

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

異常蛋白蓄積による運動系神経変性疾患の

治療法開発にむけた病態解明

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋 良輔

分担研究者 三澤日出巳

分担研究者 鈴木 泰行

分担研究者 武田 俊一

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

I 総括・分担研究報告

1. 異常蛋白蓄積による運動系神経変性疾患の治療法開発にむけた病態解明
(分担課題：運動ニューロン特異的プロテアソームノックアウトマウスの作製及び
HtrA2 の線条体黒質変性症への関与の解析) 1
高橋良輔
 2. 運動ニューロン特異的変異 SOD1 欠損マウスの作製と解析 6
三澤 日出巳
 3. HtrA2 の基質の分子クローニング 8
鈴木泰行
 4. メダカによる家族性パーキンソン病モデルの作製 9
武田俊一
-
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 10
-
- III. 研究成果の刊行物・別刷り 16

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括・分担研究報告書

異常蛋白蓄積による運動系神経変性疾患の治療法開発にむけた病態解明

（分担課題：運動ニューロン特異的プロテアソームサブユニットノックアウトマウスの作製および HtrA2 のヒト変性疾患への関与の解明）

主任研究者：高橋良輔 京都大学医学研究科・臨床神経学 教授

研究要旨 セリンプロテアーゼ HtrA2 はミトコンドリア膜間スペースに存在する。アポトーシスにおいてはミトコンドリアから細胞質に放出され重要な働きをすることが知られている。一方、パーキンソン病で HtrA2 の機能喪失変異が同定され、HtrA2 の機能喪失マウスは進行性パーキンソン病症状と神経変性を呈する。このことより、HtrA2 の正常機能は神経細胞の機能維持や生存に重要と考えられる。我々は、HtrA2 の機能喪失により基質タンパクがミトコンドリア膜間スペースに蓄積し、ミトコンドリア機能障害、神経変性が起こるとの仮説に基づき研究を行った。HtrA2 の基質候補タンパク質として POLG、MTHFD1L、UQCRCF1 を同定した。この内、POLG は HtrA2 機能喪失マウスの脳にて蓄積傾向を認めた。また HtrA2 機能喪失マウスではヘテロ、ホモのマウスで野生型と比較してオートファジーの活性化が認められた。HtrA2 機能喪失によって機能障害に陥ったミトコンドリアへの細胞の防御反応として、オートファジーによる機能障害ミトコンドリアの処理が推定される。

一方、ALS に関しては、運動ニューロン特異的に 26S プロテアソームをノックアウトされるマウスが ALS を発症するかどうかを検討することとした。本年度は 26S プロテアソームの Rpt3 サブユニットを Lox 配列で挟んだ floxed Rpt3 マウスを確立するところまで進捗した。

A. 研究目的

HtrA2 はセリンプロテアーゼでありミトコンドリアの膜間スペースに存在する。HtrA2 はアポトーシス刺激に伴ってミトコンドリアから細胞質に放出され、細胞質に存在するアポトーシス阻害タンパク質（IAP）の活性阻害及び切断を通じて細胞死を促進する。一方、アポトーシス刺激のない通常の状態における HtrA2 の機能についてはまだ不明のことが多い。我々は、HtrA2 の正常機能がミトコンドリア機能の維持に重要であり、HtrA2 の機能喪失がパーキンソン病の少なくとも一部においてその発病に関与していると考えている。その根拠として、以下の点があげられる。

①2007 年国外のグループから、家族歴の明らかでない PD 患者で HtrA2 遺伝子変異が報告されており、この変異により HtrA2 のプロテアーゼ活性は低下する（現在、PD 感受性遺伝子座の Park13 と命名されている）。

②HtrA2 機能喪失マウスは進行性のパーキンソン症状と神経細胞減少及びミトコンドリア異常を示す。

③HtrA2 の大腸菌ホモログはペリプラズムに存在し、高温ストレスにより不溶化したタンパクの分解を行い、HtrA2 の大腸菌ホモログの機能喪失変異により大腸菌は高温への耐性を失う。

HtrA2 のアポトーシス刺激のない状態での正

常機能を示すため、HtrA2 のミトコンドリアにおける基質タンパク質の検索を行った。また、これらの基質候補タンパク質が HtrA2 の機能喪失によって受ける影響を、HtrA2 機能喪失マウス脳サンプルを用いて検討した。また、HtrA2 機能喪失によりミトコンドリア機能障害が生じ、機能障害を生じたミトコンドリアは活性酸素を生じやすいなど細胞障害的であるが、HtrA2 変異を伴うパーキンソン病は高齢発症であること、HtrA2 機能喪失マウスは正常に生まれて生後 18 日頃より症状を示し始めることから、HtrA2 機能喪失によるミトコンドリア機能異常に対する何らかの対応機構とその破綻が示唆される。抗酸化システムの関与だけでなく、機能障害を生じたミトコンドリアそのものを処理する機構の関与も考えられる。細胞内でミトコンドリアのようなオルガネラの分解に働くのはオートファジーであり、オートファジーに着目した。

