

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
黒質変性及びその防御に関する研究

平成16年度～18年度 総合研究報告書

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及びその防御 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及びその防御 服部 信孝	9
2. パーキンノックインマウス作製・解析 田中 啓二	16
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	23
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	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	59

パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防御

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

遺伝性パーキンソン病 (FPD)は、単一遺伝子異常で発症することから、その病態解明は孤発型パーキンソン病(SPD)の原因究明に繋がると考えられている。その中で最も頻度が高く、世界中に分布するタイプとして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。3年間の期間で、パーキンノックアウトマウスの解析や parkin のリガーゼ活性の制御機構などを明らかにできた。In vivo autoradiography による解析で、ドパミン遊離異常を見出した。パエル受容体の解析では、アデノウィ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。このことはパエル受容体による細胞死には、ドパミン代謝と小胞体ストレスの関与が推定された。またパエル受容体 Tg マウスでは、加齢依存性に細胞死が惹起された。また parkin 変異による剖検脳と同様に封入体形成は認めなかった。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おり、parkin の機能低下でミクログリアの変化が惹起されるか検討課題として残った。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。わが国では α -synuclein の duplication の症例が存在し、浸透率が低いことが分かった。このことにより今後発症者と未発症者の違いを明らかにすることで神経保護薬の開発を目指したい。また西日本を中心に劣性遺伝性晩発性 PD の存在が確認された。

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、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。

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 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。また α -シヌクレインの multiplication の家系が報告されたが、我が国にも存在しているか解析し、計 5 家系が α -シヌクレイン遺伝子の duplication であることが分かった。興味深いことに今まで報告されてきた

duplication の家系は、認知症が存在しないことが推定されていたが、我々が解析した家系では、認知症が存在していた。

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。キノン体産生の有無をダブルノックアウトマウスとパーキンノックアウトマウスで検討を行ったが、現在のところテクニカルな問題でできなかった。

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。現在、質量分析にて分子の同定作業に入った。

パーキンの In vitro におけるユビキチンリガーゼ活性とこの活性に及ぼす AR-JP 変異の生化学的解析。

MBP 融合パーキンを E1, E2 (Ubc7, UbcH7,

Uev1/Ubc13)存在下でユビキチンと共に保温したとき、強い自己ユビキチン化活性が複数のバンドとして検出された。このユビキチン化は GST-ユビキチンを用いた場合の高分子量側へのバンドシフトで実証できた。In-frame でパーキンに融合した MBP もパーキンの疑似基質としてユビキチン化された。ポリユビキチン化を阻害するメチル化ユビキチンは、上記の活性を全く抑制しなかった。さらにユビキチン内の7個のリジン残基を全てアルギニンに変換したポリユビキチン鎖を形成できない lysine-less ユビキチンを用いても、野生型ユビキチンと同じ活性が観察された。これらの結果は、パーキンが少なくとも In vitro では、(自己ユビキチン化と疑似基質 MBP のユビキチン化で調べた限りであるが)複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることが証明された。

パーキンは N-末端側に UBL(ubiquitin-like)ドメインがあり、C-端側半分に RING1,IBR (in-between RING),RING2 が並んだ構造(配列)をもっているが、全ての領域にミスセンス変異やナンセンス変異をもった AR-JP の患者が多数存在する。そこで約 16 個の AR-JP 患者由来の変異パーキンについて MBP と融合させリコンビナントタンパク質として精製した。これらを用いて、パーキンのユビキチンリガーゼ活性を In vitro で調べた結果、RING2 に変異があるパーキンは全て、自己ユビキチン化活性を完全に喪失していたが、他の領域、即ち UBL、RING1,IBR あるいは Linker 領域 (UBL と RING1 を繋ぐ領域)にミスセンス変異をもったパーキンでは、活性の喪失は観察されなかった。

Parkin の negative regulator 14-3-3 η の存在

14-3-3 η は、parkin と結合して複合体形成をし、

そのリガーゼ活性を制御している。この制御は α -synuclein で、解除され parkin は活性型することが分かった。Parkin と α -synuclein の共通機構が明らかにされた。

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。

パエル受容体の解析

アデノウィ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、パーキンの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である α -methyl-DL-Tyrosine の腹腔内前投与により軽減した。このことはパエル受容体による細胞死には、ドパミン代謝と小胞体ストレスの関与が推定された。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 では線条体でドパミンが増加し、Pael-RKO マウスでは逆にドパミンが減少することを見出し、Pael-R がドパミン代謝に関わっていることを示した。

