

n = counted profiles, T = section thickness and D = cell body diameter (Abercrombie 1946). TH immunostaining was quantified by measuring the relative optical densities of the dorsal striatum in the stained sections using NIH-IMAGE software (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Six representative sections from anterior, medial and lateral striatum from each animal were analyzed ($n = 3$ per group).

Immunofluorescence

Mouse monoclonal anti-TH (dilution 1 : 100; Chemicon) for dopaminergic neurons and an antibody raised against Nucl. Mid. were used as primary antibodies. Either fluorescein isothiocyanate or Texas Red-labeled anti-mouse or anti-rabbit antibodies were used as secondary antibodies. After immunostaining, mounted sections were examined under a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS NT, Heidelberg, Germany).

Open-field test

Locomotor activity was evaluated by testing mice in a circular open field (90 cm in diameter, 40 cm in height) at a given time point ($n = 3$ mice in each group). Each mouse was placed in the center of the field under standard room lighting conditions. The experiment lasted for 10 min and was recorded on video. The open-field apparatus was washed with water and dried with a paper towel before each behavioral test. Each mouse was measured either three or four times during the experiment. Locomotion was scored as the average speed (cm s^{-1}) and resting period (given as a percentage of the 10-min observation time) for each group. Movement at a speed of less than 2.5 cm s^{-1} was considered as rest.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay

A TUNEL assay was performed to assess the apoptotic pattern in midbrain sections ($6 \mu\text{m}$) using the TACSTM 2 TdT-Blue Label in Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA). For the quantification of TUNEL-positive cells in the SN of WT and Nucling-deficient mice, sections were counterstained with Nuclear Fast Red, a reagent supplied in the apoptosis detection kit. TUNEL-positive cells in the SN pars compacta (SNpc) were counted from six sections of each mouse ($n = 3$ per group). The total cells in the SNpc were used as denominator.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SD. Differences between groups were examined for statistical significance by ANOVA. Values of $p < 0.05$ were taken as being statistically significant.

Results

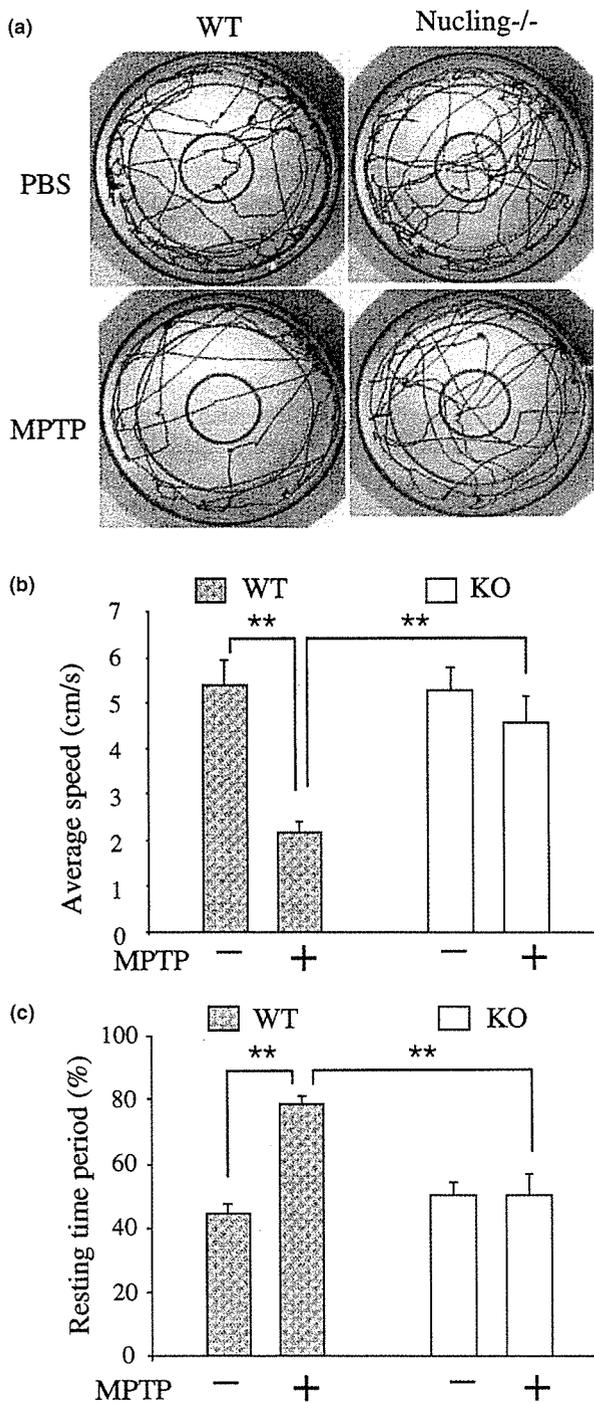
MPTP-induced locomotor dysfunction was improved in Nucling-deficient mice

Our previous study indicated that Nucling-deficient cells were resistant to stimuli-induced apoptosis (Sakai *et al.* 2004). These findings led us to suspect that Nucling-deficient mice might be resistant to the neurotoxicity of MPTP. To investigate this hypothesis, we first performed the open-field test to

examine the change of locomotor function in WT and Nucling-deficient mice after the administration of MPTP (Fig. 1a). Locomotor activity was scored using both the average speed and the resting period during the experiment. There was no statistical difference between WT and Nucling-deficient mice in locomotor function after treatment with PBS. Administration of MPTP induced an acute decrease in locomotor activity both in WT and in Nucling-deficient mice over a 24-h period (data not shown). However, 48 h after treatment with MPTP, the average speed of WT mice still displayed a marked decrease, whereas locomotor dysfunction was significantly improved in Nucling-deficient mice ($p < 0.01$; Fig. 1b). The Nucling-deficient mice did not exhibit any locomotor dysfunction even at later time points. Considering that slowness of movement is one of the clinical manifestations of Parkinson's disease, we analyzed the percentage of resting time during the open-field experiment. The resting period of WT mice showed a significant increase after treatment with MPTP, whereas that of the Nucling-deficient mice did not exhibit any change thereby indicating a resistance to the MPTP-induced locomotor dysfunction ($p < 0.01$; Fig. 1c).

Nucling-deficient mice were resistant to MPTP-induced neurotoxicity

The locomotor dysfunction in PD is the result of a reduction in the striatal dopamine content caused by the loss of dopaminergic neurons in SN. The pattern of neurodegeneration induced by MPTP parallels the situation in human parkinsonian brains in that dopaminergic neurons are lost predominantly in the SNpc, whereas dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) are less affected (German *et al.* 1996). As Nucling-deficient mice have shown a protective effect on the locomotor dysfunction induced by MPTP, we sought to detect whether Nucling-deficient mice were resistant to MPTP-induced SN dopaminergic neuronal degeneration. At the same time point (48 h) as the open-field experiment, immunohistochemistry for TH was performed on midbrain sections from WT and Nucling-deficient mice (Fig. 2). There were no significant differences in dopaminergic neurons between WT and Nucling-deficient mice treated with PBS (Figs 2a and b). This suggests that in Nucling-deficient mice, there is no impact on the development of the dopaminergic neuron pathway. Administration of MPTP induced a significant loss of TH-positive cells in the SNpc of WT mice (Fig. 2c). In contrast, Nucling-deficient mice showed less dopaminergic neuronal damage in the SNpc following MPTP treatment (Fig. 2d). We then compared the total numbers of TH-positive neurons in WT and Nucling-deficient mice. It was shown that numbers of TH-positive neurons did not differ significantly in Nucling-deficient mice compared with WT mice (Fig. 2e). Administration of MPTP induced a significant loss of TH-positive neurons in the SN of WT mice. In contrast, Nucling-deficient



mice displayed no significant decrease in the numbers of TH-positive neurons following MPTP treatment ($p < 0.01$; Fig. 2e). Next, we confirmed this by detecting apoptotic cells using TUNEL. Most of the cells in WT and Nucling-deficient mice were unlabeled after the injection of PBS (Figs 3a and b). After treatment with MPTP, many TUNEL-positive cells were found in the SNpc of WT mice (Fig. 3c), whereas only

Fig. 1 Open-field analysis of mouse behavior 48 h after treatment with either 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (four injections of 15 mg/kg, 2 h apart) or phosphate-buffered saline (PBS). (a) Representative photographs of the open field and the locomotor tracks of mice. The locomotor track of each mouse was video-recorded for a 10-min period. Data on locomotor function were analyzed using video analysis tracking software. (b) The average speed (cm s^{-1}) during an observation of 10 min is shown for wild-type (WT) and Nucling-deficient mice. WT mice treated with MPTP exhibited a significant reduction in their average speed compared with untreated mice, whereas Nucling-deficient mice did not. (c) The percentage of resting time during the 10-min observation was increased in WT mice after treatment with MPTP compared with untreated mice, whereas this tendency was not detected in Nucling-deficient mice. Data are the mean \pm SD for three mice per group and each mouse was tested either three or four times, respectively. ** $p < 0.01$; KO, knockout (Nucling-deficient).

a few were detected in Nucling-deficient mice (Fig. 3d). Analysis of the percentage of apoptotic cells in SNpc was performed on midbrain sections from WT and Nucling-deficient mice. A small proportion of TUNEL-positive cells were detected in both PBS-injected mice (Fig. 3g). MPTP induced an increased proportion of TUNEL-positive cells in the SNpc of WT mice (Figs 3e and g). In contrast, the number of TUNEL-positive cells was significantly reduced in that of Nucling-deficient mice ($p < 0.01$; Figs 3f and g). As the major pathway deriving from the dopaminergic neurons in the SN is the nigrostriatal tract, we further examined whether protection of dopaminergic neurons in Nucling-deficient mice would also be accompanied by the preservation of the distal terminal fibers in the striatum. There was no significant difference in TH immunostaining between WT and Nucling-deficient mice treated with PBS (Figs 4a, b and e). Following MPTP administration, WT mice exhibited a significant loss in the density of TH immunostaining in the dorsal striatum, whereas Nucling-deficient mice retained significantly greater densities of TH immunostaining than that of WT mice (Figs 4c, d and e). Thus, these findings indicated that Nucling-deficient mice showed neuroprotection during MPTP-induced neuronal cell death.

