

た。更に酸化ストレスのマーカーとなりうる 8-oxo-dG は核遺伝子より mtDNA で頻度が高く、かつ加齢で増加することが明らかになっている。神経細胞は分裂終了細胞であり核 DNA は複製しない。一方、mtDNA は細胞質内で複製は絶えずおこなわれている。この点に注目すると 8-oxo-dG の起源は DNA 鎖上の guanine がラジカルに攻撃されたものと dNTP pool 内にある 8-oxo-dGTP が考えられる。また誤読され複製の際にまちがって読み込まれた塩基が、アミノ酸置換をとともなう変異を誘導する可能性がある。この神経細胞の特性を考えて、われわれは、酸化ストレスによって生じる 8-oxo-dG 誘導遺伝子変異を細胞質およびミトコンドリアマトリックス存在し、防御作用を示している 8-oxo-dGTPase (MTH1) の PD における役割について九州大学大学臨床検査部康東天先生、同生体防御研究所中別府雄作先生との共同研究で検討した。ウェスタンブロットと免疫組織化学ともに MTH1 は PD 患者黒質緻密帯の神経細胞で組織特異的に増加していた<sup>16)</sup>。この MTH1 は PD 患者黒質でのみ増加しており、対照脳黒質、disease control である多系統萎縮症 (MSA) ではまったく増加していなかった。免疫組織化学はホルマリン固定パラフィン包埋中脳切片をもちい、PD 黒質緻密帯の神経細胞の細胞質が均一に染色され核に染色性はみとめられなかった。Western blot では、PD サンプルのみに 18-kDa バンドがみとめられた (Fig. 2)。8-oxo-dG についても同様に検討しており、8-oxo-dG も PD 患者黒質に特異的に増加していた。このことより、MTH1 は 8-oxo-dG 誘導遺伝子変異を防御するためにパーキンソン病患者黒質で増加しているのであろう。更に fractionation してミトコンドリア、核、cytosol に分け分布を検討したところミトコンドリアにて数倍増加していた。MTH1 には splicing variant が存在し、ミトコンドリア移行シグナルを持つものもあり単一遺伝子でありながら細胞を酸化ストレスから防御すべく核遺伝子と mtDNA の dNTP pool 内で生じた 8-oxo-dGTP を監視し、変異が生じないように作用している。ミトコンドリア分画での増加はミトコンドリア内で活性酸素種が増えていることを示している。進行性核上性麻痺の剖検脳の黒質でも検討してみたが 18-kDa の band はみとめられなかった。少なくとも黒質にかぎっては PD 特異的に発現が上昇しているといえる。MTH1 の研究成果は、PD 黒質神経細胞のミトコンドリア内で酸化ストレスがおこっているとする最初の証拠である。現在、他の DNA 修復酵素である 8-oxoguanosine DNA glycosylase (OGG1) や MYH についても PD について検討しており、PD において発現が上昇していることを突き止めた (論文投稿準備中)。ミトコンドリア内における DNA 修復酵素の上昇は変性疾患共通したメカニズムである可能性がある。

MTH1 の作用に拮抗して PD 脳で 8-oxo-dG が増加する事実は、G-to-T transition による変異の蓄積を防御するための代償的現象である可能性がもっとも高い。いかえればミトコンドリア内で活性酸素種の発生が高いことを示しているのかもしれない。修復酵素の代償的 upregulation はいかにミトコンドリア内で活性酸素種の発生が高いかを示している。つまり有位な変異を germ line 上の mtDNA にみとめなくとも

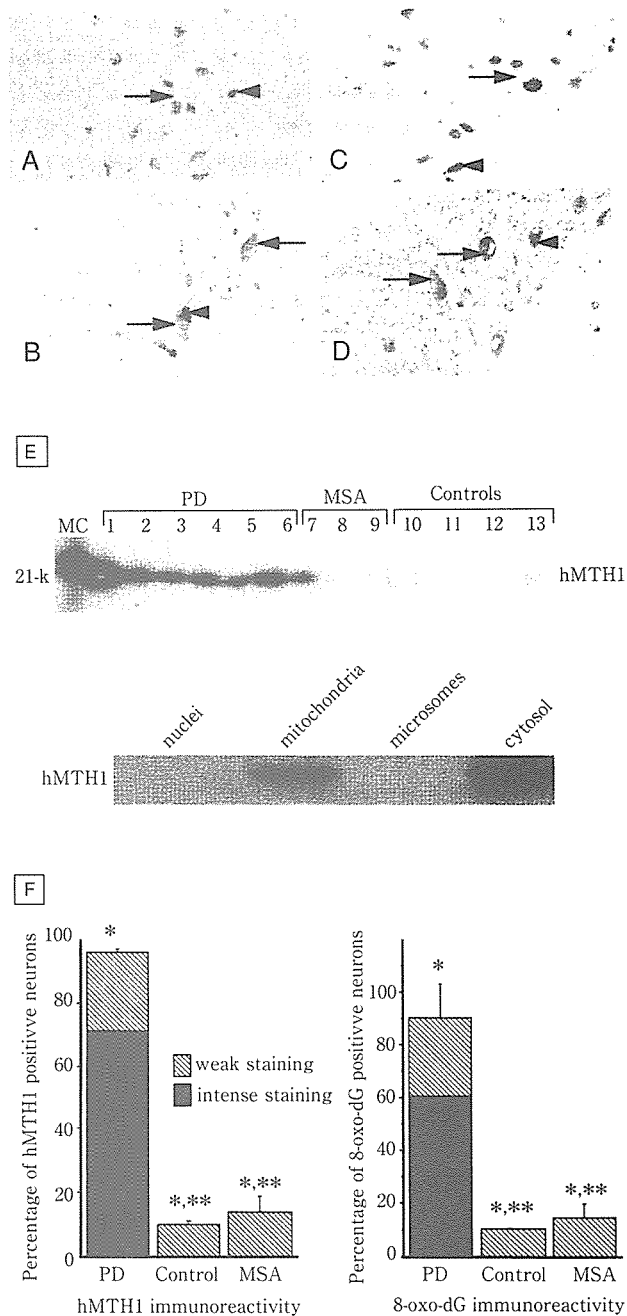


Fig. 2 A~B, 8-oxo-dG ; C~D, MTH1. いずれの抗体で細胞質が染色される。E, PD のみに MTH1 のバンドが観察された。細胞分画ではミトコンドリアと細胞質に存在していた。F, 陽性細胞を定量すると PD で有意に高かった。(\* $p < 0.01$ , PD vs MSA and control ; \*\* $p > 0.05$ , control vs MSA)

体細胞変異が、蓄積しうる可能性を示している。

#### (6) 今後のミトコンドリア研究の展望

PD のミトコンドリア機能低下の関与は酸化ストレスと併せて重要な誘因の1つであることはまちがいない。アポトーシスについても PD での関与が指摘されているが<sup>17)</sup>、アポトーシスにもミトコンドリアが関与しており、神経変性のメカニズムを考える上で、ミトコンドリアはより普遍的な細胞

活動にかかわりを持っていることは明らかである。とくに神経細胞のように分裂終了細胞では、エネルギーの産生と細胞の機能維持に重要な細胞内小器官である。一方で、ミトコンドリアは活性酸素種の主要な産生場所であり、如何にミトコンドリアの機能を維持するかが、神経変性を防ぐ上で大きな課題である。更に後述するプロテアソームの活性低下がPDで報告されている。この酵素はATP依存性プロテアーゼであり、ミトコンドリア機能低下は、このプロテアーゼの活性低下をもたらす可能性が高い。つまり蛋白分解系においてもこの系の役割は重要であることはまちがいない。神経細胞にとってミトコンドリアが重要な働きをしていることは、メンデル遺伝による家族性神経変性疾患の原因遺伝子一部にミトコンドリア関連蛋白がみいだされていることから裏付けされている。事実、Friedreich ataxiaの原因遺伝子FrataxinやWilson diseaseのcopper-transporterそしてHereditary spastic paraplegiaのparapleginはミトコンドリア関連蛋白質である。またAlzheimer病(AD)やHuntington病(HD)でもミトコンドリア電子伝達系の酵素活性低下が指摘されている。HDでは、複合体II, IIIそしてaconitaseの酵素活性低下が、ADでは複合体IVの酵素活性低下が指摘されている。このように多くの変性疾患でミトコンドリア機能低下が指摘されている。したがって、ミトコンドリアは、多くの変性疾患の変性過程における共通カスケードをなしている可能性がある。このためミトコンドリア研究はPDのみならず、神経変性の共通過程を明らかにすることが可能であるし、またミトコンドリアを保護できるような薬物(Mitochondrial drug)の開発は、神経細胞死の抑制を可能にするかもしれない。老化をふくめてミトコンドリアは多くの生命現象にかかわりを持っており、今後もこの小さな細胞内小器官を中心に更なる研究の発展が望まれる。

## II. 家族性PDの発症機序の研究

### (1) 原因遺伝子Parkinの発見

われわれは、ミトコンドリア研究を推進している中で、ミトコンドリア機能異常と酸化ストレスにかかわる蛋白としてManganese superoxide dismutase (Mn SOD)に注目した。そしてMnSODのsignal peptideのVal/Ala-9に遺伝子多型をみだし、Ala多型がPD患者において有意差を持って高頻度であることを報告した<sup>18)</sup>。更にこの遺伝子多型の検討からある一家系で遺伝子多型と発症者が完全に cosegregationしていることをみだし、少なくともMn SOD近傍に常染色体劣性若年性パーキンソンニズム(AR-JP)の原因遺伝子が存在していることが想定された。そして連鎖解析の結果、AR-JPは6q25.1-27(Park2)にマップされた。連鎖解析は新潟大学神経内科辻省二先生(現東京大神経内科)との共同研究で推進した<sup>19)</sup>。このAR-JPは、1973年にすでに山村らにより'Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms (EPDF)'と報告された独立性疾患であり<sup>20)</sup>。このEPDFの臨床的特徴を踏まえて連鎖解析を進め、山村安弘先生との共同研究で多数の家系で常染色体6番長腕に連鎖して

いることがわかった<sup>21)</sup>。そして偶然にも候補領域の1マイクロサテライトマーカーであるD6S305が欠失している1家系をみいだした<sup>22)</sup>。このマーカーの欠失の解釈としては、マーカーの近傍に欠失をともなった原因遺伝子が存在しているか原因遺伝子内にこのマーカーが存在していることが推定された。

若年性PDについては、早くから順天堂大の横地らにより40歳を境に通常のPDと違うことに注目していた。AR-JPについても40歳を境にその頻度は減じる傾向にあり、臨床的観察に基づきこの40歳境にした若年性PDの概念は適切なものであることが、AR-JPが6番染色体にマップされたことで証明されたことになる。横地らは、更に10歳未満で発症する瀬川病についても分類しており、分子生物学が隆盛を誇る以前より詳細な臨床研究から疾患の独立性を示していたことは臨床神経学の重要性を示している。

遺伝子座がマップされても遺伝子単離となると難航することが予想された。しかしながら、前述したようにマイクロサテライトマーカーが欠失している家系から予想に反して迅速に遺伝子単離に繋がった。遺伝子単離に慶応義塾大分子生物学清水信義先生の教室が確立していたBacterial artificial chromosome (BAC) libraryが威力を発揮したことがいうまでもない。このBAC libraryをもちいて、D6S305をふくむBACクローンを単離し、exon trappingにて候補遺伝子のexonを1つだけ単離できた。このexonをprobeにヒト胎児骨格筋cDNA libraryをスクリーニングし、その結果、原因遺伝子parkinと命名した新規遺伝子を単離することに成功した(Fig. 3)<sup>23)</sup>。Parkinは全長1.4Mbの巨大遺伝子であり、進行性筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンに次いで大きな遺伝子であることがわかっている。この遺伝子構造をもとにexon-intron境界を明らかにし、polymerase chain reaction (PCR)法にて各exonを増幅し、変異解析をおこない、確かにchromosome 6に連鎖する家系でparkin遺伝子変異が存在することが確認された。単離までのプロセスとして、われわれが長い間押し進めてきたミトコンドリア関連遺伝子分析の結果として、偶然にも家族性PDの原因遺伝子単離という大きな副産物をえることができた。

AR-JPの特徴としては、1) 血縁結婚のみとめられる劣性遺伝形式をとる 2) 両親は遺伝子変異のcarrierであり、一般的にはまったく正常である 3) 発症年齢は20代が多いが、40歳を少し越える発症者も存在する 4) L-dopaを開始前より睡眠によって改善のみとめられる睡眠効果や症状の日内変動が特徴である 5) 薬物治療の開始早期よりジスキネジアやwearing offをおこしやすく、上肢より下肢優位にジストニア姿勢をみとめるのを特徴とする 6) 進行は遅く、痴呆をとまわず、自律神経症状としては発汗亢進はみとめられる 7) 深部反射は亢進していることが多いが病的反射はみとめないのを特徴とする 8) 神経病理学的には、黒質および青斑核ときわめて限局した変性を特徴とし、特筆すべきこととしてPDで特異的な封入体であるLewy小体のみとめない。以上を特徴とする。しかしながら、その後の遺伝子変異解析の結果、われわれが予想していた以上に臨床型は多岐にわ

たっており、AR-JP とは上記特徴を持つ疾患であり、上記特徴を持たない若年性パーキンソニズムにおいても parkin 遺伝子変異が観察されることより遺伝子変異陽性症例は、

parkin-related disease とする必要がある。Park2 の名称は、あくまでもこの名称が遺伝子およびマップ名であることより不適であるとする意見がある。したがって正確には parkin-related disease とするのが最適であろう。