また ALS の発症仮説としてプロテアソーム阻害が注目されているが、その確証となる実験的証拠は得るため、運動ニューロン特異的プロテアソームサブユニット欠損マウスの作製にとりくんだ。

B. 研究方法

In vitro 転写/翻訳と cDNA ライブラリーを組み合わせた In vitro 発現クローニング法の手法により、HtrA2 の基質となりうる候補タンパク質をクローニングした。HtrA2 機能喪失マウス脳サンプルのウェスタンブロッティングを行い、それらの蓄積の有無の検討を行った。また、HtrA2 機能喪失マウス脳でのオートファジー活性の評価を行った。一方、プロテアソームサブユニット psmc4 の運動ニューロン特異的コンディショナルノックアウトマウス作製に関しては B6 マウスで 19S プロテアソームサブユニット

Rpt3/psmc4 の ATPase 活性部位を lox で挟んだ floxed mouse を作製し、これと運動ニューロンに特異的に Cre を発現する VChT-Cre マウスを掛け合わせて、運動ニューロン特異的にプロテアソームを欠損するマウスを作製し、運動ニューロン変性が生じるかどうか検討する。

C. 研究結果

In Vitro 発現クローニング法により、①POLG (ミトコンドリア DNA の複製に働くポリメラーゼ。この遺伝子の変異によりパーキンソン症状を呈する家系が報告されている)、②MTHFD1L (メチオン、チミジル酸、de novo プリン合成の基質となるテトラヒドロ葉酸の 1 炭素誘導体の相互変換に働く 3 つの酵素活性をもつ MTHFD1 のミトコンドリアに存在するアイソザイム。発現の増加は細胞の生存を促進する方向に働く)、③UQCRCFS1 (ミトコンドリア呼吸鎖のチトクローム bc1 複合体のサブユニット)、の 3 つのミトコンドリアタンパクを HtrA2 の基質候補タンパク質として同定した。HtrA2 機能喪失変異マウスである mnd2 マウスの脳サンプルを用い、これらの基質候補タンパク質のウェスタンブロッティングを行った。POLG、MTHFD1L については既存の市販抗体では感度が十分でなかったため、ペプチド抗体の作製を行った。UQCRCFS1 は、遺伝子型や脳組織の違いによらずほぼ一定の量を示した。POLG、MTHFD1L については、絶対量としては一定の傾向を示さなかった。HtrA2 機能喪失マウスではミトコンドリアそのものの量が減少することを考慮してミトコンドリアマーカートンパク量で補正を行うと、POLG に関しては complex I サブユニットでの補正において、皮質と線条体で野生型ホモ、ヘテロ、機能喪失変異ホモの順に量の増加を認めた。その増加量は、皮質で 10% (ヘテロで野生型に比し) と 30% (変異ホモで野生型に比し)、線条体で 70% (ヘテロで野生型に比し)

と120% (変異ホモで野生型に比し)と神経細胞減少の強い線条体でより明らかであった。オートファジー活性のマーカであるLC3-IIの量は、皮質、小脳では、野生型ホモ、ヘテロ(50%と60%)、機能喪失変異ホモ(250%と90%)の順に増加を示した。神経細胞減少の最も強くみられる線条体ではLC3-IIの絶対量は野生型でも皮質の約3倍、小脳の約2倍と高値であったが、遺伝子型での比較ではヘテロで80%増加、変異ホモで60%増加と、ヘテロよりも変異ホモがやや低値を示した。一方、運動ニューロン特異的プロテアソームサブユニットノックアウトマウスの作製に関しては、Rpt3のATPase活性部位であるエキソン7-11部位をlox配列で囲んだターゲティングベクターを用いてfloxed Rpt3マウスを作製した。Neocassetteの存在下ではRpt3のタンパク発現がみられなかったため、FLTによりこれら除去したところ、Rpt3のタンパク発現がみられるようになり、Floxed Rpt3のhomozygoteのマウスも生まれるようになった。

