

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

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 10
三澤 日出巳

3. HtrA2 の基質の分子クローニング 13
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 15
武田 俊一

- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 16

- III. 研究成果の刊行物・別刷り 25

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総合研究報告書

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

神経変性疾患の病因仮説として、異常蛋白質の蓄積による細胞毒性が重要な役割を果たしていることがさまざまな異なる疾患に共通する特徴であることが明らかになりつつあり、その原因としてタンパク質分解系が一次的に傷害されるとの考えが有力になってきた。しかしながら、実際に得られた実験的証拠は乏しい段階にある。本研究課題の目的は異常蛋白質の分解装置として主要な役割を果たす26Sプロテアソームおよび、ミトコンドリアにおいておそらく同様に異常蛋白質の分解処理に関与していることが予測されるセリンプロテアーゼ、HtrA2 がそれぞれ、治療法のない難病としてその克服が大きな医学的、社会的課題となっている筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と線条体黒質変性症 (SND) の原因に関与しているかどうかを検証しようとするものである。

まず 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。我々が樹立した運動ニューロン特異的に Cre リンコンビネースを発現するマウス (VChAT-Cre) を用い、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 マウスを樹立し、VChAT-Cre と掛け合わせることで、floxed Rpt3 マウスの確立するところまで進捗した。一方 VChAT-Cre を用い、ミトコンドリアの MnSOD を運動ニューロン特異的にノックアウトしても運動ニューロン変性は生じないこと、また家族性 ALS のモデルマウスである変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおいて運動ニューロンで変異 SOD1 の発現を低下させることにより、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) に関与するが病勢進行 (progression) における寄与は少ないことを発見した。

次に HtrA2 に関してはその自然発症の機能喪失型変異マウスおよびノックアウトマウスがともに線条体ニューロンが変性する表現型を示すことから、HtrA2 の基質蛋白質が分解されずにミトコンドリアに蓄積することによって変性が生じると考えられる。この考えにもとづき、HtrA2 の基質蛋白質を分子クローニングを用いて探索し、3 種類のミトコンドリア蛋白質 (POLG、MTHFD1L、UQCRCF1) を同定した。POLG は HtrA2 変異マウスで蓄積している可能性が示唆され、オートファジーの活性化も認められた。さらに同じく線条体ニューロンの変性を特徴とする SND を包括する疾患概念である多系統萎縮症 (MSA) において、その病理学的特徴である Glial cytoplasmic inclusion (GCI) およびパーキンソン病 (PD) の特徴的封入体である Lewy 小体が素高頻度に HtrA2 陽性であることが示され、MSA、PD への HtrA2 の関与が示唆された。また HtrA2 の変異動物を作製する試みを行ったが、メダカでは適切な変異動物を得ることができなかったが、ショウジョウバエでは siRNA によるノックダウンに成功し、各種ストレスに抵抗性になることが判明した。

A. 研究目的

ALS は骨格筋を支配する脊髄および脳幹の運動ニューロンが変性脱落するために、通常発症後数年で呼吸筋を含む全身の筋萎縮、運動麻痺を来たして死亡する。線条体黒質変性症 (SND) は線条体および被殻の著明な萎縮とグリオーシスと黒質の変性を中核病変とする変性疾患であり、パーキンソン病候が主症状であるが、レボドopa は無効で、発症後数年で寝たきりになり、自律神経症候のため、突然死することもある。両疾患と

も現在全く有効な治療法はない。患者数は合わせて日本国内に5-6千人と推定されるが、患者の苦しみは並たいていのもではなく、長期闘病における介護者の労力や医療費などの社会的負担は膨大なものになる。さらに、両疾患とも加齢により発症頻度が高まることから、少子高齢化社会において、これらの疾患の病因を解明し、予防、治療法を確立することの厚生行政上の意義はきわめて大きい。また本研究の成果は、異常蛋白質の分解処理機能低下が神経変性疾患に共通する

分子機構であるとの新しいコンセプトを提供し、他の神経変性疾患の解明にも貢献する可能性が高い。本研究は2種類の異常蛋白質の分解に関わると考えられるプロテアーゼ、26SプロテアソームとミトコンドリアのセリンプロテアーゼであるHtrA2の機能低下がそれぞれALSと線条体黒質変性症(SND)の原因になるとの作業仮説を分子、細胞、動物レベルで検証することを目的とする。具体的には運動ニューロンにおけるプロテアソームの活性低下、および異常蛋白質の増加とプロテアソーム活性障害に関与すると考えられる酸化的ストレス、さらにプロテアソームの基質となる変異蛋白質蓄積の関与に関して、26Sプロテアソームサブユニット及びアンチオキシダントを欠損するマウス、およびALSを発症する変異SOD1マウスで運動ニューロン特異的に変異SOD1を欠損するマウスの作製、解析を試みた。またHtrA2はその基質蛋白質を同定し、それがHtrA2欠損動物で蓄積しているかどうか、さらにHtrA2がヒトのSNDで不活化されているかどうか、を検討し、HtrA2モデル動物をメダカおよびショウジョウバエで試みた。