(2) Parkin 遺伝子の変異解析

先の連鎖解析で常染色体 6 番の長腕に連鎖のみとめられる日本人 AR-JP 患者の計 20 家系について遺伝子変異解析をおこなった。20 家系の日本人家系で変異解析をおこなったところ 12 家系 (60%) において exon そのものが欠失する exonic deletions であった<sup>24)</sup>。2 家系 (10%) においては、exon 5 の splicing junction および Gly コドン GGT の Guanine 中から一個 guanine が欠失する one-base deletion をみとめた<sup>25)</sup>。残りの家系については複合ヘテロ接合体であり、gene dosage technique でその存在を確認している。Park2 に連鎖する 20 家系のうち 18 家系については parkin 遺伝子変異を確認できた。複合ヘテロ接合体については Fluorescent in situ hybridization (FISH) で確認できている (論文準備中)。

日本人 AR-JP の患者の多くは欠失タイプを示していた。欠失タイプは様々であり、遺伝子変異の多様性を示しており、ハプロタイプからも創始者効果は否定された。欠失は exon 3~5 に集中しており、ホットスポットになっていた (Fig. 4)。われわれの研究室では、全国から AR-JP うたがいの samples が集まっているが頻度の差はあるものの、ほぼ全領域にわたって種々タイプの変異が観察された。本病型は最初本邦にのみみられる病型かと考えたが、変異解析が進んだ結果広く世界に分布していることが明らかとなった。現在、もっとも頻度の高い遺伝性 PD の原因遺伝子であることが判明している。日本人では、点変異は少なく、欠失型が多く白人患者では点変異が日本人患者に比して多い傾向にある。変異については missense, nonsense, microdeletion, multiple exon rearrangement と様々な変異をみとめている。報告されている変異について海外データと本邦データと合わせ Fig. 4 にまとめた<sup>24)~27)</sup>。また同胞発症者のいない孤発型 PD についてパーキン変異の検索をおこなったところ若年発症者において変異をみとめた<sup>28)29)</sup>。変異は同胞発症者のない症例でも若年発症者であると、この parkin 遺伝子に変異がみいだされる可能性は高い。

臨床症候には多岐にわたっており、通常の PD と区別つかない患者がいることがわかった。更に発症年齢についても 10 歳以下の症例から 42 歳とかなり幅がある。外国症例では 64 歳発症の症例もある。このように多様性が存在することがわかってきた。われわれの研究室では、約 700 例の若年発症の

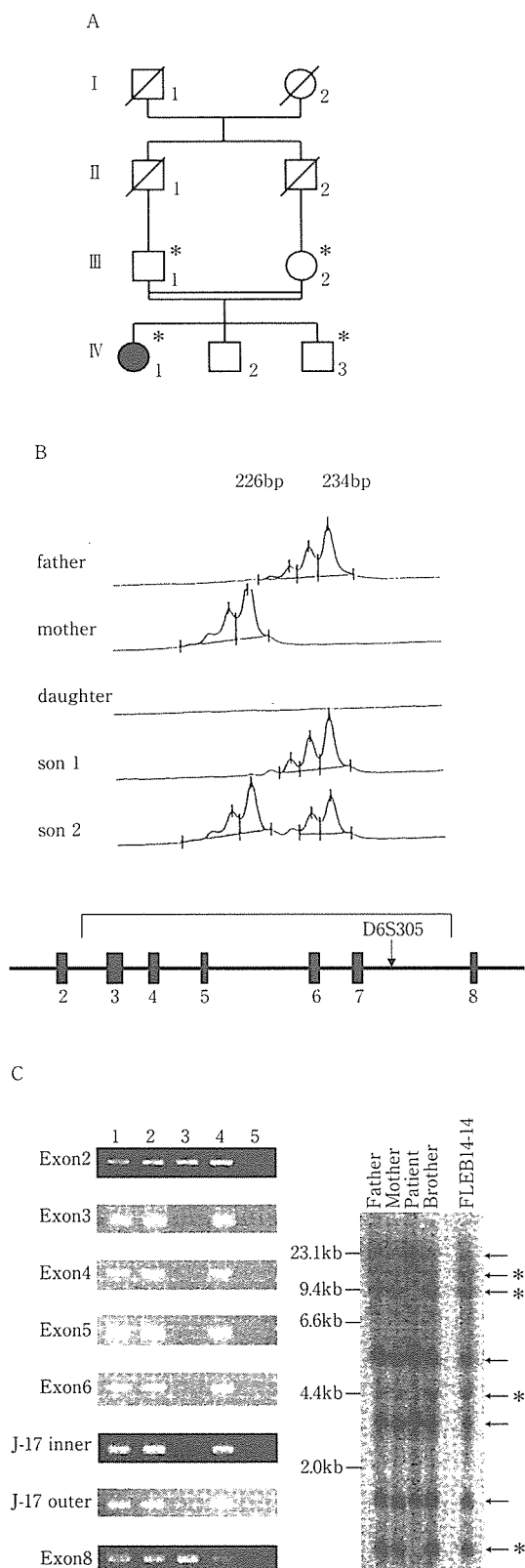


Fig. 3 A : D6S305 が欠失していた家系. B : D6S305 の PCR 産物が患者では、みとめられない。Son2 では 226bp, 234bp の二種の PCR 産物をもとめる。したがって両親は D6S305 の hemizygous に欠失していることになる。この D6S305 はパーキン遺伝子の intron 7 に位置していることが、その後明らかにされた。C : この D6S305 をふくむ BAC clone より、パーキン遺伝子を単離できた。上記患者では、exon 3-7 が欠失していた。Southern blot でも欠失は確認できた。\* : 欠失しているバンドを示す。

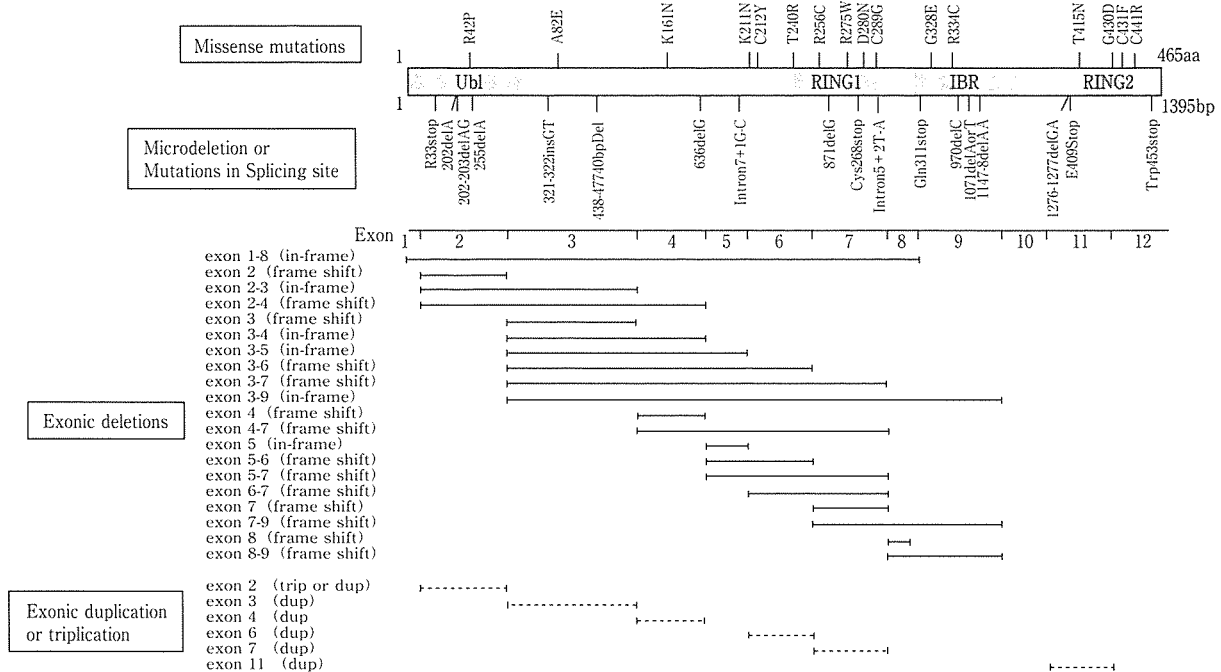


Fig. 4 今まで報告されてきたパーキン遺伝子変異。パーキン蛋白は465アミノ酸で、ubiquitin like domain (ubl), two Ring finger motifs, RING に挟まれて in between RING (IBR) によって構成されている。

PD について変異解析をおこなっているが、劣性遺伝性であれば約 50% に変異をみだしている。また一見優性遺伝性であっても parkin 遺伝子に変異を持つ家系が報告されている。われわれも数家系について同様な優性遺伝性がうたがわれる家系について parkin 遺伝子変異をみだしている。

変異での問題点としては、6 番染色体に連鎖しているにもかかわらず、coding region ないし splicing junction に変異が存在しない家系があることである。Parkin 遺伝子を制御する promoter 領域に変異が存在している可能性がある。Parkin 遺伝子の promoter は 198bp しかなく、この 198-bp の promoter を挟んで別の遺伝子 (gene located upstream of parkin, Glup) が頭を向かい合わせに存在している<sup>30)</sup>。おそらくこの promoter 領域を介して両遺伝子が制御されている可能性がある。また intron 1 は GC rich であり、発現を制御している elements が存在することが報告されている。したがって、coding region に変異のない患者については、これら regulatory 領域に変異が存在している可能性があると考え現在変異解析をおこなっている。もう一つの変異解析での問題点としては、ヘテロ接合体で病的変異が存在している患者の存在である。この解釈としては、dominant negative effect も考慮すべきであるが、上記 regulatory 領域に変異が存在している複合ヘテロ接合体の可能性もある。一方で、変異を二つのアレルに持つ患者の両親に PD が発症している家系も少ないが存在している (論文準備中)。このことより carrier であっても加齢など他の因子が加わると発症しうる可能性を示していると考えている。事実、carrier における positron emission tomography (PET) 検査では、18Fluoro-dopa の取り込みの低

下が報告されている。Sub-clinical であってもドパミンの低下がおこっていることが考えられている。この点を考慮するとハプロ不全の機序が考えられる。このことは孤発型 PD のなかにも parkin 遺伝子のヘテロ接合体が少なからず存在していることを示していると考えている。

### (3) Parkin 蛋白の機能：ユビキチンリガーゼとしての parkin 蛋白

Parkin-related disease の黒質神経変性のメカニズムを明らかにするには機能解析が必要である。まずデータベースをもちいて既存の蛋白との相同性について検討をおこなった。蛋白質全体としてみるとこれに相同な他に存在しない新規な分子だが、そのアミノ末端領域にユビキチンに相同性を有する領域 (Ubl ドメイン：ubiquitin-like domain) とカルボキシル末端領域に 2 個の RING finger とその motif に挟まれた In between RING (IBR) と名付けた特殊な領域が存在する。われわれはこの domain を RING box と命名した。更にこの RING box と Ubl を結ぶ linker region (parkin domain) と併せてパーキン蛋白は大きく 3 つの部位に分けられる (Ubl domain-linker region-RING box)。RING box にみとめられる RING-finger motif は C3HC4 タイプの motif に属する。

RING-finger motif を持つ蛋白質がユビキチンリガーゼであることが示唆されていたため、parkin 蛋白がユビキチンリガーゼである可能性を東京都臨床医学総合研究所の田中啓二先生との共同研究で検討した。その結果、parkin 蛋白がユビキチンリガーゼであることがわかった (Fig. 5, 6)<sup>31)</sup>。ユビキチンリガーゼはユビキチンプロテアソームシステムの 1 酵素である。ユビキチンプロテアソームシステムは細胞内の主要

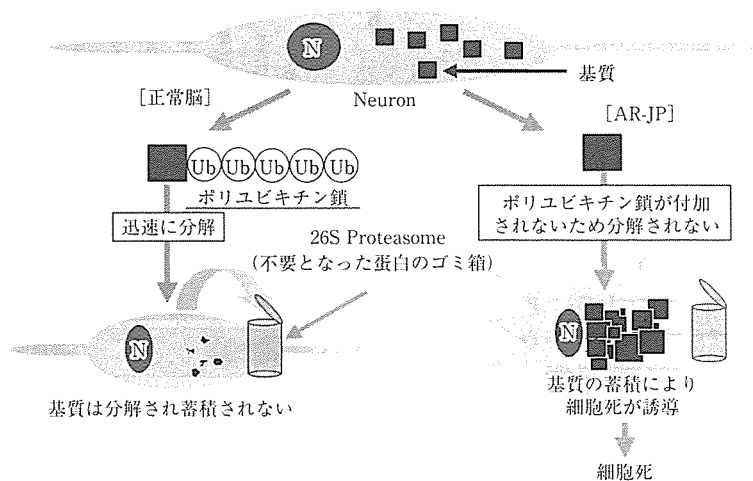


Fig. 5 正常脳では基質が蓄積されないが、AR-JP では基質が poly-ubiquitination されないために、基質が蓄積して、細胞死が誘導される。

