

VARADAN *ET AL.*, CHAPTER 12, FIG. 4. Experimental verification of the existing models for the monoUb/UBA2 complex using site-directed spin labeling. (A) represents the Ub/UBA2 structure modeled by the Ub/CUE complex (Kang *et al.*, 2003), whereas the docked structure (Mueller *et al.*, 2004) is shown in (B). The bottom row shows views of the same structures from the top. The ribbons represent the backbone of Ub and UBA2; the atom coordinates are from Mueller *et al.* (2004). The ribbon width increases proportionally to the observed paramagnetic line broadening (hence closer distance to the spin label) and is color-coded by this distance as red (closest,  $<17$  Å), orange (17–26 Å), and yellow ( $>26$  Å). The spheres represent the reconstructed positions of the spin label as “seen” by Ub (green) and by UBA2 (blue). Also shown is the side chain of Cys48 (Ub), where the spin label was covalently attached. The coordinates of the spin label were obtained using a three-dimensional search algorithm aimed at satisfying all available amide–MTSL distance constraints.

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

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

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

## 要 約

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

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

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

## 動 向

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

PDのほとんどは孤立性に発症するが、一部で

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

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

表1 causative genes for familial PD

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

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

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

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

## A. ユビキチンプロテアソーム系、小胞体ストレスと PD

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

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

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

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

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

表2 putative substrates for Parkin's E3 ligase activity

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

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

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

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

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

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

## B. ミトコンドリア, DA, 酸化ストレスとPD

一方、ミトコンドリア機能低下、酸化ストレスと孤発性PDの関連は古くから示唆されている。PD患者剖検脳内でミトコンドリア機能障害と酸化的ダメージが認められている。MPTP, ロテノン, paraquatなどのミトコンドリア複合体Iインヒビターは酸化ストレスを誘導し、PD発症モデル薬剤として使用されていることはさらなる証拠になる。ミトコンドリア障害と細胞変性は同時に存在するため、ミトコンドリア機能低下はPD発症の原因であるか、ただ二次的な変化に過ぎないか、明らかにされていないのが現状である。興味あることに、(1) Parkinノックアウトショウジョウバエでは、筋肉ミトコンドリア病変は最も顕著な病態であること<sup>15)</sup>。(2) *in vitro*でParkinの過剰発現により、ceramideなどのミトコンドリア依存性細胞死が抑制されること<sup>16)</sup>。(3) Parkinノックアウトマウスでは、呼吸鎖、酸化ストレスに関与するいくつかのミトコンドリア蛋白質の変化がみられること<sup>17)</sup>など報告され、Parkinはミトコンドリア機能に関与すると示唆している。Parkinノックアウトマウスにはミトコンドリア機能異常と酸化ストレスがみられるものの、神経変性がみられないことから、ミトコンドリア機能異常は神経変性の早期病態であることが示唆される。今後、ミトコンドリア機能異常から最終的に神経変性を引き起こす系の確立が期待される。

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

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

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

で修飾され、不活性化されるという注目すべき報告もなされている<sup>18)</sup>。これらのことは、神経伝達物質ドーパミンを含有している黒質神経細胞が常に酸化ストレスに曝されており、それから神経細胞を守るためには、いかに黒質神経細胞内に抗酸化蛋白あるいは物質が必要であることを示している。この抗酸化機構が破綻すると、神経細胞は死へのプロセスをたどり始めるのではないかと推定される。