B. 研究方法

研究課題を遂行するため、次の4名からなる研究グループを組織した。主任研究者：高橋良輔（京都大学医学研究科）、分担研究者：三澤日出巳（共立薬科大学）、武田俊一（京都大学医学研究科）、鈴木泰行（国立精神神経センター）である。

それぞれの研究者の分担は下記のとおりである。
高橋良輔：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

三澤日出巳：運動ニューロン特異的ノックアウトシステムを用いたALSミトコンドリア障害の研究

武田俊一：HtrA2ノックアウトメダカ作製の試み
鈴木泰行：HtrA2の基質蛋白質の同定およびHtrA2ノックダウンショウジョウバエの作製と解析

実験手法の概略を下記のとおりである。

1)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：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 VAcHT-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を検討する。2)運動ニューロン特異的ミトコンドリア酵素 MnSOD (SOD2) および変異 SOD1 欠損マウスの作製：VAcHT-Cre マウスと SOD2 floxed マウスを掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損するマウスを作製した。生後1年令までのマウスを組織化学的、行動学的に解析した。また、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。3)HtrA2 の機能解析とその線条体変性症・パーキンソン病病態への関与の解明：HtrA2 の基質候補となるミトコンドリア蛋白質を発現クローニングで同定した。また HtrA2 のノックダウンショウジョウバエを作製し、細胞死刺激への応答、感受性を検討した。また線条体黒質変性症を包含する疾患、多系統萎縮症(MSA)およびパーキンソン病(PD)をそれぞれ特徴づける封入体、すなわち glial cytoplasmic inclusion(GCI)と Lewy 小体に HtrA2 が局在するかどうか免疫組織化学的検討を行った。4)HtrA2

ノックアウトメダカの作製: エチルニトロソウレア (ENU) 処理をして突然変異を高密度で誘発した 5760 個体のメダカの精子を凍結保存した。精巢以外の部分からは、変異スクリーニング用に染色体 DNA を抽出した。5760 個体すべての HtrA2 遺伝子座を PCR 増幅し、さらにシークエンスすることにより、平均 60bp に一つの確率で生じるはずの突然変異を探索した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「京都大学における動物実験の実施に関する規程」および「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程 (平成 19 年 3 月 22 日教授会承認)」にしたがって行い、動物愛護上の配慮に関しては「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)」に従って行った。

C. 研究成果

1) 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: 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。Neo cassette 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 によりこれらを除去したところ、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。

2) 運動ニューロン特異的ミトコンドリア SOD2 ノックアウトマウスおよび、SOD1 変異 ALS モデルマウスにおける運動ニューロン特異的変異 SOD1 欠損マウスの作製と解析: SOD2 の Conditional KO マウスでは出生時から生後 1 年までの間に顕著な異常 (運動失調や麻痺) は観察されなかったが、酸化的ストレスを負荷したとこ

ろ、運動ニューロンのミトコンドリアでの活性酸素ラジカルの顕著な産生増大が観察された。一方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、発症時期は遅延したが、病勢進行については、初期および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。

3) HtrA2 の基質蛋白質の同定、HtrA2 の変性疾患における免疫組織化学的研究および HtrA2 ノックダウンショウジョウバエの作製と解析: HtrA2 の基質候補となりうるミトコンドリア蛋白質として POLG、MTHFD1L、UQCRC1 を同定した。HtrA2 の自然発症機能喪失マウスではウエスタンブロットによる検定で POLG の蓄積傾向が認められた。またオートファジーマーカーである LC3-II の絶対量は HtrA2 機能喪失マウスにおいて遺伝子型ヘテロで 80%、ホモで 60%増加していた。ショウジョウバエの HtrA2 orthologue である DmHtrA2 はアポトーシス刺激でミトコンドリアから放出され、DIAP1 を分解した。またノックダウンすると各種ストレスに抵抗性になった。また、HtrA2 の病理学的検討では、脳幹型及び皮質型 Lewy 小体 (67.5%、53.9%) と関連する Pale body、さらに GCI (77.1%) が HtrA2 に強陽性であった。