D. 考察

基質候補タンパク質として同定したタンパク質の絶対量は、HtrA2機能喪失変異マウス脳で必ずしも一定の増加傾向を示さなかったが、ミトコンドリアそのものの量がHtrA2機能喪失変異マウスで減少することを考慮する必要がある。HtrA2の機能喪失によりどのミトコンドリアタンパク質についても量の変化が生じている可能性は否定できないが、ミトコンドリア機能のマーカとしてよく使われるcomplex Iサブユニット量での補正において、神経細胞障害の強い線条体におけるPOLGの蓄積傾向が示唆されたことは、HtrA2機能喪失による基質タンパク質のミトコンドリアへの蓄積が神経細胞障害に関与している可能性を支持するものと考えられる。また、HtrA2機能喪

失によりミトコンドリアそのものが減少することについては、異常タンパクの蓄積傾向により機能障害に陥ったミトコンドリアは、活性酸素を生じるなどの細胞にとって有害なものとなりうることより、迅速に処理されていることが考えられる。オルガネラのような大きな細胞成分の分解にはオートファジーが働くことから、LC3-IIの定量を行ったところ、HtrA2機能喪失マウスで増加の傾向を認めた。神経細胞減少の最も著明にみられる線条体では変異型ホモはヘテロよりLC3-IIの量がやや少なかったが、オートファジーが細胞保護機構として働いていると考え、細胞減少が見られ始めている変異型ホモの線条体ではオートファジーによる細胞保護そのものの疲弊があり、また細胞減少により活発にオートファジーで対応できている残存細胞そのものが減少していることが影響していると考えれば矛盾はしない。以上の検討を行ったサンプル個体の数は少数であり、結果をより確かなものにするためにはサンプル数を増やす必要があると考える。

運動ニューロン特異的プロテアソームノックアウトマウスに関してはようやくfloxed mouseが確立できたので、これから運動ニューロン特異的にRpt3のノックアウトを行う。

E. 結論

HtrA2機能喪失による神経細胞変性の原因として、基質タンパクの蓄積によるミトコンドリア機能障害が推定された。神経変性に至るまでの生体の応答として、オートファジーの関与が示唆される。また運動ニューロン特異的26Sプロテアソームノックアウトを行う準備が整った。

F. 研究発表（以下は平成 17-19 年度発表文
を示す）

1. 論文発表

Wang, H., Imai, Y., Kataoka, A., **Takahashi, R.**
(2007) Cell type-specific upregulation of parkin in
response to ER stress. **Antioxid. Redox Signal.**
9:533-42.

Kitaguchi, H., Ihara, M., Saiki, H., **Takahashi, R.**,
Tomimoto, H. (2007) Capillary beds are decreased in
Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease.
Neurosci Lett. 417:128-31.

Igaki, T., Suzuki, Y., Tokushige, N., Aonuma, H.,
Takahashi, R., Miura, M. (2007) Evolution of
mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role
of HtrA2/Omi in *Drosophila*. **Biochem Biophys Res
Commun.** 356:993-7.

Iwasato, T., Katoh, H., Mishimaru, H., Ishikawa, Y.,
Inoue, H., Saito, Y. M., Ando, R., Iwama, M.,
Takahashi, R., Negishi, M., Itohara, S. (2007)
Rac-GAP a-Chimerin Regulates Motor-Circuit
Formation as a Key Mediator of EphrinB3/EphA4
Forward Signaling. **Cell** 130:742-753

Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Wang, H.Q.,
Masuda, M., Ikeda, T., Tsukita, K., Soda, M.,
Kodama, T., Fuwa, T., Honda, Y., Kaneko, S.,
Matsumoto, S., Wakamatsu, K., Ito, S., Miura, M.,
Aosaki, T., Itohara, S., **Takahashi, R.** (2007) Pael
receptor is involved dopamine metabolism in the
nigrostriatal system. **Neurosci. Res.**, 59:413-425.

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S.,
Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H.,
Takahashi, R., Misawa, H., Cleveland, D.W. (2008
Feb 3) Astrocytes as determinants of disease
progression in inherited amyotrophic
lateral sclerosis. **Nat. Neurosci.** 11(3):251-253

Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H.,
Kawashima, K., Endo, S. **Takahashi, R.** (2008)
L347P PINK1 mutant that fails to bind to
Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a
proteasome-dependant manner.
Neurosci. Res., in press

Ogawa, M., Mizuguchi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y.,
Imai, Y., **Takahashi, R.**, Mikoshina, K., Aruga, J.
(2008) Rines/RNF180, a novel RING finger
gene-encoded product, is a membrane-bound
ubiquitin ligase. **Gene Cells**, in press

(総説、著書)

Wang, H.Q., **Takahashi, R.** (2007) Expanding insights
on the involvement of endoplasmic reticulum stress

in Parkinson's disease. **Antioxid. Redox Signal.**
9:553-61.