神経変性におけるマイクログリアの関与の解析

HIV 感染による痴呆、神経細胞死の誘発と神経変性疾患の発症機序にはマイクログリアを介した共通機構が存在すると考えられている。一般に毒性を持たないマイクログリアは HIV 由来 nef 遺伝子を導入すると神経障害性の活性酸素種を産生するようになる。多くの神経変性疾患では、活性酸素種による酸化ストレスが主因の 1 つであることが指摘されており、nef 遺伝子導入による形質転換が神経変性の引き金になっている可能性を検討した。野生型 nef 遺伝子と変異 nef 遺

伝子で 2 次元タンパク解析法により発現タンパクの差異の有無を検討した。その結果、野生型 nef 遺伝子導入マイクログリアでは、塩基性タンパクの集積を観察し、活性型 nef 蛋白質は、NADPH オキシダーゼサブユニットの gp91 と Rac1 サブユニットの一部に結合していることが分かった。封入体形成の解析。

封入体形成のモデルを作製した。培養細胞系にプロテアソーム阻害剤を加えるとアグリゾーム形成が観察された。ピメンチンも陽性であり、定義的にはアグリゾームと言えた。このアグリゾーム形成にユビキチン・プロテアソーム系関連分子である VCP (Valosin containing protein) が局在していた。この VCP に ATPase domain D1, D2 に変異が入った変異分子を導入して解析すると D2 domain に変異の入った分子を導入した場合にアグリゾーム形成が減少した。一方、cell viability は変化なく、アグリゾーム形成と細胞死には相関が観察されなかった。

プロテアソームサブユニットの細胞内局在の検討

20S プロテアソーム α サブユニットに対する抗体で免疫組織化学的検討を行った。その結果、孤発型 PD では、線条体、黒質共に核が染色された。一方、正常対象は、全く染色されなかった。更にパーキン遺伝子変異を持った Park2 についても検討を行ったが、孤発型 PD とは異なり染色されなかった。この α サブユニットの核内局在がどのような意味合いがあるのか不明であるが、その病態に関わっている可能性を考えている。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、新規遺伝子座の絞り込みを行っている。既に *in vitro* の系で、ドパミンキノン体増加による細胞死の関与を報告したが、*in vivo* であるノックインマウスの解析でも、ドパミン遊離障害が関与していることが分かった。直接的証明として、ドパミンキノン体の関与は、測定技術により計測出来ないが、我々が進めてきた exocytosis の機能低下と併せて、パーキンがシナプス近傍で機能していることが予想された。また parkin の結合分子 14-3-3 η がリガーゼ活性を制御していることが明らかにされた。そして同じ臨床症状を呈する Park6 の遺伝子産物 PINK1 の安定性に parkin が関与していることが明らかにされた。

パエル受容体に関しては、アデノウィルスベクターに挿入し、線条体に直接注入することで細胞死が惹起された。この細胞死に小胞体ストレスやドパミン代謝が関与していることが分かった。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により小胞体ストレスの誘導が観察された。

マイクログリアの PD への関与については、*nef* 変異を導入すると毒性転換が起こることが分かった。マイクログリアの PD への関与については、今後の課題である。

VCP を用いたアグリゾーム形成について検討し、D2 domain に変異が入るとアグリゾーム形成が抑制されることが分かった。アグリゾーム形成と細胞死の関連性については証明できなかった。少なくとも封入体形成が直接的細胞死誘導因子であるとは言い難いと言える。

3年間の成果は、論文発表からも満足とは言

い難いが、成果は残せたと言える。今後は、表現型のないマウスに対し、ミトコンドリア電子伝達系 NDUFV2 のヘテロマウスと交配することで遺伝子背景としてミトコンドリア機能異常を持つマウスを作製し、パーキンソニズムが出現するか検討する。パエル受容体については、遺伝子改変モデルの長期経過フォローアップの組織学的検討を更に発展させる予定である。マイクログリアに関しては、まず MPTP マウスモデルを作製し、毒性転換されたマイクログリアにより細胞死は増強されるか検討する。

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

分担研究報告書並びに研究成果の刊行に関する一覽参照。

パーキン蛋白の機能解析と黒質変性及びその防衛

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

遺伝性パーキンソン病 (FPD)は、単一遺伝子異常で発症することから、その病態解明は孤発型パーキンソン病(SPD)の原因究明に繋がると考えられている。その中で最も頻度が高く、世界中に分布するタイプとして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。3年間で行ったことは、1) FPD の遺伝子変異スクリーニング 2) parkin の新規基質同定 3) in vitro 系におけるアンチセンス parkin を用いた細胞死モデルの確立 4) FRET を用いた FPD 遺伝子産物の相互作用のメカニズム 5) 新規 FPD 遺伝子の同定 6) 封入体形成の機序 7) FPD 遺伝子産物の細胞内局在が主な研究目的であった。3年間の成果には、満足しているが創薬に向けての成果が得られなかったことは今後の課題である