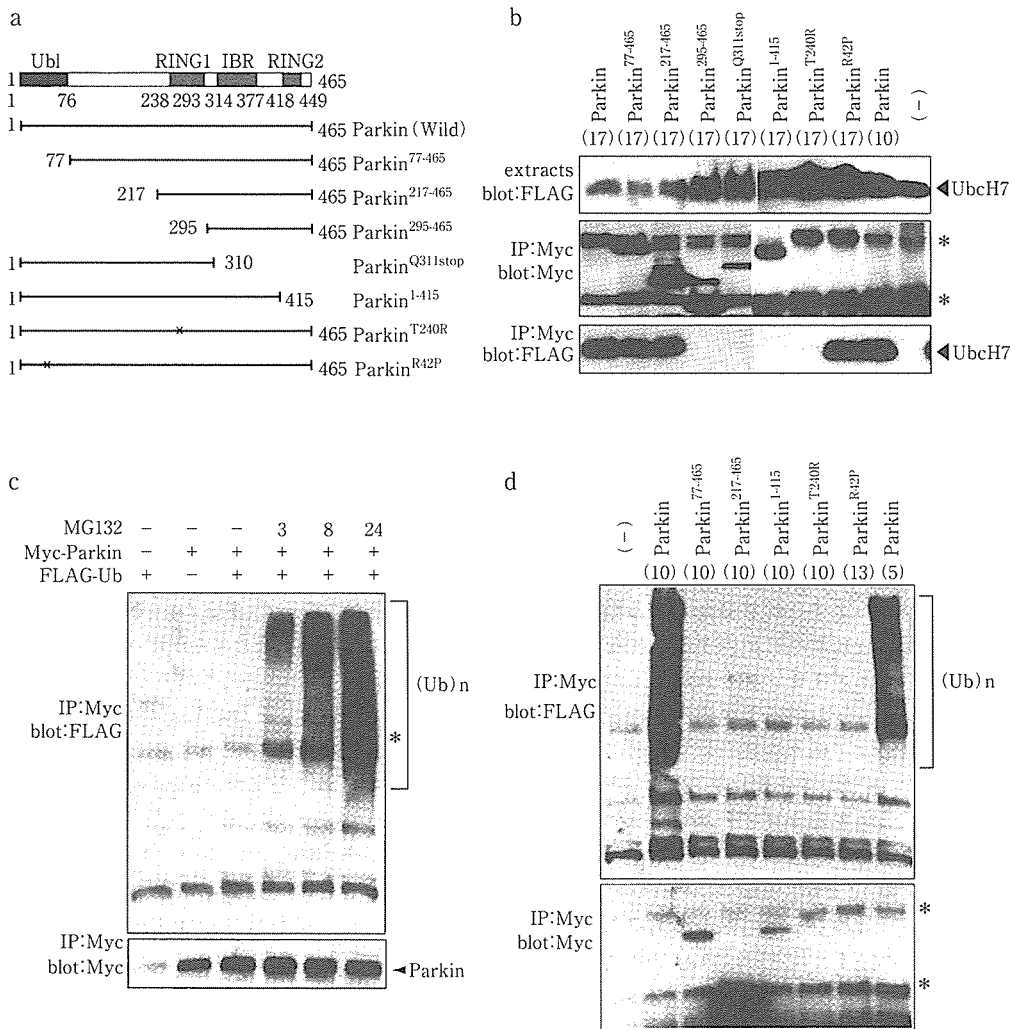
な蛋白質分解機構であり、76 アミノ酸残基からなる修飾分子ユビキチンを分解標的蛋白質に鎖状に結合するユビキチンシステムと、形成されたポリユビキチン鎖を認識して標的蛋白質を分解するプロテアソームから構成される。このシステムは細胞周期やシグナル伝達など様々な細胞調節機構において重要な機構を担っている。ユビキチン化反応は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)のカスケード反応でおこなわれ、その標的分子のリジン残基上にユビキチン鎖が形成される。このなかで基質認識(複合体)酵素であるE3は少なくとも数十種あることが知られている。Parkin 蛋白質はE2とはRING-Boxで結合してユビキチンリガーゼ活性を示す。劣性遺伝性であることから、parkin-related disease 患者でみとめられた変異 parkin 蛋白質は、ユビキチンリガーゼ活性が消失している可能性が示唆されていたが、その後の検討ですべての変異体で活性が消失していない可能性が検討されている。事実、1 症例であるが Lewy 小体が存在していたとする報告がある。この解釈としては偶然に Lewy 小体が形成されたか、患者でみとめられた変異 parkin 蛋白質のリガーゼ活性が部分的に残存していたために Lewy 小体が形成されたものと推定される。いずれにしろ、活性低下が病態の背景にあることはまちがいない。つまり AR-JP 患者脳では、標的蛋白質のポリユビキチン化が効率よくできないことで標的蛋白質が 26S proteasome で十分に分解されず、その蛋白質が神経細胞内に蓄積することで神経細胞死が生じると考えている (Fig. 5)。parkin-related disease 患者の病態解明の上で parkin 蛋白質の基質を探索することは、最重要課題である。

#### (4) パーキン蛋白質の細胞内局在

Parkin 蛋白質の基質同定においても詳細な機能解明の戦略においても細胞内局在を決定することは重要である。Parkin 蛋白質のアミノ酸配列をもとに、合成ペプチドに対する抗体を作成し、正常、孤発型 PD、AR-JP の剖検脳における検討をおこなった。抗体は、エクソン 3、9 内に相当する部位に作成した (M-73、M-74)。まず前頭葉の homogenate をもちい、west-

ern blot をおこなった。Fig. 7A~C に示すように、52kDa に相当する band をみとめた。AR-JP では、band をまったくみとめず、parkin 蛋白質は合成されても、不安定で分解速度が高いことが予想された<sup>32)</sup>。ただし、われわれが検討した症例の変異は exonic deletion あり、しかも frame-shift mutation を示すタイプであることより、open reading frame を保っている in-frame mutation のタイプでは、蛋白合成があるのか否かは現在のところ判明していない。Missense 変異のみとめた症例については患者の同意をえて筋生検にて骨格筋をもちいて解析したが、確かに骨格筋では 52-kDa に一致してパーキン蛋白質の band をみとめた(論文準備中)。更にホルマリン固定したパラフィン包埋切片をもちい、免疫組織化学的検討をおこなった (Fig. 7D)。Western blot と同様に AR-JP 脳では、まったく M-73、M-74 の抗体に反応を示さなかった。一方、孤発型パーキンソン病や正常対照では、細胞質と神経突起がよく染色された。細胞質は、granular structure が染色されており、Golgi complex に parkin 蛋白質が局在していると考えられた。更に細胞分画に fractionation し、Immunoblot をおこない、Golgi fraction と Cytosol fraction に parkin 蛋白質が存在していることを確認した (Fig. 7C)。Parkin 蛋白質が、Golgi complex と cytosol に存在することは小胞輸送に関係している可能性を示すものである。更に正常脳を使い線条体、黒質、前頭葉に分け免疫組織化学的検討および western blot をおこなったところ黒質においてパーキン蛋白質の合成がもっとも高かった (Fig. 7B)。これは parkin-related disease の選択的神経変性の病理所見を支持するものである。興味深いことに Lewy 小体が抗 parkin 抗体で染色された (Fig. 7E)。その後の研究では、Lewy 小体の構成成分に parkin の基質もふくまれていることがわかっている。

更に変異 parkin 蛋白質の局在変化の有無を検討するために、parkin 蛋白質に Green fluorescent protein (GFP) を tag 蛋白質として、変異および正常 parkin 蛋白質の局在を検討した<sup>32)</sup>。Parkin 蛋白質の C 末に GFP を付加に COS1 細胞に transfection し、細胞内局在を検討し、やはり Golgi complex にあるこ



**Fig. 6** A, B : E2 との結合を免疫沈降法 (IP) で確認している。この実験系では E2 は UbcH7 と結合する。C : MG132 で proteasome を抑制すると時間依存性に high molecular mass を観察できる。D : mutant では, high molecular mass を観察できないことより, この実験系では変異パーキン蛋白はユビキチンリガーゼ活性を持たないことが予想される。E~G : in vitro ubiquitination assay で, SH-SY5Y cell にパーキン遺伝子を transfection し, 免疫沈降したものと E1, E2 (UbcH7), radioisotope ラベルした ubiquitin を in vitro で反応させた。E では E1-E3 (IP-parkin) がそろって high molecular mass が観察される。F では変異パーキン蛋白では活性をみとめない。G : SH-SY5Y の transfection した IP-parkin では ubiquitination が観察されたが, HEK293 では観察されない。

とを証明できた (Fig. 8A~D). 更に内在性 parkin 蛋白についてレチノイン酸により神経様細胞に分化させた SH-SY5Y 細胞をもちいて抗 parkin 抗体にて検討したところ Golgi complex と神経突起がドット状に免疫染色された (Fig. 8). このドット状の染色パターンは, まさしくシナプス小胞を示すものであり, シナプス小胞にある synaptotagmine I との二重染色では共局在していることを確認した。このことより, parkin 蛋白が膜輸送システムにかかわっていることが予想された。

この細胞内局在の結果を踏まえて, PC12 細胞を NGF (Nerve Growth Factor) により神経細胞様に分化させ, GFP を tag 蛋白として parkin 蛋白を発現させ, その局在を観察した (Fig. 9D). 融合蛋白は神経突起内と核周囲の Golgi Com-

plex に局在していた。このことより外来性 parkin 蛋白と内在性蛋白の局在が完全に一致すると考え, この融合蛋白をもちいて変異 parkin 蛋白の局在を検討した。結果は, Ubl のみを持つ変異 parkin 蛋白は細胞質にびまん性に局在していたが, 他の変異 parkin 蛋白については Golgi complex に局在していた (Fig. 10)。このことは変異 parkin 蛋白と正常 parkin 蛋白では, その局在は変わらないことを示す。したがって, 疾患の発症機序には細胞内局在の変化は関与していないと推定された。つまり患者で観察される変異 parkin 蛋白の疾患発症の機序としてはユビキチンリガーゼ活性の低下が主な作用であると結論づけた。

神経はもっとも膜輸送システムが発達した細胞であり,

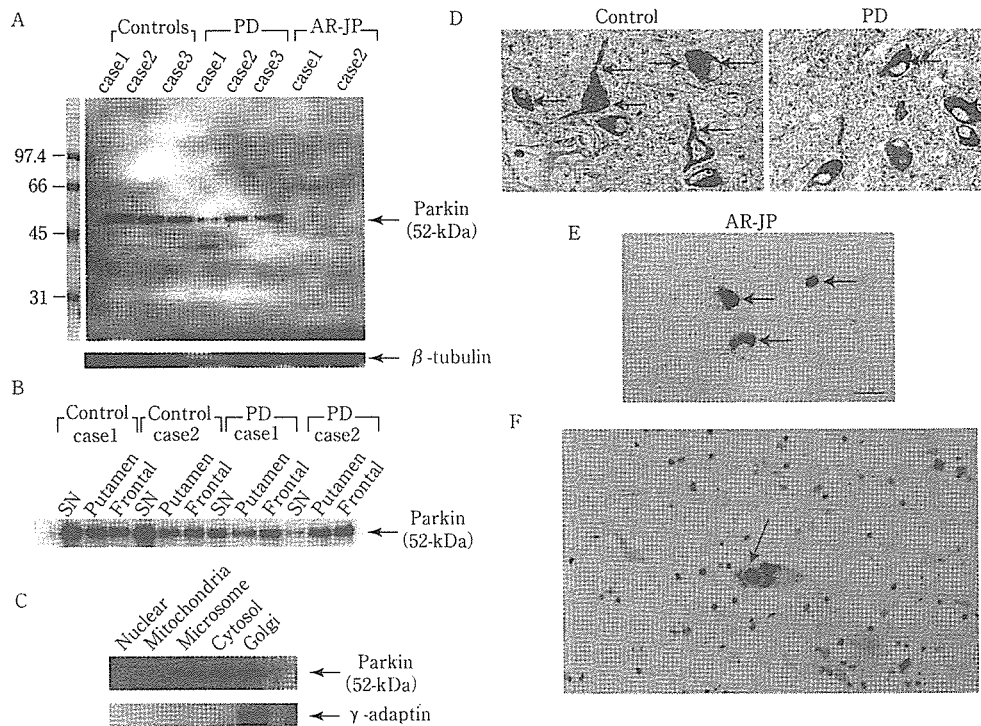


Fig. 7 A: Western blot では AR-JP にパーキン蛋白をみとめない. B: 孤発型 PD では黒質のパーキン蛋白の量が低下している. これは D に示すように細胞にパーキン蛋白が多いので, 細胞数の減少を反映していると考えられる. 一方, control ではパーキン蛋白は黒質で多い. SN, substantia nigra. C: 細胞分画では Golgi と cytosol にパーキン蛋白は分布している. D: 抗パーキン抗体では細胞質が良く染まる. AR-JP では染色性は無い. (bar = 100µm). E: Lewy 小体が抗パーキン抗体で染まる.

axon 内には蛋白合成系装置が存在しないため, その局在分布から parkin 蛋白は輸送システムによって神経終末に運ばれる蛋白であることが推定された. そこでシナプス終末から synaptosomal fraction を精製し, 免疫電顕にて検討を加えてみると, 確かに parkin 蛋白はシナプス小胞上に存在していた (Fig. 11). ショ糖勾配でもシナプスに存在している synaptotagmin や synaptophysin と分布が一致していた (Fig. 12 A, B). 更に parkin 蛋白生理的塩濃度で膜成分から可溶性成分に容易に遊離されることがわかった. シナプス小胞に存在している synapsin I とまったく同様に塩処理により容易に膜から遊離しやすい傾向にあった (Fig. 12C). Parkin 蛋白は, synapsin I 同様膜貫通ドメインを持たない. Synapsin I はリン酸化されることにより膜から遊離するので, parkin もリン酸化などにより修飾を受けている可能性がある. Computer 解析によれば, PKC や cdk5 などのリン酸化サイトが存在しており, リン酸化により膜から遊離されると推測している. この synapsin I の膜局在機構は静電的機構と提唱されており, parkin 蛋白も同様な機序により膜に局在していると予想された.