4) HtrA2 ノックアウトメダカ作製の試み: 合計 33 個の ENU 由来の変異を同定した。内訳は、ミスセンス変異が 22 個、サイレントな変異 6 個、イントロンにおける変異が 5 個であり、残念ながらナンセンス変異体が得られなかった

D. 考察

運動ニューロン特異的 26S プロテアソームノックアウトが作製できる準備が完了した。

運動ニューロンはミトコンドリア由来の活性酸素障害には高い抵抗性を有することが明らかとなった。また運動ニューロン特異的

LoxSOD1-G37R マウスの実験では、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。HtrA2 に関しては、ショウジョウバエの研究からはむしろ細胞死促進的に働く可能性もあることが示唆された。これは哺乳動物では細胞死刺激に応じて、ミトコンドリアから放出され、細胞死を促進する方向に働くという主任研究者らのかつての発見 (Suzuki Y, et al. *Mol. Cell* 8, 613-21, 2001) に合致する結果であり、HtrA2 のその面での機能はヒトとショウジョウバエでよく保存されていると考えられた。ただし神経変性を起こす面に関してはショウジョウバエでは明確にはできなかった。よりマウスに近いモデルであるメダカで精力的な探索にもかかわらず変異体が得られなかったのは残念である。いっぽう HtrA2 機能喪失マウスで我々が見出した POLG が増加傾向にあったので、今後これを多数個体で確認する。オートファジーの活性化傾向がみられたのは変性ミトコンドリアの処理過程が促進していることを示唆すると考えた。

3 年間で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準備完了の段階であり、実験の過程に大きな失敗はなかったものの、進捗の遅れが反省される。しかし運動ニューロンにおける SOD2 の意義、変異 SOD1 蓄積の意義に関しては明らかにし、論文発表も行った。HtrA2 に関しても基質蛋白質の候補は見つかったが、その意義の解明はこれからである。ショウジョウバエのモデル作製はでき、論文発表も行ったが、メダカのモデルづくりには失敗した。HtrA2 の GCI への局在を始めてあきらかにすることができ、論文投稿中である。

全体的には当初の計画より進捗が遅れ、論文発表も不十分であったことが反省される。しかしその

一方で着実に目標に向かって進捗しており、当初の目標は論文発表を到達点と考えると 2-3 年以内に到達できると思われる。最終的には疾患の病態解明および厚生行政に大きな貢献ができるものと考えている。

E. 結論

- 1) 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作製の準備が完了した。
- 2) 運動ニューロンがミトコンドリア由来の活性酸素障害には高い抵抗性を有することが明らかになった。
- 3) 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。
- 4) HtrA2 のミトコンドリアの基質を 3 種類同定した。
- 5) HtrA2 のノックダウンショウジョウバエは細胞死刺激に対して抵抗性を示す。
- 6) HtrA2 は GCI および Lewy 小体に高い確率で局在する。

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

Kim, Y.J., Nakatomi, R., Akagi, T., Hashikawa, T., Takahashi, R. (2005) Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants. *J. Biol. Chem.*, 280, 21515-21.

Sekine, K., Hao, Y., Suzuki, Y., Takahashi, R., Tsuruo, T., Naito, M. (2005) HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 279-285

Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B. (2005) Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and PI3K/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13670-13675

Sahara, N., Murayama, M., Mizoroki, T., Urushitani M., Imai, Y., Takahashi, R., Murata, S., Tanaka, K., Takashima, A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J. Neurochem.*, 94, 1254-1263

Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., Julien, J.-P. (2006) Chromogranin-mediated Secretion of Superoxide Dismutase Mutants as a Novel Pathogenic Pathway for ALS. *Nature Neurosci.*, 9:108-18.

Rezgaoui, M., Susens, U., Ignatov, A., Gelderblom, M., Glassmeier, G., Franke, I., Urny, J., Imai, Y., Takahashi, R., Schaller, H.C. (2006) The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. *J. Cell Sci.* 119, 542-9.

Kitajima, K., Takahashi, R., Yokota, Y. (2006) Localization of Id2 mRNA in the adult mouse brain. *Brain Res.* 1073-1074:93-102.

Misawa, H., Nakata, K., Matuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T. and Takahashi, R. (2006) Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiol. Dis.*, 23,169-77.