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子である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。おそらく FPD の遺伝子産物には共通機構が存在するものと考えており、最近の論文発表の内容からも FPD が遺伝性 AD と同様共通カスケードを形成していることは間違いないと考える。このことは本課題が、稀な疾患である FPD に限局することなく黒質神経変性の共通機構に繋がる可能性が高い。そのためパーキン遺伝子陰性例が少なからず存在することから、未知の遺伝子同定もこの課題の大きな目的であった。そのため既報されている遺伝子

PINK1(PARK6), DJ-1 (PARK7), Park9 の ATP13A2, PARK8 の LRRK2 が原因遺伝子として単離・同定されており、変異スクリーニングを行うことで、陰性例の中から遺伝形式、発症年齢、ドーパ反応性、ジスキネジア等の臨床症状から同じ遺伝子変異を持つことが推定される家系をグループ化して連鎖解析を行い、新たな新規遺伝子変異の単離・同定を目指した。機能解析については、in vitro 系では、アンチセンス parkin を使った細胞モデルの確立により細胞死実行分子の同定を行った。また parkin と結合する分子を FRET を用いて検討した。相互作用の機序を明らかにすることで黒質神経変性の機序を解明することも大きな目的である。また遺伝子変異から同じ家系で変異を持っていても未発症者がいることか

ら発症者と未発症者の違いを明らかにすることで早期診断の可能性、バイオマーカーのスクリーニングの可能性を検討した。

B.研究方法

- 1) FPD の遺伝子変異スクリーニング
- 2) parkin の新規基質同定
- 3) in vitro 系におけるアンチセンス parkin を用いた細胞死モデルの確立
- 4) FRET を用いた FPD 遺伝子産物の相互作用のメカニズム
- 5) 新規 FPD 遺伝子の同定
- 6) 封入体形成の機序
- 7) FPD 遺伝子産物の細胞内局在

C.研究成果

1) FPD の遺伝子変異スクリーニング

1100 症例の変異解析から、劣性遺伝性 (ARPD) の約 40%が parkin 陽性を示した。PINK1 は約 5%と parkin の約 1/8 であった。DJ-1 に関しては変異を持つ症例は一例もなかった。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。

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。また α -シヌクレインの multiplication の家系が報告されたが、我が国にも存在しているか解析し、計 5 家系が α -シヌクレイン遺伝子の duplication であることが分かった。興味深いことに今まで報告されてきた duplication の家系は、認知症が存在しないことが推定されていたが、我々が解析した家系では、認知症が存在していた。

2) parkin の新規基質同定

Yeast two hybrid にて 13 種の結合分子を見出した。そのうち新規基質として PDCD-2, LMO4 を単離した。これら分子が剖検脳ないに蓄積しているか否か現在検討中である。

3) in vitro 系におけるアンチセンス parkin を用いた細胞死モデルの確立

アンチセンスによりドパミンキノン体の増加とそれに伴う細胞死が観察された。この細胞死は α -synuclein で防御された。Parkin と α -synuclein が同じカスケードに入ることが確認できた。

4) FRET を用いた FPD 遺伝子産物の相互作用のメカニズム

FRET を用いて既知の FPD の遺伝子産物間の相互作用を検討した。その結果、parkin と PINK1 が結合し、parkin が PINK1 の安定性に関与していることが分かった。

5) 新規 FPD 遺伝子の同定

変異陰性例で parkin とは全く異なるタイプで血

縁結婚が観察された家系について連鎖解析を行った。その結果、3, 20 番に遺伝子座が絞られた。

6) 封入体形成の機序

parkin 変異を持つと一般にレビー小体は形成されない。そこで parkin ノックアウトマウスを使い forebrain bundle に直接 proteasome inhibitor を注入し、組織学的に封入体形成が観察されるか検討したが、はっきりとした所見は得られなかった。In vitro 系では、VCP に注目し、封入体形成について検討し、封入体形成と細胞死は並行していないことが分かった。

7) FPD の細胞内局在

多くの FPD 産物が脂質ラフトに局在していることが分かった。特に LRRK2 では、変異型と正常型で局在に違いがないことより、gain-of-function 効果により疾患の発症が規定されていると推定された。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、新規遺伝子座の絞り込みを行っている。既に in vitro の系で、ドパミンキノン体増加による細胞死の関与を報告した。

