

表2 家族性パーキンソン病

疾患	遺伝形式	遺伝子座	遺伝子	表現型※	年齢	L-DOPA の効果	レビー小体
PARK1	AD	4q21	α -synuclein	PD + dementia	broad	+	+
PARK2	AR	6q25-27	parkin	PD + dystonia	~ 40代	+	-
PARK3	AD	2p13	?	PD	60代	+	+
PARK4	AD	4q21	α -synuclein	PD + dementia	30代	+	+
PARK5	AD	4p14	UCH-L1	PD	50代	+	+ ?
PARK6	AR	1p35	PINK-1	PD + dystonia	30代	+	- ?
PARK7	AR	1p36	DJ-1	PD + dystonia	30代	+	?
PARK8	AD	12q12	LRRK2	PD	broad	+	+ or -
PARK9	AR	1p36	ATP13A2	PD + 注視制限	10代	+	?
PARK10	AR	1p32	?	PD	60代	+ ?	?
PARK11	AD	2q36-37	?	PD	60代	?	?
PARK12	X-linked	Xq21-25	?	PD ?	60代	?	?
PARK13	AD	2p12	Omi/HtrA2	PD	50代	+	+ ?

PD : sporadic PD の表現型 ※特徴的所見

落がみられないか、みられてもごく軽度であり、表現型も軽度な異常にとどまっている³⁸⁾。これは齧歯類以上のほ乳類では α -synuclein凝集以外の要素も重要であることを示唆しているのかもしれない。一方、同じく α -synuclein遺伝子の変異を原因とするが、正常型遺伝子の三重複がPARK4である。PARK4は孤発性PD症状に加えて早期から認知症や自律神経障害を伴い、L-ドーパが有効であるが孤発性と比べて若年で発症(30歳代)し、進行も早い。病理像ではレビー小体が黒質や青斑核のみならず大脳皮質にも広範に見られ、海馬やマイネルト基底核で空胞形成がみられる。しかし、神経原線維変化や老人斑は正常レベルにとどまる³⁹⁾。また、 α -synuclein二重複の家系も報告されているが、孤発性PDと比べて早期に発症するものの臨床症状はあまり変化なく認知症の合併も少ない⁴⁰⁾。これらの所見より、PD発症に α -synucleinは大変重要な役割を果たしていることが明らかになった。

PARK5はUCH-L1 (Ubiquitin C-terminal hydrolase) 遺伝子の変異によるもので、50歳前後で発症し、臨床症状は孤発性PDと明らかな違いはなく、L-ドーパが有効である。これまでのところドイツの一家系のみで報告で、93番目のイソロイシンのメチオニンへの変異(I93M)を認めている⁴¹⁾。UCH-L1は脱ユビキチン化酵素の一種で、他の分子と結合したユビキチンのC末端を切断してユビキチンを活性化し、ユビキチンを供給している³⁹⁾ことからI93Mの変異でユビキチン供給が低下する結果、異常蛋白が蓄積し、パーキンソン症状をおこすものと考えられている。これまでに剖検例がなくレビー小体の有無は不明であるが、トランスジェニックマウスでは中脳黒質でUCH-L1の凝集がみられている⁴²⁾。

一方UCH-L1二量体では α -synucleinに対するユビキチンリガーゼとして働き、ポリユビキチン化を行う⁴³⁾。このときのユビキチン鎖は26Sプロテアソームでの分解のシグナルとなる48番目のリジン(K48)ではなく63番目のリジン(K63)を介して形成される。その結果 α -synucleinが蓄積すると考えられているが、I93M変異ではユビキチンリガーゼ活性が低下しており、必ずしも発症危険度と相関しない⁴⁴⁾。このプロテアソームでの分解シグナルとならないユビキチン化の意義を明らかにすることが、病因解明の上での大きな鍵であると思われる。

PARK8はLRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase2) 遺伝子の変異による⁴⁵⁾。孤発例と思われていた症例でも変異が見いだされており、浸透率も様々で家族性PDでは最も多いものと思われる⁴⁶⁾。臨床症状はほぼ孤発性PDと同じであり、発症年齢も多くは50~60歳代である。L-ドーパが有効で、臨床経過も他の家族性PDと比べて比較的良好である。LRRK2は2527アミノ酸からなる分子量286kDaの巨大分子で、細胞質内やミトコンドリアに存在し、種々のドメインを持ち複数の作用を持つことが予想されている⁴⁷⁾。これまで報告された変異は、MAPキナーゼ-キナーゼ-キナーゼドメイン(MAPKKK)中のものが多く(G2019S, I2020T)⁴⁷⁾。G2019S変異ではキナーゼ活性の亢進が報告されている⁴⁸⁾。このため何らかのタンパク質の異常なリン酸化が発症につながっていると思われる。本疾患は病理所見が多彩で、MAPKKKドメインの変異でもG2019S変異ではレビー小体が見られるが⁴⁹⁾日本の相模原家系のI2020T変異ではみられないことが多く⁵⁰⁾、病理像を修飾する他因子の関与も疑われる。

B. 常染色体劣性遺伝

PARK2はparkinを原因遺伝子とする若年性パーキンソンニズムである。本邦で報告され⁵¹⁾、かつ原因遺伝子の特定⁵²⁾も行われた。変異は種々のエクソンの欠失や⁵³⁾点変異が報告されている⁵⁴⁾が、いずれにせよこれらの変異によりユビキチンリガーゼとしての活性が低下するloss-of-function変異である。孤発性PDと比較して、臨床症状においては、1)40歳以下での発症が大半である、2)ジストニアを呈する、3)症状に日内変動を認める、4)睡眠により改善する、5)L-ドーパが有効であるが早期よりジスキネジアを生じる、6)病理所見ではレビー小体を認めない、といった差異がある。また、parkinがS-ニトロシル化を受けて活性が低下することが報告されており、孤発性PDの発症にも関与していると思われる⁵⁵⁾⁵⁶⁾。このことからparkinの基質蓄積が発症原因のひとつであるとの仮説の元、さまざまなタンパク質の検索が行われた。中でもPael受容体(Parkin-associated endothelin receptor-like receptor)は⁵⁷⁾、正常な状態でも正しい折りたたみ構造をとることができないものが多く産生されるため(midfoldingしやすい)、parkinによるユビキチン化が低下すると蓄積し、小胞体ストレスを増大させる⁵⁸⁾。またPael受容体はレビー小体にも存在し、PD発症に大きな役割を果たしていると思われる⁵⁹⁾。

PARK6はPINK1 (PTEN-Induced Kinase1) 遺伝子の変異による⁶⁰⁾。30~40代で発症し、臨床症状は孤発性PDと明らかな違いはなくL-ドーパが有効な症例が多いが、より若年での発症においてジスキネジアが多い⁶¹⁾。PINK1はミトコンドリアに局在しミトコンドリアターゲットモチーフとセリン/スレオニンキナーゼドメインをもち、前者によりミトコンドリア内に移動し、後者よりミトコンドリアにおいて細胞保護的な役割を果たしていると考えられている⁶⁰⁾。これまでに報告されている変異はセリン/スレオニンキナーゼドメインに集中しており^{60)62)~64)}、キナーゼ活性が低下する。このためPINK1のキナーゼ活性が発症に重要な役割を果たしていると思われるが、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iのサブユニットのいくつかがリン酸化をされていることが報告されており^{65)~68)}、両者の関連がうかがわれる⁴⁶⁾。PINK1はレビー小体の構成成分であるが、本例でその存在が報告されているのは現在のところヘテロ変異のみである⁶⁹⁾⁷⁰⁾。

PARK7はDJ-1の変異により発症する⁷¹⁾。20~40代で発症し、孤発性PD症状に加え下肢のジストニアや眼瞼攣縮、精神症状(認知症症状、不安症、妄想など)を呈し⁷²⁾、L-ドーパが有効である。一部の症例でジスキネジアもみられる⁷¹⁾。DJ-1は抗酸化作用⁷³⁾、プロテアーゼ

活性、転写調節因子と種々の働きをもち⁷⁴⁾、種々の変異が報告されているが、変異により抗酸化作用または酸化ストレスのセンサーとしての働きが失われ⁷⁵⁾、酸化ストレスが増大してドーパミン神経細胞死がおこると考えられている。またL166P変異でDJ-1蛋白の折りたたみ不全が生じ、すみやかにユビキチン-プロテアソーム系で分解されること⁷⁶⁾、parkin基質であるPael受容体による小胞体ストレスが野生型DJ-1にて軽減される⁷⁷⁾ことも合わせると、酸化ストレス以外に想定されるPDの原因への関与も考えられる。DJ-1はレビー小体の構成成分であるが、本例においてレビー小体が存在するかどうかはわかっていない。

PARK9⁷⁸⁾⁷⁹⁾はATP13A2遺伝子の変異を原因とする、Kufor-Rakeb病として知られる。10代で発症し孤発性PDの症状に加え、錐体路障害、上方注視制限、認知症症状を合併する。L-ドーパは有効であるが、進行は早い。ATP13A2はP型ATPase(plasma membraneに存在するATPase)の一種で、正常型はリソソームの膜に発現するが、この疾患で見られる変異型は機能低下を来とし、小胞体に集まり、プロテアソームによる分解を受ける。小胞体ストレス増大でのプロテアソーム機能不全、あるいはリソソームでのタンパク分解(オートファジー)低下が神経細胞死の原因となるかどうかは不明であるが、オートファジー不全がPDの発症に関与することを示唆するもので、興味深い知見である。

C. 遺伝子多型

これまでに種々の遺伝子多型とPDの関連が報告されている。代表的なものとしては遺伝子多型にOmi/HtrA2遺伝子⁸⁰⁾がある。これはミトコンドリアのプロテアーゼであり、後に変異が発見された(PARK13)⁸⁰⁾。変異Omi/HtrA2(399番目のグリシンがセリン:G399S)ではプロテアーゼ活性が低下しており、ミトコンドリア機能不全がうかがわれる⁸⁰⁾。また、 α -synucleinでもイントロンの遺伝子多型と孤発性PDとの関連が報告されており⁸¹⁾、splicingの段階での変化も関連しているのかも知れない。