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

### むすび

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

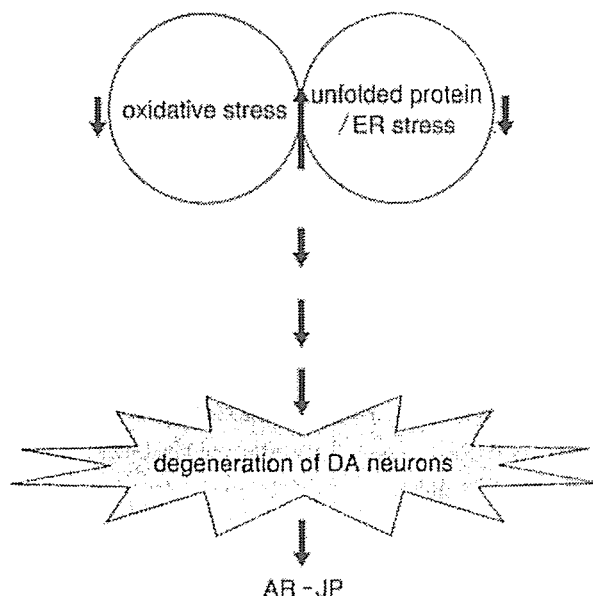


図1 hypothetical mechanism of loss of dopaminergic neurons

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

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

### 文献

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



- opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 2002; 111: 209-18.
- 4) Le WD, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet*. 2003; 33: 85-9.
  - 5) Taira T, et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. 2004; 5: 213-8.
  - 6) Valente EM, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004; 304: 1158-60.
  - 7) Kitada T, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998; 392: 605-8.
  - 8) Imai Y, et al. A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *J Biol Chem*. 2003; 278: 35661-4.
  - 9) Chung KK, et al. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*. 2001; 301: 1328-31.
  - 10) Imai Y, et al. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*. 2001; 105: 891-902.
  - 11) Yang Y, et al. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron*. 2003; 37: 911-24.
  - 12) Itier JM, et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 2277-91.
  - 13) Goldberg MS, et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2003; 278: 43628-35.
  - 14) Von Coeln R, et al. Proc Natl Acad Sci USA. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. 2004; 101: 10744-9.
  - 15) Greene JC, et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4078-83.
  - 16) Darios F, et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum. Mol. Genet*. 2003; 12: 517-26.
  - 17) Palacino JJ, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 18614-22.
  - 18) LaVoie MJ, et al. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nature Med*. 2005; 11: 1214-21.