Parkin 蛋白の機能を推定する上で, 脳の成長過程での parkin 遺伝子の発現のパターンを検討することは重要である. われわれは rat の parkin cDNA を rat 脳 cDNA library をもちいてスクリーニングし, rat parkin cDNA を単離し, これを probe に in situ hybridization をおこなった. また UbcH

7 を probe にし, 両分子の発現パターンを検討した. In situ hybridization による検討でも UbcH7 と parkin が共局在していることを確認できたが, 興味あることにその分布は ubiquitous であり, 発達過程で発現が増加していた<sup>34</sup>. このことは発達過程で重要な機能をなしていることを推測させるが, parkin 蛋白がシナプス小胞にあることと併せて synaptogenesis などの成熟過程と関連があるのではないかと推定している. 臨床的にも発症年齢のピークが基底核の成熟過程と一致していることも parkin 蛋白の機能を考える上でも興味深い所見といえる.

#### (5) parkin の基質

上記に示したように AR-JP の発症機序を考える上でユビキチンリガーゼ活性が大きな要因であることより, 基質同定が病態解明の本質的なものといえる. われわれは基質同定のためにヒト脳 cDNA をもちいて parkin 蛋白の基質候補や結合蛋白を yeast two hybrid 法にてスクリーニングをおこなった. その一つ分子として CDCrel-1 を単離した. この分子は, Dawson 等のグループから報告されている<sup>35</sup>. われわれは, 更に理化学研究所脳科学センターの高橋良輔先生との共同研究にて Endoplasmic reticulum (ER) stress にかかわる分子 Pael (Parkin-associated endothelin receptor-like) receptor を同定した<sup>36</sup>. いずれの分子も yeast two hybrid 法にて単離したものである.

Yeast two hybrid 法とはことなる方法で単離されたのが糖

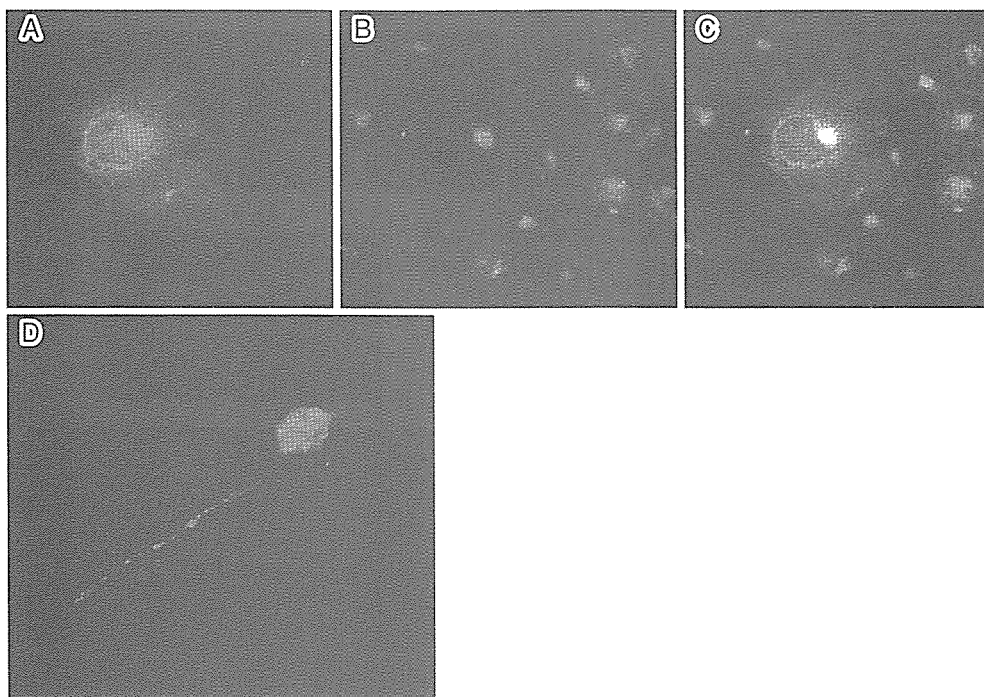


Fig. 8 A~C : Cos1 細胞に GFP-パーキン蛋白の融合蛋白をもちいて, 細胞内局在を検討した. A, GFP ; B, WGA ; C, superimposed image. Golgi complex に局在する. D : PC12 を NGF で神経様に分化させたもののパーキン蛋白の局在を検討した. 神経突起と Golgi complex に存在していた. (Bars = 50 $\mu$ m). WGA, wheat-germ agglutinin.

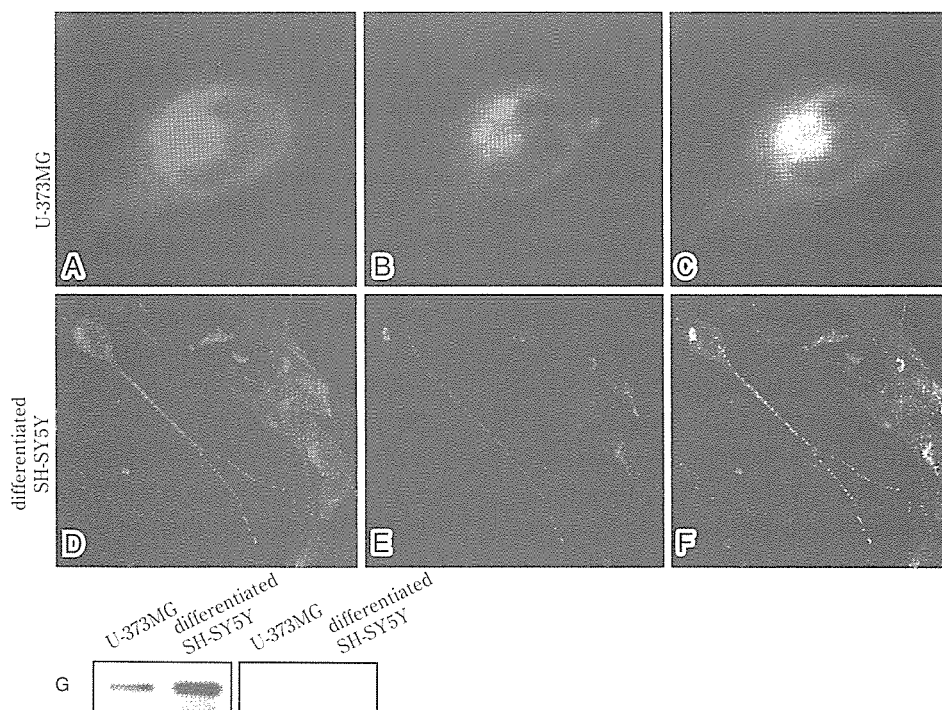


Fig. 9 A~C : U-373MG, glioblastoma cell line で内在性パーキン蛋白はこの cell line には存在していた. やはり Golgi complex にある. D~E : 神経細胞様にレチノイン酸で分化させると内在性パーキン蛋白はドット状に存在していた. シナプスにある synaptotagmine I と共局在していた. このことよりシナプスに存在していると考えられた. (Bars = 50 $\mu$ m)



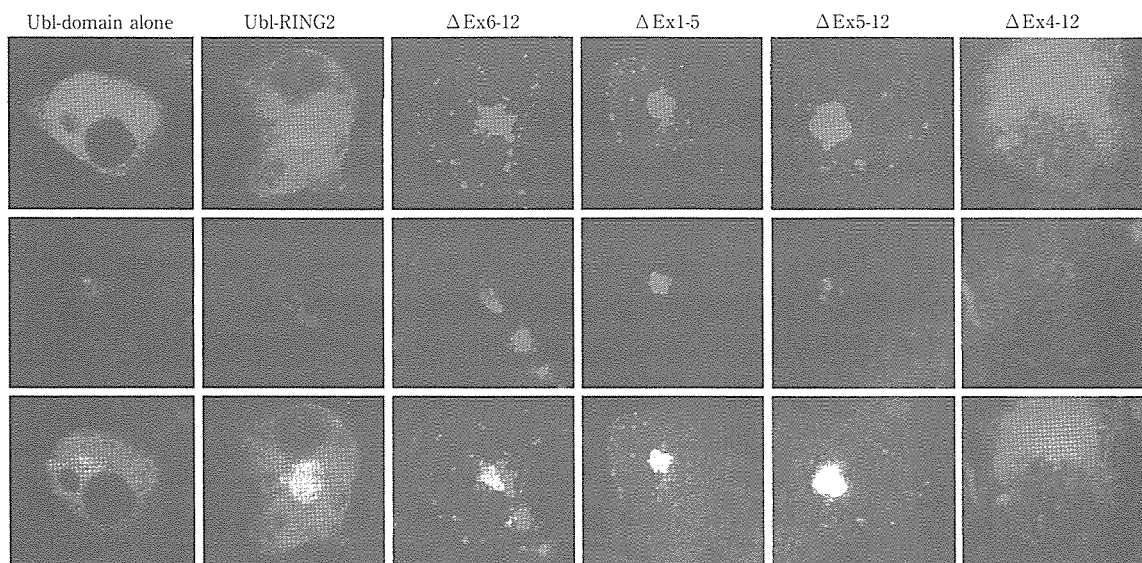


Fig. 10 Cos1 細胞に GFP-パーキン蛋白を transfection した. 上段は, GFP-パーキン蛋白, 中段は WGA で染色した. 下段は superimposed image. Ubl のみは細胞質にびまん性に染まるが, 他の変異パーキン蛋白は Golgi complex に局在していた. (Bar=50 $\mu$ m)

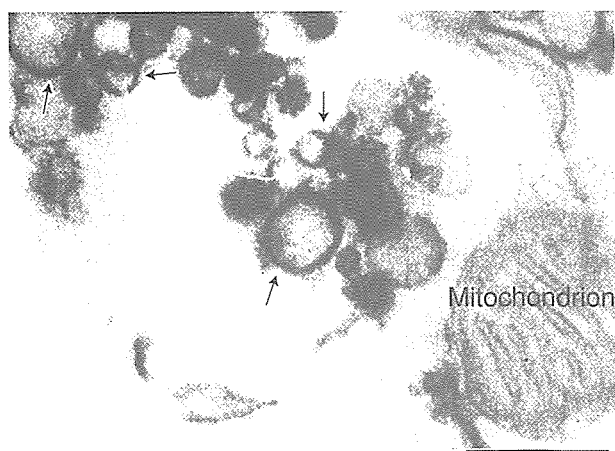


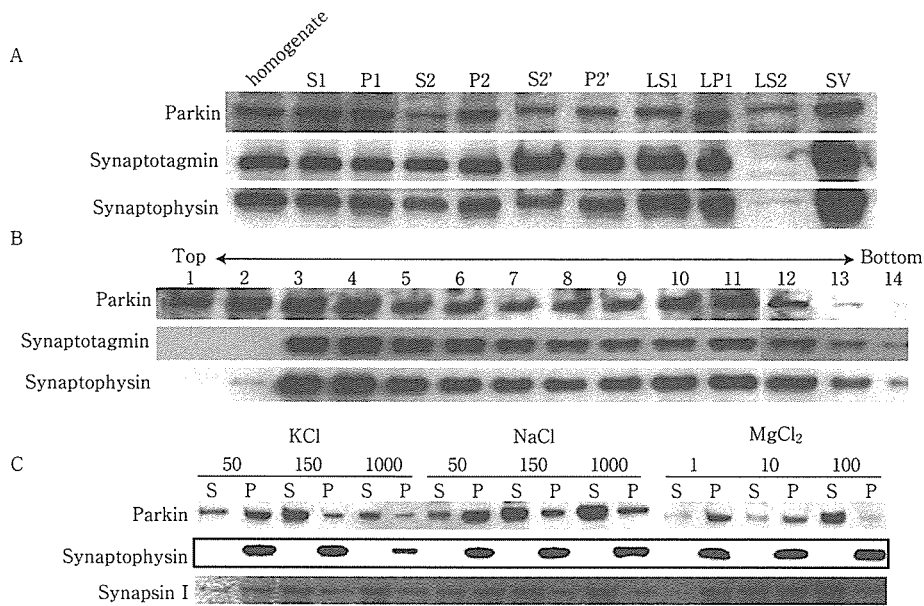
Fig. 11 免疫電顕でのパーキン蛋白の局在. Synaptic fraction に分けたものを観察した. (Bar=250nm)

化修飾された o-glycosylated  $\alpha$ -synuclein である. この分子はハーバード大の Selkoe 先生のグループとの共同研究で進めたものである<sup>37)</sup>. この分子の持つ意義は細胞死の実行分子というより Lewy 小体形成メカニズムを考える上で重要である. なぜなら AR-JP は病理学的に Lewy 小体を一般に形成しないことを特徴としている. 一方,  $\alpha$ -synuclein はこの封入対の主要分子であることが証明されており, 両分子が相互作用を示すことは封入対形成を考える上で興味深い. 正常  $\alpha$ -synuclein の分子量は 16kDa であり, 糖化修飾された分子は 22kDa の分子量を示す (Fig. 13A~C).