Nucling was involved in MPTP-induced neurotoxicity

To clarify whether Nucling is involved in MPTP-induced dopaminergic cell death, we evaluated the RNA expression of Nucling in the SN by RT-PCR. In PBS-treated WT mice, we detected only a basal level of RNA expression of Nucling (Fig. 5a, lane 2). This result was consistent with our investigations on other regions of the brain (data not shown). After the administration of MPTP, a significant increase in the level of Nucling was detected in the SN (Fig. 5a, lane 3). To confirm and determine the inducible pattern of Nucling expression in the SN after MPTP treatment, we evaluated the expression of Nucling by western blot analysis. As shown

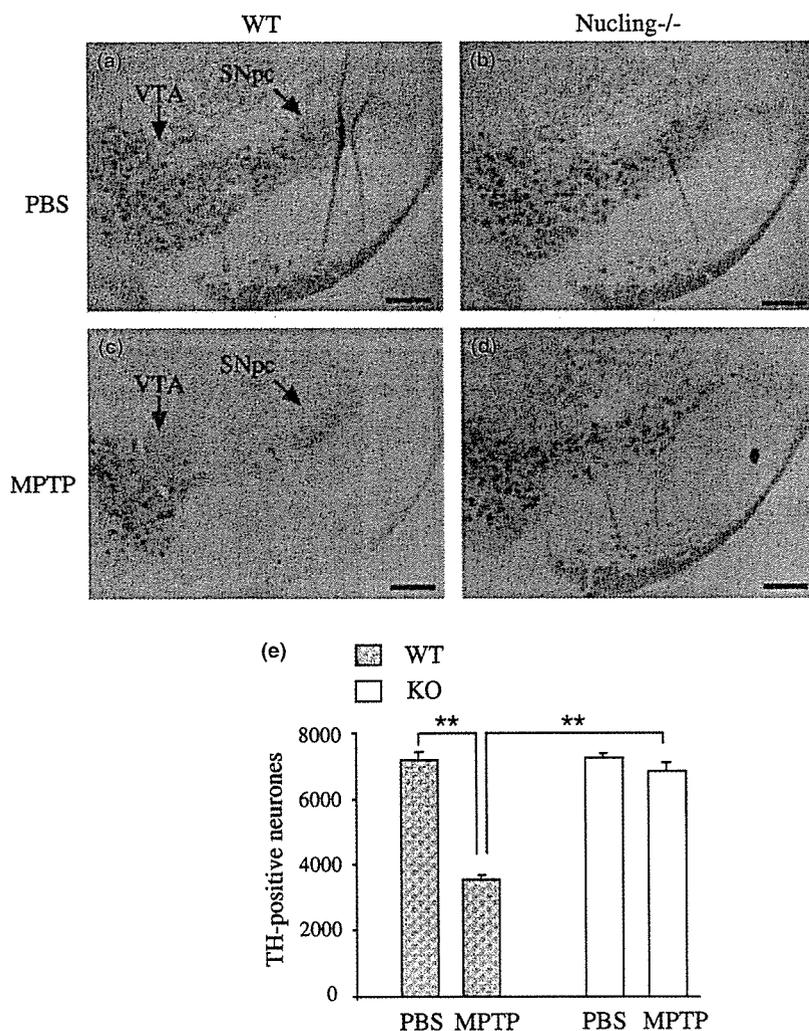


Fig. 2 Immunohistochemical staining of dopaminergic neurons with antibody against tyrosine hydroxylase (TH) in mid-brain sections from wild-type (WT) and Nucling-deficient mice 48 h after treatment with either phosphate-buffered saline (PBS) or 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). There were no significant differences in dopaminergic cell content between WT and Nucling-deficient mice treated with PBS (a and b). Nucling-deficient mice showed less dopaminergic neuronal damage in the substantia nigra pars compacta (SNpc) (d) compared with WT mice treated with MPTP (c). The histogram represents the quantification analysis of dopaminergic neurons in midbrain. MPTP caused a significant loss of TH-positive neurons in the substantia nigra (SN) of WT but not Nuclig-deficient mice ($n = 3$ per group) (e). ** $p < 0.01$. Scale bar represents 100 μm ; KO, knockout (Nucling-deficient).

in Fig. 5(b), MPTP caused a significant increase in the expression of Nucling 12 h after treatment (Fig. 5b, lane 2). This induced expression of Nucling was still observed 24 h after MPTP treatment, although at a lower level (Fig. 5b, lane 3). To further determine the localization of Nucling in the SN, we performed double labeling immunofluorescent histochemistry for Nucling and TH in SN sections after either PBS or MPTP treatment (Fig. 6). No Nucling expression was observed in TH-positive cells from MPTP-treated Nucling-deficient mice (Figs 6a–c) and PBS-treated WT mice (Figs 6d–f). At 12 h after MPTP treatment, the dopaminergic neurons of the SNpc from WT mice were found to express Nucling (Figs 6g–i). These results indicated that Nucling was involved in MPTP-induced neurotoxicity in the SN.

Up-regulation of the apoptosome was attenuated in Nucling-deficient mice after treatment with MPTP

MPTP is recognized as a mitochondrial toxin. Mitochondria are known to play a key role in the apoptotic process through

the release of cytochrome *c* and other pro-apoptotic proteins. In the cytosol, a complex known as the apoptosome is formed from Apaf-1, pro-caspase-9 and cytochrome *c*, leading to the activation of caspase-9 (Liu *et al.* 1996; Li *et al.* 1997; Susin *et al.* 1999). Previously, we have reported that Nucling was an essential component of the apoptosome during stress-induced apoptosis (Sakai *et al.* 2004). The inhibition of the neuronal cell death elicited by MPTP in Nucling-deficient mice led us to determine the pattern of apoptosome expression in MPTP-treated Nucling-deficient mice. SN tissues of mice were dissected 12 h after the last injection of either MPTP or PBS, and a cytosolic extract was prepared to assess apoptosome expression. This particular time point was chosen because it was when the most significant release of cytochrome *c* was observed after the administration of MPTP (Viswanath *et al.* 2001), and it preceded that of maximal neuronal cell death (Mochizuki *et al.* 1996). Western blot analysis revealed that the level of cytochrome *c* after the injection of PBS was almost the same between WT and

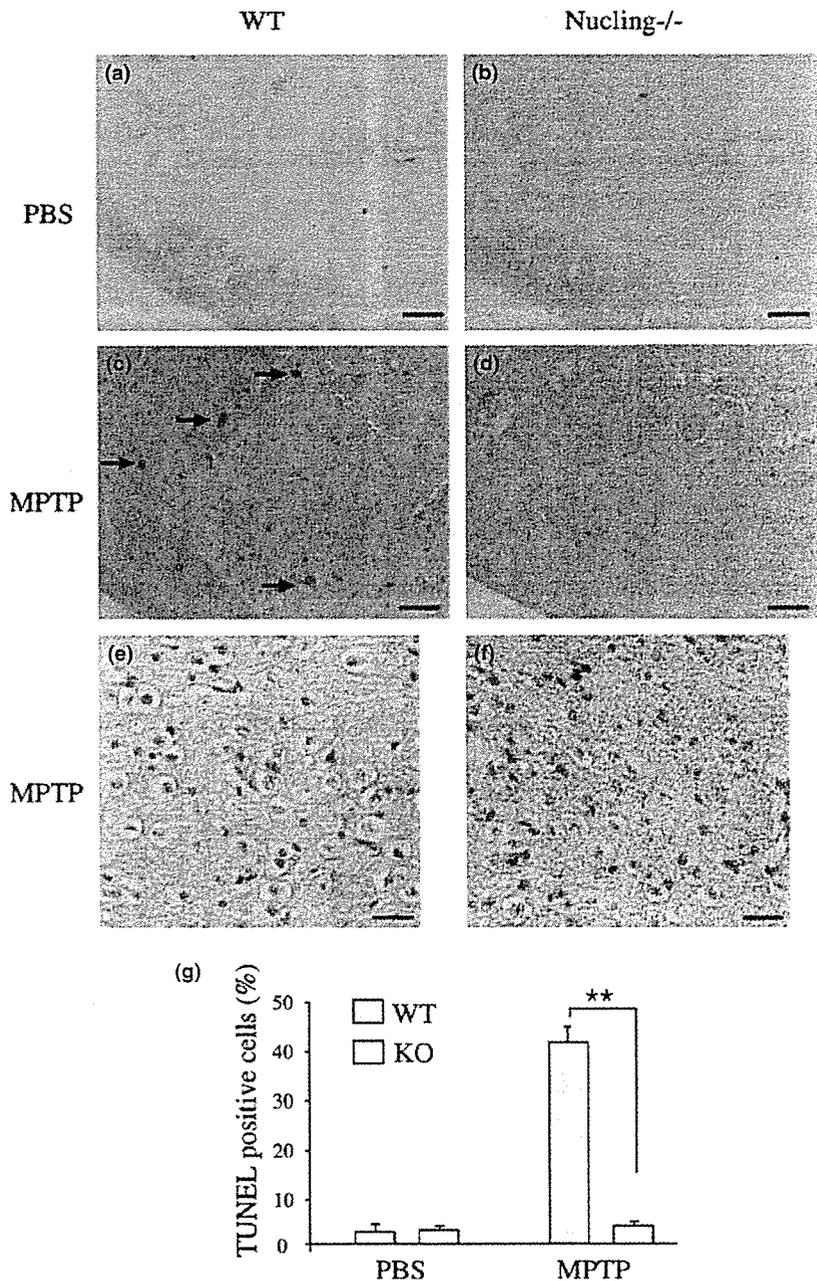


Fig. 3 TUNEL staining in substantia nigra (SN) sections of wild-type (WT) and Nucling-deficient mice 48 h after treatment with either 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or phosphate-buffered saline (PBS). Almost no TUNEL-positive cells were found in WT and Nucling-deficient mice treated with PBS (a and b). Many TUNEL-positive cells were found in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of WT mice after treatment with MPTP (c, arrows) compared with the number in Nucling-deficient mice (d). For the quantification of TUNEL-positive cells in the SNpc of WT (e) and Nucling-deficient mice (f) after MPTP treatment, sections were counterstained with Nuclear Fast Red, as described in Materials and methods. The histogram represents the quantification analysis of TUNEL-positive cells in SNpc (g). Six tissue sections per animal were counted ($n = 3$ per group). $**p < 0.01$. Scale bars: a–d, 50 μm ; e and f, 25 μm ; KO, knockout (Nucling-deficient).

Nucling-deficient mice (Fig. 7, lanes 1 and 2). After treatment with MPTP, the expression of cytochrome *c* increased in the cytosolic fraction in WT mice (Fig. 7, lanes 1 and 3), suggesting a release of cytochrome *c* from the mitochondria. In contrast, this pattern of release was inhibited greatly in Nucling-deficient mice (Fig. 7, lane 4).

Immunoblot analysis revealed that the expression not only of Apaf-1 but also of the pro-enzyme of caspase-9 (pro-caspase-9) was down-regulated in Nucling-deficient mice compared with WT mice (Fig. 7, lanes 1 and 2). Furthermore,

this tendency was also observed in response to the neurotoxic effect of MPTP, whereas the expression of both Apaf-1 and pro-caspase-9 was markedly up-regulated in WT mice (Fig. 7, lanes 3 and 4). This result was consistent with our previous finding that Nucling has a key role in the retention of the apoptosome under normal conditions and in response to apoptotic stimulus (Sakai *et al.* 2004). The activation of pro-caspase-9 was initiated by the release of cytochrome *c* from mitochondria and the apoptosome formed in the cytosol. Exposure to MPTP induced a significant increase in the level

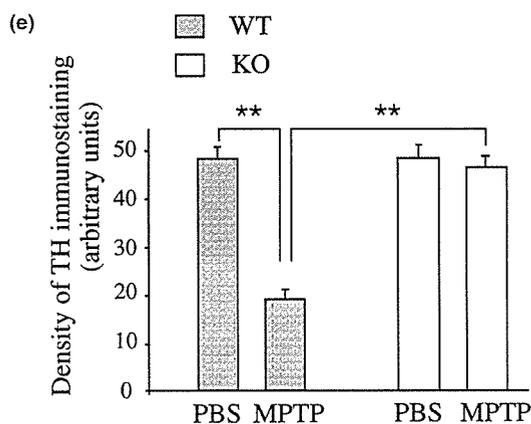
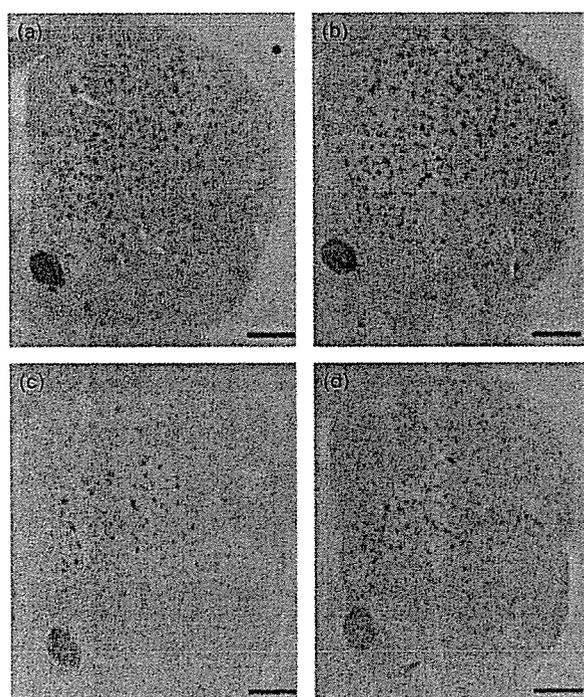