Mitsueda-Ono, T., Ikeda, A., Noguchi, E., Takaya, S., Fukuyama, H., Shimohama, S., Takahashi, R. (2006) Epileptic polyopia with right temporal lobe epilepsy as studied by FDG-PET and MRI: A case report. *J. Neurol. Sci.*, 247, 109-111.

Hitomi, T., Ikeda, A., Matsumoto, R., Kinoshita, M., Taki, J., Usui, K., Mikuni N., Nagamine, T., Hashimoto, N., Shibasaki, H., Takahashi, R. (2006) Generators and temporal succession of giant somatosensory evoked potentials in cortical reflex myoclonus: Epicortical recording from sensorimotor cortex *Clin. Neurophysiol.* 117:1481-6

Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, M., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, K., Nomura, Y. (2006) Ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin., *J. Neurochem.*, 99:1456-69.

Arai, R., Yoshikawa, S., Murayama, K., Imai, Y., Takahashi, R., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2006) Structure of human ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2 (UBE2G2/UBC7). *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 62:330-4.

Kitao, Y., Imai, Y., Ozawa, K., Kataoka, A., Ikeda, T., Soda, M., Namekawa, K., Kiyama, H., Stern,

D.M., Hori O, Wakamatsu K, Ito S, Itoharu S, Takahashi, R., Ogawa, S. (2007) Pael Receptor Induces Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra via Endoplasmic Reticulum Stress and Dopamine Toxicity, which is Enhanced under Condition of Parkin Inactivation. *Hum. Mol. Genet.*, 16:50-60.

Shirakashi, Y., Kawamoto, Y., Tomimoto, H., Takahashi, R., Ihara, M. (2006) alpha-Synuclein is colocalized with 14-3-3 and synphilin-1 in A53T transgenic mice. *Acta Neuropathol (Berl)*. 112:681-9.

Nakaji, K., Ihara, M., Takahashi, C., Itoharu, S., Noda, M., Takahashi, R., Tomimoto, H. (2006) Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke* 37:2816-23.

Kinoshita, M., Ikeda, A., Taki, J., Usui, K., Mikuni, N., Takahashi, J.B., Matsumoto, R., Fukuyama, H., Hashimoto, N., Takahashi, R. (2006) Heterogeneous epileptogenicity and cortical function within malformations of cortical development: A case report. *J. Neurol. Sci.* 251:129-33.

Kuzuya, A., Uemura, K., Kitagawa, N., Aoyagi, N., Kihara, T., Ninomiya, H., Ishiura, S., Takahashi, R., Shimohama, S. (2007) Presenilin 1 is involved in the maturation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J. Neurosci. Res.* 85:153-65.

Ohtani, R., Tomimoto, H., Wakita, H., Kitaguchi, H., Nakaji, K., Takahashi, R. (2007) Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 1135:195-200.

Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Shirakashi, Y., Honjo, Y., Tomimoto, H., Takahashi, R., Budka, H. (2007) Accumulation of Hsc70 and Hsp70 in glial cytoplasmic inclusions in patients with multiple system atrophy. *Brain Res.* 1136:219-27.

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.

Murakami, T., Moriwaki, Y., Kawarabayashi, T., Nagai, M., Ohta, Y., Deguchi, K., Kurata, T.; Takehisa, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Harigaya, Y., Shoji, M., Takahashi, R., Abe, K. (2007) PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:653-4.

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.

Yamashita, H., Kawamata, J., Okawa, K., Kanki, R., Nakamizo, T., Hatayama, T., Yamanaka, K., Takahashi, R., Shimohama, S. (2007) Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase; clues to a possible strategy for treating ALS. *J. Neurochem.* 102(5):1497-505

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 α -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)

Kim, Y.J., Takahashi, R. (2006) Role of polyunsaturated fatty acids for misfolding protein aggregations: implication for neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1086: 11-20.

Suzuki, Y., Takahashi, R. (2006) A mitochondrial serine protease regulating cellular life and death, In *Apoptosis and cancer therapy*, eds. Debatin, K.-M. and Fulda, S. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp222-232.

Takahashi, R. (2006) The pathological role of Pael-receptor/GPR37 in AR-JP. *Parkinsonism Relat Disord.*, 12, S110-S113.