Takahashi, R. (2007) The molecular pathway to
neurodegeneration in parkin-related parkinsonism. In
Protein Degradation, eds. Mayer, R.J., Ciechanover,
A.J. and Rechsteiner, M. Wiley-VCH, Weinheim,
pp195-210.

2. 学会発表

(国際学会招待講演)

Wang, H.Q., Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Iita, S.,
Nukina, N. & **Takahashi, R.**: PAEL-R Transgenic
mouse crossed with parkin deficient mouse displays
persistent endoplasmic reticulum stress, reduction in
mitochondrial complex I activity and selective
dopaminergic neuronal death. FASEB Summer
Research Conferences, 2007.7.28-8.2, Indian Wells,
U.S.A.

Takahashi, R.: The role of Pael-R in the life and death
in dopaminergic

Takahashi, R.: The molecular mechanisms
underlying parkin-related parkinsonism. Croucher
Advanced Study Institute - Innovative therapies of
movement disorders; basic and clinical sciences-
Hong Kong, China (2007.11.28)

(国内学会招待講演)

高橋良輔：パーキンソン病の分子機構。医薬薬科学特論III京都大学薬学部 (2007. 6. 6)

高橋良輔：家族性パーキンソン病を起こす原因蛋白は相互に作用しあうか？。第一回Movement Disorder Society, Japan学術集会、東京 (2007. 10. 5)

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズム。第397回難研セミナー、東京 (2007. 10. 25)

高橋良輔：パーキンソン病はどこまでわかったか？日本学術会議シンポジウム「脳と高齢者社会」、東京 (2007. 11. 26)

高橋良輔：品質管理病としてのパーキンソン病。臨床ストレス応答学会、福岡 (2007. 11. 30)

高橋良輔：家族性パーキンソン病と小胞体ストレス。BMB2007、横浜 (2007. 12. 13)

高橋良輔：「神経変性疾患のプロテオミクス」プロテオミクス講演会、岡崎 (2008. 1. 13)

高橋良輔：パーキンソン病の分子機構-最近の知見。第16回日本神経学会近畿地区生涯教育講演会、

京都 (2008. 2. 11)

高橋良輔「神経変性疾患のサイエンス —現状と今後の展望—」第120回日本神経学会東北北陸地方会ランチョンセミナー。名古屋 (2008. 3. 8.)

(研究会招待講演)

高橋良輔：パーキンソン病の分子メカニズム。第9回福岡神経内科疾患研究会、福岡 (2007. 4. 6)

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子機構。第2回青森神経内科懇話会、青森 (2007. 5. 26)

高橋良輔：遺伝子から探るパーキンソン病の分子機構。長崎ニューロサイエンス研究会、長崎 (2007. 6. 16)

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子機構。レキップ錠発売記念講演会、高松 (2007. 6. 28)

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子機構。第22回山陰老年期精神神経疾患研究会、島根 (2007. 7. 13)

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズム。第4回パーキンソン病学術講演会、札幌 (2007. 9. 1)

高橋良輔：パーキンソン病と小胞体ストレス。千里ライフサイエンスセミナー・ブレインサイエンス第20回、大阪 (2007. 9. 28)

高橋良輔：神経変性疾患の分子機構の解明。パーキンソン病Forum2007、広島 (2007. 11. 12)

高橋良輔：「パーキンソン病をめぐる最近の話題」第5回京都診療所神経内科専門医会、京都 (2007. 12. 2)

高橋良輔：パーキンソン病の分子機構へ最新の知見へ。北九州レキップ学術講演会、福岡 (2007. 12. 7)

高橋良輔：「高齢化社会と脳科学」神経変性疾患の分子メカニズムとナノ電気化学。第48回マテリアルズ・テーラリング研究会、京都 (2007. 12. 22)

高橋良輔：パーキンソン病の分子機構 —最新の知見。埼玉PD Forum、浦和 (2008. 1. 26)

高橋良輔：パーキンソン病の分子機構 —最新の知見。第9回東京都城南地区パーキンソン病治療研究会。東京 (2008. 2. 15)

高橋良輔：蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。第4階宮崎サイエンスキャンプ。宮崎 (2008. 2. 16)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

運動ニューロン特異的変異 SOD1 欠損マウスの作製と解析

研究代表者：三澤 日出巳 共立薬科大学・薬理学講座 教授

研究要旨 変異 SOD1 を導入した家族性 ALS モデルマウスにおいては、運動ニューロンに選択的な細胞障害が運動ニューロン自体の異常に起因するのか、または運動ニューロンの生存環境を含めた近傍のグリア細胞などとの相互環境に起因するのについては不明である。この点は、ALS の病態の理解および治療法の開発のために重要なポイントとなる。本年は運動ニューロン特異的遺伝子改変システムを用いて、運動ニューロンにおける変異 SOD1 の作用は、ALS の発症過程(onset)に参与するが病勢進行(progression)における寄与は少ないことを発見した。