Fig. 4 Immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining in striatum from wild-type (WT) and Nucling-deficient mice 48 h after treatment with either 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or phosphate-buffered saline (PBS). No difference in striatal TH immunostaining was observed between PBS-treated WT (a) and Nucling-deficient mice (b). MPTP caused a reduction in TH immunostaining in WT mice (c) but not Nucling-deficient mice (d). Densitometric analyses revealed a significant depletion of TH immunostaining in WT mice following MPTP treatment, whereas MPTP-treated Nucling-deficient mice retained significantly greater densities than those of WT mice (e). Six sections of each mouse were used ($n = 3$ per group). $**p < 0.01$. Scale bar represents 500 μm ; KO, knockout (Nucling-deficient).

of caspase-9 in the SN of WT mice (Fig. 7, lane 3), whereas no up-regulation of active caspase-9 was detected in Nucling-deficient mice (Fig. 7, lane 4). Taken together, these results

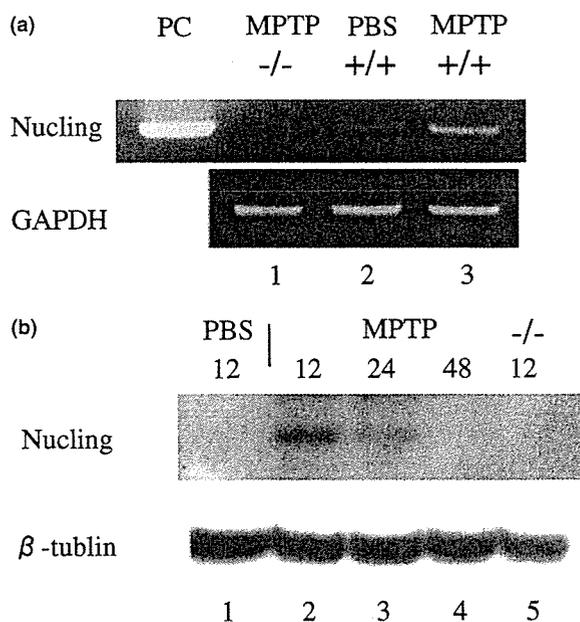


Fig. 5 Expression of Nucling in the substantia nigra (SN) was up-regulated following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment. (a) mRNA expression of Nucling in the SN. Total RNA was extracted from the ventral midbrain of WT and Nucling-deficient mice 12 h after the injection of either phosphate-buffered saline (PBS) or MPTP. RT-PCR was used to assay the Nucling mRNA expression. The endogenous expression of Nucling was weak in PBS-treated mice. After MPTP treatment, the expression of Nucling mRNA was up-regulated significantly in the SN. cDNA of heart tissue was used as a positive control (PC). (b) Western blot analysis of Nucling expression. Protein was prepared from mice ventral midbrain at 12, 24 or 48 h after treatment with either PBS or MPTP. Nucling expression was up-regulated 12 h after MPTP treatment. A slightly elevated expression of Nucling was still observed after 24 h. Experiments were repeated three times with similar results.

strongly suggested Nucling to be an apoptosis-promoting factor specifically regulating the apoptosome pathway following exposure to MPTP.

Discussion

In this study, we demonstrated that the administration of MPTP to mice resulted in increased expression of the apoptosome in the SN, followed by the degeneration of SN dopaminergic neurons. In addition, we confirmed that Nucling, an apoptosis-associated protein, was a stress-induced factor in the mouse brain. Nucling was shown to be involved in the neurotoxicity of MPTP. Defective expression of Nucling resulted in a significant reduction in the effects of MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration by inhibiting the expression of the apoptosome. Furthermore, Nucling-deficient mice exhibited attenuated behavioral deficits accompanying MPTP treatment.

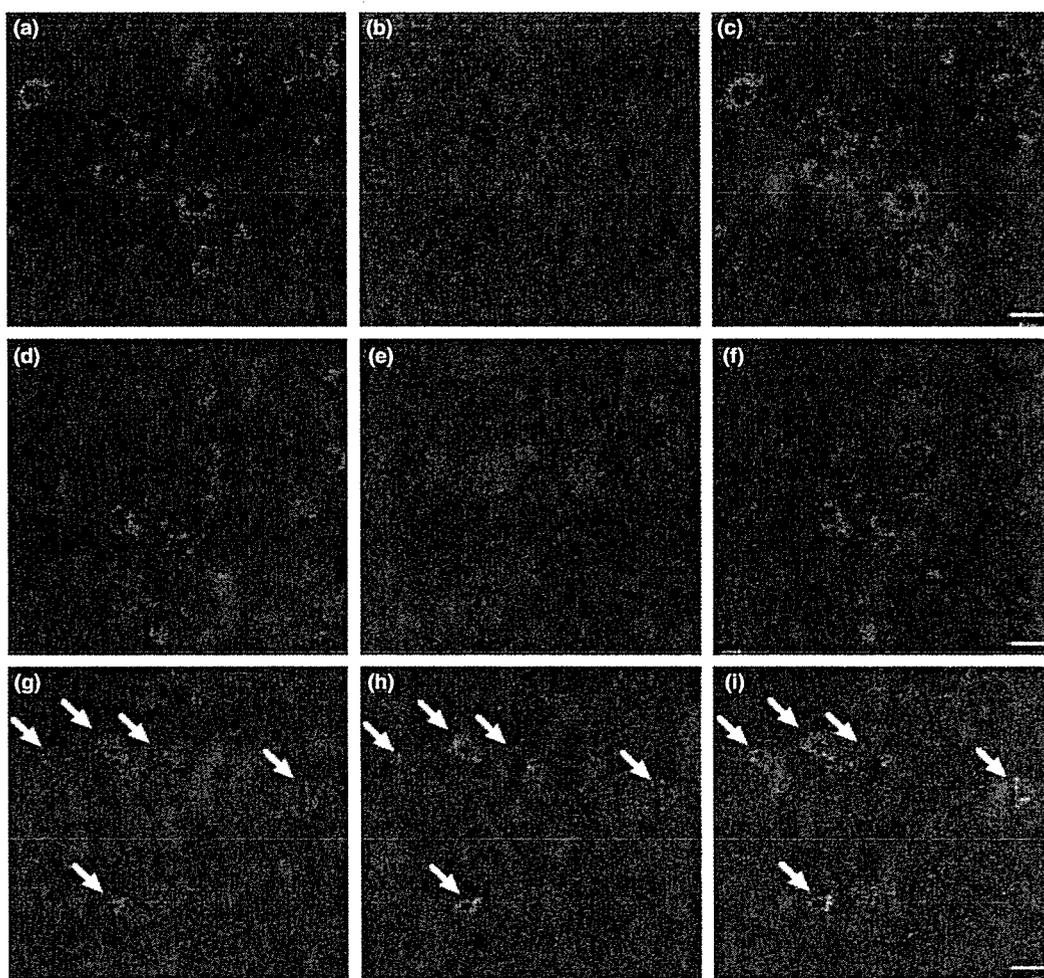


Fig. 6 Double immunofluorescence staining for tyrosine hydroxylase (TH; green) and Nucling (red) in substantia nigra (SN) sections from Nucling-deficient and wild-type (WT) mice 12 h after treatment with either phosphate-buffered saline (PBS) or 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). No expression of Nucling was observed in

MPTP-treated Nucling-deficient mice (a–c) and PBS-treated WT mice (d–f). Expression of Nucling was observed in dopaminergic neurons in SN sections from WT mice after MPTP treatment (g–i, arrows). (c, f and i) Merged images. Bar represents 20 μ m.

In humans and non-human primates, MPTP causes a severe PD-like syndrome. However, the behavioral impact of MPTP on mice may be dependent upon many factors, including mouse strain, MPTP dosing regime, or experimental methods (Sedelis *et al.* 2001). In the open-field experiment used in this study, MPTP caused an acute and dramatic decrease in locomotor activity in both WT and Nucling-deficient mice during the 24-h period after its administration (data not shown). This initial behavioral response to MPTP might be determined by several factors, including either the peripheral and central metabolism of MPTP or the uptake of MPTP into the brain. At 48 h after MPTP treatment, the locomotor function of Nucling-deficient mice almost reached control levels, whereas no such recovery was observed in WT mice. At the same time point, we also observed that Nucling-

deficient mice were resistant to MPTP-induced SN dopaminergic neuronal cell death (Figs 2 and 3). The difference in sensitivity to MPTP toxicity between WT and Nucling-deficient mice may be determined mainly by the difference in the apoptotic pathway between the two genotypes.

The mitochondrial apoptotic pathway requires the release of cytochrome *c* from mitochondria in connection with the opening of the mitochondrial transition pore (MTP). Cytochrome *c* then forms a complex with the cytoplasmic protein Apaf-1 and pro-caspase-9, leading to the activation of caspase-9 and the subsequent activation of downstream caspases (Srinivasula *et al.* 1998). It has been reported that MPP⁺ induces the opening of the MTP via the inhibition of complex I and the production of reactive oxygen species (Cassarino *et al.* 1999). In our previous study, we showed

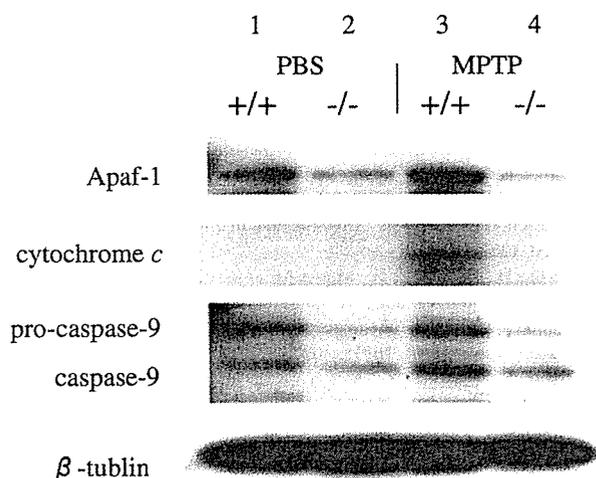


Fig. 7 Expression of apoptosome in wild-type (WT) and Nucling-deficient mice after treatment with either phosphate-buffered saline (PBS) or 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Nucling is crucial for apoptosis protease activating factor 1 (Apaf-1) expression, cytochrome *c* release from mitochondria and caspase-9 activation under MPTP cytotoxicity. WT and Nucling-deficient mice were treated with either PBS or MPTP. After 12 h, the ventral midbrain tissues were lysed in lysis buffer. Tissue extracts were fractionated into a cytosolic fraction for Apaf-1, caspase-9 and cytochrome *c*. β -Tubulin served as a loading control for each fraction. Experiments were repeated three times with similar results.

that the expression of Nucling was up-regulated in response to pro-apoptotic stimuli and was important for the induction of the apoptosome after cytotoxic stress (Sakai *et al.* 2004). In fact, we found that the overexpression of Nucling led cells to lose their mitochondrial transmembrane potential and promoted the release of cytochrome *c* into the cytosol followed by the induction of apoptosis (data not shown). In the present study, we observed that Nucling was expressed in SN dopaminergic neurons, and its expression was up-regulated following MPTP treatment (Figs 5 and 6). Moreover, the release of cytochrome *c* in Nucling-deficient mice was suppressed after the treatment (Fig. 7). This result extended our previous findings by demonstrating that Nucling was involved in the MPTP-induced dopaminergic neuronal cell death, and that deletion of Nucling was neuroprotective *in vivo*.