まとめ

これまでに述べたPDの原因と考えられている環境因子、遺伝的要因についてまとめた(図1)。即ちミトコンドリアにおける電子伝達系や各種酵素やタンパク質の機能不全で酸化的ストレスが増大し、ドーパミン神経細胞のアポトーシスを亢進する(ミトコンドリア仮説)。また異常タンパク質が、ユビキチン-プロテアソーム系が何らかの理由(異常蛋白が構造上分解困難、正常な分

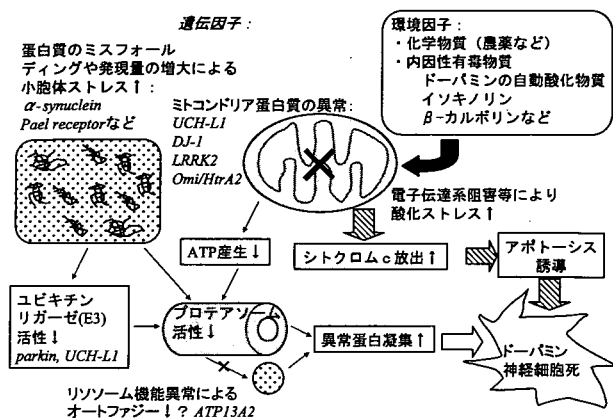


図1 パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死の仮説

解能力を超えて産生される、ミトコンドリア機能低下でATP供給が低下する)で傷害されることで蓄積し細胞毒性を持つ(ユビキチン-プロテアソーム仮説)ことが主な原因と考えられている。また一部、代償的にリソソームで行われるオートファジーの機能不全も関係しているかもしれない。今後、これらの知見をさらに発展させ、根本原因に迫る疾患の予防法や治療法の開発をすすめていくことが期待される。

文 献

- 1) Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB: Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002; 4(5): 487-502.
- 2) Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM: Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 2005; 40 (8-9): 622-633.
- 3) Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS: Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 2001; 86 (2): 122-127.
- 4) Uversky VN: Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 2004; 318 (1): 225-241.
- 5) Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG: Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (11): 1473-1485.
- 6) Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA: The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277 (3): 1641-1644.
- 7) Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT: Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 12: 1301-1306.
- 8) Watanabe Y, Himeda T, Araki T: Mechanisms of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Med Sci Monit* 2005; 11 (1): RA17-23.
- 9) Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al: Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribu-

tion to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 65 (2): 135-172.

- 10) Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Ota M, et al: Dopamine-derived endogenous 1 (R), 2 (N)-dimethyl-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res* 1996; 709 (2): 285-295.
- 11) Matsubara K, Kobayashi S, Kobayashi Y, Yamashita K, Koide H, Kimura K, et al: beta-Carbolinium cations, endogenous MPP+ analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1995; 45 (12): 2240-2245.
- 12) Matsubara K, Gonda T, Sawada H, Uezono T, Kobayashi Y, Akaike A: Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem* 1998; 70 (2): 727-735.
- 13) McMillan G: Is electric arc welding linked to manganese or Parkinson's disease? *Toxicol Rev* 2005; 24 (4): 237-257.
- 14) McNaught KS, Olanow CW: Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 60 (2): 243-247.
- 15) Beal F, Lang A: The proteasomal inhibition model of Parkinson's disease: "Boon or bust"? *Ann Neurol* 2006; 60 (2): 158-161.
- 16) Stephen L Hauser: Proteasome inhibitors revisited. *Ann Neurol* 2006; 60 (2): A10.
- 17) Inden M, Kondo J, Kitamura Y, Takata K, Nishimura K, Taniguchi T, et al: Proteasome inhibitors protect against degeneration of nigral dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *J Pharmacol Sci* 2005; 97 (2): 203-211.
- 18) Wirdefeldt K, Gatz M, Pawitan Y, Pedersen NL: Risk and protective factors for Parkinson's disease: a study in Swedish twins. *Ann Neurol* 2005; 57 (1): 27-33.
- 19) Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, Kawachi I, Colditz GA, Willett Wc, et al: Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol* 2001; 50 (1): 56-63.
- 20) Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW: Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology* 1995; 45: 1041-1051.
- 21) Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Akaike A: alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block Aβ amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* 2001; 276 (17): 13541-13546.
- 22) Liu Q, Zhang J, Zhu H, Qin C, Chen Q, Zhao B: Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *FASEB J* 2007; 21 (1): 61-73.
- 23) Xie YX, Bezaed E, Zhao BL: Investigating the receptor-independent neuroprotective mechanisms of nicotine in mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280 (37): 32405-32412.
- 24) Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Nakata Y, et al: Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 2006; 83 (8): 1461-1470.
- 25) Kalda A, Yu L, Oztas E, Chen JF: Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease.
- 26) Ton TG, Heckbert SR, Longstreth WT Jr, Rossing MA, Kukull WA, Checkoway H: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21 (7): 964-969.

- 27) 長谷川一子 : その他の遺伝性パーキンソン病家系と遺伝子. 脳の科学 第26巻増刊号 (パーキンソン病のすべて), 星和書店, 東京, 2004, p194-205.
- 28) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Nussbaum RL, et al: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276 (5321): 2045-2047.
- 29) Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Riess O, et al: Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18 (2): 106-108.
- 30) Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, de Yébenes JG, et al: The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55 (2): 164-173.
- 31) Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC: Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 2005; 123 (3): 383-396.
- 32) Adamczyk A, Kazmierczak A, Strosznajder JB: Alpha-synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochem Int* 2006; 49 (4): 407-412.
- 33) Hasegawa T, Matsuzaki-Kobayashi M, Takeda A, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, et al: Alpha-synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2006; 580 (8): 2147-2152.
- 34) Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388 (6645): 839-840.
- 35) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ, et al: Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; 293 (5528): 263-269.
- 36) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Iwatsubo T, et al: Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; 4 (2): 160-164.
- 37) Feany MB, Bender WW: A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404 (6776): 394-398.
- 38) Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF: Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2005; 2 (3): 495-503.
- 39) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Gwinn-Hardy K, et al: Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302 (5646): 841.
- 40) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Mizuno Y, Hattori N, et al: Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59 (2): 298-309.
- 41) Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Polymeropoulos MH: The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395 (6701): 451-452.
- 42) Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Mizuno Y, Noda M, Wada K, et al: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int* 2007; 50 (1): 119-129.
- 43) Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr: The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111 (2): 209-218.
- 44) 和田圭司 : PARK5 (UCH-L1). 臨床神経科学, 第25巻1号, 中外医学社, 東京, 2007, p75-76.
- 45) Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, Singleton AB, et al: Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44 (4): 595-600.
- 46) Anthony HV Schapira: Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66: S10-S23.
- 47) Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA: LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 2006; 29 (5): 286-293.
- 48) West AB, Moore DJ, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM, et al: Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *PNAS* 2005; 102 (46): 16842-16847.
- 49) Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, et al: Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann Neurol* 2006; 59 (2): 315-322.
- 50) 長谷川一子 : PARK8 (LRRK2). 臨床神経科学, 第25巻1号, 中外医学社, 東京, 2007, p81.
- 51) Yamamura Y, Sobue I, Ando K, Iida M, Yanagi T: Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology* 1973; 23 (3): 239-244.
- 52) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N, et al: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 (6676): 605-608.
- 53) Hattori N, Kitada T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y, et al: Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998; 44 (6): 935-941.
- 54) Hedrich K, Eskelson C, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C, Kramer P, et al: Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004; 19 (10): 1146-1157.
- 55) Chung KK, Thomas B, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM, et al: S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 2004; 304 (5675): 1328-1331.
- 56) Yao D, Gu Z, Nakamura T, Masliah E, Uehara T, Lipton SA, et al: Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease. S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *PNAS* 2004; 101 (29): 10810-10814.
- 57) Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R: An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001; 105 (7): 891-902.
- 58) Takahashi R, Imai Y: Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250 Suppl3 : III25-29.
- 59) Murakami T, Shoji M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, et al: Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55 (3): 439-442.
- 60) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW, et al: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304 (5674): 1158-1160.
- 61) Bonifati V, Rohe CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Oostra BA, et al: Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005; 65 (1): 87-95.
- 62) Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Bentivoglio AR, et al: PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*

- 2004; 56 (3): 336–341.
- 63) Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Mizuno Y, Hattori N, et al: Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56 (3): 424–427.
 - 64) Rohe CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V: Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56 (3): 427–431.
 - 65) Schulenberg B, Aggeler R, Beechem JM, Capaldi RA, Patton WF: Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* 2003; 278 (29): 27251–27255.
 - 66) Chen R, Fearnley IM, Peak-Chew SY, Walker JE: The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279 (25): 26036–26045.
 - 67) Murray J, Marusich MF, Capaldi RA, Aggeler R: Focused proteomics: monoclonal antibody-based isolation of the oxidative phosphorylation machinery and detection of phosphoproteins using a fluorescent phosphoprotein gel stain. *Electrophoresis* 2004; 25 (15): 2520–2525.
 - 68) Schulenberg B, Goodman TN, Aggeler R, Capaldi RA, Patton WF: Characterization of dynamic and steady-state protein phosphorylation using a fluorescent phosphoprotein gel stain and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; 25 (15): 2526–2532.
 - 69) Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Revesz T, et al: PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; 129 (Pt 7): 1720–1731.
 - 70) Murakami T, Moriwaki Y, Harigaya Y, Shoji M, Takahashi R, Abe K: PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in alpha-synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; Epub ahead of print.
 - 71) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Heutink P, et al: Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299 (5604): 256–259.
 - 72) Dekker M, Bonifati V, van Swieten J, Leenders N, Galjaard RJ, van Duijn C, et al: Clinical features and neuroimaging of PARK7-linked parkinsonism. *Mov Disord* 2003; 18 (7): 751–757.
 - 73) Meulener MC, Xu K, Thomson L, Ischiropoulos H, Bonini NM: Mutational analysis of DJ-1 in *Drosophila* implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *PNAS* 2006; 103 (33): 12517–12522.
 - 74) Shinbo Y, Niki T, Maita C, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H, et al: Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* 2006; 13 (1): 96–108.
 - 75) Takahashi-Niki K, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H: Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320 (2): 389–397.
 - 76) Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q, Chin LS, et al: Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* 2004; 279 (9): 8506–8515.
 - 77) Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H: Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312 (4): 1342–1348.
 - 78) Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Kubisch C, et al: Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38 (10): 1184–1191.
 - 79) Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ: Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 2005; 20 (10): 1264–1271.
 - 80) Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Kruger R: Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (15): 2099–2111.
 - 81) El-Agnaf OM, Curran MD, Wallace A, Middleton D, Murgatroyd C, Jaros E, et al: Mutation screening in exons 3 and 4 of alpha-synuclein in sporadic Parkinson's and sporadic and familial dementia with Lewy bodies cases. *Neuroreport* 1998; 9 (17): 3925–3927.