VCP を用いたアグリゾーム形成について検討し、D2 domain に変異が入るとアグリゾーム形成が抑制されることが分かった。アグリゾーム形成と細胞死の関連性については証明できなかった。少なくとも封入体形成が直接的細胞死誘導因子であるとは言い難いと言える。FPD 産物の相互作用では、

Parkin と PINK1 の相互作用が確認できた。Parkin は、PINK1 の安定性に関与していることが分か

った。

D. 研究発表

Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA: UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55:512-21, 2004

Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004

Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y: Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta* 1695:235-247, 2004

Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004

Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 14:1832-1850, 2004

Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N, Mizuno Y, Ogawa N: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 89:1490-1497, 2004

Namihira T, Hattori N, Shiroma S, Miyazato Y. Autosomal recessive juvenile Parkinson's disease with partial trisomy of chromosome 6q syndrome: a case report. *Psychiatry Clin Neurosci*. 58:672-673, 2004

Hattori N, Mizuno Y: Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364: 722-724, 2004

Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA: UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's

- disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55:512-21, 2004
- Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004
- Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y: Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta* 1695:235-247, 2004
- Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004
- Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 14:1832-1850, 2004
- Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N, Mizuno Y, Ogawa N: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 89:1490-1497, 2004
- Namihira T, Hattori N, Shiroma S, Miyazato Y. Autosomal recessive juvenile Parkinson's disease with partial trisomy of chromosome 6q syndrome: a case report. *Psychiatry Clin Neurosci*. 58:672-673, 2004
- Hattori N, Mizuno Y: Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364: 722-724, 2004
- 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

Funayama M, Li Y, Tomiyama H, Yoshino H, Imamichi Y, Yamamoto M, Murata M, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population **NeuroReport** 18:273-275, 2007

学会発表（招待講演のみ）

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治療：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ー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

平成17年1月から12月

31. Hattori N. Gene mutations for familial Parkinson's disease and molecular mechanisms of neuronal death. The Second International Workshop by the 21st Century COE of Fujita Health University Program in Diagnosis and Treatment for Neural and Mental Diseases, Nagoya, March 1-2, 2005
32. Hattori N. Molecular mechanism of nigral degeneration in parkin-related disease (PARK2) and regulation of parkin protein by other proteins. 16th International congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Berlin, June 5-9, 2005
33. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第6回兵庫パーキンソン病治療研究会, 神戸, 2月19日, 2005
34. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第7回和歌山・泉南地区パーキンソン病治療研究会, 堺, 3月12日, 2005
35. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序. 第46回日本神経学会総会シンポジウム, 鹿児島, 5月26日, 2005
36. 服部信孝. パーキンソン病の最前線: 基礎から臨床まで. 第46回日本神経学会総会 ランチョンセミナー, 鹿児島, 5月26日, 2005
37. 服部信孝. パーキンソン病の研究の最前線—臨床から基礎まで—. 第11回徳島神経難病治療薬研究会, 高松, 6月17日, 2005
38. 服部信孝. パーキンソン病の研究の最前線—臨床から基礎まで—. 第6回関西パーキンソン病治療フリーディスカッション, 大阪, 6月23日, 2005
39. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床ま

- で. 第6回栃木パーキンソン病治療研究会, 宇都宮, 6月24日, 2005
40. 服部信孝. 新しい治療法と今後の探訪. 第43回信毎健康フォーラム《長野》, 長野, 7月23日, 2005
41. 服部信孝. M・J・フォックスから学んだパーキンソン病—神経科学者はラッキーマンになれるか?—. 第5回山陰地区セレギリン研究会, 米子, 7月29日, 2005
42. 服部信孝. パーキンソン病の研究の最前線—臨床から基礎まで—. 第3回浜松神経機能研究会, 浜松, 9月2日, 2005
43. 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—. パーキンソン病講演会, 市原, 9月8日, 2005
44. 服部信孝. 一遺伝子から臨床現場まで—. 学術講演会 パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 甲府, 9月14日, 2005
45. 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—. Parkinson's disease セミナー, 横浜, 9月20日, 2005
46. 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—. パーキンソン病懇話会, 新宿, 10月6日, 2005
47. 服部信孝. パーキンソン病研究の最前線. 東京パーキンソン病友の会, 10月7日, 2005
48. 服部信孝. パーキンソン病研究の最前線. 区民公開講座, 江東, 10月8日, 2005
49. 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療 Up To Date, 一遺伝子から臨床現場まで—. パーキンソン病懇話会, 出雲, 11月17日, 2005
50. 服部信孝. パーキンソン病の診断と治療—サブクリニカルにおける早期診断の可能性と問題点—. 第6回北九州パーキンソン病研究会, 北九州, 11月18日, 2005
51. 服部信孝. パーキンソン病などの神経変性疾患の防いでいます. 平成17年度特定領域研究・第6回公開シンポジウム(都民公開講座), 東京, 12月24日, 2005