Apaf-1 has been shown to play an important role in the mitochondrial apoptotic pathway. It was reported that adeno-associated virus mediated-expression of a dominant negative form of Apaf-1, consisting of the WT caspase recruitment domain, in striatum provided protection against dopaminergic cell loss in the mouse MPTP model (Mochizuki *et al.* 2001). In the present study, we showed that the expression of Apaf-1 in the SN was down-regulated in Nucling-deficient mice after the injection of either PBS or MPTP compared with that in WT mice (Fig. 7). Previously, we confirmed that

endogenous Nucling formed a complex with Apaf-1/pro-caspase-9 in the cytoplasmic fraction of UV-irradiated WT MEF cells (Sakai *et al.* 2004). The present findings further support the idea that Nucling may be a strong candidate for the inducer of apoptosome expression after stress-induced neuronal apoptosis.

It has been reported that either Apaf-1⁻ or caspase-9⁻ mice displayed a fatal neuronal disorder, including forebrain hyperplasia and embryonic lethality (Ceconi *et al.* 1998; Hakem *et al.* 1998; Yoshida *et al.* 1998). Nucling-deficient mice were viable and fertile, and were shown to exhibit only inflammatory lesions and tumors, thus far. We considered that Nucling may not be essential for apoptosis during neuronal development. There might be an unknown either factor or pathway in place of the Nucling/Apaf-1 signaling pathway in neuronal development. Western blot analysis showed that the endogenous expression of Nucling was weak in PBS-treated mice (Fig. 5). Nucling appeared to be an inducible gene after stress in this region of the brain. Our data suggested that if the expression of Nucling reached a threshold after exposure to environmental stress, then the activation of apoptotic cascades and cell death could be induced. The inducible expression of Nucling in the SN may be a contributory factor for the activation of the apoptotic pathway induced by MPTP. Our results suggested that the actions of Nucling within the apoptotic cascade occurred upstream of mitochondrial injury following neuronal toxicity.

The role of apoptosis in PD is still controversial, even though there is ample evidence of apoptosis based on either morphological criteria or *in situ* end labeling (Mochizuki *et al.* 1996; Tatton *et al.* 1998). However, neuronal apoptosis seems to have an important role in PD, because several reports have suggested a correlation between apoptotic molecules and nigral cell death in this disease (Beal 2000; Yuan and Yankner 2000). Mitochondrial respiratory failure and oxidative stress are also considered to be contributors to nigral neuron death in PD. MPTP-induced activation of microglia and inducible nitric oxide synthase are believed to modulate dopaminergic neuron death (Dehmer *et al.* 2004). We also observed that astroglial activation was attenuated in the SN sections of Nucling-deficient mice following MPTP treatment, suggesting the possible involvement of Nucling in inflammatory responses in this model (unpublished observation). Indeed, Nucling was reported to play some roles in inflammation by interfering with nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling (Liu *et al.* 2004). The molecular mechanism underlying the role of Nucling in inflammation remains to be investigated.

Taken together, these results indicated that the deletion of Nucling, a mitochondrial apoptotic cascade factor, can be a potentially useful treatment for PD as anti-mitochondrial apoptotic gene therapy.

Acknowledgements

We thank Mr Shono for assistance with confocal microscopy. This work was supported by a Grant-in-aid for Scientific Research, a grant for the 21st Century COE Program from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, a Scientific Research grant from the Japan Society for the Promotion of Science and a Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. XT is supported by the Rotary-Yoneyama Memorial Foundation.

References

- Abercrombie M. (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* **94**, 239–247.
- Beal M. F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **23**, 298–304.
- Cassarino D. S., Parks J. K., Parker W. D. Jr and Bennett J. P. Jr (1999) The Parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1453**, 49–62.
- Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B. I., Roth K. A. and Gruss P. (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* **94**, 727–737.
- Chiueh C. C., Markey S. P., Burns R. S., Johannessen J. N., Jacobowitz D. M. and Kopin I. J. (1984) Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig and monkey. *Psychopharmacol. Bull.* **20**, 548–553.
- Dehmer T., Heneka M. T., Sastre M., Dichgans J. and Schulz J. B. (2004) Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I β B α induction and block of NF κ B and iNOS activation. *J. Neurochem.* **88**, 494–501.
- German D. C., Nelson E. L., Liang C. L., Speciale S. G., Sinton C. M. and Sonsalla P. K. (1996) The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* **5**, 299–312.
- Hajimohamadreza I. and Treherne J. M. (1997) The role of apoptosis in neurodegenerative diseases. *Prog. Drug Res.* **48**, 55–98.
- Hakem R., Hakem A., Duncan G. S. *et al.* (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**, 339–352.
- Heikkilä R. E., Hess A. and Duvoisin R. C. (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* **224**, 1451–1453.
- Kopin I. J. and Markey S. P. (1988) MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Ann. Rev. Neurosci.* **11**, 81–96.
- Langston J. W. (1996) The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* **47**, S153–S160.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo J., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. and Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489.
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147–157.
- Liu L., Sakai T., Sano N. and Fukui K. (2004) Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signaling. *Biochem. J.* **380**, 31–41.
- Mizuno Y., Suzuki K., Sone N. and Saitoh T. (1987) Inhibition of ATP synthesis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in isolated mitochondria from mouse brains. *Neurosci. Lett.* **81**, 204–208.
- Mizuno Y., Ikebe S., Hattori N., Nakagawa-Hattori Y., Mochizuki H., Tanaka M. and Ozawa T. (1995) Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 265–274.
- Mochizuki H., Goto K., Mori H. and Mizuno Y. (1996) Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **137**, 120–123.
- Mochizuki H., Hayakawa H., Migita M. *et al.* (2001) An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10918–10923.
- Nelson E. L., Liang C. L., Sinton C. M. and German D. C. (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J. Comp. Neurol.* **369**, 361–371.
- Nicklas W. J., Vyas I. and Heikkilä R. E. (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* **36**, 2503–2508.
- Przedborski S. and Jackson-Lewis V. (1998) Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov. Disord.* **13**, 35–38.
- Sakai T., Liu L., Shishido Y. and Fukui K. (2003) Identification of a novel, embryonal carcinoma cell-associated molecule, Nucling, that is up-regulated during cardiac muscle differentiation. *J. Biochem. (Tokyo)* **133**, 429–436.
- Sakai T., Liu L., Teng X. *et al.* (2004) Nucling recruits Apaf-1/procaspase-9 complex for the induction of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 41131–41140.
- Sedelis M., Schwarting R. K. and Huston J. P. (2001) Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* **125**, 109–125.
- Srinivasula S. M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. and Alnemri E. S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* **1**, 949–957.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N. *et al.* (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441–446.
- Tatton N. A., Maclean-Fraser A., Tatton W. G., Perl D. P. and Olanow C. W. (1998) A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **44**, S142–S148.
- Viswanath V., Wu Y., Boonplueang R., Chen S., Stevenson F. F., Yantiri E., Yang L., Beal M. F. and Andersen J. K. (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **21**, 9519–9528.
- Yang L., Matthews R. T., Schulz J. B., Klockgether T., Liao A. W., Martinou J. C., Penney J. B. Jr, Hyman B. T. and Beal M. F. (1998) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J. Neurosci.* **18**, 8145–8152.
- Yang L., Sugama S., Mischak R. P., Kiaei M., Bizat N., Brouillet E., Joh T. H. and Beal M. F. (2004) A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol. Dis.* **17**, 250–259.
- Yoshida H., Kong Y. Y., Yoshida R., Elia A. J., Hakem A., Hakem R., Penninger J. M. and Mak T. W. (1998) Apaf-1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* **94**, 739–750.
- Yuan J. and Yankner B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802–809.

生体内不斉アミノ酸分子の存在と その代謝酵素の病態生理学的意義

朴 煥 埼* 川 添 僚 也* 岩 名 沙 奈 恵* 小 野 公 嗣*
● 頼 田 和 子* 坂 井 隆 志* 福 井 清*

1. はじめに

生命世界における左右非対称の存在は（ホモキラリティー）、生物を非生物世界から区別する重要な特徴の一つとなっている。この左右の識別を担う生体分子の分子認識機構は、哺乳類の中樞神経系機能の制御にも関与することが明らかとなってきた。近年、哺乳類体内に遊離型、またはタンパク質結合型としてD型不斉アミノ酸分子が発見され、L型のアミノ酸のみで説明されてきた哺乳類の生命現象の中に、D型アミノ酸が独自に構築する生命機能制御システム、「D-アミノ酸バイオシステム」が存在することが、日本の研究者を中心として提唱されている。

遊離型のD-アミノ酸としては、D-セリン(D-Ser)とD-アスパラギン酸(D-Asp)が哺乳類で重要な生理作用を有することが明らかになっている。哺乳類の中樞神経系に存在するD-Serは、NMDA受容体のグリシンサイトに結合するコアゴニストとして作用する。またD-Aspは主に神経系や内分泌系などに高濃度に存在し、松果体においてメラトニンの分泌を抑制し、精巣ではテストステロンの合成、分泌を促進することが示唆されている。一方、哺乳類体内のタンパク質中にもD-アミノ酸が存在し、D-アミノ酸バイオシステムを構築している。例えば、アルツハイマー病で脳内に蓄積する β -アミロイドタンパク質中では、特定の残基のAspとSerが異性化してD体になっている。現在、このような変化によりタンパク質の沈着が惹起される可能性が示唆されている。また、水晶体タンパク質である α クリスタリン中の特定のAsp残基が加齢に伴ってD体化していることが明らかにされ、白内障との関連が論じられている。

本稿では、主に哺乳類における生命機能制御システムとしてのD-アミノ酸バイオシステムの普遍性を考察する

とともに、特に脳内D-Serの代謝に、アストログリア細胞に局在するD-アミノ酸酸化酵素(DAO)が積極的に関与していることを示唆する我々の研究を紹介する。

2. D-セリン(D-Ser)

1) 分布や合成および生理機能

遊離型D-Serは日本の研究者による先駆的な研究により、その存在が中枢神経系で見いだされ、さらにその分布がグルタミン酸受容体のサブタイプであるNMDA受容体の分布とほぼ一致することが明らかとされた¹⁾。その後、脳内でD-Serはタイプ2アストロサイトに存在し、non-NMDA受容体の活性化によって細胞から放出されることが報告された²⁾。NMDA受容体は、イオンチャネルを内蔵し、速い神経伝達を担うチャンネル型グルタミン酸受容体のサブタイプであり、興奮性神経伝達、シナプス可塑性ならびに学習・記憶といった高次脳機能に重要な働きを有している。現在、D-Serの生理的な機能はNMDA受容体のグリシン結合部位の選択的コアゴニストと作用して、グルタミン酸による興奮を亢進することが明らかとされている³⁾。最近になり、D-Serの生合成に関してはセリンラセマーゼがマウス脳から単離同定され、内因性D-Serはこの酵素によって細胞内のL-Serから合成されることが想定されている⁴⁾。

2) D-セリンの病態生理学的意義

これまでの報告によると、NMDA受容体のコアゴニストとして作用するD-Serは、NMDA受容体を介する興奮性神経伝達における神経調節因子として位置づけられ、NMDA受容体の機能不全に由来する種々の病態への関与が示唆されている。Choiらにより、NMDA受容

体の過興奮は細胞内へのカルシウムイオンの流入増大を招き、脳虚血、神経変性疾患などを様々な脳の病態における神経細胞死に関与している可能性が指摘されている⁵⁾。また、動物モデルでは一時的な大脳虚血後、細胞外のD-Ser濃度の上昇が観察され⁶⁾、NMDA受容体のグリシン結合部位に対するアンタゴニストは脳虚血モデル動物において神経保護作用を有していることが報告されている⁷⁾。一方、NMDA受容体の機能低下は統合失調症との関連が示唆されており、統合失調症患者にD-Serを投与すると、陽性や陰性の症状および認知行動の障害の改善が認められている⁸⁾。NMDA受容体のNR1サブユニットの変異型マウスを用いた解析では、マウス個体で統合失調症様の異常行動が観察された⁹⁾。また、健常ヒトにNMDA受容体のアンタゴニストである phencyclidine を投与すると、統合失調症のような症状が誘導されることも報告されている¹⁰⁾。さらに、Chumakovらはヒト13番染色体のSNPs解析より統合失調症の疾患感受性遺伝子の一つとしてG72遺伝子を同定し、yeast two-hy-

brid法によりG72遺伝子産物とD-アミノ酸酸化酵素(DAO)との相互作用を確認し、G72の遺伝子産物はDAO活性を上昇させることを報告している¹¹⁾。これらの多くの実験結果から、我々はDAOの活性の上昇が、神経調節因子であるD-Serの濃度の減少を招き、NMDA受容体の機能不全に起因する統合失調症発症とその病態に関与するとの仮説を提唱している。