Pathogenesis of Parkinson disease

Hiroki Takeuchi and Ryosuke Takahashi

Abstract

Although the pathogenesis of Parkinson disease (PD) is still unclear, various studies have uncovered important clues to the cause of the dopaminergic cell death. Accumulating evidence has suggested that both environmental and genetic factors collaborate and cause dopaminergic cell death. Aging, exposure to pesticides, and endogenous toxic agents, such as dopamine derivatives, might induce oxidative stress and lead to neurodegeneration. The studies on familial PD-related genes indicate that impairment of the ubiquitin-proteasome system induces the accumulation of misfolded protein, mainly α -synuclein, leading to cell death. This review discusses the possible mechanisms, underlying sporadic and familial PD.

Key words: *Parkinson disease, Pesticides, Oxidative stress, α -synuclein, Ubiquitin-proteasome system*
(*Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2007; 44: 415–421)

最新医学・第62巻・第7号（2007年7月号 別刷）

特集 パーキンソン病—最近の進歩—

アプローチ：パーキンソン病の
病因解明にどう取り組むか

高橋良輔

最新医学社

アプローチ：パーキンソン病の 病因解明にどう取り組むか

高橋良輔*

要 旨

パーキンソン病は多系統神経変性を特徴とする全身疾患であることが認識されつつある一方、分子レベルでの病因解明は家族性パーキンソン病研究の進歩によって飛躍的に進展した。発症機構に関して「異常タンパク質の蓄積」と「ミトコンドリア機能障害」の2つの有力な仮説が浮上してきた。これら分子レベルで得られた知見をシステムの理解に結び付ける統合的な視点に立ってパーキンソン病の病態を解明し、治療法開発に結びつけることが重要である。

はじめに

－パーキンソン病をどう理解するか－

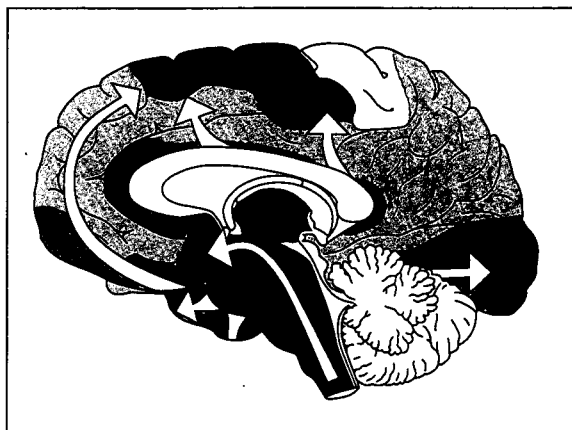
「パーキンソン病は進行性の運動障害を主症状とし、病理学的には黒質緻密層ドパミンニューロンの選択的変性を特徴とする神経変性疾患である」というのが、これまでの教科書的理解であった。ところが、現在その概念は大きく改訂を迫られている。

パーキンソン病の病理所見は、細胞が変性脱落するだけでなく後段で詳述するレビー小体という細胞質内の封入体が形成されることが特徴である。ドイツの神経病理学者 Heiko Braak は、レビー小体および関連するレビー神経突起、pale body が形成される部位に着

目し、100例以上のパーキンソン病剖検例を調べた結果、パーキンソン病の初発部位は嗅球、延髄、橋被蓋であり（ステージ1～2）、徐々に上行して橋、中脳に及び（ステージ3～4）、最終的には大脳皮質に至る（ステージ5～6）という仮説を提唱した（図1）¹⁾。この Braak の仮説は、多くの臨床家に驚きを与えたというよりも、むしろ得心のいくものであった。パーキンソン病では運動症状の発現に先行してさまざまな非運動症状、すなわち嗅覚障害、睡眠障害、自律神経症状などが生じることが知られていたが²⁾、Braak の仮説において、中脳が障害され運動症状が発現する時期以前のステージ1～2の病巣は、非運動症状に対して見事に説明を与えるものだったのである。さらに進行期における大脳皮質への病巣の進展は、臨床的には認知障害の発現と合致する（井関の稿参照）。まだ仮説として検証されなければならない点が多い

* 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学 教授

キーワード：Braak, 家族性パーキンソン病,
α-synuclein, ミトコンドリア,
プロテアソーム

図1 Braakの仮説(文献¹⁾より改変引用)

パーキンソン病の病変(レビー小体の形成)は下位脳幹から始まり、上行して中脳に至り、最終的には大脳皮質に到達する。詳細は本文参照。

とはいえ、Braakの功績により、パーキンソン病は多系統変性疾患であることが見直されようとしている。

また、パーキンソン病では心臓の metaiodobenzylguanidine (MIBG) 集積が特異的に低下することが主として日本のグループにより明らかにされ、心臓交感神経の脱神経がその病理学的根拠であることが織茂智之らにより示された(織茂の稿参照)³⁾。この事実は、パーキンソン病が中枢神経のみならず末梢神経をも障害する全身病であることを意味する。

「運動症状を主徴とする疾患」から「睡眠障害や認知障害も来す疾患」へ、また「中脳黒質ドパミンニューロンの病気」から「全身病」へと、概念のうえで複雑さを増したかに見えるパーキンソン病の病因解明に、我々はどの立ち向かえば良いのだろうか？

パーキンソン病をシステムの疾患として理解する

神経系を他の多くの臓器と分けるものは、階層性(レベル)の存在である。神経系は異なる分子の構成により、異なる性質を持つニューロンが生まれる。次にニューロン同士の結合によって神経回路が形成され、さまざま

な高次神経機能の発現が可能になる。機能の理解において分子、細胞、神経回路(またはシステム)レベルの階層的な理解が必要なのと同様、疾患の理解においても階層別の考え方は重要である。神経疾患の中で、パーキンソン病は特に階層別の理解が治療にも有効な疾患であることが、これまでも示されてきた。ドパミンニューロンの変性脱落が起きるという細胞レベルの理解は、L-DOPA、ドパミン作動薬の開発に結びついた。また大脳基底核の運動回路の解明は、定位脳破壊術、そして深部脳刺激術への道を開いた(三輪、深谷の稿参照)。ドパミンニューロンおよび関与する神経回路以外に原因のある非運動症状に関しても、分子からシステムレベルの階層的な理解の努力が有効であると考えられる。

ここからは、分子・細胞レベルでの病因解明へのアプローチに焦点を絞る。このレベルでの最も有効なアプローチは、これまでの研究史を振り返ると遺伝子からのアプローチではないかと思われる。

遺伝子からのアプローチ

パーキンソン病はほとんどの場合孤発性疾患であるが、5~10%の症例は家族性である。現在まで遺伝的危険因子も含めてパーキンソン病の病因または関連遺伝子として PARK1 から 13 までの遺伝子座が同定されており、これらのうちメンデルの法則に従う単一遺伝子疾患の病因遺伝子として7つの遺伝子が同定されている(表1)⁴⁾。遺伝性疾患の研究が孤発性疾患の理解に役立つかどうかは議論のあるところであるが、他の神経変性疾患でも遺伝性から孤発性へというアプローチは成功を収めてきた。最も良い例はアルツハイマー病である。孤発性に比べると非常にまれな家族性アルツハイマー病の病因遺伝子として、amyloid precursor protein (APP) や presenilin が同定された。これらは、孤発性アル

表1 家族性パーキンソン病の分類

	遺伝子座	遺伝子	遺伝形式
• PARK1	4q21-22	α -synuclein	AD
• PARK2	6q25-27	Parkin	AR
• PARK3	2p13	?	AD
• PARK5	4p14	UCH-L1	AD (?)
• PARK6	1p35-36	PINK1	AR
• PARK7	1p36	DJ-1	AR
• PARK8	12p11.2-q13.1	dardarin/LRRK2	AD
• PARK9	1p36	?	AR
• PARK10	1p32	?	遺伝的危険因子
• PARK11	2q36-37	?	遺伝的危険因子
• PARK12	Xq21-q25	?	遺伝的危険因子
• PARK13	2p12	Omi/HtrA2	遺伝的危険因子

AD：常染色体優性，AR：常染色体劣性

他の略語：巻末の「今月の略語」参照

ツハイマー病の病因に深くかかわる分子であることが判明したばかりでなく，治療のターゲットとしても注目され，現在のアルツハイマー病研究の中心となっている。

同じことがパーキンソン病に関しても期待され，事実，家族性パーキンソン病の病因遺伝子の研究はパーキンソン病の研究にブレークスルーをもたらした。以下に重要な遺伝子について概観する。詳細に関しては武田，野田，山下，有賀，久保の稿を参照されたい。

1. α -synuclein

α -synuclein は 140 アミノ酸の神経末端に豊富に存在する神経特異的なタンパク質であるが，生理的役割はまだ明らかでない。1997年，53番目のアラニンがトレオニンに変わるミスセンス変異が常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因となることが明らかになった。その後，別の2種類のミスセンス変異がパーキンソン病責任遺伝子として同定されている。これらは世界に数家系しかないと言われるまれな変異であるが，この発見がパーキンソン病研究にかつてない大きなインパクト