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)

Takahashi, R. : Modulators of mutant SOD1 aggregate formation. Foundation Andre Delambre Symposium at Motreal Neurological Institute "Amyotrophic Lateral Sclerosis: Causes and Therapeutic Perspectives", Montreal, Canada (2005. 9. 9)

Takahashi, R. : Promoters of mutant SOD1 aggregate formation, The 21st Century COE Program 3rd International Symposium, Nagoya (2005.12.1)

Takahashi, R. : The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, The 3rd Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Tokyo (2005.12.6)

Takahashi, R. : The molecular mechanisms of familial parkinsonism, Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program Korea-Japan Joint Seminar "Molecular and systemic basis of neurological disorders", Okazaki (2006. 2. 9)

Takahashi, R. : The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, World Parkinson Congress, Washington, D.C., U.S.A. (2006.2.24)

Takahashi, R. : The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, First Japanese German Workshop Research in Neurodegenerative diseases, Tuebingen, Germany (2006. 3. 24)

Takahashi, R. : "Proteasome inhibition" Workshop

“controversies in the pathogenesis of PD”, 10th
International Congress of Parkinson’s Disease and
Movement Disorders, Kyoto (2006.10.30)

Takahashi, R., Tateno, M., Araki, T. : SOD1
aggregates generated within motoneuronal
dendrites/cell bodies move into axons before disease
onset in a G93ASOD1 transgenic mouse model, 17th
International Symposium on ALS/MND, Yokohama
(2006.12.2),

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: 家族性パーキンソン病の分子メカニズ
ム。平野朝雄教授神経病理セミナー、大阪
(2005. 4. 30)

高橋良輔: 家族性PDは孤発性PDの理解をどこまで
深めたか。第46回日本神経学会総会ランチョンセ
ミナー、鹿児島 (2005. 5. 25)

高橋良輔: ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解
系と神経疾患治療戦略。 第23回日本神経治
療学会総会教育講演、鳥羽 (2005. 6. 10)

高橋良輔: パーキンソン病における神経変性の分
子機構。第120回つくばブレインサイエンスセ
ミナー、筑波 (2005. 6. 21)

高橋良輔: 遺伝子から見たパーキンソン病の分子
メカニズム。平成17年 度関西医科大学
大学院企画セミナー (2005. 9. 2)

高橋良輔: パーキンソン病の分子生物学。第13
回脳の世紀シンポジウム、東京 (2005. 9. 21)

高橋良輔: ドーパミンニューロンの機能発現と病
態におけるPael受容体/GPR37の役割。生理学研
究所研究会「細胞死の新たな生理機能と病態にお
ける意義、岡崎 (2005. 10. 18)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病発症の分子機構。
大阪大学蛋白質研究所セミナー「脳神経疾患研
究の最前線」(2005. 11. 25)

高橋良輔: ミスフォールド化パエル受容体とパー
キンソン病。第28回日本分子生物学会、福岡
(2005. 12. 9)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病の分子機構。滋
賀医科大学特別講義 (2006. 1. 4.)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病研究の最近の進
歩。21世紀COEプログラム・平成17年度コロキウ
ム、京都大学 (2006. 1. 21)

高橋良輔: 蛋白質品質管理病としてのパーキンソ
ン病。第79回日本薬理学会年会ランチョンセミナ
ー、横浜 (2006. 3. 9)
neurons. FASEB Summer research conferences - Fro

高橋良輔: パーキンソン病の分子生物学。平野朝
雄神経病理セミナー、大阪 (2006. 5. 20)

高橋良輔・脳神経疾患の標的蛋白質。分子脳科
学・タンパク3000 (脳・神経系) 合同セミナー、
大阪 (2006. 5. 27)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病研究の最近の進
歩。シンポジウム「21世紀の脳科学」第33回日本
脳科学会、旭川 (2006. 6. 3)

高橋良輔: イントロダクション。シンポジウム「パ
ーキンソン病研究の最前線: システムから分子ま
で」第29回日本神経科学大会、京都 (2006. 7. 19)

高橋良輔: 孤発性ALS —glutamate受容体と神経
細胞死—。ワークショップ ALSの克服に向けて
(「筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に
関する研究」班、平成18年度)、東京(2006. 7. 28)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病におけるパエル
受容体の役割。日本分子生物学会2006フォーラム、
名古屋 (2006. 12. 6)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病と小胞体ストレ
ス。第112回解剖学会全国学術大会シンポジウム、
大阪 (2007. 3. 28)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病と小胞体ストレ
ス。第127回日本薬学会、富山 (2007. 3. 30)