3. D-アミノ酸酸化酵素 (D-Amino acid oxidase; DAO, EC 1.4.3.3)

1) 反応機構

1935年、Krebsによって発見されたDAOはその反応機構に関して詳細な解析が行われてきた。本酵素はFAD (flavin adenine dinucleotide) を補酵素とするフラビン酵素で、その触媒反応はFADの酸化還元状態に基づいて二段階に分けられる。以下の反応式と図1で示したように、本酵素によって基質は酸化的脱アミノ反応を

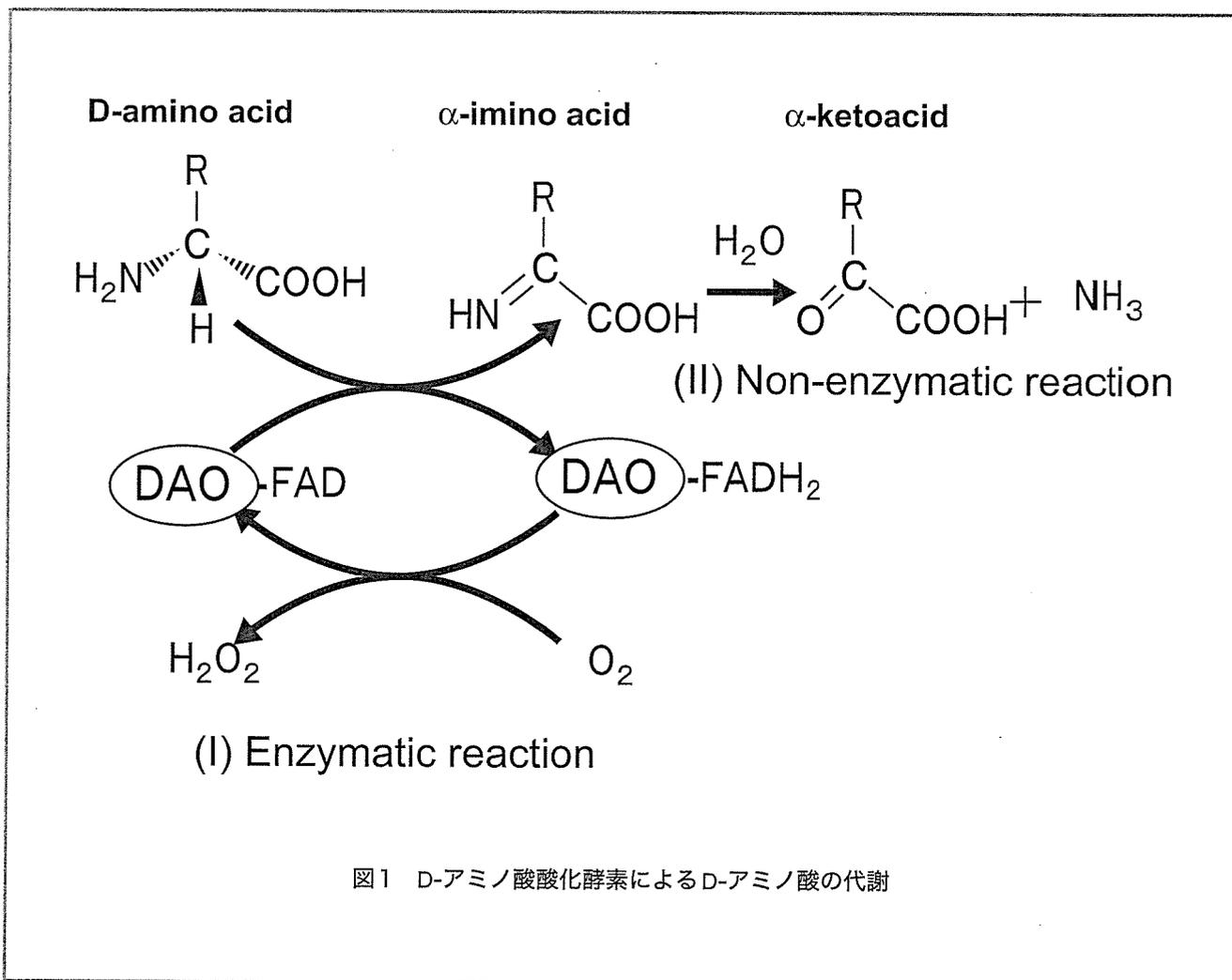
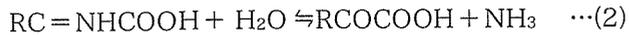
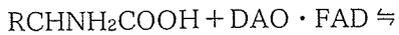


図1 D-アミノ酸酸化酵素によるD-アミノ酸の代謝

受け、1分子のアンモニアと過酸化水素が発生する。

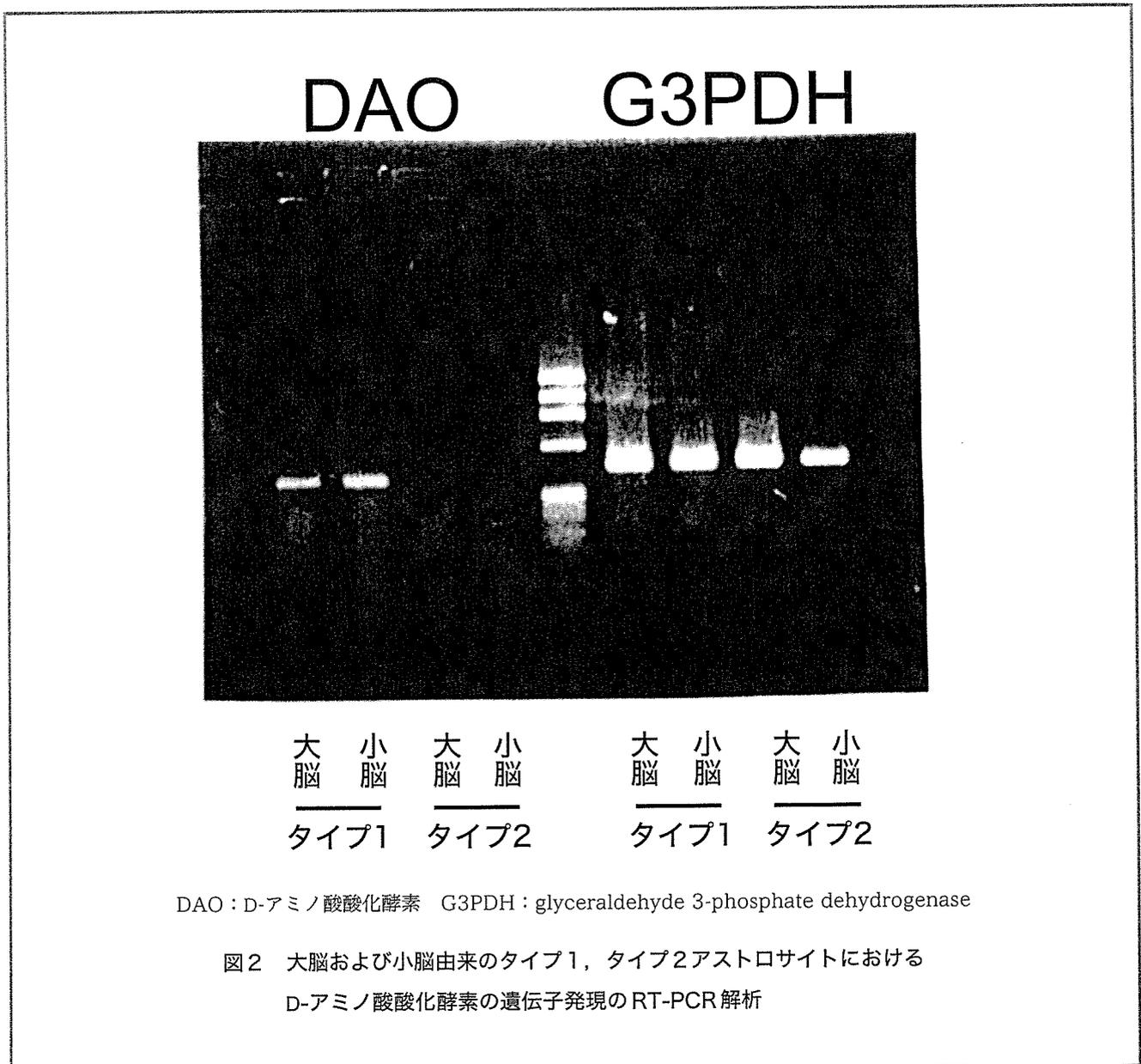


触媒反応は基質である D-アミノ酸から FAD に 2 電子が移行する還元的半反応 (1), 続いて還元型 FAD が酸素分子を 2 電子還元し過酸化水素が発生する酸化半反応 (3) によって進行する。生じた過酸化水素はペルオキシゾーム内でカタラーゼなどによって加水分解されると考えられる。これら 2 つのステップは基質代謝における 1 サイクルであり、酸化型 FAD に新たな基質分子が反応することで次のサイクルが開始する。FAD と DAO タンパクとの結合は非共有結合であり、したがってその結合は比

較的弱い。DAO の FAD 取り込みは、翻訳時もしくは翻訳後のいずれかの段階において起こると考えられる。本酵素は D-アミノ酸の中でも特に、中性及び芳香族性のもので良い基質とする。L 型アミノ酸のみで構成されていると考えられていた生体における本酵素の腎臓や肝臓、そして脳での存在の意義については長い間不明とされていた。

2) 生体内の分布及び生理機能

DAO 遺伝子はヒトゲノム 12 番染色体上に存在し¹²⁾、腎臓並びに脳、腸管において組織特異的な遺伝子発現が認められる¹³⁾。DAO の細胞内の局在に関しては、本酵素の C-末端に Ser-His-Leu で構成されている PTS 1 (Peroxisomal Targeting Signal 1) が存在するため、DAO