平成16年1月から12月

52. Hattori N, Yoshimo H, Imamichi Y, Mizuno Y. Parkin mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism (AR-EP). NO.8th international congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, Roma, June 14-17, 2004
53. 服部信孝. シンポジウム 6-1 パーキンソン病をめぐる最近の話題—パーキンソン病の

- 発症機序-遺伝性パーキンソン病からのヒントをえて. 臨床神経 44 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 5 月 11 日-14 日, 2004
54. 長谷川一子, 村田美穂, 野元正弘, 服部信孝. ソニザイド使用実態に関するアンケート調査結果. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ソニザイドの臨床研究班, 東京, 2 月 7 日, 2004
 55. 長谷川一子, 村田美穂, 野元正弘, 服部信孝, 皆内康弘. ソニザイド使用実態に関するアンケート調査結果(2). 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ソニザイドの臨床研究班, 東京, 2 月 7 日, 2004
 56. 服部信孝, 町田 裕, 佐藤栄人, 波田野靖子, 波田野琢, 李 元哲, 佐藤健一, 水野美邦, 田中啓二, 高柳 淳, 浅川修一, 清水信義. パーキンソン病の発症機序: 遺伝型と孤発型パーキンソン病の共通メカニズム. 第 11 回日本遺伝子診療学会大会, 東京, 9 月 17 日-18 日, 2004
 57. 服部信孝. パーキンソン病とは~その病態と今後の展望~. パーキンソン病とうまくつきあうために~ひとりで悩まないで~, 静岡, 4 月 3 日, 2004
 58. 服部信孝. パーキンソン病の治療. 奈良県 BIF 発売記念学術講演会, 奈良, 4 月 15 日, 2004
 59. 服部信孝. パーキンソン病薬物治療と最新の研究. パーキンソン病学術講演会, 仙台, 6 月 26 日, 2004
 60. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序~最新の知見より~. 第 3 回筑後地区パーキンソン病懇話会プログラム, 福岡, 7 月 14 日, 2004
 61. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 遺伝型と孤発型パーキンソン病の共通メカニズム. 第 11 回日本市電氏診療学会大会シンポジウム, 東京, 9 月 17 日, 2004
 62. 服部信孝. パーキンソン病について. 順天堂大学・東京理科大学交流セミナー, 千葉, 9 月 25 日, 2004
 63. 服部信孝. パーキンソン病薬物治療と最新の研究. パーキンソン病学術講演会, 仙台, 6 月 26 日, 2004
 64. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第 3 回北陸パーキンソン病研究会, 金沢, 7 月 3 日, 2004
 65. 服部信孝. パーキンソン病の発症機序~最新の知見より~. 第 3 回筑後地区パーキンソン病懇話会プログラム, 福岡, 7 月 14 日, 2004
 66. 服部信孝. パーキンソン病の基礎と臨床. 日本医師会障害教育講座 学術講演会 特別講演, 旭川, 7 月 21 日, 2004
 67. 服部信孝. パーキンソン病について. 順天堂大学・東京理科大学交流セミナー, 千葉, 9 月 25 日, 2004
 68. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第 5 回パーキンソン病治療・症例検討会, 名古屋, 10 月 1 日, 2004
 69. 服部信孝: 「パーキンソン病の臨床から基礎まで」パーキンソン病学術講演会~カバサル錠発売 5 周年記念~, 山縣, 10 月 15 日, 2004
 70. 服部信孝. パーキンソン病の基礎から臨床まで. 第 2 回新潟パーキンソン病治療研究会, 新潟, 10 月 22 日, 2004
 71. 服部信孝. パーキンソン病の研究・診断・治療. 第 10 回青函神経疾患フォーラム, 青森, 11 月 6 日, 2004
 72. 服部信孝. パーキンソン病最新医療情報と医療 Q&A. 東京都パーキンソン病友の会 医療講演会~順天堂大学服部信孝先生と語り合おう~, 東京, 11 月 10 日, 2004
 73. 服部信孝: パーキンソン病の基礎から臨床まで ~臨床だからこそ可能な研究視点~神戸パーキンソンアドバイザーパネル, 神戸, 11 月 20 日, 2004
 74. 服部信孝: パーキンソン病の病態と治療について~効果的なドパミンアゴニストの使い方~, 第 3 回西讃地区パーキンソン病懇話会, 丸亀, 11 月 26 日, 2004
- その他
特許等なし