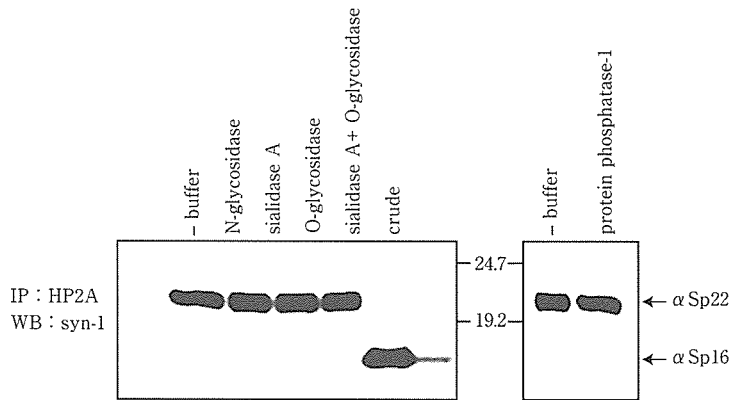
Yeast two hybrid 法で単離できた Pael receptor (Pael-R) と内在性分子に対する抗体をもちいて単離できた糖化修飾され

た  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ Spn22) は, いずれもわれわれのグループにより単離された分子である. すでに報告されているが CDCrel-1 についても詳細な検討をおこなっている. Pael-R は Orphan G protein であり, Pael-R は parkin 蛋白により, E2 である UBC6/UBC7 と協働して poly-ubiquitination されることがわかった. 更に Pael-R は正常では主に細胞膜に存在するが, 26S proteasome 阻害剤を投与すると endoplasmic reticulum (ER) 内に蓄積する (Fig. 14A). ER 内で蓄積すると細胞死が誘導されることがわかった (Fig. 14B). 更に Pael-R が実際に AR-JP 患者脳で蓄積しているか検討を加えた. 不溶性成分に Pael-R の蓄積を AR-JP 患者脳でみとめた (Fig. 15A). 更に ER stress 時に upregulation される Bip についても同じように患者脳で蓄積していた (Fig. 15B). Pael-R は蓄積することで細胞死が誘導されることが証明された. しかしながら,  $\alpha$ -synuclein, CDCrel-1, Pael-R ともに免疫組織化学的検討での蓄積の証明はできていない. 抗体の quality に依存するので, 更に詳細な検討が必要である.

CDCrel-1 については, parkin 蛋白と ubl と RING の 2 カ所で結合することがわかった. CDCrel-1 のリコンビナント蛋白を作製し, in vitro ubiquitination assay をおこなった. 2~3 個の ubiquitin が付加されることがわかった (Fig. 16). 一般に分解シグナルとして 4 個の ubiquitin が必要とされているので, この in vitro 系の実験では parkin 蛋白が分解シグナルに必要な polyubiquitin 鎖は付加できていない. Oligo-ubiquitination されることがどのような機能を示しているのかはわかっていない. Endocytosis される分子は mono-ubiquitination されるとの報告があり, 単なる分解シグナルだけでなく蛋白の合成制御もふくむ機能的コントロールにも ubiquitin 鎖がかかわっている可能性がある.



**Fig. 12** A, B : synaptic fraction のうち synaptic vesicle (SV) にパーキン蛋白は存在していた。シヨ糖勾配法では2相性に存在していた。C : 塩濃度を上げていくと pellet から supernatant に分布を変えた。これは塩処理により膜からパーキン蛋白が遊離しやすいことを示す。



**Fig. 13** ヒト剖検脳をもちいて抗 His 抗体で免疫沈降 (IP) をおこない、E1, E2 と反応させた。パーキン蛋白には His tag を付加している。この同じ処理したサンプルを抗  $\alpha$ -synuclein 抗体で immunoblot すると 22-kDa に一致した  $\alpha$ -synuclein のバンドを確認できた。高分子のバンドも同時にみとめられた。抗  $\alpha$ -synuclein 抗体で IP すると ARPD (AR-JP) で 22-kDa の  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ Sp22) をみとめた。この  $\alpha$ Sp22 は o-glycosidase と sialidase の両酵素と反応させると分子量が 16-kDa に戻った。このことより糖化修飾されたものといえる。

基質か否かの問題は別として、CDCrel-1 の過剰発現が exocytosis を抑制するという報告は、ドパミンの蓄積が細胞死にかかわっている可能性を想定させる。そこでわれわれも、ハムスターの insulinoma の cell line を使い、ヒト Growth hormone をトレーサーに parkin 蛋白の exocytosis への影響を解析した。CDCrel-1 の過剰発現による exocytosis の抑制は、われわれの実験系では再現できなかったが、変異 parkin 蛋白をもちいた解析では、dominant negative effect にて exocytosis が抑制された(論文準備中)。Exocytosis の抑制効果はドパミン貯留による細胞死を想定させる。Parkin-related disease

に特異な精神症状が出現することと関連があるのかもしれない。

われわれが検討している3つの分子以外にも Lewy 小体の構成成分である synphilin-1 も parkin 蛋白の基質候補として検討されている。また他にも Table 4 にあげた分子が基質として検討されている。また基質ではないが、proteasome と polyubiquitin 化分子との結合に必要な Rpn10 との結合が、NMR による構造解析より推定されている<sup>38)</sup> (名古屋市立大学薬学部加藤先生との共同研究で)。ユビキチンリガーゼということを考えれば基質は当然のことながら1つとはかぎら

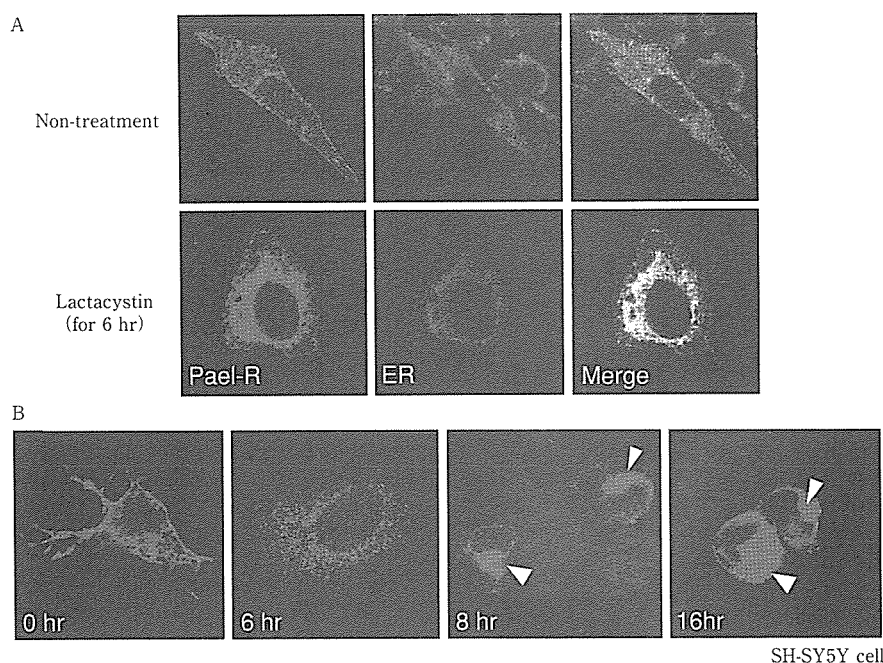


Fig. 14 A : Pael-R は proteasome inhibitor である lactacystin と反応させると ER 内に蓄積した。 B : Pael-R が時間経過とともに蓄積して細胞死が誘導された。 矢頭は aggresome like inclusion を示す。

Table 4 パーキン蛋白の基質候補と結合因子

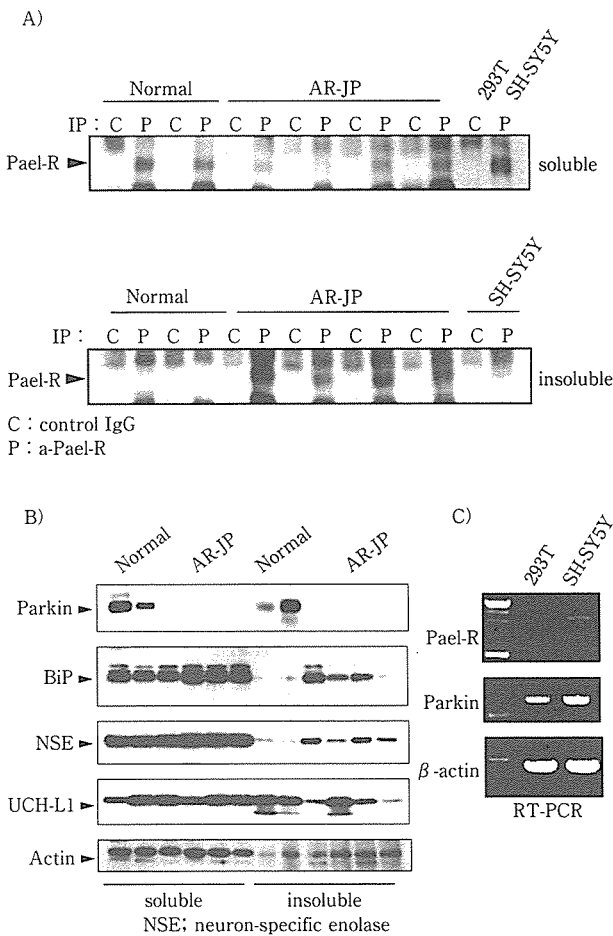
パーキン蛋白の基質候補	機能
CDCrel-1	Exocytosis (Dopamine storage?)
CDCrel-2	
Pael-receptor	ER stress (Unfolded protein response)
O-glycosylated $\alpha$ -synuclein	Lewy body formation
Synphilin-1	Lewy body formation
Cyclin E	Apoptosis (Kainate excitotoxication)
$\alpha/\beta$ Tubulin	Microtubules (assembly dysfunction)
p38 subunit	aminoacyl-tRNA syn. (protein biosynthesis)
Synaptotagmin XI	Fusion or docking, Synaptic functions
パーキン蛋白結合因子	機能
UbcH7, UbcH8, Ubc6/7, Ubc4	E2
Actin filament	Morphology
CASK/Lin2	PDZ containing scaffolding protein
Cullin-1	Multiprotein ligase
$\gamma$ -Tubulin	Centrosome
Rpn 10	Binding of parkin to proteasomal proteins

ず、すべての基質が相互作用している可能性も考えられる。事実、われわれの研究室では、yeast two hybrid 法にて上記とはことなる 13 クローンの基質候補を単離できている。基質間の相互作用ふくめて詳細な基質の機能がわかれば、parkin-related disease の脳組織特異的細胞死の機序が明らかにされるであろう。

一方で、従来の基質同定を主体とした研究戦略では限界があるのも事実である。Loss-of-function 効果を考えるとノックアウトマウスやノックインマウスの解析は有効である。最近になり 2 論文が報告されたが、表現型は存在しない<sup>39),40)</sup>。しか

しながら大脳辺縁系のドパミン代謝の亢進や線条体の細胞外のドパミン量が増加していたと報告している。われわれの研究室でもノックアウトマウスやノックインマウスを作成しており、parkin 関連蛋白のノックアウトマウスとの交配で細胞死が誘導されないか検討している。また変異 parkin 蛋白を発現させた transgenic mice も作成しており、近いうちに研究成果を発表できると考えている。

Parkin-related disease の発症機序で特記すべき点として通常の PD と比してドパミン神経細胞に変性が限局している。青斑核の変性はきわめて軽微であると報告されている。勿

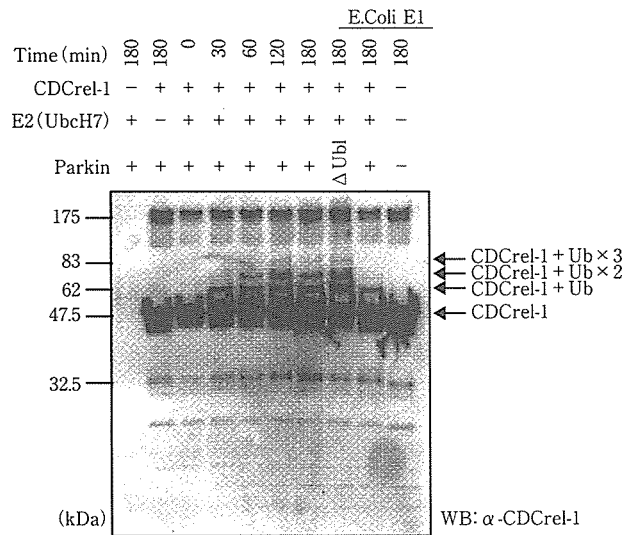


**Fig. 15** A : AR-JP では insoluble fraction に Pael-R が蓄積していた。B : また ER ストレスマーカーである Bip も同様に AR-JP で蓄積をみとめた。NSE, neuron specific enolase. C : SH-SY5Y では Pael-R が存在することが RT-PCR で確認された。

論, 症例ごとによりその程度はことなるものと考えられるが, 一般に PD の青斑核の変性は黒質同様に強いことを考えると, この所見は parkin-related disease の発症機序を考えられる上でヒントになるかもしれない。