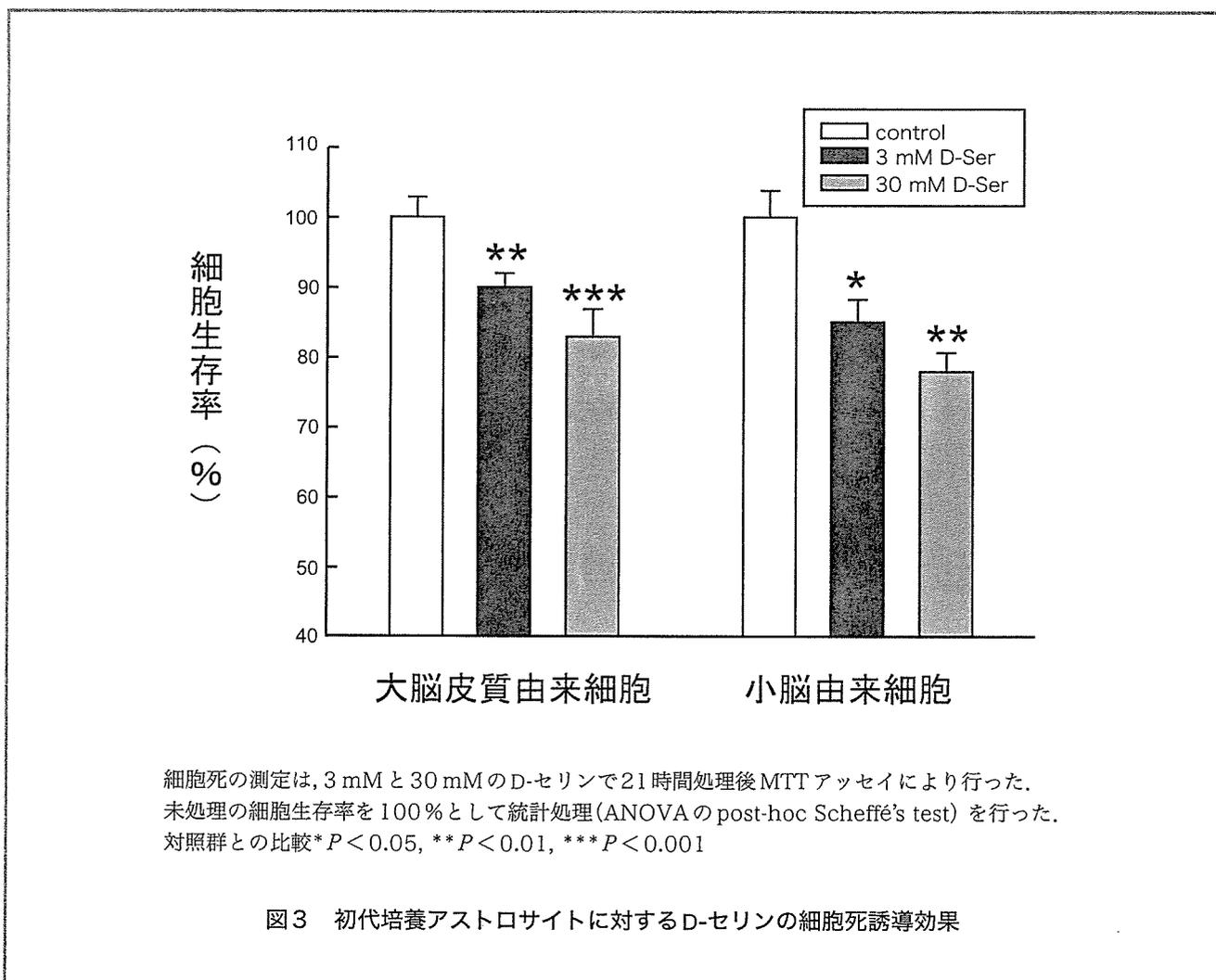


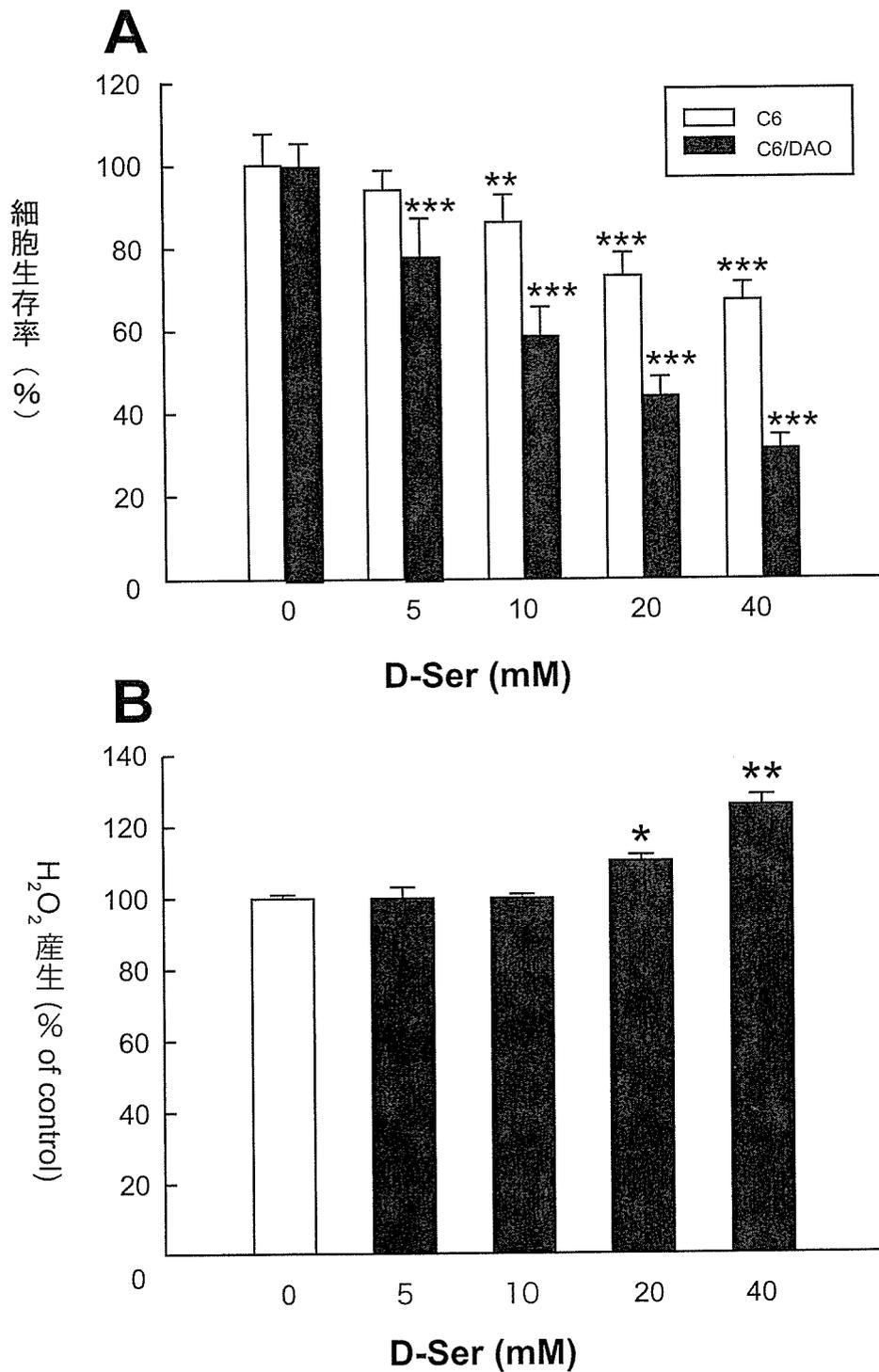
タンパクは、細胞質で成熟型タンパクとして生合成された後、ペルオキシゾームに移行、局在することが知られている^{14,15}。酵素の反応の結果による過酸化水素の発生という観点からみると、DAOが外来感染源に対する免疫面において何らかの役割を有している可能性が考えられる。さらにDAO機能亢進や基質過剰状態により過剰発生した過酸化水素は、細胞に対する酸化ストレスとなり、細胞死を誘導しうる。この点からは抗腫瘍効果が期待されている。

これまでに、我々はラットの脳よりグリア細胞の初代培養系を確立し、RT-PCR法を用いて本酵素の遺伝子発現を検討した。その結果、小脳のみならず、従来は否定的であった大脳由来のグリア細胞でもDAOの遺伝子発現が認められた(図2)。さらにタイプ1、タイプ2アストロサイトの分離培養により、D-Serの産生の方が主としてタイプ2アストロサイトであると考えられるのに対し、DAOはタイプ1アストロサイトでの発現が顕著であることを明らかにしている¹⁶。現在、我々はD-Serと本酵素

の生体内分布が負の相関を示すことから、DAOはNMDA受容体を介する神経調節物質であるD-Serを生理的基質とするその制御因子であるとの作業仮説立てている。

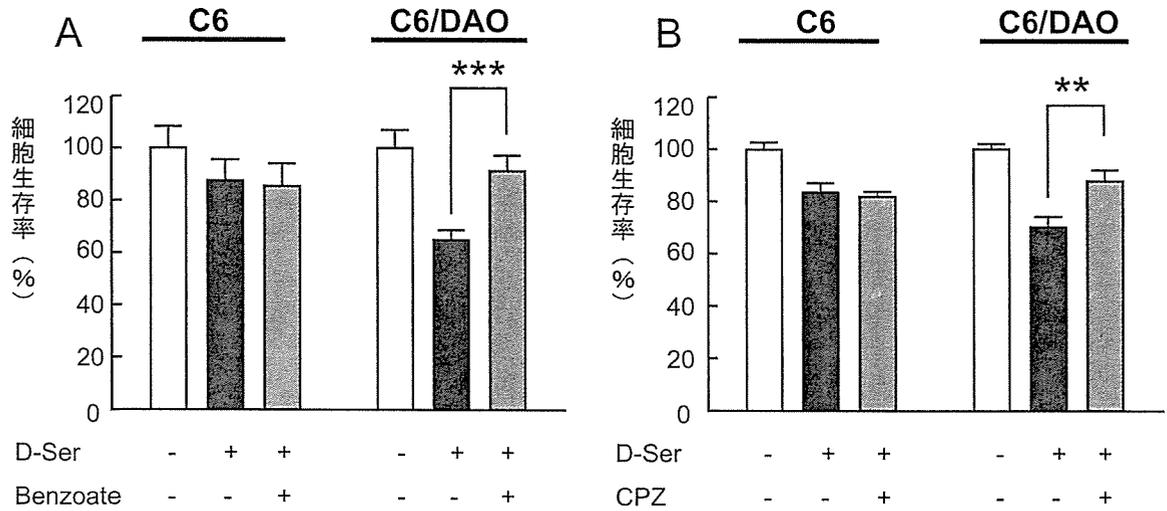
さらにラット初代培養のアストロサイトを用いて、D-Ser添加が細胞に与える影響を解析した結果、小脳由来アストロサイトの培養細胞にも、大脳由来アストロサイトにも、細胞死が認められた(図3)。ラットのC6細胞(glioma cell line)およびDAOを強制発現させたC6細胞(C6/DAO)にD-Serを添加後、細胞の変化を解析した結果、両者とも濃度依存的に細胞死が観察され、C6/DAO細胞はC6細胞より低い濃度で細胞死が誘導されることが観察された(図4A)。さらに、これらの現象はD-Serの代謝後産生されたH₂O₂の作用であることが予測された。H₂O₂は活性酸素の一つであり、細胞の機能と生存に有害な影響を直接与える物質である¹⁷。C6/DAO細胞を20 mMと40 mMのD-Serの処理後、H₂O₂を測定した。その結果、未処理群と比較すると、H₂O₂産生の増加が観察された(図4B)。





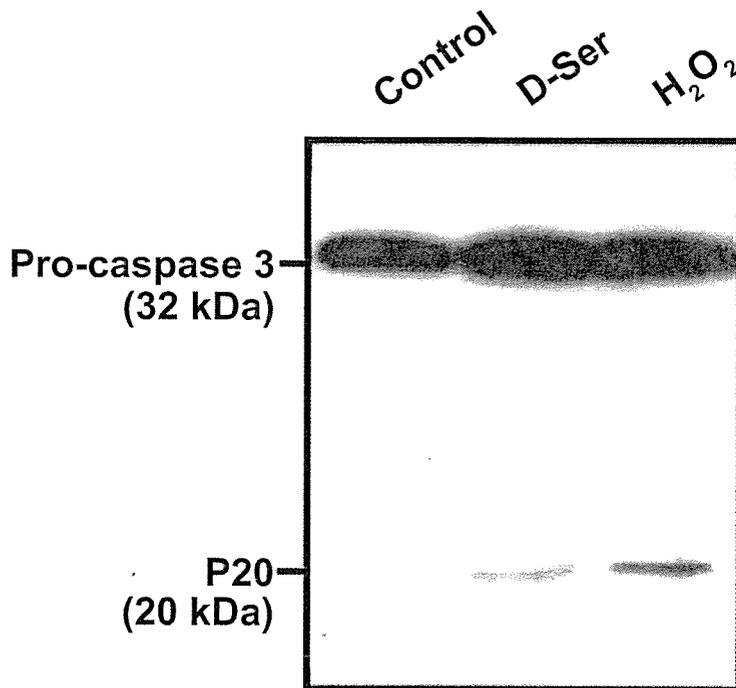
(A) C6とC6/DAO細胞の細胞生存率の測定は、既定の濃度のD-セリンで21時間処理後MTTアッセイにより行った。
 (B) C6/DAO細胞における過酸化水素の測定は、D-セリン処理1時間後、過酸化水素検出キットにより行った。
 未処理の細胞生存率を100%として統計処理(ANOVAのpost-hoc Scheffé's test)を行った。
 対照群との比較* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