を与えた。 α -synuclein がレビー小体の主要構成成分であることが，レビー小体を単離してプロテオミクスのアプローチでその成分を同定しようとしていた岩坪 威らの研究などによって明らかになったのである⁵⁾。さらに α -synuclein の遺伝子重複変異でもパーキンソン病になることが判明し，アミノ酸変異がなくとも量が増加するだけでパーキンソン病が発症する点から， α -synuclein は孤発性パーキンソン病の原因を説明しうる分子と見なされている。また戸田達史らによって α -synuclein が孤発性パーキンソン病の遺伝的危険因子になることも示された⁶⁾。現在孤発性パーキンソン病は「 α -synuclein 蓄積病」との見方が有力である。事実， α -synuclein の過剰発現によるパーキンソン病動物モデルの作製が行われ，ある程度の成功を収めている。これまで 10 種類以上の α -synuclein トランスジェニックマウスが作製され，封入体形成，ドパミン神経終末の変性など，一部の症状を再現できるモデルが発表されている。また，ショウジョウバエで α -synuclein を過剰発現すると，ドパミン神経選択的細胞死

がレビー小体様の封入体形成を伴って生じ、パーキンソン病の良いモデルになることが分かった。 α -synuclein でなぜ細胞死が起こるのかについては、プロトフィブリルという毒性の強い異常構造物になるという説⁷⁾や、プロテアソームを阻害するという説⁸⁾など諸説あるが、まだ決着していない。

2. Parkin

Parkin は、常染色体劣性若年性パーキンソン症 (AR-JP または PARK2) の原因遺伝子として、1998 年水野美邦、清水信義らのグループによって単離された。その後、*Parkin* の機能はユビキチン・プロテアソーム系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであることが分かった。ユビキチン・プロテアソーム系は不要になった異常構造タンパク質や短寿命のタンパク質を分解する主要なタンパク質分解系であり、ユビキチンが鎖状につながったポリユビキチン鎖が分解のシグナルの役割を果たし、プロテアソームという巨大なタンパク質分解酵素複合体に認識される。多くのユビキチンリガーゼの機能は、分解されるべきタンパク質にポリユビキチン鎖を付加してそのプロテアソームによる分解を促進することにある。*Parkin* が機能を失う AR-JP では、したがってその基質が蓄積して神経変性が生じるというシナリオが最も考えられる。*Parkin* の基質候補として、現在までに十数種類の分子が同定されている⁹⁾。しかしながら *Parkin* ノックアウトマウスでは神経変性は全く生じないうえ、どの分子も明確には *Parkin* ノックアウトマウスで蓄積は証明されておらず、その意味ではまだどの基質の蓄積が変性の原因かは不明である。ただ、ミスフォールド化した Pael 受容体は蓄積によって小胞体ストレスを引き起こし、細胞死を誘発するというメカニズムが示されている点で注目すべき基質である。最近我々は、

Pael 受容体トランスジェニックマウスと *Parkin* ノックアウトマウスの掛け合わせによって慢性的に小胞体ストレスが誘発され、緩徐進行性のカテコールアミン神経 (ドパミン神経およびノルアドレナリン神経) 選択的変性が生じるモデルを確立した。このマウスは AR-JP の新たなモデルとなる可能性がある。一方最近、*Parkin* は *in vitro* ではもっぱらモノユビキチン化を媒介するリガーゼであることが示されており、タンパク質分解機能との関係が注目されている¹⁰⁾。

3. その他のパーキンソン病関連遺伝子¹¹⁾

常染色体劣性パーキンソン病である PARK6 の原因遺伝子として同定された *PINK1* は、ミトコンドリアに局在するタンパク質キナーゼである。PARK6 は臨床症状からは *Parkin* の変異を原因とする PARK2 と鑑別できない。モデル動物での検討では、*Parkin* も *PINK1* もノックアウトマウスではほとんど無症状であるが、驚くべきことにショウジョウバエで *Parkin*, *PINK1* の欠損は全く同じ表現型を示すことが判明した¹²⁾。両者とも筋肉と精子のアポトーシス様変性を生じ、超微形態的にはミトコンドリアの形態異常を引き起こすのである。ドパミン神経変性の有無は報告によって異なるが、あっても軽微と考えられる。さらに見かけ上の類似性だけでなく、*PINK1* 変異ショウジョウバエの表現型は *Parkin* 過剰発現で消失するが、その逆は起こらないこと、*PINK1* と *Parkin* のダブルノックアウトで表現型が増悪しないことから、ショウジョウバエではこれら2つの遺伝子が同じシグナル伝達経路上で細胞変性を防御する役割を担っており、*PINK1* が *Parkin* の上流に位置することが明らかになった。ヒトでも欠損の表現型が全く同じであることから、*PINK1* と *Parkin* の関係は保存されている可能性がある。しかしながら、

ミトコンドリアのタンパク質キナーゼである PINK1 と、主として細胞質のユビキチンリガーゼである Parkin が、どのように機能相関しているのかは全く不明である。

最近パーキンソン病との関係で注目されているミトコンドリアタンパク質は、Omi/HtrA2 である。Omi はミトコンドリアから放出され、細胞死を促進する作用があることを我々が見いだしたセリンプロテアーゼである¹³⁾。ところが、遺伝的変異によって Omi の酵素活性が失われているマウスでは、生後数週間で線条体ニューロンの変性が起こり、パーキンソニズムを呈して死亡することが明らかになった。また、孤発性パーキンソン病患者で Omi の酵素活性が低下する変異が有意に多く見つかることが分かり、Omi は PARK13 の遺伝子として認定されている。Omi の変異ではおそらく基質が分解されなくなるのが神経変性の原因になることが予想されるので、基質の同定が重要な課題である。

PARK7 の原因遺伝子となる DJ-1 は多機能タンパク質であり、酸化還元依存的なシャペロン機能で細胞防御的に機能しているものと推測されている。DJ-1 はほとんどは細胞質にあるが、一部はミトコンドリアに局在すると言われている。

上記以外では、常染色体優性の PARK8 の原因遺伝子が LRRK2 というタンパク質キナーゼであり、変異タンパク質ではキナーゼ活性が亢進していることが報告された。LRRK2 は欧米では孤発性パーキンソン病の 1~2% を占めることが報告され、その点で注目を集めている。また、PARK9 という特殊なタイプの家族性パーキンソン病の原因遺伝子として、ATP13A2 というトランスポーター様のリソソームタンパク質が同定されたが、メカニズムに関してはまだほとんど分かっていない¹⁴⁾。

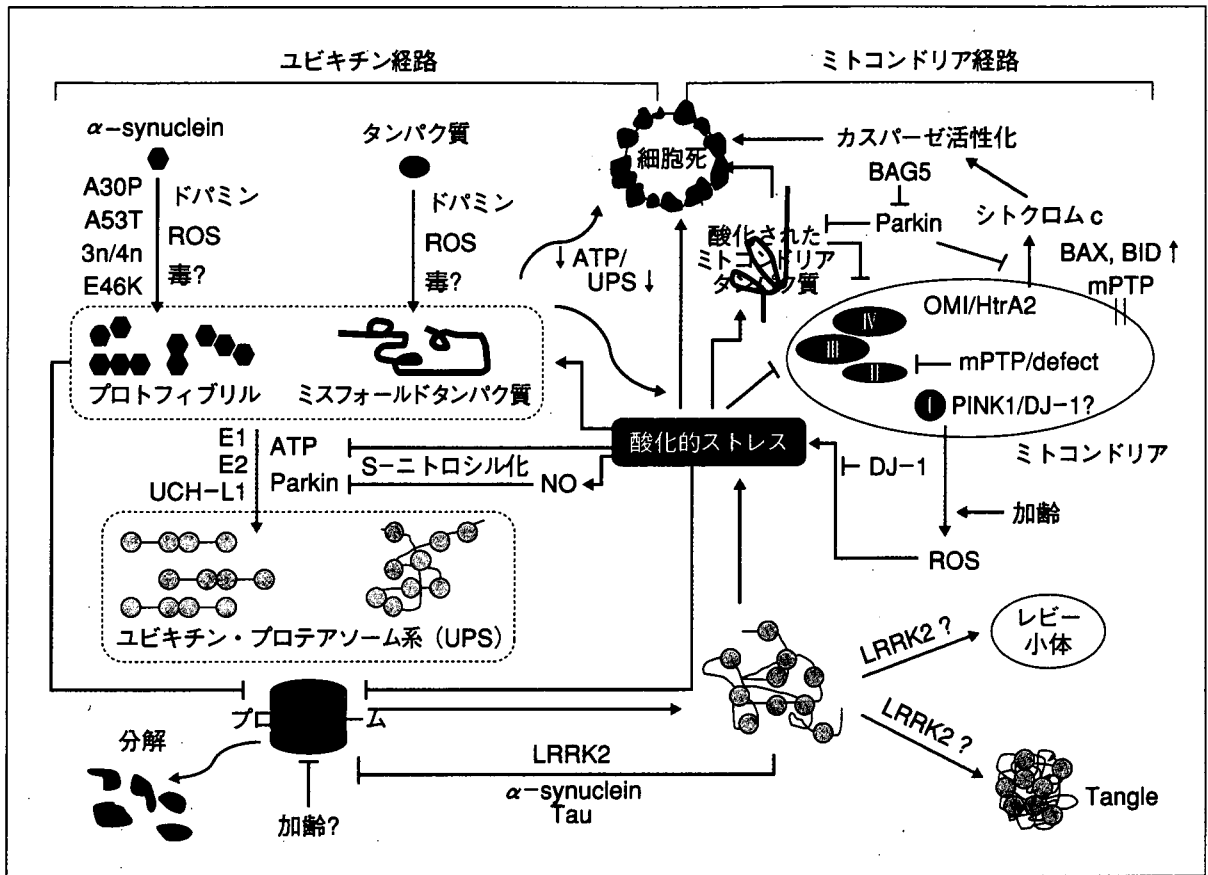
このように見ていくと、最近同定された家族性パーキンソン病原因遺伝子の多くは、ミトコンドリア機能障害とパーキンソン病の関係を示唆するものが多い。実は、ミトコンドリアは従来からパーキンソン病患者検体の検討や毒物によるパーキンソン病モデルで、病因との関係が注目されてきた。