A. 研究目的

ALS 全体の 5~10%程度を占める家族性 ALS の原因のうち、最も頻度が高いものはスーパーオキシド・ディスムターゼ 1(SOD1)の変異である。SOD1 は全身の臓器に偏在するが、ALS において顕著に障害されるのは運動ニューロンなどの神経細胞に限られており、この選択的な細胞障害性をもたらすメカニズムは不明である。近年、変異 SOD1 の作用は、運動ニューロン自体への作用 (cell-autonomous) だけでなく、運動ニューロンの周囲に存在するグリア細胞との相互作用に依存する (non-cell-autonomous) ことが示唆されているが、その詳細は明らかとなっていない。研究分担者は生後の運動ニューロン特異的に Cre を発現するマウス (VACHT-Cre マウス) の作出に成功し、運動ニューロンにターゲットを絞った病態モデルマウスの作製を試みている。この VACHT-Cre マウスと任意に変異 SOD1 の発現を消去できる新たな ALS モデルマウス (LoxSOD1-G37: 理研 BSI、山中宏二博士が作製) を掛け合わせて、全身での変異 SOD1 の発現は維持されるものの、運動ニューロンだけで変異 SOD1 の発現消去が誘導されるマウスを作製した。

B. 研究方法

生後の運動ニューロン特異的に Cre を発現するマウス (VACHT-Cre マウス) と loxP 配列を両側に挿入した全長ヒト G37R 変異 SOD1 遺伝子を導入したマウス (LoxSOD1-G37R) を掛け合わせて、運動ニューロン特異的にヒト変異 SOD1 を欠損するマウスを作製し、発症時期および罹病期間および生存期間を測定した。実験は動物実験委員会の承認のもとに、動物倫理に配慮しておこなった。

C. 研究結果

運動ニューロンにおいて変異 SOD1 の発現を選択的に消去したマウスでは、体重の増加停止を指標とした発症時期 (time of disease onset) が約 50 日間遅延した。またこれに伴い、生存時間が約 42 日間延長した。一方で、病勢進行については、10%の体重減少を指標とした初期の病勢進行および重度の筋麻痺を指標とした重症期の病勢進行のいずれにおいても効果は見られなかった。

D. 考察

今回の結果から、ALS モデルマウスにおいて、運

動ニューロンで発現する変異 SOD1 の作用は、病気の発症過程に関与するが、病勢進行に対する関与は限定的であることが判明した。一方で近年、ALS の病態形成に運動ニューロンばかりではなく周囲のグリア細胞の関与も重要であるとの知見が報告されている。山中らは *LoxSOD1-G37R* マウスを用いた実験から、アストロサイトやマイクログリアが ALS の病勢進行に重要な役割をもつことを直接的に証明した。ALS の大部分を占める孤発性 ALS では、病気の原因は不明であり、発症後に診断・治療が開始されることになるため、病気の進行を遅らせることが主要な治療戦略になると考えられる。この点で、運動ニューロンに比べて薬物や外来遺伝子などの導入が容易なグリア細胞を標的とする治療戦略の開発に期待が高まっている。さらに、幹細胞移植などの新たな治療法を開発する上でも、極めて長い軸索をもち複雑な神経ネットワークの上に成り立つ運動ニューロンよりも、グリア細胞の機能を正常化する方策を考案することが、治療法開発への近道になると考えられる。

E. 結論

ALS の主要病変部位である運動ニューロンは、変異 SOD1 の作用点として ALS 発症プロセスには関与するが、その後の病勢進行プロセスへの関与は限定的であることが判明した。この結果は、グリア細胞を ALS 治療のターゲットとする戦略の論理的根拠となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Misawa, H., Takahashi, R. and Cleveland, D.W. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited ALS. *Nature Neurosci.*, 11, 251-253 (2008)

Olsen, O., Funke, L., Long, J., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Moore, K.A., Misawa, H., Welling, P.A., Burlingame, A.L., Zhang, M. and Brecht, D.S. Renal defects associated with improper polarization of CRB and DLG polarity complexes in MALS-3 knockout mice. *J. Cell Biol.*, 179, 151-164 (2007)

Fujii, X. Y., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kasahara, T., Grando, S.A. and Kawashima K. Enhanced serum antigen-specific IgG(1) and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. *J. Neuroimmunol.*, 189, 69-74 (2007)