図4 D-アミノ酸化酵素過剰産生細胞株に対するD-セリンの細胞死誘導効果と過酸化水素産生



C6及びC6/DAO細胞に対して
 (A) D-セリン処理直前に20 mM benzoateで30分間前処理を行った。
 (B) D-セリン処理直前に1 μM chlorpromazine (CPZ)で30分間前処理を行った。
 未処理の細胞生存率を100%として統計処理(ANOVAのpost-hoc Scheffé's test)を行った。
 D-セリン処理群との比較** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

図5 D-アミノ酸酸化酵素阻害剤のアストログリア細胞への効果

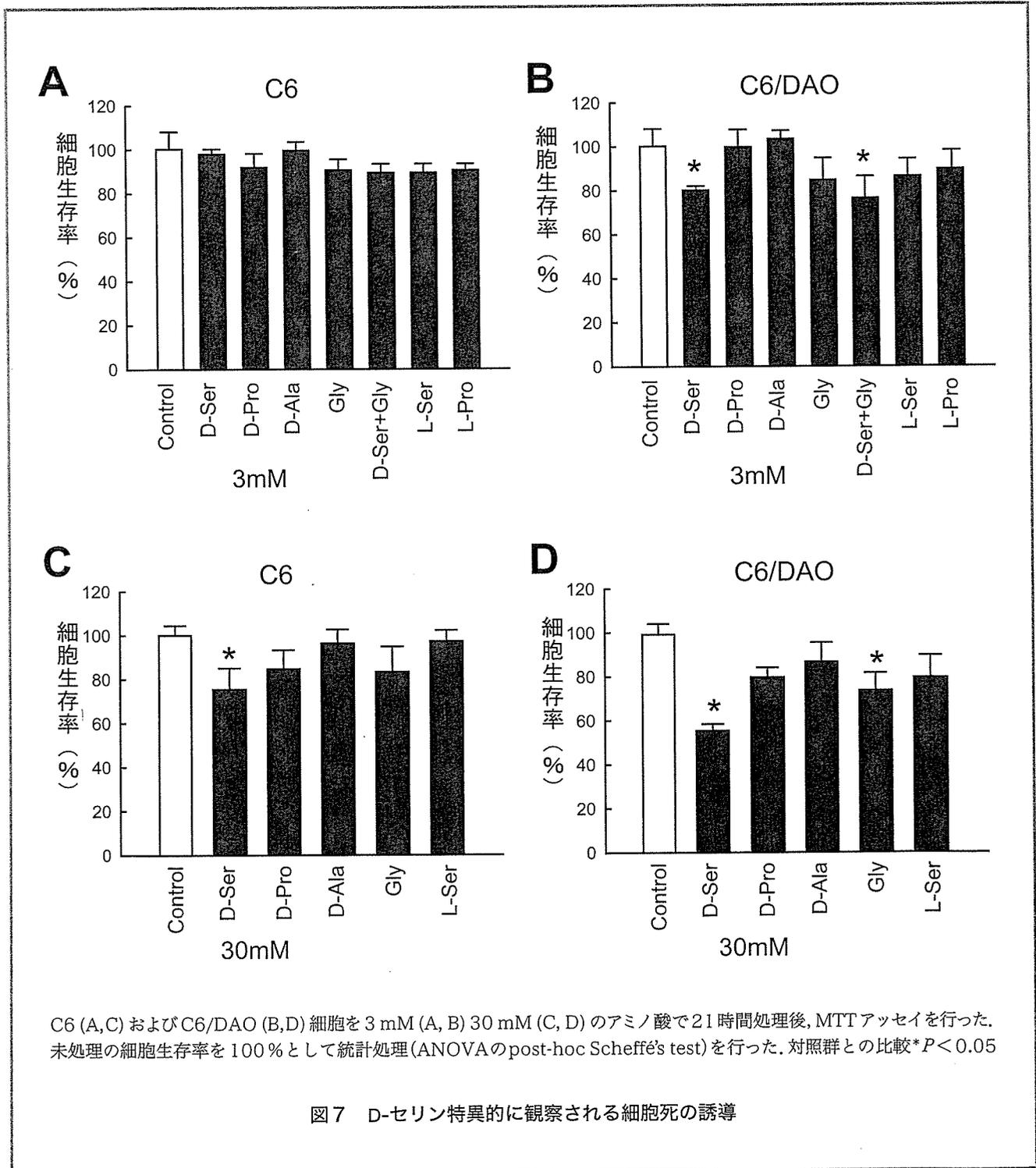


C6/DAO細胞に対して30 mM D-セリンと50 μM過酸化水素(H₂O₂)による処理を21時間行った後,細胞抽出液を回収してWestern blot法にて解析した.抗体はウサギ抗カスパーゼ-3ポリクローナル抗体を一次抗体として用いた.二次抗体はヤギ標識抗ウサギIgG抗体を用いた.

図6 D-セリンによる細胞死におけるcaspase-3の活性化

一方、この細胞死はDAOの阻害剤であるbenzoateと統合失調症治療薬のchlorpromazineの添加によって抑制された(図5)。Chlorpromazineは、古典的向精神薬として臨床で使用されているが、DAOの補酵素であるFADとの競合によりブタDAOの活性を阻害することが報告されている¹⁸⁾。これらの結果は、D-Serの添加により観察されるC6の細胞死にはDAO活性によるD-Serの代謝が関与することを示唆するものである。H₂O₂によって誘導されたこの細胞死はアポトーシスの一形態である

ことが、D-Ser処理後に観察されるcaspase-3の活性化により確認された(図6)。以上から、アストログリア細胞に局在するDAOが脳内D-Serの代謝に積極的に関与し、脳内のD-Ser濃度調節において重要な生理的役割を担っている可能性が示唆された。これらの知見を踏まえ、我々は脳内にはDAOによるD-Ser代謝系が存在して、神経調節物質であるD-Ser濃度を制御することを提唱している。



4. 細胞外D-セリンの濃度制御

NMDA受容体の機能異常に伴う神経伝達系の様々な疾患が存在することから、脳内シナプス間隙でNMDA受容体に対するコアゴニストとして機能するD-Serの細胞外濃度調節は非常に重要であると考えられる。現在、D-Serの細胞外濃度調節メカニズムとして、は、次のような因子が考えられる。

- 1) L-SerからD-Serへの転換を触媒するセリンラセマーゼが細胞外濃度調節因子の一つとして考えられる¹⁹⁾。これは、D-セリン合成系としてのセリンラセマーゼの関与を考えたメカニズムである。
- 2) 細胞膜上のトランスポーターによる調節。これに関しては、C6細胞と初代培養のアストログリア細胞を用いた研究でD-Serを取り込むトランスポーターの存在が示唆されてきた²⁰⁾。さらに我々の実験結果では、C6とC6 DAO細胞に様々なアミノ酸を添加したところ、他のアミノ酸に比べ、D-Serの添加による細胞毒性が最も顕著であった(図7)。以上から、神経調節物質であるD-Serに対する特異的トランスポーターがアストログリア細胞に存在する可能性が考えられる。
- 3) 脳内のアストログリア細胞に発現するDAOによるD-Serの代謝。D-セリン代謝系としてのFADの寄与を考えた、メカニズムであり、2)のトランスポーターにより細胞内へ取り込まれたD-Serを代謝分解することにより、細胞外のD-Serの濃度の調節を行うというモデルである²¹⁾。

5. D-アスパラギン酸(D-Asp)の生理機能

D-Aspは哺乳類体内でD-Serよりも早く発見され(1980年代中頃)、その生理活性に関しては、神経系や内分泌系における解析が行われてきた。またD-Aspは、マダコの脳に、水生無脊椎動物で最初に発見されたD-アミノ酸でもある。哺乳類体内でD-Aspは松果体実質細胞でのメラトニンの分泌を強く阻害し、下垂体前葉ではプロラクチンの分泌を促進し、下垂体後葉ではオキシトシンとバソプレッシンの産生を調節することが報告されている。また、精巣Leydig細胞ではD-Aspがテストステロンの合成・分泌を促進することが明らかとされている²²⁾。Hommaらは、D型アミノ酸の高感度な分離、定量法を開発し、D-Aspの組織内の含量や局在の発達に伴う変化

を解析してきた。特に、含量の高いラット副腎では、D-Aspは全アスパラギン酸の40%に、成熟ラットの松果体や精巣では30~40%にも達することを明らかとした。さらにこれらのレベルが変動することから、生理的な調節を受けていることを示唆している。一方、Leydig細胞ではD-AspはStAR(steroidogenic acute regulatory) proteinの発現を促進し²³⁾、視床下部や下垂体後葉の電子顕微鏡による解析ではD-Aspがheterochromatinに存在することが明らかになり、遺伝子発現調節に関連することが示唆されている。

D-Aspの生合成に関しては、PC12細胞およびそのサブクローンであるMPT1細胞や、GH3細胞の培養によって、D-Aspが細胞内とともに培地にも蓄積されることが確認され、生合成されているものと考えられている。酸性アミノ酸であるD-AspはDAOにより代謝されず、D-アスパラギン酸酸化酵素(DDO, D-ASPOX, EC 1. 4. 3. 1)という独立のオキシダーゼによって酸化される。D-Aspの含量が高い組織ではDDOの活性が低く、DDOの活性が高い組織はD-Aspの含量が低いことが知られており、この酵素が脳内のD-Asp濃度調節に関与していると考えられている。さらに、D-Aspの添加によりラットとマウスのDDOでは活性の上昇が認められ、酵母では酵素誘導が起こることが報告されている²⁴⁾。

6. タンパク質中のD-アミノ酸

1) アミロイドβタンパク質のラセミ化

哺乳類体内には遊離型以外にもタンパク質中にアミノ酸残基としてのD-アミノ酸が存在し、D-アミノ酸バイオシステムを構成すると考えられている。アルツハイマー病は記憶と認知機能が進行性に障害される神経変性疾患で、高齢痴呆患者の多くを占めている。近年、その病因としてアミロイド原因説が有力視されている。老人班の形成は、初期のびまん性老人班から末期の緻密性老人班まで20~30年をかけてゆっくり進行し、この間アミロイドを構成するβタンパク質含有アミロイドはラセミ化、異性化、ピログルタミル化など、様々な修飾反応を受ける。

Roherらは、アルツハイマー病患者脳から得たアミロイドβタンパク質のAsp1およびAsp7がラセミ化および

表1 老化タンパク質中のD-Aspと関連が示唆される病気

D-Asp含有タンパク質	病名
α A-クリスタリン	白内障
ミエリン塩基性タンパク質	多発性硬化症
エラスチン	動脈硬化
アミロイドβタンパク質	アルツハイマー病
Tau タンパク質	アルツハイマー病

異性化していることを明らかにし²⁵⁾, Tomiyamaらは、合成D-Asp含有アミロイドβタンパク質が、*in vitro*で通常のアミロイドβタンパク質より早く凝集し線維化するとともに神経細胞傷害活性が高いことを報告している²⁶⁾。また、実際のアルツハイマー病患者の脳組織にD-Asp含有アミロイドβタンパク質が蓄積していることが確認されている。これらの知見に基づき、アルツハイマーにおける神経細胞死の分子機構におけるβタンパク質のラセミ化の重要性が提唱されている。