患者検体、毒物からのアプローチ¹⁵⁾

ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I は、パーキンソン病患者の筋、脳、血小板で活性が低下していることが示されているが、原因か結果かが判然としなかった。複合体 I の活性低下をパーキンソン病の原因と結びつける考えは、ロテノン、MPTP などの神経毒がパーキンソン病を引き起こす事実によって多くの研究者にインパクトを与えるようになった。MPTP は、代謝産物の MPP⁺ がドパミントランスポーターによってドパミン神経に取り込まれることで選択毒性を発揮し、複合体 I を阻害し、活性酸素種 (ROS) の産生を上昇させて毒性を発揮する。封入体は形成しないが、ドパミン神経選択的毒性に優れるため、MPTP はパーキンソン病モデル動物作製の主流となってきた。ロテノンはマメ科植物の根から得られる天然化合物由来の農薬であるが、慢性投与によりミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害してラットにパーキンソニズムを引き起こし、黒質ドパミン神経の減少と細胞質内にレビー小体に似た封入体が形成される⁷⁾。MPTP モデルでは封入体形成が見られないことを考えると、ロテノンはよりパーキンソン病に近い毒物モデルとして有用なものと思われる。農薬とパーキンソン病の関係を示唆する疫学調査の報告もあり、環境要因としてロテノンまたはその類似化合物がパーキンソン病発症にかかわる可能性も指摘されている。

一方、家族性パーキンソン病の研究でユビ

図2 パーキンソン病の二大病因仮説に基づく神経変性経路 (文献¹¹⁾より改変引用)



略語：巻末の「今月の略語」参照

キチン・プロテアソーム系の障害が病因仮説として浮上してきたことから、プロテアソーム阻害剤のラットへの全身投与によるパーキンソン病モデル作製の試みが行われた。最初の報告では、症状・病理所見ともパーキンソン病に類似した病的変化が起こるとされ注目された。しかし再現性に問題があることが複数の研究室から指摘され、現在はこの方法によるモデル作製は困難と考えられている¹⁶⁾。

二大仮説

一異常タンパク質蓄積とミトコンドリア機能不全一

これまでの研究の流れをまとめると、 α -synuclein, Parkin の研究から導かれた「異常タンパク質の蓄積」と、PINK1, DJ-1 の研究や患者検体、毒物の研究から注目されて

きた「ミトコンドリア機能障害」が、パーキンソン病発症の二大仮説として有力である。この2つの仮説はお互いに矛盾するものではなく、密接に絡み合っているものと考えられる(図2)¹¹⁾。現段階での実験的証拠から、2つの考え方を結びつける最も重要なキーワードは酸化ストレスである。ミトコンドリアは酸素呼吸をすると同時に酸化ストレスを恒常的に産生している装置であるが、活性酸素はタンパク質を酸化してミスフォールド化させる、Parkin やプロテアソームサブユニットを酸化修飾して不活性化させる、などの作用で異常タンパク質蓄積を促進すると考えられる。一方、異常タンパク質処理に当たってATP依存のプロテアーゼである26Sプロテアソームが動員されると、ATP産生亢進の必要性からミトコンドリアに負荷がかかる

ことも想像される。さらに前述の Parkin と PINK1 の機能関連の解明は、ユビキチン・プロテアソーム系とミトコンドリアの關係に新たな視点を与えることになるであろう。

おわりに
一階層を越えたパーキンソン病の
統合的理解に向けて

以上、パーキンソン病発症メカニズムに関する分子・細胞レベルでの研究の現状と今後の見通しについて述べてきた。しかし、パーキンソン病が細胞の病気であるとともにシステムの病気であるという観点を忘れると、疾患の本質を見失うおそれがある。もし冒頭に述べた Braak の仮説が正しければ、ドパミン神経変性が始まる前にパーキンソン病は発症していることになり、その時期に治療することができれば運動障害の発症を抑えることができるかもしれない。そういう点から、ドパミン神経細胞死のみに焦点を絞ったこれまでの研究からのパラダイムシフトが求められていると言えよう。例えば、Braak の仮説や心臓交感神経の障害に示されるような「パーキンソン病は全身病である」というシステムとしての疾患概念の妥当性を分子・細胞レベルで検証することが、階層性を越えてパーキンソン病を統合的に理解する端緒となるであろうし、これからの研究が挑戦すべき大きな課題であると思われる。

文 献

- 1) Braak H, et al: Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318: 121-134, 2004.
- 2) Chaudhuri KR, et al: Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5: 235-245, 2006.
- 3) Orimo S, et al: Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* (Berl) 109: 583-588, 2005.
- 4) Hardy J, et al: Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 60: 389-398, 2006.
- 5) Baba M, et al: Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152: 879-884, 1998.
- 6) Mizuta I, et al: Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15: 1151-1158, 2006.
- 7) Volles MJ, et al: Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 42: 7871-7878, 2003.
- 8) Tanaka Y, et al: Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10: 919-926, 2001.
- 9) Imai Y, et al: How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr Opin Neurobiol* 14: 384-389, 2004.
- 10) Matsuda N, et al: Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation *in vitro*. *J Biol Chem* 281: 3204-3209, 2006.
- 11) Abou-Sleiman PM, et al: Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7: 207-219, 2006.
- 12) Tan JM, et al: Parkin blushed by PINK1. *Neuron* 50: 527-529, 2006.
- 13) Suzuki Y, et al: A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-621, 2001.
- 14) Ramirez A, et al: Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38: 1184-1191, 2006.
- 15) Schapira AH: Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 66: S10-23, 2006.
- 16) Beal F, et al: The proteasomal inhibition model of Parkinson's disease: "Boon or bust"? *Ann*

Neurol 60: 158-161, 2006.

**Approaches to the Elucidation of the Pathogenetic Mechanisms
Underlying Parkinson's Disease**

Ryosuke Takahashi

Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine

Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis

Koji Yamanaka^{1,2}, Seung Joo Chun¹, Severine Boillee¹, Noriko Fujimori-Tonou², Hirofumi Yamashita², David H Gutmann³, Ryosuke Takahashi⁴, Hidemi Misawa⁵ & Don W Cleveland¹

Dominant mutations in superoxide dismutase cause amyotrophic lateral sclerosis (ALS), an adult-onset neurodegenerative disease that is characterized by the loss of motor neurons. Using mice carrying a deletable mutant gene, diminished mutant expression in astrocytes did not affect onset, but delayed microglial activation and sharply slowed later disease progression. These findings demonstrate that mutant astrocytes are viable targets for therapies for slowing the progression of non-cell autonomous killing of motor neurons in ALS.

ALS is an adult-onset neurodegenerative disease, characterized by a progressive and fatal loss of motor neurons. Dominant mutations in the gene for superoxide dismutase (*SOD1*) are the most frequent cause of inherited ALS. Ubiquitous expression of mutant *SOD1* in rodents leads to progressive, selective motor neuron degeneration as a result of acquired toxic properties. The exact mechanism responsible for motor neuron degeneration in ALS, however, is not known^{1,2}. Mutant damage in the vulnerable motor neurons is a key determinant of disease onset³, whereas accumulating evidence supports an active role of non-neuronal cells in motor neuron degeneration³⁻⁷. Evidence with selective gene excision³ or bone-marrow grafting⁵ has demonstrated that mutant *SOD1*-derived damage in microglia accelerates later disease progression. Despite the importance of astrocyte function, the role of mutant action in astrocytes in disease has not been tested *in vivo*.

To examine whether mutant *SOD1* damage in astrocytes contributes to disease, *loxSOD1*^{G37R} mice³, carrying a mutant *SOD1* gene that can be deleted by the action of the Cre recombinase, were mated with *GFAP-Cre* mice (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1 online), which express both Cre recombinase and β -galactosidase (*LacZ*) under the control of the human GFAP promoter⁸. Mice from these matings that carry the *GFAP-Cre* transgene are denoted as Cre⁺, whereas mice without it are referred to as Cre⁻. To determine the cell-type specificity of Cre expression in the spinal cord, *GFAP-Cre* mice were mated to Rosa26 mice, which ubiquitously express a *LacZ* gene that encodes

functional β -galactosidase only after Cre-mediated recombination. Although this *GFAP-Cre* transgene is expressed in a subset of neurons in the cerebellum and hippocampus during embryogenesis⁹, measurement of β -galactosidase activity (by deposition of a blue reaction product after addition of the X-gal substrate) demonstrated that Cre expression and Cre-mediated recombination was restricted in the spinal cord to GFAP-reactive astrocytes (Fig. 1a,b). The efficiency of mutant gene excision in cultured astrocytes from newborn *loxSOD1*^{G37R}/*GFAP-Cre*⁺ mice was ~76% (Fig. 1d,e), determined by quantitative PCR for human *SOD1* transgene number (Fig. 1d) and immunoblotting for mutant *SOD1* levels (Fig. 1e). We observed neither detectable Cre activity nor mutant gene excision in microglia (Fig. 1c and Supplementary Fig. 2 online).

A simple, objective measure of disease onset and early disease was applied by initiation of weight loss, itself reflecting denervation-induced muscle atrophy. Reduction of *SOD1*^{G37R} in astrocytes did not slow disease onset nor early disease (*GFAP-Cre*⁺, 341.6 \pm 48.9 d; *GFAP-Cre*⁻, 337.0 \pm 35.8 d; Fig. 1f,h). However, late disease progression (from early disease to end stage) was sharply delayed, providing a mean extension of survival by 48 d (Cre⁺, 87.4 d; Cre⁻, 39.5 d; Fig. 1j). Progression from onset to early disease was more modestly slowed by 14 d (Cre⁺, 99.3 d; Cre⁻, 85.2 d; Fig. 1i). Overall survival was extended by 60 d (Cre⁺, 436.5 \pm 38.8 d; Cre⁻, 376.5 \pm 26.9 d; Fig. 1g). This contrasts with delayed disease onset from diminished mutant synthesis solely within motor neurons (with a *VACHT-Cre* transgene carrying the motor neuron-specific vesicular acetylcholine transporter promoter) without affecting disease progression (Supplementary Results, Supplementary Methods and Supplementary Fig. 3 online), just as reported previously with an *Isl1* (*Islet1*)-*Cre* transgene that is expressed in motor neurons and some peripheral tissues³.