パーキンソ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

本研究では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標題の研究を主目的として行ったが、同時に神経変性疾患に関連した生化学的・細胞生物学的・分子遺伝学的研究も同時に行った。その結果、明らかになったことを箇条書きすると (1) [¹¹C]raclopride を用いた in vivo autoradiography 解析からパーキン欠損マウスでは、ドーパミン(DA) release の低下、線状体における DA (D₁ and D₂) receptor の上昇、中脳における DA レベルの上昇、DA 合成の低下等のドーパミン(DA)代謝異常が観察された。(2) パーキンが in vitro において multiple monoubiquitylation (多数のモノユビキチン化) を触媒する酵素であることを発見した。(3) in vivo において、パーキンは αシヌクレインと 14-3-3η によって正負の活性制御を受けていることを見出した。さらに (4) オートファジー (自食作用) 形成の必須遺伝子 Atg7 と (5) プロテアソームの分子集合因子 PAC1 遺伝子をニューロンで特異的に欠損させると、神経変性疾患に陥ることを見出した。これらの研究は AR-JP のみならず弧発型パーキンソン病の発症機構解明の突破口を開く研究と位置づけることができる。

A. 研究目的

パーキンが AR-JP の原因遺伝子であることが本邦で発見されて以来 (1)、パーキン遺伝子に関する研究は日本が世界に誇る研究として大きく発展してきた。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 (2) 爾来パーキンの構造・機能・病態に関する包括的研究を推進してきた。この間、パーキンの研究は国内外において飛躍的に進展してきたが、AR-JP 及び弧発型パーキンソン病 (PD) の発症機構は依然として不明のままである。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 患者に見られる依然として動作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ソ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 (3)。

パーキンがユビキチンリガーゼであることが見出されてから数多くの基質候補が報告されてきたが、それらのほとんどがパーキン KO マウスで変動しないことから、それらが真の基質であることの信憑性に大きな疑義が提示されてきている。パーキンのユビキチンリガーゼ活性については、これまで in vivo 及び in vitro で多数報告されてきたが、われわ

れは生化学的に緻密に考えると、必ずしも正確に評価できないと想定した。そこで、ユビキチンシステムが存在しない大腸菌で作製したリコンビナント酵素を用いた完全 in vitro システムでパーキンの酵素活性を再評価した (4)。と同時に AR-JP 患者由来のミスセンス変異パーキンについてもリガーゼ活性との関係について詳細に解析し、AR-JP 発症機構について考察を加えることにした。同時に in vivo でパーキンの活性を調節する研究にも取り組みパーキンの活性を正負に制御する分子群を発見した (5)。

近年、神経変性疾患の発症機構にプロテアソーム (ユビキチン化タンパク質を選択的に分解する ATP 依存性プロテアーゼ複合体) やオートファジー (Greek for self-eating) の動態の重要性が国内外で多く論じられている。そこでわれわれはこの課題に真正面から取り組むためにこれらの機能を個体レベルで制御できる遺伝子改変マウスを作製した。この研究は神経変性疾患の発症機構解明の一般論に属する課題であるが、今後、ドーパミンニューロンの生理に特化した研究に発展させることができる tool として極めて重要であることが期待できる。

B. 研究方法

1) パーキンソックインマウスの作製と解析

・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。

・Neurochemical Analysis: ドーパミン (DA) とその代謝産物である 3,4-dihydroxyphenylacetic 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。

・In vivo Autoradiography: (Chemicals) [¹¹C]dihydrotetraabenazine ([¹¹C]DTBZ), [¹¹C]β-CFT (2β-carbomethoxy-3 β-(4-fluorophenyl) tropane: ドーパミン transporter probe), [¹¹C]SCH23390 (D1 receptor probe) and [¹¹C]raclopride (D2 receptor probe) は、RBI (Natick, MA) から購入した。 [¹¹C]β-CFT と [¹¹C]SCH23390 は N-methylation of the corresponding nor-compounds with [¹¹C]methyl iodide prepared from [¹¹C]CO₂ によって調整した。 [¹¹C]DTBZ は [¹¹C]raclopride O-methylation of the corresponding nor-compounds with [¹¹C]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 ([¹¹C]DTBZ, [¹¹C]SCH23390 と [¹¹C]raclopride) と 60 分後 (L-[β-¹¹C]DOPA と [¹¹C]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、放射線の分布を 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 = (RIstr - RIcere)

/ RIcere : RIstr は striatal regions (線状体) における放射活性, Ricere は cerebellum (小脳) における放射活性を表示した。

2) パーキンの生化学的及び細胞生物学的解析

・Purification of recombinant proteins: リコンビナント野生型パーキンおよび AR-JP 患者由来のミスセンス変異パーキンは、全て MBP (maltose binding protein)-融合タンパク質として大腸菌で産生し、精製して使用した。