## 第7章

## プログラム細胞死と神経変性疾患

高橋良輔, 王 華芹, 小林芳人

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

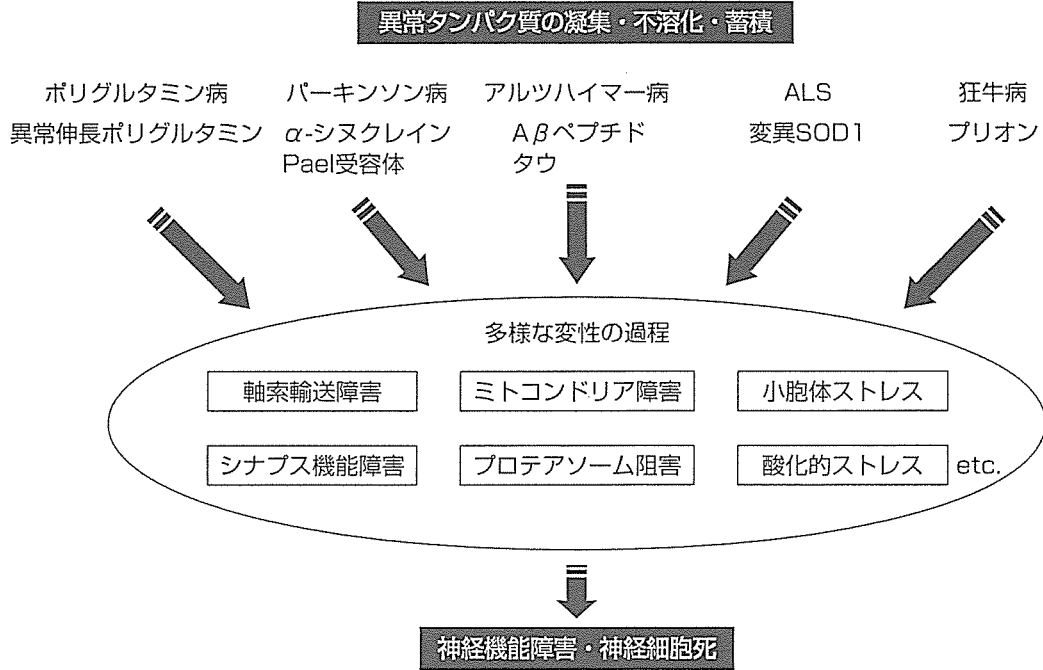
関連UP TO DATE **トピックス** 18, 19, 20

## ■ はじめに

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

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

## 概略図 神経変性疾患の分子メカニズム



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

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

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

<sup>\*1</sup>アミロイド線維

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

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

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

# 1 アルツハイマー病

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

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

## ※2 アポリポタンパク質 E4 (ApoE4)

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

## ※3 興奮性毒性

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

## ※4 $A\beta$ ワクチン療法

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

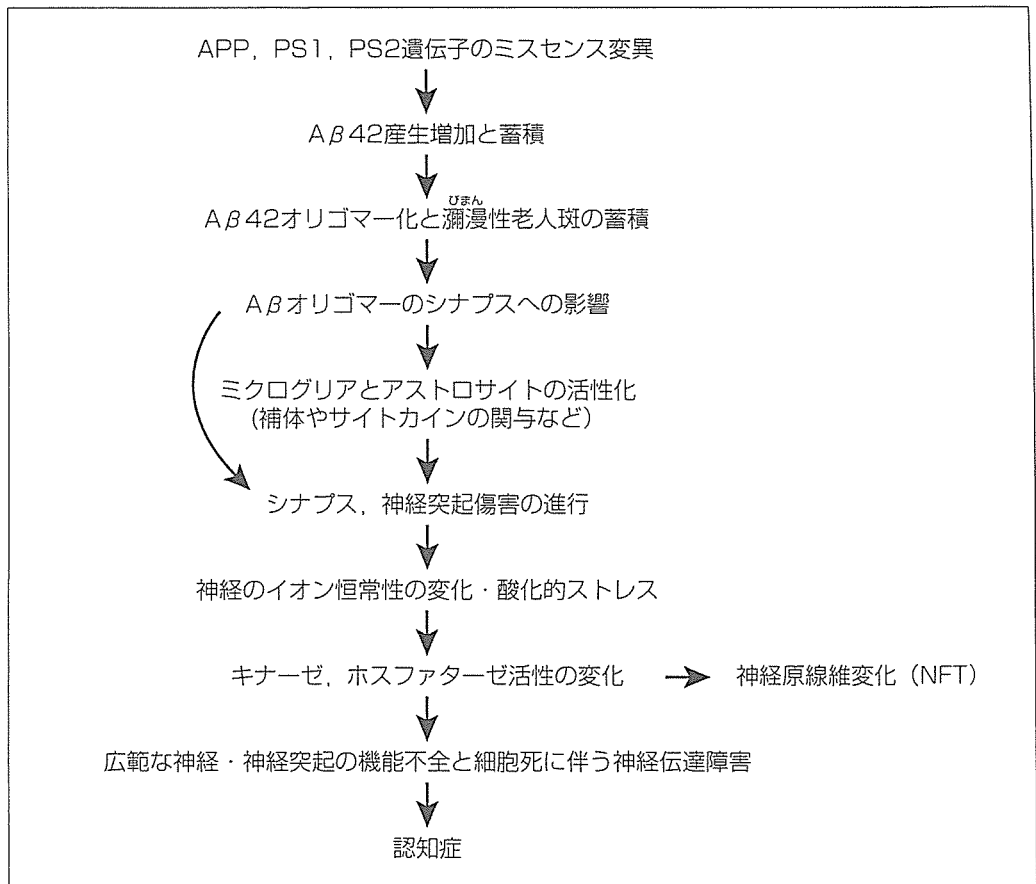


図1 アミロイドカスケード仮説

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

## 2 パーキンソン病

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

※5 家族性 PD

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

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

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

## 1) $\alpha$ -シヌクレイン

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

## 2) Parkin

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

.....  