Astrocytic and microglial cell activation is a well-accepted feature of *SOD1* mutant-mediated ALS^{1,2}. An elevated proportion of GFAP-positive astrocytes appeared before disease onset (Fig. 2a) in *loxSOD1*^{G37R} mice. This astrogliosis was progressive, readily apparent by onset (Fig. 2b) and more prominent during disease progression (Fig. 2c). Despite substantial mutant reduction, astrogliosis was not, however, different in comparing disease-matched *loxSOD1*^{G37R}/*GFAP-Cre*⁺ mice (Fig. 2d,e) and *loxSOD1*^{G37R}/*GFAP-Cre*⁻ mice (Fig. 2b,c).

Microglial activation occurred at earliest disease onset in Cre⁻ mice (Fig. 2g) and was progressively more prominent during disease progression (Fig. 2h). Microglial activation was, however, substantially delayed from onset through early disease in the *GFAP-Cre*⁺ mice when mutant *SOD1* levels were reduced only in astrocytes (Fig. 2i,j). By exploiting the presence of β -galactosidase to mark astrocytes with diminished *SOD1* mutant synthesis, examination of sections throughout lumbar spinal cords of symptomatic *loxSOD1*^{G37R}/*GFAP-Cre*⁺ mice

¹Ludwig Institute for Cancer Research and Department of Medicine and Neuroscience, University of California at San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, California 92093-0670, USA. ²Yamanaka Research Unit, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan. ³Department of Neurology, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St. Louis, Missouri 63110, USA. ⁴Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. ⁵Department of Pharmacology, Kyoritsu University of Pharmacy, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan. Correspondence should be addressed to D.W.C. (dcleveland@ucsd.edu) or K.Y. (kyamanaka@brain.riken.jp).

Received 26 November 2007; accepted 7 January 2008; published online 3 February 2008; doi:10.1038/nn2047



BRIEF COMMUNICATIONS

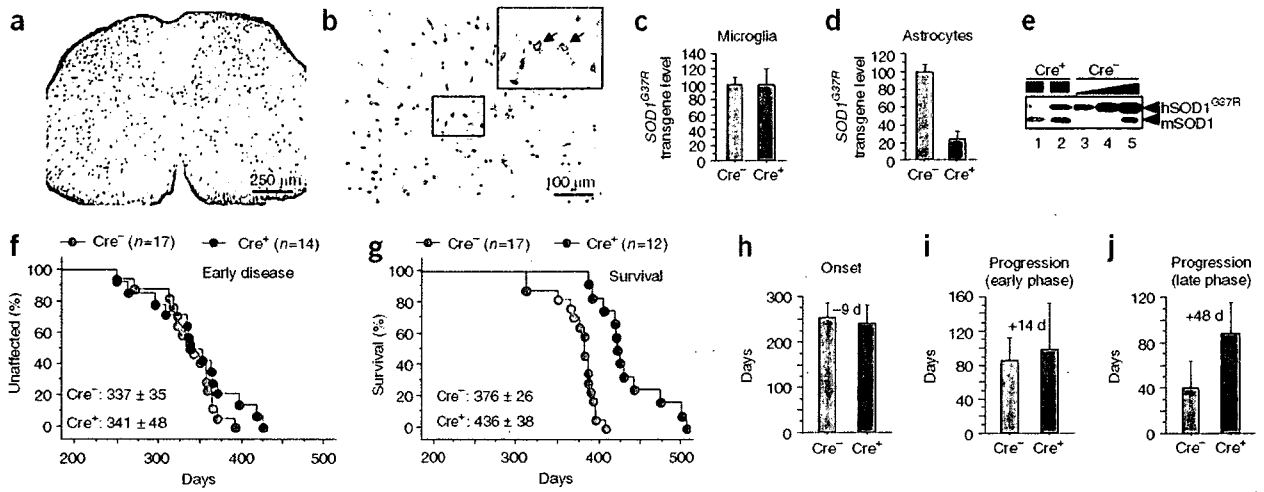


Figure 1 Selective Cre-mediated gene excision shows that mutant SOD1 action in astrocytes is a primary determinant of late disease progression. (a,b) β -galactosidase (β -gal) activity in astrocytes in whole (a) or in the anterior horn region (b) of the lumbar spinal cord section of *GFAP-Cre/Rosa26* reporter mice visualized with X-gal and immunostaining with GFAP antibody. Inset, magnified image of the boxed area in b. Arrows indicate β -gal/GFAP-Cre-expressing astrocytes. (c,d) *loxSOD1^{G37R}* transgene levels ($n = 3$ for each group) in primary microglia (c) or astrocytes (d) from *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* and *loxSOD1^{G37R}* mice using real-time PCR. (e) We determined SOD1^{G37R} and mouse SOD1 levels by immunoblotting extracts from isolated primary astrocytes of *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* (lanes 1, 2) and a dilution series of a comparable extract from *LoxSOD1^{G37R}* astrocytes representing 25%, 50% and 100% of the protein amounts loaded in lanes 1 and 2 (lanes 3–5). (f,g) Ages at which early disease phase (to 10% weight loss, $P = 0.76$; f) or end-stage disease ($P < 0.0001$; g) were reached for *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* mice (red) and *loxSOD1^{G37R}* littermates (blue). Mean ages \pm s.d. are provided. (h–j) Mean onset ($P = 0.47$) (h), mean duration of early disease (from onset to 10% weight loss, $P = 0.35$; i) and a late disease (from 10% weight loss to end stage, $P < 0.0001$; j) for *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* (red) and *loxSOD1^{G37R}* littermates (blue). At each time point, P value was determined by unpaired t -test. Error bars denote s.d.

revealed an inverse relationship (Fig. 3a–g) between the number of astrocytes with reduced mutant SOD1 (*Cre⁺*) and activated microglia (correlation coefficient, $r = -0.868$, $P < 0.001$), despite comparable astrocytic activation. Thus, microglial activation was most prominent in areas with the highest mutant SOD1-expressing astrocyte concentration.

Elevated production of nitric oxide by upregulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been reported in mutant SOD1 mice¹⁰, although deletion of the iNOS gene has modest¹¹ or no¹² effect on SOD1-mediated disease. It is not known in which glial cells this nitric oxide is produced in *in vivo* models of ALS, although both microglia and astrocytes have an ability to produce it when stimulated *in vitro*¹³. Triple staining of lumbar spinal cord sections with iNOS, Mac2 and GFAP antibodies (Fig. 3h–r) revealed that almost all iNOS-positive cells were

Mac2-positive microglia (Fig. 3n–r and Supplementary Fig. 4 online), indicating that activated microglia are the primary cell type producing nitric oxide in this SOD1 mouse model. Diminishing mutant synthesis in astrocytes inhibited iNOS induction in disease-matched, symptomatic SOD1 mice (Fig. 3h,k), consistent with substantial inhibition of microglial activation (Fig. 3i,l).

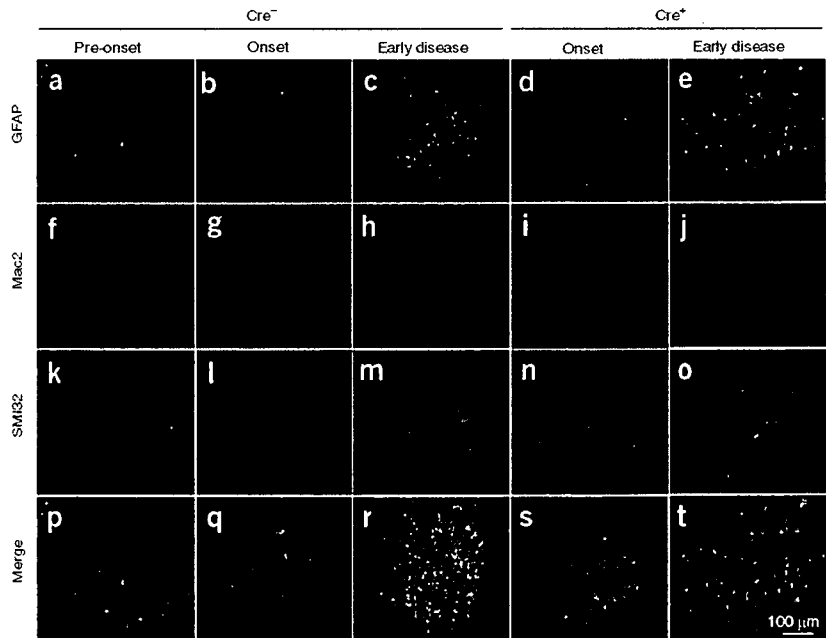


Figure 2 Selective downregulation of mutant SOD1 in astrocytes significantly inhibits microglial activation. (a–t) GFAP-positive astrocytes (a–e), Mac2-positive activated microglia (f–j) and motor neurons identified with the neurofilament antibody SMI-32 (k–o) in the lumbar spinal cord of a *loxSOD1^{G37R}* mouse before disease onset (a,f,k,p), at disease onset (b,g,l,q) or during early disease (c,h,m,r), together with *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* mice at disease onset (d,i,n,s) or during early disease (e,j,o,t). Merged images are shown in p–t.