2) Aging マーカーとしてのD-Asp含有タンパク質

Fujiiらは、老齢化によりタンパク質におけるD-Asp生成を確認し、老化マーカーとしてのD-Aspの意義を検討している。D-Asp残基のラセミ化(L-Asp→D-Asp)は、活性酸素に代表されるAging stressによって化学的(非酵素的)に生じ、加齢とともに増加すると考えられている。特に興味深いのは、近年、数々の疾患の原因タンパク質中にD-Aspが発見されたことである(表1)。さらに、KinouchiらはD-Asp含有タンパク質に特異的な分解酵素を発見し、アルツハイマー病患者の脳では、健常脳に比較して遊離のD-Asp量が低下していることから、この分解酵素の活性低下がアルツハイマー病の背景にあるとの仮説を提唱している²⁷⁾。

3) D-Aspの修飾の修復

タンパク質中のアスパラギン(Asn)残基やAsp残基が非酵素的な化学反応でD-Asp, iso-Asp及びD-iso-Asp残基へ変換する修飾は、多くの生物に保存された翻訳後

修飾である。アルツハイマー病患者の脳に蓄積したアミロイドβタンパク質や不溶性Tauタンパク質にAsp残基修飾が報告されている。Tauタンパク質のAsp残基修飾はTauタンパク質の機能不全や不溶化に重要な役割を果たしていると考えられている。一方これまでに、異性化Asp含有タンパク質に対する修復酵素が発見されている。これらはタンパク質イソアスパラギン酸メチル転移酵素(Protein L-isoaspartyl methyltransferase; PIMT)、もしくは、タンパク質カルボキシメチル転移酵素(protein carboxyl methyltransferase; PCMT)と呼ばれる。この酵素は異性化したAsp残基(D-β-Asp残基)のα-カルボキシル基を特異的にメチル化し、その後の自発的なイミド環再形成を促進する。すなわち、L-α-AspとL-β-Aspの間の平衡をよりL-α-Asp側に偏らせることによって修復能を発揮している。このAsp修飾の修復に関与するタンパク質PIMTの欠損マウスでは脳内にL-イソアスパラギン酸残基含有タンパク質が蓄積し、致死性てんかん発作や神経変性が生じることが示されている²⁸⁾。

7. おわりに

本稿では哺乳動物の脳内に存在するD-Serとその代謝酵素であるDAOの病態生理学的意義を中心に紹介した。D-Serがコアゴニストとして作用するNMDA受容体の機能不全は、様々な神経疾患に密接に関連している。現在、我々は中枢神経系アストログリア細胞における本酵素の遺伝子発現に基づき、脳内グルタミン酸ニューロンにおいて、D-Ser - DAOシステムが、神経情報伝達制御機構を構成するというモデルを提唱している(図8)。

このような「D-アミノ酸バイオシステム」の機能の解明により、NMDA 受容体の機能異常に基づく難治性精神疾患や脳卒中における神経細胞死などの病態に対する新規治療薬の開発が期待される。

参考文献

- 1) Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K.: *J. Neurochem.*, **60**, 783 (1993).
- 2) Schell, M.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3948 (1995).
- 3) Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady Jr., R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M. A., Snyder, S.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4926 (2000).
- 4) Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13409 (1999).
- 5) Choi, D.W., Rothman, S.M.: *Annu. Rev. Neurosci.*, **13**, 171 (1990).
- 6) Lo, E.H., Pierce, A.R., Matsumoto, K., Kano, T., Evans, C.J., Newcomb, R.: *Neuroscience*, **83**, 449 (1998).
- 7) Dansyz, W., Parsons, C.G.: Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: *Pharmacol. Rev.*, **50**, 597 (1998).
- 8) Tsai, G., Yang, P., Chung, L.-C., Lange, N., Coy- le, J.T.: *Biol. Psychiatry*, **44**, 1081(1998).
- 9) Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Ko- ller, B.H.: *Cell*, **98**, 427-436 (1999).
- 10) Goff, D.C., Coyle, J.T.: *Am. J. Psychiatry*, **158**, 1367 (2001).
- 11) Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., La Rosa, P., Puech, A., Tahri, N., Cohen-Akenine, A., De- labrosse, S., Lissarrague, S., Picard, F.P., Maur- ice, K., Essioux, L., Millasseau, P., Grel, P., De- bailleul, V., Simon, A.M., Caterina, D., Dufaure, I., Malekzadeh, K., Belova, M., Luan, J.J., Bouil-

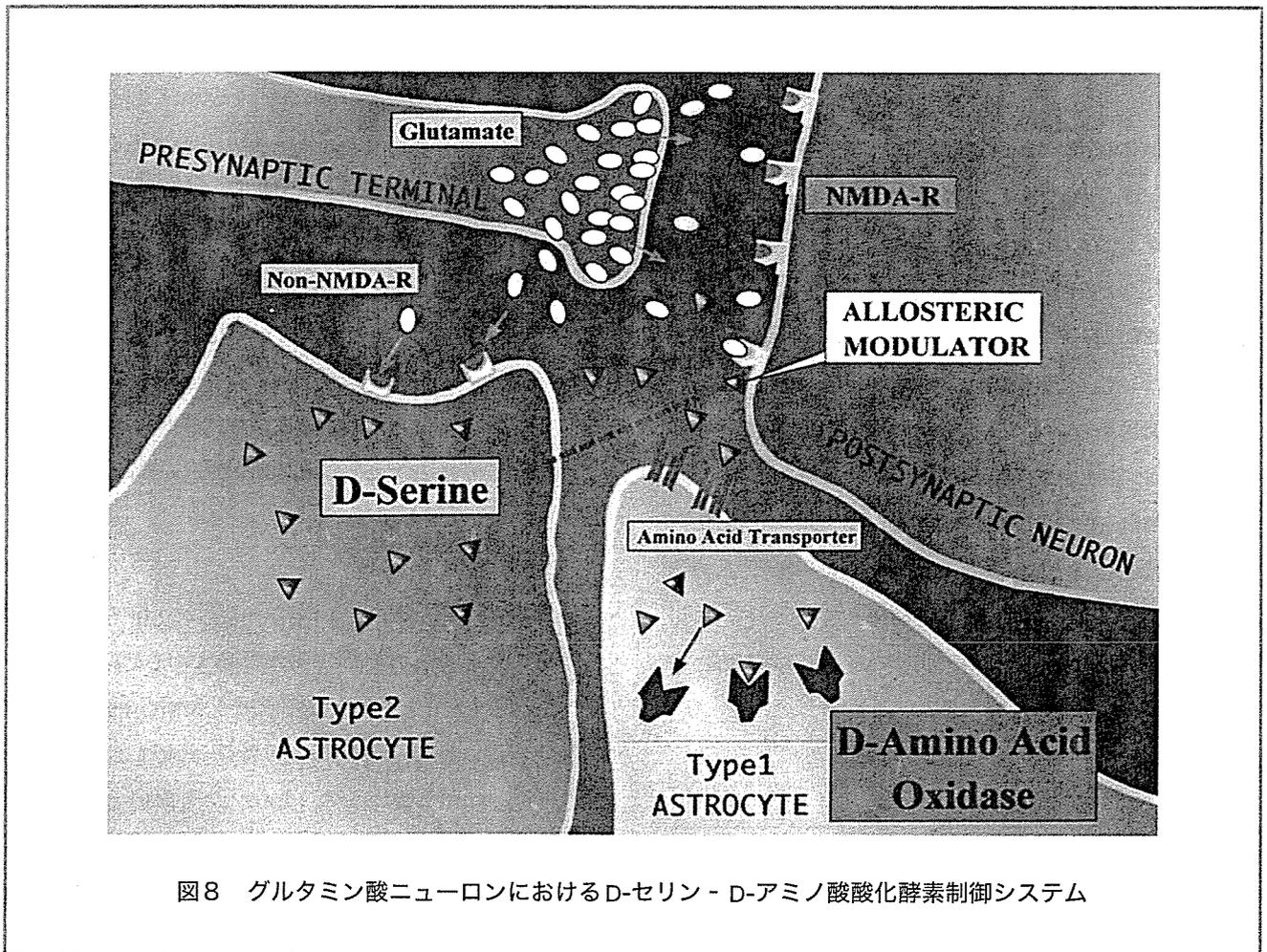


図8 グルタミン酸ニューロンにおけるD-セリン - D-アミノ酸酸化酵素制御システム

- lot, M., Sambucy, J.L., Primas, G., Saumier, M., Boubkiri, N., Martin-Saumier, S., Nasroune, M., Peixoto, H., Delaye, A., Pinchot, V., Bastucci, M., Guillou, S., Chevillon, M., Sainz-Fuertes, R., Meguenni, S., Aurich-Costa, J., Cherif, D., Gim-alac, A., Van Duijn, C., Gauvreau, D., Ouellette, G., Fortier, I., Raelson, J., Sherbatich, T., Riazanskaia, N., Rogaev, E., Raeymaekers, P., Aerssens, J., Konings, F., Luyten, W., Macchiardi, F., Sham, P.C., Straub, R.E., Weinberger, D.R., Cohen, N., Cohen, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13675 (2002).
- 12) Fukui, K., Miyake, Y.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 18631 (1992).
- 13) Fukui, K., Momoi, K., Watanabe, F., Miyake, Y.: *Biochemistry*, **27**, 6693 (1988).
- 14) Fukui, K., Momoi, K., Watanabe, F., Miyake, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 1222 (1986).
- 15) Fukui, K., Watanabe, Shibata, T., F., Miyake, Y.: *Biochemistry.*, **26**, 3612 (1987).
- 16) Urai, Y., Jinnouchi, O., Kwak, K.T., Suzue, A., Nagahiro, S., Fukui, K.: *Neurosci. Lett.*, **324**, 101 (2002).
- 17) Beckman, K. B., Ames, B. N.: *J. Biol. Chem.*, **272**: 19633 (1997).
- 18) Yagi, K., Nagatsu, T., Ozawa, T.: *Nature*, **177**, 891 (1956).
- 19) Panizzutti, R., De Miranda, J., Ribeiro, C.S., Engelender, S., Wolosker, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5294 (2001).
- 20) Hayashi, F., Takahashi, K., Nishikawa, T.: *Neurosci. Lett.*, **239**, 85 (1997).
- 21) Park, H.K., Shishido, Y., Ichise-Shishido, S., Kawazoe, T., Ono, K., Iwana, S., Tomita, Y., Yorita, K., Sakai, T., Fukui, K.: *J. Biochem.*, **139**, 295 (2006).
- 22) Nagata, Y., Homma, H., Lee, J. A., Imai, K.: *FEBS Lett.*, **444**, 160(1999).
- 23) Nagata, Y., Homma, H., Matsumoto, M., Imai, K.: *FEBS Lett.*, **454**, 317 (1999).
- 24) Yamada, R., Ujiie, H., Kera, Y., Nakase, T., Kitagawa, K., Imasaka, T., Arimoto, K., Takahashi, M., Matsumura, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1294**, 153 (1996).
- 25) Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Wolkow C., Wang, R. Cotter, R. J., Reardon, I. M., Zurcher-Neely, H. A., Heinrikson, R. L., Ball, M. J., Greenberg, B. D.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 3072 (1993).
- 26) Tomiyama, T., Asano, S., Furiya, Y. Shirasawa, T., Endo, N., Mori, H.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 10205 (1994).
- 27) Kinouchi, T., Ishiura S., Mabuchi, Y., Urakami-Manaka, Y., Nishio, H., Nishiuchi, Y. Tsunemi, M., Takada, K., Watanabe, M., Ikeda, M., Matsui, H., Tomioka, S., Kawahara, H., Hamamoto, T., Suzuki, K., Kagawa, Y.: *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **314**, 730 (2004).
- 28) Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamura, D., Tatsuoka, H., Nakako, H., Kawano, H., Kuroyanagi, H., Yahagi, Y., Kobayashi, S., Koizumi, K., Sakai, T., Saito, K., Chiba, T., Kawamura, K., Suzuki, K., Watanabe, T., Mori, H., Shirasawa, T.: *J. Neurosci.*, **15**, 2063 (1998).

V. 平成 18 年度分担研究者氏名一覧