<sup>※6</sup>アグレスーム

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

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

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

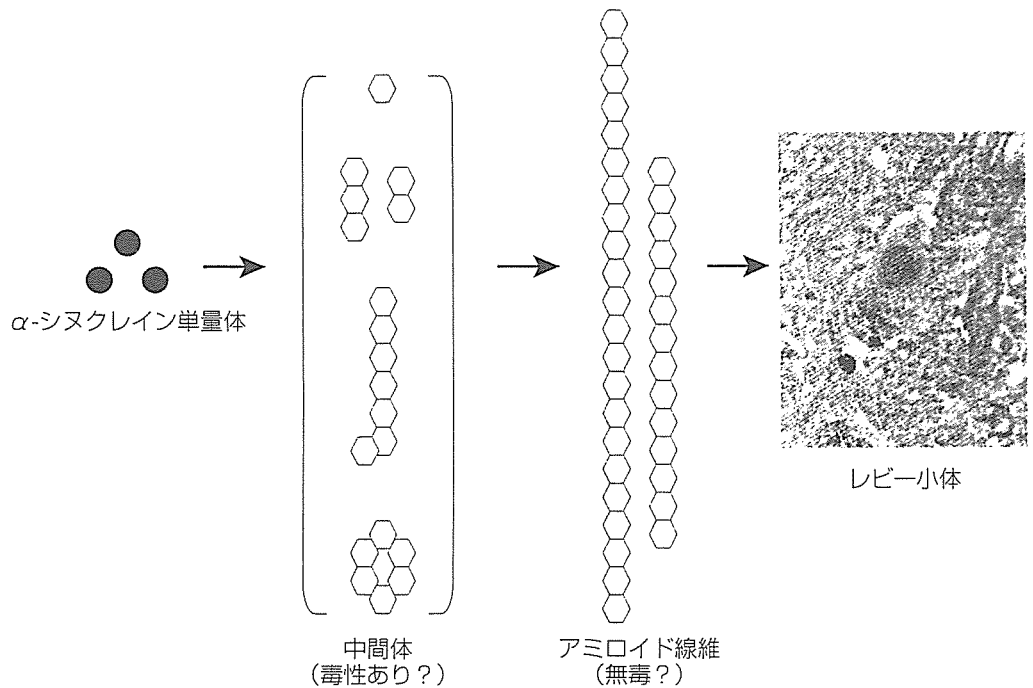


図2  $\alpha$ -シヌクレインの線維形成過程モデル

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

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

※7ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系（UPS）

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

存性と基質選択性の2つの特徴を有する（図3も参照）。

※8小胞体関連分解、小胞体ストレス応答

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

質に逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される）

③翻訳の全般的抑制で、小胞体への新生タンパク質流入を抑制

④アポトーシス

①、②、③でストレスを乗り越えなくなると④に至ると考えられる。

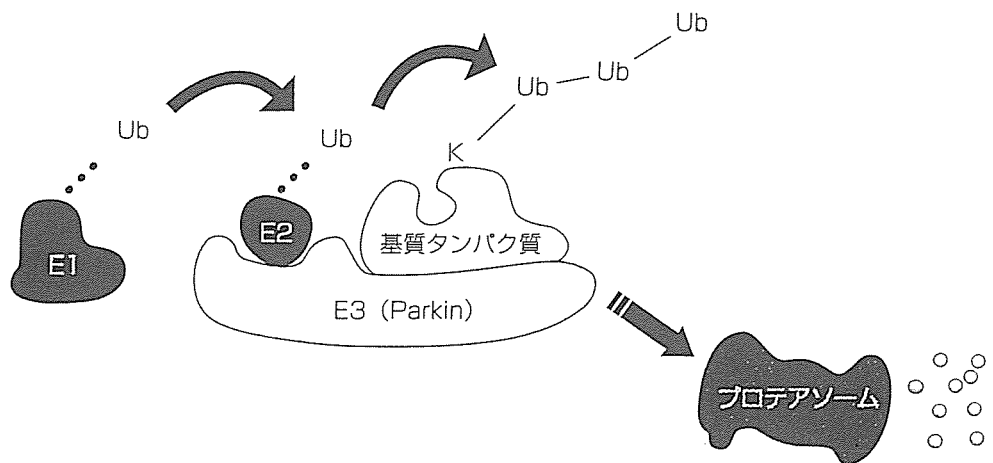


図3 Parkinとユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系

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

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

### 3 筋萎縮性側索硬化症

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





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

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

## 4 IAPと神経変性

アポトーシスと神経変性のかかわりを最も直接的に示したのは、遺伝性の運動ニ

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

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

に必要な考えがキメラマウスの実験をもとに提唱されている。

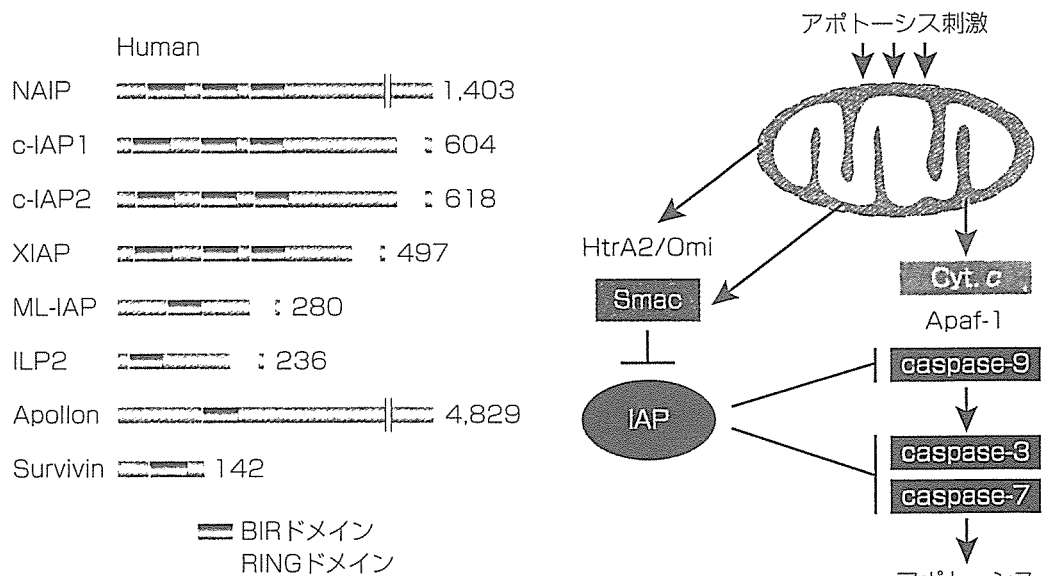


図5 IAP およびその阻害因子

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

