, 1456-69

Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M, Namekawa K, Kiyama H, Stern DM, Hori O, Wakamatsu K, Ito S, Itohara S, Takahashi R, Ogawa S. (2007) Pael Receptor Induces Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra via Endoplasmic Reticulum Stress and Dopamine Toxicity, which is Enhanced under Condition of Parkin Inactivation. **Hum. Mol. Genet.**, 16:50-60.

Wang H, Imai Y, Kataoka A, Takahashi R. (2007) Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress. **ARS Forum**, in press.

Takahashi, R. : The pathological role of Pael-receptor/GPR37 in AR-JP. *Park. Relat. Disord.*, Suppl 2:S110-3

Wang, H.Q., Imai, Y. and Takahashi, R. Expanding insights of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. **ARS Forum**, in press.

2. 学会発表

国際学会発表

Takahashi, R. : "Proteasome inhibition" Workshop "controversies in the pathogenesis of PD", 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto(2007.10.30)

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