Fujii, X. Y., Tashiro, A., Arimoto, K., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Fujii, T., Matsui, M., Kasahara, T. and Kawashima, K. Diminished antigen-specific IgG(1) and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M(1) and M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J. Neuroimmunol.*, 188, 80-85 (2007)

Kawashima, K., Yoshikawa, K., Fujii, X. Y., Moriwaki, Y. and Misawa, H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci.*, 80, 2314-2319 (2007)

Moriwaki, Y., Yoshikawa, K., Fukuda, H., Fujii, X. Y., Misawa, H., and Kawashima, K. Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Life Sci.*, 80, 2365-2368 (2007)

Kawashima, K., Misawa, H., Moriwaki, Y., Fujii, T., Horiuchi, Y., Yamada, T., Imanaka, T. and Kamekura, M. Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci.*, 80, 2206-2209 (2007)

2. 学会発表

国際学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

HtrA2 の基質の分子クローニング

分担研究者 鈴木泰行 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部 第一研究室長

研究要旨

線条体黒質変性症発症メカニズム解明のため、線条体黒質変性症と HtrA2 との関連を明らかにすべく、HtrA2 の基質タンパク質のスクリーニングを行い、3 種類のミトコンドリアタンパク質を基質候補として同定した。それぞれの cDNA 全長をクローニングするとともに、抗体を作製した。今後さらなる解析が必要である。

A. 研究目的

線条体黒質変性症は家族性遺伝性のない病因不明の神経変性疾患である。我々は以前、HtrA2 というミトコンドリア膜間腔に局在するプロテアーゼがアポトーシス刺激に応じて細胞質に放出されて細胞死を誘導することを報告した。その後、他グループから、HtrA2 の機能欠損型変異により、線条体ニューロンが変性することが報告された。本研究では、線条体黒質変性症発症メカニズム解明のため、線条体黒質変性症と HtrA2 との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HtrA2 基質タンパク質全長のクローニングと抗体作製

HtrA2 基質タンパク質のスクリーニングの結果得られたクローンの中から、ミトコンドリアに局在する可能性がある 3 クローンを選択し、全長 cDNA をクローニングし、抗体を作製した。

C. 研究結果

ミトコンドリアに局在する可能性がある 3 種類の HtrA2 基質候補遺伝子の全長 cDNA をクローニングするとともに、抗体を作製した。

D. 考察

本研究において同定された HtrA2 基質候補タンパク質は、線条体黒質変性症と類似の臨

床症状を呈するパーキンソン病との関係が示唆されている分子を含むなど興味深い結果が得られた。今後、全長 cDNA および作製した抗体を用いて、線条体黒質変性症と HtrA2 との関連について検討していく予定である。

E. 結論

HtrA2 の基質タンパク質のスクリーニングを行い、3 種類のミトコンドリアタンパク質を基質候補として同定し、抗体を作製した。線条体黒質変性症発症メカニズム解明につながる興味深い可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Igaki T., Suzuki Y., Tokushige N., Aonuma H., Takahashi R., and Miura M. Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in *Drosophila* Biochem. Biophys. Res. Commun. (2007) 356, 993-997

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（分担）研究報告書

メダカによる家族性パーキンソン病モデルの作製

分担研究者 武田 俊一 京都大学医学研究科

研究要旨

マウスよりも短期間で子孫が得られるメダカを使い、ヒトの神経性疾患のモデルを作製し、家族性パーキンソン病の原因を研究する。

武田 俊一・京都大学・教授

A.研究目的

大量の子孫が短期間に得られるメダカは、マウスの弱点を補う、遺伝学的解析のモデル生物である。メダカを使ってヒトの神経変性疾患のモデルを作製する。

B.研究方法

我々は、世界で唯一、遺伝子破壊メダカを作製できる。この優位性を生かし、家族性発症のパーキンソンモデルを作る。

（倫理名への配慮）

不要である。

C.研究結果

家族性パーキンソン病の原因遺伝子である Parkin、Pink1、ATP13A2 のそれぞれの遺伝子を破壊したメダカを取った。Parkin 遺伝子破壊メダカは、我々の飼育施設にて神経内科（高橋教授）の研究員が現在、解析中である。他のメダカは交配中である。

D.考察

遺伝子破壊メダカの作製は、『飽和変異→目的の遺伝子のヌル欠損メダカを数千匹の飽和変異メ

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

ダカのなかから探す』という手法による。この手法は、ランダムに変異を導入して遺伝子破壊するので、標的組み換えによる遺伝子破壊のように、必ず遺伝子破壊ができるわけではない。実際に、HtrA2/omi の完全遺伝子破壊は、作製できなかった。