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。京都大学パーキンソン病研究会、京都（2005. 4. 9）
- 高橋良輔：神経変性疾患の分子メカニズム。第2回南大阪PDフォーラム、大阪（2005. 5. 13）
- 高橋良輔：神経変性疾患の分子メカニズム。第42回北陸神経懇話会、金沢（2005. 6. 25）
- 高橋良輔：家族性パーキンソン病研究の最新の進歩。第6回東海パーキンソン病治療・症例検討会、名古屋（2005. 10. 7）
- 高橋良輔：蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。神経疾患セミナー、大阪（2005. 10. 14）
- 高橋良輔：ミスフォールド蛋白質とパーキンソン病。第10回東海パーキンソン病研究会、名古屋（2005. 10. 21）
- 高橋良輔：神経変性疾患の分子生物学。第10回パーキンソン病フォーラム、京都（2005. 10. 29）
- 高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子機構。第10回東北パーキンソン病治療研究会、仙台（2005. 11. 5）
- 高橋良輔：パーキンソン病の分子生物学。姫路神経カンファレンス、姫路（2005. 11. 19）
- 高橋良輔：パーキンソン病の分子病態。第5回倉敷神経内科セミナー、倉敷（2006. 1. 19）
- 高橋良輔：蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。中四国セレグリン研究会、米子（2006. 2. 11）
- 高橋良輔：蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。第7回兵庫パーキンソン病治療研究会、神戸（2006. 2. 18）
- 高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子機構。静岡パーキンソン病研究会、静岡（2006. 3. 3）
- 高橋良輔：遺伝子から探るパーキンソン病の分子機構。第19回愛媛神経内科懇話会、松山（2006. 3. 8）
- 高橋良輔：家族性パーキンソン病研究の最近の進歩。滋賀神経疾患研究会、大津（2006. 3. 11）
- 高橋良輔：蛋白質品質管理病としてのパーキンソン病。第7回千葉神経難病研究会、千葉（2006. 4. 6）
- 高橋良輔：家族性パーキンソン病研究の分子機構。長崎北神経懇話会特別講演会、佐世保（2006. 4. 10）
- 高橋良輔：パーキンソン病の黒質変性メカニズム -パエル受容体を中心に-。第14回カテコールアミンと神経疾患研究会、東京（2006. 4. 22）
- 高橋良輔：遺伝子から探るパーキンソン病の分子病態。第16回近畿老年期痴呆研究会、大阪（2006. 7. 8）
- 高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子機構。第10回宮崎Neuroscience研究会、宮崎（2006. 8. 4）
- 高橋良輔：パーキンソン病の分子生物学。第7回長井長義記念シンポジウム、徳島（2006. 9. 6）
- 高橋良輔：パーキンソン病診療における諸問題。秋田県パーキンソン病講演会、秋田（2006. 11. 17）
- 高橋良輔：遺伝子から探るパーキンソン病の発症機構。第8回神奈川セレグリン研究会、神奈川（2007. 3. 7）
- 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

G. 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

分担研究者：三澤 日出巳 共立薬科大学・薬理学講座 教授

研究要旨 分担研究者が樹立した運動ニューロン特異的ノックアウトシステムの有用性を検定し、本研究の課題であるプロテアソームノックアウトマウスへ応用するために、ALS の病態に関与することが報告されている活性酸素を生後の運動ニューロンのミトコンドリアのみで過剰産生させるモデルマウスを作製し、その病態解析をおこなった。また、変異 SOD1 を過剰発現させる従来の ALS モデルマウスとは異なり、生後の運動ニューロン特異的に変異 SOD1 の発現消去を誘導できる新たな ALS モデルマウスを作製した。どちらの場合にも、運動ニューロンに極めて限局した遺伝子改変が誘導され、本システムの有用性が実証された。

三澤日出巳・共立薬科大学 薬理学講座
教授

A. 研究目的

ミトコンドリアの機能障害や形態異常は ALS を含む多くの神経変性疾患で指摘されてきたが、近年の研究の進展により「神経変性に至る共通経路」の1つとして注目を集めている。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 (VChT-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 VChT-Cre マウスとミトコンドリアの活性酸素の除去機構として重要な MnSOD (SOD2) floxed マウス (都老人研、白澤博士より提供) を掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損するマウスの作製を試みた。ミトコンドリアで呼吸鎖 (酸化的リン酸化) により消費される酸素の 1~2% が活性酸素ラジカルになると計算されている。この活性酸素は同じくミトコンドリアに存在する MnSOD により効率的に消去され、酸化ストレス障害から細胞

を守っていると考えられている。以前から、ALS を含む様々な神経変性疾患や老化過程での MnSOD の動態 (および活性酸素の処理の異常) に注目が集まっているが、MnSOD を全身で欠失するマウスは胎生期または出生直後に拡張性心筋症にて死亡するため、成体における働きは解析できなかった。生後の運動ニューロンの約半分で遺伝子の組み換えを誘導する VChT-Cre マウスとの掛け合わせは、成熟した運動ニューロンにおけるミトコンドリア由来の活性酸素の影響を解析する理想的なモデルと考えられる。