・In vitro ubiquitylation assay: E1 と各種 E2 も全て、大腸菌でリコンビナント酵素として作製し、完全な In vitro ユビキチン化システムを構築し、アッセイした。

3) ニューロンにおけるオートファジー (自食作用) の遺伝学的研究

・条件付きオートファジー不能マウス (Atg7^{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、定法に従って行った。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 Atg7 欠損ホモマウス (Atg7^{Flox/Flox}) を作製した。

・中枢神経系特異的オートファジー不能マウス (Atg7^{Flox/Flox}:Nes) の作製: Atg7^{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) でオートファジーが不能となるマウス (Atg7^{Flox/Flox}:Nes) を作製した。

4) ニューロンにおけるプロテアソームの遺伝学的研究

・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、定法に従って行った。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。

3-3 η が結合すると、パーキンの自己ユビキチン化活性および Synphilin-1 (パーキンの既知基質)を標的としたポリユビキチン化活性は完全に抑制された。この結果、14-3-3 η はパーキンの活性阻害因子であることが判明した。

さらに 14-3-3 η と高親和性を有して結合しパーキンの活性阻害を解除する因子として α シヌクレイン (常染色体優性の家族性パーキンソン病の責任遺伝子 *PARK1* の翻訳産物)の同定にも成功した。そしてパーキンソン病患者由来の変異 α シヌクレイン ^{A30P} あるいは α シヌクレイン ^{A53T} は、この 14-3-3 η によるパーキンの阻害抑圧活性を完全に喪失していた。今回、このようにパーキンのユビキチンリガーゼ活性が 14-3-3 η と α シヌクレインによる正負の活性調節因子で巧妙に制御されていることを見出した。パーキンと 14-3-3 η は *in vitro* 及び *in vivo* で直接結合するが、14-3-3 η と α シヌクレインの結合は *in vivo* では観察されるもののリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* での結合実験では検出できないことから、我々はこの相互作用には α シヌクレインの修飾が必要であると考えている。いずれにしても 14-3-3 η は二つのパーキンソン病の責任遺伝子産物パーキンと α シヌクレインを連結させるユニークな調節因子と考えることができる。現在、この調節機構の破綻によってパーキンソン病が発症する可能性について検討中である。

4) ニューロンにおけるオートファジー (自食作用) の遺伝学的研究 (6, 7)

中枢神経系 (CNS) でオートファジーを欠損させた (生後 20 日目の) 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。なお、*Atg7^{F/F};Nes* マウスでのオートファジーは生後 (P0) においてほぼ完全に欠損しており、生後 4 週目くらいからマウスが死に始め 28 週後には、全てのマウスが死に至った。これらの表現型は、雌雄で変化がなかった。

組織化学的解析 (H&E 染色) から、オートファジーが欠損した生後 56 日目のマウス大脳及び小脳皮質においては、ニューロンの大幅な減少が見られた。とくに大脳皮質では大きな pyramidal ニューロンが顕著に欠落しており、逆に glial fibrillary acidic protein (GFAP) で染色されるグリア細胞の増殖が観察された。また小脳皮質では、Purkinje marker,

calbindin での染色像からプリキンエ細胞の大規模な欠落が観察された。さらに TUNEL staining で検定した結果、オートファジーが欠損した大脳皮質、海馬、小脳顆粒層において激しいニューロン死が観察された。

ユビキチン抗体を用いた免疫組織染色による観察から、大脳皮・小脳皮質・視床下部・海馬・橋・小脳扁桃など広範囲のニューロンにおいてユビキチン抗体陽性の封入体の出現が観察された。このユビキチンを含む大きな封入体は、免疫電子顕微鏡観察によっても確認された。そしてこのユビキチン陽性の凝集体は、最初、可能性画分に検出されたが、時間経過と共に不溶性画分に移行し封入体を形成することが判明した。さらにこのユビキチンを含む封入体は、生後から致死に至る期間、即ち aging に従ってその数とサイズが増大した。興味深いことに、ユビキチン陽性の凝集体・封入体の出現は、上記したオートファジー欠損の大脳皮質において激しく増殖しているグリア細胞内では、観察されなかった。