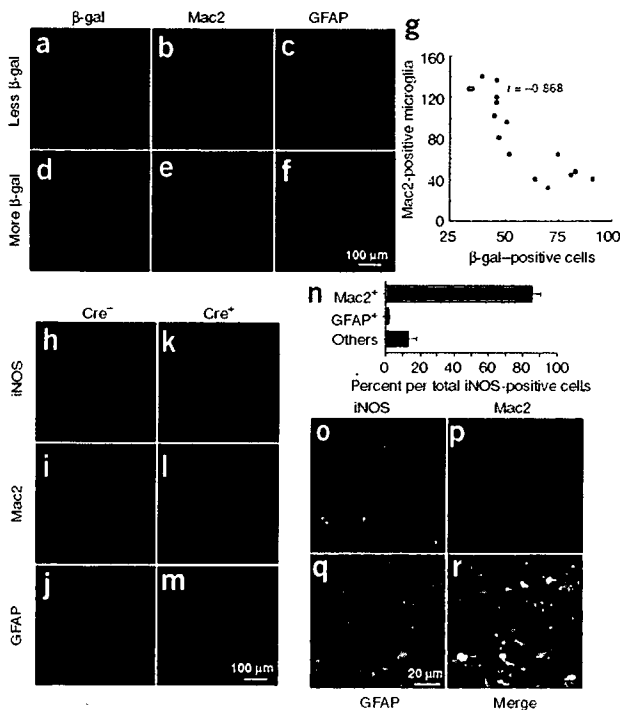


Figure 3 Mutant-expressing astrocytes enhance microglial activation and induction of iNOS. (a–f) Images of β -galactosidase (a,d), Mac2 (b,e) and GFAP (c,f) staining from a left (a–c) and right (d–f) lumbar spinal cord section from a 12-month-old *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* mouse. GFAP-Cre⁺ astrocytes are marked by β -galactosidase (a,d). (g) Inverted correlation between the number of Cre-positive astrocytes and Mac2-positive microglia in *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* mice lumbar spinal cord sections (correlation coefficient, $r = -0.868$, $P < 0.001$). (h–m) Lumbar spinal cord sections from *loxSOD1^{G37R}* (h–j) and *loxSOD1^{G37R}/GFAP-Cre⁺* (k–m) mice at the early disease stage immunostained with antibodies to iNOS (h,k), Mac2 (i,l), and GFAP (j,m). (n) Quantification of iNOS-positive cells in the anterior horn from lumbar spinal cord of symptomatic *loxSOD1^{G37R}* mice. We plotted the averaged percent of iNOS⁺/Mac2⁺ (red), iNOS⁺/GFAP⁺ (blue) and iNOS⁺/other cell type (black) per total iNOS⁺ cells. (o–r) Magnified images of anterior horn from lumbar spinal cord of symptomatic *loxSOD1^{G37R}* mice stained with iNOS (o), Mac2 (p) and GFAP (q). Merged image illustrates that iNOS-positive cells are Mac2-positive microglia (r).

in ALS by supplementing healthy astrocytes or modulating toxicity in astrocytes to control an inflammatory response of microglia.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a US National Institutes of Health grant (NS 27036) and a grant from the Packard ALS Center at Johns Hopkins (D.W.C.), as well as a Muscular Dystrophy Association developmental grant, the Uehara Memorial Foundation, the Nakabayashi Trust for ALS Research and a grant-in-aid for Scientific Research (19591021) and on Priority Area (19044048) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (K.Y.). Salary support for D.W.C. is provided by the Ludwig Institute for Cancer Research. S.B. is a recipient of a Fondation pour la Recherche Medical fellowship, an Institut National de la santé et de la Recherche Médicale fellowship and a Muscular Dystrophy Association developmental grant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.Y., S.J.C., S.B., N.F.-T. and H.Y. conducted the experiments. D.H.G., R.T. and H.M. provided essential experimental tools and advice. K.Y., S.B., and D.W.C. were responsible for the overall design of the project, analyses of the results and writing the manuscript.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

A role for astrocytes in inherited ALS has been previously considered in several contexts. Mutant-expressing astrocytes produce and release one or more as yet uncharacterized components that can accelerate motor neuron death *in vitro*^{6,7}. Focal loss of the astrocytic EAAT2 glutamate transporter in affected regions¹⁴ (Supplementary Fig. 5 online) and the failure of normal glutamate uptake of *SOD1^{G93A}* astrocytes *in vitro*¹⁵ support glutamate-dependent excitotoxicity as a component of disease. Nevertheless, diminished mutant SOD1 synthesis in most astrocytes did not affect disease-dependent loss of EAAT2 from those astrocytes (Supplementary Fig. 5), indicating that a reduction in glutamate transport reflects non-cell autonomous damage to astrocytes, in part, from mutant SOD1 synthesized by other cells. Our use of selective gene excision has now demonstrated that mutant SOD1 damage in both microglia³ and astrocytes (Fig. 1g–j) accelerates later disease progression without affecting the initiation of motor neuron degeneration and phenotypic disease onset. Discovery that damage in astrocytes determines the timing of microglial activation and infiltration provides further evidence that, beyond any direct effect of mutant astrocytes on motor neurons, such astrocytes amplify an inflammatory response from microglia (including enhanced production of nitric oxide and possibly of toxic cytokines), leading to further damage to the motor neurons and accelerated disease progression through a non-cell autonomous mechanism (Supplementary Fig. 6 online). These findings validate therapies, including astrocytic stem cell-replacement approaches, that aim to slow disease progression

1. Pasinelli, P. & Brown, R.H. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 710–723 (2006).
2. Boillee, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D.W. *Neuron* **52**, 39–59 (2006).
3. Boillee, S. *et al. Science* **312**, 1389–1392 (2006).
4. Clement, A.M. *et al. Science* **302**, 113–117 (2003).
5. Beers, D.R. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16021–16026 (2006).
6. Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T. & Eggan, K. *Nat. Neurosci.* **10**, 608–614 (2007).
7. Nagai, M. *et al. Nat. Neurosci.* **10**, 615–622 (2007).
8. Bajenaru, M.L. *et al. Mol. Cell. Biol.* **22**, 5100–5113 (2002).
9. Fraser, M.M. *et al. Cancer Res.* **64**, 7773–7779 (2004).
10. Almer, G., Vukosavic, S., Romero, N. & Przedborski, S. *J. Neurochem.* **72**, 2415–2425 (1999).
11. Martin, L.J. *et al. J. Comp. Neurol.* **500**, 20–46 (2007).
12. Son, M., Fathallah-Shaykh, H.M. & Elliott, J.L. *Ann. Neurol.* **50**, 273 (2001).
13. Barbeito, L.H. *et al. Brain Res. Brain Res. Rev.* **47**, 263–274 (2004).
14. Howland, D.S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1604–1609 (2002).
15. Vermeiren, C. *et al. J. Neurochem.* **96**, 719–731 (2006).

Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase

Miyuki Ogawa^{1,2}, Kiyomi Mizugishi³, Akira Ishiguro¹, Yoshio Koyabu³, Yuzuru Imai⁴, Ryosuke Takahashi⁴, Katsuhiko Mikoshiba^{2,3} and Jun Aruga^{1,*}

¹Laboratory for Comparative Neurogenesis, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

²Division of Molecular Neurobiology, Department of Basic Medical Science, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

³Laboratory for Developmental Neurobiology, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

⁴Laboratory for Motor System Neurodegeneration, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

We identified and characterized a novel RING finger gene, *Rines/RNF180*, which is well conserved among vertebrates. Putative *Rines* gene product (Rines) contains a RING finger domain, a basic coiled-coil domain, a novel conserved domain (DSPRC) and a C-terminal hydrophobic region that is predicted to be a transmembrane domain. N-terminally epitope tagged-Rines (Nt-Rines) was detected in the endoplasmic reticulum membrane/nuclear envelope in cultured mammalian cells. Nt-Rines was not extracted by high salt or alkaline buffers and was degraded in intact endoplasmic reticulum treated with proteinase K, indicating that Nt-Rines is an integral membrane protein with most of its N-terminal regions in the cytoplasm. *Rines* was expressed in brain, kidney, testis and uterus of adult mice, and in developing lens and brain, particularly in the ventricular layer of the cerebral cortex at embryonic stages. In cultured cells, Nt-Rines can bind another protein and promoted its degradation. The degradation was inhibited by proteasomal inhibitors. In addition, Nt-Rines itself was heavily ubiquitinated and degraded by proteasome. The involvement of Rines in the ubiquitin-proteasome pathway was further supported by its binding to the UbcH6 ubiquitin-conjugating enzyme and by its trans-ubiquitination enhancing activities. These results suggest that Rines is a membrane-bound E3 ubiquitin ligase.

Introduction

Protein degradation by the proteasome pathway plays a vital role in controlling the level of proteins involved in diverse cellular processes, including differentiation, proliferation and apoptosis (Hershko & Ciechanover 1998; Pickart 2001). In the ubiquitin-proteasome pathway, substrates are marked by covalent linkage to ubiquitin for degradation. The ubiquitinated proteins are then recognized and degraded by the 26S proteasome. Ubiquitination involves highly specific enzyme cascades such as E1 ubiquitin-activating enzyme, E2 ubiquitin-conjugating enzyme and E3 ubiquitin-protein ligase (Hershko & Ciechanover 1998; Pickart 2001). Among them, E3 ubiquitin ligase plays a key role in determining the specificity and timing of the ubiquitination of

substrates and subsequent protein degradation. Many E3 ubiquitin ligases contain a RING finger domain as a binding domain for E2 enzymes (Joazeiro & Weissman 2000; Pickart 2001).