また、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一部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

様式 I

作用に依存すること (non-cell-autonomous) が示唆されているが、その詳細は明らかとなっていない。そこで、VChT-Cre マウスと細胞特異的に変異 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 (VChT-Cre マウス) と SOD2 floxed マウスを掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損するマウスを作製した。生後 1 年令までのマウスを組織化学的、行動学的に解析した。また、生後の運動ニューロン特異的に Cre を発現するマウス (VChT-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

[運動ニューロン特異的 MnSOD (SOD2) ノックアウトマウス]

出生マウスの遺伝子型の解析では、予想される数の Conditional KO マウスが得られた。これらの Conditional KO マウスでは出生時から生後 1 年までの間に顕著な異常 (運動失調や麻痺) は観察されない。生体内の活性酸素ラジカルを特異的に検出する hydroethidine を静注したところ、運動ニューロンのミトコンドリアでの活性酸素ラジカルの顕著な産生増大が観察された。しかし、各

種抗体による組織化学的解析では細胞レベルでのいかなる神経変性の兆候も観察されなかった。

[運動ニューロン特異的 LoxSOD1-G37R マウス]

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

[運動ニューロン特異的 MnSOD (SOD2) ノックアウトマウス]

ALS 剖検例の病理組織学的な解析から、ALS の病態形成に活性酸素障害が関与するとの報告が散見されるが、今回の実験からは、少なくとも、運動ニューロンはミトコンドリア由来の活性酸素障害には高い抵抗性を有することが明らかとなった。

[運動ニューロン特異的 LoxSOD1-G37R マウス]

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。ALS の大部分を占める弧発性 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。このため、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。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

従来、VACHT-Cre マウスにおける Cre 発現の特異性はレポーターマウスとの掛け合わせにより詳細な解析が行われてきたが、SOD2 floxed マウスおよび LoxSOD1-G37R マウスとの掛け合わせ実験の結果、Cre 発現の運動ニューロンへの高い特異性が確かめられた。さらに、本システムを用いることで従来の定説を覆す新たな知見が得られた。

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., Takahashi, R., Misawa, H. 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)

Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T. and Takahashi, R. Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiol. Dis.*, 23, 169-177 (2006)

Olsen, O., Moore, K.A., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Kauer, F.W., Streuli, M., Misawa, H., Burlingame, A.L., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S. Neurotransmitter release regulated by a MALS-liprin-alpha presynaptic complex. *J. Cell Biol.*, 170, 1127-1134 (2005)

2. 学会発表

国際学会発表

Misawa H, Moriwaki Y, Kawashima K, Shimizu T, Shirasawa T, Takahashi R. Conditional knockout of SOD2 in postnatal motor neurons reveals in-vivo resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama (2006.12.1)

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

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 基質タンパク質のスクリーニング

in vitro translation 可能なプラスミドの遺伝子発現ライブラリーを用い、HtrA2 で分解されるクローンをスクリーニングすることによって HtrA2 の基質を同定した。独立したクローンを 100 クローンずつ含むプールを in vitro translation したものを組換え型 HtrA2 タンパク質存在下および非存在下でインキュベートし、分解・切断されるクローンを含むプールから基質タンパク質を発現するプラスミドを選別し、塩基配列を決定した。

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

約 4 万クローンをスクリーニングし、約 20

種類の HtrA2 基質候補タンパク質を同定した。その中には 2 種類のミトコンドリアタンパク質が含まれていた。また、細胞質タンパク質ではあるが、別の遺伝子産物としてミトコンドリア局在性の相同タンパク質をもつものが含まれていた。

これら 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

Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Amano, T., Aoki, S., Wada, K. and Noda, M.

Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. J. Cell. Physiol. (2006) 209, 172-182

Kabuta, T., Suzuki, Y., Wada K.
Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. J. Biol. Chem. (2006) 281, 30524-30533

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

2. 学会発表

株田智弘、鈴木泰行、和田圭司
Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy

日本分子生物学会 2006 フォーラム『分子生物学の未来』 愛知 2006年12月8日

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）
総合研究報告書

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

C.研究結果

我々が作製できた完全遺伝子破壊メダカは、Parkin、Pink1、ATP13A2 の各遺伝子である。Parkin 欠損メダカのみが、表現型解析に必要な数の個体を得られた。そして明確な神経症状を未だ見つけることができていない。

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、Atg10、HtrA2/omi の完全遺伝子破壊は作製できず。ミスセンス変異の個体しか取れなかった。

E.結論

家族性パーキンソン病の原因遺伝子、3種類について遺伝子破壊メダカを作製できた。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。

F.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.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

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 |
|----------------------|--|---|------------------------------------|----------------------------|---------|------|---------|
| 高橋良輔 王 華芹 小林芳人 | プログラム細胞死と 神経変性疾患 | 辻本賀英 | 細胞死・アポ トーシス集中 マスター | 羊土社 | 日本 | 2006 | 100-110 |
| Takahashi, R. | The molecular pathway to neurodegeneration in parkin-related parkinsonism. | Mayer, R.J., Ciechano ver, 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 |
|---|---|---------------------------------------|---------|-------------|------|
| Kim, Y.-J., Nakatomi, R., Akagi, T., Hashikawa, T., Takahashi, R. | Unsaturated fatty acids induce Cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked Superoxide dismutase 1 mutants. | Journal of Biological Chemistry | 280(22) | 21515-21521 | 2005 |
| Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B. | Inactivation of Drosophi DJ-1 leads to impairments of oxidative stress respons e and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. | Proc Natl Acad Sci U S A. | 102(38) | 13670-13675 | 2005 |
| 金 然正 高橋良輔 | コンフォメーション病の しくみ | BIO Clinica | 20(7) | 80-84 | 2005 |
| 高橋良輔 | パーキンソン病の分子生 物学 | 脳神経外科速 報 | 15(5) | 445-452 | 2005 |
| 高橋良輔 | ユビキチンプロテアソーム 蛋白質分解系と神経変 性疾患治療戦略 | 神経治療学 | 22(6) | 697-702 | 2005 |
| Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., Julien, J.P. | Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. | Nat Neurosci | 9(1) | 108-118 | 2006 |
| Rezgaoui, M., Susens, U., Ignatov, A., Gelderblom, M., Glassmeier, G., Franke, I., | The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. | J Cell Sci | 119(3) | 542-549 | 2006 |

| | | | | | |
|---|---|---|-----------|----------|------|
| Urny, J., Imai, Y., Takahashi, R., Schaller, H.C. | | | | | |
| 高橋良輔 | アポトーシス研究の現状 と今後の展望 | 呼吸と循環 | 54(1) | 7-11 | 2006 |
| 高橋良輔 館野美成子 | AMPA 受容体と変異 SOD1 タンパク質異常 | CLINICAL NEURO SCIENCE | 24(2) | 226-229 | 2006 |
| Kitajima, K., Takahashi, R., Yokota, Y. | Localization of Id2 mRNA in the adult mouse brain. | Brain Res | 1073-1074 | 93-102 | 2006 |
| Mitsueda-Ono, T., Ikeda, A., Noguchi, E., Takaya, S., Fukuyama, H., Shimohama, S., Takahashi, R. | Epileptic polyopia with right temporal lobe epilepsy studied by FDG-PET and MRI: A case report. | J Neurol Sci | 247(1) | 109-11. | 2006 |
| Hitomi, T., Ikeda, A., Matsumoto, R., Kinoshita, M., Taki, J., Usui, K., Mikuni N., Nagamine, T., Hashimoto, N., Shibasaki H. Takahashi, R. | Generators and temporal succession of giant somatosensory evoked potentials in cortical reflex myoclonus: Epicortical recording from sensorimotor cortex. | Clin Neurophysiol | 117(7) | 1481-6 | 2006 |
| Arai, R., Yoshikawa, S., Murayama, K., Imai, Y., Takahashi, R., Shirouzu, M., Yokoyama, S. | Structure of human ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2 (UBE2G2/UBC7). | Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun | 62(4) | 330-4. | 2006 |
| Shirakashi, Y., Kawamoto, Y., Tomimoto, H., Takahashi, R., Ihara, M. | alpha-Synuclein is colocalized with 14-3-3 and synphilin-1 in A53T transgenic mice. | Acta Neuropathol (Berl) | 112(6) | 681-9. | 2006 |
| Nakaji, K., Ihara, M., Takahashi, C., Itohara, S., Noda, M., Takahashi, R., Tomimoto, H. | Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. | Stroke | 37(11) | 2816-23. | 2006 |
| Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, M., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, K. Nomura, Y. | ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin. | J Neurochem. | 99(6) | 1456-69 | 2006 |