**(6) 変異パーキン蛋白の酸化ストレスへの関与**

Parkin 蛋白がユビキチンリガーゼであることはわかったが, 基質と細胞死の関連についての詳細なメカニズムについてはわかっていない。第一の機序として Pael-R を介した ER stress の関与が推定される。第二に酸化ストレスの関与が推定される。酸化ストレスの関与については, parkin 遺伝子変異が確認されている AR-JP 患者剖検脳を使った Perl's 染色にて鉄の沈着を確認していることより重要な因子として考えられている。PD でも鉄沈着は観察されるが, AR-JP での鉄の沈着は PD に比してより強くみとめた<sup>41)</sup>。更に AR-JP では全体が鉄染色にて染色され, 神経突起にも染色性をみとめた。鉄の沈着から AR-JP の酸化ストレスの関与の可能性が示唆された。われわれは更にこの結果を発展させるために変異パーキン蛋白をもちいて酸化ストレスの関与をイギリスの



**Fig. 16** in vitro ubiquitination assay を基質候補として大腸菌で作製した recombinant protein を使って検討した。時間依存性に CDCrel-1 に 3 個の ubiquitin が付加された。おもしろいことに CDCrel-1 を基質とすると Δubl でも同様に付加が観察された (未発表データ)。

King's college の Peter Jenner 先生との共同研究で検討した。もちいた変異 parkin 蛋白は exonic deletion of 3-5 (del 3-5), T240R, Q311X の三種について overexpression の系で検討した。もちいた cell line は NT-2 と SK-N-MC 細胞で, wild type と mutant type を transfection し, Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase などの酵素活性を測定したが, wild および変異 parkin 蛋白ともに, その活性には変化はなかったが, 3-nitrotyrosine, lipid peroxidation, protein carbonyls が上昇していた<sup>42)</sup>。更に NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が変異 parkin 蛋白を transfection したもので上昇していた。この上昇は neuronal nitric oxide synthase (nNO) にともなうものであった。変異 parkin 蛋白が酸化ストレスを誘導することがわかった。この in vitro の実験結果は AR-JP 患者剖検脳の酸化ストレスの関与を支持するものである。変異 parkin 蛋白により基質が蓄積し, その蓄積が酸化ストレスを誘導するか, 基質そのものが酸化ストレスに直接関与していることが予想される。

PD では酸化ストレスの関与が指摘されており, ミトコンドリア機能低下と併せて重要な因子として考えられている。Parkin-related disease でのミトコンドリア機能低下の有無については報告がないが, parkin の orthologue を inactivated させた C. elegance では筋組織のミトコンドリアに変性を見とめている。なぜ, 中枢神経系に変性が生じなかったのかは不明であるが, 種の違いが影響している可能性がある。ただし, C. elegance でも変性は筋組織のみであり, parkin-related disease 同様ある特定部位の変性を見とめている。この C. elegance のモデルからは, parkin のミトコンドリアへの関与が推定される。

**(7) 今後の展望**

Parkin 蛋白がユビキチン・プロテアソーム系の直接分子

であるユビキチンリガーゼであること、loss-of-function型効果により疾患が発症することより今後もっとも重要な課題は基質同定である。現在9つの基質が報告されているが、われわれの yeast two hybrid 法による結合蛋白は13クローン単離されており、基質は他にも存在することが予想される。また各基質間の関係も明らかにする必要がある。一方で、基質同定のためのアプローチでは変性機序を明らかにすることは困難と考えており、基質同定と平行して発症機序や parkin の制御機構などを明らかにしていくことが必要であろう。

また劣性遺伝性より parkin ノックアウトマウスが病態解明に良いモデルとなることは容易に予想できる。今後の詳細な解析には遺伝子組み換えマウスモデルの作製が欠かせない。Parkin 蛋白の機能については parkin-related disease の病態解明のみならず孤発型 PD の病態解明に繋がる可能性が高い。なぜなら、正常 parkin が Lewy 小体形成の上で必須因子である可能性が高い。事実、 $\alpha$ Spn22 や synphilin-1 が基質候補として検討されていることから parkin 蛋白の詳細な機能が証明されれば孤発型 PD の Lewy 小体形成のメカニズムを明らかにすることが可能と考えている。Parkin-related disease では一般に若年発症が特徴であり Lewy 小体をもとめないことより、Lewy 小体自体が細胞毒性を持つという仮説は parkin-related disease の存在がある以上否定的かもしれない。

現在 Park1, Park2, Park5, Park7 の原因遺伝子が同定されている。最近になり Park4 が  $\alpha$ -synuclein をふくむ 1.5 Mb の領域の triplication であることが報告された<sup>43)</sup>。Park4 は、家族性 DLBD の臨床型をとっていることより  $\alpha$ -synuclein の overproduction がその原因であるとしている。この考えは家族性 AD と共通しており、遺伝性 PD の共通機構に  $\alpha$ -synuclein の overproduction が共通カスケードを形成しているかもしれない。孤発型 PD は  $\alpha$ -synuclein の分解能の低下の結果かもしれない。一連の遺伝性 PD の原因遺伝子が単離され、機能が解明されれば必ずや孤発型 PD の原因が明らかにされると信じている。PD の多様性からすれば現在マップされた遺伝性 PD 以外にも存在している可能性があり、事実、新規遺伝性 PD の連鎖解析をおこなっている。更にわれわれの研究室では parkin 遺伝子変異陰性例が存在することより劣性遺伝性である Park6 に連鎖する家系が少なからず存在しており、原因遺伝子単離に向けて解析中である。Park7 にもハプロタイプからは連鎖している可能性の高い家系が存在している。その原因遺伝子 DJ-1 について遺伝子変異解析をおこなっている。

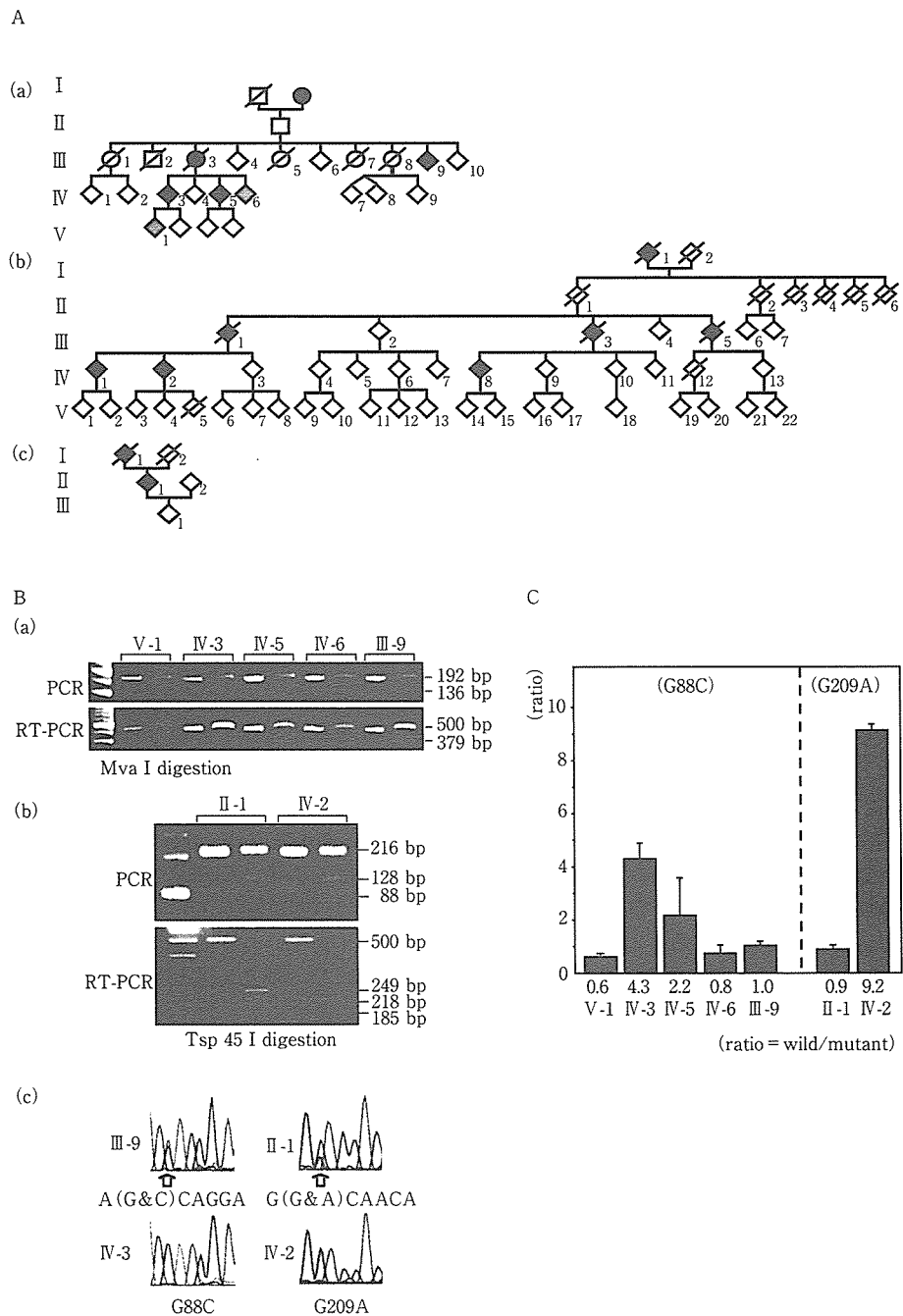
これら家族性 PD の原因遺伝子が単離されれば黒質変性の機序が明らかにされることが予想され、単一遺伝子異常から孤発型 PD 解明のアプローチが本格的に始めることができるものと信じている。

### III. Park1 に連鎖する家系における $\alpha$ -Synuclein 遺伝子のハプロ不全

Park1 の原因遺伝子  $\alpha$ -synuclein 変異は A153Thr<sup>44)</sup>,

Ala30Pro<sup>45)</sup> の2種であり、しかもその変異を持つ家系は、きわめて少ない。しかしながら、 $\alpha$ -synuclein は Lewy 小体のもっとも主要な構成成分であることが証明された。またこの遺伝子を overexpression させた mice や fruit fly では Lewy 小体の形成が証明されている。Fruit fly に関しては運動機能低下が報告されている。最近になり Ala53Thr 変異を overexpression させた mice で運動機能と Lewy 小体の形成が証明されている。したがって、 $\alpha$ -synuclein の機能解析をふくめた研究は孤発型 PD の解明に繋がる可能性がある。近年、Markopoulou らにより、 $\alpha$ -synuclein の Ala53Thr 変異をもつ家族性 PD の家系で、mutant allele の mRNA レベルが発現していないハプロ不全という状態が関与することが報告された<sup>46)</sup>。われわれは、ネブラスカ大の Katerina Markopoulou 先生、メーヨクリニックの Zbigniew Wszolek 先生、そしてチュービンゲン大の Olaf Riese 先生との共同研究で、この家系とは別の A153Thr 変異を持つアメリカ在住ギリシャ人家系と Ala30Pro の変異を持つドイツ人家系についてハプロ不全の関与について検討した。患者由来のリンパ芽球をもちいて DNA および RNA を抽出し、それをもちいて PCR, RT-PCR をおこない、各制限酵素で消化し、変異の有無を確認した。DNA では確かに各変異が存在していることを確認した。この方法では定量が不可能なので、TaqMan PCR にて定量した。この方法では TaqMan probe と呼ばれる 20~30 塩基ほどの両端に蛍光ラベルした oligonucleotide を使う。この probe の両端には reporter (5' 末端に Fluorescein 系の蛍光色素)、quencher (3' 末端に Rhodamine 系の蛍光色素) と呼ばれる2つの蛍光色素がラベルされており、この状態では蛍光共鳴エネルギーの移動現象により reporter の蛍光は抑制される。PCR の伸長反応が進むと、probe が加水分解され reporter の遊離にともない蛍光強度が増加し、指数関数的に増幅された PCR 産物を蛍光強度から real time に定量測定ができる。

われわれは Wild と Mutant を特異的に認識するように 3'-end specific primer を設定し、mutant と wild を区別できる条件を決め、 $\alpha$ -synuclein mRNA の定量をおこなった。各 mutant allele について定量した結果、ドイツ家系では罹患期間が長い症例で mutant allele の発現がほとんどみとめなかった。アメリカ-ギリシャ家系では痴呆症状のある患者で mutant allele の発現をみとめなかった。各変異については RT-PCR で確認しており、mutant allele の発現のみとめられなかった患者では直接塩基決定法でも wild type が配列として示されていた。Wild の量と Mutant の量の比では、臨床症状の重症度に相関関係がみとめられた (Fig. 17A~C)。以上のことから  $\alpha$ -synuclein に変異を持つ家系では、リンパ芽球をもちいた mRNA 定量にて臨床症状と mutant allele の発現が低下するハプロ不全に相関が、ことなる二種の変異型を持つ家系でみとめられた<sup>47)</sup>。ハプロ不全は蛋白レベルでもおこなっており、HPLC/Mass spectrometry で解析したところ確かに mutant allele にハプロ不全をみとめるリンパ芽球では wild type の  $\alpha$ -synuclein のみが発現していた。つまり蛋白レベルでハプロ不全が生じていることが証明されたわけである。リ



**Fig. 17** A (a) はドイツ家系 (Ala30Pro[G88C]変異). (b~c) はギリシャ-アメリカ家系で Ala53Thr [G209A]<sub>r</sub> 変異を持つ. B-(a, b) : すべての発症者は変異を持つことが確認された (PCR-RFLP). RT-PCR では IV-3 の罹患者は DNA 上変異を持つが, RT-PCR では変異アレルが発現していない. B-(c) : 直接塩基決定法では, やはり変異アレルの発現を観察できない. C : 変異アレルと正常アレルの比を検討した. IV-3 はもっとも症状が重く, また罹患期間も長い. IV-2 は症状も重症だが痴呆をみとめる. 変異アレルの発現は臨床症状と逆相関にあり, ハプロ不全は臨床症状を反映している. 蛋白レベルでも変異アレル由来の変異蛋白は発現していない.