E.結論

パーキンソン病の病態解析については、未だ、結論が得られていない。

G.研究発表

1.論文発表
なし

2.学会発表
なし

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（高橋良輔）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takahashi, R.	The molecular pathway to neurodegeneration in parkin-related parkinsonism.	Mayer, R.J., Ciechanover, A.J., Rechsteiner, M.	In Protein Degradation, eds.	Wiley-VCH, Weinheim	Germany	2007	195-210

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wang, H.Q., Takahashi, R.	Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease.	Antioxid. Redox Signal.	9(5)	553-61.	2007
Kitaguchi, H., Ihara, M., Saiki, H., Takahashi, R., Tomimoto, H.	Capillary beds are decreased in Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease.	Neurosci Lett	417(2)	128-31.	2007
Igaki, T., Suzuki, Y., Tokushige, N., Aonuma, H., Takahashi, R., Miura, M.	Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in Drosophila.	Biochem Biophys Res Commun	356(4)	993-7.	2007
Iwasato, T., Kato, H., Mishimaru, H., Ishikawa, Y., Inoue, H., Saito, Y. M., Ando, R., Iwama, M., Takahashi, R., Negishi, M., Ito, S.	Rac-GAP α -Chimerin Regulates Motor-Circuit Formation as a Key Mediator of EphrinB3/EphA4 Forward Signaling.	Cell	130(4)	742-53	2007
Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Wang, H.Q., Masuda, M., Ikeda, T., Tsukita, K., Soda, M., Kodama, T., Fuwa, T., Honda, Y., Kaneko, S., Matsumoto, S., Wakamatsu, K., Ito, S., Miura, M., Aosaki, T., Ito, S., Takahashi, R.	Pael receptor is involved dopamine metabolism in the nigrostriatal system.	Neurosci Res	59(4)	413-25.	2007
竹内啓喜 高橋良輔	パーキンソン病の要因	日本老年医学会雑誌	44(4)	415-421	2007

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. Cleveland, D.W.	Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis.	Nat Neurosci	11(3)	251-253	2008
Ogawa, M., Mizuguchi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y., Imai, Y., <u>Takahashi, R.</u> , Mikoshina, K., Aruga, J.	Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase.	Gene Cells	13(4)	397-409	2008
Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S. <u>Takahashi, R.</u>	L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner.	Neurosci Res			in press

研究成果の刊行に関する一覧表（三澤日出巳）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
三澤日出巳 高橋良輔	コリン作動性ニューロンと認知障害：新たな創薬ターゲットとしての高親和性コリントランスポーター		神経変性疾患のサイエンス	南山堂	東京	2007	170-178

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawashima, K., Misawa, H., Moriwaki, Y., Fujii, T., Horiuchi, Y., Yamada, T., Imanaka, T. Kamekura, M.	Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems.	Life Sci	80(24-25)	2206-2209	2007
Moriwaki, Y., Yoshikawa, K., Fukuda, H., Fujii, X. Y., Misawa, H., Kawashima, K.	Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands.	Life Sci	80(24-25)	2365-2368	2007
Kawashima, K., Yoshikawa, K., Fujii, X. Y., Moriwaki, Y. Misawa, H.	Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells.	Life Sci	80(24-25)	2314-2319	2007
Fujii, X. Y., Tashiro, A., Arimoto, K., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Fujii, T., Matsui, M., Kasahara, T. Kawashima, K.	Diminished antigen-specific IgG(1) and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M(1) and M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice.	J Neuroimmunol	188(1-2)	80-85	2007
Fujii, X. Y., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kasahara, T., Grando, S.A. Kawashima K. J.	Enhanced serum antigen-specific IgG(1) and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor a7 subunit gene knockout mice.	J Neuroimmunol	189(1-2)	69-74	2007
Olsen, O., Funke, L., Long, J., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Moore, K.A., Misawa, H., Welling, P.A., Burlingame, A.L., Zhang, M., Bredt, D.S.	Renal defects associated with improper polarization of CRB and DLG polarity complexes in MALS-3 knockout mice.	J Cell Biol	179(1)	151-164	2007

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Misawa, H., Takahashi, R., Cleveland, D.W.	Astrocytes as determinants of disease progression in inherited ALS.	Nature Neurosci	11(3)	251-253	2008
---	---	--------------------	-------	---------	------

研究成果の刊行に関する一覧表（鈴木泰行）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Igaki, T., Suzuki, Y., Tokushige, N., Aonuma, H., Takahashi, R., Miura, M.	Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in Drosophila	Biochem Biophys Res Commun	356(4)	993-997	2007