ニューロン変性疾患である脊髄性筋萎縮症<sup>※10</sup>の重症度を決定する因子として同定されたneuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)である。NAIPはアポトーシス阻害タンパク質 (IAP)ファミリーの一種である。IAPはBaculovirus IAP repeat (BIR)と呼ばれるZinc Fingerモチーフに似たドメインを有することが構造上の特徴であり、その多くは内因性のカスパーゼ (caspase) 阻害因子としての働きをもつ<sup>8)</sup>。NAIPも3つのBIRドメインを有し、caspase-3, caspase-7の阻害作用をもつ。NAIPの変異で運動ニューロン変性が増悪することから、アポトーシスが変性に関与することが示唆される。ショウジョウバエではIAPが欠損すると発生時期に全身のアポトーシスで致死となり、アポトーシスの決定的制御因子としてきわめて重要なことが示されているが、哺乳類ではいくつかのIAPのノックアウトマウスでも顕著な表現型は見られず、その生理的意義はよくわかっていない。ただIAPの機能を阻害するショウジョウバエの分子 (Reaper, Hid, Grim) のホモログにあたる2種類の分子 (SmacとHtrA2/Omi) が哺乳類でも存在することから、哺乳類でも重要な役割を担っているが、IAPがヒトでは8種類あるというリダンダンシー (冗長性)のため、機能欠損の表現型をとらえることができないだけなのかもしれない (図5とUP TO DATEトピックス20参照)。

神経変性へのアポトーシスの関与を探る目的で、ヒトの疾患を忠実に再現する現

※10 脊髄性筋萎縮症

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

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

ほど、NAIP遺伝子を欠損している割合が多いと報告されている。

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

## 5 今後の研究の展開

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

### キーポイント

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

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

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

#### ※11 RNAi

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

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

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

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

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

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

## 文 献



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

## 参考図書



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