ンパ芽球でハプロ不全がみとめられたが, 脳での状態を反映しているかは不明である. しかしながら, 臨床症状との関連で注目すべき現象であり,  $\alpha$ -synuclein 変異を持つ家族性 PD に共通した現象と捉えられる. このハプロ不全については,

parkin 遺伝子変異をヘテロ接合体で持ち発症している患者の機序についても説明可能である. したがって家族性 PD の発症にこのハプロ不全は共通した機序として存在する可能性もある.

#### IV. 家族性パーキンソン病から孤発型パーキンソン病へ

##### (1) パーキン遺伝子多型と孤発型パーキンソン病

われわれは孤発型PDのミトコンドリア研究からAR-JPの原因遺伝子単離に成功した。この単一遺伝子異常である家族性PDの研究からユビキチン・プロテアソーム系が重要であることが推定された。Lewy小体はユビキチン陽性の細胞内封入体であり、ここでユビキチン・プロテアソーム系の関与がクローズアップされたといつて過言でない。そこでわれわれはPark2, Park5の原因遺伝子パーキン遺伝子とUbiquitin carboxy-terminal-L1遺伝子多型に焦点をあて、孤発型PDのリスクファクターに成るか否か検討した。まずわれわれはパーキン遺伝子の変異解析の過程で、アミノ酸置換のある三種の遺伝子多型をみいだした<sup>48)</sup>。みいだされた遺伝子多型は、S/N167, R/W366, そしてV/L380の三カ所で、年齢分布が一致するコントロール群と家族歴のない孤発型PD群で、各遺伝子多型の頻度を検討した。S/N167, V/L380については両群で有意差をみとめなかったが、R/W366については、孤発型PD vs. コントロールが1.2 vs. 4.4%と孤発型PD群で頻度が低かった。このことよりこのR/W366遺伝子多型はPD発症に関して保護的に作用している可能性が推定された。この結果は、台湾人のPD患者でも再現されており、少なくともアジア系PD患者では保護的に作用している可能性がある。

UCH-L1遺伝子は優性遺伝性PDの原因遺伝子であるが、現在まで病的変異は1家系のみである。われわれの優性遺伝性PDがうたがわれる家系で変異を解析したが、変異はみいだせなかった<sup>49)</sup>。しかしながら、この遺伝子に遺伝子多型が存在していたので、みいだされた遺伝子多型について検討をおこなった。UCH-L1遺伝子にS/Y18の遺伝子多型をみいだしたので、そのS/Y18の頻度について検討した。この研究は白人患者についても解析するためにイギリスの神経学研究所のNicholas Wood先生、Novartis社のMichael Polymeropoulos先生の協力をえておこなった。多型であるY型が日本人で多く、wild typeとされているS型が少ない傾向にあった。日本人患者では約30%と発症をおさえる保護的作用をみとめた<sup>50)</sup>。しかしながら、白人では保護作用がなく人種間における遺伝子多型頻度を考慮すべき問題として上げられた。しかしながら、解析数を増やすとこの多型は保護的作用を持っている可能性が指摘されはじめており、世界規模で統計学的処理をおこなっている。

現在も真の危険因子の同定を目指して様々な遺伝子多型について検討している。遺伝性PDが多様性を示しているように孤発型PDもまた多様性をもった集団と考えるのが妥当と考える。現在オーダーメイド医療を目指してあらゆる臨床症候と遺伝子多型について国立精神・神経センター村田美穂先生、香川県立中央病院の山本光利先生、大阪大学臨床遺伝学戸田達史先生との共同研究で推進している。

##### (2) 臨床マーカーの開発を向けて：尿内のフリーラジカルの測定

先に触れたMPTPの黒質神経細胞死の機序は、直接ミトコンドリアのエネルギー産生系を阻害することにより細胞死を惹起させることがわかっている。またエネルギー産生系だけでなく活性酸素種を発生させることもわかっており、PDの発症機序を考えるうえでミトコンドリア機能低下と酸化ストレスの関与は重要である。そこでこの酸化ストレスの関与を示すようなマーカーの開発を検討した。PDでは脳内の8-OHdGが有意に上昇していることが報告されていたので、この8-OHdGに注目して検討している。尿中の8-OHdGは、患者に対する侵襲が少なく簡単に検査できることより有効なマーカーになりうるかもしれない。現在、MAO-inhibitorであるDeprenylの神経保護作用と併せて臨床マーカーになりうるか検討中である。

##### (3) 孤発型パーキンソン病と家族性パーキンソン病の共通メカニズムそして新薬開発に向けて

家族性PDの原因遺伝子産物であるparkin蛋白とUCH-L1はユビキチン・プロテアソーム系の直接分子であり、 $\alpha$ -synucleinはユビキチン陽性であるLewy小体の主要成分である。このことはユビキチン・プロテアソーム系がPDの発症メカニズムにおいて主要なカスケードであることを示す。更にparkin-related diseaseの病理にLewy小体のみとめないこともその系の関与を推定させるものと考えている。一方、cell biologyを使った系での $\alpha$ -synucleinの凝集に関する研究では、その凝集にミトコンドリア機能低下が必要とされている。26S proteasomeはATP依存性の蛋白分解をおこなうことよりミトコンドリア機能低下はユビキチン・プロテアソーム系の機能障害をひきおこす可能性が考えられる。つまりミトコンドリア機能低下とユビキチン・プロテアソーム系は密接な関係にあると推定される。

われわれがおこなってきたPDの発症機序に関する研究は、ミトコンドリア研究にはじまり、その研究結果からえられたヒントをもとに家族性PDの原因遺伝子parkinの単離に繋がった。更にparkin蛋白の機能がユビキチン・プロテアソーム系の構成酵素であるユビキチンリガーゼであることを明らかにすることができた。Parkin遺伝子の発見と機能解析の成功は、多くの神経変性疾患で観察されている封入体の形成機構を考える上で重要な情報を提供することになった。とくにPDではLewy小体の細胞毒性の有無については今後の検討が必要であるが、少なくともその形成過程が細胞毒性を示すのはまちがいないと考えている。したがってPDにおいてはLewy小体の形成を阻止できれば神経細胞死を抑制できる可能性が高い。さらに封入体形成はPDのみならず他の多くの神経変性疾患でも共通にみとめられており、この封入体形成を阻止できる薬物が開発されれば多くの神経変性疾患の治療に利用できると予想される。従来の治療方法はドパミンの補充に重点がおこなわれてきた。しかしながら、parkin蛋白の機能解明からのヒントからユビキチン・プロテアソーム系が神経変性に関与していることが推定されている。更にユビキチン・プロテアソーム系の関与従来の治療方法とはこ

となる新しい方向性を提供している。事実、シヨウジョウバエのPD modelの解析からはシャペロンが、新薬としての可能性が指摘されている。われわれのおこなってきた研究は更にLewy小体形成メカニズム解明へとシフトさせ、Lewy小体形成の分子機構を解明すると共にシャペロン機能を代償することが可能な薬剤の開発やユビキチン・プロテアソーム系の機能促進因子の開発などが次なる課題である。

謝辞：本研究は、ミトコンドリア研究をはじめ parkin 遺伝子や parkin 蛋白のユビキチンリガーゼの発見、その基質同定まで多くの共同研究者により遂行されてきたものであります。ここに多くの共同研究者の方々に深甚の謝辞を表したいと思います。またここに記した研究成果には、水野神経学教室の多くの教職員、大学院生、研究員、技術員の方々が参加しております。この成果は水野神経学教室のチームワークの賜であります。最後に特別論文の寄稿の機会を与えていただいた神経学会運営委員会および編集委員会の先生方に深甚の謝辞を表したいと思います。

#### 文 献

- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, et al : Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 163 : 1450—1455
- Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, et al : Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991 ; 30 : 563—571
- Yoshino H, Nakagawa-Hattori Y, Kondo T, et al : Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1992 ; 4 : 27—34
- Mizuno Y, Matuda S, Yoshino H, et al : An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1994 ; 35 : 204—210
- Nomiyama T, Tanaka Y, Hattori N, et al : Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA extracted from peripheral blood cells in diabetic patients. *Diabetologia* 2002 ; 45 : 1577—1583
- Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, et al : Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 170 : 1044—1048
- Ikebe S, Tanaka M, Ozawa T : Point mutations of mitochondrial genome in Parkinson's disease. *Mol Brain Res* 1995 ; 28 : 281—295
- Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, et al : Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998 ; 44 : 3 Suppl 1, S99—109
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, et al : Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 1993 ; 17 : 171—184
- Tanaka M, Fuku N, Takeyasu T, et al : Golden Mean to Longevity : Rareness of Mitochondrial Cytochrome b Variants in Centenarians but Not in Patients with Parkinson's Disease. *J Neurosci Res* (in press)
- Clayton DA : Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 1982 ; 28 : 693—705
- Nishigaki Y, Marti R, Copeland WC, et al : Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 1913—1921
- Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, et al : Genotype in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson disease. *Genomics* 1998 ; 49 : 52—58
- Yoritaka A, Hattori N, Yoshino H, et al : Catechol-O-methyltransferase genotype and susceptibility to Parkinson's disease in Japan. *J Neural Transm* 1997 ; 104 : 1313—1317
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, et al : Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 2696—2701
- Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, et al : Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999 ; 46 : 920—924
- Mochizuki H, Goto K, Mori H, et al : Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1996 ; 137 : 120—123
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, et al : Identification of dimorphic mutation in the mitochondrial targeting sequence in the human MnSOD gene and its allelic association with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 226 : 561—565
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, et al : Localization of a gene for autosomal recessive form of juvenile parkinsonism (AR-JP) to chromosome 6q25. 2-27. *Am J Hum Genet* 1997 ; 60 : 588—596
- Yamamura Y, Sobue I, Ando K, et al : Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology* 1973 ; 23 : 239—244
- Matsumine H, Shimizu Y, Kobayashi T, et al : Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms (EPDF) maps to the locus for autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *Neurology* 1998 ; 50 : 1340—1345
- Matsumine H, Yamamura Y, Hattori N, et al : A microdeletion spanning D6S305 co-segregates with autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *Genomics* 1998 ; 49 : 143—146
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al : Mutations in the



- parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998 ; 392 : 605—608
- 24) Hattori N, Kitada T, Matsumine H, et al : Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with AR-JP : evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998 ; 44 : 935—941
  - 25) Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, et al : Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) in the parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 249 : 754—758
  - 26) Nisipeanu P, Inzelberg R, Blumen SC, et al : Autosomal-recessive juvenile parkinsonism in a Jewish Yemenite kindred : mutation of Parkin gene. *Neurology* 1999 ; 53 : 1602—1604
  - 27) Lu CS, Wu JC, Tsai CH, et al : Clinical and genetic studies on familial parkinsonism : the first report on a parkin gene mutation in a Taiwanese family. *Mov Disord* 2001 ; 16 : 164—166
  - 28) Jeon BS, Kim JM, Lee DS, et al : An apparently sporadic case with parkin gene mutation in a Korean woman. *Arch Neurol* 2001 ; 58 : 988—989
  - 29) Kobayashi T, Wang M, Hattori N, et al : Exonic deletion mutations of the parkin gene among sporadic patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disord* 2000 ; 6 : 129—131
  - 30) Asakawa S, Tsunematsu Ki, Takayanagi A, et al : The genomic structure and promoter region of the human parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 286 : 863—868
  - 31) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al : Familial parkinson's disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000 ; 25 : 302—305
  - 32) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al : Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin : Absence of protein in AR-JP Patients. *Ann Neurol* 1999 ; 45 : 655—658
  - 33) Kubo S, Kitami T, Noda S, et al : Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 2001 ; 78 : 42—54
  - 34) Wang M, Suzuki T, Kitada T, et al : Expression of parkin and a parkin-interacting protein, ubiquitin-conjugating enzyme, UbcH7 in the developing rat brain. *J Neurochem* 2001 ; 77 : 1561—1568
  - 35) Zhang Y, Gao J, Chung KK, et al : Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 13354—13359
  - 36) Imai Y, Soda M, Inoue H, et al : An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin. *Cell* 2001 ; 105 : 891—902
  - 37) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, et al : Ubiquitination of a novel form of  $\alpha$ -synuclein by parkin from human brain : implications for Parkinson disease. *Science* 2001 ; 293 : 263—269
  - 38) Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, et al : Parkin binds the S5a subunit of 26S proteasome with the ubiquitin-like domain. *EMBO rep* 2003 2003 ; 4 : 301—306
  - 39) Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, et al : Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 43628—43635
  - 40) Itier JM, Ibanez P, Mena MA, et al : Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 2277—2291
  - 41) Takanashi M, Mochizuki H, Yokomizo K, et al : Iron accumulation in the substantia nigra of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *Parkinsonism Relat. Disord* 2001 ; 7 : 311—314
  - 42) Hyun D-H, Lee M-H, Hattori N, et al : Effect of Wild-Type or Mutant Parkin on Oxidative Damage, Nitric Oxide, Antioxidant Defences and the Proteasome *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 28572—28577
  - 43) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al : alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003 ; 302 : 841
  - 44) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al : Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997 ; 276 : 2045—2047
  - 45) Krüger R, Kuhn W, Muller T, et al : Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998 ; 18 : 106—108
  - 46) Markopoulou K, Wszolek ZK, Pfeiffer RF, et al : Reduced expression of the G209A alpha-synuclein allele in familial Parkinsonism. *Ann Neurol* 1999 ; 46 : 374—381
  - 47) Kobayashi H, Krüger R, Maropoulou K, et al : Haploinsufficiency at the  $\alpha$ -synuclein gene underlies phenotype severity in familial Parkinson's disease. *Brain* (in press)
  - 48) Wang M, Hattori N, Matsumine H, et al : Polymorphism in the parkin gene in sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999 ; 45 : 655—658
  - 49) Zhang J, Hattori N, Giladi N, et al : Failure to find mutations in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in familial Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disord* 2000 ; 6 : 199—200
  - 50) Zhang J, Hattori N, Leroy E, et al : Association Between a Polymorphism of Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) Gene and Sporadic Parkinson's Disease. *Parkinsonism Related* 2000 ; 6 : 199—200

## Abstract

**Etiology and Pathogenesis of Parkinson's disease :  
from mitochondrial dysfunctions to familial Parkinson's disease**

Nobutaka Hattori, M.D.

Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. It is urgently needed to elucidate the cause of the disease and to establish neuroprotective treatment.

We have been working on the etiology and pathogenesis of PD for many years and we found selective loss of mitochondrial complex I and the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in the nigral neurons of patients with PD. Our observation firmly established mitochondrial defects in PD. Mitochondrial respiratory failure induces oxidative damage in neurons, and we found increase in hydroxynonenal and 8-oxo-deoxyguanine, indices of oxidative damage, in the nigral neurons of PD. These abnormalities can trigger apoptotic cell death.

The primary events which induce mitochondrial failure and oxidative damage are not known, however, it has been postulated that the interaction of genetic risk factors and environmental factors would initiate the degenerative process. Based on this assumption, we conducted genetic association studies by the candidate gene methods. We found that polymorphic mutations of superoxide dismutase-2 and 24-kDa subunit of mitochondrial complex I were associated increased risk of developing Parkinson's disease.

While we were doing this genetic association study, we found a family, in which parkinsonian phenotype completely segregated with a polymorphic mutation of the superoxide dismutase-2 gene. In this family, 4 out of 6 siblings were affected with early onset parkinsonism and the parents were apparently normal. Thus the mode of inheritance appeared to be autosomal recessive and this type is now called as AR-JP or Park2. We confirmed the linkage of this type of familial Parkinson's disease to the superoxide dismutase loci that is located in the telomeric region of chromosome 6 by the linkage analysis using microsatellite markers in this region.

Then we found another family, in which an affected patient showed lack of one of the microsatellite markers (D6S315), which we were using in the linkage analysis. This observation prompted us to initiate the molecular cloning of the disease gene utilizing D6S315 as the initial probe. The molecular cloning was done with the collaboration with Professor Nobuyoshi Shimizu of Keio University. We identified a novel gene and confirmed that mutations of this novel gene were found only in the patients with autosomal recessive Parkinson's disease. The novel gene was named parkin.

We conducted mutational analysis on more than 700 families with Parkinson's disease. We also established a method to detect compound heterozygotes of parkin mutations. Mutations of the parkin gene were found in approximately 50% of autosomal recessive families. Many kinds of exonic deletions and point mutations were found. This type of familial Parkinson's disease had been considered to be unique among Japanese, but since we started mutational analysis of the parkin gene, we confirmed the world wide distribution of parkin gene mutations.

Then we analyzed functions of parkin protein with the collaboration with Dr. Keiji Tanaka of Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences. We found that parkin protein was a ubiquitin-protein ligase of the ubiquitin system. Now we are working on the candidate substrates of parkin protein as a ubiquitin ligase. We found that CDCrel-1, a synaptic vesicle protein, was a candidate substrate of parkin protein. In addition, we found two additional candidate proteins, i.e., alpha-synuclein 22 and PAEL receptor, with the collaboration of Professor Denis Selkoe of Harvard Medical School and Dr. Ryosuke Takahashi of RIKEN, respectively. Accumulation of PAEL receptor in the endoplasmic reticulum causes endoplasmic reticulum stress and apoptotic cell death. We found evidence to indicate accumulation of PAEL receptor and the presence of endoplasmic reticulum stress in a patient with AR-JP (Park2).

Thus our studies firmly established that a genetic defect of an enzyme in the ubiquitin-proteasome system induces selective nigral neuronal death. We indicated the important role of the ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration in general. In many other neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Huntington's disease, Machado-Joseph disease, dentatorubral-pallidolusian atrophy, and ALS, ubiquitinated proteins are accumulated in neurons. Thus protein handling in the ubiquitin-proteasome system appears to be affected in these neurodegenerative disorders despite the difference in the primary defects. Our studies also suggest many potential approaches for the discovery of neuroprotective treatment for not only Parkinson's disease but also other neurodegenerative disorders.

(Clinica Neurol, 44 : 241—262, 2004)

Review

# Ubiquitin, proteasome and parkin

Keiji Tanaka<sup>a</sup>, Toshiaki Suzuki<sup>a,\*</sup>, Nobutaka Hattori<sup>b</sup>, Yoshikuni Mizuno<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Oncology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0021, Japan

<sup>b</sup>Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Available online 5 October 2004

## Abstract

The ubiquitin–proteasome system (UPS) is important for intracellular proteolysis, and is responsible for a diverse array of biologically important cellular processes, such as cell-cycle progression, signaling cascades and developmental programs. This system is also involved in the protein quality control, which maintains the health of the cell. Thus, the UPS provides a clue for understanding of the molecular mechanisms underlying various neurodegenerative diseases. In the last decade, we witnessed a tremendous progress in uncovering the mechanisms of Parkinson's disease (PD). Of the several genes that can cause familial PD, parkin, the causative gene of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP), is of a special interest because it encodes an ubiquitin-protein ligase, which covalently attaches ubiquitin to target proteins, designating them for destruction by the proteasome. This review summarizes recent studies on the UPS pathway with a special reference to parkin, focusing on how parkin is linked to the pathogenesis of ARJP.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Neurodegeneration; Parkin; Parkinson's disease; Proteasome; Quality control; Ubiquitin

## 1. Introduction

Numerous studies have recently emphasized the biological importance of the ubiquitin–proteasome system (UPS), which is capable of catalyzing rapidly, timely, and unidirectionally a multitude of biological reactions including cell-cycle progression, DNA repair, cell death (e.g., apoptosis), signal transduction, transcription, metabolism, and immunity [1–3]. In addition to regulating the functions of divergent proteins, UPS plays a major role in stress response and in protein homeostasis, i.e., protein quality control, not only in the endoplasmic reticulum but also in the cytosol of eukaryotic cells [4,5]. There is sufficient evidence at present to indicate that the function of UPS is closely related to the etiology of neurodegenerative disorders, particularly Parkinson's disease (PD). Specifically, dopaminergic neurons are vulnerable to the failure of UPS-mediated protein catabolism and accumulation of as yet unidentified protein(s) caused by dysfunction of certain pathway(s) of UPS causes the loss of dopaminergic neurons.

Studies of this topic have focused on the role of UPS in the pathogenesis of both familial and sporadic PD.

## 2. Ubiquitin

Ubiquitin (Ub), consisting of 76 amino acid residues, is a highly conserved small protein that acts as a degradation marker for a wide spectrum of cellular proteins and a unique molecule of intracellular proteolysis [1]. It is first activated ATP-dependently by an E1 (activating enzyme), forming a high-energy thioester bond between ubiquitin and an E1, and the activated ubiquitin is then transferred to an E2 (conjugating enzyme), forming a similar thioester linkage between ubiquitin and an E2 (Fig. 1). In some cases, E2 directly transfers ubiquitin to the target proteins, but the reaction often requires the participation of an E3 (ligating enzyme, and thus referred as ubiquitin-protein ligase). Through a cascade of enzymatic reactions, ubiquitin is covalently attached through its C-terminal Gly residue to the  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of the Lys residue on the target proteins. Finally, a polyubiquitin chain is formed by repeated reactions through which another ubiquitin links a

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 3 3823 2237.

E-mail address: [tanakak@rinshoken.or.jp](mailto:tanakak@rinshoken.or.jp) (T. Suzuki).

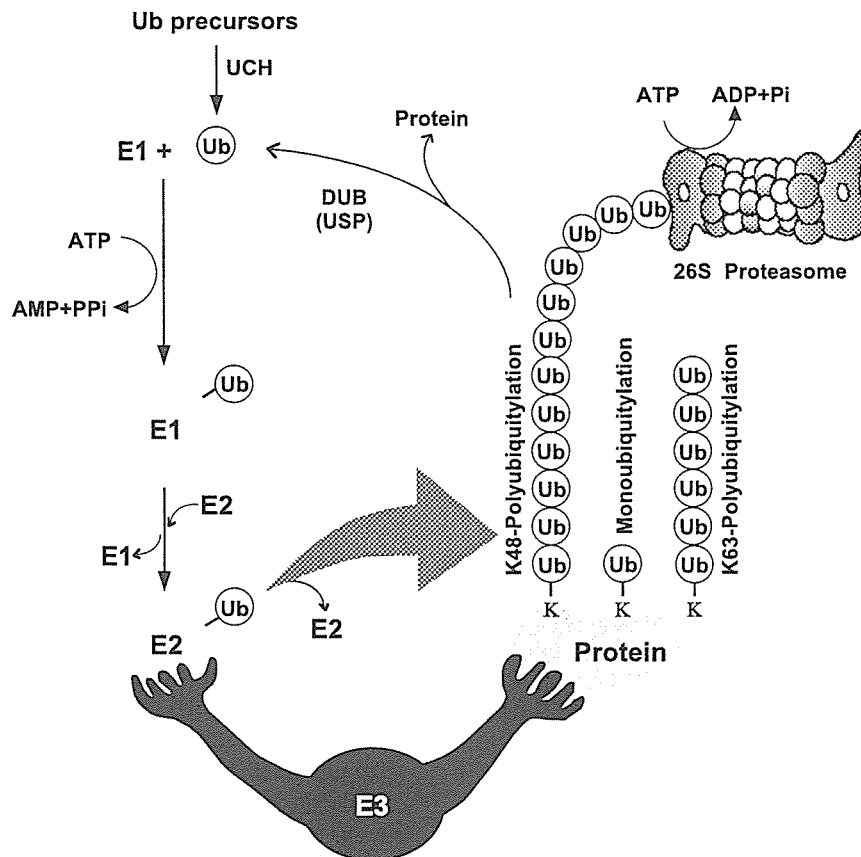


Fig. 1. The ubiquitin–proteasome system. Ub, ubiquitin; E1 (Ub-activating), E2 (Ub-conjugating), and E3 (Ub-ligating) enzymes; DUB, deubiquitylating enzyme; USP, ubiquitin-specific protease; HCH, ubiquitin C-terminal hydrolase. The 26S proteasome is a eukaryotic ATP-dependent, multi-subunit proteolytic complex. See text for details.

Lys residue at position 48 within one ubiquitin associated with the target protein (Fig. 1). Ubiquitin has seven Lys residues, which are all used for polymerization catalyzed by this ubiquitin-modifying system [2,6], but a polyubiquitin chain formed via Lys at 48 functions mainly becomes a marker for proteolytic attack by the 26S proteasome (a eukaryotic ATP-dependent 2.5-MDa multi-subunit complex) [7,8]. In addition, the K63-linked polyubiquitylation and monoubiquitylation without the formation of an ubiquitin tree have many biological roles other than proteolysis [2,3], but the details of this type of ubiquitylation are not the focus of this review.

To date, it is known that there is a single E1 for ubiquitylation, whereas E2 enzymes consist of a family of proteins, consisting of over a dozen of species in mammals. Moreover, E3s are considered to exist as molecules with a large diversity, presumably in more than hundreds or thousands species, because E3 can trap not only target protein(s) but also ubiquitin activated by the E1–E2 coupled reaction, and thus is capable of catalyzing the successive transfer of ubiquitin to the protein (see Fig. 1). Thus, in the UPS pathway, E3 plays a critical role in the selection of target proteins for degradation, because each distinct E3 usually binds a protein substrate with a degree of selectivity for ubiquitylation in a temporally and spatially regulated fashion.

So far, E3s are classified into several groups but here we propose that they should be more appropriately categorized into four types (Table 1). One is the HECT-type E3 encompassing E3 with a domain capable of binding ubiquitin as a thioester bond, termed “HECT”, which harbors 350 amino acid region of homology to the E6-AP (the first identified HECT-type E3) carboxyl terminus [9]. The major group of E3s is named RING-type E3, a general term for ubiquitin-ligases with a RING-finger motif(s) consisting of the Cys-rich consensus sequence flanked by one or two His residue(s) [10,11]. The RING-finger motif is capable of binding  $Zn^{2+}$ , and is subcategorized into typical and atypical forms. The typical RING-type E3s contain three classes with subtle differences in their structure: RING–HC (C3HC4), RING–H2 (C3H2C3), and RING–IBR–RING. The atypical RING-type E3s are structurally somewhat divergent compared with the typical types. Some of these E3s contain proteins with the PHD domain (and thus often called PHD–E3s), but this domain is not directly linked to E3 activity [12]. The third type of E3s have the U-box domain whose tertiary structure resembles the of RING-finger domain [13,14], but does not show a binding potency to  $Zn^{2+}$ , which is probably required for keeping the domain structure in RING-type E3s. Interestingly, some of the U-box E3s (e.g., Ufd2) can promote a polyubiquitin chain, provisionally termed as “E4” activity,