研究成果の刊行物・別刷り

9

The Molecular Pathway to Neurodegeneration in Parkin-Related Parkinsonism

Ryosuke Takahashi

9.1

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative disease of the motor system amongst elderly people. The prevalence of PD is approximately 1% of people by the age of 70 years [1]. PD is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra accompanied by the formation of Lewy bodies. Lewy bodies are intra-neuronal fibrillary inclusions mainly composed of α -synuclein [2]. They are regarded as the hallmark of idiopathic PD. Loss of neurons within the pars compacta of the substantia nigra causes progressive motor disturbances, classically tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability. To date, there is no known effective therapy to prevent or retard neurodegeneration as a result of PD [1, 3].

Most cases of PD develop sporadically, however, fewer than 10% of cases are familial and presumably inherited [4]. Autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) accounts for approximately 50% of cases of early-onset familial PD in affected European families [5]. It is characterized by several unique features, including young age of onset (usually under 40 years of age), dystonia, and a marked response to dopamine. The neuropathological hallmark of AR-JP is selective degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra zona compacta, similar to that observed in the idiopathic form of PD. However, AR-JP is not usually associated with Lewy bodies [6, 7].

Mutations in the parkin gene are responsible for AR-JP [8]. In this chapter, the role of parkin in the ubiquitin-proteasome system will be focused and discussed in light of recent findings.

9.2

Parkin is an E3 Ubiquitin Ligase

9.2.1

Parkin and the Ubiquitin-Proteasome System

Parkin is a 465-amino acid protein characterized by a ubiquitin-like domain at its NH₂-terminus, as well as two RING-finger motifs and an IBR (in-between RING fingers) motif at its COOH terminus (RING-IBR-RING or RBR domain) [9]. The RING domain has been shown to be a feature of ubiquitin ligase involved in the ubiquitination reaction [10]. Polyubiquitination involves a sequence of reactions performed by ubiquitin-activating (E1), ubiquitin-conjugating (E2) and ubiquitin ligating (E3) enzymes. E3 interacts with specific substrate(s) and facilitates the formation of covalent bonds between the COOH terminus of ubiquitin and ϵ -lysine, either on a target protein or on the last ubiquitin of a protein-bound polyubiquitin chain in concert with its partner E2s. Yeast protein UFD2 is a multi-ubiquitin chain elongation factor, also called E4, required for efficient multi-ubiquitination of a substrate [11]. Polyubiquitin chains are thought to be potent targeting signals for the degradation of proteins within 26S proteasomes.

Several groups have shown that wild-type parkin is an E3 ubiquitin ligase [12–14] (Figure 9.1). Parkin ubiquitinates substrate proteins or itself in concert with E2s, such as UbcH7, UbcH8, Ubc6 and Ubc7 [12–14]. Moreover, several AR-JP-related missense mutations have been identified in the ubiquitin-like

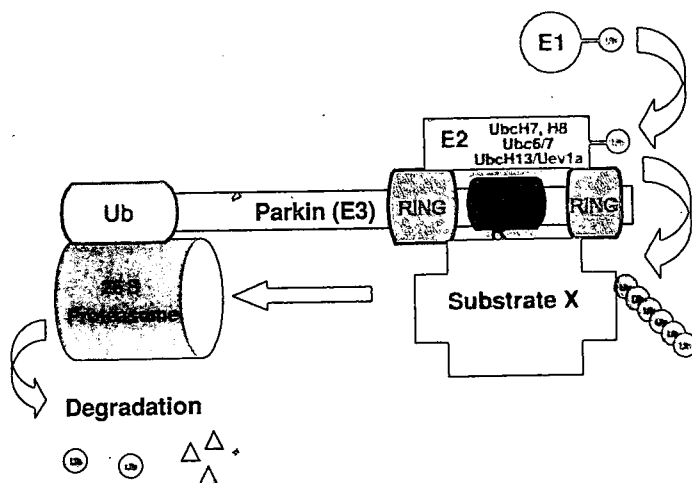


Fig. 9.1. Function of parkin in the ubiquitin proteasomal pathway. Parkin is an E3 ubiquitin ligase that recognizes substrate X and promotes ubiquitination in adjunct with two other ubiquitination enzymes, E1 and E2. Polyubiquitinated substrate X is recognized and degraded by the 26S proteasome. The

N-terminal ubiquitin-like domain and the C-terminal RING-IBR-RING domain of parkin serve as recruitment domains for 26S proteasome and E2 enzymes, respectively. Some of the known substrates of parkin associate with its RING-IBR-RING domain.