ユビキチンを含む凝集体引いては大きな封入体の形成は、プロテアソームの機能低下が関係していることが、これまでの多数の研究から報告されている。そこで、オートファジーの欠損によってプロテアソームの機能破綻がおきるか否かについて検討した。オートファジーを欠損させた脳の抽出液をグリセロール密度勾配遠心法で分画し、プロテアソームの質的・量的変動を詳細に測定した。その結果、Suc-LLVY-MCA 活性及び ODC 分解活性とも野性型マウスに比較して有意な相違は検出できなかった。またプロテアソームを構成する様々なサブユニットに対する抗体を用いた Western ブロット解析から、プロテアソームの量的変動も全く観察されなかった。これらの結果から、オートファジーを欠損させたニューロンにおいてプロテアソームの機能異常は、発生していないことが明確になった。即ち、細胞内のユビキチン化タンパク質は、プロテアソーム系とオートファジー系によって独立的に処理されていることが示唆された。

5) ニューロンにおけるプロテアソームの遺伝学的研究 (8, 9, 未発表)

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。

D. 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重要であり、このために複数のユビキチンリガーゼが存在する。これらの中で、われわれは、CHIP (10 - 12) や SCF^{Fbs} ファミリー (13 - 17) について精力的に解析してきた。本研究ではパーキンを中心に生化学的研究、細胞生物学的研究、分子遺伝学的研究を行った。その結果、研究の第一目標であったパーキンノックインマウスでは、GFP の傾向が微弱であり、パーキン遺伝子の発現部位の探索には有益な結果が得られなかった。また期待したパーキンソン病、特に AR-JP に類似した行動異常は観察されなかった。この結果は、AR-JP の発症にはパーキンの機能破綻以外に、パーキンと協調して作用する他のリスクファクターの存在が示唆された。しかし、In vivo autoradiography 解析からパーキンの欠損は、ドーパミンの代謝異常を引き起こすことを初めて見出した。即ち、パーキン欠損マウスでは、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。これが結果的にドーパミンニューロン脱落に直接的もしくは間接的に作用しているか否かは不明であるが、ドーパミン作動性ニューロンの維持に少なからず影響している可能性は否定できないので、今後の検証すべき課題であろう。

次に In vitro におけるパーキンのユビキチンリガーゼの機能について根本的に検証することを目指した。そのためユビキチンシステムが存在しない大腸菌内で合成したリコンビナント酵素群を用いてパーキンのユビキチン化活性を検証した。その結果、パーキン分子が複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることを初めて明らかにした。しかし、これは自己ユビキチン化活性とパーキンに融合した疑似基質 MBP へのユビキチン化活性であるため、真の基質が発見された場合にポリユビキチン化反応を触媒する可能性を否定するものでない。また in vivo では、パーキン

と相互作用する E4 様の酵素が存在してポリユビキチン化反応を触媒する可能性も否定できない。これらについては、今後の研究が必要である。

さらに多くの AR-JP 由来の変異パーキンを用いた解析から C-末端側に存在する RING2 ドメインがパーキンの活性中心を形成している RING-finger ドメインであることが明確になった。AR-JP は常染色体劣性の遺伝形式を取る家族性疾患であるので、RING2 ドメインの変異は、Loss-of-Function で病気が発症することは明確であるが、他のドメインの変異によって発症する場合は、酵素活性の喪失以外に細胞内でのパーキンの働きが損なわれることを示唆しており、今後の AR-JP の発症機構を考えると非常に興味深い知見を得たことになる。AR-JP の発症機構とパーキンのドメイン機能との関連性については、更なる研究の推進が必要である。

他方、最近われわれは、in vivo におけるパーキンのユビキチンリガーゼ活性を正負に制御する機構についての研究も推進した。その結果、パーキンは α シヌクレイン (PARK1 の遺伝子産物) と多面的な役割をもった分子シャペロンである 14-3-3 η によって正負の活性制御を受けていることを見出した。この活性制御機構が AR-JP もしか右派弧発型のパーキンソン病の発症に関与するかについては、今後、検討すべき課題である。

また最近、オートファジー (自食作用) やプロテアソームが神経細胞における品質管理システムに重要な役割を担っていることが、国内外で注目されている。実際われわれは、中枢神経系でオートファジーが特異的に欠損するマウス (Atg7^{Flox/Flox}:Nes) を作製し、ニューロンにおけるオートファジーの不能がユビキチン代謝異常を誘発する (6) と共に神経変性疾患を発症させること (7) を見出した。さらにプロテアソームの分子集合を支援する特異的なシャペロンである PAC1 を神経細胞において条件的に欠損させ得るマウス (PAC1^{Flox/Flox}:Nes) を作製したところ、このマウスも激しい神経変性症状を示すことが判明した (投稿準備中)。現在 Atg7 や PAC1 がドーパミンニューロンで特異的に欠損するマウスを作出中である。これらを用いてプロテアソームやオートファジーがパーキンソン病の発症にどのように関係するかについて詳細に調べる計画である。