A novel RING finger motif-containing gene, *Rines*, was found in a screening for binding partner of Zic2, which belongs to the Zic family nuclear zinc finger proteins (Aruga *et al.* 1996; Nagai *et al.* 2000; Mizugishi *et al.* 2004). Because a putative *Rines* gene product (Rines) does not show any close similarities to previously known proteins, its basic molecular properties were investigated using Zic2 as a tool protein. We characterized the structure, subcellular localization, topology and molecular functions of Rines, together with the expression profiles of *Rines* in developing and adult mice. We found that *Rines* was expressed in developing and mature brain and in other organs. Rines possessed a RING finger domain that is necessary for ubiquitin ligase activity and a novel domain, and was an integral membrane protein located

Communicated by: Hiroshi Hamada

*Correspondence: Email: jaruga@brain.riken.jp

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2008.01169.x

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 by the Molecular Biology Society of Japan, Blackwell Publishing Ltd

Genes to Cells (2008) 13, 397–409 397

mainly on the cytoplasmic side of the endoplasmic reticulum. Molecular function analyses revealed proteasomal degradation-enhancing, degradation target-binding and E2 enzyme-binding activities. Our results indicated Rines to be a novel proteasomal degradation mediator.

Results

Structural features of the Rines

In a yeast-two hybrid screening of an E10.5 mouse embryonic cDNA library using an entire N-terminal half of the mouse Zic2 protein (1–255) as a bait (Mizugishi *et al.* 2004), we isolated a clone that encodes part of a novel RING finger motif, the gene of which we named *Rines* (An abbreviation of *RING finger protein in neural stem cells*).

Nucleotide sequencing of the *Rines* cDNA revealed that the putative open reading frame (ORF) contains 1773 nucleotides (591 amino acids, accession:AA1146775, also named as *RNF180* in a cDNA collection project (Strausberg *et al.* 2002)). The predicted *Rines* gene product (*Rines*) is a 65 kDa protein containing a RING finger domain (Fig. 1A–C). The RING finger domain is a cysteine/histidine rich (C3HC4), Zn²⁺ binding domain that has been found in a number of eukaryotic proteins and considered to be chemical catalysts and molecular scaffolds that bring other proteins together (Borden 2000). Emerging evidence indicates that RING finger motif may have ubiquitin ligase activity and function in protein ubiquitination (Joazeiro & Weissman 2000; Pickart 2001). In its C-terminal end, there is a hydrophobic region, which is predicted to be a transmembrane segment by computer programs (SOSUI, Hirokawa *et al.* 1998, PHDSTM, Rost *et al.* 1996).

A homology search against BLAST/NCBI database revealed the presence of the mouse *Rines* homologues in human, chick, and zebrafish (Fig. 1B). The RING finger domain was strongly conserved among the *Rines* homologues. In addition, there were three conserved domains in an N-terminal region, an N-terminal flanking of the RING finger domain and a C-terminal portion. A homology search revealed that the N-terminally located conserved domains had a significant homology to proteins including dual specificity protein phosphatases; rat GKAP (Munoz-Alonso *et al.* 2000) and yeast Yvh1 (Gjaever *et al.* 2002) (Fig. 1D). This conserved domain (named here as DSPRC, dual specificity phosphatase–*Rines*–conserved) is consisted of about 50 amino acids residues where four cysteine residues are absolutely conserved, and is also detected in insect and plant proteins. However, functional significance of DSPRC is not clear at this point. The second conserved region contained a

cluster of basic residues. In addition, a computer program (ISREC-Coil server, <<http://www.isrec.isb-sib.ch/cgi-bin/COILS-from-paser>>) predicted the presence of a coiled-coil structure, which is known to mediate protein-to-protein interaction. The coiled-coil domain was also predicted in all the vertebrate *Rines* homologues. In the current protein database, we did not find any other proteins with a domain organization similar to that of *Rines* (Fig. 1A), suggesting that *Rines* is a unique protein.

Rines is a membrane-anchored protein

We first characterized *Rines* in terms of its subcellular localization. When N-terminally Flag epitope-tagged *Rines* (Flag-*Rines*) was produced in cells, it was detected as reticular staining in the cytoplasmic region (Fig. 2A). The staining greatly overlapped that of Calnexin, an endoplasmic reticulum (ER)-anchored integral membrane protein, suggesting ER membrane/nuclear envelope localization of *Rines*. Similarly to Calnexin, Flag-*Rines* was extracted from membrane fractions only in buffers containing detergents, but not in the presence of urea, salt alone or an alkaline buffer (Fig. 2B). In contrast, Calreticulin, a peripheral membrane protein of the ER, was extracted from the membrane fractions in an alkaline buffer (Fig. 2B). Peripheral membrane proteins can be separated from integral membrane proteins by extraction with 0.1 M Na₂CO₃ (Fujiki *et al.* 1982). These results indicate that Flag-*Rines* is an integral membrane protein, in agreement with the presence of the predicted transmembrane region. When the crude membrane fraction was treated with proteinase K in the absence of detergent, N-terminally Myc-tagged *Rines* was digested similarly to the ER membrane protein TRAP α , whereas BiP, an intraluminal ER protein, was mostly not (Fig. 2C). This result indicates that most of the N-terminus of Myc-*Rines* is located in the cytoplasm.

Expression pattern of *Rines*

The expression profile of *Rines* in mice was first examined by Northern blot analysis (Fig. 3A,B). In adult mice, the *Rines* mRNA was most strongly detected in brain, moderately in kidney, testis and uterus and weakly in lung and thymus (Fig. 3A). In the course of development, significant expression was detected from E10.5, the mRNA level was gradually increased, peaked around E13.5 and then gradually decreased (Fig. 3B). These results suggest that *Rines*, in principle, could play a role in the later gestational development.

To determine the spatial expression pattern of *Rines*, we performed a series of *in situ* hybridization histochemical

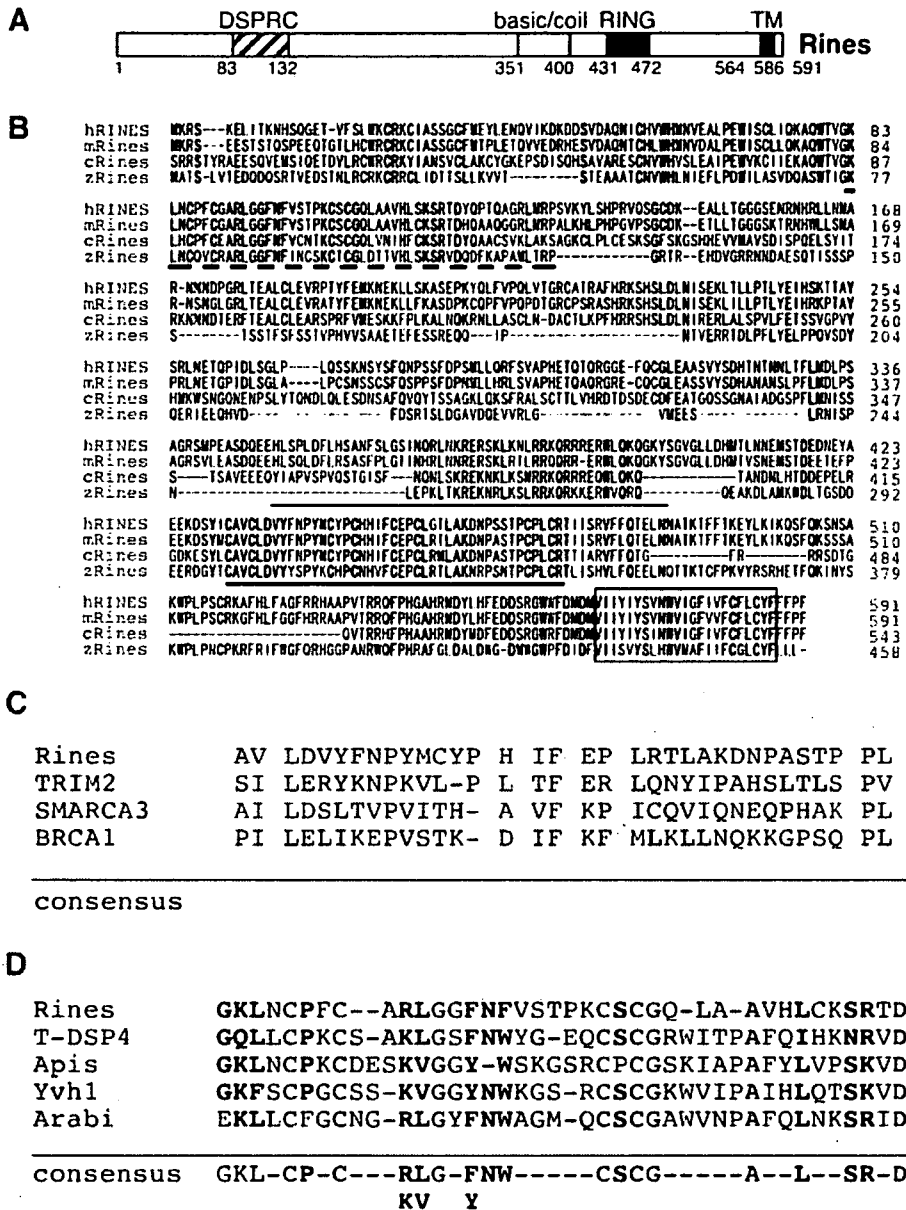


Figure 1 Structure of the Rines. (A) The domain structure of mouse Rines. DSPRC, dual specificity protein phosphatase Rines conserved domain; basic/coil, basic coiled-coil domain; RING, RING finger domain; TM, transmembrane domain. (B) Alignment of the amino acid sequences of the human (accession: CAD89939), mouse (accession: AAI146775), chick (accession: XP_429137), and zebrafish (accession: NP_956723) Rines. Dark green boxes indicate the conserved amino acids across the four species, and light green boxes indicate the conserved amino acids among the three species. Open box, transmembrane domain; thick underline, RING finger domain; thin underline, basic coiled-coil domain; broken underline, DSPRC domain. (C) Comparison of the RING finger domain amino acid sequences between mouse Rines, human TRIM2, human SMARCA3 and human BRCA1. (D) Comparison of DSPRC domain sequences derived from rat glucokinase-associated phosphatase (T-DSP4, NP_071584), an Apis mellifera protein (Apis, XP_396430), Saccharomyces cerevisiae Yvh1p (Yvh1, NP_012292), and Arabidopsis thaliana dual specificity protein phosphatase-related protein (Arabi, NP_5678561).